

소수성 Diaion HP-20 및 친화성 Concanavalin A 크로마토그래피를 이용한 Glycopeptide계 항생제 Teicoplanin의 분리 및 정제

이재찬 · 박해룡 · 박동진 · 김영배¹ · 김창진*

한국생명공학연구원 생물소재연구부, ¹고려대학교 생명공학원 식품생명공학과

Separation and Purification of Teicoplanin by Diaion HP-20 and Concanavalin A Chromatography.
Lee, Jae-Chan, Hae-Ryong Park, Dong-Jin Park, Young-Bae Kim¹, and Chang-Jin Kim*. Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Daejeon 305-600, ¹Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea – Glycopeptide antibiotics, teicoplanin was purified from a mutant strain of *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC31121, *A. teichomyceticus* MSL2211. We developed a simple procedure to separate and purify the teicoplanin from the fermentation broth. Teicoplanin was purified by two-step purification system, hydrophobic adsorption and sugar affinity chromatography in combination with HPLC analysis based on the properties of hydrophobic acyl chain and sugar moiety in teicoplanin. Teicoplanin was separated from the culture broth by Diaion HP-20 and further purified by concanavalin A affinity column chromatography. As an adsorbent resin, Diaion HP-20 in broth eliminated toxic effects on growth, reduced feedback repression of teicoplanin production, and assisted in rapid recovery of teicoplanin. The teicoplanin displayed the final yield of 80% and 95% of purity.

Key words: *Actinoplanes teichomyceticus*, concanavalin A, Diaion HP-20, teicoplanin

Teicoplanin은 *Actinoplanes teichomyceticus*가 세포외로 생산하는 glycopeptide계 항생제로서 vancomycin과 함께 병원성 그림양성 세균인 methicillin resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) 치료제로 임상에서 널리 사용되고 있다[11, 15]. Glycopeptide계 항생제는 벤젠고리를 가진 다섯 개 이상의 아미노산이 직선형으로 펩티드를 형성하고 있으며 각각의 아미노산 벤젠고리에는 당, 염소, 메틸기들이 종류에 따라 다르게 연결되어 있는 구조적 특징을 가지고 있다[2]. Teicoplanin은 구조 및 극성 차이에 따라 구분되는 T-A2-1~T-A2-5의 복합체와 T-A2 정제과정에서 생성되는 T-A3로 나누어지며[13], 그 중에서 T-A2-2가 주요 구성성분으로 가장 강한 항균력을 가지고 있다[3,4,12]. Teicoplanin을 정제하는 방법에 대한 연구에는 배양액으로부터 수용성 용매를 사용하여 추출하는 방법[14], 폴리아미드 수지를 이용한 흡착크로마토그래피[1] 및 디펩티드 친화성(D-alanyl-D-alanine) 크로마토그래피에 의한 정제방법[5]이 있으나, 후자의 경우는 수지를 재조합해야 하는 이유로 그 실시가 매우 어렵다는 단점이 있다. 한편 발효에 의한 대량생산에 있어서, teicoplanin 생산균주의 배양과정에서는 teicoplanin 생산에

따른 자기저해(self-inhibition) 현상이 큰 문제가 되고 있다. 따라서 본 연구는 새로운 정제방법으로서 teicoplanin의 구조적 특징에 따라 선택되는 크로마토그래피 방법을 이용하여 teicoplanin에 의한 자기독성 방지 및 고수율 정제방법을 개발하기 위해 행하여졌다[9].

본 실험에서 사용한 배지 및 당류는 Difco사의 특급시약을 사용하였으며 teicoplanin 정량을 위한 표준시약 targocid는 한독약품사에서 수입 시판하는 완제품을 사용하였고, 흡착제 Diaion HP-20은 일본 Mistubishi 화학, Concanavalin A(Con A)는 Pharmacia사로부터 구입하여 사용하였다.

