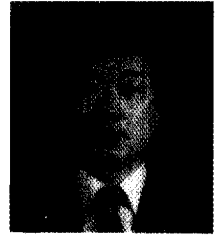


새로운 항생물질 탐색시 방선균의 발효과정



한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소 김 성 옥

I. 서 론

Waksman이 1940년대초 streptomycin을 발견한 이래 방선균은 항생물질의 주된 공급원이 되어 왔으며 현재까지 자연계에서 발견된 항생물질의 2/3(4,000종 이상)를 차지하고 있다.¹⁾ 그러나 새로운 항생물질의 발견가능성은 기지의 항생물질 수가 증가함에 따라 점점 더 낮아지고 있는 실정이나 미생물의 다양성(표1)에 기대를 걸고 일련의 새로운 탐색과 분석방법의 개발을 도모하면 아직도 그 가능성은 상존한다고 생각된다.

최근들어 새로운 항생물질을 발견하기 위한 연구동향은 크게 세가지로 대별된다. 첫째는 *Streptomyces* 속을 제외한 희귀 방선균류를 분리하거나 해양 미생물과 버섯류 및 곰팡이를 대상으로 하여 새로운 항생 물질의 발견 가능성을 증대시키려는 것과 둘째는 기존의 무작위 탐색방법을 탈피하고 보다 선택적이고 특이적인 목표 지향적인 탐색(target directed screening)을 통해 선별적인 탐색을 행하고 셋째는 유전자 조작을 통해 hybrid 항생물질을 생산하기 위한 여러 시도로 나눌수 있다.

한편 방선균의 가장 중요한 경제적인 측면은 항생물질 생산이라고 일컬어지고 있으나 방선균은 항생물질 이외에도 다른 상업적인 제품의 공급원이 되고 있으며, 어떤 방선균들은 한 종류 이상의 항생물질을 생산하기 때문에 새로운 발효기술을 응용하면 새로운 물질을 발견하는데 매우 커다란 도움을 줄 것으로 생각된다.

II. 항생물질 생합성에 영향을 주는 요소

항생물질들은 다른 2차 대사 산물에 비해 여러 특징을 지닌 상황에서 생산된다.²⁾ 다시 말하면 ① 항생물질 생산은 특정된 균주에서만 생산되며 ② 불안정하고, 생산균주를 연속적으로 계대하거나 돌연변이 처리를 하면 생산성이 소실되는 경향이 있으며 ③ 한 종류의 배지에서 생육과 관련된 동역학을 나타내지 않는다. 또한 ④ 활성이 높은 항생물질의 생산성은 발효배지내부의 영양성분 결핍으로 인한 생산 균주의 포자화와 연관되어 자주 일어나며 ⑤ 대부분의 항생물질들은 많은 유사체를 지닌 한 종류 이상의 집단으로 생산되고, 구성 성분의 분포는 배양 조건의 변형에 의해 쉽사리 변화된다는 점이다.

항생물질의 생합성이 어떻게 시작되어지고 조절되고 있는지에 대한 상세한 기작은 아직 명확하지 않으나 이러한 현상들은 많은 요소들이 항생물질 생산에 영향을 미치고 있다는 것을 암시하고 있다.

(1) 영양성분에 대한 요소

발효배지내의 영양성분들은 미생물의 생육에 필수적이거나 어떤 성분들은 항생물질 생산에 부정적인 영향을 나타낸다. 미생물 생육에 필요한 포도당이나 아미노산 그리고 다른 탄소원이거나 질소원이 발효배지내에 어느 정도 이상 존재하면 항생물질은 생산되지 않거나 매우 낮은 속도로 생산되며 그 예를 표 2에 나타내었다.

1) 포도당, 암모니아 및 무기 인산염

표 2는 포도당, 암모니아 이온 및 무기인산염이

Table 1. Antibiotic groups yielded by actinomycetes.

Organism	Antibiotic group ^a										
	AG	ML	AML	BLA	PEP	GP	ANC	TC	NUC	POL	QN
Streptomycetes											
<i>Streptomyces</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
'Rare' actinomycetes											
<i>Actinomadura</i>							●			●	
<i>Actinoplanes</i>					●	●			●	●	●
<i>Actinosynnema</i>				●							
<i>Ampullariella</i>							●		●		
<i>Dactylosporangium</i>	●								●	●	
<i>Kibdelosporangium</i>						●					
<i>Micromonospora</i>	●	●	●		●		●		●		●
<i>Nocardia</i>	●	●	●	●		●		●	●		●
<i>Nocardioopsis</i>	●										
<i>Pseudonocardia</i>						●					
<i>Saccharomonospora</i>						●					
<i>Saccharopolyspora</i>	●										
<i>Streptosporangium</i>					●						

Data mainly based on the 1976-86 issues of the Journal of Antibiotics.

^aAG, aminoglycoside; ML, macrolide; AML, ansamacrolide; BLA, β -lactam; PEP, peptide; GP, glycopeptide; ANC, anthracycline; TC, tetracycline; NUC, nucleosides; POL, polyene; QN, quinone and ●, production.

