

Sisomicin 생산균의 돌연변이와 高生産 菌株의 選別方法

이상한 · 안병우 · 신철수

한국화학연구소 응용생물연구부

(1986년 5월 30일 수리)

Mutagenesis of Sisomicin-producing Strains and Selection Method of High Producers

Sang Han Lee, Byung Woo Ahn and Chul Soo Shin

Life Science Division, Korea Research Institute of
Chemical Technology, Daejeon, Korea

(Received May 30, 1986)

A sisomicin-producing strain, *Micromonospora inyoensis*, was treated with various mutagens. The optimal death rates to obtain the high-producers of sisomicin were 90% for ultraviolet light, 99% for nitrosoguanidine, and 99.3% for nitrous acid, respectively. In place of the method of liquid culture, an agar plug method, which is easy and convenient, was used to measure the antibiotic-producing abilities of the strains isolated from mutagen-treated cells. On the other hand, as the selection method of overproducing mutants after mutagenesis, gradient agar plates which included various antibiotics and salts were used. Among the antibiotics and salts tested, gentamicin and kanamycin as antibiotics, and CoCl_2 and HgCl_2 as salts, were effective to select the high-producers of sisomicin.

Sisomicin은 gentamicin과 그 구조가 매우 유사한 aminoglycoside 계통의 수용성 항생물질로서⁽¹⁾, 1970년 Weinstein 등⁽²⁾에 의해 발견되었다.

Sisomicin은 넓은 항균스펙트럼을 가져서 *Pseudomonas* 속, *Serratia* 속, *Proteus* 속 그리고 penicillin, kanamycin 및 neomycin의 내성균등에 탁월한 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다⁽³⁾. Sisomicin은 gentamicin에 비해 독성이 더 강하나 gentamicin보다 항균력이 뛰어난 것으로 알려져 있다^(3,4).

한편, sisomicin을 공업적으로 생산하기 위한 과정중 우량균주의 개발은 필수적으로 선행되어야 한다.

본 연구에서는 sisomicin 생산균을 변이유기체로 처리한 후 우량균주를 효과적으로 선별할 수 있는 스크리닝 방법의 개발과 아울러 그 개발된 방법의 실제응용에 대하여 살펴 보았다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용한 sisomicin 생산균은 *Micromonospora inyoensis* IFO 13156 균주이었다. 한편, 항생물질 농도를 측정하는데 이용되는 피검균으로서는 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P를 사용하였다.

배지 및 배양조건

① 배지

생육배지의 조성은 Table 1에, 항생물질 생산배지의 조성은 Table 2에 나타내었다.

② 균체의 증식

250ml 삼각플라스크에 균체의 생육배지를 20ml 넣고 살균한 뒤, *M. inyoensis* 한천사면 배지로부터 1백금이 접종하여 30°C에서 3일간 진탕배양(진폭

Table 1. Germination medium of *M. inyoensis*.

Beef extract	3 g
Tryptone	5 g
Yeast extract	5 g
Dextrose	1 g
Potato starch	24g
Calcium carbonate	2 g
in 1000ml tap water	
pH 8.0 before autoclaving	

Table 2. Fermentation medium.

Starch	50g
Dextrose	5 g
Soybean meal	35g
Calcium carbonate	7 g
Cobalt chloride	0.8mg
in 1000 ml tap water	
pH 8.0 before autoclaving	

3 cm, 150 strokes/min) 하였다.

③ 항생물질 생산

50 ml의 항생물질 생산배지를 500 ml 삼각플라스크에 넣고 살균한 후, 균체의 증식이 끝난 배양액 2.5 ml을 접종량으로 첨가하여 28°C에서 4일간 진탕배양(진폭 3 cm, 150 strokes/min) 하였다.

항생물질 추출

항생물질 생산이 끝난 배양액에 황산을 넣어 pH 2.0으로 조정된 뒤, 10분간 교반하여 항생물질을 추출한 후, 원심분리하여 상등액을 취하였다. 위 상등액의 pH를 7.0으로 조절한 뒤, Ca 이온을 제거하기 위해서 oxalic acid를 첨가하였다. 다시 원심분리하여 얻은 상등액의 pH를 7.0으로 조절하여 항생물질의 농도를 측정하였다^(3,5).

