

Brevibacterium flavum ATCC 14067과 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032의 원형질체 융합에 의한 L-Methionine의 생산

빈재훈·정수자*·신동분**·류병호**

부산보건환경연구소, *부산여자전문대학 식품영양학과, **경성대학교 식품공학과

L-Methionine Production by Protoplast Fusion of *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Jae-Hoon Bin, Soo-Ja Chung*, Dong-Bun Shin** and Beung-Ho Ryu**

The Pusan Institute of Health and Environment

*Department of Food and Nutrition, Pusan Woman's Junior College

**Department of Food Science and Technology, KyungSung University

Abstract

This study was designed to investigate the productivity of L-methionine by the method of protoplast fusion between *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, and then L-methionine production was performed to continuous fermentation using the immobilized fusant cells. Mutants *B. flavum* K 104(thr⁻ met⁻ Km^r Et^r Sm^r Tm^r as genetic marker) and *C. glutamicum* B 70(thr⁻ hos⁻ Km^r Et^r Sm^r Tm^r as genetic marker) were isolated by MNGG treatment. On the other hand, protoplast of mutants were formed to treat with lysis solution containing 500 µg/ml of lysozyme. The ratios of protoplast formation and regeneration were 99% and 64~66% respectively. Fusion frequency between *B. flavum* K 104 and *C. glutamicum* B 70 showed the 3.5×10^{-5} in the 35% polyethylene glycol(PEG 6000) containing 3% PVP solution. The productivity of L-methionine by fusant BFCG 37 immobilized with sodium alginate was 0.89 g/l the batch fermentation and was 18.75 mg l⁻¹h⁻¹ on the continuous fermentation at 30°C for 72 hr.

Key words: fusion, immobilization, continuous fermentation

서 론

L-Methionine은 영양 및 생리학적으로 중요한 역할을 하는 유황을 함유한 필수아미노산으로서 음식물에서는 부족하기 쉽다. L-Methionine은 생체내에서 해독 기작에 관여하여 항지방간작용과 해독작용이 있으므로 급만성 간염 및 간경변 등의 간질환의 예방 및 치료제, 약물해독제, 아미노산수액 등의 의약품과 첨가물 그리고 배합 사료에 주로 이용되고 있으며 그 수요는 계속 증가하고 있는 실정이다⁽¹⁾. 현재 공업적으로 유기합성법에 의해 생산된 DL-methionine은 aminoacylase로 광분해를 행해야 하는 결점 때문에 미생물에 의한 발효생산에 관한 연구가 많이 진행되고 있다⁽²⁾.

L-Methionine을 생산하는데 이용되어지고 있는 미생물로서는 *Corynebacterium*^(3, 5), *Brevibacterium*^(6, 8), *Pseudomonas*⁽⁹⁾, *Bacillus*^(10, 11), *Arthrobacter*⁽¹²⁾ 그리고

Salmonella^(13, 14) 등의 세균과 *Candida*^(15, 16), *Saccharomyces*^(17, 18) 등의 효모가 이용되어지는 것으로 알려져 있으나 그 생산량은 아직 미미한 상태이다. 이와같은 생산성이 저조한 균주의 육종방법중 세포융합^(19, 23)과 균체고정화에 의한 연속 발효공정은 국내외적으로 많은 연구가 진행되어 발효생산성을 높였음을 보고하고 있다⁽²⁴⁻²⁷⁾.

따라서 본 연구는 아미노산 생산균주로 알려진 *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 및 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032를 변이된 처리를 행하여 genetic marker를 부여하고 이들 균주간의 세포융합을 시도하여 L-methionine 생산성이 뛰어난 균주를 분리하고 free cell 및 균체고정화 발효를 행하여 그 생산성을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용한 균주인 *Brevibacterium flavum* ATCC 14067는 한국종균협회(KFCC)에서 분양받았으며, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032는 일본

Corresponding author: Beung-Ho Ryu, Department of Science and Technology, KyungSung University 110-1, Daeyeon-dong, Namgu, Pusan 608-736, Korea

동경대학에서 분양받아 완전배지에 계대보존하여 사용하였다.

