

Cephalosporium acremonium 변이주가 생성하는 Cephalosporin C의 정제

이현주 · 손영선 · 안동호 · 김현수* · 현형환¹

제일제당(주) 종합연구소, ¹한국외국어대학교 자연과학대학 미생물학과

Purification of Cephalosporin C Produced by *Cephalosporium acremonium*

Lee, Heon-Ju, Young-Sun Sohn, Dong-Ho Ahn,
Hyun-Su Kim* and Hyung-Hwan Hyun¹

R&D Center, Cheil Foods and Chemicals Inc., 522-1, Dokpyong-Ri
Majang-Myon, Ichon-Kun, Kyonggi-Do 467-810, Korea

¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences,

Hankuk University of Foreign Studies, Mohyun-Myun, Yongin-Kun, Kyonggi-Do 449-850, Korea

Abstract — For an industrial-scale purification and production of cephalosporin C from a culture broth of *Cephalosporium acremonium* CSA-2.8A3 mutant, ultrafiltration, column chromatography, reverse osmosis, and spray drying were employed. Above 90% of yield and high purity of cephalosporin C were obtained through WA-30, HP-20, XAD-2000 and SK-1B column chromatographies. Especially, in the tandem operation of the columns, the recovery yield was increased up to 96%. The purified cephalosporin C was stable at 4°C and in acidic condition, while it was unstable at room temperature and in alkaline condition at pH above 8.0. Cephalosporin C powder or a final product prepared by spray drying contained 85.5% of sodium cephalosporin C, 6.3% of water, 4.63% of free Na⁺ ions, and traces of metal ions.

Cephalosporin C는 Gram 양성 및 음성세균에 모든 항균력을 갖는 물질로 각종 세균에 대하여 넓은 스펙트럼을 갖는 cephalosporin계 항생제의 전구물질인 7-amino cephalosporanic acid(7-ACA)로 전환되어진다. 따라서 cephalosporin계 유도체들의 전구물질인 7-ACA를 생산하기 위해서 미생물 배양이 끝난 발효 broth내에 존재하는 색소, 단백질, 다당류 등으로부터 cephalosporin C를 순수분리하는 공정이 개발되어야 한다.

Penicillin G와 같은 hydrophobic compound는 낮은 pH에서 용매추출법(1)으로 정제하고 있으나 cephalosporin C의 경우에는 α -amino adipyl 잔기의 hydrophilic 성질을 이용하여 흡착 및 이온교환수지를 이용한 정제법이 사용되고 있다.

Batchelor 등과 Abraham 등은 이온교환방법에 의

한 cephalosporin C 회수법을 고안하였고, activated carbon column을 통해 불순물과 무기염을 제거하였다(2-5). Voser 등은 polystyrene계 synthetic macroporous resins를 사용하여 친수성 항생물질 분리에 사용하였으며(6), Pirotta는 polystyrene non-polar resin인 암버라이트 XAD-2.4 그리고 ER-180을 사용하여 불순물과 무기염 등을 제거하고 흡착된 cephalosporin C를 용출제를 사용하여 분리하는 방법을 보고한 바 있었다(7,8).

따라서 본 연구에서는 cephalosporin C의 공업적인 생산을 위해 흡착 및 이온교환수지 등을 사용하여 색소와 불순물을 효율적으로 제거하여 cephalosporin C를 높은 수율로 정제하는 방법을 개발하였으며 이에 대한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

Key words: Purification, cephalosporin C(CPC), consecutive operation, yield

*Corresponding author

Cephalosporium acremonium YC122로부터 methionine 생합성 능력이 뛰어난 변이주인 *Cephalosporium acremonium* CSA-2.8A3을 사용하였고 30l 및 150l fermenter에서 corn steep liquor 35 g/l, peanut powder 25 g/l, gluten meal 15 g/l, CaSO₄·1/2H₂O 10 g/l, DL-methionine 5 g/l, CaCO₃ 3 g/l, (NH₄)₂SO₄ 10 g/l, FG-60 33 g/l, rice oil 35 g/l, methylolate 35 g/l, antifoam 0.7 g/l를 pH 7.2로 맞추어 25°C에서 7일간 배양하였다.

분석방법

Cephalosporin C농도 및 흡광도는 HPLC(Beckman model 163)와 spectrophotometer(Beckman) 그리고 conductivity meter(TOA CM-20s model)를 사용하였다. HPLC는 ultrasphere C-18 column을 사용하였고, 전개용매는 KH₂PO₄(0.1%), CH₃CN : H₂O (3 : 97)의 비율로 인산으로 pH 4로 맞추어 1.0 ml/min의 유속으로 254 nm에서 측정하였고(9-11), conductivity는 20 ms/cm, 색도는 420 nm에서 흡광도로 측정하였다. 최종 분말제품의 수분과 이온분석은 칼피셔(Fisher model 394) 및 ICP(JY 38 type II) 방법으로 행하였다.

