

## *Corynebacterium glutamicum* 균주 개량 및 발효 공정 최적화에 의한 L-lysine 생산성 증진

서진미 · † 현형환  
한국의외국어대학교 생명공학과  
(접수 : 2005. 5. 11., 게재승인 : 2006. 2. 2.)

### Enhancement of L-lysine Productivity by Strain Improvement and Optimization of Fermentation Conditions in *Corynebacterium glutamicum*

Jin-Mi Seo and Hyung-Hwan Hyun†  
Department of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies, Yongin 449-791, Korea  
(Received : 2005. 5. 11., Accepted : 2006. 2. 2.)

In order to minimize the reduction of lysine productivity by accumulation of lysine and byproducts in the end of fed-batch fermentations, a salt-tolerant mutant C14-49-3-15-7-3-20, which could grow at high concentrations of NaCl was isolated through mutagenesis from the *Corynebacterium glutamicum* mother strain I. In the evaluation of L-lysine productivity by fed-batch fermentations using a 5 L jar fermenter, the salt-tolerant mutant strain C14-49-3-15-7-3-20 produced 130.6 g/L of L-lysine with a 48.6% of yield. The mother strain I produced L-lysine concentration only 104.9 g/L with a yield 41.8%, implying the improvement of L-lysine productivity by introduction of salt-tolerance character.

**Key Words** : L-lysine, *Corynebacterium glutamicum*, fed-batch fermentation, salt-tolerance

#### 서론

L-Lysine은 사람이나 동물의 체내에서 합성되지 않는 필수 아미노산 중의 하나로 식품이나 가축 사료의 첨가물로 이용되어 왔다(1-3). L-Lysine의 수요가 지속적으로 증대됨에 따라 생산성을 높이기 위한 많은 연구들이 이루어지고 있다. L-lysine 생산량을 높이기 위해 classical mutagenesis를 통하여 L-lysine을 다량 생산하는 돌연변이 균주를 얻거나 발효 조건들을 확립해 나가고 있다(4, 5). 또한 최근 들어 유전공학적 방법에 의해서도 L-lysine 생산성을 높이는 연구가 많이 이루어지고 있다(6).

미생물 발효에 의한 L-lysine 생산은 회분식 또는 유가식 배양으로 생산되어지고 있다. 회분식 배양은 발효 초기에 다량의 탄소원과 질소원을 넣어주어 발효 말기에 높은 농

도의 L-lysine이 축적되게 하는 것이다. 하지만 발효 초기에 높은 농도의 탄소원과 질소원 첨가로 인해 발생한 osmotic pressure로 균의 성장 및 L-lysine의 생산이 저해되는 단점이 있다. 유가식 배양은 발효 도중에 결핍되는 요소들을 일정 간격으로 넣어주면서 배양을 수행하는 것이다. 이것은 초기 당 농도에 의해 균의 성장이 저해되는 것을 막을 수 있다(4, 7). 그러나 이러한 방법들은 발효 말기에 L-lysine의 축적으로 인하여 생긴 osmotic pressure에 의해 L-lysine 생산이 저해되는 문제점을 가지고 있어, 생산성을 증대시키는데 어느 정도의 한계성을 가지고 있다(8).

이렇게 발효 기간 동안 균은 배지 내 성분과 생산물로 부터 osmotic stress를 받게 된다. 이 osmotic pressure는 균을 inactivation시키고 생산물의 축적을 중단시킨다. 미생물은 배지 내의 osmolality가 증가하면 이를 극복하기 위해 cytoplasm에 glycine-betaine, ectoin, glutamate, glutamine, proline, trehalose 등과 같은 osmoregulator를 축적시켜 cell 안의 solute의 농도를 증가시키게 되는 것이다(9).

만약 mutagenesis를 통하여 osmotolerant mutants를 개발한다면 substrate 및 product의 농도가 높은 배지에서도 배양이 가능하고 이러한 균주를 유가식 배양 적용해 더 높은

† Corresponding Author : Department of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies, Yongin 449-791, Korea

Tel : +82-31-330-4279, Fax : +82-31-330-4566

E-mail : hhyun@san.hufs.ac.kr

L-lysine 농도 및 수율을 얻을 수 있을 것이다, 따라서 본 연구는 salt-tolerant mutant를 개발하여 L-lysine 생산성을 증대시키고 또한 salt-tolerant mutant를 characterization 하고자 하는데 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

본 연구에서는 *Corynebacterium glutamicum I* [S-aminoethyl-L-cystein (AEC)<sup>1</sup>,  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvaleric acid (AHV)<sup>1</sup>, temperature<sup>1</sup>, fluoropyruvate(F-pyr)<sup>5</sup>]를 이용하였다.

