

Bacillus natto 및 *Bacillus megaterium*의 원형질체 융합에 의한 Vitamin B₁₂의 생산

진성현·박범규*·노명훈**·김동규***·류병호***
부산시 보건환경연구소, *경성대학교 종합식품연구소
(주) 비락 식품가공과, *경성대학교 식품공학과

Production of Vitamin B₁₂ by Using Protoplast Fusion between *Bacillus natto* and *Bacillus megaterium*

Sung-Hyun Jin, Bub-Gyu Park*, Myung-Hoon Roh**,
Dong-Gyu Kim*** and Beung-Ho Ryu***

The Pusan Institute of Health and Environment, Pusan

*The Institute of Food Science and Microbiology, Kyungshung University, Pusan

**Food Processing Section, Vilac Co. Ltd., Yangsan

***Department of Food Science and Technology, Kyungshung University, Pusan

Abstract

This study was conducted to breed a high vitamin B₁₂ producer by the fusion of protoplasts between *Bacillus natto* and *Bacillus megaterium*. Auxotrophic mutants of *Bacillus natto* SH-34 (thr⁻try⁻rif^r) and *Bacillus megaterium* BK-13 (arg⁻ade⁻lys⁻str^r) which showed high protease activity and production of vitamin B₁₂, respectively, were isolated for the fusion experiment. Protoplasts were induced by incubating the cells with lysis solution containing 500 µg/ml lysozyme, and the ratio of protoplast and regeneration formation were ranged from 99% and 67%, respectively. Fusion frequencies of fusants between *Bacillus natto* SH-34 and *Bacillus megaterium* BK-13 were appeared in the ranges of 1.0×10⁻⁵ under the treatment of 30% PEG 6000 containing 3% PVP. The fusant, MNF-72 showed the highest product yield of 7.85 µg/g-cell vitamin B₁₂ in production medium. For the improvement of productivity, the immobilization of fusants with sodium alginate was carried out. In batch and continuous fermentation systems, the productivity were determined to be 0.58 µg/ml.hr and 0.80 µg/ml.hr vitamin B₁₂ under optimum condition, respectively.

Key words : auxotrophic mutant, protoplast, fusant

서 론

Vitamin B₁₂는 항악성빈혈인자 및 동물단백질인자로 각종 비타민제나 사료 등에 이용되어 지고 있으며⁽¹⁾, Vitamin B₁₂를 발효생산하는 미생물은 *Corynebacterium*, *Actinobacter*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Propionibacter*, *Pseudomonas* 및 *Bacillus* 등 많은 미생물이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다⁽²⁾. Vitamin B₁₂의 발효생산에 있어서는 Demain 등⁽³⁾이 *Pseudomonas denitrificans*를 이용한 이래로 Yongsmith와 Apiraktivongse⁽⁴⁾가 *Propionibacterium freudenreichii*

를 이용하였고, Kojima 등⁽⁵⁾이 *Arthrobacter hyalinus*로 vitamin B₁₂를 생산하였으며, Yongsmith와 Chutima⁽⁶⁾는 *Propionibacterium* AKU 1251로 고정화 균체를 만들어 vitamin B₁₂의 생산성을 높인 결과를 보고한 바 있으나 *Bacillus*속의 미생물을 이용하여 vitamin B₁₂를 생산한 보고는 거의 없는 실정이다⁽⁷⁾. 그러므로 *Bacillus*속 중 특히 발효과정에서 subtilin이라는 물질의 분비로 오염이 적고, 단백질 분해력이 우수하여 발효기간이 짧은 장점을 갖고 있는 *Bacillus natto*^(8,9)와 vitamin B₁₂ 생산균주로 알려진 *Bacillus megaterium*간을 최근 많이 이용되고 있는 균주의 육종 중 한방법인 원형질체 융합^(10,11)을 행하여 vitamin B₁₂의 발효생산을 시도하고, 또한 생산성 향상의 일환으로 발효방법의 개선점을 검토할 필요성이 있다고 사료된다. 따라서 본 연구는 *Bacillus natto*와 vi-

Corresponding author : Beung-Ho Ryu, Department of Food Science and Technolgy, Kyungshung University, 110-1, Daeyeon-dong, Namgu, Pusan 608-736, Korea

tamin B₁₂ 생산균주인 *Bacillus megaterium* 간의 중간원형질 융합을 행하여 vitamin B₁₂의 생산을 위한 조건을 검토했으며, 생산성 향상을 위한 발효조건을 조사하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용한 *Bacillus natto*는 한국종균협회(KFCC)로부터 분양받았으며, vitamin B₁₂ 생산균주인 *Bacillus megaterium* IAM 1166은 일본 동경대학 응용미생물연구소에서 분양받아 각각 완전배지(Complete medium : CM)에 계대보존하여 사용하였고, vitamin B₁₂ 정량용 균주로서 *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830은 국립보건원에서 분양받아 vitamin B₁₂ inoculum medium(Difco Co.)에 계대보존하여 사용하였다.

