

## *Corynebacterium glutamicum* 아미노산 유사체 저항성 돌연변이 균주에 의한 L-로이신의 생산

김용욱\* · 신현철 · 성진석 · 전영중 · 고중환 · 이재흥  
제일제당(주) 종합연구소

**L-Leucine Production using Amino Acid Analogues-resistant Mutants of *Corynebacterium glutamicum*.** Kim, Yong-Wook\*, Hyun-Chul Shin, Jin-Suck Sung, Yeong-Joong Jeon, Jung-Hwan Ko, and Jae-Heung Lee. R&D Center, CHEILJEDANG Corporation, 522-1, Dokpyong-Ri, Majang-Myun, Ichon-Si, Kyunggi-Do, Korea - Two kinds of Mutants of *Corynebacterium glutamicum*, which were resistant to branched chain amino acid analogues, were obtained for L-leucine production; *C. glutamicum* LT26 resistant to 4-azaleucine and  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvaleric acid, and from which *C. glutamicum* LT3811-70 resistant to DL-4-thiaisoleucine were derived. Accumulation of L-leucine in the culture broths of these mutant strains, *C. glutamicum* LT26 and LT3811-70, were much higher than those of their parent strains even though they were non-auxotrophic mutants. Enzymatic analyses were performed to measure the activities of  $\alpha$ -aceto-hydroxy acid synthase (AHAS) and  $\alpha$ -isopropylmalate synthase (IPMS), which were the key enzymes for the L-isoleucine, L-valine and L-leucine biosynthetic pathways branching from a common precursor. In *C. glutamicum* LT26 and LT3811-70, AHAS and IPMS were found to be derepressed and desensitized to L-leucine. In addition, in *C. glutamicum* LT3811-70, IPMS was further more derepressed by L-leucine and AHAS was more desensitized by L-isoleucine and L-valine compared to its parent strain, *C. glutamicum* LT26.

**Key words:** *Corynebacterium glutamicum*, L-leucine production,  $\alpha$ -aceto-hydroxy acid synthase,  $\alpha$ -isopropylmalate synthase

L-로이신은 의약 혹은 사료첨가용으로 사용되는 필수 아미노산의 하나로서 *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium glutamicum* 그리고 *Brevibacterium lactofermentum* 등의 균주들을 사용한 L-로이신 축적이 보고되고 있다[5].

대부분의 미생물에서 L-로이신의 생합성 경로는 L-이소로이신, L-발린 생합성 경로로부터 결가지 경로로 생합성 되는 것으로 알려져 있으며(Fig. 1) [11] 이들 경로 중 isopropylmalate synthase(IPMS)와  $\alpha$ -aceto-hydroxy acid synthase(AHAS)가 L-로이신과 L-발린의 생합성에 각각 관여하는 주반응효소로 알려져 있다. AHAS는 pyruvate와  $\alpha$ -ketobutyrate를 각각  $\alpha$ -acetylactate와  $\alpha$ -aceto- $\alpha$ -hydroxybutyrate로 분해시키는 생합성 초기단계 효소로 L-이소로이신, L-발린 그리고 L-로이신에 의해 효소활성저해와 효소합성저해를 받고 있으며 한편 IPMS는 L-발린 생합성단계에서 결가지 경로로 합성되는 L-로이신의 생합성에 중요한 주반응효소로 L-로이신에 의해 효소활성저해와 효소합성저해를 받고 있다 [3]. 결국 미생물에서 L-로이신의 과량생산을 위해서는

이 두효소의 조절해제가 주된 관건으로 L-이소로이신, L-발린의 영양요구성 변이주(auxotroph mutants) 혹은 비완전 영양요구성 변이주(leaky mutants)로 연구되어 오고 있다[1, 8, 14].

