

## Threonine의 생물공학적 생산

김 경 자

순천향대학교 유전공학과

(Received November 7, 1990)

### Biotechnology for the Production of Threonine Production

Kyoung-Ja Kim

Dept. Of Genetic Engineering, Soonchunhyang University Omyang, Chungnam, 336-600, Korea

**Abstract**— Various methods are available for the production of L-threonine. The microbial production of L-threonine has been achieved by breeding L-threonine analog-resistant auxotrophic mutants of various bacteria. The enzymatic production of L-threonine has been demonstrated by use of threonine metabolic enzymes such as threonine deaminase, threonine aldolase, or threonine dehydrogenase complex. Threonine synthesis from glycine and ethanol seems to be catalyzed by the enzymes Methanol dehydrogenase(MDH) and Serine hydroxymethyltransferase(SHMT), which was also found to catalyze the aldol condensation of glycine with acetaldehyde. The improved production of L-threonine has been achieved by amplifying the genes for the L-threonine biosynthetic enzymes using recombinant DNA techniques.

**Keywords** □ Threonine, Threonine operon, Threonine metabolic enzymes

L-threonine은 필수 아미노산으로 주사제, 동물의 사료첨가제로 사용될 뿐 아니라 항생물질과 다른 의약품의 합성 및 생산의 원료로 이용되고 있어 매우 중요하다. Threonine은 Fig.1에서 보는 바와 같이 2개의 비대칭 탄소원자를 가진  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxybutyric acid로서 4개의 입체구조 이성질체의 구조를 가질 수 있다. 자연에서는 L-threonine, D-threonine과 D-allo-threonine이 발견되었으나 L-allo-threonine은 발견되지 않았다.

Threonine은 Carter 등에 의해 처음으로 순수한 DL-threonine으로 합성되었다.<sup>1)</sup> Crotonic acid로부터 mercuration, bromination 반응을 거쳐  $\alpha$ -bromo- $\beta$ -methoxy-n-butyrate가 합성되고 후자는 acidification과 demethylation 반응을 거쳐 threonine으로 합성된다. 이와 같은 threonine의 복잡한 유기화학적 합성에서는 4개의 구조 이성질체가 얻어지는데 이들의 분리가 어렵다.<sup>2)</sup> Threonine의 구조 이성질체는 Fig.2에서 보는 바와 같

이 아세틸화시킨 후 *Aspergillus oryzae*에서 분리된 aminoacylase로 이성질체를 처리하면 L-threonine만을 가수분해하여 얻을 수 있다.<sup>3)</sup> Threon-

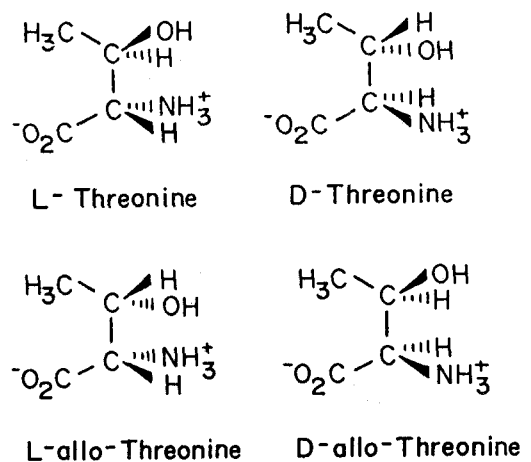


Fig. 1—Stereoisomers of threonine

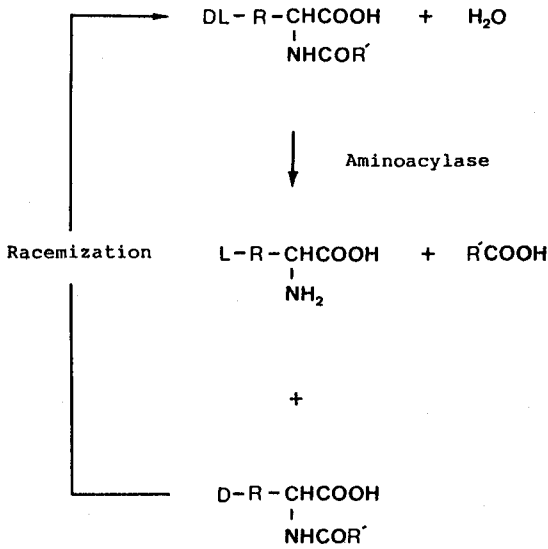


Fig. 2—Enzymatic separation of racemate for the production of L-amino acid, R=Side chain of amino acid (R'=eg. -CH<sub>3</sub>)

ine의 구조이성질체를 분리하는 다른 방법으로는 D-threonine aldolase와 L-allothreonine aldolase를 이용하여 D-threonine과 D,L-allothreonine을 분해시키고 L-threonine만을 얻는 방법이 보고되었다.<sup>4)</sup>

L-형의 threonine은 미생물을 이용하여 얻을 수 있다. Isoleucine, methionine, α,ε-Diaminopimelate 영양요구주<sup>5)</sup>나 threonine 유사체 저항성 돌연변이체들<sup>6)</sup> 중에 threonine 생산성이 높은 균주를 이용하여 threonine을 생산할 수 있다. 또한, threonine의 생합성에 이용되는 중간체(예, homoserine)를 배지에 첨가하는 방법과 threonine의 대사에 관여하는 효소를 이용하는 방법도 threonine의 생산에 이용되었다. 일반적으로 미생물을 이용하는 방법으로 L-glutamate<sup>7)</sup>나 L-phenylalanine<sup>8-10)</sup> 등의 아미노산을 값이 싼 glucose, acetate 혹은 molasses와 ammonium sulfate나 urea 등으로부터 간단히 얻을 수 있으나 미생물세포나 다른 아미노산 혹은 여러 가지 불순물로부터 필요한 아미노산을 분리시켜야 하는 단점이 있다. L-threonine의 생산효율을 높이기 위한 방법이 최근에는 형질도입,<sup>11)</sup> 원형질체 융합<sup>12)</sup>과 원형질체 형질전환<sup>13)</sup> 등과 같은 유전공학을 이용한 새로운 균종을 개발하여 다

