

## 발효에 의한 라이신(L-lysine) 생산에 관한 연구 (1)

라이신 생산균주의 분리 및 라이신 생산조건의 검토

민 태 익 · 권 태 완

한국과학기술연구소 식량자원연구실

(1971. 3. 15 수리)

## Studies on the production of lysine by fermentation process (1)

Isolation of lysine producing microorganisms and  
cultural conditions of lysine accumulation

by

Tae-Ick Mheen and Tai-Wan Kwon

Food Resources Laboratory

Korea Institute of Science and Technology

Seoul, Korea

(Received. Mar. 15, 1971)

### Abstract

Ninty four strains of lysine producing micro-organisms in culture broth during fermentation have been isolated from soil and other sources. From the comparison of the amounts of lysine produced, 6 strains have been selected as the potentially useful strains, and identified tentatively as *Micrococcus* sp. (S-16-4), *Corynebacterium* sp. (S-27-12, S-281-3, CBY-4) and *Brevibacterium* sp. (M-6-71, F-629-2), respectively. From the further studies with *Corynebacterium* sp., S-27-12, its maximum yield was found to be 4mg lysine/ml of synthetic medium, consist of glucose(7.5%), urea(0.6%), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.2%), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.05%), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.03%), MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O(0.001%) and FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.0005%) at pH 7.2 and 30°C after 4 days.

### 서 언

의 약품공업의 일부로서 발전해온 아미노산 생산공업은 근년에 와서 아미노산이 조미료로서 또는 영양강화제로 활용되기 시작하자 직접 사료제조업 및 식품공업과 직결하게 되었다.<sup>(1)</sup> 우리나라와 같이 쌀을 위주로 하고 있는 식생활에서는 단백질의 섭취량이 부족할뿐 아니라 신체발육이나 정상대사에 소요되는 몇몇 필수 아미노산, 특히 lysine과 methionine이 결핍되어 있으므로 그걸 또한 불충분한 것이다. 그러나 다행이도 최

근의 영양학적 지견에 의하면 이들 부족되는 필수아미노산을 첨가보충함으로써 곡류단백질의 질을 동물단백질의 그것에 못지 않게 향상시킬 수 있으며, 간접적으로는 식량자원을 절약할 수 있게 되는 것이다.<sup>(2)</sup>

Lysine은 현재 합성법과 발효법에 의해서 일본, 미국 및 화란등지에서 공업적으로 생산되고 있으나, 우리나라에서는 조미료로 사용되고 있는 glutamic acid 외에는 아직 다른 아미노산이 생산되고 있지 않다. 발효법에 의한 lysine의 생산에 관해서는 *Escherichia coli*의 lysine 요구주를 사용하여 diaminopimelic acid(DAP)

를 축적시키고, 다음에 DAP 탈탄산효소를 갖는 *E. coli*

나 *Aerobacter aerogenes*를 작용시킴으로써 DAP로부터 L-lysine 을 얻는 Casida<sup>(3)</sup> 및 Kita 와 Haung<sup>(4)</sup> 등의 특허를 비롯해서 Broquist 등<sup>(5)</sup> 및 Jensen 과 Shu<sup>(6)</sup> 등과 같이 lysine rich yeast로부터 lysine 을 열탕추출하는 방법이 있으나, 가장 획기적인 방법으로는 Kinoshita<sup>(7)</sup> 등의 glutamic acid 생산균주인 *Micrococcus glutamicus*의 homoserine 요구성변이주를 이용한 직접 발효법이 있다.

앞으로 우리나라에서도 유통되는 곡류 및 곡류제품을 강화하게 되는 날, lysine의 생산은 새로운 발효공업으로서 각광을 받게 될 것이다. 본 연구에서는 이와 같은 lysine 을 장차 국내에서 공업적으로 생산하기 위하여 1차적으로 전국에서 수집한 300여종의 시료로부터 lysine 생산균주 6주를 분리, 동정하였으며, 그중 *Corynebacterium* 속에 속하는 S-27-12 주에 대하여는 좀더 상세하게 그 배양조건을 검토한 바 있으므로 그 결과를 여기에 보고하는 바이다.

