

微生物에 의한 5'-이노신酸的 生産에 관한 研究

(第 2 報) *Brevibacterium ammoniagenes* 變異株에 의한 5'-이노신酸的
生成에 미치는 炭素源과 Purine 鹽基의 影響

高重煥, 孔雲泳, 孫忠弘, 裊鐘燦, *飯塚廣, **柳洲鉉

第一製糖株式會社 食品研究所, *東京理化學大學,

**延世大學校 食品工學科

(1981년 3월 13일 수리)

Studies on the Fermentative Production of Inosine 5'-monophosphate by Microorganisms.

(Part II) Effects of Carbon Source and Purine Base on Inosine
5'-monophosphate Accumulation by a Mutant of *Brevibacterium ammoniagenes*

Jung Hwan Ko, Un Young Kong, Choong Hong Son,
Jong Chan Bae, * Hiroshi Iizuka and **Ju Hyun Yu.

Foods Research and Development Center, Cheil Sugar Co., Ltd, Seoul, Korea.

*Science University of Tokyo, Japan.

**Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea.

(Received March 13, 1981)

Abstract

The effect of growth and the carbon sources including the molar ratio of fructose to glucose was studied for the maximization of inosine-5'-monophosphate (5'-IMP) production from *Brevibacterium ammoniagenes* D-21530. According to experimental results, fructose was more efficient to 5'-IMP accumulation than glucose, while the latter was better for the cell growth than the former.

To synchronously use glucose and fructose as carbon source is to optimally control the cell growth and maximum production of 5'-IMP without change of other conditions. The optimal weight percent of fructose to sum of glucose and fructose was 20~40%, and the productivity improvement over the utilization of fructose was about 40%. And also the optimality of purine base such as adenine and guanine were considered. The optimal concentrations of adenine and guanine were near 50mg/l.

緒 論

微生物을 이용한 5'-이노신酸(以下 5'-IMP 로 略

함)의 製造方法이 과거 20여년 간 日本을 비롯한 세계 각국에서 활발히 연구되어 왔으며(1~4) 工業的 生産을 가능케 하는 變異株들이 개발되었다. 이 變

異株들은 adenine 요구주, guanine 요구주, adenine-guanine 동시요구주이었다. 이들 變異株에 의한 5'-IMP 축적에는 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , 아미노산등이 다량 요구되며^(3,5,6), adenine, adenine (1980年10月25日, 韓國産業微生物學會, 第16次學術大會에서 發表)과 Mn^{++} , adenine 과 biotin 의 영향이 매우 큼을 알아내었고⁽⁷⁻¹¹⁾ 또한 5'-IMP 의 生成에 관계되는 酵素의 존재와 활성에 관한 연구^(12, 13)가 진행되어 5'-IMP 의 生合成 調節機作까지 밝혀졌다⁽¹⁴⁾. 국내에서도 1969년 金등에 의해 adenine 영양요구주의 분리에 관한 연구가 보고된 바 있고⁽¹⁵⁾ 1972년 裨등이 *Brevibacterium ammoniagenes* 에서 adenine 영양요구주를 분리하고 그 생산물을 분석하여 5'-IMP 임을 확인하였고^(16,17), 저자들도 adenine-guanine 동시 영양요구주이며 고농도의 5'-IMP 를 축적하는 *Brevibacterium ammoniagenes* 變異株를 개발하여⁽¹⁸⁾공업적으로 생산하기 시작했다.

5'-IMP 생산배지 중에서 주원료가 되는 炭素源으로는 대부분 glucose가 이용되었다. *Bacillus* 의 경우 maltose 를 사용하였으나⁽¹⁹⁾ 공업적으로 이용하기에 적당하지 않다. 본보에서는 adenine-guanine 동시요구주인 *Brevibacterium ammoniagenes* 를 사용하여 5'-IMP 의 생성에 미치는 炭素源과 adenine-guanine 의 영향을 조사하였다.

