

세포융합과 고정화 시스템을 이용한 L-Lysine의 생산성 향상

류병호·김혜성·노명훈·박범규*·정종순**·배기철***

경성대학교 식품공학과, *경성대학교 종합식품연구소, **부산시 보건환경연구소

Improvement of L-Lysine Productivity by Using Cell Fusion and Immobilized System

Beung-Ho Ryu, Hye-Sung Kim, Myung Hoon Roh, and Bob-Gyu Park,
Jong-Soon Chung and Ki-Chul Bai

Department of Food Science and Technology, Kyungsoong University

*Institute of Food Science and Microbiology, Kyungsoong University

**The Pusan Institute of Health and Environment

Abstract

This studies were designed to improve the productivity of L-lysine by protoplast fusion and immobilized system of fusants using strains of *Brevibacterium flavum* ATCC 21528, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21086 and *Corynebacterium glutamicum* 820. Mutants were isolated with concentration method of 300 μ g/ml penicillin-G after treatment of 250 μ g/ml N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *B. flavum* 37-2(Hos⁻, Kan^r, AEC^r), *B. lactofermentum* 6-2(Ile⁻, Val⁻, Str^r, AEC^r) and *C. glutamicum* 57-5(Met⁻, Thr⁻, Rif^r, AEC^r) were isolated from mutants. Protoplasts were induced by being incubated with 500 μ g/ml lysozyme of lysis solution for 6 hr and the ratio of protoplast formation and regeneration were ranging from 97-99% and 33-37%, respectively. Fusion frequencies of fusants of BBFL 21, BCFG 37 and BCLG 59 were shown in the range from 1.25×10^{-6} to 5.83×10^{-7} under the optimum conditions. The fusant BBFL 21 showed the highest productivity of 411.1 ng/ml·hr L-lysine in the lysine productivity broth at 30°C for 72 hr. In the immobilization systems, fusant BBFL 21 was employed in various polymer matrices such as sodium alginate, polyacrylamide, agar and α -carrageenan. The immobilization of sodium alginate showed the highest productivity of 413 ng/ml·hr L-lysine in the batch system. Continuous fermentation of immobilization system by using tube fermentor was produced the highest productivity 416.7 ng/ml·hr L-lysine under optimum condition.

Key words: Protoplast, fusant, immobilization

서 론

발효 미생물의 생산성 향상을 위한 균주의 육종 수단으로 핵치환, 유전자 조작기법과 더불어 원형질체 융합에 의한 균주의 개발이 활발히 진행되고 있다. 원형질체 융합은 Eddy 등⁽¹⁾이 처음으로 시도한 이후 Kao 등⁽²⁾이 식물의 원형질체에 polyethyleneglycol 과 CaCl₂를 가하여 원형질체 융합방법을 수립하면서 미생물의 육종에 대한 많은 응용 연구가 보고되었다^(3,4,5). 원형질체 융합은 원형질체 사이에서 정상세포로 재생이 가능한 세균에서

는 모두 일어나며 특히 유전교환계가 알려지지 않은 세균에서는 효과적인 육종 수단이 될 수 있다^(6,7). 현재 L-lysine 발효에 사용되는 생산 균주로서는 *Corynebacterium* sp.와 *Brevibacterium* sp. 등이 주로 이용되고 있으며 외국의 경우, Katsumata 등⁽⁸⁾은 *Brevibacterium flavum* 를 융합시킴으로써 L-lysine 생산성을 높였으며, *Brevibacterium flavum* 의 동종간 융합⁽⁶⁾과 그리고 *Brevibacterium flavum* 과 *Brevibacterium lactofermentum* 과의 이종간의 원형질체 융합⁽⁹⁾에 의하여 많은 균주의 육종이 이루어졌다. 우리나라에서는 신⁽¹⁰⁾, 임⁽¹¹⁾ 등이 Coryne형 세균들에 대한 원형질체 합성·재생 및 융합빈도 등에 대하여 연구한 이외에 성 등⁽¹²⁾이 섬유질을 기질로 한 L-lysine 생산균주의 융합연구에

Corresponding author; Beung-Ho Ryu, Kyungsoong University 110, Dae yeon dong, Nam Gu, Pusan 608-736, Korea

대한 보고가 있을 뿐이다.

한편, 발효 공업의 공정 개선을 위한 한 방법으로 고정화 균체를 이용한 생산성 향상을 위한 발효 공정 개선에 대한 연구가 있으나⁽¹³⁻¹⁶⁾ 아미노산 발효 균체의 고정화에 대한 연구는 김 등⁽¹⁷⁾과 Karube 등⁽¹⁸⁾의 연구 외에는 찾아 볼 수 없으므로 이에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다.

본 연구는 *Brevibacterium flavum* ATCC 21528, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21086, 및 *Corynebacterium glutamicum* 820에서 얻은 변이주들에 대한 원형질체 융합을 시도하였고 이들 융합주의 free cell 과 고정화 균체에 의한 L-lysine 생산성을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용한 균주는 *Brevibacterium flavum* ATCC 21528 및 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21086 및 본 실험실에 보관중인 *Corynebacterium glutamicum* 820을 사용하였다.

배지 및 용액

완전배지(CM)로 nutrient broth 를 사용하였고, 최소배지(MM)는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10, dextrose 20, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4(g/l), NaCl 50, $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.0, $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.0(mg/l), biotin 50, thiamine · HCl 200($\mu\text{g/l}$), pH 7.0이며, 균 성장 용으로는 최소배지(MM)에 0.1% yeast extract 를 첨가한 MMYE 배지를 사용하였다. 그리고 재생용 완전배지(RCM)는 CM 에 0.5M sodium succinate 를 첨가하였으며 원형질체의 재생을 위한 증충용 agar 의 농도는 0.7%를 사용하였다⁽⁶⁾.

