

빙초산을 탄소원으로한 글루탐산 생성에 관한 연구

제 1 보 고축적능균의 분리와 동정

유 영 진 · 김 택 영* · 박 계 인 · 김 기 주 · 한 덕 봉 · 송 석 훈
국립공업표준시험소 식품시험과 · *서강대 생물학과
(1973년 3월 16일 수리)

Studies on Production of L-Glutamic Acid from Acetate by Microorganisms

part 1. Isolation and Identification of powerful Glutamic Acid producing Bacteria

by

Young Jin Yoo, Taik Young Kim,* Ke In Park, Ki Joo Kim,
Deok Bong Han and Seok Hoon Song

National Industrial Standard Research Institute, Food Chemistry Division

*Suhkang University

(Received march 16, 1973)

Abstract

A bacterium strain, K-73-3, which was isolated from waste soil Korea brewing factory, could grow on acetate as the sole carbon source and accumulated a considerable amount of L-glutamic acid in the liquid culture medium (20 g/l).

This strain was named *Corynebacterium sp.* by the standard method of taxonomy procedures given in the Manual Microbiological Methods.

서 론

자연계에서 많은 종류의 L-G.A. 생성균주들이 분리되었고, 이들 균종을 이용한 L-G.A.의 공업적 생산을 시도한 연구도 많으며, 포도당, 암모니아 배지에서 L-G.A.를 발효액 중에 생산, 축적시키는 균종으로 *Micrococcus*,⁽¹⁻⁶⁾ *Brevibacterium*,⁽⁷⁻¹⁴⁾ *Microbacterium*,⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ *Corynebacterium*⁽¹⁹⁾ 등이 보고되고 있다.

1957년에 木下^(2,5), 朝井^(1,4), 陳⁽³⁾ 등이 발효법에 의해 글루탐산을 공업적으로 생산하였을 때는 당질, 질소원, 무기염의 배양액에 미생물을 배양하여 글루탐산을 얻었으며, 이때 사용된 탄소원인 당질 이외에도 탄소원으로는 a-ketoglutaric acid⁽²²⁾, γ -aminobutyric acid⁽²³⁾, 구연⁽²⁴⁾ 에틸렌구리코렌, 프로필렌구리코렌⁽²⁵⁾ 젖산⁽²⁶⁾ 에

탄올⁽²⁷⁻²⁹⁾, 석유계 탄화수소⁽³⁰⁻³³⁾, 초산⁽³⁴⁻⁴²⁾, 초산과 당질의 混用^(43,44) 등을 사용하는 여러가지 방법이 이용되었다.

그후 석유계 탄화수소, 초산을 탄소원으로한 발효법에 의한 글루탐산 제조에 관한 연구가 활발히 진행되어 미국, 일본⁽⁴⁷⁾ 등에서는 발효균의 검색, 발효조건의 개선, 발효공학적 검토, 원료의 대체 등으로 이 분야의 연구에 새로운 계기가 제시되고 있다.

특히 석유화학의 발전에 따라 석유계 탄화수소와 초산의 합성등으로 원료의 대량확보와, L-G.A. 발효의 탄소원으로서의 공급이 가능하므로 原日⁽³⁶⁾, 宮月⁽³⁴⁾, 樵⁽³⁷⁾, 木村⁽³⁵⁾, 美國의 Commerical Solvent, Sun Oil Co., 등의 연구로 공업적 L-G.A.의 생산이 가능하였고, 또한 각 연구자들은 각자 특유한 방법들을 개발하고 있다.

필자도 탄소원이 당질원료의 대체로 석유화학 제 2 차

생산물인 초산배지로 발효법에 의한 L-G.A를 생산키 위해 전국에 산재하고 있는 양조폐수장, 폐수구의 토양에서 균종을 분리하고 동정한 일부를 보고한다.

실험 방법

1. 균주의 분리

前報⁽⁴⁶⁾ 및 鄭의 方法⁽⁴¹⁾에 準하여 다음과 같이 실시 하였다.

국내 각 지방에 산재하고 있는 양조장 하수구, 폐수장에서 수집한 시료를 Table 1 과 같은 분리용 배지로 상법에 따라 bacteria 만을 평판 희석배양법에 의하여 분리 선별하였다.

