

## *Micromonospora inyoensis*에 의한 Sisomicin 생산에서 Sodium Acetate의 영향

최신원<sup>1</sup> · 유연우\*

<sup>1</sup>서울화성공업 주식회사, \*아주대학교 공과대학 생물공학과

### Effect of Sodium Acetate on the Production of Sisomicin by *Micromonospora inyoensis*

Sin Won Choi<sup>1</sup> and Yeon Woo Ryu\*

<sup>1</sup>Seoul Chemical Industry Co., Ltd.

\*Department of Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

**Abstract** — This study was carried out to enhance the production of sisomicin by *Micromonospora inyoensis* ATCC 276000. The effect of various sugars and organic acids as the supplements to a basal mineral medium was tested for the sisomicin production by fully grown mycelium. Among the substances tested, acetate and citrate greatly increased the production of sisomicin at the sixth day of culture. Especially, in the basal mineral medium containing 0.1M sodium acetate, sisomicin production was 6.7 times more than that in the same medium with glucose. When 0.1M sodium acetate was added in the fermentation medium initially, the cell growth was inhibited by sodium acetate, although specific productivity was higher than that in the same medium without sodium acetate. On the contrary, when sodium acetate was added to the culture after three days, the sisomicin production and specific productivity were 1.6 times higher than those in the same medium without sodium acetate. The results suggested that sodium acetate was a stimulating substance of sisomicin production by *M. inyoensis*.

Sisomicin은 최초로 Weinstein *et al.*(1)이 *Micromonospora inyoensis*의 배양액으로부터 분리한 후, Cooper *et al.*(2)에 의하여 그 구조가 밝혀졌다. 이러한 sisomicin은 Fig. 1에서 보는 바와같이 D-pyranose (garosamine), 2-deoxystreptamine 및 불포화당을 가지고 있는 D-glucosamine(sisosamine)으로 구성된 aminoglycoside계 항생제로 그람 양성균 및 음성균에 광범위한 항균활성을 가지고 있다(2, 3). 최근에는 *Micromonospora*의 다른 species에서도 sisomicin의 생성이 보고되었으나 대부분의 균주들은 sisomicin 뿐만 아니라 gentamicin 및 유사물질들을 많이 생성하고 있어 실제 공업적으로 이용되는 균주는 *M. inyoensis* var *tsinaensis*, *M. danubiensis* 및 *M. rosea*이다(4).

일반적으로 미생물에 의한 항생물질의 생성은 대부분의 미생물들이 세포성장이 활발한 대수증식기에는 자신이 생성한 항생물질에도 감수성을 나타내기

때문에 생리적으로 항생물질에 내성을 가지게 되는 정지기부터 항생물질을 생성한다(5). 이러한 현상은 glucose가 배지에 존재할 때 세포성장기에는 catabolite repression에 의하여 항생물질의 생성이 억제될 뿐만 아니라 일차 대사산물의 존재에 의하여 일부 항생제의 합성에 관여하는 효소의 합성 및 활성이 억제되기 때문이다(6). 이는 *Micromonospora* sp.에 의한 sisomicin 발효에서도 탄소원으로 dextrin이나 starch를 이용한 경우가 glucose를 이용하는 경우보다 sisomicin 생성이 5배정도 증가하였다는 보고(7)에서와 같이 sisomicin 생성도 glucose에 의하여 catabolite repression을 받는다. 따라서 sisomicin 생산을 위한 공업적인 생산배지에서도 탄소원으로는 starch, hydrolysed starch 및 corn meal 등을 이용하며 glucose는 1% 미만으로 첨가한다(4). 그러나 탄소원으로 starch나 dextrin을 이용하는 경우의 공업용 배지에는 일반적으로 12~14%의 불용성 물질들이 존재하므로 배지의 점도증가에 의한 통기와 교반에 어려움이 발생한다.

**Key words:** *Micromonospora inyoensis*, sisomicin, sodium acetate

\*Corresponding author

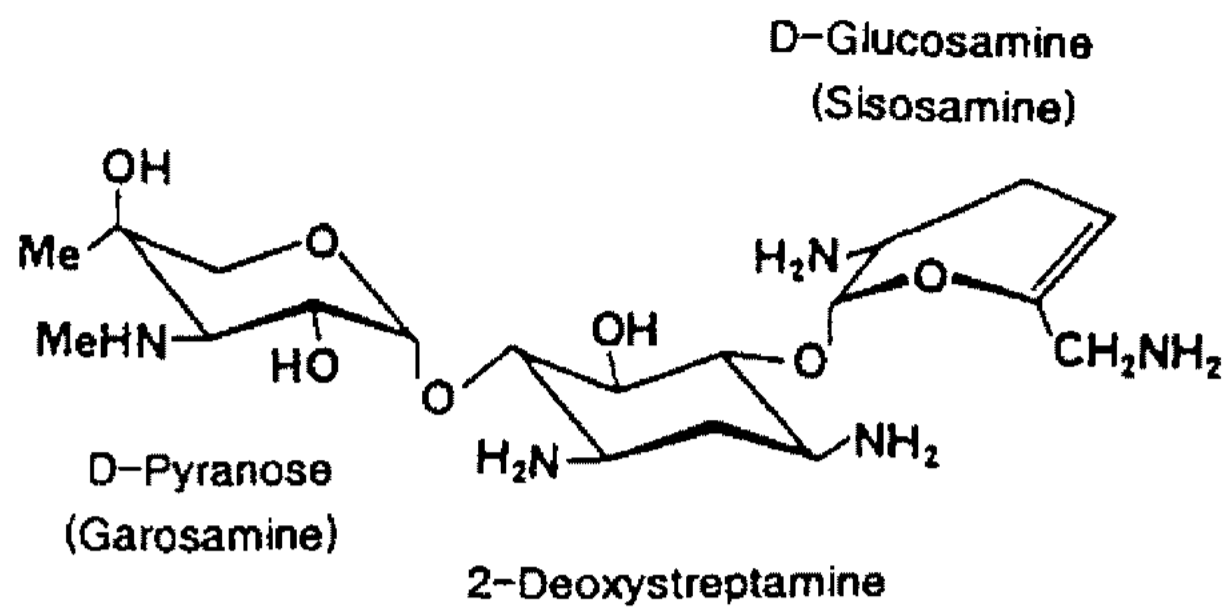


Fig. 1. Chemical structure of sisomicin.

반면 항생물질의 합성은 glucose나 다른 특정 영양분이 결핍되거나 균주내에 특정 대사산물의 축적에 의하여 촉진된다(6, 8). 이때 특정 물질의 첨가에 의한 항생물질의 생성증가는 첨가한 물질이 항생물질의 전구체로 이용되거나 또는 항생물질의 합성에 관여하는 효소의 합성을 유도하기 때문으로 알려져 있다. 실제로 *Cephalosporium cremonium*에서는 methionine의 첨가에 의하여 cephalosporin C의 생성이 촉진되었으며(9), *Nocardia mediteranei*에서는 diethylbarbiturate의 첨가에 의하여 rifamycin의 합성이 촉진되었다(10). Yanagimoto *et al.*(11)은 *Streptomyces virginiae*에서 staphylomycin의 합성촉진 인자는 균주자체가 생성한 lactone 구조를 갖는 지방산임을 밝혔으며, *S. fradiae*에서 fumarate는 neomycin 생성을 촉진하는 대사물질로 보고되었다(12). 또한  $\text{Co}^{2+}$ 의 첨가에 의하여 sisomicin의 생성이 크게 증가하는데(7, 13), 이는  $\text{Co}^{2+}$ 가 sisomicin 생합성과정중에 methylation 반응에 관여하는 효소의 cofactor로 작용하기 때문이다(14).

