

*Trigonopsis variabilis*의 고정화 및 Cephalosporin C로부터 7 β -(4-Carboxybutanamido)Cephalosporanic Acid의 전환

김종균 · 임재윤*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Immobilization of *Trigonopsis variabilis* and Conversion of Cephalosporin C to 7 β -(4-Carboxybutanamido)Cephalosporanic Acid

Kim, Jong-Gyun and Jai-Yun Lim*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,
Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

Abstract — An immobilized *Trigonopsis variabilis* cells having an high activity of D-amino acid oxidase(DAO) was used to convert CPC into GL-7-ACA. The optimal pH of the reaction system was 8.0~8.5, and the optimal temperature was 40°C. When immobilized cell was used repeatedly in semi-batchwise reaction, the system retained 80% of the initial activity after used of 12 times for over 12 hours. The storage stability of the immobilized cell was maintained for 30 days at 4°C. The CPC concentration for the maximal reaction rate was about 30 mM and 40 mM for free and immobilized cells, respectively. Substrate inhibition of CPC concentration more than 50 mM was overcome by 20~25% by immobilization. Pure oxygen supply into reaction system was most efficient in D-amino acid oxidase reaction. Continuous conversion to GL-7-ACA from CPC has been developed with an bioreactor system containing immobilized *T. variabilis* cells. By operation of the reactor for 5 hours, the average conversion yield of >80% and GL-7-ACA production of 40~45 mM per hour could be obtained.

Cephalosporin계 항생물질은 미생물 발효산물인 cephalosporin C(CPC)로부터 화학적 방법이나 효소 반응에 의하여 얻어진 7-amino cephalosporanic acid (7-ACA)에 다양한 반응기를 도입하여 새로운 물질을 반합성 함으로써 개발된다(13, 15). 기존의 화학적 방법에 의한 개발법의 여러가지 단점을 보완하고자 1970년대부터 7-ACA의 생산에 미생물 효소를 이용하려는 연구가 수행되었는데, 이 중 D-amino acid oxidase(EC 1. 4. 3. 3, DAO)(17)와 glutaryl-7-ACA (GL-7-ACA) acylase(12, 10)를 이용하는 2단계 효소법은 전환효율이 비교적 우수하여 실제로 7-ACA 생산에 이용 가능한 방법이다. 화학적 방법이나 효소법을 이용하여 CPC의 α -amino adipyl 잔기를 glutaryl기로 전환한 GL-7-ACA는 GL-7-ACA acylase에 의하여 7-ACA로 쉽게 전환된다(16). CPC로부터 GL-7-ACA로의 전환 반응은 두 단계로 진행되는데,

CPC로부터 DAO에 의한 산화적 탈아미노화 반응으로 α -keto adipyl 7-ACA가 생성되고 H₂O₂ 존재시 CO₂를 방출하며 GL-7-ACA로 전환된다(Fig. 1). CPC에 작용하는 DAO의 반응은 단순한 산화과정이라기 보다는 CPC의 α -amino adipyl chain을 변환하여 GL-7-ACA로 전환하는 반응이며, 이를 기질로 GL-7-ACA acylase에 의한 7-ACA 생산이 가능하다는 점에서 더욱 중요하다고 할 수 있다.

CPC에 활성이 있는 DAO를 생산하는 미생물은 *Trigonopsis variabilis*, *Fusarium solani* 등이 보고되었고(4, 14), 돼지의 신장에서 분리된 효소를 이용한 결과(11)도 있었다. 이들 중 *T. variabilis*는 대량배양에 의한 효소의 확보가 용이하고 반응 효율이나 전환율 면에서 우수한 것으로 알려져 있다. GL-7-ACA의 생산에 *T. variabilis*를 이용한 연구 사례는 대부분 균체를 그대로 사용하거나, 효소를 부분정제하여 사용하였는데, 균체의 직접 이용은 부산물의 생성과 균체의 제거 등 일부 문제점이 있고, 효소는 상당히 불안정하여 정제 단계가 까다롭기 때문에 실제로 생산

Key words: D-amino acid oxidase, *Trigonopsis variabilis*, cephalosporin C, GL-7-ACA

*Corresponding author

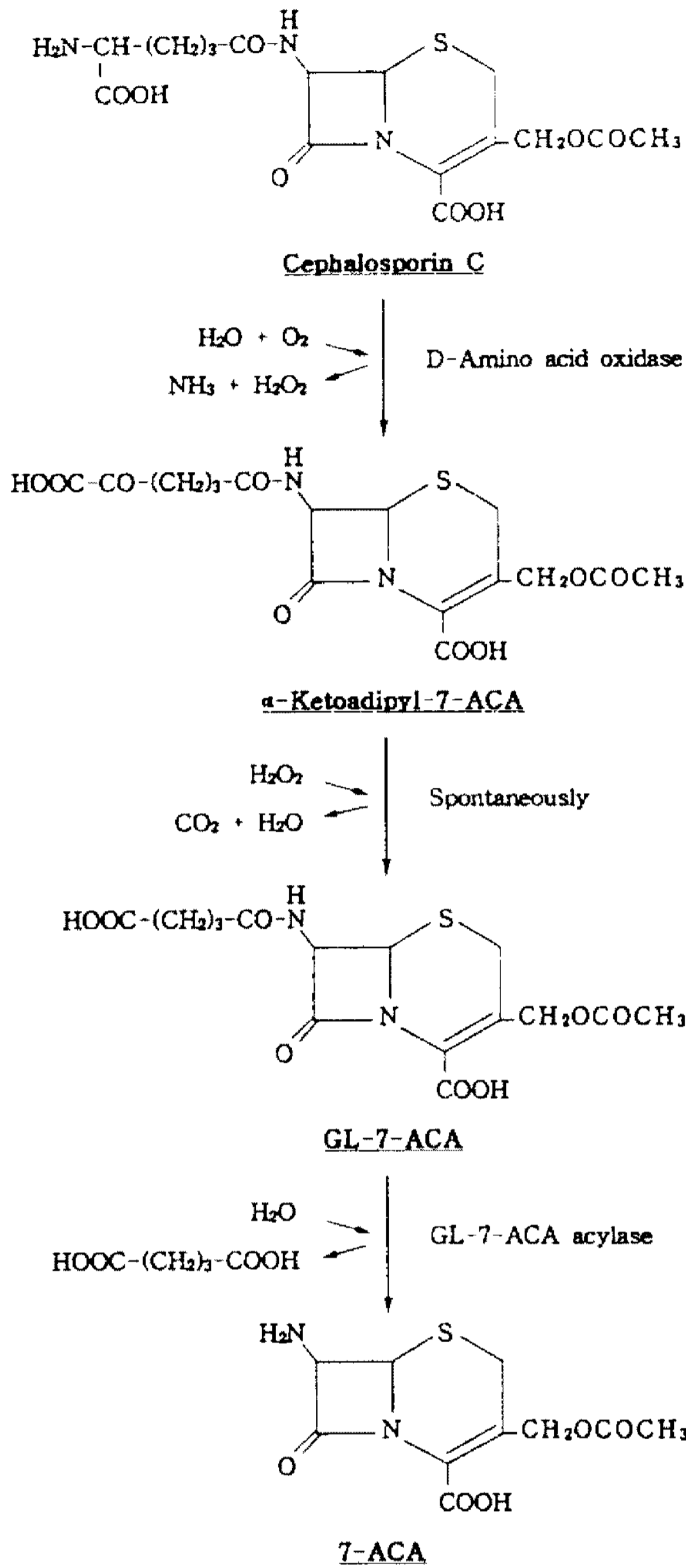


Fig. 1. Reaction scheme for the conversion of cephalosporin C to 7-ACA by D-amino acid oxidase and GL-7-ACA acylase.

반응에 사용하기는 어려움이 있다(2, 7). 따라서 본 연구에서는 미생물을 이용한 7-ACA 생산 연구의 일부로 DAO를 생산하는 *T. variabilis* 균체를 Ca-alginate에 고정화하고, 이를 이용한 연속 반응기를 설계하여 GL-7-ACA 생산을 시도하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 균주의 배양

D-Amino acid oxidase(DAO) 생산균으로는 효모인 *Trigonopsis variabilis* ATCC 58536 균주를 사용하였다. 균주의 대량배양은 배지 3 L가 포함된 5 L jar fermentor에서 수행하였으며, 배지는 glucose 10 g, yeast extract 10 g, malt extract 6 g, KH_2PO_4 5 g, K_2HPO_4 0.5 g, KCl 2 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g을 1 L 증류수에 녹여 사용하였고, 배지의 pH는 6.0으로 조절하였다. 동일배지에 28°C로 30시간 배양한 종균 배양액(200 ml)을 소포제(10%) 5 ml과 함께 접종하고 300 rpm, 0.75 vvm의 조건으로 28°C에서 통기교반하며 40시간 동안 배양하였다. 배양액을 6,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 모은 균체를 -20°C에 냉동 보관하고 실험에 사용하였다.

