

## 변이주 *Bacillus* sp. A4442에 의한 갈락토스 전이활성이 높은 $\beta$ -Galactosidase의 생산

인만진<sup>1,2\*</sup> · 최경호<sup>2</sup> · 양성준<sup>2</sup> · 김민홍<sup>2</sup> · 한금수<sup>2</sup> · 양지원<sup>3</sup> · 정진<sup>1</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 농화학과, <sup>2</sup>(주)미원 중앙연구소, <sup>3</sup>한국과학기술원 화학공학과

**초록** : 토양으로부터 분리된 *Bacillus* sp. A1 균주는 가수분해활성보다는 전이활성이 훨씬 높은  $\beta$ -galactosidase를 생산하기 때문에 산업적 응용 가능성이 있으나, glucose에 의한 catabolite repression을 보일 뿐만 아니라 lactose를 inducer로 요구한다는 결정적인 단점이 있어 갈락토올리고당의 제조에 직접 사용하기에는 적합하지 않았다. 따라서 galactose 전이효소의 생산성 제고를 피하기 위하여 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine를 이용한 3단계 변이를 시도하여 A4442변이주를 선발하였다. 이 변이주의 효소생산 능력은 팔복할 만큼 향상하였으며(약 20배 내외) catabolite repression과 lactose 요구성이 상당히 해제되었음을 확인하였다. 아울러 갈락토스가 새로운 inducer로 작용하는 것도 관찰하였다. 변이주를 이용한 발효시에 당의 농도와 배양액의 pH는 상호연관되어 효소의 생산에 영향을 끼쳤다. pH stat 기법을 이용하여 배양중 당의 농도를 0.5% 이하로 조절할 때 pH는 6.5~7.5 범위내로 유지되었으며 효소활성은 44 unit/ml-broth로 높게 나타났다(1995년 10월 5일 접수, 1995년 11월 14일 수리).

### 서 론

일반적으로 유당의 가수분해를 위하여 사용하고 있는  $\beta$ -galactosidase( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.23)는 효소반응중에 부산물로서 소량의 올리고당류를 생성하는 것으로 보고되었으나,<sup>1,2</sup> 초기에는 크게 주목받지 못하였다. 그러나 근래에 장내 유익세균종인 비피더스균의 증식인자로 갈락토올리고당의 기능성<sup>3</sup>이 부각되면서 이를 제조하기 위하여  $\beta$ -galactosidase의 당전이 활성에 대한 연구가 활발해졌다.

최근에 본 연구자들은 높은 갈락토스 전이활성이 있는  $\beta$ -galactosidase를 생산하는 미생물인 *Bacillus* sp. A1을 토양으로부터 선별하였다.<sup>4</sup> 분리한 균주의 효소생합성은 유당에 의하여 유도되고, 포도당에 의하여 저해받는 것으로 나타났으며, 효소의 활성은 낮은 편이었다. 따라서 균주의 효소생산성을 높이기 위하여 야생균주를 배양학적 또는 유전적으로 변형시켜 대량생산 균주를 개발하고 그에 맞는 최적의 배양조건을 확립하는 일이 필요하였다.

본 연구에서는 *Bacillus* sp. A1을 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)으로 변이처리하여 catabolite repression과 inducer요구성이 해제된 변이주를 얻었고, 그것의 생리적인 특성과 효소생산에 영향을 미치는 배양조건에 관해 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료 및 사용기기

균주의 돌연변이 유도와 변이주 선별에 사용한 N-me-

thyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG), 2-deoxyglucose(2-DG), 2-nitrophenyl- $\beta$ -fucoside(2-NF), phenyl- $\beta$ -galactoside(PG), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside(X-gal) 그리고 효소활성 측정에 사용한 o-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside(ONPG)와 유당은 Sigma사(St. Louise, MO)의 제품을 사용하였고, 발효배지류는 주로 Difco사(Detroit, MI)에서, 효소분해 대두단백질(SMP<sup>TM</sup>)은 Fuji Oil사(일본)에서 구입하였다.