## 실험 방법

### 1. Lysine 생산균주의 분리

토양을 비롯한 기타 시료로부터 lysine 생산균주를 분리하기 위해서는 표 1의 배지를 사용하였으며 분리 조작은 다음과 같다. 시료를 멸균수로 적당히 회석, 상법에 의하여 표 1의 SL 배지를 사용 30°C에서 48시간 평판배양후 생긴 colony 를 분리, slant 상에서 동일 조건으로 배양후 다시 L-1 및 L-2 배지에 접종하여 30°C에서 48시간 전당배양하였다. 이 배양액을 원심분리하여 그 상동액을 thin layer chromatography 법 (전개용매; butanol : acetic acid : water = 4 : 1 : 1 v/v, 발색시약; 0.3% ninhydrin 알콜용액)으로 lysine의 생산유무를 검출하였다. lysine의 생산이 검출된 균주는 다시 필요에 따라서 L-3, L-4, PL, PL-1 및 PL-2 배지를 사용하여 같은 방법으로 72시간 배양한 후 TLC

표 1. Composition of screening media

Ingredients	Media (%)			1st screening		2nd screening		final screening		
	SL	L-1	L-2	L-3	L-4	PL	PL-1	PL-2		
Glucose	3.0	5.0	5.0	5.0	10.0	5.0	5.0	10.0		
Peptone	1.0	0.5				0.1				
Beef extract	0.5	0.2				0.1				
Yeast extract	0.1	0.01	0.05	0.1		0.1				
NaCl	0.25					0.2		0.1		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		1.0		0.5		1.0				
Urea				0.5	1.0	0.5	1.0		1.0	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$			0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
$\text{K}_2\text{HPO}_4$			0.1	0.05	0.05	0.1	0.05	0.05	0.05	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$			0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	
Biotin								15 $\mu\text{g}/\text{L}$		
$\text{CaCO}_3$			0.5					0.2		
Agar	1.5									
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	6.2	7.0	6.2	6.2		
Amounts of Medium		6ml/test tube		20ml/100ml flask		50ml/500ml flask				

법으로 비교함으로써 후부균주를 선별하였다. 또 몇 주에 대해서는 gas chromatography 법<sup>(8,9)</sup>으로 생산된 lysine 을 정량 확인하였다.

### 2. 후보균주의 등정

최종적으로 선별된 lysine 생산균주의 여러가지 분류학적 성질의 검토는 세균학실험법<sup>(10)</sup>의 Manual of Microbiological Methods<sup>(11)</sup>에 따라 실시하였으며, 균의 동정은 Bergey's Manual of Determinative Bacter-

iology<sup>(12)</sup>에 준하였다.

### 3. Lysine 생산 최적조건의 검토

Lysine 생산의 최적배양조건의 검토는 최종 선별된 6주종 *Corynebacterium* 속에 속하는 S-27-12 1주에 한해 서만 실시하였다. 사용한 밑효배지는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPo}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 함유한 수용액에 각각 필요한 탄소원, 질소원, 유기영양원 및 무기염류를 가하였으며 첨가농도는 그때 그때 별

도로 기록하였다. 종배지로는 동일조성의 배지를 사용하였으며 30°C에서 24시간 배양한 것을 10% 농도로 접종하였다. 본 밸효배양은 500ml의 삼각 flask에 배지 50ml을 주입, 멀균 후 중균을 접종하여 30°C에서 72시간 배양하였다. lysine의 정량은 TLC 법으로 행하였다.

### 실험결과 및 고찰

#### 1. Lysine 생산균주의 분리

제 1차분리에서는 배양액 중에 lysine은 물론 그 이외의 아미노산 생산이 현저한 미생물은 모두 선발하였다. 표 2에서 보는 바와 같이 총 910주의 미생물로부터 아미노산의 생산이 확인된 균주는 150주에 달하며 이중 lysine의 생산이 인정된 균주는 94주였다. 배양액 중에 약간의 아미노산을 생산하는 현상은 미생물의 일반적인 생리적 성질이라고 생각되지만 그 생산량이 현저한 균주는 비교적 적었으며, 동일균주에서 겹출되는 아미노산의 양은 배지조성이나 배양조건에 따라 현저한 차이를 보였다. 따라서 제 2차분리에서는 표 1의

L-3 및 L-4 배지를 사용하여 lysine이 0.5mg/ml 이상인 균주를 선발하였으며 그중 4주에 대하여는 gas chromatography 법으로 생산된 모든 아미노산을 정량적으로 분석하였다.

