



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0122500
(43) 공개일자 2012년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01) C07K 16/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0040691
(22) 출원일자 2011년04월29일
심사청구일자 2011년04월29일

(71) 출원인
(주) 제노텍
대전광역시 유성구 가정북로 26-69 (장동)
(72) 발명자
김재중
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 309동 202호 (전민동, 엑스포아파트)
임시규
대구광역시 수성구 동원로 123, 매트르팔레스아파트 207동 2205호 (만촌동)
(74) 대리인
강성혜

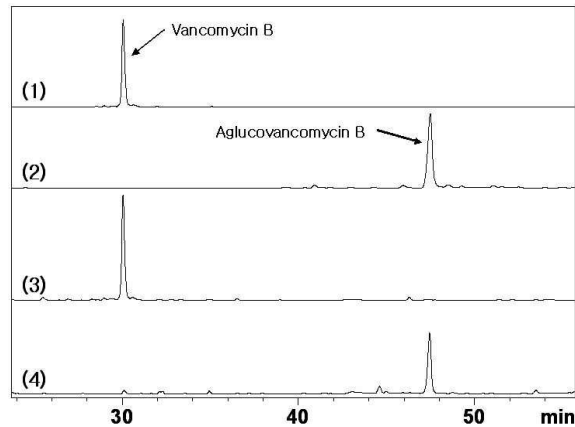
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 아글루코반코마이신을 생산하는 미생물

(57) 요약

본 발명은 아글루코반코마이신(Aglucovancomycin)을 생산하는 미생물인 아미콜라톱시스 오리엔탈리스(*Amycolaptosis orientalis*)에 관한 것이다. 좀더 구체적으로, 본 발명은 반코마이신 고생산 산업균주인 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KFCC10990P를 사용하여 *vcm17* (glycosyl transferase) 유전자를 돌연변이하여 아글루코반코마이신 고생산균주 제조방법 및 이 신균주에 관한 것이다. 본 발명으로 작제된 신균주는 반코마이신을 생산하지 않으며, 아글루코반코마이신을 고생산하여 고효율로 수득할 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

이금순

대전광역시 대덕구 계족로690번길 21, 선비마을 1
단지 103동 803호 (법동)

김동환

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 106동 904호 (진
민동, 엑스포아파트)

이미옥

대전광역시 대덕구 동춘당로 151, 그린아파트 110
동 203호 (법동)

유정현

충청북도 청주시 흥덕구 개신동 두진백로아파트
102동 908호

이보미

충청남도 논산시 해월로 29-9 (부창동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10032514

부처명 지식경제부

연구사업명 부품소재기술개발사업

연구과제명 고역가 생산 공정 개발을 통한 고순도 반코마이신 생산

주관기관 제노텍

연구기간 2009.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 헵타펩타이드로 구성된 아글루코반코마이신 모이어티에 당쇄가 하나 이상 연결되어 생성되는 글라이코펩타이드 생산균주로부터 당전이효소 유전자가 결여된 벡터를 제조하는 단계; 및
- b) 상기 선택된 균주와 동일 균주에 상기 벡터를 접합시켜 형질전환시키는 단계;를 포함하는 아글루코반코마이신 생산균주 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 a) 단계의 균주는 반코마이신 생산균주, 발히마이신 생산균주, MM47761 생산균주, 클로로에레모마이신 생산균주 및 오리엔티신 생산균주로 이루어진 그룹 중 선택된 1종의 균주임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 a) 단계의 균주는 반코마이신 생산균주임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 균주는 반코마이신을 생산하는 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 (*Amycolatopsis orientalis*)임을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

- a) 헵타펩타이드로 구성된 아글루코반코마이신 모이어티에 당쇄가 하나 이상 연결되어 생성되는 글라이코펩타이드 생산균주로부터 당전이효소 유전자가 결여된 벡터를 제조하는 단계; 및
- b) 상기 선택된 균주와 동일 균주에 상기 벡터를 접합시켜 형질전환시키는 단계;를 포함하는 제조방법에 의하여 제조되는 아글루코반코마이신 생산균주.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 a) 단계의 균주는 반코마이신 생산균주, 발히마이신 생산균주, MM47761 생산균주, 클로로에레모마이신 생산균주 및 오리엔티신 생산균주로 이루어진 그룹 중 선택된 1종의 균주임을 특징으로 하는 균주.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 a) 단계의 균주는 반코마이신을 생산하는 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 (*Amycolatopsis orientalis*)임을 특징으로 하는 균주.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 아글루코반코마이신 생산균주는 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KCTC11913BP임을 특징으로 하는 균주.

청구항 9

제5항 내지 제7항 중 선택된 어느 한 항의 균주를 이용하여 화학적 수식 또는 효소적 수식 방법으로 아글리코반코마이신 유도체를 생산하는 방법.