항생물질의 농도 측정

피검균인 *S. aureus*를 하룻밤 동안 배양한 후 520 nm에서 흡광도가 0.15 정도 되게 조정된 뒤, 그 액을 면봉으로 일정량 취하여 penassay agar plate에 3회 도말하였다. 이 agar plate 위에 실린더(내경 7.0 mm, stainless steel)를 일정한 간격으로 놓고 각각 항생물질 용액을 5 μ l 주사하였다. 2시간 동안 항생물질이 확산되게 방제한 다음 37°C 항온기에서 하룻밤 동안 배양하여 나타난 生育阻止帶의 직경을 측정하여 표준용액의 값과 비교하여 농도 μ g/ml로 환산하였다⁽⁶⁾.

Agar plug법⁽⁷⁾

포자현탁액을 변이유기제로 처리한 후 사면배지⁽⁸⁾로 만들어진 plate 위에 도말하여 28°C 항온기에서 약 일주일간 배양하여 colony를 생성시켰다. 한편, 발효생산배지에 한천을 2% 첨가한 배지를 살균한 후 25 ml를 직경 9 cm petri dish에 분주하여 굳힌 뒤, 직경 6 mm의 cork borer로 일정한 agar plug를 만들었다. 이 agar plug를 살균한 petri dish안에 넣고 agar plug의 위 표면에 위에서 생성된 각각의 colony를 접종하였다. 접종한 후 28°C 항온기에서 4일간 배양하여 항생물질을 생성시켰다. 생성된 항생물질의 농도를 측정하기 위해서 *S. aureus*가 도말된 penassay agar plate 위에 앞에서 배양된 agar plug를 놓았다. 그 후에 37°C 항온기에서 하룻밤 동안 배양한 후 각각의 생육저지대의 직경을 측정하였다.

자외선 (ultraviolet light) 처리^(9,11)

한천사면으로부터 일정량의 포자를 생리식염수에 현탁시켜 10⁶~10⁷ 개/ml 정도 되게 희석하였다. 이 현탁액 10 ml을 살균된 petri dish에 넣은 다음 10 W 자외선등으로부터 28 cm의 거리에서 1~3 분간 照射시켰다. 자외선 조사 후 광에 의한 효과를 방지하기 위하여 어두운 곳에 1시간 방치하였다가 사면배지로 만들어진 plate 위에 도말하여 항온기에서 7일간 배양한 후 생성된 colony의 활성을 agar plug법에 의해 측정하였다.

Nitrosoguanidine(NTG) 처리^(10,11)

포자를 생리식염수에 현탁시킨 후 NTG용액의 최종농도가 100 μ g/ml 되게 한 다음, 28°C의 恒温水槽에서 10~30분간 반응시킨 다음 원심분리하여 균체를 모아서 다시 동량의 M56 최소배지⁽¹¹⁾로 균체를 현탁시켰다. 이러한 과정을 2회 반복한 후 도말하여 colony를 얻었다.

Nitrous acid 처리⁽¹¹⁾

포자현탁액을 0.1 M sodium acetate 완충액 (pH 4.6)으로 세척한 다음 0.1 M sodium nitrate 용액에 다시 현탁시켜서 28°C 항온수조에서 5~15분간 반응시켰다. 반응을 정지시키기 위하여 동량의 M 56 최소배지를 첨가한 후 원심분리하였다. 이와 같은 작업을 2회 되풀이 한 다음 사면배지로 만들어진 plate 위에 도말한 후 배양하여 colony를 얻었다.

濃度勾配 plate의 조제

한천사면배지를 살균한 후 20 ml을 petri dish에 分注하여 한쪽 끝을 기울인 후 굳힌다. 그 후 plate를 똑바로 놓고 한천표면 위에 적절농도의 항생물질을 함유된 한천사면배지 20 ml를 다시 분주하여 plate 내에 항생물질의 농도구배가 생기게 하였다⁽¹¹⁾.

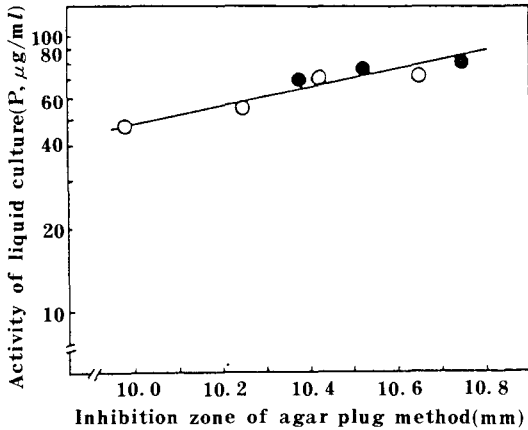


Fig. 1. Relationship between the activities measured by the methods of liquid culture and agar plug.

