Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 12, No. 4, 265 – 270(1984)

螢光細菌 *Beneckea sp.* 에 의한 Pyruvic Acid의 生産

李旺植・方元基・金政会*

고려대학교 농과대학 농화학과
한국과학기술원 생물공학과*
(1984년 8월 7일 수리)

Production of Pyruvic Acid by Luminescent Bacterium *Beneckea sp.*

Wang Sik Lee, Won Gi Bang and Jung Hoe Kim*

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
Korea University
Department of Biological Science & Engineering,
Korea Advanced Institute of Science and Technology*
(Received August 7, 1984)

Luminous marine bacteria which have ability to produce pyruvic acid were isolated from fresh fishes. Among them, newly isolated bacterium BL-1980 having the highest ability to produce pyruvic acid was selected and identified as *Beneckea sp.* Optimal conditions for the production of pyruvic acid from glucose by the bacterium BL-1980 were investigated. At the optimal conditions, 10.6g/L of pyruvic acid was produced at the conversion ratio of 35.33%.

Pyruvic acid는 糖대사뿐만 아니라, 단백질이나 지방대사에 있어서도 중추적인 역할을 하는 중요한 중간대사물질이다.[1] 그의 물리적 특성은 물, 알코올, 에테르에 溶性이고, 초산과 유사한 향기를 지니는 물질로서 알려져 있다.[2]

Glucose로부터 pyruvic acid로의 생화학적 전환 기작이 밝혀진 이후, 미생물을 사용하여 발효법으로 glucose로 부터 pyruvic acid를 생산하려는 시도가 소수의 연구자들에 의하여 수행되었다.[1,3-8]

발효법에 의한 pyruvic acid생산의 난점은 생체내 중간대사물질인 pyruvic acid가 매우 불안정하여 다른 물질로 즉시 전환되기 때문이다. 상기와 같은 이유로, 미생물에 의한 glucose로부터 pyruvic acid의 생산은 단지 pH stress, 산소제한(oxygen limitation) 혹은, 대사 저해에 따른 균체 생육의 異常현상을 야기시킴으로써 이루어질 수 있는 것으로 알려져 다.[9,10]

Pyruvic acid는 몇몇 amino acid를 생산하기 위하여 전구물질로 사용되기도 하였으나,[11-14] pyruvic acid가 비교적 값이 비싼 유기산이기 때문에 실제로 amino acid생산에 사용되지 못하고 있는 실정이다. 현재 pyruvic acid는 주로 생화학 정제시약(Fine biochemicals)으로서 생산되고 있다.

본 논문에서는 형광세균에 의한, glucose로 부터 pyruvic acid의 생산을 시도하였다. 형광세균의 일반적인 대사적 특성은 배양액중에 유기산을 생산하는 것이며, ***Photobacterium loignathi***를 제외하고는 배양액중에 pyruvic acid를 분비하는 것으로 알려져 있다.[10]

본 실험을 수행하기 위하여, pyruvic acid의 생산능을 지닌 형광세균을 분리, 동정하였으며, 이 형광세균에 의한 pyruvic acid의 생산최적조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 형광세균은 신선한 갈치(Hair-

tail), 고등어(Mackerel), 오징어(Squid), 방어(Yellow-tail)로 부터, Makiguchi등[18]의 방법에 의하여 분리하였다. 분리한 형광세균 중에서, glucose로부터 pyruvic acid생산능이 좋은 균주 BL-1980을 선별하여 사용하였다.

배지조성

균주를 분리하기 위한 배지는 glycerol 0.1%, peptone 1%, beef extract 0.3%, NaCl 3%, agar 1.5%를 포함하며, pH는 멸균전에 7.3으로 조절하였다.

균주를 보존하기 위한 배지는 上記배지중 glycerol을 0.3%로, NaCl을 2%로 각각 조정하여, 사면고체배지로 하여 사용하였다.

Pyruvic acid를 생산하는 균주의 선별을 위한 배지는 glucose 0.5%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%, beef extract 0.3%, NaCl 3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.75%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.15% 비율로하여, pH는 멸균전에 7.3으로 조절하여 사용하였다.

