

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0054964 (43) 공개일자 2011년05월25일
(51) Int. Cl. <i>C12P 1/06</i> (2006.01) <i>A01N 63/02</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0111798 (22) 출원일자 2009년11월19일 심사청구일자 2009년11월19일	(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내 (72) 발명자 유진철 광주 남구 진월동 새한아파트 101-1202 조승식 광주광역시 동구 장동 17-2 307 (74) 대리인 최성용	

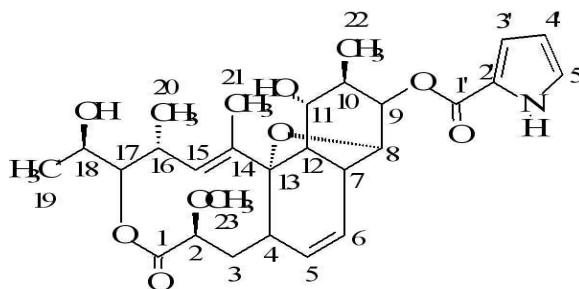
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 노카르디아속 균주로부터 항균 활성 화합물의 발효 및 분리 정제 방법

(57) 요약

본 발명은 노카르디아 속 CS682 균주(*Nocardia sp.* CS682)로부터 항균 활성 화합물의 최적 발효 및 최적 정제 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면 항균 활성 화합물은 배양액으로부터 용매추출, 농축, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 결정화의 단계를 거쳐 순수하게 정제할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

노카르디아속 균주(*Nocardia* sp. CS682)(KCTC 11297BP,)를 0.5~1.5 vvm의 통기량의 호기성 발효조건 하에서 탄소원으로써 말토오스를 배양 배지의 전체 중량을 기준으로 0.01 ~ 2.0 wt%, 질소원으로써 대두분, 귀리분 및 효모엑스를 0.01 ~ 0.5 wt%, 및 미량원소로써 탄산칼슘 0.001 ~ 0.05 wt%을 함유하는 배양 배지 중에서 25~30℃에서 3~7일 동안 150~200rpm으로 진탕하면서 배양하는 것을 특징으로 하는 노카르디아속 균주 발효물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 배양시 배양액의 pH를 조절하지 않고 배양하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 3

- 발효조에서 발효 후 얻은 노카르디아속 균주(*Nocardia* sp. CS682)의 발효물을 원심분리기를 사용하여 약 6000 rpm으로 원심분리하여 균체와 배양 상층액을 분리하는 단계,
- 상기 배양 상층액을 감압하에서 60~70℃의 온도에서 농축하는 단계,
- 농축한 배양액을 동량의 에틸아세테이트로 2 내지 3회 추출하는 단계,
- 추출액을 재차 45~55℃에서 감압농축하는 단계,
- 에틸아세테이트 추출시료를 hexan으로 평형화한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에 적하하여 hexan 및 에틸아세테이트의 비율을 1:1~4:1의 범위 내에서 조절하여 활성을 나타내는 분획만을 모아 감압 건조하여 항균 활성 화합물을 분리하는 단계, 및
- 분리한 화합물을 hexan과 에틸아세테이트로 결정화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항균 활성 화합물의 정제 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 노카르디아속 CS682(*Nocardia* sp. CS682)균주를 최적으로 배양하고 배양액 중에 존재하는 항균활성 화합물을 고효율로 정제하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 약제내성 세균의 출현은 지속적으로 증가하고 있으며 인간 생활에 심각한 위협으로 남아 있다. 지난 수년 동안, 항생제에 대한 황색포도상구균의 선천적 또는 후천적 내성, 특히 β -락탐 및 글리코펩티드에 대한 내성은 주된 걱정거리가 되고 있다. MRSA는 특히 심각한 근본(underlying) 질환 또는 면역억제 관련 질환이 있는 환자에 있어서 건강에 위협을 야기한다. 메티실린이 출현하게 된 시점부터 생겨난 MRSA는 유럽에서 처음으로 사용되었고 그의 존재는 세계 곳곳에서 검출되었다. 병원에서 감염의 거의 80%가 MRSA에 기인하는 것으로 보인다. 한국에서는 VRE 균주인 *Enterococcus durans*가 1992년에 처음으로 단리되었고, 입원 환자의 VRE의 감염의 유행은 급격히 증가하고 있다. *E. faecalis*로부터 *S. aureus*로의 높은 수준의 반코마이신 내성의 변형 전이 또한 MRSA 및 VRE의 확산을 부채질한다. 궁극적으로, 인체용 의약 및 동물 성장 촉진제에 있어서 항미생물제의 사용 증가는 MRSA 및 VRE의 출현과 관계가 있다.

[0003] 미생물 유래의 항생물질을 탐색함에 있어서, 한국의 전남 지역에서 분리한 CS682로 명명한 방선균이 강력한 항-MRSA 물질인 항균 활성 화합물 (CS-682, nargenicin)을 생산하는 것으로 밝혀졌다. 상기 항균 활성 화합물은 *Nocardia argentinensis*로부터 1977년에 처음 보고되었다[참조문헌: W.D. Celmer, G.N. Chmurny, C.E. Moppet, R.S. Ware, P.C. Watts, E.B. Whipple, J. Am. Chem. Soc. 102 (1980) 4203].

