

Clostridium sp. KH-4310이 생산하는 항생물질의 특성 및 구조

홍수형 · 김경석 · 이재근¹ · 박용복 · 하지홍*
경북대학교 유전공학과, ¹화학과

Characterization and Structural Determination of the Antibiotics Produced by a *Clostridium* sp. KH-431

Hong, Su-Hyung, Kyung-Seok Kim, Jae-Keun Lee¹,
Yong-Bok Park and Ji-Hong Ha*

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

Abstract — Antibiotics KG-431A and KG-431B were isolated from the fermentation broth of the *Clostridium* sp. KH-431. As we have shown previously, only KG-431B was successful to recrystallize. These antibiotics showed antimicrobial activities against broad spectrum of bacteria and fungi. KG-431B also showed anticancer activity against some animal tumor cells according to the SRB method. Physico-chemical properties of KG-431B were determined using UV, IR, NMR and Mass spectra. It was identified to be 3-Indole propionic acid and the structure of the KG-431A is currently under investigation.

1940년대 streptomycin의 발견 이후 방선균을 중심으로 한 항생물질 탐색시대가 시작되었다. 그러나 1960년대에 이르러 기존의 탐색방법에 의한 신물질 창출의 가능성이 줄어들어 따라 새로운 탐색방법의 필요성을 절감, 새로운 다양한 탐색방법이 개발되어 이용되어 왔다. 그 중 한 방법이 항생물질 생산균주의 대체로 이제까지 중심으로 연구되어 온 방선균 대신 새로운 미생물을 생산균주로 대체하여 이들로부터 신물질창출의 가능성을 높이고자 하는 것이다.

이에 본 연구실에서는 토양으로부터 혐기성 세균을 순수분리한 후 이들로부터 다양한 세균에 대하여 항균활성을 보이는 항생물질을 검색하였다. 항생물질 생산균주로 선발된 strain KH-431의 미생물학적 특성 및 항생물질의 생산조건, 정제과정에 대해서는 전보에서 보고하였다. 본 보에서는 strain KH-431이 분비하는 항생물질의 이화학적 성질 및 생물학적 특성 그리고 정제된 항생물질의 absorption spectra data로부터의 구조분석 결과를 보고하는 바이다.

Key words: Antibiotics, KG-431A and KG-431B, 3-Indole propionic acid

*Corresponding author

재료 및 방법

항생물질의 생물학적 특성

Mouse에 대한 LD₅₀ 측정: 부분정제된 항생물질의 LD₅₀값을 조사하기 위하여 추출, 농축된 sample을 1차 column chromatography한 후의 fraction 1~3 complex로 실험을 행하였다. Mouse는 20~25 g의 Balb/C strain 5마리를 한 group으로 하여 사용하였고 sample 농도는 mouse 1 Kg당 50~350 mg 범위로 하여 조사하였다. 이때 sample은 DMSO에 완전히 녹인 후 PBS(pH 7.4)에 1 ml로 희석하여 복강주사하였다.

MIC 측정: 정제과정에서 최종적으로 얻어진 항생물질을 512~0.125 µg/ml 농도범위로 DMSO-PBS에 희석한 후 agar dilution 방법(1,2)에 따라 MIC를 결정하였다. 시험균으로는 20종의 gram양성 및 음성균과 6종의 fungi를 사용하였다.

항암활성 측정: 정제된 KG-431B의 항암활성을 검색하기 위하여 세균을 이용한 BIA(3,4)와 동물세포를 이용하는 PADA(5,6) 및 SRB assay(7)를 행하였다.

BIA(Biochemical Induction Assay) 및 PADA(p388 Agar Diffusion Assay)는 전보(8)에서 언급한 바와

동일하다. SRB assay란 세포의 단백질 양을 측정하여 sample의 항암활성 유무를 측정하는 방법으로 sensitivity가 뛰어날 뿐 아니라 여러가지 장점을 지닌 방법으로 최근들어 항암활성의 1차검색에 많이 이용되고 있다.

Dose-response curve 작성 : 정제과정에서 최종적으로 얻어진 항생물질을 정량하여 paper disc당 농도를 0.1 µg에서 1000 µg까지 변화를 주어 활성정도를 측정한 후 Dose-response curve를 작성하였다(9).

항생물질의 이화학적 특성

용해도 : 항생물질의 용해도를 n-hexane, benzene, toluene, chloroform(CHCl₃), ethyl acetate(EtoAc), acetone, methyl alcohol(MeOH), ethyl alcohol(EtOH) 등에 대해 조사하였다.

TLC Rf Value 및 정색반응 : 여러 다양한 solvent system에서의 TLC Rf value를 측정하였다. 분리된 항생물질을 capillary tube로 TLC상에 점적한 후 solvent로 포화 상태를 이룬 chamber내에서 전개시켰다(10).

TLC 발색시약은 물질의 종류와 구조에 대한 기본적인 지식을 제공해주는 한 방법으로(11), 정제된 항생물질을 TLC상에 전개시키고 fine sprayer로 뿌려 열처리 한 후 나타난 정색반응을 조사하였다.

구조추정을 위한 기기분석 : UV Spectrum은 KG-431B를 chloroform에 녹여 200~400 nm 사이의 파장에서 Shimadzu UV-265(Japan) Spectrometer로 측정하였으며 IR spectrum은 Bomem Michelson-100 FT-IR Spectrometer를 이용하여 KBr pellet 형태로 조사하였다.

GE NMR Qe-300 Spectrometer를 사용하여 KG-431B의 ¹H NMR spectrum을 조사하였으며 ¹³C NMR spectrum은 Bruker NMR Spectrometer와 GE-300 spectrometer로 측정하였다. Sample은 DMSO 및 DMSO와 CDCl₃ complex에 녹인 상태로 사용하였다.

원소분석은 PERKIN-ELMER Model 240C Elemental Analyzer를 사용하여 행하였다.

