

Colistin 생산균주의 균주개량 및 productivity 증대를 위한 발효최적화

예병대, 황용배, 김영희, 김동건, 양호석

(주)제일바이오 연구소 생명공학실

전화 (031) 494-8227, FAX (031) 492-0586

Abstract

Colistin produced from *Penibacillus polymyxa* was widely used as an antibiotic active against gram-negative bacteria and as feed additive. This research studied on increment of colistin productivity by mutation of *P. polymyxa*. As a result, several mutants were obtained from the strain by UV radiation and NTG treatment. They produced approximately 8.5~9.0 g/L of colistin in flask and jar culture. Colistin productivity of the mutant, named *Penibacillus polymyxa* CBY, showed 100 times than that of wild type. When *Penibacillus polymyxa* CBY fermented in the optimal medium, it produced up to 18 g/L of colistin in jar fermentation.

서론

콜리스틴은 *Penibacillus polymyxa* (이하 *P. polymyxa*)으로부터 생산되는 펩타이드계 항생물질로서 1950년 Koyama *et al.* 에 의해 그람음성세균에 항균활성을 갖는다는 것이 처음 보고되었다.¹⁾ 일반적으로 콜리스틴은 시겔라속, 대장균, 녹농균 및 살모넬라속 등의 그람음성세균에 의해 유발되는 감염증을 치료하기 위해 널리 사용되어왔다. 1963년 Suzuki 등에 의해 그 구조가 밝혀졌으며, 1969년에는 콜리스틴의 생합성 경로가 부분적으로 규명되었다.²⁾ 또한 1962년에는 Morito에 의해 콜리스틴 생산을 위한 최적의 배양조건이 확립되기도 하였다.³⁾ 그 이후 콜리스틴의 공업적 생산을 위한 구조적 특성 및 발효대사에 관한 연구들이 많은 사람들에 의해 연구되었다.⁴⁻⁵⁾ 본 연구에서는 기존의 *P. polymyxa*을 UV radiation 및 NTG 처리를 이용하여 균주개량을 하고, 또한 개량된 균주를 사용하여 colistin productivity을 향상시키고자 하였다.

재료 및 실험방법

본 연구에서는 기존에 보관하고 있던 *P. polymyxa*을 개량하기 위하여 초저온 냉장고에 저장되어 있던 균주를 nutrient-broth를 이용하여 활성화시킨 다음 희석하고, 희석용액 100 μ l를 nutrient agar plate에 도말하여 균주를 분리하였다. 균주를

개량하는 방법으로 기존의 UV radiation 및 NTG 처리를 사용하였다. UV radiation 및 NTG처리에서 얻은 단일 colony들은 선별하여 각각 flask 배양을 하였다.

선별배양된 균주의 항균활성을 측정하기 위하여 배양액 30 μ l를 8 mm paper disc (ADVANTEC, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)에 분주한 다음 *E. coli*가 도포되어 있는 nutrient agar plate위에 올려놓았다. 그리고, 24 시간 후 저지환을 측정하였다.

선별된 균주들은 colistin productivity를 조사하기 위해 500 ml flask (Pyrex, USA)와 5-L jar fermentor (Kobiotec. Co., Ltd, Korea)를 사용하였다. 종균배지 (dextrin 5.6 %, CSL 0.67 %, $MgSO_4$ 0.05 %, NaCl 0.01 %, $CaCO_3$ 1 %)에 식균하여 24 시간 배양 한 다음 이를 주 발효배지(corn meal 4 %, soluble-starch 1 %, $(NH_4)_2SO_4$ 1 %, KH_2PO_4 0.05 %, $MgSO_4$ 0.05 %, NaCl 0.0125 %, acetic acid 0.01 %, aspartic acid 0.15 %, $CaCO_3$ 1 %, pH 7.3) 가 들어있는 500 ml flask 및 5-L jar fermentor에 각각 접종하여 3~4 일동안 배양하였다. Colistin 함량은 HPLC (Waters 501, USA)를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