[0004] 노카르디아 종(*Nocardia* species)은 그람 양성이고, 엄밀한 호기성인 방선균 과에 속하며, 토양, 물, 시들은 야채, 동물 분변 침전물 및 먼지에 편재하여 발견된다[참조문헌: B.A. Brown-Elliott, J.M. Brown, P.S. Conville, R.J. Wallace, Clin. Microbiol. Rev. 19 (2006) 259]. 이 과는 항생물질의 원이고 산업적으로 중요한 생물활성 분자로 잘 알려져 있으나, 노카르디아 속은 다른 후보자들에 비하여 상당히 관심을 덜 받았다. 일부 노카르디아 종은 강력한 항생물질의 원인 반면, 이들 중 대략 절반은 인간 또는 동물에 광범위한 질환을 일으키는 병원성이다[참조문헌: [W.A. Curry, Arch. Intern. Med. 140 (1980) 818].

[0005] 노카르디아 속 미생물에서 생산되는 항균활성 화합물은 특이한 마크롤리드 항생제이다. 이 마크롤리드 항생제는 호흡기 질환 치료용의 수의약품이나 사료 첨가제 또는 성장 촉진제로 널리 사용되는 항세균 화합물의 매우 중요한 부류이다. 이 항균 활성 화합물은 글리코시드 결합을 통하여 연결된 하나 이상의 테옥시 뉴트랄 및/또는 아미노당을 갖는 12 또는 16원자를 나타내는 마크로시클릭 락톤 고리를 함유하는 통상의 화학적 구조에 의해 특성화된다. 에리쓰로마이신, 클라리쓰로마이신 및 아지쓰로마이신 등의 마크롤리드 항생제는 세균성 리보솜에 선택적으로 결합하여 단백질 합성을 억제함으로써 세균에 대하여 작용한다.

[0006] 그러나, 지금까지 노카르디아속 균주의 최적의 발효 조건 및 항균 활성 물질의 정제 방법은 알려져 있지 않다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 이에, 본 발명자들은 배양 배지 중의 항균 활성 화합물을 최적으로 발효를 수행하여 정제하는 방법을 제공하고 자 예의 연구한 결과, 발명자들은 후술하는 바와 같은 노르카디아속 cs 682 균주를 최적 배양하고 배양액으로부터 항균 활성 화합물을 쉽게 고효율로 분리 정제하는 방법을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 신규한 균주인 노카르디아 속 CS682(*Nocardia* sp. CS682)균주의 최적 발효 방법 및 항균 활성 화합물의 최적 정제 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 목적은, 추가의 일면에 있어서, 상기 방법에 의해 수득된 노카르디아속 균주(*Nocardia* sp. CS682)의 발효물을 에틸아세테이트를 이용하여 추출, 농축한 후 실리카겔컬럼 단계, 결정화를 이용하여 항균 활성 화합물을 정제하는 방법을 제공하는 데 있다.

효 과

[0010] 본 발명에 의하면 특정 배지 및 발효 조건을 사용하여 노카르디아속 균주를 최적으로 발효 배양하고, 발효 배양액으로부터 용매추출, 농축, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 결정화의 단계를 거쳐 항균 활성 화합물을 순수하게 정제할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명은, 일면에 있어서, 노카르디아속 균주(*Nocardia* sp. CS682)(KCTC 11297BP,)를 0.5~1.5 vvm의 통기량의 호기성 발효조건 하에서 탄소원으로써 말토오스를 배양 배지의 전체 중량을 기준으로 0.01 ~ 2.0 wt%, 질소원으로써 대두분, 귀리분 및 효모엑스를 0.01 ~ 0.5 wt%, 및 미량원소로써 탄산칼슘 0.001 ~ 0.05 wt%을 함유하는 배양 배지 중에서 25~30℃에서 3~7일 동안 150~200rpm으로 진탕하면서 배양하는 것을 특징으로 하는 노카르디아속 균주 발효물의 제조방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은, 다른 일면에 있어서,

[0013] a) 발효조에서 발효 후 얻은 노카르디아속 균주(*Nocardia* sp. CS682)의 발효물을 원심분리기를 사용하여 약 6000 rpm으로 원심분리하여 균체와 배양 상층액을 분리하는 단계,

[0014] b) 상기 배양 상층액을 감압하에서 60~70℃의 온도에서 농축하는 단계,

[0015] c) 농축한 배양액을 동량의 에틸아세테이트로 2 내지 3회 추출하는 단계,

[0016] d) 추출액을 재차 45~55℃에서 감압농축하는 단계,

[0017] e) 에틸아세테이트 추출시료를 헥산으로 평형화한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에 적하하여 헥산 및 에틸아세

테이트의 비율을 1:1~4:1의 범위내에서 조절하여 활성을 나타내는 분획만을 모아 감압 건조하여 항균 활성 화합물을 분리하는 단계, 및

[0018] f) 분리한 화합물을 헥산과 에틸아세테이트로 결정화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항균 활성 화합물의 정제 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 발명자들은 항균효과를 가지는 물질을 탐색하기 위해 국내 자생 토양방선균을 대상으로 스크리닝을 수행하였으며 그 결과 신규한 미생물(*Nocardia sp.* CS682)을 선별하였고 이 균주가 생산하는 항균 물질이 나르제니신임(도 1참조)을 확인한 바 있다.

