

## Tylosin 생성 우수 균주선별과 Tylosin 발효

이상희<sup>1</sup> · 정병철<sup>2</sup> · 이계준\*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, <sup>1</sup>영동공과대학교 유전공학과,  
<sup>2</sup>명지대학교 이과대학 생명과학과

## Mutational and Nutritional Improvement of Tylosin Production

Sang Hee Lee<sup>1</sup>, Byeong Chul Jeong<sup>2</sup> and Kye Joon Lee\*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

<sup>1</sup>Department of Genetic Engineering, Youngdong Institute of Technology, Chungbuk 370-800, Korea

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, Myong Ji University, Youngin 449-728, Korea

**Abstract** — A tylosin-hyperproductive mutant of *S. fradiae* MNU20 was isolated among 3500 strains obtained from either MNNG- or UV-treated *Streptomyces fradiae* NRRL2702. The composition of optimal medium for tylosin production was formulated as followed as: 4 g soluble starch, 1 g glucose, 1 g corn steep liquor, 7.5 ml soy bean oil, 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, 2 g CaCO<sub>3</sub>, 2 g NaCl, 0.001 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O in 1 liter of distilled water. With the optimal medium, *S. fradiae* MNU20 was able to produce 159 mg tylosin (g biomass)<sup>-1</sup>, indicating that tylosin productivity of *Streptomyces fradiae* NRRL2702 was increased 14 times higher by mutation. When the effect of valine, succinate, and natural zeolite on tylosin production was investigated by using the optimal medium, these substances essentially enhanced tylosin production and their addition time during culture period appeared to be critical for the increase of tylosin production.

Tylosin은 상업적으로 유용한 거대고리(macrolide) 항생물질이며 *Streptomyces fradiae*에 의해서 생성된다(8). Tylosin의 화학적 구조는 3종류의 당과 모핵(aglycone)으로 구성된다(9). 생합성 경로는 두 부분으로 나뉘어진다. 전구물질(acetate, propionate 및 n-butyrate)로부터 모핵이 만들어지고 순차적으로 당들이 형성된 모핵에 첨가된다(10). 일반적으로 항생물질 발효에는 영양 물질로 자연 복합 배지가 이용되고 있으며, 실제의 발효 단계가 두 단계로 나뉘어진다. 즉 trophophase와 idiophase이고, idiophase에서는 항생물질 생성 균의 성장이 저해되고 이차 대사 산물이 형성된다. 이때 trophophase의 배지 성분과 배양 조건은 항생물질 생합성에 커다란 영향을 미친다(12).

본보에서는 *S. fradiae* NRRL2702의 tylosin 생성 능력이 증가된 균주를 개발하기 위해서 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)와 ultra violet(UV)를 처리하여 변이주를 선별하고 그 변이주를 이용하여 최적 tylosin 생성 배지와 조건을 확립하였으며 glucose, valine, succinate 및 natural zeolite의 효과를

검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주, 배지 및 균배양 조건

Tylosin 생성능이 있는 *Streptomyces fradiae* NRRL 2702를 사용하였다. 계대배양 배지 조성은 yeast extract 1g, beef extract 1g, casein hydrolyzate 2g, glucose 10g, agar 15g, 증류수 1리터였고 종균 제조 배지 조성은 glucose 30g, peptone 10g, yeast extract 10g, malt extract 3g, casamino acid 3g, 증류수 1리터였다(13). Tylosin 생성 배지 조성은 glucose 20g, sodium glutamate 20g, betain 5g, NaCl 2g, MgSO<sub>4</sub> 5g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.001g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g, CaCl<sub>2</sub> 3g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.3g, methylolerate 25g, 증류수 1리터였다(14).

최적의 tylosin 생성 배지 조성을 결정하기 위해서 평판 계대배양의 단일 포자 균락을 따서 종균 제조 배지 50 ml이 들어 있는 500 ml baffled flask에 접종한 뒤(4%) 4일간 배양후(30°C, 200 rpm) 배양액을 종균 제조 배지 4리터가 들어 있는 7리터 Jar Fermentor (Chemap)에서 66시간 배양하였다(30°C, 400 rpm, 0.5

**Key words:** *Streptomyces fradiae*, tylosin, MNNG, UV

\*Corresponding author

vol vol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>). 지름 22 mm인 시험관에 30 ml씩 분주하여 deep freezer(-70°C)에 보관하여 종균으로 사용하였다. 이는 매년 종균 제조 배양을 실시함으로써 동일한 조건을 유지하기 어려운 점을 극복하기 위한 하나의 방법이었다.

