Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 19, No. 5, 491-496 (1991)

E. coli ATCC 21990 변이주의 유가배양법에 의한 Aminoglycoside-3′-Phosphotransferase 생산

김기태 · 김학주 · 김계원* · 이정환 · 나규흠 · 양중익 · 김수일[1]
동아제약(주) 연구소, [1]서울대학교 농화학과

Production of Aminoglycoside-3′-Phosphotransferase by the Fed-Batch Cultivation of Mutant Obtained from *E. coli* ATCC 21990

Kim, Ki-Tae, Hack-Joo Kim, Gye-Won Kim*, Jeong-Hwan Lee, Kyu-Heum Na, Junn-Ick Yang and Su-Il Kim[1]
Research Laboratories of Dong-A Pharm. Co., Ltd., 47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up 449-900, Korea
[1]Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract — To maximize the production of aminoglycoside-3′-phosphotransferase of *E. coli* ATCC 21990 carrying R factor which encodes aminoglycoside-3′-phosphotransferase (APH(3′)) phosphorylating the 3′-hydroxyl group of aminoglycoside, mutants M1 and M2, media composition and several factors affecting the enzyme production during fermentation were studied. Although the specific activity of APH(3′) produced by a mutant M1 was increased as much as four times than that of *E. coli* ATCC 21990, the growth rate was decreased. The increase of the enzyme production was obtained by increased biomass during fermentation. A mutant M2 was obtained to increase the cell growth rate. Mutant M2 cells were cultivated with optimal media and pure oxygen gas in a fed-batch mode of fermentor operation. The specific activity of APH(3′) was decreased, but total enzyme activity of APH(3′) was increased as much as two point five times than that of mutant M1.

Aminoglycoside계 항생제들은 그람음성균들의 감염에 널리쓰이는 항생제로서 사용되어 왔지만 이러한 aminoglycoside 항생제들을 변형시켜 항생제로서의 역가를 저해하는 내성균주들이 많이 나타나게 되었으며 이들 내성균주들은 세포내에서 항생제를 변형시키기 위한 효소를 합성하는 R-plasmid를 함유하고 있느 것으로 알려졌다. 이러한 내성균주들이 합성하는 효소들은 아미노기를 아실화시키고 수산기를 아데닐화 또는 인산화하는 종류들도 나눌 수 있으며(1-3) Umezawa(1967) 등에 의하면 kanamycin 구조의 일부분인 글루코오스의 C-3′-수산기가 R-factor를 갖는 *E. coli*에 의해 인산화되어 비활성화된다고 보고하였다(4-6). 본 연구에서는 aminoglycoside-3′-phosphotransferase를 생산하는 R-plasmid를 갖는 *E. coli* ATCC 21990을 사용하여 ATP와 Mg^{2+}의 존재하에서 kanamycin B(KMB)의 3′-수산기를 인산화시킨 후 이를 주원료로하여 APH(3′)으로 인한 내성을 갖는 균주들에 대하여생육저해작용이 있는 신규 aminoglycoside 항생제(7)를 제조하기 위해 *E. coli* ATCC 21990의 변이주를 선별하여 효소의 고생산을 위한 산업적 이용성이 있는 균주로서 사용하였다. 또한 효소를 효율적으로 생산하기 위해 배지(8, 9)와 배양조건(10-12)을 최적화하여 균체생산성을 증가시킬 수 있도록 유가배양법(13, 14)을 시행하였다.

Key words: Aminoglycoside-3′-phosphotransferase, *E. coli*
*Corresponding author

재료 및 방법

균주

APH(3′) 생산규주로 *E. coli* ATCC 21990을 분양받아 APH(3′) 고생산성 변이주를 다음과 같이 선발하였다. 영양 배양배지(Difco)를 사용하여 37℃에서 10시간 배양한 *E. coli* ATCC 21990의 현탁액 5 m*l*을 100 W 자외선 등으로부터 30 cm 거리에서 1분간 자외선 조사하여 KMB 1 mg/m*l*을 함유하는 영양 한천배지 평판에 접종하고 37℃에서 하룻밤 배양한 후 내성을 나타내는 변이주들을 선별하였고 각각을 영양 배양배지에 배양하여 5 m*l*의 배양액에 0.1 mg/m*l*의 N-methyl-N'-mitro-nitrosoguanidine(NTG)을 첨가하여 37℃에서 1시간 배양 후 생리식염수로 여러 번 세척하여 NTG를 완전히 제거한 후 KMB 5 mg/m*l*를 함유하는 영양 한천배지 평판에 접종하여 37℃에서 하룻밤 배양하여 내성을 보이는 변이주들을 선별하였고 영양 배양배지에 계대배양한 후 0.5 mg/m*l*의 NTG 처리와 kanamycin B 10 mg/m*l*을 함유하는 한천배지 평판에 접종하여 내성균주를 선별하였으며 실험과정 중에 APH(3′)의 생산성과 생육상태가 좋은 변이주들을 각각 선별하여 APH(3′)을 얻기 위한 균주로 사용하였다.