[0020] 또한, 본 발명에서 사용되는 균주 *Nocardia sp.* CS682의 배양액은 동물의 면역증강에도 도움이 되는 것을 확인하였다(참조문헌: Subacute Toxicity study of CS682, a Fermentation Product of Korean Soil Bacteria, in Rats: 이종찬, 안태환, 강성수, 문창중, 배춘식, 김성호, 유진철, 김종춘 Laboratory Animal Reserch.2009. 25(1) : 17-13쪽; Single Oral Dose Toxicity Evaluation of CS682, a Fermentation Product of Korean Soil Bacteria, in Rats.: 신인식, 이종찬, 박나형, 강성수, 문창중, 김성호, 유진철, 김종춘. Laboratory Animal Reserch. 2007. 22(4), 401-404 쪽).

[0021] 상기 균주는 한국생명공학연구원에 2008.03.06일자로 기탁되어 기탁번호 KCTC 11297BP를 부여받았다.

[0022] 이하, 본 발명의 발효 및 정제 방법에 대해 더욱 상세히 설명한다.

[0023] *Nocardia sp.* CS682 균주 배양액 중 항균 활성 화합물의 검출

[0024] 항균 활성 화합물의 검출은 MRSA 693E(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* 693E)를 피검균으로 하여 LB 한천 평판배지 상에서 생물학적 검정(Bioassay)을 수행하여 확인하였다. 기준 물질로써는 순수 분리된 나르제니신을 표준 물질로 하여 사용하였으며 통상적으로 항생 화합물의 생산량은 저지환의 직경(mm)를 측정함으로써 결정하였다. 예를 들면, LB 한천 평판 배지에 피검균을 도말하고 그 위에 paper disk(Toyo co. 8mm)를 올려 놓는다. 올려놓은 paper disk에 배양 상층액을 적량 적하하여 37℃의 인큐베이터에 18시간 동안 배양하고 이후 나타나는 생육저지환의 지름을 측정한다. 발효액 및 부분 정제물 중의 항균 활성 화합물의 존재 여부는 박층 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography) 상에서 자외선 조사에 의한 형광반점 확인 및 황산 시액에 의한 반점의 반응으로 확인하였다. 예를 들면, silica TLC plate(Merck,co. silicagel 60, F254)에 시료 샘플을 적량을 점적하고 전개 용매로써 헥산, 에틸아세테이트(1:1 부피비)를 사용한다. 전개한 TLC plate는 UV로 형광반점을 확인하고, 10% 황산시액을 뿌리고 가열하여 탄화한 흔적 및 색을 나르제니신 표준물질과 비교하여 확인한다.

[0025] *Nocardia sp.* CS682 균주 배양 및 발효

[0026] 균주는 OSYM(귀리분 1%, 대두분 1%, 효모 엑스 1%, 만니톨 1%) 아가 플레이트에서 배양 후 4℃의 냉장고에 보관하면서 사용하였다. 균주의 장기보관은 포자를 20% 글리세롤로 보관용 바이알에 취해 -85℃에 보관하고 6개월마다 계대보존하였다.

[0027] 방선균주의 액체배양을 위해 OSYM 아가 플레이트에서 보관한 균주를 50ml의 액체 배지가 들어있는 250ml 삼각 플라스크에 접종하여 진탕 배양기(shaking incubator)에서 180 rpm, 28℃ 유지하면서 3일간 전배양한다. 전배양으로 얻은 균체는 7L 용량의 발효조(코바이오텍, 한국)에 5L의 배양액에 접종한 후 온도 28℃, 180rpm, 통기량은 1vvm의 조건으로 배양하는 것이 바람직하다. 발효용 배지의 조성은 아래 표 1과 같다.

표 1

[0028]

