

*Streptomyces kasugaensis*의 Kasugamycin 생산배지조성 및 배양조건의 검토

오 영 준*

동신대학교 식품영양학과

Studies on the Optimization of Media Composition and Cultural Conditions for Kasugamycin Production by *Streptomyces kasugaensis*

Oh, Young-Jun

Department of Food Science and Nutrition, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

Abstract— This study was conducted in order to optimize the media composition and cultural conditions for kasugamycin production by *Streptomyces kasugaensis*. The optimum culture conditions are pH 6.6 (before sterilization) and 28°C for the production of kasugamycin. The kasugamycin concentration was not increased when silicone oil as antifoam agent was added. The addition of water during the cultivation in the various media showed a positive effect for the production of kasugamycin.

Kasugamycin은 벼 체내에 침투 이행하여 도열병균의 생육을 저지하는 작용이 있고 도열병균에 대하여 치료효과 뿐만 아니라 예방효과도 가지고 있으며, 이외에도 사탕수수, 오이, 감자, 당근, 사과, 배 등에 발생하는 각종 병해에 대한 치료효과도 있다. 또한 인축 및 물고기에 대한 독성은 낮으며, 벼에 대한 약해작용도 없다. 더우기 kasugamycin은 *Pseudomonas aeruginosa*가 일으키는 전염병 방지도에 사용되며, 가축 및 물고기가 섭취했을 때 24시간 내에 urine으로 거의 배설되기 때문에 가축이나 물고기 사료에 첨가하여 사용할 수도 있다(1, 3, 9).

따라서 본 연구에서는 농용 항생제로서 여러가지 잇점이 있는 kasugamycin을 효율적으로 생산하기 위한 배지조성, 배양조건 등을 관찰하였다.

재료 및 방법

균주

Key words: *Streptomyces kasugaensis*, kasugamycin, cultural conditions

*Corresponding author

Kasugamycin의 생산조건을 검토하기 위하여 본 실험에 사용한 균주는 *Streptomyces kasugaensis* IFO 13851이었으며, 피검균 *Pyricularia oryzae*는 농촌진흥청 농약연구소에서 분양받아 사용하였다.

배양배지

계대배양 및 spore를 분리하기 위하여 Bennet's medium을 사용하였으며, 본 배양배지는 지금까지 kasugamycin의 생산에 관해 보고된 배지(1, 6)를 사용하였다(Table 1). 최적 배지조성을 설정하기 위하여 Table 1의 기본배지에 여러가지 탄소원과 질소원을 첨가하여 배지 조성을 검토하였다. 피검균인 *Pyricularia oryzae*는 potato dextrose 및 potato dextrose agar를 사용하여 액체배양과 평판배양을 실시하였다.

배양방법

종균배양은 배지 120 ml를 분주한 500 ml 삼각 flask에 *Streptomyces kasugaensis* IFO 13851을 한 백금이 접종하여 28°C 에서 180 rpm으로 3일간 진탕 배양하였다. 삼각 flask를 이용한 본 배양은 3% 종 배양액을 접종하여 28°C, 초기 pH 6.0, 180 rpm에서

Table 1. Media Composition for cultivation of *S. kasugaensis* 13851

Medium for seed and flask culture	Maltose	15 g
	Soybean flour	15 g
	NaCl	3 g
	K ₂ HPO ₄	1 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
	Distilled water	1 l
Medium for fermentor culture	Soybean oil	50 g
	Soybean flour	60 g
	NaCl	3 g
	K ₂ HPO ₄	1 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
	Antiformer	0.5 g
	Distilled water	1 l

7일간 배양하였고, 발효조(B. Braun, Biostat E)에서의 배양은 발효조의 총용량 6.4l의 65~70%를 배지로 채운 뒤 멸균하여 배양온도 27°C, 초기 pH 6.5, 교반 속도 450 rpm, 통기량 1 vvm에서 7일간 배양하였다.

