

원형질체 융합에 의한 Avermectin B_{1a} 고생산성 *Streptomyces avermitilis* 균주 개발

김경희 · 송성기 · 정연호¹ · 정용섭² · 전계택*

강원대학교 생명과학부, ¹강원대학교 생명공학부, ²전북대학교 응용생물공학부

Development of High-yielding Mutants of *Streptomyces avermitilis* for Avermectin B_{1a} Production through Protoplast Fusion. Kim, Kyung-Hee, Sung-Ki Song, Yeon-Ho Jeong, Yong-Seob Jeong¹, and Gie-Taek Chun*. Division of Life Sciences, ¹Division of Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea. ²Faculty of Biotechnology, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea – In order to enhance the productivity of AVM B_{1a} produced by *Streptomyces avermitilis* as a secondary metabolite, we established a basic protocol necessary for protoplast fusion with high-producing strains as a fusion partner, and then obtained various kinds of fusants by adopting a massive strain-development procedure (a miniaturized strain screening system). An alternative fusion method using UV and/or NTG mutation of protoplasts was developed to screen genetic recombinants without specific selectable markers. In this method, the mutants obtained by protoplast fusion after UV and/or NTG treatment (95% death rate) of the respective fusion partner (protoplasts of the respective mutants resistant against L-isoleucine antimetabolites such as O-methylthreonine and/or azaleucine) were regarded as DNA-recombined protoplast fusants. Notably it was demonstrated that most of the protoplast recombinants obtained by the UV mutation method were able to biosynthesize higher amount of AVM B_{1a}, reaching almost three times higher level (almost equal to the industrial productivity), compared to the average AVM B_{1a} amount of the parallel mother strains.

Key words: *Streptomyces avermitilis*, avermectin B_{1a}, mutation, protoplast fusion, recombinants

Avermectins(AVMs)는 *Streptomyces avermitilis*가 생산하는 이차대사산물로 지방산과 생합성경로를 공유하는 polyketide 계열의 물질로 생산균주의 균사에 축적된다[2]. AVMs는 광범위 동물구충제로 4개의 components(A₁, A₂, B₁, B₂)로 나뉘고, 각각 2개의 variants(a, b)가 있어서 모두 8개의 화합물로 구성되어 있다[2, 8]. A_{1a}, A_{2a}, B_{1a}, B_{2a}가 주된 형태이고 A_{1b}, A_{2b}, B_{1b}, B_{2b}는 소수 형태인데, 이 중 활성이 가장 뛰어난 avermectin B_{1a}(AVM B_{1a})는 별도로 abamectin으로 불려지고 있으며, 시장성이 큰 ivermectin은 AVM B_{1a}로부터 유기화학적으로 합성되는 유도체이다[3]. AVM B_{1a}는 원래 해충 방지제로 사용되었으나 동물의 장내에 기생하는 endo-parasites 및 이나 진드기 같은 ecto-parasites 감염에 대해서도 기존의 합성구충제(albendazole, oxibendazole, mebendazol, flubendazole, oxantel 등)에 비해 수백에서 수천 배에 이르는 강력한 구충효과가 입증되고, 기존의 구충제들과 교차내성(cross-resistance)을 갖지 않아 이들을 미생물 발효에 의해 경제적으로 생산하고자 하는 시도가 계속 되어왔다[9].

발효관련 생물공학 제품의 생산을 위해서는 고생산성 균주의 확보가 가장 핵심적인 관건이다. 광범위 동물구충제인 AVM B_{1a}의 약효가 다양한 임상실험을 통해 입증된 이래, AVM B_{1a}의 생합성 경로 등에 대한 많은 연구 보고가 있었으나 고역가 균주 개발 등에 대한 연구결과는 전혀 발표되지 않고 있다[4, 7, 16]. AVM B_{1a}의 고생산성 균주를 rational screening 방법에 의해 지속적으로 개발한 본 연구팀의 연구결과에 따르면 아미노산 유사체 저항성 균주나 항생제 저항성 균주들은 이들 돌연변이주가 유도된 모균주에 비해 생산성이 큰 폭으로 향상되었으나, 아미노산 유사체나 항생제의 농도가 어느 수준 이상이 되면 더 이상의 생산성 향상이 어렵게 되거나, 오히려 감소하는 경향이 있는 것으로 나타났다[13]. 따라서 본 연구에서는 고생산성 균주 개발 시의 이와 같은 문제점을 극복하기 위해 원형질체 융합방법을 도입해서 복합 저항성을 띤 균주를 개발하고자 하였다. 원형질체 융합 기술은 다양한 원핵생물과 진핵생물에서 유전자 재조합을 유도하는 기술로서 특히 유전자 분석이 제대로 이루어지지 않은 방선균, 또는 고등균류와 같은 산업 미생물에서 균주의 생산성을 증가시키는 기술로 널리 이용되며, 유전적인 교환이 잘 일어나지 않는 미생물간의 유전자 재조합 빈도를 크게 향상시키는 것으로 알려져 있다[5, 6, 11]. 또한 mating type이나 incompatibility factor, sex

*Corresponding author
Tel: 82-33-250-8547, Fax: 82-33-241-4627
E-mail: gtchun@kangwon.ac.kr

factor 등의 영향을 받지 않아 유전적 재조합 빈도를 증가시키는 장점을 가지고 있다[15]. 원형질 융합체는 단순 변이주에 비해 유전함량의 증가로 유전적 안정성이 증가되고, 배양형태, 성장속도 및 AVM B_{1a} 생산성 등과 같은 배양 생리적 특성이 뚜렷하게 향상된 고생산 균주들이 될 가능성이 높다.

AVM B_{1a}를 안정적으로 고생산하는 원형질 융합체를 획득하기 위해 본 실험에서는 유전적인 요인에 의해 큰 불안정성을 보이는 모균주를 rational screening을 통해 AVM B_{1a}를 안정적으로 고생산하는 변이주를 우선 선별한 후, 원형질체 융합방법에 의해 고생산성 균주를 획득하고자 표지 유전자가 없이도 유전자 재조합체를 신속하게 선별할 수 있는 방법을 고안하여, 이 방법을 균주개량 방법에 적용하고자 하였다. 한편 기본 연구로서 생산균주인 *S. avermitilis*에 대해 효율적인 원형질체의 형성 및 재생 조건, 또한 원형질체 융합 조건에 대한 실험을 수행하였으며, 이 결과를 바탕으로 다양한 종류의 원형질체 융합균주를 얻어, 이들의 AVM B_{1a}의 생산성을 비교 조사하였다.

