

*Brevibacterium flavum*의 Auxotrophic Mutants에 의한 L-Threonine 生成에 관한 研究

李 甲 郎 · 朴 東 喆

嶺南大學校 食品營養學科
(1987년 7월 15일 접수)

Studies on the Formation of L-threonine by auxotrophic mutants of *Brevibacterium flavum*

Kap-Rang Lee, Dong-Cheol Park

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University

(Received July 15, 1987)

Abstract

This study was attempted to increase the production of L-Threonine by *Brevibacterium flavum* ATCC 14067. To select the strain which produce the highest threonine, mutants were induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine treatment. The composition of media and cultural condition for its overproduction of threonine were also studied. In a threonine producer, strain B-13(Met⁻) was the strain producing the highest amount of threonine among methionine, lysine and isoleucine auxotrophs.

The following results were obtained.

1. The wild strain and B-13(Met⁻) produced threonine 1.4mg/ml and 4.86mg/ml, respectively.

2. The optimum composition of medium for producing threonine by *Brevibacterium flavum* B-13 was glucose 10%, ammonium sulfate 4%, potassium phosphate monobasic 0.2%, magnesium sulfate 0.05%, biotin 200μg/l, thiamine 300μg/l. Addition of nicotinic acid also led to increase L-threonine production.

3. In addition of organic nutrients to the fermentation medium, peptone were effective and addition of methionine 100μg/ml produced the highest amount of L-Threonine. Aspartic acid and homoserine were also effective when these amino acid were added to the fermentation medium.

4. Cultural condition on threonine production by B-16 were investigated. The optimum pH was 7.0-8.0. The highest amount of threonine was produced after 4 days of cultural period.

緒 論

Threonine은 필수아미노산으로서 생체내 대사 작용에 중요한 역할을 하며 곡류를 주식으로 하

고있는 食生活에 있어서는 곡류에 부족되기 쉬운 threonine과 lysine을 비롯한 필수아미노산은 食品營養에 있어서 많은 관심의 대상이 되어왔다.¹⁾ 微生物에 의한 L-threonine 生成에 관한 研究

로서는 *E. Coli*^{2~4)}, *Corynebacterium glutamicum*⁵⁾ *Brevibacterium flavum*^{6~8)} 등에 관한多數의 연구 보고가 있다. Fig. 1. 에서와 같이 *B. flavum*의 threonine 생합성 경로는 *E. Coli*의 경우보다 단순하며,⁹⁾ *B. flavum*의 경우 aspartokinase는 threonine과 lysine 共存에 의해 최종대사산물저해(feedback inhibition)를 받으며^{6, 10)} homoserine dehydrogenase는 methionine에 의해 feedback repression을 받음으로서 threonine 생합성이 조절된다고 보고되고 있다.¹¹⁾ 따라서 細菌에 의해 다량의 threonine생성을 위해서는 앞에서 말한 feedback inhibition이나 feedback repression을 해제하거나 조절할 수 있는 돌연변이균주를 이용하는 것이 보다 효율적인 것으로 보고되어 왔다.^{6, 7, 12)}

한편 최근 國內에서의 細菌에 의한 필수아미노산 생성에 관한 연구를 보면 lysine¹⁷⁾과 methionine¹⁸⁾ 등에 관한 보고는 있으나 threonine 생성에 관한 보고는 거의 없다.

본 실험에서는 細菌에 의한 L-threonine의 효율적인 생성을 검토할 目的으로 *B. flavum*을 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)

로서 반복 처리하여 methionine 영양 요구성변이주(met⁻) isoleucine요구성변이주(Ile⁻) 및 lysine 요구성변이주(lys⁻)를 유도하여 threonine 生成을 조사하고 그중 生成能이 가장 우수한 변이주를 선정하여 몇가지 培地 조성등이 threonine 生成에 미치는 영향을 검토하였다.

材料 및 方法

1. 使用菌株 및 培地

Brevibacterium flavum ATCC 14067과 이菌株로부터 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG) 처리에 의해 얻어진 영양요구성 변이주 B-13(met⁻)外 다수의 변이주를 사용하였다. 사용된 培地の 組成은 Table 1에서와 같다.

2. 영양요구성 변이주의 분리

Brevibacterium flavum ATCC 14067 菌株를 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) 로 처리하여 변이주를 Fig. 2에서와 같이 유도하였다.⁵⁾ 즉 한천사면배지에서 배양한 세균을 1白金耳 취하여 5ml의 완전배지에 접종하여 30℃에서, 24시간 培養하였다. 배양액을 원심분리후 집균한 다음 0.9% saline 용액으로 씻은후 같은용액으로 2ml의 현탁액을 만들었다. 이 현탁액에 1,000µg/ml의 NTG 환층액 용액을 같은량 加하여 20분간 실온에서 방치한후 식염용액으로 2회 세척하여 NTG를 제거하였다. 집균된 균체를 적당한 菌體농도로 희석하여 완전평판 배지에 일정량 塗抹하여 30℃에서 2~3일 배양하여 나타난 Colony를 완전배지와 최소배지를 넣은 petri-dish에 각각 이식하여 완전배지에서는 생육하지만 최소배지에서는 생육하지 못하는 colony를 분리하였으며 이들 colony들을 3회 반복배양하여 변이균주로 선별하였다.^{2, 3)}

