

## *Streptomyces* 균주의 Polyoxins 생합성 증대를 위한 영양분 효과

김 상 호 · 주 현 · †유 영 제 · \*박 영 훈  
서울대학교 화학공학과  
\*한국과학기술연구원 생명공학연구소

### Effect of Nutrients and Applications for the Overproduction of Polyoxins by *Streptomyces* Species

Sang-Ho Kim, Hyun Joo, Young-Je Yoo<sup>†</sup> and Young-Hoon Park<sup>\*</sup>

Department of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea  
<sup>\*</sup>KIST, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600, Korea

#### ABSTRACT

The effects of major nutrients and environmental factors on polyoxins biosynthesis were examined for the overproduction of antifungal agent polyoxins using *Streptomyces* sp. 809-11. The cell mass at the exponential growth phase was increased when soluble starch was used, while the polyoxins biosynthesis was increased with the formation of filamentous mycelium when glucose was used as a carbon source. It was, therefore, recommendable to use both soluble starch and glucose simultaneously as carbon sources for the cell growth and polyoxins production. The high concentration of ammonium sulfate (151.4 mM) resulted in the improvement of polyoxins production. The optimal concentration of  $K_2HPO_4$  for polyoxins production was found to be 0.5mM. By applying fed-batch culture, polyoxins production was improved to about 2-folds compared to the result from the batch culture.

#### 서 론

1940년대에 새로운 항생제를 찾기 위하여 Waksman이 체계적인 screening program을 도입한 이후로 *Streptomyces*는 가장 큰 항생제 생산균주의 하나로 이용되어왔다. *Streptomyces*가 생산하는 항생제의 하나는 주로 nucleoside 계통으로서 blasticidin S 및 polyoxins 등을 들 수 있다(1). Nucleoside 계통의 항생물질로 알려진 polyoxins는 벼잎에 문고병(sheath-blight disease)을 일으키는 *Pellicularia sasakii* 등에 효과적인 항생제를 찾는 과정에서

1965년 일본의 Isono 등(2)에 의해 발견된 항진균성 농업용 약제이다. Polyoxins는 특정 병원성균에 선택적으로 작용하여 그 항생활성이 높은 반면에 다른 미생물, 어류, 식물 및 사람과 가축에 대해서는 활성이 없기 때문에 항진균성 농업용 약제로 폭넓게 사용되어왔다(3). 농업용 살균제로는 polyoxins와 같은 항생제농약뿐만 아니라 많은 화학합성 살균제 등을 함께 사용하고 있으나 화학제품 농약은 자연계에서 분해되지 않아 독성물질의 토양잔류 문제가 제기되고 그 유독성으로 인해 심각한 환경오염문제가 뒤따른다. 예를 들어 벼의 문고병의 경우에 사용하는 항생제 농약은 polyoxins와 validamycin이 있고 화학제품으로는 유기비소제인 neoasozin을 사용하고

† Corresponding Author

있으나 neosozin의 경우 토양 중에 유해한  $AS_2O_3$ 가 잔류하게 되며 그 사용량이 매년 증가 추세이므로 이에 대한 토양오염의 문제는 매우 심각한 실정이다(4). Polyoxins의 경우 인축에 대한 유독성이 없고 체내 진균감염에 의한 질병 치료제로의 응용성(5)과 아울러 효과적인 항생제로서 이들 polyoxins을 효율적으로 생산하기 위한 연구가 많은 연구자들에 의하여 진행되어 왔으나(6, 7), 국내에서는 이러한 연구가 미비한 상황이고 이들 농약원제를 전량 수입에 의존하고 있는 실정이다. 따라서 인체 및 생물에 해가 적은 항생제 혹은 농약 생산과 직접 관련되는 polyoxins와 같은 항생제 약의 연구개발이 절실히 요구된다.

본 논문에서는 국내에서 선별한 polyoxins 생산균주를 이용하여 균주의 생리적 특성 및 polyoxins의 생합성에 미치는 환경인자의 영향 등을 조사하고 유가식배양을 수행하여 polyoxins의 합성량을 항상시킨 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

본 연구에서 항생물질 polyoxins의 생산주로서 사용한 균주는 국내 토양에서 선별하여 *Streptomyces* sp.로서 동정되고 *Streptomyces* sp. 809-11로 명명된 균주로서 한국과학기술연구원 유전공학연구소로부터 제공받았다.

항생물질 polyoxins의 항진균 활성의 측정을 위한 공시균주로는 서울대학교 식물병리학과 진균병학연구실에서 제공받은 *Pyricularia oryzae* KJ 101 및 *Neurospora crassa* KCTC 6079를 사용하였다.