재료 및 방법

생산균주

AVM B_{1a} 생산균주인 *Streptomyces avermitilis* ATCC 31272의 아미노산 유사체 저항성 변이주들을 이용하여 원형질 융합균주 개발에 사용하였다. 아미노산 유사체로는 L-isoleucine 유사체인 azaleucine(AZL)과 O-methylthreonine(OMT)을 이용하였다. AZL 저항성 변이주(AZ series 균주로 명명)와 OMT에 대한 저항성 변이주(TH series 균주로 명명)는 AVMs 중 small "a" component의 전구체인 isoleucine을 과량으로 생합성하여 궁극적으로 AVM B_{1a}를 과량으로 생합성하는 것으로 나타났다[13]. AZL과 OMT에 대한 저항성 변이주 선별은 OMT 또는 AZL이 다양한 농도로 첨가된 각각의 최소 한천배지에 생산균주의 포자를 UV나 NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 처리와 같은 돌연변이 과정을 도입하거나, 또는 돌연변이 과정 없이 도달한 후, 생성된 colony를 분리하는 방법에 의해 수행되었다. 최소 한천배지의 조성은 다음과 같다: glycerol 5 g/l, NaCl 2 g/l, KNO₃ 1 g/l, Na₂HPO₄ · 2H₂O 0.534 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/l, KH₂PO₄ 0.272 g/l, trace elements solution 0.1 ml/l, agar 20 g/l, 여기서 trace elements solution은 다음의 조성으로 이루어져 있다: FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g, MnCl₂ · 4H₂O 0.1 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.1 g, distilled water 100 ml. 선별된 균주는 20%의 glycerol liquid stock으로 -80°C 냉동고에 보관한 후, 필요시 마다 포자형성배지인 ISP 사면배지에 접종하여 28°C에서 8일간 배양하였다. ISP 사면 배지의 조성은 다음과 같다: malt extract 15 g/l, yeast extract 5 g/l, soluble starch 5 g/l, CaCO₃ 3 g/l, agar 20 g/l. 포자가 형성

되면 포자만을 수거하여 다음과 같은 조성의 성장배지에 접종하였다: soluble starch 30 g/l, yeast extract 15 g/l, cornsteep liquor 5 g/l, KH₂PO₄ 0.4 g/l.

종균배양 및 생산배양 조건

종균배양은 30 ml culture tube에 10 ml의 성장배지를 첨가하여 진탕 배양기에서 28°C, 230 rpm으로 48시간 동안 배양한 후 10%(v/v)로 생산배지에 접종하였다. 생산배지의 조성은 다음과 같다: soluble starch 132 g/l, soybean meal 10 g/l, skim milk 15 g/l, KH₂PO₄ 0.5 g/l, PEG 2,000 2.5 g/l. 생산배양은 균주의 대량선별 초반 단계에서는 30 ml culture tube에서 10 ml의 생산배지로 수행했으며, 후반부에서는 산소 공급의 중요성을 고려하여 250 ml flask에 30 ml의 생산배지로 실험을 수행하였다. 생산배양 조건은 성장배양 때와 마찬가지로 28°C, 230 rpm으로 배양하였으며 7일간 배양한 후 AVM B_{1a}의 생산성을 확인하였다. 배지의 열 멸균 시에 발생하는 현상인 침전과 갈변현상의 방지를 위해서 무기염류와 당을 분류하여 멸균한 후에 무균 상태에서 나머지 생산배지 용액과 혼합하여 사용하였다.

균체농도 분석, AVM B_{1a} 추출 및 정량 분석

균체농도는 건조중량(DCW)을 이용하여 측정하였다. 균일한 균체시료 10 ml을 얻어 15,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 남아있는 당 및 염들을 증류수로 3번 씻어내고 weighing dish에 담아 90°C dry oven에서 12시간 동안 건조한 후, 건조중량을 1 리터당으로 환산하여 나타내었다. AVMs를 추출하기 위하여 10 ml의 *S. avermitilis* 배양액을 동량의 methanol을 첨가하여 혼합한 후에, 12시간 동안 230 rpm, 28°C의 진탕배양기에서 추출한 후, 15,000 rpm에서 20분간 2번 원심 분리하여 AVM B_{1a}를 포함하고 있는 1 ml의 상등액을 취해 HPLC 정량분석을 실시하였다. AVM B_{1a} 표준용액으로는 순수한 AVM B_{1a}를 100 mg/l~500 mg/l의 농도로 methanol에 용해하여 사용하였고, HPLC 운전 조건은 다음과 같다: column은 Mightysil RP-18 GP 250-4.6(5 µm)(Kanto Chemical Co., Japan)을 사용하였고, mobile phase는 85% methanol과 15% 증류수로 구성된 혼합용액을 사용하였으며, 유속은 1.2 ml/min로 하였다. Column 온도는 40°C로 고정하였고, UV absorbance detector(Younlin Co., Korea)를 이용하여 246 nm에서 시료 내의 AVM B_{1a}를 검출하였다.

원형질체의 형성, 재생 및 융합 조건

*S. avermitilis*의 원형질체를 얻기 위해 ISP 사면배지에서 8일간 배양한 생산균주의 포자를 회수하여 glycine이 첨가된 전배양배지인 P-medium에 접종하였다. P-medium의 조성은 다음과 같다: glycerol 10 g/l, yeast extract 10 g/l, sucrose 205 g/l, CaCl₂ 3 g/l, MgCl₂ 6 g/l, glycine 10 g/l. 접종 후

37°C, 230 rpm으로 48시간 동안 배양한 후에 4,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 남아있는 배지 성분을 제거하고 균체를 삼투압으로부터 보호하기 위해 sucrose 20.5%가 포함된 M 완충용액으로 2회 세척하였다(2N NaOH를 사용하여 pH를 6.6으로 맞춤). M 완충용액의 조성은 다음과 같다: sucrose 205 g/l, CaCl₂ 3 g/l, MgCl₂ 6 g/l, KCl 0.075 g/l. 그 후 세포벽을 제거하기 위해 0.6%의 lysozyme(Sigma Chem. Co., USA)이 함유된 M 완충용액에 균체를 현탁시켜 28°C 진탕 배양기에서 90분간 온화하게 반응시켰다. 그 후 2,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 M 완충용액으로 2회 세척하여 lysozyme을 제거한 뒤, cotton과 20-25 µm의 여과지로 여과하여 균사를 제거하였다. 이와 같이 제조한 원형질체를 hemocytometer를 사용하여 계수하였다. 형성된 원형질체를 M 완충액으로 적정배수 희석하여 0.6%의 agar가 포함된 soft 배지에 현탁한 뒤, 재생배지에 pour plating하여 28°C에서 5일 동안 세포벽을 재생시켰다. 재생배지의 조성은 다음과 같다: sucrose 205 g/l, glycerol 5 g/l, NaCl 2 g/l, KNO₃ 1 g/l, Na₂HPO₄ · 2H₂O 0.534, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/l, KH₂PO₄ 0.1 g/l, trace element 0.1 ml/l, agar 20 g/l. 한편 원형질체의 재생빈도는 다음과 같이 구하였다: hemocytometer로 계수된 원형질체의 수(A)와, 이를 재생배지에 pour plating하여 나타난 colony의 수(B)를 측정하고, 원형질체 현탁액을 삼투압안정제가 첨가되지 않은 배지에 pour plating하여 나타난 colony의 수(C)를 측정한 후, 다음 식에 의해 계산하였다:

