

Achromobacter cycloclast에 의한 γ -Butyrobetaine의 L-Carnitine에로의 생물전환

이 은 구 · 이 인 영 · 박 영 훈
생명공학연구소 생물공정연구부
(접수 : 1999. 1. 7., 게재승인 : 1999. 3. 24.)

Microbial Transformation of γ -Butyrobetaine into L-Carnitine by *Achromobacter cycloclast*

Eun-Goo Lee, In-Young Lee[†], and Young-Hoon Park

Bioprocess Technology Research Division, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea
(Received : 1999. 1. 7., Accepted : 1999. 3. 4.)

We investigated optimal conditions for the microbial transformation of γ -butyrobetaine into L-carnitine by using *Achromobacter cycloclast* ATCC 21921. When the cells were cultivated in the medium containing γ -butyrobetaine as the sole carbon source for both cell growth and L-carnitine production, the maximum L-carnitine production was 2.9 g/L and the conversion yield from γ -butyrobetaine to L-carnitine was as low as 30.9 mol%. In order to enhance the L-carnitine production and the conversion yield, various carbon sources were added to the γ -butyrobetaine containing basal medium. In the medium supplemented with glycerol, L-carnitine production was as high as 4.6 g/L and the conversion yield was 88.2 mol%, showing a significant improvement in L-carnitine synthesis compared to those in the medium without glycerol. We also examined the additional effect of quaternary ammonium compounds such as betaine and choline, which are similar in structure to γ -butyrobetaine and L-carnitine. It was observed that in the presence of those quaternary ammonium compounds, both the L-carnitine production rate and the conversion yield increased. In addition, we found that cell growth was inhibited by a γ -butyrobetaine concentration of more than 3%, while L-carnitine production was efficient at the γ -butyrobetaine concentration of 2-3%. By cultivating the cells in the optimal medium containing glycerol and choline, we obtained an L-carnitine concentration of 7.2 g/L with the conversion yield of 98.7 mol% in 4 days.

Key Words : L-carnitine, microbial transformation, γ -butyrobetaine, *C. cycloclast*

서 론

L-Carnitine은 분자량이 161.2 Da인 γ -trimethyl- β -hydroxybutyrobetaine으로서 비타민 B₁₂라고도 불리 운다. 이것은 생체 내 미토콘드리아 막에서 긴사슬의 지방산을 운반하는 역할을 하며, 미토콘드리아에서 일어나는 지방산의 분해, 근육의 수축, 심장근육활동 보조, 단백질 균형, 산소섭취능 향상 등의 생리적으로 중요한 역할을 담당한다 (6). L-Carnitine은 심근경색과 혈중의 중성 지방 제거를 위한 의약품으로 사용될 뿐만 아니라, 건강 식품으로 운동선수들의 기능 향상, 스테미너 증가, 심장기능 향상, 지방 저하, 피로회복 촉진 등의 기능을 가지므로 건강 음료에 예외 없이 포함되고 있으며, 그 사용량이 꾸준히 증가하

고 있다(4, 5) 뿐만 아니라 사료에 L-carnitine을 첨가함으로써 가축의 성장속도와 영양효율이 크게 증가되어, 동물 사료 첨가제로서의 이용도 크게 기대되고 있다(3).

Carnitine의 종래 제조법은 화학합성법으로 epichlorohydrin을 출발 물질로 하여 trimethylamine을 반응시킴으로써 얻어진다 (US patent 3,135,788, 1964; US patent 4,070,394, 1978). 이러한 방법으로 생성된 carnitine은 racemic mixture 이기 때문에 동량의 D 체가 부산물로 생성되어 L 체의 수율이 낮은 문제점이 있다. 더욱이 D 체는 L-carnitine carrier protein과 L-carnitine acetyltransferase의 competitive inhibitor이기 때문에 racemic carnitine을 이용하는 것은 생리적으로 적합하지 못한 것으로 알려지고 있다 (5, 16). 근래에 Neurocrine Bioscience 사 (미국)에서 보고한 화학합성법은 (S)-3-hydroxybutyrolactone을 출발 물질로 하여 trimethylamine을 반응시키는 방법인데 (13), 이 방법은 출발 물질이 광학적으로 순수하여 L 체만 생성되나 출발 물질이 비싼 단점이 있다. 더구나 화학합성법은 반응 시 고온에서 반응시켜야 하고, 많은 양의 유기용매를 사용해야 하며, 10 단계 이상의 비교적 다단계 공정이 요구되는

[†] Corresponding Author : Bioprocess Technology Research Division, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea

Phone · 82-42-860-4489, Fax · 82-42-860-4594

e-mail: leey@krnbb4680.krnbb.re.kr

단점을 가지고 있다. 한편, 효소나 미생물을 이용하는 생물전환에 의한 방법은 상온에서 조업이 가능하며, 유기용매를 거의 사용하지 않고, 광학적으로 순수한 L 체만을 생산할 수 있다는 장점이 있기 때문에 커다란 관심을 끌고 있다 (4, 14, 17, 18). L-Carnitine 생성에 관여하는 효소로 대표적인 것들은 γ -butyrobetaine을 직접 hydroxylation에 의하여 L-carnitine으로 전환하는 γ -butyrobetaine hydroxylase (EC 1.14.11.1)와 crotonobetaine을 hydration에 의하여 L-carnitine으로 전환하는 carnitine hydratase (EC 4.2.1), 그리고 3-dehydrocarnitine을 L-carnitine으로 전환하는 L-carnitine dehydrogenase (EC 1.1.1.108)를 들 수 있다. Lindstedt 등 (10)은 1970년에 γ -butyrobetaine hydroxylase를 *Pseudomonas*로부터 분리하여 L-carnitine 생산에 이용하려는 연구를 오래 동안 수행하여 왔다. 그러나 이 효소의 경우 α -oxoglutarate 등의 보조 기질을 필요로 하고 효소의 안정성이 낮아 산업적으로 이용하는 데는 제한이 있는 것으로 알려졌다. Carnitine hydratase를 이용하는 L-carnitine 생산 방법은 독일의 Kleber 그룹에서 많은 연구를 수행하여 (5, 6, 14, 16), *Proteus* 균주를 사용하여 최대 40 g/L의 L-carnitine을 생산할 수 있는 공정을 개발하였다. 이 경우 기질로 사용하는 crotonobetaine은 D(-)-carnitine의 dehydration에 의하여 제조하는 데 원료의 제조 가격이 상대적으로 비싼 단점이 있다. 한편, L-carnitine dehydrogenase를 사용할 경우에는 NADH를 필요로 하거나 재생하는 공정을 필요로 한다. 일반적으로 효소 방법에 의한 L-carnitine 생산은 보호소의 사용과 기질의 가격, 그리고 효소의 안정성이 문제되어 현재까지는 산업적 공정으로는 이용되고 있지 않다. 상기의 단점을 극복하기 위한 방법으로 미생물 내의 단단계 대사 경로를 이용하여 값싼 기질을 사용하여 L-carnitine을 제조하는 방법이 있다. 현재, 스위스의 Lonza사에서는 전세계 L-carnitine 생산량의 50% 이상을 점유하고 있는 데, 이들은 *Agrobacterium* 균주를 사용하여 γ -butyrobetaine으로부터 L-carnitine을 생산하고 있다. 이들은 1980년대 초부터 10여년간 carnitine 생산에 집중적인 투자를 하여 1983년 수백 mg/L로 생산하던 carnitine을 90년대 초에는 연속식 재순환 반응기에서 60 g/L의 고생산성으로 L-carnitine을 생산할 수 있는 공정을 개발하였다고 보고하였다 (2, 7, 8).

L-Carnitine의 생산방법은 이 외에도 racemic mixture의 분리, 광학선택적 환원 또는 수화 (enantioselective reduction 또는 hydration)에 의한 분할 등 상당히 많은 방법이 시도되고 있다 (4, 5, 19). 그럼에도 불구하고, 가능한 방법들은 대부분 특허로 보호되어 있거나, 생산공정에 대한 자세한 내용은 거의 찾아볼 수 없는 실정이다. 또한, 외국에서는 L-carnitine의 합성에 대한 연구를 오래 전부터 지속적으로 수행하여 왔으나 국내에서는 이에 대한 연구가 거의 전무한 실정이다. 이러한 이유로 본 연구자들은 L-carnitine을 생산하는 것으로 알려진 *Achromobacter cycloclast* 균주를 사용하여 γ -butyrobetaine으로부터 L-carnitine을 생산을 위한 최적조건에 대하여 연구하였다. γ -Butyrobetaine의 L-carnitine으로의 전환수율을 높이기 위한 방법으로 에너지원으로 사용될 수 있는 당의 침가효과를 살펴보고, 대사과정에 관여하는 효소의 유도 (induction) 여부에 영향을 끼칠 수 있는 질소원의 효과를 살펴보고, 이를 토대로 고농도 생산을 꾀하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 *Achromobacter cycloclast* ATCC 21921으로 실험 전반에 걸쳐 사용하였다. 균주의 보관 및 계대를 위해서는 LB 고형배지 (20 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 10 g/L tryptone, 그리고 10 g/L agar, pH 7.0)를 사용하였다. L-Carnitine을 생산하기 위한 기본 배지 (BT 배지)의 조성은 배지 리터 당 20 g의 γ -butyrobetaine, 1.0 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g yeast extract로 하였다. L-Carnitine 생산을 조사하기 위하여 고형배지에 보관되어 있는 균을 25 ml의 LB 액체 배지를 포함한 250 ml baffled 삼각 플라스크에 접종하였다. 진탕배양기에서 27°C에서 15 시간 동안 140 rpm으로 배양한 후, BT 배지 또는 각각의 탄소원 (2%, w/v)과 질소원 (1%, w/v)을 첨가한 배지에 종균하여, 위와 동일한 조건에서 배양하면서 균체의 성장 및 L-carnitine 생산을 조사하였다. L-Carnitine 생산에 대한 기질의 유도효과를 관찰하기 위하여 이단계 플라스크 배양을 수행하였다. 이단계 배양은 20 g/L glycerol, 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L yeast extract를 포함한 배지에 γ -butyrobetaine, betaine, choline을 각각 1% (w/v)되도록 첨가하여 27°C에서 24 시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 원심 분리하여 상등액을 버리고 식염수로 균체를 세척한 후, 2%의 glycerol이 포함된 BT 배지에 균체농도가 600 nm에서 현탁도가 2.0이 되도록 동일한 양의 균체를 현탁하여, 동일 조건에서 배양하면서 균체의 성장 및 L-carnitine 생산을 조사하였다.

