

## 微生物에 의한 핵산關連物質의 生産에 관한 研究(第四報)

—*Brevibacterium* 屬 細菌 變異株의 5'-inosinic acid 醱酵 培地成分에 關하여—

裴 武 · 李 啓 準  
韓國科學技術研究所 · 應用微生物研究室

### Studies on Production of Nucleic acid Derivatives by Microorganisms(IV)

—Effect of Culture Media on 5'-IMP Accumulation by *Brevibacterium ammoniagenes*—

Moo Bae and Kye Joon Lee

Applied Microbiology Lab., Korea Institute of Science and Technology

(Received November 6, 1973)

#### Abstract

Effects of nitrogen sources, supplement of vitamins and minerals on the accumulation of 5'-inosinic acid by an adenineless mutant of *Brevibacterium ammoniagenes* were examined.

Maximal yield of 5'-inosinic acid was attained by the use of yeast extract. as organic nitrogen source Casamino acid supplemented with  $Mn^{++}$ ,  $Zn^{++}$  Ca-D-pantothenate and thiamineHCl could be substitute for it.

Subsequent experiment using the defined medium showed that the concentration of these trace element in the medium affected inosinic acid accumulation markedly. And it was found that the simulataneous addition of  $Mn^{++}$  (20 $\mu$ g/l).  $Zn^{++}$ (10 $\mu$ g/l). thiamine Hcl(10mg/l) and Ca-D-pantothenate(5mg/l) to the defined medium stimulated inosinic acid accumulation, from which 7mg/ml of inosinic acid was obtained.

#### 序 論

呈味性 물질인 5'-inosinic acid(IMP)의 생산방법에는 대체로 直接醱酵法, 핵산分解法 및 半合成法 등이 있다<sup>1,2,3)</sup>.

直接醱酵法에는 salvage 合成經路를 이용하는 경우와 영양要求變異株로서 *De novo* 合成經路를 이용할 수 있다<sup>4,5)</sup>.

Adenine 要求變異株를 사용할 때 5'-inosinic acid, inosine, hypoxanthine 즉 hypoxanthine 계통의 핵산關連物質이 직접 발효배지 내에 다량 축적하고 있음이 보고되었다<sup>6,7)</sup>.

著者들은 前報에서<sup>8,9,10)</sup> *Brevibacterium ammoniagenes*의 adenine 要求變異株의 취득방법과 취득한 變異株중에서 IMP를 다량 축적하는 變異株를 선발하여 보고한데 이어 本報에서는 선발한 變異株의 醱酵培地 성분을 검토한 결과 IMP의 蓄積量이 증가하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

#### 材料 및 方法

##### 1. 使用菌株

前報<sup>8)</sup>의 보고대로 著者들이 *Brevibacterium ammoniagenes*을 diethylsulfate 로서 처리하여 취득한 adenine 要求變異株 NO. 203을 사용하였다.

## 2. 培地組成

사용균은 nutrient agar 에 adenine HCl 을 20mg /l 첨가한 배지에 보존하였으며 발효를 위한 種培地로서는 glucose 2%, peptone 1%, yeast extract 1%, NaCl 0.25%, PH7.2을 사용하였다.

醱酵基礎培地로서는 glucose 10%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1%, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.01%, urea 0.6% (별도살균)을 사용하였고 이 기초 배지에 有機窒素源을 변화하여 첨가하고 미량 금속물질과 Vitamine 을 첨가하여 IMP 의 蓄積量의 변화를 검토하였다.

## 3. 培養 및 分析方法

배양 및 蓄積物의 분석방법은 前報<sup>10)</sup>와 동일하게 시행하였다.

## 4. 試藥 및 器具

adenine · HCl; Taketa Kosan Co., Casamino acid (Vitamin free); Difco, Hypoxanthine, inosine, 5'-inosinic acid; Kishida Chemical Co. Biotin; Thiamine · HCl, Ca-D-pantothenate; wako pure chemical LTD

Chromatographic filter paper; Wattman No 1., U. V. Spectrophotometer (DU-2) Beckmann, Controlled environmental incubator shaker; Brunswick.

## 結果 및 考察

### 1. Biotin 添加量의 變化

*Br. ammoniagens* (ATCC6872)는 biotin 要求株이므로 biotin 을 첨가해 주어야만 성장하나 과다한 량의 첨가는 균의 과다성장과 세포벽에 飽和 및 不飽和脂肪酸을 蓄積시키므로 透過力이 감소되어 培地內의 蓄積量이 현저히 줄어든다<sup>11)</sup>.