위에서 얻어진 변이균주 중에서 영양요구성 변이주를 조사하기 위하여 Table 2와 같이 최소배지에 아미노산, 비타민 및 염기들을 각각 첨가하여 변이주를 接種하여 그 成長여부를 관찰하여 영양요구성을 조사하였다.¹³⁾

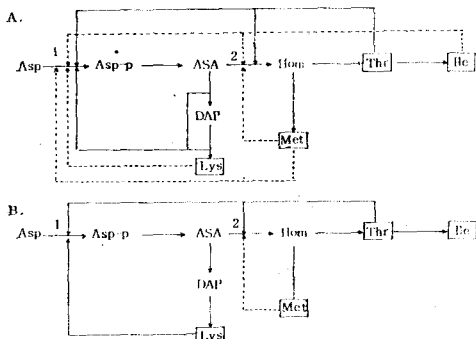


Fig. 1. Regulation of Threonine Biosynthesis in *Escherichia coli* and *Brevibacterium flavum*

1, Aspartokinase

2, Homoserine dehydrogenase

—; Feedback inhibition

.....; Feedback repression

A, *Escherichia coli*

B, *Brevibacterium flavum*

Asp-p; β-Aspartyl phosphate

ASA; Aspartic-β-semialdehyde

DAP; Diaminopimelic acid

Table 1. Composition of media

(g/l)

Component	Complete medium	Minimal medium	Fermentation medium	Seed medium
Glucose		10	100	20
Beef extract	10			
Polypeptone	10			10
Yeast extract	5			10
NaCl	3			2.5
NH ₄ H ₂ PO ₄		1		
(NH ₄) ₂ SO ₄			30	
KH ₂ PO ₄			1.5	
KCl		0.2		
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.2	0.4	
FeSO ₄ ·7H ₂ O			0.002	
MnSO ₄ ·7H ₂ O			0.002	
Trace element solution*		1 ml		
Biotin		30 μg	200 μg	
Mieki**			4 ml	
Thiamine			300 μg	
CaCO ₃			50	
pH	7.2	7.2	7.4	7.4

*Trace element solution; Na₂B₄O₇·10H₂O 88mg, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 27mg, ZnSO₄·7H₂O 8.8mg, CuSO₄·5H₂O 270mg, MuCl₂·4H₂O 7.2mg, FeCl₃·6H₂O 970mg in a liter of distilled water.

**Mieki contains 5.7mg/ml L-threonine, 1.2mg/ml L-methionine and 4.9mg/ml L-isoleucine

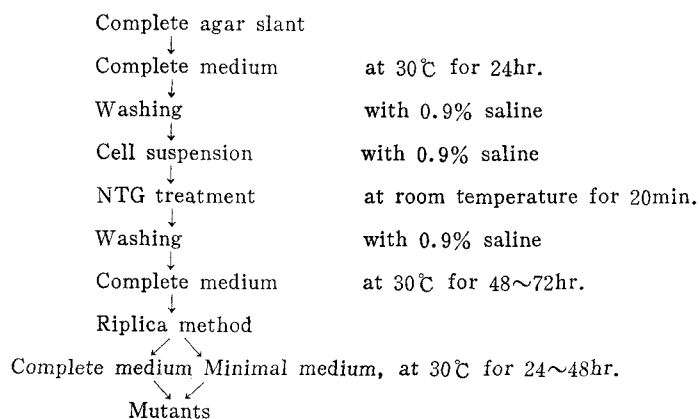


Fig. 2. Procedure for inducing mutant strains.

Table 2. Amino acid, vitamin and purine/pyrimidine pools used in the determination of auxotrophic requirements.

pool	1	2	3	4	5	6
7	adenine +	biotin + +(1)	phenylalanine *	alanine *	arginine *	leucine *
8	hypoxanthine +	folic acid + +(50)	serine *	cysteine *	ornithine *	glycine *
9	cytosine +	pantothenic acid + +(50)	tryptophan *	threonine *	aspartic acid *	isoleucine *
10	guanine +	pyridoxin + +(50)	tyrosine *	sodium thiosulphate +	proline *	histidine *
11	thymine +	thiamine + +(1)	p-aminobenzoic acid + +(50)	methionine *	glutamic acid *	lysine *
12	uracil +	riboflavin + +(250)	nicotinic acid + +(50)	choline + +(1000)	inositol + +(500)	valine *

* ; 10mg/ml of L-form (or 20mg/ml of DL-form)

+ ; 5mg/ml

+ ; μg/ml

3. 培養方法

Nutrient agar 사면배지에 成長한 菌體 1백금 이를 접종배지에 移植하여 30℃에서 24시간 진탕 배양한후 희석한후(10^9 cells/ml) 그 일정량을 발효배지 25ml에 무균적으로 접종하여 30℃에서 72시간 진탕배양하였다.

