

## *Klebsiella* sp. L-10에 의한 고점성 히아루론산 복합체의 생산

이향숙, 최영준, 이종수  
배재대학교 유전공학과

### Production of High Viscous Hyaluronic Acid Complex from *Klebsiella* sp. L-10

Hyang-Sook Lee, Young-Jun Choi and Jong-Soo Lee  
*Dept. of Genetic Engineering, Paichai University,*

토양으로부터 고점성의 히아루론산 복합체를 생산하는 균주를 분리하여 *Klebsiella* sp. L-10으로 동정하였다. *Klebsiella* sp. L-10의 히아루론산 복합체 생산 최적 배지 조성은 yeast ext. 0.1%, tryptone 3%, glucose 5%,  $K_2HPO_4$ 와  $KH_2PO_4$  각각 10mM이었고 배양조건은 배지의 초기 pH6.5, 배양온도 37°C, 배양시간 18시간 이었으며 이 조건에서 배양액 리터당 약 1,400mg의 점성이 매우 강한 히아루론산 복합체가 생산되었다.

A bacterium which produce hyaluronic acid complex was isolated from soil, and identified as *Klebsiella* sp. L-10. The maximal hyaluronic acid complex production was obtained when the strain was cultured at 37°C for 18hrs with shaking in the optimal medium containing 0.1% yeast ext., 3% tryptone, 5% glucose, 10mM  $K_2HPO_4$  and  $KH_2PO_4$ , respectively and initial pH6.5 and the final hyaluronic acid complex production under the above condition was 1,400mg per liter of cultures.

**Key words;** High Viscous Hyaluronic Acid Complex, *Klebsiella* sp. L-10

### 서론

히아루론산은 D-글루콘산과 N-아세틸 글루코사민이 -1,3 혹은 -1,4로 결합되어 있는 생체고분자물질로서 다른 산성뮤코 다당류와 함께 태반, 암세포, 관절의 결체조직, 닭벼슬 등과 일부 *Streptococcus* 속균에 존재하며 이들은 점탄성과 보습성 등이 강하여 현재 의약품과 화장품공

업 등에 널리 사용되고 있는 고부가가치의 물질이다(1~3).

히아루론산에 관한 연구는 주로 추출, 정제, 생산 및 이용 등을 중심으로한 생물공학적인 연구(3~16)와 히아루론산 합성 효소에 관한 생화학, 분자생물학적인 연구분야(17~25)로 진행되어 왔다. 그 결과, 각종 효과적인 추출, 정제 방법(2, 5, 8, 12, 13, 15, 16)과 정량법(4, 6, 7)이 개발되

있고 *Streptococcus* 속균에서의 히아루론산 합성 기작이 밝혀졌으며(17~19), 최근에는 히아루론산 합성 효소 유전자의 염기서열과 이들의 구조와 기능 등이 조사되어 보고되었다(20~25). 또한 미생물에 의한 히아루론산 생산에 관하여는 *Sc. zooepidemicus* (11,14), *Sc. equi*와 그의 변이주 (3,9,10), *Sc. pyogenes*(8) 등을 이용하여 배지조성과 배양방법 등의 히아루론산 최적 조건이 검토되었고, 대량생산을 위한 배양기 등이 개발되었다.

그러나 히아루론산의 주요 공급원인 동물조직으로부터의 추출, 정제는 이들의 황산콘드로이틴 등의 유사다당류가 혼재되어 있기 때문에 추출, 정제과정이 복잡하고 시간과 경비가 많이 들며 생산량이 낮고 순도가 떨어지는 결점이 있어(3) 비교적 추출, 정제가 용이하고 생산비가 적게 드는 새로운 미생물에 의한 히아루론산 대량 생산 체계의 확립이 절대 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 미생물을 이용하여 히아루론산 혹은 그의 복합체를 대량 생산할 목적으로 자연계로부터 히아루론산 생산 균주를 분리, 동정한 후 각종 히아루론산(혹은 복합체) 생산 조건을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 분리

각종 병원 하수구와 시장주변의 토양 및 오수, 퇴비 등을 일정량씩 멸균수 10ml 에 넣고 진탕시킨 후 5% glucose, 0.1% yeast ext, 2.0% pepton, 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.3%  $KH_2PO_4$  (pH 7.0)의 기본 배지에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 다음 생육된 집락중 집락 주위에 점액성을 띄는 균들과 기타 세균으로 추정되는 균들을 기본배지에 접종하여 37℃에서 24시간 진탕배양하였다. 배양액을 얻은 후 히아루론산을 정량하여 우수 균주를 선정하였다.

