

## L-Methionine과 Phosphate의 제한 공급에 의한 *Escherichia coli* MT201로부터의 고농도 L-Threonine 생산

이만효 · 이홍원 · 김병진<sup>1</sup> · 김천석 · 정준기 · 황용일<sup>1\*</sup>  
한국생명공학연구원 산업화지원실, <sup>1</sup>경남대학교 식품생명공학부

**High Production of L-Threonine using Controlled Feeding of L-Methionine and Phosphate by *Escherichia coli* Mutant.** Lee, Man Hyo, Hong Weon Lee, Byung Jin Kim<sup>1</sup>, Chun Suk Kim, Joon Ki Jung, and Yong Il Hwang<sup>1\*</sup>. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-333, Korea, <sup>1</sup>Division of Food and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea - L-Threonine fermentation process was constructed on batch and fed-batch culture by using *Escherichia coli* MT201. The production type of L-threonine was observed as growth-associated production in batch culture. In fed-batch culture studying optimal concentration of yeast extract in feeding media, when 600 g/l of glucose and 60 g/l of yeast extract were added in feeding media, 87 g/l of L-threonine was produced. To improve cell growth and L-threonine production, the culture of high cell density was performed in fed-batch culture with oxygen enriched air and feeding media containing L-methionine and phosphate. Under the conditions, we could achieve the highest L-threonine production of 98 g/l at 60 h. The highest productivity of L-threonine was about 3.85 g/l/h.

**Key words :** L-Threonine production, *Escherichia coli* MT201, Yeast extract, L-Methionine, Phosphate

L-Threonine은 인간이나 가축의 성장에 요구되어지는 필수아미노산의 하나로 의약품 원료 또는 사료 첨가제로서 널리 이용되고 있다. L-Threonine은 4개의 이성질체(D-, L-, D-allo, 그리고 L-allo 형태)를 가지고 있기 때문에 화학적인 합성을 통해 생산할 경우 여러 가지 이성질체가 함께 생산되는 문제가 발생된다. 따라서 높은 수율의 L-threonine을 얻기 위해서는 화학적 합성보다는 광학적 이성질체가 생산되지 않는 미생물에 의한 발효법이 보다 효과적이다[14].

현재 문헌상 L-threonine을 생산할 수 있는 미생물 균주로는 *Escherichia coli*[1, 2], *Serratia marcescens*[6, 9], *Saccharomyces cerevisiae*[15] 그리고 coryneform bacteria[4, 12] 등과 같은 다양한 미생물이 알려져 있으나, 국·내외를 막론하고 대부분의 L-threonine 생산은 *E. coli*를 이용하는 것으로 알려져 있다. 또한 L-threonine 생산 균주들은 대부분 L-threonine의 생산성을 극대화하기 위하여 고전적인 돌연변이법을 이용한 돌연변이주가 주로 이용되어 왔으나[7, 17], 80년대에 들어와 유전자 조작기술을 이용한 균주 개량도 함께 시도되고 있다[10, 11]. 미생물 변이주를 이용한 발효 공정에 사용되는 균주들은 L-threonine의 생산을 증가시키기 위하여 threonine의 유도체(AHV:  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvaleric acid) 내성 변이주[5, 7, 17]와 L-threonine의 생산과 관련된 대사조절기구를 해제하여 L-threonine이 과생산되도록 변이

가 유도된 영양요구성 변이주[13, 14] 등이 주로 이용되고 있다. 또, L-threonine 생합성에 관련된 효소의 유전자를 증폭 시킴으로서 그 효소가 과량 발현되도록 조절하는 유전자 조작법을 이용한 L-threonine 생산 균주의 개량법도 이용되고 있다[8, 10, 11]. 이러한 다양한 노력에 힘입어 최근에 발표된 문헌에 따르면 L-threonine의 연간 생산량은 30,000 톤 이상에 달하고 있으며 앞으로도 꾸준히 증가 될 것으로 기대되고 있다[3].

