

## 신규 Cephalosporin-C Deacetylase(CAH) 생산 균주인 *Bacillus sphaericus* 366M-9의 선발 및 그 효소학적 특성

이승훈 · 권태종 · 이동희\*  
건국대학교 미생물공학과

**The Isolation of *Bacillus sphaericus* 366M-9 Producing New Cephalosporin-C Deacetylase (CAH) and its Enzymatic Characterization.** Lee, Seung-Hun, Tae-Jong Kwon, and Dong-Heui Yi\*. Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea – Several microorganisms (esterase-producing group) were isolated by the solid selective media containing -naphtylacetate. Among them, strain 366M-9 having a high activity of cephalosporin-C deacetylase (CAH; EC 3.1.1.41) was selected. The strain 366M-9 was identified as *Bacillus sphaericus* on the basis of morphological, physiological, and biochemical characteristics. The production of CAH reached at maximum value after 32 hrs, when cultivated in the optimal medium containing dextrin 2.5%, peptone 2.5%, sodium chloride 0.5%, dipotassium phosphate 0.25%, ferrous sulfate 0.02%, and 7-ACA 0.1% at 30°C with initial pH 6.0. The CAH was purified by 3 steps with ammonium sulfate precipitation, adsorption chromatography on hydroxyapatite column, and Sephadex G-200 gel chromatography. The final enzyme preparation was homogeneous as judged by the analysis of SDS-PAGE and HPLC. Optimum temperature and pH for CAH activity were 50°C and around 7.0, respectively. And the enzyme was stable at pH 6.0~8.0, up to 50°C. The Michaelis-Menten constants ( $K_m$ ),  $V_{max}$  were 0.87 mM and 1.22 unit/ml, respectively.

**Key words:** Cephalosporin-C (CPC), 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA), 7-deacetylcephalosporanic acid (7-DACA), cephalosporin-C acetyl hydrolase (CAH), *Bacillus sphaericus*

Cephalosporin-C(CPC)는 1945년 Brotzu에 의해 분리된 *Cephalosporium acremonium*이 생산하는 항생물질로서, Abraham 등에 의해서 구조가 결정되었다. CPC는 산에 대해서 penicillin보다 안정하다는 점, 그람 음성 간균에 대해서 활성을 나타낸다는 점, 그리고 penicillinase에 저항성이 있다는 성질로 주목받아 세계적 규모로 성장하였다. 그러나 내성균의 출현에 따른 구조적 수식이 불가피하였으며, 강력한 동족체 생산을 위해 CPC의 3번 위치를 deacetylation하는 화학적 공정법이 개발되었다. 그러나 이러한 화학적 공정법은 화학반응시 높은 pH, 낮은 반응수율, alkaline pH에서  $\Delta^3$  double bond가  $\Delta^2$  position으로 이동하며[23], acidic pH에서는 3'-hydroxymethyl과 인접한 carboxyl group 사이에 lactone formation이 일어나, 유사 부산물의 생성으로 인한 환경오염을 야기시킨다[18]. 따라서 이러한 제반 문제점을 해결하는 방안으로 효소적 전환방법에 대한 연구를 하게 되었다. 일반적으로 cephalosporin-C deacetylase는 citrus peel[13]과 wheat germ, 세균 및 방선균[8]에서 발견되었으며, 동물 조직인 간이나 신장등에 널리 존재한다[24]. Hurber

등[12]이 *C. acremonium*을 이용한 cephalosporin-C 발효과정 중에 deacetyl cephalosporin-C의 존재를 확인한 이래, Abbott 등[2]은 *Bacillus subtilis*로부터, Yasuyoshi 등[32]은 *Rhodotorula glutinis*로부터 CAH를 분리하였다. 그러나 기질에 의한 inhibition 및 낮은 전환율 등의 문제로 산업화 적용에 한계를 나타내었다. 특히 선행연구에 있어, 기질에 의한 inhibition은 whole cell을 통한 생물전환의 가능성이 배제되게끔 하였으며, pH에 의한 기질의 안정성 문제 또한 어려운 점으로 알려졌다. 본 연구에서는 cephalosporins의 3번 위치의 deacetylation적용 목적으로 강력한 deacetylase를 분리하는 미생물을 찾기 위해, 약산성 조건의 토양, citrus peel, acetyl기가 풍부한 한약재 등을 분리원으로 실험 진행 중, 강한 효소활성을 보인 배양액 샘플들 중, 유독 한 시험관 배양액에 파리 등 곤충이 다수 죽어있는 것을 관찰, 이 시료의 분리원으로부터 균주를 순수 분리, 동정하였다. 동정결과, *Bacillus sphaericus*로 밝혀졌으며, 문헌 조사 결과, 이 미생물은 모기 유충에 대한 미생물 살충제 부문으로 많은 연구가 진행되어 왔으며, 배양 및 생리학적 특징으로 acetate를 생장에 필요한 유일한 탄소원으로 이용하며, 이를 위해 강력한 deacetylase를 분비한다. 이 연구에서 가장 중요한 전략은 분리한 *B. sphaericus*의 경우, CPC에 저해를 받지 않고 생육하며, acetate를 탄소원으로 사용하기 위해 CAH효소

