

생명공학 295126-3

최 종
연구보고서

미생물에 의한 lysine 생산성 증대를 위한 유전자 조작 및 대사조절에 관한 연구

Studies on the genetic manipulation and metabolic
regulation for lysine production by microorganism

영남대학교

농림부행정자료실



0005657

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물에 의한 lysine 생산성 증대를 위한 유전자 조작 및 대사조절에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 10

주관연구기관명: 영남대학교

총괄연구책임자: 이 감 랑

연 구 원: 김 옥 미

연 구 원: 박 선 희

연 구 원: 김 현 정

연 구 원: 배 준 태

1998-106

| |
|-------------------|
| 농림부 자료실 |
| 등록번호: 5659 |
| 등록일: 2001년 4월 30일 |
| 기증: |

요 약 문

I. 제목

미생물에 의한 lysine 생산성 증대를 위한 유전자 조작 및 대사조절에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

L-lysine은 필수 아미노산으로서, 곡류에 부족한 lysine의 공급과 더불어 사료공업에 있어서도 사료의 영양 강화 목적으로 lysine의 수요가 증가하고 있어 대사조절의 기초적인 연구와 산업화에 따른 대량생산에 많은 연구가 요구되고 있다.

현재 lysine의 상업적 생산은 *Brevibacterium* 혹은 *Corynebacterium* 속의 변이주를 이용한 직접 발효법에 주로 의존하고 있으며, 우수 균종 개발은 대부분 일본 및 프랑스 등 선진국의 학계와 산업계에서 이루어지고 있다. 특히 아미노산 생산시장의 상당한 부분은 일본이 주도하고 있는 실정이므로 국내의 기술로 우량 균종 개발이 시급한 실정이다.

최근에는 유전공학 기술을 도입하여 보다 간단하고 경제적인 균주를 개발함과 동시에 lysine 생합성에 관련된 여러 유전자를 분리하고, 또한 생산성에 있어서도 생산량을 증대시키며 발효상의 경비절감 등을 목적으로 여러 방면의 연구가 시도되고 있지만 아직 많이 부족한 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 산업적으로 lysine 발효산업에 유용한 균인 *B. lactofermentum*의 lysine 생합성에 있어서 4단계의 효소반응을 bypass하는 DDH

경로 및 *ddh* gene의 중요성을 조사하고 나아가서 *B. lactofermentum*내에서 *ddh* gene의 genetic manipulation을 수행함으로써 lysine 생합성 경로의 metabolic flux에 대한 이해와 lysine의 생산성 향상 및 생산 기술 개발에 기여할 것으로 사료된다.

또한 아미노산 발효시장의 일본 및 선진국의 편중화 현상을 극복하고 국제 경쟁력을 갖추기 위해서도 이러한 유전자 조작 및 응용 연구가 반드시 필요하다고 생각된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1차년도 : Gene disruption에 의한 *ddh* gene의 inactivation에 관한

연구

1. *ddh* gene의 coding region의 internal part를 pEMI vector에 삽입하여 pEM *ddh-int*를 제조하였다.
2. pEM *ddh-int*를 mobilizing strain인 *E. coli* S17-1로 transformation시켜 S-2-aminoethyl-L-cysteine(AEC) 내성을 가진 *B. lactofermentum*과 mating experiment를 수행하여 DDH 경로를 차단하였다.
→ Site-directed mutagenesis에 의해 *B. lactofermentum* genome내의 *ddh* gene이 disruption 되었다.
3. 항생제(kanamycin, nalidixic acid) marker를 이용한 배지에 trans-conjugates를 선별하였다.
4. Southern hybridization을 시행하여 *B. lactofermentum* genome내의 *ddh* gene이 disruption 되었는지를 재차 확인하였다.

**2차년도 : Expression vector(shuttle vector)의 제조 및 *ddh* gene의
disruption에 의한 대사 경로 조절에 관한 연구**

1. *ddh* gene의 disruption으로 인하여 DDH 경로가 차단되고 DAP 경로만을 가진 *B. lactofermentum* mutant로부터 morphology 변화를 조사하고 lysine 생성량을 정량하여 metabolic flux 등을 조사하였다.
2. Copy 수가 많고 항생제 marker를 가지는 *E. coli* vector들을 조사하여 plasmid DNA를 추출하고 *B. lactofermentum* cryptic plasmid와 ligation시켜 *B. lactofermentum*-*E. coli* shuttle vector를 구축하였다.
3. 제조된 expression vector(shuttle vector)내로 *ddh* gene을 cloning 하였다.

**3차년도 : Shuttle vector를 이용한 재조합 DNA 제조 및 유전자 조작에
의한 lysine 생산 수율의 비교분석에 관한 연구**

1. *C. glutamicum*과 같은 lysine 발효 생산균으로부터 cryptic plasmid를 분리하여 *E. coli* vector와 ligation시켜 *C. glutamicum*-*E. coli* shuttle vector를 구축하였다.
2. 제조된 *B. lactofermentum*-*E. coli* shuttle vector 및 *C. glutamicum*-*E. coli* shuttle vector내로 *ddh* gene을 함유한 DNA fragment를 cloning하여 재조합 DNA를 제조하고 이를 전기영동상에서 확인하였다.
3. *ddh* gene을 함유한 재조합 DNA를 lysine 생산균주인 *B. lactofermentum*으로 electrotransformation시켰다.
4. 재조합 DNA을 함유한 *B. lactofermentum*으로부터 DDH 활성 측정 및 lysine 생산 수율을 비교 분석하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1차년도 : Gene disruption에 의한 *ddh* gene의 inactivation에 관한 연구

ddh gene을 disruption시키기 위해 먼저 *ddh* gene의 coding region의 일부인 pXX14의 0.3kb *Bam*HI-*Hind*III fragment를 elution하여 이를 pEMI vector의 동일한 site내에 ligation시켜 pED15를 제조하였다. 이때 사용한 mobilizable vector pEMI는 *E. coli* replication origin만 가지고 있어 *B. lactofermentum*에서는 replication되지 못하고 chromosome 속으로 삽입되는 특성을 지니고 있다. 제조된 pED15로 *E. coli* S17-1을 형질전환 시킨 후 *B. lactofermentum* KCTC1846과 mating하여 항생제가 함유된 LB배지에서 transconjugants를 selection하였으며, 선별된 7개의 transconjugants로부터 plasmid DNA의 존재 및 DDH 효소활성이 전혀 관찰되지 않았다.

이 실험 결과를 통하여 transconjugants에는 autonomous plasmid가 존재하지 않으며, 나아가 pED15의 삽입으로 인해 *B. lactofermentum*의 *ddh* gene이 disruption됨으로써 DDH 경로가 차단되었음을 알 수 있었다. 이들 transconjugant 중에서 하나를 선택하여 KM1이라 명명하였다. 또한 Southern hybridization을 수행하여 *B. lactofermentum* KM1의 genome내에 *ddh* gene이 disruption되었음을 재차 확인하였다.

2차년도 : Expression vector(shuttle vector)의 제조 및 *ddh* gene의 disruption에 의한 대사 경로 조절에 관한 연구

ddh gene이 disruption되어 DDH 경로가 차단된 *B. lactofermentum* KM1의 특성을 조사하기 위하여 먼저 wild type인 *B. lactofermentum* KCTC 1844, AEC 내성균주인 KCTC1846, 그리고 mutant인 *B. lactofermentum* KM1의 성장 및 lysine 생산량을 비교 분석하였다. 그 결과 *B. lacto-*

fermentum KM1의 성장은 *B. lactofermentum*의 KCTC1844와 1846의 성장에 비해 매우 저조하였으며 lysine 생산량에서도 모 균주인 *B. lactofermentum* KCTC1846보다 80% 이상 감소하였다.

이상의 실험 결과를 통하여 *B. lactofermentum*에서의 DDH 경로의 불활성화는 균체 성장 및 lysine 생산량에 있어서 극적인 저하를 가져오기 때문에 *B. lactofermentum*의 DDH 경로는 *meso*-DAP와 lysine 생합성에 있어 필수불가결한 경로일 뿐만 아니라, lysine 생합성의 metabolic flux가 거의 DDH 경로로 흘러가는 것을 확인할 수 있었다.

B. lactofermentum-*E. coli* shuttle vector를 제조하기 위하여 먼저 *B. lactofermentum* KCTC1844내에 존재하는 cryptic plasmid pBL1을 분리하여 전기 영동상에서 확인한 결과 크기는 대략 4.4kb임을 확인할 수 있었다.

B. lactofermentum-*E. coli* shuttle vector pEB1은 *B. lactofermentum* 유래 plasmid pBL1의 4.1kb *Sph*I 단편과 *Sph*I으로 절단시킨 *E. coli* 유래 plasmid pHSG299의 2.7kb 단편과 ligation시켜 제조하였으며 크기는 대략 6.8kb 정도였다.

B. lactofermentum-*E. coli* shuttle vector pEB2는 cryptic plasmid pBL1을 제한효소 *Hind*III로 절단시켜 얻은 4.4kb 단편과 *Hind*III로 부분 절단된 pHSG299의 2.7kb 단편을 ligation시켜 제조하였으며 크기는 대략 7.1kb 정도였다.

B. lactofermentum-*E. coli* shuttle vector pEB3은 *E. coli* 유래 plasmid pJUB01을 *Hind*III와 *CIP*로 처리하여 얻은 5.5kb 단편과 cryptic plasmid pBL1의 4.4kb *Hind*III 단편을 ligation시켜 제조하였으며 크기는 대략 10kb 정도였다.

제조된 shuttle vector pEB1, pEB2, 그리고 pEB3이 *B. lactofermentum*

내에서 발현되는지의 여부를 확인하기 위하여, pEB1, pEB2, 그리고 pEB3에 의하여 *B. lactofermentum* KCTC1844와 1846을 형질전환시킨 결과 pEB1을 제외한 나머지 두 vector는 항생제를 함유한 배지상에서 발현하였다.

또한 재조합 plasmid pRK1은 shuttle vector pEB2의 *Sal*I site내로 *ddh* gene을 함유한 2.4kb *Xho*I 단편을 ligation시켜 제조하였다.

3차년도 : Shuttle vector를 이용한 재조합 DNA 제조 및 유전자 조작에 의한 lysine 생산 수율의 비교분석에 관한 연구

재조합 plasmid pRK2은 Shuttle vector pEB3을 제한효소 *Sal*I으로 완전절단시켜 얻은 대략 9kb 단편을 *ddh* gene을 함유한 2.4kb *Xho*I 단편과 ligation시켜 제조하였으며, 또한 재조합 plasmid pRK3은 Dr. Sahm으로부터 분양받은 *C. glutamicum*-*E. coli* shuttle vector pJC1의 *Sal*I site내로 *ddh* gene을 함유한 2.4kb *Xho*I 단편을 ligation하여 제조하였다.

재조합 plasmid를 함유한 *B. lactofermentum*의 DDH 활성 및 lysine 생산 수율을 비교분석하기 위하여 shuttle vector pEB2, pEB3 그리고 pJC1 및 재조합 plasmid pRK1, pRK2 그리고 pRK3 각각을 *B. lactofermentum* 균주내로 electroporation시킨 결과, 항생제를 함유한 배지상에서 모두 발현하였으며 재조합 plasmid에 의한 *B. lactofermentum*의 형질 전환율은 pRK2 보다 pRK1 및 pRK3에 의한 것이 더 우수하였다.

*B. lactofermentum*에서 *ddh* gene의 증폭에 의한 DDH 활성을 비교분석하기 위하여 *B. lactofermentum*으로부터 DDH의 활성을 측정 한 결과 재조합 plasmid pRK1 및 pRK2를 각각 함유한 *B. lactofermentum*의 DDH 활성은 대조균주보다 7배 정도, pRK3을 함유한 것의 활성은 14배 정도로 더 많이 증가하였다.

B. lactofermentum 내에서 *ddh* 유전자의 증폭에 의한 lysine 생성량은 삼각 플라스크 및 2.5 l 발효조를 이용한 발효법으로 비교 분석하였다.

삼각 플라스크 발효에서는 재조합 plasmid pRK1, pRK2 및 pRK3을 각각 함유한 균주의 경우, 48시간 이후부터 대조균주보다 lysine 생성량이 증가하기 시작하여 72시간 때에는 최대치를 나타내었으며 그 이후는 오히려 감소하였다. 72시간 때의 pRK1, pRK2 및 pRK3을 각각 함유한 균주의 lysine 생성량은 대조균주보다 18-22% 정도 증가하였다.

또한 2.5 l 발효조를 이용한 lysine 발효에서는 재조합 plasmid를 함유한 *B. lactofermentum* KCTC1846의 성장은 삼각 플라스크 발효에 의한 것보다는 2배정도 증가하였으며 lysine 생산에 있어서는 삼각 플라스크 발효에서처럼 72시간 때에 최대치를 나타내었으며, 72시간 때의 lysine 생성량은 재조합 plasmid pRK1(pEB2), pRK2(pEB3), 그리고 pRK3(pJC1)를 함유한 경우 각각 8.5g/l (7.0g/l), 7.1g/l (6.0g/l), 및 7.8g/l (6.6g/l)를 나타내어 대조균주보다 18-22% 증가하였다. ()는 대조 균주의 lysine 생성량을 표시하였다.

본 연구팀은 lysine 생성량을 더욱 더 증가시키기 위하여, 2.5 l 발효조에서 modification된 CGC배지에 soybean protein hydrolysate 혹은 yeast extract⁴⁴⁾를 첨가하여 발효를 시켰다. 그 결과 균주의 성장은 무첨가 균주에 비해 1.5배 정도 증가하였지만 lysine 생성량에는 영향을 주지 못하였다.

이상의 실험결과로 미루어 볼 때 유전자 조작에 의한 *B. lactofermentum* KCTC1846의 lysine 생성량은 대조균주와 비교하였을때 22%까지 증가하였다.

그러므로 본 연구팀은 향후 산업계와 연계하여 현재 lysine 발효산업에 이용되고 있는 균주 내로 *ddh* gene을 함유한 재조합 plasmid를 도입하는 등 우량 균주개발에 기여할 수 있으리라 사료된다.

SUMMARY

(영문요약문)

L-Lysine is one of the most important amino acids for food and feed additives. This amino acid is currently produced on a scale of about 250,000 tons per year by fermentation with classically derived mutants of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*.

B. lactofermentum, important microorganism in the industrial production of lysine, has both the diaminopimelate(DAP) pathway and the *meso*-DAP-dehydrogenase(DDH) pathway for L-lysine biosynthesis. The DAP pathway requires four step from tetrahydrodipicolinate(THDP) to *meso*-DAP in the lysine biosynthesis. In the DDH pathway, *meso*-DAP is directly formed from THDP by single enzymatic step, catalyzed by DDH. It is presumed that the DDH pathway has more merit by not requiring acetyl-CoA or succinyl-CoA and abbreviating the enzymatic reaction of four steps as found in the DAP pathway.

To investigate importance of DDH pathway and the related *ddh* gene in lysine production of *B. lactofermentum*, we introduced site-specific mutagenesis technique. The results revealed that inactivation of the DDH pathway in *B. lactofermentum* leads to dramatic reduction of lysine production as well as decrease of the growth rate, indicating that the DDH pathway is essential for high-level lysine production as well as biosynthesis of *meso*-DAP. Also, we investigated the effect of amplification of the *ddh* gene on lysine production in *B. lactofermentum*. For this

purpose, we constructed *B. lactofermentum*-*E. coli* shuttle vectors pEB1, pEB2, and pEB3. The recombinant plasmids pRK1, pRK2, and pRK3, containing the *ddh* gene of *B. lactofermentum*, were introduced into *B. lactofermentum* by electroporation. The results revealed that the specific activity of DDH by amplification of the *ddh* gene was increased 7~14 fold and also L-lysine production of *B. lactofermentum* strains harboring recombinant plasmids were 18~22% higher than that of the control.