최적 생성 배지에 첨가하는 물질들의 효과를 조사하기 위해서 실험 목적에 적합한 배지가 들어 있는 플라스크에 종균 배양액을 4% 접종하여 30°C에서 11일간 배양한 후(200 rpm) 원심분리하여(12,000×g, 20분) 상등액을 여과한 다음 pH, tylosin 및 건조균체량(dry cell weight, DCW)을 측정하였다.

### 균체량 및 tylosin 정량

회분배양시에 채취한 발효액 10 ml을 여과지(Azumi filter paper No.2)로 감압여과 하면서 증류수 20 ml로 3회 세척한 후 건조기(80°C)에서 24시간 동안 건조시켜서 측정할 무게를 DCW로 하였다.

Tylosin 정량은 280 nm의 UV detector와 µBondapak C<sub>18</sub> HPLC(Bio-Rad) column을 이용하고 mobile phase로는 40%(v/v) acetonitrile과 2%(v/v) monoethanolamine이며 유속(flow rate)은 column 수명에 따라 1.0~1.5 ml/min으로 하였다(15).

### *S. fradiae*의 돌연변이

*S. fradiae* NRRL2702로 부터 Hopwood 방법에(16) 의해서 포자 현탁액을 만들고 0.5 mg MNNG/ml 농도로 15분간 처리하였고(균주의 치사량은 45%, 17) slant에서 포자를 수확하여 0.1M phosphate 완충 용액(pH 8.0)으로 포자 현탁액을 만든 후 멸균된 평판 접시(petridish)에 7 ml 넣은 뒤에 magnetic bar로 돌리면서 자외선을 60분간(균의 치사량은 90%) 조사하였다(1). UV 처리는 암실에서 실행하였다.

## 결과 및 고찰

### 돌연변이에 의한 균주의 개발

*S. fradiae* NRRL2702 균주에 MNNG를 첫 번째 mutagen으로 처리하여 얻은 1,000개의 균주들중 *S. fradiae* MN13의 tylosin 생성능은 20%로 MNU20(MN13으로 부터 UV 처리하여 얻은 2,500개 균주들중 하나)보다 낮은 증가폭을 나타냈다(Table 1). 이는 *S. fradiae*의 경우, UV에 의한 최대 돌연변이율은 약  $2 \times 10^{-7}$ 인 반면 MNNG에 의한 최대 돌연변이율은  $1 \times 10^{-4}$  정도로 500배 정도의 차이가 발생한다는 보고에(1) 의해서 설명될 수 있다. 이는 광 회복 기작에 의한 DNA 손상 부분의 회복 능력이 우수한

**Table 1. Comparison of the tylosin productivity in different strains of *S. fradiae***

Strain	Tylosin productivity [mg (g biomass) <sup>-1</sup> ]	Relative productivity (%)
NRRL2702	11	100
MN13 <sup>1</sup>	13	120
MNU20 <sup>2</sup>	22	200

<sup>1</sup>A strain mutated by MNNG treatment from *S. fradiae* NRRL2702

<sup>2</sup>A strain mutated by UV treated from *S. fradiae* MN13

것으로 판단된다.

### Tylosin 생산을 위한 최적 배양 조건

Tylosin 생성 배지에서 최적 배양 온도를 실험한 결과, 30°C에서 tylosin 생성능이 가장 높았으며, 초기의 최적 pH는 7.0이었고 11일째의 pH는 8.3으로 증가하였다(data 생략). 공장 규모에서 tylosin 생산의 최적 배지 조성을 얻기 위해서 주로 구하기 쉽고 값싼 배지 조성들을 이용하였다. 탄소원은 glucose를 비롯하여 dextrin, glycerol, soluble starch, molasses, maltose, lactose 등 7종을 이용하여 tylosin 생성능을 비교한 결과, soluble starch(40 g/l)이었고(Table 2) glucose(1 g/l)를 혼합하여 첨가하였을 경우 최대 tylosin 생성능을 보여주었다(data 생략).

