

Teicoplanin 생산성이 우수한 *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC31121 변이주 선별 및 배양학적 특성

노용택

영동대학교 생명공학부 유전공학전공

Teicoplanin은 *Actinoplanes teichomyceticus*가 생산하는 베크마이신과 유사한 글리코펩티드계 항생제의 일종으로 메티실린 내성 황색포도상구균에 대해서도 효과가 우수한 치료제이다. 공시균주인 *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC31121에 자외선을 조사하여 teicoplanin 생산성이 우수한 균주를 얻었다. 본 연구에서 우수 변이주 획득을 위한 UV 조사에 대한 균주의 치사곡선을 구하고 변이 유도 최적 조건을 확립하였다. 또한 한천 확산법을 사용하여 모 균주와 변이주들의 teicoplanin 생산성 분포를 비교하였다. 변이주 가운데 가장 생산성이 높은 T1014-1를 최종적으로 획득하였으며 효소 활성도, 항생제 내성, 자가내성 및 teicoplanin 생산성을 조사하였으며 발효조에서 발효특성을 조사하였다.

Key Words □ *Actinoplanes teichomyceticus*, mutagenesis, teicoplanin, fermentation

Teicoplanin (Fig. 1)은 회귀 방선균인 *Actinoplanes teichomyceticus*가 세포 외로 생산하는 글리코펩티드계 항생제로서 그 작용 기작과 화학적 특성에 의해 베크마이신계로 분류되고 있다(11). 동일한 아미노산으로 이루어진 다섯 개 펩티드 골격은 이 그룹에 속하는 항생제 모두가 일정하게 공통된 특징이다. 가끔 다양한 치환체가 1번과 3번 잔기에서 위치와 개수가 다양하게 발견되는데, teicoplanin의 경우에는 1번 잔기에는 p-hydroxyphenylglycine이, 3번 잔기에는 3,5-dihydroxyphenylglycine이 결합되어 있고 tyrosine 잔기마다 염소원자가 한 개씩 결합되어 있으며 3개의 배당체가 결합되어 있는 것이 특징이다(12). Teicoplanin은 구조 및 극성 차이에 따라서 구분되는 T-A2-1에서 T-A2-5의 복합체와 정제 과정에서 분리되는 T-A1과 T-A3로 나뉘어지는데 임상적으로 사용되는 것은 T-A2 복합체이고 그 중에서 T-A2-2가 주요 구성성분으로 가장 강한 항균력을 가지고 있다(2,16).

Teicoplanin의 항균활성 기작은 세균의 펩티도글리칸 생합성 중간체인 muramyl pentapeptide의 D-alanyl-D-alanine 끝에 결합함으로써 transglycosylation과 transpeptidation을 저해함으로써 세포벽 형성을 방해하는 것이다(12). Teicoplanin은 그람양성인 entero-cocci, streptococci, staphylococci 같이 주요한 병원성 세균에 효과가 좋은 항생제로 다른 항생제에 내성이 있는 치명적인 감염에 대해 '마지막 선택'으로 불리는 치료제이다. 현재 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 치료제로서 베크마이신과 함께 임상적으로 널리 사용되고 있다.

Actinoplanes teichomyceticus ATCC31121은 인도 Indore 지방 토양에서 분리된 회귀 방선균으로 옐로우색의 영양균사를 형성하며 그것으로부터 호기성 균사가 형성된다(4). 대부분의 고체배지에서 구형내지 계란형의 sporangia를 형성하며 크기는 15-25 μm 이며 그 안에 1.5-2 μm 크기의 운동성이 강한 sporangiospore가 들어 있는 것이 특징이다. 성숙한 sporangia가 액체속에 잠기면 즉시 포자낭 포자가 유출되어 이동하다가 영양 조건이 좋으면 빠른 시간내에 발아를 하게 된다(10).

산업적으로 중요한 방선균은 유용한 이차대사산물을 다양하게 생산하는데 염색체의 크기가 매우 크고 불안정하며, 한 가지 항생물질 생합성에 여러 가지 생합성 유전자가 참여하고, 조절유전자 상호간에 복잡한 조절 기작을 통하여 이차대사 산물을 생합성하므로 특정한 구조 유전자 또는 조절 유전자 한 개를 조작하는 것으로는 효과가 없는 것으로 알려졌다. 그래서 항생제 등이

