

*Propionibacterium shermanii*에 의한 Vitamin B₁₂ 생성에 영향을 미치는 발효조건에 관한 연구

김 지 영 · 김 공 환 · *구 양 모
아주대학교 생물공학과, *서울대학교 약학과

Study on the Fermentation Conditions Influencing the Production of Vitamin B₁₂ by *Propionibacterium shermanii*

Ji Young Kim, Kong Hwan Kim and *Yang Mo Goo

Department of Biotechnology, Ajou University

*Department of Pharmacy, Seoul National University

ABSTRACT

The effects of fermentation conditions and medium compositions on the production of vitamin B₁₂ by *Propionibacterium shermanii* IFO 12391 were studied. Changes from an anaerobic to aerobic condition and a complex to synthetic medium after 48hr resulted in a 100% increase in vitamin B₁₂ production compared to an anaerobic culture alone. Glucose, fructose and lactose were found to be equally good as a carbon source for vitamin B₁₂ production. Addition of succinate and malte to the synthetic medium with glucose as a carbon source led to an increase in vitamin B₁₂ production by 33.6% and 17.2% respectively.

서 론

Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin)는 1950년대에는 activated sludges나 항생제를 생산하는 *Streptomyces*의 배양액으로부터 얻었지만 곧 높은 생산성을 지닌 균주를 개발해 사용하게 되었고, 1973년 완전한 화학합성이 성취되었으나 약 70단계가 넘는 복잡한 공정을 필요로 하기때문에 아직까지 미생물발효를 통해 생산되어지고 있는 비타민 중의 하나이다(1, 2). 최근에는 alcohol과 hydrocarbon을 기질로 이용할 수 있는 균주가 연구되고 있지만 아직은 낮은 효율에 머물고 있으며 methanol이 그런 기질중에서 가장 각광받는 물질이다(3, 4). 연간 세계적으로 5000kg 이상이 생산되고 있으며 의학산업과 성장촉진제로서 가축의 사료에 이용되고 있다(5). 현재 직접 생산에 이용되는 균주는 *Propionibacterium shermanii*, *Propionibacterium freudenreichii* 그리고 *Pseudomonas denitrificanace* 등의 고생산성 균주로 한정되어 있다.

*Propionibacterium*을 이용한 vitamin B₁₂ 발효조건에 대한 연구과정을 보면 Makarevich등(6)은 72시간된 young culture에서 vitamin B₁₂ 합성이 가장 활성적이었다고 보고하였고, Pawelkiewicz(7)는 20mg/l의 5,6-dimethylbenzimidazole(DMB)을 배지에 첨가시켜 2mg/l의 vitamin B₁₂를 생산하였다. Simon(8)은 3~4mg/l의 vitamin B₁₂를 얻었는데 교반에 의한 통기가 vitamin B₁₂ 합성 능력을 잃게 하지만 factor B(DMB를 제외한 cobalamin의 나머지 부분)를 cobalamin으로 전환하는 능력은 유지되며 호기적 배양이 vitamin B₁₂를 분해할 수 없다고 보고하였다. Jackson(9)은 1차 배양기에서는 혐기적 조건으로, 2차 배양기에서는 microaerobic조건으로 배양해 9mg/l의 vitamin B₁₂를 생산하였고 Grant(10)는 배양이 끝난 후 aeration을 26~43시간 하여줄 때 vitamin B₁₂가 증가한다고 보고하였다. Roche(11)는 매일 당을 공급해 주고 5일째 DMB를 20mg/l 첨가해 12일째 17.6mg/l의 vitamin B₁₂를 생산하였고 Rho등(12)은 미량의 cobalt가 vitamin

