

Pseudomonas sp.에 의한 nicotinic acid로부터 6-hydroxynicotinic acid의 생산

홍정진 · 황기철 · 방원기

고려대학교 농화학과

초록: 미생물을 이용하여 nicotinic acid로부터 6-hydroxynicotinic acid를 생산하기 위하여 토양으로부터 nicotinic acid를 탄소원, 질소원 및 에너지원으로 이용하는 균주를 70종 분리하였으며, 이들 균주로부터 nicotinic acid hydroxylase의 비활성이 가장 높은 균주인 SH-007를 선별하였고, *Pseudomonas* sp.로 동정되었다. *Pseudomonas* sp.의 SH-007의 nicotinic acid hydroxylase의 비활성은 배지 중 2 g/l nicotinic acid, 1 g/l(NH₄)₂SO₄ 및 0.5 g/l peptone을 사용하여 초기 pH 7.5로 조정된 후 30°C에서 24시간 배양할 때 가장 높았으며, *Pseudomonas* sp. SH-007를 24시간 배양한 후 1.5 g/l nicotinic acid를 첨가하고 18시간 배양을 계속하면 24시간 배양 때보다 nicotinic acid hydroxylase의 비활성이 12% 증가하였다. 한편, 휴지세포를 이용한 6-hydroxynicotinic acid 생산을 위하여 2 g/l nicotinic acid이 함유된 최적 반응조건하에서 3시간 반응시킨 결과 생성된 6-hydroxynicotinic acid는 2.22 g/l이었으며, 이때의 전환율은 98.2%이었다(1992년 11월 2일 접수, 1992년 12월 8일 수리).

6-Hydroxynicotinic acid는 pyridine ring을 지니는 화합물로서 순환기 질환 중 특히, 협심증 발작의 예방 내지 치료제로 쓰이는 nicotinic acid amide 유도체를 생산하는 전구체로 사용되며,¹⁾ 광범위한 항균 스펙트럼을 지니는 반합성 페니실린과 세파로스포린의 합성에 출발물질로서도 사용된다.²⁾

현재, 6-hydroxynicotinic acid는 주로 유기합성법에 의해 생산되고 있으나,³⁾ 1957년 Harary⁴⁾가 nicotinic acid를 유일한 탄소원, 질소원 및 에너지원으로 이용하여 생육할 수 있는 미생물을 발견한 이래, 미생물에 의한 nicotinic acid의 분해 기작에 관한 연구가 수행되어 왔다.⁵⁻¹⁰⁾ 최근에는 nicotinic acid 자화성 세균을 이용하여, magnesium 혹은 barium ions의 존재하에서 효소적으로 6-hydroxynicotinic acid를 생산하는 연구가 수행되었다.³⁾

본 연구에서는 토양으로부터 분리된 nicotinic acid 자화성 세균의 nicotinic acid hydroxylase의 활성을 증대시키기 위한 최적 배양학적 조건과 휴지 세포를 직접 효소원으로 이용하여 nicotinic acid로부터 6-hydroxynicotinic acid를 생성하기 위한 최적 반응 조건을 검토하였다.

본 실험에 사용한 *Pseudomonas* sp. 균주는 토양으로부터 분리한 nicotinic acid 자화성 세균이었다.

균주의 분리 및 선별

토양으로부터 nicotinic acid 자화성 세균을 분리하기 위하여 nicotinic acid가 유일한 탄소원, 질소원 및 에너지원으로 첨가된 분리용배지³⁾에 토양 시료를 가하고 30°C에서 진탕배양으로 3회에 걸쳐 48시간 간격으로 enrichment culture을 수행한 후, pour plate법에 의해 nicotinic acid 자화능을 지닌 균락들을 순수분리하였다.

6-Hydroxynicotinic acid 생산능이 우수한 균주를 선별하기 위하여 10 ml의 상기배지를 함유하는 50 ml용 삼각플라스크에 각각의 분리주를 한 백금니씩 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양하였다. 이렇게 배양한 균체를 수확한 후, 동일량의 균체를 50 mM phosphate buffer (pH 7.5)에 2.0% nicotinic acid가 함유되어 있는 반응용액에 첨가하여 30°C에서 8시간 반응시킨 후 반응액 중의 6-hydroxynicotinic acid량을 측정하여 가장 6-hydroxynicotinic acid 생산능이 우수한 균주를 선별하였다.

