

## 항생물질 생산 방선균의 역가 개량에 관하여

閔 庚 喜

(淑明女子大學校 理科學 生物學科)

### Improvement of Antibiotic-Producing *Streptomyces*

Min, Kyung Hee

(Dept. of Biology, college of Sciences, Sook-Myung Women's University)

#### 緒 論

미생물이 생산하는 대사산물중에는 인류의 건강과 영양뿐만 아니라 생물의 생리활성물질로서도 중요한 것들이 많이 발견되었다. 그중에서도 항생물질은 인류의 질병 치료에 이바지하여 왔으며 현재에도 새로운 항생물질과 새로운 균주의 screening작업이 진행되고 있다.

이렇게 자연계에서 분리한 균주는 역가가 낮아서 그대로는 쓸수 없다. 또한 고역가의 항생물질생산균을 장기간 사용하면 그 역가가 감소하게 되어 고역가로 높이지 않으면 안된다. 이런점에서 항생물질생성방선균의 개량은 경제적 중요성을 갖고 있어 생산공업에서 가장 필수적이고 기본적인 핵심이 되고 있는 것이다.

항생물질 생산균의 역가를 높인다는 것인 항생물질을 만들기 위한 개량법은 오랜 동안 연구되어 왔으나 최근에와서 항생물질 생산균의 생리적상태가 어느정도 규명되었고, 생합성의 과정이 밝혀지고, 또한 세균의 분자유전이나 대사제어의 지식이 일반화됨에 따라 새로운 시도가 보고되어 왔다.

여기서는 항생물질생성균의 육종 법과 함께 새로운 역가 향상법의 경향에 대하여 검토하고자 한다.

#### 배양조건의 이해

여러가지 항생물질은 미생물의 대사산물로서 생산미생물을 발효시키면 배양액 중에 축적되는 것이다. 어느 미생물이 항생물질을 생산하는 것은 그 미생물의 생리학적 특징으로, 이런 미생물들을 자연계에서나 인공돌연변이에 의하여 찾아내고 있는 것이다. 그러나 이들 미생물은 배양조건에 따라서 항생물질 생산량이 다르므로 최대의 항생물질생산 배양조건을 찾지 않으면 안된다. 배양조건의 이해는 항생물질 생산균의 개량을 위한 가장 빠른 첩경인 것이다.

항생물질의 생산은 일차대사산물의 아미노산이나 유기산 발효와는 달리 대사제어의 기작이 해명되어 있지 않다. 그러므로 배지 조성이나 배양조건의 검토가 필요하게 되는데 탄소원, 질소원, 무기염류, 비타민 등의 종류와 농도, pH, 온도, aeration, incubation시기 등이 검토되어야 한다. 질소원중에서도 암모니아성질소나 peptone에 따라서도 항생물질 생산능력이 다르며 탄소원중에서도 다른당보다 starch가 보다 효과적이다 또한 대부분의 항생물질 생산균은 자기양분을 소비하고난 log phase 후기부터 항생물질을 생산하므로 그 상태에서의 방선균의 생리학적 특성을 조사하는 것도 중요한 일이다. 아미노산 배당체 항생물질과 chlor-tetracycline 생산방선균만을 대상으로 하여 항생물질을 생산할 때의 생리적 상태를 살펴보고자 한다.

## 1. 아미노산 배당체 항생물질

일반적으로 아미노산 배당체 항생물질의 생산은 탄소원으로서는 glucose를 사용하면 생산량이 낮고 starch를 사용하면 높은 것으로 알려졌다(Majumdar *et al.*, 1967, Bhadra *et al.*, 1973). 이같이 glucose에 의하여 생산이 억제되는 것은 catabolite repression으로 설명되는데, neomycin 이외에도 penicillin (Davey *et al.*, 1953), cephalosporin(Dark-

en *et al.*, 1959), actinomycin(Marshall *et al.*, 1968), mitomycin(De Moss *et al.*, 1967) 등에서도 보고 되었다.

Levitov 등은 neomycin 생산균을 배양할 때에 탄소원으로서는 glucose, starch를 넣어 배양한후 phosphorus, ribose, nucleic acid, carbohydrate 등의 균체성분을 비교 검토하였다(Levitov *et al.*, 1968, 1969, Makarova *et al.*, 1969).