결과 및 고찰

생물학적 특성

Mouse에 대한 LD₅₀값은 Table 1의 결과에 따라 250~300 mg/Kg으로 나타났으며 정제된 sample에

Table 1. Determination of 50% Lethal Dose (LD₅₀)

Conc. of sample /kg. mouse	Number Dead/Total	% Dead
50~100 mg	0/5	0
100~150 mg	0/5	0
150~200 mg	0/5	0
200~250 mg	0/5	0
250~300 mg	3/5	60
300~350 mg	4/5	80

의한 결과는 아니지만 이 실험에 의하여 이들 항생물질은 mouse에 대하여 급독성은 나타내지 않는 것으로 추정된다(12).

여러 시험균에 대한 MIC값은 Table 2에 나타난 바와 같으며 KG-431A에는 다소의 불순물이 함유된 상태였으나 오히려 KG-431B보다 활성이 강하였다. Bacteria에 대한 MIC값은 전반적으로 높았으나 fungi에 대한 MIC값은 8~64 µg/ml 정도로 bacteria 경우와 비교해 볼 때 훨씬 낮게 나타난 것을 알 수 있었다.

KG-431B의 항암활성 조사결과 BIA에 대해서는 반응을 보이지 않았고 PADA에서는 positive control인 oligomycin에 의해 형성된 blue zone의 약 67%에 해당하는 양성반응을 나타내었다. SRB assay 결과 KG-431B는 실험에 사용한 4종류의 tumor cell line 모두에 대해 약한 항암활성을 보였으나 그 중 A549(lung)와 SK-MEL-2(melanoma)에 비교적 강한 활성을 나타내는 specificity를 보여주었다. SRB assay의 결과를 Table 3에 제시하였으며 이를 토대로 한 dose-response curve는 Fig. 1과 같다.

KG-431A와 KG-431B의 dose-response curve는 Fig. 2와 같이 나타났다. 이를 통해서도 KG-431A의 활성이 KG-431B의 활성보다 강함을 알 수 있었다.

KG-431A 및 KG-431B의 이화학적 성상

먼저 용해도에 있어서 KG-431A는 n-hexane, benzene, toluene, CHCl₃ 및 EtoAc에 잘 녹았으며 비교적 극성용매인 acetone, MeOH, EtOH 등에도 약간 녹았다. 한편 KG-431B는 극성이 낮은 n-hexane, benzene, toluene을 제외하고는 비교적 잘 녹았으며 특히 MeOH, EtOH, acetone 및 EtoAc에 잘 녹았다.

KG-431A와 KG-431B의 여러 solvent system에서의 TLC Rf value는 Table 4와 같다. 이 결과로 보면

Table 2. MIC of KG-431A and KG-431B

Test microorganisms		MIC($\mu\text{g/ml}$)			
		ATCC	KG-A	KG-B	
Bacteria	Gram(+)	<i>Bacillus cereus</i>	27348	128	256
		<i>Bacillus subtilis</i>	6633	64	128
		<i>Micrococcus luteus</i>	10240	128	256
		<i>Micrococcus luteus</i>	9341	64	128
		<i>Staphylococcus epidermis</i>	12228	128	128
		<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	64	128
	Gram(-)	<i>Providencia rettgeri</i>	9919	128	256
		<i>Escherichia coli</i>	30130	128	256
		<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	128	256
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	128	256
		<i>Klebsiella pneumonia</i>	10031	128	256
		<i>Escherichia coli</i>	25922	128	256
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	15473	128	256
		<i>Proteus mirabilis</i>	25971	128	256
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25977	128	256
		<i>Serratia marcescens</i>	25619	128	256
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27117	128	256
		<i>Enterobacter aerogenes</i>	10145	128	256
		<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	128	256
		Fungi	<i>Botrytis cinerea</i>		32
<i>Pellicularia oryzae</i>			8	16	
<i>Fusarium salani</i>			16	64	
<i>Collectotrichum lagenarium</i>			8	64	
<i>Collectotrichum dermatium</i>			16	64	
<i>Valsa ceratosperma</i>			8	64	

Table 3. The results of SRB assay: Net growth as % of control

Antibiotic conc.($\mu\text{g/ml}$)	Human tumor cell lines			
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	HCT15
3.0	95.4470	100.2956	95.8685	94.8140
10.0	79.4281	95.2217	93.4784	71.2576
30.0	77.1516	93.2512	90.7128	67.1686
100.0	60.0500	84.3350	70.5676	55.5001
300.0	41.3381	71.1823	48.4763	38.5659
1000.0	-22.9446	7.3399	-47.7583	4.0391

KG-431B가 KG-431A보다 극성이 더 큰 물질임을 알 수 있으며 이는 용해도 결과와도 일치하는 것으로 나타났다.

정색반응의 결과는 Table 5와 같다. KG-431A와 KG-431B는 indole ring을 검정하는 발색시약에 대

하여 반응을 나타내었으며 hydroxy acid, sugar alcohol group에 대해서도 양성반응을 보였다.

Fig. 3은 광학현미경으로 400배 확대하여 관찰한 KG-431B의 결정사진이다. 육안으로 관찰한 경우에 이 물질은 약한 ivory를 띠는 흰색이었다.