재료 및 방법

사용균주

분석방법

균체량은 분광광도계를 사용하여 배양액의 흡광도를

Key words : 6-Hydroxynicotinic acid, *Pseudomonas* sp.
Corresponding author : W. G. Bang

600 nm에서 측정하여 구하였다.

Nicotinic acid와 6-hydroxynicotinic acid량은 Langner¹¹⁾의 방법에 따라 μ -BONDAPAKTM C¹⁸의 column(Water사)을 사용하여 high performance liquid chromatography(Water사)로 측정하였다.

6-Hydroxynicotinic acid의 정성분석은 Pinder 등¹²⁾의 방법에 따라 thin layer chromatography법으로 수행하였다.

Nicotinic acid hydroxylase(EC 1.5.1.13)의 활성 측정은 Hunt¹³⁾의 방법에 따라 측정하였다. Nicotinic acid hydroxylase 활성의 1 unit는 1 mmole의 ferricyanide가 실온에서 10분간 환원된 것으로 정의하였으며, 비활성은 unit를 mg 단백질로 나눈 것으로 정의하였다.

균주의 동정

분리균주인 SH-007의 동정은 20NE 동정용 키트¹⁴⁾를 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

Nicotinic acid를 자화할 수 있는 균주의 분리 및 nicotinic acid hydroxylase의 비활성이 높은 균주의 선별

Nicotinic acid를 유일한 탄소원, 질소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 균주를 분리하기 위하여, 재료 및 방법에서 기술한 방법에 따라 70종의 균주를 순수 분리하였다. 이들 균주들로부터 고체 분리형 배지상에서 직경 2 mm 이상의 균락을 형성하는 5종을 선별하였다. Table 1에서 볼 수 있듯이 SH-007 균주가 다른 균주에 비하여 생육 및 nicotinic acid hydroxylase의 비활성이 가장 좋았기 때문에 본 실험의 공시균주로 사용하였다.

분리 균주의 동정

분리균 SH-007는 편모를 지닌 Gram 음성의 간균으

Table 1. Comparison of growth and specific activity of nicotinic acid hydroxylase of isolated microorganisms

Strains	Growth (A ₆₆₀)	Specific activity (unit/mg protein)
SH-002	0.838	9.1
SH-005	0.963	11.8
SH-007	1.362	16.7
SH-018	0.646	8.9
SH-032	0.344	6.2

Cultivation was carried out for 24 hrs at 30°C in medium containing 0.2% nicotinic acid, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and trace elements.

로서(Fig. 1), Table 2와 같은 생리적, 생화학적 특성을 나타내었다. 동정표를 사용하여 분석한 결과 분리균 SH-007는 *Pseudomonas* sp.로 부분 동정되었다.

Nicotinic acid hydroxylase 생산에 미치는 배양학적 조건

분리 균주인 SH-007의 생육과 nicotinic acid hydroxylase의 비활성에 미치는 배지 중의 nicotinic acid 농도의 영향을 조사하기 위하여 배지에 nicotinic acid의 농도를 변화시켜 실험을 수행한 결과 Fig. 2에서 볼 수 있듯이, nicotinic acid의 농도가 0.5 g/l에서 2.0 g/l까지는 균체의 생육 속도와 nicotinic acid hydroxylase의 비활성이 모두 증가하였으나, nicotinic acid의 농도가 3.0 g/l인 경우에는 균체의 생육과 nicotinic acid hydroxylase의 비활성이 급격히 감소하였다. 따라서, 이후의 실험에서는 배지에

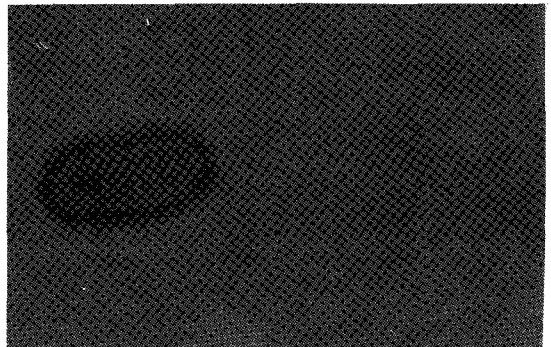


Fig. 1. Electron micrograph of *Pseudomonas* sp. SH-007 by TEM (Transmittance Electron Microscope; Sorvall TEM, 100CX-II 80 kV, Japan) after staining with 2% phosphotungstic acid (pH 6.8). Magnification, 22,000X.