$$\text{원형질체 재생빈도(regeneration frequency)} = (B - C) / A$$

상기의 방법으로 형성된 *S. avermitilis*의 원형질체 1 × 10⁷ protoplasts/ml을 2,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 0.1 ml의 M 완충액에 현탁시켰다. 이 현탁액에 1ml의 융합용액(fusion solution)을 가하고 28°C에서 180 rpm으로 5분간 원형질체 융합을 유도하였다. 융합용액의 조성은 다음과 같다: PEG 6,000 500 g/l, CaCl₂ · H₂O 3 g/l, MgCl₂ · 7H₂O 6 g/l. 그 후 4 ml의 M 완충액을 가하여 융합을 중지시키고, 0.1 ml를 soft agar에 혼합한 후 재생배지에 overlay하였다.

NTG 처리에 의한 원형질체의 돌연변이 유도 및 유도된 변이주들의 원형질체 융합

제조된 원형질체의 최종농도가 1 × 10⁷ protoplasts/ml이 되도록 2.8 mg/ml의 NTG를 45분 동안 처리(치사율 약 95%)하여, 2,000 rpm로 원심분리하고 sucrose가 포함된 M 완충용액으로 2번 세척한 후, 변이 처리된 원형질체 현탁액 0.1 ml에 융합용액 1 ml를 첨가하여 28°C, 180 rpm의 조건에서 5분간 원형질체 융합을 시도한 후, 삼투압안정제가 첨가되어 있는 재생 배지에 overlay하여 28°C에서 10일간 배양하였다.

UV 조사에 의한 원형질체의 돌연변이 유도 및 유도된 변이주들의 원형질체 융합

최종농도가 1 × 10⁷ protoplasts/ml인 *S. avermitilis*의 원형질체에 치사율이 약 95% 정도 되도록 UV를 조사하여 돌연변이를 유도한 후, 변이 처리된 원형질체 현탁액 0.1 ml에 융합용액 1 ml를 혼합하여 이들 상호간의 원형질체 융합을 시도하였다. 그 후 삼투압안정제가 첨가되어 있는 재생배지에 overlay하여 28°C에서 10일간 배양하였다. 형성된 돌연변이체는 가시광선에 의해 원상으로 회복되는 경향이 있으므로 원형질체를 담은 모든 실험 기구를 알루미늄 foil로 싸서 실험함으로써 가시광선에 의한 photoreactivation 현상이 발생하지 않도록 하였다. UV 처리는 암소에서 254 nm의 15W UV lamp 2개를 25 cm 거리에서 280초 동안 30초 간격으로 조사하였다. 그 후 0.1 ml를 pour plating으로 배양한 뒤, 각각의 조건에서의 colony를 계수하여, UV를 처리하지 않은 대조군(control)에 대한 백분율을 구하였다.

결과 및 고찰

전배양시 glycine 농도 및 전배양시간이 원형질체 형성에 미치는 영향 조사

일반적으로 전배양시 glycine을 첨가할 경우 세포벽을 쉽게 함으로써 원형질체 형성을 촉진한다고 알려져 있다[12]. 본 연구에서는 glycine 농도가 원형질체 형성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 0%에서 2.0%(w/v)의 glycine이 첨가된 전배양배지(P-medium)에 생산균주를 접종하여 배양한 뒤, 0.2%의 lysozyme을 처리하여 원형질체 형성 정도를 비교 조사하였다. 37°C에서 48시간 배양하여 균체를 회수한 후 건조균체량을 측정하고 lysozyme을 처리하여 형성된 원형질체의 수, 그리고 원형질체의 형성 시간을 관찰하였다(Fig. 1). Glycine을 1.0%의 농도로 첨가하여 전배양한 경우에서 최대 원형질체가 형성되었으며, 1.0% 이상의 농도에서는 균체 생육이 크게 저해되고 원형질체의 수가 급격히 감소하는 현상을 관찰할 수 있었다. 따라서 이후의 원형질체 형성을 위한 생산균주의 전배양시 glycine을 1.0%(v/v)으로 첨가하기로 결정하였다. 본 실험 결과 획득한 원형질체에 대한 현미경 사진을 Fig. 2에 제시하였다.

한편 *Streptomyces*는 일반적으로 exponential phase와 stationary phase 사이에 존재하는 transition phase에서 최대 원형질체형성율과 최대 재생율을 보이며, 이 시기의 균체는 낮은 성장률에 비해 영양분을 다량 축적하기 때문에 원형질체 재생에 있어서 보다 효과적이라고 보고된 바 있다[1]. 따라서 생산균주의 transition phase를 탐색하기 위해 7개의 250 ml flask에 50 ml의 전배양배지를 첨가하고, 포자 현탁액을 접종하여 37°C에서 배양하면서 24시간마다 1개의 flask를 회수해 건조균체량을 측정하였다. Fig. 3에 제시한 바와 같이 생산균주는 배양 시작 후 약 48시간에 transition phase

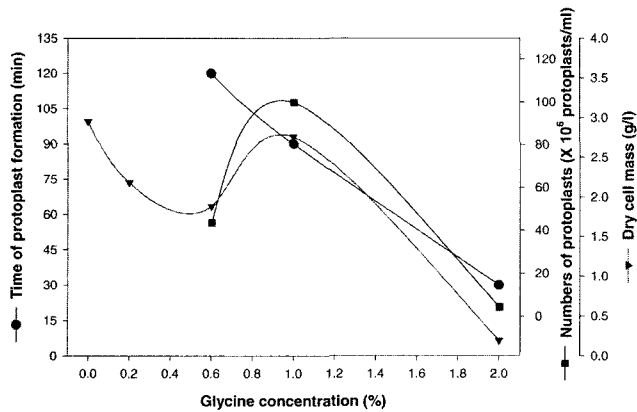


Fig. 1. Protoplast formation time, protopalst number and dry cell mass according to the concentration of glycine supplemented into the P-medium (lysozyme concentration is 0.2 % (v/v)).

