Hanguk Nonghwahak Hoechi
(J. Korean Agric. Chem. Soc.)
36(5), 332~338(1993)

Ashbya gossypii JAG-13 변이주에 의한 riboflavin의 생산

심문보 · 염성관* · 김만근* · 방원기
고려대학교 농화학과, *진로 종합연구소

초록 : 리보플라빈을 생산하기 위하여 *Ashbya gossypii* NRRL Y-1056의 균주개량을 시도하였으며 선발한 변이주 *Ashbya gossypii* JAG-13에 의한 리보플라빈의 생산시의 최적 배지조성 및 배양조건을 결정하였다. 최적 배지조성은 9%의 옥수수 기름, 3%의 젤라톤, 4%의 CSL, 0.3%의 글리신, 0.2%의 자당 지방산 에스테르 S770 였다. 배양배지의 초기 pH와 최적 배양온도는 각각 pH 6.5 와 28℃였다. 산소의 공급은 리보플라빈의 생산에 필수적이었으나 과도한 산소의 공급은 오히려 리보플라빈의 생산을 저해하였다. *Ashbya gossypii* JAG-13을 위와같은 조건에서 생물배양기를 이용하여 12일간 배양하여 6.9 mg/ml의 리보플라빈을 생산하였다(1993년 7월 26일 접수, 1993년 9월 28일 수리).

리보플라빈(7,8-dimethyl-10-ribitylisoalloxizine)은 열에 안정하며 약간의 냄새와 쓴 맛을 지닌 수용성 비타민(비타민 B_2)의 일종으로 중성 수용액상에서 밝은 황록색의 형광을 나타내며, 정제방법에 따라 세가지 형태의 오렌지색 결정체를 형성한다. 또한 강산에서는 매우 안정하나 알칼리 용액에서는 불안정하여 빛이나 자외선의 조사에 의하여 쉽게 분해된다.[1] 이 리보플라빈은 생물체내에서 유리형태로 존재하기 보다는 대부분 FMN (flavin mononucleotide) 및 FAD(flavin adenine dinucleotide) 등의 형태로 존재하며 각종 산화·환원반응을 촉매하는 효소들의 보효소로 작용한다.[2] 그러나 대부분의 동물은 리보플라빈을 생체내에서 합성하지 못할 뿐만 아니라 체내에 리보플라빈이 결핍되게 되면 식욕저하와 체중감소, 탈모 및 pellagra 유사증, 각종 지루성 피부염, 신경장애등의 리보플라빈 결핍증을 유발한다.[3] 따라서 이들에 있어서는 외부의 영양원으로부터 리보플라빈이 필수적으로 공급되어야 한다. 이러한 이유로 리보플라빈은 그동안 의약산업, 식품 및 사료산업등에서 각종 영양제 및 치료제, 식품 및 사료의 영양강화제 등으로 이용되어 왔으며 최근에는 천연색소 등으로도 이용되고 있어 그 수요가 날로 증가하고 있는 실정이다. 리보플라빈의 생산방법에는 유기합성법, 반합성법 및 미생물을 이용한 방법 등이 알려져 있으며 미생물을 이용한 방법이 선호되고 있는 추세이다.[3]

따라서 본 실험에서는 미생물에 의한 리보플라빈의 생산을 위하여 리보플라빈 생산균인 *Ashbya gossypii*의 균주개량 및 이들 변이주를 이용한 리보플라빈 생산시의 최적 배양학적 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서는 ATCC로부터 분양받은 *Ashbya gossypii* NRRL Y-1056을 모균주로 사용하였다.

배지

본 실험에서 *Ashbya gossypii*의 포자형성에는 Gorodkowa's ascospore medium(배지 A)[4]을 사용 하였는데 그 조성은 Beef extract 10 g/l, Glucose 2.5 g/l, NaCl 5 g/l였으며, 리보플라빈 생산을 위한 기본배지로는 corn oil 45 ml/l, Pancreatic gellatin hydrolysate 35 g/l, corn steep liquor 45 ml/l, glycine 3 g/l(배지 B)였고, 균주의 보존에는 yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l, peptone 5 g/l, glucose 10 g/l, agar 20 g/l(배지 C)를 각각 사용하였다.

