

Saccharomyces sake KBA No. 6에 의한 adenine과 nicotinamide로부터 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)의 생산

최인걸 · 황기철 · 방원기

고려대학교 농화학과

초록 : 미생물을 이용하여 pyridine계 보효소인 NAD를 생산하기 위하여, 12종의 효모로부터 NAD 함량이 높은 *Saccharomyces sake* KBA No. 6을 선별하였으며, NAD 생산에 미치는 여러 가지 효과를 검토하였다. NAD 생산에 있어서 탄소원으로는 4% glucose, 질소원으로는 2% bactopectone이 가장 좋았으며 최적 pH와 온도는 각각 5.0과 30 ℃이었다. 한편 NAD 전구 물질로서 nicotinamide와 adenine을 동시에 사용한 경우 NAD 생산이 가장 좋았으며 이 때의 농도는 각각 4 mg/ml과 3 mg/ml이었다. 또한 NAD 생산을 증가시키기 위하여 배양시 2가 금속이온들을 사용하였으며 이들 중 Zn^{2+} 가 매우 효과적이었다. 계면활성제의 영향은 음이온 계면활성제인 sodium dodecyl sulfate(SDS)를 사용하였을 때 효과적이었다. 상기의 최적 조건 하에서, 144시간 배양 후에 최대 NAD 생산량은 배지 100 ml당 35 mg이었으며 전체량의 89%인 31 mg의 NAD가 배지 중에 유리되었다(1992년 4월 6일 접수, 1992년 4월 29일 수리).

Nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)는 pyridine계 보효소로서, 생체내에서 수많은 산화환원효소의 보효소로 작용할 뿐만 아니라 DNA ligase 반응에서 인산기의 공여체, poly-adenosine diphosphate ribose합성효소의 기질 및 superoxide radical(O_2^-)의 생성에 관여하는 등의 광범위한 생리활성을 지닌 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 최근에는 NAD가 임상용, 진단용 및 생화학 시약으로서 생화학분야와 의학방면에서 그 용도가 확대되고 있으며 그 수요가 증대되고 있다.

1904년, Harden과 Young³⁾에 의해서 알코올 발효에 관여하는 보효소로서 NAD가 처음으로 인식된 이래, 미생물에 있어서 NAD의 생합성 과정에 대한 연구가 활발히 수행되어 왔다.^{1,2,4-6)} 또한, 미생물에 있어서 NAD의 함량은 세균과 곰팡이에 비해 효모에서 높을 뿐만 아니라 효모는 세균에 비해 균체를 얻기가 용이하여 NAD의 생산원료가 되어왔다.⁷⁻¹⁰⁾

현재 NAD의 공업적 생산에는 주로 빵효모가 이용되며 NAD의 함량을 증가시키기 위해 NAD의 전구물질이나 에너지 공급원을 첨가하여 배양을 계속하거나 계면활성제 등을 이용하여 배양액 중에 축적된 NAD를 이온교환수지 등을 이용 분리하기도 한다.^{1,11,12)}

본 실험에서는 pyridine계 보효소인 NAD를 nicotina-

mid과 adenine으로부터 생산하기 위하여 NAD 생성균주를 선별하였으며, 선별된 균주에 의한 NAD의 효과적인 생산을 위하여 배양학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

실험에 사용한 균주는 본 실험실에 보관 중인 여러 효모 균주였으며, 그 중 NAD 생산량이 가장 좋은 *Saccharomyces sake* KBA No. 6를 선별하여 사용하였다.

배지

전배양배지로는 glucose 20 g/l, yeast extract 10 g/l 및 bactopectone 20 g/l를 함유하는 YPD 배지를 사용하였으며,¹³⁾ NAD 생산을 위해 사용한 본배양배지는 glucose 20 g/l, yeast extract 10 g/l, bactopectone 20 g/l, KH_2PO_4 5.0 g/l, K_2HPO_4 5.0 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g/l를 함유하는 배지를 사용하였다. 또한 균주의 보관에는 전배양배지에 1.7% 한천이 포함된 평판 및 사면배지를 사용하였다.