\*Corresponding author  
Tel. 82-2-450-3522, Fax: 82-2-450-3517  
E-mail: dhyi@konkuk.ac.kr

유도를 목적으로 배지에 첨가한 CPC의 3번 위치의 acetyl기를 분해하여 스스로의 탄소원으로 사용하고, 같은 비율로 deacetyl화 된 CPC를 생산한다는 점이다. 이러한 *B. sphaericus*의 배양학적 특성에 착안하여, CAH 효소 연구에 최초로 응용하였으며, 이 균주가 생산하는 CAH의 산업적 활용 가능성을 검증하기 위해 CAH 효소의 분리 정제를 수행하여 단일 효소를 확보하여, 최적 활성온도, pH, 반응속도 값 등 효소학적 특성을 규명하였기에 그 결과를 보고 하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 분리방법 및 선발

Cephalosporin-C acetyl hydrolase(CAH)를 생산하는 균주를 분리하기 위하여, 분리원으로 약산성의 토양, 굴 등의 과일점질, acetyl기가 풍부한 산성의 한약재 등을 균원 시료로 하였다. 균원 시료 용액을 100ml Erlenmeyer flask에 넣고, 80°C에서 5분동안 heat-shock을 준 후, tryptic soy agar (TSA)배지에서 30°C, 32시간 정지 배양하여, 포자 생성균을 선별하였다. 균원 시료로부터 분리한 포자 생성균을 tryptic soy broth(TSB) 배지상에 1 백금이 접종하여, 30°C, 32시간 진탕배양하여 균원 시료 용액을 제조하였다. 이 균원 시료 용액 0.01 ml를 0.02 M  $\beta$ -naphthylacetate용액 0.1ml미리 도말하여 굳힌 TSA plate에 적하, 도말하여 30°C, 32시간 배양하였다. 배양이 끝난 후, plate상에서  $\beta$ -naphthylacetate 분해능이 있는 적갈색 균을 선별하였다[30].

### 미생물의 동정

분리된 균주의 동정은 Biochemical tests for identification of medical bacteria(2<sup>nd</sup> ed.)의 방법에 준하여 생리학, 배양학적 동정을 하였으며, 생화학적 동정은 Bergy's manual of systematic bacteriology[29]에 기재된 방법을 참조하였으며, Vitek system의 Bacillus biochemical card를 이용하여 동정하였다. 또한 전자현미경(TEM)에 의하여 현미경적 관찰을 기초로 하여, 형태학적 동정을 하였다.

### 사용배지 및 시약

*B. sphaericus* 366M-9으로부터 CAH효소를 생산하기 위한 배지로 dextrin 25 g/L, peptone 25 g/L, NaCl 5 g/L,  $K_2HPO_4$  2.5 g/L,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g/L, 7-ACA 1 g/L, pH 6.0이 되도록 조정하여 사용하였다. 7-ACA, 7-DACA는 영진약품 중앙연구소에서, cephalosporin-C, hydroxyapatite 및 Sephadex G-200 등은 Sigma-Aldrich사에서 구입하여 사용하였다. 그 외의 시약은 특급시약을 사용하였다.