더구나 *Micromonospora* sp.에 의한 항생제 발효시에 sisomicin은 일부분만이 배지내로 분비되고 대부분은 균체내에 축적되던지 또는 세포에 결합된 상태로 존재하는 것으로 보고되어 왔다(15, 16). 따라서 Shin *et al.*(17, 18)은 발효배지에  $\text{MgSO}_4$  또는 NaCl의 첨가에 의하여 sisomicin을 배지내로 유리시켜 sisomicin의 생산성을 크게 향상시킬 수 있었다. 그러나 초기 배양액에 높은 농도의  $\text{MgSO}_4$ 이나 NaCl를 첨가하는 경우에 sisomicin에 의한 product inhibition은 감소시킬 수 있으나 삼투압 증가에 의한 세포성장의 억제가 유발된다고 보고하였다(16, 18).

*Micromonospora* sp.에 의한 sisomicin의 일반적인 발효조건은 28~35°C에서 80~120 rpm의 교반과 0.6~1.0 vvm의 통기로 4~5일간 배양하면 600~800 mg/l의 sisomicin을 얻을 수 있는데, 이때 sisomicin 생산의 제한조건은 배양액의 높은 점도에 의하여 산소공급이 충분하지 못하기 때문인 것으로 보고되어

있다(4).

따라서 본 연구에서는 sisomicin 생성균주인 *Micromonospora inyoensis* ATCC 27600의 resting cells을 이용하여 sisomicin 생산을 증가시키는 물질을 선별하고, 선별한 물질을 이용한 sisomicin 생산의 향상 조건에 대한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본 연구에서는 *Micromonospora inyoensis* ATCC 27600를 항생제 생산을 위한 균주로 사용하였으며, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P를 항균력 검사를 위한 피검균으로 사용하였다. *M. inyoensis*의 증식을 위한 germination medium은 0.1% glucose, 2.4% soluble starch, 0.3% beef extract, 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract 및 0.2% calcium carbonate를 수돗물에 용해시켜 초기 pH를 7.5로 조정하여 사용하였다. Resting cell system을 위한 basal mineral medium은 Kawamoto *et al.*(19)의 배지를 이용하였으며, 발효배지는 5% dextrin, 0.5% glucose, 3.5% soybean meal, 0.7%  $\text{CaCO}_3$ , 0.001%  $\text{CoCl}_2$  및 0.5 ml/l의 antiform A로 구성되어 있다.

### 접종용 균주 및 sisomicin 발효

Germination medium에 *M. inyoensis*를 접종하여 28°C에서 24시간 진탕배양한 후 다시 이 배양액을 germination 배지에 5%(v/v)가 되도록 접종하여 30°C에서 3일간 진탕배양하여 접종용 균주로 이용하였다. 모든 진탕배양은 1l Erlenmeyer flask에 배지 400 ml를 넣고 rotary shaker에서 200 rpm으로 배양하였다. Resting cell system(20)에 의한 sisomicin 생산은 접종용 균주의 배양액을 3,000 rpm에서 5분간의 원심분리하여 얻은 균사체를 멸균된 0.9%의 NaCl 용액으로 2회 세척하여 basal mineral medium에 접종한 후 28°C에서 200 rpm으로 진탕배양하였다. 당류 및 유기산류에 대한 영향은 basal mineral medium에 각각의 당류와 유기산류를 0.1M의 농도가 되도록 첨가한 후 resting cell system을 이용하여 실험을 수행하였다. 이때 이당류(disaccharide) 이상의 당류들은 가수분해되었을 경우에 단당류의 농도가 0.1M이 되도록 하였다. 직접 발효에 의한 sisomicin의 생산은 5l의 jar fermentor(Bioflo-III, NBS)에 3.5l의 발효배지를 넣고 5%(v/v)의 접종용 균주를 접종한 후 30°C에서 250 rpm으로 교반하고 1.0 vvm으로 통기하면서 배양하였다.

**항생물질의 추출 및 농도측정**

발효배양액의 항생물질 농도는 *Staphylococcus aureus* ATCC 6583P를 피검균주로 이용한 항균역가 검정에 의한 filter paper disc diffusion 방법(21)으로 측정하였다. 즉 Mueller Hinton broth(Difco)에 피검균을 접종하여 28°C에서 20시간 배양한 후 배양액 2 ml를 45°C의 멸균한 Mueller Hinton agar(0.8%) 용액 30 ml와 혼합하여 이미 제조한 Mueller Hinton agar (1.5%) plate에 5 ml를 도말하여 균힌다. 이 agar plate에 시료 20 μl를 주입한 항생물질 검색용 paper disc를 놓고 4°C에서 30분간 보관하고 다시 30°C의 배양기에서 17시간 배양한 후 피검균주의 생장이 억제된 영역의 직경을 측정하였다. 이때 시료의 준비는 일정량의 발효액에 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 첨가하여 pH를 2.0으로 조정후 15분간 교반하였다. 이 용액을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하였으며, 상등액을 취하여 6N NH<sub>4</sub>OH 용액으로 pH를 7.0으로 조정후 용액내의 Ca<sup>2+</sup>를 침전시켜 제거하기 위하여 oxalic acid를 첨가하고 원심분리하였다. 상등액을 취하여 pH를 7.0으로 재조정하여 항생물질의 농도측정을 위한 시료로 이용하였다. 항생물질 검색용 paper disc는 Schleider and Schuell사의 직경이 0.5인치인 제품을 사용하였으며, 표준 항생물질로는 Sigma사의 sisomicin sulfate(635 μg base/mg)를 50 mM potassium phosphate buffer(pH 8.0)로 희석하여 사용하였다. 시료의 sisomicin 농도는 표준품의 생장억제 영역의 억제환 직경값에 의하여 얻어진 표준보정곡선으로부터 구하였다.

**분석방법**

환원당의 정량은 DNS법(22)을 이용하였으며, 세포 농도는 배양액 9.5 ml에 2N HCl 0.5 ml를 첨가하여 잔류의 CaCO<sub>3</sub>를 용해시킨 후에 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 발효배지의 경우에는 soybean meal과 CaCO<sub>3</sub>의 잔류량이 매우 높아 흡광도 측정이 어렵기 때문에 세포농도를 단백질 정량으로 측정하였다. 즉 배양액 5 ml를 2배의 증류수로 세척한 다음 0.3M trichloroacetic acid 2 ml를 첨가한 후 600 rpm으로 2분간 원심분리하여 침전물인 불용성 성분을 제거시켰다. 다시 상등액을 6,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 얻은 균사체에 증류수 5 ml와 0.4N NaOH 1 ml를 첨가한 후 cell disrupter(Virtis Co.)로 균사체를 파쇄시켰다. 원심분리에 의하여 얻은 상등액의 단백질 함량을 Bradford 방법(23)에 따라 측정하였으며, 표준품으로는 bovine serum albumin을 이용하였다.