균주의 선별

NAD를 축적하는 효모를 선별하기 위하여, 본 실험실

에서 보관 중인 균주를 YPD 배지가 10.0 ml씩 함유된 50 ml 삼각플라스크에 한 백금니씩 접종하고 30 °C에서 24시간 진탕배양(160 strokes/min)한 후에 3% nicotinamide를 1.0 ml 첨가한 후 48시간 더 배양하여 비교적 균체 생육이 좋으며 건중량당 NAD 함량이 가장 높은 균주를 선별하였다.

NAD의 정량 및 정성분석

NAD는 Takei¹⁴⁾의 열수출법을 약간 변형하여 추출하였으며, 추출액 중의 NAD 정량분석은 Klingenberg¹⁵⁾의 방법에 따라 NAD 의존성 효소인 alcohol dehydroge-

nase를 사용하여 339 nm에서 NAD의 환원에 따른 흡광도의 증가를 측정하여 정량하였다. 또한, NAD의 정성분석은 Pinder 등¹⁶⁾의 방법에 따라 thin layer chromatography 법으로 하였다.

결과 및 고찰

NAD 함량이 높은 효모의 선별

균체량이 비교적 많으면서 NAD 함량이 높은 효모를 선별하기 위해 실험방법에 기술된 바와 같이 12종의 효모를 30 °C에서 24시간 배양한 후 3% nicotinamide 1 ml을 첨가하여 48시간 배양을 계속한 뒤에 NAD를 추출하여 NAD 함량과 균체량을 비교 검토하였다. Table 1과 같이 *Saccharomyces diastycus*를 제외한 모든 효모가 전구물질의 첨가에 의해 건중량그램당 1~5 mg의 NAD를 축적하였다. 균체량은 *Candida fragilis*가 15.2 mg/ml로 가장 높았으나 건중량그램당 NAD 함량은 그리 높지 않았으며 *Saccharomyces sake* KBA No. 6가 비교적 균체량도 많고 건중량그램당 NAD의 함량이 5.9 mg으로 가장 높았다. 따라서 본 실험에서는 비교적 균체증식이 높으며 건중량그램당 NAD 함량이 가장 높은 *Saccharomyces sake* KBA No. 6를 선별하여 사용하였다.

Table 1. Accumulation of NAD in various yeasts

Strains	Growth (mg dry cell/ml)	NAD (mg/g dry cell)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11.0	3.2
<i>Saccharomyces coreanus</i>	14.3	3.0
<i>Saccharomyces carlsbergens</i>	4.4	3.9
<i>Saccharomyces delbruekii</i>	4.4	0.7
<i>Saccharomyces diastycus</i>	1.1	ND ^{a)}
<i>Saccharomyces fibuligera</i>	10.9	3.2
<i>Saccharomyces peka</i>	8.3	2.3
<i>Saccharomyces sake</i> KBA No. 6	9.2	5.9
<i>Candida fragilis</i>	15.2	3.1
<i>Hansenula saturnus</i>	7.2	1.1
<i>Hansenula capsulta</i>	8.5	2.6
<i>Pachysolen tannophilus</i>	12.9	2.8

All media contained 2% Glucose, 1% yeast extract and 2% peptone. Nicotinamide (3 mg/ml) was added at a 24 hr culture period.

^{a)}ND=Not determined.

NAD 생산에 미치는 각종 탄소원의 영향

NAD 생산배지의 탄소원을 Table 2와 같이 여러 종류의 당을 사용하여 실험을 하였다. 탄소원의 종류에 따른 균체량과 NAD 함량을 비교한 결과 Table 2와 같이 탄소원으로 glucose, maltose 및 sucrose를 사용했을 때에 건조균체량이 10 mg/ml 전후의 비슷한 값을 나타내었으나 건중량당 축적된 NAD의 양은 glucose와 suc-

Table 2. Effect of various carbon sources on accumulation of NAD

Carbon source (%)	Growth	Accumulated NAD	
	mg dry cell/ml	mg/g dry cell	mg/100 ml medium
Arabinose	1.2	7.2	0.9
Ribose	1.3	5.3	0.7
Xylose	0.7	6.2	0.4
Galactose	0.9	6.2	0.6
Glucose	10.1	7.3	7.4
Maltose	9.9	3.4	3.4
Sucrose	10.8	6.8	7.3
Raffinose	5.9	5.5	3.2

