

글루타민산 발효에 관한 연구

제 1 보 초산으로 부터 L-Glutamic Acid 생성

鄭東孝* · 朴性五** · 金鍾植*

*건국대학교 축산대학. **서울여자대학 식품가공학과

(1972년 3월 31일 수리)

Studies on the Fermentative Production of L-Glutamic Acid

Part 1. Formation of L-Glutamic Acid from Acetic Acid

by

Dong Hyo Chung*, Sung Oh Park** and Jong Sik Kim*

*College of Animal Husbandry, Kon Kuk University and

**Department of Food Processing and Technology, Seoul Woman's College

(Received March 31, 1972)

Abstract

In the course of investigation on L-glutamic acid production, acetate assimilating bacteria were isolated from natural sources. Among them, the strain No. 1214 was selected and characterized as a strain related to the genus *Brevibacterium* according to the standard method of taxonomy. This strain could grow in the acetate medium and accumulated a considerable amount of L-glutamic acid (22 g/L).

서 론

옛날에는 L-glutamic acid를 식물성 단백질을 가수분해하여 제조하였으나 木下⁽¹⁻³⁾ 등은 하수, 토양, 동물분뇨에서 분리된 효모, 곰팡이, 방사선균, 세균 등의 미생물이 당류나 무기질소원을 함유한 배지에 배양시킨 경우 상당량의 L-glutamic acid가 축적되는 것을 발견하였고, 거의 때를 같이 하여 朝井⁽⁴⁾, 蘇⁽⁵⁾ 등, 陣⁽⁶⁾ 등도 같은 균주들을 발견하였다.

이 들의 연구도 1958 년 부터 발효법이 성공되어 다른 제조법보다 이 방법으로 L-glutamic acid가 생산되고 있다.⁽⁷⁾ 현재 공업적으로 사용되는 균주들은 *Micrococcus glutamicus*^(8,9) (후에 *Corynebacterium glutamicum*으로 개칭) *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*⁽¹⁰⁾, *Microbacterium ammoniphilum*⁽¹¹⁾, *Brevibacterium divaricatum*⁽¹²⁾, *Brevibacterium*

thiogenitalis⁽¹³⁾ 등이지만 이와같은 균주의 공통성으로서 ① 호기적으로 L-glutamic acid를 축적, ② Gram 양성균, ③ 포자를 형성치 않으며 ④ 운동성은 없고 ⑤ 보통 구형, 타원형 내지 단간상이고 ⑥ biotin을 요구한다.

발효법에 의한 L-glutamic acid는 당류, 질소원, 무기염류 corn steep liquor 등이 함유된 배지에, 전기의 균주를 접종하고 배양 도중 질소원을 feeding 하므로써 pH를 7.5~8.0으로 조절하고, 호기적인 조건을 유지시킬 때 상당량 축적된다. 그러나 biotin의 농도, 호기도, 암모니아 첨가 등은 발효생산물의 pattern을 현저히 변화시키는 바 biotin의 농도가 suboptimal일 것이 요구되며, biotin과잉의 경우나, 호기도가 낮은 경우는 젖산만 축적된다. 한편 암모니아 대신에 NaOH 로 pH를 조절시키면 L-glutamic acid 대신에 α -ketoglutaric acid가 축적되므로 L-glutamic acid 발효를 공업화 시키는 것은 어려운 일이다.

* 現 中央大學校 農科大學 農産製造學科

현재 L-glutamic acid 발효의 주원료로서는 전분가루 분해액 혹은 사탕무우, 사탕수수, 당밀 등이 사용되고 있지만 당밀의 수요는 불안정하며 또한 이들 탄소원이 가장 많이 소비되기 때문에 보다 값싼 경제적인 원료로써 L-glutamic acid를 발효시키기 위하여 수요가 안정되고 경제적인 석유, (14-17) 혹은 석유화학의 제2차 제품과 합성 초산 (18-19)이 중요시 되고 있다.

여기에서는 합성초산염을 탄소원으로 한 L-glutamic acid 발효를 시도하기 위하여 우선 자연계에서 균을 분리하고 균의 특성을 조사하고 그 결과 일부를 보고한다.

