



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0138477
(43) 공개일자 2014년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 35/06 (2006.01) *C12N 1/14* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0059069
(22) 출원일자 2013년05월24일
심사청구일자 2013년05월24일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김승욱
서울 노원구 공릉로46길 32, 104동 905호 (공릉동, 삼익아파트)
김성봉
서울 성북구 화랑로 114, 307호 (하월곡동, 대운빌딩)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 6 항

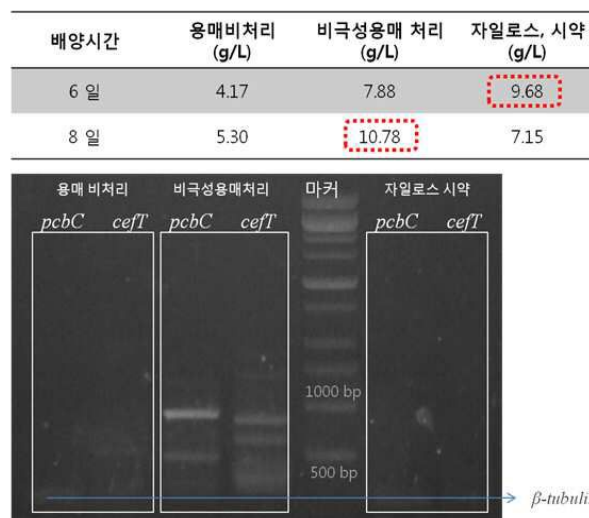
(54) 발명의 명칭 자일로스를 이용한 세팔로스포린 C의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 신규한 세팔로스포린 C의 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 미생물을 이용하여 세팔로스포린 C를 제조하는 방법에 있어서, 탄소원으로 자일로스를 포함하는 배양 배지에서 아크레모니움 크리소지늄 (*Acremonium chrysogenum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 바이오매스의 효과적인 활용이 가능하게 되고, 자일로스를 이용한 세팔로스포린 C의 생산을 통해 공정단가 절감을 실현할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

신현용

경기 군포시 산본로 299, 208동 106호 (금정동, 충무1차아파트)

유하영

서울 성북구 오패산로 90, 122동 1501호 (하월곡동, 삼성래미안아파트)

이상준

서울특별시 용산구 청암동 자이아파트 101-1102

최한석

서울 동작구 사당로23바길 9, 105동 1002호 (사당동, 동작삼성래미안아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 309016-05-5-SB010

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 첨단기술개발

연구과제명 바이오매스활용을 위한 전처리 및 당화공정 시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.04.10 ~ 2014.04.09

특허청구의 범위

청구항 1

미생물을 이용하여 세팔로스포린 C를 제조하는 방법에 있어서, 탄소원으로 자일로스를 2~8%(w/v) 농도로 포함하는 배양 배지에서 아크레모니움 크리소지늄(*Acremonium chrysogenum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법.

청구항 2

미생물을 이용하여 세팔로스포린 C를 제조하는 방법에 있어서, 탄소원으로 바이오매스로부터 분리된 자일로스를 2~6%(w/v) 농도로 포함하는 배양 배지에서 아크레모니움 크리소지늄(*Acremonium chrysogenum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 바이오매스로부터 분리된 자일로스는,

- a) 건조된 바이오매스를 분쇄한 후, 30~50 메시(mesh) 크기로 선별하는 단계;
- b) 상기 선별 단계를 거친 바이오매스를 100~140℃의 온도에서 산으로 가수분해하는 화학적 전처리 단계;
- c) 상기 화학적 전처리 단계를 거쳐 가수분해된 바이오매스를 필터를 이용하여 고체와 액체로 분리하는 단계;
- d) 상기 c)단계에서 얻어진 액체를 첨가하여 상기 a) 내지 c)단계를 2 ~ 5회 반복하여 자일로스가 농축된 액체를 획득하는 단계;
- e) 상기 d)단계를 통해 획득된 자일로스가 농축된 액체를 염기성 용액을 이용하여 중화시키는 단계;
- f) 상기 중화 단계를 거친 액체를 감압증류기를 이용하여 70 ~ 100℃에서 중탕하여 12~24시간 동안 수분을 증발시키는 단계;
- g) 상기 f)단계를 통해 얻어진 액체로부터 유리 섬유 여과지(Glass Micro Fibre Filters: GF/C)를 이용하여 불순물을 제거하는 단계; 및
- h) 상기 불순물이 제거된 액체로부터 비극성 용매를 이용하여 비극성 퓨란(furan)계 물질 및 무극성의 휘발성 물질을 제거하여 정제시키는 단계에 의하여 분리된 자일로스를 얻는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 배양은 24~30℃에서 5~15일간 진탕(shaking)배양하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법.

청구항 5

배지 조성 중 탄소원으로 자일로스를 배지 내 2~8%(w/v) 농도로 포함하는 아크레모니움 크리소지늄을 이용한 세팔로스포린 C 생산용 배지 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 자일로스는

- a) 건조된 바이오매스를 분쇄한 후, 30~50 메시(mesh) 크기로 선별하는 단계;
- b) 상기 선별 단계를 거친 바이오매스를 100~140℃의 온도에서 산으로 가수분해하는 화학적 전처리 단계;
- c) 상기 화학적 전처리 단계를 거쳐 가수분해된 바이오매스를 필터를 이용하여 고체와 액체로 분리하는 단계;
- d) 상기 c)단계에서 얻어진 액체를 첨가하여 상기 a) 내지 c)단계를 2 ~ 5회 반복하여 자일로스가 농축된 액체를 획득하는 단계;

