

베타락탐 항생제의 생합성 및 대사공학

김 용 호

영남대학교 응용미생물학과

페니실린이 발견된지 60년정도가 지났지만 아직도 베타락탐 항생제는 세계 항생제 시장에서 가장 큰 시장 점유율을 차지하고 있으며 그 수요는 21세기에도 지속될 전망이다. 페니실린계와 세파로스포린계 항생제로 양분되는 베타락탐 항생제는 분자구조상 beta-lactam ring을 갖고 있는 것이 공통점이며, beta-lactam ring과 연결된 분자구조에 따라 penam, cephem, clavam, carbapenem, monobactam 계로 세분화되고 있다. 베타락탐 항생제를 생산하는 미생물은 비교적 자연계에 널리 분포하고 있으며 대표적인 예로는 *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus*, *Anixiopsis* 등의 곰팡이와, *Streptomyces*, *Nocardia* 등의 그람양성균과 *Flavobacterium*, *Lysobacter*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Acetobacter* 등의 그람음성균 등이 있다. 이들 균주들에 있는 베타락탐 항생제 생합성 유전자의 상동성을 고려할 때 지금부터 약 3억7천만년 전쯤 항생제 생합성에 관련된 유전자가 *Streptomyces* 계통의 원핵균에서 진핵균으로 전이되었을 것이라고 추정하고 있다[2, 26, 28, 64]. 항생제는 일차대사에서 얻어진 산물로 여러 단계의 추가적인 생합성 과정을 걸쳐서 얻어지는 이차대사의 산물이다. 아직까지 이차대사물의 생합성 조절 메커니즘이 구체적으로 밝혀지지 않는 않지만 베타락탐 항생제 생합성에 관계하는 효소 유전자는 대부분 밝혀졌다[reviews: 2, 31, 32, 143, 144, 147]. 베타락탐 항생제의 산업적인 중요성 때문에 항생제의 생산수율을 증가시키기 위하여 균주개발과 발효공정 개선에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다. 이에 따라 본고에서는 최근의 베타락탐 항생제의 생합성 및 대사공학에 대한 연구동향을 minireview 형식으로 소개하고자 한다.

베타락탐 항생제의 발효 조건

두작위 돌연변이 유도에 의한 균주 개발로 Fleming이 선별한 *Penicillium notatum*의 야생균주보다 약 2000배 이상의 페니실린 생산 수율이 높은 *Penicillium chrysogenum* E-15.1 균주가 개발되었으며[48], 발효공정의 최적화 등에 의하여 베타락탐 항생제 생산 수율은 대략적으로 40-50 g/l 정도가 되고 있다[131]. 베타락탐 항생제의 발효에 영향을 미치는 환경인자로는 배지성분, pH, 온도, 산소, 세포형태, 세포농도, 생물반응기의 형태 및 교반속도, 중력 등이 있다[10, 22, 37]. *P. chry-*

*sogenum*에 의한 penicillin G 생산에서는 탄소원으로서 사용한 glucose가 생합성 중간 산물인 6-aminopenicillanic acid(6-APA)와 결합하여 페니실린 생산을 억제하며[146], parm oil을 배지에 첨가하면 benzyl penicillin의 전구체인 phenylacetic acid(PA) transport system이 좋아져서 페니실린 생산수율이 증가한다[135]. *Cephalosporium acremonium*(일명 *Acremonium chrysogenum*)에 의한 cephalosporin C(CPC) 생산에서는 탄소원으로서 peanut flour[151]나 methyl oleate[131]를 사용하여 생산수율을 증진시켰다.

베타락탐 항생제 생합성에 필요한 일차대사 산물은 균주에 따라서 생합성 경로가 서로 다르다. 베타락탐 항생제의 생합성을 위해서는 α -aminoadipic acid, cysteine, valine 세 종류의 아미노산이 필요한데 *C. acremonium*에서는 methionine이 cysteine 생합성의 전구체이지만, *P. chrysogenum*에서는 sulfate 화합물이 cysteine의 전구체이다[48]. 따라서 배지에 methionine의 첨가는 *C. acremonium* 배양에서 CPC 생산 수율을 증진시킨다[140]. 또한 *Streptomyces clavuligerus*에서는 lysine이 α -aminoadipic acid의 전구체이지만, *P. chrysogenum*이나 *C. acremonium*에서는 α -aminoadipic acid가 lysine의 전구체이다[48]. 따라서 배지에 lysine의 첨가는 *S. clavuligerus*에 의한 cephamycin C(CMC) 생산 수율을 증진시킨다[16, 70, 88]. *S. clavuligerus* 배양에서는 암모늄 이온은 세포내 alanine 농도를 증가시킴으로 CMC 생합성에 관여하는 효소 활성을 억제하였으며[69], 배양액 내에 있는 세포의 초기 농도에 따라서 항생제 생산수율이 영향을 받았다[120]. Cephalosporin C 생합성에는 산소가 중요한 역할을 하며 최적 생산을 위해서 용존 산소는 최소한 포화율 20% 이상을 유지하는 것이 필요하다[80, 81, 150]. 배양액내의 용존산소 농도를 40%에서 5%로 감소할 때 penicillin N(penN) 농도는 300%로 증가하였으나, CPC 농도는 85% 감소하였다. 따라서 산소량이 부족하면 penN을 deacetoxycephalosporin C(DAOC)로 생변환하는 expandase 효소 활성이 가장 큰 영향을 받는 것으로 확인되었다[150]. 이러한 산소 문제 때문에 세포를 고정할 때에는 porous bead나 microbead 등 담체내에 포괄된 균체에 적절한 산소 공급을 할 수 있는 세포고정 방법이 연구되고 있다[4, 102, 103]. 베타락탐 항생제는 우주공간과 같은 중력이 낮은 곳에서는 현

저히 생합성 양이 줄어들며[37], filamentous fungi인 *P. chrysogenum*이나 *C. acremonium*은 균체의 형태에 따라 항생제 생산량이 달라진다[11, 68]. Fed-batch 발효에서는 대부분 glucose를 제한기질로 사용하는데 glucose 농도가 너무 낮을 경우에는 영양분 결핍으로 인하여 세포내 vacuole이 많이 발생하기 때문에 기계적인 교반에 의하여 세포벽이 쉽게 분쇄될 수 있다[11, 105, 106, 139]. 교반에 의한 세포 파쇄를 방지하기 위해서는 stirred tank reactor 대신 airlift tower loop reactor를 사용하는 것이 효과적일 수 있다[87, 149]. 기타 베타락탐 항생제의 분리 정제를 위해서는 액상추출법이나 막분리 또는 Amberlite를 사용한 흡착크로마토그래피 등의 방법이 연구되고 있다[21, 44, 47, 56-58].

이와 같이 베타락탐 항생제의 생산을 위한 연구는 세계 각국에서 경쟁적으로 연구되고 있다. 1980년대 부터는 유전공학의 기술이 발전함에 따라 항생제 생합성 과정에 관계하는 효소 유전자의 클로닝 작업이 진행되고 있으며 현재까지 밝혀진 베타락탐 항생제의 생합성 효소 및 유전자의 특성을 정리하면 다음과 같다.

