

Preparative HPLC를 이용한 KRF-001의 대량분리정제

이 항우·김무경·정태숙·복성해

한국과학기술연구원 유전공학연구소

Large Scale Purification of KRF-001 on the Preparative HPLC

Hang-Woo Lee, Moo-Kyung Kim, Tae-Sook Jeong and Song-Hae Bok

Genetic Engineering Research Institute, KIST, Yusung P. O. Box 115, Taejon 305-600, Korea

ABSTRACT

Large scale purification to get antifungal antibiotic KRF-001 of 90% purity, was investigated using preparative HPLC. Crude KRF-001 was purified by XAD-7 adsorption chromatography, acid precipitation and microfiltration. Microfiltration was the most effective isolation method of crude KRF-001. The purification methods using C_{18} chromatography was convenient compared with the conventional methods. Delta PAK C_{18} column and Bonda PAK C_{18} column were adapted large scale purification of KRF-001. Gradient system of prep HPLC using Delta PAK C_{18} column was more effective. With these conditions, final recovery of KRF-001 yielded 77%.

서론

Bacillus subtilis subsp. *krietiensis* ATCC 55079가 생산하는 KRF-001은 각종 진균중에 광범위한 항균력을 나타내는 항진균 활성물질이며 피부자극성 시험과 급성경구 독성시험 등에 따른 의약품으로서의 활용방안 등 그 활용범위가 다양해지고 있다. 따라서 KRF-001의 산업화를 위해서 배지의 최적화, 균주개량, 분리정제기술의 간편화가 시도되고 있는데, 일반적으로 생물공학 제품의 직접생산비 중 원료와 발효부분을 합하여 전체의 30~40%, 정제비용이 60~70%를 차지하고 있고 유전자공학을 이용한 의약품인 경우는 정제부분이 전체 생산비의 90%를 차지하기도 하여 분리정제기술의 간편화가 이루어진다면 산업화의 막대한 생산비를 절감할 수 있을 것이다(1-4). 본 연구에서는 소량발효에서부터 산업

화를 위한 전 단계로 대량발효에 이르는 대량분리정제 공정의 확립을 목표로 하였다. 소규모 분리정제 방법을 토대로 하여 8ℓ에서 100ℓ까지 scale up한 발효액에 대해 막여과, 산침전법, XAD-7 크로마토그래피 등의 다양한 분리정제방법을 응용하여 crude KRF-001을 분리하였다. 또한 중간 분리정제단계에서 지금까지와는 달리 C_{18} 크로마토그래피를 적용하여 그 효율을 알아 보았으며, 최종분리정제 단계에서 prep HPLC를 사용하여 KRF-001을 대량 분리정제한 후, 이를 비교 검토한 분리정제공정을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 배양

KRF-001의 생산에 사용된 균주는 *Bacillus*

subtilis subsp. *krichtiensis* ATCC 55079의 자외선 돌연변이주 UV4를 사용하였으며, 배양은 l 당 soy-bean meal 2%, sucrose 3%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 50mg, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 5mg으로 한 공업용 생산배지에서 30°C에서 36시간 배양한 배양액을 본 실험에 사용하였다.

생물활성 검정

Overlay method에 의해 만든 곰팡이 피검균 plate에 cylinder를 놓고 각 분리단계의 시료를 첨가하여 생육저해환의 지름으로 생물활성을 검정하였다(5). KRF-001활성검정에 사용한 피검균으로는 *Candida albicans*와 *Trichophyton mentagrophytes*, *Rhizoctonia solani*였다.

KRF-001의 순도 및 정량분석

순수 KRF-001을 100ppm에서 1,000ppm까지 조제하여 agar diffusion bioassay법(5)에 의해 나타난 저해환의 크기를 각 농도에 plotting하여 나온 표준곡선과 각 농도의 용액을 analytical HPLC로 분석한 KRF-001의 활성분획의 면적(%)의 합을 각 농도에 plotting하여 표준곡선을 만들었으며, 각기 만들어진 표준곡선에 의해서 분리단계별의 순도 및 KRF-001의 양을 결정하였다(9).

균체분리

연속원심분리기(Carl Padberg 30,000rpm)와 Microfiltration system(Sartocon II system, Sartorius-Germany, membrane material: polyolefin, pore size: $0.2\mu m$, area: $0.6m^2$, filtration type: cross flow filtration)을 이용하여 균체와 발효여액을 분리하였다.

Crude KRF-001의 분리 및 농축

분리정제 공정에 있어서 대량시료처리, 회수공정의 간소화와 경제성에 입각하여 산성 침전물 형성 및 유기용매 추출, XAD-7 흡착 크로마토그래피, 막분리를 통한 retentate의 유기용매 추출 방법을 이용하여 crude KRF-001을 분리 농축하였다.

XAD-7 흡착 크로마토그래피

직경 10cm, 높이 90cm의 column에 wet volume 3.2 l 의 XAD-7(Rohm and Hass Co.) 수지를 충전하여 사용하였다. 30ml/min 유속으로 6.8 l 의 시료를 흡착시켰으며, 15 l 의 증류수로 세척하여

흡착되지 않은 불순물을 제거한 다음, 10 l 의 methanol로 유출시킨 활성분획을 감압하에 농축하여 crude KRF-001을 얻었다. 한편, 물에 제거된 불순물 중 KRF-001 유효 성분의 유무를 알아 보기 위해 따로 감압 농축하였다.