- e) 상기 d)단계를 통해 수득된 자일로스가 농축된 액체를 염기성 용액을 이용하여 중화시키는 단계;
- f) 상기 중화 단계를 거친 액체를 감압증류기를 이용하여 70 ~ 100℃에서 증탕하여 12~24시간 동안 수분을 증발시키는 단계;
- g) 상기 f)단계를 통해 얻어진 액체로부터 유리 섬유 여과지(Glass Micro Fibre Filters: GF/C)를 이용하여 불순물을 제거하는 단계; 및
- h) 상기 불순물이 제거된 액체로부터 비극성 용매를 이용하여 비극성 퓨란(furan)계 물질 및 무극성의 휘발성 물질을 제거하여 정제시키는 단계에 의하여 분리된 자일로스 인 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C 생산용 배지조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 세팔로스포린 C의 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 미생물을 이용하여 세팔로스포린 C를 제조하는 방법에 있어서, 탄소원으로 자일로스를 포함하는 배양 배지에서 아크레모니움 크리소지늄(*Acremonium chrysogenum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 제 2세대 바이오매스에는 리그노셀룰로오스계 바이오매스 (lignocellulosic biomass)와 같은 비식용(inedible) 농업 폐기물, 작물 등이 포함된다. 제 2세대 바이오매스로부터 실질적으로 활용 가능한 성분은 건조된 식물의 세포벽을 구성하는 셀룰로스(cellulose), 헤미셀룰로스(hemicellulose) 및 리그닌(lignin)까지로 정의할 수 있고, 셀룰로스의 경우 6탄당의 글루코스로, 헤미셀룰로스는 5탄당의 자일로스로 가수분해(hydrolysis)가 될 수 있어 당화 공정(saccharification process) 이후에 미생물에 의해 발효가 가능한 당(fermentable sugar)을 회수하는 것이 바이오리파이너리(Biorefinery)의 핵심공정이다. 글루코스의 경우 미생물 배양에 있어 흔히 쓰이는 탄소원이기 때문에 다양한 물질을 생산하는 발효 공정에 광범위하게 쓰일 수 있어서 1차적으로 회수의 대상이 되고 있다. 자일로스 또한 효소에 의해 회수되었을 경우, 5탄당 활용능을 가진 미생물 균주에 의해 활용될 수 있는 탄소원이고, 바이오매스를 효율적으로 활용하기 위해서는 5탄당을 활용하는 공정을 우선적으로 개발해야 한다. 2세대 바이오매스의 경우 견고하고 분해하기 힘든 구조를 지니고 있어 바이오매스를 별다른 처리 없이 당화시킬 경우, 당 회수율이 매우 낮기 때문에 전처리 공정(pretreatment process)이 필수적으로 선행되어야 한다. 물리적, 화학적인 전처리를 따로 또는 동시에 수행하는데 특히 화학적 전처리 중 약산 및 고온을 이용한 약산 전처리가 효과적으로 이에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 약산 전처리는 실링(sealing)된 반응기에 바이오매스와 약산 수용액을 넣고 약 150℃ 전후로 15분 가량 유지시키는 방법으로 비결정질의 자일로스를 주로 제거하고 리그닌도 함께 제거하는 방법이다. 이 과정에서 고온에 의한 열분해와 약산을 촉매로 하는 가수분해 효과를 얻을 수 있으며, 바이오매스 구조에 수분이 스며들어 상기 구조를 부풀어오르게 하여 이후 당화 공정에서 효소의 기질로써의 접근성을 향상시키는 효과를 가지고 있다. 그렇지만 가수분해된 자일로스의 농도가 발효 가능한 농도보다 낮기 때문에 당농도를 농축시키는 방법이 필수적으로 수반되어야 하고, 또한 가수 분해물에 포함되어 있는 자일로스를 활용하기 위해서는 포도당이나 자일로스가 과분해(over-degradation)된 퓨란(furan)계 물질들과 리그닌이 분해되어 녹은 벤젠 고리를 포함하는 휘발성 물질들을 제거해야만 한다. 그렇지 않을 경우, 이후의 발효 공정에서 균주가 성장을 억제 또는 저해 받을 수 있다.

[0003] 세팔로스포린 C는 베타-락탐계(beta-lactam) 항생제로써 아크레모니움 크리소지늄을 이용하여 생산하는 생물공정에서는 지방산 또는 식물성 오일을 이용하여 생산하고 있다. 기존의 탄소원인 지방산이나 식물성 오일의 경우 배지 내에서 완전히 소모되지 않아 분리/정제 비용이 기본적으로 높다. 또한 가격이 매년 증가해 왔으며 바이오디젤의 원료로도 사용되어 앞으로도 계속해서 가격이 상승될 것으로 예상되고 이에 따라 세팔로스포린 C 생산 공정에서 원료 가격의 상승으로 인한 전체적인 공정 비용의 상승이 나타날 것으로 생각된다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 아크레모니움 크리소지늄을 이용하여 세팔로스포린 C 항생제의 생산 시 기존의 탄소원을 대체하여 자일로스를 활용할 수 있음을 발견하였으며, 바이오매스로부터 분리한 자일로스를 활용하여 높은 농도의 세팔로스포린 C를 얻을 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0005] 한편, 대한민국 등록특허 제 10-0720667호에는 슈도모나스 에어루지노사에 의한 트리올레인으로부터 하이드록시 지방산의 제조방법에 관한 기술이 공개되어 있으나, 본 발명에서 사용되는 탄소원으로 자일로스를 포함하여 세

팔로스포린 C를 제조하는 방법과는 상이한 차이점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제 10-0720667호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 바이오매스의 전처리 후 분리한 자일로스를 이용하여 세팔로스포린 C를 생산하는 신규한 세팔로스포린 C의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 세팔로스포린 C의 생산성을 향상시키기 위해 탄소원인 바이오매스로부터 분리한 자일로스를 농축시키는 단계와 불순물 제거 및 미생물의 성장을 저해하는 물질을 제거하는 단계를 포함하여 제조된 바이오매스로부터 분리된 자일로스를 제공하는데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 미생물을 이용한 세팔로스포린 C의 생산에 이용될 수 있는 자일로스를 포함한 특정한 배지(specific medium)조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 미생물을 이용하여 세팔로스포린 C를 제조하는 방법에 있어서, 탄소원으로 자일로스를 2~8%(w/v) 농도 또는 바이오매스로부터 분리된 자일로스 2~6%(w/v) 농도로 포함하는 배양배지에서 아크레모니움 크리소지늄(*Acremonium chrysogenum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은,