Cephalosporin C 정제

미생물 배양이 끝난 발효 broth는 크게 3 step으로

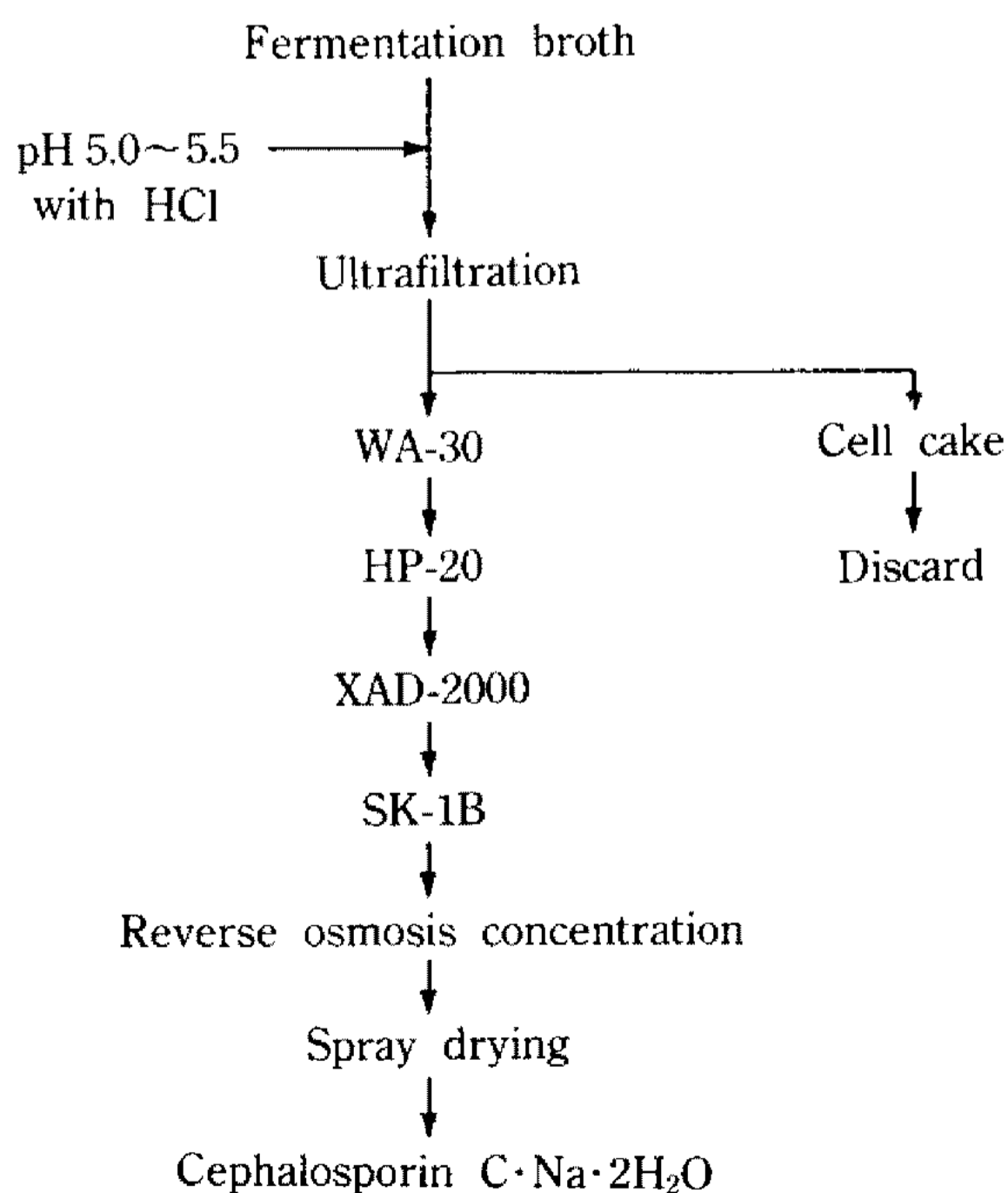


Fig. 1. Purification Process of Cephalosporin C.

정제하였다. 먼저 ultrafiltration에 의한 균체제거공정, 수지공정 그리고 농축 및 결정화공정을 통해 정제하였으며 전체적인 공정은 Fig. 1과 같다.

Ultrafiltration 및 수지공정

발효액내의 균체 및 배지고형분을 제거하기 위해 200 ml/min의 유속으로 Carbosep membrane (NMWL : 50,000, 0.32 m²)에서 diafiltration을 행하였다. Ultrafiltration이 끝난 broth에서 cephalosporin C를 정제하기 위해 약음이온교환수지인 WA-30 column chromatography와 폴리스티렌 계열의 HP-20 그리고 암버라이트 XAD-2000 column chromatography 그리고 강양이온교환수지인 SK-1B column chromatography를 사용하였다. 이때 WA-30과 HP-20는 1.5 s.v(space velocity), 암버라이트 XAD-2000는 0.5 s.v, SK-1B는 8 s.v의 유속으로 각 수지들을 수세 및 용출하였고 각각의 수지에서 cephalosporin C 수세 및 용출의 종결은 conductivity가 0.5~1.0 ms/cm에서 분획 후 HPLC로 분석하여 결정하였다.