### 사용 배지 및 발효 조건

균주 배양에 사용한 시약류는 Difco, Junsei, Showa 등의 제품이며, 본 연구에서 사용한 배지는 Table 1과 같다. Polyoxins를 생합성하기 위한 종균은 seed A 한천배지에 계대하여 보관하였으며 종균 배양은 seed A 배지를, 주배양은 main B 배지를 사용하였다. Polyoxins의 공시균주로 사용한 *Pyricularia oryzae* 및 *Neurospora crassa*의 보관과 배양을 위해서는 YM 배지를 사용하였다.

배지는 멸균 전에 1M NaOH용액을 사용하여 pH 7.3으로 조정하였으며 배지의 멸균은 멸균기에서 121°C, 15 psig 상태로 15분간 하였다. 종균의 배양은 200ml 플라스크에 100ml의 배지를 넣고 배양은

Table 1. Nutrient composition of the media.

Medium	Chemical	Concentration(g/l)
Seed A	Soluble starch	20
	Glucose	10
	Soytone	10
	Yeast extract	5
	$K_2HPO_4$	2
	NaCl	2
Main B	Soluble starch	20
	Glucose	20
	Soytone	0.5
	Yeast extract	0.5
	$(NH_4)_2SO_4$	5
	$K_2HPO_4$	0.5
	NaCl	2
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
	Trace elements*	20ml
	Soluble starch	20
Glucose	10	
Soytone	0.5	
Yeast extract	0.5	
Main C	$(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$	20
	$K_2HPO_4$	0.1
	NaCl	2
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
	Trace elements*	20ml
	Yeast extract	3
YM	Malt extract	3
	Peptone	5
	Glucose	10

\* Trace elements: 0.25g/l  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 0.5g/l  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5g/l  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.05g/l  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$

도 30°C, 교반속도 200rpm 조건의 진탕 배양기에서 48시간 동안 진행하였으며, 플라스크 배양에는 5% (v/v)가 되도록 접종하였다.

플라스크 배양은 500ml 플라스크에 200ml의 배지를 넣고 30°C, 200rpm의 조건으로 진탕 배양기에서 수행하였다. 교반식 발효조(New Brunswick Co.)를 이용한 주배양은 5ℓ 발효조에서 2ℓ의 배지를 사용하여 배양온도 30°C, 교반속도 400rpm, 통기 속도 1vvm의 조건으로 하였으며 1M NaOH용액을 주입하여 pH를 조절하였다.

### 균체농도의 측정

발효 배양액을 일정량 채취하여 이를 분광 광도계

(Kontron, UVCON930)를 사용하여 660nm에서 측정한 흡광도와 건조중량을 비교하여 보정 곡선을 결정하고 이 보정 곡선으로부터 균체의 농도를 결정하였다.

#### 항진균 활성(Antifungal Activity)의 측정

항진균 활성의 측정은 *Pyricularia oryzae* 및 *Neurospora crassa*를 공시 균주로 한 bioassay법과 HPLC 측정법을 병용하였다. 항진균 활성의 측정에 사용된 표준시료는 technical grade의 polyoxins와 순수 분리된 polyoxin B로 (주)한농과 한국과학기술연구원 유전공학연구소에서 제공받아 사용하였다. 항생제 분석을 위한 HPLC column은 Tosoh 제품(TSK gel ODS-80<sub>TM</sub> analytical column, 15cm × 4.6 mm I. D)을 사용하였다.

YM 한천배지에 보관된 공시균주를 YM 배지에 접종하여 30°C, 130rpm의 조건하에 *Pyricularia oryzae*의 경우는 72시간, *Neurospora crassa*의 경우에는 48시간 동안 진탕배양기에서 액침배양 후 동일한 배지로 희석하여, 반고체상의 한천배지와 균일하게 혼합하여 세균배양용 접시(petri dish)에 붓고 건조시켜 분석 평판(assay plate)을 만들었다. Whatman No. 2 여과지로 만든 직경 10mm의 원형 종이평판에 시료 20  $\mu$ l를 점적하여 완전히 건조시킨 것을 분석평판에 올려 놓고 37°C의 항온조에서 48시간 배양한 후 원형 종이 평판 주위에 나타나는 투명한 저지원(inhibition zone)의 직경을 측정하였다. 측정된 저지원의 직경은 상대적인 항진균 활성을 나타내며 항생물질 polyoxins의 표준시료와 비교하여 항생물질의 농도를 결정할 수 있었다. 이로부터 polyoxins의 농도와 저지원의 직경과의 관계를 나타내는 보정 곡선을 구하여 사용하였다.