또한 L-lysine 생산배지(Lysine product broth, LPB)는 glucose 100, corn steep liquor 6.0, soybean acid hydrolysate 18, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40, peptone 2.0, K_2HPO_4 0.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, L-homoserine 5.0, L-threonine 5.0, L-methionine 5.0, L-leucine 5.0(g/l), biotin 20, thiamine · HCl 100($\mu\text{g/l}$), pH 8.1를 사용하였다.

Tris-malate buffer(TM), lysis solution(LS), dilution solution(DS), fusion solution(FS) 등 각종 용액의 조성은 Kaneko 등⁽⁶⁾의 방법에 따라 조제하였다.

시약

본 실험에 사용한 penicillin-G, streptomycin, rifampicin, kanamycin, s-(2-aminoethyl)-L-cystein (AEC)는 Sigma Co. 제품, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)는 Aldrich Co.의 제품, polyethyleneglycol(PEG) 6,000은 Wako Co., lysozyme 은 Boehringer Mannheim Co.의 제품을 사용하였으며, 고정화 담체로는 sodium alginate(Junsei Co.), polyacrylamide(Bio-Rad Co.), agar(Junsei Co.) 및 α -carrageenan(Sigma Co.)을 사용했으며, 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

변이주의 분리 및 농축

대수 증식기 중기(1×10^8 cells/ml)에서 채취한 균체액을 MNNG 처리를 행하여 완전배지(CM)에서는 생육하나 최소배지(MM)에서는 생육하지 않는 균주를 변이주로 분리하였으며 변이율을 높이기 위해 Lederberg 등⁽²⁰⁾의 방법에 따라 penicillin-G로 변이주의 농축을 행하였다.

영양 요구주 · 약제 및 analog 내성주의 분리

변이원(MNNG) 처리 및 penicillin-G로 농축된 균체액을 casamino acid 1mg, nucleic acid base solution 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가한 MM 에 도달하여 30°C에서 7일간 배양하여 생육한 colony 를 MM 에 toothpick 하고 MM 상에서 생육하지 않는 colony 를 Sherman 등⁽¹⁹⁾의 방법에 따라 영양요구성 균주로 분리하였다. 분리한 균주는 Konusuke 등⁽²⁸⁾의 방법에 따라 kanamycin 100 μg , streptomycin 200 μg , rifampicin 50 μg 및 AEC 1mg/ml 를 함유한 CM 에 배양하여 생성된 colony 를 약제 및 L-lysine analog 내성균주로 분리하였다.

원형질체의 형성과 재생

Kaneko 등⁽⁶⁾의 방법에 따라 각 균주의 원형질체 형성에 대한 lysozyme 의 최적처리 농도 및 세포벽 재생에 대한 osmotic stabilizer 인 sodium succinate 의 최적처리 농도를 구하였다.

융합주의 분리

융합후 원심분리(1,000rpm/10 min·실온)하여 FS 로 2회 세척한 다음 동일 용액으로 희석하여 1.5% agar 를 첨가한 RCM 배지상에 약제를 함유한 증충용 RCM 과

융합균주를 잘 혼합하여 증충시킨 후 33°C에서 7~10일 간 배양하여 생육한 colony에 대한 영양요구성을 확인하여 융합주를 분리하였다⁽⁶⁾.

균체의 고정화

CM에 대수증식기 중기까지 배양시킨 균체액을 원심 분리(8,000rpm/5 min)하여 집균하여 TM으로 3회 세척한 후 고정화 실험용으로 사용하였다. 즉, 16g의 cell paste와 2.5% sodium alginate gel 500ml을 혼합하고 19-26 gauge 주사바늘을 통해 0.1M-CaCl₂ 용액에 적하하여 균체를 bead 상태로 고정화 한 후 0.025M-CaCl₂ 용액에 침지하여 4°C에서 12시간 숙성시켰다. Bead 내 균의 생존 지수는 bead를 포화 sodium tri-polyphosphate 용액(100mg/ml)에 용해 후 Ringer 용액에 희석시켜 methylene blue 염색법으로 생균수를 측정하여 산출하였으며, 시간 경과에 따른 배지중의 free cell 수는 haematocytometer로 측정하였다.

L-Lysine의 생산성

위에서 얻은 변이주와 융합주들의 free cell과 고정화 균체에 의한 L-lysine 생산성을 검토할 목적으로 이들을 각기 LPB 배지에 접종하여 30°C에서 72시간 배양한 다음 membrane filter(Gelman, Sci., 0.2μm)로 여과하여 아미노산 자동분석기(Hitachi Model No. 835-50, Japan)로 L-lysine 생성량을 분석하였다.

연속식 관형 발효

내부에 6cm 간격으로 stainless steel 망을 갖춘 총 용량 220ml의 유리관(내경 20mm, 길이 700mm)에 외부에 경질 유리자켓(내경 50mm)을 부착하고 자켓을 통하여 30°C 온수가 recycle 되도록 고안된 연속식 관형 bioreactor를 조립하였다(Fig. 1). 여기에 고정화 세포 200ml를 충전하고 peristaltic pump(2132 Micro-perpex, LKB)로 기질용액을 일정량씩 up flow로 통액시키면서 연속발효를 수행하였다.