결과 및 고찰

Cephalosporin C 정제

약음이온교환수지인 WA-30과 소수성교환수지인 HP-20, 암버라이트 XAD-2000 그리고 NaOH로 충전된 강양이온교환수지인 SK-1B column chromatography를 통해 단백질과 다당류 등의 불순물과 색소가 제거되었고 소디움염 cephalosporin C가 순수정제되었다(Fig. 2).

Fig. 2와 3에서 보여지듯이 WA-30과 HP-20 수지

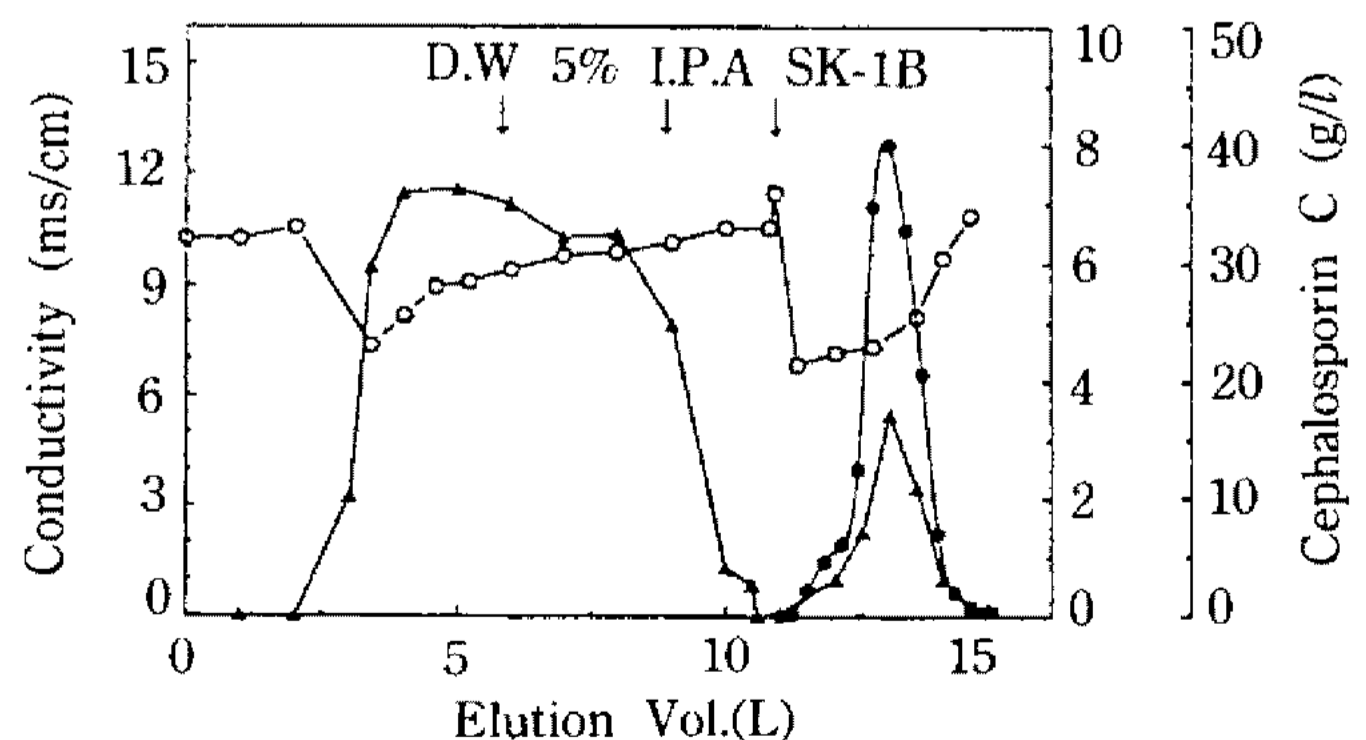


Fig. 2. Purification profile of cephalosporin C on chromatography of WA-30, HP-20, XAD-2000 and SK-1B. ●; cephalosporin C, ▲; conductivity, ○; pH.

에서는 불순물과 색소와 함께 cephalosporin C도 흡착하게 되나 물로 쉽게 용출되므로 상기 두 수지에서 흡착, 수세 및 용출을 통해 80% 이상의 순도와 탈색도를 볼 수 있었다. WA-30과 HP-20 수지를 통과한 cephalosporin C는 암버라이트 XAD-2000과 SK-1B column chromatography에 흡착되며 이는 5% isopropyl alcohol로 용출하면서 cephalosporin C 용액만을 분획하였고 분획된 cephalosporin C 용액의 탈색율과 HPLC chromatogram상의 면적비에 의해 순도는 각각 96%, 98%로 나타났다(Fig. 3).