Table 1에서 보여주는 바와같이 ribose

Table 1. The contents of mycelium and neomycin production in starch and glucose media. (Makarova *et al.*, 1969)

	Starch medium			Glucose medium		
	24	72	120(hr)	24	72	120(hr)
pH	8.3	8.5	8.3	7.4	7.7	8.1
Neomycin( $\mu$ g/ml)			1740			310
Mycelium( $\mu$ g/ml)	699	1188	1034	272	433	402
Phosphorus*	0.52	0.76	0.71	1.99	1.61	1.00
Ribose*	0.43	0.33	0.32	3.47	2.38	1.76
Nucleic acid*	2.68	2.36	2.03	12.66	5.54	3.85
Carbohydrate*	56.50	44.90	35.90	5.40	5.50	5.70

\* : % of dry mycelium weight

합량과 neomycin생산은 반비례의 관계에 있는 것이다. 그러나 carbohydrate양과 neomycin 생산과는 비례하는 경향을 보여주었다.

또한 neomycin의 구성성분인 ribose의 양은 glucose medium에서는 균체에 많이 포함되어 있으며, starch medium에서는 neomycin에 많이 포함되어 있음을 알았다. 그러나 ribose를 두가지 media에 첨가하여 주었더니 neomycin생성이 현저히 억제되었다. 그러나 다른당을 첨가했을 때는 이런 억제 현상은 볼 수 없었다.

이상의 결과로부터 미루어보아, 전분은 천천히 소비되므로 catabolite repression을 받지 않고 그대로 다량의 starch가 균체에 축적되어 있다가 균자체가 일차대사를 이차대사로 유도하여 neomycin을 형성하는 것으로 생각된다. 그런데 이 과정은 ribose에 의하

여 저해되는 것으로 추측된다.

## 2. Chlortetracycline (CTC)

Hostalek *et al.* (1973)은 chlortetracycline 생산조건을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 배지 조성중 인산은 좁은 범위의 농도에서만 효과가 있으며 배양초기의 통기는 chlortetracycline의 생산에 보다 효과적이다. 또한 benzyl thiocyanate를 첨가하면 chlortetracycline생산은 증가한다(Table 2).

*S. aureofaciens*의 당소비를 고찰하여 보면 chlortetracycline 저생산조건에서는 균의 당소비경로는 glycolysis를 통하여 소비되는 당이 비교적 많다. 그러나 chlortetracycline의 고생산조건에서는 benzyl thiocyanate가 존재하면 pentose cycle의 방향으로 당이 소비되는 것으로 해석된다.

**Table 2.** Influence of interrupted aeration and benzyl thiocyanate on the production of chlortetracycline in different strains of *S. aureofaciens*

(Hostalek *et al.*, 1973)

Strain	Interrupted culture <sup>b</sup>		Benzyl thiocyanate <sup>c</sup>		Control μg/ml
	μg/ml	% of control	μg/ml	% of control	
Bg	137	15	2005	223	897
111158	605	34	2780	157	1775
8425	1710	51	4450	133	3328

a ; Sucrose-cornsteep-soybean meal medium

b ; The aeration was stopped every hour for 10 min between 6 and 12hr of cultivation

c ; 12 μM

또한 같은 균주를 재료로하여 TCA cycle의 각효소의 활성을 검토한 결과 고생산주의 TCA cycle에 관여하는 각효소의 활성은 낮았다. 저생산주에 benzyl thiocyanate를 첨가하여 배양하면 배양역가는 증대하나 TCA cycle계 각효소의 활성은 낮았다(Hostalek *et al.*, 1973).

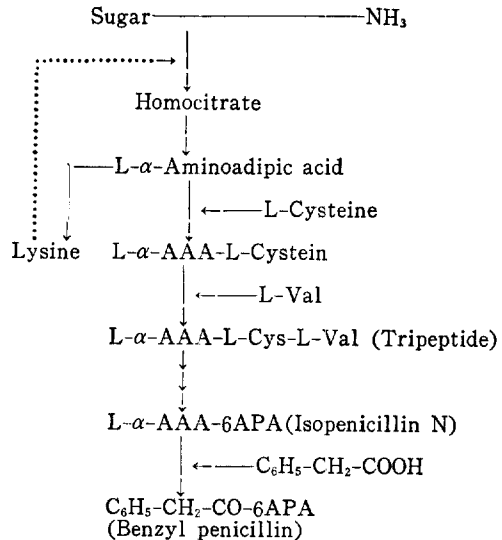
이상 chlortetracycline도 당소비가 억제된 상태에서 생산이 잘되는데 이것은 neomycin의 catabolite repression과 동일한 결과로 생각된다.