[0012] a) 건조된 바이오매스를 분쇄한 후, 30~50 메시(mesh) 크기로 선별하는 단계;

[0013] b) 상기 선별 단계를 거친 바이오매스를 100~140℃의 온도에서 산으로 가수분해하는 화학적 전처리 단계;

[0014] c) 상기 화학적 전처리 단계를 거쳐 가수분해된 바이오매스를 필터를 이용하여 고체와 액체로 분리하는 단계;

[0015] d) 상기 c)단계에서 얻어진 액체를 첨가하여 상기 a) 내지 c)단계를 2 ~ 5회 반복하여 자일로스가 농축된 액체를 수득하는 단계;

[0016] e) 상기 d)단계를 통해 수득된 자일로스가 농축된 액체를 염기성 용액을 이용하여 중화시키는 단계;

[0017] f) 상기 중화 단계를 거친 액체를 감압증류기를 이용하여 70 ~ 100℃에서 증탕하여 12~24시간 동안 수분을 증발시키는 단계;

[0018] g) 상기 f)단계를 통해 얻어진 액체로부터 유리 섬유 여과지(Glass Micro Fibre Filters: GF/C)를 이용하여 불순물을 제거하는 단계; 및

[0019] h) 상기 불순물이 제거된 액체로부터 비극성 용매를 이용하여 비극성 퓨란(furan)계 물질 및 무극성의 휘발성 물질을 제거하여 정제시키는 단계에 의하여 분리된 자일로스 인 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 배지 조성 중 탄소원으로 자일로스를 배지 내 2~8%(w/v) 농도로 포함하는 아크레모니움 크리소지늄을 이용한 세팔로스포린 C 생산용 배지 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따르면, 바이오매스의 효과적인 활용이 가능하게 되고, 자일로스를 이용한 세팔로스포린 C의 생산을 통해 공정단가 절감을 실현할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 본 발명의 바이오매스로부터 분리한 자일로스를 활용하는 공정을 나타낸 전체 개요도이다.
- 도 2는 자일로스 농도에 따른 세팔로스포린 C 생산량의 변화와 미강유(rice oil) 및 글루코스를 탄소원으로 사용했을 때의 생산량을 비교하여 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 자일로스 농도에 따른 아크레모니움 크리소지늄(*Acremonium chrysogenum*)의 세포질량(cell mass)과 미강유(rice oil) 및 글루코스를 탄소원으로 사용했을 때 세포 질량 비교를 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 자일로스를 아크레모니움 균주로 활용할 경우, 세팔로스포린 C를 만드는 세 전구체 아미노산 중 세포 내에서 가장 생산이 적은 시스테인(cysteine)을 시스타치오닌(cystathionine)으로부터 합성하는 효소인 시스타치오닌-γ-리아제(cystathionine-γ-lyase)의 상대 활량(Relative activity: OD)을 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예에서 바이오매스인 역새로부터 자일로스를 2 ~ 4회로 농축하였을 때 얻은 자일로스의 농도를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 비극성 용매를 이용하여 가수분해물 안에 녹아있는 불순물 및 저해 물질들을 제거하는 방법에 대한 개요도 및 본 발명의 실시예에 따른 실험을 수행 하였을때 상(phase)의 변화를 나타낸 사진이다.
- 도 7은 용매를 이용한 저해 물질 분리법에 이용될 수 있는 비극성 용매들의 효과를 대표적인 저해 물질인 푸르푸랄(furfural)의 제거율을 통해 비교하여 나타낸 표이다.
- 도 8은 본 발명의 방법에 따라 역새로부터 분리한 자일로스 용액을 본 발명의 방법에 의해 처리하였을 경우 CPC 생산을 6일 및 8일차에서 확인한 표와 8일차에서 각 비교 배양액에서 배양된 균주의 *pcbC*, *cefT* 유전자의 발현을 나타내는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명은 미생물을 이용하여 세팔로스포린 C를 제조하는 방법에 있어서, 탄소원으로 자일로스 2-8%(w/v) 농도 또는 바이오매스로부터 분리된 자일로스 2~6%(w/v) 농도를 포함하는 배양 배지에서 아크레모니움 크리소지늄(*Acremonium chrysogenum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법에 관한 것이다.
- [0025] 자일로스의 경우 시약의 가격이 대표적인 6탄당 글루코스의 가격과 비교할 때 비싼 편에 속한다. 하지만, 바이오매스로부터 분리된 자일로스, 그 중에서도 산-전처리를 통해 분리된 자일로스의 경우 아직 공정화 되지 않아 정확한 경제성 분석이나 실질적인 상업화는 이루어지지 않았지만, 공정비용 이외에는 원료에 대한 가격이 매우 저렴하다. 특히 산-전처리 과정에서의 자일로스 및 여러 가지 산 가수분해물을 포함한 액체의 활용에 대한 연구가 아직 활발하게 이루어지지 않고 있다. 그러나, 상기 액체의 경우, 산을 포함하는 유기산, 코크스(coke), 리그닌 및 페놀 등을 포함하고 있어 미생물의 발효에는 적합하지 않은 성질을 가지고 있다. 따라서, 산-전처리 공정의 요건을 조절하여 최대한 리그닌 및 리그닌에서 분해된 물질들의 생성을 최소화시키고 중화 단계를 통해 상기 액체를 미생물의 발효에 적합하게 하는 공정이 요구된다. 도 1에서는 본 발명의 전체적인 내용을 나타내었다. 바이오리파이너리의 바이오매스 주 활용 경로는 리그노셀룰로오스로부터 전처리를 하여 자일로스와 같은 섬유질을 둘러싼 물질들을 제거하여 전처리된 바이오매스를 얻은 다음, 이후의 공정으로 글루코스를 활용하는 것이다. 본 발명의 목적은 전처리 과정에서 가수분해되어 전처리액에 녹아있는 자일로스를 활용하는 방법을 제공하는데 있다. 가수분해물은 도 1의 일련의 단계의 처리를 통해 발효가 가능한 수준의 자일로스 용액으로 준비한 후, 영양분을 첨가하고 배양 준비를 통해 세팔로스포린 C 생산을 수행하게 된다.
- [0026] 본 발명의 실시예에서 포도당, 미강유 및 시판되는 자일로스 시약(제조사: 삼진화학(Samchun chemical), 제품명: Xylose)을 각각 이용하여 생산된 세팔로스포린 C의 생산량을 비교한 결과, 도 2에서와 같이 2%(w/v) 글루코스와 2%(w/v) 자일로스를 이용한 세팔로스포린 C 생산의 비교에서 자일로스를 이용한 생산량(약 3.5 g/L)의 최대 농도가 포도당(약 0.8 g/L)에 비해 4배 이상 높은 것으로 나타났다. 또한 3%(w/v) 미강유와의 비교에서는 4%(w/v) 이상의 자일로스 농도에서 모두 미강유를 이용한 세팔로스포린 C 생산 보다 높은 결과를 나타났다. 자일로스를 이용한 최대 세팔로스포린 C 생산량은 6%의 자일로스 농도로 발효를 수행하였을 경우, 120 시간의 배양시간에서 약 8.2 g/L의 세팔로스포린 C 농도로, 본 발명에서는 가장 최적의 탄소원 농도로 나타

