

*Brevibacterium ammoniagenes*의 아데닌-구아닌 複營養要求株에 의한 5'-크산틸酸的 蓄積

孔 雲泳 · 禹 亨九 · 孫 忠弘 · 裴 鍾燾 · 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

(1981년 3월 11일 수리)

Accumulation of Xanthosine-5'-monophosphate by Adenine-Guanine Double Auxotroph of *Brevibacterium ammoniagenes*

Un-Young Kong, Hyung-Gu Woo, Choong-Hong Son, Jong-Chan Bae and Ju-Hyun Yu*

Foods R & D Center, Cheil Sugar Co., Ltd., Seoul 150-02,

*Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120

(Received March 11, 1981)

Abstract

An adenine-guanine double and β -alanine requiring mutant, D-1550-40, which had been derived from *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872, produced a copious amount of xanthosine-5'-monophosphate (XMP). The optimum concentration of adenine and guanine for maximal accumulation of XMP was about 75 mg/l and 100 mg/l for growth. Concentrations higher than 100 mg/l of adenine and guanine inhibited cell growth and XMP accumulation strongly. The inhibition, however, could be recovered by adding 100 μ g of biotin per liter or 0.3% of casamino acids to the culture solution.

High concentrations of phosphate and magnesium salts (1.0 to 1.5% (w/v) in media) were found to be indispensable for XMP accumulation, and the presence of manganese in the culture medium stimulated both growth of cells and accumulation of XMP leaving 5'-inosinic acid unaffected. The maximal accumulation of XMP reached to 60.5 mg/l after 4 days of fermentation which had been started with a medium containing 100 mg of adenine-guanine, 5 mg of $MnSO_4 \cdot H_2O$ and 100 μ g of biotin per liter. The specific XMP synthesis (mg of XMP/mg of cells) was increased with the increase of the cell growth rate.

서 론

5'-이노신酸(5'-IMP)과 5'-구아닐酸(5'-GMP)이 글

루탐산과 더불어 맛의 相乘效果를 나타낸다는 사실이 Kuninaka⁽¹⁾에 의하여 밝혀진 이후, 이들 nucleotide의 醱酵的 生産方法을 확립하기 위한 많은 연구들이 행하여져 왔으며 이미 국내에서도 1977년 말부터 直接醱

酵法에 의한 5'-IMP 및 5'-GMP 가 생산되어 글루탐산과 혼합한 核酸複合調味料로써 널리 사용되어 오고 있다.

저자들은 *Brevibacterium ammoniagenes* 에 변이 유기체를 처리하여 5'-IMP 를 다량 축적하는 변이주를 분리하고 생성물질의 분리, 동정한 결과를 보고한 바 있다⁽²⁾. 그러나 탄소원으로부터 직접 5'-GMP 를 배지중에 축적하는 변이주는 발견되지 않았으며, 5'-크산틸酸(5'-XMP)을 5'-GMP 로 전환하는 변이주 BA-17 을 분리하여 5'-GMP 의 공업적 생산이 가능하게 되었다⁽³⁾.

이와같이 5'-XMP 는 5'-GMP 의 前驅物質로써 공업적으로 중요한 生産原料이면서도 지금까지 생성균주의 분리에 대한 연구보고는 몇몇 발표된 바 있으나^(4,5), 발효생산배지에 대한 검토나 조건은 거의 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 *Brevibacterium ammoniagenes* 에서 분리한 adenine-guanine 및 β-alanine 營養要求性 變異株⁽⁶⁾에 의한 5'-XMP 의 발효생산에 있어서 培地組成에 대한 검토와 各成分間의 相互作用效果를 조사하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6872를 변이시켜 분리한 adenine-guanine 및 β-alanine 營養要求性變異株 D-1500-40⁽⁶⁾을 사용하였다.