그러나 산업적 아미노산의 대량생산을 위해서는 가격이 낮은 기질을 이용할 수 있는 비영양요구성 변이주가 더 유용하기에 이들에 대한 연구를 수행하던 바, 본 실험에서는 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032로부터 세 개의 말단 아미노산 유사체로 저항성 변이주를 개발

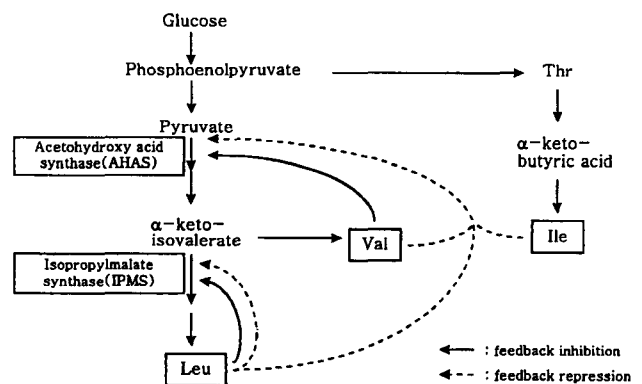


Fig. 1. Regulatory Mechanisms of L-Leucine Synthesis in *Corynebacterium glutamicum*.

\*Corresponding author  
Tel. 82-336-32-4318, Fax. 82-336-32-2784  
E-mail:

하였으며 이 균주들은 L-이소로이신, L-발린을 요구하지 않는 비영양요구성 변이주로 고농도의 L-로이신을 배지 내 축적시킴을 관찰할 수 있었다. 또한 이들 균주 대사과정의 주반응 효소에 대한 역가와 대사조절 해제에 대한 비교 분석을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

L-로이신 생산균주를 개발하기 위해 사용한 모균주는 글루탐산 또는 라이신 같은 아미노산 생산에 널리 쓰이는 *C. glutamicum* ATCC13032로서 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG, 250~500 µg/ml) 처리에 의해 4-azaleucine, α-amino-β-hydroxyvaleric acid 이중 내성변이주인 *C. glutamicum* LT26을 얻었으며 이를 다시 NTG처리하여 DL-4-thiaioleucine 내성변이주인 *Corynebacterium glutamicum* LT3811-70을 개발하였다.

### 시용배지 및 배양조건

최소배지는 glucose 10 g, ammonium sulfate 5 g, urea 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.4 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mg, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 5 mg, d-biotin 50 µg, Thiamine · HCl 120 µg per liter pH 7.0(멸균전)을 사용하였으며, 완전배지로는 glucose 10 g, peptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g per liter를 사용하였다.

삼각플라스크에서의 L-로이신 생산배지로는 sugar 100 g(원당:당밀=50:50), ammonium sulfate 10 g, urea 4 g, yeast extract 1 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mg, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 10 mg, d-biotin 50 µg, thiamine · HCl 120 µg, CaCO<sub>3</sub> 40 g per liter pH 7.0(멸균전)을 사용하여 rotatory shaker에서 30°C, 36내지 48시간 배양한 후 발효액내 L-로이신을 high performance liquid chromatography(HPLC, Waters 기종)로 정량분석하였다.

7 L Jar에서의 생산중균배지는 glucose 50 g, peptone 10 g, yeast extract 10 g, urea 3 g, NaCl 2.5 g per liter를 사용하고, 7 L Jar에서의 생산배지는 당밀(cane molasses(58%, w/w)) 180 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mg, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 10 mg, d-biotin 300 µg, Thiamine · HCl 500 µg per liter를 사용하여 추가당을 발효중에 첨가하는 유가식발효(fed-batch fermentation)로 30°C, pH7.0 교반속도 600 내지 700 rpm, 통기량 1 vvm의 조건에서 32시간 내지 36시간 발효를 실시하였다.

### 내성도 측정

아미노산 유사체의 내성도 측정은 모두 Bioscreen C

(Labsystem, Helsinki, Finland) 시스템을 이용하여 농도별, 시간별로 OD<sub>600nm</sub>을 측정하였다.