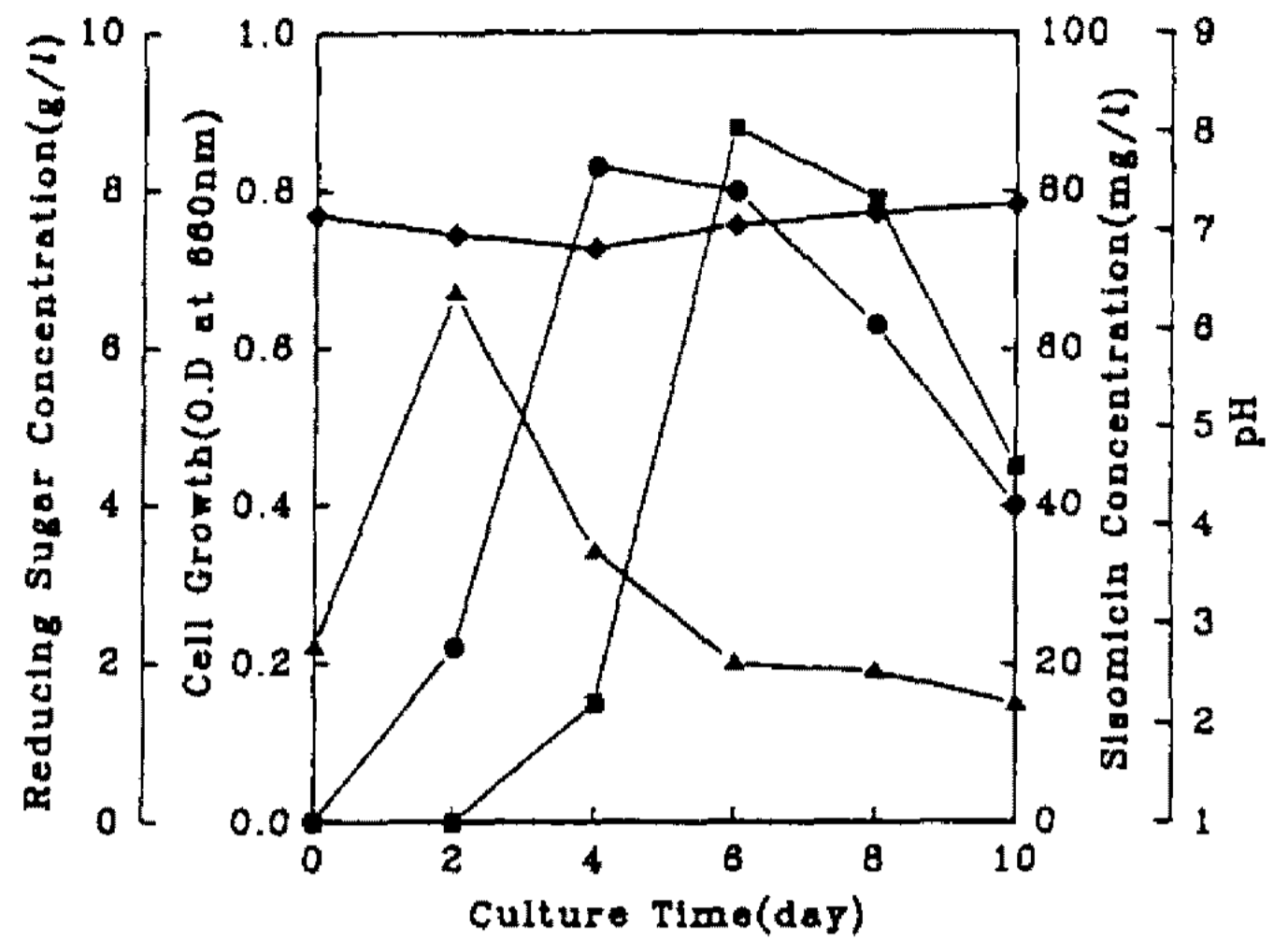


Fig. 2. Profiles of cell growth (●), sisomicin production (■), reducing sugar concentration (▲) and pH change (◆) during the culture of *M. inyoensis* in germination medium.

**결과 및 고찰**

**Sisomicin 생산 균주의 발효특성**

*Micromonospora inyoensis*의 sisomicin 생산에 대한 특성을 검토하기 위하여 1 l flask에 germination 배지 400 ml를 넣고 30°C에서 200 rpm으로 진탕배양한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 실험결과에서 초기 환원당의 농도는 glucose와 soluble starch에 의하여 2.2 g/l로 나타났으며, 배양중의 환원당 농도는 starch가 분해되면서 2일 배양시에 최대값인 6.7 g/l를 나타낸 후 감소하였다. 배지의 pH 변화는 초기 pH 7.5에서 세포성장에 따라 감소하다가 세포성장이 최대인 4일 배양시에 pH 6.8이 된 후에 다시 증가하기 시작하여 10일 배양시에 pH 7.5가 되었다. 세포성장은 glucose가 풍부한 배양초기에 활발하게 진행되어 배양 4일째에 정지기에 도달한 후 6일 배양이후부터는 cell lysis에 의하여 급격히 감소하였다. 반면 sisomicin의 항균활성은 세포성장이 멈춘 4일 배양시부터 나타나기 시작하여 환원당의 농도가 2 g/l 이하인 6일 배양시에 최대값이 된 후에 서서히 감소하였다.

따라서 *M. inyoensis*에 의한 sisomicin의 생성도 이미 보고된(6, 7) 바와 같이 glucose에 의한 catabolite repression을 받는 2차 대사산물임을 알 수 있었다. 또한 성장한 균사체가 cell lysis에 의하여 사멸되면서 cell O.D 값이 감소하는 동시에 sisomicin의 활성도 감소되었는데, 이는 이미 생성된 sisomicin이 변형되거나 분해되면서 서서히 항균활성을 상실하기 때문인 것으로 추정된다.

### Sisomicin 생산에 대한 당류 및 유기산류의 영향

일반적으로 항생물질의 합성은 glucose가 결핍되고 세포 또는 배지내에 특정 대사산물의 축척에 의하여 촉진되기 때문에 배양액에 특정한 물질을 첨가하면 항생물질의 합성이 크게 증가한다는 많은 연구결과들이 보고되어 있다(8-12). 따라서 sisomicin의 생산을 촉진하는 대사산물을 선별하기 위하여 resting cell system에 의한 여러가지 당류 및 유기산류들의 첨가영향을 검토하였다. 즉 당류 및 유기산류를 basal mineral medium에 각각 첨가하고 germination 배지에서 배양하여 얻은 동일 부피의 *M. inyoensis*의 균사체를 혼합하여 28°C에서 200 rpm으로 진탕배양한 결과를 Table 1에 나타내었다.

