

5'-GMP 생산 융합균주 RC102의 고정화에 의한 5'-GMP 생산

이인선[†] · 조정일*

계명대학교 식품가공학과

*고려대학교 농화학과

Production of 5'-GMP by Immobilized 5'-GMP Producing Fusant RC102

In-Seon Lee[†] and Jung-II Cho*

Dept. of Food Science and Technology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

*Dept. of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract

The effective production of 5'-GMP (5'-Guanylic acid) by immobilized 5'-GMP producing fusant RC102 (intergeneric protoplast fusion between *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC21263 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC21171) was investigated. The Fusant RC102 was immobilized by entrapping in κ -carrageenan, agar, polyacrylamide or Ca-alginate. 3% κ -carrageenan was selected as the most suitable matrix. In the production of 5'-GMP using the immobilized whole cells of fusant RC102, the optimum conditions were 32°C, pH 8.0, 30 μ g/L of Mn^{2+} , 1×10^{-6} % of Zn^{2+} . In order to use fermentation medium containing CSL (Corn Steep Liquor) plentiful in Mn^{2+} , the optimum conditions of penicillin G, D-cycloserine and POESA (polyoxyethylene stearylamine) for production of 5'-GMP were 0.8 unit/ml, 0.8 unit/ml and 5 mg/ml, respectively. Cationic surfactant, POESA was effective and superior to the antibiotics, penicillin G or D-cycloserine in 5'-GMP productivity. The continuous fermentation using immobilized fusant RC102 showed that 5'-GMP productivity was stable for more than 15 days.

Key words : 5'-GMP production, immobilization, fusant RC102

서 론

5'-GMP (5'-Guanylic acid) 및 5'-IMP (5'-Inosinic acid) 등의 핵산관련 물질은 glutamic acid와 더불어 정미성을 내는 특성을 가진 물질로 식품제조 공정에 있어서 그 수요가 급증하게 되었으며 지금까지 미생물 및 효소를 이용하여 5'-GMP를 생산하는 여러가지 방법이 알려져 왔다. 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 의의를 가진다고 생각된다.

이와 같은 핵산계 조미료의 제조에는 다음과 같은 방법들이 이용되고 있다. RNA를 5'-phosphodiesterase와 같은 효소로 분해시켜 생산하는 RNA 효소분해법(1), RNA를 산 가수분해시켜 ribonucleoside로 분해한 뒤 화학적으로 인산화 시키는 방법, 그 외에 발효·합성조합법(2) 등이 있다. 이 중에서 현재 산업적으로 많이 이용되고 있는 방법(3)은 5'-XMP를 직접 발효법에 의해 생산한 후 이를 미생물이나 효소를 이용하여 5'-GMP로 전환하는 방법인데, 5'-XMP를 고농도로 생산하는 균주들이 개발되어 있으며, 5'-XMP를 5'-GMP로 전환하는 균주 또한 개발된 것으로 보고되어 있으므로 가능하다. 그러나 이러한 두 단계에 의한 5'-GMP 생산 방법 역시 두가지 종류의 미생물을 동시에 관리하여야 한다는 등 여러가지 문제점이 지적되고 있다. 이러한 문제점을 해결하고 효율적으로 5'-GMP를 생산하기 위하여, 5'-XMP 생산능과 5'-XMP를 5'-GMP로 전환하는 능력을

[†]To whom all correspondence should be addressed

동시에 지니는 세포융합균주를 이미 개발하였다(4).

본 연구에서는 효율적으로 5'-GMP를 생산하기 위해 5'-GMP 생산융합균주를 적당한 담체에 고정화 시켜 5'-GMP를 연속적으로 생산하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서 사용한 5'-GMP 생산균주는 glucose로부터 직접 5'-GMP를 생산할 목적으로 세포융합에 의해 개발된 균주이다. 즉, 5'-XMP 생산균주 *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 21263와 5'-XMP를 5'-GMP로 전환하는 능력을 가지고 있는 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21171과 이속간 세포융합에서 얻은 fusant RC102를 사용하였으며, adenine 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 5'-GMP 생산을 위한 종배지(seed medium)와 발효배지(fermentation medium)의 조성은 Table 1에 나타내었다.

