

## *Nocardia orientalis* 변이주에 의한 고농도 혼합당을 이용한 반코마이신 생산

김창호\* · 고영환 · 고중환  
제일제당(주), 대소공장

**The Production of Vancomycin Using High Concentration of Mixture of Carbon Sources by *Nocardia orientalis* Mutant.** Chang-Ho Kim\*, Young-Hwan Ko and Jung-Hwan Ko. *Che Il Je Dang Corporation, San 66, Daepung-ri Daeso-myun, Eumsung-gun, Chung-buk 805-109, Korea* – The effects of carbon sources on vancomycin production were investigated using *Nocardia orientalis* CSVC 3300. Among carbon sources tested, glucose, maltose and fructose were effective for the production of vancomycin. Glucose was favored for growth, but decrease the production of vancomycin at the concentration above 7.5%. In comparison, maltose did not decrease the production of vancomycin up to the concentration of 20%. When the mixture of glucose and maltose was used in the ratio 1:3 to 1:4, the highest production of vancomycin was achieved. When glucose concentration was set at 3.0%, catabolite repression could not be observed up to total sugar concentration of 16.0%. Fermentation was carried out using commercial hydrolyzed starch composed of glucose, maltose, maltotriose and maltotetraose. The initial glucose concentration was set at 3.0% and subsequent oligosaccharide consumption was monitored by checking their supernatant with HPLC. During initial cultivation for 38 hour, glucose was the sole carbon source leading to rapid growth. After cell growth stopped, the maltose and glucose concentrations increased due to degradation of maltotriose and maltotetraose, but glucose level was maintained at around 3.0%. After 70 hour fermentation, maltose slowly converted to glucose, and vancomycin production continued during the period.

반코마이신은 1956년 McCormick(1)등에 의해 분리된 glycopeptide계 항생물질로 penicillin이나 cephalosporin계 항생제 내성균주에 탁월한 효과를 나타내는 항생제이다(2). 개발초기 독성이 강한 불순물(X라 명명) 때문에 널리 사용되지 못하였으나 X물질의 생산을 적게 하는 균주의 개발 및 정제기술의 발달로 순수한 제품이 생산되게 되었다(3).

항생물질 발효에서는 배양시 포도당처럼 이용하기 쉬운 탄소원을 공급하면 균체의 성장은 촉진되나 항생물질의 생산량은 감소하는 catabolite repression이 많이 보고되어져 있다(4-6). 항생물질과 같은 2차 대사물질은 균체의 성장과 항생물질의 생산이 비록 나누어져 있지만, 대부분의 2차대사물질의 생성이 1차대사물질을 중간원료로 하여 이루어지기 때문에 균체의 성장 과정이나 균체의 농도가 생산에 많은 영향을 미친다(7). 본 논문에서는 균체의 성장을 양호하게 하는 포도당과 catabolite repression을 하지 않는 탄소원을 적정 비율로 조합하여 고농도 탄소원을 이용하여 높은 농도의 반코마이신을 얻고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 사용배지

\*Corresponding author.

Key words: Vancomycin, *Nocardia orientalis*, catabolite repression

본 실험에 사용한 균주는 *Nocardia orientalis* ATCC 11478를 20W 자외선등으로 30 cm 거리에서 60~80초 자외선을 조사하여 얻은 *Nocardia orientalis* CSVC3300 변이주를 사용하였다. 4°C 사면배지에서 냉장 보관된 균주를 포도당 2.0%, 맥아즙 0.5%, 펩톤 1.5%의 액체 배지에 접종하여 30°C에서 20시간 삼각플라스크 배양후 접종용 균주로 사용하였다. 삼각플라스크 및 5L 발효조의 본배양 배지로는 가수분해전분 8~20%, 포도당 1.5%, 대두박 2.0%, 참치엑기스 1.5%, Tyrosine 0.01%, NaCl 0.2%를 사용하였다.

#### 분석방법

균체의성장은 발효액 10 ml을 취하여 500 g에서 10 분간 원심분리후 PMV(packed mycelium volume)을 측정하였다. 전체 당은 Bertrand법(8)에 의하여 환원당을 정량 하였고, 포도당, 말토스, 말토티리오스 및 말토테트라오스는 carbohydrate analytical column(3.9×300 mm)과 RI detector를 이용하여 waters 모델 440 HPLC를 이용하여 정량하였으며 반코마이신 농도는 comosil c<sub>18</sub> column(4.6×250 mm)과 U.V detector를 이용하여 동일한 HPLC를 이용하여 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