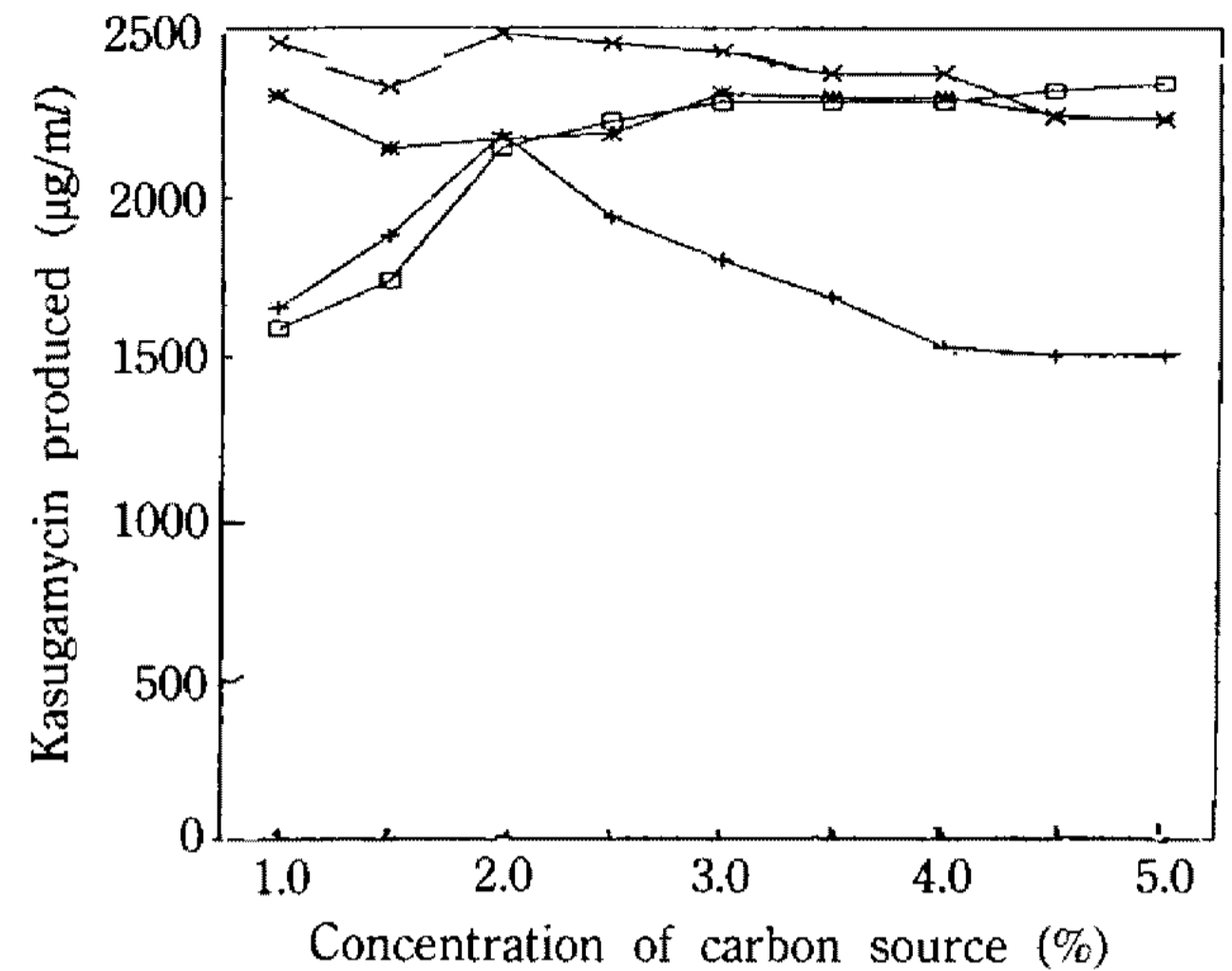
생물검정과 kasugamycin의 정량

Paper disc(φ8.0 mm, Toyo Seisakusho Co., Ltd.)에 배양액을 10 μl 가하여 건조한 다음 이를 피검균에 올려놓고 28°C에서 4~5일간 배양하여 형성된 저지원의 크기로서 kasugamycin의 생성량을 비교하였다. 한편 배양액내의 kasugamycin의 정량은 kasugamycin의 표준용액을 사용하여 피검균에 대한 표준곡선을 작성하고, kasugamycin의 정량시마다 표준용액과 배양액을 같은 조건으로 처리하여 함께 피검균 *Pyricularia oryzae*에 올려 놓고 나타나는 저지환의 크기를 통해 kasugamycin의 생산을 비교하였다.

Packed mycelium volume 및 건조균체량 측정법

Packed mycelium volume(PMV)는 일정량의 배양액을 취한 뒤 2,500 rpm(Beckman model, TJ-6)에서 20분간 원심분리하여 배양액 부피당 침전된 균체의 백분율로 나타내었다. 건조균체량(dried cell weight, DCW)은 배양액 10 ml를 취하여 PMV에서와 같이 원심분리하고 침전된 균체를 0.1 N HCl과 증류수로 세척한 뒤 Toyo filter paper로 여과한 후 37°C에서 24시간 동안 건조시켜 무게를 측정하였다.