*E. coli* 돌연변이 균주를 이용한 L-threonine 생산 사례를 보면 탄소원인 포도당을 사용하여 salt-tolerant 변이주에서 배양 80시간에 74 g/l의 L-threonine을 생산한 보고가 있었으며[19], L-aspartate와 L-homoserine-resistant 변이주로부터 75시간 배양 후 76 g/l의 L-threonine이 생산된 보고도 있다[1]. 또한, Okamoto 등은 threonine uptake system이 손상된 L-methionine 영양 요구성 변이주를 이용하여 배양 77시간에 최대 100 g/l의 L-threonine을 생산한 보고도 있다[13, 14].

본 연구에서는 L-threonine의 생산성을 극대화하기 위한 일환으로, *E. coli* K-12 유래의 L-methionine 영양요구성 변이주, *E. coli* MT201을 사용하여 첨가배지를 연속적으로 공급하는 유가식 발효 방법에 의한 L-threonine 과생산 공정에 관해 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배지조성

본 연구에 사용된 L-threonine 고생산성 균주인 *E. coli*

\*Corresponding author  
Tel. 055-249-2685, Fax. 055-249-2995  
E-mail: yihwang@kyungnam.ac.kr

MT201(Met<sup>-</sup>, Ile<sup>L</sup>, diaminopimelic acid<sup>L</sup>)은 *E. coli* K-12로부터 유래되었으며 threonine analog 물질인 AHV( $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvareric acid)에 내성을 가지는 AHV<sup>r</sup> 변이주이다. 플라스크 중균배지로 Luria Bertani(LB) 배지를 사용하였으며 L-threonine 생산을 위한 발효배지는 liter당 3 g yeast extract, 6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mg MnSO<sub>4</sub>, 1 g L-methionine, 그리고 1 ml trace metal solution (13.2 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 8.4 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.4 g MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 2.4 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.48 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.48 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.24 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, and 0.06 g K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·XH<sub>2</sub>O per liter of 0.1 N HCl)으로 구성되었다. 유가식 배양에 사용된 첨가배지는 liter당 600 g 포도당과 60 g 효모추출물로 구성되었으며 배양 조건에 따라 L-methionine과 인산염이 첨가되었다.

### 배양조건

50 ml LB 배지를 함유한 500 ml baffle 플라스크에 -70 °C에서 동결보관된 균주를 1 ml 접종하여 30°C 진탕배양기(KSI-200L, Korea Science Co., Ltd., Korea)에서 160 rpm의 조건으로 진탕 배양하였다. 24시간 배양 후 20 ml의 배양액을 200 ml의 발효배지가 들어있는 1 liter baffle 플라스크에 접종하여 LB 배지의 배양 조건과 동일하게 사용하였다. 24시간 배양 후 200 ml의 배양액은 1.8 liter의 발효배지가 들어있는 5 liter 발효조(KFC LA-150, Kobiotech Co., Ltd., Korea)에 첨가하였다. 배양 온도는 30°C, pH는 25% NH<sub>4</sub>OH를 사용하여 6.0으로 일정하게 조절하였고, 교반속도와 통기량은 용존산소의 농도가 20%이상 유지되도록 적절하게 조절하였다.

### 분석방법

균체 농도는 배양액을 증류수로 적당히 희석한 후 spectrophotometer(Uvicon 941Plus, Kontron Instrument Co., Switzerland)를 사용하여 600nm에서 측정하였다. Glucose 농도는 YSI Glucose & Lactate Analyzer(YSI 2700 SELECT, Yellow Springs Instruments Co., USA)를 사용하여 분석하였으며 L-threonine 농도는 아미노산 분석기(Model JLC-300; Nihondenshi Co., Ltd.)를 사용하였다. 유기산은 HPLC(UV-VIS detector, ERC Instrument Co., Japan)를 이용하여 Aminex 87H ion exclusion column(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 회분식 배양에 의한 L-Threonine 생산

5 liter 발효조에서 *E. coli* MT201의 생육 및 L-threonine의 생산성을 확인하기 위해 효모 추출물(yeast extract)과 포

도당을 포함한 L-threonine 생산을 위한 발효배지를 이용하여 회분식 배양을 실시하였다.

