

# 초산을 이용한 글루타민산의 발효생산에 관한 연구

## 제 1 보 글루타민산 생산균주의 분리 및 동정

하 덕 모 · 노 완 섭

(동국대학교 공과대학 식품공학과)

### Studies on the Bacterial Production of L-Glutamate from Acetate

#### Part I. Screening and Identification of L-Glutamate Producing Bacteria.

by

Duk Mo Hah and Wan Sup Noh

Department of Food Technology, College of Engineering, Dongguk University

(Received May 10, 1974)

#### Abstract

In the course of the studies on L-glutamic acid production from acetic acid, 383 strains capable of assimilating acetate as sole source of carbon were isolated from 279 kinds of soil sample. Out of them, 5 strains which produced relatively larger amount of L-glutamate from acetate were selected and named *Brevibacterium flavum* nov. sp. D1005B, *Corynebacterium glutamicum* nov. sp. D1025A, *Brevib. flavum* nov. sp. D2209B, *Coryneb. acetoacidophilum* nov. sp. D2212B and *Coryneb. acetoacidophilum* nov. sp. D2349A respectively.

#### 서 론

글루타민산(L-GA)은 오래동안 대두박 소맥 gluten 등 각종 식물단백질의 분해법에 의해서 생산되어 왔으나 원료획득 및 부산물의 활용문제에 있어서 한계점에 도달하여 2차대전후 당을 원료로 한 발효생산방법<sup>(1,2,3)</sup>이 개발되어 현재에 있어서는 대부분의 L-GA는 이 발효법에 의해서 생산되고 있다. L-GA 생산기술의 발전은 대량생산을 위한 새로운 원료의 이용기술의 발전이었으며 생체내대사 경로상에 위치하는  $\alpha$ -ketoglutaric acid<sup>(4)</sup>, fumaric acid<sup>(5)</sup>,  $\gamma$ -aminobutylic acid<sup>(6)</sup>, citric acid<sup>(7)</sup> 및 acetic acid<sup>(8,9)</sup> 등을 주원료로 하는 L-GA 발효생산의 가능성이 모색되어 왔고 이들 중 acetic acid를 이용한 L-GA 발효생산은 공업화되어 일본에서는 생산이 시작되고 있다.

본 연구는 acetic acid를 기질로 하여 발효법에 의

해서 L-GA를 생산하기 위하여 우리나라 각지대도 양으로 부터 초산자화성균주를 분리하고 이들 분리균주 중에서 우수한 글루타민산 생산균주를 선 발하였으므로 이들 글루타민산 생산균주에 대해서 보고하고자 한다.

#### 실험재료 및 방법

##### 1. 초산자화성균주의 분리

###### a. 시 료

전국 279개소의 도로 하천 하수도 논 밭 산 등 각지대의 토양을 수집하여 초산자화성균주의 분리용 시료로 하였다.

###### b. 방 법

분리용시료 약 1g을 2배량의 멸균수에 혼합시킨 다음 Table 1의 분리용 배지를 사용하여 평판 배양법을 2회 반복하여 순수분리 하였다.

##### 2. 글루타민산 생산균주의 screening

**Table 1.** Medium for Isolation of Acetic Acid Assimilating Bacteria.

Sodium acetate	100 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 mg
NaCl	10 mg
Yeast ext.	2 g
Agar	20 g
Tap water	1,000 ml
pH	7.0~7.2

a. 공시균주

토양시료로부터 순수분리한 전 초산자화성균주를 공시균주로 하였다.

b. 배지 및 배양방법

Table 2와 같은 조성의 배지를 500ml 용 후라스크에 30ml 씩 분주하여 15lb에서 10분간 살균한 후 pH 7.2가 되도록 조절한 다음 본발효배지로 사용하였으며 같은 조성의 배지를 시험관에 1.5ml 씩 분주 살균한 것을 전배양배지로 사용하였다.