배지 및 시약

세포배양에 사용한 완전배지(complete medium : meat extract 10g, peptone 10g, glucose 20g, NaCl 5g, thiamine·HCl 200 µg/l, pH 7.0) 최소배지(minimum medium : glucose 20g, (NH₄)₂SO₄ 10g, KH₂PO₄ 1g, K₂HPO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.4g, NaCl 50 mg, FeSO₄·7H₂O 0.4g, NaCl 50 mg, FeSO₄·7H₂O 2 mg, MnSO₄·6H₂O 2 mg, biotin 50 mg, thiamine·HCl 200 µg/l, pH 7.0), 영양요구성 균주의 보존용 배지(SM, supplemented medium : glucose 20g, (NH₄)₂SO₄ 10g, KH₂PO₄ 1g, K₂HPO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.4, NaCl 50 mg, FeSO₄·7H₂O 2 mg, MnSO₄·6H₂O 2 mg, biotin 50 mg, thiamine·HCl 200 µg/l, pH 7.0), 원형질체의 재생에 사용한 재생용 완전배지(RCM, regeneration complete medium : meat extract 10g, peptone 10g, glucose 20g, NaCl 5g, sodium succinate 135g, thiamine·HCl 200 µg/l, pH 6.5) 및 L-methionine 생산용 배지(MPM, L-methionine production medium : peptone 2g, glucose 100g, corn steep liquor 6g, soybean acid hydrolysate 18g, (NH₄)₂SO₄ 40 g, K₂HPO₄ 0.6g, MgSO₄·7H₂O 0.4g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, biotin 20 µg, thiamine·HCl 100 µg, antifoamer 0.01 ml/l, pH 8.1)을 사용하였으며 세포융합에 사용한 MMYE의 조성은 최소배지에 yeast extract를 0.1% 첨가하여 사용하였다. 증충용 재생용 완전배지는 agar를 0.7% 첨가하여 사용하였으며 또한 세포융합에 사용한 각종 용액은 Kaneko 등의 방법⁽²⁹⁾에 따라 제조하여 사용하였다. 한편 본 실험에 사용한 시약으로서 streptomycin, kanamycin, penicillin-G, ethionine, selenomethionine, trifluoromethionine 및 methionine hydroxamate는 Sigma Co. 제품을, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)는 Aldrich Co.의 제품을, polyethylene glycol(PEG) #6000은 Wako Co., lysozyme은 Boehringer Mannheim Co.의 제품을 사용하였으며, 고정화 담체인 sodium alginate 및 agar는 Junsei Co., polyacrylamide는 Bio-Rad Co., κ-carageenan은 Sigma Co. 제품을 사용하였으며 silicon antiformer emulsion(DB-110A)은 Dow Corning Co. USA의 제품을 사용하였다.

변이주의 분리

대수증식기(1×10^8 cells/ml)의 배양액 20 ml을 8,000 rpm에서 5분간 원심분리(Beckman No. J2-21)하여 집균한 다음 Tris-buffer(pH 7.0)으로 2회 세척한 후 2×10^8 cells/ml 되게 현탁시켜 동일량의 MNNG 용액(500 µg/ml)을 가하여 30°C에서 30분간 변이시켰다.

이를 Tris-buffer로써 3회 세척하여 질소원을 제거하고 yeast extract를 0.1%되게 첨가한 최소액체배지에서 6시간 N-starvation시킨 후 penicillin-G 용액을 첨가하여

30°C에서 2시간 동안 변이주를 농축시켰다⁽²⁸⁾. penicillin-G로 농축한 균액을 casamino acid 1 mg/ml, nucleic acid 10 mg/ml와 약제로써 kanamycin 100 µg/ml, streptomycin 200 µg/ml를 첨가한 MM에 도말하여 30°C에서 3~7일간 배양하여 생성된 colony의 영양요구성 및 약제내성주를 검토하였으며⁽⁹⁾, Kase와 Nakayama의 방법⁽⁵⁾에 따라 methionine analog 내성주를 분리하였다.

원형질체의 형성과 융합

Kaneko와 Sakaguchi의 방법⁽²⁹⁾에 따라 MMYE에 분배양시킨 변이주를 1.5시간 동안 0.3 unit/ml의 penicillin-G로 처리한 후 Tris-buffer(pH 7.0)로 2회 세척하고, 0.4 M sucrose를 삼투안정제로 첨가한 희석용액에 현탁하여 lysozyme이 함유된 lysis solution를 동량첨가한 다음 33°C에서 3시간 처리하여 원형질체를 형성시켰다. 원형질체의 형성은 현미경을 사용하여 Haematocytometer (HAWKSLEY, England)에서 계측하였으며, 한편 멸균수에 희석하여 SM plate에 도말한 다음 생성되는 colony 수를 총세포수에서 감산한 수로 확인하였다. 그리고 형성된 원형질체를 희석용액에 희석하여 osmotic stabilizer로 0.4 M sodium succinate가 섞인 RCM(0.7% agar)과 잘 섞어 RCM plate(1.5% agar)에 pour plate하여 30°C에서 7~10일간 배양한 후 형성되는 colony를 관찰하였다.

한편 두 균주의 원형질체를 동량씩 섞어 원심분리(1,000 rpm, 4°C)하여 균체를 회수한 다음 희석용액으로 2회 세척하고 총량의 1/10배의 fusion solution에 재현탁시켜 polyethylene glycol(PEG) #6000 용액을 9/10 부피되게 첨가하여 최종농도 20~50%로 가하고 30°C에서 30분간 융합을 행하였다. 융합 후 원심분리(1,000 rpm, 10 min, 실온)하여 fusion solution으로 2회 세척한 다음 동일용액으로 희석하여 1.5% agar를 함유한 재생용 완전고체배지상에 약제와 함께 0.7% agar를 첨가한 재생용 완전고체배지와 융합균주를 잘 혼합하여 증충시킨 후 33°C의 항온기에서 7~10일간 배양하고 형성된 colony의 영양요구성 및 analog 내성을 검토하여 융합균주를 분리하였다.

