KOREAN J. FOOD & NUTR
1(2) 37~42(1988)

*Brevibacterium ammoniagenes*의 영양구성 變異株에 依한 5 -*IMP* 生成

李 별나

대구공업 전문대학

식품영양학과

(1988. 11. 12 수리)

Production of 5 -IMP by Auxotroph of *Brevibacterium ammoniagenes*

Byulla Lee

Department of food and nutrition,
Taegu Technical Junior College.
(*Received November, 12, 1988*)

ABSTRACT

In attempts to obtain IMP Producting strains, *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 was treated with N.T.G. Adenine-guanine requiring mutants were obtained from *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872, and then a strain of them was selected for production of IMP and named *Brevibacterium ammoniagenes* No. 9(ade$^-$, gu$^-$). The production of IMP by *Brevibacterium ammoniagenes* No. 9 was about 3㎎/㎖ for 4 day of culture. The optimal concetration of adenine and guanine was 150㎎/㎖.

序 論

옛날부터 오징어, 다시마, 표고버섯은 식품의 지미성분을 갖고 있는 것으로 알려져 있으며 그 지미성분의 본체는 1961年 國中[1]에 의하여 5′-IMP, 5′-GMP 및 5′-XMP로 밝혀졌다. 이들은 purine nucleotide로서 단독으로 사용되기보다는 monosodium glutamate(MSG)에 少量添加함으로써 MSG의 감칠맛이 더욱 증가사는 것이 알려졌다. 또 이들의 화합물은 생체내의 핵산합성에 중요한 역할을 行하고 있는 것도 많은 연구자에 의해 보고되었다.[2,3] 이와같은 유용성이 알려짐에 따라 과거 몇 십년을 통해서 많은 연구자가 purine nucleotide 및 그 유도체에 관해서 연구 해 왔다.[4~7] 이들 화합물의 생산방식으로는 효모 ribo핵산의 분해추출법, 화학적합성법 및 발효법 등이 있으며, 발효생산균으로서는 *B. subtilis, Bre. ammoniagenes, B. megaterium, B. punilus, Corynebacterium glutamicum* 이 있다. 특히 이들 생산주에 의한 nucleotide 醱酵는 핵산生合成의 조절기구를 충분히 검토하고 그 억제계를 해제하지 않으면 안된다. 또한 nucleotide는 막을 투과하기 어렵고 세포막내의 효소에 의해서 분해되기 쉽다. 따라서 세포막투과성이 크고 생합성적으로 대사조절되는 영양요구성 변

이주를 얻는 方法이 연구되고 있다.

Purine nucleotide의 生合成경로는 1946年 Buchanan 등[8]에 의해 처음으로 연구되었으며 그 후 *Escherichia coli, Bacillus subtilis* 을 중심으로 차차 연구되어 오늘날에는 Fig. 1.과 같이 밝혀졌다. 이들 生合成경로가 밝혀짐에 따라서 미생물의 대사경로를 차단하여 목적으로하는 물질을 다량축적시키는 연구가 행해졌다.[9~11] Purine nucleotide 의

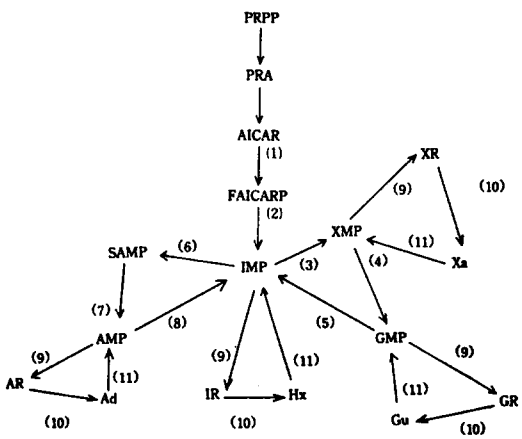

Fig. 1. Metabolism of purine nucleotide.

