

자외선 및 NTG 돌연변이 유도에 의한 *Penicillium brevicompactum* 변이주의 Mycophenolic Acid (MPA) 생산성 비교

¹엄병환 · ²최주영 · ³하병집 · ²김영수 · †²오경근

¹메인주립대 공과대학 화학생물공학과, ²단국대학교 공과대학 응용화학공학과, ³(주)코트데 기업부설연구소
(접수 : 2008. 07. 07., 게재승인 : 2008. 10. 20.)

Comparison of Mycophenolic Acid Production by *P. brevicompactum* Mutants Induced through UV and NTG Treatments

Byung-Hwan Um¹, Ju-Young Choi², Byung-jhip Ha³, Young-Soo Kim², and Kyeong-Keun, Oh^{2†}

¹Department of Chemical and Biological Engineering, University of Maine, Orono, ME 04469, USA

²Department of Applied Chemical Engineering, Dankook University, Cheonan, Choongnam, 330-714, Korea

³R&D Center, Cotde Co., Ltd, Cheonan, Choongnam, 330-858, Korea

(Received : 2008. 07. 07., Accepted : 2008. 10. 20.)

Recently, importance of immunosuppression is increasing as internal organ transplant becomes more prevalent with development of medical technology. Mycophenolic acid (MPA) is a selective inhibitor of guanine synthesis and it therefore has antibacterial, antiviral, antitumor and selective immunosuppressive activities. The objective of this study was to maximize MPA productivity through utilizing the MPA generating strain of *Penicillium brevicompactum* ATCC 16024, by inducing UV mutation and NTG mutation. The highest MPA obtained was 1.146 g/L, 2.051 g/L, and 1.390 g/L from *P. brevicompactum* UB-3, UB-9, UC-4 respectively mutants derived from UV treatment. *P. brevicompactum* NC-3 and NA-9 induced from NTG treatment yielded. 575 g/L, 2.238 g/L of MPA production respectively. Mutants capable of the highest observed production of MPA were *P. brevicompactum* UB-9 and *P. brevicompactum* NC-3 obtained using the UV and NTG treatments respectively.

Key Words : mycophenolic acid (MPA), *penicillium brevicompactum*, UV mutation, NTG mutation

서 론

Mycophenolic acid (MPA)는 1896년 Gosio에 의해 *Penicillium* 배양물에서 처음으로 분리되었고, *P. brevicompactum*, *P. stoloniferum*, *P. scabrum*, *P. nagemi*, *P. saferi*, *P. patrismei*, *P. griseoburnneum*, *P. vifidicatum*, *P. roqueforti* 등에서 MPA가 생산된다고 보고되고 있다(1). mycophenolic acid (MPA)는 장기이식 후에 발생하는 거부반응을 예방하기 위해 임상적으로 널리 사용되는 면역억제제인 mycophenolate mofetil (MMF)의 활성 화합물이다. MMF는 이식항원 자극에 대한 T 및 B 림프구의 증식을 억제하여 장기이식 거부반응을 막는다고 밝혀져 있다.

1991년 Allison 등에 의해 개발되고 1995년에 처음으로 신

장이식에 사용된 MPA의 ester형 유도체인 mycophenolate mofetil (MMF)는 경구투여시 esterase에 의해 가수분해되어 MPA로 빠르게 전환되어 강력한 면역억제효과를 나타내는 약제이다(2, 3). 면역억제제는 장기이식뿐만 아니라 루푸스, 천식, 당뇨병 등 자가면역질환에도 필수적이며, 환자들의 생존률을 획기적으로 연장시키는 중요한 약물로써 많은 국내외 기업들이 보다 진일보된 면역억제제의 연구개발에 심혈을 기울이고 있다. 이에 따라 면역억제제의 개발은 이제 경제성이 뛰어난 고부가가치 품목으로 된 지 오래이며, 이와 관련된 의료 제품, 기술, 의약품의 개발 및 국내외 시장은 무궁하다고 할 수 있다. 적응증 분야도 기존의 암, 바이러스 감염에서 면역보조제, 자가면역질환, 장기이식은 물론 신규치료제 개발이 포화상태에 있는 알러지성 질환 및 류마티스 관절염 등의 분야에서도 면역조절제의 필요성이 대두되고 있어 지속적인 관심과 참여가 요구되는 분야이다.

Fig. 1은 MPA와 그 유도체인 MMF의 구조식을 나타낸 것이다. MPA와 MMF는 항종양 (antineoplastic), 면역억제

† Corresponding Author : Department of Applied Chemical Engineering, Dankook University, Cheonan, Choongnam, 330-714, Korea.

