

알칼리성 세균에 의한 글루탐산 생산에 관한 연구

조계란¹ · 이강만^{1*} · 배 무²

이화여자대학교 ¹약학대학 ²자연과학대학

Studies on the Glutamic Acid Production by an Alkaliphilic Bacterium

Cho, Kae-Ran¹, Kang-Man Lee^{1*} and Moo Bae²

¹College of Pharmacy, ²College of Natural Sciences, Ewha Womans University, Seoul, Korea

An alkaliphilic bacterium isolated from compost was selected, identified and tested for the production of glutamic acid from ammonium fumarate. The bacterium was closely related to *Bacillus brevis*. The conditions for glutamic acid production were pH 8.0, 2% fumaric acid, and 0.8% nutrient broth. The mechanism of glutamic acid formation in this strain was postulated as following scheme. (1) Ammonium fumarate → Aspartic acid (2) Aspartic acid + α -Ketoglutaric acid → Glutamic acid + Oxaloacetic acid.

알칼리성 환경에서 성장하는 미생물은 일반 미생물과 다른 특별한 조건에서 성장한다는 이유로 생화학 및 진화적인 측면에서 관심의 대상이 되고 있다 (1). 또한 유용한 물질을 생산할 수 있는 미생물 자원으로서도 관심의 대상이 되고 있어 1970년대 이후 알칼리성 세균에 의해 여러가지 효소와 항생물질의 생성이 보고된 바 있다(1). 저자들은 알칼리성 세균의 성질을 조사하던 중에 ammonium fumarate로부터 글루탐산을 생성하는 균주를 발견하였다. 중성의 pH에서 잘 자라는 세균 중에서 글루탐산을 생성하는 균주에 대해서는 많은 보고들이 있어 왔다. *Bacillus subtilis* (2), *Bacillus anthracis* (3), *E. coli* (4-6) 등을 이용하여 α -ketoglutaric acid (α -KGA)로부터 글루탐산을 생성시킬 수 있음이 발표되었으며, *Bacterium ketoglutaricum*을 이용하여 α -KGA와 alanine으로부터 글루탐산을 (7), *Pseudomonas ovalis* (8)의 경우 α -KGA와 NH_4^+ 으로부터 글루탐산이 생성됨도 보고된 바 있다. Citric acid, malic acid, succinic acid, formic acid와 같은 유기산으로부터 글루탐산의 생성을 보고한 예도 있다(9). *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *Aerobacter aerogenes*, *E. coli*, *Micrococcus pyogenes* 등의 세균을 이용하여 fumaric acid로부터 글루탐산을 생성할 수 있음도 알려진 바 있다(10, 11). 또한 당

과 무기질소원을 직접 발효시켜 글루탐산을 대량 생산할 수 있는 방법도 개발되었다(12, 13).

본 실험에서는 ammonium fumarate로부터 글루탐산을 생성하는 알칼리성 균주를 선택하여 이 균주를 동정하고, 글루탐산 생산을 위한 배양조건, whole cell을 이용한 글루탐산 생성기전을 실험하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주선별 및 배양

전국 각지의 퇴비시료로부터 분리보관 중인 알칼리성 세균들(이화여자대학교 생물학과 미생물학 교실)을 대상으로 하여 0.8% nutrient broth(Difco)와 1% fumaric acid를 포함하는 배지를 28% NH_4OH pH 9.0 되게 조절하고, 균을 접종, 30°C에서 48시간 진탕배양하였다. 배양액을 silica gel GF 254 plate에 점적한 후 1-propanol : H_2O (9 : 5) 용매계에서 전개시키고 UV 하에서 fumaric acid의 존재를 확인하였으며, ninhydrin을 분무하고 가열하여 amino acid 축적여부를 확인하여 선별하였다.

균배양시 종균액은 30°C에서 15시간 진탕배양하였으며, 1% 농도되게 새로운 배지에 접종하여 30°C에서 48시간 진탕배양하였다.