항생물질 생산을 매우 빈번하게 억제하는 것을 나타내고 있으나 항상 항생물질의 생산을 억제하지는 않는다.

*S. fradiae*에 의한 tylosin의 생산은 전분을 기본으로 하는 생산배지에 4%의 포도당을 첨가하여도 아무런 영향을 받지 않으나 ammonium sulfate와 potassium phosphate를 생산배지에 각각 첨가하면 생산성은 급격하게 감소된다. 암모니아는 casein이나 peptone과 같은 질소 함유 영양분의 분해에 의해 생산되거나 배지속으로 방출되면 tylosin의 생산이 저해된다. 대사 경로가 결핍된 돌연변이주나 휴지기 세포 및 효소계를 이용한 연구에서는 암모니아가 aglycon 생합성에 이용된 3개의 골격(acetate, propionate 및 butyrate)형성을 방해하는 것으로 알려져 있다.³⁾

Chlortetracycline(CTC)의 산업적 생산은 *S. aureofaciens*가 이용되는데 주된 탄소원으로는 sucrose를 함유한 복합배지에서 행하여지며, pH는 암모니아수를 이용하여 6이하로 유지시킨다. 이러한 조건에서는 sucrose와 암모니아는 CTC 생산에 아

무런 저해효과를 나타내지 않으나 CTC 생산은 무기 인산염에는 상당히 민감하게 작용하여 항생물질 생산은 배지내의 무기 인산염이 고갈된 이후에만 시작된다. 무기 인산염은 anhydrotetracyclin oxygenase 와 아마도 CTC 생합성에 관련되어있는 어떤 다른 효소를 억제하는 것으로 생각된다.⁴⁾

일반적으로 저해성 영양분들은 포도당이나 다른 쉽사리 자화될수있는 탄소원, 암모니아 및 쉽사리 자화될수있는 질소원 또는 무기 인산염과 다른 인산염을 발생하는 성분들이다. 이들 세 부류중 어느 것이 주된 저해 작용을 나타내지는의 여부는 균주와 사용한 발효조건 다시말하면 항생물질의 생합성과 분해 및 조절 기작에 좌우된다. 이러한 요소들 때문에 항생물질 생산은 항상 대표적인 non-growth-associated kinetics을 따르고 있다.

2) 금속이온

여러 금속이온들 또한 항생물질 생산에 영향을 미치며 항생물질 생합성의 촉진과 저해를 포함하여 그 예를 표 3에 나타내었다.

3) 전구물질

Table 2. Regulation of antibiotic biosynthesis.

Antibiotics	Producing microorganism	Regulatory factors	Mechanism of regulation
Antibiotics Derived from Amino Acids			
Penicillin	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Glucose Methionine	Tripeptide synthesis (R), Induction
Cephalosporin	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Glucose, NH ₄ ⁺ , PO ₄ ²⁻	Ring-expandase (R)
	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	NH ₄ ⁺ , PO ₄ ²⁻	Cyclase (R, I), ring-expandase (R, I)
Cephameycin	<i>S. cattleya</i>	Glucose, NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻	(NR)
Thienamycin	<i>S. cattleya</i>	PO ₄ ³⁺	(NR)
Actinomycin	<i>S. antibioticus</i>	Glucose	Aglycone synthetase (R)
Cycloserine	<i>S. garyphalus</i>	PO ₄ ³⁻	Cyclase (I)
Vancomycin	<i>S. orientalis</i>	PO ₄ ³⁻	(NR)
Bacitracin	<i>Bacillus licheniformis</i>	Glucose	Decline of pH
Neoviridomycin	<i>S. griseoviridus</i>	Glucose	(NR)
Echinomycin	<i>S. echinatus</i>	PO ₄ ³⁻	pH Control
Colistin	<i>B. polymyxa</i>	NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻	Formation of diaminobutyric acid (R)
Gramicidin S	<i>B. brevis</i>	NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻	(NR)
Antibiotics Derived from Sugars			
Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	PO ₄ ³⁻ , A-factor	Phosphatase (I) Induction
Kanamycin	<i>S. kanamyceticus</i>	PO ₄ ³⁻ Glucose	Phosphatase (I) N-acetyl hydase (R)
Sagamycin	<i>Micromonospora sagamiensis</i>	Co ²⁺	Stimulation of N-methylation
Butirosin	<i>Bacillus vittelinus</i>	PO ₄ ³⁻	Phosphatase (R)
Lincomycin	<i>S. lincolnensis</i>	NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻	(NR)
Antibiotics Derived from Shikimic Acid and Polyketide			
Chloramphenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	NH ₄ ⁺ Chloramphenicol	(NR) Feed back inhibition to arylsulfatase
Leucomycin	<i>Streptoverticillium kitasatoensis</i>	NH ₄ ⁺	Valine dehydrogenase
		n-Butyric acid	3-O-acylase (R)
		Glucose	Induction
Spiramycin	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	n-Butyric acid, Glucose	3-O-Acylase (R) Induction
Tylosin	<i>S. fradiae</i>	NH ₄ ⁺	Metabolism of succinate and valine (R)
		Glucose, PO ₄ ³⁻	Inhibition of methyl malonic acid synthesis
Tetracycline	<i>S. aureofaciens</i>	cAMP	Stimulation of production
		PO ₄ ³⁻ Benzylthiocyanic acid	Anhydro tetracycline oxygenase (R) Induction
Candicidin	<i>S. griseus</i>	PO ₄ ³⁻	PABA synthetase (R)
Nanaomycin	<i>S. rosa</i> subsp. <i>notoensis</i>	NH ₄ ⁺	Stimulation of production
		PO ₄ ³⁻	Aglycon synthesis (R)
Avermectin	<i>S. avermitilis</i>	Glucose, PO ₄ ³⁻ , NH ₄ ⁺	(NR)
Daunomycin	<i>S. griseus</i>	L factor, I factor	Induction
Rifamycin	<i>Nocardia mediterranei</i>	B factor	Induction
Cerulein	<i>Cephalosporium caeruleus</i>	NH ₄ ⁺	(NR)
Patulin	<i>Penicillium urticae</i>	NO ₃	m-hydroxybenzyl alcohol dehydrogenase(R)
Aflatoxin	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Glucose, cAMP	Stimulation of production
Others			
Pyrrromycin	<i>Streptomyces alboniger</i>	Glucose	3-O-α-Methyltransferase (R)
Novobiocin	<i>S. niveus</i>	Citric acid, NH ₄ ⁺	(NR)