질소원으로 사용한 sodium glutamate의 농도가 20 g/l인 이유로 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, corn steep liquor, soy bean meal, soy bean oil, pharmamedia, fish meal 등 6 종류를 20 g/l로 고정하여 비교한 결과, soy bean oil이 적합한 질소원이었고(Table 3) corn steep liquor(1 g/l)와 soy bean oil(7.5 ml/l)의 조합이 최적이었다(data 생략).

**Table 2. Determination of carbon source for the optimal medium composition of *S. fradiae* MNU20**

Carbon source (40 g/l) <sup>1</sup>	Final pH	Tylosin productivity [mg (g biomass) <sup>-1</sup> ]
Glucose	5.36	26
Dextrin	6.53	3
Glycerol	5.21	7
Soluble starch	5.61	51
Molasses	8.11	2
Maltose	6.63	15
Lactose	5.92	2

<sup>1</sup>Using glucose as only carbon source, the optimum concentration of glucose was 40 g/l

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 와  $\text{CaCO}_3$ 의 농도에 따른 영향을 조사한 결과, 최적 농도는 0.2 g/l(w/w)이었고  $\text{CaCO}_3$ 의 최적 농도는 2 g/l이었다(Table 4).  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CoCl}_2$  및  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 의 최적 농도는 각각 1 g/l, 1 mg/l 및 1 g/l이었다(data 생략).

이상의 결과들로부터 *S. fradiae* MNU20을 이용한 tylosin 생산 시에 최적 배지 조성은 Table 5와 같으며 tylosin 생성능은 159 mg(g biomass)<sup>-1</sup>이었다. 배지의 최적화로 14배(*S. fradiae* NRRL2702에 비해)의 tylosin 생성능이 증가하였다.

배양 중에 glucose의 첨가 시기와 농도를 달리하여 tylosin 생성능을 비교한 결과 Table 6과 같다. Glu-

cose를 넣어 준 경우 pH는 낮아졌지만 tylosin 생성능이 감소하였다. 이는 1% 또는 2%라는 높은 농도의 glucose를 넣어 줌으로써 이 glucose에 의해서 성장은 왕성히 일어났으나 이차대사는 억제되었기 때문일 것이다. 이는 tylosin 생성이 시작되는 단계와 왕성하게 생성되는 단계인 3일째와 6일째에 glucose를 넣어 준 경우에 tylosin 생성능이 낮아진 정도가 tylosin 생성이 거의 끝난 단계인 9일째에 넣어 준 경우에 감소한 정도보다 심한 것으로 보아 타당하다고 할 수 있다. 이런 현상은 *S. antibioticus*(2), *S. alboniger*(4) 및 *S. lactamdurans*(3)에서 보고되었다.

#### Tylosin 생성능에 대한 valine과 succinate의 효과

Valine과 succinate는 tylosin 생성능을 높였지만 valine만을 넣어 준 경우, 1 g/l시 최대 tylosin 생성능이 나타났으며 succinate를 1.5 g/l로 넣어 줄 경우는 어떤 영향도 주지 못했다(Table 7). Tylosin은 저급 지방산(acetate, propionate 및 n-butyrate)으로부터 형

**Table 3. Determination of nitrogen source for the optimal medium composition of *S. fradiae* MNU20 using soluble starch (40 g/l) and glucose (1 g/l) as carbon source**

Nitrogen source (20 g/l) <sup>1</sup>	Final pH	Tylosin productivity [mg (g biomass) <sup>-1</sup> ]
Sodium glutamate	7.21	60
Ammonium sulfate	8.12	2
Corn steep liquor	6.02	95
Soy bean meal	6.01	55
Soy bean oil	6.03	140
Pharmamedia	5.03	57
Fish meal	6.02	41

**Table 4. Determination of other components for the optimal medium composition of *S. fradiae* MNU20 using soluble starch (40 g/l) and glucose (1 g/l) as carbon source and soy bean oil (7.5 ml/l) and corn steep liquor (1 g/l) as nitrogen source**

Component	Concentration (g/l)	Tylosin productivity [mg (g biomass) <sup>-1</sup> ]
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0	115
	1	139
	2	147
	3	122
	4	89
$\text{CaCO}_3$	0	140
	2	152
	4	145
	6	140
	8	132