한편 teicoplanin 생산균주로는 teicoplanin을 생산하는 모균주 *A. teichomyceticus* ATCC31121(KCTC9543)로부터 돌연변이 유도처리에 의해 제조된 변이주 *A. teichomyceticus* MSL2211를 사용하였으며[8, 10], 균주보존을 위해서는 glucose 10 g, yeast extract 1 g, peptone 2 g, beef extract 1 g, agar 15 g을 증류수 1 liter에 녹여서 만든 Bennett's 한천배지(pH 7.0)를 사용하였다. Teicoplanin 생산을 위한 종균배지는 glucose 10 g, yeast extract 4 g, peptone 4 g, MgSO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 2 g, K₂HPO₄ 4 g을 증류수 1 liter에 녹여서 만든 복합배지(pH 7.2)를 사용하였으며[8, 10], 생산배지는 mannose 30 g, yeast extract 5 g, asparagine 1.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, NaCl 0.1 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.1 g을 1 liter에 녹여서 만든 복합배지(pH 7.0)를 사용하였다.

변이주의 배양을 위해서는 변이주를 Bennett's 한천배지에

*Corresponding author
Tel. 82-42-860-4332, Fax: 82-42-860-4595
E-mail: changjin@kribb.re.kr

접종한 후 28°C 배양기에서 7일간 배양한 다음 멸균수를 넣어 유리섬유로 여과하여 순수한 포자용액만 모은 다음 포자용액을 종균 배양배지 50 ml를 포함한 500 ml 삼각플라스크에 2% (v/v) 접종하여 28°C, 150 rpm으로 30시간 동안 진탕배양하였다. Teicoplanin 생산을 위해서는 생산배지 50 ml를 포함한 500 ml 삼각플라스크에 5% (v/v) 접종하여 종균 배양의 경우와 동일한 조건으로 4일간 배양하거나, 3의 생산배지가 들어있는 51-발효조(K402, Kbiotech., Co., Korea)에 종균배양액을 5% (v/v) 접종하여 28°C에서 300 rpm, 1 vvm으로 5일간 배양하였다. 소포제는 LS-300 실리콘을 0.05% 첨가하였으며 자가독성 방지를 위해 배지내에 흡착제 Diaion HP-20을 5% (w/v) 첨가하여 배지와 함께 멸균한 다음 사용하였다.

Teicoplanin의 분리정제를 위하여는 Diaion HP-20이 포함된 발효배양액을 2,000×g에서 30분간 원심분리하여 균사체를 제거하였다. 그런다음 teicoplanin을 흡착한 Diaion HP-20을 컬럼 (2×30 cm)에 충전시키고 메탄올 30%, 50%, 80% 및 100% (v/v)의 농도로 단계별로 용출하여 분획한 후 각각의 분획의 활성을 agar diffusion assay법[9]으로 측정하였으며 활성분획은 농축하여 HPLC로 정량하였으며, 다음 단계로 Diaion HP-20 크로마토그래피 방법으로 부분정제된 시료를 감압증류하여 농축한 후 5 mM 아세트산나트륨(pH 5.2) 완충용액에 용해시킨 다음 Con A[7]를 충전한 컬럼(0.5×10 cm)에 흡착시켜 α -methylmannoside의 0~0.5 M 선형 농도구배를 통해 용출하여 분획하고, 각각의 분획을 agar diffusion assay법으로 활성을 측정하고 다음 활성분획은 농축하여 HPLC로 정량하였다.

Teicoplanin 정량분석은 배양액의 원심분리액 및 추출액을 표준 teicoplanin과 HPLC 상에서 직접 비교하는 방법을 사용하였다. 표준시약으로는 targocid(200 mg/vial teicoplanin 주사제, 한독약품)를 사용하였다. 컬럼은 YMC-Pack ODS-A(4.6×250 mm, U.S.A)를 사용하였으며 이동상으로는 완충용액 A(20 mM NaH₂PO₄:CH₃CN=95:5, pH 6.0)와 완충용액 B(20 mM NaH₂PO₄:CH₃CN=25:75, pH 6.0)를 100:0~30:70의 선형농도구배로 용출하여 분석하였다. 완충용액의 유속은 1 ml/min이었고, 254 nm에서 UV 검출기로 검출하였다. 각 peak의 면적비를 비교하여 표준용액의 회귀곡선으로부터 teicoplanin 복합체의 생성량을 계산하였다. 또한 paper disc를 이용한 한천확산법에 의한 생물학적 검정법으로 농도를 측정하였으며 검정균주로는 그림양성균인 *Bacillus subtilis* ATCC6633을 사용하였다.

