

## 항진균물질 KRF-001의 고생산성 변이주 분리

이 항우·김무경·김성욱·손광희·복성해  
한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소

### Selection of High Yielding Mutant Strains for the Antifungal Antibiotics KRF-001

Hang-Woo Lee, Moo-Kyung Kim, Sung-Uk Kim, Kwang-Hee Son and Song-Hae Bok  
Genetic Engineering Research Institute, KIST Yusung P. O. Box 115, Taejon 305-600, Korea

#### ABSTRACT

An improved method for the selective isolation of high-yielding mutant strains for the production of antifungal antibiotic KRF-001 was investigated. The mutant strain U. V 4, which produces high titer of KRF-001, was selected on the high potency agar plate after ultraviolet light irradiation. The U. V 4 strain produced 2-fold more KRF-001 than the mother strain in production media. Large scale fermentation was performed using the U. V 4 strain in 100ℓ fermenter. The antifungal antibiotic KRF-001 secreted into culture broth was detected by HPLC in 24hrs of fermentation.

#### 서 론

토양에서 분리된 약 5,200종의 균주중에서 항진균 물질 KRF-001을 생산하는 *Bacillus subtilis subsp krichtiensis* ATCC 55079를 선별하였다(1). 이 균주가 생산하는 KRF-001은 각종 진균중에 광범위한 항균력을 나타내며, 피부자극성시험과 급성경구독성 시험을 통해 의약품 원제로서 활용방안 및 다양한 생물학적 연구가 수행되어 왔다(2). 발효에 의한 항생제의 산업화를 위해서는 배지조성의 최적화, 정제 기술의 간편화, 그리고 균주 개량이 시도되어야 하며 그 중 고생산성 균주의 개발은 생산단가를 낮추는데 있어 중요한 요인이다. 본 연구에서는 KRF-001복합체의 생산수율 증가를 위한 최적화 실험 및 우수균종의 개발을 위한 돌연변이 실험(3)을 토대로, 산업화에 적용가능한 우수한 균종을 개발하고 대량배양용 생산배지를 바탕으로 100ℓ까지 scale up한 결과를 보고하고자 한다.

#### 실험 재료 및 방법

##### 생산균주

본 실험에 사용된 생산균주는 *Bacillus subtilis subsp. krichtiensis* ATCC 55079였다.

##### KRF-001의 정성 및 정량검출

피검균 *Pyricularia oryzae*를 이용한 agar diffusion assay방법(3)과 chemical assay법을 혼용하였다. Chemical assay법은 먼저 순수 KRF-001을 75% methanol에 녹여 농도를 200, 400, 600, 800, 1000ppm으로 한 후, 분석용 HPLC (Ultracarb 50DS (30), 4.6ID×150mm, Phenomenex)에 10 μm씩 injection하여 (유속:0.5ml/min, UV: 225nm) 40분간 용출한 후 나온 KRF-001 각 분획의 크로마토그램에 대한표준곡선을 만들었다. 발효액 중의 유효 항진균 활성부위만을 추출하기 위하여 Waters사

의 C<sub>18</sub>과 silica gel의 SEP-PAK cartridge를 이용하여 초기정제한 후, 필터(Millipore, 0.45um)로 여과하여 불순물을 제거한 다음 분석용 HPLC에 적용하여 HPLC 크로마토그램으로 KRF-001의 정성 및 정량분석이 가능하였다.

### 종균배양

생산균을 LBG배지(tryptone 1.0%, yeast extract 0.5%, NaCl 1.0%, glucose 1.0%, W/V)에서 배양하여 대수 증식기 후기에 무균조작으로 균체를 회수하여 새로 준비된 LB 배지와 최종농도 20%의 glycerol과 섞어 (A<sub>550</sub>=10.0) 1ml씩 냉동 vial에 분주하여 -80°C에 보관하여 working stock으로 사용하였다. 100ml의 LB배지가 채워진 1ℓ 용량의 flask (Bellco사 제품, bottom baffled)에 vial 하나를 접종하여 8시간 동안 30°C에서 200rpm으로 진탕배양하였다.

