

Ashbya gossypii로부터 riboflavin 대량생산을 위한 배지 최적화와 유기식 배양

남수완 · 장형욱 · 반재구 · 김익환* · 민태익
한국과학기술연구원 유전공학연구소

Media Optimization and Fed-Batch Fermentation for Riboflavin Overproduction by *Ashbya gossypii*

Nam, Soo-Wan, Hyung-Wook Jang, Jae-Gu Pan,
Ik-Hwan Kim* and Tae-Ick Mheen

Genetic Engineering Research Institute, KIST,
P.O. Box 17, Taedok Science Town, Taejeon 305-606, Korea

Abstract — In order to maximize the riboflavin production by a mutant strain *Ashbya gossypii*, the optimization of medium and fed-batch fermentation were performed. As carbon sources, glucose and soybean oil were necessary for the riboflavin overproduction. Optimal concentrations of glucose and soybean oil in the flask cultures were found to be 3.0% and 0.5%, respectively, in a complex medium containing corn steep liquor (CSL) 1%. Among the various organic nitrogen sources tested, CSL was the most effective one both for the cell growth and riboflavin overproduction. More than 1% concentration of CSL, however, was inhibitory to the cell growth and riboflavin production. Glycine and glutamate at each 0.5% concentration stimulated the riboflavin production. The riboflavin concentration was reached to 5.4 g/l in the batch fermentation with the optimized medium. The riboflavin production could be enhanced upto 6.8 g/l through the fed-batch fermentation employing continuous feeding of glucose and yeast extract.

미생물을 이용한 비타민 B group의 생산은 단지 riboflavin(B₂)과 cyanocobalamin(B₁₂)만이 알려져 있으며, riboflavin은 1974년 미국의 Merck사에서 *Ashbya gossypii*로부터 riboflavin을 발효 생산하면서 화학 합성과 경쟁하였다. 최근에는 화학 합성과 발효가 혼합된 반합성 공정도 이용되고 있으며, 현재 발효법에 의해 riboflavin을 생산하는 회사는 세계적으로 Merck사 뿐이며 국내 생산은 전무한 단계이다(1, 2).

처음 미생물에 의한 riboflavin의 발효는 *Clostridium acetobutylicum*을 이용한 혐기적 조건에서의 발효였으나, 그 후 *Eremothecium ashbyii*와 *A. gossypii*를 이용한 호기적 발효법으로 riboflavin이 생산되

면서 미생물에 의한 riboflavin 생산이 상업적으로 가능하게 되었다(2-4). *A. gossypii*에 의한 riboflavin 생산은 산업적인 측면에서 기업의 극비에 속하므로 현재까지 발효 공정 기법에 관한 연구는 보고된 바가 거의 없다. 하지만, 일반적으로 탄소원으로 포도당, 설탕, 기름이 이용되고 질소원으로 효모 추출물, corn steep liquor(CSL), distillers soluble 등이 이용되며 부가적으로 glycine이나 무기염류가 첨가된다(5,6). 최근에 *A. gossypii*로부터 riboflavin 발효시 적절한 농도의 비타민 첨가와 agitation 및 aeration은 riboflavin 생산에 크게 영향을 주는 것으로 보고되고 있다(7, 8).

본 연구에서는 *A. gossypii* 균주를 이용하여 riboflavin 발효 생산성 향상을 위한 발효 배지의 최적화와 유기식 발효조건의 확립에 주안점을 두어 연구를 수행하였다.

Key words: Riboflavin, *Ashbya gossypii*, media optimization, fed-batch

*Corresponding author

Table 1. Compositions of culture media used for *A. gossypii* cultivation

Component (g/l)	Medium I	Medium II	Medium III	Medium IV
Glucose	2.0	3.5	5.0	70
Yeast extract	1.0		1.0	10
Bacto-peptone	1.0			
CSL		1.0	2.0	
Soybean oil		0.5		
Glycine		0.5	0.5	
Glutamate(MSG)		0.5	0.5	
NH ₄ Cl		0.2	1.0	
KH ₂ PO ₄		0.15	0.5	
MgSO ₄ ·7H ₂ O		1.0	0.15	

재료 및 방법

사용균주 및 계대방법

본 연구에서는 *Ashbya gossypii* NRRL Y-1056의 변이주인 *Ashbya gossypii* N-461을 사용하였으며, 균주 계대 및 보관배지로는 Table 1의 medium I에 agar 2%를 넣어 만든 사면배지를 사용하였다. 사면배지상의 균주는 4°C 냉장고에 보관하고 두달에 한번씩 계대하여 사용하였다.

시약 및 배지

본 연구에 사용한 배지 성분중 포도당은 선일포도당사의 공업용 함수포도당을, 대두유는 동방유량사 제품을, corn steep liquor(CSL)은 제일제당사의 것을 사용하였다. 다른 유기질소원으로 사용한 cotton seed, casitone, corn gluten meal, molasses, gelatin hydrolysate은 미국 Sigma사의 것을, Bacto-peptone, Bactosoytone, Bacto-tryptone은 미국 Difco사의 것을 사용하였으며, glycine, glutamate(MSG) 및 기타 염류는 일본 Junsei사의 것을 사용하였다.

