

Tobramycin 고생산성 변이주의 분리

나규흠 · 김학주 · 김계원* · 김기태 · 이정환 · 양중익
동아제약(주) 연구소

Selection of High Tobramycin-Producing Mutants

Na, Kyu-Heum, Hack-Joo Kim, Gye-Won Kim*, Ki-Tae Kim,
Jeong-Hwan Lee and Junn-Ick Yang

Research Laboratories of Dong-A Pharm. Co., Ltd., 47-5, Sanggal-ri,
Kiheung-up, Yongin-gun 449-900, Korea

Abstract — An improved method for the selection of high tobramycin-producing mutants of *Streptomyces tenebrarius* ATCC 17920 was investigated. By the use of apramycin-containing media, low nebramycin-producing mutants were eliminated. Strain No. 23, resistant to apramycin and kanamycin B and sensitive to tobramycin, was isolated from soils, identified as *Pseudomonas paucimobilis* and used as a test organism for overlaying the mutants on agar plate. While inhibition zones were not shown when the parent strains were overlaid with soft agar containing the strain No. 23, clear zones were shown when high tobramycin-producing mutants were overlaid. Using this screening strategy, 58 mutants showing clear zones had been isolated, antibiotic activities of which were increased to 3-8 fold compared to that of parent strain.

미생물의 2차 대사산물인 항생제는 그 시장규모가 매년 증가하는 추세에 있으며 국내 시판 항생제는 원료 및 완제품을 거의 수입에 의존하고 있는 형편에 있다. Aminoglycoside계 항생물질인 tobramycin은 1967년 Eli-Lilly사에서 개발된 이래 내성 대장균, 녹농균 및 변형균 등 그람 음성 간균에 대해 1차 선택약으로 널리 사용되어 왔으며 aminoglycoside계 항생제 중 독성이 경미한 항생제로 알려져 왔다(1). Tobramycin은 *Streptomyces tenebrarius*가 생산하는 nebramycin이라는 복합물질로부터 분리 정제하여 사용되는데 이 nebramycin은 각각의 항생역가를 가지는 8가지 이상의 factor들로 구성되어 있고(2-4) 그중 nebramycin factor 2(apramycin), factor 4(6"-O-carbamoyl kanamycin B), factor 5'(6"-O-carbamoyl tobramycin)이 주 생산물로서 factor 4와 5'은 알칼리 처리에 의해 각각 kanamycin B와 tobramycin으로

쉽게 변환된다(5-8).

일반적으로 aminoglycoside 계열의 항생물질을 생산하는 방선균은 자기가 생산하는 항생물질에 내성을 나타내며, 다른 aminoglycoside 계열의 항생물질에 대해서도 특징적인 내성 형태를 보인다(9-12). 또한 내성범위가 다양하고 내성이 강할수록 항생물질 생산능이 높을 것으로 기대된다(13-15).

본 연구는 이러한 성질에 기초하여 nebramycin 복합체 중 tobramycin 생산성이 증가된 변이주를 한 천평판 배지상에서 선별할 수 있는 피검균의 분리 및 동정, 고농도의 항생물질에 대한 내성과 항생물질 생산능과의 관계를 조사하여 다수의 변이주들 중 tobramycin 생산성이 향상된 균주를 손쉽게 빠르게 선별하기 위한 screening 방법을 개발하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용 균주

Key words: *Streptomyces tenebrarius*, tobramycin, screening strategy

*Corresponding author

본 실험에서는 tobramycin 생산용 균주로 *Streptomyces tenebrarius* ATCC 17920을, 항생물질 농도를 측정하기 위한 피검균으로는 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P을 사용하였다.

사용 배지

S. tenebrarius ATCC 17920의 액체와 고체배양에는 Modified Bennett's medium(Dextrose 1.0%, Yeast extract 0.1%, Casein hydrolysate 0.2%, beef extract 0.1%, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, agar 2.0%) (8)을 사용하였다.

피검균인 *S. aureus* ATCC 6538 P와 토양 미생물의 배양에는 Nutrient 배지를 사용하였다.

Apramycin 내성 미생물의 분리 및 동정

Nebramycin 생산성이 향상된 변이주만을 한천 배지상에서 쉽게 선별할 수 있는 피검균을 분리할 목적으로 여러 종류의 토양을 채취하여 생리 식염액에 현탁하여 그 상등액 1 ml을 500 µg/ml의 apramycin이 포함된 영양한천 배지에 도말하고 37°C에서 3일간 배양 후 생육이 양호한 세균을 선별하였다. 분리 균주는 API kit를 사용하여 동정하였다.

