

Glutaryl 7-Aminodeacetoxycephalosporanic Acid Acylase 생산균의 분리 및 동정

이윤진 · 임재윤*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Glutaryl 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid(GL-7-ADCA)로부터 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid(7-ADCA)를 생성하는 GL-7-ADCA acylase 생산균을 자연계에서 폭넓게 검색하여 한균주를 선정하고 분리균의 형태 및 생리적 성질들을 조사하여 *Alcaligenes* sp.로 동정하였다. 분리균의 효소생산을 위한 배양조건을 검토한 결과 탄소원으로는 glucose, 질소원으로는 yeast extract, monosodium L-glutamate가 우수하였다. 효소의 작용최적 pH는 8.0이며, pH 7.0~pH 11.0 범위에서 비교적 안정하였다. 5 l jar fermentor에서 배양결과를 조사한 결과 효소의 활성은 37°C, 교반속도 300 rpm, 통기량 1 vvm 조건에서 20시간~30시간 배양시 가장 높았다.

KEY WORDS □ GL-7-ADCA acylase, *Alcaligenes* sp., 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid

Cephalosporin계 항생물질의 개발과 생산은 기존 항생제에 대한 내성균주의 증가와 함께 그 필요성이 증대되어 왔으며, 다양한 반합성 방법으로 새로운 cephalosporin계 항생물질의 개발에 대한 연구가 이루어져 왔다. 이 cephalosporin계 항생물질은 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA), 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA)에 다양한 acyl 잔기를 첨가하는 방법으로 반합성 된다. 이러한 7-ACA와 7-ADCA의 생산은 cephalosporin계 항생제의 주 원료물질이며, 주로 미생물 발효산물인 cephalosporin C (CPC)로부터 유기화학적 방법에 의하여 생산하고 있다.

Cephalexin, cephradine, cephadroxil 등의 원료인 7-ADCA는 유기화학적으로 7-ACA나 그의 유도체 또는 penicillin에서 생성시킬 수 있으며(2), 또한 penicillin을 sulfoxide로 산화시킨 후에 산촉매하에 가열하여 생산할 수 있다. 7-ACA 유도체의 C-10 위치의 acetyl 기를 유황화합물 유도체로 치환시킨 후에 Ni를 촉매로 수소화시키면 얻을 수도 있다(1). 그러나, 보다 효율적으로 7-ADCA를 생산하기 위하여 미생물이 생산한 효소를 이용하는 생물 반응기에 관한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 GL-7-ADCA acylase 활성을 갖는 미생물을 다양한 지역의 토양을 중심으로 검색하였고, 이들 중 한 균주를 선별하여 효소 활성을 확인하고, 균주의 특성 연구와 함께 동정실험을 수행하였다.

재료 및 방법

시료의 채취

균주 검색에 필요한 시료는 충청도, 강원도, 전라도

일부 지역의 토양을 채취하여 사용하였고, 그 중 agar 배지 상에서 GL-7-ADCA를 탄소원으로 이용하는 500여 균주를 분리하여 효소활성을 검토하였다.

배지 및 시약

균의 선별 및 순수배양, 효소 활성 측정에는 Shibuya 등(8)이 사용한 배지를 변형하여 사용하였고 (Table 1), GL-7-ADCA와 7-ADCA는 제일 제당(주)에서 제공 받았으며, 그외 시약은 특급시약을 사용하였다.

균주의 선별

토양 시료 1 g을 최소 액체배지 (medium-I) 100 ml에 넣어 30°C에서 2일간 진탕배양하고, 상등액 1 ml를 멸균된 0.85% saline 9 ml에 희석한 뒤, 0.1 ml를 선별용 고체배지(medium-II)에 펴서 30°C에서 3일간 배양하였다. 형성된 colony를 선별하여 다시 선별용 고체배지(medium-II)에 접종하고 2일간 배양하여 4°C에 보관하였다. 보관된 균주는 각각 효소 생산배지(medium-III) 50 ml에 접종하여 30°C에서 2일간 진탕배양한 뒤 효소 활성을 측정하였다.

