

Brevibacterium flavum ATCC 14067과
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032의
원형질체 융합에 의한 L-Methionine의 생산

食品分析科

寶在薰·李英淑·金聲俊

L-Methionine production by protoplast fusion of *Brevi-*
bacterium flavum ATCC 14067 and *Corynebacterium*
glutamicum ATCC 13032

Food Analysis Division

Bin, J. H., Lee, Y. S., Kim, S. J.

Abstracts

This study was designed to investigate the productivity of L-methionine by the method of protoplast fusion between *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, and to improve the fermentation process by continuous fermentation using the immobilized fusant and air bubble tube reactor.

Brevibacterium flavum ATCC 14067 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 were treated with 500 μ g/ml of N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine(MNNG) to obtain mutants which were able to enhance the productivity of methionine. The mutation ratio was increased to the range of 15-18% with treatment of penicillin-G. *B. flavum* K104 (thr⁻ met⁺ Km^r

Et⁻ Sm⁺ Tm⁺ as genetic marker) and *C. glutamicum* B70 (thr⁻ hos⁺ Km⁺ Et⁻ Sm⁺ Tm⁺ as genetic marker) were isolated from these mutants. On the other hand, the lysis solution containing 500 μ g/ml of lysozyme was treated to induce protoplast fusion, and the ratios of protoplast formation and regeneration were 99% and 64-66%, respectively.

Fusion frequency between *B. flavum* K104 and *C. glutamicum* B70 showed the range of 3.5×10^{-5} in the 35% polyethylene glycol (PEG 6000) containing 3% PVP solution. The productivity of L-methionine by fusant BFCG 37 immobilized with sodium alginate was exhibited to be 0.89g/l on the batch fermentation, while 1.35g/l on the continuous fermentation at 30 $^{\circ}$ C for 72hr.

I. 緒 論

L-methionine은 영양 및 생리학적으로 중요한 역할을 하는 유황을 함유한 필수 아미노산으로서 음식물에서는 부족하기 쉽다.

L-methionine은 생체내에서 해독작용 mechanism에 관여하여 抗指肝作用과 解毒作用이 있으므로 급만성 간염 및 간경변 등의 간질환의 예방과 치료제와 약물해독제 및 아미노산수역 등의 의약품과 첨가물 및 배합사료에 주로 이용되고 있으며 그 수요는 계속 증가하고 있는 실정이다.¹⁾

현재 공업적으로 유기합성법에 의해 생산된 DL-methionine은 aminoacylase로 광학분할을 행해야 하는 결점때문에 미생물에 의한 발효생산에 관한 연구가 많이 진행되고 있다.²⁾

L-methionine을 생산하는데 이용되어지고 있는 미생물로서는 *Corynebacterium*³⁻⁵⁾, *Brevibacterium*⁶⁻⁸⁾, *Pseudomonas*⁹⁾, *Bacillus*^{10,11)}, *Achrobacter*¹²⁾, 및 *Salmonella*^{13,14)}, 등의 bacteria와 *Candida*^{15,16)}, *Saccharomyes*^{17,18)} 등의 yeast가 생산에 이용되어지는 것으로 알려져있으나 그 생산량은 아직 미미한 상태이다.

이와같은 생산성이 저조한 균주의 육종방법중 세포융합¹⁹⁻²²⁾과 균체고정화에 의한 연속 발효공정은 국내외적으로 많은 연구가 진행되어 발효생산성을 높였음을 보고하고 있다.²³⁻²⁵⁾

따라서 본 연구는 아미노산 생산균주로 알려진 *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 및 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032를 변이원 처리를 행하여 genetic marker를 부여하고 이들 균주간의 세포융합을 시도하여 L-methionine생산성이 뛰어난 균주를 분리하여 free cell 및 균체고정화 시의 발효를 행하여 생산성을 검토하였다.

II. 材料 및 方法

1. 균 주

본 실험에 사용한 균주인 *Brevibacterium flavum* ATCC 14067는 한국중균협회(KFCC)에서 분양받았으며, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032는 일본동경대학에서 분양받아 complete medium (CM)에서 재대보존하여 사용하였다.

2. 배지 및 용액

세포배양에 사용한 완전배지(complete medium ; CM), 최소배지(minimum medium ; MM), 영양요구성 균주의 보충용 배지(supplemented medium ; SM), 원형질체의 재생에 사용한 재생용 완전 배지(regeneration complete medium ; RCM) 및 L-methionine 생산용 배지(L-methionine production medium ; MPM)의 조성은 Table 1과 같다. 세포융합에 사용한 MMYE의 조성은 MM에 yeast extract를 0.1% 첨가하여 사용하였고, 중층용 RCM은 agar를 0.7% 첨가하여 사용하였으며 또한 세포융합에 사용한 각종용액은 Kaneko 등의 방법²⁰⁾에 따라 제조하여 사용하였다.

3. 시 약

본 실험에 사용한 시약으로서 streptomycin, kanamycin, penicillin-G, ethionine, selenomethionine, trifluoromethionine 및 methionine hydroxamate는 Sigma Co. 제품을, N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine(MNNG)는 Aldrich Co.의 제품을, polyethylene glycol(PEG) #6000은 Wako Co., lysozyme은 Boehringer Mannheim Co.의 제품을 사용하였으며, 고정화 담체인 sodium alginate 및 agar는 Junsei Co., polyacrylamide는 Bio-Rad Co., *k-carrageenan*은 Sigma Co. 제품을 사용하였으며 silicon antiformer emulsion(DB-110A)은 Dow Corning Co. USA의 제품을 사용하였으며 기타 시약은 특급을 사용하였다.

4. 변이주의 분리 및 농축

대수증식기(1×10^8 cells/ml)의 배양액 20ml을 8,000rpm에서 5분간 원심분리(Beckman No.J 2-21)하여 집균한 다음 Tris-buffer(pH 7.0)로 2회 세척한후 2×10^8 cells/ml되게 현탁시켜 동일량의 MNNG용액 (500 μ g/ml)을 가하여 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 변이시켰다.

이를 Tris-buffer로써 3회 세척하여 질소원을 제거하고 yeast extract를 0.1%되게 첨가한

Table 1. Composition of media.

