KOREAN J. FOOD & NUTRITION
Vol. 9, No. 1, 21~28(1996)

Brevibacterium sp. 로부터 유도된 PFP 내성 변이주에 의한 L-Tyrosine 생성

배준태 · 박경숙 · 이별나
대구공업전문대학 식품영양과

Production of L-Tyrosine by PFP Resistant Mutant Induced from *Brevibacterium* sp.

Joon-tae Bae, Kyung-suk Park, Byul-la Lee
Dept. of Food and Nutrition, Taegu Technical Junior College, 831-Bondong Taegu, Korea.

Abstract

This study was attempted to investigate the production of L-tyrosine by *Brevibacterium* flavum ATCC 14067. To select the strain which produce more L-tyrosine, mutants were induced by N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine(NTG) treatment and phenylalanine auxotrophic mutants were induced by NTG and penicillin treatments. PFP resistant mutant was isolated from a phenylalanine auxotroph by retreatment with NTG and screened for increase of L-tyrosine production. PFP-326 mutant resistant to PFP (100μg/ml) was derived from phenylalanine auxotroph by mutagenesis with NTG and PFP-106 mutant resistant to PFP (120μg/ml) was derived from PFP-326 by mutagenesis with NTG. The composition of media for L-tyrosine production in strain PFP-106 was studied. PFP-106 mutant strain produced 50mg/l of L-tyrosine while the parent strain produced 0.56mg/l of L-tyrosine.

The optimum composition of medium for L-tyrosine by strain PFP-106 was 10% sucrose as carbon source, 3% ammonium sulfate as nitrogen source. The optimum cultural condition for producing L-tyrosine by strain PFP-106 was L-phenylalanine at a concentration of 100μg/mg.

Key words : L-tyrosine, *Brevibacterium* flavum ATCC 14067, PFP resistant mutant

서 론

아미노산중의 하나인 L-tyrosine 은 갑상선 hormone인 triiodo thyronine 과 thyroxine 및 epinephrine 과 norepinephrine 의 전구물질로서 피부와 모발의 색소인 melanin 형성에 필수적이며 특히 Parkinson's 병의 치료제인 L-DoPa의 합성을 위한 전구체로 쓰인다[1,2]. 지금까지 연구된 L-tyrosine 의 생성은 *E. coli*, *B. subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* 등[2,3]에서 phenylalanine 영양 요구성 변이주를 사용하여 검토되었고 3-fluorotyrosine, 3-amino tyrosine, D-tyrosine, L-histidine에 내성인 *B. subtilis* 변이주, P-fluorophenyl alanine 내성인 *salmonella typhimurium*변이주등에서 보고된바 있다[4~6].

본 연구에서는 Brevibacterium 속 균주를 사용하여 L-tyrosine생성을 검토하고 그중 비교적 생성이 높은 균주를 이용하여 N. T. G 나 penicillin 처리하여 변이주을 유도하고 phenylalanine 영양 요구성 변이주나 analog 내성 변이주를 이용하여 L-tyrosine을 검토 비교하여 L-tyrosine 생성에 효율적인 배양조건을 검토하였다.