명세서

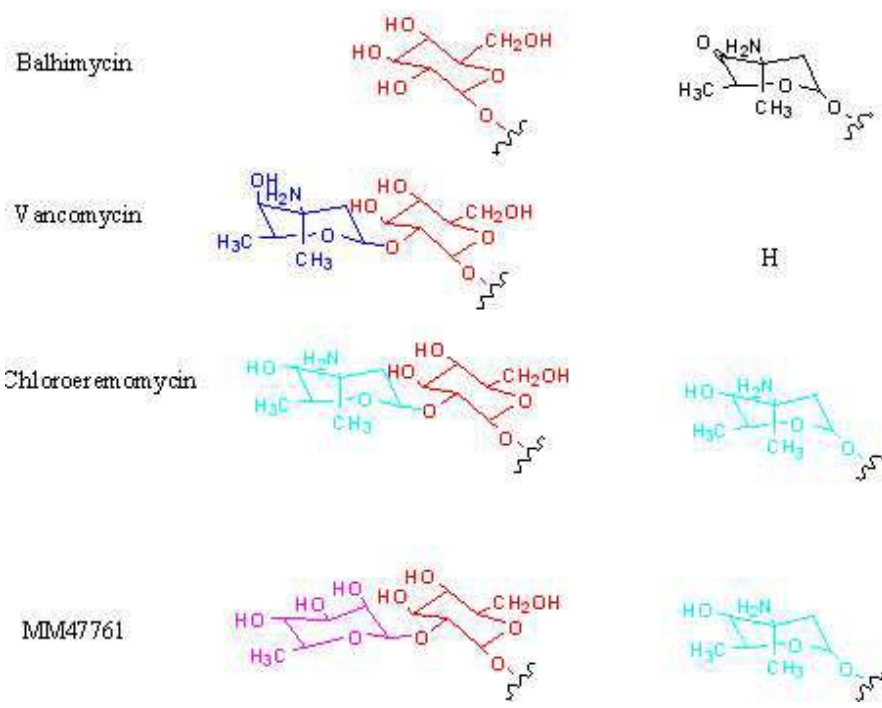
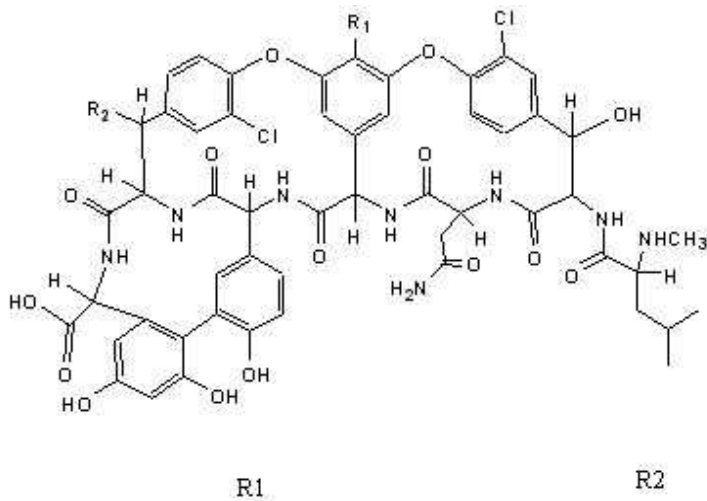
기술분야

[0001] 본 발명은 아글루코반코마이신(Aglucovancomycin)을 생산하는 미생물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 반코마이신은 Eli Lilly의 E. C. Kornfeld 박사가 반세기도 전에 보르네오섬 정글 깊숙한 토양에서 분리한 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 (*Amycolatopsis orientalis*)에서 생산되는 글라이코펩타이드 (glycopeptides)계 항생제이다. 반코마이신은 사용 초기인 1950년대 중반에는 이독성과 요독성의 심각한 독성이 나타났고, 메티실린 (methicillin)과 같은 항 스타필로코커스 페니실린 (anti-staphylococcal penicillins)이 개발되어 널리 사용되지 못했다. 그러나, 1970년대 중반에 반코마이신의 독성이 반코마이신에 혼합된 불순물에 의한 것으로 밝혀졌고, 한편 세계 도처에 메티실린 내성 스타필로코커스 오레우스 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA)가 출현하여 반코마이신이 다시 사용되기 시작하였고, 현재까지 “최후의 처방약”으로 고려되어 널리 사용되고 있다.

화학식 1



[0003]

[0004]

반코마이신의 구조는 화학식 1과 같이 7개의 아미노산 잔기가 결합되어 있는 헵타펩타이드 (hepta peptide)에 -O-반코사민 (vancosamine) - 글루코실 (glucosyl) 기가 결합되어 있는 분자량 약 1449의 항생제이다. 반코마이신은 세균 세포벽 구성 성분인 뮤코펩타이드의 D-ala-D-ala의 전구체와 결합하여 세포벽 합성을 저해하여 항균 활성을 나타내며, 주로 그람 양성세균인 포도상구균 (*Staphylococcus*), 연쇄상구균 (*Streptococcus*), 클로스트리움 디피실 (*Clostridium difficile*) 등의 감염성 질환의 치료에 사용된다.

[0005]

반코마이신은 특히, 수술환자 및 고령환자, 면역력이 약한 사람에게 치명적인 메티실린 내성 포도상구균 (MRSA)의 치료에 매우 중요한 약물이며, 주로 반코마이신 염산염의 형태로 주사제 또는 경구제로 상용되고 있다.

[0006]

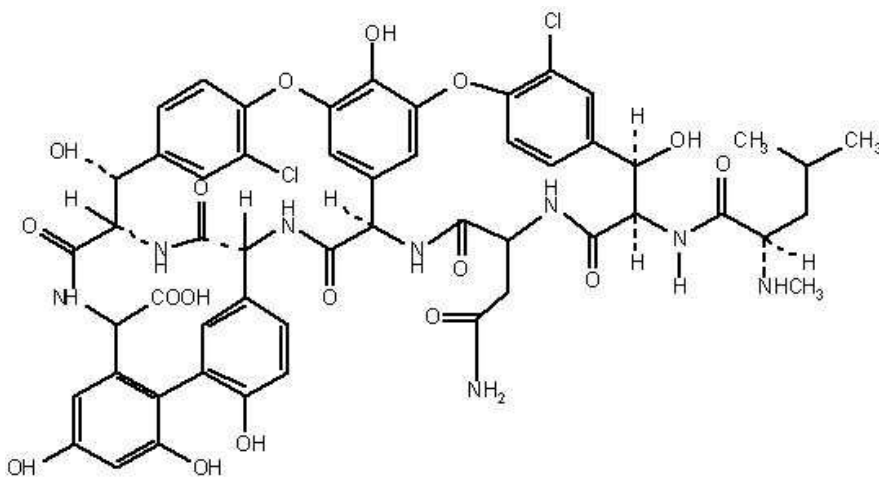
최근 반코마이신 내성균주의 출현은 공중보건의 새로운 위협으로 떠오르고 있다. 이러한 이유로 반코마이신 내성균주 등의 치료에 사용될 수 있는 새로운 글라이코펩타이드 유도체의 개발이 요구되고 있다. 클로로바이페닐 반코마이신 (Chlorobiphenyl vancomycin), 오리타반신 (oritavancin), 달바반신 (dalbavancin)과 같은 유도체가 개발되었으며 임상적 시험을 거쳐 새로이 시장에 진입 중이다.