결과 및 고찰

**Fig. 1. The effect of carbon source on the production of kasugamycin.**

—+— glucose, —×— soybean oil, —*— corn starch, —□— maltose.

탄소원의 영향

Glucose, maltose, corn starch, soybean oil를 배지에 1.5~5.0%가 되게 가한 다음 flask 배양한 결과 corn starch를 첨가한 경우에는 전분의 농도에 따라 kasugamycin의 생산량이 증가하였으나, glucose를 가한 경우에는 2.0% 이상의 농도에서 kasugamycin의 생성이 저해되는 glucose effect를 나타내었다(Fig. 1). 포도당에 의해 항생물질의 생합성이 억제되는 메커니즘은 아직 유전자 차원에서 밝혀지지 못하고 있지만, 현재 포도당에 의하여 생성의 억제되는 효소들이 일부 생산균주에서 밝혀지고 있다(4, 8). 배양액에 포도당이 고갈되면서 포도당에 의한 항생물질의 생합성 억제가 풀리면서 생합성 관련 유전자가 활성화되어 항생물질의 생합성이 활성화된다고 가정할 수 있다. Corn starch를 가했을 때는 농도의 증가에 따라 생산성의 증가를 보였다. Soybean oil의 물리화학적 성질 및 본 실험결과로 보아 생산용 배지의 탄소원으로 사용이 바람직하다고 생각되었다.

질소원의 영향

Yeast extract, corn gluten meal, soybean flour, Bacto soytone, casein, tryptone, casamino acid, Bacto peptone, ammonium sulfate 등의 질소원을 2%되게 flask 배양용 배지에 첨가하여 배양한 결과 *Streptomyces kasugaensis* IFO 13851으로부터의 kasugamycin 생산에는 soybean flour가 가장 좋은 결과를 나타내었다(Table 2).

배양온도와 pH의 영향

Streptomyces kasugaensis IFO 13851로부터의 kasugamycin 생산에 대한 온도의 영향을 검토한 결과 28°C가 최적온도이었으며(Fig. 2), kasugamycin의 생산에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과 Fig. 3에서와 같이 pH 6.3~6.6 사이에서 최대의 생산을 나타내었다.

전배양 접종시기의 영향

전배양시간의 kasugamycin 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 500 ml 삼각 flask에 Table 1의 종 배양배지 120 ml을 분주, 살균하고 *Streptomyces kasugaensis* IFO 13851를 한백금이 접종하고 이 배양액 3%을 동일배지에 접종한 후 배양한 결과 Table 3에서와 같이 64시간의 전배양액을 접종하였을 때 kasugamycin 역가가 최고에 달했으며 이후 역가는 감소하는 경향을 보였다. 지금까지 알려진 사실에서 미루어 보면 항생물질의 생합성과 균주의 생장은 서로

Table 2. The effect of nitrogen source on the production of kasugamycin

Nitrogen source (%, w/v)	Kasugamycin produced (µg/ml)
Yeast extract	1,321
Corn gluten	2,595
Soybeen flour	3,473
Bacto soytone	1,984
Casein	1,587
Tryptone	2,803
Casamino acid	2,902
Bacto peptone	1,587
Ammonium sulfate	2,756