플라스크 및 발효조 배양 방법

플라스크 배양은 500 ml baffled 플라스크에 Table 1의 medium II를 50 ml 넣고 교반속도 130 rpm(rotary type), 28°C 에서 배양하였다. 이때 접종한 세포는 사면배지에서 48시간 배양한 세포를 medium I 10 ml에 접종하여 진탕배양기(130 rpm, 28°C, rotary type)에서 24시간 배양한 세포 2%(v/v)를 접종하였다. 발효조 배양에서는 5l 발효조(Korea Fermentor Co.)에 medium III를 3l 되도록 하고 교반속도 600~800

rpm, 온도 28°C, 통기속도 0.5 vvm으로 배양하였다. 이때 접종 세포는 medium II에서 24시간 배양한 세포를 5% 접종하였다. 유가식 발효는 5l 발효조에 medium III로 세포를 24시간 배양 후, medium IV를 일정한 속도로 계속 공급하면서 배양하였다. 플라스크 배양에 사용한 배지는 멸균전 pH 6.5로 조절하여 사용하였고, 발효조에 사용한 배지는 멸균 후 공업용 암모니아수로 pH 6.5에 맞추어 사용하였다. 멸균은 autoclave에서 121°C, 1.5 bar에서 30분간 수행하였다.

Riboflavin 분석

배양액 중의 riboflavin양은 우선 배양액 중의 riboflavin 농도를 15 mg/l 이하 되게 증류수로 희석한 후 여기에 0.1 N HCl을 첨가하여 15분간 autoclave하였다. Autoclave한 희석액을 원심 분리하여(3000 rpm, 5 min) 얻은 상등액을 여과(0.25 µm)한 후 fluorometer(SFM 25, Kontron Co., Switzerland)을 이용하여 정량하였다(9).

Glucose와 Lactate 분석

배양액 중의 glucose와 lactate 정량은 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액을 적당한 농도로 희석하여 Glucose-Lactate analyzer(YSI-2300, U.S.A.)를 사용하여 정량하였다.

균체량 측정과 packed cell volume(PCV)

배양액을 원심분리하여 상등액을 제거한 후 균체를 등장액(0.9% NaCl)으로 세척하고 105°C 에서 항량에 도달할 때까지 dry oven으로 건조시킨 다음 균체량을 측정하였다. PCV는 배양액을 microwave

(금성사, Korea)로 10초간 조사하고 원심분리(3000 rpm, 20 min)하여 가라앉은 균전체의 volume을 conical tube를 이용하여 측정하였다.

유기산과 아미노산의 분석

배양액 중의 유기산 분석은 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액을 HPLC(Hitachi, Japan)로 분석하였으며, 아미노산은 상등액을 PITC(phenylisothiocyanate)를 이용한 PICO.TAG Standard Method에 의해 처리하여 HPLC(Waters, U.S.A.)로 분석하였다(10).

결과 및 고찰

탄소원의 영향

균체증식과 riboflavin 생산에 대한 포도당의 최적 농도를 조사하기 위해 medium II의 포도당 초기농도를 0%부터 10%까지 농도별로 첨가한 후 shake flask 에서 72시간 배양하였다. Table 2에서와 같이 균체증식과 탄소원에 대한 균체수율은 포도당의 농도가 2%일 때 최대값을 나타냈으며 포도당의 농도가 2%를 초과하면서 감소하였다. 특히, 포도당의 농도가 5%를 초과하면서 탄소원에 대한 riboflavin 수율 및 단위 균체당 riboflavin 생산수율은 현격히 감소하여 포도당의 농도가 7.5% 이상에서는 각각의 수율이 포도당의 농도 2%에 비하여 10배, 30배 감소하였다.

이상의 결과로부터 최적의 초기포도당 농도는 2-5%임을 알았지만 (2% 포도당 첨가 경우보다) 높은 균체증식을 위하여 3.5% 포도당 농도를 기준으로 하여 다음 실험을 수행하였다. 또한, 배지에 대두유의 첨

Table 2. Effects of glucose on cell growth and riboflavin production in the flask culture of *A. gossypii*

Glucose (%)	Dry cell weight(g/l)	Riboflavin (g/l)	$Y_{X/S}^1$ (g/g)	$Y_{P/S}^1$ (g/g)	$Y_{P/X}^1$ (g/g)
0	5.1	0.5	—	—	0.07
2.0	8.5	3.4	0.45	0.18	0.40
5.0	8.5	3.1	0.30	0.11	0.36
7.5	8.3	0.4	0.23	0.001	0.05
10.0	7.1	0.3	0.16	0.04	0.04

¹ $Y_{X/S}$: g-cell mass/g-glucose consumed
 $Y_{P/S}$: g-riboflavin produced/g-glucose consumed
 $Y_{P/X}$: g-riboflavin produced/g-cell mass
 **A. gossypii* N-461 was cultivated for 72 hrs on medium II (130 rpm, 28°C) in which only glucose concentration was varied.

가가 riboflavin 생산 증가에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있어(11) 본 연구에서도 최적의 탄소원 농도를 결정하기 위하여 초기 탄소원 농도를 3.5%로 하여 포도당과 대두유의 최적 비율을 조사하였다(Fig. 1). 균체증식은 초기 포도당 농도 3.5%일 때와 초기 포도당 농도, 대두유 농도가 각각 3.0%, 0.5%일 때 가장 높았으며 riboflavin 농도는 초기 포도당 농도, 대두유 농도가 각각 3.0%, 0.5% 일 때 가장 높았다. 또한 초기 포도당 농도가 감소할수록(대두유 농도증가) 균체 농도 및 riboflavin 농도가 감소하였다. 이는 적당한 농도의 대두유는 세포의 포자형성을 방해하거나 세포의 lysis를 방지함으로써 균체농도가 증가된 것으로 추정된다. 따라서, 세포의 원활한 성장을 위해서는 포도당의 공급이 필수적인 것으로 생각되며 소량의 대두유가 세포의 증식과 riboflavin 생산을 증진시킬 수 있음을 알았다.