Table 1은 실험실 scale에서 WA-30, HP-20, XAD-2000 그리고 SK-1B column chromatography를 각 step별로 정제한 결과이며 이때의 최종 수율은 93.6%로 나타났다.

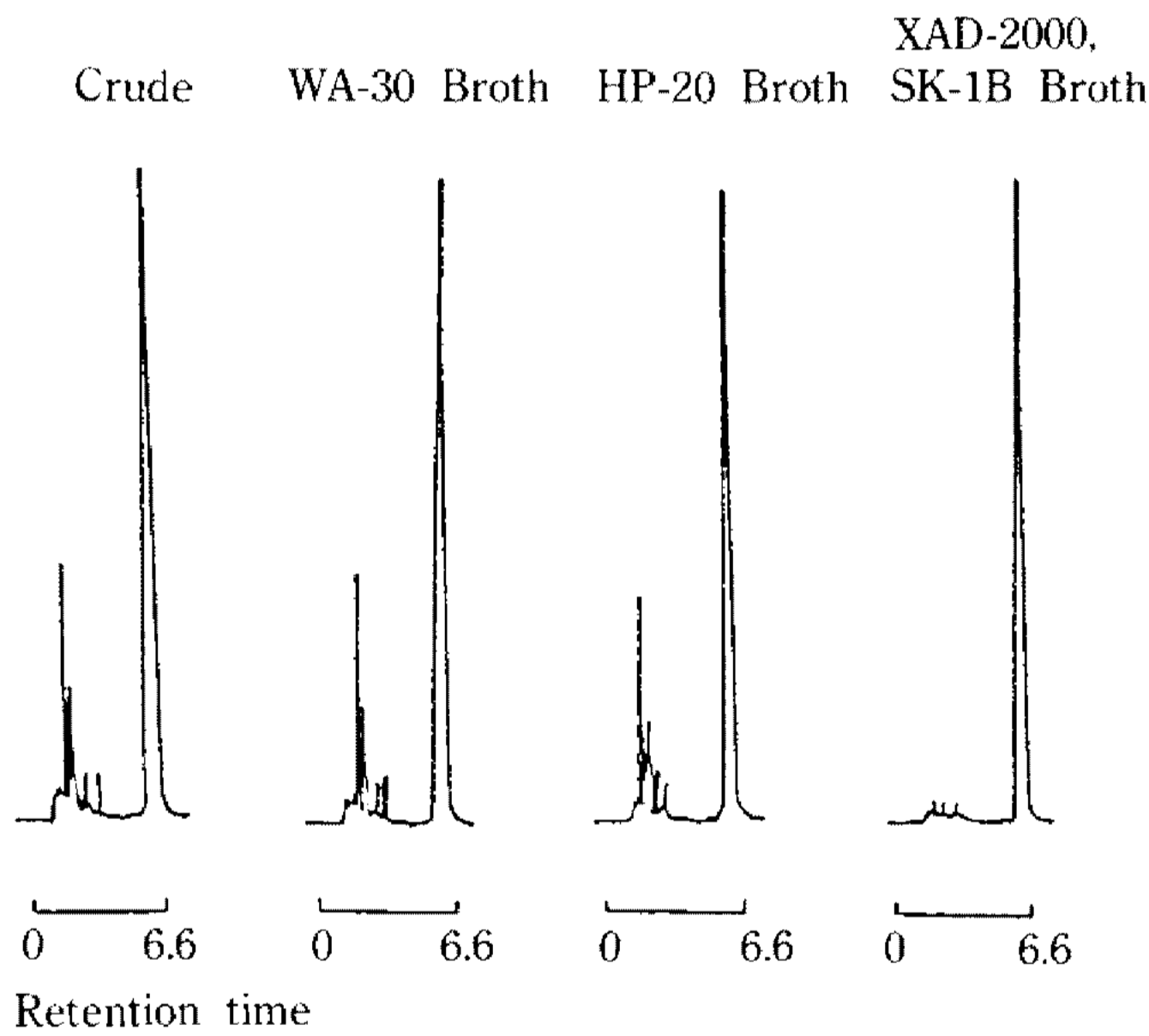


Fig. 3. High performance liquid chromatogram in each step of cephalosporin C purification ultrasphere ODS C-18 column and 0.1% potassium phosphate, and Acetonitrile: Water (3:97) pH 4.0 with H₂PO₄ as mobile phase were used.

The flow rate and absorbance wavelength were 1.0 ml/min and 254 nm, respectively.