베타락탐 항생제의 생합성 효소 및 유전자 특성

페니실린, 세파로스포린, 세파마이신의 생합성은 그림 1에 나타난 것과 같이 처음 두 단계의 효소 반응은 모두 같다. 이에 따라 페니실린과 세파로스포린 생합성에 공통적으로 존재하는 유전자는 pcb(penicillin and cephalosporin biosynthesis)로

표시하며, 다른 유전자는 pen(penicillins), cef(cephalosporins), cmc(cephamycins)로 표시한다. Penicillin 생합성에 관여하는 pcbAB, pcbC, penDE 효소 유전자는 *P. chrysogenum* chromosome I(10.4 Mb)와 *P. notatum* chromosome II(9.6 Mb), *Aspergillus nidulans* chromosome VI(3.0 Mb)에 존재하고 있다. *C. acremonium*에는 pcbAB-pcbC 유전자와 cefEF-cefG 유전자가 각기 다른 염색체에 존재하며 두 유전자 뭉치 모두 bidirectional promoter에 의하여 전사가 조절되고 있다. Cephamycin C를 생산하는 방선균(*Nocardia lactamdurans*, *S. clavuligerus*)에는 모든 유전자가 30 kb되는 유전자 뭉치에 모여있다. 여기에는 α -aminoadipic acid를 생합성하는데 관여하는 lysine-6-aminotransferase 유전자 lat도 함께 포함되어 있다. *N. lactamdurans*에서는 lat-pcbAB-pcbC 순으로 유전자가 배열되어 있으며[85], *S. clavuligerus*에서는 cefE-cefD-cefF-lat-pcbAB-pcbC 순으로 유전자가 배열되어 있다[2]. 또한 *S. clavuligerus* 유전자 뭉치에는 beta-lactamase(bla), penicillin binding protein(pbp), cephamycin 분비에 관련하는 것으로 알려진 transmembrane protein(cmcT) 유전자도 함께 포함되어 있다[91]. Cephabacin F/H를 생산하는 *Lysobacter lactamgenus* YK90은 17 kb 영역에 pcbAB-pcbC-cefE-cefF-cefD-bla 순으로 유전자 배치가 되어 있다[72, 74]. 이와 같은 유전자 배치의 구조적인 이해는 앞으로 유전공학 기술을 활용한 균주 개량 작업에 기초자료로 활용될 수 있다.

(1) ACV synthetase (pcbAB)

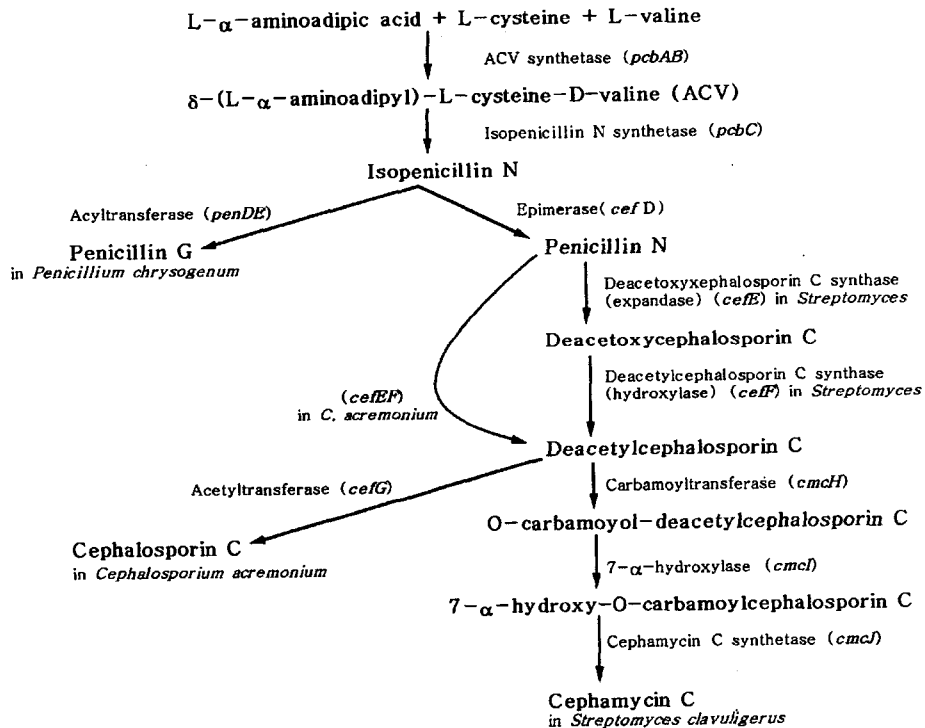


그림 1. 베타락탐 항생제의 생합성 경로.

L- α -amino adipic acid (A), L-cysteine (C), L-valine (V) 세 종류의 아미노산이 처음에는 두 효소에 의하여 연결되는 것으로 생각하여 그 유전자를 pcbA, pcbB 로 각각 명명하였으나 결국 하나의 효소에 의하여 linear tripeptide로 연결됨이 밝혀져 그 유전자가 pcbAB로 재명명되었다. ACV synthetase는 세 종류의 기질 결합부위가 있는 다기능의 단일효소이며 이들 기질을 서로 연결하는 메카니즘은 *Bacillus* 속의 nonribosomal peptide antibiotic synthetase인 gramicidin S synthetase, tyrocidine synthetase, bacitracin synthetase와 유사한 것으로 밝혀졌다[1, 52, 77, 148]. ACV synthetase가 세 아미노산을 연결하는 순서는 처음에는 L- α -amino adipic acid와 L-cysteine을 결합하고 그 다음 L-valine을 연결한다. L-valine은 dipeptide(LL-AC)에 먼저 연결된 후에 D-valine 형태로 전환된다[67, 124]. ACV synthetase에 L- α -amino adipic acid, L-cysteine, L-valine과 분자구조가 유사한 다른 종류의 기질특이성을 시험한 결과 ACV synthetase는 L- α -amino adipic acid 대신 L-S-carboxymethylcysteine를 인식하고, L-cysteine 대신 L-allylglycine, L-vinylglycine, DL-O-methylserine, L-S-methylcysteine, L-homocysteine을 인식하고, L-valine 대신 L-allo-isoleucine, L-allylglycine, L-vinylglycine, DL-allenylglycine, DL-2-amino-3-methylbuten-3-oic acid을 인식하였다[8]. 이와 같이 ACV synthetase의 nonribosomal peptide synthesis의 특성을 이용하면 자연계에 존재하지 않는 항생제나 항암제 등의 신물질 합성이 가능한 것으로 예상하고 있다[125]. *C. acremonium*와 *P. chrysogenum*의 pcbAB 유전자는 약 11-12 kbp로서 62.9% 상동성이었고 아미노산은 54.9% 상동성이 있다[2, 52]. *P. chrysogenum*의 pcbAB와 pcbC 유전자는 bidirectional promoter에 의하여 전사가 조절되고 penDE 유전자는 다른 promoter에 의하여 전사가 조절되며 pcbC와 같은 방향으로 배열되어 있다[30]. *Aspergillus nidulans*에서도 acvA(pcbAB)와 ipnA(pcbC)가 bidirectional promoter에 연결되어 있으며 penDE 유전자는 pcbC와 같은 방향으로 배열되었다[12]. *C. acremonium*의 ACV synthetase 유전자 역시 pcbAB와 pcbC의 bidirectional promoter에 연결되어 있다[52]. *C. acremonium*의 pcbAB-pcbC bidirectional promoter를 lacZ와 gusA의 reporter gene으로 활성을 비교한 결과 pcbC promoter 활성이 pcbAB promoter 활성보다 5배정도 강력한 것으로 나타났다[94]. *C. acremonium* 배지에 첨가한 methionine은 pcbAB, pcbC, cefEF 유전자의 mRNA 양 증가를 유도하였다[140].

(2) Isopenicillin N synthase (pcbC)

페니실린과 세파로스포린의 두번째 생합성 단계는 ACV linear tripeptide를 thiazolidine ring이 있는 isopenicillin N으로 생합성하는 과정이다. Isopenicillin N synthase(IPNS)은 Fe²⁺가 필요한 oxidase이다. X-ray absorption과 diffraction 방법으로 IPNS의 구조를 분석한 결과 iron center에 ACV tripeptide와

dioxygen이 결합하는 구조로 나타났다[6, 24, 45, 114, 117, 122]. pcbC 유전자는 여러 종류의 균주에 분포되어 있는데 *P. chrysogenum*[9, 19], *C. acremonium*[7, 104], *A. nidulans*[142], *S. clavuligerus*[33, 34], *S. lipmanii*[142], *L. lactamgenus*[73], *N. lactamdurans*[26] 등에서 분리하여 *E. coli*에서 발현시킬 수 있었다. *P. chrysogenum*의 pcbC는 *C. acremonium*의 pcbC와 78%, *A. nidulans*의 pcbC와 83%의 상동성을 보이고 있다. *S. clavuligerus*의 pcbC는 *S. griseus*, *S. lipmanii*, *S. jumonjinensis*의 pcbC 유전자와 80-85% 상동성이 있고, *N. lactamdurans* pcbC와 79%, *Flavobacterium* sp. pcbC와 62%, *P. chrysogenum*, *C. acremonium*, *A. nidulans* 같은 filamentous fungi와는 58-60%의 상동성을 보이고 있다[2, 26]. IPNS의 아미노산 배열에는 두 개의 conserved cysteine residue가 있으며 *C. acremonium* IPNS는 Asp-218[83], His-216와 His-272[134], Pro-285[113] 아미노산이 효소활성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되었다. IPNS는 기질인식 범위가 비교적 넓어서 ACV 유사체의 ring cyclization을 유도하여 항생효과가 있는 새로운 베타락탐 항생제를 개발하는데 활용되고 있다[61]. *A. nidulans* IPNS는 ACV에서 valine 대신 α -aminobutyrate를 사용한 ACV 유사체를 기질로 인식할 수 있었다[118].

