

## Cephalosporin C Amidase를 생산하는 *Serratia* sp. 균주의 분리와 동정

신중철 · 강용호<sup>1</sup> · 김영수\*

영남대학교 응용화학공학부, 영남대학교 응용미생물학과<sup>1</sup>

**Isolation and Identification of *Serratia* sp. Producing Cephalosporin C Amidase.** Shin, Joong-Chul, Yong-Ho Khang<sup>1</sup>, and Youngsoo Kim\*. School of Chemical Engineering and Technology, <sup>1</sup>Department of Applied Microbiology, College of Natural Resources, Yeungnam University, Kyungsan 712-749, Korea - Various side-chains are introduced to the 7-amino position of 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) to make semi-synthetic cephalosporin antibiotics. In order to convert cephalosporin C (CPC) to 7-ACA, two enzymatic reactions are generally employed. Glutaryl-7-aminocephalosporanic acid (GI-7-ACA) acylase is involved in the second step where the reaction intermediate, GI-7-ACA is converted into 7-ACA. It was recently reported that CPC amidase can convert CPC directly into 7-ACA in a single enzymatic reaction. A study was undertaken to screen microorganisms conferring enzyme activity to convert GI-7-ACA or CPC into 7-ACA by one or two enzymatic reactions. In order to screen the microorganisms rapidly, a non- $\beta$ -lactam model compound, glutaryl-*p*-nitroanilide, was utilized in an early stage, thereafter the selected microorganisms were examined with real substrates. One microorganism exhibiting both GI-7-ACA acylase and CPC amidase activities was obtained by the colorimetry method and HPLC assay, and was identified as a strain of *Serratia* species, designated as *Serratia* sp. N14.4. The optimal fermentation conditions for *Serratia* sp. N14.4 was pH 9.0 and 30°C

**Key words:** cephalosporin C acylase, 7-amino-cephalosporanic acid, *Serratia* sp., biotransformation

Cephalosporin 계 항생제는  $\beta$ -lactam 계에 속하는 항생물질로써  $\beta$ -lactamase 효소에 의한 분해에 저항성이 강하여 감염성 질환 치료약으로써 많이 사용되고 있다. Cephalosporin 계 항생제는 Cephalosporin C(CPC)의 분해물인 7-aminocephalosporanic acid(7-ACA)와 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid(7-ADCA)를 전구체로 하여 CPC의 aminoadipoyl 잔기 자리에 다양한 치환체를 유기합성에 의해 도입하여 반합성 항생제로 생산한다[16]. 7-ACA는 CPC로부터 2단계 반응을 거쳐 생성되는데 첫 번째 반응에서 CPC는 D-amino acid oxidase(DAO)에 의해 keto-adipoyl-7-ACA가 되고 곧 이은 연속반응에서 위의 반응의 부산물인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 GI-7-ACA로 변환된다. 두 번째 반응에서 이 GI-7-ACA가 GI-7-ACA acylase에 의해 7-ACA로 변환되어 반응을 종결한다[1-3, 7, 9, 14]. 7-ACA를 생산하기 위해서 CPC에서 7-aminoadipoyl 잔기를 절단하는 산업적 공정은 현재 화학합성법을 사용하고 있다. 그러나 화학합성법에 의한 7-ACA 생산은 생산비의 절감이라는 큰 장점에도 불구하고 공정효율이 떨어질 뿐 아니라 인체 및 환경에 독성을 내는 폐기물을 부산물로 만드는 등의 단점이 있다[17].