표 2. Numbers of lysine producing microorganisms

Microorganisms isolated	Amino acid producing microorganisms	Lysine producing microorganisms
Bacteria	825	138
Yeast	28	2
Fungi	57	10
Total	910	150
		94

표 3에서 보는 바와 같이 이들 균주는 lysine 이외에도 glutamic acid, alanine, valine 등이 상당량 축적되었으며 특히 homoserine의 생산이 확인된 것은 앞으로 대사산물의 양적인 침가나 영양요구성 변이주를 얻음으로써 lysine 생산의 수율을 향상시키는데 좋은 자료가 되리라고 본다.

표 3. Amino acids accumulated in the culture broth by the selected strains

Strain No.	Amino acids(mg/ml)	Ala	Val	Gly	Iso	Th	Leu	Pro	Ser	Hom	Hyd	Met	Asp	Phe	Glu	Tyr	Lys	Media
S-27-12	0.42	0.64	0.10	0.16	0.04	0.32	0.18	0.06	0.08	—	0.06	0.20	0.22	0.56	0.30	1.02	표 1 L-4	
CBY-4	1.30	0.72	0.50	0.58	0.46	0.90	0.18	0.30	※	※	0.18	0.70	0.56	0.78	0.46	2.40	" L-3	
M-6-71	0.22	2.60	0.12	0.10	0.04	0.20	0.04	0.06	0.44	—	0.02	0.18	0.12	0.44	0.10	0.98	" L-2	
F-629-2	0.62	1.38	0.24	0.54	0.10	0.54	0.26	0.16	0.28	—	0.14	0.36	0.40	1.98	0.38	0.52	" "	

※ trace

최종 분리에서는 표 1의 PL, PL-1, PL-2 배지를 사용하여 lysine 생산이 2mg/ml 이상인 균주를 선발하였다. 그결과는 표 4와 같다. 균주 S-16-4, M-6-71 및

F-629-2는 PL 배지에서, S-27-12와 S-281-3은 PL-1 배지에서 그리고 CBY-4는 PL-2 배지에서 lysine의 생산이 더 양호하였다.

표 4. List of the selected microorganisms

Strain No.	Sources isolated	Place	Media
S-16-4	Soil	Yong-Meon	표 1. PL
S-27-12	Soil	Tae-Koo	1. PL-1
S-281-3	Soil	Soo-Won	1. PL-1
CBY-4	Compost	Onyang-Onchun	1. PL-2
M-6-71	Meju	Seoul	1. PL
F-626-2	Fish	Seoul	1. PL

#### 2. 후보균주의 등정

최종적으로 선정된 lysine 생산균주 6주에 대한 분류학적 등정을 위하여 형태적, 배양적, 생리적 성질을 관찰한 결과는 표 5, 6, 7과 같으며 이들을 Bergey's manual에 준하여 종합검토해본 결과 균주 S-16-4는

*Micrococcus* 속, S-27-12, S-281-3, CBY-4는 *Corynebacterium* 속, 그리고 M-6-71, F-629-2는 *Brevibacterium* 속으로 동정되었다. 앞으로 이들 균주에 대해서는 그 활용성이 밝혀짐에 따라 더욱 완전한 동정이 이루어 질 것이다.

Table 5. Cultural characteristics of the selected microorganisms

Strain No.	S-16-4	S-27-12	S-281-3	CBY-4	M-6-71	F-629-2
Morphological characteristics						
form	coccoid, tetrad	rods, curved	rods, curved	coccoid, long chain	coccoid, short rods, long chain	
size	$1.2\mu$	$1.2 \times 4.8\mu$	$1.2\mu \times 6.0\mu$	$1.8 \sim 2.4\mu$	$1.8 \sim 1.2 \times 2.4\mu$	
motility	none	none	none	none	none	
flagella	none	none	none	none	none	
gram stain	positive	positive	variable	positive	positive	
Agar colony						
form	rhizoid	circular	circular	circular	circular	
surface	smooth	smooth	smooth	rough, curled	rough	
edge	cross	undulate	crenate	lobate	lobate	
elevation	raised	umbonate	umbonate	flat	flat	
color	white	yellow	yellow	white	white to pale	
lustre	glistening	dull	glistening(mucoid)	yellow	yellow	
Agar slant						
growth	moderate	abundant	abundant	dull	glistening(mucoid)	
form	echinulate	echinulate	echinulate	abundant	abundant	
medium	not changed	not changed	not changed	thick pellicle,	thin pellicle	
Nutrient broth				creeping	almost clear	
clouding	flocculent	no growth	no growth	not changed	not changed	
sediment	almost clear	slightly turbid	slightly turbid	scanty	scanty	
Gelatin stab						
growth	moderate	moderate	moderate	surface pellicle	surface pellicle	
liquefaction	crateriform	crateriform	napiform	stratiform	stratiform	
Potato media						
growth	moderate wrinkled	heavy growth	heavy growth	wrinkled	heavy wrinkled	
form	spreading	filiform	filiform	spreading	spreading	
color	grayish yellow	creamy yellow	yellow	light soil yellow	light soil yellow	
medium	not changed	dark	dark	not changed	not changed	