**Table 5. Composition of optimal medium for the tylosin production by *S. fradiae* MNU20**

Component	Concentration (g/l)
Soluble starch	40
Glucose	1
Corn steep liquor	1
Soy bean oil	7.5 <sup>1</sup>
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{CaCO}_3$	2
$\text{NaCl}$	2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.001

<sup>1</sup>Dimension of concentration, ml/l

**Table 6. Effect of glucose addition on the tylosin productivity in *S. fradiae* MNU20**

Concentration (g/l)	Addition time (day)	Final pH	Tylosin productivity [mg (g biomass) <sup>-1</sup> ]
0	0	7.25	159
10	3	7.17	128
10	6	7.17	131
10	9	7.02	153
20	3	7.14	115
20	6	7.08	121
20	9	6.94	144

**Table 7. Effect of valine (Val) and succinate (Suc) addition<sup>1</sup> on the tylosin productivity in *S. fradiae* MNU20**

Supplement	Concentration (g/l)	Final pH	Tylosin productivity [mg (g biomass) <sup>-1</sup> ]
NA <sup>2</sup>	0.0	7.51	159
Val	0.5	7.23	223
Val	1.0	7.15	250
Val	1.5	7.21	221
Suc	0.5	7.49	189
Suc	1.0	7.79	161
Suc	1.5	7.77	159

<sup>1</sup>Added in 5 day, <sup>2</sup>NA, not added

성되고(5) valine은 valine dehydrogenase에 의해서 2-oxoisovalerate가 되며 이는 결국 propionate 및 n-butyrate가 된다고 보고되었다(6). 또한 succinate는 propionate로 전환됨이 밝혀졌다(5). Valine과 succinate는 *S. fradiae* MNU20에서 tylosin의 전구물질로 전환되어 tylosin 생성능을 높여 주는 것으로 사료되며 특히 MNU20은, *S. fradiae* NRRL2702와 비교시, valine이 전구물질로 전환되는 능률이 succinate가 전구물질로 전환되는 능력보다 높은 것으로 유추할 수 있다.

#### Tylosin 생성능에 대한 valine 및 natural zeolite 첨가 시기의 효과

Valine만을 넣어 준 결과(Table 7)보다 zeolite을 넣어 준 경우 첨가시기에 관계없이 tylosin 생성능은 증가하였다. 특히 valine을 배양 초기에 넣어 주고 zeolite을 배양 5일째에 첨가해 줄 경우에 *S. fradiae* NRRL2702보다 3,172% 증가된 최대 tylosin 생성능이 나타났다(Table 8). 이는 초기에 넣어 준 valine이 propionate나 n-butyrate로 전환되어 tylosin 생성에 필요한 전구물질이 많이 생성되기 때문이다. 또한 일차 대사에 쓰여지고 남는 암모늄 이온은 tylosin 생성에 저해 작용을 야기시키지만(5) 이를 trapping하는 물질이 zeolite이므로 배양 5일째에 zeolite을 첨가해 주어야 할 것이다. zeolite은 nanaomycin 항생물질 등의 생성 시에 암모늄 이온을 trapping하여 그 생성을 증진시키는 물질로 보고되었다(7). 암모늄 이온을 trapping하는 다른 물질인 magnesium phosphate는 tylosin 생성능을 증진시키지 못했다(data 생략). 이와 같은 돌연변이에 의한 균주개발과 최적 생성 조건의 확립으로 약 11배의 tylosin 생성능이 증진되었으며 이는 공장 규모의 항생물질의 생산에

**Table 8. Effect of valine (Val) and natural zeolite (ZL) addition time on the tylosin productivity in *S. fradiae* MNU20 and NRRL2702**

Addition time of Val <sup>1</sup> /ZL <sup>2</sup> (day)	Final pH of MNU20/NRRL2702	Tylosin productivity of MNU20/NRRL2702 [mg (g biomass) <sup>-1</sup> ]
NA <sup>3</sup>	7.52/7.51	160/15
0/0	7.71/7.70	280/27
0/5	7.61/7.62	349/31
5/0	7.84/7.81	261/25
5/5	7.64/7.62	310/29

<sup>1</sup>1.0 g/l of valine was added

<sup>2</sup>5.0 g/l of natural zeolite was added

<sup>3</sup>NA, Val and ZL were not added

중요한 유용성을 제시해 준다.