결과 및 고찰

변이주의 분리 및 농축

MNNG(final con. 250μg/ml) 처리에 의한 변이주의 유도과 변이율의 증가를 위한 Lederberg 등⁽²⁰⁾의 방법에 따른 penicillin-G 처리를 한 결과는 Fig. 2와 같다. penicillin-G를 300 μg/ml의 농도로 변이주를 농

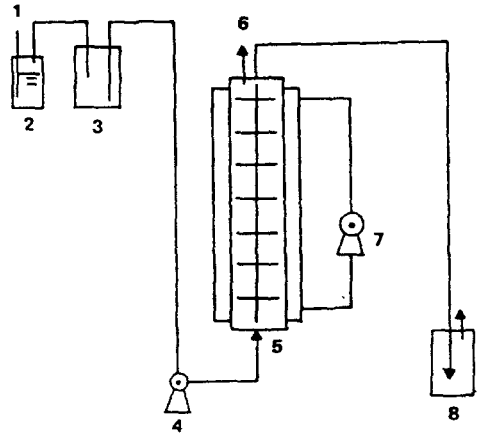


Fig. 1. Schematic diagram of continuous L-lysine fermentation
 1. Air inlet
 2. Bottle with conc-H₂SO₄
 3. Medium reservoir
 4. Peristaltic pump
 5. Reactor
 6. CO₂ vent
 7. Circulation pump
 8. Product reservoir

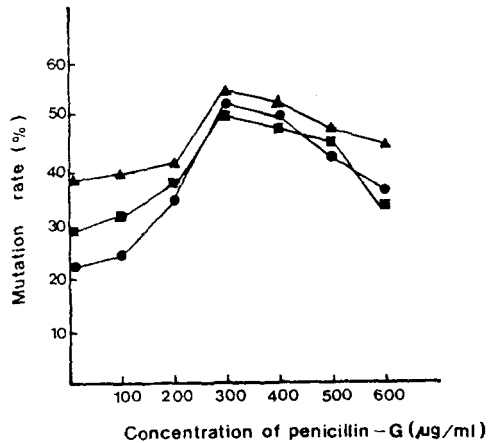


Fig 2. Effect of various concentration of penicillin-G on the mutation rate.
 ●—●: *C. glutamicum* 820
 ▲—▲: *B. flavum* ATCC 21528
 ■—■: *B. lactofermentum* ATCC 21086

축시켰을 때 변이율은 MNNG 단독 처리시 보다 전체적으로 15-22%까지 상승하였으며 이는 이⁽²¹⁾의 보고와 유사하였다.

영양요구주와 약제 및 analog 내성주의 분리

영양요구주와 약제 및 AEC 내성을 갖는 균주로 확인

된 139 균주를 LPB에서 72시간 진탕 배양하여 선발된 L-lysine 생산성이 우수한 균주의 내용은 Table 1에 나타낸 바와 같다. L-Lysine 축적 농도는 *B. flavum* 37-2의 경우 2.40%, *B. lactofermentum* 6-2는 2.29%, *C. glutamicum* 57-5는 2.24%를 나타내었다. 본 연구에서는 wild type strain에 적당한 영양요구성을 부여할 때 현저한 양의 아미노산을 축적하였다는 보고⁽²²⁻²⁵⁾ 및 영양요구성 균주에 대사길항 물질인 AEC 내성주가 L-lysine 축적량이 높았다고 한 보고⁽²⁶⁾를 조합하여 시도한 것으로 영양요구성과 약제 및 AEC 내성을 부여한 결과 L-lysine 생산성이 parent strain보다 향상됨을 확인하였다. 그리고 분리주의 영양요구성은 거의 다중 영양요구성 이었으며, *B. flavum*은 kanamycin, *B. lactofermentum*은 streptomycin, *C. glutamicum*은 rifampicin에 대하여 내성을 나타내었다.

원형질체의 형성과 재생

원형질체의 형성을 위한 세포벽 제거 효소로서는 cellulase⁽²⁷⁾, β -glucuronidase⁽²⁸⁾ 및 mutase⁽²⁹⁾ 등의 lytic enzyme을 사용하나 본 연구는 Kaneko 등⁽⁶⁾의 방법에 따라 lysozyme을 사용하였다. 즉, *B. flavum* 37-2, *B. lactofermentum* 6-2 및 *C. glutamicum* 57-5의 원형질체 형성은 대수 증식기까지 배양한 후 집균한 다음 penicillin-G(0.3 unit/ml)를 첨가하여 1.5시간 진탕 배양한 후 원형질체를 형성시키기 위해 lysozyme 30 μ g과 500 μ g/ml를 첨가한 LS에 정지 배양하면서 2시간 간격으로 원형질체의 형성율을 검토하고 Fig. 3의 결과를 얻었다. 원형질체의 형성은 효소 농도와 반응 시간에 따라 크게 달라져 lysozyme의 농도가 높을

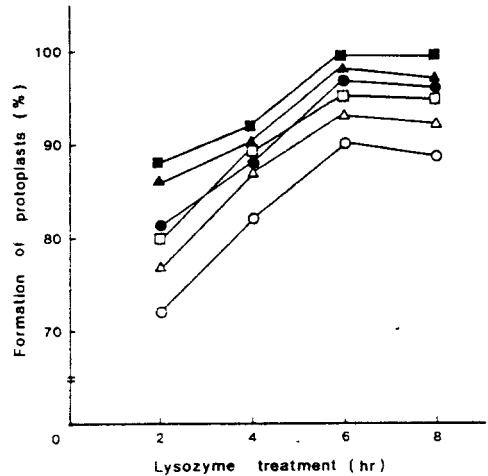


Fig. 3. Effect of reaction times and lysozyme concentration on the protoplast formation.