균주의 배양

*Ashbya gossypii*를 24시간 전배양한 배양액 2%를 배지 B가 30 ml 함유된 250 ml용 Sakaguchi flask에 접종하여 28℃에서 암상태를 유지시키며 10일간 왕복 진탕배양(5 cm, 200 strokes/min)하였다.

Key words : *Ashbya gossypii* JAG-13, riboflavin production, optimum culture conditions
Corresponding author : M. B. Shim

리보플라빈의 정성 및 정량

리보플라빈의 정성 및 정량분석은 Ritter[5]의 HPLC (column; μ-Bondapak C_{18})를 이용한 형광 분광 광도계 (450 nm, excitation filter; 495 nm, emission filter)법을 이용하였다. 분석용 시료는 일정량의 배양액을 취하여 동량의 0.1N H_2SO_4 와 혼합한 후, 121℃에서 1시간 가수분해 시킨 다음 최종 리보플라빈의 농도가 5~10 ppm이 되도록 희석하여 0.45 μm의 membrane filter로 여과한 액을 20 μl씩 사용하였다.

변이처리 및 변이주의 선발

배지 A에서 형성시킨 *Ashbya gossypii* NRRL Y-1056의 포자를 회수하여 0.9% 생리 식염수로 2회 세척한 후 1 mM 인산 완충액(pH 7.8)에 6×10^4 spore/ml이 되도록 현탁한 후, 30℃에서 20 ppm의 NTG를 이용하여 95%의 포자가 사멸할 때까지 처리하였다. NTG(*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) 처리한 포자의 현탁액을 배지 C의 평판배지에 도말하여 배양한 후 형성된 콜로니중 짙은 오렌지색의 콜로니를 선발하여 사용하였다.

결과 및 고찰

변이균주의 선발

상기의 방법으로 얻어진 *Ashbya gossypii* 콜로니 300개를 배지 B에 접종하여 10일간 배양한 결과 리보플라빈 생산능이 모균주 보다 10% 이상 향상된 4종의 변이주를 선발하였다. 이들 선발균주의 유전적 안정성을 확인하기 위하여 배지 C의 사면배지상에서 10회 계대하며 상기와 같은 방법으로 배양하면서 각 변이주의 리보플라빈 생산능의 지속성을 관찰하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 바와같이 JAG-13이 리보플라빈 생산량에 있어서나 변이균주의 안정성에 있어서 다른 변이주에 비해 가장 우수한 것으로 나타나 본 실험의 실험균주로 계속 사용하였다.

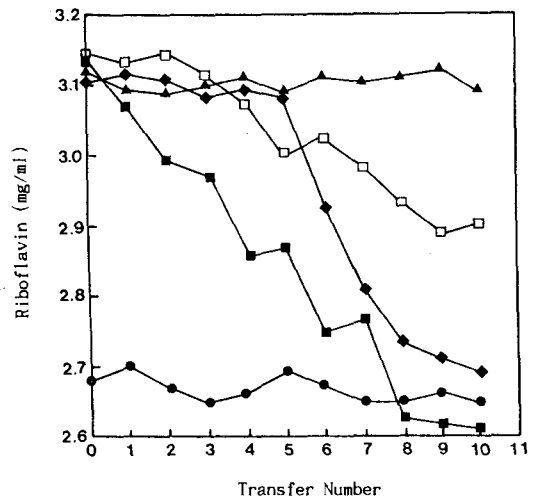

Fig. 1. Comparison of riboflavin production and genetic stabilities of mutants and wild strains of *Ashbya gossypii* NRRL Y-1056. ●—●, Wild strain; ▲—▲, JAG-13; □—□, JAG-95; ◆—◆, JAG-132; ■—■, JAG-271

