

微生物에 의한 5'-GMP의 生産에 관한 研究

(第 1 報) XMP-aminase 生産菌株의 分離

裴 鍾 燾 · 孫 忠 弘 · 孔 雲 泳 · 柳 洲 鉉*

第一製糖株式會社, 食品研究所. *延世大學校 食品工學科
(1979년 3월 5일 수리)

Studies on the Fermentative Production of Guanosine -5'-monophosphate by Microorganism (Part 1) Derivation of XMP-aminase Producing Mutants

from *Brevibacterium ammoniagenes*

Chong Chan Bae, Choong Hong SON, Un Yong Kong and Ju Hyun Yu*

Cheil Sugar Co., Ltd, Food R. & D. Center

*Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul.

(Received March 5, 1979)

Abstract

By the treatment of several mutagens, a number of 5'-guanylic acid producing mutants from 5'-xanthylic acid were obtained from *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6871. The indispensable genetic characters of the mutants were adenine requirement, lack of GMP-reductase and mutation to adenosine resistance from adenosine sensitiveness.

Main product from 5'-xanthylic acid by strain BA-17-2 was 5'-guanulic acid, and was isolated in a crystalline form by the use of anion exchange resin, Duolite 102 D.

The isolated crystalline was identified as 5'-guanylic acid by means of paper chromatography, ultraviolet absorption spectra, and infrared absorption spectrum.

緒 論

5'-Guanylic acid와 5'-inosinic acid가 강한 呈味
力을 가지고 있음이 Kuninaka⁽¹⁾에 의해 밝혀진 이
후 이러한 ribonucleotide의 醱酵的 生産方法에 관

한 研究論文이 상당수 보고되어 왔으며, 현재 일본
에서는 工業的으로 年間 約 3000톤 정도 生産되어
核酸系調味料로써 널리 사용되고 있다.

특히 5'-guanylic acid는 송이버섯등 일부 제한된
食品中에 함유되어 있고⁽²⁻⁴⁾, 製造方法 또한 5'-
inosinic acid에 비하여 해결되어야 할 難點이 많이

남아있다.

현재까지 알려진 製造方法을 보면 酵母核酸分解液中 5'-guanylic acid만 分離精製하는 方法^(5,6), guanosine을 醱酵한후 酵素 또는 化學的 方法으로 磷酸化하는 方法^(7,8) 등이 있고 기타 微生物 變異株에 의한 直接醱酵法⁽⁹⁻¹³⁾과 XMP 生産菌株과 XMP를 GMP로 전환하는 菌株의 混合培養法⁽¹⁴⁾ 등이 있다.

그러나 guanine系 nucleotide는 핵산관련물질의 生合成經路상 feedback inhibition과 repression 등에 의하여 직접 배양액중에 축적시키기가 어렵고 축적한다 해도 소량에 그치기 때문에^(12,13), 새로운 生産方法 또는 새로운 生産菌株의 開發이 시급하다.

著者등은 微生物變異株에 의한 核酸關聯物質 특히 核酸系調味料로써 사용되고 있는 5'-inosinic acid와 5'-guanylic acid의 製造方法을 研究하던중 *Brevibacterium ammoniagenes*에서 유도한 변이주 BA 17-2가 XMP를 GMP로 전환하는 효소 XMP aminase의 活性이 높았으며, 전환생성물이 5'-GMP임을 확인 동정하였기에 그 結果를 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

(1) 使用菌株

분양받은 *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6871을 新株로 사용하였다.

(2) 培地組成 및 培養方法

營養要求株分離에 사용한 배지는 meat extract 1.0 %, yeast extract 0.3 %, peptone 1.0 %, NaCl 0.3 % 및 agar 2.0 %의 營養培地를 完全배지 (complete medium; CM)로 하고, 그리고 Misawa 등⁽¹⁵⁾이 사용한 最少培地를 약간 변형한 glucose 2.0 %, (NH₄)₂SO₄ 0.3 %, KH₂PO₄ 0.1 %, K₂HPO₄ 0.3 %, MgSO₄·7H₂O 0.3 %, CaCl₂·2H₂O 10 mg/L, FeSO₄·7H₂O 10 mg/L, ZnSO₄·7H₂O 1 mg/L, MnSO₄·4H₂O 1 mg/L, L-cystein 20 mg/L, Ca-D-pantothenate 10 mg/L, thiamine-HCl 5 mg/L, biotin 30 μg/L, urea 0.2 %, casamino acid, vit. free 0.1 %를 최소배지 (minimal medium; MM)로 사용하였다.

