

Corynebacterium 세균의 이종간 원형질체 융합에 의한 재조합주의 유전학적 분석과 L-glutamate 와 L-glutamine 생성

백선영 · 이해경 · 최순영 · 김종욱¹ · 이세배² · 임번삼² · 민경희*

숙명여자대학교 생물학과, ¹미원식품주식회사 ²주식회사 미원 중앙연구소

Genetic Analysis of Recombinants by Interspecific Protoplast Fusion of Coryneform Bacteria and Their L-glutamate & L-glutamine Production

Sun-Young Baek, Hae-Kyung Lee, Soon-Young Choi, ¹Chong-Wook Kim, ²Sae-Bae Lee, ²Bun-Sam Lim and Kyung-Hee Min*

Department of Biology, College of Sciences, Sookmyung Woomen's University,
¹Miwon Foods Co., and ²Research and Development Center, Miwon Co., LTD

For interspecific protoplast fusion, *Brevibacterium flavum* 10AHR (Rif^r arg his) and *Corynebacterium glutamicum* 11TS (Sm^r trp) were induced by UV and NTG treatment. The protoplast fusion frequency between *B. flavum* 10AHR and *C. glutamicum* 11TS was 3.7×10^{-6} with the lysozyme treatment (300 μ g/ml) for 18 hrs. Genotypes of recombinants were analyzed as FMM (Rif^r Sm^r), FA (Rif^r Sm^r arg), FH (Rif^r Sm^r his), FT (Rif^r Sm^r trp), FAH (Rif^r Sm^r arg trp), FAT (Rif^r Sm^r arg trp), and FAHT (Rif^r Sm^r arg his trp). FAH 1 produced 12 fold of glutamate production compared to parental type, *B. flavum* 10AHR. In glutamine productivity, it produced 2.6 fold to parental type, *C. glutamicum* 11TS. Production of glutamate or glutamine by recombinants was involved in the specific activities of glutamate dehydrogenase (GDH) and glutamine synthetase (GS), respectively.

미생물의 균주개량을 위해서 돌연변이주를 유발하여 대사물질의 생합성경로나 그 조절기구에 관한 연구가 여러 연구자에 의하여 보고된 바 있다(1-3). 그 예로서 영양요구성 변이주, 감수성 변이주(1), 분해활성 결손주(2, 3) 및 유사물질, 내성 변이주(4, 5) 등의 생화학적 변이주들을 들 수 있다.

그러나 이 방법에 의해 우량변이주를 취득하기까지는 많은 시간과 노력이 필요하므로 유전자 재조합 방법을 이용한 접합이나 형질전환, 형질도입 등이 많이 이용되고 있으며 최근에는 한걸음 더 나아가 부분적인 교환방법보다 원형질체 융합기법이 더욱 효율적이고 간편한 것으로 보고되어 있다(6-8). 그 이유로는 조작이 비교적 간단하고 재조합체의 출현빈도가 높다는 장점이 있기 때문이다.

1979년 Kaneko 등이 *Brevibacterium flavum* 을 사용하여 원형질체 융합을 시도하여 성공한 이래(9), 1981년 Tosaka 와 Takinami 는 세포융합에 의하여 lysine 생산성을 높였다는 보고가 있다(10). 또한 1985년 국내에서도 세포융합에 의한 lysine 생산균주의 개발이 연구된 바 있다(11).

본 실험에서는 glutamate 생성균인 *Brevibacterium flavum* 과 glutamine 생성균인 *Corynebacterium glutamicum* 을 이용한 이종간 원형질체 융합을 통하여 glutamate 와 glutamine 의 생산성이 증가된 균주를 개발하고, 재조합주의 유전적 분석을 시도하였다.

재료 및 방법

실험재료

사용균주 : 본 실험에서 사용한 균주는 Table 1 과 같다. 이들 균주들은 (주)미원 기술연구소에서 제공받아

Key words: *Corynebacterium*, protoplast fusion genetic analysis of recombinants glutamate and glutamine production
*Corresponding author

Table 1. Bacterial strains used in these experiment.

