

특집: 산업적 유용미생물(I)

*Corynebacterium*의 분류, 분자생물학적 연구 및 산업적 응용

한종권 · 이재홍

제일제당(주) 종합연구소

단백질의 구성 성분인 아미노산과 유전 물질의 구성 성분인 퓨린 뉴클레오티드 계열의 핵산 물질들은 정미성을 갖는 식품 첨가물로서, 그리고 필수 아미노산 성분의 사료 첨가물로서, 산업적으로 미생물의 생합성 경로를 이용하는 발효 공법에 의해 생산된다. 매년 80만톤 이상 L-글루탐산(이하 글루탐산)이 조미료로서, 30만톤 이상의 L-라이신(이하 라이신)이 사료 첨가제로서, 그리고 1만톤 이상의 구아닐산(5'-guanylic acid, 이하 GMP)와 이노신산(5'-inosinic acid, 이하 IMP) 등의 핵산이 조미료로서 *Brevibacterium*, *Corynebacterium* 등을 포함하는 코리네형 미생물들의 변이주를 이용해서 생산되고 있다.

아미노산 및 핵산 물질들은 생체의 주요 구성 성분이므로 그의 합성이 엄밀하게 조절되어, 정상적인 경우의 세포로부터는 거의 축적되지 않기 때문에, 이러한 공업적 유용성이 높은 대사 산물의 고생산성 균주를 개발하기 위해 돌연변이원(예: NTG, 자외선 조사 등)의 처리 및 원하는 형질의 선별이라는 인공 변이법을 위주로 지속적으로 많은 노력이 기울여져 왔다. 초창기의 글루탐산 발효의 경우에는 1957년 일본의 Kinoshita에 의해 *Micrococcus glutamicus* (이후 *Corynebacterium glutamicum*으로 분류됨)의 야생균주를 이용해서 탄수화물과 암모니아를 영양원으로하여 생산되었는데(25), 이는 야생 *Corynebacterium glutamicum* 균주의 α -ketoglutarate dehydrogenase의 활성이 glutamate dehydrogenase의 활성에 비해 현저히 낮기 때문에 가능했었다. 이 후 글루탐산을 포함한 모든 아미노산 및 핵산 생산에 사용되는 고생산성 균주는 코리네형 미생물에 인공변이 처리를 하여 겉가지 반응 경로가 차단된 영양 요구성과 최종 산물에 대한 아나로그 내성이라는 두 가지의 특징을 갖는 변이주(혹은 이들의 조합)에 의해 주로 생산되고 있다. 예를 들면, 라이신의 경우에는 homoserine 영양요구성(24)과 s-aminoethyl-L-cysteine(AEC)에 대한 내성(48)이 도입된 변이주를, IMP의 경우에는 adenine과 guanine에 대한 영양요구성(혹은 leaky)(14)과 이들의 아나로그들(예: 6-mercaptopguanine, 8'-azaguanine 등)(27)에 대한 내성을 특징으로 갖는 변이주가 사용되고 있다.

이러한 인공변이 기술을 이용한 고생산성 균주의 제작에 있어서의 많은 성공 사례에도 불구하고, 이 방법에 의한 균주 개발에는 중요하고 심각한 제한이 있어왔다. 즉, genome상에 존

재하는 유전자만을 조작, 변형시킬 수 있기 때문에, 조작할 수 있는 유전자의 수가 제한된다는 것이며, 목적 유전자 이외의 다른 부분에서의 변이를 수반하여 생산 균주의 생리학적 특성 파악이 정확히 이루어지지 않음으로 인해 더 이상의 균주 개량을 어렵게 하는 경우가 종종 있다는 것이다.

재조합 DNA 기술의 사용에 의해, 유전자 copy 수를 여럿으로 늘리고, 유전자 발현을 변형시키며, 목적 단백질의 특성을 변형시키고, 외부 유전자를 도입시키는 등, 세포 내의 목적 대사 경로를 정확히 조절, 통제할 수 있기 때문에, 보다 효율적으로 고생산성 균주를 육종하는 것이 가능해지고 있다. 아미노산 생산균의 제작에 있어서 재조합 DNA 기술의 유용성은 재조합 대장균을 이용한 스테오닌, 라이신, 트립토판 생산에 의해 증명되었다. 스테오닌 생산에 있어서 multicopy plasmid pBR322를 이용해서 *thr* 오페론을 증폭시킨 결과, 스테오닌 생산성이 세배 증가하였다(40). 라이신의 경우에는 라이신 생합성 경로의 주요 효소인 dihydrodipicolinate synthetase (*dapA*)를 pBR322에 클로닝한 결과 생산성을 증가시킬 수 있었다(46). 트립토판의 경우 대장균의 *trp* 오페론을 대장균의 single copy 벡터인 F와 ColIV 클로닝하여 재조합 균주의 anthranilate synthase 역가를 두 배로 증가시켰으며, 따라서 트립토판의 생산도 두 배로 증가하였다(58). Aiba 등은 *trp* 오페론을 multicopy plasmid에 도입하여 트립토판 생산에 있어서의 최적 copy number를 구하였으며, 이 경우 5 copy가 10 copy보다 우세한 결과를 얻었다(1).

그러나 이러한 강력한 도구를 코리네형 미생물에 적용하기 위해서는 코리네형 미생물에 대하여 독자적인 숙주-벡터 시스템을 확립해야 한다. 잘 밝혀진 대장균이나, 고초균의 시스템을 이들 코리네형 미생물에 바로 사용할 수는 없다. 따라서 아미노산 생산균의 제작에 종사하는 많은 연구 그룹들이 이들 코리네형 미생물을 위한 숙주-벡터 시스템을 확립하고자 하는 노력을 수행해 왔으며, 이들 개발된 숙주-벡터 시스템을 이용하여 아미노산 및 핵산 물질의 고생산성 균주를 제작하기 위한 노력의 일환으로 중앙 탄소 대사 경로와 아미노산 생합성 경로에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 논문에서는 *Corynebacterium*, *Brevibacterium* 등의 아미노산생산 코리네형 미생물의 정확한 분류 및 산업적 이용성 등을

고찰하고, 이들 균주에 대한 숙주-벡터 시스템의 개발에 대한 노력과 개발된 숙주-벡터 시스템을 이용한 유전자 분석과 아미노산 생산 균주의 제작에의 적용 등을 살펴보고자 한다.

