

Trehalose를 생산하는 *Micrococcus luteus* 변이주의 특성 및 생산배지의 최적화

송희상 · 황기철 · 방원기*
고려대학교 자연자원대학 응용생명환경화학과

Characteristics of a Mutant of Trehalose-producing *Micrococcus luteus* and Optimization of Production Conditions. Song, Hee Sang, Ki-Chul Hwang, and Won-Gi Bang*. Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea - For the production of trehalose, microorganisms capable of producing trehalose extracellularly were screened from the stock cultures in our laboratory. Among them, *Micrococcus luteus* IFO 12708 showed the highest productivity of trehalose. For the increase of productivity, the mutant strain HS-208 having higher trehalose production was selected with NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) mutagenesis, which led to the decrease of the specific activity of trehalose phosphorylase(3.2-fold) as compared to the wild strain. The optimum condition for the trehalose production was established as follows: 20 g/l of glucose and 6 g/l of tryptone were used as a sole carbon source and nitrogen source, respectively, and cultivations were carried out at 30°C and pH 6.0. After 20 hrs cultivation, addition of 20 unit/ml penicillin G led to the higher conversion yield of trehalose. Under the optimum condition, 6.547 g/l trehalose was produced with conversion yield of 32.7%.

Key words: trehalose production, *Micrococcus luteus*, nitrosoguanidine mutation

Trehalose(O- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 1)- α -D-glucopyranoside)는 미생물에서뿐만 아니라 여러 종의 식물, 동물들에서도 널리 존재하는 비환원성 이당류로서[5] 설탕의 약 60% 정도의 감미도를 가진다[14]. 초기에 trehalose는 세포내의 영양 저장물질로만 알려졌었지만, 최근에는 세포내에서 건조, 높은 삼투압, 혹한, 열과 같은 환경 스트레스에 대한 방어 기능에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며[3, 4, 6], 순수 분리된 trehalose는 열이나 산에 안정하고 단백질이나 세포의 동결 또는 건조시 보호하는 역할을 한다. 따라서 식품, 의약 등의 분야에서 첨가물로 이용됨으로써 비용절감과 함께 부가가치를 높일 수 있을 것으로 기대되어 그 관심이 높아지고 있다[2, 11, 12].

본 연구에서는 trehalose를 생산하여 세포외로 축적할 수 있는 균주를 분리하고, 분리한 균주의 생산성을 높이기 위하여 NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)를 변이원으로 처리하여 trehalose의 분해능이 약화된 변이주를 구하고자 하였다.

또한, 변이주의 효소 활성변화를 조사하고 최적 생산조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 시약

세포외로 trehalose를 배출하는 것은 *Micrococcus* sp.와 *Deinococcus* sp.의 일부 균주들로 알려져 있으므로[1] *Micrococcus* 공시균주들과 본 실험실에서 보관중인 토양분리균주들로부터 trehalose를 생산하는 균주를 선별하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 trehalose는 Sigma사의 시약이었으며, maltose는 Difco사의 특급 시약이었다. 또한 trehalose의 정량에 사용한 N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide와 trimethylchlorosilane은 Fluka사의 시약이었으며, N,N-dimethylformamide는 Sigma사의 시약이었다. 그 밖의 시약은 시판되고 있는 1급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

배지 및 배양조건

균주의 배양을 위해서는 tryptic soy broth 30 g, glucose 10 g, 증류수 1 liter의 전배양배지를 사용하였으며, 조효소액을 얻기 위한 균체 배양배지와 trehalose 생산배지는 glucose 30 g, yeast extract 6 g, KH₂PO₄ 4 g, MgSO₄ · 7H₂O 4 g, FeCl₃ · 6H₂O 0.01 g, MnCl₂ · 4H₂O 0.01 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.01 g, 증류수 1 liter의 배지를 사용하였다[9]. Trehalose의 생산은 전배양배지에 2%의 agar가 포함된 평판배지에서 보관중이던 균체 한 백급니를 접종하여 30°C, 200 rpm에서 24시간 배양한 후, 100 ml의 생산배지가 들어 있는 500 ml 삼각 플라스크에 1 ml를 접종하여 30°C, 200 rpm에서 4일간 배양하였다.

