

*Brevibacterium ketoglutamicum*을 이용한 L-Ornithine 생산 연구 PART I: L-Ornithine 생산 고역가 안정화 균주 선발

류옥상 · 장형욱 · 이흥원 · 정준기 · 장순재¹ · 유연우² · 박영훈*
생명공학연구소, ¹양지화학 연구소, ²아주대학교 공과대학 화학 · 생물공학부

High Production of L-Ornithine by L-Citrulline Auxotroph of *Brevibacterium ketoglutamicum*: PART I: Selection of Stable Mutant Strains with Less Revertant Formation. Ryu, Wuk-Sang, Hyung-Wook Jang, Hong-Weon Lee, Joon-Ki Jung, Soon-Jac Chang¹, Yeon-Woo Ryu², and Young-Hoon Park*. Biochemical Process Engineering Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. BOX 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea, ¹Yang Ji Chemical Co., Ltd., Ansan 425-110, Korea, ²Division of Chemical Engineering and Biotechnology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea – Overproduction of L-ornithine by mutant strains isolated from *Brevibacterium ketoglutamicum* BK1046 was investigated. The strain was a L-citrulline auxotroph and exhibited culture instability during fermentation. Through a sequential screening effort, a highly stable strain with less revertant formation was finally selected and designated *B. ketoglutamicum* BK52 (KCTC 0141BP). It produced L-ornithine at a high concentration (above 9 g/L) independent of subculture or cultivation time, and also had a very low tendency of revertant formation. In a long-term storage, this strain maintained its cell stability and productivity of L-ornithine to a reasonable range.

Key words : L-ornithine, revertant formation, cell stability

L-Ornithine(L-2,5-diaminopentanoic acid)은 L-glutamic acid 계열의 비필수 엷기성 아미노산으로서 L-arginine 생합성 경로상의 중간대사산물이다[7]. L-ornithine의 용도를 보면 엷산엷 또는 아스파탐산엷의 형태로 제조되어 간장질화 치료제의 주원료로 사용되고 있다[12, 13].

미생물 발효법에 의한 L-ornithine 생산은 1957년 일본의 Kinoshita 등에 의하여 *Corynebacterium glutamicum*의 L-arginine 영양요구성 변이주를 사용하여 처음 시도되었으며 포도당을 탄소원으로 25 g/L의 L-ornithine이 생산되었다[9]. 그 후 L-ornithine의 생성 기작 및 대사조절작용에 관한 연구가 진행되어 1960년대초에 *E. coli* 및 corync형 세균에서의 L-arginine 생합성 경로가 대부분 밝혀지게 되었다[8, 18-23]. *Corynebacterium*에서의 L-arginine 생합성 경로에서는 특히 N-acetylglutamate kinase가 L-arginine 생합성 대사의 속도조절에 제한적 요소를 부여하는 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[17-20, 22]. 따라서 L-ornithine의 고효율 발효생산을 위해서는 주로 *Corynebacterium* 또는 *Brevibacterium* 등의 L-glutamic acid 생산 균주로부터 L-citrulline 영양요구성 변이주를 구하고 동시에 대표적인 arginine analog인 arginine hydroxamate 등에 내성을

가지는 변이주를 개발하는 것이 효율적인 것으로 알려져 있다[5, 18, 19]. 따라서 본 연구자들도 이미 *B. ketoglutamicum* ATCC 21092로부터 L-citrulline 영양요구성이면서 arginine hydroxamate에 내성을 가지는 L-ornithine 생산 고역가 변이주를 선발하여 *B. ketoglutamicum* BK1046으로 명명하고 이 균주를 사용하여 포도당을 탄소원으로 24 g/L의 L-ornithine이 생산된 결과를 보고한 바 있다[5].