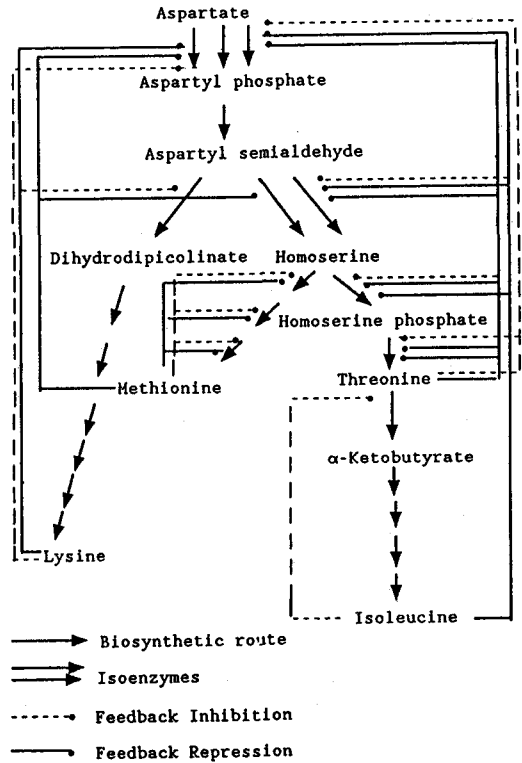


Fig. 3—The control of aspartate family of amino acids in *Escherichia coli*

각적으로 연구되고 있다.

지금까지 아미노산의 생합성<sup>14)</sup>이나 아미노산의 생산<sup>3)</sup>에 관한 전반적인 종설은 발표된 바 있으나 threonine의 생산에 관한 종설은 발표된 바가 없으므로 threonine의 생산에 관하여 본 종설에서는 미생물을 이용한 방법, 효소를 이용한 방법 그리고 유전공학을 이용한 방법으로 나누어 기술하였다. Threonine의 생산효율을 높이기 위한 여러 방법들의 장, 단점을 비교 분석하여 보다 효율적인 L-threonine 생산에 이용할 수 있도록 threonine의 생물공학적 생산에 관하여 요약하고 소개하고자 한다.

### Threonine의 생산

**L-threonine 생산 미생물 개발**—Threonine은 L-aspartate로부터 생합성되는 aspartate족 아미노산으로 이들의 생산에 대한 연구가 *E. coli*<sup>15)</sup>와

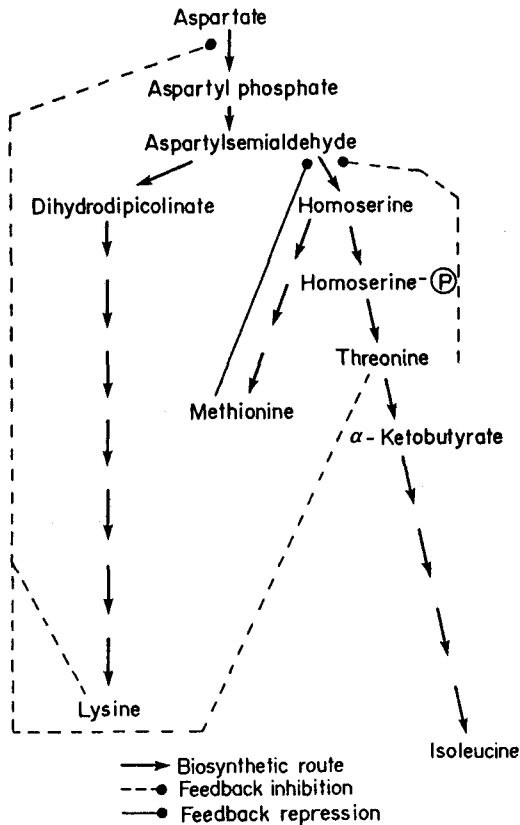


Fig. 4—The control of aspartate family of amino acid in *Corynebacterium glutamicum*

*Corynebacterium glutamicum*<sup>16)</sup>에서 주로 많이 수행되었는데 Fig. 3과 4에 이들 균주에서 threonine의 생합성 단계와 조절메카니즘이 각각 나타나 있다.

Fig. 3과 4에서 보는 바와 같이 aspartate가 aspartokinase에 의해  $\beta$ -aspartyl phosphate가 되고 후자는 NADPH 존재하에서  $\beta$ -aspartic semialdehyde dehydrogenase에 의해 환원되어  $\beta$ -aspartic semialdehyde로 변화된다. 그 후  $\beta$ -aspartic semialdehyde는 homoserine dehydrogenase에 의해 환원되어 homoserine으로 된다. 이 homoserine의 OH기가 phosphate에 의해 에스테르화된 후 pyridoxalphosphate-linked  $\beta$ - $\gamma$ -elimination 반응에 의해 phosphate기가 떨어져 나가 threonine이 생합성된다. Lysine과 methionine도 aspartate에서 생합성된다. Threonine의 생합성에 관여하는 5개의 효소 중에서 asparto-

