

***Clostridium* sp.가 생산하는 항생물질 KG-1167A 와 KG-1167B 의 최적 생산조건**

홍수형 · 남재성 · 박용복 · 하지홍*

경북대학교 유전공학과

The Optimum Culture Conditions for the Production of Antibiotics KG-1167A & KG-1167B Produced by *Clostridium* sp.

Hong, Su-Hyung, Jae-Sung Nam, Yong-Bok Park and Ji-Hong Ha*

Department of Genetic Engineering, Kyungpook National University

The bacterial strain KH-1167, identified as *Clostridium* sp. was found to produce the antibiotics KG-1167A & KG-1167B which showed a broad spectrum antibacterial activity. The highest antibiotics production was obtained in fermentation medium containing glucose, casamino acid and salt complex solution. Optimum culture condition for the maximum production of the antibiotics was also determined. Antibiotic productivity of the *Clostridium* sp. KH-1167 was increased to about 450% compared to that in the medium used for the primary isolation procedure.

전보에서 보고된 항생물질 KG-1167A 및 KG-1167B 는 국내에서 보고된 최초의 *Clostridium* sp. 유래의 항생물질로 사료되며 그 화학구조 분석과 novelty 결정은 시급히 이루어져야 할 과제로 여겨진다. 따라서 구조결정과 독성효과실험에 필요한 정제된 항생물질의 물량확보를 위하여 배지 및 배양조건 최적화실험을 행하였으며 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

전보에서 언급한 *Clostridium* sp. KH-1167 을 항생물질 생산균주로 사용하였다. PY 배지를 기초배지로 하여 실험하였으며 그 성분은 Table 1 과 같다.

항균활성 측정

항균활성의 측정은 Disc diffusion method(1-3)에 따라 행하였으며 시험균으로는 항생물질 KG-1167A 와 KG-1167B 에 비교적 민감한 반응을 나타내는 *Bacil-*

lus subtilis ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 등의 그람양성균을 사용하였다.

최적 배지성분 결정

탄소원의 결정에 있어서는 기본배지에서 peptone 과 yeast extract 양을 1/5 로 줄인 후 20 종의 탄소원을 각각 1% 씩 첨가하여 배양하였다. 최적 탄소원에 대해서는 catabolite repression 현상의 유무를 알기 위하여 0-4% 농도 범위에서 항균활성 정도를 조사하였다.

질소원의 경우 peptone 과 yeast extract 가 제거된 PY 배지에 최적 탄소원을 첨가한 후 12 종의 질소원을 0.5% 씩 첨가하였다.

Salt 의 경우 앞의 실험에서 결정된 최적 영양원을 salt 가 제거된 PY 배지에 첨가한 후 20 종의 salt 를 1mM 농도로 첨가하였으며, 0-2mM 농도 범위에서 salt 의 농도가 항생물질 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

최적 배양조건 결정

배지 최적화실험에서 결정된 배지를 사용하였으며 배지의 초기 pH 를 3~10 의 범위로 조절하여 균을 배양한 후 생산된 항생물질의 활성 정도를 조사하였다. 한편 20~60°C 온도 범위에서 최적 배양 및 항생물질 생산온도

Key words: Antibiotics, KG1167A & KG1167B, *Clostridium* sp.

*Corresponding author

Table 1. Composition of PY medium

| Components | Concentration (%) |
|---|-------------------|
| Peptone | 0.5 |
| Yeast extract | 0.5 |
| Salt solution ¹ | 4.0 (v/v) |
| Vitamine K ₁ solution ² | 0.02 (v/v) |
| Hemin solution, 0.05% | 1.0 (v/v) |
| Resazurin solution, 0.025% | 0.4 (v/v) |
| Cystein-HCl | 0.05 |

¹CaCl₂ 0.02%, MgSO₄ 0.02%, K₂HPO₄ 0.1%, NaHCO₃ 1% and NaCl 0.2%

²Dissolve 0.15 ml of Vitamine K₁ in 30 ml of 95% ethanol.

를 결정하였다.

결과 및 고찰

최적 배지성분의 결정

Table 2에서 보는 바와 같이 *Clostridium* sp. KH-1167이 이용할 수 있는 당의 종류는 다양하였으며 mannose를 제외하고는 항생물질 생산에 저해효과를 나타내지 않았다.