#### 단일당 영향실험

각 탄소원의 농도를 8%로 하여 34°C에서 4일간 삼

각플라스크 배양을 실시하여 각 탄소원의 농도가 반코마이신 생성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 1). 포도당, 과당, 말토스의 경우 반코마이신 생성이 양호하였으나 설탕, 말토티리오스, 전분의 경우는 생성량이 상대적으로 적었다. catabolite repression 유무를 조사하기 위하여 포도당 농도별로 삼각플라스크 배양을 실시하였다. 포도당 농도를 5.0%~20.0% 별로 하여 배양을 실시한 결과 Fig. 2와 같이 7.5% 이상시 catabolite repression 현상을 보여 반코마이신 생성이 감소하였다. 말토스를 이용하여 같은 실험을 한 경우에는 포도당과 달리 catabolite repression 현상이 나타나지 않아 말토스 농도변화에도 불구하고 비교적 안정된 반코마이신 역가를 보여주었다. Fig. 2 즉, 말토스 10.0% 이하의 농도에서는 포도당의 경우보다 반코마이신 생성량이 낮았지만 말토스 농도 20.0%에서도 반코마이신 생성이 저해를 받지 않았다.

현재까지 알려진 바에 의하면 말토스는 neomycin이나 sisomycin의 생산은 저해하지 않지만 kanamycin이나 cephalosporin 생성을 저해한다고 보고되어지고 있다(7).

**혼합당 영향 실험**

포도당과 말토스를 혼합하여 배양시 catabolite repression 현상유무를 조사하기 위하여 포도당과 말토스를 일정비율로 섞어 삼각플라스크 배양을 실시하였다. 이 때 총당량은 포도당만 배양에 사용시 반코마이신의 생산 억제 현상이 일어나는 12.0%로 결정하였다. Fig. 3에서와 같이 말토스의 비율이 증가할수록 반코마이신의

생성량이 증가하였고 포도당, 말토스의 농도를 3.0%, 9.0%로 하였을 때 가장 많은 량의 반코마이신이 생성되었으나 포도당의 농도가 2.0% 이하일 때 반코마이신의 생성이 감소하였다. 위와 같은 결과로부터 균체의 원활한 성장과 catabolite repression을 피하기 위하여 포도당 농도를 3.0% 정도로 유지하면서 발효조에 의한 실험을 실시하였다.