- *B. flavum* 37-2, 300 μ g/ml lysozyme
- *B. flavum* 37-2, 500 μ g/ml lysozyme
- △—△ *B. lactofermentum* 6-2, 300 μ g/ml lysozyme
- ▲—▲ *B. lactofermentum* 6-2, 500 μ g/ml lysozyme
- *C. glutamicum* 57-5, 300 μ g/ml lysozyme
- *C. glutamicum* 57-5, 500 μ g/ml lysozyme

수록 반응 시간은 짧은 경향을 나타내었으며 lysozyme 500 μ g/ml에서 6시간 반응시 *B. flavum* 37-2는 97%, *B. lactofermentum* 6-2는 98%, *C. glutamicum* 57-5는 99%의 원형질체를 형성하였다. 이 결과는 Shin 등⁽¹⁰⁾을 비롯한 여러 보고자^(6,30-31)들의 결과와는 다소 차이를 보이고 있으나 이는 균종에 따른 차이로 해석된다. 원형질체는 정상 세포와는 달리 세포벽이 일부 파괴되거

Table 1. Selection of auxotrophic-antibiotic and AEC resistant strains from wild type strains after MNNG treatment

Strains	Phenotype	Source
<i>B. flavum</i> 37-2	Hos ⁻ Kan ^r AEC ^r	<i>B. flavum</i> ATCC 21528
<i>B. flavum</i> 37-3	Ile ⁻ Thr ⁻ Kan ^r AEC ^r	"
<i>B. flavum</i> 37-4	ARg ⁻ Met ⁻ Kan ^r AEC ^r	"
<i>B. lactofermentum</i> 1-4	Met ⁻ Str ^r AEC ^r	<i>B. lactofermentum</i> ATCC21068
<i>B. lactofermentum</i> 6-2	Ile ⁻ Val ⁻ Str ^r AEC ^r	"
<i>B. lactofermentum</i>	Thr ⁻ Leu ⁻ Str ^r AEC ^r	"
<i>C. glutamicum</i> 5-2	Met ⁻ Ile ⁻ Rif ^r AEC ^r	<i>C. glutamicum</i> 820
<i>C. glutamicum</i> 5-4	Arg ⁻ Hos ⁻ Rif ^r AEC ^r	"
<i>C. glutamicum</i> 57-5	Met ⁻ Thr ⁻ Rif ^r AEC ^r	"
<i>C. glutamicum</i> 952	Leu ⁻ Rif ^r AEC ^r	"
<i>C. glutamicum</i> 966	Met ⁻ Thr ⁻ Rif ^r AEC ^r	"

나, 세포벽에서 유리된 불안정한 상태⁽³²⁻³³⁾이며 세포벽 재생에 있어 osmotic stabilizer의 농도에 따라 재생율이 달라질 수 있으므로⁽³⁴⁻³⁵⁾ 원형질체 재생에 있어서의 osmotic stabilizer의 최적 농도는 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 RCM에 sodium succinate 첨가 농도를 0.5M이 되도록 넣고 증충하였을 때 *B. flavum* 37-2는 33%, *B. lactofermentum* 6-2는 35%, *C. glutamicum* 57-5는 37%의 재생율을 나타내었다.

Osmotic stabilizer의 최적 농도는 Akamatsu 등⁽³⁴⁾, Kaneko 등⁽⁶⁾의 결과와 일치하였으나 김 등⁽³⁶⁾, 신 등⁽¹⁰⁾과는 다소 차이를 나타내었고 원형질체의 재생에 있어서는 균종에 따라 다소 차이가 있었다.

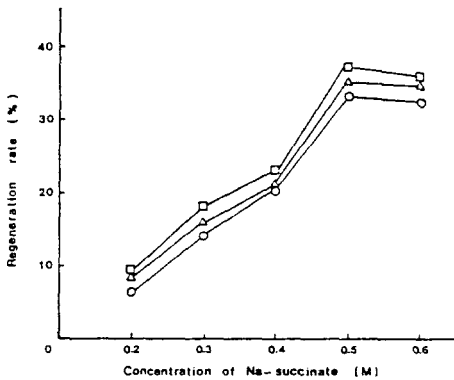


Fig. 4. Effect of Na-succinate concentration on the regeneration of protoplast.

- : *B. flavum* 37-2
- △—△: *B. lactofermentum* 6-2
- : *C. glutamicum* 57-5

융합주의 분리

L-Lysine 생산성이 뛰어난 변이주를 이용하여 각각 원형질체를 형성시킨 다음 이들 원형질체를 융합하여 분리한 융합체 및 융합 빈도를 Table 2에 나타내었다.

B. flavum 37-2와 *B. lactofermentum* 6-2의 융합주인 BBFL 21의 융합 빈도는 5.83×10^{-7} 이었으며, *B. flavum* 37-2와 *C. glutamicum* 57-5의 융합주인 BCFG 37은 3.72×10^{-6} 의 융합 빈도를 나타내었고, *B. lactofermentum* 6-2와 *C. glutamicum* 57-5의 융합주인 BCLG 59의 융합 빈도는 매우 낮았다. 이는 김 등⁽³⁶⁾ 신 등⁽¹⁰⁾의 보고와 유사한 경향을 나타내었다. 이와 같은 융합 빈도의 차이는 각 변이주의 영양요구성, 약제내성 및 L-lysine analog 등의 Marker의 종류에 따른 것으로 사료된다.

