

*Brevibacterium lactofermentum*에서 *ddh* 유전자의 Overexpression이 L-Lysine 생산에 미치는 영향

박선희 · 김옥미 · 김현정 · 배준태 · 장종선 · 이갑량
영남대학교 식품영양학과

Influence on Lysine Production by Overexpression of the *ddh* Gene in a Lysine-producing *Brevibacterium lactofermentum*

Sun-Hee Park, Ok-Mi Kim, Hyun-Jeong Kim, Jun-Tae Bae,
Jong-Sun Chang and Kap-Rang Lee
Department of Food & Nutrition, Yeungnam University

Abstract

The *ddh* gene encoding *meso*-DAP-dehydrogenase (DDH) involved in the dehydrogenase pathway is essential for high-level lysine production in *Brevibacterium lactofermentum*. To investigate its influence on lysine production by overexpression of the *ddh* gene in a lysine-producing *B. lactofermentum*, recombinant plasmid pRK1 and pRK31 containing the *ddh* gene of *B. lactofermentum* were constructed and they were introduced into *B. lactofermentum* by electroporation. Multiple copies of pRK1 and pRK31 caused 7-fold and 14-fold increase of DDH activity in *B. lactofermentum* cell extracts, respectively. As determined in shake flask fermentation, lysine production of *B. lactofermentum* harboring pRK1 or pRK31 was 22% or 19% higher than that of the control, respectively.

Key words: *Brevibacterium lactofermentum*, *ddh* gene, overexpression, L-lysine production

서 론

L-Lysine은 필수아미노산으로서 곡류에 부족한 lysine의 공급을 위한 식품첨가제로 이용될 뿐만 아니라 가축의 성장 촉진을 위한 사료첨가용으로 사용되고 있어 그 수요가 증가하고 있다.

산업적인 L-Lysine 발효생산은 *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium glutamicum*, 그리고 *Brevibacterium flavum* 등과 같은 coryneform 미생물의 변이주를 주로 이용하고 있으며, 이들 균주의 아미노산 생산성 향상을 위하여 균주자체의 특성연구와 함께 고전적인 mutagenesis, 재조합 DNA 제조, 그리고 외부 유전자 도입 등 다양한 기술이 개발되어 이용되고 있다⁽¹⁻⁴⁾.

미생물계에서의 L-lysine 생합성은 서로 다른 3가지 경로를 통하여 일어난다^(5,6)(Fig. 1). 그 중 acetylase 경로 및 succinylase 경로는 중간물질인 tetrahydrodipicolinate (THDPA)로부터 *meso*-diaminopimelate (*meso*-DAP)로

의 전환에 4단계 효소반응을 요구하지만 dehydrogenase 경로는 THDPA로부터 한단계 효소 반응을 거쳐 *meso*-DAP를 생산하며 이때 *meso*-DAP-dehydrogenase (DDH)를 암호화하는 *ddh* gene이 관여한다.

일반적으로 미생물들은 이러한 경로 중 단지 한가지 경로를 통하여 lysine을 생합성 하는 것으로 알려져 있는데^(5,6) *Escherichia coli*를 비롯한 Gram 음성균 및 대부분의 Gram 양성균들은 succinylase 경로로 lysine을 생합성하며⁽⁶⁾, dehydrogenase 경로로의 lysine 생합성은 *Bacillus sphaericus*에서 잘 알려져 있다⁽⁷⁾.

그러나 lysine 생산 균주인 *C. glutamicum* 및 *B. lactofermentum*에서는 두가지 경로 즉 succinylase 경로와 dehydrogenase 경로가 함께 작용하여 lysine을 생합성하며 산업적으로 lysine 발효산업에 널리 이용되고 있다^(8,10). 특히 dehydrogenase 경로는 lysine 생합성에 있어서 acetylase 경로 및 succinylase 경로의 4단계 효소 반응을 한단계로 진행시키며 또한 lysine 생산균주에서 succinylase 경로와 함께 작용하여 lysine을 생합성하므로 높은 수율의 lysine 생성에 기여할 것으로 사료된다.

