

Clavulanic Acid의 생산과 특성

김일출 · 김승욱

고려대학교 화학공학과

항생물질 생산은 Fleming이 1929년 penicillin을 발견한 후, 1944년에 *Penicillium*의 대량배양기술 및 분리 정제 기술이 개발됨에 따라 본격화 되었다. 항생물질은 항균범위, 생산균주, 생화학방법, 화학구조 등에 의해 분류되는데 일반적으로 화학구조에 의해 β -lactam계, aminoglycoside계, macrolide계, polyene계, peptide계, tetracycline계 등으로 나눌 수 있다. 현재까지 5,000여종의 항생물질이 알려져 있고, 대부분은 *Actinomycetes*(*Streptomyces*)로부터 분리되었다. 이들의 유도체는 3만개 이상이 되지만 현재 산업화된 물질은 150여종에 불과하다.

항생물질은 당, 아미노산, 핵산 등과 같은 1차 대사산물을 출발물질로 이용하여 2차 대사의 특유한 생합성 경로를 거쳐 생산되며 생성된 항생물질은 다시 대사과정을 거쳐 활성이 없는 화합물로 전환된다. 이러한 생합성 과정을 통해 목적하는 항생물질을 대량으로 얻기위해 생합성 제어가 필요하다. 지금까지 연구된 결과에 의하면 항생물질 생합성제어에 관여하는 것으로는 배지의 탄소원, 질소원, 인산 물질 등의 생화학적 요인들과 온도, 교반 등의 물리화학적 요인들이 있는데 생화학적요인들은 물리화학적 요인들에 비해 주로 항생물질의 생합성 초기에 강한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Corbett et al., 1987).

Clavulanic acid(CA)는 *Streptomyces clavuligerus*에 의해 처음으로 발견된 천연물질로 구조적으로 β -lactam ring을 가지고 있고 다른 β -lactam 항생제인 penicillin과 cephalosporin의 sulphur대신 oxygen atom으로 대체되어 있다(Fig. 1). 이 CA는 C-2에 β -hydroxyethylidene substituent를 가지며 C-6에는 acyl-

amino group을 가지고 있지 않다. 여기에서 β -lactam ring은 substrate의 β -lactam ring과 유사해서 substrate에서 일어나는 것처럼 β -lactamase를 acylation 시킴으로써 β -lactamase의 작용을 못하게 한다(Fisher et al., 1976). 이는 전형적인 β -lactamase inhibitor로서 내성균용 광범위 항생물질로 알려져 있으며, 이것을 amoxicillin 또는 ticarcillin 등과 일정비율로 혼합하여 사용함으로써 amoxicillin이나 ticarcillin이 목표물에 방해받지 않고 도달하여 강력한 살균작용을 발휘하도록 β -lactamase를 무력화시킨다(Brown et al., 1976). 뿐만 아니라 약한 antibacterial activity를 가지고 있지만 *Staphylococci*가 생산하는 β -lactamase와 *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus* 등의 plasmid mediated β -lactamase에 대한 강력한 inhibitor로써 작용한다(Sparatt et al., 1977). Ampicillin이나 cephaloridine 등에 clavulanic acid를 첨가하여 penicillin 내성균주인 *S. aureus*, *K. aerogenes*, *P. mirabilis*, *E. coli* 등의 minimal inhibitory concentration(MIC)을 현저히 낮추었다는 보고가 있다(Reading et al., 1979).

CA는 현재 β -lactam계 항생물질인 amoxicillin과 1:2의 비율로 혼합하여 augmentin이라는 상품명으로 시판되고 있다.

본고에서는 CA에 관련된 생산균주, 생합성경로, 작용 및 역가, 발효공정 및 최근 연구동향을 살펴보기로 한다.

Clavulanic acid 생산균주

1971년 Lilly Research Laboratories에서 Higgens와 Kastner는 남미지방의 토양 sample에서 분리한 *Streptomyces*에서 새로운 두가지의 cephalosporin계 항생제가 생산된다고 발표했다. 그들은 발견된 균주가 기존의 cephalosporin계 항생제 생산균주와 다르다는 결론에 도달했으며 *Streptomyces clavuligerus*라는 이름을 붙이기에 이르렀다.

