



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0027353
(43) 공개일자 2011년03월16일

(51) Int. Cl.

C12P 35/00 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0085411

(22) 출원일자 2009년09월10일

심사청구일자 2009년09월10일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김승욱

서울특별시 노원구 공릉동 737 삼익아파트
104-905

신현용

서울특별시 관악구 신림4동 503-7호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 6 항

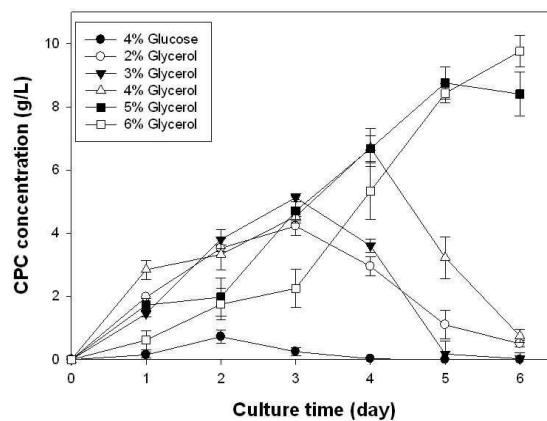
(54) 글리세롤을 이용한 세팔로스포린 C의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 신규한 세팔로스포린 C의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 미생물을 이용하여 세팔로스포린 C를 제조하는 방법에 있어서, 탄소원으로 글리세롤을 포함하는 배양배지에서 아크레모니움 크리소게눔(*Acremonium chrysogenum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 종래에는 미생물 대사저해 및 높은 가격으로 글리세롤을 이용한 세팔로스포린 C 생산은 불가능하였으나, 특정 글리세롤 농도에서는 글리세롤을 이용한 세팔로스포린 C 생산이 가능하며 탄소원으로서 포도당과 글리세롤을 동시에 이용하는 경우 세팔로스포린 C 생산량을 현저히 높일 수 있다. 기존 식물성 오일을 첨가한 배지에 비해서 세팔로스포린 C의 생산량은 높이면서 이를 분리정제 하는 비용은 낮출 수 있는 경제적인 방법임을 확인하였다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이진영

서울특별시 성북구 석관2동 337-31번지 다솜오피스
텔 403호

김은지

경기도 남양주시 진접읍 장현리 신동아아파트 102
동 203호

특허청구의 범위

청구항 1

미생물을 이용하여 세팔로스포린 C를 제조하는 방법에 있어서, 탄소원으로 글리세롤을 2-6% 농도로 포함하는 배양배지에서 아크레모니움 크리소게눔(*Acremonium chrysogenum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 탄소원으로 포도당을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 배양은 25-30℃에서 3-4일간 진탕(shaking)배양하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 배양배지는 글리세롤 2-6%, 옥수수침지액 3-7%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6-1.0%, KH_2PO_4 0.1-0.5%, K_2HPO_4 0.3-0.7%, DL-메티오닌(methionine) 0.3-0.7%, 미량원소(trace element solution) 0.2-0.6%를 포함하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법.

청구항 5

배지 조성 중 탄소원으로 글리세롤을 배지 내 2-6% 농도로 포함하는 아크레모니움 크리소게눔을 이용한 세팔로스포린 C 생산용 배지조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 탄소원으로 포도당을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C 생산용 배지조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 신규한 세팔로스포린 C의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 미생물을 이용하여 세팔로스포린 C를 제조하는 방법에 있어서, 탄소원으로 글리세롤을 포함하는 배양배지에서 아크레모니움 크리소게눔(*Acremonium chrysogenum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

최근 청정에너지 또는 대체에너지로서 바이오디젤을 생산하고 있으며, 매년 바이오디젤의 생산량은 급속히 증가

하고 있다. 특히 유럽연합, 미국, 중국, 인도 등의 바이오매스가 풍부한 나라를 주축으로 바이오디젤이 생산되고 있다. 글리세롤은 바이오디젤의 부산물로서 바이오디젤 생산량의 10%가 부산물인 글리세롤로 생산된다. 현재 이렇게 생산된 글리세롤을 이용하여 2,3-프로판디올(propanediol), 및 숙신산(succinic acid) 등을 미생물을 이용하여 생산하고 있다. 그러나 2,3-프로판디올 및 숙신산의 생산물은 생산비의 대부분이 분리/정제에 치중되어 있어, 생산물의 수율을 향상시키기 보다는 분리/정제의 기술 확보가 더 우선시 되고 있다.

