

## *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis*로부터 항진균물질 KRF-001의 생산을 위한 발효조건 및 돌연변이 연구

손광희 · 권혜경 · 이항우 · 복성해\*

한국화학연구소 생물공학실

### Effect of Some Factors on the Production of an Antifungal Compound KRF-001 from *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis*

Son, Kwang-Hee, Hye-Keong Kwon, Hang-Woo Lee and Song-Hae Bok\*

Biotechnology Lab., Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-606, Korea

**Abstract** — Antifungal compound, KRF-001, was produced by *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* isolated from soil. Physico-chemical factors affecting cell growth and bioactivity were examined to improve the production yield. Nutrient composition, temperature, pH and phosphate ion concentration were proved to be important factors for the production of KRF-001. Mutation was performed to select high yielding strains. First, mutation was performed with ultra-violet light, and the second mutation process was conducted by MNNG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) resulting in three high yielding strains.

항진균물질을 탐색하기 위한 미생물 스크리닝을 진행하여, 약 5200여 균주 중에서 한개의 유망한 토양세균을 생산균주로 선별하였다(1). *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC 55079로 명명된 이 균주가 생산하는 KRF-001 복합체의 생산수율 증가를 위한 최적화실험 및 우수균종의 개발을 위한 돌연변이를 수행한 결과를 보고하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 사용균주

*Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC 55079

##### KRF-001의 정량 및 검출

피검균 *Pyricularia oryzae*의 평판배지상에서 agar diffusion assay에 의해서 발효액 중의 유효 항진균 활성을 측정하여 저해환의 지름으로 bioactivity를 나

타내었다. 정성분석은 silica plate상에서의 thin layer chromatography를 이용하였다. Chloroform, methanol, ammonium hydroxide(15% 수용액), *i*-propanol (4 : 3 : 2 : 1)의 전개용매계에서  $R_f=0.57$ 이었으며, iodine에 의한 발색반응과 bioautography에 의해 활성부위를 확인하였다.

##### 종균배양

생산균을 LB배지(trypone 1.0%, yeast extract 0.5%, NaCl 1.0%, glucose 1.0%)에서 배양하여 대수증식기 후기에 무균조작으로 균체를 회수하여 새로 준비된 LB배지와 최종농도 10%의 glycerol과 섞어( $A_{550}=10.0$ ), 0.5 ml씩 냉동 vial에 분주하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 working stock으로 사용하였다. 150 ml의 LB 배지가 채워진 1 liter 용량의 flask(Bellco사 제품, bottom baffled)에 vial 하나를 접종하여 6시간 동안,  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 200 rpm으로 진탕배양하였다.

##### 발효

시험용 배지의 기본조성은 배지 1 liter당 sucrose

Key words: *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis*, fungicide production, mutation

\*Corresponding author

**Table 1. Effective range of pH for the isoelectric precipitation of KRF-001 from fermented broth**

| Samples   |     | Bioactivity on <i>P. oryzae</i><br>(Inhibition zone, mm) |
|---|-----|--|
| Fermentation broth                                  |     |  |
| Sonicated cell fraction <sup>1)</sup>               |     | 0  |
| pH range<br>to precipitate<br>KRF-001<br>from broth | 6.0 | 11   |
|   | 4.9 | 11   |
|   | 3.6 | 18   |
|   | 2.8 | 20   |
|   | 2.0 | 20   |
|   | 1.1 | 20   |

\*All the samples and ppt. were neutralized after the treatments and autoclaved 5 min at 121°C, and re-adjusted to initial volume prior bioassay.

<sup>1)</sup>Sonication: with micro tip, 5×30 sec for 5 ml of broth.

30g, soytone 10g, yeast extract 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 4 mg, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 5 mg, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 25 mg이었다. 발효는 1 liter 혹은 500 ml 용량의 baffled flask와 Marubishi MJ-N type 및 B. Braun Biostat-E type의 발효조를 사용하였다. 배양액 10 liter에 종균액 200 ml의 농도로 접종하여 30°C, pH 7.0, 400 rpm 및 통기량 0.5~1.0 vvm에서 배양하였다. 발효도중 pH는 5 N NaOH와 5 N HCl로 7.0±0.1 범위내로 조절하였고, silicone계의 소포제를 사용하였다.