4. 菌體의 生育度 測定

培養液中的 菌體의 生育度 측정은 Shio等⁶⁾의 방법에 따라 배양액에 0.1N-HCl를 적당량 加하여 배양액을 투명하게 하여 10배 희석한 후 Spectrophotometer로 562nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Threonine의 同定 및 測定

培養液중에 生成된 threonine은 李¹⁴⁾의 방법에 따라 paper chromatography에 의하여 分離同定하였으며 分離된 threonine은 ninhydrin으로 發色하여 Spectrophotometer로 570nm에서 흡광도

를 측정하여 표준품과 비교하여 定量하였다.

結果 및 考察

1. 영양요구성 변이주의 分離

B. flavum ATCC 14067 菌株로부터 材料 및 方法에서와 같이 NTG 처리한후 완전평판배지에 나타난 colony를 완전배지와 최소평판배지에 각각 replica하여 최소배지에서 성장하지 않는 균주를 2~3회 확인하여 안정한 변이주 903株를 선발하였으며 이를 auxonography¹³⁾로 영양요구성을 조사하여 methionine 요구성변이주 148株, isoleucine요구성 8株, lysine요구성 3株, methionine 및 isoleucine 요구주 1株등을 각각 選拔하였다. 이들 변이주들의 L-threonine 생성량을 비교하기 위하여 배양액중에 生成된 L-threonine을 paper chromatography로 分離, 同定한후 比色法으로 定量하여 그중 비교적 L-threonine 생성량이 많은 52菌株에 대하여 Table 3에 나타내었

Table 3. Threonine production by auxotrophic mutants derived from *Brevibacterium flavum* (ATCC 14067).

Strains	Character	L-Thr (mg/ml)	Strains	Character	L-Thr (mg/ml)
A-11	Ile ⁻	1.74	B-41	Met ⁻	1.98
A-25	Ile ⁻	1.50	B-44	Met ⁻	-.72
A-26	Ile ⁻	2.11	B-64	Met ⁻	2.70
B-22	Ile ⁻	1.45	B-74	Met ⁻	3.60
C-30	Ile ⁻	2.41	C-6	Met ⁻	2.76
C-48	Ile ⁻	2.67	C-9	Met ⁻	4.01
C-49	Ile ⁻	2.31	C-24	Met ⁻	2.96
F-33	Ile ⁻	2.64	C-39	Met ⁻	2.74
A-13	Lys ⁻	2.90	C-41	Met ⁻	3.01
A-44	Lys ⁻	2.10	D-26	Met ⁻	1.97
A-45	Lys ⁻	2.70	E-16	Met ⁻	1.72
B-29	Met ⁻	3.45	E-42	Met ⁻	2.01
C-1	Met ⁻ , Ile ⁻	3.17	F-17	Met ⁻	2.04
A-4	Met ⁻	3.01	C-4	Met ⁻	2.04
A-27	Met ⁻	2.01	H-2	Met ⁻	1.46
A-36	Met ⁻	1.95	H-9	Met ⁻	1.45
A-42	Met ⁻	2.94	I-4	Met ⁻	2.71
A-65	Met ⁻	3.01	J-6	Met ⁻	1.72
B-4	Met ⁻	3.72	J-7	Met ⁻	1.94
B-5	Met ⁻	3.76	J-13	Met ⁻	2.12
B-7	Met ⁻	1.97	K-6	Met ⁻	3.01
B-9	Met ⁻	1.95	K-12	Met ⁻	2.75
B-13	Met ⁻	4.86	L-21	Met ⁻	2.42
B-15	Met ⁻	1.69	L-27	Met ⁻	1.75
B-16	Met ⁻	4.57	L-64	Met ⁻	1.41
B-17	Met ⁻	4.57	ATCC 14067	Wild	1.40

다. 분리된 영양요구성 변이주의 methionine 생성량을 보면 isoleucine요구성 변이주 중에서는 C-48 균주가 2.67mg/ml, methionine요구성 변이주 중에서는 B-13균주가 4.86mg/ml으로 가장 많은 L-threonine을 생성하였으며 母菌은 1.4mg/ml의 L-threonine을 생성하였다. 앞에서 분리한 영양요구성 변이주 중에서 L-threonine 생성량이 가장 높은 B-13균주(met⁻)를 선정하여 L-threonine 생성량에 미치는 몇가지 조건을 검토하였다.

2. 培地組成이 L-threonine生成에 미치는 影響

L-threonine 生成이 가장 우수한 菌株인 B-13 (met⁻)에 있어서 탄소원, 질소원 등의 培地組成과 pH, 溫度 등의 몇가지 培養조건이 L-threonine 生成에 미치는 영향을 檢討 하였다.

