

Cephalosporin C Acylase 생산균주의 분리 및 특성

박용춘 · 김옥현 · 임재윤 · 김영창*
충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Isolation and Characteristics of Microorganism Producing Cephalosporin C Acylase

Yong-Chjun Park, Ook-Hyun Kim, Jai-Yun Lim and Young-Chang Kim*
Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

Abstract — Twenty microbial strains producing the acylase were isolated from soil by using *Micrococcus luteus* ATCC 9341 as an indicator strain, using either D-(α)-phenylglycine methylester and 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) or glutaric acid dimethylester and 7-ACA as substrates. Among the isolates, only one strain was turned out to be the 7-ACA producer from either cephalosporin C or glutaryl 7-ACA as the substrates by using the overlay of 7-ACA sensitive strain (SS5). 7-ACA produced from cephalosporin C by an isolate (APS20) was detected by high performance liquid chromatography. The isolated strain (APS20) was identified to *Bacillus macerans* on the basis of cellular fatty acid profile by gas chromatography. *Bacillus macerans* APS20 had no β -lactamase activity on cephalosporin C, and that is very important for the enzymatic production process of 7-ACA. However, this strain was resistant up to 100 μ g/ml of cephalosporin C.

반합성 cephalosporin 계 항생물질은 7-aminocephalosporanic acid(7-ACA)를 원료로 사용하여 제조되기 때문에(6, 11, 15, 16), 7-ACA를 생산하는 과정은 새로운 항생물질의 개발 및 생산에 있어서 매우 중요하다. 7-ACA의 공업적 생산과정은 cephalosporin C(2)의 D- α -aminoadipyl기를 제거하여 만드는 데 현재는 주로 유기화학적 방법에 의존하고 있다. 유기화학적 제조공정은 초저온 시설이 필요하며, 여러가지 유해한 화학약품들을 사용하기 때문에 생산 단가가 높을 뿐만 아니라 산업 폐기물에 의한 환경 오염의 우려가 많다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 cephalosporin C acylase를 이용하여 효소적으로 cephalosporin C를 7-ACA로 전환하는 공정을 개발하고자 노력하고 있다(3, 9, 10, 17). 현재 cephalosporin C acylase의 활성을 나타내는 균주는 몇 가지 보고되어(3-5, 7), 일본 Fujisawa Co. 등에서는 산업화를 추진하고 있는 것으로 알려지고 있다. 그러나 cephalosporin C에서 직접 7-ACA를 생성하는 효소를 대량 생산하는 균주를 육종하는 것이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 자연계로부터 cephalosporin C를 기질로

이용하여 7-ACA를 생성하는 균주를 새로운 검색방법을 이용하여 선발하였으며, 이 균의 특징 및 penicillin G acylase 유전자(12)와의 유연관계를 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험을 위하여 사용된 균주 및 plasmid의 특징은 Table 1과 같다. Tryptone, yeast extract, agar 등 배지성분은 Difco사로부터 구입하였으며 사용한 배지는 LB(Luria-Bertani)배지로 증류수 1l에 trypton 10 g, yeast extract 5 g, 그리고 NaCl 5 g 되게 첨가하였고, 고체배지 및 soft agar는 각각 1.5 및 0.7% 되게 agar를 첨가한 후 사용하였다.

시약

본 실험에 사용한 cephalosporin C, penicillin G, 7-aminocephalosporanic acid(7-ACA), acetonitrile, ρ -dimethylaminobenzaldehyde, D-(α)-phenylglycine methylester, 그리고 glutaric acid dimethyl ester 등의 시약은 Sigma사로부터 구입하였고 glutaryl 7-ACA는 제일제당 연구소에서 얻어 사용하였다.

Key words: Cephalosporin C acylase, Bioassay, Hybridization

*Corresponding author

Table 1. Bacterial strains and plasmid used in this study

Strains and plasmid	Relevant characteristics	Sources or references
Bacterial strains		
<i>Bacillus megaterium</i>	penicillin G acylase producer	ATCC 14945
<i>Bacillus macerans</i> APS20	cephalosporin C acylase producer	this work
<i>Micrococcus luteus</i>	Indicator strain for cephaloglycin production	ATCC 9341
SS5	Indicator strain for 7-aminocephalosporanic acid production	1
Plasmid		
pCSE94	9.4 kb, PGA ⁺	7

PGA:penicillin G acylase

시료의 채취

시료는 충북대학교 부근의 토양, 청주 모자보건센터의 하수구, 청주 하수도 종말처리장 하류의 하수구 및 청주근처의 하천으로부터 채취하여 얼음상자에 넣어 실험실로 운반하였다.