實驗材料 및 方法

(1) 使用菌株

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6872 를 變異시켜 얻은 5'-IMP 축적량이 많고 adenine-guanine 동시영양요구주인 D-21530 을 사용하였다.

(2) 培地組成 및 培養方法

종배양과 본배양의 기본배지는 Tab. 1 과 같은 조성으로 하였고, 이 배지를 120°C 에서 20분간 가압살균하여 냉각 후 사용하였다.

배양방법은, 보존균을 종배양액 25ml 를 넣은 500ml 삼각플라스크에 한 백금니 접종하여 30°C 에서 250rpm 으로 24시간 진탕배양을 시키고 이 종배양액 10ml 를 Jar Fermentor (MSJ-30, MARUBISHI Co.)에 넣은 새로운 종배지 12l 에 접종하여 30°C 에서 0.5VVM, 350rpm 으로 24시간 통기배양하였다. 이 종배양 완료액 1.2l 를 MSJ-30 Jar Fermentor 에 넣은 본배양액 10.8l 에 접종하여 30°C 에서 1VVM, 350rpm 으로 통기배양하면서 암모니아로 pH 를 7.0 으로 조절하였다.

Sucrose 가수분해액은 40% sucrose 용액에 inver-

Table 1. Composition of Media

Ingredients	Seed Medium	Fermentation* Medium
Glucose	50g/l	200g/l
KH_2PO_4	1g/l	10g/l
K_2HPO_4	1g/l	10g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1g/l	20g/l
Yeast extract	5g/l	5g/l
Meat extract	10g/l	5g/l
Peptone	5g/l	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.003g/l	0.005g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02g/l	0.010g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001g/l	0.01g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1g/l	0.1g/l
NaCl	2.5g/l	
Thiamine·HCl	0.005g/l	0.005g/l
Biotin	30μg/l	30μg/l
Adenine	0.15g/l	0.05g/l
Guanine	0.15g/l	0.05g/l
Urea	5g/l	
pH	7.2	7.2

*Nitrogen Source: NH_3

tase(7,000unit/g, SANKYO Co., Japan) 0.4% 를 가한후 55°C 에서 20시간 교반반응시켜 95% 이상 전이시킨 것을 이용하였다.

(3) 5'-IMP 의 定量方法

배지 중의 5'-IMP 의 정량은 high pressure liquid chromatography (WATERS ASSOCIATES Co., Model 440, 이하 HPLC 로 略稱)로 측정하였다. 이 때 사용한 HPLC 의 column 은 μ BONDAPAK C18, carrier fluid 는 0.01M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 이었고, 유속은 2ml/min. 로 하였다.

結果 및 考察

(1) 炭素源 종류의 菌의 生育과 5'-IMP 生成에 대한 영향.

Brevibacterium ammoniagenes D-21530 의 生育과 5'-IMP 生成에 미치는 炭素源의 영향을 알기 위하여 기본배지의 炭素源을 바꾸어 검토하였다. (Table 2) 單糖類중, galactose, mannose 에서는 菌이 生育되지 않아 5'-IMP 의 축적이 없었으나, glucose, fructose 에서는 菌이 生育하면서 5'-IMP 도 生成하였다. 二糖類인 sucrose, lactose, maltose 에서는 菌이 生育되지 않았으나 sucrose 를 invertase 로 가수분해한 액에서는 菌이 生育되고 5'-IMP 도

生成하였다. 이런 결과로 보아 이 菌은 二糖類와 單糖類 中 galactose와 mannose의 資化능력이 없음을 알 수 있었다. 資化성이 없는 sucrose를 가수분해한 액을 탄소원으로 사용한 경우, 菌이 生育되고 5'-IMP가 生成된 것은 invertase의 반응에 의하여 sucrose가 glucose와 fructose의 상태로 분해되어 존재하기 때문이라 생각된다. 그리고 이 경우 glucose와 fructose를 단독으로 이용할 때 보다 많은 양의 5'-IMP를 축적하였다.