분석방법

균체의 농도는 Uvikon spectrophotometer 942 (Kontron Instrument, Germany)를 사용하여 600nm에서 탁도를 측정함으로써 결정하였다. L-Carnitine을 정량하기 위하여 L-carnitine acetyltransferase (Sigma)를 이용한 효소측정법을 사용하였다 (11). 반응 혼합물은 최종부피 1 ml에 50 μmole acetyl-CoA (Sigma), 1 mmole 5,5'-dithiobisnitrobenzoate (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5), 10 unit L-carnitine acetyltransferase, 그리고 분석 시료로 구성되었다. 37°C에서 15분간 반응시킨 후 412nm에서 흡광도를 측정하였다. 정량 분석을 위하여 Sigma로부터 구입한 L-carnitine (순도 98%)을 사용하여 분석한 검량선과 비교하였다. 기질로 사용한 γ -butyrobetaine은 고성능액체크로마토그래프 (UV 8010, Tosoh Co. 일본)를 사용하여 정량하였다 (12). 사용한 column은 Asahipak $\text{NH}_2\text{P50}$ (4.6 X 250 mm, Showa Denko, Japan)이며, 이동상 용액으로 acetomtril-20 mM phosphate 완충용액, pH 3.5 (75:25)를 사용하였다. 이동상의 유속을 1.0 mL/min으로 하여 205nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

결 과

γ -Butyrobetaine으로부터 L-carnitine 생합성

BT 배지에서의 γ -butyrobetaine은 L-carnitine 생성의 기질이면서 세포 성장을 위한 유일한 탄소원과 질소원으로도 사용된다. *A. cycloclast* ATCC 21921 균주를 사용하여 γ -

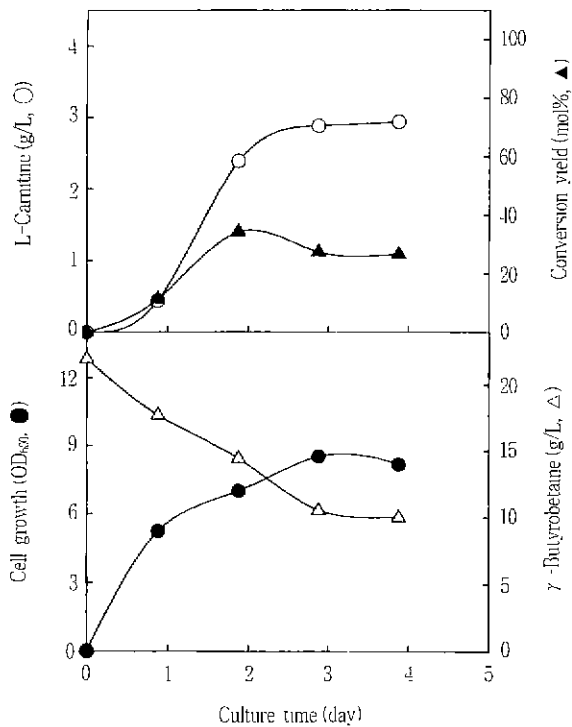


Figure 1. Microbial transformation of γ -butyrobetaine into L-carnitine. Cells were cultivated in a BT medium containing 2.0 % (w/v) γ -butyrobetaine as the sole carbon and nitrogen source.

butyrobetaine으로부터 L-carnitine 생합성에 대한 기본적인 정보를 얻기 위하여, BT 배지에서 균주를 배양하면서, 세포 성장, γ -butyrobetaine 소모, L-carnitine 생성, 그리고 γ -butyrobetaine의 L-carnitine으로의 전환수율을 조사하였다 (Figure 1). 세포 성장과 L-carnitine 생산은 배양 3일 까지 계속 증가하였으나, 그 이후로는 세포생장과 L-carnitine 생산이 증가하지 않았다. γ -Butyrobetaine 소모도 배양 3일 까지 감소하였고 더 이상 감소하지 않았는데, 배양 3일 이후에 세포의 활성이 크게 떨어졌음을 알 수 있다. 최대 L-carnitine 생성은 배양 3일에 2.9 g/L 이었다. γ -Butyrobetaine의 L-carnitine으로의 수율은 배양 전반에 걸쳐 35 mol%를 넘지 않았는데, 많은 양의 γ -butyrobetaine이 세포 성장에 사용되었음을 알 수 있다