### 발효

시험용 배지의 기본조성은 배지 1ℓ 당 dextrose 10g, soybean meal 20g, MnCl<sub>2</sub> 5mg, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 50mg의 복합배지(3)를 사용하였으며, 돌연변이주의 생산용배지는 1ℓ 당 sucrose 30g, soybean meal 20g, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 5mg, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 50mg의 복합배지를 사용하였다. 발효는 1ℓ 혹은 500ml 용량의 baffled flask와 14ℓ 용량의 Marubishi MJ-N type 및 총 용량 100ℓ의 국산 KFC-100 (Top drive방식, 한국발효기)의 발효조를 사용하였다. 배양액 부피의 2~5% 종균액을 접종한 후 pH 7.0, 30°C, 200~400rpm 및 통기량 0.5~1.0vvm에서 배양하였다. 발효 도중 pH는 조절하지 않았으며 silicon 계열 (silicon 30%, 고려인삼화학)의 소포제를 사용하였다.

### 산성 침전물 회수

손등의 보고(3)와 같이 균체에는 측정 가능한 유효성분이 없었으며 발효여액 중에 모든 항진균활성 성분이 존재하므로 isoelectric precipitation법(4)을 이용하여 KRF-001의 유효성분을 농축회수하였다.

### 환원당의 측정

발효 중 배양액 내의 잔당 및 총당은 Miller 등(5)의 방법에 준하여 glucose를 standard로 하는 DNS법으로 측정하였다.

### 균체수의 측정

발효진행 중 배양액 내의 균체수는 PDA(Potato Dextrose Agar)plate에 적절히 희석한 배양액을 도말하여, 12~16시간 배양한 후에 생성된 colony 수를 측정하였다.

### 돌연변이에 의한 우수균주 개발

#### 자외선에 의한 돌연변이

5mM caffeine, 0.1M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.03% Tween 80이 함유된 균액 (A<sub>550</sub>=0.4) 4ml를 유리 petri dish(직경 10cm)에 부어 20cm의 거리에서 2개의 자외선 lamp (10Watt)로 90초간 처리하였다.

#### 돌연변이 균주 선발

우수 돌연변이 균주선발은 *Trichophyton mentagrophytes* 피검균의 bioassay plate를 이용하였다. 항진균물질의 생산성이 낮은 돌연변이 균주의 저해환 형성을 가능한 억제하고, 고생산성 변이주만 저해환을 형성하게 하기위해 본 실험실에서 사용한 bioassay plate는 기존 농도 피검균 plate(A<sub>550</sub>=1.5)보다 2배 (A<sub>550</sub>=3)의 농도로 조제하고, 전 배양된 (30°C, 12hr) 평판배지를 사용하였다. 자외선 처리된 돌연변이주를 새로 준비된 LB배지에 옮겨 30°C에서 하룻동안 정치하여 segregation한 다음 준비된 피검균 plate에 모균주와 돌연변이주를 각각 도말하여 모균주보다 저해환이 크고 생육이 우수한 균주를 1차 선발하였다.

한편 1차에서 선발된 균을 시험용 배지를 이용하여 각각 24시간 및 48시간 배양하고 발효여액을 121°C에서 5분간 살균한 뒤, *Candida albicans* ATCC10231와 *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533의 평판배지에서 bioassay하여 나온 저해환의 크기를 서로 비교하고 반복적인 실험을 통해 저해환의 크기가 안정적이고 20mm 이상인 우수 돌연변이 균주를 재선별하였다.

