

## 항생물질을 생산하는 *Clostridium* sp. KH-431의 동정 및 항생물질의 정제

홍수형 · 김미정 · 박용복 · 이재근<sup>1</sup> · 하지홍\*  
경북대학교 유전공학과, <sup>1</sup>화학과

### Identification of the Antibiotic-Producing *Clostridium* sp. KH-431 and Purification of the Antibiotics

Hong, Su-Hyung, Mi-Jeong Kim, Yong-Bok Park,  
Jae-Keun Lee<sup>1</sup> and Ji-Hong Ha\*

Department of Genetic Engineering and <sup>1</sup>Chemistry,  
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

**Abstract**— A strain showing antibiotic activities against various bacteria and fungi was selected from approximately 2,000 microorganisms obtained from soil samples. This strain, designated as KH-431, was identified as a *Clostridium* sp. by its morphological, physiological and biochemical characteristics. The highest production of the antibiotics was achieved in a fermentation medium containing sorbitol, yeast extract, d-biotin and CaCl<sub>2</sub>. The antibiotics were isolated from the culture broth by solvent extraction using ethyl acetate, silica gel column chromatography and recrystallization. Two kinds of antibiotics, KG-431A and KG-431B were obtained after the purification procedure, and only KG-431B was successful to recrystallize.

#### 서 론

Penicillin의 발견 이후 현재까지 알려진 미생물유래의 항생물질은 약 8,600여종으로 이들 중 7할이 방선균에서 생산되며 그 나머지는 fungi나 Bacilli, Pseudomonas 등의 세균에 의하여 생산된다(1). 그러나 지금까지 알려진 항생물질의 수나 종류로 보아 기존의 방법으로 탐색되는 항생물질은 거의 모두가 이미 발견되었거나 보고되었을 가능성이 클 것으로 사료된다. 따라서 현 상황에서 신물질창출의 가능성을 높이고자 한다면 새로운 탐색방법을 모색하여야 함은 당연한 일일 것이다.

이에 본 연구실에서는 항생물질 생산균주를 기존의 미생물에서 혐기성 세균으로 대체하여 항생물질의 탐색을 행하였다. 이제까지 혐기성 세균이 항생물질

탐색에 이용된 예는 병원성미생물의 경우 시험균으로 사용된 것이 대부분으로 이들 미생물을 생산균주로 한 탐색은 거의 등한시 되어온 실정이었다.

본 연구에서 저자 등은 여러 토양시료에서 혐기성 세균을 순수분리한 후 이들로부터 bacteria 및 fungi에 대하여 비교적 강한 활성을 나타내는 균주 KH-431을 선발하여 동정하였다. 또한 이 균주에 의하여 생산되는 항생물질의 최적배양조건 및 이들 배양액으로부터 항생물질의 정제과정을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 균의 분리 및 선발

다양한 환경의 토양 1g을 증류수 5ml에 희석한 후 80°C에서 15분간 열처리하여(2) 균 분리용 시료로 사용하였다. 균 분리는 prerduced media를 이용한 Hungate 방법(3)에 따라 혐기성 상태에서 행하였다. Prerduced media를 제조하기 위하여 먼저 배지를

**Key words:** Antibiotics, KH-431, KG-431A and KG-431B, *Clostridium* sp.

\*Corresponding author

끓여 1차적으로 용존산소를 제거한 후 멸균하기 직전에 reducing agent인 cystein-HCl을 첨가하였다. 균을 접종한 후에는 배지에 nitrogen gas를 불어넣어 잔류산소를 완전히 제거한 후 고무마개로 밀봉하여 배양하였다. 균 분리에 사용된 배지의 주요 영양원으로는 peptone, tryptone, casein, saccharose, glucose, glutamate, lactate와 acetate, uric acid를 사용하였다(4).

분리한 균들을 prerduced Peptone-Yeast extract (PY)(5) 배지에서 4일간 배양한 후 paper disc method로 bacteria와 fungi에 대한 항균활성 유무를 조사하였다. 이때 시험균으로는 각각 두주씩의 Gram 양성, 음성세균과, 두주의 fungi를 사용하였으며, 이 실험에서 항균활성이 재현성있게 나타나는 균주를 최종적으로 선발하였다.

#### 선발균주의 특성 및 동정

최종선발된 균주의 형태, 생리 및 배양학적 특성을 조사하였다. 위상차 현미경으로 균주의 모양과 운동성을 조사하였으며 그 외의 특성조사는 주로 Manual of Methods for General Bacteriology(6)와 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(7)의 방법에 따라 행하였다.

#### 항균활성 측정

항균활성의 측정은 paper disc method(8)에 따라 행하였다. 시험균은 Kirby-Bauer 방법(8)으로 도말하였으며 시험배지로는 bacteria와 fungi 경우 각각 Mueller-Hinton(MH) 배지(9)와 Sabouraud-glucose (Sg) 배지(9)를 사용하였다.