Corresponding author : Byul-la Lee

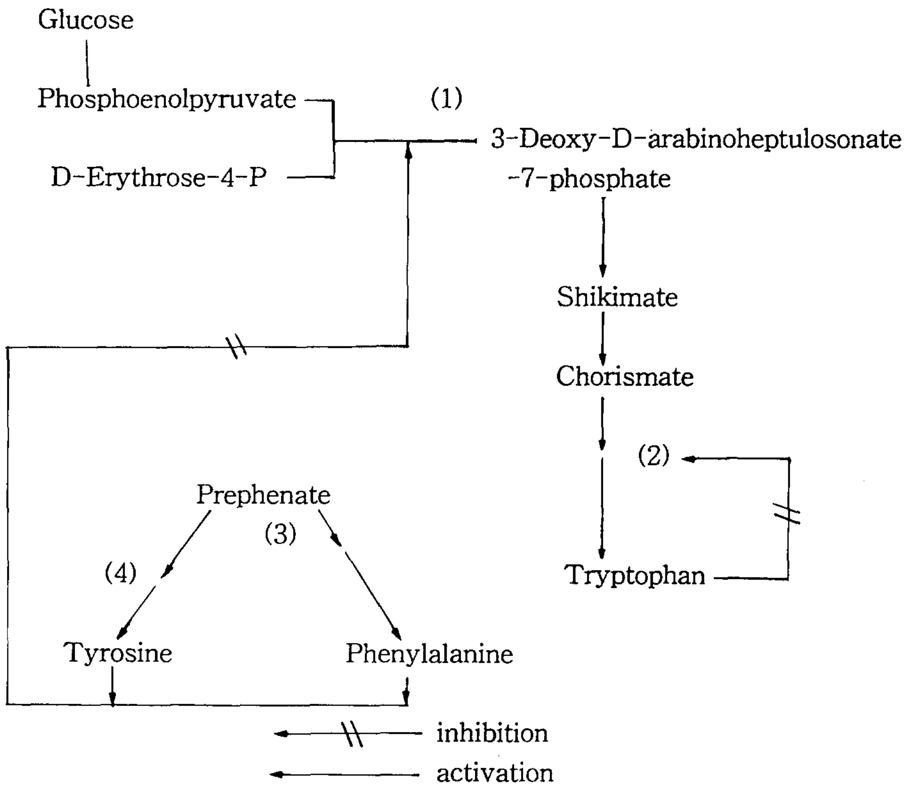

Fig 1. Regulation mechanism of aromatic acid biosynthesis in *B. flavum*
(1) DAHP synthetase.
(2) Anthranilate synthetase.
(3) Prephenate dehydratase.
(4) Prephenate dehydrogenase.

재료 및 방법

1. 사용균주

Brevibacterium flavum ATCC 14067을 사용하였다.

2. 배지 및 배양

Auxotroph 변이주와 analag 변이주를 분리하기 위하여 Table 1. 의 배지를 이용하였다. 배양 방법은 한천 사면 배지에서 배양한 균체 1백금이와 phenylalanine을 첨가한 발효 배지 20ml를 넣은 500ml 삼각 flask에 접종하여 96시간 진탕 배양하였다.

3. 균주의 생육도 측정

발효액을1N-HCl로 26배 희석하여 $CaCO_3$를 제거한 후 spectrophotometer(Hitacti Model : 100-0050)로 562nm에서 흡광도를 측정하였다[7].

4. Auxotroph 변이주 분리

먼저 한천사면 배지에서 성장한 세균 1백금이를 5ml의 완전배지에 접종한 후 30℃에서 24시간 진탕배

Table 1. Composition of media **(unit : g/l)**

Components	Complete medium	Minimal medium	Fermentation medium
Glucose		5	100
Polypeptone	10		
Yeast extract	10		
NaCl	5		
$(NH_4)_2SO_4$		1.5	40
Urea		1.5	
KH_2PO_4		3	1
K_2HPO_4		1	
$CaCl_2.2H_2O$		0.001	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0.01	0.4
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$			2ppm
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$			2ppm
Casamino acid			1
Trace element Solution*		1ml	
d-Biotin		30μg	300μg
Amino acid mixture**			10ml
Thiamine		100μg	200μg
$CaCO_3$			50
pH	7.0	7.2	7.2

* Trace element solution : $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 8,800mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 97mg, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 88mg, $(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 37mg, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 72mg, in a liter of distilled water.

** Amino acid mixture : L-Threonine 5.7mg/ml, L-Methionine 1.2mg/ml, L-Isoleucine 4.9mg/ml.

양하였다. 배양후 원심분리로 집균 0.1M 인산완충액으로 수세한 다음 2000μg/ml의 N.T.G용액과 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)을 이를 동량 혼합하고 30℃에서 30분간 반치하였다. 이를 0.1M 인산완충액으로 2~3회 원심분리후 수세하고 Penassay broth에 접종시켜서 30℃에서 24시간 배양하였다. 이를 최소배지에 일정량 접종,진탕배양하였다. (30℃/4hr) 이를 집균하여 20IU/ml의 penicillin이 함유된 최소배지에 다시 접종하여 30℃에서 6~8시간 진탕배양하였다. 이 배양액을 수세후 phenylalanine을 ml 당 100μg 함유한 최소배지에 도말후 나타난 colony를 Replica방법에 의해 phenylalanine 영양 요구성 변이주를 분리하였다[7~10].