**3. Feed back inhibition**

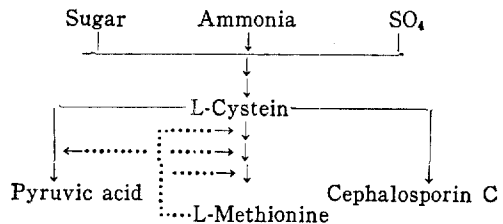
미생물발효에 있어서 일차대사산물의 생성은 일반적으로 feed back inhibition에 의하여 지배되는 주지의 사실이다. 이차대사산물인 항생물질도 이와같은 원칙에 의해 항생물질생성이 억제됨을 알게 되었다. 예를들면 penicillin fermentation은 lysine에 의해 억제되며 cephalosporin 생성은 L-methionine, chloramphenicol생성에는 phenylalanine과 tyrosine에 의한 inhibition을 들수 있다.

Lysine에 의한 penicillin 생산에 대한 저해는 lysine에 의해 aminoadipic acid의 생성이 저해됨으로서 penicillin의 습성이 저해되는 것으로 생각된다(Demain, 1957; Somerson *et al.*, 1961) (Fig. 1).

Cephalosporin C의 생성은 Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 L-methionine을 배양액중에 넣어주면 촉진된다. 이것은 L-methionine



**Fig. 1.** Possible mechanism of inhibition of penicillin biosynthesis by lysine (Demain, 1966).



**Fig. 2.** Possible mechanism of activation of cephalosporin C biosynthesis by L-methionine (Demain 1966).

이 L-cysteine으로부터 L-methionine으로의 합성경로를 억제하며 또한 L-cysteine 으로부터 pyruvic acid로 가는 pathway를 차단하므로써 L-cysteine은 결국은 cephalosporin C의 경로만으로 생합성이 이루어지는 것으

로 생각된다(Demain, 1966).

### 역가증대를 위한 개량

이같이 배양조건의 해석내지는 이해가 완료된 뒤에야 최대의 항균력증대를 위한 육종 방법이 강구되어야 할 것이다.

대부분이 재래식 방법으로 실시되고 있으나, 최근에 와서는 미생물학의 급격한 발전으로 이러한 항생물질 생산군개량도 새로운 차원에서 이루어져야 한다는 요구로부터 분

자생물학적 및 유전학적연구로 이루어지고 있다. 몇가지 방법을 설명하면 다음과 같다.

#### 1. 돌연변이에 의한 유발

Penicillin 생산균의 개량에 돌연변이 유발제가 사용된 이래로 돌연변이법은 균의 개량에 중요한 재래식 방법으로 되어있다. 돌연변이의 유발제로는 UV, X-선 같은 physical mutagen 외에 Table 3에서 보여 주는 바와 같이 chemical mutagen들이 있다. 종래의

Table 3. Some mutagenic treatments that have produced strains with superior productivity (Thoma, 1971)

Species of microorganism (product)	Mutagenic agent
<i>Penicillium chrysogenum</i> (penicillin)	UV(Ultraviolet irradiation)
"	DEB(Diepoxybutane)
"	UV+DEB
"	UV+EMS(Ethyl methanesulfonate)
"	ACR(Acridine)
"	EMS
<i>Streptomyces griseus</i> (streptomycin)	UV
<i>S. nodosus</i> (amphotericin)	UV
<i>S. noursei</i> (nystatin)	UV
<i>S. umbrinus</i> (diuretic)	NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine)
<i>S. prasinus</i> (prasinomycin)	UV
<i>S. " (prasinomycin)</i>	NTG+UV
<i>S. roseochromogenes</i> (steroid-1,6- $\alpha$ -hydroxylase)	UV
<i>Arthrobacter simplex</i> (steroid-1-dehydrogenase)	UV

생산력증대만을 위하여 사용되던 돌연변이법의 또 하나의 목적은 신항생물질의 발견에 있다. A. Kelner(1949)는 수종의 *Streptomyces*의 포자에 X-선 또는 UV를 조사하여 mutant를 얻었다. 이 mutant가 생성하는 항생물질의 항균 spectrum을 측정하고 원래 균주의 것과는 다른 항균 spectrum을 나타내어 신항생물질을 생산함을 알게 되었다(Kelner, 1949).

돌연변이에 의한 유발은 생존률 20%인것을 종전에 사용하여 왔으나 최근에는 5%의 생존률인 것을 쓰고있다. 수 많은 colony mutant을 하나하나 분리하여 확인하기에는 시간적으로나 경제적으로 무척 어려운

것이므로 medium의 pH를 변화시켜주는가 하여 특이한 형태만을 분리하는 방법외에 몇가지 특수한 방법이 있다.

#### 2. 영양요구주(Auxotroph)에 의한 방법

미생물 발효에 있어서 일반적으로 auxotroph는 항생물질생산력이 약한 것으로 알려져 있으나 그 역으로 생각하면 이점을 이용하여 고역가의 균주를 만드는 일이 가능한 것이다.