### 탄소원의 영향

시험용 복합배지를 기본으로 하여 8종류의 탄소원 (dextrose, glycerol, lactose, mannitol, xylose, sucrose, soluble starch, potato starch)을 각각 1, 2, 3%씩 10종의 질소원 (Casitone, fish meal, NZ-amine, pharmedia, polypeptone, soybean meal, soyflour, soytone, tryptone, yeast extract)을 각각 0.5, 1, 2% 첨가하여 KRF-001 생산에 미치는 탄소원과 질소원의 영향을 조사하였다.

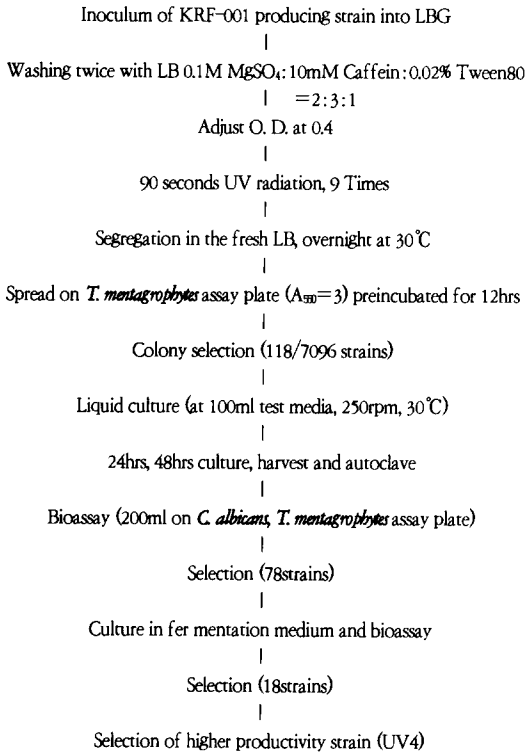


Fig 1. Mutation procedures of *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* ATCC 55079.

## 결과 및 고찰

### 변이균주 개발

KRF-001의 생산성 증대를 목적으로 하는 변이주 선별은 UV를 이용하여 돌연변이를 유발시킨 후, 모균주보다 생산성이 높은 균주를 선택하였다. 사용된 bioassay plate는 미리 전 배양하여 *Bacillus*류의 변이주와 피검균의 생육속도 차이에 따른 균주선발 저해요인을 제거하였다. 8회의 자외선조사 결과, 모균주는 피검균에 대해 저해환을 나타내지 않거나 매우 작았다. 피검균에 대해 저해환을 나타낸 7,096돌연변이주 중에서 생육이 뛰어나거나 큰 저해환을 가진 균주 118종을 선발하였다. 선발된 118종의 균주에 대해서 시험용배지를 이용하여 24시간 및 48시간 배양하여 다시 18종의 고생산성균주를 선발하였다. 이들 18종의 균주를 생산용 배지에 다시 배양하여, 그 중 가장 생산성이 뛰어난 UV4균주를 선별(Fig. 1)하였으며, UV4를 대상으로 KRF-001 대량생산에 이용될 탄소원 및 질소원 실험을 행하였다.

### 변이균주에 대한 탄소원 및 질소원의 효과

시험용 복합배지를 기본으로 8종의 탄소원과 10종의 질소원에 대해 48시간 진탕배양을 하여 시험용배지에서의 bioactivity를 기준으로 상대적인 활성을 백분율로 표시 하였다(Table 1). 대개의 발효 2차대사 산물은 당당류를 비롯한 이용하기 쉬운 탄소원에 의해 억제를 받지만(7) UV4 균주의 경우, KRF-001 생산능은 비교실험에 있어서 8종의 각종 탄소원에 대해 비교적 고른 bioactivity를 나타내고, 3% lactose, 3% maltose, 3% sucrose가 가장 높은 bioactivity를 나타냈으나, 그중 생산가를 낮출 수 있는 sucrose를 선택하였다. 한편 10종의 질소원은 3% sucrose가 탄소원으로서 기본배지에 함유된 상태에서 실험되었다. 사용된 10종의 질소원은 대두종류를 제외하면 비교적 생산 저해현상이 나타났으며 polypeptone과 tryptone에서 특히 심한 저해현상을 보였다. 따라서 UV4의 생산배지로는 sucrose 3%, soybean meal 2%,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  5mg/l,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  50mg/l 를 적용하였다(Table 2).

