

Neomycin 생산균주 *S. fradiae*의 항생물질 생산을 활성화시키는 성분조사

*김 공 환·구 양 모·황 희 숙·조 영 애·조 희 영
*아주대학교 생물공학과, 서울대학교 약학과

Examination of Metabolites Activating Production of Antibiotic in the Neomycin Producer, *S. fradiae*

Kong Hwan Kim*, Yang Mo Goo, Hee Sook Hwang, Young Ae Joe, Hee Young Cho
*Department of Biotechnology, Ajou University
Department of Pharmacy, Seoul National University

ABSTRACT

When *S. fradiae* was cultured in S medium, it started to produce neomycin in the middle of stationary phase of growth. Antibiotic production is regulated not only by glucose but also by metabolites formed from glucose. A chemically defined minimal salt broth was developed for the study of metabolites activating production of antibiotic in a neomycin producer. When growth and production of antibiotic in minimal salt broth was examined with a full grown or a vegetative mycelium, the medium was found not to be good for the growth, but to be good enough for the production of antibiotic with a full grown mycelium. When many carbohydrates, organic acids, or alcohols were supplemented with instead of glucose in the medium suspended with a full grown mycelium, the amount of antibiotic produced in the medium containing fumarate was 5 times more than that in the medium with glucose. Further study indicated that the medium is not good also for the growth but good for the production of antibiotic. The antibiotic produced in this medium was identified to be neomycin. The activation of the production of neomycin by fumarate was further confirmed in a complex medium. Fumarate is suspected to initiate and to activate the biosynthesis of neomycin at the gene level.

서 론

항생물질을 생산하는 균주를 배양하면 초기에는 균주의 생장이 활발하다가 배지에 영양요소, 특히 포도당이 고갈되면 항생물질을 생산하기 시작하는 것이 흔히 관찰된다. 일반적으로 포도당이 배지에 많이 존재하여 항생물질의 생산이 억제되는 현상을 glucose repression 이라고 부르고 있다(1). 항생물질의 생산은 포도당에 의하여 억제될 뿐 아니라 생장중에 항생물질

생산균주내에 생성되어 누적되는 특정한 대사물이 항생물질의 생합성을 발단시키는 것으로 생각되고 있다. 이런 현상을 metabolite activation이라고 부르고 있다(2). 우리는 포도당에 의하여 항생물질의 생산이 억제되는 현상과 대사물에 의하여 항생물질의 생합성이 활성화되는 현상을 규명하기 위하여 새로운 실험시스템을 개발하여 어떤 종류의 탄소원이, 또는 포도당으로부터 생성될 수 있는 대사물들 중에 어떤 대사물이 항생물질의 생합성을 자극하는지 조사하였다. 본 논문에서는

네오마이신 생산균주인 *Streptomyces fradiae*를 모델시스템으로 선택하여 연구한 결과의 일부를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

미국 일리노이주 Peoria에 있는 Northern Regional Research Laboratory의 A. J. Lyons가 보내준 네오마이신 생산균주인 *Streptomyces fradiae* NRRL B-1195를 사용하여 본 연구를 수행하였다. 균주를 기증하여준 Lyons씨에게 감사한다. 항균효력검사 균주인 *Bacillus subtilis* IFO 3134는 Institute for Fermentation, Osaka에서 구입하였다.

시약 및 기기

진탕배양은 28℃의 항온실에 설치된 회전교반기(180 rpm)로 행하였다. 균주의 건조중량은 배양액 1ml를 Eppendorf tube에 취한 후에 동결건조하여 얻었다. 모든 실험자료는 3-5개의 값을 구하여 이들의 평균을 최종 실험자료로 취하였다. 배양액에 함유되어 있는 항생물질의 양은 Sigma에서 구입한 네오마이신 황산염을 염기형태로 바꾸어 준 후에 이것을 표준품으로 사용하여 종이디스크 확산법을 사용하여 구하였다(3). 종이 디스크 확산법에서는 Schleider & Schuell 회사의 1/2 또는 1/4 inch 직경의 항생물질 검색용 종이디스크를 사용하였다. 항생물질을 검사할 때마다 표준품을 같이 검색하여 성장억제 영역의 직경을 항생물질 농도의 log 값에 대하여 보정곡선을 구하여 얻어진 검색시료의 성장억제영역의 직경 값에 대한 농도를 구하였다. 각 시료를 세번이상 조사하였고 이들 값의 평균을 최종 자료로 취하였다. 본 실험에서 사용한 시약은 Sigma Chemical Co., BDH Chemical Ltd., Fluka Chemical Co.에서 구입한 것을 사용하였다. 사용한 배지는 Sigma Chemical Co.와 Difco 회사의 제품을 사용하였다.

배지

본 실험에서는 아래의 조성을 갖는 배지(4)를 만든 후에 HCl 또는 KOH로 pH를 맞추고 멸균한 후에 사용하였다. 아래의 배지조성에서 포도당과 sucrose는 50%의 용액을 만들어 따로 멸균하여 배지에 가하였다. Diammonium citrate는 citric acid를 물에 녹이고 암모니아수로 pH를 5.5로 맞춘 후에 배지에 가하였다. Calcium malate는 malic acid를 물에 녹인 후에 calcium hydroxide를 가하여 pH를 7.0으로 맞춘 후에 배지에 가하였다.

S배지(5):

Glucose 10 g ; peptone 4 g ; yeast extract 4 g ; MgSO₄ 7H₂O 0.5 g ; KH₂PO₄ 2 g ; K₂HPO₄ 4 g ; distilled water 1 l.