Dulaney *et al.* (1967)은 CT(chlortetracycline) 균주를 UV조사하여 항생물질 생산력이 약한 auxotrophs를 얻었다. 이것에 다시 UV를 조사하여 adenine, homoserine, leucine, ornithine의 변이복귀주(protothrophs)

를 얻었는데 이 prototrophs중 원래의 strain 보다 역가가 현저하게 높은 것이 발견되었다.

Auxotroph의 recombination에 관한 연구는 erythromycin에서 연구되어왔으나 성공하지 못하고 TC나 kasugamycin 생산균인 *S. kasugaensis*의 isoleucine과 valine요구주(*ilv*)와 serine auxotroph(*ser*)를 만들어 이를 다시 hybrid prototroph로 만들었는데, 이 중 VS 176은 kasugamycin 생산능이 원래의 균주보다 상당히 높은 역가를 나타내었다(Ichikawa *et al.*, 1971) (Table 4).

Table 4. Kasugamycin productivity of the second generation of *ilv* × *ser* hybrid prototrophs (Ichikawa *et al.*, 1971).

Strain	No. of colonies tested	Average yield ( $\mu\text{g/ml}$ )
0 original		
64S58	80	7320
1 VS176	100	9280
2 VS171	60	7140
3 VS169	60	5850

### 3. Back mutation

Dulaney *et al.* (1967)은 tetracycline(TC) 생산균인 *S. viridifaciens*에 UV를 조사하여 비생산성 mutant를 만들고 이것에 다시 UV를 조사하여 생산성 revertant를 분리하였는데, 이들은 최초 UV조사전의 strain보다 6배나 생산성이 높았으며 이때에 생산균주와 비생산균주의 구별은 colony색으로 쉽게 분간할 수 있었다. 이상의 결과는 비생산균의 불활성화된 효소가 재변이에 의하여 back mutation이 일어나 gene expression으로 생산성이 높아진 것으로 생각된다.

### 4. 항생물질에 관여하는 plasmid

일반적으로 장기간 항생물질 생성균주를 사용하면 그 역가가 저해된다. 이것은 actinophage로부터 기인할수도 있으나, 그 외의 원인의 하나로는 plasmid의 소실에서 오는 것이 아닌가하는 실험적 시도가 있었다(Okanishi *et al.*, 1970). 즉 kasugamycin, oreo-

mycin, chloramphenicol(CAP) 생산균을 고온처리 하였더니 비생산균주가 7%나 생겼다. 아울러 kasugamycin 생산저해와 함께 melanin pigment형성도 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 그런데 melanin pigment형성은 plasmid에 의해 지배되므로 결국 plasmid의 감소는 kasugamycin생산의 감소를 초래하는 결과가 된다. 그후 CAP생산인자는 DNA보다 plasmid에 존재함을 알게 되었다. 최근 Akagawa *et al.* (1975)은 *S. venezuelae*를 재료로 하여 CAP 생산은 plasmid의 존재로서 이루어짐을 알게 되었으며, 8개의 marker를 사용하여 CAP 생성과 melanoid pigment형성과 관련된 mapping에 성공하였는데 CAP 비생산균주는 이같은 linkage map를 갖고 있지 않았다. 몇가지 실험적 근거로서 CAP생성은 plasmid가 조절하나 이 plasmid는 conjugation에 의하여 전달되지는 않았다.

Plasmid가 항생물질 생성에 작용하는 mechanism이 더욱 규명된다면 이것을 이용하여 보다 높은 항생물질 생산능력을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

### 5. 항생물질에 대한 내성과 불활성효소

항생물질 생산균은 자신이 생산한 항생물질에 대하여 내성을 갖게 되는데 그 내성은 생육시기에 따라 상이하여 log phase후기에 가장 높은 내성을 갖는다(Malik *et al.*, 1972).

Streptomycin(SM)생산균은 SM을 인산화하여 불활성화하는 효소를 갖고있다는 보고가 있으며(Nomi *et al.*, 1966) 아미노배당체항생물질의 생산균에도 비슷한 불활성효소가 존재함을 알게 되었다(Benveniste *et al.*, 1973) (Table 5).