질소원의 영향

배지에 첨가되는 무기 질소원보다 유기 질소원이 riboflavin 생산에 더 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있어(3, 4), riboflavin 생산에 미치는 여러 유기 질소원에 대한 영향을 조사하였다(Table 3). 균체당 riboflavin 생산수율($Y_{p/x}$)은 유기 질소원으로 CSL 1%에 gelatin hydrolysate 0.5%를 함께 첨가한 경우와 CSL

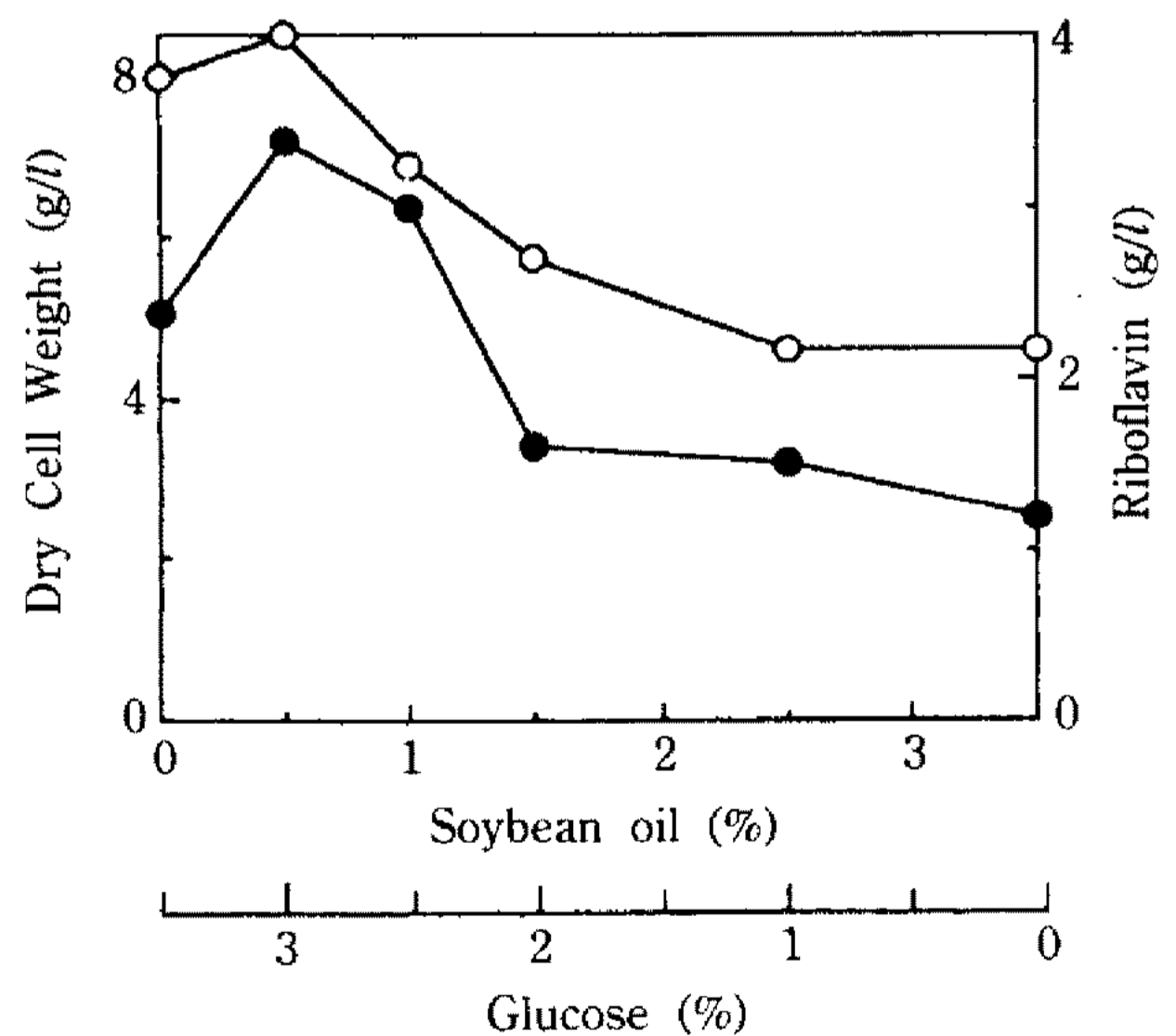


Fig. 1. Effects of glucose and soybean oil on cell growth and riboflavin production in the flask culture of *A. gossypii*.

Culture conditions are the same as in Table 2 except for glucose and soybean oil concentrations.

