Cephalosporin C acylase의 개발 및 연구 동향

강 용 호
영남대학교 생물산업공학부

7-Aminocephalosporanic acid(7-ACA)는 전세계 항생제의 40% 이상의 시장점유율을 차지하는 대부분의 세파계 항생제의 원료물질로 사용되고 있다. 현재까지 7-ACA는 사상균 곰팡이인 *Acremonium chrysogenum* 발효에 의하여 생산되는 cephalosporin C(CPC)를 iminoether나 nitrosyl chloride와 같은 화학물질을 사용하여 제조되었으나 이러한 화학공정은 반응공정이 다단계이며, 반응온도도 초저온이고, 유해한 화공약품에 의한 환경오염 발생의 문제점 및 최종 제품의 잔류 유기물 성분 제거의 어려움 때문에 앞으로는 효소를 이용한 생물전환 공정으로 대체될 전망이다.

효소를 이용한 생물전환 공정은 penicillin G의 측쇄를 penicillin acylase에 의한 단일 효소 반응으로 절단하여 6-aminopenicillanic acid(6-APA)를 생산하는데 이미 산업적으로 성공한 사례가 있기 때문에 일본 및 구미 선진국에서는 오래 전부터 자연계에서 CPC의 측쇄를 단일 효소 반응으로 절단할 수 있는 CPC acylase를 찾고자 노력하였다. 그러나 아직까지 자연계에서 7-ACA를 산업적으로 생산할 수 있을 정도의 만족할 만한 CPC acylase 를 발견하지 못하였다. 그 이유는 CPC의 생합성 경로중 L-α-aminoadipate가 L-cystein과 연결되면서 생성되는 최종 D-amino acid의 특이한 구조 때문일 것으로 추정된다(Lowe 1989; 강 1999). 그러므로 CPC에서 최종 D-amino acid group을 제거하면 7번 위치의 amino group의 결합을 효소적인 방법으로 절단하는 것은 쉬워진다. D-amino acid group은 미생물 유래의 D-amino acid oxidase를 사용하면 쉽게 전환할 수 있기 때문에 *Trigonopsis variabilis, Rhodotorula gracilis, Fusarium solani* 등의 D-amino acid oxidase(D-AAO)가 CPC 산화 반응에 이용되고 있다(Acunzo 등, 1996; Pollegioni 등, 1993). CPC를 D-amino acid oxidase로 산화하면 7-[5-carboxy-5-oxopentane]amidocephalosporanic acid(AKA-7ACA)인 keto acid가 반응생성물로 얻어지고, 이는 다시 반응 부산물로 생성되는 hydrogen peroxide에 의하여 비효소반응으로 7-(glutaryl)-amidocephalosporanic acid(glutaryl-7ACA)로 즉시 전환된다. Glutaryl-7ACA(Gl-7ACA)의 7번 위치의 측쇄는 자연계에 존재하는 Gl-7ACA acylase에 의하여 쉽게 절단된다(Fig. 1). 이와 같은 두 단계 효소반응으로 CPC에서 7-ACA 로의 생물전환율은 90% 이상이기 때문에 산업적인 생산에 실용화가 가능하다. 그러나 penicillin acylase인 경우 고정화 효소의 재사용 횟수가 100-600회 정도인데 비하여(Table 1) D-AAO나 Gl-7ACA acylase의 고정화 효소의 재사용 횟수는 20-140 회로 비교적 낮기 때문에 기존의 7-ACA 화학공정과 비교할 때 경제성에 문제점이 있다.