**Table 1. Effect of sugars and organic acids on cell growth and sisomicin production by *M. inyoensis* in basal mineral medium of resting cell system**

Compounds (0.1M)	Cell Growth (O.D. at 660 nm)			Sisomicin (mg/l)			
	Days	3	6	9	3	6	9
None		0.2	0.2	0.2	10	20	15
Glycerol		0.2	0.3	0.3	10	15	10
Arabinose		0.4	0.6	0.5	9	10	15
Xylose		0.3	0.3	0.3	10	10	9
Glucose		0.4	0.6	0.5	10	35	50
Fructose		0.2	0.5	0.5	10	20	15
Galactose		0.3	0.6	0.5	10	20	18
Mannose		0.3	0.4	0.4	10	15	15
Lactose		0.3	0.5	0.4	9	15	10
Maltose		0.3	0.4	0.4	15	20	40
Sucrose		0.3	0.4	0.3	10	10	9
Trehalose		0.3	0.4	0.4	15	55	115
Raffinose		0.3	0.4	0.4	10	17	20
Dextrin		0.2	0.3	0.3	10	40	70
Soluble starch		0.3	0.4	0.4	10	20	45
Acetic acid		0.2	0.3	0.3	30	240	200
Citric acid		0.2	0.3	0.3	35	270	205
Fumaric acid		0.2	0.2	0.3	25	75	98
Gluconic acid		0.2	0.2	0.1	10	10	0
2-keto-D-gluconic acid		0.2	0.2	0.1	0	0	0
Lactic acid		0.3	0.2	0.1	10	10	0
Malic acid		0.3	0.3	0.3	15	55	32
Malonic acid		0.2	0.2	0.1	15	15	20
Oxalic acid		0.2	0.3	0.2	35	57	43
Succinic acid		0.3	0.3	0.3	35	45	30
Tartaric acid		0.3	0.3	0.2	0	0	0
Sodium acetate		0.2	0.4	0.3	55	335	155

실험결과에서 당류의 경우 균사체의 증가는 6일 배양시에 대부분의 당류에서는 대조군에서 보다 약 2배 정도 증가한 반면, sisomicin의 생산은 9일 배양시에 glucose, maltose, trehalose, dextrin 및 soluble starch 에서만이 대조군 보다 약 2배 이상이 증가하였다. 이는 대부분의 당류들이 세포성장을 위한 탄소원 및 에너지원으로 이용될 수 있으나 sisomicin 생산을 위해서는 일부 당류만이 적합하였다. 특히 trehalose와 dextrin은 glucose보다 sisomicin의 생산이 매우 우수하였는데, 이는 catabolite repression의 약화에 의한 것으로 추정되며 Lee *et al.*(7)의 결과와 동일하였다. 유기산류의 경우 균사체는 대조군에 비하여 6일 배양시까지 약간 증가하였거나 거의 증가가 없었다. 반면 sisomicin의 생산은 일부 TCA cycle에 관련된 대사물질들에서 6일 배양시에 크게 증가하였으며, 특히 acetate, citrate 및 fumarate에서 sisomicin 생산이 매우 우수하였다. 이와같이 당류에서는 9일 배양시에 sisomicin의 활성이 최대값을 나타낸 반면 유기산류에서는 6일 배양시에 최대 활성을 나타낸 후 9일 배양시에는 현저히 감소하였다. 이는 당류, 특히 glucose를 이용할 때는 세포가 성장하는 동안에 특정 대사산물의 축척이 glucose 농도와의 비율에서 어느 이상이 될 때 sisomicin의 합성이 유도되므로 sisomicin의 생성이 지연되는 반면, 유기산류의 첨가에 의해서는 직접 sisomicin의 합성유도가 일어나 당류에서 보다 더 짧은 시간내에 더 많은 sisomicin이 합성되는 것으로 추정된다. 따라서 sisomicin의 생산이 매우 우수한 acetate 및 citrate는 sisomicin 합성의 유도물질일 가능성이 매우 높은 것으로 관찰되었으며, 이는 fumarate가 *S. fradiae*에 의한 neomycin의 합성 유도물질이라는 결과와 유사하였다(12). 또한 sodium acetate에서는 acetic acid 보다 sisomicin의 생산이 약 40% 더 증가하였는데, 이는 Shin *et al.*(18)의 결과에서와 같이 Na<sup>+</sup>에 의하여 sisomicin이 배지내로 더 용이하게 유리될 수 있었기 때문인 것으로 판단된다.

### Sisomicin 생산에 대한 sodium acetate의 영향

Sisomicin 생산에 대한 sodium acetate 첨가의 최적 농도를 결정하기 위하여 resting cell system의 basal mineral medium에 0.1~1.0M의 sodium acetate를 첨가하여 6일 배양한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 실험결과에서 0.1M의 sodium acetate를 첨가한 경우에 대조군에 비하여 균사체의 농도는 변화가 없었으나 sisomicin의 생성은 16.8배 증가하였다. 반면 0.2 M 이상의 농도에서는 sodium acetate 농도 증가에