한편, pyruvic acid생산을 위한 전배양 배지는 glucose 1%, urea 0.15%, yeast extract 0.3%, NaCl 3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.05%로 조성하고 pH는 멸균전에 7.3으로 조절하여 사용하였다. 또한, 본 배양배지는 glucose 3%, urea 0.15%, yeast extract 0.3%, NaCl 3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%로 조성하고 배양중 pH의 변화를 감소시키기 위하여 완충제로서 KH_2PO_4 2.04%와 K_2HPO_4 2.6%를 첨가하였다. pH는 멸균전에 7.5로 조절하여 사용하였다. 모든 배지의 멸균은 121℃에서 15분간 고압살균을 행하였다.

균주배양

전배양은 28℃에서 왕복진탕(115~120strokes / min)으로 15시간 행하였다.

선별균주 BL-1980에 의한 glucose로부터 pyruvic acid생산시에는 pyruvic acid생산배지 100㎖씩 지닌 500㎖용 삼각플라스크에 전배양액 1㎖씩 접종하여 28℃에서 왕복진탕배양 (112 ~ 114 strokes/min)을 하였다.

균체생육도 측정

Spectrophotometer (Spectronic 20, Bausch&Lomb)를 사용하여 546nm에서 혼탁도를 측정하였다.

Pyruvic acid의 검색

Paper chromatography법[16]과 thin layer chromatography법[17,18]을 사용하여, 배양액중의 pyruvic acid를 검색하였다.

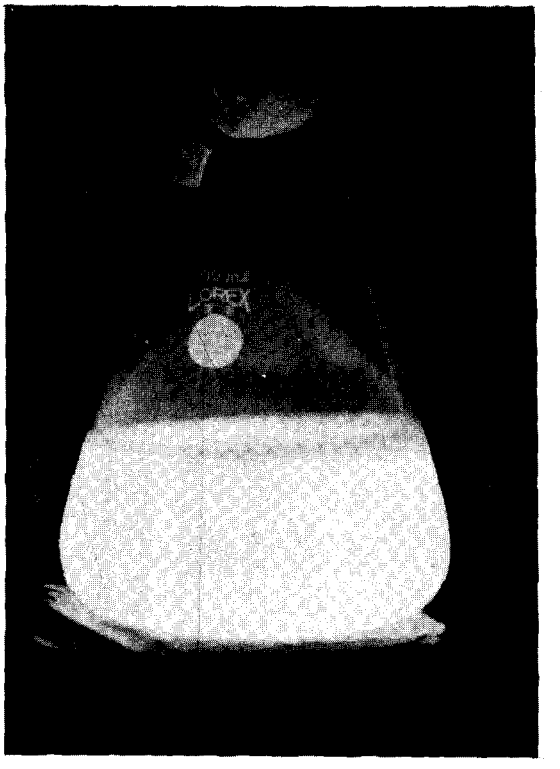

Fig. 1. Photograph taken with the light emission from bacterium BL-1980 grown in the liquid medium.

Paper chromatography법 사용시에는 Whatman No. 1 여지를 사용하였으며, 전개용매의 조성은 ether: acetic acid: water의 비율이 13 : 3 : 1이었다. Thin layer chromatography법 사용시에는 TLC plate (Silica Gel G-60, Merck, A. G.)를 사용하였으며, 전개용매의 조성은 chloroform:acetic acid의 비율이 100 : 7 이었다.

Glucose 및 Pyruvic acid의 정량

Miller등[19]의 방법에 의하여 glucose정량을, Friedemann등[20]의 방법에 의하여 pyruvic acid의 정량을 각각 하였다.

균주 동정 실험

선별균주 BL-1980의 동정을 위한 생리적 및 생화학적 실험은 Baumann등[21], Harrigan등[22], 그리고, Nealson등[23]의 방법에 의하였다.