효소활성 측정

효소활성의 측정은 산화적 탈아미노화 반응으로 생성된 keto acid를 정량하는 2,4-dinitrophenyl hydrazine 발색법(16)을 사용하였다. 효소 반응액은 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.3)에 녹인 cephalosporin C(10 mM) 5 ml과 균체 1 g(습량), 또는 고정화 균체 2.5 g을 혼합하고 catalase와 소포제 20 μl 를 첨가한 뒤, 37°C 수조에서 10~30분간 반응시켰다. 효소 반응에 필요한 산소는 산소탱크를 사용하여 1 vvm의 속도로 공급하였다. 효소활성 1 단위는 분당 1 μmol 의 keto acid를 생산하는 균체량으로 정하였다.

최종산물인 GL-7-ACA의 검출은 Shibuya 등(12)의 방법에 따라 n-butanol, acetic acid, water(3 : 1 : 1)의 용매를 사용한 박층 크로마토그래피법(TLC)을 이용하였으며, 정확한 분석은 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하였다.

균체의 고정화

T. variabilis 균체의 고정화는 담체로서 Ca-alginate를 이용한 포괄법(5)에 따라 제조하였다. 고온가압살균 후 냉각시킨 4% sodium alginate 용액과 균체 현탁액(0.4 g/ml)을 동량 혼합하고, 이 혼합액을 18-gauge의 바늘이 부착된 주사기를 사용하여 살균된 0.2 M CaCl_2 용액에 한방울씩 떨어뜨려 구형으로 제조하였으며, 이를 상온에서 2시간 교반하고 4°C에 12시간 방치하여 강화시킨 뒤, 0.05 M CaCl_2 용액에 보관하여 실험에 사용하였다.

효소활성에 미치는 온도와 pH의 영향

온도에 대한 효소활성은 25°C ~ 65°C 범위에서 검토하였으며, 온도에 대한 안정성은 각 온도에서 균체나 고정화 균체를 3시간 동안 방치한 후, 표준조

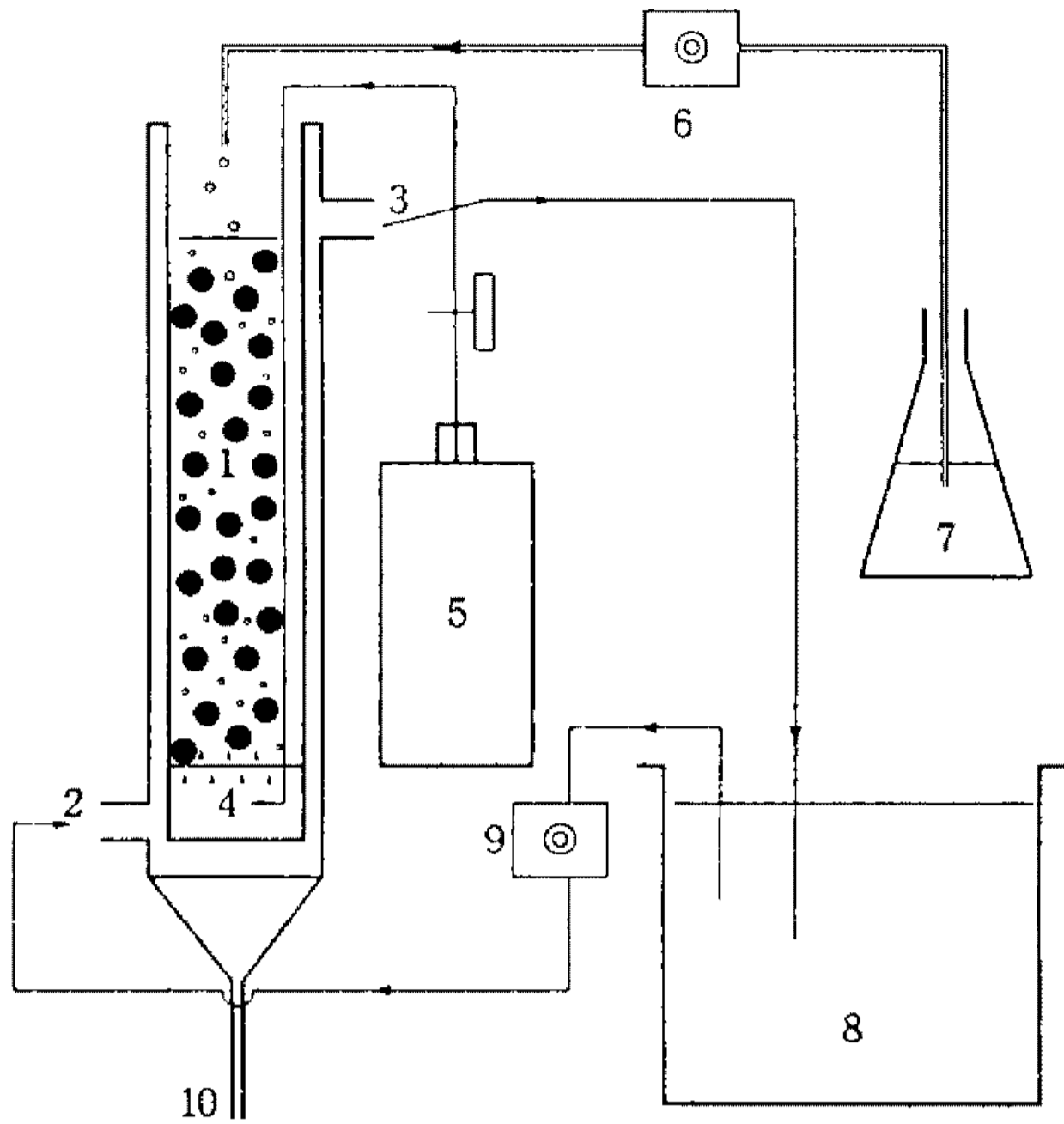


Fig. 2. Schematic diagram of column-type bioreactor packed with immobilized *T. variabilis* cells for continuous formation of GL-7ACA.

1: reactor; 2: warm water inlet; 3: warm water outlet; 4: oxygen sparger; 5: oxygen tank; 6: peristaltic pump; 7: CPC reservoir; 8: water bath(37°C); 9: water pump; 10: product outlet

건에서 잔여 활성을 측정하였다. pH에 대한 효소 활성 및 안정성은 pH 3.0~12.0 범위에서 검토하였는데, 안정성 검토는 각 pH 조건에서 4°C에 12시간 동안 방치한 후, 표준 조건에서 잔여 활성을 측정하였다.

GL-7-ACA 생산 반응기

회분식 반응은 37°C 수욕조에서 수행하였는데, 100 ml 용량의 비이커에 고정화 균체와 기질을 넣고 연속적으로 산소를 공급하면서 교반하였다. 연속 생산 반응기는 Fig. 2와 같이 water jacket이 달린 pyrex column(30×250 mm, bed volum 176 ml)을 사용하였고, 반응기의 온도를 37°C로 유지하면서 산소와 기질을 일정한 속도로 공급하고 반응산물을 같은 속도로 취하여 연속적 GL-7-ACA 생산을 수행하였다.

결과 및 고찰

균체의 고정화

균체의 고정화 방법에는 효소 활성, 고정화물의 안정성, 산물의 생산성, 제조과정 등 여러가지 조건이 고려되었는데, Ca-alginate에 의한 고정화 방법이 가장 우수하였고, 제조과정이 간단하며 공기 압축기를

