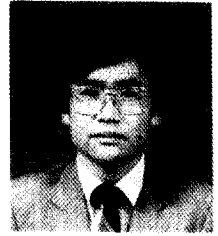


방선균을 이용한 항생물질 발효



영남대학교 약학대학 제약학과 남 두 현

1. 서 론

방선균은 그람 양성 박테리아로서, 진균류와 유사한 균사체와 포자를 형성하는 특성을 지닌 토양 미생물이다. 1944년 Selman A. Waksman이 *Streptomyces griseus*라는 토양 방선균으로부터 최초로 streptomycin을 발견한 이래, 항생물질 생산균주로서의 효용 가치가 인정되어 세계 유수의 제약회사와 연구소를 중심으로 새로운 항생물질을 생산하는 방선균의 선별과 동정이 꾸준히 계속되어와서, 현재까지 알려진 항생물질의 70%에 달하는 5,000 여종이 방선균에서 발견되었다(1). 이후 방선균을 이용하여 항생물질을 산업적으로 생산하기에 이르렀고 이에 따라 방선균에서 항생물질을 과량생산(overproduction)하기 위해 여러 생리학적, 생화학적, 유전학적 연구가 진행되어 왔으며, 한편으로는 발효 공정의 개선을 위한 많은 노력들이 경주되어왔다.

방선균에서 항생물질을 발효 생산하기 위해서는 이와 관련된 방선균의 생리학적 및 생화학적 특성을 고찰해 볼 필요가 있다. 우선, 항생물질은 방선균의 2차 대사산물으로써 이의 생산은 미생물의 성장과는 거의 연계되어 있지 않다. 즉, 방선균의 발효 과정을 살펴보면, 일반적으로 균체가 성장하는 증식 단계(trophophase)와 항생물질이 생산되는 발효 단계(idiophase)로 구분할 수 있다(2). 다시 말해서, 항생물질과 같은 2차 대사산물은 균체의 성장이 어느 정도 완료되어진 이후에 생합성되어지기 시작하며, 이는 방선균의 생활 주기상의 분화과정과도 밀접한

관계를 갖고 있는 것으로 알려져 있다.

또 하나의 특징은 한 종류의 방선균으로부터 유사한 화학적 골격을 지닌 여러 종의 항생물질들이 동시에 생산되어지는 경우가 많으며, 외부 환경에 따라 그 생산량이 크게 영향을 받는다는 사실이다. 따라서 방선균에서 목적하는 항생물질만을 과량생산하기 위해서는 배지의 조성을 비롯하여 pH, 발효온도, 통기, 진도 등 여러가지 발효 조건들을 잘 조절해 주어야 한다.

이러한 관점에서 방선균을 이용한 항생물질 발효에 있어서 그 생산량을 증대시키기 위해 고려해 주어야 할 사항들을 고찰해 보기로 한다.

2. 항생물질 발효 배지

항생물질과 같은 2차 대사산물들은 균체 성장기가 종료되면서 생합성되어지지만, 균체 성장 및 증식에 필요한 1차 대사산물을 중간원료로 하여 생산되어진다는 점에서 1차 대사산물의 생합성과 분리하여 생각할 수 없다. 즉, β -lactam계 항생물질은 아미노산으로부터, aminoglycoside계 항생물질은 당으로부터, 그리고 tetracycline, macrolide계 항생물질, pol-yene계 항생물질 등은 지방산 분해물로부터 합성되어진다(3, 4). 따라서, 항생물질의 생산량을 증대시키려면 미생물 성장뿐만 아니라 항생물질 생산에 모두 유리한 배지를 공급해 주어야 한다. 일반적으로 방선균 배양시 배지 성분이 항생물질 생산량에 미치는 영향으로는 다음과 같은 것들이 있다.

Table 1. Carbon catabolite repression in antibiotic biosynthesis.