kinase(EC 2.7.2.4)와 homoserine dehydrogenase(EC 1.1.1.3)가 중요한 조절효소이다. Threonine의 생합성은 위의 두 효소의 feedback inhibition에 의해 조절되는데 *E. coli*와 같은 장내 세균<sup>15)</sup>과 *Corynebacterium glutamicum*<sup>16)</sup>은 서로 다른 조절메카니즘을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. *E. coli*에서는 3종류의 aspartokinase 동위효소(isozyme)가 존재하고 2종류의 homoserine dehydrogenase가 존재하여 각각 다른 생성물에 의해 조절되는 것으로 보고되었다. 즉, aspartokinase 동위효소의 하나는 threonine에 의해 feedback inhibition을 받고 threonine과 isoleucine에 의해서 유전자발현이 억제(feedback repression)되는 것이다. 두번째 동위효소의 생성은 methionine에 의해서 유전자 차원에서 억제되지만 methionine은 이 효소에 feedback inhibition을 하지 못하는 것으로 보고되었다. 다른 하나의 동위효소는 lysine에 의해 유전자발현이 억제될 뿐 아니라 feedback inhibition도 받게 되는 것으로 알려져 있다. 그러나 *C. glutamicum*에서는 단 한 종류의 aspartokinase가 존재하여 threonine과 lysine에 의해 효소활성이 협동적으로 억제된다. Homoserine dehydrogenase는 *E. coli*에서는 2종류로 존재하여 각각 threonine과 methionine에 의해 feedback inhibition될 뿐 아니라 유전자발현이 억제된다. 그러나 *Corynebacterium glutamicum*에서는 한 종류의 homoserine dehydrogenase가 존재하여 threonine에 의해서는 feedback inhibition을 받게 되고 methionine에 의해서는 유전자발현이 억제되는 것으로 보고되었다.

Threonine을 대량생산하는 균주를 개발하기 위하여 이와 같은 조절메카니즘을 제거하는 것이 요구된다. 그래서 isoleucine, methionine과  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -diaminopimelate의 영양요구<sup>17)</sup>를 이용하거나 threonine의 유사체인  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvalerate(AHV)에 저항성인 변이체<sup>18,19)</sup>를 개발하여 L-threonine에 의한 feedback inhibition을 제거하여 L-threonine의 생산성을 증가시킨다. *E. coli*의 methionine 영양요구주에 있어서는 homoserine dehydrogenase와 aspartokinase 조절이 제거되어 threonine 생산이 증가된다. 그러나 *C. glutamicum*의 methionine 영양요구주에 있어서는

Table I—Production of L-threonine

Microorganism	Genetic character or precursor	Product yield (g/l)	Reference
<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Ile <sup>-</sup>	9	Takayama <i>et al.</i> (1969)
<i>Escherichia coli</i>	DAP <sup>-</sup> MET <sup>-</sup>	13	Kase and Nakayama (1971)
<i>Candida guilliermondii</i>	Ile <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup>	4	Tsukada and Sugimori (1971)
<i>Brevibacterium flavum</i>	AHV <sup>r</sup>	18	Nakamori and Shiiro (1972)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	AHV <sup>r</sup> , Met <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup>	14	Kase and Nakayama (1972)
<i>Escherichia coli</i>	AHV <sup>-</sup> , Met <sup>-</sup> , Ile <sup>-</sup>	6.1	Shiiro and Nakamori (1969)
<i>Serratia marcescens</i>	DAP <sup>-</sup> , Ile <sup>-</sup> , AHV <sup>r</sup>	12.7	Komatsubara <i>et al.</i> (1978)
<i>Serratia marcescens</i>	AHV <sup>r</sup> , AEC <sup>r</sup> , Thr-Deaminase <sup>-</sup> , Thr-Dehydrogenase <sup>-</sup>	25	Komatsubara <i>et al.</i> (1979)
<i>Bacillus subtilis</i>	L-Homoserin		Hayashibe <i>et al.</i> (1959)
<i>Proteus rettgeri</i>	L-Homoserin		Sugahara <i>et al.</i> (1964)
<i>Enterobacter</i>	DL-Homoserin		Demeni <i>et al.</i> (1975)
<i>Brevibacterium lactofermentum</i> AJ 11786 AJ 11787 (Fusant)	AEC <sup>r</sup> , AHV <sup>r</sup> , Leu <sup>-</sup> Ile <sup>-</sup> , Lys <sup>-</sup>	18	Karasawa <i>et al.</i> (1986)

Abbreviations: DAP;  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -Diaminopimelate, AHV;  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -hydroxyvalerate, AEC; S-( $\beta$ -Aminoethyl)-cysteine

methionine에 의해 homoserine dehydrogenase의 조절이 제거되지 않아 threonine 생산이 억제된다. *E. coli*, *Brevibacterium flavum*과 *Proteus rettgeri*의 AHV-저항성 돌연변이체에서도 L-threonine 생산이 증가된다는 사실이 보고되었다. *E. coli*와 *Brevibacterium flavum*의 경우는 homoserine dehydrogenase가 L-threonine에 의해 억제되지 않음으로 해서 L-threonine의 생산이 증가되나 *C. glutamicum*의 AHV-와 thialysine 저항성 돌연변이체는 aspartokinase와 homoserine dehydrogenase를 변형시켜 이 두 효소의 활성이 생물체에 의해 억제되지 않아 L-threonine의 생산이 증가되는 것으로 보고되었다.<sup>6)</sup>

