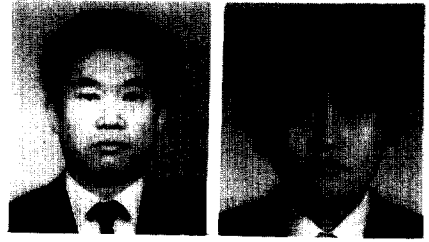


Cephalosporin Acylase의 응용



고려대학교 유전공학과 성 하 진 KIST 유전공학연구소 윤 기 홍

1. 서 론

항생물질은 그 구조에 따라 cephem계, penicillin계, aminoglycoside계, macrolide계 등을 포함한 몇가지 군으로 분류된다. Cephem계와 penicillin계 항생물질은 β -lactam ring 구조를 가지고 있어 β -lactam계 항생물질로 불리운다. β -lactam계 항생물질은 세균의 세포벽 합성을 저해함으로써 항균작용을 나타내는데 특히 cephem계 항생물질에는 항균활성이 뛰어나며 독성도 낮은 편으로 항균 범위가 넓고 내성균에 대한 작용이 강화된 여러종류의 항생제가 개발되고 있다.

cephem계에 속하며 현재 가장 많이 사용되고 있는 항생물질인 cephalosporin계 항생제는 cephalexin, cephalothin과 같은 한 두개 유도체를 제외한 거의 대부분이 중간 원료물질인 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA)로부터 합성되므로 cephalosporin계 항생제 사용량의 증가에 따라 7-ACA 수요량은 계속 증가될 것으로 현재 연간 약 1,000톤 가량 (1991년 기준) 생산되는 것으로 추정되는데 2000년대 들어서는 연간 약 1,500톤 가량 생산될 것으로 예상된다. 이러한 7-ACA는 모두 미생물로부터 생합성되는 cephalosporin C (CPC)를 출발물질로하여 화학적 방법이나 효소적 방법에 의해 제조된다. CPC로부터 7-ACA를 제조하려는 개발 초기에는 이미 penicillin을 가수분해시켜 6-aminopenicillanic acid (6-APA)로 전환시키는 penicillin acylase가 미생물에서 발견되어 그 특성이 알려져 있었으므로

CPC를 기질로 하여 δ -aminoadipylamido group을 가수분해 시킬 수 있는 cephalosporin acylase를 미생물로부터 탐색하려는 노력이 있었으나 유용한 효소를 얻지 못하여 화학적인 공정에 의해 90% 이상의 효율로 CPC를 7-ACA로 전환시킬 수 있는 방법이 먼저 개발되었다(1,2).

그런데 화학적 방법에 의한 7-ACA 합성은 초저온의 다단계의 반응을 필요로 하며 반응중에 사용하는 유독성 용매의 최종제품에의 잔존과 유독성 환경 오염물질 등을 발생하는 등의 문제점이 있어 1980년대에 들어서 효소적 방법에 의해 7-ACA를 제조하려는 연구가 활발히 진행되어 실용화 단계에 있는 실정으로 현재에 cephalosporin acylase를 이용한 효소적 방법으로 제조한 7-ACA 시장 규모는 60~80톤 규모로 전체 시장의 6~8% 수준이나 향후 5년 이내에 전체 7-ACA 시장의 50%는 효소적 방법에 의해 생산된 7-ACA로 대체될 전망이어서 cephalosporin acylase는 의약품 산업에서 그 중요성이 한층 더 강조되고 있다.

2. Cephalosporin acylase의 탐색 및 특성

자연계 미생물로부터 cephalosporin acylase을 탐색하고자 하는 연구가 계속적으로 진행되어온 결과 *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Fusarium*, *Aspergillus*와 *Penicillium* 속에 속하는 다수의 미생물에서 cephalosporin acylase가 분리되었거나 그 효소 활성이 발견되었다. 현재까지 분리된

Table 1. Substrate Profile of Cephalosporin Acylase.