(3) Acyl-CoA : Isopenicillin N Acyltransferase (penDE)

*P. chrysogenum*와 *A. nidulans*에는 isopenicillin N의 α -amino adipyl side chain을 제거하고 소수성 기질인 phenylacetyl이나 phenoxyacetyl 그룹을 붙일 수 있는 isopenicillin N acyltransferase 효소가 있으나 *C. acremonium*에는 이 효소가 없다. *P. chrysogenum*의 isopenicillin N acyltransferase는 두 개의 기질 인식 부위가 있으며 Gly-150, Glu-258, Ser-309 아미노산이 효소활성에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다[40, 136]. *A. nidulans* penDE에는 3개의 intron 부위가 있으며 *P. chrysogenum* penDE 유전자와 73%의 상동성이 있다[40, 95, 137].

(4) Epimerase (cefD)

페니실린과 세파로스포린의 생합성 경로는 isopenicillin N에서부터 달라진다. *P. chrysogenum*에서는 isopenicillin N에 있는 L- α -amino adipyl side chain이 소수성 잔기로 대체되지만 cephalosporin 생합성 균주는 L- α -amino adipyl side chain을 광학 이성체인 D- α -amino adipyl side chain으로 바꾸어서 penicillin N을 생성한다. *C. acremonium*의 epimerase는 효소 정제가 쉽지 않아서 그 유전자는 아직 밝혀지지 않았지만 *S. clavuligerus*의 epimerase 유전자인 cefD는 이미 밝혀졌으며, *S. lipmanii* cefD와 78% 상동성을 보이고 있다[2, 78]. 다른 유전자들의 상동성을 고려할 때 *S. clavuligerus*의 cefD는 *C. acremonium*의 cefD와도 유사성이 높을 것으로 예상하고 있다.

(5) Expandase (cefE), Hydroxylase (cefF), Expandase-Hydroxylase (cefEF)

Penicillin N은 세파로스포린이나 세파마이신의 직접적인 전

구체이다. Expandase 효소에 의하여 penicillin N의 five-membered thiazolidine ring이 six-membered dihydrothiazine ring으로 확대된다. Expandase는 L- α -aminoadipyl side chain으로 된 isopenicillin N은 기질로 인식하지 못한다. *S. clavuligerus*에는 expandase와 hydroxylase 효소가 각각 존재하지만, *C. acremonium*에는 하나의 효소가 expandase-hydroxylase의 두가지 기능을 동시에 수행하고 있기 때문에 유전자명을 cefEF라 표시하였다. *C. acremonium* cefEF는 chromosome II 상에 존재하며 cefG 유전자와 bidirectional promoter로 연결되어 있다. *S. clavuligerus*의 cefD와 cefE는 81 bp 떨어져 있으며 같은 방향으로 배열되어 있다[78]. *N. lactamdurans*의 cefF 유전자는 *S. clavuligerus*의 cefF와 80.8% 상동성이 있고, *C. acremonium*의 cefEF와는 66.2%의 상동성이 있다[25]. *S. clavuligerus*의 cefD 및 cefE는 *E. coli*에서는 물론[79], *C. acremonium*이나 *P. chrysogenum*에서도 발현될 수 있다[17, 111]. *C. acremonium*의 cefEF는 *E. coli*에서 발현시키면 inclusion body가 형성되기 때문에 refolding process가 필요하다[46]. Ring expandase 효소는 페니실린을 세파로스포린으로 생물 전환 할 수 있기 때문에 중요한 연구대상이 되고 있다. *S. clavuligerus*의 expandase로 ring expansion을 시험한 결과 D-carboxymethylcysteinyl-6-APA는 기질로 인식하였으나, adipyl-6-APA와 m-carboxyphenylacetyl-6-APA는 기질로 인식하지 못하였다[86, 96]. *S. clavuligerus*의 expandase 효소는 *C. acremonium*의 expandase 효소보다 기질 인식 범위가 좁은 것으로 알려졌으나 단백질공학 기술로 기질 인식 범위를 개선할 수 있을 것이다 [2, 86].

(6) Acetyltransferase (cefG)

*C. acremonium*은 cephalosporin C에서 베타락탐 항생제의 생합성 과정이 모두 끝나지만, *Streptomyces*는 deacetylcephalosporin C에서 좀더 효소 반응이 진행되어 cephamycin C 항생제를 생산한다. *C. acremonium*의 cefG(1.4 kbp) 유전자에는 79 bp와 65 bp의 두개의 intron 부위가 있으며, cefEF와 bidirectional promoter(938 bp)에 연결되어 있는데 cefEF 보다 발현양이 적다[54, 93]. *S. clavuligerus*의 cmcI hydroxylase와 cefF hydroxylase는 deacetoxycephalosporin C를 똑같이 기질로 인식하는 것으로 보아 두 유전자의 상동성이 높은 것으로 추정되고 있다[2, 36]. *N. lactamdurans*의 cmcI와 cmcJ는 pcbC와 cefF 유전자 사이에 존재하는 것으로 밝혀졌다[25]. Cephamycin C 생합성에 필요한 효소 유전자들은 아직 구체적으로 밝혀지지 않았다.

베타락탐 항생제 생합성을 위한 대사공학

베타락탐 항생제의 생합성에 관여하는 효소 유전자들의 클로닝 및 발현을 효율적으로 할 수 있는 유전공학 기술의 발전으로 세포내 대사량이나 대사경로를 의도적으로 변경하는 대

사공학이 발전하게 되었다[18, 125, 127]. 대사공학 기술은 생합성과정에서 속도결정단계의 효소 유전자를 투여하여(gene dosage) 최종 생산물의 생산수율을 증가시키거나, 균체 성장과 생산을 위한 효소 기질의 특이성 개선이나, 대사량 분포의 변경이나, 대사경로의 변경을 유도할 수 있기 때문에 최근 활발한 연구대상이 되고있다[5, 14, 82, 121, 123, 132, 133]. *P. chrysogenum*인 경우는 fed-batch 배양에서 61 internal fluxes, 49 intracellular metabolites, 21 amino acids uptakes, RNA/DNA, protein, lipid, carbohydrate, aminocarbohydrate 등의 대사 정보를 종합한 metabolic flux 분석 방법이 소개되었다[66]. 베타락탐 항생제의 생합성 경로중 속도결정 단계를 파악하는데는 항생제 생산성이 낮은 균주와 높은 균주의 생합성 경로를 서로 비교하는 것이 효과적이다[138]. *C. acremonium*에 의한 CPC 생합성 경로를 수학적 모델링으로 분석한 결과 ACV synthetase와 expandase-hydroxylase 효소 반응이 속도결정 단계인 것으로 분석되었다[90]. 실제로 *C. acremonium* 생산균주에 cefEF를 투여하였을 때 CPC 생산수율이 1.5배 정도 증가하였음이 보고되었다[127]. 또한 *C. acremonium* 균주에 acetyltransferase 유전자 cefG를 투여한 결과 CPC 생산을 2-3배 증진시킬 수 있었다[55, 92]. *S. clavuligerus*에서는 lysine ϵ -aminotransferase(lat) 유전자를 투여하여 CMC 생산량을 2-5배 증가시켰으며[71, 89], CMC 생산에 관여하는 regulatory gene(ccaR)을 투여했을 때도 CMC 생산량이 2-3배 증가하였다[108]. 외부 유전자를 숙주에서 발현시킬 때는 유전자 발현에 사용되는 promoter에 따라 유전자 발현량이 달라진다. *C. acremonium*에는 pcbC promoter나 gap(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 유전자) promoter가 사용되었으나[75], *A. nidulans*의 gpdA(glucose-6-phosphate dehydrogenase 유전자) promoter가 pcbC promoter보다 강력한 것으로 나타났다[130]. *A. nidulans*의 gdh(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 유전자) promoter와 *P. chrysogenum*의 gdh(glutamate dehydrogenase 유전자) promoter에 cefG 유전자를 연결하여 *C. acremonium*에서 발현시킨 결과 CPC 생산을 2-3배 증진시킬 수 있었다[55, 92]. 이와 같이 cefEF와 cefG 유전자의 재투여에 의한 CPC 생산 균주는 개발되었으나 유전자 크기가 11-12 kb인 pcbAB 유전자의 재투여에 의한 CPC 생산 균주 개발은 아직 발표된 것이 없다.