Table 2. Cell Growth and 5'-IMP Production by *Br. ammoniagenes* D-21530 According to Various Carbon Sources.

Carbon source	Final OD ₆₇₀ (×100)	IMP Concentration (Relative %)	Growth
Glucose	0.87	56	+
Fructose	0.61	70	+
Galactose	—	—	—
Mannose	—	—	—
Sucrose	—	—	—
Lactose	—	—	—
Maltose	—	—	—
Sucrose hydrolysat [*]	0.76	100	+

^{*}Sucrose was hydrolysed by invertase

資化성이 있는 糖, glucose, fructose와 sucrose가 가수분해액을 각각 炭素源으로 사용하여, 경시적으로 菌의 生育(Fig. 1)과 5'-IMP의 生成(Fig. 2)을 검토하였다. Glucose는 fructose에 비하여 菌의 生育速度도 빠르고 최종 生育量도 많았으나 5'-IMP의 최종 축적량은 제일 적었다. 반면 fructose는 glucose에 비하여 菌의 生育速度가 느리고 최종 生育량은 적으며 5'-IMP의 生成速度는 느리나 최종 축적량은 많았다. Fructose는 glucose보다 더 많은 양의 5'-IMP를 축적하나 가격이 비싸고 배양시간이 길기 때문에 공업적으로 사용하기에 적당치 않으므로 sucrose를 invertase로 가수분해하여 glucose와 fructose의 mole비가 1對1로 존재하는 액을 탄소원으로 사용한 결과, 菌의 生育速度와 최종 生育량은 glucose와 fructose의 중간이었고 5'-IMP의 生成速度는 다른 糖에 비하여 빠르고 최종축적량은 제일 많았다.

위의 결과로부터, 5'-IMP 生成에 가장 적당한 菌體농도를 유지시켜 당의 소모를 적게하고 5'-IMP

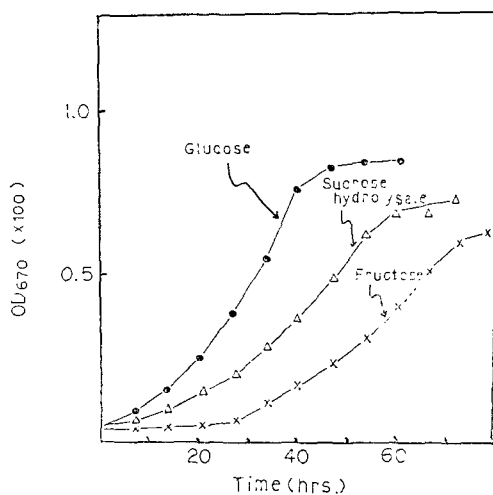


Fig. 1. Growth Response of D-21530 to Various Carbon Sources.

生成이외로 가는 대사를 억제함으로써 5'-IMP 生成대사과정이 효율적으로 진행되리라 생각되므로 菌의 生育速度가 빠른 glucose와 5'-IMP의 生成에 좋은 fructose의 특성을 활용하여 5'-IMP의 수율을 높이기 위하여 炭素源으로서 glucose와 fructose를 각각 다른 비율로 혼합하여 검토하였다. (Fig. 3) Fructose의 함유비가 증가함에 따라 5'-IMP 生成의 최대치에 도달하는 배양시간이 길어지

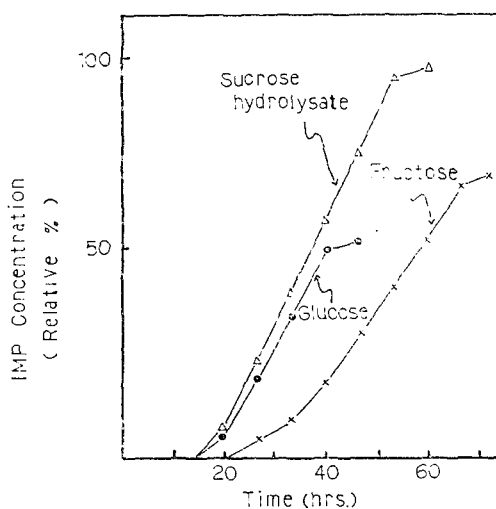


Fig. 2. IMP Production by D-21530 to Various Carbon Sources.