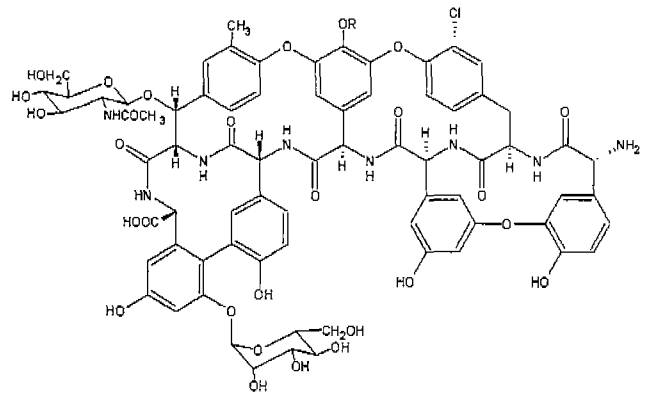


Fig. 1. The structure of teicoplanin.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 043-740-1110 Fax: 043-740-1109
E-mail; rhosong@youngdong.ac.kr

차대사산물은 구조적으로 서로 유사한 복합물질 형태로 생합성 되는 것이 특징이다(3,8). 따라서 아직도 방선균의 고생산성 균주 개발은 유전자 조작보다는 무작위 돌연변이 유도에 의하여 이루어지고 있으며 실제로 많은 효과를 거두고 있다. 방선균의 돌연변이원은 물리적으로는 자외선과 화학적으로는 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)가 주로 사용된다(5,6).

본 연구에서는 *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC31121을 모균주로 사용하여 UV에 의한 유전적 개량을 통하여 돌연변이주를 얻는 방법을 최적화하고 그 방법을 통하여 얻은 teicoplanin 과량 생산 돌연변이주를 얻은 후 발효조 배양을 통한 생산성 향상을 확인하였고, 변이주의 여러 가지 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에 사용된 균주는 생명공학연구원(KCTC)으로부터 분양 받은 *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC31121 (KCTC9543)을 사용하였다. 자연친주에 UV 조사를 통하여 얻은 변이주 T1014-1을 teicoplanin 생산 발효에 사용하였다.

배지조성

중균배지는 meat extract 3 g, tryptone 5 g, 효모추출물 5 g, 포도당 1 g, 가용성전분 24 g, CaCO₃ 0.5 g을 증류수 1 l에 녹여서 만든 복합배지(pH 7.0)를 사용하였다. 계대 배양배지는 중균배지에 한천을 18 g/L 첨가하여 사용하였다. teicoplanin 발효를 위한 생산배지는 beef extract 4 g, peptone 4 g, 효모추출물 1 g, 대두분 10 g, 포도당 10 g, NaCl 2.5 g, CaCO₃ 4 g를 증류수 1 l에 녹여 만든 복합배지(pH 7.0)를 사용하였다(4).

배양조건

A. teichomyceticus ATCC31121을 계대배양 배지에 접종하여 28°C 항온기에서 7일간 배양한 다음 형성된 포자를 40 ml의 중균배지가 들어 있는 250 ml baffled 삼각 flask에 1 ml 당 1×10⁶개가 되도록 접종하고 28°C에서 2일간 150 rpm으로 배양을 실시한 것을 중균으로 사용하였다.

Teicoplanin 생산을 위해서는 생산 배지 40 ml가 담긴 250 ml Erlenmeyer flask에 중균배양액 4 ml씩 접종하여 28°C, 120 rpm에서 7일간 배양하거나, 3 l의 생산배지가 들어있는 5 l 발효조(KF-5L, 한국발효기)에 5% (v/v) 접종량으로 중균배양액을 접종하여 배양온도 28°C, 교반속도 300 rpm, 통기량 0.5 vvm으로 7일간 배양하면서 12시간마다 시료를 취하여 분석하였다.

Teicoplanin 생산성이 증가된 변이주의 분리

*A. teichomyceticus*의 teicoplanin 생산성을 높이기 위해, 계대배양 배지에서 7일간 배양하여 얻은 포자 형성 콜로니를 생리식염수에 현탁한 후에 유리섬유로 여과하여 균사를 제거하고 포자 현탁액을 만들었다. 예상 사멸율에 따라 적당히 희석된 포자현탁액 100 μl를 중균배지가 든 한천 평판배지에 도말하고 30°C에서