발효배지는 glucose 10 %, K₂HP₄ 1 %, KH₂PO₄ 1 %, MgSO₄·7H₂O 1 %, CaCl₂·2H₂O 0.01 %, FeSO₄·7H₂O 10 mg/L, MnSO₄·4H₂O 2 mg·L, yeast extract 0.1 %, casein hydrolysate 0.1 %, Biotin

30 μg/L, adenine 30 mg/L, urea 0.6 % (pH 8.5)를 500 ml, 진탕용 삼각 flask에 30 ml 분주하고 115°C에서 15분간 가압살균하여 사용하였으며, 배양은 30°C±1°C에서 2~5일간 진탕배양하였다.

(3) 變異株 分離方法

영양요구주 분리방법은 Fig. 1에 나타난 바와같이 Lichstein 등⁽³⁶⁾의 Mutagen 처리방법과 Davis 등⁽¹⁷⁾의 Penicillin-G 처리방법을 組合하여 ultra-

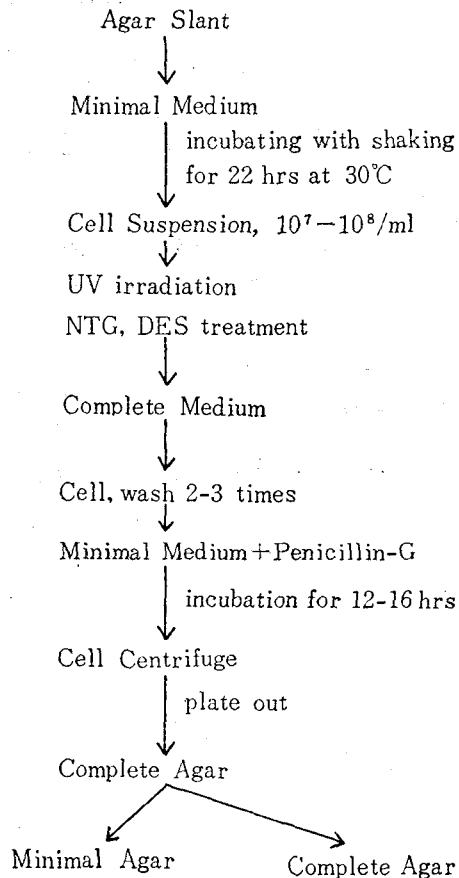


Fig. 1. Process of Auxotroph Isolation

violet 照射 및 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)과 diethyl sulfate (DES) 등을 처리하고 Lederberg의 replica방법⁽¹⁸⁾에 따라 purine 영양요구주를 분리하였다.

(4) XMP-aminase activity의 測定方法

醱酵培地에서 48 시간 진탕배양하여 얻은 균배양액을 5000×g에서 5분간 원심분리하여 균체를 모으고 Moyed & Magasanik의 방법⁽¹⁹⁾에 따라 XMP aminase 효소액을 얻었다.

XMP-aminase activity는 pH 8.58 Tris buffer 40 μ mole, $MgCl_2$ 4 μ mole, 5'-ATP 1.0 μ mole, 5'-XMP 0.6 μ mole, $(NH_4)_2SO_4$ 80 μ mole 및 효소액 0.05ml 를 증류수로 0.25ml로 한 반응액을 25°C에서 20~30분간 반응시킨후 3.5% perchloric acid 2.75ml 를 가하여 除蛋白質시킨다. 상등액을 290m μ 에서의 흡광도를 측정하고, 5'-XMP를 첨가하지 않은 대조구에 대한 optical density의 증가로써 XMPaminase activity로 표시하였다.

