

Transposon 및 NTG 돌연변이를 이용한 재조합 대장균의 라이코펜 생산성 증진

¹윤 상 활 · ⁵고 민 수 · ⁵박 경 애 · ⁶정 경 화 · ^{3,6}신 용 철 · ¹이 영 미 · ²이 숙 희 · † ^{1,2,4}김 선 원
¹경상대학교 식품영양학과, ²응용생명과학부, ³미생물학과, ⁴환경생명과학 국가핵심연구센터, ⁵솔젠트(주), ⁶(주)아미코젠
(접수 : 2005. 8. 1., 게재승인 : 2005. 10. 22.)

Enhanced Lycopene Production in Recombinant *Escherichia coli* by Random Transposon and NTG Mutagenesis

Sang Hwal Yoon¹, Min Su Ko⁵, Kyoung Ae Park⁵, Kyung Hwa Jung⁶, Yong Chul Shin^{3,6}
Young Mi Lee¹, Sook Hee Lee², and Seon Won Kim† ^{1,2,4}

¹Department of Food Science and Nutrition, ²Division of Applied Life Science (BK21),
³Department of Microbiology, and ⁴Environmental Biotechnology National Core Research Center,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
⁵SolGent Co. Ltd., Daejeon 302-858, Korea
⁶Amicogen, Inc., Jinju 660-852, Korea
(Received : 2005. 8. 1., Accepted : 2005. 10. 22.)

Escherichia coli harboring pAC-LYCO4 and pDdxs was used for lycopene production. Three wild type strains of *E. coli* OW1, MG1655, and W3110 were compared with DH5 α used before for lycopene production. Lycopene productivity of *E. coli* MG1655 was similar to DH5 α and the highest among those wild type strain. Therefore, MG1655 strain was used for random transposon and NTG mutagenesis to increase lycopene productivity. Through transposon mutation, five transposon mutants with increased lycopene productivity were obtained. It was found that genes knocked out by transposon insertion were *treB* in Tn1 mutant, B2436 in Tn2 mutant, and *rfaH* in Tn3, 4, and 5 mutants. Lycopene productivity was the highest in Tn4 mutant among the Tn mutants, which was 6-fold and 8-fold higher in lycopene concentration and content, respectively, in comparison with those obtained with wild type strain. NTG4 mutant was acquired with NTG mutation. The highest lycopene productivity of 6 mg/L and 4 mg/g DCW was obtained from the NTG4 mutant when arabinose of 0.013 mM was added for induction of *dxs*, rate-limiting gene of MEP pathway. The lycopene productivity of NTG4 mutant was increased 18-fold and 12-fold in lycopene concentration and content, respectively when comparing with the wild type strain.

Key Words : Lycopene, random mutation, transposon, NTG, *Escherichia coli*

서 론

라이코펜은 카로티노이드의 일종으로서 붉은 색을 가지며 주로 토마토에 존재하고, 카로티노이드 중에서 항산화 작용 및 항암 효과가 가장 탁월하여, 이에 관련된 심혈관계 질환, 암, AIDS 예방, 눈질환, 노화 및 퇴행성 질환에 효능이 있다고 알려져 있다(1-3). 식품에 사용되는 라이코

펜은 일반적으로 토마토에서 추출하고, 1 kg의 토마토에서 약 20 mg이 생산되어 생산단가가 매우 높다. 이미 국내외에서 라이코펜이 화학 합성되고 있으나 천연제품과는 다른 입체 이성질체 구조를 갖고 있으며, 잔류 불순물이 많아 사용에 제한이 따르므로 시장 확대가 용이하지 않을 것으로 보인다. 이러한 이유로 최근 선진국에서는 라이코펜 생합성 유전자들을 효모나 대장균에 도입해서 천연 라이코펜을 미생물로부터 경제적으로 생산하는 방법에 관한 연구들을 진행하고 있다(4-6).