2시간 미리 배양하여 세포 분열이 일어나도록 하였다. 세포 분열이 유도된 평판배지를 파장 260 nm, 20 W 자외선등 2개가 65 cm 거리에 설치된 무균상자에서 UV를 조사하였다. 90-99.99%의 사멸율이 되도록 조사 시간을 조절하면서 UV를 조사하여 돌연변이 유도를 한 후에 즉시 알루미늄 호일로 싸서 차광하여 광회복에 의한 DNA 복구가 일어나지 않도록 하였다(7). 28°C, 4일간 배양한 후에 생존 콜로니를 무작위 선별하여 생산배지가 함유된 한천배지로 만든 직경 8 mm, 높이 4 mm의 agar piece 상에 도말한 후에 건조가 안되도록 humid chamber에서 28°C, 7일간 배양한 다음 생물학적 검정을 실시하였다. 660 nm에서 광학밀도가 2.0 이상(>10⁹ CFU/ml)이 되도록 검정균인 *Staphylococcus aureus*를 배양한 후에 한천 0.5%가 함유된 nutrient 배지에 1% (v/v)가 되도록 접종한 후에 bioassay dish (23 cm×23 cm, Nunc, UK)에 150 ml를 붓고 굳힌 다음 변이주를 배양한 agar piece들을 일정한 간격으로 올려 놓고 37°C에서 1일간 배양하였다. 지지환이 가장 큰 agar piece 상의 콜로니를 선별하여 계대 배양 배지에 도말하여 배양한 후에 생산배지에서 다시 teicoplanin 생산성을 다시 확인하여 생산성이 높은 변이주를 선별하였다.

배양액 분석

건조균체량(DMW)은 배양액 10 ml를 Whatman GF/C 유리여과지로 감압 여과한 후 105°C, 2시간 건조한 후 무게를 달아 측정하였다. 포도당 농도는 dinitrosalicylic acid (DNS)법(Miller, 1959)을 사용하였으며, 암모니아는 암모니아 이온전극(EA-940 Ion Analyzer, Orion Research, USA)을 이용하여 측정하였다(14). 인의 농도는 배양액에 폴리브덴산 암모늄을 작용시켜 인산폴리브덴산암모늄을 만든 다음, 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid로 환원시켜 발색시킨 후에 660 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 구하였다(1).

Teicoplanin 농도 측정

시료내의 teicoplanin 농도 측정은 agar well diffusion 방법에 의한 생물학적 검정법을 이용하였으며 지시균으로 *Staphylococcus aureus*를 사용하였다. 표준시약으로는 Targocid (200 mg/vial teicoplanin 주사제, Gruppo Lepetit S.P.A., Italy)를 80, 400, 2000, 10000 mg/ml 용액으로 만들어 사용하였다. 지시균인 *Staphylococcus aureus*를 660 nm에서 광학밀도가 2.0 이상(>10⁹ CFU/ml)이 되도록 배양하고, 한천 0.5%가 함유된 nutrient 배지에 1%(v/v)를 접종한 후에 bioassay dish에 150 ml를 붓고 굳힌 다음 직경 5.5 mm의 유리관으로 구멍을 내고 아스피레이터로 한천을 흡입하여 agar well을 제조하였다. agar well 각각에 표준용액 및 배양액의 원심분리 상등액을 50 μl씩 넣고 1일간 배양한 다음 지지환의 크기를 측정하여 표준용액의 회귀곡선으로부터 농도를 계산하였다.

변이주의 배양학적 특성

Teicoplanin 생산성을 제외한 변이주의 특성에 대해서는 고체

배양에서의 포자형성능, 전분분해능, 단백질분해능, 삼투압 내성 및 항생제에 대한 내성을 비교하였다. 포자형성능은 포자형성배지에서 배양한 후에 현미경으로 포자낭 형성을 관찰하였다. 전분분해능은 가용성 전분을 기질로 첨가한 후 1시간 동안 형성된 포도당의 밀리몰수를 1 unit로 나타내었고, 단백분해능은 카제인

을 기질로 첨가한 후 1분 동안 형성된 tyrosine의 mg수를 1 unit로 하였으며 내염성은 생장이 가능한 최고 NaCl 농도로 하였다(17).

항생제에 대한 내성은 농도구배법을 이용하였다. 먼저 항생제가 포함된 배지를 기울여서 균한 후 같은 부피의 항생제 불포함 배지를 그 위에 부어 수평이 되도록 균한 다음 10^4 (CFU/ml)이 되도록 희석된 균주를 도말하여 4일 동안 배양한 후에 plate위에 성장 범위까지 거리를 측정하여 포함된 항생제의 최소저해농도 (MIC)를 계산하여 항생제 내성을 비교하였다.