균체고정화

완전배지에서 대수증식기 중기까지 배양시킨 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 5 min)하여 집균한 다음 Tris-buffer(pH 7.0)로써 3회 세척한 후 고정화에 사용하였다. 균체고정화를 위한 담체를 선정하기 위하여 7% polyacrylamide, 1.5% agar, 2.5% κ-carageenan 및 3% sodium alginate를 사용하였고 각종 담체와 균체를 혼합한 후 19~26 gauge 주사기를 통해 0.1 M-CaCl₂ 용액에 적하하여 고정화를 시켰으며, 고정화 bead는 0.025 M CaCl₂ 용액에 침지하여 4°C에서 12시간 숙성시킨 뒤 활성화시켜 사용하였다.

Bead내의 생존지수(viability index : V.I.)는 bead를

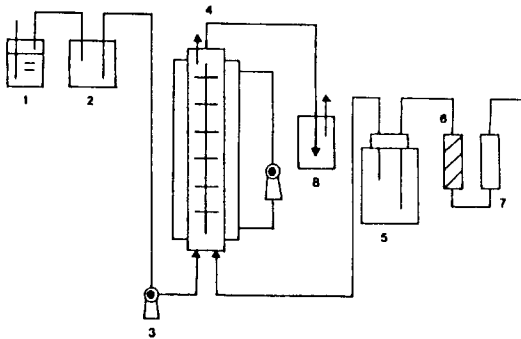


Fig. 1. Schematic diagram of continuous-air-lift tube fermentor

- 1. Bottle with conc-H₂SO₄, 2. Medium reservoir, 3. Peristaltic pump, 4. Fermentor, 5. Humidifier, 6. Air filter, 7. Rotameter, 8. Product reservoir

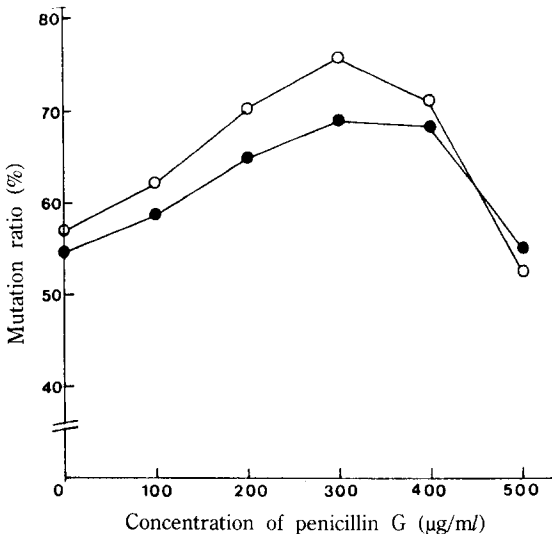


Fig. 2. Effect of various concentration of penicillin-G on the mutation ratio

○—○; *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, ●—●; *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

10% sodium tripolyphosphate 용액에 용해한 다음 Ringer 용액으로 희석하여 methylene blue 염색법으로 생균수를 측정하였으며, 시간의 경과에 따른 배지 중의 free cell 수는 Haematocytometer를 이용하여 계측하였다.

회분 및 연속식 메티오닌 발효

회분식 배양을 위하여 free cell 및 고정화 bead를 MPM 100 ml를 넣은 500 ml 삼각플라스크에서 교반속도 300 rpm, 30°C에서 96시간 발효시켰다. 한편 연속발효를 위하여 Fig. 1과 같은 연속기포관 발효조(Continuous air-

lift tube fermentor)를 제작하였으며 연속기포관 발효조는 내경 2 cm, 높이 70 cm, 운전용량 200 ml, 총진용량은 총 용량의 70~80%, superficial gas velocity는 0.98 cm³/s로 하고 고정화세포의 bead 파괴 및 bead의 고정을 위하여 6 cm 간격으로 stainless망을 설치하였다. 또한 관둘레에 경질 유리자켓(직경 5 cm)을 설치하고, water pump(Haake-Germany, type 000-5818)로 발효조 온도를 30°C로 유지하였으며 L-methionine 생산용 배지를 peristaltic pump(LKB Model No. 2132)로 하단에서부터 일정한 유량으로 공급하면서 발효를 행하였다.

메티오닌의 정량

발효액을 membrane filter(Gelman Sci., 0.2 µm)로 여과하여 아미노산 자동분석기(Hitachi Model No.835-50, Japan)로서 methionine 함량을 분석하였다. 자동조건은 column 2.6 mm ID×150 mm, resin hitachi custom ion-exchange resin #2619, buffer flow rate 0.225 ml/min, column temperature 53°C, N₂ gas pressure 0.28 kg/cm², injection volume 50 µl이다.

결과 및 고찰

변이주의 분리 및 농축

돌연변이를 유발시키는 변이원으로는 자외선(UV), ethylmethanesulfonate(EMS), methylmethanesulfonate(MMS), ethylenedibromide(EDB), β-propiolacton(β-P) 및 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) 등이 있으나 균주에 관계없이 가장 널리 이용되고 있는 강력한 변이원 중의 하나인 NMMG를 *Brevibacterium flavum* ATCC 14067과 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032에 500 µg/ml 농도로 30°C에서 30분간 처리하여 완전고체배지에 도달한 다음 3~7일간 30°C의 incubator에서 배양한 후 최소고체배지에 계대하였을 때 CM에서는 생육하나 최소배지에서는 생육하지 않는 colony를 변이주로 분리하였으며, 변이율을 높이기 위하여 Lederberg와 Zinder의 방법⁽²⁸⁾에 따라 penicillin-screening을 행하였을 때의 결과는 Fig. 2와 같다.