Corynebacterium의 분류

Corynebacterium屬의 미생물들은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1989)(10)에 기술된 분류법에 의하면 형태적으로 짧은 막대형, 또는 V 자형 등의 불규칙한 모습을 보이며(pleomorphic), 포자를 형성하지 않는 그람양성균의 특징을 갖는 코리네형 미생물(coryneform bacteria)내의 한屬의 미생물이며, 여기에는 Corynebacterium 외에도 Arthrobacter, Brevibacterium, Actinomyces, Bifidobacterium屬 등 22종류의 미생물들이 포함된다.

근래의 DNA hybridization에 의한 관계 연구와 생화학적, 생리학적인 특성 및 세포벽 구조 등에 기초를 둔 연구 결과에 의하면 지금까지 아미노산 및 핵산 관련 물질의 생산 균주로 잘 알려진 B. flavum, B. lactofermentum 등 Brevibacterium屬으로 분류되었던 미생물들과 C. lilium 등의 미생물이 C. glutamicum과 거의 동일한 것으로 여겨지고 있다(30).

실제로 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank database에 기재된 미생물들의 분류에 의하면, Corynebacterium은 원핵미생물(prokaryote)들을 통칭하는 Eubacteria 계열 내의 Firmicutes(그람양성균의 통칭)에 속하며, 이안에서 다시 G+C 함량이 높은 그람 양성균을 의미하는 Actinomycetes綱(class)내의, 코리네형 미생물(coryneform bacteria) 내의 한屬으로 분류되고 있다. 이들 코리네형 미생물에는 Corynebacterium屬 이 외에 Arcanobacterium, Brevibacterium, Curtobacterium, Dermabacter屬의 미생물들만이 포함되며, 과거 CMN group이라 하여 Corynebacterium과 밀접한 것으로 분류되었던 Nocardia, Mycobacterium 등은 별도로 분류되고, Caseobacter는 Corynebacterium과 같은 의미로 사용된다. 또한 Brevibacterium으로 분류되었던 B. lactofermentum과 B. ammoniagenes 균주는 Corynebacterium 속의 각각의 종들로 분류되며, B. flavum, C. lilium, B. divaricatum과 B. lactofermentum의 일부 균주들은 C. glutamicum 균주로 분류된다.

아미노산과 핵산 물질의 생산에 널리 이용되는 Corynebacterium들은 호기성 혹은 통성 혐기성(facultative anaerobe)의 산소 요구성을 보이며, 세포벽의 peptidoglycan의 diamino 성분은 meso-diaminopimelic acid이고, arabinogalactan 중합체와 탄소골격의 길이가 22~36의 mycolic acid 등을 세포벽에 갖는다. 또한 유전물질 내의 G+C 함량은 약 51~65%로서 다소 높은 편에 속한다. C. glutamicum의 염색체 DNA의 크기는 약 2,550 kb로서 대장균 염색체 DNA의 약 4,000 kb에 비하여

작은 크기를 보인다(2).

Corynebacterium의 이용

Corynebacterium이 아미노산 및 핵산 물질의 생산 균주로 널리 사용되는 이유는 다른 미생물들에 비해 몇 가지 확실한 장점을 보유하고 있기 때문이다. 즉, 이들 균주는 endotoxin을 생성하지 않아 인체에 대한 위험성이 상대적으로 적어서 food-grade로 사용 가능하며, 대사 과정이 상대적으로 단순하고, 대장균 등에서 발견되는 효소들의 다중성이 존재하지 않아 생합성 경로의 조절 양상 역시 대장균에 비해 상당히 간단하다. 또한 protease를 포함해 외부로 유출되는 단백질이 거의 없기 때문에 아미노산, 핵산의 공업적 생산시 높은 생산 효율을 보일 수 있다는 장점이 있다. 해당작용의 C-3 중간대사물이 TCA 회로로 유입되는 경로로 NADP-specific malic enzyme이 C. glutamicum에서, phosphoenolpyruvate kinase가 B. flavum에서, biotin-dependent pyruvate carboxylase의 활성이 B. lactofermentum에서 각각 확인되었으며, TCA cycle내의 특히 α -ketoglutarate dehydrogenase의 활성은 glutamate dehydrogenase의 활성의 1/100 정도이기 때문에 Corynebacterium 야생주의 경우에도 글루탐산을 생산하며, 이 때문에 이들이 글루탐산 생산균이라 불려지기도 한다.

이들 코리네형 미생물들의 산업적 이용성에 관하여는, 아미노산과 핵산물질이 Corynebacterium에 의해 생산되는 것 이외에도, 이들 미생물에 의한 cheese 생산(29), steroid conversion(8), terpenoid 산화(60), chloramphenicol 계열의 항생제(corynecin) 생산(54), bacteriocin-like compound의 생산(44), 항암제의 생산(39), 유화제의 생산(61), 및 탄화수소물의 분해(6) 등과 관련된 보고가 있다. 이외에도 최근 이들 균주를 위한 숙주-벡터 시스템의 개발과 함께 외부유전자 발현을 위한 숙주세포로서 Corynebacterium을 사용한 사례가 보고되었다(4,5).

Corynebacterium의 숙주-벡터 시스템의 개발

재조합 DNA 기술을 이들 균주에 적용하기 위한 선결 조치로서 이들 코리네형 미생물에 대한 숙주-벡터 시스템의 개발은 필수적이다. 숙주-벡터 시스템은 DNA를 세포 내로 도입하기 위한 형질 전환법, 유전자 운반체로서의 벡터 개발, DNA 수용체로서의 숙주 세포의 개발 등을 포함한다.

클로닝 벡터와 외부 DNA의 도입은 원형질체 형질전환법(protoplast transformation)(23,49), 전기적 형질전환법(electroporation)(10), transconjugation(52)에 의해 수행된다. 원형질체 형질전환법은 페니실린과 라이소사임에 의해 원형질체를 만든 후 polyethyleneglycol의 존재하에서 형질전환을 수행하는 방법으로써 원형질체의 재생에 시간이 오래 걸리고,

형질전환 효율이 낮다는 단점이 있기 때문에 현재에는 형질전환 효율이 높고 조작이 간편한 전기적 형질전환법이 주로 사용되고 있다. 또한 대장균의 공여균체(donor)로부터 *Corynebacterium* 내로 유전물질을 도입하는 transconjugation 방법이 개발되었으며(52), 이를 이용하여 상동 재조합(homologous recombination)에 의한 특정 유전자가 결여 혹은 치환된 변이체를 제작하였다(53).