상반된 특성인 것으로 생각되는 경우가 많았다(11). *Streptomyces kasugaensis* IFO 13851 생장은 초기의

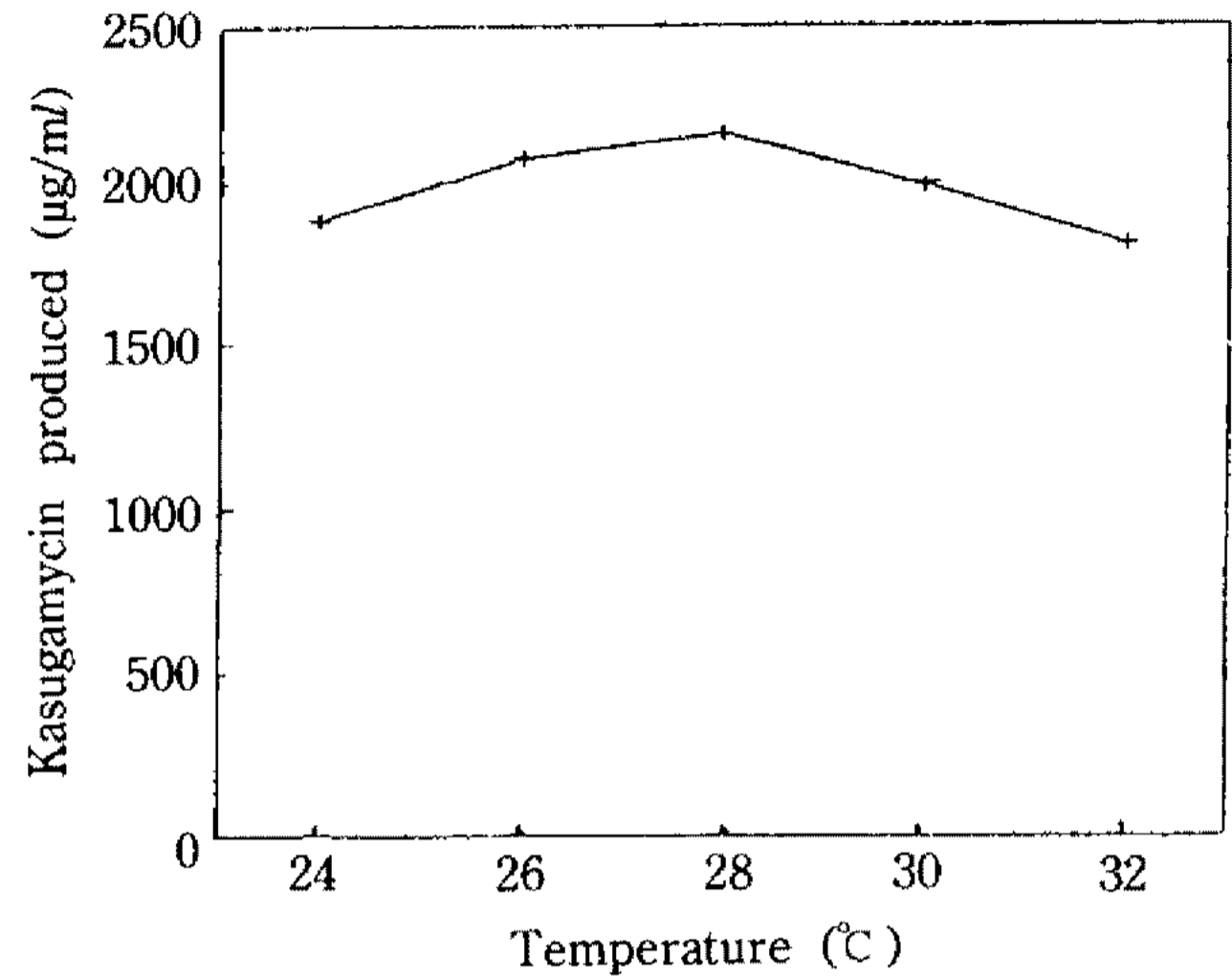


Fig. 2. The effect of incubation temperature on the production of kasugamycin.