Tel : +82-41-550-3558, Fax : +82-41-550-3509

E-mail : kkoh@dankook.ac.kr

(immunosuppressive), 항바이러스 (antiviral), 항진선 (antipsoriasis), 항진균 (antifungal) 활성과 같은 생물학적 성질을 갖는다(4-6). MPA는 선택적이고, 비경쟁적인 inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH)의 작용을 억제하여 purine 합성을 차단함으로써 선택적으로 B세포와 T세포의 증식, 항체 생성, 그리고 세포독성 T세포의 형성을 억제한다(1). 림프구의 증식을 억제할 뿐 아니라, 혈관평활근 세포 및 사구체 혈관간세포 등의 비림프구 세포에서도 증식 억제효과를 지닌다. 임상적으로, MPA는 단독 혹은 병합투여에서 이식신의 장기 생존율을 증가시킨다. 림프구에서 MPA는 IMPDH를 통한 guanosine 생성경로를 차단함으로써 증식을 억제하지만, 비림프구에서는 IMPDH에 대한 의존도가 상대적으로 낮다. IMPDH는 2종류가 있으며 Type I 효소는 주로 휴식기 림프구에서 발견되는 것에 반해, Type II 효소는 주로 활성기 림프구에서 발견되는데, MPA는 Type I 보다 Type II IMPDH에 5배 정도의 친화도를 갖는다.

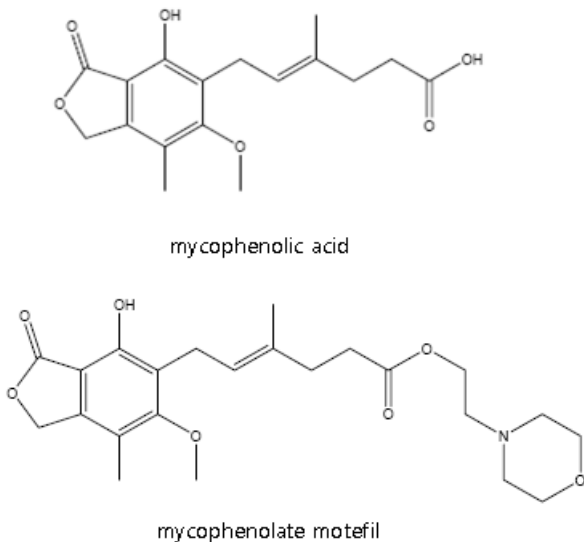


Figure 1. Chemical structure of mycophenolic acid and mycophenolate mofetil.

현재 장기 이식환자들에게 가장 널리 사용되고 있는 3대 면역억제제는 cyclosporine A, FK506 그리고 MPA이다. Cyclosporine A, FK506보다 선택적인 면역억제제라는 MPA의 작용기작이나 부작용 등에 대해서는 활발한 연구가 행해지고 있지만(9) 대량생산을 위한 액집배양, MPA 생산에 영향을 끼치는 배지 조성 또는 생산성 향상에 대한 연구는 아직까지는 드문 상황이다.

본 연구에서는 MPA를 생산하는 *P. brevicompactum* ATCC 16024에 대해 자외선과 NTG 돌연변이를 유도하여 균체의 생산성을 증가시키고자 하였다. 또한 다양한 변이주 선별 실험을 위한 생물학적 정량분석 (Bioassay) 방법이 요구됨에 따라 MPA의 생산에 대하여 생물학적 정량과 HPLC 정량분석을 이용하여 비교 분석하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양방법

본 연구에 이용된 균주 *Penicillium brevicompactum* ATCC

16024는 (주)코람바이오텍 (Dajeon, Korea)로부터 분양받았으며, Potato Dextrose Agar (PDA) (Aldrich Co., USA)에서 28℃로 10일간 배양하여 사용하였다. *Candida albicans* KCCM 11282 (Korean Culture Center of Microorganisms)는 (사)한국종균협회에서 분양받아 대량균주로 사용하였으며, PDA에서 30℃로 24시간 배양하여 사용하였다. 각 균주는 한천배지에서 활성화시켜 사용하였고, 장기간 보관 시 15% 글리세롤 stock 상태로 -70℃에서 보관하여 사용하였다. 모든 배지는 고압멸균기 (Sangwoo 500 L, Korea)에서 121℃, 15분간 멸균 후 사용하였다.