따라서 세계 각국의 연구실에서는 경제성이 높은 CPC 생물전환 공정을 개발하기 위하여 (i) D-AAO와 Gl-7ACA 효소를 함께 담체에 고정하거나(Nikolov & Danielsson, 1994), (ii) 각각 고정한 D-AAO와 Gl-7ACA 두 효소를 하나의 생물반응기에서 혼합하여 사용하거나(Bianchi 등 1998), (iii) 단백질공학 기술에 의하여 Gl-7ACA acylase의 기질특이성을 개선하여 CPC의 측쇄를 단일 효소 반응으로 절단할 수 있는 CPC acylase를 개발하고 있다(Yamada 등, 1996). 처음의 두 방법은 two-step의 생물전환 공정을 one-step의 생물전환 공정으로 대체하는 것은 가능하나 이를 위해서는 역시 D-AAO와 Gl-7ACA acylase의 두 효소가 필요하고 또한 생물전환 공정의 조절이 용이하지 않다는 단점이 있다. 한편 단백질공학에 의한

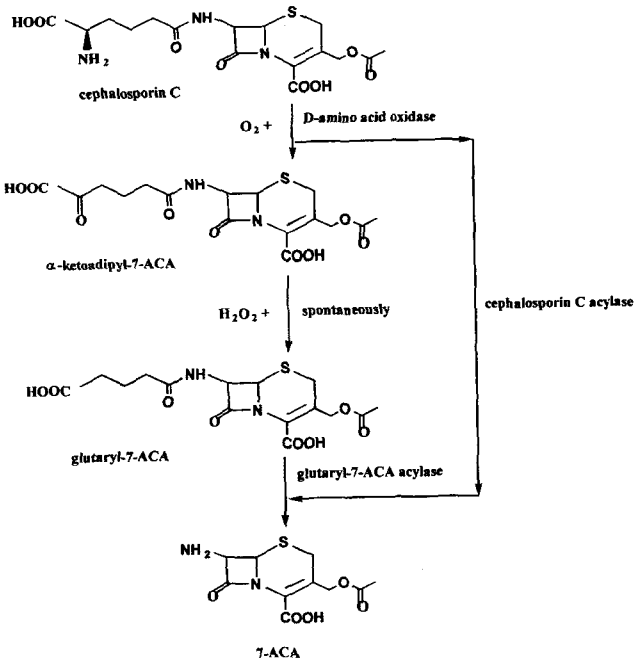

Fig. 1. Bioconversion process of cephalosporin C to 7-ACA.

Table 1. *Operational parameters and characteristics of immobilized penicillin acylase(Shewale & Sivaraman, 1989).*

Parameter	Rohm Pharma	Astra Alab AB	Boehringer Mannheim	Beecham	Teto Jozo	NOVO	Hindustan Antibiotics
Enzyme source	*E. coli*	*E. coli*	*E. coli*	*E. coli*	*B. megaterium*	?	*E. coli*
Support	Eupergit C	Sephadex G-200	Polyacrylamide	Sephadex	Polyacryloni trile fibers	?	Cellulose
Activity(U/mg)	100-150	200-250	310-360	?	?	60	300
Operational pH	8.0	7.8	8.0	7.0-8.0	8.4	7.0-7.5	7.8-8.0
Operational temp(C)	37	37	28	35-40	30-36	35	37
Substrate conc(%)	8	?	7.2-10.0	4.0-15.0	10.0	4.0-6.0	7.0
Reactor	Stirred tank	Stirred tank/ packed bed	Stirred tank	Column	Parallel column	Stirred tank/ packed bed	Stirred tank
Conversion(%)	99	97	97	?	?	98-99	97-98
No. of cycles	620	165	600	?	?	500-550	100
Kg of 6-APA/ kg of IME	250-300	757	1000	1000-2000	500-700	200	100
Storage	6 months (4C)	12 months (20C)	18 months (4C)	?	?	6 months (4C)	6 months (4C)

CPC acylase 개발은 기술적인 어려움은 있으나 penicillin acylase(PA)와 같이 단일 효소 반응으로 7-ACA를 생산할 수 있다는 점에서 상당히 매력적이다. 그러므로 본고는 단백질공학 기술에 의한 CPC acylase의 연구 동향을 소개하고자 한다. 7-ACA도 6-APA와 같은 베타락탐 구조를 갖고 있기 때문에 glutaryl acylase와 penicillin acylase의 단백질 구조 및 기능에는 유사한 점이 많다. 일반 문헌에서는 Gl-7ACA acylase와 CPC acylase를 통칭하여 cephalosporin acylase로 명명하고 있으나 본고에서는 혼란을 피하기 위하여 Gl-7ACA acylase는 glutaryl acylase(GA), CPC acylase는 cephalosporin acylase(CA)로 구분하여 사용한다.