Glucose와 galactose가 항생물질 생산에 가장 효과적인 탄소원으로 밝혀졌으며 경제성을 고려할 때 glucose가 최적 탄소원으로 사료되며, glucose를 0~4% 범위에서 각 농도별로 첨가하여 항생물질 생산능을 조사한 결과는 Fig.1과 같다. 균 생육정도는 2% 농도에서 가장 왕성하였으나 항생물질 생산에 대한 최적 농도는 1%였으며, 농도가 증가함에 따라 활성이 점차 감소되는 점으로 미루어 볼 때 glucose에 의한 catabolite repression 현상이 나타나는 것으로 사료된다.

다양한 질소원에 대한 균의 생육과 항생물질 생산량에 대한 실험결과는 Table 3과 같다. 무기태 질소에 비하여 유기태 질소의 이용성이 좋았으며 항생물질 생산성 또한 높ی 나타났음을 알 수 있었다. 사용한 질소원에 있어서 현저한 활성의 증가현상을 나타낸 것은 없었으나 비교적 항생물질 생산능이 양호하게 나타난 casamino acid를 최적 질소원으로 결정하였다.

다양한 salt의 첨가에 따른 균의 생육정도와 상대적 항생물질 생산량과의 관계는 Table 4와 같다. 단일 salt로는 CaCl₂, MgSO₄를 각각 첨가하였을 경우 균 생육과 항생물질 생산성이 비교적 양호하였으며 NaCl의 경우

Table 2. Effect of carbon sources¹ on the antibiotic production

| C-source | Growth | Final pH | Relative Activity (%) |
|-------------------|--------|----------|-----------------------|
| None ² | + | 7.07 | 100 |
| Arabinose | +++ | 6.76 | 152 |
| Cellobiose | +++ | 6.84 | 138 |
| Cellulose | ++ | 7.52 | 145 |
| CMC | +++ | 7.23 | 152 |
| Esculin | +++ | 6.49 | 148 |
| Fructose | +++ | 6.52 | 145 |
| Galactose | ++++ | 7.43 | 166 |
| Glucose | ++++ | 6.66 | 166 |
| Glycerol | ++ | 6.80 | 138 |
| myo-Inositol | +++ | 6.98 | 138 |
| Lactose | ++++ | 7.62 | 138 |
| Maltose | +++ | 5.53 | 110 |
| Mannitol | +++ | 6.94 | 124 |
| Mannose | ++ | 5.39 | 90 |
| Meliobiose | +++ | 6.46 | 121 |
| Ribose | ++++ | 7.18 | 131 |
| Sorbitol | +++ | 6.56 | 131 |
| Starch | +++ | 6.16 | 138 |
| Sucrose | +++ | 6.43 | 131 |
| Xylose | +++ | 6.68 | 138 |

Basal medium: Peptone 0.1%, Yeast 0.1%, Salt solution 4.0%, Vitamine K₁ solution 0.02%, Hemin solution 1%, Resazurin solution 0.4%, Cystein-HCl 0.05%

¹Each carbon was added to the basal medium and auto-claved after pH setting to 7.0.

²None: No carbon source was added.

균 생육은 그리 활발하지 못하였으나 항생물질 생산에 있어서는 좋은 효과를 보여주고 있다. 그러나 원래 PY 배지의 구성성분이었던 salt solution(CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, NaCl)이 항생물질 생산에는 가장 우수한 것으로 나타났다.

Salt solution의 농도에 따른 균 생육정도와 항균활성과의 관계는 Fig.2에 나타난 바와 같다. 0.4%가 최적 농도로 나타났으며 그 이상에서는 cell growth는 증가하나 활성이 점차 감소되는 점으로 미루어 보아 고농도의 salt에서는 항생물질의 생산이 억제되는 것으로 사료된다.

