

## 6-Azaauracil 내성을 지닌 *Corynebacterium glutamicum* 변이주에 의한 L-Lysine의 생산

신 현 철 · 김 성 준 · 전 영 중 · 이 재 흥  
제일제당(주) 종합연구소

### L-Lysine Production by 6-Azaauracil Resistant Mutant of *Corynebacterium glutamicum*

Hyun-Chul Shin, Seong-Jun Kim, Yeong-Joong Jeon and Jae-Heung Lee  
R&D Center, Cheil Foods & Chemicals Inc.,  
522-1, Dokpyong-Ri, Majang-Myun, Ichon-Kun, Kyonggi-Do, Korea

#### ABSTRACT

To improve L-lysine yield, pyrimidine base analogue(6-azauracil)-resistant mutants were isolated from *Corynebacterium glutamicum* KFCC10672. Among them, the best producer, *C. glutamicum* CH0516, was selected and tested for L-lysine production in a 7ℓ fermentor. It was found that the product yield obtained with *C. glutamicum* CH0516 was higher than that of the parent strain by 3%. In order to elucidate the gain in productivity with the 6-azauracil-resistant mutant, enzymatic kinetic parameters such as aspartokinase (AKase) and aspartate carbamoyltransferase (ATCase) were measured. The  $K_m$  values of AKase with *C. glutamicum* KFCC10672 and CH0516 were 200.0 mM and 166.7 mM and those of ATCase were 0.13 mM and 0.27 mM, respectively. However, the specific enzyme activities of AKase of *C. glutamicum* KFCC10672 and CH0516 were  $3.89 \times 10^{-1}$  units/mg and  $4.78 \times 10^{-1}$  units/mg, and those of ATCase were 2.20 units/mg and 1.84 units/mg, respectively. It appears that some increase in product yield with *C. glutamicum* CH0516 is likely due to the increased AKase activity and decreased ATCase activity.

#### 서 론

L-Lysine은 필수아미노산의 하나로써 사료첨가용으로 methionine 다음으로 수요가 큰 품목이며 1958년 교와학회가 *Corynebacterium glutamicum*을 이용해 처음 공업화하였으며(1) 그 후 아지노모도가 *Brevibacterium flavum* 변이주를 이용해 공업화에 성공하였다(2).

L-Lysine을 생산하는 미생물의 특성은 크게 3가지로 대별할 수 있는데 그 첫째가 leucine 또는 me-

thionine, threonine 영양요구성 변이주이고(3, 4, 5), 둘째가 threonine이나 methionine 감수성 균주 또는 lysine, threonine, methionine analogue 내성 변이주이다(6, 7). 셋째는 위 두 가지 특성에 항상 제, purine, pyrimidine base analogue 내성 및 감수성을 부여한 변이주(8, 9, 10)이다. 또한 최근에는 유전자 재조합기술이 발달됨에 따라 L-Lysine 생산균주 개발에 적용(11, 12, 13)되었으나 공업적 생산에 아직 성과가 나타나지 않는 사실에 비추어 볼 때 인공변이에 의한 균주 개발은 향후에도 균주

의 수율 향상 및 생산성 향상에 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

한편, 본 연구자들은 L-Lysine 생산 고역가 균주를 선별하기 위해 이미 leu, thr, met 영양요구성 균주 및 각종 아미노산 analogue, 항생제에 대해 감수성 또는 내성을 지닌 인공돌연변이주를 선별하여 공업적 규모에서 성과를 올렸고(14) 새로운 고역가 균주 개발을 위해 pyrimidine 및 purine base analogue 내성변이주에 의한 실험에 착수하였다. 특히 pyrimidine nucleotides 생합성에는 L-Lysine 생합성의 전구체인 aspartate가 공통으로 사용된다는 점에 착안하여 pyrimidine base의 각종 analogue 내성변이주에 대해 실험을 실시한 결과 6-azauracil만이 유용한 효과를 갖는 것이 확인되어 6-azauracil 내성주에 대한 L-Lysine 발효 실험 및 그에 관련된 효소의 특성을 연구하였다. 다음 Fig. 1은 aspartate의 생체내 대사경로를 나타낸 것으로 aspartate가 L-Lysine 합성 및 pyrimidine nucleotides 합성의 공동전구체가 됨은 물론 전자의 합성에는 aspartokinase가 후자의 합성에는 aspartate carbamoyltransferase가 key enzyme이 됨을 알 수 있다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용된 모균주 *Corynebacterium glutamicum* KFCC10672는 leucine 및 threonine, methionine 요구성을 가지며 lysine의 analogue인

