

## 배지 및 유가식 회분배양 최적화에 의한 *Streptomyces avermitilis*의 Avermectin B1a 생산성 향상

이병규\* · 김종균 · 강희일 · 이종욱

유한양행 중앙연구소 바이오텍 연구센터

Avermectin B1a의 생산성 향상을 위하여 무기인의 영향을 조사하고, 주요 유기질소원의 최적농도를 response surface methodology를 적용하여 구하였다. 1.5 g/l의 농도로 무기인을 아버멕틴 생산배지에 첨가하였을 때 B1b 성분의 구성비가 5.8%에서 3%로 감소하였으며 B1a 생성은 영향을 받지 않았다. 배지의 주요성분인 대두분, 면실분, 효모추출물 중 아버멕틴 생성에 가장 큰 영향을 끼치는 유기질소원은 대두분이었다. 실험실 규모 발효조에서 *Streptomyces avermitilis* YA99-40의 유가식 회분배양에 의해 아버멕틴 생산성을 회분배양에 비해 44.8% 증가시킬 수 있었다. 발효조 배양시작 후 136, 206 시간에 각각 30, 20 g/l의 당을 추가하는 유가식 회분배양을 실시하였을 때 B1a 성분의 최대 생산성은 회분배양 대비 86.3% 증가하였으며 생성된 총 아버멕틴 중 B1a의 구성비율도 회분배양에 비해 38%에서 45%로 향상되었다. 이 같은 결과는 산업적인 규모로 아버멕틴의 생산성을 향상시키는 데 유용하게 적용시킬 수 있다.

**Key words** □ avermectin B1a, fed-batch, response surface methodology, *Streptomyces avermitilis*

가축의 기생충 감염에 의한 경제적 손실은 전세계적으로 수십 억불에 달하는 것으로 추정되며, 특히 선충류(nematodes) 및 절족류(arthropods)에 의한 피해가 가장 심각한 것으로 알려져 있다(2). 1979년 Merck-Sharp & Dohme사에서 동물용 구충제로 개발한 아버멕틴은 *Streptomyces avermitilis*에 의하여 구조적으로 유사한 8개의 서로 다른 유도체가 동시에 생합성되며 광범위한 구충효과를 갖는 물질로서 이들 유도체중 가장 강한 구충효과를 갖고 있는 성분은 아버멕틴 B1a이다(1,5). 아버멕틴 유도체중 B1(B1a+B1b) 성분은 다른 6가지 성분과 화학적으로 분리가 용이하나 B1a와 B1b 성분을 별도로 분리하기가 곤란하다(7,13). 따라서 산업적으로 중요한 B1a를 생산하기 위하여 B 성분의 생산성이 향상된 균주개발이 돌연변이 유발과 원형질체 융합 등의 방법으로 시도되었으며(7-9), 한편으로는 아버멕틴 생산성 향상을 위하여 배지 및 배양조건 최적화가 균주개발과 연계하여 연구되어 왔다(6,12,15).

아버멕틴 생산배지 개선을 위하여 배지중의 질소원과 무기인 함량이 아버멕틴 생성에 끼치는 영향을 조사한 결과 아버멕틴의 발효에는 무기질소원 보다는 유기질소원이 중요한 역할을 하며(3), 배지에 20 mM의 phosphate가 존재하여도 아버멕틴의 생성에는 큰 영향을 받지 않는다는 보고가 있다(4). McCann-McCormick 등(12)과 Zhinan 등(17)은 탄소원과 질소원의 비율에 따라 아버멕틴의 생산성이 크게 영향받음을 확인하였다. 또한 *S. avermitilis*의 발효배지에 20 mM의  $\text{Co}^{2+}$ 를 첨가하고, 배양도중

0.8%의 propionate를 첨가함으로써, 아버멕틴의 B1a의 생산성을 크게 향상시킬 수 있었다(17).

회분배양에서 아버멕틴의 생산성을 향상시키기 위하여 배지성분을 적정량 이상으로 배지에 첨가할 때 에너지 및 탄소원인 포도당의 경우 catabolite repression을, 유기 질소원은 nitrogen catabolite repression을 야기한다. 따라서 대사산물이 생성되는 2차 대사 기간의 연장과 고농도 탄소원이 존재할 때 발생하는 catabolite repression을 극복하고 보다 높은 아버멕틴 생산성을 얻기 위하여 통상적으로 유가식 회분배양법이 이용된다. Ikeda 등(6)은 *S. avermitilis*의 배양도중 포도당을 첨가하는 유가식 회분배양을 통하여 회분배양 때 보다 B1a의 역가를 2배로 높였으며, Zhinan 등(17)도 유가식 회분배양으로 회분식 배양에 비해 B1a 생성률을 향상시키고 B1a 역가를 2배 이상 향상시켰다.