이런 단점을 보완하여 효소공학적인 방법에 의한 공정으로 7-ACA를 생산하는 것이 산업적 공정개선과 환경친화적인 측면에서 절실히 요구되고 있다. 따라서 첫째, 본 연구에서는 GI-7-ACA를 7-ACA로 생변환 하는데 관여하는 GI-7-ACA acylase를 생산하는 균주를 토양으로부터 분리하여 이러한 효소공정의 개발에 이용하기 위해 균주의 분리를 행하였다. 둘째, 위의 효소공정으로 7-ACA를 생산하려고 할 때는 DAO와 GI-7-ACA acylase의 2개의 효소에 의해 이루어진다. 그러나 위의 2개의 효소의 공정이 한 개의 효소인 CPC amidase에 의해 이루어진다고 보고되어 있다[10, 11, 13]. 따라서 CPC amidase의 활성이 존재하는 균주의 분리도 동시에 시도하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료 및 시약

*p*-Nitroaniline, glutaric anhydride, glutaric acid, sodium glutamate, 7-ACA, cephalosporin C, *p*-dimethyl-amino-benzaldehyde, fluorescamine 등의 화학시약은 Sigma사(U.S.A) 제품을 사용하였으며, potassium clavulanate는 동아제약으로부터 얻었으며, nitrocephin, 미생물배지 등은 Difco Inc.(U.S.A.) 제품을 사용하였다.

\*Corresponding author  
Tel. 82-53-810-2521, Fax. 82-53-814-8790  
E-mail: ykiml@ynuucc.yeungnam.ac.kr

### Glutaryl-*p*-nitroanilide(GNA) 합성

Glutaric anhydride 12.4 g과 *p*-nitroaniline 10 g을 20 ml의 dioxane에 녹인 다음 8시간 환류 시킨 후에 실온에서 evaporater에 의해 dioxane을 증발시키고 남은 고형물을 50 ml의 ethyl acetate에 녹이고 pH 8에서 물을 첨가하여 추출하였다[8].

### GI-7-ACA 합성

7-ACA를 0.7 M NaHCO<sub>3</sub> 용액에 녹이고, acetone에 용해한 glutaric anhydride를 가하여 pH 7-8 정도로 조정 후 acetone을 증발시켰다. 잔액을 실온에서 4-5시간 교반한 후 HCl을 첨가하여 pH를 1.5로 조정 후 NaCl을 넣어 포화시키고 ethyl acetate로 추출하여 GI-7-ACA 합성을 완성하였다[8]. 합성된 GNA와 GI-7-ACA는 HPLC를 이용하여 확인해 본 결과 98% 이상의 순도를 나타내었다.

### GI-7-ACA acylase 생산 균주의 분리

경북 경산의 여러 하천지역을 대상으로 하여 토양 시료를 채취하여 LB 배지에서 12시간 배양한 후에 혼합균의 50 µl를 5 ml 선택배지에 넣고 30°C에서 30시간 배양하였다. 선택배지의 조성은 yeast extract 1 g, NH<sub>4</sub>Cl 4 g, KCl 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> 0.05 g, ZnSO<sub>4</sub> 0.05 g, GI-7-ACA 2 g, GNA(Glutaryl-*p*-nitroanilide) 1 g 등을 물 1 l에 녹여 pH 9로 맞추었다. 선택배지에서 배양하는 동안 GNA를 분해하여 황색의 색깔을 나타내는 혼합균주를 선발하였다[15]. 이 선발된 혼합균주 0.5 ml을 LB agar plate에 고르게 도말하여 혼합균주에서 단일 colony를 분리하였다. LB plate 상의 각 colony들은 1 ml의 0.1% GNA 용액에 넣고 30°C에서 30시간 반응시켰다. GNA를 분해하여 황색을 보인 단일 colony는 GI-7-ACA acylase 활성과 nitorcephin kit를 사용하여 β-lactamase 활성을 조사하였다. GI-7-ACA acylase 활성을 크게 보인 일부 균주에 대해서는 CPC amidase 활성을 조사하였다.