Table I에서는 지금까지 보고된 L-threonine 생산에 이용된 영양요구주나 threonine 또는 lysine 유사체 저항성인 돌연변이체들과 homoserine과 같은 전구체를 feeding할 때 L-threonine을 생산하는 균주들이 열거되어 있다.<sup>5,6,20)</sup> L-threonine의

생산에 사용된 영양요구주로는 isoleucine과 methionine과 같은 단일영양을 생장에 요구하는 균이에  $\alpha, \epsilon$ -Diaminopimelate(DAP)와 methionine모두를 생장에 요구하는 이중 영양요구주 그리고 tryptophan, isoleucine 그리고 methionine을 모두 생장에 요구하는 삼중 영양요구주들이 있다. *Brevibacterium*에서는 삼중 영양요구주와 조절변이체를 융합하여 얻은 균주가 L-threonine의 생산이 높은 것으로 보고되었다.<sup>21)</sup> *E. coli*에서는 Dap, Met와 Ile 모두를 생장에 요구하는 삼중 영양요구주들 중에 isoleucine 역돌연변이체를 얻었을 때 삼중 영양요구주보다 이 역돌연변이체로 L-threonine을 더 많이 생산하였다.<sup>5)</sup> 이의 정확한 이유는 보고되지 않았다. L-aspartate로부터 생합성된 homoserine은 활성화된 후 cysteine과 반응하여 O-succinyl homoserine cystathionine synthase에 의해 cystathionine이 된다. 이 cystathionine은 분해되어 homocysteine이 된 후 methylation되

어 methionine 이 된다. Methionine 영양요구주 중 *E. coli* C-6는 methionine 대신 homocysteine 이나 cystathionine 등을 이용할 수 있는 것으로 보아 유전적으로 O-succinylhomoserine cystathionine synthase 위치가 차단된 것으로 생각되어진다.<sup>22)</sup> 또한 탄소원으로 넣어준 당의 농도가 증가시 L-threonine 의 생산이 감소하는 반면 glycerol 을 고농도로 첨가할 때는 약간의 L-threonine 의 생산 감소가 일어나는 것으로 L-threonine 생산이 catabolic repression 을 받는 것으로 생각된다.<sup>23)</sup> L-threonine 생합성의 전구체를 배양액에 첨가하여 L-threonine 을 대량생산하였다. 많은 미생물에 있어서는 L-threonine 생합성의 전구체인 homoserine 이 aspartokinase 활성을 억제하는 것으로 보고되었으나 *Corynebacterium glutamicum* (KY 10440)에 L-homoserine 을 첨가하여 주면 생장은 억제되었으나 aspartokinase 의 활성에는 영향이 없었다. *Mycobacterium tuberculosis* 에서는  $\alpha$ -aminobutyric acid 가 생장을 억제하는 것으로 보고되었는데  $\alpha$ -aminobutyric acid 가 *C. glutamicum* 의 생장을 억제하는 것으로 보아 L-homoserine 이  $\alpha$ -aminobutyric acid 로 변화되어 *C. glutamicum* 의 생장을 억제하는 것으로 생각된다. 그런데 L-homoserine 에 의한 *C. glutamicum* 의 생장억제가 L-cystine 혹은 L-glutamine 을 가해주면 회복되나 L-lysine 이나 L-isoleucine 에 의해서는 회복되지 않는데 이러한 사실은 아직 잘 설명되지 못하고 있다.

**효소를 이용한 L-threonine 의 생산**—효소를 이용하여 아미노산을 생산하려는 연구가 많이 수행되고 있다. 효소를 이용한 아미노산생산은 효소자체를 이용하거나 효소를 고정시켜 안정된 형태의 효소를 얻는 것이 중요하다. 효소를 이용한 아미노산 생산법은 값싸고 쉬울 뿐 아니라 시간이 절약되고 불순물이 생기지 않는다는 점에서 많이 이용되고 있다. L-threonine 의 생산에는 threonine 의 대사에 관여하는 효소들의 역반응에 의하여 값싼 원료로부터 L-threonine 을 생산하는 방법이 이용되고 있다. L-threonine 대사과정에 관여하는 효소<sup>24-26)</sup>들로는 Fig.5에서 보는 바와 같이 3종류가 있다.

첫째로 threonine dehydrogenase (EC 1.1.1.103) 는 threonine 을  $\text{NAD}^+$  존재하에서  $\alpha$ -amino- $\beta$ -