배지

종균의 배양배지는 영양 배양배지(Difco)와 Luria 배지 등을 사용하였고, 각 균주에 대한 본 배양배지와 발효 중의 첨가배지는 Table 3에 의거하여 사용하였다. 변이주인 *E. coli* M1의 배지로는 기초배지 1(A)를 사용하고 발효 중의 첨가배지는 포도당 용액(F)와 첨가배지인 1(N)을 사용하고 *E. coli* M2는 기초배지 2(B)를 사용하였으며 첨가배지로 포도당 용액(F)과 첨가배지 2(Z)를 사용하였다. 오염을 방지하기 위한 kanamycin B나 포도당 및 착화합물을 형성하는 성분은 여과하거나 따로 멸균하여 가압멸균된 배지에 첨가하였다.

분석 방법

흡광도(O.D)는 배양액을 농도에 따라 적당히 희석하여 분광광도계(Varian ; DMS 100S)를 사용하여 610 nm에서 측정하였고, 용존산소(D.O)의 양과 pH는 발효기(Marubishi)에 의해 감지되었으며 배양액 중의 포도당의 양은 포도당의 표준용액과 발색시약을 사용하는 Sigma사 제품의 포도당 assay kit(No. 510-DA) 사용법에 의했고 APH(3′) 활성도는 $CHCl_3$: MeOH : NH_4OH(3 : 4 : 3)의 전개용매에 의해 TLC plate 상에 전개된 인산화된 kanamycin B(p-KMB)를 ninhydrin으로 착색하여 mercury lamp를 사용하는 TLC scanner(Camag)로 546 nm에서 주사함으로써 표준곡선과 대조하여 정량하였다.

배양조건

5*l* 용량의 발효조에 2*l*의 배지용액을 만들어 각 균주의 배양에 사용하였고 균주배양액 5%를 접종하였으며 pH는 4 N NaOH를 사용하여 7.0으로 자동조절하였다. 37℃에서 비연속배양과 유가배양의 발효를 실험에 따라 9~20시간 시행하였고 교반속도는 용존산소의 상태에 따라 500~1000 rpm으로 조절하였으며 통기량은 4*l*/min을 유지하면서 용존산소가 고갈될 때는 산소가스를 공급하여 보충하였다. 배양 중에 배양액 적당량을 무균적으로 취하여 5000 rpm에서 10분간 원심분리하고 습윤중량, O.D, 글루코오스 농도, APH(3′) 활성도 등을 측정하였으며 실험에 따라 비연속 배양과 유가배양을 시행하였다.

결과 및 고찰

APH(3′) 생산성이 증가된 변이주의 분리

자외선과 NTG를 처리하여 효소의 생산성과 균체의 생육속도가 우수한 변이주를 선별하였으며 돌연변이 후 선별된 변이주들의 특성은 Table 1과 같으며 *E. coli* ATCC 21990에 비해 변이주인 *E. coli* M1은 10 mg/m*l*의 kanamycin B에서도 내성을 보였고 *E. coli* M2는 1.25 mg/m*l*의 kanamycin B에 내성을 나타냈으며 *E. coli* M1은 출발균주인 *E. coli* ATCC 21990보다 APH(3′) 생산성이 약 4배 증가하였고 *E. coli* M2는 약 3배 증가하였다. APH(3′)의 유전자를 추출하여 숙주세포내에서 많은 양의 단백질을 발현할 수 있게 하는 프로모터와 벡터 또는 숙주세포 등의 조건을 확립하여 클로닝을 할 경우 증가된 효소의 생산성을 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

질소원 변화에 따른 균체의 생산성

APH(3′) 고 생산성 변이주인 *E. coli* M1과 M2를

Table 1. *E. coli* strains producing aminoglycoside-3′-phosphotransferase

Strains	Resistance to kanamycin B(mg/ml)[a]	Specific APH(3′) activity(IU/g wet cell)	Source
E. coli ATCC 21990	0.153	3.52	ATCC
E. coli M1[b]	<10	14.45	our laboratory
E. coli M2[c]	1.25	9.38	our laboratory

[a]: MIC in nutrient agar(Difco).
[b,c]: mutant of *E. coli* ATCC 21990.