또한 Polyoxin 농도의 정량적인 측정을 위해서 HPLC에 의한 분석을 병용하였다. 유속은 1ml/min였으며, 이동상으로 0.15% TFA(Trifluoroacetic acid) 용액을 사용하였고, 검출은 254nm의 UV 흡광도를 이용하였다. 순수 분리된 polyoxin B 성분의 HPLC 분석을 통하여 polyoxin B 성분의 peak를 동정하고 polyoxin B의 농도와 저지원의 직경과의 관계를 나타내는 보정곡선을 구하고, 다시 polyoxins 표준시료의 HPLC 분석을 통하여 polyoxin B의 peak를 확인한 후에 앞에서 구한 결과를 토대로 새로운 보정곡선을 구하여 사용하였다.

#### 기질농도의 측정

전분농도의 측정은 녹말 요오드(starch-iodine)법(8)을 사용하였으며, 포도당의 농도 측정은 DNS 방법(9)을 사용하였다. 암모늄 이온 농도의 측정은 Berthelot 반응(10)을 이용하였으며, 인산염의 농도의 측정은 ascorbic acid 표준시료 정량법(11)을 사용하였다.

#### 균체의 형태학적인 분화의 관찰

회분식 배양을 통하여 배양 시작 후 채취한 배양액 중 균체의 형태학적 변화를 광학현미경으로 분석하여 특징적인 분화과정을 4단계로 분류하였다. Phase I은 포자의 발아와 대수 성장기의 균사형성, phase II는 균사와 사상 균사체의 공존, phase III는 배양액 전체가 완전히 발달된 사상균사체의 형성, phase IV는 완전 분화된 균체가 다시 포자 형성을 형성하는 단계로 분류하였다(12).

#### 결과 및 고찰

일반적으로 방선균 등으로부터 생합성되는 항생물질과 같은 이차 대사산물은 균체가 증식하는 trophophase를 지나 균체 증식이 멈추거나 감소하는 idiophase에서 생합성되는 특징을 보이며, 이때에 세 가지 주요 영양원, 즉 탄소원, 질소원, 인산염이 2차 대사산물의 생합성 및 균체 성장에 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

#### 탄소원의 영향

항생물질과 같은 이차 대사산물의 생합성에서는 일반적으로 쉽게 이용될 수 있는 포도당과 같은 탄소원의 대사산물에 의해 균체의 증식이나 이차 대사산물의 생합성이 저해되는 carbon catabolite repression(13, 14) 현상이 일어날 수 있다. 따라서 많은 경우에 이당류 혹은 다당류의 탄소원이 생산성 측면에서 우수한 탄소원으로 선택되기도 한다. 본 연구에서는 탄소원으로 가용성 전분과 포도당을 이용하여 *Streptomyces* sp. 809-11 균주의 polyoxins 생합성 및 균체 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

가용성 전분 또는 포도당을 유일한 탄소원으로 사용한 발효조 배양 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 본 실험 결과에 의하면 가용성 전분만을 유일한 탄소원으로 사용한 경우 균체의 농도는 첨가된 전분의 농도에 비례하여 어느 정도 증가하였으나 polyoxins은 거의 생합성되지 않았다. 그러나 포도당을 유일한 탄소원으로 사용한 경우는 균체 증식의 정도가 가용

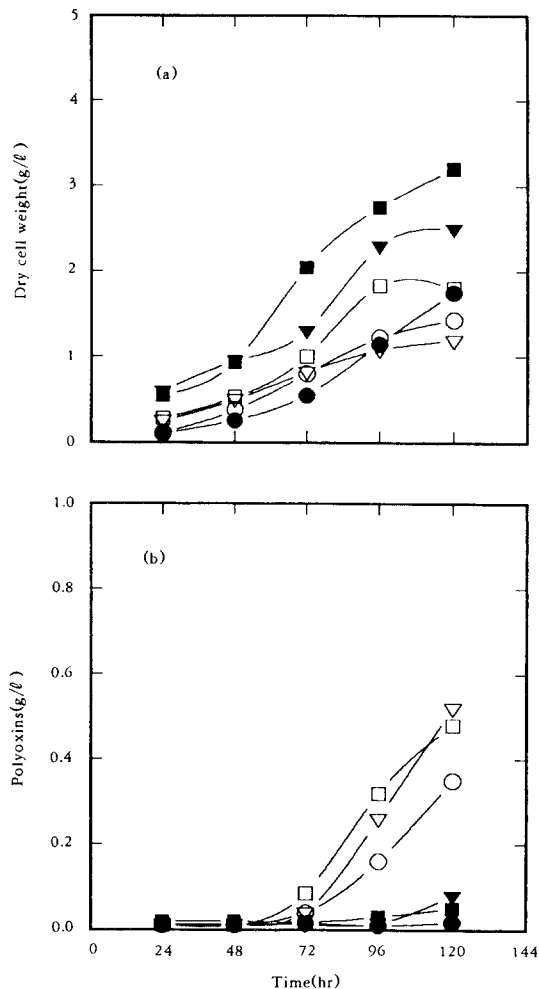


Fig. 1. Effects of glucose and starch on (a) cell growth and (b) polyoxins production in the shake-flask culture, (starch:20g/l (●), 40g/l (▼), 60g/l (■), glucose:10g/l (○), 20g/l (▽), 40g/l (□)).