#### 산성침전물의 회수

균체에는 측정가능한 유효성분이 없었으며 발효여액 중에 모든 항진균활성 성분이 존재하므로(Table 1), 균체가 제거된 발효여액에 5 N HCl을 넣어 pH를 3.0 부근으로 조정한다. 대량처리의 경우 100 rpm 정도로 완전히 섞어주어 저온에서 숙성시키고, 소량의 경우 그대로 원심분리하여 침전물을 회수한다. 이 침전물을 중성 buffer에 녹이거나, NaOH로 중화하여 사용한다. 이러한 침전에 의한 물질회수를 isoelectric precipitation(2)이라 하는데 유효성분회수에 직결한 pH 구간의 결정은 Table 1의 결과에 의해 정하였다.

#### 돌연변이 유발

자외선에 의한 돌연변이 : Caffein 10 mM을 포함한 균액(A<sub>550</sub>=1.0) 1 ml을 일회용 petri dish에 얇게 부어, 30 cm의 거리에서 2개의 10 W 자외선 lamp로 1 분간 처리(치사율 99.9%)하였다.

MNNG에 의한 돌연변이 : 자외선 돌연변이 균주에 대하여 2차 돌연변이를 유발시키기 위해 최종농도 0.1 mg/ml의 MNNG가 처리된 균액을 37°C에 10분간 정치하였다. 이것을 M56 medium(3)으로 세척하여 9가지의 피검균, *Trichophyton mentagrophytes*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Mucor hiemalis*, *Pyricularia oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans*, *Botrytis cinerea*의 평판배지 위에 각각 도말하여 모균주보다 저해환의 크기 및 생육이 우수한 균총을 선별하고 비생산성 배지인 LB 액체배지에 배양하여 최종적으로 3균주를 선발하였다.

## 결과 및 고찰

### 탄소원 및 질소원의 효과

시험용 배지를 기본으로 17종의 탄소원과 15종의 질소원에 대한 진탕배양을 하여 시험용 배지에서의 bioactivity를 기준으로 상대적인 활성을 백분율로 표시하였다(Table 2). Molasses의 경우 탄소 당량으로 환산하여 10%를 사용하였고, 액체 탄소원은 volume/weight로 농도를 정하였다. 대개의 2차 대사산물은 단당류를 비롯한 이용하기 쉬운 탄소원에 의해 생산 억제를 받지만(4), KRF-001은 이와 달리 조건분, inositol 및 soybean oil을 제외한 대부분의 탄소원에서 고른 bioactivity를 보였다. 질소원의 변화는 탄소원보다 더 뚜렷한 bioactivity 차이를 보였다. 특히 fish meal은 생산저해 효과를 보였으며, CSL(corn steep liquor)과 corn gluten meal은 두배 가까운 증대효과가 있었다. 사용된 질소원의 농도는 질소당량을 기준으로 정하였다.

### 배양조건의 영향

온도와 용존산소 조건을 고정시키고 온도만을 변화시키며 발효를 진행하여 KRF-001의 활성을 조사하였다. KRF-001의 활성은 발효액을 121°C에서 5분간 살균하여 그대로 bioassay한 결과와, 배양액을 isoelectric precipitation하여 산성침전물로 회수된 결과로 나누어 나타내었다. Fig. 1에 보듯이 온도 25°C와 30

**Table 2. Relative comparison of carbon and nitrogen sources for the production of KRF-001 in shake flask culture**

(a) Carbon sources

| Carbon sources            | Concentration<br>(%, w/w) | Bioactivity<br>(%) |
|---------------------------|---------------------------|--------------------|
| Sucrose                   | 3.0                       | 100                |
| Whey                      | 3.0                       | 141                |
| Mannitol                  | 3.0                       | 139                |
| Maltose                   | 3.0                       | 132                |
| Xylose                    | 3.0                       | 128                |
| Lactose                   | 3.0                       | 126                |
| Glycerol <sup>1)</sup>    | 3.0 (v/w)                 | 126                |
| Fructose                  | 3.0                       | 119                |
| Glucose                   | 3.0                       | 95                 |
| Dextrin                   | 3.0                       | 83                 |
| Arabinose                 | 3.0                       | 79                 |
| Molasses <sup>1)</sup>    | 10.0 (v/w)                | 71                 |
| Soluble starch            | 3.0                       | 50                 |
| Potato starch             | 3.0                       | 48                 |
| Inositol                  | 3.0                       | 35                 |
| Soybean oil <sup>1)</sup> | 3.0 (v/w)                 | 29                 |
| Corn starch               | 3.0                       | 29                 |

<sup>1)</sup>Liquid formulated sources.