라이코펜은 단위 물질인 IPP (isopentenyl pyrophosphate)가 이성체인 DMAPP (dimethylallyl pyrophosphate)에 단계적으로 중합되어 FPP (farnesyl pyrophosphate), GGPP

† Corresponding Author : Division of Applied Life Science,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
Tel : +82-55-751-5974, Fax : +82-55-751-5971
E-mail : swkim@gsnu.ac.kr

Table 1. Strains and plasmids

Strains	Relevant feature	Source or Reference
<i>E. coli</i> DH5a	F ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (τ_K , m_K^+) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i>	
<i>E. coli</i> OW1	Wild type	
<i>E. coli</i> MG1655	Wild type	
<i>E. coli</i> W3110	Wild type	
Plasmids		
pDdxs	pBAD24 derivative; P _{BAD} , <i>E. coli dxs</i> gene	(11, 12)
pAC-LYC	pACYC184 derivative; P _{lac} , <i>Erwinia herbicolor crtE, B, I</i> genes	(12)
pAC-LYCO4	pACYC184 derivative; P _{lac} , <i>Erwinia herbicolor crtE, B, I, ipiHP1</i> genes	(12)

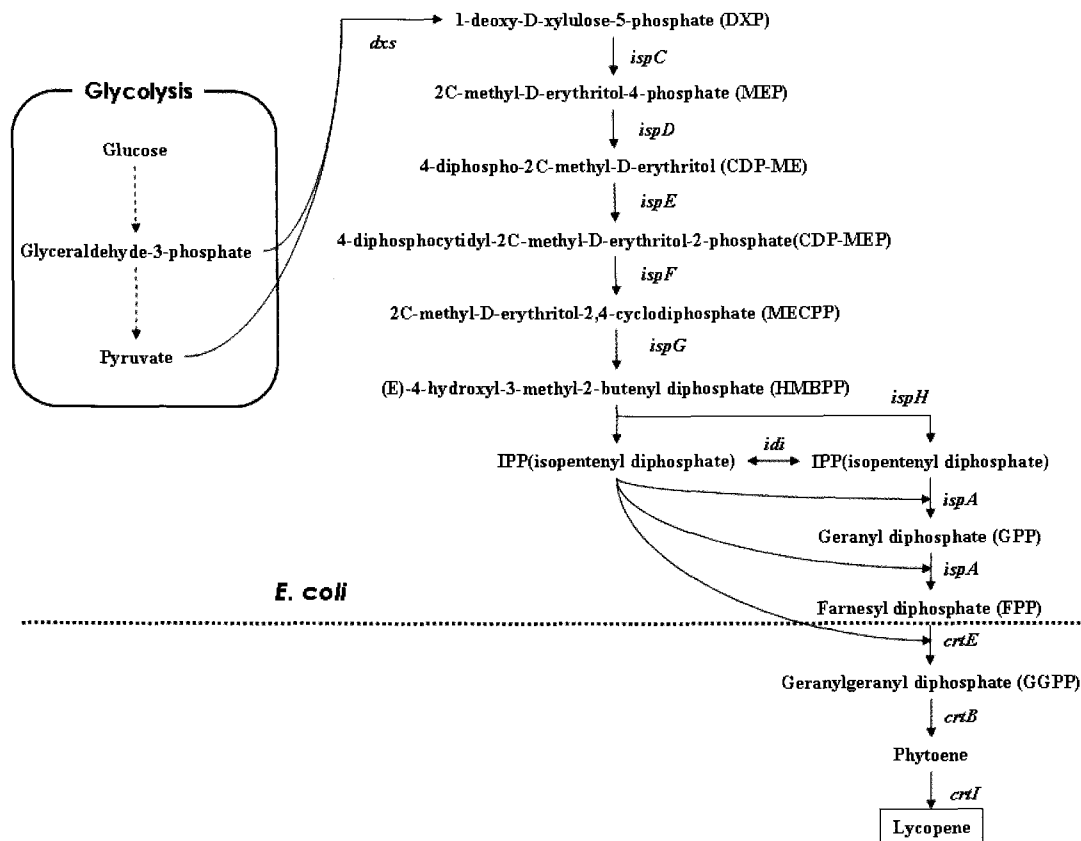


Figure 1. Biosynthesis of lycopene in *E. coli*. Lycopene is synthesized via the glycolysis pathway for glyceraldehyde-3-phosphate and pyruvate, the MEP pathway for IPP and DMAPP, the isoprenyl diphosphate pathway for FPP, and also via the foreign lycopene synthesis pathway composed of *crtE*, *crtB*, and *crtI* genes.