B₁₂ 생산을 촉진시키며 최적 cobalt 농도는 3mg/l로 vitamin B₁₂의 양을 control 보다 3배 증진시킨다고 보고했다. 그러나 4~5mg/l의 cobalt는 균성장과 vitamin B₁₂ 생산을 감소시킨다고 보고하였다. Kaleja(13)는 methionine, threonine, glycine이 균성장을 증진시키고, DL-serine 이 vitamin B₁₂ 생성을 촉진시키며 vitamin B₁(50 µg/ml)과, biotin(50 µg/ml)이 vitamin B₁₂ 합성을 증가시킨다고 보고하였다. Vorob'eva등(14)은 30℃에서 가장 많은 vitamin B₁₂가 생산되며, 배양 전반부는(2일간) 37℃, 후반부는 30℃로 했을 때 3.15mg/l의 vitamin B₁₂을 생산할 수 있다고 보고하였다. Konovalova(15)는 500 µg/l의 panthothenic acid, 200 µg/l의 thiamin, 그리고 1 µg/l의 biotin을 포함한 합성배지에서 배양할 때 많은양의 vitamin B₁₂가 생산되는 것을 관찰하였고, Osman(16)은 glucose가 가장 좋은 탄소원이며 질소원으로는 ammomium citrate와 (NH₄)₃PO₄였다고 보고하였다. Borisova(17)는 stationary cul-ture에서 vitamin B₁₂ 합성을 산소가 방해하지 않는다고 보고하였고, Kojima등(18)은 pH를 자동으로 조절해 주면서 탄소원을 나누어 공급해 주면 처음부터 모든 탄소원을 공급해 배양해 줄 때보다 두배 이상의 vitamin B₁₂를 생산할 수 있다고 보고하였다. *P. shermanii*는 산소에 저항성을 지닌 혐기성 균주로서 *P. shermanii*를 이용 vitamin B₁₂를 생산할때는 전반 3일간의 혐기적 조건과, 후반 3일간의 호기적 조건을 사용하는데 이것은 호기적 조건이 vitamin B₁₂의 구성성분인 5,6-dimethylbenzimidazole의 생산을 촉진하기 때문이다(19).

본 연구에서는 *P. shermanii* IFO 12391를 혐기적 조건하에서 48시간 정도 배양하면 균체량이 가장 높게 되는 것이 관찰되어 호기적 조건으로는 바꾸어 주고 이후부터는 후발효에 어떤 물질이 vitamin B₁₂ 생성에 영향을 미치는지 알아보기 위한 실험을 합성배지(20, 21)를 사용하여 행하였다. 후발효에 탄소원이 미치는 영향을 먼저 조사하였고, *P. shermanii*의 대사경로 중 vitamin B₁₂가 관여하는 경로에 중간물질들인 유기산의 영향을 알아보았다.

재료 및 방법

배 지

vitamin B₁₂ 분석 배지(vitamin B₁₂ free synthetic medium)는 Difco회사의 제품을 사용했다. 발효 전반부의 복합배지는 Table 1과 같고 후반부의

Table 1. Composition for complex medium (pH 7.0)

Compounds	Composition(g/L)
Glucose	30
Yeast extract	20
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0.015

Table 2. Composition for synthetic medium (pH 7.0)

Compounds	Composition(1L)
MgSO ₄ 7H ₂ O	200 mg
FeSO ₄ 7H ₂ O	10 mg
MnSO ₄ 4H ₂ O	10 mg
CaCl ₂	10 mg
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	15 mg
ZnCl ₂	5 mg
CuSO ₄	0.5 mg
KH ₂ PO ₄	3.5 g
K ₂ HPO ₄	3.5 g
trisodium citrate	0.5 g
NH ₄ NO ₃	3 g
casamino acid	2 g
L-tryptophan	0.1 g
biotin	0.15 µg
Ca-Pantothenate	0.03 mg
glucose	10 g

사용되는 합성배지는 Table 2와 같으며 실험에 사용되는 합성배지에 들어가는 당과 유기산의 양은 배지 100ml당 1g씩 이었다.

균 주

본 실험에서 사용한 균주는 *P. shermanii* IFO(Institute for Fermentation, Osaka, Japan) 12391이었다. vitamin B₁₂ 분석용 균주는 *Lacto-bacillus leichmannii* KCTC 1058을 사용하였다.

분석 방법

균성장은 분광광도계로 600nm에서 배양액의 탁도를 측정하였다. Vitamin B₁₂의 정량 방법은 Difco 사이의 Manual과 USP의 방법을 사용하였다(22, 23).