결과 및 고찰

UV조사에 의한 사멸곡선

UV를 이용한 돌연변이 유도로 고생산성 균주를 얻기 위한 최적의 UV 사멸율을 얻기 위하여 260 nm 파장의 20 W 자외선등 2개가 65 cm에 설치된 거리에서 UV 조사 시간에 따른 사멸곡선을 구하였다. Fig. 2에서 보듯이 UV 조사 시간과 잔존 세포수의 로그값은 선형 관계를 나타내었고, 사멸속도 상수는 0.055 sec^{-1} 이었다. 이 값은 다른 방선균의 사멸속도 상수 $0.03\text{--}0.05 \text{ sec}^{-1}$ 와 비교할 때 높은 값을 나타내어 UV 조사에 대해 저항성이 큰 것을 알 수 있었다.

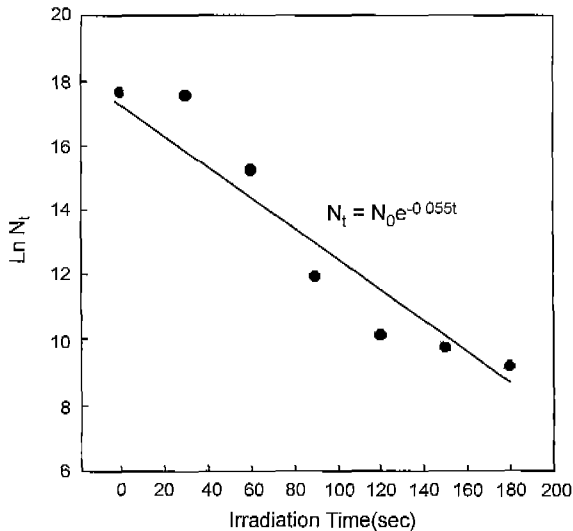


Fig. 2. Survival curve of *Actinoplanes teichomyceticus* under UV irradiation (20 W×2) at 260 nm. Nt; Number of survived cell after UV irradiation for t seconds.

UV조사 치사율에 따른 변이주들의 생산성 분포

변이원에 따라 우수 돌연변이 발생 최적 치사율이 다른 것으

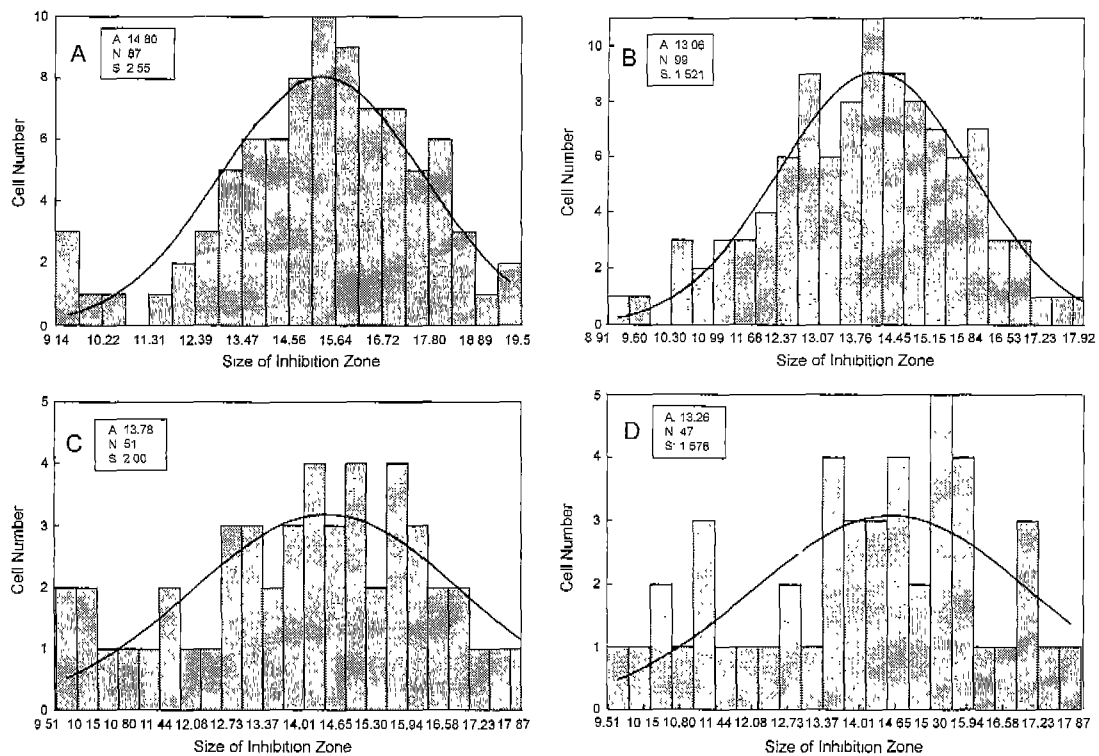


Fig. 3. Histogram of productivity variation of *Actinoplanes teichomyceticus* mutants after UV irradiation. A; 41 sec (90% lethality), B; 83 sec (99% lethality), C; 124 sec (99.9% lethality), D; 166 sec (99.99% lethality) *abbreviation: A, average; N, number; S, standard deviation.