종배양 (seed culture)을 위해 고형배지에서 보존중인 균주를 0.5cm³ 정도로 조각내고, 2~3조각을 30 ml의 배지가 함유된 250 ml 용량의 삼각플라스크에 접종하여 진탕배양기 (VS8480SF, Vision Science Co. Ltd., Korea)에서 28℃, 250 rpm으로 3일 동안 진탕 배양 하였다. 종배양을 위한 배지는 1 N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 조절하였다. MPA 생산배지는 3일간 배양한 종배양물을 30 ml의 배지가 함유된 250 ml 삼각플라스크에 10% 접종하여 종배양과 동일한 조건으로 배양하였다(8).

Mycophenolic acid (MPA) 분석

생물학적 분석 (Bioassay)을 이용한 MPA의 정량분석

MPA의 항진균 활성을 측정하기 위하여 *Candida albicans*를 시험균으로 하여 직경 9cm 배양접시에 20 ml의 PDA배지를 가한 평판배지에 시험균을 도말하고, 직경 8 mm, 두께 0.5 mm의 종이원판 (paper disc)에 20 μl의 배양액을 가한 후 배지 위에 올려놓고, 30℃ 배양기에서 24시간 배양하여, 평판배지에 생성된 생장저해환의 직경으로 MPA의 생산량을 측정하였다.

HPLC를 이용한 MPA의 정량

2 ml의 배양액을 에탄올 (ethanol)과 1 : 10의 부피로 섞어 2시간 동안 진탕배양기에서 350 rpm으로 교반하고, 1.5 ml을 7000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 HPLC로 분석하였다. 분석에 사용한 HPLC (Waters Co., USA)는 1515 isocratic pump, 717 plus autosampler, 2996 photodiode array detector로 구성되어 사용하였으며, Monomeric C₁₈ column (4.6 mm×250 mm) (Grace Vydac., USA)을 이용하여 254 nm의 파장에서 측정하였다. Peak height는 Millennium v2.15 software (Waters Co. USA)를 사용하여 분석하였으며, 이동상은 0.05 M phosphate buffer (pH 3.2)-acetonitrile을 45 : 55 (v/v)의 비율로 혼합하여 사용하였다. 유속은 0.5 ml/min으로 운전하였으며, 컬럼의 온도는 실온으로 수행하였다.

P. brevicompactum 돌연변이

자외선 돌연변이 (Ultraviolet mutation)

PDA배지를 사용하여 28℃에서 10일간 배양시켜 균체를 살균된 생리식염수 10ml에 현탁시킨 후 포자 현탁액을 조제하기 위해 멸균된 유리섬유 (glass wool)로 여과시켜 균사를 제거시킨 후, 포자만을 회수하여 돌연변이에 이용하였다. 포자 현탁액은 생리식염수로 ml당 포자가 10³에서 10⁴회 희석하여 PDA 배지에 100 μl씩 분주하였다. 분주한 평판배지를 20 W 자외선 등 2~5 (254 nm)개가 45~65cm 거리에 설치된 UV mutator (자체제작)에서 15초 간격으로 150초까지 자외선을 조사시켜 돌연변이 유도를 한 후 즉시 알루미늄 호일로 차광하여 광회복

에 의한 DNA 복구가 일어나지 않도록 하였다. 28°C의 배양기에서 10일간 배양하였다(Fig. 2. UV mutation 참조).

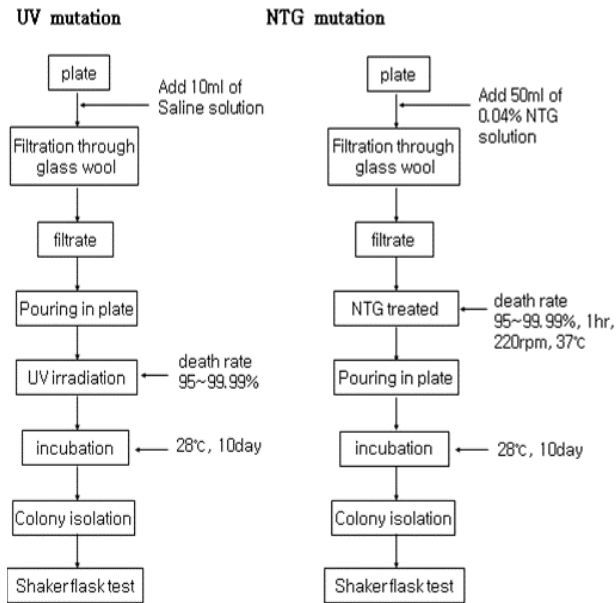


Figure 2. Flow diagram for the mutation of *P. brevicompactum* with UV irradiation and NTG.