Antibiotic	Producing Microorganism	Carbon Source	
		Inhibitory	Not Inhibitory
Cephameycin	<i>Str. clavuligerus</i>	Glycerol	Asparagine, Starch
Actinomycin	<i>Str. antibioticus</i>	Glucose	Galactose
Streptomycin	<i>Str. griseus</i>	Glucose	Mannan, L-Rhamnose
Siomycin	<i>Str. sioyaensis</i>	Glucose	Maltose
Indolmycin	<i>Str. griseus</i>	Glucose	Fructose
Chloramphenicol	<i>Str. venezuelae</i>	Glucose	Glycerol
Mitomycin	<i>Str. verticillatus</i>	Glucose	Glucose-feeding
Neomycin	<i>Str. fradiae</i>	Glucose	Maltose
Kanamycin	<i>Str. kanamyceticus</i>	Glucose	Galactose
Puromycin	<i>Str. alboniger</i>	Glucose	Glycerol
Novobiocin	<i>Str. niveus</i>	Citrate	Glucose
Candicidin	<i>Str. griseus</i>	Glucose	Glucose-feeding
Candihexin	<i>Str. viridoflavus</i>	Glucose	Glucose-feeding

① 탄소원의 종류

방선균의 배양시 포도당과 같이 비교적 이용하기 용이한 탄소원을 공급하면 균체의 성장은 다소 촉진되나 항생물질의 생산량은 격감하는 양상을 보이는데, 이를 carbon catabolite regulation 현상이라고 일컫는다(5-7). 이러한 현상은 대장균과 같은 다른 미생물에서도 잘 알려져 있는 것처럼, 포도당을 공급하면 이것의 대사가 먼저 일어나고, 포도당 대사가 거의 끝난 후 에너지가 고갈되면 cAMP가 축적되어 catabolite activating protein(CAP)과 결합하므로써 다른 탄소원을 이용하는 유전자의 발현을 유도하게 되는 유전자 조절 방식에 의해 이루어지는 것이다. 방선균에서는 아직 분자생물학적 수준에서의 이러한 유전자 조절 현상이 잘 밝혀져 있지 않으나, 항생물질 발효에서는 배지중의 포도당에 의해 그 생산이 저해되지므로 발효 배지에는 포도당 이외의 잘 활용하기 힘든 탄소원을 공급하여 주어야 한다. 다시 말해서 미생물 성장속도는 다소 감소하더라도, 포도당과 같은 탄소원에 의해 항생물질 생합성 유전자의 발현이 저해되는 것을 방지하여 유전자 발현 시기를 앞당기므로써 항생물질 생산량을 증대시킬 수 있다는 것이다. 현재까지 방선균에서의 항생물질 발효시 이러한 포도당 저해 현상을 피하기 위해 대체 탄소원을 공급하는 경우의 예는 Table 1에 요약하였다.

Table 2. Inhibition of antibiotic production by readily utilizable nitrogen sources.

Antibiotic	Producing Microorganism
Oleandomycin	<i>Str. antibioticus</i>
Erythromycin	<i>Str. erythreus</i>
Leucomycin	<i>Str. kitasatoensis</i>
Cephameycin	<i>Str. clavuligerus</i>
Novobiocin	<i>Str. niveus</i>
Candihexin	<i>Str. viridoflavus</i>

② 질소원의 종류

방선균에서 항생물질 발효시 탄소원뿐만 아니라 질소원의 경우에도 ammonium 염이나 질산염과 같이 이용하기 용이한 질소원에 의해서 항생물질 생산량이 감소하는 nitrogen catabolite regulation 현상을 관찰할 수 있다(6-8) (Table 2). 특히 고농도의 ammonium 염의 존재하에서 glutamine synthetase나 alanine dehydrogenase와 같은 아미노산 대사에 관련된 효소들의 생산이 억제되는 것으로 밝혀져 있다. 현재까지 알려진 바에 의하면 oleandomycin, erythromycin, leucomycin과 같은 macrolide계 항생물질과, cephamycin C, novobiocin 등 아미노산 유래 항생물질들은 ammonium 염과 같은 질소원이 거의 소모된 이후에 생합성되어지는 양상을 보이고 있다. 이러한 질소원의 항생물질 생합성

