

## Propionibacterium shermanii에 의한 비타민 B<sub>12</sub>의 생성에 영향을 미치는 배지첨가물들에 대한 연구

김지영\* · 김공환 · 김경자† · 구양모\*

아주대학교 생물공학과, †순천향대학교 유전공학과, \*서울대학교 약학과

(Received August 8, 1994)

### Study on the Effects of Supplemented Factors on the Production of Vitamin B<sub>12</sub> by *Propionibacterium shermanii*

Ji Young Kim, Kong Hwan Kim, †Kyoung Ja Kim and \*\*Yang Mo Goo

Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon 440-749,

†Department of Genetic Engineering, Soonchunhyang University, Onyang, 337-880 and

\*Department of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Abstract**—Following the study on the fermentation conditions influencing the production of vitamin B<sub>12</sub> by *Propionibacterium shermanii* (Korean J. Biotechnol. Bioeng. 7, 126-131, 1992), the effects of some factors supplemented in the medium on the production of vitamin B<sub>12</sub> were studied. Maximum production of vitamin B<sub>12</sub> was observed when Co<sup>+2</sup> was supplemented at the concentration of 2-4 ppm in the fermentation medium. Increase of the supplemented Co<sup>+2</sup> to 12 ppm did not inhibit the growth of the organism, but it accelerated the lysis of the organism. In the literature, peptone was reported to activate the biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub>. Examination of the effect of peptone on the growth and the production of vitamin B<sub>12</sub> showed that at early stage more vitamin B<sub>12</sub> was observed in the supplemented medium, but no difference was observed in the later stage of fermentation. Examination of the time for addition and the amount of 5,6-dimethylbenzimidazole, a precursor known to influence the production of vitamin B<sub>12</sub>, showed that a maximum yield of vitamin B<sub>12</sub> was observed when 15 mg/L was added to the fermentation medium after 2 days' incubation. The effect was comparable with the increase of the production of vitamin B<sub>12</sub> when the fermentation condition was changed to aerobic condition after 2 days' culture under anaerobic condition.

**Keywords** □ Vitamin B<sub>12</sub>, Fermentation, Production, *Propionibacterium shermanii*, Cobalt ion, 5,6-Dimethylbenzimidazole.

비타민 B<sub>12</sub>는 생체내에서 carboxyl기, hydroxyl기, 또는 amino기를 수소원자와 자리바꿈을 수행하거나 C<sub>1</sub> 화합물의 대사에 관여하는 보조효소이다.<sup>1)</sup> 채식하는 사람이나 소화흡수에 요구되는 intrinsic factor가 결여된 사람은 비타민 B<sub>12</sub>를 보조영양제로 섭취하거나 주사를 맞아야 한다. 공업적으로 미생물을 발효하면 비타민 B<sub>12</sub>를 대량 생산시킬 수 있다. 특히 propionic acid를 생산하는 박테리아들<sup>2)</sup>과 methane 생성 박테리아들을 사용하여 비타민 B<sub>12</sub>의 발효가 수행되고 있

다.<sup>3-6)</sup> 비타민 B<sub>12</sub>의 발효에 이용되는 propionic acid 박테리아로는 대표적으로 *Propionibacterium*와 *Propionibacterium freudenreichii*이 있다.<sup>7-9)</sup> *P. shermanii*를 발효하여 비타민 B<sub>12</sub>를 생산할 때, 산소, 온도에 의한 영향과 최적의 탄소원과 질소원에 대한 조사결과가 보고되었다.<sup>10)</sup> 본 논문에서는 동일 균주로 비타민 B<sub>12</sub>를 생산할 때 배지첨가물, 특히 Co<sup>+2</sup>, peptone, 5,6-dimethylbenzimidazole(DMB) 등을 배지에 첨가시켜 줄때 비타민 B<sub>12</sub>의 생산에 미치는 영향을 조사하여 비타민 B<sub>12</sub>의 생산을 위한 최적의 조건을 규명하고자 하였다.

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

**실험방법**

**기기 및 시약**-Milton Roy 회사의 Spectronic 21-UVD를 분광광도계로 사용하였다. Sigma에서 구입한 비타민 B<sub>12</sub>를 표준 비타민으로 사용하였고 5,6-dimethylbenzimidazole(DMB)은 독일의 Aldrich 회사에서 구입하였다.

