

## Sisomicin 발효에 대한 Magnesium Sulfate의 영향

한상현 · 신철수\*

연세대학교 공과대학 식품공학과

## Effect of Magnesium Sulfate on Sisomicin Fermentation

Han, Sang-Hun and Chul-Soo Shin\*

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

**Abstract** — Fermentation patterns were changed by adding magnesium sulfate to the fermentation broth and its effect on enhancement of sisomicin production was investigated. When cell growth was expressed by DNA content, trophophase and idiophase were separated, but not by dry cell weight. On the other hand, addition of magnesium sulfate had the antibiotic accumulated inside the cells be liberated into the outside, and this effect resulted in improving the final antibiotic yield. The maximum antibiotic yield was obtained when 100 mM magnesium sulfate was added after one day of cultivation, and enhanced more than three times compared to that of the control to which it was not added.

Sisomicin은 아미노글라이코사이드계 항생물질로서 그람양성균 및 음성균에 효과적이며(1-3), 발효중에 생성된 항생물질의 대부분이 균체내에 축적되는 것으로 보고되어 왔다(4-6). 이러한 이유로 발효 종료 후 얻을 수 있는 항생물질 수율은 제한을 받을 수밖에 없다. 발효의 생산성을 높히는 방법으로는 균체내에 보다 많은 항생물질을 축적시키거나 생성된 항생물질이 균체외로 유리되는 변이주의 개발이 생각될 수 있으며, 이와는 달리 발효중에 높은 염 농도를 유지시켜 균체내의 항생물질을 균체외로 유리시키는 방법이 있다(5, 6).

본 연구에서는 이들 염 중에서 가장 효과적인 magnesium sulfate의 첨가에 의한 sisomicin 발효 양상의 변화, 균체내 항생물질의 유리효과와 항생물질 수율의 증가에 미치는 영향을 분석하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 균주 및 배지

Key words: Sisomicin, *Micromonospora*, magnesium sulfate

\*Corresponding author

Sisomicin 발효에 이용된 균주는 *Micromonospora inyoensis* IFO 13156이다. 증식배지의 조성은 0.3% beef extract, 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.1% dextrose, 2.4% starch 및 0.2% calcium carbonate로서 수도물에 용해시켜 사용하였다. 한편, 발효배지의 조성은 5.0% potato starch, 3.5% soybean meal, 0.7% calcium carbonate 및  $3.4 \times 10^{-6}$  M cobalt chloride를 수도물에 용해시켰으며, 증식배지 및 발효배지의 pH는 살균전 8.0으로 조정하였다.

#### 배양방법

증식단계(germination stage)로는 250 ml 삼각플라스크에 20 ml의 증식배지를 넣고 살균한 뒤 *M. inyoensis* slant로부터 한 백금이 접종한 후에 28°C의 회전식 진탕기에서 3일간 배양하였다.

발효단계(fermentation stage)로, ‘항생물질 생산의 최적조건’에 대한 결과는 회전식 진탕기를 이용하여 얻었으며, 증식된 균체액 2.5 ml를 50 ml의 발효배지를 함유하고 있는 500 ml 삼각플라스크에 접종하여 28°C에서 250 rpm으로 4일간 진탕배양하였다. 한편, ‘발효유형의 변화’에 대한 결과는 발효조를 이용하였으며, 5 l 발효조에 2.5 l의 배지를 넣고 증식된 균

체액을 1/20배되게 첨가하였으며, 산소의 공급을 위하여 공기의 주입속도를 1 vvm으로 조절하였다.

### 항생물질 추출

일정량의 발효액을 취하고 여기에 6N 황산용액을 가하여 pH 2.0으로 조정한 후 15분간 교반하였다. 이들 용액을 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상동액을 취하여 6N ammonium hydroxide 용액으로 pH 7.0으로 조정하였다. 용액내의 Ca이온을 제거하기 위해 충분한 양의 oxalic acid를 가하고 원심분리하여 상동액을 취하여 pH 7.0으로 재조정하였다.

### 항생물질 농도 측정

발효 배양액으로부터 추출한 sisomicin의 역가 분석은 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P 균주를 피검균으로 사용하여 cylinder법으로 항생물질의 함량을 측정하였다(7). 시료가 MgSO<sub>4</sub>를 함유할 시 항생물질 농도측정에 영향을 주기 때문에 MgSO<sub>4</sub> 농도와 동량으로 ammonium phosphate를 첨가하여 MgSO<sub>4</sub>를 침전시켜 제거하였다. Ammonium phosphate는 100 mM 첨가시까지 피검균에 대한 영향이 거의 없었다.

### 균체농도 측정

발효 배양액 5 ml을 취한 후 저속에서(600 rpm, 1분간) 원심분리하여(한일 원심분리기, HA-10) 발효 배지중의 soybean meal을 일차적으로 침전시켜 제거하고, 상동액만을 모아 재원심분리하여 균체를 침전시켰다. 여기에 중류수를 가하여 혼탁시킨 후 원심분리하는 과정을 3회 반복하였다. 이와같이 얻은 균체액을 105°C 오븐에서 건조시켜 균체의 건조중량을 구하였다.

### DNA 및 phosphate의 정량

DNA 함량은 균체 혼탁액을 diphenylamine reagent로 발색반응을 시킨 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(8). 한편, phosphate의 경우 단백질이 제거된 시료 2.4 ml에 인 반응액 7.0 ml을 하여 반응시킨 후 578 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(9).

