

*Brevibacterium flavum*의 동종간 및 *Corynebacterium glutamicum*과의 이속간 원형질체 융합 및 개량균주의 L-Lysine 생합성의 대사제어

박 청 · 임번삼 · 전문진*

고려대학교 농화학과

Intraspecific Protoplast Fusion of *Brevibacterium flavum* and Intergeneric Protoplast Fusion between *Brevibacterium flavum* and *Corynebacterium glutamicum* and the Metabolic Control of L-Lysine Biosynthesis in Improved Bacterial Strains

Park Chung, Bun-Sam Lim and Moonjin Chun*

Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 132, Korea

As a trial method of breeding L-lysine producing strains, the intraspecific protoplast fusion between *Brevibacterium flavum* ATCC 21528R and *Brevibacterium flavum* ATCC 21529S and the intergeneric protoplast fusion between *Brevibacterium flavum* ATCC 21528R and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13058S were performed. The optimum conditions for protoplast formation of these strains were examined and the effect of plasma expander on regeneration and/or fusion was also observed. Both fusants No. CH23 and No. CH41 showed higher productivity of L-lysine than those of parental cells under the optimum cultural conditions at a rate of 21% and 8.9%, respectively. And, activity of several enzymes in L-lysine biosynthetic pathway including aspartokinase, a rate-limiting enzyme, was determined. Besides, metabolic control mechanism of L-lysine biosynthesis in fusant No. CH23 and in No. CH41 was investigated to compare with that of parental strains.

최근 아미노산 발효공업에 있어서 산업적으로 이 용도가 높은 lysine을 고농도로 생산하는 발효균주의 개발에 細胞融合方法이 많은 각광을 받고 있다(1, 2, 3, 4). 이 방법은 무작위적으로 돌연변이를 유발하여 개량균주를 개발하던 과거의 방법에 비하여, 미생물의 종이나屬에 관계없이 非特異적으로 적용할 수 있으며 그 操作이 비교적 간편하고 유전자의 재조합 확률도 매우 높은 것으로 알려지고 있다(5, 6).

저자 등은 이미 lysine 생산균주인 coryne형 세균의 원형질체 융합방법에 대하여 보고한 바 있으며(7, 8, 9) 이들의 세포융합 과정을 透過電子顯微鏡으로 관찰한 바 있다(10).

본 연구에서는 coryne형 세균중 lysine 발효에 널리 사용되고 있는 *Brevibacterium* spp.와 *Corynebacterium* spp.의 세균주간에 원형질체 융합을 실시하여 얻은 개량균주의 배양조건에 대하여 검토

하였으며, 아울러 생합성 회로상에 있는 주요 酵素들의 活性를 측정하여 모균의 경우와 비교 검토하였기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

사용균주 및 기본배지

본 연구에서는 lysine 생산균주인 *B. flavum* ATCC 21528R(thr⁻, AEC^r, rif^r, str^r), *B. flavum* ATCC 21529S(thr⁻, AHV^r, str^r, rif^r) 및 glutamic acid 생산균주인 *C. glutamicum* ATCC 13058S(str^r, rif^r)를 실험균으로 사용하였다. 원형질체 융합시 융합체를 선별하기 위하여 항생물질에 내성을 가진 변이주를 분리 사용하였으며(7, 8, 9), rif^r 균주는 rifampicin 100 µg/ml, str^r 균주는 streptomycin 100 µg/ml에 각각 내성을 나타내었고 상태항생제의 최소저해농도는 5 µg/ml이었다.

Key words: Protoplast fusion, L-lysine biosynthesis, metabolic control

*Corresponding author

種菌의 배양은 완전배지(complete medium, CM)를, 원형질체의 형성과 융합에는 최소배지(minimal medium yeast extract, MMYE)를, 세포벽의 재생에는 재생배지(regeneration complete growth medium, RCG)를 사용하였다. 또한 원형질체의 희석액(dilution fluid, DF), 융합액(fusion fluid, FF), 용해액(lysis fluid, LF)과 L-lysine 생산용 배지도 전보(7, 8, 9, 11)의 조성에 따랐다.