L-Carnitine 생성에 대한 탄소원의 영향

*A. cycloclast*는 γ -butyrobetaine을 주 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 성장할 수 있기 때문에 L-carnitine 생산 수율을 증가시키기 위해서는 배지 내에 γ -butyrobetaine 이외의 다른 탄소원의 첨가가 필요하다. 따라서 L-carnitine 생산을 최적화하기 위해서, BT 배지에 각각의 탄소원을 2% (w/v) 되도록 첨가하여 여러 가지 탄소원이 세포 성장 및 L-carnitine 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Table 1에서 알 수 있듯이, 세포 생장은 탄소원을 첨가하였을 경우 첨가하지 않았을 때보다 우수하였다. Fructose와 sucrose를 첨가하였을 때 세포 생장이 가장 높았으며 탄소원을 첨가하지 않은 경우를 제외하고는 glycerol에서 가장 낮게 나타났다. L-carnitine 생산은 glycerol을 첨가한

Table 1. Effect of carbon source on cell growth and L-carnitine production.

| C-source (2%) | Cell growth (OD ₆₀₀) | pH | γ -Butyrobetaine consumed (g/L) | L-Carnitine (g/L0) | Yield (mol%) |
|---------------|----------------------------------|-----|--|--------------------|--------------|
| None | 651 | 8.4 | 10.42 | 2.90 | 30.9 |
| Fructose | 1347 | 7.8 | 8.46 | 2.44 | 32.0 |
| Galactose | 11.18 | 7.7 | 12.70 | 2.96 | 25.9 |
| Glucose | 11.73 | 7.3 | 9.83 | 2.81 | 31.7 |
| glycerol | 7.86 | 5.7 | 5.79 | 4.60 | 88.2 |
| Lactose | 9.93 | 8.4 | 8.00 | 2.42 | 33.6 |
| Maltose | 12.97 | 8.3 | 14.71 | 2.48 | 18.7 |
| Starch | 9.13 | 8.3 | 4.03 | 1.59 | 43.8 |
| Sucrose | 13.37 | 7.4 | 12.40 | 2.88 | 25.8 |

Cells were cultivated in the BT medium containing the indicated carbon source at 27°C for 96hrs Experiments were conducted in duplicate. Results are expressed as thye mean values within a deviation of not more than 10%.

경우를 제외하고는 탄소원을 첨가하더라도 크게 증가하지 않았다. Glycerol을 첨가한 경우, γ -butyrobetaine 소모량은 현저히 감소한 반면 L-carnitine 생산량은 첨가하지 않은 경우에 비하여 1.5 배 이상 증가한 4.6 g/L이었으며, γ -butyrobetaine으로부터 L-carnitine 생산 수율도 88.2 mol %로 첨가하지 않은 경우에 비하여 3배 가까이 향상되었다. 이상의 결과로부터 γ -butyrobetaine으로부터 L-carnitine을 효율적으로 생산하기 위해서는 배지 내에 glycerol을 첨가하는 것이 필수적임을 일 수 있었다.

L-Carnitine 생성에 대한 질소원의 영향

γ -Butyrobetaine은 탄소원 뿐 아니라 *A. cycloclast*에 의해 질소원으로도 이용될 수 있기 때문에 탄소원을 첨가했을 경우처럼 L-carnitine 생산을 증가시키기 위하여 추가적인 질소원의 공급이 필요할 것으로 예상되었다. 따라서 각각의 질소원을 BT 배지에 10% (w/v)되도록 첨가하여 세포 성장과 L-carnitine 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Table 2에서 알 수 있듯이, soytone과 yeast extract를 첨가하였을 때 세포 생장은 별도의 질소원을 첨가하지 않았을 때보다 크게 향상하였다. 질소원의 L-carnitine 생성에 대한 영향에 대해서는 betaine과 choline의 경우를 제외하고서는 별도의 질소원을 첨가하였을 때 첨가하지 않았을 때보다 L-carnitine 생산량은 감소하였다. 이는 질소원이 상대적으로 풍부함에 따라 γ -butyrobetaine이 세포성장에 보다 많이 사용되었거나 생성된 carnitine이 세포 성장을 위한 탄소원으로 사용되었음을 시사한다. Betaine과 choline은 L-carnitine 생산에 사용되는 기질은 아니지만 γ -butyrobetaine과 같이 quaternary ammonium compound이다. Betaine과 choline을 첨가하였을 때에는 세포 생장은 거의 증가하지 않았으나 L-carnitine 생산은 4.0 g/L 이상으로 괄목할 만큼 증가하였으며, γ -butyrobetaine의 L-carnitine으로의 전환수율도 60% 이상으로 크게 향상되었다. 이는 첨가한 betaine이나 choline이 질소원으로 사용되었다기보다는 L-carnitine의 분해를 억제하였거나 아니면 L-carnitine 생성에 관련된 효소의 증폭에 관여했을 가능성을 시사한다.