\*Concentration was determined on the basis of carbon equivalent.

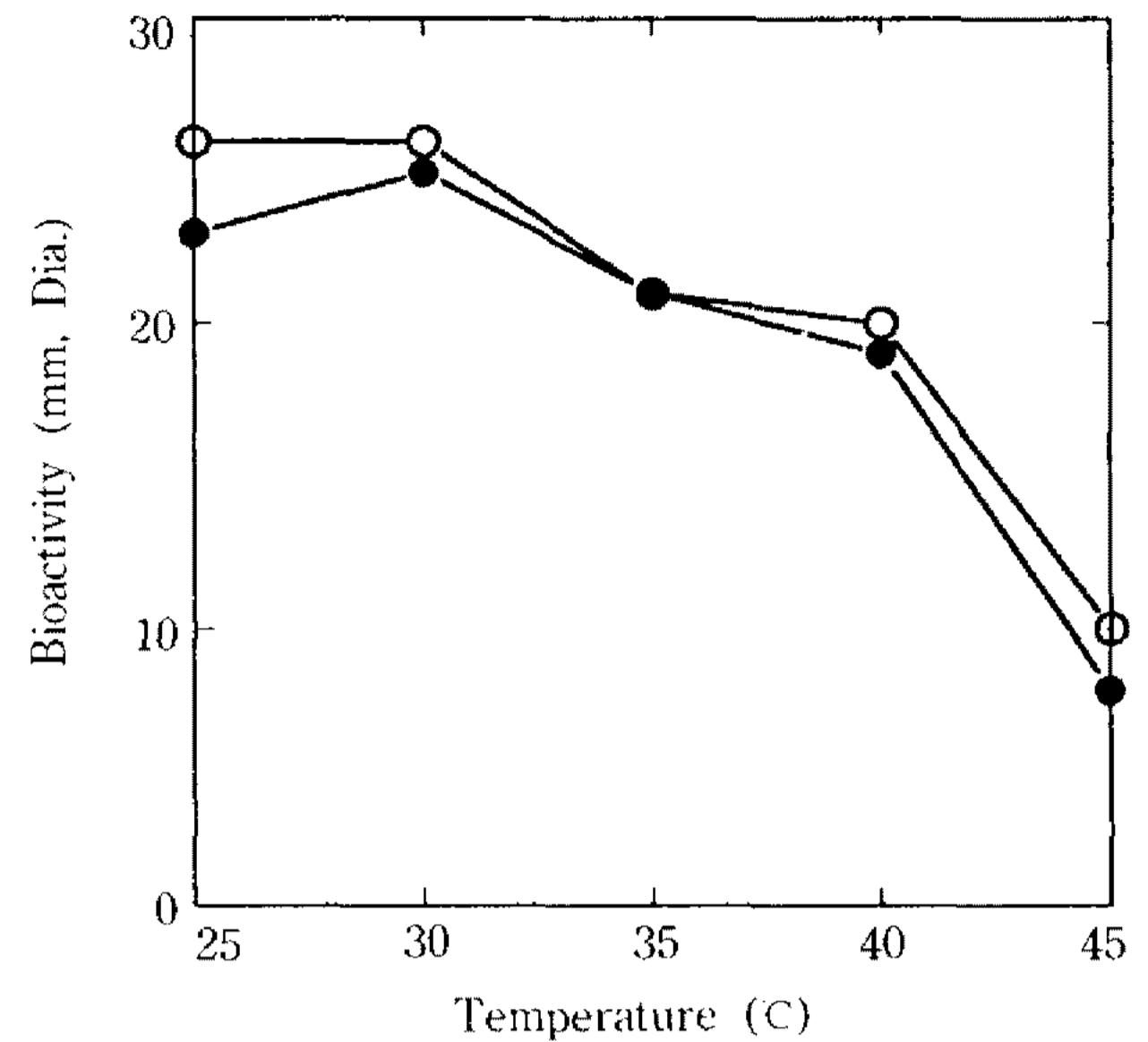
(b) Nitrogen sources

| Nitrogen sources                | Concentration<br>(%, w/w) | Bioactivity<br>(%) |
|---------------------------------|---------------------------|--------------------|
| Sucrose + yeast ext.            | 1.0+0.5                   | 100                |
| Corn steep liquor               | 6.0                       | 199                |
| Corn gluten meal                | 2.0                       | 186                |
| Polypeptone                     | 1.5                       | 161                |
| NZ-Amine                        | 1.5                       | 141                |
| Casitone                        | 1.5                       | 132                |
| Tryptone                        | 1.5                       | 132                |