(geranylgeranyl pyrophosphate) 및 phytoene을 거쳐 만들어진다(7). IPP는 일반적으로 원핵생물에서는 MEP (methyl erythritol phosphate) 경로를, 진핵생물에서는 mevalonate 경로를 통해 만들어지며, 전자전달계를 구성하는 ubiquinone이나 menaquinone, 세포벽 구성에 필요한 dolichol 합성에 필수적인 전구물질이 된다(8, 9). 대장균이 갖고 있는 MEP 경로에서는 glyceraldehyde-3-phosphate 한 분자와 pyruvate 한 분자가 결합하여 연속단계로 알려진 *dxs* (deoxyxylulose phosphate synthase) 유전자 및 *ispC*, *D*, *E*, *F*, *G* 및 *ispH*를 거쳐 IPP를 만든다(8, 10). 대장균은 이렇게 만들어진 IPP를 전자전달계 및 세포벽 합성을 위해 FPP까지 중합하지만, 라이코펜 생합성에 필요한 FPP 이후 경로를 갖고 있지 않으므로, 라이코펜 생합성을 위해서는 GGPP synthase (*crtE*), phytoene synthase (*crtB*), phytoene dehydrogenase

(*crtI*)의 세 가지 유전자가 필요하게 된다(Fig. 1). 본 논문에서는 라이코펜 생산 유전자가 도입된 재조합 대장균의 라이코펜 생산성을 향상시키기 위하여 transposon 및 NTG (nitrosoguanidine) 돌연변이 방법을 이용하였고, 이런 무작위 돌연변이 방법이 대사공학 기술을 이용한 균주개량 방법과 더불어 효율적으로 라이코펜 고생산성 균주를 개발하는데 적용될 수 있음을 제시하고 있다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 배양조건

균주 및 플라스미드는 Table 1에 나타내었다. 모든 대장균 균주의 배양은 LB (Luria Bertanii) 배지, 또는 LB 환천

고체배지에서 수행하였다. 선별 항생제로서 ampicillin, kanamycin 및 chloramphenicol을 각각 100, 25 및 50 µg/ml의 농도로 첨가하였으며, pBAD24(11) 플라스미드에 대한 유도물질인 arabinose는 물에 용해하였고 후에 기술한 농도에 따라 투여하였다.

Transposon 돌연변이

균체를 흡광도 600nm에서 1.0까지 배양한 후에 1 ml에 대한 균체를 얻어 10 mM MgSO₄ 400 ml에 현탁한 후 이 중 50 µl를 반응에 사용하였다. 균체 현탁액에 박테리오파아지 λ::TnphoA'-4(13)를 10 µl를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 10 mM MgSO₄가 함유된 LB 배지 300 µl를 첨가하고 다시 37°C에서 2시간동안 방치했다. 반응 후 LB 배지로 2회 세척한 후 kanamycin이 25 µg/ml의 농도로 포함된 LB 한천 고체배지에 도말하였으며, 콜로니가 나온 뒤에 LB 배지로 현탁·회수하여 변이체 라이브러리를 만들어 -70°C에 보관하며 사용하였다.

Inverse PCR 및 염기서열 분석

Transposon 변이체 라이브러리 검색에서 라이코펜 생산이 증가된 균주를 배양 후 균체를 얻어 transposon (Tn)이 삽입되어 있는 염색체 DNA를 추출하였고, 이를 *TaqI* 제한효소로 처리하여 잘려진 DNA를 PCR purification kit (솔젠트(주), 대전)를 이용하여 정제하였다. 정제된 DNA는 희석하여 ligation 반응을 수행하고, 이를 주형으로 하고 TNPO와 TNPI(14)를 primer로 하여 inverse PCR을 수행하였다. PCR 산물은 정제한 후 TNPO를 primer로 sequencing 반응을 수행하고 ABI 3100 genetic analyzer (ABI, US)를 이용하여 염기서열을 결정하였으며, NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 대장균 MG1655의 염색체 염기서열과 비교하여 Tn의 위치를 확인하였다. 염색체 DNA의 분리, 제한효소 처리 등은 Sambrook J. 등(15)에 명시된 방법에 따라 수행하였으며, 반응된 DNA의 정제, ligation 및 PCR은 솔젠트(주)의 제품을 사용하여 수행하였다.

