

Sisomicin 발효에 대한 탄소원의 영향과 Glucose에 의한 조절효과

안병우 · 이상한 · 신철수

한국화학연구소 응용생물연구부
(1986년 6월 19일 수리)

Effects of Various Carbon Sources and Carbon Catabolite Regulation in Sisomicin Fermentation

Byung-Woo Ahn, Sang-Han Lee and Chul-Soo Shin

Life Science Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon, Korea

(Received June 19, 1986)

Sisomicin, which is one of aminoglycoside antibiotics, was produced by *Micromonospora inyoensis*. The effects of carbon sources on sisomicin production were studied in batch cultures. Starch, dextrin and maltose were good carbon sources for the production of sisomicin. However, when glucose was used, the antibiotic productivity decreased significantly due to a carbon catabolite regulation. The carbon catabolite regulation depends mostly on carbon catabolite repression, but not on carbon catabolite inhibition. On the other hand, the growth-production curves of batch cultures show that sisomicin is produced most actively during the idiophase.

항생물질 발효에서 이용되는 탄소원으로서 glucose보다 starch, dextrin, maltose, lactose 등이 이용되어 왔으며 특히 starch, dextrin은 항생물질의 생산성을 증대시키는데 효과적인 것으로 보고되어 왔다⁽¹⁾. 그러나 곰팡이나 mycelium을 형성하는 방선균등을 이용하는 항생물질 발효에서 몇 가지 문제점들이 대두될 수 있다. 즉, 발효중 생육에 의해 증식된 균체와 starch등의 탄소원 사이에 응집이 일어나 점착성이 높은 용액을 형성하여 발효조내에 부착되거나 혹은 배지 용액의 교반시에 소요되는 에너지의 증대를 야기시킬 수 있다⁽²⁾.

한편 starch대신 glucose를 이용하는 경우 이러한 문제점들은 완화될 수 있으나, 대부분의 경우 glucose가 균의 생육에는 나쁜 영향을 주지 않으나 항생물질의 생산성을 저하시키는 것으로 보고되어 왔다⁽³⁾. 이러한 현상은 발효배지에 이용성이 좋은 탄소원이 높은 농도로 존재할 때 자주 일어나는 carbon catabolite regulation에 기인하는 것으로 생각되어 왔다⁽⁴⁾.

본 연구에서 batch culture를 이용하여 *Micromonospora inyoensis* 균주에 의해 생합성되는 sisomicin의 생산성에 대한 여러가지 탄소원의 영향을 조사하였으며, glucose에 의한 carbon catabolite regulation효과에 대해 살펴봄으로써, starch대신 glucose의 이용 가능성에 대해 검토하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 sisomicin 생산균인 *Micromonospora inyoensis* IFO 13156 균주를 사용하였다.

배지

생육배지⁽⁵⁾ 생육배지는 0.3% beef extract, 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.1% dextrose, 2.4% potato starch 및 0.2% calcium carbonate를 수도물에 녹여 살균하기 전에 pH 8로 맞추었다.

발효배지⁽⁵⁾ 발효배지는 5% potato starch, 0.5% dextrose, 3.5% soybean meal, 0.7% calcium -

carbonate 및 10^{-8} M cobalt chloride가 되게 수도물로 용해시켜 살균하기 전에 pH 8로 맞추었다. 한편 탄소원의 종류와 농도는 각각의 실험에 따라 변화시켰으며 나머지 성분은 항상 위와 같이 하였다.

배양조건

생육단계 생육배지 20 ml을 포함하고 있는 250 ml용 shake flask에 일정량의 glass bead (20개, 직경 4 mm)을 넣고 autoclave에서 가압 살균한후에 (1 atm, 15min), *M. inyoensis* 균주의 사면배양에서 한 백금을 취하여 접종하였다. 이들을 28°C에서 3일간 진탕배양 하였다.

발효단계 생육배양에서 얻어진 배양액 5 ml을 멸균된 발효배지 50 ml을 포함하고 있는 500ml용 shake flask에 접종하고, 이들을 생육단계에서와 마찬가지로 28°C에서 4일간 진탕배양 (150 strokes / min, 진폭 3 cm) 하였다.