Brevibacterium flavum ATCC 14067의 경우 18%, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032의 경우 15%의 변이율의 증가를 나타내었는데, 이는 동균주로 penicillin-screening 효과를 보고한 류 등⁽³⁾, 진⁽³¹⁾ 및 성 등⁽³²⁾이 보고한 30%의 변이율 증가보다는 다소 낮았는데 이는 동균주일지라도 본 연구에서는 여러가지 genetic marker를 부여한 관계로 변이율이 낮게 나온 것으로 생각 된다.

영양요구성과 약제 및 analog 내성주의 분리

미생물에 의한 발효생산물은 일반적으로 중간생성물이나 경로분지의 생생산물 축적에 따라 feedback inhi-

Table 1. Methionine yield by mutants of *B. flavum* ATCC 14067 and *C. glutamicum* ATCC 13032

Strain	Phenotype ^a	L-Methionine productivity (g/l)
<i>B. flavum</i> K-72	Try ⁻ Km ^r Et ^r Tm ^r	0.05
<i>B. flavum</i> K-98	Leu ⁻ Km ^r Et ^r Tm ^r	0.11
<i>B. flavum</i> K-104	Thr ⁻ Met ⁻ Km ^r Et ^r Tm ^r	0.42
<i>B. flavum</i> K-206	Met ⁻ Km ^r Et ^r Tm ^r	0.30
<i>B. flavum</i> K-431	Lys ⁻ Km ^r Et ^r Tm ^r	0.27
<i>C. glutamicum</i> B-25	Leu ⁻ Str ^r Et ^r Sm ^r	0.17
<i>C. glutamicum</i> B-69	Lys ⁻ Str ^r Et ^r Sm ^r	0.24
<i>C. glutamicum</i> B-70	Thr ⁻ Hos ⁻ Str ^r Et ^r Sm ^r	0.59
<i>C. glutamicum</i> B-160	Leu ⁻ Hos ⁻ Str ^r Et ^r Sm ^r	0.09

^aKm: Kanamycin, Sm: Selenomethionine, Str: Streptomycin, Tm: Trifluoromethionine, Et: Ethionine

hibition이 일어나며 L-methionine 발효시 *Brevibacterium flavum*의 경우 기질 결합부위 중 S-acetyl-L-methionine에 의해서 feed back inhibition이 일어나고, *Corynebacterium glutamicum*의 경우 cystathionine- γ -synthase에 의해 inhibition이 나타나는 것으로 알려져 있다⁽²¹⁾. 또한 L-methionine의 경우 발효경로가 유사한 L-threonine의 축적에 의해서도 inhibition은 나타나므로 이와 같은 발효과정 중의 inhibition을 해제하기 위하여 본 연구는 영양요구성과 약제 및 methionine analog 내성주를 분리하여 Table 1에 나타내었다. 변이주 *B. flavum* K104의 경우 thr⁻ met⁻ Km^r Et^r Sm^r Tm^r의 genetic marker를 가지며 L-methionine 생산능은 0.42 g/l였으며, *C. glutamicum* B70의 경우 thr⁻ hos⁻ str^r Et^r Sm^r Tm^r의 genetic marker를 나타내며 L-methionine 생성능은 0.59 g/l로 나타났다.

이와같은 결과는 Morinaga 등⁽⁹⁾은 *Pseudomonas* sp.의 ethionine 내성균주로 0.4~0.8 g/l의 methionine을 생산하였음을 보고한 결과와 비슷하나 Kase 등⁽¹⁵⁾이 보고한 2 g/l의 methionine을 생산하였음을 보고한 결과 보다는 생성능은 낮았다.

원형질체의 형성 및 재생

세포막 중의 peptidoglycan 구조를 용해하여 원형질 상태의 원형질 융합에 필요한 조건을 만들기 위한 각종의 세포막 용해효소 중 procaryotic cell의 세포막 용해효소로 주로 사용되는 lysozyme의 처리농도에 따른 원형질체의 형성은 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 원형질체의 형성은 lysozyme 농도 및 시간의 경과에 따라 크게 달라지며 lysozyme의 농도가 높거나 반응시간이 길수록 원형질체의 형성율은 증가하나 재생율은 점차적으로 감소한다⁽³⁰⁾. *B. flavum* K104는 500 μ g/ml의 lysozyme을 6시간 처리하였을 때 원형질체의 형성율은 99.9%였다. 이와같은 결과는 *Bacillus* 및 *Cellulomonas*의 원형질체 형성에 대해 성 등⁽³²⁾ 김과 이⁽³³⁾가 보고한 바와 유사한