리보플라빈 생산에 미치는 탄소원의 영향

Ashbya gossypii JAG-13에 의한 리보플라빈의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 배지 B에 서로 다른 탄소원을 사용하여 실험한 결과, Table 1과 같이 포도당 등을 탄소원으로 사용한 경우 보다 식물성 오일을 탄소원으로 사용한 경우의 리보플라빈 생산량이 월등히 높아 옥수수 기름을 리보플라빈 생산을 위한 탄소원으로 사용하였다. 또한 옥수수 기름의 농도가 리보플라빈 생산에 미치는 영향을 살펴본 결과, Fig. 2에 나타난 바와 같이 기질에 대한 리보플라빈의 수율은 옥수수 기름을 5% 사용했을 때가 가장 높았으나, 리보플라빈 생산량은 9%를 사용했을 때가 3.77 mg/ml로서 가장 좋았다. 따라서 이 후의 실험에서는 탄소원으로 9%의 옥수수 기름을 사용하였다.

리보플라빈 생산에 미치는 질소원의 영향

Ashbya gossypii JAG-13에 의한 리보플라빈의 생산에

Table 1. The effect of carbon sources on the production of riboflavin by *Ashbya gossypii* JAG-13

Carbon source*	Dry cell mass (mg/ml)	Riboflavin (mg/ml) (mg/ml)
Glucose	10.1	0.80
Fructose	6.5	0.81
Galactose	2.1	0.04
Mannose	9.5	0.92
Maltose	7.4	0.56
Sucrose	9.2	1.08
Lactose	1.7	0.02
Ribose	–	–
Xylose	–	–
Arabinose	–	–
Starch	13.2	0.01
Corn oil	11.3	3.20
Soy bean oil	11.5	3.06

*Carbon sources added were 5% (W/V)

미치는 질소원의 영향을 알아보기 위하여 여러 단백질 가수분해물들을 질소원으로 사용하여 실험한 결과, Table 2에서 볼 수 있듯이 젤라틴의 가수분해물인 젤라톤이 질소원으로 가장 우수하였으며, Fig. 3에서 볼 수 있듯이 3%의 젤라톤 사용시의 리보플라빈 생성량이 3.97 mg/ml로 최대를 나타내었다. 따라서 이 후의 실험에서는 질소원으로 3%의 젤라톤을 사용하였다.

리보플라빈 생산에 미치는 Corn steep liquor(CSL)의 영향

*Ashbya gossypii*는 growth factor로 biotin, inositol, thiamine 등의 비타민을 필요로 하는 것으로 알려져 있다.[6] 따라서 *Ashbya gossypii*에 의한 리보플라빈의 생산시에는 이들 성장인자를 공급하여 주어야만 하며 이러한 성장인자의 공급원으로서 Corn steep liquor(CSL)가 가장 적합한 것으로 알려져 있다.[7] 본 실험에서도 *Ashbya gossypii* JAG-13에 의한 리보플라빈의 생산에 미치는 CSL의 영향을 살펴본 결과, Fig. 4에 나타난 바와 같이 4%의 CSL을 첨가하여 준 경우의 리보플라빈 생산량이 4.13 mg/ml로 무첨가군에 비하여 약 9배 정도 증가하여

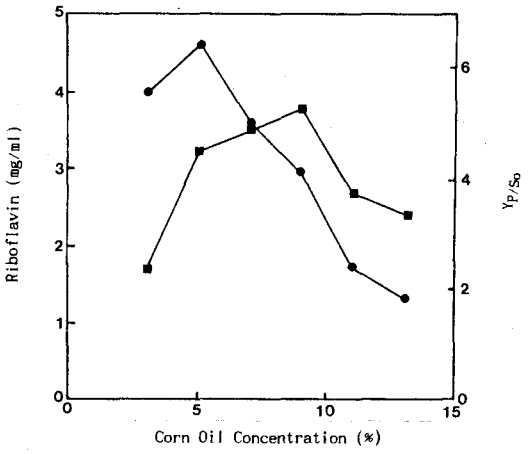

Fig. 2. The effect of corn oil concentration on the production of riboflavin by *Ashbya gossypii* JAG-13. Y_P/S_0=(riboflavin %/corn oil %)×100 ■—■, Riboflavin; ●—●, Y_P/S_0

