

## ***Clostridium* sp.가 생산하는 항생물질 KG-1167A 와 KG-1167B 의 정제 및 특성**

홍수형 · 류재호 · 박용복 · 하지홍\*

경북대학교 유전공학과

### **Purification and Characterization of Antibiotics KG-1167A & KG-1167B Produced by *Clostridium* sp.**

**Hong, Su-Hyung, Jae-Ho Ryu, Yong-Bok Park and Ji-Hong Ha\***

*Department of Genetic Engineering, Kyungpook National University*

**The antibiotics KG-1167A and KG-1167B were isolated from the fermentation broth of the bacterial strain KH-1167, identified as *Clostridium* sp. The individual antibiotics, KG-1167A & KG-1167B were separated and purified by solvent extraction followed by silica gel column chromatography. These antibiotics showed antibacterial activities against broad spectrum of gram positive and gram negative bacteria. The physico-chemical properties and UV spectra suggest that they possess aromatic moiety in their structures.**

새로운 미생물의 순수분리에 의한 신물질 탐색은 penicillin의 실용화가 이루어진 이후부터 수많은 연구자들에 의하여 부단히 수행되어 오고 있다. 그러나 미생물 종의 다양성을 고려할 때 지금까지 분리, 연구되어 온 미생물은 특정 생태계의 특수한 종류에 한정되어 있는 실정인데, 실제로 지난 40여년간 신물질 탐색에 있어서 가장 광범위한 연구가 행하여져 오고 있는 것으로 방선균을 들 수 있으며 나머지는 fungi, bacilli 및 pseudomonas 등이 대부분을 차지한다. 이들을 대상으로 한 screening 현황을 살펴보면 매년 약 700만주의 미생물이 분리되어 3,000여종에 달하는 항생물질이 정제되었지만 그 3% 정도에 지나지 않는 100여종만이 새로운 물질로 밝혀지고 있다(1).

항생물질의 생산은 엄격한 species-specific한 관계에서 벗어나는 경우도 있으나 중간 유연관계가 멀수록 동일한 항생물질을 생산하는 확률은 낮아진다는 일반적인

법칙을 고려할 때 지금까지 신물질 탐색에 시도되지 않은 미생물에 대한 연구가 시급하다 하겠다(1). 특히 다루기가 까다롭다는 이유로 거의 이 방면에서 연구가 무시되어오던 혐기성 미생물에 대한 결과는 아무도 예측할 수 없을 것이다.

이에 본 연구실에서는 국내의 다양한 생태계로부터 spore를 형성하는 혐기성 세균을 약 2,200여주 순수분리하였으며 이들 분리된 세균들로부터 그람 양성, 음성의 다양한 세균에 대하여 항균활성을 띄는 반면, 고등동물에 대하여 독성이 비교적 적은 항생물질을 검색하였다. 항생물질 생산균주로 선별된 strain KH-1167의 미생물학적 특성에 대해서는 이미 보고된 바 있으며(2) 본보에서는 strain KH-1167이 분비하는 항생물질의 추출, 정제, 부분정제된 항생물질의 물리-화학적 성질 및 생물학적 특성에 대한 연구결과를 보고하는 바이다.

#### **재료 및 방법**

##### **사용균주 및 배양방법**

항생물질 생산균주로는 *Clostridium* sp. KH-1167을

Key words: Antibiotics, KG-1167A & KG-1167B, *Clostridium* sp.

\*Corresponding author

사용하였다(2). 균 배양은 멸균된 purine-fermenting clostridia 배지를 pharmaceutical bottle에 넣고 nitrogen gas를 불어넣어 공기를 완전히 치환한 후 silicon 마개로 밀봉하고 혐기상태를 유지하는 Hungate method (3)에 따라 행하였으며 30°C에서 4일간 배양하였다.

#### pH 및 온도에 대한 안정성 실험

4일간 배양한 균액 10 ml 씩을 HCl, NaOH 원액을 사용하여 각각 pH 2에서 12의 범위까지 조절할 후 30°C에서 20시간 방치하였다. 온도에 대해서는 30°C와 70°C 범위에서 각각 1시간에서 5시간까지의 간격으로 열처리하여 4°C에 20시간 방치한 후 항균활성을 조사하였다.

#### 추출 및 정제

극성이 다른 각종 유기용매를 사용하여 물층으로부터의 항생물질 이동성을 조사하였다(4,5). 이들 중 이동성이 좋은 유기용매를 선택하여 배양액과 동일한 양으로 2회 추출한 후 농축하였으며, 농축과정에서는 rotary vacuum evaporator와 vacuum pump(ULVAC, G-50 D)를 사용하였다. 농축된 sample에 비극성용매를 첨가하여 supernatant와 precipitation 부분으로 나눈 후 각각을 silica gel column chromatography(6)를 반복하면서 정제하였다. 추출과정 중 항생물질의 이동은 물질의 특성에 따라 bioassay, 화학적 정량법 및 bioautography 방법(7-9)을 병행하여 추적하였다.