고정화

본 실험에서 사용한 담체는 k-carrageenan, polyacryl-

amide, calcium-alginate 및 agar를 사용하였으며 균체 고정화 방법은 다음과 같다. k-carrageenan에 의한 고정화는 Tosa 등(5) 및 Sato 등(6)의 방법에 따랐으며, gel을 만든 후 2×2×3(mm³) 입방 크기로 절단하였다. Gel의 강도를 높여주기 위하여 0.3M KCl용액에 4°C에서 2시간 동안 침지한 후 멸균증류수로 2회 세척하여 사용하였다. Polyacrylamide에 의한 균체 고정화는 Nilsson 등(7)과 Bang 등(8)의 방법에 따라 고정하였으며, Ca-alginate에 의한 고정화는 Makiguchi 등(9) 및 White와 Portno(10)의 방법을 따라 행하였다.

고정화 균체의 hardening방법

고정화 균체 8g을 0.088M HMDA(hexamethylene diamine)가 포함된 0.33M phosphate buffer(pH 7.0) 60ml에 넣고 0°C에서 온화하게 진탕하여 10분간 반응시킨 후 12.5% glutaraldehyde용액을 5ml 첨가하고 1시간 동안 반응시켰다(11). 멸균증류수로 2회 세척하여 전환반응에 사용하였다.

고정화 균체의 견고성 측정

고정화 균체의 견고성을 측정하기 위해서 Rheometer(Sun Kagaku Co., Ltd, type M-1107)를 사용하였다(12). 고정화 균체를 1cm 크기로 절단하여 평판위에 놓고 adaptor(직경 50mm)를 설치한 다음 압착시켜 compression force를 측정하여 kg/cm²으로 나타내었다. 분석조건은 force scale 8kg, chart speed 120mm/min, table speed 3.13mm/sec, compression ratio 0.7mm/sec이었다.

Glucose 정량

Glucose 정량은 DNS방법(13)에 따라 정량하였으며 glucose 표준곡선으로부터 산출하였다.

5'-GMP의 분석

반응 후 상등액을 희석하여 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 5'-XMP와 5'-GMP를 정량하였다.

결과 및 고찰

균체 고정화 담체 선정

균체의 고정화에서 가장 중요한 것은 균체의 특성에 적당한 담체의 선택에 있다. 우선 기질의 전달이 잘 되어야 하며, 균체에 나쁜 영향을 미치지 말아야 된다는

Table 1. The composition of medium for 5'-GMP production by fusant RC102

	Seed medium	Fermentation medium
Glucose	10.0%	10.0%
KH ₂ PO ₄	0.1%	0.1%
K ₂ HPO ₄	0.3%	0.3%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0%	1.0%
Meat extract	0.4%	-
Peptone	0.5%	-
C.S.L. ¹⁾	-	0.5%
Urea ²⁾	0.2%	0.2%
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1%	0.01%
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10mg/L	10mg/L
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	200µg/L	200µg/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	30µg/L	-
Amino acid Mix. ³⁾	1µg/L	-
Biotin	30µg/L	30µg/L
Thiamin HCl	5mg/L	5µg/L
pH	-	8.0%

¹⁾C.S.L=Corn Steep Liquor

²⁾Separately autoclaved

³⁾Amino acids mixture ; a mixture of four amino acids of glycine, L-glutamic acid, L-aspartic acid and L-cystine

점 등 갖추어야 할 조건이 많다. Polyacrylamide는 상대적 비교를 위해 사용하였으며, 그의 *k*-carrageenan, Ca-alginate, agar는 높은 균체포집성, 저독성 등의 장점이 있어 사용하였다.