1) 탄소원의 영향

炭素源의 利用性を 조사하기 위하여 glucose를 비롯하여 Sucrose, fructose, maltose, mannose, xylose, galactose 및 lactose 등을 사용하여 B-13 菌株의 L-threonine 生成을 調査하고, 그중 가장 생성율이 높은 탄소원을 濃度別로 첨가하여 生成량을 검토 하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 各各의 炭素源을 10% 첨가시의 L-threonine 生成량은 glucose가 배양액 ml당 4.86mg으로 가장 많이 생성되었으며 xylose, galactose 등은 생성량이 비교적 낮았다.

glucose를 농도별로 첨가하여 L-threonine 生成을 본 결과 Fig. 3에서와 같이 10%에서 가장 높은 생성량을 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 감소하였다. 이는 Shio等⁶⁾의 보고와 같은 경향이였다. 그러나 Nakamori等⁹⁾은 *E. Coli*의 AHV(α -amino- β -hydroxy valeric acid) 내성변

Table 4. Effect of various carbon source on L-threonine production by B-13

Carbon source (10%)	Growth (O.D×1/26)	L-threonine (mg/ml)
Fructose	0.91	4.79
Glucose	0.78	4.86
Mannose	0.64	3.26
Maltose	0.65	2.10
Sucrose	0.65	3.47
Xylose	0.80	2.87
Galactose	0.94	3.36
Lactose	0.78	3.01

Glucose in fermentation medium was replaced 10% of each carbon source.

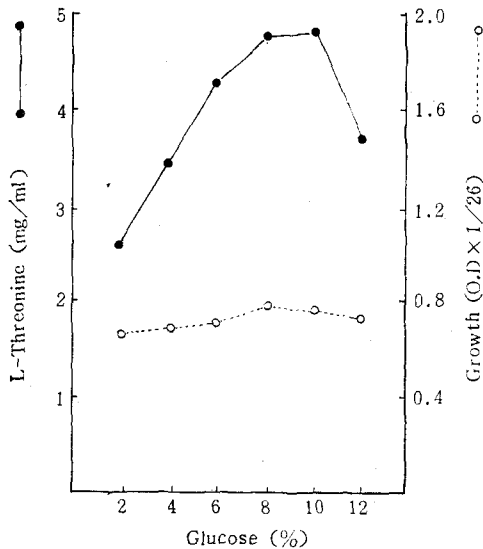


Fig. 3. Effect of glucose concentration on L-threonine production by B-13.

이중에서 탄소원의 농도가 3%일때 L-threonine 생성량이 가장 높았다고 보고 한바 있다.

2) 窒素源의 영향

몇가지 질소원의 영향을 검토하기 위하여 ammonium chloride, ammonium sulfate, ammonium nitrate, potassium nitrate 등을 이용하여 L-threonin 生成을 조사한 결과 Table 5에서와 같이 ammonium sulfate가 4.86mg/ml로서 가장 우수하였으며 ammonium chloride도 비교적 양

Table 5. Effect of nitrogen source on L-threonine production by B-13.

Nitrogen source (3%)	Growth (O.D×1/26)	L-threonine (mg/ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.78	4.86
NH ₄ NO ₃	0.52	4.76
NH ₄ Cl	0.26	4.81
Urea	0.26	1.78
KNO ₃	0.36	1.26

Ammonium sulfate in fermentation medium was replaced by 3% of each nitrogen source.

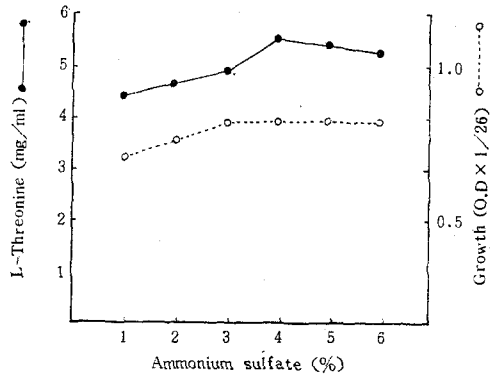


Fig. 4. Effect of ammonium sulfate concentration on threonine production by B-13.

호한 결과를 나타내었다. 또한 L-threonine 생성이 가장 우수한 ammonium sulfate를 농도별로 첨가해본 결과 Fig. 4에서와 같이 기본배지에서 사용한 3%보다 약간 높은 농도인 4~5%에서 L-threonine 생성량이 약간 증가되는 것으로 나타났다. 培養基中の 사용된 질소원으로서 ammonium sulfate를 사용한 경우가 많으며^{2,5,6,15)} Miwa等¹⁶⁾은 E. Coli K-12 균주의 실험에서 ammonium sulfate를 1%이상 첨가한 경우 L-threonine 생성량이 급속히 감소하는 경향을 보고하였으며 Nakamori等⁶⁾은 B. flavum의 AHV 내성 변이주를 사용한 L-threonine 발효에서 ammonium sulfate를 15% 농도로 첨가하였을때 L-threonine이 가장 많이 생성됨을 보고 하였다.

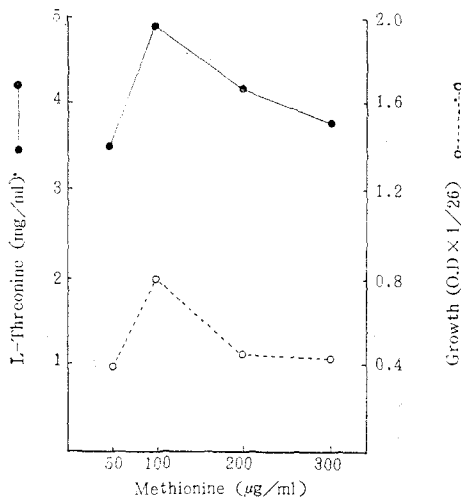
3) L-threonine 生成에 미치는 amino acid의 影響

Amino acid가 L-threonine 生成에 미치는 영

Table 6. Effect of amino acid on L-threonine production by B-13.