No. 1 배지:

Glucose 31.8 g ; diammonium citrate 10.0 g ; monosodium glutamate 2.0 g ; K₂HPO₄ 0.5 g ; NaCl 2.5 g ; CaCO₃ 1.0 g ; MgSO₄ 7H₂O 1.0 g ; FeSO₄ 7H₂O 0.02 g ; ZnSO₄ 7H₂O 0.01 g ; distilled water 1l ; pH 7.3.

No. 2 배지:

Glucose 10 g ; KNO₃ 1 g ; MgSO₄ 7H₂O 0.5 g ; FeSO₄ 7H₂O 0.05 g ; CuSO₄ 5H₂O 0.05 g ; CaCO₃ 10 g ; D,L-histidine 0.05 g ; deionized water 1 l.

No. 3 배지(sucrose-nitrate broth; Czapek's broth):

Sucrose 30 g ; NaNO₃ 2 g ; K₂HPO₄ 1.0 g ; KCl 0.5 g ; MgSO₄ 7H₂O 0.5 g ; FeSO₄ 7H₂O 0.01 g ; distilled water 1l ; pH 7.2-7.3.

No. 4 배지(glucose-asparagine broth):

Glucose 10 g ; asparagine 0.5 g ; K₂HPO₄ 0.5 g ; distilled water 1l ; pH 6.8.

No. 5 배지(glycerol-glycine broth; Plotho's broth):

Glycerol 20 g ; glycine 2.0 g ; K₂HPO₄ 1.0 g ; NaCl 2.0 g ; CaCO₃ 0.2 g ; MgSO₄ 7H₂O 0.5 g ; FeSO₄ 7H₂O 0.1 g ; distilled water 1l ; pH 7.2.

No. 6 배지(glucose-calcium malate broth):

Glucose 20 g ; calcium malate 10 g ; NH₄Cl 0.5 g ; K₂HPO₄ 0.5 g ; distilled water 1l.

No. 7 배지(glucose-minimal salt broth):

glucose 20 g ; KNO₃ 4.0 g ; NaCl 5.0 g ; K₂HPO₄ 2.0 g ; MgSO₄ 7H₂O 1.0 g ; CaCl₂ 0.4 g ; MnSO₄ 7H₂O 0.01 g ; FeSO₄ 7H₂O 0.02 g ; distilled water 1l ; pH 7.0

No. 8 배지(glycerol-urea broth):

glycerol 15 g ; urea 2.0 g ; K₂HPO₄ 0.5 g ; MgSO₄ 7H₂O 0.5 g ; NaCl 0.5 g ; FeSO₄ 7H₂O 0.1 g ; distilled water 1l.

Neomycin 생산 복합배지(6):

Soybean meal 25 g ; glucose 10 g ; brewer's yeast 5 g ; NaCl 5 g ; CaCO₃ 2 g ; deionized water 1l.

항균효력 조사 및 항생물질의 정량(3)

Nutrient broth (Difco)에 *B. subtilis*를 접종하여 24시간 29℃에서 배양한 후 2ml를 45℃로 유지된 멸균한 nutrient agar (Difco) 용액 100ml에 가하였다. 이 용액을 잘 흔들어 준 후에 20ml씩 취하여 100mm 직경의

Petri dish에 부어주고 굳혔다. 이 아가판 위에 항생물질검색용 종이디스크를 접착시키고 30분간 4℃에 보관한 후에 아가판을 29℃의 항온실에 17시간 보관하였다가 검색균주의 생장이 억제된 영역의 직경을 측정하였다. 항생물질의 정량분석은 시료 30 μ l로 항생물질검색용 종이디스크를 적셔 검색하였다. 표준 항생물질로 사용한 엽기형 네오마이신은 Sigma에서 구입한 네오마이신 황산염을 물에 녹여 음이온 교환수지(PA-412)를 처리하여 엽기로 만든 후에 동결건조하여 얻었다. Phosphate buffer (potassium, 100 mM, pH 8.5)에 연속회석하여 녹인 시료로 성장억제 영역의 직경을 얻었다. 검색용액에 함유된 항생물질의 양은 보정곡선에서부터 구하였다.

*S. fradiae*가 생성하는 항생물질의 동정

Sigma에서 구입한 네오마이신 황산염을 증류수에 녹인 용액과 배양액에서 얻은 시료용액을 cellulose thin layer chromatography (TLC) plate에 점적하여 이 TLC plate를 acetonitrile-water-17% ammonia water (40:30:1)로 전개한 후에 ninhydrin 용액(1% acetone 용액)으로 발색시켰다. 배양액에서 시료용액은 아래와 같은 방법으로 얻었다. 즉 배양액을 양이온 교환 수지(IRC-50)로 충전되어 있는 관에 통과시켜 항생 물질을 흡착시켰다. 이 이온교환 수지를 묽은 염산(0.01-0.5N)을 통과시키면서 흘러나오는 용액을 분획수집하였다. 항균효력을 보이는 분획수집액을 모아 감압증류한 후에 물에 녹여 음이온교환수지(PA-412)를 처리하고 감압증류하여 잔유물을 얻었다. 이 잔유물을 증류수에 녹여 묽은 황산으로 pH를 2.0으로 맞춘 후에 감압증류시켜 잔유물을 얻어 물에 녹여 시료로 사용하였다. 동일한 방법으로 얻은 TLC plate를 전개한 후에 *B. subtilis*가 함유된 아가판 위에 얹어 4℃에서 30분간 접촉시켜 두었다가 TLC plate를 제거하고 아가판을 배양하여 항균효력을 보이는 반점을 확인하였다.