성 전분을 사용한 경우보다는 낮으나 polyoxins의 생합성은 낮은 균체 증식의 정도에 비하여 매우 높은 정도로 이루어졌다. 이러한 결과를 토대로 *Streptomyces* sp. 809-11 균주는 발효조 배양에서 가용성 전분과 포도당을 함께 혼합 사용하는 것이 균체의 증식과 polyoxins의 생합성에 적합하다고 판단하여, 같은 양의 가용성 전분에 대해 사용하는 포도당의 농도를 달리하여 균체 증식 및 polyoxins의 생합성

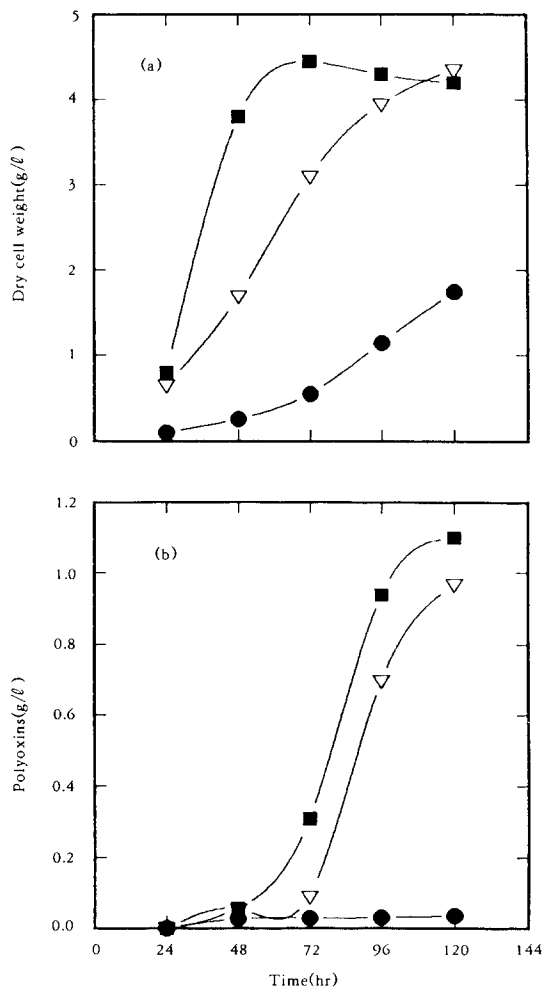


Fig. 2. Effects of starch-glucose mixed medium on (a) cell growth and (b) polyoxins biosynthesis in the shake-flask culture.(starch 20g/l (●), starch 20g/l +glucose 10g/l (▽), starch 20g/l +glucose 20g/l (■)).

에 대한 영향을 살펴 보았다. Fig. 2에서와 같이 전분만 사용된 배지에 비하여 포도당이 함께 혼합 첨가된 배지가 균체의 성장 속도면에서는 약 2.5배 정도가 더 빨랐으며, polyoxins의 생합성량은 보다 높게 나타났다. 또한 같은 양의 가용성 전분에 대하여 첨가된 포도당의 농도가 증가할수록 균체 증식의 속도가 촉진되고 생합성되는 polyoxins의 양도 포도당의 농도에 비례하여 증가하는 양상을 보여주었다.

Table 2. Effects of ammonium sulfate level on the cell growth and polyoxins production in the shake-flask culture ( $Q_{p, \max}$ : maximum specific production rate,  $P_{\max}$ : maximum polyoxins concentration,  $X_m$ : maximum dry cell weight).

Ammonium sulfate(mM)	$X_m$ (g/ℓ)	$Q_{p, \max}$ (g polyoxin/g cell * hr)	$P_{\max}$ (g/ℓ)
37.9	2.97	0.0075	0.35
75.7	1.65	0.028	0.61
151.4	1.46	0.098	0.67
227.0	1.32	0.156	0.52

Table 3. Effects of phosphate level on the cell growth and polyoxins production in the shake-flask culture ( $Q_{p, \max}$ : Maximum specific production rate,  $P_{\max}$ : maximum polyoxins concentration,  $X_m$ : maximum dry cell weight).