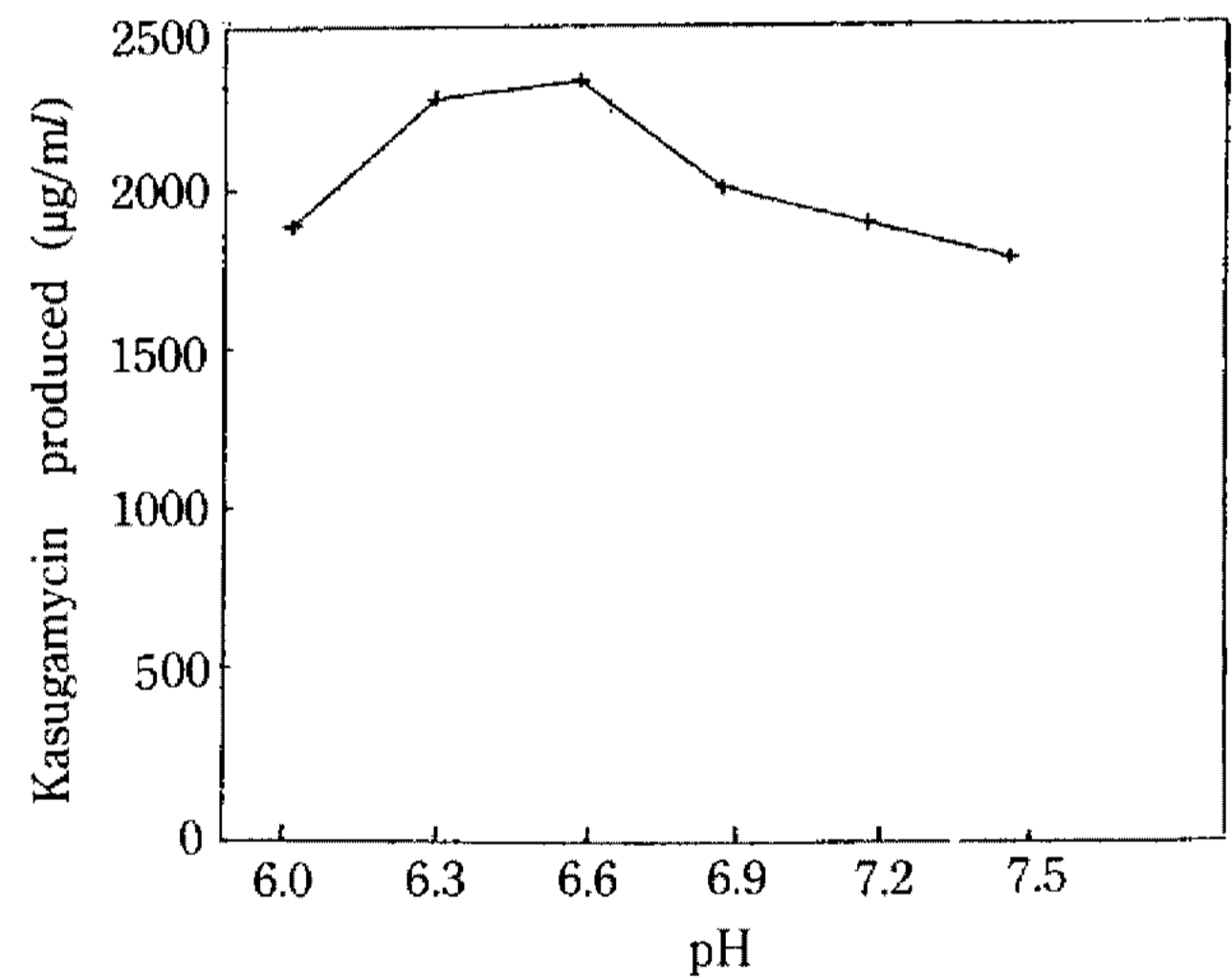


Fig. 3. The effect of initial pH on the production of kasugamycin.

Table 3. The effect of inoculum time of preculture on the production of kasugamycin

Condition at inoculum				After 7 days cultivation		
Time	pH	PMV (%)	DCW (mg/ml)	pH	PMV (%)	Kasugamycin produced (µg/ml)
24	6.57	6.6	6.8	7.61	7.0	4.52
42	7.11	9.5	7.2	7.82	7.7	1,086
48	7.11	8.2	9.0	8.08	7.8	1,245
64	7.21	10.5	8.8	6.81	11.1	2,150
68	7.24	10.5	8.7	6.72	—	1,991
72	7.22	10.2	9.3	6.86	12.6	1,585
90	7.11	11.4	8.9	7.07	8.9	1,229

Table 4. The effect of antiformer (silicone oil) on the production of kasugamycin

Concentration of antiformer (%)	Kasugamycin produced ($\mu\text{g/ml}$)
0	2,481
0.01	2,369
0.025	2,315
0.05	2,580
0.075	2,505
0.1	2,315
0.25	2,580
0.5	2,530

유도기 및 대수 증식기를 지나 약 3일 후부터 휴지기에 달하고 이때부터 kasugamycin이 낮은 양으로 관찰되기 시작하는데, 이러한 생산균주의 특성으로 보아 전 배양시기의 조절은 kasugamycin의 역가를 증가시키는데 상당한 영향을 줄 수 있다는 것을 관찰할 수 있었다.