Table 1. Composition of the basal solid media

Ammonium-acetate	15 g (as acetic acid)
Sodium-acetate	25 g (as acetic acid)
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g
Fe ⁺⁺	2 ppm
Mn ⁺⁺	2 ppm
Thiamine·HCl	0.1μg
Agar	18 g
Distilled water	1000 ml

pH 7.6~8.6

상기 평판배양법에의해 분리한 총 균주는 Table 2 의 기본액체배지를 17×180 mm의 시험관에 5ml 씩 추가하여 30°C에서 72 hrs 진탕배양하였고, 이 배양액을 朴⁽⁴⁶⁾, 陳⁽⁸⁾등과 같은 방법으로 원심분리 또는 제단백제로 균체를 제거하여 이 일정량을 취하여 TLC 와 PC 법⁽⁴⁸⁾에 따라 L-G.A. 생성 유무를 조사한 결과 시료 178 점으로부터 2,000주의 균주를 분리하였다. 그중 G.A. 축적량 5g/l 이상인 균주 300여종을 분리하여, 다시 2차 screening한 결과 G.A. 10g/l 생성 균주 9주를 분리하고, 이 중에서

Table 2. Composition of basal culture media

Sodium-acetate	20 g
Ammonium-acetate	20 g
Urea	0.5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g
Thiamine·HCl	100 μg
Fe ⁺⁺	2 ppm
Mn ⁺⁺	2 ppm
Biotin	0.3 μg
Distilled water.	1000 ml

pH 8.2

G.A. 20g/L 이상 생성하는 균주 (K-73-3)을 얻어 이것만을 동정하였다.

2. 배지와 배양조건

제 2 차 screening한 결과 G.A. 10g/l 생성균주 9종에 대하여는 배지와 배양조건을 다음과 같이 실시 하였다.

Table 1 의 액체배지 50 ml를 500 ml 진탕 flask 에 분주하고 12 Lbs, 20 min 간 고압 증기 살균하여 접종하고 30°C, 72 hrs 간 진탕 (진폭 60 mm, 120 rpm)하여 seed 로 하였으며, Table 2 의 배지 50 ml를 500 ml 진탕 flask 에 추가한 후 여기에 前記 seed 를 5%정도로 접종하고, 上記와 같이 진탕배양하였고, 배양액의 pH는 7.8~8.2 로 조절하였다.

3. L-Glutamic acid 의 정량

前報⁽⁴⁶⁾에 따라 L-glutamic acid는 배양액의 일정량을 취하여 균체 단백질을 제거한 다음 TLC와 PC로 정량 하였다.^(49~52)

4. 균의 동정

균의 형태적 생리적 및 배양적 특성은 Bergey씨 방법⁽⁵⁴⁾에 준하여 동정 하였다.

결과 및 고찰

1. 균의 동정

선발된 균종의 형태적 생리적 및 배양적 특성은 Table 3 과 같다.

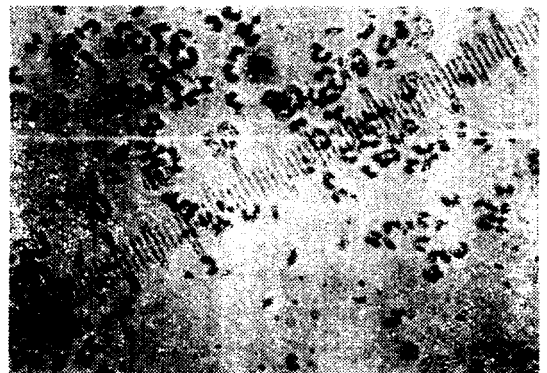


Fig. 1. Photomicrograph of Corynebacterium strain K-73-3 grown in nutrient broth at 30°C for 24 hours

Table 3. Charactersics of isolated strain K7-3-3

1. Microscopic observation
 - (1) Vegetative cells ; short straight rods with rounded ends.
 - (2) Motility ; non-motile
 - (3) Flagells ; absent

- (4) Gram stain ; positive
- (5) Endospore ; no spore

II. Cultural characteristics

- (1) Nutrient agar slant ; moderate growth, filiform and milky white.
- (2) Nutrient agar colonies; circular, smooth, umbonate and milky white.
- (3) Nutrient agar stab ; growth occur only on the surface.
- (4) Gelatin stab ; growth occur only on the surface and gelatin not liquefies.
- (5) Nutrient broth ; moderate turbid with viscid sediment, membranous surface are seen along tube.