선발한 후 최적조건의 배지를 선택하기 위해 각 균주에 대해 500 ml 용량의 삼각플라스크에 1% 포도당, 0.9% NaCl과 12종류의 각 질소원 1%를 첨가하여 100 ml 용액으로 만든 후 37℃에서 18시간 동안 진탕배양하여 610 nm에서 O.D를 측정하였다. 최적배지의 선택시 세균의 성장에 인산염이 pH를 일정하게 유지시켜주는 완충작용을 한다는 점을 감안하여 배지 중에 KH_2PO_4와 K_2HPO_4를 적당량 첨가하였으며 *E. coli* M1의 경우는 bacto soytone을 사용하였을 때 O.D값이 3.27로써 가장 높은 값을 나타냈으며 tryptone과 peptone 등의 O.D값도 높았지만 bacto-soytone과는 거의 1.0의 차이를 보였다(Table 2). Luria 배양배지가 미생물 배양에 많이 사용되는 배지로서 재조합 유전자의 발현에도 널리 쓰이는 배지인점에 착안하여 변이주의 배양에 질소원으로서 yeast extract와 tryptone을 사용한 결과 *E. coli* M2의 경우는 bacto soytone보다는 yeast extract를 사용하였을 때 균체의 생육속도가 약 2배 증가함을 삼각플라스크 배양을 통하여 확인하였다.

Table 2. Effect of nitrogen source

N-source	OD at 610 nm
Yeast extract	1.00
Casein hydrolysate	0.36
Peptone	2.30
Tryptone	2.51
Beaf extract	2.19
Corn steep liquor	1.13
Soytone	3.27
Thr, Leu, ILe	0.46
$(NH_4)_2SO_4$	0.08
NH_4Cl	0.08
KNO_3	0.08
NH_4NO_3	0.08

E. coli M1의 유가배양법을 통한 APH(3′)의 생산

E. coli M1의 균주 배양액은 2g bacto soytone, 0.8g KNO_3, 0.9g NaCl을 100 ml 증류수에 혼합하여 121℃에서 20분간 가압멸균하고 0.22 μm 원판 여과지를 이용하여 여과한 kanamycin B(50 μg/ml)를 첨가하여 37℃에서 10시간 동안 200 rpm으로 진탕배양한 후 2 l 배양액에 접종하였다. 2 l 배양액을 만들기 위해 14g KH_2PO_4, 16g K_2HPO_4, 10g yeast extract, 50g bacto soytone을 증류수에 녹여 4 N NaOH로 pH 7.0을 조절하고 121℃에서 30분간 가압멸균 후 50% 포도당 용액 40 ml, 15% $MgSO_4$ 용액 20 ml, 소포제 A 1 ml를 각각 따로 멸균하여 0.22 μm 원판여과지로 여과된 kanamycin B(150 μg/ml)와 함께 첨가하였으며 균주배양액 100 ml를 접종하였고 초기 교반속도는 500 rpm, 통기량은 4 l/min으로 하였으며 여과된 4 N NaOH 용액을 사용하여 pH 7.0을 자동으로 유지하였다. 20시간 동안의 배양을 통하여 포도당의 양이 6시간부터 많은 양이 감소되기 시작했으며 용존산소의 양 역시 일정한 교반속도에서 6시간 후 현저히 감소함에 따라서 유가배양법에 의해 배양 9시간 후에 Table 3의 탄소원인 포도당 용액 20 ml, 11시간에는 포도당 용액 20 ml와 첨가배지 1을 50 ml, 15시간 후에는 포도당 용액 40 ml와 첨가배지 1을 50 ml 첨가하였으며 교반속도를 변화시켜 용존산소의 양을 배양 후 16시간까지 일정하게 유지하였다(Fig. 1). 발효 중에 많은 기포가 생성되는 것을 방지하기 위해 Sigma사의 소포제 A를 0.5 ml/l 첨가하여 배양이 끝날 때까지 기포생성을 억제할 수 있었으며 유가배양을 위해서 첨가배지로 $MgSO_4$가 혼합된 포도당과 금속이온과 K_2HPO_4가 혼합된 yeast extract를 사용하여 배양액 중의 포도당이 고갈되는 것을 막고 영양원을 재공급함으