산성 침전물 형성 및 유기용매 추출

발효상등액을 천천히 저으면서 5N-HCl을 첨가하여 pH 2.8로 조절한 다음 4°C에서 12시간 이상 정치하였다. 형성된 침전물을 회수하여 이 침전물에 5N-NaOH를 가하여 중화한 다음 동량의 butanol로 4회 추출하고 규조토(diatomaceous Earth, Sigma Co.)로 여과하여 불순물을 제거한 뒤, Thin Film Evaporator(TFE)로 감압농축하여 crude KRF-001을 얻었다.

Microfiltration(MF)에 의한 Retentate의 유기용매 추출

MF system을 이용하여 세포 및 발효여액을 10배 농축시키고 이 농축액에 동량의 butanol로 4회 추출하고 규조토로 여과하여 불순물을 제거한 뒤, TFE로 감압농축하여 crude KRF-001을 얻었다.

KRF-001의 순수분리 정제

역상 실리카겔 크로마토그래피, 실리카겔 크로마토그래피 및 Prep HPLC를 통해 KRF-001을 순수 분리 정제하였으며, 각 크로마토그래피 단계마다 KRF-001의 활성분획은 피검균에 의해 나타난 저해환과 UV를 통해 확인하였다.

실리카겔 크로마토그래피

각종 분리·농축단계에서 얻어진 crude KRF-001의 분말 10g을 용해가 용이한 혼합유기용매(MeOH/Tetrahydrofuran=4/1, v/v) 100ml에 녹인 다음, Ethylacetate(EtOAc)와 MeOH의 혼합용매(9:1, v/v)로 수회 세척된 실리카겔(silica gel 60, 70~230mesh, Merck) column(glass column size: 50 ID×200mm, bed volume: 380ml)에 loading하였다. 흡착된 시료는 세척용매와 동일용매로 비율을 달리하여 용출시키고 최종적으로 100% MeOH로 각각 유출하여 분취한 뒤, 각 분취에 대한 활성을 조사하였다.

역상 실리카겔 크로마토그래피

실리카겔 크로마토그래피를 이용하여 감압농축 건

조된 활성분획의 분할 10g을 증류수에 녹여 wet volume 600ml인 C₁₈ column(Lichroprep[®] RP-18, 40~63 μ m, Merck Co. glass column size: 68 ID \times 55mm)에 loading하였으며, 약 500ml 물로 흡착되지 않은 물질을 제거한 뒤, MeOH농도를 높이면서 약 200ml씩 step-gradient로 용출하고, 최종용매로써 acetonitrile로 용출한 뒤, 각 분획을 정성·정량 분석하였다.

분석용 HPLC

분석용 HPLC(Phenomenex ultracarb 5 0DS (30) 4.6 ID \times 150mm) column을 이용하여 KRF-001의 분리조건을 알아 보았다. 기 분리되어 나온 KRF-001을 MeOH 100, 90, 80, 75, 70% 및 60%의 용매조건으로 유속 0.5ml/min로 40분간 용출시키면서 UV 225nm에서 분리양상을 검토하였다.

분취용 HPLC(Prep HPLC)

분석용 HPLC에서 나온 조건 중 비교적 분리양상이 뛰어난 MeOH 70%와 75% 조건을 Delta PAK C₁₈(column size: 50 ID \times 300mm, particle size; 15 μ m, Waters사) column과 Bonda PAK C₁₈(column size: 47 ID \times 300mm, particle size; 15~20 μ m, Waters사) column을 이용하여 Isocratic 및 Gradient법으로 Delta Prep 4000 System(Waters사 Prep HPLC System)에서 KRF-001을 분취하였다.

결과 및 고찰

생물활성 검정

피검균 *C. albicans*와 *T. mentagrophytes*에 대한 bioassay에서 각 분리단계의 시료 중 KRF-001의 활성이 있는 시료는 저해환을 나타내고 있다. 이와 같은 저해환을 나타낸 시료를 모아 감압농축하였다. 물론 HPLC를 이용한 KRF-001의 분석방법이 정확한 양을 측정하기에는 편리한 점이 있으나 KRF-001의 활성분획의 부분적인 정량분석은 agar diffusion method를 병행하였다.

KRF-001의 분리정제

본 실험실에서는 지금까지 수차에 걸쳐 KRF-001의 분리정제를 시도하여 기존의 분리·정제방법을 확립시킨 바 있다(2). 그러나 KRF-001의 산업화에 따르는 대량발효, 대량분리정제에는 예기치 못한 많

은 문제점들이 나타날 수 있으며, 또한 기존의 방법은 소규모 실험에 적합하고 대량분리, 정제에는 미흡하다고 생각된다. 따라서 crude KRF-001 분리에 있어서 몇 가지 새로운 방법을 시도해 보았고, 또한 역상 실리카겔 크로마토그래피와 prep HPLC방법을 도입하여 대량 분리정제를 시도하였다.

Crude KRF-001의 분리

발효액의 원심분리를 통해 얻어진 침전물과 상등액을 대상으로 한 활성시험에서 상등액만이 활성이 나타나므로 상등액을 주로 하여 XAD-7 흡착크로마토그래피, 산 침전법, 유기용매 추출법 및 MF System을 이용하여 각각 lot별로 달리하여 나온 활성분획을 감압농축하여 crude KRF-001으로 하였다(Fig. 1).