따라서 본 실험에 사용한 變異株의 醱酵培地內에 첨가할 biotin 의 량을 결정하기 위하여 有機窒素源인 yeastextract, peptone 및 Casamino acid 을 사용할 때 첨가하는 biotin 의 량과 IMP 蓄積量과의 관계를 검토한 결과 Fig 1과 같다.

Casamino acid 의 경우 biotin 의 농도 30 $\mu$ g/l 에서 IMP 의 蓄積量이 가장 많았고 biotin 량의 증가에 따라 蓄積量이 줄어든데 비해 yeast extract 나 peptone 의 경우 biotin 의 량 30 $\mu$ g/l 에서 IMP 의 蓄積量이 최고치를 나타내나 biotin 량의 증가에 따라 IMP 의 蓄積量이 별로 감소하지 않은 것이 나타났다.

이런 현상은 yeast extract 나 peptone 이 casamino acid 보다는 더 복잡한 조성의 질소원이므로 biotin 과 관련되거나 혹은 특정적으로 작용하는 기타의 물질들이 있을 것으로 추측된다.

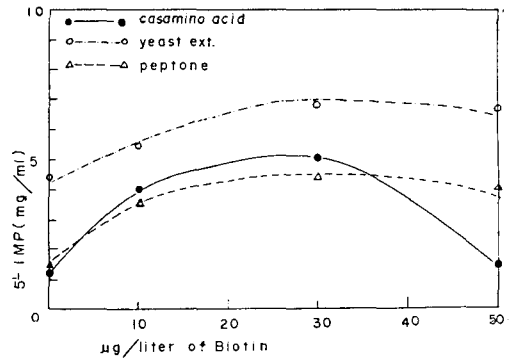


Fig. 1 Effect of Biotin on 5'-IMP Accumulation Medium; Basal medium plus nutrients 1%

### 2. 天然有機窒素源의 變化

變異株 No. 203의 醱酵培地에 첨가하는 有機窒素源을 선택하기 위하여 yeast extract, peptone, casamino acid, meat extract, N. Z. amine 및 corn steep liquor 에 대하여 실험한 결과 Table 1과 같다.

微量금속물질과 Vitamin 을 첨가하지 않을 경우 yeast extract 을 사용할때 IMP 의 蓄積量이 가장 많았으나 微量金屬물질과 Vitamin 을 첨가하였을 경우 IMP 의 蓄積量은 현저하게 감소하였다.

반면 Casamino acid 의 경우는 이들 微量添加物質의 첨가에 의해서 IMP 의 蓄積量이 증가한 결과를 나타냈다.

Table 1. Effect of Various Nitrogen Sources on 5'-inosinic acid and Hypoxanthine Accumulation

Nitrogen Sources	Accumulation mg/ml			
	Medium-1		Medium-2	
	HX.	5'-IMP	HX.	5'-IMP
Casamino acid	3.0	2.0	0.7	5.0
Yeast ext.	5.6	8.7	2.9	4.1
Peptone	1.5	4.0	0.5	6.6
Meat ext.	2.0	3.5	0.2	5.2
N. Z. amine	1.4	2.4	3.4	2.5
C. S. L.	3.0	3.8	3.0	2.6

Medium-1 : Basal Medium plus biotin 30 $\mu$ g/L and nitrogen sources 1%

Medium-2 : Mn<sup>+2</sup> 10 $\mu$ g/L, Zn<sup>+2</sup> 100 $\mu$ g/L, Thiamine HCl 5mg/L, and Ca-D-Pantothenate 10mg/L were added to medium-1

이러한 현상의 主要原因은 天然有機窒素源에 들어 있는 各種 微量成分들로서  $Mn^{++}$ ,  $Zn^{++}$ , thiamine 및 pantothenate 임이 밝혀졌다<sup>12)</sup>.

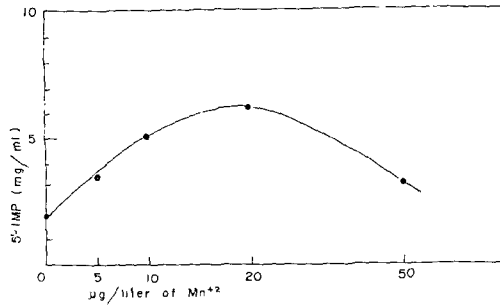
따라서 이들 微量成分이 變異株 No. 203의 蓄積에 미치는 영향을 검토할 필요가 있고 有機窒素源 으로서는 casamino acid 을 사용함이 적당하다고 판단되었다.