5. PFP 내성 변이주 분리

위에서 분리한 phenylalanine 영양요구성 변이주를 N.T.G. 처리한 다음 ml 당 100μg의 PFP 가 함유된 최소평판배지에 도말하여 30℃에서 5~7일간 배양하여 내성주를 분리하였다. 분리 된 균주를 다시 N.T.G 재처리하여 고농도의120μg/ml, 150μg/ml, 200μg/ml, 300μg/ml의 PFP 내 성변이주를 분리하였다[11].

6. L-Tyrosin 정량

배양액 중의 아미노산을 분리하기 위하여 발효한 액을 원심분리한 후 상징액을 amberlite IR-120-P(Na형) 수지를 채운 column(1.1×30cm)에 흡착시킨 후 수지체적의 10배량의 0.1 N-HCl용액으로 세척하고, 4N 암모니아수로 흡착된 아미노산을 1ml/min의 유속으로 용출시 켰다. 그리고 용출액은 회전식 감압 농

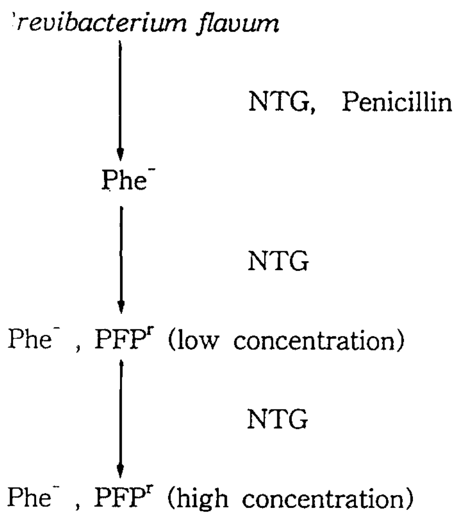

Fig 2. The procedure of mutation Abbreviations used ;
NTG; N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine
Phe; Phenylalanine auxotroph
PFP; P-Fluorophenylalanine resistant.

축 증발기로 감압 농축시켜 paper partition chromatography의 시료로 사용하였다[12].

배양액 중의 아미노산을 동정하기 위하여 시료와 표준 물질인 L-tyrosine을 paper chromatography용 Whatman No. 1에 점적한 다음 전개시키는데, 이때 전개용매의 조성은 n-butanol:acetic acid:water=4:1:2의 비율로 18~20시간 전개시킨 후 여지를 실온에서 건조시켜 0.2% ninhydrin용액으로 분무하여 발색시켰다. 그리고 표준 물질의 L-tyrosine도 동일한 조건하에서 전개 발색시켜 시료의 Rf치와 비교하였다.

배양액 중의 L-tyrosine 생성량을 정량 분석하기 위하여 Uden-friend와 Cooper등의 2- nitroso-β-naphthol method에 의하여 정량하였다[13]. 발효액 1ml와 증류수 3ml를 30% trichlor-oacetic acid 1ml와 혼합하여 10분간 원심분리한 후 2ml를 취한 다음 0.1% 1-nitroso-2-naphthol 1ml와 nitric acid rea-gent 1ml를 혼합하였다. 혼합액은 water bath를 사용하여 55℃에서 30분간 방치시킨 후 냉각시켜 ethylene dichloride 10ml를 첨가하여 원심분리 시킨 다음 상징액을 취하여 분광 광도계(Hitachi Model 100-0050)로 450nm에서 O.D.를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. Auxotroph 변이주와 PFP 변이주의 분리