**균주**-*Propionibacterium shermanii* IFO 12391은 일본의 Institute of Fermentation in Osaka에 구입하여 사용하였고 비타민 B<sub>12</sub>의 검색용 균주인 *Lactobacillus leichmannii* KCTC 1058은 한국종균 보관소(KCTC)에서 분양받아 사용하였다.

**배지**-비타민 B<sub>12</sub>의 생성용 복합배지로는 glucose 30 g, yeast extract 20 g, cobalt nitrate(6 H<sub>2</sub>O) 0.015 g을 증류수 1 L에 녹인 것을 사용하였고 *L. leichmannii*의 보관용 배지로는 yeast extract 7.5 g peptone 7.5 g, glucose 10 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, tomato 주스용액은 캔에 든 tomato 주스를 원심분리하여 얻은 상등액 1 L에 celite 5 g을 넣고 잘 섞고 걸러주는 과정을 반복하여 맑은 노란색의 용액을 얻어서 약간의 toluene을 부어 냉장고에 보관한 것이다. 비타민 B<sub>12</sub> 검색배지는 Difco회사 제품을 사용하였다.

**균주의 보관**-*P. shermanii*는 비타민 B<sub>12</sub>의 생성용 배지에 혐기적 조건하에서 30°C에서 48시간 동안 120 rpm으로 진탕배양한 후에 냉장고에 보관하였다. 이것을 보관용 균주로 또는 inoculum으로 사용하였다. 보관한 균주는 4주 마다 계대배양하여 주었다. *L. leichmannii*는 보관용 배지에 inoculation한 후에 36°C에서 1일에 한번씩 stab배양하여서 계대하여 주었다. 배지는 활성을 유지하기 위하여 3일 이상 오래된 것은 사용하지 않았다.

**비타민 B<sub>12</sub>의 검색용 시약의 준비**-비타민 B<sub>12</sub> 추출용 용액은 disodium phosphate 7.5 g, 무수 citric acid 7.5 g, sodium metabisulfate 10 g을 물 100 ml에 녹인 것을 사용하였다. 표준 cyanocobalamine의 보관용액은 데시케이터에서 하루이상 건조시킨 비타민 B<sub>12</sub> 2.5 mg을 25% ethanol수용액 250 ml에 녹인 것을 사용하였다. 이 용액은 빛이 들어가지 않도록 알루미늄 foil로 싸서 냉장고에 보관하였다. 이 용액을 25% ethanol 수용액으로 비타민의 농도가 0.03 ng/ml가 되게 희석하여 사용하였다.

**발효기구**-균의 배양은 300 ml 삼각플라스크에 배

양액을 담아 회전식 진탕배양기(Korea Manhattan Co. Model 848OS)에서 수행하였다. 배양플라스크는 시료를 채취하거나 용액 또는 배지를 주사기로 주입할 수 있는 고무마개로 막아 공기의 유입을 차단하였다. 고무마개에는 질소를 채운 풍선을 단 주사기를 꽂아 배양플라스크내에 혐기적 조건을 유지시켰다.

**환원당의 정량**-환원당의 양은 Dinitrosalicylic acid법<sup>13)</sup>을 사용하여 정량하였다. 당 농도가 2.0 g/L 이하가 되도록 희석한 시료용액 8 ml에, 또는 0~2.0 g/L농도 범위에 들어있는 당 표준용액 8 ml에 0.3N Ba(OH)<sub>2</sub> 용액과 5%(w/w) ZnSO<sub>4</sub> 용액을 1 ml씩 넣어 주었다. 이 용액을 원심분리(6000 rpm, 10분)하여 상등액 1 ml에 DNS시약 1 ml를 가한 후에 100°C 항온 수조에서 5분간 가열한 다음 급속냉각한 뒤 물 10 ml를 가하여 분광광도계로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. DNS시약은 dinitrosalicylic acid 1 g과 Rochele salt 30 g에 2N NaOH 20 ml를 첨가한 뒤 가열하면서 녹여 혼합물의 최종부피를 100 ml로 맞춘 것을 사용하였다.