[0003] 한편, 아크레모니움 크리소게눔(*Acremonium chrysogenum*)을 이용하여 세팔로스포린 C 항생제의 생산 시 지방산 또는 식물성 오일을 이용하여 생산하고 있지만, 바이오디젤의 생산량 증가로 바이오디젤의 원료물질인 지방산과 식물성 오일의 가격이 매년 증가하고 있다. 그리고 항생제 생산을 위해 첨가된 지방산과 식물성 오일은 배지 내에서 완전히 소모되지 않아 분리/정제 비용을 더 많이 발생시키고 있다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 아크레모니움 크리소게눔을 이용하여 세팔로스포린 C 항생제의 생산 시 기존의 식물성 오일을 대체할 탄소원을 탐색해 오던 중 바이오디젤의 부산물인 글리세롤을 이용하여 세팔로스포린 C를 생산할 수 있음을 발견하였으며, 또한 탄소원 대사 저해가 일어나지 않는 낮은 농도의 글리세롤을 이용하면 아크레모니움 크리소게눔에서 세팔로스포린 C를 높은 농도로 얻을 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 바이오디젤 생산 시 부산물로 생성되는 저가의 글리세롤을 이용하여 세팔로스포린 C를 생산하는 신규한 세팔로스포린 C의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 미생물을 이용한 세팔로스포린 C의 생산에 이용될 수 있는 세팔로스포린 C 생산용 배지 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0007] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 미생물을 이용하여 세팔로스포린 C를 제조하는 방법에 있어서, 탄소원으로 글리세롤을 2-6% 농도로 포함하는 배양배지에서 아크레모니움 크리소게눔(*Acremonium chrysogenum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 세팔로스포린 C의 제조방법을 제공한다.

[0008] 일반적으로, 아크레모니움 크리소게눔에서 글리세롤을 이용한 세팔로스포린 C의 생산은 탄소원 대사 저해로 인하여 생산되지 못하는 것으로 알려져 있었다. Demain (1979; Microbial technology: current state, future prospects, vol. 29. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom) 및 Gatenbeck(1968; J. Ferment. Technol. 56:345-353)의 연구에 의하면, 글리세롤은 세팔로스포린과 같은 베타-락탐계 항생제의 생산을 저해하는 것으로 보고 되었으며, 또한 ACVS, 즉 초기항생물질의 중합단계에서도 중합을 억제하는 것으로 보고 되었다 (Zhang, Demain, 1992; Crit. Rev. Biotechnol. 12:245-260).

[0009] 상기와 같은 이유 이외에도, 글리세롤은 2000년대 이전에는 가격이 너무 높아서 세팔로스포린 C의 생산에 이용하기 어려웠다. 그러나 현재는 거의 1/10 수준으로 가격이 낮아졌고, 글리세롤을 이용하여 세팔로스포린 C 생산하기 위한 배지 조성도 예전에 비해 많은 기술적 진보가 있었다. 따라서 본 발명에서는 상기 언급한 바와 같이, 최근 활발히 연구되는 바이오디젤의 부산물인 글리세롤을 이용하여 세팔로스포린 C를 생산할 수 있는 신규한 방법을 개발하였다.

[0010] 본 발명의 실시예에서, 포도당과 글리세롤을 각각 이용하여 세팔로스포린 C를 생산량을 비교한 결과, 도 1에서와 같이 포도당을 이용하여 세팔로스포린 C를 생산하는 경우와 비교하여 글리세롤을 이용하는 경우 월등히 높은 생산량을 보였다.