원형질체형성, 재생 및 융합

실험균주의 원형질체 형성과 재생 및 융합을 위한 기본 처리방법은 전보(7, 8, 9)에 준하였다.

또한 원형질체의 세포벽재생과 융합에 중요한 영향을 미치는 것으로 보고된 polyvinyl pyrrolidone (PVPI)(12), dextran(13) 및 gelatin(14) 등에 대하여 검토하였다.

L-Lysine 생산성

실험균주 및 융합주의 L-lysine 생산성 확인은 전보(9)에 따랐다.

효소의 활성 측정

Aspartokinase(AKase)의 활성은 Black(15)의 hydroxamate 법을 일부 수정한 Shii와 Mijajima의 방법(16)에 따라서 측정하였고, PEP carbox-

ylase의 활성과 pyruvate kinase의 활성은 Ozaki 등의 방법(17)을 사용하였다.

결과 및 고찰

원형질체형성, 세포벽재생 및 융합

원형질체의 형성은 penicillinG 0.3 unit/ml 과 lysozyme 300~400 μg/ml 의 농도로 10~12시간 처리하였던 바 모든 실험균주에서 99.9%의 원형질체 형성율을 나타내었다. 이는 전보(8, 9)의 최적조건이 본 실험균에 대해서도 유효함을 보여주는 것이다. 형성된 원형질체는 고장상태를 유지해야 하므로 (11) 0.4 M sodium succinate 를 사용하였다.

Table 1은 plasma expander 인 polyvinyl pyrrolidone(PVPI)과 dextran 및 gelatin 이 원형질체의 세포벽 재생에 미치는 영향을 나타낸 것으로 PVPI 는 균의 종류에 관계없이 30 g/l 첨가했을 때 가장 높은 재생율을 보였는데, 이 농도에서 *Brevibacterium flavum* ATCC 21529S 의 재생율은 무첨가시의 8 배까지 상승하였다. 그러나, dextran 은 *B. flavum* 에서 1 배내지 5 배의 효과가 있었고 gelatin 은 균종에 관계없이 원형질체 재생에 미치는 효과가 거의 없었다.

원형질체 융합에는 전보(9)에서 확인된대로 PEG 6000, 30%(w/v)를 사용하였고, pH 역시 Tozawa

Table 1. Effect of concentration of various plasma expanders on protoplast regeneration frequency of *Coryneform* bacteria

Strains	<i>B. flavum</i> ATCC 21528R			<i>B. flavum</i> ATCC 21529S			<i>C. glutamicum</i> ATCC 13058S		
	PVPI	dextran	gelatin	PVPI	dextran	gelatin	PVPI	dextran	gelatin
Plasma expander conc. (g/l)									
0		1.76			1.48			8.26	
20	7.05	9.87	1.45	7.74	3.28	1.60	13.44	8.31	8.23
30	10.58 *(6.01)	10.12 (5.75)	1.93 (1.09)	12.48 (8.43)	6.5 (4.39)	1.78 (1.20)	26.33 (3.18)	7.98 (0.96)	8.37 (1.01)
50	7.35	7.84	1.19	8.07	2.67	1.30	17.92	6.64	7.06

*(): Balance (times) = $\frac{Rf(\%) \text{ at } 3\% \text{ plasma expander concentration}}{Rf(\%) \text{ at } 0\% \text{ plasma expander concentration}}$

**R.f(%) = $\frac{\text{Colony number on RCG agar}}{\text{Total cells-non protoplasted cells}} \times 100$

Table 2. Effect of plasma expander concentration on fusion frequency of *Coryneform* bacteria