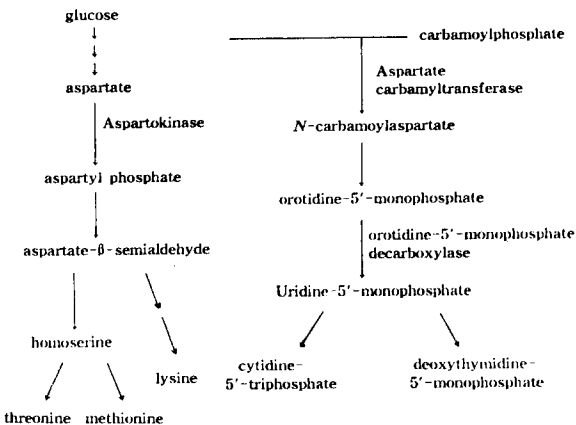


Fig 1. Metabolic pathway and key enzymes related to L-lysine and pyrimidine nucleotides biosynthesis.

S-(2-aminoethyl)-L-cysteine과 arginine의 analogue인 arginine hydroxamate 내성을 지닌 변이 균주이다. 한편 L-Lysine 생산고역가 균주인 *C. glutamicum* CH0516은 6-azauracil이 4g/l, leu, thr, met이 각각 0.1 g/l 함유된 최소배지에서 *C. glutamicum* KFCC10672를 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG, 250 to 500µg/ml)로 인공변이시켜 선별하였다.

배지 및 배양조건

최소배지 성분은 glucose 10g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g, urea 2g, leucine 0.1g, threonine 0.1g, methionine 0.1g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.1g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 12mg, MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 12mg, biotin 100µg, thiamine · HCl 100µg, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O 80µg, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>27</sub> · 4H<sub>2</sub>O 40µg, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10µg, CuSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 300µg, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 10µg, FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1mg, agar 20g per liter pH 7.0(before autoclaving)이었다. 플라스크 발효배지로는 sucrose 75g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20g, corn steep liquor 100g, urea 4g, leucine 0.2g, threonine 0.1g, methionine 0.1g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, NaCl 2.5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 12mg, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 12mg, MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 12mg, biotin 300µg, thiamine · HCl 500µg, CaCO<sub>3</sub> 40g, per liter (pH 7.0)을 사용하여 rotary shaker에서 30°C, 60시간 내지 72시간 배양 한후 발효액 내 L-lysine을 정량분석하였다.

7ℓ 발효조 실험은 추가당 및 추가물을 발효 중에 첨가하는 유가식발효(fed-batch fermentation)로 온도 30°C, pH 7.2, 교반속도 700 내지 800rpm, 통기량 1vvm의 조건에서 55 내지 60시간 발효를 실시하였으며 사용배지는 당밀(cane molasses(55%, w/w)) 230g, corn steep liquor 100 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 7mg, MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 7mg, leucine 1.1g, threonine 0.5g, methionine 0.5g per liter 이었다.

세포의 성장도 및 총당의 측정

발효조 내의 세포성장도는 발효액을 100 내지 200배 희석 한 뒤 optical density(O.D)를 측정하여 나타냈으며 총당은 공지의 방법인 Bertrand법(15)에 의해 분석하였다.

L-Lysine 농도 분석

L-Lysine 농도는 상등액이 아닌 whole broth를

기준으로 산성닌히드린(acidic ninhydrin)법(16)과 high performance liquid chromatography(HPLC, Waters 기종)로 분석 정량하였다.

#### Aspartokinase(AKase) 효소액의 제조 및 활성도 측정

세포를 원심분리하여 회수한 후 TEM 완충용액(50mM Tris-HCl(pH 7.6), 1mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM 2-mercaptoethanol)으로 세척한 후 동일한 용액에 재현탁시킨 다음 세포를 20분 동안 4°C에서 sonicator(a microtip-equipped Sonic & Materials)를 사용하여 파쇄하였다. 그 후 30분 동안 10,000×g에서 원심분리하여 고형분을 제거하고 상등액에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 포화용액을 상등액의 3배 부피를 가한 다음 원심분리하여 단백질 침전물을 회수하고 이를 완충용액에 용해시켜 aspartokinase의 효소 활성을 측정하는데 사용하였다.

한편 효소의 활성은 Black방법(17)에 따라 100mM Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(pH 8.0), 10mM ATP, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 100mM hydroxylamine, 400mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50mM potassium aspartate의 반응혼합액을 사용하여 측정하였다.

