

Pseudomonas sp. L-10 에 의한 글루탐산의 생산

이종수¹ · 안용근² · 김나미³ · 이석건

¹배재대학교 유전공학과, ²충청전문대학 식품영양과,

³한국인삼연구소연구원, 충남대학교 식품공학과

Production of Glutamic Acid by *Pseudomonas* sp. L-10

Jong-Soo Lee¹, Young-Geun Ahn², Na-Mi Kim³, Suk-Kun Lee

¹Dept. of Genetic Engineering, Pai-Chai University, Taejon 302-735, Korea

²Dept. of Food Nutrition, Chungcheong Junior College, Cheonwon 363-890, Korea

³Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

Dept. of Food Technology, Chungnam Natl. University, Taejon 305-764, Korea

Abstract

A bacterium L-10 which produce much of glutamic acid was isolated from soil and identified as the genus *Pseudomonas*. The maximal glutamic acid production was obtained when the strain was cultured at 30°C for 30 hrs in the optimal medium containing 5% glucose, 0.5% each of urea and yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, 0.3% (NH₄)₂HPO₄, 0.5µg/l biotin and initial pH 7.0, and then final glutamic acid production under the above conditions was 1.2mg/ml of cell cultures.

Key words : Glutamic acid, *Pseudomonas* sp. maximal glutamic acid production, urea and biotin.

서 론

아미노산은 생체 단백질의 구성요소로, 저칼로리 감미료, 향산화제, 빵이나 사료 등의 첨가제, 의약품 및 각종 중합체 원료, 생리활성 조절 물질 등으로 폭 넓게 사용되고 있으며 최근 그 수요는 더욱 증가하고 있어서¹⁾ 생산량 증가를 위한 생산방법의 개선과 생산효율이 높은 균주의 검색과 육종이 필요하다.

현재 많은 종류의 아미노산들이 미생물을 이용한 직접 발효법이나 변이주 이용법, 전구체 첨가법 및 효소적 방법 등으로 생산되고 있으며 그 중 글루탐산이 약 90%를 차지하고 있다²⁾.

대표적인 글루탐산 생산균주는 *Corynebacterium glutamicum*^{3,4)}와 *Brevibacterium flavum* 등⁵⁾이 있으며 각종 당과 황산암모늄, 요소 등의 질소원을 이용하여 사용당의 약 30% 수율로 글루탐산을 생산하고 있고,

비오틴과 C₁₁~C₁₈ 지방산 및 페니실린등의 첨가로 세포벽 투과성을 증진시켜 글루탐산 수율을 10%이상 증대시켰다. 또한, α-케토글루타르산에서 화학적 방법으로 글루탐산을 생산한 결과 보고⁶⁾가 있고 구연산 같은 유기산⁷⁾이나 푸마르산⁸⁾에서도 글루탐산이 생산된 결과 보고가 있다. Yamada 등⁹⁾은 *B. lactofermentum*의 phosphoenolpyruvate carboxylase 활성이 증가된 monofluoroacrylate 내성 변이주가 글루탐산 수율을 증가시켰다고 보고하였고, 조 등¹⁰⁾은 알칼리성 *Bacillus brevis*가 1%의 푸마르산에서 약 22%의 글루탐산을 전환시킨 결과를 보고하였다.

본 실험에서는 미생물을 이용하여 글루탐산을 대량 생산하고자 자연계로부터 글루탐산 생산력이 우수한 세균을 분리하여 동정하고 글루탐산 생산을 위한 배지 조성 및 배양조건 등을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 글루탐산 생산균주의 분리

대전을 중심으로 한 충남지역의 토양과 퇴비 등을 멸균 생리식염수에 현탁시킨 후 1% 푸마르산을 함유한 육즙 평판 배지에 접종하여 30℃에서 48시간 배양한 다음 1차로 생육이 왕성한 균들을 선별하였다. 이들을 beef extract 0.2%, Bacto-peptone 0.2%, glucose 5.0%, urea 1.3%, fumaric acid 1.0%, MgSO₄ 0.04%, FeSO₄ 0.01%, KH₂PO₄ 0.2% (pH 7.0)를 함유한 선정배지에 접종하여 30℃에서 48시간 진탕배양한 후 6,000rpm 으로 10분간 원심분리하여 상정액을 회수한 다음 상정액 중의 글루탐산 함량을 측정하여 시험균주를 선정하였다.

2. 균주의 동정

선정균주의 형태학적, 생화학적 및 배양학적 특성 등을 Manual of Method for General Bacteriology¹⁰⁾와 Micorobiological Method¹¹⁾ 에 따라 조사한 후 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology¹²⁾ 로 동정하였다.