#### 항균활성 및 MIC 측정

항균활성 측정은 직경 8 mm filter paper를 이용하여 Disk-diffusion 방법(7)에 따라 행하였다. 시험균은 Kirby-Bauer 방법(10)으로 도말하였으며 시험배지로는 Mueller-Hinton(MH) 배지(11)를 사용하였다. MIC 측정을 위해서는 solvent extraction 과정을 거쳐 얻어진 부분정제된 항생물질을 512~0.25 µg/ml 농도범위로 희석한 후 Agar dilution 방법(12, 13)을 행하였다. 시험균으로는 한국화학연구소로부터 분양받은 19종의 그람양성 및 음성균을 사용하였다.

#### 항암활성 측정

항암활성의 1차 검색법으로 세균을 이용한 BIA와 동물세포를 이용한 PADA를 행하였다.

BIA(Biochemical Induction Assay)(14-16)는 미국 Fredrick Cancer Res. Center로부터 분양받은 *E.coli* BR 513, BR 475lex, BR 339 세 균주를 사용하여 진행하였다. Lag phase까지 배양한 상기 균주들을 각각

8 mm filterpaper를 사용하여 시료와 반응시킨 후 β-galactosidase의 생산을 발색기질인 BNG(6-bromo-2-naphthyl β-galactopyranoside)를 써서 검정하였다.

PADA(p388 Agar Diffusion Assay)(16, 17)에서는 murine leukemia cell을 이용하였으며 시료의 암세포에 대한 각종 dehydrogenase의 활성저해 정도를 측정함으로써 항암효과를 검정하였다. Positive control로는 25 µg의 oligomycin을 사용하였으며 dehydrogenase 활성을 측정하기위한 검정시약으로는 2,6-dichloro-indophenol을 사용하였다.

#### 독성실험(18, 19)

부분정제한 sample을 DMSO에 녹인 후 phosphate buffer saline solution(pH 7.4)에 희석하여 20~25g BALB/C mouse 5마리를 한 group으로 하여 복강주사하였다. Sample 농도는 kg 당 50~100 mg, 100~150 mg 및 150~200 mg으로 하였고 7일간 관찰한 후 LD<sub>50</sub> value를 결정하였다.

### 결과 및 고찰

#### pH 및 온도변화에 대한 안정성

균 배양액 중 항균활성을 갖는 물질은 Fig. 1에 나타난 바와 같이 pH 4~11 사이의 비교적 넓은 범위에서 안정한 것으로 생각되며 pH 3 이하와 12 이상에서는 활성이 감소되는 것으로 나타났다.

온도에 대해서는 Fig. 2와 같이 40°C까지는 안정한 것으로 보이며 70°C에서 5시간 열처리한 후에는 60% 이상이 실활된 것으로 나타났다.

#### 추출 및 정제

KH-1167 배양액을 동일한 volume의 ethyl acetate로 추출하였을 때 90% 이상의 항균활성이 용매층에서 나타났으며 원심분리에 의하여 세균을 제거한 상등액만 추출하였을 때보다 배양액 그대로를 추출하였을 때 용매층에서의 항균활성이 크게 나타난 바 본 실험에서는 배양액으로부터 균을 제거하지 않고 바로 EtOAc로 추출하여 사용하였다.

추출 후 농축한 sample에 7~10배의 n-Hexane을 첨가하여 침전부분과 상등액 부분으로 나눈 후 각각의 활성을 조사하였다. 이들 두 부분에서 모두 활성이 나타났으며 bioautography에 의하여 TLC 상에서의 spot을 비교한 결과 R<sub>f</sub>값이 각각 다르게 나타난 바 이들을 다른 물질로 추정하고 Fig. 3의 과정에 따라 정제하였