결과 및 고찰

형광세균의 분리

신선한 갈치, 고등어 및 방어에서 채취한 세균

들 중에서 형광을 발하는 16개의 균주가 분리되었으며, 이들 중에서 세균 BL-1980의 형광성은 Fig. 1에서 보여주고 있다.

Pyruvic acid생산균주의 선별

형광을 발하는 16개의 균주의 pyruvic acid 생산능을 paper chromatography에 의하여 정성적으로 관찰한 결과, 갈치 (Hair-tail), 고등어 (Mackerel), 오징어 (Squid)에서 채취한 균주는 pyruvic acid생산 능이 없었으며, 방어 (Yellowtail)에서 분리한 균주만이 뚜렷한 pyruvic acid 생산능을 보여주었다. 이들의 pyruvic acid 생산능은 Table 1에서 보여주고 있으며, 본 실험에서는 가장 생산능이 좋은 BL-1980을 사용하였다.

Table 1. Production of pyruvic acid by isolated strains

Source	Strain	Pyruvic acid produced (g/100mL)
Hair-tail	BL-1968	–
	BL-1969	–
	BL-1970	–
	BL-1971	–
Mackerel	BL-1972	–
	BL-1973	–
	BL-1974	–
	BL-1975	–
Squid	BL-1976	–
	BL-1977	–
	BL-1978	–
	BL-1979	–
Yellow-tail	BL-1980	0.040
	BL-1981	0.021
	BL-1982	0.034
	BL-1983	0.016

Cultured in the preculture medium for 12hr at 28℃.

Pyruvic acid의 확인

선별된 형광세균 BL-1980에 의하여, glucose 로부터 생산된 물질은 pyruvic acid임이 paper chromatography법과 thin layer chromatography법에 의하여 확인되었다.

Fig. 2는 paper chromatogram상에 몇몇의 표준유기산과 배양액중의 유기산의 위치를 보여주고 있다.

Paper chromatography와 thin layer chromatography, 표준유기산과 배양액중의 유기산의 Rf값 비교에 의하여, 배양액중의 유기산이 pyruvic acid로 판명되었으며, 이때 pyruvic acid의 Rf값은 paper chromatography에서 0.51, thin layer chromatography에서 0.25와 0.36을 보여 주었다.

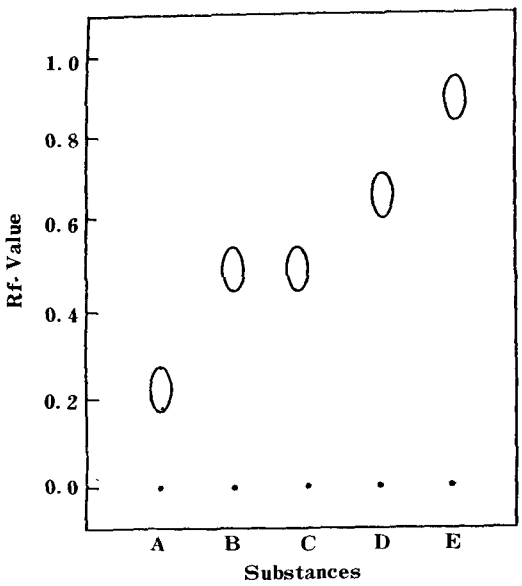

Fig. 2. Papaer chromatogram of culture broth and standard organic acids.

A: Citric Acid, B: Pyruvic Acid,
C: Culture Broth, D: Succinic Acid,
E: Fumaric Acid

Pyruvic acid 생산에 미치는 산소의 영향

Table 2에서 보는 바와같이, Pyruvic acid 생산에는 정치배양보다는 산소공급이 잘되는 진탕배양이 더 효과적인 것으로 판명되었으며, 진탕배양에 의한 pyruvic acid생산량은 정치배양에 의한 pyruvic

Table 2. Comparison of the production of pyruvic acid in static culture and shaking culture

	Static culture	Shaking** culture
Initial pH	7.5	7.5
Final pH	5.8	6.0
Glucose consumed (g/100mL)	1.94	2.30
Pyruvic acid produced (g/100mL)	0.14	0.73
Yield of pyruvic acid (%)*	7.20	31.70