¹Abbreviations: (R), repression; (I), inhibition; (NR), Not reported.

Table 3. Influence of metal ions on antibiotic production.

Antibiotic	Producing microorganism	Metal ion	Action
Putulin	<i>Penicillium urticae</i>	Mn ²⁺	Stimulation of production
Sagamycin	<i>Micromonospora sagamiensis</i>	Co ²⁺	Stimulation of <i>N</i> -methylation
A-Factor	<i>Streptomyces griseus</i>	Co ²⁺	Stimulation of production
Bialaphos	<i>S. hygroscopicus</i>	Co ²⁺	Stimulation of <i>P</i> -methylation
Lincomycin	<i>S. lincolnensis</i>	Mg ₃ (PO ₄) ₂	Reduction of NH ₄ ⁻ content
Candicidin	<i>S. griseus</i>	Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , Mg ²⁻	Reduction of PO ₄ ³⁻ content
Nourseothricin	<i>S. noursei</i>	Zn ²⁺	Stimulation of production
Gentamicin	<i>M. purpurea</i>	Ca ²⁻	Stimulation of <i>N</i> -methylation
β-Lactam	<i>S. clavuligerus</i>	Fe ²⁺	Reduction of inhibition by PO ₄ ³⁻

Table 4. Enhancement of production of antibiotics by ammonium ion- and phosphate-trapping agents.

Trapping agents	Amount added		Maximum antibiotic titers (μg ml ⁻¹)	
	(%)	Antibiotics	No addition	Addition
(NH ₄ ⁺)				
Magnesium phosphate	1.0	Leucomycin	700	3800
Sodium phosphotungstate	0.5	Spiramycin	150	450
Natural zeolite	1.0	Tylosin	59	149
Magnesium phosphate	1.0	Cephalosporin	400	1600
NH ₄ ⁻ -saturated zeolite	0.2	Nanaomycin	85	750
Natural zeolite (PO ₄ ³⁻)	1.0	Cerulenin	40	280
Allophane	0.5	Tylosin	50	130
Allophane	0.5	Nanaomycin	110	505
Allophane	0.5	Candicidin	180	530

아미노산이나 짧은 사슬의 지방산 및 알코올류 (propanol)의 첨가시 항생물질의 생산성이 증가된다는 사실은 잘 알려져 있으나 그 기작은 아직 명확하지 않다. 그러나 이러한 증가는 첨가한 화합물이 중간체나 그 전구물질로 변환될때 일어나는 것으로 생각된다.

(2) 저해물질이나 생산물과 상호 작용하는 포집제의 첨가

암모늄이온이나 인산염을 포집하는 포집제를 이용한 새로운 발효기술의 개발로 여러 형태의 항생물질 생산시 2~10배의 증가를 이룩하였다. 이러한 포집제중 암모늄이온 포집제로서는 magnesium phosphate와 합성 zeolite 및 mordenite와 같은 천연 zeolite가 있으며 인산염을 포집하는 포집제로서는 allophane과 magnesium carbonate가 주로 이용된다.

발효는 살균하기전 이러한 포집제중의 하나를 첨가한 진탕 플라스크나 발효조에서 통상적인 방법으로 행하여지며 암모니아와 인산염의 양이 보충 배지내에서 낮아져서 항생물질 생산성이 상당히 증가된다 (표 4). 이러한 발효기술을 암모늄이온이 억제된 발효와 인산염이온이 억제된 발효라 부르고 있으며 이 방법의 주된 특징은 암모늄이온이나 무기인산염들이 저해를 나타내지 않고 미생물 생육을 충분히 뒷받침 해주는 어느 선까지 감소된다는 점이다.

