

고수율 Kasugamycin 생산 변이주의 선발시 여러 인자들의 효과

김윤정*·이상한·손광희·복성해

한국화학연구소 생물공학연구실

Effect of Some Parameters for Selecting the High Kasugamycin Producing Mutants

Kim, Yoon J.*, Sang H. Lee, Kwang H. Son and Song H. Bok

Biotechnology R & D Center, Korea Research Institute of Chemical Technology,
P.O. Box 9, Daedeog-Danji, Daejeon 302-343, Korea

Effects of the inoculum size of testing organism and pH of the plate and the concentration of agar were investigated for the selection of high kasugamycin producing mutants of *Streptomyces kasugaensis* ATCC 15174. For the detection of high kasugamycin-producing mutants, both concentrations of agar and test organism were optimized at the concentrations of 2% and 0.35 (A_{550}), respectively. The pH 7 was optimum for both growing the testing organism, *Pseudomonas fluorescens* IFO 12180, and for obtaining more promising mutant strains of *S. kasugaensis*. Under these conditions, mutants had been isolated which, tested later in liquid cultures, gave higher kasugamycin yields than that of the parent strain.

*Streptomyces kasugaensis*에 의하여 발효 생산되는 kasugamycin은 *Pyricularia oryzae*에 의한 도열병의 방제를 위하여 60년대에 발견된 이래 벼농사에 필수적인 농약으로 사용되어 왔다(1). 발효에 의한 항생제의 산업화를 위해선 무엇보다도 배지의 최적화, 분리정제기술의 간편화, 그리고 균주개량 등이 시도되어야 한다. 그중 균주의 개량은 생산단가를 낮추는데 있어 가장 중요한 요인이 되고 있다. *Streptomyces kasugaensis* ATCC 15174를 mutation하여 agar piece method를 이용하여 고생산성 변이주를 찾는 본 mutation program의 기본적인 전략은; 1) 억제환의 크기를 작게하여 모균주는 agar piece 주위에 억제환을 생성하지 못하게 하고 2) 고생산성 변이주만이 억제환을 만들게 하여 불필요한 작업을 생략하고 신속하고 간편하게 다량의 colony에서 우수한 변이주를 선별하는 것이다. 위의 전략을 만족시키는 system을 개발하기 위하여 억제환의 크기에 영향을 미치는 여러가지 인자들에 대하여 연

구를 하였다.

재료 및 방법

균 주

본 실험에 사용된 kasugamycin 생산용 균주는 *Streptomyces kasugaensis* ATCC 15174를 America Type Culture Collection에서 분양받아 사용하였으며 피검균은 *Pseudomonas fluorescens* IFO 12180을 연세대학교 공과대학 식품공학과 내의 중균협회로부터 분양받아 사용하였으며 그의 agar piece를 위한 bioassay plate에 피검균으로 선발하기 위하여 사용한 균주들은 독일의 Hoechst사에서 분양받아 사용하였다(Table 1).

배 지

1) Agar piece를 제조하기 위한 배지의 조성은 Ichikawa 등(3)이 사용한 배지를 변형하여 다음과

Key word: *Streptomyces kasugaensis*, kasugamycin, mutation program, agar piece method

*Corresponding author

Table 1. MIC values of microorganism candidates for testing organism to kasugamycin.

Testing organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IFO 12180	15.62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7712	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10701	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 88012	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 110/2	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1592E	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1771	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1771M	250
<i>Pseudomonas cepacia</i>	125
<i>Streptococcus pyrogens</i> 77	250
<i>Streptococcus faecium</i> MD 86	>1000
<i>Staphylococcus aureus</i> SG 511	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> 285	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> 503	>1000
<i>Escherichia coli</i> 055	250
<i>Escherichia coli</i> DC 0	250
<i>Escherichia colid</i> DC 2	125
<i>Escherichia coli</i> TEM	250
<i>Escherichia coli</i> 1507E	250
<i>Salmonella typhimurium</i>	125
<i>Klebsiella aerogenes</i> 1082 E	500
<i>Klebsiella aerogenes</i> 1522 E	500
<i>Enterobacter cloacae</i> 999	500
<i>Enterobacter cloacae</i> 1321 E	250

같이 사용하였다. Maltose, 5%; soybean meal, 2%; NZ-Amine, 0.75%; peptone, 0.75%; NaCl, 0.3%; K_2HPO_4 , 0.1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05%; agar, 2%; pH 7.0.