NTG 돌연변이

NTG (Aldrich, USA)는 100 mg/ml로 acetone에 용해시킨 것을 sodium citrate buffer (pH 5.5)로 희석하여 사용하였다. 균체를 흡광도 600 nm에서 1.0까지 배양한 후에 3 ml를 취하여 균체를 얻은 후 citrate buffer로 2회 세척하고 다시 1 ml의 citrate buffer에 현탁하였다. 균체 현탁액에 1 mg/ml로 희석된 NTG 용액을 50 ml 넣고 잘 섞은 후에 37°C에서 20분간 반응 후 얼음에서 냉각시켰다. 충분히 냉각된 반응액을 원심분리하여 균체를 얻었으며, 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 2회 세척하고, 최종 1 ml의 동일 buffer로 재현탁하였다. NTG를 처리한 균체 현탁액은 동일 buffer로 희석하여 LB 한천 고체배지에 도말한 후 37°C에서 배양하였다.

P1 파아지 형질도입

돌연변이가 유발된 균주의 P1 파아지 용균액을 만들기 위해 각각의 균주를 10 mM MgSO₄와 5 mM CaCl₂가 함유

된 LB 배지 3 ml에 배양한 후, 60 µl의 P1 파아지를 첨가하여 균체가 용균될 때까지 약 3시간 정도 배양하였다. 균체가 완전히 용균되었을 때, chloroform 50 µl를 첨가하여 잘 섞은 후 원심분리 하여 그 상층액을 4°C에 보관하며 사용하였다. 수용 세포는 흡광도 600 nm에서 1.0까지 배양한 후 얻은 균체를 400 µl의 10 mM MgSO₄, 5 mM CaCl₂이 함유된 용액에 현탁하였고, 이 중 100 µl를 취하여 앞서 준비한 각 균주의 P1 용균액을 10 µl 첨가해서 30°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액에 700 µl의 LB 배지를 첨가하여 다시 30°C에서 10분간 방치한 후 50 mM sodium citrate buffer (pH 7.0)로 2회 세척하여 LB 한천 고체배지에 도말한 후 37°C에서 배양하였다.

라이코펜의 추출 및 분석

세포 배양액 50 ml을 10,000 rpm에서 3분간 원심분리한 후 회수된 균체를 증류수로 2회 세척하고 105°C에서 12시간 건조하여 건조 균체의 무게를 측정하였다. 배양액 중의 라이코펜을 정량하기 위해서 세포 배양액 300 µl를 원심분리한 후 회수된 균체에 아세톤 1 ml를 첨가하고 55°C에서 15분간 반응하여 라이코펜을 추출하였다. 추출 상등액을 얻기 위하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 침전시킨 후에 상등액을 취해서 470 nm에서의 흡광도를 측정하였다(12, 16, 17).

결과 및 고찰

대장균 균주별 라이코펜 생산성 비교

라이코펜 생산성에 별다른 문제가 없으면서 유전학적 방법들의 도입이 용이한 균주를 찾기 위해서 실험실에서 사용되는 몇 가지의 대장균 균주들을 대상으로 하여 라이코펜 생산성을 시험하였다. 대장균 OW1, MG1655, W3110 균주에 pDdxs와 pAC-LYCO4 플라스미드(Table 1)를 도입해서 라이코펜 생산능력을 부여한 후 기존에 이용되었던 상동성 재조합이 불가능한 대장균 DH5α와 라이코펜 생산성 정도를 LB 한천 고체배지 상에서의 콜로니 색상으로 비교하였다. 라이코펜은 붉은색의 색소물질로 라이코펜 생산량에 비례해서 콜로니의 색은 붉은 색을 띄게 된다. 그 결과, W3110과 OW1 균주의 라이코펜 생산성은 DH5α의 라이코펜 생산성보다 매우 낮았으나 MG1655 균주의 경우에는 DH5α의 라이코펜 생산성과 거의 유사하였다(Table 2). 따라서 유전체 염기서열 분석이 완료되어서 유전학적 연구가 용이할 뿐만 아니라 라이코펜 생산성도 우수한 MG1655 균주를 돌연변이를 이용한 라이코펜 생산성 향상 연구의 숙주균주로 선정하였다.