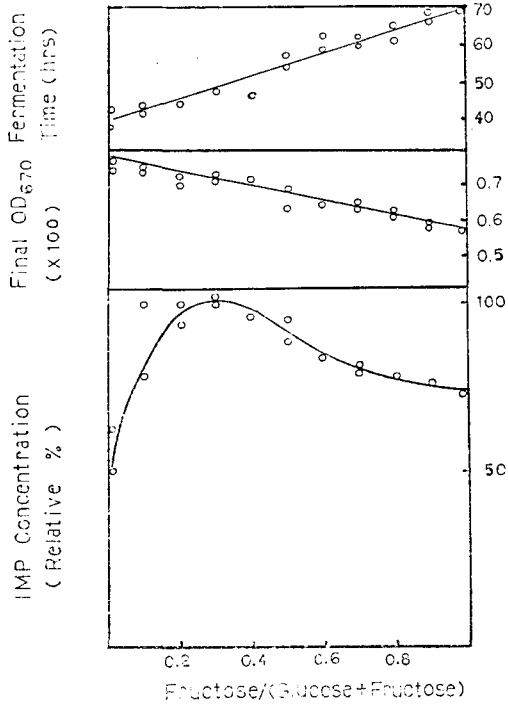


Fig. 3. IMP Production According to the Ratios of Fructose to Glucose.

고 菌體生成量이 적어졌다. 5'-IMP 生成에 대한 fructose의 최적비율은 20~40%이었다. 따라서 菌 증식을 목적으로 하는 종배양의 경우는 炭素源으로 glucose를 단독으로 사용하는 것이 효율적이며 본배양시 glucose와 fructose의 혼합비를 적당히 하여줌으로써 5'-IMP의 生成을 더 향상시킬 수 있음을 알았다.

(2) Adenine guanine 이 미치는 菌의 生育과 5'-IMP 生成

核酸生成菌은 영양요구성물질의 종류와 농도에 따라 菌의 生育과 核酸의 生成이 다르며⁽²⁰⁾, *Brevibacterium ammoniagenes* D-21530은 adenine-guanine 동시 요구주이므로⁽¹⁸⁾ glucose와 fructose를 3對7로 혼합하여 炭素源으로 사용한 배지에 adenine과 guanine을 1對1로 혼합하여 40시간 배양하였을 때 purine 농도의 영향을 검토하였다. (Table. 3) 菌의 生育은 purine 농도 150mg/l까지는 증가되었으나 그 이상의 농도에서는 정상상태였다. 5'-IMP 生成은 purine 첨가농도 50mg/l에서 배양한 것이 가장 좋았다.

Table 3. 5'-IMP Production by *Br. ammoniagenes* D-21530 According to the Concentration of Adenine and Guanine.

Purine Base (mg/l)	Time (hrs)	OD ₆₇₀ (×100)	Residual Sugar Concentration (%)	IMP Concentration (Relative %)
25	40	0.32	3.8	77
50	40	0.60	1.4	100
100	40	0.79	1.6	80
150	40	0.89	1.4	64
200	40	0.88	1.5	60
250	40	0.90	1.3	59

酸酵에 의하여 糖이 소비되어 배지 중의 殘糖量이 1.5%될 때까지 菌生育(Fig. 4)과 5'-IMP 生成(Fig. 5)을 경시적으로 검토한 결과, purine 농도가 높을수록 菌生育速度와 당소모속도가 빠르며 최종 生育量도 많았으나 5'-IMP 生成에 대한 purine 첨가의 최적농도는 50mg/l 이고 그 이상의 농도에서는 약간 감소하였다. 이와같이 purine을 5'-IMP 生成의 최적첨가농도보다 많이 첨가하였을 경우에는 菌生育이 촉진되고 5'-IMP 生成으로 가는 대사과정이 다소 비 효율적으로 진행됨을 알 수 있었다.