3. 글루탐산의 확인 및 정량

배양액을 원심분리하여 얻은 상정액에 1N HCl을 가해 글루탐산의 등전점인 pH 3.2까지 조정후 4℃에서 3시간 방치시킨 후 15,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 침전물을 증류수에 녹였다. 이 용액을 2차원 TLC (1차 전개용매 ; 1-propanol : H₂O (9 : 5), 2차 전개용매 ; 1-butanol : acetic acid : H₂O (13 : 2 : 5)) 전개하여 글루탐산을 확인하고 조 등⁹⁾

Table 1. The morphological, cultural and biochemical characteristics of *Pseudomonas* sp. L-10

Morphological characteristics	
Form	rod
Size	1.97×2.50~2.90 μ m
Motility	positive
Garm staining	negative
Cultural characteristics	
Nutrient agar slant	abundant
1% glucose nutrient agar	abundant
7% NaCl nutrient agar	scanty
Temperature for growth, °C	25~40
pH for growth	5.0~10.5
Oxygen requirement	aerobic
Chloramphenicol, Tetracycline	resistant
Streptomycin	
Biochemical characteristics	
Catalase activity	positive
Urease activity	positive
Oxidase activity	positive
Hydrolysis of starch and casein	positive
Indole formation	negative
H ₂ S production	negative
Citrate utilization	positive
Methyl red /V.P. test	negative
Acid production	
sucrose, maltose, ribose, starch	positive
glucose, galactose, lactose, xylose	negative

의 Ninhydrin 변법으로 글루탐산을 정량하였다.

결과 및 고찰

1. 글루탐산 생산균주의 분리 및 동정

푸마르산을 함유한 육즙배지에서 생육이 왕성하여 무작위로 선별한 285 균주 중 18 균주가 글루탐산을 생산하고 있는 것을 확인하고, 최종적으로 배양액 m/당 0.51mg의 글루탐산을 생산하는 L-10 균주를 시험균주로 선정하였다.

L-10의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성 등을 조사한 결과 시험균주는 그람 음성의 호기성 단간균($1.97 \times 2.5 \sim 2.90 \mu\text{m}$)으로 운동성이었고, 7% NaCl을 함유한 육즙 배지에서 생육하지 않았다. 또한, 슈크로스, 말토스, 리보스, 전분 등으로부터 산을 생성하였고 citrate를 이용하였으며, catalase, urease, oxidase 등의 효소활성을 나타내었다. Methyl red와 Voges-Proskauer 시험은 음성이고 인돌을 생산하지 않았다 (Table 1). 이상의 시험결과를 종합할 때 L-10 균주는 *Pseudomonas mendocina*와 유사하였으나 최종 동정 실험이 진행 중이므로 *Pseudomonas* sp. L-10으로 명명하였다.

2. 글루탐산 생산조건

1) 배지의 종류

글루탐산 및 다른 아미노산 생산배지로 알려진 몇 종의 배지에 *Pseudomonas* sp. L-10을 접종하여 30°C에서 48시간 진탕배양한 후 상정액의 글루탐산 함량을 측정된 결과 Fig. 1과 같이 5% glucose, 0.5%의 urea와 yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (pH 6.0) 조성을 가진 Ikida의 5번 배지¹³⁾에서 글루탐산이 가장 많이 생산되었다. 이것은 조 등⁹⁾이 2% 푸마르산에 0.8% nutrient broth를 첨가한 배지에서 글루탐산이 가장 많이 생산되었다는 결과와 다소 다른 결과이다.

2) 배지의 초기 pH와 배양온도

배지의 초기 pH가 글루탐산 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 pH 6.0~7.0에서 글루

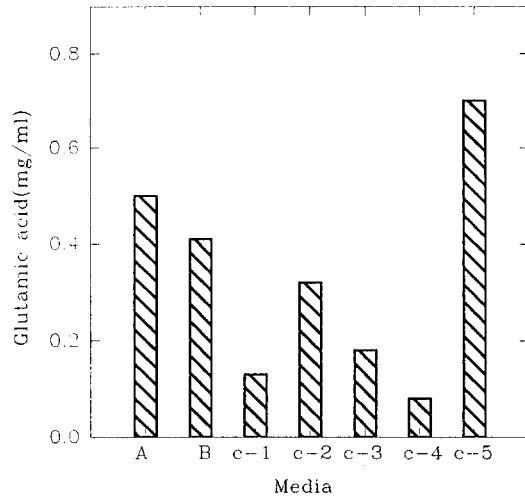


Fig.1 Effect of various medium on the production of glutamic acid by *Pseudomonas* sp. L-10.