Transposon 돌연변이를 통한 라이코펜 생산성 향상

대장균 MG1655 균주의 염색체 DNA 내에 존재하는 특정 유전자의 기능이 상실되었을 때 라이코펜 생산성이 증가되는 변이체를 선별하기 위해서 transposon 돌연변이를 수행하였다. 우선 transposon (Tn)인 TnphoA-4가 숙주 균주의 염색체 DNA 내에 무작위로 삽입된 약 25,000 개의 변

이체 라이브러리를 제조하였다. 이 라이브러리에 라이코펜 합성 유전자 함유 pAC-LYCO4 플라스미드를 도입하였고 한천 고체배지 상의 콜로니 색깔을 비교함으로써 야생형 균주의 콜로니 색깔보다 더 진한 붉은 색을 띠는 돌연변이체 14개 균주를 1차 선발하였다.

Table 2. Comparison of lycopene production between different strains of *E. coli*

Plasmids	DH5a	OW1	MG1655	W3110
pAC-LYC	++	++	++	+
pAC-LYCO4	+++	++	++	-
pDdxs/pAC-LYC	++++	-	+++	+
pDdxs/pAC-LYCO4	+++++	++	++++	+

* The "+" signs represent red color intensity of colony and the "-" signs indicate no color.

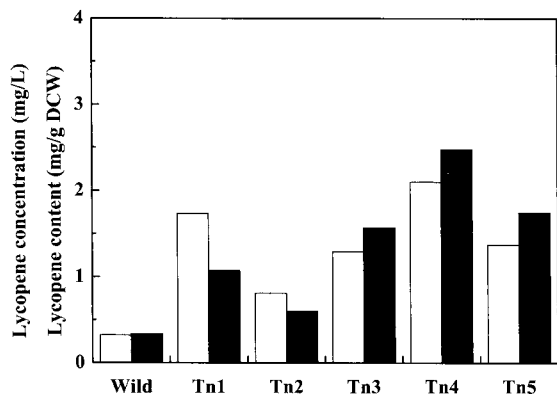


Figure 2. Comparison of lycopene production between Tn mutants and wild type strain of *E. coli* MG1655 harboring pDdxs and pAC-LYCO4. Lycopene concentration and content were indicated with white bar and black bar, respectively. Culture were carried out for 24 hours at 37°C in LB medium containing antibiotics (100 µg ampicillin, 50 µg chloramphenicol, and 25 µg kanamycin per ml) and inducer (arabinose, 0.2% (w/v)).

1차 선발된 돌연변이체의 Tn 부위를 형질도입 방법에 의해 pAC-LYCO4를 함유하는 재조합 MG1655 야생형 균주에 옮겨서 라이코펜 생산성 증가가 그대로 유지되는지를 확인함으로써 최종적으로 5개의 Tn 돌연변이체를 선발하였다 (data not shown here). 이들 Tn 돌연변이체에 MEP 경로의 율속단계 유전자 *dxs*를 갖는 pDdxs 플라스미드를 추가로 도입하고 야생형 MG1655 재조합 균주와의 라이코펜 생산성을 비교하였다(Fig. 2). 라이코펜 생산량과 균체 내 함량 면에서 모두 Tn 돌연변이체가 야생형인 균주에 비해서 2배 이상 높았고, 특히 Tn4 변이체의 경우에는 라이코펜 생산량은 6배, 균체 내 함량은 7배로 가장 높았다. 라이코펜은 균체 내에 축적되는 물질로 생산 공정에서의 유기 용매 추출 공정을 고려할 때에 높은 균체 내 함량은 균주개발의 중요한 기준의 하나가 된다. Tn 삽입에 의해서 결손된 유전자를 파악하기 위하여 Tn 변이체의 염색체 DNA를 분리한 후에 *Sau3AI* 또는 *TaqI* 제한 효소로 절단