#### 최적 배지성분 결정

최적 탄소원을 결정하기 위하여 기본배지에서 peptone과 yeast extract양을 0.1%로 줄인 후 20종의 탄소원을 각각 1%씩 첨가하여 배양하였다. 최적 탄소원에 대해서는 catabolite repression 현상의 유무를 알기 위하여 0~4% 농도 범위에서 항균활성 정도를 조사하였다.

질소원의 경우 peptone과 yeast extract가 제거된 PY배지에 최적 탄소원을 첨가한 후 12종의 질소원을 0.5%씩 첨가하였다.

비타민의 영향을 알아보기 위하여 비타민이 제거된 배지에 다른 영양원을 첨가한 후 12종의 비타민을 2 µg/ml 농도로 각각 첨가하여 항생물질의 생산에 미

치는 영향을 알아보았다. Salt의 경우 salt가 제거된 PY배지에 앞의 실험에서 결정된 최적 영양원을 첨가한 후 20종의 salt를 1 mM 농도로 각각 첨가하였으며, 0~2% 농도 범위에서 salt의 농도가 항생물질의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

#### 최적 배양조건 결정

배지 초기pH의 영향을 조사하기 위하여 앞의 실험에서 결정된 PY배지의 pH를 2~12의 범위로 각각 조절하여 균을 배양한 후 생산된 항생물질의 활성 정도를 조사하였다. 한편 10~60°C 온도 범위에서 최적배양 및 생산온도를 결정하였다. 최적배양시간을 조사하기 위하여 growth profile을 조사하였는데 배양초기에는 3시간마다, 이후로는 12시간마다 배양액을 채취하여 각각의 항균활성 및 생육정도를 측정하였다.

#### 항생물질의 추출 및 정제

항생물질의 추출 및 정제과정에서 손실을 줄이기 위하여 먼저 배양액상태에서의 pH 및 온도에 대한 항생물질의 안정성을 조사하였다. 그 후 20%의 배양액으로부터 항생물질을 추출, 정제하기 위하여 다음과 같은 예비실험을 행하였다. 먼저 항생물질이 균체의 부로 분리되는지의 여부를 조사하기 위하여 5,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후의 상등액과 pellet 추출물에 대하여 각각 항균활성을 조사하였다. 그 후 물과 섞이지 않는 각종 유기용매를 사용하여 배양액으로부터의 전용여부를 검토하고(10), 배양액 pH를 4, 7, 10으로 조절한 후의 전용정도도 조사하였다(11). 이러한 방법으로 추출된 sample을 농축한 후 silica gel(Merck, 70~230 mesh, 230~400 mesh) column chromatography(12)와 재결정실험(13)을 반복하면서 정제하였다.

## 결과 및 고찰

#### 균의 분리 및 선발

Hungate method에 의해 최종적으로 2,000여주의 혐기성 세균을 순수분리하였다. 항균활성시험을 통한 1차 screening에서는 약 2%에 해당하는 43주를 선발하였다. 이들 중 특히 Tryptone-yeast extract 배지에서 순수분리된 strain KH-431은 배양할 때마다 항균활성의 재현성을 보여 이를 최종선발, KH-431이라 명명하였다.

**Table 1. Physiological characteristics of strain KH-431 and *Clostridium fallax***

|                    | KH-431         | <i>Clostridium fallax</i> |
|--------------------|----------------|---------------------------|
| Gelatin hydrolysis | -              | -                         |
| Arabinose          | - <sup>w</sup> | -                         |
| Cellobiose         | -              | -                         |
| Esculin            | - <sup>w</sup> | a                         |
| Fructose           | a <sup>w</sup> | a                         |
| Galactose          | -              | a                         |
| Glucose            | a              | a                         |
| Glycerol           | -              | -                         |
| myo-Inositol       | -              | -                         |
| Lactose            | - <sup>w</sup> | -                         |
| Maltose            | a              | a                         |
| Mannitol           | -              | -                         |
| Mannose            | -              | a                         |
| Meliobiose         | -              | -                         |
| Ribose             | a <sup>w</sup> | a <sup>w</sup>            |
| Sorbitol           | -              | a <sup>w</sup>            |
| Starch             | a              | a                         |
| Sucrose            | a              | -                         |
| Xylose             | -              | a                         |
| Indole             | -              | -                         |
| Catalase           | -              | -                         |
| Urease             | -              | -                         |
| Nitrate reductase  | -              | -                         |
| Milk curd reaction | +              | +                         |
| Motility           | -              | -                         |

a : strong acid-pH 5.5 or below

a<sup>w</sup>: most strains acid, some strains weak

+: more than 90% strains positive

-: more than 90% strains negative

### 선발균주의 동정

Spore의 열에 대한 저항성을 조사하는 heat test (14)에 의해 strain KH-431은 spore를 형성하는 것을 확인하였다. strain KH-431의 형태학적 특성을 알기 위하여 1500배 위상차 현미경으로 관찰한 결과 이 균주는 terminal spore를 형성하는 rod type이며 운동성은 없는 것으로 나타났다. Gram staining 결과는 positive였으며 catalase를 생산하지 않는 것으로 나타났다. 이 결과들을 종합해 볼 때 strain KH-431은 *Clostridium* sp.임을 알 수 있었다(15). 최적배양온도는 30°C, 최적 배양 pH는 7로 나타났으며 기타 특성은 Table 1과 같다. 이러한 형태적 관찰, 배양 및 생리학적 특성, 생화학적 특성, 특히 당 이용성 등을 검토한 결과 이 균주는 *Clostridium fallax*와 가장 유

**Fig. 1. Phase-contrast micrograph of strain KH-431 (×1500).****Table 2. Optimum composition of medium for antibiotic production**

| Components        | Concentration |
|-------------------|---------------|
| sorbitol          | 2.5%          |
| yeast extract     | 1.0%          |
| CaCl <sub>2</sub> | 0.4%          |
| d-biotin          | 4 µg/ml       |

사성이 많은 것으로 나타났다. Fig. 1은 위상차 현미경으로 1500배 확대하여 관찰한 strain KH-431의 사진이다.

### 항생물질의 최적배양조건

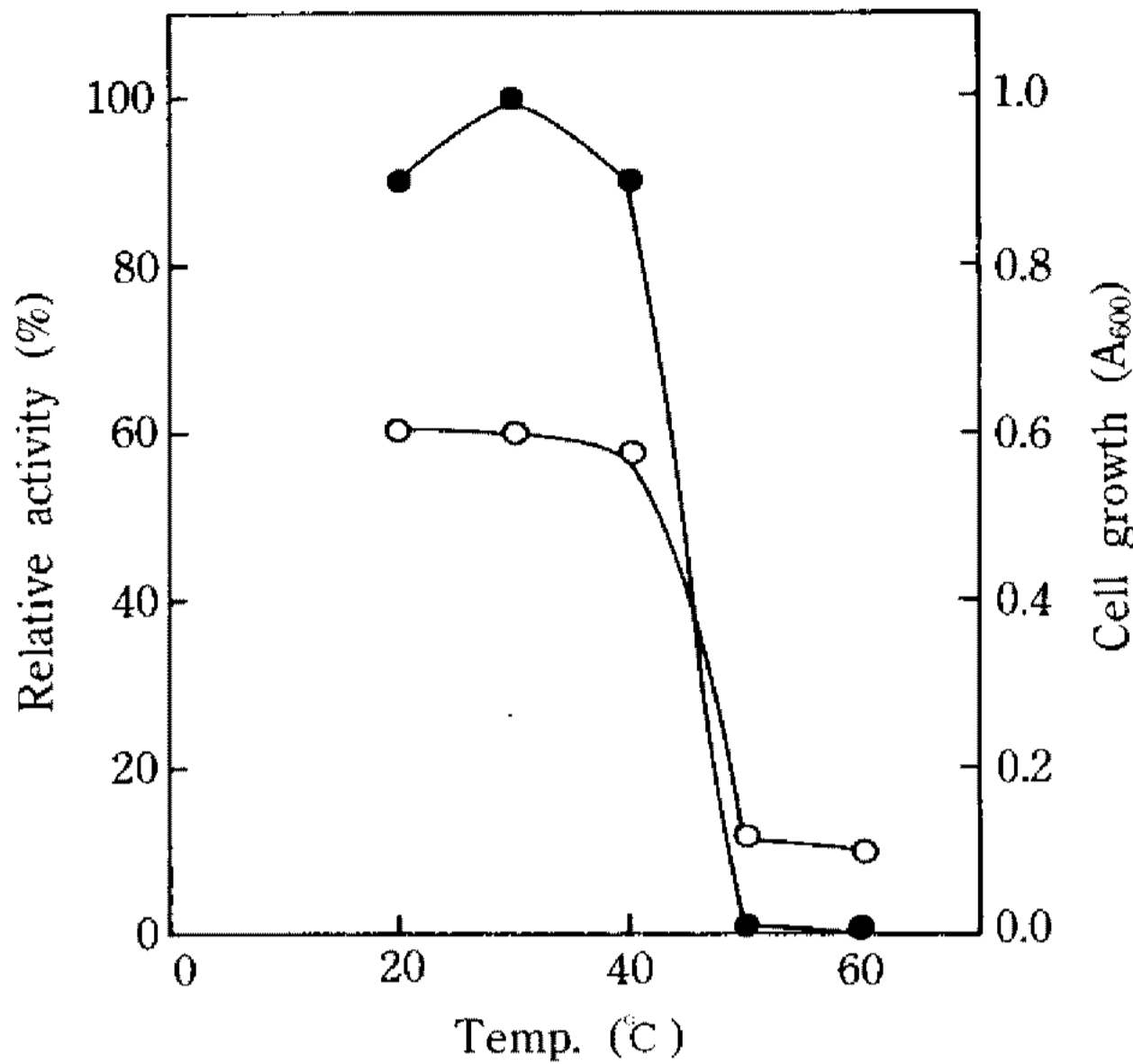
각각의 배지성분 및 그 농도에 대한 항균활성의 변화를 조사한 결과 strain KH-431이 항생물질을 생산하는데 있어서의 최적배지성분은 다음과 같이 나타났다.