[0007] 많은 약물들에서 당의 존재가 매우 중요한데 이는 물성의 변화 또는 생체내 안정성 증대 등의 여러 가지 약동력학적인 원인에 의해 당이 약품의 인 비보 활성을 크게 증대시키기 때문이다. 반코마이신 또한 당의 존재와 종류에 따라 세포벽의 결합에 미치는 열동역학적인 특성이 크게 변화하여 인 비보 활성이 달라질 수 있다.

[0008] 그러므로 반코마이신과 같은 글라이코펩타이드계 항생제의 신규 구조 개발을 위해 당의 변화가 1차적으로 고려되는 유도체 생산의 전략이 되고 있다. 이러한 전략 중 한 가지는 반코마이신 등을 비당체로 변환하여 이를 이용하여 화학적 수식 혹은 효소화학적 수식을 통해 신규물질을 창출하는 것이다.

[0009] 화학적인 수식을 통한 신규 물질 창출의 예로, 반코마이신, 테이코플라닌 등의 비당체를 화학적으로 수식하는 반합성 공정을 통해 HIV 치료 목적의 항 레트로바이러스 활성 (anti-retroviral activity)이 있는 신규의 친지질 글라이코펩타이드 (lipophilic glycopeptides)를 조제한 사례 (J. Med. Chem. 2003, 46, 2755-2764, J. Med. Chem. 2005, 48, 3885-3890, Antiviral Research, 2006, 71, 227-236)가 있다. 그리고, 효소화학적 수식의 좋은 예로는 글루코스 전이효소 (D-glucosyltransferase, GtF)와 반코사민전이효소 (L-vancosaminyl-transferase, GtD)를 활용하여 신규 글라이코펩타이드를 창출한 것이다 (Nat. Biotechnol. 2003, 21, 1467-1469; J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 9604-9605; US 2008/0268504; US 2004/0259228). 이들은 당전이 효소들의 약한 기질 특이성 (relaxed substrate specificity)을 활용하여 반코마이신 비당체 (aglycone)에 원래의 기질인 글루코스와 반코사민을 대신하여 다양한 합성 데옥시당 (deoxy sugar)이나 아미노당 (amino sugar)을 부착하여 다양한 글라이코펩타이드 유도체들을 조제하여 우수한 항균 활성을 나타내는 물질을 창출하였다.

화학식 2



[0010] 상기 신규 물질 창출 전략은 반코마이신 비당체 등의 펩타이드 골격에 당을 부가 수식하는 것이다. 반코마이신 비당체 (Vancomycin aglycon; Molecular Formula, C₅₃H₅₂Cl₂N₈O₁₇; MW, 1143.9)는 다수의 비단질원성 아미노산 (non-proteinogenic amino acids)들을 포함하는 7개의 아미노산이 연결되어 있는 복잡한 구조 (화학식 2)로 구성되어 있다. 이러한 복잡한 구조특성과, 입체적 특성에 때문에 반코마이신 비당체는 화학적 합성을 통하여 생산하기가 매우 어렵다.

[0012] 따라서, 본 발명 이전에는 반코마이신 비당체는 반코마이신 (혹은 오리엔티신, orienticins)을 산가수분해하여 당을 절단, 제거하여 수득하는 방법으로 제조하였다 (J. Antibiotics 2011, 63, 103-109, J. Antibiotics, 1986, 39, 1430-1442, J. Antibiotics, 1988, 41(6), 819-822). 즉, 미생물 발효 배양 단계, 반코마이신의 정제 단계 후 정제된 반코마이신의 당을 화학적인 방법으로 절단한 후 당을 제거하는 또 다른 정제단계 후 최종적으로 반코마이신 비당체 (이하 "아글루코반코마이신"과 혼용함, 동일한 의미임)을 얻을 수 있다. 이와 같이 종래의 방법으로 아글루코반코마이신을 얻기 위해서는 여러 단계를 거쳐야 하므로 제조가 복잡하고 생산 효율이 매우 낮았다.

[0013] 반코마이신 비당체를 얻는 다른 방법은 반코마이신 혹은 발히마이신(balhimycin), 클로로에로모마이신(chloroeremomycin)을 생산하는 미생물균주를 발효 배양하여 발효 부산물로 배양액 내에 소량 포함될 수 있는 비당체를 수득하는 것이다. 그러나 배양액 내에는 주생산물인 반코마이신 (발히마이신 등)을 포함하여 유사체들

이 많으며, 또한 비당체의 생산량이 매우 미미하기 때문에 정제가 어려워 이 방법은 이용되고 있지 않다.

[0014] 반코마이신 비당체의 구조는 발히마이신, 클로로에레모마이신, 오리엔티신의 비당체와 동일한 구조이다. 반코마이신, 발히마이신, 클로로에레모마이신의 당전이 효소는 다양하다. 반코마이신의 당 전이효소로는 Gt fE, Gt fD가 있으며, 발히마이신 생합성 유전자군에 Bgt fA, Bgt fB, Bgt fC가 있고, 클로로에레모마이신에는 Gt fA(Orf11), Gt fB(Orf12), Gt fC(Orf13)가 존재하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 따라서, 본 발명은 위 문제점들을 해결하고 반코마이신 비당체를 좀더 간단한 방법으로 생산하는 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 유전자 재조합 기술을 이용하여 반코마이신, 발히마이신, 클로로에레모마이신 또는 오리엔티신을 생산하는 균주에서 선택적으로 글라이코실트랜스퍼라제 등의 당전이효소 유전자를 파괴하여 아글루코반코마이신만을 특이적으로 생산하는 균주를 작제하였다.

