약학회지 제40권 제 2 호 212~217(1996)
Yakhak Hoeji Vol. 40, No. 2

형질전환에 의한 *S. cattleya*의 카바페넴 항생제 생산성 향상

박지선 · 이강만#
이화여자대학교 약학대학
(Received November 2, 1995)

Improvement of Carbapenem Antibiotics Productivity in *S. cattleya* by Transformation

Ji Sun Park and Kang Man Lee#
College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract— *Streptomyces cattleya* is a producer of carbapenem antibiotics, thienamycin and N-acetylthienamycin, which have potent and broad-spectrum antibacterial activities. We studied on strain improvement for antibiotic productivity of *S. cattleya* by transformation technique which employed *S. cattleya* protoplasts and chromosomal DNAs of glutamic acid producers: *Corynebacterium glutamicum* and *Arthrobacter simplex*. 150 Transformant strains were cultured and bioassayed using *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* as test organisms. 8.7% of transformants tested showed 1.4~2.6 fold higher productivities than wild type which produced 1.61±0.67 μg/ml. The best transformant produced 8.36±2.84 μg/ml carbapenems.

Keywords □ *S. cattleya*, antibiotic, transformation, protoplast regeneration, productivity.

*Streptomyces cattleya*는 cephamycin, penicillin N과 carbapenem계 항생제인 thienamycin, N-acetylthienamycin 등을 생산하는 균주이다.[1)]

Carbapenem계 항생제는 β-lactamase에 의한 가수분해에 높은 저항성이 있어 β-lactam계 항생제에 내성을 획득한 많은 균의 감염증에 사용되며, 또 대부분의 Gram 양성균 특히 Gram 양성의 구균들에 높은 항생력이 있고 *Pseudomonas* 속을 포함하여 대부분의 Gram 음성균에 대해 다른 β-lactam계 항생제보다 높은 항생력을 보이는 등 강력하고 광범위한 항생 효과로 현재 많은 관심을 끌고 있는 항생제이다. 자연계로부터 처음으로 확인된 carbapenem계 항생제인 thienamycin은 생체 조직에 잘 분포되며 동물 실험에서 다른 항생제보다 적은 부작용을 나타낸다고 보고되어[2)] 이 물질의 화학적 안정성을 높인 N-formylimidoyl 유도체 imipenem이 뇌수막염, 레지오넬라증, 급성 전신 감염증 등 각종 병균의 감염증에 임상적으로 사용되고 있다.[3)]

한편 *S. cattleya*에서 carbapenem계 항생제의 생산량은 1~4 μg/ml정도로[1)] 아주 낮은데 이처럼 균주에서의 항생제 생산량이 적은 경우, 발효에 의한 산업적 생산이 어렵기 때문에 이 균주에서의 carbapenem계 항생제 생산량의 증가에 관심을 갖게 되었다. 일반적으로 생산성이 증가된 균주를 선별하는 연구에는 주로 UV, X-ray 조사, NTG등의 화학변이제 처리에 의한 변이가 이용되고 있고 원형질체 융합이나 형질전환방법등을 이용한 유전자 재조합도 가능하다고 알려져 있다.[4)] 본 연구에서는 형질전환을 이용한 균주개량을 시도하였는데 형질전환에는 *S. cattleya*의 원형질체와 이 균주에서 carbapenem계 항생물질의 생합성 전구체로 알려진 glutamic acid[5)]를 생산하는 *C. glutamicum*[6)]과 *A. simplex*[7)]의 chromosomal DNA를 이용하였다.

*S. cattleya*의 포자를 자외선 조사하여 얻은 ar-

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-360-3041, 3036 (팩스) 02-360-3051, 2851

ginine 영양요구주 A-32의 원형질체에 PEG를 이용한 염색체 형질전환을 실시하였고, 재생되는 형질전환균주(transformant)를 선별하기 위하여 최소재생배지(MRM)의 최적화를 검토하였다. 형질전환균주들을 액체배양하여 bioassay로 정량시 원균주보다 생산성이 5.2배까지 향상된 균주를 얻을 수 있었기에 이에 보고하는 바이다.

실험방법

균주 - 본 연구에서는 carbapenem계 항생제 생산균주로 *Streptomyces cattleya* KCTC 1468과 이 균주의 변이로 얻어진 arginine 영양요구주 A-32를, glutamic acid 생산균주로는 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032와 *Arthrobacter simplex* IAM 1660을 사용하였고, bioassay의 시험균으로는 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus aureus* SG 511을 사용하였다.