회분식 배양 결과, 총 배양 33시간 동안에 균체량은 흡광도(OD<sub>600</sub>)를 기준으로 약 20까지 증가하였고, L-threonine 생산은 약 18.8 g/l까지 이루어졌다(Fig. 1). 이때 L-threonine의 최대 생산성은 약 0.83 g/l/h이었고 포도당을 기준으로 한 생산 수율은 약 0.41 g/g이었다.

회분식 배양에서 균주의 생육과 L-threonine 생산량과의 관계는 성장 관련 형태의 증식 곡선을 보여주고 있다. 이것은 일반적으로 coryneform bacterial[4]를 이용한 아미노산 발효가 혼합 성장 관련 형태의 증식 곡선을 보여주는 것과는 발효 생리가 다름을 알 수 있다. 따라서, *E. coli* MT201을 이용한 L-threonine 발효에 있어서 균주의 균체량이 증가되면 L-threonine의 생산량도 증가될 것으로 기대된다.

### 유가식 배양에 의한 L-Threonine 생산

효모추출물은 아미노산, 비타민류, 무기염류 및 유기 질소원 성분들이 풍부하게 함유되어 있어 미생물의 배양에 광범위하게 사용되고 있는 기질로서 미생물의 생육 및 물질생산에 있어 중요한 역할을 한다[16]. 그러므로 균주의 생육 및 L-threonine 생산을 증가시키기 위한 유가식 배양의 첨가배지 성분으로 사용하였다. L-threonine 생산에 적합한 최적의 효모추출물 농도를 알아보기 위하여 다양한 농도의 효모추출물(100 g/l, 80 g/l, 60 g/l, 40 g/l)을 600 g/l의 포도당이 함유된 첨가배지에 첨가하여 균주의 생육 및 L-threonine 생산량을 관찰하였다.

다양한 농도의 효모추출물을 함유한 첨가배지를 사용하여 유가식 배양을 수행한 결과 첨가배지내 효모추출물 농도가 100 g/l로 존재할 때 균체량은 가장 높았다(Fig. 2A). L-

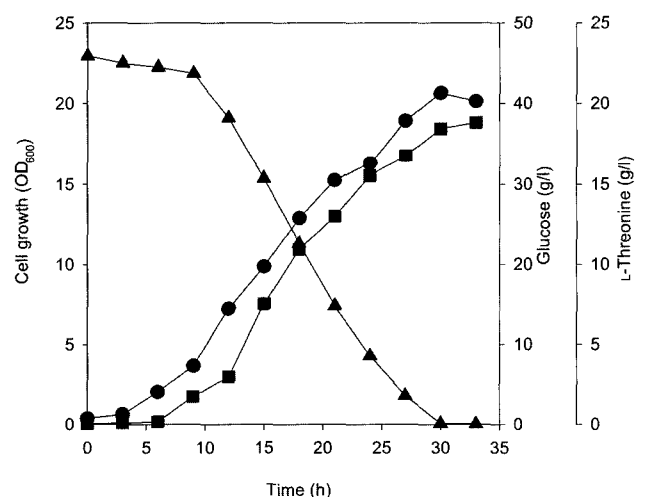


Fig. 1. Time course of L-threonine production by *E. coli* MT201 in a 5 liter jar fermentor. Symbols: ●, optical density; ▲, glucose; ■, L-threonine.

Threonine의 생산은 균체 증식과 함께 시작되어, 약 72 g/l 까지 증가되었고 생산성은 약 1.96 g/l/h이었다. 한편, 효모 추출물 80 g/l를 이용한 유기식 배양에서 균체량은 흡광도 (OD<sub>600</sub>)를 기준으로 약 77까지 증가하였고 L-threonine의 생산도 약 76 g/l까지 증가하였다(Fig. 2B). 이때 L-threonine의 생산성은 약 2.04 g/l/h이었다. 60 g/l의 효모추출물을 함유한 첨가배지가 연속적으로 공급되었을 때 L-threonine이 가장 높게 생산되어졌는데, 이때 생산된 L-threonine의 최종 농도는 86.2 g/l이었고(Fig. 2C), L-threonine의 생산성은 약 2.12 g/l/h이었다. 마지막으로 40 g/l의 효모추출물을 첨가한 유기식 배양에서는 L-threonine의 생산뿐만 아니라 균체 증식도 낮아 총 배양 42시간 동안 균체량은 흡광도(OD<sub>600</sub>)를 기준으로 45.7까지 증가하고 L-threonine은 49 g/l만 생산되었다(Fig. 2D).