Table 3. Media composition

A. Basic medium 1		$ZnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.0144
KH_2PO_4	0.7%	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.012
K_2HPO_4	0.8%	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.012
Yeast extract	0.5%	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.006
Bacto soytone	2.5%	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1.9
Kanamycin B	1 m*l*/*l*	H_3BO_3	0.5
$MgSO_4$	4 m*l*/*l*	HCl	37.0
Trace metal	3 m*l*/*l*	F. Glucose solution	
Antifoam A	0.5 m*l*/*l*	Glucose	500.0g/*l*
B. Basic medium 2		$MgSO_4$	5.0g/*l*
KH_2PO_4	0.7%	G. Amino acids solution	
K_2HPO_4	0.8%	Threonine	10.0g/*l*
NaCl	0.5%	Leucine	5.0g/*l*
Yeast extract	2.0%	Isoleucine	5.0g/*l*
Tryptone	1.0%	H. Supplement medium 1	
Kanamycin B	1 m*l*/*l*	K_2HPO_4	5.0g/*l*
$MgSO_4$	4 m*l*/*l*	Yeast extract	10.0g/*l*
Trace metal	3 m*l*/*l*	Bacto soytone	50.0g/*l*
Antifoam A	0.5 m*l*/*l*	Trace metal	6 m*l*/*l*
C. Kanamycin B solution		I. Supplement medium 2	
Kanamycin B	50.0g/*l*	K_2HPO_4	5.0g/*l*
D. $MgSO_4$ solution		Yeast extract	50.0g/*l*
$MgSO_4$	150.0g/*l*	Tryptone	10.0g/*l*
E. Trace metal solution(g/*l*)		Trace metal	6 m*l*/*l*
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.162	J. 5 M NH_4OH	

로써 O.D값이 12.8에서 O.D 38.0으로 증가되었고 APH(3′)의 활성도는 297 IU/*l*에서 777 IU/*l*으로 증가되었다.

E. coli M2의 최적배지와 유가배양법에 의한 APH (3′)의 생산

E. coli M2의 균주배양액은 0.5g yeast extract, 1.0g tryptone, 0.5g NaCl을 증류수 100 m*l*에 녹여 121℃에서 20분간 가압멸균한 후 0.22 μm 원판 여과지를 이용하여 여과한 kanamycin B(50 μg/m*l*)를 첨가하여 37℃에서 200 rpm으로 10시간 동안 진탕배양한 후 2 *l* 배양액에 무균적으로 접종하였다. 2 *l* 배양액을 만들기 위해 14g KH_2PO_4, 16g K_2HPO_4, 10g NaCl, 40g yeast extract, 20g tryptone을 증류수 1.8 *l*에 혼합하여 4 N NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 유지하고 121℃에서 30분간 가압멸균하여 50% 포도당 용액 120 m*l*, 15% $MgSO_4$ 용액 20 m*l*, Metal용액 6 m*l*, 소포제 A 1 m*l*를 각각 따로 멸균하여 첨가하고 여과된 kanamycin B