* Yield $= \frac{\text{Product}}{\text{Glucose consumed}} \times 100\,(\%)$

**Cultured in a reciprocal shaker (112-114 strokes /min) at 28℃ for 35hr.

Table 3. Effect of glucose concentration on the production of pyruvic acid

Glucose concentration (%)	Cultivation time (hr)	Glucose consumed (g/100mL)	Pyruvic acid produced (g/100mL)	Conversion * (%)
2	30	1.96	0.44	22.0
3	45	2.42	0.68	22.6
4	50	2.60	0.75	18.7

$$*\text{Conversion} = \frac{\text{Product}}{\text{Initial Glucose}} \times 100\,(\%)$$

Cultured in a reciprocal shaker (112-114 strokes/min) at 28℃.

acid생산량보다 약 5배정도 더 많았다. 이 결과는 산소의 공급량이 pyruvic acid생산에 영향을 미친다는 Ruby등[9]과 Doudoroff[24]의 결과와 일치하는 것이었다.

Pyruvic acid생산에 미치는 기질농도의 영향

Pyruvic acid생산배지의 glucose농도를 2%, 3%, 4%로 변화시켜 배양한 결과, Table 3에서 보는 바와같이, pyruvic acid対糖수율은 3%의 glucose를 함유한 배지에서 22.6%로 가장 높았다. 한편, 2% 및 4%의 glucose를 사용하였을 경우에는 각각 약간 낮은 값을 보여 주었다.

Pyruvic acid생산에 미치는 초기 pH의 영향

Pyruvic acid생산배지의 초기 pH를 6.5에서 9.5까지 변화를 주어 배양한 결과, Table 4에서 보는 바와같이, 형광세균 BL-1980에 의한 pyruvic acid 생산능력은 초기 pH 9.0에서 가장 양호하였다.

Pyruvic acid생산에 미치는 補正 pH의 영향

Pyruvic acid생산배지의 초기 pH를 6.0에서 9.0까지 변화를 주어 배양하였으며, 배양중의 pH는 초기 pH와 일정하게 하기 위하여, 일정시간마다10 N-NaOH를 사용하여 보정하였다. Table 5에서 보는 바와같이, pH 6.5와 pH 7.0에서 pyruvic acid의 최대 생산량을 나타내었다. pH 7.0의 경우는 pH 6.5보다 24시간 빠르게 최대 생산량에 도달하였다.

Fig. 3은 배양중의 pH를 7.0으로 일정하게 보정하였을 경우, 균주의 생육도와 pyruvic acid 생산량 및 기질 소비량을 보여주고 있다. Fig. 3에서 보는 바와같이, 배양 60시간에 도달하였을 경우, 1.06g/100mL의 pyruvic acid가 생산되었다. 이때 사용한 기질 농도는 3%이었다.

Pyruvic acid 생산에 미치는 온도의 영향

배양액의 pH를 7.0으로 조정하면서 23℃, 28℃, 33℃에서 배양하였다.

Table 6에서 보는 바와같이, Pyruvic acid 생산 조건은 28℃가 최적이었으며, 이때 対糖수율은 35.33%이었다.

Table 4. Effect of initial pH on the production of pyruvic acid

Initial pH	Final pH	Glucose consumed (g/100mL)	Pyruvic acid produced (g/100mL)	Conversion (%)
6.5	6.1	0.83	0.12	4.0
7.0	6.5	1.10	0.30	10.0
7.5	5.8	2.57	0.62	20.67
8.0	5.8	2.63	0.70	23.33
8.5	5.8	2.59	0.70	23.33
9.0	6.0	2.76	0.74	24.67
9.5	6.5	2.28	0.53	17.67

Cultured in a reciprocal shaker (112-114 strokes /min) at 28℃ using production medium containing 3% of glucose.