### CAH 활성의 측정

Spectro-colorimetry법에 의한 효소 활성도 측정은 0.1 M

phosphate buffer(pH 7.0) 2 ml에 0.02 M pNPA용액 3 ml을 첨가한 반응액을 실험군과 대조군으로 나누어 조효소액 1 ml을 첨가하여 30°C에서 1시간 반응시킨 후, 1 N NaOH 3 ml을 가하여 효소반응 정지 및 발색시킨 후, spectrophotometer를 이용하여 400 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 7-ACA 1 g/L를 혼합한 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)를 기질로 3 ml 첨가하고, 조효소액을 1 ml 첨가하여 30°C, 1시간 반응시킨 후, 2 M sodium acetate(pH 4.0) 3 ml을 첨가하여 반응을 정지시켰다.

효소 반응물을 membrane filter로 여과하여 생성된 반응물을 표준 물질과 비교하여 정량 및 기질 전환율을 계산하였다. 효소의 활성은 30°C에서 시간당 1  $\mu$ mole의 7-ACA를 탈아세틸화 시키는 양을 1 unit으로 정의하였다[2, 3, 19].

### 조효소액의 조제

500 ml Erlenmeyer flask에서 전배양된 배양액을 2.5%발효조에 5%(v/v) 수준으로 접종하였고, working volume은 60%, 교반속도는 120 rpm, 배양온도는 30°C에서 통기량은 0.8 v/v/m, pH 6.0으로 조절하여, 36시간 배양하였다. 이 배양액을 6,000 rpm, 20분간 원심분리 하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체를 생리 식염수로 2회 washing한 후, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁, lysozyme으로 10분간 반응시킨 후, 초음파 파쇄기를 이용하여 3분 간격으로 3회 반복하여 파쇄하였다. 파쇄한 균체를 8,000 rpm, 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 ammonium sulfate를 40~70% 분별 침전하고, 10,000 rpm으로 원심분리 후, 소량의 0.1M phosphate buffer에 현탁하여, 24시간 4°C에서 투석하여 탈염한 것을 조효소액으로 사용하였다.

### CAH의 정제

조효소액을 phosphate buffer로 미리 평형화시킨 hydroxyapatite column에 주입하고, running하였다. 이 때 유속은 20 ml/hr로 하였으며, 흡착된 효소는 phosphate buffer 농도를 0.4 M까지 다르게 농도 구배시켜 용출시킨 후, tube당 5 ml씩 분획하여 효소활성이 있는 부분을 모아 농축하였다. 농축된 효소를 0.1 M phosphate buffer로 미리 평형화시킨 Sephadex G-200 column에 주입하고, 펄리스타 펌프에 의해 가압하면서, 동일 buffer로 5 ml/hr 유속으로 tube당 5 ml씩 분획하였다. 정제된 효소 단백질의 단일성은 Bio-Rad mini-gel system을 이용하여 SDS-PAGE 분석을 통해 검증하였다.

### 기질의 반응속도에 미치는 영향

효소반응 속도에 미치는 기질 농도의 영향을 조사하기 위하여 기질 농도를 달리하며, 반응 속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plot하여,  $K_m$ 값과  $V_{max}$ 값을 구하였다.

결과 및 고찰

분리 균주의 선발 및 동정

분리 균주 366M-9의 고체 배지상에서의 특성은 중성 및 약산성 조건에서는 생육이 좋았으나, 알칼리 조건에서는 생육이 늦고, 집락의 크기도 작았다. 집락은 circular form의 pink색을 띄었으며, 배지 표면에 단단히 밀착, 밀집하여 넓게 퍼진다. 형태학적 특징은 Fig. 2의 전자 현미경사진(TEM) 및 Table 1과 같이 성장 균체를 채취하여, 현미경으로 관찰한 결과, 그람양성의 간균이었으며, 운동성과 포자를 형성하며, 크기는 1.5~2.0 μm × 0.5~0.7 μm였다. 또한 *Bacillus* 속의 큰 특징 중 하나인 catalase 생성능을 조사한 결과, 양성 반응을 나타내었다. 생화학적 특징은 Bergy's Manual of

Table 1. Morphological characteristics of isolated strain 366M-9.

Characteristic	Strain 366M-9	<i>B. sphaericus</i>
Gram stain	+	+
Shape	Rods	Rods
Size	(1.5~2.0) × (0.5~0.7) μm	(1.5~5.0) × (0.6~1.0) μm
Motility	+	+
Spore formation	+	+

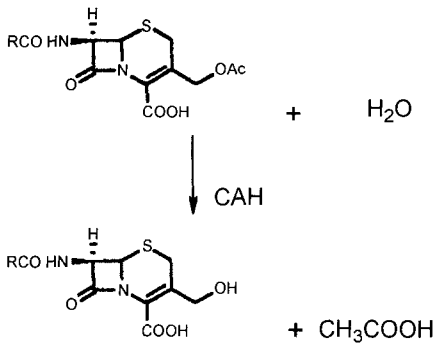


Fig. 1. Enzymatic conversion of cephalosporin-C to deacetyl cephalosporin-C.