고수율 teicoplanin 생산을 위해 본 실험에서 사용한 *A. teicomyceticus* MSL2211은 UV에 의한 돌연변이체로서 모균주[6]에 비해 teicoplanin 생산량이 3배 이상(65.7 mg/l) 증가되었으나 10 mg/l 이상의 농도에서 자체 teicoplanin에 의한 균성장의 저해를 받았다. 따라서 자가독성 방지 및 feedback inhibition 방지를 위해 배양액 내에 흡착제 Diaion

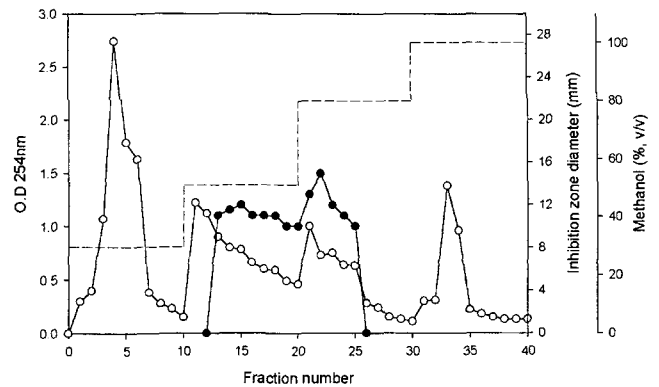


Fig. 1. Diaion HP-20 hydrophobic chromatography of teicoplanin on stepwise gradient with methanol. Symbols: (○), O.D. 254 nm; (●), inhibition zone diameter (mm); (---), methanol (% v/v).

HP-20 5% (w/v)를 배양초기에 배지와 함께 멸균하여 첨가한 다음 배양하였다. 그 결과 균성장이 저해를 받지 않았으며 흡착제를 첨가하지 않았을 때에 비해 4배 이상(265 mg/l) teicoplanin 생산량이 증가하였다.

따라서, 본 연구에서는 teicoplanin의 분리정제를 위하여 teicoplanin의 구성성분인 지방산과 세 개의 당 성분에 대한 친화력을 이용한 흡착크로마토그래피 방법을 사용하였으며, 지방산과 흡착할 수 있는 Diaion HP-20 및 당 부분과 친화성이 있는 Con A를 이용한 정제결과는 다음과 같다.

Diaion HP-20 소수성 크로마토그래피는 최적 배지조건 및 배양조건으로 배양한 배양액을 원심분리하여 균사체를 제거한 다음 원심분리된 Diaion HP-20을 컬럼에 충전시킨 다음 메탄올 30%, 50%, 80% 및 100%의 농도로 단계별로 용출하였다. 그 결과 50~80% 메탄올 분획이 활성분획으로 나타난 바, 생산된 teicoplanin은 Diaion HP-20에 잘 흡착되며 50%~80% 메탄올에 의해 용이하게 탈착되었다(Fig. 1). Diaion HP-20은 teicoplanin을 정제하기 위해 기존에 사용한 polyamide-CC6 수지[1]와는 그 구조와 물성이 상이한 것으로서 구상의 폴리머로 다공성이며 표면적이 커서 흡착성이 강하고 폴리머 표면이 소수성의 성질을 가지고 있어, teicoplanin의 결사슬인 지방산을 효율적으로 흡착할 수 있으므로 대용량의 배양액을 처리하는데 적합하였다. 또한 세척 후 재사용이 가능하여 teicoplanin 정제에 가장 효과적으로 적용할 수 있는 수지로 사료된다. 또한 흡착제로서 중간 정도의 흡착력을 가지고 있는 Diaion HP-20 수지의 경우 용출용매로서 부탄올이나 아세톤[1]을 많이 사용하는데, 본 실험에서는 Diaion HP-20 수지와 teicoplanin에 특이적으로 적용되는 점을 결정한 결과 물과 메탄올을 일정비로 혼합하여 사용하는 것이 효과적이었다.