| Casamino acid                   | 1.5                       | 132                |
| Soybean meal                    | 2.0                       | 126                |
| Soytone + beef ext.             | 1.0+0.5                   | 114                |
| Yeast ext.                      | 3.0                       | 110                |
| Cotton seed flour <sup>1)</sup> | 2.0                       | 100                |
| Pharmamedia                     | 2.0                       | 87                 |
| Soytone + malt ext.             | 1.0+0.5                   | 76                 |
| Fish meal                       | 1.5                       | 10                 |

\*Concentration was determined on the base of nitrogen equivalent.

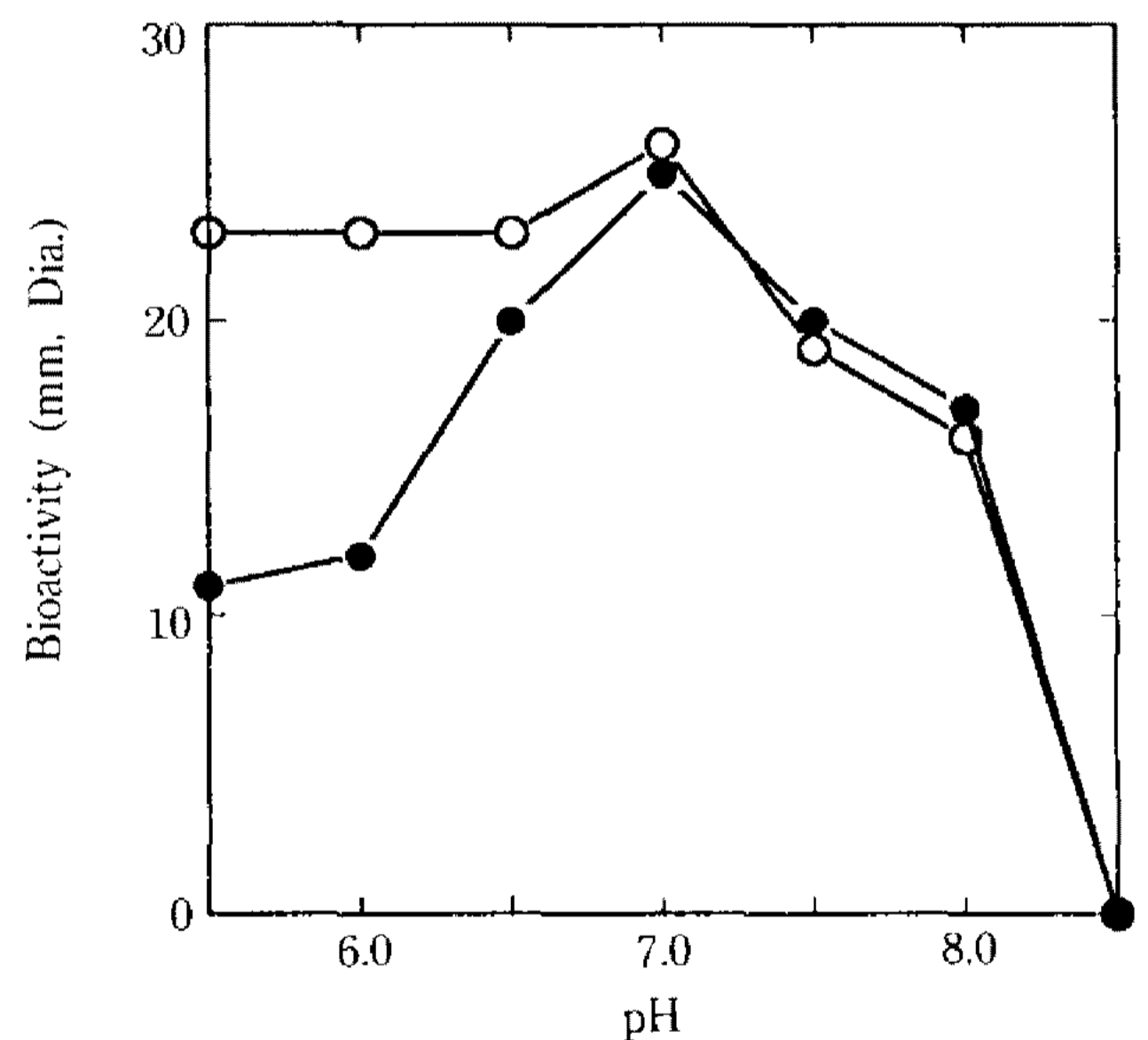
\*ext.=extract

<sup>1)</sup>Product of Sigma Co.