났다.

- [0027] 본 발명에서, 상기 자일로스를 탄소원으로 포함한 배양 배지를 이용한 세팔로스포린 C 생산에서 특정 함유량 범위에서는 자일로스의 대사 저해 없이 세팔로스포린 C의 생산이 이루어지는 것을 확인하였다. 자일로스 및 비교 탄소원을 포함한 각각의 배지에 접종된 균주가 접종 직후 배지에서 바로 생장을 시작하여 정지기(stationary phase)를 유지하는 것을 도 3에서 확인할 수 있다. 본 발명의 실시예의 결과 바람직하게는 시약 자일로스 4~8%(w/v)의 농도 범위에서 배지에 포함되는 환경의 경우, 특별한 저해 없이 세포가 성장하고 세팔로스포린 C를 생산하는 것이 확인 되었다.
- [0028] 세팔로스포린 C는 2차 대사물이기 때문에, 아크레모니움 균주가 자일로스를 활용하는 대사 경로를 직접적으로 규명하기는 어려우나 전구체로부터 세팔로스포린 C를 생산하는 대사 경로에서의 주요 효소의 활성을 측정함으로써 자일로스 활용에 대한 간접적인 대사 경로 확인을 진행하였다. 도 4는 배양 시간에 따른 시스타치오닌- γ -리아제(cystathionine- γ -lyase)의 상대 활량(Relative activity: OD) 변화를 나타낸 그래프이다. 시스타치오닌- γ -리아제(cystathionine- γ -lyase)는 시스타치오닌으로부터 시스테인을 합성하는 효소이고, 시스테인은 세팔로스포린 C를 합성하는 세가지 전구체 중 가장 양이 적어 대사 경로상 병목(bottle neck)에 해당하는 물질이기 때문에 시스타치오닌- γ -리아제(cystathionine- γ -lyase)의 활성의 증가는 곧 세팔로스포린 C 합성 경로의 활성이 증가했음을 나타내는 지표가 될 수 있다. 도 4에서 6%의 글리세롤을 탄소원으로 사용하였을 때 보다 약 1.7배 높은 시스타치오닌- γ -리아제(cystathionine- γ -lyase)의 활성을 96시간의 배양 전후에서 확인할 수 있었다. 세포의 건조 무게를 나눠서 단위 세포당 활성으로 계산하였을 경우 8% 자일로스는 세포당 50.279의 활성을 6% 글리세롤의 경우 35.064를 나타내었는데, 세포당 시스타치오닌- γ -리아제(cystathionine- γ -lyase)의 활성이 8%의 자일로스를 활용하였을 경우가 약 1.4배 더 높은 활성을 나타내었고, 세팔로스포린 C 생산은 8% 자일로스의 경우 5일째의 배양에서 약 8.1 g/L를 보였고 6% 글리세롤은 약 6.1 g/L의 생산량에 그쳐서 시스타치오닌- γ -리아제(cystathionine- γ -lyase) 활성이 높은 배양 샘플이 더 많은 세팔로스포린 C를 생산하였음을 나타내었다. 따라서, 본 발명에 따른 탄소원인 자일로스만을 포함하는 배지가 높은 세팔로스포린 C 생산을 하는 결과를 나타내었다.
- [0029] 세팔로스포린 C를 생산하는 대사경로에서 세가지 전구체, 즉, 2-aminoapipate, 발린(valine) 및 시스테인을 이용하여 이소페니실린 N(Isopenicillin N)을 합성하는 효소인 IPN synthase를 암호화(coding)하는 유전자 *pcbC* 및 생산된 세팔로스포린 C를 세포벽까지 전달하여 세포 밖으로 수송하는 CefT 단백질을 암호화(coding)하는 *cefT* 유전자의 발현을 조사하여 적절한 대사경로를 활용하는지 확인하였다. 도 8에서는 농축된 5.9%의 자일로스를 이용하여 에틸 아세테이트(ethyl acetate)를 처리하지 않은 배양액, 에틸 아세테이트를 처리한 배양액 및 자일로스 시약을 이용한 배양액을 이용한 각 배양에서의 6일 및 8일째에서의 세팔로스포린 C 생산량과 mRNA를 추출 후, 역전사 효소를 통한 cDNA 합성 및 PCR을 통한 증폭을 통해 *pcbC*, *cefT* 유전자의 발현을 확인할 수 있었다. 유전자의 발현 확인은 배양 8일차에 일괄적으로 수행되었고, control(자일로스 시약)에서는 이미 균주가 사멸기로 들어선 상태이고 에틸 아세테이트(ethyl acetate)를 처리하지 않은 배양액의 경우 저해를 받아 세포양이 많이 늘어나지 않은 상태라 유전자의 발현이 아주 희미하게 확인되었다. 또한 에틸 아세테이트로 처리한 배양액의 경우 8일째에 가장 많은 세팔로스포린 C 생산량을 보였으며 선명한 유전자의 발현을 확인하였다. 이는 글리세롤 및 정제되지 않은(crude) 글리세롤을 이용한 생산에서보다 높은 생산량을 나타내었다.
- [0030] 또한, 본 발명에서 상기 바이오매스로부터 분리한 자일로스는
- [0031] a) 건조된 바이오매스를 분쇄한 후, 30~50 메시(mesh) 크기로 선별하는 단계;
- [0032] b) 상기 선별 단계를 거친 바이오매스를 100~140℃의 온도에서 산으로 가수분해하는 화학적 전처리 단계;
- [0033] c) 상기 화학적 전처리 단계를 거쳐 가수분해된 바이오매스를 필터를 이용하여 고체와 액체로 분리하는 단계;
- [0034] d) 상기 c)단계에서 얻어진 액체를 첨가하여 상기 a) 내지 c)단계를 2 ~ 5회 반복하여 자일로스가 농축된 액체를 수득하는 단계;
- [0035] e) 상기 d)단계를 통해 수득된 자일로스가 농축된 액체를 염기성 용액을 이용하여 중화시키는 단계;
- [0036] f) 상기 중화 단계를 거친 액체를 감압증류기를 이용하여 70 ~ 100℃에서 증탕하여 12~24시간 동안 수분을 증발