성분	함량
말토오스	0.5 wt%
귀리분	0.15 w%
대두분	0.15 w%
효모 엑스	0.15 w%
탄산 칼슘	0.05 w%
나머지	물

- [0029] 본 발명에서 사용되는 배양용 배지성분 중 탄소원으로는 말토오스, 전분, 유당, 과당, 솔비톨, 수크로오스, 글루코스, 만니톨 등을 사용할 수 있다. 이들 탄소원은 배양배지의 전체 중량을 기준으로 0.01 ~ 2.0 wt% 범위에서 사용할 수 있으며, 바람직하게는 0.05~ 2.0 wt%의 탄소원을 사용하는 것이 좋다. 또한 이들 탄소원을 하나 혹은 둘 이상의 성분을 혼합 사용할 수 있으며, 본 발명에 바람직하게는 말토오스를 사용하는 것이 더욱 바람직할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 사용되는 배양용 배지성분 중 질소원으로써 효모 엑스, 대두분, 펩톤, 쇠고기 엑스, 귀리분, 말트 엑스를 들 수 있다. 이들 질소원은 배양배지의 전체 중량을 기준으로 0.01 ~ 0.5 wt% 범위에서 사용할 수 있으며, 바람직하게는 0.05~ 0.5 wt%로 사용하는 것이 좋다.
- [0031] 또한 이들 질소원을 하나 혹은 둘 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수도 있으며, 바람직하게는 효모 엑스, 대두분, 귀리분을 혼합하여 사용하는 것이 더욱 바람직할 수 있다. 본 발명에 사용된 질소원으로써 바람직하게는 효모 엑스, 대두분 및 귀리분을 0.45 wt%로 사용한다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 배양용 배지성분 중 미량원소로써 $MgCl_2$, KCl , $CaCO_3$, $NaCl$, $FeSO_4$, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 를 포함할 수 있다. 이들 미량원소는 배양배지의 전체 중량을 기준으로 0.001 ~ 0.1 wt% 범위에서 사용할 수 있으며, 바람직하게는 0.05 중량%의 $CaCO_3$ 를 사용한다.
- [0033] 본 발명의 배양에 사용될 수 있는 종균 배지의 조성은 다음의 표 2에 나타낸 바와 같다.

표 2

[0034]

종균 배지의 조성	
성분	함량
귀리분	20g
건조 효모	10g
대두분	10g
만니톨	20g
증류수	1리터까지

- [0035] 종균 배지 50mL을 250mL 용량의 플라스크에 넣어 멸균한 후, 실온으로 냉각시키고 종균배지와 조성이 같은 고체 배지에서 배양한 노카르디아 속 균주의 균체를 액체 배지에 접종하여 48시간 내지 72시간 동안 180rpm, 28℃의 조건에서 배양한다. 배양한 균체는 다시 1L 플라스크에 준비한 250mL의 종균배지에 5% 수준으로 접종하여 48시간 내지 72시간 180rpm, 28℃의 조건에서 배양하여 발효조 배양기에 접종한다.
- [0036] 본 배양에 사용한 발효조는 총용량 7L의 발효조(코바이오텍, 한국)을 사용하고 배양액은 발효용 배지 조성으로 5L를 만들어 사용한다. 발효는 5L의 발효액에 250mL의 종균액을 접종한 후 150~200 rpm, 바람직하게는 180 rpm에서, 25~30℃의 온도, 바람직하게는 30℃, 통기량 0.5~1.5 vvm의 조건으로 2 내지 7일 동안 수행한다. 발효시 발생하는 거품의 제거를 위해 소포제는 시그마사의 Antifoam을 0.01%수준으로 사용한다.
- [0037] 대량발효를 위해 총 용량 50L, 500L의 발효조(코바이오텍, 한국)을 사용하고 배양액은 발효용 배지 조성으로 35L를 만들어 사용한다. 50L배지에 접종하는 균체는 종균배양용 배지를 사용하며 발효배지의 5%수준으로 접종하여 배양한다. 50L 발효조에서는 72시간 180rpm, 28℃, 통기량 0.5vvm의 조건으로 배양하는 것이 바람직하고, 배양 후 배양액은 500L 발효조로 옮겨 대량배양을 실시한다. 500L 발효조에 배양액은 330L를 발효용배지 조성으로 만들어 사용하며 50L 발효조에서 배양액을 접종한 후 180rpm, 28℃, 통기량 0.5 vvm의 조건으로 배양하는 것이 바람직하다. 발효시 발생하는 거품의 제거를 위해 소포제는 다우코닝사의 Antifoam을 10배 희석하여 사용하며 거품이 형성될 때에만 일시적으로 사용한다.
- [0038] *Nocardia sp.* CS682 균주는 발효시작 후 서서히 배양액의 pH가 증가하기 시작하는데 pH의 증가는 항균 활성 화합물의 생산과 밀접한 관련이 있다. 배양액의 pH는 서서히 증가하다가 약 48시간 이후 빠르게 증가하며 96시간 후에는 pH가 약 8.9까지 증가하여 유지되는 경향을 보인다. 항균 활성 화합물은 pH가 약 8.0이 되는 시점부터 생산되기 시작하며 pH가 8.9에 도달하는 시점까지 생산량이 증가하는 특징을 보인다. 반면 발효액 내에 바실러스속 균주가 우점한 경우 pH는 감소하여 약 6.0~6.4근처까지 감소하는 경향을 볼 수 있으며 항균 활성 화합물의 생산 또한 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과로 보아 배양액의 pH의 변화는 항균 활성 화합물의 생산과 밀접한 관계를 가지며 항균 활성 화합물의 생산 및 발효액의 오염여부 판단에 중요한 지표가 될 수 있음

을 알 수 있다.