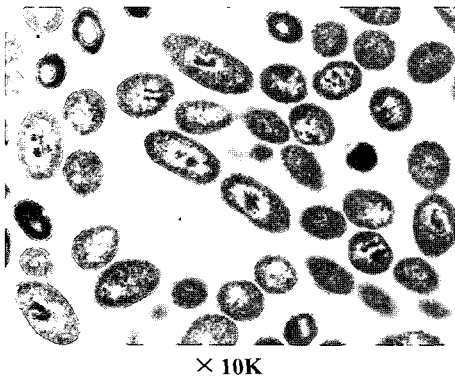


Fig. 2. Electronmicroscopy(TEM) of isolated *Bacillus sphaericus* 366M-9.

Systematic Bacteriology[2]의 기준과 비교하여 *Bacillus*의 종을 확인하기 위해 그람 양성균 동정장치인 Vitek system을 이용하여 분석하였다. 그 결과는 Table 2와 같으며, *B. sphaericus*와 99% 일치하였다.

CAH의 정제

*B. sphaericus* 366M-9가 분비하는 CAH의 정제를 위하여, 2.5 l jar fermentor를 이용하여 30°C, 32시간 배양하였다. 배양 후, 상등액을 40~70% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가해 분별 침전시킨 후, 0.01 M phosphate buffer에 투석하여 투석된 용액을 동일 buffer로 평형화하였다. Hydroxyapatite column에 loading하여 0.1 M phosphate buffer로 흘린 후, phosphate

Table 2. Biochemical characteristics of isolated *Bacillus* sp. 366M-9 (Vitek test).

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Negative control	-	Maltose	-
Sucrose	-	Trehalose	-
Tetrazolium red	-	Palatinose	-
Tagatose	-	Sorbitol	-
Glucose	-	N-Acetyl-D-glucosamine	-
Inositol	-	Amylopectin	-
Galactose	-	Potassium thiocyanate	-
Arabinose	-	7% Sodium chloride	-
Xylose	-	Mandelic acid	-
Mannitol	-	Oleandomycin	-
Raffinose	-	Sodium acetate	+
Salicin	-	Arabitol	-
Amygdalin	-	Polyamidohydrostreptin	-
Inulin	-	Nalidixic acid	-
Ribose	-	Esculin	+

Type : Bacillus card 99% *Bacillus sphaericus*.

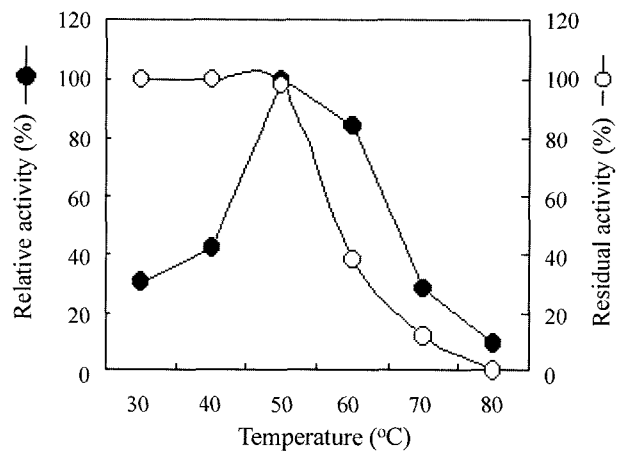


Fig. 3. Effects of temperature on the activity and stability of CAH-9. The enzyme activities were measured at different temperatures. The residual activities were measured after the enzymes were incubated at each temperature, for 1 hr.

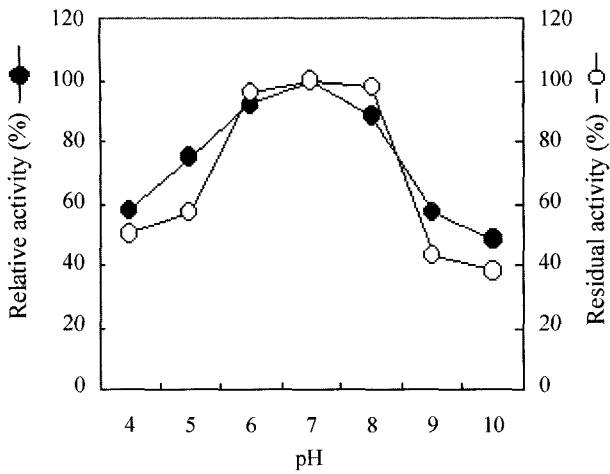


Fig. 4. Effects of pH on the activity and stability of CAH-9. The enzyme activities were measured at various pH in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4-6), 0.1 M phosphate buffer (pH 6-8), and 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8-10). The residual activities were measured after the enzymes in each pH buffer were incubated at 37°C, for 1 hr.

buffer를 0.4 M까지 gradient를 주어 binding된 단백질을 용출시켰다. 효소 활성이 있는 fraction(No.42~49)을 모아 동결건조하였다. 농축된 효소를 0.1 M phosphate buffer로 미리 평형화된 Sephadex G-200 column에 주입하고 동일 buffer로 loading하여 분획하였다. 단계별 정제 과정을 거쳐 회수된 효소 단백질은 SDS-PAGE 분석을 통해 단일 효소로 정제되었음을 확인할 수 있었으며(Fig. 5), 최종적으로 약 7.5%의 CAH 효소가 회수되었다(Table 3).

정제된 CAH의 특성 조사

온도의 영향 - *B. sphaericus* 366M-9가 생산하는 CAH의 활성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이, 50°C에서 최대활성을 나타내었다. 이는 *Bacillus*

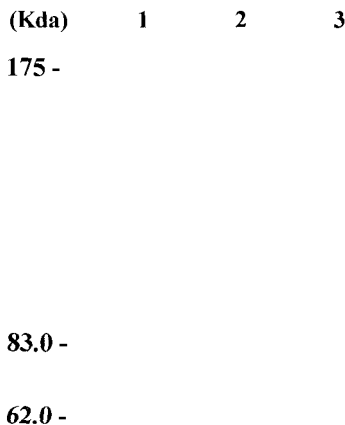


Fig. 5. Purified CAH-9 on SDS-PAGE. Lane 1, size marker ; lane 2, the purified CAH by hydroxyapatite; lane 3, the purified CAH by Sephadex G-200.

Table 3. Summary of purification of CAH-9 from *Bacillus sphaericus*.

Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (u/mg)	Yield (%)
Cell free extract	4498.0	677.4	6.64	100
Ammonium sulfate precipitation	2775.3	389.8	7.12	62
Adsorption chromatography	1273.0	106.6	11.94	28
Gel chromatography	335.6	16.1	20.84	7.5

*subtilis*, *Rhodotorula toruloides* 기원의 CAH가 40~50°C의 최적온도를 갖는다는 보고[3, 31]와 다소 상이 한 결과로 다른 기원의 CAH보다 높은 활성온도를 보였다. *B. sphaericus* 366M-9가 생산하는 CAH의 열에 대한 안정성을 검토한 결과는 Fig. 3와 같다. 30°C에서 80°C까지 각각의 온도에서 1 시간 열처리 한 후, 그 잔존 활성을 50°C에서 측정하여 나타내었으며, 50°C까지 열에 대한 안정성이 유지된 반면, 그 이상의 온도에서는 잔류활성이 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

pH의 영향 - *B. sphaericus* 366M-9가 생산하는 CAH의 활성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과는 Fig. 4과 같이 pH 7.0에서 최대활성을 나타내었다. 이는 *B. subtilis*가 생산하는 CAH최적 pH가 중성이라는 점에서 일치하였으나, *R. toruloides*, *R. glutinis*가 생산하는 CAH의 최적 pH인 6.0과 5.5와는 차이를 보였다[31]. *B. sphaericus* 366M-9가 생산하는 CAH의 pH의 안정성은 각각 다른 pH buffer에 1시간 반응시킨 후, 그 잔존 활성을 나타내었으며, Fig. 4에서 보는 바와 같이 pH 6.0~8.0까지의 범위에서 90%이상의 잔존활성도를 나타내었다. pH 4.0~5.0 범위에서는 약 50%, pH 10.0에서는 급격히 실패되어 약 30%의 잔존 활성도를 나타내었다. 이러한 약산성~약알칼리에 걸쳐있는 좁은 pH 안정구간은 생물전환 과정시, CPC를 외부환경으로부터 보호하고, 기질 안정성을 부여하면서 최대 수율을 나타낼 수 있는 장점

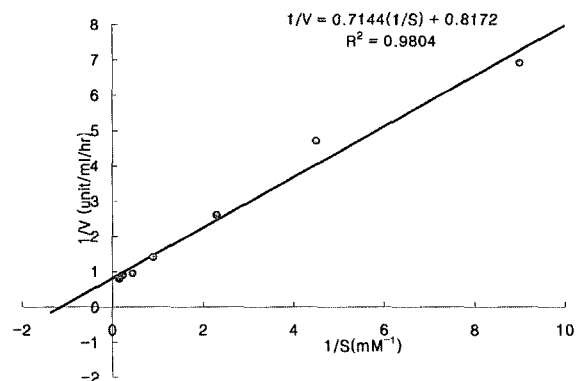


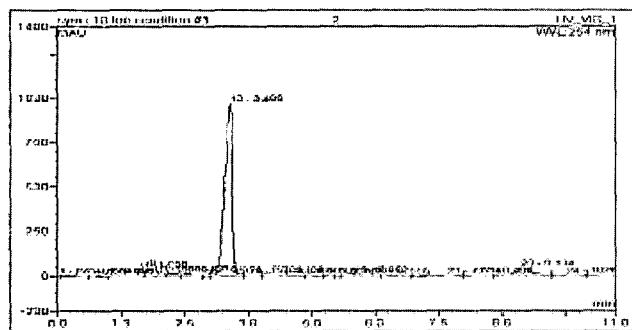
Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of various concentration of 7-ACA on CAH-9 reaction rate. The reaction was carried out using different concentrations of 7-ACA as substrate.

이 있다.

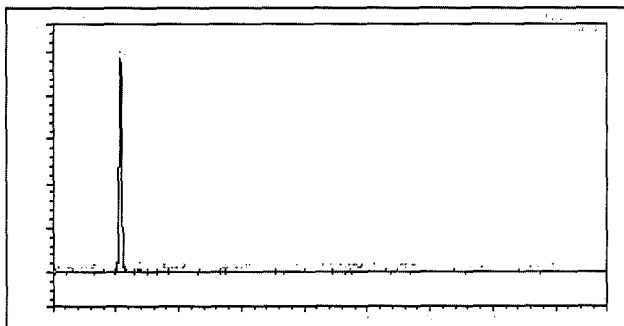
Michaelis-Menten 상수( $K_m$  값) - 효소 반응 속도에 미치는 기질 농도의 영향을 조사하기 위하여, 기질농도를 달리하며, 반응속도를 측정하여, Lineweaver-Burk plot한 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 7-ACA에 대한  $K_m$  값은 0.87 mM이며,  $V_{max}$ 는 1.22 unit/ml이었다. 이는 Akio 등[3]의 *B. subtilis* 기원의 CAH의  $K_m$  값인 1.0 mM보다 상대적으로 낮았다.

#### 분해산물의 분석

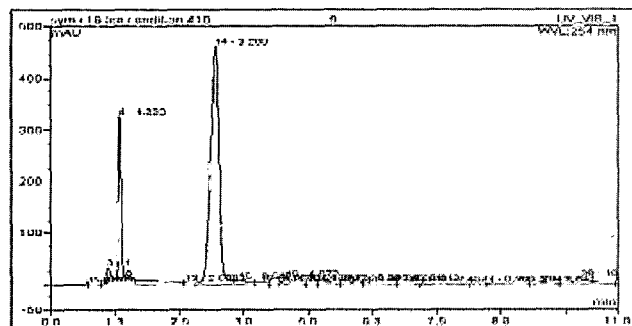
*B. sphaericus* 366M-9이 생산하는 CAH 효소에 의한 7-ACA의 분해산물을 HPLC를 사용하여, 표준물질과 비교 분석하였으며, 그 결과는 Fig. 7와 같다.



The HPLC of 7-ACA (standard solution)



The HPLC of 7-DACA (standard solution)



The HPLC of CAH-9 products after reaction

Fig. 7. The HPLC of CAH-9 products. The peak of first HPLC was 7-ACA as substrate, the peak of second HPLC was 7-DACA as product. the peaks of third HPLC were converted 7-DACA from 7-ACA and remained 7-ACA.