배지 및 용액

본 실험에 사용한 배지는 완전배지(Complete medium : CM), 최소배지(Minimum medium : MM)와 원형질체의 재생에 사용한 재생용 완전배지(Regeneration complete medium : RCM), 또한 vitamin B₁₂ 생산용 배지(vitamin B₁₂ producing medium : B₁₂PM) 등 각종 배지의 조성은 Table 1과 같이 조제하여 사용하였다. 그리고 원형질체의 재생을 위한 증충용 RCM(0.7% agar) 및 각종 용액의 조성은 Kaneko 등의 방법⁽¹²⁾에 따라 제조하여 사용하였다.

조효소활성의 측정

*Bacillus natto*를 변이원으로 처리하여 단백 분해활성이 높은 변이주를 선발하기 위하여 CM배지에 배양한 균액의 조효소활성은 Casein-Folin 법⁽¹³⁾에 따라 측정하였다.

영양요구 및 억제내성주의 분리

변이원(MNNG)처리⁽¹⁴⁾를 행한 균체를 casamino acid (free vitamin) 1 mg/ml, nucleic acid mixture 10 µg/ml 및 약제로써 streptomycin 100 µg/ml, rifampicin 50 µg/ml 되게 첨가한 MM 고체배지에 도달하여 30°C에서 3~7일간 배양시켰을 때 형성한 집락을 Sherman 등의 방법⁽¹⁵⁾에 따라 영양요구성과 억제내성을 갖는 균주로 분리하였다.

원형질체의 형성과 융합

Kaneko 등의 방법⁽¹²⁾에 따라 4시간 동안 본 배양시킨 변이주를 1.5시간 동안 0.3 Unit/ml의 penicillin-G로 처리한 다음 BS(buffer sol'n)로 3회 세척하고 DS(dilution

Table 1. Composition of media (gram per liter)

Ingredient	CM ^{a)}	MM ^{b)}	RCM ^{c)}	SM ^{d)}	B ₁₂ RM ^{e)}
Bacto-beef extract	3		3		
Bacto-peptone	5		5		
Soy-peptone					3
Tryptone					17
Sucrose		0.1		0.1	
Glucose					2.5
L-Monosodium glutamate		0.05		0.05	
NaCl		0.005		0.005	5
K ₂ HPO ₄					2.5
KH ₂ PO ₄ · 12H ₂ O		0.042		0.042	
MgSO ₄ · 7H ₂ O					
CoCl ₂ · 6H ₂ O					10 ppm
Sodium succinate			135		
Biotin	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Adenine sulfate				20 mg	
Tryptophane				20 mg	
Arginine-HCl				20 mg	
Lysine				30 mg	
Threonine				200 mg	
pH	7.0	7.0	6.5	7.0	7.3

a) CM : Complete medium

b) MM : Minimum medium

c) RCM : Regeneration complete medium

d) SM : Supplemented medium

e) B₁₂PM : Vitamin B₁₂ productive medium

sol'n)에 현탁하여 동량의 LS(lysis sol'n)로 원형질체를 형성시켰다. 원형질체의 융합은 두 균주의 원형질체 10 ml(1 × 10⁸ cells/ml)씩을 혼합시켜 원심분리(4,000 rpm, 10 min, 4°C)한 후 집균한 다음 FS(fusion sol'n) 2 ml에 현탁하고 여기에 0.1 M CaCl₂ 및 3% PVP를 함유한 30% PEG 6000용액 2 ml를 가하여 30°C에서 30분간 융합을 행하였다.

융합주의 분리

융합한 후 원심분리(4,000 rpm, 10 min, room temp.)하여 FS로 2회 세척한 다음 동일한 용액으로 희석하고, RCM 배지상에 약제를 함유한 증충용 RCM(0.7% agar)와 융합균액을 잘 혼합하여 증충시킨 다음 30°C 항온기에서 7~10일간 형성된 집락의 억제내성 및 영양요구성을 검토하여 융합균주로 분리하였다.