SM생산균을 시료로 하여 비교 검토한 결과 SM생산량과 불활성 효소의 활성과는 확실히 비례된 상관을 보여주었으나 내성과 불활성효소활성과의 연관은 명료치 않았다(Nimi *et al.*, 1971) (Table 6). 또한 내성과 배양액중의 phosphatase의 관계도 아직 검토된 바 없다. 그러나 neomycin생산균인 *S.*

**Table 5.** Antibiotic-modifying enzymes present in various aminoglycoside-producing bacteria (Nomi *et al.*, 1969, Benveniste *et al.*, 1973)

Strains	Antibiotics produced	Modifying enzymes
<i>Streptomyces griseus</i> MA-8	Streptomycin(SM)	SPT
<i>S. bikiniensis</i> NRRL	SM	SPT
<i>S. spectabilis</i>	Spectinomycin	KGAT
<i>S. flavopersicus</i>	Spectinomycin	SPT
<i>S. fradiae</i>	Neomycin	NPT
<i>S. albogriseolus</i>	Neomycin	NPT
<i>S. rimosus</i>	Paromomycin	NPT, KGAT
<i>S. ribosidificus</i>	Ribostamycin	NPT, KGAT
<i>Bacillus circulans</i>	Butirosine	NPT
<i>S. kanamyceticus</i>	Kanamycin	KGAT
<i>Micromonospora purpurea</i>	Gentamycin	KGAT
<i>S. tenebrarius</i>	Nebramycin	KNAT

SPT: streptomycin phosphotransferase

KGAT: kanamycin-gentamycin acetyltransferase

NPT: neomycin phosphotransferase

KNAT: kanamycin-neomycin acetyltransferase

**Table 6.** Comparison in streptomycin-phosphorylating activity of four cultures with different productivity of streptomycin (Nimi *et al.*, 1971)

Strain	Streptomycin productivity ( $\mu\text{g/ml}$ )	Streptomycin tolerance ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inactivated ratio (%)
HUT 6037 (parent)	252	500	79
4A-125	25	100	22
A-12	trace	200	0
N-1	0	50	0

\* Inactivated ratio was expressed as a percentage ratio of phosphorylated streptomycin to substrate streptomycin after one hour reaction. Cell-free extract was used as enzyme solution in the reaction mixture.

**Table 7.** Alkaline phosphatase activity of *S. fradiae* and neomycin production(Majumdar *et al.*, 1971)

Medium	Time of harvest (days)	Average wt. of mycelium (mg wt./culture flask)	Alkaline phosphatase activity		Neomycin production in culture filtrates ( $\mu\text{mol/culture flask}$ )
			Specific activity	Total activity	
NaNO <sub>3</sub> -maltose -salts	3	60.0	0.115	6.90	2.50
	5	59.3	0.301	17.85	9.99
	7	39.9	0.386	15.40	14.78
Glycine-maltose -salts	3	32.1	0.023	0.72	0.08
	5	147.8	0.039	5.25	2.45
	7	110.0	0.050	5.58	3.92
Glutamic acid- glucose-salts	3	78.8	0.020	1.60	0.73
	7	148.0	0.014	2.02	—

*fradiae*를 maltose와 glycine을 넣어준 배지에서 배양하면 neomycin 생산은 감소하고 neomycin pyrophosphate가 축적함을 알게 되었다(Majumdar *et al.*, 1969, 1970). 또한 이 불활성화된 neomycin을 alkaline phosphatase가 분해하여 활성있는 neomycin을 생성함을 발견하였다. Neomycin 저생산배지에서는 alkaline phosphatase의 활성이 낮고 고생산배지에서는 alkaline phosphatase의 활성이 높은 것으로 보아 neomycin 생성과 alkaline phosphatase 활성과는 비례함을 알았다(Majumdar *et al.*, 1971)(Table 7).

이상의 streptomycin과 neomycin의 예를 종합하여 보면 아미노배당체항생물질의 생산은 그 항생물질을 불활성화하는 효소의 활성과 alkaline phosphatase 활성에 비례되는 관계에 있으며 또한 균이 갖는 내성은 불활성효소의 활성으로부터 유래하는 것으로 추측된다. 따라서 위의 결과는 새로운 균계량법을 제시하여 주는 것이 된다. 즉 ① 불활성화효소의 활성이 높은 log phase 후기의 균을 선택할 것 ② 불활성화된 항생물질을 활성화하는 효소의 활성이 log phase 후기에 높게 되도록 배지조성이나 균의 개량을 하여야 할 것이다.