균의 생육 및 효소활성의 측정은 전보<sup>4</sup>)와 같은 방법으로 수행하였다.

발효조는 Multigen 2L jar fermentor(New Brunswick Scientific사, USA)에 당의 공급을 위하여 Miniplus 2 정량펌프(Gilson사, France)를 부착하였다.

#### 사용균주

실험에 사용한 균주는 토양으로부터 분리하여 (주)미원 중앙연구소에 보관중인 *Bacillus* sp. A1 으로 nutrient agar 배지(Difco사, USA)에 보존하면서 사용하였다.

#### NTG에 의한 돌연변이

*Bacillus* sp. A1을 최소배지에서 대수증식기까지 증식시킨 후 NTG(200  $\mu$ g/ml)를 가하고 37°C에서 20분 처리하여 생리식염수로 세척, 원심분리하였다(NTG 제거). 균을 2회 반복하여 세척하고, X-gal이 첨가된 변이주 선별용 고체배지에 도말하여 37°C에서 48시간 배양 후 청색 colony를 형성하는 균주를 선별하였다. Catabolite repression을 해제하기 위하여 2-DG<sup>5</sup>)를, inducer 요구성을 해제하기 위하여 2-NF<sup>6</sup>)와 PG<sup>7</sup>)를 선별용 고체배지에 첨가하여 변이주 선별의 selection maker로 이용하였다.

찾는말: *Bacillus* sp. A4442,  $\beta$ -galactosidase, 임의 돌연변이, 'pH stat' 기법

\*연락처자

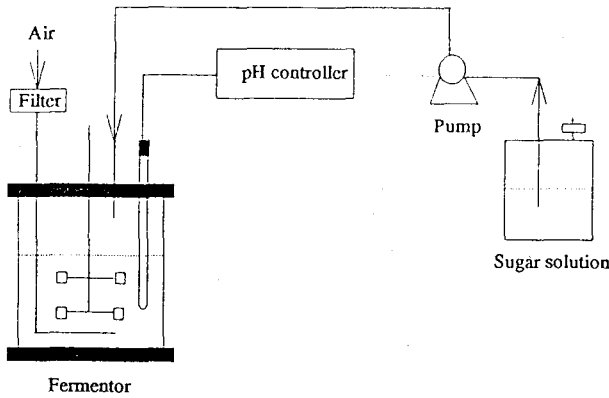


Fig. 1. Schematic diagram of the apparatus used for the fed-batch cultivation.

선발된 colony를 변이주 선별용 액체배지에 37°C에서 48시간 진탕배양하여 조효소액을 얻었다. 먼저 ONPG를 기질로 효소활성을 측정하고, 모균주보다 높은 활성을 보인 조효소액은 유당에 반응시켜 전환률과 전이율<sup>4)</sup>을 구하여 높은 전환률과 전이율을 유지하며 효소활성이 향상된 변이주를 최종선별하였다.

각종 배지의 조성은 다음과 같다. 최소배지: 포도당 5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, NaCl 0.01 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g/L (pH 7.0). 변이주 선별용 액체배지: 최소배지에 0.1% SMP를 첨가. 변이주 선별용 고체배지: 최소배지에 0.1% SMP와 1.5% agar를 첨가. 변이주 보존배지: nutrient agar배지.

#### 변이주를 이용한 효소생산

*Bacillus* sp. A4442 변이주를 발효용 배지(포도당 2 g/L, 갈락토스 5 g/L, 유당 3 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/L, SMP 5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, NaCl 0.01 g/L (pH 7.0) 50 ml에 배양하여 발효용 접종원으로 하였으며, 동일 배지 1.2 L를 함유한 발효조에 접종하여 통기량 1 vvm, 교반속도 400 rpm으로 37°C에서 배양하였다. 이때 Fig. 1과 같은 'pH-stat' 방법으로 발효조 pH controller와 정량펌프를 연결시켜 pH가 7 이상으로 상승하면 10% 유당용액에서 당이 공급되도록 하였다.

