

## 7-ACA 생물공정 개발을 위한 생체 촉매 연구 : VHb-DAO 기질 특이성(I)

하영란, 정성희, 김숙현, 강용호  
영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과  
(053)810-2398, FAX(053)811-4319

### 서론

반합성 세파계 항생제 제조의 시발 물질로 대부분 7-aminocephalosporanic acid(7-ACA)를 사용한다. 7-ACA를 생산하는 방법은 화학적 방법과 효소적 방법이 있다. 화학적 방법은 환경오염을 유발하고 많은 에너지가 요구됨으로 효소적 방법으로 점차 대체되고 있다.<sup>1)</sup> 미생물 효소에 의한 방법으로 Cephalosporin C(CPC)를 Glutaryl-7-aminocephalosporanic acid(GL-7ACA)로 생변환하는 D-amino acid oxidase(DAO)와 GL-7ACA를 7-ACA로 전환하는 GL-7ACA acylase에 의한 두 단계 효소반응이 연구되고 있다.<sup>2)</sup> CPC를 DAO에 의하여 생변환 하기 위해서는 전자 수용체로써 산소가 필요하지만 산소는 수용액에서 용해도가 극히 낮기 때문에 고압의 산소를 공급해야한다. 본연구는 산소 공급 문제를 해결하기 위해 *Vitreoscilla* Hemoglobin(VHb) 유전자를 DAO 유전자와 융합하여 새로운 융합효소를 개발하여 기질 특이성을 조사하였다.<sup>3)</sup>

### 재료 및 방법

D-amino acid oxidase(DAO) 유전자는 *Rhodotorula gracilis* (ATCC 26217)의 DAO cDNA를 사용하였다. Recombinant PCR 방법을 이용하여 VHb 유전자와 DAO유전자를 융합하였다. 융합한 VHb-DAO를 과발현시키기 위하여 pET vector에 클로닝하였다. VHb-DAO 과발현 생산 균체를 10L 배양한 후 초음파 분쇄기로 세포를 파쇄하여 세포 추출액을 획득하였다. 획득한 세포 추출액은 Ammonium sulfate로 침전 한 후 DEAE-Sepharose FF를 이용, VHb-DAO를 부분정제 하였다. 부분정제한 VHb-DAO와 기질 CPC를 반응하여 HPLC로 활성을 확인하였다. 부분정제한 효소액을 11종류의 D-form 아미노산들과 반응하여 Michaelis 상수  $K_m$  및 최대속도  $V_{max}$ 를 조사하였다. 효소활성은 발색반응을 이용하여 측정하였다.<sup>4)</sup>

## 결과 및 고찰

VHb::DAO 유전자를 pET vector에 클로닝하여 VHb-DAO단백질이 전체단백질의 40%이상 발현되었다. 부분 정제한 VHb-DAO 효소액과 기질 CPC를 혼합한 후 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60분 반응시킨 결과, 30분 이상 반응시키면 CPC가 GL-7ACA로 80%이상 변환되었다. 효소액과 11종류의 D-form의 아미노산을 반응한 결과  $K_m$ 은 D-Methionine이 0.1506mM로 가장 낮으며,  $V_{max}$ 는 D- $\alpha$ -aminophenylacetic acid가 0.506  $\mu$  moles/min로 가장 높은 수치를 나타냈다.

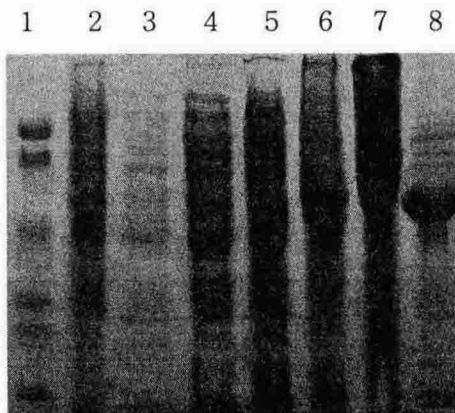


Fig 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of samples at different stage of purification. Gel was stained with Coomassie Blue (1) protein marker, (2) DAO cell extraction, (4, 5) precipitated DAO by ammonium sulfate, (6) VHb-DAO cell extraction, (7) precipitated VHb-DAO by ammonium sulfate, (8) purified VHb-DAO by DEAE sepharose

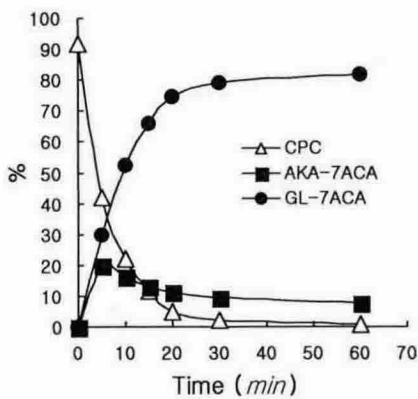


Fig 2. Time course of VHb-DAO activity. against CPC. CPC ( $\blacktriangle$ ), AKA-7ACA ( $\blacksquare$ ), and GL-7ACA ( $\bullet$ )

Table 1. Kinetic parameters of VHb-DAO activity on various substrate

Substrate	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu$ mol/min)
D-Serine	$3.083 \pm 0.420$	$0.0989 \pm 0.019$
D-Phenylalanine	$2.312 \pm 0.061$	$0.1023 \pm 0.010$
D-Aminophenylacetic acid	$1.818 \pm 0.115$	$0.1506 \pm 0.005$
D-Histidine	$1.502 \pm 0.188$	$0.0379 \pm 0.003$
D-Threonine	$3.512 \pm 0.699$	$0.0429 \pm 0.003$
D-Methionine	$0.078 \pm 0.007$	$0.0234 \pm 0.003$
D-Leucine	$0.830 \pm 0.036$	$0.1197 \pm 0.002$
D-Valine	$0.284 \pm 0.012$	$0.0601 \pm 0.001$
D-Tryptophan	$0.303 \pm 0.003$	$0.0363 \pm 0.002$
D-Asparagine	$4.170 \pm 0.961$	$0.669 \pm 0.013$

### 요약

부분 정제한 VHb-DAO와 CPC를 30분 이상 반응시키면 CPC가 GL-7ACA로 80%이상 변환되었다. VHb-DAO와 D-form의 아미노산이 반응한 결과  $K_m$ 은 D-Methionine, D-Valine이 낮으며,  $V_{max}$ 는 D- $\alpha$ -aminophenylacetic acid, D-Leucine, D-Phenylalanine가 높은 수치를 나타내었다.

### 참고문헌

1. 전영중, 세파계 항생제의 효소적 생산 방법(1996), *생물화학공* 10:45-53
2. Dey, E. S., Flygare, S., and Mosbach, K. Stabilization of D-amino acid oxidase from yeast *Trigonopsis variabilis* used for production of glutaryl-7-aminocephalosporanic acid from Cephalosporin C. (1991), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 27:239-250
3. Khosla, C., and Bailey, J. R. The *Vitreoscilla Hemoglobin* gene: Molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli* (1993) *Mol. Gen. Genet* 214:158-161
4. Yun-Huey Lee, Wen-shen Chu, and Wen-hwei Hsu, Bioconversion of cephalosporin C with D-amino acid oxidase from the yeast *Rhodospirium toruloides* (1994), *Biotechnol. Lett.*, 16:467-474