**균의 성장측정**-배양액의 균체량은 배양액을 10배 희석한 후에 inoculum이 들어있는 초기 배지에 기준하여 600 nm에서 분광광도계로 흡광을 측정하여 상대적인 양을 구하였다.

**비타민 B<sub>12</sub>의 정량**-비타민 B<sub>12</sub>의 정량을 Difco manual과 AOAC 및 USP에 기재된 방법을 변형하여 사용하였다.<sup>12)14)</sup> 1~2일에 한번씩 stab배양을 10번 이상 수행한 *L. leichmannii*의 검색균주와 준비한 지 4일이 지나지 않은 이 균주의 배양배지를 사용하여 수행하였다. 배양배지의 조성에서 agar를 뺀 조성의 배지 10 ml에 stab배양에서 *L. leichmannii*를 옮겨 36°C에서 16~24시간 배양한 후에 원심분리하여 얻은 균을 saline buffer로 3회 세척한 후에 50배 희석한 균용액을 inoculum으로 사용하였다. 비타민 B<sub>12</sub> 검색용 시료에 비타민 B<sub>12</sub>추출용 용액 25 ml를 넣어 주고 10분간 121°C에서 autoclave한 후에 1 ml당 비타민 B<sub>12</sub>의 양이 표준곡선에 맞는 양이 되도록 검색용액을 준비하였다. 비타민 B<sub>12</sub> 검색용 배지를 1.0 ml씩 넣어 주고 증류수로 2.0 ml가 되게 맞춘 후에 멸균하였다. 3쌍의 실험관에 비타민 B<sub>12</sub> 검색용 시료용액 0.4, 0.6, 0.8 ml를 가하고 비타민 B<sub>12</sub> 검색용 배지 1 ml씩을 가하고 증류수로 2.0 ml가 되게 맞춘 후에 멸균하였다. 5개의 실험관에 비타민 B<sub>12</sub> 검색용 배지를 1 ml씩 가

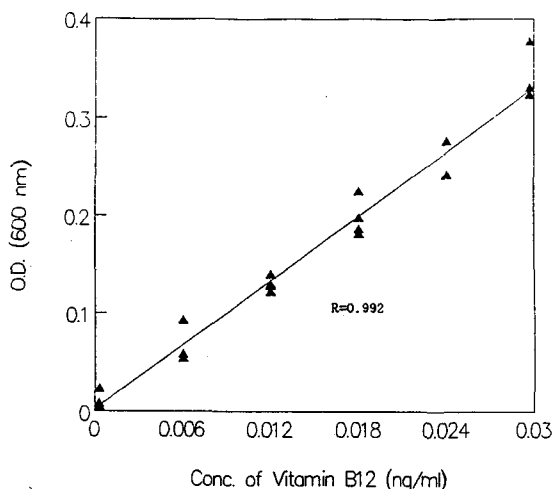


Fig. 1—Standard curve for the assay of vitamin B<sub>12</sub>.

하고 증류수로 2.0 ml가 되게 맞춘 후에 멸균하였다. 5개의 실험관에 비타민 B<sub>12</sub> 검색용 배지 1 ml와 증류수 1 ml를 가한 용액을 동일한 조작을 하여 2개는 blank로 사용하였고 3개에는 inoculum을 가하여 비타민 B<sub>12</sub>가 결여된 배지에서의 균주의 성장 정도를 결정하는 blank로 사용하였다. 멸균한 실험관을 사용하였으며 배양액을 실험관에 가한 후에는 121°C에서 3~5분간 autoclave하여 준 후에 inoculum을 1 방울씩 가하여 주고 36°C에서 16~24시간 배양하였다. 배양중에 배양액을 2시간 간격으로 조사하여 표준 비타민 B<sub>12</sub>를 가장 많이 가한 실험관에서 혼탁도가 더 이상 증가하지 않을 때에 배양을 중지하고 각 배양액의 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Inoculum을 가하지 않은 배양액을 blank로 사용하여 흡광 0 점으로 계산하였다. 이때 얻어진 비타민 B<sub>12</sub>의 대표적인 표준곡선이 Fig. 1에 보이고 있다. 비타민 B<sub>12</sub>의 검색이 필요할 때마다 표준곡선을 같이 구하여 비타민 B<sub>12</sub>의 양을 정량하였다.