Potassium phosphate dibasic triphosphate(mM)	$X_m$ (g/ℓ)	$Q_{p, \max}$ (g polyoxin/g cell * hr)	$P_{\max}$ (g/ℓ)
control	0.55	0.195	0.74
0.57	1.50	0.190	0.78
1.15	1.40	0.071	0.57
1.72	1.46	0.023	0.65
2.30	1.80	0.015	0.72
2.87	1.68	0.015	0.62

#### 질소원의 영향

일반적으로 항생제와 같은 이차 대사산물의 생합성을 하는 경우에 배지 내에 과량의 질소원이 존재하면 질소원 또는 질소원의 대사산물이 이차 대사산물의 생합성을 억제하여 생산성을 떨어뜨리는 nitrogen metabolite repression(15) 현상이 일어날 수 있다. 본 실험에서는 질소원으로  $(NH_4)_2SO_4$ 를 사용하여 질소원의 균체 증식 및 polyoxins의 생합성에 미치는 영향을 조사하였다.  $(NH_4)_2SO_4$ 의 양을 각각 37.9, 75.7, 151.4, 227.0mM이 되도록 배지에 첨가한 후 균체의 증식 및 polyoxins의 생합성을 조사하였다. Table 2에서와 같이  $(NH_4)_2SO_4$ 의 양이 증가할수록 균체의 증식은 저해를 받아 최종 균체의 농도 및 균체증식속도는 부진하였으나, polyoxins의 최대 비생산속도( $Q_{p, \max}$ )는  $(NH_4)_2SO_4$ 의 사용량에 비례하여 증대하는 경향을 확인하였다. 그러나 최대 polyoxins 생합성량은  $(NH_4)_2SO_4$ 가 비교적 고농도인 151.4mM일 때 최대 생합성량을 보이다가 질소원이 보다 많이 첨가될수록 최대생합성량이 서서히 감소하였다. 또한 질소원의 증가에 따른 최대 비생산속도의 급격한 증가현상은 polyoxins의 최대 생합성량 증가에 의한 요인보다는 균체의 성장감소에 의한 영향으로 판단된다. 이런 결과는 *Streptomyces* sp. 809-11 균주가  $(NH_4)_2SO_4$ 를 이용함에 있어 균

체의 생육을 위해서는 적은 양만을 필요로 하나 polyoxins의 생합성을 위해서는 보다 많은 양의  $(NH_4)_2SO_4$  양을 필요로 하고 있음을 보여주고 있으며 polyoxins의 생합성량을 최대로 하기 위하여는 균체의 성장과 생합성기작을 동시에 최적화할 수 있는 농도가 존재한다는 사실을 보여주고 있다.

#### 인산염의 영향

인산염은 항생제 생산균주에 있어 균체 성장에는 필수적인 영양원으로 항생 물질의 생합성에는 저해 작용을 일으키는 것으로 알려져 있다(16-17). 본 실험에서는 인산염으로  $K_2HPO_4$ 를 사용하여 균체의 생육 및 polyoxins의 생합성에 대한 영향을 조사하였다. 대체로 10mM 이상의 인산염 농도에서는 항생제의 생합성이 이루어지지 않는다는 것이 일반적으로 보고된 방선균을 이용한 항생제의 발효에서 알려진 사실이다(18-19). 따라서  $K_2HPO_4$ 의 농도를 0~2.87mM(0~0.5g/ℓ)로 다르게 하여 인산염의 polyoxins 생합성에 대한 영향을 조사하였다. Table 3에서와 같이 *Streptomyces* sp. 809-11 균주의 경우에도 인산염의 농도가 높아질수록 초기 균체 성장이 촉진되고 최대 균체농도가 증가하였으나 polyoxins의 생합성은 인산염의 농도가 증가할수록 저해를 받아 생합성이 잘 이루어지지 않았다. 또한 인산염의

농도가 약 0.5mM 정도에서 polyoxins의 합성은 최적을 보였으며 균체의 농도는 인산염의 농도가 증가할수록 촉진되는 경향을 보여주었다. 이상과 같은 결과를 통하여 인산염의 영향에 대한 조사에서 polyoxins의 생합성을 위한 인산염의 최적 농도가 존재하며 그 이상의 농도에서는 생합성이 저해를 받음을 알 수 있었다.