N-methyl-N-nitro-N-nitroguanidine 돌연변이 (NTG mutation)

PDA에서 28°C로 10일간 배양한 균체를 살균된 생리식염수 5 ml에 현탁시킨 후 glass wool로 여과시켜 균사를 제거하였다. 이를 6,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 한 후 멸균수를 제거하고 0.04% NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, Sigma)를 첨가하여 잘 섞어준 다음 진탕배양기 (38°C, 220 rpm)에서 60분 동안 돌연변이를 유도하였다(9). 이것을 9,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 멸균수 2 ml로 세척을 2회 실시하여 NTG를 제거하였다. 최종적으로 0.8% saline solution (NaCl) 2ml을 첨가하여 원액을 만들고 PDA 평판배지에서 균체수가 100-200개 정도 되도록 희석하여 도말한 다음 알루미늄 호일로 싸서 28°C 배양기에서 10일 동안 배양하였다(Fig. 2. NTG mutation 참조).

결과 및 고찰

생물학적 정량을 위한 대상균주 선정

P. brevicompactum ATCC 16024가 생산하는 MPA의 항균 활성을 조사하기 위하여 수종의 세균과 진균에 대한 항균 활성을 측정하였다. Table 1에 대상균주와 배양 조건에 대하여 나타내었다. 박테리아는 nutrient agar (NA) 배지를 사용하여 *E. coli*와 *S. aureus*, *S. enteritidis*는 37°C 배양기에서 24시간, *B. cereus*는 30°C 배양기에서 12시간 배양하여 측정하였고, 진균류는 potato dextrose agar (PDA) 배지를 사용하여 *V. lecanii*는 25°C, *A. fumigatus*는 28°C 배양기에서 120시간, *C. albicans*는 30°C 배양기에서 24시간 배양하여 생성된 성장저해환을 비교하여 항균활성을 측정하였다.

Table 1. Comparison of antimicrobial activity of MPA against various microorganisms

Microorganism	Culture conditions			Antimicrobial activity	
	Temp (°C)	Media ^{a)}	Time (hr)		
Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	37		24	-
	<i>Sfaphylococcus aureus</i>	37	NA	24	-
	<i>Salmonella enteritidis</i>	37		24	-
	<i>Bacillus cereus</i>	30		12	-
	<i>Verticillium lecanii</i>	25		120	+
Fungi	<i>Aspergillus fumigatus</i>	28	PDA	120	-
	<i>Candida albicans</i>	30		24	+

^{a)} Type of media; NA : Nutrient Agar, PDA : Potato Dextrose Agar.

P. brevicompactum ATCC 16024에서 생산되는 MPA는 표 1에서 나타낸 바와 같이 *C. albicans*와 *V. lecanii*에 대해서는 항진균력이 나타났으나 *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *B. cereus*, *A. fumigatus*에 대해서는 항진균력이 없는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 생물학적 정량분석의 대상 균주로 *C. albicans*을 이용하였다.

MPA의 추출 및 정량분석

P. brevicompactum ATCC 16024를 PDB에서 10일간 배양한 배양액으로부터 MPA를 추출하였다. 세포 내부의 MPA와 세포 외부의 MPA의 농도를 각각 측정하기 위해 균체와 배양 여액을 나누고, 추출 용매 (에탄올)를 첨가하여 MPA를 추출하였다. 또한, 추출 효율을 증가시키기 위해 균질화 및 초음파 처리 (37kHz)방법으로 MPA 추출 실험을 하였다.

초음파 처리 시간에 따른 MPA 추출량은 초음파 처리 30분까지는 MPA의 양이 증가하다가 30분 이후로는 MPA의 추출량에 큰 차이를 보이지 않게 되었다(data not shown). 따라서 배양액의 최적 추출조건으로 30분간 초음파 처리한 배양물을 에탄올과 1 : 10의 비율로 혼합하여 추출하는 것으로 선정하였다.