실험 방법

1. 균의 분리

분리원으로써 하수, 토양, 동물분뇨 등을 사용하여 다음의 분리용 배지(acetate urea bouillon, Table 1)로 상법에 따라 평면배양을 하였다.

Table 1. Composition of screening and seed medium

Beef extract	1.0%
Polypeptone	0.5
NaCl	0.5
Glucose	0.5
Sodium acetate	0.5
Urea	0.5
Agar	1.5
pH	7.4

28~30°C에서 48시간 배양한 후 생성된 colony를 같은 조성의 사면배지에 이식하고 Table 2의 액체배지 5 ml를 추가한 시험관에 접종하고 28°C에서 진탕배양을 하였다.

경시적으로 배양액을 취하여 paper chromatography 법으로 L-glutamic acid의 생성 유무를 조사하였다.

Table 2. Composition of main medium

Ammonium acetate (as acetic acid)	15.0 g
Sodium acetate (as acetic acid)	30.0
Corn steep liquor	2.0
KH ₂ PO ₄	2.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.8
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2 ppm
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2 ppm
Thiamine HCl	100 r
Biotin	0.5 r

Phenol red	10 mg
Tap water	1000 l
pH	7.6

이 배지에서 L-glutamic acid 생성능이 15 g/l 이상인 균주는 5균주, 20 g/l 이상의 균주는 1균주 (No.1214)였으므로 이것만을 동정하고 배양을 시도하였다.

2. 균의 동정

균은 형태적, 생리적 및 배양적 특성으로 동정하였다.

3. 배지와 배양조건

Seed용 전배양배지는 Table 1의 배지 50 ml를 500 ml 들이 진탕플라스크에 분주하고 0.75 kg/cm², 20 분간 고압증기 살균하여 접종하고 30°C에서 1주야 진탕 (진폭 7 cm, 120 rpm) 하여 seed로 하였다.

한편 Table 2의 배지 50 ml를 500 ml들이 진탕플라스크에 추가하고 역시 같은 방법으로 살균하여 전기의 seed를 5%정도 접종하고 진탕배양하였다. 배양 개시후 pH가 저하되어 phenol red가 붉은 색에서 오렌지 색으로 변할 때마다 5% acetic acid를 feeding 하면서 배양을 계속하였다.

4. L-Glutamic acid 정량

L-Glutamic acid는 일정량의 배양액을 9,000 rpm에서 원심분리하여 그 상등액을 10배로 희석하여 paper chromatography로 정량하였다. (20-21)

5. α-Ketoglutaric acid 정량

α-Ketoglutaric acid는 2,4-dinitrophenyl hydrazine-HCl로 hydrazone시켜 Friedman 과 Haugen 방법에 따라 정량하였다.

6. Acetic acid 정량

Acetic acid는 수증증류법에 따라 정량하였다.

7. Diaminopimelic acid (DAP) 정량

Glucose bouillon 배지에 균을 접종하여 24~28 시간 배양한 후 원심시켜 증류수로 몇 차례 수세하고 아세톤 처리로 건조하였다. 얻은 균체를 6N HCl로 10시간 (100°C) 가수분해시킨 후 소량의 물을 가하여 감압으로 염산을 완전히 제거하고 humin 질은 원심하여 그 상등액을 Rhauland 법 (22)에 따라 paper chromatography 법으로 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 균의 형태적, 생리적 특성

분리 균주 No. 1214의 형태적, 생리적, 및 배양적 특성은 Table 3과 같다.

Table 3. Descriptive chart of isolated strain

- I. Morphological;
Cell are straight rods with rounded ends, snapping division and unbranched. Gram positive. Non-motile, no flagella and non-spore forming.
- II. Cultural ;
1. Nutrient agar colony ; Circular, smooth, entire convex and milky white to yellow.
 2. Nutrient agar slant ; Moderate growth filiform glistening and milky white to yellow.
 3. Nutrient broth ; Moderate turbid, and pellible is sometimes seen, visid yellow sediment, no odor.
 4. Nutrient agar stab ; Growth was best at top.
 5. Gelatin stab ; Growth occurred at top scantily. Line of puncture is villous, no liquefaction.
- III. Physiological ;
1. B.C.P. milk ; Slightly acid production, soft coagulation was formed. Coagulation by Lab enzyme was negative.
 2. Nitrite ; Produced from nitrate.
 3. Indole ; Not formed.
 4. Acetyl methyl carbiol ; Not formed.
 5. Hydrogen sulfide ; Produced.
 6. Methyl red test ; Negative.
 7. Starch ; Not liquefied.
 8. Catalase ; Positive.
 9. Urease ; Present.
 10. No acid fast ; No acid fast.
 11. Cellulose ; No decomposition.
 12. Relation to free oxygen ; Aerobic.
 13. Requirement ; Biotin, thiamine
 14. Diaminopimelic acid ; Present.
 15. Acid production