[0011] 본 발명에서, 상기 글리세롤을 탄소원으로서 세팔로스포린 C의 생산용 배지에 첨가하는 경우 특정 함유량 범위에서는 글리세롤에 의한 대사저해가 일어나지 않으면서 세팔로스포린 C 생산량이 증가하는 것을 확인하였다 (도 1 참조). 첨가되는 글리세롤의 양은 바람직하게는 2-6%, 더욱 바람직하게는 2-4%이다. 상기 글리세롤의 함유량이 2-6% 이상인 경우, 아크레모니움 크리소게눔이 세팔로스포린 C를 생산하는 대사경로에서 탄소 저해가 일어나 농도가 높아질수록 세팔로스포린 C의 생산시간이 늦어진다. 세팔로스포린 C 생산을 위한 공정비용을 감안한다면, 장기간의 배양보다는 4-5일에서 세팔로스포린 C를 회수하여 분리 정제하는 것이 바람직하다. 실제

산업 공정에서도 4-5일에서 세팔로스포린 C를 회수하여 정제한다. 또한 4% 글리세롤에 비해 5, 6% 글리세롤을 첨가한 경우 생산성이 감소하는 것을 확인하였다. 4%의 경우, 생산성은 0.0175 g/g·h(생산량/기질량·시간)에 비해 5,6% 글리세롤의 생산성은 각각 0.014 및 0.011 g/g·h 이었다. 실제 산업적인 공정에서는 생산되는 물질의 량도 중요하지만, 오랜 기간동안 생산을 하면, 소요되는 공정비가 증가하기 때문에 물질이 생산되는 생산성도 중요한 요인이 된다. 따라서 초기 생산 시 많은 량의 세팔로스포린 C를 생산하기 위해서 2-4% 글리세롤을 배지에 첨가하여 세팔로스포린 C를 생산하는 것이 적당하다.

[0012] 본 발명의 방법에서, 상기 탄소원으로 글리세롤과 함께 포도당을 더 포함하는 것이 바람직하다. 종래 포도당을 이용하여 세팔로스포린 C를 생산하던 것을 글리세롤로 대체하여 세팔로스포린 C를 생산할 수 있을 뿐 아니라, 포도당과 글리세롤을 함께 사용하여도 세팔로스포린 C를 생산할 수 있으며 이 경우 예상치 못한 현저한 세팔로스포린 C 생산량의 향상 효과를 확인하였다. 상기 글리세롤과 함께 첨가되는 포도당의 함량은 바람직하게는 2-4%, 더욱 바람직하게는 4%이다. 이와 같이, 상기 글리세롤을 단독 사용하여 탄소원으로 이용할 수 있으나 포도당을 함께 함유하는 배양배지의 경우 더 많은 세팔로스포린 C를 생산하였다 (도 2 참조).

[0013] 본 발명의 방법에서, 상기 배양은 25-30℃에서 3-4일간 진탕(shaking)배양하는 것이 바람직하다. 본 발명의 실시예 3에서, 27℃에서 300 rpm으로 4일간 배양하였을 때 가장 높은 세팔로스포린 C 생산량을 확인하였다. 이러한 판단은 산업 생산 공정에서의 비용을 고려한 것으로, 글리세롤 4%를 첨가하여 4일간 세팔로스포린 C를 생산하는 것이 글리세롤 6%를 첨가하여 6일째 생산하는 것보다 비용을 줄일 수 있다. 또한 배양에 사용되는 배지는 상기과 같이 글리세롤을 배지 부피의 2-6%(v/v)로 첨가하는데, 이 때 배지의 기본 조성은 글리세롤 2-6%, 옥수수침지액 3-7%, (NH₄)₂SO₄ 0.6-1.0%, KH₂PO₄ 0.1-0.5%, K₂HPO₄ 0.3-0.7%, DL-메티오닌(methionine) 0.3-0.7%, 및 미량원소(trace element solution; CaCl₂·2H₂O 0.007%, CuSO₄·5H₂O 0.00075%, ZnSO₄·7H₂O 0.003%, MnSO₄·H₂O 0.003%, MgSO₄·7H₂O 0.035%, Na₂SO₄·7H₂O 0.016%, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O 0.016%) 0.2-0.6%를 포함한다.