Amino acids (0.01%)	Growth (O.D×1/26)	L-threonine (mg/ml)
Lysine	1.0	3.64
Aspartic acid	0.76	5.28
Homoserine	0.82	5.74
Isoleucine	1.07	3.57
Control	1.0	4.80

B-13 cells were cultured in fermentation medium containing given amino acids

**Fig. 5. Effect of methionine concentration on L-threonine production by B-13.**

항을 알아보기 위하여 aspartic acid 계열의 아미노산을 발효배지에 첨가해본 결과 Table 6에서와 같이 aspartic acid와 homoserine 첨가시에 L-threonine 생성량이 각각 5.28mg/ml와 5.74mg/ml로서 대조구 보다 약간 증가 되었다. 이는 aspartic acid와 homoserine이 threonine의 전구물질이기 때문인 것으로 생각되며 lysine 첨가시에 L-threonine 생성이 감소되는 현상은 concerted feedback inhibition에 인한 것으로 보여진다.^{2,11)}

그리고 영양요구성 물질인 methionine을 농도별로 배양기에 첨가해본 결과 Fig. 5에서와 같이 methionine 농도가 100µg/ml 일때가 L-threonine 생성량이 가장 높았으며, 그 이상의 고농도에서는 감소하는 것으로 나타났다. 이는 methionine

에 의해 homoserine dehydrogenase가 feedback repression 되는 현상으로 생각된다.¹¹⁾ methionine 영양요구성 변이주에 대한 methionine 첨가에 관한 연구보고로서 Hirakawa等²⁾은 E. Coli의 methionine 영양요구성 변이주의 methionine 최적량은 50µg/ml라고 보고하였으며 Kase等¹⁰⁾은 *Corynebacterium glutamicum*의 methionine 영양요구주에 있어서 L-threonine 생성에 필요한 최적농도는 100µg/ml이었으며 200µg/ml 이상의 농도에서는 생성량이 억제되었다고 보고 하였다.

4) Vitamin 첨가의 影響

Vitamin이 L-threonine 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 nicotinic acid와 7종의 비타민을 발효배지에 각각 0.05%가 되게 첨가해본 결과 Table 7에서 보는 바와 같이 菌의 생육은 folic acid와 pantothenate 등 몇가지 비타민에서 증가되는 경향을 나타내었으며 nicotinic acid, inositol, pyridoxine에 있어서는 다른 비타민 보다 L-threonine 생성을 증가시켰다.

또한 thiamine을 농도별로 배양액중에 첨가하여 L-threonine 생성에 미치는 영향을 조사하여 본결과 Fig. 6에서와 같이 thiamine 300µg/l 첨가시 L-threonine이 가장 많이 생성되었다. 또한 별도의 실험에서 biotin이 L-threonine 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 배양액에 biotin 200 µg/l 첨가한 경우 L-threonine 생성량이 가장 높았다(Fig. 7).

Nakayama等¹⁵⁾은 *Arthrobacter paraffineus*

Table 7. Effect of vitamin on L-threonine production by B-13.

Vitamin (0.05%)	Growth (O.D×1/26)	L-threonine (mg/ml)
Folic acid	1.45	4.09
Ascorbic acid	1.08	4.05
Riboflavin	1.02	3.40
Nicotinic acid	0.72	7.70
Inositol	1.18	5.81
P-Aminobenzoic acid	0.62	3.95
Pyridoxine	0.82	6.27
Pantothenate	1.36	4.45
nono	1.0	4.80

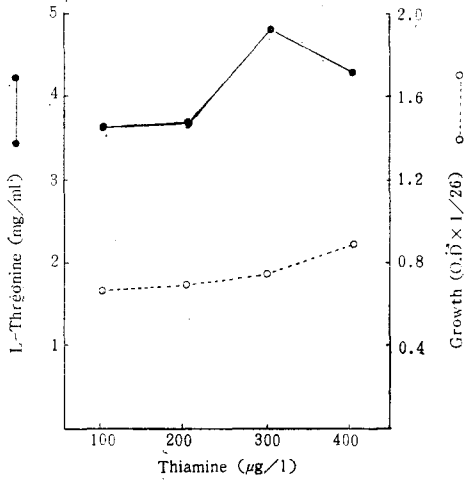


Fig. 6. Effect of thiamine concentration on L-threonine production by B-13.

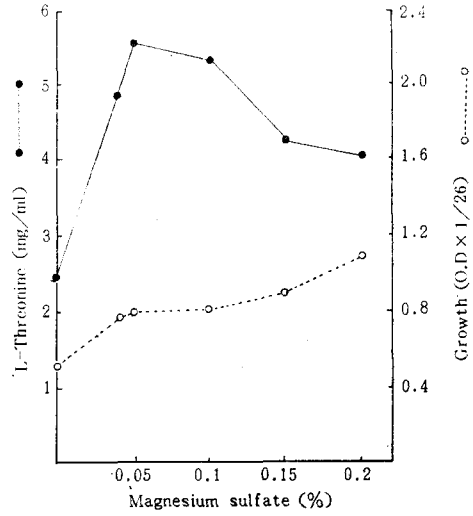


Fig. 8. Effect of magnesium sulfate concentration on L-threonine production by B-13.