사용된 배지성분들이 5'-IMP 生成에 효율적으로

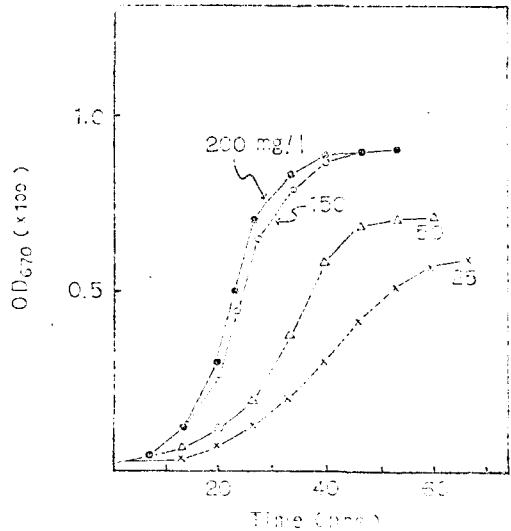


Fig. 4. Growth Response of D-21530 to Concentration of Adenine and Guanine

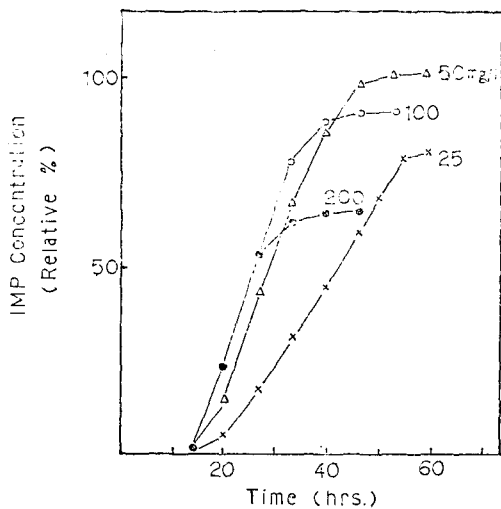


Fig. 5. IMP Production by D-21530 to Concentration of Adenine and Guanine.

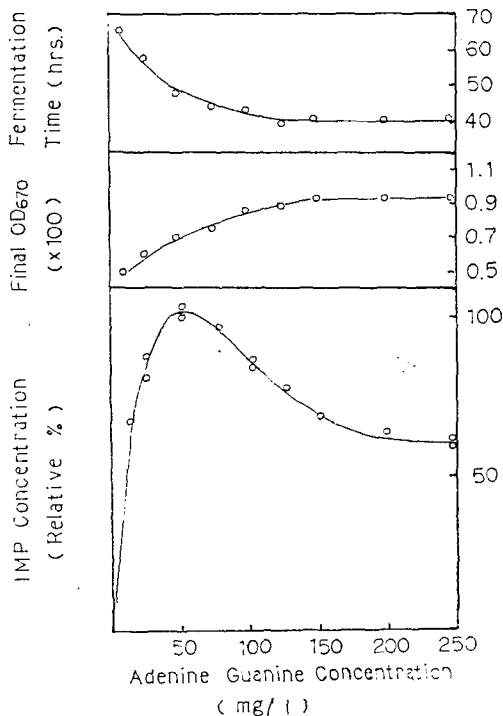


Fig. 6. IMP Production According to the Concentration of Adenine and Guanine.