배지조성

보존배지 및 종배지조성은 黃登⁽⁶⁾의 배지와 동일하며 기초발효배지조성은 다음과 같다: glucose, 10%; KH₂PO₄, 1%; K₂HPO₄, 1%; MgSO₄·7H₂O, 1%; (NH₄)₂SO₄, 1%; CaCl₂·2H₂O, 0.01%; MnSO₄·H₂O, 2mg/l; FeSO₄·7H₂O, 10mg/l; ZnSO₄·7H₂O, 1mg/l; thiamine·HCl, 5mg/l; biotin, 30μg/l; β-alanine, 5mg/l; adenine, 30mg/l; guanine, 30mg/l.

pH 는 5N NaOH 로 멸균전에 8.3 으로 조절하고 2.6 l 의 jar fermentor(Marubishi, Model MD-26)에 발효배지 1l 를 넣은 다음 120°C 에서 20분간 加壓滅菌한 후 사용하였다.

배양방법

등배지 30 ml 를 넣은 250 ml 진탕배양용 삼각플라스크에 상기 변이주 1 백균이를 접종하고 30°C 에서 24시간 rotary shaker(180 rev/min, 5 cm thrust)에서 진탕 배양하였다. 배양균체를 원심분리하여 모으고 멸균 생리식염수로 2회 세척한 후 ml 당 10⁸ cell 이 되게

발효배지로 희석하여 접종액으로 사용하였다.

접종액의 접종량은 발효배지의 10%(v/v)용량으로 하였고, 30±1°C 에서 통기량 1 vvm 및 교반속도 900 rpm 의 조건하에서 48 시간에서 60 시간동안 통기배양 하였으며 pH 는 암모니아수로 자동조절하였다.

5'-XMP 의 분석방법

5'-XMP 는 HPLC 法⁽⁷⁾에 의하여 정량하였으며, 이때에 0.01 M(NH₄)₂PO₄ 완충액을 流速 분당 2 ml 로 통과시켰고 column 은 μ-Bondapak C18 을 사용하였다. 또한 발효액중의 5'-XMP 량은 5'-XMP·Na₂ 로 측정하였고, 미생물 균체량은 일반적으로 사용되는 건조법을 이용하여 乾燥菌體量(DCW, mg/ml)으로 표시하였다.

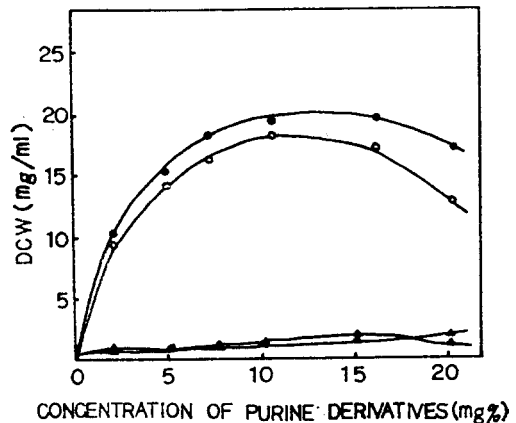


Fig. 1. Effect of purine derivatives on growth. Cultivation was carried out for 24 hr at 30°C in minimal medium⁽³⁾ supplemented with various concentration of purine derivatives: ○; adenine and guanine, ●; adenine and guanine supplemented with hypoxanthine, △; AMP and GMP, and ▲; adenosine and guanosine.

결과 및 고찰

Adenine 과 guanine 의 영향

Purine 유도체의 농도변화가 미치는 變異體 D-1550-40 의 生育을 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 이 菌은 adenosine 또는 guanosine 등의 nucleoside 나 5'-아데닐酸(AMP) 및 5'-GMP 등의 nucleotide를 가한 배지에서 균 증식은 확인하기 어려웠다. 그러나 adenine 이나 guanine 을 첨가한 배지에서는 양호한 생

육을 나타내었고 10 mg% 이상의 고농도를 가하였을 경우는 약간 균의 생육이 억제되는 경향을 보였다. 그리고 hypoxanthine을 더 첨가하면 이 첨가한 hypoxanthine에 의하여 생육촉진효과를 나타내었다.

이러한 결과는 *Brevibacterium ammoniagenes*의 guanine 要求株인 KY 7450 이 生育因子인 guanine대신에 guanosine 이나 5'-GMP를 가한 배지에서 생육이 되었다는 Misawa 등⁽⁸⁾의 보고와는 대조적이었다.

