

## Cephalosporin C 내성과 7-Aminocephalosporanic Acid 감수성을 지닌 균주의 선별 및 특성

김옥현 · 박용춘 · 임재윤 · 김영창\*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

### Isolation and Characterization of a Cephalosporin C Resistant and 7-Aminocephalosporanic Acid Sensitive Strain

Ook-Hyun Kim, Yong-Chjun Park, Jai-Yun Lim and Young-Chang Kim\*

Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

**Abstract** — A strain which showed cephalosporin C resistance and 7-aminocephalosporanic acid sensitivity was isolated from nature. Among the isolates, SS5 was sensitive to cephalosporin C, penicillin G, ampicillin, 7-aminocephalosporanic acid, 6-aminopenicillanic acid, and 7-aminodeacetoxy cephalosporanic acid at concentrations of 1,000 µg/ml, 2,000 µg/ml, 3,000 µg/ml, 30 µg/ml 100 µg/ml and 100 µg/ml, respectively. But SS5 was sensitive at very low concentration of chloramphenicol, kanamycin, neomycin, streptomycin and tetracycline. Since SS5 was sensitive to 7-ACA (30 µg/ml) and didn't have β-lactamase activity on the cephalosporin C, SS5 could be useful as an indicator strain for the production of 7-ACA, which is an important precursor for the synthesis of many semisynthetic cephalosporins.

Cephalosporin C acylase (penicillin amidohydrolyase EC 3.5.1.11)는 cephalosporin C(1)를 δ-aminoadipic acid와 7-aminocephalosporanic acid(7-ACA)로 가수분해하는 효소이다. 7-ACA는 cephalosporin 계열 항생제의 합성원료로 사용되기 때문에(3, 7, 9, 10) 7-ACA를 제조하는 과정은 제약산업에 있어서 매우 중요하다. 7-ACA의 유기 화학적인 제조공정은 생산단가가 비싸고 산업 폐기물에 의한 환경오염의 우려가 많기 때문에 이러한 단점을 보완하기 위하여 효소를 이용하고자 하는 노력이 경주되고 있다. 이 효소를 생산하는 균주는 p-dimethylaminobenzaldehyde (PDAB)를 이용한 발색반응(5, 11), thin layer chromatography(TLC)(8) 및 high performance liquid chromatography(HPLC)(2) 등으로 선별하고 있으나 위와같은 방법을 처음부터 이용하여 선별하면 비 경제적이고 시간도 많이 소요되기 때문에 비 효율적이다. Penicillin acylase 생산균 선별이나 효소 유전자를 클로닝 하는 경우에는 지시균으로 *Serratia marcescens* ATCC 27117을 이용하고 있지만(6) 아직 cephalosporin C acylase를 선별하는데 사용할 수 있는 지시균에

관하여는 보고되지 않았다. 지시균의 사용은 적은 시간에 많은 시료를 검색할 수 있다는 장점이 있기 때문에 지시균 선별은 cephalosporin C acylase 생산균을 선별하기 위한 중요한 과제라고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 cephalosporin C acylase 생산균을 선별하는데 이용할 목적으로 cephalosporin C에 대한 β-lactamase 활성이 없고 cephalosporin C에 내성을 나타내며 7-ACA에 감수성이 높은 균주를 자연계로부터 선별하였고 그 특성을 알아보았다.

### 재료 및 방법

#### 시료 및 배지

시료는 청주시, 청원군, 진천군 그리고 괴산군 지역에서 토양, 하천수 및 하수를 채취하여 얼음상자에 보관하여 실험실로 운반하였다. 사용한 LB 고체배지는 증류수 1l에 Bacto trypton 10 g, Bacto yeast extract 5 g, NaCl 5 g 그리고 agar 15 g을 첨가하여 사용하였다. LB-CPC는 LB 고체배지에 cephalosporin C를 500 µg/ml 되게 첨가하였고 LB-ACA는 7-ACA를 100 µg/ml 되게 넣어 사용하였다. Cephalosporin C와 7-ACA는 Sigma사로부터 구입하였으며 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)에 녹여 사용하였다.

**Key words:** Cephalosporin C acylase, 7-Aminocephalosporanic acid, indicator, bioassay

\*Corresponding author

Overlay용 soft agar는 Bacto antibiotic assay medium 2(Bacto beef extract 1.5 g, Bacto yeast extract 3 g, Bacto peptone 6 g, agar 7 g, D.W. 1,000 ml, pH 7.5)를 사용하였다.