Schrumpft 등⁽⁹⁾은 *C. glutamicum*에서 dehydrogenase 경

Corresponding author: Kap-Rang Lee, Department of Food & Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

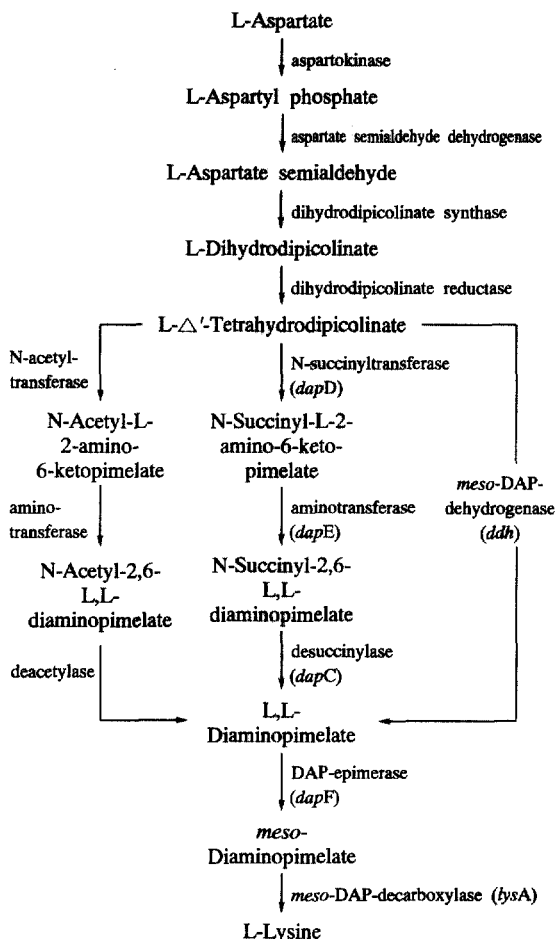


Fig. 1. Biosynthetic pathway of L-lysine in procaryotes. The acetylase pathway (left), succinylase pathway (center), and dehydrogenase pathway (right) are utilized for biosynthesis of lysine in procaryotes.

로를 불활성화시켰을때 대사 중간 물질인 N-succinyl-diaminopimelate의 축적과 동시에 lysine 생산의 감소를 초래한다고 보고하였다. 또한 본 연구자 등도 *B. lactofermentum*의 lysine 생합성 경로에 있어서 dehydrogenase 경로에 많은 관심을 가지고 연구를 하면서 *B. lactofermentum*의 dehydrogenase 경로의 존재를 처음으로 규명하였으며⁽¹⁰⁾ 또한 dehydrogenase 경로에 관여하는 *dhh* gene을 cloning하고 그의 염기서열을 보고 한 바 있다⁽¹¹⁾. 아울러 최근에는 본 연구자 등이 *B. lactofermentum*의 *dhh* gene을 disruption하여 dehydrogenase 경로를 차단시킨 결과, *B. lactofermentum dhh* mutant의 성장 및 lysine 생산량에서 극적인 감소를 초래하므로 *B. lactofermentum*에서의 dehydrogenase 경로는 meso-DAP 및 lysine 생합성에 있어 필수적인 경

로로 작용한다는 것을 확인하였다⁽¹²⁾. 그러므로 *C. glutamicum* 및 *B. lactofermentum*이 lysine을 많이 생산하는 것은 dehydrogenase 경로가 부가적으로 존재하기 때문인 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 lysine 발효산업에 이용되고 있는 *B. lactofermentum*의 lysine 생산성을 증대시키기 위한 일환으로, lysine 생합성에 있어서 필수적으로 작용하는 dehydrogenase 경로에 관여하는 *dhh* gene을 *B. lactofermentum*내에서 증폭시킴으로써 *B. lactofermentum*의 lysine 생성량에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmid

B. lactofermentum KCTC1846 (ATCC21798)⁽¹³⁾은 S-2-aminoethyl-L-cysteine (AEC) 내성변이주로서 재조합 DNA의 숙주세포로 사용하였고, *E. coli* JM109는 plasmid DNA를 안정하게 보관시키는 균주로 사용하였다.