Table 2. Characteristics of the bacterium SH-007

Assimilation of carbon compounds:					
Glucose	+	Arabinose	-	Mannose	-
Mannitol	+	Gluconate	+	Malate	+
Caprate	+	Citrate	-	Adipate	+
Maltose	+	N-acetylglucoamine			+
Phenylacetate	+				
Reduction of nitrate to nitrite					+
Reduction of nitrate to nitrogen					-
Indole production from trptophan					-
Acidification of glucose					+
β -Galactosidase					+
Oxidase					+
Urease					-

Symbols: +; Positive; -; Negative.

2.0 g/l의 nicotinic acid를 사용하였다.

증식 세포의 nicotinic acid hydroxylase의 비활성에 미치는 배지 질소원의 영향을 조사하기 위하여 2 g/l의 nicotinic acid를 지닌 분리 배지에 Table 3과 같이 무기 질소원을 첨가하여 실험을 수행한 결과, (NH₄)₂SO₄를 첨가한 경우, 균체량 및 nicotinic acid hydroxylase의 비활성이 (NH₄)₂SO₄의 농도가 증가할수록 함께 증가하였으나 (NH₄)₂SO₄의 농도가 1 g/l 이상일 때는 그 증가

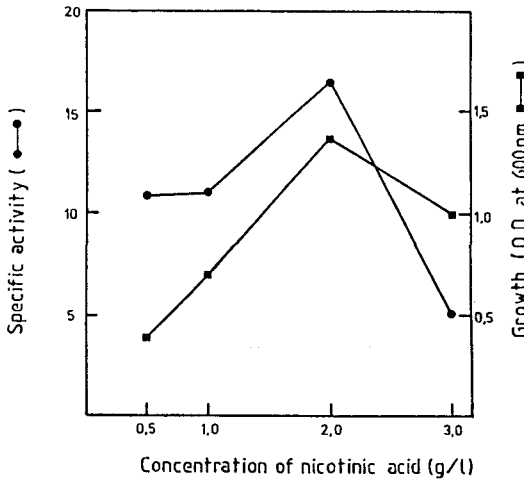


Fig. 2. Effect of nicotinic acid concentration in culture medium on the specific activity of nicotinic acid hydroxylase of *Pseudomonas* sp. SH-007. Cultivation was carried out for 24 hrs at 30°C in medium containing 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and trace elements, in addition to nicotinic acid.

Table 3. Effect of inorganic nitrogen source on the specific activity of nicotinic acid hydroxylase of *Pseudomonas* sp. SH-007

Inorganic nitrogen	Concentration (g/l)	Growth (A ₆₀₀)	Specific activity (unit/mg protein)
None		1.369	16.7
	0.25	1.413	22.5
	0.50	1.452	23.8
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.75	1.514	24.7
	1.00	1.627	25.3
	1.50	1.508	23.9
(NH ₂) ₂ CO	1.00	1.449	17.5
NH ₄ Cl	1.00	1.374	12.5

Cultivation was carried out for 24 hrs at 30°C in medium containing 0.2% nicotinic acid, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and trace elements, in addition in inorganic nitrogen.

폭이 감소하였으므로 질소원으로써 (NH₄)₂SO₄의 최적 농도는 1 g/l로 하였다.

배지의 초기 pH가 증식 세포의 nicotinic acid hydroxylase에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배지의 pH를 6.8에서부터 8.0까지 변화시켜 실험을 수행한 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같이 균체의 생육과 nicotinic acid hydroxylase의 비활성은 초기 pH 7.5일 때 최대치를 나타

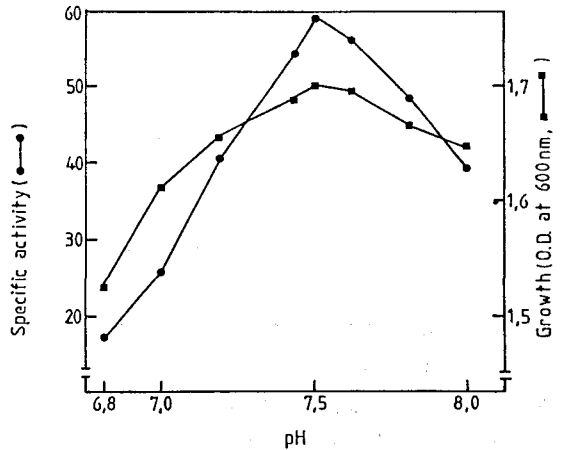


Fig. 3. Effect of medium pH on the specific activity of nicotinic acid hydroxylase of *Pseudomonas* sp. SH-007.

