

Internal Adsorbent가 부착된 Bioreactor를 이용하여 *Serratia* sp. KH-95로부터 생산된 Prodigiosin의 분리 및 정제

송민정, 배정돈, 김창호*, 김승욱, 홍석인
고려대학교 화학공학과, Bio Network*

Isolation and Purification of Prodigiosin from *Serratia* sp. KH-95 by a Bioreactor with an Internal Adsorbent

Min-Jung Song, Jungdon Bae, Chang-Ho Kim*, Seung-Wook Kim, Suk-In Hong
Department of Chemical Engineering, Korea University,
BIO NETWORK*

서론

기관 이식 시장이 확대됨에 따라, 면역억제제의 사용이 증가되고, 그에 따른 연구가 진행되고 있다. 기존의 면역 억제제는 비정상 세포 뿐만 아니라, 정상 세포의 기능도 억제함으로써 여러 가지 부작용들이 생겼다. 이에 비정상 세포의 기능만을 선별적으로 저해하는 새로운 면역억제제인 prodigiosin이 대두되었다. 이 prodigiosin은 *Serratia* 계열의 균주로부터 생산되어지는 색소 속에 들어 있는 것으로, 기존의 균주의 색소 생산량은 10~100 mg/L로 매우 낮아 공업화에 관한 연구는 이루어지지 못하고 있는 실정이다(1). 반면에 본 연구에서 사용되어진 *Serratia* sp. KH-95에 의해서 생산되는 prodigiosin계 색소는 BIA (Bioreactor with Internal Adsorbent)를 이용할 경우 최종농도가 약 13.08 g/L로 월등한 생산성을 보인다(2). 본 연구에서 사용되어진 생물 반응기 BIA는 product inhibition을 막아줌으로써 색소 생산성을 증가시킬 뿐만 아니라, 회수를 용이하게 하는 잇점을 가지고 있다. 그러나, 아직 *Serratia* sp. KH-95에 의해서 생산되는 prodigiosin계 색소의 구조가 명확하게 밝혀지지 않았기에 분리 및 정제를 통하여 이것이 prodigiosin과 같은 구조임을 보인다면 면역억제제의 대량 생산은 가능하다고 본다. 본 연구는 *Serratia* sp. KH-95에 의해 대량 생산된 색소를 기기분석을 통해 분리·정제하여 그 구조를 밝히려 했다.

실험 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배지조성

충북 음성의 토양에서 직접 분리한 prodigiosin계 적색 색소를 생산하는 *Serratia* sp. KH-95 (KFCC-10970)은 10 g/L dextrose, 10 g/L yeast extract, 10 g/L peptone, 20 g/L agar를 함유한 한천배지를 사용하여 28°C에서 24시간 동안 배양 후 1달 간격으로 계대 배양하여 4°C에서 냉장 보관하여 유지하였다. 10 g/L bacto peptone, 10 g/L yeast extract, 2 g/L K₂HPO₄, 10 g/L dextrose를 종균배지로 사용하여 500 ml Erlenmeyer flask에 50 ml을 만들어 28°C, 200 rpm에서 12시간 동안 배양 후 2% (v/v)를 생산 배지에 접종하였으며 생산 배지 조성은 20.0 g/L casein, 1.7 g/L K₂HPO₄, 1.0 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 1.0 g/L NaCl로 초기 pH는 멸균하기 전 7.0으로 조정하였다. 이 때 foam 발생을

방지하기 위해 antiform을 0.05% (v/v) 넣어주었다.

2. 흡착제

Diaion HP-20 수지 (Sigma)는 순수한 isopropyl alcohol에 12시간 동안 유지한 후 증류수로 세척하여 121°C에서 20분간 멸균하여 멸균된 증류수에 보관하였다.

3. 생물 반응기

Internal adsorbent가 부착된 생물 반응기는 반응기 안에 직접 흡착제를 충전시킴으로써 배양 과정에서 생산되는 색소를 즉시 흡착시킬 수 있다. 이는 cell wall 주위에 색소를 제거해줌으로써 균주의 색소 생산량을 증가시킬 뿐만 아니라, 배양을 마친 후 색소 회수에도 편리하다.