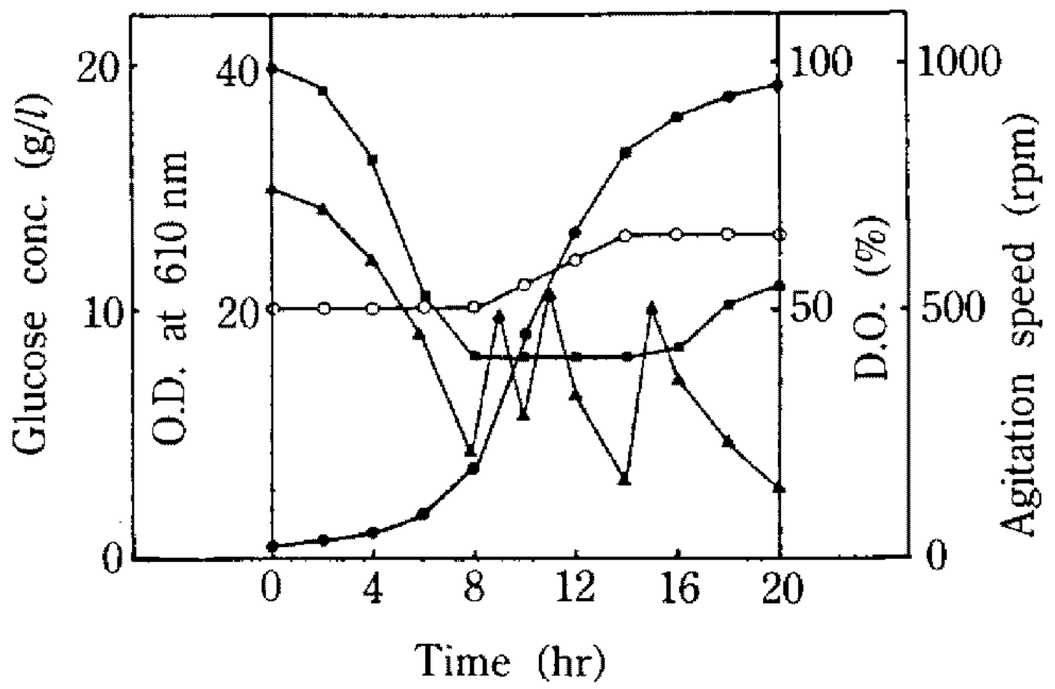

Fig. 1. Culture profile of fed batch type fermentation by *E. coli* M1.

The fed batch culture was performed in a jar fermentor with 2.0 liters of culture broth containing media A at 37℃, and the pH was controlled to 7.0 with 4 N NaOH. The initial agitation rate was set at 500 rpm and the aeration was 4 *l*/min. Media F and H were added at 9 hr, 11 hr and 15 hr. Symbols: ●-●, OD at 610 nm; ▲-▲, glucose concentration; ■-■, dissolved oxygen; ○-○, agitation.

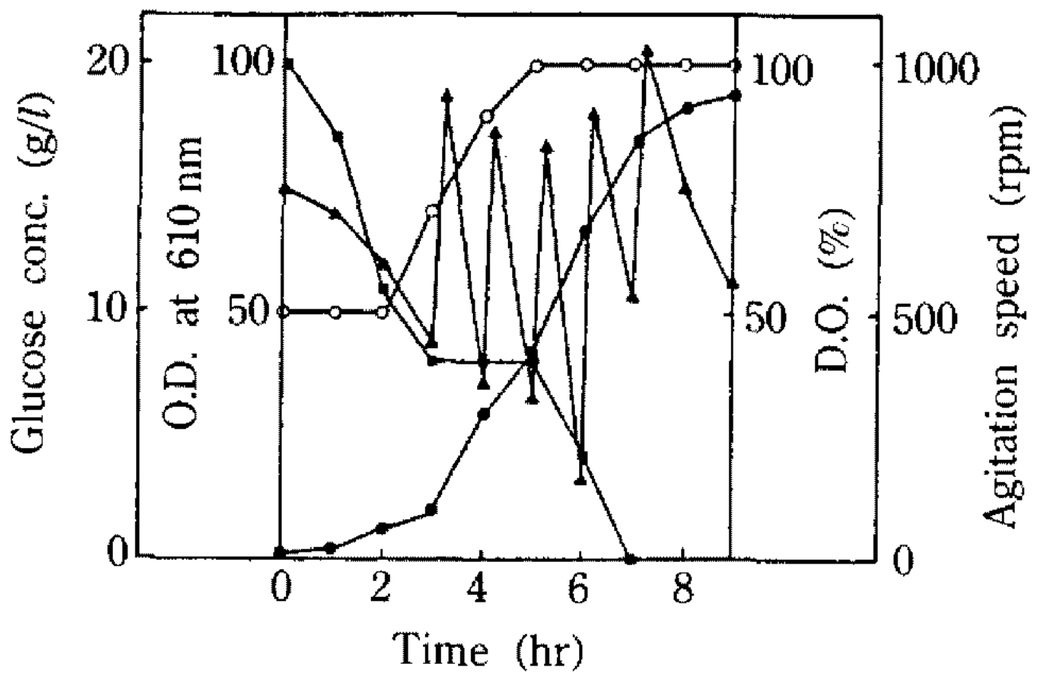

Fig. 2. Culture profile of fed batch type fermentation by *E. coli* M2.
The culture was performed in a jar fermentor with 2.0 liters of culture broth containing media B at 37℃, and the pH was controlled to 7.0 with 4 N NaOH. Initial agitation rate was at 500 rpm and maxinum agitation was at 1000 rpm. Aeration was at 4 *l*/min, and supplement media f and I were added to replenish nutrients during the fermentation. Symbols: ●-●, OD at 610 nm; ▲-▲, glucose concentration; ■-■, dissolved oxygen; ○-○, agitation.