(5) 核酸關聯物質의 定量方法

反應生成物은 paper chromatography 법⁽¹¹⁾ 및 column chromatography 법⁽²⁰⁾에 의하여 定量하였다.

結果 및 考察

(1) XMPaminase 生産菌株의 分離

Masanik 등⁽²¹⁾의 purine 系 核酸關聯物質 生合成의 代謝經路에 관한 보고를 보면, 미생물 특히 세균의 경우 돌연변이주에 의한 guanine 系 核酸關聯物質의 축적은 GMP-reductase activity에 주로 관련이 있다고 알려져 있다. 그러나 본 저자들은 UV, NTG 및 DES 등의 변이유기체를 처리하여 각종 purine 영양요구변이주를 획득하고 이들에 의한 핵산관련물질 생성균주를 검색한 결과 adenine 영양요구주에 의해서는 주로 hypoxanthine 계 유도체를 생성하였고, guanine 영양요구주는 xanthine계 유도체를 생성하였으며, 기타 영양요구주에서도 guanine 계 유도체를 생성하는 변이주는 발견할 수 없었다. 이러한 사실은 *Brevibacterium ammoniagenes*의 핵산관련물질 생합성경로상 GMP-reductase activity가 강하거나 XMP-aminase activity가 충분히 약하다는 (혹은 대사산물에 의한 저해) 사실을 암시하여 준다고 생각되어, UV, NTG 및 DES 등을 단독 또는 혼합하여 연속처리하면서 각 변이주의 XMP-aminase와 GMP-reductase activity를 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 GMP-reductase activity가 거의 없고 XMP-aminase activity가 강한 변이주 BA-17-2를 분리할 수 있었으며, 이들 변이주의 genotype와 효소활성을 요약하여보면 Table 1과 같다.

GMP-reductase의 activity와 XMP-aminase activity는 엄밀한 상관관계는 없었으나, 일반적으로 XMP-aminase activity가 높을수록 GMP-reductase가 낮은 경향을 보였다.

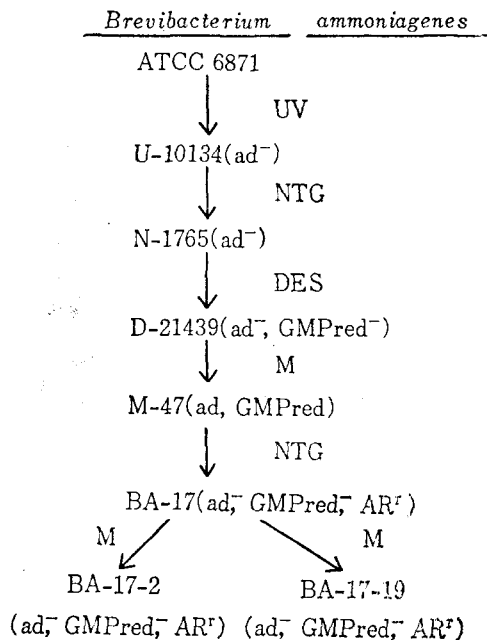


Fig. 2. Derivation of XMP-aminase Producing Mutants.

Inside of parenthesis indicates genotype of mutants, M; the process of monoclonal isolation.

Table 1. Ezyme Activity of Various Mutants

Strain	Genotype	XMP-aminase activity	GMPred uctase activity
Wild type	—	0.01	-0.34
U-10134	ad ⁻ , AR ^s	0.013	-0.25
N-1765	ad ⁻ , AR ^s	0.012	-0.25
D-21439	ad ⁻ , GMPred ⁻ , AR ^s	0.02	-0.08
M-47	ad ⁻ , GMPred ⁻ , AR ^s	0.19	-0.05
BA-17	ad ⁻ , GMPred ⁻ , AR ^r	0.68	-0.04
BA-17-2	ad ⁻ , GMPred ⁻ , AR ^r	0.98	-0.004
BA-17-2	ad ⁻ , GMPred ⁻ , AR ^r	0.96	-0.004

*1. XMP-aminase activity was determined according to the method⁽⁴⁾ in materials and methods of this paper. The results represent the increase in optical density at 290m μ .