Higgens와 Kastner에 의해 발견된 *S. clavuligerus*는 U.S Northern Regional Research Laboratory Collection에 NRRL 3585로 American Type Culture Collection에 ATCC 27064로 각각 보관되어졌다.

이후 *S. clavuligerus*에 의해 생산되는 CA가 처음 발견된 이후로 같은 물질을 생산하는 다른 균주가 있다는 것이 보고되

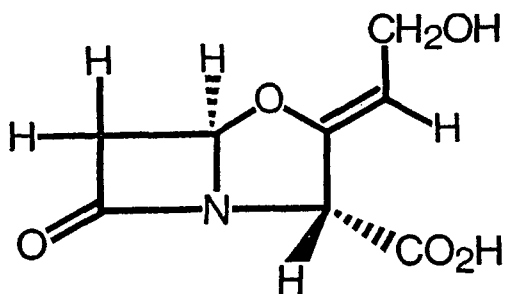


Fig. 1. Structure of clavulanic acid.

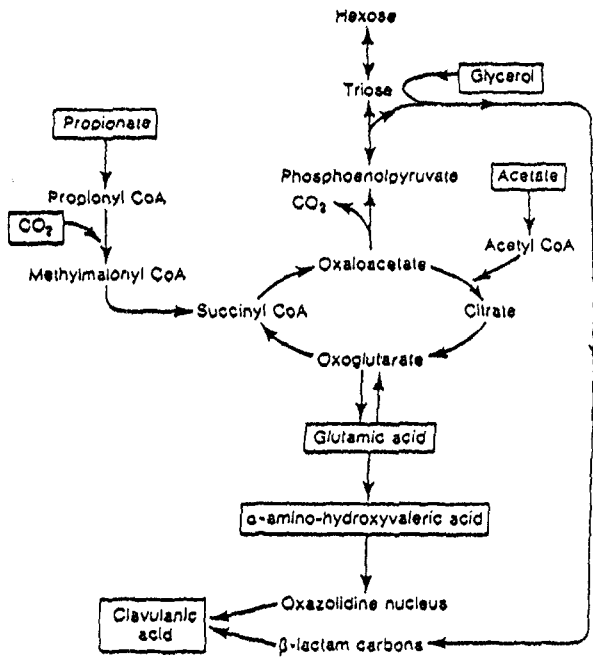


Fig. 2. Summary of probable routes of incorporation of labeled precursors in clavulanic acid biosynthesis (4)

어졌고, 물론 그 보고 전수는 극히 적다. 예를 들면 *S. jumonjensis*나 일본의 토양 sample 에서 동정된 균주인 *S. katsu-rahomanus*와 *Streptomyces* sp.p6621이 있다. 이 각각의 균주들에 대해서는 5절에서 다시 언급할 것이다. 그리고 여기서 주로 언급할 CA는 *S. clavuligerus* ATCC 27064 또는 변이주에 의해 생산되는 것이라고 밝혀준다.

또한 *S. clavuligerus*는 CA외에 cephamycin C, penicillin N, 7-(5-amino-5-carboxy-valeramido)-3-carbamoyloxymethyl-3-cephem-4-carboxylic acid도 생산하는 것으로 밝혀졌다(Romero et al., 1984).

생합성 경로

β -Lactamase inhibitor인 CA의 생합성은 발효중에 labelled precursors(Elson and Oliver, 1978; Stirling and Elson, 1979; Elson, 1981; Elson et al., 1981)에 의해 연구되어졌다.

β -lactam ring(C-5, C-6 and C-7)의 carbon atom은 glycerol로부터 β -hydroxypropionate intermediate를 통해서 형성되며, C-2, C-3, C-8, C-9, C-10의 5개의 carbon atom은 ornithine에서 형성되는 것으로 알려졌다. Fig. 2와 3은 CA의 생합성 경로와 scheme을 나타내고 있다.