페니실린과 세파로스포린의 생합성 경로는 서로 유사하기 때문에 외부 유전자의 삽입으로 페니실린 생산균주에서 세파로스포린을, 세파로스포린 생산 균주에서 페니실린을 생산할 수 있는 재조합균주가 개발되고 있다. 예를 들면 *P. chrysogenum* 염색체에 *S. clavuligerus*의 cefE 유전자와 *S. lipmanii*의 cefD 유전자를 삽입하여 deacetoxycephalosporin C(DAOC)의 생합성을 유도하였으며[3, 18], *P. chrysogenum* 염색체에 *S. clavuligerus*의 cefE나 *C. acremonium*의 cefEF 유전자를 삽입하여 adipoyl-7ADCA와 adipoyl-7ACA를 생산할 수 있었다.

여기에서 얻은 adipoyl side chain은 *Pseudomonas amidase*에 의하여 절단되어 반합성 세파로스포린계 항생제의 원료물질로 사용되는 7-aminocephalosporanic acid(7-ACA)와 7-amino-deacetoxycephalosporanic acid(7-ADCA)를 제조할 수 있었다 [27]. 이와 반대로 *C. acremonium* 염색체에 *P. chrysogenum*의 penDE 유전자를 넣어서 발현시킨 결과 penicillin G의 생합성을 유도할 수 있었다[52]. 베타락탐 항생제의 생합성에 관계하는 유전자외에도 외부 유전자로서 *Vitreoscilla hemoglobin* 유전자를 *C. acremonium* 염색체에 넣어서 CPC 생산을 5배 정도 증가시킬 수 있었으며[29], *Fusarium solani* M-0718 유래의 D-araino acid oxidase 유전자와 *Pseudomonas diminuta* V22 유래의 cephalosporin acylase 유전자를 *C. acremonium* 염색체에 넣어서 7-ACA, 7-ADCA, 7-aminodeacetylcephalosporanic acid(7-ADACA)의 생합성을 유도할 수 있었다[62, 63]. 발효에 의한 7-ACA의 생산은 그 수율이 매우 낮은 것이 단점이나 이런 문제는 앞으로 강력한 promoter 개발이나 단백질공학 기술로 관련 효소의 기질 특이성을 높이는 방법으로 생산 수율을 점차 개선할 수 있을 것이다. Filamentous fungi는 외부 유전자로 형질전환하는 방법이 *E. coli*나 yeast에 비하여 간단하지 않으며 또한 효율도 매우 낮기 때문에 형질전환 방법에 따라 외부유전자의 삽입 효율이 다르다[16, 43, 51, 126]. Filamentous fungi에는 circular molecule 보다 linearized plasmid가 형질전환 효율이 2-3배 좋으며, *C. acremonium*의 β -tubulin 유전자[99]나, *P. chrysogenum*의 nitrate reductase(niaD) 유전자[38, 145]를 사용하면 원하는 염색체 부위에 외부 유전자를 삽입할 수 있는 homologous transformation system 개발이 가능하다.

베타락탐 항생제를 생산하는데 사용하는 *P. chrysogenum*이나 *C. acremonium*은 항생제 생산뿐만 아니라 재조합 단백질 생산을 위한 숙주로도 이용되고 있다. Filamentous fungi를 숙주로 이용하는 이유는 posttranslational modification이 정확하게 일어나고, 세포밖으로의 단백질 분비 체계가 잘 확립되었기 때문이다[107]. 지금까지는 *Trichoderma*나 *Aspergillus* 종이 숙주로 많이 연구되고 있으나 *P. chrysogenum*과 *C. acremonium*도 오랜기간 항생제 생산에 사용된 점을 고려할 때 발효기술이 많이 축적되어 있으며, 유전적 특징도 많이 알려져 있고, 인체나 환경에도 안전하다고 볼 수 있다. 따라서 human thrombomodulin[60], blood-coagulation inhibitor hirudin[100, 112], human lysozyme[98], human tear lipocalin[50] 등의 유전자들을 *P. chrysogenum*과 *C. acremonium*에서 발현시켜 의약품 단백질 생산을 연구하고 있다.

결론 및 전망

베타락탐 항생제는 생합성 경로등이 다른 항생제에 비하여 비교적 잘 알려져 있다. 항생제 생산 수율을 증진시키기 위하

여 그동안 사용해 오던 무작위 돌연변이체 유도에 의한 균주 개발 방법은 이제 거의 한계점에 이르러서 앞으로는 유전공학 및 단백질공학 기술을 이용한 대사공학에 의존할 가능성이 높아지고 있다. 베타락탐 항생제에 관여하는 효소들은 개별적으로 클로닝하여 단백질 공학적인 기술로 기질 특이성을 개선한 다음 in vitro 상에서 새로운 물질을 합성하는데 활용될 것이다 [35, 59, 84]. 베타락탐 항생제는 이차대사물이라서 조절 메커니즘이 매우 복잡하지만 분자 유전학적인 특징과 관련 효소의 생화학적 특성들에 대한 새로운 연구결과가 계속 보고되고 있으므로 언젠가는 대사 분포도가 작성될 것이다. 이런 대사분포도가 마련되면 수학적 모델링에 의한 항생제 생합성의 대사량 예측이 가능하여 합리적인 균주 개발 방법을 제시할 수 있을 것이다. 베타락탐 항생제 생산은 국내에서도 중요한 생물산업의 한 분야임으로 산학협동 연구에 의한 체계적인 대사공학 연구가 필요하다.

참고문헌

- Aharonowitz, Y., J. Bergmeyer, J. M. Cantoral, G. Cohen, A. L. Demain, U. Fink, J. Kinghorn, H. Kleinkauf, A. MacCabe, H. Palissa, E. Pfeifer, T. Schwecke, H. van Liempt, H. von Dohren, S. Wolfe, and J. Zhang. 1993. δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, the multienzyme integrating the four primary reactions in β -lactam biosynthesis, as a model peptide synthetase. *Biotechnology*. **11**: 807-810.
- Aharonowitz, Y., G. Cohen, and J. F. Martin. 1992. Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 461-495.
- Alvi, K. A., C. D. Reeves, J. Peterson, and J. Lein. 1995. Isolation and identification of a new cephem compound from *Penicillium chrysogenum* strains expressing deacetoxycephalosporin C synthase activity. *J. Antibiotic*. (Tokyo). **48**: 338-340.
- Araujo, M. L. G. C., R. P. Oliveira, R. C. Giordano, and C. O. Hokka. 1996. Comparative studies on cephalosporin C production process with free and immobilized cells of *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272. *Chem. Eng. Sci.* **51**: 2835-2840.
- Bailey, J. E. 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science*. **252**: 1668-1675.
- Bainbridge, Z. A., R. I. Scott, and D. Perry. 1992. Oxygen utilisation by isopenicillin N synthase from *Penicillium chrysogenum*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **55**: 233-238.
- Baldwin, J. E., J. M. Blackburn, C. J. Schofield, and J. D. Sutherland. 1990. High level expression in *Escherichia coli* of a fungal gene under the control of strong promoters. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**: 45-52.