### 결과 및 고찰

#### 변이주의 선별

토양에서 선별한 *Bacillus* sp. A1이 생산하는 β-galactosidase는 대부분 균체의 효소이며 가수분해활성에 비하여 전이활성이 우수하여 갈락토올리고당의 제조에 사용할 수 있는 가능성을 보였다. 그러나 효소의 생합성이 포도당에 의하여 저해를 받으며, inducer로 유당이 필요하고, 효소의 생산성이 낮다는(1.8 unit/ml-broth) 단점들 때문에 *Bacillus* sp. A1을 갈락토올리고당의 제조에

Table 1. Production of the β-galactosidase by mutants of *Bacillus* sp. A1\*.

Mutation target	Mutant	Enzyme activity (U/ml-broth)	Relative activity**
Catabolite repression	A1141	6.0	3.3
Inducer requirement	A614	13.0	7.2
	A778	12.0	6.7
	A811	16.0	8.9
	A1126	14.0	7.8
Inducer requirement	A4442	30.0	16.7

\* The selected strains were cultured at 37°C for 2 days in baffled flasks containing 50 ml of fermentation medium described in Materials and Methods.

\*\* Relative activity of each mutant was presented as the ratio of enzyme activity of the mutant to that of wild type strain A1.

직접 이용하기는 곤란하였다. 따라서 catabolite repression과 inducer 요구성을 해제하여 효소생산성을 증가시킬 목적으로 *Bacillus* sp. A1 야생균주에 NTG를 처리하여 임의 돌연변이를 유도하였다.

포도당의 항대사물질(antimetabolite)인 2-DG는 통상적으로 catabolite repression이 해제된 변이주의 선별에 selection maker로 많이 사용되고 있다.<sup>5,8,9)</sup> 우선 포도당에 의한 catabolite repression 해제를 목표로 포도당 0.3%, 2-DG 0.02% 그리고 X-gal을 첨가한 배지에서 성장속도가 빠른 청색 colony를 선별하였다. 청색을 보이는 100여 개의 변이주를 선별하고, 액체배양하여 모균주보다 활성이 약 3배 향상된 A1141 변이주를 선별하였다.

2차로 inducer 요구성의 해제를 위하여 A1141를 모균주로 변이를 유도하였다. β-galactosidase inducible로 알려진 2-NF 0.01%와 포도당 0.1%, X-gal을 첨가한 배지에서 청색 colony를 선별하였다. 많은 변이주들 중에서 A1141보다 효소활성이 최소 2배 이상 증가한 A614, A778, A811, 및 A1126 변이주를 얻었으며, 그중에서 A811 변이주는 그 효소활성이 16 unit/ml로 제일 우수하였다.

효소생산성을 더욱 향상시키기 위하여 3차로 역시 inducible로 알려진 PG를 0.05% 첨가한 동일한 배지에서 A811 변이주를 모균주로하여 동일한 방법으로 NTG를 처리하여 최종적으로 A4442 변이주를 얻었다. A4442 변이주를 배양한 결과 효소활성은 야생균주인 A1보다 17배 증가된 30 unit/ml까지 증가하였다. 단계별로 얻어진 변이주의 효소생산성을 Table 1에 정리하였다.