**최적 조건하의 회분식 배양**

앞선 실험에서의 회분식 배양결과인 Fig. 3에 의하면 균체농도는 배양 1일 후에 최대 농도에 도달하고 배양 2일 후부터 감소하는 경향을 보이고 있다. 항생물질 polyoxins의 생합성은 균체의 농도가 증가하는 동안에는 소량으로 증가하다가 균체의 농도가 감소하기 시작하는 배양 2일 후부터 급격히 증가하여 배양 3일째에 최대 농도에 도달하였다. 이러한 배양과정 중의 각각의 영양원의 농도 변화를 조사하였는데 그 결과를 살펴 보면 균체의 농도가 급격히 증가하는 동안에는 탄소원으로 사용한 가용성 전분과 포도당 모두가 매우 빠른 속도로 감소하는 결과를 보이고 있다. 이때에 polyoxins 생합성이 급격히 증가하는 시점은 쉽게 이용할 수 있는 탄소원인 포도당이 배지내에서 고갈되는 시점과 일치하였다. 이는 일반적인 항생물질의 생합성에서와 마찬가지로 초기의 대수 성장기에 포도당을 이용하여 균체의 증식을 촉진하고 포도당이 고갈된 후 서서히 이용되는 탄소원인 가용성 전분을 이용하여 항생물질의 생합성에 이용하고 있음을 알려준다. 탄소원을 제외한 다른 영양원들의 농도는 항생제의 생합성과 균체의 증식과 직접적으로 관련을 보이는 경향을 보이지 않았다. 질소원으로 사용한  $(NH_4)_2SO_4$ 의 농도는 배양초기의 대수 성장기에 약간의 감소를 보인 후에는 polyoxins의 생합성시기에도 감소를 보이지 않고 있다. 인산염으로 사용한  $K_2HPO_4$ 의 농도는 균체의 성장이 최대에 이른 시점에서 거의 고갈되어 배지내에 남아 있지 않았고 균체의 농도가 감소할 동안에는 균체의 lysis에 의한 세포 성분의 배지 내로의 유출에 의해 다시 약간의 농도의 증가를 보이며 초기 넣어준 양의 60% 정도까지 증가하였다. 회분식 배양의 결과로부터 *Streptomyces* sp. 809-11 균주는 polyoxins 생산을 위한 최적 배지에서 균체의 지속적인 성장과 polyoxins의 생합성을 막는 일차적인 이유가 탄소원의 고갈에 있음을 알았다.

최적 배지에서의 회분식 배양을 진행하는 동안 균체의 증식 및 polyoxins의 생합성과 균체의 형태학

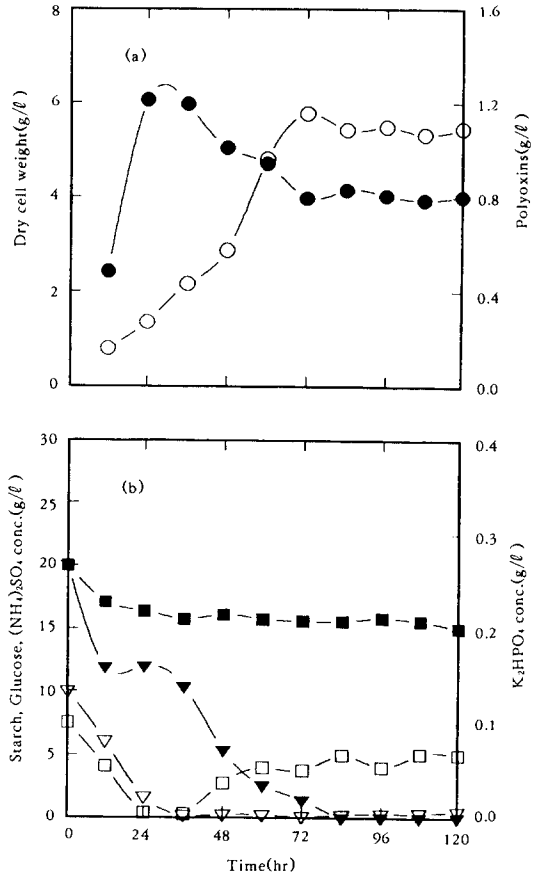


Fig. 3. Cell growth and polyoxins biosynthesis in medium optimized batch culture (a) dry cell weight (●), polyoxins (○), (b) medium component ; starch (▼), glucose (▽),  $(NH_4)_2SO_4$  (■),  $K_2HPO_4$  (□).

적인 분화의 과정에는 매우 밀접한 관계가 있다. 배양 12시간에서는 포자가 발아하여 작은 크기의 균사를 형성하기 시작한다. 이때에 균체는 대수 성장기에 접어들어 급속한 성장을 시작하였으며 polyoxins은 아주 적은 양만이 합성되었다. 배양 24시간에서는 생성된 균사가 더욱 발전하여 배양액중에 완전히 발달한 사상 균사체를 형성하기 시작하였다. 이때에 균체는 대수 성장기를 거쳐서 최고의 균체농도에 도달하였으나 여전히 polyoxins의 생합성은 적은 양의 증가에 그쳤다. 배양 36시간에서는 부분적으로 발달한 사상 균사체가 배양액 전체에 걸쳐서 완전히 발달하여 완전히 분화된 사상 균사체를 형성하였다.

