

溫度調節型 發現 Vector를 함유한 Phenylalanine 生産菌의 分子育種

정동호^{1*}·심상국²·이영춘¹·정호권³

¹중앙대학교 산업대학 식품가공학과, ²동남보건전문대학 식품가공과,

³건국대학교 공과대학 미생물공학과

초록 : Phenylalanine 생산시 tyrosine이 부생되지 않도록 *tyrA* 유전자 발현이 낮은 여러가지 온도조절형 plasmid를 제작하였으며, phenylalanine 생산균주인 대장균 AT2471[*tyrA*⁻, *thi*⁻]은 tyrosine 영양요구 변이균주이므로 생산배지에 tyrosine 첨가없이 phenylalanine을 생산할 수 있도록 하기 위하여 tyrosine 복귀변이균주를 분리하여 phenylalanine 생산을 검토하였다. 2.5l jar fermenter를 사용하여 tyrosine 첨가없이 phenylalanine 생산을 검토하여 대장균 AT2471/pSY146A, 대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주 5/pSY111-14를 39°C에서 55시간 배양한 결과 각각 12 g/l, 15 g/l를 생산하였다(1994년 10월 13일 접수, 1995년 1월 25일 수리).

서 론

Phenylalanine은 필수 아미노산의 하나로서 의료용 수액, 영양 강화제, 사료 첨가제로서 이용 되고 있다. 또 phenylalanine은 peptide성 감미료인 aspartame의 구성 아미노산이기 때문에 공업적인 관점에서 그 수요가 점점 증가되고 있다. 특히 aspartame은 설탕보다 약 200 배나 달고 설탕 대체 감미료로서는 물론 당뇨병 환자의 감미료로서의 그 이용이 기대된다.¹⁾ 이처럼 여러가지 면에서 phenylalanine 대량생산은 시급히 요구되고 있다.

Phenylalanine 생산을 위하여 직접 발효법의 향상을 위한 생산 균주의 육종에는 *Brevibacterium*속, *Corynebacterium*속 등의 glutamic acid 생산균^{2,6)}과 *Escherichia coli*^{7,8)} 등이 사용되고 있다. 지금까지는 phenylalanine 생산을 증가하기 위하여 생합성 경로의 genetic manipulation(즉, mutation과 transduction)을 시도하였지만, 최근에는 세포내 조절기구(intracellular regulatory mechanism)의 해명과 gene cloning 기술의 발전으로 발효법으로 phenylalanine을 양산할 수 있게 되었다.⁹⁻¹⁰⁾

Tryptophan, phenylalanine 및 tyrosine 등의 방향족 아미노산은 대장균의 세포내에서 엄밀한 제어에 의하여 생합성 된다. Phenylalanine 생합성 경로의 조절단계는 두개의 효소반응에 의한다고 생각된다. 그 하나는 *pheA* 유전자로 code 되는 chorismate mutase P-prephenate dehydratase [CMP dehydratase (EC 5,4,99,5/4,2,1,51)]가 촉매하는 반응이고, 다른 하나는 *aroG* 유전자로 code되는 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase [DAHP synthase(EC 4,1,2,15)]가 촉매하는 반응이다.¹¹⁾ 이들 두 효소의 유전자 발현은 phenylalanine에 의하여 억제 받으며¹²⁻¹⁴⁾ 그리고 *pheA* 유전자의 발현은 at-

uation에 의한 제어도 받고 있다고 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾

야생형 대장균은 DAHP synthase isoenzyme 즉, phenylalanine repressible DAHP synthase(*aroG* 유전자로 code), tyrosine repressible DAHP synthase(*aroF* 유전자로 code), tryptophan repressible DAHP synthase(*aroH* 유전자로 code)의 세 종류로 구성되어 있다.¹⁸⁾ 따라서 균체 내에서 phenylalanine을 생산하기 위해서 *aroG* 유전자 대신에 *aroF* 유전자로 대응할 수 있다는 것은 충분히 예상된다.

Sugimoto¹⁹⁾ 등은 유전자 발현을 제어하기 위하여 lambda phage의 온도감수성 repressor 유전자 *cI₈₅₇*과 P_{R-P_L} promoter 하류에 β-galactosidase 생산 구조유전자 *lacZ'*가 삽입된 plasmid pSY10으로 형질전환시킨 대장균을 사용한 model 실험에서 P_{R-P_L} promoter에 의하여 *lacZ'* 유전자의 전사, 번역이 배양온도의 변화에 따라 조절가능하다는 것을 밝혔다.