8. Baldwin, J. E., C.-Y. Shiau, M. F. Byford, and C. J. Schofield. 1994. Substrate specificity of L- δ -(α -amino adipoyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Cephalosporium acremonium*: demonstration of the structure of several unnatural tripeptide products. *Biochem. J.* **301**: 367–372.
9. Barredo, J. L., J. M. Cantoral, E. Alvarez, B. Diez, and J. Martin. 1989. Cloning, sequence analysis and transcriptional study of the isopenicillin N synthase of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 91–98.
10. Basak, S., A. Velayudhan, and M. R. Ladisch. 1995. Simulation of diauxic production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*: lag model for fed-batch fermentation. *Biotechnol. Prog.* **11**: 626–631.
11. Bellgardt, K. H. 1998. Process models for production of beta-lactam antibiotics. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **60**: 153–194.
12. Bergh, K. T., O. Litzka, and A. A. Brakhage. 1996. Identification of a major cis-acting DNA element controlling the bidirectionally transcribed penicillin biosynthesis genes *acvA* (*pcbAB*) and *ipnA* (*pcbC*) of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **178**: 3908–3916.
13. Brakhage, A. A. and J. V. den Brulle. 1995. Use of reporter genes to identify recessive trans-acting mutations specifically involved in the regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **177**: 2781–2788.
14. Cameron, D. C. and F. W. Chaplen. 1997. Developments in metabolic engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 175–180.
15. Cameron, D. C. and I. T. Tong. 1993. Cellular and metabolic engineering. An overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **38**: 105–140.
16. Cantoral, J. M., B. Diez, J. L. Barredo, E. Alvarez, and J. F. Martin. 1987. High-frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology.* **5**: 494–497.
17. Cantwell, C. A., R. J. Beckmann, J. E. Dotzlar, D. L. Fisher, P. L. Skatrud, W. K. Yeh, and S. W. Queener. 1990. Cloning and expression of a hybrid *Streptomyces clavuligerus* *cefE* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* **17**: 213–221.
18. Cantwell, C., R. Beckmann, P. Whiteman, S. W. Queener, and E. P. Abraham. 1992. Isolation of deacetoxycephalosporin C from fermentation broths of *Penicillium chrysogenum* transformants: construction of a new fungal biosynthetic pathway. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **248**: 283–289.
19. Carr, L. G., P. L. Skatrud, M. E. Scheetz, S. W. Queener, and T. D. Ingolia. 1986. Cloning and expression of the isopenicillin N synthetase gene from *Penicillium chrysogenum*. *Gene.* **48**: 257–266.
20. Chapman, J. L., P. L. Skatrud, T. D. Ingolia, S. M. Samson, K. R. Kaster, and S. W. Queener. 1987. Recombinant DNA studies in *Cephalosporium acremonium*. *Develop. Indust. Microbiol.* **27**: 165–174.
21. Chaubal, M. V., G. F. Payne, C. H. Reynolds, and R. L. Albright. 1995. Equilibria for the adsorption of antibiotics onto neutral polymeric sorbents: experimental and modeling studies. *Biotechnol. Bioeng.* **47**: 215–226.
22. Chu, W.-B. Z. and A. Constantinides. 1988. Modeling, optimization, and computer control of the cephalosporin C fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 277–288.
23. Cohen, G., A. Argaman, R. Schreiber, M. Mislovati, and Y. Aharonowitz. 1994. The thioredoxin system of *Penicillium chrysogenum* and its possible role in penicillin biosynthesis. *J. Bacteriol.* **176**: 973–984.
24. Cooper, R. D. 1993. The enzymes involved in biosynthesis of penicillin and cephalosporin; their structure and function. *Bioorg. Med. Chem.* **1**: 1–17.
25. Coque, J. J. R., F. J. Enguita, R. E. Cardoza, J. F. Martin, and P. Liras. 1996. Characterization of the *cefF* gene of *Nocardia lactamdurans* encoding a 3'-methylcephem hydroxylase different from the 7-cephem hydroxylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 605–609.
26. Coque, J. J. R., J. F. Martin, J. G. Calzada, and P. Liras. 1991. The cephamycin biosynthetic genes *pcbAB*, encoding a large multidomain peptide synthetase, and *pcbC* of *Nocardia lactamdurans* are clustered together in an organization different from the same genes in *Acremonium chrysogenum* and *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1125–1133.
27. Crawford, L., A. M. Stepan, P. C. McAda, J. A. Rambosek, M. J. Conder, V. A. Vinci, and C. D. Reeves. 1995. Production of cephalosporin intermediates by feeding adipic acid to recombinant *Penicillium chrysogenum* strains expressing ring expansion activity. *Biotechnology.* **13**: 58–62.
28. Demain, A. L. 1991. Production of beta-lactam antibiotics and its regulation. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China [B]*. **15**: 251–265.
29. DeModena, J. A., S. Gutierrez, J. Velasco, F. J. Fernandez, R. A. Fachini, J. L. Galazzo, D. E. Hughes, and J. F. Martin. 1993. The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Biotechnology.* **11**: 926–929.
30. Diez, B., S. Gutierrez, J. L. Barredo, P. van Solingen, L. H. M. van der Voort, and J. F. Martin. 1990. The cluster of penicillin biosynthetic genes. *J. Biol. Chem.* **265**: 16358–16365.
31. Diez, B., E. Mellado, R. Fouces, M. Rodriguez, and J. L. Barredo. 1996. Recombinant *Acremonium chrysogenum* strains for the industrial production of cephalosporin. *Microbiologia.* **12**: 359–370.
32. Diez, B., E. Mellado, M. Rodriguez, R. Fouces, and J.-L. Barredo. 1997. Recombinant microorganisms for industrial production of antibiotics. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 216–226.
33. Doran J. L., B. K. Leskiw, A. K. Petrich, D. W. S. Westlake, and S. E. Jensen. 1990. Production of *Streptomyces clavuligerus* isopenicillin N synthase in *Escherichia coli* using two-cistron expression systems. *J. Ind. Microbiol.* **5**: 197–206.
34. Durairaj, M., J. L. Doran, and S. E. Jensen. 1992. High-lev-

