

## 생합성 경로의 이해를 통한 Avermectin B<sub>1a</sub> 고생산성 변이주 개발

송성기 · <sup>1</sup>정용섭 · †전계택  
강원대학교 생명과학부, <sup>1</sup>전북대학교 응용생물공학부  
(접수 : 2005. 9. 5., 게재승인 : 2005. 10. 21.)

### Development of Avermectin B<sub>1a</sub> High-yielding Mutants through Rational Screening Strategy based on Understanding of Biosynthetic Pathway

Song, Sung Ki, Yong Seob Jeong<sup>1</sup>, and Gie-Taek Chunt<sup>†</sup>  
Division of Life Sciences, Kangwon National University,  
<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University.  
(Received : 2005. 9. 5., Accepted : 2005. 10. 21.)

Avermectin (AVM) B<sub>1a</sub> produced by *Streptomyces avermitilis* via polyketide pathway is a secondary metabolite with powerful anthelmintic and insecticidal activities, thus being used as an efficient agent in the field of agriculture and animal health. It has been reported that a precursor for AVM B<sub>1a</sub> biosynthesis was isoleucine and the biosynthetic pathway of AVM B<sub>1a</sub> was closely similar to that of fatty acid. Based on understanding of the biosynthetic pathway of AVM B<sub>1a</sub>, we intended to screen various mutants resistant against O-methyl threonine (OMT), an isoleucine-anti metabolite, and/or mutants resistant against p-fluoro phenoxy acetic acid (pFAC), an inhibitor of fatty acid biosynthesis. It was inferred that these mutants could produce AVM B<sub>1a</sub> more efficiently, due to the acquired capability of not only overproducing isoleucine intracellularly but also channelling metabolized carbon-sources into the polyketide pathway, thus leading to enhanced biosynthesis of AVM B<sub>1a</sub>. The resulting mutant (PFA-1 strain) resistant against 100 ppm of pFAC was able to produce approximately 42 fold higher amount of AVM B<sub>1a</sub> compared to the parallel mother strain (4,200 vs. 100 units/l). In addition, through the process of continuous strain improvement program carried out by gradually increasing the OMT concentration, it was possible to obtain a more attractive mutant with greater AVM B<sub>1a</sub> production capacity (9,000 units/l). Notable was that significantly higher producer (12,000 units/l) could be selected through further screening of the resistant mutants, this time, to even higher concentration of pFAC. Meanwhile, through the analysis of AVM B<sub>1a</sub> production histograms (i.e., number of strains according to their AVM B<sub>1a</sub> biosynthetic ability) for the earlier strains in comparison with the high producers having the characteristics of resistance to OMT and pFAC, it was found that production stability of the high-yielding producers were remarkably improved, as demonstrated by the fact that larger proportion of the mutated strains had greater capability of AVM B<sub>1a</sub> biosynthesis (71% in the range between 5,000 and 7,000 units/L; 47% in the range between 6,000 and 7,000 units/l). Based on these consequences, it was concluded that the rational screening strategy based on the understanding of the biosynthetic pathway of AVM B<sub>1a</sub> was very effective in obtaining high-yielding mutants with the features of enhanced production stability.

**Key Words :** *Streptomyces avermitilis*, avermectin B<sub>1a</sub>, mutation, rational screening, polyketide

#### 서 론

Avermectins (AVMs)은 방선균인 *Streptomyces avermitilis*가 생합성하는 이차대사산물로써 16-membered pentacyclic

lactone의 oleandrose disaccharide derivatives이며, 특별한 항박테리아나 항진균 활성은 없지만 강력한 구충효과를 지닌 물질이다(1). AVMs은 8개의 유사한 물질의 복합체로써 (A<sub>1a</sub>, A<sub>1b</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub>, B<sub>1a</sub>, B<sub>1b</sub>, B<sub>2a</sub>, B<sub>2b</sub>), 그 중에서 AVM B<sub>1a</sub>가 가장 강력한 생물학적 활성을 지닌다고 알려져 있다(2). 또한 AVM B<sub>1a</sub>는 축산업에서 널리 이용되고 있는 반합성 avermectin인 ivermectin의 전구체로 이용된다(3). AVM B<sub>1a</sub>는 polyketide pathway를 통해 합성되며, idiophase 단계에서 생산되는 전형적인 이차대사산물 생산 유형을 보이고, 관련 이

† Corresponding Author : Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University

Tel : +82-33-250-8547, Fax : +82-33-241-4627

E-mail : gtchun@kangwon.ac.kr

차대사경로에 관련된 효소들의 낮은 기질 특이성으로 인해 A와 B 성분들이 동시에 생산되고 물에 대해 매우 낮은 용해도를 보이며, 주로 생산균주의 균사 내에 축적된다(4, 5).

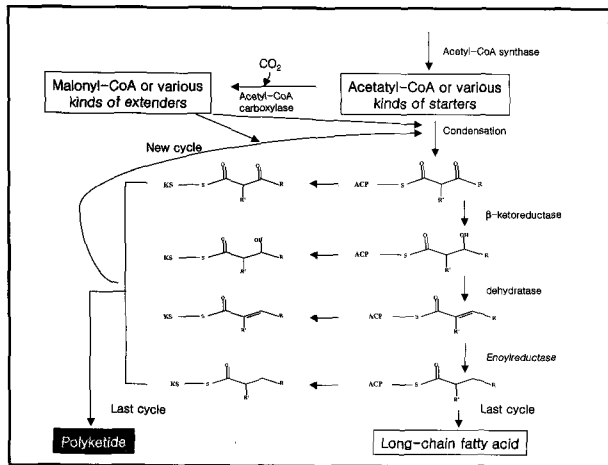


Figure 1. Fatty acid and polyketide biosynthesis pathway.