앞의 실험에서 L-tyrosine생성이 가장 우수한 균주 *Brevibacterium flavum*을 공시 균주로하여 실험재료 및 방법에 따라 phenylalanin이 첨가된 최소 평판 배지에서 자 라는 1300개 균주를 1차 확인하여 140개 균주를 선별하였다. 선별된 140개 균주를 2차 확인하여 50균주를 선별한후 phenylalanine 영양 요구성 변이주 판정을 위한 3차확인 으로 50개 균주중에서 14개 균주를 선별하였다. 이들의 L-tyrosine 생성량을 비교검 토한 결과 우수한 균주를 선별하여 이를 다시 phenylalanine 영양요구성 변이주로 부 터 analog 내성 변이주를 분리하였다. phenylalanine 영양요구성 변이주를 N.T.G처 리한후 저농도(100μg/ml)의 *P*-fluorophenylalanine과 phenylalanine이 함유된 최소평판배지에 도말하여 5~7일간 배양하였다. 그 결과 PFP 내성 변이주가 13균주 분 리되었다. 이중 L-tyrosine 생성 검토 결과 우수한 균주를 선별하여 고농도에서 PFP 내성변이주를 유도하기 위하여 다시 N.T.G 처리한 후 120μg/ml, 150μg/ml, 200μg/ml, 300μg/ml의 고농도 PFP를 함유한 최소평판배지에 도말하여 각각 변이주를 유도하였 다. 그 결과 비교적 L-tyrosine 생성이 높은 균주 5균주를 선별하였다.

2. 분리된 변이주로 부터 생성된 L-tyrosine의 동정

분리된 변이주로 부터 생성된 L-tyrosine의 동정을 위하여서는 Paper Chromatography 방법을 이용하였으며 그 결과 표준품의 L-tyrosine과 같은 Rf치인 0.49를 나타내었다.

3. 분리된 변이주의 L-tyrosine 생성량비교

Brevibacterium flavum 으로 부터 1차 N.T.G 처리된 phenylalanine 영양요구주 14균 주의 L-tyrosine 생성량과 2차 N.T.G 처리된 phenylalanine PFP 균주 13개균주의 생 성량을 비교 검토하고 다시

Table 2. Comparison of L-tyrosine production by phenylalanine auxotrophic mutants and phenylalanine auxotroph-PFP resistant mutants from *Brevibactenium flavum*

	Strains	Character	PFP Con. (μg/ml)	L-tyrosine(mg/l)
	Bre. flavum	Wild		0.56
	APT-96	phe-		5.60
1st	APT-98	phe-		5.60
	APT-99	phe-		7.00
N.T.G	APT-104	phe-		14.00
treatment	APT-106	phe-		11.20
	APT-109	phe-		8.40
	PFP-322	phe-, PFP^{r}	100	41
2nd	PFP-326	phe-, PFP^{r}		44
N.T.G	PFP-327	phe-, PFP^{r}		40
treatment	PFP-330	phe-, PFP^{r}		40
	PFP-334	phe-, PFP^{r}		42
3rd	PFP-106	phe-, PFP^{r}	120	50
N.T.G	PFP-107	phe-, PFP^{r}	150	25
treatment	PFP-108	phe-, PFP^{r}	200	19

3차 N.T.G 처리하여 얻은 5균주의 L-tyrosine 생성량을 비교하여 검토한 결과는 Table 2. 과 같다. 그 결과에서 1차에서 얻어진 phenylalanine auxotroph 만의 변이주가 2차, 3차 보다 낮은 생성량을 나타내었고 2차에서 얻어진 phenylalanine auxotroph PFP내성인 변이주는 3차 N.T.G 처리된 균주보다 생성율이 낮았다. 이것은 L-tyrosine 생성량이 높은 균주를 얻기 위해서는 변이처리의 횟수를 높이는 것이 유리하다는 것을 알수있고 그것은 세포내 대사 과정에서 L-tyrosine 만을 생성하도록 하는 세포변이율이 높다는 것을 의미한다. 우선 1차 N.T.G 처리시 유도된 변이주 APT-104 균주가 14mg/l의 생성율로 다른 변이주에 비해 높은 생성을 나타 내었다. 이를 더욱 N.T.G 처리하여 유도된 PFP (100μg/ml) 내성균주에서는 PFP-326균주가 44mg/l 로서 1차 때보다 훨씬 높은 생성을 보였다. 더욱이 PFP 내성을 높이기 위해 3차 N.T.G 처리된 균주중에서는 우수한 생성을 나타낸것이 PFP(120μg/ml)에서 유도된 PFP-106이 50mg/l로서 가장 우수하였다. 따라서 PFP 농도가 너무 높은 내성 균주라도 L-tyrosine 생성이 낮다는 것을 알았다.