**발효조에 의한 반코마이신 생성**

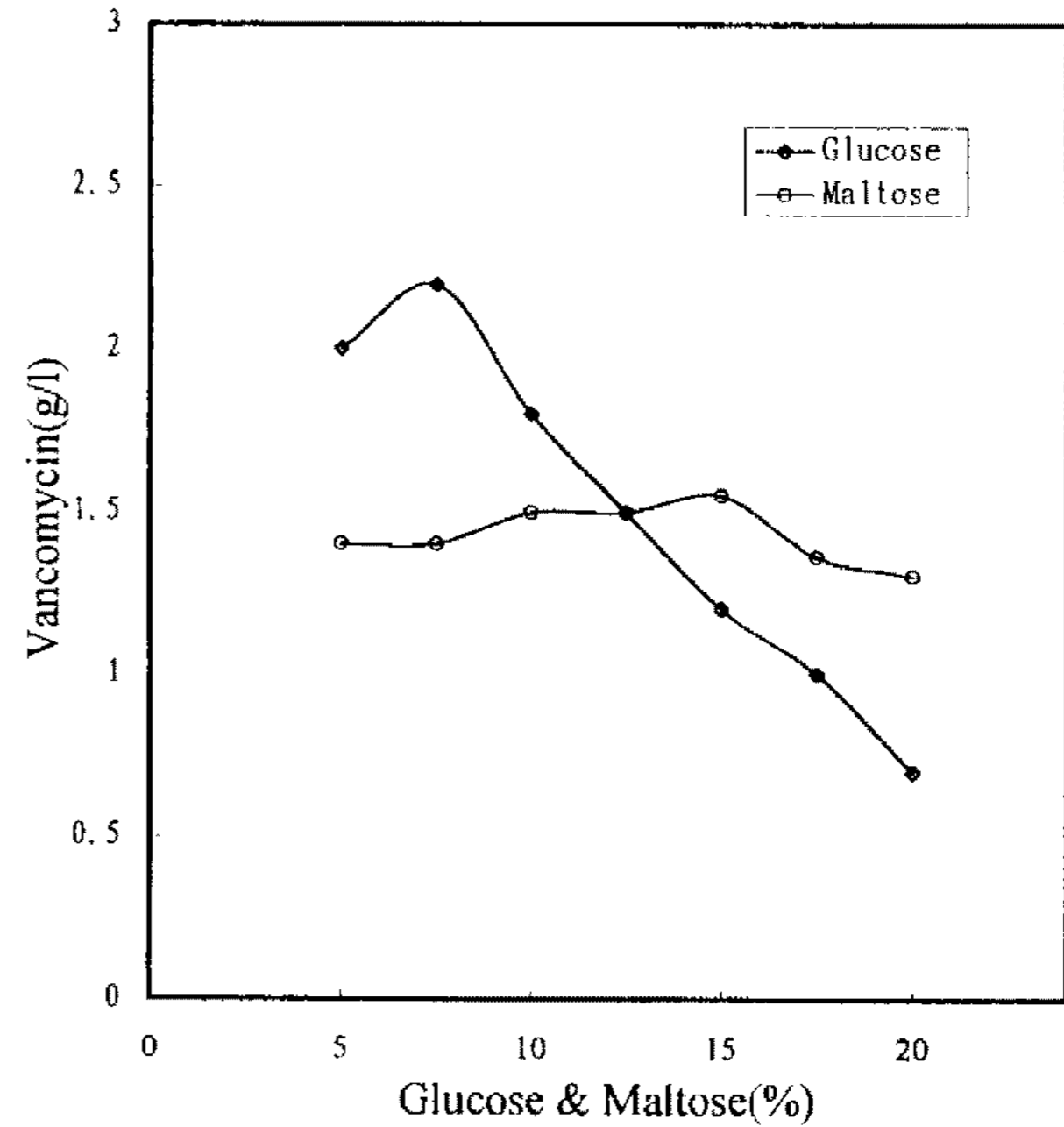


Fig. 2. Effect of glucose and maltose concentration on vancomycin production in flask culture.