아미노산 발효생산시 영양요구성 변이주를 사용하는 경우 플라스크 배양이나 회분식 배양에서는 잘 나타나지 않는 균주의 degeneration 또는 불안정성에 대한 문제가 유가식 배양 또는 연속 배양등 장기적인 배양에서는 나타날 수 있다. 이는 배양중에 고역가 균주의 성장을 증가하는 비생산성 혹은 저생산성 변이주, revertant 등이 출현하기 때문이라고 보고된 예가 많다[1, 11, 15, 16]. Azuma 등[1,2]은 *C. acetoacidophilum* MC13을 사용하여 L-arginine을 고농도 연속 배양법으로 생산하고자할때 생산 안정성이 100여 시간 정도밖에 유지되지 못하고 배양시간이 경과될수록 원래의 고역가 균주외에 저생산성 변이주, 고생산성 변이주, L-arginine 영양요구성 변이주들이 발생되며 점차 우세균주화 되어 L-arginine 생산성이 급격히 감소되었다고 보고한 바 있다. 또한 영양요구성 변이주의 불안정성으로 인해 야기되는 생산성 감소현상에 대한 정량적 연구는 L-homoserine 및 L-leucine 영양요구성 변이주인 *C. glutamicum* ATCC 21253을 사용한 L-lysine 연속 배양 실험에서 처음 보고되

*Corresponding author
Tel. 82-42-860-4440, Fax. 82-42-860-4594
E-mail: ypark@kribb4680.kribb.re.kr

었다[10]. 이들은 연속 배양중 영양요구성 변이주와 revertant 간의 경쟁에 대한 동력학적 묘사를 통해 얻어진 적정 배지조성 예상치를 유가식 배양에 적용하여 발효공정의 안정성을 연장시킨 바 있다.

한편 본 연구자들은 L-ornithine 생산을 위해 개발된 L-citrulline 영양요구성 변이주인 *B. ketoglutamicum* BK1046의 연속 배양에서 revertant의 출현으로 인한 균주의 불안정성을 확인하고 이를 저농도 연속 배양 실험을 통해 L-arginine과 인산염을 동시에 제한하는 방법을 사용하여 revertant 증가를 억제시킨 연구결과를 이미 보고한 바 있다[6].

본 논문에서는 발효기간동안 균주의 불안정성이 현저하게 나타났던 *B. ketoglutamicum* BK1046로부터 revertant 발생이 적고 L-ornithine 생산 역가가 지속적으로 안정화된 고역가 우량 산업 균주를 선발하게된 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에서 사용한 균주는 *B. ketoglutamicum* BK1046 [5]과 이로부터 유도된 *B. ketoglutamicum* BK52(KCTC 0410BP)이다. 종균배지 및 최소배지로는 YPD medium (pH 7.2)과 M9 medium(pH 6.8)[3]을 각각 사용하였다. L-ornithine 생산을 위한 플라스크 배양용 기본 발효배지의 조성은 배지 liter당 60 g glucose, 10 g yeast extract, 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4 g KH_2PO_4 , 0.3 g Na_2HPO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g CaCO_3 , 1 ml 미량원소용액(2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ per liter of 0.1 N HCl)이며 pH를 4 N NaOH로 7.2로 조정하여 사용하였다. 회분식 배양용 발효배지의 조성은 배지 liter당 100 g glucose, 5 g yeast extract, 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5 g KH_2PO_4 , 3 g Na_2HPO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 ml 미량원소용액(2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ per liter of 0.1 N HCl)이다. 유가식 배양시 복합배지(complex medium)의 성분은 배지 liter당 500 g glucose, 70 g yeast extract, 60 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g KH_2PO_4 , 8 g Na_2HPO_4 , 5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 으로 조성하여 일정량씩 공급하였다. 플라스크 배양은 30°C 진탕배양기(KSI-200L, 고려기기 제작, 서울, 한국)에서 150 rpm으로 72시간 진탕배양후 균체 농도 및 L-ornithine 농도등을 조사하였다. 회분식 배양시 5 liter 발효조(KFC MK250, 한국발효기(주) 제작, 인천, 한국)를 사용하여 30°C에서 600 rpm, 1 vvm으로 조업하였고 발효액의 pH를 4 N NH_4OH 로 7.0으로 유지시키며 배양하였다. 유가식 배양은 탄소원인 포도당 농도가 10~15 g/L에 이르는 시점에 맞추어 복합배지를 발효조 초기 조업부피(1 liter)의 20%씩 즉, 200 ml씩 간헐적으로 3회 공급해주는 방법을 사용하여 조업하였다.