Aspartate에 대한 겉보기 K<sub>m</sub> 값은 double reciprocal plot에 의해 결정하였으며 비효소활성(specific enzyme activity)은 표준조건하에서 1분당 aspartate hydroxamate 1×10<sup>-3</sup>mole을 생산하는 단백질의 양을 효소 활성의 1unit로 결정하였으며 단백질의 양은 Lowry 방법(18)에 의해 측정하였다.

#### Aspartate Carbamoyltransferase(ATCase) 효소액의 제조 및 활성도 측정

원심분리하여 회수한 세포는 10mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 세척한 후 0.5mM 2-mercaptoethanol과 20μM EDTA를 함유하는 동일한 완충용액에 현탁하였다. 세포는 전술한 방법과 동일한 방법으로 파쇄하였으며 획득한 효소의 침전물은 10mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.5)에 재현탁한 후 Linda와 Jones방법(19)에 의해 aspartate carbamoyltransferase의 활성을 측정하였다.

한편 생성된 N-carbamoylaspartate는 Lansing과 Jones방법(20)에 따라 정량하였으며 반응혼합액으로 10mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.5)에 25mM potassium aspartate와 10mM lithium carbamoylphosphate를 각각 용해한 후 사용하였

다.

Aspartate에 대한 겉보기 K<sub>m</sub>값은 double reciprocal plot에 의해 결정하였으며 비효소활성(specific enzyme activity)은 표준조건하에서 1분당 N-carbamoylaspartate 1×10<sup>-2</sup>mole을 생산할 수 있는 단백질의 양으로 결정하였다.

## 결과 및 고찰

### 6-Azauracil이 세포성장에 미치는 영향

6-Azauracil이 *C. glutamicum* KFCC10672 성장에 미치는 영향을 검토하기 위하여 배양액에서 대수기 중반까지 성장한 세포를 무균식염수로 2~3번 세척한 후 6-azauracil이 농도별로 첨가된 최소배지(leu, thr, met 각각 0.1g/ℓ 첨가)에 일정량의 균을 접종하였다. 30°C에서 12시간 배양 후 562nm에서 O.D를 측정하여 6-azauracil 농도에 따른 세포의 성장을 상대성장도(Relative growth)로 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 균의 성장저해 농도는 2g/ℓ임을 알 수 있다.

### 6-Azauracil 내성변이주에 의한 L-Lysine 고생산 균주 선별

*C. glutamicum* KFCC10672를 NTG 처리하여 leu, thr, met 및 6-azauracil(4g/ℓ)이 포함된 최소배지에 도달한 뒤 30°C에서 5~7일 배양하면서 colony의 크기가 큰 것부터 선별하여 플라스크 실험을 실시하였다(Fig. 3). 선별된 500여 내성균주중 L-Lysine 생산량 및 수율이 모균주에 비해 우수한 균주는 약 10여 주였고, 플라스크 실험 및 single

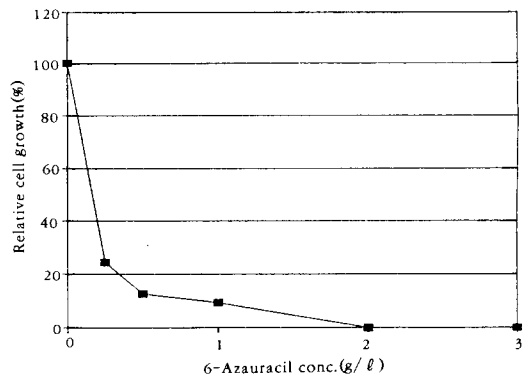


Fig. 2. Effect of 6-azauracil on the cell growth of *C. glutamicum* KFCC10672.

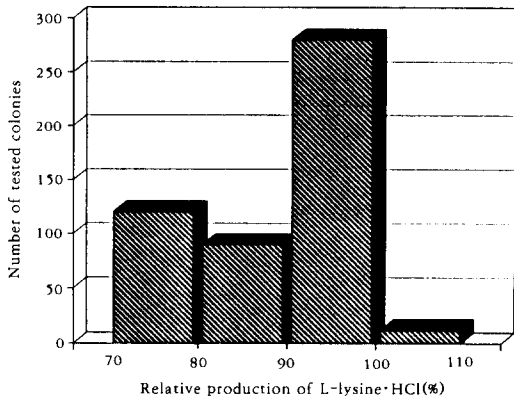


Fig 3. Distribution of 6-azauracil resistant mutants derived from *C. glutamicum* KFCC10672 with respect to L-lysine production.

colony isolation 실험을 거쳐 최종 1주를 선별하여 그 균주를 *C. glutamicum* CH0516이라 명명하고 7ℓ 발효조에서 그 생산량을 시험하였다.