## 6. Hybrimycin

Shier *et al.* (1969)은 neomycin 생산균인 *S. fradiae*에 nitrosoguanidine을 처리한후 neomycin 구성성분인 deoxystreptamine을 첨가하지 않았더니 colony중에 neomycin을 생산하지 않는 mutant를 분리하였다. 이 mutant는 신항생물질을 생산하였는데, 이것은 아미노배당체이며 구조적으로 neomycin 성분인 deoxystreptamine 대신 그의 유사물질인 streptamine 또는 epistreptamine으로 되어 있음이 확인되었다. 이런 신항생물질을 hybrimycin이라 한다. 이같은 방법으로 kanamycin을 이용하여 신항생물질을 만들어내었다(Kojima *et al.*, 1973). 이들 hybrimycin은 원래의 항생물질 보다는 역가가 낮

으나 아미노 배당체 항생물질이나 macroli-de항생물질에는 기대되는 바가 크다.

## 7. 생합성 과정의 변이에 의한법

항생물질은 수많은 효소가 연속적으로 작용하여 생합성되므로 이들 효소의 일부를 유전적으로 변환시켜주면 생합성의 중간대사 산물이나 구조적으로 변형된 물질이 생겨날 것이다. 이들 화합물이 항균력을 갖는다면 새로운 항생물질이 될 가능성이 큰 것이다. 이런 가정하에 Vanek *et al.* (1971)은 tetracycline 생합성의 각단계 효소작용을 변환시켜서 중간대사 산물로서 demethyl tetracycline과 demethyl chlortetracycline 등이 발효액중에 축적됨을 발견하였다. 즉 *S. aureofaciens*의 tetracycline류의 생합성을 알기쉽게 표현한 것이 Fig. 3이다. 검은 색 원(72 compounds)은 이미 알려진 중간대사 산물 내지는 항생물질이고 흰색 원(45 hypothetical compounds)은 아직 발견되지 않

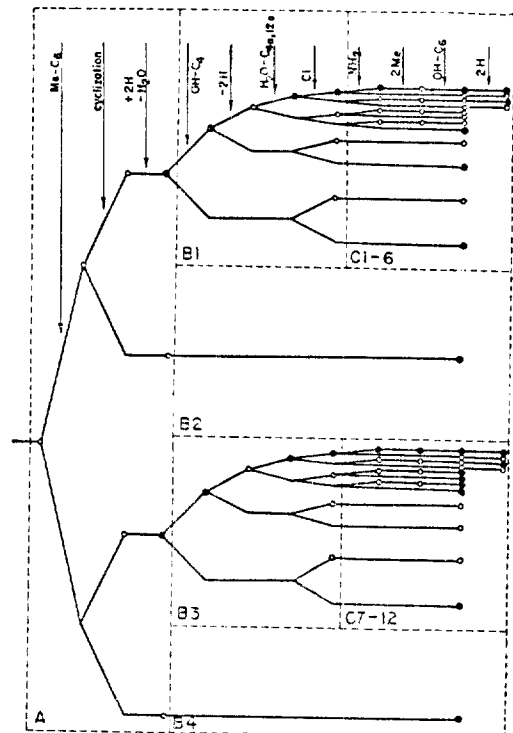


Fig. 3. Total scheme of the biosynthesis of tetracycline compounds(Vanek *et al.* 1971).

았으나 생산가능한 항생물질이든가 그의 중간대사 산물이다.

이런 방법을 인위적으로 이용하여 실험항생물질을 만들기 위하여는, 우선 항생물질 생합성과정을 어느 정도 해명할 것이며 그 다음에 어느단계의 enzyme에 제동을 가한다면 새로운 항생물질의 개발이 이루어지리라 믿는다.

### 8. 유전자 전달법

일반적으로 비교적 가까운 종간 즉 DNA 상동성이 50% 이상인 종간에는 유전인자의 전달이 가능하다. 이 방법에는 ① conjugation, mating, mapping에 의한 recombination ② phage에 의한 transduction이나 DNA에 의한 transformation이 있다. conjugation에 의한 recombination의 예는 *S. aureofaciens*와 *S. rimosus*, 그리고 *Nocardia erythropolis*와 *N. canicruria*간의 recombination이 일어남이 보고 되었다(Adams *et al.*, 1963). 그러나 이같은 실험은 균간의 DNA상동성측정이나 상동효소의 아미노산 배열등을 확인한 후에 실시한다면 더욱 효과적일 것이다. 이 방법은 conjugation할 때

상대가 극히 한정되어 있는 점이 단점이다. Phage에 의한 transduction도 phage가 한정되어 있으며 host specificity를 감안한다면 실용되기 어렵다. 이들중에서 DNA에 의한 transformation은 실험항생물질의 개발에 가장 가능한 방법으로 생각되는데 DNA를 받아들여 recombination하는 조건이 어렵다. Transformation에 관한 보고는 수편이나 되나 그중 Hopwood *et al.* (1972)이 *Thermoactinomyces vulgaris*를 재료로 한 실험은 대표적인 것이다. 최근 Okanishi *et al.* (1966, 1968)은 kanamycin 생산균인 *S. kanamyceticus*의 원형질을 특별히 조제하여 원형질막을 얇게 한후 phage DNA를 감염시키는데 성공하였으나 원래의 원형질로 복귀하지는 못했다. 그후 Okanishi *et al.* (1974)은 방선균의 원형질을 MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 등을 함유한 고정액중에 처리하여 원형질막을 얇게 만든 후 다시 본래의 원형질로 40% 복귀하는데 성공하였다(Table 8). 이 두가지 시도는 방선균에도 DNA에 의한 transformation이 가능하다는 것을 간접적으로 시사하는 것이다.