A: Beef extract 0.3%, peptone 0.5% (pH 7.2)

B: Glucose 5.0%, urea 1.3%, beef extract 0.2%, peptone 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%, FeSO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.2% (pH 7.0)

C-1: Glucose 5.0%, urea 0.8%, beef extract 0.2%, peptone 0.2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, K_2HPO_4 1% (pH 7.2)

C-2: Glucose 5.0%, beef extract 0.2%, peptone 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, K_2HPO_4 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0%, CaCO_3 3.0% (pH 7.2)

C-3: Glucose 1.0%, urea 0.8%, beef extract 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, K_2HPO_4 0.1% (pH 7.2)

C-4: Glucose 1.0%, urea 0.5%, yeast extract 0.5%, peptone 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, K_2HPO_4 0.1% (pH 7.2)

C-5: Glucose 5.0%, urea 0.5%, yeast extract 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, K_2HPO_4 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.3% (pH 6.0)

탐산이 가장 많이 생산되었고 pH 5.0 이하와 9.0 이상에서는 거의 생산되지 않았다. 한편, 조 등⁹⁾은 알칼리성 세균에 의한 글루탐산 생산에 관한 연구에서 pH 8.0~9.0에서만 약 0.74~0.94mg/ml의 글루탐산이 생산되었다고 보고하였다.

또한 *Pseudomonas* sp. L-10에 의한 글루탐산 생산

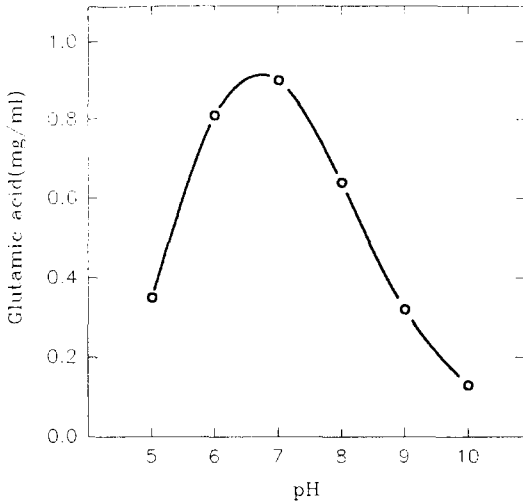


Fig. 2 Effect of initial pH of medium on the production on the production of glutamic acid by *Pseudomonas* sp. L-10.

에 미치는 배양온도의 영향을 조사한 결과 30°C에서 글루탐산을 가장 많이 생산하였고 40°C에서도 30°C의 25% 정도가 생산되었다(Fig. 3).

3) 배양시간

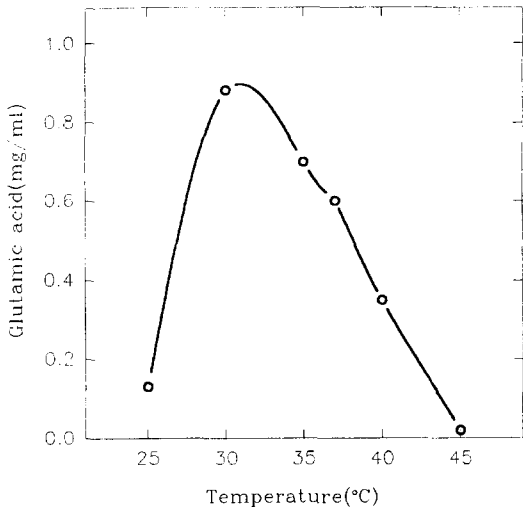


Fig. 3 Effect of culture temperature on the production of glutamic acid by *Pseudomonas* sp. L-10.

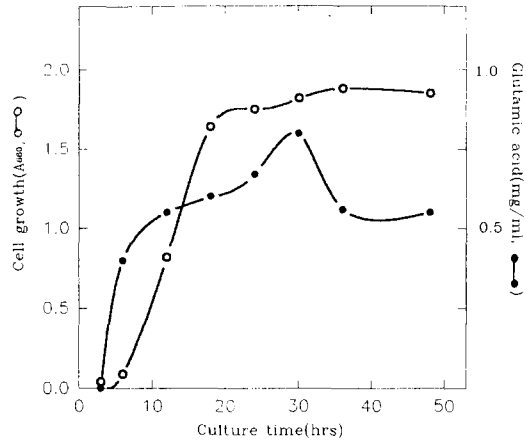


Fig. 4 The time course of the production of glutamic acid by *Pseudomonas* sp. L-10.