Table 2. Effect of nitrogen source on cell growth and L-carnitine production.

| N-source (1%) | Cell growth (OD ₆₀₀) | pH | γ -Butyrobetaine consumed (g/L) | L-Carnitine (g/L) | Yield (mol%) |
|---|----------------------------------|-----|--|-------------------|--------------|
| None | 6.77 | 7.5 | 10.71 | 2.94 | 30.2 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 6.02 | 8.2 | 10.52 | 1.23 | 12.9 |
| Galactose acid | 4.99 | 8.5 | 6.17 | 0.00 | 0.0 |
| Beef extract | 6.71 | 8.7 | 6.11 | 1.22 | 22.0 |
| Yeast extract | 10.50 | 8.8 | 7.73 | 1.23 | 17.5 |
| Peptone | 4.16 | 8.0 | 7.53 | 1.41 | 20.6 |
| Tryptone | 7.63 | 8.7 | 7.38 | 1.38 | 20.6 |
| Soytone | 14.50 | 8.9 | 12.80 | 0.22 | 1.9 |
| Betaine | 4.76 | 8.1 | 7.09 | 4.04 | 62.7 |
| Choline | 6.81 | 7.2 | 6.47 | 4.79 | 81.4 |

Cells were cultivated in the BT medium containing the indicated carbon source at 27°C for 96hrs. Experiments were conducted in duplicate. Results are expressed as they mean values within a deviation of not more than 10%.

Quaternary ammonium compound의 L-carnitine 생성에 대한 영향

앞의 연구 결과에서 quaternary ammonium compound 계열인 betaine과 choline 만이 L-carnitine 생성을 크게 증가시켰다. 이러한 quaternary ammonium compound가 L-carnitine 생성에 관련된 효소를 유도하는 지 여부를 알아보기 위하여, 이 단계 배양을 하였다. Betaine, choline, 그리고 γ -butyrobetaine 을 1% (w/v) 포함한 BT 배지에서 세포를 배양한 후, 동일한 양의 세포를 신선한 BT 배지에 전탁하여 L-carnitine 생성을 비교하였다. Figure 2에서 알 수 있듯이, quaternary ammonium compound를 일단계에서 첨가하였을 때, 이단계에서 L-carnitine 생산 시 지연 시간 (lag time)이 단축되었으며 최종 L-carnitine 생산량도 일단계에서 아무 것도 첨가하지 않은 경우보다 월등히 향상되었다. 이러한 경향은 choline을 사용하였을 때 더욱 두드러지게 나타났는데, control에 비하여 2배 가량 생산속도 (productivity)가 높았다. 이와 유사한 연구 결과로서, vitamin B₁₂의 생합성 시 betaine을 첨가하여 관련된 효소의 활성을 증폭시킴으로써 목적 산물의 생산량을 증가시킬 수 있었다는 보고가 있다 (1, 9). 본 연구 결과와 선행된 연구를 종합해 볼 때, *A. cycloclast*를 이용하여 L-carnitine 생합성 시 본 연구에 사용한 quaternary ammonium compound는 L-carnitine 생합성 효소를 유도하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

γ -butyrobetaine 초기농도가 L-carnitine 생성에 미치는 영향

γ -butyrobetaine이 세포 성장과 L-carnitine 생산에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 초기 농도를 0에서 4% (w/v) 까지 달린 BT 배지에서 *A. cycloclast* 균주를 배양하였다. Figure 3에 각기 다른 γ -butyrobetaine 농도에서의 시간에 따른 세포 성장과 L-carnitine 생산을 도시하였다. γ -Butyrobetaine 농도 1% 이하에서는 배양액 내 기질이 제한됨에 따라 배양 48 시간 만에 세포 생장이 정지하였고, 3% 이상에서는 성장 속도가 저

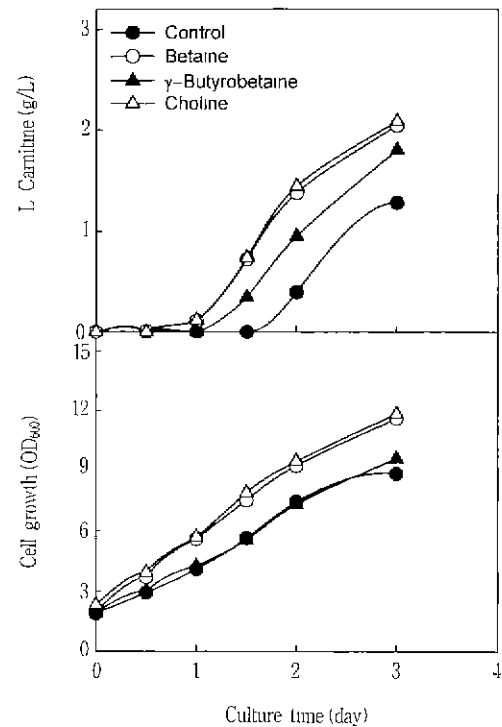


Figure 2. Effect of quaternary ammonium compounds on L-carnitine production. Cells were precultivated in a medium containing 1% of quaternary compound for 24 h at 27°C. Cells were washed with saline after harvesting, then an equal amount of cells was transferred into the BT medium containing glycerol, and further cultivated at 27°C. The Figure shows the time profile of the second stage of the culture.

하되었음을 알 수 있다. 한편, L-carnitine 생산에 있어서는 γ -butyrobetaine이 비교적 낮게 (0.5와 1.0%) 첨가된 경우 생성된 L-carnitine이 일정한 시간이 지난 후 다시 감소하는 것을 알 수 있는 바, 배양액 내 기질의 농도가 낮아지면 생성된 L-carnitine을 다시 세포 성장을 위한 탄소원으로 사용됨을 알 수 있다. L-carnitine 생성은 γ -butyrobetaine 초기 농도가 3% 일 때 120시간 배양 후 최대 5.0 g/L에 달하였다.