(per liter)

Ingredient	CM	MM	RCM	SM	MPM
meat extract	10g		10g		
peptone	10g		10g		2g
glucose	20g	20g	20g	20g	100g
NaCl	5g	50mg	5g	50mg	
corn steep liguor					6g
soybean acid hydroysate					18g
(NH ₄) ₂ SO ₄		10g		10g	40g
KH ₂ PO ₄		1g		1g	
K ₂ HPO ₄		1g		1g	0.6g
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.4g		0.4g	0.4g
FeSO ₄ · 7H ₂ O		2mg		2mg	0.01g
MnSO ₄ · 6H ₂ O		2mg		2mg	
biotin		50mg		50μ/g	20μ/g
thiamine HCL	200μg	200μg	200μg	200μg	100μg
sodium succinate			135g		
L-homoserine				5g	
L-threonine				5g	
L-methionine				5g	
Antiformer					0.01ml
pH	7.0	7.0	6.5	7.0	8.1

CM : complete medium

MM : minimum medium

RCM : regeneration complete medium

SM : supplemented medium

MPM : L-methionine productive medium

MM broth에서 6시간 N-starvation시킨후 penicillin-G용액을 첨가하여 30°C에서 2시간동안 변이주를 농축시켰다.²⁰

5. 영양 요구성과 약제 및 analog 내성주의 분리

변이원(MNNG) 처리를 행한 다음 penicillin-G로 농축한 균액을 casamino acid 1mg/ml, nucleic acid 10mg/ml와 약제로써 kanamycin 100mg/ml, streptomycin 200mg/ml를 첨가한 MM에 도말하여 30℃에서 3~7일간 배양하여 생성된 colony의 영양요구성 및 약제 내성주를 검토하였으며²⁰, kase와 Nakayama의 방법²¹에 따라 methionine analog 내성주를 분리하였다.

6. 원형질체의 형성과 재생

Kaneko와 Sakaguchi의 방법²²에 따라 MMYE에 본 배양시킨 변이주를 1.5시간 동안 0.3 unit/ml의 penicillin-G로 처리한 후 Tris-buffer(pH 7.0)로 2회 세척하고, 0.4M sucrose를 osmotic stabilizer로 첨가한 희석용액에 현탁하여 lysozyme이 함유된 lysis solution를 동량첨가한 다음 33℃에서 3시간 처리하여 원형 질체를 형성시켰다.

원형질체의 형성은 현미경을 사용하여 Haematocytometer(HAWKSLEY, England)에서 계측하였으며, 한편 멸균수에 희석하여 SM plate에 도말한 다음 생성되는 colony수를 총세포수에서 감산한 수로 확인하였다.

그리고 형성된 원형질체를 희석용액에 희석하여 osmotic stabilizer로 0.4M sodium succinate가 섞인 RCM(0.7% agar)와 잘 섞어 RCM plate (1.5% agar)에 pour plate하여 30℃에서 7~10일간 배양한 후 형성되는 colong를 관찰하였다. 원형질체의 형성을 및 재생율은 다음식에 의해 계산하였다.

$$\text{원형질체의 형성율(\%)} = \frac{\text{형성된 원형질체 수}}{\text{원형질체 형성에 사용된 균수}} \times 100$$

$$\text{재생율(\%)} = \frac{\text{RCM에서 재생된 균수} - \text{원형질체가 형성 안된 균수}}{\text{원형질체 형성에 사용된 균수}} \times 100$$

7. 원형질체의 융합

두 균주의 원형질체를 동량의 섞어 원심분리(1,000rpm, 4℃)하여 균체를 회수한 다음 희석 용액으로 2회 세척하고 총량의 1/10배의 fusion solution에 재현탁시켜 polyethylene glycol (PEG) #6000용액을 9/10부피되게 첨가하여 최종농도 20~50%로 가하고 30℃에서 30분간 융합을 행하였다.

8. 융합주의 분리

융합후 원심분리(1,000rpm, 10min, 실온)하여 fusion solution으로 2회 세척한 다음 동일용

액으로 희석하여 1.5% agar를 함유한 RCM plate상에 약제를 함유한 0.7% agar를 첨가한 RCM과 융합균주를 잘 혼합하여 증충시킨 후 33°C의 항온기에서 7~10일간 배양하고 형성된 colony의 영양요구성 및 analog 내성을 검토하여 융합주로 분리하였으며, 융합빈도는 다음식에 따라 계산하였다.

$$\text{융합빈도} = \frac{\text{약제가 함유된 RCM에서 생육한 균수}}{\text{원형질체의 형성에 사용된 균수}}$$

9. 균체고정화

완전 배지에서 대수증식기 중기까지 배양시킨 배양액을 원심분리(8,000rpm, 5min)하여 집진한 다음 Tris-buffer(pH 7.0)로써 3회 세척한 후 고정화에 사용하였다.

균체고정화를 위한 담체를 선정하기 위하여 7% polyacrylamide, 1.5% agar, 2.5% *k-carrageenan* 및 3% sodium alginate를 사용하였고 각종 담체와 균체를 혼합한 후 19~26 gauge 주사기를 통해 0.1M-CaCl₂ 용액에 적하하여 고정화를 시켰으며, 고정화 bead는 0.025M CaCl₂ 용액에 침지하여 4°C에서 12시간 숙성시킨 뒤 활성화시켜 사용하였다.

Bead내의 생존지수(viability index; V. I.)는 bead를 10% Sodium tripolyphosphate 용액에 용해한 다음 Ringer 용액으로 희석하여 methylene 염색법으로 생존수를 측정하였으며, 시간의 경과에 따른 배지 중의 free cell수는 Haematocytometer를 이용하여 측정하였다.

10. L-Methionine의 생산성

L-Methionine 생산능의 우수한 균주를 분리하기 위하여 변이원 처리를 행하여 얻은 변이주와 이들 변이주들간의 세포융합을 하여 분리한 융합주를 free cell상태 및 균체고정화를 행하여 발효생산을 시도하였을 때의 L-methionine 생산량을 검토하였다.