#### 변이주 A4442의 생리적 변화

A4442 변이주를 포도당, 갈락토스, 및 유당을 각각 탄소원으로 배양하여 β-galactosidase의 비활성(효소활성을 균의 생육으로 나눈 값)을 측정하였다(Fig. 2). 야생균주 A1의 β-galactosidase는 유당에 의하여 유도되는 효소이므로<sup>4)</sup> 유당을 사용한 실험구에서만 높은 비활성을 보였으나, 변이주 A4442는 어느 탄소원 조건하에서도 거의

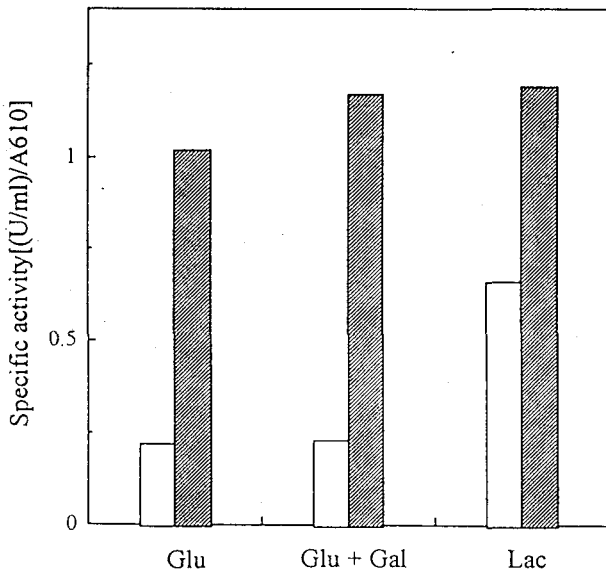


Fig. 2. Effects of glucose, galactose and lactose on the specific activities in parent strain, *Bacillus* sp. A1 and the mutant, *Bacillus* sp. A4442. The monosaccharides(0.5%) were added to the medium as carbon sugar. Open bar, parent strain *Bacillus* A1; closed bar, mutant *Bacillus* sp. A4442.

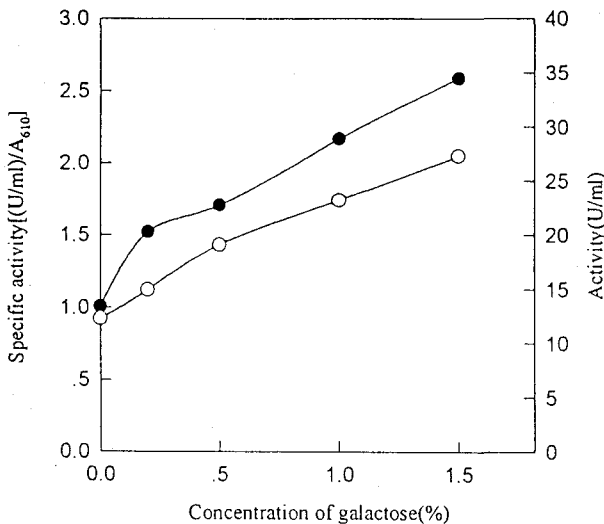


Fig. 3. Dependence of  $\beta$ -galactosidase production on initial concentration of galactose. *Bacillus* sp. A4442 was cultured at 37°C for 24 hr in minimal medium containing galactose at various concentrations. ●-●, specific activity; ○-○, activity.

유사한 비활성을 나타냈었다. 이는 변이주 A4442가 constitutive mutant로서, 포도당에 의한 catabolite repression이 상당히 해제되었음을 시사하는 것이다. 탄소원과는 무관하게 전반적으로 변이주의 비활성이 야생균주에 비하여 현저히 높은 것은 변이주의 효소 생산성이 크게 향상되었기 때문인 것으로 해석된다.

아울러 주목할 만한 점은 갈락토스가 존재하는 경우가 포도당만을 탄소원으로 사용하는 경우에 비하여 비활성이 높다는 사실이다. 이를 좀더 구체적으로 조사하기

Table 2. Effect of initial glucose concentration on the production of  $\beta$ -galactosidase by *Bacillus* sp. A4442.

[Glucose] (%)	pH after 15 hr	Activity (U/ml-broth)	Growth (A610)
0	8.13	11.2	7.18
0.2	7.74	14.6	10.42
0.5	6.67	15.9	12.24
1.0	5.55	6.8	5.48
1.5	5.50	5.4	3.28

*Bacillus* sp. A4442 was cultured at 37°C for 15 hours in minimal medium containing glucose at various concentration.