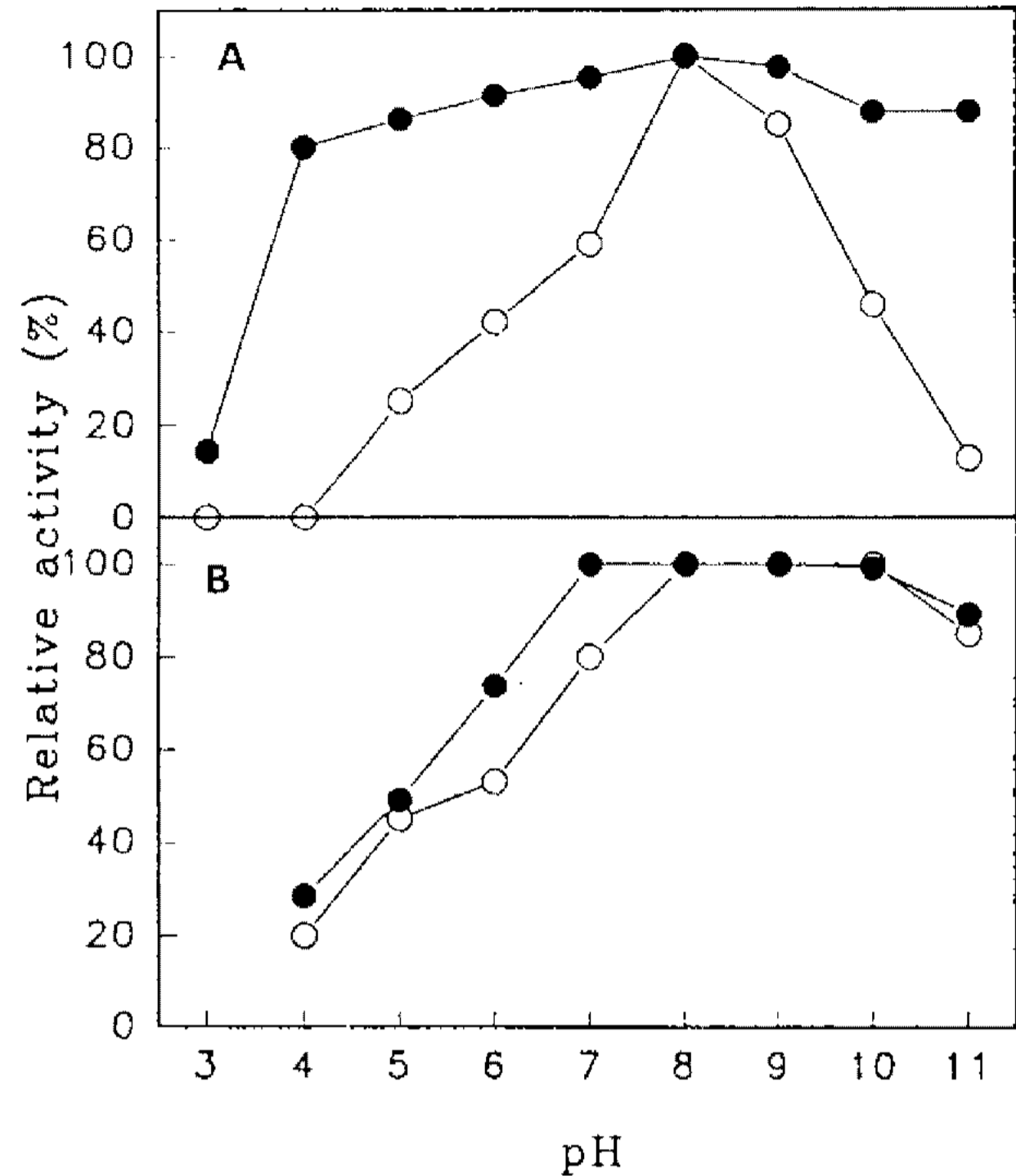


Fig. 3. Effect of pH on the DAO activity (A) and stability (B) of free (○) and immobilized cells (●).

Buffers: pH 3.0~3.5: glycine-HCl; 4.0~5.5: acetate; 6.0~8.0: sodium phosphate, 8.0~9.0: Tris-HCl; 10.0~11.0: carbonate; 11.0~12.0: Na₂HPO₄-NaOH

사용하여 연속적인 대량제조가 가능하였다.

pH에 의한 영향

각 pH 조건에서 30분간 비고정 균체와 고정화 균체의 효소 활성을 검토한 결과(Fig. 3-A), 비고정 균체에 비하여 고정화 균체가 pH에 대한 영향을 적게 받았으며, 반응의 최적 조건은 pH 8.0~9.0 범위로 나타났다. pH 8.0~9.0 사이의 효소 활성에 큰 차이는 없었으나, pH 8.3이 최적의 조건이었다. 고정화 균체의 경우 pH 4.0~11.0의 넓은 범위에서 80% 이상의 활성을 보임으로써 비고정 균체에 비하여 활성 범위가 상당히 넓었고, 비고정 균체와 고정화 균체 모두 산성 환경보다 pH 7.0 이상의 알카리 환경에서 안정하였다(Fig. 3-B).

온도에 의한 영향

효소 반응을 25°C~65°C의 온도 범위에서 30분간 수행하여 그 영향을 검토한 결과 Fig. 4와 같이 효소 활성은 35°C~45°C 범위에서 최대를 나타냈고, 균체의 고정화로 50°C 이상의 온도에서 약간의 활성 감소를 보였으며, 반응의 최적 온도는 40°C였다. 각 온도에서 3시간 동안 방치했을 때, 활성의 안정성은 55

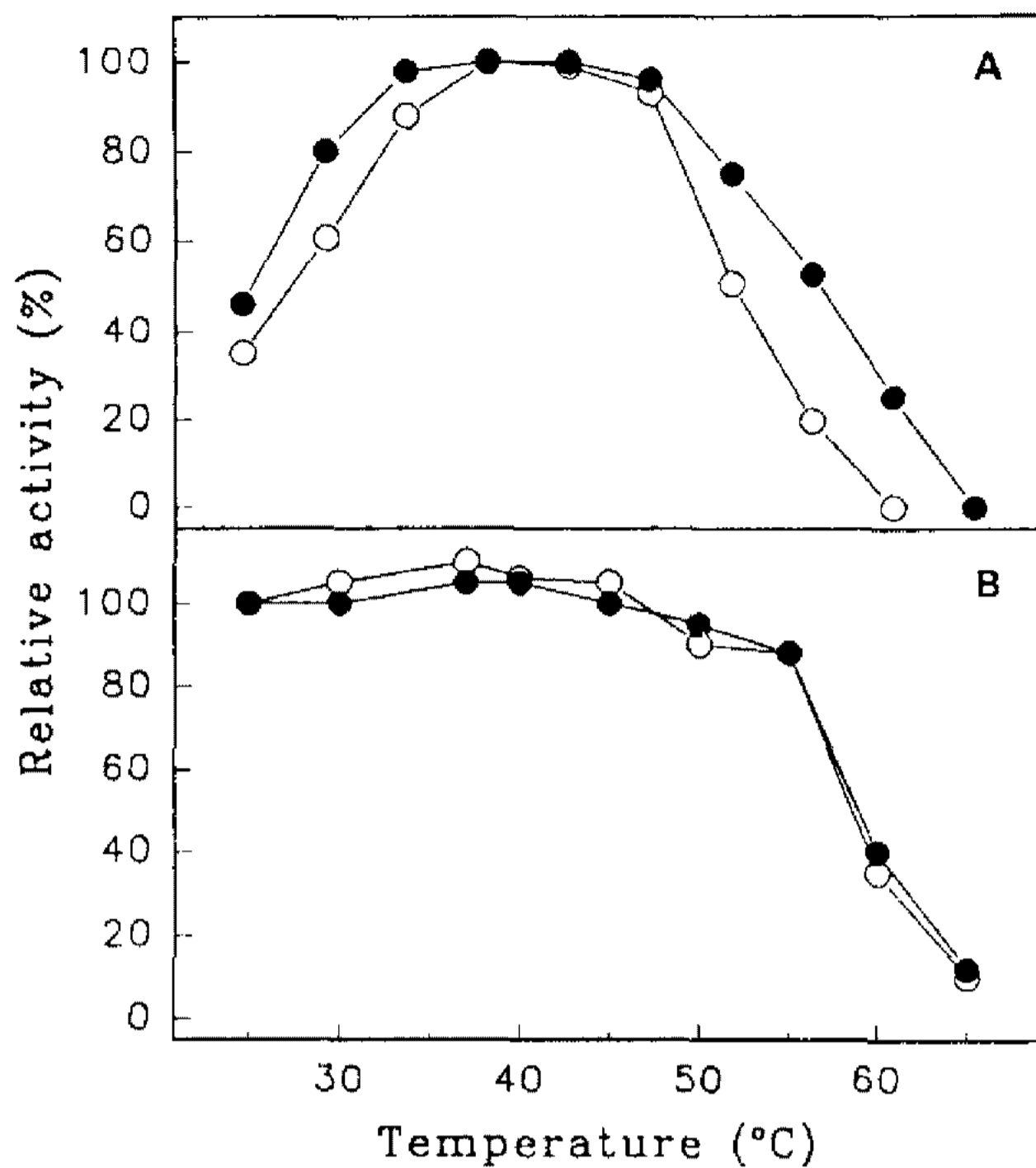


Fig. 4. Effect of temperature on the DAO activity (A) and stability (B) of free (○) and immobilized cells (●).