탄소원의 경우 균의 생육은 glucose를 사용하였을 때가 가장 왕성하였으나 항균활성은 sorbitol을 사용하였을 때 최대로 나타났으며, 그 농도에 있어서는 2.5% 전후에서 약 20% 정도의 활성차이를 보였다.

질소원으로는 유기질소원이 무기질소원보다 균의 생육 및 항생물질생산에 더 적합한 것으로 나타났으며 특히 yeast extract 첨가시 현저한 활성증가현상을 보였고 농도에 대해서는 별로 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

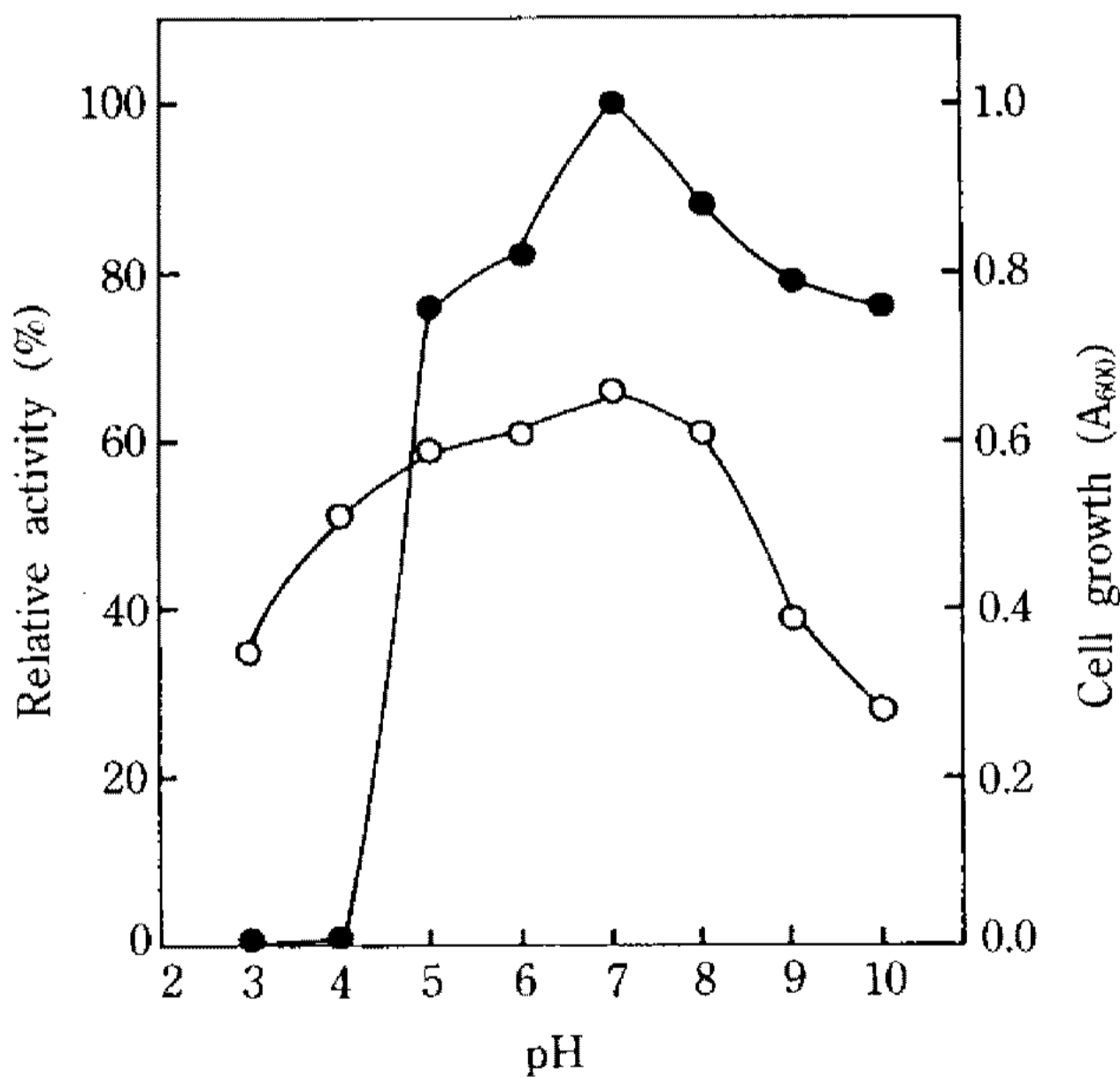
비타민에 있어서는 d-biotin을 첨가하였을 때가 항생물질생산에 있어서 가장 효율적이었으며 salt원으로는 CaCl<sub>2</sub>를 사용하였을 때가 효과적이었다. 이상의 결과를 종합하여 Table 2에 나타내었다.