### 배지 및 배양 방법

L-lysine 생산량을 알아보기 위해 SA 배지 (glucose 10 g/L, urea 1 g/L, polypeptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, beef extract 5 g/L, NaCl 2.5 g/L, Agar 22 g/L)에 접종하여 30°C에서 36-40시간 계대 배양한 뒤 5 ml의 전배양 배지 PS (sucrose 50 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, Urea 1 g/L, CSL 12 ml/L, polypeptone 10 g/L, yeast extract 10 g/L, nicotinic acid 3 mg/L, thiamine·HCl 1 mg/L, d-biotin 50 ug/L,  $\beta$ -alanine 5 mg/L)를 포함한 50 ml 삼각플라스크에 1 loop 접종한다. 진탕배양기 (30°C, 250 rpm)로 8-12시간 배양하여 균체 농도 (OD<sub>610</sub>)가 5-6일 때, 10 ml의 F-선별 배지 (sucrose 70 g/L, 당밀 30 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 g/L, CaCO<sub>3</sub> 50 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, CSL 14 ml/L, thiamine·HCl 0.3 mg/L, MnSO<sub>4</sub> 2 mg/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 mg/L, d-biotin 1 mg/L)가 포함된 100 ml 삼각플라스크에 5%를 접종하여 진탕 배양기 (30°C, 200 rpm)로 5-6일 배양하였다.

유가식 배양에서는 사면 배지인 SA 교체배지에 접종하여 30°C에서 36-40시간 계대 배양 한 뒤 50 ml의 전배양 배지 PS를 포함한 500 ml 삼각플라스크에 1 loop 접종하여 진탕 배양기 (30°C, 200 rpm)로 14-16시간 배양하였다. 균체 농도 (OD<sub>610</sub>) 5-6일 때, 1 L의 중배양 배지 S (sucrose 36 g/L, 당밀 24 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L, Urea 1 g/L, CSL 36.5 ml/L, nicotinic acid 5.25 mg/L, thiamine·HCl 2 mg/L,  $\beta$ -alanine 5 mg/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.5 mg/L, CuSO<sub>4</sub> 1 mg/L, AZ-20R 0.25 ml/L)가 포함된 2.5 L 발효조 (코바이오택)에 5% (v/v) 되도록 식균하였다. 배양온도는 31.5°C, 통기량은 1 vvm으로 유지하면서 교반 속도는 700 rpm로 하였으며, NH<sub>4</sub>OH를 이용하여 pH 6.9로 조절하여 중배양하여 균체 농도 (OD<sub>610</sub>) 35-40 정도까지 배양한 다음 본배양 배지 LM에 접종하였다. 본배양은 1.3 L의 본배양 배지 LM (sucrose 18 g/L, 당밀 12 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 g/L, CSL 20 ml/L, nicotinic acid 1.5 mg/L, thiamine·HCl 2.3 mg/L, d-biotin 200 ug/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 11 mg/L, AZ-20R 0.2 ml/L)이 포함된 5 L 발효조 (코바이오택)에 18% (v/v)가 되도록 식균하였다. 발효 기간 동안 NH<sub>4</sub>OH를 이용하여 pH 6.9로, 교반 속도는 850 rpm, 통기량은 1 vvm으로 조절하여 배양하였다. 초기 발효조의 온도는 33°C으로 조절하

여 주다가 packed cell volume (PCV)이 6-8%가 되었을 때 온도를 37°C로 올려주어 배양하였다. 발효 중 배양액에 당이 결핍되면 추가 배지 F (sucrose 270 g/L, 당밀 180 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 g/L, d-biotin 600 ug/L)를 첨가하였다.