이상의 담체를 균체를 고정화하여 전환율을 비교한 결과는 Table 2와 같으며 3% *k*-carrageenan이 가장 좋은 것으로 나타났다. Ca-alginate의 경우 phosphate 그리고 Mg^{2+} , K^{+} 이온들이 Ca^{2+} 이온을 용해시켜 gel이 파괴되며, agar의 경우는 비교적 기계적 강도가 낮고, 상대적인 생산성이 낮게 나타났다.

고정화 균체의 견고성

고정화 균체를 사용하여 목적하는 생성물을 장시간 연속적으로 생산하는 경우, 고정화 균체가 마찰에 의한 마모가 적고 외부의 압력에 대한 일정한 강도를 유지할 수 있어야 한다. 본 실험에서는 균체를 각 담체에 고정화시켜 1.0cm³ 크기로 절단하고 Rheometer를 통하여 gel 강도를 측정하였다. Table 3에서 보면 *k*-carrageenan이 가장 높았으며 agar와 polyacrylamide의 순서로 나타났다. 5'-GMP 생산성을 고려했을 때 3% *k*-carrageenan이 우수하였다.

고정화 균체의 5'-GMP 생산조건

pH의 영향

5'-GMP 생산에 있어서 배지의 pH 영향을 살펴보기 위해 초기 pH값을 5N NaOH로 7.0~9.0 까지 바꾸어

Table 2. 5'-GMP production by immobilized cells of fusant RC102 in various matrix

Matrix	Relative 5'-GMP production (%)
Polyacrylamide	74.7
Agar	69.5
Ca-alginate	81.2
<i>k</i> -carrageenan	
2%	75.7
3%	100
4%	84.6

Table 3. Gel strength of the immobilized cells of fusant RC102

Matrix	Hardness (kg/cm ²)
Polyacrylamide	3.2
Agar	2.3
<i>k</i> -carrageenan	
2%	4.5
3%	5.3
4%	6.0

주면서 24시간 마다 urea를 두번 첨가해 주었으며, 96시간 배양 후 최종 pH는 초기 pH값과 거의 일치하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 pH 8.0에서 가장 생산성이 높았다. 이로 미루어 보아 5'-GMP 발효시에는 pH를 7.5~8.0 사이로 조절하는 것이 매우 중요하다고 생각된다.

각종 염류의 영향

핵산관련 물질을 생산하는데 있어서 미량원소들의 영향이 매우 크다는 보고에 따라(14-16) 본 실험에서는 무기염류의 농도 변화에 따른 균체량과 5'-GMP 생산량과의 관계를 검토한 결과 (Fig. 1), Mn^{2+} 의 농도가 증가함에 따라 균체량이 현저히 증가하지만 5'-GMP의 생산량은 Mn^{2+} 20~40 μ g/L에서 가장 높았다가 점차 감소하는 경향을 보였으며, Zn^{2+} 와 Ca^{2+} 의 경우는 Mn^{2+} 의 농도가 30 μ g/L 첨가된 배지에서 농도별로 배양하여 본 결과 Zn^{2+} 의 농도 $1 \times 10^{-6}\%$ 에서 5'-GMP의 생산량은 가장 높았지만, 농도가 계속 증가함에 따라 생산량이 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 Ca^{2+} 의 농도가 증가할수록 균체량과 5'-GMP 생산량이 증가함을 알 수 있었다.

5'-GMP 생산에 대한 항생물질의 효과

일반적으로 5'-GMP를 포함한 핵산관련 물질은 세포막 투과성이 매우 낮기 때문에 세포내에 축적된 5'-GMP가 밖으로 빠져 나오지 못한다. 따라서 5'-GMP의 세포막 투과성을 증가시키기 위한 연구가 시도되고 있다(17). 본 연구에서는 세포막 합성을 억제하는 항생물질의 일종인 penicillin G와 D-cycloserine의 처리 시기 및 처리 농도에 대한 효과를 살펴 보았다. 배지 중의 Mn^{2+} 농도가 낮을 때 세포막 합성에 영향을 주어 5'-GMP의 세포막 투과성이 증가되고 고농도일 때면 균체의 생육만 증가할 뿐 5'-GMP의 생산은 억제된다. 따라서 Mn^{2+} 이 풍부하고 값이 싼 C.S.L (Corn Steep Liquor)을 발효배지로 사용하기 위해서 Mn^{2+} 200 μ g/L 첨가된 발효배지에 배양하여 penicillin G와 D-cycloserine의 처리 시기는 각각 6.5시간으로 나타났고, 최적 농도도 공히 0.8