○—○; wild type. ●—●; mutant.

결과 및 고찰

Agar plug 법과 액체배양법의 상관관계

Plate에서 생성된 colony의 항생물질 생성능을 측정하는데 시간과 노력을 많이 요하는 액체배양 대신에 간편한 agar plug 법 (고체배양)을 이용할 수 있다면 동일 시간에 다량의 colony에 대한 活性測定이 가능하다. 그러므로 액체배양법과 agar plug법 사이에 비례적인 상관관계가 이루어진다면 액체배양 대신에 agar plug법을 이용할 수 있을 것이다. 임의로 생산균의 親株와 돌연변이주들을 선택하여

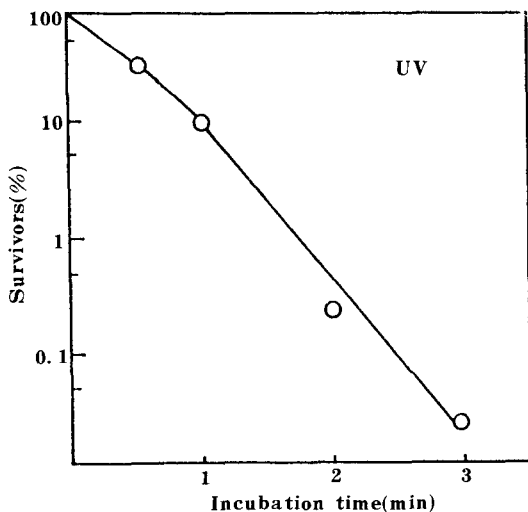


Fig 2. Cell survival rate versus incubation time in UV-treatment.

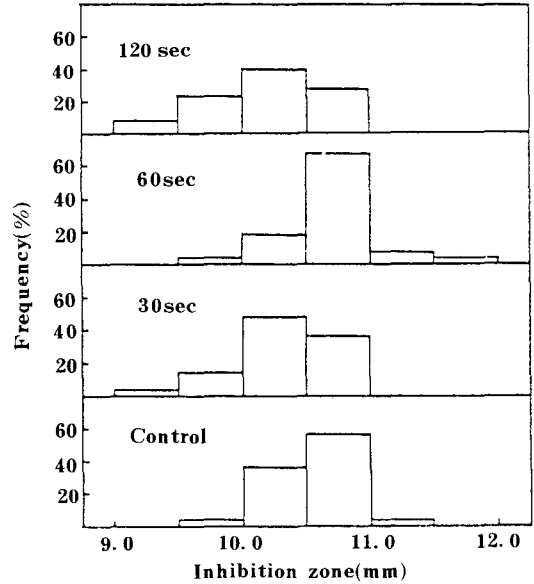


Fig. 3. Activity distribution depending on the time of UV-treatment.

Control; no UV-treatment.

같은 균주에 대하여 액체배양과 agar plug 법에 의하여 각각 배양한 후 액체배양의 환성 (μg/ml)과 agar plug 법의 생육저지대의 크기 (mm)사이의 상관관계를 살펴보았다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 액체배양에서 낮은 환성을 나타내는 균주는 agar plug에서도 낮은 생육저지대를 나타낸 반면, 액체배양에서 환성이 높은 균주일수록 비례적으로 agar plug에서 생육저지대의 크기가 증가하였다. 이러한 결과로부터 액체배양법 대신 agar plug 법을 이용할 수 있을 것이며, 이 방법을 환성이 높은 colony를 분리하는 앞으로의 실험에 이용하였다.