L-Ornithine 생산 변이주의 우량 안정화 균주 선발 방법

L-Ornithine 생산 고역가 변이주인 *B. ketoglutamicum* BK1046중에서 natural selection을 통해 계대 횟수, 균주의 장기적 보관에 따른 L-ornithine 생산 역가 및 출현된 revertant 수를 측정하여 안정성이 우수한 우량 균주를 선발하였다. 즉, *B. ketoglutamicum* BK1046으로부터 유래되어 colony 형태로 순수분리된 각각의 균주를 종균배지를 사용하여 12시간 간격으로 연속하여 최소한 10회 이상 계대배양하면서 종균배양액을 최소배지에 도달하는 방법으로 각 분리된 균주의 revertant 수를 조사하였다. 또한 이를 발효배지에 접종하여 72시간 동안 플라스크에서 배양한 후 균체 농도 및 L-ornithine 생산 역가를 분석하였다. 위 방법으로 선발된 우량 안정화 균주를 5 liter 발효조에서 회분식 배양과 유가식 배양을 수행하여 revertant 수의 변화와 L-ornithine 생산 역가를 최종적으로 확인하였다.

분석방법

균체 농도는 spectrophotometer(UVICON 430, Kontron Instruments, Italy)를 사용하여 측정하였으며 배양액을 생리 식염수(0.85% NaCl)로 희석하거나 CaCO_3 가 포함된 경우에는 0.1 N HCl로 적당히 희석한 후 600 nm에서 흡광도를 측정한후 dry cell weight으로 환산하였다. L-citrulline 영양요구성을 상실한 revertant 균주의 측정은 배양액을 L-citrulline이나 L-arginine이 포함되지 않은 최소평판배지에 도달하여 30°C에서 3~5일간 배양한후 나타나는 colony 수로 revertant 균체수를 측정하였다. 포도당 농도는 Glucose & Lactate Analyzer(YSI 2000, USA)를 사용하여 측정하였으며 L-ornithine 농도는 Chinard[4]의 ninhydrin 발색법을 사용하였다.

결과 및 고찰

L-Ornithine 생산 고역가 안정화 균주 선발

L-Ornithine 발효생산에 있어 발효도중에 L-citrulline 영양요구성이 상실된 revertant의 출현등과 같은 균주의 불안정성이 전체 발효공정의 생산성을 현저히 감소시키는 원인이 되고 있다[20]. 따라서 보다 안정화된 균주의 선발을 위해 먼저 L-citrulline 영양요구성 변이주인 *B. ketoglutamicum* BK1046으로부터 colony 형태로 반복작업을 통해 순수분리된 각각의 균주들을 종균배지에 배양한 후 발효배지에 접종하므로써 계대배양 횟수에 따른 최대 L-ornithine 생산 역가와 종균배양액내의 revertant 수를 조사하였다(Table 1).

그 결과 *B. ketoglutamicum* BK1046의 경우에는 5회 계대후부터 L-ornithine 생산 역가가 상당히 감소된 반면에 11회 계대배양을 반복해도 L-ornithine 생산 역가에 거의 변함이 없는 균주를 선발할 수 있었으며 이를 *B. ketoglutamicum* BK52로 명명하였다. 이들의 접종직후 발효배양액내의

Table 1. L-Ornithine production and revertant formation of *B. ketoglutamicum* BK1046 and *B. ketoglutamicum* BK52 by subculture

Transfer cycles*	Maximum product concentration (g/L)		Cells/ml of revertant in the total cell number (10^8 - 10^9 cells/ml)	
	<i>B. ketoglutamicum</i> BK1046	<i>B. ketoglutamicum</i> BK52	<i>B. ketoglutamicum</i> BK1046	<i>B. ketoglutamicum</i> BK52
1st	8.6	9.5	10^2	10^1
3rd	8.7	9.3	10^2	10^1
5th	5.1	9.6	10^3	10^1
7th	2.5	9.2	10^4	10^1
9th	1.5	9.3	10^5	10^1
11th	1.0	9.3	10^5	10^1

