

## Cephalosporin C 생물전환을 위한 *Trigonopsis variabilis* (ATCC10679) 변이균주의 간편한 선별 및 D-amino acid oxidase 유전자 배열

†강 용 호 · 박 선 영

영남대학교 응용미생물학과

(접수 : 1999. 2. 11., 게재승인 : 1999. 3. 24.)

### Rapid Screening of Mutant Strains of *Trigonopsis variabilis* (ATCC10679) for Cephalosporin C Bioconversion and Sequences of D-amino acid oxidase Genes

Yong-Ho Khang† and Sun Young Park

Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749

(Received : 1999. 2. 11., Accepted : 1999. 3. 24.)

Simple and rapid screening methods were developed to screen mutant strains of *Trigonopsis variabilis* ATCC10679 (TW). D-amino acid oxidase (D-AAO) from a mutant strain, T26, showed about 30% higher specific activity against cephalosporin C than from its wild type, TW. D-AAO genes from both TW and T26 strains were cloned and sequenced. There was one nucleotide changed from T to C at 811 position, resulting in an amino acid codon changed from Phe-258 to Ser-258.

Key Words : Cephalosporin C, bioconversion, D-amino acid oxidase, screening, sequencing

#### 서 론

미생물의 효소를 사용하여 세파게 항생제 원료 물질인 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA)를 산업적으로 생산하는 데는 D-amino acid oxidase (D-AAO)와 glutaryl acylase의 두 효소가 필요하다 (1) D-AAO는 cephalosporin C (CPC)를  $\alpha$ -keto-adipyl-7-aminocephalosporanic acid (AKA-7ACA)로 생변환하고 AKA-7ACA는 반응 부산물인 hydrogen peroxide에 의하여 비효소반응으로 glutaryl-7ACA (G1-7ACA)로 전환된다. G1-7ACA는 다시 glutaryl acylase에 의하여 7-ACA로 생변환된다. 7-ACA 생물공정에 사용되고 있는 D-AAO 효소는 *Fusarium solani*(2), *Rhodotorula toruloides*(3), *Trigonopsis variabilis* (4), *Rhodotorula gracilis*(5)에서 얻어지고 있다. 이들의 D-AAO 유전자는 모두 밝혀졌으나(6-9) 미생물 유래의 D-AAO 분자구조는 아직 밝혀지지 않았다. D-AAO 효소의 분자구조를 모르는 상태에서 CPC에 대한 기질특이성이 높은 효소를 개발하기 위해서는 화학적으로 균주의 돌연변이를 유도한 후 CPC 생변환율이 높은 D-AAO 효소를 생산하는 균주를 선별하는 방법이 효과적이다. 문헌상에 보고된 D-AAO의 활성 측정 방법은 균주의 세포추출액과 기질을 반응시킨 후 용존 산소의 감소 속도 측정법이나(5), 생성되는 keto

acids의 탐지를 위한 2,4-dinitrophenyl hydrazine 발색법 (10), 또는 HPLC (5)에 의한 분석법으로 측정하고 있다. 그러나 이런 분석 방법은 돌연변이 유도에 의하여 생성되는 수많은 변이균주들의 D-AAO 활성을 짧은 시간내에 동시에 분석하여 상호 비교하기에는 적합하지 않다. 이런 문제점을 극복하기 위하여 본 연구에서는 D-AAO 효소 반응물로 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 발색 및 발광법으로 탐지하여 D-AAO 효소 활성을 매우 간편하고 빠르게 측정할 수 있는 방법을 개발하여 소개하였다. 이 방법으로 *T. variabilis* 변이균주들중에서 CPC에 대한 기질 특이성이 개선된 D-AAO 효소를 생산하는 균주를 선별하고 그 균주에서 D-AAO 효소 유전자를 클로닝하여 유전자 배열을 밝혔다.

#### 재료 및 방법

##### 사용 균주 및 플라스미드

*Trigonopsis variabilis* (ATCC 10679; KCTC 7263)는 한국과학기술원 생명공학 연구소의 유전자은행에 의뢰하여 미국 ATCC에서 구입하여 사용하였으며, 배지로는 yeast extract 10g/L, malt extract 15g/L, D-methionine 2g/L를 사용하였다. Vector로는 pALTER-EX2 (Promega, USA)를 사용하였으며 *E. coli* JM109 DE3 (Promega, USA)에 형질전환하였다.

##### 돌연변이 유도 및 균주 선별

*T. variabilis*를 3일간 배양한 후 회수하여 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)을 200~600  $\mu$ g/ml로 첨가하고 30°C에서 15~60분간 배양하였다. NTG로 처리한 균주는 0.6M KCl buffer로 세척하고 10<sup>-3</sup>~10<sup>-9</sup>로 희석한 다음 미리 준

† Corresponding Author : Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Republic of Korea

Tel : 053-810-2398, Fax : 053-811-4319

e-mail : ykhkang@ynuucc.yeungnam.ac.kr

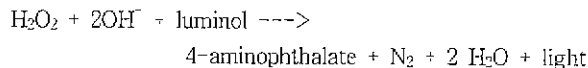
비한 agar plate 에 도말하고 30°C에서 5일간 배양하였다. Agar plate 에는 효소 반응에 의하여 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 탐지하기 위하여 peroxidase (Sigma)와 2,2'-azino-bis 3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma)를 첨가하였다. D-methionine을 기질로 사용할 때 D-AAO 반응에 의해 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 chromogene (ABTS)이 첨가된 agar plate에서 발색(녹색)하므로 녹색이 나타나는 부분의 균주를 선별하였다.

#### D-AAO 효소정제

*T. variabilis* 균주를 5ℓ 용 fermenter에서 3일간 배양한 후 회수하여 French press (1000기압)를 사용하여 세포벽을 파쇄하였다. 파쇄된 내용물을 원심분리하여 상등액에 ammonium sulfate 를 20-70% 첨가하여 침전물을 회수한 다음 4°C에서 투석하였다. 효소 정제는 DEAE-Sephadex 이온교환수지를 사용하였으며 Pollegioni and Pilone의 실험방법을 참고하였다(11)

#### D-AAO 활성 분석

D-AAO 반응에 의하여 부산물로 생성되는 과산화수소의 양을 화학적인 발광법으로 측정하여 효소활성을 분석하였다. 과산화수소는 luminol과 peroxidase 존재하에 다음과 같은 반응이 진행되면서 빛(chemiluminescence)을 발한다



따라서 여러 종류의 기질(CPC 또는 D-amino acids)과 D-AAO 효소반응액에 luminol 혼합액 (peroxidase + luminol + FAD)을 넣고 luminometer (Tuner Desines, USA)를 사용하여 10초 동안 발생한 빛의 양을 측정하였다. 반응용액은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 μmole 당 빛의 방출량이 97 cps (counts per second) 정도가 되도록 조절하였으며, D-AAO 1 unit는 1분동안 기질 1 μmole을 전환하는 것으로 정하였다.

#### D-AAO 유전자 증폭 및 클로닝

*T. variabilis* 균주를 200ml 씩 3일간 배양한 후 이들을 원심분리하여 균체를 얻었다. 이들을 PBS buffer (0.2g/L KCl, 80g/L NaCl, 0.2g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.15g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4)로 2번 세척한 후 얻은 균체에 GTC buffer (4M guanidine thiocyanate, 25mM sodium citrate, 2% β-mercaptoethanol)를 0.2g/ml가 되도록 넣었다. GTC buffer에 든 균체를 minibeat beater로 파쇄한 후 상업용 PCR kit (Promega, U.S.A)를 사용하여 D-AAO 유전자를 증폭하였다. 이때의 primer는 primer A: 5'-ATGGCTAAAATCGTTGTT-3', primer B: 5'-CTAAA-GGTTTGGACGAGT-3'를 사용하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 1 min, 55°C에서 1 min, 72°C에서 1 min으로 35회 반응시켰다. 분리한 PCR 단편은 Klenow와 T4 polynucleotide kinase로 처리하고 pALTER-Ex2 vector (Promega, U.S.A)의 *StuI* 위치에 클로닝하였다.

D-AAO 유전자의 염기서열은 한국바이오니아(주)에 의뢰하여 자료를 제공받았다.