### KRF-001의 정성 정량분석

발효진행에 따른 생리활성물질의 역가검정은 기존의 bioassay와 TLC로서도 가능하지만 TLC에서는 KRF-001과 TLC상의 특성이 유사하여 아주 근접한 Rf 값을 가지는 미지의 물질이 발효액에 상존해 있어 발색반응시 생산된 KRF-001의 명확한 구별이 어렵고, 또한 bioassay에서는 피검균이 자라는데 시간이 걸리므로 (최소 24시간) harvest 시기 (KRF-001이 최대량으로 존재하는 시간)를 결정하는데 많은 어려움이 따른다. 따라서 기본리된 순수 KRF-001로 분석했을 때 각 분획의 retention time과 활성분획 peak의 모양(Fig. 2)으로 정성분석이 가능하였고, 확인된 KRF-001 분획의 크로마토그램의 면적을 각 농도에 plotting하여 얻어진 표준곡선(Fig. 3-2)을 이용하여 발효액의 정확한 정성, 정량 분석을 시도하였다. 시간별 발효액을 각 5ml씩 취하여  $C_{18}$ 과 Silica gel의 SEP-PAK cartridge(Waters)를 이용하여 크로마토그래피하였으며, filter (Millipore, 0.45  $\mu m$  재질; PVDF)로 여과하여 불순물을 제거한 다음, 분석용 HPLC에 적용하였다. 발효액의 HPLC상 크로마토그램과 retention time으로서 KRF-001의 정성분석이 가능하고 또한 면적을 표준곡선에 plotting하여 KRF-001의 정량분석을 할 수 있었다. 또한, KRF-001의 각 농도를 피검균에 대해서 agar diffusion method에 의해 나타난

**Table 1. Relative comparison of carbon and nitrogen sources for the KRF-001 bioactivity in shake flask culture.**

**(a) Carbon sources**

Carbon Sources	Concentration (% W/W)	Bioactivity(%)
Dextrose	1	100
	2	115
	3	115
Lactose	1	105
	2	115
	3	120
Maltose	1	110
	2	120
	3	125
Sucrose	1	115
	2	115
	3	125
Mannitol	1	115
	2	115
	3	115
Corn starch	1	110
	2	110
	3	105
Soluble starch	1	110
	2	110
	3	110
Glycerol <sup>1)</sup> (V/W)	1	115
	2	115
	3	115

<sup>1)</sup> Liquid formulated sources.

\* Concentration was determined on the basis of carbon equivalent.

**(b) Nitrogen sources**

Nitrogen Sources	Concentration(% W/W)	Bioactivity (%)
Casitone	0.5	76
	1	80
	2	72
Fishmeal	0.5	40
	1	48
	2	72
NZ-Amine	0.5	28
	1	28
	2	42
Pharmamedia	0.5	72
	1	72
	2	80
Polypeptone	0.5	56
	1	52
	2	56
Soybean meal	0.5	72
	1	88
	2	100
Soyflour	0.5	80
	1	80
	2	96
Soytone	0.5	72
	1	96
	2	100
Tryptone	0.5	60
	1	64
	2	68
Yeast extracts	0.5	84
	1	84
	2	80

\* Concentration was determined on the base of nitrogen equivalent.