## 요 약

*S. fradiae* NRRL2702로부터 MNNG와 UV 처리에 의해서 tylosin 생성능이 증진된 *S. fradiae* MNU20 균주를 선별하였다. MNU20이 최대 tylosin 생성능을 갖는 최적 배지 조성은 soluble starch 4 g, glucose 1 g, corn steep liquor 1 g, soy bean oil 7.5 ml, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O 1 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, NaCl 2 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.001 g, 증류수 1리터였다. MNU20의 최적 플라스크 배양에서 glucose는 tylosin 생성을 저해하였고 valine과 succinate는 증진시켰으며 valine에 의한 증진 효과가 높았으며 natural zeolite에 의한 암모늄 이온 trapping 효과에 의해서 tylosin 생성능이 증진되었다. 특히 이들의 첨가 시기는 tylosin 생성능의 증진에 중요한 요인이었다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Baltz, R.H. 1978. Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regulation. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 93-102.
- Baltz, R.H. and P. Matsushima. 1983. Advances in protoplast fusion and transformation in *Streptomyces*.

- tomyces. Exper. Suppl.* **46**: 143-148.
3. Cortes, J., P. Liras, J.M. Castro, and J.F. Martin. 1986. Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in *Streptomyces lactamdurans* is exerted on the formation of  $\alpha$ -aminoadipyl-cysteinyl-valine and deacetoxycephalosporin C synthase. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1805-1811.
  4. Delic, V., D.A. Hopwood, and E.J. Friend. 1970. Mutagenesis by MNNG in *Streptomyces coelicolor*. *Mutation Res.* **91**: 167-178.
  5. Demain A.L. 1985. Control of cephamycin formation in *Streptomyces clavurigerus* by nitrogen compounds. Pp. 77-88. In H. Kleinkauf, H. Dohren, H. Dornauer, and H. Neseman (ed.), *Regulation of Secondary Metabolite Formation*, VCH, Berlin.
  6. Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrempf. 1985. Making a *Streptomyces* spore suspension. Pp. 3-5. In F. Crowe and Sons (ed.), *Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual*. John Innes Institute, Norwich, United Kingdom.
  7. Jones, G.H. 1985. Regulation of phenoxazine synthase expression in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* **163**: 1215-1218.
  8. Kang, H.A. and K.J. Lee. 1987. Regulation of tylosin biosynthesis by cell growth rate in *Streptomyces fradiae*. *Kor. J. Microbiol.* **16**: 492-495.
  9. Kennedy, J.H. 1978. Lipid chromatographic analysis of fermentation broth: cephalosporin C and tylosin. *J. Chromatogr. Sci.* **16**: 492-495.
  10. McGuire, J.M., W.S. Boniece, C.E. Higgins, M.M. Hoehm, W.M. Starks, J. Westhead, and R.M. Wolfe. 1961. Tylosin a new antibiotic: I. Microbial studies. *Antibiotic. Chemother.* **11**: 320-327.
  11. Morin, R.B. and M. Gorman. 1964. The partial structures of tylosin, a macrolide antibiotic. *Tetrahedron Lett.* **34**: 2339-2345.
  12. Omura, S., A. Takeshima, A. Nakagawa, F. Piriou, and G. Lukacs. 1977. Studies on the biosynthesis of 16-membered macrolide antibiotics using carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **16**: 2860-2866.
  13. Omura, S., A. Taki, K. Matsuda, and Y. Tanaka. 1984. Ammonium ions suppress the amino acid metabolism involved in the biosynthesis of protylonolide in a mutant of *S. fradiae*. *J. Antibiot.* **37**: 1363-1369.
  14. Sankaran, L. and H. Pogell. 1975. Biosynthesis of puromycin in *Streptomyces alboniger*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**: 721-726.
  15. Seno, E.T., F.M. Pieper, and F.M. Huber. 1977. Terminal stages in the biosynthesis of tylosin. *Antimicro. Agents Chemother.* **11**: 455-461.
  16. Shen, Y.Q., J. Heim, N.A. Solomon, S. Wolfe, and A.L. Demain. 1984. Repression of  $\beta$ -lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen source. *J. Antibiotic.* **37**: 503-511.
  17. Stonesifer, J. and R.H. Baltz. 1985. Mutagenic DNA repair in *Streptomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 1180-1183.

(Received 10 August 1995)