표 6. Physiological properties of the selected microorganisms

Strain No.	S-16-4	S-27-12	S-281-3	CBY-4	M-6-71	F-629-2
Action on Litmus milk	clear, peptonized	purple	purple	reddish purple	clear, peptonized	clear, peptonized
KNO <sub>3</sub>	+	-	-	-	+	-
Production of H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-
Ammonia	+	-	-	-	+	+
Hydrolysis of starch	+	+	+ (weak)	+ (weak)	+	+
Test of Catalase	+	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+ (weak)	+
V.P.	+	-	-	-	+	+
M.R.	-	-	-	-	-	-
Reduction of Neutral Red	-	-	-	-	-	-
Methylene Blue	-	-	-	-	-	-
Relation to pH	5.0~9.0	4.0~9.5	4.5~9.5	4.0~9.5	4.0~9.5	4.0~9.5
Free oxygen	Aerobic	Aerobic	Aerobic	Aerobic	Aerobic	Aerobic
NaCl (5%)	+	+	+	+	+	+
concentration (10%)	-	-	-	-	-	-
Optimum temperature	30°C	30°C	30°C	30°C	37°C	37°C
Thermal death point	70°C	70°C	70°C	70°C	80°C	80°C
Sources	Soil	Soil	Soil	Compost	Meju	Fish

표 7. Gas and acid production from various carbohydrates by the selected microorganisms\*

Strain No.	S-16-4	S-27-12	S-281-3	CBY-4	M-6-71	F-629-2
Carbohydrates						
Glucose	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	-	-	al	al(weak)
Mannose	+	al	±	al(weak)	±	±
Xylose	al	-	±	-	-	al(weak)
Arabinose	+	+	±	+	-	-
Rhamnose	al	al	al	al	al	al
Sucrose	+	+	al	+	±	+ (weak)
Lactose	al	al(weak)	al(weak)	al(weak)	al	al
Maltose	+	+	+	+	±	±
Trehalose	+ (weak)	+	+	+	al	al(weak)

Mellibiose	al	+	+	+	al	al
Raffinose	al	+	+	÷	al	al(weak)
Dextrin	+	+	+	+	±	al(weak)
Starch	+ (weak)	+	+	+	±	al
Inulin	+ (weak)	+	+	+	±	al
Mannitol	+	+	+	+	±	±
Glycerin	+	+	+	+	±	÷
Dulcitol	al	al	al	al	al	al
Adonitol	al	al	al	al	al	al
Ethanol	al	al	al	al	al	al
Salicin	al	+	-	al(weak)	al	±

\* : All strains did not produced gas from all carbohydrates.

+: acid production

± : growth, but not changed.

- : no growth

al : alkaline

### 3. S-27-12 주에 의한 lysine 생산조건의 검토

#### 가. Glucose 농도

Lysine 생산에 미치는 최적의 glucose 농도를 알기 위하여 표 8에서 보는 바와 같이 glucose 농도를 1-10% 까지 변화시켜서 비교해 본 결과는 glucose의 농도가 높을수록 생육은 양호하였으나 lysine의 생산은 glucose의 농도가 7.5%와 10%일 때 양호하였다. glucose 7.5-10%의 농도에서는 lysine 생산에 별다른 변동이 없는 것으로 보고 본 실험 이후의 glucose 농도는 7.5%를 사용하였다.