변이유기체 처리조건에 따른 활성 분포

포자현탁액을 자외선으로 처리하여 처리시간에 따른 생존율을 살펴보았다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 자외선으로 1분 처리하였을 경우 10% 정도, 2분 처리하였을 경우 0.2% 정도 생존하였다. Fig. 3은 각각 다른 시간 동안 자외선 처리된 현탁액을 plate에 도말하여 일주일 후에 얻어진 colony를 agar plug 법에 의하여 각각의 환성을 측정된 결과이다. 자외선으로 처리하지 않은 对照區 (control)의 활성 분포는 10.0~11.0 mm 정도의 생육저지대를 나타내었다. 이에 비해 30초와 120초 동안 각각 자외선 처리한 區의 활성분포는 대조구의 그것보다 전반적으로 낮은 경향을 나타내었으나, 60초 처리구에서는 11.0~12.0 mm의 생육저지대를 나타내는 colony가 10% 정도나 생성되어 대조구보다 환성이 높은 群

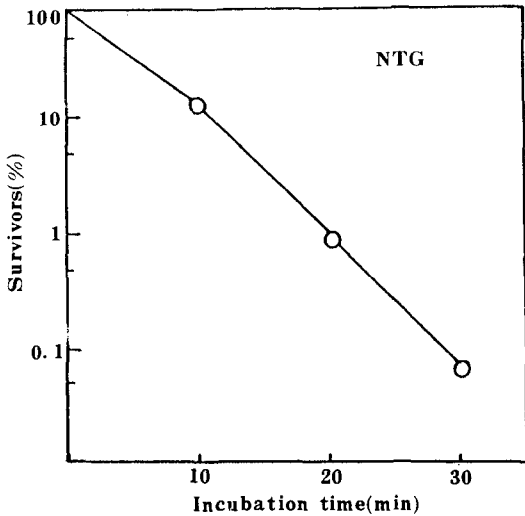


Fig. 4. Cell survival rate versus incubation time in nitrosoguanidine treatment.

이 증가하였다. Fig. 4는 NTG로 시간별 처리한 뒤 *M. inyoensis*의 생존율을 살펴본 것이다. 10분 처리구에서 90% 정도 20분 처리구에서 99% 정도의 사멸율을 보여 주었다. Fig. 5는 NTG 처리 후 생존한 각 colony의 활성분포를 살펴본 것이다. 10분 처리구와 30분 처리구가 대조구보다 활성분포가 낮아지는 경향을 보이고 있으나, 20분 처리구에서는 11.5~12.0 mm의 생육저지대를 나타내는 돌연변이 주도 5% 정도 생성되어 대조구에서 나타나지 않는

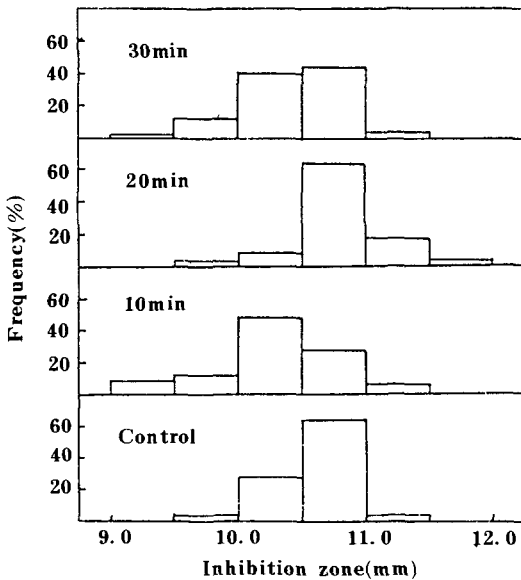


Fig. 5. Activity distribution depending on the incubation time of nitrosoguanidine treatment. Control; no nitrosoguanidine treatment.

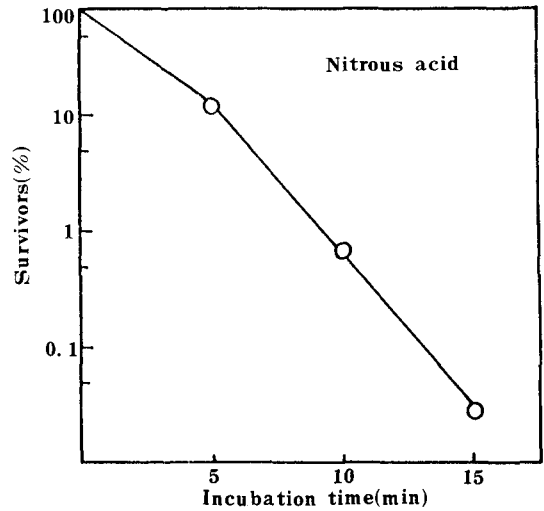


Fig. 6. Cell survival rate versus incubation time in nitrous acid-treatment.