Clavulanic acid의 작용 및 역가

앞에서도 언급했듯이 CA의 β -lactam ring은 substrate의 β -

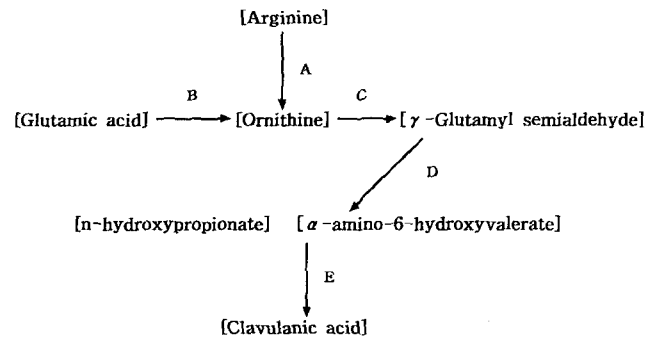


Fig. 3. Biosynthetic pathway of clavulanic acid (18).
A. Arginase; B. ornithine biosynthetic enzymes
C. ornithine- δ -amino-transferase;
D. γ -glutamyl-semialdehyde reductase;
E. clavulanic acid synthase

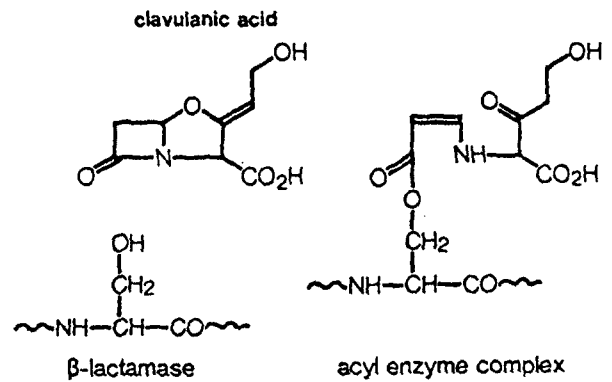


Fig. 4. Mode of action of clavulanic acid (17).

lactam ring과 유사해서 substrate에서 일어난 것처럼 β -lactamase를 acylation 시킴으로써 해서 β -lactamase 로서의 작용을 못하게 하는 것이다(Fig. 4).

그러나 현재 CA는 단독으로는 사용되지 못하고 있으며 ampicillin이나 cephaloridine 등에 첨가되어 사용되고 있는데, 이 유는 단독으로 쓰일때 보다 첨가되어 같이 쓰일 때가 MIC에 있어서 더 향상된 결과를 보여주기 때문이다(Table 1, 2).

Table 1. Antibacterial synergism between ampicillin and clavulanic acid sodium salt (15)

MIC (μ g/ml)	Bacterial strain		
	Clavulanic acid sodium salt	Ampicillin	Ampicillin in presence of 1 μ g/ml clavulanic acid sodium salt
<i>Klebsiella</i> sp 62	31	125	<0.4
<i>Enterobacter cloacae</i>	62	250	62
<i>Serratia marcescens</i>	125	>500	62
<i>Staphylococcus aureus</i> (Russel)	15	500	<0.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	62	250	7.5

Table 2. Antibacterial synergism between cephaloridine and clavulanic acid sodium salt (15)

Bacterial strain	MIC (µg/ml)		
	Clavulanic acid sodium salt	cephaloridine	Cephaloridine in presence of 5 µg/ml clavulanic acid sodium salt
<i>Proieus mirabilis</i> 899	>500	62	7.5
<i>Staphylococcus aureus</i> (Russel)	15	3.1	<0.03
<i>Staphylococcus aureus</i>	62	15	3.7

Table 3. Inhibition of β-lactamase by clavulanic acid (17)

β-lactamase		Pathogen	Inhibition by clavulanic acid
Genetic basis*	Class ⁺		
C	I	<i>Enterobacter P. aeruginosa</i>	No
C	II	<i>P. mirabilis</i>	Yes
P	III(TEM)	<i>E. coli</i>	Yes
P	III(SHV)	<i>K. pneumoniae</i>	Yes
C	IV	<i>K. pneumoniae</i>	Yes
P	V(OXA)	<i>E. coli</i>	Yes
P	V(PSE)	<i>P. aeruginosa</i>	Yes
C	· · ·	<i>Bacteroides species</i>	Yes
P	· · ·	<i>Staphylococcus</i>	Yes

*C=chromosomally mediated β-lactamase; P=plasmid-mediated β-lactamase.