[0017] 가장 간단한 아글루코반코마이신 생산 균주를 확보할 수 있는 유전자들의 돌연변이체 제작 전략은 Gt fE (혹은 유사유전자, homologue)의 돌연변이체의 작제가 될 수 있다. 또한, 반코마이신 고생산 산업균주에서 당전이효소를 돌연변이시킬 경우 확보될 균주는 아글루코반코마이신 고생산 균주가 될 것이다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에서 본 발명자들은 반코마이신 고생산 균주인 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 (*Amycolatopsis orientalis*) KFCC10990P의 반코마이신 생합성 유전자군을 확보하고 이들 유전자군 중에서 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 C329.4 유래의 *gtfE* 유사체 (homologue)인 *vcm17* 유전자를 돌연변이하여 고생산성 아글루코반코마이신 생산 미생물을 제조하였다. 본 발명자들이 제조한 신규 미생물은 한국미생물자원센터에 기탁하였다(기탁번호; KCTC11913BP). 신규주의 미생물학적 특징과 생리학적 특징은 특허 제0246094호의 균주와 차이가 없었다. 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KCTC11913BP의 작제는 실시예에서 구체적으로 설명한다.

[0019] 본 발명은 헵타펩타이드로 구성된 아글루코반코마이신 모이어티에 당쇄가 하나 이상 연결되어 생성되는 글라이코펩타이드 생산균주로부터 당전이효소 유전자가 결여된 벡터를 제조하는 단계; 및

[0020] 상기 선택된 균주와 동일 균주에 상기 벡터를 접합시켜 형질전환시키는 단계;를 포함하는 아글루코반코마이신 생산균주 제조방법을 제공한다.

[0021] 상기 당전이효소는 글라이코실트랜스퍼라제 등 다양한 당전이효소를 포함한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 헵타펩타이드로 구성된 아글루코반코마이신 모이어티에 당쇄가 하나 이상 연결되어 생성되는 글라이코펩타이드 생산균주가 반코마이신 생산균주, 발히마이신 생산균주, MM47761 생산균주, 클로로에레모마이신 생산균주 및 오리엔티신 생산균주로 이루어진 그룹 중 선택된 1종의 균주임을 특징으로 한다.

[0023] 상기 "헵타펩타이드로 구성된 아글루코반코마이신 모이어티에 당쇄가 하나 이상 연결되어 생성되는 글라이코펩타이드"는 화학식 1에 나타낸 것으로 한정되는 것은 아님을 분명히 밝혀둔다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 균주가 반코마이신 생산균주임을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 균주가 반코마이신을 생산하는 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 (*Amycolatopsis orientalis*)임을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 헵타펩타이드로 구성된 아글루코반코마이신 모이어티에 당쇄가 하나 이상 연결되어 생성되는 글라이코펩타이드 생산균주로부터 당전이효소 유전자가 결여된 벡터를 제조하는 단계; 및 상기 선택된 균주와

동일 균주에 상기 벡터를 접합시켜 형질전환시키는 단계;를 포함하는 제조방법에 의하여 제조되는 아글루코반코마이신 생산균주를 제공한다.

- [0027] 또한, 본 발명은 상기 헵타펩타이드로 구성된 아글루코반코마이신 모이어티에 당쇄가 하나 이상 연결되어 생성되는 글라이코펩타이드 생산균주가 반코마이신 생산균주, 발히마이신 생산균주, MM47761 생산균주, 클로로에레모마이신 생산균주 및 오리엔티신 생산균주로 이루어진 그룹 중 선택된 1종의 균주임을 특징으로 한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 균주가 반코마이신 생산균주임을 특징으로 하는 생산균주를 제공한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 균주가 반코마이신을 생산하는 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 (*Amycolatopsis orientalis*)임을 특징으로 하는 생산균주를 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 균주가 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KCTC11913BP임을 특징으로 하는 생산균주를 제공한다.
- [0031] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 아글루코반코마이신 생산균주를 이용하여 아글루코반코마이신 유도체를 생산하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명의 방법에 의하여 제조된 본 발명의 신균주는 아글루코반코마이신을 생산하였다.
- [0033] 또한, 본 발명의 신균주에 의하여 생산된 아글루코반코마이신은 병원균에 대하여 항생 활성을 나타내었다.
- [0034] 따라서, 본 발명의 신균주는 반코마이신 내성을 나타내는 미생물에 대한 새로운 항생물질로서 유용한 아글루코반코마이신을 제공한다.
- [0035] 뿐만 아니라, 본 발명의 신균주는 아글루코반코마이신을 대량 생산할 수 있으므로, 이를 이용하여 효소적 또는 화학적 수식방법 등을 수행하면 새로운 아글루코반코마이신 유도체를 개발할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 반코마이신 생합성유전자군 지도와 *vcm17* 유전자의 모식도이다.
- 도 2는 *vcm17* 유전자 돌연변이주의 제작 모식도이다.
- 도 3은 돌연변이체의 항균활성 시험 결과이다.
- 1: 반코마이신 표준품 10 μ g
- 2: 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 (*A. orientalis*) KFCC10990P 배양액 10 μ g
- 3: 본 발명의 신균주인 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KCTC11913BP 배양액 10 μ g.
- 도 4는 아글루코반코마이신을 고생산하는 본 발명 신균주 발효 배양액의 HPLC 크로마토그램이다.
- 1, 반코마이신 표준품; 2, 아글루코반코마이신 표준품; 3, 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KFCC10990P 배양액; 4, 본 발명의 신균주 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KCTC 11913BP 배양액.
- 도 5는 RT 47분 (아글루코반코마이신) 분획물의 매스 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 이하, 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 특히, 본 발명의 구체적인 실시예로서 반코마이신 생산균주를 제조한 것을 들었으나, 아글루코반코마이신 모이어티를 갖는 글라이코펩타이드 생산균주이면 특별한 제한 없이 본 발명의 구성을 적용할 수 있음은 당업자에게 자명하다.