본 연구에서는 *S. avermitilis* 변이주로부터 B1a의 생산성 향상과 B1b의 생성을 최소화하기 위한 조건선정을 위하여 무기인의 영향을 flask 배양을 통하여 검토하고, RSM (response surface methodology) 기법을 사용하여 배지성분중 유기질소원 농도의 최적화를 수행하였으며, 이를 토대로 유가식 회분배양에 의한 B1a 생산성 향상을 발효조 배양을 통하여 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주

배지 최적화 연구에 사용한 균주는 *Streptomyces avermitilis* YA99-40으로 *Streptomyces avermitilis* ATCC 31271에 자외선 조사, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine NTG를 처리하여 획득한 변이주이다.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 031-452-4111, Fax: 031-456-4418  
E-mail: lbks@yuhan.co.kr

### 배지 조성

*S. avermitilis* YA99-40의 계대배양 배지는 inorganic nitrate starch agar (ISP No. 2, Difco)(16)에 soyptone (Sigma)을 2 g/l로 첨가하여 사용하였다. 종균배양 배지의 조성은 포도당 2%, 대두분 1.5%, corn steep liquor 0.5%, 효모추출물 0.3%, CaCO<sub>3</sub> 0.3%이었으며, 아버멕틴 발효를 위한 기본배지(SPYG)의 조성은 포도당 7%, 대두분 1.5%, 면실분 0.5%, 효모추출물 0.4%, 대두유, 0.5%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01%, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001%, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.001%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001%이었다. 멸균 전 배지의 pH는 7.0으로 조절하였다.

### 배양조건

*S. avermitilis* YA99-40을 계대배양 배지에 접종하여 28°C 항온기에서 7일간 배양한 다음 형성된 포자를 40 ml의 종균배지가 들어있는 250 ml baffled 삼각 flask에 1 ml 당 1×10<sup>6</sup> 개가 되도록 접종하고 28°C에서 24시간 동안 200 rpm으로 배양을 실시하였다. 배지조성 최적화를 위하여 본배양 배지 40 ml이 담긴 250 ml Erlenmeyer flask에 5%(v/v) 접종량으로 종균배양액을 접종하여 28°C의 항온실에서 2.5 cm의 진폭을 가진 진탕배양기(SI-4000R, Jeiotech)에 240 rpm으로 교반하며 7일간 배양하였다. 발효조 배양은 7 l 발효조(KF-7L, 한국발효기)에 4 l의 배지를 넣고 10%(v/v)의 종균배양액을 접종하여 배양온도 28°C, 교반속도 350 rpm, 통기량 0.8 vvm으로 고정하여 포도당 농도와 배양조건에 따라 9-12일간 배양하였다. 발효조 배양 시 기본 포도당 농도는 회분배양의 경우 9 %이었으며 유가식 회분배양의 경우 초기 포도당 농도는 7%이었다

### 무기인 영향

기본배지에 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 첨가하지 않고 *S. avermitilis* YA99-40을 배양하였을 때와 각각 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g/l의 농도로 배지에 첨가하여 배양하였을 때의 B1a 생산성 및 B1b 생성률을 조사하였다.

### 배지조성 최적화

아버멕틴 생성을 위한 유기질소원의 최적화를 위하여 반응표면 분석법(RSM; Response surface methodology)을 적용하였다. 아버멕틴 생성에 영향을 미치는 대두분, 면실분, 효모추출물의 농도별 영향을 확인하기 위하여 Table 1과 같은 중심합성법

**Table 1.** Experiment combinations according to codes of experimental design for optimization of avermectin production

Levels	Variables (g/l)		
	Soybean meal (X <sub>1</sub> )	Cotton seed flour (X <sub>2</sub> )	Yeast extract (X <sub>3</sub> )
-1.414	14.4	0	1.6
-1	15.0	0.8	2.0
0	16.5	2.8	3.0
+1	18.0	4.8	4.0
1.414	18.6	5.6	4.4

(central composite design)을 사용하였다. 독립변수로 대두분(X<sub>1</sub>), 면실분(X<sub>2</sub>), 효모추출물(X<sub>3</sub>)을 각각 선정하고, 아버멕틴 역가(Y)를 종속 변수로 선택하였을 때, 반응 변수에 대한 기본 model을 다음 식과 같이 가정하였다.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

시험 model의 통계적 분석에는 Sigmastat (ver. 2.0, SPSS)를 사용하였다.