### 효소액의 제조와 활성도 측정

30°C, 24시간 배양한 세포를 원심분리한후 ultrasonic oscillator를 이용하여 파쇄한 다음 다시 고속원심분리하여 상등액을 crude enzyme으로 사용하였다.

α-Acetohydroxy acid synthase(AHAS) 활성도 측정은 Stromer and Umbarger[13]의 측정법으로 수행하였으며 비활성도(specific activity)는 α-acetolactate생성량을 µmoles/hr/mg<sub>protein</sub>으로 나타내었다.

α-Isopropylmalate synthase(IPMS) 활성도 측정은 Eggling *et al.*[12]의 측정법으로 수행하였으며 비활성도(specific activity)는 CoA 생성량을 µmoles/hr/mg<sub>protein</sub>으로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

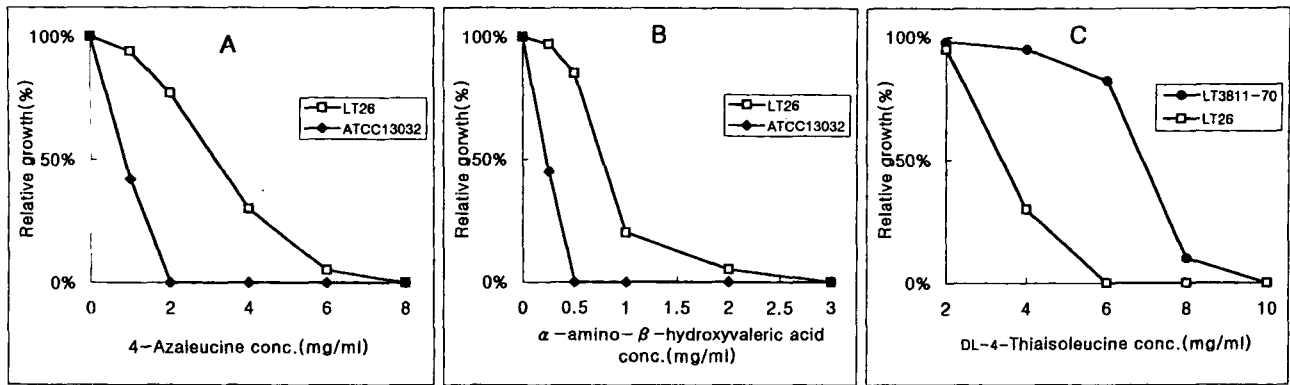
### 각 아미노산유사체가 세포성장에 미치는 영향

L-로이신의 생산을 위한 대사조절 변이주 개발에 앞서 우선 *C. glutamicum* ATCC13032의 여러 가지 아미노산 유사체에 대한 생육저해능을 실험하였다. L-로이신생산 균주 개발을 위해 지금까지 알려진 아미노산 유사체 내지는 약제들에는 여러종류가 있으나[2, 4, 7, 10] 본실험에서는 4-azaleucine과 α-amino-β-hydroxyvaleric acid를 L-로이신과 L-발린에 대한 유사체로 사용하였다. 그 결과 *C. glutamicum* ATCC13032는 4-azaleucine 2 g/L, α-amino-β-hydroxyvaleric acid 0.5 g/L에 내성이 없음을 알 수 있었다(Fig. 2). 이농도의 유사체를 함유한 최소배지에 NTG처리된 *C. glutamicum* ATCC13032를 도말하여 내성변이주를 획득한 후 플라스크 L-로이신 생산배지에서 실험한 결과 최고생산변이주 *C. glutamicum* LT26을 얻었으며 이때 L-로이신의 농도는 14.2 g/L로서 모균주의 발효농도(0.2 g/L)에 비해 획기적으로 증가하였다.

분리된 LT26 변이주는 다시 NTG 처리후 L-이소로이신의 유사체인 DL-4-thiaioleucine에 대한 내성도를 측정하였다 그 결과 6 g/L에 내성이 없음을 확인하고 상기와 같은 방법으로 내성변이주를 얻어 최고생산변이주로서 *C. glutamicum* LT3811-70을 분리하였으며 이 때 이 균주에 의해 플라스크배양에서 생산된 L-로이신의 농도는 18.1 g/L였다.