### 균체내 항생물질의 유리

4일간 배양된 균체액을 취하여 원심분리한 후 얻

어진 균체를 0.06 M 인산 완충액으로 세척하고, 여러가지 농도의 magnesium sulfate를 함유하고 있는 (0~250 mM) 인산 완충액(0.06 M, pH 7.0)에 동량의 균체를 각각 가하여 28°C에서 약하게 교반하며 반응시켰다. 반응 후 일정량을 취하여 원심분리한 후 완충액으로 세척하고 균체내에 남아있는 항생물질의 양을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 발효유형의 변화

Sisomicin 발효의 회분식 배양중에 나타나는 여러 가지 인자들의 변화 양상을 살펴보았다(Fig. 1). 일반적으로 항생물질과 같은 이차 대사산물 발효에서 trophophase와 idiophase는 서로 분리되는 것으로 알려져 왔다(10). Fig. 1에서 보는 바와 같이 균체증식을 dry cell weight와 DNA 함량으로 각각 달리하여 나타내었다. 균체증식과 항생물질의 생성 시기를 비교할 때, 균체증식을 DNA 함량으로 나타내는 경우 발효 경과 후 45~50시간 후에 stationary phase에 도달하였으며, 이 시기에 항생물질이 생성되기 시작하였다. 이들 결과는 trophophase와 idiophase가 분명하게 구분되는 것을 보여주고 있다. 이와는 달리, 균체증식을 dry cell weight로 나타내었을 때 앞의 경우와는 달리 발효 45~50시간 이후에도 10시간 이상 여전히

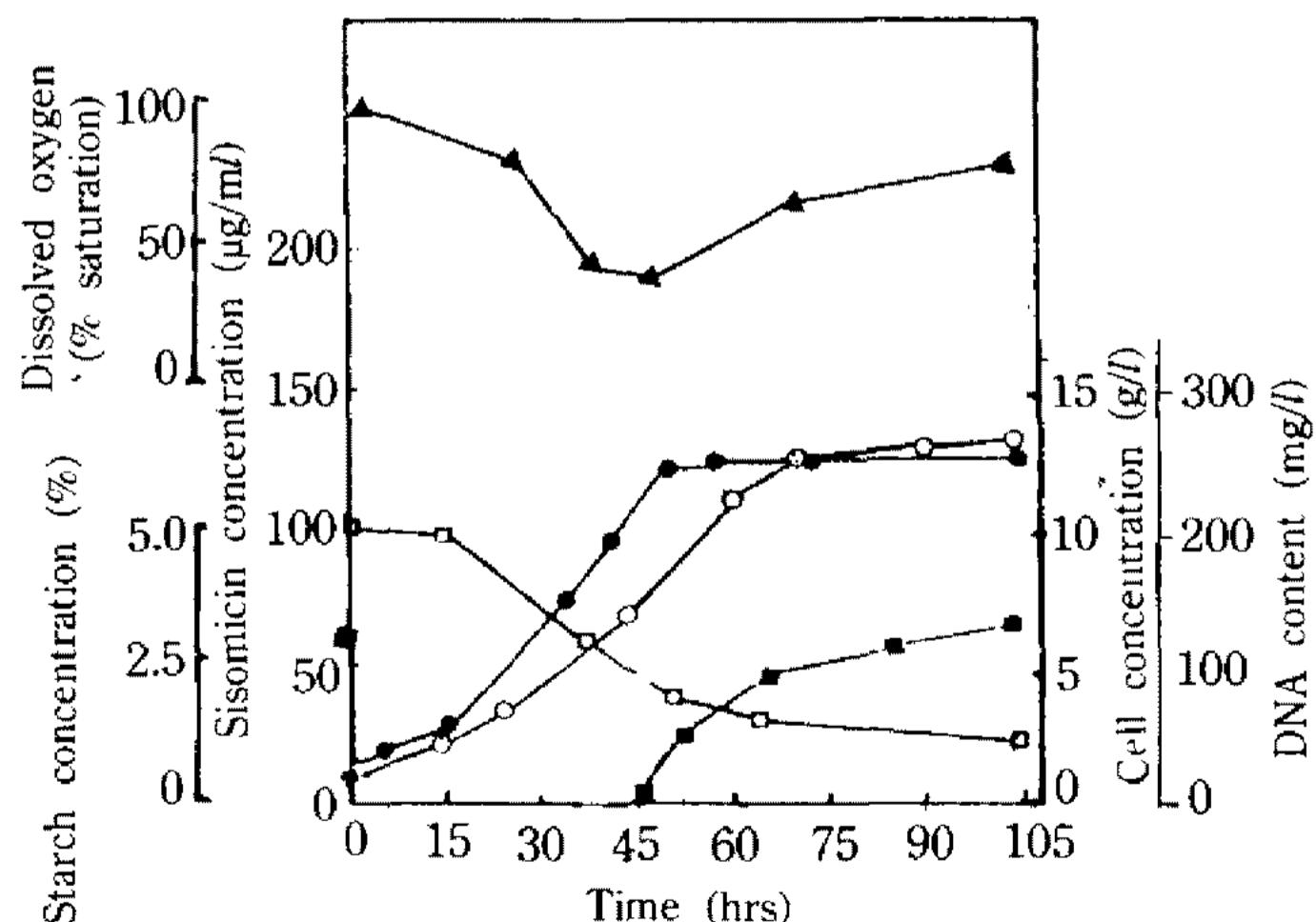


Fig. 1. Patterns of batchwise sisomicin fermentation.