Zeolite, kaoline, celite와 다른 천연 무기물들이 pellet 형성을 억제하기 위하여 미생물 세포와 상호작용하여 산소와 영양분의 섭취를 증가시키고 2차 대사 산물의 생합성을 촉진하게되면 항생물질 생산성은 높아진다. 또한 β-cyclodextrin을 0.2~1% 첨가하여 방선균에 의한 lankacidin의 생산성을 약 10

배 증가시킨 예도 보고되고 있으며, 이때 cyclodextrin이 포집체를 형성한후 lankacidin을 안정화 시켜 lankacidine이 feed back 저해제로 작용하지 못하게 하는 것으로 알려지고 있다.⁸⁾

(3) 세포내 유도 물질

항생물질 생합성은 표 5에 나타난 저분자량의 세포내 유도 물질에 의해서도 조절되는 것으로 생각된다.

(4) 물리 화학적 요소

1) pH

방선균의 균사체 생육 뿐만 아니라 발효배지의 pH는 항생물질 발효시 중요하고 발효를 추적하는데 편리한 척도이다. 배지의 pH는 발효조에서는 자동적으로 조절되나 플라스크에서의 발효의 경우 pH는 CaCO₃, phosphate salts, ammonia와 Na₂CO₃를 발효배지에 첨가하여 조절한다. 그러나 완충제들이 가끔 항생물질 생산에 역효과를 나타내고 인산염들이 자주 저해를 나타내어 중성 부근으로 pH를 조절하고자 할때에는 MOPS (N-morpholinopropane-sulfonic acid)와 다른 합성 아이노산을 배지에 첨가하여 사용한다. 완충제로 널리 사용되고 있는 CaCO₃도 cerulenin 발효시에는 생산을 저해한다고 알려져 있다.⁹⁾

2) 온도

항생물질 생산시 온도의 영향도 pH의 영향과 유사하여 적절한 생육온도에서 배양하여야 한다. *Streptomyces*의 한 저온성 균주는 15°C에서 항생물질 생산하나 28°C로 배양하면 항생물질을 불활성화시키는 효소가 생산되어 28°C에서는 항생물질을 생산하지 않는다.¹⁰⁾

3) 통기, 교반과 pellet 형성

산소와 CO₂는 항생물질 생산시 많은 영향을 나타내며 용존산소농도는 생육속도가 최대일때 가장 낮은 값을 나타낸다. 최소값이 영에 가까이 도달하면 어떤 미생물의 경우 항생물질 생합성 기구가 손상을 받게되어 정상적인 생산시기에 도달되어도 항생물질 생산이 이루어지지 않는다. Arai 등¹¹⁾은 *Streptomyces*의 한 균주를 500 rpm으로 발효조에서 배양하여 최소량의 산소농도로도 mimosamycin과 chlorocarcin A,B,C의 상호생산을 하였으나 교반속도를 250 rpm으로 감소시키면 최저치의 산소농도가 영에

Table 5. Intracellular factors inducing antibiotic biosynthesis.

Intracellular inducer	Producing microorganism	Antibiotic production induced
A Factor	<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycin
B Factor	<i>Nocardia mediterranei</i>	Rifamycin
I Factor	<i>S. griseus</i>	Daunomycin
L Factor	<i>S. griseus</i>	Daunomycin
Inducing material	<i>S. virginiae</i>	Virginiamycin

도달되어 두 항생물질의 생산이 일어나지 않고 streptomycin의 생산이 시작된다고 보고하였다.

*S. aureofaciens*에 의한 tetracycline의 생산은 낮은 산소량에 민감하나 CO₂에는 민감하지 않았으며, *Saccharopolyspora erythraeus*에 의한 erythromycin 생산은 용존 CO₂ 양이 높으면 증대되는 반면 *P. chrysogenum*에 의한 penicillin 생산은 반대로 저해되었다.

통상의 발효조건하에서 *Streptomyces*의 균사체들은 pellet을 형성하며 이 pellet 들은 배양액의 점도와 pellet 내에 함유된 세포의 생리적인 상태에 영향을 미치게 된다. Pellet의 크기가 직경이 3~10 mm인 경우에는 pellet 속의 산소 전달이 방해받으나 배양액의 점도는 감소되며, 직경이 3mm 이하이면 pellet 속의 산소전달이 제한을 받지 않으나 배양액의 점도는 다소 감소한다. 반면에 pellet이 형성되지 않는 배양액에서는 항상 점도가 높아 산소전달이 제약을 받는다.

간헐적으로 배양액에 물을 첨가하여 점도를 감소시킬수 있으며, *Streptomyces* 균주에서는 zeolite, celite, kaoline 등을 첨가하여 pellet 형성을 억제하여 항생물질 생산성을 증대시키기도 한다.