Plasmid pXX14는 전보^(10,11)에 보고한 대로 *dhh* gene을 함유한 재조합 plasmid로 사용하였으며, *B. lactofermentum*-*E. coli* shuttle vector pEB1는 본 연구자 등이 제조하여 본 연구실에 보관중인 것을 사용하였다. 7.1 kb pEB1은 *B. lactofermentum*으로부터 분리된 4.4 kb cryptic plasmid pBL1과 *E. coli* replicon을 가지는 2.7 kb pHSG299가 ligation되어 제조되었으며, *C. glutamicum*-*E. coli* shuttle vector pC1은 Dr. H. Sahn^(14,5)으로부터 분양받았다. 본 실험에 사용한 균주 및 plasmid의 특성은 Table 1과 같다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used

Strain/plasmid	Genotype	Source or reference
<i>B. lactofermentum</i> AEC Nx' ser KCTC1846		KCTC, 19
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB)F. [traD36 proA' proB' lacI' lacZΔM15]</i>	Promega
plasmid pEB1	Km'	Our lab
pJC1	Km'	14, 15
pXX14	Ap' <i>dhh</i> '	10, 11
pRK1	Km' <i>dhh</i> '	This work
pRK31	Km' <i>dhh</i> '	This work

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

배지 및 배양 조건

실험에 사용한 모든 균주 배양에는 LB (Luria-Bertani) 배지⁽⁶⁾를 이용하였으며, 필요에 따라 ampicillin (Ap), kanamycin (Km) 그리고 nalidixic acid (Nx)를 첨가하여 배양 하였다. Lysine 생산을 위한 플라스크 배양은 완전배지 CG III배지⁽⁷⁾에서 48시간 배양한 종배양액을 최소배지 CGX 배지⁽⁷⁾에 재접종한 후, 200 rpm으로 진탕하면서 30°C에서 96시간이상 배양하였다. 또한 jar fermentor (2.5 L, EYELA, Japan) 배양에서는 glucose와 (NH₄)₂SO₄ 농도를 각각 10% 및 4%로 조절된 CGX배지를 사용하였으며 교반속도 400 rpm, 30°C, pH 7.2의 조건으로 96시간이상 배양하였다.

DNA 조작 및 형질전환

*E. coli*로부터 plasmid DNA는 Birnboim and Doly⁽⁸⁾의 alkaline lysis 방법에 따라 추출되었다. 제한효소 절단 및 ligation 반응은 Sambrook 등⁽⁹⁾의 방법에 준하여 수행하였으며 DNA 단편은 투석막을 이용하여 agarose gel 상에서 분리되었다.

*E. coli*의 형질전환은 Sambrook 등⁽⁹⁾의 방법에 따라 수행하였으며, *B. lactofermentum*의 형질전환은 Bonnasie 등⁽¹⁰⁾의 방법에 준하여 2500 voltage에서 electroporation시켰다.

meso-DAP-dehydrogenase (DDH) 활성 측정

DDH 활성측정은 Yeh 등⁽¹¹⁾이 사용한 방법에 따라 배양된 균체를 0.2 M glycine-KCl-KOH buffer (pH 10.5)에 현탁하여 세포를 파괴한 후 원심분리하여 얻은 상층액을 crude extract로 사용하였다. 효소활성은 기질로 10 mM diaminopimelic acid를 사용하였고 조효소로서 0.1 mM NADP가 포함된 0.2 M glycine-KCl-KOH buffer에 crude extract를 첨가하여 마지막 부피를 1 mL로 맞춘다음 37°C에서 30분간 반응시켜 340 nm에서 환원된 NADPH의 양을 측정하였다. 1 unit는 1분당 1 μmole NADPH의 형성을 촉매 하는 효소 양으로 정의하였으며 비활성은 단백질 mg당 units로 표시하였다. 단백질 정량은 Lowry 등의 방법에 따라 750 nm에서 흡광도로 측정하였으며 bovine serum albumin (0.3 mg/mL)을 standard로 사용하였다.