[0014] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 배지 조성 중 탄소원으로 글리세롤을 배지 내 2-4% 농도로 포함하는 아크레모니움 크리소게눔을 이용한 세팔로스포린 C 생산용 배지조성물을 제공한다. 또한, 상기 배지조성물은 탄소원으로 포도당 4%를 더 포함하는 것이 바람직하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0016] 실시예 1. 아크레모니움 크리소게눔의 종배양

[0017] 아크레모니움 크리소게눔(*Acremonium chrysogenum*, ATCC20339)의 종균(seed) 배양을 위해, 슈크로즈(sucrose) 1.25 g, 포도당(glucose) 포도당 0.5 g, 옥수수침지액(corn steep liquor) 1.25 ml, (NH₄)₂SO₄ 0.2 g, 대두박(soy bean meal) 1.5 g, 목화씨 단백질(cotton seed flour) 0.5 g 및 CaCO₃ 0.5 g를 포함하는 배지를 사용하였다. 상기 균주는 250 ml 플라스크에서 50 ml의 배지량을 첨가하여 27℃에서 300 rpm으로 3일간 배양하였다.

[0018] 실시예 2. 포도당을 이용한 CPC의 생산

[0019] 포도당 2 g, 옥수수침지액 2.5 ml, (NH₄)₂SO₄ 0.4 g, KH₂PO₄ 0.15 g, K₂HPO₄ 0.25 g, DL-메티오닌(methionine) 0.25 g, 미량원소(trace element solution; CaCl₂·2H₂O 0.0035 g, CuSO₄·5H₂O 0.00035 g, ZnSO₄·7H₂O 0.0015 g, MnSO₄·H₂O 0.0015 g, MgSO₄·7H₂O 0.0175 g, Na₂SO₄·7H₂O 0.008 g, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O 0.008 g) 0.2 g를 포함하는 배지를 500 ml의 삼각플라스크에 50 ml를 채우고, 상기 실시예 1에서 배양된 균주를 접종한 후 27℃에서 6일간 300 rpm으로 배양하여 세팔로스포린 C의 생산량을 확인하였다.

[0020] **실시예 3. 글리세롤을 이용한 CPC의 생산**

[0021] 탄소원으로서 포도당을 글리세롤로 바꾸고, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 상기 균주를 배양하여 세팔로스포린 C의 생산량을 확인하였다. 이 때 사용된 글리세롤은 각각 2%, 3%, 4%, 5%, 및 6%로 하였으며 글리세롤 농도에 따른 세팔로스포린 C의 생산량의 변화를 도 1에 나타내었다.

[0022] 도 1에서, 3-4%의 글리세롤을 첨가했을 때 세팔로스포린 C의 생산량은 배양 3일째 가장 높게 나타났다.

[0023] **실시예 4. 포도당과 글리세롤을 이용한 CPC의 생산**

[0024] 탄소원으로서 글리세롤과 포도당을 동시에 사용하고, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 상기 균주를 배양하여 세팔로스포린 C의 생산량을 확인하였다. 이 때 사용된 탄소원의 농도는 포도당 4%와 글리세롤 2%, 및 포도당 4%와 글리세롤 4%로 하였다. 세팔로스포린 C의 최적 생산량을 비교하기 위해 종래 식물성 오일을 사용한 생산하는 방법으로서 포도당 4%와 미강유(rice oil) 3%를 사용하여 비교하였다. 글리세롤과 포도당 농도에 따른 세팔로스포린 C의 생산량 변화를 도 2에 나타내었다.

[0025] 도 2에서, 식물성 오일인 미강유를 첨가한 경우와 비교하여 포도당과 글리세롤을 동시에 사용한 경우 더 높은 세팔로스포린 C 생산량을 보였다. 특히 4%의 포도당과 4%의 글리세롤을 탄소원으로 사용하였을 때 약 2배 정도 높은 세팔로스포린 C 생산량을 보였다.