균체 고정화를 위한 담체의 선정

균체 고정화를 위한 담체의 선정은 담체의 종류에 따라 기질농도에 따른 확산속도, 산소의 공급 및 gel 강도에 영향을 받는다. 현재 사용되고 있는 담체인 polyacrylamide, agar, κ -carrageenan 및 sodium alginate를 사용하여 L-lysine 생산성이 우수한 융합주 BBFL 21을 각 담체에 고정화한 bead를 LPB에 넣고 30°C에서 120 rpm으로 진탕하면서 70hr 배양한 후 L-lysine을 분석한 결과는 Table 4와 같다. 2.5% sodium alginate로 고정화 하여 L-lysine 생산성을 조사한 결과 2.98%의 비교적 높은 수율을 얻었다. 그러나 polyacrylamide의 경우에는 1.91%, κ -carrageenan은 2.47%, agar는 0.54%를 나타내었다. Sodium alginate에 균체를 고정화 시켜 발효의 생산성을 향상시킨 보고는 많이 발표된

Table 2. Comparison of fusion frequency of protoplasts on interspecific fusion between fusants in L-lysine productivity

Strains	Cross	Phenotype	Fusion frequency
BBFL 21 ^{a)}	<i>B. flavum</i> 37-2	Ile ⁻ Hos ⁻ Val ⁻	5.83×10^{-7}
	<i>B. lactofermentum</i> 6-2	Kan ^r Str ^r AEC ^r	
BCFG 37 ^{b)}	<i>B. flavum</i> 37-2	Met ⁻ Hos ⁻ Thr ⁻	3.72×10^{-6}
	<i>C. glutamicum</i> 57-5	Kan ^r Rif ^r AEC ^r	
BCLG 59 ^{c)}	<i>B. lactofermentum</i> 6-2	Ile ⁻ Val ⁻ Thr ⁻	1.25×10^{-6}
	<i>C. glutamicum</i> 57-5	Str ^r Rif ^r AEC ^r	

a) BBFL 21 is fusant between *B. flavum* 37-2 and *B. lactofermentum* 6-2
 b) BCFG 37 is fusant between *B. flavum* 37-2 and *C. glutamicum* 57-5
 c) BCLG 59 is fusant between *B. lactofermentum* 6-2 and *C. glutamicum* 57-5

Table 3. L-Lysine productivities of whole cells immobilized in various matrices

Wet cell (g)	Concentration of matrix for immobilization (%)	Productivities on whole cells (%)
0.5	sodium alginate 2.5	2.98
0.5	polyacrylamide 7.0	1.91
0.5	agar 1.5	0.54
0.5	k-carrageenan 2.5	2.47

Table 4. L-Lysine productivities of parent strains, mutants and fusants

Strains	L-lysine productivity (%)
<i>B. flavum</i> ATCC 21528	0.94
<i>B. flavum</i> 37-2	2.40
<i>B. flavum</i> 37-3	1.78
<i>B. flavum</i> 37-4	2.22
<i>B. lactofermentum</i> ATCC 21068	1.00
<i>B. lactofermentum</i> 1-4	1.25
<i>B. lactofermentum</i> 6-2	2.29
<i>B. lactofermentum</i> 1-7	1.24
<i>C. glutamicum</i> 820	0.85
<i>C. glutamicum</i> 5-2	1.45
<i>C. glutamicum</i> 5-4	1.21
<i>C. glutamicum</i> 57-5	2.24
<i>C. glutamicum</i> 952	1.67
<i>C. glutamicum</i> 966	1.96
BBFL 21 ^{a)}	2.96
BCFG 37 ^{b)}	2.65
BCLG 59 ^{c)}	2.80

a) BBFL 21 is fusant between *B. flavum* 37-2 and *B. lactofermentum* 6-2

b) BCFG 37 is fusant between *B. flavum* 37-2 and *C. glutamicum* 57-5

c) BCLG 59 is fusant between *B. lactofermentum* 6-2 and *C. glutamicum* 57-5

바 있다^(13,37-39).

한편 L-glutamate 생산시 균체 고정화에 α -carrageenan이 효과적이었다는 보고⁽¹⁷⁻¹⁸⁾와는 달리 본 실험에서는 α -carrageenan을 80°C에서 녹인 후 45°C의 균체액과 혼합시 사멸 균수의 증가와 α -carrageenan 농도의 상승으로 인해 점성의 증가로 bead 형성이 어려웠으며, α -carrageenan 농도를 줄이면 bead의 강도가 낮아 발효과정중 bead가 파손되어 고정화 담체로 사용하기에는 부적합하였다.

L-Lysine의 생산성

실험균을 LPB에 접종하여 72hr 배양후 amino acid

analyzer로 L-Lysine 함량을 측정된 결과 Table 4와 같이 *B. flavum* ATCC 21528의 변이주인 *B. flavum* 37-2, *B. flavum* 37-3 및 *B. flavum* 37-4의 경우 각기 2.40, 1.78 및 2.22%로서 *B. flavum* 37-2가 가장 우수하였으며, *B. lactofermentum* ATCC 21068의 변이주인 *B. lactofermentum* 1-4, *B. lactofermentum* 6-2 및 *B. lactofermentum* 1-17은 각기 1.25, 2.29, 1.24%였으며 *C. glutamicum* 820에서 변이된 *C. glutamicum* 5-2, *C. glutamicum* 5-4 및 *C. glutamicum* 57-5는 각각 1.45, 1.21, 2.24%를 나타내었다. 그리고 *B. flavum* 37-2 및 *B. lactofermentum* 6-2를 융합시킨 후 분리한 융합주 BBFL 21의 L-lysine 함량은 2.96%, *B. flavum* 37-2와 *C. glutamicum* 57-5를 융합시킨 융합주 BCFG 59는 2.80%로 융합주가 훨씬 높은 L-lysine 축적량을 보인한 Tosaka 등⁽⁹⁾의 결과와 일치하였다. 한편 분리된 융합주의 L-lysine 생산성에 있어서는 김⁽³⁸⁾, 경⁽⁴⁰⁾ 및 민⁽⁴¹⁾ 등이 보고한 L-lysine 생산성 보다는 다소 높았으나, Sano 등⁽⁴²⁾이 보고한 3.2% 보다는 낮았다. 이는 친주의 우수균주 선택이나 α -chlorocaprolactum, γ -methyllysine 등의 강력한 저해 인자의 marker를 가진 균주를 개발할 경우 L-lysine 생산성은 더욱 향상되리라 본다. 또한 변이주중 L-lysine 생산성이 가장 우수한 *B. flavum* 6-2, *B. lactofermentum* 37-2 및 *C. glutamicum* 57-5에서 분리된 융합주 BBFL 21을 sodium alginate에 고정화를 시켜 72hr 회분식 및 관형 발효기를 이용한 연속식 발효를 행하였을 때의 아미노산 생성량은 Table 5에서 보는 바와 같다. 융합주 BBFL 21의 경우 L-lysine 이외 L-alanine 775.4mg%, L-glutamic acid 433.9% 및 L-leucine 426.3mg%로 여러 종류의 아미노산을 축적하였으며, 융합주 BCFG 37과 BCLC 59도 L-lysine 이외에 L-alanine, L-glutamic acid, L-leucine, L-valine을 생산 축적하였다. 相田 등⁽⁴³⁾도 L-lysine 발효시 L-valine, L-alanine 등이 다량 축적되었다고 보고한 바 있다.