L-Lysine 및 glucose 정량

Cremer 등⁽¹²⁾의 방법에 따라 항생제가 첨가된 CG III배지에서 배양시킨 균체를 원심분리하여 모우고 0.9% NaCl로 2회 세척하여 각 시료의 OD₆₀₀ 값을 동일하게한 후 CGX 및 변형된 CGX배지로 재접종하여

96시간이상 배양하였다. 균체성장, 잔존 glucose 농도 및 lysine 생성량 분석을 위하여 3시간마다 시료 2 mL씩을 취하였으며, 배양과정 동안 10 N NH₄OH를 첨가하여 pH 7.2를 유지하였다. 균체농도는 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(Hitachi U-2000, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, lysine 생성량은 배양액을 원심분리하여 얻은 상층액을 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC (Waters Co., USA)로 측정하였다. Glucose 정량은 glucose oxidase를 사용하여 Sigma사에서 추천한 방법에 따라 측정하였으며 모든 분석은 3회 이상 반복실험하여 평균값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

재조합 plasmid 제조 및 *B. lactofermentum*의 형질전환

Shuttle vector pEB1 및 pJC1을 이용하여 *ddh* gene을 함유한 재조합 plasmid를 제조하기 위하여, pXX14로부터 *ddh* gene을 함유한 2.4 kb *Xho*I 단편을 elution하여 pEB1 및 pJC1의 *Sal*I site내로 삽입하여 각각

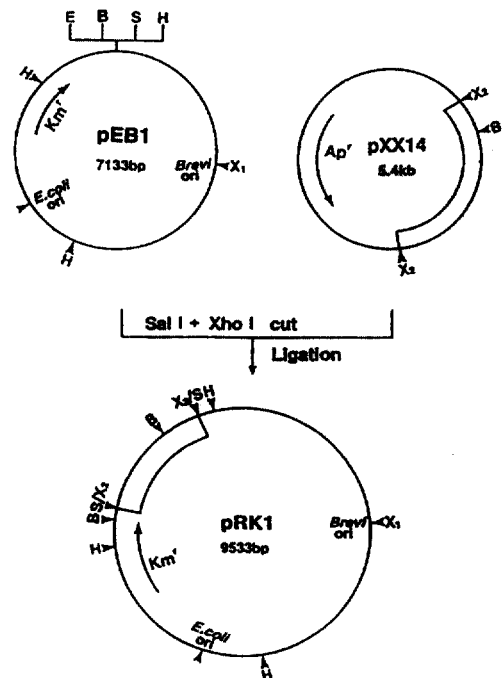


Fig. 2. Construction of recombinant plasmid pRK1. The pRK1 was constructed by inserting the 2.4 kb *Xho*I fragment of pXX14 at the *Sal*I site of pEB1. B: *Bam*HI, E: *Eco*RI, H: *Hind*III, S: *Sal*I, X₁: *Xba*I, X₂: *Xho*I.

pRK1 및 pRK31을 제조하였다(Fig. 2, 3). 각각의 ligation mixture에 의하여 *E. coli* JM109를 형질전환하였고, 형질전환체는 Km을 함유한 LB 배지에서 선발되었다. 형질전환체로부터 분리된 plasmid DNA는 여러 가지 제한효소로 절단시켜 agarose gel에서 전기영동시킨 결과, Fig. 4A 및 4B에서 보는 것처럼 9.5 kb pRK1과 8.

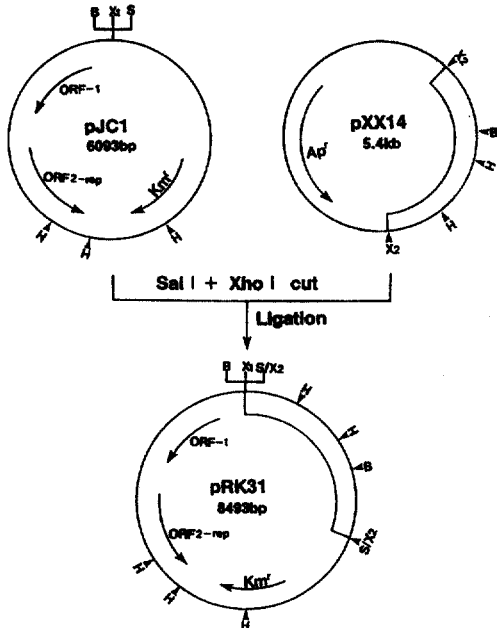


Fig. 3. Construction of recombinant plasmid pRK31. The pRK31 was constructed by inserting the 2.4 kb *Xho*I fragment of pXX14 at the *Sal*I site of pJC1. B: *Bam*HI, H: *Hind* III, S: *Sal*I, X₁: *Xba*I, X₂: *Xho*I.