다음 단계로 Con A 친화성 크로마토그래피는 Con A가 α -D-mannopyranosyl과 α -D-glucopyranosyl 잔기에 결합하므로 α -결합된 glucosyl 치환기를 함유하는 테이코산 세포

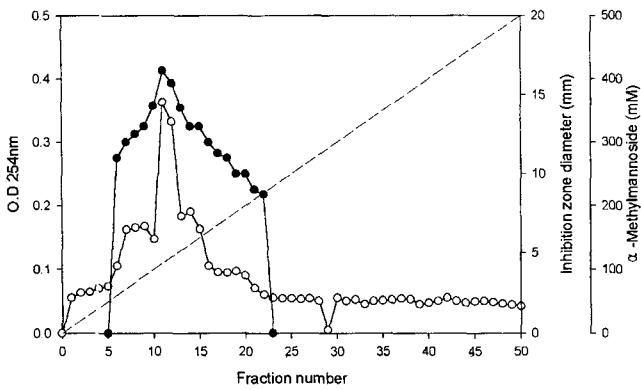


Fig. 2. Concanavalin A affinity chromatography of teicoplanin in the presence or absence of linear gradient with 0.5 M α -methylmannoside. Symbols: (○), O.D. 254 nm; (●), inhibition zone diameter (mm); (---), α -methylmannoside (mM).

벽을 가진 세균에 결합할 수 있고, teicoplanin은 구조상 mannose를 포함하고 있으므로 상호 친화성이 있다. 따라서 시판되는 teicoplanin을 사용하여 Con A 농도에 따른 결합력을 조사하여 HPLC로 분석한 결과 Con A 1 ml 당 약 2 mg의 teicoplanin을 결합하였다. 위와 같은 사실로부터 Diaion HP-20 column을 통과시켜 부분정제된 분획을 감압증류하여 농축한 후 5 mM 아세트산나트륨(pH 5.2) 완충용액에 용해시킨 다음 Con A를 충전한 컬럼(0.5×10 cm)에 흡착시켜 용출하였다. 이 때 사용되는 용출액은 glucose, mannose, α -methylglucoside 및 α -methylmannoside로 구성된 당을 포함하는 용액이 바람직하며, 실험결과 pH를 4.5 이하로 낮추거나 α -methylmannoside를 0~0.5 M 선형농도구배를 통해 0.265 ml/min의 유속으로 용출하는 것이 가장 효과적이었다(Fig. 2) 당-친화성 크로마토그래피는 잘 알려진 정제방법이나 teicoplanin 정제에 Con A를 흡착제로 사용하고 용출용매로 α -methylmannoside를 적용하여 사용한 것은 본 연구가 처음이며 수율과 순도에 있어서도 본 연구에서 추가한 당-친화성 크로마토그래피를 통해 수율 80%, 순도 95%의 teicoplanin을 정제함으로써, Anacleto 등[1]이 폴리아미드를 이용한 흡착크로마토그래피를 통해 정제한 수율 74.3%, 순도 85% 보다 높게 고순도로 teicoplanin을 정제하였다.

HPLC에 의한 teicoplanin 정량분석에서 표준시료 teicoplanin의 T-A2-2 성분은 32.0분, T-A2-3는 32.9분, T-A2-4는 36.2분, 그리고 T-A2-5는 36.9분에서 용출되었으며(Fig. 3A), 동일한 조건으로 본 연구에서 배양된 배양액으로부터 Diaion HP-20 소수성 크로마토그래피와 Con A 친화성 크로마토그래피를 통해 정제한 시료를 HPLC로 분석한 결과 95%의 고순도로 teicoplanin을 정제하였음을 확인하였다(Fig. 3B).

이상의 결과에서, Diaion HP-20 소수성 크로마토그래피 및 Con A 친화성 크로마토그래피를 이용한 정제방법은 기존의 정제방법인 폴리아미드 수지 및 디펩티드를 이용하는