미생물발효를 통한 이차대사산물의 생산에 있어서 생산 균주의 역가와 생산성은 고려되어야 할 가장 중요한 요인이다(6). 광범위 동물구충제인 AVM B<sub>1a</sub>의 약효가 다양한 임상 실험을 통해 입증된 이래, AVM B<sub>1a</sub>의 생화학, 생물학적 연구 결과는 많이 보고되었으나, 고역가 균주 개발 경로 등에 대한 연구결과는 전혀 발표되지 않고 있는 실정이다(7-10). 균주개발의 효율성은 어떠한 균주 선별 전략을 이용하느냐에 따라 크게 달라진다. 전통적인 random screening은 생산 균주의 돌연변이 후 생존한 변이주들의 생산성을 직접 확인하는 방법으로, 현재까지 여러 면에서 성공적인 사례가 보고되었지만(11, 12), 대량의 변이주의 생산성을 일일이 확인해야 하므로 시간과 비용이 많이 소모되는 방법이다(13). 이러한 단점을 극복하고자 rational screening 방법이 고안되었다(14). 이 방법은 원하는 생산물의 생합성 경로에 대한 지식을 바탕으로 수많은 돌연변이주 가운데 원하는 방향으로 변이가 일어난 변이주를 선별하는 방법으로, 일반적으로 원하는 대사산물의 독성 유사체나 항생물질에 대한 저항성 변이주를 선별하게 된다(15).

AVM B<sub>1a</sub>의 생합성 과정에서 isoleucine에서 유래된 2-methylbutryl-CoA가 전구체로 이용된다(4)(Fig. 2). 따라서 AVM B<sub>1a</sub>를 고생산하기 위해서는 우선 전구물질인 isoleucine의 생합성이 활발히 진행되어야 한다. Isoleucine의 아미노산 유사체에 저항성을 나타내는 균주들은 feedback inhibition/repression 현상을 극복하여 일정량의 isoleucine을 합성한 후에도 계속적으로 isoleucine을 다량 합성할 수 있을 것이다. 이로 인해 더욱 많은 전구체가 AVM B<sub>1a</sub> 생합성 경로로 공급되어 궁극적으로 AVM B<sub>1a</sub> 생합성량이 증가될 가능성이 높다. 또한 AVM은 지방산과 그 경로를 공유하는 polyketide 계열의 물질이므로(4)(Fig. 1), 세포의 생존에 필수적인 지방산 합성 저해 물질이 존재함에도 불구하고 생존하는 변이주는 지방산 합성 뿐만 아니라, polyketide의 생합성 경로로의 대사 또한 활발할 것이다. 상기에 언급한 가능성을 바탕으로 AVM B<sub>1a</sub> 고생산 변이주

를 선별하기 위하여, 본연구진은 UV와 NTG에 의해 돌연변이를 유도하고 생존한 변이주 중, isoleucine의 아미노산 유사체인 O-methyl threonine (OMT)과 지방산 저해물질인 p-flouro phenoxy acetic acid (pFAC)에 대한 저항성 돌연변이주를 선별하고자 하였다.

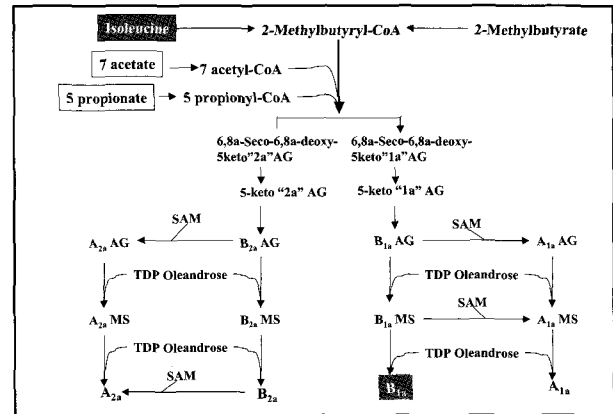


Figure 2. Proposed pathway for biosynthesis of the AVM "a" in *S. avermitilis*.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배양조건

본 연구에서는 AVM B<sub>1a</sub> 생산균주인 *Streptomyces avermitilis* ATCC 31272의 돌연변이주를 모균주로 사용하였다. Solid stock은 *S. avermitilis*를 포자형성배지인 ISP 배지의 한천 사면배지에 접종한 후 28°C에서 7일간 배양한 후 균주를 4°C에 보관하여 필요시마다 사용하였다. 또한 20%의 glycerol이 포함된 liquid stock을 만들어 -80°C 냉동고에 보관하였다. ISP 사면 배지의 조성은 다음과 같다: malt extract 15 g/l, yeast extract 5 g/l, soluble starch 5 g/l, CaCO<sub>3</sub> 3 g/l, agar 20 g/l. 다음과 같은 조성의 성장배지 30 ml을 250 ml 삼각 플라스크에 첨가하여 진탕배양기에서 28°C, 48시간동안 배양하였다: soluble starch 30g/l, yeast extract 15 g/l, cornsteep liquor 5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 g/l. 각 단계마다 오염여부를 확인하기 위하여 현미경을 통한 관찰을 수행하였다.

#### 종균배양 및 생산배양 조건

종균배양은 30 ml culture tube에 10 ml의 성장배지를 첨가하여 진탕 배양기에서 28°C, 230 rpm으로 48시간 동안 배양한 후 10% (v/v)로 생산배지로 접종하였다. 생산배지의 조성은 다음과 같다: soluble starch 132 g/l, soybean meal 10 g/l, skim milk 15 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/l, PEG 2,000 2.5 g/l. 생산배양은 균주의 대량선별 초반 단계에서는 30 ml culture tube에서 10 ml의 생산배지로 수행했으며, 후반부에서는 산소 공급의 중요성을 고려하여 250 ml flask에 30 ml의 생산배지로 실험을 수행하였다. 생산배양 조건은 성장배양 때와 마찬가지로 28°C, 230 rpm으로 배양하였으며 7일간 배양한 후 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성을 확인하였다. 배지의 열 멸균 시에 발생하는 현상인 침전과 갈변현상의 방지를 위해서 무기염

류와 당을 분류하여 멸균한 후에 무균 상태에서 나머지 생산배지 용액과 혼합하여 사용하였다.