0.1 g/2 m*l*을 첨가하고, 100 m*l* 균주배양액을 접종하였다. 초기 교반속도는 500 rpm이었고 O.D를 40%로 유지하기 위해 rpm을 조절하였다. 9시간 배양 후 61.2 g/*l*의 습윤중량과 570 IU/*l*의 APH(3′) 활성도를 얻었으며 O.D값은 45.0으로 *E. coli* M1에서보다 O.D값이 32.2만큼 더 증가하였다. 동일한 배지조건에서 배양 후 3시간에 Table 3의 멸균된 포도당 용액 40 m*l*를 첨가하고 용존산소의 양을 40%로 유지하기 위해 rpm을 변화시켰으며(Fig. 2) 9시간 배양 후 125.3g/*l*의 습윤중량과 1360 IU/*l*의 APH(3′) 활성도를 얻었으며, *E. coli* M1에서보다 활발한 균체의 증식으로 인하여 APH(3′)의 활성도(IU/*l*)가 약 2배 증가하였다. 변이주 M1의 유가배양에는 20시간이 소요되었지만 변이주 M2의 경우는 최적 배양시간이 9시간으로 최적배지와 배양조건하에서 변이주 M2의 생육속도(g/*l*/hr)가 변이주 M1보다 약 5배 빠름을 확인하였다.

산소가스를 이용한 *E. coli* M2의 배양

유가배양에 의한 *E. coli* M2의 배양 중 교반속도는 1000 rpm에서도 5시간 후부터 용존산소의 양이 40% 이하로 감소되었기 때문에 산소가스를 미량 주입하면서 용존산소의 양을 일정하게 유지시킨 결과 13시간