합성능을 이용한 acylase 생산균주의 선발

채취한 시료를 0.85% 생리식염수에 적당량 희석하여 LB 고체배지에 도말하고, 형성된 colony는 이쭉시게를 이용하여 다시 LB 고체배지에 picking 하여 37°C에서 10시간 정도 배양하였다. 기질로 D-(α)-phenylglycine methylester와 7-ACA를 각각 2 mM, 1 mM, 또는 glutaric acid dimethyl ester와 7-ACA를 각각 2 mM, 1 mM 되게 4 ml의 LB soft agar에 첨가하고 하룻밤 배양한 *Micrococcus luteus* ATCC 9341을 200 μ l 넣고 잘 섞어준 후 자란 colony 위에 overlay하여 30°C에서 12시간 배양하였다. 기질을 넣지않고 지시균만을 혼합하여 overlay한 대조구에서는 환이 형성되지 않고 기질을 넣어준 plate에서 지시균의 생장 저지환이 형성되는 균주를 선발하였다.

가수분해능을 이용한 acylase 생산균주의 선발

위에서 선발한 환 형성균주를 LB 고체배지에 picking하고 30°C에서 10시간 배양하였다. 배양 후 4 ml LB soft-agar에 기질로 cephalosporin C, 또는 glutaryl 7-ACA를 각각 0.5 mg/ml 되게 첨가하고 본 연구실에서 분리한 7-ACA에 민감한 균주인 SS5(1)의 하룻밤 배양한 배양액 200 μ l를 잘 섞어준 후 생장한 colony 위에 overlay하여 10시간 배양하였다. 배양후 기질의 가수분해로 인하여 생성된 7-ACA에 의한 SS5의 생장 저지환을 형성하는 균주를 선발하였다.

효소활성 측정

Cephalosporin C acylase와 penicillin G acylase의 활성은 LB 액체배지 4.5 ml에 균을 배양하여 균체를 모은 다음 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 2회 세척하고 동일 완충용액 0.5 ml에 현탁하였다. 그리고 cephalosporin C 및 penicillin G를 각각 3 mg/ml로 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응후 반응액에 50 mM NaOH-20% glacial acetic acid(1 : 2) 용액을 3 ml 첨가하여 반응을 정지시키고 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이 상층액에 methanol에 녹아 있는 0.5% p-dimethylaminobenzaldehyde를 0.5 ml 첨가하여 10분간 반응시킨 후 415 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

HPLC

선발된 균주들을 4.5 ml의 LB 액체배지에 접종하여 30°C에서 약 10^9 cells/ml이 될 때까지 배양한 다음 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0) 1.5 ml에 2번 세척하고 동일 완충용액 100 μ l에 잘 현탁하여 cephalosporin C를 ml당 3 mg 되게 넣어 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응액은 원심분리하여 상층액을 얻고 HPLC(Millipore Waters, U.S.A.)를 위한 반응액으로 사용하였다. 전개용매(완충용액)로는 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)에 acetonitrile을 2.0% 되게 첨가한 용매를 사용하였다. 사용한 column은 μ BondapakTMC18 3.9 \times 300 mm(Waters사), 작동압력은 1,000 PSI, 용매의 유속은 분당 1 ml(1 ml/min)로 하였다. 그리고 시료의 양은 위에서 반응시킨 반응액의 2.5 μ l를 취하여 주입하여 UV 254 nm에서 검출하였다.

균주의 동정

선발된 균주의 동정은 MIDI사(Barksdale Prof. Center, Newark, DE, U.S.A.)에 의뢰하여 세포의 지방산조성을 gas chromatography로 조사하여 Data base와 비교하여 수행하였다.

균주의 전자현미경 관찰

LB 고체배지에서 24시간 30°C에서 배양한 균주의 집락을 agar block의 표면적이 0.5 cm²가 되도록 떼어내 0.2M potassium phosphate(pH 7.0) 완충액에 희석하여 만든 2.5% glutaraldehyde 용액에서 2시간 전 고정하고, 0.2M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 15분씩 3번 세척후 1% osmium tetroxide 용액에서 3시간동안 후 고정하고 ethanol로 탈수 및 isoamyl acetate로 치환하여 자연건조시킨 시료를 sputter coater(Edwards, S 150B)로 gold coating 하여 주사현미경(Hitachi Co. S-507)으로 관찰하였다.

각종 항생제에 대한 내성 측정

LB 고체배지에 균체의 하룻밤 배양한 배양액 200 μ l를 4 ml의 LB soft agar에 섞어 overlay 하고 그 위에 종이 disk를 놓고 항생제 stock 제조법에 의거하여 제조한 각각의 항생제 stock을 20 μ l씩 찍은 후 30°C에서 배양하였다. 배양후 각각의 항생제로 인한 균체의 생장 저지환의 크기를 관찰하였다.