배지 - A-32의 원형질체를 효율적으로 재생시키기 위한 MRM의 최적화 실험에는 최소배지(minimal medium : L-asparagine 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, agar 1%, pH 7.0~7.2, 멸균후 glucose 1% 첨가)에 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.51%, $CaCl_2$ 0.279%를 가한 배지를 최소재생배지(minimal regeneration medium : MRM)로 하고 여기에 arginine을 0.05% 첨가하여 기본배지로서 이용하였다. *S. cattleya* 및 형질전환균주의 carbapenem계 항생제 생산배지로는 complex medium(CM : glucose 1%, yeast extract 1%, $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.005%, KH_2PO_4 0.018%, Na_2HPO_4 0.0198%)을 사용하였다. Bioassay용 배지로는 *Bacillus*의 경우 NB배지를, *Staphylococcus*의 경우 Mueller-Hinton배지를 사용하였다.

시약 - 원형질체 형성에 사용한 lysozyme, 형질전환에 사용한 PEG 1000등은 Sigma 제품을 사용하였으며 PEG 4000, 6000은 Fluka, PEG 8000은 Fisher Biotech 제품을 사용하였다. 배지 성분은 Difco 제품을 사용하였으며 기타 모든 시약은 특급 또는 1급 제품을 사용하였다. Bioassay용 disc는 Whatman No. 3 여지를 직경 6 mm로 잘라 사용하였으며 표준품으로 사용한 imipenem은 중외제약의 티에남(주)를 사용하였다.

A-32의 원형질체 형성 - Lysozyme 처리시 2.5 mg/m*l* lysozyme solution을 60 m*l* 가한 것 이외의 모든 조작은 송 등[8]의 방법에 따랐으며 원형질체 형성 여부는 현미경으로 확인하였다.

MRM의 최적화 실험 - 위에서 기술한 기본 MRM에 sucrose를 첨가하거나 MRM의 성분 중 아미노산의 종류, $CaCl_2$, $MgCl_2$, K_2HPO_4의 농도를 변화시킨 배지를 조제하여 A-32 원형질체 현탁액을 도포하고 32 °C에서 7일간 배양한 후 재생된 colony수를 세어 원형질체 재생효율을 구하였다. 이 결과에 따라 각 성분의 조건중 재생효율이 가장 좋은 것을 조합한 변형 MRM을 조제하여 A-32 원형질체를 재생시켜 기본 MRM과 재생효율을 비교하였다.

Chromosomal DNA 분리 - *A. simplex*의 DNA는 Rodriguez *et al.*[9]의 방법에 따라, *C. glutamicum*의 DNA는 Follettie *et al.*[10]의 방법에 따라 분리하였으며, 분리된 DNA를 0.8% agarose gel electrophoresis와 260 nm, 280 nm에서의 흡광도 측정으로 농도를 결정하였다.

형질전환[11] - DNA의 양이 각각 0.5, 2.5, 3.75, 5, 7.5, 10 μg에 해당하는 부피의 DNA 용액(*A. simlpex* : 37.5 mg/m*l*, *C. glutamicum* : 86.8 mg/m*l*)을 P buffer 0.1 m*l*에 혼합하고 이를 0.2 m*l*의 원형질체 현탁액(10^7 cfu/m*l*)에 가하였다. 40% PEG 4000 0.3 m*l*를 가해 실온에서 5분간 반응시킨 후 P buffer 4 m*l*를 가하고 4000 rpm에서 원심분리하였다. Pellet을 P buffer 0.8 m*l*에 현탁시키고 현탁액을 300, 200, 100, 50 μ*l*씩 변형 MRM에 도포한 후 32°C에서 10일 동안 재생시켰다. 위에서 기술한 반응의 조건 중 PEG를 변화시켰을 때에는 PEG 4000대신 PEG 1000, 6000, 8000을 사용하였고, 반응시간은 5, 10, 20, 30분으로 변화시켰다. 이 때 DNA는 *A. simplex*의 DNA를 2.5 μg 사용하였다.