주사 전자현미경에 의한 관찰

선별한 균주의 집락을 배양하기 위하여 멸균된 이쑤시게로 선별용 고체배지에 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 집락을 포함하는 agar block의 표면적이 0.5 cm² 되도록 떼어낸 시료를 0.2 M potassium phosphate buffer(pH 7.2)로 만든 2.5% glutaraldehyde 용액에서 2시간 동안 전고정하고 동일 buffer로 15분씩 3번 세척한 후 다시 buffer에 녹여 만든 1% osmium tetroxide 용액에서 3시간 동안 후고정하였다. 그리고 graded alcohol series (25, 50, 60, 70, 80, 90, 95% ethanol)에서 15분씩 탈수시킨 후 100% ethanol에서 20분씩 2번 최종 탈수시킨 후 isoamyl

Table 1. Composition of culture media.

Ingredient	Medium-I (w/v %)	Medium-II (w/v %)	Medium-III (w/v %)
Beef extract	—	0.3	0.5
Yeast extract	—	0.2	0.2
Peptone	—	1.0	1.0
Monosodium L-glutamate	—	—	0.5
Glutaric acid	0.2	0.1	0.1
NaCl	0.05	0.3	0.3
NH ₄ Cl	—	0.2	0.2
K ₂ HPO ₄	0.1	0.5	0.5
K ₂ CO ₃	0.05	—	—
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	—	0.01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001	—	0.01
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0005	—	0.0005
GL-7ADCA*	0.5	—	—
Agar	—	1.5	—

The pH of media was adjusted to 7.0.

*Sterilized by filtration.

acetate로 치환하여 자연건조시켰다. Suptter coater (Edwards S 150B)를 이용하여 gold로 coating하여 주사 전자현미경(Hitachi, S-507)으로 관찰하였다.

GL-7-ADCA acylase 활성 측정

효소생산 배지에서 배양한 배양액을 7000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체만을 모은 뒤, 이를 0.1 M phosphate buffer(pH 7.5)로 3회 세척하고 균체 300 mg (wet weight)에 동일 buffer 1 ml로 균체 현탁액을 만들어 효소액으로 사용하였다. 효소활성의 측정은 균체액 0.25 ml를 0.1 M phosphate buffer(pH 7.5)에 녹인 GL-7-ADCA(5 mg/ml) 0.25 ml와 섞어 37°C에서 60분간 반응 시킨 후, 원심분리하여 균체를 제거하였다.

상등액에 0.005% fluorescamine 0.5 ml를 가하여 40분간 발색시킨 뒤 378 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, TLC에 의하여 효소 반응액중의 7-ADCA를 검출하였는데, Silica gel G F₂₅₄ (Merck) plate에 효소 반응액을 spotting 한 후, n-butanol: acetic acid: water (3 : 1 : 1)의 용매로 10 cm 전개하여 UV 254 nm에서 확인하였다. HPLC는 Bondapack C-18 column과 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5), 1.5% acetonitrile의 mobile phase, flow rate 1 ml/min의 조건으로 전개하여 UV 254 nm에서 검출하였다.

균주의 배양조건 검토 및 대량 배양

Beef extract 1.0%, glutaric acid 0.1%를 포함한 배지를 기본배지로 하여 배양 조건을 검토하였다. 다양한 탄소원과 질소원 1%, 인산염 0.5%, 금속이온 0.05%~1%를 각각 기본배지에 첨가하고 250 ml 플라스크에서 2일간 진탕 배양하여 균체증식과 효소생산을 검토하였다. 또한, 균주의 배양 온도를 25°C~37°C 범위에서 비교 검토하였다. 균체의 증식은 일정량의 배양액을 취하고 이를 원심분리하여 모은 균체의

Table 2. GL-7-ADCA acylase activity of some strains.

Strain	Absorbance at 378 nm	7-ADCA content (μg/ml)	β-lactamase activity(%)
J-203	0.118	10	—
J-206	0.348	28	+
J-400	0.303	24	++
J-421	0.573	46	—
S-400	0.303	24	+
S-473	0.534	44	—
S-526	0.518	40	+++
S-539	0.160	13	+
S-579	0.584	48	+++

습량을 측정하였다. 결정된 배양 조건에 의한 균주의 대량 배양은 배지 3 l가 포함된 5 l jar fermentor에서 수행하였으며, 동일 배지 200 ml에 37°C로 24시간 배양한 종균을 소포체 5 ml와 함께 접종하고 300 rpm, 1 vvm의 조건으로 37°C에서 통기교반하며 3일간 배양하였다.

