

고정화 미생물에 의한 뉴클레오타이드 생산

조정일 · 정승원
고려대학교 농화학과

Production of Nucleotide by Immobilized Cell

Jung-Il CHO and Sung-Won JUNG

Department of Agricultural Chemistry, Korea University,
Seoul 136-701, Korea

The effective production of 5'-GMP(5'-Guanylic acid) by enzymatic conversion of 5'-XMP(5'-Xanthylic acid) was investigated. The lyophilized *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 19216 which were used as the XMP aminase source, was immobilized by entrapping in *K*-carrageenan, agar, polyacrylamide or Ca-alginate. 3% *K*-carrageenan was selected as the most suitable matrix.

In the production of 5'-GMP using the free cells of *B. ammoniagenes* ATCC 19216, the optimum conditions were 42°C, pH 7.0, 100mg/ml glucose, 120mg/ml cell, 8mg/ml MgSO₄ · 7H₂O, 5mg/ml POESA, 5mg/ml phytic acid. Under the conditions, 94.5% of 5'-GMP was converted within 8 hours.

In the production of 5'-GMP using the immobilized whole cells of *B. ammoniagenes* ATCC 19216, the optimum conditions were 37°C, pH 7.5, 50mg/ml glucose, 1mg/ml KH₂PO₄, 10mg/ml phytic acid, 60mg/ml cell, 8mg/ml MgSO₄ · 7H₂O, 5mg/ml POESA. Under the conditions, 64.7% of 5'-GMP was converted within 40 hours.

서 론

글루타민산 나트륨과 더불어, 5'-GMP(5'-Guanylic acid) 등의 핵산계 조미료는 감칠맛(palatability)을 내는 특성을 가진 물질로 식품제조공정에 있어서 용도에 따라 다양하게 사용되고 있다. 수산 가공품의 경우 가공방법, 어종에 따른 핵산 함량에 따라 첨가량을 달리하고 있다. 일반적으로 넙치, 가자미, 대구는 0.1~0.15%(5'-IMP기준)의 핵산을 함유하며, 조기, 전갱이, 다랑어는 약 0.2~0.3%(5'-IMP기준)를 함유한다. 이와 같은 각 어종별 핵산 함량을 참고로 하여, 조미가공품 제조시에는 5'-GMP를 5~10%, 통조림 제조시에는 0.003~0.01%, 연제품 가공에는 0.75~1.0% 정도로 첨가되고 있다.

이와 같은 핵산계 조미료의 제조에는 다음과 같

은 방법들이 이용되고 있다. RNA를 5'-phosphodiesterase와 같은 효소로 분해시켜 생산하는 효소분해법(Kuninaka *et al.*, 1961), RNA를 산 가수분해시켜 ribonucleoside로 분해한 뒤 화학적으로 인산화시키는 방법(Numata *et al.*, 1969), 그 외에 발효합성조합법(Shiro, 1976), 직접 발효법(Abe *et al.*, 1966)등 있다. 현재 밝혀진 정미성 핵산으로는 5'-IMP, 5'-GMP, 5'-XMP(5'-Xanthylic acid)가 있으나, 정미성의 정도는 5'-GMP가 가장 크고, 그 다음으로는 5'-IMP, 5'-XMP의 순이다. 그러므로 가장 큰 정미성을 갖는 5'-GMP를 미생물을 이용하여 효율적으로 생성시키는 것은 핵산 조미료의 사용 용도에 비추어 보아 중요한 의의 가진다고 생각된다.

본 연구에서는 효율적으로 5'-GMP를 생산하기 위해 *Brevibacterium ammoniagenes*을 동결 건조시

켜 적당한 담체에 고정화시켜 5'-XMP를 5'-GMP로 전환을 시도하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 19216로서, 5'-XMP를 5'-GMP로 전환하는 능력을 가지고 있으며, adenine과 histidine 영양요구성이다.

사용배지

균주보관용 배지(stock slant)의 조성은 다음과 같다.

(g/l); Polypeptone 10, Yeast extract 5, Beef extract 5, NaCl 5, Agar 15, pH 7.0

종배지(seed medium)의 조성은 다음과 같다.

(g/l); Glucose 40, Yeast extract 10, Beef extract 5, Polypeptone 5, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01, ZnSO_4 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, CaCl_2 1, Ca-pantothenate 0.015, Nicotinic acid 0.015, Thiamin · HCl 0.005, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3, Urea 2, Biotin 1.0×10^{-4} , Adenine 5.0×10^{-5} , Histidine 7.0×10^{-5} , pH 8.3 with KOH

발효배지(fermentation medium)의 조성은 다음과 같다.