⁺Designates the Richmond and Sykes classification of β-lactamase.

SHV=sulphydryl variable; OXA=oxacillin hydrolyzing; PSE=Pseudomonas specific enzyme.

Table 4. Effect of clavulanic acid on the susceptibility of β-lactamase-producing bacteria to amoxicillin and ticarcillin (17)

Microorganism	MIC (µg/ml)			
	Amox	Amox+CA*	Tic	Tic+CA ⁺
<i>S. aureus</i>	256	1.0	64	2.0
<i>S. epidermidis</i>	128	1.0	128	4.0
<i>H. influenzae</i>	64	0.25	128	0.25
<i>B. catarrhalis</i>	16	0.25	64	0.12
<i>N. gonorrhoeae</i>	128	1.0	64	1.0
<i>K. pneumoniae</i>	>128	4.0	128	4.0
<i>E. coli</i>	>256	8.0	>256	16.0
<i>P. mirabilis</i>	>256	4.0	>256	8.0
<i>P. vulgaris</i>	>256	2.0	256	2.0
<i>B. fragilis</i>	32	0.5	16	1.0

Amox=amoxicillin; CA=clavulanic acid; Tic=ticarcillin

*The concentration of amoxicillin-clavulanic acid (2:1) is expressed in terms of the concentration of amoxicillin.

⁺Expressed as the MIC of ticarcillin in the presence of clavulanic acid at 2 µg/ml.

생물산업

그리고 시중에서 시판되고 있는 CA는 amoxicillin과 1:2의 비율로 혼합하여 augmentin이라는 상품명으로 판매되고 있는데, Table 3은 CA의 β-lactamase inhibition을, Table 4는 amoxicillin과 ticarcillin의 β-lactamase inhibition을 보여준다.

특히 augmentin은 gram-positive와 gram-negative 및 aerobes와 anaerobes organism의 넓은 영역에 걸친 살균력을 가지고 있으며, 호흡기 질환, 피부질환 및 골수염 같은 질환에 특히 더 좋은 효과를 보이고 있다.

발효공정

CA를 생산하는 발효공정에 대한 전반적인 내용을 살펴본다. 주로 종균, 생산 배지 및 발효조건에 대한 내용을 논의한다.

종균배지

CA 생산을 위한 종균배지로는 1% soybean flour, 2% dextrin, 0.2% soybean oil이 주로 쓰이고 있으며, pH는 7.3정도로 초기에 맞추어서, 28°C에서 3-5일 정도 rotary shaker(2-in throw, 240 rpm)에서 배양시키며, 생산을 위한 inoculum size는 균체의 활성도, 전체 발효의 형태에 미치는 영향 등을 고려해 볼 때 매우 중요한 변수라고 생각되며, CA 생산의 경우는 3~5% 정도가 적당한 것으로 알려져 있다.

생산배지

지금까지 연구된 결과에 따르면, CA 합성에 있어서 가장 중요한 영양분은 soybean protein이다. 그리고 탄소원, 질소원, 무기염에 대한 영양분이 논문이나 patent 등에 제시되어 있으며(4, 15), 그중 대표적인 몇가지를 예로 든다면, Beecham patent에는 1.5% soybean flour, 1.0% glycerol, 0.1% KH₂PO₄, 0.2% soybean oil이 생산배지로 제시되어 있으며, British patent No. 1543563에는 3% soybean meal, 4.7% soluble starch, 0.01% FeSO₄ · 7H₂O, 0.01% K₂HPO₄, 0.05%(vol/vol) silicon anti-foam emulsion이 제시되어 있으며, 본 실험실에서 확립된 배지로는 1.5% soybean flour, 1.0% glycerol, 0.1% KH₂PO₄, 0.2% soybean oil, 0.4% MgSO₄, 0.02% FeCl₂가 제시되었다.