### GI-7-ACA acylase와 CPC amidase 활성 조사

GNA가 GI-7-ACA acylase에 의해 분해되어 황색을 보인 단일 colony 균주를 casein 15 g, yeast extract 10 g, glucose 30 g, sodium glutamate 5 g, glutaric acid 1 g을 1 l에 녹여 pH 9로 만든 발효배지의 50 ml에 접종하여 30°C에서 30시간 배양하였다[15]. 그 배양된 균은 원심분리하여 50 mM Tris buffer, pH 7.5로 3번 씻은 후에 같은 buffer에 ethanol과 toluene을 각각 1%씩 첨가하여 만든 permeation용액에 5분간 분산시켜 permeable cell을 만든다. 이 막투과성 세포에 1%의 GI-7-ACA와 0.4%의 potassium clavulanate(β-lactamase 효

소 저해제)를 50 mM TrisCl buffer에 녹인 용액에 현탁시켜서 30°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 반응시킨 cell을 원심분리 한 후 상층액으로 반응의 활성을 조사하였다. 활성조사를 위한 반응액은 위의 상층액 0.5 ml와 0.5% *p*-dimethyl-amino-benzaldehyde(DAB)를 methanol에 녹인 용액 0.2 ml로 되어있다. 이 두 용액을 혼합하여 5분 후에 415 nm에서 흡광도를 측정 하였다[12]. CPC amidase 활성의 측정은 위의 GI-7-ACA acylase 활성 측정과 같으나 기질로 GI-7-ACA 대신 CPC를 같은 양 사용하였다.

GI-7-ACA acylase에 의한 7-ACA 생성을 확인하는 또 다른 방법으로 butanol:acetic acid:water=3:1:1로 구성된 이동상 용매와 silica gel 60F<sub>254</sub>를 이용한 thin layer chromatography(TLC)을 이용하였다. 생성된 7-ACA는 0.05%의 fluorescamine을 분무하여 확인하였다. 보다 정밀하게 7-ACA 생성을 확인하기 위하여 µ-Bondapak C18 칼럼을 이용한 HPLC를 사용하였다. 전개를 위한 이동상 용매는 2% acetonitrile를 20 mM ammonium acetate, pH 5.7 용액에 혼합한 용액을 사용하였다. HPLC peak는 254 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다[4].

## 결과 및 고찰

### GI-7-ACA acylase 및 CPC amidase 생산균주의 활성 조사

Cephalosporin 계 항생물질 생합성의 전구체인 7-ACA의 생성은 두 단계 효소반응 공정에 의해 이루어지는데 두 번째 반응은 GI-7-ACA를 기질로 하여 GI-7-ACA acylase 효소에 의하여 7-ACA를 생성하는 반응이다. 이와 같은 GI-7-ACA acylase 생산 균주를 토양으로 부터 분리하기 위하여 경북 경산 하천 변의 토양시료를 채취하여 멸균 증류수에 희석한 후에 0.1%의 GNA가 든 선택배지에서 30°C에서 30시간 배양하였다. GNA의 분해에 의해 생긴 황색을 생성한 혼합 균주들에서 약 1000개의 단일 colony를 분리하여 0.1% GNA 용액으로 다시 확인한 결과 그 중에서 가장 진한 황색을 띤 12 균주를 최종 선발하였다. 선발된 12 균주에 대해서 GI-7-ACA acylase 활성조사를 행하였다. DAB 용액을 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하는 광도법으로 생성된 7-ACA 양을 확인하였다. Fig. 1에서와 같이 선택한 상위 12개의 활성 균주 중에서 N14.4 균주의 활성이 가장 높게 나타났다.

또한 N14.4 균주를 이용하여 GI-7-ACA acylase 활성을 측정할 때 β-lactamase 활성이 얼마나 존재하는 지를 알아보기 위하여 nitorcephin kit를 이용한 실험을 행한 결과 β-lactamase 활성이 양성으로 판명되었다. 따라서

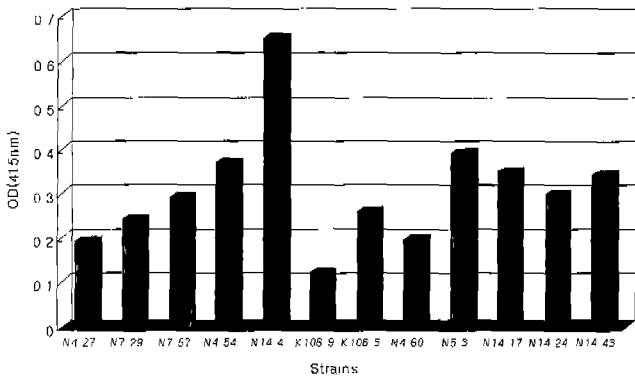


Fig. 1. Measurements of GI-7-ACA acylase activities of the microbial strains obtained from the single colonies on LB agar plates. GI-7-ACA was used as a substrate. The colorimetry method was carried out to measure OD at 415nm using DAB as a coloring agent.