이용되도록 하기 위하여 菌體生合成을 적정한 수준으로 유지시킬 필요가 있었다. purine 농도변화에 따라 최종 菌生育量, 培養時間, 5'-IMP 生成量の 상호관계를 비교한 결과 (Fig. 6), 50mg/l 근처에서 菌體가 적절히 生育되고 5'-IMP 生成이 최대였다. 菌體増殖을 목적으로 하는 種培養의 경우는 生育速度가 빠르고 최종 生育量이 더 이상 증가되지 않는 150mg/l 를 사용하는 것이 효과적이라 생각된다.

要約

Adenine-guanine 동시영양요구성인 *Brevibacterium ammoniagenes* D-21530 을 사용하여 5'-IMP 을 생산할 경우, 5'-IMP 생성에는 탄소원으로 fructose 가 glucose 보다 효율적이었다. 반면에 균생육에는 glucose 를 탄소원으로 사용하는 것이 좋았다. Glucose 와 fructose 를 혼합하여 사용할때 균생육을 적절히 조절하여 5'-IMP 축적을 증가시킬 수 있었으며 fructose 와 glucose 의 혼합당에 있는 fructose 의 함유율을 20~40% 범위로 하였을 때 5'-IMP 생성이 최대가 되었고 fructose 단독으로 사용할 때보다 약 40% 증가되었다. 또한 영양요구성물질인 adenine 과 guanine 의 첨가농도가 증가함에 따라 균생육이 촉진되나 150mg/l 이상에서는 정상상태였고, 5'-IMP 생성은 50mg/l 까지는 첨가농도에 따라 급격히 증가하나 그 이상에서는 감소하였다.

參考文獻

- 1) M. Fujimoto and K. Uchita, Agr. Biol. Chem., **29**, 249 (1965)
- 2) S. Imada, I. Nogami, Y. Nakao and S. Igarashi, Ann. Rept. Takeda Res. Lab. (Japanese), **23**, 54 (1964)
- 3) T. Nara, M. Misawa and S. Kinoshita, Agr. Biol. Chem., **31**, 1351 (1967)
- 4) J. Schwartz and P. Margarith, J. Appl. Bact., **34**, 348 (1971)
- 5) T. Nara, M. Misawa and S. Kinoshita, Agr. Biol. Chem., **32**, 1153 (1968)
- 6) T. Komuro, T. Nara, M. Misawa and S. Kinoshita, Agr. Biol. Chem., **33**, 1018 (1969)
- 7) A. Furuya, S. Abe and S. Kinoshita, Agr. Biol. Chem., **34**, 210 (1970)
- 8) T. Nara, M. Misawa, T. Komuro and S.

- Kinoshita, *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1198 (1969)
- 9) A. Furuya, S. Abe and S. Kinoshita, *Appl. Microbiol.*, **16**, 981 (1968)
- 10) T. Nara, T. Komuro, M. Misawa and S. Kinoshita, *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1030 (1969)
- 11) A. Furuya, S. Abe and S. Kinoshita, *Appl. Microbiol.*, **18**, 977 (1969)
- 12) H. Momose, H. Nishikawa and N. Katsuya, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10**, 343 (1964)
- 13) A. L. Demain and D. Hendlin, *J. Bact.*, **94**, (1967)
- 14) T. Nara, T. Komuro, M. Misawa and S. Kinoshita, *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 739(1969)
- 15) 金浩植, 李春寧, 李啓湖, 金尙淳, *農化學會誌* **11**, 137 (1969)
- 16) 裴武, 李啓準, *한국미생물학회지*, **10**, 73 (1972)
- 17) 裴武, 李啓準, *한국미생물학회지*, **10**, 109 (1972)
- 18) 裴鐘燾, 孔雲泳, 孫忠弘, 張旭, 柳洲鉉, *한국산업미생물학회지*, **7**, 119 (1979)
- 19) I. Nogami, M. Kida, T. Iijima and M. Yoneda, *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 144 (1968)
- 20) I. Shiio and K. Ishii, *J. Biochem. (Tokyo)*, **69**, 339 (1971)