2) 생산용 균주를 보관하거나 전배양을 하기 위한 배지의 조성은 다음과 같다(Bennett's medium) (6). Yeast Extract, 0.1%; beef extract, 0.1%; NZ-Amine 0.2%; glucose, 1%; agar(*), 2%; pH 7.0(* 전배양시엔 제거)

3) 항생물질 발효배지는 다음과 같다(F.6.6) (3) Soybean oil, 6%; soybean meal, 6%; NaCl, 0.1%; K_2HPO_4 , 0.05%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05%; pH 7.0

항생물질의 농도정량

항생물질의 농도정량은 cylinder($\phi 8\text{mm}$)를 이용하여 agar diffusion 방법으로 결정하였으며, 사용된 피점균은 *P. fluorescens* IFO 12180를 사용하였으며 배지는 GPA(3) (glucose, 0.5%; peptone, 0.5%; agar, 1.5%; pH 7.0)를 사용하였다.

MIC 값의 결정

Kasugamycin에 대한 피점균(Table 1)의 MIC (minimal inhibitory concentration)값은 agar dilution method를 이용하여 결정하였으며(2) 배지는 Mueller Hinton agar(Difco)를 사용하였다. 시험 농도는 kasugamycin을 serial 2-fold dilution하여 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 까지의 구간에서 실시하였다.

돌연변이의 유발

Streptomyces kasugaensis ATCC 15714의 포자에 caffein(Sigma)을 섞어 최종농도가 5mM 되게 한 후 UV(도시바 공업주식회사, 15 W)로 30cm 거리에서 99.5%의 사멸률을 갖는 시간인 30초간 조사하여 돌연변이를 유발시켰다.

Agar piece 의 제조

Agar piece는 Ichikawa 등(3)이 개발한 방법을 따랐으나 고체배지에서와 액체배지에서의 상호 correlation을 위하여 Freysoldt 등(5)이 개발한 방법으로 수정하여 실험을 진행하였다. 즉, agar piece 내의 항생물질의 농도를 균질화시키기 위하여, 4일간 배양된 agar piece를 4°C 냉장고에 약 24시간 가량 둔 다음 assay plate에 올려놓았다.

1차 Screening

Agar piece 주위에 억제환이 나타난 colony를 한 백금이를 따서 Bennett 사면배지에 접종하고 다시 한 백금이를 따서 PDA plate에 streaking 하였다. 사면배지는 29°C에서 3일간 배양한 후 1차 배양에 사용하였으며, PDA plate에서 3일간 배양 후 나타난 colony를 무작위로 15개 선발하여 Bennett 사면배지에 접종하고 다시 3일간 배양 후 2차 발효를 위하여 4°C에 보관하였다.

1차 발효

1차 발효는 생산용 배지(F.6.6)를 10ml 넣은 시험관(21×200mm)에 균주를 접종하여 시험관용 진탕배양기(reciprocal type, 진폭 5cm, 동양과학 공업주식회사)에서 200 strokes/min의 조건하에 29°C에서 6일간 배양하였다.

2차 발효

1차 발효 후 500 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 역가를 가지는 변이주를 선발하였다(2차 screening) 2차 발효는 냉장고에 보관중인 15개의 colony를 30ml의 F6.6

배지를 넣어 살균한 300 ml 의 bottom baffled flask (Bellco) 에 접종하여 진탕배양기 (rotary type, 진폭 5 cm, 동양과학공업주식회사, Model D-7-0681) 에서 200 rpm 으로 29°C 에서 6 일간 배양하였다.