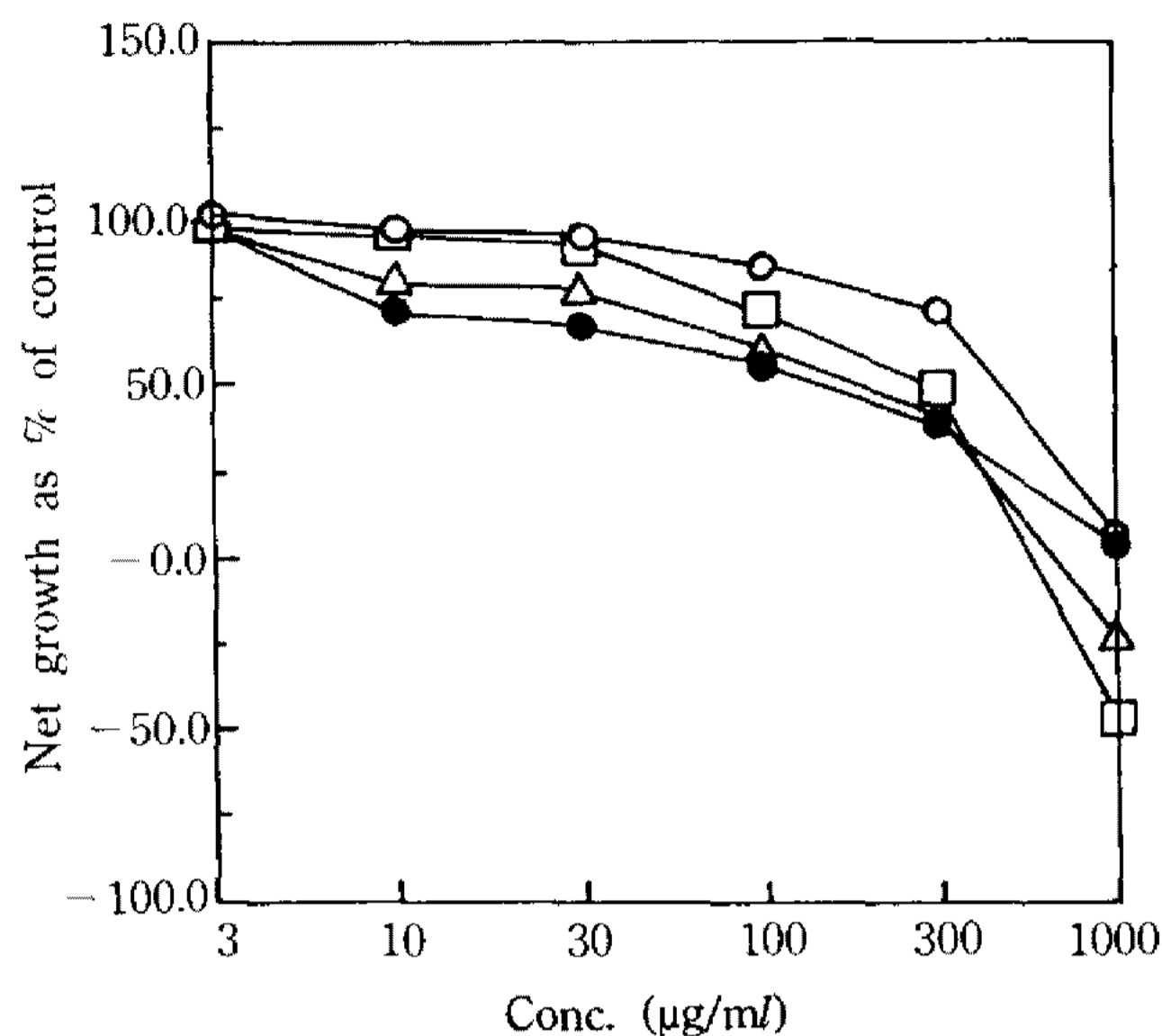


Fig. 1. Dose-response analysis of KG-431B at the SRB assay.

△-△ A549(Lung), ○-○ SK-OV-3(Ovary), □-□ SK-MEL-2(Melanoma), ●-● HCT15(Colon)