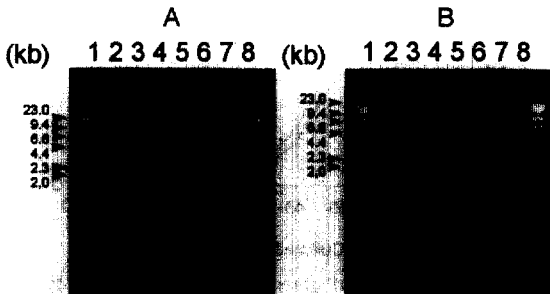


Fig. 4. Identification of constructed pRK1 (A) and pRK31 (B). (A) Lane 1: λ DNA digested with *Hind* III, 2: pEB1 digested with *Sal*I, 3: pXX14 digested with *Xho*I, 4: pRK1, 5: pRK1 digested with *Bam*HI, 6: pRK1 digested with *Hind* III, 7: pRK1 digested with *Xba*I, 8: λ DNA digested with *Hind* III. (B) Lane 1: λ DNA digested with *Hind* III, 2: pJC1 digested with *Sal*I, 3: pXX14 digested with *Xho*I, 4: pRK31, 5: pRK31 digested with *Bam*HI, 6: pRK31 digested with *Hind* III, 7: pRK31 digested with *Xba*I, 8: λ DNA digested with *Hind* III.

Table 2. Transformation efficiency and DDH activity of *B. lactofermentum* KCTC1846 with plasmids

plasmid	recipient	transformation efficiency (transformants/ μ g DNA)	DDH sp. act. ¹⁾ (U/mg)
None	<i>B. lactofermentum</i> 1846		0.15
pEB1	<i>B. lactofermentum</i> 1846	7.5×10^3	0.14
pJC1	<i>B. lactofermentum</i> 1846	6.0×10^3	0.16
pRK1	<i>B. lactofermentum</i> 1846	20.0×10^3	1.09
pRK31	<i>B. lactofermentum</i> 1846	25.0×10^3	2.10

¹⁾The specific activities of DDH (DDH sp. act.) 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.

5 kb pRK31이 제조되었음을 확인할 수 있었다.

제조합 plasmid pRK1 및 pRK31에 의한 *B. lactofermentum*의 형질전환은 electroporation에 의해 이루어졌으며, 각각의 형질전환체는 Km을 함유한 배지에서 발현하였다. *B. lactofermentum*의 형질전환율은 Table 2에서 보는 바와 같이 서로 비슷한 수준을 나타내었다.

*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 제조합 plasmid를 함유한 *B. lactofermentum* KCTC1846으로부터 DDH의 활성을 측정하였다. Table 2에서 보는 것처럼 대조균주로 사용한 AEC 내성균주와 shuttle vector pEB1 혹은 pJC1을 함유한 균주간의 효소활성은 서로 비슷한 수준을 나타내었으며, 제조합 plasmid pRK1을 함유한 *B. lactofermentum*의 DDH의 활성은 대조균주보다 7배 정도 증가하였으며, pRK31을 함유한 것의 활성은 14배 정도로 더 많이 증가하였다. 이상의 실험 결과에서 pRK1보다 pRK31을 함유한 *B. lactofermentum*의 DDH 활성이 더 높게 증가한 것은 *B. lactofermentum*-*E. coli* shuttle vector pEB1에서 *B. lactofermentum* replicon을 제공한 pBL1의 copy 수보다 *C. glutamicum*-*E. coli* shuttle vector pJC1에서 *C. glutamicum* replicon을 제공한 pHM1519의 copy 수가 4배 이상 많기 때문으로⁶⁾ 사료된다.

