

Streptomyces natalensis ATCC274480이 생산하는 natamycin의 정제법 개발

이창권¹ · 장한수¹ · 김종태 · 황용일*

경남대학교 생명과학부, ¹(주)바이오알앤즈 유전체연구소,

Received September 26, 2003 / Accepted January 25, 2004

Development on the Purification Process of Natamycin from *Streptomyces natalensis* ATCC27448. Lee, Chang-Kwon¹, Han-Su Jang¹, Jong-Tae Kim and Yong-Il Hwang*. Division of Life Science, Kyungnam University, 449 Wolyong-dong, Masan 631-701, Korea, ¹PrimBio R&Ds, Institute for Genome Reconstruction, 3-10, 2nd-Engineering building, Kyungnam University, 449 Wolyong-dong, Masan 631-701, Korea – Natamycin, produced by *Streptomyces natalensis* ATCC27448, is a polyene macrolide antibiotic, is widely used in the food industry in order to prevent mould contamination. This study carried out to develop an efficient purification process of natamycin from fermentation broth. The stability of natamycin in fermentation broth during storage period was investigated at 4°C and room temperature. After the storage of fermentation broth for 14 days at 4°C, residual activity of natamycin was about 80% but decreased by 27% at room temperature. As solvent to extract natamycin from fermentation broth, methanol was the most efficient. A developed purification procedure includes methanol extraction and Diaion HP-20 column chromatography. Approximately 2.9 g of natamycin was obtained with a final yield of 69.1% and purity of 96.6% from 1.8 l of fermentation broth by this developed purification procedure.

Key words – *Streptomyces natalensis*, Natamycin, Polyene macrolide, Purification

Gram양성의 토양미생물인 방선균은 원핵미생물에서는 볼 수 없는 다양한 형태분화[3]를 한다는 특징과 더불어 의약품, 농업용으로 이용되고 있는 항생물질 및 항암제 등의 유용한 생리활성물질들을 다수 생산한다는 점에서 학술적 및 산업적으로 유용한 연구대상이 되고 있는 미생물군의 하나이다. 실제로 현재까지 산업적으로 이용되고 있는 유용생리활성물질들의 약 66%는 방선균에 의해 생산되어지고 있는 것으로 보고되어져 있다[1,12].

방선균 *Streptomyces natalensis*에 의해 생산되어지는 나타마이신은 다원환 lactone에 아미노당이 결합한 polyene macrolide계(Fig. 1)[7]에 속하는 물질로서 진균세포막의 주 구성성분인 에르고스테롤의 합성을 차단하여 세포막 성장을 방해하고 세포의 성장을 멈추게 하는 항진균 활성과 그들이 생산하는 독소의 상당수를 억제하는 활성이 보고되어져 있다[2,5,6,10,11,13]. 또한 나타마이신은 인간에 무해하다는 특징을 갖고 있어 미국 FDA에서 치즈 및 소시지 등의 식품표면처리용 항진균제로서 승인받은 물질이다[4,8]. 또한 나타마이신은 진균에 대해 광범위한 항진균활성을 갖고 있으므로 인간의 피부 칸디다증 및 안구감염증 치료약으로도 널리 사용되고 있는 산업적으로 유용한 항생물질이다[4]. 그러나 나타마이신은 화학구조상 물과 극성 유기용매에 대해 대체로 용해도가 낮고 비극성 용매에는 거의 녹지 않는 단점을 갖고 있으며[4], 이러한 특성 때문에 배양액으로부터의 나타마이

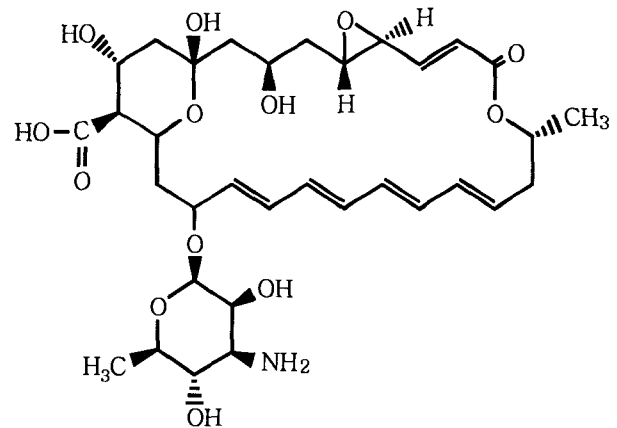


Fig. 1. Structure of natamycin.