Abbre. PRPP ; 5－phosphoribosypyrophosphate
PRA ; 5－phosphoribosypylamine
AICAR ; 5－amino－4－imidazole carboxamide ribotide
FAICARP ; 5－formamide－4－imidazole carboxamide ribotide
IMP ; Inosine－5 －monophosphate,
XMP ; Xanthosine－5 －monophosphate
GMP ; Guanosine－5 monophosphate,
SAMP ; Succino－adenosine monophosphate
AMP ; Adenosine－5*monophosphate,
Gu ; Guanine, GR ; Guanosine
Ad ; Adenine, AR ; Adenosine, IR ; Inosine, Hx ; Hypoxanthine
XR ; Xanthosine, Xa ; Xanthine

Enzymes ; (1)AICAR formyltransferase, (2) IMP cyclohydrase
(3)IMP dehydrogenase, (4)GMP synthetase, (5)GMP reductase
(6)SAMP synthetase, (7)SAMP lyase, (8)AMP deaminase
(9)Nucleotidase, (10)Nucleosidase, (11)Pyrophosphorylase

菌株가 이용되었으며, IMP의 축적을 위해서는 Fig. 2.에서와 같이 adenine과 guanine 또는 xanthine 영양요구주가 다량축적가능하였고, XMP의 축적을 위해서는 adenine과 guanine의 영양요구주가 다량축적하는 것으로 알려졌다. 또한 GMP축적을 위해서는 대사경로를 차단한 영양요구성 변이주를 얻는 것이 많은 문제점과 난점을 갖고 있으므로 영양요구성 변이주가 이용되고 있지 않는 실정이다.

한편 생산균의 능력을 충분하게 발휘시키기 위해서는 그 배양관리 및 배지조성이 중요하다. 따라서 본 논문에서는 purine nucleptode 생합성계의 조절기구에 대하여 서술하고 *Bre. ammoniagenes* ATCC6872로 부터 영양요구성 변이주를 分離하고 이를 利用하여 5′－IMP의 生成과 培地組成을 검토하였다.

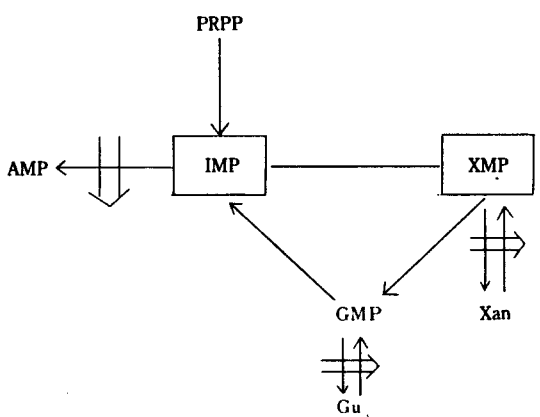

Fig. 2. Genetic block of IMP Producer and XMP Producer mutants.
IMP Producer(ade⁻, gu⁻ or xan⁻), XMP Producer(ade⁻, gu⁻) Genetic block

實驗材料 및 方法

(1)使用菌株

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6872를 N.T.G. (N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine)처리하여 5'-IMP의 生成量이 높은 *Brevibacterium ammoniagenes* No. 9(ade⁻, gu⁻)을 얻어 본 실험에 사용하였다.

(2)培地組成 및 醱酵方法

Brevibacterium ammoniagenes ATTC 6872로부터 영양요구성 변이주를 얻기 위하여 table 1에 나타난 완전배지와 최소배지[12]에 각각 成長反應을 살펴보았다. 얻어진 영양요구성 변이주는 2% agar를 添加한 nutrient slant 培地에 보존하였으며, 生成物을 조사하기 위하여 접종배지와 醱酵培地를 각각 사용하였다.

발효方法으로는 사면배지에서 성장한 영양요구성 변이주를 1백금이 취하여 250mℓ 삼각 플라스크내의 종 배지 20mℓ에 접종하고 24時間동안 30℃에서 진탕배양하였다(220r.p.m.). 진탕배양 후 배양액은 발효배지 10mℓ를 넣은 후 100mℓ 삼각플라스크에 각각 10%씩 접종하여 30℃에서 4~5日間 진탕배양하였다.

(3)영양요구성 변이주의 分離方法

사면배지에 성장한 *Brevibacterium ammoniagenes* ATTC 6872를 1백금이 취하여 접종배지에 접종하고 30℃에서 24時間 培養하였다. 그 후 Fig. 3.에서와 같이 원심분리하여 세척한 다음, 5mℓ의 생리식염수에 현탁하였다. 이 균체현탁액(약 10^5 cell/mℓ)에 N.T.G. 용액(100μg/mℓ)을 함유한 0.1M phosphate buffer 용액을 同量 혼합하여 실온에서 20~30分間 방치한 후 원심분리하여 2~3회 세척, 集菌하였다. 이를 적당한 농도로 희석하고 완전