벡터가 가져야 하는 특징 중의 하나는 숙주 세포 내에서의 복제능력이다. 지난 10 여년간 이를 위해 2.7 kb부터 160 kb까지 다양한 종류의 코리네형 미생물의 플라스미드들과 파지(phage)들이 분리되어왔다. 일부 플라스미드의 경우는 전체 염기서열 및 복제와 관련된 서열도 규명되었으며(12), 숙주 세포의 분열시 플라스미드의 분배(partition)에 관여하는 서열이 밝혀지기도 하였으나(28), 대부분의 경우 그 기능이 아직 불분명한 상태로 남아있다(cryptic). 벡터의 또 다른 요건인 항생제 내성 marker로서는 *Corynebacterium*에서 유래된 streptomycin, tetracyclin, trimetoprim 내성(55,56), *Streptomyces* 유래의 chloramphenicol 내성과 hygromycin 내성(51), Tn5 에서 유래된 kanamycin 내성(50) 등의 유전자들이 코리네형 미생물에서 성공적으로 발현되었다.

이들 플라스미드들 중 크기가 작고 상대적으로 높은 copy number를 유지하는 플라스미드와 기능이 잘 알려진 대장균 벡터 혹은 고초균의 벡터와의 융합에 의해 shuttle 벡터들이 제작되었으며, 이들은 두 개의 서로 다른 replicon을 한 플라스미드 내에 함유하기 때문에 대장균과 코리네형 미생물 혹은 고초균과 코리네형 미생물에서 자유로운 복제가 가능하다(41). 숙주 세포의 범위가 넓은 transmissible 플라스미드인 RP4의 mob 유전자를 갖는 *C. glutamicum*과 대장균간의 shuttle vector가 제작되었는데, 이는 대장균 공여체의 염색체에 삽입되어 있는 RP4 유도체의 transfer-assisting 기능을 이용해서 코리네형 미생물 내로 conjugation에 의해 DNA를 도입시킬 수 있는 기능을 갖고 있다(transconjugation).

외부 유전자를 이들 코리네형 미생물에서 성공적으로 발현시키기 위해서는 발현 벡터의 개발이 필수적이다. *B. lactofermentum*의 플라스미드인 pAM330의 프로모터와 trimetoprim 내성유전자의 프로모터 등 2개의 프로모터를 이용하는 발현 벡터 개발이 보고되기도 하였으며(55), 대장균의 유발성 프로모터인 lacUV5, tac, P_RL 프로모터들의 유발성이 *B. lactofermentum*에서 성공적으로 발현되었지만(59), 이들 코리네형 세균으로부터 유래된 강력한 유발성 프로모터의 보고는 아직 없다. 이 밖에도 *B. lactofermentum* 파아지로부터 유래된 cos 부위를 도입한 cosmid 벡터에 관한 보고도 있지만(41), 실제 사용여부는 불투명하다.

일반적인 숙주-벡터 시스템에서 외부 DNA에 대한 제한효소 활동성을 감소시키는 것은 높은 형질전환 효율을 얻기 위
생물산업

한 필수적인 요건이다. 이를 위해 NTG-돌연변이에 의해 restriction-결여 변이주를 구하고자 하는 노력이 있어왔으며, 실제로 이렇게 얻어진 균주에 대한 형질전환 효율을 높인 보고도 있다(31). 하지만 이 균주의 어떠한 restriction system이 결여되었는지에 관한 구체적인 보고는 미흡한 실정이다. 또한 세포에 도입된 외부 DNA의 변형을 억제해서 유전적으로 안정적인 숙주 세포를 제작하고자 하는 목적으로 *Corynebacterium*의 recA 유전자가 클로닝되었다(3).

코리네형 미생물의 숙주-벡터 시스템의 응용사례

유전자 분석

코리네형 미생물의 재조합 DNA 기술의 개발이 가장 중요하게 기여한 것은 유전적 분석도구로서였다. 이 분야에서 숙주-벡터 시스템의 첫 응용 사례는 *B. lactofermentum*의 염색체로부터 클로닝된 *trp* 오페론의 분석이었다. 이 오페론의 7222 bp의 염기서열 내에는 7개의 ORF가 존재했으며(34), *trpL*이라 명명된 ORF-1은 17개의 아미노산을 코드했고, 여기에는 세 개의 인접한 트립토판이 존재하는데, 이는 *trp* 오페론의 attenuation을 위한 leader peptide로 추정되었다. 나머지 ORF 들은 Complementation test에 의해 *trpE*, *trpG*, *trpD*, *trpB*, *trpA*로 밝혀졌다. 이들 peptide 들의 중요한 특징은 트립토판 잔기가 상대적으로 적다는 것이며, *trpE*, *trpG*, *trpA*에는 트립토판 코돈이 없고, 나머지는 1% 미만으로 존재하는데 이는 이들 효소들의 합성이 트립토판 결여시 유도될 수 있다는 것을 추정 가능케 해준다. 이들 coding sequence의 앞에는 대장균의 리보솜 결합 부위인 Shine-Dalgarno 서열과 유사한 서열이 존재하고, *B. lactofermentum trp* 오페론의 코돈 사용 경향은 코돈의 세 번째 위치에서 C를 사용하는 경향이 높았다. 트립토판 유전자들의 배열순서, Harr plot, hydrophilicity 등 구조적 유사성을 다른 미생물들의 경우와 비교한 결과, 그람 양성인 *B. lactofermentum*는 그람 양성인 고초균보다는 그람 음성 미생물들의 경우와 더 높은 유사성을 보였다.

트립토판 유전자 cluster의 5'-과 3'-flanking region을 분석한 결과, *trpL* 유전자의 32-bp 상부에 위치한 프로모터를 찾았으며, 이 프로모터의 -35와 -10부위의 TACACA 와 AATAAT 서열은 대장균 *trp* 프로모터와 유사하였다. *trpE* 유전자의 상부에 대장균의 경우와 유사한 attenuation 서열과 유사한 서열이 발견되었으며, 이 위치에서의 염기서열 변화에 의해 anthranilate synthase와 anthranilate phosphoribosyltransferase 역가가 높아지는 것으로 보아 생체내에서도 attenuator로 작동하는 것으로 보인다. *trp* 오페론의 3'-flanking 부위에서는 대장균의 경우와 유사한 ρ -independent terminator가 발견되었다(35).