신 회수 및 정제에는 많은 문제점들이 제기되고 있다. 현재까지 배양액으로부터 나타마이신의 회수 및 정제과정에 대한 다양한 연구가 이루어졌으나 보고된 방법[9]은 지적재산권에 의해 보호되어 있어 이용하기 어려울 뿐만 아니라 나타마이신 정제방법에 관한 학술논문의 보고는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 논문에서는 효율적으로 나타마이신을 회수하고 정제하는 방법을 개발하는 것을 목적으로 하고 있다.

재료 및 방법

사용균주 및 나타마이신의 생산

나타마이신의 생산을 위해 사용한 균주는 *Streptomyces*

*Corresponding author

Tel : +82-55-249-2717, Fax : +82-55-249-2995

E-mail : yihwang@kyungnam.ac.kr

natalensis ATCC 27448이며, 물질 생산용 배지조성은 1.4% (w/v) soy flour, 1% (w/v) glucose, 3% (w/v) lactose 및 0.3% (w/v) yeast extract (pH 7.0)이다. 나타마이신의 정제는 5 L 발효조(Best Korea Co. Ltd., KOREA)를 사용하여 30℃에서 300 rpm의 교반속도로 7-8일간 배양하여 얻은 배양액을 4℃냉장고에 보관해 두고 사용하였다.

나타마이신의 정량분석

본 연구에서 이용된 모든 나타마이신의 정량분석은 아래와 같은 조건에서 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 이용하였다. 모든 시료는 methanol (HPLC 용, J. T. Baker, USA)로 추출 및 적절히 희석하여 4℃에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리(MICRO 17R, Hanil Science industrial Co. Ltd., KOREA)한 후 HPLC에 의해 정량 분석 하였다. 본 연구에 이용된 HPLC는 독일 KNAUER사의 HPLC 펌프 K-1001과 UV detector가 장착되어 있으며 TOSOH사(JAPAN)의 Ø 4.6×150 mm의 칼럼을 사용하였다. 용매는 80%(v/v)의 methanol을 사용하였고 칼럼의 온도는 40℃, 유속은 분당 1 ml, 주입량은 20 µl로 하였다.

HPLC에 의한 나타마이신의 정량분석을 위해 나타마이신 표준물질(Minimum 95%, Sigma, USA)을 사용하여 표준곡선을 다음과 같이 작성하였다. 5 mg의 나타마이신을 5 ml의 methanol에 완전히 녹인 후 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg/ml의 농도가 되도록 각각 methanol로 희석한 후 원심분리하고 HPLC를 통해 정량분석하여 표준곡선을 작성하였다.

저장안정성

배양액의 보존과 정제과정 동안 발생할 수 있는 나타마이신의 활성 변화를 검토해보기 위해 저장안정성 및 열안정성 시험을 실시하였다. 저장안정성 시험을 위해 나타마이신이 함유된 배양액과 그 배양액을 12,000 rpm, 4℃에서 30분간 원심분리하여 얻은 침전물을 각각 4℃와 실온에서 보관하고 0, 3, 8, 14, 21, 28, 35일째마다 나타마이신의 정량적인 분석을 실시하였다.