[0038] <실시예 1> *vcm17* 유전자의 확보

[0039] 코스미드 라이브러리 (Cosmid library)는 SuperCos1 (Stratagene, USA) 코스미드 벡터를 사용하여 작제하였다. 유전자 DNA를 물리적인 절단을 통해 30-45 kb 정도의 사이즈를 함유하는 코스미드 라이브러리로 작제하였다. 작제된 코스미드 2000개의 양 말단의 염기서열을 분석하여 비라이보솜 펩타이드 합성효소 (nonribosomal peptide synthetase; NRPS) 서열을 가지는 5개의 코스미드 (COS001F04, COS017C05, COS005H09, COS019E09, COS004B12)를 선택하여 샷건 서열분석 (shotgun sequencing)을 수행하여 약 94,557 kb의 반코마이신 생합성 유전자 연결 정보를 확보할 수 있었다. 확보한 반코마이신 생합성 유전자는 약 94 kb에 전체 72개의 유전자가 예측되었다. 이를 *vcm* 유전자군으로 명명하였다. 예측된 유전자에서 반코마이신 생합성과 연관된 유전자로는 헵타펩타이드 (heptapeptide) 형성을 담당하는 NRPS 유전자인 *cepA*, *cepB*, *cepC* 유사체 (homologue)인 *vcm8, 9, 10*과, 반코마이신과 D-글루코스 부착을 담당하는 *gtfD, E* 유사체 (homologue)인 *vcm16, 17*, 헵타펩타이드의 원환화 (cyclization)를 담당하는 *oxyA, B, C* 유사체 (homologue)인 *vcm12, 13, 14* 등을 포함하여 36개의 핵심 유전자가 포함되어 있었다. 이를 통해 *gtfE* 유전자의 유사체인 *vcm17* 유전자 (서열번호 5)를 확인하였으며, 이를 함유하고 있는 코스미드인 COS019E09을 확보하였다. COS019E09에 포함되어 있는 반코마이신 생합성 유전자를 도 1에 나타내었다.

[0040] <실시예 2> *vcm17* 유전자가 제거된 벡터의 작제

[0041] 본 발명에서 사용한 돌연변이체의 작제는 Gust B. 등이(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2003, 100, 1541-1546) 보고한 방법에 준하여 실시하였다. 돌연변이체 작제에 사용한 프라이머는 VM_ΔgtfE_F(5'-ggcgccgaggtgcggatgtgcgccccgccgactgcgcgattccggggatccgtcgacc-3') (서열번호 1), VM_ΔgtfE_R(5'-caccgcgcgcaacaacaggtccgcgccaccgcgccccctgttagctggagctgcttc-3') (서열번호 2)이다. 작제를 위한 돌연변이 *apr-OriT* 카세트 (cassette)는 pIJ773을 주형으로 VM_ΔgtfE_F, VM_ΔgtfE_R 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하여 약 1.4 kb 단편들을 확보하였다. 확보된 단편을 COS019E09로 형질전환된 *E. coli* BW25113/pIJ790 균주에 전기충격법으로 도입하여 COS019E09(Δ*vcm17::aac(3)IV-oriT*) 코스미드 벡터를 만들었다 (도 2).

[0042] <실시예 3> 접합에 의한 방선균의 돌연변이체 작제

[0043] *vcm17* 제거 돌연변이 균주를 위한 운반벡터의 방선균으로의 도입은 *E. coli*/*Streptomyces* 간의 엑스콘주게이션 (exconjugation) 방법 (Practical *Streptomyces* Genetics, 2000)으로 전달하였다. 비메틸화 주게 (non-methylating donor)로 *dam*⁻, *dcm*⁻ 인 *E. coli* ET12567/pUZ8002에 COS019E09(Δ*vcm17::aac(3)IV-oriT*) 코스미드 벡터를 전기충격법으로 도입하여 이를 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KFCC10990P 균주에 엑스콘주게이션을 통해 형질전환하였으며, 그 결과 *vcm17* 돌연변이체 (*A. orientalis* KCTC 11913BP)를 확보할 수 있었다.

[0044] 돌연변이체의 염색체를 분리하여 VM_gtfE_F (5'-gagccgaggagacgtcgaacc-3') (서열번호 3), VM_gtfE_R (5'-ccgggaagtggctgacatcgcg-3') (서열번호 4) 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 결과 1.6 kb 단편이 증폭되었으며, 또한 아프라마이신 (apramycin)에는 내성, 카나마이신 (kanamycin)에는 감수성을 보여 이중 교차 돌연변이 (double cross over mutant)임을 확인하였다.

[0045] <실시예 4> 신균주 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KCTC 11913BP의 발효

[0046] 본 발명의 신균주 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KCTC 11913BP와 이의 원균주 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KFCC10990P를 아래의 조건으로 발효 배양하였다. 각 균주를 500 ml 엘런마이어 삼각 플라스크에 들어있는 25 ml 배지 (1.1% soytone peptone, 0.3% 효모 추출액, 0.3% 맥아 추출액, 1.7% 텍스트로스, pH 7.5)에 30 °C, 240 rpm의 조건에서 하루 동안 배양하여 활성화시킨 후, 활성화된 종배양 균주를 3 l 엘런마이어 플라스크에 들어있는 150 ml의 시드 배지 [0.5% 감자단백, 0.5% 생대두분, 0.3% CaCO₃, 4.2% 산화전분, 0.05% AZ-20R (antifoam)]에 접종, 동일 조건에서 이틀 동안 배양을 실시하였다. 시드 배지에서 배양된 배양액 150 ml를 5 l 배양기에 들어있는 2.85 l의 발효 배지 [1.8% 감자단백, 0.112% NaCl, 1.4% 생대두분, 1% 포도당, 8.8% FG-60, 0.3% AZ-20R (antifoam), pH 10.5]에 접종하여 34 °C, DO 60% 이상으로 유지하기 위해 교반과 통기를 하면서 배양하였다.