높은 활성을 가진 colony들이 나타났다. NTG 처리의 경우 흔히 80~90%의 사멸율일 경우에 가장 좋은 효과를 얻는다고 알려져 있으나⁽¹⁰⁾ 본 실험에서는 99% 사멸율일 경우가 최적조건이었다.

변이유기제로 nitrous acid를 처리하여 보았다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 5분 처리구에서는 10%, 10분 처리구에서는 0.7% 정도 생존하였다. Fig. 7은 nitrous acid를 시간별 처리하였을 때의 활성분포를 살펴본 것이다. Nitrous acid를 15분 처리한 뒤 생성된 colony의 활성분포는 대조구에 비해 현저히 낮은 경향을 나타내고 있으나 5분 처리구와

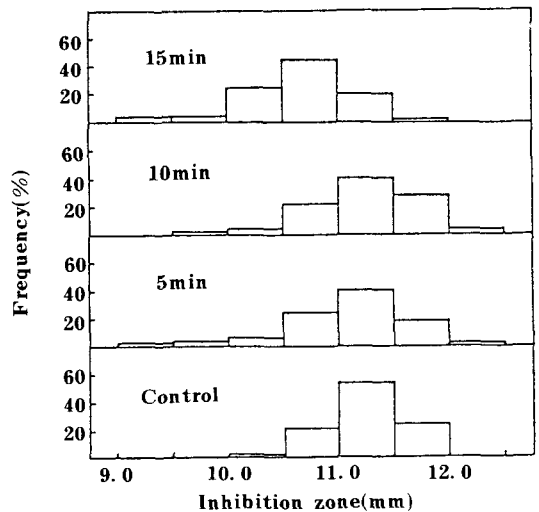


Fig. 7. Activity distribution depending on the incubation time of nitrous acid-treatment. Control; no nitrous acid-treatment.

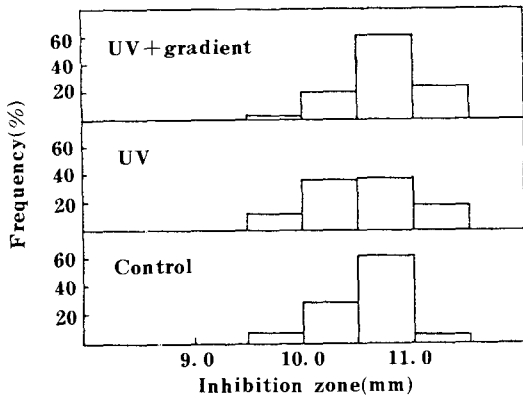


Fig. 8. Effects of gentamicin on the selection of high producers in UV-treated cells.

Control; no UV-treatment.
 UV; UV-treatment for 60 seconds.
 UV+gradient; treatment of UV-treated cells on gentamicin-gradient plate.

10분 처리구에서의 생육저지대가 12.0~12.5mm 정도인 colony가 5% 정도 생성되어 대조구에 비해 높은 활성을 가진 colony 군이 나타났다.

이상의 결과에서 알 수 있듯이 자외선은 90%, N-TG는 99%, nitrous acid는 99.3% 사멸율에서 높은 활성을 나타내는 colony 군이 증가하여 가장 효과가 좋았다. 이상의 3 가지 변이유기체 처리중 활성 분포는 nitrous acid구에서 가장 넓고 활성이 높은 colony가 많이 생성되었다. 앞으로 더 활성이 높은 우량균주를 얻기 위해서 두가지 이상의 변이유기체를 동시에 처리하는 시도를 할 예정이다.

Gentamicin 농도구배 plate의 효과

변이유기체 처리후 활성이 높은 돌연변이주를 선택적으로 분리하는데 항생물질 농도구배 plate를 사용하였다. 변이유기체로 처리된 현탁액을 항생물질의 농도구배 agar plate 위에 도말하여 높은 농도구배에서 나타난 colony, 즉 비교적 항생물질에 저항성이 높은 colony를 선택하여 그들의 활성을 측정하였다.