배지의 초기 pH 및 배양온도의 결정

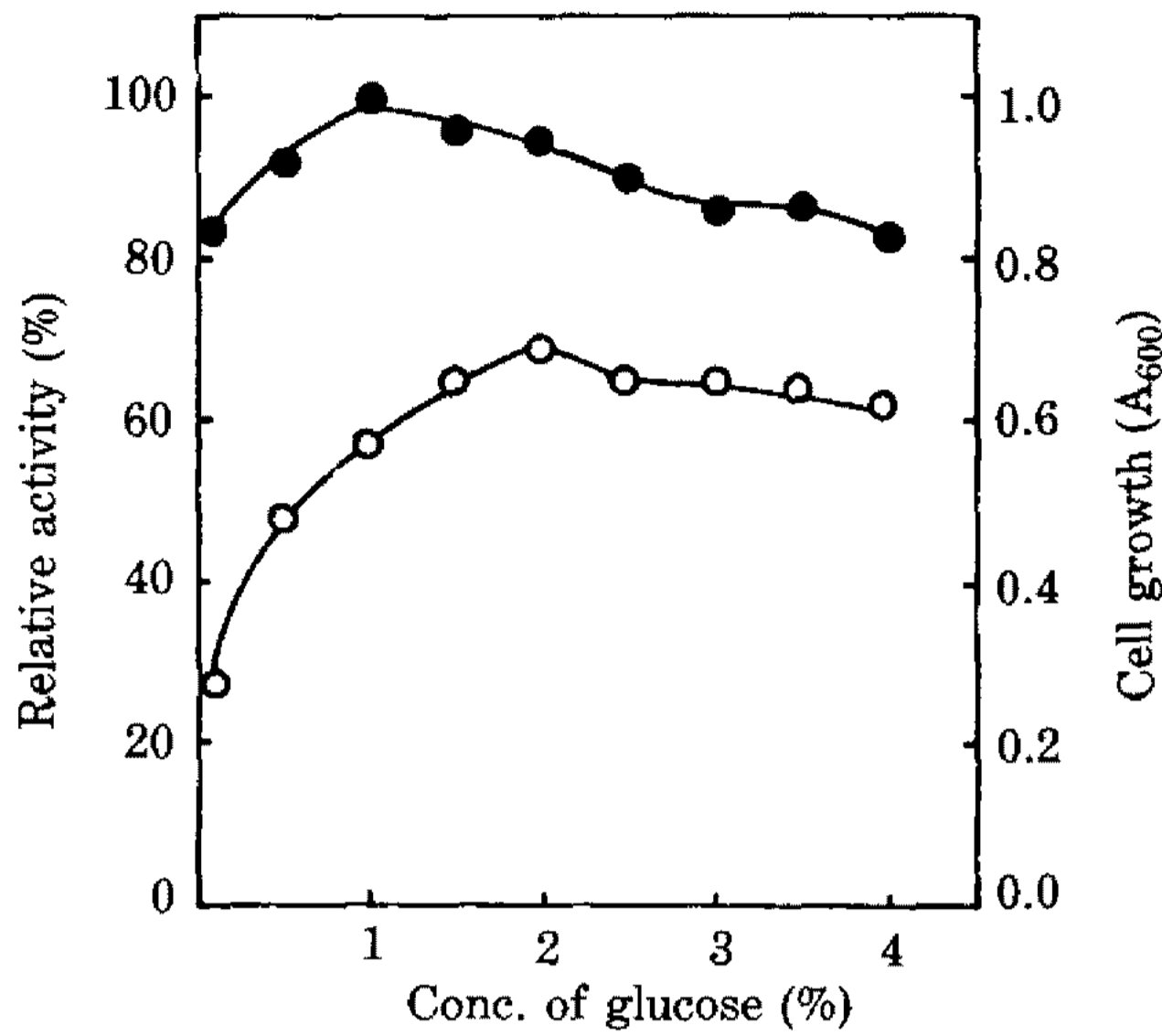


Fig. 1. Effect of glucose concentration on the antibiotic production

●—● : Relative activity
○—○ : Cell growth

Table 3. Effect of nitrogen sources¹ on the antibiotic production

| N-source | Growth | Final pH | Relative Activity (%) |
|---|--------|----------|-----------------------|
| None ² | +++ | 6.44 | 100 |
| Yeast Extract | ++++ | 6.28 | 110 |
| Casamino acid | ++++ | 7.06 | 113 |
| Malt Extract | +++ | 5.69 | 110 |
| Peptone | ++++ | 6.19 | 106 |
| Asparagine | ++++ | 6.52 | 106 |
| Urea | ++ | 6.52 | 90 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | + | 6.19 | 97 |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | ++ | 6.05 | 84 |
| NH ₄ Cl | +++ | 5.96 | 97 |
| NH ₄ NO ₃ | + | 6.27 | 90 |
| NaNO ₃ | + | 6.23 | 103 |
| KNO ₃ | +++ | 6.36 | 94 |

Basal medium: Glucose 1%, Salt solution 4%, Vitamine K₁ solution 0.02%, Hemin solution 1%, Resazurin solution 0.4%, Cystein-HCl 0.05%

¹Each nitrogen was added to the basal medium and autoclaved after pH setting to 7.0.