β -lactamase의 활성도 측정

균주를 3 ml 배양하여 균체를 회수하고 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 2회 세척 후 동일 완충용액 0.5 ml에 재 현탁하였다. 재 현탁액에 cephalosporin C를 ml당 0.1 mg 되게 첨가하고 30°C에서 2시간 반응시켰다. 반응후 0.2N HCl을 1.5 ml 넣은 후 원심분리하고 상층액을 1/10로 희석하여 OD₂₆₀에서 흡광도의 변화를 측정하였다(18).

Southern hybridization

Southern hybridization은 nitrocellulose(NC) 막과 ECL(enhanced chemiluminescence, Amersham, USA) kit를 사용하여 수행하였다. 탐침자는 *Bacillus megaterium* ATCC 14945의 penicillin G acylase 유전자(*pga*)가 클로닝된 pCSE94(12)를 *AsnI* 제한효소로 절단 후 1,297 bp와 705 bp를 회수하여 사용하였으며(13), DNA labelling reagent와 glutaraldehyde 용액을 이용하여 37°C에서 10분 반응시켜 탐침자로 사용하였다. Hybridization 용액은 hybridization 완충용액에 blocking agent와 NaCl을 5% 및 0.5M 되게 각각

첨가하였고, hybridization 조건은 42°C에서 16~20시간 행하였다. 세척은 1차 세척 완충용액(0.4% SDS, 0.5×SSC)를 이용하여 55°C에서 20분간 2회 반복한 후, 2차 세척 완충용액(2×SSC)을 이용하여 상온에서 5분간 세척을 2회 반복하였다. 검출은 검출용액 1과 검출용액 2를 동량 섞어준 후 상온에서 NC 막 위에 정확히 1분 반응시켰다. 그리고 사란랩으로 NC 막을 감싸고 Hyperfilm-ECL을 이용하여 1분간 노출시킨 후 현상액 및 고정액을 이용하여 필름을 현상하였다.

결과 및 고찰

Cephalosporin C acylase 생산균주의 선발

Acylase 활성에 의하여 기질인 D-(α)-phenylglycine methylester와 7-ACA로부터 cephaloglycin을 생산하는 균주를 cephalosporin 계열에 매우 민감한 *M. luteus* ATCC 9341을 지시균으로 이용하여 선발하였다. 또한 D-(α)-phenylglycine methylester는 비교적 penicillin G의 R-그룹에 해당하기 때문에 cephalosporin C의 기질에 보다 밀접한 R-그룹으로 glutaric acid dimethyl ester와 7-ACA를 이용하여 glutaryl 7-ACA를 생산하는 균주를 *M. luteus* ATCC 9341을 지시균으로 이용하여 20여 균주를 선발하였다. 위의 균주들을 대상으로 cephalosporin C 및 glutaryl 7-ACA를 기질로 이용하여 7-ACA를 생산하는 균주를 선발하기 위하여 본 연구실에서 분리한 7-ACA에 민감한 균주인 SS5(1)를 지시균으로 이용하여 bioassay를 한 결과 각각의 기질에 대하여 10 mm 및 7 mm의 생장 저지환을 형성하는 균주를 선발하였고(Fig. 1) 이 균주를 APS20이라 명명하였다. 이 결과로부터 APS20은 cephalosporin C 및 glutaryl 7-ACA를 기질로 이용하여 7-ACA를 생성할 수 있으며 glutaryl 7-ACA보다 cephalosporin C로부터 7-ACA를 생성하는 기질 특이성이 높은 것으로 판단된다. 또한 APS20 균주의 cephalosporin C 및 penicillin G에 대한 기질 특이성을 알아보기 위하여 발색반응을 조사해 본 결과 cephalosporin C와 penicillin G의 기질에 대하여 OD₄₁₅ 값이 0.235 및 0.048을 나타내었다. 이는 APS20 균주가 cephalosporin C에 대하여 활성이 더 높음을 의미한다. 효소활성을 보다 더 정확히 조사하기 위하여 효소반응 산물을 HPLC로 분석하였다. 재료 및 방법 난에 기술한 조건에서 7-ACA는 8.50분 그리고 cephalosporin C는 10.7분에 peak가 나타났으며 실제 반응후 retention 시간이 8.50분에 반응생성 물질인 peak가 나타남을 확인하였다(Fig. 2). 이와 같은 결과로부터 APS20