Bacterial strain	Genotype	Source
<i>Brevibacterium flavum</i> 10		<i>B. flavum</i> ATCC 14067
<i>Corynebacterium glutamicum</i> 11		<i>C. glutamicum</i> ATCC 13058
<i>B. flavum</i> 10AHR	Rif ^r arg his	<i>B. flavum</i> 10
<i>C. glutamicum</i> 11TS	Sm ^r trp	<i>C. glutamicum</i> 11

사용하였다.

배지 및 완충용액 : 본 연구에서 기본적으로 사용한 배지는 complete medium(CM), minimal medium(MM), minimal medium yeast extract(MMYE), 원형질 융합과 그 재생을 위한 배지 및 완충용액으로는 lysis fluid(LF), dilution fluid(DF), fusion fluid(FF), Tris-Malic acid(TM) buffer, regeneration compete medium(RCM)을 Kaneko 등(1979)과 Lim(1985)의 방법에 따라 사용하였다. Glutamate와 glutamine 생산을 위한 발효배지는 glucose 140g, (NH₄)₂SO₄ 30g, GLC 15 ml, urea 2mg, mineral solution, KH₂PO₄ 1.4g, K₂HPO₄ 1.4g, MgSO₄ 0.5g, thiamine-HCl 2mg, biotin 5g, CaCO₃ 30g을 증류수 1l에 녹인 것을 사용하였다.

시약 : Panicillin G(1580 unit/ml)과 lysozyme(50,000 unit/ml)은 Sigma Co.(U.S.A)의 특급을 사용하였으며 polyethylene glycol(PEG; MW 6,000)은 J.T. Baker Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다.

실험방법

가. 원형질체 형성, 재생 및 융합

원형질체의 형성, 재생, 융합실험은 Lim(1985)의 방법에 따라 실시하였다.

나. L-Glutamate와 L-glutamine 생성량의 측정

융합주들을 MMYE에 접종하여 15~18시간 배양한 후 20ml의 발효배지에 희석하여 30°C에서 72시간 진탕배양(180 rpm, 500 ml Erlenmyer Flask)하고 10,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 상등액을 모은 후 high-performance liquid chromatography(HPLC) column(Nova-Pak C₁₈)에서 glutamate와 glutamine의 생성량을 산출하였다. 이 때 HPLC 분석조건은 다음과 같다.

Detector : Waters 420 Fluorescence detector,

· Flow rate ; 2.0 ml/min, Gradient ; 10~65% absolute methanol in 15 min Linear, Eluent ; 50 mM NaOAc (pH 5.7) and absolute methanol

다. Glucose의 농도는 DNS법에 의하여 측정하였다(12).

라. 효소 활성 측정

조효소용액 : 시험균의 종균배양액을 20ml의 발효배지에 1% 접종하여 30°C에서 72시간 진탕배양(180 rpm, 500 ml Erlenmyer Flask)한 후 3,000 rpm으로 침전시킨 후 MgSO₄·7H₂O와 NaCl이 첨가된 phosphate buffer에 현탁한 다음, sonicator(Fisher Co.)로 20분간 처리하였다. 이것을 다시 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 효소용액으로 사용하였다.

Glutamate dehydrogenase(GDH) 활성 측정 : GDH는 NADPH를 이용하여 합성반응 기작을 수행하므로(13) NADP의 oxidation rate를 측정하여 그 활성도를 측정하였다.

Glutamine synthetase(GS) : GS 활성 측정법은 원리에 따라 3종류(14)가 있으나 정확한 활성도를 구할 수 있는 γ -glutamylhydroxamate 생성량 측정법을 사용하였다(15).

이 효소의 1 unit는 분당 1 μ mole의 γ -glutamylhydroxamate가 형성되는데 필요한 효소량으로 하였다.