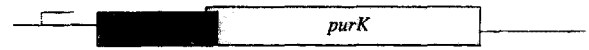
퓨린 생합성 경로의 *purF* 유전자와 *purK-purE* 유전자가 *B. ammoniagenes* 균주로부터 클로닝 되었다(7,15). 퓨린 생합성

경로의 첫 단계의 효소인 5'-phosphoribosyl-1'-pyrophosphate (PRPP) amidotransferase를 코딩하는 *purF* 유전자는 핵산물질 생산균주의 제작에 도입되는 아나로그인 6-mercaptopguanosine(MG) 내성을 선별마커로 이용해서 클로닝되었으며, 구조상으로 고초균의 PRPP amidotransferase와 높은 유사성을 보였다. 또한, 아나로그인 MG 내성은 PRPP amidotransferase 효소 자체의 유전적 변화에 기인하며, 구체적으로는 *purF* 구조유전자의 염기서열이 두 위치에서 변화되고 이에 따라 PRPP amidotransferase 효소의 아미노산 서열이 두 위치에서 변화됨으로써 이 효소가 최종 산물인 GMP에 의한 feedback inhibition으로부터 해제되는 데에 기인하였다. 또 다른 유전자인 *purK-purE*는 생합성 경로의 여섯 번째 단계인 5'-phosphoribosyl-5'-aminoimidazole carboxylase를 코딩하는 효소로서, 촉매 기능을 하는 *purE* 유전자의 산물과 정확한 기능이 밝혀지지 않은 *purK* 유전자의 산물이 결합된 형태로 존재한다. 이 유전자는 hypoxanthine의 영양 요구성을 갖는 *B. ammoniagenes* 변이주의 complementation에 의해 클로닝되었다. 이 두 유전자의 배열 상태는 미생물과 고등 생물 등 알려진 모든 생물체에서 다르게 나타나는데, *B. ammoniagenes*의 경우에는 대장균, 고초균 등의 미생물과 효모, 식물체 등의 고등 생물의 중간체적인 형태를 보이는 것으로 보아 *B. ammoniagenes* 균주의 진화적인 위치를 가늠케 해준다(Fig. 1).

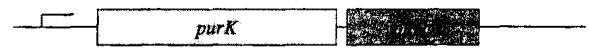
최근 코리네형 미생물의 translation, transcription의 start signal과 관련된 프로모터 서열에 관한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다. Martin 그룹에서는 프로모터의 염기서열이 제거된 chloramphenicol acetyltransferase 유전자(*cat*), 혹은 Tn5 유래의 프로모터의 염기서열이 제거된 kanamycin phosphotransferase 유전자(*aphII*)를 reporter로 하는 promoter-probe vector를 제작하여 이들 코리네형 세균의 전사 개시 서열의 특성을 분석하였다(32). 대부분의 대장균 프로모터들이 코리네형 미생물에서 성공적으로 발현되고, 또한 염기 서열상 일부 유사한 점이 존재하는 것으로 보아 *B. lactofermentum* RNA polymerase의 인식 부위가 대장균 효소의 인식 부위와 유사한 것으로 보인다. 즉, -10 위에서는 대장균의 consensus와 유사한 염기서열이 이들 코리네형 프로모터에 존재하고, -35 위치에서는 일부 유사한 염기서열을 보이는 프로모터도 있지만 그렇지 않은 것들도 존재한다. 그람 양성균의 프로모터에 흔히 존재하는 특징인 -41~-45위치의 'A-cluster', -16~-15 위치의 dinucleotide sequence 'TG', -10 region 아래쪽에 위치하는 conserved A와 T 잔기의 존재등의 특징들 중에서 TG 구조만이 코리네형 프로모터에 존재한다.

Sinsky 그룹에서는 deletion analysis와 S1 nuclease mapping에 의해 putative promoter sequence의 위치를 결정하고, 이들을 align시켜 나름대로의 *Corynebacterium*의 consensus promoter sequence를 결정하였다(37). 이들에 의하면 코리네형

E. coli and *B. subtilis*



B. ammoniagenes ATCC6872



S. cerevisiae, *S. pombe* and *V. aconitifolia*

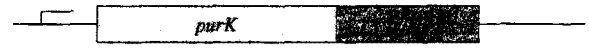


Fig. 1. Schematic illustration of the organization of *purE* locus, *purK* and *purE*, from several organisms. Arrows indicate the transcription direction of *purK* and *purE*, respectively.

프로모터의 consensus sequence는 대장균, 고초균의 경우와 같이 -10 위치의 conserved hexameric motif인 5'-TATAAT-3'를 갖지만, -35 위치에서는 어떠한 conserved sequence가 발견되지 않고 대신에 염기 서열상 purine 잔기들이 많이 존재한다. 또 다른 특징으로는 -20 위치에 conserved motif인 5'-TGTGT-3'의 서열을 갖는다. 이들 -10 motif, -35 purine richness, -20 TGTGT motif는 변이 연구에 의해 모두 *C. glutamicum*의 promoter strength에 중요한 영향을 미치는 것이 밝혀졌다.

한편 Sahn 그룹에서도 클로람페니콜 내성 유전자를 이용해 promoter-probe 벡터를 제작하고 이를 이용해 *C. glutamicum*의 프로모터들을 클로닝하고 분석한 결과, 분리된 모든 프로모터들이 대장균에서 발현 가능하며, 대장균이나, 고초균과 같이 전사 개시점 상부 35 bp 위치의(ttGcca)와 10 bp 상부 위치의(TA.aaT) 보존서열을 갖고 있다. 그러나, 대장균, 고초균의 경우와는 달리 *C. glutamicum* 프로모터의 경우 -35 위치에서의 서열 보존성은 매우 낮다(45).

아미노산 생산균의 육종

클로닝된 유전자들을 이용해서 생합성 경로상 병목 부위의 효소 활성을 향상시키거나, 생합성 경로에서 산물에 의한 주요 조절 효소의 조절을 해제시킴으로써 목적 대사물의 생산성이 증가된 균주를 제작하는데 재조합 DNA 기술은 매우 유용하게 사용될 수 있다.