## 결과 및 고찰

### 돌연변이 균주의 선별 및 D-AAO 특성

D-AAO 효소를 생산하는 *T. variabilis* 균주를 화학적으로 돌연변이 시켜서 cephalosporin C에 대한 D-AAO 활성이 야생 균주보다 우수한 변이균주를 선별하고자 하였다. 변이균주들의 D-AAO 활성을 agar plate 상에서 선별이 가능하게 하기 위하여 carbohydrate oxidase 생성균주를 선별하는데 사용하는 ABTS 및 peroxidase가 들어있는 agar plate에 배양하여 과산화수소의 발생에 의한 발색이 나타나는가를 조사하였다(12). *T. variabilis* 야생균주는 D-methionine이 기질로 들어있는 agar plate에서 발색이 되지 않았으나 NTG를 처리한 균주를 도말했을 때는 2-3일 배양한 후에 균주위에 녹색의 환이 보였다. Agar 배지에서 녹색이 나타난 변이 균주들은 균주내의 catalase가 생성되지 않았거나 D-AAO 활성이 개선되었다고 생각하고 녹색 주변의 균주 (약 3 × 10<sup>5</sup>)를 선별하여 완충용액으로 회수하여 다시 agar plate에 도말하는 과정을 반복하였다. Agar plate에서 발색이 나타나는 균주는 Figure 1에서와 같이 D-methionine 이 들어 있는 배지에서 잘 자라지 못하였는데 그 이유는 세포내에 생성되는 과다한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양 때문인 것 같았다.

D-methionine을 기질로 사용할 때 녹색이 뚜렷이 나타나는 28개의 독립균주를 선별하여 기질로서 D-methionine 대신 CPC를 사용하여 각 균주의 기질특이성을 조사하였다. 조사방법은 이들 28개의 균주를 액체 배지에서 3일간 배양한 다음 각 균주를 회수하여 minibeat beater로 세포추출액을 제조하여 CPC 용액 (10mM)과 30°C에서 30분간 반응시킨 다음 각 반응물에서 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양을 luminometer 로 측정하였다. 실험을 두번이상 반복한 결과 세포추출액의 전체 단백질당 D-AAO 효소 활성이 야생균주보다 높게 나타나는 균주를 선별하였다 (Figure 2). 이 균주들의 D-AAO 효소가 기질특이성이 변화되었는지 아니면 단순히 D-AAO 생산량이 증가하였는지를 확인하기 위하여 여러 종류의 D-amino acids를 사용하여 효소의 기질 특이성을 비교하였다. T22 균주는 T21 균주와 CPC에 대한 기질특이성이 차이가 없었으므로 T7, T9, T14, T21, T26 균주를 선별하였다. 각 균주의 세포추출액의 전체 단백질 양을 같게 한 다음 D-AAO 효소 반응을 측정한 결과 Figure 3에서와 같이 D-leucine, D-methionine, D-tryptophane, D-phenylalanine 등에 대하여 공통적으로 높은 기질특이성을 보였다. 그러나 각 기질에 대한 특이성이 서로 일치하지 않았으며, CPC에 대한 효소활성은 T26이 야생균주 보다 약 30% 정도 높게 나타났다.

이와 같은 세포추출액의 결과를 확인하기 위하여 야생균주 (TW)와 T26 변이균주를 대량 배양하여 DEAE-Sephadex 이온 교환수지를 사용하여 D-AAO 효소를 부분정제하였다. 부분정제한 D-AAO 효소와 CPC를 기질로 사용하여 반응한 결과 Figure 4에서와 같이 전체 단백질당 T26의 D-AAO 효소가 TW의 D-AAO 효소보다 CPC에 대한 효소활성이 역시 약 30% 정도 높게 나타남을 제확인하였다. 이런 결과가 효소의 아미노산 변경에 따른 분자구조의 변화 때문인지, 아니면 변이균주의 다른 유전학적인 특성 때문인지를 이해하기 위하여 TW와 T26의 D-AAO 유전자 배열을 조사하였다. 각 균주의 염색체 DNA를 분리하여 PCR 방법으로 D-AAO 유전자만을 증폭한 다음 pALTER-Ex2 vector에 클로닝하여 유전자 배열을 조사

Table 1. Comparison of D-amino acid oxidase genes among *T. variabilis* ATCC10679 (TW), its mutant (T26), and *T. variabilis* CBS4095 (TcDNA) registered in GenBank (accession E07001).

TW	1	ATGGCTAAAA	TCGTTGTTAT	TGGGTAAGTG	CCTTGATACC	AGACGGCTGA
T26	1	ATGGCTAAAA	TCGTTGTTAT	TGGGTAAGTG	CCTTGATACC	AGACGGCTGA
TcDNA	1	ATGGCTAAAA	TCGTTGTTAT	TGG-----	-----	-----
TW	51	CATTGTGTTA	GTGCCGGTGT	TGCCGGTTTA	ACTACAGCTC	TTCAACTTCT
T26	51	CATTGTGTTA	GTGCCGGTGT	TGCCGGTTTA	ACTACAGCTC	TTCAACTTCT
TcDNA	51	-----	-TGCCGGTGT	TGCCGGTTTA	ACTACTGCTC	TTCAACTTCT
TW	101	TCGTAAAGGA	CATGAGGTTA	CAATTGTGTC	CGAGTTTACG	CCCGGTGATC
T26	101	TCGTAAAGGA	CATGAGGTTA	CAATTGTGTC	CGAGTTTACG	CCCGGTGATC
TcDNA	101	TCGTAAAGGT	CATGAGGTTA	CAATTGTGTC	CGAGTTTACG	CCCGGTGATC
TW	151	TTAGTATCGG	ATATACCTCG	CCTTGGGCAG	GTGCCAACTG	GCTCACATTT
T26	151	TTAGTATCGG	ATATACCTCG	CCTTGGGCAG	GTGCCAACTG	GCTCACATTT
TcDNA	151	TTAGTATCGG	ATATACCTCG	CCTTGGGCAG	GTGCCAACTG	GCTCACATTT
TW	201	TACGATGGAG	GCAAGTTAGC	CGACTACGAT	GCCGTCTCTT	ATCCTATCTT
T26	201	TACGATGGAG	GCAAGTTAGC	CGACTACGAT	GCCGTCTCTT	ATCCTATCTT
TcDNA	201	TACGATGGAG	GCAAGTTAGC	CGACTACGAT	GCCGTCTCTT	ATCCTATCTT
TW	251	GCGAGAGCTG	GCTCGAAGCA	GCCCCGAGGC	TGGAATTTCGA	CTCATCAACC
T26	251	GCGAGAGCTG	GCTCGAAGCA	GCCCCGAGGC	TGGAATTTCGA	CTCATCAACC
TcDNA	251	GCGAGAGCTG	GCTCGAAGCA	GCCCCGAGGC	TGGAATTTCGA	CTCATCAACC
TW	301	AACGCTCCCA	TGTTCTCAAG	CGTGATCTTC	CTAAACTGGA	AGGTGCCATG
T26	301	AACGCTCCCA	TGTTCTCAAG	CGTGATCTTC	CTAAACTGGA	AGGTGCCATG
TcDNA	301	AACGCTCCCA	TGTTCTCAAG	CGTGATCTTC	CTAAACTGGA	AGGTGCCATG
TW	351	TCGGCCATCT	GTCAACGCAA	CCCCTGGTTC	AAAAACACAG	TCGATTCTTT
T26	351	TCGGCCATCT	GTCAACGCAA	CCCCTGGTTC	AAAAACACAG	TCGATTCTTT
TcDNA	351	TCGGCCATCT	GTCAACGCAA	CCCCTGGTTC	AAAAACACAG	TCGATTCTTT
TW	401	CGAGATTATC	GAGGACAGGT	CCAGGATTGT	CCACGATGAT	GTGGCTTATC
T26	401	CGAGATTATC	GAGGACAGGT	CCAGGATTGT	CCACGATGAT	GTGGCTTATC
TcDNA	401	CGAGATTATC	GAGGACAGGT	CCAGGATTGT	CCACGATGAT	GTGGCTTATC
TW	451	TAGTCGAATT	TGCTTCCGTT	TGTATCCACA	CCGGAGTCTA	CTTGAACTGG
T26	451	TAGTCGAATT	TGCTTCCGTT	TGTATCCACA	CCGGAGTCTA	CTTGAACTGG
TcDNA	451	TAGTCGAATT	TGCTTCCGTT	TGTATCCACA	CCGGAGTCTA	CTTGAACTGG
TW	501	CTGATGTCCC	AATGCTTATC	GCTCGGCGCC	ACGGTGGTTA	AACGTCGAGT
T26	501	CTGATGTCCC	AATGCTTATC	GCTCGGCGCC	ACGGTGGTTA	AACGTCGAGT
TcDNA	501	CTGATGTCCC	AATGCTTATC	GCTCGGCGCC	ACGGTGGTTA	AACGTCGAGT
TW	551	GAACCATATC	AAGGATGCCA	ATTTACTACA	CTCCTCAGGA	TCACGCCCGG
T26	551	GAACCATATC	AAGGATGCCA	ATTTACTACA	CTCCTCAGGA	TCACGCCCGG
TcDNA	551	GAACCATATC	AAGGATGCCA	ATTTACTACA	CTCCTCAGGA	TCACGCCCGG
TW	601	ACGTGATTGT	CAACTGTAGT	GGTCTCTTTG	CCCGGTCTTT	GGGAGGCGTC
T26	601	ACGTGATTGT	CAACTGTAGT	GGTCTCTTTG	CCCGGTCTTT	GGGAGGCGTC
TcDNA	601	ACGTGATTGT	CAACTGTAGT	GGTCTCTTTG	CCCGGTCTTT	GGGAGGCGTC
TW	651	GAGGACAAGA	AGATGTACCC	TATTCGAGGA	CAAGTCGTCC	TTGTTTCGAAA
T26	651	GAGGACAAGA	AGATGTACCC	TATTCGAGGA	CAAGTCGTCC	TTGTTTCGAAA
TcDNA	651	GAGGACAAGA	AGATGTACCC	TATTCGAGGA	CAAGTCGTCC	TTGTTTCGAAA
TW	701	CTCTCTTCCT	TTTATGGCCT	CCTTTTCCAG	CACTCCTGAA	AAAGAAAATG
T26	701	CTCTCTTCCT	TTTATGGCCT	CCTTTTCCAG	CACTCCTGAA	AAAGAAAATG
TcDNA	701	CTCTCTTCCT	TTTATGGCCT	CCTTTTCCAG	CACTCCTGAA	AAAGAAAATG
TW	751	AAGACGAAGC	TCTATATATC	ATGACCCGAT	TCGATGGTAC	TTCTATCATT
T26	751	AAGACGAAGC	TCTATATATC	ATGACCCGAT	TCGATGGTAC	TTCTATCATT
TcDNA	751	AAGACGAAGC	TCTATATATC	ATGACCCGAT	TCGATGGTAC	TTCTATCATT
TW	801	GGCGGTTGTT	TCCAACCCAA	CAACTGGTCA	TCCGAACCCG	ATCCTTCTCT
T26	801	GGCGGTTGTT	TCCAACCCAA	CAACTGGTCA	TCCGAACCCG	ATCCTTCTCT
TcDNA	801	GGCGGTTGTT	TCCAACCCAA	CAACTGGTCA	TCCGAACCCG	ATCCTTCTCT
TW	851	CACCCATCGA	ATCCTGTCTA	GAGCCCTCGA	CCGATTCCCG	GAAGTACCA
T26	851	CACCCATCGA	ATCCTGTCTA	GAGCCCTCGA	CCGATTCCCG	GAAGTACCA
TcDNA	851	CACCCATCGA	ATCCTGTCTA	GAGCCCTCGA	CCGATTCCCG	GAAGTACCA
TW	901	AAGATGGCCC	TCTTGACATT	GTGCGGGAAT	GCGTTGGCCA	CCGTCTGGT
T26	901	AAGATGGCCC	TCTTGACATT	GTGCGGGAAT	GCGTTGGCCA	CCGTCTGGT
TcDNA	901	AAGATGGCCC	TCTTGACATT	GTGCGGGAAT	GCGTTGGCCA	CCGTCTGGT
TW	951	AGAGAGGGCG	GTCCCCGAGT	AGAATTAGAG	AAGATCCCCG	GCGTTGGCTT
T26	951	AGAGAGGGCG	GTCCCCGAGT	AGAATTAGAG	AAGATCCCCG	GCGTTGGCTT
TcDNA	951	AGAGAGGGCG	GTCCCCGAGT	AGAATTAGAG	AAGATCCCCG	GCGTTGGCTT
TW	1001	TGTTGTCCAT	AACTATGGTG	CCGCCGGTGC	TGGTTACCAG	TCCTCTTACG
T26	1001	TGTTGTCCAT	AACTATGGTG	CCGCCGGTGC	TGGTTACCAG	TCCTCTTACG
TcDNA	1001	TGTTGTCCAT	AACTATGGTG	CCGCCGGTGC	TGGTTACCAG	TCCTCTTACG
TW	1051	GCATGGCTGA	TGAAGCTGTT	TCTTACGTCG	AAAGAGCTCT	TACTCGTCCA
T26	1051	GCATGGCTGA	TGAAGCTGTT	TCTTACGTCG	AAAGAGCTCT	TACTCGTCCA
TcDNA	1051	GCATGGCTGA	TGAAGCTGTT	TCTTACGTCG	AAAGAGCTCT	TACTCGTCCA
TW	1101	AACCTTTAG				
T26	1101	AACCTTTAG				
TcDNA	1101	AACCTTTAG				

Table 2. Comparison of D-AAO amino acid sequences among *T. variabilis* ATCC10679 (TW), its mutant (T26), and *T. variabilis* CBS4095 (TCDNA) registered in GenBank (accession E07001).

	10	20	30	40	50
TW T26 TCDNA	MAKIVVIGAG MAKIVVIGAG MAKIVVIGAG	VAGLTTALQL VAGLTTALQL VAGLTTALQL	LRKGHEVTIV LRKGHEVTIV LRKGHEVTIV	SEFTPGDLSI SEFTPGDLSI SEFTPGDLSI	GYTSPWAGAN GYTSPWAGAN GYTSPWAGAN
TW T26 TCDNA	WLTIFYDGGKL WLTIFYDGGKL WLTIFYDGGKL	ADYDAVSYPY ADYDAVSYPY ADYDAVSYPY	LRELARSSPE LRELARSSPE LRELARSSPE	AGIRLINQRS AGIRLINQRS AGIRLINQRS	HVLKRDLPKL HVLKRDLPKL HVLKRDLPKL
TW T26 TCDNA	EGAMSAICQR EGAMSAICQR EGAMSAICQR	NPWFKNTVDS NPWFKNTVDS NPWFKNTVDS	FEIEDRSRI FEIEDRSRI FEIEDRSRI	VHDDVAYLVE VHDDVAYLVE VHDDEAYLVE	FASVCIHTGV FASVCIHTGV FRSVCIHGTG
TW T26 TCDNA	YLNWLMSQCL YLNWLMSQCL YLNWLMSQCL	SLGATVVKRR SLGATVVKRR SLGATVVKRR	VNHIKDANLL VNHIKDANLL VNHIKDANLL	HSSGSRPDVI HSSGSRPDVI HSSGSRPDVI	VNCSGLFARF VNCSGLFARF VNCSGLFARF
TW T26 TCDNA	LGGVEDKKMY LGGVEDKKMY LGGVEDKKMY	PIRGQVVLVR PIRGQVVLVR PIRGQVVLVR	NSLPFMASFS NSLPFMASFS NSLPFMASFS	STPEKENEDE STPEKENEDE STPEKENEDE	ALYIMTRFDG ALYIMTRFDG ALYIMTRFDG
TW T26 TCDNA	TSIIGGCFQP TSIIGGCSQP TSIIGGCFQP	NNWSSEPDPS NNWSSEPDPS NNWSSEPDPS	LTHRILSRAL LTHRILSRAL LTHRILSRAL	DRFPELTKDG DRFPELTKDG DRFPELTKDG	PLDIVRECVG PLDIVRECVG PLDIVRECVG
TW T26 TCDNA	HRPGREGGPR HRPGREGGPR HRPGREGGPR	VELEKIPGVG VELEKIPGVG VELEKIPGVG	FVVHNYGAAG FVVHNYGAAG FVVHNYGAAG	AGYQSSYGMA AGYQSSYGMA AGYQSSYGMA	DEAVSYVERA DEAVSYVERA DEAVSYVERA
TW T26 TCDNA	LTRPNL< LTRPNL* LTRPNL<				

하였다. 유전자 염기서열 분석은 외부기관(바이오니아)에 의뢰하였으며 각 균주의 D-AAO 염기서열은 Table 1에 제시하였다.

본 연구에서 사용한 *T. variabilis* ATCC10679 (TW)의 D-AAO 유전자를 GenBank에 등록된 다른 균주와 비교하였을 때 *T. variabilis* ATCC20931 (Accession Z80895, unpublished data) D-AAO 유전자와 동일하였으며, *T. variabilis* CBS4095 (Accession E01451) D-AAO의 cDNA와는 점선으로 표시된 intron 부위를 제외하고 5군데의 염기서열이 차이가 있었다 (6). TW의 D-AAO 유전자와 T26의 D-AAO 유전자는 811번 위치에서 T에서 C로 바뀌어 진 것 외에는 모두 같았다. TW와 T26의 D-AAO 염기서열에서 intron 부위(24-61번)를 제외한 다음 아미노산 서열을 비교한 결과는 Table 2에 제시하였다. TW와 T26의 D-AAO 효소의 아미노산 배열은 811번 유전자가 T에서 C로 바뀌어서 Phe-258이 Ser-258로 변경되었으며, TW와 *T. variabilis* CBS4095의 D-AAO 효소의 아미노산 배열을 비교할 때는 Val-135이 Glu-135로, Ala-142이 Arg-142로 두 곳의 아미노산이 변경되었다.

문헌상에 발표된 바에 의하면 *T. variabilis* D-AAO 효소의 Cys-298과 *R. gracilis* D-AAO 효소의 Cys-208이 flavin adenine dinucleotide (FAD) cofactor와 결합하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었으나(13, 14), 최근 논문에 의하면 *T. variabilis* D-AAO 효소의 cysteine은 FAD 결합과는 무관한 것으로 나타나고 있고(15), 오히려 Asp-206이 FAD와 결합하

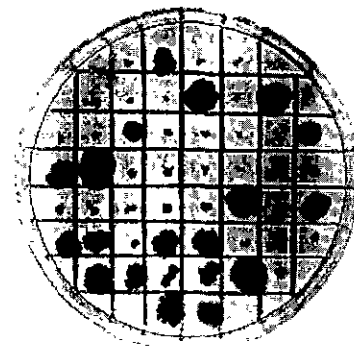


Figure 1. Mutant strains of *T. variabilis* that were not grown well on an agar plate containing D-methionine

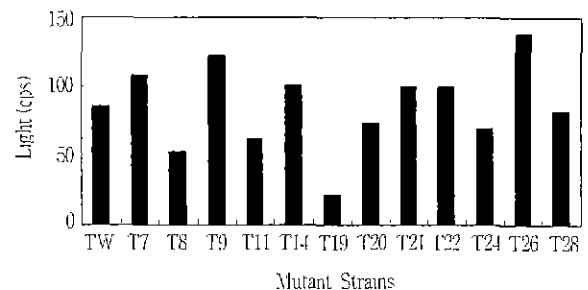


Figure 2. D-AAO activities against cephalosporin C in cell extracts of *T. variabilis* mutant strains.

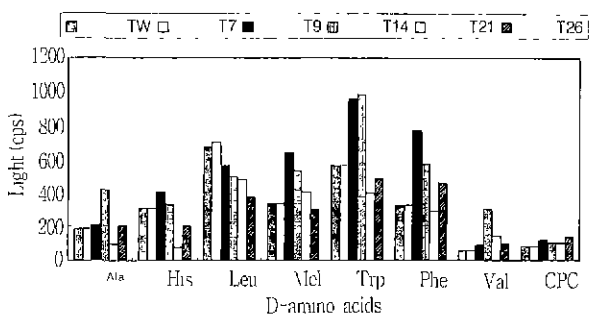


Figure 3. D-AAO activities against various D-amino acids and cephalosporin C in cell extracts of *T. variabilis* mutant strains.

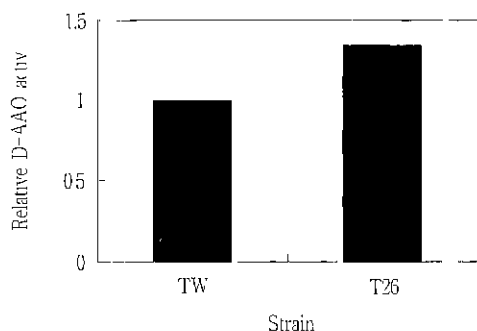


Figure 4. D-AAO activities against cephalosporin C in partially purified enzyme solutions from *T. variabilis* ATCC10679 (TW) and its mutant T26 strain.

는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(16).

본 연구의 결과에서 밝힌 Val-135이 Glu-135로, Ala-142이 Arg-142로, Phe-258 이 Ser-258 로 변경됨에 따른 D-AAO 활성이나 안정성, 또는 CPC 기질특이성에 미치는 영향을 좀더 정확히 이해하기 위해서는 앞으로 site-directed mutagenesis 방법을 사용한 효소공학 연구가 필요하다. 일반적으로 균주의 돌연변이 유도에 의한 효소의 분자 구조 개선 방법은 효율성이 매우 낮으나 본 연구에서 개발한 간편한 D-AAO 효소 활성 분석 방법은 그 낮은 효율성을 증진 시키는데 도움이 될 수 있을 것이다. 효모 유래의 D-AAO 분자구조 연구는 동물유래의 D-AAO 효소의 구조와 기능에 대한 생화학적인 연구에도 큰 도움이 될 것이다 (17).