나타마이신의 추출 및 정제

1) 나타마이신의 추출

나타마이신 배양액 300 ml (2 mg/ml)을 4℃에서 12,000 rpm으로 30분간 원심분리(Hitachi CR21F, JAPAN)한 후 상정액은 버리고 남은 침전물에 methanol을 300 mL 첨가하였다. 침전물을 methanol에 완전히 현탁시킨 후 진한 염산용액을 이용하여 pH를 3.0으로 맞추어 10분간 교반하여 추출하였다.

2) 농축

나타마이신을 추출한 methanol 용액을 45℃에서 결정이

생기지 않도록 적절하게 진공감압농축(EYELA, Rotary evaporator N-1000, JAPAN)하였다.

3) Diaion HP-20 column chromatography

Diaion HP-20의 평형화를 위해 50% (v/v) acetone을 첨가하고 10분간 천천히 교반한 후, 4℃에서 24시간 동안 정치하였다. 평형화된 Diaion HP-20에서 50% (v/v) acetone을 제거하고 증류수로 수세한 후 적절한 양의 증류수를 첨가하여 천천히 칼럼에 충전하였다. Diaion HP-20이 충전된 칼럼에 진공감압에 의해 농축된 시료를 주입한 후 불순물을 제거하기 위해 증류수 600 ml, 30% (v/v) methanol 300 ml, 그리고 50% (v/v)의 methanol 300 ml를 순차적으로 칼럼에 주입하여 천천히 용출시켰다. 불순물이 제거된 칼럼에 80% (v/v)의 methanol 600 ml로 나타마이신을 용출하였다. 용출액을 진공감압 농축하여 생성된 나타마이신 결정을 가지고 정제수율과 순도를 조사하였다.

나타마이신의 정제수율 및 순도 검사

나타마이신의 정제수율은 각 정제과정마다 HPLC 분석에 의해 조사되었고 최종적으로 얻은 나타마이신 결정의 중량을 측정하여 수율을 계산하였다. 최종적으로 얻은 나타마이신 결정의 순도는 적정량의 나타마이신을 채취하여 methanol에 적절히 희석한 후 원심분리하여 HPLC 분석을 통해 결정하였다.

결과 및 고찰

나타마이신의 저장안정성

배양액의 보존과 정제과정 동안 발생할 수 있는 나타마이신 활성의 변화를 검토하기 위해 배양액과 그 배양액을 원심분리하여 얻은 침전물을 각각 4℃와 실온에 보관하여 저장안정성 시험을 하였다. 그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 배양액과 침전물을 4℃에서 보관하였을 때 나타마이신의 활성이 14일째까지 80% 이상 유지되었으나, 침전물의 나타마이

Table 1. Storage stability of natamycin after fermentation

| Time (days) | Contents of natamycin (µg/ml) | | | |
|-------------|-------------------------------|-------------|--------------------|-------------|
| | 4℃ | | Room temperature | |
| | Fermentation broth | Pellet | Fermentation broth | Pellet |
| 0 | 466.4 (100)* | 277.5 (100) | 466.4 (100) | 242.6 (100) |
| 3 | 461.2 (99) | 242.6 (87) | 431.2 (93) | 174.1 (72) |
| 8 | 431.2 (93) | 239.6 (86) | 277.7 (60) | 84.2 (35) |
| 14 | 388.3 (83) | 225.8 (81) | 124.7 (27) | 29.4 (12) |
| 21 | 381.8 (82) | 119.9 (43) | 65.1 (14) | 14.8 (6) |
| 28 | 350.5 (75) | 103.3 (37) | 0.0 (0) | 0.0 (0) |
| 35 | 324.6 (70) | 64.4 (23) | 0.0 (0) | 0.0 (0) |

*Percentage (%).