○, cell mass; ●, riboflavin

Table 3. Effects of organic nitrogen sources on cell growth and riboflavin production in the flask culture of *A. gossypii*

Organic nitrogen sources	Dry cell weight(g/l)	Riboflavin (g/l)	$Y_{P/X}$ (g/g)
CSL(0%)	4.2	0.33	0.08
CSL(1%)	8.1	2.80	0.35
Cotton seed(1%)	12.3	2.56	0.21
Bacto-peptone(1%)	4.9	0.15	0.03
Casitone(1%)	9.3	0.10	0.01
Corn gluten meal(1%)	1.9	0.10	0.05
Bacto-soytone(1%)	13.4	0.16	0.01
Molasses(5%)	15.2	0.60	0.03
CSL(1%)+ Gelatin hydrolysate(0.5%)	6.5	2.50	0.38
Bacto-tryptone(1%)	10.0	0.20	0.02

**A. gossypii* N-461 was cultivated for 72 hrs on medium II (130 rpm, 28°C) in which only CSL was varied with different organic nitrogen sources.

1%를 첨가한 경우에 각각 0.38, 0.35로서 다른 유기 질소원들을 사용했을 경우보다 균체의 riboflavin 생성 수율이 크게 향상되었다. Cotton seed를 사용한 경우도 상당히 높은 수율(0.21)을 보였으나 CSL을 첨가하는 경우보다 약 40% 감소한 값을 보였다. 이와같이 CSL을 사용했을 때 다른 유기 질소원에 비하여 riboflavin 생성 능력이 증가된 것은 CSL내에 세포의 생육을 활성화하는데 필요한 물질, 특히 비타민을 포함하고 있기 때문으로 생각된다(12, 13).

따라서, CSL을 최적 유기 질소원으로 결정하고, CSL 농도를 0에서부터 5%까지 변화시켜 균체증식과 riboflavin 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2). CSL 농도가 1% 이상일 때에는 균체 증식과 riboflavin 생산은 큰 영향이 없었다. 그러나 CSL 농도 1%에서 탄소원에 대한 riboflavin 생산수율($Y_{P/S}$)은 0.083으로 CSL을 배지내 첨가하지 않은 경우(0.014)에 비하여 탄소원에 대한 riboflavin 수율이 약 6배 증가하였으며, CSL 농도가 2%를 초과하면서 riboflavin의 탄소원에 대한 수율은 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다. 한편, 배지내 lactate 농도는 CSL 농도가 증가할수록 증가하였는데 그 이유는 CSL 용액내에 lactate가 혼합되어 있기 때문이다(실제 본 연구에 사용한 CSL 용액내에는 약 120 mg/ml-CSL 농도로 lactate가 함유되어 있었다). 따라서 2% 이상의 CSL 농도에서는 균체생육보다 riboflavin 생합성능이 더욱 심각히 저