### 2. 균주의 동정

선정 균주의 형태학적, 생화학적 및 배양학적 특성 등을 Manual of Method for General Bacteriology(26)와 Microbiological Method

(27) 등에 따라 조사한 후 Bergeys Manual of Systematic Bacteriology(28)로 동정하였다.

### 3. 히아루론산의 정량

배양액을 원심분리하여 얻은 상등액에 50% 되게 에탄올을 가하여 4℃에서 12시간 방치하고 15,000 rpm 으로 10분간 원심분리하여 침전물을 얻은 다음 에탄올로 세척하고 5ml 증류수에 녹인 후 이 용액중의 히아루론산 함량을 Carbazole method(7)에 따라 uronic acid 의 양으로 정량하였다. 즉, 황산에 녹인 0.25mM sodium tetraborate 1.5ml에 시료용액 250 $\mu$ l 를 넣어 섞은 후 100℃에서 10분간 가열한 후 냉각시켰다. 이를 524nm에서 흡광도를 측정하여 *Sc. zooepidemicus*로부터 생산, 정제된 히아루론산 표준으로부터 작성된 표준곡선으로부터 히아루론산함량을 계산하였다.

### 4. 균체 농도 측정

균체 농도는 배양액 일정량을 취하여 8,000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하고 증류수로 세척한 다음 105℃에서 10분간 건조시킨 다음 무게를 측정하여 배양액중의 건조균체량으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 히아루론산 생산 균주의 분리 및 동정

자연계로부터 분리된 약 200여종의 균주와 타 목적으로 본 연구실에서 분리 보관 중이던 40여종의 세균 중 평판 배지에서 집락주위에 점성물질로 추정되는 환을 형성하고 배양액이 점성을 띠는 균들에 대한 히아루론산 생산량을 측정 비교한 결과 쓰레기장의 토양에서 분리한 L-10 균주가 약 250mg/l 의 히아루론산을 생산하여 시험균주로 최종 선정하였다.

선정 균주 L-10의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성 등을 조사한 결과 Table 1 과 같고 전자현미경 사진은 Fig.1과 같다. 선정균주는 그람 음성의 직쇄상간균으로 점질성의 캡슐을 형성하였고 운동성은 없었다. 또한 37℃에서 잘 자랐고 10℃에서도 생육이 있으며 배양액이 매우 높은 점성을 띠었고 통성 혐기성이었으며 methyl

Table 1. Taxonomical characteristics of the selected strain L-10.

Characteristics	L-10
<b>Morphological characteristics</b>	
Gram staining	negative
Shape	rod, straight
Size	(0.4-0.7) x (2.0-4.0) $\mu$ m
Motility	none
Flagella	-
Capsule	+(viscous)
<b>Cultural characteristics</b>	
Growth on nutrient agar,	pH 7.0 + pH 10.0 - 1% glucose + 8% NaCl + KCN +
Temperature for growth(optimum temp.)	10-50 $^{\circ}$ C (37 $^{\circ}$ C)
pH for growth(optimum temp.)	4.0-8.0 (7.2)
Oxygen requirement	Facultative anaerobic
<b>Physiological characteristics</b>	
Methy red test	-
Voges-Proskauer test	+
Catalase	+
Oxidase	-
Urease	-
Indole production	+
H <sub>2</sub> S production	-
Nitrate reduction	+
Citrate utilization	+
Casein hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	-
Starch hydrolysis	+
$\beta$ -Galactosidase, extracellular(intracellular)	-(+)
Arginine dehydrolase production	-
Lysine decarboxylase production	+
Degradation of pectate	+
Resistance : streptomycin, chloramphenicol	+
amphicilin, penicillin, tetracyclin	-
Acidification : glucose, sucrose, starch, mannitol, ethano	+
lactose, ribose, xylose, glycerol	-
G+C mole %	48
<b>Assimilation of sugars</b>	
Glucose, sucrose, maltose, ribose, starch, glycerol, ethan	+
Fructose, lactose, xylose	-