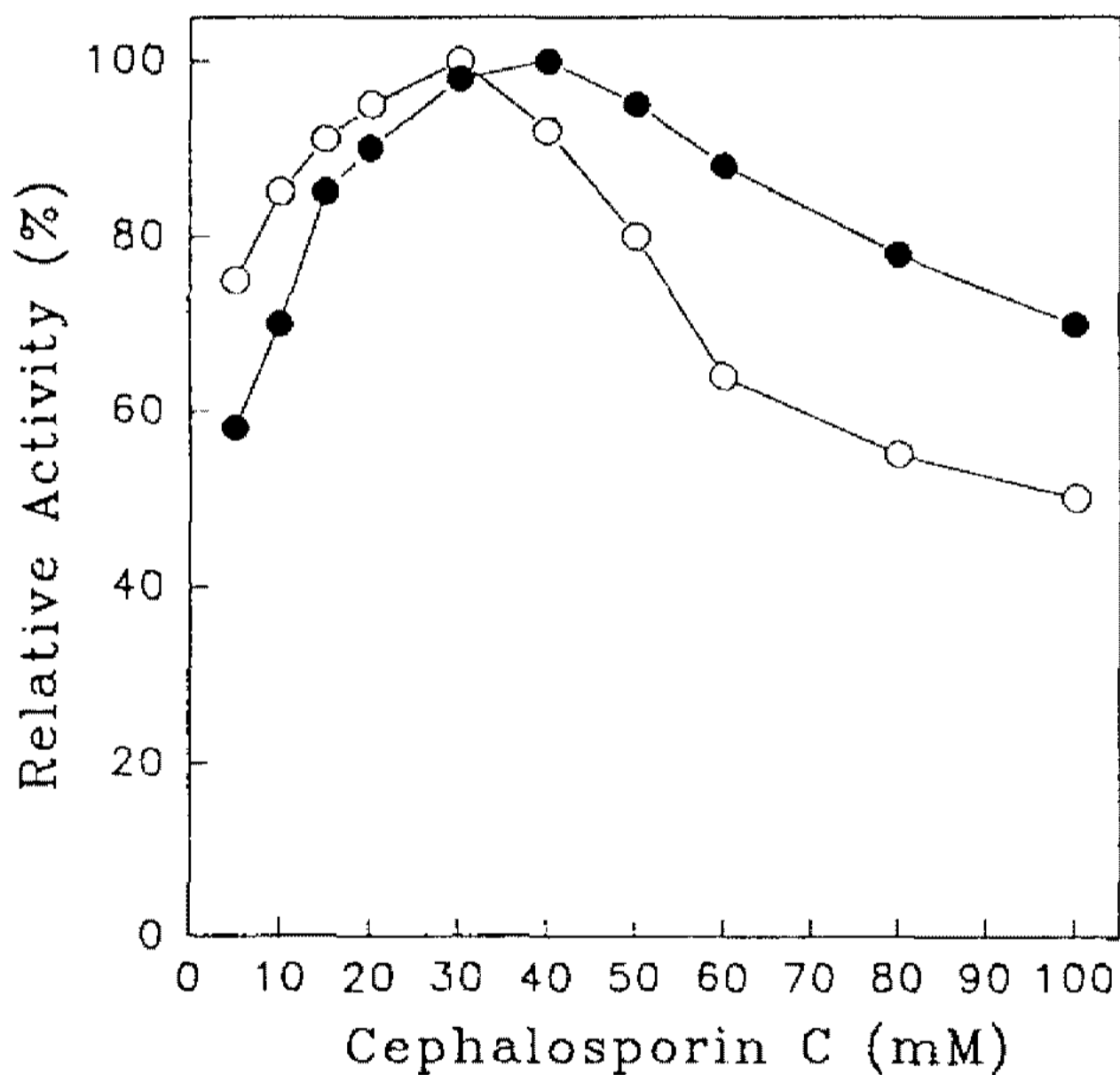


Fig. 5. Effect of cephalosporin C concentration on the DAO activity of free (○) and immobilized cells (●).

°C 까지 80% 이상 유지할 수 있었으며, 균체의 상태 별로 큰 차이를 보이지 않았다. 고정화 균체의 경우, 37°C 에서 12시간 동안 방치하여도 활성의 감소를 보이지 않아 비교적 안정한 것으로 확인되었다. 또한, 4°C 에 보관한 고정화 균체를 37°C 에서 1시간 동안 방치한 뒤의 활성은 그렇지 않은 경우보다 약 5% 정도 높게 나타났다.

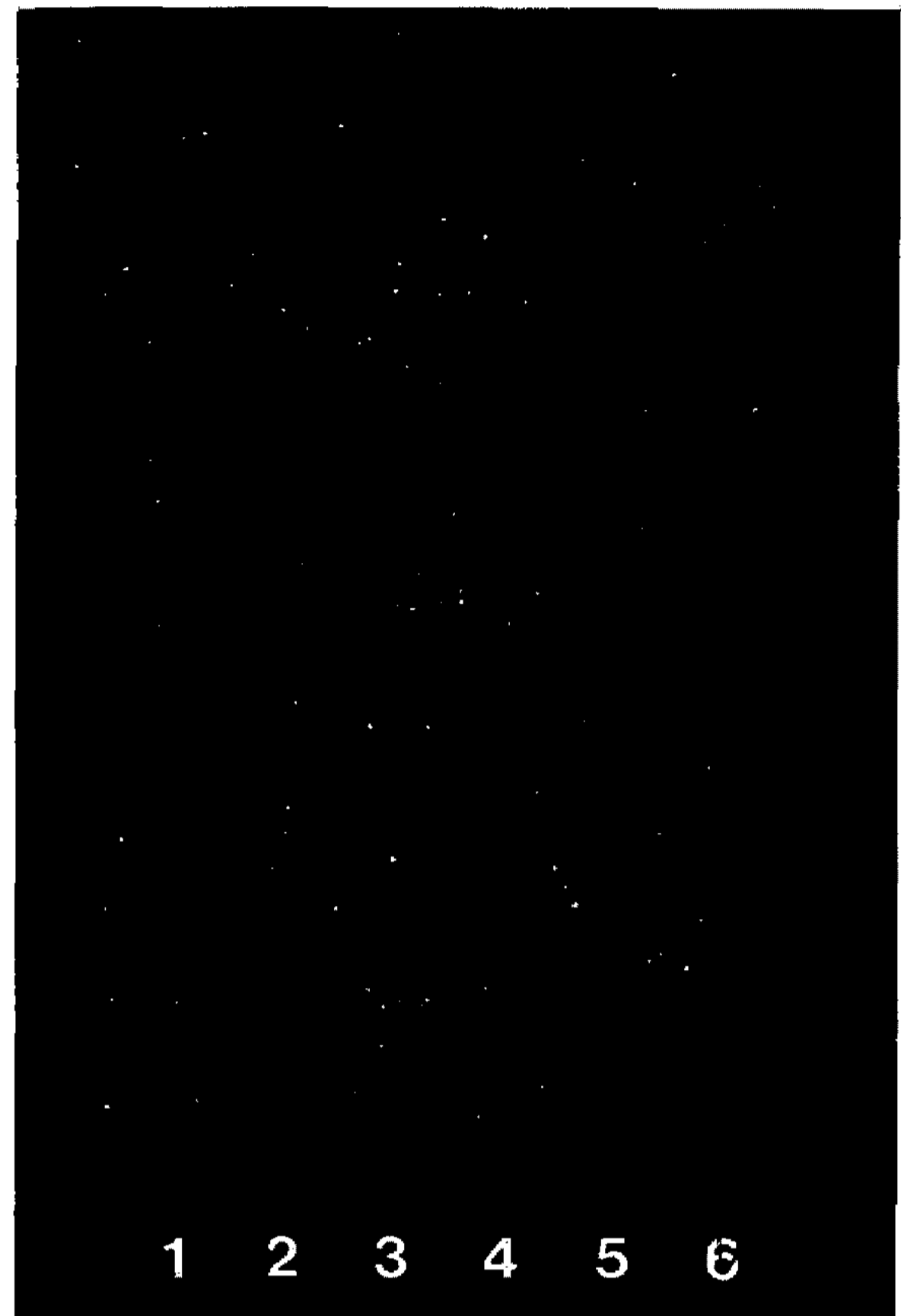


Fig. 6. Thin-layer chromatogram of GL-7-ACA produced from CPC by immobilized *T. variabilis* cells. Separation of products was carried out on silica gel G F₂₅₄ plate using n-butanol:acetic acid:water (3:1:1; v/v). Lane 1: CPC; 2: GL-7-ACA; 3, 4, 5, 6: products of reaction for 0, 20, 40, 60 min, respectively

기질 농도에 의한 영향

다양한 기질 농도에서 효소 활성을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 비고정 균체는 30 mM, 고정화 균체는 40 mM에서 최대 활성을 나타내었다. 비고정 균체는 40 mM 이상의 기질 농도에서 급격한 활성의 감소를 보였는데, 균체의 고정화로 이러한 기질 저해 효과를 10~20% 감소시킬 수 있었다. 고정화 균체의 경우, 50 mM의 기질을 사용할 때 전환 속도가 일정하게 유지되었고, 85%의 전환효율을 얻을 수 있었다(Fig. 6, 7).

산소 공급의 효과

CPC로부터 GL-7-ACA의 산화적 전환반응에 가장 중요한 요소는 산소의 공급이다. 효소반응에 대한 순수한 산소와 공기의 공급을 비교한 결과는 Fig. 8에 나타난 바와 같이 비고정 균체의 경우, 전환 속도에 차이가 있었지만 전환 효율에는 큰 차이가 없었다. 그러나, 고정화된 균체는 공기를 공급했을 경우, 전환

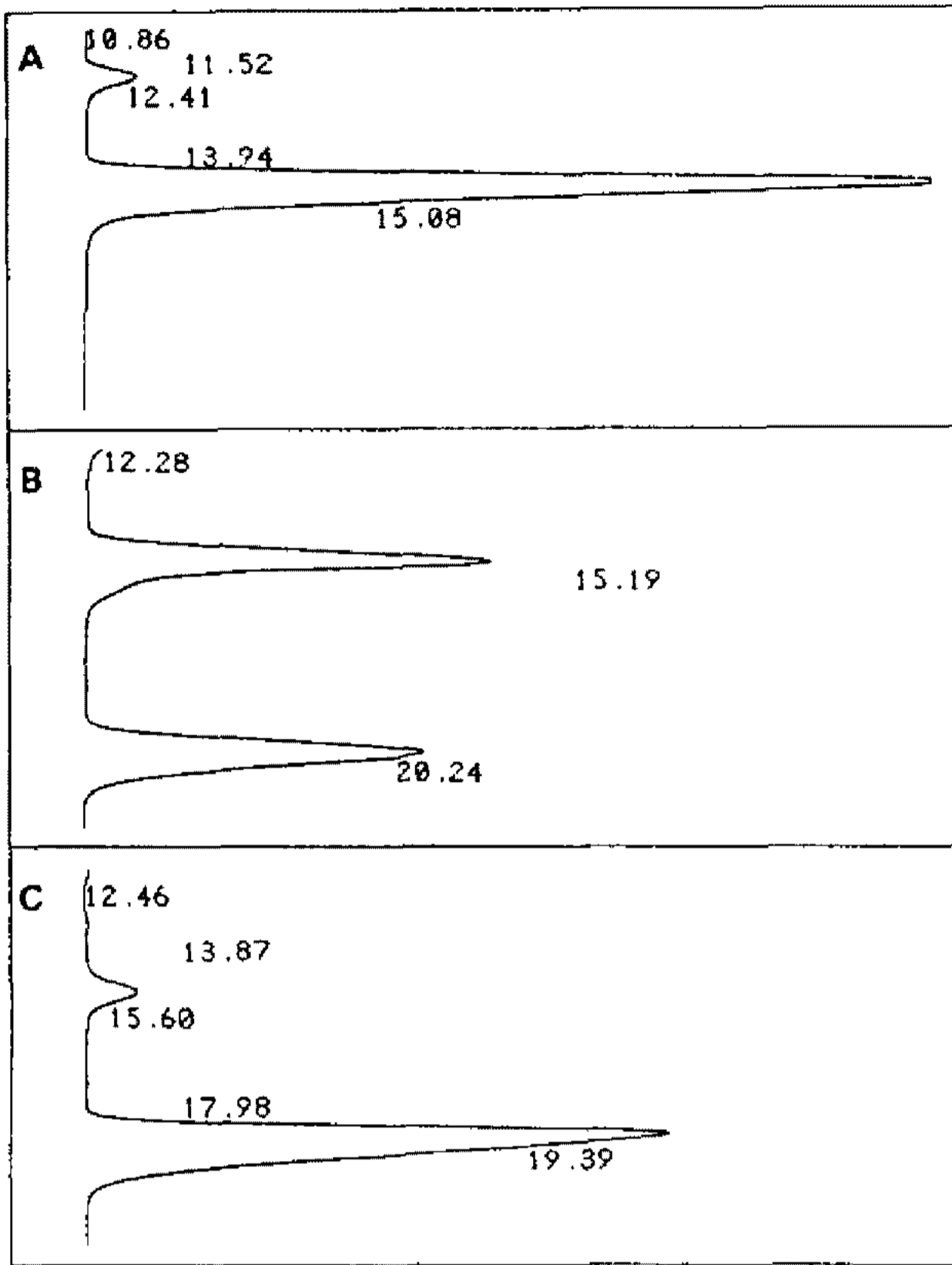


Fig. 7. HPLC diagram of GL-7-ACA produced from CPC by immobilized *T. variabilis* cells.
 A: 0 min, B: 20 min, C: 60 min, Column: μ Bondapack C-18 (3.9 \times 300 nm), Mobile phase: 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5), 2~25% acetonitrile, Flow rate: 1 ml/min, Detection: UV₂₅₄

속도가 감소할 뿐 아니라 전환율도 50%로 상당히 감소함을 알 수 있었다. 고정화 균체의 산화적 활성이 비고정 균체에 비하여 낮은 수준을 유지하는 것은 산소의 공급이 부족하기 때문이며, 이러한 문제를 해결하기 위한 여러 방법이 시도되었다(1, 3). 그 중, 본 연구에서 검토된 H₂O₂의 이용은 bead의 안정성과 전환 효율면에서 적합하지 않았다. 또한, 고정화 균체의 표면에 공기방울이 생기는 등 물리적 손상이 생기기도 하며, 반응액 상단으로 떠올라 반응 효율을 저하시키는 원인이 되었다. 따라서, 고정화 균체의 산소 공급은 경제성 면에서 불리하지만, 순수한 산소를 공급하는 것이 적당하였다. 순수한 산소를 공급하는 것은 소규모의 연구에는 가능하지만 대량 생산이나 공업적 이용에는 경제적 어려움이 뒤따르게 되므로 대체 가능한 방법을 연구하는 것이 필요할 것이다. 고정화 균체에 대한 산소 공급의 문제점을 해결하기 위하여 *T. variabilis* 균주가 갖는 catalase 활성을 이용하여 H₂O₂로서 산소의 공급을 시도한 결과는 Fig. 9와 같다. H₂O₂를 공급한 반응에서 기질의

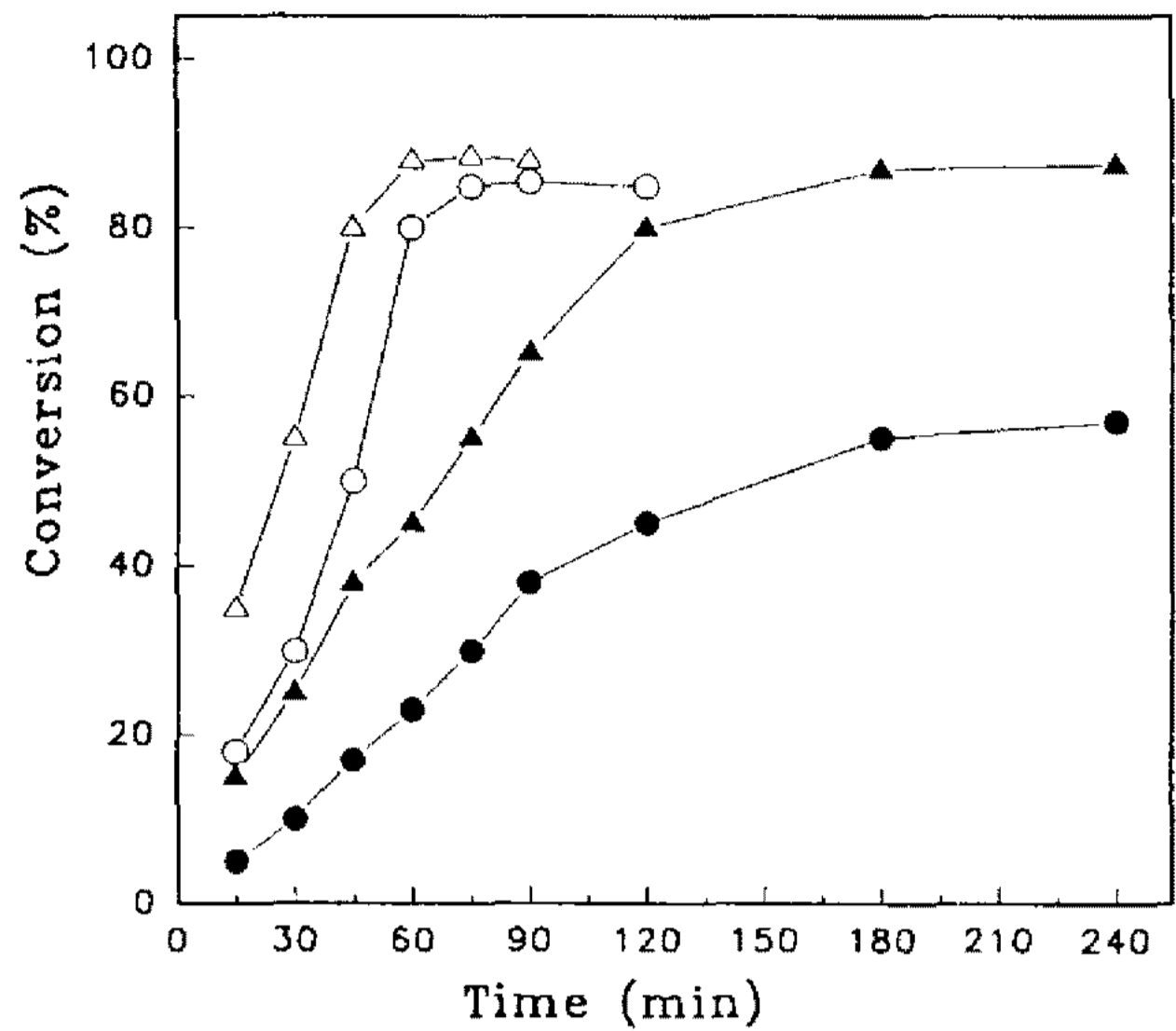


Fig. 8. Time courses of CPC conversion to GL-7-ACA by free and immobilized cells in a batch system supplying with air and pure O₂ as oxygen source.
 Δ : free cell with O₂; \blacktriangle : free cell with air; \circ : immobilized cell with O₂; \bullet : immobilized cell with air