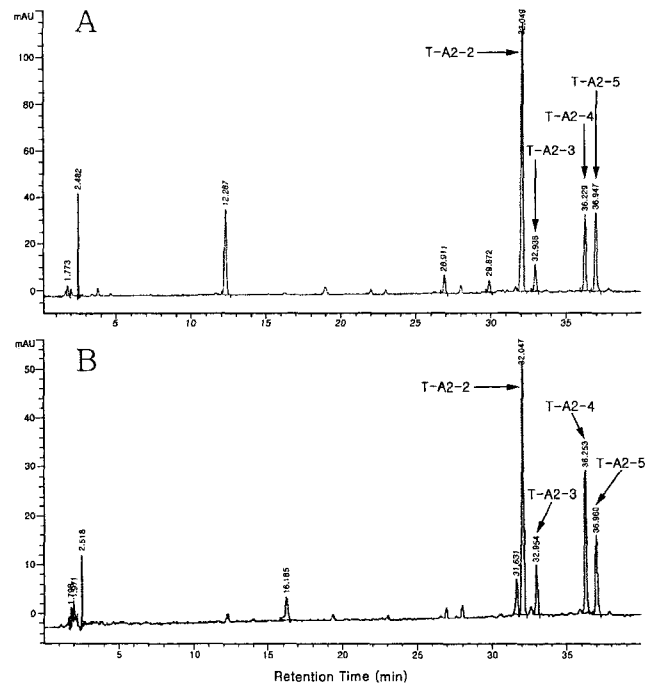


Fig. 3. HPLC gradient chromatogram of standard teicoplanin complex (A) and purified sample by concanavalin A from *A. teicomyceticus* MSL2211 (B).

방법에 비해 정제과정 중 pH를 여러번 조절하는 등의 단계를 거치지 않고 바로 정제할 수 있어 편리하며 또한 수지의 재활용이 가능하다는 잇점이 있고, 특히 Diaion HP-20은 배양과정에서 teicoplanin을 흡착함으로써 자가독성을 감소시키고 teicoplanin 수율을 증가시키는 효과가 있어 대용량의 배양액을 처리하는데 적합하며 teicoplanin 정제에 바로 이용됨으로써 10% 이상 수율이 증가되었고, Con A 친화성 크로마토그래피를 통해서 고순도로 teicoplanin을 정제하였다.

REFERENCES

- Anacleto, G. and P. Gianbattista. 1990. Teicoplanin recovery process. *European patent 91116126*.
- Barna, J. C. J. and D. H. Williams. 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics vancomycin group. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**: 339-357.
- Borghi, A., C. Coronelli, L. Faiuolo, G. Allievi, R. Pallanza, and G. G. Gallo. 1984. Teicomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teicomyceticus* nov. sp. *J. Antibiotics* **37**: 615-620.
- Borghi, A., P. Antonini, M. Zalon, P. Ferrari, L. F. Zerilli, and G. C. Lancini. 1989. Isolation and structure determination of two new analogs of teicoplanin, a glycopeptide antibiotic. *J. Antibiotics* **42**: 361-366.
- Corti, A. and G. Cassani. 1985. Synthesis and characterization of D-alanyl-D-alanine-agarose, a new bioselective adsorbent for affinity chromatography of glycopeptide antibiotics.

- Appl. Biochem. Biotechnol.* **11**: 101-109.
6. Francesco, A, L. Giancarlo, and G. Anacleto. 1990. Method for selectively increasing the ratio of single major components of teicoplanin A2 complex. *U.S. Patent 4,927,754*.
 7. John. F. and A. Roservear. 1973. An assessment of the fractionation of carbohydrate on concanavalin A-sepharose 4B by affinity chromatography. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* **1973**: 2042-2045.
 8. Kim, C. J., H. R. Park, D. J. Park. 1999. Novel variant *Actinoplanes teicomyceticus* MSL 2211 and teicoplanin produced therefrom. *Patent No. 0321305*.
 9. Kim, C. J., H. R. Park, D. J. Park, 1999. Process for purifying teicoplanin and teicoplanin prepared therefrom. Patent No. 03211304.
 10. Lee. J. C., H R. Park, D. J. Park, K. H. Son, K. H. Yoon, Y. B. Kim and C. J. Kim. 2003. Production of teicoplanin by a mutant of *Actinoplanes teicomyceticus*. *Biotechnol. Lett.* **25**: 537-540.
 11. Martin, J. W. 1996. The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin. 1996. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**: 209-222.
 12. Parenti, F., G. Beretta, M. Berti, and V. Arioli. 1978. Teicomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teicomyceticus* nov. sp. I. Description of producer strain, fermentation studies and biological properties. *J. Antibiotics* **31**: 276-283.
 13. Pryka, R. D. 1988. Teicoplanin: An investigational glycopeptide antibiotic. *Clin. Pharm.* **7**: 647-658.
 14. Snipes, C. E. and J. S. Coleman. 1987. Extraction of teicoplanin A2 from whole culture fermentation broth. *U.S. Patent 4,696,817*.
 15. Zeckel, M. L. 1997. A closer look at vancomycin, teicoplanin and antimicrobial resistance. *J. Chemother.* **9**: 311-335.

(Received Jan. 17, 2003/Accepted Apr. 21, 2003)