L-이소로이신, L-발린, L-로이신이 α-Acetohydroxy acid synthase(AHAS)와 α-Isopropylmalate synthase(IPMS) 효소에 미치는 영향

AHAS는 L-이소로이신, L-발린, L-로이신 합성 대사조



**Fig. 2.** The Effects of Analogues on the cell growth of *C. glutamicum* ATCC13032, LT26 and LT3811-70. Strains were cultured aerobically at 30°C for 18 h in minimal medium with appropriate analogues added. A, 4-azaleucine effect on ATCC13032 and LT26; B,  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvaleric acid effect on ATCC13032 and LT26; C, DL-4-thiaisleucine effect on LT26 and LT3811-70.

절에서 초기 반응에 관여하는 주반응효소로 알려져 있으며, 한편 IPMS 경우는 L-로이신 합성 가지사슬의 초기반응 효소로 L-로이신 합성 대사조절의 주반응 효소로 알려져 있으므로 본 실험에서 개발된 두 개의 변이주가 이들 두 효소의 효소역가에 있어서의 변이와 대사조절 양상의 변이에 의한 것임을 알아보기 위해 두 효소의 활성상의 차이와 가지말단 아미노산들에 대한 효소활성저해의 차이를 실험해 보았다.

**Table 1.** A Comparison of Specific activities and L-leucine productivities with various strain of *C. glutamicum*

| Strains   | Specific activity<br>( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}_{\text{protein}}$ ) |      | L-Leu produced<br>(g/L) |
|-----------|--|------|-------------------------|
|           | AHAS   | IPMS |                         |
| ATCC13032 | 2.6  | 2.1  | 0.2                     |
| LT26      | 31.4   | 20.7 | 14.2                    |
| LT3811-70 | 36.8   | 27.1 | 18.1                    |

Strains were cultured aerobically at 30°C for 36 h to test for L-leucine productivity together with enzyme assay in a 250 ml flask containing 20 ml of the L-leucine production medium.

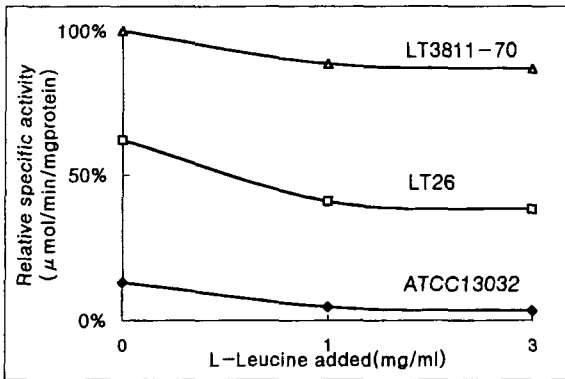
Table 1에서 나타난 바와 같이 모균주(*C. glutamicum* ATCC13032)와 변이주(*C. glutamicum* LT26과 LT3811-70)간에 AHAS의 경우는 약 15배, IPMS의 경우는 약 10배 이상의 활성도의 차이가 있었음이 나타났다. 그러나 이들효소의 대사조절은 대사말단 아미노산에 의해 철저히 효소활성저해를 받고 있어 활성도의 차이만 가지고는 L-로이신의 배지내 축적을 나타낼 수 없어 Table 2에서와 같이 세 개의 아미노산에 대한 대사조절 양상을 조사해 보았다. 예상한 바와 같이 모균주인 *C. glutamicum* ATCC13032의 경우 1 mM L-로이신에 대해 AHAS는 약 50%의 저해를, IPMS는 약 60%의 저해를 보여주고, L-이소로이신, L-발린에 대해서는 AHAS가 L-로이신의 경우보다 조금더 높은 저해를, IPMS는 전혀 효소활성저해를 나타내지 않았다. 이는 IPMS에서 가지사슬로 만들어지는 L-로이신이 AHAS보다는 IPMS를 더 철저히 대사조절하고 있음을 증명해 주고 있다.