### Salt-tolerant mutants의 분리

Salt-tolerant mutant를 분리하기 위해 *C. glutamicum I* 균주를 NTG (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine)로 처리한 후 saline으로 세번 washing하였다. 8-10%의 NaCl이 포함되어 있는 SA broth 배지에 접종하여 30°C에서 3-5일 배양하면서 enrichment를 수행하였다. SA 배지에서 자란 균을 8%, 9%의 NaCl이 포함되어 있는 SA agar 배지에 도말하여 배양하였다. 8%의 NaCl이 포함된 배지에서 생장이 빠른 mutant colony와 모균주가 성장하지 않는 9%의 NaCl이 포함된 배지에서 자라는 colony를 선별하여 flask 배양으로 L-lysine 생산량을 알아보았다.

### L-lysine의 정량

발효액 내의 L-lysine 농도는 paper chromatography를 이용하여 정량 하였다. 3MM chromatography paper (Whatman)에 발효액을 점적하여 butanol, 증류수 그리고 acetic acid가 3.5 : 2.5 : 1로 섞인 전개액에 16-18시간 전개한 뒤 paper를 건조시킨다. 0.2% ninhydrin solution을 paper 위에 sprayer를 이용하여 뿌린 다음 60°C dry oven에서 3분간 반응시킨다. 발색부위에 2% ninhydrin solution을 떨어뜨려 다시 3분간 반응시킨 뒤 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)로 발색부위를 적신 후 dry oven에서 40분간 반응시킨다. 발색 부위만 잘라 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)와 methanol이 1 : 1로 섞인 용액 10 ml에 담가 1시간 정도 용출한다. 용액만 따라내어 2500 rpm에서 5분간 원심분리 한 뒤 상등액을 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 균체 농도 및 당 농도 분석

균체 농도 측정은 optical density (O.D.)와 pack cell volume (PCV) 방법을 이용하였다. O.D.의 경우 균체 배양액을 증류수로 적절히 희석하여 spectrophotometer (Spectronic 20+, Milton Roy)를 이용해 610 nm에서 흡광도를 측정하였고, PCV는 균체 배양액 10 mL을 4000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 이용하여 측정하였다.

배양액의 당 농도 분석은 Bertrand method 법을 이용하여 total carbohydrate를 측정하였으며 환원당 정량은 glucose (Sigma)를 표준시료로 사용하여 DNS (Aldrich) 방법으로 측정하였다(10).

## 결과 및 고찰

### Salt-tolerant mutant의 분리

Salt-tolerant mutant를 분리하기 위해 먼저 모균주 I에 NTG를 처리하여 인공 돌연 변이를 수행한 후 9%의 NaCl이 포함된 SA 액체 배지에서 enrichment시켰다. 배양 중 모균주 I가 성장하지 않는 9%의 NaCl이 포함된 SA 배지

에 도달하여 빠르게 성장한 균주를 선별하였다. Flask 배양을 수행한 후 L-lysine 생산량을 정량한 결과 모균주 I는 53.3 g/L의 L-lysine을 생산하였고 수율이 51.6%로 나타났다. 반면 salt-tolerant mutant C14-49-3-15-7-3-20 균주는 61.2 g/L의 L-lysine을 생산하였고 수율이 61.0%였다(Table 1).

**Table 1.** Comparison of L-lysine production between *C. glutamicum* strain I, and salt-tolerant mutant C14-49-3-15-7-3-20

Strain	Growth (OD <sub>610</sub> )	Consumed sugar concentration (g/L)	L-lysine concentration (g/L)	L-lysine yield (%)
I	29.4	103.6	53.3	51.4
C14-49-3-15-7-3-20	29.4	100.5	61.2	60.9

**SA 배지내 NaCl 농도에 따른 모균주 및 salt-tolerant mutant의 성장 비교**

선별한 salt-tolerant mutant C14-49-3-15-7-3-20의 특성을 알아보려고 하였다. C14-49-3-15-7-3-20 균주와 모균주 I를 이용하여 SA broth 배지 내의 NaCl 농도에 따른 균체 성장 정도를 비교하였다(Fig. 1). control인 0.25%와 8%, 9%, 10%의 NaCl이 포함된 배지에서 배양한 결과 mutant들은 8%, 9%, 10%의 NaCl이 포함되어 있는 배지에서 모균주인 I보다 OD 값이 높았고 growth rate도 높았다. 10%의 NaCl이 포함되어 있는 배지에서 모균주 I의 균체 생장이 94% 정도 inhibition 받은 반면 salt-tolerant mutant strain