4) 삼투압

Aminoglycoside 계 항생물질인 istamycin 생산균주 (*Streptomyces tenjimariensis*)와 같은 해양미생물들은 5~7%의 NaCl이 함유된 배지에서도 생육이 되는 반면¹²⁾ 많은 다른 해양 미생물들은 일반적인 환경하에서도 잘 생육이 되며 어떤 균주들은 생육시 3~5%의 NaCl이나 아주 낮은 농도의 유기 영양분들을 필요로 한다.

III. 발효조건의 조절

발효 환경의 변화는 항생물질 생산에 변화를 일으키게 되고 이 변화는 활성을 나타내는 화합물의 수율이나 조성에도 변화를 나타내나 이 두가지 현상은 실제로 생산된 어떤 성분이 시간에 따라 나타났다 사라지는 것과도 연관되어 있다. 또한 새로이 나타나는 성분들은 새로운 화합물일지도 모르기 때문에 적절히 발효조건을 조절하면 새로운 약제를 발견할 가능성은 높아진다. 새로운 생리활성 화합물을 발견하기위한 이러한 시도의 몇몇 성공사례를 아래에 요약하여 기술하고자 한다.

1) 발효 배지용 영양성분의 선별

발효배지용 영양성분의 적절한 선정은 주로 항생물질 생산을 증진시키는 일과 연관되어 있으며, 발효용배지는 주로 탄소원, 질소원, 무기 금속이온과 CaCO_3 와 같은 완충제로 구성된다. 복합배지가 높은 수율과 경제적인 이유로 인해 더 선호되고 있으며

화학 합성 배지는 거의 이용하지 않는다.

암모니움염과 무기인산염은 복합배지내에 함유되어 있고 높은 농도의 암모늄염과 무기 인산염은 항생물질 생합성을 촉진시키지 않기때문에 복합배지에 첨가하지 않는다.

2) 고 농도의 인산염을 함유한 배지

저농도 인산염 배지가 항생물질 생산시 더 바람직하다고 일반적으로 알려져 있는 데에도 불구하고 1~2%의 고농도 무기인산염을 함유한 배지를 이용하여 pyrrolnitrin을 발견하였다. 그 이후 고농도 인산염을 이용하여 monocyclic β -lactam인 nocardicin, 면역증진제인 FK 156, cationomycin, oxetanocin이 각각 발견되었다 (표 6).

① Nocardicins¹³⁾

Nocardicin은 *Nocardia uniforms* subsp. *tsuyamaensis* ATCC 21806에 의해서 생산되며, 항생물질 활성은 β -lactam 고갈도 변이주를 이용하여 발견한 최초의 monocyclic β -lactam이다.

Table 6. Bioactive substances discovered in fermentation media containing various salts added at high concentrations.

Addition (%)	Antibiotics discovered
Phosphate salt (0.5-3.6)	Pyrrolnitrin, Herbicidin, FR-31564, FR-32863, FR-33289, FR-900130, FR-900148, Herbicolins, Malioxamycin, Carpetimycin, <i>epi</i> -Thienamycin, Candioplanecin, Cationomycin, 3-Demethoxy-3-ethoxy-tetracenomycin C, AT-265, 6643-X, FK-156, Demethoxyrapamycin, Mura-ceins, Penitricin, SN-7, Mitomycin analogs, Oxetanocin, PB-5266A, B & C
Ammonium salt (0.5-1.0)	Octapeptin D, Gilvocarcins, 4- <i>epi</i> -Cetocycline, AN-3, 8006-1, Safracins, Ancovenin, AN-7A, 7B & 7C, AN-1, 15B2, Phenacein, Monacolins A & J, Biphenomycins A & B, Dihydrofusarubins, Pereniporins A & B, Herbimycin B, Karabemycin
Magnesium salt (0.3-1.25)	A-60, Senacarcin A, Neocarzinostatin chromophore, Y-T0678 H, Chicamycin
Phosphate salt (0.5-3.6) plus magnesium salt (0.25-1.0)	Bicyclomycin, Nocardicin A, FR-900098, FR-900137, Echinospurin, Oxirapentyn
Phosphate salt (0.5-1.0) plus ammonium salt (0.5-1.0)	Valienamine, Fengycin, Amiclenomycin peptides

Sources: *Journal of Antibiotics* (Tokyo) (1975-1990); *Agricultural and Biological Chemistry* (1960-1988); *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1970-1988).

Table 7. New antibiotics found at Kitasato in screening using ammonium-depressed or phosphate-depressed fermentations.