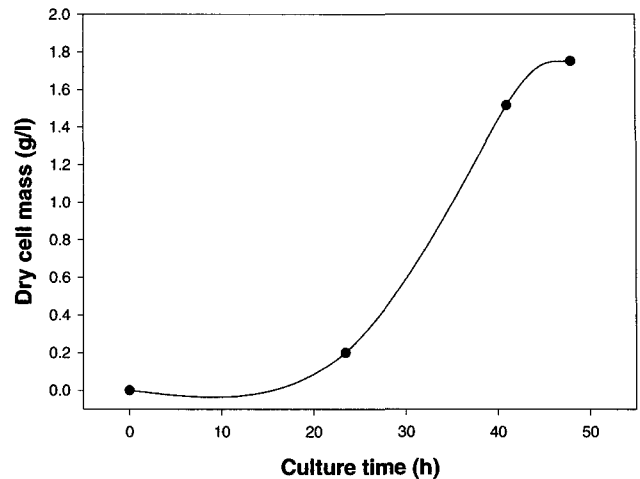


Fig. 3. Time-course profile of dry cell mass in P-medium.

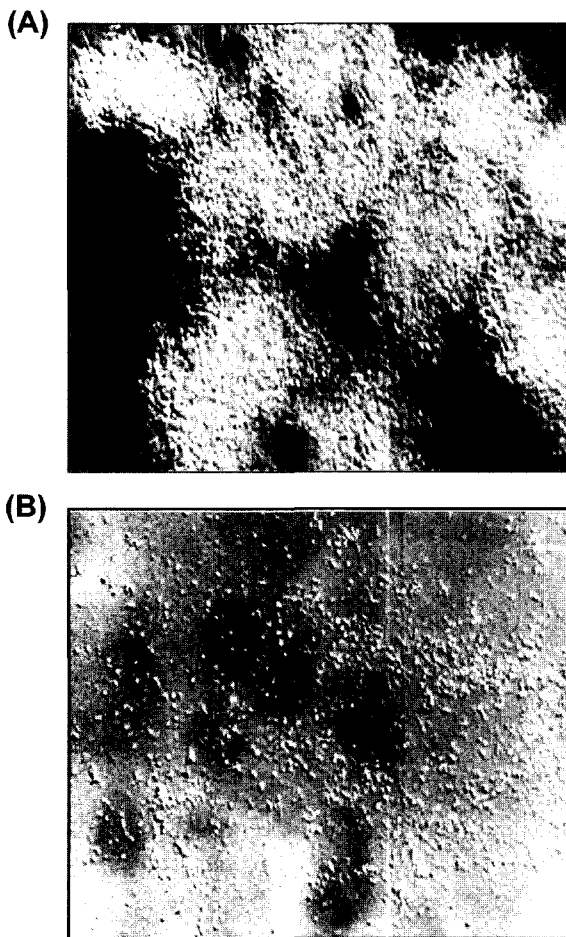


Fig. 2. Microscopic photographs for *S. avermitilis*. (A) Before lytic enzyme treatment, (B) After lytic enzyme treatment.

에 도달하는 것으로 나타났으며, 이 결과에 따라 원형질체 형성을 위한 전배양 시간을 48시간으로 결정하였다.

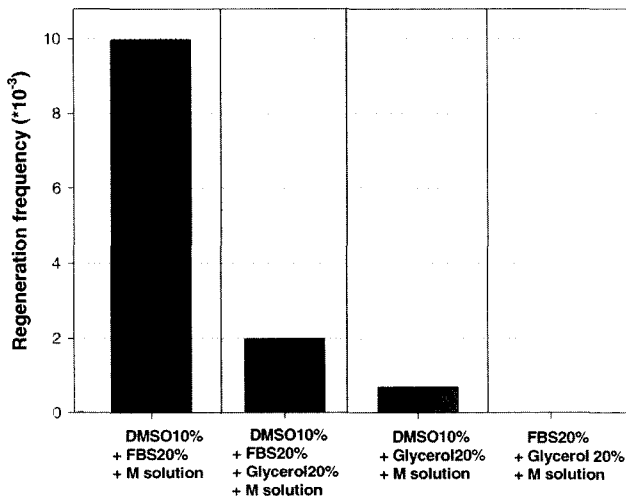
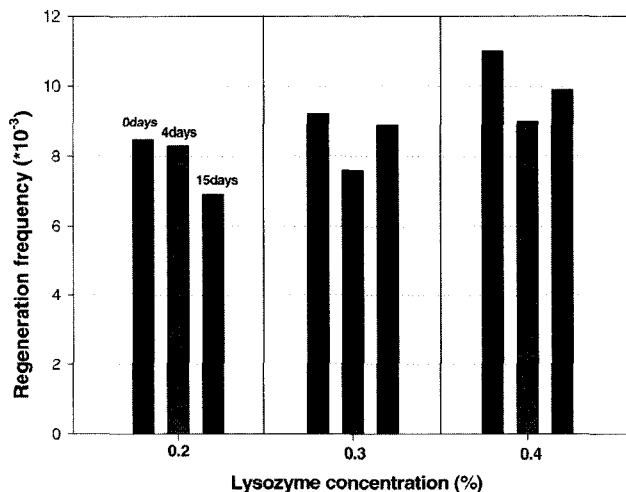
생산균주의 원형질체 형성, 융합, 재생의 최적조건 조사 및 형성된 원형질체의 보관조건 조사

생산균주의 원형질체를 신속하게 대량으로 얻기 위해 다음의 다양한 배양변수가 원형질체 형성에 미치는 영향을 원형질체재생빈도(regeneration frequency)를 측정 기준으로 해서 조사하였다. Table 1에 생산균주인 *S. avermitilis*의 원형질체 형성, 융합 및 재생을 위해 각 배양변수에 대해 조사한 최적의 실험조건을 요약하여 제시하였다. 각각의 최적의 배양변수에서의 원형질체재생빈도는 대략 10^{-2} 에서 5×10^{-1} 의 범위에 존재하는 것으로 나타났다. 이 이후의 원형질체 형성 및 융합 실험은 본 실험 결과 얻은 최적의 배양조건에서 수행하였다.