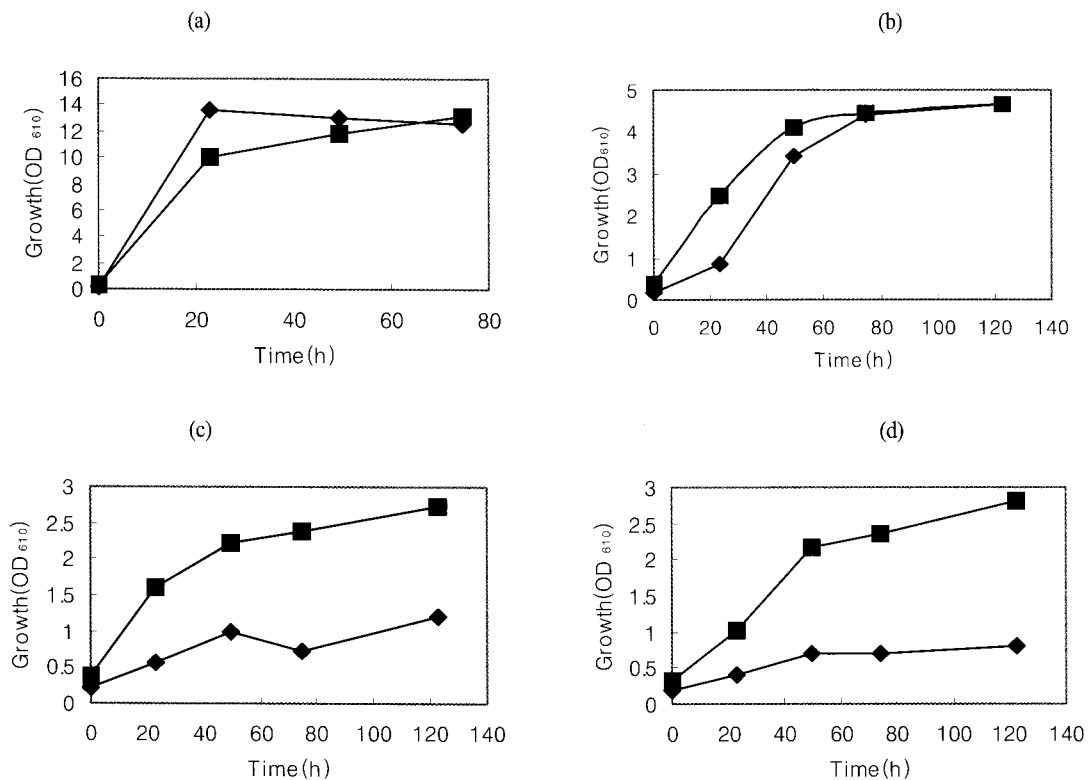
C14-49-3-15-7-3-20의 경우에는 약 78% 정도 inhibition 받았다. 이것으로서 C14-49-3-15-7-3-20은 모균주 I보다 salt에 대해 tolerant하다고 사료된다.

**Production 배지내 당농도에 따른 균체 성장 및 L-lysine 생산량 비교**

F-선별 배지의 당농도에 따른 균체 성장 및 L-lysine 생산량을 알아보려고 하였다. 10%, 15%, 17%로 당농도를 달리하여 배양한 결과 salt-tolerant mutant C14-49-3-15-7-3-20 균주는 모든 농도에서 모균주 I보다 growth 및 L-lysine 생산량이 높았다(Fig. 2). 모균주 I의 경우에는 당농도가 높아짐에 따라 L-lysine 생산량이 낮아지는 반면 salt-tolerant mutant strain C14-49-3-15-7-3-20은 10%와 15%의 당농도에서 60.3 g/L, 59.6 g/L로 생산량이 거의 비슷하였고 17%일 때 균체 농도가 (OD<sub>610</sub>) 23.2, L-lysine 47.4g/L로 growth와 생산량이 감소하였다.