Fig. 3은 HPLC정량분석을 위한 MPA의 표준 크로마토그램과 실제 배양액을 추출한 시료를 분석한 결과이다. 표준물질과 동일한 체제시간에 다른 물질의 방해를 받지 않는, 분석이 용이한 결과를 얻었다. 또한 Fig. 4는 MPA의 농도 (HPLC 분석)와 생물학적 정량분석법에 의한 대상균주의 저해환의 관계를 나타낸 것이다. 0.1 g/L이하의 농도 범위에서는 MPA의 농도가 증가함에 따라 저해환의 직경이 선형으로 증가하였지만, 그보다 더 높은 농도에서는 비례하지 않았으며, 0.6 g/L 이상에서는 저해환의 크기에 영향을 미치지 못해 생물학적 정량분석은 0.1 g/L 이하로 희석하여 정량 분석하였다. Fig. 4는 배양액의 추출 방법과 배양액 부분별 MPA농도에 관하여 생물학적 정량법과 HPLC를 이용해 비교 분석한 결과이다. 그림에서 보이는 것처럼 균질화 처리는 MPA 추출에 효율을 보이지 못했지만, 초음파 처리는 효과적으로 MPA를 배양액으로부터 추출할 수 있었다. 또한 배양액에서는 MPA의 농도가 상대적으로 높게 나타났지만, 균체에서 추출한 MPA의 농도는 아주 낮은 것으로 *P. brevicompactum* ATCC 16024에서 생산되는 MPA는 세포의 생산물 (extracellular product)인 것으로 판단되었다. 생물학적 정량 방법에서 균체 내부의 MPA를 얻을 수 없었던 이유는, 미량의 MPA 항진균 활성이 너무 미약하여 육안에 의한 저해환으로 표시될 수 없었던 것으로 사료된다.

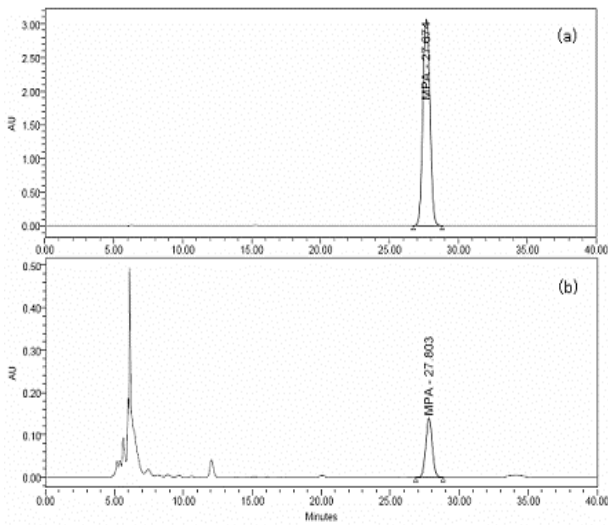


Figure 3. HPLC chromatograms of standard MPA (a) and MPA in culture broth (b).

Fig. 5에서 보여지는 것처럼 추출 시 초음파 처리 유무에 따른 MPA 추출 결과를 나타내었다. 초음파 처리한 배양액과 균체에서 0.756 g/l과 0.043 g/l, 아무 처리하지 않은 시료에서 0.532 g/l과 0.021 g/l의 MPA를 얻었다. 처리하지 않은 배양액과 균체에서 얻은 MPA의 농도와 비교하여 초음파 처리한 시료에서 얻어낸 MPA는 각각 142%와 204%로 MPA 추출량이 증가하는 것으로 확인되었다.

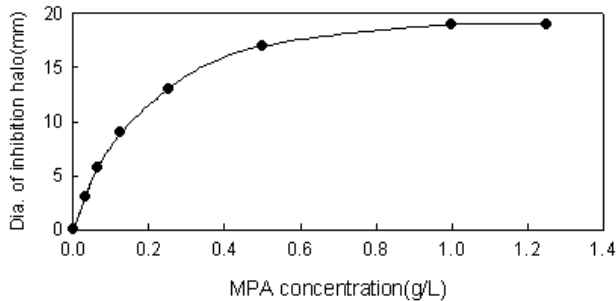


Figure 4. Relation of MPA concentration to diameter of inhibition halo.

자외선 돌연변이 (UV mutation)

미생물의 돌연변이 유도에 물리적 유도원으로 가장 많이 사용되는 방법은 자외선 돌연변이이다. PDA 배지에 균주를 분주한 후 자외선을 시간에 따라 가하고 10일 동안 28℃ 배양기에서 배양하여 변이주를 얻었다. 자외선 조사 균주의 자외선에 의한 균주의 생존율은 Fig. 6에 나타내었다. 자외선 조사시간이 60초일 때 10%, 75초일 때 6%, 120초 일 때 1% 미만의 생존율을 얻었다. 자외선 광원과 시료와의 거리는 균주의 생존율 변화에 큰 영향을 미치지 못한 것으로 판단하여 본 실험에서의 광원과 시료와의 거리는 65cm로 고정하여 실험을 수행하였다. 고생산성 균주를 탐색할 때 무작위 선별된 변이주 균집 모두를 배양하여 검정하는 것은 많은 시간, 비용, 인력을 필요로 하므로 대량 정량분석을 위하여 *Candida albicans*에 대한 MPA의 항진균 활성을 이용하여 변이주를 선별하였다. 본 실험에서는 자외선 투광시간을 120초로 하여 1% 미만의 생존된 균주를 대상으로 *C. albicans*에 대한 MPA