(g/l); Glucose 130, Fructose 20, KH_2PO_4 10, K_2HPO_4 10, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, ZnSO_4 0.01, $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005, L-cysteine 0.2, Ca-pantothenate 0.02, Nicotinic acid 0.005, Biotin 1.5×10^{-5} , Thiamin · HCl 0.005, Urea 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6, Beef extract 2, Adenine 1.0×10^{-4} , Histidine 1.5×10^{-4} , pH 6.8 with KOH

균주배양

균주의 배양 및 배양균체의 동결건조 처리 과정은 Fig. 1과 같으며, 동결 건조균체는 -20°C 에서 보관하였다.

전환반응

전환반응에 사용된 basal mixture의 조성은 다음과 같다.

(g/l); Glucose 50, KH_2PO_4 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10, Phytic acid 5, POESA 5, 5'-XMP broth, Freeze drying cells

동결 건조된 전환균주는 고정화하였을 경우에는 60mg/ml , free cell의 경우에는 120mg/ml 의 농도가

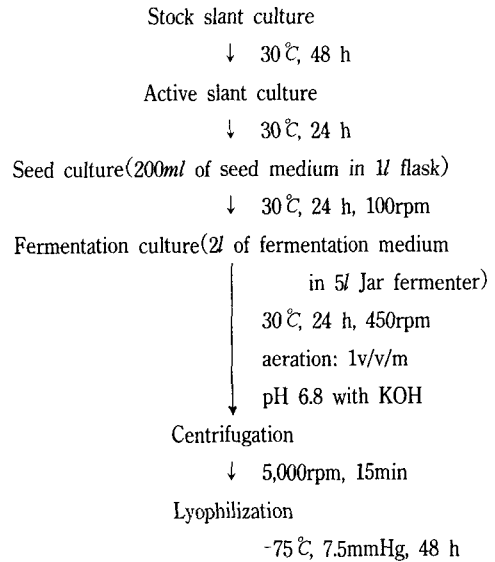


Fig. 1. Preparation of 5'-XMP converting strains

며, 반응시간은 각각 50h와 10h, 반응온도는 40°C 로 하였다. 반응액의 pH는 NH_4OH (9%)를 사용하여 1시간 간격으로 7.4가 되도록 조정하여 주었다.

균체고정화

본 실험에서 사용한 담체는 *K-carrageenan*, polyacrylamide, Ca-alginate 및 agar를 사용하였으며 균체고정화 방법은 다음과 같다.

*K-carrageenan*에 의한 고정화는 Tosa(1979) 등의 방법에 따랐으며, gel을 만든후 $2 \times 2 \times 3(\text{mm}^3)$ 입방크기로 절단하였다. Gel의 강도를 높여 주기 위하여 0.3M KCl용액에 4°C 에서 2시간 동안 침지한 후 멸균 증류수로 2회 세척하여 사용하였다. Polyacrylamide에 의한 균체고정화는 Mattiasson(1983) 등의 방법에 따라 고정하였으며, calcium alginate와 agar에 의한 고정화는 각각 Nilsson(1983) 등의 방법에 따라 고정화하였다.

고정화균체의 hardening방법

고정화균체 8g을 0.088M HMDA(hexamethylene diamine)가 포함된 0.33M phosphate buffer(pH 7.0) 60ml에 넣고 0°C 에서 gentle shaking하여 10분간 반응시킨 후 12.5% glutaraldehyde용액을 5ml 첨가하고 1시간 동안 반응시켰다. 멸균증류수로 2회 세척하여 전환반응에 사용하였다.

Glucose 정량

Glucose 정량은 DNS방법(1960)에 따라 정량하

였으며 glucose표준 곡선으로부터 산출하였다.

무기인산과 마그네슘의 정량

반응액의 무기인산 농도를 측정하기 위하여 Chen(1956) 등의 방법에 따랐으며, 마그네슘의 정량은 EDTA method(1969)에 따라 정량하였다.

5'-XMP와 5'-GMP의 분석

반응후 상정액을 희석하여 HPLC를 이용하여 5'-XMP와 5'-GMP를 정량하였다.

고정화균체의 견고성 측정

고정화균체의 견고성을 측정하기 위하여 Rheometer(Sunkageku Co. LYD. Type M-1107)을 사용하였다. 고정화균체를 1×1×1(cm³) 크기로 절단하여 평판위에 놓고 adaptor(직경 50mm)를 설치한 다음 압착시켜 compression force를 측정하여 g으로 표시하였다. 분석조건은 force scale 8km, chart speed 120mm/min, table speed 3.13mm/sec, compression ratio 0.7이었다.