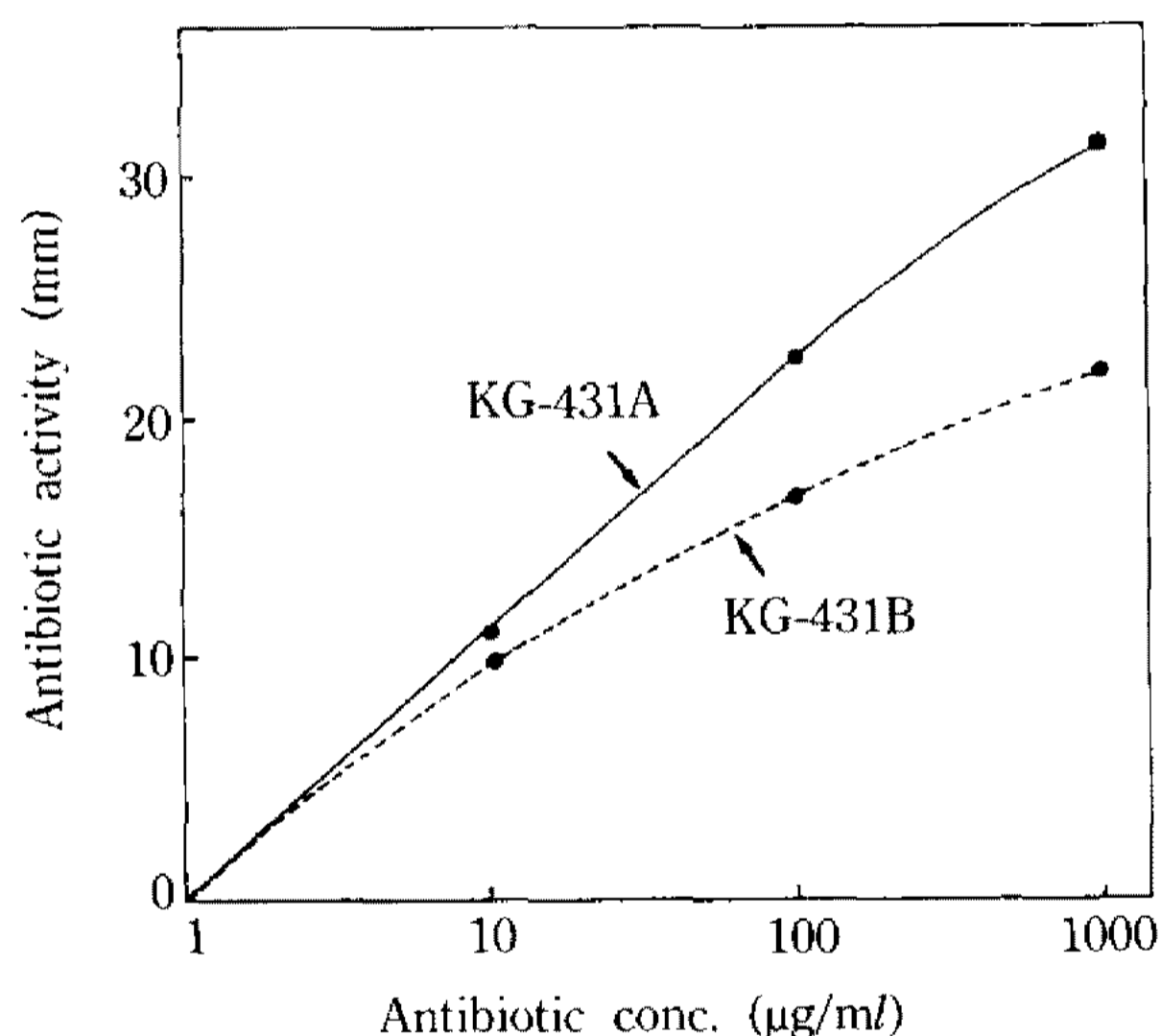


Fig. 2. Dose-response curves of KG-431A and KG-431B.

Table 4. TLC Rf values of KG-431A and KG-431B

Solvent system	Rf values	
	KG-431A	KG-431B
CHCl ₃	0.65	0.11
EtoAc-Benzene (2:8)	0.52	0.22
EtoAc-Benzene (5:5)	0.70	0.62
Acetone-Benzene (1:9)	0.55	0.13
Acetone-Benzene (5:5)	0.76	0.64
MeOH-Benzene (1.5:8.5)	0.76	0.47

TLC; Merck, silica gel plate 60 GF₂₅₄ (0.2 mm) was used and the spots were detected under UV-254 and 365 nm or by spraying 10% H₂SO₄.

Table 5. The Results of color reaction of KG-431A and KG-431B

Color reagent	KG-431A	KG-431B
Dragendorf	(-)	(-)
Ehrlich	purple-red	purple
FeCl ₃	brown	brown
Iodine-Azide -starch	(-)	(-)
BPB-Boric Acid	yellow	yellow
Phenol-H ₂ SO ₄	red-brown	red-brown
Anisaldehyde -H ₂ SO ₄ ·EtOH	gray	gray
Hydroxylamine -FeCl ₃	red-brown	red-brown
10% H ₂ SO ₄	red-brown	red-brown
Iodine (Vapor)	(+)	(+)
Ninhydrin	(-)	(-)



Fig. 3. Photography of the crystal of KG-431B (×400).

구조결정

190 nm에서 400 nm 사이의 UV 흡광 spectrum은 Fig. 4와 같이 나타났다. KG-431B는 200 nm 부근에서 end absorption을 나타내었으며 220 nm에서 shoulder peak가 나타났다.

KG-431B의 FT-IR spectrum은 Fig. 5와 같다. 3444.5 cm⁻¹에 나타난 peak는 이 물질이 NH group을 함유하고 있음을 보여주며, carboxyl OH의 수소결합을 2900 cm⁻¹ 부근에서 broad peak로 확인할 수 있었다. 1700.8 cm⁻¹에서의 peak는 C=O absorption을 나타낸다.

KG-431B의 ¹H NMR spectrum은 Fig. 6과 같다. δ_{2.38}(t, 2H)과 δ_{2.77}(t, 2H)은 -CH₂CH₂- group을 나타내며, δ_{6.72}-δ_{7.28}(m, 5H)의 multiplet으로 aromatic pro-

ton을 확인할 수 있었다. $\delta_{9.65}(s, 1H)$ 는 -NH secondary amine을 보여주며, $\delta_{3.9}$ 부근의 broad peak로 COOH group을 추정할 수 있었는데 특히 D_2O 를 첨가하였을

때 -NH와 OH peak가 완전히 없어지는 점으로 이를 확인할 수 있었다. Sample을 DMSO에 녹였을 때 decoupling 방법에 의한 ^{13}C NMR로부터 4개의 quaternary carbon과 5개의 aromatic carbon 그리고 한개의 C=O carbon을 찾아볼 수 있었다. 한편 $CDCl_3$ 와 DMSO complex에 녹였을 때 peak가 11개로 나타나는 점으로 보아 이 화합물은 11개의 carbon을 가지는 것으로 추정된다. ^{13}C NMR spectrum은 Fig. 7과 같다.

Mass Spectrum 측정결과 Fig. 8과 같이 molecular ion peak는 189에, 그리고 base peak는 130으로 나타났으며 원소분석 결과는 Table 6과 같이 나타났다.

이상의 결과들을 종합해 보면 KG-431B의 화학식은 $C_{11}H_{11}NO_2$ 인 것으로 추정된다. IR 및 NMR spectra, 화학식으로부터 이 물질의 구조를 유추해 보면 Fig. 9