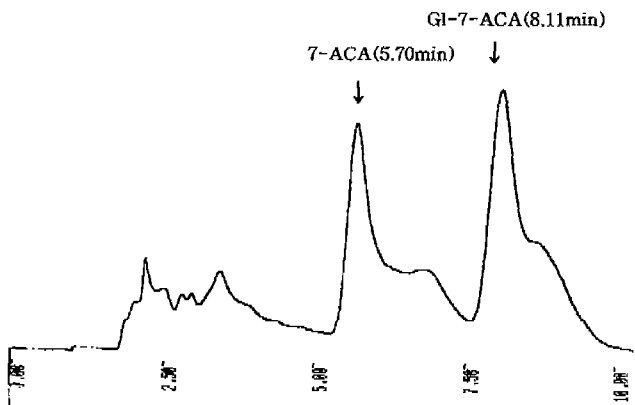


Fig. 2. HPLC chromatogram of the GI-7-ACA acylase reaction mixture incubated with the permeable whole cells of *Serratia* sp. N14.4. The retention time and the peak of GI-7-ACA as a substrate are shown at the same arrow, and those of 7-ACA as a product are also indicated at the other arrow.

$\beta$ -lactamase 활성에 의한 GI-7-ACA acylase 활성의 측정의 방해로 제거하기 위하여  $\beta$ -lactamase 활성 억제제인 potassium clavulanate를 0.3% 농도까지 반응용액에 첨가하였다. 이 경우에  $\beta$ -lactamase 활성이 3시간이상 억제되어 GI-7-ACA acylase 활성 측정에 전혀 방해가 되지 않았다.

분리된 N14.4 균주의 GI-7-ACA acylase 활성을 HPLC를 이용하여 확인하였다. 위의 재료와 방법의 GI-7-ACA acylase 활성조사 방법과 같이 행하여 반응액의 50  $\mu$ l를 HPLC에 주입하여 분석하였다. Fig. 2에서와 같이 기질인 GI-7-ACA와 N14.4 균주의 GI-7-ACA acylase 활성에 의해 생성된 반응물인 7-ACA를 retention time 8.11분과 5.7분에서 각각 확인할 수 있다. 이것으로부터 N14.4 균주의 GI-7-ACA acylase 활성을 확인 할 수 있었다.

분리한 12개의 균주 중에서 GI-7-ACA acylase 활성이 높은 N4.54, N14.4, N5.3, N14.17과 N14.43 등의 5개의

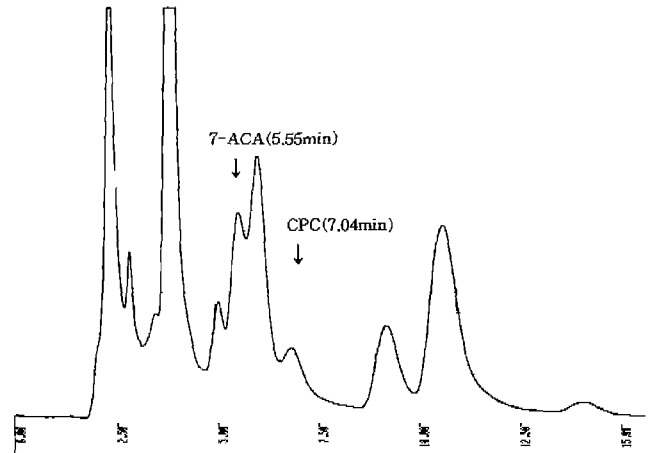


Fig. 3. HPLC chromatogram of the CPC amidase reaction mixture incubated with the permeable whole cells of *Serratia* sp. N14.4. The retention time and the peak of CPC as a substrate are shown at the same arrow and those of 7-ACA as a product are also indicated by the other arrow.