접종용 *S. fradiae*의 균사체 준비

S배지 10ml에 *S. fradiae*를 접종하여 28℃의 교반기로 24시간 배양하여 종균을 얻었다. 이 종균 배양액을 S배지에 2%(v/v)가 되도록 가한 후에 36시간동안 28℃에서 진탕배양하였다. 이 배양액을 원심분리하여 상등액을 버리고 균사체만을 0.85%의 소금물로 씻어 주고 바로 사용하거나 또는 -20℃에 냉동 보관하였다가 필요시 접종용 균사체로 사용하였다.

S배지에서 *S. fradiae*를 배양할 때 성장 특성 조사

*S. fradiae*를 S배지 10ml에 접종하여 29℃의 교반기로 24시간 배양하여 얻은 종균 배양액을 동일한 배지 500ml에 2%(v/v)가 되도록 가하여 동일한 조건에서 배양하면서 일정한 시간간격으로 배양액을 취하여 균사체의 건조중량과 항생물질의 함량을 구하고 pH를 측정하였다.

최소화학 염배지들에서 항생물질 생산균주의 성장특성 조사

No. 1 배지에서 No. 8 배지 까지의 다양한 조성을 가진 최소화학 염배지를 만들어 KOH나 HCl로 pH를 7.0-7.3으로 맞춘 후에 50ml의 삼각 플라스크에 10ml씩 넣어 주고 동일한 부피의 S 배지에 배양하여 원심분리한 후에 소금물로 씻어 얻은 접종용 *S. fradiae*의 균사체를 현탁하여 주었다. 이 현탁액을 29℃로 유지된 교반기로 교반하면서 일정한 시간 간격으로 교반액을 취하여 교반액에 함유되어 있는 항생물질의 양을 분석하였다.

항생물질의 생산을 활성화하는 탄소화합물의 조사

Arabinose, D(-)-fructose, D(+)-galactose, glucose, glycerol, lactose, maltose, D(+)-mannose, raffinose, rhamnose, soluble starch, L(-)-sorbose, sucrose, trehalose, D(+)-xylose, ascorbic acid, butyric acid, citric acid, fumaric acid, D-gluconic acid, glyoxylic acid, 2-keto-D-gluconic acid, 5-keto-D-gluconic acid, lactic acid, magnesium acetate, D, L-malic acid, malonic acid, oxalic acid, potassium acetate, propionic acid, pyruvic acid, sodium acetate, sodium benzoate, succinic acid, tartaric acid, acetone, *n*-butanol, *iso*-butanol, ethanol, inositol, *n*-propanol, *iso*-propanol 또는 D-sorbitol을 증류수에 녹여 멸균한 후에 125mM의 농도가 되도록 포도당 대신에 No. 7 배지에 가하였다. 동일한 부피의 S배지에 배양하여 원심분리하여 수확한 후에 소금물로 씻어준 *S. fradiae*의 접종용 균사체를 현탁하여 주고 29℃의 교반기로 4.5일간 진탕하였다. 진탕액에 생성된 항생물질의 양과 균사체의 무게를 구하였고 pH를 측정하였다.

항생물질의 정량(2)

종이디스크 확산법에 의하여 항생물질 검색용으로 사용한 보정곡선이 Fig. 1에 보이고 있다. 이 보정곡선은 동일한 아가 plate 위에서 검색시료와 함께 실시하여 구하였고 시료마다 별도로 행하였다.

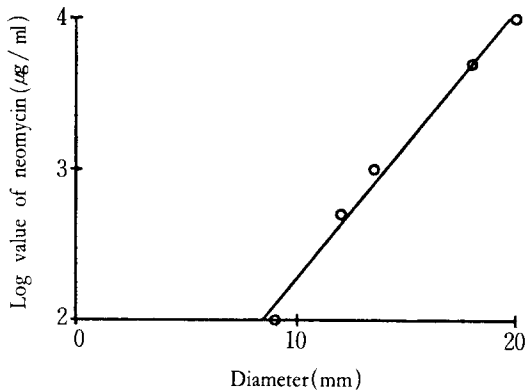


Fig. 1. A calibration curve for the assay of antibiotic by paper disk agar diffusion.

네오마이신 생성 복합배지에 *S. fradiae*를 배양하였을 때 fumarate가 항생물질의 생산에 미치는 영향

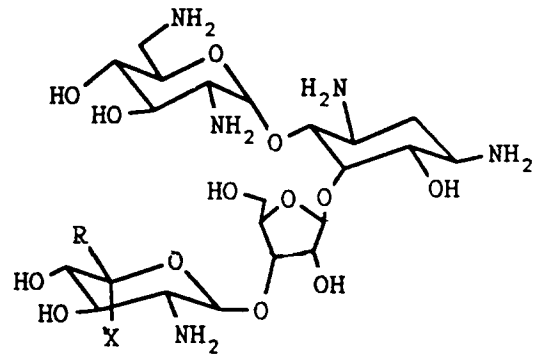
Neomycin 생성배지에 S 배지에서 종균배양한 배양액을 2%가 되도록 가하여 준 후에 6일간 29°C의 교반기로 배양하였다. 배양액에 생성된 항생물질의 양을 정량하였다.