*cycles: seed transfer into YPD medium

revertant 수를 비교해 본 결과 *B. ketoglutamicum* BK1046에서는 접종초기부터 10^3 cells/ml의 revertant가 존재하였지만 *B. ketoglutamicum* BK52의 경우 접종초기 revertant 수가 10^1 cells/ml에 불과하였으며 이때 총균수는 10^6 ~ 10^7 cells/ml이었다. 또한 12시간 동안 배양한 후 증가된 종균배양액내의 revertant 수를 측정할 결과 *B. ketoglutamicum* BK1046과 *B. ketoglutamicum* BK52의 경우 총 10^8 ~ 10^9 cells/ml중에서 각각 10^4 cells/ml, 10^1 cells/ml로 나타났다. 이 두 균주를 종균배지를 사용하여 12시간마다 계대배양을 실시한 결과 *B. ketoglutamicum* BK1046의 경우에는 11회 계대배양시 종균배양액내의 revertant 수가 10^5 cells/ml로 급격히 증가하였으나 *B. ketoglutamicum* BK52의 경우에는 revertant 수가 증가하지 않고 초기농도인 10^1 cells/ml 수준에서 그대로 유지되었으며 이때에도 총 균수는 10^8 ~ 10^9 cells/ml로 나타났다.

따라서 계대배양 횟수와 배양시간에 관계없이 L-ornithine 생산 역가가 높은 수준에서 안정적으로 유지되고 revertant 형성율도 낮은 *B. ketoglutamicum* BK52를 우량균주로 최종 선발하였다. 여기서 *B. ketoglutamicum* BK52의 경우 돌연변이 유발이나 유전자 조작등 어떠한 인위적 조작도 가하지 않고 단순히 계대배양을 통한 자연적 분리 방법을 통해 선발되었으므로 모균주인 *B. ketoglutamicum* BK1046과 비교하여 유전적인 차이점은 크지 않을 것으로 추정된다. 그러나 균주 안정성 증대가 어떠한 유전적 진화로부터 유발되는지에 대해서는 산업미생물학적인 관점에서 매우 중요하며 앞으로 이에 관한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

계대배양에 따른 L-Ornithine 생산 고역가 균주의 분포

B. ketoglutamicum BK52의 각 계대배양에서 나온 종균배양액을 YPD 평판배지에 도말하여 나타난 일정한 수의 colony를 분리하여 종균배지에 종균배양 후 발효배지에 접종하여 3일간 배양한 다음 이들 각 균주의 L-ornithine 생산 역가를 측정하여 그 분포를 조사하였다(Fig. 1).

그 결과 *B. ketoglutamicum* BK52는 계대배양 횟수가 증가할수록 생산 역가 분포 폭이 좁아져 5회 계대배양시 9

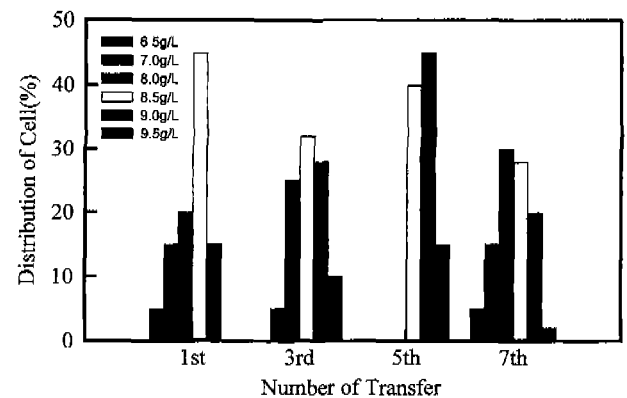


Fig. 1. Distribution curve of L-ornithine producing strain by *B. ketoglutamicum* BK52.

g/L 이상의 L-ornithine 생산 역가를 가지는 고역가 균주가 대부분을 차지하였다. 그러나 7회 계대배양이후에 분리된 균주의 경우 역가가 낮아진 저생산성 균주 수가 증가되는 결과를 보여 상대적으로 종균배양액내 존재하는 L-ornithine 고역가 균주의 분포가 낮아짐이 관찰되었기 때문에 7회 이상 계대배양을 수행한 경우에는 다시 고역가 균주의 screening 작업이 필요하다고 판단되었다.