●—●: cell concentration (DNA content)

○—○: cell concentration (dry weight)

■—■: sisomicin concentration

□—□: starch concentration

▲—▲: DOT (dissolved oxygen tension)

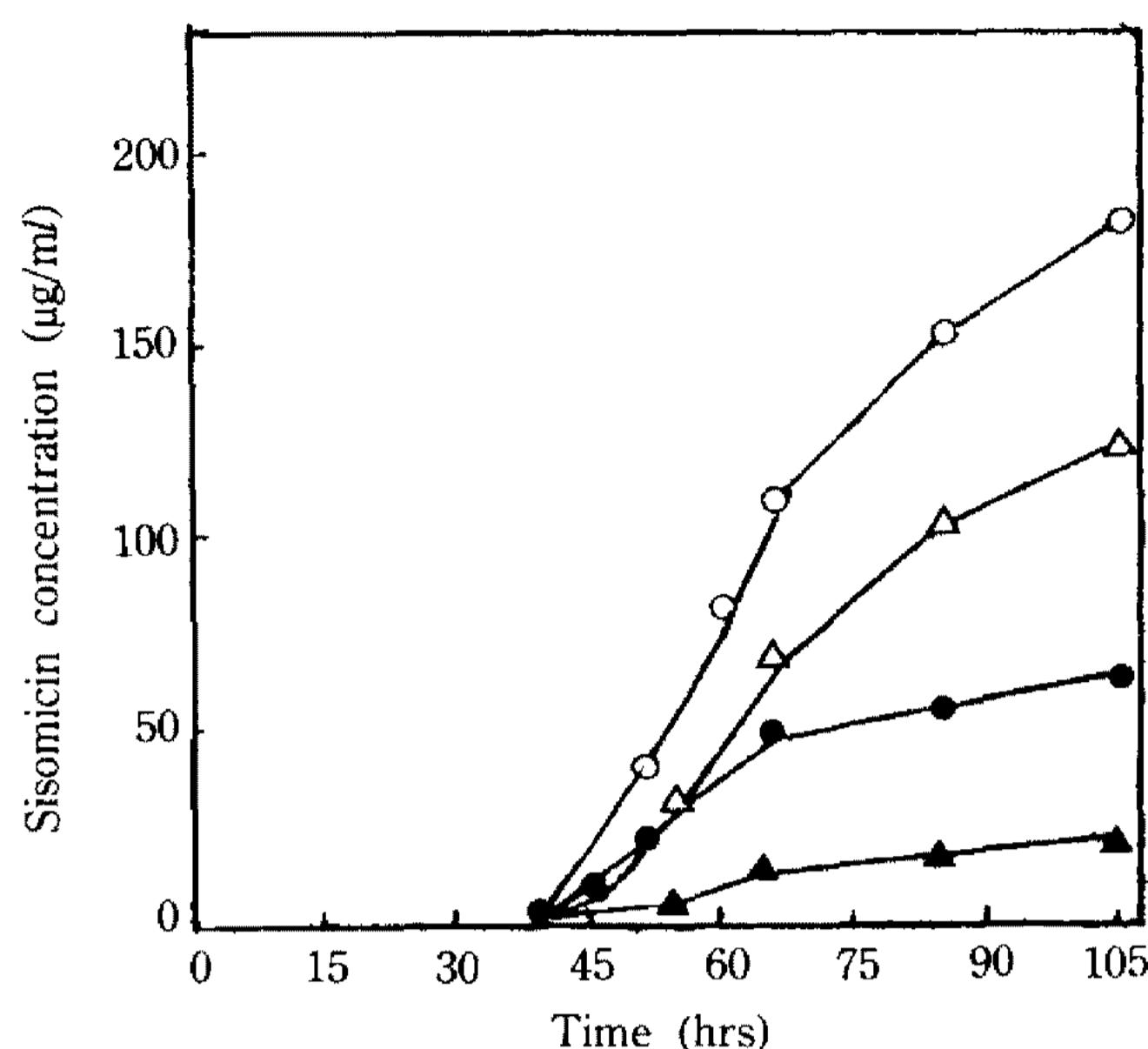


Fig. 2. Changes of product formation in sisomicin fermentation by adding  $MgSO_4$ .

●—●: control, total sisomicin content  
▲—▲: control, extracellular sisomicin content  
○—○: addition of  $MgSO_4$ , total sisomicin content  
△—△: addition of  $MgSO_4$ , extracellular sisomicin content

빠른 속도로 증가되었으며, 이 경우 trophophase와 idiophase가 서로 분리되지 않음을 알 수 있다.

한편, 이 기간 동안에 발효조내의 용존산소(DO) 농도는 급격히 감소되나 여전히 saturation값의 30% 이상을 유지하고 있어 이러한 발효조건하에서 산소 문제는 별로 심각하게 일어나지 않을 것으로 예상된다.

다음으로 발효초기에 magnesium sulfate의 최종농도를 40 mM되게 배지에 첨가하여 항생물질 생산량의 변화를 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 magnesium sulfate을 첨가한 경우 첨가하지 않은 경우 (control)에 비교하여 sisomicin 총 생산량은 2.5배 이상 증가하였으며, 균체외로 유리되는 항생물질의 양을 비교할 때 더욱 현저하게 증가되었다. 이와 같은 항생물질 수율의 증가는 주로 균체외로 유리되는 항생물질의 양이 증가되는데 기인하는 것을 알 수 있다. 한편, magnesium sulfate의 첨가는 균체의 증식을 약간 저해하는 것으로 나타났으나 trophophase-idiophase 양상에 변화를 주지 않았다.