Cultivation was carried out for 24 hrs at 30°C in medium containing 0.2% nicotinic acid, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 50 mM phosphate buffer and trace elements.

Table 4. Effect of organic nitrogen source on the specific activity of nicotinic acid hydroxylase of *Pseudomonas* sp. SH-007

Organic nitrogen	Concentration (g/l)	Growth (A ₆₀₀)	Specific activity (unit/mg protein)
None		1.687	58.1
Yeast Extract	0.005	1.743	66.7
	0.010	1.851	65.9
	0.015	1.880	67.1
	0.020	2.052	54.8
Peptone	0.005	1.833	76.8
	0.010	1.862	73.2
	0.015	1.871	69.9
	0.020	1.926	62.1

Cultivation was carried out for 24 hrs at 30°C in medium containing 0.2% nicotinic acid, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) and trace elements, in addition to organic nitrogen.

내었다. 위의 결과는 Kulla와 Lehky³⁾의 결과인 최적 pH 7.0과는 상이한 결과였다.

균체의 생육과 nicotinic acid hydroxylase의 비활성에 미치는 유기 질소원의 첨가효과를 검토하기 위하여 Table 4와 같이 유기 질소원들을 사용하여 실험한 결과,

yeast extract와 peptone을 사용하였을 경우, 균체의 생육은 대조구에 비해 3내지 21% 증가하였으며, 0.05%의

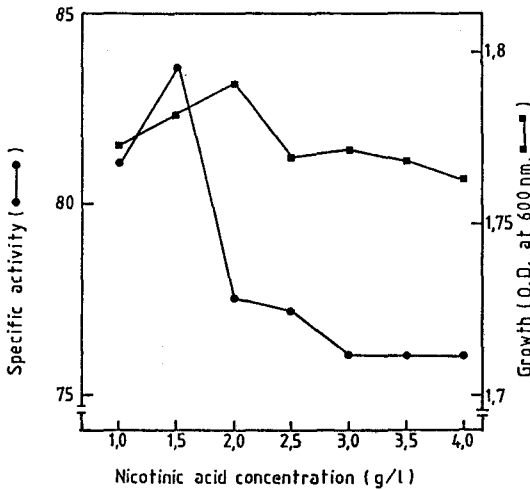


Fig. 4. Effect of nicotinic acid feeding on the specific activity of nicotinic acid hydroxylase of *Pseudomonas* sp. SH-007.

Cultivation was carried out for 24 hrs at 30°C after feeding nicotinic acid in medium containing 0.2% nicotinic acid, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 50 mM phosphate buffer and trace elements.

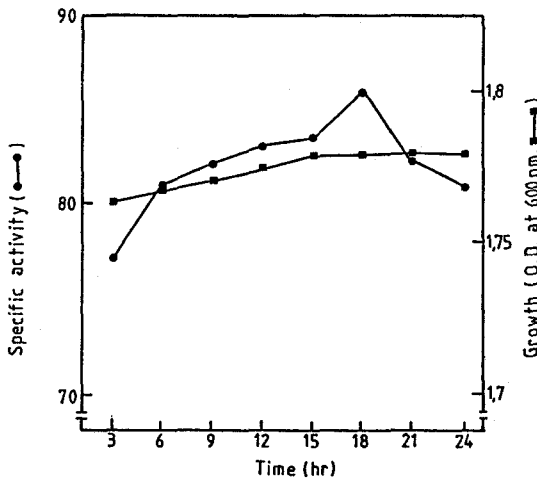


Fig. 5. Time course of the specific activity of nicotinic acid hydroxylase of *Pseudomonas* sp. SH-007. Cultivation was carried out for 24 hrs at 30°C on feeding 0.15% nicotinic acid in medium containing 0.2% nicotinic acid, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 50 mM phosphate buffer and trace elements.