우량변이주의 보관

2 차 발효를 통해 얻은 우량변이주를 포자생성을 위해 Bennett 사면배지에 접종하여 2 주간 배양하고 멸균 증류수를 넣고 pasteur pipet 으로 긁어 포자를 회수한 후 20% glycerol 에 섞거나 냉동건조하여 Biofreezer (Forma Scientific) 에 -80°C 에서 보관하였다.

Assay 를 위한 titer 의 제조 (1)

발효액 10 ml 을 3000 rpm 으로 원심분리하여 고형물을 제거하고 상등액을 얻었다. 이 상등액에 6 N H₂SO₄ 를 소량 넣어 pH 2 로 낮추고 규조토 (Sigma) 를 5% 수준으로 첨가하고 충분히 교반한 후 filter paper (Whatman No. 1) 로 감압여과하여 투명한 여액을 얻었으며 이 여액을 다시 6 N NH₄OH 로 pH 7 로 중화시켰다. 이 용액을 bioassay 하는데 사용하였으며 필요에 따라 1/15 M phosphate buffer 로 희석하여 사용하였다.

결과 및 고찰

피검균의 선정

본 연구에 가장 부합되는 피검균을 선정하기 위하여 MIC test 를 하였다 (Table 1). 25 개의 피검균

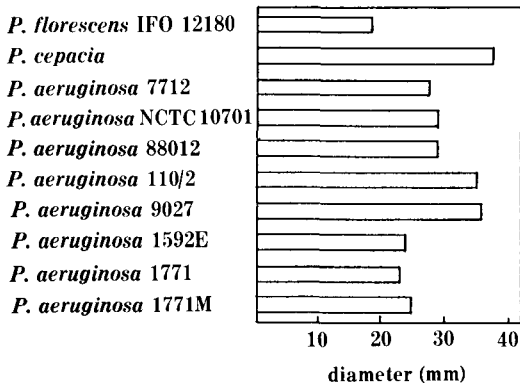


Fig. 1. Comparison of diameters of bacterial inhibition at the same concentration of kasugamycin (70µg of 1mg/ml) against *Pseudomonas* sp. (inoculum size, A₅₅₀=0.27).

후보 중에서 *Pseudomonas* sp. 들은 Table 1 에 나타났듯이, kasugamycin 에 비교적 민감하였고, 이들의 성장 최적온도가 *S. kasugaensis* 의 그것과 비슷하였으므로 (2) 1 차 선발하였다. 그리고 *Pseudomonas* sp. 들을 피검균으로 하여 cylinder 를 이용하여 agar diffusion assay 를 하였다. 이때 *Pseudomonas fluorescens* IFO 12180 을 피검균으로 하는 assay plate 에서 억제환의 크기가 가장 작았으므로 (Fig. 1), 이 균을 agar piece 용 assay plate 에 사용할 피검균으로 선정하였다.

pH 의 효과

Fig. 2 에 나타났듯이 배지의 pH 가 7.0 일 때 억제환의 크기가 가장 작게 나왔으므로 pH 7.0 을 적절한 수소이온 농도로 고정하여 사용하였다. 이 pH 는 고체배지에서 피검균이 가장 잘 자라는 수소이온 농도로 생각된다. 왜냐하면 억제환의 크기는 피검균의 lag time 이 짧을수록, 생장속도가 빠를수록 작아지기 때문인데, 이것들은 균생육을 최적화 하면 유도 가 가능하기 때문이다 (7, 8).