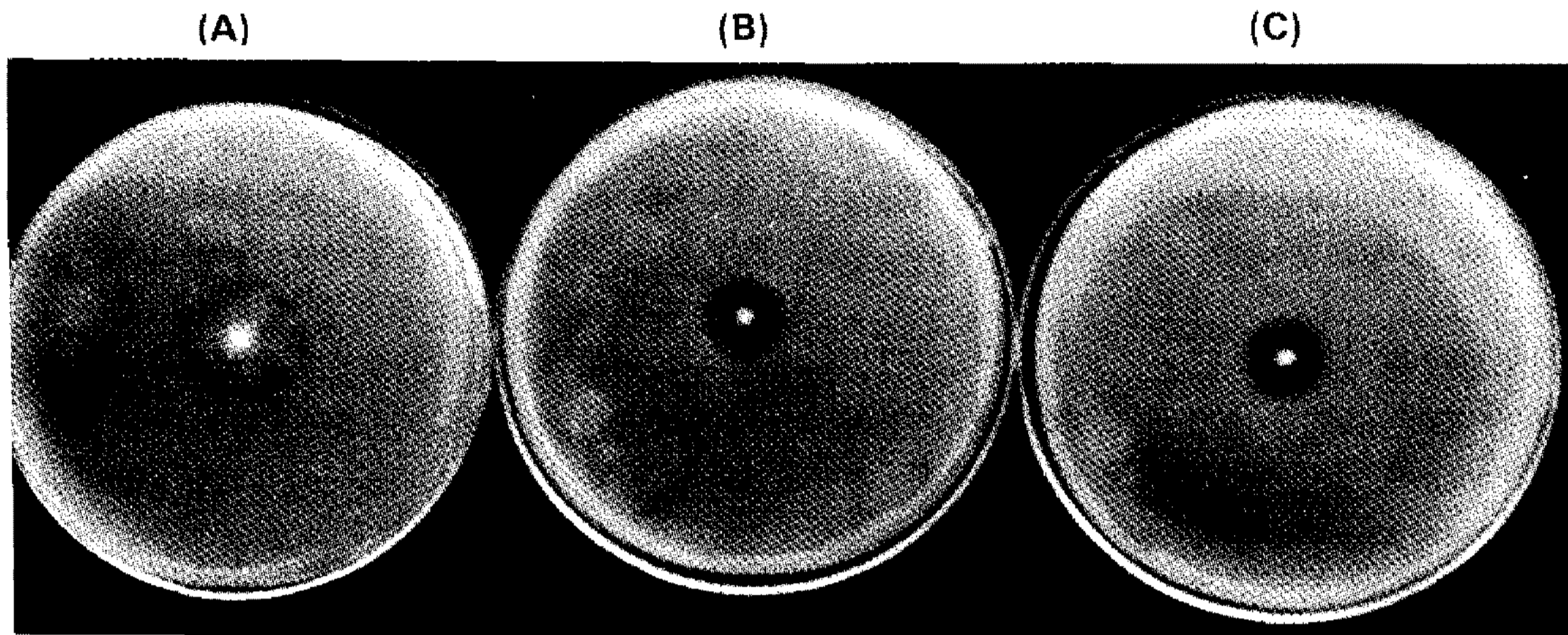


Fig. 1. Detection of deacylase activity by overlay methods. The inhibitory zone of SS5 (7-ACA^s) was caused by 7-ACA produced from either the cephalosporin C (B) or glutaryl-7ACA (C) by *B. macerans* APS20. A: only SS5.