Table 1. Purification of cephalosporin C from *C. acremonium* in lab. scale

Purification step	Volume (l)	Total CPC (g)	Decolorization (%)	*Purity (%)	Yield (%)
U/F broth	5.0	90.5	0	72	100
WA-30	5.5	89.4	43	79	98.8
HP-20	8.7	87.0	86	80	96.1
XAD-200, SK-1B	7.7	84.7	96	98	93.6

*HPLC chromatogram area % of cephalosporin C

온도 안정성

정제된 cephalosporin C를 4°C, 20°C, 30°C에서 isopropyl alcohol 용액내에서 1~10일 동안 방치하면서 HPLC로 잔존량을 측정된 결과, Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 4°C에서는 10일 이상 동안 안정하게 유지되었으나, 20°C에서는 3일과 10일 동안 각각 20%, 50% 정도 손실되었고, 30°C에서는 3일 동안 50% 정도가 손실이 일어났다. Cephalosporin C 용액도 검붉게 변하면서 420 nm에서 흡광도로 증가하는 것으로 보아 색깔을 갖는 다른 물질로 상당 부분이 변성되는 것으로 생각된다.

pH 안정성

Fig. 5는 cephalosporin C를 5% isopropyl alcohol에서 pH를 조정하여 24시간 방치한 후 잔존량을 측정한 결과이며, 대체로 pH 2~8에서는 안정하게 유지되나 pH 8 이상에서는 급격한 손실이 발생함을 알

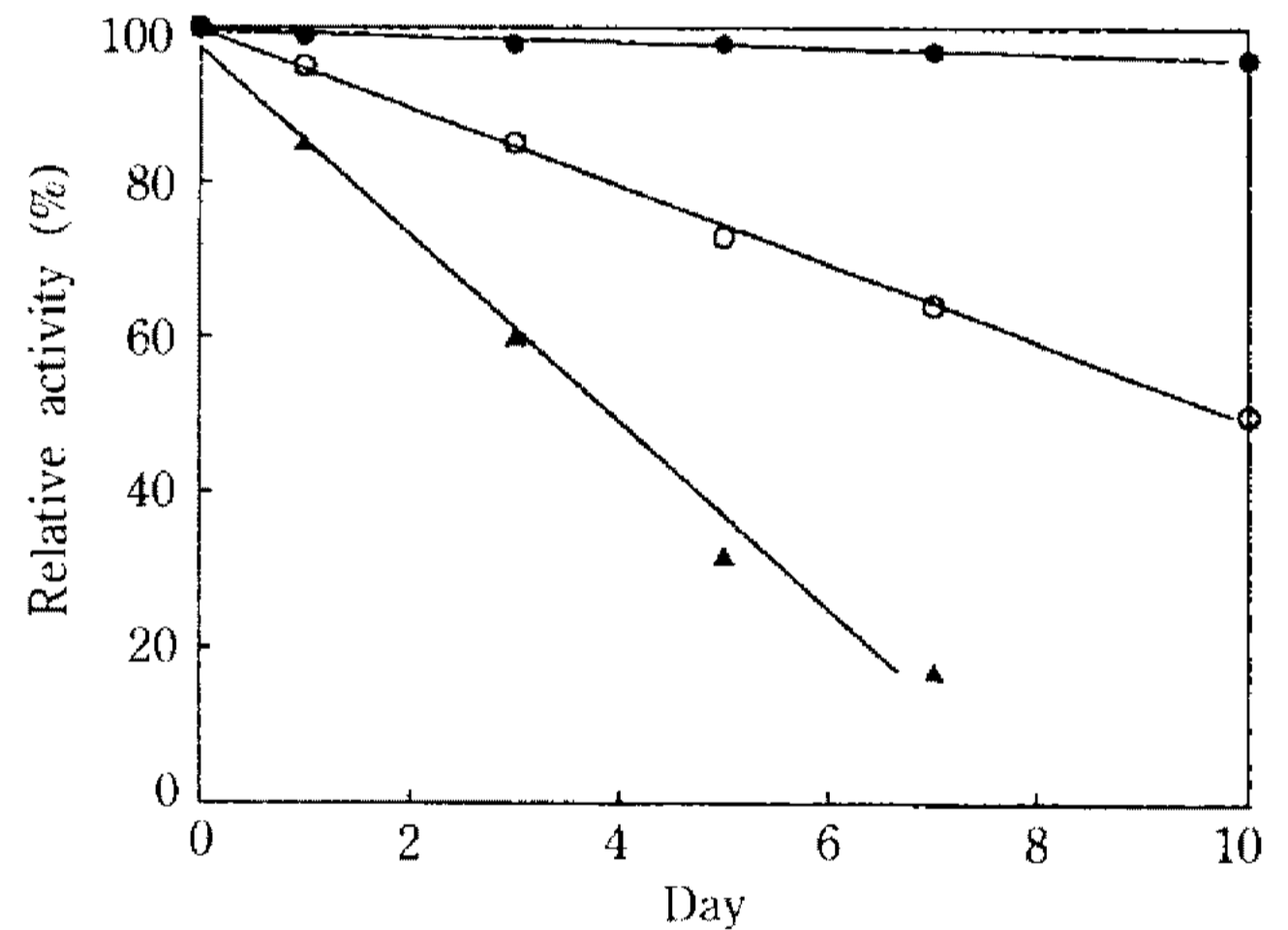


Fig. 4. Effect of temperature on the stability of cephalosporin C.