피검균의 전배양시 교반의 효과

P. fluorescens 를 피검균으로 사용하기 위하여 전

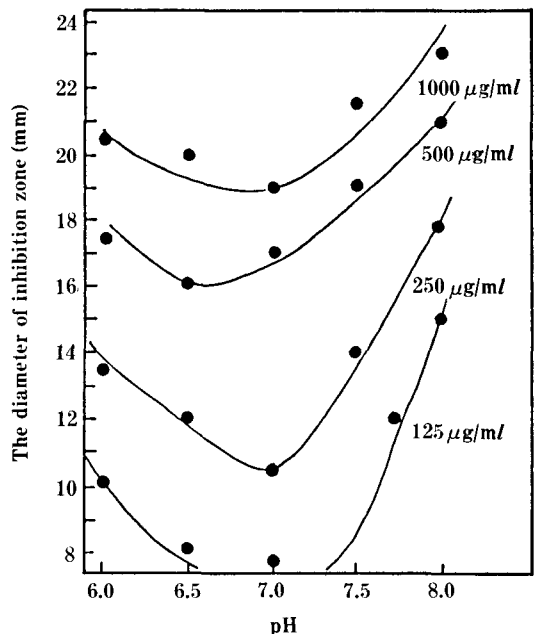


Fig. 2. Effect of pH on the inhibiting activities of kasugamycin against *P. fluorescens* IFO 12180 (inoculum size, A₅₅₀=0.25).

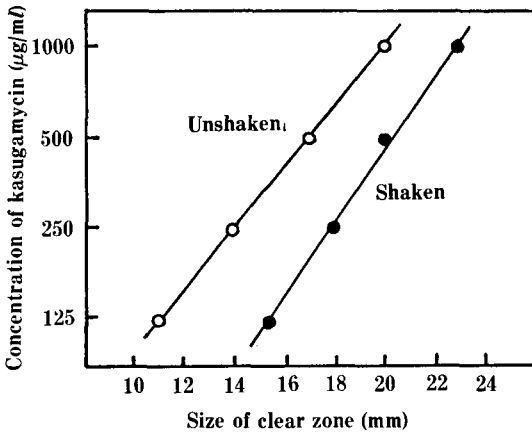


Fig. 3. Comparison of standard curve according to testing organism's preculture condition of inoculum (inoculum size, $A_{550}=0.25$).

배양을 할 때 진탕배양을 하게 되면 이 균은 정치배양한 균보다 kasugamycin에 민감하였다(Fig. 3). 그러므로 본 실험에서는 실험의 목적상 피검균은 정치배양하여 사용하였다.

피검균의 성장상태, 즉 log phase에 있는 균과 stationary phase에 있는 균이 동일한 양의 같은 항생제에 대하여 서로 다른 민감도를 가질 수 있다(9, 10). 즉 피검균을 진탕배양하면 통기효과와 물질전달이 우수해지므로 피검균의 성장속도가 빨라져서 24시간 배양한 이 피검균은 log phase의 말기 또는 stationary phase에 있었고 정치배양한 균은 log phase에 있었다. Fig. 3과 같이 진탕배양한 피검균이 kasugamycin에 대하여 더 민감한 것은 이런 이유 때문이라고 생각된다.

Agar의 농도

Agar 농도의 증대로 항생물질의 확산속도를 감소시켜 억제환의 크기를 감소시킬 수 있었다. 그러나 3% 이상의 agar 농도일 때, overlay하면 상온에서 쉽게 굳어버렸으므로 조작하기 쉬운 2%의 agar 농도를 선정하였다.

피검균의 Inoculum size

피검균의 농도가 낮으면 ($A_{550}=0.3$), kasugamycin이 만드는 억제환이 서로 겹쳐서 생산성 높은 균주를 선택하기 어려웠다(Fig. 4-c). 피검균의 농도를 높은 결과($A_{550}=0.35$), 억제환이 작게 나타나 유망한 변이주 colony를 식별하기 쉬웠다(Fig. 4-d). 모균주는 두 경우 모두 억제환이 나타나지 않았다(Fig. 4-a, b). 일반적으로 bioassay 용으로 권장하는

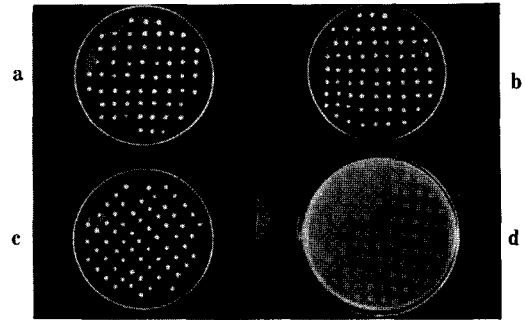


Fig. 4. Clear zones on bioassay plates at different inoculum size of testing organism. (a and c, $A_{550}=0.3$; b and d, $A_{550}=0.35$: a and b, wild type of colony; c and d, mutant of colony)