UV 및 NTG 처리에 의한 사멸률 조사 및 균주선별

본 연구에서는 기존의 균주를 개량하기 위하여 UV radiation 및 NTG처리를 이용하였다. 수회에 걸친 UV조사 결과 30초 이상 처리시 거의 100 %의 사멸률을 나타내었다(figure 1(A)). UV 처리후 살아남은 균주를 다시 NTG처리한 경우는 0.05 mg/mL이상에서 거의 100 % 사멸률을 보였다(figure 1(B)). 따라서 여러조합에 의한 수백회의 mutation으로 많은 수의 colony을 얻을 수 있었다.

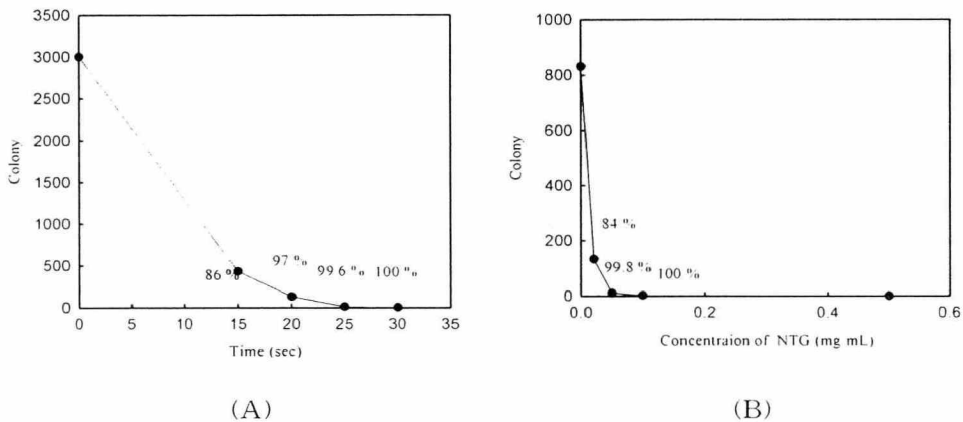


Figure 1. UV radiation 및 NTG 처리에 따른 사멸곡선
(A) UV radiation (B) NTG

선별균주 배양 및 colistin productivity 조사

앞선 결과에서 선별된 균주를 flask 배양을 하고 일반적인 bio-assay method를 이용하여 *E. coli*에 대한 항균활성을 측정해서 1차적으로 항균력이 우수한 균주를 선별하였다. 1차 선별된 mutant들을 주 발효배지에서 flask배양하여 colistin productivity를 조사한 후 2차 우수 균주를 선별하였다. Table 1에서 보는 것처럼 거의 모든 균주가 7.0 g/L 이상의 productivity를 보였고, 특히 CSU-11-20-4, CSU-14-20-3, CSU-24-20-8, CSU-29-20 3이 약 9.0 g/L로 다소 높은 colistin productivity를 보였다. 이것은 기존보다 약 20~30 % 그리고 wild type 보다는 100 배 향상된 것으로 이전보다 colistin productivity가 상당히 개선이 되었음을 알 수 있었다.

이러한 flask 결과를 바탕으로 5-L jar fermentor에서 다시 주요 균주들에 대해서 colistin productivity를 살펴보았다. Figure 2에서처럼 CSU-11-20-4의 colistin productivity가 같은 배양 조건에서 가장 우수하였고 나머지 균주들은 상기 균주보다 약 5~40 %의 낮은 colistin productivity를 보였다. 따라서, CSU-11-20-4을 새로이 *Penibacillus polymyxa* CBY (이하 *P. polymyxa* CBY)라 명명하였고, 특허출원을 하였다.

아울러 최적의 배지조건에서 *Penibacillus polymyxa* CBY를 배양한 결과 최대 18 g/L의 colistin productivity를 보였다(data not shown).