Table 5. Effect of pH control on the production of pyruvic acid

Initial pH	Pyruvic acid produced (g/100mL)	Cultivation time (hr)
6.0	0.52	84
6.5	1.04	84
7.0	1.06	60
7.5	0.95	48
8.0	0.86	48
8.5	0.47	48
9.0	0.43	48

Initial pH was maintained during fermentation by addition of 10N-NaOH solution.

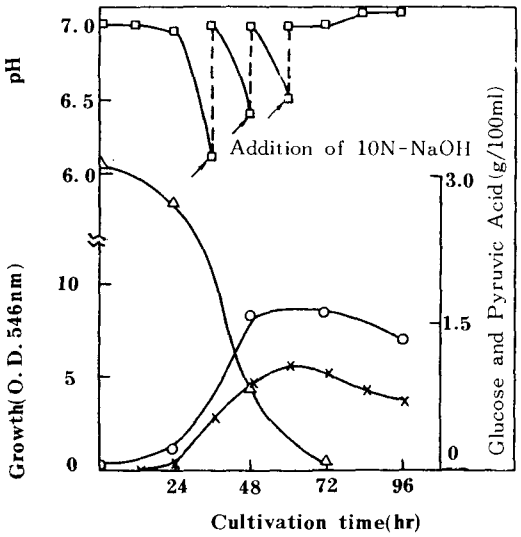

Fig. 3. Effect of pH 7.0 on the production of pyruvic acid.

—□— pH —○— Growth Curve
—△— Glucose —×— Pyruvic Acid

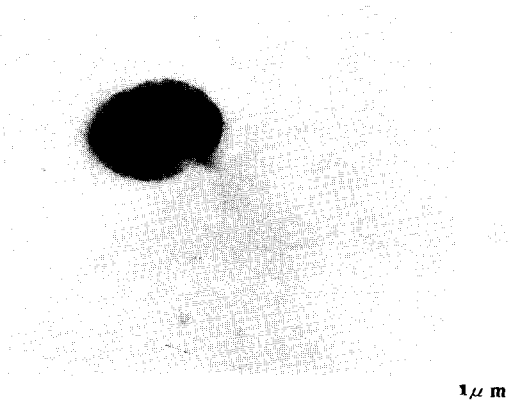

Fig. 4. Scanning electron micrograph of strain BL-1980.

Table 6. Effect of temperture on the production of pyruvic acid

Temperature (℃)	Cultivation time (hr)	Glucose consumed (g/100mL)	Pyruvic acid produced (g/100mL)	Conversion (%)
23	72	2.72	0.55	18.33
28	60	2.64	1.06	35.33
33	24	2.14	0.94	31.33

Cultured in a reciprocal shaker (112-114 strokes/min) using a production medium containing 3% of glucose

Table 7. Taxonomical properties of strain BL-1980

Morphological and Cultural Characteristics

Colonial morphology: Off-white, Circular, Convex

Gram stain: Negative

Shape: Coccobacilli

Size: 0.8-1.4 μm

Motility: Mobile by means of a single polar flagellum (Fig. 4)

Physiological Characteristics

Growth type: Facultatively anaerobic

Growth temperature: 4℃ : −
28℃ : +
45℃ : −

Luminescence: + (Fig. 1)

Gas production: −

0/129 Sensitivity: −

Indole production: +

Voges-Proskauer reaction: −

Methyl Red test: −

Carbohydrate metabolism (O/F medium): Fermentative

Enzyme production: Catalase: +
Oxidase: +
Cellulase: +
Gelatinase: +
Nitrate reductase: +
Amylase: +

Growth on: Maltose: +
Cellobiose: +
Mannitol: +
Proline: +
Lactate: +
Pyruvate: +
Acetate: +
Propionate: +
Tyrosine: +

+ : positive
− : negative
0/129 : 2, 4 − diamino − 6, 7 − diisopropylpteridine phosphate
O/F: oxidation/fermentation

9. 세균 균주 BL-1980의 동정

본 실험에 사용한 형광세균 BL-1980의 균학적 성질은 Table 7에 요약되어 있다.