Glutamate synthase(GOGAT) : GOGAT은 여러 종류의 transaminase와 coupled reaction으로 반응을 수행하는 것으로 알려져 있다(16, 17).

마. 단백질 정량은 Folin Lowry method(18)를 이용하였다.

결과 및 고찰

영양요구성 변이주 및 항생물질 내성 변이주 선별

자외선 조사와 NTG 처리에 의해 얻어진 여러 영양요구성 변이주 중에서 glutamate와 glutamine의 생산성 향상에 직접 영향을 미칠 것으로 예상되는 arginine, histidine, tryptophan 요구성 변이주만을 선별하여 본 실험에 사용하였다.

자외선 조사시 처리시간을 7분 40초로 하였을 때 영양요구주 분리에 가장 좋은 조건인 0.1%의 생존율(19)를 나타내었으며, NTG 처리시에는 200 μ g/ml의 농도로 30분 처리하였을 때 가장 효과적인 변이율을 보이는 50%의 생존율(20)을 나타내었다.

또한 항생물질 내성 변이주는 Sm^r와 Rif^r 변이주의 경

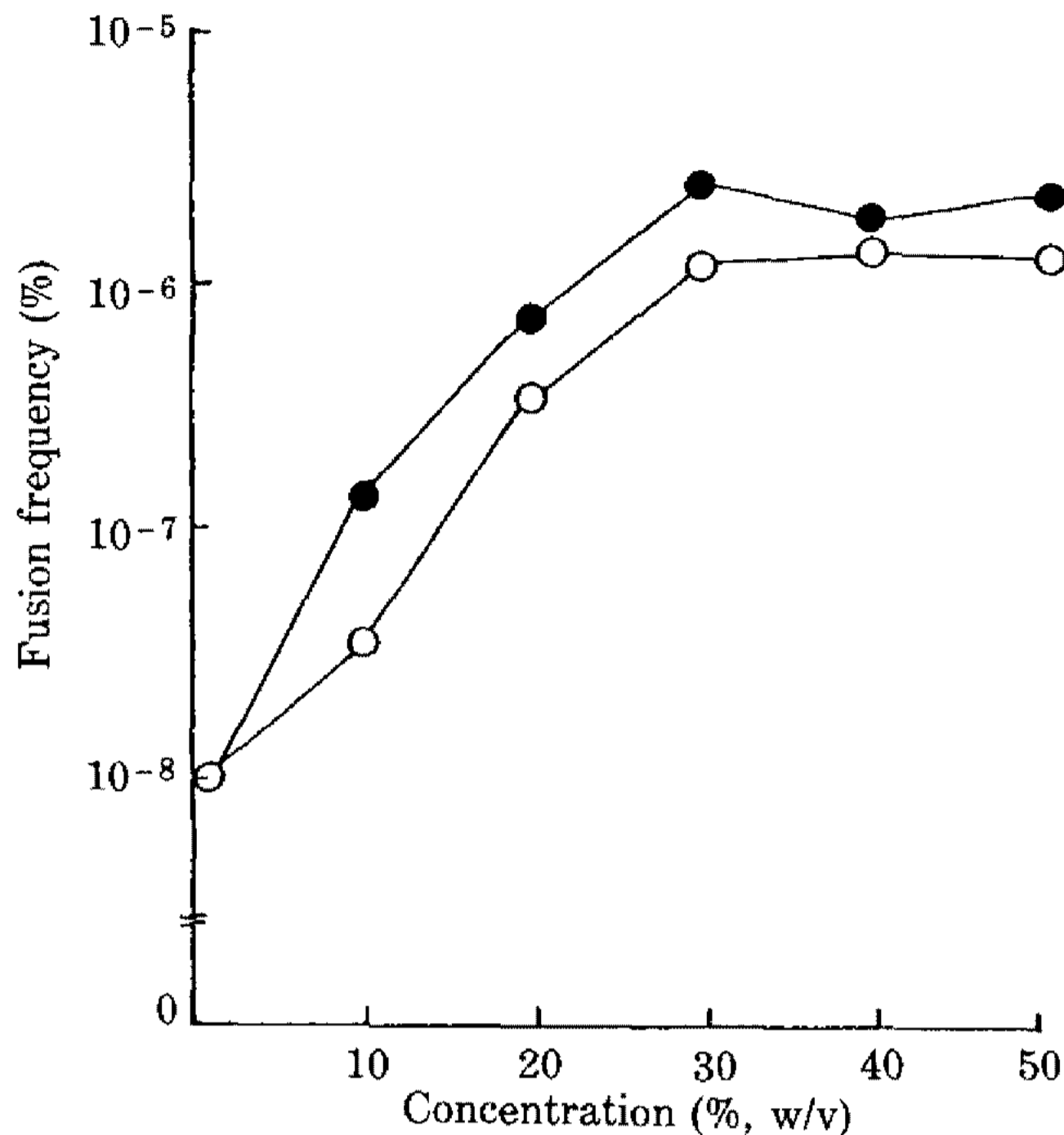


Fig. 1. Effect of PEG concentration of protoplast fusion.

PEG 6,000 (●-●), PEG 1,000 (○-○)

우 각각 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 streptomycin과 rifampicin 농도에 저항성을 나타내는 변이주로 *C. glutamicum* 11에서 11TS(trp), *B. flavum* 10에서 10 AHR(Sm^r arg his)를 만들어 융합실험에서 모균으로 사용하였다(Table 1).

원형질체의 융합