### 유가식 회분배양 조건 최적화

유가식 회분배양 조건을 최적화하기 위하여 *S. avermitilis* YA99-40을 대상으로 7 l 발효조에 배지의 초기 포도당 농도를 70 g/l로 하여 배양하면서, 배양 시작 후 128, 136, 144 시간에 각각의 발효조에 30 g/l의 농도로 포도당을 첨가하고 배양을 240 시간까지 계속하여 유가식 배양조건을 검토하였다. 반복 유가식 회분배양은 유가식 회분배양에서 선정된 최적조건을 기본으로 일차 포도당 추가 후 배양을 각각 196, 206, 216시간까지 진행한 다음 2차로 20 g/l의 포도당을 발효조에 첨가하여 280 시간까지 배양을 계속하였다. 발효조 배양은 회분배양 때와 동일한 조건에서 수행하였다.

### 균체량 및 glucose 농도 측정

균체량은 배양액 10 ml을 취하여 15 ml의 원심분리관(Falcon)에 넣어 3000×g에서 10분간 원심분리한 다음 PMV(packed mycelial volume)를 측정하였다. 배양액 내의 포도당 농도는 배양시간 경과에 따라 채취한 배양액을 원심분리한 후 상등액을 증류수로 10~100배 희석하고, Accutrend Sensor (FR-51, Boehringer Mannheim)를 이용하여 측정하였다.

### 아버멕틴 추출 및 역가측정

배양액 2.5 ml를 취하여 15 ml의 원심분리관에 넣고 5 ml의 ethylacetate를 가한 다음 3시간 동안 진탕시켜 *S. avermitilis* 균사체 내에 축적된 아버멕틴을 추출한 다음, HPLC (L-7200 series, Hitachi)로 분석하였다. 분석에 사용된 column은 Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR (4.6×250 mm, Hitachi)이었으며, 용매는 acetonitrile, H<sub>2</sub>O, methanol을 14.5:4.5:1.0으로 혼합하여 기포를 제거한 후 사용하였다. 용매의 flow rate는 1.0 ml/min, 검출장치는 245 nm인 조건에서 아버멕틴 분석을 수행하였다. 아버멕틴 B1a 및 B1b의 비율은 245 nm에서의 peak 총면적에서 B1a 및 B1b가 각각 차지하는 peak의 면적비로 계산하였다

## 결 과

### 무기인 영향

SPYG 배지에 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 0.5 g/l 단위로 0~2.0 g/l까지 첨가하여 *S. avermitilis* YA99-40의 아버멕틴 생성에 관한 영향을 조사한 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 배지에 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 0.5~1.5 g/l까지 첨가할 때 아버멕틴 B1a 생성은 거의 영향을

**Table 2.** Phosphate effect on avermectin biosynthesis by *S. avermitilis* YA99-40

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l)	B1a (mg/l)	B1b <sup>a</sup> (%)
0	1,341	5.8
0.5	1,333	4.8
1.0	1,365	4.0
1.5	1,449	3.0
2.0	1,242	3.1

<sup>a</sup>Portion of total avermectins.**Table 3.** The response of avermectin production with *S. avermitilis* YA99-40 by changing concentration of soybean meal, cotton seed flour, and yeast extract

No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Response
1	-1	-1	-1	1240
2	-1	-1	+1	1173
3	-1	+1	-1	1336
4	-1	+1	+1	1089
5	+1	-1	-1	1282
6	+1	-1	+1	1072
7	+1	+1	-1	1369
8	+1	+1	+1	1055
9	-1.414	0	0	1336
10	+1.414	0	0	1219
11	0	-1.414	0	1238
12	0	+1.414	0	1192
13	0	0	-1.414	1450
14	0	0	+1.414	1313
15	0	0	0	1358
16	0	0	0	1452

받지 않았으나 생성된 총 아버멕틴 중 B1b의 구성비는 5.8%에서 3.0%로 낮아짐이 확인되었다. 첨가된 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도가 1.5 g/l를 초과한 경우 B1a의 생성이 저해되고 B1b 성분의 감소효과는 더 이상 나타나지 않음을 알 수 있다. 따라서 아버멕틴 생성에 적합한 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도는 1.5 g/l로 결정하였다.