Addition (%)	Nutritional limitation	New antibiotics	Producing microorganism
MgP ¹ (0.5)	NH ₄ ⁺	Nanaomycin αA, αB, αE	<i>Streptomyces</i> sp. OM-173
		Thiotetromycin	<i>Streptomyces</i> sp. OM-674
		Diazaquinomycin	<i>Streptomyces</i> sp. OM-704
		Globopeptin	<i>Streptomyces</i> sp. MA-23
MgC ² (0.5)	PO ₄ ³⁻	Triacsins	<i>Streptomyces</i> sp. SK-1894
		Ahpatinin	<i>Streptomyces</i> sp. WK-142
Allophane ³ (0.5%)	PO ₄ ³⁻	Jietacins	<i>Streptomyces</i> sp. KP-197
		Phthoxazolin	<i>Streptomyces</i> sp. OM-5714

¹MgP, Magnesium phosphate, Mg₃(PO₄)₂·8H₂O

²MgC, Magnesium carbonate, 4MgCO₃Mg(OH)₂·5H₂O

³Allophane, Alumino silicate, Al₂O₃SiO₂nH₂O(n=2-6), a noncrystalline clay.

발효는 고농도 인산염 배지 (glycerol 3%, cottonseed meal 2%, dried yeast cell 2%, potassium phosphate 2.18%, sodium phosphate dibasic 1.43%, magnesium chloride 0.5%)를 이용하여 30℃에서 4일간 배양하였다.

② Cationomycin¹⁴⁾

Polyether계 항생물질로 *Actinomadura azurea*에 의해 생산되며 Gram 양성 세균에 유효하고 항 coccidial 활성을 나타내며 Ca²⁺과 높은 친화력을 나타낸다.

발효는 glycerol 1.5%, oat meal 3%, dried yeast cell 0.5%, potassium phosphate 0.5%, sodium phosphate dibasic 0.5%, magnesium chloride 0.1% 배지를 이용하여 28℃에서 9일동안 배양한다.

3) 다른 염들을 고농도로 함유한 배지

Ammonium sulfate, ammonium phosphate, NaCl이나 magnesium sulfate를 고농도로 항생물질 발효 배지에 첨가하여 표 6에 나타낸바와 같이 새로운 항생물질을 얻었다. 항생물질 A-60¹⁰⁾은 2% 이상의 magnesium sulfate 존재하에서만 생산되나 이 염류가 어떤 기작에 의해 항생물질 생합성을 촉진시키지는 아직 명확하지 않다.

4) 암모니움이온과 인산염이 억제된 발효

Tanaka와 Omura 등⁵⁾은 항생물질 탐색을 위해 암모니움이온과 인산염을 포집하는 포집제를 이용하여 암모니움 이온과 인산염 이온이 억제된 발효를 개발하였다. 대부분 항생물질의 생산성은 magne-

sium phosphate나 allophane을 배지에 첨가하면 상당히 증가되기 때문에 포집제가 존재할때만 생산되는 항생물질이라면 새로운 화합물일지도 모른다는 가정하에 생리활성물질을 탐색하여 8종류의 새로운 화합물을 발견하였다 (표 7).

① Diazaquinomycin¹⁵⁾

Streptomyces sp. OM-704 균주가 생산하며 Gram 양성균에 효과가있고 thymidilate synthase를 저해한다. 이 항생물질은 천연물에서 발견된 최초의 항엽산(antifolate)제이다.

발효는 암모니움이온 포집제를 함유하고있는 배지 (glucose 0.5%, corn steep liquor 1%, oatmeal 1%, pharmamedia 1%, K₂HPO₄ 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.5%와 FeSO₄·7H₂O, MnCl₂·4H₂O, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, CoCl₂·2H₂O 각각 0.001%, pH 7.0)를 이용하였다.

② Triacsins¹⁶⁾

Streptomyces sp. SK-1894에 의해 생산되며 지방 대사를 저해하는 저해제 탐색에서 발견된 항생물질로 세균과 동물세포의 acyl-coA synthetase를 특이적으로 저해하고, 또한 단백질과 glycoconjugate의 acylation을 저해한다.

발효는 인산염 포집제로서 basic magnesium carbonate를 함유한 배지 (glucose 1%, soluble strach 1%, corn steep liquor 0.3%, oatmeal 1%, pharmamedia 1%, basic magnesium carbonate 0.5%)를 이용하여 27℃에서 60시간동안 행하였다.

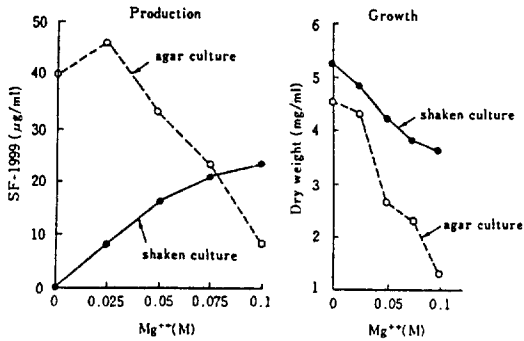


Fig. 1. Effect of Mg^{2+} on the antibiotic production and growth of *S. platensis* SF-1999.

분해되지 않고 잔존하여 한천배양으로부터 추출이 가능하였다고 보고하고 있다.