CONTENTS

(영 문 목 차)

| | |
|--|----|
| Chapter 1. Introduction | 18 |
| Paragraph 1. Objectives and contents of research development | 18 |
| Chapter 2. Studies on the genetic manipulation and metabolic regulation for lysine production by microorganism | 22 |
| Paragraph 1. Contents of research development | 22 |
| 1. Bacterial strains and plasmids | 22 |
| 2. Materials and instruments | 22 |
| 3. Media and culture conditions | 25 |
| 4. Isolation of DNA and transformation | 25 |
| 5. Enzymatic digestion and ligation of DNA | 26 |
| 6. Measurement of <i>meso</i> -DAP-dehydrogenase activity and protein determination | 26 |
| 7. Southern hybridization | 26 |
| 8. Mating experiments | 27 |
| 9. Determination of glucose consumption and L-lysine production | 27 |
| Paragraph 2. Results of research development | 29 |
| 1. Objectives of the first year : Studies on the introduction of the <i>ddh</i> gene disruption | 29 |

| | | |
|----|--|----|
| 가. | Construction of pED15 for inactivation of the <i>ddh</i> gene | 29 |
| 나. | Disruption of the <i>ddh</i> gene of <i>B. lactofermentum</i> | 29 |
| 다. | Southern hybridization | 32 |
| 2. | Objectives of the second year : Studies on the regulation of metabolic pathway through disruption of the <i>ddh</i> gene and construction of the <i>ddh</i> gene and construction of expression vector(shuttle vector) | 35 |
| 가. | Character Site of <i>B. lactofermentum</i> mutant | 35 |
| 나. | Construction of the <i>B. lactofermentum</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector pEB1 | 37 |
| 다. | Construction of the <i>B. lactofermentum</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector pEB2 | 38 |
| 라. | Construction of the <i>B. lactofermentum</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector pEB3 | 43 |
| 마. | Transformation of <i>B. lactofermentum</i> by electroporation | 43 |
| 바. | Construction of the recombinant DNA pRK1 | 46 |
| 3. | Objectives of the third year : Studies on the construction of recombinant DNA using shuttle vector and analysis of the lysine production by the genetic manipulation | 49 |
| 가. | Construction of the recombinant DNA pRK2 | 49 |
| 나. | Construction of the recombinant DNA pRK3 | 49 |
| 다. | Transformation of <i>B. lactofermentum</i> by electroporation | 49 |
| 라. | <i>meso</i> -DAP-dehydrogenase activity of <i>B. lactofermentum</i> | 57 |
| 마. | L-lysine production of <i>B. lactofermentum</i> by amplification of the <i>ddh</i> gene | 59 |
| | Paragraph 3. References | 67 |

List of figures

Figures

| | |
|---|----|
| Fig. 1. Biosynthetic pathway of L-lysine in procaryotes----- | 19 |
| Fig. 2. Procedure of mating experiments between <i>E. coli</i> S17-1 and <i>B. lactofermentum</i> ----- | 28 |
| Fig. 3. Construction of the pED15 used for <i>ddh</i> gene disruption ----- | 30 |
| Fig. 4. Identification of constructed pED15 ----- | 31 |
| Fig. 5. Schematic illustration of the recombination events leading to site-specific disruption of the <i>B. lactofer-</i> <i>mentum ddh</i> gene----- | 33 |
| Fig. 6. Southern hybridization analysis of the constructed mutant ----- | 34 |
| Fig. 7. Construction of shuttle vector pEB1 ----- | 39 |
| Fig. 8. Identification of constructed pEB1 ----- | 40 |
| Fig. 9. Construction of shuttle vector pEB2 ----- | 41 |
| Fig. 10. Identification of constructed pEB2 ----- | 42 |
| Fig. 11. Construction of shuttle vector pEB3 ----- | 44 |
| Fig. 12. Identification of constructed pEB3 ----- | 45 |
| Fig. 13. Construction of recombinant DNA pRK1 ----- | 47 |
| Fig. 14. Identification of constructed pRK1 ----- | 48 |
| Fig. 15. Construction of recombinant plasmid pRK2 ----- | 50 |

| | |
|---|----|
| Fig. 16. Identification of constructed pRK2 | 51 |
| Fig. 17. Restriction map of shuttle vector pJC1 | 52 |
| Fig. 18. Construction of recombinant plasmid pRK3 | 53 |
| Fig. 19. Identification of constructed pRK3 | 54 |
| Fig. 20. Comparison of growth, glucose consumption, and lysine production of <i>B. lactofermentum</i> strains in shake flask fermentation | 60 |
| Fig. 21. Comparison of growth, glucose consumption, and lysine production of <i>B. lactofermentum</i> strains in shake flask fermentation | 61 |
| Fig. 22. Comparison of growth, glucose consumption, and lysine production of <i>B. lactofermentum</i> strains in shake flask fermentation | 62 |
| Fig. 23. Comparison of growth, glucose consumption, and lysine production of <i>B. lactofermentum</i> strains in 2.5 ℓ jar fermentation | 63 |
| Fig. 24. Comparison of growth, glucose consumption, and lysine production of <i>B. lactofermentum</i> strains in 2.5 ℓ jar fermentation | 64 |
| Fig. 25. Comparison of growth, glucose consumption, and lysine production of <i>B. lactofermentum</i> strains in 2.5 ℓ jar fermentation | 65 |

List of Tables

Tables

| | |
|---|----|
| Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study ----- | 23 |
| Table 2. DDH activity, growth rate, and amount of lysine secreted by the strains of <i>B. lactofermentum</i> ----- | 36 |
| Table 3. Transformation efficiencies of <i>B. lactofermentum</i> KCTC1844 and 1846 strains with plasmids----- | 56 |
| Table 4. DDH activity of <i>B. lactofermentum</i> KCTC1846 with plasmids ----- | 58 |

목 차

| | |
|---|----|
| 제1장 서론 | 18 |
| 제1절 연구개발의 목적 및 범위 | 18 |
| 제2장 미생물에 의한 lysine 생산성 증대를 위한 유전자 조작 및 대사조절에 관한 연구 | 22 |
| 제1절 연구개발 내용 | 22 |
| 1. Bacterial strains 및 plasmids | 22 |
| 2. 시약 및 기기 | 22 |
| 3. 배지 및 배양조건 | 25 |
| 4. DNA 분리 및 형질전환 | 25 |
| 5. DNA의 enzymatic digestion 및 ligation | 26 |
| 6. <i>meso</i> -DAP-dehydrogenase 효소 활성 및 단백질 정량 | 26 |
| 7. Southern hybridization | 26 |
| 8. Mating experiments | 27 |
| 9. L-Lysine 및 glucose 정량 | 27 |
| 제2절 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의 | 29 |
| 1.1차년도 연구목표: Gene disruption에 의한 <i>ddh</i> gene의 inactivation 에 관한 연구 | 29 |
| 가. <i>ddh</i> gene의 불활성화를 위한 pED15 제조 | 29 |
| 나. <i>B. lactofermentum</i> 내에서 <i>ddh</i> gene의 disruption | 29 |
| 다. Southern hybridization | 32 |

| | |
|--|----|
| 2.2차년도 연구목표: Expression vector(shuttle vector)의 제조 | |
| 및 <i>ddh</i> gene의 disruption에 의한 대사 경로 조절에 관한 연구 | 35 |
| 가. <i>ddh</i> gene이 disruption된 <i>B. lactofermentum</i> 의 특성 | 35 |
| 나. <i>B. lactofermentum-E. coli</i> shuttle vector pEB1 제조 | 37 |
| 다. <i>B. lactofermentum-E. coli</i> shuttle vector pEB2 제조 | 38 |
| 라. <i>B. lactofermentum-E. coli</i> shuttle vector pEB3 제조 | 43 |
| 마. 제조된 shuttle vecror pEB1, pEB2, pEB3에 의한 <i>B. lactofermentum</i> 의 형질전환 | 43 |
| 바. Shuttle vector pEB2내로 <i>ddh</i> gene의 cloning: pRK1 제조 | 46 |
| 3.3차년도 연구목표 : Shuttle vector를 이용한 재조합 DNA 제조 및 유전자 조작에 의한 lysine 생산수율의 비교 분석에 관한 연구 | 49 |
| 가. Shuttle vector pEB3내로 <i>ddh</i> gene의 cloning: pRK2 제조 | 49 |
| 나. Shuttle vector pJC1내로 <i>ddh</i> gene의 cloning: pRK3 제조 | 49 |
| 다. <i>B. lactofermentum</i> 의 형질전환 | 49 |
| 라. <i>B. lactofermentum</i> 의 <i>meso</i> -DAP-dehydrogenase(DDH) 활성화 | 57 |
| 마. <i>ddh</i> 유전자의 증폭을 통한 <i>B. lactofermentum</i> 의 L-lysine 생산 | 59 |
| 제3절 참고문헌 | 67 |

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적 및 범위

L-lysine은 필수 아미노산으로서, 곡류에 부족한 lysine의 공급과 더불어 사료공업에 있어서도 사료의 영양강화 목적으로 lysine의 수요가 증가하고 있다. 뿐만 아니라 필수 아미노산의 이용범위도 넓어져 식품강화제로 이용됨과 동시에 의약 분야에서도 영양제나 치료제로도 이용되고 있어 대사조절의 기초적인 연구와 산업화에 따른 대량생산에 많은 연구가 요구되고 있다.

현재 lysine의 상업적 생산은 *Brevibacterium* 혹은 *Corynebacterium* 속의 변이주를 이용한 직접 발효법에 주로 의존하고 있으며, 우수 균종 개발은 대부분 일본 및 프랑스 등 선진국의 학계와 산업계에서 이루어지고 있다. 특히 아미노산 생산시장의 상당한 부분은 일본이 주도하고 있는 실정이므로 국내의 기술로 우량 균종 개발이 시급한 실정이다.

미생물을 이용한 lysine 발효연구는 초기에는 S-2-aminoethyl-L-cysteine (AEC)과 같은 lysine 유도체에 대한 내성 변이주를 이용한 대량 생산의 유도¹⁻²⁾, 이속간 원형질체 융합에 의한 lysine 생산 균주 개발³⁻⁵⁾, 그리고 당 소비속도와 균체성장이 향상된 균주의 개발⁶⁻⁸⁾ 등 균주자체의 특성을 이용하여 lysine의 생성량을 향상시키는 연구가 진행되어 왔다. 최근에는 유전공학 기술을 도입하여 보다 간단하고 경제적인 균주를 개발함과 동시에 lysine 생합성에 관련된 여러 유전자를 분리하고⁹⁻¹³⁾, 또한 생산성에 있어서도 생산량을 증대시키며 발효상의 경비절감등을 목적으로 여러 방면의 연구가 시도되고 있지만 아직 많이 부족한 실정이다.

원핵생물계에서의 L-lysine 생합성은 3가지 서로 다른 경로를 통하여 일어난다¹⁴⁾. Fig. 1에서 보는 바와 같이 acetyl화 된 중간 대사물¹⁵⁾ 및 succinyl화

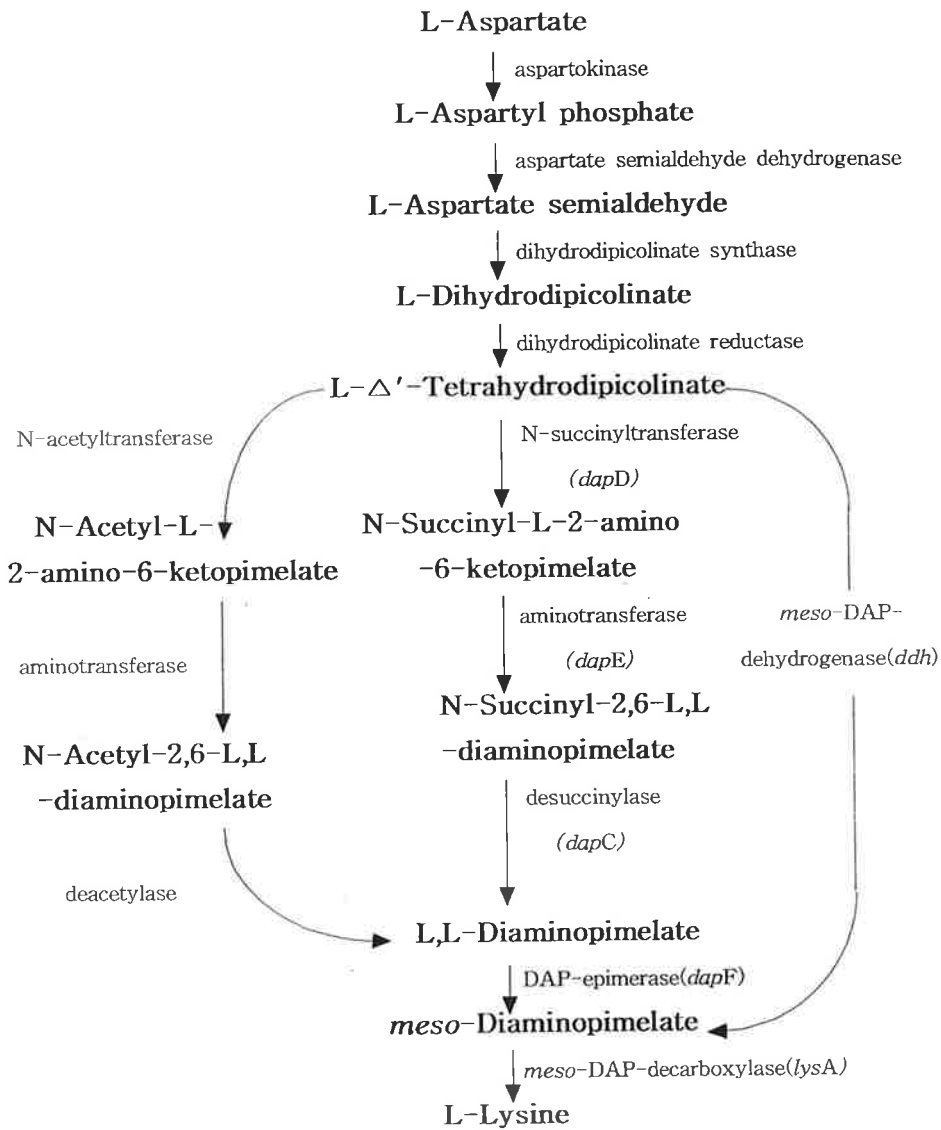


Fig. 1. Biosynthetic pathway of L-lysine in procaryotes.

The acetylated intermediates(left) and succinylated intermediates(center) of the diaminopimelate(DAP) pathway and *meso*-DAP-dehydrogenase(DDH) pathway(right) are utilized for biosynthesis of lysine in procaryotes.

된 중간 대사물¹⁶⁻¹⁷⁾을 각각 거쳐 lysine을 생합성하는 2가지 다른 diaminopimelate(DAP) 경로¹⁸⁾는 중간 물질인 tetrahydrodipicolinate (THDPA)로부터 meso-DAP로의 전환에 4단계 효소반응을 요구하지만 meso-DAP-dehydrogenase (DDH) 경로¹⁹⁻²⁰⁾는 THDPA로부터 한 단계 효소반응을 거쳐 meso-DAP를 생산하며 이때 meso-DAP-dehydrogenase gene(*ddh*)이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이 중 DDH 경로는 DAP 경로에 비하여 acetyl-coA와 succinyl-coA를 필요로 하지 않으며, 4단계의 효소 반응을 줄여주므로 많은 이점과 중요성을 가질 것으로 추정된다.

최근에는 acetyl화 된 중간 대사물 및 succinyl화 된 중간 대사물을 각각 거쳐 lysine을 생합성하는 2가지 다른 DAP 경로를 acetylase 경로 및 succinylase 경로로 구별하고 있으며²¹⁾, DDH 경로는 dehydrogenase 경로로 불리어지고 있으나²¹⁾, 본 연구에서는 협약서에서 표기한 대로 DAP 경로 및 DDH 경로로 표시하였다.

일반적으로 미생물들은 이러한 생합성 경로 중 단지 한가지 경로를 이용하여 lysine을 생합성하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. 이 중 대표적인 경로인 DAP 경로는 *Escherichia coli*를 비롯한 모든 Gram(-) 균주 및 대부분의 Gram(+) 미생물들이 이용하는 경로이며²²⁾, DDH 경로를 통하여 lysine을 생합성하는 균은 많지 않으며 *Bacillus sphaericus*에서 잘 연구되어 있다¹⁹⁾.

그러나 lysine 생산 균주인 *C. glutamicum* 및 *B. lactofermentum*에서는 두가지 경로, 즉 DAP 경로와 DDH 경로가 함께 작용하여 lysine을 생합성하며 산업적으로 lysine 발효산업에 널리 이용되고 있다²³⁻²⁵⁾. 특히 DDH 경로는 lysine 생합성에 있어서 DAP 경로의 4단계 효소반응을 한단계로 진행시키며 또한 생산균주에서 DAP 경로와 함께 작용하여 lysine을 생합성하기 때문에 높은 수율의 lysine을 생성하는데 기여할 것으로 사료된다.

본 연구팀은 *B. lactofermentum*의 lysine 생합성 경로에 있어서 DDH 경로에

많은 관심을 가지고 다년간 연구를 하면서 *B. lactofermentum*에서 DDH 경로의 존재를 처음으로 규명하였으며²⁵⁾, 또한 DDH 경로에 관여하는 *ddh* gene을 cloning하고 그의 sequence를 보고한 바 있다²⁶⁾.

본 연구의 1차년도 연구 목표는 “Gene disruption에 의한 *ddh* gene의 inactivation에 관한 연구” 로써, 본 연구팀은 gene-direct mutagenesis 방법을 통하여 *B. lactofermentum* genome내에서 *ddh* gene을 disruption시켜 DDH 경로를 차단시키는 실험을 수행하였다.