#### AVM B<sub>1a</sub> 추출 및 정량 분석

AVMs를 추출하기 위하여 10 ml의 *S. avermitilis* 배양액을 동량의 methanol을 첨가하여 혼합한 후에, 12시간 동안 230 rpm, 28°C의 진탕배양기에서 추출한 후, 15,000 rpm에서 20분간 2번 원심 분리하여 AVM B<sub>1a</sub>를 포함하고 있는 1 ml의 상등액을 취해 HPLC 정량분석을 실시하였다. AVM B<sub>1a</sub> 표준용액으로는 순수한 AVM B<sub>1a</sub>를 100~500 mg/l의 농도로 methanol에 용해하여 사용하였고, HPLC 운전 조건은 다음과 같다: column은 Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 µm) (Kanto Chemical Co., Japan)을 사용하였고, Mobile phase는 85% methanol과 15% 증류수로 구성된 혼합용액을 사용하였으며, 유속은 1.2 ml/min로 하였다. Column 온도는 40°C로 고정하였고, UV absorbance detector (Younglin Co., Korea)를 이용하여 246 nm에서 시료 내의 AVM B<sub>1a</sub>를 검출하였다.

#### UV 변이 처리 방법

UV 변이처리 방법으로서 포자형성 배지인 ISP 사면배지에 자란 포자를 증류수로 수거한 뒤 주사기 여과를 거쳐서 순수한 포자를 얻었다. 그리고 hemocytometer를 이용하여 회수한 포자를 계수한 뒤 rocker 위에 포자 현탁액 8 ml가 담겨있는 멸균된 유리 petri-dish를 올려놓은 후 온화하게 혼합하면서 UV를 조사하였다. UV 처리는 암소에서 254 nm의 15 W UV lamp (VIBER LOURMAT Co., VL-215C) 2개를 20 cm 거리에서 0~300초 동안 30에서 50 초 간격으로 조사하였다. 그 후 0.1 ml씩 agar plate에 도말하여 각각의 조건에서 colony를 계수하여, UV를 처리하지 않은 control에 대한 백분율을 구하여 생존율이 99.9%인 UV 처리시간을 변이조건으로 이용하였다. 즉 UV를 20 cm 거리로 유지하고 각 시간 별로 조사한 결과 270초에서 생존율이 99.9%임을 확인하여 이 조건하에서 *S. avermitilis*에 대한 UV 변이처리를 수행하였다.

#### NTG 변이 처리 방법

NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 변이 처리방법은 UV 변이 처리방법과 동일한 과정을 통해 회수한 포자를 pH 9.0인 TM (Tris-Malate) buffer에 현탁 한 후 0~3 mg/ml의 농도로 methanol에 녹인 NTG를 첨가하여 60분간 반응시킨 후 0.1 ml씩 agar plate에 도말하였다. 각각의 조건하에서 colony를 계수하여 NTG를 처리하지 않은 control에 대한 백분율을 구하여 생존율이 99.9%인 NTG 처리 농도를 변이조건으로 이용하였다. 즉 처리시간은 60분으로 유지하고 각 농도 별로 NTG를 처리한 결과 2 mg/ml의 농도에서 생존율이 99.9%임을 확인하여 이 조건을 NTG 변이 조건으로 결정하였다.

#### 지방산 생합성 저해제와 아미노산 유사물질 저항성균주 분리 방법

본 실험에서는 지방산 생합성 저해제와 isoleucine 유사

체를 이용하여 rational screening을 수행하고자 하였다. 지방산 생합성 저해제에 대한 저항성 균주를 분리하기 위해 먼저 ISP 사면배지에서 자란 포자를 증류수로 수거한 뒤 주사기 여과를 거쳐서 순수한 포자를 회수하였다. 박테리아의 지방산 생합성 저해물질은 *p*-flouro phenoxy acetic acid (pFAC)를 사용하였고 isoleucine의 아미노산 유사체는 *O*-methyl threonine (OMT)을 이용하였다. pFAC 및 OMT에 대한 저항성을 띄는 변이주를 얻고자 UV와 NTG를 각각 처리하여 실험을 수행하였다. pFAC은 100~1,200 ppm, OMT는 20~100 ppm의 농도로 점차 증가시켜 저항성 균주를 선별하였다. 배지 성분에 의한 변이주의 성장을 억제하기 위해 최소배지를 이용하였다. 최소배지의 조성은 다음과 같다: glycerol 5.0 g/l, NaCl 2.0 g/l, KNO<sub>3</sub> 1.0 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.534 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.272 g/l, agar 20 g/l, trace element 1.0 ml/l. Trace element: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g/l, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.1 g/l, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g/l. 선별된 colony를 포자형성 배지로 옮겨 28°C에서 7일 동안 배양한 후 포자를 회수하여 성장배지에서 48시간 배양한 후 생산배지에 접종하여 7일간 배양하여 HPLC 정량 분석을 통해 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 확인하는 절차를 거쳐 고 생산 변이주를 선별하였다. 선별된 colony를 포자 형성 배지로 옮겨 매 실험마다 균주의 보관용으로 한천사면배지에 접종하였다.

#### Miniature 배양실험

고생산 균주의 선별에 있어서 중요한 것은 rational screening 방법으로 접근해가면서 가능한 한 짧은 시간 내에 많은 균주를 선별하여 생산성을 확인하는 것이다. 일반적으로 수행하던 shake flask 배양의 경우 250 ml flask에 50 ml의 배지를 사용하는데, 이러한 방법은 배지의 양과 실험수행의 공간적인 문제 그리고 많은 실험기자재의 확보가 선행되어야 한다. 그러나 본 실험실에서 확립한 소규모 배양 실험의 경우 세포 성장단계와 생산단계는 직경 30 mm의 test tube에 10 ml를 첨가하여 배양하였다. 그 결과 기존의 삼각플라스크를 사용하는 실험방법보다 많은 저항성 변이주들을 선별할 수가 있었고, 이들로부터 AVM B<sub>1a</sub> 고생산 변이주를 선별할 수 있었다. Rational screening 방법에 근거하여 우선 지방산 생합성 저해제와 아미노산 유사물질에 저항성을 띄는 단일 균주를 얻어 두 개의 포자형성 agar slant에 접종하여 7일간 배양하여 하나의 사면배지는 stock 보관용으로 4°C에 보관하고, 다른 하나의 사면배지는 10 ml의 성장배지의 seed로 접종하여 48시간동안 배양하였다. 다시 10 ml의 생산배지에서 7일간 배양한 후 HPLC를 이용하여 고생산 변이주를 선별하였다.