의 항진균 활성을 측정하였다. 대조구와 비교해 *P. brevicompactum* UB-9의 성장저해환의 비율이 2.13으로 다른 변이주들의 항진균 활성에 비해 다소 높은 값을 나타내었다(Fig. 6). 항진균 활성을 이용한 1차 변이주 선별 후, 선별된 변이주를 액침 배양하여 MPA 생산량을 측정하였다. Fig. 7은 각 변이주들의 MPA 생산량을 HPLC 분석 값으로 나타낸 것으로 Fig. 6의 생물학적 정량 방법과도 잘 일치하는 것으로 나타났다. *P. brevicompactum* UB-3, UB-9, 그리고 UC-4에서 각각 1.146 g/L, 2.051 g/L, 그리고 1.390 g/L의 MPA를 생산하였다. 따라서, 자외선 돌연변이주로 UB-9가 MPA 생산에 적합한 변이주로 결정되었다.

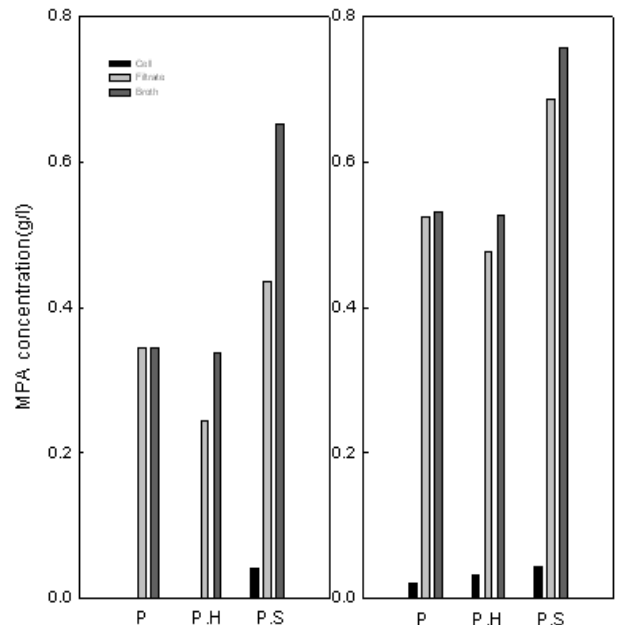


Figure 5. MPA production in cell, filtrate, and broth treatment with homogenization and sonification; analyzed with bioassay (left) and HPLC (right). Note - P: untreated, H: Homogenization, and P.S: Sonification.

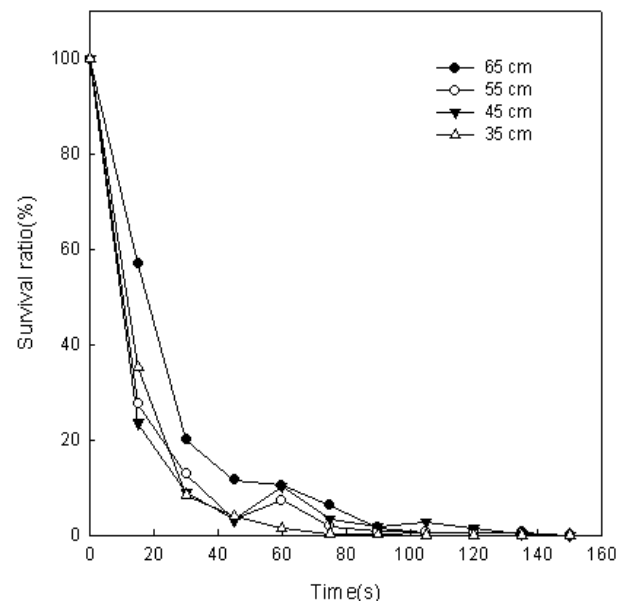


Figure 6. Survival ratio of selected strain treated with UV irradiation (1.2 μJ/cm²) at various distances.