따라서 발효배지중 첨가되는 adenine 과 guanine 의 농도가 균의 생육과 5'-XMP 축적에 미치는 영향을 보

면(Fig. 2), 고농도첨가에서 균의 생육보다는 5'-XMP 축적에 강한 저해현상을 보였다. 생육에 대한 最適濃度는 100 mg/l 였으나, 5'-XMP 축적을 위한 最適濃度는 75 mg/l 였다. 이와같이 5'-XMP 축적에 양호한 최적농도가 균의 생육에 대한 최적농도보다 다소 낮은 경향은 Misawa 등^(8,9)의 결과와 유사하였다.

無機磷酸鹽과 마그네슘鹽의 영향

5'-IMP를 발효배지중에 고농도로 축적시키기 위해서는 K_2HPO_4 와 KH_2PO_4 및 $MgSO_4$ 의 농도를 각각 1% 이상 유지시켜야 한다고 알려져 있다⁽¹⁰⁾. 이러한 이유는 정확히 밝혀지지는 않았지만 nucleotide의 직접 발효법에서 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

D-1550-40 菌株의 5'-XMP 生産에 미치는 무기인산염과 마그네슘염의 농도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다.

5'-XMP 生産에 있어 最適條件의 인산염의 농도는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 0.5%첨가시는 1.0%, 1.0% 첨가하였을 때는 1.0~1.5% 그리고 1.5% 첨가시는 1.5%를 각각 나타내었다. 이들의 모든 염이 각각 1.0~1.5%의 고농도에서 5'-XMP 축적이 양호한 것을 알았고 고농도보다는 저농도의 인산염과 마그네슘염의 첨가에서 특히 저농도의 인산염 첨가에서 5'-XMP 축적이 낮았다. 이것은 nucleotide가 生合成될 때 인산이온이 菌體內 필요한 성분일뿐 아니라 nucleotide에 인산1분자가 반드시 결합되어야 하기 때문인 것으로 생각하였다.

망간이온의 영향

Nara 등^(11,12)에 의하면 *Brevibacterium ammoniagenes*나 기타 세균에 의한 5'-IMP나 AMP 또는 5'-GMP의 발효생산에 있어서 망간이온농도의 영향이 커서 망간감수성 변이주의 경우 30 $\mu g/l$ 의 망간이온이 존재하여야만 5'-IMP의 축적이 최대로 도달됨을 보고한 바 있다.

망간이온농도가 균의 생육과 축적에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig.4에서 보는 바와 같다. $MnSO_4 \cdot H_2O$ 를 발효배지중에 0~5 mg/l로 첨가하였을 경우에는 망간이온농도의 증가에 비례하여 균 증식분 아니라 5'-XMP축적을 촉진하였으나 그 이상의 농도에서는 변화가 없었다. 또한 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 를 5 mg/l 이상 첨가한 발효배지에서 배양 중의 세포형태를 현미경으로 관찰하여 보았으나 아무런 변화도 나타나지 않았다.

5'-IMP 발효에서 망간이온은 글루탐산 발효에서의 biotin역할과 유사한 작용을 하여 배지중에 과잉으로 존재할 경우에는 균체증식을 촉진하고 상대적으로 생성물질의 균체의 축적을 저해한다고 알려져 있다⁽¹³⁾. 특히 5'-IMP 발효에서는 망간이온농도와 배양중의 세

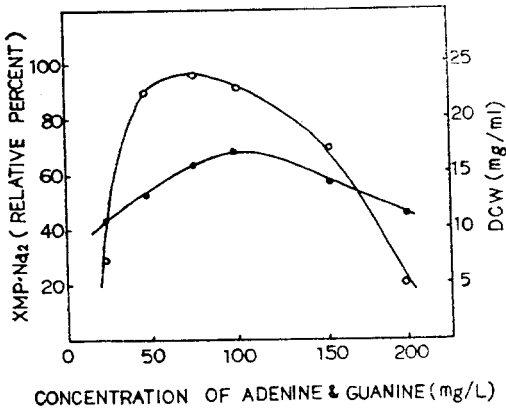


Fig. 2. Effect of adenine-guanine concentration on growth and XMP accumulation
●; Cell growth (DCW, mg/ml) and ○; relative concentration of 5'-XMP-Na₂ in culture broth(%)