배양온도 및 배지의 초기 pH 변화에 따른 균의



**Fig. 2. Effect of culture temperature on the antibiotic production.**

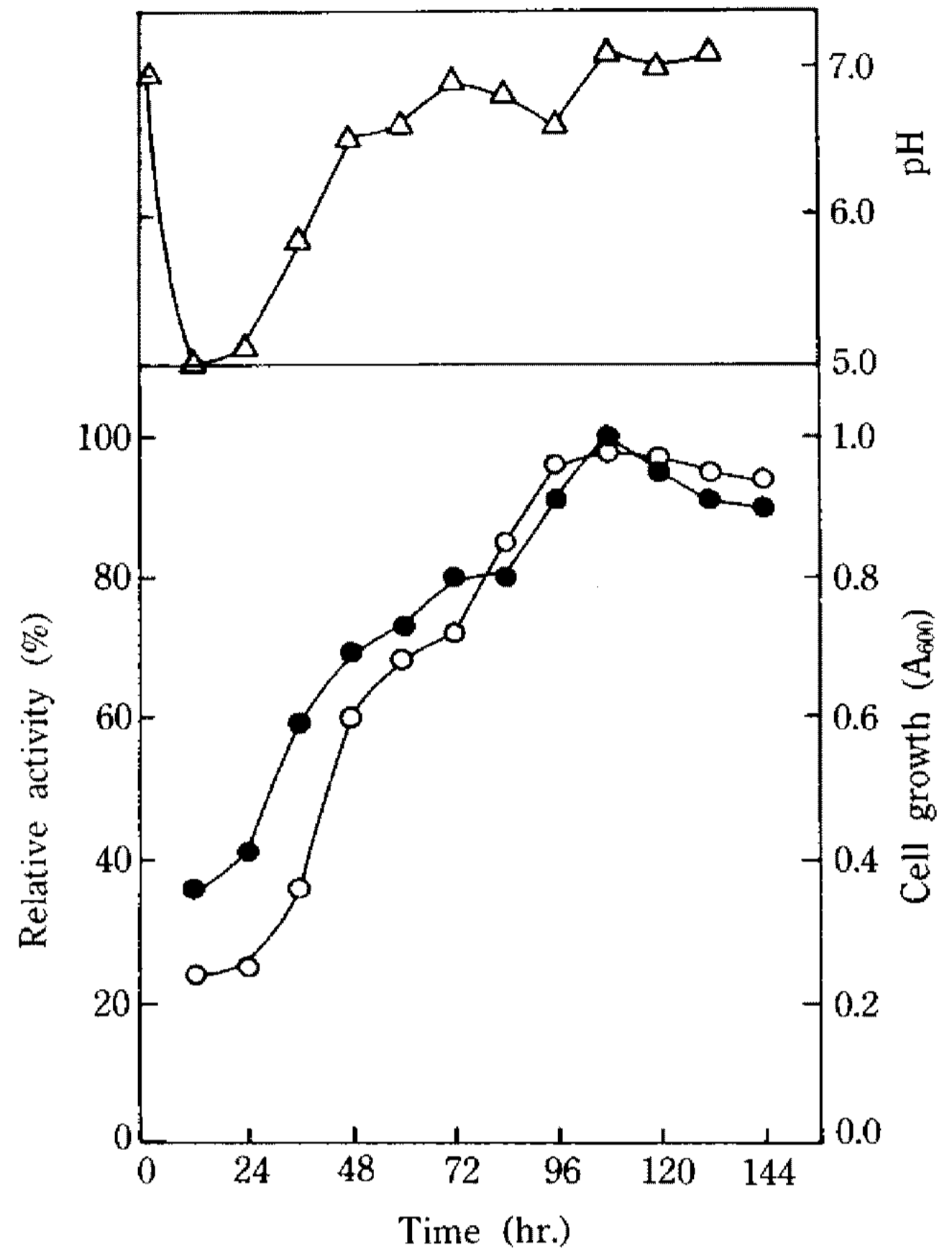
○—○ cell growth, ●—● antibiotic activity  
 Relative activity: % of the antibiotic activity (mm) to the maximum activity (mm) (maximum antibiotic activity is the activity at 30°C)  
 Test microorganism: *Bacillus subtilis* ATCC 6633



**Fig. 3. Effect of initial medium pH on the antibiotic production.**

○—○ cell growth, ●—● antibiotic activity  
 Relative activity: % of the antibiotic activity (mm) to the maximum activity (mm) (maximum antibiotic activity is the activity at pH 7)  
 Test microorganism: *Bacillus subtilis* ATCC 6633

생육 및 항생물질 생산성을 조사한 결과 Fig. 2 및 Fig. 3과 같이 나타났다. 배양온도에 있어서 항균활성은



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

○—○ cell growth, ●—● antibiotic activity  
 Relative activity: % of the antibiotic activity (mm) to the maximum activity (mm) (maximum antibiotic activity is the activity at 108 hrs.)  
 Test microorganism: *Bacillus subtilis* ATCC 6633  
 Inoculation point: time zero

30°C 에서 최고로 나타났으며 40°C 에서의 생육정도는 30°C 에서와 비슷하지만 항균활성은 약간 감소하였다. 50°C 에서는 균의 생육이 불가능하였다.