2) *Streptomyces platensis* SF-1999 균주의 항생물질 생산

한천배지에서 *S. platensis* SF-1999 균주가 생산하는 항생물질의 분리를 시도하였으나 생산량이 적고, 신규성을 규명하는데 필요한 충분한 양을 한천배양으로부터 추출하는 일이 곤란하여 각종 배지와 배양조건을 검토하고 변이주의 분리를 시도하였다. 배지농도를 2배로 농축한 결과 약간의 생산성이 나타나고, Mg^{2+} 의 첨가에 의해 생산성이 향상된 데다가 진탕배양에서도 생산성을 나타내는 변이주의 분리에도 성공하여 심부배양에서의 생산이 가능하게 되었다 (그림 1). 이 Mg^{2+} 의 첨가효과가 배양의 초기(24시간이내)에만 유효한 것으로부터 항생물질의 생산에 직접 작용하는 것이 아니라 오히려 생합성을 유도시키는 효과라 생각된다.

V. 결 론

일반적으로 미생물들은 여러 종류의 항생물질이나 생리활성물질을 생산하는 능력이 매우 높고 그 종류 또한 다양하며 복잡한 조절기작에 의해 항생물질의 생합성과 분해가 일어나고 있으나 상세한 조절기작은 아직도 잘 알려져 있지 않다.

미생물 탐색 프로그램시 이용된 발효조건들이 수많은 토양 미생물 가운데 몇몇 균주만의 생육에 유리한 조건이라면 이 미생물들도 그 자신의 항생물질을 생산하게 될 것이며 이것에 대한 몇몇 예도

이미 본문에서 언급하였다. 미생물과 검출방법이 확립되면 새로운 항생물질의 발견은 다양한 발효조건이 변수로 작용할지도 모른다.

한편 한천배양에서 명확한 항균활성을 나타내는 데도 불구하고 진탕배양시 항균활성을 나타내지 않는 이유는 단순하지 않고 다양하다고 생각된다. 한천배양으로는 대량 배양이 곤란하기 때문에 한천배양에서만 항생물질을 생산하는 균주도 충분히 검토하면 대량배양이 가능할 것으로 생각된다. 심부배양으로 생산을 검토하는 경우의 요점을 정리하면 ① 한천배양과 진탕배양과를 생육, 형태, pH 등에 대해 경과를 추적하고 비교하여 양자를 접근시키도록 노력하고 ② 한천과 한천내에 미량 함유된 각종 성분을 첨가하거나 ③ 배지농도의 검토를 행하고 ④ 고농도 Mg^{2+} 첨가 ⑤ 전배양의 검토 ⑥ 변이주의 분리등을 열거할 수 있다.

참고문헌

1. Berdy J. 1985. Screening, classification and identification of microbial products. In : Ver-rall M. S. (editors), Discovery and isolation of microbial products p.10-31, Ellis Horwood.
2. Omura, S. and Tanaka, Y. 1986. Macrolide antibiotics. In : Pape, H. and Rehm, H. J. (editors). Biotechnology-A Comprehensive Treatise in 8 Volumes, vol. 4, p.359-391, Verlag-chemic Weinheim.
3. Tanaka, Y., Taki, A., Masuma, R. and Omura, S. 1986. *J. of Antibiotics*, **39**, 813-821.
4. Behal, X., Gregrova-Prusakova, J. and Hostalek, Z. 1982. *Folia Microbiologica*, **27**, 102-106.
5. Tanaka, Y. and Omura, S. 1988. Regulation of biosynthesis of polyketide antibiotics. In : Okami, Y., Beppu, T. and Ogawara, H. (editors), Biology of Actinomycetes '88, p.418-423, Japan Science Society Press, Tokyo.
6. Masuma, R., Tanaka, Y. and Omura, S. 1983. *J. of Fermentation Technology* **61**, 607-614.
7. Masuma, R., Tanaka, Y., Tanaka, H. and Omura, S. 1986. *J. of Antibiotics*, **39**, 1557-1564.
8. Sawada, H., Suzuki, T., Akiyama, S. and Nakao, Y. 1990. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **32**, 556-559.

Table 8. Antibiotic production and mycelial type by wild and mutant of *S. halstedii* SF-1993 strain.

	Parent	Non-fragmented No. 101	Mutant No. 105	Fragmented No. 121	Mutant No. 175
GB medium					
Potency ($\mu\text{g/ml}$)	0	620	750	0	0
Mycelial Morphology	fragmented	filamentous		fragmented	
1/2 GB medium					
Potency ($\mu\text{g/ml}$)	380	400	440	0	0
Mycelial morphology	filamentous	filamentous		fragmented	

GB medium : glycerol 2.0%, polypepton 1.0%, meat extract 0.5%, CaCO_3 0.3%
Shaking : on a rotary shaker (220 rpm) at 28°C for 40 hours

IV. 한천배양에서만 항균성을 나타내는 방선균

자연계에서 분리한 미생물을 대상으로 항균활성을 조사해보면 한천배양에서 항균활성을 나타내는 균주라도 진탕배양하면 반드시 모든 균주가 항균활성을 나타내지 않는 것을 자주 경험하게 된다. 이러한 현상에 대해 많은 연구자들이 보고하고 있으나^{17,18)} 그 원인을 조사한 연구는 거의 없고 한천배양에서만 생산되는 항생물질을 분리한 예도 극히 적다.¹⁹⁾

莊村²⁰⁾에 의하면 토양으로부터 항균활성을 나타내는 분리균중 약 0.4%가 한천배양시에만 항균활성을 나타내고 진탕배양시에는 항균활성을 나타내지 않았으며, 이러한 균주들을 진탕배양시의 균사 형태에 따라 균사가 분단하는 균주(분단형)와 균사체가 분단하지 않는 균주(비분단형)로 크게 나누었다.