Shim²⁰⁾은 phenylalanine 생산을 향상하고자 lambda phage의 온도감수성 repressor 유전자 *cI₈₅₇*와 P_{R-P_L} promoter 그리고 feedback이 해제된 phenylalanine 생성의 조절유전자 *pheA^{FR}*과 *aroF^{FR}*를 cloning하여 여러가지 온도조절형 plasmid를 제작하였다. 그러나 pSY110-14를 형질전환시킨 대장균 AT2471은 많은 양의 phenylalanine을 생산하였지만 plasmid pSY110-14EP_{R-P_L} *pheA^{FR}* *tyrA* *aroF^{FR}*중에 있는 *tyrA* 유전자에 의하여 phenylalanine 생산시 tyrosine도 소량 같이 생산되므로 공업화에 문제시 된다.

따라서 phenylalanine 생산시 tyrosine이 부생되지 않을 정도로 *tyrA* 유전자를 발현시킬 수 있는 plasmid를 제작할 수 있다면 많은 양의 phenylalanine을 생산하면서도 tyrosine이 생산되지 않는 균주가 개량 육종될 것

찾는말 : molecular breeding, phenylalanine production, temperature-controllable vector, *E. coli*

*연락처

으로 기대된다. 한편 phenylalanine 생산균주인 대장균 AT2471은 tyrosine 영양요구 변이균주로서 생산배지에 tyrosine을 첨가하여야만 한다. 따라서 생산배지에 tyrosine 첨가없이 phenylalanine을 생산하기 위하여 tyrosine 복귀변이균주를 분리하여 *tyrA* 유전자를 함유하지 않은 plasmid pSY130-14, pSY111-14를 형질전환시키면 tyrosine은 생산하지 않고 phenylalanine만을 생산하는 균주가 개량 육종될 것으로 기대되어 실험한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmid

본 실험에 사용한 대장균의 균주와 plasmid는 Table 1과 같다.

배지 및 배양

완전배지는 L-broth(1% bactotryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)를 사용하였다. 최소배지는 M9 최소배지(0.2% glucose, 1.4% Na₂HPO₄·12H₂O, 0.3% KH₂PO₄, 0.5% NaCl, 0.1% NH₄Cl, 0.0015% CaCl₂·2H₂O, 0.01% MgSO₄·7H₂O)를 사용하였으며 필요에 따라 요구 아미노산(20 mg/l)과 thiamine(20 mg/l)을 첨가하였다. 약제내성은 kanamycin(25 mg/l), tetracycline(12.5 mg/l)를 첨가하여 선택하였다.

Phenylalanine 생산배지는 2% glucose, 1% sodium citrate, 0.04% sodium glutamate, 0.02% Na₂HPO₄·12H₂O, 0.6% KH₂PO₄, 1% NaCl, 0.2% NH₄Cl, 0.003% CaCl₂·2H₂O, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 1 mg/l trace element solution [MnSO₄·4H₂O 8 μl/l, CuSO₄·5H₂O 10.7 μl/l, (NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O 6.7 μl/l, Co(NO₃)₂·6H₂O 6.7 mg/l, FeSO₄·7H₂O 10.7 μl/l, ZnCl₂·7H₂O 0.8 mg/l]와 0.0002% thiamine으로 조성된 배지를 사용하였다.

배양은 phenylalanine 생산배지 50 ml가 든 500 ml들이 Sakaguchi flask에 접종하여 120 strokes/min의 속도로 진탕배양 하였다. 2.5 l jar fermenter(Marubishi Co., Ltd., Japan)에 생산배지 1.5 l를 넣고 교반속도 700 rpm, 통기

량 1.5 vvm으로 배양하였다.

형질전환

형질전환은 Morrison의 방법²¹⁾에 따라 대장균의 competent cell을 제조하였으며, competent cell과 DNA를 혼합하여 0°C에서 30분간 방치한 후 42°C water bath에서 2분간 heat shock하고 LB배지 1 ml를 가하여 37°C에서 90분간 형질발현시킨 후 항생물질이 첨가된 LB 평판배지에 도말하여 배양하였다.

Plasmid의 분리 및 정제

Plasmid의 대량분리는 Chwell과 Helinski의 방법²²⁾에 따라 CsCl-EtBr 평형밀도구배 초원심분리로 행하였고, plasmid의 소량분리는 Birnboim 등의 방법²³⁾에 따라 행하였다.

DNA의 절단 및 연결

제한효소 반응은 plasmid DNA 용액, TA 완충액[33 mM Tris-HCl(pH 7.9)-66 mM potassium acetate-10 mM magnesium acetate-0.5 mM dithiothreitol-calf albumin 0.1 %], 제한효소 그리고 살균증류수를 가하여 합친 것이 10 μl 되게 하여 37°C에서 1시간 행하였다. T₄ DNA polymerase의 반응은 O'Farrell의 방법²⁴⁾에 따라 37°C에서 30분간 반응시켰다. T₄ DNA ligase의 반응은 Maniatis 등의 방법²⁵⁾에 따라 16°C에서 16시간 반응시켰다.