저해 현상을 방지하기 위해, macrolide계 항생물질의 생산에서는 불용성의 magnesium phosphate를 공급하여 ammonium 이온을 포획시키므로써 그 생산성을 증가시킬 수 있다(9). 또한 cephamycin과 같은 아미노산 유래 항생물질 발효에서는 proline, asparagine과 같은 아미노산을 대체 질소원으로 공급해주므로써 항생물질 생산성 향상을 도모할 수 있다(8).

③ 인산염의 농도

인산염은 생체내에서 에너지 부하(energy charge)를 조절해 주는 물질로써 항생물질 생산에 심대한 영향을 끼친다(6,7,10). 즉, 고농도의 인산염에서는 방선균의 성장은 촉진되나 항생물질 생산이 저해되어지고, 저농도의 경우에는 방선균이 잘 성장하지 못한다. 현재까지 인산염이 항생물질 생산에 영향을 미치는 양식으로 세 가지 가능성이 추정되어지고 있는데, 첫번째로 인산염의 고갈이 증식 단계(trophophase)로 부터 항생물질 생산 단계(idiophase)로의 대사 전환을 유도하게 된다는 사실로부터 고농도의 인산염에 의한 대사 전환의 저해를 들 수 있다. 두번째로 aminoglycoside계 항생물질의 경우 이의 생합성에 필요한 효소 phosphatase의 활성이 인산염의 농도가 높을 때 감소하는 것으로 알려져 있으며, 마지막으로 candidin 발효에서는 인산염(또는 ATP)이 repressor와 결합하여 항생물질 생합성 유전자의 발현을 억제한다는 사실도 입증되어졌다(11). 따라서, 방선균에서의 항생물질 발효에서는 Table 3에서와 같이 배지중의 인산염 농도를 잘 조절하여 주어야 한다.

④ 금속 이온

금속 이온은 생체내에서 효소의 cofactor로 이용되어지므로, 항생물질과 같은 2차 대사산물의 생합성에 관여하는 특정 효소의 활성에 필요한 금속 이온을 공급해 주므로써 항생물질 생산량 증대를 도모할 수 있다(9). 일반적으로 방선균에서의 항생물질 발효에서는 철(Fe) 이온이나 아연(Zn) 이온에 의해 항생물질 생산성이 증대되는 것으로 알려져 있다(12). 특히 *Micromonospora purpurea*에서 생산되는 gentamicin의 경우 코발트(Co) 이온을 공급해 주면 methylation 반응이 촉진되어 gentamicin C_{1a}와 C_{2b}의 생산량이 감소하는 대신 gentamicin C₁과 C₂의 생산량은 증가하게 된다.

Table 3. Inhibition of antibiotic biosynthesis by inorganic phosphate.

Antibiotic	Producing Microorganism	Optimal Pi Range (mM)
Streptomycin	<i>Str. griseus</i>	1.5 ~ 15
Kanamycin	<i>Str. kanamyceticus</i>	2.2 ~ 5.7
Amphotericin B	<i>Str. nodosus</i>	1.5 ~ 2.2
Candididin	<i>Str. griseus</i>	0.5 ~ 5.0
Chlortetracycline	<i>Str. aureofaciens</i>	1~5
Vancomycin	<i>Str. orientalis</i>	1~7
Actinomycin	<i>Str. antibioticus</i>	1.4 ~ 17
Tetracycline	<i>Str. aureofaciens</i>	0.14~0.2
Cycloheximide	<i>Str. griseus</i>	0.05~0.5

⑤ 효소저해제

방선균에서 1차 대사산물의 대사에 관련된 효소 저해제를 배지에 첨가하면 이러한 물질들이 항생물질 등 2차 대사산물의 원료로 활용되어지므로 그 생산량을 증가시킬 수 있다. 즉, streptomycin, kanamycin과 같은 aminoglycoside계 항생물질의 경우 세포벽 합성 저해제인 bacitracin을 공급해주면 균체내 aminosugar들이 이들 항생물질 생합성에 이용되어 항생물질 생산량이 증가하게 된다.