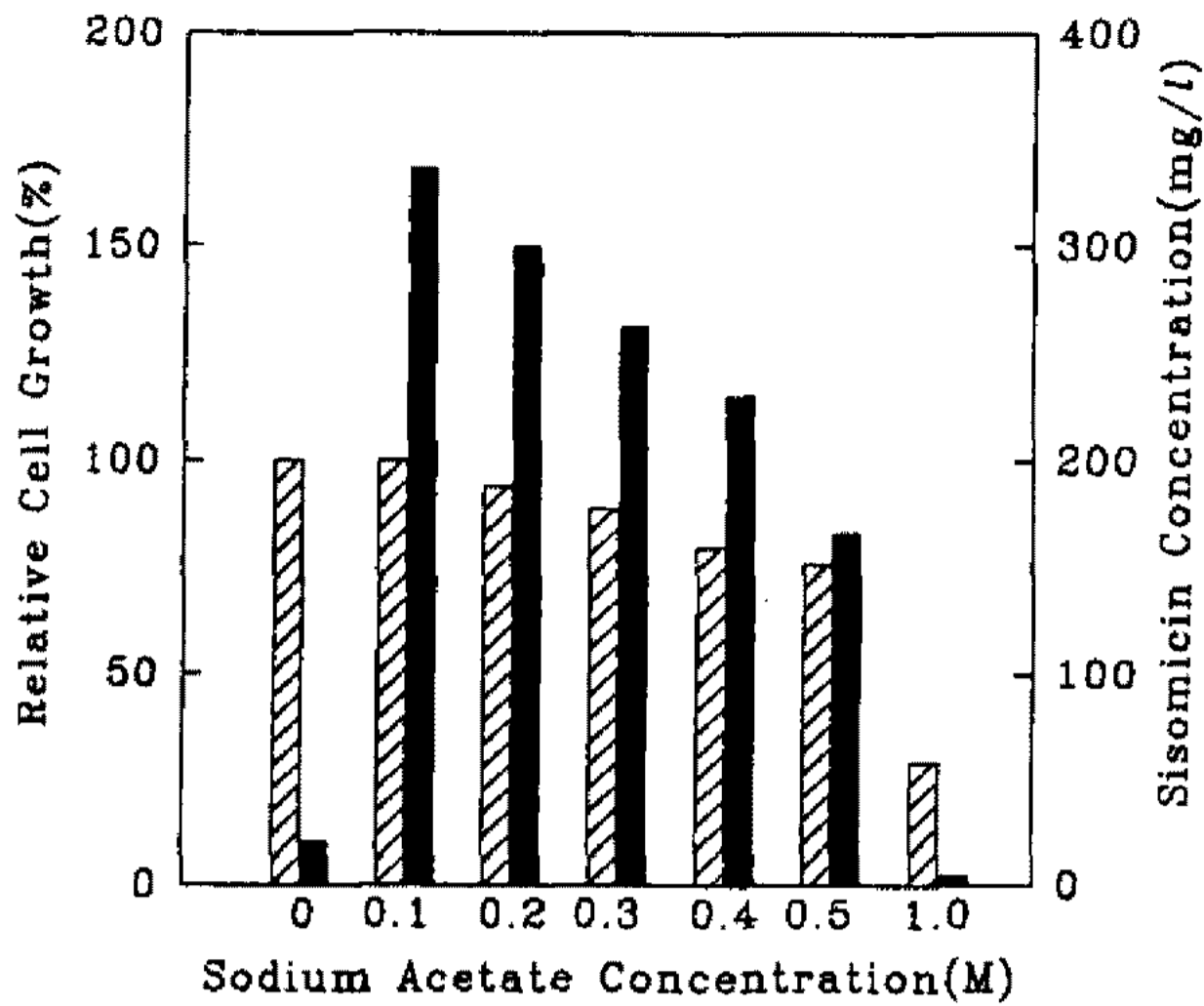


Fig. 3. Effect of sodium acetate on cell growth (■) and sisomicin production (▨) by *M. inyoensis* in basal mineral medium of resting cell system.

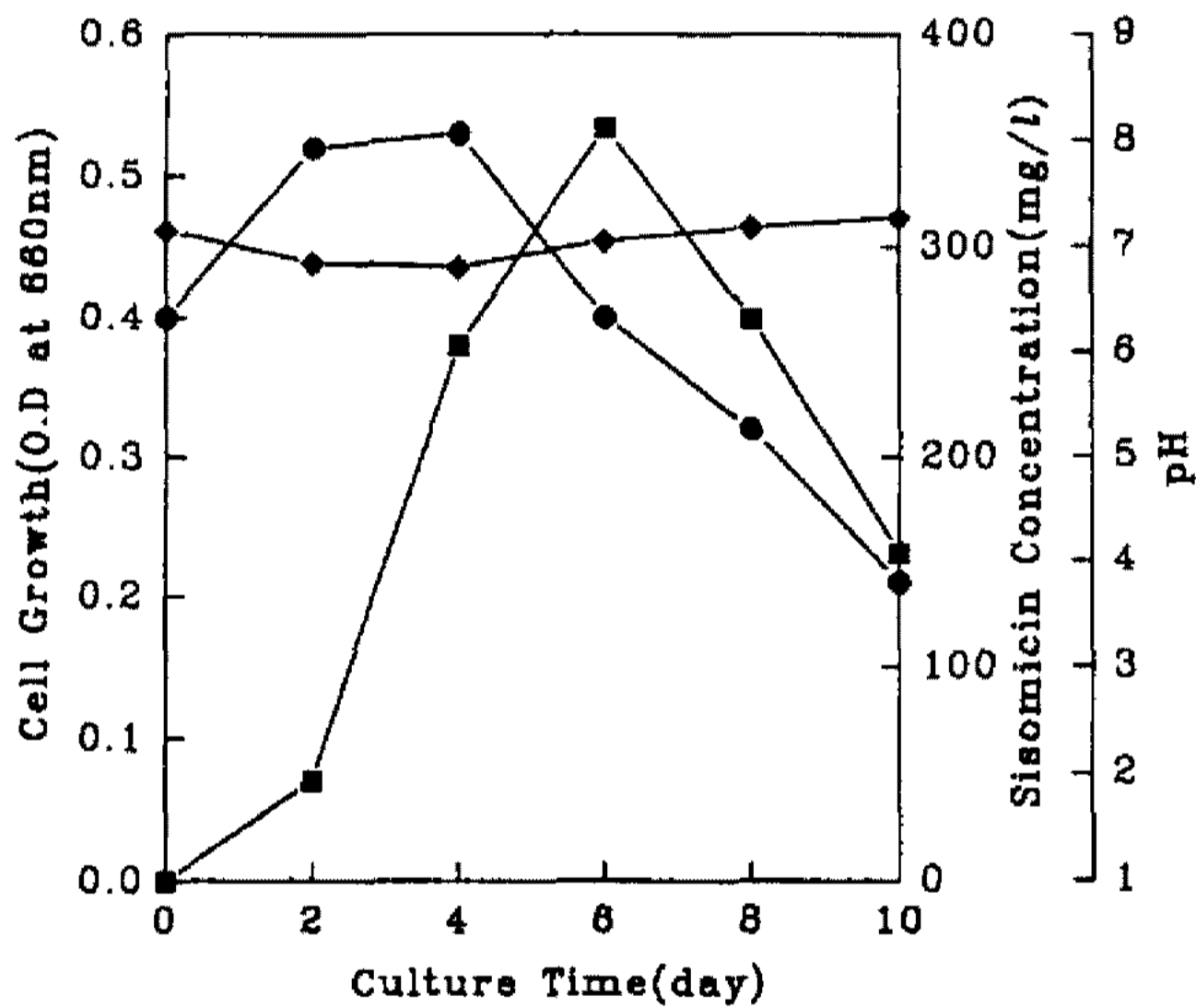


Fig. 4. Profiles of cell growth (●), sisomicin production (■) and pH change (◆) during the culture of *M. inyoensis* in basal mineral medium of resting cell system containing 0.1M sodium acetate.

따라 균사체 농도와 sisomicin의 생산이 감소하였다. 특히 1.0M의 sodium acetate 농도에서는 균사체의 생육도 억제되고 sisomicin의 생성도 매우 미약하였다. 이러한 결과는 Shin *et al.*(18)의 보고에서 0.1M의 NaCl 첨가에 의하여 sisomicin 생성이 첨가하지 않은 경우 보다 46%가 증가한 반면, 1.0M의 NaCl 첨가에 의해서는 83%가 감소하였다는 결과와 거의 동일하였다.