표 8. Effect of glucose concentration on lysine production

Glucose (%)	Final pH	Growth*	Lysine**
1	9.2	0.07	-
2	9.2	0.10	+
3	9.2	0.13	++
5	9.0	0.28	+++
7.5	9.0	0.42	++++
10	8.6	0.65	++++

Basal medium: Urea 0.9%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.001%

\* Absorbance at 660 m $\mu$  after X 32 dilution

\*\* ÷, ca. 0.5mg/ml; +, ca. 1.0mg/ml;

++, ca. 2.0mg/ml. ++÷, ca. 2.5mg/ml;

+++, ca. 3.0mg/ml; +++÷, ca. 3.5mg/ml;

++++, ca. 4.0mg/ml.

#### 나. 질소원 및 농도

최적의 질소원을 선택하기 위해서는 두기질소원으로  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , urea의 4종류를 사용하였으며 그 첨가농도는 표 9와 같다. 결과는 urea 0.6% 첨가시가 가장 양호하였으며 그 다음은  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.55%의 첨가시였다.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 는 각각 0.4%와 0.65% 첨가시에 생장이 urea 0.6% 첨가시와 비슷하였지만 lysine은 생산되지 않았다. Urea 이외의 무기질소원 첨가시는 미생물의 생장과 함께 pH가 산성으로 떨어지기 때문에 배지를 살균한 후 0.5%에 해당하는  $\text{CaCO}_3$ 를 별도로 살균하여 첨가하므로 pH를 어느 정도 유지시킬 수 있었다. 0.9%의 urea 첨가시는 pH가 떨어지는 현상을 볼 수 없어  $\text{CaCO}_3$ 를 첨가하지 않았으나, 0.3% 첨가시는 pH가 산성으로 떨어져서 다시 urea의 농도를 0.2-1.0%로 세분하여 시험해 본 결과는 표 10과 같았다. 즉 urea의 농도가 0.4% 이하에서는 pH가 산성으로 떨어졌으며, 0.6% 이상에서는 중성-미알카리성을 유지하였다. 그러나 미생물의 생장은 urea의 농도가 증가함에 따라 감소되었고 동시에 lysine의 생산도 감소되었다. 이는 Nakayama와 Kinoshita<sup>(13)</sup>의 *Bacillus subtilis*에 의한 lysine 축적에 관한 연구에서 urea가 질소원으로서 양호하며 pH를 중성으로 유지하는데 좋은 효과를 나타낸다는 보고와 일치하는 바가 있다. 그러나 urea를 질소원으로 사용할 경우에도 첨가하는 농도나 배지의 살균온도 및 살균시간에 따라서 pH는 달라지는 경향이 있으며 살균 후 배지의 현저한 caramel화가 일어나므로 urea는 가

표 9. Effect of nitrogen sources and concentration on lysine production

Nitrogen sources (%)	CaCO <sub>3</sub>	Final pH	Growth*	Lysine**
NH <sub>4</sub> Cl	0.55	+	7.6	0.65 +++
	1.10	+	8.0	0.14 -
	1.65	+	8.0	0.05 -
	2.20	+	8.0	0.01 -
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.65	+	7.8	0.60 +
	1.30	+	8.2	0.12 -
	2.00	+	8.2	0.03 -
	2.70	+	8.4	0.01 -
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.40	+	7.8	0.66 -
	0.80	+	6.0	0.42 -
	1.20	+	7.8	0.25 -
	1.60	+	8.0	0.02 -
Urea	0.30	-	5.4	0.74 +++
	0.60	-	8.6	0.67 +++
	0.90	-	8.4	0.45 +++
	1.20	-	7.8	0.15 -

Basal medium : Glucose 7.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001, CaCO<sub>3</sub> 0.5% pH7.2

\* , \*\* : Same as Table 8

표 10. Effect of urea concentration on lysine production

Urea(%)	Final pH	Growth*	Lysine**
0.2	3.8	0.48	+++
0.3	4.0	0.61	+++
0.4	4.0	0.69	++++
0.6	7.6	0.69	+++
0.8	9.2	0.17	+
1.0	8.4	0.10	-

Basal medium : Same as Table 9.

\* , \*\* : Same as Table 8.

능하면 별도로 살균하여 첨가할 뜻이 요청된다.