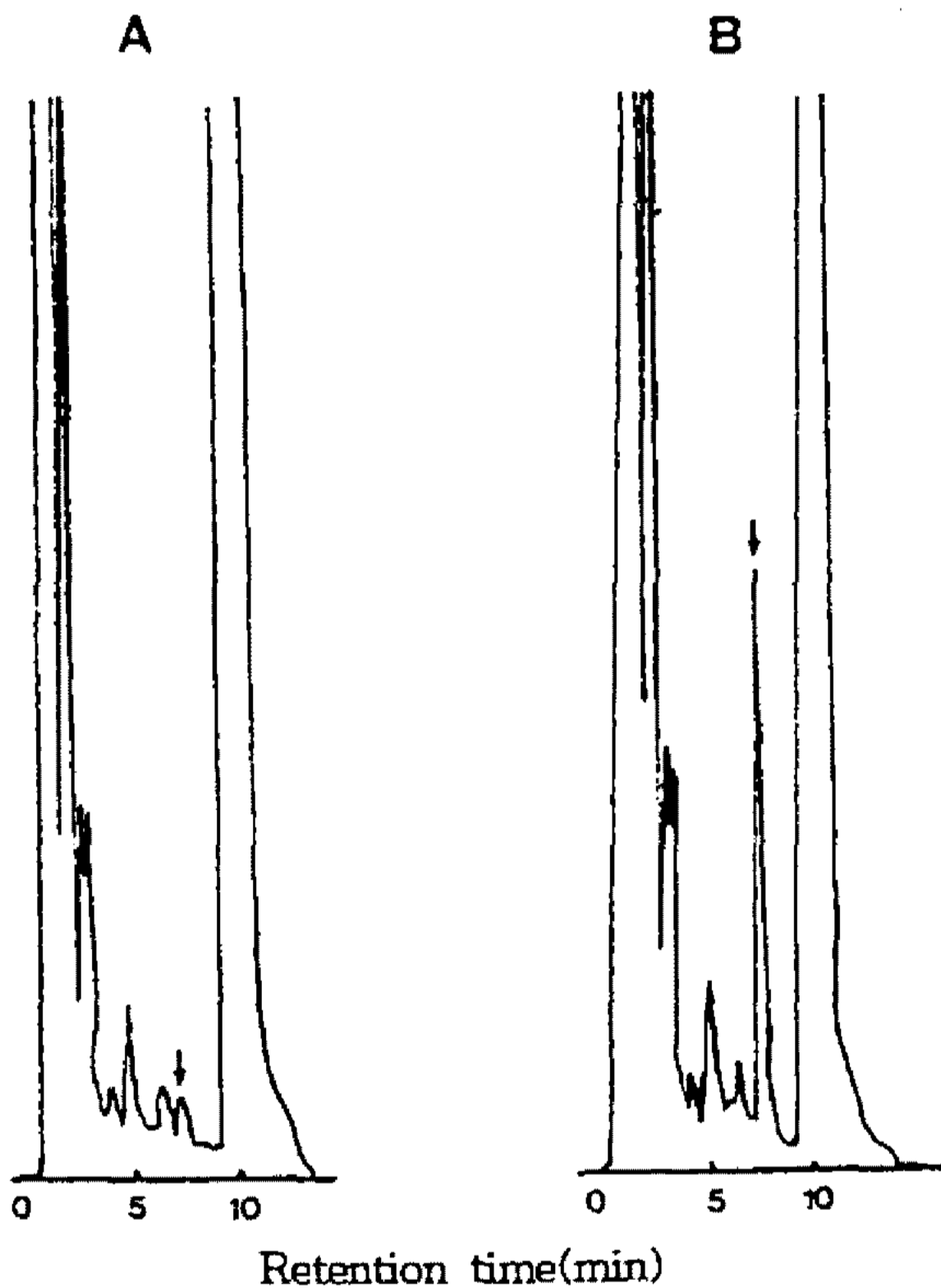


Fig. 2. HPLC profile of 7-ACA produced from cephalosporin C by *B. macerans* APS20. The arrow indicates to the 7-ACA peak.

A: *B. macerans* APS20-cephalosporin C reaction sol 2.5 μ l, B: *B. macerans* APS20-cephalosporin C reaction sol 2.5 μ l + 7-ACA (100 ng/ml) 2.5 μ l.

은 cephalosporin C acylase를 생성하는 균주임을 확실히 확인할 수 있었다.