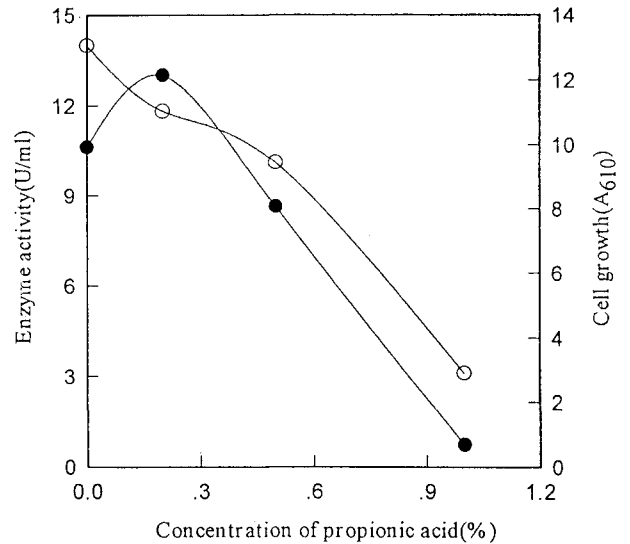


Fig. 4. Effect of propionic acid on enzyme production. *Bacillus* sp. A4442 was cultured at 37°C for 24 hr in minimal medium containing propionic acid at various concentrations. ●-●, cell growth; ○-○, enzyme activity.

위하여 포도당(0.5%)을 주 탄소원으로 하는 배지에 0~1.5% 범위내에서 5단계로 갈락토스를 첨가하여 A4442를 배양한 다음 생산된  $\beta$ -galactosidase의 활성과 비활성을 각각 측정하였다(Fig. 3). 배지중 갈락토스의 농도가 증가할수록 활성과 비활성은 공히 증가하였으며 그 변화 양상은 유사하였다. 이러한 사실은 갈락토스 첨가가 단순히 탄소원 농도의 증가에 의한 균의 생육을 향상시킨 결과라기 보다는 오히려 A4442의  $\beta$ -galactosidase 생합성에 inducer로서 관여하고 있음을 시사한다. 야생균주인 *Bacillus* sp. A1의 배양시 갈락토스가 효소비활성을 어느정도 증가시킨다는 앞서의 관찰<sup>4)</sup>과 아울러 *Streptococcus lactis*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyvermyces fragilis* 등과 같은 미생물에서도 갈락토스가 inducer로 작용한다는 기존의 보고<sup>10,11,12)</sup>들도 이러한 판단의 근거가 되었다.

#### 변이주 A4442에 의한 효소생산

통상적인 발효에서 당의 초기 농도가 높으면 당의 대사와 호흡간의 불균형으로 인하여 acetic acid, propio-

Table 3. Dependence of cell growth and enzyme productivity on the pH control methods.

	control methods		without
	method I*	method II**	pH control
Enzyme activity (U/ml)	26.29	43.94	13.38
Cell growth ( $A_{610}$ )	26.2	21.96	7.72
Productivity (U/L/hr)	1.10	1.53	0.62

Fermentation was performed in a 2 L jar fermentor equipped with a pH controller which was coupled with a peristaltic pump for addition of ammonia water or 10% lactose. Fermentation conditions were as follows: temperature, 37°C; pH, 7.0; aeration, 1 vvm; agitation, 400 rpm.

\* method I: pH controlled with ammonia water pumping-in.