하고 self-ligation시켜서 얻은 반응액을 주형으로 하여 inverse PCR을 수행하였다. 그 후에 PCR 산물의 염기서열을 결정하고 NCBI database 상의 대장균 MG1655 균주의 염색체 염기서열과 비교하여 Tn이 삽입된 유전자의 위치를 확인하였다. 그 결과, Tn3, Tn4, Tn5는 *rfaH* 유전자 (transcription antiterminator for polysaccharide associated operons) 위치에, Tn1은 *treB* 유전자 (PTS system enzyme II, trehalose specific), Tn2는 B2436 유전자 (putative multimodular enzyme) 위치에 삽입되어 있음을 확인하였다. 이들 유전자의 기능 상실이 어떻게 해서 라이코펜 생산성 증진에 영향을 미치는지는 유추하기가 쉽지 않았으나, 무작위 transposon 돌연변이를 통해서 기존에 보고가 되지 않은 라이코펜 생산과 관련된 신규 유전자 3개를 발굴하게 되었다. 이러한 결과를 통해서 앞으로 라이코펜 생산균주로 사용하게 될 재조합 대장균에 이들 유전자의 결손을 유도함으로써 부가적으로 라이코펜 생산성을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

NTG 돌연변이를 통한 라이코펜 생산성 향상

라이코펜 합성 유전자를 함유한 MG1655 재조합 균주에 강력한 돌연변이원인 NTG를 처리하여 무작위 돌연변이를 시킨 다음 라이코펜 생산성이 증가된 돌연변이체를 선별하였다. 상기한 transposon 돌연변이는 변이가 일어난 유전자를 알 수 있지만 유도 가능한 변이는 transposon 삽입에 의한 결손으로 제한되는 단점이 있다. 그러나 NTG 돌연변이는 라이코펜 생산성 증가와 관련된 특정 유전자의 기능 상실뿐만 아니라 기능 약화 또는 기능 강화 등의 다양한 변이 유발이 가능하다. 하지만 NTG 돌연변이는 transposon 돌연변이와는 달리 변이가 일어난 유전자 부위를 확인하기가 어려운 단점이 있다.

라이코펜 생산성이 증가된 돌연변이체를 선별하기 위해서 다양한 농도의 NTG를 처리하고, 한 개의 LB 한천 고체 배지에 약 500 ~ 800개의 콜로니가 자랄 수 있도록 희석하여 도말하였다. 그 후에 약 25,000개 이상의 콜로니의 색깔을 비교 관찰하여 MG1655 야생형 재조합 균주의 콜로니 색깔보다 더 진한 붉은색을 나타내는 20개의 돌연변이체를 1차 선발하였다. 또한 대장균 MG1655 염색체 DNA에 변이가 일어나지 않고 pAC-LYCO4 플라스미드에 변이가 일어나서 라이코펜 생산성이 증가될 수 있는 가능성을 배제하기 위하여 1차 선별한 돌연변이 균주로부터 pAC-LYCO4 플라스미드를 제거한 후에 변이가 없는 pAC-LYCO4 플라스미드를 돌연변이 균주에 재도입하여 라이코펜 생산성을 정량하였다. 이 과정을 통해서 최종적으로 5개의 돌연변이 균주를 선별하였다(data not shown here).

pAC-LYCO4 플라스미드를 지니고 있는 이들 4개 NTG 돌연변이 균주에 pDdxs 플라스미드를 부가적으로 도입하여 라이코펜 생산성을 확인해 본 결과, 4개의 돌연변이주 중에서 NTG4로 명명된 돌연변이 균주가 가장 높은 라이코펜 생산성을 나타냈다(Fig. 3). NTG4 돌연변이 균주의 또 다른 장점은 소량의 arabinose 첨가로도 높은 라이코펜 생산성을 얻을 수 있는 것이다(Fig. 4). Arabinose는 pDdxs 플라스미드 내에 존재하는 *dxs* 유전자의 발현 유도 물질로

arabinose의 첨가량이 13.3 mM일 때가 최고의 라이코펜 생산성을 나타냈었던 기존의 연구결과와는 달리 매우 낮은 농도인 0.013 mM의 arabinose에서 라이코펜 생산성이 최대가 되었다. 벡터 pBAD24 내에 도입된 외래 유전자의 발현 유도물질로서 사용되는 arabinose는 가격이 비싸서 라이코펜 대량 생산 공정에 사용하기가 어려운 측면이 있다. 그러나 NTG4 돌연변이 균주를 이용하게 되면 arabinose를 소량 첨가하여도 최대의 생산성을 얻을 수 있으므로 라이코펜 대량생산이 가능할 것으로 기대된다.