Magnesium sulfate의 첨가가 발효중에 균체내의 DNA 및 발효액 중의 phosphate 함량에 미치는 영향을 살펴보았다(Fig. 3). Magnesium sulfate 첨가시

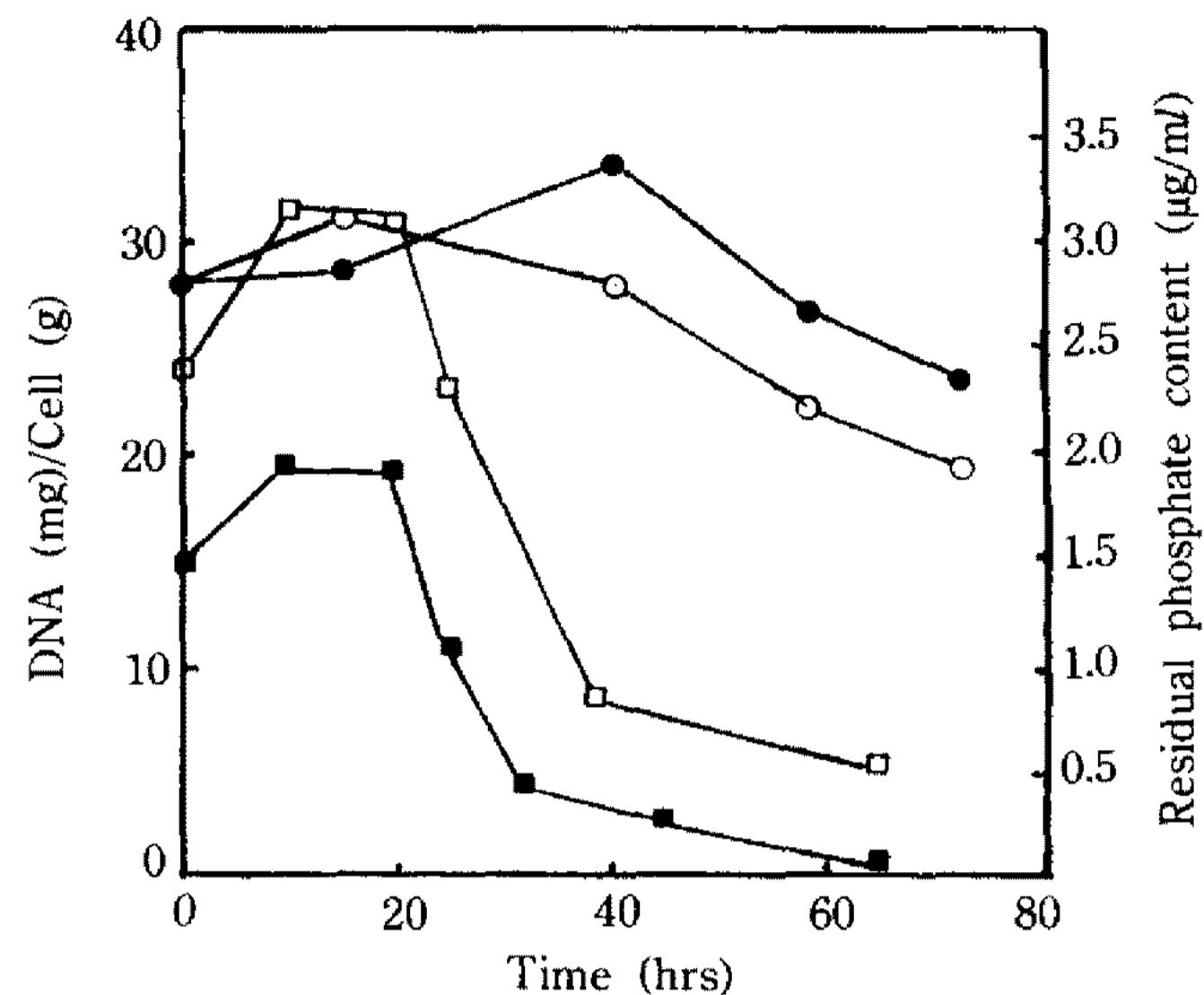


Fig. 3. Effect of addition of  $MgSO_4$  on DNA content inside the cells and phosphate content in the broth.

○—○: control, DNA content  
●—●: addition of  $MgSO_4$ , DNA content  
□—□: control, phosphate content  
■—■: addition of  $MgSO_4$ , phosphate content

에 단위 균체량당 DNA 함량은 대체로 control에 비교하여 높게 유지되었으며, 발효액에 존재하는 phosphate 함량은 낮게 유지되었다. 항생물질 발효에 있어 많은 경우 phosphate에 의한 조절작용이 보고되어 왔는데(11), magnesium sulfate 첨가에 의한 항생물질 수율 증가의 원인으로 magnesium sulfate가 배양액 중의 phosphate를 trapping하여 그 농도를 낮게 유지시켜 phosphate에 의한 조절작용을 경감시켜 줄 것으로 추측된다(12).

#### 균체내 항생물질의 유리

앞의 결과에서 알 수 있듯이 발효중에 배양액의 magnesium sulfate 농도를 높게 유지시킬 때 균체내의 항생물질이 균체외로 유리되는 것으로 생각되어, 이를 확인하기 위하여 균체가 증식되지 않는 조건下에서 항생물질의 유리현상을 분석하였다. 배양액으로부터 균체만을 취하여 여러가지 농도의 magnesium sulfate를 함유하고 있는 완충용액에 혼탁시켜 magnesium sulfate 농도에 따른 균체내 항생물질의 유리 정도를 측정하였다(Fig. 4). Fig. 4에서 보는 바와 같이 0 mM의 magnesium sulfate 농도에서는 균체내 항생물질이 균체외로 전혀 유리되지 않았으며, 그 농도가 증가함에 따라 항생물질의 유리 정도가 점차

