

Streptoalloteichus hindustanus 발효시 Nebramycin Factor 5' 역가 및 구성비율에 대한 산소전달속도의 영향

김정근* · 이병규¹ · 노용택²

한국산업기술대학교 생명화학공학과, ¹유한양행 중앙연구소, ²영동대학교 생명공학부

The Effect of Oxygen Transfer Rate on the Nebramycin Factor 5' Activity and Component Ratio in *Streptoalloteichus hindustanus* Fermentation. Kim, Jeong-Keun*, Byung-Kyu Lee, and Yong-Taik Rho.

Department of Chemical Engineering and Biotechnology, Korea Polytechnic University, 2121 Jungwang-dong, Shi-hung-si, Kyunggi-do 429-793, Korea, ¹Yuhan Research Institute, 27-3 Dangeong-dong, Gunpo-si, Kyunggi-do 435-715, Korea, ²Faculty of Life Science and Engineering, Youngdong University, Chungbuk 370-701, Korea - Nebramycin is a complex of aminocyclitol compounds that is produced by aerobic culture in fermentation process. The major antibiotic factors produced by *Streptoalloteichus hindustanus* are nebramycin factor 2, 4, 5' and kanamycin A. A mutant was selected, producing nebramycin factor 5' activity 16.4 times higher than parent strain by microbiological assay using *Pseudomonas aeruginosa* CH-U34AF. The component ratio of nebramycin factor 5' was dramatically increased from 34% to 70% by the optimization of fermentation condition. It was found that the component ratio of nebramycin factor 5' in fermentation was especially affected by the oxygen transfer rate. Optimum oxygen transfer rate for maximal nebramycin factor 5' productivity and ratio during *S. hindustanus* fermentation was elucidated to 0.50 mMO₂/min.

Key words: *Streptoalloteichus hindustanus*, nebramycin, factor 5', tobramycin, oxygen transfer rate

Nebramycin은 *Streptomyces tenebrarius*, *Streptoalloteichus hindustanus* 등의 방선균에 의해 생산되는 아미노글리코사이드계 항생물질로서 factor 1에서 factor 13까지의 복합체로 구성되어 있다[8, 9, 13]. 다양한 nebramycin 복합체 중에서 factor 2, factor 4(6'-O-carbamoyl kanamycin B), factor 5' (6'-O-carbamoyl tobramycin) 등이 주요 구성 성분이고 이 밖의 다른 성분들은 소량 생산되는 것으로 알려져 있다[3, 6, 11]. 한편 Park 등[11]은 *S. hindustanus*의 발효액 분석을 통하여 factor 2, factor 4, factor 5' 등의 주요 구성성분 이외에 kanamycin A도 배양 중에 많은 양이 생산됨을 확인하였다.

Nebramycin factor 2는 apramycin으로 불리며 닭, 돼지, 송아지의 대장균증, 살모넬라병 등을 치료할 수 있는 동물용 주사제 혹은 사료 첨가제의 형태로 시판되고 있다[7]. 또한 nebramycin factor 4와 factor 5'는 염기에 의한 가수분해로 carbamoyl기가 제거되면 각각 인체용 항생제인 kanamycin B와 tobramycin으로 전환된다[4, 10]. 특히 tobramycin은 녹농균에 대한 좋은 활성과 넓은 항균력 때문에 패혈증, 중추신경계 감염증, 중증 하기도 감염증, 요도 감염증 등의 치료에 널리 쓰이고 있다[2, 4, 5]. 이와 같이 인체용 항생제로 널리 사용되는 tobramycin을 경제성 있게 생산하기 위해서