[0039] **항균 활성 화합물의 검출 및 정제**

[0040] 총 용량 7L 발효조에서 발효 후 배양액은 원심분리기를 사용하여 6000 rpm의 속도에서 원심분리하여 균체와 약 3L 배양 상층액을 분리하였다. 배양 상층액은 감압하에서 60-70℃의 온도에서 농축하여 1L로 농축하였다. 농축한 배양액은 동량의 에틸아세테이트로 2 내지 3회 추출하였으며 추출액은 다시 45~55, 바람직하게는 50℃~60℃에서 감압농축하여 최소량으로 농축한다.

[0041] 에틸아세테이트 추출시료는 헥산으로 평형화한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Merck co.)에 적하하여 헥산 및 에틸아세테이트의 비율을 적절히 조절하여 활성을 나타내는 분획만을 모아 감압 건조하여 항균 활성 화합물을 분리하였다. 분리한 화합물은 헥산과 에틸아세테이트로 결정화하여 흰색의 결정성 물질을 얻었다.

[0042] **<실시예>**

[0043] 이하, 본 발명은 다음의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명이 이들 실시예에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[0044] 실시예에서 사용된 나르제니신, 에리쓰로마이신은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구매하였다. 실리카 겔, 에틸아세테이트, 헥산은 머크사(Merck, Darmstadt, Germany)로부터 입수하였다. 모든 기타의 화학약품 및 시약은 시험연구용 급을 사용하였고, 물은 HPLC 급을 사용하였다.

[0045] **실시예 1: 7L 발효조에서 *Nocardia sp.* CS682 균주의 배양 및 발효**

[0046] *Nocardia sp.* CS682 균주(KCTC 11297BP, 2008.03.06자로 한국생명공학연구원에 기탁됨)를 증류수 1L 당 귀리분 20g, 건조 효모 10g, 대두분 10g, 만니톨 20g, 아가 1.50g가 함유된 고체 배지에 도말하여 28℃에서 3일간 배양하였다. 배양 후 균체 집락을 취하여 50mL의 액체 배양 배지에 접종하여 28℃, 180rpm에서 3일간 진탕 배양하였다. 액체 배양 배지는 귀리분 20g, 건조 효모 10g, 대두분 10g, 만니톨 20g을 1L증류수에 녹여 조제하였다. 배양 배지 250mL을 1L 삼각 플라스크에 준비하여 멸균 후 5% 수준으로 종균을 접종하여 3일간 진탕 배양하였다. 7L 발효조에서 배양을 위해 1L 당 귀리분 1.5g, 건조 효모 1.5g, 대두분 1.5g, 말토오스 5g, CaCO₃ 0.5g이 되도록 조제하여 5L를 준비하였다. 종배양액 250mL을 준비된 발효조에 접종하고 28℃, 180rpm에서 1vvm의 통기량으로 7일 동안 pH는 조절하지 않고 배양하며 항균 활성 화합물의 생산량과 pH변화를 조사하고 그 결과를 표 3에 나타내었다. 배양시 거품의 제거를 위해 발효액에 0.01%수준으로 소포제를 투입하였다.

표 3

[0047]

배양시간 (hr)	pH	저지환 (cm/40μl)	생산량 (mg/L)
0	6.7	0.8	0
24	7.93	0.8	0
48	8.08	1.2	2.24
72	8.38	1.5	5.08
96	8.63	1.5	5.08
120	8.64	1.7	8.06
144	8.65	1.9	12.13
168	8.55	1.9	12.13

[0048] 위와 같이 7L 발효조에서 5L 규모로 최적 배지 조건에서 약 7일간 배양하며 pH 및 항균 활성 화합물의 생산량을 모니터링한 결과 *Nocardia sp.* CS682가 pH가 약 8이 넘어가는 시점부터 항균 활성 화합물이 생산됨을 알 수 있었다. pH는 8.6근처에서 유지되는데 pH의 변화가 없는 시점에서 화합물의 생산량도 뚜렷한 증가가 없음을 확인하였다. 이는 항균 활성 화합물의 생산량은 *Nocardia sp.* CS682균주의 배양액의 pH와 밀접한 관련이 있음을 의미한다.

[0049] 실시예 2: 50L 발효조에서 *Nocardia sp.* CS682 균주의 배양 및 발효

[0050] *Nocardia sp.* CS682 균주를 증류수 1L 당 귀리분 20g, 건조 효모 10g, 대두분 10g, 만니톨 20g, 아가 1.50g가 함유된 고체배지에 도말하여 28℃에서 3일간 배양하였다. 배양 후 균체 집락을 취하여 50mL의 배양 배지에 접종하여 28℃, 180rpm에서 3일간 진탕배양하였다. 배양배지는 귀리분 20g, 건조 효모 10g, 대두분 10g, 만니톨 20g, CaCO₃ 0.5g을 1L증류수에 녹여 조제하였다.