#### 결과 및 고찰

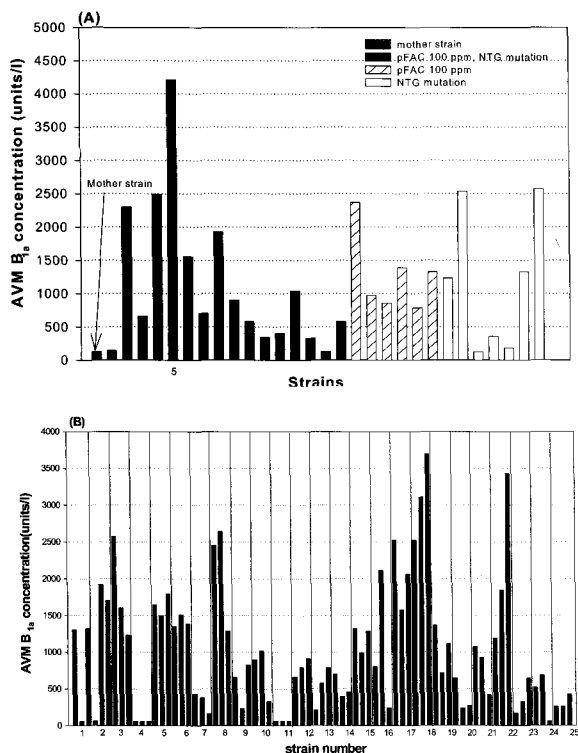
##### 소규모 배양을 통한 생산균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생합성 능력 확인

AVM B<sub>1a</sub> 고생산 균주를 얻기 위해 모세포로 사용된 *S. avermitilis* ATCC 31272의 변이주에 대해 NTG를 이용하여

돌연변이를 유도하여 지방산 합성 저해제인 pFAC 100 ppm에 대한 저항성 변이주를 획득하였다. 모균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성은 약 100 units/l로 매우 낮은 반면, 돌연변이주들의 생산성은 매우 다양하였다. 특히 pFAC 100 ppm에 대한 저항성을 보인 변이주인 5번 균주는 약 4,200 units/l의 AVM B<sub>1a</sub>를 생합성하였다(Fig. 3A). 다양한 대사산물을 생산하는 방선균은 산업적으로 매우 가치가 있음에도 불구하고 그 유전적 불안정성으로 인해 산업 균주의 개발이 매우 어렵다고 알려져 있다. 대부분의 방선균의 chromosome은 다른 박테리아와는 달리 linear 형태를 띠고 있고, 균사 내에 여러 개의 chromosome이 다량 존재하는 ceonocyte로써, homologous recombination과 deletion 현상이 매우 높은 빈도로 일어난다(16). 따라서 pigmentation, sporulation 그리고 이차대사산물의 생합성 능력과 같은 genotypic marker가 급격히 변하는 현상을 관찰할 수 있다(17). Fig. 3A의 5번 균주의 단일 포자들을 얻은 후 2일 동안 성장배지에서 배양한 후, 3개의 동일한 생산배지에 동일하게 접종하여 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 확인하였다(Fig. 3B). 그 결과 동일한 배양 조건에도 불구하고 생산 tube마다 다른 생산성을 보였다. 즉 생산균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산 재현성이 매우 낮은 것으로 확인되었다. 본 결과는 생산 균주의 유전적 불안정성에서 기인한 것으로 판단된다. 따라서 고역가 AVM B<sub>1a</sub> 생산균주를 개발하기 위해서는 지속적인 screening과정과 유전적으로 안정적인 변이주의 개발이 필수적이다.

중 대사물이거나 중간 대사물인 전구체로부터 유도된다(18). 이는 2차 대사산물 생합성에 필요한 기질을 공급해주는 1차대사의 활성을 조절해 주는 기작이 생산균주의 2차대사 활성에도 심각하게 영향을 미칠 수 있음을 암시한다. Chen(19) 등은 clavulanic acid의 전구체인 ornithine과 glycerol을 배양 중 첨가하여 clavulanic acid 생산성이 약 2배 증가한 결과를 얻었고, *Claviceps species*의 배양을 통한 ergot alkaloid 생산에서도 전구체인 tryptophan 첨가에 의한 ergot alkaloid 생합성 증가 현상이 나타났다(20). 상기의 예와 같이 이차대사산물의 전구체를 배양액에 첨가하여 그 생산성을 증가시키는 방법 이외에 특정 전구체를 과량 생산하는 변이주를 개발하는 시도 또한 계속되고 있다. Zvenigorodskii 등(21)은 virginiamycin의 전구체인 phenylalanine 유사체(*m*-fluorophenylalanine)에 대한 저항성 균주를 선별한 결과, virginiamycin 생산성이 모균주에 비해 약 25% 증가한 변이주를 획득할 수 있었다. 또한 rifamycin-B 생산균주인 *Amycolatopsis mediterranei* XC 1-02를 지속적으로 screening을 통해 고역가 돌연변이주를 선별하여 생리적 특성을 조사한 결과, 고역가 변이주는 rifamycin-B의 전구체인 propionate를 다량 합성하는 것을 확인 할 수 있었다(22). 본 결과는 전구체가 과량 합성될 경우 목적 이차대사산물 또한 다량 생산될 수 있다는 가능성을 암시한다.