**Table 2.** Medium for Screening of L-Glutamic Acid Forming Bacteria.

Sodium acetate	20 g
Ammonium acetate	20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 mg
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10 mg
NaCl	10 mg
Thiamine-HCl	100 ug
Biotin	0.3 ug
Distilled water	1,000 ml
pH	7.0~7.2

각 균주의 1백급니를 전배양배지에 이식하여 30°C에서 24시간 진탕배양한 다음 본발효배지에 이식하고 48시간 후의 L-GA생성량을 비교하였다.

사용한 진탕배양기는 회전식이며 회전속도 200 rpm, 회전반경 1.6cm이다.

배양중에 있어서 배양액의 pH를 12~16시간 간격으로 측정하고 50% acetic acid를 사용하여 pH를 7.0~7.2로 조절하였다.

c. L-GA의 분석

각균주의 배양액을 원심분리에 의하여 균체를 분리하고 그 상정액을 TLC법(전개용매 : butanol ; acetic acid : water=60 : 15 : 25v/v, 발색시약 ; 0.3% ninhydrin acetone용액)으로 L-GA를 분석하였으며 동시에 L-GA탈탄산효소를 이용한 점압법<sup>(10)</sup>에 의한 L-GA분석법도 병행하였다. 점압법에 사용한 탈탄산효소는 *E. coli* ATCC 11246의 acetone 전조분말(Worthington Biochemical Corporation제)이다.

3. L-GA 생산균주의 동정

최종적으로 우수한 L-GA 생산균주로 선발된 균주는 형태적, 생리적 및 배양적인 제성질을 미생물학적인 일반방법<sup>(11,12,13)</sup>에 의하여 시험 검토하고 Bergy's Manual of Determinative Bacteriology<sup>(14)</sup>에 준하여 분류 동정하였다.

실험결과 및 고찰

1. 초산자화성균주의 분리

279개소의 각지대 토양시료로부터 초산자화성세균 383균주를 순수분리하였으며 분리원의 종류 및 균주수는 Table 3과 같다.

대부분의 토양시료로부터 초산자화성세균을 분리할 수 있었으며 그 출현수는 시료의 종류에 따라서 뚜렷한 차이를 볼수없었으므로 초산자화성세

**Table 3.** Occurrence of Acetate Assimilating Bacteria.

Kind of samples for isolation	Number of samples	Number of isolated strains
Station	15	30
Ground	26	36
Road	49	65
Mountain	16	28
Market	14	25
Garden	36	46
Oil stand	18	23
Stream	19	27
Farm	15	18
Sewage	53	67
Rice field	13	18
Total	279	383

균은 광범위하게 널리 분포되어 있는 것으로 추측된다. 또 시료중의 초산자화성세균의 종류는 취락의 외관으로 보아 대개의 경우 한 시료로부터 1~2균주가 분리되었으며 가장 많은 경우 3균주가 분

리되었다.

## 2. L-GA 생산균주의 screening

초산자화성균 383균주의 대부분이 L-GA를 생성하고 전 공시균주의 약 40%가 1당 15g 이상의 L-GA를 생성하였으며 383 전 공시균주의 L-GA생성능을 요약하면 Table 4와 같다.

**Table 4.** Abilities of Isolated Acetate Assimilating Bacteria for L-Glutamate Accumulation.

Number of strains				
L-glutamate accumed. (g/L)				
0~1	1~4	4~10	10~25	Total
182	139	48	41	383

이들중 배지 1당 15g 이상의 L-GA를 생성하여 가장 L-GA생성능이 우수하다고 인정되는 5균주를 선정하였고 이 5균주의 분리원은 Table 5와 같다.

**Table 5.** List of the Selected Bacteria for L-Glutamate Production.

Strain No.	Source of isolation	Place
1005 B	Rice field	Moonkyong
1025 A	Road	Seoul
2209 B	Sewage	Seoul
2212 B	Sewage	Anyang
2349 A	Market	Seoul

우수균주로 인정되는 2209 B균주는 48시간 배양시에 배지 1당 약 20g의 L-GA를 생성하며 50~60시간 배양시 약 24g의 L-GA를 생성하여 이미 알려진 균주에 비하여 발효시간이 빠른 우수한 글루타민산 생산균주로 인정된다.