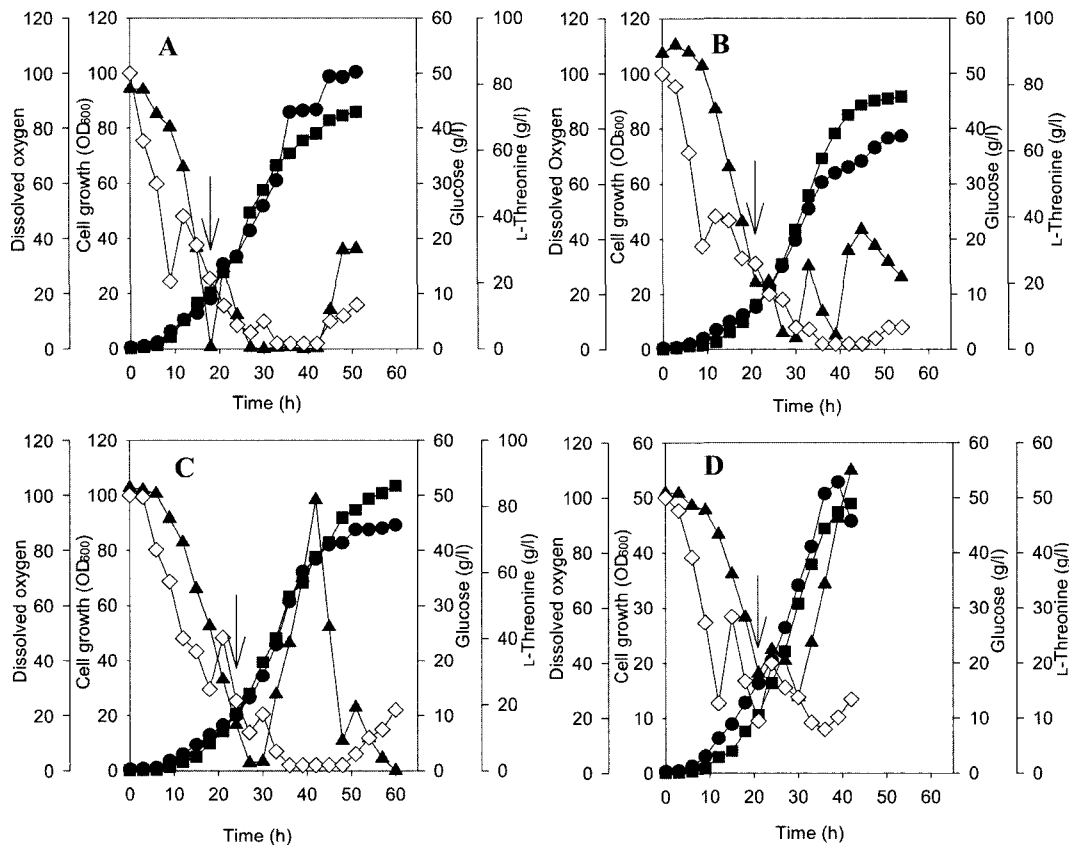
다양한 농도의 효모 추출물이 함유된 첨가배지를 이용한 유기식 배양에서 과도한 균체 증식으로 인해 배양액중의 용존산소가 결핍되었다(Fig. 2). Shimizu 등[18]의 연구에 의하면 배양액중의 용존산소 농도가 풍부할 때 L-threonine의 생산량은 증가되었다. 따라서 향후 배양에서는 용존산소의

결핍 방지 및 L-threonine의 생산성 향상을 위해 산소가 다량 함유된 혼합공기를 사용하였다.

