

Effect of culture pH and media composition on the ratio of teicoplanin A₁ and A₂ biosynthesis

김윤정, 송윤석, 노용택*

영동대학교 생명공학부 유전공학과

전화 (043) 740-1110, FAX (043) 740-1109

Abstract

Teicoplanin is a glycopeptide antibiotic produced by *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. ATCC 31121. It is active against Gram-positive bacteria and it is under evaluation for use in man. Teicoplanin mixture in fermentation broth contains major amounts of teicoplanin A₁ and A₂, and a minor amount teicoplanin of A₃. Commercial teicoplanin product is composed of five major components of very similar polarity, designated T-A₂-1, 2, 3, 4 and 5, and the more polar component, designated T-A₃. The culture conditions were studied in order that hydrophilic teicoplanin A₂ components are more produced but hydrophobic teicoplanin A₁ with lower bioactivity are less produced in submerged culture. Effects of culture pH and nutrients on the biosynthesis ratio of teicoplanin A₁ and A₂ were confirmed in flask culture using MOPS buffer system through TLC, bioautography and bioassay. It was elucidated that optimal pH is 7.4 for teicoplanin A₂ biosynthesis but is 5.2 for teicoplanin A₁ biosynthesis, and that trace elements stimulate A₂ production but malt extract stimulate A₁ production.

서론

Teicoplanin은 회귀 방선균인 *Actinoplanes teichomyceticus*에 의해 생합성되는 항생제로서, 구조적으로는 vancomycin ristocetin계 glycopeptide로 methicillin resistant *staphylococcus aureus*(MRSA) 같은 항생제 내성 병원균에 대해 약효를 갖고 있으며 임상적으로 널리 사용되고 있는 항생제이다. Teicoplanin complex는 A₁, A₂, A₃ 3가지 물질의 혼합물로 밝혀졌으며, 가장 강한 항균력을 지닌 것은 teicoplanin A₂이다. 본 연구에서는 *Actinoplanes teichomyceticus*를 UV로 돌연변이 시킨 고생산성 변이주를 사용하여, 배양액 pH 향상 및 산업적으로 중요한 구성 성분인 teicoplanin A₂의 생합성 향상과 배지 조성 변화에 따른 teicoplanin 생산성을 증가시키는 것이 본 연구의 목적이다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 균주

한국생명공학연구소로부터 분양받은 *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121을 돌연변이 시킨 변이주 T318-1을 사용하였다.

2. 배지 성분 및 조건

종균배지는 beef extract 3g, tryptone 5g, dextrose 1g, starch 24g, yeast extract 5g을 증류수 1L에 녹여 pH를 6.8로 보정한 복합배지를 사용하였다.

생산배지는 glucose 30g, yeast extract 5g, asparagine 1.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, NaCl 0.1g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1g, MOPS(3-morpholino-propanesulfonic acid) 15g을 증류수 1L에 녹인 복합 배지를 사용하였다. 배양액 pH는 5N-NaOH로 pH 5.0부터 0.2 간격으로 pH 7.6까지로 보정하였다. 그리고 배지성분 첨가실험은 생산배지 1L에 cotton seed meal 5g, trace elements solution(boric acid 0.5g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.04g, KI 0.1g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.2g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.4g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4g, ammonium molybdate 0.2g in 1N-HCl 1L, 1mL), malt extract 20g을 각각 첨가한 후, pH 7.4로 보정하여 실험하였다.

3. 배양 방법

종균배양은 250ml Erlenmeyer flask에 종균배지를 50ml씩 분주하여 28°C, 145rpm에서 3일간 배양한 후, teicoplanin 생합성을 위한 생산배지가 25ml씩 들어있는 250ml Erlenmeyer flask에 종균을 10%(v/v)가 되게 집중하였다. 본 배양은 28°C, 180rpm에서 7일간 배양하였다.

4. 균체 성장 측정

Whatman GF/C filter(ϕ 47mm)에 배양액 5ml을 감압여과시킨 후, 105°C, 2시간동안 dry oven에서 건조시켜 건조균체량(DMW, g/L)를 측정하였다. 눈금있는 원심분리관에 배양액 10ml을 취한 뒤, 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체침전부피(PMV, %)를 측정하였다.

5. Teicoplanin 농도 측정

배양액내 teicoplanin 농도는 생물학적 검정법을 사용하였는데 agar diffusion 방법 중 agar well 방법을 사용하였고, 지시균으로는 *Staphylococcus aureus*를 사용하였다. 검량선 작성을 위한 표준시약으로는 targocid(Gruppo Lepetit S.p.A., Italy)를 312.5, 625, 1250, 2500mg/L 용액으로 만들어 사용하였다.

6. Teicoplanin A₁과 A₂의 TLC 분리 및 Bioautography

배양액 50 μ l를 TLC plate (silica gel 60F₂₅₄, Merck)에 점적하여, 전개용매에 의해 전개시킨 후, 지시균이 혼합된 영양한천배지를 TLC plate 위에 덮어 bioautography를 실시하여 배양액 중 teicoplanin A₁과 A₂의 생합성 비를 비교하였다. 이때 사용된 teicoplanin 표준시약은 targocid 1g/L 용액을 사용하였고, 전개용매 조성은

n-propanol:ethyl acetate:NH₄OH = 2:1:2로 만들어 사용하였으며, TLC 전개 용기는 전개 용매로 2시간 정도 충분히 포화시킨 후 사용하였다.