[0047] <실시예 5> 항균활성 측정

[0048] 항균 활성 측정을 위해 바실러스 썬틸리스 (*Bacillus subtilis*) ATCC 6633을 피검균으로 사용하였다. LB 한천 배지 {1% 트립톤 (tryptone), 0.5% 효모 추출물, 1% NaCl, 1.5% 한천}을 멸균하여 40~50 °C로 식힌 후, 피검균을 접종하여 피검균 배지를 준비하였다. 돌연변이주의 배양액을 원심분리하여 상등액 30 µl를 페이퍼 디스크 (ADVANTEC, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)에 묻힌 후 미리 준비한 피검균 배지에 올려 30 °C에서 2일 동안 배양하여 저해활성환 (clear zone)의 크기를 측정하여 항균력을 확인하였다.

[0049] 도 3과 같이 *vcm17*이 제거된 돌연변이체인 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KCTC11913BP의 배양액에는 원균주인 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KFCC10990P와 비교했을 때는 항균활성이 낮으나, 여전히 매우 큰 항균활성을 나타냄을 확인할 수 있다.

[0050] <실시예 6> 신균주 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KCTC 11913BP 생산 물질 분석

[0051] 실시예 4에서와 같이 배양한 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KCTC 11913BP의 배양액에 묽은 황산 (pH 1.8)을 9배 (v/v) 첨가하여 혼합 후 원심분리 및 필터하여 대사물질을 추출하였다. 추출된 대사물질은 HPLC로 표 1과 같이 분석하였다.

[0052] 그 결과 도 4와 같이, 원균주 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KFCC10990P가 생산하는 반코마이신이 RT 30분에 검출된 반면, 본 발명의 신균주에서는 이들 피크가 소실되었다. 그러나, *vcm17* 결실 돌연변이체인 본 발명의 신균주 생산물질에서는 야생균주 (원균주)에 나타나지 않은 RT 47 분의 큰 피크가 관찰되었다. 이 피크를 HPLC로 분취하여 아글루코반코마이신 표준물질 (GeneChem, 대전)과 비교한 결과 HPLC 머무름 정도와 분자량이 동일함을 확인하였다.

표 1

항목	조건 내용
칼럼	Symmetry C18 (5 µm, 4.6×250 mm, waters)
칼럼온도	상온
흡수과장	280 nm
이동상	A/B(100/0)-(60 분)-A/B(70/30) A: 10 mM aqueous ammonium acetate B: 100% acetonitrile
유속	0.8 mL/분
시료주입량	10 µl

[0054] 본 발명 신균주의 생산물질을 더욱 면밀하게 확인하기 위해 47분 분획물을 ESI-MS로 질량분석을 수행하였다. 그 결과, 아글루코반코마이신 표준품과 동일하게 *m/z* 1143.3, 1144.3, 1145.3, 1146.3 의 전형적인 2개의 염소 (chloride)가 함유된 양상의 매스 피크가 관찰되어 본 발명 신균주의 생산물질이 아글루코반코마이신임을 확인하였다 (도 5).

[0055] 이 RT 47분 피크를 분취하여 항균활성을 측정한 결과, 도 3에서 나타난 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KCTC 11913BP가 생산하는 항균활성의 대부분을 차지하였으며, 그 이외 분획에서는 아주 미미한 항균 활성이 측정되었다. 또한 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KCTC 11913BP의 실시예 4에서의 발효조건으로 3일간 발효할 경우 아글루코반코마이신 생산능력이 약 1 g/l 인 것으로 나타났다. 이러한 결과로 볼 때 본 발명의 신균주 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 KCTC11913BP는 아글루코반코마이신을 주로 생산하는 균주임을 확인할 수 있었다.

수탁번호

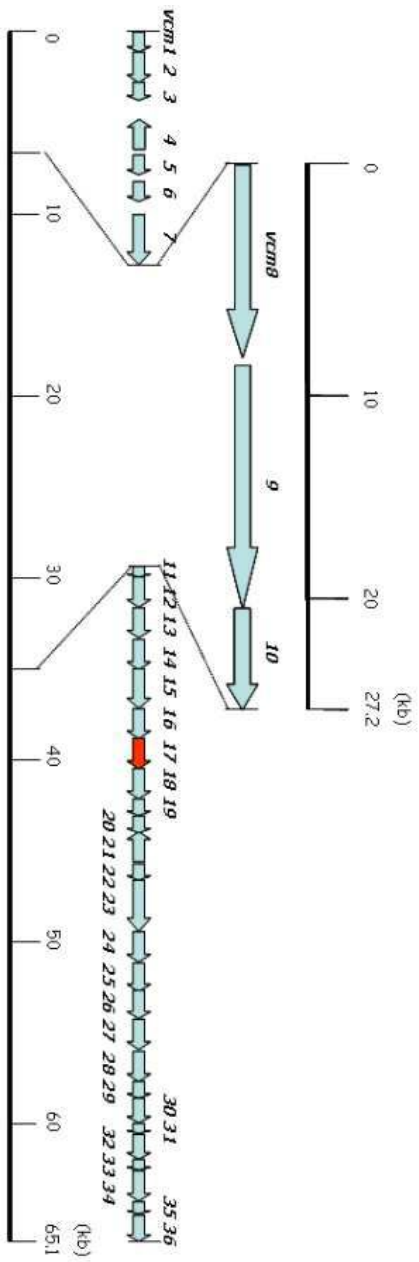
[0056] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터