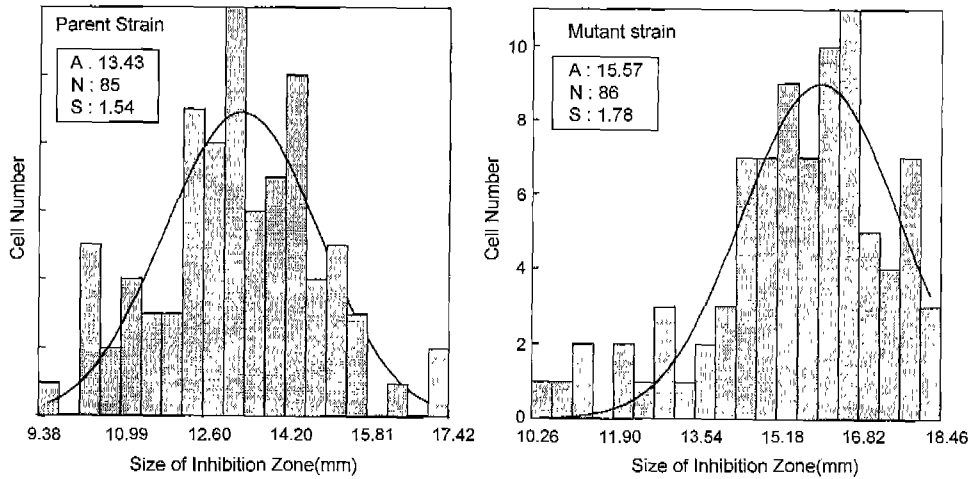


Fig. 4. Histogram of teicoplanin productivity in natural variants and UV-induced mutants of *Actinoplanes teichomyeticus*.

로 보고되고 있는데, NTG가 60-70% 사멸을일 때 우수 돌연변이 발생 빈도가 높은 반면 UV조사는 99.9% 사멸을일 때 우수 변이주 발생 빈도가 높은 것으로 보고되고 있다(5-7). 본 연구에서는 우수 돌연변이주 출현 확율이 높은 UV조사 시간을 구하기 위하여 Fig. 2에서 구한 사멸곡선식에서 치사율 90%, 99%, 99.9%, 99.99%가 되기 위한 UV 조사시간 41초, 83초, 124초 그리고 166초를 확인하고 해당 시간별로 UV를 조사하여 생존한 콜로니에 대한 생물학적 검정에 의한 저지환 크기를 측정하여 히스토그램을 작성하였다(Fig. 3). 치사율이 낮으면 안정된 분포를 나타내는 반면 고역이 균주의 출현빈도가 떨어지고, 치사율이 높으면 분포가 매우 불안정해지면서 고역이 균주 발생 빈도도 오히려 감소하는 경향을 나타내었다.

모균주와 변이주 집단간 생산성 비교

Fig. 3에서 실험한 결과에 따라 우수 변이주 출현 빈도가 높은 치사율 90%가 되도록 UV 조사 시간을 120초로 하여 얻어진 변이주 86개와 UV를 조사하지 않은 모균주 85개에 대해 무작위로 생물학적 검정에 의한 저지환 크기를 측정하여 히스토그램을 작성한 결과는 Fig. 4와 같다. 모균주의 자연변이주들에 대해 teicoplanin 역가 분포를 조사한 결과 전형적인 정규분포곡선을 그리면서 안정한 역가분포를 나타내었고 UV 조사로 얻어진 변이주의 역가분포는 모균주와 비교할 때 정규분포곡선의 peak가 오른쪽으로 이동하였다. 전체 집단의 평균역가도 증가하였으며 집단의 최대 역가도 증가하였다. 위 결과로부터 120초간의 UV 조사로 치사율이 90%인 조건으로 돌연변이를 유도한 후에 16,126개의 변이주의 역가를 조사하여 최종적으로 teicoplanin 생산능이 뛰어난 돌연변이주 T991014-1을 얻었다.