결과 및 고찰

네오마이신 생산균주의 배양특성과 항생물질의 생합성과 생합성의 조절 메카니즘

네오마이신은 2-aminoglucosamine (neosamine), deoxystreptamine 그리고 ribose가 서로 연결되어 있는 aminoglycoside계 항생물질(Fig. 2)로 이들 구성성분들은 glucose로부터 생성되는 것으로 알려져 있다(7). 네오마이신에 존재하는 deoxystreptamine 부위는 glucose로부터 myoinositol을 거쳐 생합성되는 것으로 생각되고 있다. 2-Aminoglucosamine (neosamine)은 glucose가 oxoglucose로 산화된 후에 transamination에 의해 생성되는 것으로 생각되고 있고, ribose는 hexose-monophosphate 경로에 의하여 glucose에서 부터 생성되는 것으로 생각된다.

Radioisotope로 표지된 glucose를 네오마이신 생산균주인 *S. fradiae*에 feeding하였을 때 소량의 glucose만이(1-3%) 직접 네오마이신으로 변형되는 것으로 밝혀져(8) glucose는 네오마이신의 생합성 단계에 있어서 직접적인 전구체인가에 대해서는 의문이 야기되고 있다. 그러나 radioisotope로 표지된 neosamine이나 deoxystreptamine을 *S. fradiae*에 feeding하였을 때 50% 이상의 높은 율로 네오마이신에 표지된 것으로 밝혀져 이



R=H, X=CH₂NH₂: Neomycin B
R=CH₂NH₂, X=H: Neomycin C

Fig. 2. The structures of neomycins B and C.

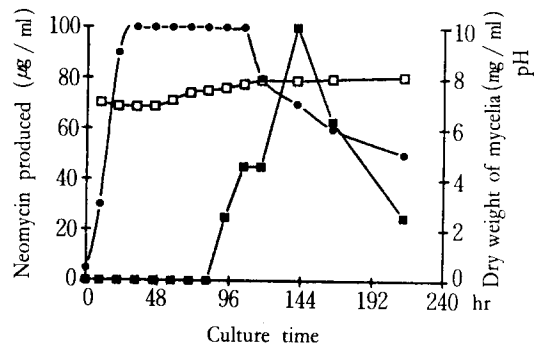


Fig. 3. Fermentation characteristics (●: dry cell weight; ■: the amount of antibiotic; □: pH of the broth) when *S. fradiae* was cultured in S medium.

들은 네오마이신의 생합성에 아주 직접적인 전구체가 되고 있음을 알 수 있다.

S 배지에 네오마이신 생산균주인 *S. fradiae*를 배양하였을 때 포도당이 풍부한 배양 초기에는 항생물질의 생합성이 억제되면서 생장이 활발하게 일어나는 것이 관찰되고 있다(Fig. 3). 이 배양에서 1.5일 후에 생장이 중지된 휴지기에 달하고 항생물질의 생산은 3일째 부터 낮은 양으로 관찰되기 시작하다가 6일째에 최고에 달하는 것이 관찰되고 있다. 이런 현상은 포도당이 항생물질의 생합성을 억제하는 대표적인 예가 될 수 있을 것이다. 포도당이 배양액에서 2일째에 고갈되기 시작하여 그후 24시간이 지나면 항생물질이 생산되기

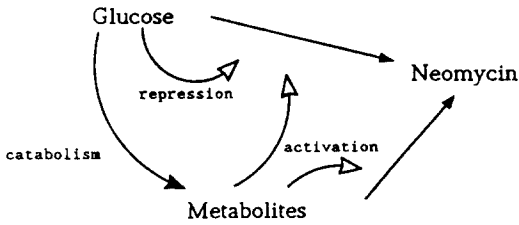


Fig. 4. The postulated regulation of the biosynthesis of neomycin.

시작한다. 즉 발효 3일 째에 항생물질 생산이 시작되고 있다. 이 현상은 항생물질의 생합성이 glucose repression이 풀리면 곧 항생물질의 생합성이 시작되지 않는다는 사실을 매우 잘 보이고 있다. 항생물질의 생산 유전자를 자극하는 제2의 대사물이 존재할 수 있다는 가능성을 보이고 있다. 항생물질을 생산하는 균이 성장할 때 포도당이 대사되면서 생성되는 특정한 대사물이 세포내에 누적되면서 이 대사물이 항생물질의 생합성을 활성화하는 것으로 생각할 수 있다. 이 과정을 모두 고려하여 보면 네오마이신의 생합성 과정은 Fig. 4에 보이고 있는 조절 메카니즘들이 개여되고 있는 것으로 가정할 수 있다.

항생물질의 생합성과 발효에 관련된 많은 다른 사람들의 연구(9-10)로 부터도 배양액에 포도당이 풍부할 때는 균주가 활발하게 성장하고 이 때는 항생물질의 생합성이 억제되는 현상이 보고되고 있다. 배양액에 포도당이 고갈되면서 포도당에 의한 항생물질의 생합성 억제가 풀리면서 이 대사물이 항생물질의 생합성 유전자를 활성화하여 항생물질의 생합성이 활성화된다고 가정할 수 있다. 이 대사물은 균주의 생장이 활발할 때 포도당의 대사에서 생성되어 세포내에 누적되는 것으로 생각되고 있다. 이 대사물에 대한 외부에서 섭취되는 포도당의 비율이 일정한 값을 증가하게 되면 항생물질의 생산 유전자를 활성화한다고 생각할 수 있다.