효소 활성에 미치는 pH의 영향

pH에 대한 효소활성 및 안정성은 pH 4.0~11.0 범위에서 검토하였다. pH 4.0~6.0 구간은 citrate buffer, pH 6.0~7.0 구간은 phosphate buffer, pH 8.0~9.0 구간은 Tris-HCl buffer, pH 10.0~11.0 구간은 carbonate buffer를 각각 사용하였다. 안정성 검토는 각 pH 조건에서 4°C에서 효소액을 48시간 동안 방치한 후, 표준 조건에서 잔여 활성을 측정하였다.

균주의 동정

분리균의 동정은 Manual of methods for general bacteriology(3)와 Bergey's manual of systematic bacteriology(5) 등의 동정방법을 참고하였고, GN microplate (Biology, Inc.)에서 30°C 24시간 배양한 결과를 MicroLog 2 database (Biolog, Inc.)에서 비교하여 확인하였다.

결과 및 고찰

효소 생산균의 분리

일반 토양에서 GL-7-ADCA를 탄소원으로 이용하는 500여 균주를 분리하고, 이들을 배양하여 GL-7-ADCA acylase활성을 검토하였다. Shibuya 등(8)은 GL-7-ACA를 생성하는 *Pseudomonas* sp. SY-77-1을 토양으로부터 분리하였는데 이 균이 생성하는 효소는 GL-7-ACA와 더불어 GL-7-ADCA도 가수분해한다. 또한 SY-77-1 균주의 효소 생성능을 향상시키기 위해 여러 단계 돌연변이 시킴으로써 효소 생성능이 증가된 변이주 *Pseudomonas* sp. GK-16이 보고(4)되었다. 본 실험에서 분리된 여러 균주들은 발색반응 실험을 수행하여 효소생성 균주를 선별하였고 (Table 2), bacteria인 J-421 균주의 효소 반응액에서 TLC (Fig. 1)와 HPLC에 의한 분석으로 소량의 7-ADCA가 생

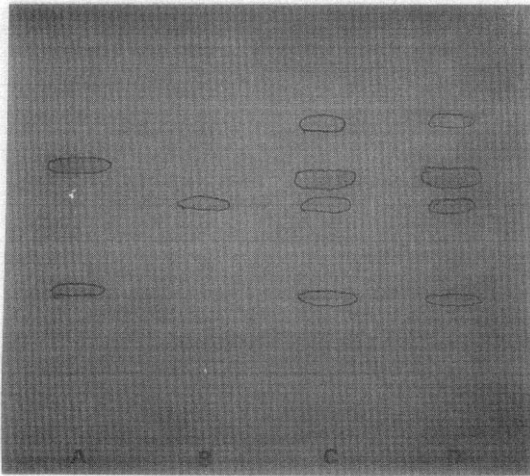


Fig. 1. Thin layer chromatogram of reaction products by J-421 strain.

Separation of products on Silica gel G F254 plate was carried out using n-butanol: acetic acid: water (3:1:1 v/v). Lane A, GL-7-ADCA; B, 7-ADCA; C and D, reaction products for 30 min and 60 min respectively.

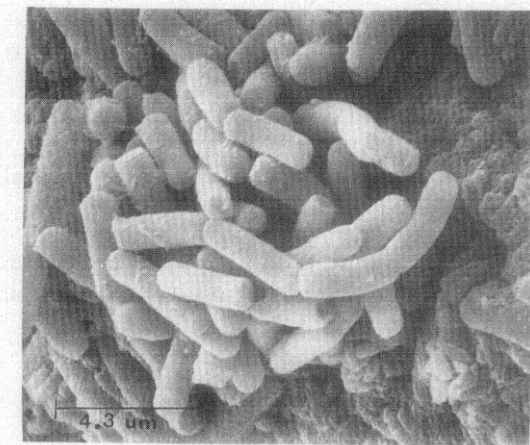


Fig. 2. Scanning electron microphotogram of GL-7-ADCA acylase producer J-421 strain.

성되는 것을 확인하였다.

균주의 동정

J-421 균주의 동정을 위하여 다양한 형태적, 생화학적 특성을 조사하였는데, 세포는 gram 음성 간균 (Fig. 2)으로 비교적 넓은 범위의 온도와 pH에서 증식 능력이 있었고, 최적 생육 조건은 37°C의 온도와 배지의 초기 pH는 7.0이었다. 그 외의 형태학적 특성으로는 운동성이 있으며 포자를 형성하지 않았다 (Table 3). 여러 생리학적 특성은 GN microplate에서 조사하였는데 catalase와 oxidase가 positive로 나타

Table 3. Morphological and cultural properties of isolated strain No. J-421.

Cell shape	short rod
Cell size	0.8 μ × 2.4 μ
Motility	positive
Spore	negative
Colony type	round
Colony color	whitish cream
Gram-stain	negative
Growth pH	5.0~10.0

Table 4. Physiological properties of isolated strain No. J-421.

Catalase activity	positive
Oxidase activity	positive
Urease activity	negative
Methyl-Red	negative
Voges-Proskauer	negative
Indol production	negative
H ₂ S production	negative
Nitrate reduction	positive
Hydrolysis of gelatin, starch	negative
Utilization of alanine, acetate, histidine, D-gluconic acid, succinate	positive
Utilization of glucose, arabinose, fructose, cellobiose, galactose, maltose	negative

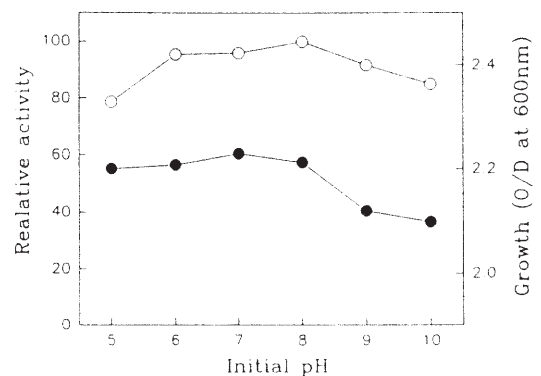


Fig. 3. Effect of initial pH on the enzyme production. ○, Growth; ●, enzyme activity.

났다. 에너지원으로서 alanine, succinate와 같은 amino acids는 이용할 수 있으나 glucose, arabinose, fructose 등은 이용하지 못하였다. 그 외 여러가지 생리적 특성을 GN microplate에서 조사하고 Biolog사의 database와 비교하여 *Alcaligenes* sp. J-421로 동정하였다 (Table 4).

효소 생산성 향상을 위한 배양조건

Table 5. Effect of various carbon sources on the enzyme production.

Carbon source	Final pH	Absorbance at 600 nm	Relative activity (%)
Starch	8.15	1.640	94
Glucose	8.12	1.700	100
Lactose	9.04	1.686	92
Maltose	9.07	1.660	92
Fructose	8.55	1.820	87
Sucrose	9.18	1.683	97
Galactose	8.18	1.691	88
Raffinose	9.12	1.698	96
Xylan	9.22	1.522	95
None	9.17	1.580	93

Cultivation was carried out for 2 days at 37°C in the basal medium containing 0.5% yeast extract, 0.2% monosodium L-glutamate, 0.1% glutaric acid, and 0.2 % NaCl.

Table 6. Effect of various nitrogen sources on the enzyme production.

Carbon source	Final pH	Absorbance at 600 nm	Relative activity (%)
Yeast extract	9.35	1.986	100
Peptone	9.35	1.714	92
Tryptone	9.33	1.935	94
Monosodium L-glutamate	9.60	1.673	99
NH ₄ Cl	8.48	1.516	74
NH ₄ CO ₃	8.66	1.485	65
(NH ₄) ₂ SO ₄	8.73	1.391	72
(NH ₄) ₂ HPO ₄	8.55	1.473	80
MgNO ₃	8.66	1.399	62
KNO ₃	8.80	1.321	80
NaNO ₃	9.31	1.431	87
None	9.23	1.381	94

Cultivation was carried out for 2 days at 37°C in the basal medium containing 1.0% beef extract, 0.1% glutaric acid, 0.2% NaCl, and 0.5% K₂HPO₄.

Table 7. Effect of various phosphorous sources on the enzyme production.

Phosphorus source	Final pH	Absorbance at 600 nm	Relative activity (%)
K ₂ HPO ₄	9.62	1.879	100
KH ₂ PO ₄	9.60	1.845	75
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	9.62	1.845	75
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	9.60	1.853	77
(NH ₄) ₂ HPO ₄	9.30	1.777	86
None	9.76	1.770	

Cultivation was carried out for 2 days at 37°C in the basal medium containing 1.0% beef extract, 0.5% yeast extract, 0.2% monosodium L-glutamate, and 0.1 % glutaric acid.