한편, aminoglycoside 계통의 항생물질을 생산하는 미생물은 자신이 생산하는 항생물질에는 비교적 내성이 강하다고 알려져 왔다⁽¹²⁾. 본 실험에서 sisomicin과 그 구조가 매우 유사한 gentamicin의 농도구배 agar plate 상에서 생성된 colony의 sisomicin 생성능을 비교하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 대조구와 자외선 처리구의 colony들의 활성분포에 비해, 자외선 처리한 뒤 농도구배 plate를 통해 분리된 colony들의 경우 낮은 활성을 나타내는 colony의 수가 줄어들은 반면, 높은 활성을 나타내는 colony의 수가 증가하는 것으로 보아 gentamicin에 저

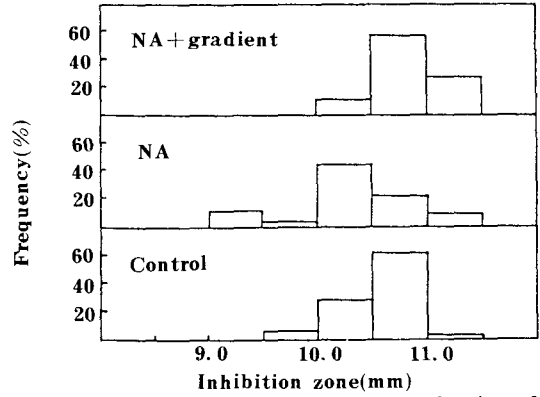


Fig. 9. Effect of gentamicin on the selection of high producers in nitrous acid-treated cells.

Control; no nitrous acid treatment.
 NA; nitrous acid-treatment.
 NA+gradient; treatment of nitrous acid-treated cells on gentamicin-gradient plate.

항성이 강한 균은 sisomicin 생산능이 높음을 보여 주었다. Fig. 9는 변이유기체로 nitrous acid를 처리하고 난 뒤 gentamicin 농도구배 plate의 처리효과를 살펴본 것이다. Nitrous acid를 처리하고 난 뒤 활성이 낮게 나타나는 돌연변이주가 많은 분포를 나타내었으나 gentamicin 농도구배 plate를 거친 후

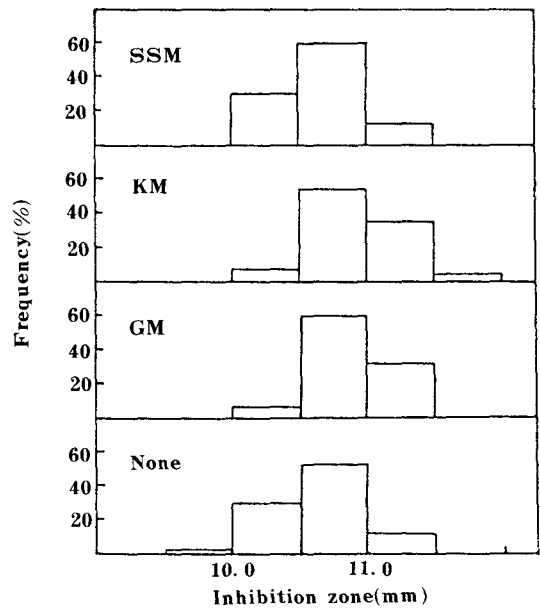


Fig. 10. Effects of various antibiotics on the selection of high producers in UV-treated cells.

None; no antibiotic treatment.
 GM; treatment on gentamicin-gradient plate.
 KM; treatment on kanamycin-gradient plate.
 SSM; treatment on sisomicin-gradient plate.

이들의 수는 줄어들고 높은 활성을 가진 돌연변이 주들이 주로 분리되었다.

이와 같이 자외선과 nitrous acid 처리 후 gentamicin 농도구배 plate를 통과한 후 두 경우 모두 높은 활성을 나타내는 colony가 증가하는 것으로 보아 gentamicin을 첨가한 농도구배 agar plate의 이용은 sisomicin을 생산하는 우량균주를 분리하는데 효과적인 것으로 생각된다.