L-carnitine의 최적 생산

이상의 결과로부터 *A. cycloclast* 균주를 이용하여 γ -butyrobetaine으로부터 L-carnitine을 고농도로 생산하기 위해서는 배지 내에 glycerol과 choline을 첨가하는 것이 요구되고, γ -butyrobetaine 초기 농도가 3% 이내로 하는 것이 유리함을 알 수 있었다. Figure 4는 BT 배지에 γ -butyrobetaine 2%, glycerol 2%, 그리고 choline을 1% 첨가하여 *C. cycloclast* 균주를 배양하였을 때의 세포성장, γ -butyrobetaine 소모량, L-carnitine 생산, 그리고 전환수율을 나타내고 있다. 배양 후 4일 만에 세포 성장은 최대 11.0 OD₆₀₀ (세포 건조 중량 3.6 g/L에 해당함)에 달하였고, 이때 L-carnitine 생산은 7.2 g/L에 달하였다 또한 γ -butyrobetaine의 L-carnitine으로의 전환수율은 98.7%로서 γ -butyrobetaine 거의 전부가 세포 성장으로 사용되지 않고 L-carnitine 생산으로 전환되었음을 알 수 있다.

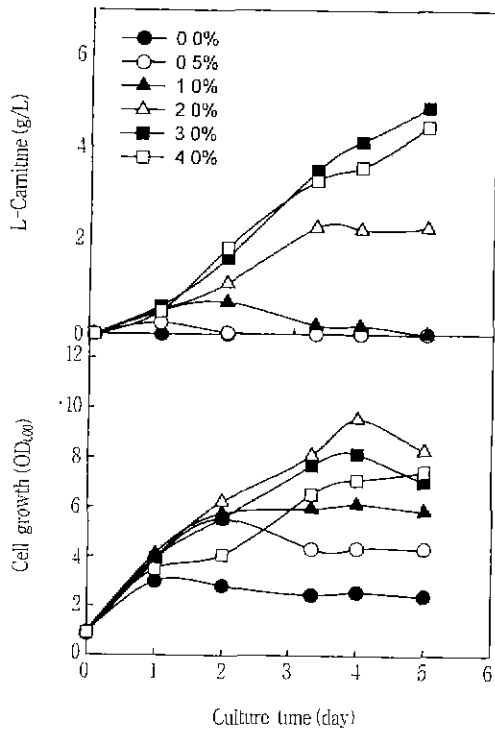


Figure 3. Effect of γ -butyrobetaine concentration on cell growth and L-carnitine production.

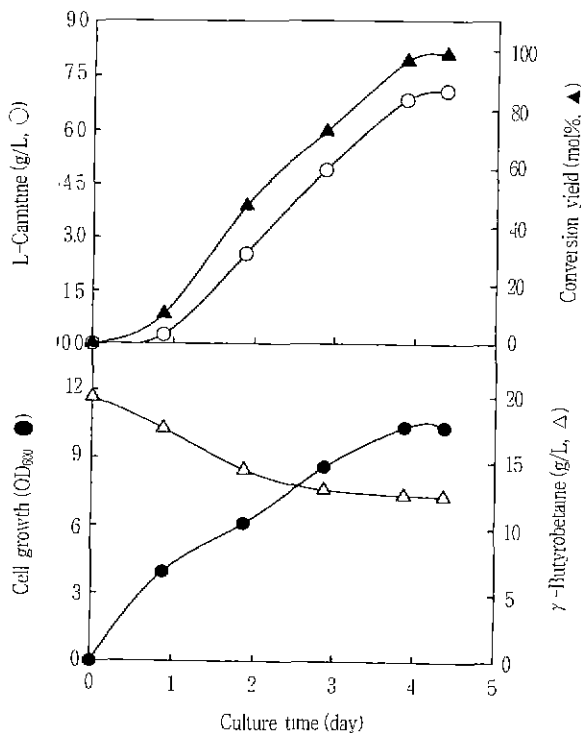


Figure 4. The time profiles of L-carnitine production, cell growth, γ -butyrobetaine consumption, and molar conversion yield. Cells were cultivated in a BT medium supplemented with 2% glycerol and 1% choline.