Table 8. Effect of various metallic salts on the enzyme production.

Metallic salts	Final pH	Absorbance at 600 nm	Relative activity (%)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	9.67	1.841	66
FeSO ₄ ·7H ₂ O	9.73	1.861	69
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	9.69	1.838	59
MnSO ₄ ·5H ₂ O	9.63	1.872	56
CuSO ₄ ·5H ₂ O	9.68	1.831	100
CoCl ₂ ·6H ₂ O	9.81	1.940	83
NaCl	9.67	1.840	57
None	9.76	1.770	79

Cultivation was carried out for 2 days at 37°C in the basal medium containing 1.0% beef extract, 0.5% yeast extract, 0.2% monosodium L-glutamate, and 0.1 % glutaric acid.

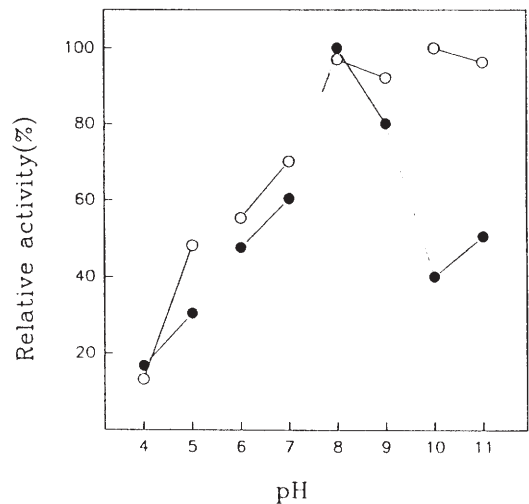


Fig. 4. Effect of pH on the activity (●) and stability (○) of GL-7-ADCA acylase from J-421 strain. Buffers (50 mM); citrate buffer (pH 4.0~5.0), phosphate buffer (pH 6.0~7.0), Tris-HCl buffer (pH 8.0~9.0), carbonate buffer (pH 10.0~11.0). The enzyme solution adjusted to various pH (4.0~11.0) and the solution was stored at 4°C for 48 hours at each pH.

초기 pH의 영향: 초기의 pH를 5.0부터 10.0까지 1.0 간격으로 배지를 만든 후 배양하여 효소의 활성을 측정해본 결과 (Fig. 3) pH 7.0에서 활성이 가장 높게 나타났다. 균의 성장은 pH 8.0에서 가장 왕성하였다.

탄소원의 영향: 각종 탄소원 1%를 함유한 기본배지를 이용하여 탄소원의 종류에 따른 효소 생산량을 조사해본 결과 Table 5와 같다. 균체의 증식이나 효소 활성에 glucose가 다른 성분들에 비하여 우수하였다.

질소원의 영향: 각각의 질소원 1%가 들어 있는 기본배지에서 배양하여 효소의 생산성을 비교해본

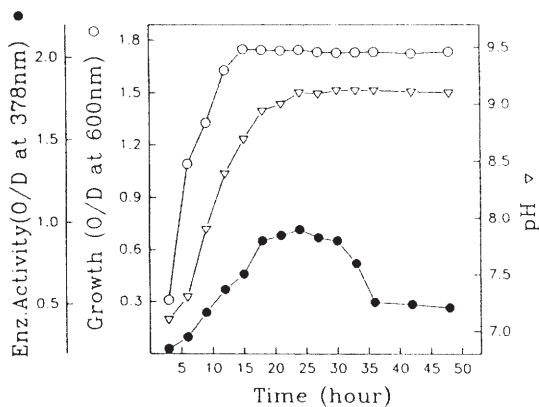


Fig. 5. Enzyme activities in the time course of J-421 strain culture.

J-421 strain was cultivated on 3l culture medium using 5l jar fermentor. The pH, cell growth, GL-7-ADCA acylase activities during cultivation were measured.

Culture conditions; temperature 37°C, initial pH 7.0, agitation of 300 rpm, aeration of 1 vvm.

결과 (Table 6) 균의 성장과 효소의 생산성은 모두 yeast extract가 들어있는 배지에서 가장 높게 나타났으며, 다음으로는 monosodium L-glutamate가 우수하였다. 이와 같이 무기 질소원에 비하여 여러 성분의 복합체인 유기 질소원을 공급할 때, 균체의 성장이 우수하였다. 무기 질소원으로는 NaNO_3 에서 효소의 활성이 높았다.