2차년도에서는 연구 목표가 “expression vector(shuttle vector)의 제조 및 *ddh* gene의 disruption에 의한 대사경로 조절에 관한 연구” 로써 1차년도 연구를 통하여 획득한 *B. lactofermentum* mutant(DDH 경로 차단)로부터 균체 성장 측정 및 lysine 생성량 정량 등 morphology 변화를 조사하였다. 또한 *B. lactofermentum*내에서 DDH 경로에 관여 하는 *ddh* gene을 증폭시키기 위하여, *B. lactofermentum*-*E. coli* shuttle vector(expression vector)를 제조하고, *ddh* gene을 함유한 재조합 DNA도 구축하였다.

최종 단계인 3차년도의 연구목표에서는 *ddh* gene을 함유한 재조합 DNA로 *B. lactofermentum*을 형질전환시켜 대조균주와 효소 활성 및 lysine 생산량을 비교 분석하여 보았다. *ddh* gene의 증폭을 통하여 DDH 경로쪽으로 metabolic flux를 증가시켰을때 lysine 생성량은 대조균주보다 18-22% 정도 증가하였다.

그러므로 본 연구에서는 산업적으로 lysine 발효산업에 유용한 균인 *B. lactofermentum*으로부터 lysine 생합성 경로에 관여하는 DDH 경로 및 *ddh* gene의 중요성을 조사하고 유전자 조작을 통하여 lysine 생산성을 향상시키는 연구를 수행하였기 때문에 lysine 생합성 경로의 metabolic flux에 대한 이해와 lysine 생산성 향상을 위한 기술 개발에 기여할 것으로 사료된다.

제 2 장 미생물에 의한 lysine 생산성 증대를 위한 유전자 조작 및 대사조절에 관한 연구

제1절 연구개발 내용

1. Bacterial strains 및 plasmids

Brevibacterium lactofermentum KCTC1844는 wild type 균주로 사용하였고, *B. lactofermentum* KCTC1846²⁷⁾은 AEC 내성 변이주로 이용하였다.

Escherichia coli S17-1²⁸⁾은 mobilizing donor 균주로 사용하였고, *E. coli* JM109는 plasmid DNA를 안정하게 보관시키는 균주로 사용하였다.

Plasmid vector로는 *ddh* gene을 함유한 pXX14²⁵⁻²⁶⁾를 사용하였으며 mating 실험을 위하여 pEM I¹⁴⁾을 사용하였다. *B. lactofermentum*-*E. coli* shuttle vector 제조를 위하여는 *B. lactofermentum* 유래의 plasmid pBLI²⁹⁾과 *E. coli* vector pHSG299 및 pJUB01³⁰⁾이 사용되었으며, Sahm³¹⁾으로부터 분양받은 plasmid pJC1은 *Corynebacterium glutamicum*-*E. coli* shuttle vector로 사용하였다. 본 실험에 사용된 균주와 plasmids는 Table 1에 요약하였다.

2. 시약 및 기기

제한 효소는 Promega사, 제철 화학사 그리고 Boehringer Mannheim제품을 구입하였으며, [α -³²P]dCTP 및 [α -³²P]dATP는 Amersham Co. 제품을 사용하였다. Probe 제조에 사용된 oligolabeling kit는 Pharmacia로부터 구입하였고, hybridization용의 membrane은 Schleicher & Schuell의 nitro-cellulose membrane을 사용하였다. DAP(mixture of L,L-D,D and meso-isomer), ampicillin(Ap), kanamycin(Km), 그리고 그 외의 시약은 Sigma Co. 등

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

| Strain/plasmid | Genotype | Source/reference |
|---------------------------------|--|------------------|
| <i>B. lactofermentum</i> | | |
| KCTC1844 | Wild type Nx ^r | KCTC |
| KCTC1846 | ser AEC ^r Nx ^r | KCTC, 27 |
| KM1 | KCTC1846 <i>ddh</i> : :pEMddh-int Nx ^r Km ^r | This work |
| <i>E. coli</i> | | |
| S17-1 | mobilizing donor strain <i>hscR recA, tra</i> from RP4 derivative integrated in the chromosome | 28 |
| JM109 | <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17</i> <i>gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB)F.</i> [<i>traD36 proA⁺ proB⁺ lacI^q</i> <i>lacZΔM15</i>] | Promega |
| plasmid | | |
| pXX14 | Ap ^r , <i>ddh</i> ⁺ | 25, 26 |
| pEMI | Km ^r oriV _{<i>E. coli</i>} , pK19:: [ori _{TRP4}] | 14 |
| pEMddh-int | Km ^r pEMI::internal <i>ddh</i> fragment | This work |
| pBL1 | <i>B. lactofermentum</i> cryptic plasmid | 29 |
| pHSG299 | Km ^r | Takara |
| pJUB01 | Ap ^r , Cm ^r | 30 |
| pEB1 | Km ^r | This work |
| PEB2 | Km ^r | This work |
| pEB3 | Ap ^r , Cm ^r | This work |
| pJC1 | Km ^r | 31 |
| pRK1 | Km ^r , <i>ddh</i> ⁺ | This work |
| pRK2 | Ap ^r , Cm ^r , <i>ddh</i> ⁺ | This work |
| pRK3 | Km ^r , <i>ddh</i> ⁺ | This work |

Abbreviations: AEC, S-2-aminoethyl-L-cystein; Nx, nalidixic acid; Km, kanamycin; Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol; KCTC, Korean Collection for Type Cultures

에서 구입한 특급시약을 사용하였다. Lysine 발효 배양은 2.5 l jar fermentor(EYELA, M-100)를 사용하였으며, Lysine 정량은 amino acid analyzer(Pharmacia, Biochrom 20) 및 HPLC(Waters)를 이용하여 분석하였다.

3. 배지 및 배양조건

실험에 사용된 모든 균주 배양에는 LB(Luria-Bertani)배지³²⁾를 사용하였으며, 필요에 따라 ampicillin(Ap), kanamycin(Km), chloramphenicol(Cm) 그리고 nalidixic acid(Nx)를 첨가하여 배양하였다. 플라스크를 이용한 lysine 발효배지로는 완전배지로서 CGIII배지¹⁴⁾(Bacto-pepton 10g, Bacto-yeast extract 10g, NaCl 25g/ℓ)를, 최소배지로서 CGX배지³³⁾(glucose 40g, (NH₄)₂SO₄ 20g, KH₂PO₄ 0.5g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.25g, MnSO₄·7H₂O 0.01g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, ZnSO₄·H₂O 0.001g, CuSO₄ 0.2mg, NiCl₂ 0.02mg, biotin 0.2mg, CaCO₃ 2%/ℓ) 및 modification된 CGC배지¹⁴⁾(glucose 50g, (NH₄)₂SO₄ 20g, KH₂PO₄ 0.5g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.25g, MnSO₄·7H₂O 0.01g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, ZnSO₄·H₂O 0.001g, CuSO₄ 0.2mg, NiCl₂ 0.02mg, NaCl 0.1g, CaCl₂ 0.01g, biotin 0.5mg, nicotinamide 0.5mg/ℓ)를 사용하였으며, 2.5ℓ jar 발효조 실험을 위한 배지는 glucose와 (NH₄)₂SO₄를 각각 10% 및 4%로 modification한 CGC배지¹⁴⁾를 사용하였다. 본 실험에 사용한 *B. lactofermentum* 및 *E. coli*는 호기적 조건하에서 각각 30℃ 및 37℃에서 배양하였다.

4. DNA 분리 및 형질전환

*B. lactofermentum*의 chromosomal DNA는 Asubel 등의 방법에 따라 분리하였다. Coryneform strains으로부터 plasmid DNA분리는 Miwa 등³⁴⁾의 방법에 의하여, 또한 *E. coli* plasmid DNA는 Sambrook 등³²⁾의 alkaline lysis 방법에 따라 추출되었다. *E. coli*의 형질전환은 Sambrook 등³²⁾의 방법에 따라 10-100ng DNA를 200μℓ competent cell에 가하여 42℃에서 2분간 heat-shock을 시키고 난 다음, 항생제 첨가 배지에 도말하고 37℃에 배양시켜 colony를 확인하였다.

*B. lactofermentum*의 형질전환은 균체를 penicillin G(1U/ml)로 처리한 후 2500 voltage에서 electroporation³⁵⁾방법으로 수행하였다.

5. DNA의 enzymatic digestion 및 ligation

Recombinant DNA를 제조하기 위해서는 plasmid DNA를 정해진 효소 unit에 따라 절단시켰으며 필요시 Sambrook 등³²⁾의 방법에 따라 calf intestine phosphatase (CIP)도 처리하였다. 그리고 agarose gel에서 원하는 DNA fragment를 분리할 때에는 투석막을 사용하여 electroelution 방법³²⁾으로 추출하거나 또는 gene clean kit를 사용하여 회수하였다. Ligation시에 plasmid DNA와 foreign DNA의 비율은 Sambrook 등³²⁾의 조건에 따라 수행하였다.

6. meso-DAP-dehydrogenase(DDH)효소 활성 및 단백질 정량

DDH 활성측정은 Yeh 등²⁰⁾이 사용한 방법에 따라 배양된 균체를 0.2M glycine-KCl-KOH buffer(pH 10.5)에 현탁하여 세포를 파괴한 후 원심분리하여 얻은 상층액을 crude extract로 사용하였다. 효소활성은 기질로 10mM diaminopimelic acid를 사용하였고 조효소로서 0.1mM NADP⁺가 포함된 0.2M glycine-KCl-KOH buffer에 crude extract를 첨가하여 마지막 부피를 1ml로 맞춘다음 37°C에서 30분간 반응시켜 340 nm에서 환원된 NADPH의 양을 측정하였다. 효소 1 unit는 1분당 1 μ mole NADPH를 생산하는 양으로 표시하였으며 비활성은 단백질 mg당 units로 표시하였다. 단백질 정량은 Lowry 등³⁶⁾의 방법에 따라 750nm에서 흡광도로 측정하였으며 bovine serum albumin(0.3 mg/ml)을 standard로 사용하였다.

7. Southern hybridization

Southern hybridization에 사용된 probe DNA는 Pharmacia LKB protocol에 따라 제조하였다. pXX14의 2.4kb *Xho* I fragment를 [α -³²P]dCTP로 labeling 하고 이를 probe로 사용하여, Southern³⁷⁾의 방법에 따라 *B. lactofermentum*의 chromosomal DNAs와 hybridization은 실시하였다. Southern blot은 gel 상의 DNAs를 capillary 방법을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 전이하고 probe와 hybridization 반응을 시켰다. 그 후 intensifying screen이 양면으

로 들어있는 cassette에 고정시키고 X-ray film을 얹어 -70°C에서 12~36시간 감광시킨 후 현상하였다.

8. Mating experiments

B. lactofermentum KCTC1846과 *E. coli* S17-1의 mating 실험은 Schafer 등³⁸⁾의 방법에 따라 수행하였다. 먼저 plasmid pEMddh-int를 mobilizing strain인 *E. coli* S17-1로 형질전환시켜 Km(50µg/ml)을 함유한 LB배지에서 대수기까지 배양시켰으며 이를 donor cell로 사용하였다. recipient cell인 *B. lactofermentum* KCTC1846은 Nx(30µg/ml)를 함유한 LB배지에서 48시간 동안 배양되었으며 가능한 여러 restriction system을 막기 위하여 48.5°C, 9분동안 열처리하였다. Donor와 recipient cell의 혼합비율은 1:5로 하였으며 20°C에서 원심분리에 의해 pellet(mating mixture)를 모우고 500µl LB배지에 현탁시켰다. *B. lactofermentum* transconjugants는 Km(25µg/ml)과 Nx(30µg/ml)를 함유한 LB배지에서 selection되었으며, mating 실험 절차는 Fig. 2에 간단하게 나타나 있다.

9. L-Lysine 및 glucose 정량

Cremer 등³³⁾ 및 shrumpt 등¹⁴⁾의 방법에 따라 항생제가 첨가된 CGIII배지에서 배양시킨 균체를 원심분리하여 모우고 0.9% NaCl로 2회 세척하여 각 sample의 OD₆₀₀ 값을 동일하게 하여 CGX 및 modification된 CGC 배지로 재접종하여 96시간 동안 배양하였다. 균체 성장(OD₆₀₀), glucose 소비량 및 lysine 생성량의 분석을 위하여 3시간 마다 sample 2 ml씩을 취하였으며, 배양동안 10N NH₄OH를 첨가하여 pH 7.4를 유지하였다. Lysine 정량은 배양액을 원심분리하여 얻은 상층액을 0.45µm membrane filter로 filtration한 후 HPLC (Waters)로 분석하였으며, 3회 이상 반복 실험하여 평균값으로 나타내었다. Glucose 정량은 glucose oxidase를 사용하여 Sigma사에서 추천한 지시에 따라 분석하였다.

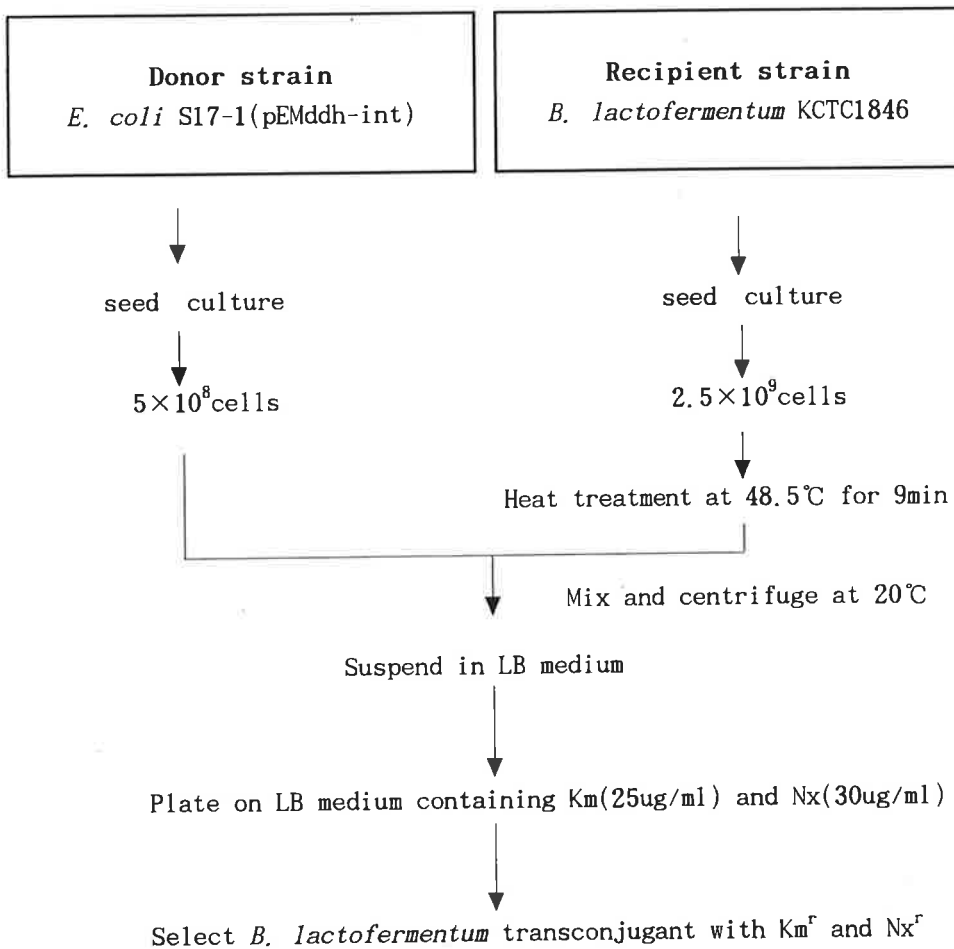


Fig. 2. Procedure of mating experiments between *E. coli* S17-1 and *B. lactofermentum*.

Mating experiments were done at the donor-recipient ratio of 1:5.

제2절 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 1차년도 연구목표: Gene disruption에 의한 *ddh* gene의 inactivation에 관한 연구

가. *ddh* gene의 불활성화를 위한 pED15 제조

이를 위해 mobilizable vector로서 Schrupf 등¹⁴⁾이 제조한 pEMI를 사용하였는데, 이 vector는 pK19³⁹⁾에서 유래된 multiple cloning site와 Tn5의 Km^r gene을 함유하고 있으며, 특히 *E. coli*의 replication origin만 가지고 있기 때문에 *B. lactofermentum*에서는 replication 되지 못하고 chromosome 속으로 삽입되는 특성을 지니고 있다. 나아가 plasmid RP4의 transfer origin(oriT)를 가지고 있어 mobilizing strain인 *E. coli* S17-1에 의해 mobilization 할 수 있는 성질을 갖고 있다.