red 시험과 oxidase 시험은 음성이었고 H<sub>2</sub>S 을 생성하지 않았으며 젤라틴을 가수분해 시키지 못한 반면에 Voges-Proskauer 시험, catalase 시험 등은 양성이었다고 인들을 생성하였으며 citrate을 이용하였고 특히 lysine decarboxylase 활성이 없었고 pectate을 분해하였다.

이상의 성질들을 종합하여 볼 때 본 선정 균주는 Bergey's manual의 *Klebsiella* 속균으로 추정된다.

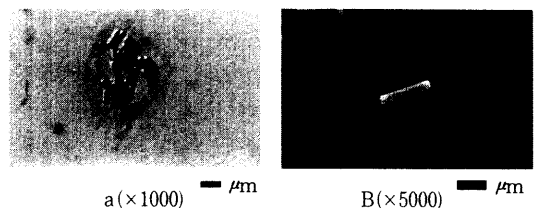


Fig. 1. Photographs(A) and scanning electron micrograph(B) of *Klebsiella* sp. L-10.

## 2. 히아루론산 생산 조건

### 1) 탄소원

각종 탄소원을 3~5 %씩 기본 배지에 첨가하여 시험균주를 배양한 후 히아루론산 생산량을 조사한 결과 Table 2에서와 같이 glucose가 생육과 히아루론산 생산에 가장 양호하였고, acetate, citrate, oxalate 등의 유기산염중 acetate 이외에는 모두 탄소원으로 이용하지 못했다.

Table 2. Effect of carbon sources on the production of hyaluronic acid complex from *Klebsiella* sp. L-10.

Carbon source*	Growth (Dry cell weight, g/l)	HA (mg/l)	Yield coefficient (mgHA/gCell)
Glucose	0.795	464	583
Galactose	0.210	27	129
Sucrose	1.000	207	207
Maltose	0.755	288	381
Soluble starch	0.833	160	192
Ribose	0.200	72	360
Glycerol	0.779	294	377
Ethanol	0.740	278	376
Sodium acetate	0.390	144	369
Sodium citrate	-	-	-
Sodium oxalate	-	-	-
Lactic acid	-	-	-
Control	0.730	267	366

\*Glucose and Galactose : 5%, the other sugars :3%

한편, glucose의 농도를 1.0~9.0 %로 기본 배지에 첨가하여 배양한 후 히아루론산 생산량을 측정한 결과(Fig. 2), 5% 첨가시 약 500mg/l의 히아루론산을 생산하였고, glucose 농도가 증가함에 따라 히아루론산 생산량도 원만하게 증가되는 경향이었다. 이는 본 시험균주가 점질성의 캡슐을 형성하고 있어 배지중의 glucose의 세포 내 확산전달에 대한 저항이 커지므로 glucose에 대한 catabolic repression을 위해 높은 농도가 필요하게 되며 따라서 glucose 농도가 높아짐에 따라 히아루론산 생성이 비교적 높게 유지되는 것으로 생각된다. 한편 장 등(9)은 *Sc. zoepidemicus*의 경우 3% glucose 첨가시 0.105 mg/ml의 히아루론산이 생산되었고 장(3)은 *Sc. equi* PCI 1988 변이주의 경우 8% glucose 첨가로 5g/l의 히아루론산을 생산하였다고 보고

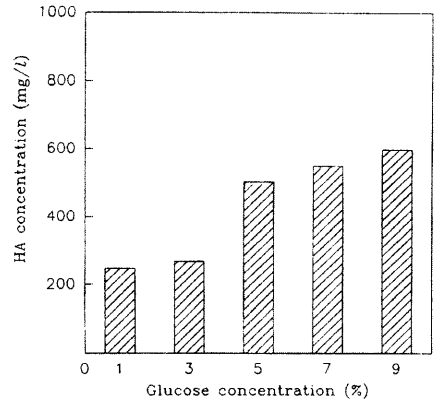


Fig. 2. Effect of concentration of glucose on the production of hyaluronic acid complex from *Klebsiella* sp. L-10.