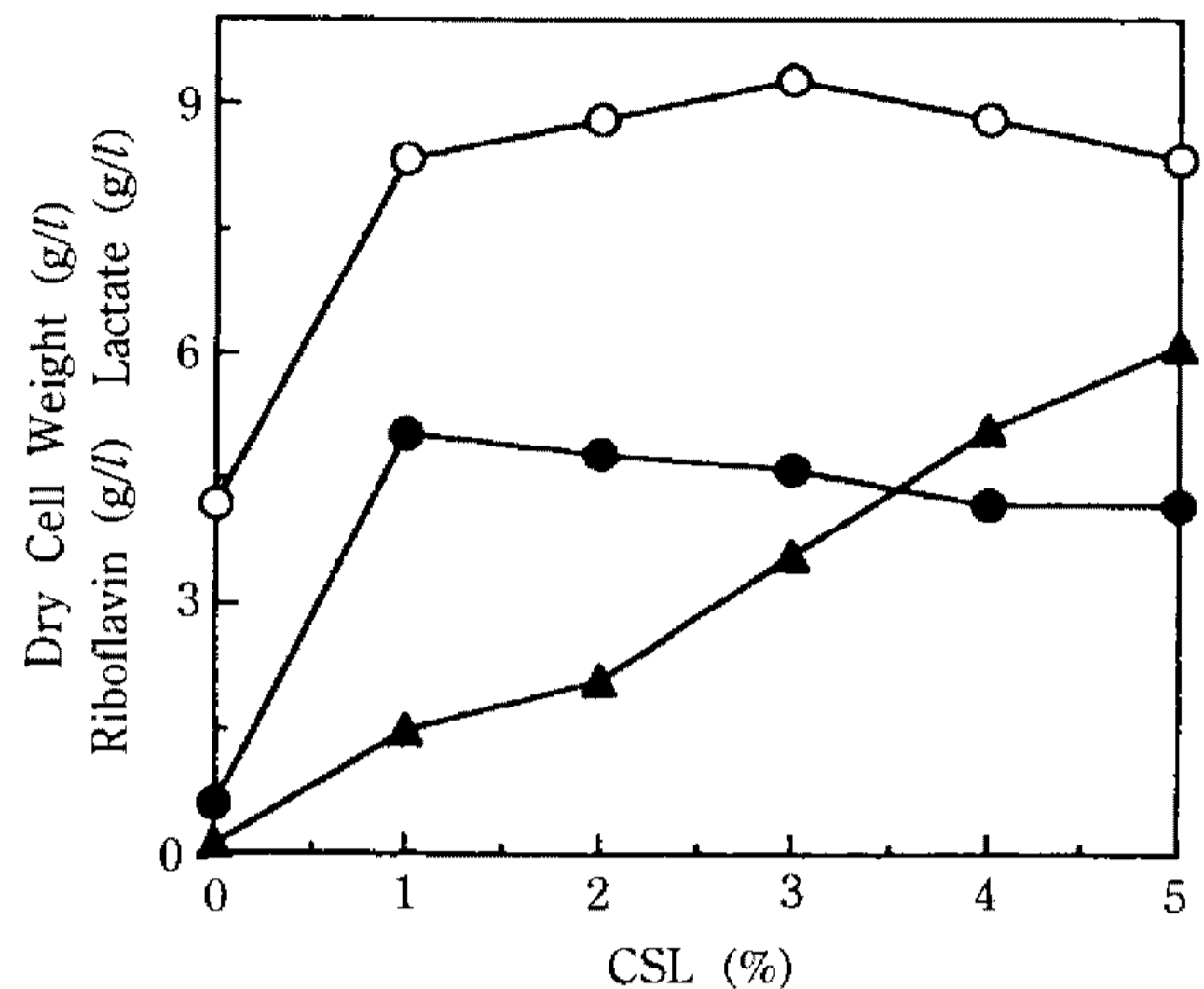


Fig. 2. Effects of corn steep liquor(CSL) on the growth and riboflavin production in the flask culture of *A. gossypii*.

Culture conditions are the same as in Table 3 except for CSL concentration.

○, cell mass; ●, riboflavin; ▲, lactate

해받음을 알 수 있으며, 이러한 저해작용과 lactate의 관계에 대하여는 추후에 더 연구되어야 할 것이다.

이상의 결과로부터 세포의 생육활성과 riboflavin 생합성능을 장기간 유지시키기 위해서는 적절한 농도로 CSL을 계속 공급하거나 CSL이 함유하고 있는 정도의 비타민 혼합액 및 다른 질소원을 함께 공급하는 유가식 배양법의 응용이 필수적인 것으로 판단된다.

Riboflavin 합성 전구체의 영향

Riboflavin 생합성의 전구체로 알려진 glycine과 glutamate(1, 5, 11)의 영향을 조사하기 위해 초기 glycine과 glutamate의 농도를 0에서부터 3%까지 변화시켜 균체 증식과 riboflavin 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Table 4에서와 같이 균체의 riboflavin 생합성능은 glycine의 초기농도가 증가 할수록 증가하여 0.5% 농도에서 단위 균체당 riboflavin 생성수율은 가장 높았으며 0.5%를 초과하면서 균체의 riboflavin 생성수율은 감소하였다. 또한 glutamate의 농도를 변화시킨 결과(Table 5), 균체의 riboflavin 생합성능은 glycine 영향과 거의 유사한 결과를 나타내었다. Glycine과 glutamate 농도가 각각 3%일 때 riboflavin 생산량은 이들을 첨가하지 않은 경우(0%)보다 낮은 수준을 보였다. 균체농도는 glycine의 경우 별 영향이 없었지만 glutamate의 경우 2%까지는 균

Table 4. Effects of glycine on cell growth and riboflavin production in the flask culture of *A. gossypii*

Glycine (%)	Dry cell weight(g/l)	Riboflavin (g/l)	$Y_{P/X}$ (g/g)
0	7.9	1.0	0.13
0.1	7.6	2.3	0.30
0.3	8.0	3.1	0.39
0.5	8.1	3.5	0.43
1.0	8.2	2.6	0.32
2.0	8.3	2.0	0.24
3.0	8.0	0.8	0.10

**A. gossypii* N-461 was cultivated for 72 hrs on medium II (130 rpm, 28°C) in which only glycine concentration was varied.

Table 5. Effects of glutamate on cell growth and riboflavin production in the flask culture of *A. gossypii*

Glycine (%)	Dry cell weight(g/l)	Riboflavin (g/l)	$Y_{P/X}$ (g/g)
0	5.6	1.0	0.18
0.1	6.2	1.3	0.21
0.3	7.4	2.8	0.38
0.5	7.8	3.5	0.45
1.0	8.3	3.0	0.36
2.0	10.4	1.0	0.01
3.0	7.6	0.5	0.07

**A. gossypii* N-461 was cultivated for 72 hrs on medium II (130 rpm, 28°C) in which only glutamate concentration was varied.

체의 증식을 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 glycine은 riboflavin 전구체로 이용되는 반면 glutamate는 riboflavin 전구체 뿐만 아니라 균체증식에도 이용된다는 것을 알 수 있다. 그러나 너무 높은 glycine과 glutamate 농도에서는 대사과정중 발생하는 암모니아와 세포벽 합성저해 또는 세포벽 기능상실 등에 기인하여 균체증식과 riboflavin 생합성 능이 감소하는 것으로 추정된다(14, 15). 따라서, 고농도의 이들 전구체는 riboflavin 생산성을 감소시키므로 적정한 농도를 유지시켜 주는 것이 바람직하다.