본 연구에서는 먼저 *ddh* gene의 coding region의 일부인 pXX14의 0.3kb *Bam*HI-*Hind*III fragment를 elution하여 이를 pEMI vector의 동일한 site내에 ligation시켜 pED15를 제조하였다(Fig. 3). Fig. 4에서 보는 것처럼 재조합 plasmid DNA를 분리하여 *Bam*HI와 *Hind*III 효소로 이중 절단시켜 전기영동한 결과, *ddh* 유전자의 일부인 0.3kb *Bam*HI-*Hind*III fragment가 pEMI vector내에 삽입되었음을 확인할 수 있었다.

나. *B. lactofermentum*내에서 *ddh* gene의 disruption

*B. lactofermentum*의 DDH 경로에 관여하는 *ddh* gene을 disruption시키기 위하여, 제조된 pED15로 *E. coli* S17-1을 형질전환시킨 후 *B. lactofermentum* KCTC1846과 mating 실험을 수행하였다. 이 과정에서 pED15는 *E. coli* S17-1로부터 conjugation에 의해 *B. lactofermentum* KCTC1846으로 전이되며, 그

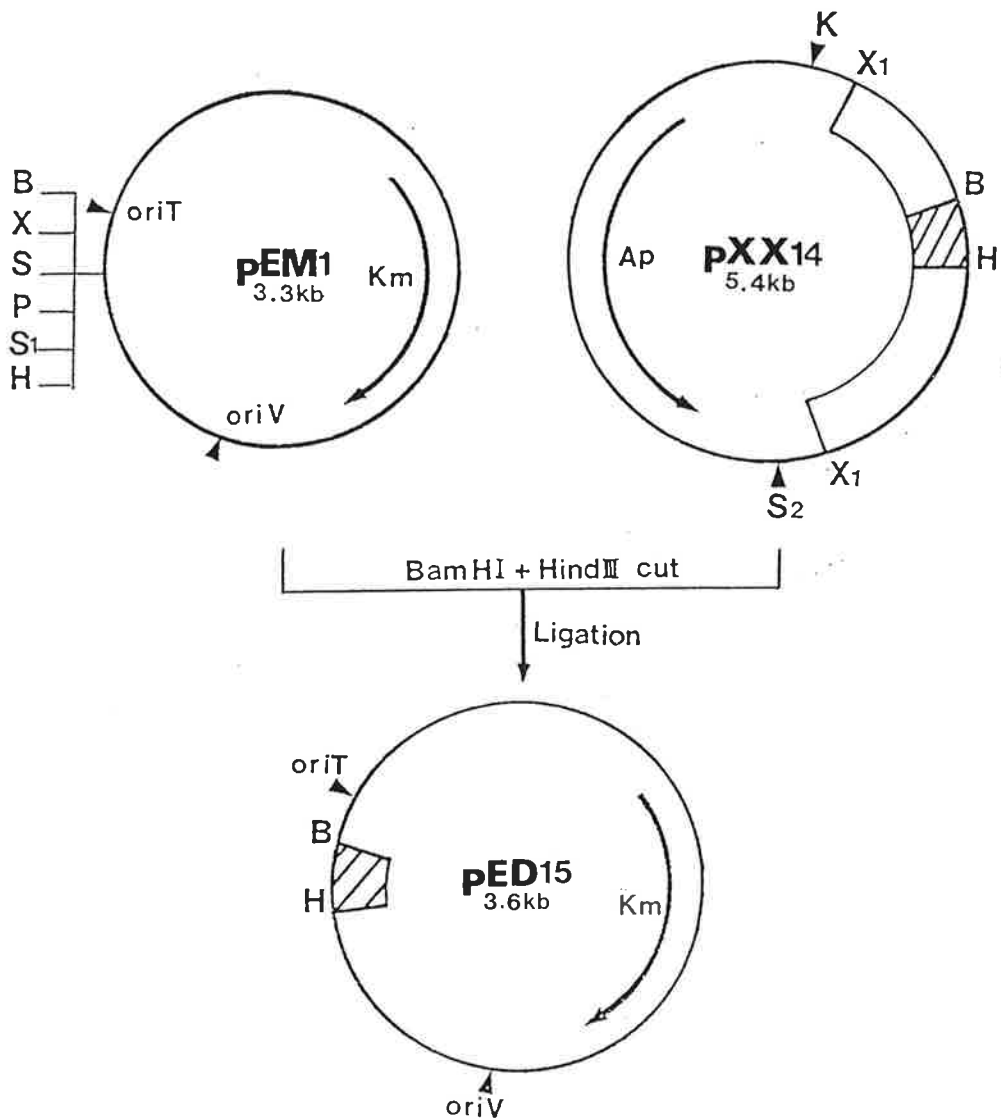


Fig. 3. Construction of the pED15 used for *ddh* gene disruption.

The 300bp *Bam*HI-*Hind*III fragment of pXX14 located within the coding region of the *ddh* gene was inserted in the pEM1 vector. B, *Bam*HI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; S, *Sal*I; S₁, *Sph*I; S₂, *Sac*I; X, *Xba*I; X₁, *Xho*I.

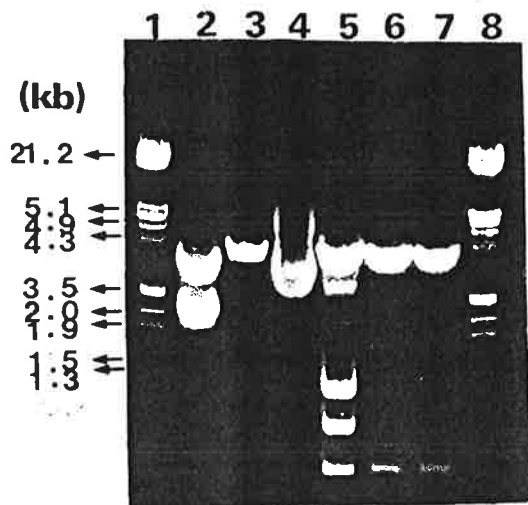


Fig. 4. Identification of constructed pED15.

- Lane 1. λ DNA digested with *Hind*III and *Eco*RI
- Lane 2. pEMI DNA
- Lane 3. pEMI DNA digested with *Bam*HI and *Hind*III
- Lane 4. pXX14 DNA
- Lane 5. pXX14 DNA digested with *Bam*HI and *Hind*III
- Lane 6. pEMddh-int digested with *Bam*HI and *Hind*III
- Lane 7. pEMddh-int with *Bam*HI and *Hind*III
- Lane 8. λ DNA digested with *Hind*III and *Eco*RI

후 nonreplicative plasmid인 pED15내의 0.3kb *Bam*HI-*Hind*III fragment가 *B. lactofermentum* genomic *ddh* locus에 recombination이 일어나 삽입된다 (Fig. 5). Transconjugants는 Km(25 μ g/ml)와 Nx(30 μ g/ml)을 함유한 LB배지에서 selection되었으며, 선별된 7개의 transconjugants로부터 plasmid DNA의 존재 및 DDH 효소활성이 전혀 관찰되지 않았다.

이 실험 결과를 통하여 transconjugants에는 autonomous plasmid가 존재하지 않으며, 나아가 pED15의 삽입으로 인해 *B. lactofermentum*의 *ddh* gene이 disruption됨으로써 DDH 경로가 차단되었음을 알 수 있었다. 이들 transconjugant중에서 하나를 선택하여 KM1이라 명명하였다.

다. Southern hybridization

B. lactofermentum KM1의 genome내에 *ddh* gene이 disruption되었는지의 여부를 확인하기 위하여 Southern hybridization을 수행하였다. AEC 내성 균주인 *B. lactofermentum* KCTC1846과 *ddh* gene이 disruption된 *B. lactofermentum* KM1의 chromosomal DNA를 분리하여 제한효소 *Xho*I으로 절단시킨 후 α -³²P로 label된 pXX14의 2.4kb *Xho*I fragment와 hybridization하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 것처럼 *B. lactofermentum* KCTC1846에서는 약 2.4kb 위치에서, *B. lactofermentum* KM1에서는 약 6.0kb 위치에 각각 하나의 hybridizing fragment가 관찰되었다. 이러한 결과는 *B. lactofermentum* genome내의 *ddh* locus에 pED15(3.6kb)가 삽입되어 *ddh* gene이 disruption됨으로써 6.0kb의 fragment가 관찰됨을 보여주는 것이다.

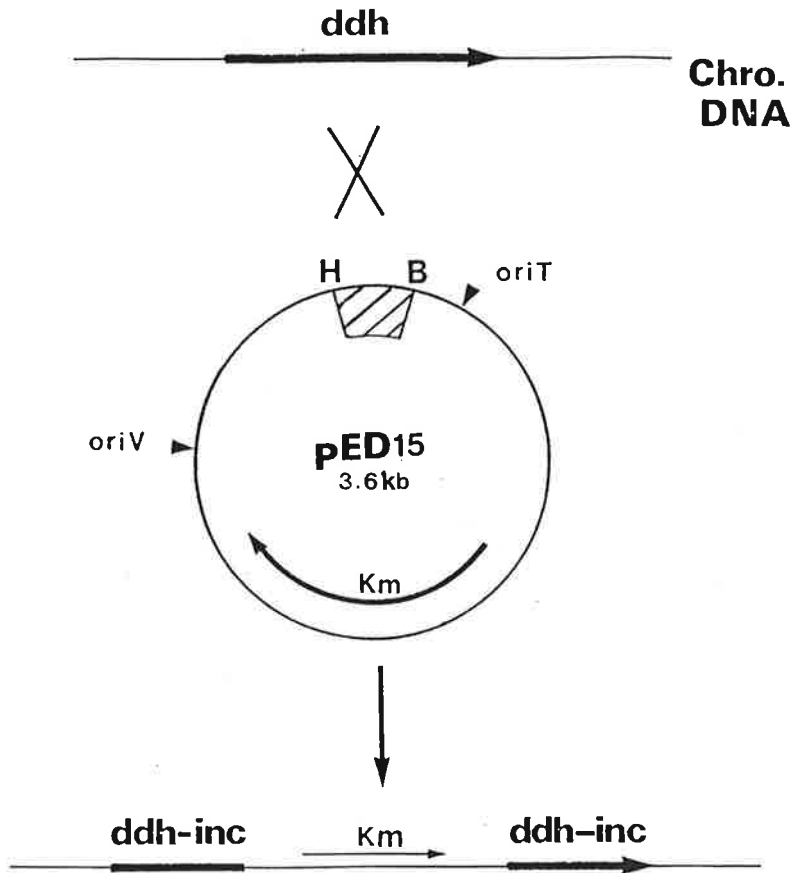


Fig. 5. Schematic illustration of the recombination event leading to site-specific disruption of the *B. lactofermentum* *ddh* gene. Single crossover between the 300bp fragment of *ddh* gene on the nonreplicative plasmid pED15 and chromosomal *ddh* locus disrupted the *ddh* gene by plasmid integration and conferred resistance against kanamycin. Chro. DNA, chromosomal DNA; *ddh-inc*, *ddh*-incomplete.

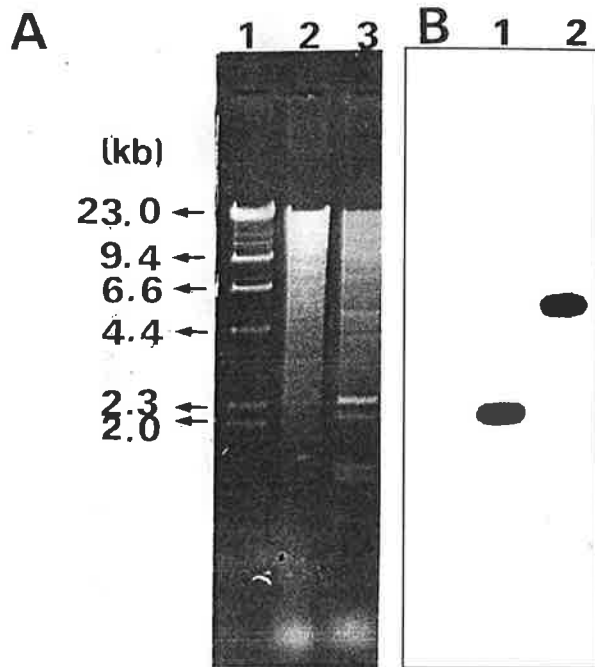


Fig. 6. Southern hybridization analysis of the constructed mutant.

Chromosomal DNAs isolated from *B. lactofermentum* KCTC1846 and the mutant KMI were digested with *Xho*I, subjected to agarose gel electrophoresis, transferred to nylon membrane and hybridized with a labeled 2.4kb *Xho*I fragment of pXX14.

A. Agarose gel electrophoresis

Lane 1. λ DNA digested with *Hind*III

Lane 2. *B. lactofermentum* KCTC1846 chromosomal DNA digested with *Xho*I

Lane 3. *B. lactofermentum* KMI chromosomal DNA digested with *Xho*I

B. Autoradiogram

2. 2차년도: Expression vector(shuttle vector)의 제조 및 *ddh* gene의 disruption에 의한 대사 경로 조절에 관한 연구

가. *ddh* gene이 disruption된 *B. lactofermentum*의 특성

ddh gene이 disruption되어 DDH 경로가 차단된 *B. lactofermentum* KM1의 특성을 조사하기 위하여 먼저 wild type인 *B. lactofermentum* KCTC1844, AEC 내성균주인 KCTC1846, 그리고 KM1을 완전배지인 CGIII에서 30°C, 48시간, 그리고 최소배지인 CGX에서 30°C, 72시간 동안 각각 배양하여 OD₆₀₀에서 균수를 측정하여 성장을 비교 분석하였다. 그 결과 *B. lactofermentum*의 KCTC1844와 1846의 성장에 비해 mutant인 KM1은 성장이 매우 저조하였다. 이는 아마도 DDH 경로의 불활성화로 인해 세포벽 합성에 필수적인 *meso*-DAP와 세포의 성장에 필요한 lysine 양의 공급이 부족하기 때문에 이러한 결과가 초래되었다고 여겨진다(Table 2). 이 결과를 뒷받침하기 위해 이들의 lysine 생산량을 측정하였을 때에도 현저한 차이를 나타내었다. *B. lactofermentum* KM1에서의 lysine 생산량은 모 균주인 *B. lactofermentum* KCTC1846보다 80% 이상 감소하였다. 이와 같이 *B. lactofermentum*이 DAP 경로만을 가졌을 때 균체의 성장 및 lysine 생산량에 있어서 극적인 저하를 가져오는 결과는 DDH 경로가 *meso*-DAP 및 lysine 생합성에 있어 필수불가결한 경로라는 것을 확인해주는 셈이다.

그러나 *C. glutamicum*에서 DDH 경로를 gene-directed mutagenesis 방법으로 차단시킨 Schrumpt 등¹⁴⁾의 보고에 따르면, 변이주들이 여전히 wild type과 비슷한 성장을 유지하는 것으로 보아 *C. glutamicum*에서의 DDH 경로는 세포의 생육을 위한 *meso*-DAP 및 lysine 생합성에 필수적인 경로로 작용하지 않는다고 보고하였다. 그렇지만 DDH 경로의 불활성화는 대

Table 2. DDH activity, growth rate and amount of lysine secreted by the strains of *B. lactofermentum*.

| strain | DDH sp. act. (U/mg) | Growth rate(h ⁻¹) | | Lysine(mM) ^d |
|--|---------------------------|----------------------------------|------|-------------------------|
| | | CGIII | CGX | |
| <i>B. lactofermentum</i> 1844 | 0.09 | 0.47 | 0.56 | 6 |
| <i>B. lactofermentum</i> 1846 ^a | 0.15 | 0.48 | 0.57 | 20 |
| <i>B. lactofermentum</i> KM1 | 0.00 | 0.36 | 0.29 | 0.25 |

^a Strain 1846 is a mutant with feedback-resistant aspartate kinase

^b Lysine was determined in supernatants after cells were cultivated on CGX media for 72hrs.

사 중간 물질인 N-succinyl-diaminopimelate의 축적과 동시에 50% 이상 lysine 생산의 감소를 초래하므로 이러한 DDH 경로는 metabolic flux가 증가되면 중간 대사물을 lysine으로 변화시키는데 필요조건으로 작용한다고 보고하였다.

그러므로 *C. glutamicum*과 *B. lactofermentum*과 같은 glutamic acid bacteria가 lysine을 많이 생산하는 것은 DDH 경로가 부가적으로 존재하기 때문일 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과를 통하여 *B. lactofermentum*에서의 DDH 경로는 meso-DAP와 lysine 생합성에 있어 필수불가결한 경로일 뿐만 아니라, lysine 생합성의 metabolic flux가 거의 DDH 경로로 흘러가는 것을 확인할 수 있었다.