시험 방법

균배양은 300ml 삼각플라스크에서 회전식 진탕배양기를 사용하여 30℃, 120rpm으로 하였고 혐기적

조건은 고무마개로 플라스크를 막은 후에 주사기를 이용 내부의 공기를 빼내고 질소를 주입해 만들었다. 산소가 들어가지 못하도록 질소가 충전된 풍선이 연결된 주사기를 꽂아둔 채 배양하였다. 호기적 조건은 플라스크를 면진하여 진탕배양해 만들었다. pH 조절은 sampling한 배지에 pH를 측정하고 나후 NaOH를 사용하여 pH 7이 되게 보정하고 이때 들어간 NaOH의 양을 플라스크 내에 남아있는 배지양에 맞추어 넣어 주어 보정해주었다. 배양조건변경은 Table 1의 복합배지에서 혐기적으로 48시간 배양한 후, 균을 saline buffer로 두번 세척하여 복합배지를 제거한 후 Table 2의 합성배지로 옮기고 호기적 조건을 만들어 계속 배양해 주었다. Table 1의 복합배지에서 혐기적으로 2일간 배양한 균액을 접종하였으며 접종량은 실험배지량의 10%였다.

결과 및 고찰

산소에 의한 영향

Vitamin B₁₂의 생성에 산소는 매우 중요한 요소이므로 먼저 산소의 영향에 대한 실험을 수행하였다. Fig. 1과 2는 산소가 균성장과 vitamin B₁₂생성에 미치는 영향을 본 것이다. 호기적 조건에서 배양시키면 균의 성장이 좋지 못했으며 vitamin B₁₂의 생성량도 0.4μg/ml 정도였다. 그러나 혐기적으로 배양하면 *P. shermanii*가 혐기성 균주이므로 1.6μg/ml의 vitamin B₁₂를 생산하였으며 균의 성장도 좋아졌다. 그리고 3일간 혐기적으로 배양하다 후반 3일간 호기적으로 배양해주는 일반적인 배양방법을 사용하면 vitamin B₁₂의 생성량은 2.2μg/ml로서 혐기적 배양시보다 1.4배 증가했다. 이것은 산소가 vitamin B₁₂의 구성성분인 DMB의 합성을 촉진하기 때문이다. 균의 성장을 위해서는 혐기적조건이 필요하지만 DMB의 합성을 촉진해서 vitamin B₁₂를 생산하는데에는 호기적조건이 요구되므로 전반부는 균의 성장을 위해 혐기적 조건이, 후반부는 vitamin B₁₂ 생성량을 증가시키기 위해 호기적 조건이 필요하다는 *Propionibacterium*의 특이한 배양방법이 vitamin B₁₂ 생성에 좋다는 것이 입증되었다. 균체량은 배양 48시간째 가장 높았다.

배양 방법의 변경

산소에 대한 실험을 기초로 배양방법을 바꾸어 주었는데 혐기적조건은 균주 성장에만 필요하고, vitamin B₁₂의 양을 증가시키기 위해서는 산소가 필요하

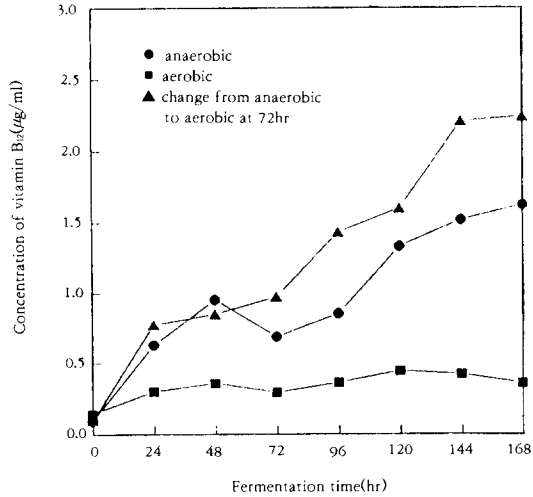


Fig. 1. Effect of oxygen on the production of vitamin B₁₂ by *Propionibacterium shermanii*