1. Penicillin acylase

Penicillin acylase는 이미 산업적으로 널리 활용되고 있기 때문에 효소 생산을 위한 유전자 클로닝, 발현벡터의 promoter, plasmid origin, plasmid 안정성, 숙주, 기타 배양 조건 등에 대한 최적화 연구가 많이 보고되었다. Sobotkova 등(1996)은 재조합 *E. coli* RE3(pKA18) 균주에서 penicillin G acylase 활성을 배양액 부피당 4500 unit/l(1000 unit/g cell dry wt.)까지 생산하였다. Penicillin acylase와 glutaryl acylase는 대부분 signal peptide, alpha-subunit, spacer peptide, beta-subunit로 구성되어 있다. α-subunit와 β-subunit으로 절단은 periplasmic space 부근에서 자체적으로 발생하며(autocatalytic processing), α-subunit와 β-subunit는 hydrophobic interaction과 tight-fit folding에 의하여 결합되어 $\alpha2\beta2$인 tetramer로 구성되어 있다(Sudhakaran 등 1992).

Duggleby 등(1995)은 *E. coli*에서 분리한 penicillin acylase의 결정구조를 연구하여 26개의 아미노산으로 구성된 signal sequence와, 209개의 아미노산으로 구성된 α-subunit, 54개의 아미노산으로 구성된 spacer peptide, 566개의 아미노산으로 구성된 β-subunit를 보고하였으며, 이 효소의 3차 구조를 1.9 Å resolution으로 밝혔고, 경쟁적 저해제인 phenylacetic acid를 사용하여 enzyme/inhibitor complex를 2.5Å resolution으로 밝혔다. 이 penicillin acylase의 β-subunit의 N 말단에 있는 serine(Serβ1)을 cysteine으로 변경하면 효소활성을 잃었으며, threonine, arginine, glycine 등으로 변경하면 효소가 α-subunit와 β-subunit으로 분리되지 않아서 Serβ1 아미노산이 효소활성 및 auto-splicing에 매우 중요한 역할을 하는 것을 밝혔다. Penicillin acylase는 serine residue를 사용하여 amide와 ester bond를 가수분해한다는 점에서 serine protease와 유사성이 있다. 이런 점에 착안하여 Lee & Park(1998)은 serine protease inhibitors를 penicillin acylase, glutaryl acylase, serine proteases에 각각 적용한 결과 Table 2에서와 같이 효소저해 반응 결과가 inhibitor에 따라서 다르게 나타났다.

Providencia rettgeri ATCC31052(strain Brol)에서 분리한 penicillin G acylase는 signal peptide(1-23 아미노산), α-subunit(24-228), spacer peptide(229-284), β-subunit(285-837)로 구성되었다(Klei 등 1995). 이 PA 효소의 결정구조를 분석한 결과 β-subunit의 N 말단에 있는 Serβ1 이 역시 효소활성 및 subunit 분리에 중요한 역할을 하였으며, Ca++ 이온이 α-subunit의 한개의 아미노산, β-subunit의 다섯 개의 아미노산과 결합하였다(McDonough 등, 1999). *P. rettgeri* 균주에서 분리한 penicillin acylase와 *Pseudomonas* sp. SE83(Matsuda 등 1987)에서 분리한 glutaryl acylase의 주요 아미노산 부위를 비교한 결과, 두 효소 모두 Serβ1이 효소활성에 중요한 역

Table 2. Inhibition of Gl-7ACA acylase and penicillin G acylase(Lee & Park, 1998).