**Table 2. Composition of culture media.**

Stock Vial	Inoculum	Production
Tryptone 1.0%	Tryptone 1.0%	Soy bean meal 2.0%
Yeast ext. 0.5%	Yeast ext. 0.5%	Sucrose 3.0%
NaCl 1.0%	Glucose 1.0%	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O 5mg/ℓ
	NaCl 1.0%	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 50mg/ℓ
	Antifoam 0.1%	Antifoam 0.1%
pH 6.8-7.0	pH 6.8-7.0	pH 6.5-7.0

저해환을 각 농도에 대해서 plotting하여 얻어진 표준곡선(Fig. 3-1)을 이용하여 시간별 발효액의 KRF-001 농도도 측정하였다. *T. mentagrophytes*에

대한 bioassay 결과 얻어진 배양시간별 발효액의 KRF-001 농도와 HPLC를 이용한 시간별 농도 비교는 Table 3에서 보는 것처럼 bioassay에서는 15hr, 18hr의 발효액은 plate상에서는 bioactivity를 보여 주고 있으나 각각의 피검균에서 만들어진 표준곡선에서는 200ppm 이하의 KRF-001의 농도를 명확히 규정할 수가 없었다. 그리고, 약 700ppm에서부터는 KRF-001의 항진균활성이 포화상태에 이르러 그

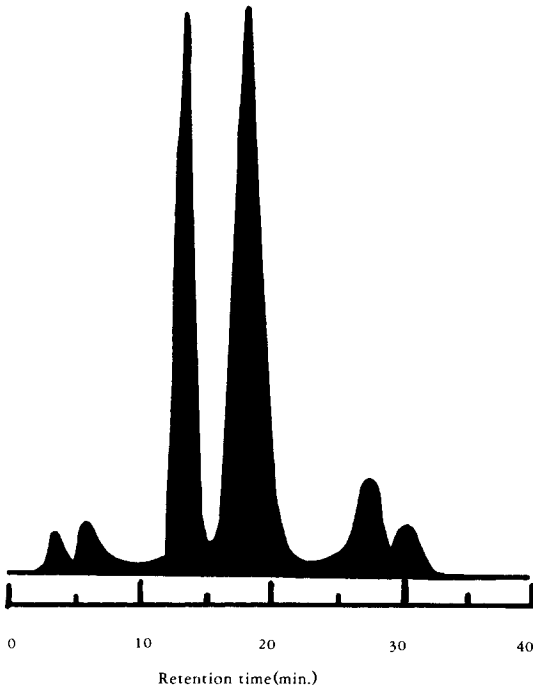


Fig 2. Elution profiles of KRF-001 on analytical HPLC.

이상의 농도를 측정할 수가 없었다. 반면 Fig. 3-2에서 보는 바와 같이 HPLC를 이용한 chemical assay법에서는 각 농도에 대해서 크로마토그램의 면적이 거의 비례하여 정확한 KRF-001의 양을 측정할 수 있었다. 이러한 점들과 시간상의 이득 때문에 HPLC를 이용한 KRF-001의 정량, 정성분석이 더 적합한 방법이라고 생각된다. 또한 지금까지 본 연구실에서 행하던 분리정제공정에서 chemical assay법을 KRF-001의 분리정제공정에 응용할 수 있으리라 사료된다.

변이균주에 의한 KRF-001의 발효 진행도

UV조사를 통해 모균주로부터 얻어진 변이주 UV4를 이용하여 발효를 실시하였다. 발효는 14ℓ와 100ℓ 용량의 발효조에서 working volume 8ℓ, 60ℓ로 배양하였다. 예비실험(탄소원 및 질소원 시험)을 통하여 결정된 생산배지 (sucrose 3%, soybean meal 2%, MnCl<sub>2</sub>; 5mg/ℓ, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 50mg/ℓ)를 사용하였으며, working volume 8ℓ의 경우(Fig. 4) 30℃, pH 7.0, 400rpm, 공기공급 1vvm 발효조건에서 36시간 배양하였고, working volume 60ℓ