Resting cell system의 basal mineral medium에 0.1M sodium acetate를 첨가한 조건에서 배양시간에 따른 세포성장파 sisomicin의 생산에 대한 실험결과를 Fig. 4에 나타내었다. 실험결과에서 균사체는 4일 배

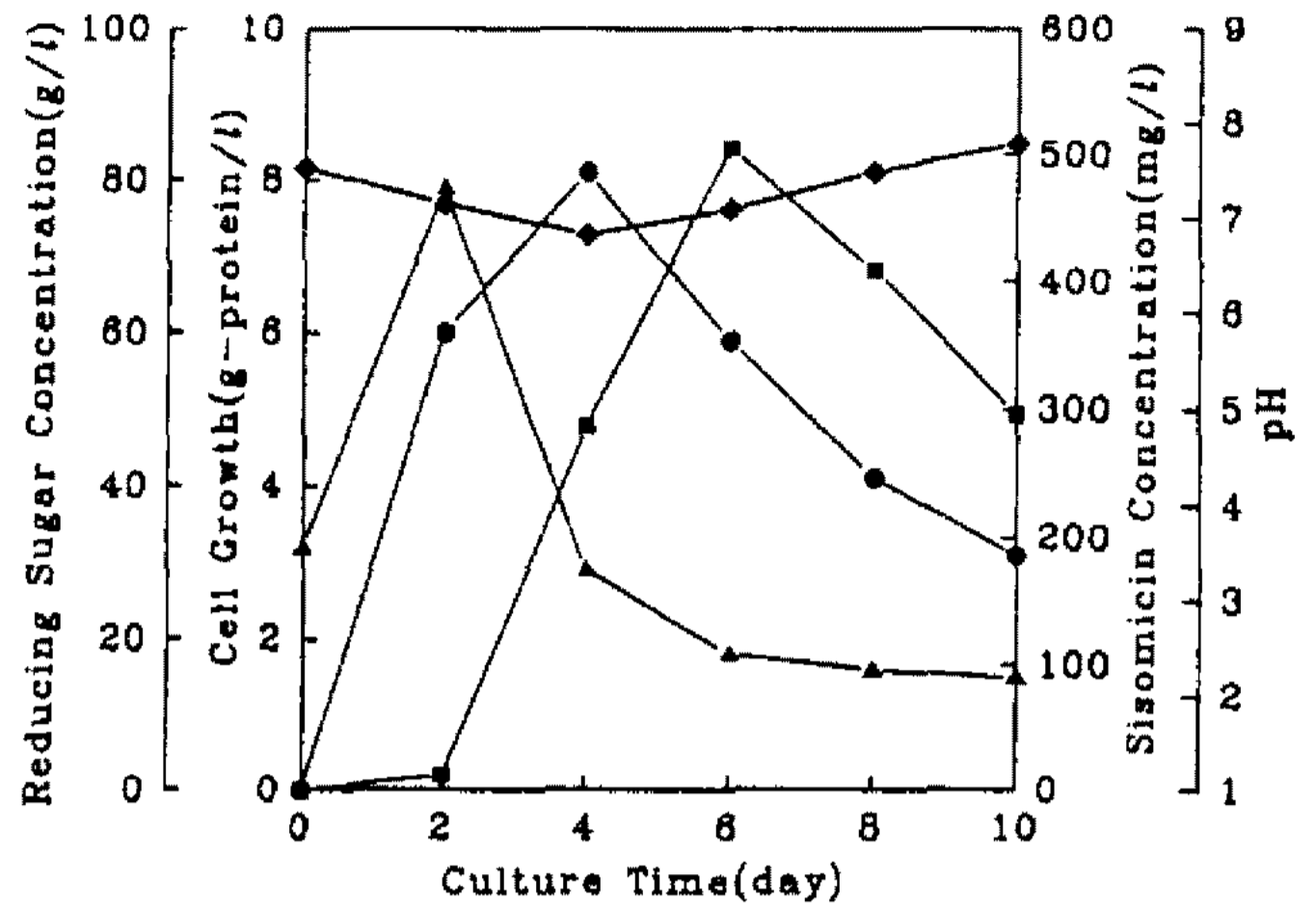


Fig. 5. Profiles of cell growth (●), sisomicin production (■), reducing sugar concentration (▲) and pH change (◆) during the culture of *M. inyoensis* in fermentation medium.

양시까지 약간 증가한 후에 감소하였으나 sisomicin 생산은 배양 초기부터 생성되기 시작하였으며, 2일 배양시부터는 급격히 증가하여 6일 배양시에 최대값을 나타낸 후 급격히 감소하였다. 이러한 결과에서 배양초기에는 약간의 sodium acetate가 세포 성장에 이용되고 있음을 알 수 있었으며, 또한 sisomicin이 배양 초기부터 생성이 시작된 것으로 보아 acetate에 의한 catabolite repression 없이 sisomicin 합성의 유도가 일어났음을 확인할 수 있었다. 그러나 6일 배양 이후부터 탄소원의 고갈에 의하여 균사체의 분해가 촉진되고 동시에 생성된 sisomicin이 변형되거나 분해되어 항균활성이 감소되는 것으로 추정된다. 이러한 현상은 fumarate에 의한 neomycin의 생산에서도 동일한 결과가 보고되었다(12).

#### 직접 발효에 의한 sisomicin 생산

Germination 배지에서 배양한 균사체를 발효배지에 5%(v/v) 농도로 접종하여 jar fermentor를 이용한 sisomicin 발효에 대한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 실험결과는 Fig. 2의 germination 배지에서와 거의 동일한 유형의 세포성장, sisomicin 생산, 환원당 농도 및 pH의 변화를 나타내었다. 단지 sisomicin의 최대 생산량이 germination 배지에서는 88 mg/l인데 비하여 발효배지에서는 505 mg/l로 약 5.7배 증가하였는데, 이는 발효배지가 germination 배지보다 sisomicin 생성을 위하여 더 적합한 성분들로 구성되어 있기 때문이다. 특히 발효배지에는 sisomicin의 생성을 크게 증가시키는  $Co^{2+}$ 가 존재하는데,  $Co^{2+}$ 는 sisomicin 생합성과정에서 methylation 반응에 관여하는 효소의 cofactor로 알려져 있다(7, 13, 14). 또한 환원당의 농