[0026] 결론적으로, 도 1과 2의 결과를 바탕으로 글리세롤에 의해서 세팔로스포린 C의 생산량이 향상되는 것을 확인하였고, 특히 포도당과 글리세롤을 동시에 첨가하였을 때 최적의 세팔로스포린 C 생산량을 보이는 것을 확인하였다.

산업이용 가능성

[0027] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 글리세롤을 이용하여 미생물로부터 세팔로스포린 C를 생산할 수 있으며, 이 때 최적 글리세롤 함량은 4%였다. 또한 배양배지에 첨가되는 탄소원으로서 포도당과 글리세롤을 동시에 이용하는 경우 세팔로스포린 C 생산량이 가장 높게 나타났다. 기존 식물성 오일을 첨가한 배지에 비해서 약 2배 이상의 세팔로스포린 C의 최대 생산량을 보였으며, 분리정제를 고려한다면, 분리정제 비용의 30%의 저감효과를 볼 수 있을 것으로 기대한다. 더욱이 페바이오매스를 이용한 고부가가치 창출기술 개발에 큰 의미가 있으며, 산업적으로 적용 시 항생제의 분리정제 비용의 감소와 저가의 원료물질을 사용함으로써 항생제의 가격경쟁력 확보가 예상된다.

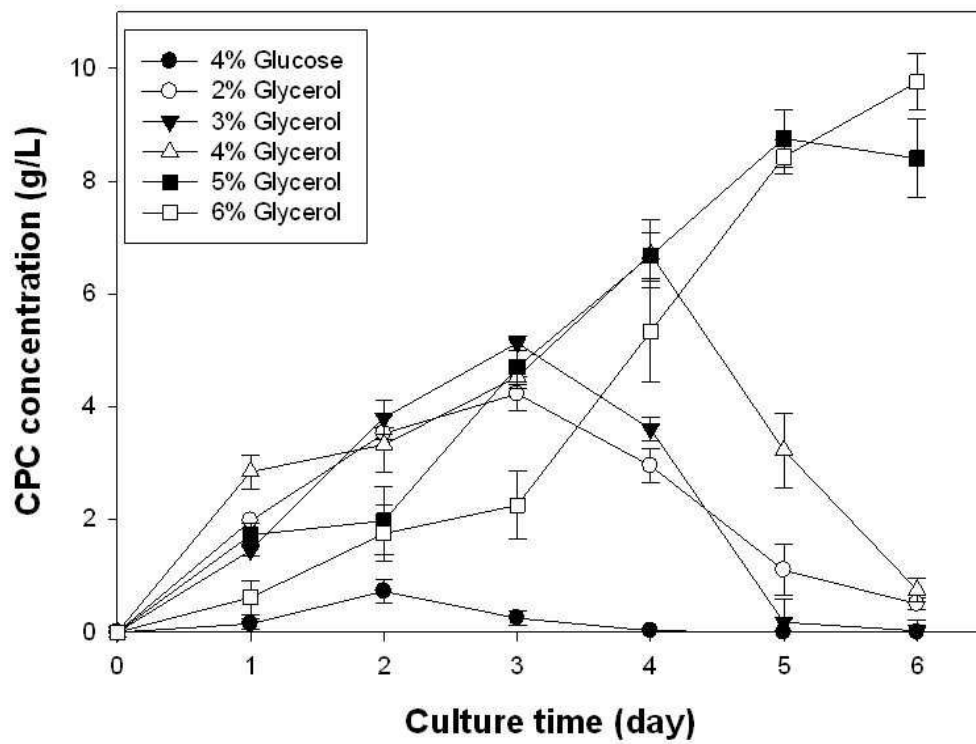
도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 글리세롤 농도에 따른 세팔로스포린 C 생산량의 변화를 나타내는 그래프이다.

[0029] 도 2는 글리세롤 및 포도당 농도에 따른 세팔로스포린 C 생산량의 변화를 나타내는 그래프이다.

도면

도면1



도면2