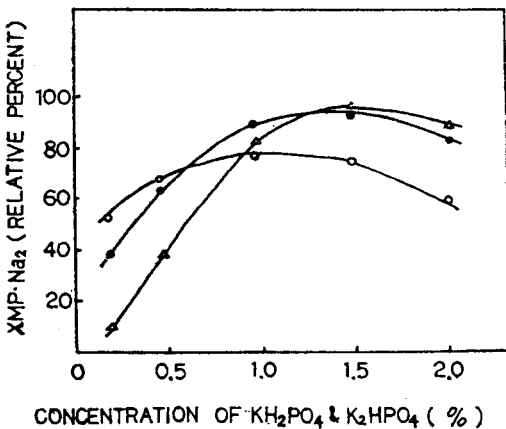


Fig. 3. Effect of phosphate and magnesium concentration on XMP accumulation
The concentration of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: ○; 0.5%, ●; 1.0% and △; 1.5%

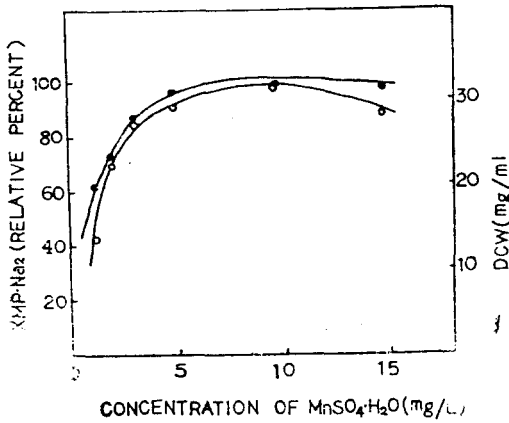


Fig. 4. Effect of Manganese concentration on growth and XMP accumulation
 ○; Cell growth(DCW, mg/ml) and ●; relative concentration of 5'-XMP·Na₂ in culture broth(%)

포형태가 밀접한 관계를 가지며, 고농도의 망간이온을 첨가하여 배양할 경우 세포형태는 배양초기의 coryne form 에서 rod form으로 변하면서 균중식이 많은 반면 5'-IMP 축적량은 적어진다. 그러나 30 µg/l 정도의 저농도에서는 배양 후기에 세포형태가 팽창된 방담이 형으로 변하여 5'-IMP의 세포의 축적이 많아진다고 보고되어 있다. 따라서 5'-IMP 발효에서는 망간이온이 5'-IMP의 세포막투과 mechanism과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있으나, D-1550-40에 의한 5'-XMP 발효의 경우는 5'-IMP 발효와는 달리 5'-XMP의 세포막 투과에 별다른 영향을 미치지 않으며 균체중식량에 비해 하여 생성된 5'-XMP가 바로 세포외로 투과되어 배지 중에 축적되는 것으로 생각된다.

Biotin의 영향

親株인 *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 와 그 變異株 D-1550-40은 모두 생육인자로서 biotin 을 요구한다. 따라서 배지중의 biotin의 최적농도를 결정하기 위해서는 adenine과 guanine농도와의 相互作用 및 效果를 검토할 필요가 있다. 망간과잉농도하에서 biotin과 adenine 및 guanine의 농도가 균중식 및 5'-XMP축적에 미치는 영향은 Fig. 5와 같다.

adenine과 guanine을 각각 25 mg/l 또는 100 mg/l 을 가한 경우, biotin농도를 0~100 µg/l까지 添加濃度를 높임으로써 균의 증식과 5'-XMP축적량이 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 前者는 定常狀態로 되고 後者는 定常狀態 또는 약간 減少되었다. 한편 adenine과