All media contained 2% peptone, 1% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% K₂HPO₄, 0.5% MgSO₄·7H₂O and 0.0001% ZnSO₄·7H₂O. Nicotinamide (3 mg/ml) was added at a 24 hr culture period.

rose를 사용하였을 때가 maltose를 사용하였을 때 보다 약 2배 많았다. Arabinose를 탄소원으로 사용하였을 때에 건중량당 축적된 NAD의 양은 glucose를 사용하였을 때와 거의 같은 값을 나타내었으나, 생성된 균체량이 glucose를 사용하였을 때에 비해 약 11%에 지나지 않았으며, 또한 sucrose 보다는 glucose를 사용하는 것이 경제적이다 생각되어 이후의 실험에서는 탄소원으로 glucose를 사용하였다. 탄소원으로 선정된 glucose의 최적 농도를 결정하기 위하여 glucose의 농도를 1~10%로 변화시켜 실험한 결과는 Fig. 1과 같았다. Glucose의 농도가 높을수록 균체량은 증가하였으나 건중량당 NAD의 함량은 glucose가 4%일 때 가장 높았다. Glucose가 6~10%가 사용되었을 때에는 NAD의 함량이 감소하는 경

향을 보였다. 따라서 이후의 실험에서는 탄소원으로 4% glucose를 사용하였다.

NAD 생산에 미치는 각종 유기질소원의 효과

1% yeast extract를 지닌 NAD 생산배지에 Table 3에서와 같이 각종 유기질소원을 2%씩 첨가하여 조사하였다. Table 3과 같이 여러 유기질소원들이 2%씩 NAD 생산배지에 첨가되었을 경우 첨가되지 않은 경우에 비해 약 22~30%의 균체량의 증가를 보였다. 그러나 yeast extract, peptone, tryptone을 첨가하여 배양하였을 때가 첨가하지 않은 경우에 비해 건중량당 NAD의 생산량은 약간 증가하였으나, 용적당 NAD의 양은 큰 차로 증가되었다. 그 중에서도 peptone이 첨가되었을 때 건

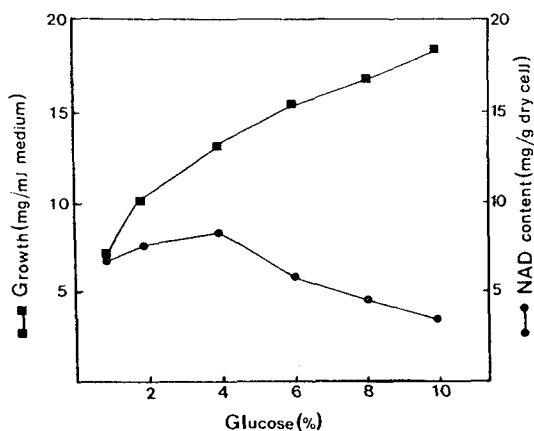


Fig. 1. Effect of glucose on NAD accumulation. In addition to glucose, all media contained 2% peptone, 1% yeast extract, 0.5% KH_2PO_4 , 0.5% K_2HPO_4 , 0.5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.0001% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Nicotinamide (3 mg/ml) was added at a 24 hr culture period. Cultivation was carried out for 72 hrs at 30 °C.

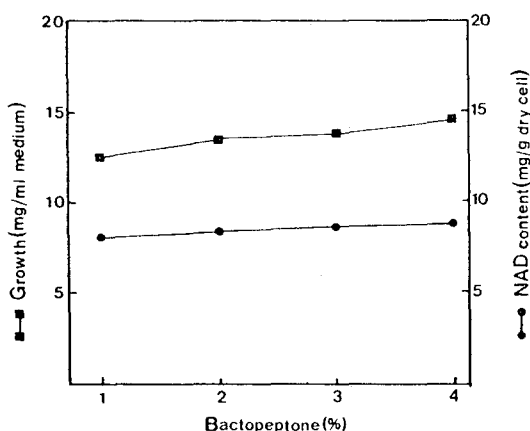


Fig. 2. Effect of bactopeptone on NAD accumulation. In addition to peptone, all media contained 4% glucose, 1% yeast extract, 0.5% KH_2PO_4 , 0.5% K_2HPO_4 , 0.5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.0001% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Nicotinamide (3 mg/ml) was added at a 24 hr culture period. Cultivation was carried out for 72 hrs at 30 °C.