ketobutyrate 로 산화시키는 효소로서 *Bacillus*, *Arthrobacter*<sup>23)</sup>와 몇몇 다른 미생물에서 발견되었다.<sup>27,28)</sup> 이때 생성된  $\alpha$ -amino- $\beta$ -ketobutyrate 는 aminoacetone 을 거쳐 pyruvate 로 변화되거나<sup>26)</sup> 2-amino-3-oxobutyrate : CoA ligase (aminoacetone syntase)에 의해 acetyl CoA 와 glycine 으로 변화되는 것이다.<sup>29)</sup> 전자는 *Bacillus* 에서 발견되었고 후자는 *Arthrobacter* 와 *Pseudomonas oxalaticus* 에서 발견되었다. 둘째로 Threonine dehydratase (deaminase) (EC 4.2.1.16)는 L-threonine 을 2-oxobutyrate 로 변화시키는 효소로서 생성된 2-oxobutyrate 가 propionate 를 거쳐 succinyl-CoA 로 변화된다.<sup>25)</sup> 이 효소는 여러 박테리아에서 발견되었다. 2-oxobutyrate 는 isoleucine 으로 변화되기도 한다. *E. coli* 에서는 두 종류의 threonine deaminase 가 발견되었다. 하나는 isoleucine 생합성에 관여하는 것으로 aerobic 상태에서 생성되며 L-isoleucine 에 의해 억제된다. 다른 threonine deaminase 는 분해에 관여하는 것으로 혐기성 상태에서 생성되며, L-isoleucine 에 의해 활성이 억제되지 않으며 threonine 과 serine 에 의해 유도되며 최적 활성에는 adenylic acid 가 필요하다. 세번째로 threonine aldolase (EC 4.1.2.5) (L-threonine : acetaldehyde lyase)는 threonine 을 glycine 과 acetaldehyde 로 분해시키는 효소로서 threonine 과 allothreonine 이 한 효소에 의하여 분해되기도 하기도 하고 서로 다른 효소에 의해 분해되기도 한다.<sup>30)</sup> 즉 토끼의 간에서는 L-threonine 과 DL-allothreonine 이 한 효소에 의해 분해되는 것으로 나타났으나<sup>29)</sup> 양의 간에서는 각각 threonine aldolase 와 allothreonine aldolase 에 의해 분해되는 것으로 나타났다.<sup>25)</sup> 쥐의 간에서는 서로 상반되는 보고가 나와서 L-threonine 과 DL-allothreonine 이 과연 한 효소에 의해 분해되는지 아니면 서로 다른 효소에 의해 분해되는지 논란이 되고 있다.<sup>31)</sup> 토끼의 간에서는 threonine aldolase 가 serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)와 동일한 것으로 보고되었다.<sup>29)</sup> Serine hydroxymethyltransferase 는 3-hydroxy amino acid 를 glycine 과 상응되는 aldehyde 로 분해시키고 D-alanine 과 pyridoxal phosphate 의 transamination 반응, aminomalonate 의 탈탄산반응

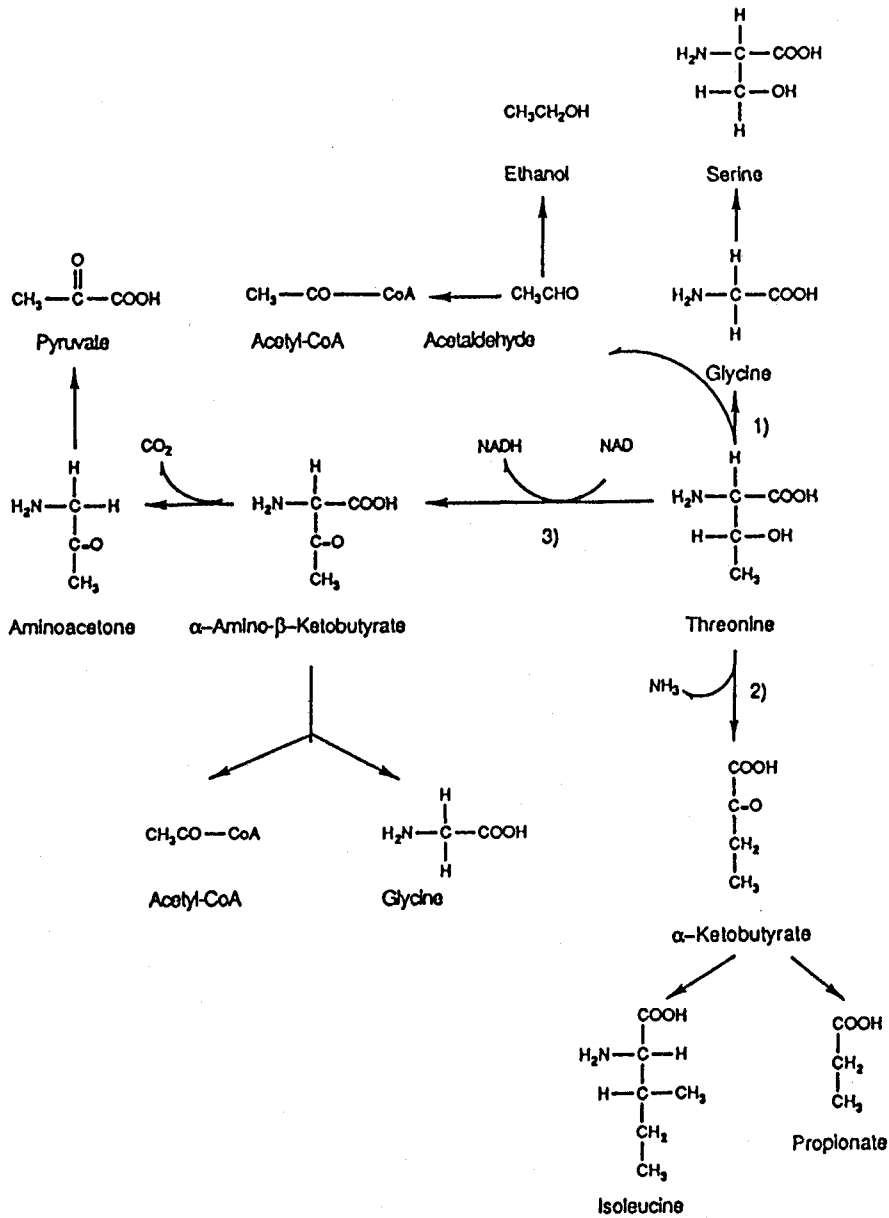


Fig. 5 — The metabolic pathways of Threonine

등을 촉매하는 효소로 광범위한 기질특이성을 가지고 있다. *Candida*, *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Xanthomonas* sp. 등에서는 threonine 이나 allothreonine 에 의해 threonine aldolase 가 유도되는 것으로 나타났으나 *Clostridium pasteurianum* 과 *Selenomonas ruminantium* 에서는 유도되지 않고 일정한 것으로 나타났다.<sup>31)</sup> 또한

*Clostridium pasteurianum*, *Candida humicola* 에서는 가역적인 반응을 촉매하는 것으로 나타났으나 쥐의 간에서는 비가역적인 것으로 보고되었다.