-○- Glucose, -◇- Maltose

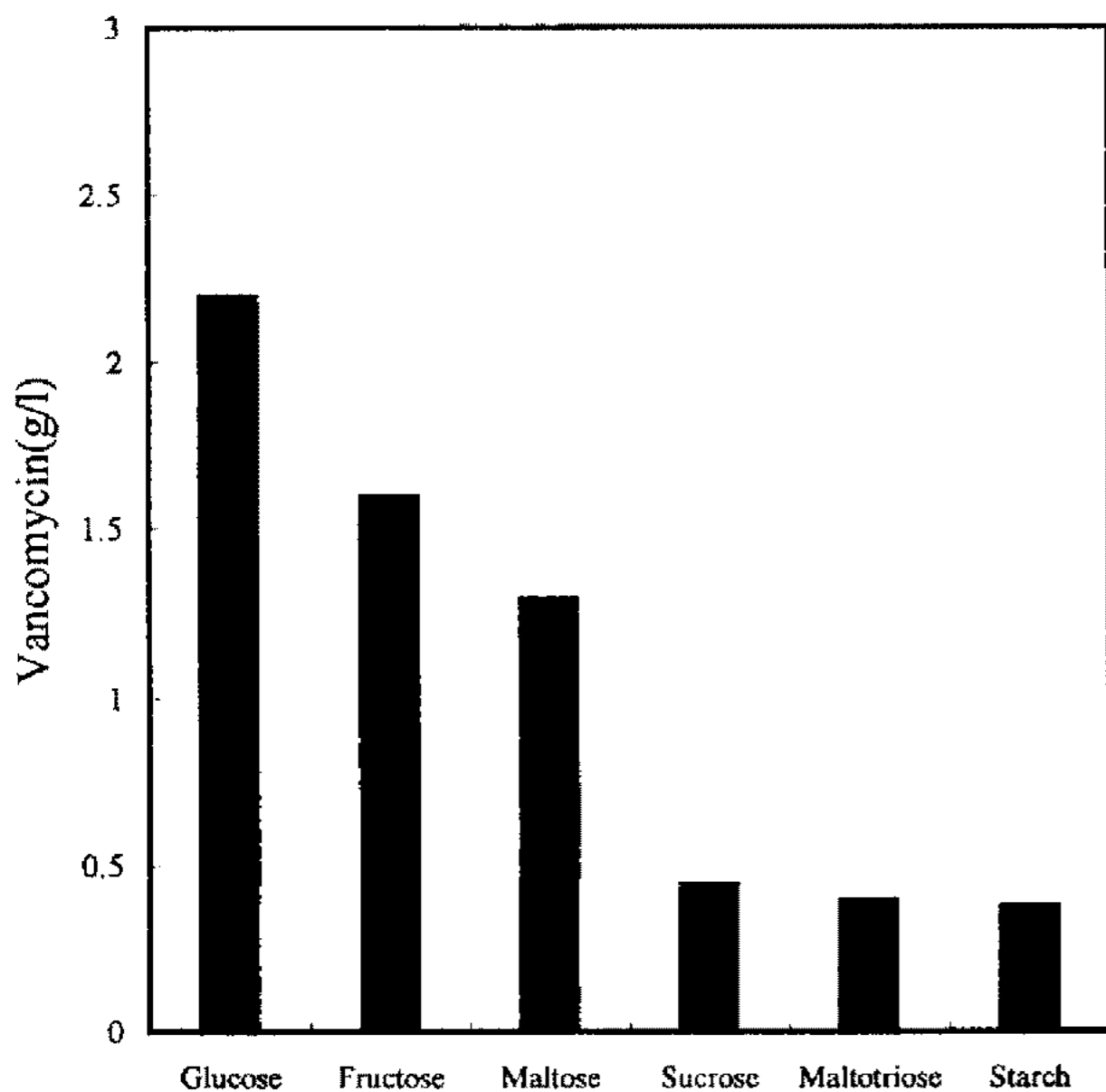


Fig. 1. Effect of carbon sources on vancomycin production at 34°C and rpm 220 in flask culture.