그 외에 최근에는 corn starch나 glutamic acid, 그리고 CSL 등의 배지최적화 연구도 수행되고 있는 것으로 보인다. 특히 corn starch의 경우는 탄소원인 glycerol이 경제성면에서 다소 불리한 점이 있기 때문에 corn starch를 분해시킨 후 사용하는 연구도 수행중인 것으로 보인다. 그리고 *S. clavuligerus* 외에 CA를 생산하는 다른 균주에 의한 배지도 Table 5에 나타내었다.

발효조건

실제 발효에서는 위의 배지 성분 외에도 초기 pH, 배양온도, 배양시 초기 교반속도 및 통기속도가 중요한 변수가 된다.

Table 5. Clavulanic acid fermentation media for other species

<i>Streptomyces species</i>	Media	References
<i>S. jumonjinensis</i>	1% soybean flour, 2% glucose monohydrate, 0.2% CaCO ₃ , 0.001% CoCl ₂ · 6H ₂ O, 0.5%Na	British Patent No. 1, 563, 103
<i>S. katsurahamanus</i>	1.5% Soybean flour, 1.5% cottonseed flour, 3% glucose, 3% coornstarch; pH 6.5	Japnaese Patent No. 53-104796
<i>Streptomyces sp. P6621</i>	1.0% soybean flour, 2.0% soluble starh, 0.5% glycerol, 0.1%consteep liquor, 0.01% FeSO ₄ 7H ₂ O; pH 7.0	Japanese Patent No. 55-162993

배양온도는 28°C가 가장 적절하다고 보이며, 항생제를 생산하는 배양에서 pH는 가장 중요한 변수라고 생각되는데, 예를 들면 cephalosporin C 생산과정에서도 초기에 7.3으로 맞추는 pH는 반응시간이 진행됨에 따라 낮아지다가 pH 5-6 사이에서 가장 좋은 역가를 보이며, 시간이 지남에 따라 pH는 다시 증가하는 경향을 보인다. 이러한 pH의 변화는 morphology에도 영향을 미치는 것으로 보이며, *S. clavuligerus* 배양에서도 마찬가지로 pH의 변화는 처음에는 감소하다가 다시 증가하는 경향을 보이고 있다. *S. clavuligerus*는 pH 7~7.5 부근에서 가장 좋은 성장형태를 나타내기 때문에 초기 pH를 7.0으로 시작하는 것이 가장 적당하리라 생각되며, 이는 균체에 미치게 되

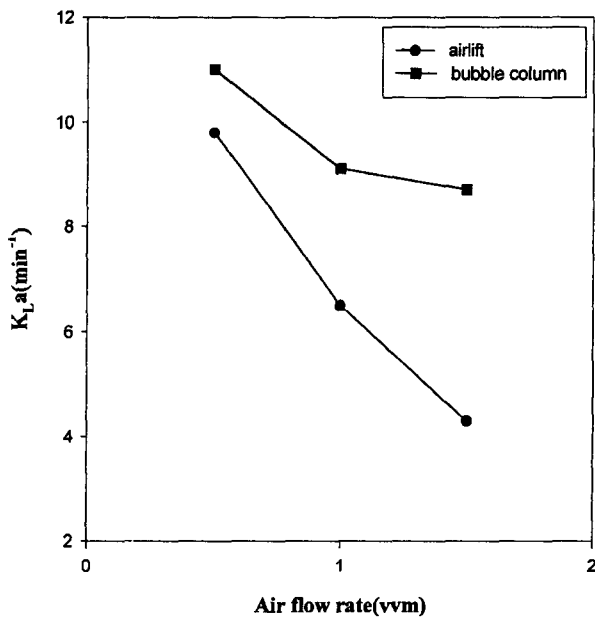


Fig. 5. Effect of air flow rate on K_La during CA production in air lift and bubble column bioreactors.