이상으로 L-tyrosine 생성량 비교에서 생성량이 가장 우수한 균주는 PFP-106으로 3 차 N.T.G 처리된 균주를 선택하였다.

4. *Bre. flavum* PFP-106 (phe-, PFP^{r})의 배지조건

1) 탄소원의 영향

생물은 그들의 원형질을 구성하는 다수의 유기 화합물을 합성하기위해 탄소원을 필 요로 한다. 광합성균이나 무기 영양균에 있어서는 CO_2가 유일한 탄소원이나 그외 미생물은 탄소원으로 유기에너지원과 소량의 CO_2를 필요로 한다.

본 실험에서는 Glucose, Fructose, Maltose, Mannose, Sucrose를 각각 10%농도를 첨가하여 L-tyrosine 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 3. 에서와 같이 Sucrose와 Glucose 첨가시 L-tyrosine 생성량이 각각 76mg/l, 50mg/l로서 Mannose의 생성량인 22mg/l와 비교시 높게 나타났다. 따라서 Sucrose와 Glucose 의 영향을 농도별로 조사한 결과 Fig. 3. 에서와 같이 10% 농도에서 가장 높았으며, 그 이상의 농도에서는 균의 생육과 L-tyrosine생성량과 감소되었다.

이는 Hagino와 Nakayama등[11]이 Corynebacter-

Table 3. Effect of various carbon sources on L-tyrosine production by mutant PFP-106

Carbon Sources	Growth(562nm)	L-Tyrosine(mg /l)
Glucose	0.92	50
Fructose	0.75	26
Maltose	0.83	34
Mannose	0.70	22
Sucrose	0.94	76

Carbon source in fermentation medium was replaced 10% of each carbon source.

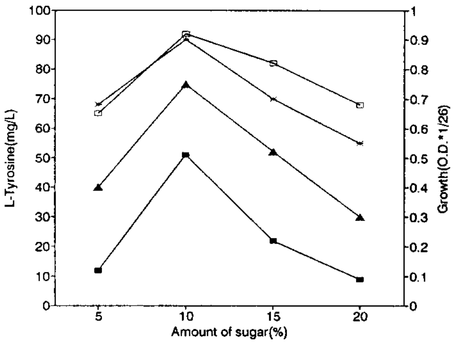

Fig 3. Effect of glucose and sucrose concentration on L-tyrosineproduction by strain PFP-106.
L-Tyrosine production : ■---■ ; Glucose,
▲---▲ ; Sucrose.
Growth: *-----* : Glucose,
□---□ : Sucrose.

ium glutamicum균주를 사용하여 탄소 원의 영향을 조사한 결과에서 Sucrose의 L-tyrosine생성량이 가장 높았으며, 또한 10%의 농도에서 L-tyro-sine생성량이 가장 양호하였다고 보고한 결과와 같은 경향을 나타내었다.

2) 질소원의 영향

세포 구성 성분(주로 단백질)은 질소를 함유하여 세균에서의 질소 함량은 세포 건조 중량의 약 10%로, 세균이 필요로 하는 질소의 형은 그 효소적 환원 능력에 따라 결정된다고 알려져 있다. 그리고 질산염이나 아질산염은 아래와같이 각각의 환원효 소에 의해서

$$NO_3^- \xrightarrow[\text{reductase}]{NO_3^-} NO_2^- \xrightarrow[\text{reductase}]{NO_2^-} NH_3$$

NH_3로 환원되며 아질산염은 호기적인 상태에서 terminal electron acceptor로 작용한다.

일반적인 사상균이나 gram 양성세균은 암모늄(NH_3)을 바탕으로 잘 발육하고 질 산염이나 아질산염을 이용하는 경우는 거의 드물다.

본 실험에서는 L-tyrosine생성에 적합한 질소원을 조사하기 위하여 $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl, NH_4NO_3, KNO_3, Urea를 3% 농도로 첨가한 결과 Table 4 에서와

Table 4. Effect of nitrogen sources on L-tyrosine production by PFP-106

Nitrogen sources	Growth(562nm)	L-Tyrosine(mg /l)
$(NH_4)_2SO_4$	0.91	50
NH_4Cl	0.64	20
NH_4NO_3	0.50	36
KNO_3	0.27	12
Urea	0.90	42

Ammonium sulfate in fermentation medium was replaced by 3% of each nitrogen source.