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

*B. lactofermentum*내에서 *ddh* gene의 증폭에 의한

lysine 생성량을 조사하기 위하여, 먼저 플라스크 발효법으로 *B. lactofermentum* 균주를 최소배지인 CGX에서 96시간 배양하여 균체농도, 잔존 glucose 농도 및 lysine 생성량을 비교 분석하였다. Fig. 5에서 보는 것처럼 재조합 plasmid를 함유한 균체농도는 shuttle vector를 함유한 대조균주와 거의 유사하므로 *ddh* gene의 증폭은 *B. lactofermentum*의 균체 성장에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 그러나 lysine 생성량의 비교 분석에서는 Fig. 6A에서 보는 것처럼 재조합 plasmid pRK1를 함유한 균주의 경우 48시간 이후부터 대조균주보다 lysine 생성량이 증가하기 시작하여 72시간때에는 최대치를 나타내었으며 그 이후는 오히려 감소하였다. 최대치를 나타낸 72시간때의 lysine 생성량은 대조균주가 4.38 g/L이었으며 pRK1을 함유한 균주는 5.34 g/L로 대조균주보다 22% 정도 증가하였다. 또한 재조합 plasmid pRK31을 함유한 균주에서도 pRK1의 경우처럼 거의 유사한 양상을 나타내었으며 72시간때의 lysine 생성량은 대조균주가 4.39 g/L이었으며 pRK31을 함유한 균주는 5.21 g/L로 거의 19% 정도 증가하였다(Fig. 6B). 앞선 실험결과에서 pRK1보다 pRK31을 함유한 *B. lactofermentum*의 DDH 활성이 더 높은 수준을 나타내었음에도 불구하고 lysine 생성량에서는 비슷한 증가 수준을 보인 것은 *B. lactofermentum*에 lysine 생합성을 조절하는 제한인자가 존재하기 때문인 것으로 사료된다. 위와 같은 결과로부

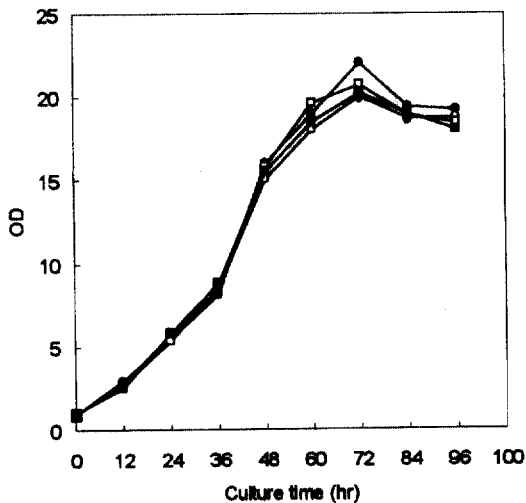


Fig. 5. Comparison of growth in flask fermentations of *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pEB1 (○—○), pJC1 (□—□), pRK1 (●—●), and pRK31 (■—■). OD: optical density.

터 재조합 plasmid pRK1을 함유한 균주를 선택하여 당과 질소원을 각각 10% 및 4% 첨가한 배지 조건으로 발효조 배양에서 lysine 생성량을 검토하였다(Fig. 7). 배양결과 재조합 plasmid pRK1을 함유한 균주의 lysine 생산에서는 플라스크 발효에서처럼 72시간때에 최대치를 나타내었으며, lysine 생성량은 8.6 g/L를 나타내어 대조균주의 7.0 g/L보다 23% 정도 증가하여 *B. lactofermentum*에서 *ddh* gene의 증폭으로 lysine 생성량이 증대됨을 확인하였다.