한편, 융합주 BBFL 21을 sodium alginate로 고정 후 회분식 및 연속식 발효를 72hr 동안 행한 바 free cell의 경우와 마찬가지로 L-lysine 외에 L-alanine, L-leucine, L-aspartic acid, L-glutamic acid 등이 다량으로 축적되었다.

융합주를 이용한 회분식 및 연속식 L-Lysine 발효

L-Lysine 생산성이 우수한 융합주 BBFL 21을 이용

하여 free cell 상태 및 균체 고정화를 시킨 후 회분식 발효와 연속식 발효를 30°C에서 72, 96 및 120hr 행하여 배양액 중의 L-lysine 생산성을 비교하였다. 고정화 담체의 bead내 생균수 및 bead에서 분리된 free cell 수는 Fig. 5와 같다. 72hr LPB에서 배양시 고정화 세포내이 생존 지수는 각기 회분식과 연속식의 경우 0.97 및 0.98을 나타내었으나 120hr 발효시 회분식은 0.92로 감소하였으며, 배지중의 free cell 수도 2.5×10^8 에서 6×10^8 cells/ml로서 균수가 낮아졌는데 이는 cell의 활성이 급격히 떨어진 데 기인한 것으로 사료된다. 그러나 연속식의 경우 120hr 까지 생존 지수의 변화는 거의 없었으며 배지중의 free cell 수도 6.5×10^9 cells/ml을 유지하였다. 또 Fig. 5에서 보듯이 용합주 BBFL 21를 free cell 상태로 72hr 발효했을 때 $411 \text{ ng/ml} \cdot \text{hr}$ 의 L-lysine을 축적하였으나 그 이후 더 증가하지는 아니하였다. 그리고 고정화 세포를 회분식 발효를 72hr 실시한 바 $413.9 \text{ ng/ml} \cdot \text{hr}$ 의 L-lysine을 축적하였다. 이것은 sodium glutamate 생산에 있어 균체 고정화를 행하였을 때 발효 시간에 따라 완만히 증감하였다는 김 등⁽²⁵⁾의 보고와 유사한 경향으로서 free cell 상태에서의 L-lysine 함량의 감소 현상은 기질의 고갈과 대사물질의 축적에 따른 것으로 추정된다. 반대로, 고정화 균체에 의한 L-lysine 생산

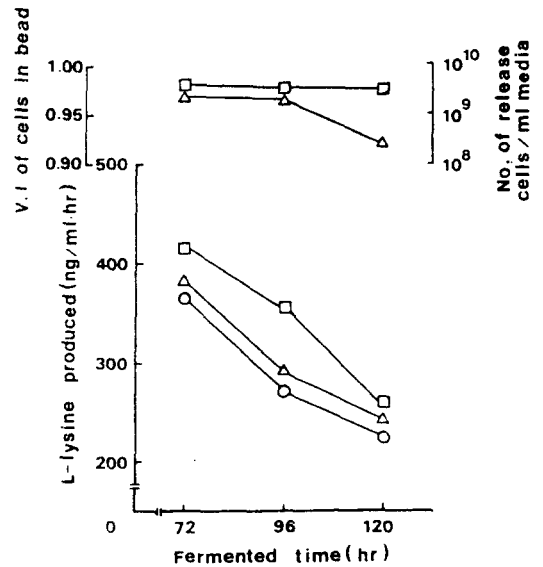


Fig. 5. L-lysine productivity and viability index (V. I.) in bead during fermentation.

○—○: free cell of fusant BBFL-21
 △—△: batch fermentation by immobilized system
 □—□: continuous fermentation by tube fermentor

Table 5. Contents of amino acid produced from the culture broth(LPB) of fusants and immobilized cell

(unit: mg/100g)

Amino acids	Strains				
	BBFL 21 ^{a)}	BCFG 37 ^{b)}	BCLG 59 ^{c)}	BBFL 21 ^{d)}	BBFL 21 ^{e)}
Asp	187.9	457.5	373.1	593.4	434.2
Thr	152.6	67.6	90.7	48.9	37.3
Ser	63.0	57.3	101.0	54.8	59.7
Glu	433.9	704.8	1141.4	546.0	483.0
Pro	tr	tr	tr	tr	tr
Gly	91.5	102.9	136.5	80.3	85.3
Ala	775.4	567.2	472.6	904.7	783.7
Cys	19.2	37.2	40.2	20.1	22.1
Val	92.7	655.5	425.9	81.1	84.0
Met	280.1	390.2	243.4	260.2	270.4
Ile	62.7	65.1	83.0	58.8	59.3
Leu	426.3	444.3	395.1	611.6	517.6
Thr	tr	tr	tr	tr	tr
Phe	tr	tr	tr	tr	tr
His	45.2	90.3	80.7	39.5	44.7
Lys	2959.9	2652.7	2804.0	2980.0	3000.2
Arg	107.1	122.7	182.6	96.3	105.9
Total	5697.5	6415.4	6609.4	6375.7	5987.4

a) BBFL 21; fusant between *B. flavum* 37-2 and *B. lactofermentum* 6-2

b) BCFG 37; fusant between *B. flavum* 37-2 and *C. glutamicum* 57-5

c) BCLG 59; fusant between *B. lactofermentum* 6-2 and *C. glutamicum* 57-5

d) Batch fermentation were carried out incubated in immobilized system for 72hr by using BBFL 21 strain

e) Continuous fermentation were carried out incubated in immobilized system 72hr by using BBFL 21 strain