농도구배 plate에 효과적으로 이용될 수 있는 항생물질의 스크리닝

Gentamicin이 농도구배 plate에 사용될 경우 활성이 높은 colony의 수가 증가하였지만 아주 높은 균은 거의 선별되지 않았기 때문에 좀 더 효과있게 농도구배 plate에 이용될 수 있는 항생물질을 선별할 필요가 있다. 그래서 aminoglycoside 계통의 항생물질인 sisomicin, kanamycin, gentamicin, streptomycin, lincomycin, spectinomycin 등을 이용한 농도구배 plate를 만들어 좀 더 효과적인 항생물질을 선별하는 시도를 하였다. 포자현탁액을 1분간 자외선 처리한 후 여러가지 항생물질의 농도구배 plate에서 분리된 colony들의 항생물질 생성능을 살펴보았다. Fig. 10에서 보는 바와 같이 sisomicin은 별로 효과가 없었으나 gentamicin은 효과가 있었다. 특히 kanamycin의 경우 생육저지대의 직경이 11.5~12.0 mm인 colony가 5% 정도 생성되어 매우 좋은 효과가 있는 것으로 나타났다. Aminoglycoside 계통의

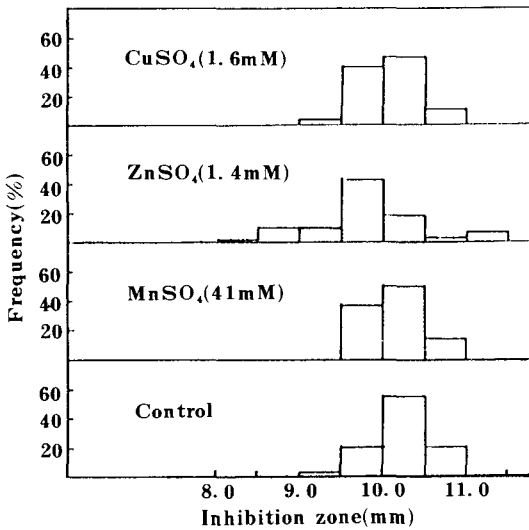


Fig. 11. Effect of various salts on the selection of high producers in UV-treated cells.

Control; no treatment.
 MnSO₄; treatment on MnSO₄-gradient plate.
 ZnSO₄; treatment on ZnSO₄-gradient plate.
 CuSO₄; treatment on CuSO₄-gradient plate.

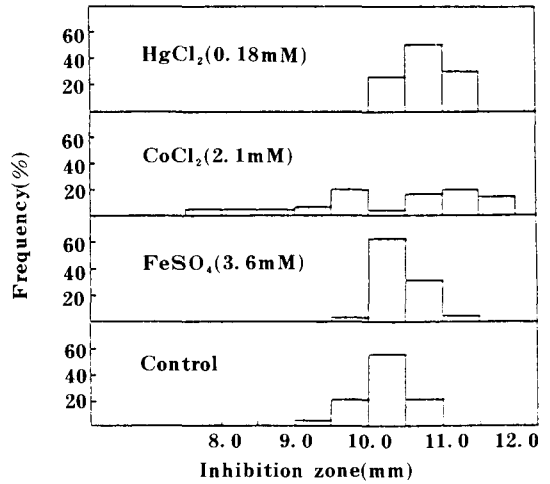


Fig. 12. Effects of various salts on the selection of high producers in UV-treated cells.

Control; no treatment.
 FeSO₄; treatment on FeSO₄-gradient plate.
 CoCl₂; treatment on CoCl₂-gradient plate.
 HgCl₂; treatment on HgCl₂-gradient plate.

항생물질을 생산하는 균은 자기가 생산하는 항생물질에 대해서는 耐性이 강한 것으로 보고되며¹²⁾, 특히 내성이 강한 균일수록 더욱 높은 항생물질 생성능을 가지고 있을 것으로 생각된다. 그러나 이 실험에 의하면 sisomicin에 내성이 높은 생산균의 활성분포는 거의 변화하지 않아 효과가 별로 없는 것으로 나타난 것은 매우 특이한 사실이다. 한편 kanamycin의 경우 gentamicin에 비해서 효과가 더욱 좋아 gentamicin구에서 나타나지 않는 더욱 높은 활성을 가진 균이 나타났다.

이와 같은 방법을 이용하여 농도구배 plate에 효과적으로 이용될 수 있는 항생물질을 선별하여 농도구배 plate에 이용함으로써 우량균주를 좀 더 효과적으로 분리할 수 있을 것이다.