한편, 이러한 실험결과를 *Corynebacterium* 속, 또는 *Brevibacterium* 속에 pyrimidine 및 purine base analogue에 내성을 부여했을 때 플라스크 발효실험에서 모균주에 비해 5% 이상의 농도 향상이 이루어졌다는 보고(10)와 거의 일치하였다.

발효조에 의한 L-Lysine 발효

7ℓ 발효실험에서 *C. glutamicum* KFCC10672와 CH0516의 L-Lysine 생산성 시험은 배양 중 당밀과 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, leu, thr, met을 첨가하는 유가식 배양(fed-batch fermentation)에 의해 실시하였으며 *C. glutamicum* CH0516이 KFCC10672에 비해 세포의 양이 줄어들었음에도 불구하고 L-Lysine 생산량은 오히려 3% 이상 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 4).

Aspartokinase(AKase) 및 Aspartate Carbamoyltransferase(ATCase) 활성 측정

*C. glutamicum* KFCC10672 및 CH0516의 AKase의 활성을 측정된 결과 aspartate에 대한 겐보기 K<sub>m</sub>값은 각각 200mM, 166.7mM이었으며 비효소활성(specific enzyme activity)은 각각 3.89 × 10<sup>-1</sup>units/mg, 4.78 × 10<sup>-1</sup>units/mg이었다(Table 1). *C. glutamicum* KFCC10672에 비해 CH0516의

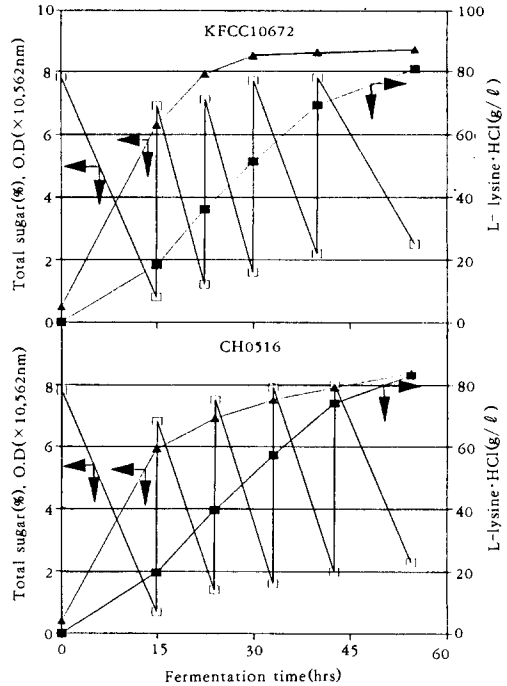


Fig 4. Fed-batch fermentation kinetics of *C. glutamicum* KFCC10672 and CH0516 in a 7L fermentor at 30°C, pH 7.0 and 1vvm (■) L-lysine · HCl, (□) Total sugar, (▲) O.D.

낮은 K<sub>m</sub>값과 높은 비효소활성은 CH0516 균주의 L-Lysine 고농도 축적에 기여했을 것이라 판단된다.

한편, *C. glutamicum* KFCC10672 및 CH0516의 ATCase의 활성은 aspartate 및 carbamoyl phosphate를 기질로 하여 측정된 결과 aspartate에 대한 겐보기 K<sub>m</sub>값은 각각 0.13mM, 0.27mM이었으며, 비효소활성(specific enzyme activity)은 각각

Table 1. The apparent K<sub>m</sub> values for aspartate and specific enzyme activities of AKase of *C. glutamicum* KFCC10672 and CH0516.

Strains	K <sub>m</sub> values(mM)	Specific enzyme activity(units/mg)
KFCC10672	200.0	3.89 × 10 <sup>-1</sup>
CH0516	166.7	4.78 × 10 <sup>-1</sup>

A unit of enzyme was defined as amount of proteins, which catalyze the formation of 1 × 10<sup>-3</sup> mole of aspartate hydroxamate per minute.

**Table 2. The apparent Km values for aspartate and specific enzyme activities of ATCase of *C. glutamicum* KFCC10672 and CH0516.**

Strains	Km values(mM)	Specific enzyme activity(units/mg)
KFCC10672	0.13	2.20
CH0516	0.27	1.84

A unit of enzyme was defined as amount of proteins, which catalyze the formation of  $1 \times 10^{-2}$  mole of N-carbamoylaspartate per minute.

