Cephaosporium acremonium M25에 의한 Cephalosporin C 생산성 향상을 위해 통계학적 방법을 이용한 배지 최적화

김진희, 김나리, 임정수, 박승원*, 김승욱
고려대학교 화학공학과, (주)제일제당*

Medium optimization for the production of Cephalosporin C using the statistical method by *Cephalosporium acremonium* M25

Jin-Hee Kim, Na-Ri Kim, Jung-Soo Lim, Seung-Won Park* and Seung-Wook Kim
Department of Chemical Engineering, Korea University,
CHEIL JEDANG Corporation*

서론

Cephalosporium acremonium은 곰팡이의 일종으로, Cephalosporin과 여러 효소를 생산하는 대표적 균주로 꾸준한 관심의 대상이었다(1).
Cephalosporin C의 작용 기전 및 독성은 penicillin과 유사하지만, penicillin보다 β-lactamase에 안정하므로 더 넓은 항균력을 지니고 있으며, Cephalosporin C는 그람 양성·음성세균 모두에 적용되는 여러 β-lactam계 항생제의 중요한 시작물질이다(2).
본 연구에서는 Cephalosporin C의 생산성을 높이기 위해 통계학적인 방법을 통해 생산배지를 최적화하였다.

실험 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배지조성

사용균주는 원균주 *C. acremonium* ATCC 20339를 U.V를 이용해서 돌연변이 처리하여 얻은 돌연변이주 M25를 사용하였다. 계대배양은 PDA slant를 이용하고, 종균배지는 2.5% sucrose, 1.0% glucose, 3.0% soybean meal, 1.0% cotton seed flour, 2.5% corn steep liquor, 0.4% $(NH_4)_2SO_4$, 그리고 0.5% $CaCO_3$을 포함하도록 최적화 하였다. 최적화 전 기본배지는 2.7% glucose, 3.6% sucrose, 0.8% $(NH_4)_2SO_4$, 0.3% KH_2PO_4, 0.5% K_2HPO_4, 0.5% DL-methiomine과 0.4% trace element solution, 5% corn steep liquor를 사용하였다.

2. 배양 조건

초기 pH는 1N NaOH를 가지고 pH 7.0으로 일정하게 하였으며, 종균배양에서 $CaCO_3$는 pH를 잰후 멸균시켰고, 당과 $(NH_4)_2SO_4$는 다른 성분과 따로 멸균하였다.
종균배양과 생산배양은 250ml 삼각플라스크를 사용했고, 27℃ 온도와 300rpm의 교반속도를 유지하였다. 서로 다른 시기의 종균들을 다양한 부피비로 혼합한 혼합종균을 각각 본 배양에 접종한 결과 초기 종균과 말기 종균을 3:7의 부피비로 혼합한 경우에 가장 좋은 결과를 나타났기 때문에 생산 배지에 10% 접종 시킨후 7일간 배양하였다(3).

3. 배지 최적화

본 생산배양에서는 여러 탄소원과 질소원으로 배지조성을 달리하여 실험하였고, 이에 따른 Cephalosporin C 생산성을 bioassay를 통해 비교함으로써 최대의 Cephalosporin C를 생산 할 수 있는 탄소원과 질소원을 SAS (Statistical Analysis System) program을 이용하여 실험 통계학적방법으로 확립하였다. 사용된 배지 구성 성분들 중에서 Cephalosporin C 생산에 가장 큰 영향을 미치는 factor를 선택하기 위하여 ANOVA(Analysis of Variance)를 사용하였고 이로부터 얻어진 factor들의 최적 농도를 구하기 위하여 RSM(Response Surface Methodology)을 사용하였다.

4. 분석 방법

Dry Cell Weight (DCW)

균사체의 균체량은 배양액 10ml을 12000 rpm에서 10분간 원심분리해서 Whatman glass-microfiber filter GF/C를 통해 filtration 시킨후 cells을 dry oven에서 말린후 무게를 측정하였다.

Glucose assay

환원당의 양은 modified DNS 방법을 이용해서 측정하였다. DNS와 반응시킨 배양액은 575nm spectrophotometer를 이용해서 absorbance를 측정하였다.