plasma expander	Cross PEG conc. (g/l)	<i>B. flavum</i> ATCC 21528R × <i>B. flavum</i> ATCC 21529S		<i>B. flavum</i> ATCC 21528R × <i>C. glutamicum</i> ATCC 13058S	
		PEG(%)0	PEG(%)30	PEG(%)0	PEG(%)30
		PVPI	0	—	2.3×10^{-7}
	20	2.87×10^{-7}	7.6×10^{-7}	3.5×10^{-7}	3.0×10^{-6}
	30	2.04×10^{-7}	2.58×10^{-6}	6.1×10^{-7}	2.8×10^{-5}
	50	1.32×10^{-7}	1.09×10^{-6}	4.4×10^{-7}	1.0×10^{-6}
dextran	0	—	2.30×10^{-7}	ND	1.4×10^{-7}
	20	1.45×10^{-8}	3.80×10^{-7}	ND	ND
	30	2.04×10^{-8}	3.90×10^{-7}	1.65×10^{-7}	3.57×10^{-6}
	50	1.06×10^{-7}	4.8×10^{-7}	ND	ND
gelatin	0	—	2.30×10^{-7}	ND	1.4×10^{-7}
	20	1.20×10^{-7}	5.1×10^{-7}	1.09×10^{-7}	3.62×10^{-7}
	30	4.65×10^{-7}	1.48×10^{-6}	2.04×10^{-7}	2.65×10^{-6}
	50	2.31×10^{-7}	8.9×10^{-7}	1.25×10^{-7}	7.61×10^{-7}

*ND; Not determined

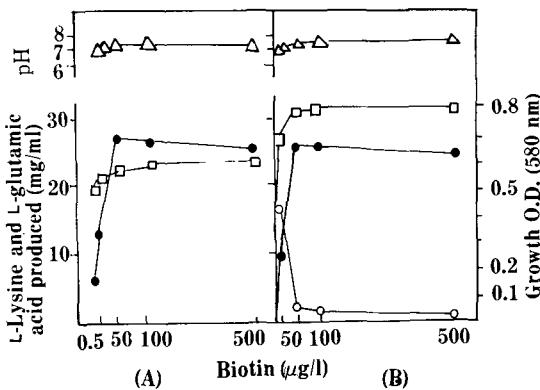


Fig. 1. Effect of biotin concentration on (A) L-lysine production of fusant CH23 and (B) L-lysine and L-glutamic acid production of fusant CH41

●; L-lysine produced, ○; L-glutamic acid produced, □; growth, △; pH

등(18)이 보고한, 산성측보다는 pH 8.0~12.0 범위의 알칼리성측으로 갈수록 융합이 촉진된다는 보고에 의해 전보(9)에서 확인된 융합액의 pH 10.5로 처리하였다.

Table 2는 同種間 및 異屬間 융합실험에서 나타난 융합빈도를 비교한 것으로 PEG 30%(w/v) 첨가시 융합이 일어나며 여기에 PVPI 30 g/l을 동시 첨가했을 때 *B. flavum* 동종간의 경우 2.58×10^{-6} , *C.*

glutamicum 과의 이속간의 경우 2.8×10^{-5} 으로 가장 높은 융합빈도를 나타내었다. 이는 PEG 무첨가에 비해 융합빈도가 10~200배 촉진된 것이다.

융합균주의 유전형질 확인 및 L-Lysine 생산성 측정

다음으로, *B. flavum* 간의 동종간 및 *B. flavum* 과 *C. glutamicum* 간의 이속간 원형질체 융합에서 얻은 융합주들에 대한 항생물질 내성과 영양요구성 및 analog 내성 등에 대해서 검토하여, 그 결과 Table 3(A)의 융합주 C군과 (B)의 융합주 B군을 융합된 개량균주로 선정하였다(Table 3).

그 결과 Table 4에서 보듯이 *B. flavum* 동종간의 융합에서 얻은 fusant No. CH 23, *B. flavum* 과 *C. glutamicum* 이속간의 융합에 얻은 fusant No. CH41은 親株인 *B. flavum* ATCC 21528R 보다 lysine 생성능이 각각 21%와 8.9%가 향상되었음을 확인하였다.

Fusant No. CH23과 No. CH41의 배양조건

Fig.1은 lysine 생산에 미치는 biotin의 영향(19)을 나타낸 것으로 융합주 CH 23에서는 biotin 농도가 증가할 수록 lysine의 생산은 증가하였으나 50 µg/l 농도수준에 도달하면 더 이상 lysine량은 증