이러한 예를 다음에 열거하는 아미노산의 경우를 예로 들어 보기로 하겠다.

(1) 스테오닌

B. lactofermentum 균주로부터 스테오닌 아나로그인 α -amino- β -hydroxyvaleric acid(AHV)에 대한 내성의 homoserine dehydrogenase(HD) 유전자를 클로닝하여, 스테오닌 생산 균주에 도입한 결과 HD 역가가 2배 증가하였으며, 스테오닌 생산이 17.5 g/l에서 25 g/l로 증가하였고, 라이신 생산이 12 g/l에서 1.1 g/l로 감소하였다(42). 이때 호모세린 생산 역시 0.5 g/l

에서 2.8 g/l로 증가하였으며, 이는 이 재조합 균주에 의한 스테오닌 생산에 있어서의 제한단계는 homoserine kinase(HK)임을 의미한다. 따라서 생산성을 더욱 높이기 위해서는 HK 유전자의 증폭이 필수적이다. HK 유전자를 클로닝하여, 도입한 결과, 자체로는 스테오닌 생산을 증가시키지 못했으나, HD와 함께 도입되었을 때는 스테오닌 생산이 33 g/l로 증가되었다. 두 유전자를 한 숙주 세포 내에 존재하도록 하기 위해 compatible한 두 종류의 벡터에 각 유전자를 클로닝하여 도입하는 방법을 사용하였다. Ishida 등은 *B. flavum* 균주에 대장균의 *thr* 오페론을 도입해서 효소 역가가 발현되는 것을 확인했으며, 균주의 스테오닌 생산성을 높였다(17). *B. lactofermentum* 재조합 균주의 발효시 문제점인 플라스미드의 안정성(stability) 저하에 의해 재조합 플라스미드의 효과가 최대한 발현되지 못하는 것을 배지 성분 및 무기염의 최적화에 의해 해결하여 스테오닌의 생산성을 높인 보고도 있다(18).

(2) 라이신

라이신 생합성에 있어서 가장 중요한 효소는 aspartokinase(AK)로서, 변이에 의해 라이신과 스테오닌에 의한 feedback inhibition이 해제되면 라이신 생산성이 월등하게 향상된다. Tierbach 등은 AEC 내성과 라이신 분비능을 부여하는 *C. glutamicum* DNA 단편을 클로닝했으나, 재조합 균주의 specific AK 역가는 숙주 세포의 경우와 거의 같았고, 반면에 feedback inhibition의 정도는 숙주와 donor의 중간 정도였다(57). Kalinowski 등은 이의 염기 서열을 규명하여, COOH 말단 쪽 절반의 *lysC*와 전체의 aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase(*asd*) 유전자를 찾아내었으며(22), AEC 내성은 *lysC*의 COOH 말단 부분에 기인하는 것으로 추정하였다. 이 플라스미드를 사용해서 숙주세포의 *asd* 효소 역가를 30~60배 증가시킬 수 있었다. Menkel 등은 *C. glutamicum aspA* (aspartase) 유전자를 클로닝해서 aspartokinase에 대한 기질 공급의 연구를 하였다(38). 결과 숙주세포의 라이신 생산성은 30 mM에서 최대 68 mM까지 증가하였다. 라이신 생합성 경로의 주요 효소인 dihydrodipicolinate synthase(DDPS) (*dapA*)에 대해서는 *C. glutamicum*의 *dapA* 유전자가 Cremer 등에 의해 클로닝되었으며(9), 여기에는 *dapB* (dihydrodipicolinate reductase, DDPR)가 동시에 존재하였다. *C. glutamicum*내에서 이 플라스미드에 의해 DDPS 역가가 15배 증가하였고, DDPR 역가는 28배 증가시킬 수 있었다. 대장균과 코리네형 미생물의 라이신 생합성 경로의 한가지 큰 차이점은 meso-diaminopimelate-D-dehydrogenase(DDH) (*ddh*)가 코리네형 세균에는 존재하고, 대장균에는 존재하지 않는다는 것이다. 이효소는 L- α -amino- ϵ -ketopimelate에서 meso-diaminopimelate에 이르는 경로를 우회시키는 여분의 효소이다. Isino 등은 *C. glutamicum ddh* 유전자를 클로닝하고 염기서열을 밝혔다(19).

(3) 방향족 아미노산

생물산업

트립토판, 페닐알라닌, 티로신 생합성 경로에 공통적으로 작용하는 dehydroquinone synthase(DQS)의 유전자 (*aroL*), shikimate kinase(SK)의 유전자 (*aroB*), 그리고 shikimate dehydrogenase(SKD)의 유전자(*aroE*)들이 한 개의 DNA 절편으로 동시에 클로닝되었다. 이들 유전자들을 포함하는 플라스미드에 의해 host 균주의 해당 효소의 역가가 SK는 12배, SKD는 3배 증가하였으며, *B. lactofermentum* 재조합 균주의 트립토판 생산성을 1.6 g/l에서 4.2 g/l로 증가시켰다(33). Ikeda 등은 트립토판 생산 *C. glutamicum* 변이주에 조절 해제된 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase와 트립토판 생합성 유전자들을 도입하고 또한 발효 후반부에 축적되어 세포에 유해한 indol의 과량 축적을 억제하기 위한 목적으로 d-phosphoglycerate dehydrogenase를 같이 도입해서 50 g/l의 트립토판을 61%의 수율로 생산할 수 있었다(16). 티로신을 생산하는 *B. lactofermentum* 변이주에서 *aroL* 재조합 균주의 티로신 생산성은 17.4 g/l에서 21.6 g/l로 증가하였고 또 다른 유사한 재조합 균주에서는 티로신 생산을 6.8 g/l에서 21.6 g/l로 증가시켰으며, 부수적으로 페닐알라닌의 생산성을 5.5 g/l에서 6.9 g/l로 증가시켰다(36).