*2. GMP-reductase activity was determined by the method of Nogami et al⁽²²⁾. The results represent the decrease in optical density at 290 m μ .

특히 XMP-aminase activity는 GMP-reductase activity 보다는 Adenosine resistance가 결정적인 요인으로 작용하는 것으로 추측되며, purine 영양 요구성 즉 adenine 영양요구성과 GMP-reductase 결핍이 guanine系 유도체를 합성하는데 중요한 인자라고 보고한 연구도 있으나⁽²²⁾ 본보에서는 adenine 영양요구성이 XMP-aminase activity 증가에 필요하다는 사실을 확인할 수는 없었다.

(2) XMP-aminase 生産菌株 BA-17-2의 Growth Response

Table 1의 XMP-aminase 生産菌株중 activity가 가장 우수한 strain BA-17-2를 최소배지에 adenine, adenosine, AMP 및 GMP 등을 첨가하고 30°C에서 24시간 진탕배양한후 660 m μ 에서 optical density를 측정된 결과 Fig. 3과 같다. strain BA-17-2는 adenine에 의하여 생육하는 영양요구성을 나타냈으며, adenosine이나 AMP 및 GMP 등을 첨가한 최소배지에서 생육하지 않는 것으로 보아 adenase 및 nucleotidase가 없는 것으로 생각된다. 또한 adenine

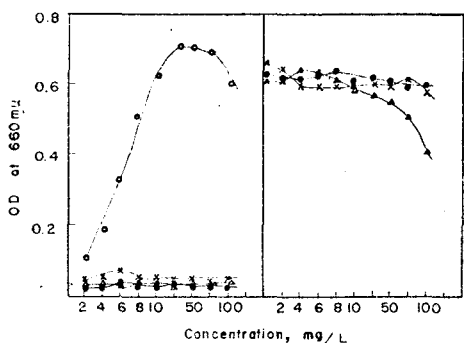


Fig. 3. Growth Response of Strain BA-17-2.

Cultivation was carried out for 24 hrs at 30°C in minimal medium (I) and supplemented medium with 30 mg/L of adenine (II)

○—○; adenine, ●—●; adenosine, ×—×; AMP, △—△; GMP

첨가 최소배지에서 adenosine이나 AMP 및 GMP에 의해 생육저해를 받지 않는 사실은 매우 흥미있는 일이며, 특히 XMP-aminase activity가 낮은 변이주들이 adenosine이나 AMP에 의해 생육저해를 받는 반면 BA-17-2는 거의 영향을 받지 않는 것으로 볼때 이러한 성질이 XMP-aminase activity와 깊은

관련이 있는 것으로 추측된다.

(3) BA-17-2 strain에 의한 XMP 전환물질의 分離同定

500 ml Baffled Erlenmyer flask에 발효배지 30 ml를 넣고 115°C에서 15분간 가압살균후 BA-17-2 1 백금이를 완전배지에 식균하여 30°C에서 24시간 배양한 액을 10% 용량으로 발효배지에 식균하고 30°C에서 48시간 진탕배양하였다. 배양액은 Moyed and Magasanik의 방법⁽¹⁹⁾에 따라 XMP-aminase 효소액을 얻고 pH 8.58의 Tris buffer에 MgCl₂, 5'-ATP, 5'-XMP, (NH₄)₂SO₄ 및 효소액의 반응액 조성(분석방법 (4)참조)으로 25°C에서 30분간 반응시킨후 3.5% perchloric acid로 제단백시켜 시료로 사용하였다.