XAD-7 흡착 크로마토그래피

XAD-7은 비극성, 극성물질을 모두 효과적으로 분리할 수 있는 양쪽성 흡착능을 지닌 흡착제로 지

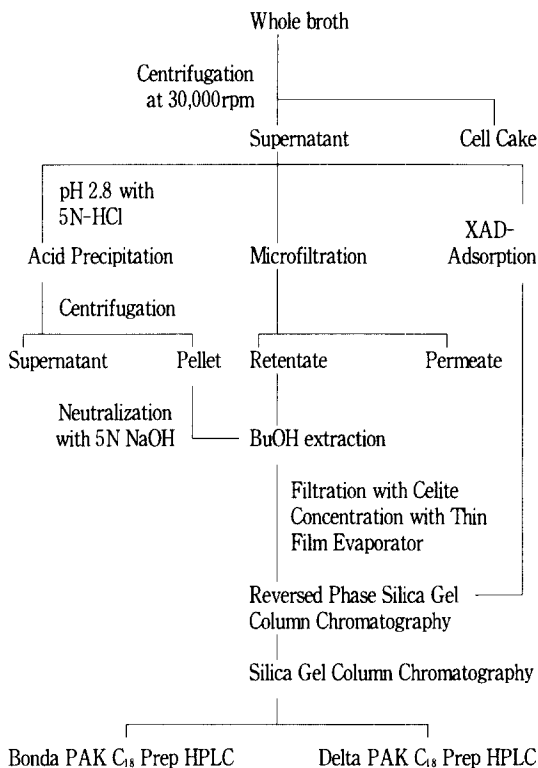


Fig 1. Total purification procedures of KRF-001.

금까지 XAD-7 bed volume의 5배에 해당하는 발효액을 흡착시켜 KRF-001 활성분획을 얻을 수 있었다. 그러나 UV4 발효액의 경우에는 bed volume의 약 2배 정도를 흡착시킨 후 그 pass out 분획에서도 KRF-001의 활성을 나타냈다(Table 1). 이러한 결과로부터 메탄올 용출액으로부터 KRF-001 회수율이 비교적 낮음을 알 수 있고, 물분획을 재처리하여 KRF-001 활성분획을 회수할 수도 있으나, 대량치료 처리의 경우는 공정처리상 많은 문제점이 따른다고 생각된다. 따라서 KRF-001의 대량치료 처리에는 XAD-7 흡착법의 도입이 비효율적인 것으로 판단되어 MF 및 산 침전법에 대해 검토하였다.

MF System에 의한 KRF-001의 농축

먼저 원심분리 대신에 400mesh의 체를 이용하여 발효액 중의 대다수 고형 산물을 제거한 다음, 막면적 1.2m²의 MF system에서 공급유량과 순환유량 및 back pressure를 조절하여 ATP(Average Transmembrane Pressure)를 일정조건으로 유지시키면서 막분리를 행하여 retentate와 permeate로 나누었다. 이때 농축은 약 10배까지 가능하였으며 (Table 2), retentate를 처음 부피로 희석한 것과 원액 그리고 permeate 3부분으로 나누어 bioassay를 하였다. Fig. 2에서 보는 것처럼 permeate의 flux는 시간이 경과함에 따라 급격히 떨어지면서 1.5배 이상 농축 되었을 때 안정된 flux를 가지는 경향이 있었다. 이는 400mesh로 여과를 시켜 대다수 고형성분은 제거되었지만 생산균 및 발효액 중의 여러 성분들이 membrane 표면에 cake층을 만들어 가면서 여과되는 결과로써 permeate에 KRF-001 활성이 남아 있는 것은 분자량이 약 500~1,000 정도인 lipopoly-

peptide계의 KRF-001의 일부가 여과초기 단계에 membrane pore를 빠져 나가는 것으로 생각되고, 이들을 산침전법에 의해 회수시켰을 때 그 양은 대량정제에 있어 전체의 5% 미만에 지나지 않았고 대부분의 KRF-001는 retentate에 잔류하는 것으로 보아 대량정제공정에는 용이한 방법이라 생각된다. 한편, Table 2의 bioassay한 결과에서 10배 농축된 retentate 원액은 피검균에 대해 전혀 활성이 나타나지 않았으나, 6배 희석한 액에서 활성이 나타난 것은 발효액 중에 존재하는 KRF-001 이외의 물질도 함께 농축된 것으로 볼 수 있다. bioassay는 반드시 피검균 agar 표면으로 물질이 확산되어야만 그 결과를 볼 수 있는데 KRF-001 외의 다른 고농도의 농축물이 KRF-001의 확산을 저해하여 저해환 형성

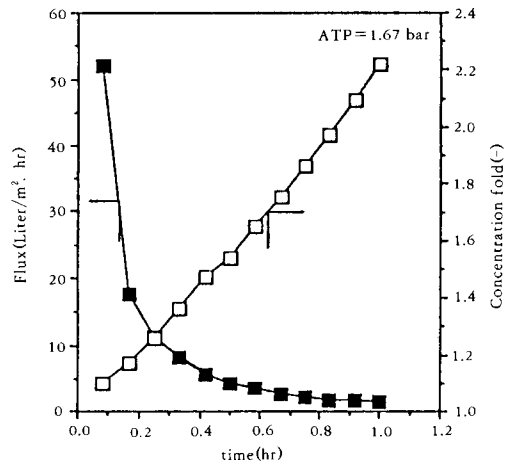


Fig 2. Performance of microfiltration for concentration with UV4 fermentation broth.