효소를 이용한 L-threonine 의 생산방법은 위에 열거한 대사에 관여하는 효소를 이용한 방법이 주로 보고되었다. 즉, threonine cleavage complex 는 threonine dehydrogenase 과 aminoacetone

synthase와의 혼합체로 이 효소 혼합체를 이용해 glycine과 acetyl CoA로부터 L-threonine을 생산할 수 있으며 쥐와 토끼의 간에서 증명되었다.<sup>32)</sup> Methylophile인 *Pseudomonas*에서는 methanol dehydrogenase와 serine hydroxymethyltransferase를 이용하여 threonine을 생산하기도 한다.<sup>33)</sup> Methanol dehydrogenase은 ethanol을 acetaldehyde로, methanol을 formaldehyde로 변화시키며 각각의 aldehyde와 glycine이 threonine과 serine으로 변화된다. 공기 중에서 말린 *pseudomonas cell*로 실험한 결과 threonine만 생성되는 것으로 보아 L-serine 생산에 조효소로 작용하는 tetrahydrofolate가 공기에 의해 산화되어 불활성화되는 것이 아닌가 추측된다. 쥐와 토끼의 간에서는 glycine과 acetaldehyde로부터 serine hydroxymethyltransferase에 의해 L-allo-threonine이 합성되었으나<sup>34)</sup> 양의 간에서는 threonine aldolase에 의해 glycine과 acetaldehyde로부터 L-threonine이 합성되었다. 혐기성 박테리아인 *Ruminococcus flavefaciens*에서는 glycine과 acetaldehyde로부터 새로운 threonine 합성효소에 의해 L-allo-threonine이 합성된다는 사실이 밝혀졌다.<sup>35)</sup> 이 새로운 threonine 합성효소는 종래의 threonine aldolase나 serine hydroxymethyltransferase와는 다른 효소임이 밝혀졌으며 자연계에서는 발견되지 않은 L-allo-threonine이 생합성된다는 점에서 L-allo-threonine의 생리적 기능이나 독성물질, 항생제 등에서의 발견여부가 관심이 되고 있으며 소의 위벽에 사는 혐기성 bacteria에서의 이용도에 대해서도 연구가 진행되고 있다.

**유전공학을 이용한 L-threonine의 생산**—종래의 발효공법을 이용하여 L-threonine을 생산하는 방법의 단점으로 지적되던 낮은 효율을 개선하기 위해 유전공학을 이용하여 L-threonine 생산효율을 높이게 되었다.<sup>36)</sup> 유전공학에는 threonine operon을 분리시켜 형질전환시키는 방법<sup>37)</sup>과 threonine 생합성에 관여하는 중요한 효소 중의 하나인 homoserine dehydrogenase(HD) gene을 증폭시키거나 HD gene 외에 HD 다음 단계를 촉매하는 효소인 homoserine kinase(HK) gene을 동시에 cloning시키는 방법 등이 주로 이용되고 있다.<sup>38,39)</sup> *E. coli*에서 threonine operon을 분리시켜 PBR

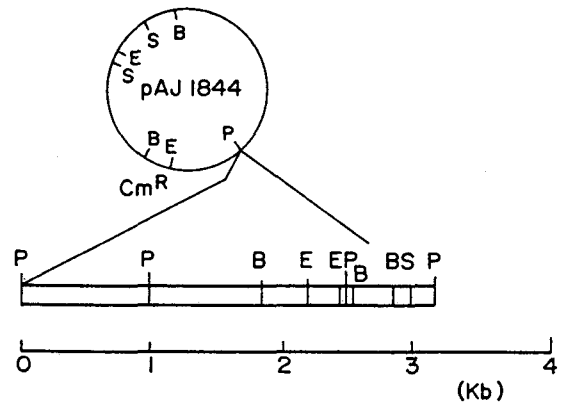


Fig. 6—Restriction Map of PAJ 210

The circle and the straight line indicate vector plasmid PAJ1844 and *B. lactofermentum* M-15 chromosomal fragment containing the HD gene, respectively. The abbreviation used are: P, Pst I; E, EcoR I; B, *B*el I; S, Sst I; Cm<sup>R</sup>, Chloramphenicol resistance

322의 *Hind*III 위치에 삽입시켜 이 recombinant plasmid를 *E. coli* NRRL 12100에 transformation시켜 ampicillin과 tetracycline에 저항성인 clone을 골라 높은 L-threonine 생산효율(9~12g/l)과 plasmid 안정성을 얻게 되었다.<sup>40)</sup> 이 때 glucose 농도를 증가시킬 경우 성장에는 도움을 주었으나 threonine 생산량과 plasmid 안정성에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. *E. coli* K-12의  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvaleric acid 저항성 돌연변이체로부터 *E. coli*의 threonine operon을 clone하여 L-threonine을 과량 생산하는 *E. coli* WKY 8366에 넣어준 결과 대부분의 plasmid는 불안정하였으나 threonine operon과 kanamycin 저항성인 gene으로 구성된 recombinant plasmid인 PGH 2B1는 안정성이 높았으며 4.5배의 threonine 감수성의 aspartokinase 활성을 나타내었고 threonine을 20% 이상 생산하였다.<sup>37)</sup>