이때에 균체의 농도는 최대 농도를 계속 유지하였으며 polyoxins의 농도는 계속 적은 양의 증가를 유지하고 있었다. 배양 48시간에는 균체는 완전히 분화된 사상 균사체로부터 포자의 상태로 분화되었다. 이때에 균체의 농도는 감소하기 시작하고 polyoxins의 농도는 급격히 증가하기 시작하였다. 증가되는 polyoxins의 생합성은 그후로 약 24시간 동안 계속되어 배양 3일째에 최대 생산량을 얻었다. 즉 polyoxins의 생합성은 완전히 분화된 사상 균사체로부터 포자의 발생으로 이어지는 단계에서 가장 왕성하다고 할 수 있다.

형태학적인 분화와 연관을 지을 수 있는 또 다른 요인은 배지성분의 조성이다. 일반적으로 방선균류의 morphology는 배지조성과 물리적 요인에 의하여 크게 달라질 수 있는 것으로 알려져 있다(20-21). 앞서의 탄소원의 영향에 관한 실험에서 모든 환경 조건이 충분한 발효조실험에서도 가용성 전분만을 사용한 경우는 polyoxins의 생합성이 거의 이루어지지 않은 결과를 보였으며 포도당만을 사용한 경우는 균체의 성장이 가용성 전분을 사용한 것보다 못하지만 사상균사체로의 분화는 촉진되어 polyoxins의 생합성은 어느 정도 이루어졌다. 이러한 결과는 균체의 형태학적인 분화와 무관하지 않다. 실험적인 관찰에 의하면 탄소원으로 포도당을 사용하는 경우는 균체의 분화가 완전하게 이루어져 완전히 분화된 사상 균사체를 이루지만 포도당을 사용하지 않고 가용성 전분만을 탄소원으로 사용한 경우는 분화의 과정이 완전히 분화된 사상 균사체로까지 분화하지 않고 작은 크기의 균사를 이루다가 포자의 발생 단계로 진행되는 것을 보여준다. 따라서 polyoxins의 생합성이 사상 균사체에서 포자의 발생으로 이어지는 단계에서 지배적으로 생합성되는 사실에 비추어 볼 때, 가용성 전분만을 탄소원으로 사용하는 경우는 polyoxins의 생합성이 낮은 것을 설명할 수 있다.

#### 유가식 배양

Polyoxins 생합성은 사상 균사체에서 포자를 발생시키는 단계에서 지배적으로 생합성되며 탄소원으로 포도당을 사용하는 것이 균체 분화의 과정에서 완전히 발달한 사상 균사체를 이루는데 중요한 요인임을 알았다. 따라서 최적 배지에서 회분식 배양을 진행하다가 탄소원의 고갈되는 시점에서 포도당이 주성분으로 포함된 배지를 공급하는 유가식 배양을 통하여 균체의 성장을 지속시키고 polyoxins의 생합성을 증가시키려는 실험을 수행하였다. 균체의 농도가 계

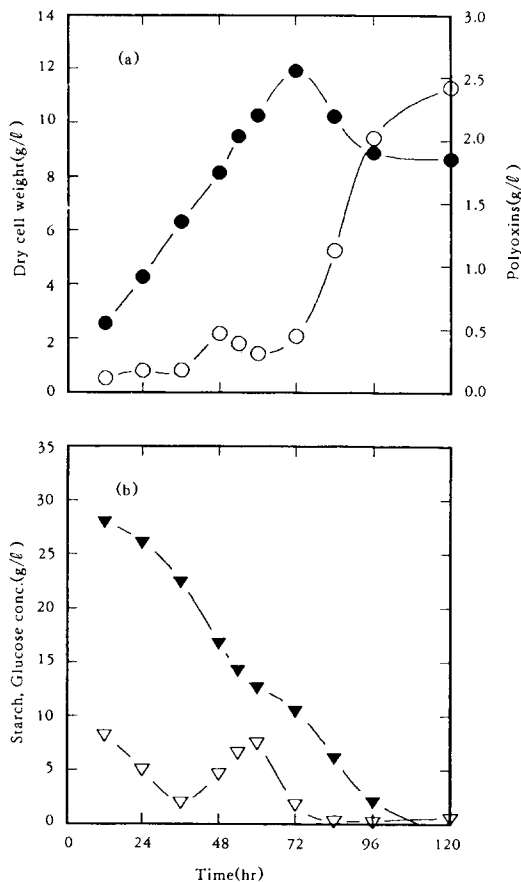


Fig. 4. Cell growth and polyoxins biosynthesis in fed-batch culture. (a) dry cell weight (●), polyoxins (○), (b) changes of carbon source, starch (▼), glucose (▽).