Enzyme Source	Substrate Profile			
	Glutaryl 7-ACA	Succinyl 7-ACA	Adipyl 7-ACA	CPC
<i>Pseudomonas</i> SE-83				
acylase I	100	trace	8	0
acylase II	100	26	69	5
<i>Pseudomonas</i> A14	100	1,046	ND*	0
<i>P. diminuta</i> N176	100	ND	19	2.4
<i>P. diminuta</i> V22	100	ND	60	3.2
<i>B. laterosporous</i> J1	100	117	80	0

*, Not determined

cephalosporin acylase는 기질특이성에 따라 CPC를 직접 7-ACA로 가수분해시키는 CPC acylase와 CPC에는 작용하지 못하나 CPC로부터 D- α -amino group이 제거된 7- β -(4-carboxybutanamido) cephalosporanic acid (GL 7-ACA)를 7-ACA로 가수분해시키는 GL 7-ACA acylase의 두가지 부류로 크게 구분될 수 있으며 그들이 촉매하는 반응은 그림 1과 같다. 대부분의 cephalosporin acylase는 GL 7-ACA acylase에 속하며 CPC acylase 효소활성을 갖는 것은 소수에 불과한데 이것은 CPC의 7번 탄소위의 D- α -amino adipic acid가 매우 안정한 acyl 결합을 하고 있어 가수분해되기 어렵기 때문에 표 1에 나타난 것처럼 CPC acylase 활성을 갖는 효소는 모두 GL 7-ACA도 가수분해시킬 수 있다.

Shibuya등은 GL 7-ACA acylase를 생성하는 *Pseudomonas* sp. SY-77-1을 토양으로부터 분리하였는데(3) 이균이 생산하는 효소는 GL 7-ACA와 더불어 succinyl 7-ACA와 adipyl 7-ACA를 가수분해한다. SY-77-1 균주의 효소 생산능을 향상시키기 위해 여러 단계 돌연변이시킴으로써 효소 생산능이 20배 증가된 변이주 *Pseudomonas* sp. GK-16가 개발되었는데 이것은 현재 GL 7-ACA acylase 생산 균주로 사용되고 있다. *Pseudomonas* sp. A14와 *Bacillus laterosporus* J1에서 생성되는 GL 7-ACA acylase는 succinyl 7-ACA와 adipyl 7-ACA를 GL 7-ACA보다 느리게 가수분해하는 GK-16 균주의 효소와는 각기 다른 기질특이성을 지니고 있는데 A14 균주의 효소는 succinyl 7-ACA를 GL 7-ACA보다 10배 이상의 빠른 속도로 가수분해하며 J1 균주의

효소는 succinyl 7-ACA, adipyl 7-ACA와 GL 7-ACA를 비슷한 속도로 가수분해한다 (4). *Pseudomonas* sp. SE-83에서는 두가지 종류의 cephalosporin acylases가 발견되었는데 (5) acylase I은 GL 7-ACA에 대한 기질 친화성이 높은 반면 CPC를 가수분해할 수 없는 GL 7-ACA acylase이고 acylase II는 비교적 기질특이성 범위가 넓어 GL 7-ACA와 함께 CPC도 가수분해시키는 CPC acylase이다. 한편 SE-83 균주와는 생화학적 성질이 다른 *Pseudomonas diminuta* N176과 V22도 CPC acylase를 생성하는데 (4) 이러한 효소들은 모두 GL 7-ACA에 비해 CPC에 대한 기질친화성이 매우 낮다고 하겠다. 최근에도 여러종류의 CPC 유도체를 개발하여(6) CPC acylase를 생성하는 미생물을 탐색하는 연구가 계속적으로 진행되고 있으며 기질 친화성의 정도는 알려지지 않았지만 *Arthrobacter* sp. 45-8A로부터 CPC acylase가 발견되었다 (7).

3. Cephalosporin acylase의 분자생물학

Cephalosporin acylase를 단백질과 유전자적 수준에서 분석한 결과 *B. laterosporous* J1의 효소를 제외한 다른 세균의 효소는 2개의 서로 다른 subunit로 구성되어 있는데(표 2) 실제 이들 유전자의 염기배열에서 예상되는 단백질은 N-말단으로부터 alpha-subunit와 beta-subunit를 포함하고 있는 단일의 전구체 단백질인데 이것은 cephalosporin acylase의 효소 활성이 없으며 *Pseudomonas* sp. SE-83의 acylase I의 것외에는 beta-subunit의 분자량이

