

NTG－다중항생소저항성변이에 의한 스피노신생성균그루의 육종

김철진, 박현화, 윤은희

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《새로운 과학기술분야를 개척하기 위한 사업도 전망성있게 밀고나가야 합니다.》

(《김정일선집》 증보판 제11권 138페이지)

스피노신(Spinosyn)은 큰 고리구조를 가지고있는 락톤류화합물의 일종으로서 토양방선균 *Saccharopolyspora spinosa*가 생성하는 2차대사산물인데 농업용광복생물살충제로 널리 응용되고있다. 스피노신류살충제는 살충효과가 특별히 좋고 살충물질새가 독특하여 응용범위가 매우 넓을뿐만아니라 사람과 포유동물에 대한 독성이 거의 없고 환경피해가 없는 등의 우점이 있다.[2]

우리는 니트로조구아니딘(NTG)과 자외선(UV)을 리용한 물리화학적변이방법과 리보솜공학기술을 리용한 다중항생소저항성변이방법을 결합시켜 스피노신생성능력이 높은 균그루를 육종하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

출발균그루로는 *Saccharopolyspora spinosa* ATCC49460을 리용하였다.

배지로는 경사면계대배지(포도당 0.5%, 소고기엑스 0.3%, 카제인물작용분해물 0.025%, 정제우무 2%, pH 7.2), 종균배지(포도당 2.5%, 카제인물작용분해물 2.5%, 효모추출물 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2%, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.02%, pH 7.2), 발효배지(포도당 4%, 폴립성농마 3%, 효모엑스 2%, NaCl 0.3%, $CaCO_3$ 0.1%, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.02%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%, pH 7.2)를 리용하였으며 균그루의 배양은 선행방법[6]에 기초하여 진행하였다.

NTG변이와 UV변이, 다중항생소저항성변이 그리고 균그루의 총변이률과 정변이률에 대한 계산은 선행방법[1, 4]에 따라 진행하였다.

스피노신에 대한 분석은 HPLC법[3](장치: 《CXTH-3000》; 탑C-18: 길이 18cm, 내경 5.0mm; 류동상: 90% 메틸알콜; 측정파장 246nm, 시료주입량 10 μ L, 류속 1.3mL/min)으로 진행하였다.

결과 및 논의

1) 스피노신생성균그루육종에 미치는 물리화학적변이조건인 영향

*S. spinosa*균그루의 유전적특성과 스피노신합성물질새가 완전히 명백하게 밝혀지지 않은 조건에서 물리화학적변이는 여전히 스피노신의 생성량을 늘이고 균그루를 개조하기 위한 중요한 수단으로 된다.[1, 5]

균그루육종을 위하여 먼저 스피노신생성률에 미치는 NTG 및 UV변이조건인 영향을 검토하였다.(표 1)

표 1. 스피노신생성률에 미치는 NTG 및 UV변이조건인의 영향

구분	변이시간/min	검토균수/개	총변이률/%	정변이률/%	최고생성률/%
대조	—	—	—	—	100
NTG	20	30	60.0	13.3	119.27
	40	30	70.0	40.0	121.84
	60	30	66.7	26.7	113.91
UV	1	45	40.0	4.4	105.86
	2	45	57.8	13.3	110.23
	3	45	64.4	17.8	107.64
	4	45	75.6	17.8	116.38
	5	45	62.2	8.9	112.09

NTG 0.75mg/mL; UV 25W, 30cm

표 1에서 보는바와 같이 0.75mg/mL NTG로 40min동안 처리했을 때 정변이률과 스피노신최고생성률이 모두 가장 높았다. 그리고 25W UV등으로 30cm의 거리에서 3~4min동안 처리했을 때 정변이률이 가장 높았고 스피노신최고생성률은 처리시간이 4min일 때 가장 높았다. 이로부터 우리는 0.75mg/mL NTG로 40min동안 처리하고 25W UV등(거리 30cm)으로 4min동안 처리하는것을 스피노신생성량을 높이는 최적변이조건으로 선택하였다.

2) 스피노신생성균그루육중에 미치는 다중항생소저항성변이조건인의 영향

항생소저항성변이는 리보솜의 일부 단백질을 암호화하는 유전자들의 특정한 부위에서 일어나는데 이것은 미생물의 2차대사과정에 직접 영향을 주어 생성물의 양을 크게 변화시킬 수 있다.[4]

우리는 먼저 리보솜변이에 널리 쓰이는 5종의 항생소(스트렙토미쥬(Str), 젠타미쥬(Gen), 리팜피신(Rif), 에리트로미쥬(Ery), 클로람페니콜(Chl))을 선정한 다음 *S. spinosa* ATCC49460 균그루에 대한 항생소들의 최소억제농도를 결정(Str 0.5 μ g/mL, Gen 10 μ g/mL, Rif 200 μ g/mL, Ery 40 μ g/mL, Chl 3 μ g/mL)하고 이것을 항생소저항성변이의 선발농도로 하였다.

다음 스피노신생성에 미치는 항생소조합의 영향을 검토하였다.

5종의 항생소들중에서 스트렙토미쥬를 다중항생소저항성변이의 첫번째 항생소로 선택했을 때 변이균그루의 정변이률이 전반적으로 높았고 기타 4종의 항생소들인 경우에는 정변이률이 매우 낮았다. 그리고 2번째부터 5번째 항생소들의 순서는 정변이률에 유의한 영향을 미치지 않았다. 스트렙토미쥬를 다중항생소저항성변이의 첫번째 항생소로 선택했을 때 스피노신생성에 미치는 항생소조합의 영향은 표 2와 같다.