Trehalose의 분석

Trehalose의 분석은 Hanne[8]의 방법에 따라 gas chro-

*Corresponding author

Tel. 82-2-3290-4030, Fax. 82-2-925-1970

E-mail: agrchem@kucncx.korea.ac.kr

matography(Hewlett Packard, HP 5890 Series II)를 사용하였다. 상기에서 얻어진 배양액 100 μ l를 취하여 원심분리한 후, 상등액 40 μ l를 Speed Vac(Savant사)을 이용하여 건조시켰다. 건조된 시료를 20 μ l의 N,N-dimethyl-formamide에 현탁시킨 후, trimethylchlorosilane이 1% 함유된 N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide 20 μ l를 넣어주고 30분 이상 상온에서 방치한 다음 상등액 1 μ l를 취하여 시료로 사용하였다. 내부 표준물질로는 sucrose를 사용하였으며 분석조건은 다음과 같다: Column, HP-1(25 m by 0.32 mm[inner diameter]) capillary column; Detector, FID(flame ionization detector); Injector temperature, 260°C; Detector temperature, 300°C; Oven temperature, 250°C; Gas flow rate: Carrier gas(He), 100 ml/min; Combustion gas(H₂), 25 ml/min.

균체량 측정

균의 생육은 spectrophotometer(LKB사, Novaspec II)를 사용하여 610 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

Trehalose 생산균주의 선별

상기의 균주들을 생산배지가 5 ml씩 들어있는 시험관에 한 백금이씩 접종하여 30°C, 200 rpm에서 4일간 진탕배양하였다. 균체를 제거한 상등액내에서 trehalose의 생성 유무를 GC를 사용하여 조사하였으며 그 중 trehalose를 체외로 생산하는 균주 5종을 1차 선별하였다.

Trehalose 생산능이 증가된 변이주의 분리[7]

상기에서 선별한 균주의 trehalose 생산을 높이기 위해, 생산배지의 한천 평판배지에서 48시간 배양된 *Micrococcus luteus* IFO 12708 균주를 생산배지에 접종하여 배양시킨 후 대수기에 이른 균체를 수확하여 100 mM citrate buffer(pH 7.0)로 2회 세척(2,800 rpm, 4°C, 20분)하고 동일 buffer로 현탁시킨 다음 NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)의 최종농도가 200 μ g/ml 되도록 첨가하고 30°C에서 80분 동안 정지한 후 반응액 50 μ l를 취해 생산배지에 한천이 첨가된 평판배지에 도달하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 이때 생육된 균락을 생산배지가 5 ml씩 들어있는 시험관에 멸균 이쑤시개를 이용하여 접종한 후 96시간 째에 상등액을 취해 GC로 분석하여 trehalose 농도가 가장 높은 균주를 선별하여 *Micrococcus luteus* HS-208로 명명하였다.

Trehalose phosphorylase의 활성 분석

수확한 습균체를 약 200 mg/ml이 되도록 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)가 함유되어 있는 100 mM phosphate 완충용액(pH 7.0)에 현탁한 후, 4°C에서 30초씩 15회 초음파 분쇄한다. 분쇄된 세포 찌꺼기는 원심

분리(15,000×g, 20분)로 제거하고 상등액을 반응에 사용한다. 반응액은 200 μ mol trehalose, 50 μ mol phosphate 완충용액(pH 7.0), 50 μ mol N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid(TES)-KOH 완충용액(pH 7.0)에 세포 분쇄 상등액(1 mg protein)을 첨가하고 최종부피가 1 ml이 되도록 하였다. 위의 반응액을 30°C에서 15분간 반응 후, glucose oxidase-peroxidase method를 이용하여 생성된 glucose의 양을 측정하였다.