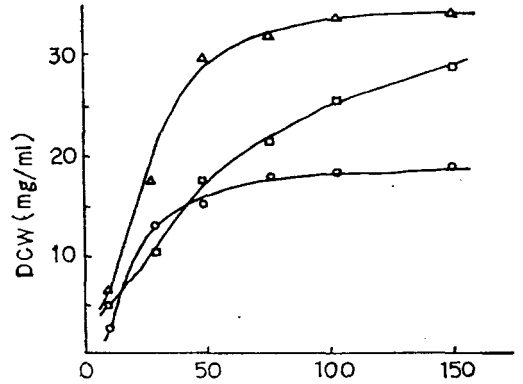


Fig. 5. Effect of biotin concentration on growth and XMP accumulation

The concentration of adenine-guanine :
 ○; 25 mg/l, △; 75 mg/l and □; 100 mg/l

guanine을 각각 75 mg/l 첨가한 경우는 균의 증식과 5'-XMP의 축적량 모두가 biotin첨가농도를 고농도로 하여도 증가되는 경향을 보였다. 그리고 biotin 15 µg/l 을 첨가할 경우에 균중식은 adenine-guanine농도 75 mg/l에서 좋았으나, 5'-XMP 축적에는 adenine-guanine 농도 100 mg/l가 제일 좋았다.

이와같은 결과를 볼 때 D-1500-40에 의한 5'-XMP 발효에서 biotin농도가 고농도의 adenine과 guanine에 의한 균생육 및 5'-XMP 축적저해를 어느정도 감소시키는 경향은 있으나, 5'-XMP축적량은 biotin보다 adenine과 guanine의 농도가 더 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

Casamino acid의 영향

Casamino acid는 5'-IMP 발효에서 균중식과 5'-IMP

생성량을 증가시킬 뿐 아니라 그 親株인 *Brevibacterium ammoniagenes* 역시 균중식을 촉진한다는 보고가 있다⁽¹⁴⁾. 5'-XMP발효에 미치는 casamino acid 첨가 효과를 조사하였다.

Table 1. Effect of casamino acids on growth and XMP accumulation

Concentration of adenine & guanine (mg/l)	Relative conc. of casamino acids (%)	Dry cell weight (mg/ml)	Relative conc. of XMP·Na ₂ (%)
23	0.0	14.6	17.4
	0.1	18.3	35.2
	0.3	17.2	55.0
	0.5	14.1	40.3
	1.0	13.9	36.2
75	0.0	18.5	74.2
	0.1	20.3	88.3
	0.3	26.2	100.0
	0.5	27.1	96.0
	1.0	25.9	85.6
100	0.0	10.4	50.3
	0.1	11.7	66.1
	0.3	17.4	77.8
	0.5	23.2	96.0
	1.0	24.0	94.5

Table 1에서 보는 바와같이 casamino acid는 biotin의 결과와 같이 균체증식과 5'-XMP축적에 있어서 adenine과 guanine에 의한 저해를 어느정도 감소시키는 경향이 보였으며, 그 최적첨가농도는 adenine-guanine 75 mg/l일 경우 casamino acid 0.3%이었다.

이와같이 biotin이나 casamino acid첨가가 adenine과 guanine에 의한 5'-XMP 생성저해를 어느정도 해제시켜주는 이유는 biotin 또는 casamino acid 중의 아미노산이 核酸代謝制御酵素에 관여하기 때문인 것으로 추측된다.

5'-XMP 발효중의 成分變化

위에서 검토한 배지성분중 adenine과 guanine을 각각 100 mg/l, biotin 100 µg/l 및 MnSO₄·H₂O 5 mg/l을 넣어서 5'-XMP를 발효시켜 경시적으로 본 발효액중의 각 성분변화를 보면 Fig. 6과 같다.

발효시작 1일후 배지중 함유된 잔존 포도당은 급격히 감소되면서 균중식이 활발히 진행되었고, 따라서 5'-XMP는 4일후 최대량 60.5 mg/ml가 축적되었다. 5'-

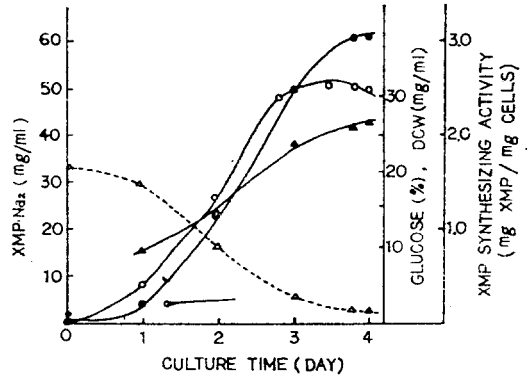


Fig. 6. Time course of XMP fermentation by D-1550-40 strain

Fermentation medium : 20% glucose, 1% KH₂PO₄, 1% K₂HPO₄, 1% MgSO₄·7H₂O, 1% (NH₄)₂SO₄, 0.01% CaCl₂·2H₂O, 5 mg/l MnSO₄·H₂O, 10 mg/l FeSO₄·7H₂O, 1 mg/l ZnSO₄·7H₂O, 5 mg/l thiamine·HCl, 5 mg/l β-alanine, 100 µg/l biotin and 100 mg/l each adenine and guanine. pH 8.3 before autoclaving. Fermentation was carried out aerobically for 4 days at 30°C.