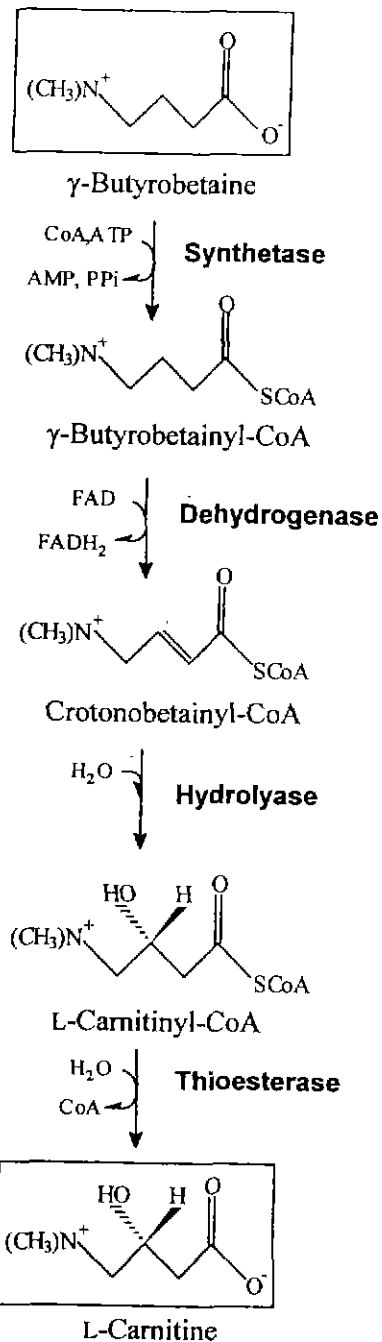


Figure 5. Pathway for L-carnitine biosynthesis from γ -butyrobetaine.

토 론

*Achromobacter cycloclast*에서의 γ -butyrobetaine으로부터 L-carnitine을 생합성하는 대사 경로에 대해서는 아직 분명하게 밝혀지지 않았지만, 일반적으로 미생물 내에서 L-carnitine은 다음과 같은 경로에 의해서 생합성되는 것으로 알려져 있다. Figure 5에 도시하였듯이, γ -butyrobetaine이 synthetase에 의하여 활성화되고 dehydrogenase에 의하여 crotonobetainyl-CoA로 전환된다. 이것은 다시 hydrolyase (hydratase라고도

함)에 의하여 베타 위치가 hydroxylation되고 thioesterase에 의하여 최종적으로 L-carnitine으로 전환된다. 결국, γ -butyrobetaine의 베타 위치를 hydroxylation하기 위하여 4 단계의 효소 반응을 필요로 하며, 이들 반응을 위하여 coenzyme A, FAD, 그리고 ATP와 같은 에너지원 또는 조효소를 필요로 한다. 일반적인 효소 반응에서는 이러한 조효소를 재생하는 것이 어려우나 미생물을 사용할 경우에는 발효과정을 통하여 에너지원과 대사과정에 필요한 보조소의 공급이 원활하게 이루어진다. 그러나 미생물을 이용하여 γ -butyrobetaine으로부터 L-carnitine 생합성 시 γ -butyrobetaine을 유일한 탄소원으로 사용하면 이것이 세포생장과 에너지원으로도 사용되기 때문에 전환율이 낮아질 수 있음을 쉽게 예상할 수 있다. 따라서 L-carnitine 생합성을 저해하지 않으면서 세포생장과 에너지원으로 이용될 수 있는 영양소의 공급이 필수적이다. 본 연구에서는 glycerol을 첨가하였을 때 L-carnitine 생성도 증가하고 전환수율도 크게 증가하였으나, 세포생장과 에너지원으로 좋은 탄소원임을 알 수 있었다. 또한, L-carnitine 생합성에 있어서 고려해야 할 중요한 점은 L-carnitine의 분해에 대한 것이다. L-carnitine은 대사 중간산물이기 때문에 γ -butyrobetaine으로부터 L-carnitine을 생성하는 미생물의 경우 L-carnitine dehydrogenase 또는 L-carnitine dehydratase 등에 의하여 L-carnitine이 분해될 수 있다 (5, 15). 본 연구에서도 γ -butyrobetaine을 유일한 탄소원으로 사용하였을 때 전환수율이 낮았고, 그림 3에서 생성된 L-carnitine이 분해됨이 이러한 사실을 뒷받침 해준다 이러한 사실로부터 γ -butyrobetaine으로부터 L-carnitine을 고농도, 고수율로 생산하기 위해서는 L-carnitine 분해능이 소실된 변이균주를 선별하는 것이 매우 중요함을 알 수 있다.

본 연구에서는 *A. cycloclast* 균주를 사용하여 γ -butyrobetaine으로부터 L-carnitine을 생산하는 조업 조건에 대한 일 반을 보여주었다. Glycerol과 choline을 함유한 배지에서 최대 생산량은 7.2 g/L로써 첨가하지 않았을 때에 비하여 2 배 이상 증가하였으며, 전환수율은 거의 100%에 달하였다. 이상의 연구 결과는 모두 플라스크 배양에서 진행된 것으로 발효조 배양을 통하여 훨씬 향상된 L-carnitine 생산이 가능할 것으로 보인다. 그 이유는, 발효조 배양에서는 산소공급을 원활하게 할 수 있어 L-carnitine 생산에 필요한 에너지 공급에 매우 유리할 것으로 기대되기 때문이다. 또한 본 연구 결과는 모두 회분식 연구 결과이었는데 반하여, γ -butyrobetaine을 배양액 내에 일정한 농도로 유지되도록 유가식 배양을 함으로써 L-carnitine을 고농도로 생산할 수 있을 것으로 기대해본다

요 약

본 연구에서는 *A. cycloclast* ATCC 21921 균주를 사용하여 γ -butyrobetaine으로부터 L-carnitine을 생산하는 최적 조건에 대한 연구를 수행하였다. 배양액 내에 γ -butyrobetaine만을 포함하였을 때는 최대 L-carnitine 생산량이 2.9 g/L 이었고 전환수율도 30.9 mol%로 매우 낮았다. L-carnitine 생산에 미치는 탄소원의 영향을 관찰한 결과 glycerol을 첨가할 경우 L-carnitine 생산량이 4.6 g/L 그리고 전환수율이 88.2 mol%로 γ -butyrobetaine만을 포함하였을 때보다 월등히 향상되었다.