효소 활성의 단위는 glucose 1 μ mol을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

Trehalose 생산능이 증가된 변이주의 개발

Trehalose생산을 위한 변이주를 만들기 위해 trehalose를 세포외로 축적하는 균주를 1차로 100여종 선별하였다. 선별된 균주를 전배양한 후, 전배양액 1%를 본 배양배지에 접종하여 30°C에서 96시간 배양하고, 그 상등액을 GC로 분석하여 trehalose가 생성되었음을 정성적으로 확인하고 정량하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 5종의 균주들이 세포외로 trehalose를 축적하는 것으로 나타났으며, 이 중에서 4종의 균주들이 trehalose의 세포외 축적 미생물로 이미 알려진바 있는 *Micrococcus* sp.이었으며 그 외엔 *Erwinia aroideae*에서 trehalose가 생성되었으나 매우 소량이었다. Trehalose 생산은 *Micrococcus luteus* IFO 12708이 2.366 g/l로 가장 우수하여 *Micrococcus luteus* IFO 12708을 trehalose 생산을 위한 변이주 개발의 모균주로 이용하였다. Trehalose의 생산능이 증가된 균주를 구하기 위하여 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 돌연변이원으로 NTG를 처리하여 생체내에서 trehalose를 분해하는데 관여하는 효소인 trehalose phosphorylase[EC 2.4.1.64][10, 13]의 활성이 약화된 균주를 구하여 생산에 이용하고자 하였다. NTG로 처리된 후 생육된 균주들 중에서 모균주보다 trehalose 생산능이 증가된 균주들과 그들의 trehalose phosphorylase 활성을 Table 2에 나타내었다. Table 2에서 보듯이 HS-208은 야생균주에 비해 trehalose phosphorylase 활성이 3.2배 감소하였다. 이는 *Micrococcus luteus* IFO 12708에서는

Table 1. Comparison of trehalose production in stock cultures

Strains	Trehalose (g/l)
<i>Micrococcus flavus</i>	0.410
<i>Micrococcus glutamicum</i>	0.387
<i>Micrococcus luteus</i> IFO 3763	0.137
<i>Micrococcus luteus</i> IFO 12708	2.366
<i>Micrococcus roseus</i> IFO 3764	-
<i>Erwinia aroideae</i>	0.093

Cultivations were carried out for 96 hours at 30°C in the production medium.

Table 2. Comparison of trehalose production and trehalose phosphorylase activity in *Micrococcus luteus* IFO 12708 and its mutant strains

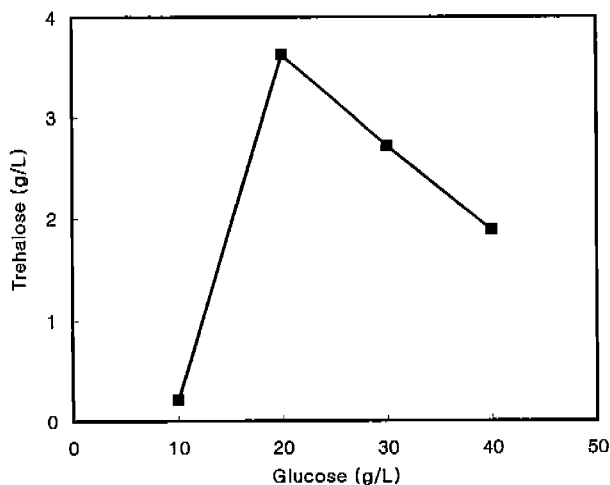
Strains	Growth (OD ₆₁₀)	Trehalose (g/l)	Trehalose phosphorylase activity (nmol/min · mg protein)
Wild strain	18.05	2.366	39.5
Mutant strains			
HS-152	17.88	2.480	27.6
HS-178	19.02	3.090	31.4
HS-195	17.11	2.856	20.7
HS-207	18.44	2.435	22.9
HS-208	17.31	3.567	12.3
HS-299	16.79	2.761	40.1

Cultivations were carried out for 96 hours at 30°C in the production medium.

trehalose phosphorylase가 trhalose 분해에는 관여하나 합성에서는 무관함을 의미한다. 따라서 trhalose phosphorylase 활성이 약화된 변이주를 이용하여 trehalose 생산조건을 검토하였다.

Trehalose 생산에 미치는 glucose 농도와 유기 질소원의 영향

생산배지를 기초로 하여 glucose의 농도를 10 g/l에서 50 g/l까지 변화시키면서 각각의 glucose 농도가 HS-208 균주의 trehalose 생산에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 96시간 배양시에 glucose 농도 20 g/l일 때 trehalose 생산량이 최대였으며, 그 때의 생산량은 3.627 g/l 이었다. 20 g/l보다 높은 농도에선 농도의 증가에

**Fig. 1. Effect of glucose concentration on the trehalose production by *Micrococcus luteus* HS-208.**

Cultivations were carried out at 30°C in the production medium (pH 5.8).