Table 1. Comparison of bioactivity on the fractions of XAD-7 adsorption chromatography against various test microorganisms.

*Test Organisms		Samples	Whole broth	XAD-7 Fraction	
				Pass out	MeOH Eluate
I. D. (mm)	<i>C. albicans</i>		17	18	11
	<i>R. solani</i>		19	9	16
	<i>T. menta.</i>		24	12	22

**C. albicans* : *Candida albicans*
R. solani : *Rhizoctonia solani*
T. menta. : *Tricophyton mentagrophytes*
 I. D. : Inhibition Zone Diameter

Table 2. Comparison of bioactivity on the fractions of microfiltration against test microorganisms.

*Test Organisms		Samples	Permeate	Retentate	
				6 folds Dilution	1 fold retentate
I. D. (mm)	<i>C. albicans</i>		12	24	—
	<i>T. menta.</i>		15	23	—

**C. albicans* : *Candida albicans*
T. menta. : *Tricophyton mentagrophytes*
 I. D. : Inhibition Zone Diameter
 (—) : Not detected.

을 방해한 것으로 사료된다.

염산침전물의 유기용매 추출법

천천히 stirring하면서 5N-HCl을 가하여 pH2.8로 조절한 다음 4℃에서 12시간 이상 정치시켰다. 형성된 침전물을 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 침전물을 5N-NaOH로 중화하였다. 중화된 액에 KRF-001의 추출력이 뛰어난 부탄올을 동량씩 가하여 충분히 다음 bioassay를 통하여 회수율을 높이기 위하여 통상 4회 정도 추출하였다. 한편, MF system에서 얻어진 retentate 또한 같은 방법으로 부탄올로 추출하였으며, 추출액을 구조토로 여과한 다음 감압 농축하여 crude KRF-001을 얻었다. 이 상과 같이 crude KRF-001의 분리·정제에서의 효율은 막분리를 통한 회수율이 가장 높았으며 다음으로 흡착법에 의한 회수율이 50% 정도였으나 회수 전체공정을 감안할 때 물층에 대한 KRF-001의 회수는 대량정제의 경우 비경제적임이 판단되었다 (Table 3).

KRF-001의 순수분리정제

Crude KRF-001을 감압농축하여 실리카겔 크로마토그래피와 역상 실리카겔 크로마토그래피를 하였으며, 분취용 HPLC에서 최종 분리정제를 하였으며,

이것을 분석용 HPLC에 크로마토그래피하였을 때 나타난 KRF-001의 활성분획을 표준곡선에 적용하여 90% 순도를 가진 KRF-001을 얻었다. 또한 각각의 분리정제 단계별 KRF-001의 순도는 동일한 방법으로 측정하였다.

실리카겔 크로마토그래피

산소와 수소 원자가 3차원 그물구조로 연결되어 있으며 실리카겔 입자 각각은 말단의 실리콘 원자가 OH group(silanol group)들로 포화된 다공성 구조를 갖는 실리카겔은 고정상의 극성이 이동상의 극성보다 높은 순상 크로마토그래피라고도 한다. 여러 가지 기공과 입자의 크기를 가진 실리카겔 중 일반적으로 사용 가능한 Si-60(pore size, 60 Å)을 이용하여 어느 정도 큰 극성을 띤 KRF-001을 분리 정제하였다. 실리카겔 크로마토그래피에서 문제가 되는 것은 이동상의 용매가 일반적으로 비극성을 띤 용매(EtOAc: MeOH=9:1)로부터 용출을 시작하므로 이동상의 용매보다 극성을 더 띤고 있는 KRF-001을 녹이기가 용이하지 않다. 따라서 이동상 용매에서 결정화되지 않고 완전히 녹일 수 있는 용매를 선정하는 것이 시급한 일이었다. 검토한 용매 중, THF(tetrahydrofuran)는 비극성이지만 용해도가 뛰어나므로 MeOH과 혼합된 용매(MeOH/THF=4/1, v/v)에서 crude KRF-001을 용해시켜 실리카겔 크로마토그래피를 하였다. 한편, 각각의 용출분획은 실리카겔에 흡착되었다가 용출되는 띠(band)로 달리하였다. 각 분획을 피검균에 대해 bioassay를 하였을 때 (Table 4), 저해환을 나타내는 4~8까지의 분획을 모아 감압농축하였다. 이때 분석용 HPLC를

Table 3. Partial purification yields of crude KRF-001 on various purification steps.

Partial purification Method	XAD-7*		APN**	MF-System***
	H ₂ O+P.O.	MeOH		
Total treated Vol (l)	6.8	6.8	7.3	57.30
Initial conc.of broth (ppm)		620	800	57.3
Purified and recovered				750
final conc.(ppm)	131	191	356	509
Partial recovery	21	30.1		
Recovery(%)		51.1	44.5	67.9

*XAD-7: XAD-7 Adsorption chromatography
 **APN: Acid precipitation
 ***MF-System: Retentates of ultrafiltration were concentrated 10 folds against whole broth.
 Initial concentration and purified final concentration were calculated from bioassay standard curve.

Table 4. Comparison of bioactivity on the fractions of silica gel chromatography against test microorganisms.