## 요 약

토양으로부터 강력한 CAH activity를 갖는 균주를 분리하여, 생화학적, 배양학적, 전자현미경 동정을 한 결과, *Bacillus sphaericus*로 확인되었으며, 이를 *B. sphaericus* 366M-9로 명명하였다. 또한 이 균으로부터 최초로 cephalosporin-C deacetylase(CAH)를 분리 정제하였다. 정제수율은 약 7.5%였으며, *B. sphaericus* 366M-9에서 분리한 CAH-9의 최적 활성 온도는 50°C였으며, 효소안정 온도구간은 30~50°C이다. 또한 최적 활성 pH는 7.0이었으며, 효소안정 pH구간은 pH 6.0~8.0으로 90% 이상의 잔존 활성도를 나타내었다. 효소반응속도에 미치는 기질의 영향에서는  $K_m$  값은 0.87 mM이며,  $V_{max}$ 는 1.22 unit/ml이었다.

## REFERENCES

- Abbott, B. J. and D. S. Fukuda. 1975. Cephalosporin acetyltransferase (*Bacillus subtilis*). *Methods Enzymol.* **43**: 731-734.
- Abbott, B. J. and D. S. Fukuda. 1975. Physical properties and kinetic behavior of a cephalosporin acetyltransferase produced by *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol.* **30**: 413-419.
- Akio takimoto., Kenji mitsushima., Shigeo yagi., and Takayasu sonoyama. 1994. Purification, characterization and partial amino acid sequences of a novel cephalosporin-C deacetylase from *Bacillus subtilis*. *Ferm., and Bioeng. J.*, **77**(1): 17-22.
- Parmer., A., H. Kumar., S. S. Marwaha., and J. F. Kennedy. 1998. Recent trends in enzymatic conversion of cephalosporin-C to 7-aminocephalosporanic acid(7-ACA). *Critical Reviews in Biotech.* **18**: 1-12.
- Demian, A. L. and J. Zhang. 1998. Cephalosporin-C production by *Cephalosporium acremonium*. *Critical Reviews in Biotech.* **18**: 283-294.
- Choi, D.-H., Y.-D. Kim, I.-S., Chung, S.-H., Lee, S.-M., Kang, T.-J., Kwon, and K.-S. Han. 2000. Gene cloning and expression of cephalosporin-C deacetylase from *Bacillus* sp. KCCM10143. *Microbiol. Biotech., J.*, **10**: 221-226.
- Cucchi A. and C. S. Rivas. 1994. Sensitivity of spores and growing cells of *Bacillus thuringiensis var israeliensis* and *Bacillus sphaericus* to osmotic variations. *Current Microbiol.* **28**: 123-127.
- Demian, A. L., R. B. Walton, J. F. Newkirk, and I. M. Miller. 1963. Microbial degradation of cephalosporin C. *Nature* **199**: 909-910.
- Fujisawa, Y., H. Shirafuji, and T. Kanzaki. 1975. Deacetylcephalosporin C formation by cephalosporin C acetylhydrolase of *Cephalosporium acremonium* mutant. *Agric. Biol Chem.* **39**: 1303-1309.
- Sahoo, G. C., N. N. Dutta., N. N. Dass. 1999. Liquid membrane extraction of cephalosporin-C from fermentation broth. *J. Membrane Science* **157**: 251-261.
- Hinnen, A. and J. Nuesch. 1976. Enzymatic hydrolysis of