균주의 장기 보존성

B. ketoglutamicum BK52의 장기 보존성을 실험하기위해 *B. ketoglutamicum* BK52를 대수기 중기까지 배양한 후 glycerol 보존법[14]에 의해 만든 균체액을 -70°C 냉동고에서 6개월 이상 장기간 보존하면서 viable cell 수, revertant 수 및 L-ornithine 생산 역가를 기간별로 측정할 결과 큰 차이없이 비교적 일정하게 유지되었다(Fig. 2).

즉, 동결건조법을 사용하지 않고 간단한 glycerol 보존법만으로 -70°C 냉동고에서 균주 stock을 장기 보존하면서 균주를 사용해도 발효생산에는 별 문제가 없음이 확인되었다.

Revertant가 L-Ornithine 생산에 미치는 영향

B. ketoglutamicum BK52와 *B. ketoglutamicum* BK52로부터 L-citrulline 영양요구성이 상실된 revertant를 분리한

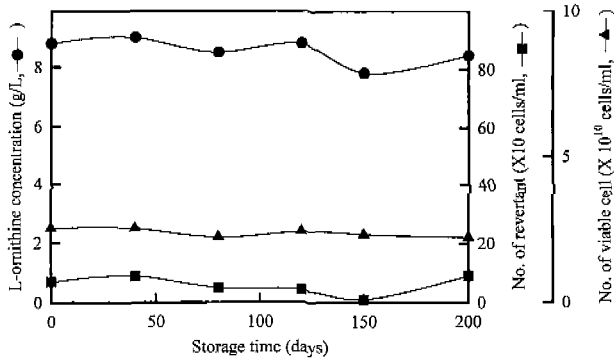


Fig. 2. Time profile of L-ornithine, No. of viable cell and No. of revertant on storage time.

후 발효배지에 각각 접종하여 72시간동안 플라스크에서 배양하면서 revertant가 L-ornithine 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Table 2).

그 결과 revertant의 최대 세포 비성장속도(μ_m)와 L-arginine 소모속도는 각각 0.18 hr^{-1} , 12 mg/L-hr 로 *B. ketoglutamicum* BK52와 비슷했으나 48시간 후 revertant 균체 농도가 13 g/L 로 *B. ketoglutamicum* BK52보다 3배 정도 증가되었으며 30 mg/L 의 L-arginine이 생산되었다. 또한 revertant는 소모한 포도당중 25%를 세포성장에만 주로 이용하였으나 *B. ketoglutamicum* BK52는 소모한 포도당중 12%와 13%를 세포성장과 L-ornithine 생산에 각각 나누어 이용되고 있는 것으로 관찰되었다.

즉, revertant는 배지내 L-arginine 농도에 제한받지 않고 탄소원에 제한받는만큼 세포성장을 하므로써 균체농도가 높았으며 영양요구성 변이주인 *B. ketoglutamicum* BK52의 경우에는 L-arginine 농도에 제한을 받아 탄소원이 풍부해도 L-arginine에 대한 세포성장수율만큼만 증식하면서 L-ornithine을 생산한 것으로 볼 수있다.

다음으로 초기 revertant 농도가 L-ornithine 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 3).