## 3. L-GA 생산균주의 동정

우수한 글루타민산 생산균주로 선정된 5균주의 형태적, 생리적 및 배양적 성질을 관찰한 결과는 Table 6, 7 및 8과 같다.

이들을 Bergy's Manual of Determinative Bacte-

**Table 6.** Cultural Characteristics of the Selected Microorganisms.

Strain No	1005 B	1025 A	2209 B	2212 B	2349 A
Morphological form characteristics	rods	rods	rods	rods	rods
size( $\mu$ )	1.2~1.8× 2.0~2.8	0.5~0.8× 1.8~2.8	1.2~1.8× 2.5~3.0	0.8~1.0× 2.8~3.0	0.8~1.0× 3.0~3.5
motility	non	non	non	non	non
flagella	non	non	non	non	non
gram stain	positive	positive	positive	positive	positive
Agar colony form	circular	circular	circular	circular	circular
surface	smooth	smooth	smooth	rough, curled	smooth
edge	entire	entire	entire	undulate	entire
elevation	convex	convex	convex	raised	convex
color	light yellow	light yellow	deep yellow	light yellow	yellowish red
lustre	glistening	glistening	glistening	dull	glistening
Agar slant growth	abundant	abundant	abundant	moderate	abundant
form	echinulate	echinulate	echinulate	beaded	effuse
medium	not change	not change	not change	not change	not change
Nutrient broth surface growth	not growth	ring	membranods	no growth	no growth
clouding	slightly turbid	slightly turbid	slightly turbid	slightly turbid	slightly turbid
sediment	scanty	scanty	moderate	scanty	scanty
Gelatin stab growth	filiform	filiform	filiform	beaded	filiform
liquefaction	createriform	createriform	createriform	napiform	createriform
Potato media growth	heavy growth	heavy growth	heavy growth	moderate	heavy growth
form	spreading	spreading	spreading	filiform	spreading
color	cream yellow	cream yellow	cream yellow	grayish yellow	yellowish red
medium	not change	dark	dark	not change	not change

**Table 7.** Physiological Properties of the Selected Microorganisms.

Strain No	1005 B	1025 A	2209 B	2212 B	2349 A
Action on litmus milk	purple	purple peptonized	purple peptonized reddish	purple	purple reddish
KNO <sub>3</sub>	+	+	+	-	-
Production of H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Ammonia	+	+	+	+	+
Hydrolysis of Starch	-	-	-	-	-
Test of					
Urease	+	+	+	+	+
V. P.	-	-	-	+	-
M. R.	-	-	-	+	-
Relation of pH	4.5~9.0	4.5~9.0	5.0~9.0	4.5~9.5	4.5~9.0
Free oxygen	aerobic	aerobic	aerobic	aerobic	aerobic
NaCl concentration (7%)	+	+	+	+	+
(12%)	-	-	+	-	-
Optimum temperature	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C
Sources	soil	soil	soil	soil	soil

**Table 8.** Gas and Acid Production from Various Carbohydrates by the Selected Microorganisms.

Carbohydrates	Strain No	1005 B	1025 A	2209 B	2212 B	2349 A
Arabinose		-	-	+	+	+
Dextrin		+	-	+	-	±
Fructose		+	+	+	+	+
Galactose		-	-	-	-	-
Glucose		+	+	+	+	+
Glycerol		-	-	-	-	-
Inulin		-	-	-	-	-
Lactose		-	-	-	-	-
Maltose		+	-	±	±	±
Mannitol		+	+	-	-	-
Mannose		-	-	+	-	+
Salicin		+	+	+	-	+
Sorbitose		-	-	-	±	-
Sorbitol		-	-	-	±	-
Starch		-	-	-	-	-
Trehalose		-	-	-	+	+
Xylose		-	-	+	-	-

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

±: Acid production.