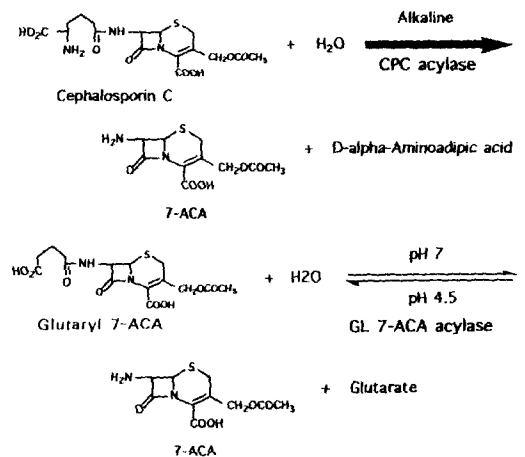
Table 2. Molecular weight and subunit structure of cephalosporin acylase

Organism	Enzyme	Molecular weight	Subunit structure		Reference
			Alpha	Beta	
<i>Pseudomonas</i> SE-83	acylase I	58,100	38,200	19,900	10
	acylase II	83,600	25,400	58,200	10
<i>Pseudomonas</i> A14	GL 7-ACA acylase	89,000	28,000	61,000	11
<i>Pseudomonas</i> GK-16	GL 7-ACA acylase	70,000	16,000	54,000	9
<i>P. diminuta</i> N176	CPC acylase	84,000	26,000	58,000	11
<i>B. laterosporous</i> J1	GL 7-ACA acylase	70,000			12

alpha-subunit보다 크다. 이러한 전구체 단백질은 세포내에서 post-translation processing을 받아 두 개의 subunits로 분리된 후 이들은 다시 화합하여 활성을 갖는 효소가 된다. 한편 penicillin acylase의 전구체 단백질이 alpha-, beta-subunit 외에 효소 전구체를 periplasm으로 운반하는데 관여하는 signal peptide와 두 개의 subunit가 folding하는데 관여하는 spacer peptide를 가지고 있는 것과는(8) 달리 cephalosporin acylase의 전구체 단백질은 signal peptide와 spacer peptide를 가지고 있지 않는데 예외적으로 *Pseudomonas* sp. GK-16의 GL 7-ACA acylase 전구체 단백질에서 penicillin acylase 전구체 단백질의 signal peptide보다 3개의 아미노산 잔기가 긴 signal peptide가 발견되었다 (9).

4. Cephalosporin acylase의 산업적 응용

Cephalosporin acylase는 cephalosporin계 항생제 합성의 중간원료인 7-ACA를 효소적 합성법이나 직접 발효법에 의해 생산하기 위해서는 필수적인 효소로 이를 이용한 7-ACA 효소합성법 중에서 현재 실용화 단계에 있는 예로는 일본의 Asahi Chemical 회사가 개발한 2단계 반응공정을 들 수 있는데 이것은 cephalosporin acylase가 CPC보다는 GL 7-ACA를 훨씬 효과적으로 가수분해시키므로 7-ACA의 합성 수율을 높이기 위해 CPC를 GL 7-ACA로 전환시킨 후 GL 7-ACA acylase로 처리하여 7-ACA를 합성하는 것이다. 이러한 2 단계 반응 공정에서

**Fig. 1.** Reaction formula of cephalosporin acylase.

CPC를 GL 7-ACA로 전환시키는 반응은 화학적 방법이나 *Trigonopsis variabilis*에서 생산되는 D-amino acid oxidase (D-AAO) 효소를 이용한 방법으로 이루어지므로 7-ACA의 효소적인 합성법은 화학적 반응과 효소적 반응에 의한 2단계 공정으로 구성된 것과 2단계 반응이 모두 효소에 의해 수행되는 방법으로 구분되는데 어떠한 방법에서도 효소는 그 안정성을 유지시키기 위해 담체에 고정화시켜 사용한다. 상기 회사외에도 미국의 Biopure사, Lilly사, 독일의 Boehringer Mannheim사와 일본의 Fujisawa Pharmaceutical사 등도 GL 7-ACA acylase를 이용한 2단계 효소적 합성법을 개발 중이다. 그러나 2 단계 반응공정에 의한 CPC의 7-ACA로

전환은 그 전환수율면에서 기존의 화학적인 방법보다 열세에 있는 형편이다.

한편 Isogai 등은 7-ACA 직접 발효균을 제조하기 위해 1990년에 *Fusarium solani* M-0718의 D-AAO 유전자와 *P. diminuta* V22의 GL 7-ACA acylase 유전자를 강력한 발현제인 alkaline protease의 조절유전자 아래에 도입시켜 CPC 생산균인 *Acremonium chrysogenum* BC2116에서 동시에 발현시킴으로써 미생물로부터 최초로 7-ACA를 직접 생합성하였으나 그 생산량이 150 µg/ml 수준에 불과하다 (13).