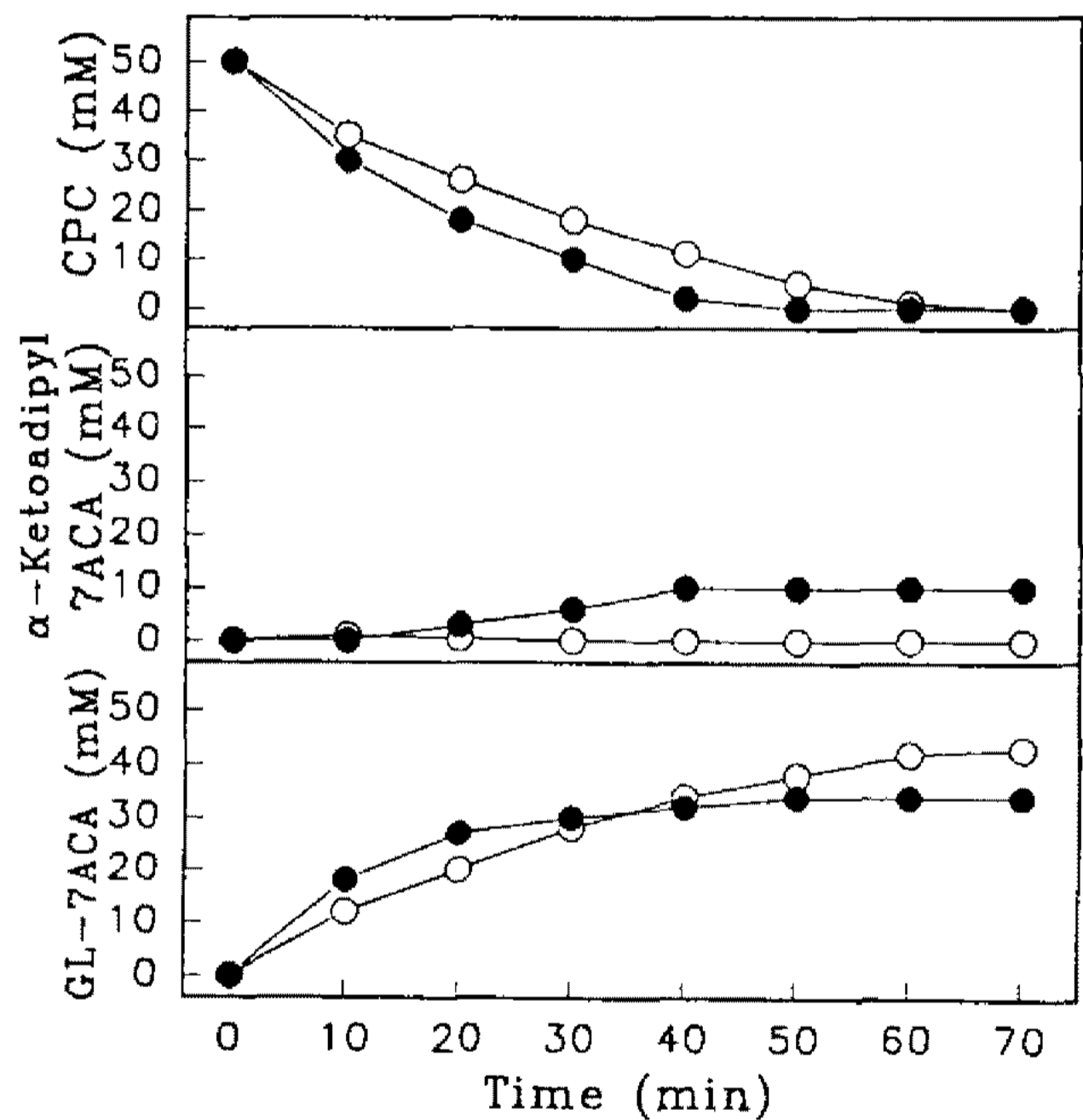


Fig. 9. CPC conversion to GL-7-ACA by immobilized cells supplying with pure O₂ (\circ) and H₂O₂ (\bullet) as oxygen source.
 Substrate solution was composed of 50 mM CPC, 50 μ M NaN₃, with pure O₂ supply or 50 mM CPC, 20 mM H₂O₂.

전환은 순수한 산소를 공급할 때보다 빠르지만 GL-7-ACA로의 전환율이 10% 정도 감소하였으며, 반응의 중간 산물인 α -ketoadipyl 7ACA가 GL-7-ACA로 전환되지 못하고 축적되었다.

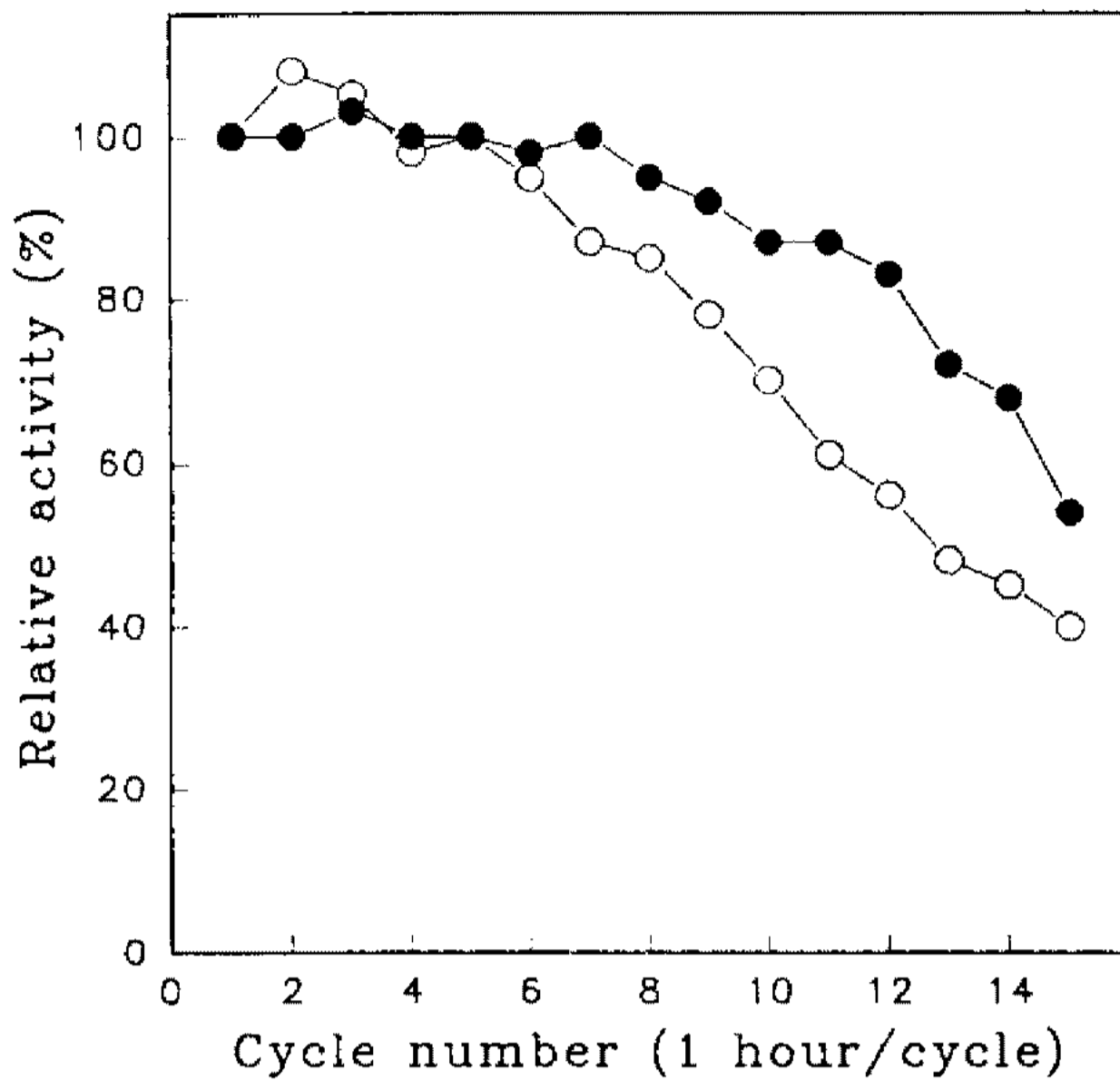


Fig. 10. Stability of DAO activity of *T. variabilis* cells immobilized with Ca-alginate during operation of the batch system.

Semi-batchwise operation was performed with (●) and without (○) 10 mM CaCl₂.