(가) 5'-XMP 전환물질의 Paperchromatogram

제단백한 반응액을 guanine系 유도체의 분리에 우수한 isobutyric acid系展開劑(A)와 Dioxane系展開劑(B)를 사용하여 whatman No. 2에 spotting

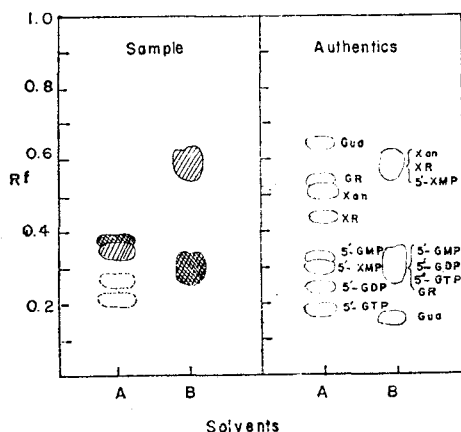


Fig. 4. Paperchromatograms of the Converted Substances from 5'-XMP by Strain BA-17-2.

Solvent A; Iso-Bu. acid-1N NH₄OH-Acetic acid (10 : 5 : 1)
B; Dioxane-IsoPrOH-HCl-H₂O (45 : 45 : 1 : 15)

한후 25°C에서 상승법으로 전개한 paperchromatogram을 보면 Fig. 4와 같다.

Isobutyric acid系展開劑A에서는 5'-XMP와 5'-

UMP의 구별이 명확하지 못하여 Dioxane系 展開劑 B를 사용한 결과 5'-GMP와 5'-XMP와의 명확한 구분을 할 수 있었으며, 5'-XMP는 대부분 5'-GMP로 전환되었고 5'-GDP와 5'-GTP의 spot가 흔적정도로 나타났다. 그러나 guanine이나 guanosine 또는 xanthosine이나 xanthine으로의 분해는 인정할 수 없었다.

(나) Column Chromatography 에 의한 분획량

Dowex 1×2 (Cl⁻ type), 200~400 mesh의 ion exchange column chromatography를 이용하여 반응 생성물을 분리한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 F₁~F₅의 peak가 형성되었다. 이들 각각의 fraction을 분취하여 UV-absorption spectrum을 조사한 결과 Table 2에서 보는 바와같이 Fraction 2는 5'-GMP, Fraction 3은 5'-XMP로 판단되며 Fraction

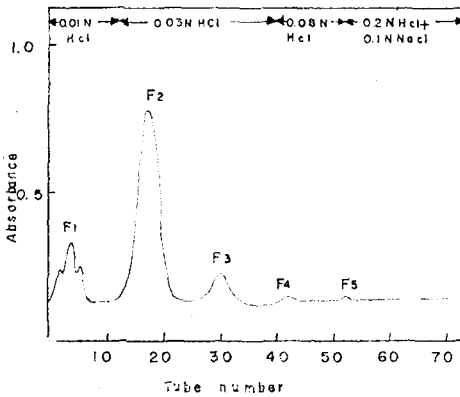


Fig. 5. Column Chromatogram of the Converted Substances from 5'-XMP by Strain BA-17-2.

The eluate was adjusted to pH 9.0 with sodium hydroxide and percolated through a 25×3 cm column containing 150 ml of Dowex 1×8 (Cl⁻), 200~400 mesh resin at a rate of 10 ml/min.

4 및 Fraction 5는 각각 5'-GDP 및 5'-GTP임을 알 수 있다. 그러나 Fraction 1의 물질을 확인할 수 없었다. 각각의 농도로 XMP를 반응액에 첨가하여 30°C에서 30분간 반응한후 생성물질을 정량한 결과를 요약하여 보면 Table 3과 같다.

10 mg/ml 이하의 5'-XMP에서 거의 대부분 5'-GMP로 전환되었으며 그의 5'-GDP 및 5'-GTP는 인정할 수 없었으며 그 이상 농도에서는 흔적정도 생

Table 2. UV Spectral Data of Fraction F₂ to F₅

Fraction	pH	λ_{max}	250/260	280/260	280/250	Type
F ₂	2	255				5'-GMP
	7	252	1.16	0.68	0.28	
	11	256				
F ₃	2	234, 262				5'-XMP
	7	249, 275	1.27	1.02	1.23	
	11	248, 277				
F ₄	2	255				5'-GMP
	7	253	1.16	0.68	0.58	
	11	257				
F ₅	2	253				5'-GTP
	7	255	1.16	0.68	0.58	
	11	255				

Table 3. Conversion of 5'-XMP to 5'-GMP by Strain BA-17-2.