△; Residual glucose(%), ●; Accumulation of 5'-XMP, ▲; XMP synthesizing activity and ○; Dry cell weight(mg/ml).

XMP 축적량은 Fig. 6에서와 같이 균체량에 비례하는 경향이 뚜렷하였으며 이를 단위 균체량당 5'-XMP 축적량 즉 5'-XMP 生成活性은 발효 2~3일간이 가장 높음을 알 수 있었다.

요 약

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6872를 변이하여 얻은 adenine-guanine 및 β-alanine 營養要求性이고 5'-XMP를 다량 생산하는 변이주 D-1550-40을 사용하여 醱酵培地成分의 最高濃度와 각 성분간의 相互作用效果를 검토하였다.

5'-XMP 蓄積에 필요한 adenine 및 guanine의 最適濃度는 각각 75 mg/l이었으나 生育에 대한 最適濃度는 이 보다 높은 100 mg/ml이었으며 그 이상의 농도에서는

5'-XMP 축적에 심한 저해를 초래하였다. 이러한 현상은 biotin을 100 $\mu\text{g/l}$ 이상 첨가하거나 casamino acid를 0.3% 이상 첨가함으로써 배제할 수 있었다.

5'-IMP 발효의 경우와 마찬가지로 無機磷酸鹽과 마그네슘염은 5'-XMP 축적에도 1.0~1.5%가 適當하였다.

MnSO_4 의 농도가 0~5 mg/l 의 범위 안에서 증가함에 따라 균중식과 5'-XMP의 축적은 촉진되었으나 그 이상의 농도에서는 변화가 없었고 정상상태를 나타내었다.

Adenine과 guanine 각 100 mg/l , $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/l 및 biotin 100 $\mu\text{g/l}$ 가 함유된 발효배지에서 배양한 결과 4일후 60.5 mg/ml 의 5'-XMP가 축적되었으며, 5'-XMP의 生成活性은 菌體量에 비례하여 배양 2일 내지 3일에서 가장 높았다.

문 헌

1. Kuninaka, K.: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **34**, 489 (1960)
2. 襄鍾燾, 孫忠弘, 孔雲泳, 張旭, 柳洲鉉: 韓國微生物學會誌, **7(3)**, 119 (1979)
3. 襄鍾燾, 孫忠弘, 孔雲泳, 柳洲鉉: 韓國微生物學會誌, **7(3)**, 127 (1979)
4. Misawa, M., Nara, T., Udagawa, K., Abe, S. and Kinoshita, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 688 (1964)
5. Demain, A. L., Jackson, M., Vitali, R. A., Hendlin D. and Jacob T. A.: *Appl. Microbiol.*, **13**, 757 (1965)
6. 黃鍾仁, 孫忠弘, 田鎔燮: 大韓民國特許 第6844號 (1979)
7. Bennett, M. C.: *J. Agr. Food Chem.*, **25**, 219 (1977)
8. Misawa, M., Nara, T., Udagawa, K., Abe, S. and Kinoshita, S.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, **19**, 143 (1969)
9. Misawa, M., Nara, T. and Kinoshita, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 694 (1964)
10. Nara, T., Misawa, M. and Kinoshita, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1351 (1967)
11. Nara, T., Misawa, M. and Kinoshita, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 1153 (1968)
12. Nara, T., Misawa, M., Komura, T. and Kinoshita, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1224 (1967)
13. Nakayama, K., Nara, T., Tanaka, H., Sato, Z., Misawa, M. and Kinoshita, S.: *Amino Acid and Nucleic acid*, **10**, 112 (1964)
14. Furuya, A., Abe, S. and Kinoshita, S.: *Appl. Microbiol.*, **16(7)**, 981 (1968)