***P. shermanii*의 배양과 비타민 B<sub>12</sub>의 생산성 조사**— 혐기적 조건은 고무마개로 배양액이 들어 있는 플라스크를 막은 후에 주사기를 이용하여 내부의 공기를 빼내고 질소를 채운 고무풍선에 연결된 숨을 채운 주사기를 꽂아 플라스크를 질소로 채웠다. 이 과정을 반복하여 플라스크의 내부의 공기를 질소로 완전히 바꾸어 주었다. 배양을 하는 중에도 플라스크 내에 외부보다 더 높은 압력을 유지하기 위하여 질소 풍선을 플라스크 고무마개에 계속 꽂아 두었다. 호기적인 조건은 플라스크의 질소 고무풍선과 고무마개를

면봉으로 바꾸어 주고 진탕배양하여 이루었다. 배양액의 pH조절은 배양액의 pH를 측정한 후에 pH를 7.0으로 맞추기 위하여 필요한 1N NaOH의 양을 구하고 이 값을 플라스크 내에 남아 있는 배양액에 환산하여 주고 2N NaOH용액을 가하여 주어 배양액의 pH를 7.0으로 맞추어 주었다. 배양은 500 ml 삼각플라스크에 200 ml의 배지를 가하고 수행하였으며 시료의 채취는 2.0~3.5 ml씩 하였다. Inoculum은 배지의 10%가 되도록 가하였다.

## 결과 및 고찰

**비타민 B<sub>12</sub>의 정량과 *P. shermanii*의 배양**—비타민 B<sub>12</sub>의 양을 분석하는 방법으로는 성분이 정확히 정의된 합성배지를 사용할 수 있다. 초기에 이 방법을 여러번 시도하였으나 사용한 시약의 순도때문에 실패하였다. 검색에 사용한 균주가 워낙 미량의 비타민 B<sub>12</sub>를 감지하기 때문에 20여가지의 시약을 조성으로 가지는 비타민 B<sub>12</sub>가 전혀 안들어 있는 검색용 합성배지를 만드는 것이 어려웠다. 그래서 본 실험에서는 Difco회사에서 제조한 비타민 B<sub>12</sub>검색용 배지를 사용하였다. 비타민 B<sub>12</sub>의 양을 정량하기 위하여 매번 보정곡선을 2개이상의 자료를 평균하여 구하여야 하기 때문에 많은 양의 배지가 요구되었다. 그래서 본 연구에서는 상용하는 10 ml의 용액대신에 2 ml씩을 사용하여 *L. leichmannii*를 배양하여 표준곡선을 구하고 비타민 B<sub>12</sub>의 양을 정량하였다. 대표적인 표준곡선이 Fig. 1에 보이고 있다. 표준곡선의 R값은 0.99에서 0.98까지 얻어졌다. 오차가 많이 포함된 경우에는 재분석하였다.

*L. leichmannii*는 짧은 간균 형태이지만 비타민 B<sub>12</sub>가 들어 있지 않은 합성배지에 배양하였을 때는 비타민 B<sub>12</sub>의 결여로 인하여 보통의 길이보다 약 10배 정도 더 긴 모양으로 변형되는 것이 관찰되었다. 이것은 비타민 B<sub>12</sub>가 결여되어 deoxyribonucleotide가 합성되지 못하여 균의 정상적인 분열이 일어나지 못하는 반면 다른 영양분이 충분하여 균체의 성장이 계속 일어나 생겨나는 현상으로 생각된다. *P. shermanii*의 petri dish상의 배양은 도말한 아가판을 약 0.5 g 정도의 pyrogallol과 2N NaOH용액 2~3 ml를 넣은 워트 뚜껑에 포개어 parafilm으로 잘 밀봉하여 30°C에 보관하여 이루었다. 24시간 후에 노란색의 큰

콜로니를 형성하였다.

*P. shermanii*는 성장하면 초산과 propionic acid를 생성하여 배양액의 pH가 떨어진다. 특히 균을 접종하여 배양하면 24~36시간 동안에 균이 왕성하게 성장하면서 배양액의 pH가 급격히 떨어진다. 따라서 되도록 좋은 배양조건을 만들어 주기 위하여서는 짧은 시간 안에 pH를 보정하여 주는 것이 요구되는 데 균을 접종한 후에 24시간 동안에는 12시간마다 24~36시간 사이에는 6시간 마다 배양액의 pH를 보정하여 주었다. 96시간 이후에는 균의 분해와 유기산의 생성이 균형을 이루어 배양액의 pH의 변화는 관찰되지 않는다.