Added 5'-XMP (mg/ml)	5'-XMP remaining (mg/ml)	Conversion rate (%)	Products (mg/ml)		
			5'-GMP	5'-GDP	5'-GTP
5	0	100	5.1	0	0
10	0.1	99	10	0	0
15	0.3	98	14.8	trace	trace
20	0.7	96.5	19.5	trace	trace

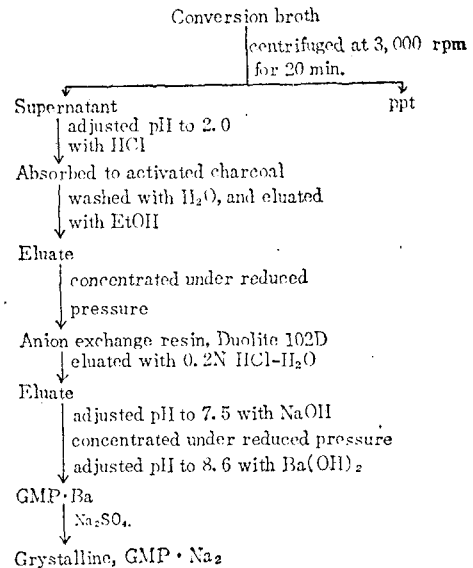


Fig. 6. Isolation Procedure for Obtaining Crystalline 5'-GMP.

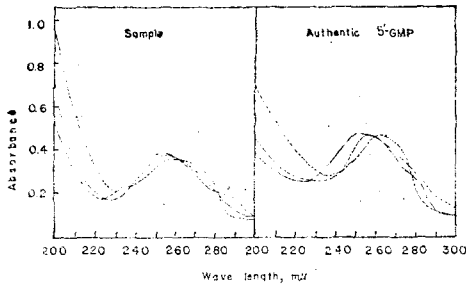


Fig. 7. UV Absorption Spectra of Crystalline Obtained from Converted Substances by Strain BA-17-2.

.....acidic, — neutral, - · - · - alkaline

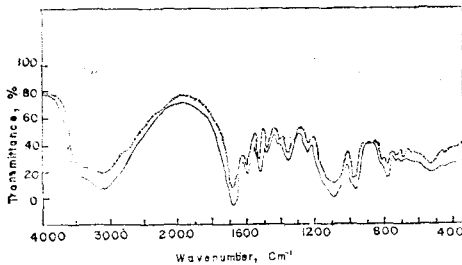


Fig. 8. Infra-Red Spectrum of Crystalline 5'-GMP Isolated from Converted Substances of Strain BA-17-2.

— Authentic, Sample
Sample: in KBr Wafer,

성되었다. 이것은 Furuya 등 (11,14)의 결과에서 5'-GDP 및 5'-GTP가 다량 생성되었다는 보고와는 전혀 달리 BA-17-2가 상당히 우수한 균주임을 증명하여 주고 있다. 또한 효소를 정제하지 않고 직접 효소함유액을 사용하였을 때에도 동일한 결과를 나타내는 것을 볼때 본 BA-17-2는 XMP-aminase가 강하고 또한 전환된 5'-GMP를 5'-IMP로 환원하거나 GDP 및 GTP로 인산화하는 능력이 거의 없어 공업적으로 5'-GMP를 생산하는데 적합한 균주임을 알 수 있다.

(다) 轉換物質의 分離와 UV 및 IR spectrum

BA-17-2의 생산효소 XMP-aminase를 이용하여 5'-XMP를 5'-GMP로 전환시킨 1l를 Fig. 6의 방법에 따라 GMP결정 6.3g을 얻었다. 이 결정 일정

량을 증류수에 용해한 후 산성, 중성, 알칼리성에서 UV-흡수 spectrum을 조사한 결과 (Fig. 7)표준품과 거의 일치하였으며, 또한 Infra-red spectrum을 표준품과 비교하여도 absorption band가 거의 일치하였다(Fig. 8). 따라서 BA-17-2가 생산하는 XMP-aminase는 5'-XMP에서 확실히 5'-GMP를 생산함을 알 수 있다.