**Cephalosporin C 내성 및 7-ACA에 민감한 균주의 선발**

토양 및 하천수는 멸균된 생리식염수(0.85% NaCl)로 적당량 희석하여 LB 고체배지에 도말하고 30°C에서 18시간 배양하였다. 성장한 colony를 이쭉시개를 이용하여 LB, LB-CPC 그리고 LB-ACA 배지에 각각 picking 한 후 30°C에서 18시간 배양한다. 성장한 colony 중에서 LB-CPC에서 성장하고 LB-ACA에서 성장하지 못하는 균주를 선발하였다.

**MIC 측정**

위에서 선발한 균주를 LB 액체배지에서 진탕배양하여 4 ml의 soft agar에 200 µl를 접종하고 LB 고체배지에 overlay 하였다. 그 위에 종이 disk를 놓고 각각의 항생제 stock 제조법에 의거하여 제조한 항생제를 20 µl 씩 찍고 30°C에서 18시간 배양하여 각각의 항생제에 의한 성장 저지환의 크기를 관찰하였다.

**β-lactamase의 활성도 측정**

SS5 균주를 3 ml 배양하여 균체를 회수하고 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 2회 세척후 동일 완충용액 0.5 ml에 재현탁하였다. 재현탁후 cephalosporin C를 ml 당 0.1 mg되게 첨가하고 30°C에서 2시간 반응시킨다. 반응액에 0.2N HCl을 1.5 ml 넣어 잘 섞어준 후 원심분리하여 상층액을 1/10로 희석후 OD<sub>260</sub>에서 흡광도의 변화를 측정하였다(11).

**균주의 동정**

선발된 균주의 동정은 MIDI사(Barksdale Prof. Center, Newark, DE, U.S.A.)에 의뢰하여 수행하였다.