균체의 고정화

균체의 고정화는 sodium alginate, κ-carrageenan, agar 및 polyacrylamide 등을 고정화 담체로 이용하였으며, 고정화 방법은 Ryu 등의 방법⁽¹⁶⁾에 준하였다. Bead내의 생존지수(Viability index, V.I)는 bead를 sodium tripolyphosphate 용액(100 mg/ml)에 용해시켜 Ringer 용액

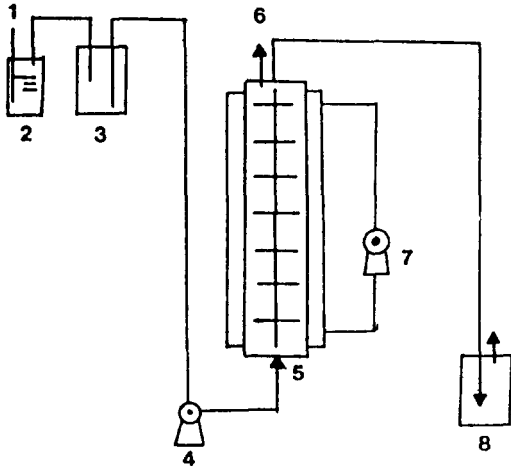


Fig. 1. Schematic diagram of continuous vitamin B₁₂ tube fermentator

- 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

으로 회석한 다음 methylene blue 염색법으로 생균수를 측정하였으며 시간경과에 따른 배지 중의 유리된 균체 수는 Haematocytometer를 이용하여 계측하였다.

균체 중의 vitamin B₁₂의 추출

균체 중에 함유된 vitamin B₁₂의 추출은 岡田 등의 방법⁽¹⁷⁾에 준하여 실험하였다.

Vitamin B₁₂의 생산성 검토

Vitamin B₁₂ 생산능이 우수한 균주를 분리할 목적으로 변이원 처리를 행하여 얻은 변이주와 이들 변이주를 융합시킨 융합주를 유리된 균체상태 및 균체고정화를 이용하여 발효를 행하였을 때의 vitamin B₁₂ 축적량을 정량하였다. 즉, 각각의 유리된 균체상태 및 고정화 bead를 30°C에서 12, 24, 36, 72, 96시간 배양한 다음 원심분리(8,000 rpm, 10 min)로 집균하여 생리식염수로 3회 세척한 후의 cell paste를 岡田 등의 방법⁽¹⁷⁾에 따라 추출한 다음 *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830을 사용하여 정량하였다.

연속식 관형발효

연속식 관형발효기는 내경 2 cm인 유리관을 이용하여 제작하였으며 규격은 총 용량 220 ml, 충전용량은 총용량의 70~80%로 고정화로 하여 고정화 세포의 파괴를 방지하기 위하여 6 cm 간격으로 stainless망을 설치하였다. 또한 관둘레에는 직경 5 cm의 경질유리자켓을 설치

Table 2. Protease activity and stringiness of the mutants of *Bacillus natto*

Strain	Phenotype	Stringiness on SM ^{a)}	Protease activity (unit/ml)
(Parent)			
<i>B. natto</i>	Wild type	+	95
(Mutant)			
<i>B. natto</i> SH-17	pro-rif ^r	+	135
<i>B. natto</i> SH-23	arg-rif ^r	+	127
<i>B. natto</i> SH-34	thr-try-rif ^r	+	250
<i>B. natto</i> SH-57	leu ⁻ -rif ^r	+	152
<i>B. natto</i> SH-72	lys-met-rif ^r	+	214
<i>B. natto</i> SH-132	arg-lys-rif ^r	+	197
<i>B. natto</i> SH-173	ade-rif ^r	+	114
<i>B. natto</i> SH-304	leu-thr-rif ^r	+	207
<i>B. natto</i> SH-461	lys-thr-rif ^r	+	174
<i>B. natto</i> SH-712	met-pro-rif ^r	+	168
<i>B. natto</i> SH-816	arg-leu-rif ^r	+	232
<i>B. natto</i> SH-1214	lys-rif ^r	+	149
<i>B. natto</i> SH-1272	try-met-rif ^r	+	191

a) Minium medium containing auxotrophic material

하고 Water pump(Haake-Gelman, type 000-5818)로서 반응기 온도를 30°C로 유지하였으며, B₁₂PM을 peristaltic pump(LKB)로 하단에서부터 일정한 유량으로 공급하면서 발효를 행하였으며 관형발효기의 장치는 Fig. 1과 같다.