시키는 단계;

- [0037] g) 상기 f) 단계를 통해 얻어진 액체로부터 유리 섬유 여과지(Glass Micro Fibre Filters: GF/C)를 이용하여 불순물을 제거하는 단계; 및
- [0038] h) 상기 불순물이 제거된 액체로부터 비극성 용매를 이용하여 비극성 퓨란(furan)계 물질 및 무극성의 휘발성 물질을 제거하여 정제시키는 단계에 의하여 분리된 자일로스를 얻는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명에서 사용하는 바이오매스는 억새뿐만 아니라 자연계에 존재하는 모든 리그노셀룰로오스계 바이오매스(lignocellulosic biomass)를 지칭하는 것으로 셀룰로스, 자일렌, 리그닌으로 구성된 식물 세포의 세포벽을 활용하는 것을 나타낸다. 효율적인 측면에서 자일로스 함량이 비교적 높은 억새를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 농업 부산물인 벼짚, 보릿짚, 옥수수대(corn cob) 및 거친 특성을 갖는 나무(톱밥)도 이용할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 방법에 따라 바이오매스로 억새를 이용하여 1회 가수분해 하였을 때, 얻을 수 있는 자일로스의 양은 약 3 g/L로 0.3%(w/v)이다. 이는 세포가 성장하기에 매우 부족한 양으로 2% 이상의 농도로 농축되어야 한다. 억새를 가수분해시킨 후, 전처리된 바이오매스인 고체와 가수분해물인 액체를 분리시킨 후, 새로운 억새를 가수분해물과 혼합하여 전처리를 수행하는 방법으로 상기 단계를 2 ~ 5회 반복하여 자일로스가 농축된 액체를 수득하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 상기의 방법으로 4회를 농축을 한 결과 약 2.2% (22 g/L) 농도의 자일로스를 얻을 수 있었다.
- [0041] 상기 단계를 거쳐 농축된 자일로스는 염기성 용액, 바람직하게는 수산화 칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$)을 이용하여 중화시켰다.
- [0042] 또한 추가적으로 감압증류를 이용하여 70 ~ 100℃에서 중탕하여 12~24시간 동안 수분을 증발시키는 단계를 거치면, 6% 이상의 자일로스 농도를 얻을 수 있었다.
- [0043] 상기 단계를 통해 얻어진 액체는 유리 섬유 여과지(Glass Micro Fibre Filters: GF/C)를 이용하여 불순물을 제거하는 단계를 거쳤다.
- [0044] 바이오매스를 약산을 통해 가수분해 할 경우, 실험 조건이나 바이오매스의 종류에 따라 섬유질인 다당을 둘러싸고 있는 비결정성의 다당류와 페놀 성분을 기반으로 한 리그닌 등이 가수분해 되는 정도가 달라진다. 고온의 조건에서 전처리 할 경우, 리그닌 부분이 가수분해 되면서 벤젠고리를 포함하는 페놀류나 사슬형 탄화수소 등과 같은 무극성의 휘발성 물질이 가수분해물에 녹아져 나오게 되고 5탄당인 자일렌의 경우 열분해가 진행되면서 푸르푸랄(furfural)로 전환되고, 섬유질 다당인 셀룰로스의 경우 열분해가 진행되면서 하이드록시메틸푸르푸랄(hydroxymethylfurfural)로 전환되어 가수분해물에 섞여있게 된다. 이러한 물질들은 세포의 성장 및 생산의 저해를 일으켜 목표 세포량과 목표 물질 생산량을 저해시키는 요인이 된다. 이러한 퓨란(Furan)계 물질과 페놀류, 탄화수소사슬 등의 공통적인 특성은 비극성의 성질을 나타내기 때문에, 비극성 용매를 이용해 가수분해물과 혼합시켜준 후, 비극성 저해 물질들을 제거하는 공정을 거치면 많은 저해물질을 제거할 수 있음을 확인하였고, 다양한 비극성 용매를 이용해 실험을 진행하였다. 도 6은 비극성 용매를 이용한 저해 물질 제거 과정의 개요도와 실제 실험을 나타내었다. 구체적으로, 50 mL 튜브에 20 mL 보다 적은 양의 가수분해물과 1:1 비율의 비극성 용매를 넣어 분리하였고, 예시대로 수행하였을 때 서로 섞이지 않고 불균일(heterogeneous)계를 형성하였다. 이 튜브를 볼텍싱(vortexing) 하여 격렬하게 섞어주면, 일시적으로 상이 뒤섞인 것처럼 보이는데 이 때 가수분해물(물 층)에 소량 녹아있던 비극성의 물질들이 비극성 용매상으로 이동하게 된다. 이후 10분 가량 방치해 두면 다시 상이 분리되면서 비극성 용매상의 색이 바뀌어 있음을 확인할 수 있었다. 도 7은 다양한 비극성 용매들을 이용하여 대표적인 저해물질인 푸르푸랄(furfural)을 제거하는 실험에 대한 결과를 나타내었고, 에틸 아세테이트(ethyl acetate)를 이용하였을 경우 남아있는 푸르푸랄(furfural)이 90% 정도 제거되는 것을 확인 할 수 있었다. 상기와 같이 가수분해물을 처리하여 바이오매스로부터 분리된 자일로스를 이용하여 아크레모니움 균주의 배양을 위한 탄소원으로 활용하였다.
- [0045] 본 발명의 방법에서, 상기 배양은 $27 \pm 3^\circ\text{C}$ 온도에서 5~15일간 진탕(shaking)배양 하는 것이 바람직하다. 구체적으로, 본 발명의 실시예에서는 자일로스 시약을 이용하여 27°C 의 온도에서 5일간 배양하였을 때, 가장 높은 세팔로스포린 C 생산량을 확인하였다.