#### 다. 유기영양원 및 농도

사용균주인 S-27-12는 유기질소원이나 growth factor를 첨가하지 않는 합성배지에서만도 잘 생육되며 lysine의 생산성이 우수한 균주이기는 하지만 유기질소원으로써 peptone, beef extract, casein-hydrolysate, 및 yeast extract를 각각 0.05, 0.2, 0.5% 첨가하여 lysine 생산을 비교하였다. 결과는 표 11에서 보는바와 같이 peptone, yeast extract를 첨가했을 때 양호하였으나, 그 첨가농도는 영양원의 종류에 따라 각각 달랐으며

표 11의 결과에 첨가시에는 비생물의 성장이나 lysine 생성이 모두 감소되었다.

표 11. Effect of organic nutrients on lysine production

Organic nutrients (%)	Final pH	Growth*	Lysine**
None	8.6	0.22 ++	
Peptone	9.0	0.62 ++	
	8.4	0.70 ++	
	7.0	0.58 +++	
Beef ext.	9.0	0.58 ++	
	8.6	0.60 ++	
	8.8	0.50 +	
Casein-hydrolysate	8.4	0.70 ++	
	8.2	0.67 ++	
	8.8	0.61 ++	
Yeast ext.	8.8	0.52 ++	
	8.4	0.76 +++	
	8.2	0.55 ++	
P+B+C+Y	8.4	0.55 ++	
	8.6	0.48 ++	
	8.8	0.31 +	

Basal medium : Glucose 7.5%, Urea 0.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001, pH 7.2

\* , \*\* : Same as Table 8.

#### 타. pH

Urea를 질소원으로 사용하였을 경우, 살균후 배지의 pH가 변하여 시발 pH의 영향을 알 수 있으므로

표 12. Effect of initial pH on lysine production

Initial pH	Final pH	Growth*	Lysine**
6.0	8.8	0.53 ++	
6.5	8.8	0.55 ++	
7.0	8.0	0.82 ++	
7.5	8.4	0.73 ++	
8.0	8.2	0.77 ++	
6.0***	8.4	0.70 ++	
6.5***	8.6	0.56 ++	
7.0***	8.4	0.73 ++	
7.5***	9.2	0.62 ++	
8.0***	9.2	0.60 ++	

Basal medium : Same as Table 8.

\* , \*\* : "

\*\*\* pH readjusted after sterilization

살균후에 다시 pH를 0.1N HCl과 0.1N NaOH로 보정하여 최초의 배지의 pH가 lysine 생산에 미치는 영향을 검토해본 결과는 표 12와 같다. 표에서 보는 바와 같이 시발 pH에 관계없이 생장과 lysine 생산이 거의 비슷하였다. 이는 flask 배양의 결과로 pH의 보정이 정확하지 못하거나 않았거나 생장되어 pH를 자동적으로 보정할 수 있는 Fermacell을 이용하여 더욱 상세한 검토가 요청된다.

#### 다. 인산염

시발 pH가 선발균주의 생장이나 lysine의 생산에 뚜렷한 영향을 미치지 못하였으므로 다시 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 및 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 첨가농도에 대한 효과를 알기 위해서는 urea를 0.6, 0.9% 추가한 세제에서 표 13과 같은 농도로 첨가하여 lysine 생산을 비교진표

하였다. 표 13에서 보는 바와 같이 배양액의 최종 pH는 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 첨가농도에 관계없이 8.6에서 9.2를 나타냈으며 미생물의 생장과 lysine의 생산에도 뚜렷한 효과를 알 수 없으나 urea의 농도가 높을 경우 첨가하는 인산염의 양이 약간 많은편에서 lysine의 생산이 양호한 결과를 보이고 있으며 배지를 살균한 후에 다시 pH를 보정하였을 경우에 미생물의 생장이나 lysine 생산은 살균후 pH를 보정하지 않은 경우보다 더 양호한 결과를 나타내고 있다.