The purified CPC (15 g/l) was incubated in 5% isopropyl alcohol solution (pH 7.0) at 4, 20, 30°C for 1~10 days and then residual activity was assayed by HPLC. ●; 4°C, ○; 20°C, ▲; 30°C.

수 있었다. 따라서 모든 정제작업은 pH 4~6 범위에서 이루어져야 회수율이 높게 나타남을 알 수 있었다.

역삼투막 농축

Fig. 6은 수지공정을 통해 정제된 cephalosporin C를 reverse osmosis membrane(MW : 300)상에서 15 kg/cm²의 압력으로 농축한 것이며, 농축에 따른 cephalosporin C 농도, 온도, permeate 유속, 그리고 permeate로 유출되는 cephalosporin C 농도 등의 변화를 나타낸 것으로 cephalosporin C가 100 g/l 농도까지 농축되면 급격히 유속이 늦어지며, permeate로 빠져 나가는 cephalosporin C의 농도도 2 g/l 정도까지 증가하였다.

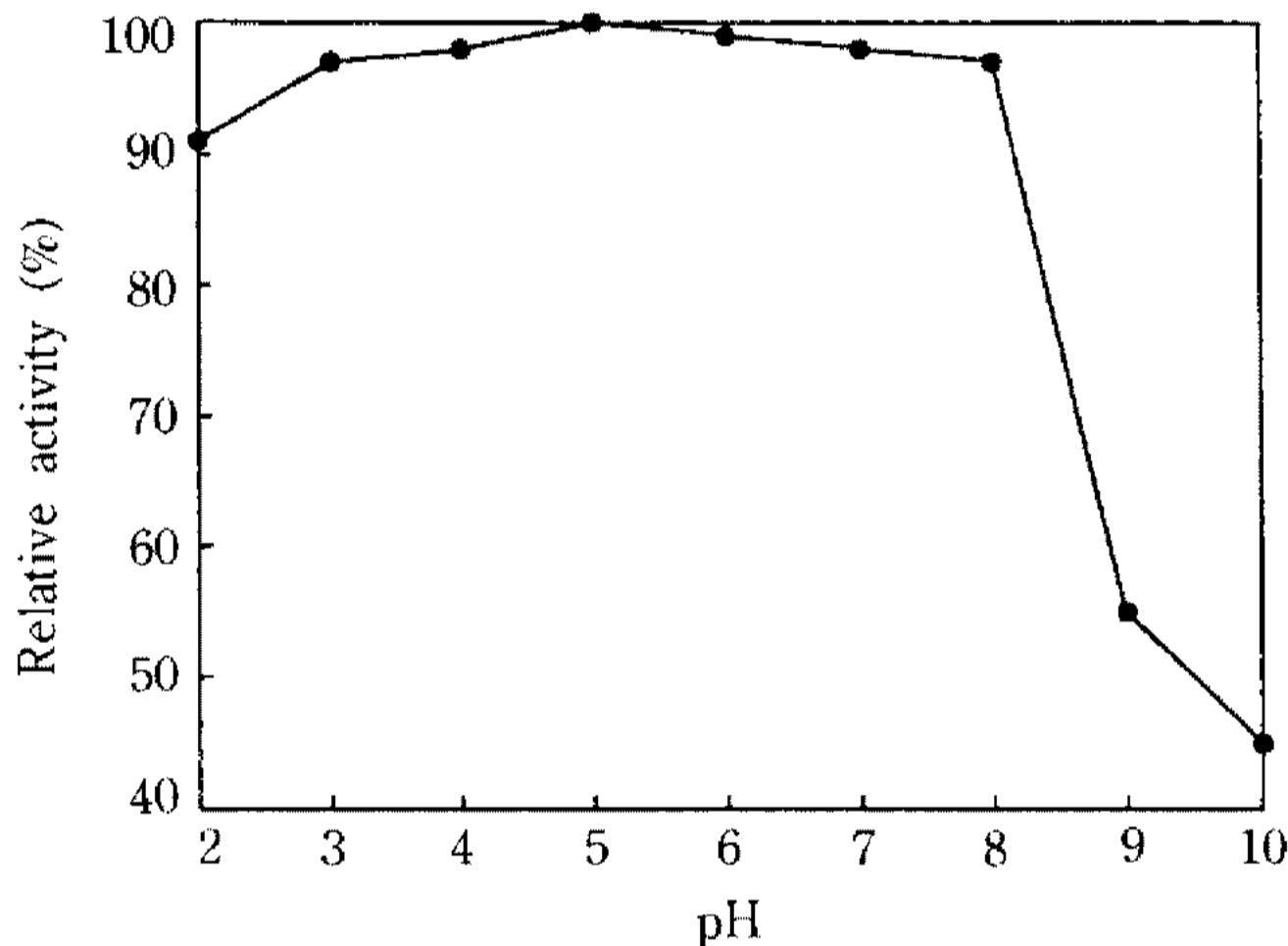


Fig. 5. Effect of pH on the stability of cephalosporin C.