Cephalosporin C acylase를 생산하는 APS20 균주의 동정 및 특성

그람염색 결과 APS20 균주는 그람양성이며 간균

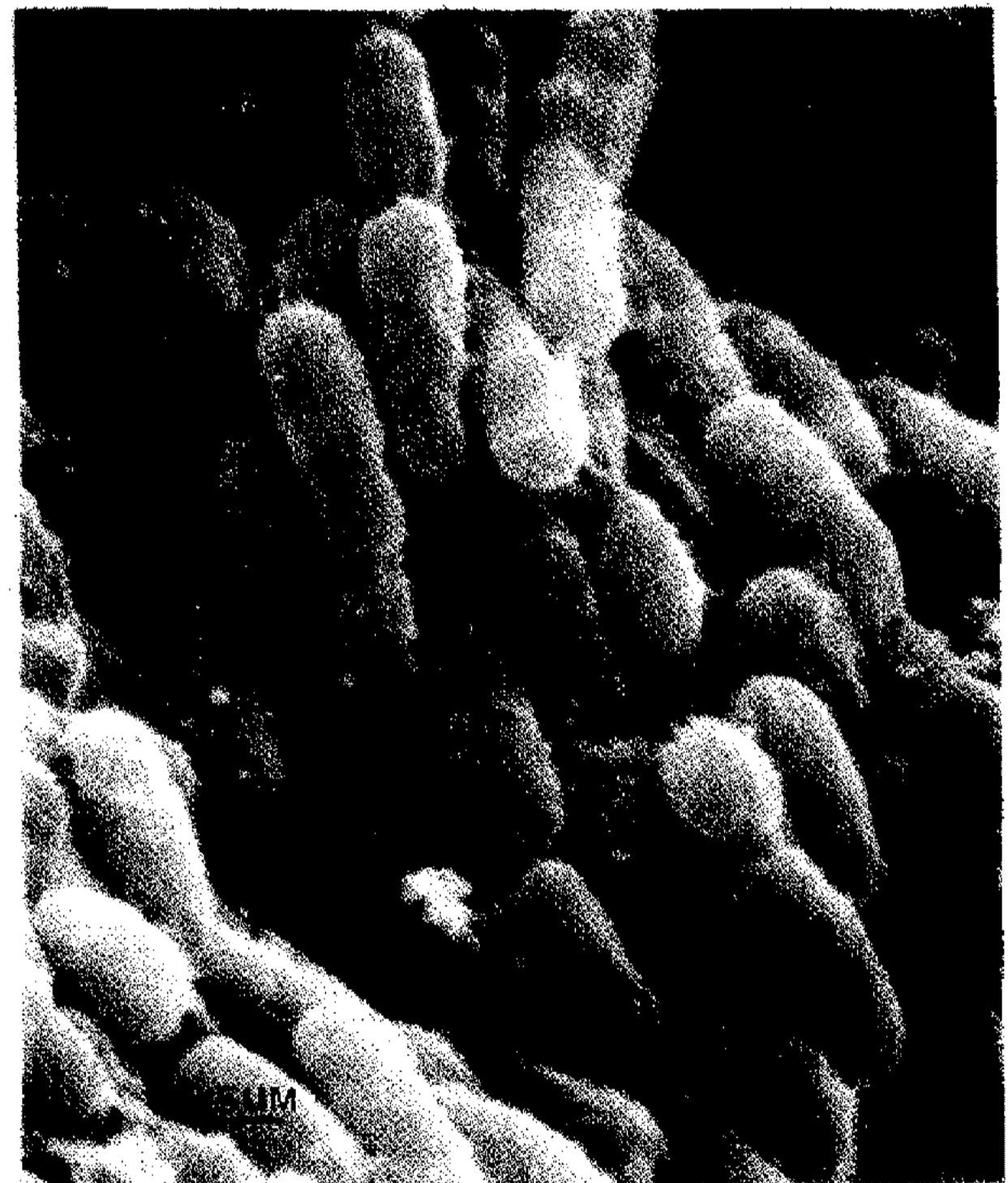


Fig. 3. Scanning electron microphotograph of *B. macerans* APS20.

으로 관찰되었다(Fig. 3). 균주 동정을 위하여 세포의 지방산 조성을 분석한 결과 12-methyltetradecanoate가 전체 지방산의 35.64%로 가장 많았고 13-methyltetradecanoate(29.13%) 및 palmitate(11.19%)의 순으로 나타났다(Table 2). 세포의 지방산 함유율에 대한 데이터 베이스(MIS System Software)와 비교 분석한 결과 APS20은 *Bacillus macerans*와 83.7%의 상동성을 나타냄으로써 *Bacillus macerans*로 동정되었다. 각종 항생제에 대한 내성 실험 결과 cephalosporin C 500 μ g/ml, penicillin G 50 μ g/ml, ampicillin

100 µg/ml, cephaloglycin 50 µg/ml, cephalixin 50 µg/ml 그리고 7-ACA 10,000 µg/ml에서는 생장 저지 현을 나타냈지만, cephalosporin C 100 µg/ml, penicillin G 5 µg/ml, ampicillin 50 µg/ml, cephaloglycin 5 µg/ml, cephalixin 5 µg/ml 그리고 7-ACA 1,000 µg/ml에서는 생장에 아무런 영향을 주지 않았다(Table 3). 즉 *Bacillus macerans* APS20은 7-ACA에 대한 강한 내성을 나타냄으로써 cephalosporin C로부터 다량의 7-ACA 생산을 유도하는 산업적 이용 가능성이 큰 것으로 생각된다. 그리고 cephalosporin C에 대한 β-lactamase 활성은 없었으나 비교적 높은 농도(100 µg/ml)의 cephalosporin C에 대하여 내성을 나타내는 것은 매우 흥미롭다. *Bacillus macerans* APS20의 cephalosporin C acylase의 유전자와 *B. megaterium* ATCC 14945의 penicillin G acylase 유전자(*pga*)와의 상동성을 알아보기 위하여 *pga*를 탐침자로 이용하여 Southern hybridization을 실시하였으나(Fig. 4) 두 균주의 상동성은 확인할 수 없었다.

요 약

7-aminocephalosporanic acid(7-ACA)에 내성이 있으나 cephalosporin 계 항생제에는 민감한 *Micrococcus luteus* ATCC 9341을 지시균으로 사용하고, D-(α)-phenylglycine methylester와 7-ACA, 또는 glutaric

Table 2. Cellular fatty acid composition of soil bacterial isolate APS20.

Fatty acids	Amount (%) ^a
13 : 0 ISO	0.55
14 : 0	2.34
15 : 0 ISO	29.13
15 : 0 ANTEISO	35.64
15 : 0	0.63
16 : 0 ISO	0.55
16 : 1 ω11c	3.81
16 : 0	11.19
ISO 17 : 1 ω10c	1.62
17 : 0 ISO	7.63
17 : 0 ANTEISO	6.37

^aPercentage of the total peak area from gas-liquid chromatography of methylesters.