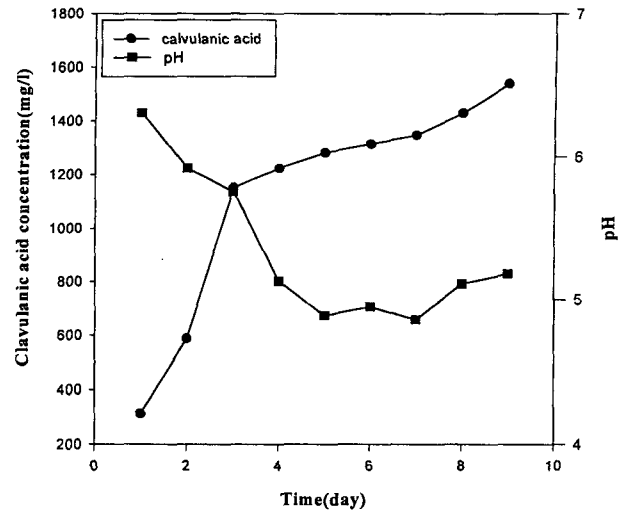


Fig. 6. Clavulanic acid production in a bubble column bioreactor.

는 stress를 줄여 발효 중기 이후 cell의 안정성에 크게 효과를 미칠수 있기 때문이다.

교반식 반응기에서 배양시 반응초기의 교반속도는 균체에 미치는 shear force, 균체의 morphology 변화, 반응기내의 D. O 유지, broth의 점도, 발효조내로 공급되는 power input 등이 발효에 크게 영향을 미치는 요소들이다. 본 실험에서의 결과에 따르면 교반식 반응기에 비해 유동층형 반응기가 더 효율적임을 알 수 있었고, 또한 airlift 및 bubble column bioreactor에서는 통기속도가 매우 중요한 요소가 되는데 이는 발효조내의 통기속도에 따른 K_La 값을 측정해서 가장 적절한 통기속도를 찾는 방법이 한 예이다. Fig. 5는 airlift와 bubble column bioreactor에서 CA생산중 K_La 값을 보여주는데 0.5 vvm의 통기속도가 적합한 것으로 나타났다.

또한 Fig. 6은 bubble column에서 free cell에 의한 CA의 생산을 보여주고 있으며, Fig. 7은 polyurethane pellet Z97-020에 고정화한 균체에 의한 CA의 생산을 보여주고 있다. 이러한 결과는 고정화가 CA생산에 있어서 효과적임을 알 수 있다. 고정화방법에 의해 2차 대사물을 생산하기 위한 연구도 많은 연구자들에 의해 시도되고 있다.

회수공정

발효가 끝난 후엔 발효액으로부터 CA를 얻기 위해서 우선 broth를 여과와 원심분리에 의해 *S. clavuligerus* mycelium을 걸러낸다. 1차 추출은 cell의 mycelium을 없앤 broth로부터 fractionation에 의해 이루어진다. 대규모 공정에 적당한 두가지 공정(Fig. 8)중 첫 번째 방법은 산성을 띄고 있는 발효액로부터 불용성의 유기용매로 추출하는 방법이고, 두 번째 방법은 강염기성 anion exchange resin에 의한 흡착이다. 이후의 정제는 ion exchange chromatography에 의해 이루어진다. 그리

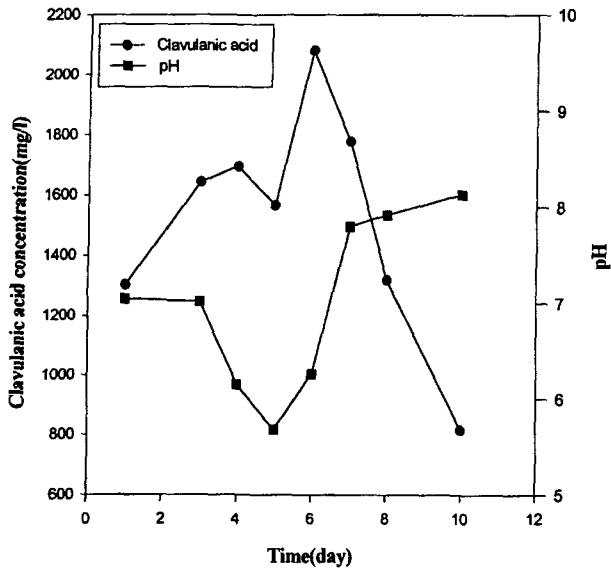


Fig. 7. Clavulanic acid production by immobilized cell in a bubble column bioreactor.