균주를 선택하여 CPC amidase 활성을 HPLC를 이용하여 측정하였다. HPLC 실험을 위하여 control 실험으로 permeable cell, 7-ACA, GI-7-ACA, 그리고 CPC를 standard로 하여 peak의 height와 retention time을 확인하여 반응에서 생긴 생성물을 확인하였다(control peak들은 결과로 제시되지 않았음). 그 결과 GI-7-ACA acylase 활성이 가장 높은 N14.4 균주만이 CPC amidase의 활성을 보여주었다. Fig. 3에서 기질인 CPC와 반응 생성물인 7-ACA는 retention time 7.04분과 5.55분에서 보여지고 있다. 기질인 CPC는 반응을 시작할 때 0.1%의 농도를 사용하였다. 이 농도에서 HPLC peak height에 의한 CPC의 농도는 검출기의 최대값을 초과하였으나 반응을 종결된 후에는 분해되어 거의 남아 있지 않음을 Fig. 3의 CPC의 HPLC peak에서 보여주고 있다.

이와 같이 분리한 N14.4 균주가 기질로서 GI-7-ACA와 CPC를 모두 사용하여 GI-7-ACA acylase와 CPC amidase 활성을 보임으로서 분리한 N14.4 균주는 2종류의 반응을 수행하는 효소 혹은 효소들을 가지고 있음을 알 수 있다. 보다 정확한 분석을 위해서는 순수 분리정제된 효소로 정량적인 확인 작업이 다음의 연구과제로 뒤따라야 할 것이다.

분리 균주의 동정

토양으로부터 분리한 GI-7-ACA acylase 및 CPC amidase를 생산하는 균주인 N14.4의 동정을 위하여 전자현미경(SEM) 상에서 균주의 형태를 확인 한 결과 Fig. 4에서와 같이 세균의 형태는 간상형이며 짧은 편모를 갖고 있어 운동성을 확인 할 수 있었다. 분리균주의 생화학 및 생리화학적 실험결과는 Table. 1에서와 같이 Gram

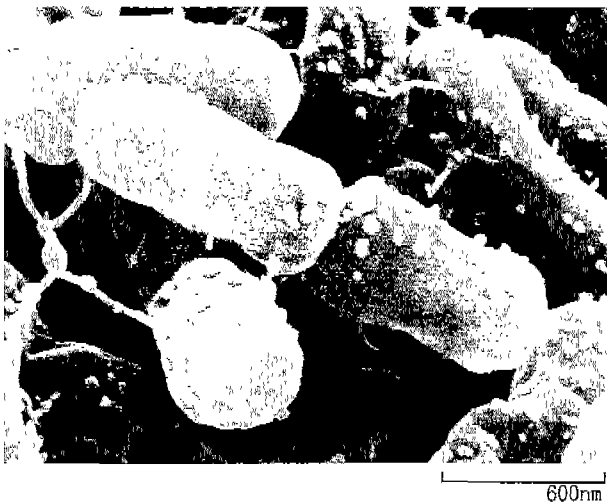


Fig. 4. Scanning electron micrograph of *Serratia* sp. N14.4. The measuring scale is shown at the bottom of the figure.

Table 1. Physiological, morphological, and biological characteristics of *Serratia* sp. N14.4 strain

Characteristics	N14.4
Gram reaction	-
Cell shape	rod
Motility	-
Catalase	+
Oxidase	+
Indole production	-
Voges-Proskauer	+
Methyl red	+
Simmans citrate	+
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	+
H <sub>2</sub> S production	-
Urea	-
KCN	+
Malonate	-
L-rhamnose	+
D-sorbitol	+
Trehalose	+
D-mannose	+
D-xylose	+
L-arabinose	+
Maltose	+
D-mannitol	+
Trans-aconitate	+
Adonitol	+
Benzoate	-
M-erythritol	-
Gentisate	-
D-Malate	-
Gelatin	+