항균활성 및 MIC 측정

항균활성 측정은 피검균으로 *S. aureus* ATCC 6538 P를 사용하여 cylinder cup agar diffusion법(16)에 따라 행하였고, 토양 미생물들의 MIC치는 agar dilution법(17)을 사용하였다.

돌연변이의 유발(18)

자외선 조사 : *S. tenebrarius* 포자 현탁액 5 ml을 9 cm의 petridish에 넣고 10 W 자외선등으로부터 30 cm의 거리에서 1분간 조사하여 돌연변이를 유발시켰다.

N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine(NTG) 처리 : 포자를 0.05 M Tris 완충액(pH 8.5)으로 1회 세척하고 현탁시킨 후 NTG를 최종 농도 3 mg/ml 되게 첨가하고 완전히 섞어주었다. 37°C에서 1~2시간 진탕반응한 후 원심분리하여 상등액을 버리고 멸균증류수에 포자를 현탁하여 사용하였다.

고농도 apramycin이 포함된 배지에서의 생육변화

변이처리한 포자현탁액을 각각 0, 100, 300 mg/ml (최종농도)의 apramycin이 포함된 modified benett's medium에 각각 초기농도 3×10^6 cells/ml되게 접종하고 37°C 진탕 배양기에서 5일간 배양하면서 생균수를 측정하였다.

생육저지환의 측정

각 농도의 apramycin 함유 배지에서 생육하고 있는 배양액을 멸균 생리식염수로 수차례 세척하여 apramycin을 완전히 제거하고, 한천 평판배지에 20~30주 정도되게 도말하여 37°C에서 3일간 배양하였다. 한천 평판 표면을 *S. aureus* ATCC 6538 P를 포함하는 soft agar(nutrient broth(Difco) 0.8% + agar 0.6%)로 약 0.1 cm 두께로 살짝 덮은 후 37°C에서 16시간 배양한 후 colony 주위에 나타나는 생육저지환의 직경을 측정하였다.

Tobramycin의 정량

발효액중의 tobramycin은 Dionex의 HPLC system을 이용하여 분석하였다. Column으로 HPIC-AS 6 column을 사용하였고 water : 150 mM NaOH(1 : 9)를 용매로 1.0 ml/min의 속도로 용출하면서 PAD (Gold) detector로 검출하였다.

결과 및 고찰

Apramycin 내성 미생물의 분리 및 동정

Tobramycin 고생산성 변이주의 screening system에 적합한 피검균을 분리할 목적으로 토양으로부터 500 µg/ml의 apramycin이 포함된 nutrient 한천평판 배지에서 생육이 양호한 세균 7주를 분리하고 각각의 균주에 대하여 생육속도와 apramycin, kanamycin B 및 tobramycin에 대한 MIC를 측정하였다(Table 1). 그 결과 생육속도가 가장 빠르고 apramycin과 kanamycin B에 강한 내성을 나타내며 또한 tobramycin에도 내성을 보이는 strain No. 23을 본 screening system의 피검균으로 선정하였고, API 20 NE kit를 사용하여 strain No. 23을 동정한 결과 *Pseudomonas paucimobilis*로 확인되었다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 strain No. 23을 함유하는 soft agar 배지로 overlay 하였을 경우 *S. tenebrarius* 모균주는 저지환을 나타내지 못했고 tobramycin 생

Table 1. Growth rates and MIC values of soil microorganisms resistant to apramycin

test organisms	growth*	MIC (mg/ml)			source
		Apramycin	Kanamycin B	Tobramycin	
Strain No. 11	+	1.25	0.313	0.156	Our laboratory
No. 15	++	2.5	0.078	1.25	↗
No. 23**	+++	1.25	0.156	0.078	↗
No. 25	+	2.5	0.039	0.313	↗
No. 35	+	2.5	0.156	0.156	↗
No. 36	+	2.5	0.313	0.156	↗
No. 54	+	2.5	0.625	0.313	↗
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P***	+++	0.006	0.003	0.003	ATCC