결과 및 고찰

MOPS buffer system을 이용하여 flask에서 배양액 pH에 따른 teicoplanin 생산성 비교 실험을 실시하였다. 초기 pH 7 이하에서는 pH가 낮을수록 균체 생장은 저해 받지만 생산성은 증가되는 것을 확인하였다(Table 1). 그러나 pH 7.0 이상 7.6 이하에서는 균체 성장과 teicoplanin 생합성 모두 증가하는 경향을 보였다. Fig. 1에서 TLC 후 bioautography 결과, teicoplanin A₁과 A₂의 비율은 낮은 배양액 pH에서 A₁의 비율이 큰 반면, pH 7.0 이상에서는 A₂의 생합성 비율이 높은 것을 볼 수 있었다.

배지 성분 첨가에 의한 teicoplanin 생산성 실험에서는 cotton seed meal 첨가구는 비교적 균체 생장은 높았지만 teicoplanin 생합성을 강하게 억제시키는 결과를 나타냈다. Malt extract 첨가구는 배양액 pH가 낮게 유지되었으며 A₁의 생합성이 촉진되었고, trace elements 첨가구는 균체 생장은 낮았지만 가장 높은 teicoplanin 생산성을 나타냈으며, A₁에 대한 A₂의 비율도 가장 높았다(Table 2, Fig. 2).

본 실험에서 teicoplanin 혼합물 전체의 생산성 및 teicoplanin A₁, A₂의 생합성 비율에 영향을 미치는 것은 배양액 pH, 질소원, 탄소원과 trace elements라는 것을 확인하였지만 좀 더 복잡한 외부환경의 상호작용에 의한 것으로 생각되었다.

참고 문헌

1. Cociglio. M, H. Peyriere, D. Hillaire-Buys and R. Alric. 1997. Application of a standardized coextractive cleanup procedure to routine high-performance liquid chromatography assays of teicoplanin and ganciclovir in plasma. *J. Chromatography B*. **705**, 79-85.
2. Bardone. M. R, M. Paternoster and C. Coronelli, 1997. Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. *J. Antibiotics*. **31**(3), 170-177.
3. Borghi. A, P. Antonini, M. Zanol, P. Ferrari, L. F. Zerilli and G. C. Lancini. 1989. Isolation and structure determination of two new analogs of teicoplanin, a glycopeptide antibiotic. *J. Antibiotics*. **42**, 361-366.
4. Borghi. A. D. Edwards, L. F. Zerilli and G. C. Lancini. 1991. Factors affecting the normal and branched-chain acyl moieties by *Actinoplanes teichomyceticus*. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 587-592.

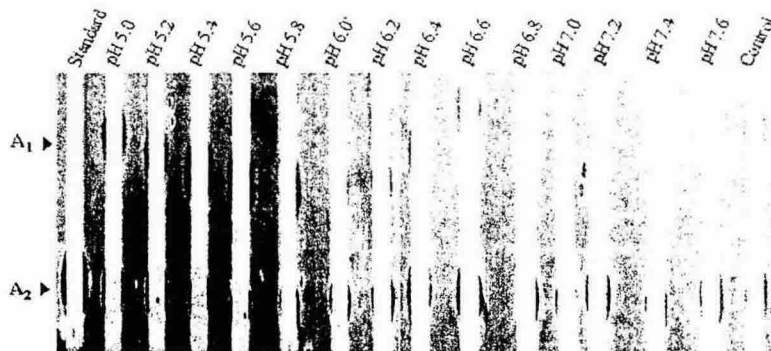


Fig. 1. Thin layer chromatography of teicoplanin culture broth in the addition of various nutrients media composition followed by bioautography

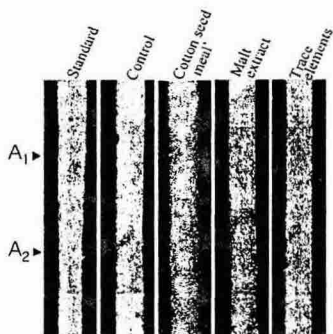


Fig. 2. Thin layer chromatography of teicoplanin culture broth in the various pH followed by bioautography.

Table 1. Growth and teicoplanin production in the various media.

Initial pH	Final pH	PMV(%)	DMW(g/L)	Teicoplanin(mg/L)
5.0	6.10	4	4.00	129.7
5.2	5.61	5	4.41	379.5
5.4	5.19	5	4.81	318.5
5.6	5.49	6	5.27	245.7
5.8	5.55	6	5.42	216.5
6.0	6.20	6	5.56	215.1
6.2	6.65	7	5.73	215.1
6.4	6.94	8	5.20	193.6
6.6	7.13	8	5.06	183.0
6.8	7.22	9	5.54	155.7
7.0	7.29	10	5.76	74.5
7.2	7.35	10	6.42	182.7
7.4	7.60	11	6.18	202.2
7.6	7.66	10	6.28	152.7

Table 2. Growth and teicoplanin production in the various initial pH of the production media.

Media	Final pH	PMV (%)	DMW (g/L)	Teicoplanin (mg/L)
production medium +cotton seed meal	7.02	12	6.88	157.6
production medium +trace elements	6.58	10	5.11	1114.1
production medium +malt extract	5.07	13	8.15	638.1