배지 초기 pH 경우는 pH 7일 때가 항균활성 및 균의 생육 모두 최대로 나타났다. Strain KH-431은 비교적 넓은 범위의 pH에서 생육이 가능한 것으로 사료되며 항균활성은 초기 pH가 산성일 때보다 알칼리 상태일 때 더 크게 나타났다.

6일간 배양하는 동안 균의 생육 및 항균활성의 변화는 Fig. 4와 같이 나타났다. 균의 생육과 더불어 그 활성도 점차 증가하는 추세를 보였으며 stationary phase에 접어든 후인 108시간이 되면서 활성은 최고에 달했다. 이후 배양시간이 지날수록 활성은 다시 10% 정도 감소하였다. 배지 pH는 처음 12시간 동안 7에서 5로 떨어졌다가 72시간이 지나면서 다시 초기 pH로 돌아갔으며 이때부터는 시간의 경과와 무관하게

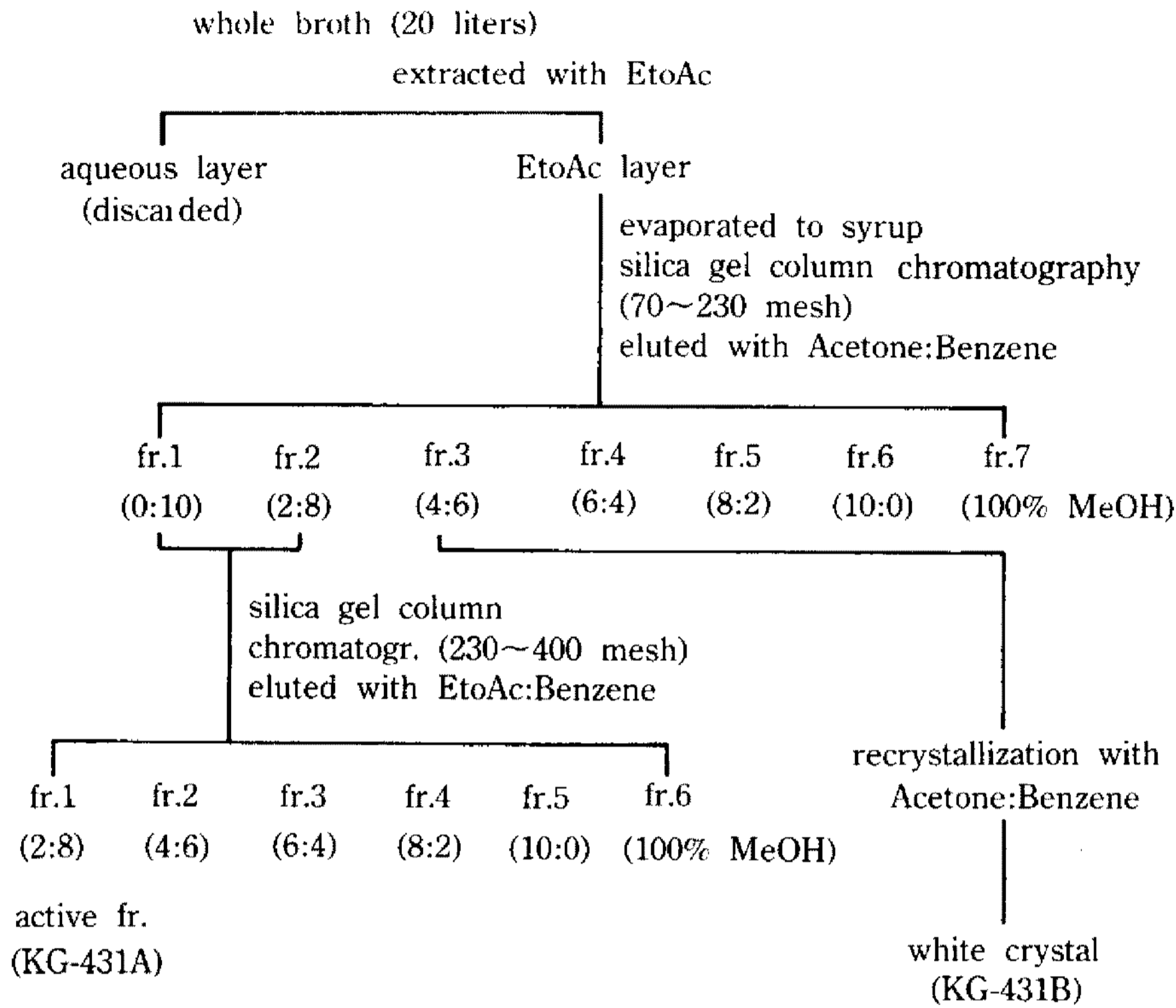


Fig. 5. Isolation procedures of the antibiotics.

거의 일정하게 유지되었다.