-: No acid production.

riology에 준하여 분류하면 1005 B 및 2209 B 균주는 *Brevibacterium flavum*에 2212 B 및 2349 A 균주는 *Corynebacterium acetoacidophilum*에 1025 A

균주는 *Coryneb. glutamicum*에 각각 유사하다. 그러나 椎尾 등의 특허<sup>(15)</sup> 및 高山 등의 보고<sup>(16,17)</sup>에 기재된 이들 균주의 성질과 비교해 보면 *Brevib.*

*flavum* ATCC 13826과 유사한 1005 B 균주는 mannitol로부터 산을 생성하며 2209 B 균주도 arabinose 및 xylose로부터 산을 생성하는 점이 다르므로 이들 균주는 *Brevib. flavum*의 유사한 새로운 균주로 인정되어 *Brevib. flavum* nov. sp. D 1005B 및 *Brevib. flavum* nov. sp. D2209B로 명명하였고 *Coryneb. acetoacidophilum* ATCC 13870에 유사한 2212 B 균주는 maltose로부터 산을 생성치 않으며 arabinose로부터 산을 생성하는 점이 다르고 2349 A 균주도 2212 B 균주와 같이

maltose 및 arabinose의 산생성이 다를 뿐 아니라 salicin으로부터 산을 생성하므로 이들 균주는 *Coryneb. acetoacidophilum* nov. sp. D2212B 및 *Coryneb. acetoacidophilum* nov. sp. D2349A로 명명하였으며 *Coryneb. glutamicum* M588과 유사한 1025 A 균주는 maltose로부터 산을 생성치 않으므로 *Coryneb. glutamicum* nov. sp. D1025A로 명명하였다.