신 활성은 보관 21일째에 43%까지 급격히 감소하였다. 반면 4℃에서 배양액 중의 나타마이신 활성은 보관 35일째까지 약 70%를 유지하였다. 실온에 보관하였을 때의 배양액과 침전물의 나타마이신 활성은 보관 8일째에 각각 60%와 35% 정도로 급격히 감소하였다. 이러한 결과를 통해 나타마이신은 4℃에서 보다 실온에서 활성이 더 빨리 감소되었으며, 침전물 상태로 보관하는 것 보다 배양액 상태로 보관하는 것이 더 높은 활성을 유지함을 알 수 있었다.

나타마이신의 추출용매 선택

배양액에서 나타마이신을 경제적으로 추출할 수 있는 용매를 선택하기 위해 50% (v/v) acetic acid, methanol, butanol, 증류수, isopropanol, ethanol에 대해 용해도를 측정하였다. 나타마이신에 대한 용해도는 Table 2에서와 같이 50% acetic acid > methanol > ethanol > H₂O > isopropanol > butanol 순이었다. 다른 용매보다 나타마이신에 대한 용해도가 훨씬 높은 50% acetic acid와 methanol을 추출용매로 선정하여 추출과정의 효율성을 검토해 보았다. 그 결과 50% acetic acid는 용해도는 우수하나 methanol 보다 나타마이신에 대한 안정성이 떨어지고 추출과정에서 불순물이 증가하는 등의 문제점이 대두되었다(결과 미제시). 따라서 본 연구에서는 배양액으로부터 나타마이신을 추출하는데 50% acetic acid에 비교하여 위의 문제점이 훨씬 적은 methanol을 선정하였다.

배양액 300 ml (2 mg/ml)로부터 methanol을 사용하여 나타마이신을 가장 효율적으로 추출할 수 있는 양을 검토하기 위해 methanol을 100 ml에서부터 800 ml까지 100 ml씩 첨가하여 각 단계별로 나타마이신의 함량을 조사하였다. 그 결과 300 ml의 methanol을 사용하여 추출한 경우가 83%의 나타마이신의 회수율을 보였고, 그 이상의 methanol을 사용할 경우 이와 비슷한 회수율을 나타내거나 오히려 낮은 회수율을 보였다(결과 미제시). 따라서 경제성을 고려하여 나타마이신 600 mg에 대해 methanol 300 ml를 추출을 위한 적정 methanol 양으로 결정하였다. Olson[9] 등은 methanol에 용해된 상태로 나타마이신이 존재할 경우 나타마이신과 methanol이 methyl ester를 형성함으로써 나타마이신의 함량이 줄어들며 추출액의 pH가 낮을수록 온도가 높을수록 methyl ester 화합물이 증진한다고 보고하고 있다. 그러나 본 연구에

Table 2. Solubility of natamycin on various solvents

| Solvents | Solubility of natamycin (mg/ml) |
|------------------|---------------------------------|
| 50% Acetic acid | 10.00 |
| Methanol | 5.00 |
| Ethanol | 0.50 |
| H ₂ O | 0.10 |
| Isopropanol | 0.04 |
| Butanol | 0.03 |

서는 배양액상에 존재하는 나타마이신을 methanol로 추출할 때 pH 3.0으로 맞추었는데 이는 pH가 3.0일때 나타마이신이 가장 높은 용해도를 나타내었기 때문이다(결과 미제시). 나타마이신의 모든 추출 및 정제과정에 사용되는 methanol에 대한 나타마이신의 활성 손실을 줄이기 위해서는 나타마이신이 매탄올에 용해되어 있는 시간을 최대한 줄이고 4℃ 정도의 낮은 온도에서 보관하는 것이 필요하다. 또한 나타마이신의 추출에 있어서 나타마이신 2 g이 함유된 침전물에 대해 1 l의 methanol을 2회에 나누어 첨가, 추출하는 것이 1 l의 methanol을 한번에 첨가하여 추출하는 방법보다 효율적이었(결과 미제시).