한편, 항생물질 생합성의 최종단계에 관여하는 효소의 저해제를 공급하므로써 생합성 중간체의 항생물질 생산도 시도할 수 있다(9). 예로써 methionine 유사체인 ethionine을 공급하여 methylation 반응을 저해하므로써 chlorotetracycline 발효균주인 *Str. aureofaciens*에서 demeclocycline(7-chloro-6-demethyl-tetracycline)의 생산을 유도할 수 있으며, *Str. lincolnensis*에 의한 lincomycin 발효에서도 ethionine을 첨가하여 N-demethylincomycin을 생산할 수 있다. 이외에도 macrolide계 항생물질의 발효 배지에 butyric acid을 첨가해 주면, 생합성의 마지막 단계인 O-acetylation 반응을 촉매하는 효소의 생산이 억제되어 acetyl화 되지 않은 항생물질이 주로 생산되어지는데, leucomycin 발효에서는 leucomycin A₃보다 항균력이 높은 leucomycin A₁이, spiramycin 발효에서는 spiramycin II보다 주로 spiramycin I이 생산되어지게 된다.

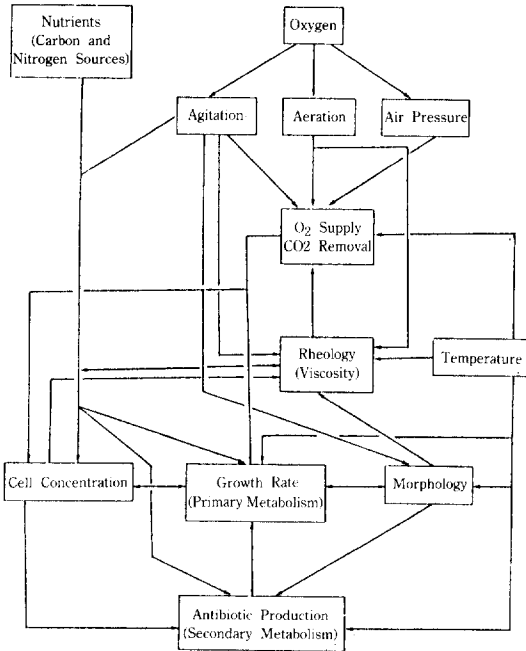


Fig. 1. Schematic diagram of the interplay between the organism and its environments.

3. 항생물질의 발효 공정

방선균에서의 항생물질 생산성을 제고하기 위해서는 배지중의 영양소 뿐만 아니라 방선균이 성장하는 여러 외부환경, 즉 pH, 배양온도, 통기정도, 교반속도, 점도 등을 고려하여야 한다. 이러한 발효 인자들은 Fig. 1에서와 같이 방선균의 성장과 밀접한 관계가 있으며, 이들 상호간에도 상관관계를 지니고 있다.

① 항생물질 발효에 미치는 인자들

배지의 pH는 방선균 성장과 항생물질 생산 모두에 영향을 미친다. 따라서 회분식 발효에서는 배지 내에 탄산칼슘(CaCO_3), 인산칼륨(K_2HPO_4), 중탄산나트륨(NaHCO_3) 등을 첨가하여 배지의 pH를 어느 정도 일정하게 유지해주면 항생물질 생산량을 증가시킬 수 있다.

방선균들은 대체적으로 30°C 내외에서 잘 성장하나 항생물질 생산에 적합한 배양온도는 이보다 낮은 25°C 내외로 알려져 있다. 따라서 방선균의 항생물질 발효에서는 미생물 성장단계와 항생물질 발효단계의 배양온도를 달리 조절하면 항생물질 생

산량 증대를 기대할 수 있다.