여기에서는 10% 접종액중의 revertant 농도를 각각 0% 부터 5% 까지 변화시켜 발효배지에 접종하는 플라스크 배양을 실시하였다. 그 결과 접종직후의 배양액내 revertant

Table 2. Kinetic parameters of *B. ketoglutamicum* BK52 and their revertant in the shake-flask culture

Kinetic parameters	<i>B. ketoglutamicum</i> BK52	Revertant
$\mu_m \text{ (hr}^{-1}\text{)}$	0.17	0.18
L-ornithine produced (g/L)	6.3	-
L-arginine produced (mg/L)	-	30
L-arginine uptake rate (mg/L/hr)	12.8	12.3
Cell mass (g/L)	5.6	15.2
$Y_{p/s} \text{ (g/g)}$	0.13	-
$Y_{x/s} \text{ (g/g)}$	0.12	0.25

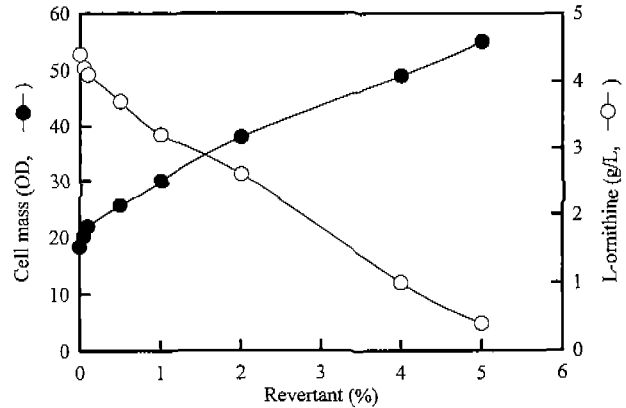


Fig. 3. Effect of revertant added on L-ornithine production.

농도가 증가될수록 revertant 농도에 비례하여 균체 농도도 현저히 증가되었으며 반대로 L-ornithine 생산수율은 비례적으로 감소되었다. 즉, 배양액내 초기 revertant 농도가 0.1%를 초과하면서부터는 그 농도가 0.5%씩 증가할 때마다 세포농도도 5 OD씩 증가되어 revertant 농도가 0.5%일 때에 0.1%와 비교하여 3배까지 증가되었다.

한편 L-ornithine 실제 생산기간을 보면 초기 revertant 농도가 0.1% 이하에서는 배양말기까지 지속적으로 L-ornithine이 생산된 반면에 revertant 농도가 0.5%를 초과하면서부터는 revertant 수의 증가에 의해 L-ornithine이 생산되지 못하였다. 이는 L-ornithine 발효시 영양요구성 변이주와 revertant가 같이 존재할 경우 탄소원에 대한 세포성장수율은 두 균주가 거의 같으나 영양요구성 변이주만 L-arginine 농도에 대해 세포성장이 제한받기때문에 배지에 존재하는 L-arginine 농도에 해당하는만큼의 세포성장 수율을 보이므로 L-arginine이 고갈되면 증식을 멈춘다. 그러나 revertant의 경우 L-arginine 농도에 상관없이 증식하므로 초기 revertant 농도가 일정수준을 초과할 경우 세포성장에 제한을 받지 않는 revertant의 균체농도가 상대적으로 증가하여 발효가 진행될수록 영양요구성 변이주에 비해 우세균주가 되므로써 대부분의 탄소원 소비가 주로 revertant에 의해서 이루어진다. 이에 따라 발효조 전체의 탄소원에 대한 L-ornithine 생산수율을 감소시키는 원인이 된다.

따라서 L-arginine 영양요구성 변이주를 사용한 L-ornithine 발효시 접종액내의 revertant 농도가 1% 이하 즉, 접종직후의 배양액내 초기 revertant 농도가 0.1% 이하가 되는 조건에서 발효를 수행해야되는 것으로 나타났으며 안정성이 개선된 *B. ketoglutamicum* BK52를 사용할 경우 revertant 수 증가에 의한 L-ornithine 생산수율이 감소되는 등의 문제는 발생되지 않았다.