속적으로 증가하는 배양 36시간 후에 포도당의 농도는 약 2g/l의 농도까지 감소하였는데 이 시점에서 포도당이 포함된 배지를 공급하기 시작하여, 24시간 동안 공급하였는데 이때 최종 배양액의 부피가 3 l가 되었다. 유가식배양의 결과 Fig. 4에서와 같이 균체 성장의 증가가 계속되어 배양 3일째에 최대 균체의 농도가 약 12g/l까지 이르렀다. 균체의 형태학적인 분화는 배양 초기의 대수 성장기에 사상 균사체를 형성한 후 균체 성장이 지속되는 기간 동안은 형태의 변화가 일어나지 않았다. Polyoxin의 생합성은 포도당의 공급 후 균체 성장이 최대 균체농도에 도달하여 멈추는 시점까지 별로 이루어지지 않다가 균체의 성장이 멎고 균체농도가 감소하며 사상 균사

체에서 포자의 발생이 이루어지는 시점에서 급격히 생합성이 증가하여 최고 농도가 약 2.5g/l 에 이르렀다. 이는 최적 배지의 회분식 배양에서 얻을 수 있었던 polyoxins 생합성농도의 2배 이상이 되는 농도이다.

## 요 약

국내에서 선별된 *Streptomyces* sp. 809-11 균주의 항생물질 polyoxins의 생합성 능력을 향상시키기 위하여 주요 영양원에 따른 균체의 증식 및 polyoxins의 생합성에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험결과 가용성 전분만을 사용한 배지에서는 초기 대수적 성장기의 균체량은 증가하였으나 polyoxins의 생합성량은 적게 나타났으며, 포도당을 이용한 경우는 사상균사체의 형성을 증가시켜 polyoxins의 생합성량을 증가시켰으나 초기 균체의 성장률은 매우 저조하였다. 따라서 균체의 성장과 polyoxins의 생합성 향상 두 가지 측면을 모두 고려하여 볼 때 탄소원으로 가용성 전분과 포도당을 혼용하여 사용하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. 질소원으로 사용한  $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$ 는 비교적 고농도인 151.4mM에서 최대 항생제 생합성량을 보여주었으며, 인산염으로 사용된  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 는 0.5mM 정도에서 최적의 polyoxins 생합성을 보여 주었다. 유가식배양을 도입하여 초기에는 균체 성장을 위하여 전분과 포도당이 함유된 배지에서 배양하였고, 탄소원의 고갈시점에는 사상 균사체의 분화 촉진을 위하여 포도당을 공급한 결과 polyoxins의 생합성량을 회분식 배양에 비하여 두 배 이상으로 증가시켰다.

## 참 고 문 헌

1. S. K. Takeuchi, K. Hirayama, H. Ueda, H. Sakai and H. Yonehara(1958), *J. Antibiotics*, Vol. **A11**, 1.
2. K. Isono, J. Nagatsu, K. Kobinata, K. Sasaki, and S. Suzuki(1965), *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 848.
3. 과학기술처 보고서(1990), 유용 생체활성물질

- 생산기술 개발에 관한 연구(V).
4. 사단법인 농약공업협회(1990), '농약연보'.
5. T. Azuma and K. Isono(1977), *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 3347.
6. S. Shapiro(1989), *Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes*, p. 77, CRC Press, Florida.
7. M. Veelken and H. Pape(1982), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **15**, 206.
8. C. K. Mathews and K. E. Van Holde(1990), *Biochemistry*, p. 284, Benjamin Cummings, Redwood City.
9. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
10. F. Serien, B. Arnold, and J. E. Bailey (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 982.
11. J. F. Marin and L. E. McDiniel(1976), *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **3**, 135.
12. E. Y. Kim(1991), *Ph. D. Thesis*, Dept. of Chemical Engineering, Seoul Nat. Univ., Seoul.
13. Y. Aharonowitz and A. L. Demain(1978), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **14**, 159.
14. M. Gallo and E. Katz(1972), *J. Bacteriol.*, **109**, 659.
15. J. A. Gallant(1979), *Annu. Rev. Genet.*, **13**, 393.
16. J. F. Martin(1976), *Microbiology-1976*, (D. Schlessinger, eds), p. 548, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
17. J. F. Martin(1977), *Adv. Biochem. Eng.*, **6**, 105.
18. Y. Aharonowitz and A. L. Demain(1977), *Arch. Microbiol.*, **115**, 169.
19. J. Romero, P. Liras and J. F. Martin(1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 318.
20. K. Chater and M. J. Merrick(1976), *Genetics of Industrial Microorganism*(K. D. Macdonald, eds), p. 583, Academic Press, London.
21. L. V. Kalakoutsii and N. S. Agre(1976), *Bacteriol. Rev.*, **40**, 469.