수탁번호 : KCTC11913BP

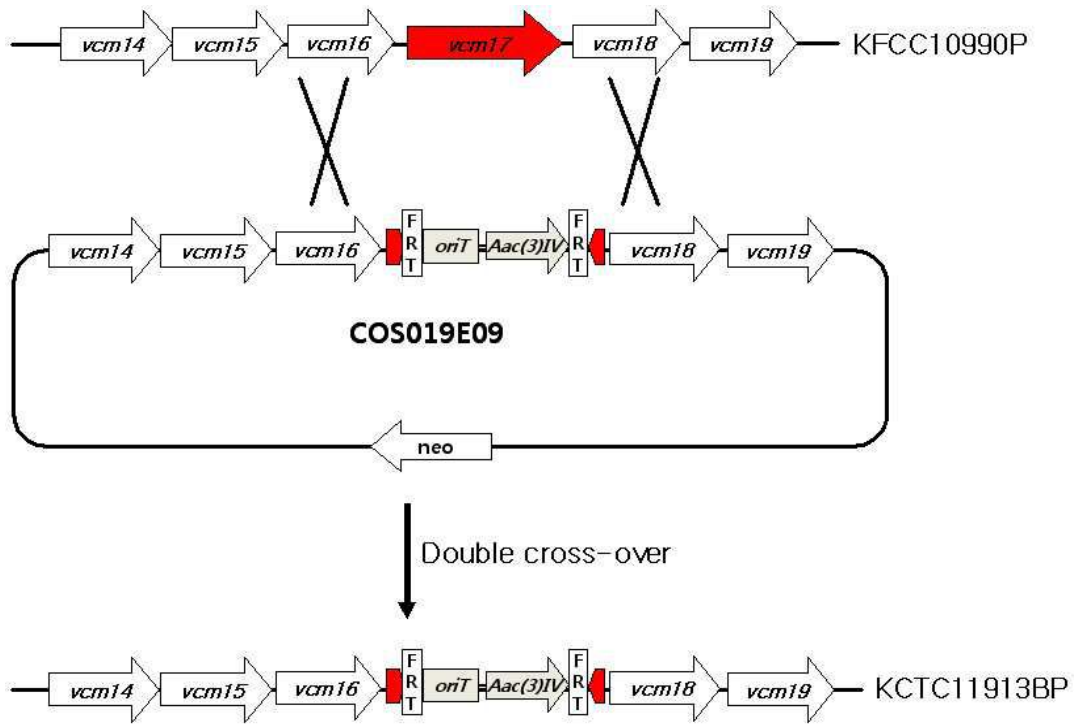
수탁일자 : 20110404

도면

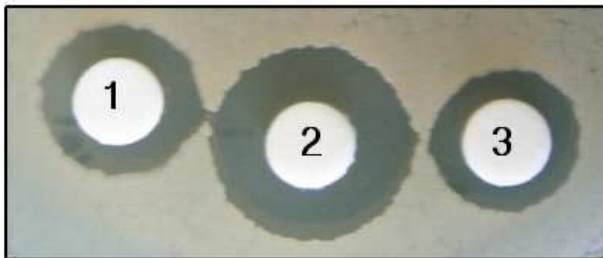
도면1



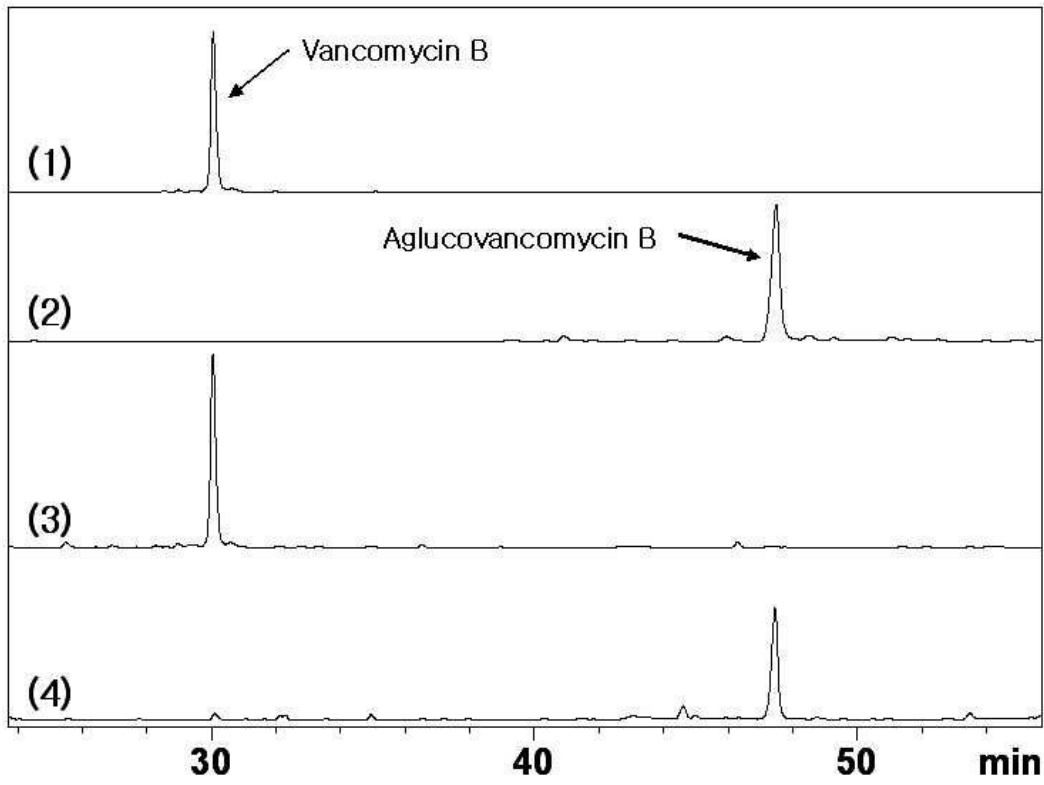
도면2



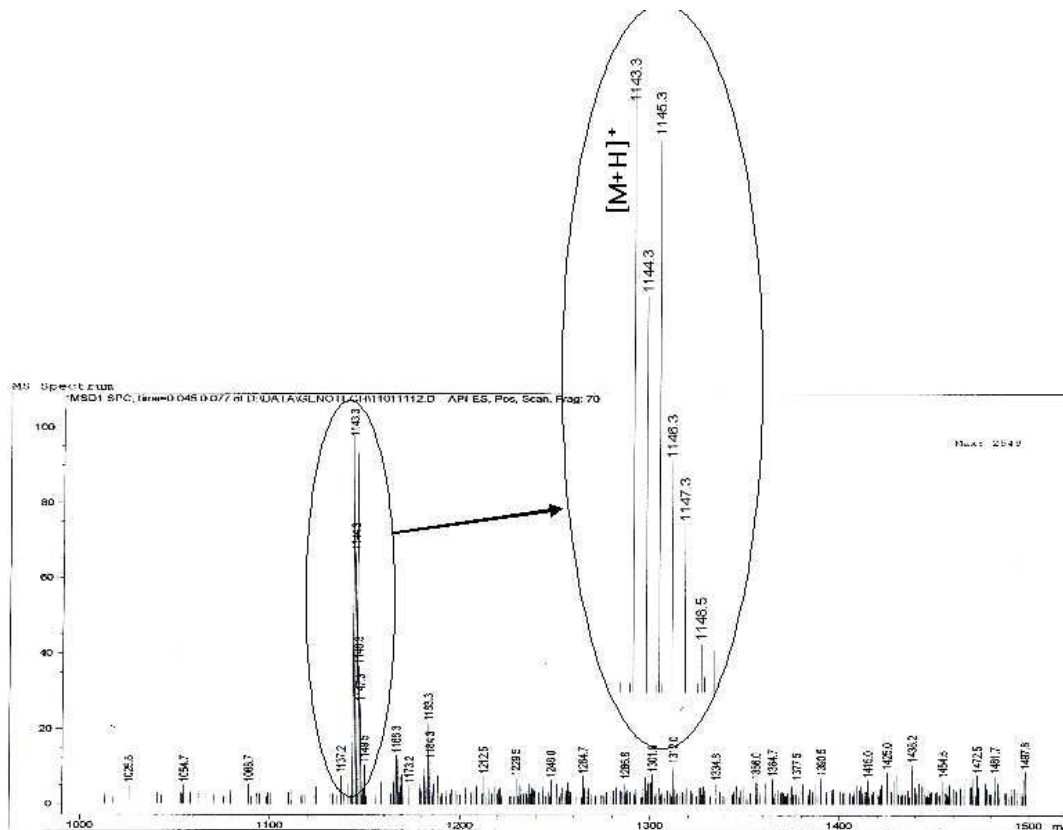
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110>	GENOTECH CO., LTD.	
<120>	A microorganism producing aglucovancomycin	
<130>	genotech-aglucovancomycin	
<160>	5	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	59	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	1	
	ggcgccgagg tgcggatgtg cgccccgccg gactgcgca ttccgggat cgtcgacc	59
<210>	2	
<211>	58	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	2	
	caccgcgcg aacaacaggt ccgcgccac cgcggcccct gtaggtgga gctgcttc	58
<210>	3	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	3	
	gagccgcca gacgtcgaac c	21
<210>	4	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	4	
	ccgggaagtg gtcgacatgc g	21

<210> 5
 <211> 1176
 <212> DNA
 <213> *Amycolatopsis orientalis*
 <400> 5

gtggcgttgg cggtagcggtt gcgggagcgc ggcgccgagg tgcggatgtg cgccccgccc 60

gactgcgcgg atcggctggc cgaagtcgac gtgccgcata tgcacctcgg tgcgtcggcg 120

cgcccgctcg ccgggcaggc gaaacccttg acggccgagg acatgctccg gttcacgacc 180