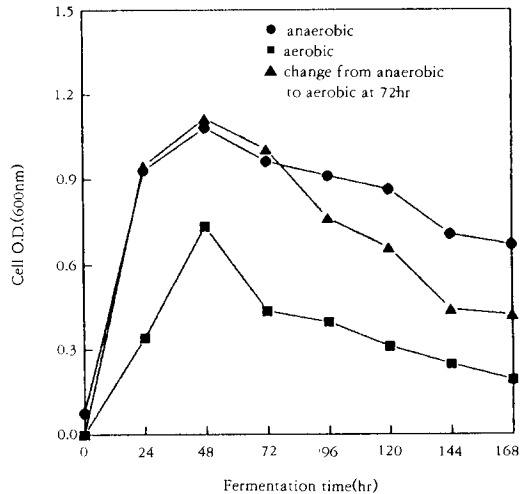


Fig. 2. Effect of oxygen on the growth of *Propionibacterium shermanii*

므로 배양 2일 즉 균체량이 가장 높을 때 호기적조건으로 바꾸어 주었고, 첨가물질의 영향에 대한 효과를 더욱 정확히 알기 위하여 복합배지를 합성배지로 바꾸어 실험을 수행하였다. Fig. 3은 혐기적조건에서 복합배지를 사용 48시간 균주를 배양한 후에 합성배지, 호기적조건으로 변경시킨 후 vitamin B₁₂의 생성과 균의 성장을 본 것이다. 실험결과 합성배지에서 혐기적 조건으로 계속 배양해주는 것보다 호기적 조건으로 배양해줄 때 vitamin B₁₂의 생산이 1.

5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 로 2배 증가하였다. vitamin B₁₂는 조건을 변경하여준 후 48시간까지 급증했으며 균체량도 12시간 이내에 최고에 이르러 발효시간을 단축할수 있었다. 이런 효과는 탄소원이 나누어 공급되어지고 균 세척시에 전반부 발효에서 생산되는 acetic acid와 propionic acid가 제거되며 산소공급에 의해서 DMB가 생성촉진되는 등의 복합적인 이유 때문인 것으로 생각되어지는데 Fig. 1의 결과를 보면 산소공급만으로는 vitamin B₁₂가 Fig. 3에서 보여지는 것처럼 급격히 증가하지 않으며 아울러 Fig. 3의 control에서처럼 배지교환에 의한 균의 product제거나 탄소원공급만으로 역시 급격한 vita-min B₁₂의

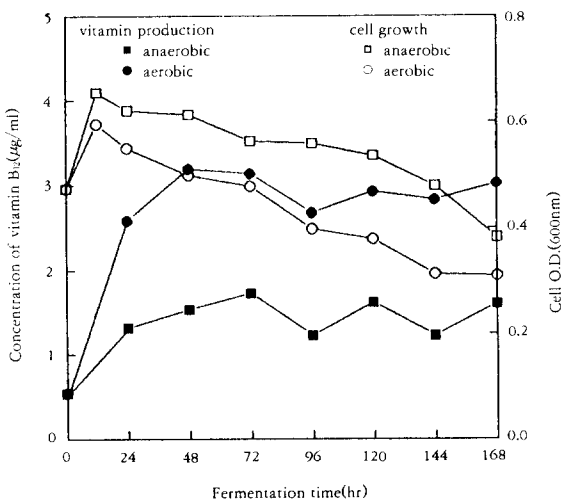


Fig. 3. Effect of oxygen on the production of vitamin B₁₂ and cell growth upon change of medium(from complex to synthetic) at 48hr

생산이 되지 않으므로 앞에 언급된 세가지요인이 복합적으로 작용한 것으로 생각된다.