결과 및 고찰

영양요구성 및 약제내성주의 분리

변이원(MNNG) 처리한 균체의 영양요구성원을 조사하기 위하여 casamino acid(free vitamin) 1 mg/ml, nucleic acid mixture 10 µg/ml 및 약제로서 streptomycin 100 µg/ml, rifampicin 50 µg/ml을 각각 첨가한 MM 고체배지에 생육한 집락을 Sherman 등의 방법⁽¹⁵⁾에 따라 영양요구성 및 약제내성주로 분리하였다.

Table 2에 나타난 바와 같이 영양요구성 및 약제내성주로 확인된 균주 중 *Bacillus natto* SH-34의 경우 SM 고체배지상에 stringiness를 형성하고 threonine, tryptophane의 영양요구성과 rifampicin 내성주이며, protease activity가 가장 우수하였으며, stringiness를 형성하지 않는 *Bacillus natto* SH-173 및 *Bacillus natto* SH-1214의 경우 protease activity가 낮았고, 전체적으로 단일 영양요구성 균주 및 stringiness를 형성하지 않는 균주의 protease activity가 다소 낮은 경향을 나타내었다.

Vitamin B₁₂ 생산균주인 *Bacillus megaterium* IAM 1166을 변이원 처리를 행하여 분리한 변이주의 영양요

Table 3. Vitamin B₁₂ production of the mutants of *B. megaterium* IAM 1166

Strain	Phenotype	Stringiness on SM ^{a)}	Vitamin B ₁₂ production (µg/g-cell)
(Parental strain)			
<i>B. megaterium</i> IAM1166	Wild type	+	3.95
(mutant)			
<i>B. megaterium</i> BK-9	met-try-str ^r	+	4.35
<i>B. megaterium</i> BK-13	arg-ade-lys-str ^r	+	4.82
<i>B. megaterium</i> BK-55	leu-str ^r	-	4.04
<i>B. megaterium</i> BK-134	pro-lys-str ^r	-	4.17
<i>B. megaterium</i> BK-174	met-thr-str ^r	+	4.59
<i>B. megaterium</i> BK-212	ade-str ^r	+	3.98

a) Minimum medium containing auxotrophic material

구성, 약제내성, stringiness 및 B₁₂PM에서 vitamin B₁₂ 생산능을 Table 3에 나타낸 바와 같이 arginine, adenine, lysine의 영양요구성을 가지며 streptomycin에 내성을 나타내는 *Bacillus megaterium* BK-13은 4.82 µg/g-cell로 가장 낮았다.

또한, SM에서 stringiness가 형성되지 않는 *Bacillus megaterium* BK-55 및 *Bacillus megaterium* BK-134의 경우 vitamin B₁₂의 생산능이 낮은 경향을 나타내었다.

원형질체의 형성과 융합

원형질체의 형성을 위한 세포벽 용해효소는 lysozyme, zymolase, cellulase⁽¹⁸⁾, β-glucuronidase⁽¹⁹⁾ 및 mutase⁽²⁰⁾ 등의 세포벽용해 효소가 사용되어지고 있으며, 삼투압 안정제에 있어서도 sucrose, sorbitol, mannitol, KCl 등이 일반적으로 사용되고 있으나 본 연구는 Kaneko 등의 방법⁽¹²⁾에 따라 lysozyme을 사용하여 변이주 *Bacillus natto* SH-34 및 *Bacillus megaterium* BK-13을 0.4 M sucrose가 함유된 LS로 원형질체를 형성시켰을 때, lysozyme 농도에 따른 원형질체 형성을 Fig. 2와 같이 나타냈다.

Bacillus natto SH-34의 경우 300 µg/ml, *Bacillus megaterium* BK-13의 경우 500 µg/ml의 lysozyme 처리시 99% 이상의 원형질체가 형성되었다. 이와 같은 결과는 Furuya⁽²¹⁾, Okanishi⁽²²⁾ 등의 보고와는 다소의 차이가 있으나 이는 균종에 따른 차이로 사료된다.