하였다.

### 2) 질소원

히아루론산 생산에 미치는 각종 질소원의 영향을 검토하기 위하여 5% glucose가 함유되어 있는 기본배지에 각종 질소원을 일정농도로 단독 혹은 혼용하여 히아루론산 생산을 검토한 결과 무기질소원 대부분과 요소 등을 균 생육이나 히아루론산 생산에 이용하지 못하였으나 yeast extract, tryptone, peptone, beef extract 등의 유기질소원은 잘 이용하였다(Table 3). 또한 이들을 혼용하였을 때 0.1% yeast extract와 3.0% tryptone 첨가시 1,140mg/l의 히아루론산을 생산하여 가장 좋은 질소원이었다.

Table 3. Effect of nitrogen source on the production of hyaluronic acid complex from *Klebsiella* sp. L-10.

Nitrogen source(%)	Growth (Dry cell weight, g/l)	HA (mg/l)	Yield coefficient (mgHA/gCell)
Tryptone	1.0	0.950	152
Peptone	1.0	0.325	168
Casamino acid	0.5	-	-
Urea	0.5	-	-
Yeast ext.	0.2	0.700	512
Casein	0.2	-	-
Beef ext.	0.2	0.130	233
NH <sub>4</sub> Cl	0.1	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1	-	-
Ammonium acetate	0.1	-	-
Ammonium citrate	0.1	-	-

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1	-	-	-
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0.1	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	-	-	-
Ammonium oxalate	0.1	-	-	-
NaNO <sub>3</sub>	0.2	-	-	-
KNO <sub>3</sub>	0.2	-	-	-
<hr/>				
Yeast ext. +Tryptone				
0.05	1.0	1.04	390	375
	2.0	1.20	783	653
	3.0	1.18	656	556
0.10	+Tryptone			
	1.0	1.18	574	486
	2.0	1.24	784	632
	3.0	1.24	1,140	919
0.10	+Peptone			
	1.0	0.87	456	524
	2.0	1.07	523	486
	3.0	0.94	940	1,000
0.30	+Tryptone			
	1.0	1.22	637	522
	2.0	1.29	828	642
	3.0	1.28	984	769
0.30	+Peptone			
	1.0	1.00	760	760
	2.0	1.21	1,157	956
	3.0	1.19	1,163	986
Yeast ext. 0.1% + Tryptone 3.0%+Peptone 1.0%		1.36	1,140	812
Control		0.07	-	-

3) 완충용액

예비실험 결과 여러가지 완충용액 중 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 완충용액이 히아루론산 생산에 제일 좋았으므로 이들의 최적농도를 조사한 결과 10mM에서 히아루론산이 가장 많이 생산되었으며 (Table 4) 그 이상의 농도에서는 줄어드는 경향이였다.

한편, 기본배지에 무기염류와 미량원소들을 일정농도로 첨가하여 히아루론산 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 Cu<sup>2+</sup> Mn<sup>2+</sup> 등이 생산을 다소 저해시켰을뿐 큰 영향은 없었다. (data not shown)

Table 4. Effect of concentration of phosphate buffer on the production of hyaluronic acid complex from *Klebsiella* sp. L-10.