[0051] 배양배지 250mL을 1L 삼각 플라스크에 준비하여 멸균 후 5%수준으로 종균을 접종하여 3일간 진탕 배양하였다. 50L 발효조에서 배양을 위해 1L 당 귀리분 1.5g, 건조 효모 1.5g, 대두분 1.5g, 말토오스 5g, CaCO₃ 0.5g이 되도록 조제, 멸균하여 35L를 준비하였다. 종배양액 1.7L을 준비된 발효조에 접종하고 28℃, 180rpm에서 1vvm의 통기량으로 pH는 조절하지 않고 배양하고 그 결과를 표 4에 나타냈다. 배양시 거품의 제거를 위해 발효액에 0.01%수준으로 소포제를 투입하였다.

표 4

[0052]

배양시간(hr)	pH	저지환 (cm/40 μ l)	생산량 (mg/L)
1	7.53	0.8	0
12	7.93	0.8	0
24	8.32	0.8	0
36	8.69	1.0	1.14
48	8.73	1.3	3
60	8.85	1.5	5.08
72	8.9	1.7	8.06

[0053] 위와 같이 50L 발효조에서 35L 규모로 최적 배지 조건에서 약 3일간 배양하며 pH 및 항균 활성 화합물의 생산량을 모니터링한 결과 *Nocardia sp.* CS682가 pH가 약 8.5가 넘어가는 시점부터 항균 활성 화합물이 생산됨을 알 수 있었다. pH는 8.9에 도달할 때까지 항균 활성 화합물의 생산량이 지속적으로 증가하는 것으로 보아 항균 활성 화합물의 생산량은 *Nocardia sp.* CS682균주의 배양액의 pH와 밀접한 관련이 있음을 의미한다.

[0054] 실시예 3: 500L 발효조에서 *Nocardia sp.* CS682균주의 배양 및 발효

[0055] *Nocardia sp.* CS682균주를 증류수 1L 당 귀리분 20g, 건조 효모 10g, 대두분 10g, 만니톨 20g, 아가 1.50g가 함유된 고체배지에 도말하여 28℃에서 3일간 배양하였다. 배양 후 균체 집락을 취하여 50mL의 배양 배지에 접종하여 28℃, 180rpm에서 3일간 진탕 배양하였다. 배양배지는 귀리분 20g, 건조 효모 10g, 대두분 10g, 만니톨 20g을 증류수 1L에 녹여 조제하였다.

[0056] 배양배지 250mL을 1L 삼각플라스크에 준비하여 멸균 후 5%수준으로 종균을 접종하여 3일간 진탕 배양하였다. 50L 발효조에서 배양을 위해 1L 당 귀리분 1.5g, 건조 효모 1.5g, 대두분 1.5g, 말토오스 5g, CaCO₃ 0.5g이 되도록 조제, 멸균하여 35L를 준비하였다. 종배양액 1.7L을 준비된 발효조에 접종하고 28℃, 180rpm에서 0.5vvm의 통기량으로 pH는 조절하지 않고 배양하였다. 배양시 거품의 제거를 위해 발효액에 0.01%수준으로 소포제를 투입하였다.

[0057] 500L 발효를 위해 500L 발효조에 350L의 배양액을 1L 당 귀리분 1.5g, 건조 효모 1.5g, 대두분 1.5g, 말토오스 5g, CaCO₃ 0.5g이 되도록 조제, 멸균하여 준비하였다. 50L 발효조에서 배양한 균체는 무균조작으로 15L를 옮겼다. 배양조건은 28℃, 150rpm에서 0.5vvm의 통기량으로 pH를 조절하지 않고 배양하고 그 결과를 표 5에 나타냈다. 배양시 발생하는 거품은 필요시 10배 희석한 소포제(다우코닝사, 미국)를 소량 첨가하여 거품생성을 억제하였다.

표 5

[0058]

배양시간 (hr)	pH	저지환 (cm/40 μ l)	생산량 (mg/L)
1	7.04	0.8	0
12	7.49	0.8	0
24	8.34	0.8	0
36	8.74	1.5	5.08
48	8.76	1.8	9.94
60	8.86	1.9	12.13
72	8.98	2.1	17.53
84	9.02	2.3	24.49
96	9.05	2.5	33.28

[0059]

위와 같이 500L 발효조에서 350L 규모로 최적 배지 조건에서 약 4일간 배양하며 pH 및 항균 활성 화합물의 생산량을 모니터링한 결과 *Nocardia sp.* CS682가 pH가 약 8.5가 넘어가는 시점부터 항균 활성 화합물이 생산됨을 알 수 있었다. pH는 9.05에 도달할 때까지 항균 활성 화합물의 생산량이 지속적으로 증가하는 것으로 보아 항균 활성 화합물의 생산량은 *Nocardia sp.* CS682균주의 배양액의 pH와 밀접한 관련이 있음을 의미한다. 실시예 1 및 2, 3에서 보는 바와 같이 *Nocardia sp.* CS682 균주는 본 발명에서 사용된 최적 발효 배지를 이용하여 5, 50, 500L 규모의 발효조에서 발효시 항균 활성 화합물은 배양액의 pH가 약 8.0 내지 8.5가 되는 시점에서 유의성 있게 생산됨을 알 수 있었다. 이 결과로 볼 때 *Nocardia sp.* CS682 균주 발효시 발효액의 pH는 항균 활성 화합물 및 면역증강물질 생산양상을 예측할 수 있는 중요한 인자로 볼 수 있으며, 반복적으로 발효물을 생산시 생산량 및 품질관리의 지표로 정할 수 있다. 또한 위의 결과는 본 발명자들이 결정한 최적 발효 배지가 500L 발효조까지 대량 배양시 유의성 있는 배양 및 항생 화합물 생산을 할 수 있어 5ton 규모의 발효조에서도 기존과 동일한 발효패턴을 예측할 수 있을 것이다.