본 균은 gram 음성균으로, 운동성을 지니며, 통성혐기성 短桿菌으로 관찰되었다.

Gas 생성, oxidase 실험, 0/129 sensitivity 측정에서는 음성, 발광성실험에서는 양성, O/F 배지에서는 발효성임을 보여주었다.

Fig. 1 의 사진은 본 균의 형광성을 보여주고 있으며, Fig. 4 는 고체 배지 상에서의 flagellum을 보여주고 있다.

이상의 결과로부터 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[25] 와 Baumann등 [21] 의 분류동정법에 의하여, 분리균주 BL-1980은 *Beneckea sp.* 로 동정되었다.

요 약

신선한 생선에서 분리한 형광세균들 중에서, glucose로부터 pyruvic acid생산능이 가장 좋은 균주 BL-1980을 선별하여, *Beneckea sp.* 로 동정하였다.

Glucose로부터 pyruvic acid생산을 위한 배양 최적조건이 검토되었으며, pH 7.0, 배양온도 28℃에서 60시간 진탕배양하였을때 10.6g/L의 pyruvic acid가 생산되었다. 또한, 이때 사용한 3%의 glucose로부터 pyruvic acid로의 전환율은 35.33%이었다.

참고문헌

1. 北原覚雄, 福井作蔵：醱酵工, **29**, 227 (1951)
2. Merck and Co., Inc. : *The Merck Index*, 9th ed., 1041 (1976)
3. 北原覚雄, 福井作蔵：醱酵工, **29**, 287 (1951)
4. Katagiri, H., Tochikura, T., and Imai, K. : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan.*, **21**(4), 215 (1957)
5. 斎藤健, 宇田川青, 阿部重雄: 農化, **35**(4), 313 (1961)
6. 阿部重雄, 斎藤健: 特許公報 昭40－13793 (1965)
7. Takao, S. and Tanida, M. : *J. Ferment. Technol.*, **60**(4), 277 (1982)
8. Moriguchi, M., Shuto, K., and Hashimoto, T. : *J. Ferment. Technol.*, **62**(3), 243 (1984)
9. Ruby, E. G. and Nealson, K. H. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**(2), 164 (1977)
10. Hastings, J. W. and Nealson, K. H. : *Ann. Rev. Microbiol.*, **31**, 549 (1977)
11. Kumagai, H., Tanaka, H., Sejima, S., and Yamada, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **41**(10), 2071 (1977)
12. Yamada, H. and Kumagai, H. : *Adv. Appl. Microbiol.*, **19**, 249 (1975)
13. P. Decottignies-Le Marechal, R. Calderon-Seguin, J. P. Vandecasteele, and R. Azerad: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, 33 (1979)
14. Yamada, H., Yoshida, H., Nakazawa, H., and Kumagai, H. : *Acta, Vitamin. Enzymol.* (Milano), **29**, 248 (1975)
15. Makiguchi, N., Arita, M., and Asai, Y. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **25**, 387 (1979)
16. Denison, F. W. Jr. and Phares, E. F. : *Anal. Chem.*, **24**(10), 1628 (1952)
17. Smith, I. and Seakins, J.W. T. : *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, William Heimann Medical Books Ltd., Vol. 1, 244 (1976)
18. Smith, I. and Seakins, J. W. T. : ibid, Vol. **1**, 253 (1976)
19. Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E., and Burton, A. L. : *Anal. Biochem.*, **2**, 127 (1960)
20. Friedemann, T. E. and Haugen, G. E. : *J. Biol. Chem.*, **147**, 415 (1943)
21. Baumann, P., Baumann, L., and Mandel, M. : *J. Bacteriol.*, **107**, 268 (1971)
22. Harrigan, W. R. and McCance, M. E. : *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*, Academic Press, New York, (1976)
23. Hastings, J. W. and Nealson, K. H. : *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, Berlin, 1332 (1981)
24. Doudoroff, M. : *J. Bacteriol.*, **44**, 461 (1942)
25. Bachanan, R. E. and Gibbons, N. E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 340 (1974)