항생물질의 추출⁽⁵⁾

발효후 배양액을 황산으로 pH 2로 맞추후 15분간 살며시 교반하면서 균체로부터 항생물질의 추출을 유도한 뒤, 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거하고 항생물질의 추출액을 얻었다. 원심분리하여 얻어진 상등액의 pH를 암모니아수로 pH 7로 조정하고, Ca⁺⁺이온을 제거하기 위해 여기에 충분한 양의 oxalic acid를 첨가한 후 녹였다. 다시 그 용액을 원심분리하여 상등액을 취하고, 이것을 암모니아수로 pH 7로 조정하여 얻은 용액을 항생물질의 농도 측정하는데 사용하였다.

항생물질의 농도 측정

발효 배양액으로부터 추출한 sisomicin의 역가 분석은 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P 균주를 피검균으로 사용하여 cylinder 방법으로 행하였다⁽⁶⁾. 항생물질의 역가 분석용 배지로서 penassay 고체배지⁽⁷⁾를 살균하여 약 25ml씩 직경 100mm되는 petri dish에 부어 굳힌 다음, 그 위에 하룻밤 동안 액체 배양한 피검균 배양액을 일정한 농도로 (OD₅₂₀ ≒ 0.15) 희석하여 접종하고 건조한 후 살균된 cylinder를 이 고체배지위에 일정한 간격으로 놓고 여기에 일정량 (5 μl)의 시료와 표준용액을 주사하였다. 그 후 그대로 약 2시간 정도 방치한 다음, 37°C 항온기에서 배양하여 항생물질에 의한 피검균의 생육 저지대를 생성케 하였다. 시료의 항생물질 농도는 생성된 생육 저지대의 직경을 측정하여 sisomicin의 표준곡선으로부터 구하였다.

균의 농도 측정

발효 배양액 5 ml을 취한 후 저속에서 (1500 rpm, 1분간) 원심분리하여 (한일 Centrifuge, HA-10) 발효배지중의 soybean meal을 일차적으로 침전시켜

제거하고 상등액만을 모아 다시 재 원심분리하여 (3000 rpm, 10분) 균을 침전시켰다. 여기에 증류수를 가하여 현탁시킨후 원심분리하여 배지중의 starch를 씻어내는 작업을 3회 되풀이하여 대부분의 starch를 제거하였다. 이렇게 하여 얻은 침전액을 105°C 오븐에서 건조시켜 균의 건조 중량을 구하였다.

Starch정량

배양액의 starch농도는 starch-iodine 반응⁽⁸⁾으로 측정하였다. 즉, 일정량의 배양액을 취한 후 약 0.02% 이하의 starch농도가 되도록 증류수로 희석하여 이 액 1 ml을 취하고, 여기에 0.005% 요-드 용액 (0.05% KI 포함) 5 ml을 가하여 25°C 수조에서 10분간 발색시킨후 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 starch농도는 starch표준용액의 흡광도와 비교하여 상대적으로 계산하였다.

Glucose정량

배양액의 glucose 농도는 DNS (dinitrosalicylic acid) 방법⁽⁹⁾으로 측정하였다. 시료 배양액의 glucose농도를 약 0.1% 이하가 되도록 증류수로 희석한 후 이 액 0.5 ml를 취하고 여기에 DNS 용액 1.5 ml를 가하였다. 이것을 끓는 물에서 5분간 방치하여 발색시키고 여기에 10 ml의 증류수를 가한후 550nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucose 표준용액의 흡광도와 상대적으로 비교하여 시료의 glucose농도를 구하였다.

결과 및 고찰

Sisomicin 생성에 대한 탄소원의 효과

M. inyoensis 균주를 이용한 sisomicin의 발효 생산에 영향을 미치는 몇가지 탄소원의 효과를 조사

Table 1. Effects of various carbon sources on sisomicin fermentation.