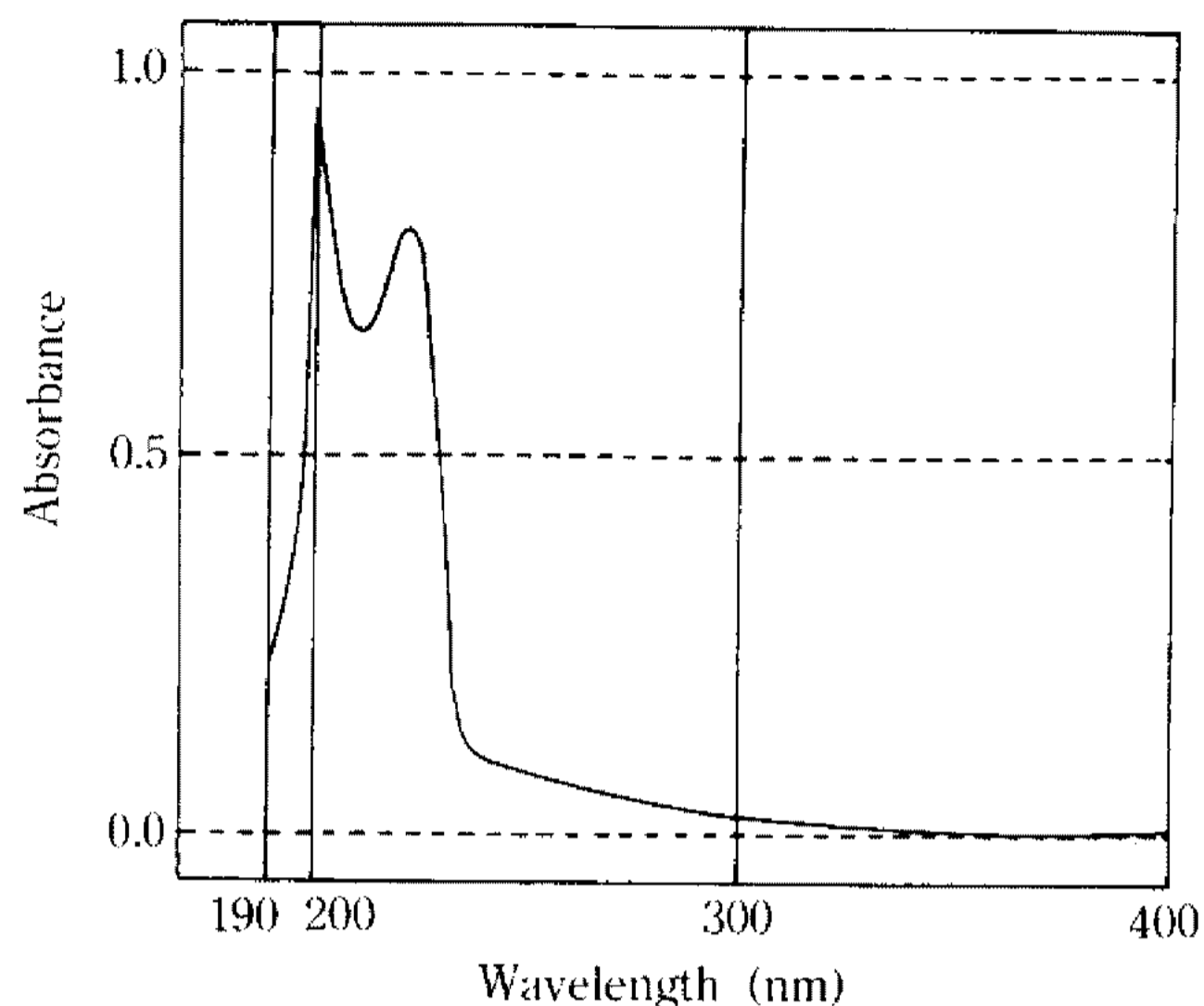


Fig. 4. UV spectrum of KG-431B.

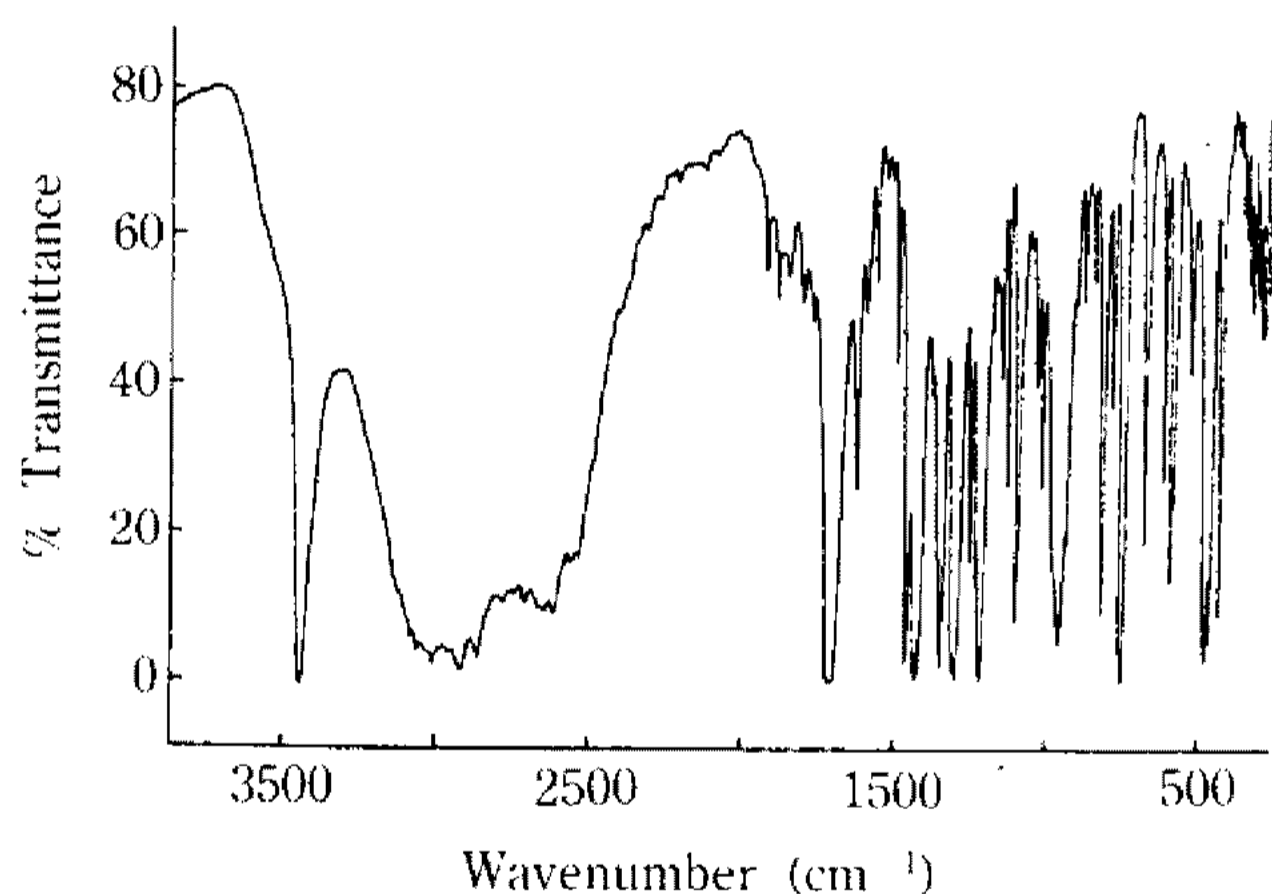


Fig. 5. FT-IR Spectrum of KG-431B.