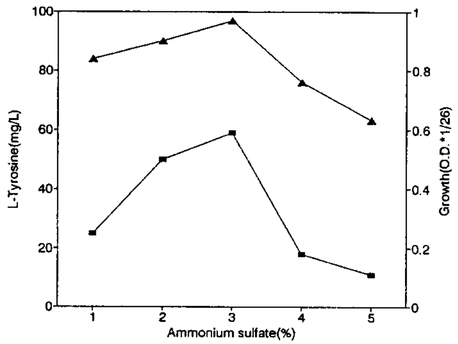

Fig 4. Effect of ammonium sulfate concentration on L-tyrosine production by strain PFP-106.
■-----■ : L-Tyrosine production
▲-----▲ : Growth

같이 $(NH_4)_2SO_4$와 Urea첨가시는 L-tyrosine 생성량이 각각 50mg/l, 42mg/l로서, KNO_3첨가시의 L-tyrosine 생성량인 12mg/l에 비하여 높게 나타났다. 따라서 $(NH_4)_2SO_4$의 농도에 따른 L-tyrosine 생성량을 조사한 결과 Fig. 4 에서와 같이 3% 농도로 첨가하였을 때 L-tyrosine 생성량이 최대를 나타내었다.

3) Amino acid의 영향

아미노산이 L-tyrosine 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 L-Glutamic acid, L-Histidine, Phenylalanine, Tryptophan을 발효 배지에 0.1% 농도로 각각 첨가하였다.

Table 5. Effect of amino acids on L-tyrosine production by strain PFP-106

Amino acids	Growth (562nm)	L-Tyrosine (mg/l)
None	0.89	48
L-Glutamic acid	0.93	106
L-Aspartic acid	0.91	104
L-Histidine	0.90	88
L-Phenylalanine	0.55	20
L-Tryptophan	0.97	108

Amino acid in fermentation medium was replaced by 0.1% of each amino acid.

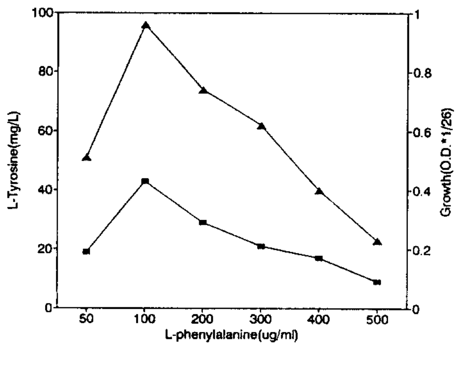

Fig 5. Effect of L-phenylalanine on the L-tyrosine production by mutant PFP - 106.
■-----■ : L-Tyrosine production
▲-----▲ : Growth

그 결과 Table에서와 같이 phenylalanine을 제외한 대부분의 아미노산 첨가시 L-tyrosine생성량은 증가되었다. 이것은 Hagino와 Nakayama등[11]이 *Corynebacterium glutamicum*을 이용하여 아미노산의 영향을 조사한 실험에서 glutamic acid, aspartic acid의 첨가가 효과적이었다는 보고와 동일하였으며, 또한 tryptophan의 영향은 *Corynebacterium glutamicum*에서 chorismate mutase활성의 상승에 기인하여 효과적이었다.[14] 는 보고와 같은 경향을 나타내었다.

4) L-Tyrosine 생성에 있어서 L-phenylalanine의 영향

PFP-106 균주의 발효시 L-phenylalanine의 농도에 따른 L-tyrosine 생성량을 조 사하기의 위하여 50μg/ml, 100μg/ml, 200μg/ml, 300μg/ml, 400μg/ml, 500μg/ml 농도 로 첨가하였을때 Fig. 5. 에서와 같이 100μg/ml첨가시 L-tyrosine 생성량이 가장 높았으며, 고농도에서는 L-tyrosine 생성량이 감소하였다. Hagino와 Nakyama등[11]이 *Corynebacterium glutamicum*을 이용하여 L-phenylalane농도가 L-tyrosine생성에 미치는 영향을 조사한 결과에서 보고한 것과 같은 경향을 나타내었다.