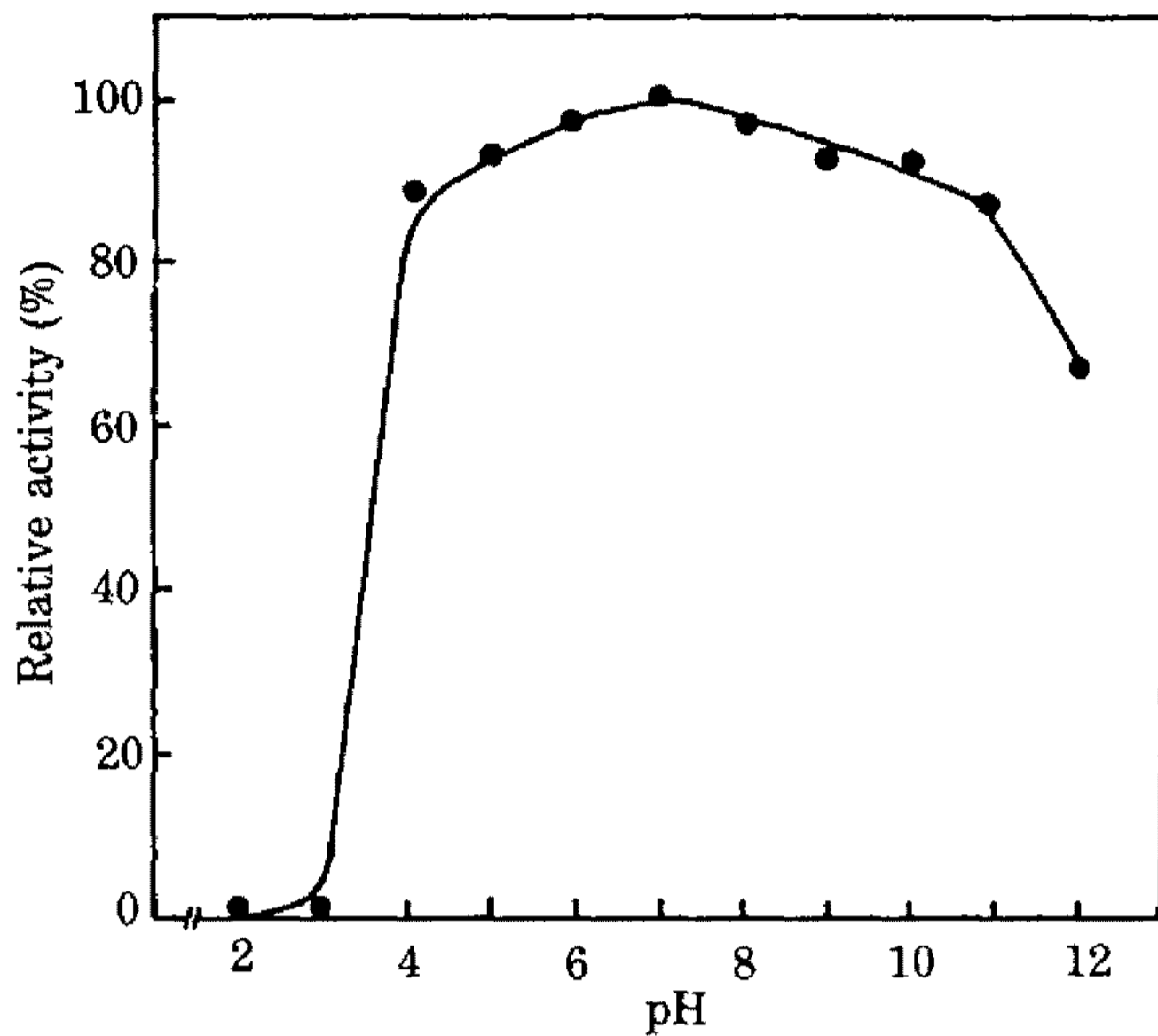


Fig. 1. Effect of pH on the stability of the antibiotic in crude culture solution

다. 편의상 침전부분의 항생물질을 KG-1167A, 상등액부분의 것을 KG-1167B라 명명하였다. 이러한 정제과정을 거쳐 10 liter의 배양액으로부터 KG-1167A는 34.1 mg을, KG-1167B는 12mg을 각각 얻었다. 정제된 항생물질의 silica gel TLC 결과를 Fig.4에 나타내었으며 이 결과에 의하여 KG-1167B는 순수한 물질임이 확인되었으나, KG-1167A는 2가지 정도의 불순물이 포함된 부분정제된 상태임을 알 수 있었다. KG-1167A의 경우 TLC R<sub>f</sub>값의 차이가 큰 것으로 미루어 보아 preparative TLC에 의하면 완전정제가 가능할 것으로 사료되며, 이러한 부분정제된 항생물질의 특성은 다음과 같다.

#### 물리 - 화학적 특성

**용해도 :** KG-1167A는 흑갈색으로 Ethanol, Acetone 및 Methanol 등에 잘 녹았으며, 비교적 비극성 용매인 cyclo-Hexane, Benzene, Toluene 및 Chloroform에는 거의 용해되지 않았다. 반면 적갈색을 띠는 KG-1167B는 비극성용매에 잘 녹았으나 극성용매에는 잘 녹지않는 반대현상을 보였다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 KG-1167A가 KG-1167B에 비하여 극성 정도가 큰 것으로 추정된다. 이는 또한 동일한 solvent system에서의 TLC R<sub>f</sub>값을 비교한 Table 1의 결과와도 일치되는 것으로 사료된다.