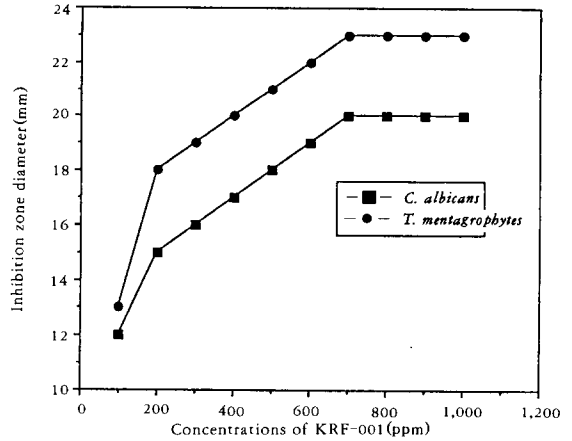


Fig 3-1. Comparison of bioactivity standard curves of various KRF-001 concentrations on agar diffusion bioassay against test organism.

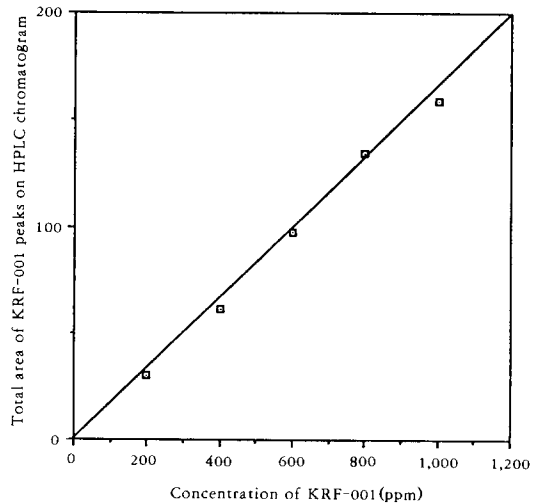


Fig 3-2. Standard curve for the determination of KRF-001 by HPLC.

에서는 30℃, 0.7~1.0vvm, 140~200rpm의 조건으로 36시간 배양하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 8ℓ 발효의 경우 pH 변화는 거의 없었으며, 총당은 약 50% 소모한 것으로 나타났다. 균체수는 20시간 대에 최대를 나타냈고 이에 따라 항진균 활성도 점차 증대하여 33시간대에 가장 높은 활성을 나타내었다. 또한 Fig. 5에 나타난 60ℓ의 경우, pH와 총당의 변화는 8ℓ 발효와 거의 유사하게 나타났으

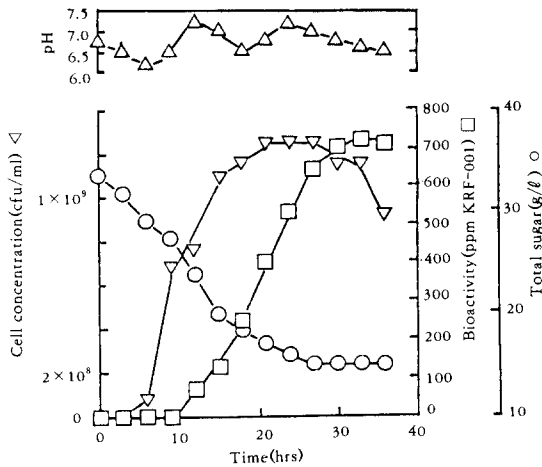


Fig 4. Time course of KRF-001 production on 14liter fermentor.

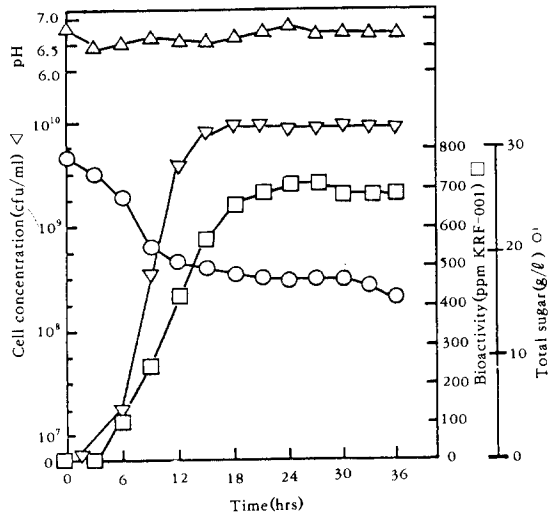


Fig 5. Time course of KRF-001 production on 100 liter fermentor.