요　약

*Brevibactericum*속 균주로 부터 N.T.G. 처리하여 1차로 140개의 변이주를 선별하였다. 이들 균주로 부터 2차 확인후 50균주를 선택 생성량을 보았다. 그 중 가장 생성량이 많은 균주 APT-104(phe-) 균주를 다시 N.T.G. 처리하여 PFP 내성 균주 13균주를 분리하여 그 중 가장 생성량 높은 균주를 다시 N.T.G. 처리하여 PFP 농도가 높은 곳에서 내성이 강한 균주를 5균주 선택 하였다.

이상 선택한 균주의 L-tyrosine 생성량을 비교 검토한 결과 PFP-106 균주에서 가장 높은 생성을 보였다. (50mg/l) 따라서 이 균주의 배지조건을 검토하였다. 그 결과 탄소원에서의 영향은 Sucrose 나 glucose 첨가시 76mg/l, 50mg/l 로서 효과적이었으며 그 농도는 10% 농도가 가장 효과적 이었다. 질소원에서는 $(NH_4)_2SO_4$첨가시가 50mg/l 로 높았고 다른 질소원

은 오히려 낮은 생성을 보였다. 그 농도는 3%가 적당하였다. 아미노산의 영향은 glutamic acid와 L-tryptophane 생성에서 각각 106mg /l, 108mg /l로서 가장 효과적이었다. 또한 L-phenylalanine 의 농도는 100mg /l 첨가시 L-tyrosine 생성량이 50mg /l로서 가장 효과적이었다.

참고문헌

1. Davis, B. D. : Experientia., **6**, 41(1950).
2. Asai, T. : Amino acids., **1**, 11(1959).
3. Polsinelli, M. : Linkage relationship between genes for amino acid or nitrogenous base biosynthesis and genes controlling resistance to structurally correlated analogs., Giorn. *Microbiol.*, **13**, 99(1965).
4. Nester, E. W., Jensen, R. A. and D. S. Nesser: Regulation of enzyme synthesis in the aromatic amino acid pathway of *Bacillus aultilia., J. Bacteriol.*, **97**, 83(1969).
5. Chamney, W. S. and Jensen, R. A. : D-Tyrosine as a metabolic inhibitor of *Bacillus sultilis., J. Bacteriol.*, **98**, 205(1969).
6. Chapman, L. F. and Nester, E. W. : Common element in the repression control of enzymes of histidine and aromatic amino acid biosynthesis in *Bacillus sultilus., J. Bacteriol.*, **96**, 1658(1968).
7. Sugimoto, S., Nakagawa, M., Tsuchida, T. and I. Shiio: Rehulation of aromatic amino acid biosynthesis and production of tyrosine and phenylalanine in *Bnevilactenium glutamicum., Agr. Biol. Chem.*, **37**(9), 2001(1973).
8. Hagino, H., Yoshida, H., Kato, F., Arai, Y., Katsumata, R. and K. Nakayama: L-Tyrosine production by polyauxotrophic mutants of *Conynelactenium hlutamicum., Agr. Biol. Chem.*, **37**(9), 2001(1973).
9. 石川長未: 미생물 유전학 실험법. 87(1982).
10. 柳田友道: 미생물 실험 방법. 294(1977).
11. Hahino, H. and Nakayama, K. : L-Tyrosine production by analogresistant mutants derived from a phenylalanine auxotroph of *Conynedactenium glutamicum., Agr. Biol. Chem.*, **39**(2), 331(1975).
12. Cooper, T. G. : The tools of Biochemistry., 162.
13. Udenfriend, S. and Cooper, J. R. : The chemical estimation of tyrosine and tyramine., *J. Biol. Chem.*, **196**, 227(1952).
14. Hagino, H. and Nakayama, K. : Regulatory properties of chorisumate mutase from *Conynelactenium glutamicum., Agr. Biol. Chem.*, **39** (2) 331(1975).

(1995년 11월 28일 수리)