이상을 종합 고찰하여보면 변이유발제로

Table 8. Effect of various chemicals on regeneration of the normal filamentous state from protoplasts (Okanishi *et al.*, 1974)

Chemicals added to basal medium*					Regeneration (%)			
MgCl <sub>2</sub> (mM)	CaCl <sub>2</sub> (mM)	PPB** (mM)	KCl (mM)	Casamino acids (%)	<i>Streptomyces griseus</i>		<i>Streptomyces venczuelae</i>	
					3 days	5 days	5 days	7 days
3	3	0.22	—	0.01	0.4	0.4	2	2
3	60	0.22	—	0.01	8	37	27	32
60	3	0.22	—	0.01	25	31	3	3
20	50	0.22	—	0.01	19	41	44	47
50	20	0.22	—	0.01	28	37	50	51
50	20	0.44	—	0.01	38	48	44	47
50	20	0.83	—	0.01	33	43	38	39
50	20	1.54	—	0.01	0.4	10	7	12
50	20	0.22	2	0.01	28	36	50	53
50	20	0.22	—	—	0.4	31	2	37

\* Basal medium; sucrose, 120g; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.25g; trace element solution, 2ml; glucose 10g; L-asparagine, 2g; 0.25M TES buffer (pH 7.2), 100ml; agar, 22g; and D.W. to 1000ml.

\*\* PPB; potassium phosphate buffer (pH 7)



처리한균을 분리할 때에 일부의 균은 log phase 후기까지 배양해서 내성균을 분리할 것과 변이의 유발에 의하여 얻어진 비생산 균주로부터는 재변이를 유발하여 고생산균인 prototroph를 분리하는 것을 생각할 수 있다. 또한 분자생물학을 토대로한 유전학적

입장에서 임의로 손쉽게 gene의 도입 내지는 제거로 항균력을 향상시키든가 새로운 항생물개발에 경주한다면 우리가 원하는 항생물질 개발에 많은 도움이 될것으로 믿는다.

### 引用 文 獻

1. Adams, J.N., and Bradley, S.G., 1963. Recombination events in the bacterial genus *Nocardia*. *Science*, **140**, 1392—1394.
2. Akagawa, H., M. Okanishi and H. Umezawa, 1975. A plasmid involved in chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae*. *J. Gen. Microbiol.*, **90**, 336—346.
3. Bhadra, R., Gosmani, S.K., and Majumdar, S.K., 1973. Effect of different complex nutrients on neomycin production by *Streptomyces fradiae*. *Folia Microbiol.*, **18**, 300.
4. Benveniste, R., and Davies, J., 1973. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in *Actinomyces* similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2276.
5. Darken, M.A., Jensen, A.L., and Shu, P., 1959. Production of gibberellic acid by fermentation. *Appl. Microbiol.*, **7**, 301.
6. Davey, V.F., and Johnson, M.J., 1953. Penicillin production in corn steep media with continuous carbohydrate addition. *Appl. Microbiol.*, **1**, 208.
7. Demain, A.L., 1957. Inhibition of penicillin formation by lysine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 244—246.
8. Demain, A.L., 1966. Industrial fermentations and their relation to regulatory mechanisms. *Adv. Appl. Microbiol.*, **8**, 1—27.
9. De Moss, R.D., 1967. Antibiotica Vol. 2, Biosynthesis (Eds. Gottlieb, D., and Shaw, D. D.) Spring Verlag, New York, p. 66.
10. Dulaney, E.L., and Dulaney, D.D., 1967. Mutant productions of *Streptomyces viridifaciens*. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, **29**, 782.
11. Hopwood, D.A., and Wright, H.M., 1972. Transformation in *Thermoactinomyces vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.*, **71**, 383—398.
12. Hostalek, Z., and Vanek, Z., 1973. Genetics of industrial microorganisms, Actinomycetes and fungi (Eds. Vanek, Z., Hostalek, Z., and Cudlin, J.) *Academia Praque* p.353.
13. Ichikawa, T., Date, M., Ishikura, T., and Ozaki, A., 1971. Improvement of kasugamycin producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol.*, **16**, 218—224.
14. Kelner, A., 1949. Studies on the genetics of antibiotic formation: The induction of antibiotic-forming mutants in actinomycetes. *J. Bacteriol.*, **57**, 73.
15. Kojima, M. and Stator, A., 1973. Microbial semi-synthesis of aminoglycosidic antibiotics by mutants of *Streptomyces ribosidificus* and *S. kanamyceticus*. *J. Antibiotics*, **26**, 784.
16. Levitov, M.M., Makarova, I.P., and Meshkov, A.N., 1968. Nitrogen-containing mycelium fractions of *Actinomyces fradiae* 129 producing neomycin during growth on media with various carbohydrates. *Mikrobiologiya*, **37**, 1004.
17. Levitov, M.M., and Makarova, I.P., 1969. A study on carbohydrate content of the mycelium of *Actinomyces fradiae* 129 in connection with neomycin biosynthesis. *Mikrobiologiya*, **38**, 1021—1026.
18. Levitov, M.M., Markarova, I.P., and Meshkov, A.N., 1969. The effect of carbohydrates on neomycin biosynthesis. *Mikrobiologiya*, **38**, 425—427.
19. Majumdar, M.K., and Majumdar, S.K., 1967. Utilization of carbon and nitrogen-containing