**Production 배지내 salt 농도에 따른 균체 성장 및 L-lysine 생산량 비교**

Mutant strain C14-49-3-15-7-3-20을 이용하여 F-선별배지의 NaCl 농도에 따른 균체 성장 및 L-lysine 생산량을 알아보려고 하였다. 0%, 1%, 2%, 3%로 농도를 달리하여 배양한 결과 모균주 I의 경우에는 NaCl 농도가 증가함에 따라 L-lysine 생산량이 급격히 감소되는 반면 C14-49-3-15-7-3-20

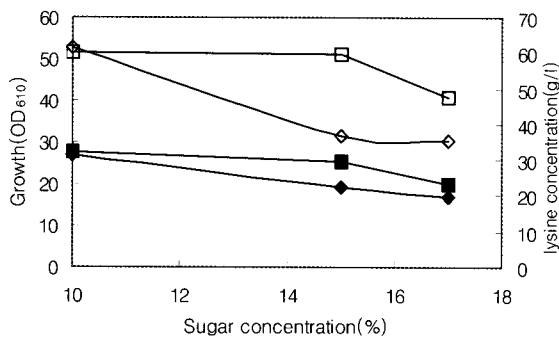


**Figure 1.** Comparison of growth of *C. glutamicum* strain I, salt-tolerant mutant C12-49-3-15-7-3-20 in a liquid medium with high salt concentration (Experiments were conducted by cultivating cells in a 250 ml-Erlenmeyer Flask containing 25 ml of complex medium supplemented with 0.25% (a), 8% (b), 9% (c) and 10% (d) NaCl, which was controlled at 30°C and shaken at 250 rpm (◆; strain I, ■; strain C14-49-3-15-7-3-20)).

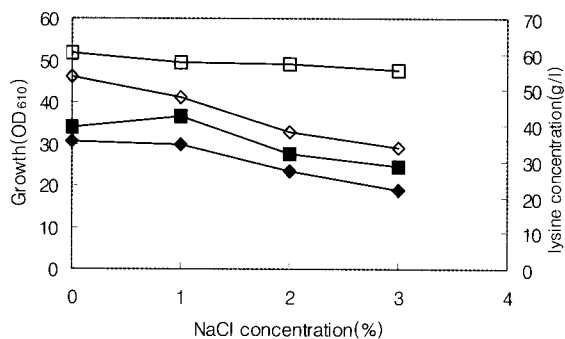
의 경우에는 1%의 NaCl이 포함된 배지에서 57.5 g/L, 2%의 NaCl이 포함된 배지에서는 57.1 g/L 그리고 3%의 NaCl이 포함된 배지에서는 L-lysine 생산량이 55.3 g/L로 크게 감소되지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과를 바탕으로 하여 C14-49-3-15-7-3-20 균주는 salt-tolerance를 가지고 있어서 배지 내에 고농도의 당과 salt를 첨가하여 osmolality가 높은 환경에서도 잘 견딜 수 있는 것으로 사료된다.

**Table 2.** Effect of proline on the growth and L-lysine production by I and salt-tolerant mutants in high salt medium

Strain	2% Salt medium		2% Salt medium + proline	
	Growth (OD <sub>610</sub> )	L-lysine concentration (g/L)	Growth (OD <sub>610</sub> )	L-lysine concentration (g/L)
I	25.0	43.5	31.0	50.1
C14-49-3-15-7-3-20	33.0	60.8	34.0	57.7



**Figure 2.** Effect of high sugar concentration on the L-lysine production and growth in *C. glutamicum* mother I and salt-tolerant mutant C14-49-3-15-7-3-20. Cells were grown in a Erlenmeyer flask(100 ml) containing 10 ml of production (medium with 10%, 15% and 17% at 30°C with shaking at 250 rpm, ◆; growth, ◇; L-lysine for *C. glutamicum* strain I, ■; growth, □; L-lysine for *C. glutamicum* mutant C14-49-3-15-7-3-20).



**Figure 3.** Effect of high salt concentration on the L-lysine production and growth in *C. glutamicum* mother I and salt-tolerant mutant C14-49-3-15-7-3-20. Cells were grown in a Erlenmeyer flask (100 ml) containing 10 ml of production medium with 0%, 1%, 2% and 3% NaCl at 30°C with shaking at 250 rpm (◆; growth, ◇; L-lysine for *C. glutamicum* strain I, ■; growth, □; L-lysine for *C. glutamicum* mutant C14-49-3-15-7-3-20).