要 約

5'-GMP의 直接醱酵生産菌株의 分離目的으로 *Breuibacterium ammoniagenes* ATCC 6871에 자외선조사 및 NTG, DES 등의 변이제처리를 한 결과 guanine系 核酸關聯物質을 직접 培地中에 축적하는 變異株는 分離할 수 없었으며, adenine 영양요구주으로써 GMP-reductase가 결핍되고 adenosine 및 AMP에 의해 생육저해를 받지 않는 변이주가 XMP-aminase activity가 현저히 높았음을 알았다.

이러한 변이주중 BA-17-2가 XMP-aminase의 activity가 가장 높았으며 또한 전환된 5'-GMP를 GDP나 GTP로 거의 인산화하지 않았으며 그리고 guanosine이나 guanine으로 분해하지 않았다.

생성된 5'-GMP를 anion exchange resin Duolite 102 D를 사용하여 분리하고 ultraviolet 및 Infra-red spectrum을 조사한 결과 5'-GMP로 동정되었다.

文 獻

- 1) A. Kuninaka: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **34**, 489 (1960).
- 2) 中島, 市川, 鎌田, 藤田: *農化(日)*, **35**, 803 (1961).
- 3) 橋田, 毛利, 志賀, 西川, 寺本: *醸工(日)*, **41**, 420 (1963).
- 4) 中島, 市川, 鎌田, 藤田: *農化(日)*, **35**, 797 (1961).
- 5) 緒方浩一, 今田哲, 中尾義雄: *日本特訴公報*, 昭 41-1267 (1966).
- 6) 北野一昭, 秋山峻一, 福田秀雄: *Amino acid and Nucleic acid*, **20**, 49 (1969).
- 7) 土屋義夫, 竹西忠男, 加藤哲也, 森壽雄: *日本特訴公報*, 昭 40-18319 (1965).
- 8) 宮内謙吉, 松本義樹, 古屋武: *日本特訴公報*, 昭 45-10595 (1970).
- 9) 内理, 長谷川安弘: *日本特訴公報*, 昭 41-2239,

- (1966).
- 10) T. Nara, M. Misawa and S. Kinoshita: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 561 (1968).
 - 11) A. Furuya, S. Abe, and S. Kinoshita: *Biotechnol. and Bioeng.*, **13**, 229 (1971).
 - 12) 奥村信二, 山野井昭雄, 駒形和雄, 城昭雄, 村松伸紀: 日本特許公報, 昭 42-6158 (1967).
 - 13) 大澤岳義, 瀬戸進, 渡邊臥朗, 石田寅夫: 日本特許公報, 昭 42-3836 (196).
 - 14) 古屋 晃, 岡地 諒, 高山健一郎, 阿部重雄: *Amino acid and Nucleic acid*, **27**, (1973).
 - 15) M. Misawa, T. Nara and S. Kinoshita: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 514 (1969).
 - 16) H. C. Lichstein and E. L. Oginisky: "Experimental Microbial Physiology", W. H. Freeman Co., pp. 72 (1965).
 - 17) Davis, B. D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 4267 (1948).
 - 18) Lederberg, J. and Lederberg E. M.: *J. Bacteriol.*, **63**, 399 (1952).
 - 19) H. S. Moyed and B. Magasanik: *J. Biol. Chem.*, **226**, 351 (1957).
 - 20) A. L. Demain, R. A. Vitali, B. L. Wilker, J. W. Rothrock, and T. A. Jacob: *Biotechnol. and Bioeng.*, **6**, 361 (1964).
 - 21) B. Magasanik and D. Karibian: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 144 (1968).
 - 22) I. Nogami, M. Kida, T. Iijima and M. Yoneda: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 144 (1968).