*+, growth poor; ++, growth moderate; +++, growth abundant

**strain No.23 was identified as *Pseudomonas paucimobilis* using API 20 NE kit

***test organism for antibiotic activity determination

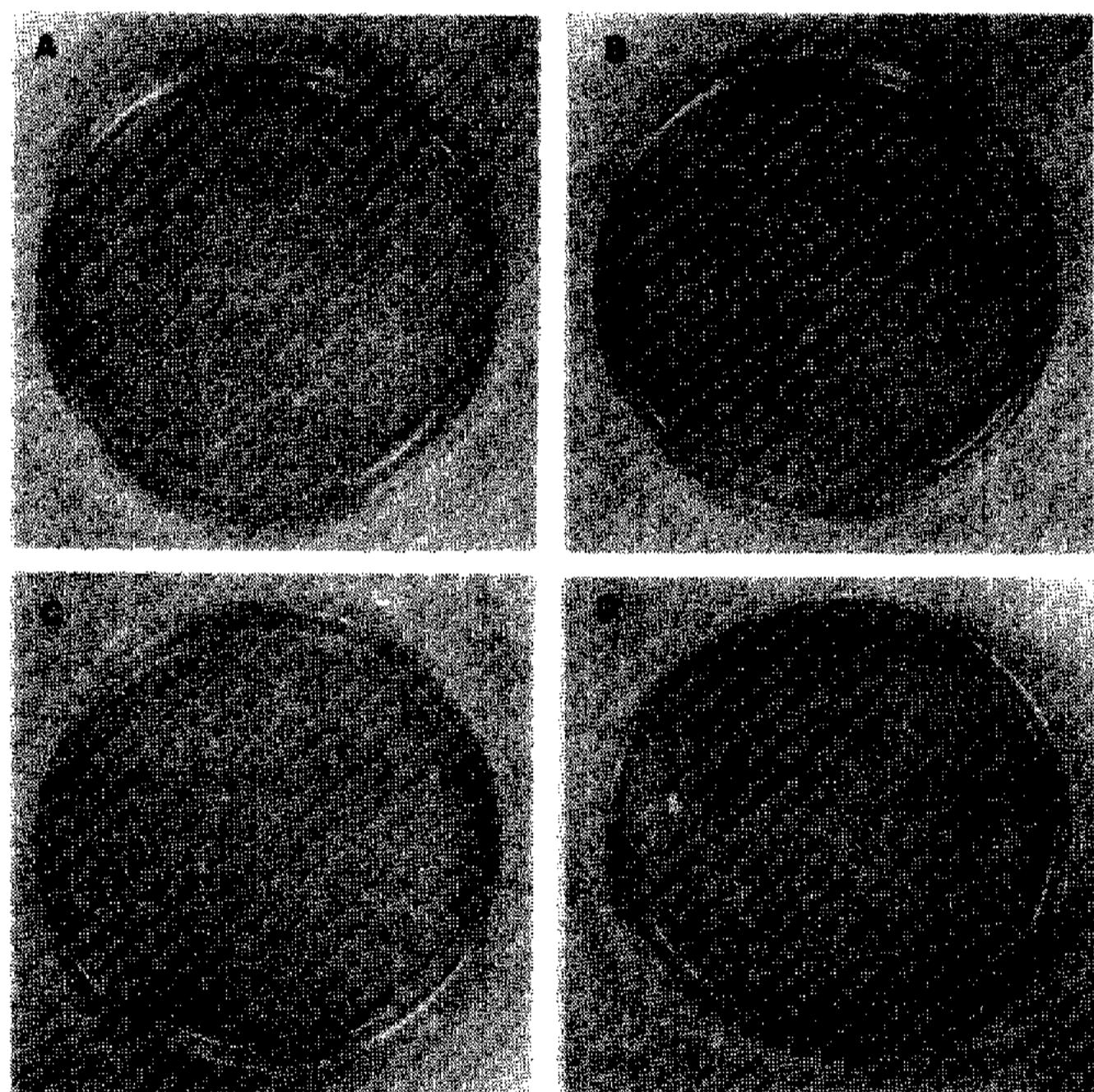


Fig. 1. Inhibition zones of parent strain and mutant strain on bioassay using strain No. 23 (*Ps. paucimobilis*) and *S. aureus* as test organisms.

A: parent strain overlaid with strain No. 23 (*Ps. paucimobilis*)

B: parent strain overlaid with *S. aureus*

C: mutant strain overlaid with strain No. 23 (*Ps. paucimobilis*)

D: mutant strain overlaid with *S. aureus*

산성이 증대된 변이주의 경우에만 저지환을 형성하였다. 그러므로 strain No. 23을 이용하여 다수의 변이주 중 생산성이 향상된 변이주를 쉽게 선별할 수 있었다.