Table 4. Effect of pH on 5'-GMP production by immobilized cells of fusant RC102

pH	Relative 5'-GMP production (%)
7.0	30.4
7.5	94.2
8.0	100
8.5	33.7

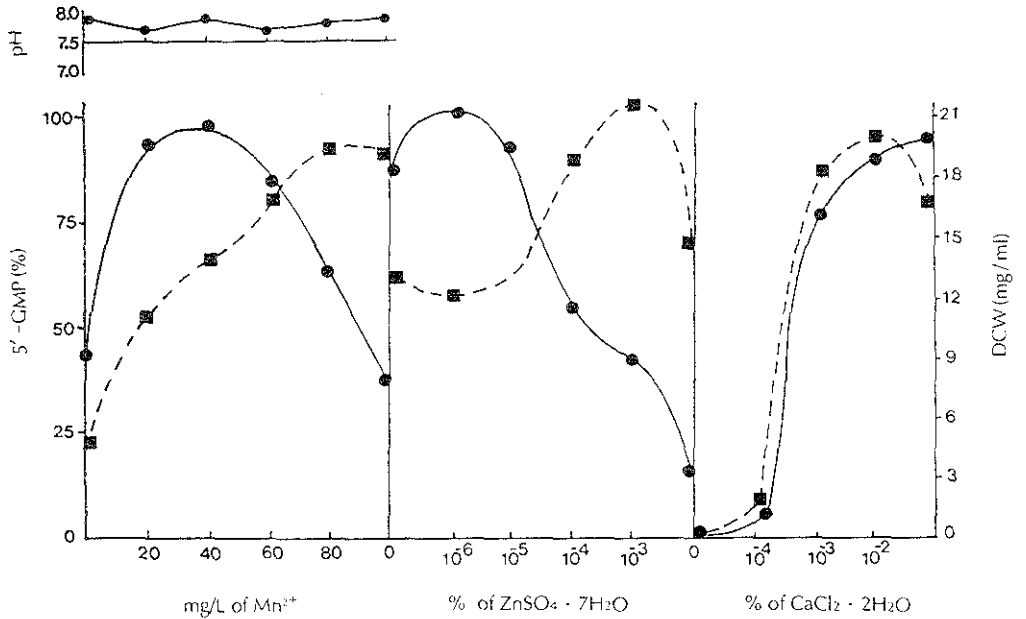


Fig. 1. Effect of the presence of trace metals in the fermentation medium on the bacterial growth and the accumulation of 5'-GMP with the fusant RC102.

●—● : Total value of 5'-GMP, ■—■ : Dried cell weight (DCW)

Table 5. Effect of penicillin G on 5'-GMP fermentation by immobilized cells of fusant RC102

Penicillin G addition		4-day broth	
Time (hr)	Conc. (unit/ml)	DCW (mg/ml)	5'-GMP (%)
	none	21.8	51
3.5	0.4	17.2	58
	0.8	15.3	60
6.5	0.4	16.7	78
	0.8	13.5	100
9.5	0.4	16.5	45
	0.8	12.0	44

Table 6. Effect of D-cycloserine on 5'-GMP fermentation by immobilized cells of fusant RC102

Penicillin G addition		4-day broth	
Time (hr)	Conc. (unit/ml)	DCW (mg/ml)	5'-GMP (%)
	none	22.5	52
3.5	0.4	18.3	65
	0.8	20.1	67
6.5	0.4	17.2	95
	0.8	16.3	100
9.5	0.4	17.5	90
	0.8	16.2	95

unit/ml)으로 나타났다 (Table 5, 6).