Key words: Alkaliphilic bacterium, *Bacillus* sp., ammonium fumarate, glutamic acid

*Corresponding author

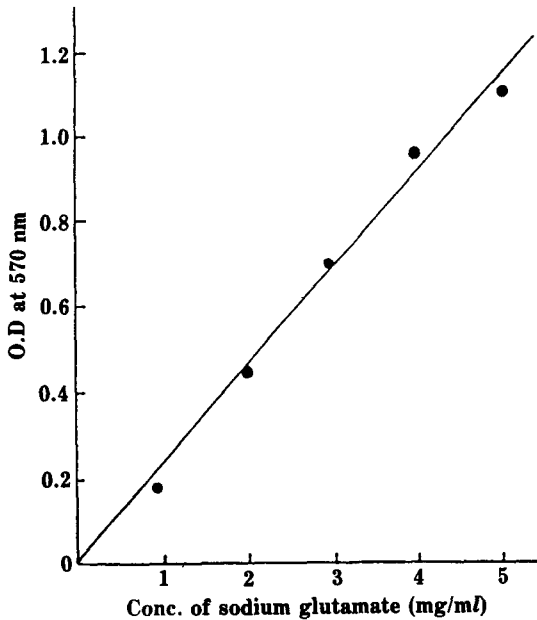


Fig. 1. The standard calibration curve for the determination of glutamic acid.

생성물질의 확인

최종 선별된 균주가 생성하는 아미노산을 확인하기 위하여 2차원 TLC를 이용하였다. 1차 전개용매로 1-propanol : H₂O (9 : 5)를, 2차 전개용매로 1-butanol : acetic acid : H₂O (13 : 2 : 5)를 사용하였다.

균주의 보존

알칼리성 세균을 보존하기 위하여 사용한 배지는 1% glucose, 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.1% KH₂PO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 1% Na₂CO₃, 2% Agar (pH 10.3)를 함유하는 것을 사용하였으며, 상온에서 보존하였다.

균주의 동정

실험균주의 형태학적, 생리학적, 생화학적 특징은 Manual of Methods for General Bacteriology (14)에 제시된 방법에 준하여 실험하였으며, 실험결과들을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (15)에 기술되어 있는 사항들과 비교하였다.

글루탐산의 정량

글루탐산의 정량은 ninhydrin 변법을 이용하였다. 활성화시킨 TLC plate에 균배양액을 원심분리하여 얻은 상등액을 10 µl씩 점적하였다. 1-propanol :

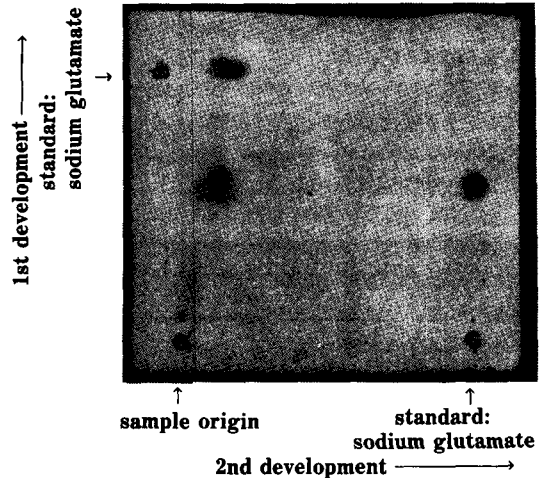


Fig. 2. The two-dimensional TLC of the filtrate of *Bacillus* species No. 35 strain culture broth.

TLC was developed two-dimensionally: first development in the solvent system 1-PrOH:H₂O (9:5, v/v) and second development in the solvent system 1-BuOH:HAC:H₂O (13:2:5, v/v/v). The spots were visualized using ninhydrin reagent.

H₂O (9 : 5) 용매계에서 전개시킨 후 건조하여 ninhydrin 시액 (ninhydrin 1g, ethanol 100 ml, Collidin 4 ml)을 분무하였다. 50°C에서 30분간 가온하여 발색시킨 후 해당 반점을 긁어 내어 에탄올 용액 (0.005% CuSO₄·5H₂O/75% ethanol) 3 ml로 20분간 추출한 다음 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 570 nm에서 흡광도를 측정하여 글루탐산 양을 정량하였다 (표준곡선 : Fig.1).

글루탐산 생성기전

균을 배양한 (30°C, 48 hr) 배양액 20 ml을 원심분리 (6000 rpm, 10 min)하여 모은 균체를 1% ammonium fumarate (pH 9.0) [A액], 1% α-ketoglutaric acid·NH₄⁺ (pH 9.0) [B액], 1% α-ketoglutaric acid + 1% aspartic acid (pH 9.0) [C액], 1% oxaloacetic acid + 1% glutamic acid (pH 9.0) [D액] 각각의 용액에 첨가하여 30°C에서 48시간 진탕시킨 후, 반응액을 silica gel TLC plate에 점적, 1-propanol : H₂O (9 : 5) 전개용매에서 전개시켰다. 건조된 plate에 ninhydrin 시액을 분무하고 가온하여 반응결과를 확인하였다.