상기의 방법을 통해 형성된 원형질체를 이용해서 단기간에 효율적인 조사를 수행하기 위해, 형성된 원형질체를 보관하는 방법을 조사하였다. 일반적으로 세포를 안정적으로 보관하기 위해서 -180°C liquid nitrogen tank를 이용하는 경우가 많다[14]. 본 연구에서는 형성된 원형질체를 liquid nitrogen tank에 보관 시, 원형질체가 파괴되는 현상을 최소화하는 조건을 탐색하기 위해 다양한 조건으로 보관용액을 제조하여 liquid nitrogen tank에 보관한 후, 보관 시간에 따른 원형질체의 재생빈도를 조사하였다. 보관용액의 조건은 다음과 같다: (i) DMSO 10% + FBS 20% + M 완충용액 70%, (ii) DMSO 10% + FBS 20% + Glycerol 10% + M 완충용액 60%, (iii) DMSO 10% + Glycerol 20% + M 완충용액 70%, (iv) FBS 20% + Glycerol 10% + M 완충용액 70%. 각각의 조건에서 배양 일수에 따른 원형질체의 재생 빈도를 확인한 결과 (i)번 조건에서 약 1×10^{-2} 의 가장 높은 재생빈도가 나타났으며(Fig. 4), 상기의 조건으로 보관할 경우 원형질체의 재생빈도는 보관 일수에 영향을 받지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 본 실험의 결과로 인해 형성된 원형질체의 보관이 가능하게 되어, 원형질체 융합을 통

Table 1. Optimum conditions for formation, fusion and regeneration of protoplasts of *Streptomyces avermitilis*.

Parameters affecting formation and fusion of protoplasts	Optimum value
Lysozyme concentration	0.6% (v/v)
Length of time for lysozyme treatment	90 min
pH of M buffer (osmotic stabilizer)	pH 6.6
Composition of regeneration medium	Minimal medium supplemented with 205 g/L of sucrose
pH of regeneration medium	pH 6.5
Temperature for protoplasts regeneration	28°C
Molecular weight of PEG as a fusogen	PEG 6000
Concentration of PEG as a fusogen	50% (v/v)

**Fig. 4. Regeneration frequency according to protoplast preservation method in liquid nitrogen tank.****Fig. 5. Regeneration frequency according to lysozyme concentration and preservation period in liquid nitrogen tank.**

한 AVM B_{1a} 고생산성 균주 선별을 더욱 신속히 수행할 수 있게 되었다.

돌연변이된 원형질체의 상호 융합에 의한 유전자재조합체 선별 방법 확립

유전자재조합체만을 특이적으로 선별하는 각 단계는 원형질체 융합방법에서 가장 중요한 단계이다[10]. 즉 유전자재조합체를 선택적으로 선별하기 위해서 표지유전인자를 갖게 하는 것이 우선시 요구된다. 그러나 일반적으로 표지유전인자로 이용되는 안정적인 영양요구성 변이주를 획득하는 것이 방선균에서는 어려울 뿐만 아니라, 모균주에 비해 이차대사산물의 생산성이 현저하게 낮아지거나 소실되는 특징을 보인다[17]. 또한 antimetabolite로 작용하는 아미노산 유사체에 대해 일정 농도 이상의 저항성을 갖는 균주를 선별할 경우 생산성이 더 이상 증가하지 않는 경향을 보이는 문제점이 있다[13].

본 실험에 사용된 *S. avermitilis*의 경우도 원형질체 융합 시 표지 유전인자로 사용하고자 영양요구성 변이주 선별 실험을 수행하였으나, 다른 방선균에서와 마찬가지로 선별 가능성이 굉장히 낮았으며 선별된 균주의 AVM B_{1a} 생산성이 매우 낮게 나타났다. 또한 방선균 자체의 유전적인 불안정성으로 인해, 설사 영양요구성 균주가 선별되었다하더라도 야생 균주형으로 되돌아가는 일이 빈번하게 발생하였다. 한편 융합시 표지유전인자로 사용하기 위한 아미노산 유사체에 대한 저항성 균주를 선별하기 위해, 다양한 균주들을 이용해서 실험을 수행했음에도 불구하고 상호 교차저항성을 갖는 균주를 선별해 낼 수 없었다. 따라서 원형질체 융합방법에서 유전자재조합체를 획득할 수 있는 방법으로 표지인자를 사용하지 않고, 대신 돌연변이 방법을 도입해서 유전자재조합체를 선별하는 방법을 고안하였다. 사용된 돌연변이원에는 따라 두 가지로 나누어 실험을 수행하였으며, 돌연변이원으로는 보편적으로 이용되고 있는 UV와 NTG를 사용하였다. 실험 결과, 원형질체의 95% 이상이 사멸하는 범위에서 돌연변이원을 처리하였기 때문에 돌연변이 시킨 원형질체의 경우에는 거의 대부분이 재생되지 않지만, 주목할 만하게도 원형질체 융합 단계를 거치게 되면 재생율이 현저하게 증가하는 것으로 나타났다(하기에 실험결과 제시). 이는 돌연변이된 두개의 원형질체가 융합과정 중에 손상된 유전자를 서로 상호보완 시켜주기 때문에 나타나는 현상인 것

으로 판단된다. 요약하면 원형질체가 치사율이 매우 높게 돌연변이 처리된 후, 원형질체 융합에 의해 성공적으로 재생된 재생균주는 대부분이 유전자 재조합된 융합균주로 구성되어 있을 가능성이 매우 높은 것으로 간주하였다.

NTG 처리에 의한 유전자 재조합체 선별 및 AVM B_{1a}의 생산성 조사

NTG는 알킬화물질(alkylating agent)로 타 돌연변이 유발원과 유사하게 error-prone repair 기작에 의해 돌연변이를 유발하는 물질이다. UV 돌연변이가 유전자의 transversion이나 deletion을 유도하는데 비해, NTG는 GC pair를 AT pair로 변화시키는 물질로 비교적 낮은 치사율을 보이는 반면, 돌연변이율이 높아 이차대사산물의 고생산성 균주개발 시 널리 사용되고 있는 돌연변이원이다[15]. 본 연구에서는 돌연변이 유발물질인 NTG를 이용하여 유전자 재조합체를 선별하고자 하였다. 원형질융합 파트너(partner)로서 OMT 저항성 균주인 TH150-5와 AZL 저항성 균주인 ZH27 또는 ZH35을 이용하였다. 상기에서 확립된 최적 조건을 이용해서 두 가지 균주의 원형질체를 형성한 후, 치사율이 95% 정도 되는 2.8 mg/ml의 NTG를 45분 동안 처리하였다. 그리고 NTG를 처리한 2종의 원형질체 각 0.1 ml에 1 ml의 융합용액을 첨가하여 28°C, 180 rpm의 조건에서 5분간 원형질 융합을 시도한 후 삼투압안정제가 첨가되어 있는 재생배지에 overlay하여 28°C에서 10일간 배양한 결과, 원형질 융합을 수행하지 않은 경우에는 거의 모든 원형질체가 사멸되었으나, 주목할 만하게도 원형질체 융합을 수행한 경우에는 최고 48%까지 회복된 것을 관찰할 수 있었다(이 결과에 따라 약 43% 정도가 유전자 재조합된 융합체일 것으로 판단함. 이후에는 융합반응에 의해 생존한 균주를 융합균주라고 명명함)(Fig. 6).

형성된 융합균주들의 AVM B_{1a} 생산성을 확인해 보기 위해 250 ml 플라스크에서 7일간 30 ml 규모로 배양한 결과, 다양한 AVM B_{1a} 생산성과 morphology가 관찰되었다(Fig. 7). 융합 파트너인 대조군이 대부분 약 4,800 units/l의 AVM B_{1a} 생산성을 보인 반면, 원형질융합체는 8,400 units/l 범위의 생산성을 보여 주는, 대략 1.7배 정도의 생산성이 향상된 다수의 융합균주들을 확인할 수 있었다. 특히 TH150-5와 ZH35 융합의 경우, 생산성이 약 9,400 units/l로 약 2배 정도 향상된 균주도 획득할 수 있었다. 원형질체 상태에서 돌연변이율이 높은 NTG를 돌연변이원으로 사용하여 이차대사가 심각하게 영향을 받았을 거라고 판단되나, 이와 같이 생산성이 높은 융합균주가 다수 존재함은 원형질체 융합방법이 이차대사산물 고생산성 균주 개발 시 매우 효율적인 방법임을 제시하는 결과로서 주목할 만하다고 하겠다.

UV 처리에 의한 유전자재조합체 선별 및 AVM B_{1a}의 생산성 조사

돌연변이원으로 NTG에 비해 좀 더 온화한 UV를 사용하

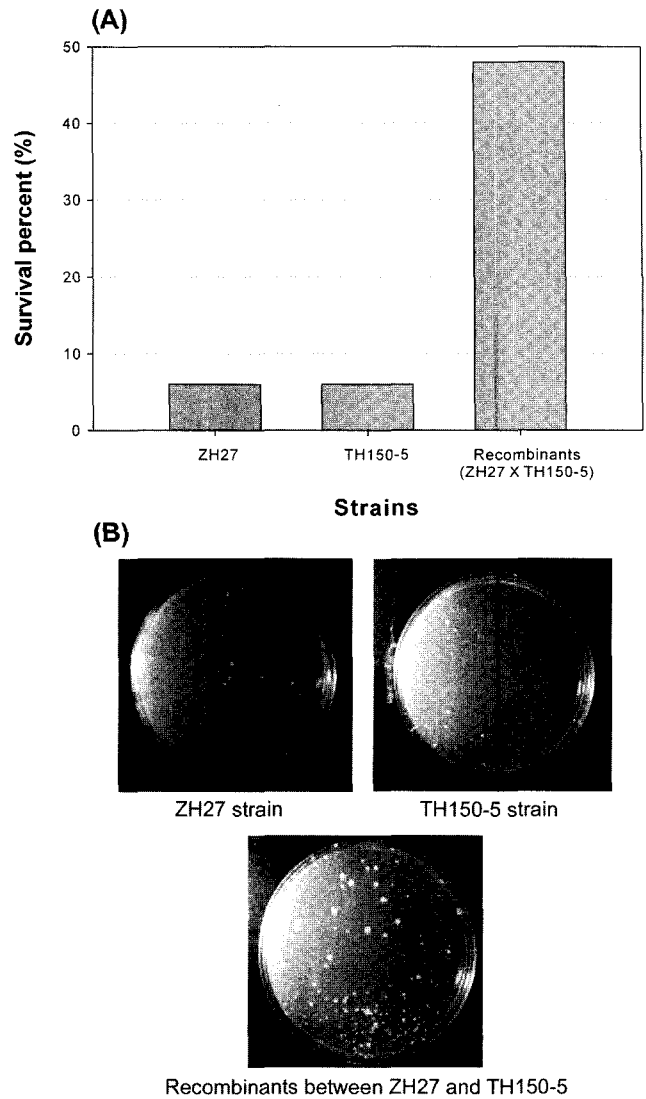


Fig. 6. The effect of NTG treatment on non-fused protoplasts (ZH27 and TH150-5) and protoplast fusants (recombinants) as represented by (A) survival percent and (B) number of survived colonies.

여 융합균주를 선별하여 이들의 AVM B_{1a}의 생산성 분포를 조사하고자 하였다. UV는 NTG와 더불어 널리 사용되고 있는 돌연변이원으로 일반적으로 thymine dimer를 형성해 유전자의 transversion이나 deletion을 유도하며, GC pair를 AT pair로 변화시켜 변이를 유도하는 NTG에 비해 온화한 돌연변이원으로 알려져 있다[15]. 원형질융합 파트너로서 OMT 저항성 균주인 TH150-9와 AZL 저항성 균주인 ZH3.5-14를 이용하였다. UV 조사는 5 × 10⁷ protoplasts/ml가 되도록 희석된 원형질체를 rocker 위에 놓은 뒤 암소에서 온화하게 혼합하면서 254 nm의 15W UV lamp 2개를 25 cm 거리에서 30초 간격으로 270초 동안 조사하였다(약 96%의 원형질체 치사율). UV를 조사한 2종의 원형질체를 융합용액과 1:10으로 혼합하여 28°C, 180 rpm의 조건에서

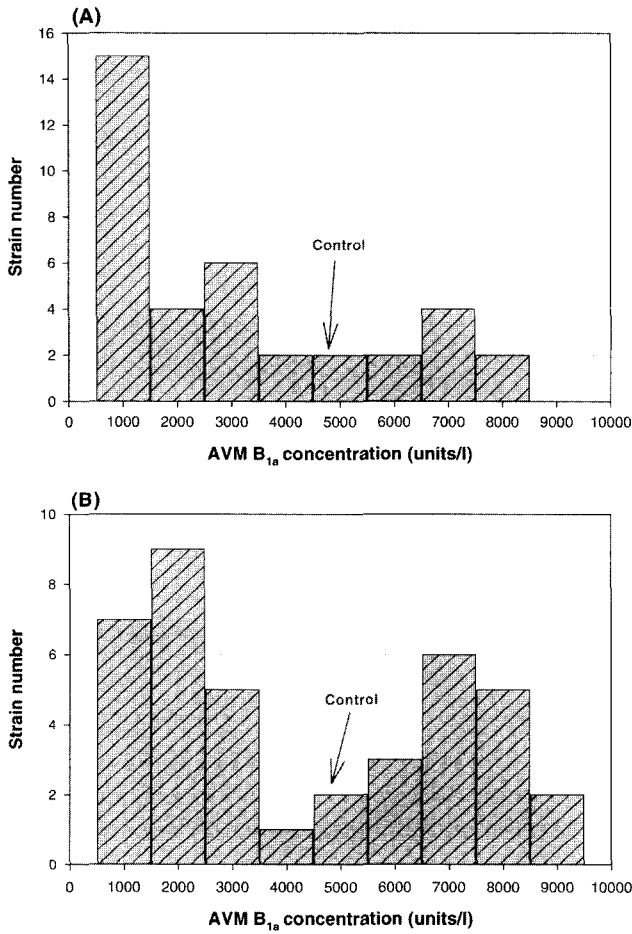


Fig. 7. Histograms for AVM B_{1a} production by the recombinants derived from protoplast fusion through NTG mutation of the protoplasts (NTG exposure period of 45 min was applied).

(A): protoplast fusion between TH150-5 and ZH27

(B): protoplast fusion between TH150-5 and ZH35.

5분간 원형질체 융합을 시도하였다. 그 후 재생 배지에 overlay하여 28°C에서 10일간 배양한 결과, 이 경우에도 주목할만하게 돌연변이 처리한 원형질체의 생존율은 최대 4% 정도를 유지한 반면, 융합반응 후 얻은 융합체의 생존율은 약 42% 정도로 매우 높게 나타났다(Fig. 8). 이 결과에 따라 약 38% 정도가 유전자 재조합된 융합균주일 것으로 판단하였다.

선별된 융합균주를 7일간 250 ml 플라스크에서 배양한 결과, 앞의 NTG 실험과 마찬가지로 AVM B_{1a} 생산성이 넓은 분포로 퍼져 있었으나, 2종의 융합파트너인 모균주의 평균 생산성에 비해 2~3배 정도 향상되었고, 안정된 생산성 경향을 보여주는 융합균주를 다수 확인할 수 있었다(Fig. 9). NTG 변이에서 얻은 융합균주는 대조군에 비해 AVM B_{1a} 생산성이 더 높은 균주가 약 34% 정도 존재하고, 최대 생산성도 약 2배 정도 증가했지만(Fig. 7), UV 변이를 통해 얻

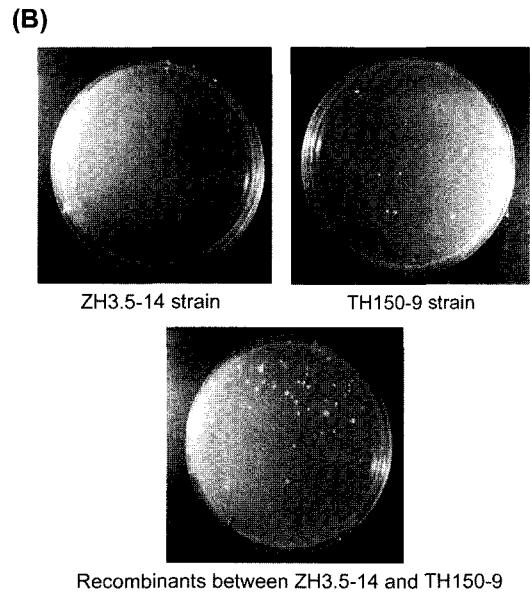
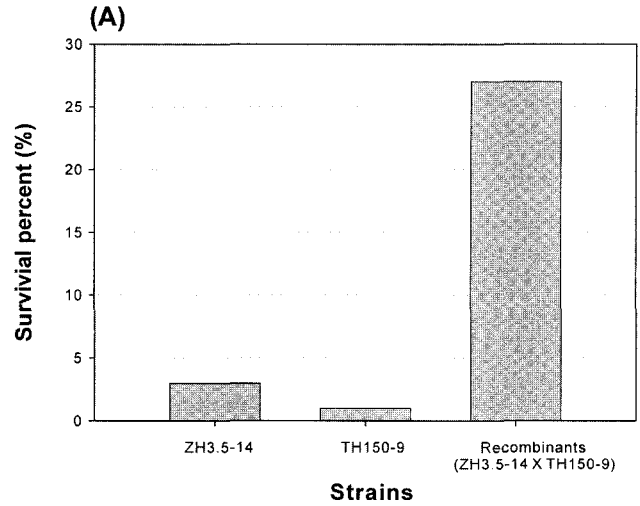


Fig. 8. The effect of UV irradiation on non-fused protoplasts (ZH3.5-14 and TH150-9) and protoplast fusants (recombinants) as represented by (A) survival percent and (B) number of survived colonies.

은 융합균주는 대조군에 비해 거의 대부분(약 96%) 생산성이 더 높게 나타났으며, 최대 생산성도 약 3배 정도 증가하는, 거의 산업용 균주의 생산성에 도달하는 고생산성 균주를 선별하는 주목할 만한 결과를 얻을 수 있었다. 이는 UV 변이조건이 일반적으로 NTG 변이조건에 비해 보다 안정적이어서, 원형질체의 UV 돌연변이 시 polyketide pathway로 이루어져 있는 모균주의 avermectin 생합성 이차대사가 덜 심각하게 영향을 받는 것이 한 이유가 될 수 있을 것으로 보인다. 한편 원형질체 융합시 유전자재조합빈도가 일반적으로 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-3}$ 정도인 점을 감안해 볼 때, 본 연구에서 고안한 UV 조사를 통한 융합균주의 선별 방법은 특별한 표지유전인자를 이용하지 않고서도 유전자재조합체의 선별 확

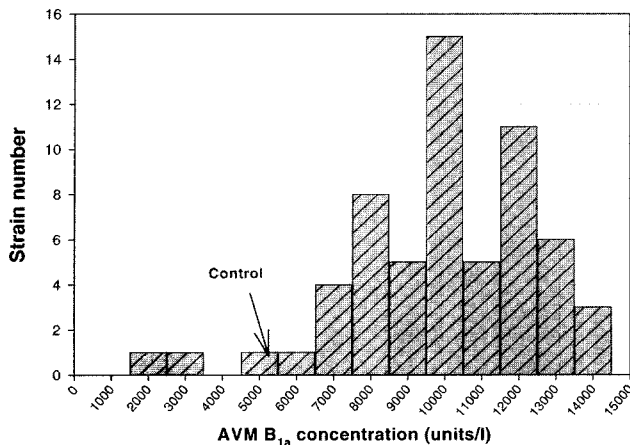


Fig. 9. Histogram for AVM B_{1a} production by the recombinants derived from protoplast fusion through UV mutation of the protoplasts of TH150-9 strain and ZH3.5-14 strain (UV exposure period of 270 sec was applied).

률을 획기적으로 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, AVM B_{1a}의 생산성도 비교적 단기간 안에 큰 폭으로 증대시킬 수 있는 효율적인 방법으로 판단된다.

현재 본 연구실에서는 UV 돌연변이 방법에 의해 선별한 고생산성 융합균주들의 생산 안전성을 5세대에 걸쳐 확인하고 있는 중이다. 보다 안정적인 고생산성 균주들을 획득하기 위해서는, 원형질체 융합을 위한 융합파트너의 선별 단계에서부터 균주의 안정성 조사를 충분히 거친 후에 원형질체 융합을 수행하는 것이 보다 효과적인 것으로 현재 진행 중인 실험결과 관찰되어, 이에 따라서 원형질체 융합에 의한 균주 개량 연구를 더욱 체계적으로 수행하고 있다. 또한 고생산성 균주 개발과 함께 고생산성 균주에 더욱 적합한 배지 성분 및 농도에 대해 통계학적 방법을 이용해서 재조사를 수행하고 있다. 한편 선별된 고생산성 융합균주들의 배양생리학적 특성, 배양형태적 특성 및 AVM B_{1a} 생산 kinetics 등을 5리터 규모의 발효조 배양을 통해 조사하고 있으며, 이에 대한 결과들은 곧 발표될 예정이다.

요 약

*Streptomyces avermitilis*가 생산하는 이차대사산물인 avermectin B_{1a}(AVM B_{1a})의 생산성을 향상시키고자, 고생산성 균주를 융합파트너로 이용하여 원형질체 융합에 필요한 기본 실험조건을 확립하였고, 대량 선별시스템을 이용하여 다양한 융합균주들을 선별하였다. 특별한 표지인자가 없는 경우에도 원형질체 융합에 의해 유전자재조합체들을 선별할 수 있는 방법을 개발하였다. 즉 고생산성 균주의 원형질체(L-isoleucine 유사체인 O-methylthreonine 또는 azaleucine에 대한 저항성 변이주의 원형질체)의 치사율이 약 95% 정도 되도록 UV나 NTG로 각 원형질체를 돌연변이시킨 후, 융합을

시도하여 재생된 변이주를 원형질 융합된 유전자재조합체로 간주하는 방법을 고안하였다. 돌연변이원으로 UV를 이용할 경우 대부분의 유전자재조합 균주들의 AVM B_{1a} 생산성이 융합 모균주들에 비해 높게 나타났으며, 주목할 만하게도 최고 3배 정도 향상된, 거의 산업용 균주의 생산성을 갖는 균주들을 선별할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 강원대학교 연구년 교수 연구비에 의하여 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Baltz, R. H. 1977. Method of obtaining *Streptomyces* protoplast capable of efficient cell regeneration. United State patent 4159226.
- Burg, R. W., B. M. Miller, E. E. Baker, J. Birnbaum, S. A. Currie, R. Hartman, Y. I. Kong, R. L. Monaghan, G. Olson, I. Putter, J. B. Tunac, H. Wallick, E. O. Stapley, R. Oiwa, and S. Omura. 1979. Avermectin, new family of potent anthelmintic agents: Producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**: 361-367.
- Chen, S. T., O. D. Hensens, and M. D. Schulman. 1989. Biosynthesis, p. 55-72. In William C. Campbell (ed.), *Ivermectin and abamectin*. Springer-Verlag, New York.
- Curdova, E., V. Jechova, J. Zima, and Z. Vanek. 1989. The effect of inorganic phosphate on the production of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *J. Basic microbiol.* **29**: 341-346.
- Fodor, K. and L. Alfoldi. 1976. Fusion of protoplast of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**: 2147-2150.
- Hopwood, D. A. 1981. Genetic studies with bacterial protoplasts. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**: 237-272.
- Ikeda, H., H. Kotaki, H. Tanaka, and S. Omura. 1988. Involvement of glucose catabolism avermectin production by *Streptomyces avermitilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 282-284.
- Ikeda, H. and S. Omura. 1997. Avermectin biosynthesis. *Chem. Rev.* **97**: 2591-2610.
- Kohler, P. 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int. J. Parasitol.* **31**: 336-345.
- Lalithakumari, D. 2000. *Fungal protoplast: A biotechnological tool*, pp. 112-114. Science publishers, inc., Enfield, New Hampshire, U.S.A.
- Oh, Y. K., J. L. Speth, and C.H. Nash. 1980. Protoplast fusion with *Streptosporangium viridogriseum*. *Dev. Ind. Microbiol.* **21**: 219-226.
- Sagara, Y., K. Fukui, F. Ota, N. Yoshida, T. Kashiyama, and M. Fujimoto. 1971. Rapid formation of protoplasts of *Streptomyces griseoflavus* and their fine structure. *Jpn. J. Microbiol.* **15**: 74-84.

13. Song, S. K. Development of high yielding stable mutants for avermectin B_{1a} production through rational screening method and examination of their fermentative physiological characteristics, M. S. Thesis. Kangwon National university, 2002.
14. Stanbury, P. F., A. Whitaker, and S. J. Hall. 1995. *Principles of fermentation technology*, p. 42-43. 2nd ed. Elsevier Science Ltd, U.K.
15. Vinici, V. A. and G. Byng. 1999. Strain improvement by nonrecombinant methods, p. 104-113. In Demain A. L., J. E. Davis, etc (eds.), *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
16. Xu, Z. and P. Cen. 1999. Stimulation of avermectin B_{1a} biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* by feeding glucose and propionate. *Biotechnol. Lett.* **21**: 91-95.
17. Yu, J. H. and A. H. Thomas. 1999. Filamentous fungi, p. 417-434. In Demain A. L., J. E. Davis, etc (eds.), *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

(Received Feb. 16, 2004/Accepted Mar. 8, 2004)