Bioassay

Cephalosporin C 생산성은 paper disk를 사용한 agar-diffusion method를 이용해서 측정하였다. Test균은 *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750을 사용하였고, bioassay는 nutrient agar (NA) 배지를 이용하였다. Test균을 37℃에서 24시간 배양한 다음, inhibition zone의 지름을 측정하여 CPC 농도를 결정하였다.

결과 및 토의

1. 배지최적화전의 본 배양에서의 *C. acremonium* M25의 성장특성

종균배양액을 접종하여 생산배지 최적화하기 전의 본 배양을 7일동안 한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 균체량은 2일째까지 급격히 증가하고 그 이후 거의 일정하게 유지되었다. 최대 균체량은 33 g/L를 나타내었고 균체량이 증가한 이후 CPC가 생산되기 시작하였다. CPC는 2일째부터 생산되기 시작하여 5일째 최대값 0.39 g/L를 나타내었다. 그리고 CPC 생산성은 0.0039 g/l·h임을 알 수 있었다.

2. ANOVA(Analysis Of Variance)에 의한 분석

CPC의 생산성을 향상시키기 위해 생산 배지를 최적화하였다. 사용된 배지성분들 중에서 CPC 생산에 가장 큰 영향을 미치는 factor를 선별하기 위해 ANOVA가 사용되었다. Table 1에 ANOVA 분석에 의한 결과를 나타내었다. F값은 실험된 범위내에서의 각 factor들의 영향력을 나타내는 것으로 크면 클수록 영향이 큼을 나타내고, P값은 실험된 factor가 효력이 없을 가능성을 나타내는 것으로 작을수록 신뢰할수 있다는 의미이다. Table 1에서 보는 바와 같이 CPC 생산성은 가장 큰 F값과 가장 작은 P값을 가지는 glucose와 CSL의 영향이 가장 큰 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 glucose와 CSL의 최적농도를 구하고자 하였다.

3. RSM(Response Surface Methodology)에 의한 최적농도 결정

ANOVA로부터 결정된 glucose와 CSL의 최적농도를 결정하기 위해 Table 2와 같이 여러 범위에서 실험하여 실험값을 구했다. 이 결과를 토대로 RSM을 실행하였고 CPC 생산량에 대한 다항식을 다음과 같이 얻었다.

CPC 생산량 = 0.418 - 0.005X - 0.188X2 + 0.101Y - 0.104Y2 + 0.076XY

(X = glucose, Y = CSL)

다항식을 통한 mesh plot을 통해 각각의 최적농도를 구할수 있었다. 통계학적으로 계산된 최적농도는 1.95% glucose와 5.59% CSL이었고 이때의 CPC 예상값은 0.4 g/L이었다 (Fig. 2).

4. 배지최적화를 통한 CPC 생산성 향상

통계학적인 방법을 이용하여 최적화된 생산배지조성은 1.95% glucose, 0.8% $(NH_4)_2SO_4$, 0.3% KH_2PO_4, 0.5% K_2HPO_4, 0.5% DL-methiomine과 0.4% trace element solution, 5.5% corn steep liquor로 최적화 되었다.

최적화한 후의 *acremonium* M25를 배양한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 균체량은 배양 4일째까지 증가하여 최대 균체량 35 g/L를 나타내었고 CPC의 생산도 배양 초기부터 시작되어 3일째까지 증가하여 최대값 0.43 g/L를 나타내었다. 그렇지만 3일 이후 급격하게 감소하는 것을 알수 있었다. 그리고 Fig. 4에서 보듯이 CPC 생산성은 0.0059 g/l·h를 나타내었고, 배지최적화 하기 전 결과보다 최적화 후의 CPC 생산성이 66%가 향상됨을 보였다.

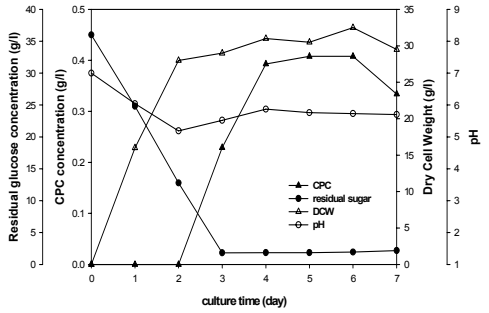

Fig 1. Time courses of CPC concentraion, residual sugar, cell mass, pH in the main culture.