결과 및 고찰

글루탐산 생성균주의 선별 및 동정

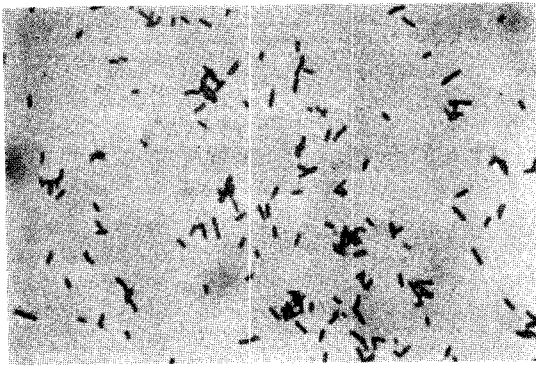


Fig. 3. The microscopic photograph of *Bacillus* species No. 35 strain ($\times 600$).

Ammonium fumarate 를 포함하는 nutrient broth 에서 성장을 보이고 fumarate 의 소실과 ninhydrin 양성인 물질을 축적하는 8 균주 중 가장 활성이 좋은 No.35 균주를 선별하였다.

선택된 균주가 축적하는 물질을 확인하기 위하여 2 차원 TLC 를 이용한 결과는 Fig.2 에서 볼 수 있으며 각각의 Rf 치는 0.52(1 차 전개), 0.18(2 차 전개) 이었다.

선택된 균주의 현미경시야에서 형태를 Fig.3 에서 볼 수 있으며, 형태학적, 생리학적, 생화학적 특징은 Table 1 에서 요약하였다. Catalase, anaerobic growth, Voges-Proskauer test, 당의 이용성, casein, gelatin, starch, citrate 이용성, nitrate reduction, indole 형성능, 5% NaCl 에서 성장여부, 성장 온도범위 등의 실험결과를 종합할 때 본 균주는 *Bacillus brevis* 와 유사하였다(15).

글루탐산 생성 및 균의 성장에 미치는 배양조건 영향

배양시간에 따른 pH, 배양액의 탁도, 글루탐산 생성량을 조사한 결과를 Fig.4 에서 볼 수 있다. 이 균주는 24 시간 배양에서 정체기에 들어 갔으며, 글루탐산 생성은 48 시간 배양시 최고치를 보였다. pH 는 12 시간 배양시 낮아졌다가 점차 높아졌다. 배지의 pH 가 균의 성장과 글루탐산 생성에 미치는 영향을 보기 위한 실험에서 배지의 pH 를 5.9-10.0 으로 조절하여 배양한 결과, Table 2 에서 보는 바와 같았다. pH7 이하에서는 균의 성장이 거의 없었으며, pH8 이상에서 균의 성장이 좋았다. 글루탐산 생성은 pH8,9에서 볼 수 있었으며 pH10 이상에서는 균의 성장을 볼 수 있었음에 비해 글루탐산 생성은 볼 수 없었다.

Table 1. The morphological, cultural and biochemical characteristics of strain *Bacillus* species No. 35.

Morphological characteristics	
Form	rods
Size width	0.5 - 1 μ m
length	2 - 5 μ m
Motility	positive
Gram staining	positive
Spore	spherical
Cultural characteristics	
Nutrient broth	positive
Nutrient agar slant	positive
Alkaline medium	positive
Basal medium	positive
Anaerobic agar	negative
Sabouraud dextrose agar	negative
3% NaCl nutrient broth	negative
Temperature for growth, $^{\circ}$ C	20 - 55
pH range	6.5 - 11
Biochemical characteristics	
Catalase activity	positive
Urease activity	positive
Hydrolysis of starch	positive
casein	positive
Reduction of nitrate	positive
methylene blue	positive
Indole & H ₂ S production	negative
Fermentation of mannitol, xylose, arabinose	negative
Gelatin liquefaction	positive
Citrate utilization	positive
Methyl red & Voges-Proskauer test	negative

배지 중 첨가되는 fumaric acid 의 양에 따른 글루탐산 생성에서는 2% 첨가에서 생성량이 가장 많았으나 1% 첨가에 비하여 현저한 증가효과는 볼 수 없었다(Table 3).