#### 바. 무기이온

Glucose 7.5%, urea 0.9%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, NaHPO<sub>4</sub> 0.05%를 기초액으로 하여 Mg<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>과 Sano et al.<sup>(10)</sup>가 첨가한 미량원소 용액을 첨가하여 lysine 생산에 미치는 영향을 검토하였다. Mg<sup>++</sup> 이온의 첨가

표 13 Effect of potassium salts and its concentration on lysine production

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> %	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> %	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> %	Urea %	pH		Readjusted after sterilization	Final pH	Growth*	Lysine**
				Before steriliz- ation	After steriliz- ation				
0.05			0.6	5.4	8.6	(7.2)***	9.0(9.0)***	0.30(0.62)***	++(++)***
0.1			"	5.2	8.4	"	"	0.62(0.64)	+++(++)
0.2			"	5.0	8.0	"	"	0.61(0.62)	++(++)
0.05	0.05		"	6.2	8.6	(7.0)	"	0.58(0.60)	++(++)
0.1	0.05		"	6.0	8.4	"	"	0.56(0.55)	++(++)
0.2	0.05		"	5.8	7.8	"	"	0.60(0.63)	++(++)
0.05		0.05	"	6.2	8.4	(6.8)	"	0.63(0.64)	++(++)
0.1		0.05	"	6.1	8.4	"	"	0.58(0.61)	++(++)
0.2		0.05	"	6.0	7.8	"	"	0.65(0.64)	++(++)
0.05			0.9	5.4	8.8	(7.2)	8.8(9.0)	0.28(0.63)	++(++)
0.1			0.9	5.2	8.6	(7.0)	9.0(9.0)	0.60(0.62)	++(++)
0.2			0.8	5.0	8.2	(6.8)	9.0(8.6)	0.59(0.52)	++(++)
0.05	0.05		0.9	6.2	8.8	(7.0)	8.6(8.6)	0.25(0.54)	+(++)
0.1	0.05		0.9	6.0	8.6	"	8.8(8.8)	0.64(0.36)	++(++)
0.2	0.05		0.9	5.8	8.2	(6.8)	9.0(9.0)	0.61(0.70)	++(++)
0.05		0.05	0.9	6.2	8.8	(7.0)	8.6(9.0)	0.50(0.48)	++(++)
0.1		0.05	0.9	6.1	8.8	"	8.6(8.8)	0.32(0.30)	++(++)
0.2		0.05	0.9	6.0	8.4	(6.8)	8.6(8.6)	0.35(0.41)	++(++)

Basal medium : Glucose 7.5%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001%

\* Absorbance at 660m<sub>μ</sub> after X40 dilution (cultivation, 95 hrs.)

\*\* Same as Table 8.

( ) \*\*\* Results from pH readjusted

에 대한 효과는 표 14에서 보는 바와 같이 0.03%에서 생육과 lysine 생산에 똑같이 양호한 결과를 보이고 있으며 0.5% 이상에서는 lysine 생산이 감소되었다.

**표 14. Effect of magnesium sulfate concentration on lysine production**

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Final pH	Growth*	Lysine**
0.01(%)	4.2	0.42	+++
0.02	4.0	0.47	+++
0.03	4.0	0.57	+++
0.04	4.0	0.55	+ +
0.05	4.0	0.54	+
0.1	3.8	0.50	-

Basal medium : Glucose 7.5%, Urea 0.3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001

\*,\*\* Same as Table 8.

표 15에서 보는 바와 같이 Sano 와 Shiio가 사용한 미량원소용액의 첨가와 Zn<sup>++</sup> 이온의 첨가는 효과가 전혀 없었으며 Fe<sup>++</sup> 이온 10mg/L 이상에서는 lysine의 생산이 거의 인정되지 않았다. 그러나 Mn<sup>++</sup> 이온 10mg/L 와 Fe<sup>++</sup> 이온 5mg/L 의 첨가시는 양호한 결과를 보였다.

**표 15. Effect of other mineral ions on lysine production**

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Final pH (mg/L)	Growth*	Lysine**
10	10	10	9.0	0.11	-
			8.6	0.68	++
10	10	10	6.2	0.41	-
			8.6	0.71	+ + +
10	10	10	9.2	0.45	+
			8.6	0.72	+ + +
5	5	5	9.2	0.06	+
			8.8	0.04	-
5	5	5	8.6	0.68	++
			8.6	0.58	+
Trace element solution(ml/L)					
	1		8.8	0.12	-
	2		8.4	0.17	-

Basal medium : Glucose 7.5%, Urea 0.9, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%

\*,\*\* Same as Table 8.