Carbon Source	S (g/l)	X (g/l)	P (μg/ml)
Starch	50	9.0	87
Dextrin	50	8.2	87
Maltose	20	7.2	85
Sucrose	20	5.1	38
Lactose	20	3.0	4
Glucose	20	5.2	69
Glycerol	20	1.7	3

S; concentration of carbon source

X; cell concentration

P; antibiotic concentration

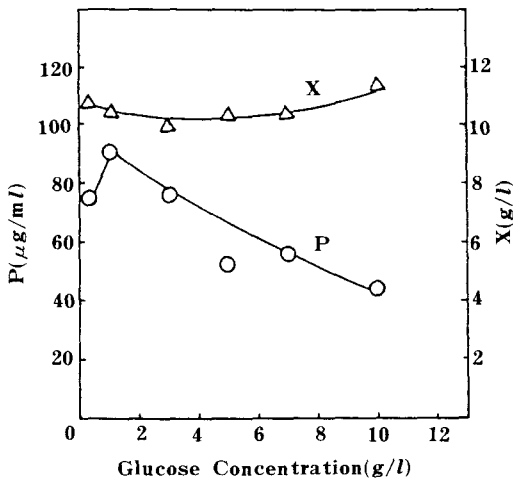


Fig. 1. Effects of various glucose concentrations on sisomicin production at a fixed starch concentration (50 g/l).

X; cell concentration
P; antibiotic concentration

하였다 (Table 1). Starch, dextrin 및 maltose를 사용했을 때 생성된 항생물질의 농도는 가장 높았고, sucrose와 glucose를 사용했을 때 많이 감소하였으며, lactose와 glycerol을 사용했을 경우에 균의 생육은 심하게 저해를 받았으며 항생물질은 거의 생성되지 않았다.

Starch를 탄소원으로 사용하는 경우, 발효중 배양 초기 균의 생육을 좋게 해주기 위해서 보통 발효배지에 starch와 더불어 glucose를 소량 첨가한다. 초기 starch 농도를 50 g/l로 고정하고 glucose 농도

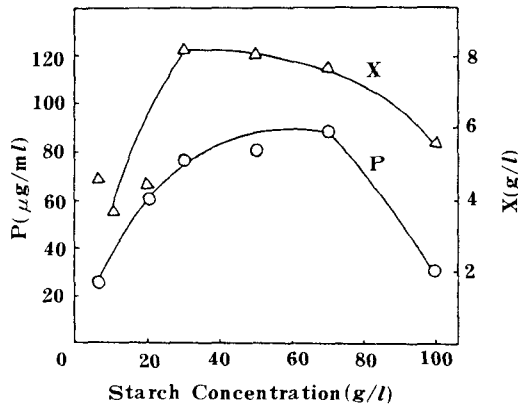


Fig. 2. Effects of various starch concentrations on sisomicin production at a fixed glucose concentration (1 g/l).

X; cell concentration
P; antibiotic concentration

를 다양하게 변화시켜 배양한 후 항생물질의 농도와 균의 농도 변화를 관찰하였다 (Fig. 1). 사용된 glucose의 농도 범위에서 균의 농도는 거의 변화가 없었으나, 항생물질의 농도는 glucose 농도가 1 g/l 일 때 가장 높게 나타났다. 다음에는 glucose 농도를 1 g/l로 고정하고 starch 농도를 변화시켜 항생물질의 농도 및 균의 농도 변화를 관찰하였다 (Fig. 2). 항생물질의 농도는 starch 농도 50~70 g/l 부근의 값에서 가장 높게 얻어졌다.

한편 곰팡이나 mycelium을 형성하는 방선균을 이용한 항생물질 발효에서 starch나 dextrin 등을 사용할 때 항생물질의 생산성은 좋은 반면, starch와 균체 사이에 응집이 일어나 발효조내의 벽이나 impeller 등에 부착됨으로써 발효조를 깨끗한 상태로 유지하기 어렵고 이로써 발효조내의 열전달을 방해할 수 있다. 둘째로는 발효배지의 점도가 높아 교반시 더욱 많은 에너지가 필요로 할 것이다. 그러나 starch 대신 glucose를 이용할 때 이러한 문제점들을 어느정도 해결할 수 있을 것으로 생각된다. Table 1에서 보는 바와같이 탄소원으로 starch에 비하여 glucose를 사용했을 때 균의 생육에 대해서 별 영향을 주지 않는 것으로 생각되나, 항생물질의 농도는 감소하였다. 이러한 효과는 glucose에 의한 carbon catabolite regulation에 기인하는 것으로 생각된다.