Fumaric acid 대신 여러가지 다른 유기산을 첨가하여 글루탐산 생성을 실험한 결과 fumaric acid, citric acid, oxaloacetic acid, succinic acid, α -ketoglutaric acid 순서로 글루탐산 생성이 감소하였다. 한편 유기산을 첨가하지 않은 경우는 글루탐산의 생성을 볼 수 없었다(Table 4).

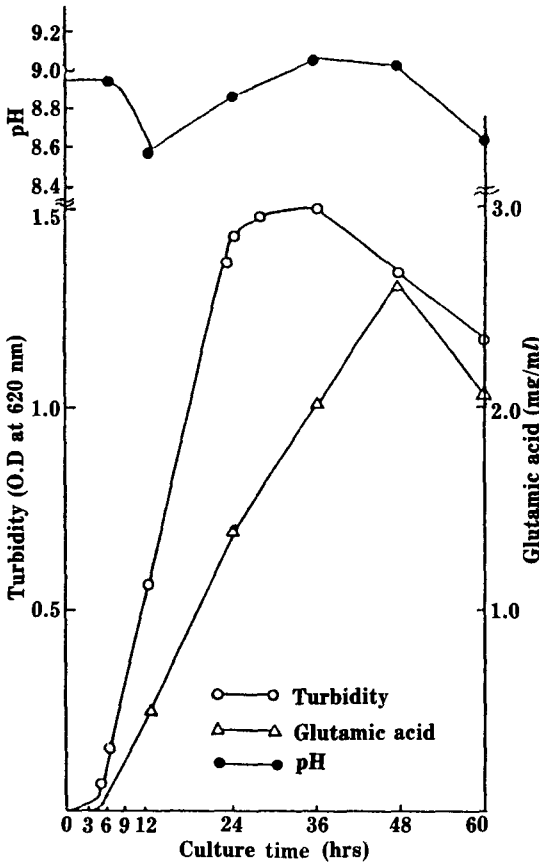


Fig. 4. The time course of the glutamic acid production.

Table 2. The effect of pH on the glutamic acid production and cell growth.

Initial pH		Final pH	Growth (O.D)	G.A. (mg/ml)
Before autoclave	After autoclave			
6.0	5.90	5.85	0.011	0
7.0	6.30	6.30	0.008	0
8.0	7.30	9.15	2.840	0.937 ± 0.471*
9.0	8.45	9.15	3.135	0.738 ± 0.242
10.0	9.50	9.30	4.055	0
11.0	10.05	9.40	3.440	0

*Values are mean ± S.D.

유기질소원으로 nutrient broth 대신 yeast extract, beef extract, polypeptone, casein, corn steep liquor, peptone 등을 0.8% 농도되게 첨가한 각각의 배지에

Table 3. The effect of fumaric acid concentration on the glutamic acid production and cell growth.

Fumaric acid conc. (%)	Growth (O.D)	G.A. (mg/ml)
0.5	1.446	0
1	1.620	2.137 ± 0.335*
2	1.512	2.818 ± 0.273
3	1.337	2.403 ± 0.406

*Values are mean ± S.D.

Table 4. The effect of carbon sources on the glutamic acid production and cell growth.

C. source (%)	Growth (O.D)	G.A. (mg/ml)
Fumaric acid	1.627	2.113
α-Ketoglutaric acid	2.841	0.128
Oxaloacetic acid	1.194	0.344
Succinic acid	1.191	0.207
Citric acid	1.723	1.133
Maleic acid	0.000	0
None	1.050	0

Table 5. The effect of organic nitrogen sources on the glutamic acid production and cell growth.

N. source (0.8%)	Growth (O.D)	G.A. (mg/ml)
Nutrient broth	1.533	2.267
Yeast extract	2.409	0.573
Beef extract	0.602	0.930
Polypeptone	0.005	0
Casein	0.008	0
Corn steep liquor	5.392	0
Peptone	0.000	0

서 균성장과 글루탐산 생성을 본 결과, nutrient broth 를 이용한 경우 글루탐산 생성이 가장 좋았다 (Table 5).