원형질체는 정상세포와 달리 세포벽이 일부 파괴되거나 세포벽에서 유리된 불안정한 상태⁽²³⁻²⁵⁾이므로 세포벽 재생에 사용되는 삼투압 안정제의 종류에 따라 재생률이 크게 달라질 수 있다. 본 실험에 사용한 삼투압 안정제로는 Kaneko 등의 방법⁽¹²⁾에 따라 sodium succinate를 RCM에 첨가하였을 때의 원형질체의 재생에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 3에 나타내었으며, 0.5 M sodium su-

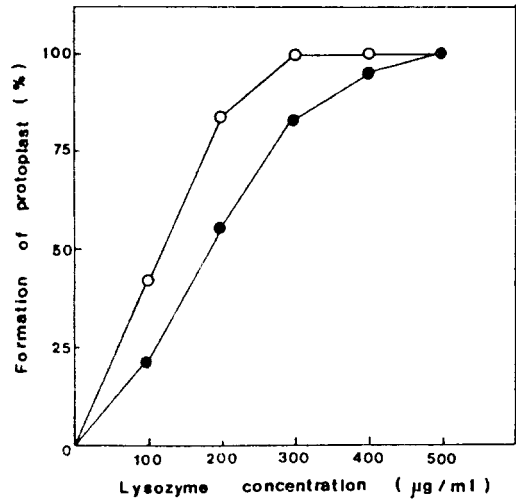


Fig. 2. Effect of lysozyme concentration on the protoplast formation *Bacillus natto* SH-34(thr⁻try⁻rif^r) and *Bacillus megaterium*

BK-13(arg⁻ade⁻lys⁻rif^r) were treated in LS at 30°C for 30 min.

○—○ : *Bacillus natto* SH-34

●—● : *Bacillus megaterium* BK-13

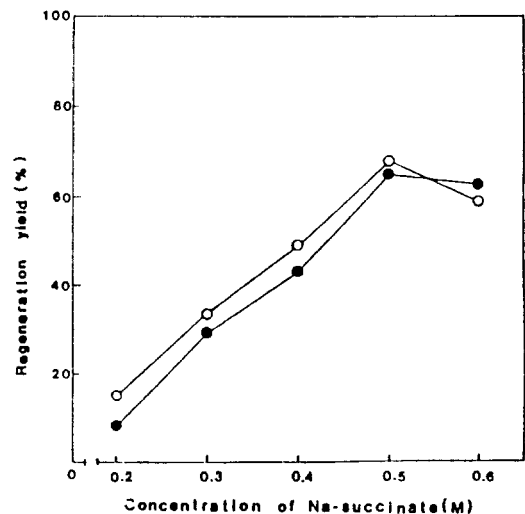


Fig. 3. Effect of Na-Succinate concentration on the regeneration

○—○ : *Bacillus natto* SH-34

●—● : *Bacillus megaterium* BK-13

ccinate를 첨가하고 0.7% ager를 함유한 RCM으로 증충하였을 때 *Bacillus natto* SH-34는 67%, *Bacillus megaterium* BK-13은 65%로 가장 높은 재생률을 나타내었다. 이는 삼투압 안정제의 농도에 있어 Akamatsu 등⁽²⁷⁾과 Kaneko 등⁽¹²⁾의 보고와는 일치하나 金 등⁽²⁷⁾ 및 申

Table 4. Fusion frequency between *B.natto* SH-34 and *B.megaterium* BK-13

Cross	Fusion frequency (str ^r rif ^r)	
	30%PFG6000	30%PEG6000 containing 3%PVP ^{a)}
<i>B. natto</i> SH-34 (thr ⁻ try ⁻ rif ^r) X		
<i>B. megaterium</i> BK-13 (arg ⁻ ade ⁻ lys ⁻ str ^r)	1.0 × 10 ⁻⁶	1.0 × 10 ⁻⁵

a) polyvinylpyrrolidone

Table 5. Fusanmt formation by protoplast between *B. natto* SH-34(thr⁻try⁻rif^r) and *B.megaterium* BK-13 (arg⁻ade⁻str^r)

Strain	Arg	Ade	Lys	Thr	Try	Str	Rif	No. of colony
(Parental strain)								
<i>B. natto</i> SH-34	+	+	+	-	-	S ^{a)}	R ^{b)}	+
<i>B. megaterium</i> K-13	-	-	-	+	+	R	S	-
(Fusant)								
	+	+	+	-	-	R	R	12
	-	-	-	+	+	R	R	9
	+	+	+	+	+	R	R	39
	-	+	+	-	-	R	R	7
	+	-	-	+	+	R	R	15
	+	+	+	+	-	R	R	3

a) Sensitive

b) Resistant

등⁽²⁸⁾의 결과와는 다소 상이하였다.