III. Physiological characteristics

- (1) Nitrate ; weakly reduced to nitrate
- (2) Indole ; not formed
- (3) Hydrogen sulfide ; produced
- (4) Methyl red reaction ; negative
- (5) Starch ; not liquefied
- (6) Catalase ; positive
- (7) Urease ; positive
- (8) Gelatin ; not liquefied
- (9) Voges-Proskauer reaction ; negative
- (10) Skatol reaction ; negative
- (11) Ammonia ; not produced from peptone
- (12) Fermentation of carbohydrates ; as shown in Table 4 acid is produced from glucose, maltose, salicin, mannose, dextrin, inulin. In all cases gas formation is not recognized.

Table 4. Acid production from carbohydrates by strain

Carbohydrates	acid	gas	Carbohydrates	acid	gas
Xylose	-	-	Cellobiose	+	-
Fructose	+	-	Salicin	(+)	-
Lactose	-	-	Rhamnose	-	-
Maltose	(+)	-	Mannose	+	-
Glucose	+	-	Dextrin	(+)	-
Saccharose	-	-	Raffinose	+	-
Mannit	-	-	Inulin	(+)	-
			Arabinose	-	-

(+) Positive at 48 hrs and negative at 7 days.

본 균종은 탄수화물인 glucose, fructose, mannose, dextrin, maltose, cellobiose, salicin, inulin 으로부터 산을 생성하나, lactose, xylose, rhamnose, arabinose, mannit 에서는 산을 생성하지 못하고 탄수화물의 대사에서 gas

를 전혀 발생하지 않는다.

특히, 본 균종은 高山⁽⁵¹⁾, 奥村⁽¹²⁾, Abe,⁽⁵²⁾ 木下⁽⁵⁾, 土井⁽¹⁵⁾씨의 L-G.A생성 균주의 분류학적 연구 논문과 山田⁽⁵³⁾ 등이 언급한 L-G.A. 생성균의 공통 성질과 특성이 유사하나, 본 분리 균종은 salicin 으로부터 산을 생성하며 sucrose 으로부터는 산을 생성하지 않으며, 高山⁽⁵²⁾ 이 분류학적으로 연구 검토한 균종인 *Corynebacterium glutamicus* K. 9594의 성질과 유사한 것은 탄수화물의 대사에 산생성과 gas 를 생성하지 않는 점이며, 또한 본 균종은 dextrin, maltose, salicin, inulin 의 경우 48시간에서는 산을 생성한후 7일 에서는 다시 알칼리성으로 변화시키는 성질을 갖고있다.

그리고, urease, nitrate 반응에서 positive 이며, H₂S 생성 능력이 있는 점과 현미경적 관찰을 보아 *Corynebacterium glutamicus* 속의 유사한 점으로 미루어 보면, 본 균종은 Bergy's Manual 에 기재된 균종에서는 찾아 볼 수 없다.

故로 생리적 특성과 당발효 능력을 검토한 결과 *Corynebacterium glutamicus* nov sp. 로 간주된다.

요 약

1. 양조폐수장, 폐수구에서 분리한 K-73-3은 초산염을 자화하여 L-G,A를 20 g/l 생산 하였다.
2. 분리된 균주는 형태학적, 생리학적, 분류학적, 배양학적인 특성으로 보아 *Corynebacterium glutamicus* nov sp.로 간주된다.

참 고 문 헌

- 1) Asai, T. Aida K., Oishi K.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Jap.*, **21**, 134 (1957).
- 2) 木下祝郎等 : *Pro. Intn. Symposium on Enzyme Chemistry*, Tokyo Kyoto, p. 464 (1957).
- 3) 陳稜宗, 陳倫宗, 社聰明 : *醱酵工學雜誌(日本)* **37**, 310 (1959). *醱酵工學雜誌(日本)* **35**, 371 (1957).
- 4) 朝井勇宣, 相田浩, 大石邦夫 : *醱酵協會誌(日本)*, **15**, 371(1957).
- 5) 木下祝郎, 板垣史郎, 中山清 : *Amino acid*, **2**, 42 (1960).
- 6) Kinoshita S.: *Recent Progress in Microbiology*, **8**, 334 (1962).
- 7) Su, Y. C., Yamada K.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Jap.*, **24**, 69 (1960).
- 8) 太田修二, 田中政民 : *Amino acid*, **1**, 50 (1959).
- 9) 太田修二, 田中政民 : *醱酵工學雜誌(日本)*, **37**, 261 (1959).