- compounds for neomycin production by *Streptomyces fradiae*. *Appl. Microbiol.*, **15**, 744—749.
20. Majumdar, M.K., and Majumdar, S.K., 1969. Amino sugar antibiotic as phosphoamide from *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiotics*, **22**, 174—175.
21. Majumdar, M.K. and Majumdar, S.K., 1970. Isolation and characterization of three phosphoamino-neomycins and their conversion into neomycin by *Streptomyces fradiae*. *Biochem. J.*, **120**, 271—278.
22. Majumdar, M.K., and Majumdar, S.K., 1971. Relationship between alkaline phosphatase and neomycin formation in *Streptomyces fradiae*. *Biochem. J.*, **122**, 397.
23. Makarova, I.P., Levitov, M.M., and Meshkov, A.V., 1969. A study on the content of phosphorus, nucleic acids and pentoses in mycelium of *Actinomyces fradiae* 129 in connection with neomycin biosynthesis. *Mikrobiologiya*, **38**, 52.
24. Malik, V.S., and Vining, L.C., 1972. Chloramphenicol resistance in a chloramphenicol-producing *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.*, **18**, 583—590.
25. Marshall, R., Redfield, B., Katz, E., and Weisbach, H., 1968. Change in phemoxazine synthetase activity during the growth cycle of *Streptomyces antitibioticus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 317.
26. Nimi, O., Ito, G., Ohta, Y., Funayama, S., and Nomi, R., 1971. Streptomycin-phosphorylating enzyme produced by *Streptomyces griseus*. *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 856—861.
27. Nomi, R., and Nimi, O., 1969. Chemical structure of a Streptomycin precursor. *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1459.
28. Okanishi, M., Haman, K.A., and Umezawa, H., 1968. Factors affecting infection of protoplasts with DNA of actinophage PK-66. *J. Virology*, **2**, 686.
29. Okanishi, M., Ohta, T., and Umezawa, H., 1970. Possible control of formation of aerial mycelium and antibiotic production in *Streptomyces* by episome factors. *J. Antibiotics*, **23**, 45.
30. Okanishi, M., Suzuki, K., and Umezawa, H., 1974. Formation and reversion of Streptomycetes protoplast: Culture condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.*, **80**, 389.
31. Okanishi, M., Utahara, R., and Okami, Y., 1966. Infection of the protoplasts of *Streptomyces kanamyceticus* with DNA preparation from Actinophage PK-66. *J. Bacteriol.*, **92**, 1850.
32. Shier, W.T., Rinehart, K.L., and Gottlieb, D., 1969. Preparation of four new antibiotics from a mutant of *Streptomyces fradiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **63**, 198.
33. Somerson, N.L., Demain, A.L., and Nunheimer, J.D., 1961. Reversal of lysine inhibition of penicillin production by  $\alpha$ -aminoadipic or adipic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 238—241.
34. Thoma, R.W., 1971. Use of mutagens in the improvement of production strains of microorganisms. *Folia Microbiol.*, **16**, 197.
35. Vanek, Z., Cudlin, J., Blumauerova, M., and Hostalek, Z., 1971. How many genes are required for the synthesis of chlortetracycline? *Folia Microbiol.*, **16**, 225.