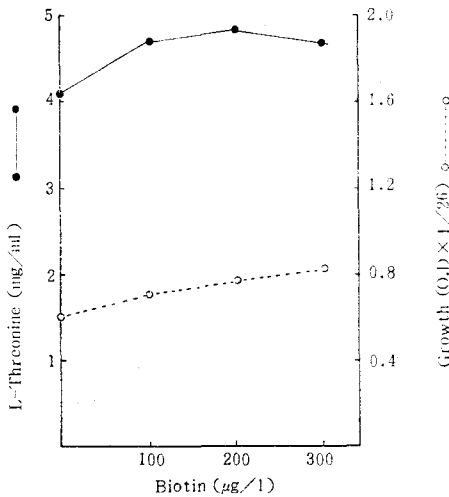


Fig. 7. Effect of biotin concentration on L-threonine production by B-13.

에 의한 L-threonine 생성에 있어서 pyridoxine, nicotinic acid, inositol, cyanocobalamine 및 folic acid 등이 생성량을 증가시켰다고 보고하였으며 또한 Shioo等⁹⁾은 *B. flavum*을 이용한 L-threonine 생성에 있어 biotin 200µg/l, thiamine 300µg/l의 농도에서 L-threonine이 최대생성량을 나타내었다고 보고 하였다.

5) Magnesium sulfate가 L-threonine 생성에 미치는 영향
Magnesium 이온이 L-threonine 생성에 미치

는 영향을 조사하기 위해 magnesium sulfate를 발효배지에 여러농도로 첨가해 본 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 0.05%로 첨가 했을때 L-threonine 생성이 培養液 ml당 5.53mg으로 가장 많이 생성되었다. 이같은 결과는 Shioo等⁹⁾이 *B. flavum*의 AHV 내성변이주를 이용한 L-threonine 생성에 있어서 magnesium sulfate의 농도가 0.05%일때 가장 높은 생성량을 보였다는 보고와 같은 경향이였으며, Nakamori等⁹⁾은 *E. Coli*를 이용한 L-threonine의 발효에 있어서 magesium sulfate의 농도를 0.1%로 첨가했을 때 가장 많은 L-threonine이 생성되었다고 보고하였다.

6) 磷酸鹽의 影響

磷酸鹽이 L-threonine 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 배양기에 KH₂PO₄, K₂HPO₄, Na₂HPO₄ 및 NaH₂PO₄등의 인산원을 0.15% 농도로 첨가하여 L-threonine 생성을 검토하였다. Table 8에서 보는 바와 같이 KH₂PO₄를 첨가한 발효배지에서 L-threonine 생성량이 4.86mg/ml로서 가장 많이 생성 되었다. 또한 KH₂PO₄를 농도별로 첨가한 실험에서는 Fig. 9에서와 같이 0.2%첨가했을때 L-threonine 생성이 가장 높았다.

Shioo等⁹⁾은 *B. flavum*의 AHV 내성변이주에 있어서 KH₂PO₄의 첨가량이 0.1% 일때 L-threonine 생성량이 가장 높았다고 보고 하였으며,

Table 8. Effect of potassium and phosphorus sources on L-threonine production by B-13

Potassium and phosphorus(0.15%)	Growth (O.D×1/26)	L-threonine (mg/ml)
KH ₂ PO ₄	0.78	4.86
K ₂ HPO ₄	1.02	3.64
Na ₂ HPO ₄	0.28	3.71
NaH ₂ PO ₄	0.34	3.26

KH₂PO₄ in fermentation medium was replaced by each potassium or phosphorus sources

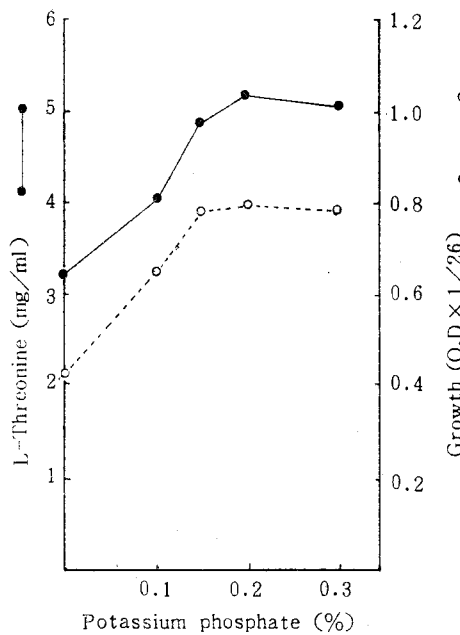


Fig. 9. Effect of potassium phosphate concentration on L-threonine production by B-13.

Kase等¹⁵⁾은 *Arthrobacter paraffineus*에 있어서 KH₂PO₄와 K₂HPO₄를 0.4% 농도로 첨가한 발효 배지에서 L-threonine 생성이 가장 높았다고 보고하였다.