**항생물질의 추출 및 정제**

pH 및 온도에 대한 항생물질의 안정성을 조사한 결과 pH 경우 중성 pH에서는 매우 안정하였으며 산성 pH에서도 활성이 크게 감소되지는 않았다. 그러나 pH 10을 넘어선 염기 pH에서는 50% 정도의 활성이 감소하였다. 온도에 있어서는 120°C 에서 20 분간 가열하였을 때도 큰 활성감소는 없었던 바 비교적 안정한 것으로 나타났다. 최적조건에서 배양한 약 20%의 배양액을 균체분리와 pH 수정없이 EtoAc로 2회 추출하였다.

정제과정은 Fig. 5에 나타난 바와 같으며, column chromatography를 거친 후 여러 용매를 이용한 재결정 실험을 행한 결과 KG-431B는 acetone과 benzene을 동량 혼합한 용매에서 결정이 만들어졌다. KG-431A는 15 ml 정도에서 더이상 농축이 되지않을 뿐 아니라 어떤 용매에서도 결정이 형성되지 않았다. 이 상태의 sample을 TLC상에서 전개시킨 결과 KG-431A는 activity를 나타내는 spot 외에도 인접한 2개의 불순물 spot으로 나뉘어졌다. KG-431B는 여러 TLC solvent system에서 전개 후 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, iodine vapour, Ehrlich, FeCl<sub>3</sub>, Phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 등의 발색시약

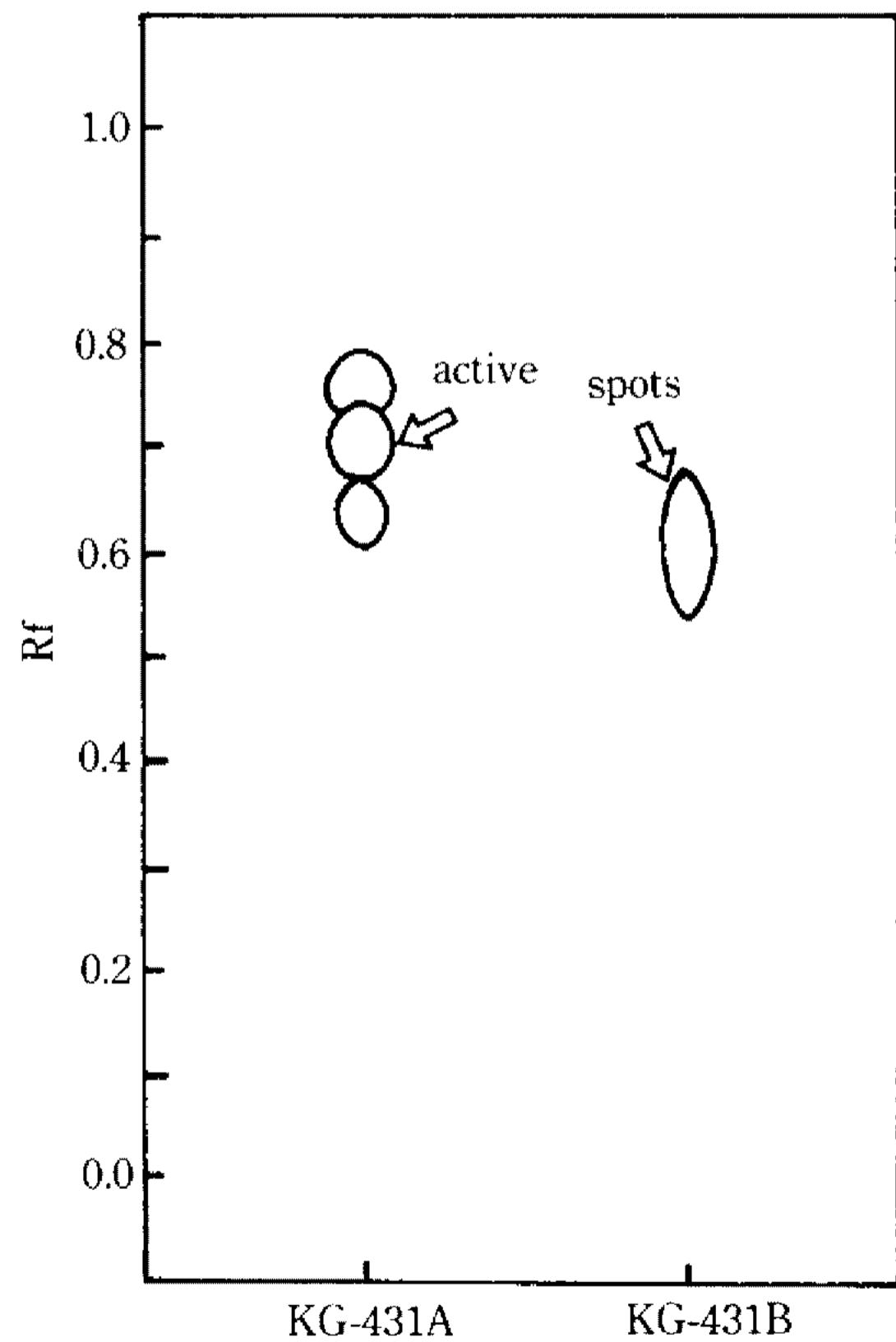


Fig. 6. TLC of the antibiotics.