The initial concentration of each carbon source → 8% w/v Culture time → 96 hrs

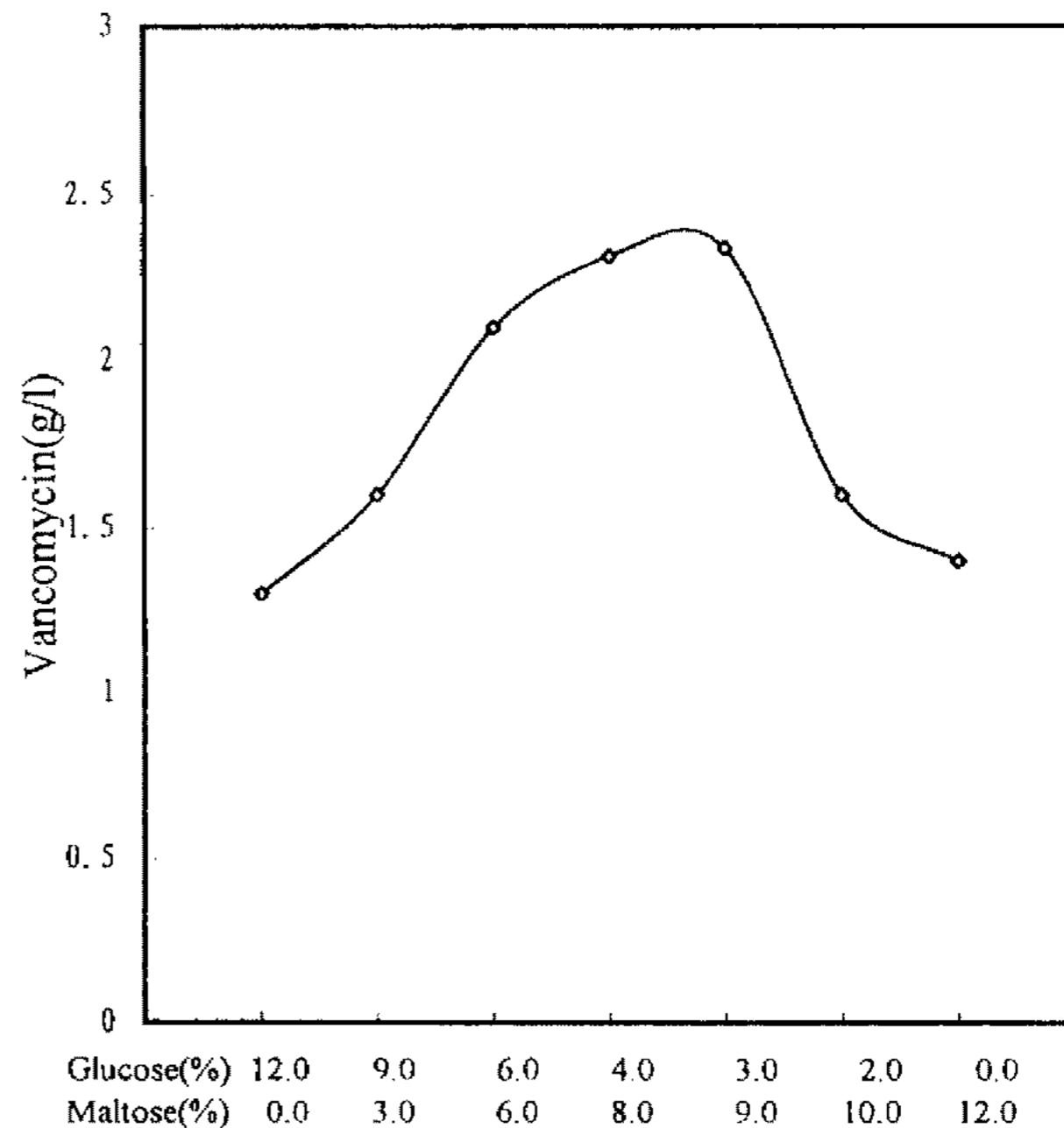
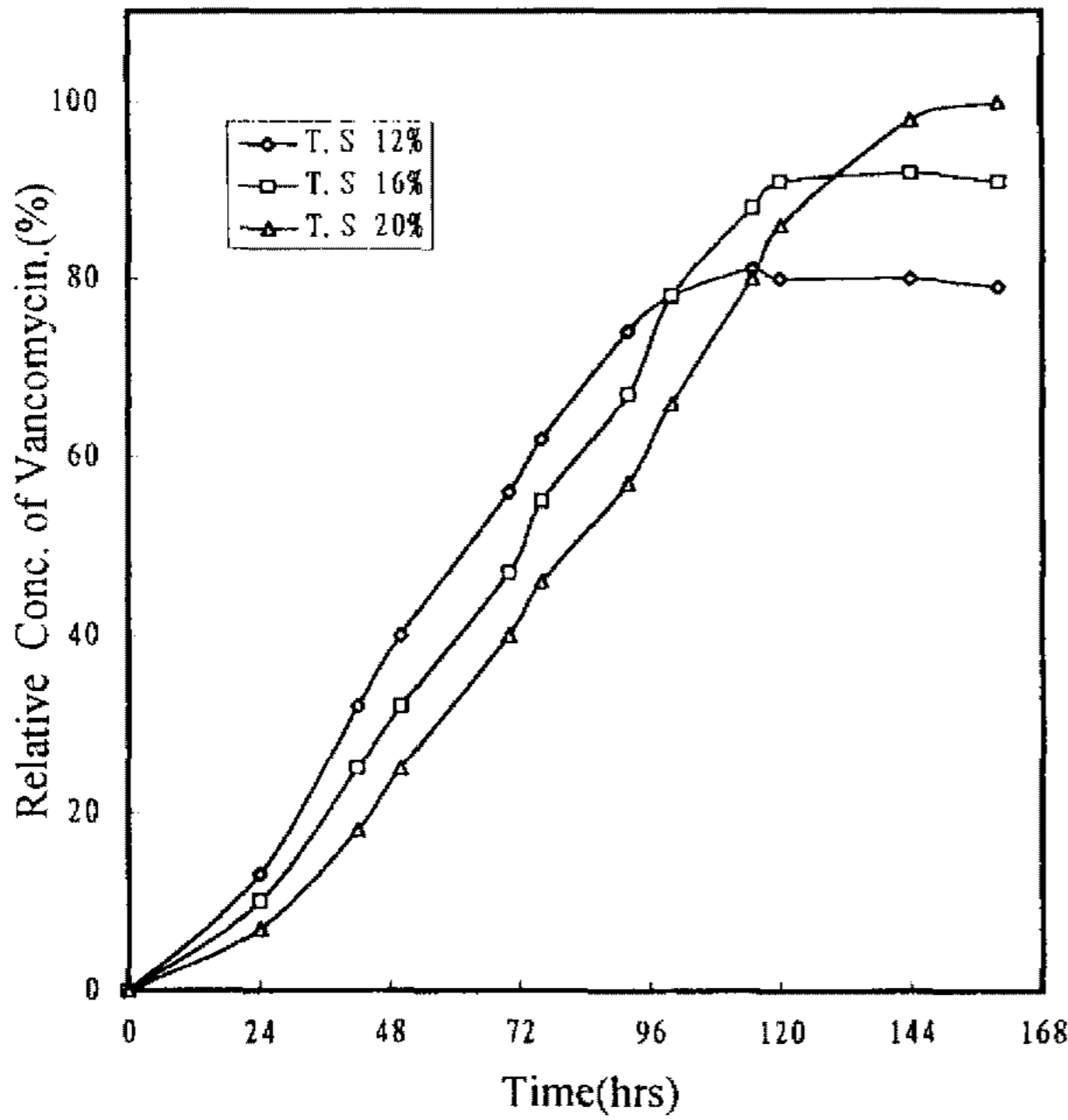


Fig. 3. Effect of glucose-maltose mixture on vancomycin production in flask culture.



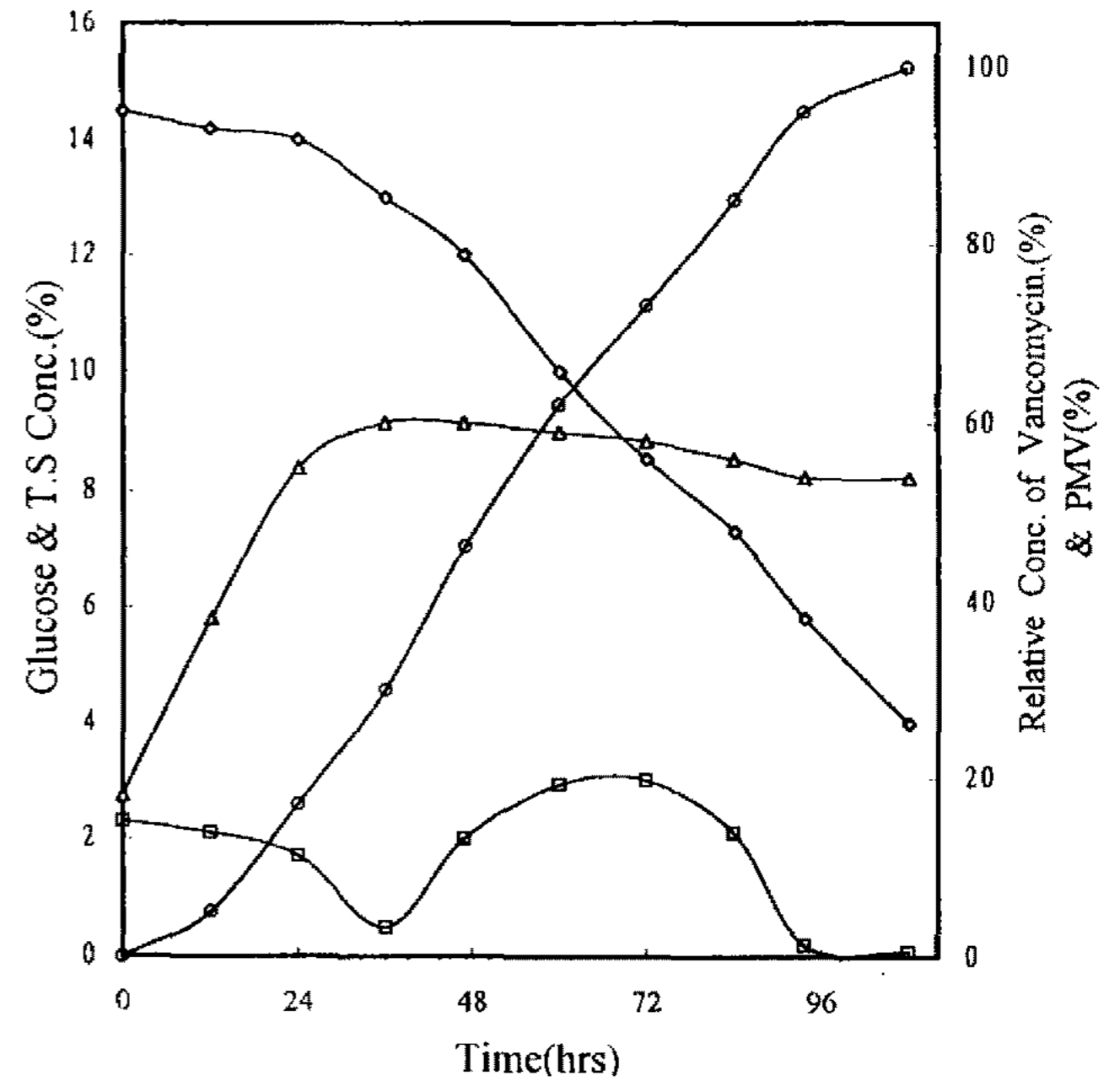
**Fig. 4. Effect of total sugar (T.S.) concentration on vancomycin production in 5L fermentor.**  
Temp.: 34°C, RPM: 500~700, Aeration: 0.5~1.0 vvm  
-◇- T.S 12%, -□- T.S 16%, -△- T.S 20%

**Table 1. Composition of hydrolyzed starch solution.**

Composition	Concentration
Glucose	6.0
Maltose	29.0
Maltotriose	37.0
Matotetraose	4.0
Water	24.0

발효중 당이 모두 소모되면 배양액의 pH가 상승하면서 반코마이신의 생성이 중지되었다. 이때 추가당을 공급하여도 더 이상 반코마이신이 생성되지 않고 균체의 성장만 일어나는 것이 관찰되었다. 그러므로 고농도의 반코마이신을 생산하기 위하여 초기 당농도를 높게 하는 것이 유리하였다. 포도당 농도를 3.0%로 유지하면서 말토스를 첨가하여 총당량을 12.0%, 16.0%, 20.0%로 하여 5L 발효조에서 반코마이신 발효를 실시하였다. Fig. 4에서와 같이 총당량 16.0%까지 반코마이신 생성이 양호하였으며 총당량이 20.0%에서는 반코마이신의 생산이 다소 늦어지는 현상이 일어났다.

저가의 탄소원을 사용하기 위하여 공업적으로 대량 생산되는 가수분해 전분을 사용하여 반코마이신 발효를 실시하였다. 이때 선정된 가수분해전분의 조성 성분은 Table 1과 같이 포도당, 말토스 그리고 포도당으로 구성된 3탄당, 4탄당으로 이루어져 있다. 가수분해전분의 포도당 농도가 낮기 때문에 초기 포도당 농도를 3.0%로 유지하기 위하여 15 g/l의 포도당을 배지에 추가하였다. Fig. 5에서와 같이 초기 균체의 성장은 이용하기 쉬운



**Fig. 5. Typical fermentation profiles of vancomycin in 5L fermentor.**  
-◇- T.S, -□- Glucose, -△- PMV, -○- Vancomycin

포도당에 의하여 일어나는 것으로 관찰되었으며 균체의 성장이 멈춘 후 전체 당의 농도가 떨어지면서 반코마이신이 생성되는 것이 확인되었다.

110시간 이상 배양시 포도당의 농도가 0.03% 이하로 떨어지면서 반코마이신의 생성이 중단되었다. 이때 총 환원당은 4.0%를 기록하였으나 이 물질은 환원력을 가진 물질로서 비발효성 물질이다. 이것은 HPLC에 의한 당분석을 통하여 당이 아님을 알 수 있었다.

배양중 말토스 이상의 다당류들이 균체에 의하여 이용되는 과정을 알아보기 위하여 발효액 상등액을 HPLC를 이용하여 시간에 따른 각각의 당농도 변화를 살펴보았다. Fig. 6에서와 같이 배양 시작후 38시간 동안 포도당이 단독으로 소모되면서 균체의 성장이 빠르게 일어났다. 균체의 성장이 멈춘 후 말토트리오스 및 말토테트로스가 분해되면서 말토스와 포도당의 농도가 증가되었고 포도당의 농도를 3.0% 내외로 유지하면서 반코마이신의 생성이 계속되었다.

말토테트로스를 단독으로 탄소원으로 이용시 반코마이신의 생성이 매우 낮은 것은(Fig. 1) 위와 같은 결과로부터 유추하면 배양 초기에 균체가 쉽게 이용할 수 있는 탄소원(포도당)이 부족하여 균체의 성장이 매우 저조한 결과로 사료된다. 그러므로 포도당 같은 균체의 성장을 양호하게 하는 이용하기 쉬운 탄소원과 catabolite repression이 최소인 탄소원의 농도를 적절한 비율로 사용하므로써 균체의 성장을 양호하게 함과 동시에 높은 농도의 반코마이신을 생성할 수 있었다.