즉, 각각의 free cell 및 고정화 bead를 MPM 100ml을 넣은 500ml 삼각 플라스크에서 교반속도 300rpm, 온도 30°C에서 96시간 발효시킨 다음 배양액은 membrane filter (Gelman Sci., 0.2μm)로 여과하여 아미노산 자동분석기 (Hitachi Model No.835~50, Japan)로서 분석하였고 그 조건은 Table 2와 같다.

11. 연속식 기포관 발효

본 실험에 사용한 연속기포관 발효조 (Continuous air-lift tube fermentor) 및 실험장치는 Fig. 1 과 같다.

연속기포관 발효조는 내경 2cm, 높이 70cm, 운전용량 200ml, 충전용량은 총 용량의 70~80%, superficial gas velocity는 0.98cm²/s로 하고 고정화세포의 bead 파리 및 bead의 고정율

위하여 6cm 간격으로 stainless망을 설치하였다.

Table 2. Operating condition of amino acid analyzer for determination of L-methionine.

Instrument	: amino acid analyzer(Hitachi Model 835-50)
Column	: 2.6 mmID × 150 mm
Resin	: Hitachi custom ion-exchange resin # 2619
Buffer flow rate	: 0.225 ml / min
Column temperature	: 53°C
N ₂ gas pressure	: 0.28 kg / cm ²
Injection volume	: 50μl

또한 판 들레에 경결 유리 자켓 (직경 5cm)을 설치하고, water pump(Haake-Germany, type 000-5818)로 발효조 온도를 30°C로 유지하였으며 MPM을 peristaltic pump(LKB Model No. 2132)로 하단에서 부터 일정한 유량으로 공급하면서 발효를 행하였다.

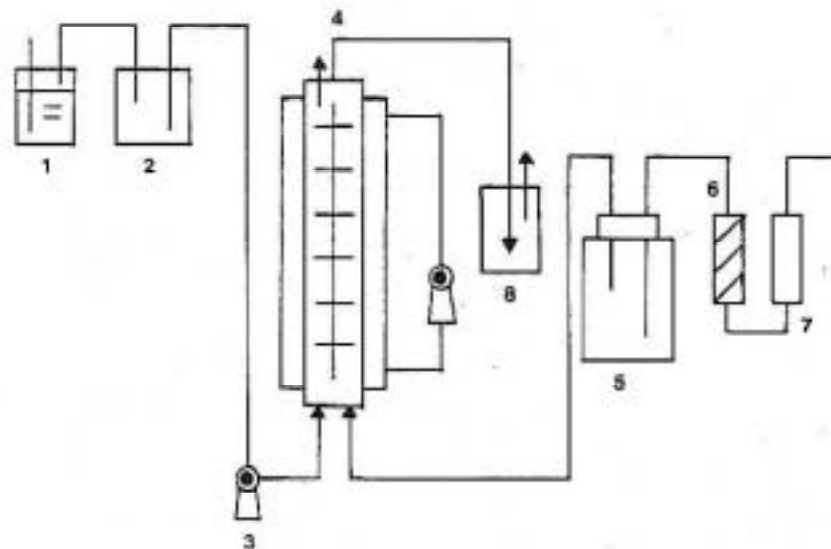


Fig. 1 Schematic diagram of continuous-air-lift tube fermentor.

- | | |
|--|----------------------|
| 1. Bottle with conc-H ₂ SO ₄ | 5. Humidifier |
| 2. Medium reservoir | 6. Air filter |
| 3. Peristaltic pump | 7. Rotameter |
| 4. Fermentor | 8. Product reservoir |

III. 結果 및 考察

1. 변이주의 분리 및 농축

돌연 변이를 유발시키는 변이원으로는 ultraviolet(UV), ethylmethanesulfonate(EMS), methylmethanesulfonate(MMS), ethylenedibromide(EDB), β -propiolacton(β -P) 및 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) 등이 있으나 관주에 관계없이 가장 널리 이용되고 있는 강력한 변이원 중의 하나인 MNNG를 *Brevibacterium flavum* ATCC 14067과 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032에 500 μ g/ml 농도로 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하여 CM plate에 도달한 다음 3-7일간 30 $^{\circ}$ C의 incubator에서 배양한 후 MM plate에 tooth picking 하였을 때 CM에서는 생육하나 MM에서는 생육하지않는 colony를 변이주로 분리하였으며, 변이율을 높이기 위하여 Lederberg 와 Zinder의 방법²⁰에 따라 penicillin-screening을 행하였을 때의 결과는 Fig. 2와 같다.

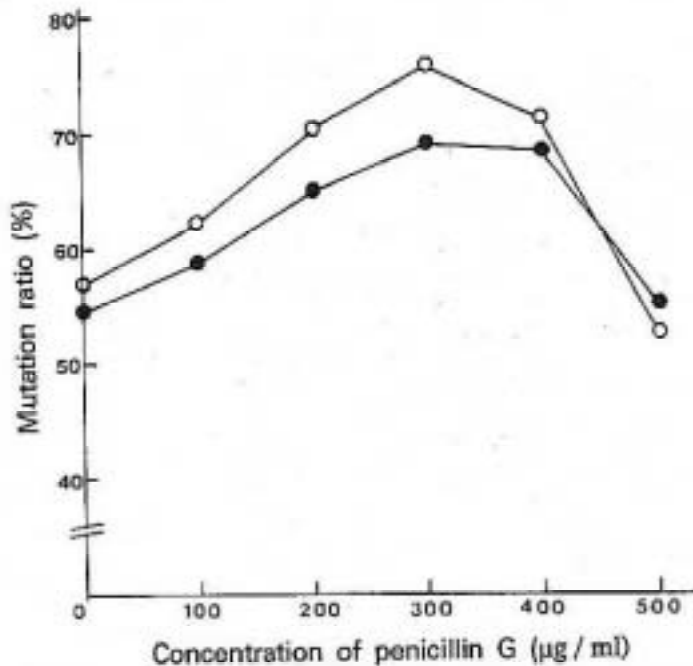


Fig. 2 Effect of various concentration of penicillin-G on the mutation ratio.