융합모균들을 lysozyme 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 18시간 처리하여 99.9%의 원형질체가 형성되었으며, 이 때의 세포벽 재생은 25%의 재생률을 보여주었다. 이 조건하에서 융합촉진제인 PEG 6,000, 30% (w/v)를 처리하여 *B. flavum* 10 AHR과 *C. glutamicum* 11TS의 이종간 원형질체 융합을 시도하였다. 융합빈도는 최고 3.7×10^{-6} 을 나타내었으며, 재생된 원형질체의 수에 대한 RCM 선별배지에 나타나는 colony 수로 계산하였다. 이것은 Kaneko 등(1979)이 발표한 5.0×10^{-6} 보다 다소 낮은 값이었다. Fig.1는 PEG 1,000과 PEG 6,000의 농도에 따른 융합효과를 본 것으로서 분자량은 PEG 6,000이 더욱 효과적이었으며, 농도별로는 PEG 6,000의 경우 30%에서, PEG 1,000의 경우는 40%가 가장 높은 융합빈도를 나타내었다.

융합주의 유전형질의 확인

원형질체 융합을 통하여 얻은 융합주들은 RCM 선별

Table 4. Genotypes of fusant groups obtained by protoplast fusion between *B. flavum* 10AHR *C. glutamicum* 11TS.

Group	Strain	Genotype				
I	FMM	Rif ^r	Sm ^r			
II	FA	Rif ^r	Sm ^r	arg		
III	FH	Rif ^r	Sm ^r	his		
IV	FT	Rif ^r	Sm ^r	trp		
V	FAH	Rif ^r	Sm ^r	arg	his	
VI	FAT	Rif ^r	Sm ^r	arg	trp	
VII	FAHT	Rif ^r	Sm ^r	arg	his	trp

배지에 5회 이상 계대배양하여 안정성을 검토하였고, MM 배지에 모균주들의 요구 아미노산을 첨가한 배지에 융합주들을 옮겨줌으로써 유전형질을 확인하였다.

그 결과를 Table 4에서 볼 수 있는 바와 같이 Group V에 속하는 융합주가 대다수를 차지하였는데, 그들의 아미노산 요구성이 arginine과 histidine인 것으로 나타났다.

L-Glutamate와 L-glutamine 생성량

실험을 통하여 얻은 융합주들을 발효시켜 glutamate와 glutamine의 생산성을 알아본 결과(Table 5) Group V에 해당하는 융합주들은 대부분 모균주에 비해 glutamate와 glutamine의 생산성이 월등히 증가한 경향을 나타내었다. 특히 glutamate 생산성이 월등히 증가를 나타내었는데, FAH1의 경우 모균주인 *B. flavum* 10AHR에 비해 12배 증가하였고 FAH2, FAH3, FAH4의 경우에 있어서도 모균주에 비해 7~10배 가량 생산량이 증가하였다.

또한 이러한 균주들은 glutamine 생산성에 있어서도 모균주인 *C. glutamicum* 11TS에 비해 1.2~3.7배까지 증가하였다. 이러한 경향은 Group V에 해당하는 융합주들이 arg, his 영양요구주이므로 glutamate 합성이나 glutamine 합성으로 갈라지는 metabolic branch를 유전적으로 절단하여 주기 때문에 결과적으로 glutamate나 glutamine이 배양액 중에 많이 축적되는 것으로 사료된다.

Fig.2는 glutamate의 생산성이 타 융합주에 비해 월등히 증가된 FAH1에 대해 시간경과에 따른 glutamate와 glutamine의 생성을 살펴본 것으로서, 기본배지에서 72시간 배양하는 동안 발효시간 경과에 따라 glucose가 소비되는 동시에 glutamate와 glutamine의 생성량은

Table 5. Production of L-glutamate and L-glutamine by recombinants and parent strains.

Group	Strain	*Growth (A ₆₁₀ × 10)	Production (g/l)	
			L-glutamate	L-glutamine
Parental strain	<i>B. flavum</i> 10AHR	2.46	2.7	0.2
	<i>C. glutamicum</i> 11TS	2.40	0.5	1.2
Recombinants	FMM 1	0.64	0.9	0.6
	2	0.66	1.2	0.3
	FA 1	0.76	0.9	0.6
	2	0.65	0.6	0.3
	FH 1	0.85	1.0	0.7
	FT 1	0.72	0.7	1.8
	FAH 1	1.21	31.2	3.1
	2	1.99	18.9	3.3
	3	0.93	25.5	0.3
	4	0.88	21.6	4.0
	FAT 1	0.80	1.0	0.6
	FAHT 1	0.10	1.2	trace

*Growth was determined as follows; Culture broth treated with 18% HCl to remove CaCO₃ was diluted 10 fold with water and was measured optical density at 610 nm and production of L-glutamate and L-glutamine.

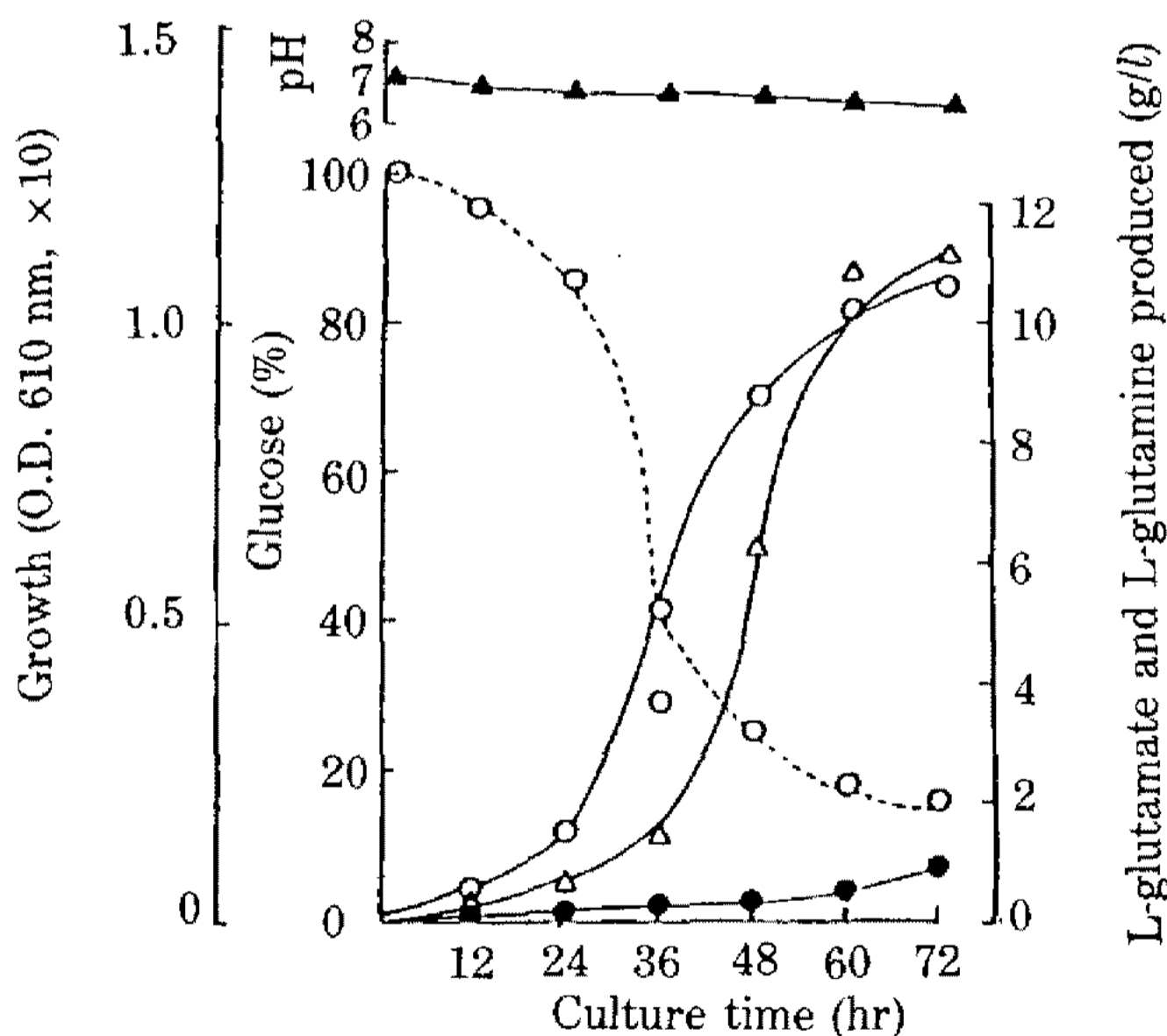


Fig. 2. Time course of L-glutamate and L-glutamine production of fusant FAH 1.

The fermentation were carried out at 30°C, 180 rpm shaking incubator.

L-glutamate (○—○), L-glutamine (●—●), Glucose (○—○), Growth (△—△), pH (▲—▲)

점차 증가하여 결국 14%의 glucose로부터 31.2g/l의 glutamate와 3.1g/l의 glutamine이 생성되었음을 보여주고 있다.

Table 6. Specific activities of glutamate dehydrogenase (GDH), glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT) from fusants and their parents.

Strain	Specific activity (U/mg protein, × 10 ⁻²)		
	GDH	GS	GOGAT
FAH 1	5.32	2.19	0.65
FAH 4	2.53	3.38	0.99
<i>B. flavum</i> 10 AHR	1.56	1.10	0.34
<i>C. glutamicum</i> 11 TS	0.51	1.81	0.12

효소생성 비교

융합주들의 glutamate와 glutamine의 생성에 관련된 rate-limiting enzyme인 glutamate dehydrogenase (GDH), glutamine synthetase (GS), glutamate synthase (GOGAT)의 활성도를 측정하였다 (Table 6).

Glutamine의 생성이 가장 높았던 FAH4의 경우 glutamate로부터 glutamine 생성에 관여하는 효소인 glutamine synthetase의 활성도가 가장 높은 값을 나타내었으며, 비교적 glutamine 생성이 높게 나타났던 FAH1도 그 활성도가 높게 나타났다. 따라서 glutamine 생성과 GS 사이에는 밀접한 관계가 있음을 알 수 있

었다.

또한 glutamate 생성이 가장 높았던 FAH1이 타 균주에 비해 GDH의 높은 활성도를 나타내었으므로 glutamate 생성과 GDH 효소의 활성도 사이에는 비례적인 경향을 나타내었음을 관찰할 수 있었다.

요 약

자외선 조사와 NTG를 처리하여 *Brevibacterium flavum* 10AHR(arg his Rif^r)과 *Corynebacterium glutamicum* 11TS(trp Sm^r)의 돌연변이주를 분리하였다. *B. flavum* 10AHR과 *C. glutamicum* 11TS를 300 µg/ml의 lysozyme으로 18시간 처리하여 원형질체를 형성하고, 융합시 30%의 PEG 6,000으로 처리하였을 때 가장 높은 3.7×10⁻⁶의 융합빈도를 나타내었다. 재조합주의 유전적 분석결과 재조합주들은 FMM(Rif^r Sm^r), FA(Rif^r Sm^r arg), FH(Rif^r Sm^r his), FT(Rif^r Sm^r trp), FAH(Rif^r Sm^r arg his), FAT(Rif^r Sm^r arg trp), FAHT(Rif^r Sm^r arg his trp)으로 분류되었다. FAH에 속하는 균주들은 대부분 모균주에 비해 glutamate와 glutamine의 생산성이 월등히 증가하였으며, FAH1의 경우 glutamate 생성에 있어 모균주인 *B. flavum* 10AHR에 비해 12배, glutamine은 모균주인 *C. glutamicum* 11TS에 비해 2.6배 정도 생성이 현저히 증가하였다. 재조합주들의 효소활성을 측정해본 결과 glutamate와 glutamine의 생성량은 GDH와 GS의 활성도와 각각 관련이 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Sano, K. and Z. Shilo: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 97 (1971).
2. Ozaki, H. and Z. Shilo: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1567 (1983).
3. Shilo, Z., H. Ozaki and K.W. Takeda: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 101 (1982).
4. Takenouchi, E., T. Yamamoto, D.K. Nikelova, H. Janaka and K. Soda: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 727 (1979).
5. Hirose, Y., K. Sano and M. Shibai: Academic. Press Inc., 155 (1978).
6. Baltz, R.H.: *J. Gene. Microbiol.*, **107**, 93 (1978).
7. Fodor, K. and L. Alford: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 2147 (1976).
8. Hopwood, D.A. and H.M. Wright: *Mol. Gen. Genetics.*, **162**, 307 (1978).
9. Kaneko, H. and K. Sakaguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1007 (1979).
10. 戶坂修, 瀧波弘一; 리ゾン 醱酵, 醱酵と工業, **40**(2) (1982).
11. Lim, B.S.: Thesis of Ph. D., Korea University (1985).
12. Miller, G.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959).
13. Park, B. and S. Austral: *J. Biochem.*, **115**, 760 (1969).
14. Stadtman, E.R. and A. Ginsberg: *The enzyme 3rd.* 755 (1974).
15. *Method in enzymology.* **17A**, 900 (1970).
16. Tyler, B.: *Ann. Rev. Biochem.*, **479**, 1127 (1978).
17. Yelton, M.M. and D.C. Yoch: *J. Gen. Microbiol.*, **123**, 335 (1981).
18. Low, D.H., N.J. Roserbrought, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
19. Palleroni, N.J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1865 (1983).
20. Adelberg, E.A., M. Mandel and G.C.C. Chen: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **18**, 788 (1965).
21. 신명교, 이세영, 임변삼, 전문진: *Kor. J. Microbiol.* **22**, 175(1984).
22. 배영석, 서정훈: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**, 365(1986).
23. 배영석, 서정훈: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**, 230(1986).

(Received April 23, 1990)