글루탐산 생성기전

Ammonium fumarate 로부터 글루탐산이 생성되는 기전을 알아보기 위하여 균체를 모아 세척하여 ammonium fumarate, α-ketoglutaric acid·NH₄⁺, α-ketoglutaric acid-aspartic acid, oxaloacetic acid-glutamic acid 가 포함된 각각의 용액에 첨가하여 반

Table 6. The pattern of amino acids in the reaction mixture of whole cell of No. 35 strain and various substrates.

Substrate	Presence of glutamic acid	Presence of aspartic acid
Ammonium fumarate	+++	+
α -Ketoglutaric acid-Ammonium	-	-
α -Ketoglutaric acid-Aspartic acid	+++	-
Oxaloacetic acid-Glutamic acid	+++	-

+++ : Significant amount; + : trace amount; - : no presence

응시킨 후 반응액 중에 glutamic acid의 생성여부, aspartic acid 소실 및 생성여부를 조사한 실험에서는 Table 6에서 보는 바와 같이 α -KGA·NH₄⁺와 aspartic acid를 포함한 반응액으로부터는 aspartic acid 모두가 없어지고 글루탐산의 생성을 볼 수 있었다. 이러한 결과로부터 글루탐산 생성기전은 ammonium fumarate가 aspartic acid로 전환되고 α -KGA로 transamination되어 글루탐산이 생성되는 것으로 추정된다. 한편 oxaloacetic acid와 glutamic acid가 함유된 반응액으로부터 aspartic acid가 생성, 축적되지는 않았다.

요 약

알칼리성 세균으로부터 ammonium fumarate를 이용하여 글루탐산을 생성할 수 있는 균주를 분리, 동정하였으며, 글루탐산 생성에 미치는 여러가지 요인들과 생성기전에 관하여 조사하였다. 선택된 균주는 형태, 성질 등에서 *Bacillus brevis*와 유사하였다. 여러가지 배양조건 중에서 2% fumaric acid에 0.8% nutrient broth를 첨가하고 암모니아수로 pH를 9로 조절한 배지에서 글루탐산 생성이 가장 좋았으며, 1% fumaric acid로부터 글루탐산으로의 전환율은 약 22%였다. 생성기전을 알아보기 위한 실험에서 whole cell을 이용하였을 때 ammonium fumarate로부터 글루탐산 생성을 볼 수 있었으며,

α -ketoglutaric acid와 aspartic acid가 포함된 반응액에서 glutamic acid 생성과 aspartic acid 소실을 동시에 볼 수 있었다. 따라서 생성기전은 fumaric acid가 aspartic acid로 전환되고, aspartic acid와 α -KGA가 반응하여 glutamic acid가 생성되는 것으로 추정된다.

참고문헌

- Horikoshi, K. and A. Teruhiko: Alkalophilic Microorganisms: A new microbial world, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 3-139 (1982).
- Konikova, A.S., M.G. Kritsman and L.M. Yakobson: *Biokhimiya*, **13**, 39 (1948).
- Housewright, R.D. and C.B. Thorne: *J. Bacteriol.*, **60**, 89 (1950).
- Sakurai, S. and S. Akabori: Japanese Patent Sho 31 (1956).
- Sakurai, S. and S. Akabori: Japanese Patent Sho 32 (1957).
- Kato, J., H. Wakamatsu, S. Kaneo and S. Hori: Japanese Patent Sho 32 (1957).
- Masuo, E. and Y. Wakizaka: In Report Presented at the Annual Meeting of Agr. Chem. Soc. Japan (Tokyo, May, 1955).
- Otsuka, S., H. Yazaki, H. Nagase and K. Sakoguchi: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**, 69 (1957).
- Snythe, C.V. and H.T. Huang: U.S. Patent 2,749,279 (1956).
- Aoki, R., Y. Kondo, T. Tsunoda and T. Ogawa: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **34**, 536 (1960).
- Ogawa, T., T. Tsunoda, R. Aoki, K. Kinoshita, S. Okumura and Y. Kondo: U.S. Patent 2,971,890 (1961).
- Kinoshita, S., K. Nakayama and S. Akita: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **22**, 176 (1958).
- Asai, T., K. Aida and K. Oishi: *J. Ferm. Assoc. Japan*, **15**, 371 (1957).
- American Society for Microbiology (ed.): *Manual of Methods for General Bacteriology.*, 409 (1981).
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 2*, Williams & Wilkins, Baltimore., 1122 (1986).

(Received September 5, 1989)