Table 2. The effect of nitrogen sources on the production of riboflavin by *Ashbya gossypii* JAG-13

Nitrogen source*	Riboflavin (mg/ml)
Enzymatic digest of casein	
Casitone	0.52
Tryptone	0.26
Acid digest of casein	
Casamino acid	0.64
Enzymatic digest of animal tissue	
Bacto-peptamine	0.47
Bacto-peptone	2.68
Neo-peptone	1.19
Proteolictic-peptone	2.20
Tryptose	1.26
Gellatone	3.78
Enzymatic digest of soy bean meal	
Soytone	1.65

*Nitrogen sources added were 5% (W/V)

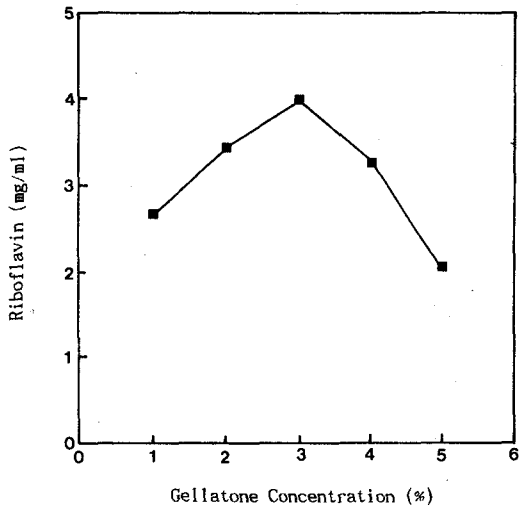

Fig. 3. The effect of gellatone concentration on the production of riboflavin by *Ashbya gossypii* JAG-13.

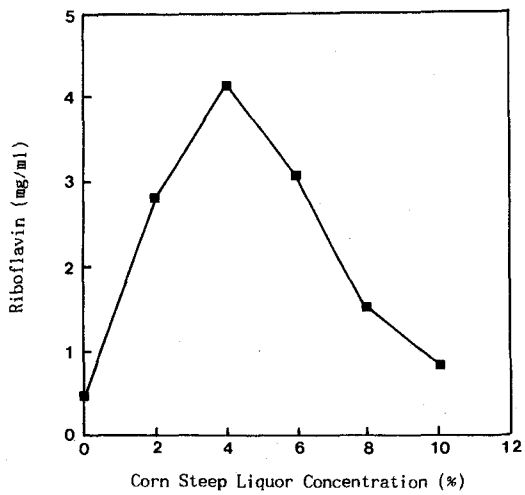

Fig. 4. The effect of corn steep liquor concentration on the production of riboflavin by *Ashbya gossypii* JAG-13.

그 효과가 우수함을 알 수 있었다. 따라서 이 후의 실험에서는 성장인자 공급원으로 4%의 CSL을 사용하였다.

리보플라빈 생산에 미치는 글리신의 영향

Demain[8]은 글리신, 쎄린, 쓰레오닌, 구아노신 등의 물질이 미생물에 의한 리보플라빈의 생산을 촉진한다고 보고하였으며, 특히 그 중에서도 글리신은 purine의 전구체로 purine의 합성을 촉진시켜 결국 *Ashbya gossypii*에 의한 리보플라빈의 합성을 촉진시킨다고 하였다. 따라서 본 실험에서도 *Ashbya gossypii* JAG-13에 의한 리보플라빈의 생산에 미치는 글리신의 영향을 알아본 결과, Fig. 5에 나타난 바와 같이 글리신을 0.3% 첨가한 경우의 리보플라빈 생성량이 4.22 mg/ml로 무첨가군에 비하여 약 35% 이상 높았으며, 그 이상의 글리신 농도에서는 오히려 리보플라빈 합성을 저해하였다. 이것은 과도한 글리신의 첨가는 리보플라빈 합성을 저해한다는 Lago 와 Kaplan[6]의 결과와도 일치하는 것이었다. 따라서 이 후의 실험에서는 0.3%의 글리신을 사용하였다.