Table 3. Effect of nitrogen sources on accumulation of NAD

Nitrogen source (2%)	Growth	Accumulated NAD	
	mg dry cell/ml	mg/g dry cell	mg/100 ml medium
None	10.5	7.9	8.3
Casein hydrolysate	13.2	6.7	8.8
Yeast extract	13.0	8.1	10.5
Peptone	13.4	8.4	11.3
Tryptone	13.7	8.1	11.1
Soy bean meal	13.5	4.1	5.5
Corn steep liquor	12.8	7.8	9.9

All media contained 4% glucose, 1% yeast extract, 0.5% KH_2PO_4 , 0.5% K_2HPO_4 , 0.5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.0001% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Nicotinamide (3 mg/ml) was added at a 24 hr culture period.

증량당 NAD의 생산량이 6.3%, 용적당 NAD의 양은 36% 증가하였다.

따라서 최적 질소원으로는 peptone을 선택하여 그 농도에 따른 NAD 함량과 균체량과의 관계를 살펴보았다. Fig. 2와 같이 peptone의 농도가 증가할수록 NAD 함량과 균체량도 함께 증가하였으나, peptone의 농도가 2% 이상일 때는 그 증가폭이 감소하였기 때문에 peptone의 최적농도를 2%로 하였다.

NAD 생산에 미치는 Nicotinamide의 영향

Nicotinamide는 NAD 합성의 전구물질로 salvage 경로를 통하여 NAD로 전환된다고 알려져 있다.¹⁶⁾ Nicotinamide의 농도가 NAD의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 효모의 대수증식기 말기(24시간)에 nicoti-

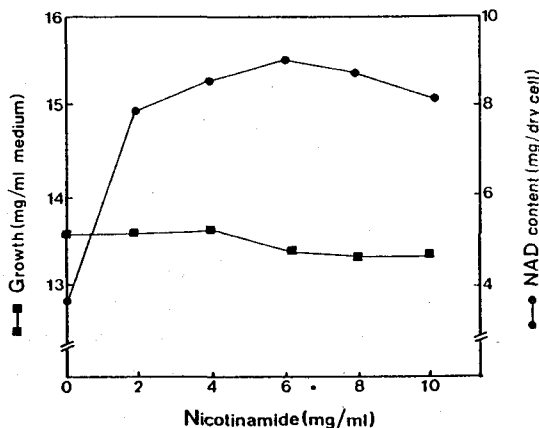


Fig. 3. Effect of nicotinamide on NAD accumulation. Cultivation was carried out for 72 hrs at 30 °C in the medium containing 4% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% K₂HPO₄, 0.5% MgSO₄·7H₂O and 0.0001% ZnSO₄·7H₂O. Nicotinamide was added at a 24 hr culture period.

namide를 첨가하여 조사하였다. Fig. 3에서와 같이 배지에 nicotinamide를 4 mg/ml가 되도록 첨가하였을 때 가장 높게 NAD 함량을 생산하였으며, 이 때의 NAD 함량은 건중량당 8.9 mg이었다. 그 이상의 nicotinamide 농도에서는 NAD 함량이 미세하게 감소하는 경향을 보였다. 따라서 NAD 생산에 가장 좋은 nicotinamide의 농도는 4 mg/ml이었다.

NAD 생산에 미치는 adenine의 첨가효과

ATP와 같은 purine nucleotide의 축적조건이 NAD의 생산을 촉진하며 nicotinamide나 nicotinic acid가 ade-

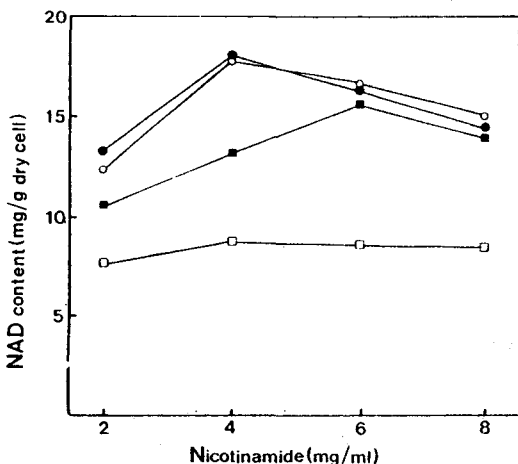


Fig. 4. Effect of adenine addition on NAD accumulation.