**결과 및 고찰**

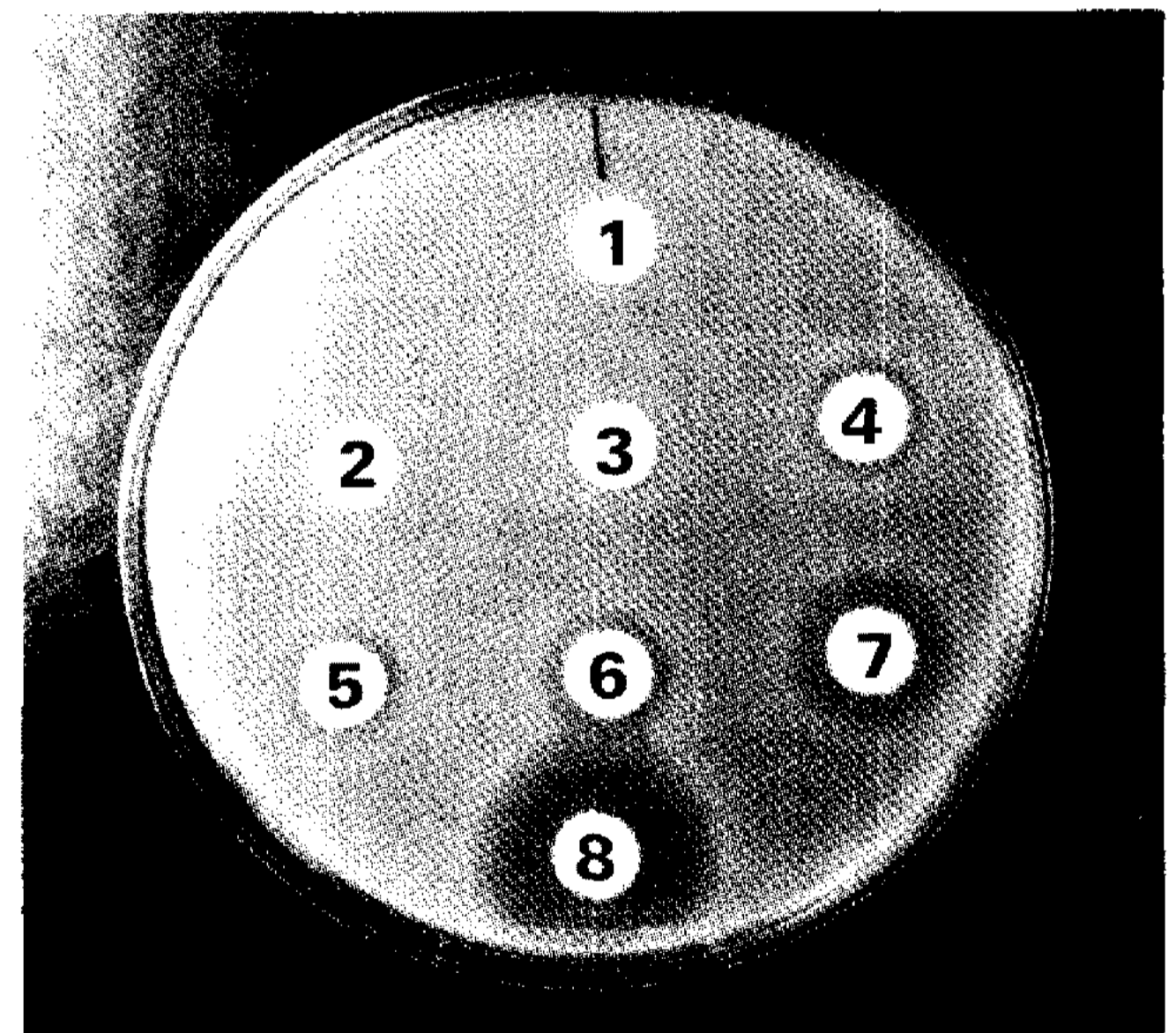
**7-ACA에 민감한 균주의 선발**

여러지역에서 채취한 시료를 LB 고체배지에 도말

하고 형성된 약 10,000개의 집락들에 대하여 cephalosporin C와 7-ACA에 대한 감수성을 조사하였다. 이 중에서 cephalosporin C에 내성을 나타내며 7-ACA에 감수성을 지닌 균주를 50여개 찾아냈으나 이 균주들의 대부분은 계대배양하는 과정에서 7-ACA에 내성을 나타내었으며 계속하여 7-ACA에 대하여 감수성을 유지하는 9가지 균주를 최종 선발하였고 이들의 cephalosporin C 및 7-ACA에 대한 MIC를 측정하였다 (Table 1). 9가지의 균주 중에서 cephalosporin C에 대하여 β-lactamase 활성도가 없으며 cephalosporin C와 7-ACA의 MIC 농도차가 제일 크고 7-ACA에 대하여 제일 적은 농도에서도 성장하지 못하는 SS5를 지시균으로 최종 선발하였다. SS5의 7-ACA에 대한 MIC는 Fig. 1과 같다. 이 균주는 cephalosporin C에 대한 내성이 비교적 크고 7-ACA에 대하여 매우 민감하므로 cephalosporin C acylase 생산균주를 선발하기 위한 지시균으로 유용할 것 같다.

**7-ACA에 민감한 균주인 SS5의 특성**

SS5의 여러가지 항생제, 6-aminopenicillanic acid



**Fig. 1. Susceptibility of SS5 against 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA).**

1; control, 2; 7-ACA 10 µg/ml, 3; 7-ACA 20 µg/ml, 4; 7-ACA 30 µg/ml, 5; 7-ACA 40 µg/ml, 6; 7-ACA 50 µg/ml, 7; 7-ACA 100 µg/ml, 8; 7-ACA 1,000 µg/ml.

**Table 1. Cephalosporin C and 7-ACA MICs of soil isolates.**

Antibiotics (µg/ml)	Soil isolates									
	CS1	CS3	SS2	SS3	SS5	CPCS5	CPCS6	CCS4	CCS8	
Cephalosporin C	2,000	1,000	1,000	1,000	1,000	500	600	1,000	1,000	
7-ACA	100	70	50	60	30	40	30	50	50	

**Table 2. Antibiotic MICs of a soil isolate, SS5.**

Antibiotics	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
glutaryl-7-ACA	1,000
Penicillin G	2,000
Ampicillin	3,000
Chloramphenicol	5
Kanamycin	20
Neomycin	30
Streptomycin	10
Tetracyclin	5
6-APA	100
7-ADCA	100

**Table 3. Cellular fatty acid composition of a soil isolate, SS5**

Fatty acids	Amount (%) <sup>a</sup>
10 : 0 30H	2.38
12 : 0	3.94
14 : 0	0.70
15 : 1 $\omega$ 6c	1.23
15 : 0	2.84
16 : 1 $\omega$ 7c	43.53
16 : 0	28.85
17 : 0	2.01
18 : 1 $\omega$ 7c/ $\omega$ 7t/ $\omega$ 12t	14.17
18 : 0	0.34

<sup>a</sup>Percentage of the total peak area from gas-liquid chromatography of methylesters.