2.20units/mg, 1.84units/mg이었다( Table 2). Table 2에서 알 수 있듯이 *C. glutamicum* CH0516의 ATCase는 KFCC10672에 비해 높은 Km값과 낮은 비효소활성을 가짐으로써 세포성장애 사용되는 aspartate를 최소화시키고 여분의 aspartate가 AKase에 의해 L-Lysine 합성에 사용되었기 때문에 CH0516에 의한 L-Lysine의 생성 증가가 가능했음 것으로 사료된다.

## 요 약

L-Lysine 고역가 생산균주를 개발하기 위해 공지의 균주인 *C. glutamicum* KFCC10672를 인공 돌연변이시켜 pyrimidine analogue인 6-azauracil(4g/ℓ) 내성을 부여한 결과 모균주에 비해 L-Lysine 생산성이 3% 증가된 *C. glutamicum* CH0516을 획득할 수 있었다.

L-Lysine 생산성 향상의 원인을 규명하고자 *C. glutamicum* KFCC10672 및 CH0516의 aspartokinase(AKase)와 aspartate carbamoyltransferase(ATCase)의 aspartate에 대한 Km값을 측정함 결과 AKase의 Km값은 200.0mM, 166.7mM이었고 ATCase의 Km값은 0.13mM, 0.27mM이었다.

한편 *C. glutamicum* KFCC10672와 CH0516의 AKase 비효소활성은 각각  $3.89 \times 10^{-1}$ units/mg,  $4.78 \times 10^{-1}$ units/mg이었고 ATCase의 경우는 각각 2.20units/mg, 1.84units/mg이었다.

*C. glutamicum* CH0516이 KFCC10672에 비해 세포의 성장도가 낮고 L-Lysine 생산성이 높은 이유로서는 CH0516의 ATCase의 aspartate에 대한 Km값이 KFCC10672의 값에 비해 크고 비효소활성이 낮은 점에서 찾을 수 있다. 즉 CH0516 ATCase의 aspartate 사용량이 KFCC10672에 비해 낮기

때문에 여분의 aspartate가 AKase에 의해 L-Lysine이 합성됨으로써 L-Lysine 생산성 증가가 얻어진 것으로 사료된다. 이러한 사실은 CH0516 AKase의 Km값이 KFCC10672에 비해 낮고 비효소활성이 높은 점에서도 뒷받침된다.

## 참 고 문 헌

1. S. Kinoshita, K. Nakayama and S. Kitada (1958), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4**, 128-129.
2. K. Sano and I. Shioo(1967), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**, 349-358.
3. R. Miyajima and I. Shioo(1971), *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 424-430.
4. O. Tosaka and H. Hirakawa(1978b), *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1501-1506.
5. C. Josef, C. Trephow, L. Eggeling and H. Sahm(1988), *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 3221-3229
6. K. Sano and J. Shioo(1970), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **16**, 373-391.
7. O. Tosaka, K. Takanami and Y. Hirose (1978a), *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 745-752.
8. I. Shioo, H. Yoshino and S. Sugimoto(1970), *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3275-3282.
9. S. Kurihara, K. Araki, K. Akeyama and Y. Takasawa(1972), US Pat., 3,678,810.
10. T. Nakanishi, T. Azuma, T. Hirao, K. Hattori and M. Sakurai(1985), UK Pat., 2,152,509 A.
11. G. Thierbach, A. Schwarzer and A. Pühler (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 356-362.
12. G. Thierbach, J. Kalinowski, B. Bachmann and A. Pühler(1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 443-448.
13. Yeh, P., A. M. Sicard and A. J. Sinskey (1988), *Mol. Gen. Genet.*, **212**, 105-111.
14. 오종원, 김성준, 조영재, 박내현, 이재홍(1991), KR Pat. 44,119.
15. 한국생화학회, 교재편찬위원회(1983), 실험생화학, 208-212.
16. O. Tosaka, H. Enei and Y. Hirose(1983), *Trend Biotechnol.*, **1**, 70-74.
17. S. Black(1962), *Methods in Enzymology.*, **5**,

- 820-822.
18. R. R. Alexander, J. M. Griffiths and M. L. Wilkinson(1985), *Basic Biochemical Method.*, 14-16.
  19. B. A. Linda and M. E. Jones(1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2308-2315.
  20. M. P. Lansing and M. E. Jones(1969), *Anal. Biochem.*, **32**, 408-419.