표 2. 스피노신생성에 미치는 항생소조합의 영향

구분	검토균수/개	총변이률/%	정변이률/%	최고생성률/%
대조	—	—	—	100
Str	45	53.3	22.2	121.72
StrGen	45	57.8	35.6	137.90
StrGenRif	45	62.2	53.3	170.37
StrGenRifEry	45	64.4	60.0	172.59
StrGenRifEryChl	45	80.0	42.2	141.32

표 2에서 보는바와 같이 총변이률은 5종의 항생소를 조합했을 때 가장 높았지만 정변이률은 4종의 항생소(StrGenRifEry)를 조합했을 때 60%로서 가장 높았으며 이때 스피노신

최고생성률도 가장 높았다. 그리고 3종의 항생소(StrGenRif)를 조합했을 때에도 4종의 항생소를 조합했을 때보다 총변이률과 정변이률이 약간 낮았지만 다른 항생소조합들보다는 현저히 높았다. 이로부터 우리는 3종(StrGenRif) 및 4종의 항생소(StrGenRifEry)조합을 스피노신생성량을 높이는 최적변이조건으로 정하였다.

3) NTG 및 UV변이와 다중항생소저항성변이의 결합에 의한 균그루육종

우리는 위에서 결정한 물리화학적변이조건과 항생소저항성변이조건에 기초하여 먼저 출발균그루 *S. spinosa* ATCC49460에 대하여 각각 NTG변이와 UV변이를 유도한 다음 매 변이시험구에 대하여 각각 3종 및 4종의 항생소저항성변이를 유도하였다.(표 3)

표 3. NTG, UV-다중항생소저항성변이균그루의 변이률과 최고생성량

구분	검토균수/개	총변이률/%	정변이률/%	최고생성량/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
NTG-3종항생소변이	45	84.4	57.8	257.4
NTG-4종항생소변이	45	80.0	64.4	286.7
UV-3종항생소변이	45	71.1	31.1	206.8
UV-4종항생소변이	45	66.7	37.8	223.1

표 3에서 보는바와 같이 NTG변이와 항생소저항성변이를 결합한 시험구들에서는 UV변이와 항생소저항성변이를 결합한 시험구들보다 총변이률과 정변이률, 스피노신최고생성량이 모두 높았다. 그리고 NTG변이와 3종항생소저항성변이를 결합한 시험구에서는 총변이률이 가장 높았고 NTG변이와 4종항생소저항성변이를 결합한 시험구에서는 총변이률은 그보다 조금 낮았지만 정변이률과 스피노신최고생성량이 가장 높았다. 스피노신생성량이 가장 높은 변이균그루는 *S. spinosa* 2-24($286.7\mu\text{g/mL}$)로서 출발균그루에 비하여 생성량이 약 2.9배 증가하였다.

변이균그루의 유전적대사안정성을 검토하기 위하여 스피노신생성량이 가장 높은 5개의 변이균그루를 선택하고 경사면배지를 리용하여 5차 계대하면서 계대회수에 따르는 스피노신생성량의 변화를 고찰하였다.(그림)

그림에서 보는바와 같이 5개의 변이균그루들 중 3개 균그루는 5차 계대한 후 스피노신생성량이 90~96%로 유지되었고 나머지 2개 균그루는 유전적으로 불안정하였다. 그중 변이균그루 *S. spinosa* 2-24의 유전적안정성이 가장 좋았다.

S. spinosa 2-24균그루가 생성한 스피노신에 대한 HPLC분석을 진행한 결과 살충활성을 나타내는 기본활성성분인 스피노신 A와 D가 나타내는 봉우리가 표품의 경우와 일치하였다. 이로부터 *S. spinosa* 2-24균그루가 유전적으로 안정하게 스피노신을 생성한다는것을 알수 있었다.

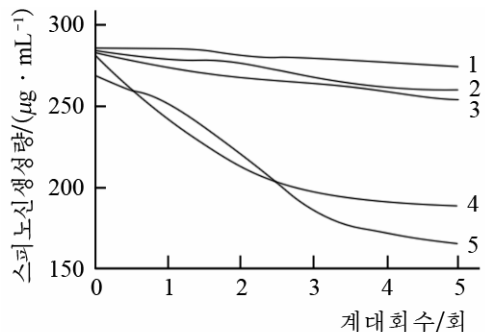


그림. 계대회수에 따르는 스피노신 생성량의 변화

1-5는 균그루번호가 각각 2-24, 2-15, 2-28, 1-17, 1-30인 경우

맺 는 말

NTG-다중항생소저항성변이로 육종한 변이균그루 *Saccharopolyspora spinosa* 2-24는 출발균그루에 비하여 스피노신생성량이 약 2.9배 높으며 유전적으로 안정하다.

참 고 문 헌

- [1] B. Huang et al.; Microbiology & Biotechnology, 99, 4419, 2015.
- [2] C. Waldron et al.; Chemistry & Biology, 8, 487, 2001.
- [3] C. Xue et al.; Biochemical Engineering Journal, 72, 92, 2013.
- [4] K. Ochi et al.; Advances In Applied Microbiology, 56, 175, 2004.
- [5] P. M. Tarcisio et al.; Chemosphere, 222, 503, 2019.
- [6] 乔广军 等; 食品与发酵科技, 48, 33, 2012.

주체110(2021)년 1월 5일 원고접수

Breeding of Spinosyn Producing Strain through Multi-Antibiotic Resistance Mutagenesis Combined with NTG Mutagenesis

Kim Chol Jin, Pak Hyon Hak and Yun Un Hui

A variant, *Saccharopolyspora spinosa* 2-24, bred through multi-antibiotic resistance mutagenesis combined with NTG mutagenesis achieved spinosyn productivity about 2.9 times higher than that of the original strain, and was genetically stable.

Keywords: multi-antibiotic resistance mutagenesis, spinosyn