소포제의 영향

대부분의 호기성 미생물발효에 있어서 거품은 중요한 문제이다. 거품이 많이 생길 경우 배양액 중의 균체에 산소전달에 있어서 영향을 미치게 되며, 이에 대한 균성장 및 최종산물수율에 큰 영향을 가져오게 된다. 본 실험에서는 silicone oil의 농도에 대한 영향을 검토하기 위하여 fermentor에서 Table 1의 fermentor용 배지를 채운 후에 silicone oil을 0.1~0.5% 농도로 되게 첨가하여 kasugamycin의 역가를 측정 비교하였다(Table 4). Silicone oil의 농도가 0.05 및 0.25%(v/v)일 때 최고의 생산성을 나타냈으나 소포제가 kasugamycin 생산에 미치는 일률적인 영향은 관찰할 수가 없었다. 따라서 일정농도까지의 silicon oil은 kasugamycin 생산에는 유의적인 영향을 미치지 않은 것으로 생각된다. 이러한 원인은 배지 중에 포함된 soybean oil이 배양 중의 거품의 생성을 억제하는 효과도 있는 것으로 추정되었다.

배양액 중의 물첨가가 kasugamycin 생산에 미치는 영향

Kasugamycin의 생산성을 증가시키기 위하여 배양 조건 및 배지의 최적화 연구와 아울러 배양중에 물을 첨가하여 발효조건을 개선하려는 보고가 있다(6). 본 실험에서도 그 효과를 비교 검토하기 위하여 발효조

에서 탄소원 및 질소원의 농도를 달리한 Table 1의 fermentor용 배지에 3% 종배양액을 접종하여 배양하면서 배양 1, 2 및 3일 후에 물을 첨가하였다. 첨가한 물의 양은 배지 전체 부피의 1/5였으며, 그 실험결과를 비교하여 보면 5%의 탄소원 및 질소원 첨가 배지에서는 그 효과를 관찰할 수 없었으나 7%와 9% 농도에서는 생산성 증가효과가 관찰되었다.

요 약

본 연구는 농용항생제인 kasugamycin의 생산을 위하여 *S. kasugaensis*의 배양조건 및 배지조성을 고찰하였다. Kasugamycin 발효시 최적 탄소원 및 질소원은 각각 soybean oil과 soybean flour였다. 배지 최적온도 28°C, 최적 pH는 6.6이었다.

본 배양의 최적 접종 상태는 64~68시간 배양한 전배양액으로 접종하였을 때였으며, 발효중 물의 첨가는 생산성의 증가를 나타냈으나 소포제로서 silicone oil 첨가는 별 영향을 관찰할 수가 없었다.

참고문헌

1. Umezawa, H., Y. Okami, T. Hashimoto, K. Suhara, M., Hamada, and T. Takeuchi. 1965. A new antibiotic, kasugamycin. *J. Antibiot.* **18**: 101-103.
2. Fuka, J., B. Proska, and M. Sturdikova. 1989. Regulation of biosynthesis of metabolites in *Streptomyces kasugaensis* kasugamycin. *Folia Microbiol.* **34**: 418-420.
3. Agency-Ind. Sci. 1986. Production of phytopathogenic fungal spores inhibiting agent. Japan. Patent 61289005.
4. Akgawa, H., Y. Takano, and K. Kawaguchi. 1987. Characterization of a natural cointegrate of the pock-forming plasmids pSK1-star and pSK2-star of *Streptomyces kasugaensis* MB273. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1941-1949.
5. Hokko Chem. Ind. Co. 1982. Soil disinfectant containing kasugamycin. Japan. Patent 57206602.
6. Hokko Chem. Ind. Co. 1984. High yield kasugamycin preparation. Japan. Patent 58170494.
7. Shirling, E.B., and D. Gottlieb. 1960. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. *Intern. J. Syst. Bact.* **16**: 313-340.
8. Hirasawa, K., M. Ichihara, and M. Okanishi. 1985. Nucleotide sequence of *Mec*⁺ gene region of *Streptomyces kasugaensis*. *J. Antibiot.* **38**: 1795-1798.

9. Perez, F.J. 1987. Trials with kasugamycin in post-harvest control of *Penicillium expansum* in apples. *Alimentaria*. **162**: 71-76.
10. Reiblein, W.J., P.D. Watkin and G.H. Wagman. 1973. Binding of gentamycin and aminoglycoside antibiotics to mycelium of various Actinomycetes. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **4**: 602-606.
11. Kim, K.H., Y.M. Goo, H.S. Hwang, Y.A. Joe and H.Y. Cho. 1991. Examination of metabolite activating production of antibiotic in the neomycin producer, *S. fradiae*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **6**: 69-77.
12. Karanagh, F. 1975. Antibiotic assays. Pp. 53-56. *In Methods of Enzymology*. Vol. 43. Academic Press, New York.

(Received January 6, 1992)