발효배지에 탄소원으로 glucose만을 사용하여 sisomicin 생산에 대한 glucose의 영향을 살펴보았다. 배양 초기의 glucose 농도를 다양하게 변화시켜 발효가 끝난 후 각각 균의 농도와 항생물질의 농도를 측정하였다 (Table 2). 발효배지의 초기 glucose 농도가 20 g/l 일 때 항생물질의 농도가 가장 높았으며, glucose 농도가 50 g/l 이상일 경우에는 glucose에 의해 균의 생육이 저해를 받았고 항생물질은 거의 생성되지 않았다. 한편 30 g/l glucose 농도에서의 균의 농도는 20 g/l glucose 농도에서 보다 약간 증가

Table 2. Effects of various glucose concentrations on sisomicin production.

Glucose (g/l)	X (g/l)	P (μg/ml)
5	3.5	20
10	4.3	42
20	6.2	81
30	7.3	50
50	3.5	-
70	3.4	-

X; cell concentration
P; antibiotic concentration

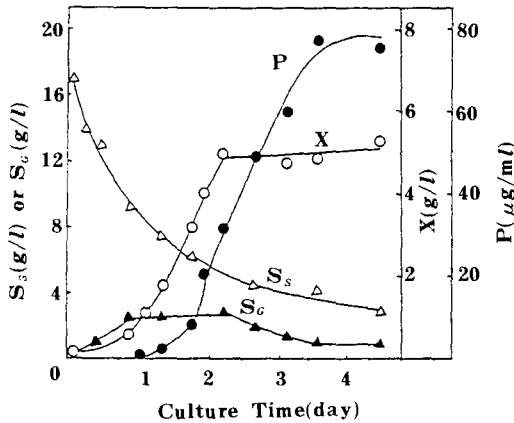


Fig. 3. Growth-production curves of sisomicin fermentation.

S_s; starch concentration
 S_g; glucose concentration
 X; cell concentration
 P; antibiotic concentration

하였으나 항생물질의 농도는 오히려 감소하였다. 이러한 결과는 항생물질 생성에 대한 glucose로부터 유발되는 carbon catabolite regulation에 기인하는 것으로 생각된다⁽⁴⁾.

Sisomicin 발효에 있어 carbon catabolite regulation 효과

항생물질 발효에서 발효배지에 사용된 탄소원에 의해 일어나는 carbon catabolite regulation 현상의 그 작용기작은 명확하게 밝혀지지 않았으나, 많은 항생물질의 생합성의 조절에 관여하는 것으로 알려져 왔다⁽¹⁾. 그리고 glucose에 의한 carbon catabolite regulation은 항생물질 생합성 효소계의 형성이 carbon catabolite에 의해 유전자 수준에서 억제되는 catabolite repression과 이미 합성된 효소의 활성이 저해를 받는 catabolite inhibition으로 나눌 수 있다⁽¹⁰⁾. Carbon catabolite regulation을 유발하는 탄소원중 특히 glucose는 균의 생육에는 좋지만, 대부분의 항생물질의 생합성을 방해하는 것으로 잘 알려져 왔다⁽¹⁾. Fig. 3의 growth-production 곡선으로부터 추측할 수 있듯이, 항생물질의 생합성을 조절하는 glucose의 catabolite repression은 항생물질 생성에 관여하는 효소계가 주로 형성되는 시기 즉, 대수증식기에 해당되는 1-2일간의 배양시간에 일어날 것으로 예상된다. 한편, 항생물질 생합성의 조절이 catabolite inhibition 효과에 의해 영향을 받는다면 growth-production 곡선의 배양시간 2일 후에 그 효과가 현저하게 나타날 것으로 생각된다. 따라서 *M. inyoensis* 균주를 이용한 sisomicin의 발효에서 glucose에 의해 유발되는 catabolite regulation

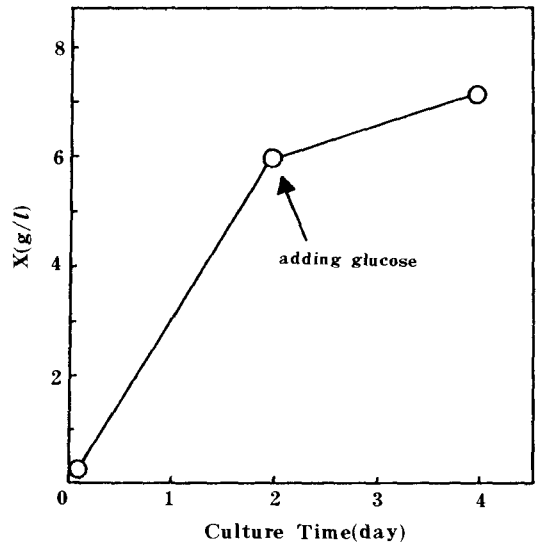


Fig. 4. Addition of glucose during sisomicin fermentation.

X; cell concentration

의 현상이 catabolite repression 혹은 catabolite inhibition에 의한 것인지를 다음의 실험을 통하여 검토하였다.

다음에서, 발효중 sisomicin의 생합성 조절에 대한 glucose의 catabolite inhibition 효과를 살펴보았다. Inhibition 효과의 존재유무를 파악하기 위해 배양시간 2일까지 같은 glucose 농도에서 배양하고 그 효과가 주로 나타날 것으로 예상되는 배양시간 2일 후에 glucose 농도를 다양하게 변화시켜 (Fig. 4) 4일

Table 3. Effects of glucose concentration on the carbon catabolite inhibition occurred during sisomicin fermentation.

t = 48 h			t = 96 h			
X (g/l)	P (μg/ml)	S (g/l)	S (g/l)	X (g/l)	P (μg/ml)	P/X
6.0	18	2.5	1.8	7.1	92	12.9
6.0	18	4.3	2.0	6.8	89	13.1
6.0	18	6.7	3.5	7.2	95	13.2
6.0	18	9.8	5.5	7.6	95	12.5
6.0	18	13.2	9.6	7.1	94	13.2
6.0	18	23.1	18.6	7.7	90	11.7
6.0	18	42.2	35.8	7.4	98	13.2
6.0	18	68.6	63.8	6.3	82	13.0

S; glucose concentration
 X; cell concentration
 P; antibiotic concentration
 P/X; antibiotic amount per cell mass

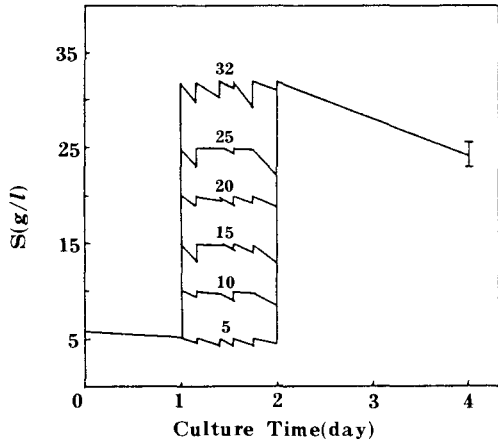


Fig. 5. Regulation of glucose concentrations during the logarithmic phase of growth.

S; glucose concentration

까지 배양한 다음, 균의 농도 (X), 항생물질의 농도 (P) 및 단위 균의 농도당 항생물질의 농도 (P/X) 즉, 균의 activity의 변화를 관찰하였다 (Table 3).

각각의 glucose 농도에 따른 배양후에 얻어진 최종 균의 농도, 항생물질 농도 및 균의 activity 들 사이에는 별로 차이가 나타나지 않았다. 따라서 발효중 glucose에 의한 catabolite inhibition 효과는 sisomicin의 생합성 조절에 별로 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