- : *Brevibacterium flavum* ATCC 14067
- : *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Brevibacterium flavum ATCC 14067의 경우 18%, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032의 경우 15%의 변이율의 증가를 나타내었는데, 이는 평균주로 penicillin-screening 효과를 보고한 류등²⁶⁾, 진²⁷⁾ 및 성 등²⁸⁾이 보고한 30%의 변이율 증가보다는 다소 낮았는데 이는 평균 주일지라도 본 연구에서는 여러가지 genetic marker를 부여한 관계로 변이율이 낮게 나온 것으로 생각된다.

2. 영양요구성과 약제 및 analog내성주의 분리

미생물에 의한 발효생산물은 일반적으로 중간생성물이나 경로분지의 생산물축적에 따라 feed back inhibition이 일어나며 L-methionine발효 시 *Brevibacterium flavum*의 경우 기질 결합 부위 중 S-acetyl-L-methionion에 의해서 feed back inhibition이 일어나고, *Corynebacterium glutamicum*의 경우 cystathionine-γ-synthase에 의해 inhibition이 나타나는 것으로 알려져 있다²⁹⁾.

또한 L-methionine의 경우 발효경로가 유사한 L-threonine의 축적에 의해서도 inhibition은 나타나므로 이와같은 발효과정 중의 inhibition을 해제하기 위하여 본연구는 영양요구성과 약제 및 methionine analog내성주를 분리하여 Table 3에 나타내었다.

Table 3. Methionine productivity of the mutants of *B. flavum* ATCC 14067 and *C. glutamicum* ATCC 13032.

Strain	Phenotype	L-Methionine productivity (g/l)
<i>B. flavum</i> K-72	Try ⁻ Km ⁺ Et ⁺ Tm ⁺	0.05
<i>B. flavum</i> K-98	Leu ⁻ Km ⁺ Et ⁺ Tm ⁺	0.11
<i>B. flavum</i> K-104	Thr ⁻ Met ⁺ Km ⁺ Et ⁺ Tm ⁺	0.42
<i>B. flavum</i> K-206	Met ⁻ Km ⁺ Et ⁺ Tm ⁺	0.30
<i>B. flavum</i> K-431	Lys ⁻ Km ⁺ Et ⁺ Tm ⁺	0.27
<i>C. glutamicum</i> B-25	Leu ⁻ Str ⁺ Et ⁺ Sm ⁺	0.17
<i>C. glutamicum</i> B-69	Lys ⁻ Str ⁺ Et ⁺ Sm ⁺	0.24
<i>C. glutamicum</i> B-70	Thr ⁻ Hos ⁺ Str ⁺ Et ⁺ Sm ⁺	0.59
<i>C. glutamicum</i> B-160	Leu ⁻ Hos ⁻ Str ⁺ Et ⁺ Sm ⁺	0.09
Km ; Kanamycin	Sm ; Selenomethionine	
Str ; Streptomycin	Tm ; Trifluoromethionine	
Et ; Ethionine		

변이주 *B. flavum* K104의 경우 $thr^- met^+ Km^+ Et^+ Sm^+ Tm^+$ 의 genetic marker를 가지며 L-methionine 생산능은 0.42g/l였으며, *C. glutamicum* B70의 경우 $thr^- hos^+ Str^+ Et^+ Sm^+ Tm^+$ 의 genetic marker를 나타내며 L-methionine생성능은 0.59g/l로 나타났다.

이와같은 결과는 Morinaga 등은 *Pseudomonas* sp.의 Ethionine내성균주로 0.4-0.8g/l의 methionine를 생산하였음을 보고한 결과와 비슷하나 kase 등이 보고한 2g/l의 methionine을 생산하였음을 보고한 결과 보다는 생성능은 낮았다.

3. 원형질체의 형성 및 재생

세포막 중의 peptidoglycan구조를 용해하여 원형질 상태의 원형질 융합에 필요한 조건을 만들기 위한 각종의 세포막 용해효소 중 procaryotic cell의 세포막 용해효소로 주로 사용되는 lysozyme의 처리농도에 따른 원형질체의 형성은 Fig.3에 나타낸 바와 같다.

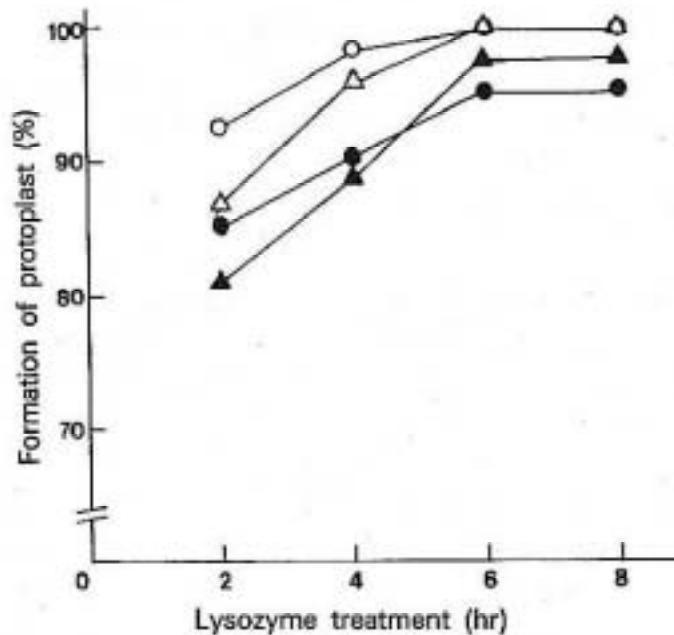


Fig. 3 Effect of reaction times and lysozyme concentration on the protoplast formation.

- ; *B. flavum* K-104 500µg/ml lysozyme
- ; *B. flavum* K-104 300µg/ml lysozyme
- △—△ ; *C. glutamicum* B-70 500µg/ml lysozyme
- ▲—▲ ; *C. glutamicum* B-70 300µg/ml lysozyme

원형질체의 형성은 lysozyme농도 및 시간의 경과에 따라 크게 달라지며 lysozyme의 농도가 높거나 반응시간이 길수록 원형질체의 형성율은 증가하나 재생율은 점차적으로 감소한다²⁶. *B. flavum* K104는 500 μ g/ml의 lysozyme을 6시간 처리하였을 때 원형질체의 형성율은 99.9%였다. 이와같은 결과는 *Bacillus* 및 *Cellulomonas*의 원형질체 형성에 대해 성 등²⁶ 김과 이²⁷가 보고한 바와 유사한 경향을 나타내었다.