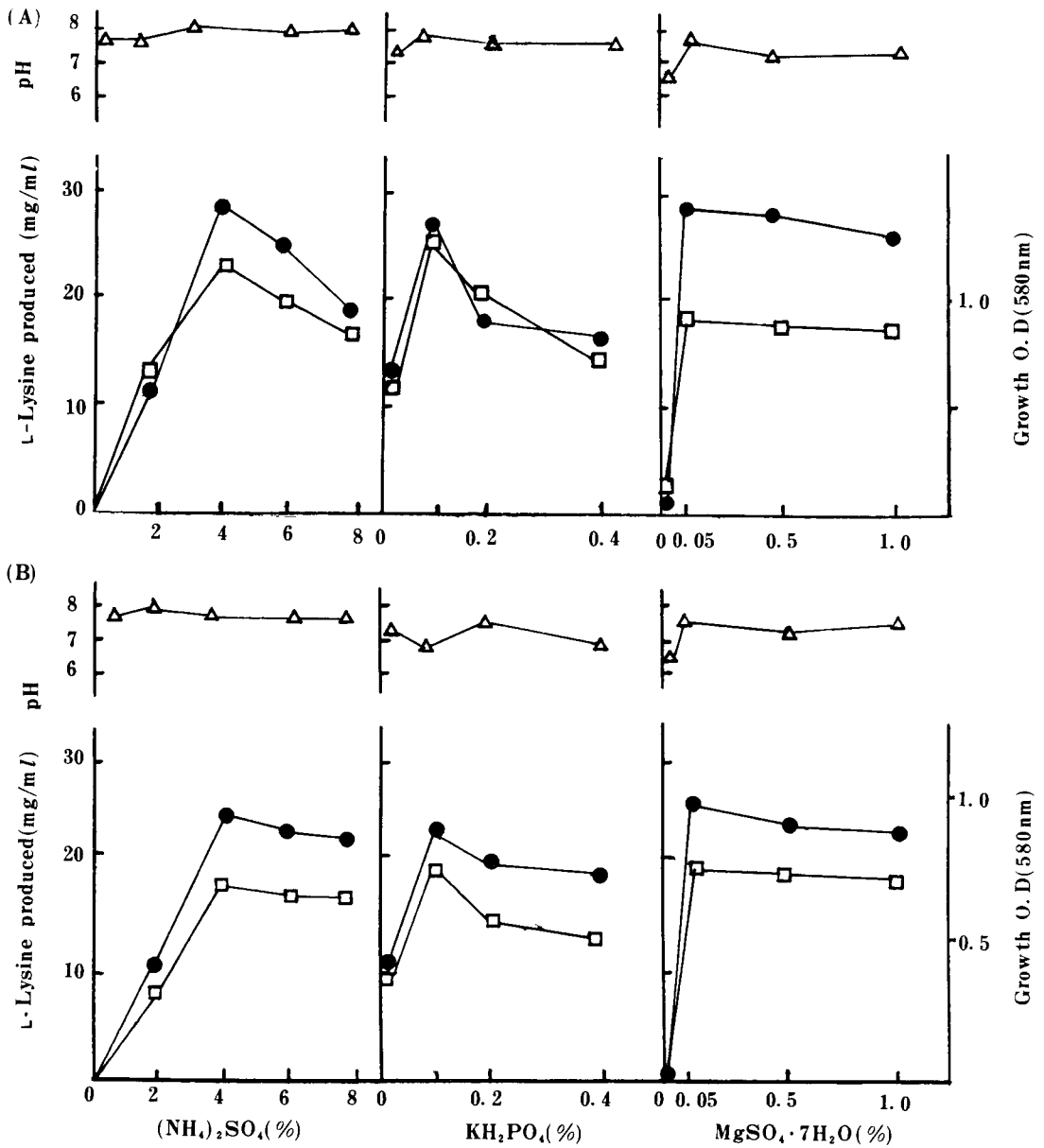


Fig. 2. Effect of salt concentration on L-lysine production of (A) fusant CH23 and (B) fusant CH41
 ●, L-lysine produced, □; growth; △; pH

가하지 않았다. Glutamic acid 생산균인 *C. glutamicum*을 이용하여 얻은 fusant No. CH41의 경우 biotin의 영향이 주목되는데, glutamic acid 생산에는 biotin 첨가농도가 5 µg/ml 이하일 때 최대 수적량을 나타낸은 이미 알려진 바와 같다(2).