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 돌연변이 (NTG mutation)

미생물의 화학적 돌연변이 유도원으로 사용되는 NTG에 대한 생존율은 Fig. 9에 나타내었다. NTG 처리시간 0~10분 사이에 생존율이 급격하게 떨어졌으나, 그 이후의 생존율은 미세하게 감소함을 보였다. 0.02% NTG 처리 10분이 지났을 때의 생존율은 2.02%였고, 60분에서 1.12%, 90분에서 0.3% 생존율을 얻었다. 본 실험에서는 NTG 처리시간을 60분으로 하여 1.12%의 생존된 균주를 대상으로 자외선 돌연변이에서의 같이 변이주를 선별하였다. 1차 선별된 변이주의 액침배양 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 1차 선별된 변이주에서 대조군보다 MPA 생산이 높게 나타난 변이주는 *P. brevicompactum* NA-9와 NC-3이었으며, 각각 1.575 g/l, 2.238 g/l의 MPA 생산성을 보였다.

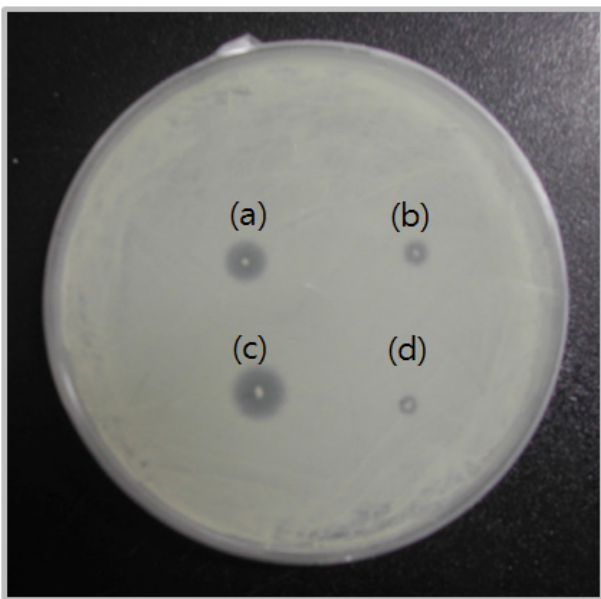


Figure 7. Inhibition zone of MPA produced by *P. brevicompactum* and its mutants. (a) UC-4, (b) UD-1, (c) UB-9, (d) Control.

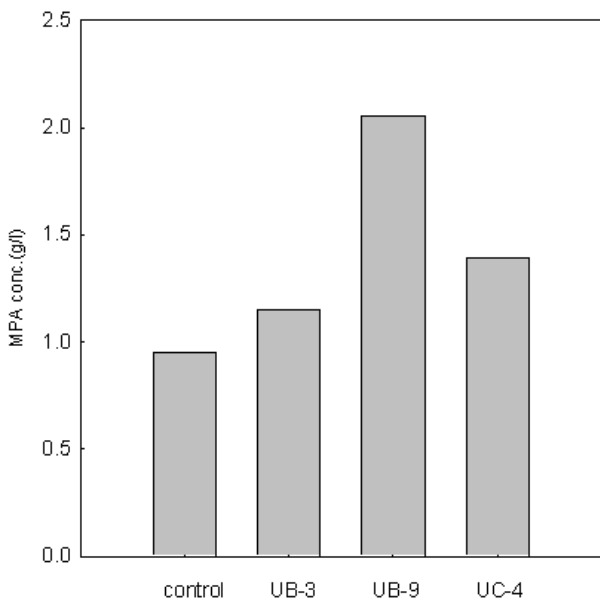


Figure 8. MPA production by mutants after UV irradiation (1.2 μJ/cm²).

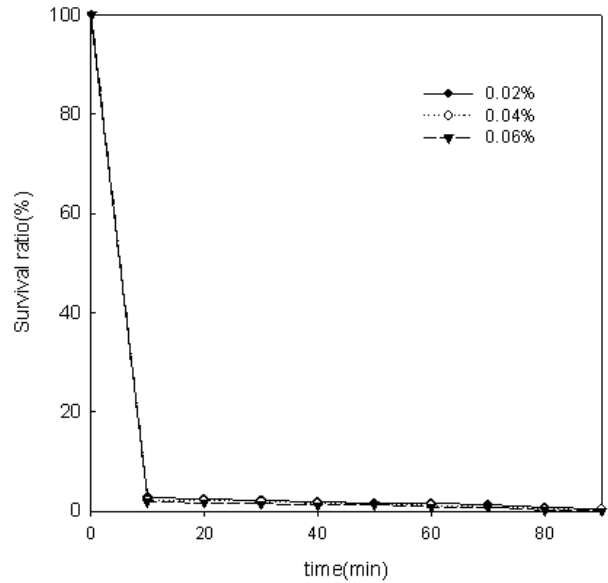


Figure 9. Survival ratio of selected strain treated with various NTG concentrations.