포도당에 의해 항생물질의 생합성이 억제되는 메카니즘은 아직 유전자 차원에서는 밝혀지지 못하고 있지만, 현재 포도당에 의하여 생성이 억제되는 효소들이 일부 항생물질 생산균주에서 밝혀지고 있다(11-12). 배양액에 특정한 물질을 첨가할 때에 항생물질의 생산이 증가한다는 연구결과(13) 보고는 많이 있지만 그러나 배양액에 포도당이 고갈되면서 섭취되는 포도당의 양이 줄어들 때 균주의 생장이 억제되면서 특정한 물질이 항생물질의 생합성을 자극하는지에 대해서는 지

금까지 보고된 구체적인 연구결과는 없다. 또한 구체적으로 어떤 대사물이, 그리고 또 항생물질의 생합성 단계중에 어느 단계를 활성화하는지에 관해서도 아직까지 알려지지 않고 있다. 본 연구에서는 네오마이신의 생합성을 활성화하는 대사물들을 조사하기 위하여 탄수화물, TCA cycle의 중간체, glycolysis 중간체등을 포함한 44종의 화합물들에 대하여 항생물질의 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

접종크기

일반적으로 미생물들은 특정한 배지내에서 일정한 population으로 성장하면 더 이상 성장하지 않는다는 점을 생각하여 먼저 네오마이신 생성균주를 S배지에서 키운 후에, 성장한 균사체를 수확하여 소금물로 씻어 주고 다시 동일한 부피의 최소화화 염배지에 현탁하여 일정한 기간동안 진탕한 후에 배지중에 넣어준 탄소원이 항생물질의 생산에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하려고 시도하였다. 이 방법에서는 우선 균주를 성장하지 않는 일정한 상태로 유지한 후에 그 균주의 2차 대사물의 생성 및 조절에 관하여 규명하려고 하였다.

본 연구에서는 항생물질 생성균주를 먼저 지수기의 성장단계가 끝나는 시간까지 충분히 배양한 후에 균사체를 새로운 배지에 충분히 현탁하여 주는 방법을 사용하였다. 이 방법을 사용하면 균이 성장하는데 잘 이용되지 못하는 탄소화합물들에 대해서도 항생물질의 생합성에 어떤 영향을 미치는가 조사할 수 있을 것으로 생각되었다. 지금까지 알려진 사실에서 미루어 보면 항생물질의 생합성과 균주의 생장은 서로 상반된 특성이므로 생각되는 경우가 많이 있다. 따라서 항생물질의 생합성을 활성화하는 탄소화합물들은 균의 성장에는 잘 이용되지 못할 것으로 기대된다. 그러므로 2-5%의 접종을 사용할 경우에는 이들이 들어 있는 배지에서 균이 잘 성장하지 못하게 되어 이들이 항생물질의 생합성에 대해서 나타내는 특성을 외적으로 관찰하기가 어려울 것이다.

기본배지의 선택

항생물질의 생산에 탄소화합물이 미치는 영향을 조사하기 위하여 적절한 배지를 선택하는 것이 요청된다. 그래서 *S. fradiae*가 살아남고 항생물질의 생산 연구에도 이용할 수 있는 배지를 개발하기 위하여 "The Actinomycetes", Vol. II (Waksman, 1961)(4)에 주어진 배지들 중에서 최소화화 염배지 8종을 선택하였다. 가장 적절한 배지는 항생물질 생산균에 독성이 없어야하고 균주는 활발한 대사를 유지하면서 살아남아야 하고 또

한 균주가 적절한 시간에 항생물질을 많이 생산할 수 있어야 한다. 따라서 No. 1배지에서 No. 8배지까지 8가지의 배양액에 동일한 부피의 S 배지에서 배양하여 수확한 *S. fradiae*의 접종용 균사체를 현탁하여 진탕하면서 배양액에 생성된 항생물질의 양을 조사하였다. 이들 중에 No. 4배지와 No. 8배지에서는 10일간 배양하였을 때 항생물질의 생산이 전혀 관찰되지 않았다.

Fig. 5에서 볼 수 있듯이 No. 1배지에서는 배양을 시작한 후에 4일째 부터 서서히 항생물질의 양이 증가하기 시작하다가 10일째에 최고에 달하였다. 배양액에 생성된 항생물질이 네오마이신이라고 가정하면 ml당 65 μg 의 항생물질이 생성되었다. No. 2배지에서는 4일째 부터 항생물질의 양이 점점 증가하여 10일째는 40 μg 에 달하였다. No. 3배지에서는 2일째부터 항생물질이 생성되기 시작하여 4일에서 6일 사이에 항생물질의 양이

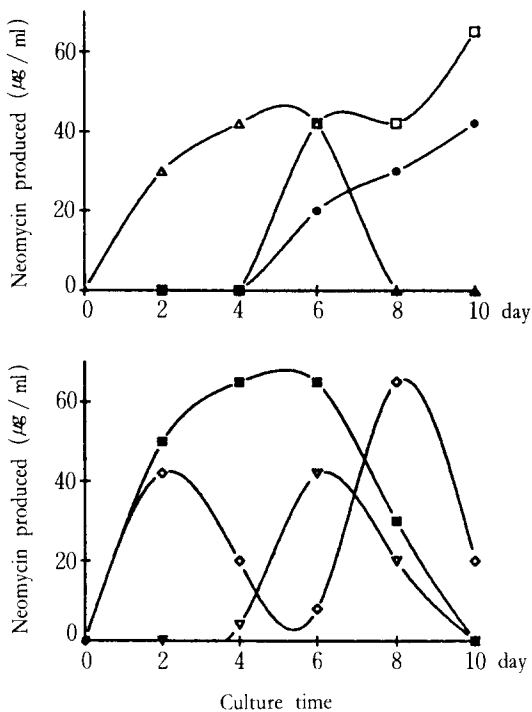


Fig. 5. Fermentation characteristics of *S. fradiae* when it was cultured in S medium, harvested, and resuspended in the same volumes of 8 minimal salt brothes (No. 1 medium: □; No. 2 medium: ●; No. 3 medium: △; No. 5 medium: ▽; No. 6 medium: ◇; No. 7 medium ■).

40 μg 에 달하였다가 그후에 급격히 감소하여 8일째에는 항생물질이 거의 검출되지 않았다.

No. 5 배지에서는 2일째 부터 항생물질이 검출되기 시작하여 6일째에 항생물질의 양이 최대값(40 μg)을 나타내었다가 그 후에 급격히 감소하여 10일째에는 항생물질이 거의 완전히 소실되는 특징을 보였다. No. 6 배지에서는 2일째에는 항생물질의 양이 42 μg 에 달하다가 6일째는 오히려 감소하다가 8일째에 최대값인 65 μg 을 보인 후에 다시 급격히 감소하였다.

No. 7 배지에서는 2일째에는 항생물질의 양이 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 나타내었으며 4일과 6일 사이에는 65 $\mu\text{g/ml}$ 의 최대값을 보이다가 그 이후에는 감소하여 10일째에는 항생물질은 거의 검출되지 않았다. 이 배지에서는 생성된 항생물질의 최대값도 다른 배지에 비해 높았으며 항생물질이 최대로 생성되는 시간도 4일에서부터 6일 사이로 적절하다고 생각되어 항생물질의 생합성을 조절하는 대사물을 찾기위한 본 실험에 적절하다고 생각되어 이 배지를 기본 배지로 선택하였다.

No. 7배지에 동일한 부피의 S배지에 배양하여 수확한 *S. fradiae*를 현탁하여 진탕하였을 때 항생물질 생산 및 균주의 성장특성

No. 7배지에 동일한 부피의 S배지에서 *S. fradiae*를 배양하여 수확한 균사체를 소금물로 씻어준 후에 현탁하고는 진탕하면서 생성된 항생물질의 양, 균사체의 무게 및 pH를 그린 배양곡선이 Fig. 6에 보이고 있다. 이 배양곡선을 보면 균사체의 무게는 초기에 약간 증가하여 약 1.5배나 되나 점차 감소하여 크게 변화되지

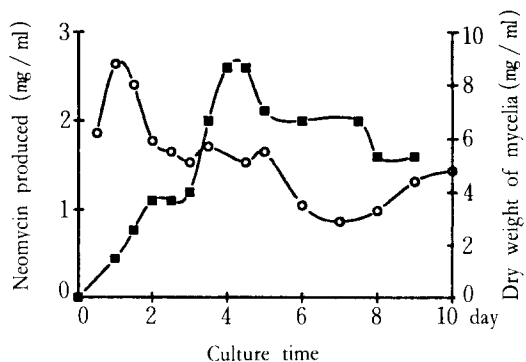


Fig. 6. Fermentation characteristics of *S. fradiae* when it was cultured in S medium, harvested, and resuspended in the same volume of No. 7 medium (○: dry cell weight; ■: the amount of antibiotic).

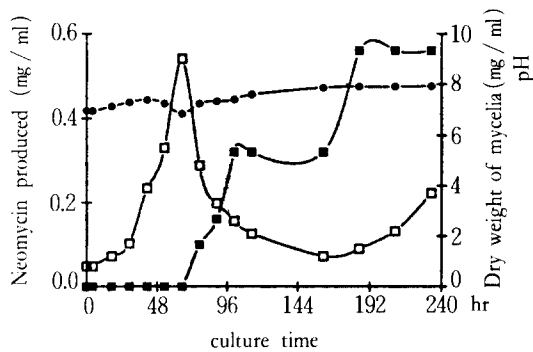


Fig. 7. Fermentation characteristics of *S. fradiae* when it was inoculated in No. 7 medium at 2% volume ratio (□: dry cell weight; ■: the amount of antibiotic; ●: pH of the broth).

않고 있다. 포도당의 양을 조사하였을 때 1.5일 째에 최저치에 달하였다. 배양액의 pH는 7.0에서 서서히 증가하여 8.5에 달하고 항생물질은 초기에서부터 생성되기 시작하여 4일 째에 최대에 달하고 있다. 그러나 동일 배지에 S배지에 키운 *S. fradiae*의 균사체를 배양액의 부피의 2%가 되게 집중하여 배양 하였을 때 (Fig. 7) 균사체의 무게는 1.5일 째부터 증가되었다가 3일 째에 급격히 감소하는 특성을 보이고 있다. 항생물질은 3일 째부터 서서히 증가되기 시작하여 10일 째까지 계속 증가되었다.

각종 탄소화합물이 항생물질의 생성에 미치는 영향

*S. fradiae*을 배양할 때 항생물질의 생성에 각종 탄소화합물이 미치는 영향을 조사하기 위하여 15종의 일반 당류, 20종의 유기산류, 그리고 8종의 알콜류를 No. 7배지의 포도당 대신에 첨가하고 동일한 부피의 S배지에 배양하여 수확한 *S. fradiae*의 균사체를 현탁한 후에 4.5일간 진탕한 후에 배양액중에 생성된 항생물질의 양을 네오마이신을 표준품으로 사용하여 정량하였다. 이 실험에서 유기산류를 첨가하여준 현탁액에서는 항생물질의 생산이 많은 것을 관찰하였다. 특히 fumarate를 첨가하여 준 배양액에서는 포도당을 첨가하여 준 배양액에서 보다 5-6배 더 많은 양의 항생물질이 생성되는 것이 관찰되었다.

네오마이신 생산균주를 충분히 키운 후에 배양액만을 No. 7배지로 바꾸어 줄 때 fumarate를 첨가하여 준 현탁액에서, 현탁하기전의 균사체의 무게와 4.5일간 현탁한 후에 얻은 균사체의 무게를 비교하였을 때

거의 동일하여 현탁중에 균주가 분해되지도 않고 성장도 거의 일어나지 않았다. No. 7 배지의 포도당 대신에 glycerol, D-fructose, lactose, raffinose, L-sorbose, sucrose, ascorbic acid, D-gluconic acid, glyoxylic acid, 2-keto-D-gluconic acid, 5-keto-D-gluconic acid, oxalic acid, sodium benzoate, tartaric acid, *n*-butanol, *iso*-butanol, inositol, *n*-propanol, *iso*-propanol 또는 D-sorbitol을 가하여 준 배지에서 균사체를 가하여 현탁한 경우에는 포도당을 가하여 준 경우에 비해 항생물질의 생산은 50% 미만이었다. 현탁한 후에 균사체의 건조 중량이 줄어든 탄소화합물은 ascorbic acid D-gluconic acid, glyoxylic acid D-sorbitol로 이들의 현탁액에 남아있는 균사체의 건조중량은 현탁전의 양의 50% 미만이었다.

Fumarate를 첨가한 No. 7배지에서 배양특성과 생성된 항생물질의 특성

No. 7배지에 Glucose 대신에 fumarate를 125mM의 농도로 첨가한 배지에 동일한 부피의 S배지에서 배양한 *S. fradiae*를 현탁하여 진탕하였을 때 배양특성과 항생물질 생산특성이 Fig. 8에 보이고 있다. 이 배양특성을 살펴보면 항생물질은 6-8일 사이에 최대로 생성되고 있다. 이 때 생성된 항생물질의 양은 포도당을 가하였을 때 보다 약 4배 더 많이 생성되었다. fumarate를 첨가한 동일한 배지에 S 배지에 배양한 균주를 배양액의 2%의 농도가 되도록 집중하여 주었을

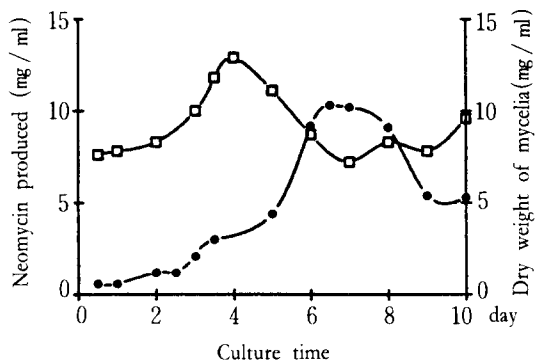


Fig. 8. Fermentation characteristics of *S. fradiae* when it was cultured in S medium, harvested, and resuspended in the same volume of No. 7 medium where fumarate was added instead of glucose (□: dry cell weight; ●: the amount of antibiotic).

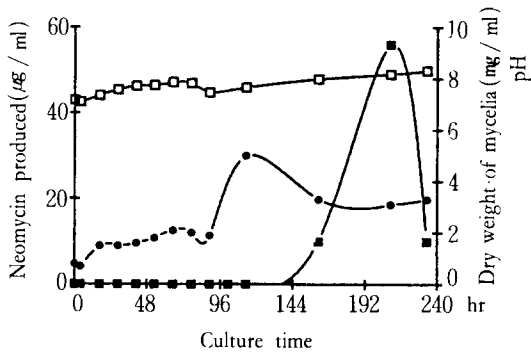


Fig. 9. Fermentation characteristics of *S. fradiae* when it was inoculated in No. 7 medium at 2% volume ratio (●: dry cell weight; ■: the amount of antibiotic; □: pH of the broth). The glucose in No. 7 medium was substituted with fumarate.

때 배양특성이 Fig. 9에 보이고 있다. 이 때는 균사체의 무게는 3.5일 째에 서서히 증가하여 5일 째에 최대에 달하고 항생물질의 생산은 6일 째에 시작하여 9일 째에 최대에 달하고 있다. 이 결과를 포도당을 가하여 주어 얻은 실험결과 (Fig. 7)와 비교하여 보면 포도당의 경우 1.5일째부터 급격한 성장이 일어나다가 포도당이 고갈되면서 균사체가 분해되기 시작하나 fumarate를 가하여 준 경우에는 느리게 성장하여 4일 째에 성장을 보이다가 6일 째 부터는 균사체 무게가 감소되는 것이 관찰되고 있다.

Fumarate를 125mM로 가하여 준 배지에 동일한 부피의 S배지에 배양하여 수확한 균사체를 현탁하여 진탕한 배양액을 7일 째에 진탕을 중지하고 진탕액에 생성된 항생물질을 양이온 교환수지에 흡착시켜 묶은 염산(0.05N)으로 회수하고 음이온 교환수지로 처리한 후에 묶은 황산(0.05M)으로 pH를 2로 맞춘 후에 농축하여 TLC로 분석하고 또한 bioautography로 확인하였을 때 생성된 항생물질은 네오마이신과 동일한 R_f 값을 보였다. 또한 생성된 항생물질을 보고된 이온교환수지를 이용한 방법으로 분리하였을 때 네오마이신으로 확인되었다.

복합배지에서 항생물질의 생합성의 활성화 효과

네오마이신 생산 배지로 쓰이는 복합배지와 이 배지에 fumarate를 125mM의 농도로 첨가하여 준 배지에 *S. fradiae*를 5%의 농도(v/v)로 첨가하여 주고 7

일간 배양한 후에 생성된 항생물질의 양을 분석하여 비교하였을 때 약 2.5배 더 많은 양의 항생물질이 생성되는 것이 관찰되었다.