### 3. 微量金屬物質의 添加量

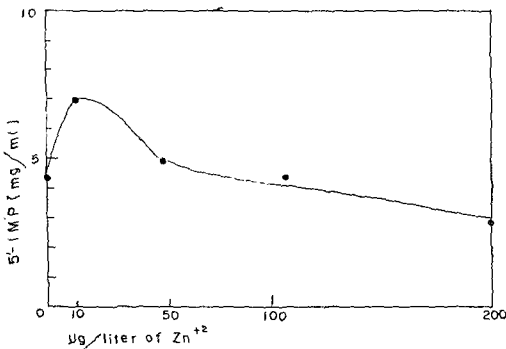
$Mn^{++}$ 농도의 변화에 따른 IMP의 蓄積量을 측정한 결과 Fig 2.와 같고  $Zn^{++}$ 농도의 변화에 따른 IMP의 蓄積量의 변화는 Fig 3.과 같다.

$Mn^{++}$ 농도 20  $\mu g/l$ 로 첨가하였을 때 IMP의 蓄積量이 최고였으며 그 이상의 농도에서는 蓄積量이 감소되었다. 또한  $Zn^{++}$ 의 농도 10  $\mu g/l$ 로 첨가하였을 때 IMP의 蓄積量이 가장 많으나  $Zn^{++}$ 농도의 증가에 따라 IMP의 蓄積量은 급격히 감소하였다.

$Mn^{++}$ 이 IMP의 蓄積에 미치는 機轉은 菌의 성장



**Fig. 2** Effect of  $Mn^{+2}$  on 5'-IMP Accumulation  
Medium: Basal medium plus casamino acid 1%, biotin 30 $\mu g/L$ ,  $Zn^{+2}$  100 $\mu g/L$ , Ca-D-pantothenate 10mg/L and thiamine HCl 5mg/L. pH 8.3



**Fig. 3** Effect of  $Zn^{+2}$  on 5'-IMP Accumulation  
Medium: Basal medium plus casamino acid 1%, biotin 30 $\mu g/L$ ,  $Mn^{+2}$  10 $\mu g/L$ , Ca-D-pantothenate 10mg/L and thiamine HCl 5mg/L. pH 8.3

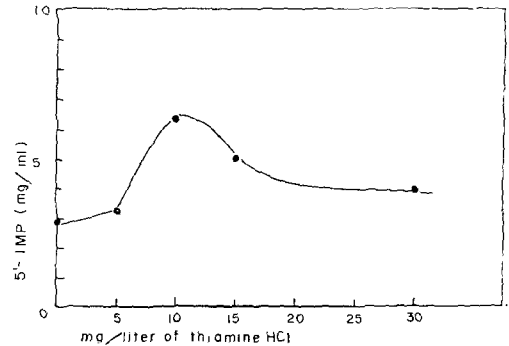
과 이에 따르는 透過力인 것으로 알려졌다<sup>13,14)</sup>. 즉 Furuya 등에 의하면 菌 성장 最適濃도보다 낮은 농도에서 IMP의 蓄積量이 가장 많은데 이때 菌의 성장은 비정상적이고 세포벽에 이상이 생겨 透過力이 증진된 것으로 보고되었다.

한편  $Zn^{++}$ 의 첨가는 菌의 성장을 촉진하며  $Mn^{++}$ 와 동시에 존재할 때 IMP의 蓄積量은 증가하는 것으로 알려졌다<sup>11)</sup>.

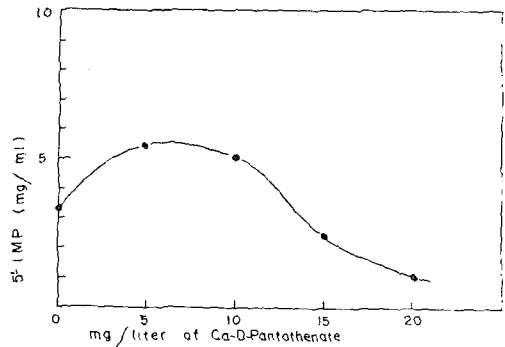
본 연구에 사용한 變異株 No. 203의 경우  $Mn^{++}$  20  $\mu g/l$ ,  $Zn^{++}$  10  $\mu g/l$ 로서 첨가함이 좋은 것으로 판단된다.

### 4. Thiamine HCl 및 Ca-D-pantothenate의 영향

Thiamine HCl과 Ca-D-pantothenate 각각의 농도 변화에 따른 IMP의 蓄積量을 측정한 결과 Fig 4. 및 Fig 5와 같다.



**Fig. 4** Effect of Thiamine HCl on 5'-IMP Accumulation  
Medium: Basal medium plus casamino acid 1%, biotin 30 $\mu g/L$ ,  $Zn^{+2}$  1000 $\mu g/L$ ,  $Mn^{+2}$  10 $\mu g/L$  and Ca-D-pantothenate 10mg/L. pH 8.3



**Fig. 5** Effect of Ca-D-pantothenate on 5'-IMP Accumulation  
Medium: Basal medium plus Casamino acid 1%, biotin 30 $\mu g/L$ ,  $Zn^{+2}$  100 $\mu g/L$ ,  $Mn^{+2}$  10 $\mu g/L$  and thiamine HCl 50mg/L. pH 8.3.