Fraction No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Eluate		EtOAc(9): 1:1			1:9			MeOH(1)			
*Test organisms		MeOH(1)									
I.D. (mm)	<i>C. albicans</i>	-	-	-	8	18	20	20	13	-	
	<i>T. menta.</i>	-	-	-	10	22	25	25	15	-	

**C. albicans* : *Candida albicans*
T. menta. : *Tricophyton mentagrophytes*
 I. D. : Inhibition Zone Diameter
 (-) : Not detected.
 EtOAc(Ethylacetate) : MeOH(Methanol)=9:1(v/v)

통하여 순도가 약 37% 정도임을 확인할 수 있었고, KRF-001보다 비극성인 물질의 대부분이 제거됨을 알 수 있었다(Table 6).

역상 실리카겔 크로마토그래피

순상 실리카겔 크로마토그래피에 반해 역상 크로마토그래피는 고정상의 극성이 이동상보다 낮아서 순상 크로마토그래피와는 모든 것이 정반대로 행해진다. 본 연구에 사용된 역상 크로마토그래피에서 고정상으로는 화학적으로 변화시킨 실리카겔로써 여기에 사용되는 물질은 비극성 유기 기능기로서 octadecyl(C₁₈)을 사용하였는데, 역상 충전물은 실리카겔보다 고가이지만 평형시간이 짧고, 극성물질 분리에 적당하며, 수용성 물질을 쉽게 분리해 낸다는 장점이 있다. 이동상은 용매강도면에서 물이 가장 약한 용매이며 극성이 감소할수록 용매강도가 증가하게 되므로 이동상은 일반적으로 물 또는 물과 잘 섞이는 다른 용매를 섞어서 사용하게 된다(7). 따라서 역상 실리카겔 크로마토그래피에서는 시료를 물에 녹여서 크로마토그래피하여 각 분획을 bioassay하였다(Table 5). 역상 실리카겔 크로마토그래피에서 나온 각 분획에 대한 bioassay에서 5, 6, 7, 8의 분획이 KRF-001활성을 나타내었다. 역상 실리카겔 크로마토그래피에서는 KRF-001의 순도가 60%임이 분석용 HPLC로 확인(Table 6)되었으며, KRF-001보다도 극성인 물질이 제거되었음을 알 수 있었다.

HPLC

분석용 HPLC

분석용 HPLC column(Phenomenex ultracarb 5

Table 5. Comparison of bioactivity on the fractions of reverse phase silica gel(C₁₈) chromatography against test microorganisms.

Fraction No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Eluate		H ₂ O 9:1		7:3	5:5	3:7	1:9	MeOH		MeCN
*Test organisms										
I. D.	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	14	19	16	13	-
(mm)	<i>T. menta.</i>	-	-	-	-	18	19	15	13	-

**C. albicans* : *Candida albicans*

T. menta. : *Tricophyton mentagrophytes*

I. D. : Inhibition Zone Diameter

(-) : Not detected.

MeOH : Methanol, MeCN : Acetonitrile

ODS(30) 4.6ID×150mm)을 이용하여 KRF-001의 분리조건을 알아보았다. 기분리되어 나온 KRF-001을 100, 90, 80, 75, 70% 및 60% MeOH의 용매조건으로 유속 0.5ml/min로 40분간 용출시키면서 UV 225nm에서 검토하였다(Fig. 3). 100%와 90% MeOH에서는 KRF-001이 전혀 분리되지 않았으며 80% MeOH에서는 색소와 함께 분리되었고, 60%와 70% MeOH에서 분리하는 가능하나 분리시간이 길어서 비효율적이었으며 75% MeOH에서 가장 좋은 분리양상을 나타냈다. 75% Methanol 조건에서는 6개로 이루어진 complex(2, 8) 중 KRF-001의 2, 3번 분획이 분리되지 않고 있으나, 대량분리 정제에서 complex 자체가 목적이므로 이 조건을 분취용 HPLC에 그대로 적용할 수 있었다. 이미 언급된 KRF-001의 정량분석을 위한 표준곡선 표식에도 역시 이 조건을 그대로 적용하였다.

분취용 HPLC

분석용 HPLC에서 나온 조건 중 분리양상이 가장 뛰어난 70%와 75% MeOH 조건을 Bonda PAK C₁₈ column과 Delta PAK C₁₈ column을 이용한 분취용 HPLC에 적용하여 각각 유속 30ml/min, 1800~2100psi로 UV 225nm에서 80분간 용출하였다. Bonda PAK C₁₈ column을 이용한 분리조건 검토에서 75% MeOH와 70% MeOH조건에서 Fig. 4에서 보는 것처럼 분리양상은 비슷하나 75% MeOH 조건에서 분리시간이 훨씬 단축되었다. 따라

Table 6. Total purification yield of crude KRF-001 on various chromatography steps.

Purification step	Total weight (g)	Purity (%)	Total p.i. ⁴ (g)	Purification fold (-)	Recovery yield (%)
1) BuOH Ext.	140/4,211	13	18.20	1.00	100
2) Silica Gel Column	45	37	16.65	1.09	91
3) C ₁₈ -Column	21	60	12.60	1.13	69

1) BuOH Ext. : Butanol extracts.

2) Silica Gel Column : Silica gel chromatography.

3) C₁₈-Column : Reverse phase silica gel chromatography.

4) Total p.i. : Total pure ingredient weight.