L-Threonine 생산 균주의 성장 곡선을 보면 배양 45시간 이후부터는 성장이 거의 이루어지지 않았다. 이것은 생산 균주의 생육에 관여하는 기질 중 어떤 성분이 부족하여 발생한 현상으로 생각된다. 따라서 가장 부족하게 공급한 제한 기질인 L-methionine 양을 분석한 결과 초기 발효배지에 1 g/l의 농도로 첨가한 L-methionine이 배양 42시간 이후부터 거의 고갈된 상태였다(data not shown). 이것은 L-threonine 생산 균주가 L-methionine이 고갈된 상태에서 첨가배지의 효모추출물에 함유된 미량의 L-methionine에 의존해 제한 생육되었음을 의미한다.

**균체의 고농도 배양을 통한 L-Threonine 생산성 향상**

L-Threonine 생산을 향상시키기 위하여, 초기 발효배지내 인산염 및 L-methionine 등 몇 가지 기질의 양을 증가시켜 균주의 고농도 배양을 실시하였다. 증가된 기질의 양을 살펴보면, 효모추출물과 L-methionine의 농도는 각각 3 g/l와 1 g/l에서 20 g/l와 3 g/l로, 인산염과 마그네슘염의 농도는

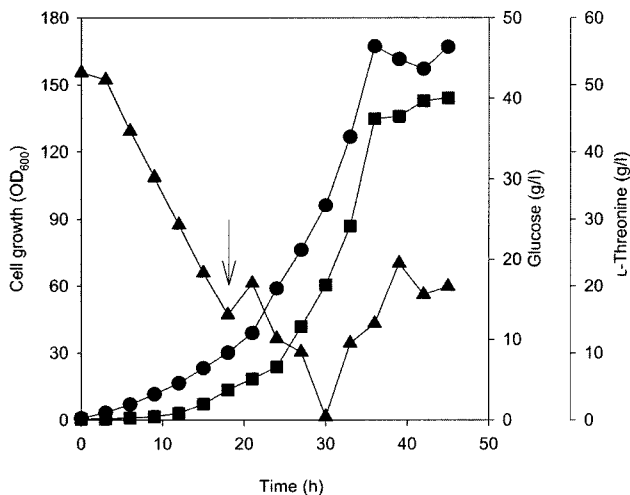


**Fig. 2. Effect of yeast extract concentrations on L-threonine production by *E. coli* MT201.** Various concentrations of yeast extract were added in feeding solution. The arrow indicates the start of continuous feeding of 600 g/l glucose and (A) 100 g/l yeast extract, (B) 80 g/l yeast extract, (C) 60 g/l yeast extract, and (D) 40 g/l yeast extract. Symbols: ●, optical density; ▲, glucose; ■, L-threonine; ◇, dissolved oxygen.

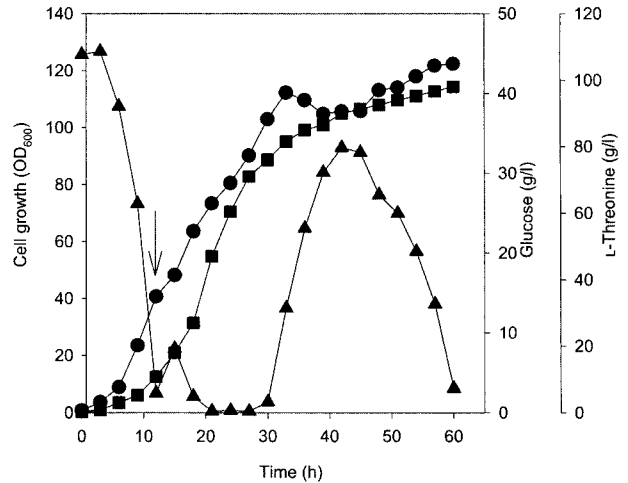
각각 2 g/l와 1 g/l에서 10 g/l와 4 g/l로 증가시켰다. 또, 균체의 고농도 배양에 따른 배양액중의 용존산소 결핍을 방지하기 위해서 배양 24시간부터 산소가 다량 함유된 혼합공기를 발효조에 공급하였다.