융합주의 분리

변이주 *Bacillus natto* SH-34 및 *Bacillus megaterium* BK-13을 융합시키기 위해, 융합촉진제인 30% PEG 6000을 단독으로 사용하였을 때와 융합자극제로 알려진 3% polyvinylpyrrolidone(PVP)를 첨가하였을 때의 융합빈도는 Table 4와 같다.

PEG 6000을 단독으로 사용시 융합빈도는 1.0 × 10⁻⁶으로 낮은 경향이었으나 3% PVP를 첨가함으로써 융합빈도는 1.0 × 10⁻⁵으로 다소 상승하였다. 그러나 전체적으로 융합빈도가 낮은 상태였는데 이는 변이주의 genetic marker의 차이에 기인한 것으로 사료된다.

그리고 분리한 융합주 85균주에 대한 genetic marker를 조사한 결과는 Table 5와 같다. *Bacillus natto* SH-34와 *Bacillus megaterium* BK-13간의 융합체 중 완전한 염색체 재조합이 일어난 것은 39주였으며, 나머지 46주는 친주 중의 어느 한편의 phenotype을 가지거나 불완전한 재조합이 일어난 것으로 보인다.

한편, 융합체에 의한 stringiness 및 vitamin B₁₂의 생산성을 검토한 결과는 Table 6과 같으며, vitamin B₁₂

Table 6. Stringiness and vitamin B₁₂ production of fusants

Strain	Stringiness on SM ^{a)}	Vitamin B ₁₂ production (μg/g-cell)
MNF ^{b)} -25	+	5.25
MNF-72	+	7.85
MNF-101	-	4.99
MNF-156	+	6.82
MNF-162	+	5.17

a) Minimum medium containing auxotrophic material

b) Fusant between *Bacillus natto* SH-34(thr⁻try⁻rif^r) and *Bacillus megaterium* BK-13(arg⁻ade⁻lys⁻str^r)

Table 7. Vitamin B₁₂ production of whole cells immobilized in various matrices

Wet cell (g)	Concentration of matrix for immobilization(%)	Production on whole cells(μg/g)	
0.5	Sodium alginate	2.5	8.2
0.5	Polyacrylamide	7.0	5.9
0.5	Agar	1.5	6.3
0.5	κ-Carrageenan	2.5	7.7

생산성이 우수한 융합주 MNF-25, MNF-72, MNF-101, MNF-162를 선발하였고 이 중, MNF-72가 7.85 μg/g-cell의 vitamin B₁₂를 생산하여 가장 우수한 균주로 나타났다.

균체의 고정화

균체를 고정화할 수 있는 담체의 선정을 위하여 polyacrylamide, agar, κ-carrageenan 및 sodium alginate에 vitamin B₁₂ 생산능이 뛰어난 융합주인 MNF-72를 고정화시킨 bead를 B₁₂PM에 대해 20 : 1의 비율로 500 ml/삼각플라스크에서 30°C, 24시간 진탕배양한 다음 균체를 추출하여 vitamin B₁₂를 측정한 결과는 Table 7과 같다. 2.5% sodium alginate로 고정화하여 vitamin B₁₂의 생산량을 측정한 결과 8.2 μg/g-cell의 높은 수율을 얻는데 비해 polyacrylamide 및 agar에 의한 고정화 균체에서는 vitamin B₁₂의 생산량이 낮았으나 κ-carrageenan의 경우 sodium alginate와 큰 차이점은 없었다. 이는 L-glutamic acid 생산에 있어 균체고정화 담체 κ-carrageenan이 sodium alginate보다 우수하였다는 보고⁽²⁹⁾와는 차이가 있었지만 본 실험에서는 고정화시 45°C의 온도에서 cell paste와 혼합함으로써 whole cell의 활성저하와 사멸균수의 증가에 의해 vitamin B₁₂의 생산이 낮았던 것으로 생각된다.