**Fig. 1. Effect of culture temperature on the bioactivity of KRF-001.**

All the data are the maximum values at each culture conditions. Open symbols are for the broth and close for isoelectric precipitate.

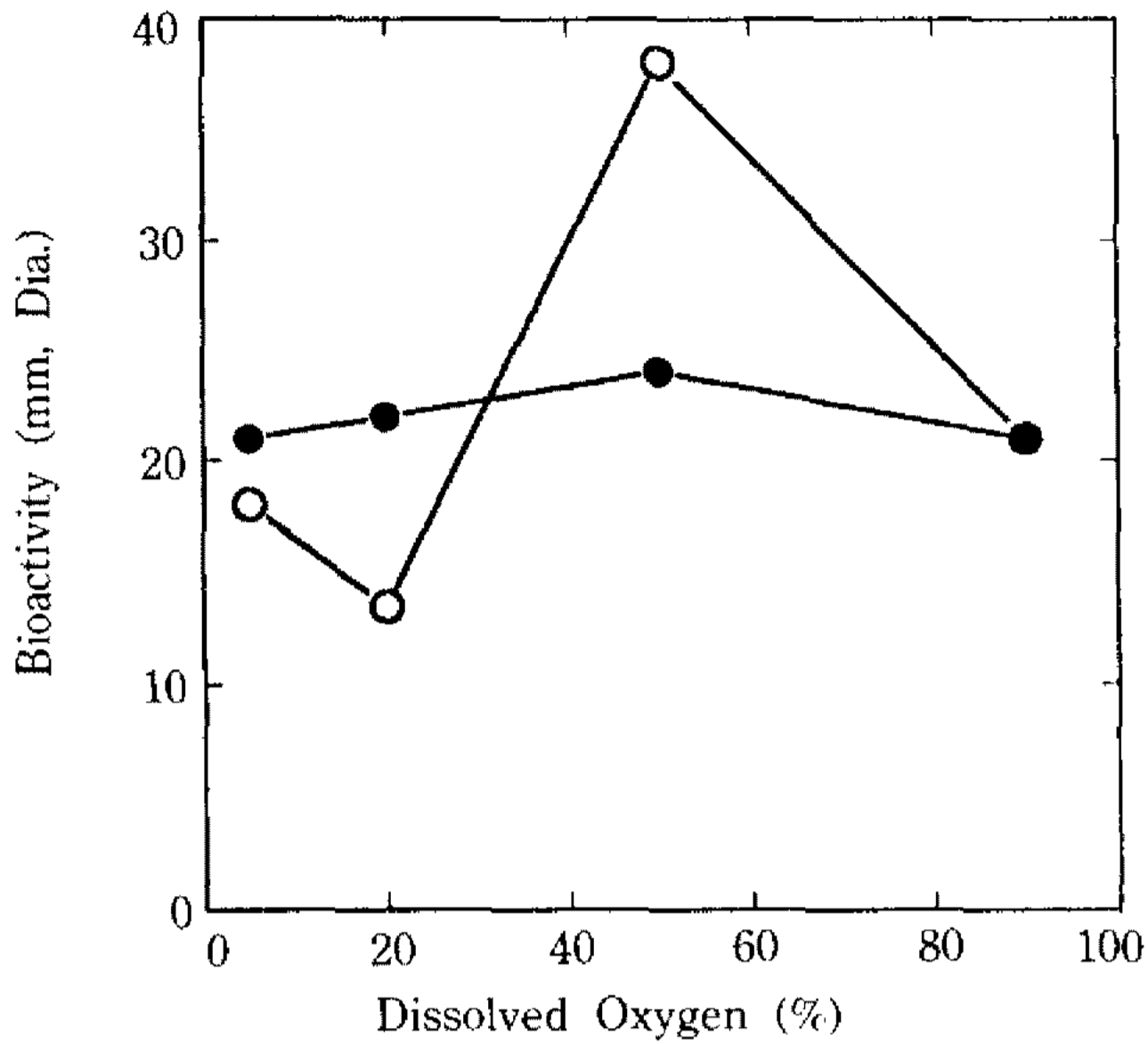


**Fig. 2. Effect of pH on the bioactivity of KRF-001.**

All the data are the maximum values at each culture conditions. Open symbols are for the broth and close for isoelectric precipitate. For pH control, 5 N HCl and 5 N NaOH were added into the fermenter automatically.