음성이며, Voges-Proskauer, Methyl red test에서 양성으로 나타났다. 또한 catalase와 oxidase를 생산하며 lysine 및 ornithine decarboxylase 활성에도 양성이며, gelatin, esculin 분해 또한 양성인데 비해 urea 분해 및 H<sub>2</sub>S 생산은 음성으로 나타났다. 당 분해에 있어서는 L-rhamnose, D-sorbitol, trehalose, D-mannose, D-xylose, L-arabinose, maltose, D-mannitol 등의 당을 이용할 수 있으며 adonitol, benzoate, M-erythritol, gentisate, D-malate 등을 이용할 수 없는 것으로 확인되었다. 이 결과를 Bergey's manual에 따라 비교 분석한 결과 *Serratia* 속에 속하는 것으로 사료되었다[6]. 또한 더 정확한 균주의 동정을 위하여 미생물동정용 software인 BIOLOG system(Biolog Inc., U.S.A)를 이용한 96-well 실험을 행한 결과 분리한 균주가 *Serratia* 속에 속하는 것을 다시 확인 할 수 있었다. Biolog Inc.에서 제공하는 Biolog software를 이용한 동정은 먼저 균주가 Gram 음성인지 확인하고 BUGM agar에서 2번 계대 배양한 후 탁도계에 서 Gram 음성에 맞는 탁도를 정한후 96-well 생화학 plate에 분주한 다음 1일간 배양한 후에 590 nm에서 흡광도를 측정한다. 그 결과 Biolog 동정용 kit의  $\alpha$ -cyclodextrin에서 부터 glucose-6-phosphate까지 96가지의 여러 가지 당 및 아미노산 등의 물질 분해율을 조합한 0.534의 값으로 *Serratia* sp.임을 확인하였다.

GI-7-ACA acylase의 생산 조건

7-ACA를 GI-7-ACA로부터 생산하기 위하여 기본적인 발효조건을 조사하였다. GI-7-ACA acylase를 생산하는 *Serratia* sp. N14.4 균주의 발효배지의 초기 pH에 의한 GI-7-ACA acylase의 최적 생산조건은 Fig. 5에서와 같이 pH 9.0에서 가장 높게 나타났다. 발효배지의 조성은 재료와 방법에 있는 조성으로 하였고 발효를 시작하기 전 초기 pH는 각각 원하는 대로 조정하여 발효를 진행하

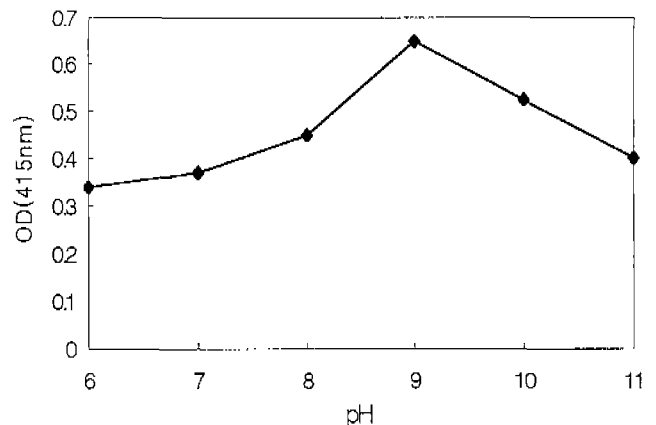


Fig. 5. The effect of temperature during the fermentation of GI-7-ACA acylase activity.

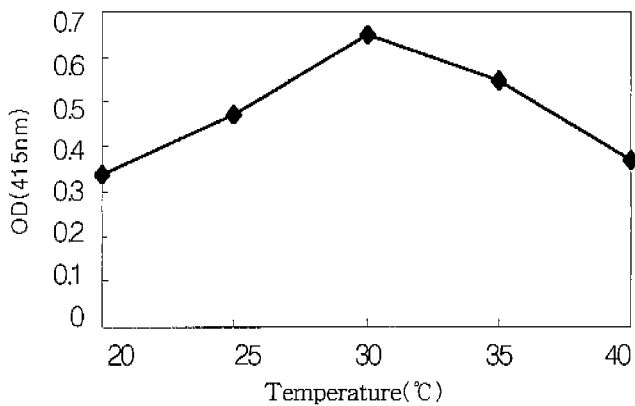


Fig. 6. The effect of pH during the fermentation of GI-7-ACA acylase activity.