Nebramycin 고생산성 변이주의 선별에 apramycin의 영향

자외선 조사나 NTG 처리하여 얻은 수 많은 변이주들 중 일차적으로 nebramycin 생산성이 향상된 변이주를 선택적으로 분리하기 위하여 nebramycin complex중 주성분인 apramycin을 고농도로 첨가한 배지를 사용하였다. Aminoglycoside 계통의 항생물질은 자기가 생산하는 항생물질에 내성이 강하며 내성이 강할수록 항생물질 생산성이 높을 것으로 기대된다(9-15).

Fig. 2에서 보는 바와 같이 apramycin을 첨가하지 않은 배지에서는 일반적인 성장곡선을 나타내었으나, 100 mg/ml의 apramycin을 첨가한 배지에서는 24시간 배양후 생균수가 1/30로 감소하였고 300 mg/ml의 apramycin을 첨가한 배지의 경우에는 48시간 경과후 생균수가 1/10³로 감소하다가 그 이후에는 점차 증가하였다. 이는 고농도의 apramycin에 견디지 못하는 변이주들이 사멸하여 생균수가 계속 감소하다가 어느 시점에 그 농도에 견디어 살아남은 변이주들이 번식하여 생균수가 점차 증가한 것으로 생각된다. 그리고 그림에는 나와 있지않지만 300 mg/ml 이상의 항생물질 농도에서는 어느정도 시간이 경과후 균이 모두 사멸하였다.

위의 각 배지에서 생균수가 가장 적을때의 균액을 취해 생리 식염수로 수회 세척하여 한천 평판배지에 20~30주 정도되게 도달하여 3일간 배양한 후 *S. aureus* ATCC 6538 P를 포함하는 soft agar로 overlay

하여 각 돌연변이주들의 저지환을 측정하여 분포도를 조사하였다. Fig. 3에서와 같이 apramycin을 첨가하지 않은 경우 직경 5 mm 이상의 저지환을 보이는 변이주가 전체(500 여주)의 20% 이하로 분포했으나 300 mg/ml의 apramycin 배지에서 살아남은 변이주들은 50% 이상이 직경 5 mm 이상의 저지환을 나타내었다.