이상과 같이 선발된 글루타민산 생산균주가 모두 *Brevibacterium* 속과 *Corynebacterium* 속에 속

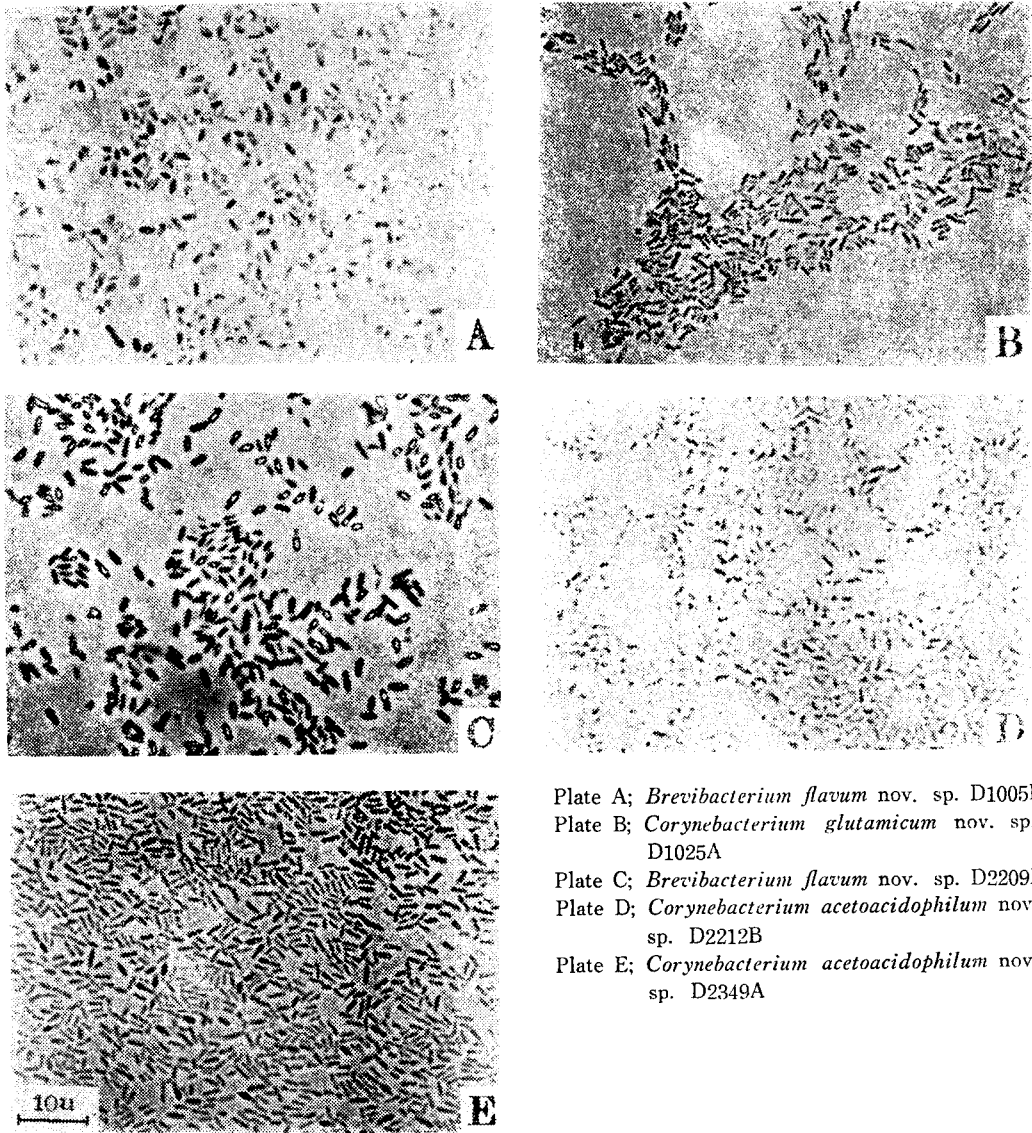


Fig. 1. Photomicrographs of Selected Strains for L-Glutamate Production from Acetate, cultured on Nutrient Agar for 24 hours at 30°C.

하며 현재까지 acetic acid로 부터의 L-GA 생산균 주로서 검토되었거나 유망시 되어온 균주도 Table 9에 종합 표시한 바와 같이 대부분이 이속에 속하

**Table 9.** Bacteria which produce L-Glutamate from Acetate.

<i>Corynebacterium acetophilum</i>	18
<i>Corynebacterium acetoacidophilum</i>	19, 20, 21, 22
<i>Corynebacterium sp.</i>	15, 23
<i>Corynebacterium acetoglutamicum</i>	19, 22, 24
<i>Corynebacterium hydrocarbolustum</i>	25, 26
<i>Corynebacterium callunae</i>	22
<i>Corynebacterium lilium</i>	22, 27
<i>Corynebacterium herculis</i>	22, 27
<i>Brevibacterium flavum</i>	15, 19, 20, 21, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33
<i>Brevibacterium roseum</i>	15, 19, 21, 22, 23, 31, 32
<i>Brevibacterium divaricatum</i>	19, 34
<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	19, 20, 21, 23
<i>Brevibacterium saccharolyticum</i>	21, 27, 31, 32
<i>Brevibacterium immariophilum</i>	21, 31, 32
<i>Microbacterium ammoniaphilum</i>	33, 34, 35
<i>Arthrobacter citreus</i>	27, 36

는 것으로 보아 초산으로 부터 L-GA 생산균주는 거의 *Brevibacterium* 속과 *Corynebacterium* 속에 속하는 것으로 추측된다

### 요 약

전국 각지대의 279개소의 토양시료로 부터 초산 자화성세균 383균주를 분리하였으며 이들 초산자화성세균중 L-GA생성 능이 우수한 5 균주를 선정하고 균학적성질을 조사하여 *Brevibacterium flavum* nov. sp. D1005B, *Corynebacterium glutamicum* nov. sp. D1025A, *Brevibacterium flavum* nov. sp. D2209B, *Corynebacterium acetoacidophilum* nov. sp. D2212B 및 *Corynebacterium acetoacidophilum* nov. sp. D2349A로 동정 명명하였다.

### 참 고 문 헌

- 1) Asai, T., K. Aida and K. Otsuka: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **21**, 134(1957).
- 2) Kinoshita, S., S. Uda and M. Shimono: J. Gen. Appl. Microbiol. Tokyo, **3**, 193(1957).
- 3) Omura, S., R. Tsugawa, T. Tsunoda, T.

Matsui, K. Kono and N. Miyaji: The monthly meeting of Agricultural Chemical Society of Japan, held in May 1959.