(1) 분단형 균주

한천배양에서만 항균성을 나타내는 방선균은 분단형이 많은 것이 특징으로 분단이라는 것은 처음에는 filamentous 하게 신장한 균사가 진탕배양시 분단하여 간균상 또는 구균상으로 되는것을 의미한다.

Streptomyces halstedii SF-1993 균주는 glycerol bouillon agar (GB agar)에서 Gram 음성균에 대해 항균성을 나타내나 진탕배양시에는 항균성을 나타내지 않는다.²¹⁾

SF-1993 균주를 한천배양과 진탕배양을 하여 비교한 결과 항생물질을 생산하지 않는 진탕배양에서는 균사가 분단하는데 비해 항생물질을 생산하는 한천배양에서는 균사의 분단이 일어나지 않고 filamentous 하였다. 이러한 결과는 균사의 형태에 따라 2차 대사산물이 상이하다는 것을 시사하고 있다. 균사의 분단이 일어나지 않도록 진탕배양을 하면 항생물질이 생산될것으로 생각하여 배지농도를 1/2로 희석하여 진탕배양한 결과 균사의 분단이 일어나지 않고 항생물질도 생산되었다. 또한 GB 배지에서 분단하지 않는 비분단 변이주와 역으로 1/2 GB 배지에서도 분단하는 변이주를 분리한 후 얻은 배양결과로부터도 균사형태와 항생물질 생산성 관계는 보다 명확하게 되었다 (표 8).

(2) 비분단형 균주

한천배양에서만 항균성을 나타내는 방선균 중에 비분단형 균사의 경우에는 진탕배양에서 항균활성을 나타내지 않는 이유가 서로 상이하다.

1) *Streptomyces kurssanovii*로부터 fumaramidmycin 생산²²⁾

Fumaramidmycin은 한천배양으로부터 추출정제된 최초의 항생물질로 Maruyama 등²²⁾은 fumaramidmycin은 진탕배양에서도 생산되나 분해효소에 의해 바로 분해되는데 비해 한천배양에서는 분해활성이 미약하고 더구나 생산된 fumaramidmycin이 한천배지중에 확산되어 균사와의 접촉이 적기때문에

9. Iwai, Y., Awaya, J., Kesado, T., Yamada, H., Omura, S. and Hata, T. 1973. *J. of Fermentation Technology*, **51**, 575-581.
10. Ogata, K., Osawa, H. and Tani, Y. 1977. *J. of Fermentation*, **55**, 285-289.
11. Arai, T., Yazawa, K. and Mikami, Y. 1976. *J. of Antibiotics*, **29**, 398-407.
12. Hotta, K., Saito, N. and Okami, Y. 1980. *J. of Antibiotics*, **33**, 1502-1509.
13. Aoki, H., Sakai, H., Kohsaka, M. et al. 1976. *J. of Antibiotics*, **29**, 492-500.
14. Nakamura, G., Kobayashi, K., Sakurai, T. and Isono, k. 1981. *J. of Antibiotics*, **34**, 1513-1514.
15. Omura, S., Iwai, Y., Hinotozawa, K., Tanaka, H., Takahashi, Y. and Nakagawa, A. 1982. *J. of Antibiotics*, **27**, 363-365.
16. Omura, S., Tomoda, H., Xu, Q. M., Takahashi, Y. and Iwai, Y. 1986. *J. of Antibiotics*, **39**, 1211-1218.
17. Emerson, R. L., Whiffen, A. J., Bohonos, N. and DeBoer, C. 1946. *J. of Bacteriology*, **52**, 357-366.
18. Rouatt, J. W., Lechevalier, M. and Waksman, S.A. 1951. *Antibiot. Chemother.*, **1**, 185-192.
19. McCann, P.A. and Pogell, B.M. 1979. *J. Antibiotics*, **32**, 673-678.
20. 莊村 喬, 1988, 日本放線菌 研究會 會報, **46**, 19-26.
21. Shomura, T., Yoshida, J., Amano, S., Kojina, M. Inouye, S. and Niida, T. 1979. *J. of Antibiotics*, **32**, 427-435.
22. Maruyama, H. B., Suhara, Y., Suzuki-Watanabe, J. et al. 1975. *J. of Antibiotics*, **28**, 636-647.
23. Shomura, T., Yoshida, J. Kondo, Y. et al. 1983. 明治製藥 研究年報, **22**, 1-8.