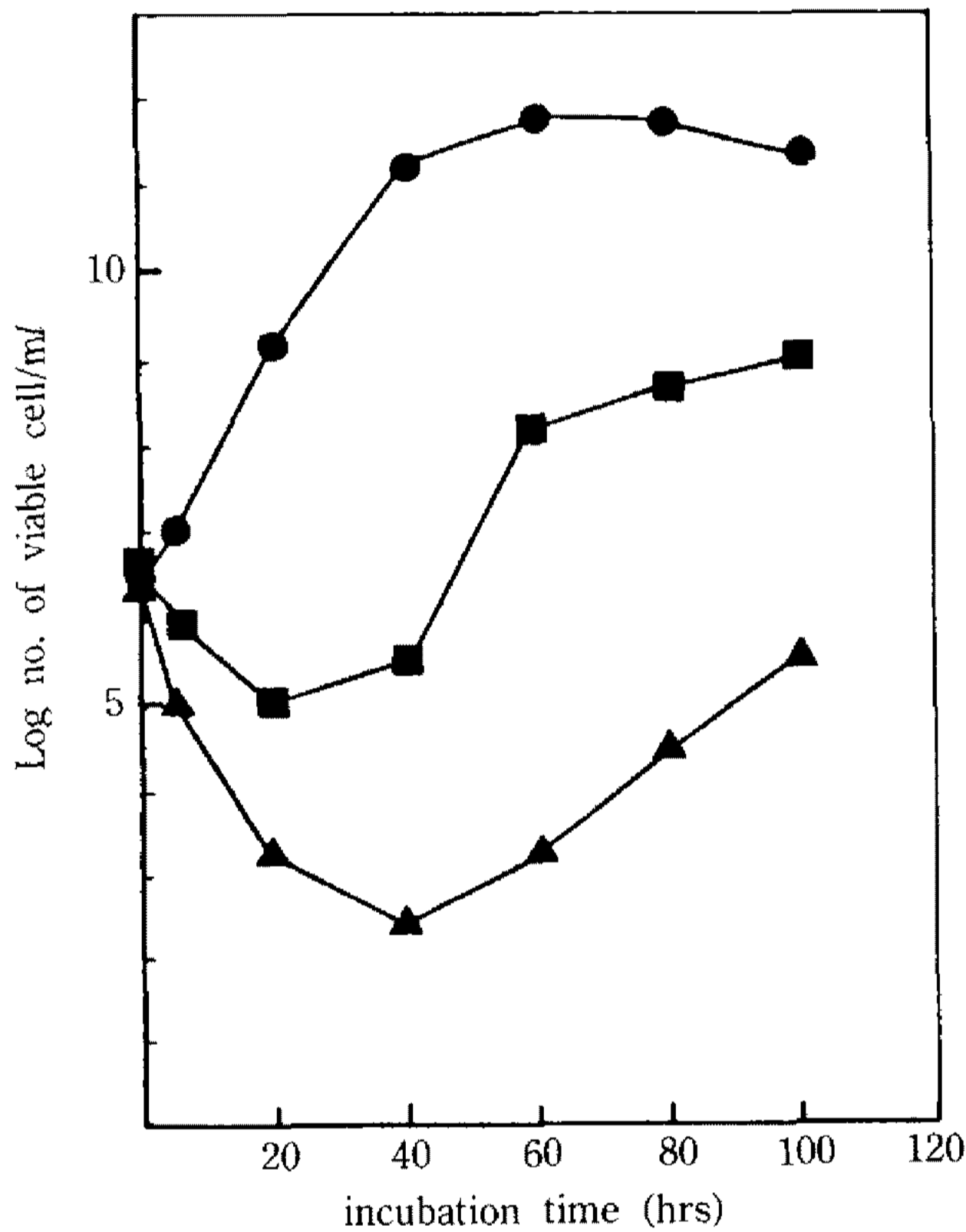


Fig. 2. Effect of apramycin on the growth of *Streptomyces tenebrarius* mutants.

- : Apramycin free medium
- : 100 mg/ml apramycin containing medium
- ▲—▲: 300 mg/ml apramycin containing medium

그러므로 고농도 apramycin 배지를 사용함으로써 nebramycin 생산성이 낮은 변이주들을 1차적으로 제거할 수 있었다.

Tobramycin 고생산성 변이주의 선발

Nebramycin 생산성이 낮은 변이주를 일차적으로 제거한 후 그 중 tobramycin 생산성이 증가된 변이주를 선별하기 위해 strain No.23을 포함하는 soft