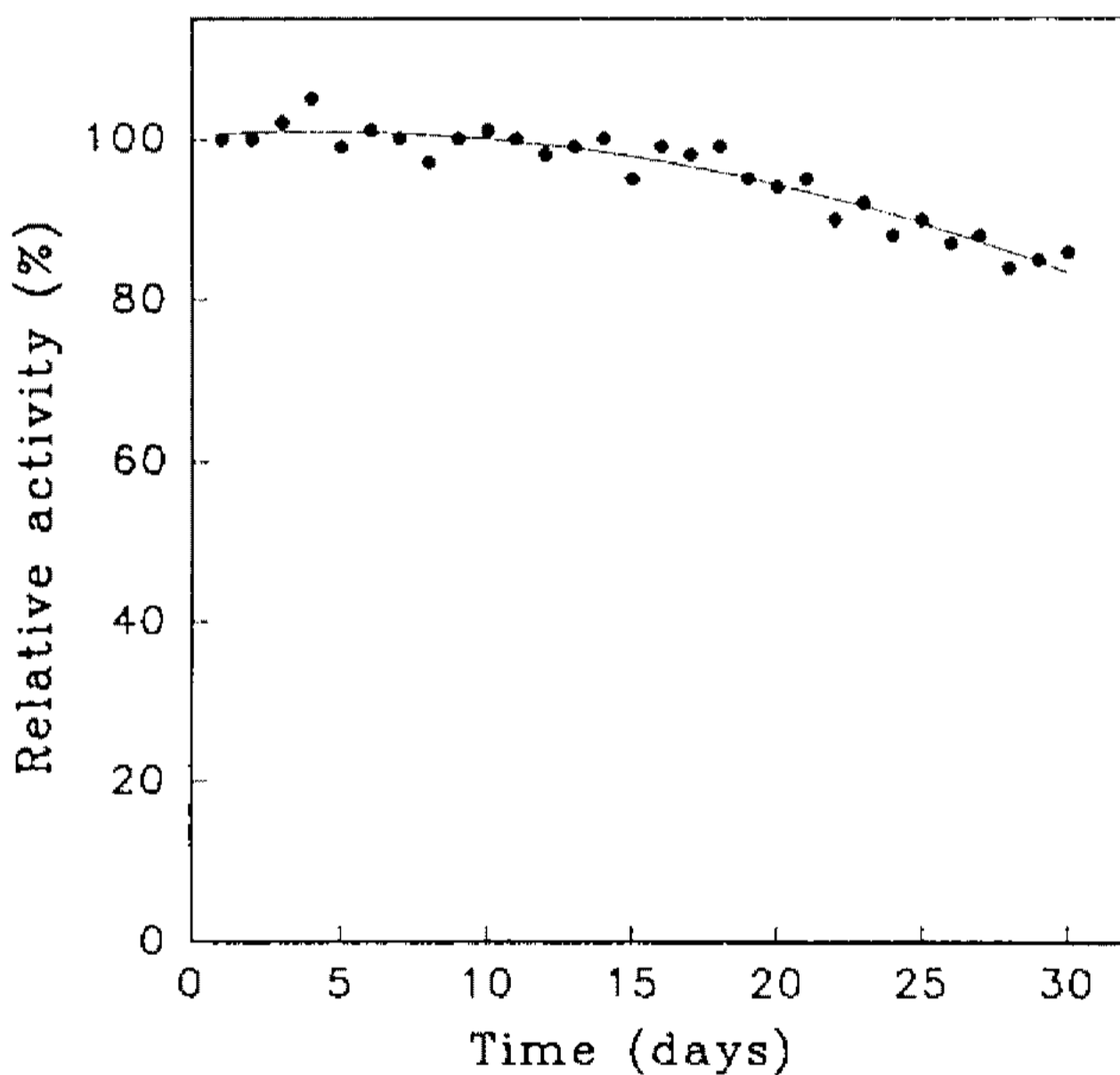


Fig. 11. Stability of DAO activity of *T. variabilis* cells immobilized with Ca-alginate during storage.

The entrapped cells were stored in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3) containing 10 mM CaCl₂ at 4°C for different periods of time.

고정화 균체의 반응 및 저장 안정성

GL-7-ACA의 회분식 생산 반응기에서 고정화 균체의 반복 사용 정도를 검토한 결과는 Fig. 10과 같다. 고정화 균체를 10회 반복 사용할 때까지 80% 이상의 활성을 유지할 수 있었고, 15회 사용시 활성의 50%가

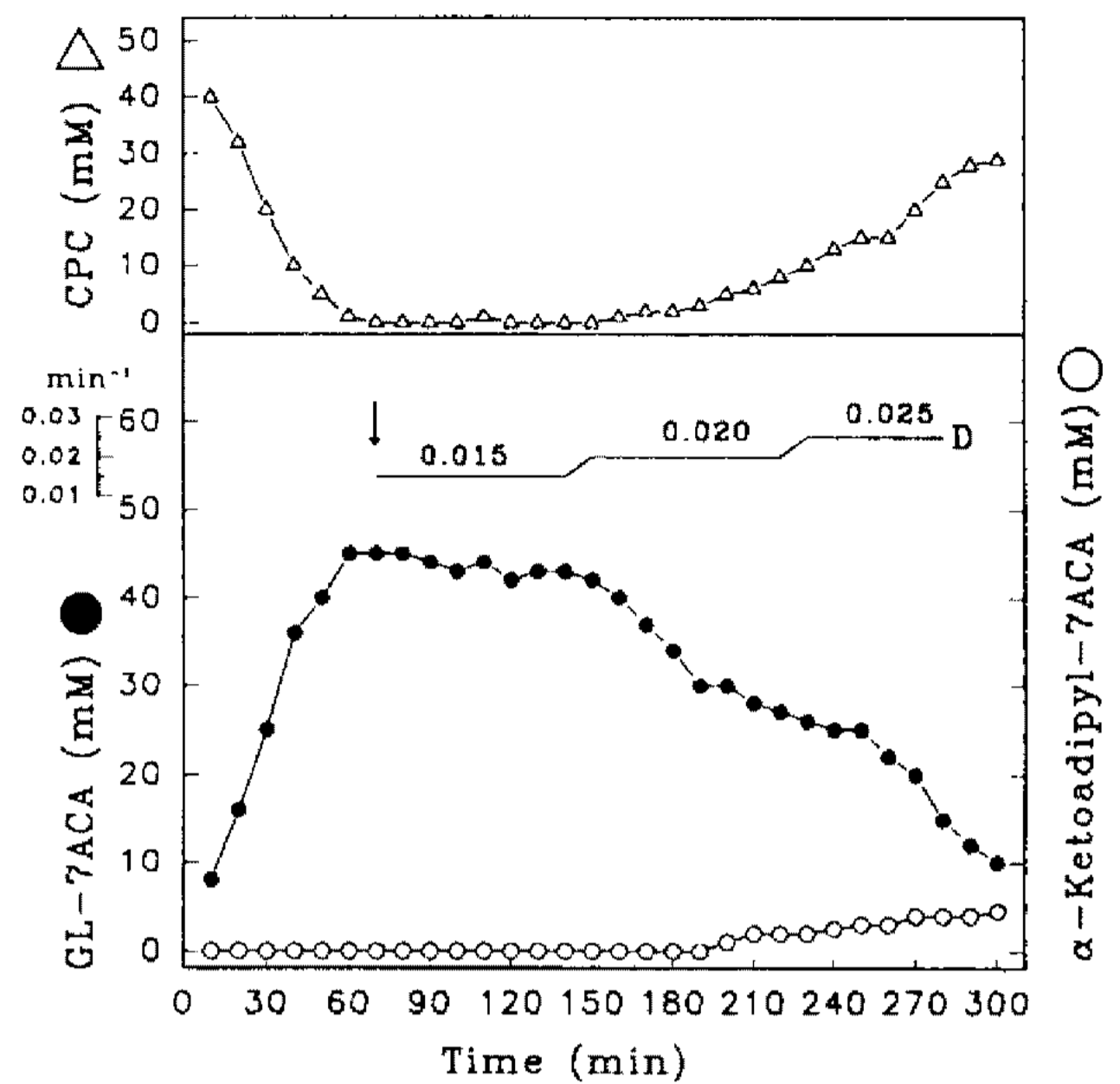


Fig. 12. Continuous GL-7-ACA production by the immobilized cells at various dilution rate (D).

The continuous feeding of fresh substrate (50 mM CPC, 10 mM CaCl₂, 50 μM NaN₃) was carried out after an initial batch phase. Arrow: start of continuous reaction.

감소하였다. 균체의 반복 사용 정도는 반응액에 10 mM의 CaCl₂를 첨가했을 때, 3~5회 증가시킬 수 있었다. 고정화 균체를 4°C에 보관하면서 30일 동안 잔여 활성을 측정하여 저장 안정성을 검토하였는데 (Fig. 11), 2주 후부터 고정화 균체 외부로 약간의 균체 손실이 있었으나, 30일까지 활성의 80%가 유지되었다.

Alginate를 이용한 고정화 균체의 활성 감소는 Ca²⁺ 이온의 유출로 인한 겔의 약화와 이에 따르는 균체의 유출이 가장 큰 요인인데(6, 9), 효소 반응액에 CaCl₂를 첨가하면 반복 사용 횟수를 늘일 수 있었다. 고정화 균체는 37°C에서 비교적 안정하므로 조업 중 균체의 유출을 막을 수 있는 방법과 고정화물의 안정성을 저하시키는 물리적 요소를 개선한다면 상당 기간 동안의 GL-7-ACA 생산이 가능할 것이다.

GL-7-ACA의 연속 생산

고정화 균체로 채워진 연속 반응기를 사용하여 GL-7-ACA를 연속적으로 생산하기 위한 반응 조건을 검토하였다. 반응액의 희석 속도를 변화시키면서 생성된 GL-7-ACA를 측정된 결과(Fig. 12), 분당 0.015의 희석 속도, 60분의 잔류시간으로 반응할 때, 회분식 반응기와 같은 수준의 전환율을 얻을 수 있었고, 희석 속도가 증가함에 따라 전환율은 감소하였다. 전환율의