서론에서 언급했던 것처럼 isoleucine 유사체인 OMT에 대한 저항성 변이주는 AVMs 중 small "a" component의 전구체인 isoleucine을 과량으로 생합성하여 궁극적으로 AVM B<sub>1a</sub>를 과량 생산할 수 있을 것으로 보인다. 이러한 전략에 따라 이전의 random screening에 의해 획득한 18번 균주(Fig. 3B)를 PFA-1으로 명명하고 NTG에 의해 돌연변이를 유도하여 isoleucine antimetabolite인 OMT (*O*-methyl threonine)에 대한 저항성 균주를 선별하기 위해 최소배지에 여러 농도의 OMT를 첨가하여 실험하였다(Fig. 4A). OMT가 10~80 ppm 농도로 첨가된 배지에서 생존한 colony에 대한 생산성을 확인해 본 결과, AVM B<sub>1a</sub> 생산성은 0~7,000 units/l로 다양한 생산성을 보였고 이 중 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 증가된 변이주가 있는 반면 모균주보다 낮은 생산성을 보이는 균주도 관찰되었다. 한편 한번의 실험으로 변이주의 저항성을 급격히 증가시킨 경우 (OMT 80 ppm), 생산성이 오히려 모균주인 PFA-1보다 낮은 것을 볼 수 있다. 이러한 현상은 균주 개발에 있어서, 계획적이고 체계적으로 저항성을 증가시켜야 생산성 또한 유사하게 증가한다는 것을 제시해주고 있다. 본 실험의 결과 AVM B<sub>1a</sub> 생합성 능력이 우수한 2개의 균주를 분리하였다. 지속적인 돌연변이와 screening에 의해 모균주보다 생산성이 증가한 변이주를 선별할 수 있었지만, 모균주가 AVM B<sub>1a</sub> 생산의 불안정성을 보였기 때문에 생산의 안정성을 확인해 보았다. Fig. 4B는 선별된 몇 종의 변이주를 성장배지에서 배양한 후에 동일한 조성의 3개의 생산배지에 접종하여 배양한 후 (triplicate 배양), AVM B<sub>1a</sub>의 생합성량을 비교한 결과이다. 각각의 변이주마다 약간의 생산성 차이는 있었지만, OMT 500 ppm에서 저항성을 띄었던 H 균주는 약 9,000 units/l의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 보였다. 본 결과는 균주 개발 초기 균주인 PFA-1 (최대 4,200 units/l)보다 AVM B<sub>1a</sub>



**Figure 3.** AVM B<sub>1a</sub> production by various mutants (A) resistant to pFAC in test tube cultivation and (B) derived from further random screening in triplicate test tube cultivations (10 ml culture volume).

**아미노산유사체 저항성 변이주 선별**

일반적으로 대다수의 2차 대사산물은 1 차 대사산물의 최

생산성이 2배 이상 증가했을 뿐만 아니라 triplicate 실험에서도 거의 동일한 생산성을 보여, 생산 안정성 또한 크게 증가하였다.

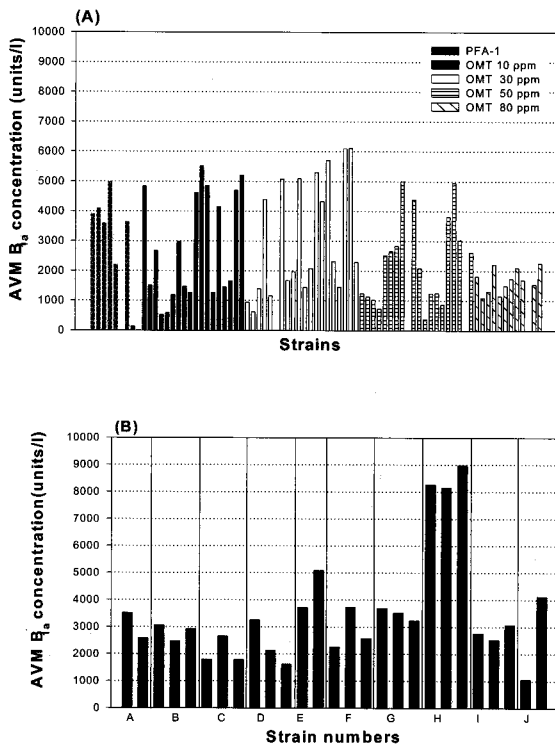


Figure 4. AVM B<sub>1a</sub> production by (A) OMT resistant mutants in test tube cultivation and (B) various strains derived from rational screening method in triplicate test tube cultivations (10 ml culture volume).

지속적으로 OMT에 대한 저항성을 증가시키기 위해 H 균주를 ENP-1.78로 명명하고 NTG를 이용하여 돌연변이를 유도한 후, OMT 80 ppm의 OMT가 첨가된 고체배지에서 배양하였다. 생존한 colony들의 AVM B<sub>1a</sub>의 생합성 능력을 확인한 결과(Fig. 5A), AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 소실된 변이주도 선별되었지만, 모균주에 비해 약 20% 향상된 생산성을 보이는 변이주를 선별할 수 있었고 이 변이주를 ENP88-69이라 명명하였다. 또한 이번 실험의 모균주였던 ENP-1.78을 돌연변이를 유도하지 않고 random screening한 결과 선별된 colony들의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 약 5,000 units/L로 거의 일정한 것을 확인할 수 있었다. 이는 초기 불안정한 모균주에서는 관찰할 수 없었던 현상으로, 변이주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산에 있어서 안정성이 크게 증가되었음을 제시해주는 결과이다. 연속적인 액상배양에 의해 genetic marker가 소멸되는 생산균주의 유전적 특성에 비추어 볼 때(23), 본 결과는 매우 고무적이라고 할 수 있다. 연속적으로 저항성을 높이기 위하여 ENP88-69을 OMT 100 ppm의 농도에서 저항성 돌연변이주를 선별하였다(Fig. 5B). 그 결과, 모균주에 비해 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 약 2배 증가한 (9,200 units/l) 돌연변이주를 획득할 수 있었다.