- [0046] 또한 배양에 사용되는 배지는 상기와 같이 자일로스를 배지 부피의 2~8%(w/v)로 첨가하는데, 이때 배지의 기본 조성은 자일로스 2~8%(w/v), 옥수수침지액(corn steep liquor) 3~7%(w/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6~1.0%(w/v), KH_2PO_4 0.1~0.5%(w/v), K_2HPO_4 0.3~0.7%(w/v), DL-메티오닌(methionine) 0.3~0.7%(w/v), 미량원소(trace element solution) 0.2~0.6%(w/v)를 포함한다.
- [0047] 미량원소(trace element)는 하기 조성으로 10배 농도로 stock을 해 놓고 배지에 최종 농도 10배 희석이 되는 양으로 사용하였다.
- [0048] 배지에서의 최종 미량원소의 조성 및 농도는 40 mg/L ZnCl_2 , 200 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 및 10 mg/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ 이다.
- [0049] 본 발명은 배지 조성 중 탄소원으로 자일로스를 배지 내 2~8%(w/v) 농도로 포함하는 아크레모니움 크리소지늄을 이용한 세팔로스포린 C 생산용 배지 조성물을 제공한다.
- [0050] 상기 자일로스는 본 발명의 방법에 따라 바이오매스로부터 분리된 자일로스 일 수 있다.
- [0051] 또한, 상기 배지 조성물은 본 발명의 방법에 따라 발효에 활용되기 적합한 당인 것이 바람직하다.
- [0052] 이하 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 이들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.
- [0053] **실시예 1. 아크레모니움 크리소지늄 종 배양**
- [0054] 아크레모니움 크리소지늄(*Acremonium chrysogenum* M35)의 종균 배양 (seed culture)을 위해, 수크로스(sucrose) 1.25g, 포도당(glucose) 0.5g, 옥수수침지액(corn steep liquor) 1.25 mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2g, 대두박(soybean meal) 1.5g, 목화씨 단백질(cotton seed flour) 0.5g 및 CaCO_3 0.5g을 포함하는 배지를 사용하였다. 상기 균주는 250mL의 에를렌마이어 플라스크(Erlenmeyer flask)에서 50 mL의 배지량을 첨가하여 27℃에서 300 rpm로 3일간 배양하였다.
- [0055] **실시예 2. 바이오매스로부터 자일로스 분리 및 농축**
- [0056] 본 실시예에서는 바이오매스 중 억새(miscanthus)를 사용하였다. 건조 상태의 억새를 분쇄하여 30~50 mesh 사이즈의 체(sieve)를 이용하여 선별하였다. 그 후, 분말 상태의 억새 5 g을 1L의 플라스크에 넣고 4%의 황산을 400 mL 넣고 억새가 황산 용액에 잠길 수 있도록 하고 121℃의 밀폐된 환경(멸균기와 같은 환경)에서 1시간 동안 방치하였다. 가수분해 후 고체(자일렌이 제거된 전처리 후 바이오매스)와 액체(자일로스가 포함된 용액)를 필터를 이용해 분리하고 액체는 다시 새로운 억새 5 g과 함께 1리터 플라스크에서 가수분해 시켰다. 상기 과정을 4~5회 정도 반복하였을 때, 약 2 ~ 2.5%(w/v)(20~25 g/L)의 자일로스(xylose)를 얻을 수 있었다. 본 발명에서는 약 20~60 g/L 농도의 자일로스를 사용하였다. 농축된 자일로스는 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 이용해 중화시켰다. 또한, 감압증류기를 이용하여 90℃에서 중탕하여 12 ~ 24시간 동안 수분을 증발시키는 경우 3배 이상의 농축된 자일로스 농도를 얻을 수 있으며, 도 8의 결과로 나타난 추가로 농축시킨 약 5.9% 자일로스를 이용하여 생산을 진행하였다.
- [0057] **실시예 3. 바이오매스로부터 분리한 자일로스의 후처리 공정을 통한 아크레모니움 균주의 성장 및 세팔로스포린 C 생산을 저해하는 물질 제거**
- [0058] 실시예 2로부터 얻은 약 2.2%(w/v) 농도의 자일로스액을 GF/C필터(47 mm pie, circles, Cat No. 1822 047)를 이용하여 불순물을 제거하였다. 분리된 20 mL 이하의 액체를 50 mL 코니칼 튜브(conical tube)에 넣고 1:1 비율의 에틸 아세테이트(Ethyl acetate)를 첨가한 후 2분간 격렬히 볼텍싱(vortexing)을 하여 자일로스액 층에 녹아