발효조에서의 Riboflavin 생산 발효

이상의 배지 최적화 결과로부터 조성이 결정된(균체농도를 증가시키기 위해 glucose 농도와 CSL 농도를 각각 5%, 2%로 상향조정) medium III를 이용

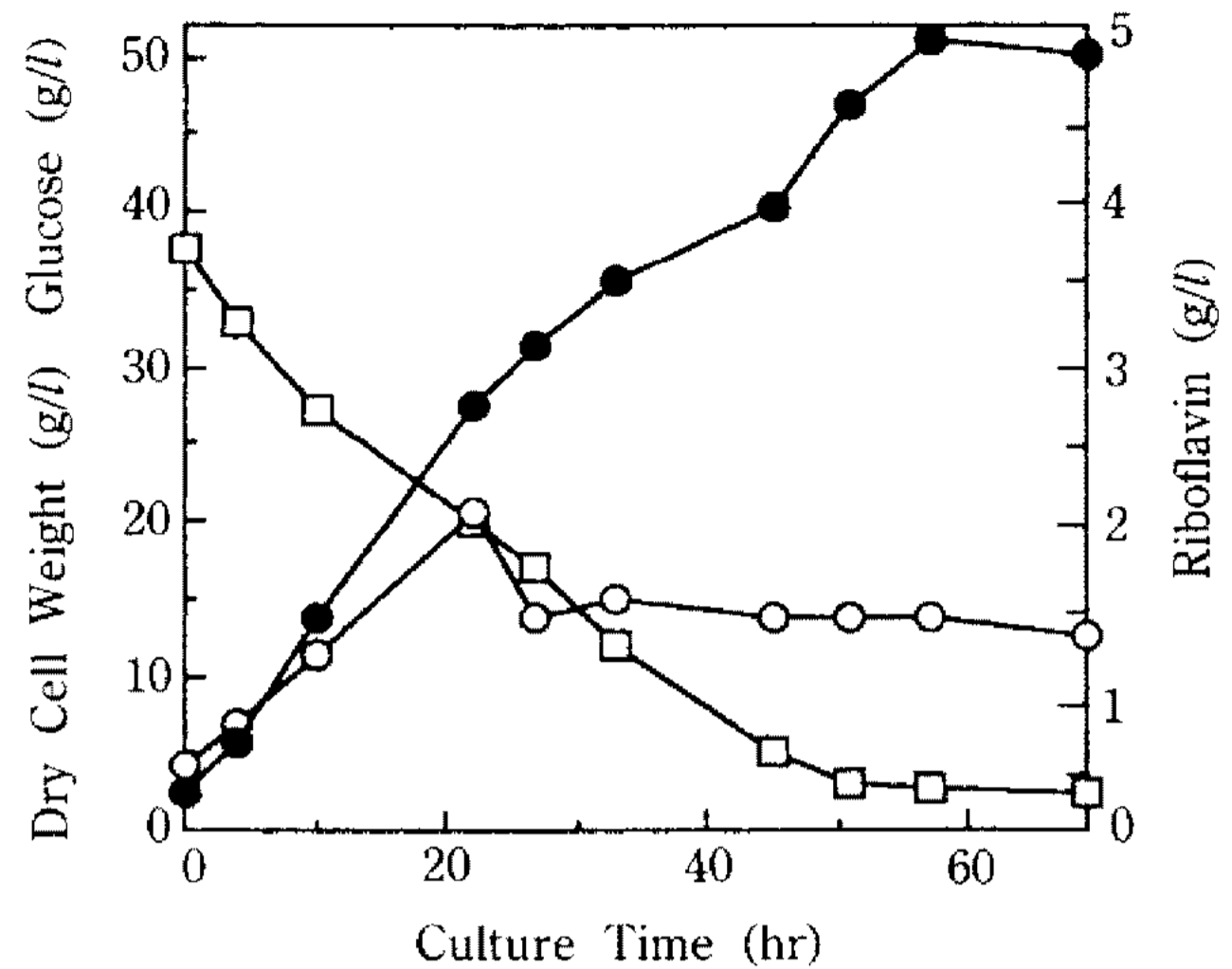


Fig. 3. Time courses of cell growth (○), riboflavin production (●), and glucose consumption (□) in the batch culture of *A. gossypii* with medium III.

하여 조업부피 3l로 회분식 발효를 수행하였다. Fig. 3에서와 같이 발효 초기에는 배양시간이 경과함에 따라 균체증식과 함께 riboflavin이 생성되었으며, riboflavin 생성 개시 24시간 후에는 균체증식이 중지되면서 riboflavin 생성속도가 둔화되기 시작하여 포도당이 고갈되는 60시간에서 5.4 g/l의 riboflavin 최종농도를 얻었다. 한편, 세포의 활성을 나타내는 단위 균체당 기질의 소모속도인 q_s (g-glucose/g-cell·hr)와 세포의 riboflavin 생성능력을 나타내는 단위 균체당 riboflavin 생성속도인 q_p (g-riboflavin/g-cell·hr)는 발효 초기 각각 0.1, 0.011이었지만 균체증식 정지와 riboflavin 생성속도의 둔화가 발생하는 24시간 이후부터는 각각 0.04, 0.003으로 현저하게 감소하였다. 이것은 riboflavin 발효시, 24시간이 경과하면 세포의 대사적 활성을 유지시킬 수 있는 영양원(비타민류)의 고갈로 인한 riboflavin 생성능력의 저하로 생각된다. 따라서 세포의 대사적 활성을 장시간 유지시킬 수 있는 영양원을 연속적으로 공급하는 유가식 배양이 riboflavin의 생산수율을 증가시키기 위한 방법으로 사용될 수 있다.