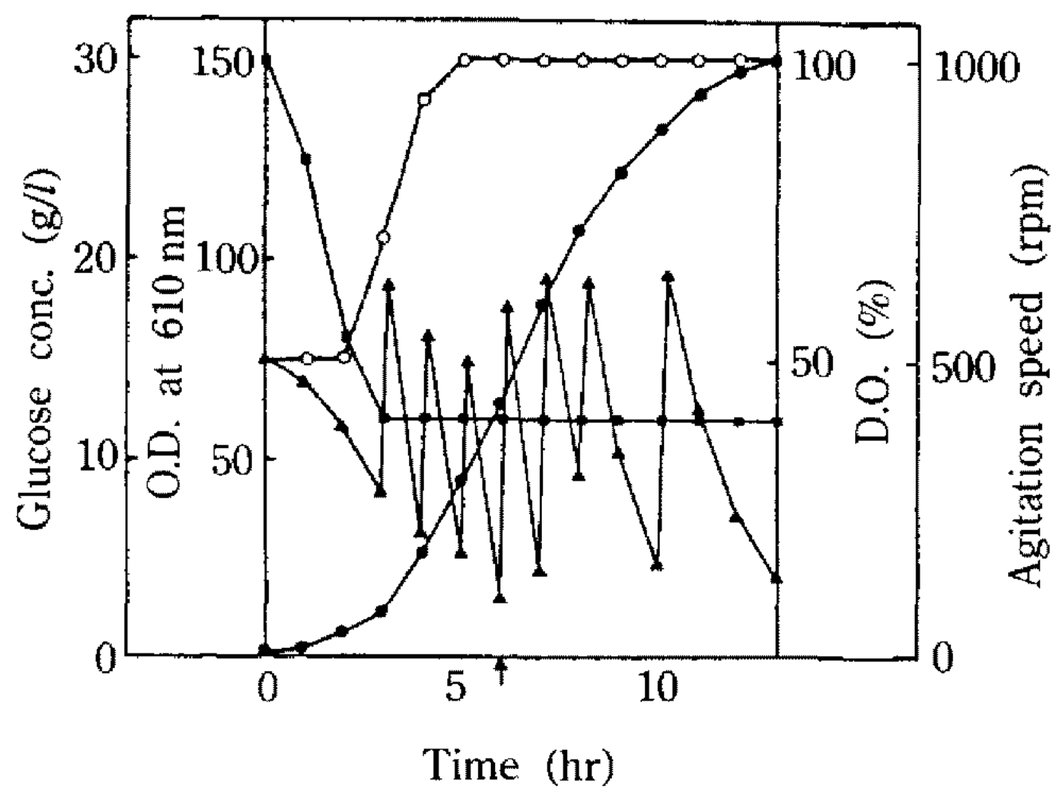

Fig. 3. Glucose concentration and dissolved oxygen level during the fed batch culture without oxygen limitation using E. coli M2.
The culture was performed in a jar fermentor with 2 liters of culture broth containing media B at 37℃, and the pH was controlled to 7.0 with 4 N NaOH. Dissolved oxygen level was maintained at 40% using pure oxygen gas. Media F and I were added during the culture to replenish nutrients. Symbols: ●-●, OD at 610 nm; ▲-▲, glucose concentration; ■-■, dissolved oxygen; ○-○, agitation.

