

Production of Avermectin from *Streptomyces avermitilis* NRRL8165 by optimization of medium composition

Sang-Heum Shin¹, Kwon-Hye Ko¹, Hyun-Woo Kang¹, Heui-Yun Kang²,
Yong-Sung, Kim¹, Yeon-Woo Ryu¹

¹Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon, Korea

²Institute of Biotechnological Industry, Inha University, Incheon, 402-751, Korea

TEL: +82-31-219-2449, FAX: +82-31-216-8777

Abstract

In this study, we tried to optimize the composition of medium and culture conditions for the total avermectin and avermectin B1 production from *S. avermitilis*, which is a natural producer of avermectin family. Among various carbon and organic nitrogen sources tested, fructose and malt extract were most effective on avermectin production. Next, addition of polyethylene glycol and K₂HPO₄ in medium significantly improved the intracellular contents of avermectin. Thus the optimized medium composition was 50 g/L fructose, 30 g/L malt extract, 5 g/L casamino acid, 2.5 g/L PEG 3,350, and 1 g/L K₂HPO₄, which increased the avermectin production from 10 to 478 mg/L. The contents of avermectin B1 complex was about 50% of the total amount of avermectin.

서 론

방선균에 의해 2차 대사산물로 생산되는 macrocyclic lacton 계열의 avermectin의 발견으로 인해 동물구충제 시장의 일대 혁신적인 변화가 일어나고 있다¹⁾. 즉 구충제로서의 강력한 활성뿐만 아니라 진드기, 이 등의 외부 기생충에 대해서도 충분한 효과가 입증되어, 이들을 미생물 발효에 의해 경제적으로 생산하고자 하는 시도가 세계 유수의 생물공학회사에서 적극적으로 추진되어 왔다²⁻⁴⁾.

Avermectin은 A_{1a}, A_{2a}, B_{1a}, B_{2a}, A_{1b}, A_{2b}, B_{1b}, B_{2b} 등의 8개 유도체로 생합성 되나, 이 중에서 B_{1a}가 가장 효과적이며, 광범위한 구충효과를 나타내는 것으로 알려져 있다⁵⁾(Fig. 1). 동물의 기생충에 효과가 있는 활성물질을 탐색하는 중에 약 40,000 개 이상의 토양미생물을 선별한 결과 오직 한 균주인 *S. avermitilis* 만이 생산한다. Avermectin의 세계시장 규모는 약 6,000억원 정도인 고부가가치 동물의약품이다.

따라서 본 연구에서는 *S. avermitilis*로부터 avermectin B1을 생산하고자 배지조성의 최적화를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지, 배양조건

균주는 avermectin 생산을 위하여 가장 널리 사용되고 있는 *Streptomyces avermitilis* NRRL8165를 NCAUR(National Center for Agricultural Utilization Research)에서 분양받아 사용하였다. 종균배지로는 SM배지(glucose 3%, yeast extract 3%, malt extract 0.3%, soybean flour 0.5%, peptone 0.5%)를, 생산배지로는 complex medium(glucose 4.5%, casein acid 2.4%, casamino acid 0.25%, polyethylene glycol 8,000 0.25%)를 이용하였다. 배양조건은 30℃, 180 rpm에서 종균배양은 48 hrs 배양하였으며 본 배양으로 10% 접종하여 7일간 배양하였다.

2. Avermectin의 추출

Avermectin의 추출은 배양액 4 ml을 취하여 VS5500N centrifuge(Vision, Korea)을 이용하여 4,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상등액과 cell을 분리한 후 cell에 100% methanol을 4 ml 첨가하여 200 rpm에서 3 시간동안 교반시켜 주었다.

3. Avermectin의 정량 분석

μ BondaPak C18 column(Waters, USA)을 이용하여 HPLC 로 분석하였다. Detector는 Waters 486 UV detector(Waters, USA)를 사용하였으며, 파장은 246 nm, 이동상 용매는 methanol:water(85:15)을 사용하였으며, 유속은 1.2 ml/min 으로 하였다. Column의 온도는 40℃로 유지하였다.