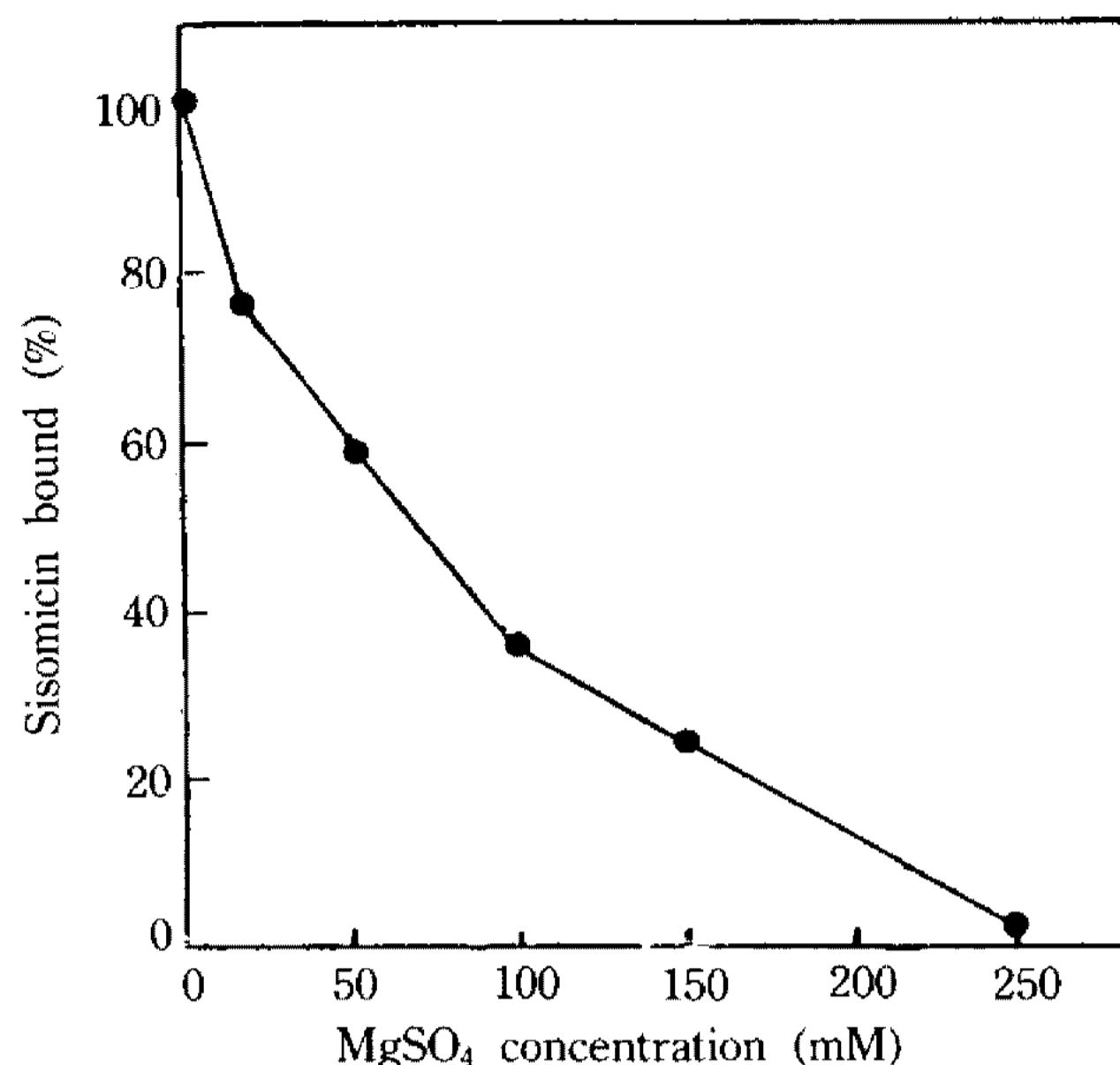


Fig. 4. Liberation pattern of intracellular sisomicin in the buffer solutions with various contents of MgSO<sub>4</sub>.