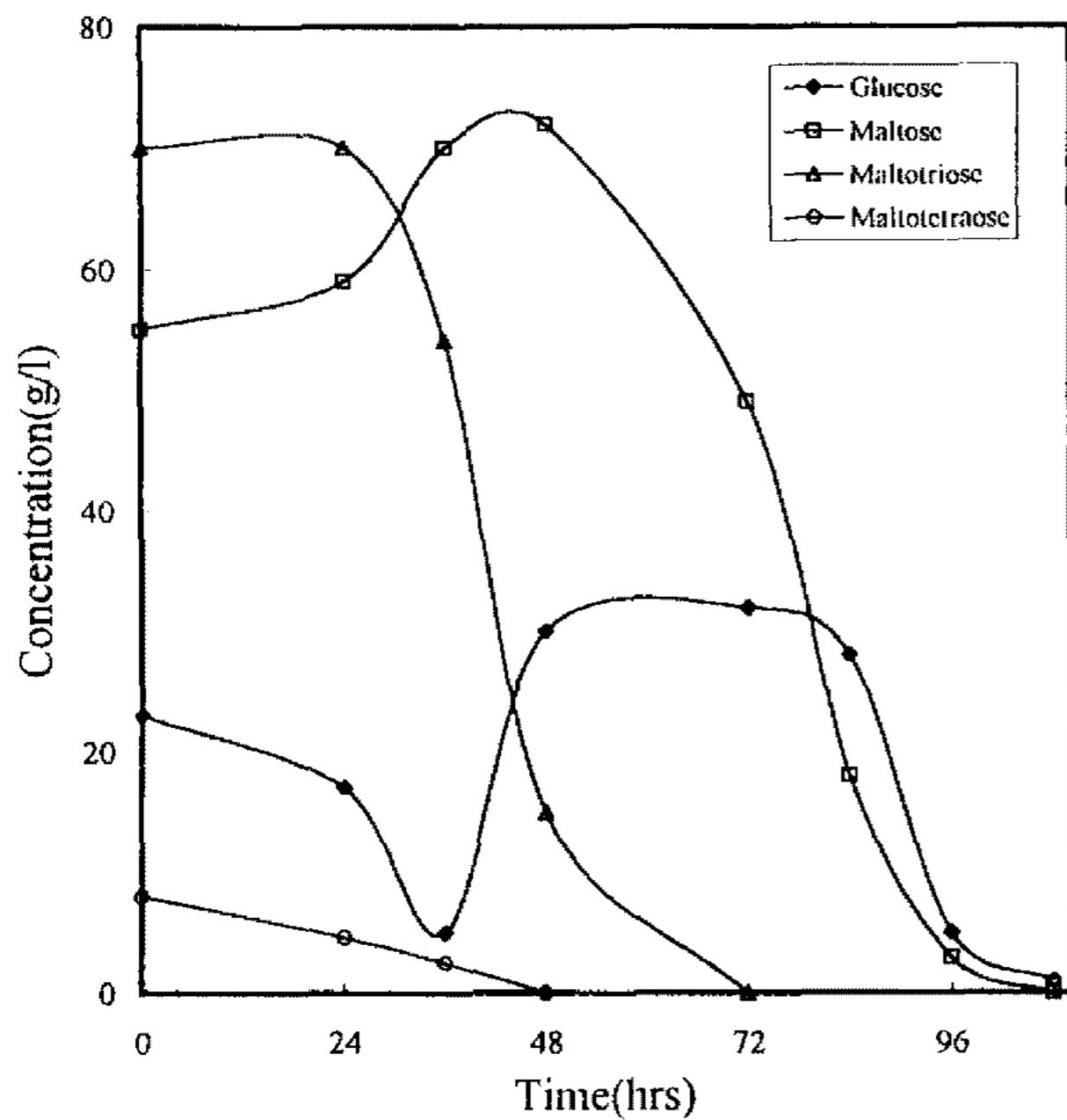


Fig. 6. Profile of carbon source consumption during the cultivation.  
 -◇- Glucose, -□- Maltose, -△- Maltotriose, -○- Maltotetraose

요 약

반코마이신 생성에 미치는 탄소원의 영향을 조사하였다. 조사한 탄소원중 포도당, 말토스, 과당이 반코마이신의 생성에 양호하였으나 포도당 7.5% 이상의 농도에서는 반코마이신의 생성이 억제되었다. 그러나 말토스는 20%까지 반코마이신의 생성을 억제하지 않았다. 말토스와 포도당을 혼합하여 배양한 결과 3:1 내지 4:1 비율로 하였을 때 가장 양호한 결과를 나타내었다. 포도당 농도를 3%로 고정후 말토스를 첨가하여 발효조에 의한 배양을 실시한 결과 당농도가 16%까지 catabolite repression 현상을 보이지 않고 반코마이신 생성이 용이하였다.

상업적으로 가격이 싼 탄소원을 이용하기 위하여 포도당, 말토스 및 다당류(말토티리오스와 말토테트로

스)를 함유하고 있는 가수분해 전분을 이용하여 반코마이신 발효를 실시하였다. 배지내 초기 포도당 농도를 3.0%로 맞춘 후 배양중 말토스 이상의 다당류들이 균체에 의하여 이용되는 과정을 알아보기 위하여 발효액 상등액을 HPLC를 이용하여 시간에 따른 각 당들의 농도 변화를 살펴보았다. 배양 시작 후 38시간동안 포도당이 단독으로 소모되면서 균체의 성장이 빠르게 일어났다. 균체의 성장이 멈춘 후 말토티리오스 및 말토테트로스가 분해되면서 말토스와 포도당의 농도가 증가되었고 이때 포도당의 농도는 증가하여 3.0% 이내로 유지되면서 반코마이신의 생성이 계속되었다.

참고문헌

1. McCormick, M.H., W.H. Stark, and G.E. Dittenger. 1956. Vancomycin new antibiotic. *Antibiotic Ann.* 1955-1956.
2. Cunha, B.A. and A.M. Ristuccia. 1983. Clinical usefulness of vancomycin. *Clin. Pharm.* 2: 417-424.
3. McCormick, M.H. and H. Westlacke. 1984. Using Non-functional resins purification of Glycopeptide antibiotics. US Patent, 4,440,753.
4. Aharonowitz, Y. and A.L. Demain. 1978. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14: 159-164.
5. Gall, M. and E. Katz. 1972. Regulation of secondary metabolite biosynthesis Catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J. Bacteriol.* 109: 659-667.
6. A.L. Demain. 1982. Catabolite regulation in industrial microbiology, Pp. 3-20. In V. Krumphanzl, B. Sikyta, and Z. Van (ed), *Overproduction of Microbial Production*, Academic press.
7. D.I.C. Wang, C.L. Coony, A.L. Demain, P. Dunnill, A. E. Humphry, and M.D. Lilly. 1979. *Fermentation and Enzymatic Technology*, Pp. 26-36. John Wiley and Sons, Inc.
8. 한국생화학회 교재편찬위원회. 1986. *신편 실험생화학*, Pp. 405-407. 탐구당, 서울.

(Received 9 January 1996)