(6-APA) 그리고 7-animodeacetoxycephalosporanic acid(7-ADCA)에 대한 MIC는 Table 2와 같다. SS5의 MIC로부터 glutaryl 7-ACA에서 1 mg/ml 이상 저항성이 나타남으로 cephalosporin C acylase 뿐만 아니라 glutaryl 7-ACA acylase 생산균을 선발하는 데에도 사용할 수 있을 것이다. 그러나 6-APA에 대해서는 7-ACA보다 비교적 감수성이 약하기 때문에 penicillin acylase 생산균 선발 실험에는 적당치 않을 것으로 생각된다. 그람염색 결과 SS5는 그람음성이며 간균으로 나타났으며 MIDI사에 의뢰한 세포의 지방산 분석결과 palmitoleic acid가 전체 지방산의 43.53%로 가장 많았고 palmitate(28.53%) 순으로 나타났다. 그리고 지방산 함유량에 대한 데이터 베이스(MIS System Software)와 비교 분석한 결과 유사한 균주와의 상동성이 극히 낮은 결과(14.2%)(Table 3)를 나타냄으로서 기존의 균주와는 매우 특이한 지방산 구성 성분을 함유하는 새로운 균주가 아닌가 판단된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 교육부 학술연구 조성비(유전공학) 지원에 의하여 수행되었음.

## 참고문헌

1. Abraham, E.P. and G.F. Newton. 1961. The structure of cephalosporin C. *Biochem. J.* **79**: 377-393.
2. Aramori, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, Y. Yokota, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda and H. Imanaka. 1991. Isolation of soil strain producing new cephalosporin acylase. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 227-231.
3. Coene, B., A. Schanck, J.M. Dereppe and M.V. Meerssche. 1984. Substituent effect on reactivity and spectral parameters of cephalosporins. *J. Med. Chem.* **27**: 694-700.
4. Loder, B., G.F. Newton and E.P. Abraham. 1961. The cephalosporin C nucleus (7-aminocephalosporanic acid) and some of its derivatives. *Biochem. J.* **79**: 408-416.
5. Matsuda, A., K. Matsuyama, K. Yamamoto, S. Ichikawa and K. Komatsu. 1987. Cloning and characterization of the genes for two distinct cephalosporin acylase from a *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* **169**: 5815-5820.
6. Mayer, H., J. Collins and F. Wagner. 1980. Cloning of the penicillin G acylase gene of *Escherichia coli* ATCC 11105 on multicopy plasmids. *Enzyme Engineering* **5**: 61-69.
7. Nishikawa, J. and K. Tori. 1984. 3-Substituent effect and 3-methylene substituent effect on the structure-reactivity of 7 $\beta$ -(acylamino)-3-cephem-4-carboxylic acid derivatives studies by carbon-13 and IR spectroscopies. *J. Med. Chem.* **27**: 1657-1663.
8. Shibuya, Y., K. Matsumoto and T. Fujii. 1981. Isolation and properties of 7 $\beta$ -(4-carboxybutanamido)cephalosporanic acid acylase-producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 1561-1567.
9. Takahashi, T., Y. Yamazaki, K. Kato and M. Isono. 1972. Enzymatic synthesis of cephalosporins. *J. Am. Chem. Soc.* **94**: 4035-4037.
10. Tinti, M.O., P. Foresta, E. Quaresima, P. De Witt and M.T. Ramacci. 1980. Cephalosporin derivatives in the furyl properties. *J. Antibiot.* **33**: 1177-1182.
11. Yuzo, S., M. Kunio and T. Fujii. 1981. Isolation and properties of 7 $\beta$ -(4-carboxybutanamido)cephalosporanic acid acylase producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 1561-1567.

(Received 10 January 1995)