4. 생산 방법

Internal adsorbent에 흡착제를 충전시킨 후 전처리 과정을 거친 후 이를 생물 반응기에 넣고 500 rpm, 28°C에서 24시간 배양하였다. 배양을 끝낸 후, internal adsorbent를 꺼내어 물로 씻어내고 이를 1시간 동안 냉동 보관하였다가 흡착제에 흡착된 색소를 methanol로 추출하였다. 이 때 추출된 색소를 0.1 N HCl로 pH 3으로 보정하였다.

5. 분석 방법

회수된 색소를 농축한 후, 12000 rpm에서 30분간 원심분리해서 상등액을 취하였으며 이를 filtration을 통해 particles를 제거하고, fatty acids나 수용성 불순물을 제거하기 위해 n-hexane, methanol, water로 각각 상분리 시킨다. 농축한 sample를 silica-gel 칼럼을 이용하여 용매로서 n-hexane : ethyl-acetate = 2 : 1 조성으로 1차 분리 한 후 농축하였다. 2차 분리를 위해 TLC상에서 용매 조성이 chloroform : methanol = 95 : 5에서 재 분리하였다. Preparative TLC plate (Aldrich, Z265810)에서 색소를 acetone으로 추출하였고, 이를 12000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액만 취하여 filtration시켜 농축하였다. 이 작업은 TLC plate에 단일 band가 확인될 때까지 반복한 후 농축액 5 ml에 0.1 N HCl로 pH 3을 보정하여 chloroform을 넣고 다시 농축하였다. 시료를 채취해 UV/Vis. spectrum, FT-IR, ESI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 기기분석을 하였다.

결과 및 토의

TLC 분석 결과 R_f 값이 0.45였으며, 기기 분석 결과 UV/Vis. spectrum에서 산성·중성 용액에서 최대 흡수 피크는 535 nm, 염기성 용액에서 470 nm로 (Fig. 1), 기존 문헌상에 알려진 prodigiosin의 것과 동일한 결과를 얻을 수 있었으며, 이를 토대로 Prep-HPLC를 이용하여 대량으로 순수 분리할 수 있었다 (Fig. 2). 분리된 compound의 분자량을 확인하기 위하여 ESI-MS를 이용한 기기분석을 실시한 결과 Fig. 3에서와 같이 주 피크의 (M+H)⁺가 m/z 324으로 확인되어 본 색소의 분자량은 prodigiosin과 동일한 323으로 확인되었다. FT-IR spectrum (CHCl₃)을 이용하여 분석을 실시한 결과 Fig. 4에서와 같이 3370 cm⁻¹의 흡수 피크로부터 N-H 결합, 2840~2920 cm⁻¹의 피크로부터 C-H aliphatic 결합 등을 확인함으로써 기존 문헌상에 알려진 prodigiosin의 것과 동일한 pattern임을 알 수 있었다. ¹³C-NMR, ¹H-NMR data 비교 결과, prodigiosin의 것과 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 5, Fig. 6).

따라서, *Serratia* sp. KH-95에 의해서 생산된 compound는 prodigiosin임을 확인하였다.

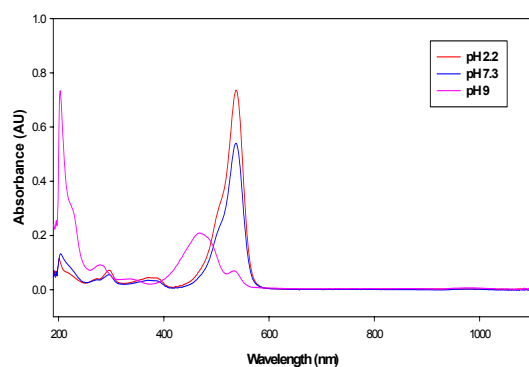


Figure 1. UV/Vis. spectrum of the red pigment as pH change.

