

# 빙초산을 탄소원으로 한 글루타민산 생성에 관한 연구

—고축적능균의 분리와 동정—

유영진 · \*박계인 · 김기주 · 한덕봉 · 김요성

(국립공업표준 시험소 식품시험과, \*경희대학교 산업대학 식품가공학과)

## On the Production of L-Glutamic Acid from Acetate by Some Microbes.

—Isolation and Identification of Powerful Glutamic Acid-Producing Bacteria—

YOO, Young Jin, \*Ke In PARK, Ki Joo KIM, Deok Bong HAN,  
and Yo Sung KIM

Dept. of Food Technology, National Industrial Standard Research Institute,

\*Dept. of Food Technology, College of Industry, Kyunghee University)

### ABSTRACT

Bacterium strain, K-173-10, which was isolated from waste soil of Korean brewing factories, could grow on acetate as the sole carbone source and accumulate a considerable amount of L-glutamic acid (24g/l) in the liguid culture medium.

This strain was named by *Brevibacterium ammoniagenes* sp. by the standard method of taxonomy procedures given in the Manual of Microbiological Methods.

### 結 論

미생물계에 널리 분포되어 있는 세균, 효모, 곰팡이, 방사균 등의 배양액 중에 미량이나마 글루타민산이 축적되는 것이 발견된 후 많은 연구자들에 의해서 발표된 글루타민산 생성균 균종은 *Micrococcus*(木下, 1960), *Brevibactrium*(小林克己, 1959), *Corynebacterim*(Shiio, 1965), *Microbacterium*(宮月恭一, 1960), *E.coli*(堀津, 1967)에 속한 것이며, 이외에도 신균주는 계속 보고되고 있다.

이와같은 글루타민산 생성균주를 이용한 공업화에 관해서는, Mirrison(1949), 또 Kita(1957)의 *Cephalosorium* 균주로 배지 중에서 글루타민산을 얻었으나 축적량이 작은 이유로 공업화에 성공치 못하였고, 1955년에 Johnson 이 미국에서 L-글루타민산을

발효법에 의해 공업적 생산을 시도한 바 있으나 그후 이에 대한 구체적인 보고가 없었다. 후에 木下(1960), 陳(1957)등은 탄소화물(glucose), 질소원(ammonia. urea), 무기염등으로 조성된 배지로서 발효법에 의한 L-글루타민산 생성의 공업화가 시도되어 L-글루타민산은 발효법에 의한 대량 생산이 가능하였다.

근래에는 배지 원료의 탄소원으로는 탄수화물 이외에 석유탄화수소(井口喬, 1966), 합성초산(Shiio, 1959), ethanol(奥村, 1968)을 이용한 L-글루타민산 발효법이 새로운 연구과제로 등장하게 되었고, 더욱이 탄소수가 5~6의 난화수소와는 달리 공업적으로 생산이 용이하며 또한 염가인 탄소 수가 C<sub>2</sub>인 초산을 원료로 L-글루타민산을 생성하여 생화학적으로 흥미가 있으며 공업적으로 유용한 방법으로 초산을 탄소원으로 한 L-글

루타민산 발효법의 기술적인 기초확립과 공업화를 시도하기 위하여 우선 우리 나라 자연계에서 글루타민산 축적능이 강한 균주를 전국에 산재하고 있는 탁주 양조 폐수장, 폐수구로부터 분리하고 균의 특성을 조사한 결과의 일부를 보고한다.

### 材料 및 方法

#### 1. 균주의 분리

국내 각지방에 산재하고 있는 각양조장 하수구, 폐수장에서 수집한 시료를 Table 1과 같은 분리용 배지로 상법에 따라 bacteria 만을 평판희석 배양법에 의하여 분리 배양하였다.

Table 1. Composition of the basal solid media.