변이주의 배양학적 특성

돌연변이주와 모균주의 특성을 비교하기 위하여 포자 형성능, 전분분해능 및 단백질분해능, teicoplanin 생산성을 비교한 결과 변이주가 포자 형성능은 상실하였지만 전분 분해능과 단백질 분

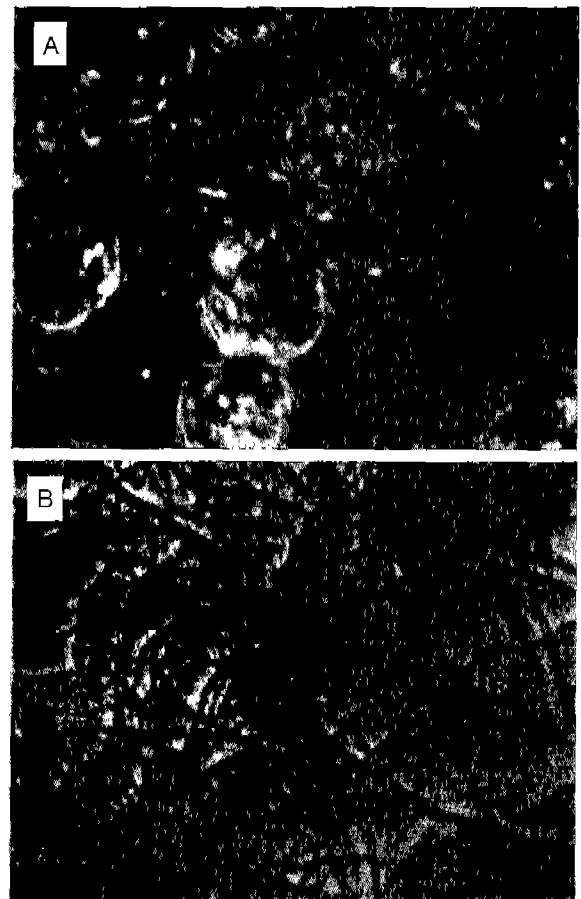


Fig. 5. Mycelia and sporangia of parent strain A and mutant strain B.

해능은 큰 차이는 나지 않았고, 삼투압 내성은 증가하였으며, teicoplanin 생산성은 모균주에 비하여 약 10배 정도 증가되었다 (Fig. 5 및 Table 1). 포자 형성능은 형태학적 분화이고, teicoplanin은 생리학적 분화로 밀접한 관계가 있다고 보고되고 있다 (15). 방선균의 경우 두가지 분화가 모두 idiophase에 발현이 된

Table 1. Comparison of characteristics of parent and mutant strain in submerged culture

	Parent strain	Mutant T1014-I
Amylase activity, unit/ml	2.2	1.9
Protease activity, unit/ml	215	237
Halotolerance to NaCl, %	1.2	1.2
Teicoplanin production, $\mu\text{g/ml}$	35	367

Table 2. Comparison of MIC to the various antibiotics in parent and mutant strain.

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$) of parent strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$) of mutant strain
Streptomycin	1.28	0.28
Erythromycin	1.12	0.65
Rifampicin	1.33	1.19
Tetracycline	2.66	2.24
Teicoplanin	0.76	1.20

다고 알려져 있다. 본 연구에서 선별된 변이주는 형태학적 분화인 포자 형성능은 상실되었지만 이차대사산물인 teicoplanin의 생합성은 증가된 것으로 보아 포자 형성과 직접 관련된 유전자만 손상되고 분화 전체와 관련된 조절유전자들은 그대로 보존되었다고 볼 수 있다. 전분분해능과 단백질분해능은 항생제 생산 배지 조성에 큰 영향을 줄 수 있는 인자이다. 가격이 저렴하면서 이차대사에 대한 이화억제를 방지할 수 있는 산업용 배지 성분들은 고분자 탄수화물과 농수산 유래 단백질들이기 때문이다. 변이주의 탄소원 및 질소원 동화 능력은 변화되지 않았기 때문에 teicoplanin 생산을 위한 배지로 농수산 유래 자연 원료가 사용될 수 있을 것이다. 또 삼투압 내성과 관련이 있는 내염성은 배지 조성 최적화 과정에서 농도 변화에 대한 균주의 적응력의 척도가 될 수 있기 때문에 산업균주 개발에 매우 중요한 인자이다.