Fig. 6에 OMT의 농도에 따른 변이주들의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성에 대한 histogram을 나타내었다. 초기에 screening된 불

안정한 돌연변이주 (A)의 대부분이 0~4,000 units/L로 낮은 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 보이는 반면, OMT의 농도를 높여가며 돌연변이를 유도한 결과 선별된 변이주 (B, C)는 고생산성인 균주들의 비율증가로 인해 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 나타내는 x축의 오른쪽으로 치우치고 생산 재현성 또한 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

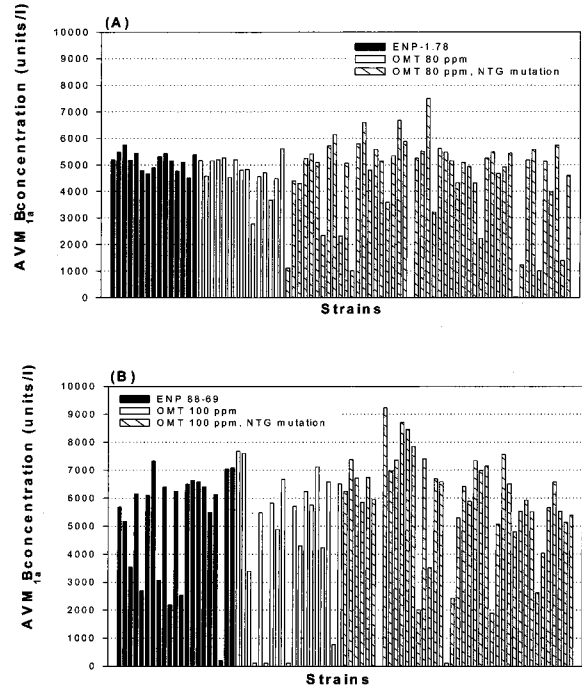


Figure 5. AVM B<sub>1a</sub> production by resistant mutant against (A) 80 ppm and (B) 100 ppm of OMT in test tube cultivations (10 ml culture volume).

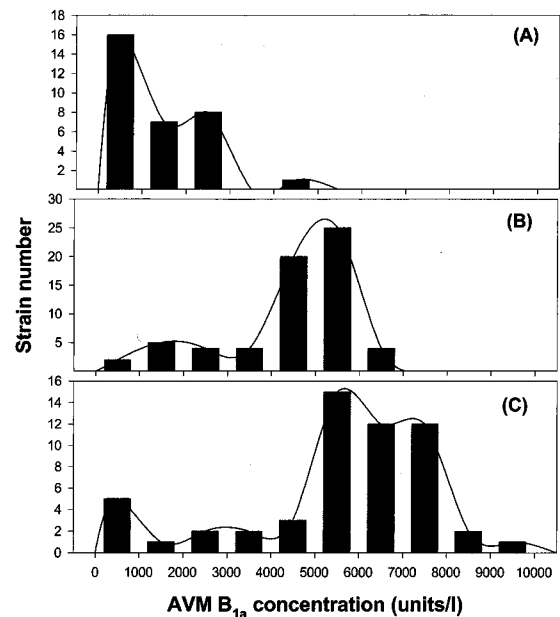
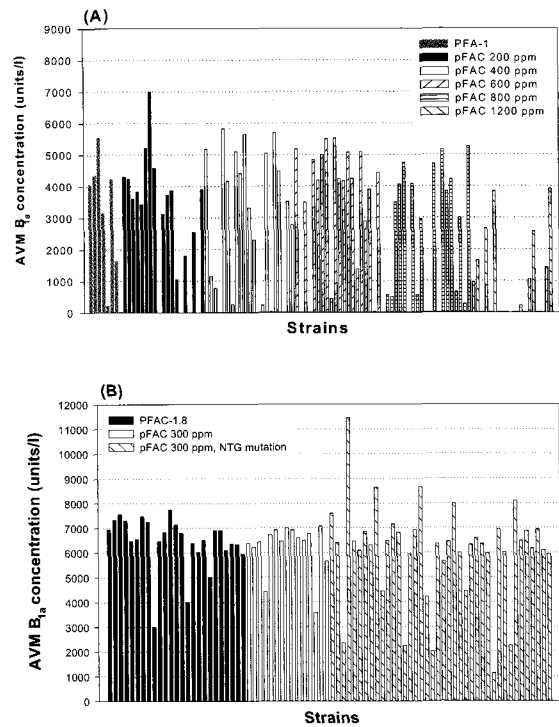


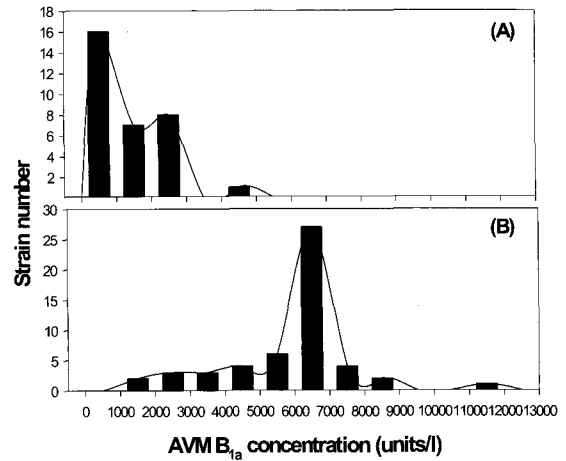
Figure 6. Histograms for (A) initially screened unstable mutants, and stable mutants derived from treatment of (B) 80 ppm and (C) 100 ppm of OMT.