- el expression of the *Streptomyces clavuligerus* isopenicillin N synthase gene in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 4038–4041.
35. Earl, A. 1991. The genetic engineering approach to beta-lactam antibiotic process strain improvement. J. Chem. Technol. Biotechnol. **50**: 123–126.
 36. Enguita, F. J., P. Liras, A. L. Leitao, and J. F. Martin. 1996. Interaction of the two proteins of the methoxylation system involved in cephamycin C biosynthesis. Immunoaffinity, protein cross-linking, and fluorescence spectroscopy studies. J. Biol. Chem. **271**: 33225–33230.
 37. Fang, A., D. L. Pierson, S. K. Mishra, D. W. Koenig, and A. L. Demain. 1997. Secondary metabolism in simulated microgravity: beta-lactam production by *Streptomyces clavuligerus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **18**: 22–25.
 38. Feng, B., E. Friendlin, and G. A. Marzluf. 1994. A reporter gene analysis of penicillin biosynthesis gene expression in *Penicillium chrysogenum* and its regulation by nitrogen and glucose catabolite repression. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 4432–4439.
 39. Fernandez-Canon, J. M. and M. A. Penalva. 1995. Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. **246**: 110–118.
 40. Fernandez, F., S. Gutierrez, J. Velasco, E. Montenegro, A. T. Marcos, and J. F. Martin. 1994. Molecular characterization of three loss-of-function mutations in the isopenicillin N-acyltransferase gene (*penDE*) of *Penicillium chrysogenum*. J. Bacteriol. **176**: 4941–4948.
 41. Fierro, F., K. Kosalkova, S. Gutierrez, and J. F. Martin. 1996. Autonomously replicating plasmids carrying the AMA1 region in *Penicillium chrysogenum*. Curr. Genet. **29**: 482–489.
 42. Fierro, F., E. Montenegro, S. Gutierrez, and J. F. Martin. 1996. Mutants blocked in penicillin biosynthesis show a deletion of the entire penicillin gene cluster at a specific site within a conserved hexanucleotide sequence. Appl. Microbiol. Biotechnol. **44**: 597–604.
 43. Fincham, J. R. S. 1989. Transformation in fungi. Microbiol. Rev. **53**, 148–170.
 44. Firouztale, E., J. J. Maikner, K. C. Deissler, and P. G. Cartier. 1994. Validation of a theoretical model for adsorption using cephalosporin C and polymeric reversed-phase resins. J. Chromat. **658**: 361–370.
 45. Fujishima, Y., P. Nordlund, G. Pelosi, C. J. Schofield, S. C. J. Cole, J. E. Baldwin, and J. Hajdu. 1994. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on a recombinant isopenicillin N synthase from *Cephalosporium acremonium*. J. Mol. Biol. **242**: 712–714.
 46. Ghag, S. K., D. N. Brems, T. C. Hassell, and W.-K. Yeh. 1996. Refolding and purification of *Cephalosporium acremonium* deacetoxycephalosporin C synthetase/hydroxylase from granules of recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol. Appl. Biochem. **24**: 109–119.
 47. Ghosh, A. C., R. K. Mathur, and N. N. Dutta. 1997. Extraction and purification of cephalosporin antibiotics. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **56**: 111–145.
 48. Glazer, A. N. and H. Nikaido (Eds). 1995. Microbial Biotechnology; antibiotics, pp. 432–515. W. H. Freeman and Co., New York.
 49. Gouka, R. J., W. van Hartingsveldt, R. A. L. Bovenberg, C. M. J. van Zeijl, C. A. M. J. J. van den Hondel, and R. F. M. van Gorcom. 1993. Development of a new transformant selection system for *Penicillium chrysogenum*: isolation and characterization of the *P. chrysogenum* acetyl-coenzyme A synthetase gene (*facA*) and its use as a homologous selection marker. Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**: 514–519.
 50. Graessle, S., H. Haas, E. Friedlin, H. Kurnsteiner, G. Stoffler, and B. Redl. 1997. Regulated system for heterologous gene expression in *Penicillium chrysogenum*. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 753–756.
 51. Gustafson, G. D., T. D. Ingolia, G. Kirchner, and J. L. Roberts. 1993. Fusion reporter gene for bacterial luciferase. United States Patent 5,196,524.
 52. Gutierrez, S., B. Diez, E. Alvarez, J. L. Barredo, and J. F. Martin. 1991. Expression of the *penDE* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding isopenicillin N acyltransferase in *Cephalosporium acremonium*: production of benzylpenicillin by the transformants. Mol. Gen. Genet. **225**: 56–64.
 53. Gutierrez, S., B. Diez, E. Montenegro, and J. F. Martin. 1991. Characterization of the *Cephalosporium acremonium* *pcbAB* gene encoding α -amino adipyl-cysteinylyl-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. J. Bacteriol. **173**: 2354–2365.
 54. Gutierrez, S., J. Velasco, F. J. Fernandez, and J. F. Martin. 1992. The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase. J. Bacteriol. **174**: 3056–3064.
 55. Gutierrez, S., J. Velasco, A. T. Marcos, F. J. Fernandez, F. Fierro, J. L. Barredo, B. Diez, and J. F. Martin. 1997. Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **48**: 606–614.
 56. Hano, T., M. Matsumoto, and T. Ohtake. 1994. Continuous extraction of penicillin G with liquid surfactant membrane using Vibro Mixer. J. Memb. Sci. **93**: 61–68.
 57. Hano, T., M. Matsumoto, T. Ohtake, and F. Hori. 1992. Reactive extraction of cephalosporin C. J. Chem. Eng. Japan. **25**: 293–297.
 58. Hano, T., T. Ohtake, M. Matsumoto, and S.-I. Ogawa. 1993. Application of a liquid surfactant membrane for the recovery of penicillin G. J. Memb. Sci. **84**: 271–278.

59. Hershberger, C. L. 1996. Metabolic engineering of polyketide biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 560–562.
60. Honda, G., A. Matsuda, M. Zushi, S. Yamamoto, and K. Komatsu. 1997. Heterologous protein production in *Acremonium chrysogenum*: expression of bacterial cephalosporin C acylase and human thrombomodulin genes. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 948–955.
61. Huffman, G. W., P. D. Gesellchen, J. R. Turner, R. B. Rothenberger, H. E. Osborne, F. D. Miller, J. L. Chapman, and S. W. Queener. 1992. Substrate specificity of isopenicillin N synthase. *J. Med. Chem.* **35**: 1897–1914.
62. Isogai, T., M. Fukagawa, I. Aramori, M. Iwami, H. Kojo, T. Ono, Y. Ueda, M. Kohsaka, and H. Imanaka. 1991. Construction of a 7-aminocephalosporanic acid (7ACA) biosynthetic operon and direct production of 7ACA in *Acremonium chrysogenum*. *Biotechnology.* **9**: 188–191.
63. Isogai, T., M. Fukagawa, H. Kojo, M. Kohsaka, H. Aoki, and H. Imanaka. 1991. Cloning and nucleotide sequences of the complementary and genomic DNAs for the alkaline protease from *Acremonium chrysogenum*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 471–477.
64. Jensen, S. E. and A. L. Demain. 1995. Beta-lactams. *Biotechnology.* **28**: 239–268.
65. Jensen, S. E. and D. W. S. Westlake. 1989. Immobilization of β -lactam synthesizing enzymes. *Dev. Indus. Microbiol.* **30**: 113–119.
66. Jorgensen, H., J. Nielsen, J. Villadsen, and H. Mollgaard. 1995. Metabolic flux distributions in *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.* **46**: 117–131.
67. Kallow, W., T. Neuhofer, B. Arezi, P. Jungblut, and H. von Dohren. 1997. Penicillin biosynthesis: intermediates of biosynthesis of δ -L- α -aminoadipyl-L-cysteinyl-D-valine formed by ACV synthetase from *Acremonium chrysogenum*. *FEBS Lett.* **414**: 74–78.
68. Karaffa, L., E. Sandor, J. Kozma, and A. Szentirmai. 1996. Cephalosporin-C production, morphology and alternative respiration of *Acremonium chrysogenum* in glucose-limited chemostat. *Biotechnol. Lett.* **18**: 701–706.
69. Kasarenini, S. and A. L. Demain. 1994. A role for alanine in the ammonium regulation of cephalosporin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Ind. Microbiol.* **13**: 217–219.
70. Kern, B. A., D. Hendlin, and E. Inamine. 1980. L-lysine ϵ -aminotransferase involved in cephamycin C synthesis in *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**: 679–685.
71. Khetan, A., L. H. Malmberg, D. H. Sherman, and W. S. Hu. 1996. Metabolic engineering of cephalosporin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **782**: 17–24.
72. Kimura, H., M. Izawa, and Y. Sumino. 1996. Molecular analysis of the gene cluster involved in cephalosporin biosynthesis from *Lyso-bacter lactamgenus* YK90. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 589–596.
73. Kimura, H., S. Matumura, M. Suzuki, and Y. Sumino. 1995. Sequencing of the β -Isoproopylmalate dehydrogenase gene (*LEU2*) from *Acremonium chrysogenum* and its application to heterologous gene expression. *J. of Ferment. and Bioeng.* **80**: 538–540.
74. Kimura, H., H. Miyashita, and Y. Sumino. 1996. Organization and expression in *Pseudomonas putida* of the gene cluster involved in cephalosporin biosynthesis from *Lyso-bacter lactamgenus* YK90. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 490–501.
75. Kimura, H., Y. Sumino, and M. Suzuki. 1991. Cloning and sequencing of the putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Cephalosporium acremonium* and its application to heterologous gene expression. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 145–150.
76. Kimura, H., M. Suzuki, and Y. Sumino. 1995. Cloning and expression of the isopenicillin N synthase gene from *Lyso-bacter lactamgenus* YK90. *J. Ferment. Bioeng.* **80**: 118–123.
77. Kleinkauf, H. and H. von Dohren. 1990. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur. J. Biochem.* **192**: 1–15.
78. Kovacevic, S., M. B. Tobin, and J. R. Miller. 1990. The β -lactam biosynthesis genes for isopenicillin N epimerase and deacetoxycephalosporin C synthetase are expressed from a single transcript in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Bacteriol.* **172**: 3952–3958.
79. Kovacevic, S., B. J. Weigel, M. B. Tobin, T. D. Ingolia, and J. R. Miller. 1989. Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Streptomyces clavuligerus* gene encoding deacetoxycephalosporin C synthetase. *J. Bacteriol.* **171**: 754–760.
80. Kozma, J. and L. Karaffa. 1996. Effect of oxygen on the respiratory system and cephalosporin-C production in *Acremonium chrysogenum*. *J. Biotechnol.* **48**: 59–66.
81. Kozma, J., L. Lucas, and K. Schugerl. 1993. Alternative respiration and antibiotic production of *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 463–465.
82. Liao, J. C. 1993. Modelling and analysis of metabolic pathways. *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**: 211–216.
83. Loke, P., J. Sim, and T.-S. Sim. 1997. Functional analysis of a conserved aspartate D218 in *Cephalosporium acremonium* isopenicillin N synthase. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**: 137–140.
84. Luengo, J. M. 1995. Enzymatic synthesis of hydrophobic penicillins. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **48**: 1195–1212.
85. Madduri, K., C. Stuttard, and L. C. Vining. 1991. Cloning and location of a fine governing lysine ϵ -aminotransferase, an enzyme initiating β -lactam biosynthesis in *Streptomyces*