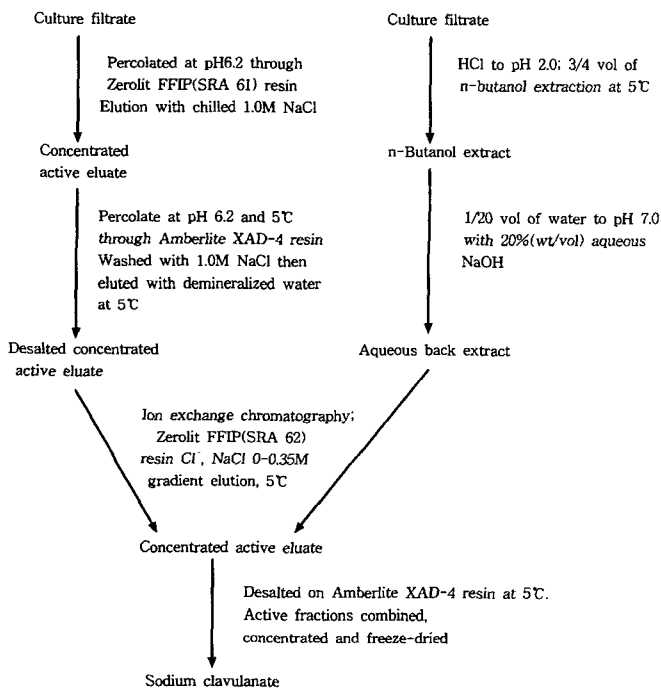


Fig. 8. Scheme for product recovery and purification with two alternative methods for primary extraction (4).

고 위와 같이 얻어진 고순도 생산물 용액은 동결건조와 결정화에 의해 얻어진다.

Clavulanic acid의 최근 연구 동향

CA에 관한 연구는 다른 항생제들에 비해 상당수준의 연구가 이루어진 것은 아니다. 국내에서는 소수의 대학과 기업체만이 균주개발이나 최적발효조건 확립의 연구가 진행되고 있

생물산업

다. 그러나 최근 90년대에는 여러 가지 흥미를 끌만한 연구들이 발표되고 있다.

특히 관심을 끄는 연구는 최근 관심을 끌고 있는 morphology에 대한 연구이다. *S. clavuligerus* ATCC 27064를 이용해서 발효시킬 때, 발효조의 교반속도에 따른 CA 생산과 교반속도에 따른 morphology 변화를 연구했으며, 결론은 CA의 생산성은 교반속도에 의해 큰 영향을 받지 못하며, morphology의 변화는 큰 교반속도에서 더 빨리 일어나며, morphology와 CA의 생산성은 별 관계가 없다는 결론이다(Belmar-Beiny and Thomas., 1990).

또다른 연구로는 *S. clavuligerus*에 의해 생산되는 항생제의 생합성이 cell density에 미치는 영향에 관한 것으로 이 연구도 역시 morphology와 연관이 있으며, cephamycin C와 CA를 생산하는 cell의 안정성은 배지의 영양분을 변화시키지 않고도 포자의 발아 후에 쉽게 얻어질 수 있으며, inoculum으로써 사용된 포자의 농도가 중요한 역할을 한다는 연구이다(Sanchez and Brana., 1996).