TLC: Silica gel 60GF<sub>254</sub>  
 Solvent system: Ethyl acetate, Benzene (1:1)  
 Spots were detected by UV long and short waves

및 UV-254, 365 nm에서 관찰한 결과 순수한 물질임을 확인하였다. 이상의 TLC 결과를 Fig. 6에 나타내었다. KG-431A의 완전정제를 위하여 현재 다른 정제방법의 도입을 검토하고 있다.

## 요 약

순수분리된 2,000여 주의 혐기성 세균으로 부터 선별된 strain KH-431은 bacteria 및 fungi에 대하여 재현성있는 항균활성을 보이는 물질을 생산하였다. Strain KH-431은 그 형태 및 생리, 생화학적 특성으로 미루어 보아 *Clostridium fallax*의 근연종으로 동정되었다. strain KH-431의 항생물질 생산을 위한 최적 배양조건에 대해 고찰한 결과 PY배지를 기초배지로 사용하고 sorbitol, yeast extract, d-biotin 그리고  $\text{CaCl}_2$ 를 영양원으로 첨가하였을 때가 양호한 것으로 나타났다. 배지 초기 pH 및 배양온도, 배양시간에 대한 최적조건은 각각 pH7과 30°C, 108시간으로 나타났다. 20%의 배양액으로 부터 solvent extraction, silica gel column chromatography를 거쳐 얻은 sample을 재결정한 결과 KG-431B는 순수한 결정상태로 얻어졌으나 KG-431A의 완전정제에는 많은 문제점이 뒤따른 바 현재 다른 정제방법의 도입을 고려중에 있다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 일반연구 학술조성비 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

## 참고문헌

- Berdy, J. 1989. The discovery of new bioactive microbial metabolites: Screening and identification. Pp. 3-25. In Bushell, M.E. and U. Grafe (eds.). *Bioactive Metabolites from Microorganisms*. Elsevier.
- Krieg, N.R. 1981. Enrichment and isolation. Pp. 114-115. In Murray, G., C. Nester, K. Wood and M. Phillips (eds.). *Manual of Methods for General Bacteriology*. ASM.
- Robert, B.H. and M.P. Bryant. 1981. The genera *Butyrivibrio*, *Succinivibrio*, *Succinimonas*, *Lachnospira* and *Selenomonas*. Pp. 1481-1486. In Starr, M. P., H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schlegel (eds.). *The Prokaryotes*. Vol. 2. Springer-Verlag.
- Hill, E.O. 1981. The genus *Clostridium*. Pp. 1756-1803. In Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schlegel (eds.). *The Prokaryotes*. Vol. 2. Springer-Verlag.
- Holdeman, L.V., E. Picato and W.E.C. Moore. 1977. Formulas for pre-reduced media, medium components and additives. Pp. 144-149. In *Anaerobic Lab. Manual*. V.P.I. Anaerobic Lab., Virginia Polytechnic Institute and State University. Southern Printing Co. Blacksburg, Virginia.
- Smibert, R.M. and N.R. Krieg. 1981. General characterization. In Murray, C., K. Nester, K. Wood and M. Phillips (eds.). Pp. 409-443. *Manual of Methods for General Bacteriology*. ASM.
- Elizabeth, P.C., W.L. George and S.M. Finegold. 1984. Genus *Clostridium*. Pp. 1141-1200. In Sneath, P.H.A., N.S. Mair and J.G. Holt. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. William and Wilkins Co.
- Harold, J. B. 1985. Antimicrobial sensitivity testing. Pp. 138-144. In *Microbiological Applications*. 5th ed. Wm. C. Brown Publishers.
- Difco Lab. 1984. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Pp. 582-768. In *Difco Manual*. 10th ed., Difco Lab, Detroit, Michigan, U.S.A.
- Poole, C.H. and B.A. Schuette. 1984. The column in liquid chromatography. Pp. 438-448. In *Contemporary Practice of Chromatography*. Elsevier.
- Yu, J.H. 1987. 새로운 산업미생물의 탐색(II). *Microorg. Ferment.* 11: 1-17.
- Stok, R. and C.B.F. Rice. 1978. Liquid phase chromatography on columns. Pp. 19-56. In *Chromatographic Methods*. 3rd ed., Chapman Science And Hall and Paperbacks.
- Roberts, R.M., J.C. Gilbert., L.B. Rodewald and A.S. Wingrove. 1985. Solids, recrystallization and melting points. Pp. 65-91. In *Modern Experimental Organic Chemistry*. Saunders College Publishing.
- Holdeman, L.V., E. Picato and W.E.C. Moore. 1977. Procedures and specific tests: Biochemical tests. Pp. 120-129. In *Anaerobic Lab. Manual*. V.P.I. Anaerobic Lab., Virginia Polytechnic Institute and State University. Southern Printing Co. Blacksburg, Virginia.
- Harold, J. B. 1985. Data applications to systematics: Use of Bergey's manual and Computer assistance. Pp. 173-178. In *Microbiological Applications*. 5th ed. W. C. Brown Publishers.

(Received September 2, 1992)