있는 비극성의 퓨란(furan)계 물질들과 무극성의 휘발성 물질들을 분리한다. 이후 분별 깔때기에 옮기고 10분간 방치하면 에틸 아세테이트(Ethyl acetate)와 자일로스액이 층 분리가 되고 저해물질들이 제거된 자일로스액을 따로 분리하여 10분간 끓는 물에 증탕하여 남아있는 에틸 아세테이트(Ethyl acetate)를 증발시키고 멸균시키는 과정을 거쳐 본 발명의 탄소원으로 활용하였다.

[0059] **실시예 4. 시약 자일로스를 이용한 세팔로스포린 C의 생산**

[0060] 시약 자일로스 2~8%(w/v), 옥수수침지액 (corn steep liquor) 3~7%(w/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6~1.0%(w/v), KH_2PO_4 0.1~0.5%(w/v), K_2HPO_4 0.3~0.7%(w/v), DL-메티오닌(methionine) 0.3~0.7%(w/v), 미량원소(trace element solution, 40 mg/L ZnCl_2 , 200 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 및 10 mg/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 24\text{H}_2\text{O}$) 0.2~0.6%(w/v)를 증류수에 녹여 멸균 후 상기 실시예 1에서 종배양된 균주를 접종하고 27℃, 300 rpm에서 7~8일을 배양하여 세팔로스포린 C의 생산량을 확인하였다. 이 때 사용된 자일로스는 각각 2%, 4%, 6%, 8%로 하였으며 자일로스 농도에 따른 세팔로스포린 C의 생산량의 변화를 도 2에 나타내었다.

[0061] 도 2에서, 자일로스를 이용한 최대 세팔로스포린 C 생산은 6%의 자일로스 농도로 발효를 수행하였을 경우, 120 시간의 배양시간에서 약 8.2 g/L의 세팔로스포린 C 농도를 보여서 가장 높게 나타났다.

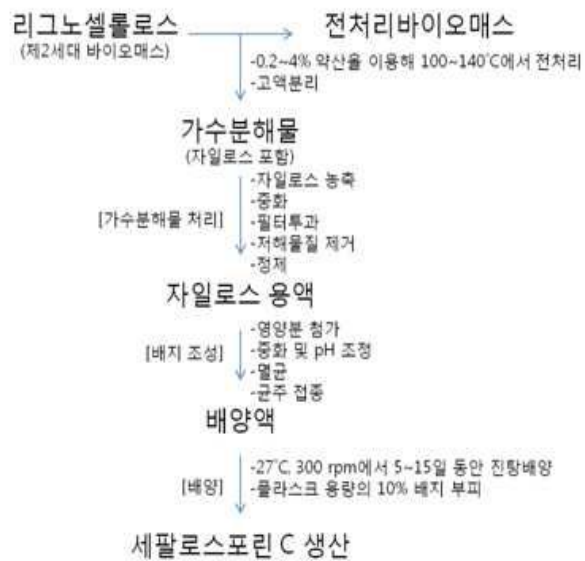
[0062] **실시예 5. 바이오매스로부터 분리한 자일로스를 이용한 세팔로스포린 C의 생산**

[0063] 실시예 2로부터 얻은 5.9%(w/v)의 자일로스액에 옥수수 침지액(corn steep liquor) 3~7%(w/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6~1.0%(w/v), KH_2PO_4 0.1~0.5%(w/v), K_2HPO_4 0.3~0.7%(w/v), DL-메티오닌(methionine) 0.3~0.7%(w/v), 미량원소(trace element solution, 40 mg/L ZnCl_2 , 200 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 및 10 mg/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 24\text{H}_2\text{O}$) 0.2~0.6%(w/v)에 해당하는 각각의 양을 녹이고, 멸균 후 종배양된 0.2~1mL 균주를 접종하고 27℃, 300 rpm에서 11~13일 동안 배양하여 세팔로스포린 C의 생산량을 확인하였다. 이 때 풍부한 산소의 전달을 위해 사용된 에를렌마이어 플라스크의 10% working volume으로 배양하였다(예를 들면, 250 mL 플라스크의 경우 25 mL의 부피로 배양하였다)

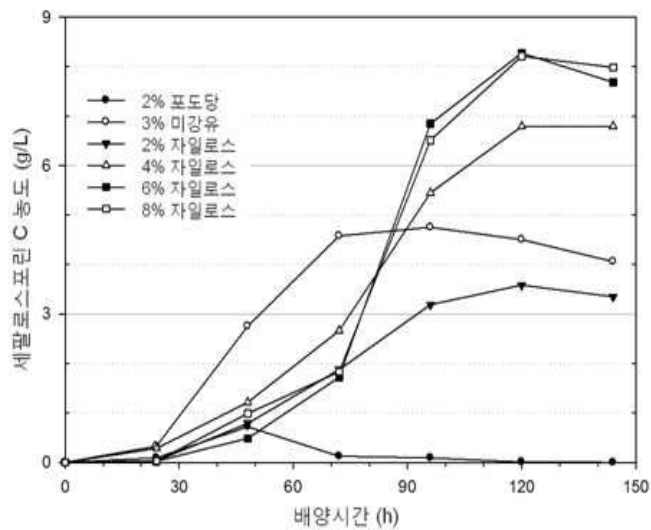
[0064] 도 8에서는 상기 단계에 따른 산-전처리 단계에서 분리 및 처리된 자일로스를 포함한 배지를 이용하여 아크레모니움 크리소지눔(*Acremonium chrysogenum*)을 배양하였을 때, 8일차에 가장 높은 10.78 g/L의 세팔로스포린 C 생산을 나타내었고, mRNA를 추출 후, 역전사 효소를 통한 cDNA 합성 및 PCR을 통한 증폭을 통해 *pcbC*, *cefT* 유전자 발현을 확인하였다.