탄소원에 의한 영향

복합배지에서 혐기적조건으로 48시간 배양 후 여러가지 탄소원이 존재하는 합성배지에서 호기적배양을 하였을 때 탄소원에 의한 vitamin B₁₂ 생성에 대한 영향을 살펴보았다. 실험결과(Table 3) galactose, maltose 및 sucrose는 탄소원으로 이용되지 못하며 균체의 증가가 없었다. 배양조건변경 후 3일째 vitamin B₁₂양이 최대가 되었는데 arabinose는 glucose를 탄소원으로 사용했을 때의 3.20 $\mu\text{g/ml}$ 에 비해 vitamin B₁₂ 생성이 2.27 $\mu\text{g/ml}$ 로 70.9%였고 galactose, maltose와 sucrose는 1.29, 1.70, 1.37 $\mu\text{g/ml}$ 로 40~50% 정도밖에는 생산을 못하였는데 이 양은 탄소원이 없는 합성배지에서 vitamin B₁₂ 생성량인 1.50 $\mu\text{g/ml}$ 과 거의 같은 양이었다. Osman (14)의 실험에서는 glucose가 가장 좋은 탄소원이라고 보고했지만 본 실험에서 배양조건을 변경한 후에는 mannose와 fructose, lactose도 glucose와 같이 좋은 탄소원으로 밝혀졌다. 즉 배양 3일째 vitamin B₁₂ 생성량은 glucose 3.20 $\mu\text{g/ml}$ 에 대해 lactose 2.96 $\mu\text{g/ml}$, fructose 3.23 $\mu\text{g/ml}$, mannose 2.66 $\mu\text{g/ml}$ 로서 92.5%, 100.9%, 83.1% 였다.

유기산에 의한 영향

혐기성 미생물은 기질의 산화과정으로부터 ATP를 생산하면서 NAD를 환원시킨다. 이때 환원되어 생성된 NADH는 다시 산화되어야만 계속적으로 기질을 산화해서 ATP를 생산할 수 있게 되는데 *Propionibacterium* 은 malate, fumarate, succinate

Table 3. Effect of carbon sources on the vitamin B₁₂ production and cell growth of *Propionibacterium shermanii* IFO 12391 upon change of culture conditions¹

Carbon Source	Conc. of Vitamin B ₁₂ ($\mu\text{g/ml}$) ²	Relative Vitamin B ₁₂ Production(%)	Cell Density ² (abs. $\lambda=600\text{nm}$)
none	1.50	46.9	0.410
glucose	3.20	100.0	0.793
fructose	3.23	100.9	0.846
lactose	2.96	92.5	0.778
mannose	2.66	83.1	0.819
arabinose	2.27	70.9	0.675
maltose	1.70	53.1	0.477
sucrose	1.37	42.8	0.453
galactose	1.29	40.3	0.528

1. Conditions are changed from anaerobic and complex medium to aerobic and synthetic medium after 48hr.
 2. Incubated for 3 days after condition change.

Table 4. Effect of organic acids on the vitamin B₁₂ production of *Propionibacterium shermanii* IFO 12391 upon change of culture conditions¹

Organic Acid	Conc. of Vitamin B ₁₂ (μ g/ml) ²	Relative Vitamin B ₁₂ Production(%)
glucose	3.07	100.0
glucose+succinate	4.14	134.9
glucose+malate	3.64	118.7
glucose+fumarate	3.04	99.0
fumarate	1.17	38.1
succinate	1.08	35.2
malate	1.00	32.6

1. Conditions are changed from anaerobic and complex medium to aerobic and synthtic medium after 48hr.

2. Incubated for 3 days after condition change.

등의 유기산이 관여되는 경로를 통해 NADH를 산화하게 된다. 이 과정 중에 관여되는 효소에 vitamin B₁₂가 coenzyme으로 이용되기 때문에 *Propionibacterium*은 vitamin B₁₂를 다량 합성하게 된다. 따라서 본 실험에서는 이런 유기산들이 vitamin B₁₂의 생성에 영향을 미치리라고 생각하고 후발효시 유기산이 vitamin B₁₂ 생성에 미치는 영향을 관찰하였다. 실험 결과(Table 4) malate, succinate, 그리고 fumarate는 탄소원이 없는 배지에서는 전혀 vitamin B₁₂의 생성에 영향을 미치지 못했다. 그러나 탄소원으로 glucose를 넣어주었을 때는 vitamin B₁₂의 생성량이 유기산에 의해 증가되었는데 succinate와 malate는 유기산을 넣어주지 않은 control의 vitamin B₁₂ 생성량인 3.07 μ g/ml에 대해 각각 4.14, 3.64 μ g/ml로서 1.34배 그리고 1.18배 증가되었다. 따라서 malate와 succinate가 vitamin B₁₂의 생성을 촉진시킴을 알 수있다.