결과 및 고찰

1. PEG(polyethylene glycol) 에 대한 영향

PEG를 첨가하지 않을 시 mycelia보다는 pellet에 가깝게 성장하는 것을 확인하였으며, 첨가 시 mycelia를 형성하면서 성장하는 것을 확인하였다. 이는 PEG가 cell surface에 작용하여 membrane의 유동성을 증가시켜 cell의 형태를 mycelia로 유발시키

는 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다. 또한 분자량에 따라 비교해 본 결과, morphology나 생산에 큰 차이는 보이지 않았지만, PEG 3,350에서 가장 좋은 결과를 보여 PEG 8,000을 PEG 3,350으로 변경하였다(Fig. 2).

2. K₂HPO₄ 에 대한 영향

배지 내 phosphate를 첨가한 결과, 0.5 mM과 11.5 mM에서 avermectin의 생산이 약간의 저해를 받는 것으로 나타났고, 2.9 mM에서도 생산성이 낮은 것을 볼 수 있었다. 그 중에서 5.7 mM의 조건에서 avermectin의 생산이 가장 높았으며, 생산되지 않았던 avermectin B1 역시 3.8 mg/L 생성되었다. 이는 광범위 구충제 avermectin B1의 생성에 K₂HPO₄가 크게 작용한다는 것으로 추정된다(Fig. 3).

3. 탄소원과 질소원에 대한 영향

여러 가지 탄소원과 질소원의 영향을 본 결과, 탄소원으로는 fructose가 질소원으로는 malt extract가 avermectin 생산에 있어 최적의 energy source로 선정되었다(Fig. 4). 이에 대한 각각의 농도를 비교하면서 C/N ratio를 결정한 결과, 5:3이었다. 이는 avermectin 생합성에 관련된 효소의 활성 또는 효소 합성 기작이 배지 중의 C/N 비율에 따라 매우 정밀하게 조절됨을 추정할 수 있으며, 여러 가지 탄소원과 질소원에 있어서 fructose와 malt extract가 avermectin 생합성에 큰 영향을 주는 것으로 추정된다(Fig. 5).

요 약

본 연구에서 수행한 avermectin 생산을 위한 배지 최적화에서 기존의 총 avermectin의 함량 10 mg/L를 470 mg/L까지 증가시켰으며, 이 중 광범위 활성을 가지는 avermectin B1도 50%에 달했다. 최적화된 배지 조성은 50 g/L fructose, 30 g/L malt extract, 5 g/L casamino acid, 2.5 g/L PEG 3,350, and 1 g/L K₂HPO₄ 이다. K₂HPO₄와 fructose, malt extract가 avermectin 생합성에 크게 작용하는 것으로 추정된다.

References

1. Burg, R.W., Miller, E.E. Baker, J. Bimbaum, S.A, Currie, R.Hartman, Y-I., Kong, R.L. Monaghan, G. Olson, I. Putter, J.B. Tunac, H. Wallick, E.O.Stapley, R. O iwa, and S. O mura. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents : production organism and fermentation.

- (1979) *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 361-367.
- Ikeda, H., H. Kotaki, H. Tanaka, and S. O mura, Involvement of glucose catabolism on avermectin production by *Streptomyces avermitilis*. (1988) *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 282-284.
 - McCann-McCormick, P.A., R.L. Monaghan, E.E. Baker, R.T. Goegleman, and E.O. Stapley. Fermentation development and process development. P69-74 In Moo-Yong, M, et al.(eds), *Advences in Biotechnology*. Pergamon, New York. (1981)
 - Omstead, M.N., L. Kapan, and B.C. Buchland. Fermentation development and process improvement. (1989) P.33-54. In W.C. Camphell(ed.), *Ivemectin and abavectin*. Springer-Verlag, New York.
 - Egerton, F.R., D.A. Ostlind, L.S.Blair, C.H.Eary,D,Suhayda, S. Cifelli, R. F. Riek, and W.C. Cambell. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Efficacy of the Bla componet. (1979) *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 372-378.