Vitamin B₁₂의 생산성 검토

Vitamin B₁₂ 생산성이 뛰어난 융합주 MNF-72를 이

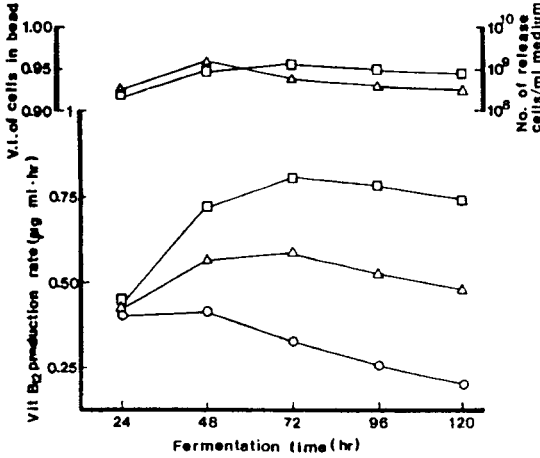


Fig. 4. Vitamin B₁₂ productivity and viability index (V. I.) in bead during fermentation

○—○ : free cell of fusant MNF-72
 △—△ : batch fermentation by immobilized system
 □—□ : continuous fermentation by tube fermentator

용하여 유리된 균체상태 및 균체고정화를 이용하여 회분식과 연속식 발효 등의 발효조건을 검토한 결과는 Fig. 4와 같다.

유리된 균체의 경우, 최적 배양시간은 48시간으로 나타났다. 더 이상의 발효시간 경과에 따른 vitamin B₁₂ 생산성은 급속히 감소하였고, 고정화 담체로서 회분식 발효의 경우 72시간 이후로는 유리된 균체와 같이 점차적으로 감소하는 경향이었는데 이는 bead내의 생균수의 감소와 기질의 감소에 따른 것으로 생각된다.

한편, 관형발효조에 의한 연속식 발효는 회분식보다 vitamin B₁₂ 생산성이 뛰어났으며, 72시간 배양시 0.80 µg/ml.hr의 높은 수율을 나타내었다.

또한 유리된 균체의 경우 발효시간의 경과에 따라 생산량의 급속한 감소와는 달리 고정화발효는 시간의 경과에 따라 점차적으로 감소하는 추세였다. 그리고 bead내의 생존지수 및 배양액 중의 유리된 균체수에 있어서 회분식의 경우 72시간에 생존지수는 0.96에서 0.94로 감소하였으나 연속식 발효의 경우 96시간까지 bead내 생존지수 및 유리된 균체수는 0.95 및 1×10^9 cells/ml로 나타났다.

이와 같은 결과는 Yongsmith 및 Chutima⁽⁶⁾가 *Propionibacterium* arl AKU 1251을 sodium alginate로 고정화하여 batch식 발효를 행했을 때 0.33 µg/ml.hr의 vitamin B₁₂을 얻었음을 보고한 결과보다 변이주 *Bacillus natto* SH-34와 *Bacillus megaterium* BK-13의 융합주인 MNF-72를 이용한 연속식 발효로서 훨씬 높은 수율을 얻을 수 있었다.

요 약

Vitamin B₁₂의 생산성을 높이기 위하여 *Bacillus natto*와 vitamin B₁₂ 생산균주로 알려진 *Bacillus megaterium* IAM 1166 균주간의 중간 원형질체 융합을 시도하였다. 변이원 처리에 의해 활성이 우수하며 genetic marker로써 thr⁻try⁻rif^r인 *Bacillus natto* SH-34 및 arg⁻ade⁻lys⁻str^r의 genetic marker를 가진 *Bacillus megaterium* BK-13을 분리하였다. 원형질체 융합을 행하기 위하여 500 µg/ml lysozyme 처리시 원형질체 형성률과 재생률은 99% 및 67%를 나타내었다. 변이주 *Bacillus natto* SH-34 및 *Bacillus megaterium* BK-13간에 1.0×10^{-5} 을 나타내었다. 융합주 MNF-72는 vitamin B₁₂ 생산용 배지에서 7.85 µg/ml의 높은 생산성을 나타내었으며, 융합주 MNF-72를 sodium alginate로 고정화를 하여 회분식 및 연속식 발효를 행하였을 때 72시간에 0.58 µg/ml.hr 및 0.80 µg/ml.hr의 vitamin B₁₂를 생산하였다.