Concentration (mM)	HA (mg/l)
0	650
10	1200
20	800
30	780

4) pH와 온도

히아루론산 생산에 미치는 배지의 초기 pH의 영향을 검토한 결과 pH 6.5 에서 히아루론산이 제일 많이 생산되었으며 (Fig. 3), pH 6.0 이하에서는 거의 생산되지 않았다. 이는 *Sc. zoopidemicus*을 이용한 히아루론산 생산 실험에서 배양중 배지의 pH를 조절하지 않으면 5.0부근까지 낮아지며 이렇게 되면 균 생육도 미약하고 히아루론산 분해효소의 작용도 작용 최적 pH 부근이 되므로 히아루론산도 매우 적게 생산되었다는 유 (14)의 보고와 유사한 결과이었다.

한편 온도에 따른 히아루론산 생산량을 조사한 결과 *Sc. equi*와 *Sc. zoopidemicus*(9)와 같

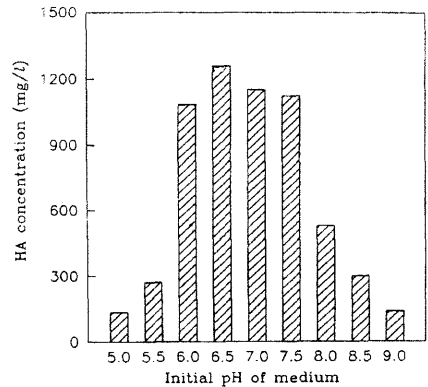


Fig. 3. Effect of initial pH of medium on the production of hyaluronic acid complex from *Klebsiella* sp. L-10.

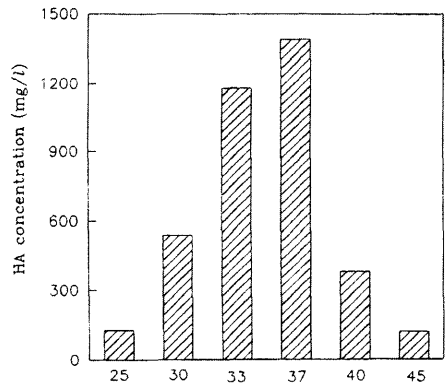


Fig. 4. Effect of temperature on the production of hyaluronic acid complex from *Klebsiella* sp. L-10.

이 37℃에서 제일 많이 생산되었고 30℃ 이하와 40℃ 이상에서는 거의 히아루론산이 생산되지 않았다(Fig. 4).

이상의 최적 생산조건에서 히아루론산을 대량으로 배양한 다음 PEG와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 이용한 이상계 추출법(13)과 활성탄 등을 이용한 정제법(2, 9) 등으로 정제한 후 글루콘산 함량은 앞서의 Carbazol법으로, 아세틸 글루코사민 함량은 Boas의 방법(6)으로 측정된 결과 점성이 매우 높았으면서 이들이 약 80대 20의 비율로 함유되어 있었고 IR spectrum 조사에서도 아세틸 글루코사민의 관능기로 추정되는 부분이 매우 낮게 보이는 점등으로 미루어 보아 지금까지의 *Streptococcus* 속균이 생산하는 히아루론산과는 매우 다른 화학조성을 가진 히아루론산 복합체로 생각되어지며 현재 이들에 대한 일련의 화학조성과 구조 및 물리화학적 특성에 관한 추가의 실험을 실시하고 있다.

### 감사의 말씀

본 연구는 1993년도 배재대학교 교내 학술연구비 지원(93-11-07)에 의하여 수행된 연구의 일부로 이에 감사드리고 또한 본 실험결과는 한국산업미생물학회 추계 학술발표회에서 발표(1993. 10. 요약집 p.87) 되었다.