효율적인 나타마이신 정제법의 확립

약 4.2 g의 나타마이신이 함유된 배양액 1,800 ml를 원심분리를 통해 침전물을 회수한 후, 1 l의 methanol을 사용하여 2회(총 2 l)에 걸쳐 나타마이신을 추출한 후 적절히 농축하였다. Column chromatography에서 문제가 되는 이물질 제거를 위해 탈지면을 사용하여 농축된 시료를 여과한 후 200 g을 Diaion HP-20을 사용하여 column chromatography를 실시하였다. Diaion HP-20에 흡착된 나타마이신의 회수는 0, 30, 50, 80%의 methanol을 이용하여 농도 구배법에 의해 용출하였다. 그 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 순도가 96.6%, 정제수율이 69%인 약 2.9 g의 나타마이신을 얻었다. 정제수율 및 순도는 Sigma사의 나타마이신 표준시료를 이용하여 HPLC에 의해 얻어졌다(Fig. 2). 본 연구에서 확립되어진 나타마이신의 정제과정은 Fig. 3에서 보여주는 바와 같다.

Olson 등은 나타마이신 배양액의 pH를 조절하여 나타마이신을 정제하는 공정을 개발하고 지적재산권을 확보한 바 있다[9]. 그러나 이 공정을 통해 획득한 나타마이신의 정제수율은 본 연구에서 확립된 방법과 거의 비슷한 수준이었으나 순도가 80% 정도에 불과하며 과량의 강산과 강염기를 사용하므로 나타마이신의 대량정제에 있어서 많은 문제점이 발

Table 3. Purification of natamycin

| | Natamycin | |
|----------------------------|--------------|----------------|
| | Contents (g) | Percentage (%) |
| Fermentation broth | 4.2 | 100.0 |
| Pellet | 4.1 | 97.6 |
| MeOH* extract | 3.2 | 76.2 |
| 0% MeOH eluate | 0.0 | 0.0 |
| 30% MeOH eluate | 0.0 | 0.0 |
| 50% MeOH eluate | 0.3 | 7.0 |
| 80% MeOH eluate | 2.9 | 69.1 |
| Recovery (80% MeOH eluate) | 2.9 | 69.1 |
| Purity | 2.8 | 96.6 |

*Methanol.

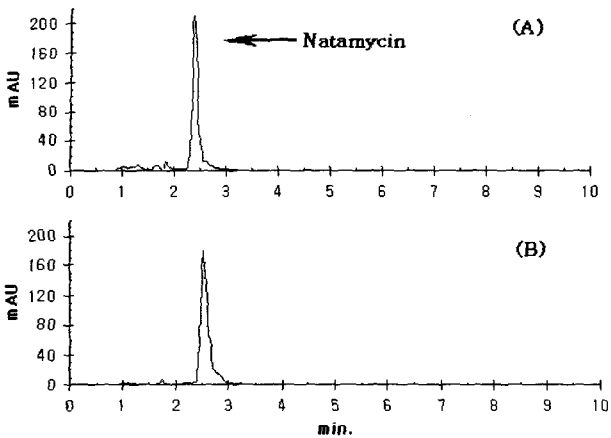


Fig. 2. HPLC profiles of the commercial and purified natamycin.
 (A) The standard natamycin from Sigma Chemical Co.,
 (B) The purified natamycin in this study.

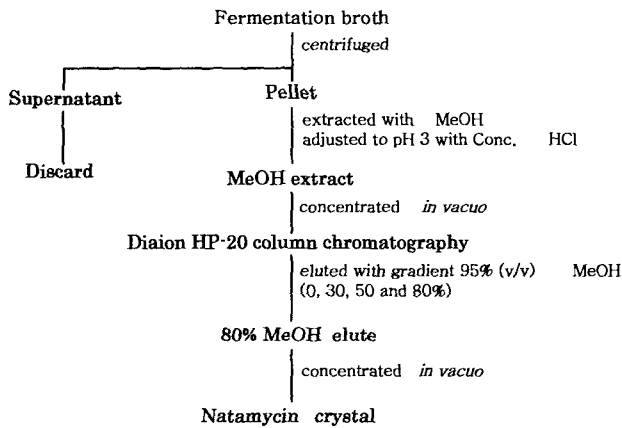


Fig. 3. Purification procedure of natamycin.