#### 배지조성 최적화

본 배양 배지의 질소원 중 아버멕틴 생성에 큰 영향을 미치는 대두분과 면실분의 농도별 영향을 확인하기 위하여 RSM을 이용한 최적화를 실시하였다. Table 3의 시험결과를 통계적으로 분석하여 각 질소원 농도별로 아버멕틴 생성에 미치는 영향을 설정된 model식에 적용하였다. 각 변수들의 최적 농도를 구하기 위하여 Table 4의 각 회귀변수를 model 식에 대입하면,

$Y = 1434.83 - 6.53X_1 - 82.75X_2 - 259.57X_3 + 5.99X_1X_2 - 30.13X_1X_3 - 264.16X_2X_3 - 100.99X_{12} - 103.58X_{22} - 119.53X_{32}$  이 된다. 이 model로부터 아버멕틴 생성을 극대화할 수 있는 각 변수의 최적치를 계

**Table 4.** Regression results from the data of central composite designed experiments<sup>a</sup>

Model term	Regression coefficients	Standard Error	t-value	P-value
$\beta_0$	1434.826	132.342	10.842	<0.001
$\beta_1$	-6.531	47.311	-0.138	0.892
$\beta_2$	-82.748	48.123	-1.720	0.102
$\beta_3$	-259.572	50.101	-5.181	<0.001
$\beta_{12}$	5.986	45.452	-1.412	0.897
$\beta_{13}$	-30.125	57.193	-2.085	0.604
$\beta_{23}$	-264.162	45.525	-1.668	<0.001
$\beta_{11}$	-100.999	71.505	0.132	0.174
$\beta_{22}$	-103.578	49.688	-0.527	0.051
$\beta_{33}$	-119.530	71.652	-5.803	0.112

<sup>a</sup>Determination coefficient R<sup>2</sup>=0.835, R=0.914; Standard error of estimate=228.771; F value by ANOVA=10.569.

산하면, X<sub>1</sub>(대두분) = 16.4, X<sub>2</sub>(면실분) = 2.0, X<sub>3</sub>(효모추출물) = 3.0 g/l가 된다. 이들 값은 이론적으로 아버멕틴의 최대 역가를 나타낼 수 있는 질소원 농도가 된다. 이 값들은 기본배지 조성을 기준으로 대두분은 1.4 g/l 추가, 면실분과 효모추출물은 각각 3 g/l, 1 g/l를 감소시켜야함을 의미한다. 또한 이 값을 model식에 대입하면 최적화된 배지조성에서 *S. avermitilis* YA99-40를 배양할 때 이론상의 아버멕틴 B1a의 최대 역가는 1,451 mg/l이다. Fig. 1은 B1a 생성에 대한 대두분과 면실분 그리고 대두분과 효모추출물과의 농도별 상관 관계를 등고선 식으로 나타낸 것으로 B1a 생성에 가장 큰 영향을 끼치는 유기질소원은 대두분임을 나타내고 있으며, 효모추출물, 면실분 순으로 영향력이 감소함을 보여주고 있다. 실제로 최적화된 배지조성에서 회분배양을 수행한 결과 B1a 역가는 flask 배양 시 1,570 mg/l, 7 l 발효조 배양 시 1,558 mg/l에 달함이 확인되었다.

#### 유가식 회분배양 최적화

Flask 배양에서 phosphate 첨가, 그리고 질소원 최적화를 통하여 아버멕틴 B1a 생산성 향상과 B1b 구성비를 3.0%대로 낮출 수 있음을 확인하고 이러한 조건을 실험실 규모의 7 l 발효조 배양에 적용하여 *S. avermitilis* YA99-40의 아버멕틴 생산성을 조사하였다. 7 l 발효조를 이용한 유가식 회분배양(fed-batch)에서 초기 포도당 농도를 60, 70, 80 g/l로 달리하고 추가 포도당 농도와 포도당 첨가시기를 달리하여 유가식 배양을 수행한 결과 초기 포도당 농도가 70 g/l, 추가한 포도당 농도가 30 g/l일 때 아버멕틴 발효에 가장 적합함이 확인되었다(data not shown). 따라서 초기 포도당 농도 70 g/l, 추가 포도당 농도 30 g/l를 기본조건으로 설정하고 추가 포도당 첨가시기의 최적조건 설정, 반복적인 포도당 첨가에 의한 아버멕틴의 생산성 향상을 조사하였다.