한편 *C. glutamicum* LT26과 LT3811-70의 경우는 모균주와는 달리 1 mM L-로이신에 대해 AHAS나 IPMS 모두 거의 저해를 받지 않고 다른 아미노산에 대해서도

**Table 2.** Inhibitory effects of various branched-chain amino acid on AHAS and IPMS activities

| Amino acids (1 mM) | Relative activity(%) |      |      |      |           |      |
|--------------------|----------------------|------|------|------|-----------|------|
|                    | ATCC13032            |      | LT26 |      | LT3811-70 |      |
|                    | AHAS                 | IPMS | AHAS | IPMS | AHAS      | IPMS |
| None               | 100                  | 100  | 100  | 100  | 100       | 100  |
| L-Val              | 35                   | 99   | 76   | 99   | 90        | 98   |
| L-Ile              | 38                   | 99   | 66   | 98   | 88        | 99   |
| L-Leu              | 53                   | 43   | 98   | 97   | 98        | 99   |
| L-Val+L-Ile        | 35                   | -    | 75   | -    | 86        | -    |
| L-Val+L-Leu        | 33                   | -    | 77   | -    | 92        | -    |
| L-Ile+L-Leu        | 33                   | -    | 86   | -    | 95        | -    |
| L-Val+L-Ile+L-Leu  | 38                   | -    | 78   | -    | 97        | -    |

Cultural conditions were the same as in Table 1. except for amino acids added.



**Fig. 3. Repressive Effect of L-Leucine on IPMS for various strains of *C. glutamicum*.**

Strains were cultured at 30°C for 24 h with L-leucine production medium.

AHAS의 효소활성저해가 상당히 해제되어 *C. glutamicum* LT3811-70 균주가 *C. glutamicum* LT26 균주보다 더 해제되어 있음이 나타났다. 이상과 같은 결과는 L-로이신의 축적에 있어서 역시 세포내 IPMS와 AHAS의 활성도와 이들 효소의 대사조절이 중요한 요소임을 증명하고 이들 변이주에 있어서 유전적 변이가 일어났음을 나타내고 있다.

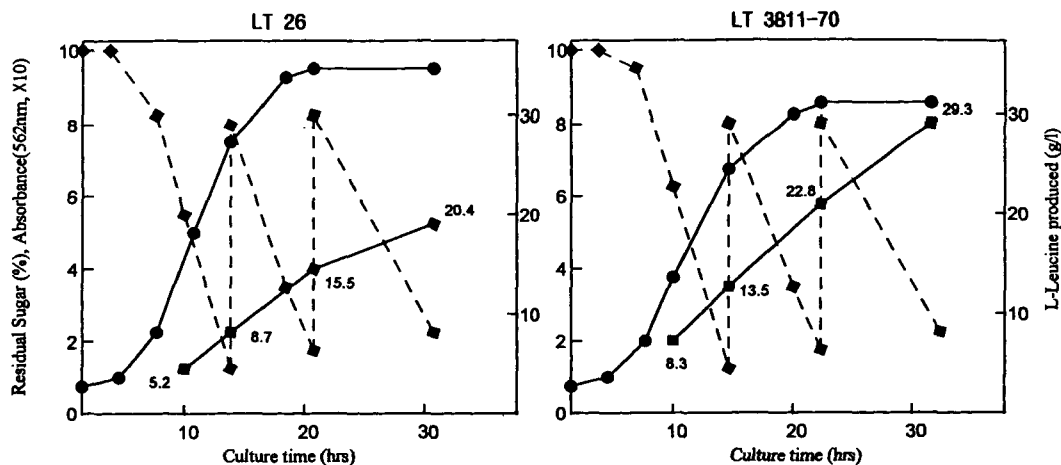
*C. glutamicum* LT26과 LT3811-70에 있어서는 IPMS에 대한 L-로이신 효소합성저해의 차이를 보여주고 있는데(Fig. 3) 모두 모균주인 *C. glutamicum* ATCC13032에 비해 높은 활성도를 가지나 *C. glutamicum* LT3811-70 균주가 *C. glutamicum* LT26 균주보다 더 효소합성저해가 해제되어 있음을 보여주고 이같은 차이가 *C. glutamicum* LT26균주보다 더 높은 L-로이신의 배지내 축적을 가져오는 것으로 보여진다.