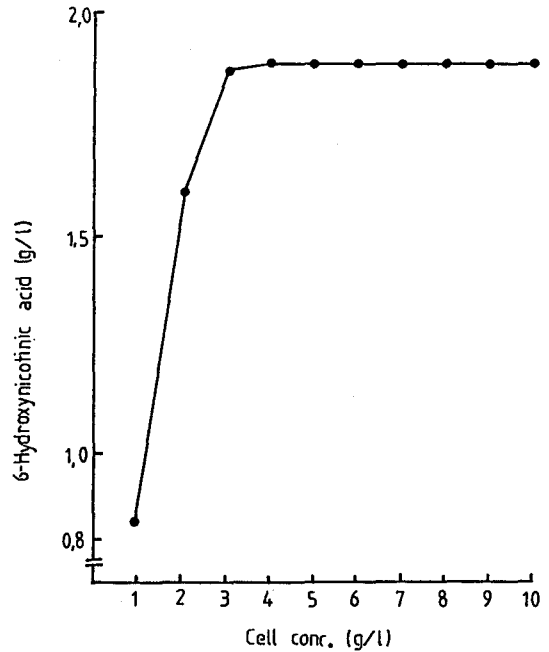


Fig. 6. Effect of cell concentration on 6-hydroxynicotinic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 4 hours at 30°C in reaction mixture (pH 7.5) containing 0.2% of nicotinic acid and 50 mM phosphate buffer.

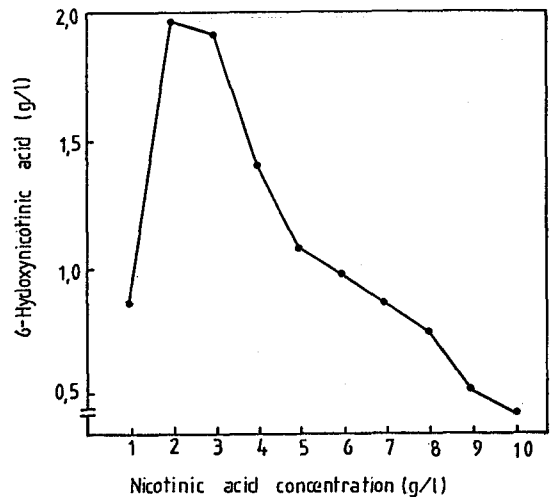


Fig. 7. Effect of nicotinic acid concentration on 6-hydroxynicotinic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 4 hours at 30°C in reaction mixture (pH 7.5) containing 4.0 g/l of cell concentration and 50 mM phosphate buffer.

peptone을 사용하였을 때에 효소의 비활성은 대조구에 비해 20%로 가장 높았다.

Nicotinic acid hydroxylase의 생성에 미치는 nicotinic

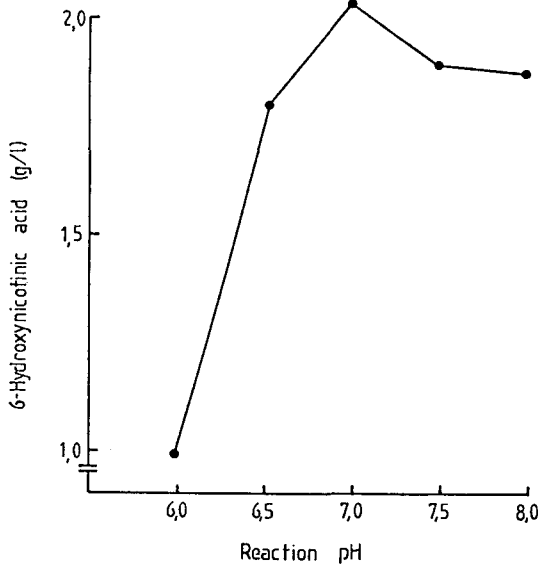


Fig. 8. Effect of pH on 6-hydroxynicotinic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 4 hours at 30°C in reaction mixture containing 4.0 g/l of cell concentration, 0.2% of nicotinic acid and 50 mM phosphate buffer.