**혐기적 조건과 호기적 조건이 *P. shermanii*의 배양에서 비타민 B<sub>12</sub>의 생산에 미치는 영향**— 이미 보고한 바와 같이 호기적인 조건하에서 *P. shermanii*를 배양하면 균의 생장이 현저히 떨어지고 비타민 B<sub>12</sub>의 생산도 거의 없었다.<sup>10)</sup> 혐기적인 조건하에서는 균의 성장도 뛰어나 48시간 후에 최고에 달하고 비타민 B<sub>12</sub>은 168시간 까지 계속 증가하는 것이 관찰되었다. 혐기적 조건으로 3일간 배양한 후에 호기적인 조건으로 바꾸어 주면 비타민 B<sub>12</sub>의 생산을 혐기적 조건을 계속 유지하는 경우보다 거의 2배까지 더 많았으나 배양을 계속하면 균이 더 많이 분해되는 것이 관찰되었다. 비타민 B<sub>12</sub>의 발효에서 산소가 미치는 영향은 전 논문<sup>10)</sup>에 자세히 인용되어 있고 결과도 자세히 기술되어 있다.

**Co<sup>+2</sup>의 농도가 비타민 B<sub>12</sub>의 생산에 미치는 영향**— Co<sup>+2</sup>은 비타민 B<sub>12</sub> 분자에 들어있는 중금속으로 비타민 B<sub>12</sub>의 생합성에 중요한 조절기능을 하리라 생각된다. 1964년에 Sathyanarayana는 미량의 Co<sup>+2</sup>이 비타민 B<sub>12</sub>의 생산을 촉진시키며 배양액에 3 mg/L의 농도가 되도록 Co<sup>+2</sup>을 가하여 주면 3배 더 많은 양의 비타민 B<sub>12</sub>가 생성된다고 보고하였다.<sup>15)</sup> 그러나 4~5 mg/L의 Co<sup>+2</sup>의 농도는 균의 성장을 저해하고 비타민 B<sub>12</sub>의 생산도 오히려 감소시킨다고 보고하였다. 본 실험에서도 유사한 결과를 얻었다. 즉 cobaltous nitrate를 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 및 100 ppm이 들어있는 플라스크에 균을 혐기적으로 배양하여 배양 7일째 생성된 비타민 B<sub>12</sub>의 양을 조사하였을 때 Fig. 2에 보인 바와 같이 cobaltous nitrate가 10~20 ppm 들어 있는 배양액, 즉 Co<sup>+2</sup>이 2~4 ppm 들어 있는 배양액에서 가장 많은 양의 비타민 B<sub>12</sub>가 가장 많이 발견되고 있다.

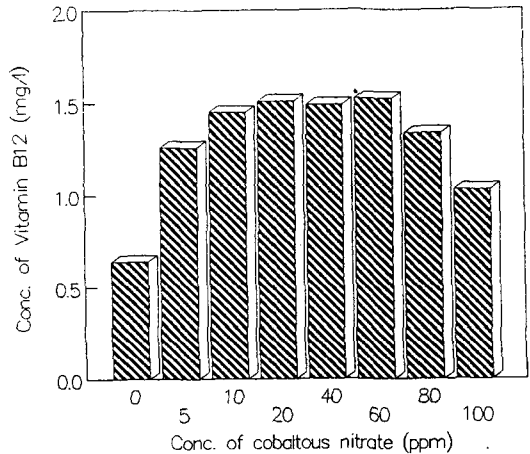


Fig. 2—Effect of cobaltous nitrate concentration on vitamin B<sub>12</sub> production.