*Brevibacterium lactofermentum* M-15의 homoserine dehydrogenase(HD)를 code하는 3.2 kb의 chromosomal DNA 분절을 Fig.6에서 보는 바와 같이 plasmid PAJ 1844의 PstI 위치에 삽입시킨 후 *B. lactofermentum* M-15에 transformation시켜 L-threonine 생산량을 25g/l(1.4배) 증가시켰다. 그러나 HD-recombinant 종은 threonine 외에 lysine과 homoserine의 양도 증

가되어 HD에 의해 생성된 homoserine이 완전히 threonine으로 전환되지 않는 것으로 밝혀졌다. Homoserine을 threonine으로 변화시키는 첫번째 단계에 관여하는 homoserine kinase(HK)을 clone함으로써 threonine 생산을 33g/l까지 증가시킬 수 있었고 lysine과 homoserine량을 감소시킬 수 있었다. 이 때, HD와 HK gene이 같은 숙주에 동시에 존재하기 위해서는 plasmid incompatibility를 제거해야 하므로 HD와 HK gene을 각각 compatible한 다른 plasmid vector 즉, chloramphenicol 저항성인 plasmid PAJ 1844와 trimethoprim 저항성인 plasmid PAJ 212에 결합시킨 후 *B. lactofermentum*에 형질전환시켰다. 이 형질전환체는 30% 정도 threonine 생산이 증가되었고 homoserine과 lysine과 같은 부산물이 HD-recombinant plasmid만 가진 형질전환체보다 훨씬 감소되었다.<sup>39)</sup> 이외에 *Serratia marcescens*에서는 transduction 기법을 이용하여 L-threonine 생산을 40g/l로 증가시켰다.<sup>41)</sup> 유전공학을 이용한 L-threonine 생산의 경우 recombinant plasmid가 균이 성장하는 동안 소실되어 버리는 경우가 많다.<sup>42)</sup> 그러므로 Threonine의 생산량을 증가시키기 위해서는 recombinant plasmid의 안정성에 관한 연구가 필요하다.

## 결 론

L-threonine의 대량생산을 위해서는 균주개량이 필요하다. L-threonine의 생합성과정과 조절메카니즘을 이해함으로써 L-threonine 생산효율이 높은 균주를 개발할 수 있다. 여러 영양요구주나 threonine의 유사체 저항성 돌연변이체를 이용하여 L-threonine 생산을 증가시킬 수 있다. Threonine 대사에 관여하는 효소의 역반응을 이용하여 L-threonine을 생산할 수도 있다. 최근에는 threonine의 생합성에 관여하는 효소 중 조절효소인 homoserine dehydrogenase와 homoserine kinase gene을 cloning하거나 threonine operon을 cloning하여 유전공학적으로 개량된 균주를 얻어 L-threonine을 대량생산할 수도 있다. 앞으로 threonine operon의 발현에 관한 연구가 활발히 진행되어야 하겠다.

## 문 헌

- 1) Carter, H.E. and West, H.D.: *Org. Synthesis, coll. vol.* 3, 813 (1955).
- 2) Meltzer, H. L. and Sprinson, D. B.: The synthesis of 4-C<sup>14</sup>, N<sup>15</sup>-threonine and a study of each metabolism. *J. Biol. Chem.* 197, 461-474 (1952).
- 3) Soda, K., Tanaka, H. and Esaki, N.: Amino Acids in Biotechnology vol. 3, *Verlag Chemie*, 477-532 (1983).
- 4) Denki Kagaku Kogyo K. K., Tokyo. JP: Verfahren zur Herstellung von L-Threonoine. German Patent. offenlegungsschrift, DE 3247703A1 (1983).
- 5) Kase, H., Tanaka, H. and Nakayama, K.: Studies on L-Threonine Fermentation. Part I: production of L-Threonine by Auxotrophic Mutants of various Bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 35, 2089-2096 (1971).
- 6) Kase, H. and Nakayama, K.: Production of L-Threonine by analog-resistant Mutants. *Agric. Biol. Chem.* 36, 1611-1621 (1972).
- 7) Soda, K., Tanaka, H. and Esaki, N.: Amino Acids in Biotechnology vol. 3, *Verlag Chemie*, 520-522 (1983).
- 8) Choi, Y. J. and tribe, D.: Continuous production of phenylalanine using an *Escherichia coli* regulatory mutant. *Biotech. Lett.* 4, 223-228 (1982).
- 9) Gil, G. H., Kim, S. R., Bae, J. C. and Lee, J. H.: pilot-scale production of L-phenylalanine from D-glucose. *Enz. Micro. Technol.* 7, 370-373 (1985).
- 10) Tsuchida, T., Matsui, J., Enei, J. and Yoshinaga, F.: L-phenylalanine by fermentation. *U.S. patent* 3, 909, 353.
- 11) Komatsubara, S., Kisumi, M. and Chibata, I.: Transductional Construction of a Threonine-producing Strain of *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 834-840 (1978).
- 12) Karasawa, M., Tosaka, O. Ikeda, S. and Yoshii, H.: Application of protoplast Fusion to the development of L-Threonine and L-Lysine producers. *Agr. Biol. Chem.* 50(2), 339-346 (1986).
- 13) Katsumata, T., Ozaki, A., Oka, T. and Furuya, A.: Protoplast Transformation of Glutamate-producing Bacteria with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 159, 306 (1984).
- 14) Umbarger, H. E.: Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu. rev. Biochem.* 47, 533-606 (1978).
- 15) Patte, J. C., Lebras, G. and Cohen, G. N.: Regulation