결과 및 고찰

균체고정화 담체 선정

안정성과 높은 효소활성, 물질 전달 등의 조건을 충족시키는 담체 선정이 중요하다. Polyacrylamide는 상대적 비교를 위해 사용하였으며, 그외 K-carrageenan, Ca-alginate, agar는 높은 균체포집성, 저독성 등의 장점이 있어 사용하였다.

이상의 담체로 균체를 고정화하여 전환율을 비교한 결과는 Table 1과 같으며 3% K-carrageenan이 가장 좋은 것으로 나타났다. Ca-alginate의 경우 phosphate 그리고 Mg⁺⁺, K⁺이온들이 Mg⁺⁺이온을 용해시켜 gel이 파괴되며, agar의 경우는 비교적 기

Table 1. Conversion ratio by immobilized cells in various matrices

Matrices	Relative conversion ratio(%)
Polyacrylamide	46.2
Agar	40.3
Ca-alginate	79.8
2% Carrageenan	63.7
3% Carrageenan	100
4% Carrageenan	83.8

계적 강도가 낮고, 상대적인 전환율이 낮게 나타났다.

고정화균체의 견고성 측정

고정화균체를 사용하여 목적하는 생성물을 장시간 연속적으로 생산하는 경우, 고정화균체의 높은 gel강도가 요구된다. 본 실험에서는 균체를 각 담체에 고정화시켜 1.0cm³크기로 절단하고 Rheometer를 통하여 gel강도를 측정하였다. 결과는 Table 2에서 보듯이 K-carrageenan이 가장 높았으며 agar와 polyacrylamide의 순서로 나타났으며 전환율과 비교하였을 때 3% K-carrageenan이 우수하였다.

Table 2. Comparison of gel hardness

Matrices	Hardness(kg/cm ²)
Polyacrylamide	0.780
Agar	1.324
2% Carrageenan	4.611
3% Carrageenan	5.699
4% Carrageenan	6.375

고정화균체와 free cell의 전환반응 조건

pH의 영향

결과는 Fig. 2와 같이 고정화균체는 7.5, free cell의 경우에는 7.0이 최적 pH였다.

온도의 영향

Fig. 3에서 보는 바와 같이, 고정화균체는 37℃, free cell은 42℃에서 높은 전환율을 보였다. 일반적으로 고정화에 의해 최적반응 온도는 약간 높아지거나 유사한 것으로 알려지고 있지만, 본 실험의 경우 고정화균체가 고정화하지 않은 균체보다 낮

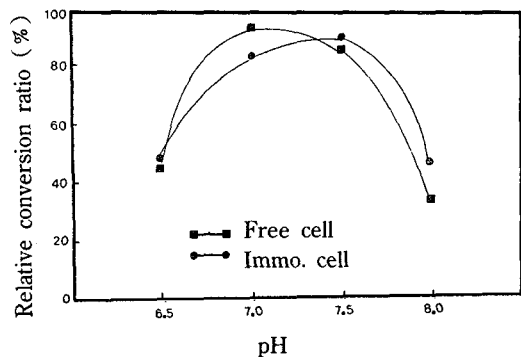


Fig. 2. Effect of pH on the 5'-GMP production by immobilized cell and free cell

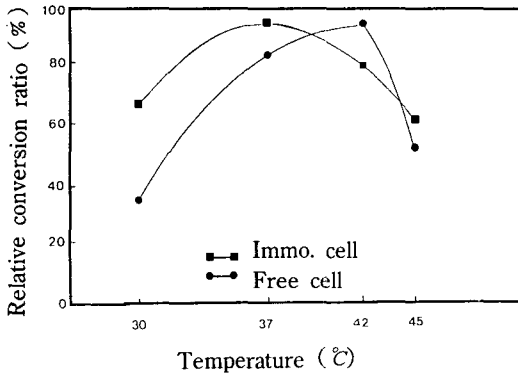


Fig. 3. Effect of temperature on the production of 5'-GMP by immobilized cell and free cell

은 온도에서 높은 전환율을 나타내었다.

Glucose의 농도

한 분자의 5'-XMP전환을 5'-GMP로 전환하는 효소인 XMP aminase는 두 분자의 ATP가 요구된다. 본 실험에서 전환반응에 필요한 ATP는 glucose를 이용한 균체의 대사과정에 의한 것이다. 따라서 glucose농도에 따른 영향을 검토하였으며 그 결과는 Fig. 4와 같았다.