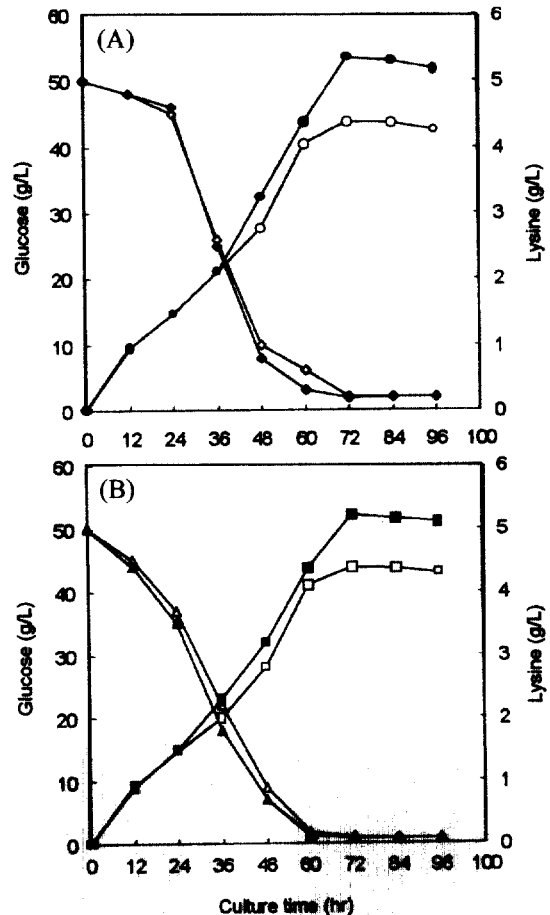


Fig. 6. Comparison of glucose consumption and lysine production in flask fermentations of *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring pRK1 (A) or pRK31 (B). (A) Decrease of glucose concentration (◆—◆) and increase of lysine concentration (●—●) in *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pEB1 (open symbols) or pRK1 (filled symbols). (B) Decrease of glucose concentration (▲—▲) and increase of lysine concentration (■—■) in *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pJC1 (open symbols) or pRK31 (filled symbols).

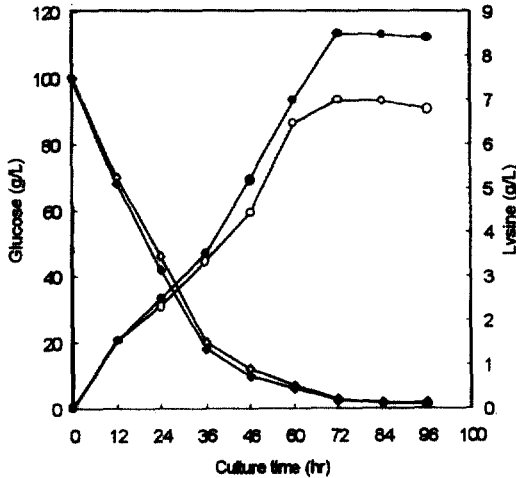


Fig. 7. Comparison of glucose consumption and lysine production of *B. lactofermentum* strains in 2.5 L jar fermentation. Decrease of glucose concentration (◆—◆) and increase of lysine concentration (●—●) in *B. lactofermentum* KCTC1846 harboring plasmid pEB1 (open symbols) or pRK1 (filled symbols).