Betaine, choline와 같은 quaternary ammonium compounds 들이 L-carnitine 생산에 미치는 영향을 조사해본 결과, 이들에 의하여 L-carnitine 생산 속도가 빨라지고 전환수율도 증가함을 알 수 있었다. 한편, 기질인 γ -butyrobetaine 농도 3% 이상에서 세포 생장은 저해되고 L-carnitine 생산은 기질 농도 2-3%에서 가장 우수함을 알 수 있었다. 본 연구에서 구한 최적 생산 조건, 다시 말해서 glycerol과 choline을 배양액에 포함하고 기질의 농도를 2%로 하여 플라스크에서 회분식 배양을 하였을 때, 배양 4일 만에 최대 7.2 g/L의 L-carnitine을 생산할 수 있었고 이때 γ -butyrobetaine으로부터 L-carnitine으로의 전환수율은 98.7 mol%이었다.

참 고 문 헌

1. FA, Y. H., J. P. Kusel, and A. L. Demain (1984). Dependence of betaine stimulation of vitamin B₁₂ overproduction on protein synthesis. *Appl. Env. Microbiol.*, **47**, 1067-1069.
2. Hoeks, F. W. J. M. M., H. G. Kulla, and H. P. Meyer (1992). Continuous cell-recycle process for L-carnitine production: Performance, engineering and downstream processing aspects compared with discontinuous processes. *J. Biotechnol.*, **22**, 117-128.
3. Hoeks, F. W. J. M. M., J. Muhle, L. Bohlen, and I. Psenicka (1996). Process integration aspects for the production of γ -butyrobetaine into L-carnitine. *Chem. Eng. J.*, **61**, 53-61.
4. Joeres, U. and M. R. Kula (1994). Screening for a novel enzyme hydrolysing L-carnitine amide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 599-605.
5. Jung, H., K. Jung, and H. P. Kleber (1993). Synthesis of L-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **50**, 21-44.
6. Kleber H. P. (1997). Bacterial carnitine metabolism. *FEMS Microbiol. Lett.*, **147**, 1-9.
7. Kulla, H. G. (1991). Enzymatic hydroxylation in industrial application. *Chimia*, **45**, 81-85.
8. Kulla, H. G. and P. Lehky (1993). *Microorganisms useful in the process for the production of L-carnitine*, US Patent 5,187,093.
9. Kusel, J. P., Y. H. Fa, and A. L. Demain (1984). Betaine stimulation of vitamin B₁₂ biosynthesis in *Pseudomonas denitrificans* may be mediated by an increase in activity of δ -aminolaevulinic acid synthesis. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 835-841.
10. Lindstedt, G., S. Lindstedt, and M. Tofft (1970). γ -Butyrobetaine hydroxylase from *Pseudomonas* sp. AK 1. *Biochem.*, **9**(22), 4336-4342.
11. Marquis, N. R. and I. B. Fritz (1964). Enzymological determination of free carnitine concentrations in rat tissues. *J. Lipid. Res.*, **5**, 184-187.
12. Marzo, A., N. Monti, and M. Ripamonti (1988). Application of high performance liquid chromatography to the

- analysis of propionyl-L-carnitine by a stereospecific enzyme assay, *J. Chromatogra.* **459**, 313-317.
13. McCarthy, J. R. (1995) Process for the preparation of L-carnitine, US patent 5,473,104.
 14. Obon, J. S., J. R. Maquez, M. Canovas, H. P. Kleber, and J. S. Iborra (1997). L(-)-Carnitine production with immobilized *Escherichia coli* cells in continuous reactors. *Enz. Micro. Technol.*, **21**, 531-536.
 15. Seim, H., H. Loster, R. Claus, H. P. Kleber, and E. Strack (1982), Formation of γ -butyrobetaine and trimethylamine from quaternary ammonium compounds structure-related to L-carnitine and choline by *Proteus vulgaris*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **13**, 201-205
 16. Seim, H. and H. P. Kleber (1988), Synthesis of L(-)-carnitine by hydration of crotonobetaine by enterobacter ia, *Appl Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 538-544.
 17. Shapiro, S., M. Bernardini, and C. J. Sih (1994), Biocatalytic process for the production of L(-)-carnitine from crotonobetaine and strains of *Proteus* for use in said process. US Patent 5,300,430.
 18. Yokozeki, K., S. Takahashi, and Y. Hirose (1988), Asymmetric production of L-carnitine from trans-crotonobetaine by *Proteus mirabilis*, *Agr Biol Chem.*, **52**, 2415-2421.
 19. Vandecasteele, J. P. (1980), Enzymatic synthesis of L-carnitine by reduction of an achiral precursor: the problem of reduced nicotinamide adenine dinucleotide recycling, *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 327-334.