발효조 배양 시작 후 128, 136, 144 시간에 배양액의 잔당농도를 측정하고 30 g/l에 달하는 농도로 추가 포도당을 첨가하여

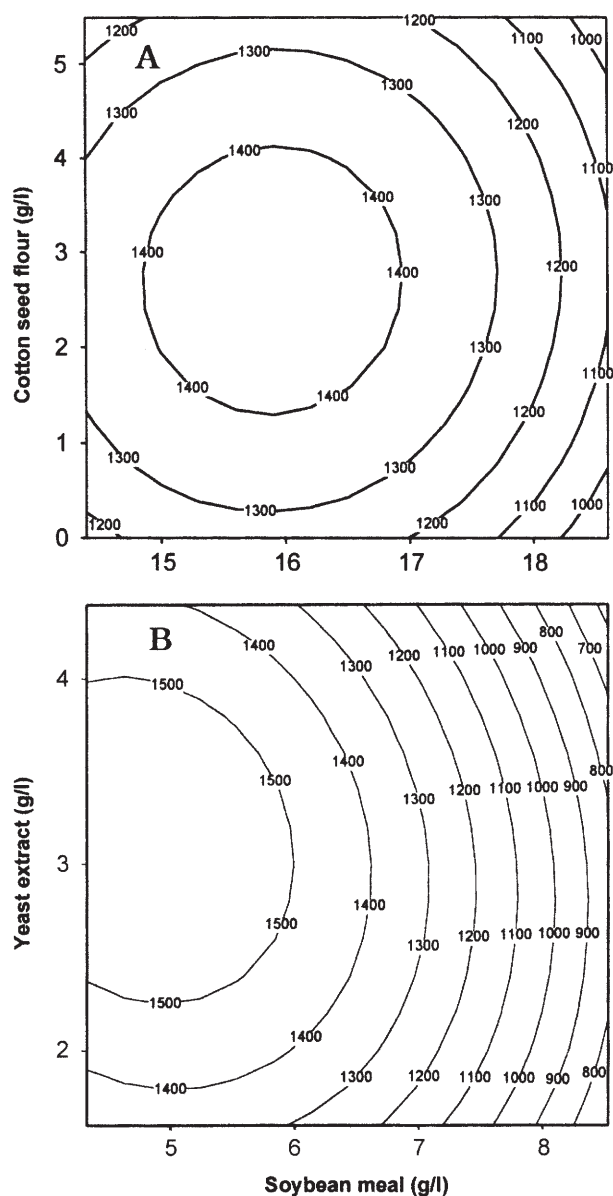


Fig. 1. Contour plots of production of avermectin B1a (mg/l) as a function of soybean meal and cotton seed flour (A), soybean meal and yeast extract (B).

배양한 결과와, 1차로 136 시간에 30 g/l에 달하는 추가 포도당을 첨가하여 배양을 진행하면서 2차로 배양 196, 206, 216 시간에 20 g/l의 달하는 포도당을 발효조에 첨가하여 280 시간까지 배양한 결과를 Table 5에 제시하였다. 유가식 회분배양에서 *S. avermitilis* YA99-40는 잔당농도가 10 g/l 미만인 조건에서 포도당을 추가로 첨가할 때 최대로 아버멕틴 B1a를 생성함을 알 수 있다. 1차로 30 g/l의 포도당을 첨가하고 다시 잔당 농도가 10 g/l이하로 저하되는 시기에 2차로 포도당 20 g/l를 첨가할 때 B1a 생산성이 최대에 달함을 알 수 있다. Table 6에 배지 최적화 이전과 이후 그리고 유가식 회분배양에 의한 B1a 생산성 향상 결과를 제시하였다. 배지 최적화 이전에 *S. avermitilis* YA99-40

Table 5. Effect of the glucose feeding time and the glucose concentration on the production of avermectin B1a by *S. avermitilis* YA99-40

Operation mode	Glucose feeding time (hr)	Feeding Glucose (g/l)	Residual Glucose (g/l)	B1a (mg/l)
Fed Batch	128	30	13.8	1,780
	136	30	8.5	1,978
	144	30	3.2	1,840
Repeated fed-batch	136, 196	30, 20	7.7, 12.3	2,366
	136, 206	30, 20	8.6, 7.1	2,545
	136, 216	30, 20	8.2, 2.2	2,278

Table 6. Effects of the medium optimization and the glucose feeding mode on the production of avermectin B1a by *S. avermitilis* YA99-40 in a 7 l laboratory fermentor

Cultivation mode	Batch in SYPG <sup>a</sup>	Batch in SYPG-2 <sup>b</sup>	Fed-batch mode A <sup>c</sup>	Fed-batch mode B <sup>d</sup>
Initial glucose concentration (g/l)	90	90	70	70
Time of cultivation (hr)	210	210	240	280
B1a (mg/l)	1,366	1,558	1,978	2,545
Improvement of B1a (%)	—	14.1	44.8	86.3
Proportion of B1a in total avermectins (%)	38	40	42	45

<sup>a</sup>SYPG, medium before optimization.