Table 3. Effect of organic nitrogen sources on the trehalose production by *Micrococcus luteus* HS-208

Nitrogen sources	Trehalose (g/l)
Yeast extract	3.764
Tryptone	4.404
Peptone	1.077
Soytone	0.685
Beef extract	0.728

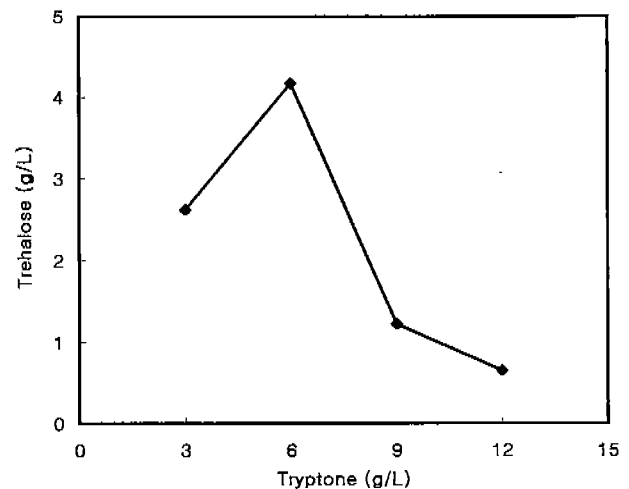
Cultivations were carried out at 30°C in the production medium with 20 g/l of glucose (pH 5.8).

따라 생산량이 점차 감소함을 보였다. 따라서 이후의 실험에서는 20 g/l의 glucose를 사용하였다.

또한, Trehalose 생산에 미치는 유기 질소원의 영향을 조사하기 위하여 glucose가 20 g/l씩 함유되어 있는 생산배지에 유기 질소원으로 yeast extract, tryptone, peptone, soytone, beef extract, corn steep liquor를 각각 6 g/l의 농도로 첨가하고 96시간 췌의 trehalose 생산량을 분석하였다(Table 3). Table 3에서 보듯이 tryptone을 첨가한 배지에서 4.404 g/l의 최대 생산량을 나타내었다. 따라서 이후의 실험에선 유기 질소원으로 tryptone을 사용하기로 하였으며, tryptone의 최적농도는 3 g/l에서부터 12 g/l까지 변화를 주어 실험한 결과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 6 g/l에서 4.174 g/l의 최대 생산량을 나타내었다.

Trehalose 생산에 미치는 초기 pH와 온도의 영향

Trehalose의 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 20 g/l의 glucose와 6 g/l의 tryptone을 함유하는 생산배지의 초기 pH를 pH 5.5에서 pH 8.0까지 변화시켜

**Fig. 2. Effect of tryptone concentration on the trehalose production by *Micrococcus luteus* HS-208.**

Cultivations were carried out at 30°C in the production medium with 20 g/l of glucose (pH 5.8).

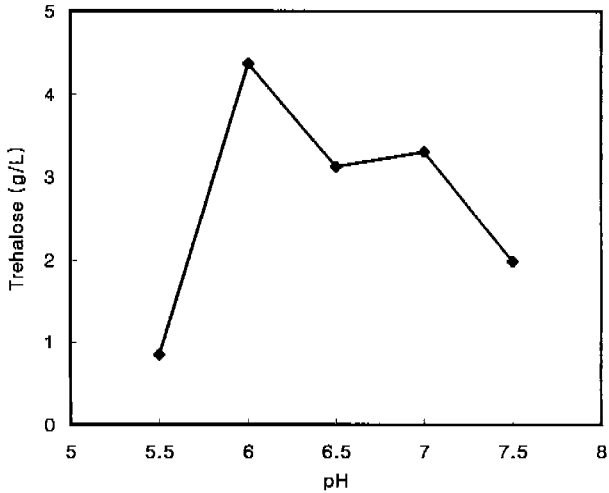


Fig. 3. Effect of initial pH on the trehalose production by *Micrococcus luteus* HS-208.

Cultivations were carried out at 30°C in the production medium with 20 g/l of glucose and 6 g/l of tryptone.

96시간동안 배양한 후, trehalose의 생산량을 검토하였다 (Fig. 3). Fig. 3에서 나타난 바와 같이 초기 pH가 6.0에서 생산량이 4.371 g/l로써 가장 우수하였는데 이는 균체 생육의 최적 pH인 7.0과는 차이가 있는 것으로서 약산성의 pH에서 trehalose의 생산이 우수함을 확인하였다. pH 6.0 이상에서는 생산량이 점차 감소하였으며 pH 6.0 이하에서는 pH의 작은 변화에도 생산량이 급격히 감소함을 확인하였다.

또한, Trehalose의 생산에 미치는 배양 온도의 영향을 조사하기 위하여 20 g/l의 glucose와 6 g/l의 tryptone을 함유하는 생산배지에 전배양액을 1%가 되도록 접종한 다음 배양온도를 25°C에서 45°C까지 변화를 주어 배양하였다. 결

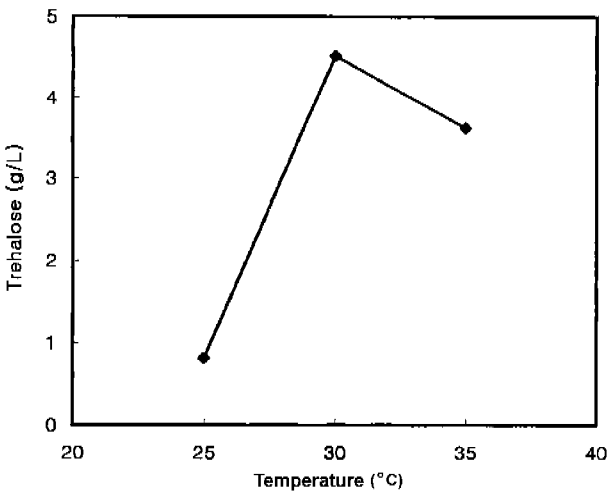


Fig. 4. Effect of temperature on the trehalose production by *Micrococcus luteus* HS-208.

Cultivations were carried out at various temperature in the production medium with 20 g/l of glucose and 6 g/l of tryptone (pH 6.0).

과는 Fig. 4에서 나타난 바와 같이 균체 생육의 최적온도인 30°C에서 4.514 g/l로 가장 좋았으며, 30°C보다 낮은 온도에서는 매우 소량의 생산을 보였다. 그리고 30°C보다 높은 온도에선 온도의 증가에 따라 생산량이 점차 감소함을 보였다.

Trehalose 생산에 미치는 penicillin의 영향

Micrococcus sp.가 Gram 양성균이므로 균체의 세포벽 투과성을 높이기 위해 penicillin의 첨가 영향을 조사하였다. 따라서 20 g/l의 glucose와 6 g/l의 tryptone을 함유하는 생산배지에 전배양액을 1% 되도록 접종하여 배양한 후 20시간째(OD₆₁₀: 15)에 penicillin G를 최종농도가 20 unit/ml이 되도록 첨가하고 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 균체량은 96시간 동안 전혀 변함이 없었으나 상등액을 GC로 분석한 결과 trehalose의 생산량은 Fig. 5에서 볼 수 있듯이 6.540 g/l로서 첨가전보다 약 40%에 이르는 생산증가를 보였다. 이로써 penicillin이 균체의 세포벽 합성을 부분적으로 저해함으로써 trehalose의 세포외 배출을 향상시킴을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 얻어진 최적 조건하에서 20 g/l의 glucose로부터 6.547 g/l의 trehalose를 생산해 낼 수 있었는데, 이는 전환율 32.7%로서 균주 배양을 통해 trehalose를 대량생산해낼 수 있는 가능성을 확인한 것이며, 지속적인 균주의 개발과 발효조를 이용한 연속배양의 최적조건을 확립함으로써 trehalose의 생산성을 더욱 높일 수 있을 것으로 기대된다.