[0060]

실시예 4: 항균 활성 화합물의 분리정제

[0061]

실시예 1 및 2에서 얻은 발효액 일부인 3L를 이용하여 항균 활성 화합물을 정제하였다. 약 3L의 발효액을 동량의 유기용매 에틸아세테이트로 2 내지 3회 추출하여 분별깔때기를 이용하여 추출액을 회수하였다. 회수한 용매 층은 60℃에서 감압농축하여 최소량으로 농축하였으며 건조중량으로써 약 600mg을 얻었다. 추출물은 실리카겔 크로마토그래프를 수행하였다. 헥산으로 평형화한 실리카겔을 오픈 컬럼에 충전하여 0.8 X 15cm 의 컬럼을 만들었다. 헥산으로 평형화한 컬럼에 약 300mg의 에틸아세테이트 건조물을 최소량의 에틸아세테이트 용매로 녹여 컬럼에 부하하였다. 로딩 후 용매는 펌프를 사용하여 전개시켰으며, 헥산 340mL을 이용하여 전개시키고 이어 헥산과 에틸아세테이트를 4:1 중량비 1.7L 및 3:1 중량비 200mL로 항균 활성 화합물을 용출시켰으며 용출액의 속도는 시간당 145mL이었다. 용출 중 얻은 항균 활성 화합물 분획은 결정화 하여 흰색 내지는 미황색의 분말 44.3mg을 얻었다. 컬럼크로마토그래프 수행시 컬럼에 충전하는 시료 추출물의 양은 컬럼 부피의 10% 이내로 사용하며 바람직하게는 5% 이내로 사용한다. 본 발명자들은 5% 이내로 하여 컬럼에 충전하여 항균 활성 화합물을 용출하는 경우 순도가 가장 높음을 발견하였다. 항균 활성 화합물의 용출시 함께 나타나는 불순물은 박층크로마토그래피(Thin Layer Chromatography) 상에서 전개용매조건 헥산: 에틸아세테이트 1: 1중량부로 전개시 Rf 0.22 및 0.5에서 발견되는데 컬럼에 충전하는 시료 추출물의 양은 컬럼 부피의 5%가 초과되는 경우 Rf상 0.5에서 확인 가능한 불순물이 목적물질인 항균 활성 화합물과 동시에 용출됨을 확인하였다. 위의 컬럼크로마토그래피를 이용한 항균 활성 화합물의 정제에서 용출용매의 속도는 시간당 145mL이 항균 활성 화합물을 순수하게 분리하는데 최적조건으로 확인하였다. 용출용매의 속도는 시간당 145mL 이하의 경우 항균 활성 화합물의 정제도는 거의 동일하며 속도가 145mL을 초과하여 용출하는 경우는 불순물의 용출량이 서서히 증가하여 분리능이 떨어짐을 알 수 있었다. 따라서 용출용매의 속도는 시간당 145mL일 때의 깨끗한 항균 활성 화합물을 단시간에 얻을 수 있고 또한 용매 사용량 또한 경제적임을 알 수 있었다.

[0062]

비교예 1: 5L, 50L, 500L 발효조에서 에머슨 배지를 이용한 *Nocardia sp.* CS682 균주의 발효

[0063]

Nocardia sp. CS682균주를 증류수 1L 당 쿠리분 20g, 건조 효모 10g, 대두유 10g, 만니톨 20g, 아가 1.50g가

함유된 고체 배지에 도달하여 28℃에서 3일간 배양하였다. 배양 후 균체 집락을 취하여 50mL의 에머슨 배지에 접종하여 28℃, 180rpm에서 3일간 진탕배양하였다. 에머슨배지는 Beef extract 4g, 호모 엑스 1g, 펩톤 4g, 글루코오스 10g, NaCl 2.5g 증류수 1L에 녹여 조제하였다.

[0064] 에머슨 배지 250mL을 1L 삼각 플라스크에 준비하여 멸균 후 5%수준으로 종균을 접종하여 3일간 진탕배양하였다.

[0065] 7L 발효조에서 배양을 위해 에머슨 배지 5L를 준비하였다. 종배양액 250mL을 준비된 발효조에 접종하고 28℃, 180rpm에서 1vvm의 통기량으로 pH는 조절하지 않고 배양하며 항균 활성 화합물의 생산량과 pH와의 관계를 관찰하였다. 배양시 거품의 제거를 위해 발효액에 0.01%수준으로 소포제를 투입하였다.