- 10) 小林克乙, 布子信夫: 醱酵工學雜誌(日本) **37**, 440 (1959).
- 11) 小川知可良, 大出通資: *Amino acid*, **1**, 45 (1959).
- 12) 奥村信二, 都河龍一郎, 角田俊直: 日本農藝化學會誌, **36**, 141 (1962).
- 13) 大石邦夫, 相田浩: *Amino acid and Nucleic acid* **8**, 35 (1963).
- 14) 山田浩一: *Amino acid*, **2**, 36 (1960).
- 15) 土井新次: *Amino acid*, **2**, 26 (1960).
- 16) 宮月恭, 大澤岳義: 特許公報 昭 39-2988.
- 17) 増尾榮太郎, 脇板光治: 特許公報 昭 37-6342.
- 18) 奥村信二, 都河龍一郎: 日本農藝化學會誌 關東支部 第192回 講演會, (昭和 34年 5月).
- 19) Shio, I., Mitsugi, K., Otsuka, S., Tsunoda, T.: U. S. Pat., **3**, 117, 915 (1965).
- 20) Lee, W.H., Good, R. C.: U. S. Pat., **3**, 087, 863 (1963).
- 21) Otsuka S., Yazak H., Sakaguch K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**, 35 (1957).
- 22) Tsunoda T., Aoki R., Kinoshita K., Konoda Y.: 日本農藝化學會誌, **33**, 221 (1959).
- 23) Kinoshita S., udaka S., Shimono M.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**, 193 (1957).
- 24) 宮地昇, 松中俊規, 北井淳夫: 特許公報 昭37-9298.
- 25) 那須, 脩, 山林克之, 布子信夫: 特許公報 昭38-20947.
- 26) Oki T., Sayama Y., Nishimura Y., zaki A.O.: *Agr Biol. Chem.*, **32**, 119 (1968).
- 27) 三中俊一, 西村幸男, 北井淳夫: *Amino acid and Nucleic acid*, **19**, 73 (1969), **19**, 82 (1969).
- 28) 奥村信二: 日本食品工業學會誌, **12**, 12 (1968).
- 29) 井口喬, 早川司郎, 武田勳: 日本農藝化學會誌 **40**, 26 (1966).
- 30) Yamada K.: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 390 (1963).
- 31) Shio I., Uchiar: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **9**, 23 (1963).
- 32) Kobayashi, K., Ikeda, S.: *Amino acid and Nucleic acid*, 132 (1971).
- 33) Tsunoda T., Shio I., Mitsugi K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7**, 18 (1961).
- 34) Kimura K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10**, 23(1964).
- 35) Harada J., Kozi, Seto, Yoshikatsu, Murooka: *J. Ferment Tech.*, **46**, 169 (1969).
- 36) Isamu, Shio, Mitsugr, Tsunoda T.: *J. Biochemistry*, **46**, 1665 (1969).
- 37) Tsama T., Shio I.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7**, 18 (1961).
- 38) 岡部節三, 澁川滿, 大内俊二, 日本農藝化學會誌 **42**, 563 (1968).
- 39) 岡部節三, 澁川滿, 大内俊二, 日本農藝化學會誌 **43**, 758 (1969).
- 40) 澁川滿: Symposium, 昭 VI, p35 (1970).
- 41) 鄭東孝: 한국식품과학회지, **4** (2), 112 (1972).
- 42) 神崎俊彦, 北野一昭, 隅野靖弘, 岡崎尙良: 日本農藝化學學會誌 **46**, 95 (1972).
- 43) Commercial Solvent Co., U. S. Pat., **3**, 313, 709.
- 44) Sun Oil Co., U. S. Pat., **3**, 201, 323.
- 45) 協和醱酵工業 K. K., 英國特許 **1**, 102, 906.
- 46) 朴啓仁, 金奇珠, 俞永鎮: 國立公業研究所報告 **13**, 167 (1963).
- 47) Wallenfels K.: *Naturewissen*, **21**, 491 (1950).
- 48) ErichHeftmann: *Chromatography*, 2nd Ed., (1967): Reinhold Publishing Co, New York., p. 373.
- 49) 渡邊泰, 渡邊敏子: 日本農藝化學會誌 **34**, 620 (1960).
- 50) Society of American Bacteriologist's Manual of Microbiological Methods, Mc Graw-Hill Co. Inc.(1957).
- 51) 高山健一郎, 阿部重雄, 木下祝郎: 日本農藝化學會誌 **39**, 328(1965).
- 52) Abe S., Jakayama K., Kinoshita, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**, 279 (1967).
- 53) アミノ酸醱酵, 上總論: アミノ酸, 核酸集談會編(共立出版株式會社) 東京部, 1972.
- 54) Breed, R. S., Murray, E. S. D., Smith, N. R.: *Bergey's Manual of Deteminative Bacteriology*, The Williams and Wilkins Co., (1957).