또한 1단계에 의해 CPC를 7-ACA로 전환시키기 위해 *Pseudomonas* SE-83 균주로부터 CPC acylase 활성을 갖는 acylase II 유전자를 크로닝하여 과잉 발현시키고 이를 이용하여 CPC를 한단계 반응공정으로 7-ACA로 전환시켰으나 반응산물인 7-ACA에 의한 효소활성 저해의 문제가 있어 효소 자체의 개발과 반응기 개발이 요구되는데 특히 CPC에 대한 기질친화성이 높은 CPC acylase가 탐색 개발될 경우 7-ACA 생산 공정에 매우 큰 영향을 미칠 것이 확실하므로 최근에도 계속적인 효소탐색이 진행되고 있는데 이를위해 기질이 β-lactamase에 의해 파괴되지 않고 관찰하기 쉬운 여러종류의 CPC 유도체가 개발되어 사용되고 있다.

앞으로 고품질의 7-ACA를 경제적으로 생산하기 위해서는 효소적 방법에 의한 7-ACA의 생산공정이 필연적으로 요구되며 특히 환경보호 및 폐기물 처리 비용의 증가와 함께 효소적 방법은 기존의 화학적 합성법에 비해 보다 강한 경쟁력을 갖을 수 있으므로 아직까지는 전체 생산량에서 보면 효소적 방법에 의한 7-ACA의 생산 규모가 미미한 실정이지만 효소 이용기술의 발달에 힘입어 CPC가 7-ACA로 전환되는 효율이 화학적 방법을 능가하는 효소적 방법이 개발될 전망이다.

국내의 경우는 아직까지 7-ACA 제조를 위한 효소공정이 확립되지는 못하였으나, 7-ACA 생산을 위한 원료물질인 CPC는 시장에서 거래되지 않기 때문에 CPC 발효공정을 보유하지 못한 기업이 7-ACA 생산에 참여하기는 현실적으로 어려운 실정에 비추어 볼때 CPC가 현재 종근당과 제일제당에서 발효 생산되고 있다는 장점을 지니고 있으므로 효

소적 합성법을 개발할 경우 CPC 발효 생산공정과 연계함으로써 고순도의 7-ACA 제조가 가능하며 이를 이용하여 부가가치가 높은 4세대 세팔로스프린계 항생제(예, cefpirome, cefpimizole, cefixime등)의 합성기회가 부여될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Fechtig, B., H. Peter, H. Bickel and E. Vischer (1968) *Helv. Chim. Acta*, **51**: 1109-1120.
2. Morin, R. B., B. G. Jackson, E. H. Flynn and R. W. Roeske (1969) *J. Amer. Chem. Soc.*, **91**: 1396-1400.
3. Shibuya, Y., K. Matsumoto and T. Fujii (1981) *Agric. Biol. Chem.*, **45**: 1561-1567.
4. Aramori, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, Y. Yokota, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda and H. Imanaka (1991) *J. Ferment. Bioeng.*, **72**: 227-231.
5. Matsuda, A., K. Matsuyama, K. Yamamoto, S. Ichikawa and K. Komatsu (1987) *J. Bacteriol.*, **169**: 5815-5820.
6. Zhang, Q. -J., W. -X. Xu and L. Shi (1991) *Anal. Biochem.*, **196**: 201-206.
7. Zhang, Q. -J. and W. -X. Xu (1993) *Arch. Microbiol.* **159**: 392-395.
8. Schumacher, G., D. Sizmann, H. Haug, P. Buckel and A. Bock (1986) *Nucleic Acid Res.*, **14**: 5713-5727.
9. Matsuda, A., and K.-I. Komatsu (1985) *J. Bacteriol.* **163**: 1222-1228.
10. Matsuda, A., K. Toma and K. -I. Komatsu (1987) *J. Bacteriol.* **169**: 5821-5826.
11. Aramori, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, T. Isogai, H. Ono, Y. Ishitani, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda and H. Imanaka (1991) *J. Ferment. Bioeng.*, **72**: 232-243.
12. Aramori, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, H. Ono, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda and H. Imanaka (1991) *J. Bacteriol.*, **173**: 7848-7855.
13. Isogai, T., M. Fukagawa, I. Aramori, M. Iwami, H. Kojo, T. Ono, Y. Ueda, M. Kohsaka and H. Imanaka (1991) *Bio/Technol.*, **9**: 188-191.