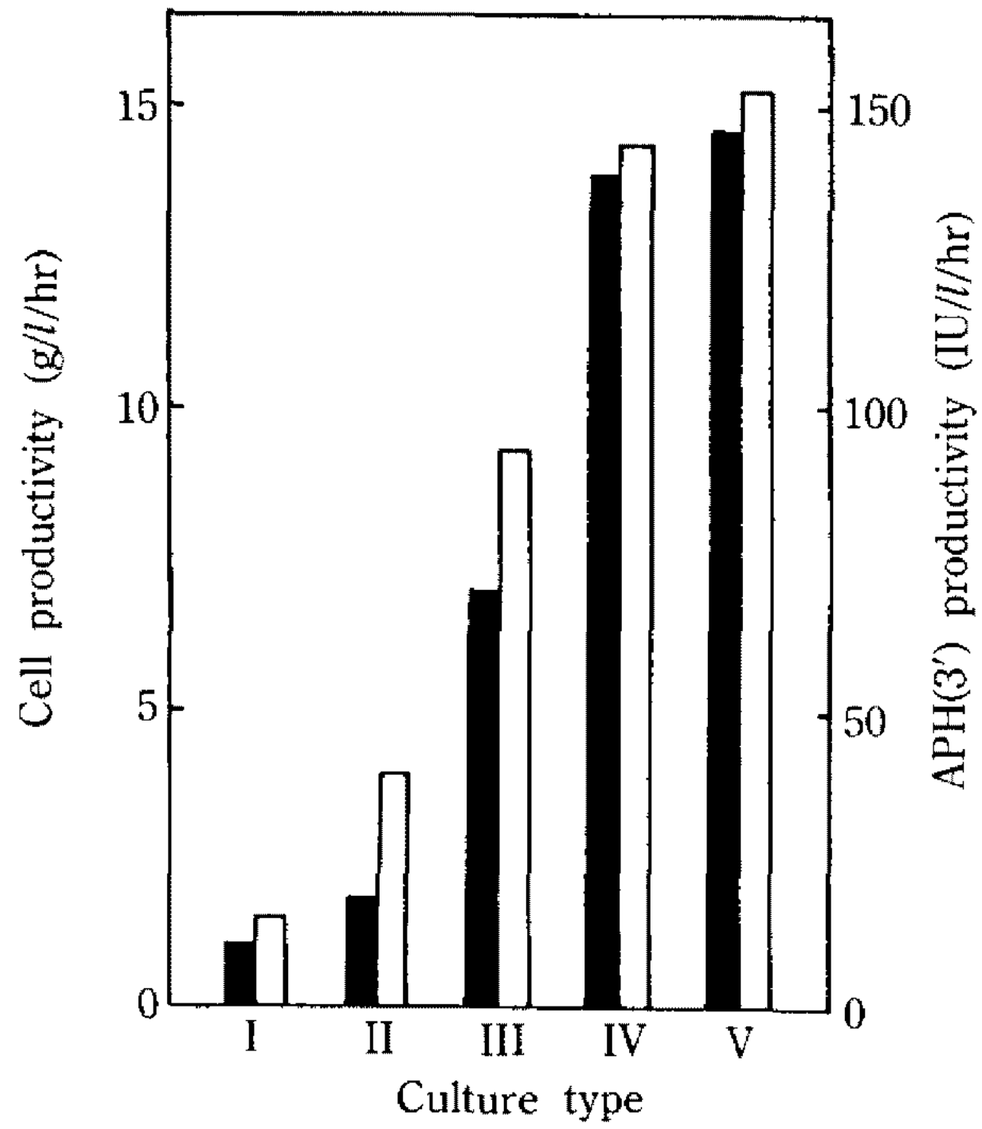

Fig. 4. Productivity of cell and APH(3′) in the case of various types of culture.
Symbols: ■, wet cell mass; □, APH(3′) activity. I: batch culture of *E. coli* M1, II: fed-batch culture of *E. coli* M1, III: batch culture of *E. coli* M2, IV: fed-batch culture of *E. coli* M2, V: fed-batch culture with pure oxygen gas of *E. coli* M2.

동안 균체가 증식하였으며(Fig. 3) 190.0g/*l*의 습윤중량과 1980 IU/*l*의 APH(3′) 활성도를 얻음으로써 유가배양에 의한 *E. coli* M1의 배양에서보다 약 2.5배 증가시킬 수 있었다(Fig. 4). 이로써 변이주 M1의 배양액 1 liter당 297 IU에서 변이주 M2의 사용과 발효조건의 최적화에 의해 1980 IU의 활성도를 얻음으로써 산업적 이용이 가능하게 되었다. 유전자조작을 통한 균주개발에 의해 APH(3′) 생산성을 더 증가시키고 배기가스 중의 CO_2와 O_2 등의 분석장치를 용존산소의 양을 측정하는 모니터와 연결하여 교반속도와 산소공급을 자동으로 조절하는 조절기 등을 보완하거나 산소주입없이 충분히 용존산소를 유지할 수 있도록 임펠레 등을 새롭게 고안한 발효기 등을 이용하여 배양조건을 최적화할 경우 균체의 생산성을 훨씬 더 증가시킬 수 있을 것으로 짐작된다.

요 약

Aminoglycoside-3′-phosphotransferase(APH(3′))를 생산하는 균주인 *E. coli* ATCC 21990을 산업적으로 이용하기 위해서 자외선 조사 및 NTG를 처리하고 고농도의 kanamycin B에 내성을 갖는 변이주인 *E. coli* M1과 M2를 선별하였다. *E. coli* M1은 단위균체당 효소 생산성은 높으나 생육속도가 낮아 실용적이질 못했고 주 질소원인 yeast extract를 사용했을 때 *E. coli* M1보다 *E. coli* M2가 생육속도가 훨씬 빨랐으며 약 2배의 APH(3′)을 얻을 수 있었고 산소가스를 사용하였을 경우는 약 2.5배의 APH(3′)을 얻었다.

참고문헌

1. Benveniste, R. and J. Davies: *Biochemistry*, **10**, 1787 (1971)
2. Benveniste, R. and J. Davies: *FEBS Lett.*, **14**, 293 (1971)
3. Benveniste, R. and J. Davies: *Annu. Rev. Biochem.*, **42**, 471 (1973)
4. Okanishi, M., S. Kondo, Y. Suzuki, S. Okamoto and H. Umezawa: *J. Antibiotics*, **20**, 132 (1976)
5. Umezawa, H., M. Okanishi, R. Utahara, K. Maeda and S. Kondo: *J. Antibiotics*, **20**, 136 (1967)
6. Umezawa, H., M. Okanishi, S. Kondo, K. Hamana, R. Utahara, K. Maeda and S. Mitsuhashi: *Science*, **157**, 1559 (1967)
7. Okutani, T., T. Asako, K. Yoshioka, K. Higara and M. Kita: *J. Am. Chem. Soci.*, **99**, 1278 (1977)
8. Kim, B.H., L.S. Baik, T.I. Mheen and M.H. Han: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **9**, 29 (1981)
9. Xiaolili, J., W. Robbins, Jr. and K.B. Taylor: *J. Indust. Microbiol.*, **5**, 85 (1990)
10. Gleiser, L.E. and S. Bauer: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1015 (1981)
11. Bauer, S. and J. Shiloach: *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 993 (1974)
12. Mori, N.J. Yano, T. Kobayashi and S. Shimizu: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **12**, 313 (1979)
13. Dunn, L.J. and M.R. Mor: *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1805 (1975)
14. Dairaku, K., Y. Yamasaki, H. Morikawa, S. Shioya and T. Takamatsu: *J. Ferment. Technol.*, **60**, 67 (1982)

(Received June 12, 1991)