나. *B. lactofermentum*-*E. coli* shuttle vector pEB1 제조

B. lactofermentum-*E. coli* shuttle vector를 제조하기 위하여, 먼저 Miwa 등³⁴⁾의 방법에 따라 *B. lactofermentum* KCTC1844내에 존재하는 cryptic plasmid pBL1을 분리하였다. pBL1 DNA를 제한효소로 처리하여 0.7% agarose gel 전기 영동상에서 확인한 결과, 크기는 대략 4.4kb임을 확인할 수 있었다(Fig. 8, lane 2).

분리된 *B. lactofermentum* 유래 plasmid pBL1의 4.1kb *Sph*I 단편을 elution하고 난 후 *Sph*I으로 절단시킨 *E. coli* 유래 plasmid pHSG299의 2.7kb 단편과 ligation시켜 *E. coli* JM109를 형질전환시킨 결과, Km(25 μ g/ml)을 함유한 LB배지상에서 약 100여개의 형질전환체를 얻었다. 이 형질전환체로부터 10개의 colony를 선발하여 plasmid DNA를 분리한 후 전기영동한 결과, 모두 같은 크기의 pattern을 나타내었으며 크기는 대략 6.8kb정도였다. 이 중 하나의 형질전환체를 선발하여 pEB1으로 명명하고

(Fig. 7) 여러 가지 제한효소로 반응시켜 0.7% agarose gel 전기영동상에서 분석하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 pEB1을 제한효소 *Bam*HI로 절단하였을때 약 6.8kb 정도의 단일 band를 나타내었고(lane 5), 또한 *Sph*I으로 절단하였을 때는 4.1kb와 2.7kb의 두 band가 관찰되었다(lane 7). 따라서 plasmid pBL1과 pHSG299가 ligation되어 *B. lactofermentum*-*E. coli* shuttle vector pEB1이 제조되었다는 것을 확인할 수 있었다.

다. *B. lactofermentum*-*E. coli* shuttle vector pEB2 제조

B. lactofermentum 유래 plasmid pBL1을 제한효소 *Hind*III로 절단시켜 얻은 4.4kb 단편과, *Hind*III로 부분 절단된 *E. coli* 유래 plasmid pHSG 299의 2.7kb 단편을 ligation시켜 *E. coli* JM109를 형질전환시켰다. 그 결과, Km(25 μ g/ml)을 함유한 LB배지상에서 약 200여개의 형질전환체를 얻었으며 그 중 10개의 colony를 선발하고 plasmid DNA를 분리하여 전기영동한 결과, 모두 같은 크기의 pattern을 나타내었으며 크기는 대략 7.1kb 정도였다. 이 중 하나의 형질전환체를 선발하여 pEB2으로 명명하고(Fig. 9) 여러 가지 제한효소로 반응시켜 0.7% agarose gel 전기영동상에서 분석하였다. Fig. 10에서 보는 것처럼 pEB2를 제한효소 *Eco*RI으로 절단하였을때 약 7.1kb 정도의 단일 band를 나타내었으며(lane 6), 또한 *Hind*III으로 완전 절단하였을 때는 대략 4.4kb, 2.1kb 그리고 0.6kb의 세 band를 관찰할 수 있었다(lane 7). 따라서 plasmid pBL1과 pHSG299가 ligation되어 *E. coli*-*B. lactofermentum* shuttle vector pEB2가 제조되었다는 것을 확인할 수 있었다.

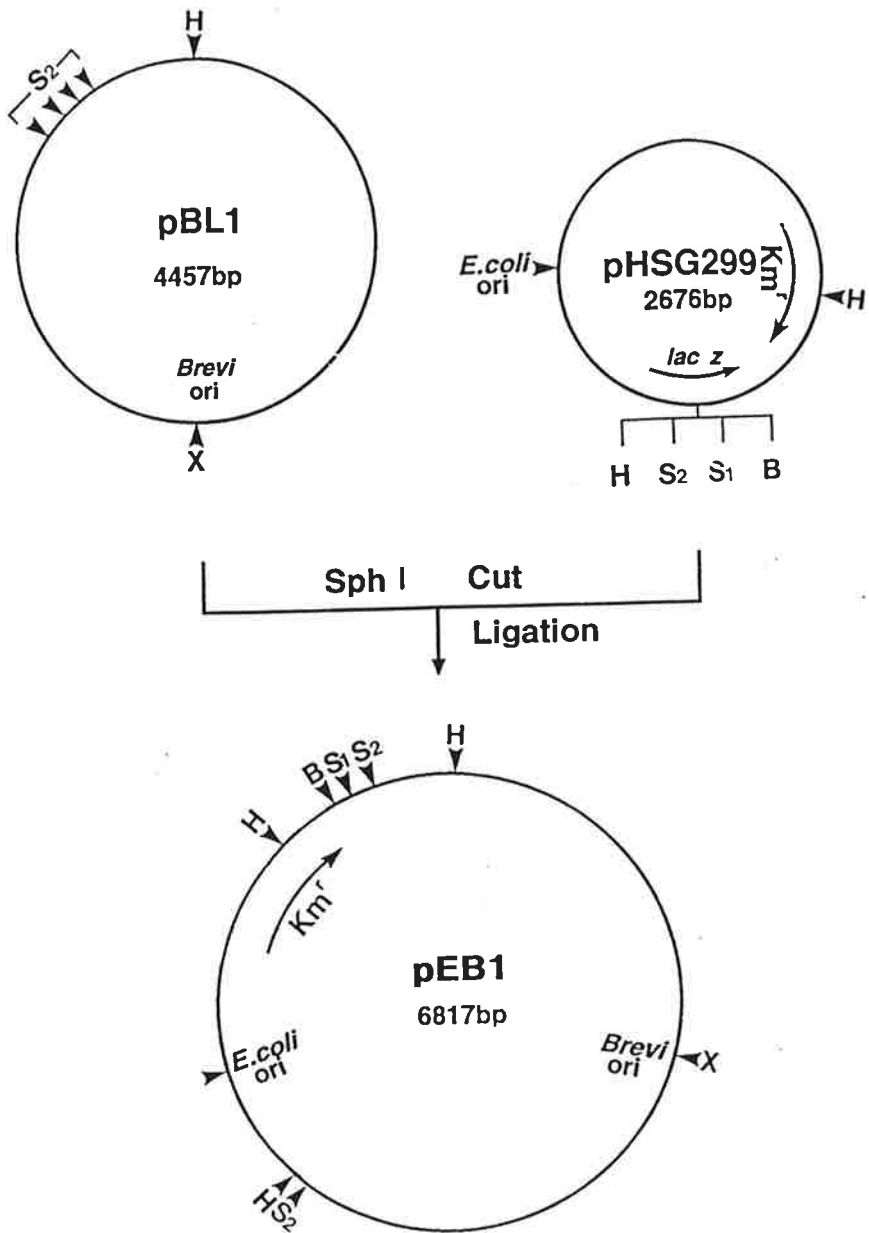


Fig. 7. Construction of shuttle vector pEB1.

The plasmid pBL1 was digested with *SphI* and ligated with pHSG299 digested with *SphI*. B, *BamHI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; S₁, *SalI* S₂, *SphI*; X, *XbaI*

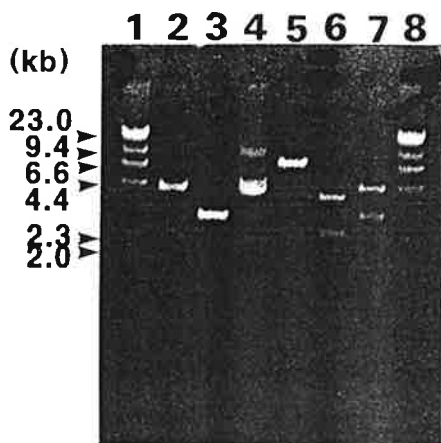


Fig. 8. Identification of constructed pEB1.

The plasmid pEB1 was digested with various restriction endonucleases

- Lane 1. λ DNA digested with *Hind*III
- Lane 2. *B. lactofermentum* cryptic plasmid pBL1 digested with *Sph*I
- Lane 3. *E. coli* plasmid pHSG299 digested with *Sph*I
- Lane 4. pEB1 DNA
- Lane 5. pEB1 digested with *Bam*HI
- Lane 6. pEB1 digested with *Hind*III
- Lane 7. pEB1 digested with *Sph*I
- Lane 8. λ DNA digested with *Hind*III

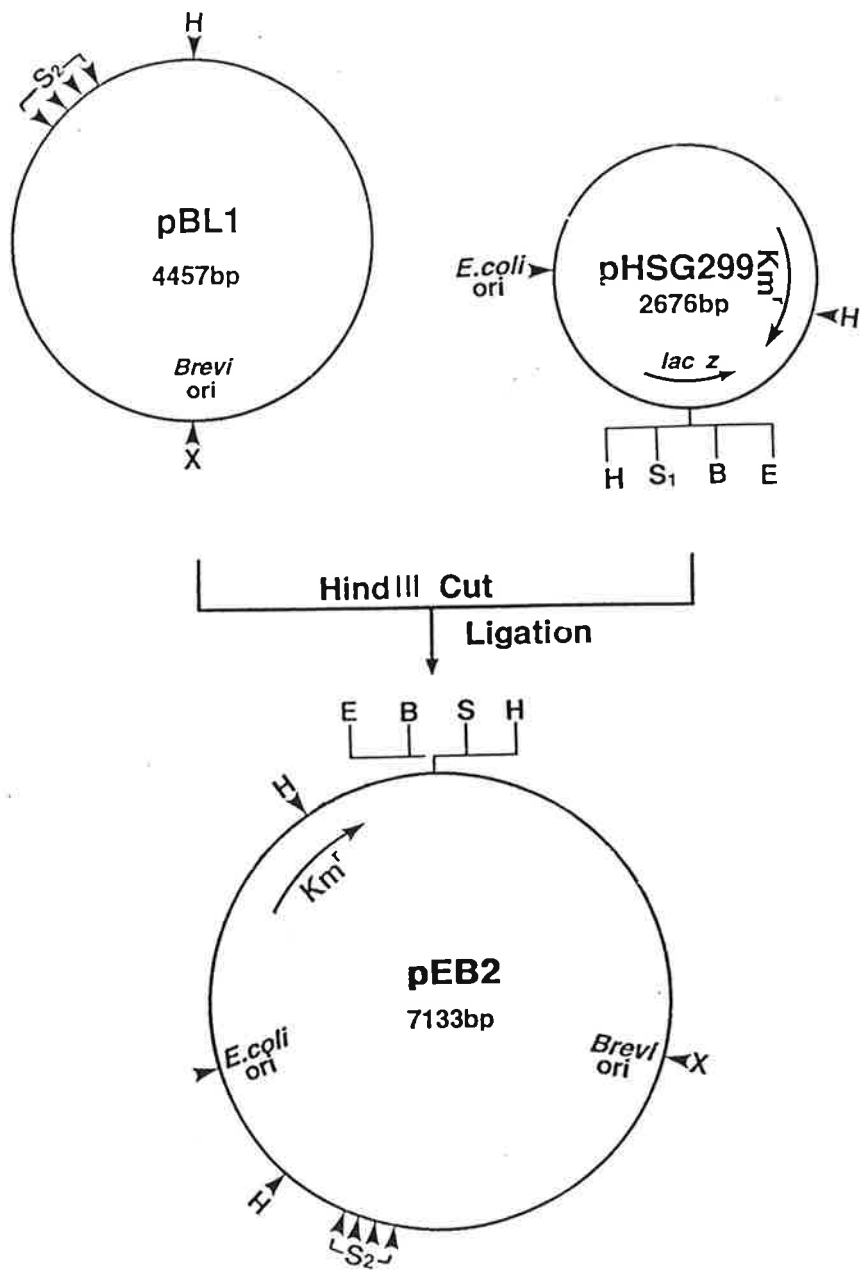


Fig. 9. Construction of shuttle vector pEB2.

The plasmid pBL1 was digested with *Sph*I and ligated with pHSG299 partially digested with *Hind*III. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI, H, *Hind*III; S₁, *Sa*II; S₂, *Sph*I; X, *Xba*I



Fig. 10. Identification of constructed pEB2.

Plasmid pEB2 was digested with various restriction endonucleases

Lane 1. λ DNA digested with *Hind*III

Lane 2. *B. lactofermentum* cryptic plasmid pBL1 digested with *Hind*III

Lane 3. *E. coli* plasmid pHSG299 digested with *Hind*III

Lane 4. pEB2 DNA

Lane 5. pEB2 digested with *Bam*HI

Lane 6. pEB2 digested with *Eco*RI

Lane 7. pEB2 digested with *Hind*III

Lane 8. λ DNA digested with *Hind*III

라. *B. lactofermentum*-*E. coli* shuttle vector pEB3 제조

E. coli 유래 pJUB01를 *Hind*III와 CIP로 처리하여 얻은 대략 5.5kb 단편과 *B. lactofermentum* 유래 cryptic plasmid pBL1의 4.4kb *Hind*III 단편을 ligation시켜 ampicillin($50\mu\text{g}/\text{ml}$)과 chloramphenicol($25\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유한 LB배지상에서 약 60여 개의 형질전환체를 획득하였다. 이 형질전환체 중 10개를 선별하여 plasmid DNA를 분리한 후 전기영동한 결과, 모두 같은 크기의 pattern을 나타내었고 크기는 대략 10kb 정도였다. 이 중 하나를 선별하여 pEB3로 명명하고(Fig. 11) 여러 가지 제한효소로 반응시켜 0.7% agarose gel 전기영동상에서 분석한 결과, Fig. 12에서 보는 것처럼 *Hind*III로 절단하였을 때 4.4kb와 5.5kb정도의 두 band를 관찰할 수 있어(lane 6), *B. lactofermentum*-*E. coli* shuttle vector pEB3이 제조된 것을 확인할 수 있었다.

마. 제조된 shuttle vector pEB1, pEB2, pEB3에 의한 *B. lactofermentum*의 형질전환

제조된 shuttle vectors가 *B. lactofermentum*내에서 발현되는지의 여부를 확인 하기 위하여, pEB1, pEB2 그리고 pEB3으로 *B. lactofermentum* KCTC1844와 1846을 형질전환시켰다. 그 결과 pEB2를 함유한 형질전환체는 Km($25\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유한 배지에서 colony를 형성하였고, 또한 pEB3에 의한 것은 Cm($5\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유한 배지에서 발현하였지만, Ap를 함유한 배지 상에서는 발현하지 못하였다. 이것은 Ap^r gene이 *B. lactofermentum*에서 발현하지 못한다는 Ozaki 등⁴⁰⁾의 보고와 일치하였다. 또한 pEB1을 함유한 형질전환체는 항생제를 함유한 LB 배지상에서 전혀 발현하지 못하였다. 아마도 pEB1 제조시 *B. lactofermentum* 유래 pBL1 vector의 0.3kb *Sph*I 단편의 제거로 인해 autonomous replication을 위한 open

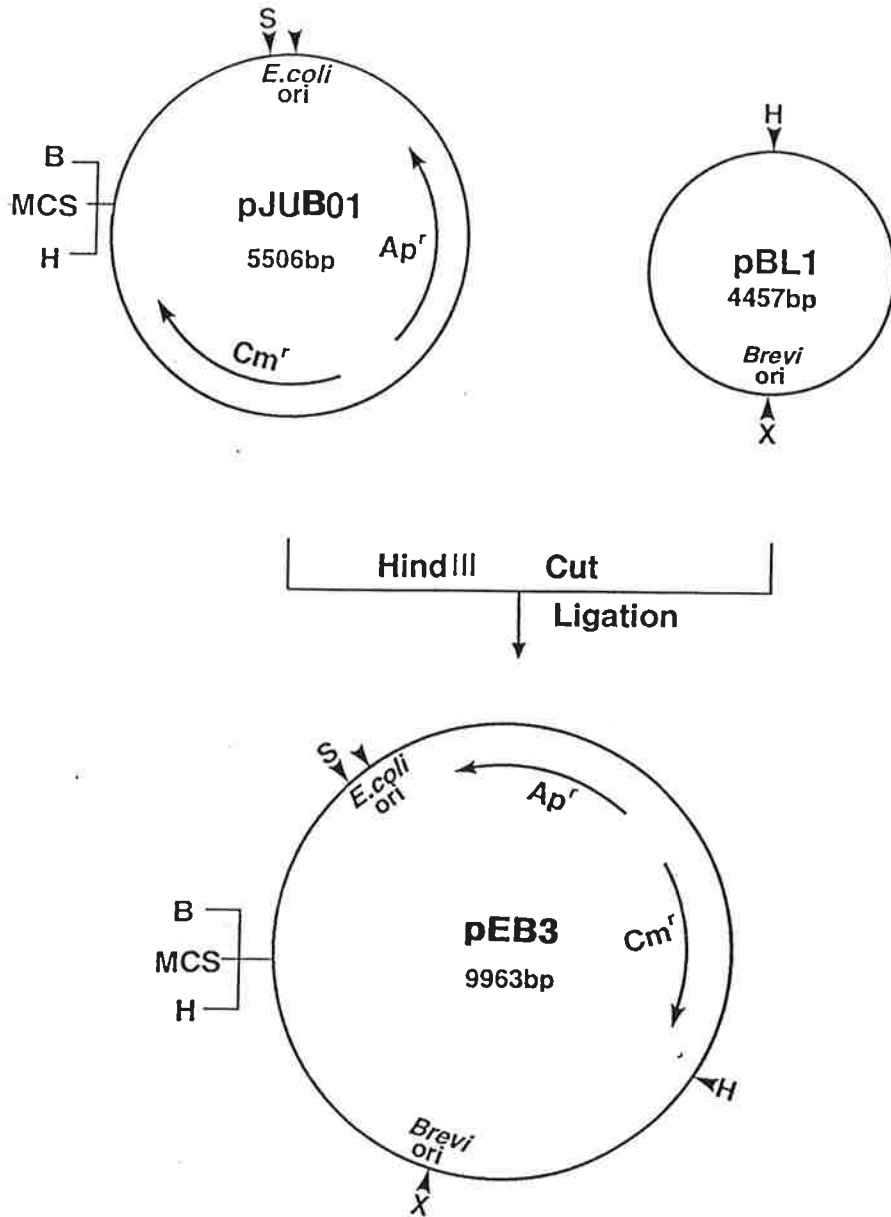


Fig. 11. Construction of shuttle vector pEB3.