이어서, 각종 염류농도의 영향(20, 21)을 조사하고 Fig.2의 결과를 얻었다. Fusant No. CH23과 No.

CH41은 서로 유사한 경향을 보이고 있는데, (NH₄)₂SO₄와 KH₂PO₄는 각각 4%와 0.1% 부근에서 최적이었다고, MgSO₄·7H₂O는 0.04%가 최적농도로 작용하였다. 그러나, (NH₄)₂SO₄와 KH₂PO₄는 농도가 증가함에 따라 lysine 생산량이 감소하였는데 이는 菌株生育의 감소에 기인한 것으로 보인다.

Table 3. Auxotrophic characterization for fusants formed by protoplast fusion

Fusant type	RCG + str + rif	MM	MM + thr	MM + AEC	MM + AEC + AHV	No. of colonies obtained
A	+	±	+	±	+	12
B	+	-	-	+	±	4
C	+	-	+	+	+	2
D	+	-	+	-	+	3
E	+	++	++	+	+	2

(B) Cross: *B. flavum* ATCC 21528R (thr⁻, AEC^r, rif^r) × *C. glutamicum* ATCC 13058S (str^r)

Fusant type	RCG + str + rif	MM	MM + thr	MM + AEC	No. of colonies obtained
A	+	+	+	±	5
B	+	-	++	+	2
C	+	-	±	±	11
D	+	±	+	+	4

* RCG + str + rif was RCG supplemented 50 µg/ml of streptomycin and 50 µg/ml of rifampicin

** MM was minimal medium

*** MM + AEC was minimal medium supplemented 2mg/ml of aminoethyl cysteine

Table 4. L-Lysine and L-glutamic acid productivity in parental cells and their fusants

Strains	L-Lysine accumulated (mg/ml)	L-Glutamic acid accumulated (mg/ml)	Relative index
<i>Brevibacterium flavum</i> ATCC 21528R	24.3	ND**	100*
<i>Brevibacterium flavum</i> ATCC 21529S	12.7	ND	52.3
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13058S	0.1	20.2	0.41
CH 2 (intraspecific)	25.4	ND	104.5
CH 6 (intraspecific)	25.9	ND	106.58
CH23 (intraspecific)	29.6	ND	121.81
CH40 (intergeneric)	22.8	-	93.82
CH41 (intergeneric)	26.4	16.2	108.99

* The number showed the relative percentage of L-lysine productivity for *B. flavum* ATCC 21528R

** ND: Not determined

Table 5는 여러 glucose 농도에서 생산되는 lysine 양을 나타낸 것으로 표준배지(10%)에서보다 높은 농도의 glucose 첨가배지에서 생산성이 높았다. 그러나, 생산수율(%)은 fusant No. CH23의 경

우 10% glucose 농도에서 가장 좋았고, fusant No. CH41의 경우는 10%~13%에서 최적치를 나타내었다.

Table 5. Effect of glucose concentration on L-lysine production

Fusant	Glucose concentration (%)	pH	Growth O.D. (580nm 1/25)	L-Lysine produced		
				Amount (mg/ml)	Residual sugar (%)	Yield** (%)
CH23	8	6.9	0.876	18.2	0.7	24.9
	10	7.3	1.03	29.6	2.4	38.9
	12	7.4	1.24	30.2	3.6	35.9
	13	7.2	1.22	30.9	4.3	35.5
CH41	8	7.0	0.692	6.708	0.6	9.06
	10	7.3	1.17	8.99	2.8	12.48
	12	7.5	1.36	10.23	3.3	11.75
	13	7.3	1.09	13.37	3.8	12.35

Glucose fermentation medium was replaced by that of each given concentration. Cultivation was carried out 30°C for 72 hrs on a reciprocal shaker.

$$**Yield (\%) = \frac{L\text{-Lysine produced } (\%)}{\text{Glucose consumed } (\%)} \times 100$$

Table 6. Specific activities of various enzymes of L-lysine producing parental cells and their fusants