- spp. J. Bacteriol. **173**: 985–988.
86. Maeda, K., J. M. Luengo, O. Ferrero, S. Wolfe, Y. M. Lebedev, A. Fang, and A. L. Demain. 1995. The substrate specificity of deacetoxycephalosporin C synthase ("expandase") of *Streptomyces clavuligerus* is extremely narrow. Enzyme Microbiol. Technol. **17**: 231–234.
 87. Makagiarsar, H. Y., P. Ayazi Shamlou, C. R. Thomas, and M. D. Lilly. 1993. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. Bioprocess. Eng. **9**: 83–90.
 88. Malmberg, L. H., W. S. Hu, and D. H. Sherman. 1995. Effects of enhanced lysine ϵ -aminotransferase activity on cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **44**: 198–205.
 89. Malmberg, L. H., W. S. Hu, and D. H. Sherman. 1993. Precursor flux control through targeted chromosomal insertion of the lysine ϵ -aminotransferase (*lat*) gene in cephamycin C biosynthesis. J. Bacteriol. **175**: 6916–6924.
 90. Malmberg, L. H. and W. S. Hu. 1992. Identification of rate-limiting steps in cephalosporin C biosynthesis in *Cephalosporium acremonium*: a theoretical analysis. Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**: 122–128.
 91. Martin, J. F. and S. Gutierrez. 1995. Genes for beta-lactam antibiotic biosynthesis. Antonie Van Leeuwenhoek. **67**: 181–200.
 92. Mathison, L., C. Soliday, T. Stepan, T. Aldrich, and J. Rambosek. 1993. Cloning, characterization, and use in strain improvement of the *Cephalosporium acremonium* gene *cefG* encoding acetyl transferase. Curr. Genet. **23**: 33–41.
 93. Matsuda, A., H. Sugiura, K. Matsuyama, H. Matsumoto, S. Ichikawa, and K. Komatsu. 1992. Cloning and disruption of the *cefG* gene encoding acetyl coenzyme A: deacetylcephalosporin C O-acetyltransferase from *Acremonium chrysogenum*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **186**: 40–46.
 94. Menne, S., M. Walz, and U. Kuck. 1994. Expression studies with the bidirectional *pcbAB-pcbC* promoter region from *Acremonium chrysogenum* using reporter gene fusions. Appl. Microbiol. Biotechnol. **42**: 57–66.
 95. Montenegro, E., J. L. Barredo, S. Gutierrez, B. Diez, E. Alvarez, and J. F. Martin. 1990. Cloning, characterization of the acyl-CoA: 6-amino penicillanic acid acyltransferase gene of *Aspergillus nidulans* and linkage to the isopenicillin N synthase gene. Mol. Gen. Genet. **221**: 322–330.
 96. Morgan, N., I. A. C. Pereira, I. A. Andersson, R. M. Adlington, J. E. Baldwin, S. C. J. Cole, N. P. Crouch, and J. D. Sutherland. 1994. Substrate specificity of recombinant *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase. Bioorg. Med. Chem. Lett. **4**: 1595–1600.
 97. Morita, S., M. Kuriyama, M. Nakatsu, and K. Kitano. 1994. High level expression of *Fusarium alkaline* protease gene in *Acremonium chrysogenum*. Biosci. Biotech. Biochem. **58**: 627–630.
 98. Morita, S., M. Kuriyama, M. Nakatsu, M. Suzuki, and K. Kitano. 1995. Secretion of active human lysozyme by *Acremonium chrysogenum* using a *Fusarium alkaline* protease promoter system. J. Biotechnol. **42**: 1–8.
 99. Nowak, C. and U. Kuck. 1994. Development of an homologous transformation system for *Acremonium chrysogenum* based on the β -tubulin gene. Curr. Genet. **25**, 34–40.
 100. Nowak, C., R. Radzio, and U. Kuck. 1995. DNA-mediated transformation of a fungus employing a vector devoid of bacterial DNA sequences. Appl. Microbiol. Biotechnol. **43**: 1077–1081.
 101. Olano, J., D. de Arriaga, F. Busto, and J. Soler. 1995. Kinetics and thermostability of NADP-isocitrate dehydrogenase from *Cephalosporium acremonium*. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 2326–2334.
 102. Park, H.-J. and Y.-H. Khang. 1995. Production of cephalosporin C by immobilized *Cephalosporium acremonium* in polyethyleneimine-modified barium alginate. Enzyme Microb. Technol. **17**: 408–412.
 103. Park, H.-J. and Y.-H. Khang. 1995. Studies of repeated fed-batch fermentation of cephalosporin C in an immobilized cell bioreactor. J. Microbiol. Biotechnol. **5**: 229–233.
 104. Patino, C., F. Sanchez, and M. A. Penalva. 1989. Low level expression in *Escherichia coli* of a fungal gene under the control of strong promoters. FEMS Microbiol. Lett. **58**: 139–144.
 105. Paul, G. C., C. A. Kent, and C. R. Thomas. 1994. Hyphal vacuolation and fragmentation in *Penicillium chrysogenum*. Biotechnol. Bioeng. **44**: 655–660.
 106. Paul, G. C. and C. R. Thomas. 1996. A structure model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. Biotechnol. Bioeng. **51**: 558–572.
 107. Peberdy, J. F. 1994. Protein secretion in filamentous fungi—trying to understand a highly productive black box. Trend. Biotechnol. **12**: 50–57.
 108. Perez-Llarena, F. J., P. Liras, A. Rodriguez-Garcia, and J. F. Martin. 1997. A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both β -lactam compounds. J. Bacteriol. **179**: 2053–2059.
 109. Perry, D., E. P. Abraham, and J. E. Baldwin. 1988. Factors affecting the isopenicillin N synthetase reaction. Biochem. J. **255**: 345–351.
 110. Prade, R. A. and W. E. Timberlake. 1994. The *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans wetA* developmental regulatory genes are functionally equivalent. Mol. Gen. Genet. **244**: 539–547.
 111. Queener, S. W., R. J. Beckmann, C. A. Cantwell, R. L. Hodges, D. L. Fisher, J. E. Dotzlar, W. K. Yeh, D. McGilvray, M. Greaney, and P. Rosteck. 1994. Improved expression of a hybrid *Streptomyces clavuligerus cefE* gene