였다. GI-7-ACA acylase 활성은 재료와 방법에 준하여 진행하였고 30시간 배양한 발효액이 600 nm에서 흡광도 1 OD 값에 달하는 농도의 발효액 50 ml을 취하여 활성 측정을 수행하였다. 이러한 결과는 비슷한 실험을 행한 기존의 논문들에서 보고된 것과 유사한 패턴을 보이고 있다[5, 12]. 배양온도에 의한 acylase 생산조건을 조사한 결과 Fig. 6에서와 같이 30°C에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과도 역시 GI-7-ACA acylase 활성에 대한 기존의 보고된 논문들과 비슷한 결과를 보여 주고 있다 [5, 12]. 이러한 실험결과들을 바탕으로 우리가 분리한 *Serratia* sp. N14.4 균주도 GI-7-ACA acylase 활성을 가지고 있다는 것을 간접적으로 다시 확인할 수 있었다.

현재까지의 연구는 cephalosporin 계의 반합성 항생제의 전구체인 7-ACA를 기질인 GI-7-ACA와 CPC에서 생산하는 효소인 GI-7-ACA acylase와 CPC amidase 활성을 가진 균주를 분리하여 활성을 확인하는 실험을 진행하였다. Colorimetry 법에 의한 효소의 활성조사와 HPLC에 의한 효소의 활성분석에 의해 *Serratia* sp. N14.4 균주가 GI-7-ACA acylase 및 CPC amidase 활성을 가지고 있는 것을 확인하였다. 그 효소의 분리정제에 의한 확인과 효소의 cloning 등이 다음 과제로 계속 진행되어야 할 것이다.

## 요 약

Cephalosporin계 반합성 항생제의 합성은 시발물질인 7-ACA에서부터 시작된다. 이 7-ACA는 CPC로부터 일반적으로 두 단계 효소공정에 의해 생성된다. 이 두 번째 단계의 효소공정은 반응의 중간생성물인 GI-7-ACA에서 7-ACA를 만드는 반응이며 GI-7-ACA acylase가 관여한다. 또한 cephalosporin C amidase 효소는 기질인 cephalosporin C로부터 한 단계 효소 반응에 의해 7-ACA를 직접 생성한다. 본 연구는 토양으로부터 GI-7-

ACA acylase 효소 혹은 CPC amidase 효소를 생산하는 균주를 분리하는 연구를 수행하였다. GNA를 이용하여 효소 활성이 있는 12 균주를 선발하였으며 colorimetry 방법으로 이 균주들을 확인한 결과 N14.4 균주의 GI-7-ACA acylase 활성이 가장 높게 나타났다. 또한 HPLC를 이용한 효소의 활성의 분석에서 N14.4 균주는 GI-7-ACA acylase와 CPC amidase 활성을 모두 보였다. 분리한 N14.4 균주를 동정하기 위하여 형태학적 관찰, 생화학 및 생리화학적 실험을 수행한 결과 *Serratia* sp.에 속하는 균주로 확인되었다. *Serratia* sp. N14.4 균주를 이용한 GI-7-ACA acylase의 생산조건은 pH 9.0와 30°C에서 최적임을 보였다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 '97 특정기초연구의(과제번호: 97-04-01-05-01-3) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 지원에 감사드립니다. Potassium clavulanate( $\beta$ -lactamase 효소 저해제)를 보내주신 동아제약 이성희 박사님과 논문의 원고를 수정해 준 한길환 박사님께 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Alfani, F., M. Cantarella, N. Cutarella, A. Gallifuoco, P. Golini, and D. Bianchi. 1997. Enzymatic conversion of cephalosporin C into glutaryl 7-aminocephalosporanic acid. A study in different reactor configurations. *Biotechnol. Lett.* **19**: 175-178.
2. Arami, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, H. Ono, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda, and H. Imanaka. 1991. Cloning of a novel 7  $\beta$ -(4-Carboxybutanamido)-cephalosporanic acid acylase gene of *Bacillus laterosporus* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 7843-7855.
3. Arami, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, T. Isogai, H. Ono, Y. Ishitani, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda, and H. Imanaka. 1991. Cloning and nucleotide sequencing of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin C acylase genes from *Pseudomonas* strains. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 232-243.
4. Aramori, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, Y. Yokota, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda, and H. Imanaka. 1991. Isolation of soil strains producing new cephalosporin C acylases. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 227-231.
5. Aramori, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, Y. Yokota, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda, and H. Imanaka. 1992. Comparative characterization of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin C acylases. *J. Ferment. Bioeng.* **73**: 185-192.
6. Claus, D. and R. C. W. Berkeley. 1986. Genus *Serratia*