결 론

네오마이신 생산균주인 *S. fradiae*를 S배지에 배양하면 다른 항생물질을 생산하는 균주와 유사하게(11-13) 포도당에 의한 항생물질의 생합성이 억제되는 것이 관찰되고 있다. 또한 포도당의 대사물중에 항생물질의 생산 유전자의 발현을 초기화하는 물질이 존재하는 것으로 생각되었다. 이 대사물을 조사하기 위하여 *S. fradiae*를 현탁하였을 때 생명력을 유지하면서 항생물질을 생산하는 최소화학 염배지인 No. 7 배지를 개발하였다. 이 배지에 포도당 대신에 fumarate를 첨가하여 배양하였을 때 네오마이신이 포도당을 첨가하였을 때 보다 약 5-6배 더 많이 생성되었다.

네오마이신을 생산하는 복합배지에서 *S. fradiae*를 배양하면서 fumarate를 첨가하여 주었을 때 포도당을 첨가하여 준 배지에서 보다 약 2.5배 더 많은 항생물질이 생성되었다. 본 연구에서는 항생물질을 생산하는 균주는 성장을 주도하는 탄소원을 사용하여 성장할 때 특정한 대사물을 세포내부에 누적하고 이 대사물의 양과 배지에서 흡수하는 포도당의 양의 비가 일정한 값을 증가할 때 성장주도 탄소원에 의한 항생물질이 생산 유전자 발현의 차단이 풀리고 이 대사물에 의하여 항생물질의 생산이 자극될 수 있다고 생각된다. 네오마이신을 생산하는 균주의 경우에는 본 실험의 연구결과에 따르면 이 대사물은 fumarate로 생각될 수 있다.

요 약

네오마이신 생산균주를 S배지에 배양하면 네오마이신이 성장정지기의 중간에 항생물질의 생산이 시작된다. 이런 특성은 다른 항생물질을 생산하는 균주에서도 관찰되고 있다. 항생물질의 생산은 포도당 뿐만 아니라 포도당의 대사물에 의하여 조절되고 있다. 네오마이신 생산균주에 항생물질의 생산을 활성화하는 대사물을 찾기 위하여 한 최소화학배지를 개발하였다. 이 배지에 동일한 부피의 S 배지에서 성장시켜 수확한 *S. fradiae*의 균사체를 현탁하여 진탕하면서 또는 S배지에 배양한 배양액을 2%의 부피비로 No. 7배지에 가하여 주어 배양하였을 때 항생물질의 생산은 좋았으나 균주의 생장은 좋지 못하였다. 이 배지에 포도당 대신에 여러종류의 탄소원을 가하여 주고 동일한

부피의 S 배지에서 배양하고 수확한 *S. fradiae*의 균사체를 현탁하고 진탕하였을 때 fumarate를 가한 경우 포도당을 가한 경우보다 항생물질의 생산이 약 5-6배 더 많았다. 포도당 대신에 fumarate를 가한 No. 7 배지에 동일한 부피의 S 배지에서 배양하여 수확한 *S. fradiae*의 균사체를 가하거나 S 배지 배양액을 2% 부피비로 가하여 조사하였을 때 생산은 나쁘나 항생물질의 생산은 떨어졌다. 항생물질의 생산은 이 경우 동일한 조건하에서 포도당을 가한 경우보다 약 4배 더 많았다. Fumarate를 첨가한 배지에서 생성된 항생물질은 네오마이신인 것으로 확인되었다. 네오마이신의 생산에 쓰이는 복합배지에 포도당 대신에 fumarate를 가하여 준 경우에 포도당을 가한 경우보다 약 2.5배 더 많은 항생물질이 생성되었다. 이 연구에서 네오마이신의 생산을 향상시키는 대사는 fumarate일 가능성이 증명되었다.

감 사

이 논문은 1989년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음

참 고 문 헌

1. A. L. Demain (1963), *Clin. Med.*, **70**, 2045.
2. A. L. Demain, and E. Inamine (1970), *Bacteriol. Rev.*, **34**, 1.
3. J. F. Acar (1980), in "Antibiotics in Laboratory

Medicine", Ed. V. Lorian, The William & Wilkins Company, Baltimore, pp 328-329.

4. S. A. Waksman (1961), *The Actinomycetes*, Vol. II, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp 328-329.
5. M. Okanishi, K. Suzuki, and H. Umezawa (1974), *J. Gen. Microbiol.*, **80**, 400
6. J. M. Porter (1976), *Methods Enzymol.* **43**, 23.
7. K. L. Rinehart, Jr., and R. M. Stronshane (1976), *J. Antibiot.*, **29**, 319.
8. K. L. Rinehart, Jr., J. M. Malik, R. S. Nystrom, R. M. Strohshane, S. T. Truitt, and T. Taniguchi (1974), *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 2263.
9. A. A. Sukatsch and G. Neseemann (1977), *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 046p. 252.
10. E. C. Weingerg (1970), *Adv. Microbiol.*, *Physiol.*, **4**, 1.
11. A. Satoh, H. Ogawa, and Y. Satomura (1976), *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 191.
12. M. Gallo and E. Katz (1972), *J. Bacteriol.*, **109**, 659.
13. E. B. Inamine, D. Lago, and A. L. Demain (1969), in "Fermentation Advances", Ed. D. Perlman, Academic Press, New York, pp 199-221.

(Received; March 18, 1991, Accepted; April 30, 1991)