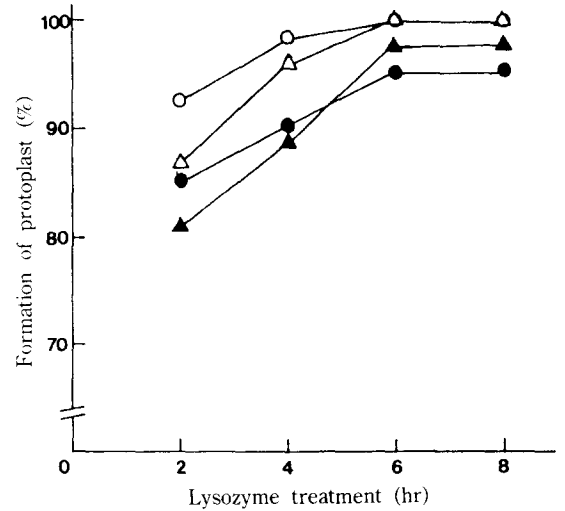


Fig. 3. Effect of lysozyme treatment period and concentration of lysozyme on the protoplast formation

○—○; *B. flavum* K-104 500 μ g/ml lysozyme, ●—●; *B. flavum* K-104 300 μ g/ml lysozyme, △—△; *C. glutamicum* B-70 500 μ g/ml lysozyme, ▲—▲; *C. glutamicum* B-70 300 μ g/ml lysozyme

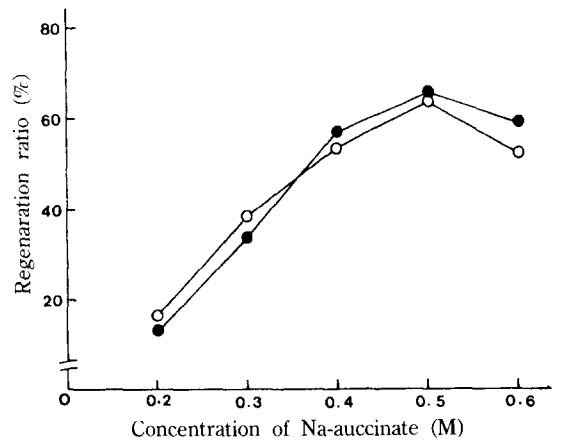


Fig. 4. Effect of Na-succinate concentration on the regeneration of protoplast

○—○; *B. flavum* K-104, ●—●; *C. glutamicum* B-70

경향을 나타내었다.

원형질체의 재생율은 Fig. 4에 나타난 바와 같으며 원형질체는 정상세포와는 달리 세포벽이 손상을 받았거나 불안정한 상태에 있으므로 세포벽의 재생에는 삼투압안정제의 종류 및 농도에 따라 크게 달라질 수 있다⁽³⁴⁾.

본 연구는 Kaneko와 Sakaguchi⁽²⁹⁾의 방법에 따라 sodium succinate를 삼투압안정제로 사용하였다. 즉 RCM에 0.5 M sodium succinate를 첨가하여 증충하였을 때 *B. flavum* K104는 64%, *C. glutamicum* B70은 66%로 가장

Table 2. Fusion frequency between *B. flavum* K-104 and *C. glutamicum* B-70

Cross	Fusion frequency(Km ^r St ^r)	
<i>B. flavum</i> K-104 (Thr ⁻ Met ⁺ Km ^r Et ^r Sm ^r Tm ^r) ^b	With 35% PEG # 6000	With 35% PEG # 6000 +3% PVP ^a
×		
<i>C. glutamicum</i> B-70 (Thr ⁻ Hos ⁺ Str ^r Et ^r Sm ^r Tm ^r) ^b	8.7×10 ⁻⁶	3.5×10 ⁻⁵

^aPolyvinylpyrrolidone

^bKm: Kanamycin, Sm: Selenomethionine, Str: Streptomycin, Tm: Trifluoromethionine, Et: Ethionine

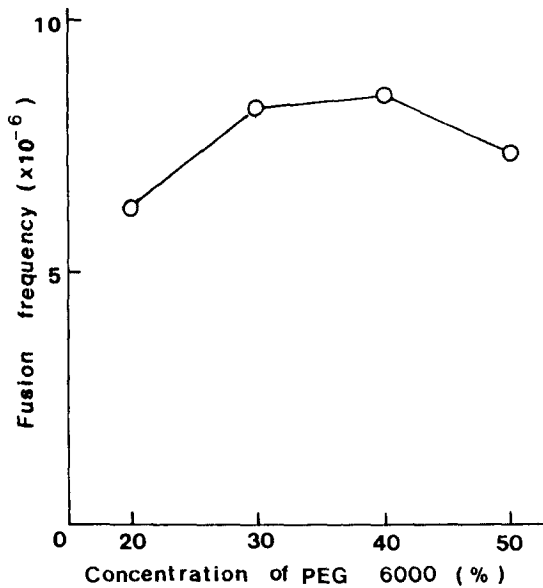


Fig. 5. Effect of PEG # 6000 concentration on the protoplast fusion

높은 재생율을 나타내었다. 이는 *Brevibacterium* 및 *Corynebacterium*의 삼투안정제로 0.5 M sodium succinate가 가장 좋았다고 보고한 Kaneko와 Sakaguchi⁽²⁹⁾ 및 Akamatsu와 Sekeiguchi⁽³⁵⁾의 결과와는 일치하였으나 *Cellulomonas flavigena*의 삼투안정제로서 0.4 M sodium succinate가 가장 효과적이었음을 보고한 조와 배⁽³⁴⁾의 보고와는 상이하였는데 이것은 균종에 따른 차이로 생각된다.