B. ketoglutamicum BK52의 회분식 및 유가식 배양에서의 안정성

우선 L-ornithine 생산 고역가 안정화 우량균주로 선발된

Table 3. A comparison of fermentation parameters in *B. ketoglutamicum* BK1046 and *B. ketoglutamicum* BK52 in fed-batch culture with intermittent feeding of complex medium

Fermentation parameters	<i>B. ketoglutamicum</i> BK1046	<i>B. ketoglutamicum</i> BK52
Fermentation time (hrs)	108	96
Cell mass (g/L)	51	47
L-ornithine produced (g/L)	47	59
$Y_{p/s}$ (g/g)	0.18	0.22
Molar yield (%)	24	30
Productivity (g/L-hr)	0.44	0.60

B. ketoglutamicum BK52를 5 liter 발효조에서 회분식 배양을 수행하여 균주 특성과 L-ornithine 생산 역가를 최종적으로 확인하여 *B. ketoglutamicum* BK1046의 경우와 비교하였다.

그 결과 67 시간만에 26 g/L의 L-ornithine이 생산되어 대당수율과 L-ornithine 생산성은 각각 26%(molar yield 35%)와 0.39 g/L-hr로 나타나 *B. ketoglutamicum* BK1046의 경우의 24%(molar yield 32%), 0.35 g/L-hr와 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 두 균주의 균체 농도도 각각 24 g/L와 22 g/L로 비슷하였다.

한편 발효를 진행하면서 24시간마다 revertant 수를 측정해본 결과 *B. ketoglutamicum* BK1046을 사용한 발효에서는 접종직후의 revertant 농도가 총 균수 10^7 cells/ml 중에서 10^3 cells/ml이었고 발효경과에 따라 그 수가 증가하여 발효말기에는 총균수 10^9 cells/ml중에서 revertant 수가 10^5 cells/ml로 나타났다. 그러나 *B. ketoglutamicum* BK52의 경우에는 초기 10^1 cells/ml의 revertant 농도가 변하지 않고 발효말기까지 일정하게 유지되었다.

다음으로 유기질소원과 무기질소원이 함께 포함된 복합 배지를 포도당이 10~15 g/L 이하로 존재하게 되는 시점에 발효조 조업부피의 20%씩 간헐적으로 3회 첨가해주는 유가식 배양을 수행한 결과 얻어진 두 균주의 발효성능을 Table 3에 요약하였다.

즉, *B. ketoglutamicum* BK1046의 경우 초기 10^2 cells/ml의 revertant 수가 발효시간 경과에 따라 계속 증가하여 발효종료시간인 108시간째에는 10^7 cells/ml까지 이르렀으나 *B. ketoglutamicum* BK52의 경우에는 회분식 배양에서와 마찬가지로 초기 10^1 cells/ml의 revertant 수가 발효시간이 경과해도 증가되지 않고 일정하게 유지됨을 알 수 있었다. 또한 이때 발효시간이 12시간 이상 단축되어 L-ornithine 생산성도 1.3배 증가되므로써 산업용 균주로서도 사용가능하다고 판단되었다.

요 약

본 연구에서는 L-ornithine의 산업적 생산에 이용하기 위

해 L-citrulline auxotroph인 *B. ketoglutamicum* BK1046 으로부터 계대배양 횟수나 배양시간에 관계없이 revertant 발 생률이 낮은 수준으로 유지되면서 9 g/L 이상의 L-ornithine 생산 역가를 장기적으로 보유하는 *B. ketoglutamicum* BK52 (KCTC 0141BP)를 선발하였다. *B. ketoglutamicum* BK52 는 5회 계대배양했을때 L-ornithine 생산 고역가 균주가 주 로 분포하였으며 -70°C 냉동고에서의 6개월 이상 장기 보 관시에서도 균주 안정성에 문제가 없었다. 또한 revertant가 배양액내에 0.1% 이상 존재하게 되면 균체 농도는 증가하 지만 L-ornithine 생산은 급격히 감소되는 현상을 보였으나 *B. ketoglutamicum* BK52의 경우 이런 문제가 없었으며 회분식 배양과 유가식 배양을 통한 실험결과에서도 *B. ketoglutamicum* BK52의 경우 안정성이 뛰어난 우량 균주 로 나타나 이의 산업적 이용이 충분히 가능할 것으로 판단 되었다.