은 bead 내부의 미중식 세포의 활성화에 따른 것으로 사료된다.

연속식 발효의 경우 72hr에 L-lysine을 416.7ng/ml·hr을 축적하였으며 120hr 발효에 의해 325ng/ml·hr을 축적하였으므로 72시간 경과후 부터는 발효의 효율성이 떨어졌다. 또한 연속식 발효는 L-Lysine 외에 전체적으로 L-alanine을 배양액중 총 아미노산에 대해 11-18%의 높은 농도가 축적되는 반면, 배양시간에 따라 L-aspartic acid 및 L-glutamic acid 등이 점차적으로 감소하였다.

한편 고정화 세포내의 viability index는 72hr에 거의 1에 가까웠으나 그 이후 서서히 감소하여 120hr 후 0.9에 근접하였다. 이는 고정화에 의해 bead 외측에 cell이 기질의 감소에 따라 서서히 사멸되므로 생존수가 감소하는데 기인하는 것으로 사료된다.

요 약

L-Lysine 생산 균주인 *B. flavum* ATCC 21528, *B. lactofermentum* ATCC 21086 및 *C. glutamicum* 820을 이용하여 L-lysine 생산성이 우수한 균주를 분리할 목적으로 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) 250 μ g/ml 농도로 처리한 다음 300 μ g/ml의 penicillin-G로 변이주를 농축하여 *B. flavum* 37-2(Hos⁻, Kan^r, AEC^r), *B. lactofermentum* 6-2(Ile⁻, Val⁻, Str^r, AEC^r) 및 *C. glutamicum* 57-5(Met⁻, Thr⁻, Rif^r, AEC^r) 등의 변이주를 분리하였다. 분리된 변이주의 원형질체 형성은 lysozyme 500 μ g/ml를 함유한 LS 용액으로 6시간 처리시 원형질체의 형성율은 97-99%였으며, 세포벽 재생율은 0.5M sodium succinate를 함유한 RCM에 0.7% osft agar를 중층하였을 때 33-37%를 나타내었다.

또 각각의 원형질체를 동량 혼합후 30% PEG 6,000에서 융합을 시킨 다음 분리된 융합주 BBFL 21, BCFG 37 및 BCLG 59는 $1.29 \times 10^{-6} \sim 5.83 \times 10^{-7}$ 의 융합 빈도를 나타내었다. 분리된 융합주 BBFL 21은 LPB에서 30 $^{\circ}$ C, 72hr 배양하였을 때 411.1ng/ml·hr로 높은 L-lysine 생산성을 나타내었다.

발효 방법을 개선할 목적으로 융합주 BBFL 21을 sodium alginate, polyacrylamide, agar, κ -carrageenan 등으로 고정화 하여 회분식 발효를 행한 바 413ng/ml·hr로 sodium alginate로 처리했을 때 가장

좋았다.

고정화 균체를 이용하여 관형 발효기를 제작하여 연속 발효를 행한 바 416.7ng/ml·hr의 가장 높은 L-lysine 생산성을 나타내어 회분식 보다 높은 수율을 얻었다.

감사의 글

본 연구는 87년(주)미원 부설 한국 음식문화연구원의 연구 지원비에 의해 수행된 결과로서 연구지원에 깊이 감사 표시하는 바입니다.

문 헌

- Eddy, A.A. and Williamson, D.H. : A method for isolation protoplast from yeast. *Nature(London)*, 179, 1252(1957)
- Kao, K.N., Michayluk, M.R. : A method of high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Plant.*, 115, 355(1974)
- Ohunki, T., Etoh, Y. and Beppu, T. : Interspecific and interspecific hybridiza of *Mucor pusillus* and *Mucor meihei* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 451(1982)
- Foder, K. and Alfoldi, L. : Polyethyleneglycol induced fusion of bacterial protoplasts. *Molec. Gen. Genet.*, 168, 55(1979)
- Hopwood, D.A. and Wright, H.M. : Bacterial protoplast fusion; Ricombition in fused protoplast of *Streptomyces coelicolor*. *Molec. Gen. Genet.*, 162, 307(1978)
- Kaneko, H. and Sakaguchi, K. : Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, 43(5), 1007(1979)
- Götz, F., Ahme, S. and Lindberg, N. : Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion in *Staphylococci*. *J. Bacteriol.*, 145, 74(1981)
- 有馬賢治, 高野勇 : 微生物のプロトプラスト融合. *醸酵工誌*, 57, 380(1979)
- Tosaka, O., Karasawa, M., Ikeda, S. and Yoshii, H. : Genetic recombination in amino acid-producing bacteria by protoplast fusion. 4th International symp. on GIM Abstracts.(1982)
- Shin, M.G., Lee, S.Y., Lim, B.S. and Chun, M.J. : The