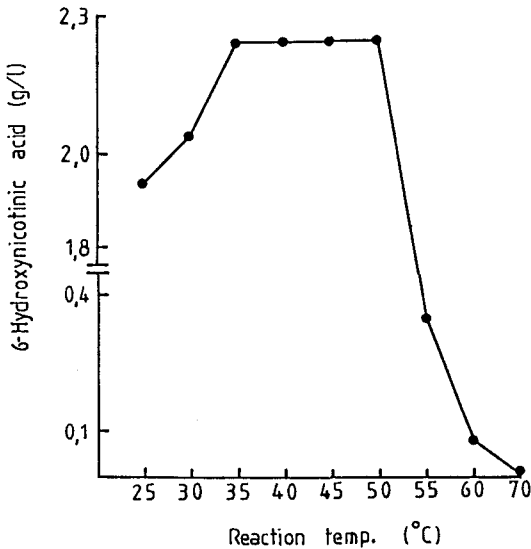


Fig. 9. Effect of temperature on 6-hydroxynicotinic acid production with resting cells.

Reaction was carried out for 4 hours at 30°C in reaction mixture (pH 7.0) containing 4 g/l of cell concentration, 0.2% of nicotinic acid and 50 mM phosphate buffer.

acid 첨가의 영향을 조사하기 위해 배양 초기의 2 g/l nicotinic acid가 균체 생육에서 거의 소모된 24시간 후에 Fig. 4에서와 같이 nicotinic acid를 첨가하여 24시간 배양한 균체의 nicotinic acid hydroxylase 비활성을 조사한 결과, 1.5 g/l의 nicotinic acid를 첨가하였을 때, 가장 높은 nicotinic acid hydroxylase의 비활성을 나타내었다.

위의 결과들로부터 얻어진 최적 조건하에서 *Pseudomonas* sp. SH-007의 생육과 nicotinic acid hydroxylase의 비활성의 경시적 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 1.5 g/l의 nicotinic acid를 첨가한 후, 배양시간이 18시간 되었을 때 균체의 nicotinic acid hydroxylase 비활성이 최대가 되었으며 초기 비활성에 비해 12% 증가한 값이었다. 또한, 시간이 더 경과됨에 따라 nicotinic acid의 비활성이 저하됨을 알 수 있었다.

휴지세포를 사용한 nicotinic acid로부터 6-hydroxynicotinic acid를 생산하기 위한 조건

휴지세포에 의한 6-hydroxynicotinic acid 생산에 있어서 균체량과 6-hydroxynicotinic acid 생성량과의 관계를 검토한 결과, Fig. 6에서 볼 수 있듯이 균체량이 3 g/l이 이를 때까지는 6-hydroxynicotinic acid 생성량이 거의 직선적인 비례관계로 증가하나 균체량이 4 g/l 이상 일 때는 거의 6-hydroxynicotinic acid 생성량이 포화됨을 알 수 있었다. 이 때의 6-hydroxynicotinic acid 생성량은 1.89 g/l이었다.

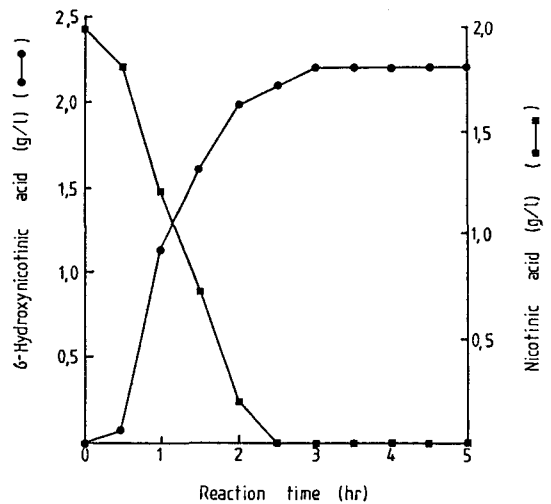


Fig. 10. Time course of 6-hydroxynicotinic acid production with resting cells.

Reactions was carried out at 30°C mixture (pH 7.0) containing 4.0 g/l of cell concentration, 0.2% of nicotinic acid and 50 mM phosphate buffer.

휴지세포에 의한 6-hydroxynicotinic acid 생산시에 nicotinic acid의 농도가 6-hydroxynicotinic acid 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, Fig. 7에서와 같이 nicotinic acid의 농도가 2 g/l에 이를 때까지 6-hydroxynicotinic acid 생성량은 계속적으로 증가하나 그 이상의 농도에서는 감소함을 알 수 있었다. 이 때의 6-hydroxynicotinic acid 생성량은 1.98 g/l이었다.