The purified CPC of various pH values were incubated for 24 hours at 4°C.

Table 2는 cephalosporin C의 공업적 생산을 위해 실험실 scale보다 약 30배 scale up시킨 pilot scale에서의 실험결과이며 백색 결정의 cephalosporin C 제품의 최종 생산수율은 82%로 나타났다. 이는 최종 생산된 S/D 결정제품의 양인 2,135g 중에서 cephalosporin C·Na·2H₂O의 함량이 85.5%를 점유하고 있었고 따라서 S/D 결정제품 중 85.5%에 해당하는 1,826g을 최종 생산량으로 계산하여 산정한 비율이다. 특히 수지공정에서 WA-30, HP-20, XAD-2000 그리고 SK-1B 수지들을 직렬하게 연결하여 전체수지에 cephalosporin C 용액을 통과시키면서 증류수나 용출

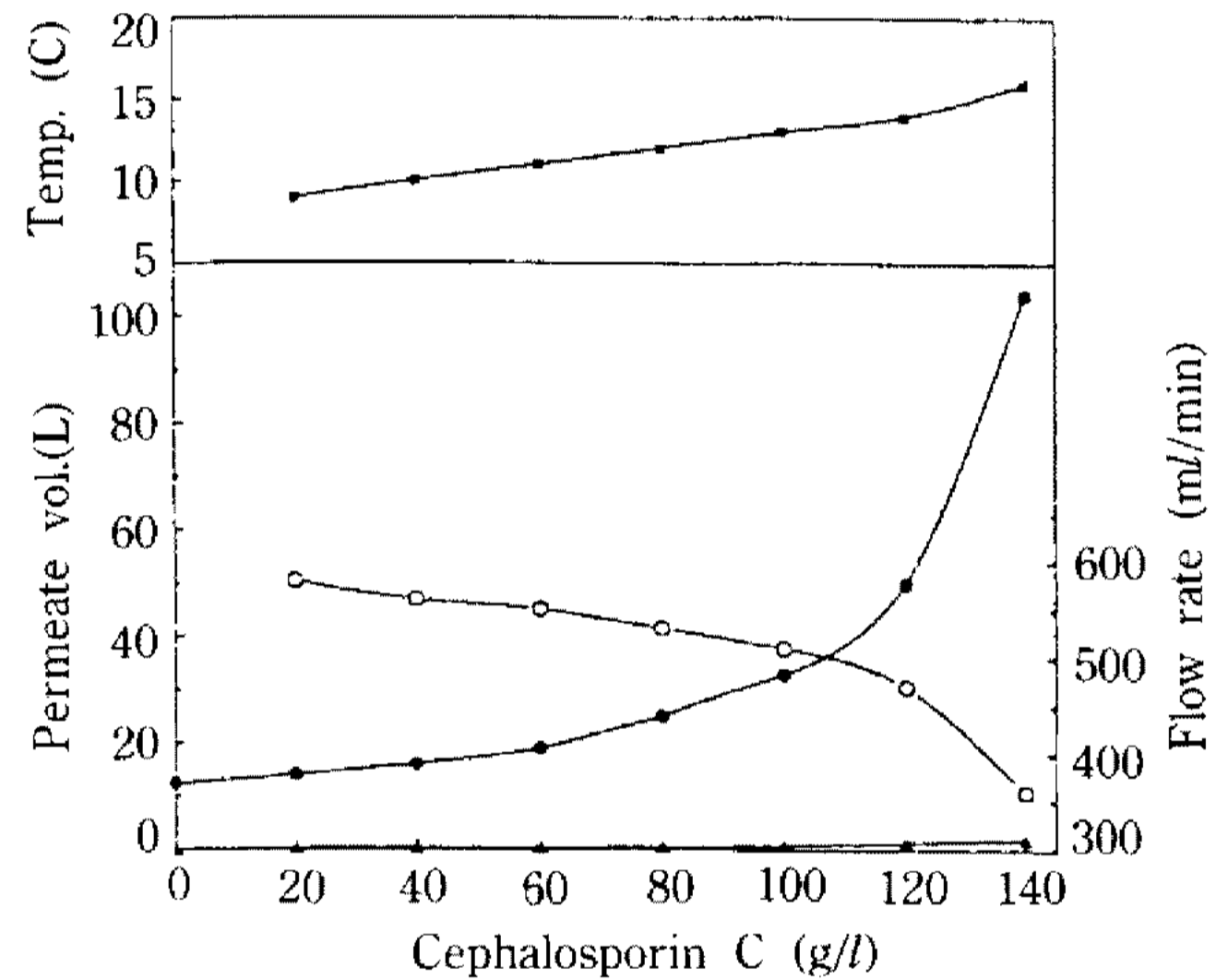


Fig. 6. Profile of reverse osmosis concentration. Operation pressure and membrane M.W. were 15 kg/cm², 300, respectively.