생활 가능성이 많다. 따라서 본 연구를 통해 확립된 나타마이신의 정제방법은 고순도의 나타마이신을 효율적으로 대량 정제할 수 있는 방법이라고 생각된다.

요 약

나타마이신 배양액을 4℃와 실온에서 14일 동안 보관하였을 때, 4℃에서는 나타마이신의 활성이 80% 이상 유지되었으나 실온에서는 27%로 급격하게 감소하였다. 이러한 사실은 나타마이신의 손실을 최소화하기 위해서는 최대한내에 배양액으로부터 나타마이신을 회수할 필요성과 장기간 보관 시에는 4℃이하에서 보관할 필요성을 제시하고 있다. 효율적인 나타마이신 정제과정을 개발하기 위해 배양액으로부터 나타마이신의 추출 용매 및 적정 사용량에 대해 조사한 결과 2 g의 나타마이신을 추출하는데 1 l의 methanol을 사용

하는 것이 가장 효율적이었다. 확립된 나타마이신 추출에 필요한 methanol의 양과 Diaion HP-20을 이용한 column chromatography를 적용하여 4.2 g의 나타마이신이 함유된 1,800 ml의 배양액으로부터 2.9 g의 나타마이신을 획득하였다. 본 연구에서 개발된 정제과정을 통해 순도가 96.6%이고 회수율이 69.1%인 나타마이신을 얻을 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 BK21사업 핵심분야에 의해 지원되었으며, 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

- Berdy, J. 1995. Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites?. Part 1. pp. 3-23, *Proceedings of the 9th International Symposium on The Biology of Actinomycetes*, Allerton Press, New York.
- Brik, H. 1981. Natamycin. pp. 513-542, In Florey K.(ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances*, Academic Press, New York.
- Chater, K. F. 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**, 685-713.
- Davidson, P. M. and C. H. Doan. 1993. Natamycin, pp. 395-407, In Davidson P. M. and A. L. Branen (eds.), *Antimicrobials in Foods*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel and Hong Kong.
- Davis, N. D. and U. L. Diener. 1987. Mycotoxins, pp. 517-578, In Beuchat L. R. (ed.), *Food and Beverage Mycology*, Van Nostrand-Reinhold, New York.
- De Boer, E. and M. Stolk-Horsthuis. 1977. Sensitivity to natamycin (pimaricin) of fungi isolated in cheese warehouses. *J. Food Prot.* **40**, 533-536.
- Gil, J. A. and J. F. Martin. 1997. Polyene antibiotics, pp. 551-576, In: Strohl, W. R.(ed.), *Biotechnology of antibiotics*, 2nd ed. Marcel Dekker, New York.
- Kiermeier, F. 1973. Zum Einsatz von Pimaricin zur Verhinderung der Schimmelpilz Entwicklung auf Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Unters. Forsch* **151**, 179-186.
- Olson, P. T., J. R. Millis and M. H. Reimer. 1997. Natamycin recovery. *U.S patent* 5,591,438.
- Omura, S (ed.). 1984. *Macrolide Antibiotics*. pp. 7-63, 1st ed., Academic Press, New York.
- Pedersen, J. C. 1992. Natamycin as a fungicide in agar media. *Appl. Env. Microbiol.* **58**, 1064-1066.
- Strohl, W. R. 1997. Industrial antibiotics: today and the future, pp. 1-47, In: Strohl, W. R. (ed.) *Biotechnology of antibiotics*, 2nd ed. Marcel Dekker, New York.
- Ziogas, B. N., H. D. Sisler and W. R. Lusby. 1983. Sterol content and other characteristics of pimaricin-resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Pesticide Biochem. Physiol.*, **20**, 320-326.