#### TLC 발색시약에 대한 반응성

상법에 따라 행한(11, 20, 21) 발색반응 결과를 Table 2에 수록하였다. KG-1167A와 KG-1167B 모두 acidic

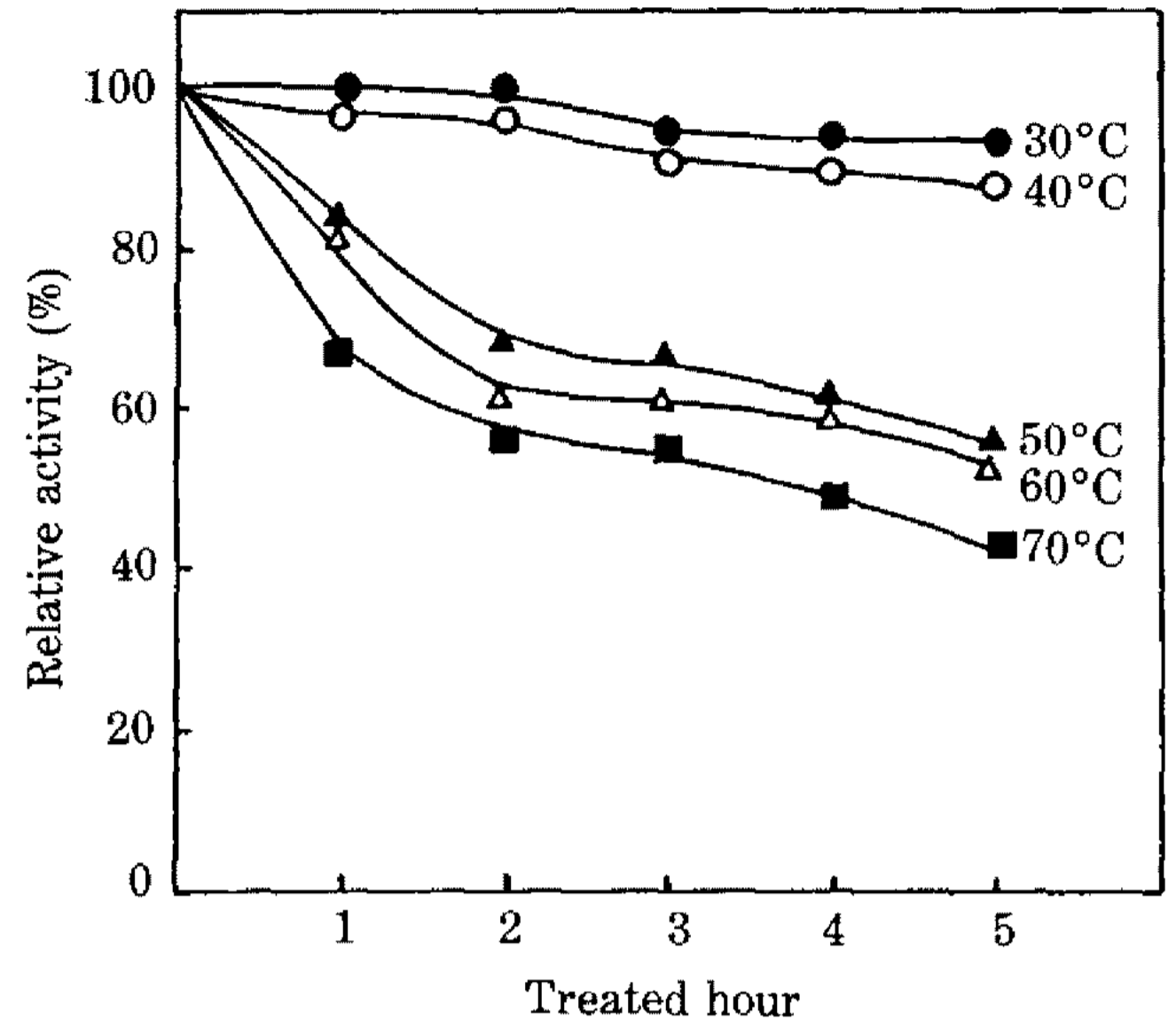


Fig. 2. Effect of temperature on the stability of the antibiotic in crude culture solution

Table 1. TLC R<sub>f</sub> values of the antibiotics KG-1167A & KG-1167B

Solvent system	KG-1167A	KG-1167B
Methanol-Chloroform (1:9)	0.87	0.61
Methanol-Benzene (1:9)	0.83	0.55
Methanol-Chloroform (1:99)	0-0.02	0
Methanol-Benzene-Chloroform (1:49:50)	0-0.02	0
Ethyl acetate-Chloroform (3:7)	0.53	0.41

group을 검정하는 FeCl<sub>3</sub> reagent, sugar alcohol을 검정하는 BPB-Boric reagent 및 phenol, terpene을 검정하는 Anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-EtOH reagent에 대하여 양성반응을 보였다.