Carbapenem계 항생물질 생산성의 확인 - Carbapenem계 항생물질의 표준품으로는 imipenem 을 사용하였는데 differential spectrophotometric assay[1]로 그 양을 정량하였으며, imipenem과 thienamycin의 분자량의 비로 이를 thienamycin의 양으로 환산하였다. 이 imipenem 희석액을 bioassay하여 검량선을 작성하고 형질전환균주의 배양액을 bioassay하여 생성되는 carbapenem의 양을 이 검량선에서 결정

하였다. Bioassay와 건조균체량 측정은 다음과 같은 방법으로 행하였다. 형질전환균주의 포자를 CM 액체배지 3 m*l*에 접종하여 28℃에서 2일 종배양하고 CM 액체배지 3 m*l*에 종배양액을 최종농도가 10%되게 접종하여 28℃에서 6일간 본배양하였다. 각 배양액 1 m*l* 씩을 미리 무게를 잰 eppendorf tube에 취하여 12,000 rpm에서 원심분리하여 상등액은 따로 취해놓았다. Eppendorf tube와 남은 pellet을 80 ℃에서 48시간 동안 건조시켜 이를 칭량하여 건조균체량을 계산하였다. 따로 취해놓은 상등액 또는 imipenem 희석액 7 μ*l*를 disc에 가한 후 시험균을 도포한 고체배지에 얹어 37℃에서 *B. subtilits*는 8시간, *S. aureus*는 두 균주 모두 24시간동안 배양하였다. 배양후 inhibition zone의 크기를 측정하였다.

결과 및 고찰

MRM의 최적화

원형질체를 이용한 형질전환실험을 행할 때 영양요구주의 복귀돌연변이(revertant) 원형질체를 선별적으로 재생시켜야 하는 경우 영양요구주의 원형질체는 재생되지 않으면서 복귀돌연변이의 원형질체만 재생될 수 있는 최소 영양 조건을 갖춘 배지가 필요하다. 최소배지인 MM에 원형질체의 재생에 필요한 $CaCl_2$, $MgCl_2$를 첨가하고 arginine을 첨가하였을 때 A-32의 원형질체가 재생되어 이 $CaCl_2$, $MgCl_2$를 첨가한 배지를 최소재생배지(MRM)라 하였으며 이 배지의 조성을 변화시킴으로써 원형질체의 재생효율을 증가시키고, 이를 형질전환균주 원형질체의 재생배지로 사용하기 위하여 arginine이 첨가된 MRM의 성분 중 아미노산 변화, $CaCl_2$, $MgCl_2$, K_2HPO_4 농도의 변화와 sucrose 첨가에 따른 A-32 원형질체의 재생효율을 보았다.

일반적으로 원형질체는 고장액에서 더 안정하다고 알려져 있어[12] MM에 sucrose를 첨가하여 고장 배지(hypertonic media)를 조제하여 A-32 원형질체를 재생시켰다. Sucrose를 0.4 M 첨가하였을 때의 재생효율이 21.39%로 sucrose를 첨가하지 않았을 때의 8.26 %에 배해 현저한 증가를 보였으며(Fig. 1), sucrose의 농도가 진해질수록 colony가 늦게 나타나고 colony의 크기가 작아지는 현상이 나타났다.

MM의 주요성분인 $CaCl_2$, $MgCl_2$, K_2HPO_4의 농도를 변화시켰을 때에는 그 농도가 각각 20 mM, 25 mM, 0.05%일 때 재생효율이 9.22%, 8.26%, 8.26%로 가장 높았다(Fig. 2, 3).

Amino acid의 종류를 변화시켰을 때에는 기본 MRM의 L-asparagine보다 proline, glutamine, glutamic acid를 첨가했을 때 재생 효율이 증가하였으며 특히 glutamic acid를 첨가했을 때의 재생 효율이 15.

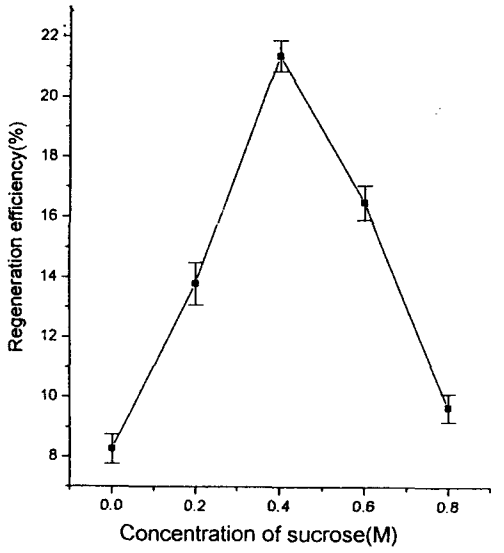

Fig. 1 — Regeneration efficiency of A-32 protoplast on MRM with various sucrose concentrations.