Table 1.Media for Auxotroph Isolation and Fermentation

Seed medium(%)		Minimal medium(g/ℓ)		Complete(Fermentation)medium(g/ℓ)
glucose	2	glucose	20.0	100.0
peptone	1	$(NH_4)_2SO_4$	3.0	3.0
yeast extract	1	KH_2PO_4	1.0	10.0
NaCl	0.3	K_2HPO_4	3.0	10.0
pH	8.0	$MgSO_47H_2O$	0.3	10.0
		$CaCl_22H_2O$	10mg	0.1
		$FeSO_47H_2O$		10mg
		$ZnSO_47H_2O$		1mg
		$MnCl_24H_2O$		1mg
		Cysteine		20mg
		thiamine	5mg	5mg
		Ca-D-pantothenate	10mg	10mg
		*urea	2.0	6.0
		biotin	30μg	30μg
		pH	7.0	8.0

*; autoclaved seperately

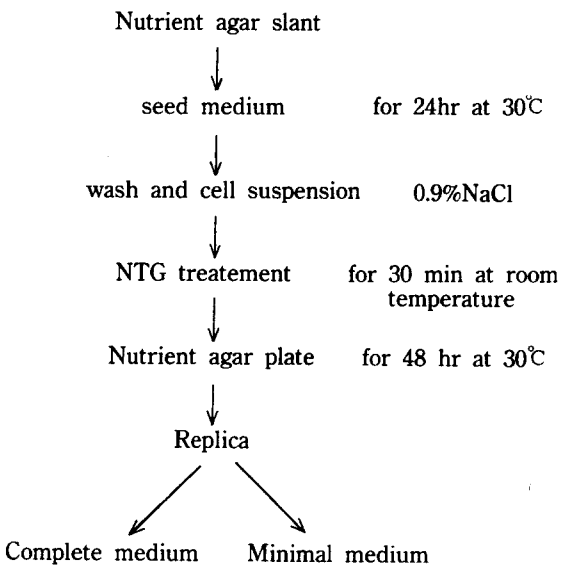

Fig. 3. NTG treatment and isolation of mutants.

평판배지에 일정량 塗抹하여 30℃에서 2-3일간 培養하였다. 이때 나타난 colony를 완전배지와 최소배지에 각각 移植하여 成長실험에 의해 변이주를 分離하였다.[13~15]

(4)分析方法

培養液中의 5′-IMP와 Hx의 分析은 paper chromatography에 의해서 行해졌다.[16] 즉 전개용매로는 isobutyric acid와 0.5N NH_4OH(5 : 3v/v)을 사용하였으며 실온에서 약 12時間 전개 후 표준용매와 동일한 Rf치의 자외선 흡수부분을 절취하여 0.1N HCl로 1日 추출한 후 spectrophotometer(Hitachi model) 250nm에서 측정하여 定量하였다.

菌株의 生育度測定은 배양액에 0.1N HCl을 적당량 加하여 배양액을 투명하게 한 후 적당히 희석하여 spectrophotometer 660nm에서 흡광도를 측정하였다.[17]

結果 및 考察

(1)*Bre. ammoniagenes* ATCC 6872로 부터 영양요구성 변이주의 分離.

Bre. ammoniagenes ATCC 6872로 부터 adenine과 guanine 영양요구성 변이주의 分離는 실험방법에 의해 NTG처리하여 table 2.에서와 같이 purine 염기를 添加한 최소배지에서 각각 成長反應을 살펴보았다. 야생주는 모든 배지에서 成長하였고, purine 요구성 변이주(Pur^-)는 adenine과 guanine 중 어느 한 가지만 添加한 배지에서도 성장하였다. adenine 要求性 변이주(ade^-)는 adenine을 添加한 배지에, adenine과 guanine 둘다 要求性 변이주(ade^-, gu^-)는 adenine과 guanine 둘다 添加한 배지에 각각 成長하였다. 菌株成長실험 결과로 얻은 변이주는 212균주로서, adenine 영양요구성 변이주가 31菌株, guanine 영양요구성 변이주가 14菌株, purine 영양요구성 변이주가 150菌株. adenine과

Table 2.Growth Response of Mutants

	Addition growth				
Phenotype	C	Ad+MM	Gu+MM	Ad+Gu+MM	none
Wild type	+	+	+	+	+
Ade^-	+	+	−	+	−
Gu^-	+	−	+	+	−
Ade^-,Gu^-	+	−	−	+	−
Pur^-	+	+	+	+	−