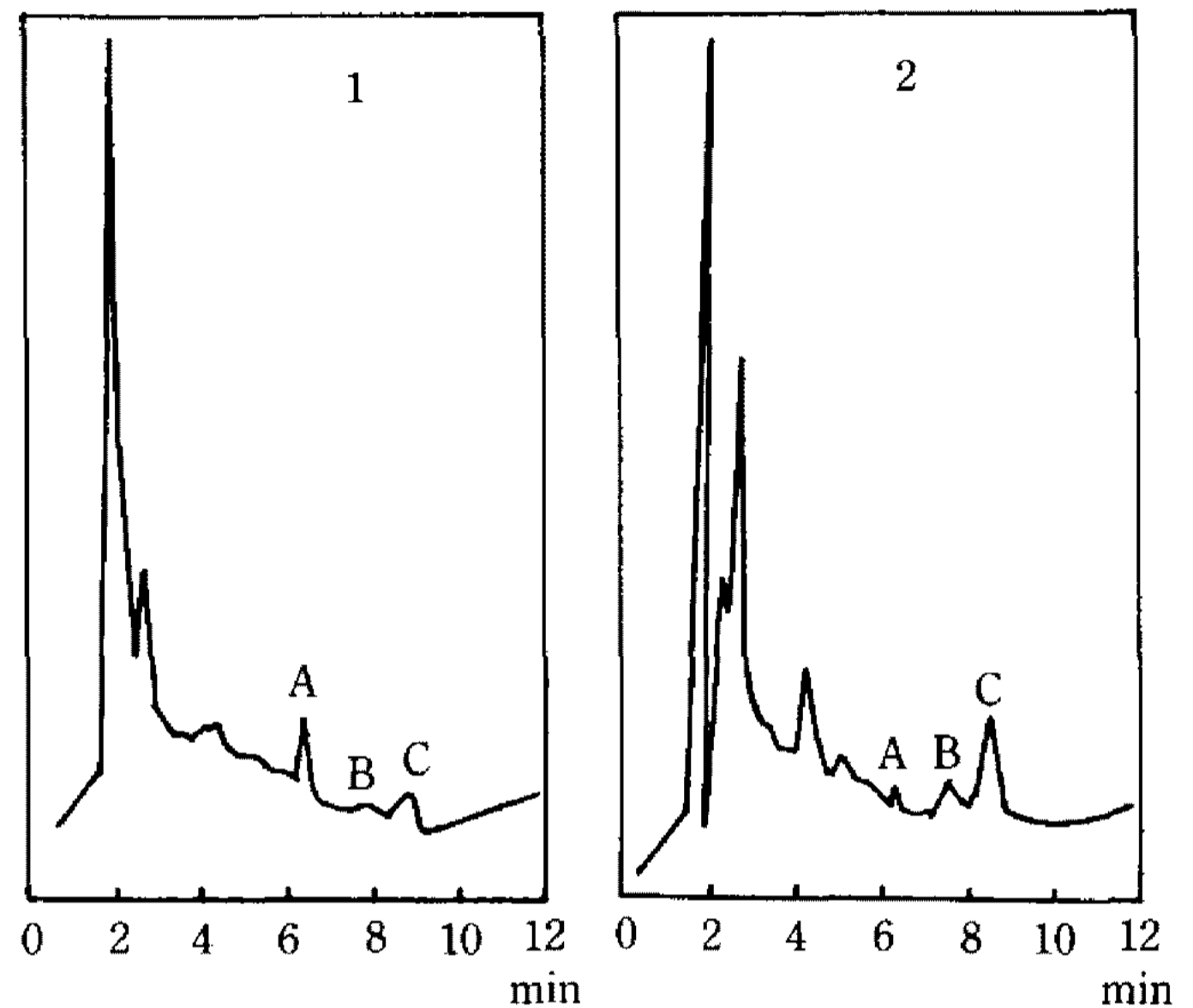


Fig. 4. HPLC of fermentation broths. Chromatogram 1 was obtained from broth of *Streptomyces tenebrarius* ATCC 17920. Chromatogram 2 was obtained from broth of its mutant.

Conditions; HPIC-AS 6 column, PAD detector, flow-rate 1.0 ml/min, eluent water/150 mM NaOH (1:9). Peak A, factor 2 (apramycin); peak B, factor 4 (carbamoyl kanamycin B); peak C, factor 5' (carbamoyl tobramycin).