원형질체의 재생율은 Fig4에 나타난 바와 같으며 원형질체는 정상 세포와는 달리 세포벽이 손상을 받았거나 불안정한 상태에 있으므로 세포벽의 재생에는 osmotic stabilizer의 종류 및 농도에 따라 크게 달라질 수 있다²⁶.

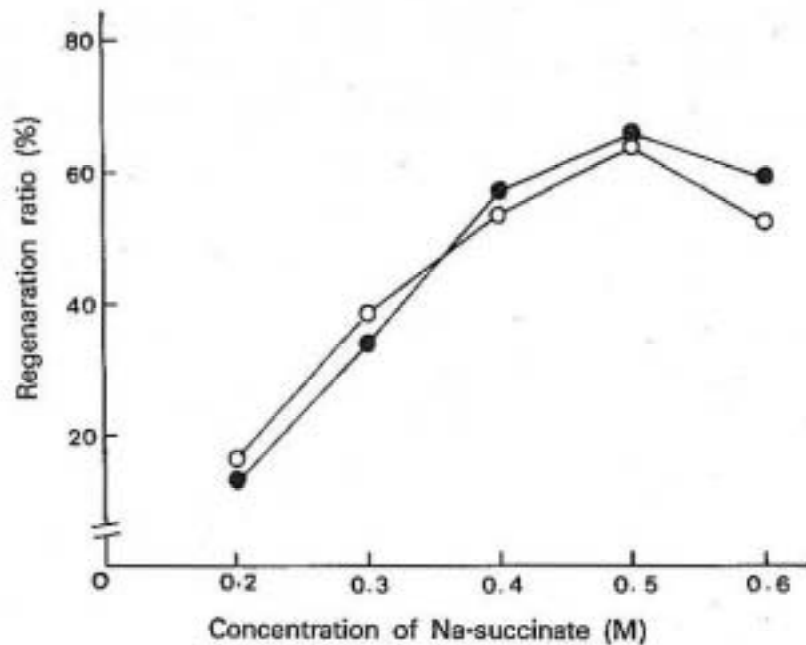


Fig. 4. Effect of Na-succinate concentration on the regeneration of protoplast.

- ; *B. flavum* K-104
- ; *C. glutamicum* B-70

본 연구는 Kaneko와 Sakaguchi²⁸의 방법에 따라 sodium succinate를 osmotic stabilizer로 사용하였다. 즉 RCM에 0.5M sodium succinate를 첨가하여 증충 하였을 때 *B. flavum* K104는 64%, *C. glutamicum* B70은 66%로 가장 높은 재생율을 나타내었다.

이는 *Brevibacterium* 및 *Corynebacterium*의 osmotic stabilizer로 0.5M sodium succinate가

가장 좋았다고 보고한 kaneko와 Sakaguchi²⁸⁾ 및 Akamatsu와 Sekeiguchi²⁹⁾의 결과와는 일치 하였으나 *Cellulomonas flavigena*의 osmotic stabilizer로서 0.4M sodium succinate가 가장 효과적이었음을 보고한 조와 배³⁰⁾의 보고와는 상이하였는데 이것은 균종에 따른 차이로 생각된다.

4. 융합주의 분리

변이주 *B. flavum* K104 및 *C. glutamicum* B70간의 세포 융합을 행하기 위하여 procaryotic cell의 세포 융합에 주로 사용되는 융합 촉진제인 polyethylene glycol(PEG) #6,000을 사용하였을 때의 PEG #6,000 농도에 따른 결과는 Fig 5와 같다.

식물세포의 융합에 융합촉진물질로서 PEG를 최초로 사용한 Kao와 Michayluk는 PEG의 ether linkage와 세포막의 단백질, 탄수화물간에 수소결합을 형성하여 원형질체 사이에 분자간 가교에 의한 응집이 일어나서 긴밀하게 접촉되어 있는 원형질체의 (+)부분과 (-)부분간의

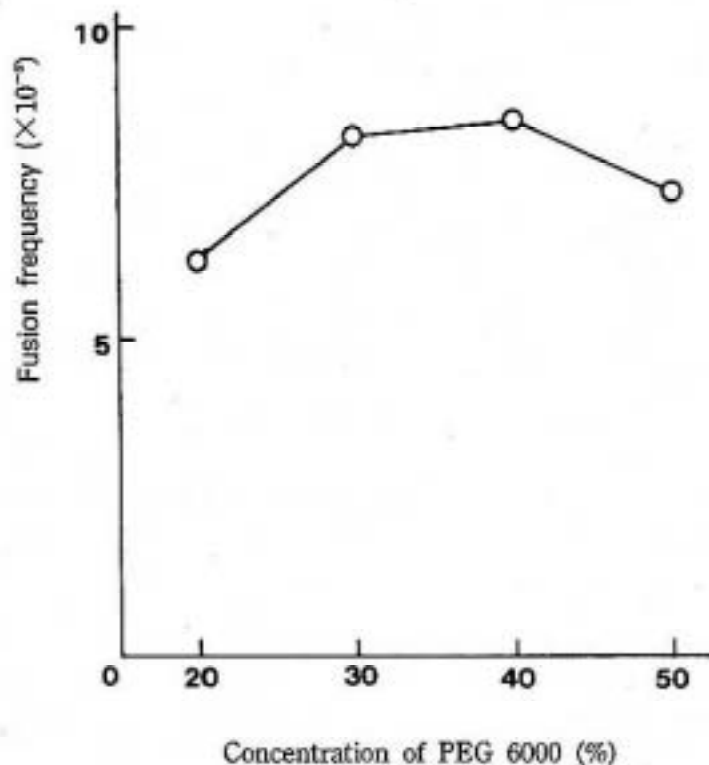


Fig. 5 Effect of PEG #6000 concentration on the protoplast fusion.