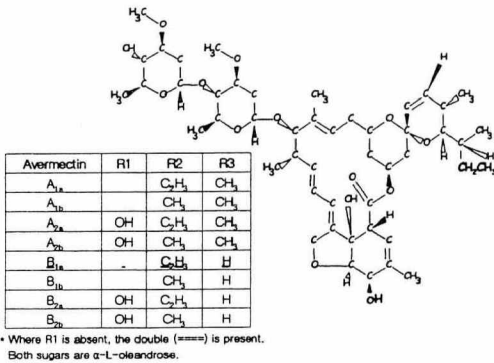


Figure 1. Structure of avermectins.

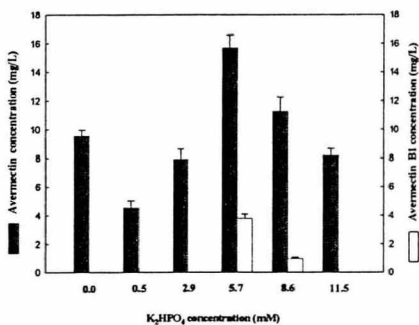


Figure 3. Effects of K₂HPO₄ concentrations on avermectin production.

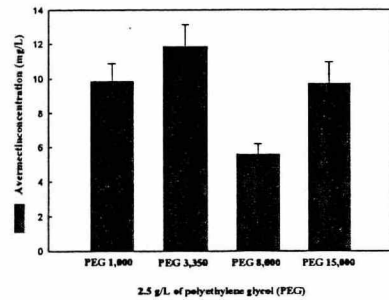


Figure 2. Effects of the molecular weight of polyethylene glycol on avermectin production.

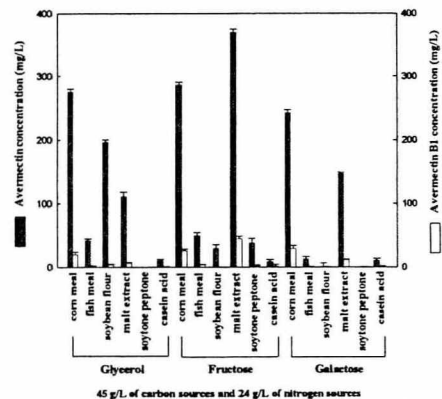


Figure 4. Effects of nitrogen sources selected on avermectin production with glycerol, fructose and galactose as carbon sources selected.

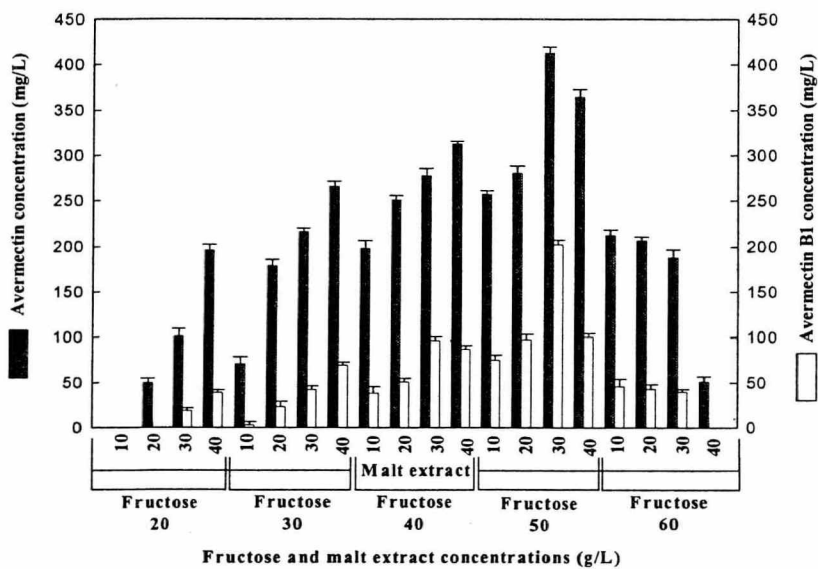


Figure 5. Effects of the various concentrations of malt extract (N-source) and fructose (C-source) on avermectin production.