리보플라빈 생산에 미치는 계면 활성제의 영향

일반적으로 계면 활성제는 오일이나 탄화수소를 기질로 이용하는 미생물의 배양에 있어서 기질의 분산 및 기질에 대한 세포벽의 투과성을 증가시켜 균체의 증식 또는 유용 물질의 합성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.[9] 따라서 본 실험에서도 *Ashbya gossypii* JAG-13에 의한 리보플라빈의 생산에 미치는 비이온성 계면활성제의 영향을 살펴보기 위하여 6종의 비이온성 계면 활성제를 이용하여 실험한 결과, Table 3에 나타난 바와 같이 자당 지방산 에스테르 계열의 일종인 S770의 리보플라빈 합성 촉진 효과가 가장 우수하였으며 그 최적 농도는 0.2%였다. 그러나 다른 계면활성제들은 오히려 리보플라빈 합성을 저해하였으며 이러한 결과는 리보플라빈의 생산에 있어서 여러 비이온성 계면활성제 중에서도 Tween 및 Span 계열의 계면활성제가 효과적이라는 Smith 등[10]의 결과와는 차이가 있었다.

Table 3. The effect of nonionic surfactants on the production of riboflavin by *Ashbya gossypii* JAG-13

Surfactant*	Riboflavin (mg/ml)
None	4.18
Tween 80	4.52
Tween 40	4.24
Tween 20	3.86
Span 80	3.71
S 770+	5.02
S 1170+	4.20

*Surfactants added were 2% (V/V)
+These surfactants were used with 10% (W/V) solution

Table 4. The effect of inoculum age on the production of riboflavin by *Ashbya gossypii* JAG-13

Age (hrs)	Riboflavin (mg/ml)
24	5.02
48	3.82
72	2.88

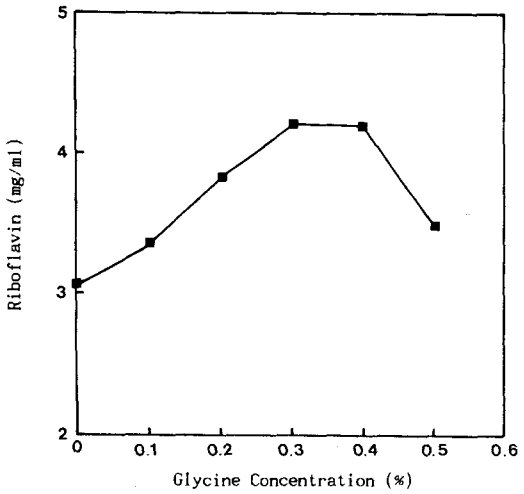

Fig. 5. The effect of glycine concentration on the production of riboflavin by *Ashbya gossypii* JAG-13.

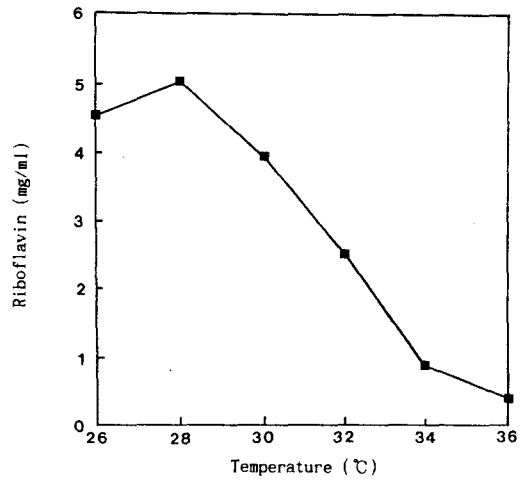

Fig. 6. The effect of cultivation temperature on the production of riboflavin by *Ashbya gossypii* JAG-13.