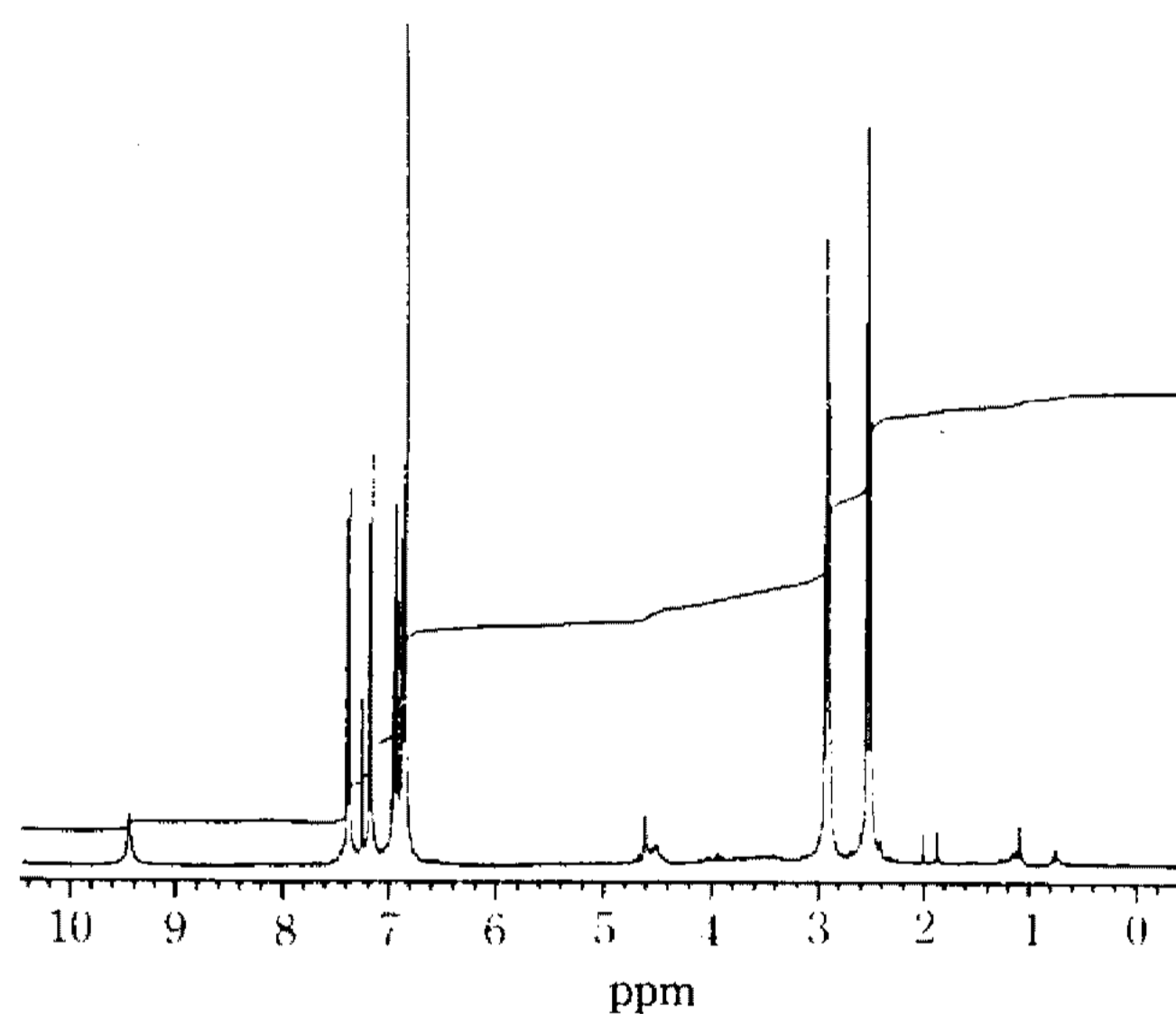


Fig. 6. 1H NMR spectrum of KG-431B.