### 참고 문헌

1. Laurent, T. C. and J. R. E. Fraser, FASFB J. 6; 2397 (1992)
2. 김태진, 히아루론산의 개발 현황과 그의 발효생산에 관한 연구, 생물화공 4(1); 56 (1990)
3. 장이섭, 고점도의 히아루론산 배양을 위한 반응기 최적화, 서울대학교 대학원 박사학위논문 (1992)
4. Gardell, s., The analysis of mucopolysaccharides, Biochem, Sor. Symp. pp 39-49 (1961)
5. Prehm, P., Release of hyaluronate from eukaryotic cells, Biochem. J. 267; 185 (1990)
6. Boas, N. F., Method for the determination of hexosamine in tissue, J. Biol. Chem. 204; 553 (1953)
7. Bitter, T. and H. M. Muir, A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. 4; 330 (1962)
8. Bracke, J. W. and K. Thacker, Hyaluronan from *Streptococcus pyogenes* type 18. U.S. Pat. 4517295 (1985)
9. 장이섭, 정교민, Chemostat culture 에서의 hyaluronic acid 생산에 관한 연구. 한국생물공학회지 1; 25 (1987)
10. Brown K. K. Production of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* and its mutant, U. S. Pat. 4782046 (1988)
11. Acasaca, H., S. Seto, M. Yanagi, S. Fukushima and T. Mitsui. Production of hyaluronic acid from *Streptococcus zooepidermicus* #104. J. Soc. Cosmet. Chem. 22; 35 (1988)
12. 김태진, 현사원, 강엽. 인산염 조절에 의한 히아루론산의 제조 방법. 대한민국특허. 90-5774 (1990)
13. 정교민, 정기천. 히아루론산 회수방법. 대한민국특허. 90-5779 (1990)
14. 유대식. *Streptococcus zooepidermicus*에 의한 히아루론산의 생산. 한국생물공학회지. 7; 112 (1992)
15. Holmbeck, S. and L. Lerner. Separation of hyaluronan oligosaccharides by the use of anion-exchange HPLC. Carbohydrate Research. 239; 239 (1993)
16. 윤종원, 김덕중, 정운철, 박정극, 김태진. 활성탄을 이용한 히아루론산 배양액의 유색물질 제거. 한국 생물공학회지. 8; 143 (1993)
17. Markovitz, A., J. A. Cifonelli and A. Dorfman. The biosynthesis of hyaluronic acid by group A *Streptococcus*. J. Biol. Chem. 234; 2343 (1959)
18. Stoolmiller, A. C. and A. Dorfman. The biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus*. J. Biol. Chem. 244; 236 (1969)
19. Sugahara, K., N. B. Schwartz and A. Dorfman. Biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus*. J. Biol. Chem. 254;

- 6252 (1979)
20. Triscott, M. X. and van de Rijn. Solubilization of hyaluronic acid synthetic activity from *Streptococcus* and its activation with phospholipids. *J. Biol. Chem.* 261; 6004 (1986)
  21. Mausolf, A., J. Jungman, H. Robenek and P. Prehm. Shedding of hyaluronate synthase from *Streptococci*. *Biochem. J.* 267; 191 (1990)
  22. Heldin, P., T. Asplund., D. Ytterberg., S. Thelin and T. C. Laurent. Characterization of the molecular mechanism involved in the activation of hyaluronan synthetase by platelet-derived growth factor in human mesothelial cells. *Biochem. J.* 283; 165 (1992)
  23. Lansing, M., S. Lellig, A. Mausolf, I. Martini, F. Crescenzi, M. Oregan and P. Prehm. Hyaluronate synthase : cloning and sequencing of the gene from *Streptococcus* sp.. *Biochem. J.* 289; 179 (1993)
  24. DeAngelis, P. L., J. Papaconstantinou and P. H. Weigel. Isolation of a *Streptococcus pyogens* gene locus that direct hyaluronan biosynthesis in capsular mutants and in Leterologous bacteria. *J. Biol. Chem.* 268; 14568 (1993)
  25. DeAngelis, P. L., J. Papaconstantinou and P. H. Weigel. Molecular cloning, identification and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogens*. *J. Biol. Chem.* 268; 19181 (1993)
  26. Gerhardt, P. Manual of methods for general bacteriology. ASM. Washington (1981)
  27. Collins, C. H. and P. M. Lyne. Microbiological method(4th ed.) pp169. Butterworths. London/Boston (1976) 28. Krieg, N. R. Bergey's manual of systematic bacteriology. vol. 1. p461. Willians & Wilkins Press. Baltimore (1984)