**고농도의 salt가 포함되어 있는 production 배지 내 osmoprotective compound 첨가 유무에 따른 균의 생장 및 L-lysine 생산량 비교**

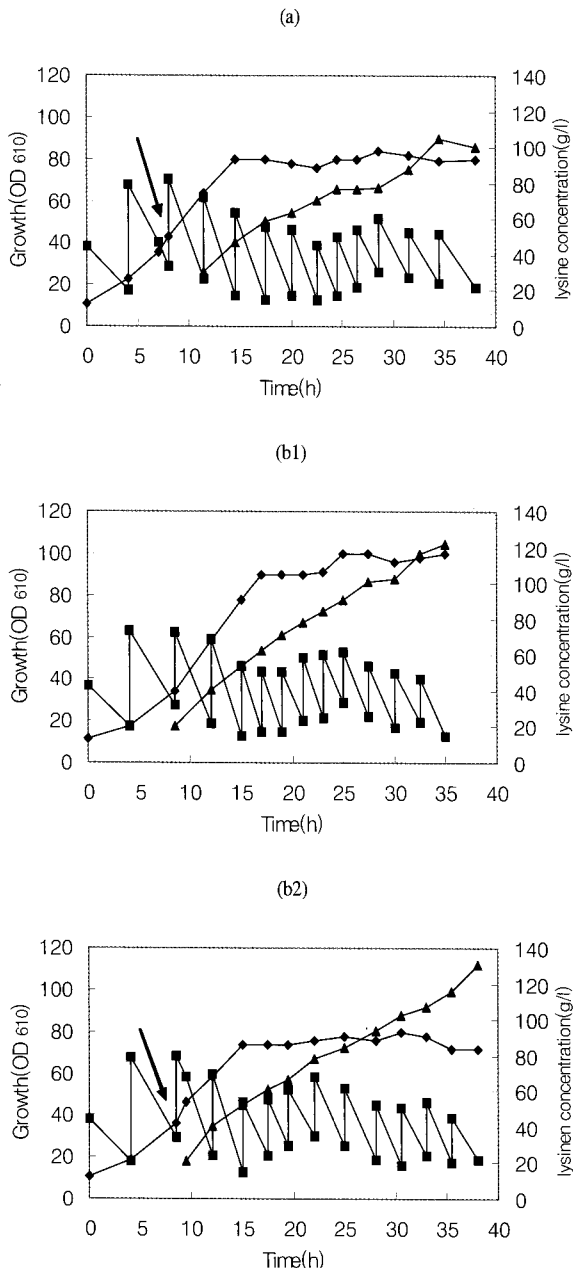
모균주 I와 salt-tolerant mutant를 osmoprotectant인 0.9 g/L의 proline이 포함되어 있는 high salt medium에서 배양하였다(Table 2). 모균주 I는 고농도의 salt가 포함되어 있는 배지에 osmoprotectant를 첨가하였을 경우 첨가하지 않은 경우보다 더 잘 자라고 L-lysine 생산량도 높을 것이다. 하지만 salt-tolerant mutants의 경우에는 salt-tolerance를 가지고 있기 때문에 proline이 포함되어 있는 배지와 포함되어 있지 않은 배지에서의 growth 및 L-lysine 생산량이 비슷할 것이다. 실험을 수행한 결과 I 균주의 경우 2%의 salt만 포함되어 있는 배지에서 균체 농도 (OD<sub>610</sub>) 25.0, 생산량이 43.5 g/L인 반면 proline이 첨가된 배지에서는 균체 농도 (OD<sub>610</sub>) 31.0 g/L, 생산량이 50.1g/L로 증가하였다. 그러나 mutant strain C14-49-3-15-7-3-20의 경우에는 2%의 NaCl은 첨가하고 proline을 첨가하지 않았을 경우 균체 농도 (OD<sub>610</sub>)는 33.0이고 L-lysine 생산량은 60.8 g/L인 반면 proline을 첨가하였을 경우에는 균체 농도 (OD<sub>610</sub>)가 34.0, L-lysine 생산량이 57.7 g/L로 다소 감소한 경향이 나타났다.