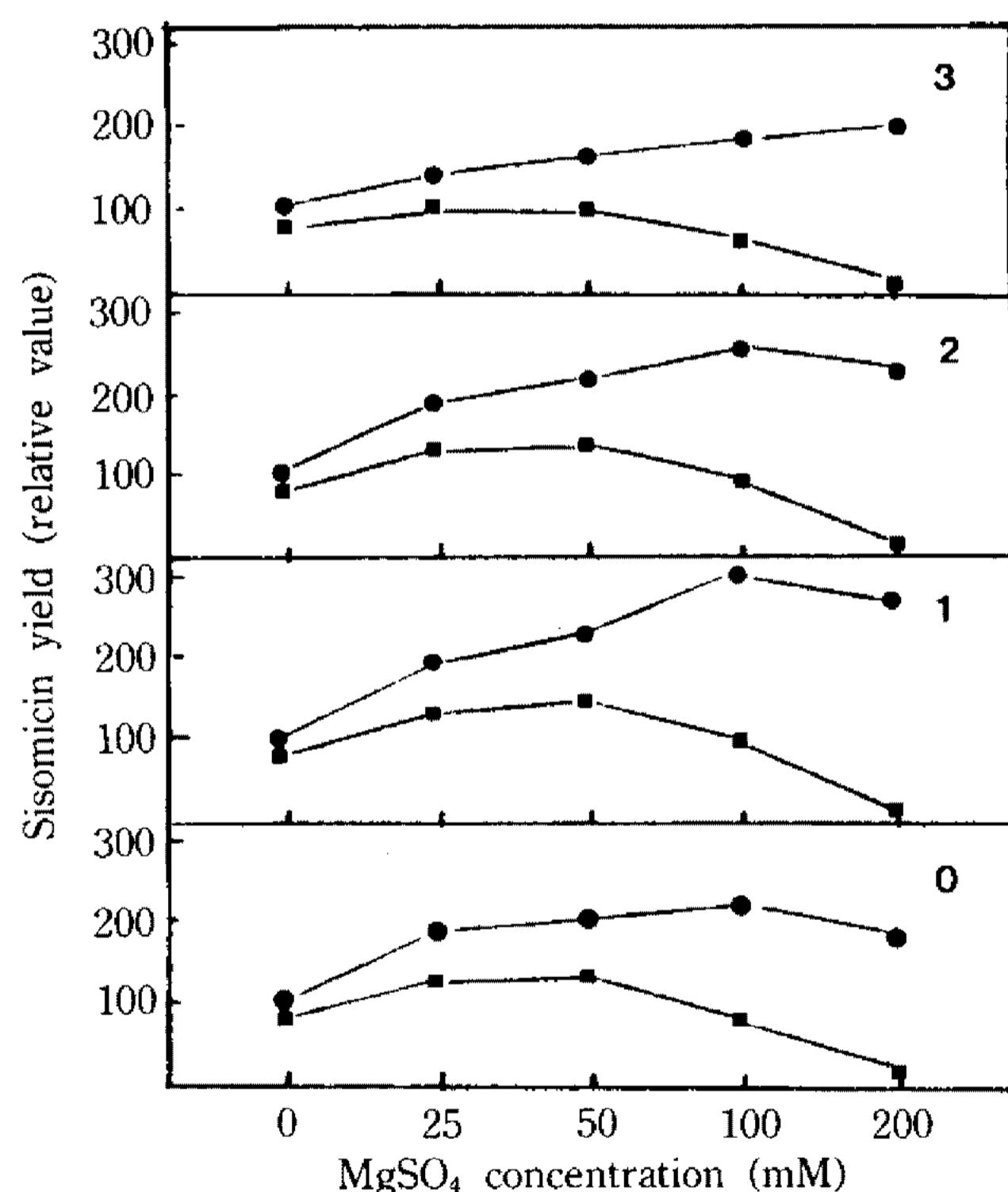


Fig. 5. Adding effect of various MgSO<sub>4</sub> contents at different cultivation times.

\*The numbers in the rectangles denote the adding time of MgSO<sub>4</sub>.

0: at the beginning of cultivation, 1: after 1 day, 2: after 2 days, 3: after 3 days