The plasmid pBL1 was digested with *Sph*I and ligated with pJUB01 digested with *Hind*III. B, *Bam*HI; H, *Hind*III; S, *Sal*I; X, *Xba*I; MCS, multi cloning site

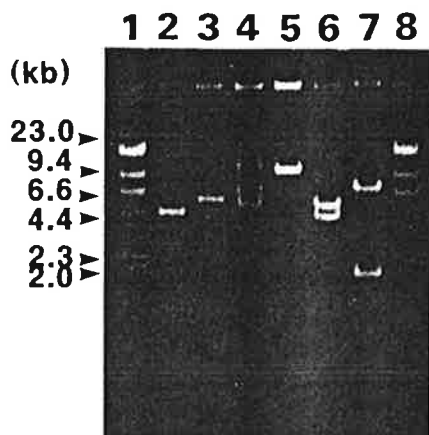


Fig. 12. Identification of constructed pEB3.

Plasmid pEB3 was digested with various restriction endonucleases

Lane 1. λ DNA digested with *Hind*III

Lane 2. pBL1 digested with *Hind*III

Lane 3. *E. coli* plasmid pJUB01 digested with *Hind*III

Lane 4. pEB3 DNA

Lane 5. pEB3 digested with *Bam*HI

Lane 6. pEB3 digested with *Hind*III

Lane 7. pEB3 digested with *Xba*I

Lane 8. λ DNA digested with *Hind*III

reading frame(ORF)의 일부가 파괴되었으리라 사료된다⁴¹⁾.

바. Shuttle vector pEB2내로 *ddh* gene의 cloning: pRK1 제조

제조된 shuttle vector pEB2의 *Sa*I site내로 *ddh* gene을 함유한 2.4kb *Xho*I단편을 cloning시키기 위하여, vector DNA와 insert DNA를 2:1비율로 혼합한 DNA molecules를 *E. coli* JM109로 형질전환시켜 kanamycin(25 μ g/ml)을 함유한 LB배지상에서 형질전환체를 획득하였다.

이들 중 하나의 형질전환체를 선발하여 pRK1으로 명명하고(Fig. 13) plasmid DNA을 분리하여 *Bam*HI으로 절단시킨 결과, Fig. 14에서 보는 바와 같이 shuttle vector pEB2내에 함유된 *Bam*HI site와 *ddh* gene의 단편내에 함유된 *Bam*HI site가 절단되어 두 개의 band를 관찰할 수 있어 (lane 5), shuttle vector pEB2내에 *ddh* gene을 함유한 2.4kb 단편이 cloning된 것을 확인할 수 있었다.

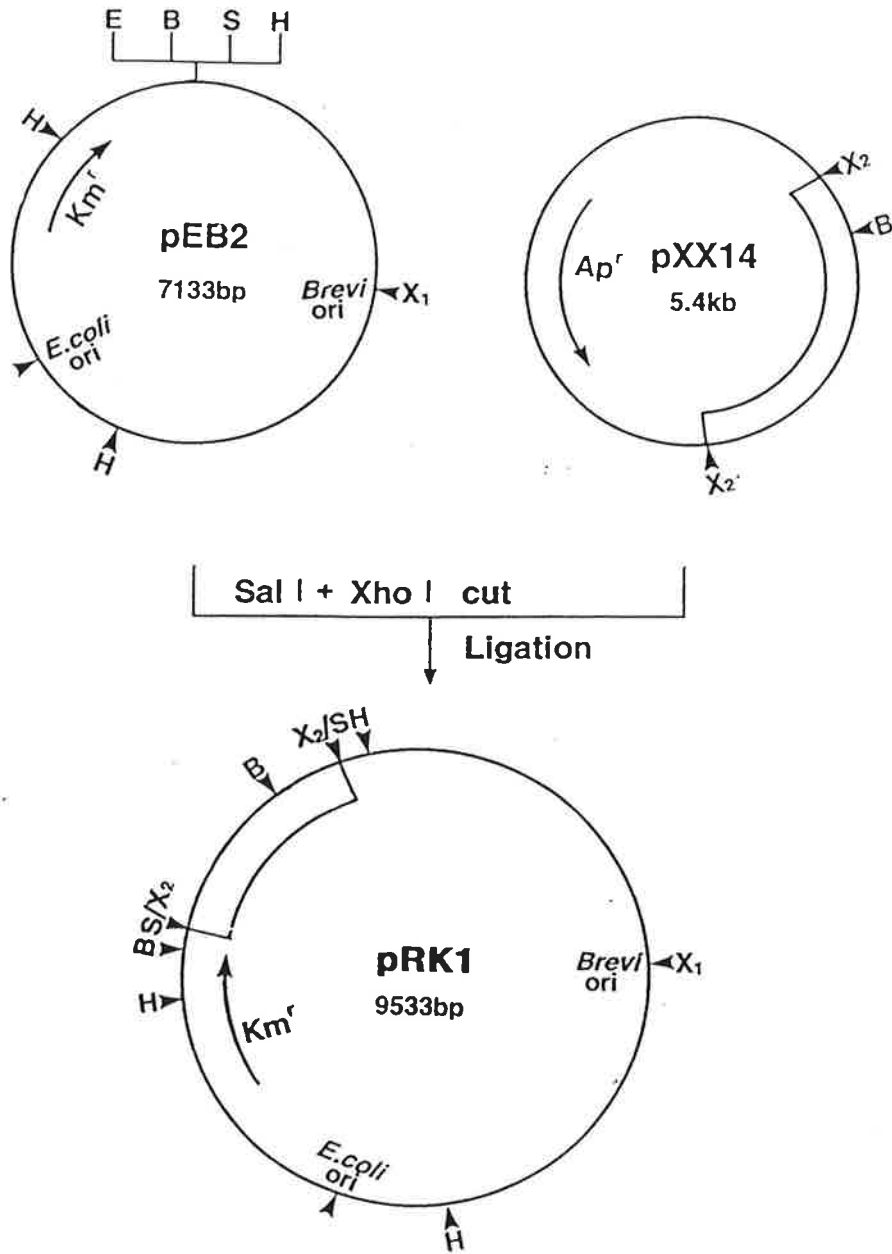


Fig. 13. Construction of recombinant DNA pRK1.

The pRK1 was constructed by inserting the 2.4kb *Xho*I fragment of pXX14 at the *Sal*I site of pEB2. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S, *Sal*I; X₁, *Xba*I; X₂, *Xho*I

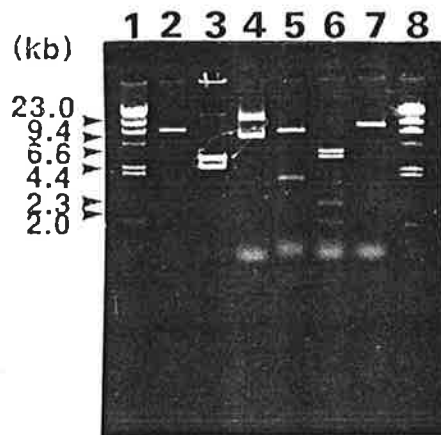


Fig. 14. Identification of constructed pRK1.

Plasmid pRK1 was digested with various restriction endonucleases

- Lane 1. λ DNA digested with *Hind*III
- Lane 2. pEB2 digested with *Sal*I
- Lane 3. pXX14 digested with *Xho*I
- Lane 4. pRK1 DNA
- Lane 5. pRK1 digested with *Bam*HI
- Lane 6. pRK1 digested with *Hind*III
- Lane 7. pRK1 digested with *Xba*I
- Lane 8. λ DNA digested with *Hind*III

3. 3차년도 연구목표: Shuttle vector를 이용한 재조합 DNA 제조 및 유전자 조작에 의한 lysine 생산 수율의 비교분석에 관한 연구

가. Shuttle vector pEB3내로 *ddh* gene의 cloning: pRK2 제조

Shuttle vector pEB3을 제한효소 *Sal*I으로 완전절단시켜 얻은 대략 9kb 단편을 *ddh* gene을 함유한 2.4kb *Xho*I 단편과 ligation시켜 pRK2을 제조하였다(Fig. 15). Fig. 16에서 보는 바와 같이 pRK2를 *Bam*HI으로 절단시킨 결과, *ddh* gene이 가지고 있는 *Bam*HI site가 절단되어 대략 12kb 위치에서 단일 band를 확인할 수 있어(Lane 5) shuttle vector pEB3내로 *ddh* gene을 함유한 2.4kb 단편이 삽입되었음을 확인하였다.

나. Shuttle vector pJC1내로 *ddh* gene의 cloning: pRK3 제조

Shuttle vector pJC1(Fig. 17)의 *Sal*I site내로 *ddh* gene을 함유한 2.4kb *Xho*I 단편을 cloning하여 pRK3을 제조하였다(Fig. 18). Fig. 19에서 보는 바와 같이 pRK3을 *Bam*HI으로 절단시킨 결과, *ddh* gene이 가지고 있는 *Bam*HIsite와 pJC1의 *Bam*HIsite가 절단되어 두 band를 확인할 수 있어(lane 5) shuttle vector pEB3내로 *ddh* gene을 함유한 2.4kb 단편이 삽입되었음을 확인하였다.

다. *B. lactofermentum*의 형질전환

ddh gene의 증폭에 의한 lysine 생산수율을 비교분석하기 위하여 shuttle vector pEB2, pEB3 그리고 pJC1 및 재조합 plasmid pRK1, pRK2 그리고 pRK3을 *B. lactofermentum*내로 electroporation시켰다. pEB2, pJC1, pRK1 및 pRK3을 각각 함유한 *B. lactofermentum* KCTC1844와 1846은 Km(25 μ g/ml)을 함유한 LB배지상에서, 또한 pEB3 및 pRK2를 함유한

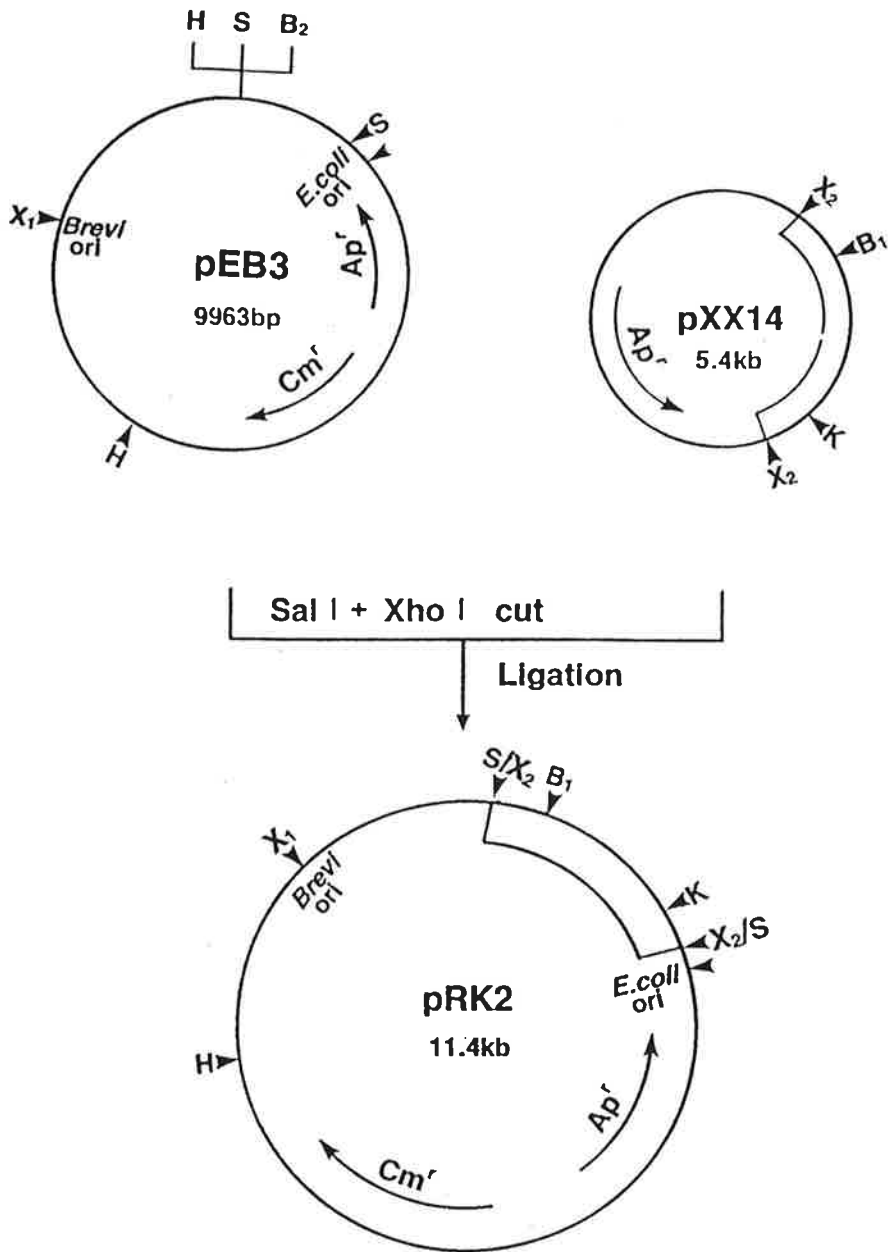


Fig. 15. Construction of recombinant plasmid pRK2.

The pRK2 was constructed by inserting the 2.4kb *Xho*I fragment of pXX14 at the *Sal*I site of pEB3. B, *Bam*HI; B₂, *Bgl*II; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; S, *Sal*I; X₁, *Xba*I; X₂, *Xho*I

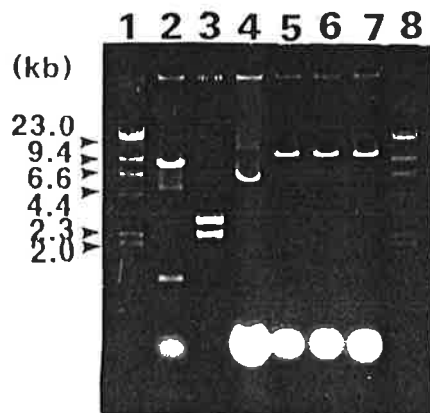


Fig. 16. Identification of constructed pRK2.