- 4) Otsuka, S., H. Yazaki and K. Sakajuchi: J. Gen. Appl. Microbiol. Tokyo, **3**, 35(1957).
- 5) 青木良平, 近藤安弘, 角田後直, 小川鐵雄: 日農化誌, **33**, 843(1959).
- 6) 角田後直, 青木良平, 木下一幹, 近藤安弘: 日農化誌, **33**, 221(1959).
- 7) Smyth, C. V. and H. T. Hang: U. S. Patent 2, 749, 279(1956).
- 8) Shiio, I., S. Otsuka and T. Tsunoda: The 11th Symposium on Enzyme Chemistry. Japan, held in July 1959.
- 9) Shiio, I., K. Mitsugi and T. Tsunoda: J. Biochem., **46**, 1665(1959).
- 10) Umbreit, W. W., R. H. Burris and J. F. Stauffer: "Manometric Techniques", 207(1957).
- 11) Society of American Bacteriologists: "Manual of Microbiological Methods" McGraw-Hill Book Co., Inc. (1957).
- 12) Lord, T. H.: "Determinative Bacteriology" Burgess Publishing Co., (1959).
- 13) Jacobs, M. B. and M. J. Gerstein: "Hand Book of Microbiology" D. Van Nostrand Co., (1960).
- 14) Breed, R. S., E. G. Mearns and N. R. Smith: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 7th edition, The Williams & Wilkins Co., (1957).
- 15) 椎尾勇, 光本浩司, 大塚愼一郎, 角田後直: 日本特許, 昭 39-17348 (1964).
- 16) 高山健一郎, 阿部重雄, 木下祝郎: 日農化誌, **39**, 328, 335, 342(1965).
- 17) Abe, S., K. Takayama and S. Kinoshita: J. Gen. Appl. **13**, 279(1967).
- 18) Harada, T., K. Seto and Y. Murooka: J. Fermet. Technol., Japan, **46**, 169(1968).
- 19) 都河龍一郎, 奥村信二, 黒沼秀雄: 日本特許, 昭 45-945 (1970).
- 20) 村尾千秋, 菱沼一夫, 山下直, 都河龍一郎, 奥村信二: 日本特許, 昭 45-26710 (1970).
- 21) Tsunoda, T., I. Shiio and K. Mitsugi: J. Gen. Appl. Microbiol., **7**, 18(1961).
- 22) Ajinomoto Co. & Sanraku Ocean Co.: French Patent, No. 1,546,260(1967).

- 23) Shiiro, I., K. Mitsugi and T. Tsunoda: J. Biochem., **46**, 1665(1959).
- 24) Kyowa Hakko Kogyo Co.: French Patent, No. 1,424,809(1967).
- 25) Shiiro, I., S. Otsuka, R. Ishii and N. Natsuya: J. Gen. Appl. Microbiol., **9**, 23(1963).
- 26) Yamada, K., J. Takahashi and K. Kobayashi: Agr. Biol. Chem., **27**, 773(1963).
- 27) Ajinomoto Co. and Sanraku Ocean Co.: French Patent, No. 1,555,238(1968).
- 28) 椎尾勇, 大塚愼一郎, 角田後直: 酵素化学シンポジウム, **14**, 351(1950).
- 29) Shiiro, I., S. Otsuka and T. Tsunoda: J. Biochem., **46**, 1303(1959).
- 30) Shiiro, I., S. Otsuka and T. Tsunoda; J. Biochem., **46**, 1597(1959).
- 31) Shiiro, I.: J. Biochem., **47**, 273(1960).
- 32) Shiiro, I.: *ibid.*, **49**, 141(1961).
- 33) 宮井恭一, 山本外男, 大澤岳義: 日本特許, 昭41-7435 (1960).
- 34) 岡部節三, 波川満, 大澤岳義: 日本農化誌, **42**, 563, **43**, 758(1969).
- 35) Tanaka, K. and K. Kimura: British Patent, 1,095,274(1968).
- 36) Phillips, U. A.: U. S. Patent, 3, 227, 725 (1963).