이러한 연구 이외에 최근에는 *S. clavuligerus* 배양 중에 CA가 broth내에서 생산과 동시에 분해도 일어나는데 배지내의 성분을 변화시켜 줌으로 해서 repression이나 inhibition에 관한 연구가 행해졌으며(Mayer and Deckwer., 1996), 회수율을 높이려는 CA 정제에 관한 연구로는 ion-pairing system에 관한 연구가 진행중이다(Mayer et al., 1997). 그러나 분리정제에 관련된 연구는 아직 미진한 편이며 더 활발히 진행되어야 할 것 같다.

참고문헌

1. Arcuri, E. J., Nichols, T. S., Brix, V. G., Santamarina, B. C., Buckland, B. C. and Drew, S. W. 1983. Thienamycin production by immobilized cells of *Streptomyces cattleya* in a bubble column. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 2399.
2. Bandyopadhyay, B., Humphrey, A. E. and Taguchi, H. 1967. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation system.(1967) *Biotechnol. bioeng.*, **9**: 533.
3. Belmar-Beiny, M. T. and Thomas, C. R. 1990. Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: Effect of stirrer speed in batch fermentation. *Biotechnol. and Bioeng.*, **37**: 456.
4. Butterworth, D., Clavulanic acid : Properties, Biosynthesis, and Fermentation., In : Vandamme, E. J.(eds.). *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. Marcel Dekker, Inc., 225.
5. Brown, D., Evans, J. R. and Fletton, R. A. 1979. Structures of three novel β-lactams isolated from *Streptomyces clavuligerus*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 226.
6. Brown, A. G., Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G., Hood, J. D., Reading, C. and Rolinson, G. N. 1976. Na-

- turally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J. Antibiot.* **29**: 668.
7. Corbett, K. 1987. Production of antibiotics. In.: Bu'lock, J. and Kristiansen, B.(eds.). Basic Biotechnology. Academic Press, London, 425.
 8. Townsend C. A. and Krol, W. J. 1988. The role of molecular oxygen in clavulanic acid biosynthesis: Evidence for a bacterial oxidative deamination. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1234.
 9. Dominguez, M. G., Martin, J. F. and Liras, P. 1989. Characterization of sugar uptake in wild-type *Streptomyces clavuligerus*, which is impaired in glucose uptake, and in a glucose-utilizing mutant. *J. Bacteriol.* **171**: 6808.
 10. Elson, S. W. and Oliver, R. S. 1978. Studies on the biosynthesis of clavulanic acid. Incorporation of ^{13}C -labelled precursor. *J. Antibiot.* **31**: 586.
 11. Fawcett, P. A., Usher, J. J. and Abrahams, E. P. 1976. Aspects of cephalosporin and penicillin biosynthesis. Proceedings of the Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Academic Press, London, 129.
 12. Fisher, J., Charnas, R. L. and Knowles, J. R. 1978. Kinetic studies on the Inactivation of *Escherichia coli* RTEM β -lactamase by clavulanic acid, *Biochemistry.*, 17-11: 2180.
 13. Mayer A. F. and Deckwer W. D. 1996. Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**: 41.
 14. Mayer A. F., Hartmann, R. and Deckwer, W. D. 1997. Diffusivities of clavulanic acid in porous sorption systems with ion pairing. *Chem. Eng. Sci.*, **52**: 4561.
 15. Patent 4,556,559. 1985. Preparation of clavulanic acid and its salts and esters.
 16. Reading, C and Cole, M. 1977. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*: *Antimicrob. Agents. Chemo.* 11-5: 852.
 17. Rolinson, GN. 1991. Evolution of Beta-lactamase inhibitors, *Review of Infectious Diseases*, **13**: S727.
 18. Romero, J., Liras, P. and Martin, J. F. 1984. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**: 318.
 19. Romero, J., Liras, P. and Martin, J. F. 1988. Isolation and biochemical characterization of *Streptomyces clavuligerus* mutants in the biosynthesis of clavulanic acid and cephamycin C*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**: 510.
 20. Sanchez, L. and Brana, A. F. 1996. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology*, **142**: 1209.
 21. Sparatt, B. G., Jobanputra, V. and Zimmermann, W. 1979. Binding of thienamycin and clavulanic acid to the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* k-12: *Antimicrob. Agents. chemo.*, 12-3, 406.