Strain	L-Lysine produced (mg/ml)	Specific activity (unit/mg protein)			
		PC	PK	AK	
				Inhibition (%)*	
<i>B. flavum</i> ATCC 21528R	24.3	94.6	82.3	6.48	8.4
<i>B. flavum</i> ATCC 21529S	12.7	88.1	91.7	5.59	7.66
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13058S	0.1	80.7	167.2	4.35	89.1
CH23	29.6	98.1	74.5	5.23	3.8
CH41	26.4	95.8	133.2	4.87	4.3

PC: Phosphoenolpyruvate carboxylase PK; Pyruvate kinase

AK: Aspartokinase

*Inhibition by 10mM L-lysine plus 10 mM L-threonine

개량균주의 L-lysine 생합성경로와 대사제어

Lysine 생합성 경로는 크게 두 가지 경로로 추정되고 있는데 (22), 하나는 phosphoenolpyruvate에서 phosphoenolpyruvate carboxylase(PC)의 작용을 받아 oxaloacetate를 지나서 aspartate로 가는 경로와, 다른 하나는 phosphoenolpyruvate에서 pyruvate kinase(PK)의 작용을 받아 TCA 회로를 통하여 oxaloacetate를 거쳐 aspartate로 가는 경로이다. 친주들과 선별된 fusant No. CH23 및 No. CH41에 대하여 anaplerotic pathway에 의해서 oxaloacetate를 보충하는 경로와 TCA cycle를 통하는 경로를 대비하기 위하여 PC, PK의 활성을 비

교하였고, 또한 lysine 생합성의 중심효소인 AKase 활성을 비교하였다(Table 6).

B. flavum 동종간의 융합에서 얻은 fusant No. CH23이 친주인 *B. flavum* ATCC 21528R보다 lysine 생산성이 21% 증가한 것은 주로, AKase의 lysine과 threonine에 의한 concerted feedback inhibition이 감소했기 때문인 것으로 판단되며 PC의 효소활성은 친주들과 마찬가지로 PK의 활성보다는 높은 경향을 유지하고 있으나, fusant No. CH23에서는 특히 PK의 활성이 친주들보다 낮은 것을 알 수 있었다. 즉, PC의 활성이 *B. flavum* ATCC 21528R보다 약 4% 증가한 반면 PK는 약 10% 감

Table 7. Effect of L-threonine and L-lysine on aspartokinase activity in parental cells and its fusants

L-Threonine added (μ mole/ml)	L-Lysine added (μ mole/ml)	Relative activity (%)				
		<i>B. flavum</i> ATCC 21528R	<i>B. flavum</i> ATCC 21529S	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13058S	CH23	CH41
—	—	100	100	100	100	100
1	1	115.3	102.4	54.2	109.8	108.6
10	10	91.6	92.34	10.90	96.2	95.7

* As 100% we took aspartokinase activity in the absence of the amino acids in the reaction mixture; this done to determine the activity of the enzyme.
 ** The specific aspartokinase activity of *B. flavum* ATCC 21528R, *B. flavum* ATCC 21529S, *C. glutamicum* ATCC 13058S, CH23 and CH41 were 6.48, 5.59, 4.35, 5.23 and 4.87 nmoles/min/mg protein, respectively.

소하였다.

Lysine 생산균과 glutamic acid 생산균 이속간의 융합에서 얻은 fusant No. CH41이 친주보다 생산성이 증가한 이유는 AKase의 concerted feedback inhibition이 감소한 점과 fusant No. CH41의 PC 활성이 친주중의 *C. glutamicum* 보다 19% 증가한 반면, PK 활성이 38%나 현저히 감소한 것으로 보아 TCA 회로를 경유하여 aspartate로 가는 경로대신 phosphoenolpyruvate에서 oxaloacetate를 거쳐 aspartate로 가는 회로로 생합성 과정이 변경된 때문으로 해석된다.

Brevibacterium 속이나 *Corynebacterium* 속에서 lysine 생합성 회로상의 중심효소(key enzyme)인 aspartokinase(AKase)는 lysine 과 threonine에 의하여 그 활성이 조절받는데 이를 Table 7에 나타내었다.

Lysine 과 threanine 을 각각 10 mM 씩 첨가했을 때 fusant No. CH23과 No. CH41은 각각 무첨가시 AKase 상대활성의 3.8%와 4.3%의 저해를 받았으며 이는 친주들과 비교하여 저해효과가 크게 감소한 것이다.