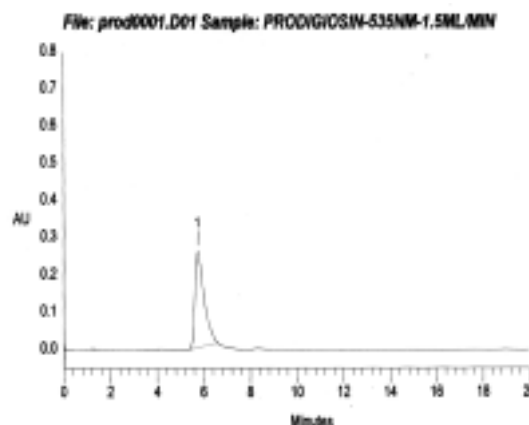


Figure 2. HPLC profile of the red pigment at 535 nm.

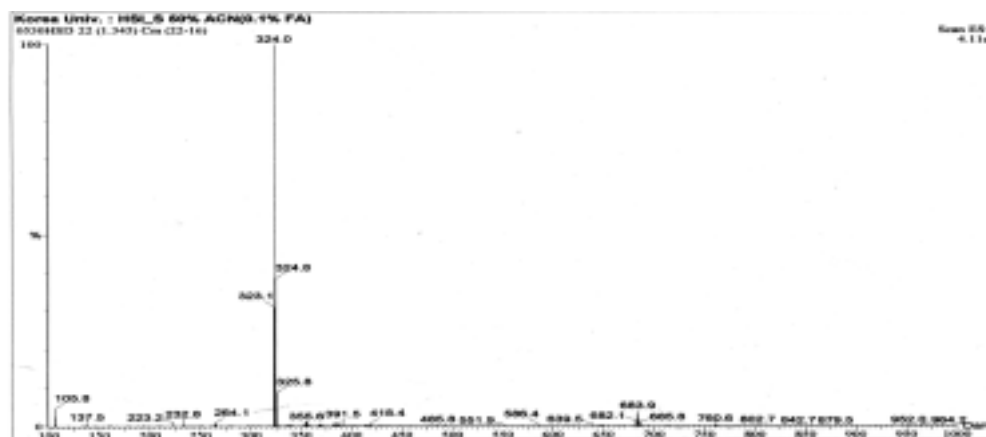


Figure 3. ESI-MS spectrum of the red pigment produced by *Serratia* sp. KH-95.

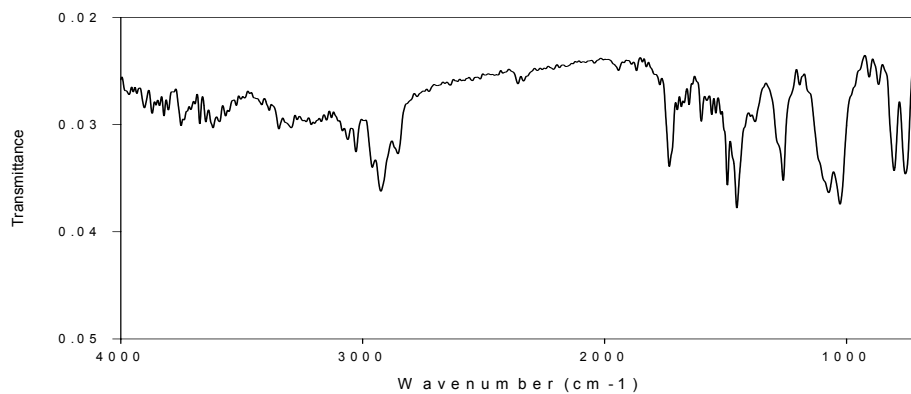


Figure 4. FT-IR spectrum of the red pigment produced by *Serratia* sp. KH-95.