결합에 의해 융합주가 생성되는 것이라고 보고한 바 있다²⁰. Fig.5에서와 같이 PEG #6,000의 첨가는 30~40%에서 가장 융합빈도가 높았으며 30% 이하 및 40% 이상에서는 점차적으로

Table 4. Fusion frequency between *B. flavum* K-104 and *C. glutamicum* B-70.

Cross	Fusion frequency(Km ^r St ^d)	
	With 35% PEG #6000	With 35% PEG #6000 + 3% PVP*
<i>B. flavum</i> K-104 (Thr ⁻ Met ⁺ Km ^r Et ^r Sm ^r Tm ^r)		
×		
<i>C. glutamicum</i> B-70 (Thr ⁻ Hos ⁺ Str ^r Et ^r Sm ^r Tm ^r)	8.7×10^{-6}	3.5×10^{-5}

* : Polyvinylpyrrolidone

Km : Kanamycin

Sm : Selenomethionine

Str : Streptomycin

Tm : Trifluoromethionine

Et : Ethionine

Table 5. Fusion formation by protoplast between *B. flavum* K-104 and *C. glutamicum* B-70.

Strain	Thr	Met	Hos	Km	Str	No. of colony
	(parental strain)					
<i>B. flavum</i> K-104	-	+	+	R	S	
<i>C. glutamicum</i> B-70	-	+	+	S	R	
	(fusant)					
	-	-	+	R	R	7
	-	+	-	R	R	6
	+	+	+	R	R	9
	-	-	-	R	R	4
	-	+	+	R	R	5
	+	+	-	R	R	3
	+	-	-	R	R	1

R : resistant

S : sensitive

떨어지는 경향을 나타내었는데 이와같이 PEG농도가 낮을 경우 융합빈도가 감소하는 것은 용액내의 삼투압 안정제 및 positive polar group과 PEG의 ether linkage가 서로 간섭에 의해 융합빈도가 감소하며, 한편 파랑의 PEG #6,000 용액에서는 osmotic damage 현상이 일어나 원형질체의 사멸을 유도하여 융합빈도가 낮게 나타났다고 생각된다.

따라서 본 실험에서는 PEG #6,000의 최적 농도를 35%로 제조하여 이후의 실험에 사용하였고 *B. flavum* K104 및 *C. glutamicum* B70간의 융합시 융합 자극제로 알려진 3% polyvinylpyrrolidone (PVP)을 첨가하였을 때의 융합 빈도를 Table 4에 나타내었다.

PEG #6,000 단독 사용시 융합빈도는 8.7×10^{-4} 으로 다소 낮은 상태였으나 3% PVP를 첨가함으로써 3.5×10^{-3} 으로 다소 상승하였다. 그리고 분리한 융합주 35주 간의 genetic marker를 조사하여 Table 5에 나타내었으며 *B. flavum* K104와 *C. glutamicum* B70간의 융합주 중 met⁺, hos⁺의 phenotype을 나타내는 5균주를 분리하여 이중 L-methionin 생산성이 가장 우수한 BFCG 37을 선발하여 이후의 고정화 균체에 사용하였다.

5. 균체의 고정화

발효공정 중 생산성 향상을 위해 사용되어지는 한 방법이 균체 고정화이며 고정화 담체로서는 일반적으로 polyacrylamide, sodium alginate, agar, *k-carrageenan*등이 사용되어 지고 있다.²³ 이들 균체고정화 담체로서 L-methionin생산성이 우수한 융합주인 BFCG 37를 고정화 시킨 bead를 발효 배지인 MPM에 대해 20 : 1의 비율로 500ml 삼각 플라스크에서 30°C, 48시간 진탕 배양한 다음 아미노산 분석기로 배양액의 L-methionin함량을 분석한 결과는 Table 6과 같다.

Table 6. L-Methionine production of whole cells immobilized in various matrices

Concentration of matrices for immobilization	(%)	Production on whole cells(g/l)
Sodium alginate	3.0	0.89
Polyacrylamide	7.0	0.17
Agar	1.5	0.09
<i>k</i> -Carrageenan	2.5	0.48

3% sodium alginate로 고정화하여 L-methionin 생산량을 측정한 결과 0.89g/ml의 생산수율을 얻었으나 polyacrylamide, agar 및 *k-carrageenan*등으로 고정화 하였을 때는 다소 생산

량이 저조하였다.

이와 같은 결과는 sodium alginate를 담체로 하여 균체고정화를 하였을 때 발효생산성이 가장 좋았음을 보고한 여러 연구자들^{25, 26, 27}의 결과와 같았으나, L-glutamic acid 발효 생산에 있어 고정화 담체로써 *k-carrageenan*이 고정화 담체로서 가장 우수하였음을 보고한 Karube 등²⁸의 결과와는 상이하였다.

본 연구에 있어서도 *k-carrageenan*을 고정화담체로 사용하였을 때 80℃의 온도에서 *k-carrageenan*을 용해하여 균체와 섞어 40~50℃사이에서 45℃ 이하로 떨어지기전에 bead를 형성시킨으로 bead내 사멸균수가 증가하고 균체의 활성이 다소 낮아져 생산능이 저조하게 나타난 것으로 생각된다.