방선균은 호기성 박테리아이기 때문에 배지내로의 산소공급이 발효상 중요한 인자가 된다. 특히 방선균은 다른 박테리아에 비해 용존산소 양이 낮은 상태에서도 비교적 잘 자라지만, 단위 미생물당 산소흡입속도(oxygen uptake rate)는 상당히 높기 때문에 산소공급이 원활하지 못하면 산소 고갈에 의해 성장이 중단되어진다(13). 더구나, cephamycin C나 oxytetracycline과 같이 생합성 과정에 산화단계를 거치는 항생물질의 발효에서는 용존산소의 양이 적을 경우 이들의 생합성 중간체인 penicillin N이나 tetracycline 등이 주로 생산되고 목적하는 항생물질의 양은 감소하는 추세를 보인다(9). 따라서, 항생물질 생산량을 증가시키기 위해서는 발효 배지내로의 통기와 배양액의 교반을 통해 용존산소의 양이 최적 상태로 유지되도록 해주어야 한다. 그러나, 교반정도가 지나칠 때에는 방선균의 균사체가 과쇄되어져서 항생물질 생산량이 오히려 감소하는 경우도 있다.

방선균이 성장하면 일반적으로 배지의 점도가 높아지는 경향을 보이는데, 이러한 점도의 증가는 발효공정상 여러가지 어려움을 초래한다(14). 즉, 점도가 높아지면 열전달이나 물질전달이 잘 일어나지 않으며, 이에 따라 균체로의 산소전달도 어려워지게 되고, 나아가서 교반상 어려움으로 인한 동력소모도 증가하게 된다.

② 항생물질 발효 공정

미생물의 발효 공정은 표층발효(surface fermentation)와 액침발효(submerged fermentation)로 대별되어지는데, 항생물질 발효는 주로 액침발효에 의존하고 있다. 표층발효에 의한 항생물질 생산은 생산 단가가 저렴한 이점은 있으나, 배양상태를 일정하게 유지시켜 줄 수가 없기 때문에 균일한 성장상태를 확보할 수 없고 따라서 여러 종의 대사산물(항생물질)들이 동시에 생산되는 경우가 있다. 이에 반해 액침발효에서는 방선균의 외부 환경을 일정하게 유지하여 주는데 것이 가능하므로, 균일한 성장을 통하여 목적하는 항생물질의 생산을 증가시킬 수 있는 장점이 있다.

현재까지 항생물질 생산을 위한 액침발효법으로는 주로 회분식 발효법(batch fermentation)이 이용되고 있다. 이외에 앞에서 언급한 탄소원이나 질소원들에

의한 항생물질 생합성 저해를 받지 않도록 하기 위해 개발된 반회분식 발효법(fed-batch fermentation)도 널리 이용되고 있는 실정이다. 이 방법은 앞의 탄소원이나 질소원을 함유한 배지를 항생물질 발효과정에서 여러번 나누어 공급해주는 방식으로, penicillin 발효에 처음 적용된 후 방선균을 이용한 항생물질 발효에도 적용되어지고 있다. 특히 Table 1에서와 같이 포도당에 의해 항생물질 생산이 저해되어지는 경우, 반회분식 발효법에 의해 포도당을 공급해주면 이러한 저해 현상을 최소화시킬 수 있다.

한편 연속식 발효법(continuous fermentation)을 이용한 방선균으로부터의 항생물질 생산 공정 연구는 아직도 학문적 수준을 넘어서지 못하고 있는 것이 현실이다. 그러나, 많은 경우는 아니지만 cephamycin C, tylosin, candicidin과 같은 몇몇 항생물질 생산에서는 액침발효에서의 배지중 영양소에 의한 영향을 최소화시키고 나아가서 방선균의 성장을 조절해 주어야 하는 불편함을 없애기 위해, 방선균 균사체를 고정화시켜 항생물질 생산을 시도하려는 노력이 경주되고 있는데(15), 이 방법이 성공하면 항생물질 생산에도 연속 발효법이 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