gagacgatcg ccacgcagtt cgagcggatt ccggcggccg ccgaaggatg cgccgcggtg 240

gtgacgaccg gcctgctggc cgccgccatc ggcgtgctgt cggtagccga aaagctgggc 300

atcccctact tctatggctt ccaactgccg agctatgtgc cgtcgccgta ctatgcgctt 360

ccgcccccc tcggcgagcc gcccgcaccg gacgggaccg acatccaggc gctgtgggag 420

cgcaacaacc agagcgccta ccggcggtag ggggagccgc tcaacagcag gcgcgccgcc 480

atcggcctgc cgccggtgga ggacatcttc ggccacggct acaccgatca cccgtggatg 540

gcggcggacc cggtagctggc cccgctgcaa cccacggatc tcgacgccgt gcagaccggg 600

gcgtggatcc tgcccagca acgaccgatt tccgtgagc tggaggcgtt cctggacgcc 660

ggcgcaccac cggtagcttc ggggttcggc agccttcgcg cccccgccga cgccgcgaag 720

gtggccatcg aggcgatccg tgcccacggc caccgggtga tcctctcccg cggctgggcc 780

gatctggtcc tgcccagca ccgggaggac tgtttcgcca tcggcgaagt gaatcagcag 840

gtgctgttcc gccgggtggc cgccgtcatc caccacggcg gcgcgggcac gaccacgtg 900

gccacgcggg cgggcgtccc ccagatcctg gttccccaga tcgcggacca gcctactac 960

gccgccccggg tgcccgaact gggggtcggg gtggcgcata acggccccgac cccgaccttc 1020

gacacgttgt cggcggcgtt caccaaggcc ctgctccgg aaacgcgctg gcgagcggaa 1080

gccgtggcgg aaacggtcca gacggacggg gccgcggtgg ccgcggacct gttgttcgcc 1140

gcggtgaccg ggaaccagcc cgccgttccc gcctga 1176