Table 1. The statistical analysis by ANOVA.
(A : sucrose, B : glucose, C : $(NH_4)_2SO_4$
D : DL-methionine, E : CSL)

Factor	CPC production	
	F value	P value
A	176.60	0.0008
B	**815.03**	**0.0001**
C	31.03	0.0114
D	1.32	0.3339
E	**197.84**	**0.0008**
A*B	12.36	0.0390
A*C	25.48	0.0150
A*D	1.94	0.2580
A*E	30.64	0.0116
B*C	50.44	0.0057
B*D	5.77	0.0957
B*E	**276.95**	**0.0005**
C*D	3.67	0.1514
C*E	0.02	0.8981
D*E	58.13	0.0047

Table 2. Experimental design and results for the determination of optimal conditions using glucose and CSL

RUN	glucose	CSL	CPC production
1	-1	-1	0.170
2	1	-1	0.065
3	-1	1	0.185
4	1	1	0.319
5	-1.414	0	0.072
6	0	-1.414	0.035
7	1.414	0	0.062
8	0	1.414	0.334
9	0	0	0.408
10	0	0	0.408
11	0	0	0.408

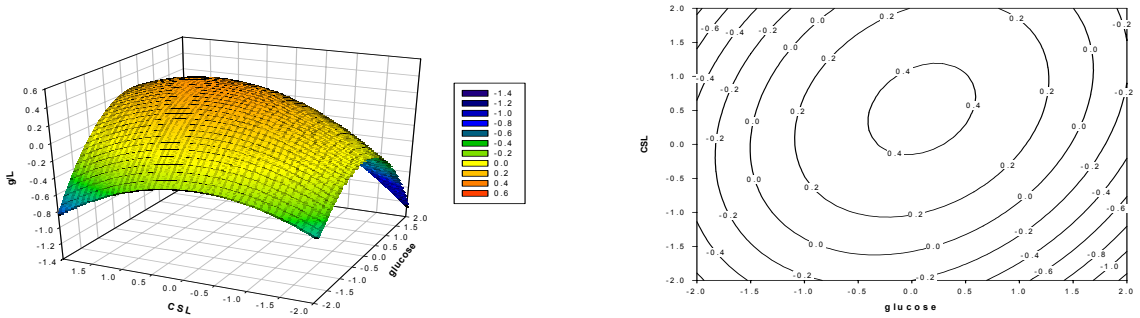

Fig 2. The effect of glucose and CSL on CPC production.

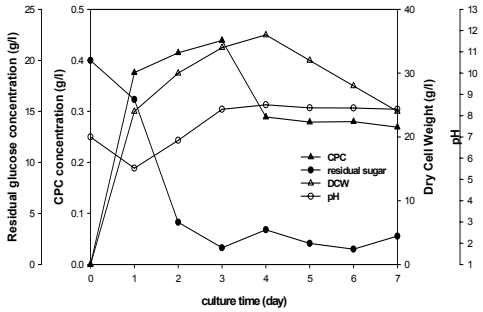

Fig 3. Time courses of main culture in the optimized media composition.

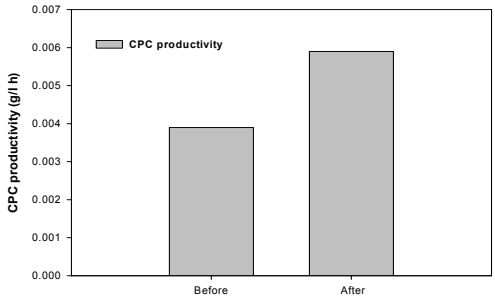

Fig 4. Comparison of CPC productivity.

감사의 글

본 연구를 지원하여 주신 유변공정연구센터 (한국과학재단 ERC)에 감사드립니다.

참고문헌

1. A. J. G. Cruz, A. S. Silva, C. O. Hokka, : *Chem. Eng. Sci.*, **54**, 3137-3142 (1999)
2. G. Seidel, C. Tollnick, M. Beyer, Y. Fahimi, K. Schugerl, : *Process Biochem.*, **38**, 229-239 (2002)
3. M. S. Lee, J. S. Lim, C. H. Kim, S. W. Kim, : *Letters in Appl. Microbiol.*, **32**, 402-406 (2001)