\*\* method II: pH controlled with lactose pumping-in.

nic acid, malic acid 등과 같은 유기산이 축적된다.<sup>13,14</sup> 이런 현상은 배양중 배양액 pH의 하락으로 가시화 되며, 그 결과는 균의 생육저해 및 효소 생산성 하락으로 나타난다.<sup>15</sup> 변이주 A4442의 경우 포도당의 초기 농도가 1.0% 이상일 때 배양액의 pH가 6.0 이하로 떨어졌으며, 균의 생육과 효소활성은 절반 이하수준으로 급격하게 감소하였다(Table 2). 유기산의 첨가가 균의 생육과 효소 생산성에 미치는 영향을 propionic acid를 이용하여 조사하였던 바 (Fig. 4), 유기산 초기 농도 0.2% 이상의 배지조건에서 생육과 효소활성은 산 농도와 반비례 관계를 보였다. 위의 결과들로부터, A4442를 이용한 효소 생산시 최적의 생산성을 확보하기 위해서는 배양액의 pH를 6.5 ~ 7.5 범위내로 유지하여야 하며 이는 발효중 잔당의 농도를 항상 0.5% 이내로 조절하여 유기산 생성을 최대한 억제하므로써 가능함을 알 수 있다.

따라서 본 연구에서는 pH controller와 정량펌프를 사용하여 무기염기(주로 암모니아수)를 공급하므로써 발효중 pH 하강을 억제하는 일반적인 'pH-stat' 기법 대신에 유당의 공급으로 pH를 조절하는 기법을 채택하였다. 이는 재조합 대장균의 유가식 배양시에 용존산소량의 변화를 감지하여 포도당의 공급을 자동조절하는 소위 'DO-stat' 기법<sup>16</sup>이나 *Bacillus subtilis*의 고농도 배양시에 포도당의 농도를 0.02%로 유지하므로써 propionic acid의 생성을 억제하고 따라서  $\beta$ -galactosidase의 생성량을 2배 이상 높일 수 있었던 on-line glucose analyzer technique<sup>17</sup>과 유사한 원리에 기초하였으나, 발효조내 당의 농도변화에 민감하게 반응하는 pH 변화를 감지하여 당공급을 자동으로 조절하였다는 점에서 차이가 있다.

암모니아수로 단순히 pH를 조절하는 것과 당의 농도를 조절함으로써 유기산 생성 억제를 통하여 pH를 조절하는 방법간에는 균의 생육과 효소 생산성에 분명히 차이가 있을 것으로 상정되어 이에 관한 조사를 실시하였다. 3기의 발효조에 pH를 조절하지 않은 경우, 당의 초기농도를 높이고 pH를 암모니아수로 조절하는 경우, 및 초기당을 0.5%로 하고 유당을 공급하여 pH를 조절한

경우로 각각 구별하여 발효실험을 실시하였다(배양중 pH의 set point는 7.0으로 설정). 당으로 pH를 조절하는 경우가 암모니아를 사용하는 일반적인 방법에 비하여 균의 생육은 약간 떨어지나, 효소생산성은 약 40%, 효소활성은 약 70% 향상되었다(Table 3). 이때 배양액의 pH는 6.5~7.5 범위로 유지되었으며, 잔당의 변화는 0.5% 수준 이하로 유지되고 있었다(테이타 제시는 생략함). 이 결과는 미생물의 대사를 이용하여 배양중 pH를 조절하는 방법이 A4442변이주의  $\beta$ -galactosidase의 생산에 관련한 매우 효과적임을 의미한다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## 참고 문헌