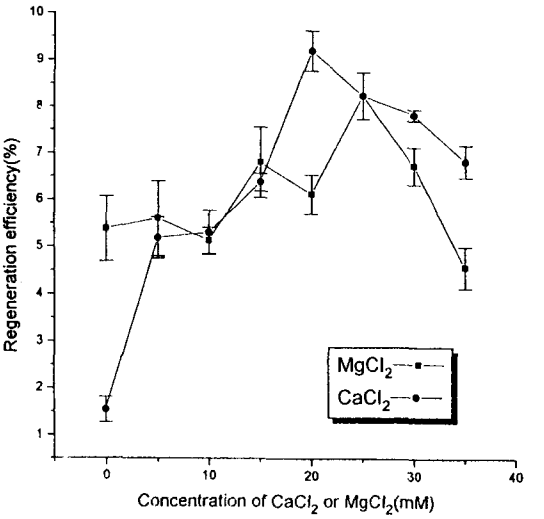

Fig. 2 — Regeneration efficiency of A-32 protoplast on MRM with various $CaCl_2$ or $MgCl_2$ concentration.

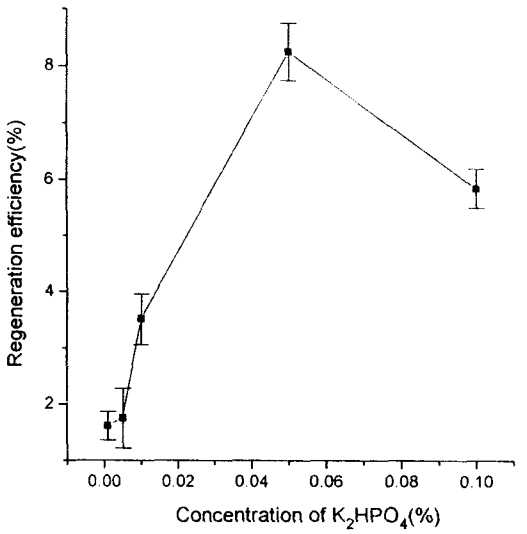

Fig. 3 — Regeneration efficiency of A-32 protoplast on MRM with various K_2HPO_4 concentration.

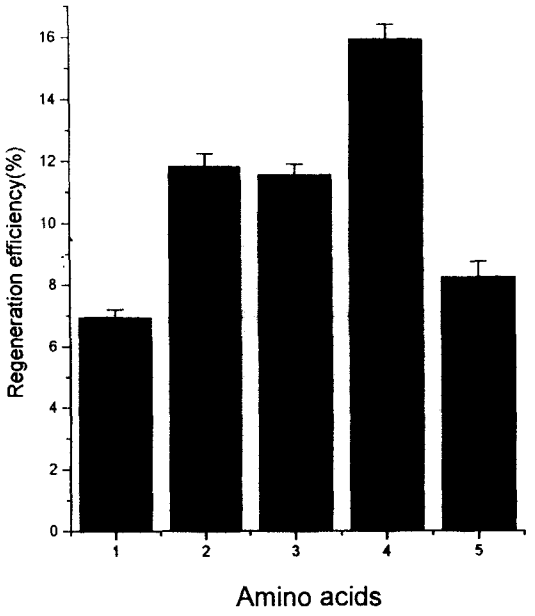

Fig. 4 — Regeneration efficiency of A-32 protpolast on MRM with various amino acids. No amino acid addition(1), proline(2), glutamine(3), glutamic acid(4) and asparagine(5).

94%로 가장 높았다(Fig. 4).

이상의 결과에서 재생효율이 가장 높은 각 성분의 조건을 조합하여 변형 MRM을 조제하여 A-32 원형질체를 재생시켰을 때 재생효율은 28.49±0.83%로 기본 MRM에서의 재생효율 8.32±0.88%에 비해 3.4배 증가하였다.