**유가식 배양에 의한 L-lysine 생산량 비교**

5 L 발효조를 이용하여 *C. glutamicum* I와 salt-tolerant mutant strain C14-49-3-15-7-3-20 균주를 유가식 배양법으로 배양하여 균의 생장 및 L-lysine 생산량을 알아보았다. 배양시 초기 발효조의 온도를 33°C로 유지하여 배양하면서, PCV가 7.5%가 되는 시점에 온도를 37°C로 올려줌으로서 균체 농도로 가는 탄소의 흐름을 줄이고 L-lysine 생산을 높이고자 하였다. 그 결과 salt-tolerant mutant strain C14-49-3-15-7-3-20의 경우 균체 농도가 (OD<sub>610</sub>) 91.0, L-lysine 농도 113 g/L, L-lysine 수율 41.8%이었다(Data not shown). 하지만 mutant strain C14-49-3-15-7-3-20의 경우 온도를 37°C로 올려주었을 때 균의 생장 속도가 느려지는 것으로 보아 temperature-sensitive mutant인 것으로 사료되어 다음과 같은 실험을 수행하였다.

5 L 발효조를 이용하여 *C. glutamicum* C14-49-3-15-7-3-20 균주를 유가식 배양법으로 배양할 때 온도가 균체 농도 및 L-lysine 생산에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 모균주의 경우 발효 초기의 온도는 33°C로 유지하여 배양하면서, PCV가 7.5%가 되는 시점에 온도를 37°C로 올려줌으로서 균체 농도로 가는 탄소의 흐름을 줄이고 L-lysine 생산을 높이고자 하였다. 그리고 mutant strain의 경우에는 배양 온도를 33°C로 유지하여 배양한 것과 초기 발효조의 배양 온도를 33°C로 유지하여 배양하면서 PCV가 7.5%가 되는 시점에 배양 온도를 35°C로 올려 주고 배양한 것을 비교하였다. Fig. 4에서와 같이 모균주 I는 38시간 동안 배양하였을 때 L-lysine 농도 104.9 g/L, L-lysine 수율 40.5%를 나타내었다. 반면 salt-tolerant mutant C14-49-3-15-7-3-20의 경우 온도를 33°C에서 35°C로 올려 배양하였을 때 L-lysine 농도가 130.6 g/L, L-lysine 수율이 48.6%로 가장 많은 양의 L-lysine을 생산하였다. 그리고 33°C 배양 온도

에서 35시간 동안 배양한 경우에는 L-lysine 농도 122.4 g/L, L-lysine 수율 44.5%를 나타내었다. 그러므로 NaCl에 내성을 가진 *C. glutamicum* C14-49-3-15-7-3 균주의 배양 온도에 따른 L-lysine 생산 양상을 살펴본 결과 초기 발효 온도는 33°C로 유지하여 배양하면서, PCV가 6-8%가 되는 시점에 배양 온도를 35°C로 배양하는 것이 L-lysine의 생산에 적합한 것으로 사료된다.



**Figure 4.** Effect of temperature on the growth and L-lysine production by *C. glutamicum* strain I and salt-tolerant mutant C14-49-3-15-7-3-20 in fed-batch culture (a; strain I, b; strain C14-49-3-15-7-3-20, (a); The Arrow indicate a temperature shifted from 33°C to 37°C, (b2); The Arrow indicate a temperature shifted from 33°C to 35°C (◆; Cell concentration (OD<sub>610</sub>), ■; Sugar concentration (g/L), ▲; L-lysine concentration (g/L)).

## 요 약

본 연구에서는 *Corynebacterium glutamicum* I 균주에 salt tolerance를 도입하여 L-lysine 생산량을 증가시키고자 하였다. I 균주를 이용하여 mutagenesis를 수행한 후 모균주가 생장하는 못하는 9%의 NaCl이 포함된 배지에서 빠르게 생장하는 C14-49-3-15-7-3-20 균주를 선별하였다. flask 배양으로 L-lysine 생산을 조사한 결과 모균주 I의 경우 L-lysine 농도가 53.3 g/L, 수율이 51.6%인 반면 변이주 C14-49-3-15-7-3-20의 경우에는 L-lysine 농도 61.2 g/L, 수율 61.0%로 나타났다. 그리고 5 L 발효조에서 유가식 배양법으로 배양하여 L-lysine 생산량을 조사하였다. 그 결과 모균주는 113.0 g/L의 L-lysine을 생산하였고 수율은 41.8%이었다. 하지만 변이주의 경우에는 33°C로 유지하여 배양한 후 PCV가 7.5%가 되는 시점에 배양 온도를 35°C로 올려주고 배양하였을 때 L-lysine 생산량이 130.6 g/L, 수율이 48.6%로 모균주보다 많은 양의 L-lysine을 생산하였다.