융합주의 분리

변이주 *B. flavum* K104 및 *C. glutamicum* B70간의 세포융합을 행하기 위하여 원핵세포의 융합에 주로 사용되는 융합촉진제인 polyethylene glycol(PEG) #6,000을 사용하였을 때의 PEG #6,000 농도에 따른 결과는 Fig. 5와 같다. 식물세포의 융합에 융합촉진물질로써 PEG를 최초로 사용한 Kao와 Michayluk는 PEG의 ether linkage와 세포막의 단백질, 탄수화물간에 수소결합을 형성하여 원형질체 사이에 분자간 가교에 의한 응집이

Table 3. L-Methionine production by whole cells immobilized in various matrices

Concentration of matrices for immobilization	Production on whole cells(g/l)	
	(%)	
Sodium alginate	3.0	0.89
Polyacrylamide	7.0	0.17
Agar	1.5	0.09
κ-Carrageenan	2.5	0.48

일어나서 긴밀하게 접촉되어 있는 원형질체의 (+)부분과 (-)부분간의 결합에 의해 융합주가 생성되는 것이라고 보고한 바 있다⁽³⁶⁾. Fig. 5에서와 같이 PEG #6,000의 첨가는 30~40%에서 가장 융합빈도가 높았으며 30% 이하 및 40% 이상에서는 점차적으로 떨어지는 경향을 나타내었는데 이와같이 PEG 농도가 낮을 경우 융합빈도가 감소하는 것은 용액내의 삼투안정제 및 positive polar group과 PEG의 ether linkage가 서로 간섭에 의해 융합빈도가 감소하며, 한편 과량의 PEG #6,000 용액에서는 osmotic damage 현상이 일어나 원형질체의 사멸을 유도하여 융합빈도가 낮게 나타났다고 생각된다.

따라서 본 실험에서는 PEG #6,000의 최적농도를 35%로 제조하여 이후의 실험에 사용하였고 *B. flavum* K104 및 *C. glutamicum* B70간의 융합시 융합자극제로 알려진 3% polyvinylpyrrolidone(PVP)를 첨가하였을 때의 융합빈도를 Table 2에 나타내었다. PEG #6,000 단독 사용시 융합빈도는 8.7×10⁻⁶으로 다소 낮은 상태였으나 3% PVP를 첨가함으로써 3.5×10⁻⁵으로 다소 상승하였다. 그리고 *B. flavum* K104와 *C. glutamicum* B70간의 융합주로 BFCG 37(thr⁻, met⁻, hos⁺, Km^r, str^r, Et^r, Tm^r, Sm^r)을 분리하여 선별하였고 이 균주를 사용하여 고정화 실험에 사용하였다.

균체의 고정화

발효공정 중 생산성 향상을 위해 사용되어지는 한 방법이 균체고정화이며 고정화 담체로서는 일반적으로 polyacrylamide, sodium alginate, agar, κ-carrageenan 등이 사용되어 지고 있다⁽³⁰⁾. 이들 균체고정화 담체로서 L-methionin 생산성이 우수한 융합주인 BFCG 37를 고정화시킨 bead를 발효배지인 L-methionine 생산용 배

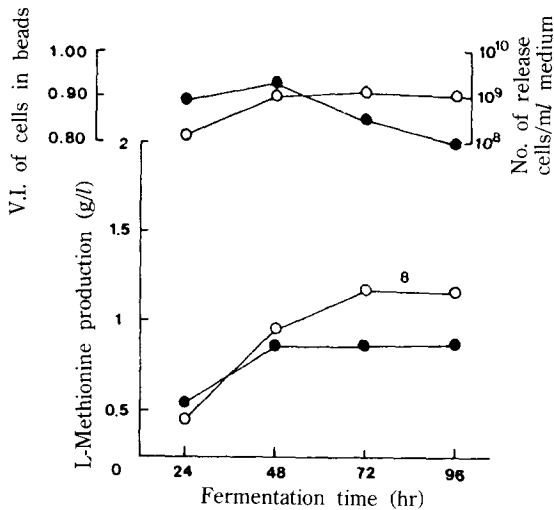


Fig. 6. L-Methionine production and viability index (V.I.) in bead during fermentation

○—○; Continuous fermentation by bubble, ●—●; Batch fermentation by immobilized system

지에 대해 20 : 1의 비율로 500 ml 삼각플라스크에서 30 °C 48시간 진탕배양한 다음 아미노산 분석기로 배양액의 L-methionin 함량을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 3% sodium alginate로 고정화하여 L-methionin 생산량을 측정할 결과 0.89 g/ml의 생산수율을 얻었으나 polyacrylamide, agar 및 κ -carrageenan 등으로 고정화하였을 때는 다소 생산량이 저조하였다. 이와같은 결과는 sodium alginate를 담체로 하여 균체고정화를 하였을 때 발효생산성이 가장 좋았음을 보고한 여러 연구자들^(27,30,31)의 결과와 같았으나, L-glutamic acid 발효생산에 있어 고정화담체로서 κ -carrageenan이 고정화 담체로서 가장 우수하였음을 보고한 Karube 등⁽⁹⁾의 결과와는 상이하였다.