Table I — Transformation efficiency of A-32 protoplast with various amounts of chromosomal DNA of *C. glutamicum* or *A. simplex*

DNA amount(μg)	Tranformation efficiency/cell	
	C. glutamicum	*A. simplex*
0	1.08×10^{-6}	1.08×10^{-6}
0.5	1.23×10^{-5}	1.43×10^{-5}
2.5	2.63×10^{-5}	3.70×10^{-5}
3.75	3.27×10^{-5}	3.34×10^{-5}
5	3.88×10^{-5}	3.19×10^{-5}
7.5	3.44×10^{-5}	2.92×10^{-5}
10	3.54×10^{-5}	2.87×10^{-5}

Table II — Transformation efficinecy of A-32 protoplast with various PEGs with chromosomal DNA (2.5 μg) of *A. simplex*

PEG	Transformation effiency/cell
1000	1.56×10^{-6}
4000	3.70×10^{-5}
6000	2.94×10^{-5}
8000	2.13×10^{-5}

Table III — Transformation efficiency of A-32 protoplast with various reaction times

Reaction time(min)	Transformation efficiency/cell
5	3.23×10^{-5}
10	3.87×10^{-5}
20	2.59×10^{-5}
30	2.34×10^{-5}

형질전환

A-32 원형질체에 A. *simplex*와 *C. glutamicum*의 chromosomal DNA를 형질전환시켰을 때 그 효율은 Table I과 같았다. 첨가하는 DNA의 양에 따른 형질전환효율은 4×10^6개의 원형질체에 가한 DNA의 양이 *A. simplex*의 경우 2.5 μg일 때 3.70×10^{-5}/cell로, *C. glutamicum*의 경우 5 μg일 때 3.88×10^{-5}/cell로 가장 높았다.

분자량이 다른 PEG를 사용하였을 때의 형질전환효율은 PEG 4000에서 가장 좋았다(Table II). 또 반응시간을 변화시켜 보았을 때의 형질전환효율은 반응시간이 10분일 때 가장 높아 *S. cattleya*의 염색체 형질전환에는 비교적 짧은 시간이 요구되는 것으로 나타났다(Table III).

Table IV — Carbapenem productivities of *S. cattleya* wild type and transformant strains.

Strains	Productivity(μg/ml)	Productivity ratio
Wild type	1.61±0.67	1
A-32	1.00±0.36	0.6
1	8.36±2.84	5.2
2	4.08±0.54	2.5
3	3.90±1.62	2.4
4	4.25±0.38	2.6
5	2.31±0.41	1.4
6	2.61±1.27	1.6
7	3.27±1.36	2.0
8	3.67±0.95	2.3
9	6.52±2.65	4.1
10	3.90±1.62	2.4
11	3.43±2.09	2.1
12	3.71±1.81	2.3
13	3.07±0.80	1.9
14	2.50±0.22	1.6
15	3.07±0.80	1.9

Carbapenem계 항생물질의 생산성이 향상된 균주의 선별

형질전환 결과 생성된 colony 중 150개를 3회 액체배양하였을 때 건조균체량은 원균주와 형질전환균주 모두 6.5±0.5 mg/ml로 큰 변화는 보이지 않았으며, bioassay한 후 carbapenem양을 thienamycin으로 환산하였을 때 원균주의 1.61±0.67 μg/ml보다 생산성이 증가된 균주를 다수 얻었다(Table IV). 한편 DNA를 가하지 않고 형질전환 조작을 행하여 생성된 colony 10개를 액체배양하여 bioassay하였을 때의 carbapenem 생성량은 1.93±1.0 μg/ml로 원균주와 큰 변화가 없었다.

*S. cattleya*의 thienamycin 생성량이 1~4 μg/ml이라는 보고에 따른다면[1] 본 연구에 사용된 원균주의 생성량은 비교적 낮은 편이었다. 형질전환으로 얻은 균주 중 생성량이 증가된 균주는 150개 중 15개로 10%에 해당하였으며 이 중 13개(8.7%)의 생성량은 2.31±0.41~4.25±0.38 μg/ml로 원균주보다는 증가되었으나 보고에 비해 현저히 증가하지 않은 것들이었고, 8.36±2.84, 6.52±2.65 g/ml로 생산성이 각각 5.2배, 4.1배 증가한 균주들도 얻을 수 있었다.

한편 이러한 생산성의 증가가 *S. cattleya*에서 생산되는 carbapenem계 항생제 외의 β-lactam계 항생물질 즉, cephamycin, penicillin N등의 생산성 증가에 기인하는지를 알아보기위하여 β-lactamase 생성균주인 *S. aureus* SG 511에 대하여 bioassay를 하여 감소되는 항생력의 정도를 측정하였다. *S. aureus* SG 511를 시험균주로 사용했을 때 배양액 중 총항생력은 원균주의 경우 1.9% 감소하였고, 형질전환균주의 경우는 1.8~4.6% 감소하였다. 이러한 감소는 β-lactamase에 민감한 물질에 의한 현상으로 생각할 수 있으므로 형질전환균주들에서의 역가의 증가는 95% 이상이 carbapenem계 항생제의 생성량 증가에 의한 것임을 알 수 있었다.