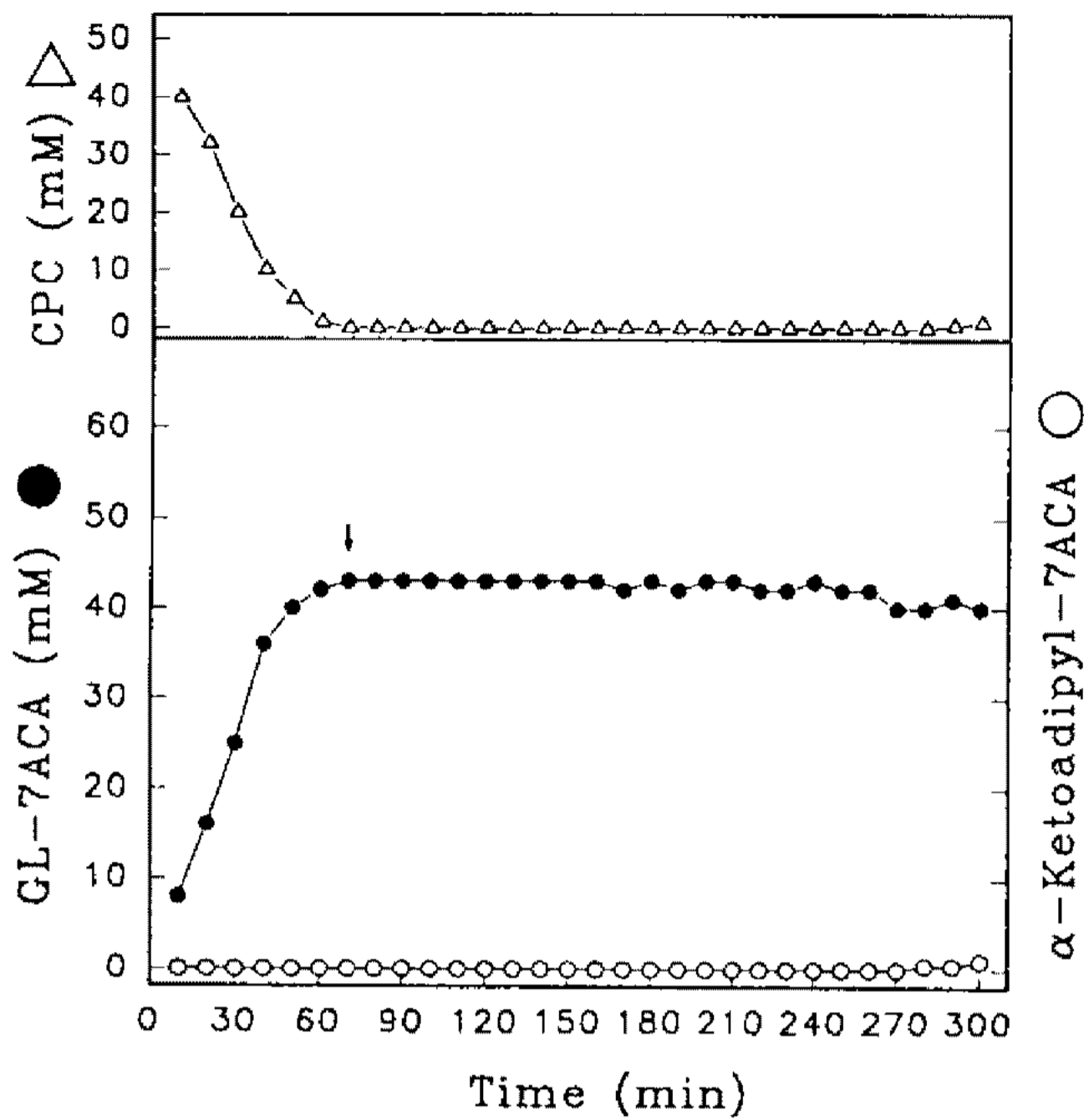


Fig. 13. Continuous GL-7-ACA production by the immobilized cells at dilution rate 0.015 min^{-1} .

The continuous feeding of fresh substrate (50 mM CPC, 10 mM CaCl_2 , 50 μM NaN_3) was carried out after an initial batch phase. Arrow: start of continuous reaction.

감소가 회석 속도의 감소로 인한 결과인지 확인하기 위하여 회석 배율을 0.015로 일정하게 유지하면서 5 시간 동안 반응시킨 결과, GL-7-ACA의 생성이 일정하게 유지되었고(Fig. 13), 시간당 약 40~43 mM 정도의 GL-7-ACA를 생산할 수 있었다. 연속 반응기에서도 산소의 공급 조건을 검토하였으나, 회분식 반응에서와 같은 결과를 얻었으며 반응기에서 기질 공급과 생성물 회수의 방향을 바꾸어서 비교한 결과에서도 큰 변화가 없었다.

CPC에서 GL-7-ACA를 높은 효율로 생산할 수 있는 반응기가 확립되고, 이러한 연구를 기초로 하여 7-ACA를 손쉽게 생산함으로써 CPC로부터 7-ACA를 생산하는 일련의 반응기의 설계가 가능할 것으로 기대된다. 또한, 두 종류 이상의 균주를 동일 담체에 함께 고정화하여 생전분으로부터 직접 에탄올을 생산하는 연구(8, 18)에서와 같이 하나의 반응 system에 두 가지 효소를 함께 고정화한다면, CPC에서 7-ACA로의 직접 생산이 단일 반응기를 통하여 이루어질 수도 있을 것이다.

요 약

균체의 고정화 방법은 1% Triton X-100으로 활성

화된 균체를 2% calcium alginate에 고정화하는 것이 적합하며, 고정화 균체는 비고정 균체에 비하여 pH에 대한 안정성이 증대되었다. 효소활성은 고정화 균체에서는 기질농도 40 mM에서 최대활성을 보였고, 생균체에서는 30 mM에서 최대 활성을 나타내었다. Cephalosporin C로부터 GL-7-ACA의 전환효율은 85% 이상 가능하였으며, 기질 농도가 높아질수록 효율은 감소하였다. 고정화 균체의 반복사용은 10회까지 가능하였으며, 4°C에서 30일간 DAO 활성의 감소나 균체의 손실이 없이 비교적 안정하였다. 순수한 산소나 H_2O_2 를 사용하여 산소의 공급 및 고정화 담체의 안정성을 검토한 결과 반응에 필요한 산소의 공급은 H_2O_2 를 사용할 경우가 우수하였지만 담체의 안정성이 떨어졌다. 고정화 균체를 이용한 연속 반응기에서 회석 배율을 0.015로 일정하게 유지하여 시간당 약 40~43 mM 정도의 GL-7-ACA를 생산하였다.

감사의 글

본 연구는 1992년도 교육부지원 학술진흥재단 지방대육성 연구비에 의하여 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Adlercreutz, P. and B. Mattiasson. 1984. Oxygen supply to immobilized cells. 4. Use of p-benzoquinone as an oxygen substitute. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 296-302.
- Berg, C.P. and F.A. Rodden. 1976. Purification of D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *Anal. Biochem.* **71**: 214-222.
- Holst, O., S.O. Enfors, and B. Mattiasson. 1982. Oxygenation of immobilized cells using hydrogen-peroxide: a model study of *Gluconobacter oxydans* converting glycerol to dihydroxyacetone. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 64-68.
- Isogai, T., H. Ono, Y. Ishitani, H. Kojo, Y. Ueda, and M. Kohsaka. 1990. Structure and expression of cDNA for D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from *Fusarium solani*. *J. Biochem.* **108**: 1063-1069.
- Kierstan, M.P.J. and M.P. Coughlan. 1985. Immobilization of cells and enzymes by gel entrapment. Pp. 39-48. In Woodward, J. (ed.), *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press, Ltd.
- Klein, J., J. Stock, and K.D. Vorlop. 1983. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 86-91.

7. Kubicek-Pranz, E.M. and M. Rhr. 1985. D-amino acid oxidase from the yeast *Trigonopsis variabilis*. *J. Appl. Biochem.* **7**: 104-113.
8. Lee, S.W., T. Ebata, Y.C. L and H. Tanaka. 1993. Co-immobilization of three strains of microorganisms and its application in ethanol production from raw starch under unsterile conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 36-42.
9. Martinsen, A., G. Skjåk-Bræk, and O. Smidsrød. 1989. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 79-89.
10. Matsuda, A., K. Matsuyama, K. Yamamoto, S. Ichikawa, and K. Komatsu et al. 1987. Cloning and characterization of the genes for two distinct cephalosporin acylase from a *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* **169**: 5815-5820.
11. Mazzeo, P. and A. Romeo. 1972. Enzymic and chemical transformation of the side chain of cephalosporin C. *J. Chem. Soc. Perkin I.* **20**: 2532.
12. Shibuya, Y., K. Matsumoto, and T. Fujii. 1981. Isolation and properties of 7 β -(4-carboxybutanamido)-cephalosporanic acid acylase-producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 1561-1567.
13. Smith, A. 1985. Cephalosporins, Pp. 163-185. In M. Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, Pergamon Press. Ltd.
14. Szwajcer, E. and K. Mosbach. 1985. Isolation and partial characterization of a D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from the yeast *Trigonopsis variabilis*. *Biotechnol. Lett.* **7**: 1-7.
15. Takahashi, T., Y. Yamazaki, K. Kato, and M. Isono. 1972. Enzymatic synthesis of cephalosporins. *J. Am. Chem. Soc.* **94**: 4035-4037.
16. Tsuzuki, K., K. Komatsu, S. Ichikawa, and Y. Shibuya. 1989. Enzymatic synthesis of 7-amino cephalosporanic acid. *Nippon Nogeikagak Kaishi.* **63**: 1847-1853.
17. Yagi, K. 1991. D-Amino acid oxidase, Pp. 271-283. In S.A. Kuby (ed.), *A Study of Enzymes*, Vol. 2, CRC Press. Ltd.
18. Yamade, K. and S. Fukushima. 1989. Continuous alcohol production from starchy materials with a novel immobilized cell/enzyme bioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* **67**: 97-101.

(Received April 4, 1994)