°에서 최대의 활성을 보여 중온군(5)의 성질을 나타내었으며 45°C에서는 cup size까지 활성이 감소되었다.

배양 중의 pH를 5.5에서 8.5까지 변화시킨 결과 Fig. 2에서와 같이 중성의 조건에서 활성이 높았다. 특히

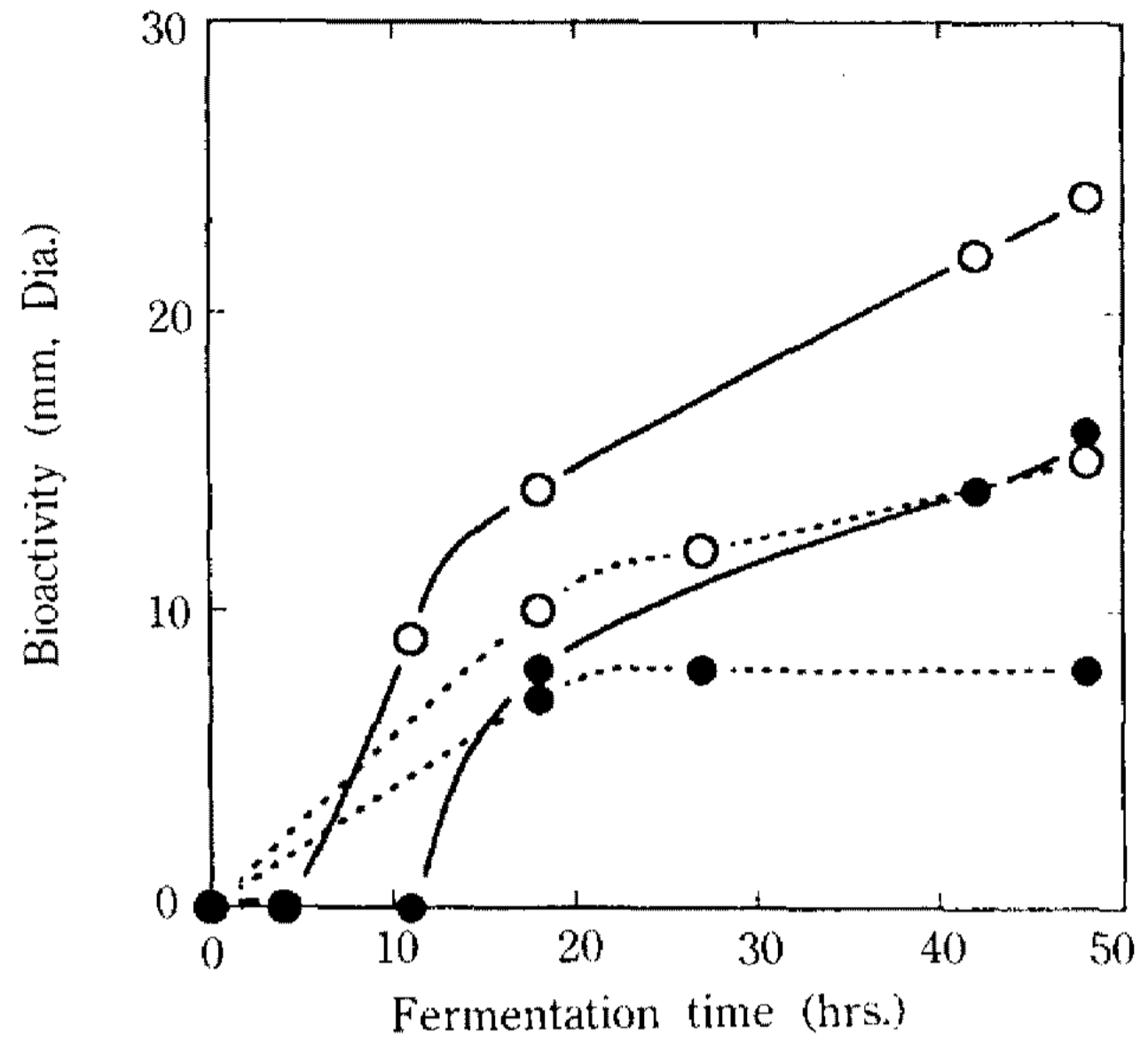


**Fig. 3. Effect of dissolved oxygen (DO) concentration on the bioactivity of KRF-001.**

All the data are the maximum values at each culture conditions. Open symbols are for the broth and close for isoelectric precipitate. DO control was performed by the change of agitation speed and aeration rate concomitantly.

pH 5.5와 6.0에서는 배양액과 산성침전물에서의 KRF-001 활성이 큰 차이를 보여서, 낮은 pH 조건에서는 작용범위가 다른 활성물질이 생산될 수 있는 가능성이 보인다. 또한 pH 8.5의 배양조건에서는 세포생육이  $A_{550}=8.0$ 에 이룸에도 불구하고 전혀 KRF-001의 활성을 찾을 수 없었다.

Biostat-E type의 발효조와 Ingold DO probe를 이용하여, 통기량과 교반속도를 동시에 조절하여 발효기간 동안 원하는 용존산소농도(DO)를 5%내외의 오차로 유지시킬 수 있었다. Probe의 반응시간 문제로 5% DO 이하의 조건은 유지시킬 수 없었다. 실험은 DO  $5\pm 5\%$ ,  $20\pm 5\%$ ,  $50\pm 5\%$  그리고 90% 이상의 네 수준에서 진행하였다. Fig. 3에서와 같이 산성침전물이 DO 전 범위에 걸쳐서 고른 KRF-001의 활성을 보이는 반면, 발효액의 활성은 DO에 따라 변화가 심해서 DO가 pseudoactivity에 영향을 주고 있음을 알 수 있었다. 