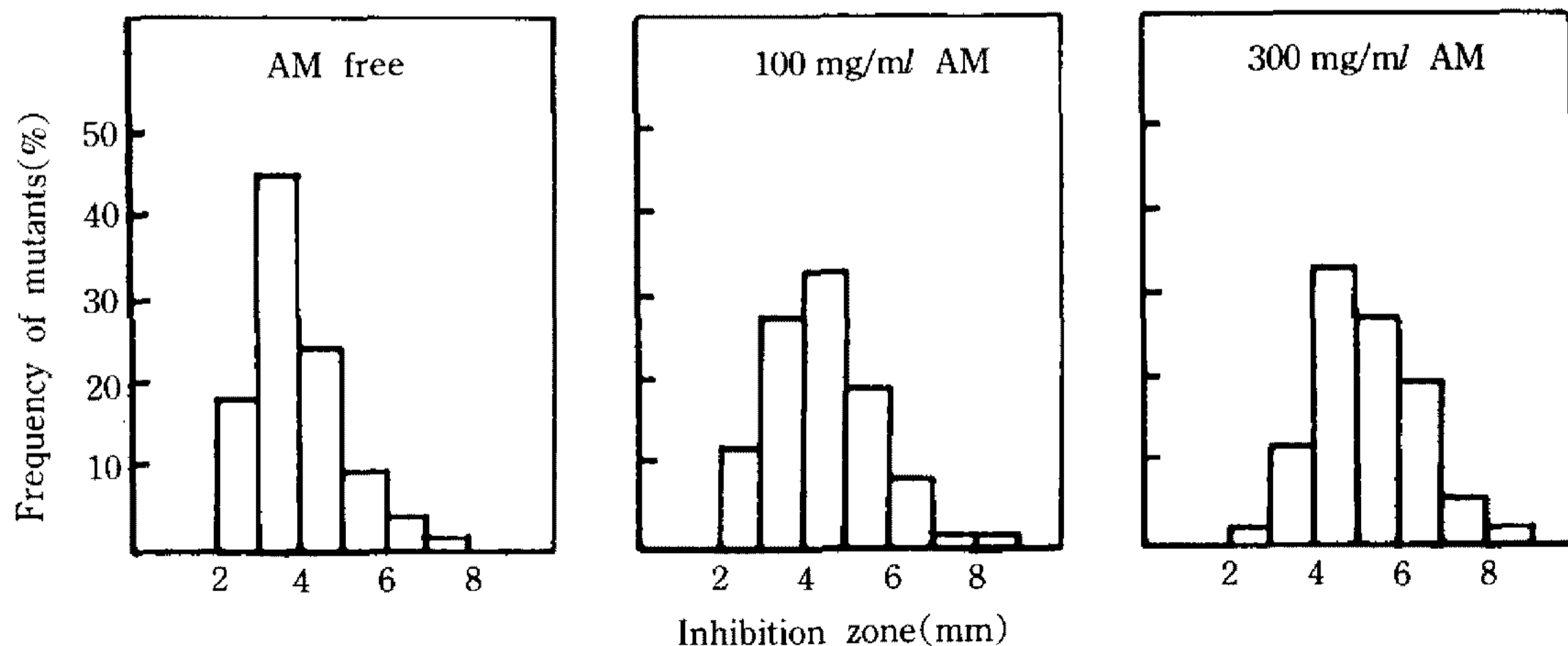


Fig. 3. Activity distribution depending on the concentration of apramycin.

Mutants of *Streptomyces tenebrarius* were overlaid with strain No.23 (*Ps. paucimobilis*).

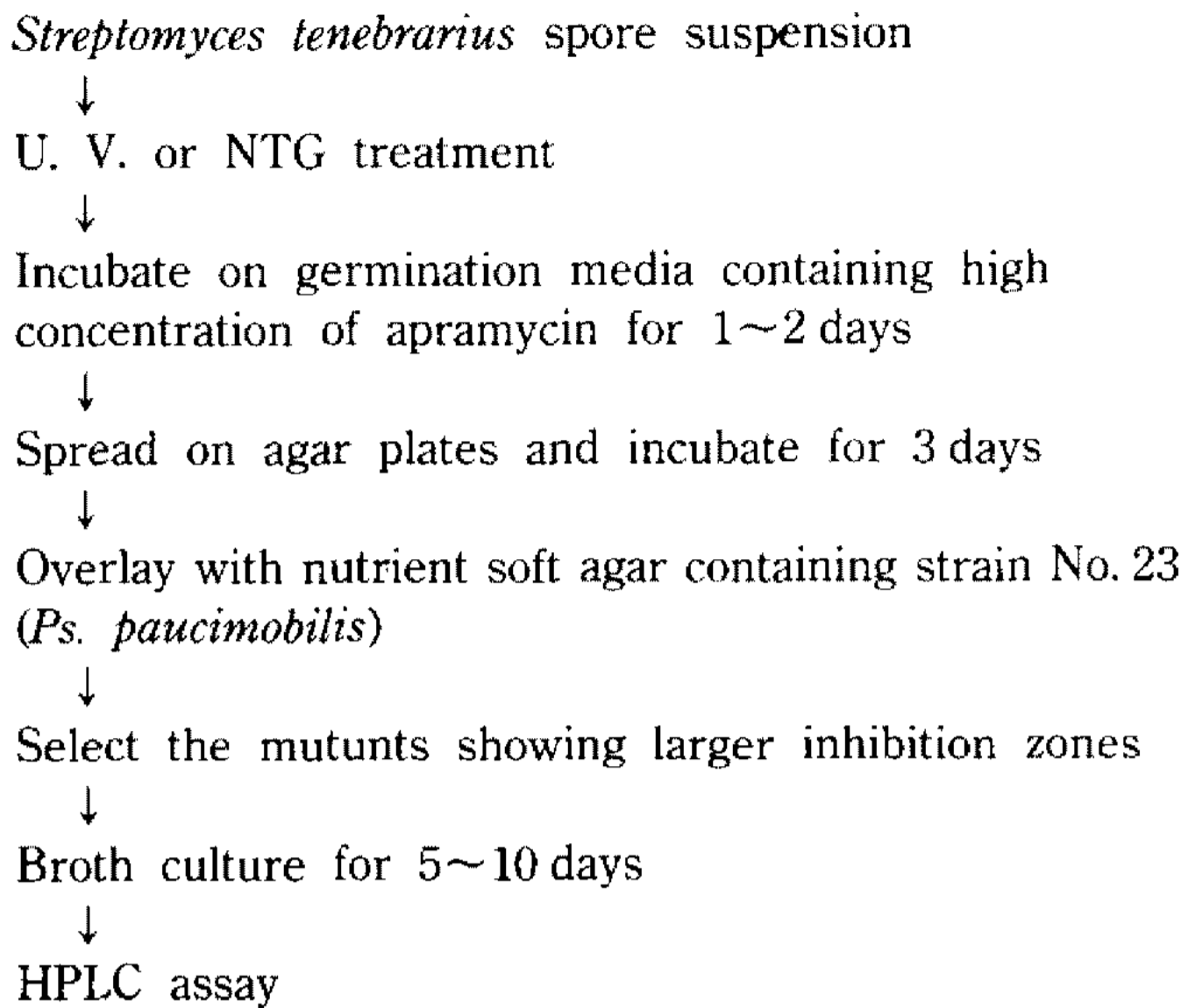


Fig. 5. Screening strategy for selecting the high tobramycin-producing mutants.