피검균의 inoculum size는 저농도 항생제의 농도를 정량하는데 사용된다. Inoculum size가 커지게 되면 lag time이 줄어들므로 억제환의 크기가 작아지게 된다(8). Inoculum size는 본 실험에서 억제환을 줄이는데 가장 중요한 역할을 하였으며, 우량변이주를 선발할 때의 inoculum size는 bioassay할 때에 비하여 약 3배의 균농도가 사용되었다. 한편 이 조건에서는 agar piece를 2배 가량 더 처리할 수 있는 이 점이 있었다(Fig. 4-c, d).

선발된 우량변이주

상기와 같은 방법으로 mutation program을 진행시켜 33,240개의 agar piece 중 Fig. 4-d와 같이 억제환을 만드는 변이주 444개를 선발하고 test tube를 이용한 1차 발효를 통하여 21개의 변이주를 얻었다. 2차 발효는 300ml 용량의 bottom baffled flask에 30ml의 생산용 배지를 넣어 실시하였는데, 그 결과 모균주에 비하여 5-7배의 역가를 지닌 우량 변이주를 얻었다.

결론

- 1) MIC test와 cylinder를 이용한 agar diffusion assay 방법으로 *Pseudomonas fluorescens* IFO 12180을 피검균으로 선정하였으며 이 균을 inoculum으로 사용하기 위해서는 29°C에서 정치배양 하였다.
- 2) 피검균의 inoculum size는 $A_{550}=0.35$ 이었다.
- 3) 효과적인 assay용 배지의 조성은 glucose, 0.5%; peptone, 0.5%; agar, 2.0%; pH 7.0 이었다 (원래의 GPA 배지에서의 agar의 농도는 1.5%이었다).
- 4) 모균주(*S. kasugaensis* ATCC 15714)에 비하여

5-7 배의 역가를 지닌 4 개의 mutant 를 얻었다.

사 사

본 연구를 수행하는데 있어 많은 도움을 주신 한국화학연구소 생물공학연구실의 권용국씨께 감사드립니다.

참고문헌

1. Umezawa, H.: *U.S. Patent* 3,358,001 (1967).
2. Levitan, A.A.: *Applied Microbiology* **15**(4), 750-753 (1967).
3. Ichkawa, T., M. Date, T. Ishikura and A. Ozaki: *Folia Microbiologica* **16**, 284-224 (1971).
4. Ditchburn, P., B. Giddings and K.D. Macdonald: *J. Appl. Bacteriol.* **37**, 515-523 (1974).
5. Freysoldt, C., I. Groth, E. J. Borman, P. Muhlig and C. Kuhne: *J. Microbiological Method* **5**, 167-175 (1986).
6. Nakao, H.F.: *Manual of Microbiological Experiment* ed. Kyowa Hakko Kogyo Tokyo Research Laboratory: Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. p. 78 (1986).
7. Acar, J.F. and F.W. Goldstein: *Antibiotics in Laboratory Medicine* 2nd ed. ed. Victor Lorian: Williams and Williams and Wilkins 27-63 (1985).
8. Barry, A.L.: *Antibiotic in Laboratory Medicine* 2nd ed. ed. Victor Lorian: Williams and Wilkins 1-26 (1985).
9. Thrupp, L.D.: *Antibiotic in Laboratory Medicine* 2nd ed. ed. Victor Lorian: Williams and Wilkins 93-150 (1985).
10. Barry, A.L., C. Thormsberry, R.N. Jones, P.C. Fuchs, T.L. Gavan and E.H. Gerlach: *Proc. R. Soc. Med.* **70**(suppl. 9), 3-71 (1977).

(Received February 15, 1989)