따라서 산성 침전물 이외의 방법으로 KRF-001을 회수하려는 경우 bioprofile의 변화에 유의하여 회수공정을 설계해야 한다. 용존산소농도 90% 이상에서 bioactivity가 Fig. 1과 Fig. 2의 30°C, pH 7.0에서의 값과 다른 것은 사용된 발효조의 차이에 기인한다고 여겨진다.



**Fig. 4. Time courses of the KRF-001 production in the low and high phosphate medium.**

Solid lines are for the bioactivity in lower phosphate (0.05% of  $K_2HPO_4$ ) medium and dashed lines for the higher phosphate (0.75% of  $K_2HPO_4$  and 0.15% of  $KH_2PO_4$ ) one. Symbols are same as in Fig. 1.

**인산염에 의한 KRF-001 생산조절**

기본배지에 포함된 0.05%의  $K_2HPO_4$  이외에도, soytone 1.0%와 yeast extract 0.5%에서 비롯되는 인산이 이미  $K_2HPO_4$ 로 환산하여 0.05%에 해당하는 양만큼 더 들어있다(6, 7). 따라서 기본배지에는 실질적으로 0.10%의 인산염이 있다고 계산해야 한다. 기본배지에  $K_2HPO_4$ 를 별도로 넣지않고 진행한 저농도 인산배지에서의 발효과정( $K_2HPO_4$  0.05% 해당량)과  $K_2HPO_4$  0.7%와  $KH_2PO_4$  0.15%가 첨가된 고농도 인산배지에서의 발효과정을 Fig. 4에 나타내었다. 균체성장은 두 경우 비슷했지만, 배양액 및 산성침전물의 bioactivity는 고농도 인산배지에서 저해환의 지름이 1/2 감소되어 KRF-001의 생산성 감소를 알 수 있었고, 인산염의 농도가 낮은 경우 발효액 중의 bioactivity는 10시간의 배양시간부터 일찍 나타났다. 이는 대개의 항생물질 생산이 phosphate에 의해서 조절받는 사실(8)과 같은 양상이다.