도면

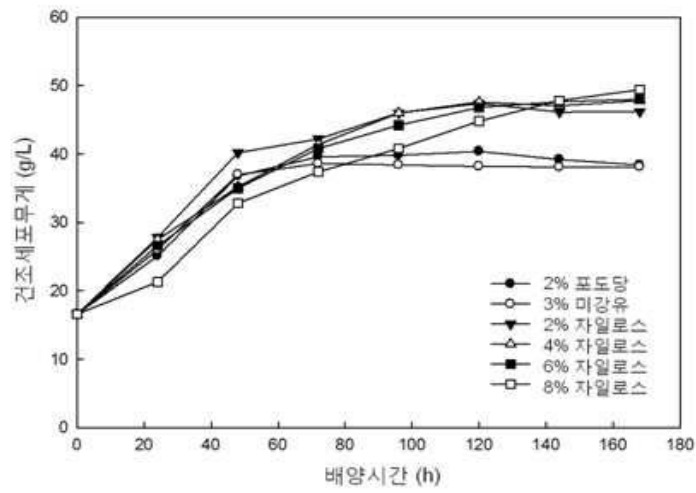
도면1



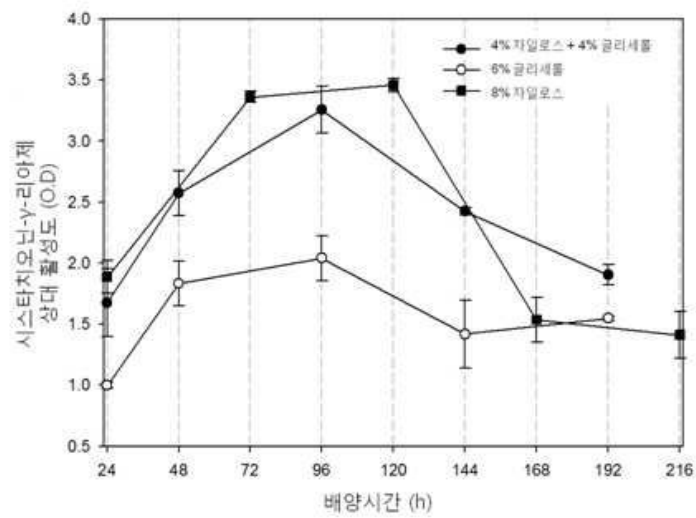
도면2



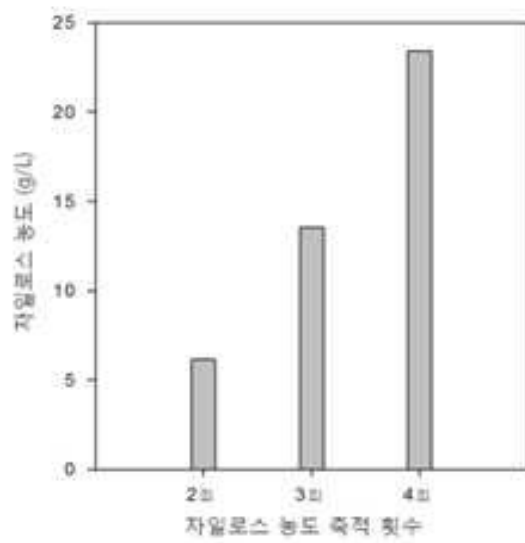
도면3



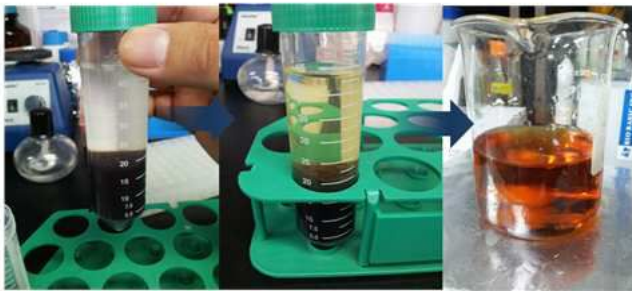
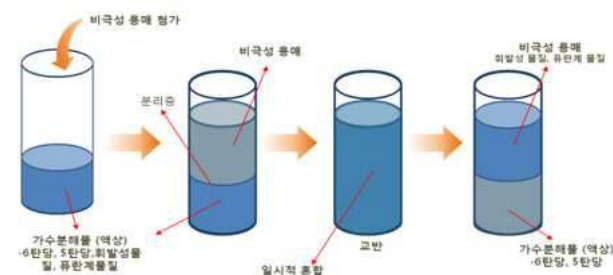
도면4



도면5



도면6



도면7

	첨가물		
	20 g/L	10 g/L	
용매 종류	자일로스	푸르푸람	제거율
에틸 아세테이트	18.901 g/L	1.112 g/L	88.87%
헵탄	19.371 g/L	6.285 g/L	37.14%
헥산	19.594 g/L	6.915 g/L	30.84%
아이소옥탄	11.166 g/L	4.386 g/L	56.13%

도면8

배양시간	용매비처리 (g/L)	비극성용매 처리 (g/L)	자일로스, 시약 (g/L)
6 일	4.17	7.88	9.68
8 일	5.30	10.78	7.15