이 결과는 Sathyanarayana 등의 연구와 동일한 결과가 얻어졌다. 그러나 Sathyanarayana 등은 Co<sup>+2</sup>이 4~5 ppm일 때는 균의 성장과 비타민 B<sub>12</sub>의 생성량이 감소한다고 보고하였지만 Fig. 2에 보인 바와 같이 Co<sup>+2</sup>이 12 ppm이 될 때까지 비타민 B<sub>12</sub>의 생산량은 줄지 않는 것으로 나타났다. Cobaltous nitrate를 0, 20, 100 ppm의 농도로 첨가시킨 배지에서 *P. shermanii*를 배양하여 Co<sup>+2</sup>이 과잉으로 존재할 때 균의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 3에 보인 바와 같이 96시간까지의 배양에서는 균의 성장에는 영향이 없는 것으로 나타났고 그 이후에는 균의 양이 감소하는 것이 관찰되어 균의 보존능력에는 Co<sup>+2</sup>이 영향을 끼치는 것으로 나타났다. Co<sup>+2</sup>을 과량으로 첨가시킨 배양액에서는 60시간이 지나면서 배양액이 적색을 띠기 시작하였는데 첨가한 Co<sup>+2</sup>의 농도가 높을수록 짙은 붉은색이 되었다. 그러나 Co<sup>+2</sup>가 들어 있지 않은 대조 배양액에서는 적색화 현상이 관찰되지 않았다. 대조배양액에 가하여 준 yeast extract에 Co<sup>+2</sup>이 포함되어 있어서 control에서도 비타민 B<sub>12</sub>가 어느정도 생성되었는데 cobalt nitrate를 20 ppm을 가하여 준 배양액에서는 약 3배 정도 더 많은 양의 비타민 B<sub>12</sub>가 생성되었다(Fig. 4 참조). 비타민 B<sub>12</sub>의 발효중에 배양액에 첨가한 Co<sup>+2</sup>은 중금속으로 생체의 많은 종류의 효소의 inhibitor로 기능할 수 있어 이 금속이온이 균의 포도당의 대사속도에 영향을 미치는지를 조사하였다. Co<sup>+2</sup>의 농도에 관계없이 48시간째 배지에 첨가한 포도당은 거의 다 소비되었다. 이

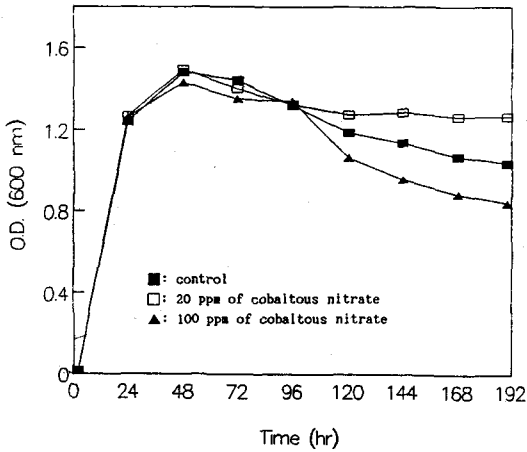


Fig. 3—Effect of cobalt ion on the growth of *P. shermanii*.

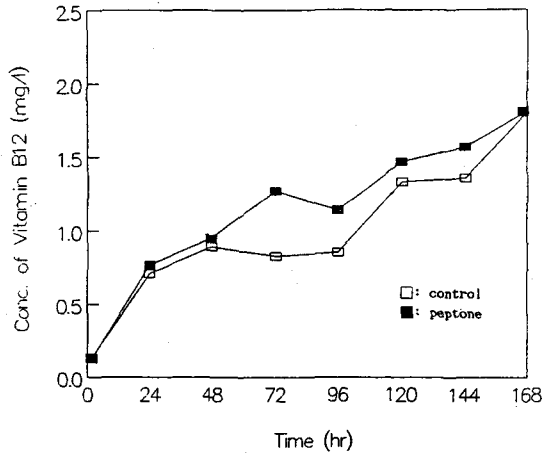


Fig. 5—Effect of peptone on the production of vitamin B<sub>12</sub> by *P. shermanii*.

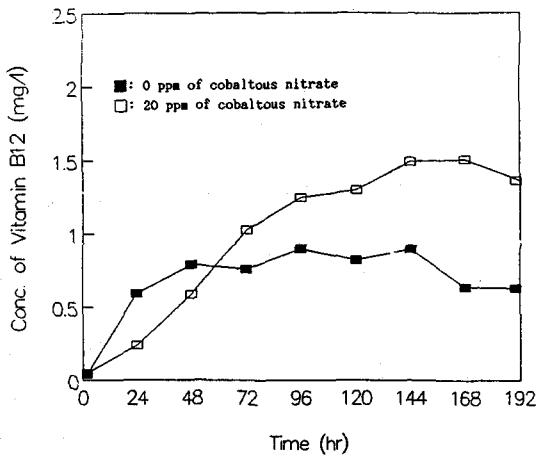


Fig. 4—Effect of cobalt ion on the production of vitamin B<sub>12</sub> by *P. shermanii*.