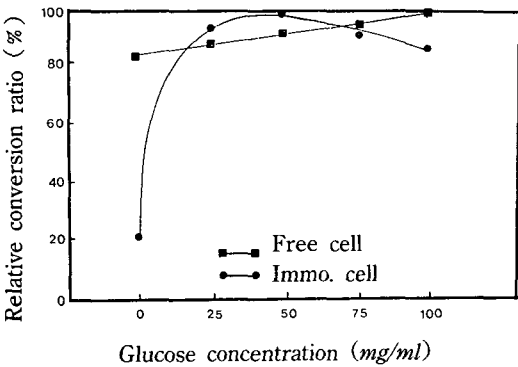


Fig. 4. Effect of glucose concentration on 5'-GMP production

배양액에 0, 25, 50, 75, 100(mg/ml)의 농도로 첨가하여 전환반응을 한 결과 고정화균체는 50mg/ml, free cell은 100mg/ml의 농도에서 높은 전환율을 보였다.

마그네슘의 영향

XMP aminase의 cofactor로서 작용하는 Mg⁺⁺농도의 영향을 살펴보았다. 배양액에 0.2%의 Mg⁺⁺이 포함되어 있고, phytic acid는 5mg/ml로 하였다. Free cell과 고정화균체 모두 8mg/ml의 마그네슘

농도에서 높은 전환율을 나타내었다.

무기인산의 영향

고정화균체는 무기인산이 1mg/ml, free cell은 무첨가일때 높은 전환율을 보였다. 반응액으로는 0.74%의 phosphate가 포함된 배양액을 사용하였다.

Polyoxyethylenestearylamine(POESA)의 영향

일반적으로 세포내에서 생성된 5'-GMP는 세포 밖으로 빠져 나오지 않는다. 따라서 5'-GMP의 세포막 투과성 증대를 위해 계면활성제나 항생물질등을 처리하여 주는데, 5'-GMP의 생산에는 POESA가 효과적인 것으로 보고되고 있다(Takashi et al., 1969). 본 실험에서는 POESA를 농도별로 처리하였는데, 그 결과 5mg/ml 농도에서 모두 높은 전환율을 보였다(Fig. 5).

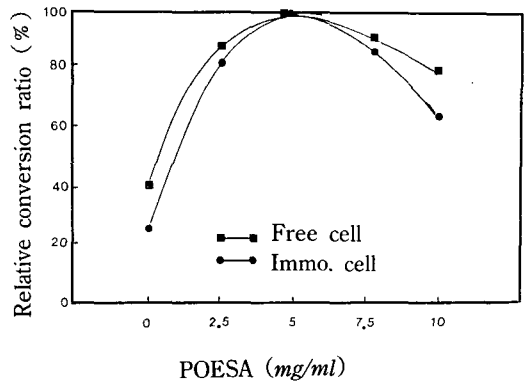


Fig. 5. Effect of POESA concentration on 5'-GMP production

전환반응의 최적조건

고정화균체

최적반응 조건은 pH 7.5, 온도 37°C, glucose 50, KH₂PO₄ 1, MgSO₄ · 7H₂O 5, immo. cell 60, phytic acid 5 immo., POESA 5(mg/ml)이었으며 전환반응을 시도한 결과는 Fig. 6과 같다. 40시간이 경과한 후 생성된 5'-GMP는 14.8g/l이었으며 전환율로 환산하여 보면 64.7%이었다.

Free cell

최적반응 조건은 pH 7.0, 온도 42°C, glucose 100, MgSO₄ · 7H₂O 10, free cell 120, phytic acid 5, POESA 5(mg/ml)이었으며, 이들 조건하에서 전환반응을 시도하여 Fig. 7과 같은 결과를 얻었다. 8시간 반응에서 최고 21.8g/l의 5'-GMP가 생성되었으며 전환율은 94.5%이었다.

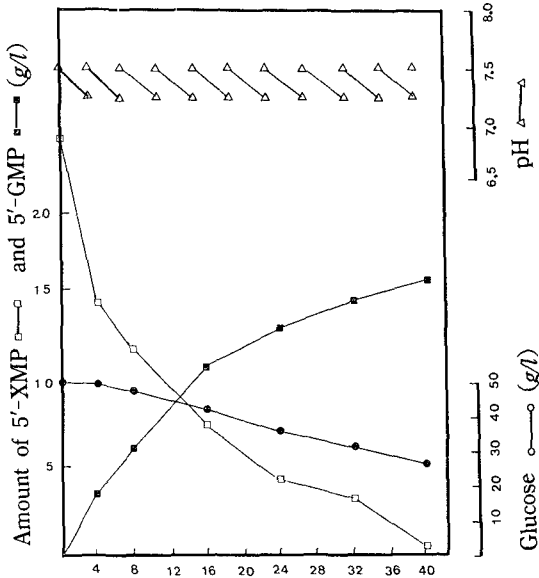


Fig. 6. 5'-GMP production under the optimum condition of conversion reaction using immobilized cell