Sucrose	+	+
Maltose	+	+
Trehalose	+	+
Mannitol	-	-
Salicine	+	-
Xylose	-	-
Galactose	-	-
Lactose	-	-
Raffinose	-	-
Cellobiose	-	-
Melibiose	-	-
Dextrin	-	-
Glycerol	-	-

note ; + : Acid production. - : Acid no production.

이상 No.1214는 Gram양성균, 두포자. 비운동성, biotin, thiamine의 요구도, 타원 내지 단간균으로 호기적 상태에서 L-glutamic acid를 생산하는 것 등은 L-glutamic acid 생성균의 공통성질과 아주 유사하였다. (24,25)

특히 diaminopimelic acid (DAP)는 미생물체에 특이적으로 존재하여 (26,27) 세균에서는 Gram양성 구균에는 존재하지 않는다고 한다. 고도 세포벽조성이 분류학적 위치와 밀접한 관계를 갖는다는 보고도 허다하다. (28-30) 그런데 DAP는 일반 Micrococcus속에는 없는데 반하여 분리 균주 No.1214에는 상당량이 존재하고 있는 것으로 보아 Corynebacterium 속이나 Brevibacterium속일 것 같다. (9)

그러나 Brevibacterium는 Bergey's 제 7 에 (31) 처음으로 수록된 genus이나 Corynebacterium속 및 다른 근연속과의 구별이 명확치 않으며 현재 Brevibacterium속이라 정해진 것도 그 성질이 다른 것이 많아 genus까지 정하는 것도 이 genus에서는 더욱 곤란하다. 그러나 표준 균주와 균학적 여러 성질 등이 같은 점으로 보아 Brevibacterium flavum에 유사 균주로 생각된다.

2. 초산염을 기질로 할 때 L-Gutamic acid 발효 경과

실험 방법에서 기술한 바와 같이 진탕양했을 때 발효 경과는 Fig. 1과 같다. 본 발효에서 L-glutamic acid는 20시간 후 부터 100시간 까지 급진적으로 생성되었다. 또 α-ketoglutaric acid는 20시간 후 부터 생성되는 것으로 보아 이 균의 초기 증식속도가 비교적 늦다는 것을 알 수 있다. L-Glutamic acid의 최고 생성은 22 g/l 이나 급후 각종 배양의 조건을 검토한다면 보다 많은 L-glutamic acid가 생성되리라 생각된다.

Sugar	Strain <i>Brevibacterium flavum</i> ATCC 13826	Isolated strain
Glucose	+	+
Fructose	+	+
Mannose	+	+

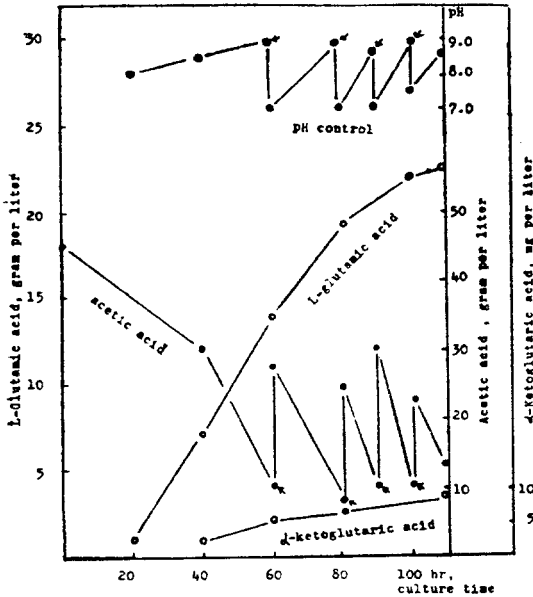


Fig. 1. Chemical changes during fermentation of L-glutamic acid in acetate medium

요 약

- 1) 자연계에서 분리한 세균의 한 균주(No.1214)는 초산염을 자화하여 L-glutamic acid를 상당량(22 g/l) 생산하였다.
- 2) 분리된 균주는 형태학적, 생리학적, 배양학적인 특징으로 보아 *Brevibacterium flavum* 속으로 간주되었다.