Fig. 4는 riboflavin 발효시 포도당과 yeast extract로 구성된 medium IV를 6 ml/hr(4.2 g-glucose/hr에 해당)로 연속적으로 공급하는 유가식 발효 결과를 나타낸 것으로 세포는 lysis없이 일정한 균체농도(15 g/l)를 유지하였으며, riboflavin 생성속도는 생성개시 후 100시간 동안 일정하게 유지되었다. 또한, 기질의 비소모속도인 q_s 는 riboflavin 생성개시 25시간 후부터 감소하였지만 복합배지의 연속적 공급에 의해 증가되어 riboflavin 생성속도가 둔화될 때까지 일정하게(0.070

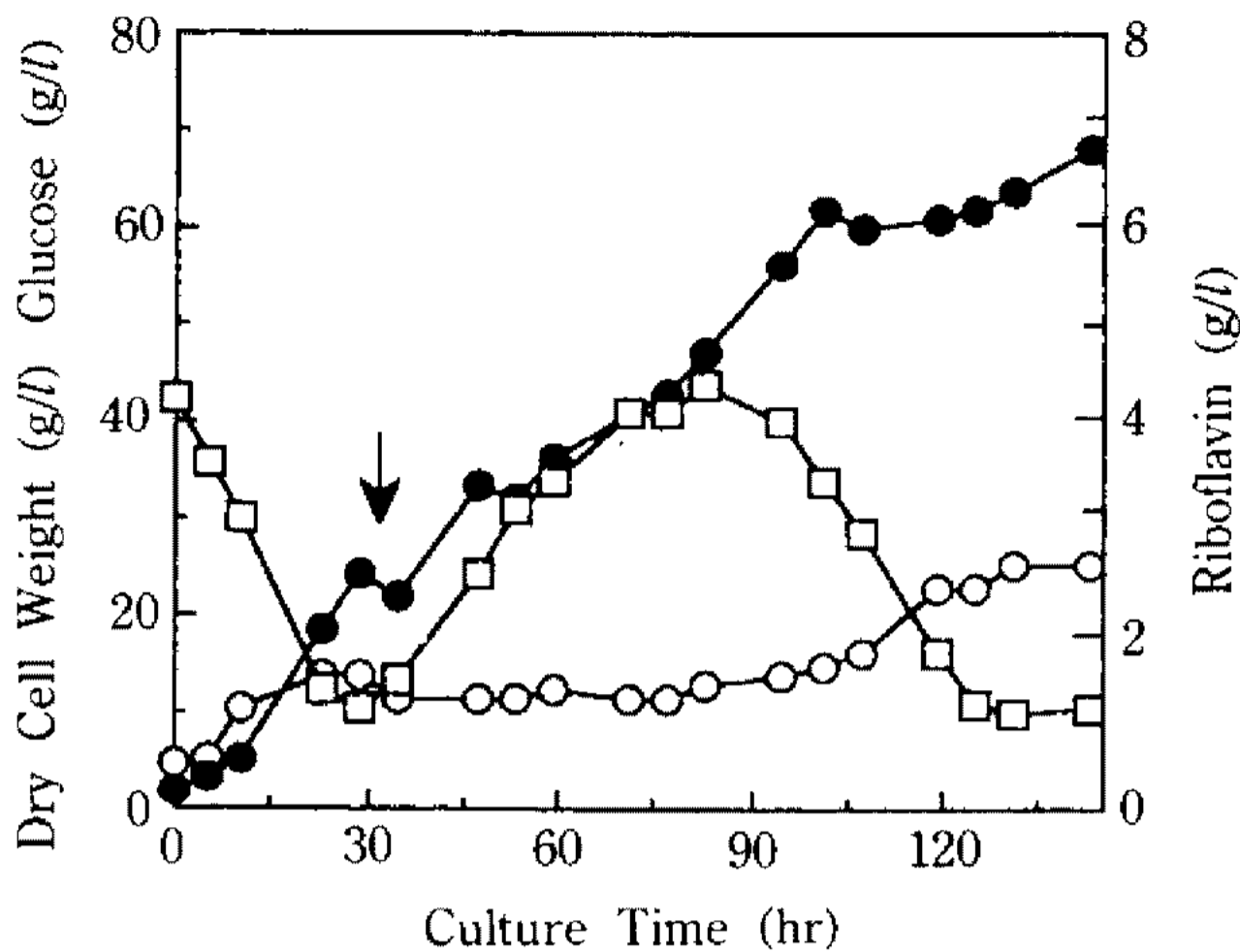


Fig. 4. Time courses of cell growth (○), riboflavin production (●) and glucose consumption (□) in the fed-batch culture of *A. gossypii*.

The arrow indicates the time when complex medium IV was fed at a flow rate of 6 ml/hr.

g/g·hr) 유지되었다. 이와 함께 riboflavin 비생성속도인 q_p 도 복합배지의 공급에 의해 발효 개시후 약 100시간까지 0.012 g/g·hr로 연장 유지되었고 100시간 후 0.002 g/g·hr로 감소하였다. 따라서 복합배지의 연속적인 첨가에 의해 riboflavin 생합성 활성을 100시간까지 장시간 유지시킬 수 있었으며 이와 함께 riboflavin 생성속도 및 생성시간이 연장되어 최종 6.8 g/l의 riboflavin을 생산할 수 있었다.

아미노산 분석결과 glycine은 다른종류의 아미노산보다 빠르게 소모되었으며, 아미노산 중 α -ketoglutarate(C_5 Unit)로 전환되는 아미노산 종류(proline, glutamate)가 빨리 소모되었다. 또한 유기산 분석 결과 propionic acid, lactic acid, iso-butyric acid 및 succinate가 발효액에 존재하였으며 이 중 iso-butyric acid는 다른 유기산에 비하여 발효시간 경과에 따라 현저하게 증가하였다(data not shown). 이러한 아미노산과 유기산이 균체증식과 riboflavin 생산에 미치는 영향은 좀더 자세한 실험에 의해 검증되어야 할 것이다.