●—●: total sisomicin content  
■—■: intracellular sisomicin content

증가하여 250 mM의 magnesium sulfate 농도 부근에서는 대부분이 유리되었다. 한편, 이들 유리현상은

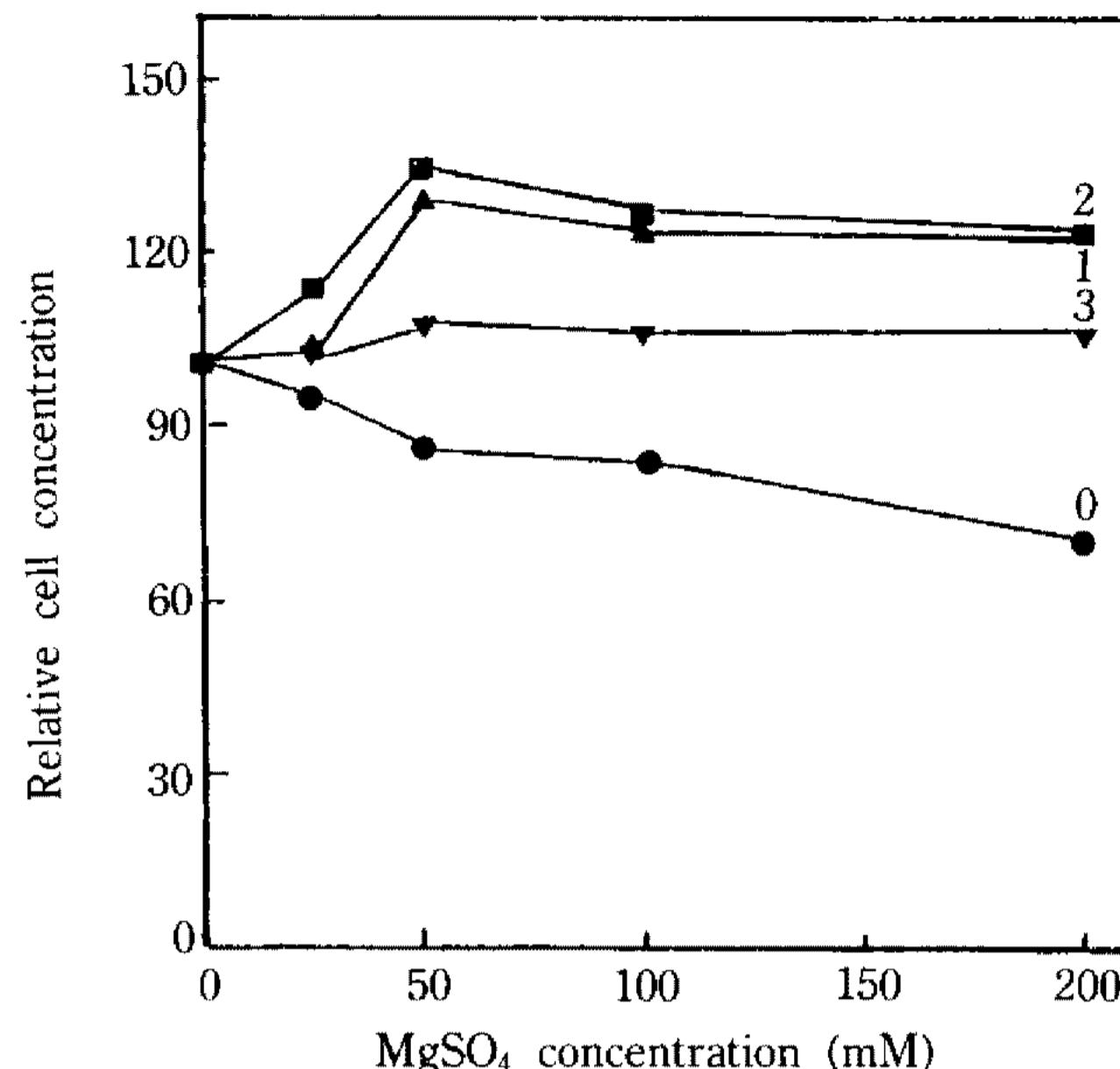


Fig. 6. Effect of addition of various MgSO<sub>4</sub> contents on the cell growth at different cultivation times.

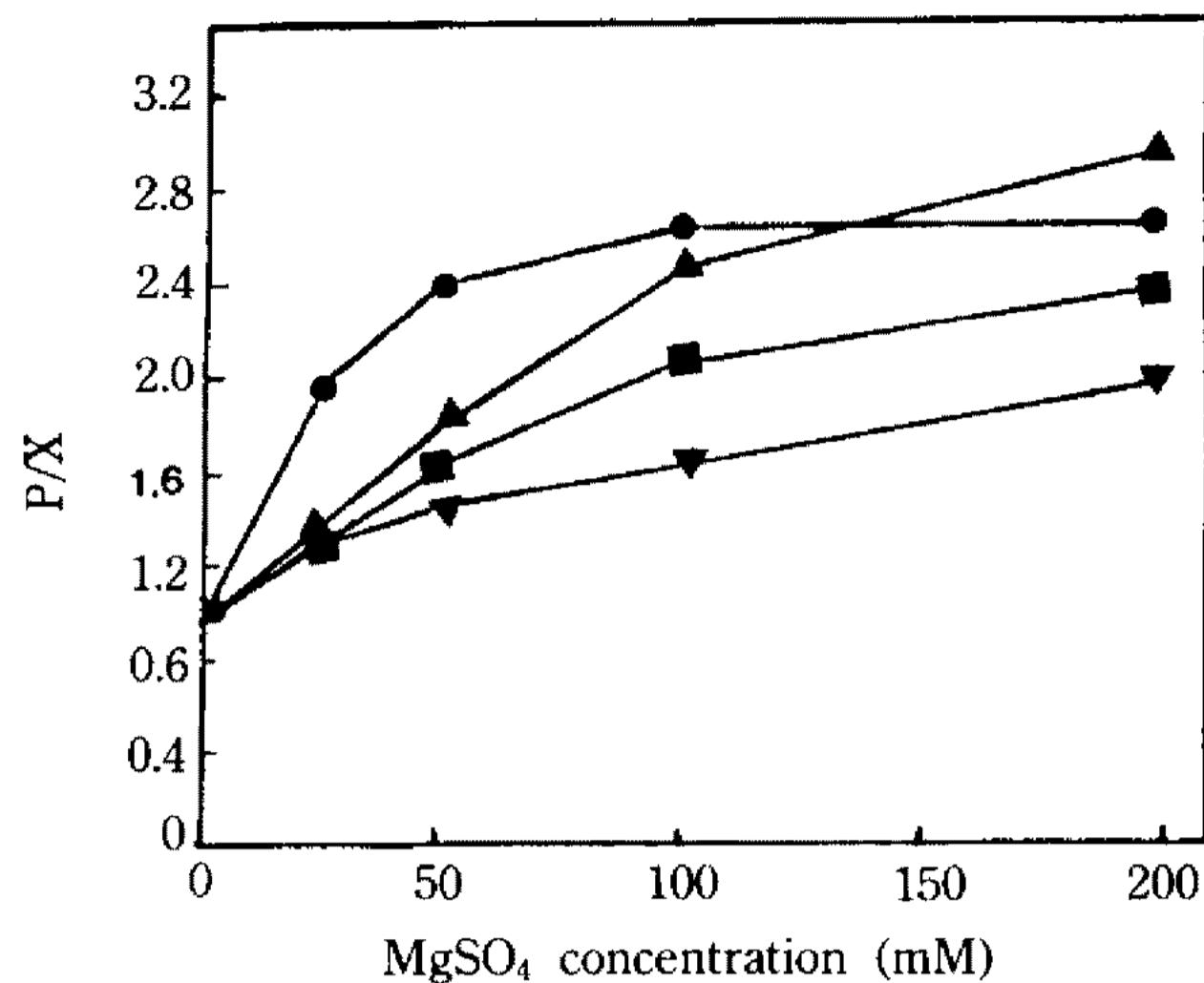
\*The numbers of the rectangles denote the adding time of MgSO<sub>4</sub>.

0: at the beginning of cultivation, 2: after 1 day, 3: after 2 days, 4: after 3 days

수분내에 일어나 평형상태에 도달하였다. 이러한 결과는 발효중에 magnesium sulfate의 첨가가 균체내에 생성되는 항생물질을 균체외로 신속하게 유리시킨다는 사실을 확인하여 주는 것이다.