Agarose gel 전기영동

Tanaka 등의 방법²⁶⁾에 따라 0.8% agarose slab gel을 사용하여 전기영동용 TAE 완충액 e40 mM Tris-acetate-2 mM EDTA(pH 7.8)]으로 전기영동하였다. Agarose gel에서 DNA 단편의 회수는 Weislander 등의 방법²⁷⁾에 따라 gel을 넣은 투석 튜브를 전기영동조에 담그어 100 V에서 2시간 영동하여 gel 중의 DNA 단편을 용출시킨 후 ethanol 침전을 하였다.

복귀변이균주의 분리

완전배지에 도말하여 배양 후 생성된 colony를 tyrosine을 첨가하지 않은 최소배지에 각각 replica하여 37°C에서 2~3일 배양하여 생성된 colony를 자연변이에 의한 tyrosine revertant로 분리하였다.

조(粗)효소액의 조제 원심분리한 대장균 균체를 25 mM potassium phosphate(pH 7.4)에 현탁시키고 20 KC로 2분간 초음파(Ultrasonic disruptor, Tomy Seiko, Ltd., Japan) 처리하여 균체 파쇄체를 침전시켜 상정액을 100배 희석한 완충액으로 4°C에서 투석하여 조효소액으로 하였다.

Chorismate mutase P-prephenate dehydrogenase활성의 측정

Cotton과 Gibson의 방법²⁸⁾에 따라 0.01 M potassium

Table 1. Principal microorganisms and plasmids

Organisms or plasmids	Genotype or characteristic of both
<i>Escherichia coli</i>	
MC1065	Δ <i>lac</i> , <i>leu</i> , B6, <i>trpC9830</i> , <i>stra</i> , <i>hsdR</i>
KA197	<i>thi-1</i> , <i>pheA97</i> , <i>relA1</i> , <i>spoT1</i>
AT2471	<i>tyrA4</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>spoT1</i>
AB3257	<i>thi-1</i> , <i>ilvC7</i> , <i>argE3</i> , <i>his-4</i> , <i>proA2</i> <i>aroH367</i> , <i>aroG365</i> , <i>aroF363</i> , <i>xyl-5</i> , <i>galK2</i> <i>lacY1</i> , <i>Mtl-1</i> , <i>rps712</i> , <i>tfr-3</i> , <i>tsx-358</i>
Plasmids	
pSY 50	<i>pheA</i> , <i>tyrA</i> , <i>aroF</i> , <i>Ap</i> ,
pSY110-14	<i>cl₈₅₇</i> , P _R -P _L , <i>pheA^{FR}</i> , <i>tyrA</i> <i>aroF^{FR}</i> , <i>Km'</i>
pSY111-14	<i>cl₈₅₇</i> , P _R -P _L , <i>pheA^{FR}</i> , <i>aroF^{FR}</i> , <i>Km'</i>
pSY130-14	<i>cl₈₅₇</i> , P _R , <i>aroF^{FR}</i> , P _L <i>pheA^{FR}</i> , <i>Km'</i>

prephenate 용액 100 μ l, 0.5 M Tris-HCl 완충액(pH 8.2) 400 μ l, 0.001 M EDTA 용액 100 μ l, 0.01 M DTT 용액 100 μ l, 0.05 M NAD용액 100 μ l를 넣은 반응액에 조효소액 200 μ l를 가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응은 100°C의 탕욕 중에서 10분간 가열하여 반응을 정지시키고 냉각 후 생성된 NADH를 340 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질의 정량

Lowry 등의 방법²⁹⁾에 따라서 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 정량하였다.

Phenylalanine의 정량

McCaman 등에 의한 형광분석³⁰⁾으로 하였다. 즉, 균체를 제거한 배양액 100 μ l에 0.6 N trichloroacetic acid 용액 100 μ l, 0.3 M succinate 완충액(pH 5.8) 2007 μ l를 가하여 교반 후 60°C에서 2시간 가열하였다. 냉각 후 새로 조제한 동(銅) 시약(sodium carbonate 1.6 g/l-potassium sodium tartarate 65 mg/l-cupric sulfate 60 mg/l)을 가하여 교반 후 형성된 형광물질을 365 nm에서 여기(勵起)시켜 515 nm에서 형광을 측정하여 phenylalanine을 정량하였다.

Tyrosine의 정량

Udenfriend 등의 비색법³¹⁾에 따라 행하였다. 즉, 균체를 제거한 배양액 0.6 ml에 12% trichloroacetic acid 용액 2 ml, nitrosonaphtol 용액 0.9 ml, nitric acid-sodium nitrate 용액 0.9 ml를 가하여 교반 후 5°C에서 30분간 가열하였다. 냉각 후 ethylene dichloride 4.5 ml를 가하여 잘 교반하여 원심분리(2,000 rpm, 5 min) 후 물층의 황색을 450 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosine을 정량하였다.