+ ; growth, − ; no growth

MM ; minimal medium, C ; complete medium

guanine 영양요구성 변이주가 17菌株로서 각각 分離되었다. 이들 영양 요구성 변이주 중에서 IMP 생합성 경로성의 효소, SAMP synthetase와 XMP aminase나 IMP dehydrogenase가 동시에 결손된 것으로 추측되는 adenine-guanine 영양요구성 변이주가 IMP나 XMP를 다량 축적하는 것이 알려졌다.[18] 본 실험결과에서도 分離한 영양요구성 변이주 중에서 菌株의 生育度가 양오하며 IMP 生成이 가장 높은 adenine-guanine 영양요구주를 선택하여 이를 *Brevibacterium ammoniagenes* No. 9(ade$^-$, gu$^-$)로 명명하였다.

(2)*Bre. ammoniagenes* No. 9(ade$^-$, gu$^-$)의 IMP 醱酵과정.

母菌인 *Bre. ammoniagenes* ATCC 6872는 배지 중의 염기, 즉 Hx, guanine 또는 adenine으로 부터 각각 IMP, GMP 및 AMP를 *salvage*合成에 의해 生成하는 것이 알려져 있다.[19] 本 實驗에서 얻어진 菌株, *Brevibacterium ammoniagenes* No. 9(ade$^-$, gu$^-$)의 IMP 醱酵는 Fig. 4. 에서와 같이 발효초기 1~2日동안에는 크게 증가하지 않았으나 3日후부터 급증하여 4日에 最大인 약 3㎎/㎖의 生成量을 나타내었고 Hx는 초기에 완만하였으나 3日에 最大를 나타내고 그 후 減少하였다. 균의 生育度는 1~3日사이에는 유도기를 나타내었으며 3~4日에는 대수기, 4~5日에 정상기에 달하였으며 그 때에 IMP 축적이 가장 증가하였다. 따라서 IMP 축적이 最大에 달한 培養 4日경을 살펴보면 Hx의 양이 감소하고 IMP가 축적한 것을 볼 수 있다. 이것은 처음에 *de novo*하게 生成된 Hx이 3日경과함에 따라 *salvage*合成에 의해 IMP로 전환된 것으로 생각된다.

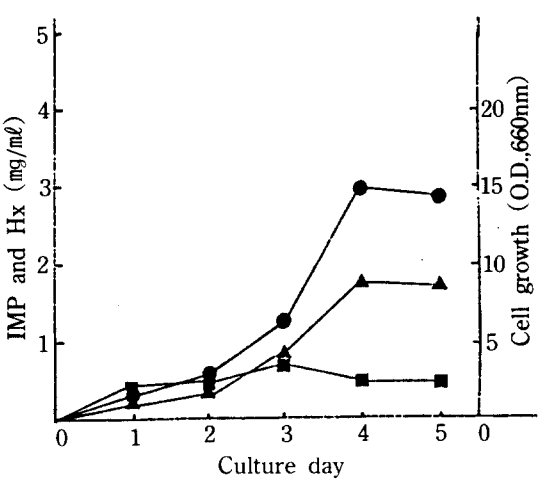

Fig. 4. IMP fermentation of *Brevibacterium ammoniagenes* No. 9(ade$^-$, gu$^-$).
The mufant was cultured in fermentation medium with a reciprocal shaker at 30℃.
IMP ; ●—●, Hx ; ■—■, cell growth ; ▲—▲

(3)adenine과 guanine 濃度에 따른 IMP 생성.

Brevibacterium ammoniagenes No. 9(ade$^-$, gu$^-$)의 醱酵培地에서 adenine과 guanine의 농도에 따른 최적조건을 살펴보았다. 그 결과는 Fig. 5.에서와 같이 adenine과 guanine의 농도가 150㎎/㎖일때에 가장 높은 IMP를 나타내었으며 그 以下일때도 減少하였고 그 以上일때도 감소하였다.