Thiamine HCl 10 mg/l 첨가할 때와 Ca-D-pantothenate 5 mg/l 첨가할 때 각각 IMP의 蓄積量이 가장 많았다.

이들 vitamin은 醱酵基礎培地和 같은 고농도의 phosphate에 의한 균의 성장저해를 해시키며<sup>14)</sup> 또한 核酸關連物質의 生成에 직접 관여하며 세포막 형성에도 작용하여 透過力에 영향을 준다고<sup>12)</sup> 각각 보고된바 있다.

이상 검토한 Mn<sup>+</sup>, Zn<sup>+</sup>, Thiamine HCl 및 Ca-D-pantothenate의 최적농도를 동시에 첨가하여서 IMP의 蓄積量을 측정할 결과 Table 2와 같다. 즉 5'-inosinic acid의 蓄積量이 증가하였다.

Table 2. Accumulation of 5'-inosinic acid in the Defined Media

	Medium-A	Medium-B
Glucose	10%	10%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	1
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1	1
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.01	0.01
Urea	0.6	0.6
Casamino acid	1.0	1.0
Biotin	30 μg/L	30 μg/L
Zn <sup>+2</sup>	100 μg/L	10 μg/L
Mn <sup>+2</sup>	10 μg/L	20 μg/L
Ca-D-Pantothenate	10 mg/L	5 mg/L
Thiamine HCl	5 mg/L	10 mg/L
Amounts of 5'-IMP Accumulated mg/ml	5.0	7.0

이상 著者들은 *Brevibacterium ammoniagenes*의 adenine 要求變異株 No. 203의 醱酵培地 성분중 微量成分의 添加量을 검토 보고하는 바 이를 기본으로 기타의 醱酵條件에 관하여서는 此後에 報告하기로 한다.

### 要 約

核酸關連物質중 呈味性物質인 5'-inosinic acid을 直接醱酵法으로 생산함에 있어 培地組成의 검토를 본 실험에서 수행하였다.

有機窒素源으로서의 yeast extract 1%을 사용함이 좋았고 biotin의 첨가량은 30 μg/l였을때 IMP의 축적량이 가장 많았다.

有機窒素源으로 Casamino acid를 쓸 경우 Mn<sup>+</sup> 20 μg/l, Zn<sup>+</sup> 10 μg/l, Thiamine HCl 10 mg/l 및 Ca-D-pantothenate 5 mg/l를 첨가해주면 IMP의 蓄積量이 증가하였으며 最高 7.0 mg/ml의 IMP가 醱酵培地중에 생성되었다.

### 參 考 文 獻

1. Nara, T. M. Misawa and S. Kinoshita; *Agr. Biol. Chem.*, **32** 956(1968)
2. Kuninaka, A., S. Otsuka, Y. Kobayashi and K. Sakaguchi *Bull. Agr. Chem. Soc.*, **23**, 239(1959)
3. Hara, T. Y., Koaze, Y. Yamada and K. Sato; *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 747(1992)
4. Nara, T., M. Misawa and S. Kinoshita; *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1224(1967)
5. Nakayama, K., T. Suzuki, S. Sato and S. Kinoshita; *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10**, 133(1964)
6. Dermain, A. L., M. Jackson, R. A. Vitali, D. Hendln and T. A. Jacob; *Appl. Microbiol.* **14**, 821(1966)
7. Nara, T. M. Misawa, K. Nakayama and S. Kinoshita; *Amino Acid and Nucleic acid 醱酵と代謝* **8**, 94(1963)
8. Bae, Moo and Kye Joon Lee; *Kor. Jour. Microbiol.*, **10**, 73(1972)
9. Bae, Moo and Kye Joon Lee; *Kor. Jour. Microbiol.*, **10**, 109(1972)
10. Bae, Moo, A. S. Yoon and K. J. Lee; *Kor. Jour. Microbiol. Bioeng.* **1**, 13(1973)
11. Komuro, T. T., Nara, M. Misawa and S. Kinoshita; *Agr. Biol. Chem.* **33** 1019(1968)
12. Nara, T. M. Misawa and S. Kinoshita; *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 1153(1968)
13. Furuya, A. S. Abe and S. Kinoshita; *Amino Acid and Nucleic Acid 醱酵と代謝* **18**, 50 (1968)
14. Furuya, A. S. Abe and S. Kinoshita; *Amino Acid and Nucleic Acid 醱酵と代謝* **19**, 97(1969)