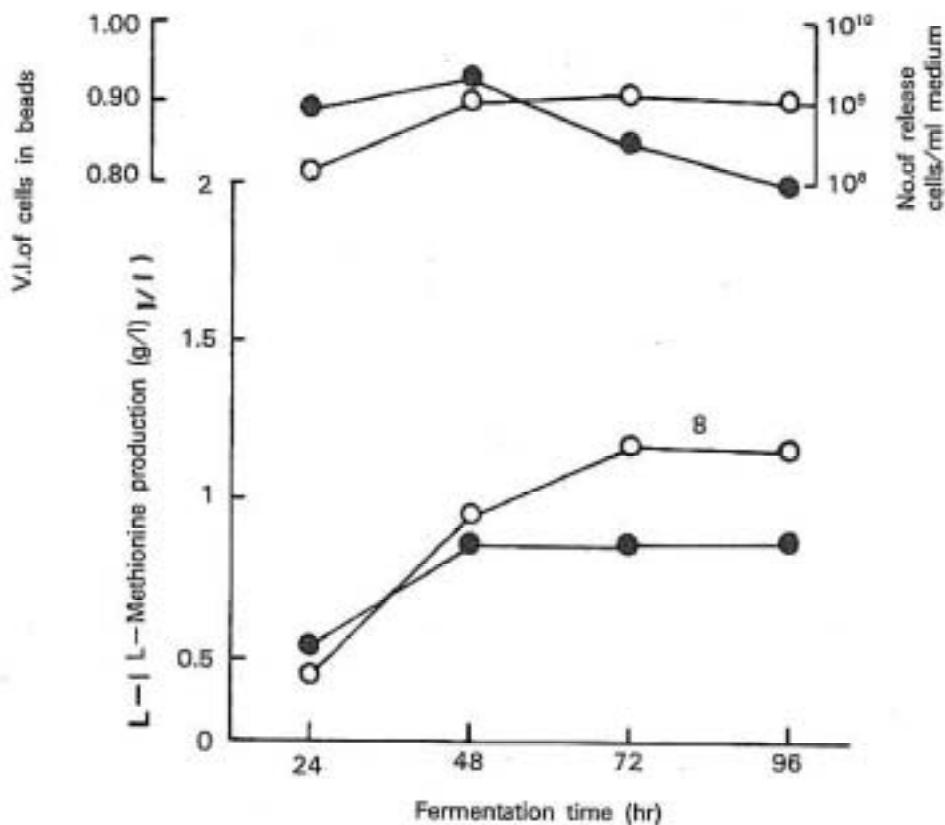


Fig. 6 L-Methionine production and viability index(V. I.) in bead during fermentation.

○—○ : Continuous fermentation by bubble.

●—● : Batch fermentation by immobilized system

6. L-methionin의 생산성

L-methionin 생산능이 뛰어난 융합주 BFCG 37을 free cell과 고정화 균체로서 플라스크 및 연속식 기포관에 의한 발효를 행하였을때의 L-methionin 생산량을 Fig. 6에 나타낸 바와 같다.

발효를 48시간 하였을 때 고정화 bead내의 균체 생존지수는 플라스크와 연속식 기포관에 의한 경우 0.96 및 0.91를 나타내었으나 72시간 발효시 플라스크에 의한 발효는 0.82로 급격히 감소되었고 배지 중의 free cell수도 3.9×10^8 에서 5.0×10^8 으로 감소하였다.

이는 플라스크내의 한정된 조건과 기질의 고갈 및 생산물에 의한 저해 등의 여러가지 요인에 의해 생존수도 점차적으로 감소하였다고 생각된다.

그러나 연속식 기포관에 의한 발효는 72시간까지 생존 지수의 변화는 크게 변화하지 않았으나 72시간 이후 점차적으로 감소하는 경향이있으며 배지의 free cell수도 1.0×10^8 cells/ml을 유지하였으며 이후 다소 감소하는 경향을 나타내었다.

따라서 플라스크에 의한 발효보다 연속적 기포관 발효가 보다 효과적이었으며 연속식 기포관에서 72시간 발효시 L-methionine의 최대생산량은 1.35g/l이었다.

이와같은 결과는 Morinaga 등⁸⁾이 *Pseudomonas sp.*로 생산한 0.4~0.8g/l L-methionine보다 우수하였으나, *C. glutamicum*을 이용하여 Kase 및 Nakayama⁹⁾가 보고한 2.0g/l L-methionine보다 생산 수율이 낮게 나타났다. 따라서 본 연구의 결과는 균체의 육종방법 및 발효방법에 따라 생산성이 향상될 수 있음을 알 수 있었으며, L-methionine의 생산성을 보다 높이기 위해 L-methionine 발효 경로 중 co-repressor로 작용하는 S-adenosyl-L-methionine 합성 효소의 결손주의 분리 및 발효생산물들의 신속한 분리 등에 관한 계속적인 연구가 수행될 경우 L-methionine의 생산성은 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

IV. 要 約

본 연구는 *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 및 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032간의 protoplast fusion을 행하여 L-methionine의 생산성을 검토하고 발효 조건을 개선하기 위하여 연속 배양을 행하였다.

양 균주의 genetic marker의 부여 및 활성을 높이기 위하여 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) 500 μ /ml로 처리 하였으며 penicillin-screeing에 의해 변이율을 15~18% 향상시켰다.

변이원 처리에 의해 Thr⁻ Met⁺ Km⁺ Et⁺ Sm⁺ Tm⁺의 genetic marker를 가진 *B. flavum* k-104와 Thr⁻ Hos⁺ Str⁺ Et⁺ Sm⁺ Tm⁺의 genetic marker를 가진 *C. glutamicum* B-70을 분리 하였다.

원형질체 융합을 실험하기 위하여 500 μ g/ml의 lysozyme으로 처리하였을 때 원형질체 형성을 및 제생율은 각각 99% 및 64~66%를 나타내었다.

변이주 *B. flavum* K-104와 *C. glutamicum* B-70의 원형질체를 혼합하여 3% PVP를 함유한 35% PEG 용액으로 원형질체 융합을 행하였을 때의 융합 빈도는 3.5×10^{-6} 을 나타내었다.

Sodium alginate로 고정화 시킨 융합주 BFCG 37은 L-methionine 생산용 배지(MPM)에서 회분식으로 72시간발효 시 0.89g/l의 methionine을 생산하였으나 연속 배양에서는 72시간 발효로 1.35g/l의 L-methionine를 안정적으로 생산할 수 있었다.