문 헌

- Friedrich, W : *Vitamins*, Walter de Gruyter, p.839 (1988)
- Sebrell, W.H. and Haris, R.S. : *The vitamins*, second edition, 2, p.120(1968)
- Demain, A.L., Daniels, H.J., Schnable, L. and White, R.F. : Specificity of the Stimulatory Effect of Betaine on the Vitamin B₁₂ Fermentation. *Nat.*, 220(28), 1324 (1968)
- Yongsmith, B. and Apiraktivongse, P. : Vitamin B₁₂ production from soybean curd whey with *propionibacterium freudenrichii*. *J. Ferment. Technol.*, 16, 105 (1983)
- Kojima, I., Sato, H. and Fujiwara, Y. : Process for fermentatively producing vitamin B₁₂. *U.S. Patent*, 4 (119), 492(1978)
- Yongsmith, B. and Chutima, K. : Production of vitamin B₁₂ by living bacterial cells immobilized in calcium alginate gels. *J. Ferment. Technol.*, 61, 593(1983)
- 奈良 高, 鯨島 廣年 : 微生物と 醱酵生産. 公立出版株式會社, 1. 193(1979)
- Ke-Ho Lee, Hyo-Ji Lee and Moon-Kyo Chung : Studies on Chung-Kook-Jang(part I). *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, 14(3), 191(1971)
- Su-Yung Kim and Ze-Uook Kim : Studies on the changes of Protein, Peptide and Amino Acid During Natto Preparation. *Kor. Agric. Chem. Soc.*, 8, 1(1967)
- Foder, K. and L. Alfolder : Fusion of protoplast of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Sci. USA*, 73(6), 2147

- (1976)
11. Gabor, M.H. and Hotchkiss, R.D. : Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *Bacillus subtilis* protoplasts. *J. Bacteriol.*, **137**, 1346(1979)
 12. Kaneko, H. and Sakaguchi, K. : Genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, **43**(5), p. (1979)
 13. 萩原文二 : 酵素研究法, **2**, 240(1959)
 14. Lederberg, J. and Zinder, N. : Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin. *J.A.C.S.*, **70**, 4267(1948)
 15. Sherman, F., Gerald, R.F. and James, B.H. : *Methods in yeast genetics*, Cold spring Harbor Lab., New York, 5(1983)
 16. Beung-Ho Ryu, Hye-Sung Kim, Myung-Hoon Roh, Bub-Gyu Park, Jong-Soon Chung and Ki-Chul Bai : Improvement of L-lysine productivity by using cell fusion and immobilized system. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **21**(1), 154(1989)
 17. 岡田憲幸, 田部井英夫, 森勝美, 加藤清昭, 柳本正勝 : 食總研報. *Rept. Natl. Food Res. Inst.*, **43**, 121(1983)
 18. Yamada, T. and Sakaguchi, K. : Protoplast induction in *Chlorella* species. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1905(1981)
 19. Hong, S.W., Hah, Y.C. and Park, H.M. : The conidial protoplast fusion of cellulolytic fungus, *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.*, **22**, 207(1984)
 20. Stephen, E.R. and Nasin, A. : Production of protoplasts in different yeasts by mutanase. *Can. J. Microbiol.*, **27**, 550(1981)
 21. Furuya, A., Katsumata, R., Ozaki, A. and Oka, T. : Protoplast transformation of glutamate producing bacteria with plasmid DNA. *J. of Bacteriol.*, **159**, 306(1984)
 22. Okanishi, M., Suzuki, K. and Umezawa, H. : Formation and Reversion of *Streptomyces* protoplast ; Cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.*, **80**, 389(1974)
 23. Park Chung, Bun-San Lim, Moon-Jin Chun and Woo-Kap Kim : Electron Microscopic observation on protoplast fusion of *Coryneform bacteria*. *Kor. J. Microbiol.*, **23**(4), 265(1985)
 24. Hah, Y.C., Lim, H.M., Park, H.M. and Hong, S.W. : Electron microscope study of protoplasts released from the mycelium of *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Electron Microscopy*, **13**, 49(1983)
 25. Kim, H.S. and Dewey, D.Y. Ryu : Continuous glutamate production using on immobilized wholecells system. *Technol and Bioeng.*, **24**, 21(1982)
 26. Akamatsu, T. and Sekeguchii, J. : Studies on generation media for *Bacillus subtilis* protoplast. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2887(1981)
 27. Kim, Jong-Heon, Beon-Sam Lim, Se-Young Lee and Moon-Jin Chun : Frequency improvement of protoplast fusion in *Coryneform bacteria*. *Kor. J. Microbiol.*, **23**(3) 190(1985)
 28. Shin, Myoung-Gyo, Se-Young Lee, Bun-Sam Lim and Moon-Jin Chun : The protoplast formation regeneration and fusion of *Coryneform bacteria*. *Kor. J. Microbiol.*, **22**(3), 175(1984)
 29. Karube, I., Wang, Y., Tamiya, E. and Kawrai, M. : L-Glutamate production by protoplasts immobilized in carrageenan gel. *J. Biotech.*, **6**, 1(1987)
-
- (1990년 4월 13일 접수)