[0066] 50L 발효조에서 배양을 위해 에머슨 배지를 35L를 준비하였다. 종배양액 1.7L을 준비된 발효조에 접종하고 28℃, 180rpm에서 0.5vvm의 통기량으로 pH는 조절하지 않고 배양하였다. 배양시 거품의 제거를 위해 발효액에 0.01%수준으로 소포제를 투입하며 항균 활성 화합물의 생산량과 pH를 관찰하여 그 결과를 표 6에 나타냈다.

표 6

[0067]

배양시간 (hr)	pH	저지환 (cm/40 μ l)	생산량 (mg/L)
1	6.9	0.8	0
24	8.2	1.1	1.62
48	8.2	1.5	5.08
72	8.75	1.8	9.94
96	8.9	2.2	20.8

[0068] 위와 같이 50L 발효조에서 35L 규모로 에머슨 배지에서 약 4일간 배양하며 pH 및 항균 활성 화합물의 생산량을 모니터링한 결과 *Nocardia sp.* CS682가 pH가 약 8.2가 넘어가는 시점부터 항균 활성 화합물이 생산됨을 알 수 있었다. pH는 8.9에 도달할 때까지 항균 활성 화합물의 생산량이 지속적으로 증가하는 것으로 보아 항균 활성 화합물은 pH가 관련이 있음을 알 수 있다.

[0069] 500L 발효를 위해 500L 발효조에 350L의 에머슨 배양액을 조제, 멸균하여 준비하였다. 50L 발효조에서 에머슨 배지로 28℃, 180rpm, 0.5vvm으로 배양한 균체는 무균조작으로 15L를 500L 발효조로 옮겼다. 500L 발효조에서 배양조건은 28℃, 150rpm에서 0.5vvm의 통기량으로 pH를 조절하지 않고 배양하며 항균 활성 화합물의 생산량과 pH변화를 모니터링하고 그 결과를 표 7에 나타내었다. 배양시 발생하는 거품은 필요시 10배 희석한 소포제(시그마사, 미국)를 소량 첨가하여 거품생성을 억제하였다.

표 7

[0070]

배양시간 (hr)	pH	저지환 (cm/40 μ l)	생산량 (mg/L)
1	6.6	0.8	0
24	7.98	0.8	0
48	8.12	1.2	2.24
72	8.3	1.5	5.08
96	7.88	1.7	8.06
120	8.37	1.8	9.94
144	8.52	1.8	9.94
168	8.62	2	14.65

[0071] 위와 같이 500L 발효조에서 350L 규모로 에머슨 배지에서 약 7일간 배양하며 pH 및 항균 활성 화합물의 생산량을 모니터링한 결과 *Nocardia sp.* CS682가 pH가 약 8.12가 넘어가는 시점부터 항균 활성 화합물이 생산됨을 알 수 있었다. 그러나 에머슨배지의 경우 pH는 8.6을 유지하며 항균 활성 화합물의 생산량도 증가하지 않음을 알 수 있다. 에머슨 배지로 500L 규모확대(scale up)시 50L수준의 발효 패턴의 양상은 보이지 않으며 항균 활성 화합물의 생산량이 최적배지로 발효할 때에 비해 약 절반수준을 보인다. 이는 에머슨 배지가 *Nocardia sp.* CS682의 발효시 pH와 항균 활성 화합물의 생산이 밀접함을 보여주지만 발효시간, 생산효율을 고려시 규모 확대를 위한 에머슨 배지의 선택은 적절하지 않음을 알 수 있다.

[0072] **비교예 2: 항균 활성 화합물의 분리정제**

[0073] *Nocardia* sp. CS682 발효액(실시에 1) 8L를 이용하여 항균 활성 화합물을 정제하였다. 약 8L의 발효액은 동량의 유기용매 에틸아세테이트로 2 내지 3회 추출하여 분별 깔때기를 이용하여 추출액을 회수하였다. 회수한 용매층은 60℃에서 감압농축하여 최소량으로 농축하였으며 메탄올 8mL에 녹였다. 추출물은 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. Sephadex LH20을 109cm x 1.8cm의 컬럼에 충전하여 메탄올로 평형화한 후 샘플을 적하하여 시간당 13 mL의 속도로 메탄올을 이용하여 항균 활성 화합물을 용출시켰다. 활성분획은 TLC 및 Bioassay 하여 화합물을 확인하여 모아 다시 농축하였다. 농축물은 에틸아세테이트에 녹여 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 수행하였다. 실리카겔을 헥산으로 평형화한 1.8cm X 22cm 컬럼에 약 139mg의 분획물을 최소량의 에틸아세테이트용매로 녹여 컬럼에 부하하였다. 헥산을 단독으로 전개시키고 이어 헥산과 에틸아세테이트를 2: 1 중량비로 활성 화합물을 용출시켰으며 용출 중 얻은 화합물의 분획은 결정화하여 흰색 내지 미황색의 분말 32.3mg을 얻었다.

도면의 간단한 설명

[0074] 도 1은 나르제니신의 구조를 나타내는 도면.

도면

도면1