Blatt 등[6]에 의한 *Salmonella typhimurium* LT2와

*Escherichia coli* W의 조사 결과에 따르면 *Corynebacterium*과는 다른 메카니즘을 가진 AHAS에 대한 연구결과를 보여주고 있다. 이들 균주는 두 개의 AHAS isoform이 존재하고 AHAS I의 경우 L-이소로이신, L-발린 그리고 L-로이신에 의해 효소활성저해를 받고 이 효소의 생성이 L-발린과 L-로이신의 다원화된 효소합성저해를 받으며, AHAS II의 경우 효소활성저해를 받지않고 이 효소의 생성은 L-이소로이신, L-발린 그리고 L-로이신에 의한 다원화된 효소합성저해도 받지 않는 복잡한 메카니즘을 가짐을 보고한 바 있다[9]. 그러나 Tsuchida 등 [15]에 의한 *Brevibacterium*의 실험 보고에 의하면 그러한 가능성이 아직까지 완전히 부정되지는 않았지만 이러한 *Coryne*형 균주에 있어서는 AHAS가 단일 효소로 존재하여 L-이소로이신, L-발린 그리고 L-로이신에 의한 효소활성저해와 이 효소의 생성에 다원화된 효소합성저해를 보여주고 있음을, 게다가 *S. typhimurium*이나 *E. coli*보다는 단순한 메카니즘을 가졌음을 보고한 바 있다. 그러한 기존의 보고에 착안하여 본 실험에서는 L-이소로이신, L-발린 그리고 L-로이신의 유사체에 대한 저항성 변이주를 가지고 이상과 같은 L-로이신 생산균주를 개발할 수 있었으며 역시 L-로이신의 생산에는 AHAS와 IPMS 이들 두효소의 활성과 조절이 균형적으로 증가하고 해제되어야함을 보여주고 있다.

**발효조에 의한 L-로이신 발효**

7L 발효조를 이용한 실험에서는 상기의 *C. glutamicum* LT26과 LT3811-70 균주를 사용하여 배양중 당밀을 첨가하는 유가식 배양(fed-batch fermentation)에 의해 실시하였으며 이때 *C. glutamicum* LT26과 LT3811-70에서 각각 L-로이신의 발효농도 20.4 g/L와 29.3 g/L, 대당수율 11.3%와 16.3%로서 *C. glutamicum* LT26 및 LT3811-70 발효



**Fig. 4. Time Course of L-Leucine Production of *C. glutamicum* LT26 and LT3811-70.**

Cultivation was carried out in 7L Jar fermentor containing the L-leucine production medium.

◆—◆, L-leucine produced; ●—●, Absorbance (562 nm); ◆····◆, Residual sugar.

농도가 모균주인 *C. glutamicum* ATCC13032에 비해 획기적으로 증가한 균임을 재확인할 수 있었다(Fig. 4).