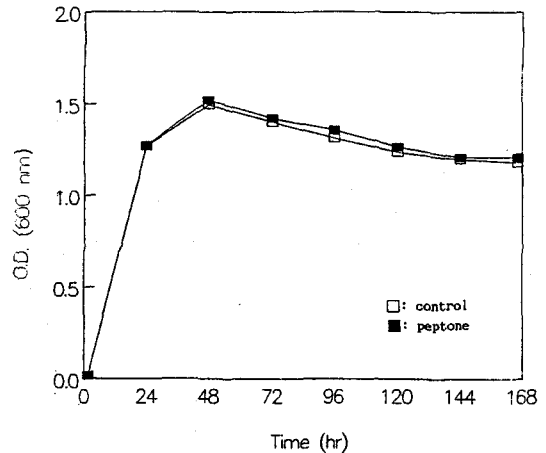


Fig. 6—Effect of peptone on the growth of *P. shermanii*.

결과에서 과량의  $Co^{+2}$ 이 포도당의 대사와 성장에는 영향이 없으며 초기에 비타민 B<sub>12</sub>의 생성을 활성화시키는 것이 관찰되었다.

Peptone이 균주의 성장과 비타민 B<sub>12</sub>의 생산에 미치는 영향—Kaleja,<sup>16)</sup> Baranova,<sup>17)</sup> 그리고 Marawaha<sup>17)</sup>는 아미노산과 펩타이드가 균의 성장을 촉진하고 비타민 B<sub>12</sub>의 생성에 좋은 효과를 나타내는 것으로 보고하였다. 그래서 본 연구에서도 배지에 peptone을 첨가하여 주면 비타민 B<sub>12</sub>의 생산이 되는지 또는 균주의 성장에 영향을 끼치는지를 조사하였다. Fig. 5와 6에 보이고 있듯이 peptone은 균주의 성장에는 거의 영향을 보이지 않았으나 비타민 B<sub>12</sub>의 생산은 72시

간이 될 때 증가하였으나 168시간의 배양후에는 peptone을 가한 배양액이나 가하지 않은 배양액에 동일한 양이 관찰되었다.

5,6-Dimethylbenzimidazole(DMB)가 비타민 B<sub>12</sub>의 생산에 미치는 영향—Marawaha의 연구에서 3일째 호기적인 조건으로 바꾸어 배양할 때 DMB는 6일째 배양액에 첨가하여 줄 때 최대의 비타민 B<sub>12</sub>의 생산이 관찰됨을 보고하였다.<sup>19)</sup> 본 연구에서는 혐기적인 배양을 수행하면서 DMB를 배양 2, 4 및 6일째 15 mg/L가 되도록 가하여 주어 Fig. 7에 보인 결과를 얻었다. 배양초기에 그리고 4일째 DMB를 첨가하여 준 배양액에서는 비타민 B<sub>12</sub>의 생산이 증가되었으나 6일째 넣어준 배양액에서는 전혀 영향을 보이지 않았다. 균

문 헌

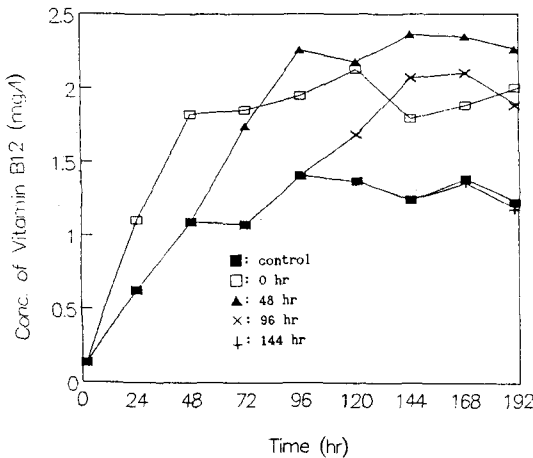


Fig. 7—Influence of 5,6-dimethylbenzimidazole addition at different phases of cultivation on vitamin B<sub>12</sub> production by *P. shermanii*.

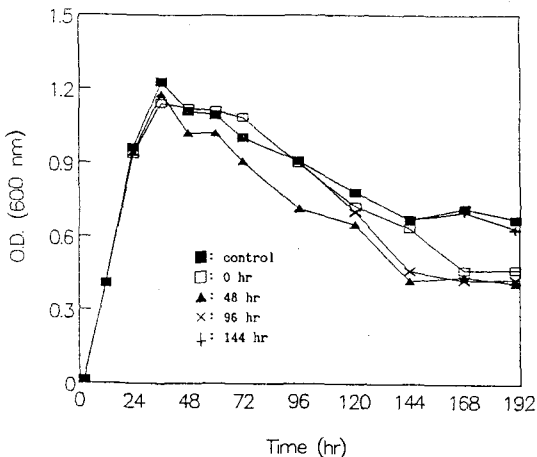


Fig. 8—Influence of 5,6-dimethylbenzimidazole addition at different phases of cultivation on growth of *P. shermanii*.