리보플라빈 생산에 미치는 접종원의 배양기간 및 접종량의 영향

Ashbya gossypii JAG-13에 의한 리보플라빈의 생산에 미치는 접종원의 배양기간 및 접종량이 미치는 영향을 살펴본 결과, Table 4에 나타난 바와 같이 *Ashbya gossypii* JAG-13의 24시간 전배양액이 접종원으로 가장 우수하였으며, 이들 접종원을 2% 사용하였을 때의 리보플라빈 생성량이 5.02 mg/ml로 가장 높았다. 배양기간과 접종량이 증가함에 따라 리보플라빈의 생성량이 감소하였는데 이는 Tanner 등[11]의 실험과도 일치하는 것이었다.

리보플라빈 생산에 미치는 배양온도의 영향

*Ashbya gossypii*는 넓은 온도 범위에 걸쳐서 활발히 증식할 수 있으나 리보플라빈은 제한된 온도에서만 생산되는 것으로 알려져 있다.[12] 따라서 본 실험에서도 *Ashbya gossypii* JAG-13에 의한 리보플라빈의 생산에 미치는 배양온도의 영향을 살펴본 결과, Fig. 6과 같이 28℃에서 배양한 경우 5.02 mg/ml으로 최대의 리보플라빈이 생산되었으나 30℃이상에서는 리보플라빈의 생산이 급격히 감소하여 36℃에서는 리보플라빈이 거의 생산되지 않았으며, 이것은 Demain[8]의 보고와도 일치하는 것이었다.

리보플라빈의 생산에 미치는 초기 pH의 영향

*Ashbya gossypii*에 의한 리보플라빈의 생산시 배지의 초기 pH가 매우 중요한 것으로 알려져 있다.[13] 따라서 본 실험에서도 *Ashbya gossypii* JAG -13에 의한 리보플라빈 생산에 미치는 배지의 초기 pH의 영향을 알아본 결과, Fig. 7에서 볼 수 있듯이 Ashbya gossypii JAG-13에 의한 리보플라빈의 생산량은 중성 pH인 6.5에서 7.0사이에서 5.02 mg/ml로 가장 높게 나타났으며 pH 4.5에서는 리보플라빈의 생산량이 매우 미미하였다. 이와 같은 결과는 Özbas와 Kustal[13]의 실험결과와도 매우 잘 일치하는 것이었다.

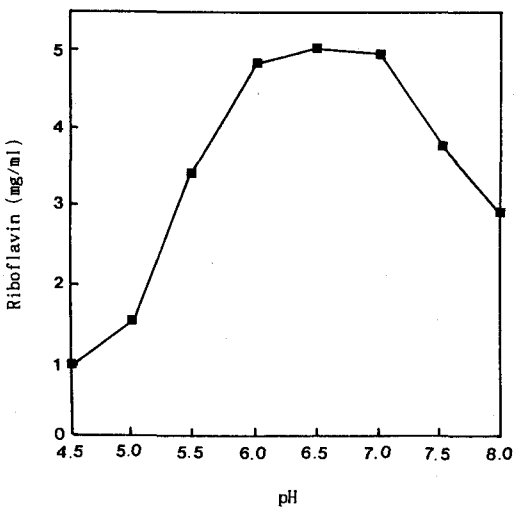

Fig. 7. The effect of initial pH of medium on the production of riboflavin by *Ashbya gossypii* JAG-13.