이상의 결과를 종합하면, *Corynebacterium* sp. (S-27-12)는 탄소원으로 glucose 7.5%, 질소원으로 urea 0.6%가 lysine 생산의 최적농도였으며 urea를 질소원으로 사용할 경우 인산염의 농도는 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%가 최적이었다. 또 유기영양원의 첨가는 lysine 생산에 현저한 영향을 미치지 못하였으며, 두 가지 이온은 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03%, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001% 그리고 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0005% 첨가시가 최적이었다. 따라서 이들 결과를 토대로하여 glucose 7.5%, urea 0.6%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03%, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001% 및 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0005%로 된 pH 7.2의 합성배지를 만들고 여기에 *Corynebacterium* sp. (S-27-12)을 30°C에서 4일간 친광배양하므로서 4mg/ml의 lysine 생산을 확인하였다.

야생균주에 의한 lysine 생산에 관해서는 글팡이를 이용한 Dulaney<sup>(15)</sup>의 보고가 있으나, 그 생산량은 최적조건 하에서 배양했을 때 0.4mg/ml에 불과하였으며, Nakayama 와 Hogino<sup>(16)</sup>도 세균, 효모 및 글팡이를 aspartic acid 함유배지에 배양하여 0.3~3.6 mg/ml의 생산을 보고 한바 있다. 이와 같이 친연의 야생균주중에는 lysine을 대사물로 배양액 중에 축적하는 균주는 많으나 그 양은 한정되어 있음이 밝혀졌다.

현재 공업적으로는 *Micrococcus glutamicus*<sup>(17)</sup>나 *Brevibacterium fluvum*<sup>(18)</sup>의 homoserine 소구 변이주에 의해서 14~30 mg/ml의 lysine을 생산하고 있으나 이를 변이주의친주 (parent strain)의 lysine 생산량은 3.5 mg/ml에 지나지 않았음을 미루어 보아 앞으로 이들 후보균주에 대하여는 영양요구성 변이주를 얻음으로써 lysine 생산수율을 향상시킬 가능성이 충분히 있다고 본다.

## 요 약

전국 각지에서 수집한 토양을 비롯한 기타 사료로부터 배양액 중에 lysine을 생산 축적하는 미생물 94주를 분리하여 이를 다시 비교검토함으로써 lysine 생산이 2 mg/ml 이상인 균주 6주를 선정하고 군학적 성질을 조사한 결과 *Micrococcus* 속 1주, *Corynebacterium* 속 3주, *Brevibacterium* 속 2주였다. *Corynebacterium* sp. 1주 (S-27-12)에 대한 합성배지에서의 lysine 축적 조건을 검토한 결과 glucose 7.5%, urea 0.6%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03%, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0005%, pH 7.2가 최적이었으며 이 때의 lysine 생산량은 4mg/ml 정도였다.

## 인용 문헌

1. Wakaki, S.: Amino Acids, 7, 86 (1963)
2. 木全茂幸: 日食品工業, 12, (8) 98 (1969)
3. Casida, L.E.: U.S. Pat. 2,771,396 (1956)
4. Kita, D.A. and Haung, H.T.: U.S. Pat. 2,481,532 (1957)
5. Broquist, H.P., Stiffey, A.V. and Albrecht A.M.: Appl. Microbiol., 9, 1 (1961)
6. Jensen, A.L. and Shu P.: ibid, 9, 12 (1961)
7. Kinoshita, S., Nakayama, K. and Kitada, S.: J. Gen. Appl. Microbiol., 4, 128 (1958)
8. Gerke, C.W. and Shahrokhii: F. Anal. Biochem., 15, 97 (1966)
9. Lankin, W.M. and Gerke, C.W.: Anal. Chem., 37, 382 (1965)
10. 醫科學研究所學友會編: 細菌學實習提要, 第2版, 丸善株式會社 東京 (1967)
11. Pelczar, M. J., Jr.: Manual of Microbiological Methods, McGraw-Hill Book Co., New York (1957)
12. Breed, R.S., E.G.D. Murray and N.R. Smith: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th Ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore (1957)
13. 中山清, 木下祝郎: 日農化誌, 35, 119 (1960)
14. Sano, K. and Shiio, I.: J. Gen. Appl. Microbiol., 13, 349 (1967)
15. Dulaney, E.L.: Can. J. Microbiol., 3, 467 (1957)
16. 中山清, 萩野浩志: 日本特許出願公告, 44-24302 (1969)
17. 木下祝郎, 中山清, 北田宗平: 日本特許, 284,339 (1961)
18. Sano, K. and Shiio, I.: J. Gen. Appl. Microbiol., 16, 373 (1970)