²None: No nitrogen source was added.

Fig.3에 나타난 바와 같이 배양온도는 30°C가 가장 효과적으로 나타났으며 이 때 균의 생육도 가장 왕성하였다. 50°C 이상에서는 균의 생육이 거의 불가능한 것으

Table 4. Effect of salts¹ on the antibiotic production

| Salt | Growth | Final pH | Relative Activity (%) |
|---|--------|----------|-----------------------|
| None ² | ++ | 4.90 | 100 |
| AlK (SO ₄) ₂ ·12H ₂ O | +++ | 3.70 | . |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | +++ | 6.11 | 127 |
| CoCl ₂ | + | 5.46 | . |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | ++ | 4.31 | . |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | + | 2.42 | . |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | ++++ | 4.36 | . |
| LiCl | ++ | 5.90 | 104 |
| MgCl | +++ | 5.79 | 108 |
| MgSO ₄ | +++ | 5.57 | 123 |
| MnCl ₂ | + | 5.99 | 85 |
| MnSO ₄ | +++ | 5.14 | 104 |
| K ₂ HPO ₄ | +++ | 6.56 | 119 |
| KH ₂ PO ₄ | ++ | 6.16 | 115 |
| NaCl | ++ | 5.50 | 123 |
| NaHCO ₃ | +++ | 6.54 | 117 |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | ++ | 5.94 | 88 |
| Na ₂ CO ₃ | +++ | 6.89 | 119 |
| Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O | ++ | 6.21 | 95 |
| ZnSO ₄ | + | 5.88 | 100 |
| Salt soln. | +++ | 5.54 | 131 |

Basal medium: Glucose 1%, Casamino acid 0.5%, Vitamine solution 0.02%, Hemin solution 1.0%, Resazurin solution 0.4%, Cystein-HCl 0.05%

¹Each salt was added to the basal medium and autoclaved after pH setting to 7.0.

²None: No salt was added.

로 나타났다.

초기 pH에 있어서는 균의 생육은 pH5~10 사이에서 큰 변화 없이 거의 일정하였으나 항생물질 생산능은 pH 5일 때 가장 우수하였으며 pH10에서는 20% 정도의 활성이 감소되었다. pH4 이하의 산성 영역에서는 균이 거의 생육하지 못하였다.

배양시간에 따른 균의 성장도 및 항균활성의 변화

6일간 배양하는 동안 균의 생육 및 항균활성의 변화는 Fig.4와 같이 나타났다. 균의 생육과 더불어 그 활성도 점차 증가하는 추세를 보였으며 균의 생육이 거의 정지된 상태, 즉 stationary phase에 접어든 96시간이 지나면서 활성은 최고에 달하였다. 이후 배양시간이 증가할수록 활성은 다시 14% 정도 감소하였다. 미생물에 의