*Brevibacterium*과 *Corynebacterium*에서 페닐알라닌 생산에 DS, chorismate mutase(CM), prephenate dehydrogenase(PD) (*pheA*) 등의 세단계의 제한 단계가 존재하며, 이들 중 PD는 페닐알라닌 특이 경로의 첫 단계 효소이다. *B. lactofermentum*로부터 *pheA* 유전자를 클로닝하였으며, 이에 의해 재조합 균주의 PD 역가가 15배 증가하였고, 페닐알라닌 생산이 4.2 g/l에서 11.8 g/l로 증가하였다. 상호 compatible한 두 종류의 플라스미드를 사용하여 *pheA* 유전자와 DS 유전자를 한 재조합 균주에 동시에 형질전환시킨 결과, 페닐알라닌 생산성이 5.5 g/l에서 18.2 g/l로 증가하였다(20). *C. glutamicum*의 *pheA* 유전자는 315개의 아미노산을 코딩하며, 대장균의 chorismate mutase-P-prephenate dehydrogenase 복합체의 COOH 말단 2/3 부위와 26%의 높은 homology를 보인다(13).

(4) Phosphoenolpyruvate Carboxylase

상호 공존이 가능한 compatible vector의 사용으로 여러 유전자가 함께 존재하는 system의 제작이 가능해지고, 이들 시스템에 의한 스테오닌 생합성의 제한 단계를 단계적으로 제거하는 것이 성공함으로써 원료 물질로부터 높은 효율로 대사물을 축적하는 미생물을 제작하는 것이 가능해졌다.

아미노산 생산을 늘리는 다른 시도로서 아미노산 생합성 경로의 시발 물질의 공급을 늘리려는 노력이 있었다. TCA 회로의 구성 성분인 oxaloacetate(OAA)는 amination에 의해 아스파르트산으로 전환되고, 계속해서 이 아스파르트산은 라이신, 메치오닌, 스테오닌, 이소루이신 등의 아스파르트산 계열의 아미노산들의 시발물질로 작용한다. 게다가, OAA는 acetyl-CoA와 의 축합에 의해 citrate를 생성하는 기질로서도 매우 중요하다.

글루탐산 계열의 아미노산들인 글루탐산, 알지닌, 프롤린 등이 citrate로부터 -ketoglutarate를 거쳐서 합성된다. 따라서 중앙 탄수화물 대사 경로의 phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) 유전자(ppc)의 클로닝에 의해 oxaloacetate (OAA)의 합성을 증가시켜 아스파르트산과 글루탐산 계열의 아미노산들의 생산성을 증가시키코자 하는 노력이 수행되었다. *B. lactofermentum*의 PEPC 역가가 감소된 변이주를 수용체로 하여 *B. lactofermentum*의 ppc 유전자를 클로닝하였다. 이렇게 해서 얻어진 플라스미드는 매우 낮은 copy 수를 갖지만(1-2), PEPC 효소역가를 1.5배 증가시켰으며, 일부 아미노산 생산을 증가시켰다. 예를 들면, 프롤린 생산 균주의 생산성이 10.5 g/l에서 18.0 g/l로 증가하였으며, 스테오닌 생산 균주의 생산성은 15.4 g/l에서 17.3 g/l로 증가하였다(47). *C. glutamicum*의 ppc 유전자는 대장균 ppc 결여 변이주를 이용해서 클로닝하였다. 이는 919개의 아미노산을 코딩하고 별도의 프로모터와 terminator를 갖는 독립된 유전자이다(11). *C. glutamicum* 균주에서 ppc 유전자 증폭에 의해 효소 역가가 13배 증가하였으며, 또한 라이신 생산을 10~15% 증가시켰다(43).

결 론

상기와 같이 코리네형 미생물의 숙주-벡터 시스템의 개발에 힘입어 이들 균주로부터 여러 유전자들이 클로닝되었으며 또한 이들 클로닝된 유전자들을 이용하여 아미노산 생합성 경로의 주요 조절 부위의 효소 활성을 증가시키려는 노력이 있어 왔으나 해당 부위 이외의 알려지지 않은 다른 제한 단계의 존재 등의 이유로 인해 산업적으로 유용한 고생산성 균주 제작이 성공적으로 이용된 사례는 트립토판의 경우를 제외하고는 매우 드문 실정이다.

실제로 NCBI의 GenBank database에 등록된 *Corynebacterium*의 유전자는 270여 건으로서, 이 중 아미노산 생합성 관련 유전자는 41건, 중앙 탄수화물 대사 관련 유전자는 15건, 아미노산 막 투과 및 전달 관련 유전자 9건 등이 등록되어 있다. 이러한 수치는 대장균 유전자가 4300여건, 고초균의 유전자가 900여건 등록되어 있는 것에 비교하여 볼 때 매우 낮은 수치임을 알 수 있다.

코리네형 미생물에 대한 기초지식의 일부로서 이들 미생물의 전체 염색체의 제한효소 지도를 작성해야 할 것으로 사료된다. 대장균의 경우에는 각각의 5-과 3-말단에서 서로 겹쳐지는 클론을 갖는 모든 phage의 3400개의 대장균 염색체 DNA 조각의 bank를 제작해서, 전체 대장균 염색체 DNA의 모든 부위에 대한 정보를 확보할 수 있었다(26). Bak 등에 의해 보고된 바 대로(2), 코리네형 세균의 염색체의 크기는 대장균의 경우에 비해 약 2/3 정도이기 때문에 코리네형 미생물의 chromosomal gene bank를 제작하는 것은 그리 어렵지는 않을 것

이다. 게다가 전체 염색체의 염기 서열을 밝히는 것도 이 분야에 종사하는 산업체의 협동적 노력이 있다면 가능할 것으로 사료되는 바이다.

이러한 점 이외에도, 비록 많은 종류의 벡터가 개발되었다고는 하지만, 대장균에 비교해 볼 때는 low-, high copy number vector, cosmid, runaway vector, mini-mu-like vector 등 더 많은 벡터의 개발이 필요하며, 관계되는 모든 유전자의 클로닝외에도, 유전자 copy 수의 최적화, 프로모터 조작에 의한 유전자 발현의 개선, 클론의 안정적 유지, 그리고 세포내 중간대사물의 정확한 분석 방법 확립에 관한 문제 등이 재조합 DNA기술에 의해 성공적으로 아미노산, 핵산 생산 균주를 육종하기 위해 수반되어야 할 것으로 생각된다. 실제로 재조합 DNA 기술에 의한 아미노산 균주 육종의 성공적인 사례라 할 수 있는 트립토판의 경우도(16) 해당 유전자가 최초로 클로닝된지 7년 만에 얻어진 결과이다. 즉, 유전자의 도입에 의해 세포내의 대사변화를 측정하여, 다른 제한 단계를 찾아내는 일들을 반복적으로 수행하여 얻어진 결과로서 각 단계에서 중간대사물의 정확한 측정은 필수적이라 하겠다.