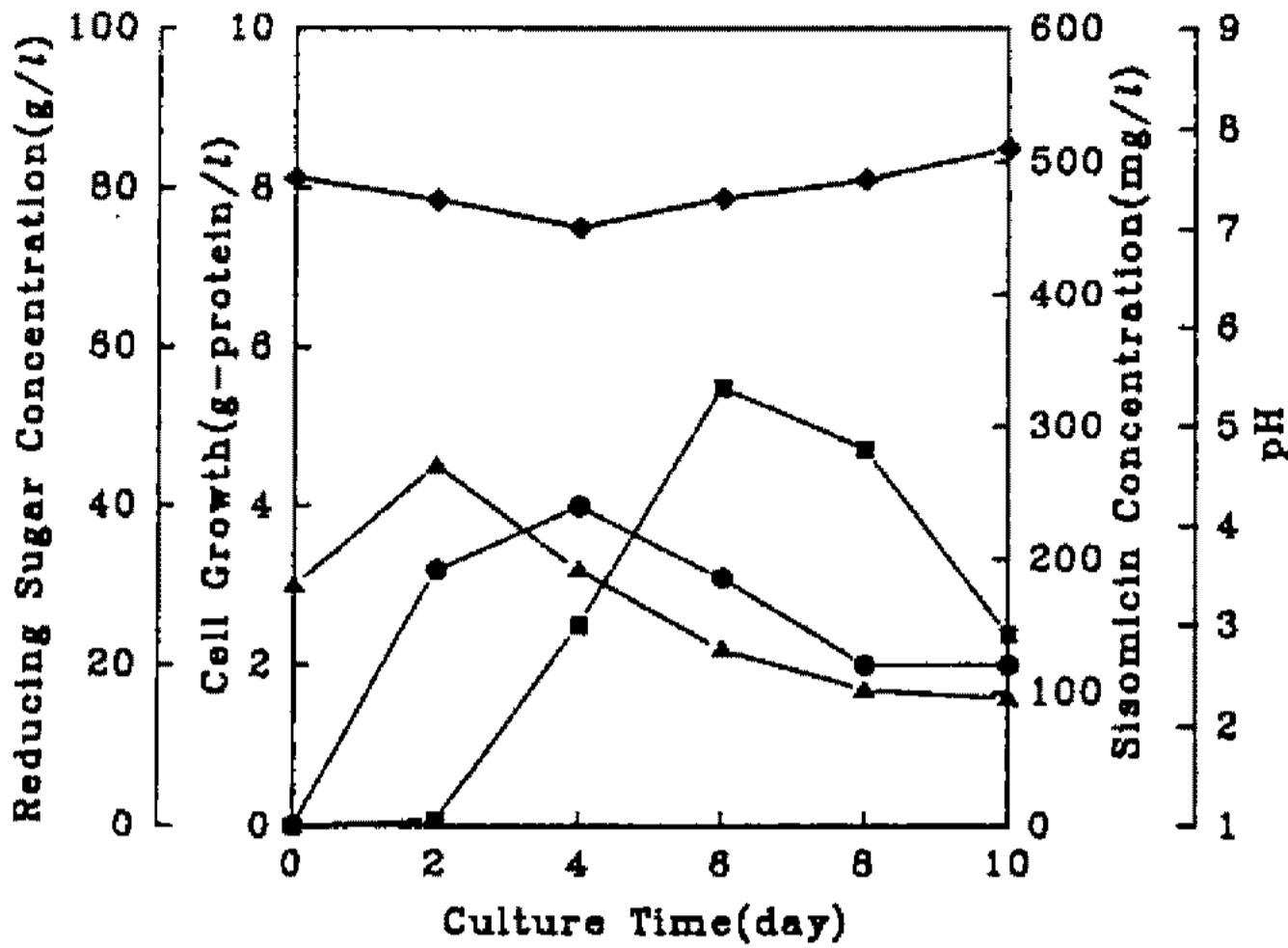


Fig. 6. Profiles of cell growth (●), sisomicin production (■), reducing sugar concentration (▲) and pH change (◆) during the culture of *M. inyoensis* in fermentation medium containing 0.1M sodium acetate initially.

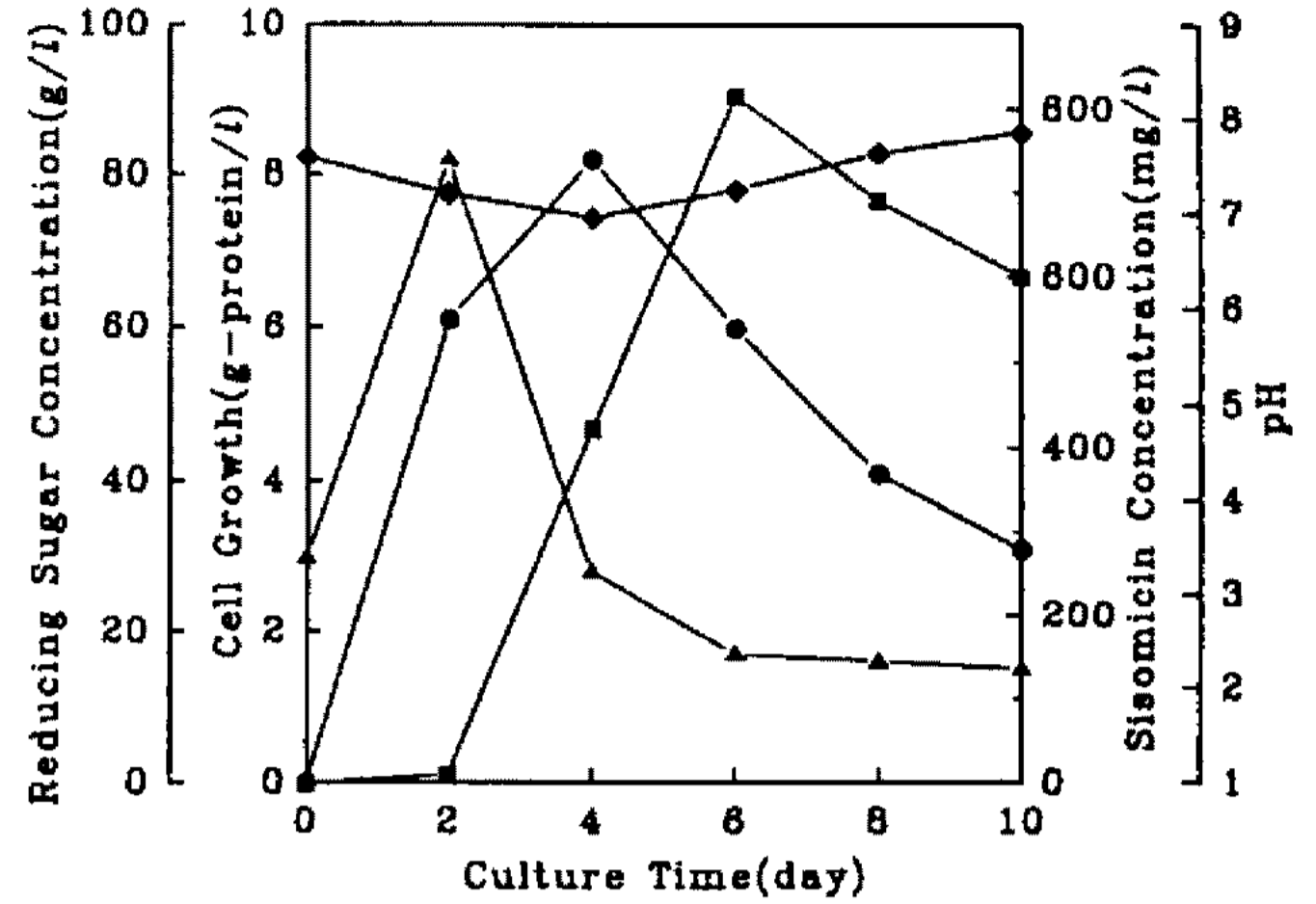


Fig. 7. Profiles of cell growth (●), sisomicin production (■), reducing sugar concentration (▲) and pH change (◆) during the culture of *M. inyoensis* in fermentation medium when 0.1M sodium acetate was added to culture after three days.

도는 발효배지에 첨가한 glucose 및 dextrin과 soybean meal에 약 30% 정도 존재하는 탄수화물들에 의하여(14) 초기 환원당의 농도가 약 30 g/l를 나타내었으며, 2일 발효시에는 dextrin과 soybean meal에 존재하는 탄수화물들의 가수분해에 의하여 환원당의 농도가 약 80 g/l까지 증가한 후에 급격히 감소하였다.