L-lysine 생산과 균주의 생장에 대한 osmotic pressure의 영향을 조사하기 위해 변이주 C14-49-3-15-7-3-20을 고농도의 NaCl과 당이 포함되어 있는 배지에 각각 배양하여 균체 생장 및 L-lysine 생산량을 조사하였다. 그 결과 모균주는 균체 생장이 느리고 생산량도 낮은 반면 변이주 C14-49-3-15-7-3-20의 경우에는 균체 생장 정도가 높고 생산량도 모균주보다 높았다. 그리고 2%의 NaCl이 포함되어 있는 배지에 osmoprotectant를 첨가하였을 경우 모균주는 균체 생장 및 L-lysine 생산량이 높아졌다. 하지만 C14-49-3-15-7-3-20 균주의 경우에는 proline의 영향을 받지 않았다. 이러한 결과로 *Corynebacterium glutamicum* 균주에 salt tolerance를 도입하면 L-lysine 생산성을 크게 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

## 감 사

이 논문은 바스프 주식회사의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

## REFERENCES

- Hopwood, D. A. (1981), The genetic programming of Industrial microorganisms, *Sci. Am.* **245**(3), 30-42.
- Robert, D., R Kiss, and G. Stephanopoulos (1992), Metabolic characterization of a L-lysine-production strain by continuous culture, *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 565-574.
- Keele, R., B. Laufer, C. Brunzema, D. Weuster-Botz, R. Kramer, and C. Wandrey (1996), Reaction engineering analysis of L-lysine transport by *Corynebacterium glutamicum*, *Biotechnol. Bioeng.* **51**, 40-50.
- Hadji, S. A., Queric, M. P., Deschamps, A. M., and J. M. Lebeault (1998), Optimization of L-lysine production by *Corynebacterium sp.* in fed-batch cultures, *Biotechnol. Lett.* **10**(8), 583-586.
- Takiguchi, N., Fukui, N., Shimizu, N., Shimizu, H., and S. Shioya (1998), Method of *Corynebacterium glutamicum* fermentation time extension with high lysine production rate by leucine addition, *J.*

*Ferm. Bioeng.* **86**(2), 180-184.

6. Ohnishi, K. and M. Ikeda (2002), A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant, *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**, 217-223.
7. Kawahara, Y., Yoshibara, Y., Ikeda, S., Yoshii, H., and Y. Hirose (1990), Stimulatory effect of glycine-betaine on L-lysine fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 87-90.
8. Young-Hee Kim, See-young Lee, Hyun-Hwan Lee, Hyung-Hwan Hyun (2001), Production of L-lysine by continuous culture of *Corynebacterium glutamicum*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**(5), 474-479.
9. C. Varela, E. Agosin, M. Klapa, and G. Stephanopoulos (2003), Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 547-555.
10. Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426.
11. Weuster-Botz, D., Kelle, R., Frantzen, M., and C. Wandrey (1997), Substrate controlled fed-batch production of L-lysine with *Corynebacterium glutamicum*, *Biotechnol. Prog.* **13**, 387-393.
12. K. H. Song, H. H. Lee, and H. H. Hyun (2002), Characterization of salt-tolerant mutant for enhancement of L-threonine production in *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 647-651.
13. Csonka, L. N. (1981), Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*, *Mol. Gen. Genet.* **182**, 82-86.
14. Hodgson, J. (1995), Bulk amino-acid fermentation; Technology and commodity trading, *Bio. Technology* **12**, 152-155.
15. Eggeling, L. and H. Sahm (1999), L-glutamate and L-lysine; traditional products with impetuous developments, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 146-153.