●; cephalosporin C, ▲; permeate cephalosporin C, ○; flow rate, ■; temperature.

Table 2. Purification of cephalosporin C from *C. acremonium* in pilot scale

Purification step	Volume (l)	Concentration (g/l)	Total CPC (g)	Recovery (%)	Yield (%)
Fermentation broth	102	21.6	2,204		100
Ultrafiltration	182	11.26	2,050	93	93
Resin operation	160	12.3	1,970	96.1	89
Reverse osmosis	18	104	1,871	95	85
*Spray dry (CPC·Na·2H ₂ O)			2,135 (1,826)	97.6	82

*Cephalosporin C·Na·2H₂O content: 85.5%

Table 3. Specification of cephalosporin C products

Water (%)	Na (%)	Ca (ppm)	Fe (ppm)	Zn (ppm)	K (ppm)	CPC·Na·2H ₂ O (%)
6.3	4.63	280	232	11	122	85.5

제로 수세, 단리 그리고 용출을 조절함으로써 96%까지 수지정제수율 상승을 이룰 수 있었다.

Table 3은 이상의 방법으로 생산된 최종 결정제품의 조성을 분석한 것으로 결정제품 중 cephalosporin C·Na·2H₂O의 함량은 85.5%로 나타났다. 그 외에는 수분이 6.3% 정도 존재하였고 free Na⁺이 다소 포함되어 있었고 Ca, Fe, Zn 그리고 K와 같은 금속이온의 함량은 500 ppm 이내로 존재하였다.

요 약

Cephalosporium acremonium CSA-2.8A3 변이주로부터 생성된 cephalosporin C를 정제하여 산업적 이용을 위해 ultrafiltration으로 균체를 제거하고 수종의 수지공정을 통하여 소디움염 형태의 cephalosporin C를 정제하였으며 역삼투막에 의한 농축과 분무건조를 행하였다.

WA-30, HP-20, XAD-2000, SK-1B column chromatography를 통해 90% 이상의 높은 수율과 순도를 얻을 수 있었고, 특히 상기 수지들을 직렬로 연결하여 사용함으로써 수율을 96%까지 올릴 수 있었다.

정제된 cephalosporin C는 산성조건과 4°C에서는 안정하였으나, pH 8 이상의 염기성 조건과 상온에서는 안정성이 급격히 약화되었다. 따라서, 정제된 cephalosporin C는 역삼투막 농축과 분무건조로 결정화하였으며 백색 결정제품 중 소디움염 cephalosporin C의 함량은 85.5%였고, 그 외의 대부분은 수분 및 Na⁺이었고 500 ppm 이내의 Ca, Fe, Zn, K 등과 같은 금속이온도 미량 존재하였다.

참고문헌

1. Andrisano, R., G. Guerra and G. Mascellani. 1976. Extraction of cephalosporin C from fermentation broths via lipophilic intermediates and the production of 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA). *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **26**: 459-568.
2. Belter, P.A. 1985. Ion exchange recovery of antibiotics. Pp.473-480. In M.Y. Murray (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2. Pergamon Press.
3. Abraham, E.P., G.F. Newton and C.W. Hale. 1965. Process for isolating cephalosporin C. *US Pat.* **3,184,454**.
4. Newton, G.G.F., E.P. Abraham. 1955. Cephalosporin C, a new antibiotic containing Sulphur and D-aminoadipic acid. *Nature* **175**: 548-552.
5. Town, P.W., E.P. Abraham, G.G.F. Newton, C.W. Hale and G.A. Miler. 1962. Incorporation of Acetate into cephalosporin C. *Biochem. J.* **84**: 157-166.
6. Voser, W. 1982. Isolation of hydrophilic fermentation products by adsorption chromatography. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **32**: 109-115.
7. Pirotta, M. 1982. Amberlite ER-180- a new styrene divinylbenzene adsorbent specifically designed for industrial chromatography and particularly for the extraction of cephalosporin C. *Angew. Makromol. Chem.* **109**: 197-201.
8. Sacco, D., E. Dellacherie. 1981. Liquid chromatography of cephalosporin C and α -amino acid mixtures on polyfunctional polystyrene resins. *J. Chromatography.* **211**: 79-86.
9. Kennedy, J.H. 1979. High performance liquid chromatography analysis of fermentation broth: Cephalosporin C and tyrosin. *J. Chromatographic Sci.* **16**: 492-495.
10. Roderick, E.W. and M. Fox. 1982. Custom made C18 columns for the hydrophobic chromatography of cephalosporin C derivatives. *J. Antibiot.* **35**: 1538-1546.
11. Usher, J.J., M. Lewis and D.W. Hughes. 1985. Determination by high performance liquid chromatography of some compounds involved in the biosynthesis of penicillin and cephalosporin C. *Anal. Biochem.* **149**: 105-110.

(Received November 28, 1991)

1. Andrisano, R., G. Guerra and G. Mascellani. 1976. Extraction of cephalosporin C from ferme-