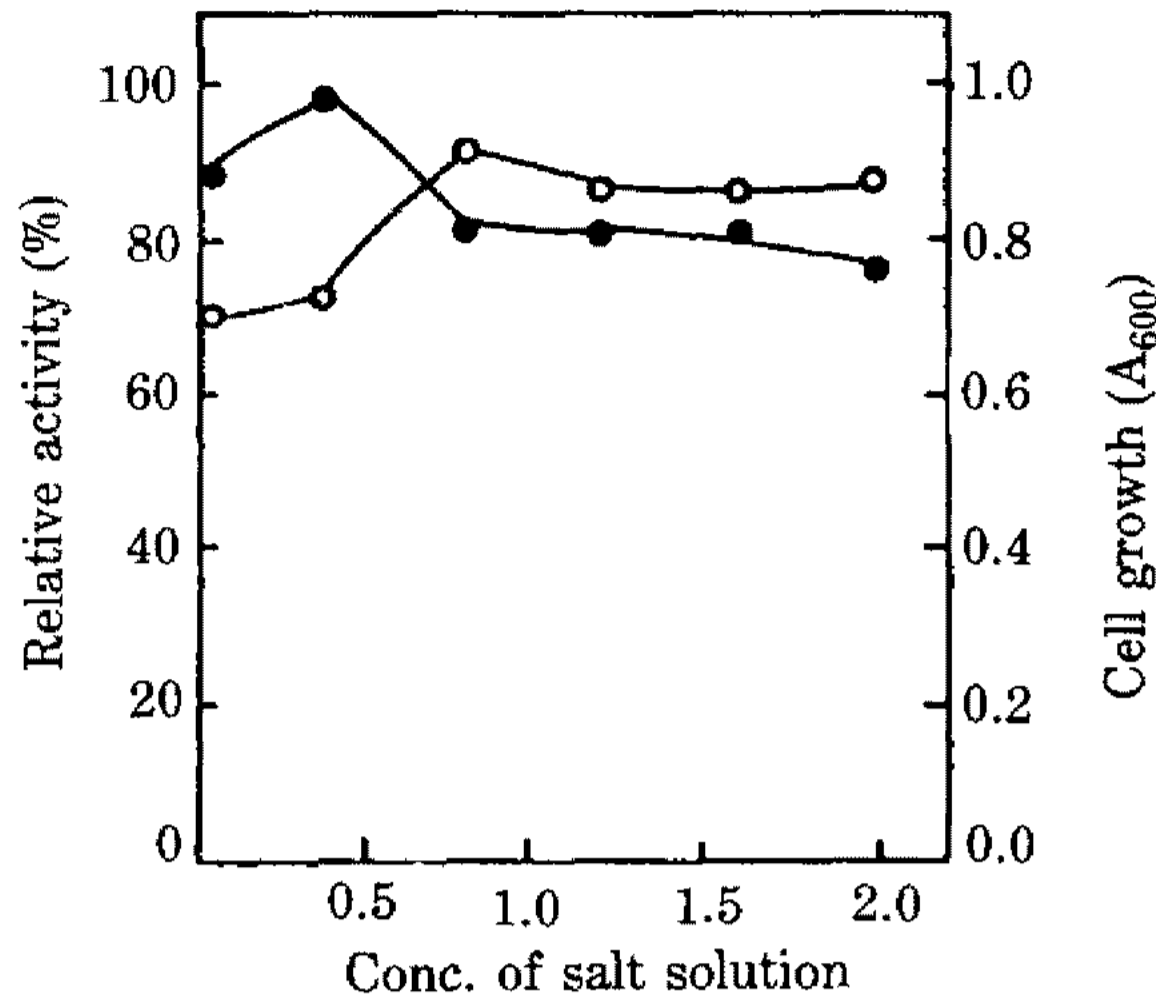


Fig. 2. Effect of salt concentration on the antibiotic production

●—● : Relative activity
○—○ : Cell growth

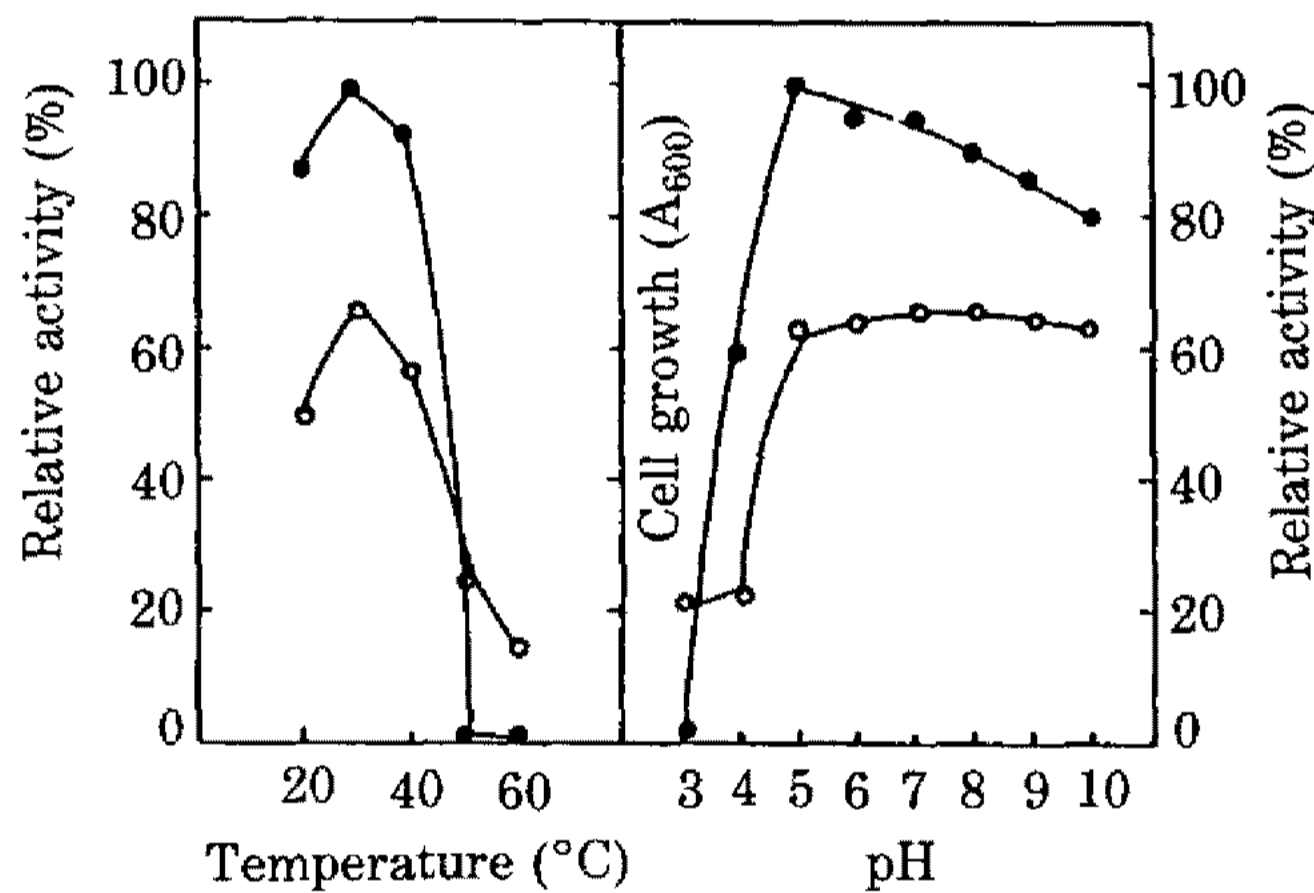


Fig. 3. Effect of temperature and pH on the antibiotic production

●—● : Relative activity
○—○ : Cell growth

한 2차 대사산물은 일반적으로 환경상태가 양호하여 균의 생육이 활발한 trophophase가 끝난 뒤인 idiophase에 접어들면서 활발하게 생산되는데 본 실험에서도 이와 비슷한 양상을 띠었다.

배지 pH는 처음 24시간 동안 7에서 5.8로 낮아졌다가 72시간이 지나면서 거의 6.5 정도로 일정하게 유지되었다.

본 실험에서 항생물질 생산을 위한 최적 배양시간은 108시간임을 알 수 있었다.