휴지세포에 의한 6-hydroxynicotinic acid 생산에 있어서 pH가 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 값을 6.0에서 8.0까지 변화시키면서 6-hydroxynicotinic acid 생성량을 비교, 검토한 결과, Fig. 8과 같이 6-hydroxynicotinic acid 생성에 있어서의 최적 pH 값은 7.0이었으며, 6.5 이하에서는 생성량이 급격히 감소됨을 알 수 있었다.

휴지세포에 의한 6-hydroxynicotinic acid 생산에 있어서 온도가 미치는 영향을 조사하기 위하여 반응온도를 25°C에서 70°C까지 변화시키면서 6-hydroxynicotinic acid 생성량을 비교, 검토한 결과 Fig. 9와 같이 6-hydroxynicotinic acid 생성의 최적 온도는 35°C이었으며, 35°C부터 50°C까지는 거의 생성량이 일정함을 보였다. 이상의 결과로부터 얻어진 최적조건하에서, *Pseudomonas* sp. SH-007의 휴지세포에 의한 nicotinic acid로부터 6-hydroxynicotinic acid 생성의 경시적인 변화를 Fig. 10에 나타내었다. 반응 후, 3시간째까지는 생성량이 계속적으로 증가하나, 3시간 이후에는 생성량이 포화되는 경향을 나타내고 있다. 이때의 최대 6-hydroxynicotinic acid 생성량은 2.22 g/l이었으며, 이론적으로 사용한 nicotinic

acid에 대한 6-hydroxynicotinic acid의 수율은 98.2%이었다.

참 고 문 헌

1. 永野洋幸, 境一成, 神山博: 日本特許 公開公報 昭 62-286968(1987)
2. 山田博忠, 戸引久雄: 日本特許 公開公報 昭 54-5978 (1979)
3. Kulla, H. and Pavel, L.: U.S. Patent, 4: 738-924 (1988)
4. Issac, H.: J. Biol. Chem., 227: 815(1957)
5. Hunt, A. L., Hughes, D. E. and Lowenstein, J. M.: Biochem. J., 66: 170(1958)
6. Hirschberg, R. and Ensign, J. C.: J. Bacteriol., 108: 571(1971)
7. Issac, H.: J. Biol. Chem., 227: 823(1957)
8. Berman, E. J. and Stainer, R. V.: J. Biol. Chem., 228: 923(1957)
9. Ensign, J. C. and Rittenberg, S. C.: J. Biol. Chem., 239: 2285(1964)
10. Hughes: J. Biol. Chem., 60: 303(1953)
11. Langer, K. J.: J. Liq. Chromatogr., 10: 377(1987)
12. Hunt, A. L., Hughes, D. E. and Lowenstein, J. M.: Biochem. J., 66: 503(1957)
13. Pinder, S., Clark, J. B. and Greenbaum, A. L.: In method in Enzymology, Vol. XVIMM(B), Academic Press, New York, 20(1971)
14. Hunt, A.L.: Biochem. J., 72: 1(1959)
15. API system, S. A.: Analytical profile index(1986)

Production of 6-hydroxynicotinic acid by nicotinic acid-assimilating *Pseudomonas* sp.

Jeong-Jin Hong, Ki-Chul Hwang and Won-Gi Bang (Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Abstract : For the production of 6-hydroxynicotinic acid from nicotinic acid, bacteria capable of assimilating nicotinic acid as a sole carbon, nitrogen and energy source were isolated from soils. Among them, SH-007, newly isolated strain having the best activity of nicotinic acid hydroxylase was selected and identified as *Pseudomonas* sp. The specific activity of nicotinic acid hydroxylase of *Pseudomonas* sp. was highest when the strain was cultured at 30°C for 24 hrs in the medium (pH 7.5) containing 2 g nicotinic acid, 1 g (NH₄)₂SO₄, and 0.5 g peptone per liter. The addition of 1.5 g/l of nicotinic acid into the 24 hrs incubated culture medium resulted in the 12% higher specific activity of nicotinic acid hydroxylase than that of the non-added control after further 18 hrs incubation. In the 6-hydroxynicotinic acid production through the reaction with resting cells, 2.22 g/l of 6-hydroxynicotinic acid was produced from 2 g/l of nicotinic acid after incubation of 3 hrs under optimum conditions, which corresponds to 98.2% of theoretical 6-hydroxynicotinic acid yield.