Plasmid pRK2 was digested with various restriction endonucleases

Lane 1. λ DNA digested with *Hind*III

Lane 2. pEB3 digested with *Sal*I

Lane 3. pXX14 digested with *Xho*I

Lane 4. pRK2 DNA

Lane 5. pRK2 digested with *Bam*HI

Lane 6. pRK2 digested with *Kpn*I

Lane 7. pRK1 digested with *Xba*I

Lane 8. λ DNA digested with *Hind*III

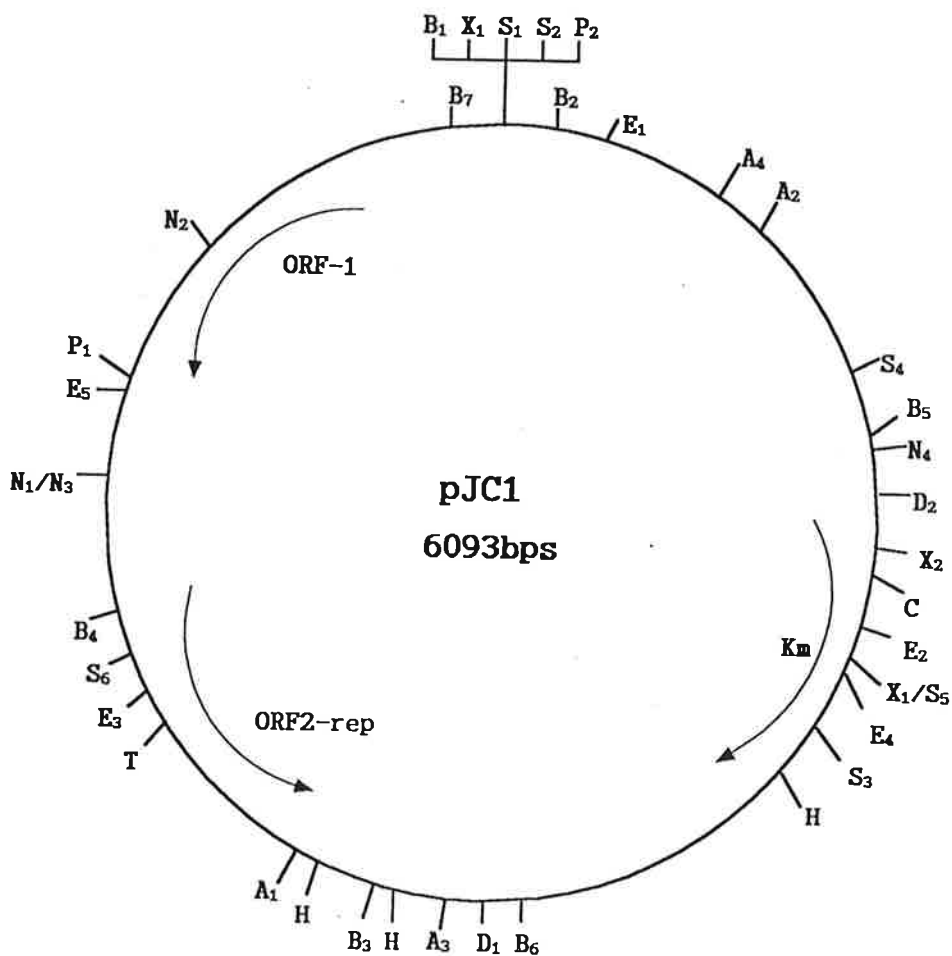


Fig. 17. Restriction map of shuttle vector pJC1.

A₁, *Af*III; A₂, *Alu*NI; A₃, *Apa*I; A₄, *Asu*II; B₁, *Bam*HI; B₂, *Bgl*I; B₃, *Bgl*II; B₄, *Bpu*1102; B₅, *Bst*I; B₆, *Bst*EII; B₇, *Bsu*36; C, *Cla*I; D₁, *Drd*I; D₂, *Dra*III; E₁, *Eam*1105; E₂, *Ear*I; E₃, *Eco*57; E₄, *Eco*NI; E₅, *Eco*RI; H, *Hind*III; N₁, *Nae*I; N₂, *Nco*I; N₃, *Ngc*MI; N, *Nhe*I; P₁, *Pma*CI; P₂, *Pst*I; S₁, *Sal*I; S₂, *Sfc*I; S₃, *Sgf*I; S₄, *Sgr*A I; S₅, *Sma*I; S₆, *Sph*I; T, *Tth*I; X₁, *Xba*I; X₂, *Xho*I; X₃, *Xma*I

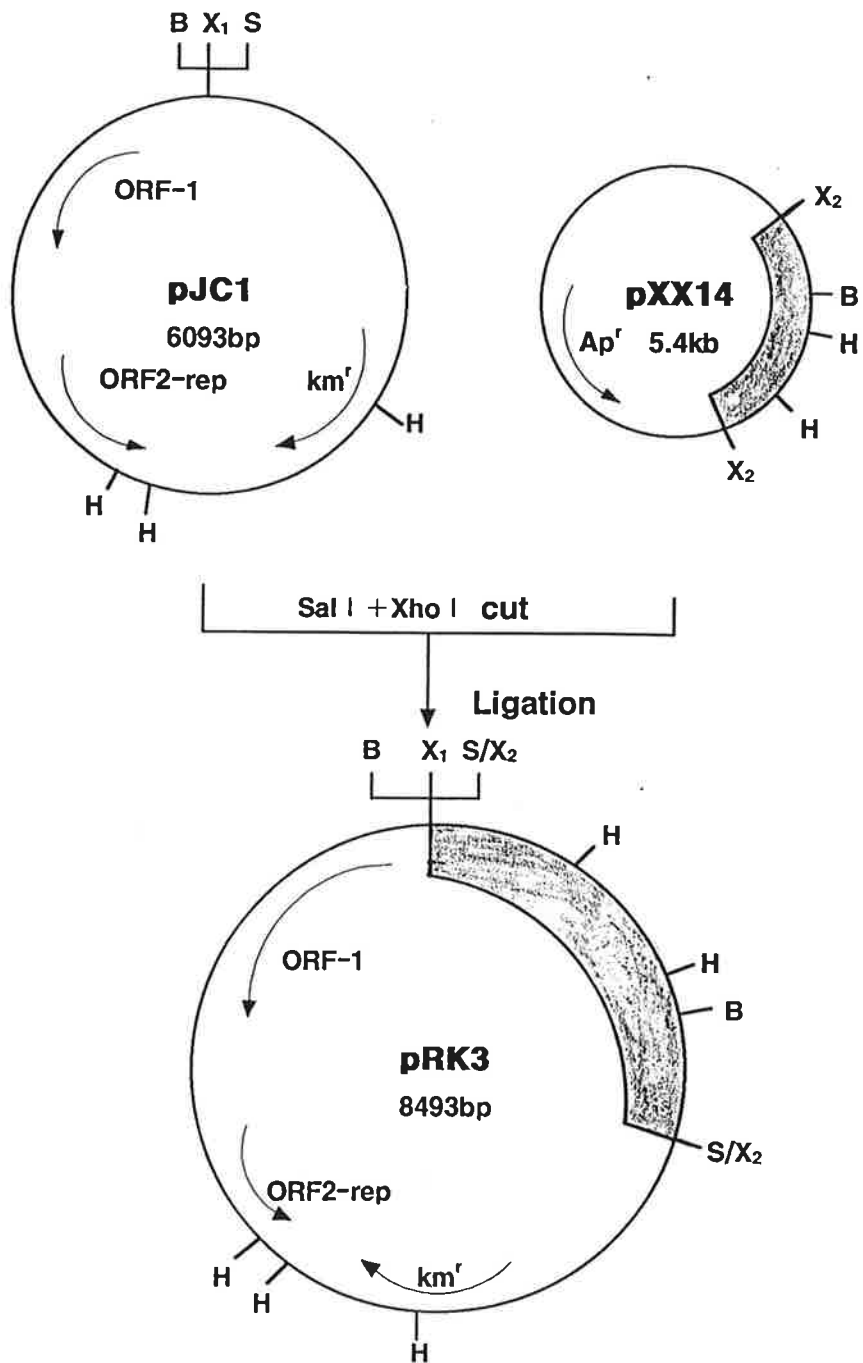


Fig. 18. Construction of recombinant plasmid pRK3.

The pRK3 was constructed by inserting the 2.4kb *Xho*I fragment of pXX14 at the *Sal*I site of pJC1. B, *Bam*HI; H, *Hind*III; S, *Sal*I; X₁, *Xba*I; X₂, *Xho*I



Fig. 19. Identification of constructed pRK3.

The plasmid pRK3 was digested with various restriction endonucleases

- Lane 1. λ DNA digested with *Hind*III
- Lane 2. pJC1 digested with *Sal*I
- Lane 3. pXX14 digested with *Xho*I
- Lane 4. pRK3 DNA
- Lane 5. pRK3 digested with *Bam*HI
- Lane 6. pRK3 digested with *Hind*III
- Lane 7. pRK3 digested with *Xba*I
- Lane 8. λ DNA digested with *Hind*III.

B. lactofermentum KCTC1844와 1846은 Cm(5 μ g/ml)을 함유한 LB배지상에서 각각 발현하였다. Shuttle vector에 의한 *B. lactofermentum*의 형질 전환율은 Table 3에서 보는 바와 같이 pEB2 및 pJC1에 의한 효율이 pEB3에 의한 것보다 우수하였다. 제조된 pEB2 및 pEB3의 *B. lactofermentum*의 replicon은 모두 4.4kb cryptic plasmid pBL1로부터 유래하였지만 형질전환율에서 차이를 보인 것은 pEB3보다 pEB2의 vector 크기가 2kb 이상 작기 때문으로 추정된다. 또한 재조합 plasmid에 의한 *B. lactofermentum*의 형질전환율에서도 shuttle vector에 의한 것 처럼 pRK2보다 pRK1 및 pRK3에 의한 것이 더 우수하였다(Table 3).

Table 3. Transformation efficiencies of *B. lactofermentum* KCTC1844 and 1846 strains with plasmids.

| Plasmids | Transformation frequency of <i>B. lactofermentum</i> (transformants/ μg DNA) | |
|----------|---|--------------------|
| | 1844 | 1846 |
| pEB2 | 8.2×10^3 | 7.5×10^3 |
| pEB3 | 2.0×10^3 | 2.5×10^3 |
| pJC1 | 7.0×10^3 | 7.2×10^3 |
| pRK1 | 12.0×10^3 | 20.0×10^3 |
| pRK2 | 2.7×10^3 | 2.0×10^3 |
| pRK3 | 9.2×10^3 | 15.0×10^3 |

라. *B. lactofermentum*의 meso-DAP-dehydrogenase(DDH) 활성

*B. lactofermentum*에서 *ddh* gene의 증폭에 의한 DDH 활성을 비교분석하기 위하여, AEC 내성균주인 *B. lactofermentum* KCTC1846 및 shuttle vector 혹은 재조합 plasmid를 함유한 *B. lactofermentum* KCTC1846으로부터 DDH 활성을 측정하였다. Table 4에서 보는 것 처럼 대조균주로 사용한 AEC 내성균주와 shuttle vector pEB2, pEB3, 그리고 pJC1을 함유한 균주간의 효소활성은 서로 비슷한 수준을 나타내었으며, 재조합 plasmid pRK1 및 pRK2를 각각 함유한 *B. lactofermentum*의 DDH의 활성은 대조균주보다 7배 정도, pRK3을 함유한 것의 활성은 14배 정도로 더 많이 증가하였다. 이상의 실험결과에서 pRK1 혹은 pRK2보다 pRK3을 함유한 *B. lactofermentum*의 DDH 활성이 더 높게 증가한 것은 *B. lactofermentum*-*E. coli* shuttle vector pEB2 및 pEB3에서 *B. lactofermentum* replicon을 제공한 pBL1의 copy 수보다 *C. glutamicum*-*E. coli* shuttle vector pJC1에서 *C. glutamicum* replicon을 제공한 pHM1519의 copy 수가 4배 이상 많기 때문으로⁴²⁾ 사료된다.

Table 4. DDH activity of *B. lactofermentum* KCTC1846 with plasmids.

| plasmid | recipient | DDH sp. act. ¹⁾ (U/mg) |
|---------|-------------------------------|--------------------------------------|
| None | <i>B. lactofermentum</i> 1846 | 0.15 |
| pEB2 | <i>B. lactofermentum</i> 1846 | 0.14 |
| pEB3 | <i>B. lactofermentum</i> 1846 | 0.11 |
| pJC1 | <i>B. lactofermentum</i> 1846 | 0.16 |
| pRK1 | <i>B. lactofermentum</i> 1846 | 1.09 |
| pRK2 | <i>B. lactofermentum</i> 1846 | 0.78 |
| pRK3 | <i>B. lactofermentum</i> 1846 | 2.10 |

¹⁾The specific activities of DDH(DDH sp. Sact.) were expressed as units per milligram of total protein. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μ mol of NADPH per min.

마. *ddh* gene의 증폭을 통한 *B. lactofermentum*의 L-lysine 생산

*B. lactofermentum*내에서 *ddh* gene의 증폭에 의한 lysine 생성량을 조사하기 위하여, 먼저 삼각 플라스크 발효법으로 *B. lactofermentum* 균주를 최소배지인 CGC에서 96시간 배양하여 균체 성장, glucose 소비량 및 lysine 생성량을 비교 분석하였다. Fig. 20A, 21A 그리고 22A에서 보는 것처럼 재조합 plasmid를 함유한 균주의 성장은 shuttle vector를 함유한 대조균주와 거의 유사하므로 *ddh* gene의 증폭은 *B. lactofermentum*의 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 그러나 lysine 생성량의 비교 분석에서는 Fig. 20B와 21B에서 보는 것처럼 재조합 plasmid pRK1 및 pRK2를 각각 함유한 균주의 경우 48시간 이후부터 대조균주보다 lysine 생성량이 증가하기 시작하여 72시간 때에는 최대치를 나타내었으며 그 이후는 오히려 감소하였다. 최대치를 나타낸 72시간 때의 lysine 생성량은 대조균주가 각각 4.38 g/ℓ 및 4.30 g/ℓ 이었으며 pRK1을 함유한 균주는 각각 5.34 g/ℓ 및 5.07 g/ℓ 으로 대조균주보다 각각 22% 및 18%정도 증가하였다.

또한 재조합 plasmid pRK3을 함유한 균주에서도 pRK1 및 pRK2의 경우처럼 거의 유사한 양상을 나타내었으며 72시간 때의 lysine 생성량은 대조균주가 4.39 g/ℓ 이었으며 pRK3을 함유한 균주는 5.21 g/ℓ 로 거의 19% 정도 증가하였다(Fig. 22B). 앞선 실험결과에서 pRK1 및 pRK2보다 pRK3을 함유한 *B. lactofermentum*의 DDH 활성이 더 높은 수준을 나타내었음에도 불구하고 lysine 생성량에서는 비슷한 증가 수준을 보인 것은 *B. lactofermentum*내에 lysine 생합성을 조절하는 제한인자가 존재할 것으로 사료된다.

2.5ℓ 발효조를 이용한 lysine 발효에서는 Fig. 23A, 24A 그리고 25A에서 보는 것처럼 재조합 plasmid pRK1, pRK2 및 pRK3을 함유한 *B. lactofermentum* KCTC1846의 성장은 대조 균주와는 비슷한 수준을 나타내었으나 삼각 플라스크 발효에 의한 것보다는 2배 정도 증가하였다.

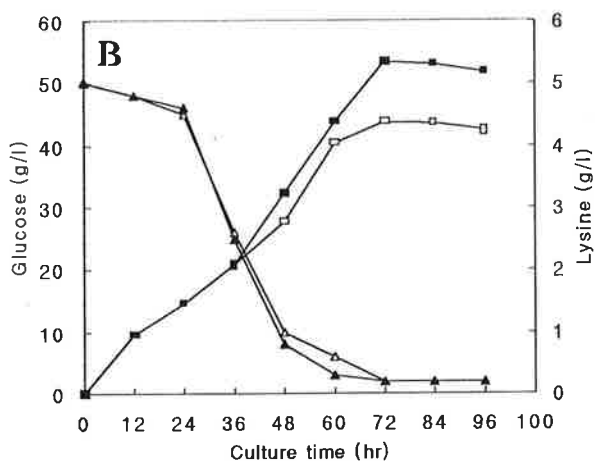
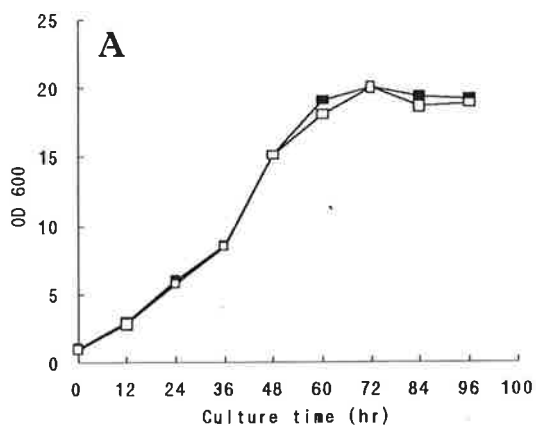


Fig. 20. Comparison of growth, glucose consumption, and lysine production of *B. lactofermentum* strains in shake flask fermentation.