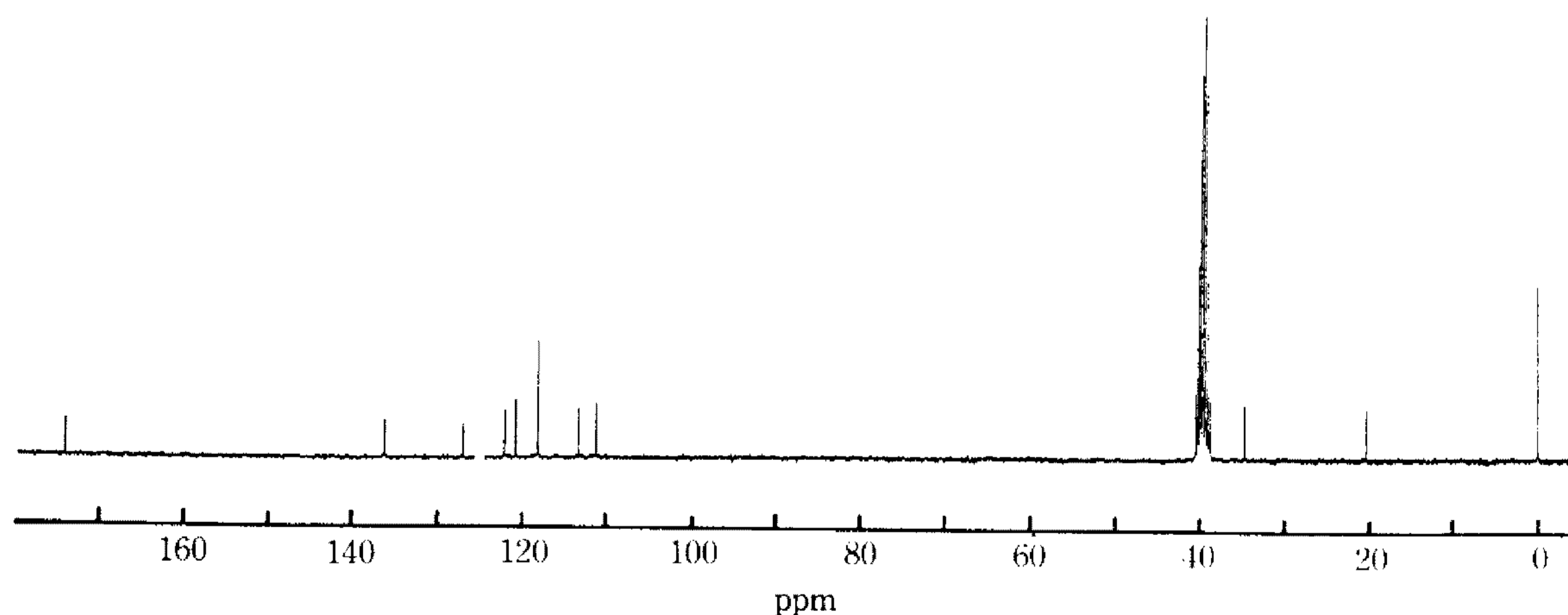


Fig. 7. ^{13}C NMR spectrum of KG-431B.

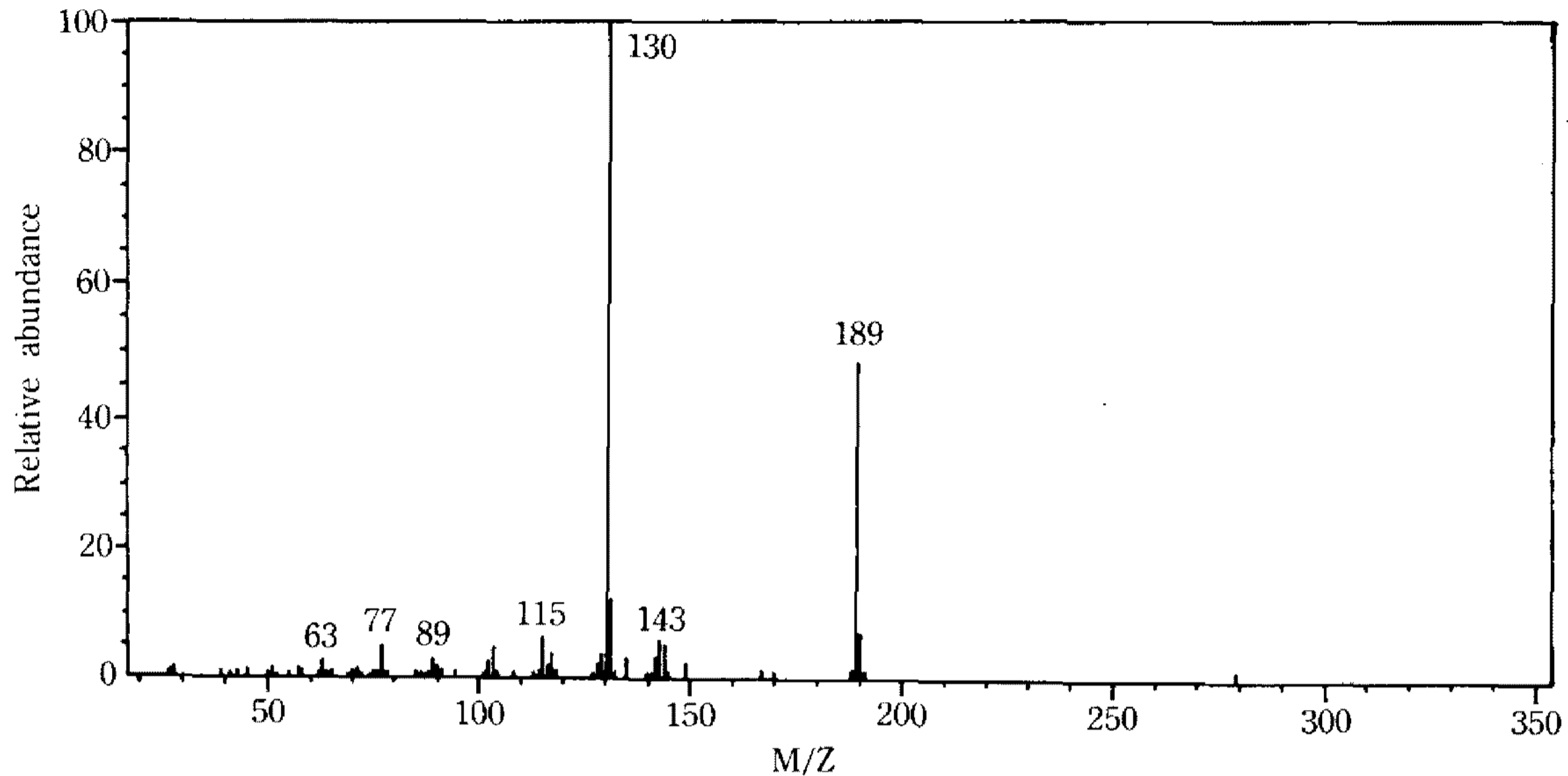
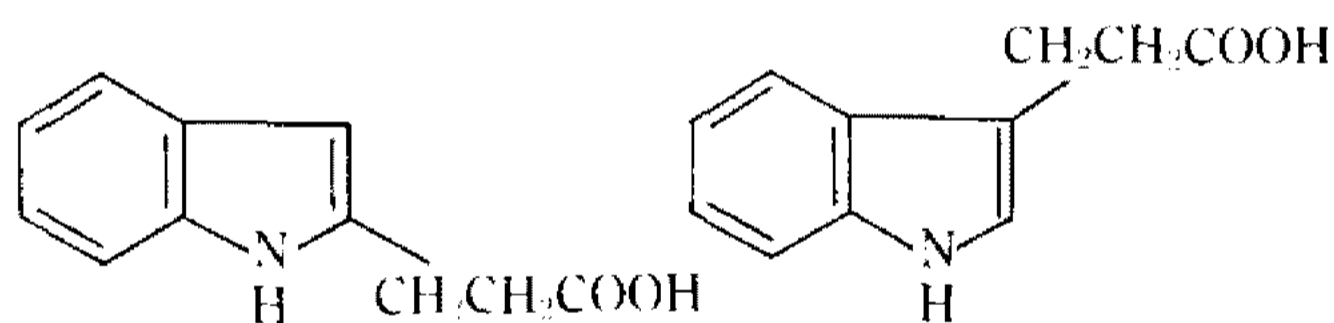