Polyoxyethylene stearylamine (POESA)의 영향

일반적으로 세포내에서 생성된 5'-GMP는 세포밖으로 유출되지 않는다. 따라서 5'-GMP의 세포막 투과성 증대를 위해 계면활성제나 항생물질 등을 처리하여 주는데, 5'-GMP의 생산에는 POESA가 효과적인 것으로 보고되고 있다 (17). 본 실험에서는 POESA를 농도별로 처리하였는데, 그 결과 5mg/ml 농도에서 모두 높은 전환율을 보였다 (Table 7).

고정화 균체의 재사용

고정화 균체의 장점은 재사용에 따른 경비 절감이다. 따라서 5'-GMP 생산용 배지 20ml을 함유한 500ml용 플라스크에 고정화 균체 2ml을 가하여 32°C에서 72시간 진탕 배양한 후 고정화 균체를 회수하여 0.9% 생리 식염수로 2회 세척한 다음 생산용 배지에 접종하여 같은 조건에서 5회 반복 실험을 하였으며 그 결과는 Table 8에 나타내었다. 이 때 3회 사용시까지는 5'-GMP 생산량은 거의 일정한 수준을 유지하였으며 5회 이상 재사용하여도 생산량에는 큰 변화가 없었다.

Table 7. Effect of POESA¹⁾ on dry cell weight (DCW) and the relating productivity 5'-GMP by the immobilized cells of fusant RC102 fermentation at 32° C

Cycloserine addition		4-day broth	
Time (hr)	Conc. (unit/ml)	DCW (mg/ml)	5'-GMP (%)
	none	22.5	52
18	1	16.9	65
	5	15.3	67
24	1	17.5	95
	5	16.2	100
30	1	22.5	90
	5	21.7	95

¹⁾POESA : polyoxyethylene stearylamine
Average value for n is about 15

Table 8. Reuse test of 5'-GMP production by immobilized fusant RC102

No. of reuse	5'-GMP produced (mg/ml)
1	712
2	729
3	708
4	683
5	642

고정화 fusant RC102를 이용한 5'-GMP 생산

앞서 고정화 균체의 5'-GMP 생산 조건들을 바탕으로 연속식 발효를 실시하였다. 통기율은 2V/V/M, reactor working volume 100ml, 고정화 균체 부피 10ml로 pH 7.8, 32°C에서 연속적으로 5'-GMP를 생산하였다. 그 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 12시간 활성화 시킨 후 5일 경과시 5'-GMP 생산량은 steady state에 도달하였으며, 그 이후에도 거의 일정한 수준의 생산량을 유지하였다.

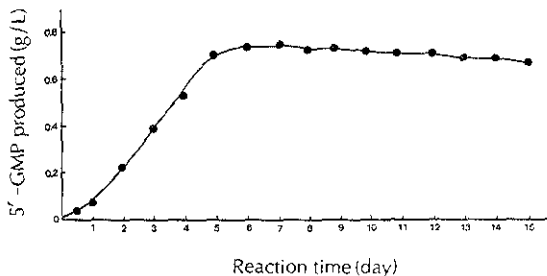


Fig. 2. Pattern of continuous production of 5'-GMP using 3% k-carrageenan immobilized fusant RC102.

요 약

5'-GMP (5'-Guanylic acid) 생산 융합균주 fusant RC 102를 고정화하여 5'-GMP를 연속적으로 생산하고자 하였다. 균체 고정화용 담체로서 k-carrageenan, polyacrylamide, Ca-alginate 및 agar 등 4가지 담체에 고정화한 결과 최적 담체로서 3% k-carrageenan을 선정하였으며, 이담체에 고정화한 균체를 이용하여 5'-GMP 연속적으로 생산하였다. 고정화 균체에 의한 5'-GMP 생산의 최적 온도 및 pH은 32°C, pH 8.0, 미량원소로서 Mn²⁺과 Zn²⁺의 농도는 각각 30µg/L, 1×10⁻⁶%이었다. Mn²⁺이 풍부하고 값싼 CSL (Corn Steep Liquor)을 배지로서 사용하기 위해서 penicillin G와 D-cycloserine 및 POESA (polyoxyethylene stearylamine) 농도 최적 농도는 각각 0.8unit/ml, 0.8unit/ml, 그리고 5mg/ml으로 나타났다. 항생물질 보다 계면활성제가 효과적이었다. 이상의 최적 조건에서 고정화 fusant RC102는 15일간 안정되게 5'-GMP를 생산하였다.