nebramycin 생산균주의 돌연변이와 배양조건 검토 등을 통한 nebramycin factor 5' 역가 향상과 구성비율 등의 개선이 중요하다. 지금까지의 연구자들은 *S. tenebrarius* 돌연변이 균주에 의한 factor 5'의 구성비율의 변화 등에 대하여 검토하여 7%로부터 최고 40%까지 구성비율의 향상을 보고한 바 있다[10, 11]. 그러나 배양조건에 따른 nebramycin factor 5' 역가와 구성비율의 변화에 대하여 보고된 바는 없으며 특히 희귀 방선균인 *S. hindustanus*의 발효 연구는 거의 없는 실정이다. 또한 *S. tenebrarius*는 apramycin의 생합성 비율이 높은 단점이 있어 tobramycin의 전구체인 nebramycin factor 5' 생산에는 *S. hindustanus*가 적합한 것으로 알려져 있어 산업화 연구에 많이 이용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 *S. hindustanus*를 NTG 등으로 처리하여 factor 5' 생산량이 높은 변이주를 선별한 후 온도, 배양액량, 교반속도 등의 산소 전달속도에 영향을 주는 배양조건변화의 따른 nebramycin factor 5' 역가와 구성 성분의 비율에 미치는 영향 등을 조사하였다.

실험재료 및 방법

균주

본 실험에는 *Streptoalloteichus hindustanus* ATCC 31217, 31218, 31219와 이들로부터 분리된 factor 5' 고역가 변이주 (YHT-0001, YHT-0002) 등 5 균주를 사용하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-31-4968-326, Fax: 82-31-4968-329

E-mail: kjkim@kpu.ac.kr

Nebramycin factor 5' 고역가변이주의 선별

S. hindustanus ATCC 31218 포자현탁액(10^7 CFU/ml)을 UV로 1분간 조사한 후, 고농도의 apramycin(2.0-10.0 mg/ml)을 함유하는 한천 보존배지(glucose 10 g/L, yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, Bacto-peptone 5 g/L, agar 20 g/L)에 도말하여 4-6일간 37°C에서 생육한 변이주를 agar piece에 접종하였다. 고역가변이주의 선별시 apramycin을 사용한 이유는 nebramycin factor 5'와 apramycin은 동일한 균주에서 생합성되는 동일계 aminoglycoside계 항생제이므로 가수분해 전에 항생력이 약한 nebramycin factor 5'보다는 큰 미생물 성장 저해 작용기작을 갖고 있는 유사체인 apramycin을 이용하여 자가독성에 대한 내성이 큰 변이주를 선별함으로써 nebramycin factor 5' 생산성이 높은 변이주를 얻고자 하였다. Agar piece 제조 배지의 조성은 glycerol 20 g, corn gluten meal 10 g, cotten seed flour 10 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.3 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, CaCO₃ 3 g, agar 20 g을 증류수에 녹여 pH 6.4로 맞춘 후 1 L가 되도록 하였다. 35°C에서 9일 배양한 agar piece는 nebramycin 중 특히 factor 5'에만 민감한 *P. aeruginosa* CH-U34AF를 피검균주로 하여 고역가 변이주를 선별하였다.

배지 및 발효 조건

플라스크와 발효조 종균배양을 위한 성장 배지는 glucose 10 g, soluble starch 10 g, NZ-amine 2 g, yeast extract 1 g, KCl 1 g, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 1 g, CaCO₃ 1 g을 증류수에 녹여 pH 6.8로 맞춘 후 1 L가 되도록 하여 사용하였다. Factor 5' 생산배지는 glycerol 30 g, com gluten meal 40 g, cotten seed flour 10 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.3 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, CaCO₃ 3 g, cotten seed oil 20 g, corn steep solid 5 g을 증류수에 녹여 pH 6.4로 맞춘 후 1 L가 되도록 하여 사용하였다. 플라스크 배양은 500 ml 진탕 플라스크에 배양액 150 ml를 넣고 접종하여 150~180 rpm에서 NBS 4330 shaker를 사용하여 210시간 배양하였다. 발효조 실험은 7 L의 발효조(한국발효기)에 4 L의 배지를 넣고, 121°C, 30분 습열 살균하여 냉각한 후 종균배지 400 ml를 접종하였다. 이를 37°C, 1.0 vvm의 통기량 하에서 300~600 rpm의 교반 속도로 190시간 배양하였다.