- sp., pp. 187–247. In P. H. A. Sneath (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
7. Conion, H. D., J. Baqai, K. Baker, Y. Q. Shen, B. L. Wong, R. Noiles, and C. W. Rausch. 1992. Two step immobilized enzyme conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. *Biotechnol. Bioeng.* **46**: 510–530.
  8. Franzosi, G., E. Battiste, I. Gagliardi, and W. Vander Goes. 1995. Screening characterization of microorganisms with glutaryl-7-ADCA acylase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 508–513.
  9. Huber, F. M., J. T. Vicenzi, and A. J. Tietz. 1992. High yielding culture conditions for the biosynthesis of D-amino acid oxidase by *Trigonopsis variabilis*. *Biotechnol. Lett.* **14**: 195–200.
  10. Ishi, Y., Y. Saito, T. Fujimura, T. Isogai, H. Koji, M. Yamashita, M. Niwa, and M. Kohsaka. 1994. A novel 7- $\beta$ -(4-carboxybutanamido)-cephalosporanic acid acylase isolate from *Pseudomonas* strain C427 and its high-level production in *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.* **77**(6): 591–597.
  11. Ishi, Y., Y. Saito, T. Fujimira, H. Saito, H. Sasaki, Y. Noguchi, H. Yamada, M. Niwa, and K. Shimomura. 1995. High-level production, chemical modification and site-directed mutagenesis of a cephalosporin C acylase from *Pseudomonas* strain N176. *Eur. J. Biochem.* **230**: 773–778.
  12. Khang, Y. H. and B. H. Yoo. 1997. Isolation and characterization of soil strains producing glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2**: 105–108.
  13. Nobbs, T. J., Y. Ishi, T. Fujimura, Y. Saito, and M. Niwa. 1994. Chemical modification and site-directed mutagenesis of tyrosine residues in cephalosporin C acylase from *Pseudomonas* strain N176. *J. Ferment. Bioeng.* **77**(6): 604–609.
  14. Pilone, M. S., L. Pollegioni, P. Casalin, B. Curti, and S. Ronchi. 1989. Properties of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. *Eur. J. Biochem.* **180**: 199–204.
  15. Shewale, J. G., K. K. Kumar, and G. R. Ambekar. 1987. Evaluation of determination of 6-aminopenicillanic acid by *p*-dimethyl aminobenzaldehyde. *Biotechnol. Techniq.* **1**: 69–72.
  16. Sudhakaran, V. K., B. S. Deshpande, S. S. Ambedkar, and J. G. Shewale. 1992. Molecular aspects of penicillin and cephalosporin acylases. *Process Biochemistry* **27**: 131–143.
  17. Tanaka, A., T. Tosa, and T. Kobayashi. 1993. Production of 6-APA, 7-ACA, and 7-ADCA by immobilized penicillin and cephalosporin amidase, pp. 67–68. *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. Marcel Dekker Inc., NY.

(Received February 10, 1999)