** The purification data presented here are used for 140/4,211g BuOH extracts.

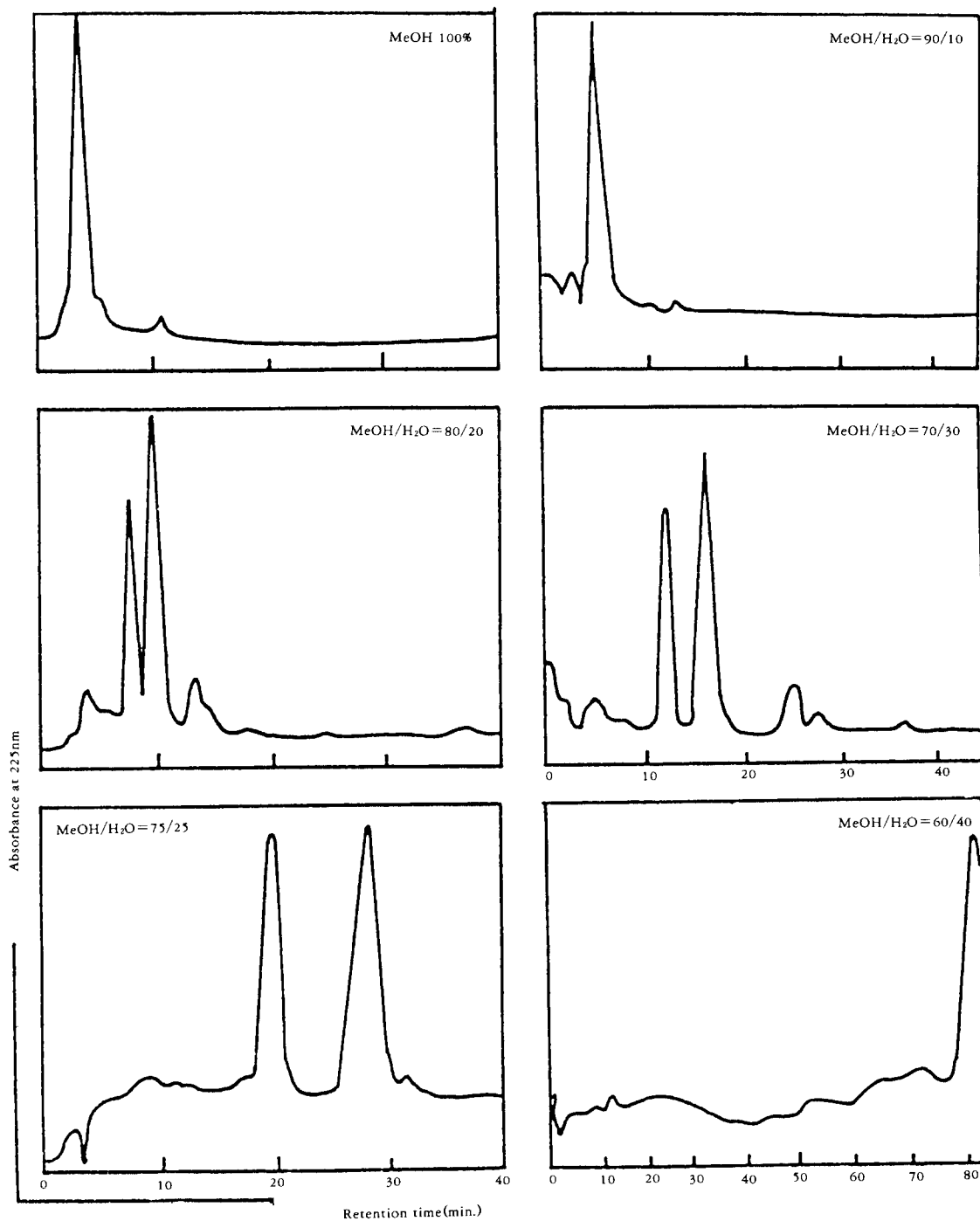


Fig 3. Elution profiles of KRF-001 according to various MeOH concentrations on the analytical HPLC. Analytical conditions; UV 225nm, flow rate 0.5ml, column: Phenomenex Ultracarb 5 ODS(30) 4.6 ID \times 150mm.

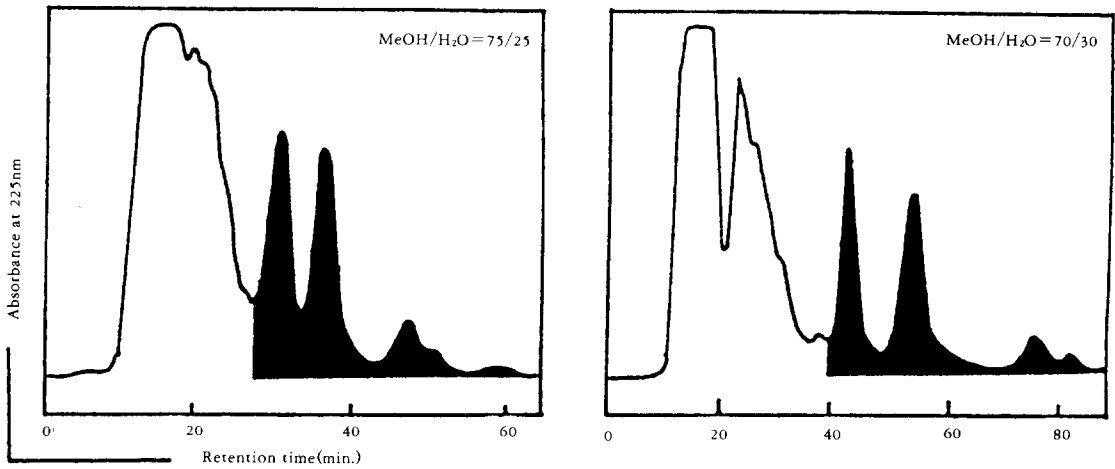


Fig 4. Isocratic Elution profiles of KRF-001 according to optimized MeOH concentrations using Bonda PAK C_{18} column on the preparative HPLC. Black area are the active portion of KRF-001.