산소전달속도(Oxygen Transfer Rate) 측정

산소전달속도의 측정은 Cooper 등[1]의 방법에 의해 측정하였다. 0.5 N Na₂SO₃ 용액(0.001 M Cu⁺⁺ 첨가)을 배양기에 넣고 통기, 교반하면서 일정 시간마다 5 ml 취하여 0.5 N I₂ 용액 5 ml를 즉시 첨가하고, 종말점 직전 전분 지시약을 첨가한 후 0.1 N Na₂SO₃로 적정하여 소비 ml를 구한 후 그것으로부터 산소전달속도(OTR, mM O₂/min)를 구하였다. 배양 및 OTR 측정은 옆면에 4개의 배플이 있는 500 ml 진탕플라스크와 직경 8 cm의 6개 blade를 갖은 디스크 터빈

임펠러가 3단으로 장착된 7 L 발효조를 사용하였다.

HPLC 분석

표준품 혼합 용액과 배양액을 각각 reaction vial(5 ml)에 250 µl씩 넣고, 1 M Tris 용액 250 µl와 4%(w/v) DNFB/AcCN 용액 1,000 µl를 첨가한 후 마개를 밀봉하고 교반한 다음, 60°C heating block에서 40분간 반응시켜 표준액과 배양액의 nebramycin factor들의 amino group을 dinitrophenyl 유도체화 하였다. 이 반응액을 실온에서 방냉한 후 4°C에서 30분 동안 방치하여 층을 분리시킨 다음 AcCN층(상층) 10 µl를 컬럼에 주입하였다. Nebramycin factor들의 구성비율과 농도는 HPLC(Waters, USA)를 사용하여 측정하였으며, 이때 분석 조건은 UV 파장 353 nm, C₁₈ Nova pak 컬럼(3.9 mm × 150 mm, 4 µm), 유속 1.5 ml/min, 이동상 AcCN: H₂O: ACOH (53.0:45.5:0.5)의 혼합 용매를 사용하였다. 표준 물질로는 kanamycin A, factor 4, factor 5', apramycin 을 사용하여 정량적으로 비교 분석하였다[13](Fig. 1).

Nebramycin factor 5'의 구성비율(%)은 총 nebramycin 농도에 대한 nebramycin factor 5' 농도 비율을 %로 나타낸 것이다.

결과 및 고찰

배양온도에 따른 구성비율의 변화

S. hindustanus ATCC 31218의 돌연변이로부터 분리된 고역가 변이주 YHT-0001을 사용하여 배양 온도에 따른

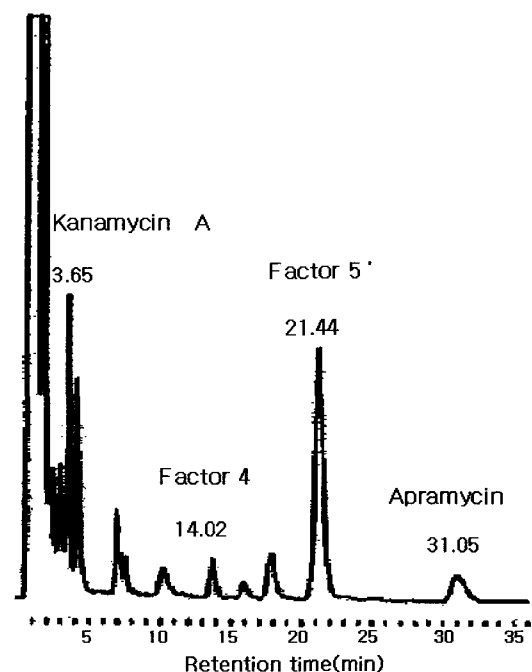


Fig. 1. Separation of the major components of nebramycin complex from *Streptoalloteichus hindustanus* YHT-001 fermentation broth.

Table 1. Effect of temperature on the production of nebramycin complexes.