Table 3. Antibiotic susceptibility of *B. macerans* APS20.

Antibiotics	Concentration (µg/ml)					
	10,000	1,000	500	100	50	5
Cephalosporin C	28*	20	14	0	0	0
Penicillin G	27	24	23	15	13	0
Cephaloglycin	34	29	25	18	14	0
Cephalixin	44	34	32	27	24	13
Ampicillin	31	23	18	12	0	0
7-aminocephalosporanic acid	10	0	0	0	0	0

*diameter of inhibitory zone (mm).

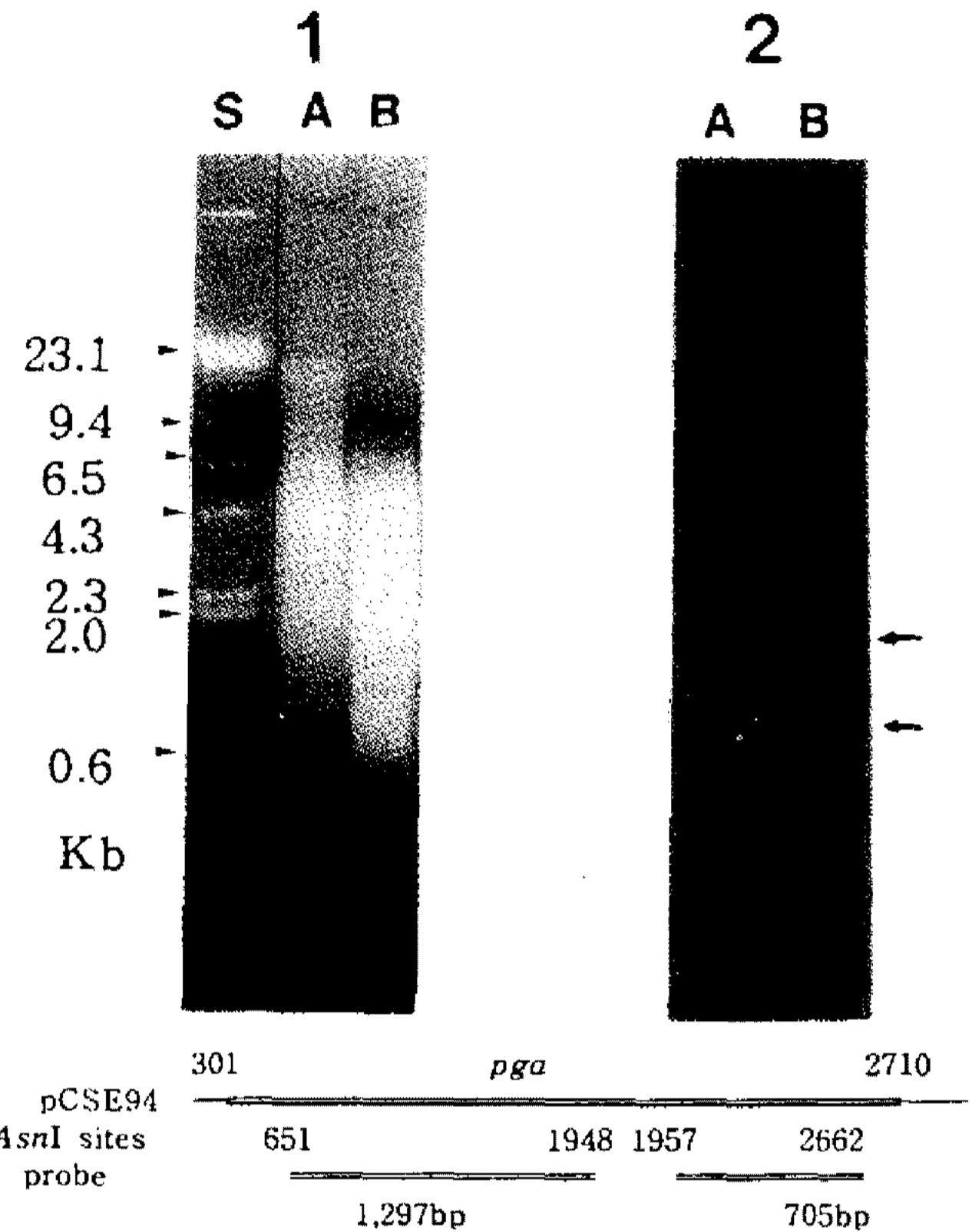


Fig. 4. The comparison of penicillin G acylase gene of *B. megaterium* ATCC 14945 and cephalosporin C acylase gene of *B. macerans* APS20 by Southern hybridization.