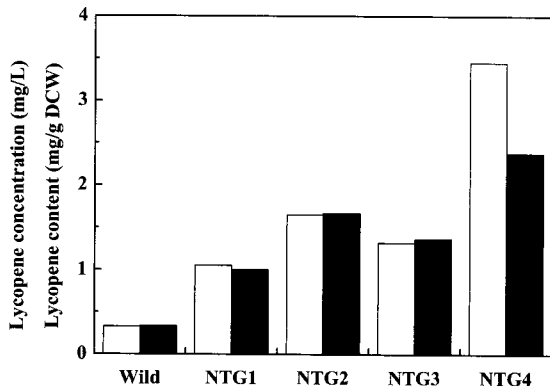


Figure 3. Comparison of lycopene production between NTG mutants and wild type strain of *E. coli* MG1655 harboring pDdxs and pAC-LYCO4. Lycopene concentration and content were indicated with white bar and black bar, respectively. Culture were carried out for 24 hours at 37°C in LB medium containing antibiotics (100 µg ampicillin, and 50 µg chloramphenicol per ml) and inducer (arabinose, 0.2% (w/v)).

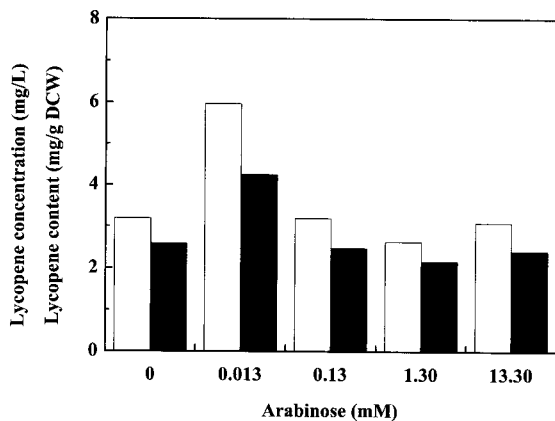


Figure 4. Effect of arabinose concentration on lycopene production from NTG4 mutant. Culture condition was the same as described in Figure 3, except variation of arabinose concentration.

Arabinose 0.013 mM이 첨가된 LB 배지에서 NTG4 돌연변이주는 6 mg/L와 4 mg/g DCW의 라이코펜 생산성을 보였고, 이것은 MG1655 야생형 재조합 균주에 비해서 농도는 18배, 균체 내 함량면에서는 12배 이상 라이코펜 생산성이 증대된 것이다.

본 연구는 대사공학 기술을 이용해서 라이코펜 생산균주의 생산성을 향상시키는 것과 더불어 Tn 및 NTG를 이용한 무작위 돌연변이 기술이 라이코펜 생산균주 개량에 효과적으로 적용될 수 있음을 제시하고 있다. 이것은 라이코펜이 색소물질로서 돌연변이로 생산성이 향상된 콜로니를 색깔로서 쉽게 선별할 수 있기 때문이다. 따라서 무작위로 만들어진 대규모 라이브러리의 탐색도 단시간에 가능하게 된다. 앞에서 언급한 바와 같이 무작위 Tn 돌연변이 연구를 통해서 염색체 상의 *rfaH*, *treB*, B2463 유전자들이 Tn 삽입에 의해 기능이 상실되었을 때 라이코펜 생산성이 증진되는 것을 확인한 바가 있다. 따라서 라이코펜 생산성이 증가된 Tn 변이주들의 변이를 P1 형질도입을 이용해서 NTG 처리에 의해 얻어진 우량 돌연변이 균주 NTG4에 옮긴다면 라이코펜 생산성이 더욱 증가된 새로운 변이주를 얻는 것도 가능할 것이다.