<sup>b</sup>SYPG-2, medium after optimization.

<sup>c</sup>Fed-batch mode A, 30 g/l glucose feeding at 136 hr, <sup>d</sup>Mode B, repeated glucose feeding 30 and 20 g/l at 136 and 206 hr, respectively.

는 회분배양 결과 낮은 B1a 생산성을 보이며 생성된 총 아버멕틴 중 B1a 구성비율도 38%로 비교적 낮은 편이나, 배지 최적화 이후 B1a 생산성은 14% 그리고 B1a 구성비율은 40%로 각각 향상되었다. 또한 *S. avermitilis* YA99-40는 유가식 회분배양 및 반복 유가식 회분배양을 통하여 B1a 생산성은 회분배양 대비 86.3% 향상되었으며 B1a 구성비율은 45%로 향상되었음을 보여주고 있다.

Fig. 2는 7 l 발효조에서 최적화된 배지조성에서 *S. avermitilis* YA99-40으로 반복 유가식 회분배양을 수행하였을 때의 배양 양상을 나타낸 것으로 cell의 성장은 48시간 이내에 대부분 이루어지고, 아버멕틴은 배양 48 시간 이후부터 시간에 비례하여 10.6 mg/l/hr 비율로 생성됨을 알 수 있다. 배지의 pH는 배양 초기 급격히 감소하였다가 24 시간 이후 다시 급상승을 한 다음 아버멕틴의 생성과 더불어 서서히 감소하다가 배지내의 포도당 고갈과 더불어 다시 상승함을 알 수 있다. 포도당 소모 후 배양액의 pH 상승은 배양종료 시점을 알려주는 지표로 이용될 수 있다.



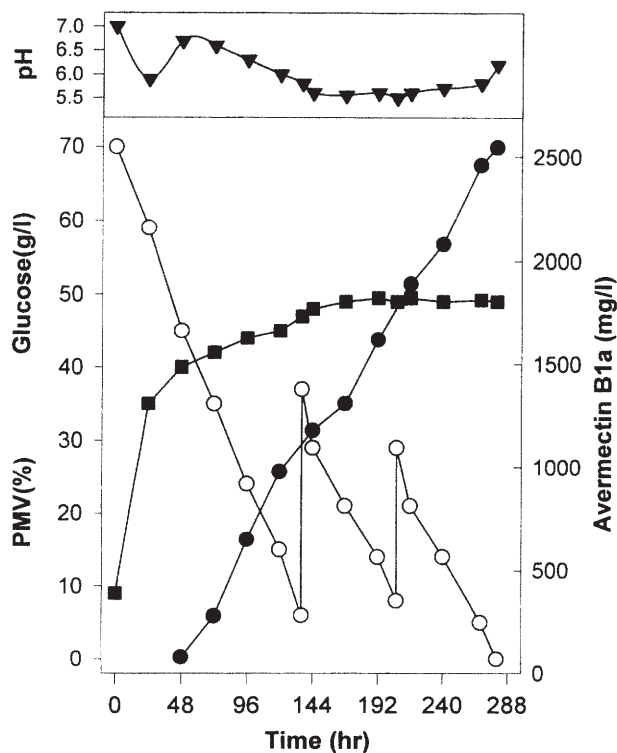


Fig. 2. The avermectin production by *S. avermitilis* YA99-40 in 7 l laboratory fermentor. The medium was optimized through optimization of pH, phosphate, and organic nitrogen sources. The glucose feeding was carried out by addition of 30 and 20 g/l of glucose at 136 and 206 hr, respectively. Symbols: avermectin (●), glucose (○), pH (▼), PMV (packed mycelial volume, ■).