Cultivation was carried out for 72 hrs at 30 °C in the medium containing 4% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% K₂HPO₄, 0.5% MgSO₄·7H₂O and 0.0001% ZnSO₄·7H₂O. Nicotinamide and adenine were added at a 24 hr culture period. □—□ : Adenine was not added, ■—■ : 1 mg/ml adenine, ○—○ : 3 mg/ml adenine, ●—● : 5 mg/ml adenine.

Table 4. Effect of metal ions on accumulation of NAD

Metal ion (200 µg/l)	Accumulated NAD	
	Growth mg dry cell/ml	mg/g dry cell
None	13.5	15.0
Ca ²⁺	13.0	14.5
Cu ²⁺	13.5	14.4
Fe ²⁺	13.4	14.2
Mn ²⁺	13.1	15.6
Zn ²⁺	13.5	18.1

All media contained 4% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% K₂HPO₄ and 0.5% MgSO₄·7H₂O. Nicotinamide (4 mg/ml) and adenine (3 mg/ml) were added at a 24 hr culture period.

nine과 함께 배지에 첨가되었을 때 NAD 뿐만 아니라 AMP, ADP, ATP가 생성된다. 또한 adenine이 결합되면 nicotinamide mononucleotide가 축적된다는 것이 알려져 있다.^{6,17)} 본 실험에서 adenine을 nicotinamide와 함께 NAD를 축적시키기 위하여 최적 농도에 따른 영향을 조사하였다. 이 때 adenine의 농도를 1 mg/ml, 3 mg/ml 및 5 mg/ml로 하여 nicotinamide의 농도를 2 mg/ml에서 6 mg/ml로 변화시키면서 NAD의 축적량을 조사하였다. Fig. 4에서와 같이 nicotinamide의 농도가 4 mg/ml이고 adenine의 농도가 3 mg/ml일 때 NAD 함량은 건중량당 18.0 mg이었으며 이는 adenine이 첨가되지 않았을 때의 NAD 함량의 2배에 상당하는 양이었다.

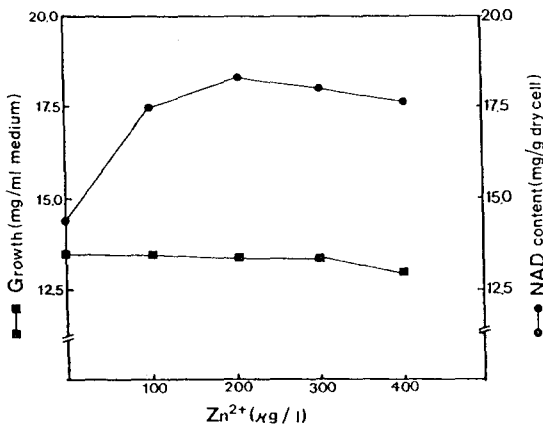


Fig. 5. Effect of Zn²⁺ ion on NAD accumulation. In addition to the metal ions, all media contained 4% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% K₂HPO₄ and 0.5% MgSO₄·7H₂O. Nicotinamide (4 mg/ml) and adenine (3 mg/ml) were added at a 24 hr culture period. Cultivation was carried out for 72 hrs at 30 °C.

NAD 생산에 미치는 금속이온의 효과

본 실험에서는 Zn²⁺가 미생물의 pyridine nucleotide 함량에 미친다는 것으로 알려져 있으므로, 여러 가지 2가 금속이온이 NAD 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Table 4에서와 같이 Mn²⁺과 Zn²⁺을 제외하고 다른 금속을 사용하였을 때는 오히려 무첨가의 경우보다 건중량당 NAD의 축적량이 3.4~5.6%로 감소하는 경향을 보였다. 특히 Zn²⁺ 사용시 NAD의 축적량의 증가는 *Saccharomyces carlsbergensis*를 사용하여 NAD를 생산할 때 Zn²⁺이 효과적이었다는 결과¹⁸⁾와 일치하였다. 또한 최적 Zn²⁺ 농도를 결정하기 위해 Zn²⁺의 농도를 변화시켜 실험한 결과 Fig. 5와 같이 Zn²⁺가 200 µg/l일 때 NAD 함량이 건중량당 18.3 mg로 가장 효과적이었다. 따라서 Zn²⁺의 농도를 200 µg/l로 하여 계속 실험을 하였다.

NAD 생산에 미치는 초기 pH 영향

배지의 초기 pH값을 3에서 10까지 변화시켜 72시간 배양한 후에 균체량과 NAD 함량을 측정하였다. Table 5에서와 같이 배지의 초기 pH값이 4에서 6 사이에서 다른 초기 pH값을 비해 균체량이 많았으며, NAD의 함량도 같은 경향을 보였다. 특히 배지의 초기 pH값이 5인 경우 균체량(13.6 mg/ml)에 있어서나 NAD 함량(18.1 mg/ml)에 있어서 가장 높은 값을 나타내었다. 상기의 결과는 *Saccharomyces oviformis*를 사용하여 NAD를 생산할 때 최적 pH값이 3이었다¹⁴⁾라는 결과와는 일치하지 않았으나 *Saccharomyces carlsbergensis*를 사용하여 NAD를 생산할 때 사용한 pH값 5¹⁸⁾와는 일치하는 것이었다.

NAD 생산에 미치는 온도의 영향

온도를 20 °C에서 40 °C로 변화시키면서 배양한 결과는 Fig. 6과 같았다. 본 실험의 결과, 30 °C에서 균체량과

Table 5. Effect of initial pH on accumulation of NAD

Initial pH	Growth		Accumulated NAD	
	mg dry cell/ml	mg/g dry cell	mg/g dry cell	mg/100 ml medium
3	12.0	17.0	17.0	20.4
4	13.0	17.2	17.2	22.4
5	13.6	18.1	18.1	24.6
6	13.4	16.7	16.7	22.4
7	12.0	14.1	14.1	16.9
8	11.5	14.9	14.9	17.1
9	11.3	14.7	14.7	16.6
10	6.7	13.6	13.6	9.1

All media contained 4% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% K₂HPO₄, 0.5% MgSO₄·7H₂O and 0.0001% ZnSO₄·7H₂O. Nicotinamide (4 mg/ml) and adenine (3 mg/ml) were added at a 24 hr culture period.

NAD 함량이 가장 좋았다. 상기의 결과는 *Saccharomyces*속을 이용하여 NAD를 생산할 때의 최적 온도 30℃라는 보고^{14,18)}와 일치하였다.

NAD 생산에 미치는 계면활성제의 영향

일반적으로 계면활성제는 막투과성이 증가한다고 알려져 있으며, 계면활성제가 NAD 생산을 증진시킨다는 보고^{6,7)}에 따라 본 실험에서는 양이온성 계면활성제, 음

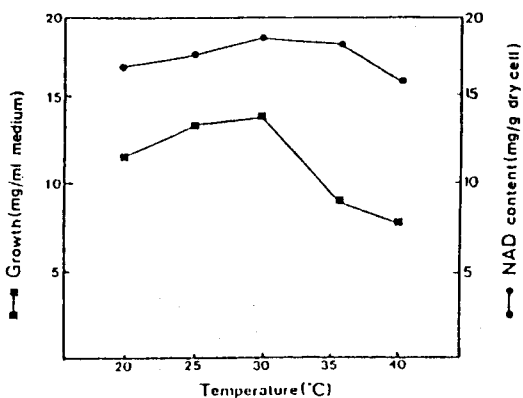


Fig. 6. Effect of temperature on NAD accumulation. Cultivation was carried out for 72 hrs in the medium containing 4% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% K₂HPO₄, 0.5% MgSO₄·7H₂O and 0.0001% ZnSO₄·7H₂O. Nicotinamide (4 mg/ml) and adenine (3 mg/ml) were added at a 24 hr culture period.

이온성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제를 사용하여 균체의 대수증식기 말기에 배지에 0.01과 0.1%되게 첨가하여 실험하였다. Table 6에서와 같이 양이온성 계면활성제인 CTAB과 CPC는 균체의 증식을 저해하고 적은 양의 NAD를 균체내에 함유함과 동시에 배지 중으로 NAD를 방출시키는 것으로 나타났다. 비이온성 계면활성제로 사용한 Tween 40, Tween 80 및 Triton X-100의 경우에는 균체의 증식저해는 그리 크지 않았다. 음이온성 계면활성제인 SDS가 배지에 0.01% 사용되었을 경우 배지 100 ml당 25.9 mg의 NAD가 균체내에 축적되었으며, SDS가 0.1% 사용되었을 경우에는 약 30%의 NAD가 배지 중으로 방출되는 결과를 보였다. 이것은 세균인 *Brevibacterium ammoniagenes*에 있어서 양이온 계면활성제가 가장 효과적이라는 보고¹¹⁾와는 일치하지 않았으나 효모인 *Saccharomyces carlsbergensis*의 경우 음이온성 계면활성제인 sodium cetyl sulfate(SCS)가 NAD 생산에 가장 좋았다는 Sakai 등의 보고¹⁸⁾와는 같은 경향을 나타내는 것으로 사료된다. 따라서, 약간의 효과를 보이는 SDS의 최적 첨가농도를 결정하기 위해서 배지에 0.001%에서 0.3%까지 변화시켜 조사한 결과 Table 7과 같이 배지에 0.05%로 첨가했을 때 전체 NAD의 20% 정도가 배지 중으로 방출되고 전체 NAD 함량이 배지 100 ml당 27.4 mg으로 가장 높았다. 배지에 SDS를 0.3% 이상으로 첨가되었을 때에는 균체내에는 NAD가 거의 남아있지 않고 배지 중으로 방출되었으나 전체 NAD량은 감소하였다.

Table 6. Effect of surfactants on accumulation of NAD

Surfactant ^{a)} (%)	Growth		Accumulated NAD (mg/100 ml medium)		
	mg dry cell/ml		Intracellular	Extracellular	Total
None		13.8	24.6	—	24.6
CTAB	0.01	10.2	8.8	—	8.8
	0.1	5.8	0.4	2.3	2.7
CPC	0.01	8.8	1.0	3.2	4.2
	0.01	12.7	25.9	—	25.9
SDS	0.1	11.3	16.9	6.4	23.3
	0.01	12.8	23.2	—	23.2
Tween 40	0.1	11.9	24.2	—	24.2
	0.01	12.7	13.2	—	13.2
Tween 80	0.1	13.8	12.8	—	12.8
	0.01	12.6	22.5	—	22.5
Triton	0.1	12.4	24.2	—	24.2

All media contained 4% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% K₂HPO₄, 0.5% MgSO₄·7H₂O and 0.0001% ZnSO₄·7H₂O. Nicotinamide (4 mg/ml) and adenine (3 mg/ml) were added at a 24 hr culture period.

^{a)} Added at 24 hr culture period.

Table 7. Effect of sodium dodecyl sulfate on accumulation of NAD

SDS ^{a)} (%)	Growth		Accumulated NAD (mg/100 ml medium)		
	mg dry cell/ml		Intracellular	Extracellular	Total
None	13.8		24.6	—	24.6
0.001	13.3		24.9	—	24.9
0.005	13.0		24.8	—	24.8
0.01	12.9		26.1	—	26.1
0.05	11.9		22.1	5.3	27.4
0.1	11.6		16.8	6.8	23.6
0.2	11.1		7.9	9.6	17.5
0.3	10.9		1.4	8.9	10.3

All media contained 4% glucose, 1% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% K₂HPO₄, 0.5% MgSO₄·7H₂O and 0.0001% ZnSO₄·7H₂O. Nicotinamide (4 mg/ml) and adenine (3 mg/ml) were added at a 24 hr culture period.

^{a)}Added at 24 hr culture period.

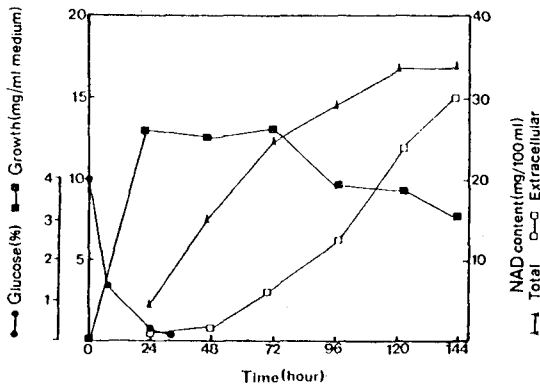


Fig. 7. Time course of NAD accumulation by *Saccharomyces sake* KBA No. 6.

Cultivation was carried out for 72 hrs at 30 °C in the medium containing 4% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% K₂HPO₄, 0.5% MgSO₄·7H₂O and 0.0001% ZnSO₄·7H₂O. Nicotinamide (4 mg/ml) and adenine (3 mg/ml) were added at a 24 hr culture period.

배양시간에 따른 NAD 생산

상기의 최적 조건하에서 시간 경과에 따른 NAD 생산량을 조사한 결과 Fig. 7과 같았다. 탄소원으로 사용한 glucose는 24시간 이후에 거의 소모되었으며, NAD는 nicotinamide와 adenine이 첨가된 이후에 비례적으로 증가하였다. 배양 24시간 후에 SDS를 첨가하여 계속 배양한 결과 축적된 NAD가 배지 중으로 방출되었다. 배양 140시간 후에 NAD 생산량은 균체내에서 40 mg/100 ml 이었으며, 균체외의 존재량은 31 mg/100 ml 이었으며 배지 100 ml당 35 mg이었다. 이 때 총 NAD량의 89%가 배지 중으로 방출되었다.

참 고 문 헌

1. 桑原正章 : 醱酵と工業, 42 : 738(1984)
2. 桑原正章 : 醱酵と工業, 37 : 29(1979)
3. Miyake, Y. and Gaylor, G. L. : J. Biol. Chem., 248 : 7345(1973)
4. Scott, T. A. and Matthey, M. : Biochem. J., 107 : 606 (1968)
5. Foster, J. W. and Moat, A. G. : Microbiol. Rev., 44 : 83(1980)
6. Bazdyreva, N. M. : Appl. Biochem. Microbiol., 25 : 121(1988)
7. Wimpenny, J. W. T. and Firth, A. : J. Bacteriol., 111 : 24(1972)
8. Kuwahara, M., Ishida, Y. and Miyagawa, Y. : J. Ferment. Technol., 60 : 399(1982)
9. Kuwahara, M., Ishida, Y., Miyagawa, Y. and Kawakami, C. : J. Ferment. Technol., 62 : 237(1984)
10. 早野恒一, 建部 到, 北原覺雄 : 日本 農化, 38 : 515 (1964)
11. Nakayama, K. : US Patent, 3,705,080(1966)
12. 中山 清 : JP 47-19748, 47-19749(1972)
13. Lodder, J. : The Yeasts, A taxonomic study, 2nd ed., 76 North-Holland Publishing Company, New York(1970)
14. Tekei, S. : Nippon Nogeikagaku Kaishi., 40 : 283 (1966)
15. Klingenberg, M. : Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., Weinheim Verlag Chemie, 2045(1983)
16. Pinder, S., Clark, J. B. and Greenbaum, A. L. : Methods in Enzymology. Vol. 18 (Part B) : 20(1967)
17. Nakayama, K., Sato, Z., Tanaka, H. and Kinoshita,

S. : Agr. Biol. Chem., 32 : 1331(1968)

Chem., 37 : 1041(1973)

18. Sakai, T., Uchida, T. and Chibata, I. : Agr. Biol.

Production of NAD from adenine and nicotinamide by *Saccharomyces sake* KBA No.6

In-Girl Choi, Ki-Chul Hwang and Won-Gi Bang(Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Abstract : In order to produce nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) which is a pyridine nucleotide coenzyme, *Saccharomyces sake* KBA No. 6 having high NAD content was selected from 12 strains of yeast and various factors affecting the production of NAD were investigated. For NAD production, 4% of glucose was effective as a carbon source and 2% of bactopectone was the best nitrogen source. The optimum pH and temperature was 5.0 and 30 °C, respectively. Also, when 4 mg/ml of nicotinamide and 3 mg/ml adenine were used as precursors simultaneously, NAD production was the best. To increase NAD production, 2 valence metal ions were used during cultivation and Zn²⁺ was very efficient. Among the surface active agents, anionic sodium dodesyl sulfate (SDS) was effective. Under the optimum conditions, the maximum amount of produced NAD was 35 mg/100 ml medium after cultivation of 144 hrs and 89% of total NAD amount, 31 mg of NAD, was leaked into culture broth.