Fig. 8. Mass spectrum of KG-431B.

Table 6. The results of elemental analysis of KG-431B

Elements	% of composition
Carbon	69.15
Nitrogen	5.95
Hydrogen	7.15



A: 2-Indole propionic acid B: 3-Indole propionic acid

Fig. 9. Supposed structures of KG-431B.

와 같이 두가지로 생각할 수 있다.

이들 물질중 Aldrich에서 판매되고 있는 3-Indole propionic acid를 구매하여 KG-431B와 TLC Rf값 및 발색반응 등을 비교해 본 결과 모두 동일한 결과를 보였다. 그 외에도 "Aldrich IR Data Book"과 "Handbook of ¹H NMR Spectra and Data"에 수록된 3-Indole propionic acid의 기기분석 data와 KG-431B의 data를 비교해본 결과 모두 일치한 바 KG-431B는 3-Indole propionic acid(3-IPA)와 동일한 물질임을 확인하였다.

요 약

순수분리된 2,000여주의 혐기성 세균으로부터 선

발된 *Clostridium* sp. KH-431은 bacteria 및 fungi에 대하여 재현성있는 항균활성을 나타내는 항생물질 KG-431A와 KG-431B를 생산하였다. 이들 중 KG-431B는 항암활성의 1차 검색에서도 양성반응을 보인 바 이에 대한 후속연구를 계획중에 있다. 이들의 MIC 값을 비교해 보면 완전정제가 가능하였던 KG-431B 보다는 차라리 정제과정에서 많은 어려움이 따라 불완전 정제된 상태로 실험을 행한 KG-431A의 활성이 더 뛰어난 것을 알 수 있었다.

정제된 KG-431B의 여러가지 이화학적 특성과 spectra data가 기지물질인 3-IPA와 일치하나 본 실험을 통해 밝혀진 항암활성의 검색은 정제된 3-IPA에서는 아직까지 알려진 바 없는 생물학적 특성으로 간주된다. 또한 *Clostridium*속에서 최초로 발견된 3-IPA 존재에 대한 결과는 아직 정제가 완료되지 않은 KG-431B에 관한 연구와 함께 후속적인 확인 연구가 진행중에 있다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 일반연구 학술조성비 지원에 의해 이루어진 것입니다.

참고문헌

1. Giancarlo, L. and F. Parenti. 1982. Activity of the antibiotics. Pp. 14-22. In *Antibiotics*. Springer-Verlag.
2. Hewitt, W. and S. Vincent. 1987. Test organisms.

- Pp. 9-21. In *Theory and Application of Microbiological Assay*. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.
3. Elespuru, R.K. and R.J. White. 1983. Biochemical Prophage Induction Assay: A Rapid Test for Antitumor Agents that Interact with DNA. *Cancer Res.* **43**: 2819-2830.
 4. Elespuru, R.K. and S.G. Moore. 1986. Micro-BIA, a Colorimetric Microtiter Assay of Prophage Induction. *Mutat. Res.* **164**: 31-40.
 5. Garretson, A.L., R.K. Elespuru and R.J. White. 1984. In Vitro Prescreens for the Detection of Antitumor Agents. *Dev. Industrial Microbiol.* **22**: 211-218.
 6. Klein, F. and R.T. Ricketts. 1980. Uniform Production and Bulk Storage of p388 Murine Lymphoma Cells for Antitumor Assay. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **163**: 406-410.
 7. Lee, J.O. 1990. 신규항암제의 약효평가. Pp. 19-33. 신물질창출을 위한 생물활성연구법. 한국생화학회.
 8. Hong, S.H., J.H. Ryu, Y.B. Park and J.H. Ha. 1990. *Clostridium* sp.가 생산하는 항생물질 KG-1167 A와 KG-1167B의 정제 및 특성. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**(3): 286-291.
 9. Hewitt, W. and S. Vincent. 1987. The agar diffusion assay. Pp. 42-44. In *Theory and Application of Microbiological Assay*. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.
 10. Egon, S. 1969. Apparatus and general techniques in TLC. Pp. 52-72. In *Thin Layer Chromatography*. 2nd ed., Springer-Verlag.
 11. Krebs, K.G., D. Heusser and H. Wimmer. 1969. Spray reagents. In Egon, S. (ed.), Pp. 854-908. *Thin Layer Chromatography*. Springer-Verlag.
 12. Yu, J.H. 1987. 새로운 항생물질의 screening법. Pp. 3-16. 항생물질의 기술개발연구. 연세대학교 식품공학과 미생물공학연구실.

(Received September 2, 1992)