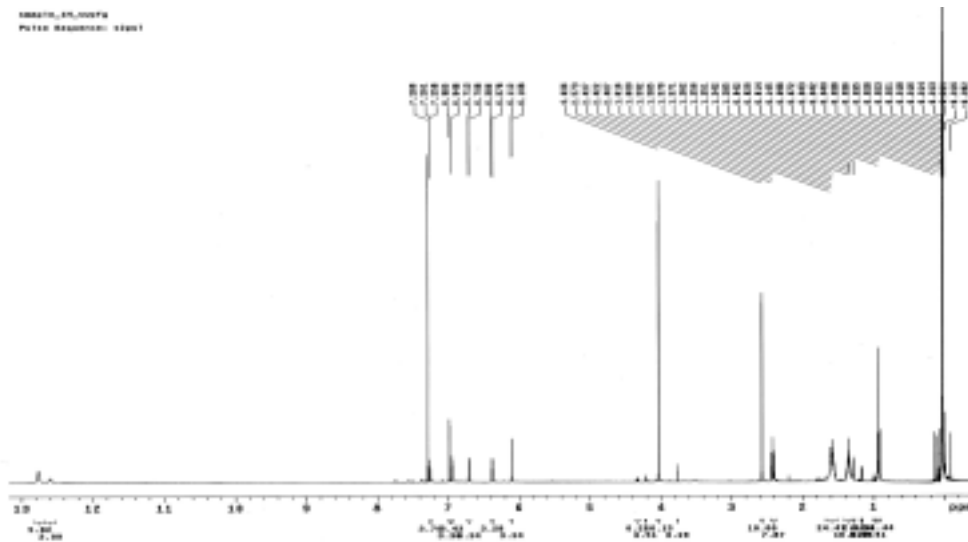


Figure 5. ^1H -NMR spectrum of the red pigment produced by *Serratia* sp. KH-95.

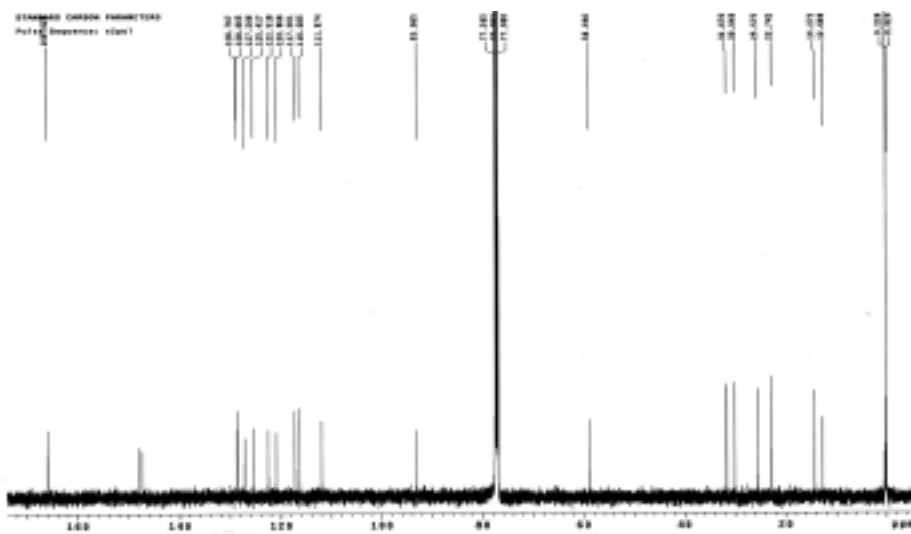


Figure 6. ^{13}C -NMR spectrum of the red pigment produced by *Serratia* sp. KH-95.

참고문헌

1. Kim, C. H., Kim, S. H., Hong, S. I.: *Kor. J. Appl. Microbiol., Biotechnol.* **26**, 4, 283-289 (1998)
2. Bae, J. D., Moon, H. S., Oh, K. K., Kim, C. H., Lee, D. S., Kim, S. W. & Hong, S. I. : *Biotechnol. Lett.*, **23**, 1315-1319 (2001)
3. Cang, S., Sanada, M., Johdo, O., Ohta, S., Nagamatsu, Y. & Yoshimoto, A. : *Biotechnol. Lett.*, **22**, 1761-1765 (2000)