## 고 찰

항생제 발효 시 적정농도 이상의 phosphate가 배지에 첨가되면 항생제 생성대신 균체의 성장이 야기되어 이차대사가 억제되고 일차대사로의 전환이 이루어진다(11). Martin(10)은 30종 이상의 많은 항생제가 phosphate에 의해 생성이 저해된다고 보고하였으며 phosphate에 의해 저해되는 정도에 따라 3가지 group으로 구분하였다. 즉, 첫 번째 group은 1 mM 이하의 phosphate에 의해 저해를 받으며, 두 번째 group은 1-10 mM의 phosphate의 존재 하에 이차대사가 저해받지 않으며, 세 번째 group은 10 mM 이상의 phosphate에 의해 이차대사가 저해를 받는다고 하였다. *S. avermitilis* YA99-40은  $K_2HPO_4$ 가 2 g/l (11.5 mM phosphate)의 농도로 배지에 첨가될 때 아버멕틴 생성이 저해됨이 확인되어 세 번째 group에 속함을 알 수 있다. 이는 Čurdová 등(4)의 결과, 즉 *S. avermitilis*는 세 번째 항생물질 생성 group에 속한다는 보고와 일치하였다. *S. avermitilis* YA99-40은  $K_2HPO_4$ 를 1.5 g/l의 농도로 배지에 첨가할 경우 아버멕틴의 생산성이 영향을 받지 않을뿐더러 오히려 B1b 성분의 생성률을 저하시키는 효과가 있었다. 이는 *S. avermitilis* YA99-40가 당을 이용할 때 생성되는 유기산에 의해 야기되는 배양액의 pH 저하를 배지에 첨가된  $K_2HPO_4$ 가 방지하기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 *S.*

*avermitilis* YA99-40의 아버멕틴 생산을 최적화하기 위한 방안으로 아버멕틴 생산 배지에 1.5 g/l (8.6 mM)의  $K_2HPO_4$ 를 기본적으로 첨가하였다.

RSM 기법으로 유기질소원 농도를 최적화한 결과 이론상 아버멕틴 B1a의 최대 역가는 1,451 mg/l이었는데, flask 배양 결과 B1a 역가는 이보다 약간 높은 1,570 mg/l을 기록하였고 7 l 발효조 배양 시에는 1,558 mg/l을 기록하였다. 이 같은 결과는 RSM 기법을 적용하여 유기질소원의 농도를 최적화에 한 것이 적절하였음을 의미한다. 세 가지 유기질소원 중 B1a 생성에 가장 큰 영향을 주는 성분은 대두분이었다. 배지의 유기질소원 중 대두분을 소량의 양적 변화를 가하여도 B1a 생산성이 민감하게 영향받았으며 이 같은 현상은 면실분보다는 효모추출물과의 관계에서 뚜렷하게 나타남이 확인되었다. 이상의 배지 최적화 결과를 종합하여 새로 조성한 아버멕틴 생산배지 SPYG-2는 유기질소원의 농도를 대두분 16.4 g/l, 면실분 2 g/l, 효모추출물 3 g/l로 변경하였다.

*S. avermitilis* YA99-40을 이용하여 유가식 회분배양을 수행한 결과 B1a의 구성비는 42%까지 향상되었고, 반복 유가식 회분배양을 통하여 45%까지 향상되었으며 B1a 생산성은 회분배양에 비해 각각 48.6%, 86.3% 증가함으로써, 유가식 회분배양에 따른 아버멕틴의 생산성 향상은 8가지의 아버멕틴 유도체중 B1a 성분의 생산성 증가에 특히 유효함을 알 수 있다. 이는 *S. avermitilis* K139의 배양 후기에 추가로 일정량의 당을 배양액에 첨가함으로써 아버멕틴 총 생성량이 2배로 증가되었다고 한 Ikeda 등(6)의 보고와 그리고 *S. avermitilis* IP762의 발효조 배양 후반에 각각 10 g/l의 포도당을 3회에 걸쳐 첨가한 결과 B1a 생산성이 회분배양에 비해 378.1 mg/l에서 780 mg/l로 2배 이상 향상되고 생성된 총 아버멕틴 중 B1a의 구성비도 32.5%에서 38.5%로 현저히 개선되었다고 한 Zhinan 등(18)의 보고와 유사한 결과이다. 이 같은 결과는 균주개량, 배지조성의 최적화를 바탕으로 배양환경의 생리적 조절에 의한 아버멕틴 B1a 성분의 생산성 향상이 2500 mg/l 수준까지 가능성을 제시하고 있다.

따라서 RSM 기법을 적용한 실험실 규모의 배지 최적화와 유가식 회분배양에 의한 B1a 생산성 및 성분비의 향상 결과는 배양규모의 확대 시 유용하게 적용될 수 있으며, 이는 아버멕틴의 산업적 생산에 있어 경제성을 크게 높일 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 산업자원부 산업기반기술개발사업(과제번호: A00-961-5411-01)의 지원에 의해 수행된 결과의 일부로서, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Burg, R.W., B.M. Miller, E.E. Baker, J. Birnbaum, S.A. Currie, R. Hartman, Y.-L. Kong, R.L. Monaghan, G. Olson, I. Putter, J.B. Tunac, H. Wallick, E.O. Stapley, R. Ōiwa, and S. Ōmura. 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing

- organism and fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 361-367.
2. Campbell, W.C., M.H. Fisher, E.O. Stapley, G. Albers-Schönberg, and T.A. Jacob. 1983. Ivermectin: A potent new antiparasitic agent. *Science* 221, 823-828.
  3. Cimburková, E., J. Zima, J. Novák, and Z. Vaňk. 1988. Nitrogen regulation of avermectins biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* in a chemically defined medium. *J. Basic Microbiol.* 28, 491-499.
  4. Čurdová, E., V. Jechová, J. Zima, and Z. Vaněk. 1989. The effect of inorganic phosphate on the production of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *J. Basic Microbiol.* 29, 341-346.
  5. Egerton, J.R., D.A. Ostlind, L.S. Blair, C.H. Eary, D. Suhayda, S. Cifelli, R.F. RieK, and W.C. Campbell. 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Efficacy of the B1a component. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 372-378.
  6. Ikeda, H., H. Kotaki, H. Tanaka, and S. Ōmura. 1988. Involvement of glucose catabolism on avermectin production by *Streptomyces avermitilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 282-284.
  7. Ikeda, H. and S. Ōmura. 1991. Selective production of specific components of avermectins. *J. Antibiot.* 44, 560-563.
  8. Ikeda, H. and S. Ōmura. 1993. Genetic aspects of the selective production of useful components in the avermectin producer *Streptomyces avermitilis*. *Actinomycetol.* 7, 133-144.
  9. Ikeda, H. and S. Ōmura. 1995. Control of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* for the selective production of a useful component. *J. Antibiot.* 48, 549-562.
  10. Martin, J.F. 1977. Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv. Biochem. Eng.* 6, 105-127.
  11. Martin, J.F. and A.L. Demain. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 44, 230-251.
  12. McCann-McCormick, P.A., R.L. Monaghan, E.E. Baker, R.T. Goegelman, and E.O. Stapley. 1981. Fermentation development and process development. P.69-74 In Moo-Yong, M, et al. (eds), *Advances in Biotechnology*. Pergamon, New York.
  13. Miller, B.M., L. Chaiet, D.J. Cole, L.J. Cole, J.E. Flor, R.T. Geogelman, V.P. Gullo, H. Joshua, A.J. Kempf, W.R. Krellwitz, R. L. Monaghan, R.E. Ormond, K.E. Wilson, G. Albers-Schönberg, and I. Putter. 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Isolation and chromatographic properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 368-371.
  14. Novak, J.P., T. Rezanka, and Z. Vaněk. 1992. Nitrogen regulation of fatty acid and avermectins biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *FEMS Microb. Lett.* 93, 57-62.
  15. Omstead, M.N., L. Kaplan, and B.C. Buchland. 1989. Fermentation development and process improvement. P.33-54. In W.C. Campbell (ed.), *Ivermectin and abamectin*. Springer-Verlag, New York.
  16. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16, 313-340.
  17. Zhinan, X. and C. Feilin. 1999. Enhanced production of avermectin B1a by medium optimization and glucose feeding with *Streptomyces avermitilis*. *Bioprocess Engineering* 20, 67-71.
  18. Zhinan, X. and C. Feilin. 1999. Stimulation of avermectin B1a biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* by feeding glucose and propionate. *Biotechnol. Letters* 21, 91-95.

(Received May 14, 2001/Accepted June 4, 2001)

# ABSTRACT: Enhanced Production of Avermectin B1a with *Streptomyces avermitilis* by Optimization of Medium and Glucose Feeding

Byung-Kyu Lee\*, Jong-Kyun Kim, Heui-Il Kang, and Jong-Wook Lee (Biotech Research Center, Yuhan Research Institute, Gunpo 435-715, Korea)

The effect of phosphate on the production of avermectin B1a was studied. Response surface methodology was applied to optimize the concentration of organic nitrogen sources. The portion of B1b in total avermectins was decreased from 5.8% to 3.0% by the addition of 1.5 g/l inorganic phosphate to the production medium. Among organic nitrogen sources, soybean meal was the most effective on avermectin biosynthesis. Results showed that B1a productivity was increased by 44.8% in a laboratory scale fermenter cultivation of *Streptomyces avermitilis* YA99-40 through fed-batch process. A maximal B1a productivity was obtained by repeated 30 and 20 g/l of glucose feeding at 136 and 206 hour, respectively. The B1a productivity was increased by 86.3% and the proportion of B1a in the total avermectins was improved from 38% to 45% with respect to the control process. These results would be very useful for enhancing productivity of B1a in an up-scaled processes.