변이주의 항생제 내성 및 자가내성

UV조사에 의한 돌연변이 특성을 확인하기 위하여 작용기작이 서로 다른 5가지 항생제에 대한 최소저해농도(MIC)를 측정하였다(Table 2). Rifampin, tetracycline에 대한 MIC는 변화가 없었지만 streptomycin, erythromycin에 대한 돌연변이주의 MIC값이 감소한 것으로 보아 UV조사에 의해 ribosome에 변이가 일어났거나 내성관련 유전자가 변화되었다고 생각되었다. 배지에 teicoplanin을 첨가하여 자가독성을 측정해본 결과 모균주보다 58%정도 증가되었고 이것은 곧 teicoplanin의 역가 향상에 밀접한 관계가 있다고 생각된다. 그러나 외부에서 teicoplanin을 첨가하지 않고 4일간 배양한 발효액 내의 teicoplanin 농도는 이 보다 훨씬 높았는데 이것은 MIC 측정시 사용된 종균배지에서는 성장 위주의 일차대사만 일어나고 이차대사가 안 일어나며 동일한 조절기작을 받는 자가산물에 대한 내성관련 유전자들의 발현율이 낮기

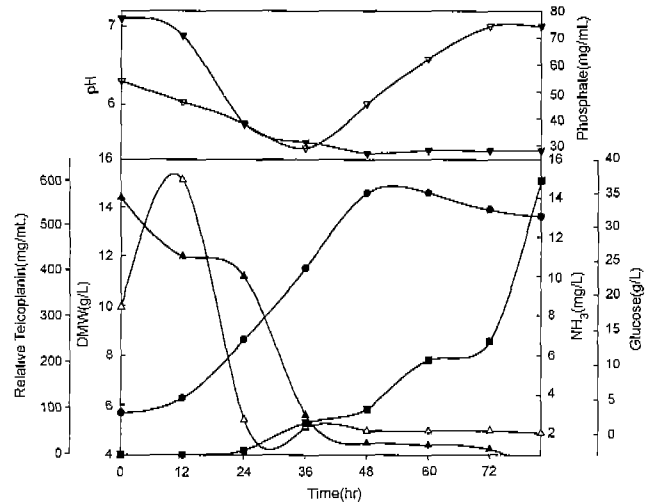


Fig. 6. Time course for the mycelium growth and teicoplanin production in batch culture of 5L-jar fermentor using a mutant of *Actinoplanes teichomyceticus*. -●-, DMW; -■-, teicoplanin; -▲-, glucose; -△-, NH₃; -▽-, pH; -▼-, phosphate.

때문인 것으로 생각되었다. *A. teichomyceticus*와 같은 glycopeptide계 항생제를 생산하는 방선균의 내성기작은 peptidoglycan을 이루는 D-Ala-D-ala을 D-Ala-D-lac으로 바꾸는 것으로 알려져 있다(13,19). 이것과 관련된 여러 유전자는 세포가 성장하는 배양 초기에는 발현이 되지 않고 정체기에서 높은 수준으로 발현이 되어 자기산물에 대한 내성을 갖게 되어 높은 농도의 teicoplanin을 생합성할 수 있는 반면, 성장과 일차대사가 주로 일어나는 종균배지에서는 내성이 발현되지 않아 자기산물에 대해 더 민감한 것이라고 생각되었다.

변이주를 이용한 Teicoplanin 발효

본 연구에서 얻어진 고역가 돌연변이주를 생산배지를 사용하여 5 l-발효조에서 회분배양한 결과는 Fig. 6과 같았다. 고역가 균주로 선별된 변이주 *A. teichomyceticus* T1014-I는 접종 후 24시간이 경과한 후 teicoplanin 생합성이 시작되었다. Teicoplanin 생합성 시점이 배양액내 암모니아가 고갈되고 pH가 급격히 감소된 시점과 일치하였고, 암모늄이온이 고갈된 72시간 이후 급격히 증가하여 배양 84시간에 최대에 도달하였다. 84시간 이후에는 생성된 teicoplanin의 농도가 감소하는 경향을 보였다(제시되지 않음). 탄소원으로 첨가된 포도당과 가용성 전분은 배양 초기 36시간까지 급히 소모되었고 이 기간 동안에는 유기산의 축적으로 배양액의 pH도 계속 감소하여 36시간에 최저에 도달하였다. 포도당이 고갈된 후에는 균체 성장속도가 감소하여 48시간 이후에는 일정하게 유지된 반면 배양액 pH는 계속 증가하였다.