중금속염을 이용한 농도구배 plate의 효과

농도구배 plate를 만들 때 항생물질 대신 여러가지 중금속염을 첨가하여 농도구배 plate를 만들어 이들의 효과를 살펴보았다. 포자현탁액을 1분간 자외선 처리한 후 여러가지 중금속염의 농도구배 plate에서 분리된 colony들의 항생물질 생성능을 살펴보았다. Fig. 11에서 보는 바와 같이 Cu와 Mn이 첨가된 농도구배 plate에서 분리된 colony들의 활성분포는 별로 좋은 효과를 나타내지 못하였으나 Zn은 약간의 효과를 나타내었다. 그리고, Fig. 12에서 보는 바와 같이 Fe와 Hg의 경우 11.0mm 이상의 생육저지대를 나타내는 colony가 각각 5%, 35% 정도로 생성되었다. 특히 Co-농도구배 plate

구는 중금속염중 가장 좋은 효과를 보여서 11.0mm 이상의 생육저지대를 나타내는 colony가 38% 정도 생성되었다.

한편, Hg, Cu 등의 중금속 혹은 유기금속이온들이 배지에 존재할 경우, β -lactam계 항생물질을 생산하는 미생물들은 항생물질을 분비하여 위의 중금속과 복합체를 형성하여 이들 중금속에 의한 阻害 효과를 감소시킨다는 보고가 있다⁽¹³⁾. 이러한 연유에서 이들 중금속에 저항성이 높은 돌연 변이주를 분리하여 우량균주를 스크리닝할 수 있다. Fig. 12에서 보는 바와 같이 본 실험에서 보여진 Hg와 Fe의 효과는 이와 같은 機作과 관련이 있는 것으로 추정된다.

Co 이온은 sisomicin 생합성 경로중 methylation 과정에 중요한 因子로 알려져 있다⁽¹⁴⁾. Co- 농도구배 plate에서 분리된 colony의 활성이 높은 것으로 보아, 이들 colony의 경우 항생물질 생합성 과정에서 methylation 과정이 변화된 결과로 추정되나, 더 자세한 기작에 대해서는 앞으로 많은 연구가 필요하다.

요 약

Sisomicin 생산균인 *Micromonospora inyoensis* 균주를 변이유기체로 처리하였을 때 활성이 높은 균주들을 얻기 위한 최적조건으로는 각각 자외선(UV light) 처리에서 90%, nitrosoguanidine (NTG)에 대해 99%, nitrous acid에 대해 99.3%의 사멸율을 나타내는 경우였다. 이 때 분리된 colony들의 sisomicin 생성능의 측정은 액체배양 대신 쉽고 간편한 agar plug법을 사용하였다.

한편, 변이유기체로 처리한 후, 우량균주를 선택적으로 분리하기 위한 방법으로 aminoglycoside계통의 항생물질 혹은 중금속염을 함유한 농도구배 agar plate에서 생성된 균주들의 활성을 살펴본 결과, 항

생물질로서는 gentamicin, kanamycin 이, 중금속염으로서는 Co, Hg가 효과적이었다.

참고문헌

1. Kugelman, M., A.K. Mallans and H.F. Vernay.: *J. Antibiot.*, **26**, 394 (1973)
2. Weinstein, M.J., E.M. Oden and J.A. Waitz: *J. Antibiot.*, **23**, 551 (1970)
3. Wagman, G.H. and M.J. Weinstein: *Antibiotics*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 176 (1978)
4. Weinstein, M.J., G.H. Wagman and J.A. Waitz: *Infect.*, **4** (Suppl. 4), 285 (1976)
5. US Patent **3,832,286** (1974)
6. Kirshbaum, A. and B. Arret: *J. Pharm. Sci.*, **56**(4) 511 (1967)
7. Ichikawa, T., M. Date, T. Ishinura and A. Ozaki: *Folia Microbiol.* **16**, 218 (1971)
8. Iijima, T.: List of Culture (IFO), Institute for Fermentation, Osaka, (1984)
9. McDonald, K.D., J.M. Hutchinson and W.S. Gillet: *J. Gen. Microbiol.*, **33**, 366 (1963).
10. Deric, V.: *Mutation Res.*, **9**, 167 (1970)
11. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.W. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips: *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, (1981)
12. Hotta, K., A. Takahashi, N. Saito and Y. Okami: *J. Antibiot.*, **36**, 1748 (1983)
13. Choi, S.H.: M.S. Thesis (KAIST) (1985)
14. Umezawa, H., A.L. Demain, T. Hata and C.R. Hutchinson: *Trends in Antibiotic Research*. Japan Antibiotics Research Association (1982)