이상의 결과에서 PC와 PK 효소간의 활성균형을 이루고 concerted feedback inhibition이 감소된 융합균주에서 lysine의 생산성이 향상됨을 확인하였다.

요 약

Lysine 생산균주를 개량하기 위한 시도로서 *Brevibacterium flavum* ATCC 21528R 과 *Brevibacterium flavum* ATCC 21529S 의 동종간 및 *Brevibacterium flavum* ATCC 21528R 과

Corynebacterium glutamicum ATCC 13058S 와의 이속간 원형질체 융합을 실시하였다.

이들 균주들에 대한 원형질체 형성의 최적조건을 조사하고 재생과 융합에서의 plasma expander의 효과를 검토하였다. 융합주 No. CH23과 No. CH41은 최적 배양조건하에서 L-lysine 생산성이 모균에서보다 각각 21%와 8.9% 향상된 것이었다.

L-Lysine 생합성 회로상의 중심효소인 aspartokinase를 포함한 주요효소의 활성을 측정하였고, 융합주 No. CH23과 No. CH41에서의 L-lysine 생합성 대사제어를 친주와 비교하였다.

참고문헌

1. Tosaka, O., K. Takinami and Y. Mirose: *Agri. Biol. Chem.* **42**, 745 (1978)
2. Zhdanova, N., V. Livshits, A. Shtannikov, T. Leonova and L. Kozyreva: 4th Int. Symp on GIM Abstract. (1982)
3. Santamaric, R., J.M. Mesas and J.F. Martin: 4th Int Symp on GIM Abstract, p. 60 (1982)
4. 瀧波 弘一; リジン醗酵: 醗酵と工業, **40** (2), (1982).
5. Foder, K. and L. Alföldi: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **73**, 2147-2150 (1976)
6. Götz, F., S. Ahrne, and N. Lindberg: *J. Bacteriol.* **145**, 74 (1981)
7. Shin, M.G., B.S. Lim, S.Y. Lee and M.J. Chun: *Kor. J. Microbiol.* **22**(3), 175-181 (1984)
8. Kyung, K.C., B.S. Lim, S.Y. Lee and M.J. Chun: *Kor J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**(3), 279-283 (1985)
9. Kim, J.H., B.S. Lim, S.Y. Lee and M.J. Chun: *Kor. J. Bacteriol.* **23**(3), 190-196 (1985)

10. Park, C., B.S. Lim, M.J. Chun and W.K. Kim: *Kor. J. Microbiol.* **23**(4), 265-270 (1985)
11. Kaneko, H. and K. Sakaguchi: *Agri. Biol. Chem.* **43**, 1007-1013 (1979)
12. Takashi, A. and J. Sekiguchi: *Agri. Biol. Chem.* **45**(12), 2887-2894 (1981)
13. Gabor, M.H. and R.D. Hotchkiss: *J. Bacteriol.* **137**(3), 1346-1353 (1979)
14. Okamoto, T., Y. Fujita and R. Irie: *Agri. Biol. Chem.* **47**, 259 (1983)
15. Black, S.: *Method in Enzymology*. Vol 5, 820-823 (1962).
16. Miyajima, R., S. Otsuka and I. Shiio: *J. Biochem.* **63**(2), 139 (1968)
17. Ozaki, H. and I. Shiio: *J. Biochem.* **66**(3), 297 (1969)
18. 唐澤昌彦, 戸坂修; 細菌の プロトプラスト 融合法, 日本公開特許, 昭 58-158184 (1983).
19. Tosaka, O., H. Hirakawa and K. Takinami: *Agri. Biol. Chem.* **43**(3), 491 (1979)
20. Bang, B.H., and J.H. Seu: *Kor J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **12**(3), 241-246 (1984)
21. Tsuchida, T., F. Yoshinaga, K. Kubota, H. Momose and S. Okumura: *Agri. Biol. Chem.* **39**(5), 1149-1153 (1975).
22. Shvinka, J., U. Viestursand and M. Ruklisha: *Biotechnol. Bioeng* Vol. **XXII** 897-912 (1980)

(Received February 26, 1987)