배양액 pH는 암모늄이온이 자화될 때 세포 밖에 남게되는 양성자에 의해 급격히 감소한 것으로 생각되었으며, 암모늄이온과 포도당은 균체생장은 촉진하지만 teicoplanin 생합성은 강하게 억제하는 것으로 생각되었다. 다른 항생제를 생산하는 방선균에서처럼 *A. teichomyceticus*의 teicoplanin 생합성에서도

암모늄이온과 포도당이 생합성과 밀접한 관계가 있는 것으로 판단되었다(18).

감사의 글

본 연구는 충북지방중소기업청 산학연 공동기술개발 지역컨소시엄 연구개발 사업(과제번호 영동대 01-11)의 지원에 의해 수행된 결과의 일부로서, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 실험생화학, 1996. 한국생화학회 고재편찬위원회. 탐구당.
2. Borghi, A., C. Coronelli, L. Faniuolo, G. Allievi, R. Pallanza, and G.G. Gallo. 1984. Teicomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* NOV. SP. *J. Antibiotics*. 37(6), 615-620.
3. Chater, K.F. 1979. (Editor) Genetics of industrial microbiology. pp. 123.
4. Coronelli, C., G. Beretta, M.R. Bardone, and F. Parenti. 1980. US Patent 4,239,751.
5. Davies, O.L. 1964. Screening for improved mutants in antibiotic research. *Biometrics* 20, 576-591.
6. Delic, V., D.A. Hopwood and E.J. Friend. 1970. Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. *Mutation Res.* 9, 167-182.
7. Gerhardt, P., G. E. Murray, G. Gostilow, F. W. Nester, A. W. Wood, N. R. Krig, and G. B. Phillips. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology, pp. 222-242. American Society for Microbiology. Washington.
8. Hesseltine, C.W. and W.C. Hayes. 1973. Sources and management of microorganisms for development of a fermentation industry. *Prog. Ind. Microbiol.* 12, 3-46.
9. Heydorn, A., T. Suhr-Jessen, and J. Nielsen. 1999. Growth and production kinetics of a teicoplanin producing strain of *Actinoplanes teichomyceticus* *J. Antibiotics*. 52, 40-44.
10. Higgins, M.L. 1967. Release of sporangiospores by a strain of *Actinoplanes*. *J. Bacteriol.* 94(3), 495-498.
11. Lancini, G. 1989. Fermentation and biosynthesis of glycopeptide antibiotics. In Bushell M.E. and Grafe U. Eds. Bioactive metabolites from microorganisms. pp. 283-296. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.
12. Lancini, G. and Cavalleri B. 1977. Glycopeptide antibiotics. In Kleinkauf H. and von Dohren H. Eds. Biotechnology, Second Edition, vol. 7, pp. 369-396. VHC, Weinheim.
13. Marshall, C.G., Lessard, A.D., Park, I.S., and Wright. G.D. 1998. Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2215-2220.
14. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
15. Ochi, K. 1986. Occurrence of the stringent response in *Streptomyces* sp. and its significance for the initiation of morphological and physiological differentiation. *J. Gen. Microbiol.* 132, 2621-2631.
16. Parenti, F., G. Beretta, M. Berti, and V. Arioli. 1978. Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* NOV. SP. *J. Antibiotics*. 31(4), 276-283.
17. Rho, Y.T. 1997. Studies on the induction and repression of serratidase in *Serratia* culture. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 408-413.
18. Rho, Y.T., G. Nam-Kung, and K.J. Lee. 1991. Rheological characteristics of rifampicin B fermentation using *Nocardia mediterranei*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 1, 70-74.
19. Sosio, M., A. Bianchi, E. Bossi and S. Donadio. 2000. Teicoplanin biosynthesis genes in *Actinoplanes teichomyceticus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 379-384.

(Received September 18, 2001/Accepted October 22, 2001)

ABSTRACT: Screening and Characteristics of a Mutant of *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC31121 Highly Producing Teicoplanin

Yong-Taik Rho* (Department of Genetic Engineering, Youngdong University, Chungbuk 370-701, Korea)

Teicoplanin is a kind of glycopeptide antibiotics produced by *Actinoplanes teichomyceticus*, and used in the clinical antibiotic such as vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC 31121 was mutated with UV to obtain a superior mutant strain with increased level of teicoplanin production. In this investigation, lethal curve was obtained and the optimal condition to induce mutagenesis was determined to isolate the desirable mutant strain. It was also confirmed that teicoplanin activities by agar diffusion method was compared with the parent strain. One mutant strain, T991014-1 with the highest productivity, was finally selected, and was characterized through the various tests such as amylase activity, protease activity, halotolerance, antibiotic resistance, autotoxicity, and productivity. And fermentation characteristics of the mutant strain were also studied.