KG-1167B는 이외에도 aromatic acid를 검정하는 Ehrlich reagent에 대해서 양성반응을 보인 바 KG-1167A와 다소 다른점을 보였다.

이들은 penicillin 계통의 항생물질을 검정하는 발색시약에 대하여는 반응을 나타내지 않았는데 실제로 penicillinase를 처리한 후에도 항균활성에는 전혀 변화가 없었으며, peptide 계통의 물질과 반응하는 ninhydrin에 대해서도 음성반응을 보였다.

#### UV λ<sub>max</sub>

KG-1167A 및 KG-1167B를 각각 95% EtOH 및

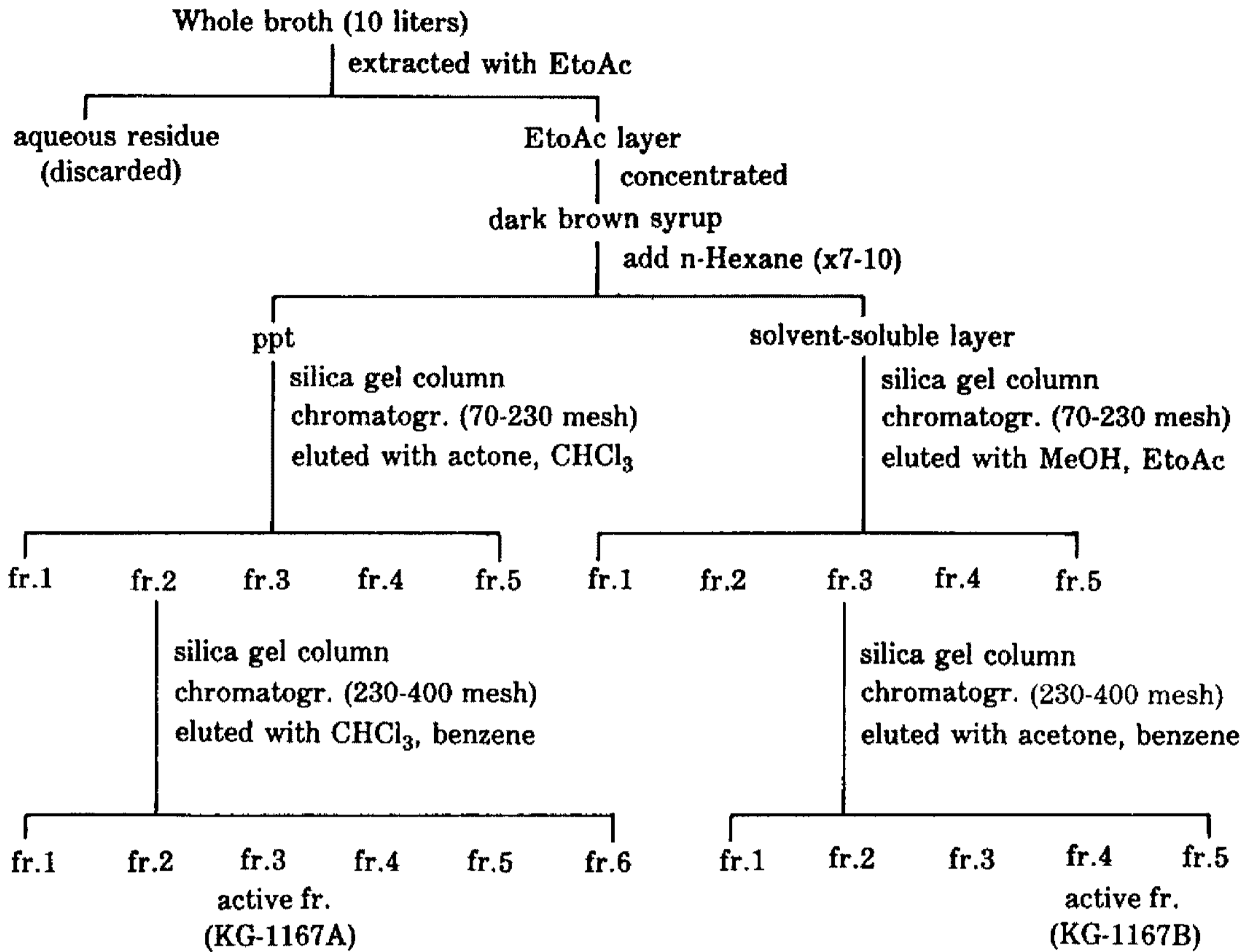


Fig. 3. Isolation procedure of the antibiotics KG-1167A & KG-1167B

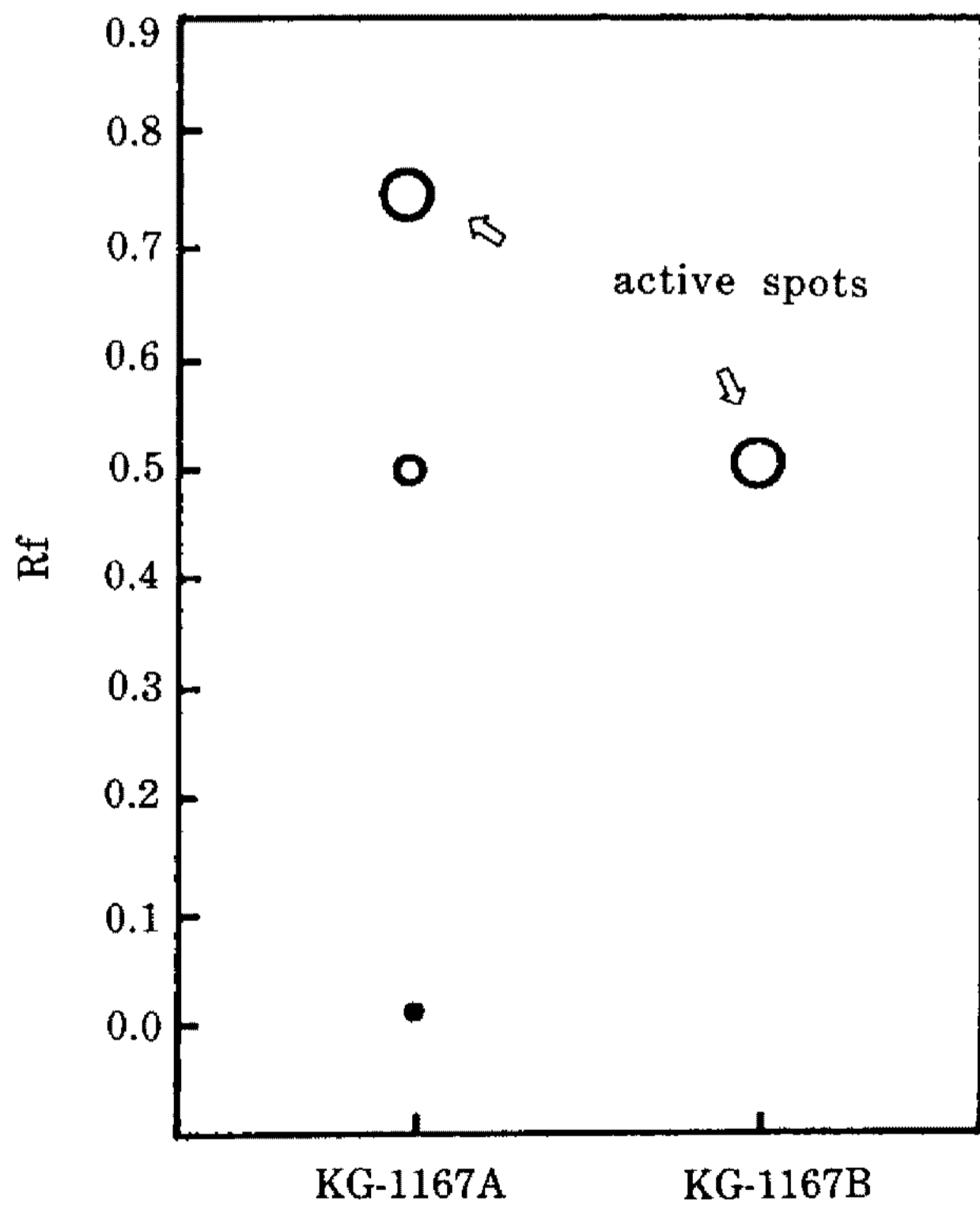


Fig. 4. Silica gel TLC of the antibiotics KG-1167A & KG-1167B  
(Ethyl acetate: Benzene = 1:1)

cyclo-Hexane 에 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 녹인 후 Shimadzu UV-265 Spectrometer 를 이용하여 200~400nm 사이의 파장에서 흡광도를 측정 한 결과 Fig.5 와 같이  $\lambda_{max}$  가 모두 200~250 nm 에서 나타 났다. 한편, 현재 진행 중인  $^1\text{H-NMR}$  분석 결과  $\delta_{7-7.5}$  부분에서 multiplet 을 나타 내는 점 등으로 미루어 보아 이들은 aromatic ring 을 포함하고 있는 화합물로 추정된다.

**생물학적 특성**

KG-1167A 와 KG-1167B 는 조사한 모든 세균에 대하여 생육저해 효과를 보인 바 broad spectrum 항생물질임을 알 수 있었다. MIC 값은 Table 3 에 나타난 바와 같이 그람음성균의 경우보다는 *B. subtilis* 등의 그람양성균에 대해서 약간 낮았으며, KG-1167A 보다는 KG-1167B 의 활성이 더 강함을 알 수 있었다. 지금까지의 정제과정으로 미루어 볼 때 완전정제된 이들의 MIC 값은 1/16~1/32 이하로 낮아질 것으로 추정된다.