본 연구에 있어서도 κ -carageenan을 고정화담체로 사용하였을 때 80°C의 온도에서 κ -carageenan을 용해하여 균체와 섞어 40~50°C 사이에서 45°C 이하로 떨어지기 전에 bead를 형성시킴으로 bead내 사멸균수가 증가하고 균체의 활성이 다소 낮아져 생산능이 저조하게 나타난 것으로 생각된다.

L-Methionine의 생산성

L-Methionine 생산능이 뛰어난 융합주 BFCG 37을 free cell과 고정화균체로서 플라스크 및 연속식 기포관에 의한 발효를 행하였을 때의 L-methionine 생산량을 Fig. 6에 나타낸 바와 같다. 발효를 48시간 하였을 때 고정화 bead내의 균체 생존지수는 플라스크와 연속식 기포관에 의한 경우 0.96 및 0.91를 각각 나타내었으나 72시간 발효시 플라스크에 의한 발효는 0.82로 급격히 감소되었고 배지 중의 free cell수도 3.9×10^8 에서 5.0×10^8 으로

감소하였다. 이는 플라스크내의 한정된 조건과 기질의 고갈 및 생산물에 의한 저해 등의 여러가지 요인에 의해 생존수도 점차적으로 감소하였다고 생각된다. 그러나 연속식 기포관에 의한 발효는 72시간까지 생존 지수의 변화는 크게 변화하지 않았으나 72시간 이후 점차적으로 감소하는 경향이였으며 배지의 free cell수도 1.0×10^9 cells/ml을 유지하였으며 이후 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 플라스크에 의한 발효보다 연속식 기포관 발효가 보다 효과적이었으며 연속식 기포관에서 72시간 발효시 L-methionine의 최대생산량은 $18.75 \text{ mg l}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ 이었다.

이와같은 결과는 Morinaga 등⁽⁹⁾이 *Pseudomonas* sp.로 생산한 0.4~0.8 g/l·L-methionine보다 우수하였으나, *C. glutamicum*을 이용하여 Kase 및 Nakayama⁽⁵⁾가 보고한 2.0 g/l보다 생산수율이 낮게 나타났다. 따라서 본 연구의 결과는 균체의 육종방법 및 발효방법에 따라 생산성이 향상될 수 있음을 알 수 있었는데, L-methionine의 생산성을 보다 높이기 위해 L-methionine 발효경로 중 co-repressor로 작용하는 S-adenosyl-L-methionine 합성효소의 결손주의 분리 및 발효생산물의 신속한 분리 등에 관한 계속적인 연구가 수행될 경우 L-methionine의 생산성은 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 및 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032간의 protoplast fusion을 행하여 L-methionine의 생산성을 검토하고 발효조건을 개선하기 위하여 연속배양을 행하였다. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) 500 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하였으며 *B. flavum* K-104(Thr⁻ Met⁺ Km⁺ Et⁺ Sm⁺ Tm⁺)와 *C. glutamicum* B-70(Thr⁺ Hos⁺ Km⁺ Et⁺ Sm⁺ Tm⁺)의 변이주를 분리하였다. 이들 변이주에 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 lysozyme을 처리하였을 때 원형질체 형성을 및 재생율은 각각 99% 및 64~66%를 나타내었으며 융합 빈도는 3% PVP를 함유한 35% PEG 용액에서 3.5×10^{-5} 을 나타내었다. Sodium alginate로 고정화시킨 융합주 BFCG 37은 72시간 회분배양에서 0.89 g/l의 methionine을 생산하였고 연속배양에서는 $18.75 \text{ mg l}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ 의 L-methionine을 안정적으로 생산할 수 있었다.

문 헌

1. 鯨島廣年, 奈良高: 微生物과 醱酵生産. 公立出版株式會社 (1979)
2. 相田浩, 波弘一, 千畑一郎, 中山清, 山田秀明: アミノ酸醱酵. 學會出版 (1986)
3. Yamagata, S., Takeshima, K. and Naiki, N.: Metabolism of L-methionine by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biochem.*, 77, 1029(1975)
4. Kase, H. and Nakayama, K.: Isolation and characteri-