NH <sub>4</sub> -acetate	15g(as acetic acid)
Na-acetate	25g( " )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.4g
Fe <sup>++</sup>	2ppm
Mn <sup>++</sup>	2"
Thiamine hydrochloride	0.1μg
Agar	18g
D. W.	1000ml
pH	7.6~8.6

상기 평판배양법에 의하여 분리한 총균주는, Table 2의 기본액체 배지를 17×180mm의 시험관에 5ml 씩 추가하여 30°C에서 72 hrs 진탕배양 하였고, 이 배양액에서 朴(1963), 陳(1957)과 같은 방법으로 원심분리 또는 제단백제로 균체를 제거하여 이 배양액 일정량을 취하여 T.L.C.와 P.C. 법에 따라 L-글루타민산 생성 유무를 조사한 결과 시료 178점으로부터 2000주의 균주를 분리하였다. 그중 G.A. 축적량 5g/l 이상인 균주 300여종을 분리하여, 다시 2차 screening한 결과 G.A. 10g/l 생성 균주 9주를 분리하고, 이중에서 G.A. 24.29g/l 이상 생성하는 균주(K-173-10)를 얻어, 이것만을 동정하였다.

Table 2. Composition of basal liquid culture media.

Sodium acetate	20g
NH <sub>4</sub> -acetate	20g
Urea	0.5"
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2"
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.4"
Thiamine HCl	100μg
Fe <sup>++</sup>	2ppm
Mn <sup>++</sup>	2"
Biotin	0.3μg
D. W.	1000ml
pH	8.2

#### 2. 배지와 배양조건

Table 1의 액체배지 50ml를 500ml 용진탕 flask에 분주하고 15 lbs, 20mins 동안 고압증기 살균하여 접종하고 30°C, 72hrs 진탕(진폭60mm, 120rpm)하여 seed로 하였으며, Table 2의 배지 50ml를 500ml 용진탕 flask에 추가한 후 여기에 前記 seed를 5% 정도로 접종하고 上記와 같이 진탕 배양하였고, 배양액의 pH는 7.8~8.2로 조절하였다.

#### 3. L-glutamic acid의 정량

朴(1963)의 前報에 따라 L-glutamic acid는 배양액의 일정량을 취하여 균체 단백질을 제거한 다음 T.L.C.와 P.C.로 정량하였다.

### 結果 및 考察

#### 1. 균의 동정

선발된 균종의 형태적, 생리적 및 배양적 특성은 Table 3과 같다.

K-173-10은 탄수화물로부터 酸生成능이 없으며, maltose로부터 酸生成능이 결핍되고, urease 양성, 硝酸還元성이 있다. 高山(1965)의 글루타민산 생성균群的 分類 및 그 성질의 연구보고에 의한 group I, type 6에 속하는 것은 glucose로부터는 아주 약하게 酸을 생성하고 maltose로부터 酸을 생성하는 *Brevibacterium ammoniagenes* Oishi, 大石氏가 분리한 *Brevibac-*

**Table 3** Characteristics of the isolated strain.

- I. Microscopic observation
  - (1) Vegetative cells; Short rods with rounded ends. Occur in pairs, and also singly and in irregular masses. (Fig.1.)
  - (2) Motility; non-motile
  - (3) Flagella; absent
  - (4) Gram's stain; positive
  - (5) Endospore; no spore
- II. Cultural characteristics
  - (1) Nutrient agar slant; moderate growth, filiform and milky white.
  - (2) Nutrient agar colonies; circular, smooth, pulvinate and milky white.
  - (3) Nutrient agar stab; growth occur only on the surface.
  - (4) Gelatin stab; growth occur only on the surface, and gelatin not liquefied.
  - (5) Nutrient broth; moderate turbid with viscid sediment, membranous surface are seen along the tube.
- III. Physiological characteristics
  - (1) Nitrate; weakly reduced to nitrite
  - (2) Indole; not formed
  - (3) Hydrogen sulfide; produced
  - (4) Methyl red test; negative
  - (5) Starch; not liquefied
  - (6) Catalase; positive
  - (7) Urease; positive
  - (8) Galatine; not liquefied
  - (9) Voges-Proskauer reaction; negative
  - (10) Skatol reaction; negative
  - (11) Ammonia; not produced from peptone
  - (12) Fermentation of carbohydrates; not produced acid and gas from carbohydrate.
  - (13) Oxygen; aerobic
  - (14) Temperature; Opt. 28 to 32°C.
  - (15) pH; Opt. 7.6 to 8.6



**Fig. 1.** Photomicrographs of *Brevibacterium ammoniagenes* strain K-173-10 grown in nutrient broth at 30° for 24hrs, (× 1,500)

*terium ammoniagenes* Aida(1963)의 菌과 상이한 점은 본 균주(K-173-10)가 glucose, maltose로부터 전연 酸을 생성하지 않는다는 것이며 Bergey's Manual의 제 7 판에 수록된 *B. eibacterium ammoniagenes* Breed에 해당하는 세균과 유사한 특성을 나타내고 있다. 그러나 다만 ammonia 생성 능력이 없는 점이 상이하다.

또한 K-173-10은 高山(1963), 奥村(1962), 木下(1959), 土井(1960)氏 등의 L-글루타민산 생성균주의 분류학적 연구보문과 山田(1972)의 amino산 醱酵總論에 열거된 L-글루타민산 생성 균주의 공통성을 보면

1. 好氣的으로 L-글루타민산을 축적
2. gram 양성
3. 포자를 형성하지 않는다.

4. 운동성이 없다.
5. 보통 球形, 橢圓形 내지 短桿狀
6. Biotin 요구성  
상기와 같이 본 연구 균종도 L-글루타민

산 생성 균종의 균학적 여러 공통성질과 아주 유사한 점으로 보아 K-173-10 *Brevibacterium ammoniagenes*에 유사 균주로 사려된다.

### 摘 要

1. 양조폐수장, 폐수구의 토양에서 분리한 K-173-10은 酢酸鹽을 資化하여 L-글루타민산을 24g/l 생성하였다.
2. 분리된 균주는 행태학적, 생리학적, 분류학적 특성으로 미루어 보면 *Brevibacterium ammoniagenes* sp.로 간주된다.

### 引 用 文 獻

1. Breed, R. S., Murray, E. G. D., and Smith, N. R., 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Williams & Wilkins Co.
2. Doi, S., Y. Kaneko, 1960. A glutamic acid-producing bacteria. *Amino Acids*, **2**, 26.
3. Heftmann, E., 1967. *Chromatography*, 2nd Ed., 373. Reinhold Publishing Co., New York.
4. Johnson, M. J., 1955. Glutamic acid-production, *Fermentation*, **47**, 1872.
5. Kinoshita, S., S. Itagaki, & K. Nakayama, 1960. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *Amino Acids*, **2**, 42.
6. Kita, D. A., U. S. Pat., 2,789,939.
7. Morrison, G. A., Hinshelwood, C. Y., 1949. Nitrogen utilization and growth of coliform bacteria. *J. Chem. Soc.*, 380.
8. Okumura, S., R. Tsugama, & T. Tsunoda, 1962. Studies on the L-glutamic acid fermentation, Part I. The new bacteria of the genus *Brevibacterium* isolated from the nature to produce L-glutamic acid. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **36**, 141.
9. Shiiio, I., K. Mitsugi, T. Tsunoda, 1959. Bacterial formation of L-glutamic acid from acetic acid in the growing culture medium. *J. Biochem.*, **46**, 1665.
10. Shiiio, I., K. Mitsugi, S. Otuka, T. Tsunoda 1965. U. S. Pat., 3,117,915.
11. Takayama, K., S. Abe, & S. Kinoshita, 1965. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria, Part I. Taxonomical characters. **39**, 328-340.
12. Takashi Iguchi, Shiro Hayakawa, & Isao Takeda, 1966. L-glutamic acid formation from hydrocarbons by microorganisms. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **40**, 26.
13. Society of American Bacteriologists, 1967. *Manual of Microbiological Methods*. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
14. 陳秩宗, 陳倫宗, 社聰明, 1959. 글루타민산 醱酵에 關する 研究 (第6報). 1942號 菌의 菌學的 性質. 釀工, **37**, 310.
15. 奥村信二, 1968. 石油からの L-글루타민산 나트륨의 生産, 食品工業, **12**, 12.
16. 朴啓仁, 金奇珠, 兪永鎭, 1963. 발효방법에 의한 글루타민산 제조에 관한 연구 (號1報). 國立工業研究所報告, **13**, 167.
17. 小林克己, 布子信夫, 佐藤吉郎, 小川紀兒, 1959. 甜菜糖蜜의 글루타민산 醱酵 (第1報). 基礎研究, 釀工, **37**, 440.
18. 宮月恭一, 大澤岳義. 特許公報. 昭39-2988.
19. 아미노산 醱酵, 上, 總論. 아미노산·核酸集談會編, 1972. 共立出版, 東京都.