**지방산 생합성 저해제 저항성 변이주 선별**

Polyketide 계열 물질의 생합성은 지방산의 생합성 경로와 많은 부분을 공유하고 있다. 따라서 지방산 합성 저해제에 대한 저항성 변이주는 지방산 합성량이 낮아도 생존 가능한 균주이거나 지방산과 polyketide 대사산물의 생합성이 동시에 증가된 균주일 가능성이 높다. 콜레스테롤 저하 물질인 lovastatin을 생합성하는 *Aspergillus terreus* 균주 개발 과정 중 지방산 합성 저해제인 cerulenin에 대한 저항성 변이주를 선별한 결과, lovastatin 생산성이 모균주에 비해 약 30% 증가한 변이주를 획득할 수 있었다(24). 본 연구에서는 PFA-1 (4,200 units/L)을 모균주로 하여 pFAC의 농도에 따른 저항성 균주를 선별하였다. 200~1,200 ppm의 pFAC를 최소배지에 첨가하여 pFAC에 대한 저항성 변이주들을 살펴본 결과 다양한 생산성을 나타내었다(Fig. 7A). OMT 저항성 변이주들과 마찬가지로 모균주보다 AVMB<sub>1a</sub> 생산량이 약 7,000 units/l을 보이는 균주가 있는 반면 생합성을 하지 못하는 균주도 관찰되었다. 이 중 가장 높은 AVMB<sub>1a</sub> 생산량을 보였던 pFAC 200 ppm의 저항성 균주를 PFAC-1.8 (7,000 units/l)이라 명명하였다. 계속적으로 저항성을 증가시키기 위하여 이 변이주를 모균주로 하여 300 ppm의 pFAC에 대한 저항성 변이주들을 얻었고(Fig. 7B), AVMB<sub>1a</sub> 생산량이 약 1.5배 증가한 균주(11,000 units/l)를 선별하여 pFAC 182라고 명명하였다. 또한, OMT 저항성 변이주들과 같이 돌연변이를 유도하지 않고 random screening으로 선별한 colony들의 생산성이 거의 일정한 것을 확인할 수 있었는데 (약 7,000 units/l), 이는 pFAC 저항성 변이주 또한 초기 모균주보다 안정성이 크게 증가하였음을 제시해 주는 결과이다. Fig. 8은 지방산 생합성 저해제인 pFAC를 이용하여 rational screening을 수행한 종합적인 결과이다. OMT 저항성 균주와 마찬가지로, 낮은 AVMB<sub>1a</sub> 생합성량을 보였던 초기 모균주에 비해 생산성 및 안정성이 월등히 증가한 것을 볼 수 있다. 한편 생산균주의 보관과 취급 및 배지조성 등과 같은 배양 환경적 요인이 변화할 경우, 비록 고생산성 변이주라 하더라도 그 생산성이 크게 변화하는 현상이 나타났다. 이는 방선균이 가지고 있는 유전적·생리적인 특성 뿐만 아니라, 구조가 매우 유사한 AVMB<sub>1a</sub>들이 동시에 생합성되기 때문으로 판단된다. 따라서 AVMB<sub>1a</sub>의 산업적 생산을 위해서는 8가지 AVMB<sub>1a</sub> 복합체 중 B<sub>1a</sub>만을 생합성하는 방향성 변이주 개발이 필요할 것으로 판단되고 안정적인 AVMB<sub>1a</sub> 생산을 위해서 catabolite repression을 크게 받는 생산균주의 배양을 위한 통계학적 방법의 배지 최적화가 이루어져야 할 것이다. 일반적으로 대부분의 intracellular product는 최종 산물에 의해 feedback inhibition 혹은 repression을 받게 되어 일정량 이상이 생합성되면, 더 이상의 생합성이 불가능해지는 현상이 종종 발견된다. 이러한 현상을 균주 개량을 통해 극복하기 위해 연구를 지속적으로 수행한 결과, 본 연구진은 특정한 조건에서 AVMB<sub>1a</sub>가 세포 외로 분비되는 고무적인 현상을 발견하였다. 앞으로 본 현상에 대한 집중적인 연구가 진행 될 경우, 고생산성 고분비성 생산균주에 의한 AVMB<sub>1a</sub> 생산성의 극대화를 이룰수 있는 발효·추출 병행 생물공정이 개발될 수 있을 것으로 기대된다.



**Figure 7.** AVMB<sub>1a</sub> production by resistant mutants against (A) various concentrations and (B) 300 ppm of pFAC in test tube cultivations (10 ml culture volume).



**Figure 8.** Histograms for (A) initially screened unstable mutants and (B) stable mutants derived from treatment of 300 ppm of pFAC.

**요 약**

AVMB<sub>1a</sub>는 *Streptomyces avermitilis*가 생합성하는 이차대사산물로, 강력한 구충효과를 갖는 polyketide 계열의 물질이다. AVMB<sub>1a</sub> 생합성의 전구체로 isoleucine이 사용되고 AVMB<sub>1a</sub>의 생합성 경로가 지방산 합성과 유사하므로, 전구체를 과량생합성하고 polyketide 생합성 경로로 진행되는 탄

소원의 흐름이 증가된 변이주를 선별하기 위하여 isoleucine의 아미노산 유사체 (O-methyl threonine)와 지방산 합성 저해물질 (*p*-fluoro phenoxy acetic acid)에 대한 저항성 변이주를 선별하고자 하였다. 모균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성은 약 100 units/L로 매우 낮은 반면, 100 ppm의 pFAC에 대한 저항성 변이주인 PFA-1는 약 4,200 units/l의 AVM B<sub>1a</sub>를 생산하는 것으로 관찰되었다. 이 균주를 모균주로 하여 OMT에 대한 저항성을 지속적으로 증가시킬 경우 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 2배 더 증가한 약 9,000 units/l의 생합성 능력을 보이는 고생산성 변이주를 개발할 수 있었다. 또한 주목할 만하게도 지방산 저해물질인 pFAC에 대한 변이주의 저항성을 지속적으로 증가시킴으로써 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 11,000 units/L에 이르는 고역가 변이주를 선별할 수 있었다. 한편 상기의 OMT와 pFAC를 이용한 rational screening 전략을 통해 지속적으로 선별한 변이주들에 대한 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성 분포를 histogram을 통해 분석해 본 결과, 초반부에 선별된 돌연변이주들은 AVM B<sub>1a</sub>의 생합성 능력에 있어서 거의 모두가 (95% 이상) 4,000 units/l 이하의 비교적 낮은 범위에 분포하는 반면, OMT와 pFAC의 농도를 높여가며 유도된 저항성 돌연변이주들의 경우에는 이들 중에 고생산성 균주의 비율이 뚜렷하게 증가 (OMT에서 5,000~7,000 unit/l 범위에 71%; pFAC에서 6,000~7,000 unit/L 범위에 47%) 하는 것으로 확인되었다. 이로부터 polyketide 생합성 경로와 AVM B<sub>1a</sub>의 생합성 경로의 이해를 통해 수행된 rational screening 전략이 AVM B<sub>1a</sub> 고생산성 뿐만 아니라 고 안정성의 특성을 갖는 균주를 선별하는데 매우 효율적임을 알 수 있었다.

