

## Lincomycin 생산균주인 *Streptomyces lincolnensis*의 고생산 균주선별과 용존산소조절 배양방법의 확립

이봉진<sup>1,2</sup>, 최종심<sup>1</sup>, 백미진<sup>1</sup>, 이상종<sup>2</sup>, 정연호<sup>3</sup>, 정용섭<sup>4</sup> 전계택<sup>1</sup>  
강원대학교 생명과학부<sup>1</sup>, (주)에스티알바이오텍<sup>2</sup>,  
강원대학교 식품생명공학부<sup>3</sup>, 전북대학교 응용생물공학부<sup>4</sup>  
전화 (033) 250-8547, FAX (033) 241-4627

### 서론

Lincomycin은 *Streptomyces lincolnensis*에 의해서 생합성되는 이차대사산물로서 그람양성 세균에 대하여 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 미국의 Upjohn사에 의해 최초로 개발된 Lincomycin은 호흡기 감염증 및 수술 후 2차 세균 감염 방지에 탁월한 효능이 있는 인간의 약품이며, 또한 고효율 동물성장 촉진용 사료첨가제로서도 사용되고 있어 그 시장성이 매우 큰 항생제 중의 하나이지만, 현재 국내에서는 전량 수입에 의존하고 있다.

본 연구에서는 lincomycin을 대량 생산하기 위해 이 물질을 과량으로 생산할 수 있는 변이주를 획득하고자 균주개발 전략을 수립하였다. 고생산 변이주의 선별을 위해 lincomycin 생합성에 관련된 유전자와 저항성 유전자가 clustering되어 있는 특징을 이용하였다. 즉 고농도의 lincomycin에 변이주를 노출시키는 경우, 변이주들의 저항성 유전자가 증폭될 때, 저항성 유전자와 근접한 생합성 유전자 또한 동시에 증폭되어 변이주들의 lincomycin의 생합성 능력이 향상될 수 있을 것으로 기대하였다. 또한 lincomycin의 전구체로 알려진 tyrosine의 아미노산 유사체인 tyrosine hydroxamate에 대한 저항성 변이주를 얻고자 하였다. 이 균주 개발 전략을 택한 이유는 생산균주가 lincomycin 생합성에 관련된 전구물질의 feed-back 저해현상을 극복하여 생합성에 필요한 전구물질을 과다 발현하거나 배지내의 전구물질의 사용을 극대화시킬 수 있을 것으로 판단하였기 때문이다. 그리고 이차대사산물의 생산성에 심각한 영향을 끼치는 용존산소를 원하는 수준으로 조절하기 위한 배양공정을 확립하고자 하였다.

### 재료 및 방법

사용된 균주는 *Streptomyces lincolnensis*이며 다양한 돌연변이 균주를 얻어 lincomycin의 생산성을 확인하였다. 또한 용존산소 조절배양방법의 확립을 위해 5L 발효기에서 (주)로카스의 발효전용 제어시스템인 AutoLab LK930을 이용하여 교반속도와 공기의 유입량을 조절하는 방식으로 실험하였다.

### 결과 및 고찰

Lincomycin을 고생산하는 균주를 얻기 위해 lincomycin 저항성변이주와 tyrosine hydroxamate 저항성변이주를 얻었다. Lincomycin 저항성변이주의 경우, UV와 NTG를 처리하여 돌연변이를 유도하여 각각의 단일 균주를 얻어 배양한 결과, 비교적 온화한 돌연변이

원인 UV를 처리한 경우,  $1.75 \times 10^6$  units의 생산성을 보이는 균주들이 많이 선별되었고  $2.75 \times 10^6$  units 이상의 생산성을 나타내는 균주를 선별하지 못하였다. 반면에 NTG로 돌연변이를 유도한 경우,  $2.25 \times 10^6$  units의 생산성을 나타내는 균주가 가장 많이 선별되었고,  $4.25 \times 10^6$  units의 생산성을 나타내는 균주도 선별하였다 (Figure 1). 이로써 이차대사산물의 생합성에 있어서 돌연변이원은 높은 빈도로 돌연변이를 유발하는 NTG가 적절하다는 것을 확인할 수 있었다. Tyrosine hydroxamate 저항성변이주의 경우, 3일에 걸쳐 균주를 선별하였고 이 중에서 3일째 선별한 변이주가 1일과 2일에 선별한 변이주보다 비교적 높은 lincomycin의 생산성을 나타냄을 확인하였다 (Figure 2).

일정 수준의 용존산소를 유지하기 위해 교반속도와 공기 유입량의 정밀한 조절을 필요로 하게 되는데 이를 위해 컴퓨터를 연결한 발효조의 자동제어시스템인 (주)로카스의 AutoLab LK930을 이용하였다. 배양액의 용존산소 농도에 따라 교반속도와 공기의 유입량이 컴퓨터 명령에 의해 자동적으로 조절됨으로서 시간과 인력의 낭비를 막을 수 있고 정확하게 원하는 수준으로 용존산소를 조절할 수 있었다. 용존산소를 포화농도의 30%로 유지하기 위하여 교반기의 속도를 150 ~ 350 rpm 범위에서 적절히 변화시킴과 동시에 공기의 공급속도를 1 ~ 3.5 L/min으로 변화시켜 가며 실험을 수행하였다. 이것은 용존산소를 유지하기 위해 무한정 교반속도를 증가시킬 경우, 미생물의 shear stress에 의해 악영향을 미치게 되는 문제점을 보완하기 위함이다. 배양 24시간 내에 용존산소가 급격히 감소하여 30%이하의 수준으로 감소하기 시작하였을 때 교반속도와 공기의 유입량이 이를 보정하기 위해 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 배양전반에 걸쳐 30%의 용존산소가 유지됨을 확인하였고 배양후반에는 더 이상의 균체성장이 이루어지지 않아 용존산소가 증가하여 교반속도와 공기의 유입량이 최소값으로 유지됨을 확인하였다 (Figure 3). 실험 대조군으로서 교반속도와 공기의 유입량을 수동으로 조절한 경우 용존산소가 제한되는 것을 확인하였다 (Figure 4). 균체량을 비교하여 보았을 때 용존산소를 유지한 것이 대조군보다 약 3 g/L가 더 증가한 것을 확인하였고 (Figure 5), 이차대사산물인 lincomycin은 용존산소를 조절한 경우가 매우 높은 생산성을 나타내는 것을 확인하였다 (Figure 6). 이로부터 방선균에 의해 생합성되는 이차대사산물인 lincomycin의 경우 충분한 용존산소 공급이 생산성 증가에 매우 중요함을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. Argoudelis. A. D. and Coats J. H. Process for producing lincomycin. (1973) US Pat. 3,726,766.
2. Argoudelis. A. D. and Coats J. H. Process for preparing lincomycin. (1974) US Pat. 3,812,014.
3. Brix, T., Drew, S. W., and Buckland, B. C. Fermentation process development within a computer controlled pilot plant. In Progress in industrial microbiology, (1988) Volume 25 - Computer in fermentation technology. 151-193.
4. Peschke, U. Schmidt, H. Zhang, H. Z., and Piepersberg, W. Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. (1995) Mol. Microbiol. 16, 1137-1156.