요 약

L-Lysine 발효산업에 이용되고 있는 *B. lactofermentum* 의 L-lysine 생합성은 succinylase 경로와 dehydrogenase 경로를 통하여 일어난다. 특히 lysine 생산 균주에 부가적으로 존재하는 dehydrogenase 경로는 lysine 생합성에 있어서 필수적인 경로로 작용하며 이때 meso-DAP-dehydrogenase (DDH)를 암호화하는 *ddh* gene이 관여한다. 그러므로 *B. lactofermentum*의 lysine 발효에 있어서 *ddh* gene의 over expression에 의한 lysine 생성량을 비교 조사하기 위하여, shuttle vector pEB1 및 pJC 1으로 *ddh* gene을 삽입하여 재조합 plasmid pRK1 및 pRK31을 구축하였고 이를 *B. lactofermentum*으로 도입시켜 DDH 활성을 측정된 결과 pRK1을 함유한 균주는 대조균주보다 7배 정도, pRK31을 함유한 균주는 14배 정도 증가하였다. 또한 Shuttle vector를 함유한 대조균주와 재조합 plasmid를 함유한 균주간의 성장 비교에서는 서로 비슷한 수준을 나타내었으며 플라스크 배양에서 lysine 생성량의 비교 분석에서는 재조합 plasmid를 함유한 균주의 경우 48시간 이후부터 대조균주보다 lysine 생성량이 증가하기 시작하여 72시간 때에는 최대치를 나타내었으며 그이후는 오히려 감소하였다. 최대치를 나타낸 72시간때의 lysine 생성량은 대조균주가 4.38 g/L를 나타내었으며 pRK1 및 pRK 31을 함유한 균주는 각각 5.34 g/L 및 5.21 g/L이었다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 *B. lactofermentum*내에서 *ddh* gene의 증폭에 의한 lysine 생성량은 pRK1 및 pRK31에서 대조균주보다 각각 20% 및 19% 증가하였다. 또한 발효조 배양에서의 lysine 생성량도 재조합 균주가 대조균주보다 23% 정도 증가를 나타내어 *B. lactofermentum*에서 *ddh* gene의 증폭으로 lysine 생성량이 증가하였음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 지원하는 농림기술관리센터의 농림수산물특정연구과제의 연구비 지원으로 수행된 연구결과물의 일부이며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Fernandez-Gonzalez, C., Gil, J.A., Mateos, L.M., Schwarzer, A., Schafer, A., Kalinowski, J., Puhler, A. and Martin, J.F.: Construction of L-lysine over-producing strains of *Brevibacterium lactofermentum* by targeted disruption of the *hom* and *thrB* genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 554-558 (1996).
2. Erdmann, A., Weil, B. and Kramer, R.: Lysine secretion by *Corynebacterium glutamicum* wild type: regulation of secretion carrier activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 604-610 (1994).
3. Kieran, L.D. and Shivnan, E.: High frequency transformation of whole cells of amino acid producing coryneform bacteria using high voltage electroporation. *Biotechnol.*, **7**, 1067-1070 (1989).
4. Martin, J.F., Santamaria, H. and Aguilar, A.: Cloning systems in a amino acid-producing corynebacteria. *Biotechnol.*, **5**, 137-146 (1987).
5. Schrupf, B., Schwarzer, A., Kalinowski, J., Puhler, A., Eggeling, L. and Sahm, H.: A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, **173**, 4510-4516 (1991).
6. Scapin, G., Cirilli, M., S. Reddy, G., Gao, Y., Vederas, J.C. and Blanchard, J.S.: Substrate and inhibitor binding sites in *Corynebacterium glutamicum* diaminopimelate dehydrogenase. *Biochem.*, **37**, 3278-3285 (1998).
7. White, P.J.: The essential role of diaminopimelate dehydrogenase in the biosynthesis of lysine by *Bacillus sphaericus*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 739-749 (1983).
8. Cremer, J., Treptow, C., Eggeling, L. and Sahm, H.: Regulation of enzyme of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 3221-3229 (1988).
9. Misono, H., Ogasawara, M. and Nagasaki, S.: Characterization of meso-diaminopimelate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* and its distribution in bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2729-2734 (1986).
10. 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.: Cloning and functional expression of the *ddh* gene involved in the novel pathway

- of lysine biosynthesis from *Brevibacterium lactofermentum* (in Korean). *Mol. Cells*, 4, 295-299 (1994).
11. Kim, O.M., Kim, H.J., Kim S.D., Park, D.C. and Lee, K.R.: Cloning and sequencing of the *adh* gene involved in the novel pathway of lysine biosynthesis from *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 5, 250-256 (1995).
 12. Kim, O.M., Park, S.H. and Lee, K.R.: Site-specific inactivation of *meso*-diaminopimelate-dehydrogenase gene (*adh*) in a lysine-producing *Brevibacterium lactofermentum* (in Korean). *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26(5), 387-392 (1998).
 13. Santamaria, R.I., Gil, J.A. and Martin, J.H.: High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J. Bacteriol.*, 162, 463-467 (1985).
 14. Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L. and Sahm, H.: Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55(3), 684-688 (1989).
 15. Cremer, J., Eggeling, L. and Sahm H.: Cloning the *dapA*, *dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.*, 220, 478-480 (1990).
 16. Sambrook, J., Fritsh, E.T. and Maniatis, T.: *Molecular cloning*, a laboratory manual 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. (1989).
 17. Cremer, J., Eggeling, L. and Sahm, H.: Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(6), 1746-1752 (1991).
 18. Birnboim, H.C. and Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure of screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, 7, 1513-1523 (1979).
 19. Bonnassie, S., Burini, J.F., Oreglia, J., Trautwetter, A., Patte, J.C. and Sicard, A.M.: Transfer of plasmid DNA to *Brevibacterium lactofermentum* by electrotransformation. *J. Gen. Microbiol.*, 136, 2107-2112 (1990).
 20. Yeh, P., Sicard, A.M. and Sinskey, A.J.: General organization of the genes specifically involved in the diaminopimelate-lysine biosynthetic pathway of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.*, 215, 105-111 (1988).
 21. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).

(1998년 11월 13일 접수)