의 성장이 끝난 2일째 DMB를 배양액에 가하여 주었을 때 비타민 B<sub>12</sub>의 생산이 가장 많이 증가하였다. Fig. 8에 보이고 있는 바와 같이 DMB는 균주의 성장에 거의 영향을 미치지 못하였다.

감사의 말씀

본 연구는 과학재단 설립 신 의약품 연구센터의 연구비 지원과 순천향대학교 연구비 지원에 의하여 수행되었다.

- 1) Dolphin, D., 19832, B<sub>12</sub>, Vols. 1 and 2, John Wiley and Sons, New York.
- 2) Hetinga, D. H. and Reinbold, G. W., 1972, The propionic acid bacteria-A Review, *J. Milk Food Technol.*, **35**, 295-447.
- 3) Nishio, N., Yano, T., and Kamikubo, T. 1975, Isolation of methanol utilizing bacteria and its vitamin B<sub>12</sub> production. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 21-27.
- 4) Nishio, N., Udda, M., Omae, Y., Hayashi, M. and Kamikubo, T., 1976, Utilization of hydrocarbon and vitamin B<sub>12</sub> production by *Bacillus badius*, *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 2037-2043.
- 5) Kamikubo, T., Hayashi, M., Nishio, N. and Nagai, S., 1978, Utilization of non-sugar sources for vitamin B<sub>12</sub> production, *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 971-973.
- 6) Sodano, C. S. Vitamins. Synthesis, production and use. Advances since 1970. 1978. Noyes Data Corporation, Park Ridge, New Jersey, pp. 61-83.
- 7) Crueger W and Crueger, A. 1984. Biotechnology(A handbook of industrial microbiology), Science Tech., pp. 187-190.
- 8) Lago, B. D. and Kaplan, L. 1981, In "Advances in Biotechnology", Vol. 3, Proc. 6th Int. Ferm. Symp., London, Canda, Pergamon, pp. 241-246.
- 9) Florent, J. and Ninet, L., 1979, In "Microbial Technology", H. J. Peppler and D. Perman, Eds, 2nd Ed., Vol. 1, Academic Press, N. Y. pp. 497-519.
- 10) Kim, J. Y., Kim, K. H., and Goo, Y. M., 1992, Study on the fermentation conditions influencing the production of vitamin B<sub>12</sub> by *Propionibacterium shermanii*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **7**, 126-131.
- 11) G. H. Miller, 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- 12) Difco Manual, 10th Ed. 1984. Difco Lab.
- 13) AOAC Methods. 14th Ed. 1984. Washington D. C AOAC. pp. 862-865.
- 14) U. S. Pharmacopeia National Formulary. USP XXI Rockville, MD, U.S. Pharmacopeial Convention, pp 1183-1185.
- 15) Sathyanarayana, R. S.: Wahsingto, D. R. 1964, In

- fluence of cobalt ion on *Propionibacterium freudenreichii*. *Nature*, 212-213.
- 16) Kaleja, E. 1964. The influence of some amino acids, trace elements, and B group vitamins on the growth and vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis of *Propionibacterium shermanii* cultures. *Mikrobiol. Protsessy i Proizv., Akad. Nauk Latv. SSR, Inst. Mikrobiol.* 15-21. CA, **62**, 4355.
- 17) Baranova, N. A. and Vorobeva, L. I. 1971. Influence of peptides on vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis by *Propionibacterium shermanii*. *Biol. Nauki* **14**, 97-99. CA, **75**, 18548.
- 18) Marwaha, S. S.: Sethi, R. P.: Kennedy, J. F. 1983. Role of amino acids, betine and cholinein vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis by strains of *Propionibacterium*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **5**, 454-456.
- 19) Marwaha, S. S.: Sethi, R. P.: Kennedy, J. F. 1983. Influence of DMB on biosynthesis by strains of *Propionibacterium*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **5**, 361-364.