- zation of S-adenosylmethionine-requiring mutants and role of S-adenosylmethionine in the regulation of methionine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 161(1975)
5. Kase, H. and Nakayama, K.: L-Methionine production by methionine analog-resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 153(1975)
 6. Kase, H., Nakayama, K. and Kinoshita, K.: Production of O-succinyl-L-homoserine by auxotrophic mutants of *Aerobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 153(1970)
 7. Ozaki, H. and Shiiro, I.: Methionine biosynthesis in *Brevibacterium flavum*; Properties and Essential role of O-acetylhomoserine sulfhydrylase. *J. Biochem.*, **91**, 1163(1982)
 8. Cherest, H. Ficher and de Rovichon-Szulmajster, H.: Induction of nutritional mutants of glutamic acid bacteria and their amino acid accumulation. *J. Bacteriol.*, **97**, 328(1969)
 9. Morinaga, Y., Tani, Y. and Yamada, H.: L-Methionine production by methionine-resistant mutants of a facultative methylotroph, *Pseudomonas* FM 518. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 473(1982)
 10. Brush, A. and Paulus, H.: The enzyme formation of O-acetylhomoserine in *Bacillus subtilis* and its regulation by methionine and S-adenosylmethionine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 735(1971)
 11. Wyman, A., Shelton, E. and Paulus, H.: Purification and properties of homoserine transacetylase from *Bacillus polymyxa*. *J. Biol. Chem.*, **250**, 3897(1975)
 12. Kase, H. and Nakayama, K.: O-Acetylhomoserine as an intermediate in methionine biosynthesis in *Arthro bacter paraffineus*, *Corynebacterium glutamicum* and *Bacillus* species. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 687(1975)
 13. Savin, M.A. and Flavin, M.: Cystathionine biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **112**, 299(1972)
 14. Savin, M.A., Flavin, M. and Slaughter, C.: Regulation of homosteine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **111**, 547(1972)
 15. Komatsu, K., Yamada, T. and Kodaira, T.: Induced mutation and strain selection in some industrially important microorganisms. *J. Ferment. Technol.*, **52**, 93(1974)
 16. Okanishi, M. and Gregory, K.F.: Isolation of mutants of *Candida tropicalis* with increased methionine content. *Can. J. Microbiol.*, **16**, 1139(1970)
 17. Morzycka, E., Swantor-korszynska, D., Paszowski, A., Grabski, J. and Raczynska-Boianowka, K.: Methionine overproduction by *Saccharomyces lipolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 125(1976)
 18. Yamagata, S., Takeshima, K. and Naiki, N.: O-Acetylserine and O-acetylhomoserine sulfhydrylase of yeast: Studies with methionine auxotrophs. *J. Biochem.*, **77**, 1029(1975)
 19. Ohunki, T., Etoh, Y. and Beppu, T.: Interspecific and interspecific hybridiza of *Mucor pusillus* and *Mucor meihei* by proroplast fusion. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 451(1982)
 20. Genthner, F.J. and Borgia, P.T.: Sphaeroplast fusion and heterokaryon formation in *Mucor recemosus*. *J. Bacteriol.*, **134**, 349(1978)
 21. Foder, K. and Alfoldi, L.: Polyethyleneglycol induced fusion of bacterial protoplasts. *Molec. Gen. Genet.*, **168**, 55(1979)
 22. Foder, K. and Alfoldi, L.: Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.)*, **73**, 2147(1976)
 23. Hopwood, D.A. and wright, H.M.: Bacterial protoplast fusion: Recombination in fused protoplast of *Streptomyces coelicolor*. *Molec. Gemn. Genet.*, **162**, 307(1978)
 24. 오종원, 최호준, 변유량: 고정화 pachsolon tannophilus에 의한 D-xylose의 에타놀로의 전환. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 170(1987)
 25. Kim, H.S. and Dewey, D.Y. Ryu: Continuous glutamate production using on immobilized whole cells system. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 2167(1982)
 26. Karube, I. Wang, Y. Tamiya, E. and Kawai, M.: L-Glutamate production by protoplasts immobilized in carrageenan gel. *J. Biotech.*, **6**, 1(1987)
 27. Ryu, B.H. and Nam, K.D.: Continuous alcohol fermentation using immobilized growing yeast cells. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 248(1987)
 28. Lederberg, J. and Zinder, N.: Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin. *J.A.C.A.* **70**, 4267(1948)
 29. Kaneko, H. and Sakaguchi, K.: Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1007(1979)
 30. 류병호, 김혜성, 노명훈, 박법규, 정종순, 배기철: 세포 융합과 고정화 시스템을 이용한 L-Lysine의 생산성 향상. *한국식품과학회지*, **21**, 154(1989)
 31. 진성현: *Bacillus natto* SH-89 및 *Bacillus megaterium* IAM 1166의 protoplast fusion에 의한 vitamin B₁₂의 생산. *경성대학교 석사학위논문* (1990)
 32. 성낙계, 정덕화, 이무영, 정영철: 속간원형질체 융합에 의한 섬유질 기질로부터 L-Lysine 생산균주의 개발. *한국미생물학회지*, **16**(2), 150(1988)
 33. 김도만, 이계호: *Bacillus pumilus*와 *Cellulomonas fimi*의 원형질체 형성과 재생. *한국산업미생물학회지*, **18**(2), 109-114(1990)
 34. 조보연, 배 무: 원형질체 형성과정에 쓰이는 osmotic stabilizer의 평가방법. *한국산업미생물학회지*, **15**(4), 299(1987)
 35. Akamatsu, T. and Sekeiguchii.: Stucies on regeneration media for *Bacillus subtilis* protoplasts. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2887(1981)
 36. Kao, K.N. and Michayluk, M.R.: A method of high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *planta*, **115**, 355(1974)