요 약

P. shermanii IFO 12391을 이용 vitamin B₁₂를 생산할 때 산소의 영향은 매우 큰 것으로 나타났는데 배양 전반부는 혐기적 조건이, 후반부는 호기적 조건이 vitamin B₁₂ 생성증진에 효과적임이 밝혀졌다. 본 연구를 통하여 배양 48시간 동안은 복합배지상에서 혐기적으로 배양하다가 48시간 이후부터는 합성 배지로 바꾸고 호기적 조건으로 배양해주는 방법이 vitamin B₁₂의 생성을 증가시켰다. 이런 배양방법을 이용하여 탄소원과 유기산이 vitamin B₁₂ 생성에 미치는 영향을 알아본 결과 glucose, fructose, lactose가 좋은 탄소원이었으며 유기산 중에서는 succinate와 malate가 각각 34.9%와 18.7%의 vitamin B₁₂

생성을 촉진시켰다.

감 사

본 연구는 1991년도 한국과학기술원 생물공정 센터의 일반연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. T. H. Maugh (1973), *Science.*, **179**, 266.
2. W. Crueger and A. Crueger (1984), *Biotechnology, (A Handbook of Industrial Microbiology)*, p.187-190., Science Tech.
3. T. Kamikubo, M. Hayashi, N. Nishio and S. Nagai (1978), *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 971
4. I. Kojima, K. Sato, N. Hiroshi, and Y. Oguchi (1978), *U. S. Pat.* 4119492.
5. B.D. Lago and L. Kaplan(1981), in " *Advances in Biotechnology*", Vol **3**, p. 241-246. Proc. 6th Int. Ferm. Symp., London, Canada. Pergamon.
6. V. N. Makarevich, V. G. Makarevich, T. P. Verkhovtseva, and T N. Lazuikovaa (1958), *Mikrobioloigiya* **27**, 19 *Chem. Abstr.* **52**, 11180.
7. J. Pawelkiewicz. (1958), *Pol. Pat* 38116. *Chem. Abstr.* **4**, 7984.
8. A. Simon (1959), *Acta Microbial. Acad. Sci. Hung.* **6**, 267(in German) *Chem. Abstr.* **54**, 19836.

9. P. W. Jackson (1960), Brit. Pat 846149 *Chem. Abstr.* **55**, 6780
10. D. W. Grant (1960), U. S. Pat. 2956932 *Chem. Abstr.* **55**, 3925.
11. F.H. Roche (1961), Brit. Pat. 866488 *Chem. Abstr.* **55**, 23925.
12. S.S. Rho and D.R. Washington (1964), *Nature* **202**(4928), 212 *Chem. Abstr.* **61**, 989.
13. E. Kaleja (1964), *Mikrobiol. Protsessyi Proizu.*, Akad. Nauk Latu. SSR, Inst. Mikrobiol. 15–21(Russ). *Chem. Abstr.* **62**, 4355.
14. L. I. Vorob'eva L. F. Kozyreva (1967), *Vestbn. Mosk. Unw.*, Ser. **22**(2), 52(Russ). *Chem. Abstr.* **67**, 42549.
15. L.V. Konovalova and L. I. Vorob'evs (1969), *Biol. Mauki*, (1), 91–93(Russ) *Chem. Abstr.* **63**, 76275.
16. H. G. Osman and M. S. Chenouda (1968), *J. Chem. U. A. R.* **11**(3), 97(Russ) *Chem. Abstr.* **71**, 19727.
17. T. G. Borisova (1971), *Biol. Nauki.* **14**(7), 92 (Russ) *Chem Abstr.* **75**, 128466.
18. I. Kojima, K. Komiya, H. Sato, and Y. Oguchi (1983), *European. Pat.* 87920
19. J. Florent and L. Ninet (1979), In "*Microbial Technology*" (H. J. Pepler and D. Perman, eds), 2nd Ed., Vol. **1**, p. 479–519. Academic Press, New York.
20. D. A. Ferguson and C.S. Cummins (1978), *J. Bacteriology*, **135**, 858–867.
21. A. Menon and D. Shemin (1967), *Archives of Biochemistry and Biophysics* **121**, 304.
22. *Difco Manual* 10th Ed. (1984), Difco Laboratories.
23. U. S. Pharmacopeia National Formulary, USP XXI. Rockville ; U. S. Pharmacopeial Convention, p. 1183.