- in *Penicillium chrysogenum*. Ann. N.Y. Acad. Sci. **721**: 178–193.
112. Radzio, R. and U. Kuck. 1997. Efficient synthesis of the blood-coagulation inhibitor hirudin in the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **48**: 58–65.
 113. Ramsden, M., B. A. McQuade, K. Saunders, M. K. Turner, and S. Harford. 1989. Characterization of a loss-of-function mutation in the isopenicillin N synthetase gene of *Acremonium chrysogenum*. Gene. **85**: 267–273.
 114. Randall, C. R., Y. Zang, A. E. True, Jr. L. Que, J. M. Charnock, C. D. Garner, Y. Fujishima, C. J. Schofield, and J. E. Baldwin. 1993. X-ray absorption studies of the ferrous active site of isopenicillin N synthase and related model complexes. Biochemistry. **32**: 6664–6673.
 115. Renno, D. V., G. Saunders, P. Smith, A. T. Bull, and G. Holt. 1992. Mitotic instability of integrated plasmids in *Penicillium chrysogenum* transformants. J. Biotechnol. **24**: 291–298.
 116. Rius, N., K. Maeda, and A. L. Demain. 1996. Induction of L-lysine ϵ -aminotransferase by L-lysine in *Streptomyces clavuligerus*, producer of cephalosporins. FEMS Microbiol. Lett. **144**: 207–211.
 117. Roache, P. L., I. J. Clifton, Hensgens, C. M., N. Shibata, C. J. Schofield, J. Hajdu, and J. E. Baldwin. 1997. Structure of isopenicillin N synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation. Nature. **387**: 827–830.
 118. Rowe, C. J., C. P. Shorrocks, T. D. Claridge, and J. D. Sutherland. 1998. Analysis of the conversion of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D- α -aminobutyrate by active-site mutants of *Aspergillus nidulans* isopenicillin N synthase. Chem. Biol. **5**: 229–239.
 119. Samson, S. M., R. Belagaje, D. T. Blankenship, J. L. Chapman, D. Perry, P. L. Skatrud, R. M. VanFrank, E. P. Abraham, J. E. Baldwin, S. W. Queener, and T. D. Ingolia. 1985. Isolation, sequence determination and expression in *Escherichia coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium*. Nature. **318**: 191–194.
 120. Sanchez, L. and A. F. Brana. 1996. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. Microbiology. **142**: 1209–1220.
 121. Schlosser, P. M. and J. E. Bailey. 1990. An integrated modeling-experimental strategy for the analysis of metabolic pathways. Math. Biosci. **100**: 87–114.
 122. Scott, R. A., S. Wang, and M. K. Eidsness. 1992. X-ray absorption spectroscopic studies of the high-spin iron(II) active site of isopenicillin N synthase: Evidence for Fe-S interaction in the enzyme-substrate complex. Biochemistry. **31**: 4596–4601.
 123. Selkov, E., S. Basmanova, T. Gaasterland, I. Goryanin, Y. Gretchkin, N. Maltsev, V. Nenashev, R. Overbeek, E. Pan-yushkina, L. Pronevitch, Jr. E. Selkov, and I. Yunus. 1996. The metabolic pathway collection from EMP: the enzymes and metabolic pathways database. Nucl. Acids Res. **24**: 26–28.
 124. Shiau, C. Y., J. E. Baldwin, M. F. Byford, W. J. Sobey, and C. J. Schofield. 1995. δ -L-(α -aminoadipoyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase: the order of peptide bond formation and timing of the epimerisation reaction. FEBS Lett. **358**: 97–100.
 125. Skatrud, P. L. 1992. Genetic engineering of β -lactam antibiotic biosynthetic pathways in filamentous fungi. Trends Biotechnol. **10**: 324–329.
 126. Skatrud, P. L., S. W. Queener, L. G. Carr, and D. L. Fisher. 1987. Efficient integrative transformation of *Cephalosporium acremonium*. Curr. Genet. **12**: 337–348.
 127. Skatrud, P. L., A. J. Tietz, T. D. Ingolia, C. A. Cantwell, D. L. Fisher, J. L. Chapman, and S. W. Queener. 1989. Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. Biotechnology. **7**: 477–485.
 128. Smith, A. W., K. Collis, M. Ramsden, H. M. Fox, and J. F. Peberdy. 1991. Chromosome rearrangements in improved cephalosporin C-producing strain of *Acremonium chrysogenum*. Curr. Genet. **19**: 235–237.
 129. Smith, A. W., M. Ramsden, M. J. Dobson, S. Harford, and J. F. Peberdy. 1990. Regulation of isopenicillin N synthetase (IPNS) gene expression in *Acremonium chrysogenum*. Biotechnology. **8**: 237–240.
 130. Smith, A. W., M. Ramsden, and J. F. Peberdy. 1992. Analysis of promoter activity by transformation of *Acremonium chrysogenum*. Gene. **114**: 211–216.
 131. Sohn, Y.-S., K.-C. Lee, Y.-H. Koh, and G.-H. Gil. 1994. Changes in cellular fatty acid composition of *Cephalosporium acremonium* during cephalosporin C production. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 947–952.
 132. Stephanopoulos, G. 1994. Metabolic engineering. Curr. Opin. Biotechnol. **5**: 196–200.
 133. Stephanopoulos, G. and A. J. Sinskey. 1993. Metabolic engineering-methodologies and future prospects. Trends Biotechnol. **11**: 392–396.
 134. Tan, D. S. H. and T.-S. Sim. 1996. Functional analysis of conserved histidine residues in *Cephalosporium acremonium* isopenicillin N synthase by site-directed mutagenesis. J. Biol. Chem. **271**: 889–894.
 135. Tan, I. K. P., J. M. Fernandez-Canon, A. Reglero, and J. M. Luengo. 1993. Effect of analogues of phenylacetic acid (PA) on the PA transport system in *Penicillium chrysogenum* strains H1107 and M223. Appl. Microbiol. Biotechnol. **40**: 113–116.
 136. Tobin, M. B., S. C. J. Cole, S. Kovacevic, J. R. Miller, J. E. Baldwin, and J. D. Sutherland. 1994. Acyl-coenzyme A: isopenicillin N acyltransferase from *Penicillium chrysoge-*

- num*: effect of amino acid substitutions at Ser-227, Ser-230, and Ser-309 on proenzyme cleavage and activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 39–46.
137. Tobin, M. B., M. D. Fleming, P. L. Skatrud, and J. R. Miller. 1990. Molecular characterization of the acyl-coenzyme A: isopenicillin N acyltransferase gene (*penDE*) from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans* and activity of recombinant enzyme in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 5908–5914.
138. Usher, J. J., D. W. Hughes, M. A. Lewis, and S. J. Chiang. 1992. Determination of the rate-limiting step(s) in the biosynthetic pathways leading to penicillin and cephalosporin. *J. Ind. Microbiol.* **10**: 157–163.
139. Vanhoutte, B., M. N. Pons, C. R. Thomas, L. Louvel, and H. Vivier. 1995. Characterization of *Penicillium chrysogenum* physiology in submerged cultures by color and monochrome image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **48**: 1–11.
140. Velasco, J., S. Gutierrez, F. J. Fernandez, A. T. Marcos, C. Arenos, and J. F. Martin. 1994. Exogenous methionine increases levels of mRNAs transcribed from *pcbAB*, *pcbC*, and *cefEF* genes, encoding enzymes of the cephalosporin biosynthetic pathway, in *Acremonium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* **176**: 985–991.
141. Walz, M. and U. Kuck. 1993. Targeted integration into the *Acremonium chrysogenum* genome: disruption of the *pcbC* gene. *Curr. Genet.* **24**: 421–427.
142. Weigel, B. J., S. G. Burgett, V. J. Chen, P. L. Skatrud, C. A. Frolik, S. W. Queener, and T. D. Ingolia. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of isopenicillin N synthetase genes from *Streptomyces lipmanii* and *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **170**: 3817–3826.
143. Weil, J., J. Miramonti, and M. R. Ladisch. 1995. Biosynthesis of cephalosporin C: regulation and recombinant technology. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 88–90.
144. Weil, J., J. Miramonti, and M. R. Ladisch. 1995. Cephalosporin C: mode of action and biosynthetic pathway. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 85–87.
145. Whitehead, M. P., S. J. Gurr, C. Grieve, S. E. Unkles, D. Spence, M. Ramsden, and J. R. Kinghorn. 1990. Homologous transformation of *Cephalosporium acremonium* with the nitrate reductase-encoding gene (*niaD*). *Gene.* **90**: 193–198.
146. Yang, Z.-F., K. Schugerl, and L. Lucas. 1996. The inhibitory mechanisms of glucose and carbon dioxide on the biosyntheses of penicillins and cephalosporins. *J. Biotechnol.* **51**: 137–148.
147. Yeh, W. K. 1997. Evolving enzyme technology for pharmaceutical applications: case studies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 334–343.
148. Zhang, J. and A. L. Demain. 1992. ACV synthetase. *Crit. Rev. Biotechnol.* **12**: 245–260.
149. Zhou, W., K. Holzhauer-Rieger, T. Bayer, and K. Schugerl. 1993. Cephalosporin C production by a highly productive *Cephalosporium acremonium* strain in an airlift tower loop reactor with static mixers. *J. Biotechnol.* **28**: 165–177.
150. Zhou, W., K. Holzhauer-Rieger, M. Dors, and K. Schugerl. 1992. Influence of dissolved oxygen concentration on the biosynthesis of cephalosporin C. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 848–854.
151. Zhou, W., K. Holzhauer-Rieger, M. Dors, and K. Schugerl. 1992. Influence of medium composition on the cephalosporin C production with a highly productive strain *Cephalosporium acremonium*. *J. Biotechnol.* **23**: 315–329.