배양 결과 L-threonine 생산 균주의 균체량은 배양 21시간 이후부터 급격하게 증가하기 시작하여 36시간까지 증가하였다. 배양 말기에 균체량은 흡광도(OD<sub>600</sub>)를 기준으로 168까지 증가하였지만 L-threonine은 오히려 감소하여 48 g/l만 생산되었다(Fig. 3). 이것은 배양 초기에 과량으로 첨가된 배지성분들에 의해서 미생물의 대사가 지나치게 균체 증식 쪽으로만 진행되어 L-threonine 생산량의 감소를 초래한 것으로 생각된다. 따라서 유가식 배양에서 발효초기에 사용하는 배지(초기발효배지)에 과량으로 균체증식에 필요한 배지성분을 첨가하는 것은 L-threonine의 생산량을 향상시키는 방법으로 효과적이지 못하였다.

과도한 균체 증식을 피하면서 L-threonine 생산량을 증가시키기 위해, 초기발효배지에서 농도를 높인 기질 중 균체 증식에 가장 큰 영향을 줄 것으로 사료되는 인산염과 L-methionine에서 각각 8 g/l와 2 g/l를 초기발효배지에 추가하는 대신에 첨가배지에 첨가하여 유가식 배양을 실시하였다. 배양 결과 균체의 생육은 배양 초기부터 빠른 속도로 증가하기 시작하였으나 Fig. 3의 경우와 같은 지나친 증식은 발생하지 않았다. 배양 60시간동안 균체량은 흡광도(OD<sub>600</sub>)를 기준으로 122까지 증가하였고, L-threonine은 98 g/l로 Fig. 3의 결과와 비교할 때 약 2배가량 향상되었다(Fig. 4). 이때 L-threonine의 최대 생산성은 약 3.85 g/l/h로 가장 높았다. 한편 대장균의 고농도 배양에 문제가 될 수 있는 acetic acid의 생산은 Fig. 2C 발효의 경우 배



**Fig. 3.** Effect of concentrations of L-methionine, yeast extract, phosphate, and magnesium added in culture media on L-threonine production and growth. The arrow indicates the start of continuous feeding of 600 g/l glucose and 60 g yeast extract. Symbols: ●, optical density; ▲, glucose; ■, L-threonine.



**Fig. 4.** Time course of cell growth and L-threonine production under optimal concentrations of feeding media. The arrow indicates the start of continuous feeding of 600 g/l glucose, 60 g/l yeast extract, 8 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 2 g/l methionine. Symbols: ●, optical density; ▲, glucose; ■, L-threonine.

양 32시간부터 2.7 g/l 이상 축적되어 최종적으로는 5 g/l 이상 생산된 반면 최적화된 배양조건에서는 배양 51시간까지 약 2 g/l까지만 축적 되었다(data not shown).

**요 약**

본 연구에서는 *E. coli* MT201을 이용한 L-threonine 발효 공정을 확립하였다. 회분식 배양에서 L-threonine 생산이 균체 증식과 더불어 증가하는 증식과 연관된 형태의 생산 곡선을 보여주었다. L-Threonine 생산에 대한 조건을 확립하기 위한 유가식 배양에서 첨가배지내 최적 효모추출물과 포도당의 농도는 각각 60 g/l와 600 g/l이었으며, 약 87 g/l의 L-threonine이 생산되었다. 유가식 배양에서도 L-threonine의 생산은 회분식 배양과 마찬가지로 균체량의 증가와 더불어 L-threonine 생산이 증가하는 증식과 연관된 형태를 보여주었다. 이러한 결과를 바탕으로 적절한 균체량의 증가와 L-threonine 생산성 향상을 위하여 L-methionine과 인산염이 추가로 공급된 첨가배지를 이용한 고농도 배양 조건이 확립되었다. 한편 고농도 배양에 따른 용존산소의 결핍을 해결하기 위하여 산소가 포함된 혼합공기를 사용하였다. 최적화된 유가식 배양 결과 균체 증식도 원활하게 증가하였으며, L-threonine의 생산도 약 98 g/l로 향상되었다. 이때 L-threonine의 생산성은 약 3.85 g/l/h이었다.