Temperature (°C)	Factor 5' Relative activity (%)	Nebramycin factor ratio (%)			
		Factor 5'	Factor 2	Factor 4	Kanamycin A
30	58	28	39	14	19
32	64	28	38	16	18
35	75	30	40	15	15
37	100	34	38	14	14
40	78	25	39	13	23

*180 rpm, 210 hr, 50 ml/500 ml, 4 sides baffled flask.

nebramycin factor 5' 역가와 구성비율을 검토한 결과, 37°C에서 factor 5' 역가 및 구성비율이 가장 높게 나타났다(Table 1). 37°C 배양시의 nebramycin factor 5' 역가는 30°C 배양시 보다 약 1.7배 높았으며 nebramycin 구성비율을 비교한 결과, factor 5'은 6% 증가하였지만 kanamycin A의 구성비율은 약 5% 감소하였고, factor 2와 factor 4의 구성비율은 일정하였다.

배지액량에 따른 구성비율 변화

플라스크의 배양액량에 따른 factor 5' 역가 및 구성비율을 검토한 결과, 150 ml의 배양액량에서 가장 높은 역가와 구성비율을 나타내었다(Table 2). 일반적으로 500 ml 진탕 플라스크의 최적액량으로 알려진 50 ml와 배지액량 변화에 따른 nebramycin factor 5' 역가와 구성비율을 비교한 결과,

150 ml 배지액량으로 배양시의 factor 5' 역가는 약 1.4배, factor 5'의 구성비율은 21% 증가하였으며 factor 2는 16% 그리고 kanamycin A는 5% 각각 감소하였다. 이와 같은 결과에 따라 *S. hindustanus* 발효시 nebramycin factor 5' 역가와 구성비율은 물질전달속도 또는 산소전달속도에 매우 민감하다는 것을 확인하고 교반속도와 산소전달속도에 따른 factor 5' 역가와 구성비율의 변화를 조사하였다.

플라스크의 교반속도에 따른 구성비율 변화

플라스크의 교반속도에 따른 factor 5' 역가와 구성비율을 검토한 결과, 150 rpm(산소전달속도 0.5 mMO₂/min)에서는 300 rpm(산소전달속도 2.30 mMO₂/min) 보다 factor 5' 역가가 약 4배 높게 나타났으며 factor 5'의 구성비율도 70%로 45% 증가하였다(Table 3). 따라서 플라스크에서 *S. hindustanus*

Table 2. Effect of working volume on the production of nebramycin complexes in the flask culture.

Volume (ml)	Factor 5' Relative activity (%)	Nebramycin factor ratio(%)			
		Factor 5'	Factor 2	Factor 4	Kanamycin A
50	69	45	20	25	10
75	76	48	16	20	16
100	92	56	8	21	15
150	100	66	5	24	5
200	76	63	5	19	13

*37°C, 180 rpm, 500 ml 4 sides baffled flask, 210 hr.

Table 3. Effect of agitation speed and oxygen transfer rate on the production of nebramycin complexes.

Agitation (rpm)	Oxygen transfer rate (mMO ₂ /min)	Factor 5' Relative activity (%)	Nebramycin factor ratio (%)
			Factor 5'
130	0.35	74	48
150	0.50	100	70
180	0.90	89	60
210	1.20	57	45
250	1.70	36	37
300	2.30	24	25

*37°C, 150 ml/500 ml, 4 side baffled flask, 210 hr.

Table 4. The relative activity and change of nebramycin complex produced with various agitation in fermentor.

Agitation (rpm)	Oxygen transfer rate (mMO ₂ /min)	Factor 5' Relative activity(%)	Nebramycin factor ratio(%)			
			Factor 5'	Factor 2	Factor 4	Kanamycin A
300	0.35	64	52	9	10	29
350	0.50	100	60	13	12	20
400	0.90	50	42	26	12	18
500	1.20	38	37	32	17	14
600	1.70	30	19	55	21	5

*37°C, 1 vvm, 4 L medium in 7 L Jar.