- protoplast formation, regeneration and fusion of Coryneform bacteria. *Kor. Jour. Microbiol.*, 22(3), 175(1984)
11. Lim, B.S. : Studies on breeding og L-lysine producing microorganisms by cell fusion and bioreactor system by immobilization of fusants. *ph. D. Thesis, Korea Univ.*(1985)
 12. Sung, N.K., Chung, D.H., Park, B.K., Chung, Y.C. and Chun, H.K. : Development of L-lysine producing strains from cellulosic substrate by the intergeneric protoplast fusion., *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 16(3), 175(1988)
 13. Ryu, B.H. and Nam, K.D. : Continuous alcohol fermentation using immobilized growing yeast cells. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 15(4), 248(1987)
 14. Suh, K.H., Choi, M.H. and Song, S.K. : Comparative study on continous ethanol fermentor. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 16(3), 205(1988)
 15. Lim, J.D. and Choi, C.Y. : Effect of reactor operation mode on citric acid production using imobilized yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 14(1), 1(1986)
 16. Oh, J.W., Choi, H.J. and Pyun, Y.R. : The conversion of D-xylose to ethanol by immobilized *Pachysolen tannophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 15(3), 170(1987)
 17. Kim, H.S. and Dewey, D.Y. Ryu : Continuous glutamate production using on immobilized whole -cells system. *Technol. and Bioeng.*, 24, 2167(1982)
 18. Isao Karube, Yongxiang Wang, Eiichi Tamiya and Masahiro Kawarai : L-glutamate production by protoplasts immobilized in carrageenan gel. *J. of Biotech.*, 6, 1(1987)
 19. Sherman, F., Gerald, R.F. and James, B.H. : Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Lab. New York, p.5(1983)
 20. Lederberg, J. and Zinder, N. : Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin. *J.A. C.S.*, 70, 4267(1948)
 21. 이무영 : B. flavum 과 C. glutamicum 과의 원형질체 융합, 석사학위 논문, 경상대학교(1985)
 22. 中山清 : 最近の微生物工業(化學工業別冊, Vol. 12, No. 8), 化學工業社 p.129(1973)
 23. アミノ酸・核酸集談會編 : アミノ酸醗酵(上)(下), 共立出版(1972)
 24. Nakayama, K., Araki, K. and Kase, H. : Nutritional improvement of food and feed proteins. Pienum Publishing Corporation., p.219(1973)
 25. Nakayama, K. : Genetic of industrial microorganisms, Vol. I, Bacteria, p.219(1973)
 26. Konosuke, S. and Shiio, I. : Microbial production of L-lysine production by mutants resistant to S-(2-aminoethyl)-L-cysteine. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 16, 373(1970)
 27. Yamada, T. and Sakaguchi, K. : Protoplast induction in Chlorella species. *Agric. Biol. Chem.*, 45(8), 1905(1981)
 28. Hong, S.W., Hah, Y.C. and Park, H.M. : The conidial protoplast fusion of cellulolytic dungus, *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.*, 22(44), 207(1984)
 29. Stephen, E.R. and Nasim, A. : Production of portoplasts in different yeasts by mutanase. *Can. J. Microbiol.*, 27, 550(1981)
 30. Furuya, A., Katsumata, R., Ozaki, A. and Oka, T. : Protoplast transformation of glutamate producing bacteria with plasmid DNA. *J. of Bacteriology.*, 159(1), 306(1984)
 31. Okanishi, M., Suzuki, K. and Umezawa, H. : Formation and reversion of *Streptomyces* protoplast; Culture condition and morphological study. *J. of Gen. Microbiol.*, 80, 389(1974)
 32. 박 청·임번삼·전문진·김우람 : Coryne형 세균의 원형질체 융합에 관한 전자현미경적 관찰. *Kor. J. Microbiol.*, 23(2), 265(1985)
 33. Ha, Y.C., Lim, H.M., Park, H.M. and Hong, S.W. : Electron microscopic study of protoplasts released from the mycelium of *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Electron Microscopy.*, 13(1), 49(1983)
 34. Akamatsu, T. and Sekeiguchii, J. : Studies on regeneration media for *Bacillus subtilis* protoplasts. *Agric. Biol. Chem.*, 45(12), 2887(1981)
 35. Wyrick, P.B. and Rogers, H.J. : Isolation and characterization of ceell wall-defective variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J. of Bacteriol.*, 116(1), 456(1973)
 36. 김종현·임번삼·이세영·전문진 : Coryne형 세균의 원형질체 융합빈도 향상. *Kor. Jour. Microbiol.*, 23(3), 190(1985)
 37. Wafaa Mahmoud and Hans Jürgen Rehm : Chlortetracycline production with immobilized *Streptomyces aureofaciens*; I. Batch culture. *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 333(1987)
38. Waffa Mahmoud and Hans Jürgen Rehm : Chlor-tetracycline production with immobilized *Streptomyces aureofaciens*; II. Semiocontinuous and continuous fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 335(1987)
39. Nam, K.D., Choi, M.H., Kim, W.S., Kim, H.S. and Ryu, B.H. : Simultaneous saccharification and alcohol fermentation of unheated starch by free, immobilized and coimmobilized systems of gluco-amylase and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.*, **66**(4), 427(1988)
40. Kyung, K.C., Lim, B.S., Lee, S.Y. and Chun, M.J. : Development of L-lysine producing strains by intergeneric protoplast fusion of *Brevibacterium flavum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**(3), 279(1985)
41. 민태익·김항목·권태완 : Studies on the production of lysine by fermentation process(2), *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **4**(2), 123(1972)
42. Sano, K. and Shiio, I. : *ibid.*, **16**, 373(1970)
43. 相田浩·龍波弘一·千火田一郎·中山清·山田秀明 : アミノ酸 醱酵, 學會出版 center. 285-286(1986)
(1988년 11월 12일 접수)