## 요 약

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032를 모균주로 한 아미노산 유사체들에 저항성을 지닌 돌연변이 균주들로부터 두 종류의 L-로이신 생산균주를 개발하였다. 그 중 하나인 *C. glutamicum* LT26은 4-azaleucine과  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvaleric acid에 저항성을 지니는 균주이며, 다른 한 균주는 *C. glutamicum* LT3811-70로서 *C. glutamicum* LT26을 모균주로한 DL-4-tiaisoleucine 저항성 돌연변이 균주이다. 이들 두 돌연변이 균주들의 배양액내에서의 L-로이신의 축적은 이들이 비영양요구성 균주임에도 불구하고 모균주보다 획기적으로 높았으며 이를 해명하고자 L-이소로이신과 L-발린 그리고 L-로이신 생합성 과정의 주반응 효소인  $\alpha$ -acetoxy acid synthase(AHAS)와  $\alpha$ -isopropylmalate synthase(IPMS)의 분석을 수행하였다. *C. glutamicum* LT26과 LT3811-70에서 AHAS와 IPMS는 모두 L-로이신에 대해 효소활성저해와 효소합성저해가 거의 해제되었고, *C. glutamicum* LT3811-70 균주의 경우 모균주인 *C. glutamicum* LT26 균주보다 IPMS의 L-로이신에 대해 효소합성저해가, AHAS는 L-이소로이신과 L-발린등에 대해 효소활성저해가 10% 이상 더 해제되었음을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. Ambe-Ono, Y., K. Sato, K. Totsuka, Y. Yoshihara, and S. Nakamori. 1996. Improved L-leucine production by an  $\alpha$ -aminobutyric acid resistant mutant of *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 1386-1387.
2. Araki, K., M. Ueda, and S. Saigusa. 1974. Fermentative production of L-leucine with auxotrophic mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agr. Biol. Chem.* **38**: 565-572.
3. Azuma, T. and T. Nakanishi. 1988. Enzymatic background for the reversion or stabilization of an L-leucine producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1525-1528.
4. Azuma, T. and T. Nakanishi. 1988. Stabilization of an unstable L-leucine producing strain of *Corynebacterium glutamicum* by enhancement of L-valine biosynthesis. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1521-1524.
5. Azuma, T., T. Nakanishi, and H. Hagino. 1987. Properties of revertants appearing in L-leucine fermentation culture broth. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 3245-3249.
6. Blatt, J. M., W. J. Pledger, and H. E. Umbarger. 1972. Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. XX. Multiple forms of acetoxy acid synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**: 444-450.
7. Calvo, J. M., M. Freundlich, and H. E. Umbarger. 1969. Regulation of branched-chain amino acid biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: isolation of regulatory mutants. *J. Bacteriol.* **97**: 1272-1282.
8. Calvo, R. A. and J. M. Calvo. 1967. Lack of end-product inhibition and repression of leucine synthesis in a strain of *Salmonella typhimurium*. *Science* **156**: 1107-1109.
9. Grimminger, H. and H. E. Umbarger. 1979. Acetoxy acid synthase I of *Escherichia coli*: purification and properties. *J. Bacteriol.* **137**: 846-853.
10. Kisumi, M., S. Komatsubara, and I. Chibata. 1971. Valine accumulation by  $\alpha$ -aminobutyric acid-resistant mutants of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **106**(2): 493-499.
11. Kisumi, M., S. Komatsubara, and I. Chibata. 1973. Leucine accumulation by isoleucine revertants of *Serratia marcescens* resistant to  $\alpha$ -aminobutyric acid: lack of both feedback inhibition and repression. *J. Biochem.* **73**: 107-115.
12. Kohlhaw, G. B. 1988.  $\alpha$ -Isopropylmalate synthase from yeast. *Methods Enzymol.* **166**: 414-423.
13. Stromer, F. C. and H. E. Umbarger. 1964. The requirement for flavine adenine dinucleotide in the formation of acetolactate by *Salmonella typhimurium* extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**: 587-592.
14. Tsuchida, T., F. Yoshinaga, K. Kubota, H. Momose, and S. Okumura. 1974. Production of L-leucine by a mutant of *Brevibacterium lactofermentum* 2256. *Agr. Biol. Chem.* **38**: 1907-1911.
15. Tsuchida, T. and H. Momose. 1975. Genetic changes of regulatory mechanisms occurred in leucine and valine producing mutant derived from *Brevibacterium lactofermentum* 2256. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 2193-2198.

(Received October 9, 1997)