리보플라빈의 생산에 미치는 산소의 영향

*Ashbya gossypii*는 통성 혐기성 미생물로서 혐기조건하에서는 알콜발효를 수행하는 것으로 알려져 있다.[14]

Table 5. The effect of oxygen on the production of riboflavin by *Ashbya gossypii* JAG-13

Aeration rate*	Riboflavin (mg/ml)
1/5	2.25
1/4	4.91
1/3	6.59
1/2	6.02

The culture was carried out in bioreactor (B. Braun Biostat E, 8 L). Working volume was 5 L.
*Aeration rate was relative volume of supplied air against working volume per minute and agitation speed was 400 rpm with three impellers.

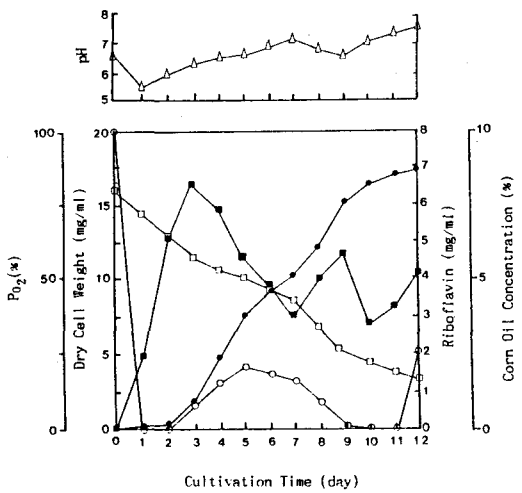

Fig. 8. Time course of the production of riboflavin by Ashbya gossypii JAG-13.
The culture was carried in bioreactor (B. Braun biostat E, 18L). Working volume was 10 L, aeration rate was 1/3 V of working volume per minute and agitation speed was 400 rpm with three impellers.
■—■, Dry cell weight; ●—●, Riboflavin; □—□, Corn oil; △—△, pH; ○—○, Po_2

또 Harvey 와 Plaut[15] 는 산소분자가 riboflavin synthatase의 활성을 저해한다고 하였다. 본 실험에서도 *Ashbya gossypii* JAG-13에 의한 리보플라빈의 생산에 미치는 산소의 영향을 살펴보기 위하여 생물배양기에 1분당 산소의 공급속도를 배양액량의 1/5 V부터 1/2 V까지 차별화시켜 배양한 결과, Table 5에서 볼 수 있듯이 산소의 공급이 부족하거나 지나칠 경우에 리보플라빈 생산량이 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 Wickerharm 등[16]의 주장과도 일치하는 것이었다.

생물 반응기 배양실험

본 실험에서는 *Ashbya gossypii*에 의한 리보플라빈의 발효특성을 알아보기 위하여 *Ashbya gossypii*를 상기의 배지 및 배양조건하에서 생물반응기를 이용하여 배양시키며 균체량, 리보플라빈, 기질의 농도 및 pH와 Po_2 등의 경시적 변화를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 8에서 볼 수 있듯이 *Ashbya gossypii*는 접종 후 3일까지 활발히 증식하다가 대수증식기 말부터 리보플라빈이 형성되기 시작하면서 균체의 자기분해가 일어나기 시작하여 균체량이 약 1/2까지 감소하였다. 그러나 배양 후반기에 *Ashbya gossypii*는 자신들의 자기분해로 형성된 영양원을 이용하여 다시 증식하는 cryptic growth가 관찰되었다. 리보플라빈은 접종 2일 후부터 서서히 생산되기 시작하여 균체의 자기분해와 함께 활발히 생성되었다. 이러한 결과는 리보플라빈의 합성이 균체의 자기분해와 밀접히 관련되어 있을 것이라는 Demain[8]과 Florent[17]의 주장과도 일치하는 것이었다.