발효시 nebramycin factor 5' 역가 및 구성 비율은 교반속도에 의해 많은 영향을 받음을 확인하였고 최적 산소전달속도는 0.5 mMO₂/min로 나타났다. 지금까지 Stark 등[10, 11]은 다양한 *S. tenebrarius* 돌연변이 균주를 사용하여 nebramycin factor 5' 구성비율의 변화를 보고한 바 있으나 산소전달속도의 차이에 따라 nebramycin 구성비율의 변화한다는 결과는 본 연구가 최초이다.

발효조의 교반속도에 따른 구성비율 변화

발효조의 교반속도에 따른 산소전달속도를 측정 후 배양시의 factor 5' 역가와 구성비율의 변화를 확인한 결과, 350 rpm 즉 산소전달속도 0.50 mMO₂/min으로 배양시 factor 5'의 역가 및 구성비율이 가장 높게 나타났다(Table 4). 한편 1.70 mMO₂/min 배양시는 factor 5'와 kanamycin A의 역가와 구성비율이 현저히 감소하였고 반면에 factor 2와 factor 4의 역가 및 생성비율이 증가하였다. 이와 같은 결과에 따라 *S. hindustanus* 발효시 nebramycin factor 5' 역가와 구성비율은 전달되는 산소의 양에 매우 민감하게 변화함을 확인하였고 최적 산소전달속도보다 높은 산소를 전달할 시는 factor 5'와 kanamycin A 역가 및 구성비율이 감소하고 factor 2와 factor 4의 역가 및 구성 비율이 증가되는 현상이 확인되었다. 이상의 결과에 의해 *S. hindustanus* 발효시 공급된 산소량은 hydroxyl기의 산소 공여자로서 유사한 구조의 factor 5', 4, kanamycin A 등의 구조를 결정하는데 중요한 역할을 할뿐만 아니라 이들과는 다른 구조골격을 갖는 apramycin

생합성과정에 크게 영향을 준다고 사료되었다.

모균주와 고역가 변이주의 비교

Nebramycin의 다양한 factor들 중에서 factor 5'에만 민감한 *P. aeruginosa* CH-U34AF를 피검균주로 하여 다양한 돌연변이체로부터 factor 5' 고역가변이주를 선별하였다. *S. hindustanus* ATCC 31218로부터 피검균주에 대하여 큰 저지환을 나타내는 factor 5' 고역가 변이주인 YHT-0001, YHT-0002를 선별하였다. 앞에서 확인된 최적발효 조건하에서 3종의 *S. hindustanus* wild type과 고역가 변이주들의 factor 5' 역가와 구성비율의 변화를 비교 검토한 결과, 고역가 변이주 YHT-0001은 모균주에 비해 factor 5'의 역가는 16.4배의 비약적인 증가를 하였으나 factor 5', factor 2의 구성비율은 각각 11%, 2% 증가하였고 factor 4와 kanamycin A의 구성비율은 각각 4%, 9% 감소한 균주로 나타났다(Table 5).

요 약

본 연구에서는 *S. hindustanus* ATCC 31218로부터 선별된 변이주를 사용하여 배양조건이 nebramycin 주요 생산물인 factor 2, factor 4, factor 5', kanamycin A 등의 구성비율과 역가에 미치는 영향을 조사하였다. 실험결과, nebramycin의 factor들의 구성비율은 온도 및 배지보다는 배양액량, 교반속도 등에 의해 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. 따라서 플라스크와 발효조의 산소전달속도를 각각 측정하여 factor 5'

Table 5. The relative activity and ratio of nebramycin factors produced by wild and mutant strains under the optimal culture condition.

Strains	Factor 5' Relative activity(%)	Nebramycin factor ratio(%)			
		Factor 5'	Factor 2	Factor 4	Kanamycin A
<i>Str. hindustanus</i> ATCC 31217	90	63	6	19	12
<i>Str. hindustanus</i> ATCC 31218	100	59	8	18	15
<i>Str. hindustanus</i> ATCC 31219	80	57	12	18	13
<i>Str. hindustanus</i> YHT-0001	1640	70	10	14	6
<i>Str. hindustanus</i> YHT-0002	1270	68	10	14	8

*37°C, 150 rpm, 150 ml/500 ml, 4 sides baffled flask.