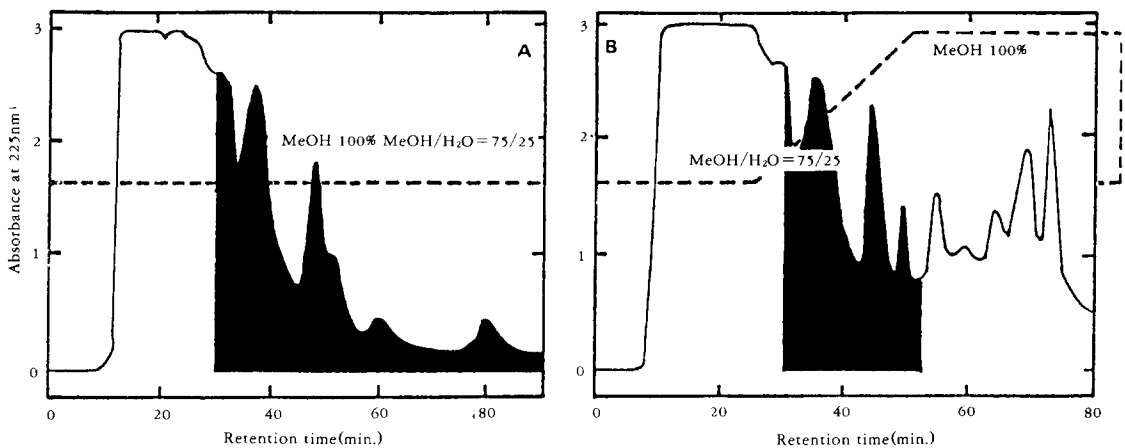


Fig 5. Isocratic(A) and gradient(B) elution profile of KRF-001 using Bonda PAK C_{18} column on the preparative HPLC. Each fractions were collected every 4 mins. Sample injection weight are 3.6g

서 Bonda PAK C_{18} column에서는 75% MeOH을 분리조건으로 하였고, 60%순도의 KRF-001 3.6g을 isocratic elution(Fig. 5(A))과 25분까지 75% MeOH, 50분까지 75% MeOH~100% MeOH 농도로 linear gradient, 80분까지 100% MeOH을 흘리는 방법으로 분취하였을 때(Fig. 5(B)), isocratic elution에서는 90% 순도의 KRF-001 1.38g을 linear gradient elution에서는 90% 순도의 KRF-001 1.56g을 얻을 수 있었다. 따라서 Bonda

PAK을 이용한 대량 분리정제는 회수율이 높고 분리시간이 빠른 linear gradient방법을 이용하였다. Delta PAK C_{18} column을 이용한 분리조건 검토에서는 Fig. 6에서 보는 것처럼 분리양상은 비슷하였으나 70% MeOH 조건에서 색소가 더 잘 분리되므로 이를 Delta PAK C_{18} column의 분리조건으로 하였고, isocratic elution(Fig. 7(A))과 0분에서 25분까지 70% MeOH, 25분에서 50분까지 70~100% MeOH의 농도로 linear gradient로 용출하

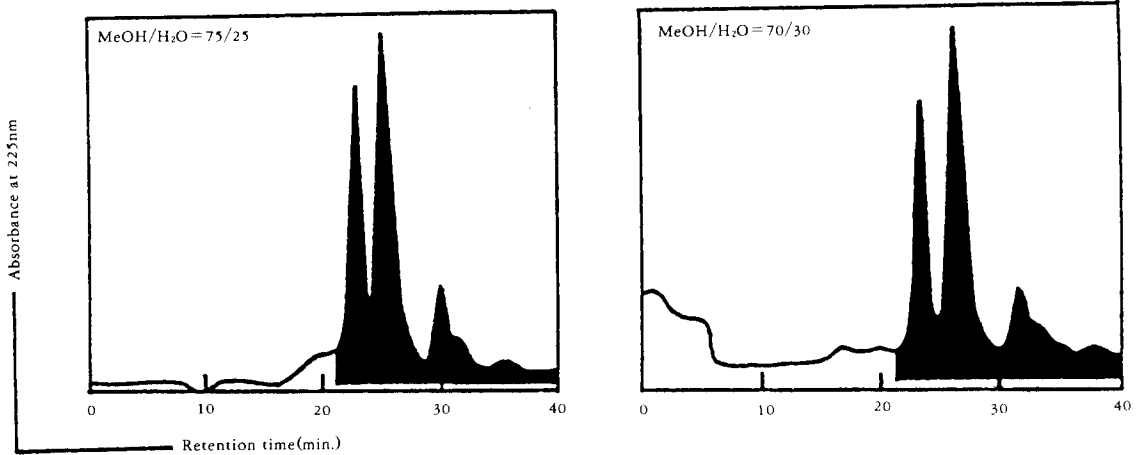


Fig 6. Isocratic elution profiles of KRF-001 according to optimized MeOH concentrations using Delta PAK C₁₈ column on the preparative HPLC.