1. Aronson, M. (1952) Transgalactosidation during lactose hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **39**, 370-378.
2. Wierzbicki, L. E. and F. V. Kosikowski (1973) Formation of oligosaccharides during  $\beta$ -galactosidase action on lactose. *J. Dairy Sci.* **56**, 1400-1404.
3. Matsumoto K., Y. Kobayashi, N. Tamura, T. Watanabe and T. Kan (1989) Production of galactooligosaccharides with  $\beta$ -galactosidase. *Denpun Kagaku* **36**, 123-130.
4. 인만진, 김민홍, 정 진(1995) 갈락토스 전이활성이 높은  $\beta$ -galactosidase 생산균의 분리 및 효소생산과 관련된 몇 가지 특징. *한국농화학회지* **38**, 502-506.
5. Cohn, M. and K. Horibata (1959) Physiology of the inhibition by glucose of the induced synthesis of the  $\beta$ -galactoside-enzyme system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **78**, 624-635.
6. Demain, A. L. (1971) Increasing enzyme production by genetic and environmental manipulations, p 86-95. In W. B. Jakoby(ed.), *Methodes in Enzymology* Vol. 22, Academic Press, New York.
7. Jacob, F. and J. Monod (1961) Genetic regulation mechanisms in the synthesis of protein. *J. Mol. Biol.* **3**, 318-356.
8. Uden, N V., C. Cabeça-Silva, A. Madeira-Lopes and I. Spencer-Martins (1980) Selective isolation of derepressed mutants of an  $\alpha$ -amylase yeast by the use of 2-deoxyglucose. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 651-654.
9. Do, E. J., H. D. Shin, C. Kim and Y. H. Lee (1993) Selection and characterization of catabolite repression resistant mutant of *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* producing cyclodextrin glucanotransferase. *J. Microb. Biotechnol.* **3**, 78-85.
10. Citti, J. E., W. E. Sandine and P. R. Elliker (1965)  $\beta$ -Galactosidase of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **89**, 937-942.
11. Pedrique, M. and F. J. Castillo (1982) Regulation of  $\beta$ -D-galactosidase synthesis in *Candida pseudotropicalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 303-310.
12. Dickson, R. C. and J. S. Markin (1980) Physiological studies of  $\beta$ -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **142**, 777-785.

13. Doelle, H. W., K. N. Ewings and N. W. Hollywood (1982) Regulation of glucose metabolism in bacterial systems. *Adv. Biochem. Eng.* **23**, 1-35.
14. Gleiser, I. E. and S. Bauer (1981) Growth of *E. coli* W to high cell concentration by oxygen level linked control of carbon source concentration. *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 1015-1021.
15. Zabriskie, D. W. and E. J. Arcuri (1986) Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. *Enz. Microb. Technol.* **8**, 706-717.
16. Sakamoto, S., M. Iijima, H. Matsuzawa and T. Ohta (1994) Production of thermophilic protease by glucose-controlled fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.* **78**, 304-309.
17. Park, Y. S., K. Kai, S. Iijima and K. Kobayashi (1992) Enhanced  $\beta$ -galactosidase production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 686-696.

---

**Production of  $\beta$ -Galactosidase with High Transgalactosylation Activity by *Bacillus* sp. A4442 Mutant**

Man-Jin In<sup>1,2\*</sup>, Kyung-Ho Choi<sup>2</sup>, Sung-Joon Yang<sup>2</sup>, Min-Hong Kim<sup>2</sup>, Keum-Soo Han<sup>2</sup>, Ji-Won Yang<sup>3</sup> and Jin Jung<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University, Suwon, Korea; <sup>2</sup>Biotechnology Division, R&D Center, Miwon Co., Ltd., Seoul, Korea; <sup>3</sup>Department of Chemical Engineering, KAIST, Taejeon, Korea)

**Abstract:** In an attempt to improve the productivity of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus* sp. A1, which was isolated from soil and has remarkably higher transgalactosylation activity than lactose hydrolysis activity, a chemical mutation procedure using N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine followed by selection was conducted. The final selection, designated as *Bacillus* sp. A4442, turned out to show a substantially increased enzyme productivity. Catabolite repression by glucose and lactose requirement as an inducer for the enzyme biosynthesis, which were shown in the parent strain, was markedly diminished; instead it was found out that galactose acts as another inducer. Because pH of medium, one of the most important factors for cell growth as well as enzyme production, is closely related with the sugar concentration during culture, it was kept in the optimum range of 6.5~7.5; for this the initial glucose concentration was adjusted to be 0.5% which was thereafter maintained by the controlled pumping-in of lactose using the pH-stat technique. By doing so, we were able to increase the productivity of  $\beta$ -galactosidase with high transgalactosylation activity up to 44 U/ml-broth.

---

\*Corresponding author