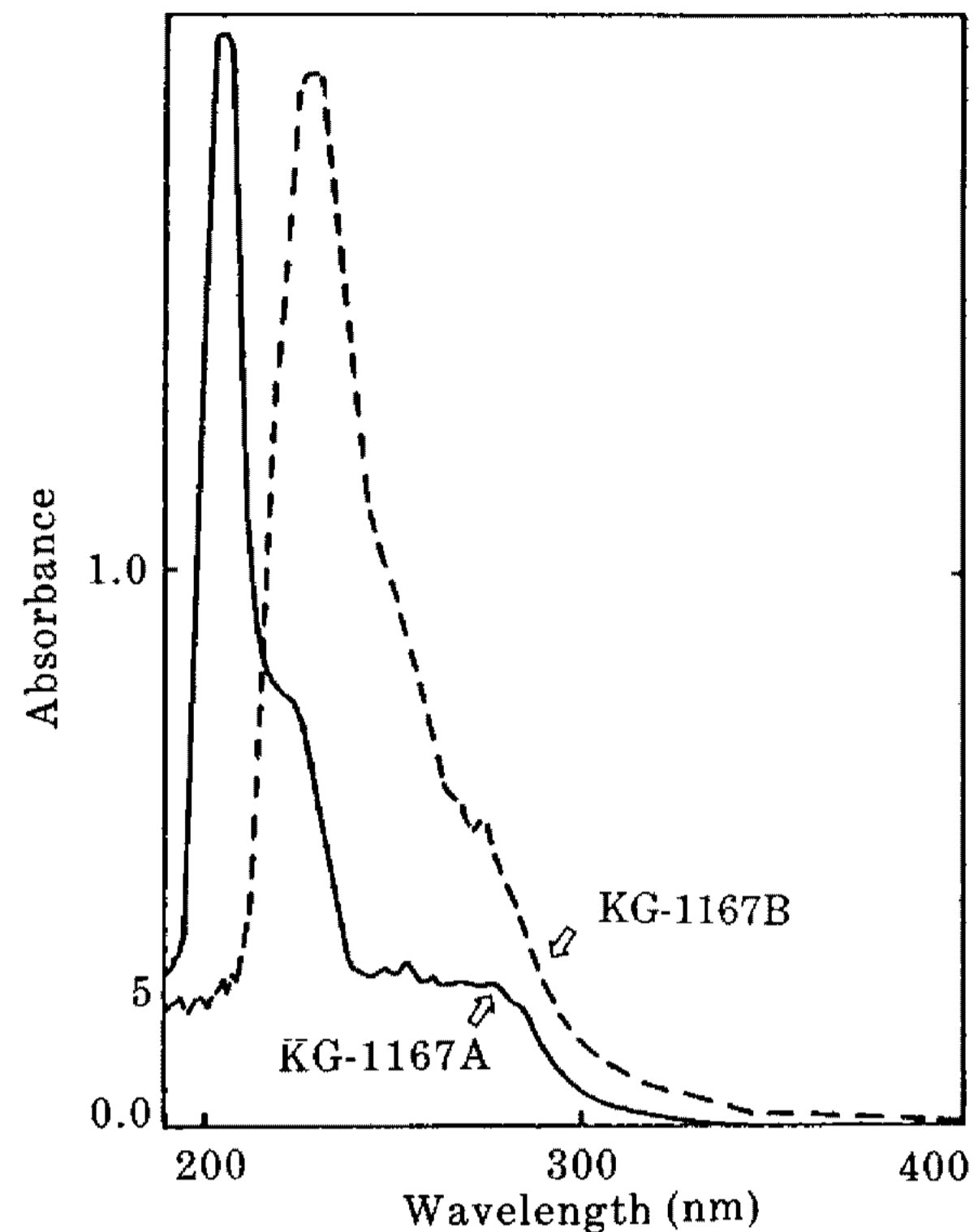
항암활성측정 실험에 있어 BIA 에 대해서는 KG-1167A 및 KG-1167B 모두 음성반응을 보였으나 PADA 에 대해서는 positive control 에 의하여 형성된 blue zone 의 약 64% 에 해당하는 양성반응을 나타낸 바

**Table 2. Color reactions of the antibiotics KG-1167 & KG-1167B**

Color reagent	KG-1167A	KG-1167B
Dragendorf	-	-
Ehrlich	-	yellow
FeCl <sub>3</sub>	brown	yellow
Iodine-Azide-Starch	-	-
BPB-Boric acid	yellow	yellow
Phenol-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-
Anisaldehyde-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·EtOH	blue	blue
Hydroxylamine-FeCl <sub>3</sub>	-	-
10 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Ninhydrin	brown	yellow

이들의 항암활성에 관한 후속연구가 필요하리라 사료된다.