**돌연변이주 선발**

모균주로부터 UV 돌연변이에 의해 1차 선발된 5 균주에 대해, MNNG로 2차 돌연변이를 시도하여 3 균주를 분리했다. 선별 효율을 높이기 위해서는 hypersensitive mutant를 사용하거나 선별조건을 강화

**Table 3. Time courses of bioactivity of KRF-001 from mother cell and mutant MN-1 on various fungus**

| Test organisms                         | Bioactivity (Inhibition zone, mm) at |      |          |      |          |      |
|--|--------------------------------------|------|----------|------|----------|------|
|  | 26 hours                             |      | 52 hours |      | 70 hours |      |
|  | P.S. <sup>1)</sup>                   | MN-1 | P.S.     | MN-1 | P.S.     | MN-1 |
| <i>Pyricularia oryzae</i>              | 22                                   | 28   | 21       | 26   | 21       | 26   |
| <i>Candida albicans</i>                | 8                                    | 15   | 8        | 17   | +        | 16   |
| <i>T. mentagrophytes</i> <sup>2)</sup> | 19                                   | 26   | 17       | 27   | 18       | 25   |
| <i>Rhizoctonia solani</i>              | 18                                   | 27   | 12       | 24   | 15       | 25   |
| <i>Botrytis cinerea</i>                | 19                                   | 24   | 19       | 30   | 20       | 28   |
| <i>Fusarium oxysporum</i>              | —                                    | 8    | —        | 14   | —        | 11   |
| <i>Mucor hiemalis</i>                  | 8                                    | 10   | 8        | 10   | 8        | 10   |

<sup>1)</sup>P.S.: parent strain

<sup>2)</sup>*T. mentagrophytes* = *Trichophyton mentagrophytes*

\*—: no activity, +: trace activity (below cup size)

하는 방법(9, 10)이 가능한데 다수의 대상으로부터 보다 효율적으로 선발균주 수를 줄여 나가기 위해, 생산용 배지로는 적합치 않은 LB 배지를 2차 돌연변이 선별시 사용했다. 선발균주 중 MN-1을 sucrose 2%가 포함된 시험배지 100 ml(500 ml baffled flask)에 접종하여 배양시간별로 모균주와의 bioactivity를 비교하였다(Table 3). 배양시간을 70시간까지 지속시킨 결과 전범위에 걸쳐 모균주보다 MN-1이 높은 bioactivity를 보였다.

## 요 약

토양세균 *B. subtilis* subsp. *krietiensis*로부터 항진균활성물질 KRF-001 복합체를 생산하기 위한 발효 조건을 조사하였다. Whey와 mannitol 등이 탄소원으로, CSL, corn gluten meal 그리고 polypeptone이 복합질소원으로 좋았다. 중온균인 생산균은 중성 pH

조건에서 *P. oryzae*에 대한 bioactivity가 가장 높았으며, 0~10% DO의 낮은 용존산소 조건에서도 bioactivity가 유지되었다. 인산염의 농도가  $K_2HPO_4$  0.047%에서 0.097%로 높아짐에 따라 1/2의 bioactivity 감소가 관찰되었다. 한편 UV 및 MNNG에 의한 돌연변이에 의해 우수균주 3개를 선별하였다.

## 감사의 말

본 연구 수행에 있어 발효조 운전을 담당한 권용국씨께 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Kim, S.U., J.W. Lee, S.H. Lee and S. H. Bok: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 337 (1991)
2. Green, A.A. and W.L. Hughes: *Method. Enzymol.*, **1**, 67 (1955)
3. Carlton, B.C. and B.J. Brown: *Manual of methods for general bacteriology*. (P. Gerhardt et al., eds.) ASM, USA, 226 (1981)
4. Martin, J.F. and A.L. Demain: *Microbiol. Rev.*, **44**, 230 (1980)
5. John, H.H.: *Method. Enzymol.*, **43**, 7 (1975)
6. Miller, T.L. and B.W. Churchill: *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. (A.L. Demain, N.A. Solomon eds.) ASM, USA, 130 (1986)
7. Cejke, A.: *Biotechnology*. (H. Brauer, ed.) Verlag Chemie, FRG, **2**, 629 (1985)
8. Martin, J.F.: *Adv. in Biochem Eng.*. (T.K. Ghose ed.) A. Fiechter and N. Blakebrough, **6**, 105 (1977)
9. Na, K.H., H.J. Kim, G.Y. Kim, K.T. Kim, J.H. Lee and J.I. Yang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 343 (1991)
10. Kim, Y.J., S.H. Lee, K.H. Son and S.H. Bok: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 131 (1989)

(Received October 17, 1991)