이상의 결과로부터 포도당과 yeast extract의 연속적인 공급은 riboflavin의 수율을 증가시키지만 균체농도는 15 g/l 이상으로 증가시키지 못했다. 즉, riboflavin의 수율을 더욱 향상시키기 위해서는 균체농도의 증가가 필수적임을 알 수 있다. 이러한 사실은 *A. gossypii* 연속배양시 riboflavin 생산단계에 있는 균체를 농축하여 플라스크 배지에서 48시간 배양한 결과, 농축된 균체의 농도가 높을수록 riboflavin 수율이

증가하는 사실로부터도 알 수 있었다(data not shown).

요 약

본 연구에서는 *Ashbya gossypii*를 이용한 비타민 B2 (riboflavin) 생산에 있어서 발효배지의 최적화를 위해 탄소원(포도당과 대두유), 유기 질소원(CSL의 8종), 전구체(glycine 및 glutamate)의 영향을 검토하였다. 또한 생성균주의 고농도 배양을 통한 riboflavin 생산성 향상을 위해 유가식 배양을 수행하였다. 최적 발효배지의 탄소원은 기질 저해를 피할 수 있는 3%의 포도당과 0.5%의 대두유를 사용함으로써 riboflavin 생산수율을 증가시킬 수 있었다. 유기 질소원으로는 corn steep liquor(CSL)가 가장 좋았으며, 최적 CSL의 농도는 1%였다. Riboflavin 생합성의 전구체인 glycine과 glutamate는 배양 초기에 0.5%로 첨가하는 것이 riboflavin 생산에 가장 좋았다. 세포의 riboflavin 생합성 활성을 장기간 유지시키고 균체의 고농도 배양을 위해 포도당과 yeast extract로 구성된 복합배지를 연속적으로 공급한 유가식 발효 결과, 플라스크 배양(3.5 g/l)보다 약 100%, 발효조를 이용한 회분식 발효(5.4 g/l)보다 약 20% 향상된 6.8 g/l의 최종 riboflavin 생산농도를 얻었다. 이상의 결과로부터 탄소원, 전구체 및 필수 영양소(특히 비타민) 공급원인 CSL의 최적화된 공급 전략을 통한 유가식 발효와 고농도 균체 배양 기술의 확립으로 riboflavin 생산수율을 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Perlman, D. 1978. Vitamins, pp. 303-326. In A.H. Rose (ed.), *Economic Microbiology*, Vol. 2 (Academic Press, London).
2. Pape, H. and H.J. Rehm. 1985. Vitamin B₂, pp. 127-132. In H.J. Rehm and G. Reed (eds.) *Biotechnology*, Vol. 4 (VCH, Weinheim).
3. Pfeifer, V.F., F.W. Tanner, and D.H. Trauffer. 1950. Riboflavin by fermentation with *Ashbya gossypii*. *Ind. Eng. Chem.* 42: 1776-1781.
4. Hickey, R.J. 1953. Some nutritional requirements for biosynthesis of riboflavin by *Eremothecium ashbyii*. *J. Bacteriol.* 63: 27-33.
5. Demain, A.L. 1972. Riboflavin oversynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.* 26: 369-388.
6. Perlman, D. 1979. Microbial process for ribofla-

- vin production, pp. 521-527. In H.J. Peppler and D. Perlman (eds.), *Microbial Technology*, Vol. 1 (Academic Press, New York).
7. O'zbas, T. and T. Kutsal. 1991. Effect of growth factors on riboflavin production by *Ashbya gossypii*. *Enz. Microb. Technol.*, **13**: 594-598.
 8. O'zbas, T. and T. Kutsal. 1991. Effects of agitation and aeration rates on riboflavin fermentation by *Ashbya gossypii*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **13**: 97-105.
 9. Association of vitamin chemists. 1966. pp. 147-168. In M. Freed (ed.), *Methods of Vitamin Assay* (Interscience, New York).
 10. Choi, D.K., W.S. Ryu, B.H. Chung, S.W. Nam, and Y.H. Park. 1992. Production of L-ornithine by citrulline auxotrophic mutants of glutamate-producing bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 102-107.
 11. Lago, B. D. and L. Kaplan. 1980. Vitamin fermentation: B₂ and B₁₂, pp. 241-246. In M. Moo-Young, L. Vezina, and K. Singh (eds.), *Advances in Biotechnology*, Vol. 3 (Pergamon Press, Toronto).
 12. Cejka, A. 1984. Preparation of media, pp. 631-698. In H. Brauer (ed.), *Biotechnology*, Vol. 2 (VCH, Weinheim).
 13. Miller, T. L. and B.L. Churchill. 1986. Substrates for large scale fermentations. pp. 123-136. In A.L. Demain and N.A. Solomon (eds.), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (American Society for Microbiology, Washington D.C.).
 14. Tanaka, Y., H. Tanaka, S. Omura, K. Araki, and K. Nakayama. 1981. Magnesium phosphate stimulate microbial conversion of glycine into L-serine by release from regulation by ammonium ions. *J. Ferment. Technol.* **59**: 447-455.
 15. Hammes, W., K.N. Schleider, and O. Kandler. 1973. Mode of action of glycine on biosynthesis of peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **116**: 1029-1053.

(Received October 4, 1993)