요 약

본 실험에서는 *Clostridium* sp. KH-1167의 항생물질

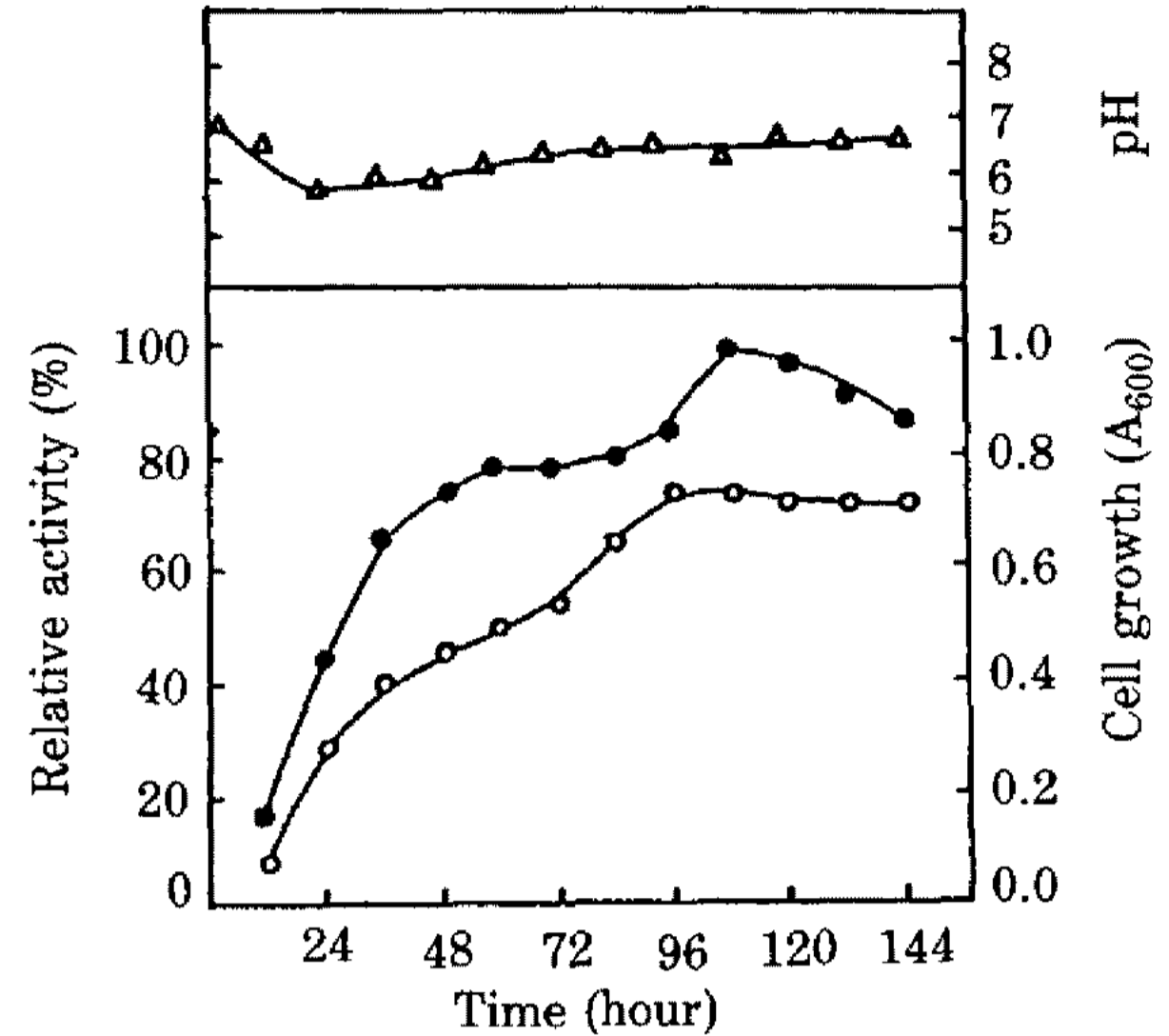


Fig. 4. Growth profile and time course of the antibiotic production

●—● : Relative activity
○—○ : Cell growth
△—△ : pH

생산을 위한 최적 배양조건에 대하여 고찰하였다. PY 배지를 기초배지로 사용하였을 때 탄소원으로는 1%의 glucose가 가장 효과적이었으며 질소원으로는 casamino acid가 비교적 양호한 것으로 나타났다. Salt에 있어서는 여러 salt를 복합적으로 첨가하였을 때 활성이 최대 나타났다. 배지초기 pH 및 배양온도에 대한 최적 조건은 각각 pH5와 30°C로 나타났으며 108시간 배양하였을 때 항생물질의 생산이 최대 나타났다. 이러한 배양조건 최적화 실험결과 KH-1167의 항생물질 생산능력은 처음 분리에 사용되었던 배지에서 보다 450% 정도 증가되었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 일반연구 학술조성비의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참고문헌

1. Harsh, J.H. : *Methods in Enzymology*, 43, Antibiotics, Academic Press(1975).
2. 유주현 : 항생물질의 기술개발연구(1987).
3. Hewitt, W. and S. Vincent : *Theory & Application of Microbiological Assay*, Academic Press(1989).
4. Holdeman, L.V., E. Picato and W.E.C. Moore : *Anaerobic Lab. Manual*(1977).
5. 도재호, 주현규 : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 17(3), 207-212(1989).

(Received April 23, 1990)