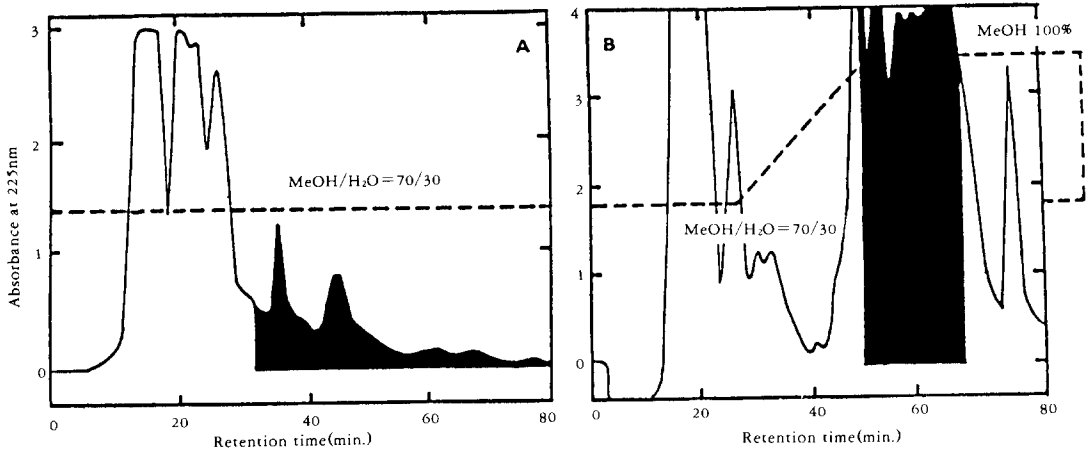


Fig 7. Isocratic(A) and gradient(B) elution profile of KRF-001 using Delta PAK C₁₈ column on the preparative HPLC. Each fractions were collected every 4 mins. Sample injection weight are 2.78(A), 10.5(B)g

였으며, 50분에서 80분까지는 100% MeOH로 용출하는 linear gradient 방법으로 분취하였다(Fig. 7(B)). 순도 60%의 KRF-001 2.78g을 injection한 isocratic elution에서는 90% KRF-001 1.32g을 얻을 수 있었으며 순도 60%의 KRF-001 10.5g을 injection한 후 linear gradient injection방법으로 90% KRF-001 6.30g을 얻을 수 있었다. 또한 용출방법에 있어 linear gradient 방법이 분리시간을 단축할 수 있었고 회수율(77%)에 있어서도 뛰

어남을 알 수 있었다. KRF-001의 대량 분리정제에 있어서 Bonda PAK C₁₈ column과 Delta PAK C₁₈ column의 비교에서는 Delta C₁₈ column의 효율이 훨씬 뛰어났다(Table 7). 그러나 대량 분리정제에 있어서도 loading되는 시료의 양이 많으면 많을수록 column 세척시간이 더 길어지고 활성부위가 뒤로 밀려가는 양상을 나타냈다. 따라서 위의 최적조건으로 분리할 수 있는 시료의 양은 column capacity를 감안할 때 약 5g의 시료가 적당하였다.

Table 7. Total purification yield of pure KRF-001 using two preparative columns with the gradient and isocratic preparative HPLC system.

Column	Purification method	Total weight (g)	Purity (%)	Total ¹⁾ p.i. weight (g)	Recovery* (%)
Delta PAK C ₁₈	Gradient	10.50	60	6.30	
		5.37	90	4.83	77
Bonda PAK C ₁₈	Isocratic	2.78	60	1.67	71
	Gradient	3.60	60	2.16	
		1.56	90	1.40	65
	Isocratic	3.60	60	2.16	
		1.38	90	1.24	57

요 약

항진균물질 KRF-001의 분리정제 공정에 있어서 XAD-7 크로마토그래피, 산침전법, microfiltration을 사용하여 crude KRF-001을 분리정제하였을 때, microfiltration 방법이 기존의 다른 두 방법보다도 회수율이 2~3배 뛰어난 것으로 판명되었으며, 실리카겔 크로마토그래피, C₁₈ 크로마토그래피법을 이용하여 분리정제방법을 간소화할 수 있었다. 또한 Bonda PAK C₁₈ column과 Delta PAK C₁₈ column을 prep HPLC에 사용한 결과, 순도 90%

KRF-001의 대량분리 정제가 가능하여 산업화시 이를 이용할 수 있는 기초를 확립하였다.

참고 문헌

1. S. U. Kim, J. W. Lee and S. H. Bok(1991), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 337.
2. S. U. Kim, N. K. Lee, T. S. Jeong, Y. K. Kim, J. J. Choi and S. H. Bok(1991), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**(6), 598.
3. 장호남(1990), *생물화학공정*, p. 469, 대영사.
4. K. H. Son, H. K. Kwon, H. W. Lee and S. H. Bok(1991), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 614.
5. E. J. Nkanga and C. Hagedorn(1978), *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **14**(1), 51.
6. A. A. Green and W. L. Hughes(1955), *Method. Enzymol.*, **1**, 67.
7. C. F. Poole and S. A. Schuette(1984): *Contemporary Practice of Chromatography*.
8. J. K. Phae, M. Shoda and H. Kubota(1990), *J. Ferment. and Bioeng.*, **69**, 1.
9. H. W. Lee, M. K. Kim, S. U. Kim, K. H. Son and S. H. Bok(1994), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*(Processing).