Table 3. Comparison of assay methods for the detection of KRF-001.

Culture time (hrs)	0	15	18	21	24	27	30
Method and Conc.							
KRF-001 1) Bioassay (ppm)	—	—	—	190	200	400	700
2) HPLC	—	80	206	373	386	412	650

1) Concentration was calculated by bioassay standard curve.  
 2) Concentration was calculated by HPLC chromatogram.  
 (—): Not detected.

Table 4. Time courses of bioactivity of KRF-001 from mother cell and mutant UV4.

Culture time (hrs)	0	6	9	12	15	18	21	24	26	27	30	33	36
Sstrains													
Mother Cell	—	—	—	—	—	—	—	—	—	300	—	—	300
8L	0	0	0	70	130	250	400	532	—	643	699	720	710
UV4 60L	0	100	250	425	550	650	690	710	—	705	660	650	640

주입으로 판단되었고 또한 모균주와 비교했을 때 UV4 변이주는 650~720ppm의 생산량을 보여주고 있어 생산량은 2배 이상 향상되었다( Table 4).

요 약

KRF-001의 대량생산에 관한 연구를 수행하여 산업화연구에 연결할 수 있는 자외선을 이용한 변이주 개발을 통해 모균주보다 약 2배 이상의 생산능이 높은 UV4균주를 개발하였으며, 또한 10배까지 scale up한 발효를 통해 안정된 돌연변이주임을 확인할 수 있었다. HPLC를 이용한 KRF-001의 정성정량분석 방법을 개발함으로써 발효 중 harvest 시기를 정확히 결정할 수 있었으며 대량발효에 따른 대량 분리 정제 방법의 전략을 수립할 수 있었다.

나, 배양시간에 따른 균체증식은 8ℓ의 경우보다 빠른 증식속도를 보였고 균체총수에 있어서도 5~7배 증가하는 경향을 보였으며, 항진균 활성은 배양 후 약 24시간 만에 최대를 나타내어 발효용량이 커질수록 물질 생산도 빨라짐을 알 수 있었고, 24시간에서 26시간 사이가 KRF-001의 최대생산을 위한 가장 적당한 발효시간임을 알 수 있었다. 본 균주 UV4에 의한 발효에서 균체수의 증가에 따른 물질 생산의 형태는 mixed-growth associated product formation을 나타내어 일반적인 항생물질의 생산이 secondary metabolism인 것에 비해 발효시간을 상당히 줄일 수 있음을 알 수 있었다. 한편 UV4를 대상으로 working volume 8ℓ에서 60ℓ로 scale up 했을 때 KRF-001의 생산능 비교는 Table 4에서 보는 것처럼 생산용량을 10배 가까이 증대했을 때도 거의 동일한 KRF-001의 생산량을 나타내어 안정된 변이

## 참고문헌

1. S. U. Kim, J. W. Lee, S. H. Lee and S. H. Bok (1991), *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **19**, 337.
2. S. U. Kim, N. K. Lee, T. S. Jeong, Y. K. Kim, J. J. Choi and S. H. Bok(1991), *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*,**19**(6), 598.
3. K. H. Son, H. K. Kwon, H. W. Lee and S. H. Bok(1991), *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **19** (6), 614.
4. A. A. Green and W. L. Hughes(1955), *Method Enzymol.*, **1**, 67.
5. T. L. Miller and B. W. Churchill, *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, (A. L. Demain, N. A. Solomon eds.) ASM, U. S. A., **130** (1986).
6. Y. J. Kim, S. H. Lee, K. H. Son and S. H. Bok(1989), *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17** (2), 131.
7. J. F. Martin and A. L. Demain(1980), *Microbiol. Rev.*, **44**, 230.