요 약

*Trigonopsis variabilis* ATCC10679 (TW)의 변이균주를 선별하기 위하여 쉽고 간편한 균주 선별방법을 개발하였다. 변이균주 (T26)의 D-amino acid oxidase (D-AAO)는 야생균주 (TW)의 D-AAO 효소보다 cephalosporin C에 대한 기질특이성이 약 30% 높았다. 이들 두 균주에서 D-AAO 유전자를 클로닝하여 각 유전자를 비교해본 결과 811번 위치의 T가 C로 변경되었으며 이에따른 아미노산은 Phe-258이 Ser-258로 바뀌었다.

감 사

본 연구는 1997년도 영남대학교 학술연구비와 연구조교비 (박선영)의 지원을 받았으며, 한국과학재단 특정기초 (97-0401-0501-3) 연구비의 일부를 지원 받았기에 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Conlon, H. D., J. Baqai, K. Baker, Y. Q. Shen, and B. L. Wong (1995), Two-step immobilized enzyme conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid, *Biotechnol. Bioeng.* **46**, 510-513.
2. 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.
3. Lee, Y. H. and W. S. Chu (1996), D-amino acid oxidase activity from *Rhodospiridium toruloides*, *Lett. Appl. Microbiol.* **23**, 283-286.
4. Acunzo, A. D., E. D. Alteris, F. Maurano, E. Battistel, and P. Parascandola (1996), D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*: Immobilization of whole cells in natural polymeric gels for glutaryl-7-aminocephalosporanic acid production, *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 138-142.
5. Pilone, M. S., S. Buto, and L. Pollegioni (1995), A process for bioconversion of cephalosporin C by *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase, *Biotechnol. Lett.* **17**, 199-204.
6. Kenichi, K., M. Akio, and S. Kokichi (1987), D-amino acid oxidase gene, *Japan patent* JP1987262994-A/1.
7. Gonzalez, F. J., J. Montés, F. Marun, M. C. Lopez, E. F. Erminan, J. Catalan, M. A. Galan, and A. Dominguez (1997), Molecular cloning of TvDAO1, a gene encoding a D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*, *Yeast.* **13**, 1399-1398.
8. Pollegioni, L., G. Molla, S. Campaner, E. Martegani, and M. S. Pilone (1997), Cloning, sequencing and expression in *E. coli* of a D-amino acid oxidase cDNA from *Rhodotorula gracilis* active on cephalosporin C, *J. Biotechnol.* **58**, 115-123.
9. Alonso, J., J. L. Barredo, B. Diez, E. Mellado, F. Salto, J. L. Garcia, and E. Cortes (1998), D-amino-acid oxidase gene from *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*) ATCC26217, *Microbiology* **144**, 1095-1101.
10. Ramon, F., M. Castillon, I. De La Mata, and C. Acebal (1998), Chemical mechanism of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*: pH dependence of kinetic parameters, *Biochem. J.* **330**, 311-314.
11. Pollegioni, L. and M. S. Pilone (1992), Purification of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Protein Express. Purifcat.* **3**, 165-167.

12. Danneel, H.-J., M. Ullrich, and F. Giffhorn (1992), Goal-oriented screening method for carbohydrate oxidase produced by filamentous fungi, *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 898-903.
13. Schrader, T. and J. R. Andreesen (1993), Evidence for the functional importance of Cys298 in D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*, *Eur. J. Biochem.* **218**, 735-744
14. Pollegioni, L., S. Campaner, A. A. Raibekas, and M. S. Pilone (1997), Identification of a reactive cysteine in the flavin-binding domain of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* **343**, 1-5.
15. Schrader, T. and J. R. Andreesen (1996), Studies on the inactivation of the flavoprotein D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 458-464.
16. Ju, S. S., L. L. Lin, W. C. Wang, and W. H. Hsu (1998), A conserved aspartate is essential for FAD binding and catalysis in the D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*, *FEBS Lett.* **436**, 119-122.
17. Mattevi, A., M. A. Vanoni, and B. Curti (1997), Structure of D-amino acid oxidase: new insights from an old enzyme, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 804-810.