參 考 文 獻

1. 鮫島廣年, 奈良高(1979): 微生物과 醱酵生産, 公立出版株式會社
2. 相田浩, 波弘一, 千畑一郎, 中山清, 山田秀明(1986): アミノ酸醱酵, 學會出版
3. Yamagata, S., Takeshima, K. and Naiki, N. (1975): Metabolism of L-methionine by *Corynebacterium glutamicum*, *J. Biochem* 77, 1029
4. Kase, H. and Nakayama, K. (1975): Isolation and characterization of S-adenosylmethionine requiring mutants and role of S-adenosylmethionine in the regulation of methionine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*, *Agric. Biol. Chem.*, 39, 161~168.
5. Kase, H. and Nakayama, K. (1975): L-Methionine production by methionine analog-resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum*, *Agric. Biol. Chem.*, 39, 153~160.
6. Kase, H., K. Nakayama, K. and Kinoshita(1970): Production of O-succiny-L-homoserine by auxotrophic mutants of *Aerobacter aerogenes*, *Agric. Biol. Chem.*, 153, 34, 274~281
7. Ozaki, H. and Shiio, I. (1982): Methionine biosynthesis in *Brevibacterium flavum*; Properties and Essential role of O-acetylhomoserine sulfhydrylase, *J. Biochem.*, 91, 4, 1163~1171
8. Cherest, H. Ficher and de Rovichon-Szulmajster, H. (1969): Induction of nutritional mutants of glutamic acid bacteria and their amino acid accumulation *J. Bacteriol.*, 97, 328.
9. Morinaga, Y., Tani, Y. and Yamada, H.(1982): L-Methionine production by methionine-resistant mutants of a facultative methylotroph, *Pseudomonas* FM 518, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2, 473.
10. Brush, A. and Paulus, H. (1971): The enzyme formation of O-acetylhomoserine in *Bacillus subtilis* and its regulation by methionine and S-adenosylmethionine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45, 735~741.

11. Wyman, A., Shelton, E. and Paulus, H. (1975) : Purification and properties of homoserine trasacetylase from *Bacillus polymyxa*, *J. Biol. Chem.*, 250, 10, 3897.
12. Kase, H. and Nakayama, K. (1975) : O-Acetylhomoserine as in intermediate in methionine biosynthesis in *Arthrobacter paraffineus*, *Corynebacterium glutamicum* and *Bacillus species*, *Agric. Biol. Chem.*, 39, 687-693.
13. Savin, M. A. and Flavin, M. (1972) : Cystathionine synthesis in yeast : An alternative pathway for homoserine biosynthesis, *J. Bacteriol.* 112, 299.
14. Savin, M. A., Flavin, M. and Slaughter, C. (1972) : Regulation of homosteine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol.*, 111, 547.
15. Komatsu, K., Yamada, T. and Kodaira, T. (1974) : Induced mutation and strain selection in some industrially impotent microorganisms, *J. Ferment. Technol.*, 52, 93.
16. Okanishi, M. and Gregory, K. F. (1970) : Isolation of mutants of *Candida tropicalis* with increased methionine content, *Can. J. Microbiol.*, 16, 12, 1139
17. Morzycka, E., Swanor-korszynska, D., Paszowski, A., Grabski, J. and Raczynska-Boianowska, K. (1976) : Methionine overproduction by *Saccharomyces lipolitica*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 1, 125
18. Yamagata, S., Takeshima, K. and Naiki, N. (1975) : O-Acetylserine and O-acetylhomoserine sulfhydrase of yeast : Studies with methionine auxotrophs, *J. Biochem.*, 77, 1029
19. Ohunki, T., Etoh, Y. and Beppu, T. (1982) : Interspecific and interspecific hybridiza of *Mucor pusillus* and *mucor meihei* by proroplast fusion, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 451
20. Genthner, F. J. and Borgia, P. T. (1978) : Sphaeroplast fusion and heterokaryon formation in *Mucor recemosus*, *J. Bacteriol.*, 134, 349
21. Foder, K. and Alfoldi, L. (1979) : polyethyleneglycol induced fusion of bacterial protoplasts, *Molec. Gen. Genet.*, 168, 55
22. Foder, K. and Alfoldi, L. (1976) : Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 73, 2147
23. Hopwood, D. A. and wright, H. M. (1978) : Bacterial protoplast fusion : Recombination in fused protoplast of *Streptomyces coelicolor*, *Molec. Gem. Gemet.*, 162, 307
24. 오종원, 최호준, 변유량(1987) : 고정화 pachsolen tannophilus에 의한 D-xylose의 에타놀로의 전환, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 15, 170.
25. Kim, H. S. and Dewey, D. Y. Ryu(1982) : Continuous glutamate production using on immobilized whole cells system, *Technol. and Bioeng.*, 24, 2167

26. Karube, I. Wang, Y. Tamiya, E. and Kawarai, M. (1987) : L-Glutamate production by protoplasts immobilized in carrageenan gel, *J. of Biotech.* 6, 1
27. Ryu Beung Ho and Ki Du Nam(1987) : Continuous alcohol fermentation using immobilized growion yeast cells, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 15(4), 248~252
28. Lederberg, J. and Zinder, N. (1948) : Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin, *J. A. C. A.* 70, 4267
29. Kaneko, H. and Sakaguchi, K. (1979) : Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*, *Agric Biol. Chem.* 43, 1007
30. 류병호, 김혜성, 노명훈, 박법규, 정종순, 배기철(1989) : 세포융합과 고정화 시스템을 이용한 L-Lysin의 생산성향상, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 21(1), 154~163
31. 진성현(1990) : *Bacillus natto* SH-89 및 *Bacillus megaterium* IAM 1166의 protoplast fusion에 의한 vitamin B₁₂의 생산, 석사학위논문, 경성대학교
32. 성낙계, 정덕화, 이무영, 정영철(1988) : 속간원형질체 융합에 의한 섬유질 기질로부터 L-Lysine생산균주의 개발, *Kor. J. Microbiol. Bioeng.*, 16(2), 1501
33. 김도만, 이계호(1990) : *Bacillus pumilus*와 *Cellulomonas fimi*의 원형질체 형성과 재생, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 18(2), 109~114
34. 조보연, 배무(1987) : 원형질체 형성과정에 쓰이는 osmotic stabilizer의 평가방법, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 15(4), 299~300
35. Akamatsu, T. and Sekeiguchii, (1981) : Studies on regeneration media for *Bacillus subtilis* protoplasts, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2887
36. Kao, K. N, Michayluk, M. R. (1974) : A method of high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts, *plants*, 115, 355.