agar로 overlay한 결과 colony 주위에 저지환이 명확히 나타나는 변이주 58주를 분리하였고, 이 각각의 균주를 액체배양하여 얻은 상등액을 HPLC로 분석한 결과 모균주에 비해 3~8배 tobramycin 생산성이 향상되었음을 확인하였다. Fig. 4는 모균주와 생산성이 향상된 변이주인 SM2-C2의 배양상등액을 HPLC로 분석한 한 예를 나타낸 것으로 모균주에 비해 변이주의 tobramycin 생산성이 약 3배 정도 증가했음을 알 수 있다.

이상의 결과를 요약하여 Fig. 5와 같이 tobramycin 고생산성 변이주를 쉽고 빠르게 선별할 수 있는 screening 전략을 수립하였으며, 이 방법은 tobramycin뿐 아니라 다른 aminoglycoside계 항생물질 생산 균주의 screening시에도 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

Tobramycin 고생산성 변이주를 쉽고 신속하게 선별할 수 있는 screening 방법을 개발하였다. 고농도의 apramycin이 포함된 배지를 사용함으로써 nebramycin 생산성이 낮은 변이주들을 1차적으로 제거할 수 있었다. 모균주인 *S. tenebrarius* ATCC 17920에는 저지환을 나타내지 못하고 생산성이 향상된 변이주의

경우에만 저지환을 형성하는 strain No. 23을 토양으로부터 분리하여 *Ps. paucimobilis*로 동정하였고 1차 선별된 변이주들 중 tobramycin 생산성이 높은 균주들을 선별하기 위한 피검균으로 사용하였다.

이러한 screening 전략으로 strain No. 23에 명확히 저지환을 나타내는 변이주 58주를 얻었고, HPLC를 이용하여 각 변이주의 tobramycin 생산성을 비교 측정된 결과 모균주에 비해 3~8배 생산성이 향상되었음을 확인하였다.

참고문헌

1. Harold C.N.: *J. Infect. Dis.*, **134**, supplement, 3 (1976)
2. Stark, W.M., M.M. Hoehn and N.G. Knox: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1967**, 314 (1968)
3. Higgens, C.E. and R.E. Kastner: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1967**, 324 (1968)
4. GB 2, 114, 978 A (1983)
5. Stark, W.M., N.G. Knox and R.M. Wilgus: *Folia Microbiologica*, **16**, 205 (1971)
6. Thompson, R.G. and E.A. Presti: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1967**, 332 (1968)
7. Koch, K.F., F.A. Davis and J.A. Rhoades: *J. Antibiotics*, **26**, 745 (1973)
8. USP 3, 691, 279 (1972)
9. Vining, L. C.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **25**, 147 (1979)
10. Yamamoto, H., K. Hotta, Y. Okami and H. Umezawa: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **100**, 1396 (1981)
11. Hotta, K., H. Yamamoto, Y. Okami and H. Umezawa: *J. Antibiotics*, **34**, 1175 (1981)
12. Yamamoto, H., K. Hotta, Y. Okami and H. Umezawa: *J. Antibiotics*, **35**, 1020 (1982)
13. Hotta, K., A. Takohashi, Y. Okami and H. Umezawa: *J. Antibiotics*, **36**, 1789 (1983)
14. Hotta, K., A. Takahashi, N. Saito, Y. Okami and H. Umezawa: *J. Antibiotics*, **36**, 1748 (1983)
15. Lee, S.H., B.W. Ahn and C.S. Shin: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 271 (1986)
16. Kavanagh, F.: *Analytical Microbiology* Vol. II, Academic Press, New York (1972)
17. Hash, J.H.: *Methods in Enzymology* Vol. 43, Academic press, New York (1975)
18. Hopwood, D.A.: *Genetic Manipulation of Streptomyces*, The John Innes Foundation (1985)

(Received July 18, 1991)