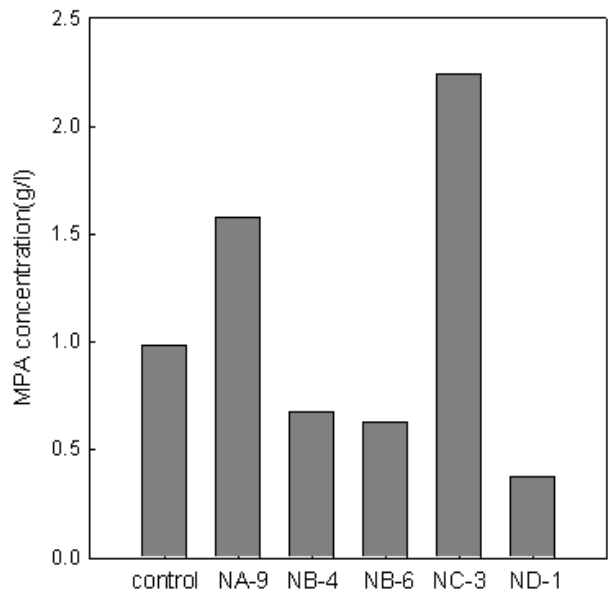


Figure 10. MPA production by mutants with NTG mutation (0.02%).

결론

P. brevicompactum ATCC 16024이 생산하는 MPA의 돌연변이 유도에 의한 균주 개발에 대한 연구를 수행하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 생물학적 정량분석과 HPLC를 이용한 정량분석의 비교 결과, 시료중 MPA의 양이 0.1 g/L 이하에서는 선형으로 증가하여 비교적 합리적인 상관관계를 얻을 수 있었으므로 변이주의 선별 실험에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 MPA는 세포외 물질로서 판명되었고, 배양액으로부터 MPA를 추출할 때에는 초음파 처리를 수행함으로써 추출 효율을 높일 수 있었다. *P. brevicompactum* ATCC 16024의 MPA 생산성 증가를 위한 균주개발에서 자외선과 NTG 돌연변이 유도 결과 각각의 방

범에서 *P. brevicompactum* UB-9과 *P. brevicompactum* NC-3의 변이주를 얻었으며, 액침배양에서 UB-9은 2.051 g/l, 그리고 NC-3은 2.238 g/l의 MPA를 생산하여, 각각 2.71배, 그리고 2.96배 생산성이 증가하였다.

REFERENCES

1. Jekkel, A. et al. (2001), Microbiological transformation of mycophenolic acid, *J of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11**, 423-426.
2. Allison, A. C. and Eugui, E. M. (2000), Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action, *Immunopharmacology* **47**, 85-118.
3. Sollinger, H. W. (1995), Mycophenolate Mofetil for the Prevention of Acute Rejection in Primary Cadaveric Renal Allograft Recipients, *Transplantation* **60**, 225-232.
4. Hattori, K. and T. Suzuki (1974), Large scale production of erythritol and its conversion to D-mannitol production by n-alkane grown, *Agri. Biol. Chem.* **38**, 1203-1208.
5. Aoki, M. A. Y. et al. (2000), Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol, *Biotechnology Letters* **15**, 383-362.
6. Noh, B. S. et al. (2000), Optimization of Culture Conditions for Erythritol Production by *Torula* sp., *J. of Microbiology and Biotechnology* **10**, 69-74.
7. Choi, D. B., K. A. Cho, W. S. Cha, and S. R. Ryu (2004), Effect of Triton X-100 on Compactin Production from *Penicillium citrinum*, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9**, 171-178.
8. Park, M. H., H. J. Ryu, and K. K. Oh (2004), Isolation of Lipase Producing Yeast and Optimization of Cultivation Condition, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**(2), 148-153.
9. Yoon, S. H., M. S. Ko, K. A. Park, K. H. Jung, Y. C. Shin, Y. M. Lee, S. H. Lee, and S. W. Kim (2006), Enhanced Lycopene Production in Recombinant *Escherichia coli* by Random Transposon and NTG Mutagenesis, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **21**(2), 90-95.