이것은 Misawa등[18]이 얻은 *Brevibacterium ammoniagenes* KY 3482-9-28로부터 IMP 醱酵와

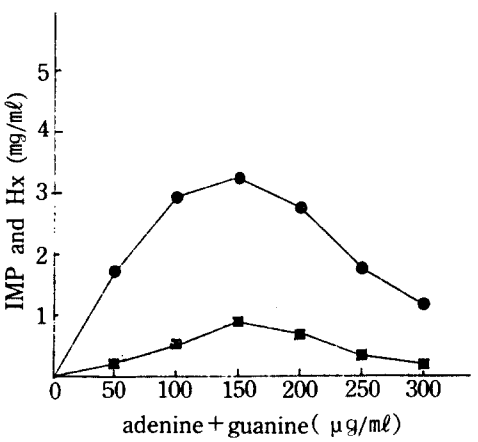

Fig. 5. Effect of adenine and guanine concentration on IMP accumulation by *Brevibacterium ammoniagenes* No. 9.
The mutant was cultured in fermentation medium containing 50μg, 100μg, 150, 200 and 300 μg/mℓ of adenine and guanine. Cultivation was carried out at 30℃ for 4days, with a reciprocal shaker.
IMP ; ●—●, Hx ; ■—■

같은조건을 나타내었다. 또한 Hx의 生成量도 IMP의 生成과 비슷한 형태를 나타내어 IMP 生成이 많을때 Hx의 生成量도 증가하였다. 따라서 본 균으로부터 IMP 축적을 위해서는 IMP에서 Hx의 生成을 억제하는 것과 adenine과 guanine의 培地中의 濃度가 또한 중요한 것으로 나타났다.

要 約

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6872로부터 N.T.G. 처리하여 adenine-guanie 영양요구성 변이주, 즉 *Brevibacterium ammoniagenes* No. 9를 얻었으며, 이 균주는 그 生合成경로상의 효소, SAMP synthetase와 IMP dehydrogenase나 XMP aminase가 결여된 것으로 여겨진다. 本 實驗에서 이 菌株의 IMP 醱酵과정에서는 배양 4日경에 최대의 IMP를 生成하였고 그 때에 Hx는 減少하였으므로 이는 *salvage*合成에 의해 Hx의 IMP로 전환된 것으로 생각된다. 또한 배지中의 adenine과 guanine의 최적농도는 150㎎/㎖로서 adenine과 guanine의 培地中의 농도가 IMP醱酵에 크게 영향을 미쳤다.

참 고 문 헌

(1) 国中明, "蛋核酵" 6, 403 (1961)
(2) 栃倉辰六郎, 發酵と工業, 特集シリーズ, 462 (1986)
(3) 緒方浩一, 木下祝郎, 角田俊直, 相田浩, "核酸發酵" 講談社 (1977)
(4) H. Machida and A. Kuninaka, *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 868 (1969)
(5) S. Mantani, J. Fukumoto and T. Yamamoto, *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 242 (1972)
(6) R.S. Makman and E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.*, **240**, 1309 (1965)
(7) T. Tochikura, H. Kawai, S. Tobe, K. Kawaguchi, M. Osugi and K. Ogata, *J. Ferment. Technol.*, **46**, 957 (1968)
(8) M. Buchanan and S. C. Hartman, "*Advances in Enzymology*" (ed. F.F. Nord), **21**, 199 Interscience. Publishers, New York (1959)
(9) S. Teshiba and A. Furuya, *Agr. Biol. Chem.*, **46** (9), 2257 (1982)
(10) K. Ishii and U. Shiio, *Agr. Biol. Chem.*, **36**(9), 1511 (1972)
(11) H. Momose, H. Nishikawa and N. Katsuya, *J. Gen. Appl. Microbial.*, **10**, 343 (1964)
(12) A. Furuya, S. Abe. and S. Kinoshita. Kinoshita, *Appied Microbiology* **16**(7), 981 (1968)
(13) S. P. Colowick and No O. Kaplan, "*Methods in Enzymology*," 1, 328 Academic press, New York (1955)
(14) C. Eklund and C. E. Lankford, "Laboratory Manual for General Microbiology" 21, Prentic-Hall Inc. (1977)
(15) J. H. Miller, "Experimeuts in Molecular Genetics" 121, Cold Spring Haber Laboratory (1972)
(16) T. Nara, M. Misawa and S. Kinoshita, *Agr. Biol. Chem.*, **32**(5), 561 (1968)
(17) H. Kase and K. Nakayama, *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 2021 (1974)
(18) M. Misawa, T. Nara and S. Kinoshita, *Agr. Biol. Chem.*, **33**(4), 514 (1969)
(19) T. Nara, M. Misawa and S. Kinoshita, Amino Acid Nucleic Acid, **16**, 54 (1967)