참고문헌

1. Koyama, Y., Kurosawa, A., Tsuchiya, A., Takakuda, K., *J. Antibiotics*, 3, 457 (1950).
2. Suzuki, T., Inouye, H., Fujikawa, K. and Nagasawa, S., *J. Biochem.*, 54, 25 (1963).
3. Morito, T., Antibiotic Colistin from *Bacillus colistinus* Koyama: Part I. Studies on the Culture of *Bacillus colistinus* Koyama. (I), *Nippon Noeikagaku Kaishi*, 36, 18 (1962).
4. Ito, M., Aida, K. and Uemura, T., Studies on the Bacterial Formation of Peptide Antibiotics, Colistin: Part II. On the Biosynthesis of 6-Methyloctanoic and Isooctanoic Acids, *Agr. Biol. Chem.*, 33, 2, 262-269 (1969).
5. Ito, M., Aida, K. and Uemura, T., Studies on the Bacterial Formation of Peptide Antibiotics, Colistin: Part III. On the Biosynthetic Pathway of α,γ -Diaminobutyric Acid and Relationship between Colistin Formation and amino Acids Metabolism in *Bacillus colistinus* Koyama, *Agr. Biol. Chem.*, 33, 2, 262-269 (1969).

Table 1. Colistin productivity in flask

Strain	Colistin productivity (g/L)	Strain	Colistin productivity (g/L)	Strain	Colistin productivity (g/L)
CS-4	7.2	CSU-11-20-3	7.4	CSU-24-20-8	8.2
CSU-4-20-3	7.9	CSU-11-20-4	9.0	CSU-26-20-1	8.2
CSU-5-25-1	7.5	CSU-11-20-6	7.8	CSU-27-20-2	8.0
CSU-6-25-2	7.6	CSU-13-20-6	7.3	CSU-27-20-3	8.6
CSU-7-20-5	6.7	CSU-14-20-3	8.6	CSU-28-20-5	7.9
CSU-9-30-2	8.0	CSU-20-20-1	7.4	CSU-28-20-10	8.7
CSU-10-20-2	8.3	CSU-20-20-3	7.9	CSU-29-20-3	8.8
CSU-10-20-3	7.5	CSU-20-20-12	7.8		
CSU-11-20-1	7.5	CSU-24-20-3	7.7		
CSU-11-20-2	7.8	CSU-24-20-5	7.7		

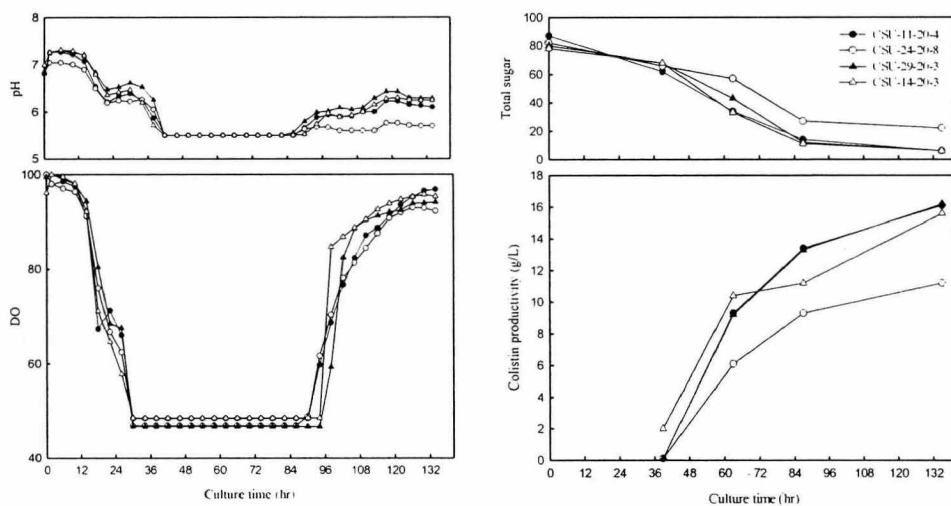


Figure 2. Colistin productivity in 5-L jar fermentor