한편 mouse LD<sub>50</sub> 값은 150~200 mg/kg 으로 나타났다.

**Fig. 5. UV spectra of the antibiotics KG-1167A & KG-1167B****Table 3. MIC values of the antibiotics KG-1167B**

Test microorganisms	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	KG-1167A	KG-1167B		
Gram (+)	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 27348	128	64	
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	64	32	
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	128	64	
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	64	32	
	<i>Staphylococcus epidermis</i> ATCC 12228	128	64	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	128	64	
	Bacteria	<i>Providencia rettgeri</i> ATCC 9919	128	64
<i>Escherichia coli</i> ATCC 31030		128	64	
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617		128	64	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		128	64	
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 10031		128	64	
Gram (-)		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	128	64
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 15473	128	64
		<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	128	64
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	128	64
		<i>Serratia marcescens</i> ATCC 27117	128	64
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25619	128	64
		<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 29751	128	64
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028		128	64	

## 요 약

순수분리된 2,200 여주의 혐기성 세균으로부터 선별된 *Clostridium* sp. KII-1167 은 그람양성 및 음성균에 대하여 재현성있는 항균활성을 나타내는 물질을 생산하였다. Solvent extraction, silica gel column chromatography 에 의하여 배양액으로부터 항생물질 KG-1167A 와 KG-1167B 를 부분정제 하였다. 이들은 pH4~11 의 범위에서는 비교적 안정하였으며, 온도에 대해서는 50°C 정도에서부터 점차 불안정해지는 것을 알 수 있었다. UV  $\lambda_{max}$  분석결과로부터 이들은 aromatic ring 을 포함하고 있는 화합물로 추정되는데, 현재 진행 중인 MS, <sup>1</sup>H-NMR 등의 분석결과와도 상당히 일치되었다. 19종의 그람양성 및 음성균에 대한 부분정제된 KG-1167A 와 KG-1167B 의 MIC 값은 32~128  $\mu$ g/ml 로 나타났으며 mouse 에 대한 LD<sub>50</sub> 값은 150~200 mg/kg 이었다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 일반연구 학술조성비의 지원에 의해 이루어졌음을 밝힙니다. 아울러 정제과정에 많은 도움을 주신 한국화학연구소의 지옥포 박사님께 감사드립니다.

## 참고문헌

- Lancini, G. and F. Parenti: *Antibiotics, An Integrated View*, Springer-Verlag (1982).
- 한국산업미생물학회 : 학회소식, 제 2 권, 제 1 회, p.57, p. 69(1989).
- Shapton, D.A. and R.G. Board: *Isolation of Anaerobes*, Academic Press (1971).
- Poole, C.F. and B.A. Schnette: *Contemporary Practice of Chromatography*, Elsevier (1984).
- Weinsetin, M.J. and G.H. Wagman: *Antibiotics, Isolation, Separation & Purification*, Elsevier (1978).
- Stok, R. and C.B.F. Rice: *Chromatographic Methods*, 3rd Ed., Science Paperbacks (1978).
- Hash, J.H.: *Methods in Enzymology*, 43, *Antibiotics*, Academic Press (1975).
- Issag, H.J., E.W. Barr and A. Zszalos: *J. Chromatogr.*, 133, 291-301 (1977).
- Egon, S.: *Thin Layer Chromatography*, Springer-Verlag (19669).
- Cappuccino, J.G. and N. Sherman: *Microbiology, A Lab. Manual*, 2nd Ed., p.248, The Benzamin-Cummings (1987).
- Difco Lab.: *Difco Manual*, 10th Ed., p.582 (1984).
- 한국화학연구소 : *A Study on the Establishment of Pharmaceutical Screening Program*, Vol.1, 2, 과학기술처 (1988).
- 유주현 : 항생물질의 기술개발연구, pp.44-47, 연세대학교 식품공학과(1987).
- Elespuru, R.K. and R.J. White: *Cancer Res.*, 43, 2819-2830 (1983).
- Elespuru, R.K. and M.B.A. Yamolinsky: *Environ. Mutagen*, 1, 65-78 (1979).
- Garretson, A.L., R.K. Elespuru and R.J. White: *Dev. Industrial Microbiol.*, 22, 211-218 (1984).
- Klein, F. and R.T. Ricketts: *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, 163, 406-401 (1980).
- Kurusu, K. and K. Ohda: *J. Antibiot.*, 40(11), 1506-1512 (1987).
- Shoji, J., H. Hino and E. Kondo: *J. Antibiot.*, 41(6), 713-718 (1988).
- Vlaclimir, B.: *J. Chromatogr.*, 15, 379-392 (1964).
- Shimizu, K. and G. Jamura: *J. Antibiot.*, 3(6), 649-653 (1981).

(Received April 23, 1990)