(1) Agarose gel electrophoresis of *AsnI* digested chromosomal DNA of *B. macerans* APS20 (A) and *B. megaterium* ATCC 14945 (B). (2) Southern blot hybridization with *AsnI* digest (1,297 bp and 705 bp) of pCSE94 as a probe. The arrows indicate signal. Abbreviation: S; λ-*HindIII* size marker.

acid dimethyl ester와 7-ACA를 기질로 사용한 bioassay 방법으로 acylase 활성에 의하여 집락 주위에 지시균의 성장 저지환을 생성하는 20 종류의 세균을 선발하였다. 환 생성균들 중에서 cephalosporin C, glutaryl 7-ACA에는 내성이 있으나 7-ACA에는 감수성이 있는 SS5 균을 이용한 bioassay 방법과 HPLC 분석을 통하여 cephalosporin C acylase 활성이 있는 APS20 균주를 최종적으로 선발하였으며, 이 균주는 *Bacillus macerans*로 동정되었다. *B. macerans* APS20은 cephalosporin C에 대한 β -lactamase 활성이 없었으나, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 cephalosporin C에 내성을 나타내었다. 그러나 penicillin G의 경우에는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 성장하지 못하였다.

감사의 말씀

본 연구는 교육부 학술연구 조성비(유전공학, 1992년도)와 일부는 1994년도 기초과학연구비로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김옥현, 박용춘, 임재윤, 김영창. 1995. Cephalosporin C 내성과 7-aminocephalosporanic acid 감수성을 지닌 균주의 선발 및 특성. 산업미생물학회지 투고중.
2. Abraham, E.P. and G.F. Newton. 1961. The structure of cephalosporin C. *Biochem. J.* **79**: 377-393.
3. Aramori, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, Y. Yokota, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda and H. Imanaka. 1991. Isolation of soil strains producing new cephalosporin acylase. *J. Ferment. Bioengin.* **72**: 227-231.
4. Aramori, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, T. Isogai., H. Ono, Y. Ishitani, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda and H. Imanaka. 1991. Cloning and nucleotide sequencing of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin C acylase genes from *Pseudomonas* strains. *J. Ferment. Bioengin.* **72**: 232-243.
5. Aramori, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, H. Ono, Y. Ishitani, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda and H. Imanaka. 1992. Comparative characterization of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin C acylases. *J. Ferment. Bioengin.* **73**: 185-192.
6. Coene, B., A. Schanck, J.M. Dereppe and M.V. Meerssche. 1984. Substituent effect on reactivity and spectral parameters of cephalosporins. *J. Med. Chem.* **27**: 694-700.
7. Kawate, S., T. Fukuo and K. Kunito. 1987. Cephalosporin C acylase, part I. Isolation and cultivation of cephalosporin C acylase-producing microorganism. *Technol. Rep. Kansai Univ.* **29**: 77-94.
8. Loder, B., G.F. Newton and E.P. Abraham. 1961. The cephalosporin C nucleus (7-aminocephalosporanic acid) and some of its derivatives. *Biochem. J.* **79**: 408-416.
9. Matsuda, A., K. Matsuyama, K. Yamamoto, S. Ickikawa and K. Komatsu. 1987. Cloning and characterization of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* **169**: 5815-5820.
10. Matsuda, A., K. Toma and K.I. Komatsu. 1987. Nucleotide sequences of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* **169**: 5821-5826.
11. Nishikawa, J. and K. Tori. 1984. 3-Substituent effect and 3-methylene substituent effect on the structure-reactivity of 7 β -(acylamino)-3-cephem-4-carboxylic acid derivatives studies by carbon-13 and IR spectroscopies. *J. Med. Chem.* **27**: 1657-1663.
12. Kang, J.H., Y. Hwang and O.J. Yoo. 1991. Expression of penicillin G acylase gene from *Bacillus megaterium* ATCC 14945 in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Biotechnol.* **17**: 99-108.
13. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1990. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
14. 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.
15. Takahashi, T., Y. Yamazaki, K. Kato and M. Isono. 1972. Enzymatic synthesis of cephalosporins. *J. Am. Chem. Soc.* **94**: 4035-4037.
16. Tinti, M.O., P. Foresta, E. Quaresima, P. De Witt and M.T. Ramacci. 1980. Cephalosporin derivatives in the furyl properties. *J. Antibiot.* **33**: 1177-1182.
17. Walton, R.B. 1964. Search for microorganisms producing cephalosporin C amidase. *Dev. Ind. Microbiol.* **5**: 349-353.
18. Yuzo, S., M. Kunio and T. Fujii. 1981. Isolation and properties of 7 β -(4-Carboxybutanamido) cephalosporanic acid acylase-producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 1561-1567.

(Received 23 January 1995)