4. 결 론

미국 Bristol 사의 자료에 따르면 항생물질 생산성의 증가는 3가지 방법으로 성취되었는데, 하나는 유전학적 방법에 따른 발효 균주의 개량(29.8%)이었고, 또 하나는 미생물 생리학적 조절에 따른 항생물질 과량생산 유도(32.2%)였으며, 나머지 하나는 생물공학적 기술 개발에 의한 반회분식과 같은 발효 공정 개량(38.0%)이라고 하였다(16). 이처럼 항생물질 발효에서의 미생물 생리 연구와 발효 공정 개발은 아주 중요한 위치를 차지하고 있다. 그러나, 항생물질 발효가 지난 50년간 미생물 산업을 이끌어 온 대표적인 미생물 발효 기술임에도 불구하고, 현재까지 연구되어온 많은 부분들이 제약회사들에 의해 노출되어지지 않고 있기 때문에, 이 분야의 발전에 상당한 장애 요인이 되어온 것도 사실이다. 이러한 문제점에도 불구하고, 항생물질 생산의 경제성을 향상시키기 위해 앞으로도 이 분야에서는 많은 발

전이 있을 것이고, 따라서 미생물 발효 기술의 발전에도 크게 기여할 것으로 믿어 의심치 않는다.

참고문헌

1. Berdy, J. 1985. Screening, classification, and identification of microbial products. In: *Discovery and isolation of microbial products* (ed. by M.S. Verrall) pp.9-31, Ellis Horwood Publisher, Chichester.
2. Rose, A.H. 1979. Production and industrial importance of secondary products of metabolism. In: *Secondary products of metabolism* (ed. by A.H. Rose) pp. 1-33, Academic Press, London.
3. Demain, A.L. 1972. Cellular and environmental factors affecting the synthesis and excretion of metabolites. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **22**: 345-362.
4. Drew, S.W. and A.L. Demain. 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**: 343-356.
5. Demain, A.L., Y.M. Kennel, and Y. Aharonowitz. 1979. Carbon catabolite regulation of secondary metabolism. In: *Microbial technology: current state, future prospects* (ed. by A.T. Bull, D.C. Ellwood, and C. Ratledge) pp.163-185, Cambridge University Press, Cambridge.
6. Martin, J.F. and A.L. Demain. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* **44**: 230-251.
7. Demain, A.L., Y. Aharonowitz, and J.F. Martin. 1983. Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. In: *Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics* (ed. by L.C. Vining), pp.49-72, Addison-Wesley Publishing, London.
8. Y. Aharonowitz. 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.* **34**: 209-233.
9. Iwai, Y. and S. Omura. 1982. Culture conditions for screening of new antibiotics. *J. Antibiot.* **35**: 123-141.
10. Martin, J.F. 1977. Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv. Biochem. Eng.* **6**: 105-127.

11. Martin, J.F. and P. Liras. 1989. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**: 173-206.
12. Weinberg, E.D. 1970. Biosynthesis of secondary metabolites: roles of trace metals. *Adv. Microbiol. Physiol.* **4**: 1-44.
13. Bushell, M.E. 1988. Growth, product formation and fermentation technology. In: *Actinomycetes in biotechnology* (ed. by M. Goodfellow, S.T. Williams, and M. Mordarski) pp.185-217, Academic Press, San Diego.
14. Küenzi, M.T. 1978. Process design and control in antibiotic fermentations. In: *Antibiotics and other secondary metabolites. biosynthesis and production* (ed. by R. Hütter, T. Leisinger, J. Nesch, and W. Wehrli) pp. 39-56, Academic Press, London.
15. Karube, I, S. Suzuki, and E.J. Vandamme. 1984. Antibiotic production with immobilized living cells. In: *Biotechnology of industrial antibiotics* (ed. by E.J. Vandamme), pp.761-780, Marcel Dekker, New York.
16. Nyiri, L.K. and M. Charles. 1977. Economic status of fermentation processes. *Ann. Reports Ferment. Processes* **1**: 365-381.