## REFERENCES

1. Yoon, Y., E. S. Kim, Y. S. Hwang, and C. Y. Choi (2004), Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 626-634.
2. Kohler, P. (2001), The biochemical basis of anthelmintic action and resistance, *Int J Parasitol.* **31**, 336-345.
3. Campbell, W. C., M. H. Fisher, E. O. Stapley, and G. Albers-Schonberg (1983), Ivermectin: A potent new antiparasitic agent, *Science* **221**, 823 - 828.
4. Chen, S. T., O. D. Hensens, and M. D. Schulman (1989), Biosynthesis, In Ivermectin and abamectin, W. C. Campbell, Ed., p51, Springer-Verlag, New York.
5. Song, S. K. (2002), Development of high yielding stable mutants for avermectin B<sub>1a</sub> production through rational screening method and examination of their fermentative physiological characteristics, M. S. Thesis, Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon.
6. Nielsen, J. (1998), The role of metabolic engineering in the production of secondary metabolites, *Curr Opin Microbiol.* **1**, 330-336.
7. Curdova, E., V. Jechova, J. Zima, and Z. Vanek (1989), The effect of inorganic phosphate on the production of avermectin in *Streptomyces avermitilis*, *J. Basic Microbiol.* **29**, 341-346.
8. Ikeda, H., H. Kotaki, H. Tanaka, and S. Omura (1988), Involvement of glucose catabolism in avermectin production by *Streptomyces avermitilis*, *Antimicrob Agents Chemother.* **32**, 282-284.
9. Mironov, V. A., A. V. Sergeeva, A. V. Gavrilina, and V. N. Danilenko (2003), Dependence of the composition of the avermectin complex of *Streptomyces avermitilis* on glucose content of the growth medium, *Prikl Biokhim Mikrobiol.* **39**, 208-212.
10. Schulman, M. D., D. Valentino, and O. Hensens (1986), Biosynthesis of the avermectins by *Streptomyces avermitilis*. Incorporation of labeled precursors, *J Antibiot (Tokyo)* **39**, 541-549.
11. Lyutskanova, D. G., M. M. Stoilava-Disheva, and V. T. Petekova (2005), Increase in tylosin production by a commercial strain of *Streptomyces fradiae*, *Appl Biochem Microbiol.* **41**, 165-168.
12. Malina, H., C. Tempete, and M. Robert-Gero (1985), Enhanced sinefungin production by medium improvement, mutagenesis and protoplast regeneration of *Streptomyces incarnatus* NRRL 8089, *J. Antibiot (Tokyo)* **38**, 1204-1210.
13. Fiedurek, J., J. Rogalski, and Z. Ilczuk (1990), Intensification of glucose oxidase synthesis with *Aspergillus niger* by way of mutistage mutagenization, *Acta. Biotechnologica* **10**, 357-362.
14. Rowlands, R. T. (1984), Industrial strain improvement: rational screens and genetic recombination techniques, *Enzyme Microbial Technol.* **6**, 290-300.
15. Demain, A. L. (2000), Microbial biotechnology, *Trens Biotechnol.* **18**, 26-31.
16. Volff, J. N. and J. Altenbuchner (1998), Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome, *Mol Microbiol.* **27**, 239-246.
17. Novak, J., J. Kopecky, O. Kofronova, and Z. Vanek (1993), Instability of the production of avermectins, sporulation, and pigmentation in *Streptomyces avermitilis*, *Can J. Microbiol.* **39**, 265-267.
18. Drew, S. W. and A. L. Demain (1977), Effect of primary metabolites on secondary metabolism, *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 343-356.
19. Chen, K. C., Y. H. Lin, J. Y. Wu, and S. J. Hwang (2003), Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding, *Enzyme Microbial Technol.* **32**, 152-156.
20. Krupinski, V. M., J. E. Robbers, and H. G. Floss (1976), Physiological study of ergot: Induction of alkaloid synthesis by tryptophan at the enzymatic level. *J. Bacteriol.* **125**, 158-165
21. Zvenigorodskii, V. I., B. V. Tiaglov, and T. A. Voeikova (2001), Isolation of peptide antibiotic virginiamycin components and selection of their producer *Streptomyces virginiae*, *Prikl Biokhim Mikrobiol.* **37**, 301-308.
22. Jin, Z. H., J. P. Lin, Z. N. Xu, and P. L. Cen (2002), Improvement of industry-applied rifamycin B-producing strain, *Amycolatopsis mediterranei*, by rational screening, *J. Gen Appl Microbiol.* **48**, 329-334.
23. Gravius, B., T. Bezmalinovic, D. Hranueli, and J. Cullum (1993), Genetic instability and strain degeneration in *Streptomyces rimosus*, *Appl Environ Microbiol.* **59**, 2220-2228.
24. Park, S. O. (2000), Establishment of screening procedure for high yielding mutants of lovastatin, and studies on their fermentation properties, M. S. Thesis, Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon.