

## *Actinoplanes teichomyceticus*의 변이주에 의한 Teicoplanin 발효생산

김성진, 안현진, 김재영, 노용택\*

영동대학교 생명공학부 유전공학과

전화 (0414) 740-1110, FAX (0414) 740-1109

### Abstract

*Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121 was mutated with UV to obtain a superior mutant strain with increasing level of teicoplanin production. In this investigation lethal curve was obtained and the optimal condition to induce mutagenesis was determined and to isolate the desirable mutant strain. It was also confirmed that teicoplanin activities by agar diffusion method to be compared to the mother strain. One mutant strain, T991014-1 that had the highest teicoplanin productivity was finally selected for further investigation including fermentation pattern. The mutant was characterized by the various tests such as amylase activity, protease activity, antibiotic resistance, autotoxicity, and productivity.

**Key words** : teicoplanin, *Actinoplanes teichomyceticus*, mutagenesis, strain development

### 서론

Teicoplanin은 *Actinoplanes teichomyceticus*가 세포 외로 생산하는 glycopeptide계 항생제로서 현재 methicillin resistance *Staphylococcus aureus*(MRSA) 치료제로서 vancomycin과 함께 임상에서 널리 사용되고 있다. teicoplanin의 항균활성 기작은 peptidoglycan의 D-alanyl-D-alanine에 결합함으로써 transglycosylation과 transpeptidation을 저해함으로써 이루어진다. Teicoplanin은 극성 차이에 따라서 구분되는 T-A2-1에서 T-A2-5의 복합체와 T-A2의 정제 과정에서 생성되는 T-A1과 T-A3로 나누어지고 T-A2-2가 가장 강한 항균력을 가지고 있다.

본 연구에서는 *Actinoplanes teichomyceticus*를 모균주로 사용하여 UV에 의한 유전적 개량을 시도함으로써 teicoplanin을 과량생산하는 돌연변이주를 얻고자 돌연변이 조건을 구해 보았고 이 조건으로 돌연변이시켜 teicoplanin을 과량으로 생산하는 돌연변이주를 얻은 후 발효조배양을 통한 생산성향상을 확인하였고 최소 저해 농도를 연구하였다.

### 실험 재료 및 방법

#### 1. 실험 균주

생명공학연구소로부터 분양 받은 *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC31121을 사용하였다. 이 균주는 Parenti 등(1977)에 의해 토양으로부터 분리된 균주로 teicoplanin을 생산하는 균주로 알려져 있다.

#### 2. 배지 성분

중균배지는 10g glucose, 4g peptone, 4g yeast extract, 0.5g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2g  $KH_2PO_4$ , 4g  $K_2HPO_4$ 를 증류수 1 l 에 녹여서 만든 복합배지를 사용하였다(pH 7.0). 생산배지는 4g beef extract, 4g peptone, 1g yeast extract, 10g soybean meal, 10g glucose, 2.5g NaCl, 4g  $CaCO_3$ 를 증류수 1 l 에 녹여 만든 복합배지를 사용하였다(pH 7.0).

### 3. 배양방법

250ml Erlenmeyer flask에 중균배지를 50ml씩 분주하여 48시간동안 28°C, 120rpm에서 배양한 후 3 l 의 생산배지가 들어있는 5 l 발효조(한국발효기(주))에 5%가 되도록 접종하였다. 접종된 발효조는 28°C, 120rpm, 0.5vvm으로 4일간 배양하면서 12시간마다 sample을 취하여 분석하였다.

### 4. Teicoplanin 활성 측정

Agar diffusion 방법을 이용하였으며 지시균으로 *Staphylococcus aureus* 사용하였다. Bioassay의 기준을 위해 표준시약인 targocid를 80, 400, 2000, 10000 $\mu$ g/ml용액으로 만들어 사용하였고 HPLC 분석을 통하여 teicoplanin 생산성을 확인하였다.

### 5. UV에 의한 돌연변이 유도

FVM을 적당히 희석한 후 10초 단위로 UV등(280nm, 20W)으로 조사를 한 뒤 4일간 배양시켜 살아남은 세포수를 계산한 후 사멸곡선을 구하였다. 이 사멸곡선을 이용하여 사멸율이 99.9%되는 120초간 조사하여 균주의 돌연변이를 유도하였다.

### 6. 최소저해농도(MIC) 측정

Agar gradient 방법을 이용하여 먼저 항생제가 포함된 배지를 기울여서 굳힌 후 같은 부피의 항생제 불포함 배지를 그 위에 부어 균희 10<sup>4</sup>이 되도록 희석된 균주를 도말하여 4일 동안 배양하였다. plate위에 자란 균의 거리를 재어 포함된 항생제의 최소저해 농도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

UV를 이용한 돌연변이 유도에 있어서 최적의 사멸율인 99.9%의 조건을 만들기 위해 사멸곡선을 구해 보았다. UV 조사시간이 125초일 때 *A. teichomyceticus*의 kd 값은 0.055였고 다른 방선균과 비교해보았을 때 높은 kd값을 가졌다(Fig. 1). 이 조건이 teicoplanin의 역가를 증진시킬 수 있는 것인지 알아보기 위해 먼저 모균주의 teicoplanin 역가분포를 정구분포로 알아본 결과 가우스 곡선을 그리면서 안정한 역가분포를 나타내었다(Fig. 2). 위 조건을 기본으로 한 120초간 UV 조사로 얻어진 mutant의 역가분포를 모균주와 비교해본 결과 가우스 곡선의 peak가 오른쪽으로 이동하였다(Fig. 3). 위 결과로 약 120초간의 UV조사가 teicoplanin의 역가를 증진시킴을 확인하여 이 조건으로 돌연변이를 유도하여 총 3780개의 돌연변이주의 역가를 비교하였고 최종적으로 teicoplanin 생산능이 모균주보다 약 10배정도 증가된 하나의 돌연변이주(T991014-1)를 얻어내었다.

여기서 얻어진 고역가 돌연변이주를 생산배지를 사용하여 5 l -jar fermentor에서 회분배양할 때의 균체생장과 teicoplanin생합성과정은 Fig.4와 같다. 선택된 *A. teichomyceticus*의 돌연변이주는 접종 후 24시간이 지나서야 teicoplanin 생합성이 관찰되었고 72시간에서 급격히 증가하여 배양 84시간에 최대에 도달하였다. 탄소원으로 첨가된 포도당과 가용성 전분은

배양 초기 24시간 안에 급히 소모되었고 이 기간 동안에는 유기산의 축적으로 배양액의 pH도 계속 감소하였다. 충분한 탄소원으로 인해 단백질의 분해에 의한 pH 상승은 없었으나 84시간 이상 장기배양을 할 경우 기질 고갈, 세포 분해 등에 의한 질소화합물의 축적으로 pH는 급격히 증가하였다(data는 나타내지 않았음). 배양액의 pH는 암모니아 농도와 밀접한 관계가 있음이 나타났으며 암모니아 이온이 충분한 초기 지수성장기에서 균체성장속도가 높았으나 높은 암모니아 이온 농도에 의해 teicoplanin생합성은 강하게 저해받는 것 같다. 암모니아 이온 농도가 낮아지면서 teicoplanin은 시작되었고 암모니아 이온이 고갈되면서부터 teicoplanin생합성은 급격히 증가하였다. 다른 항생제를 생산하는 방선균처럼 *A. teichomyceticus*의 teicoplanin생합성에 관련된 여러 유전자들과 암모니아 이온 농도는 밀접한 관계가 있다고 생각된다.

돌연변이주와 모균주의 전분분해효소와 단백질분해효소의 활성도를 비교하여 보았지만 큰 차이는 나지 않았으며 배양액에서 두 효소의 활성도가 낮은 것으로 보아 세포 외로 분비되는 보다 세포막에 붙어있는 효소의 양이 많다고 생각된다(data는 나타내지 않았음). 그리고 UV조사에 의한 돌연변이를 확인하기 위하여 여러 항생제에 대한 최소저해농도를 측정해보았다(Table 1). Streptomycin, erythromycin, 에 대한 돌연변이주의 MIC값이 감소한 것으로 보아 UV조사에 의해 ribosome의 서열이 달라졌거나 내성관련 유전자가 변화되었다고 생각된다. 배지에 teicoplanin을 첨가하여 자가독성을 측정해본 결과 모균주보다 58%정도 증가되었고 이것은 곧 teicoplanin의 역가 향상에 밀접한 관계가 있다고 생각된다. 그러나 84시간 동안 배양한 발효액 내의 teicoplanin농도와는 큰 차이가 있는데 이것은 MIC 측정시 성장을 위한 종균배지의 사용과 자기 산물에 대한 내성관련 유전자들의 낮은 발현율이라고 생각된다. *A. teichomyceticus* 같은 glycopeptide계 항생제를 생산하는 방선균의 내성기작은 peptidoglycan을 이루는 D-Ala-D-ala을 D-Ala-D-lac으로 바꾸는 것이다. 여기에 관련된 여러 유전자는 세포가 성장하는 배양 초기에는 발현이 되지 않고 정체기에서 높은 수준으로 발현이 되어 자기산물에 대한 내성을 가져 이때는 높은 teicoplanin농도에서 가능하기 때문에 성장을 위한 종균배지에서 자랄 때는 자기산물에 대해 더 민감한 것이라고 생각된다.

#### 참고 문헌

1. Parenti, F. G., G. Beretta, and M. Berti, Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. *J. Antibiotics*. **31**: 276-287
2. Gerhardt, P., G. E. Murray, G. Gostilow, F. W. Nester, A. W. Wood, N. R. Krig, and G. B. Phillips. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology, P p. 222-242. American Society for Microbiology. Washington.
3. Rho, Y. T. Studies on the induction and repression of serrapeptidase in *Serratia* Culture. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 408-413, 1997
4. Arne, H., Trine, S. J. and Jens, N. Growth and production kinetics of a teicoplanin producing strain of *Actinoplanes teichomyceticus* *J. Antibiotics*. **52**: 40-44
5. Rho, Y. T., G. Nam-Kung, and K. J. Lee, Rheological characteristics of rifampicin B fermentation using *Nocardia mediterranei* *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 70-74

6. Marshall, C. G., Lessard, A. D., Park, I. S., and Wright, G. D. Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2215-2220

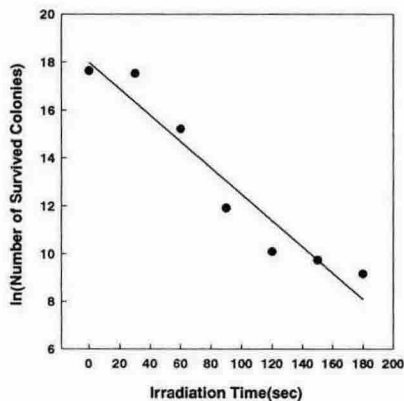


Fig. 1. Survival curve of *A. teichomyceticus* by UV lamp(20W) at 280nm  
 $N_t = N_0 e^{-0.055t}$

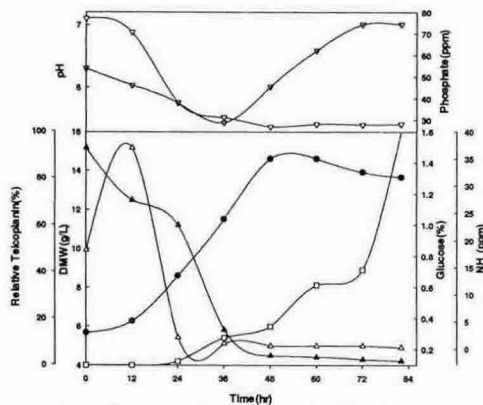


Fig. 4. Time course for the mycelium growth and teicoplanin production in batch culture of 5L-jar fermentor using mutant of *Actinoplanes teichomyceticus*  
 ●, DMW; ■, teicoplanin; △, glucose; ◇, NH<sub>3</sub>; □, pH; ○, phosphate

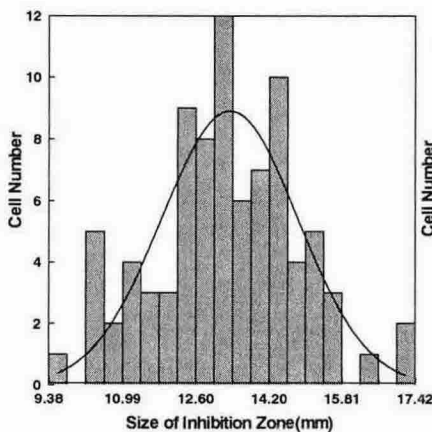


Fig. 2. Normal distribution in productivity of teicoplanin of natural variants of *Actinoplanes teichomyceticus*

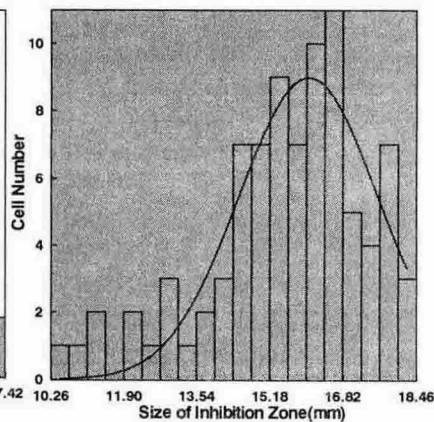


Fig. 3. Normal distribution in productivity of teicoplanin of superior of a UV-treated population of *Actinoplanes teichomyceticus*

Table 1. Comparison of MIC by various antibiotics in mother strain and mutant

Antibiotics	MIC of mother strain( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MIC of mutant( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
streptomycin	1.275	0.275
erythromycin	1.12	0.645
rifampicin	1.33	1.19
tetracycline	2.66	2.24
teicoplanin(autotoxicity)	0.76	1.2