**감사의 말**

본 연구는 한국바스프사의 지원 및 2003년도 BK21사업의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Furukawa, S., A. Ozaki, and T. Nakanishi. 1988. L-Threonine production by L-aspartate- and L-homoserine-resistant mutant of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 550-553.
2. Furukawa, S., A. Ozaki, Y. Kotani, and T. Nakanishi. 1988. Breeding of L-threonine hyper-producer of *Escherichia coli* W. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 253-257.
3. Hermann, T. 2003. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* **104**: 155-172.
4. Ishida M., H. Kawashima, K. Sato, K. Hashiguchi, H. Ito, 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.
5. Kase, H., and K. Nakayama. 1972. Production of L-threonine by analog-resistant mutants. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 1611-1621.
6. Komatsubara, S., M. Kisumi, and I. Chibata. 1983. Transductional construction of a threonine-hyperproducing strain of *Serratia marcescens*: Lack of feedback controls of three aspartokinases and two homoserine dehydrogenases. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1445-1452.
7. Lee, J. H., J. W. Oh, H. H. Lee, and H. H. Hyun. 1991. Production of L-threonine by auxotrophs and analogue resistant mutants of *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 583-587.
8. Lee, J. H., J. W. Oh, K. S. Noh, H. H. Lee, and J. H. Lee. 1992. Construction of L-threonine overproducing *Escherichia coli* by cloning of the threonine operon. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 243-247.
9. Masuda, M., S. Takamatsu, N. Nishimura, S. Komatsubara, and T. Tosa. 1992. Improvement of nitrogen supply for L-threonine production by a recombinant strain of *Serratia marcescens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **37**: 255-265.
10. Miwa, K., S. Nakamori, K. Sano, and H. Momose. 1984. Stability of recombinant carrying the threonine operon in *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 2233-2237.
11. Miwa, K., T. Tsuchida, O. Kurahashi, S. Nakamori, K. Sano, and H. Momose. 1983. Construction of L-threonine overproducing strains of *Escherichia coli* K-12 using recombinant DNA techniques. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2329-2334.
12. Mori, M., and I. Shiio. 1987. Pyruvate formation and sugar metabolism in an amino acid-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 129-138.
13. Okamoto, K., and M. Ikeda. 2000. Development of an industrially stable process for L-threonine fermentation by an L-methionine-auxotrophic mutant of *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **89**: 87-89.
14. Okamoto, K., K. Kino, and M. Ikeda. 1997. Hyperproduction of L-threonine by an *Escherichia coli* mutant with impaired L-threonine uptake. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 1877-1882.
15. Ramos, C., and I. L. Calderon. 1992. Overproduction of threonine by *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to hydroxynorvaline. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1677-1682.
16. Roman, K., S. Ernest, and S. Jan. 1992. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* Biomass. *Food Biotechnol.* **6**: 225-237.
17. Shiio, I., and S. Nakamori. 1969. Microbial production of L-threonine. Part I. Production by *Escherichia coli* mutant resistant to  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvaleric acid. *Agr. Biol. Chem.* **33**: 1152-1160.
18. Shimizu, E., T. Oosumi, H. Heima, T. Tanaka, J. Kurashige, H. Enei, K. Miwa, and S. Nakamori. 1995. Culture conditions for improvement of L-threonine production using a genetically self-cloned L-threonine hyperproducing strain of *Escherichia coli* K-12. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 1095-1098.
19. Song, K. H., H. H. Lee, and H. H. Hyun. 2000. Characterization of salt-tolerant mutant for enhancement of L-threonine production in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 647-651.

(Received Mar. 5, 2004/Accepted June 7, 2004)