- by methionine of the synthesis of a third aspartokinase and a second homoserine dehydrogenase in *Escherichia coli* K12. *Biochim. Biophys. Acta.* **136**, 245-257 (1967).
- 16) Kase, H. and Nakayama, K.: Mechanism of L-threonine and L-lysine production by analog-resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **38**, 993-1000 (1974).
  - 17) Tsukada, Y. and Sugimori, T.: Induction of Auxotrophic Mutants from Candida species and their Application to L-Threonine Fermentation. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 1-7 (1971).
  - 18) Shio, I. and Nakamori, S.: Microbial production of L-Threonine. part I. production by *Escherichia Coli* mutant resistant to  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -hydroxyvaleric acid. *Agric. Biol. Chem.* **33**, 1152-1160 (1969).
  - 19) Shio, I. and Nakamori, S.: Microbial Production of L-threonine. Part II. production by  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvaleric acid resistant mutants of glutamate producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **34**, 448-456 (1970).
  - 20) Stadtman, E. R., Cohen, G. N., Lebras, G., and deRobichon-Szulmajster, H.: Feedback inhibition and repression of aspartokinase activity in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **236**, 2033-2038 (1961).
  - 21) Kaneko, H. and Sakaguchi, K. Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 867-868 (1979).
  - 22) Hirakawa, T., Tanaka, T. and Watanabe, K.: L-Threonine production by Auxotrophs of *E. coli*. *Agric. Biol. Chem.* **37**, 123 (1973).
  - 23) Freundlich, M.: Multivalent repression in the biosynthesis of threonine in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **10**, 277-282 (1963).
  - 24) Bell, S. C. and Turner, J. M.: Bacterial catabolism of threonine. *Biochem. J.* **156**, 449 (1976).
  - 25) Karasek, M. A. and Greenberg, D. M.: Studies on the properties of Threonine Aldolase. *J. Biol. Chem.* **227**, 191-205 (1957).
  - 26) Luginbuhl, G.H., Hofler, J. and Decedue, C.J.: Biodegradative L-Threonine Deaminase of *Samonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **120**, 559-561 (1974).
  - 27) Willet, A.J. and Turner, J.M.: Threonine metabolism in a strain of *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* **117**, 27-28 (1970).
  - 28) Blackmore, M.A. and Turner, J.M.: Threonine Metabolism via Two-carbon Compounds by *pseudomonas oxalaticus*. *J. Gen. Microbiol.* **67**, 243 (1971).
  - 29) Schirch, L. and Gross, T.: Serine Hydroxymethyltransferase identification as the Threonine and Allothreonine. *J. Biol. Chem.* **243**(21), 5651-5655 (1968).
  - 30) Morris, J.G.: Utilization of L-Threonine by a *pseudomonas*: A catabolic Role for L-Threonine Aldolase. *Biochem. J.* **115**, 603-605 (1969).
  - 31) Malkin, L.I. and Greenberg, D. M.: Purification and properties of Threonine or Allothreonine Aldolase from Rat Liver. *Biochim. Biophys. acta.* **85**, 117-131 (1964).
  - 32) Willet, A.J. and Turner, J.M.: L-Threonine Acetaldehyde-Lyase in a Strain *Bacillus Subtilis*. *Biochim Biophys. Acta.* **252**, 105-110 (1971).
  - 33) Yamada, H., Miyazaki, S.S. Shirae, H. and Izumi, Y.: Threonine production from Glycine and Ethanol by a Methanol-utilizing Bacterium. *J. Ferment. Technol.* **63**, 507-512 (1985).
  - 34) Davis, L. and Thompson, R.S.: Enzymatic production of L-Allothreonine and L-Threonine. In: proc. 4th European Congress on Biotechnology 1987, vol. 2, Neijssel, O.M.; van der Meer, R.R. and Luyben, K. CH. A.M. (eds), Elsevier Science pub. B.V., Amsterdam.
  - 35) Kim, K.-J.: Isolierung und Charakterisierung des L-allothreonine bildenden Enzymes in *R. flavefaciens*. Dissertation, Bonn (1987).
  - 36) Miwa, K., Tsuchida, T., Karahashi, O., Nakamori, S., sana, K. and Momose, H.: Construction of L-Threonine overproducing Strains of *Escherichia coli* K-12 using Recombinant DNA Techniques. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2329 (1983).
  - 37) Mizukami, T., Yagisawa, M., Oka, T. and Fukuya, A.: Improvement of the Stability of Recombinant Plasmids carrying the Threonine operon in an L-Threonine-hyperproducing Strain of *Escherichia coli* W. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 1019-1027 (1986).
  - 38) Morinaga, Y. Takagi, H., Ishida, M., Miwa, K., Sato, T., Nakamori, S. and Sana, K.: Threonine production by Co-existence of cloned Genes coding

- Homoserine Dehydrogenase and Homoserine Kinase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* 51(1) 93-100 (1987).
- 39) Nakamori, S., Ishida, M. Takagi, H. Ito, K. and Miwa, K.: improved L-threonine production by the Amplication of the Gene Encoding Homoserine Dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* 51, 87 (1987).
- 40) Nudel, B.C., Corradini, C. Fraile, E. and Giulietti, A. M.: Plasmid maintenance and Threonine production by recombinant *Escherichia coli* Strains. *Biotec. Lett.* 9, 77-82 (1987).
- 41) Shimura, K.: Threonine. In comprehensive Microbiology ed. Murray Moo Young, *peragmon press*, 641 (1985).
- 42) Santamaria, S., Gil, J.A., Mesas, J.M. and Martin, J. F.: Characterization of an Endogenous plasmid and Development of Cloning Vectors and a Transfromation System in *Brevibacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 130, 2237 (1984).