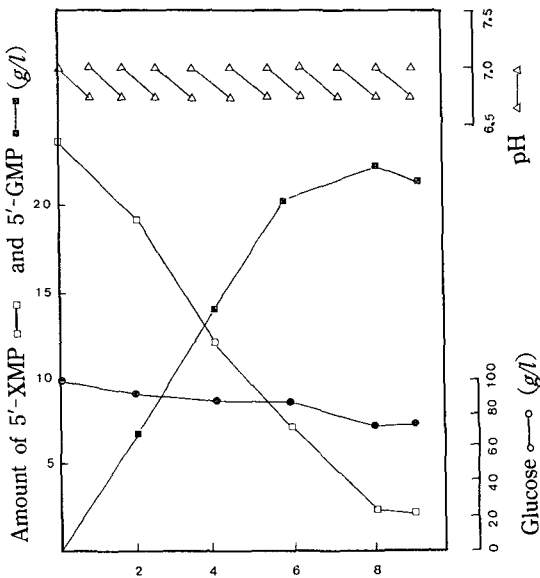


Fig. 7. 5'-GMP production under the optimum condition of conversion reaction using free cell

요약

5'-XMP의 효소적 전환에 의한 효율적인 5'-

GMP의 생산을 위하여 동결 건조한 *Bevibacterium ammoniagenes* ATCC 19216을 K-carrageenan, polyacrylamide, Ca-alginate 및 agar 등 4가지 담체에 고정화시켜 XMP aminase 효소원으로 사용하였다. 최적담체로서 선정된 3% K-carrageenan에 고정화한 균체를 이용하여 5'-GMP를 생산하였다.

고정화되지 않은 전환균주에 의한 5'-GMP의 최적생산 조건은 42°C, pH 7.0, 100mg/ml의 glucose, 8 mg/ml의 MgSO₄ · 7H₂O, 5mg/ml의 POESA, 120mg/ml의 cell, 5mg/ml의 phytic acid으로 나타났으며, 이때 전환율은 94.5%이었다.

고정화균체에 의한 5'-GMP의 최적생산 조건은 37°C, pH 7.5, 50mg/ml의 glucose, 1mg/ml의 KH₂PO₄, 10mg/ml의 phytic acid, 60mg/ml의 고정화균체, 8mg/ml의 MgSO₄ · 7H₂O, 5mg/ml의 POESA이며 이때 전환율은 64.7%이었다.

참고 문헌

Abe, S. and K. Udagawa. 1966. Japanese Patent 41~12, 673.

Chen, P. S., Toribara, T. Y. and Warner, H. 1956. Micro determination of phosphorous, *Anal. Chem.*, 28, p. 1756.

G. Schwarzenbach and Flaschka. 1969. Complexometric Titrations, H.M.N.H. Irving translated, Methen.

Karube, I., Urano, N., Matsunaga, T., Suzuki, S. 1982. Hydrogen Production from glucose by immobilized growing cells, *Eur. J. Appl. Microbial. Biotech.* 16, 5~9.

Kuninaka, A., M. Kibi and N. Yoshino. 1961. Studies on 5'-phosphodiesterase in microorganisms, *Agr. Biol. Chem.* 25(9), 693~701.

Mattiasson, B. 1983. In *Immobilized cells and Organells*, Vol. 1, pp. 3~26, CRC Press.

Miller, G. L., Blum, R., Glunnon, W. E. and Burton, A. L. 1960. Measurement of Carboxymethylcellulose activity, *Anal Biochem.* 2, 129.

Nilsson, K., Birnbaum, S., Flygare, S., Mosbach, K. and Brodelius, P. 1983. A general method for the immobilization of cells with preserved viability, *Eur. J. Appl. Microbial. Biotech.* 17, 319~326.

Numata, T., M., Kisshi, T. Sato, N. Yanno, S. Senoo and H. Hiro. 1969. Japanese Patent 44~25,

- 587.
- Shiro, T.. 1976. Microbial Producton of Nucleic acid Related substances part III, Production of GMP from AICAR, pp. 158~167.
- Takashi, Nara and Kinoshitta. 1969. Production of nucleic acid related substances by fermentative processes part XXX, Amino acid and Nucleic acid, 20, 92~99.
- Tosa, T., Mori, T. and Chibata, I. 1979. Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix, *Biotech. Bioeng.* 21, 1697~1709.
-
- 1991년 2월 18일 접수
1991년 3월 15일 수리