7) 有機營養源의 影響

몇가지 유기영양원이 L-threonine 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 yeast extract, peptone, corn steep liquor extract를 각각 5% 농도로 첨가한 결과 Table 9에서와 같이 peptone 과 yeast extract 첨가시 threonine 생성량이 각

Table 9. Effect of various nutrients on L-threonine production by B-13.

Natrients (5%)	Growth (O.D×1/26)	L-threonine (mg/ml)
Yeast extract	0.83	7.32
Peptone	0.89	8.26
Corn steep liquor	1.04	6.86
Meat extract	1.37	5.60

각 8.26mg/ml와 7.32mg/ml로서 가장 높은 생성량을 보였다.

8) pH의 影響

L-threonine 생성에 미치는 培養初期 pH의 영향을 알아보기 위하여 pH3.0에서 pH9.0까지의 구간에서 실험한 결과 Fig.10에서와 같이 pH6~8사이에서 L-threonine 생성량이 4.69~5.07mg/ml로서 높은 생성량을 나타내었다. Shio等⁹⁾과 Kase等¹⁰⁾은 *B. flavum*의 AHV 내성변이주와 *E. Coli*의 L-threonine 생성은 pH7~8일때 가장 높았다고 보고 하였다.

9) 培養時間의 影響

배양시간에 따른 L-threonine 생성을 조사하기 위하여 배양 24시간 부터 120시간까지 측정된 결

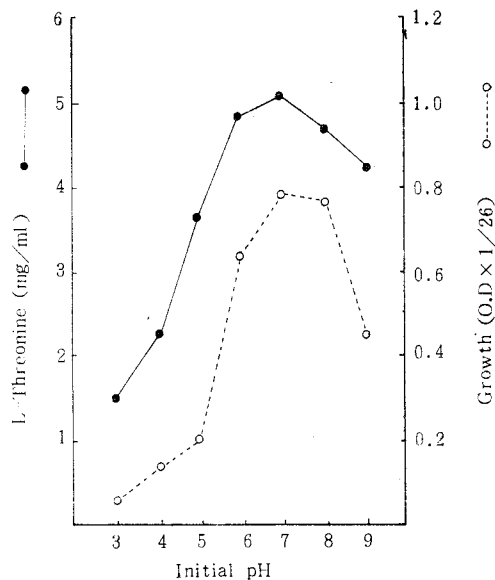


Fig. 10. Effect of initial pH on L-threonine production by B-13.

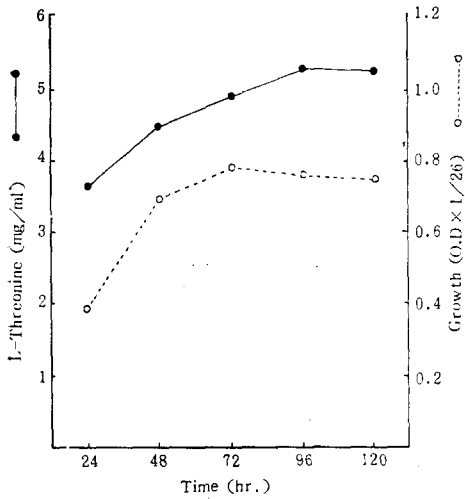


Fig. 11. Effect of cultivation time on L-threonine production by B-13.

과 Fig. 11에서 보는 바와 같이 菌의 生育은 배양 72시간에 최고에 달하였으며 L-threonine 생성량은 96시간에 가장 높았으며 그이후에는 증가하지 않았다. Nakamori等⁹⁾은 *E. Coli*에 있어서 L-threonine 생성이 배양 96시간에 가장 높았다고 보고 하였으며 Shio等¹⁰⁾은 *B. flavum*을 이용한 L-threonine 생성에 있어서 배양 72시간에 가장 높은 생성량을 나타내었다고 보고 하였다. 또한 Kase等¹⁰⁾은 *E. Coli*의 영양요구성 변이주를 이용한 L-threonine 생성실험에서 배양후 120시간에 생성량이 가장 높았다고 보고 하였다.

要 約

本實驗은 細菌에 의한 L-threonine의 효율적인 生成을 검토할 目的으로 *Brevibacterium flavum* ATCC 14067을 사용하여 L-threonine 生成能이 우수한 菌株을 選拔하기 위해 변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)로 처리하여 突然變異株를 誘導한 後, 다시 methionine 영양요구주, lysine 영양요구주, isoleucine 영양요구주, methionine 및 isoleucine 영양요구주를 選拔하였다. 또한 選拔된 영양요구성 변이주들 중에서 L-threonine 生成能이 原菌에 비해 3~4배 정도 우수한 B-13菌株(met⁻)를 選拔하여 L-threonine 生成力, 培地 組成 및 培養

에 따른 몇가지 要因들에 대하여 실험한 결과 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. L-threonine 생성량은 원균주가 1.4mg/ml에 비해 methionine 영양요구성 변이주인 B-13은 4.86mg/ml로서 약 3.5배의 높은 생성량을 나타내었다.