#### 항생물질 생산의 최적조건

Magnesium sulfate에 의한 균체내 항생물질의 유리효과를 발효시스템에 좀더 응용하기 위하여 항생물질 생산에 미치는 magnesium sulfate의 최적 첨가조건을 결정하였다. 이를 위해 magnesium sulfate의 첨가량과 첨가시기를 변화시켜 이들이 항생물질 수율에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 5). Fig. 5에서 보는 바와 같이 magnesium sulfate가 전혀 첨가되지 않은 경우(control)의 항생물질 수율을 100으로 하여 상대치로 각각 나타내었다. 배양시작 후 1~2일 경과되어 magnesium sulfate 첨가시에 높은 항생물질 수율이 얻어졌으며, 100 mM까지는 magnesium sulfate 농도가 증가할수록 높은 수율이 얻어졌다. 최대 항생물질 수율은 발효시작 1일 후에 magnesium sulfate를 100 mM되게 첨가하였을 때 얻어졌으며 control에 비교하여 3배 이상 증가되었다. 이와같은 항생물질 수율의 증가는 Fig. 5에서 나타난 바와 같이 주로



**Fig. 7. Product formation per unit cell mass under addition of various MgSO<sub>4</sub> contents at different cultivation times.**

●—●: addition of MgSO<sub>4</sub> at the beginning of cultivation  
 ▲—▲: after 1 day  
 ■—■: after 2 days  
 ▼—▼: after 3 days

균체외에 유리된 항생물질의 양이 증가하는데 기인하는 것으로 사료된다. 한편, 배양시작 3일 후에 첨가시에는 큰 효과가 나타나지 않았으며, 이는 대부분의 항생물질이 이미 생성되어 균체내 항생물질의 유리시간이 단축된데 원인이 있는 것으로 사료된다.

한편, 각각의 조건하에서 얻어진 균체농도를 비교할 때, Fig. 6에서 알 수 있듯이 발효초에 magnesium sulfate을 첨가할 때 대체로 균체증식이 약간 저해되었으나 1일 이후 첨가시에는 오히려 증가하는 경향을 보여주었다. 발효 1일 후 100 mM의 magnesium sulfate 첨가시에 가장 높은 항생물질 수율이 얻어진 것은 높은 magnesium sulfate 농도에서도 균체증식이 양호하게 유지되는 한편, 항생물질의 유리가 일어날 수 있는 시간이 충분히 주어져 Fig. 7에서 보는 바와 같이 단위 균체량당의 항생물질 수율이 높아진데 기인하는 것으로 사료된다. 즉, magnesium sulfate의 첨가는 항생물질 생성기간 동안 균체내의 항생물질을 균체 외로 유리시켜 균체내의 농도를 낮게 유지시켜 주므로써 product inhibition을 경감시켜주는데 주로 기인하는 것으로 추측된다. 이와 아울러, magnesium sulfate는 항생물질 합성에 관여하는 효소 생성의 조절에 간접적으로 관여할 가능성이 있는데, 이는 이미 앞에서 언급한 바와 같이 magnesium sulfate가 배

양액에 존재하는 phosphate를 trapping하여 그 농도를 낮게 유지시키는 것과 관련이 있을 것으로 추정된다.

## 요 약

Sisomicin 발효중에 magnesium sulfate의 첨가에 의해 일어나는 발효양상의 변화와 항생물질 수율의 증가에 미치는 영향을 분석하였다. 균체증식을 DNA 함량으로 나타낼 때 trophophase와 idiophase가 서로 분리되었으나, 건조중량으로 나타낼 때 구별되지 않았다. 발효중에 magnesium sulfate의 첨가는 균체내에 축적되는 항생물질을 균체외로 유리시키며, 이러한 효과는 균체의 비생산성을 높하게 되어 항생물질의 수율을 증가시키는 것으로 사료된다. 한편, magnesium sulfate의 최적 첨가조건은 배양시작 1일 후에 100 mM을 첨가할 때 얻어지며, 첨가하지 않은 경우에 비교하여 최종 발효수율이 3배 이상 증가되었다.

## 감사의 말

본 연구는 1990년도 연세대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 대하여 감사를 드립니다.

## 참고문헌

1. Weinstein, M.J., G.M. Luedeman and G.H. Wagman. 1975. Antibiotic 66-40. US Pat. 3,907,771.
2. Weinstein, M.J., G.M. Luedemann, G. Ridge and G.H. Wagman. 1974. Sisomicin and method for its production. US Pat. 3,832,286.
3. Ristuccia, A.M. 1984. Aminoglycosides. In A.M. Ristuccia & B.A. Cunha (ed.), *Antimicrobial Therapy*, Pp. 305-328, Raven Press, New York.
4. Schmidt-Kastner, G., and H. Reimann. 1976. The production of sisomicin. *Infection* 4(Suppl. 4): 292-293.
5. Shin, C.S., B.W. Ahn, S.H. Lee, S.U. Kim, and S.H. Bok. 1988. Liberation of sisomicin from cells by sodium chloride. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 37-38.
6. 신철수, 한상현, 이상한. 1989. 무기질 염이 sisomicin 발효수율의 증가에 미치는 영향. 산업미생물학회지 17: 247-251.
7. Kirshbaum, A. and B. Arret. 1967. Outline of details for official microbiological assays of anti-

- biotics. *J. Pharm. Sci.* **56**: 511-515.
8. Herbert, D., P.J. Phipps and R.E. Strange. 1971. *Methods in Microbiology*, Vol. 5B, p. 209.
9. Bailey, K. 1963. In M.U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York.
10. Demain, A.L., Y. Aharonowitz and J.F. Martin. 1983. Metabolic control of secondary biosynthetic pathways, Pp. 49-72, In L.C. Vining (ed.), *Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics*, Addison-Wesley Publishing Co., London.
11. Martin, J.F. 1977. Control of antibiotic synthesis by phosphate, Pp. 105-127. In T.K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough (ed.), *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin.
12. Masuma, R., Y. Tanaka, H. Tanaka and S. Omura. 1986. Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents. *J. Antibiot.* **39**: 1557-1564.

(Received January 5, 1992)