결과 및 고찰

Plasmid pSY130-14에 *tyrA* 유전자의 삽입

대장균 AT2471/pSY130-14의 배양에는 tyrosine을 첨가하여야 하는데 tyrosine을 첨가하지 않고 배양하기 위하여 plasmid pSY130-14의 *Pst*I site 또는 *Ava*I site에 *tyrA* 유전자를 삽입한 plasmid pSY146과 plasmid pSY140을 Fig. 1과 같이 재조합하였다. 즉, plasmid pSY50 [*aroF tyrA pheA*]를 *Pvu*II와 *Hpa*I으로 절단하여 *tyrA* 유전자를 함유한 1.7 kb의 단편을 agarose gel 전기영동으로 부터 회수하였다. 한편 plasmid pSY130-14를 *Pst*I 또는 *Ava*I으로 부분분해하여 cohesive end를 blunt end로 변화시킨 후 *tyrA* 유전자 단편을 삽입하였다. 제작된 plasmid pSY146과 pSY140은 *tyrA* 유전자의 전사 방향에 따라 두가지 형태로 된다. *cl*₃₅₇ 방향으로 향하는 것을 plasmid pSY146A와 pSY140A, 그것과 역방향인 것을 plasmid pSY146B와 pSY140B로 명명하였다.

제작된 plasmid pSY146A, pSY146B, pSY140A, pSY140

B로 형질전환시킨 숙주 대장균 AT2471(이하 대장균 AT2471/pSY146A, 대장균 AT2471/pSY146B, 대장균 AT2471/pSY140A, 대장균 AT2471/pSY140B라 약함)을 40°C에서 24시간 플라스크 배양한 결과는 Table 2와 같다. 즉, plasmid pSY146B는 plasmid pSY130-14와 거의 같은 양의

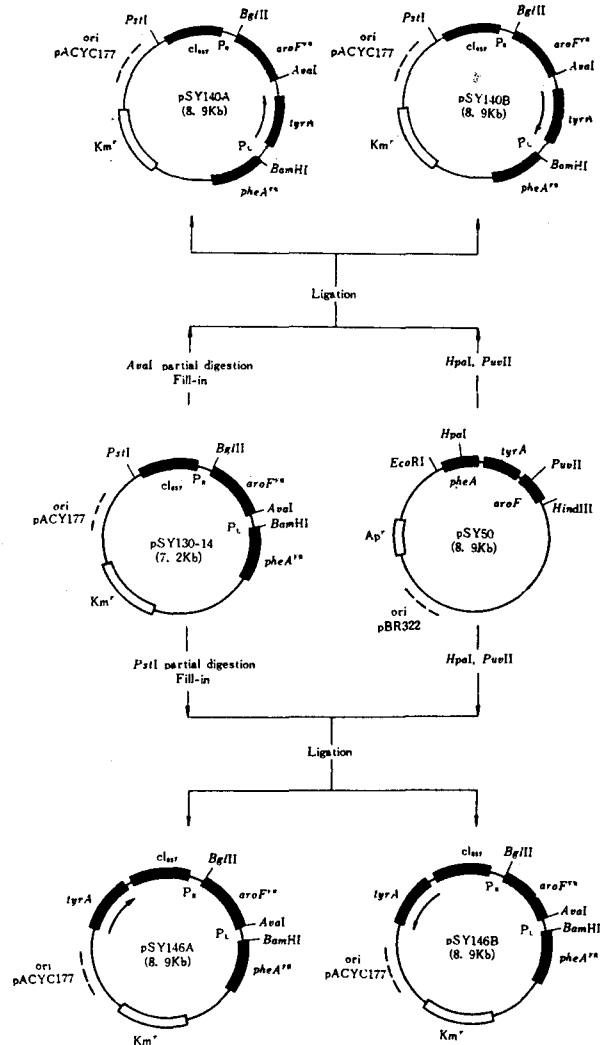


Fig. 1. Construction of the plasmid pSY146 and pSY140. At the *Pst*I and *Ava*I site which located on the plasmid pSY130-14 *Hpa*I-*Pvu*II fragment, harbouring the *tyrA* structure gene of plasmid pSY50, was inserted respectively.

Table 2. Phenylalanine production by various transformants.

Plasmid	Genotype	Phenylalanine production(mg/l)
pSY130-14*	P _R <i>aroF</i> ^{FR} P _L <i>pheA</i> ^{FR}	650
pSY146A	P _R <i>aroF</i> ^{FR} P _L <i>pheA</i> ^{FR} <i>tyrA</i>	740
pSY146B	P _R <i>aroF</i> ^{FR} P _L <i>pheA</i> ^{FR} <i>tyrA</i>	620
pSY140A	P _R <i>aroF</i> ^{FR} <i>tyrA</i> P _L <i>pheA</i> ^{FR}	520
pSY140B	P _R <i>aroF</i> ^{FR} <i>tyrA</i> P _L <i>pheA</i> ^{FR}	550

Host strain: *Escherichia coli* AT2471(*tyrA4*, *thi-1*) 24 hrs cultivated at 40°C by Sakaguchi flask. *15 μ g/ml tyrosine was supplemented.

phenylalanine을 생산하였지만 plasmid pSY146A는 약간 많은 양을 생산하였다. 한편 plasmid pSY140은 plasmid pSY130-14 보다 적은 양을 생산하였다. 그러나 plasmid pSY146A와 plasmid pSY146B 사이에 왜 생산능의 차이가 있는지, 그리고 plasmid pSY 140의 생산능이 낮은 이유는 확실하지 않다.

한편 대장균 AT2471/pSY146A를 jar fermenter로 배양하였을 때의 경시변화는 Fig. 2와 같으며 phenylalanine 생산량은 plasmid pSY130-14보다 적은 12 g/l이었다. 그 이유로는 plasmid pSY13 0~14의 경우보다 균체수량이 낮았기 때문이던가 또는 대사경로가 prephenic acid에서 phenylalane과 tyrosine으로 분리되었기 때문이라고 생각할 수 있다.^{4,10}

tyrA 유전자 활성이 phenylalanine 생산에 미치는 영향

tyrA 유전자를 갖고 있는 plasmid pSY110-14, pSY146A, pSY146B, pSY140A, pSY140B의 경우 phenylalanine 생산량에 큰 차이를 보이고 있다. 이것이 tyrA 유전자 산물인 CMP dehydrogenase 활성과 어떠한 관계가 있는가를 알아보기 위하여 40°C에서 24시간 플라스크 배양을 하여 phenyl-alanine, tyrosine 생산량, 그리고 CMP dehy-

drogenase 활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다.

CMP dehydrogenase 활성은 plasmid pSY110-14의 경우가 plasmid pSY146과 pSY140보다도 약 4배 높아 이것이 phenylalanine 생산에 직접적으로 관여하고 있다고 생각된다. Plasmid pSY110-14의 경우 aroF와 tyrA 유전자가 polycistronic으로 전사됨으로써 tyrA 유전자 자신의 promoter를 가진 plasmid pSY146과 pSY140 경우보다도 더욱 강하게 전사되기 때문으로 생각된다.

Hudson과 Davidson²³에 의하면 tyrA operon에도 internal promoter가 존재할 가능성이 있다고 시사한바 있다. 즉, aroF 유전자의 끝과 tyrA 유전자의 앞사이에 정확하게 tyrA 유전자의 발현을 전사하기 어려운 약한 활성을 가진 promoter가 존재하며 이 promoter는 효소활성을 나타내는 정상보다 짧은 polypeptide의 활성을 유도할 수 있다고 시사하였다. 따라서 polycistronic으로 전사된 plasmid pSY110-14보다 tyrA 유전자 자신의 promoter를 가진 plasmid pSY146과 pSY140의 CMP dehydrogenase가 불완전한 구조를 갖기 때문에 활성이 낮은 것이 아닌가 생각된다.

대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주의 분리

숙주 대장균 AT2471은 tyrosine 영양요구 변이균주이고 plasmid pSY130-14와 pSY111-14에는 tyrA 유전자가 없으므로 plasmid pSY130-14 또는 pSY111-14로 형질전환시킨 숙주 대장균 AT2471은 배양시 tyrosine을 첨가하여야 되는데 tyrosine을 첨가하지 않고 phenylalanine을 생산하기 위하여 대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주의 분리를 시도하였다.

즉, 완전배지에 생성된 대장균 AT2471의 colony를 tyrosine이 첨가되지 않은 최소배지에 replica하여 배양한 후 자연변이에 의하여 생성된 colony를 대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주로 하였으며 7균주를 플라스크 배양한 결과는 Table 4와 같다.

대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주와 숙주 대장균 AT2471와의 phenylalanine 생산량은 비교하면 tyrosine 복귀변이균주 모두가 현저히 낮았다. 이와같이 낮은 이유는 대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주의 균체중식이 숙주 대장균 AT2471보다 약 2배 정도이다. 이것은 carbon flow가 균체중식 쪽으로 이용되어 phenylalanine 합성으로의 유도가 낮기 때문이거나 또는 대사경로가

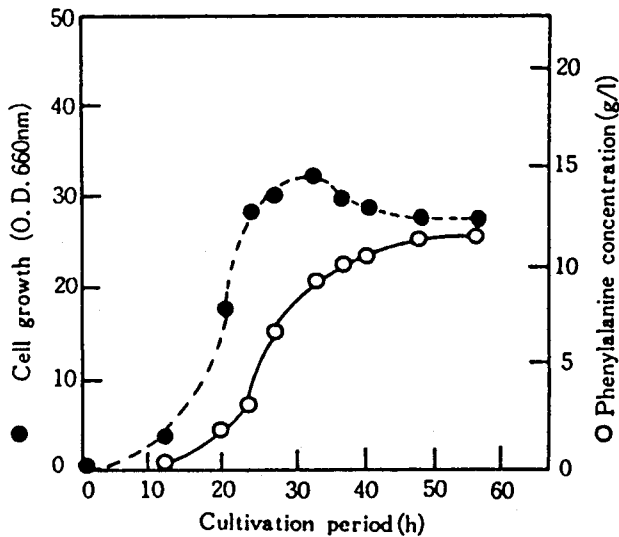


Fig. 2. Phenylalanine production by strain AT2471/pSY146A at 39°C with 2.5 l jar fermenter

Table 3. Chorismate mutase P-prephenate dehydrogenase activity of crude extracts

Strain/plasmid	Phenylalanine production(mg/l)	Tyrosine production(mg/l)	Chorismate mutase P-prephenate dehydrogenase activity(unit/mg/protein)
AT2471/pSY110-14	950	13.07	1.32×10^{-3}
AT2471/pSY146A	740	13.07	3.45×10^{-4}
AT2471/pSY146B	620	14.86	3.77×10^{-4}
AT2471/pSY140A	520	12.26	1.40×10^{-4}
AT2471/pSY140B	550	13.25	1.43×10^{-4}

24 hrs cultivated at 40°C by Sakaguchi flask.

Table 4. Phenylalanine production by various tyrosine revertants

	Cell growth(OD ₆₆₀)	Phenylalanine production(mg/l)
Revertant 1	3.71	16.1
Revertant 2	4.68	12.5
Revertant 3	4.23	13.7
Revertant 4	3.70	16.1
Revertant 5	4.21	15.8
Revertant 6	4.35	14.0
Revertant 7	3.92	12.8
AT2471*	2.09	33.9

24 hrs cultivated at 40°C by Sakaguchi flask. *15 µg/ml tyrosine was supplemented.

Table 5. Phenylalanine production by tyrosine revertants/pSY 130-14 at various temperature

Strain	38.5°C		40°C		42°C	
	OD 660	Phe(mg/l)	OD 660	Phe(mg/l)	OD 660	Phe(mg/l)
Revertant 1	6.46	348	5.39	503	4.68	179
Revertant 2	6.13	410	5.40	584	4.32	170
Revertant 3	5.67	410	5.02	628	4.46	205
Revertant 4	5.86	398	5.15	547	4.51	207
Revertant 5	5.76	432	5.41	653	4.63	186
Revertant 6	6.20	380	6.05	680	4.64	181
Revertant 7	5.93	435	5.22	684	4.69	170
AT2471*	2.31	852	2.24	650	1.50	291

24 hrs cultivated by Sakaguchi flask. *15 µg/ml tyrosine was supplemented.

phenylalanine과 tyrosine으로 분리되기 때문이라고 생각된다.

대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주/pSY130-14의 phenylalanine 생산

Plasmid pSY130-14를 형질전환시킨 대장균 AT2471 복귀변이균주(이하 대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주/pSY130-14라 약함)를 여러 온도에서 24시간 플라스크 배양한 결과는 Table 5와 같다.

균체중식은 대장균 AT2471/pSY130-14보다도 대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주/pSY130-14가 약 2배 정도 높았다. 한편 phenylalanine 생산은 plasmid pSY130-14는 온도조절형 발현 vector이므로 온도가 상승함에 따라 생산량이 높았다. 배양온도 38.5°C에서는 대장균 AT2471/pSY130-14보다도 대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주/pSY130-14의 생산량이 적었다. 그러나 40°C에서는 거의 같은 양을 생산하였으나 42°C에서는 38.5°C, 40°C에 비하여 유전자의 과잉 발현에 의하여 균체중식과 phenylalanine생산이 급격히 감소된 것으로 생각된다.

대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주/pSY111-14의 phenylalanine 생산

대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주에 plasmid pSY 111-14를 형질전환시킨 균주(이하 대장균 AT2471 tyro-

Table 6. Phenylalanine production by AT2471 tyrosine revertants/pSY111-14 at various temperature

Strain	38.5°C		40°C		42°C	
	OD 660	Phe(mg/l)	OD 660	Phe(mg/l)	OD 660	Phe(mg/l)
Revertant 1	5.56	521	4.94	1020	4.51	404
Revertant 2	5.46	477	4.78	907	3.65	448
Revertant 3	5.46	584	4.76	750	4.42	483
Revertant 4	6.69	548	4.86	605	4.29	452
Revertant 5	6.36	689	4.68	1209	3.89	442
Revertant 6	5.11	685	4.67	1114	4.77	480
Revertant 7	5.08	672	4.58	800	3.73	492
AT2471*	2.27	1057	1.82	1165	1.73	423

24 hrs cultivated by Sakaguchi flask. *15 µg/ml tyrosine was supplemented.

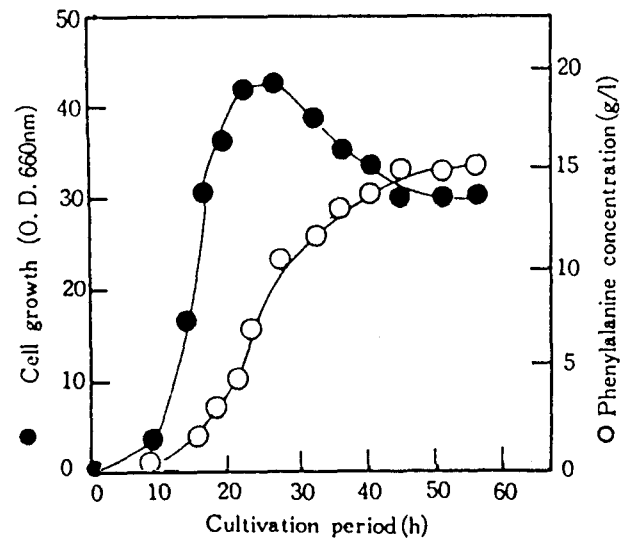


Fig. 3. Phenylalanine production by AT2471 tyrosine revertant 5/pSY111-14 at 39°C with 2.5/ jar fermenter

sine 복귀변이균주/pSY111-14라 약함)를 여러 온도에서 24시간 플라스크 배양한 결과는 Table 6과 같다. 대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주/pSY130-14의 경우와 같이 대장균 AT2471/pSY111-14 보다도 대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주/pSY111-14의 경우 phenylalanine 생산이 낮았다. 그러나 40°C에서 대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주 5/pSY111-14의 경우 대장균 AT2471/pSY 111-14보다 더 많은 phenylalanine을 생산하였다.

그리고 대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주/pSY130-14의 경우에서와 같이 모든 균주가 40°C까지 생산량이 저하하였다. 이것은 대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주/pSY130-14에서와 같은 이유라고 생각된다. 그리고 한편 대장균 AT2471 tyrosine 복귀변이균주 5/pSY111-14를 jar fermenter로 배양하였을 때의 경시적 변화를 Fig. 3에 나타내었다.

38.5°C에서 55시간 배양으로 15 g/l의 phenylalanine을 생산하여 대장균 AT2471/pSY130-14의 생산량보다 약간 상승하였다. 따라서 tyrosine 첨가없이 tyrosine 부생없이

phenylalanine을 많은 양 생산할 수 있는 균주를 육종하였다.

사 사

본 연구는 문교부 대학부설 유전공학연구소 연구비 지원으로 이루어진 연구 결과이며 이에 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Stegink, L. D. and L. T. Filer, Jr. (1984) Aspartame, Physiology and Biochemistry. p21, Marcel Inc, New York and Basel
2. Akashi, K., H. Shibai and Y. Hirose (1979) Effect of oxygen supply on L-phenylalanine, L-proline, L-glutamine and L-arginine fermentations. *J. Ferment. Technol.* **57**, 321-327.
3. Tokoro, Y., K. Oshima, M. Okii, K. Yamaguchi, K. Takata and S. Kinoshida (1970) Microbial production of L-phenylalanine from n-alkane. *Agr. Biol. Chem.* **34**, 1516-1521.
4. Hagino, H. and K. Nakayama (1974) L-Phenylalanine production by analog-resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agr. Biol. Chem.* **38**, 157-161.
5. Tsuchida, T. and K. Sano (1981) Producing L-phenylalanine by fermentation. UK patent **2053**, 906.
6. Ozaki, A., R. Katsumara, T. Oka and A. Furuya (1985) Cloning of the genes concerned in phenylalanine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* and its application to breeding of a phenylalanine producing strain. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2925-2930.
7. Chok, Y. J. and D. E. Tribe (1982) Continuous production of phenylalanine using an *Escherichia coli* regulatory mutant. *Biotechnol. Lett.* **4**, 223-228.
8. Hwang, S. I., G. H. Gil, Y. J. Cho, K. R. Kang, J. H. Lee, and J. C. Bae (1985) The fermentation process for L-phenylalanine production using an auxotrophic regulatory mutant of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **22**, 108-113.
9. 木任雅彦 (1982) 細胞内遺傳子組換え手法によるアミノ酸生産菌株の育成. *醸酵と工業* **40**, 614-624.
10. Sugimoto, S., M. Yabuta, T. Seki, T. Yoshida and H. Taguchi (1985) Expression of *pheA* gene using P_R-P_L tandem promoter of bacteriophage lambda. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 336-342.
11. Herman, K. and R. L. Somerville (1983) Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation. p323, Addison Wesley Publishing Company.
12. Brown, K. D. and R. L. Somerville (1971) Repression of aromatic amino acid biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **108**, 386-391.
13. Camakarlis, H. and J. Pittard (1973) Regulation of tyrosine and phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: properties of the *tyrR* gene product. *J. Bacteriol.* **115**, 1135-1144.
14. Im, S. W. K., H. Davidson and J. Pittard (1971) Phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: mutants derepressed for chorismate mutase P-prephenate dehydratase. *J. Bacteriol.* **106**, 784-790.
15. Theo, A. A. D., P. Crewther and B. E. Davidson (1972) Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **247**, 4447-4452.
16. Kolter, R. and C. Yanofsky (1982) Attenuation in Amino acid Biosynthetic Operons. *Ann. Rev. Genet.* **16**, 113-134.
17. Zurawski, G., K. D. Brown, D. Killingly and C. Yanofsky (1978) Nucleotide sequencing of the leader region of the phenylalanine operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4271-4275.
18. Gibson, F. and J. Pittard (1970) The regulation of biosynthesis of aromatic amino acids and vitamins. *Curr. Topics Cell Reg.* **2**, 28-63.
19. Sugimoto, S., T. Seki, T. Yoshida and H. Taguchi (1986) Intentional control of gene expression by temperature using the repressor-promoter system of bacteriophage lambda. *Chem. Eng. Comm.* **45**, 241-253.
20. 沈相國 (1987) 溫度調節型 發現 Vector를 함유한 大腸菌에 의한 Phenylalanine 生産에 관한 研究. 中央大學校 食品加工學科 博士論文.
21. Morison, D. A. (1977) Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. *J. Bacteriol.* **132**, 349-351.
22. Clewell, D. B. and D. R. Helinski (1969) Supercoiled circular DNA-protein complex in *E. coli*; Purification and induced conversion to an open circular form. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **62**, 1159-1166.
23. Birnboim, H. C. and J. Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids Res.* **7**, 1513-1523.
24. O'Farrell, P. H., E. Kutter and M. Nalcanishi (1980) A restriction map of the bacteriophage T₄ genome. *Mol. Gen. Genet.* **179**, 421.
25. Maniatis, T., E. F. Frish and J. Sambrook (1982) Molecular Cloning. p396, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
26. Ogita, Z. (1964) Improved agar gel media for thin layer electrophoresis. *Med. J. Osaka Univ.* **15**, 141-153.
27. Weislander, L. (1979) A simple method to recover intact high molecular RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose gels. *Anal. Biochem.* **98**, 305-309.
28. Cotton, R. G. H. and F. Gibson (1970) Tyrosine and phenylalanine biosynthesis: The T and P proteins; chorismate mutase. *Meth. Enzymol.* **17**, 565-574.
29. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
30. McCaman, M. W. and E. Robins (1962) Fluorometric method for the determination of phenylalanine in serum. *J. Lab. Clin. Med.* **59**, 885-890.
31. Udentriend, A. and J. R. Cooper (1952) The chemical estimation of tyrosine and tyramine. *J. Biol. Chem.* **194**, 227-230.
32. Hudson, G. S. and B. E. Davidson (1984) Nucleotide sequence and transcription of the phenylalanine and tyrosine operons of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* **180**, 1023-1051.

Molecular Breeding of Phenylalanine Producing *E. coli* Containing Temperature-Controllable Vector

Chung Dong Hyo^{1*}, Sang Kook Shim², Young Chun Lee¹ and Ho Kwon Chung³(¹*Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea*, ²*Department of Food Technology, Dongnam Health Junior College, Suwon 440-714, Korea*, ³*Department of Microbial Technology, KonKuk University, Seoul 133-701, Korea*)

Abstract: In order to produce phenylalanine without tyrosine co-production, we constructed various temperature-controllable expression vectors by insertion of lower expression of the *tyrA* gene into the plasmid pSY130-14. And tyrosine revertant to cultivate without addition of tyrosine, was selected from *Escherichia coli* strain AT2471[*tyrA*, *thi*] by spontaneous mutation. The strain AT2471 harbouring plasmid pSY146A and the tyrosine revertant 5 harbouring plasmid pSY111-14 produced 12 g/l and 15 g/l of phenylalanine respectively in a 2.5 l jar fermenter at a constant temperature of 39°C after 55 hours cultivation.

*Corresponding author