결 론

*S. cattleya*의 arginine 영양요구주 A-32의 원형질체에 *C. glutamicum*과 *A. simplex*에서 분리한 chromosomal DNA를 transformation시켰을 때 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *S. cattelya*의 arginine 영양요구주 A-32 원형질체의 재생효율은 sucrose를 0.4 M 첨가하고 $CaCl_2$를 25 mM에서 20 mM로, amino acid를 asparagine에서 glutamic acid로 바꾼 MRM에서 기존의 MRM보다 3.4배 증가하였다.

2. PEG 4000을 이용한 방법으로 *S. cattleya*의 염색체 형질전환이 가능하였으며 그 결과는 다음과 같았다. Glutamic acid 생성균주인 *C. glutamicum*과 *A. simplex*의 chromosomal DNA를 분리하여 A-32의 원형질체 4×10^6개에 형질전환시켰을 때 transformation 효율은 DNA의 양이 각각 5 μg일 때 3.88×10^{-5}/cell, 2.5 μg일 때 3.70×10^{-5}/cell로 가장 높았으며 PEG 분자량을 변화시켰을 때에는 PEG 4000에서, 반응시간을 변화시켰을 때는 10분일 때 가장 높았다.

3. Transformation 결과 생성된 균주중 150개를 액체 배양하여 *B. subtilis, S. aureus*를 시험균으로 이용한 bioassay로 정량하여 thienamycin 양으로 환산하였을 때 carbapenem계 항생제의 생산성이 원 균주의 1.61±0.67 g/ml에 비해 1.4~2.6배 증가한 균주를 8.7% 빈도로 얻을 수 있었으며, 생산성이 4.1배, 5.2배 증가한 균주도 얻을 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 1994년도 이화여자대학교 교내 연구비 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Kahan, J. S., Kahan, F. M., Goegelman, R. T., Currie, S. A., Jackson, M., Stapley, E. O., Miller, T. W., Miller, A. K., Heldlin, D., Mochales, S., Hernandez, S., Woodruff, H.B. and Birnbaum, J.: Thienamycin, a new β-lactam antibiotic; I. Discovery, taxanomy, isolation, and physical properties. *J. Antibiotics*. **32**, 1-12 (1979).

2) Kornbrust, D., Eydelloth, R. and Garratty, G.: Investigation of the potential for beta-lactam antibiotics to elicit type II hypersensitivity reaction in rats and monkeys. *Fund. Appl. Toxocol.* **12**, 558-566 (1989).

3) Birnbaum, J., Kahan, F. M., Kropp, H. and Macdonald, J. S.: Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am. J. Med.* **78(suppl 6A)**, 3-21 (1985).

4) Betina, V.: Regulation of antibiotic biosynthesis. *In* The chemistry and biology of antibiotics. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York. pp. 175-176 (1983).

5) Williamson, J. M., Inamine, E., Wilson, K. E., Douglas, A. W., Liesch, J. M. and Shoenberg, G. A.: Biosynthesis of the β-lactam antibiotic, thienamycin, by *Streptomyces cattleya*. *J. Biol. Chem*. **260**, 4637-4647 (1985).

6) Shukuo, K., Katsunobu, T. and Akita, S.: Method of producing L-glutamic acid. *U.S. Patent* 3,002,889. Oct, 3, 1961.

7) Tanaka, K., Kimura, K. and Machida-Shi: *U.S. Patent* 3,511,752. May, 12, 1970.

8) 송은경, 박영훈: *Streptomyces cattleya*의 protoplast 형성 및 재생에 관한 연구. 한국산업미생물학회지. **15**, 61-67 (1987).

9) Rodriguez, R. L. and Tait, R. C.: Isolation of *B. subtilis* chromosomal DNA. *In* Recombinant DNA techniques. An introduction. Addison-wesley publishing company. pp. 162-163 (1983).

10) Follettie, M. T and Sinskey, A. J.: Molecular cloning and nucleotide sequence of the *C. glutamicum* pheA gene. *J. Bacteriol.* **167(2)**, 695-702 (1986).

11) Takao, I., Hiduo, T. and Hinga, S.: Polyethyleneglycol-induced transformation of *Streptomyces* protoplast by chromosomal DNA. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **27**, 431-433 (1981).

12) Okanish, M., Suzuki, K. and Umezawa, H.: Formation and reversion of *Streptomyces*: Cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* **80**, 389-400 (1974).