인산염의 효과: 각종 인산염의 초기 농도가 0.5% 되게 첨가한 기본배지에서 배양한 후 효소의 생산을 비교해본 결과(Table 7) K_2HPO_4 를 첨가했을 때, 효소 활성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

금속염의 영향: 금속염들에 대한 영향은 Table 8에서와 같이 CuSO_4 의 첨가로 효소 생산성을 높일 수 있었으며, 다른 금속염의 첨가에 의해서는 좋은 효과를 볼 수 없었다.

최적 pH 및 pH에 대한 안정성

각각의 pH에서 효소 반응을 수행한 결과(Fig. 4) 효소 활성을 가장 높게 나타낸 부분은 pH 8.0이었다. 효소의 pH에 대한 안정성을 조사해본 결과 효소는 pH 8.0 이상의 알칼리에서 90% 이상의 높은 활성을 유지하였다.

배양적 특성

J-421 균주의 성장은 5l jar fermentor에서 37°C, 교반속도 300 rpm, 통기량 1 vvm의 조건으로 배양 시작한 후 12~15시간 사이에 가장 높은 성장을 보

였으며 배양액의 pH는 균의 성장과 비슷한 양상으로 pH 9.2까지 증가하였다(Fig. 5). 균주의 효소 활성은 대수증식기가 끝나는 20~30 시간대에서 가장 높았으며 배양시간이 길어 질수록 감소하였다. J-421 균주는 절대 호기성으로서 비교적 많은 통기량을 필요로 하였으며, 균주의 성장속도가 매우 빨라 효소의 생산에는 매우 유리하였으며 대량으로 배양하여도 30 시간 이내에 최대의 효소활성을 얻을 수 있었다.

사 사

본 연구는 1992년도 교육부지원 한국학술진흥재단 지방대학육성 연구비에 의하여 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Chauvette, R.R. and P.A. Pennington, 1973. Chemistry of cephalosporin antibiotics: XXVII. 3-Methylenecephams. *J. Org. Chem.* **38**, 2994-2999.
2. Cooper, R.D.G. and D.O. Spray, 1972. Cephalosporins and penicillins. chemistry and biology, p. 183-230. Academic Press, New York.
3. Gerhardt P., 1981. Manual of methods for general bacteriology, ASM, Washington.
4. Ichikawa, S., Y. Murai, S. Yamamoto, Y. Shibuya, T. Fujii, K. Komatsu, and R. Kodaira, 1981. The isolation and properties of *Pseudomonas* mutants with an enhanced productivity of 7 β -(4-carboxybutanamido)-cephalosporanic acid acylase. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2225-2229.
5. Krieg, N.R., 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 1, p. 361-373. Williams & Wilkins Press, Baltimore.
6. Matsuda, A. and K. Komatsu, 1985. Molecular cloning and structure of the gene for 7 β -(4-carboxybutanamido)-cephalosporanic acid acylase from a *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* **163**, 1222-1228.
7. Matsuda, A., K. Matsuyama, K. Yamamoto, S. Ichikawa, and K. Komatsu, 1987. Cloning and characterization of the gene for two distinct cephalosporin acylase from *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* **169**, 5815-5820.
8. 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.

(Received April 22, 1994)

(Accepted May 23, 1994)

ABSTRACT: Isolation and Identification of Microorganism Producing Glutaryl 7-Aminodeacetoxycephalosporanic Acid Acylase

Lee, Yun Jin and Jai Yun Lim* (Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheong-ju 360-763, Korea)

Microorganism producing glutaryl 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid (GL-7-ADCA) acylase was screened from soil. The microorganism was identified as *Alcaligenes* sp. J-421 by its morphology and biochemical properties. Cultural conditions of *Alcaligenes* sp. J-421 were investigated for the production of GL-7-ADCA acylase. Optimum medium composition was 1% glucose, 1% beef extract, 0.5% yeast extract, 0.2% monosodium L-glutamate, 0.1% glutaric acid, 0.2% NaCl, 0.5% K₂HPO₄, and 0.05% CuSO₄·5H₂O. Optimum cultivation conditions for the production of the enzyme in 5 l jar fermentor were 37°C, tip speed 300 rpm, aeration 1 vvm. Optimum reaction pH of the enzyme was 8.0 and the enzyme was stable at pH 7.0~11.0.