위의 글루탐산 생산 최적조건에서 배양시간에 따른 균 생육과 글루탐산의 생산을 조사한 결과 Fig. 4와 같이 배양 30시간에 글루탐산 생산이 최고치를 보인 후 점차 감소하였다. 이것은 생산된 글루탐산에 의하여 이들의 세포내 합성이 억제되었기 때문인 것¹³⁾으로 추정되며, 또한 조 등⁹⁾의 알칼리성 세균에 의한 글루탐산 생성 실험에서 48시간에 최고의 생성량을 보인 결과보다 배양시간이 좀 더 빠른 결과이었다.

4) 세포투과성 조절 물질

일반적으로 글루탐산이 세포 내에서 건조 세포 mg 당 약 25~35 μ g 축적되면 세포 자체의 되돌림 저해에 의하여 생합성이 억제된다¹³⁾. 따라서 글루탐산을 대량 생산하기 위해서는 글루탐산 생산균주의 세포벽 합성을 저해하여 세포의 투과성을 증진시켜야 한다. 따라서 세포벽 합성 저해물질로 알려진 비오틴과 항생물질이 *Pseudomonas* sp. L-10의 글루탐산 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 (Table 2) 비오틴을 0.5 μ g/l 첨가하였을 때 글루탐산 생산량이 약 20% 증가되었으나 그 이상 첨가하면 오히려 생산량이 감소하였다. 이는 *Corynebacterium glutamicum*의 경우 2.5 μ g/l의 비오틴 첨가시 글루탐산 생성이 최고로 증가(30mg/ml) 되었다는 결과¹³⁾보다 다소 낮은 농도이다. Ampicillin

Table 2. Effect of biotin on the production of glutamic acid by *Pseudomonas* sp. L-10

Biotin concentration ($\mu\text{g}/\text{l}$)	Glutamic acid (mg/ml)
0	0.80
0.1	1.05
0.5	1.20
1.0	1.10
5.0	0.70
10.0	0.64

의 첨가는 글루탐산 생성 증가에 별 영향을 주지 않았다(data not shown).

요 약

토양으로부터 글루탐산 생산력이 우수한 세균을 분리하여 *Pseudomonas* sp. L-10 으로 동정하였다.

Pseudomonas sp. L-10에 의한 글루탐산 생산은 시험균주를 5% glucose, 0.5% urea와 yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 의 조성을 가진 배지에 0.5 $\mu\text{g}/\text{l}$ 의 비오틴을 첨가하여 pH 7.0으로 조정후 30 $^\circ\text{C}$ 에서 30 시간 진탕 배양하였을 때 가장 좋았으며 이 때 배양액 ml당 약 1.2mg의 글루탐산이 생산되었다.

감사의 말

본 연구는 '95학년도 배재대학교 교내 학술 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Wulf, C. and Anneliese, C. : *In Biotechnology*, Science Tech. Madison, WI. p. 127-147 (1984)
2. 박무영 : 응용미생물학, 민음사. p. 47-78 (1995)
3. Kinoshita, S., Udaka, S. and Shimono, M. : Amino acid fermentation(I) Production of L-glutamic acid by various microorganism, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3 : 193-205 (1957)

4. Kinoshita, S., Nakayama, S. and Akita, S. : Taxonomic study of glutamic acid accumulating bacteria, *Micrococcus glutamicus*, nov. sp. *Bull Agric. Chem. Sac. Japan*, 22 : 176-185 (1958)
5. Housewright, R. D and Thorne, C. B. : Production of glutamic acid from α -ketoglutaric acid by chemical method, *J. Bacteriol.* 60 : 89-92 (1956)
6. Synthe, C. V. and Huang, H. T. : U. S. Patent, 2, 749, 279 (1956)
7. Ogawa, T., Tsunoda, T., Aoki, R., Kinoshita, S. and Kondo, Y. : U. S. Patent 2971, 890 (1961)
8. Yamada, Y., Ttakagi, T. and Takinami, K. : Fermentation production of L-glutamic acid, Japan Patent 53, 32, 193 (1978)
9. 조계란, 이강만, 배무, 알칼리성 세균에 의한 글루탐산 생산에 관한 연구, 한국산업미생물학회지, 17 : 563-567 (1989)
10. Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Phillips, G. B. : *Manual of Methods for General Bacteriology*, Am. Soc. for Microbiol, USA (1981)
11. Collins, C. H. and Lyne, P. M. : *Microbiological Methods* (4th Ed.) The Butterworths Co. (1987)
12. Peter, H. A. S., Nicolas, S. M., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore (1986)
13. 김찬조, 이석진, 김교창, 오만진, 김도영, 정순택 : 발효공학, 선진문화사, p. 379-408 (1989)

(1995년 9월 12일 수리)