요 약

라이코펜 생산성을 향상시키기 위하여 몇 가지 대장균 균주들을 대상으로 생산성 시험을 한 결과 MG1655 균주가 가장 우수하였다. 대장균 MG1655 균주의 염색체 DNA 내에 존재하는 특정 유전자의 기능이 상실되었을 때 라이코펜 생산성이 증가되는 변이체를 선별하기 위해 transposon 돌연변이를 수행하였으며, 5종의 우수 transposon 변이체를 얻었다. 특히, Tn4 변이체는 야생형 MG1655에 비해서 라이코펜 생산량은 6배, 균체 내 함량은 7배로 가장 높았다. Transposon 삽입에 의해 결손된 유전자를 파악하기 위해 inverse PCR을 통해 염기서열을 확인하였으며, 결손된 유전자는 *rfaH*, *treB*, B2436으로 규명되었다. 또한 특정 유전자 기능의 상실뿐만 아니라 기능의 강화나 변화 등에 의한 라이코펜 생산성이 증가된 변이체를 선별하기 위해 NTG 돌연변이를 수행하였으며, 4개의 우수한 NTG 변이체를 얻었다. 이들 중에 NTG4 변이체가 가장 높은 라이코펜 생산량을 보였다. 특히, NTG4 변이체는 발현유도물질인 arabinose의 소량 (0.013mM) 첨가 시에 라이코펜 농도, 6 mg/L와 균체 내 함량 4 mg/g DCW로 최대의 라이코펜 생산성을 보였고, 이것은 야생형 MG1655에 비해서 각각 18배와 12배 높은 생산성이다.

감 사

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단 (KRF-2003-002-F00059)의 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bendich, A. (1993), Biological functions of dietary carotenoids, *Ann N. Y. Acad. Sci.* **691**, 61-67.
- Rice-Evans, C. A., Sampson, J., Bramley, P. M., and D. E. Holloway (1997), Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo*? *Free Radic. Res.* **26**, 381-398.
- Jyonouchi, H., Hill, R. J., Tomita, Y., and R. A. Good (1991),

- Studies of immunomodulating actions of carotenoids. I. Effects of beta-carotene and astaxanthin on murine lymphocyte functions and cell surface marker expression in *in vitro* culture system, *Nutr. Cancer* **16**, 93-105.
- Misawa, N., Yamano, S., and H. Ikenaga (1991), Production of beta-carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthesis genes from *Erwinia uredovora*, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1847-1849.
 - Sandmann, G. (1994), Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants, *Eur. J. Biochem.* **223**, 7-24.
 - Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., and N. Misawa (1994), Metabolic engineering for production of beta-carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1112-1114.
 - Cunningham, F. X., Jr., Chamovitz, D., Misawa, N., Gantt, E., and J. Hirschberg (1993), Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of beta-carotene, *FEBS Lett.* **328**, 130-138.
 - Eisenreich, W., Rohdich, F., and A. Bacher (2001), Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids, *Trends Plant Sci.* **6**, 78-84.
 - Boucher, Y. and W. F. Doolittle (2000), The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways, *Mol. Microbiol.* **37**, 703-716.
 - Rohdich, F., Kis, K., Bacher, A., and W. Eisenreich (2001), The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 535-540.
 - Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., and J. Beckwith (1995), Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter, *J. Bacteriol.* **177**, 4121-4130.
 - Kim, S. W., and J. D. Keasling (2001), Metabolic engineering of the nonmevalonate isopentenyl diphosphate synthesis pathway in *Escherichia coli* enhances lycopene production, *Biotechnol. Bioeng.* **72**, 408-415.
 - Wilmes-Riesenberg, M. R. and B. L. Wanner (1992), TnpA and TnpA' elements for making and switching fusions for study of transcription, translation, and cell surface localization, *J. Bacteriol.* **174**, 4558-75.
 - Ko, M. and C. Park (2000), Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* **303**, 371-382.
 - Sambrook, J. and D. W. Russell (2001), *Molecular Cloning*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 - Kang, M. J., Y. M. Lee, S. H. Yoon, J. H. Kim, S. W. Ock, K. H. Jung, Y. C. Shin, J. D. Keasling, and S. W. Kim (2005), Identification of genes affecting lycopene accumulation in *Escherichia coli* using a shot-gun method, *Biotech. Bioeng.* In press.
 - Kang, M. J., S. H. Yoon, Y. M. Lee, S. H. Lee, J. E. Kim, K. H. Jung, Y. C. Shin, and S. W. Kim (2005), Enhancing lycopene production in *Escherichia coli* by optimization of lycopene synthetic pathway, *J. Microbiol. Biotech.* In press.