발효배지를 이용한 sisomicin 생산에서 sodium acetate의 첨가시기에 대한 연구를 수행하였다. 발효배지에 0.1M의 sodium acetate를 배양초기에 첨가한 경우와 대수기 말기인 배양 3일째에 첨가한 경우에 대한 실험결과를 각각 Fig. 6과 7에 나타내었다. Sodium acetate를 배양초기에 첨가한 경우에는 균체의 생육이 크게 저해되었으며 sisomicin의 최대 생산량도 sodium acetate를 첨가하지 않은 경우보다 더 낮았다 (Fig. 6). 그러나 specific productivity는 sodium acetate를 첨가하지 않은 경우에 86 mg/g-protein인 반면 첨가한 경우는 107 mg/g-protein으로 더 높았다. 이는 sodium acetate의 첨가에 의하여 세포의 sisomicin 합성은 촉진되었으나 배지의 삼투압 증가에 의한 세포성장이 억제되어 sisomicin의 최대 생산량이 감소된 것으로 사려된다(16, 17).

Sodium acetate를 3일 배양후에 첨가한 경우(Fig. 7)의 세포성장은 sodium acetate를 첨가하지 않은 경우와 거의 동일한 값을 나타낸 반면 sisomicin 생산은 6일 배양시에 최대 815 mg/l이고 specific productivity는 136 mg/g-protein으로 sodium acetate를 첨가하지 않은 경우보다 모두 1.6배 증가하였다.

이러한 결과로서 *M. inyoensis*에 의한 sisomicin의

생성은 glucose의 대사중간산물인 acetate에 의하여 촉진되며, 균사체의 성장이 정지기에 도달될 때 acetate를 첨가하면 sisomicin의 생산이 크게 증가함을 알 수 있었다.

### 요 약

본 연구는 *M. inyoensis*를 이용하여 sisomicin의 생산을 향상시키기 위한 연구를 수행하였다. *M. inyoensis*에 의한 sisomicin의 발효특성은 glucose에 의한 catabolite repression에 의하여 합성이 억제되고, glucose가 고갈되면 축적된 특정산물에 의하여 합성이 유도되었으나 동시에 균사체가 사멸되면서 sisomicin의 항균활성도 상실되었다. Sisomicin의 생산을 향상시키는 물질을 선별하기 위하여 당류 및 유기산류들을 resting cell을 이용하여 검정한 결과 acetate와 citrate가 sisomicin의 생산을 크게 증가시켰다. 특히 sodium acetate의 첨가에 의하여 sisomicin의 생산이 대조군에 비하여 16.8배, glucose일 때보다 6.7배 증가하였으며, 최적농도는 0.1M이었고 그 이상의 농도에서는 세포성장이 억제되고 sisomicin의 생산도 감소되었다. 발효배지에 0.1M sodium acetate를 발효초기에 첨가한 경우는 첨가하지 않은 대조군에 비하여 세포성장과 sisomicin의 최대 생산량이 낮은 반면 배양 3일째에 첨가한 경우는 6일 배양에서 대조군에 비하여 sisomicin의 최대 생산량과 비생산성이 모두 1.6배 증가하였으며, 이때의 sisomicin 농도는 815 mg/l였다. 따라서 *M. inyoensis*에 의한 sisomicin의 생산에서 sodium acetate는 세포성장을 억제시키지만

sisomicin의 생성을 촉진시키는 물질임을 확인하였으며, 특히 균사체의 성장이 정지기에 도달될 때 첨가하면 sisomicin의 생산이 크게 증가함을 알 수 있었다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 농업생물신소재 연구센터의 일부 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Weinstein, M.J., A. Marquez, R.T. Testa, G.H. Wagman, E.M. Oden and J.A. Qaitz. 1970. Antibiotics 6640, a new *Micromonospora* produced aminoglycoside antibiotics. *J. Antibiot.* **23**: 551-554.
- Cooper, D.J., R.S. Jaret and H. Reimann. 1971. Structure of sisomicin, a novel unsaturated aminoglycoside antibiotic from *M. inyoensis*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **42**: 285-293.
- Waitz, J.A., E.L. Jr. Moss, E.M. Oden and M.J. Weinstein. 1970. Antibiotic 6640. III. Biological studies with antibiotic 6640, a new broad spectrum aminoglycoside antibiotic. *J. Antibiot.* **23**: 559-562.
- Bérdy, J. and M. Járαι. 1986. *Micromonospora* produced aminoglycoside antibiotics: chemistry and microbiology. *Proc. Biochem.* **26**: 93-106.
- Demain, A.L. 1974. How do antibiotic-producing microorganisms avoid suicide? *Ann. N.Y. Acad.* **235**: 601-612.
- Demain, A.L., Y. Aharonowitz and J.F. Martin. 1983. *Metabolic control of secondary biosynthetic pathways*, Pp. 49-72. In Vining, L.C. (Ed), *Biochemistry and Genetic regulation of Commercially Important Antibiotics*, Addison-Wesley Publishing Co., London.
- Lee, J.H., G.H. Gil, Y.J. Cho and M.Y. Yoo. 1986. Factors affecting sisomicin production by *Micromonospora inyoensis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**: 355-358.
- Demain, A.L. and E. Inamine. 1970. Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase ( $\alpha$ -D-mannosidase) formation. *Bacteriol. Rev.* **34**: 1-19.
- Drew, S.W. and A.L. Demain. 1973. Methionine control of cephalosporin C formation. *Biotechnol. Bioeng.* **15**: 743-754.
- Lancini, G. and R.J. White. 1973. Rifamycin fermentation studies. *Process Biochem.* **8**: 14-16.
- Yanagimoto, M. and G. Terui. 1971. Physiological studies on staphylomycin production. 2. Formation of a substance effective in inducing staphylomycin production. *J. Ferment. Technol.* **49**: 611-618.
- 김공환, 구양모, 황희숙, 조영애, 조희영. 1991. Neomycin 생산균주 *S. fradiae*의 항생물질 생산을 활성화 시키는 성분조사. *한국생물공학회지* **6**: 69-77.
- Shin, C.S., S.H. Han and S.H. Lee. 1989. Effect of mineral salts on the improvements of sisomicin yield. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 247-251.
- Cruger, W. and A. Cruger. 1989. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology (2nd Ed)*, Pp. 63, 255, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Schmidt-Kastner, G. and H. Reimann. 1976. The production of sisomicin. *Infection* **4**(Suppl. 4): 292-293.
- 한상현, 신철수. 1992. Sisomicin 발효에 대한 magnesium sulfate의 영향. *산업미생물학회지* **20**: 213-218.
- Shin, C.S. and S.H. Han. 1995. Effect of magnesium sulfate on product inhibition of sisomicin production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 96-99.
- Shin, C.S., B.W. Ahn, S.H. Lee, S.U. Kim and S.H. Bok. 1988. Liberation of sisomicin from cells by sodium chloride. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 37-38.
- Kawamoto, I., T. Oka and T. Nova. 1983. Carbon and nitrogen utilization by *Micromonospora* strain. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 203-215.
- Hu, W.S., A.F. Brana and A.L. Demain. 1984. Carbon source regulation of cephem antibiotic production by resting cells of *S. clavuliger* and its reversal by protein synthesis inhibitors. *Enzyme Microbiol. Technol.* **6**: 155-160.
- Lancini, G. and F. Parenti. 1982. *Antibiotics: An Integrated View*, Pp. 14-19, Springer-Verlag New York, Inc.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

(Received 5 July 1995)