생산의 최적 산소전달조건을 검토한 결과, 0.50 mMO₂/min 으로 배양시 factor 5'의 역가가 가장 높았으며 구성비율도 70% 이상을 나타내었다. 한편 0.9 mMO₂/min 이상으로 배양시는 factor 5'의 역가와 구성비율이 현저히 감소한 반면 factor 2의 역가와 구성비율이 급격히 증가하였다. 한편 본 연구에 사용된 변이주 *S. hindustanus* YHT-0001는 factor 5'의 역가는 16.4배, factor 5'구성비율은 약 11% 향상된 균주로 확인되었다. *S. hindustanus* 발효시 공급되는 산소량은 단지 hydroxyl기와 아미노기의 존재유무에 따라 구조가 결정되는 factor 5', factor 4, kanamycin A의 hydroxyl기 생성을 위한 산소공여자로 역할뿐만 아니라 배당체 구조에 차이를 보이는 apramycin 생합성과정에 영향을 크게 준다고 사료되었다.

REFERENCES

1. Cooper, F. M., G. A. Fernstrom, and S. A. Miller. 1944. Performance of gas-liquid contactors. *Ind. Eng. Chem.* **36**: 504-509.
2. Koch, K. F. 1975. Chemistry and conformation of aminoglycoside antibiotic: Tobramycin. *Drug Action Drug Resistant Bact.* **2**: 113-121.
3. Koch, K. F., F. A. Davis, and J. A. Rhoades. 1973. Nebramycin: Separation of the complex and identification of factors 4, 5, and 5'. *J. Antibiot.* **26**: 745-751.
4. Koch, K. F. and J. A. Rhoades. 1970. Structure of nebramycin factor 6, a new aminoglycosidic antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 309-313.
5. Koch, K. F., K. E. Merkel, S. C. O'Connor, J. L. Occolowitz, J. W. Paschal, and D. E. Dorman. 1978. Structures of some of the minor aminoglycoside factors of the nebramycin fermentation. *J. Org. Chem.* **43**: 1430-1434.
6. Park, Y. K., M. Y. Park, S. C. Kim, and H. G. Yang. 1993. Determination of nebramycin factor 2,4,5,5',6 and kanamycin A in fermentation broth of *Streptoalloteichus hindustanus* ATCC 31218 mutant using 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) as a derivatizing agent by High performance liquid chromatography. *Yakhak Hoeji* **37**: 1-8.
7. Sean O'Connor, L. K. T. Lam, Noel D. Jones, and M. O. Chaney. 1976. Apramycin, a unique aminocyclitol antibiotic. *J. Org. Chem.* **41**: 2087-2092.
8. Stark, W. M., M. M. Honex, and K. G. Knox. 1967. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. I. Detection and biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 314-323.
9. Stark, W. M., N. G. Knox, and R. M. Wilgus. 1971. Strains of *Streptomyces tenebrarius* and biosynthesis of nebramycin. *Folia Microbiol.* **16**: 205-217.
10. Stark, W. M., N. G. Knox, and R. M. Wilgus and R. Dubus. 1975. The nebramycin fermentation: Culture and fermentation development. *Develop. Indust. Microbiol.* **17**: 61-78.
11. Stark, W. M., R. M. Wilgus, and R. Dubus. 1980. Fermentation studies with aminoglycoside-producing microorganisms. *Develop. indust. Microbiol.* **21**: 77-89.
12. Thompson, R. Q. and E. A. Presti. 1967. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. III. Isolation and chemical-physical properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 332-340.
13. U.S Patent 4,032,404. 1977. Fermentation process for producing apramycin and nebramycin factor 5'.

(Received Aug. 29, 2003/Accepted Nov. 24, 2003)