2. B-13에 의한 L-threonine 生成에 적당한 培地組成은 glucose 10%, ammonium sulfate 2%, potassium phosphate monobasic 0.2%, magnesium sulfate 0.05%, biotin 200μg/l, thiamine 300μg/l이었으며 nicotinic acid 0.05% 첨가시 더욱 증가 되었다.

3. B-13에 있어서 유기영양원에 대한 효과는 yeast extract와 peptone이 양호하였으며 영양요구물질인 methionine은 100μg/ml가 적당하였으며 aspartic acid와 homoserine 첨가시 L-threonine 생성이 증가되었으며 lysine 첨가시에는 감소하는 경향이 나타났다.

4. B-13에 의한 L-threonine 생성에 가장 적절한 pH는 7.0~8.0이었으며 培養日數는 4일이 적당하였다.

References

1. Alejandro Mosqueda-Suarez: A New Type of Bread. Wheat-and-Rice Bread. *Food Technol.*, **12**, 15~17 (1958).
2. Tamotsu Hirakawa, Tamotsu Tanaka and Kiyoshi Watanabe: L-Threonine Production by Auxotrophs of *E. coli*, *Agri. Biol. Chem.*, **37**(1), 123~130 (1973).
3. Huang, H. T.: Production of L-Threonine by Auxotrophic Mutants of *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol.*, **9**, 419~424 (1961).
4. Tamotsu Hirakawa and Kiyoshi Watanabe: Mechanism of L-Threonine Production in *E. coli*, Auxotrophs, *Agri. Biol. Chem.*, **33**(1), 77~84 (1974).
5. Hiroshi Kase and Kiyoshi Nakayama: Production of L-Threonine by Analog-resistant Mutants, *Agri. Biol. Chem.*, **36**(9), 1911~1621 (1972).
6. Isamu Shio and Shigeru Nakamori: Microbiol Production of L-Threonine, Part II.

- Production by α -Amino- β -hydroxyvaleric acid Resistant Mutants of Glutamate Producing Bacteria. *Agri. Biol. Chem.*, **34**(3), 448~456 (1977).
7. Shigeru Nakamori and Isamu Shiio; Production of L-Threonine by Mutants Resistant to Both α -Amino- β -hydroxyvaleric Acid and (S-2-Aminoethyl)-L-cystein Derived from *Brevibacterium flavum*. *Agri. Biol. Chem.*, **37**(3), 653~659 (1973).
 8. Isamu Shiio, Akemi Sasaki, Shigeru Nakamori and Konosuke Sano: Production of L-Isoleucine by AHV Resistant Mutants of *Brevibacterium flavum*. *Agri. Biol. Chem.*, **37**(9), 2053~2061 (1973).
 9. Isamu Shiio and Shigeru Nakamori: Microbiol Production of L-Threonine. Part I. Production by *Escherichia coli* Mutant Resistant to α -Amino- β -hydroxyvaleric acid, *Agri. Biol. Chem.*, **33**(8), 1152~1160 (1969).
 10. Hiroshi Kase, Hauro Tanaka and Kiyoshi Nakayama: Studies on L-Threonine Fermentation. Part I. Production of L-Threonine by Auxotrophic Mutants of Various Bacteria, *Agri. Biol. Chem.*, **35**(3), 2089~2096 (1971).
 11. Hiroshi Kase and Kiyoshi Nakayama: Mechanism of L-Threonine and L-Lysine Production by Analog-resistant Mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agri. Biol. Chem.*, **33**(5), 993~1000 (1974).
 12. Konosuke Sano and Isamu Shiio: Microbiol Production of L-Lysine. III. Production by Mutants Resistant to S-(2-Aminoethyl)-L-Cysteine. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **16**, 373~391 (1970).
 13. Jeffrey, H. Miller; Experiments in Molecular Genetics Cold Spring Harbor Laboratory. p.121~129, (1972).
 14. Sung Woo Lee: Physio-chemical Studies on the after-ripening of hot pepper fruits (part 4). *J. Kor. Agri. Chem. Society*, **14**(1), 43~50 (1971).
 15. Hiroshi Kase and Kiyoshi Nakayama: L-Threonine Production by a Mutant of *Arthrobacter paraffineus*. *Agri. Biol. Chem.*, **37**(7), 1643~1694 (1973).
 16. Kiyoshi Miwa, Takayasu Tsuchida, Osamu Kurahashi, Shigeru Nakamori, Konosuke Sano and Hauro Momose: Construction of L-Threonine Overproducing Strains of *Escherichia coli* K-12 Using Recombinant DNA Techniques. *Agri. Biol. Chem.*, **47**(10), 2329~2334 (1984).
 17. 경기천·임번삼·이세영·전문진, *Brevibacterium flavum*과 *Corynebacterium glutamicum*의 이속간 원형질체융합에 의한 L-lysine균주개발. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**(3), 279~283 (1985).
 18. 이갑량·박정룡·최청·손재숙·이별나·이인선, *Corynebacterium glutamicum*의 Methionine 내성변이주에 의한 methionine 생성에 관한 연구. 영남대학교 자원문제연구논문집, **4**(1), 91~101, (1985).