참고문헌

1. Aiba, S., H. Tsunekawa, and T. Imanaka, (1982). New approach to tryptophan production by *E. coli*: genetic manipulation of composite plasmids *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 289-297.
2. Bak, A. L., C. Christiansen, and A. Stenderup, (1970). Bacterial genome sizes determined by DNA renaturation studies. *J. Gen. Microbiol.* **64**, 377-380.
3. Billman-Jacobe, H. (1994). Nucleotide sequence of a *recA* gene from *Corynebacterium glutamicum*. *DNA sequence*, **4**, 403-404.
4. Billman-Jacobe, H., A. L. M. Hodgson, M. Lightowlers, P. R. Wood, and A. J. Radford, (1994). Expression of ovine γ -interferon in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1641-1645.
5. Billman-Jacobe, H., L. Wang, A. Kortt, D. Stewart, and A. Radford, (1995). Expression and secretion of heterologous protease by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1610-1613.
6. Cardini, G., and P. Jurtshuk, (1970). The enzymatic hydroxylation of n-octane by *Corynebacterium* sp. strain 7ECIC. *J. Biol. Chem.* **245**, 2789-2796.
7. Chung, S.-O., J.-H. Lee, S. Y. Lee, and D.-S. Lee, (1996). Genomic organization of *purK* and *purE* in *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC6872: *purE* locus provides a clue for genomic evaluation. *FEMS Microbiol. Lett.* **137**, 265-268.
8. Constantinides, S., (1980). Steroid transformation at high substrate concentrations using immobilized *Corynebacterium simplex* cells. *Biotechnol. Bioengin.* **22**, 119-136.

9. Cremer, J., L. Eggeling, and H. Sahn, (1990). Cloning the *dapA*, *dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **220**, 478-480.
10. Dunican, L. K., and E. Shivan, (1990). High frequency transformation of whole cells of amino acid producing coryneform bacteria using high voltage electroporation. *Bio/Technol.* **7**, 1067-1070.
11. Eikmann, B. J., M. T. Follettie, M. U. Griot, and A. J. Sinskey. (1989). The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression. *Mol. Gen. Genet.* **218**, 330-339.
12. Fernandez-Gonzalez, C., R. F. Cadenas, M. F. Noirot-Gros, J. F. Martin, and J. A. Gil, (1994). Characterization of a region of plasmid pBL1 of *Brevibacterium lactofermentum* involved in replication via the rolling circle model. *J. Bacteriol.* **176**, 3154-3161.
13. Follettie, M. T., and A. J. Sinskey, (1986). Molecular cloning and nucleotide sequence of the *Corynebacterium glutamicum pheA* gene. *J. Bacteriol.* **167**, 692-702.
14. Furuya, A., S. Abe, and S. Kinoshita, (1968). Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes, XIX. Accumulation of 5-inosinic acid by a mutant of *Brevibacterium ammoniagenes*. *Appl. Microbiol.*, **16**, 981-987.
15. Han, J.-K., S.-O. Chung, J.-H. Lee, and S. M. Byun, (1997). 6-Mercaptoguanosine resistance is related with *purF* gene encoding 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate amidotransferase in inosine-5-monophosphate overproducing *Brevibacterium ammoniagenes*. *Biotechnol. Lett.* **19**, 79-83.
16. Ikeda, M., K. Nakanishi, K. Kino, and R. Katsumata, (1994). Fermentative production of tryptophan by a stable recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* with a modified serine-biosynthetic pathway. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 674-678.
17. Ishida, M., E. Yoshino, R. Makihara, K. Satoh, H. Enei, and S. Nakamori, (1989). Improvement of an L-threonine producer derived from *Brevibacterium flavum* using threonine operon of *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2269-2271.
18. Ishida, M., H. Kawashima, K. Sato, K. Hashiguchi, H. Ito, and H. Enei, and S. Nakamori, (1994). Factors improving L-threonine production by a three L-threonine biosynthetic genes-amplified recombinant strain of *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 768-770.
19. Isino, S., T. Mizukami, K. Yamaguchi, R. Katsumata, and K. Akari, (1988). Cloning and sequencing of the meso-diaminopilelate-D-dehydrogenase gene from *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2903-2909.
20. Ito, H., K. Sato, K., K. Sano, H. Enei, and Y. Hirose, (1990) Molecular breeding of a L-phenylalanine producer using a cloned prephenate dehydrogenase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 190-195.
21. Jones, D., and Collins, M. D., (1986). Irregular nonsporulating Gram-positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp.1261-1434, Baltimore, Williams and Wilkins.
22. Kalinowski, J., B. Bachmann, G. Tierbach, and A. Puhler, (1990). Aspartokinase genes *lysC* and *lysC* overlap and are adjacent to the aspartate β -semialdehyde dehydrogenase gene *asd* in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 317-324.
23. Katsumata, R., A. Ozaki, T. Oka, and A. Furuya, (1984). Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **159**, 306-311.
24. Kinoshita, S., K. Nakayama, and S. Kitada, (1958). L-Lysine production using microbial auxotroph. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **4**, 128-133.
25. Kinoshita, S., S. Uda, and M. Shimono, (1957). Amino acid fermentation, I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**, 193-205.
26. Kohara, Y., K. Akiyama, and K. Isono, (1987). The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell*, **50**, 495-508.
27. Konishi, S., and T. Shiro, (1968). Fermentative production of guanosine by 8-azaguanine resistant of *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* **32**, 396-398.
28. Kurusu, Y., Y. Satoh, M. Inui, K. Kohama, M. Kobayashi, M. Terasawa, and H. Yukawa, (1991). Identification of plasmid partition function in coryneform bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 759-564.
29. Lee, C. W., S. Lucas, and M. J. Desomazeaud, (1985). Phenylalanine and tyrosine catabolism in cheese coryneform bacteria. *FEMS Microbio. Lett.* **25**, 201-205.
30. Liebl, W., M. Ehrmann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer, (1991). Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 2029T, *Brevibacterium flavum* DSM 20411, *Brevibacterium lactofermentum* DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20317 to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rDNA gene restriction patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 255-264.
31. Lin, L.-S., and Y.-S. Chiou, (1993). Isolation of restriction deficient mutant for *Corynebacterium glutamicum* by electroporation. *Biotechnol. Lett.* **7**, 823-826.
32. Martin, J. F., (1989). Molecular genetics of amino acid producing corynebacteria. in I. Hunter and M. Rhodes (ed.), Society for General Microbiology Symposium 44, Cambridge University Press, Cambridge. pp. 25-59.
33. Matsui, K., K. Miwa, and K. Sano, (1988). Cloning of gene cluster of *aroB*, *aroE*, and *aroL* for aromatic amino acid biosynthesis in *Brevibacterium lactofermentum*, a glutamic acid producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 525-531.
34. Matsui, K., K. Sano, and E. Ohtsubo, (1986). Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of the *Brevibacterium lactofermentum* tryptophan operon. *Nucleic A-*