인 용 문 헌

- 1) Kimoshita, S., Tanaka, K., Udaka, S. and Akita, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 3, 193 (1957).
- 2) Kinoshita, S., Tanaka, K., Udaka, S. and Akita, S.: *Processings of the International Symposium on Enzyme Chemistry*, Tokyo and Kyoto, p.464 (1957).
- 3) 木下祝郎, 田中勝宜, 端高重三, 秋田定夫, 齊藤健: *醸酵協會誌*, 16, 1 (1958).
- 4) 朝井勇宣, 相田浩, 大石邦夫: *醸酵協會誌*, 15, 371 (1957).
- 5) 蘇遠志, 山田浩一: *Amino acid and Nucleic acid*, (醸酵と代謝), 1, 38 (1959).
- 6) 陣秩宗, 陣偏宗, 社聰明: *日本醸酵工學會誌*, 37, 310 (1959).
- 7) 木下祝郎: *醸酵協會誌*, 3, 247(1958).
- 8) Kinoshita, S., Nakayama, K. and Akita, S.: *Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan)*, 22, 176 (1958).
- 9) 木下祝郎, 板垣史郎, 中山清: *Amino acid and*

Nucleic acid, (醸酵と代謝), 2, 42 (1960).

- 10) 奥村信二, 都川麗一郎, 角田俊直, 河野景明, 松井俊規, 宮地昇: *日本農藝化學會誌*, 37, 32 (1963).
- 11) 宮井恭一, 鶴尾功, 小平了二, 秋元融: *日本農藝化學會誌*, 37, 32. (1963).
- 12) Su, Y.C. and Yamada, K.: *Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan)* 24, 140 (1960).
- 13) Kanzaki, T., Isobe, K., Okazaki, H., Motizuki, K. and Fukuda, H.: *Agr. Biol. Chem.*, 31, 1307 (1967).
- 14) Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 27, 390 (1963).
- 15) Shiiio, I. and Uchio, R.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 9, 23 (1963).
- 16) Shiiio, I. and Uchio, R.: *J. Gen. Appl. Microoiol.*, 15, 65 (1969).
- 17) 井口喬, 早川司郎, 武田勲: *日本農藝化學會誌*, 40, 36 (1960).
- 18) Tsunoda, T., Shiiio, I. and Mitsugi, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 7, 18 (1961).
- 19) Tsunoda, T., Shiiio, I. and Mitsugi, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 7, 30 (1961).
- 20) 鄭東孝, 朴性五, 金煥辰: *한국농화학회지*, 14, 131. (1971).
- 21) 鄭東孝: *한국식품과학회지*, 3, 189 (1951).
- 22) Friedman, T. E. and Haugen, G. E.: *J. Biol. Chem.*, 147, 415 (1943).
- 23) Rhauland, L. E., Work, E., Denman, R. F. and Hoare, D.S.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 77, 4844 (1955).
- 24) 高山健一郎, 河部重雄, 木下祝郎: *日本農藝化學會誌*, 39, 328 (1965).
- 25) 高山健一郎, 河部重雄, 木下祝郎: *日本農藝化學會誌*, 39, 335 (1965).
- 26) Work, E. and Dewy, D. L.: *J. Gen. Microbiol.*, 9, 394 (1953).
- 27) Hoare, D. S. and Work, E.: *Biochem. J.*, 65, 441 (1957).
- 28) Cummins, C. S. and Harris, H.: *J. Gen. Microbiol.*, 13, 111 (1955).
- 29) Cummins, C. S. and Harris, H.: *J. Gen. Microbiol.*, 14, 583 (1956).
- 30) Cummis, C. S. and Harris, H.: *J. Gen. Microbiol.*, 18, 173 (1958).
- 31) *Beregy's Manual of Determinative Bacteiology*, 7th Ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore (1957).