배양기간 중 배양액의 pH는 접종 1일 후까지, pH 6.5에서 pH 5.5 까지 감소하였으나 리보플라빈이 생산되기 시작하면서 pH 7.1 까지 서서히 상승하였으며 이것은 Mickelson 등[14]의 결과와도 일치하는 것이었다. 배양액중의 상대적 산소분압을 나타내는 Po_2는 배양초기에 0%까지 감소하다가 2일 후부터 약 20%까지 서서히 증가하였다. 그러나 균체의 2차 증식이 활발히 일어나는 배양 8일 경에 다시 감소하였다가 배양말기에 서서히 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 통기량을 좀 더 높여주어 배양액중의 Po_2를 50%로 유지시키며 배양한 경우, 오히려 리보플라빈의 생산량이 감소하는 경향을 나타내었다.

이와 같이 생물반응기를 이용하여 *Ashbya gossypii* JAG-13을 12일간 배양할 경우 약 6.9 mg/ml의 리보플라빈이 생산되었다.

참 고 문 헌

1. Jauregg, T. W.: In 'The Vitamins', Vol. 5, p. 1, Academic Press, New York. London(1972)
2. Friedrich, W.: In 'Vitamins', p. 403, Walter De Gruyter Press, Berlin. New York(1988)
3. Goldsmith, G. A.: In 'Riboflavin', p. 221, Plenum Press, New York. London(1975)
4. Pridham, T. G., Raper, K. B.: Mycologia, 44 : 452 (1952)
5. Ritter, E. D.: J. AOAC., 53(3) : 542(1970)
6. Lago, B. D., and Kaplan, L.: In 'Adv. Biotechnol.', Vol. 3, Proc. 6th Int. Ferm. Symp. London. Canada, p. 241, Pergamon Press, Toronto(1981)
7. Malzahn, R. C., Phillips, R. F. and Hanson, A. M.: U. S. Patent 2, 876, 169(1959)
8. Demain, A. L.: Ann. Rev. Microbiol., 26 : 369(1972)
9. Schlee, D. and Straube, G.: Die Pharmazie, 39(H. 12) : 805(1984)
10. Smith, C. G., Smith, G. A. and Papadoupoulou, Z.: Biochim. Biophys. Acta, 47 : 344(1961)
11. Tanner, F. W. Jr., Vojnovich, C. and Van Lanen, J. M.: J. Bacteriol., 58 : 737(1949)
12. Celetti, P., Strom, R., Giordano, M. G., Barra, D. and Grovenco, S. : J. Biochem., 57(6) : 773(1965)
13. zbas, T. and Kustal, T.: Enzyme Microb. Technol., 8 : 593(1986)
14. Mickelson, M.N.: J. Bacteriol., 59 : 659(1950)
15. Harvey, A. R. and Plaut, G. W. E.: J. Biol. Chem., 241(9) : 2120(1966)
16. Wickerham, L. J., Flickinger, M. H. and Johnston, R. M.: Arch. Biochem., 9 : 95(1946)
17. Florent, J.: In 'Biotechnology', Vol. 4, p. 127, VCH Press, FRG.(1986)

The production of riboflavin by *Ashbya gossypii* JAG-13

Moon-Bo Shim*, Sung-Kwan Yum**, Man-Keun Kim**, Won-Gi Bang* (*Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Korea University, Seoul, 136-701, Korea : **JINRO Central Research Institute, Biotechnology Lab., Seocho P. O. Box 215, Seoul, Korea)

Abstract : For the production of riboflavin, strain development of *Ashbya gossypii* NRRL Y-1056 was attempted by NTG(*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) treatment. The optimum composition of culture medium and other culture conditions for the production of riboflavin by selected mutant Ashbya gossypii JAG-13 were determined. The optimum composition of medium was 9% of corn oil, 3% of gellatone, 4% of CSL, 0.3% of glycine, 0.2% of S770. The optimum culture temperature and initial pH of medium was 28℃ and 6.5, respectively. oxygen was essential for the production of riboflavin, but excess oxygen inhibit the production of riboflavin. When *Ashbya gossypii* JAG-13 was cultured under above conditions for 12 days with a bioreactor, 6.9 mg/m*l* of riboflavin was produced.