- cids Res.* **14**, 10113-10114.
35. Matsui, K., K. Sano, and E. Ohtsubo, (1987). Sequence analysis of the *Brevibacterium lactofermentum trp operon*. *Mol. Gen. Genet.* **209**, 299-305.
 36. Matsui, K., M. Ishida, M. Tsuchiya, and K. Sano, (1988). Construction of tryptophan-producing recombinant strains of *Brevibacterium lactofermentum* using the engineered *trp* operons. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1863-1865.
 37. McCormick, M. M., M. T. Follettie, and A. J. Sinskey, (1993). Characterization of the structure/function relationships of *Corynebacterium glutamicum* promoters. 93rd, ASM General Meeting, p.331.
 38. Menkel, E., G. Tierbach, L. Eggeling, and H. Sahm, (1989). Influence of increased aspartate availability in lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 684-688.
 39. Milas, L., and M. T. Scott, (1978). Antitumor activity of *Corynebacterium parvum*. *Advances in Cancer Research*, **26**, 257-306.
 40. Miwa, K., T. Tsuchida, O. Kurahashi, S. Nakamori, K. Sano, and H. Momose, (1983). Construction of L-threonine overproducing strains of *E. coli* K-12 using recombinant DNA technologies. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2329-2332.
 41. Miwa, K., K. Matsui, M. Tanabe, K. Ito, M. Ishida, H. Takagi, S. Nakamori, and K. Sano, (1985). Construction of novel shuttle vector and a cosmid vector for the glutamic acid producing bacteria *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, **39**, 281-286.
 42. Nakamori, S., M. Ishida, H. Takagi, K. Ito, K. Miwa, and K. Sano, (1987). Improved L-threonine production by the amplification of the gene encoding homoserine dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Agri. Biol. Chem.* **51**, 87-91.
 43. O'Regan, M., G. Tierbach, B. Bachmann, D. Villeval, P. Lepage, J.-F. Viret, and Y. Lemoine, (1989). Cloning and nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxylase-coding gene of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Gene*, **77**, 237-244.
 44. Patek, M., J. Hochmannova, J. Nesvera, and J. Stransky, (1986). Glutamycin, a bacteriocin-like substance produced by *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **52**, 129-140.
 45. Patek, M., B. J. Eikmanns, J. Patek, and H. Sahm, (1996). Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiol.* **142**, 1297-1309.
 46. Reverend, B. D., M. Boitel, A. M. Deschamps, J.-M. Lebeault, K. Sano, K. Takinami, and J.-C. Patte, (1982). Improvement of *E. coli* strains overproducing lysine using recombinant DNA techniques. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **15**, 227-230.
 47. Sano, K., K. Ito, K. Miwa, and S. Nakamori, (1987). Amplification of the phosphoenol pyruvate carboxylase gene of *Brevibacterium lactofermentum* to improve amino acid production. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 597-599.
 48. Sano, K., and I. Shiio, (1970). Microbial production of L-lysine III. Production by mutants resistant to S-(2-aminoethyl)-L-cysteine. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**, 373-378.
 49. Santamaria, R. I., J. A. Gil, and J. F. Martin, (1984). High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **162**, 463-467.
 50. Santamaria, R., J. A. Gil, J. M. Mesas, and J. F. Martin, (1984). Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 2237-2246.
 51. Santamaria, R., J. F. Martin, and J. A. Gil, (1987). Identification of a promoter sequence in the plasmid pUL340 of *Brevibacterium lactofermentum* and construction of new cloning vectors for corynebacteria containing two selectable markers. *Gene*, **56**, 199-208.
 52. Schaffer, A., J. Kalinowski, R. Simon, A.-H. Seep-Feldhaus, and A. Puhler, (1990). High-frequency conjugal plasmid transfer from Gram-negative *Escherichia coli* to various Gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 1663-1666.
 53. Schwarzer, A., and A. Puhler, (1991). Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Bio/Technol.*, **9**, 84-87.
 54. Suzuki, T., Honda, H., and R. Katsumata, (1972). Production of antimicrobial compounds analogous to chloramphenicol by n-paraffin-grown bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 2223-2228.
 55. Takagi, H., Y. Morinaga, K. Miwa, S. Hakamori, and K. Sano, (1986). Versatile cloning vectors constructed with genes indigenous to a glutamic acid producer *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2597-2603.
 56. Takeda, Y., M. Fujii, Y. Nakajyoh, T. Nishimura, and S. Isshiki, (1990). Isolation of a tetracycline resistance plasmid from a glutamate producing *Corynebacterium melassecola*. *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 117-122.
 57. Tierbach, G., J. Kalinowski, B. Bachmann, and A. Puhler, (1990). Cloning of a DNA fragment from *Corynebacterium glutamicum* conferring aminoethyl cysteine resistance and feedback resistance to aspartokinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 443-448.
 58. Tribe, D. E., and J. Pittard, (1979). Production of tryptophan by *E. coli*: genetic manipulation of the pathways leading to tryptophan formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 181-188.
 59. Tsuchiya, K., and Y. Morinaga, (1988). Genetic control sys-

- tems of *Escherichia coli* can confer inducible expression of cloned genes in coryneform bacteria. *BioTechnol.* **6**, 428-430.
60. Yamada, Y., C. Won Seo, and H. Okada, (1985). Oxidation of a cyclic terpenoides by *Corynebacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 960-963.
61. Zajic, J. E., H. Guinard, and D. F. Gerson, (1977). Emulsifying and surface active agents from *Corynebacterium hydrocarboclastum*. *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 1295-1301.