REFERENCES

1. Azuma, T., T. Nakanishi, and M. Sugimoto. 1988. Isolation and characterization of a stable L-arginine producer from continuous culture broth of *Corynebacterium acetoacidophilum*. *J. Ferment. Technol.* **66**: 279-284.
2. Azuma, T., T. Nakanishi, and M. Sugimoto. 1988. Factors affecting L-arginine production in the continuous culture of an L-arginine producer of *Corynebacterium acetoacidophilum*. *J. Ferment. Technol.* **66**: 285-290.
3. Calton, B.C. and B. J. Brown. 1981. Gene mutation, pp.222-242. *Manual of Methods for General Bacteriology*. ASM, Washington DC.
4. Chinard, F. P. 1952. Photometric estimation of proline and ornithine. *J. Biol. Chem.* **199**: 91-95.
5. Choi, D. K., W. S. Ryu, B. H. Chung, S. W. Nam, and Y. H. Park. 1992. Production of L-ornithine by citrulline auxotrophic mutants of glutamate-producing bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 102-107.
6. Choi, D. K., W. S. Ryu, B. H. Chung, S. W. Nam, and Y. H. Park. 1996. Production of L-ornithine by citrulline auxotrophic mutants of *Brevibacterium ketoglutamicum* in dual substrate limited continuous culture. *J. Ferm. Bioeng.* **81**: 216-219.
7. Davis, B. D. 1955. Intermediates in amino acid biosynthesis. pp. 257-268. *Advances in Enzymology*. Interscience Publishers Ltd., London.
8. Deken, R. H. 1962. Pathway of arginine biosynthesis in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **8**: 462-466.
9. Kinoshita, S., K. Nakayama, and S. Udaka. 1957. The fermentative production of L-ornithine. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 276-277.
10. Kiss, R. D. and G. Stephanopoulos. 1992. Metabolic characterization of a L-lysine-producing strain by continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 565-574.
11. Park, N. H. and P. L. Rogers. 1986. L-Phenylalanine produc-

- tion in continuous culture using a hyper producing mutant of *E. coli* K12. *Chem. Eng. Commun.* **45**: 185–196.
12. Ruffio P. 1987. *Amino acid Products and Technology*. Business Opportunity Report C-056 Business Communication Co., Inc., Norwalk, Connecticut, USA.
 13. Salvatore, F., F. Cimino, C. Maria, and D. Ciitadini. 1964. Mechanism of the protection by L-ornithine-L-aspartate mixture and by L-arginine in ammonia intoxicification. *Arch. Biochem. Biophys.* **107**: 499–503.
 14. Sambrook, J., E. F. Fritch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Appendix 3, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 15. Silyta, B. and Z. Fencl. 1975. Continuous production of enzymes, pp. 158. *Enzyme Engineering* 4. Plenum Press, New York.
 16. Skot, G. 1983. Prospects for continuous culture in the production of enzymes. *Proceedings Conference, Adv. In Fermentation*. Chelsea, London.
 17. Udaka, S. 1966. Pathway-specific pattern of control of arginine biosynthesis in bacteria. *J. Bacteriol.* **91**: 617–621
 18. Udaka, S. and S. Kinoshita. 1958. Studies on L-ornithine fermentation. I. The biosynthetic pathway of L-ornithine in *Micrococcus glutamicus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **4**: 272–2826.
 19. Udaka, S. and S. Kinoshita. 1958. Studies on L-ornithine fermentation. II. The biosynthetic pathway of L-ornithine in *Micrococcus glutamicus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **4**: 283–288.
 20. Udaka, S. and S. Kinoshita. 1958. The change of fermentation product by a feedback type mechanism. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **4**: 283–2288.
 21. Vogel, H. J. 1953. Path of ornithine synthesis in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **39**: 578–583.
 22. Vogel, H. J., W. D. McElroy, and B. Glass. 1955. *Amino Acid Metabolism*, pp. 335. Johns Hopkins, Baltimore
 23. Yoshida, H., K. Araki, and K. Nakayama. 1979. Mechanism of L-arginine production by L-arginine production mutants of *C. glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 105–111.

(Received June 19, 1999)