- cephalosporin-C by extracellular acetylhydrolase of *Cephalosporium acremonium*. *Antimicrob. agents, Chemother.* **9**: 824-830.
12. F. M., Hurber, R. H. Baltz, and P. G. Caltrider. 1968. Formation of desacetyl cephalosporin-C in cephalosporin C in cephalosporin C fermentation. *Appl. Microbiol.* **16**:1011-1014.
  13. Jeffery, J. D'A., E. P. Abraham, and G. G. F. Newton. 1961. Deacetyl cephalosporin C. *Biochem. J.* **81**: 591-596.
  14. Weil, J., J. Miramonti, and M. R. Ladisch. 1995. Cephalosporin C: Mode of action and biosynthetic pathway. *Enzyme Microbial Technol.* **17**: 85-87.
  15. Kozma, J. and L. Karaffa. 1996. Effect of oxygen on the respiratory system and cephalosporin-C production in *Acremonium chrysogenum*. *J. Biotechnology* **48**: 59-66.
  16. Kenji Mitsushima, Akio Takimoto, Takayasu Sonoyama, and Shigeo Yagi. 1995. Gene cloning, nucleotide sequence, and expression of a cephalosporin-C deacetylase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2224-2229.
  17. Konecny, J. and W. Voser. 1977. Effect of carrier morphology and buffer diffusion on expression of enzymatic activity. *Biochem. Biophys. Acta* **485**: 367-378.
  18. Kukolja, S. 1968. Chemistry of cephalosporin antibiotics.XI. Preparation and properties of deacetylcephaloglycin and its lactone. *J. Med. Chem.* **11**: 1067-1069.
  19. Keay, L. and E. M. Crook. 1965. Effect of metal ions on Hog liver esterase. *Biochem. Biophys. Ar.* **111**: 626-634.
  20. 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.
  21. Meenakshisundaram, R., R.K. Fernando, K. Jenny, R. Sachidanandham, and K. Jayaraman. 1997. Metabolic response of *Bacillus sphaericus* 1593M for dual substrate limitation in continuous and total-cell retention cultures. *Appl. Microbiol.* **47**: 554-559.
  22. Michael, P. and M. Sean, Tonzi, et al, 1997. Purification and characterization of a cephalosporin esterase from *Rhodospiridium toruloides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4807-4811.
  23. Morin, R. B., B. G. Jackson, R. A. Muller, E. R. Lavagnino, W. B. Scanlon and S. L. Andrews. 1969. Chemistry of cephalosporin antibiotics. XV. Transformations of penicillin sulfoxide. A synthesis of cephalosporin compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **91**: 1401-1407.
  24. O'Callaghan, C. H. and P. W. Muggleton. 1963. The formation of metabolites from cephalosporin compounds. *Biochem. J.* **89**: 304-308.
  25. Golini, P., D. Bianchi, E. Battistel, P. Cesti, and R. Tassinari. 1995. Immobilization of D-amino acid oxidase from different yeast: Characterization and application in the deamination of cephalosporin-C. *Enzyme Microbial Technol.* **17**: 324-329.
  26. Srivastava, P. and S. Kundu. 1999. Studies on cephalosporin-C production in air lift reactor using different growth modes of *Cephalosporium acremonium*. *Process Biochem.* **34**: 329-333.
  27. Pundle, A.V. and H. Siva raman. 1994. Medium optimization for the production of penicillin V acylase from *Bacillus sphaericus*. *Biotech. Lett.* **16**: 1041-1046.
  28. Meenakshisundaram, S., G. Suresh, R. K. Fernando, K. Jenny, R. Sachidanadham, and K. Jayaraman. 1997. Metabolic response of *Bacillus sphaericus* 1593M for dual-substrate limitation in continuous and total-cell-retention cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 554-559.
  29. Mujawar, S. K., A. Kotha, C. R. Rajan, S. Ponratham, and J. G. Shewale. 1998. Development of tailor-made glycidyl methacrylate divinyl benzene copolymer for immobilization of D-amino acid oxidase from *Aspergillus* species strain 020 and its application in the bioconversion of cephalosporin-C. *J. Biotechnol.* **74**: 11-22.
  30. Sneath, et al., 1986. Endospore-forming gram-positive rods and cocci Bergy's manual of systematic bacteriology. **2**: 1104-1139.
  31. Thomas B. Higerd and John spizizen. 1973. Isolation of two acetyl esterase from extracts of *Bacillus subtilis*. *Bacteriol. J.* **114**: 1184-1192.
  32. Yasuyoshi S., A.Tetsuya, A. Motoi, O. Yohko, Y. Keizo, T. Yoshiki, and K. Nobuo. 1998. Purification and properties of cephalosporin-C deacetylase from yeast, *Rhodotorula glutinis* 38B1, useful for bioconversion of 7-aminocephalosporanic acid derivatives. *J. Ferm. Bioeng.* **85**: 53-57.
  33. Pocker, Y. and J. T. Stone. 1967. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase, Kinetic studies of the enzyme, catalyzed hydrolysis of *p*-Nitrophenyl acetate. *Biochem.* **6**: 668-678.

(Received May 28, 2004/Accepted Sep. 13, 2004)