다른 한편, glucose에 의한 catabolite repression의 효과가 발효중 sisomicin의 생합성 조절에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다. Catabolite repression이 일어나리라고 예상되는 배양시간 1-2 일 사이 즉, 균의 생육단계의 대수증식기 동안에 6 개의 플라스크 배양액의 glucose 농도를 5g/l 에서 최대 32 g/l 까지 조절 유지시키고, 2일 이후에는 모든 플라스크의 glucose 농도를 32 g/l 로 조정하여 계속 배양하였다 (Fig. 5). 배양후 얻어진 균의 농도, 항생물질의 농도 그리고 균의 activity의 변화를 관찰하였다 (Table 4). 균의 농도는 glucose의 농도 변화에 관계없이 거의 비슷하게 얻어졌으나, 항생물질의 농도는 15-20 g/l 의 glucose 농도에서 가장 높게 나타났으며, 32 g/l 이상의 glucose 농도에서 항생물질 농도가 급격히 감소하였다. 한편 glucose의 농도 변화에 따른 균의 activity를 비교하여 보았을 때 glucose 농도 25 g/l까지는 거의 변화가 없었으나, 32 g/l 이상에서 균의 activity가 급격히 감소하는 것을 알 수 있었다. 32 g/l 이상의 glucose 농도에서 일어나는 이러한 효과는 glucose에 의한 catabolite repression에 의해 유발되는 것으로 생각할 수 있다.

Table 4. Effects of glucose concentration on the carbon catabolite repression occurred during sisomicin fermentation.

Glucose (g/l)	X (g/l)	P (μg/ml)	P/X
5	5.7	68	11.9
10	5.6	76	13.6
15	5.8	79	13.6
20	5.9	81	13.7
25	5.6	69	12.3
32	5.1	48	9.4

X; cell concentration

P; antibiotic concentration

P/X; antibiotic amount per cell mass

결론적으로, glucose를 탄소원으로 이용하는 sisomicin 발효시에 높은 glucose 농도에 의해 항생물질 생성에 대한 carbon catabolite regulation이 일어나며, catabolite inhibition 효과 보다는 주로 catabolite repression 효과가 크게 작용하는 것으로 추측된다. 이와같이 발효배지에 탄소원으로서 starch를 사용할 경우 야기되는 문제점들을 극복하기 위해 glucose로 대체할 경우, sisomicin의 생합성은 carbon catabolite regulation을 받아 결국 생산성의 감소가 예상된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 배양 초기에 과량의 glucose를 일시에 첨가해 주는 단순한 batch system보다는 배양중 소량의 glucose를 천천히 배양액중으로 첨가해 주는 fed-batch를 이용하면 탄소원으로 starch를 사용하는 경우 이상의 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

Micromonospora inyoensis 균주에 의한 sisomicin의 발효에서 항생물질의 생산성에 대한 여러가지 탄소원의 영향을 batch culture를 이용하여 검토하였다. Starch, dextrin 및 maltose는 sisomicin의 생산에 좋은 탄소원으로 밝혀졌으나, glucose가 사용되었을 때 sisomicin 생산성은 carbon catabolite regulation에 기인하여 크게 감소되었다. 한편 sisomicin 생합성에 대한 carbon catabolite regulation은 catabolite inhibition 효과보다 주로 catabolite repression 효과에 좌우되었다.

참고문헌

- Vining, L.C.: Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics, Addison-Wesley Publishing Company, U.S.A., (1983).

2. Suijdam, J.C. and B. Metz: *Biotechnol Bioeng.* **23**, 111 (1981).
3. Ikeda, Y. and T. Beppu: *Genetics of Industrial Microorganisms*, Kodansha LTD., Tokyo, (1982).
4. Umezawa, H., A.L. Demain, T. Hata and C.R. Hutchinson: *Trends in Antibiotic Research*, JARA, Tokyo, (1982).
5. Weinstein, M.T., G.M. Luedemann, and G.H. Wagman: *U.S. Patent* **3,832,286** (1974)
6. Hewitt, W.: *Microbiological Assay*, Academic Press, New York, 1st ed., (1977).
7. Difco Manual, Difco Laboratories Inc., Detroit, 9th ed., (1977).
8. Bergmeyer, H.U.: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. **2**, 885 (1974).
9. Shin, C.S.: Ph. D. Thesis, Rutgers University, (1984).
10. Wang, D.I.C., C.L. Cooney, A.L. Demain, P. Dunnill, A.E. Humphrey and M.D. Lilly: *Fermentation and Enzyme Technology*. Wiley Interscience Publication, New York (1979).