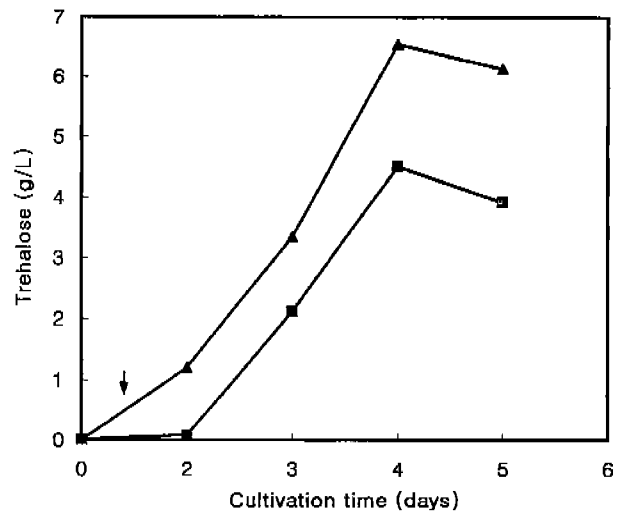


Fig. 5. Effect of penicillin G on the trehalose production by *Micrococcus luteus* HS-208.

Cultivations were carried out at 30°C in the production medium with 20g/l of glucose and 6g/l of tryptone (pH 6.0).

↓ : Addition of 20 unit/ml penicillin G into 1 l of culture broth

■—■ : Production without penicillin G

▲—▲ : Production with penicillin G

요 약

Trehalose를 생산하기 위하여 실험실 보유의 공시균주들 중에서 세포외로 trehalose를 축적하는 균주를 선별하였다. 그들 중 *Micrococcus luteus* IFO 12708이 가장 높은 trehalose 생산성을 보여 주었다. 이 균주의 생산성을 향상시키기 위하여 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)을 돌연변이원으로 trehalose 생산이 증가되는 균주개발을 시도하였으며, HS-208이 생산성이 증가된 변이주로서 선별되었다. 개발된 변이주의 trehalose phosphorylase 활성을 조사한 결과 야생균주에 비해 활성이 3.2배 감소하였으며, 이 변이주를 이용하여 trehalose의 생산을 위한 최적 배양 조건을 검토하였는데 최적 조건은 다음과 같다. 유일한 탄소원으로서는 glucose 20 g/l과 질소원으로서는 tryptone 6 g/l를 최적기질로 이용하며, 초기 pH는 6.0, 최적 배양 온도는 30°C였다. 또한, 본 배양 접종 후 20시간째에 penicillin G를 20 unit/ml이 되도록 첨가하고 3일 동안 배양했을 때 높은 수율을 보여주었다. 이러한 최적조건하에서 20 g/l의 glucose로부터 6.547 g/l의 trehalose를 생산하였으며 이 때 전환율은 32.7%이다.

REFERENCES

- Ahmad, Z. I., J. R. Alden, and M. D. Montague. 1980. The occurrence of trehalose in *Micrococcus* sp. *J. Gen. Microbiol.* **121**: 483-486.
- Camilo, C., S. Sen, M. Thangavelu, S. Pinder, and B. Roser. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: Simplified molecular biology. *Bio/technology* **10**: 1007-1011.
- Crowe, J. H. and L. M. Crowe. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science* **223**: 701-703.
- De-Araujo, P. S. 1996. The role of trehalose in cell stress. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**(7): 873-875.
- Elbein, A. D. 1974. The metabolism of α , α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **30**: 227-256.
- Gadd, G. M., K. Chalmers, and R. H. Reed. 1987. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**: 249-254.
- Gerhardt, P., G. E. G. Murray, R. N. Gostilow, F. W. Nester, A. W. Wood, N. R. Krig, and G. B. Phillips. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*, pp. 222-226. American Society for Microbiology, Washington.
- Hanne, M. 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 2841-2849.
- Hideki, K., J. Miyazaki, A. Yokota, Y. Kanegae, K. Miyagawa, and Y. Sugiyama. 1995. Trehalose production by a strain of *Micrococcus varians*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**(8): 1522-1527.
- Kazuo, A. and T. Masuda. 1995. Production of trehalose phosphorylase by *Catellatospora ferruginea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**: 47-51.
- Lee, C. K. 1987. The chemistry and biochemistry of sweetness of sugars. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **45**: 19-351.
- Lois, M. C., J. H. Crowe, A. Rudolph, C. Womersley, and L. Appel. 1985. Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose. *Arch. Biochem. Biophys.* **242**: 240-247.
- Malcolm, D. 1979. *Enzymes*, pp. 788-789, 3rd ed. Longman.
- Scher, M. 1993. Trehalose to find more food functions as cost falls. *Food process April*: 95-96.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, and M. D. Provenzano. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.

(Received March 31, 1999)