문 헌

- Kuninaka, A., Kibi, M. and Yoshino, N. : Studies on 5'-phosphodiesterase in microorganisms. *Agric. Biol. Chem.*, **25**, 693 (1961)
- Shiro, T. : Production of GMP from AICAR, Microbial production of nucleic acid related substances. Wiley and Sons, Tokyo, p.158 (1976)
- Fujio, T., Kotani, Y. and Furuya, A. : Production of 5'-guanylic acid by enzymatic conversion of 5'-xanthylic acid. *J. Ferment. Technol.*, **62**, 131 (1984)
- 이세배, 정태만 : 미생물에 의한 5'-구아닐산의 제조 방법. 특허공고 제 1940호 (1985)
- Tosa, T., Sato, T., Mori, T. and Chibata, I. : Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix. *Biotech. Bioeng.*, **21**, 1697 (1979)
- Sato, T., Nishida, Y., Tosa, T. and Chibata, I. : Immobilization of *Escherichia coli* cells containing aspartase activity with k-carrageenan. *Biochim. Biophysica. Acta*, **570**, 179 (1979)
- Nillsson, S., Birnbaum, S., Flygare, S., Mosbach, T. and Brodelius, T. : A general method for the immobilization of cells with preserved viability. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 319 (1983)
- Bang, W. G., Benrendt, V., Lang, S. and Wanger, F. : Continuous production of L-tryptophan from indole and L-serine by immobilized *Escherichia coli* cells. *Biotech. Bioeng.*, **25**, 1013 (1983)
- Makiguchi, N., Maanobu, A. and Asai, Y. : Immobilization of a luminous bacterium and light intensity of luminous materials. *J. Ferment. Technol.*, **58**, 17 (1980)
- White, F. H. and Portno, A. D. : Continuous fermen-

- tation by immobilized brewers yeast. *J. Inst. Brew.*, **84**, 228(1978)
11. Bang, W. D., Lang, S., Sahm, H. and Wanger, H. : Continuous production of L-tryptophan by *Escherichia coli* cells. *Biotech. Bioeng.*, **25**, 999(1983)
 12. Lee, I. S. and Cho, J. I. : Continuous fermentation of L-lysine by immobilized *Corynebacterium glutamicum*. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**, 322(1994)
 13. Miller, G. L., Blum, R., Glunnon, W. E. and Burton, A. L. : Measurement of carboxymethylcellulose activity. *Anal. Biochem.*, **2**, 129(1960)
 14. Komoro, T., Nara, T., Misawa, M. and Kinoshita, S. : 5'-purine nucleotide fermentations with *Brevibacterium ammoniagenes* establishment of chemically defined medium and effect of trace metals. *Amino acid and Nucleic acid*, **19**, 157(1968)
 15. Nara, T., Misawa, M. and Kinoshita, S. : Fermentative production of 5'-purin ribonucleotides by *Brevibacterium ammoniagenes*. *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 561(1968)
 16. Nara, T., Misawa, M. and Kinoshita, S. : Pantothenate, thiamine and manganese in 5'-purine ribonucleotides production by *Brevibacterium ammoniagenes*. *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 1153(1968)
 17. Nara, T., Misawa, M., Komoro, T. and Kinoshita, T. : Effect of antibiotics and surface active agents on 5'-purine nucleotide production by *Brevibacterium ammoniagenes*. *Amino acid and Nucleic acid*, **30**, 92(1979)

(1995년 7월 31일 접수)