A. Growth of *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pEB2 (□) or pRK1 (■).

B. Decrease of glucose concentration (▲) and increase of lysine concentration (■) in *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pEB2 (open symbol) or pRK1 (filled symbol). OD, optical density

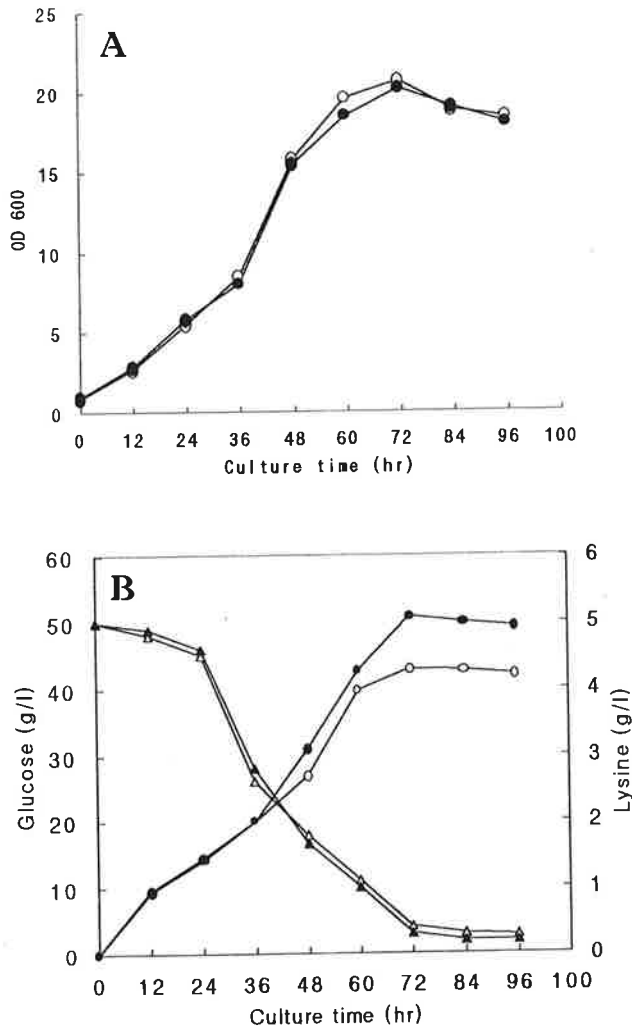


Fig. 21. Comparison of growth, glucose consumption, and lysine production of *B. lactofermentum* strains in shake flask fermentation.

A. Growth of *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pEB3 (○) or pRK2 (●).

B. Decrease of glucose concentration (▲) and increase of lysine concentration (●) in *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pEB3 (open symbol) or pRK2 (filled symbol). OD, optical density

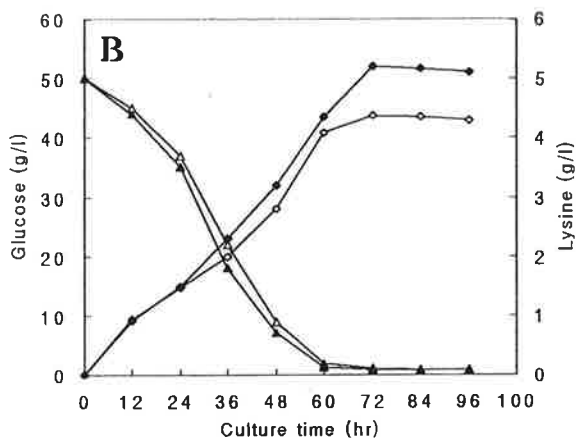
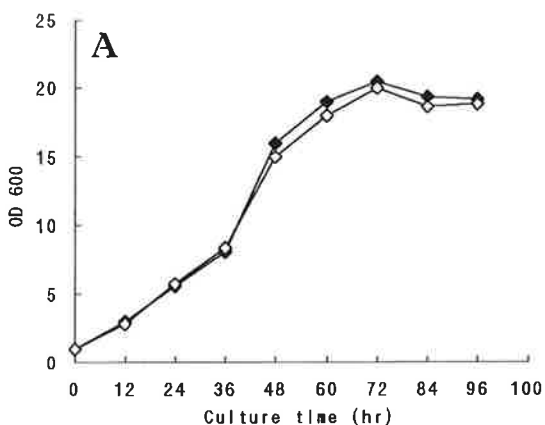


Fig. 22. Comparison of growth, glucose consumption, and lysine production of *B. lactofermentum* strains in shake flask fermentation.

A. Growth of *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pJC1 (◇) or pRK3 (◆).

B. Decrease of glucose concentration (▲) and increase of lysine concentration (◆) in *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pJC1 (open symbol) or pRK3 (filled symbol). OD, optical density

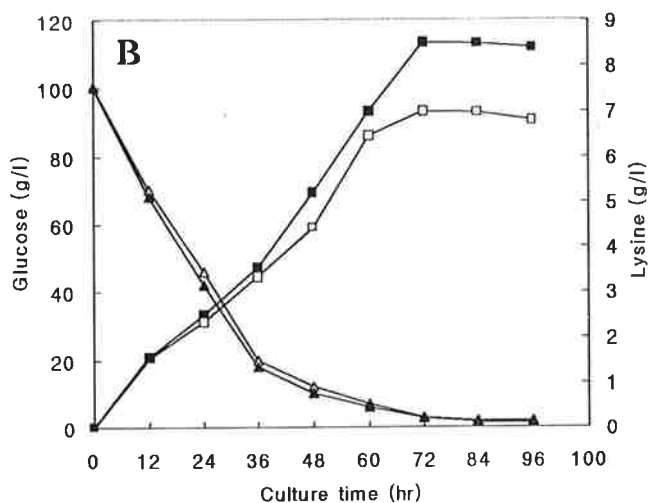
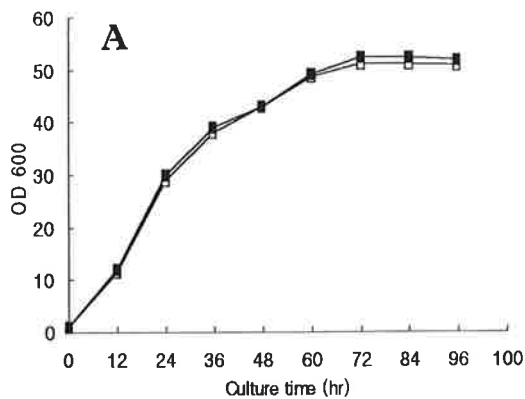


Fig. 23. Comparison of growth, glucose consumption, and lysine production of *B. lactofermentum* strains in 2.5 l jar fermentation.

A. Growth of *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pEB2 (□) or pRK1 (■).

B. Decrease of glucose concentration (▲) and increase of lysine concentration (■) in *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pEB2 (open symbol) or pRK1 (filled symbol). OD, optical density

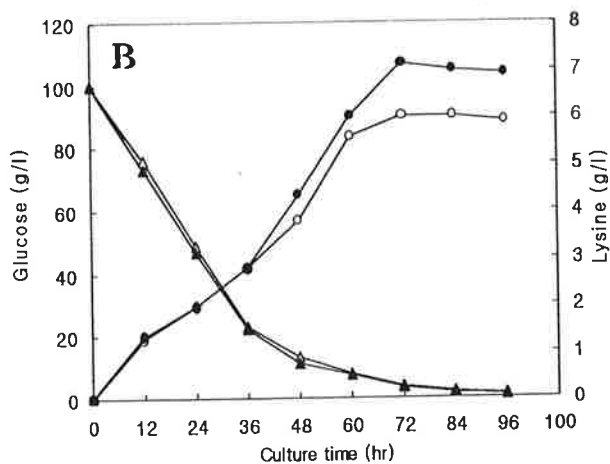
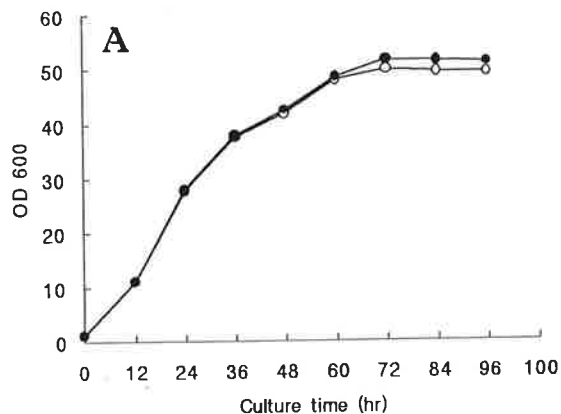


Fig. 24. Comparison of growth, glucose consumption, and lysine production of *B. lactofermentum* strains in 2.5 l jar fermentation.

A. Growth of *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pEB3 (○) or pRK2 (●).

B. Decrease of glucose concentration (▲) and increase of lysine concentration (●) in *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pEB3 (open symbol) or pRK2 (filled symbol). OD, optical density

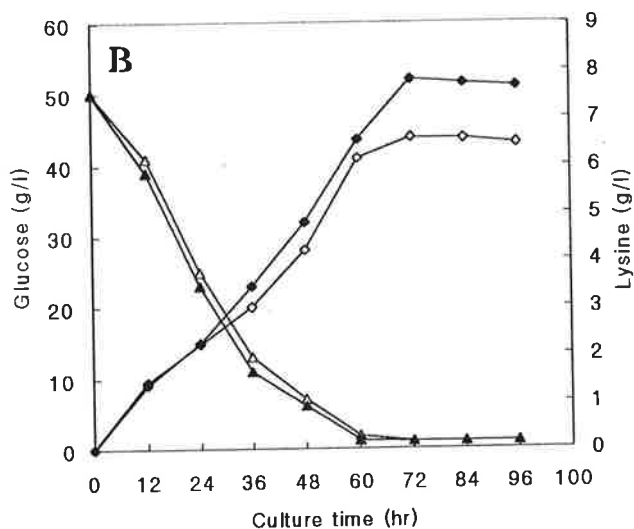
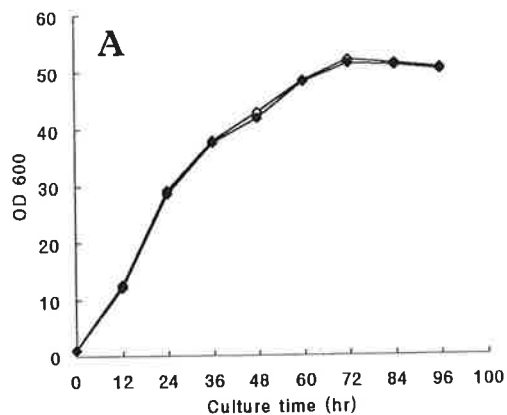


Fig. 25: Comparison of growth, glucose consumption, and lysine production of *B. lactofermentum* strains in 2.5 l jar fermentation.

A. Growth of *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pJC1 (◇) or pRK1 (◆).

B. Decrease of glucose concentration (▲) and increase of lysine concentration (◆) in *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pJC1 (open symbol) or pRK3 (filled symbol). OD, optical density

또한 lysine 생산에 있어서도 삼각 플라스크 발효에서처럼 72시간 때에 최대치를 나타내었으며, 72시간 때의 lysine 생성량은 재조합 plasmid pRK1(pEB2), pRK2(pEB3) 그리고 pRK3(pJC1)를 함유한 경우 각각 8.5g/l (7.0g/l), 7.1g/l (6.0g/l), 및 7.8g/l (6.6g/l)를 나타내어 대조균주보다 18~22% 증가하였다. ()는 대조 균주를 표시하였다. 그러나 2.5ℓ 발효조에서 modification된 CGC배지에 soybean protein hydrates⁴³⁾ 혹은 yeast extract⁴⁴⁾를 첨가하여 발효를 시킨 결과 lysine 생성량은 오히려 감소하였다(data not shown).

이상의 실험결과로 미루어 볼 때 *ddh* gene의 증폭에 의한 *B. lactofermentum* KCTC1846의 lysine 생산량은 대조균주보다 22%까지 증가하였다. 그러므로 본 연구팀은 향후 산업계와 연계하여 현재 lysine 발효산업에 이용되고 있는 균주에 *ddh* gene을 함유한 재조합 plasmid를 도입하는 등 우량 균주 개발에 기여할 수 있으리라 사료된다.

제3절 참고문헌

1. Tosaka, O., Takinami, K., and Hirose, Y. 1978. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, S 745-752.
2. Sano, K., and Shioo, I. 1970. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **16**, 373-391.
3. Karasawa, M., Tosaka, S. I., and Yoshi, H. 1986. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 339-346.
4. 이인선 1987. 영남대학교 대학원 박사학위논문.
5. Kyung, K. C., Lim, B. S., Lee, S. Y., and chun, M. J. 1985. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bieng.*, **13**, 279-283.
6. Mori. M. and Shioo, I. 1987. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 129-138.
7. Mori. M. and Shioo, I. 1987. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2671-2678.
8. Shioo, I., Sugimoto, S. i., and Kawamura, K. 1990. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1513-1519.
9. Ishino, S., Mizukami, T., Yamaguchi, K., katsumata, R., and Araki, K. 1988. *Agirc. Biol. Chem.*, **52**, 2903-2909.
10. O' Regan, M., Thierbach, G., Bachmann, B., Nillevall, D., Lepage. P., Vivet, J. F., and Lemoine, Y. 1989. *Gene*, **77**, 237-251.
11. Yeh, P., Sicard, A. M., and Sinskey, A, J. 1988. *Mol. Gen. Genet.*, **215**, 105-111.
12. Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L., and Sahm, H. 1989. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 684-688.
13. Cremer, J., Eggeling, L., and Sahm, H. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1746-1752.
14. Schrumpf, B., Schwarzer, A., Kalinowski, J., Puhler, A., Eggeling, L. and

- Sahm, H. 1991 *J. Bacteriol.*, **173**, 4510-4516.
15. Sundharadas, G. and C. Gilvarg. 1967. *J. Biol. Chem.*, **242**, 3983-3988.
 16. Berges, D. A., W. E. Dewolf, G. L. Dunn, D. J. Newman, S. J. Schmidt, J. J. Taggart, and C. Gilvarg. 1996. *J. Biol. Chem.*, **261**, 6160-6167.
 17. Kindler, S. H. and C. Gilvarg. 1960. *J. Biol. Chem.*, **235**, 3532-3535.
 18. Sonntag, K., L. Eggeling, A. D. Graaf, and H. Sahm. 1993. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 1325-1331.
 19. White, P. J. 1983. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 739-749.
 20. Yeh, P., A. M. Sicard, and A. J. Sinskey. 1988. *Mol. Gen. Genet.* **215**, 105-111.
 21. Scapin, G., M. Cirilli, S. G. Reddy, Y. Gao, J. C. Vederas, and J. S. Blanchard. 1998. *Biochem.*, **37**, 3278-3285.
 22. Scapin, G., Cirilli, M., S. Reddy, G., Gao, Y., Vederas, J. C. and Blanchard, J. S. 1998. *Biochem.*, **37**, 3278-3285.
 23. Cremer, J., Treptow, C., Eggeling, L. and Sahm, H. 1988. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 3221-3229.
 24. Misono, H., Ogasawara, M. and Nagasaki, S. 1986. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2729-2734.
 25. Roh, J. H., Kim, O. M., Park, D. C., Kim, H. J., Yun, H. K. Kim, S. D. Lee, I. S. and Lee, K. R. 1994. *Mol. Cells*, **4**, 295-299.
 26. Kim, O. M., Kim, H. J., Kim S. D., Park, D. C. and Lee, K. R. *J. 1995. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 250-256.
 27. Santamaria, R. I., Gil, J. A., and Martin J. H. 1985. *J. Bacteriol.*, **162**, 463-467.
 28. Schwarzer, A. and Puhler, A. 1991. *Bio/technology.* **9**, 84-87
 29. Santamaria, R., J. A. Gil J. M. Mesae, and J. F. Martin. 1984. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2237-2246.

30. Barak, I., M. Koptides, M. Jucovic, M. Sisova, and J. Timko. 1990. *Gene*, **95**, 133-135.
31. Cremer, J., Eggeling, L. and Sahm H. 1990. *Mol. Gen. Genet.*, **220**, 478-480.
32. Sambrook, J., Fritsh, E. T. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual* 2nd ed, ColdSpringHarbor Laboratory, ColdSpringHarbor, New York.
33. Cremer, J., Eggeling, L. and Sahm, H. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1746-1752.
34. Miwa, K., Matsui, H., Terabe, M., Nakamori, S., Sano, K., and Momose, H. 1984. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2901-2903.
35. Bonnassie, S., J. F. Burini, J. Oreglia, A. Trautwetter, J. C. Patte, and A. M. Sicard. 1990. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2107-2112.
36. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randoll. 1951. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
37. Southern, E. M. 1975. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.
38. Schafer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A. H., and Puhler, A. 1990. *J. Bacteriol.*, **172**, 1663-1666
39. Pridmore, R. D. 1987. *Gene*. **56**, 309-312.
40. Ozaki, A., Katsumata, R., Oka, T. and Furuya, A. 1984. *Mol. Gene. Genet.*, **196**, 175-178.
41. Fernandez-gonzalez, C., Cadenas, R. F., Noiro-Gros, M. F., Martin, J. F., and Gil, J. A. 1994. *J. Bacteriol.*, **176**, 3154-3161
42. Martin, J. F., Santamaria, H. and Aguilar, A. 1987. *Biotechol.* **5**, 137-146.
43. Shiratsuchi, M., Kuronuma, H., Kawahara, Y., Yoshihara, Y., Miwa,

- H, and Nakamori, S. 1995. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 83-86.
44. Hadj Sassi, A., Deschamps, A. M. and Lebeault, J. M. 1996. *Process Biochem.*, **31**, 493-497.