Inhibitor (concentration)	Gl-7ACA acylase	Penicillin G acylase	Subtilisin	Trypsin
DFP(5mM)	+	+	-	-
PMSF(5mM)	+	-	-	-
APMSF(5mM)	+	+	+	-
3,4-DCI(1mM)	+	+	+	-
Leupeptin(5mM)	+	+	+	-

DFP, Diisopropylphosphofluoridate.
PMSF, Phenylmethylsulfonyl fluoride.
APMSF, 4-amidinophenylmethylsulfonyl fluoride.
3,4-DCI, 3,4-dichloroisocoumarin.
+, presence of enzyme activity.
-, complete absence of enzyme activity.

Table 3. Comparison of key residues in penicillin acylase (PA) from *Providencia rettgeri* Brol(McDonough 등 1999) with glutaryl acylase(GA) from *Pseudomonas* sp. SE83 (Matsuda 등 1987).

Residue in PA	Location (A, active site; S, specificity pocket)	Residue in GA
Serβ1	A	Serβ1
Alaβ69	A, S	Hisβ70
Leuα140	S	Leuα163
Pheα144	S	Valα167
Pheβ24	S	Argβ24
Tyrβ52	S	Valβ52
Trpβ154	S	Aspβ177
Ileβ177	S	Aspβ177

할을 하였다(Table 3). 이와같이 penicillin acylase와 glutaryl acylase의 Serβ1이 효소 활성 중심인 것으로 볼 때 이 두 효소는 모두 N terminal nucleophile superfamily(Ntn, Murzin 등 1995)에 속하는 것으로 추정되고 있다.

2. Glutaryl-7ACA acylase

Glutaryl-7ACA acylase 활성을 갖고 있는 미생물 균주는 1980년대 초기부터 일본을 중심으로 미국, 이탈리아, 스웨덴, 인도, 중국 등 세계 각국에서 꾸준히 새로운 균주가 발견되고 있다. 국내에서도 *Pseudomonas diminuta* KAC-1(김 & 윤, 1997), *Pseudomonas cepacia* BY21(Khang & Yoo, 2000) 등의 균주가 선별되었다. Glutaryl acylase는 대부분 Pseudomonas 속의 토양 균주에서 발견되고 있으나, 간혹 *Bacillus*속의 균주에서도 효소활성이 나타나고 있다. Glutaryl acylase 생성균주는 대부분 강한 β-lactamase나 esterase 활성을 동시에 갖고 있어서 선별하기가 쉽지 않지만 Franzosi 등(1995)은 4가지의 모델 기질(adipoyl-, glutamyl-, and glutaryl-p-nitroanilide and glutarylcoumarin)을 합성하여 발색반응으로 glutaryl-3-deacetoxy-7-aminocephalosporanic acid(glutaryl-7ADCA)를 가수분해하는 acylase 활성이 우수한 5개의 토양 균주를 간편하게 선별하였다(Table 4).

Table 4. Glutaryl-7ADCA acylase activity isolated from soils(Franzosi 등 1995).

Strain	Activity(U/l)	pH	Dry wt(g/l)
Achromabacter xylosooxidans	16	8.5	3.8
P. paucimobilis	5.2	9.5	3.9
Pseudomonas sp.	8.6	9.5	0.9
Bacillus sp.	7.3	7.5	5.3
Bacillus cereus	10.3	9.5	4.2

Glutaryl acylase는 대부분 세포의 periplasmic membrane에 위치하고 있으며, 간혹 *Bacillus* sp. 에서 세포밖으로 분비되는 효소도 발견되고 있다(Sonawane 등 1996). Glutaryl-7ACA acylase 활성은 보통 pH7.5-pH9.5 범위에서 최적활성을 보이고 있으나 효소 반응액의 pH가 낮을수록 기질인 glutaryl-7ACA나 반응 생산물인 7-ACA의 안정성이 증가하기 때문에 최근 중국에서는 pH5.5에서 최적 활성을 갖는 *Pseudomonas nitroreducens*를 선별하였다(Lee 등 1998). 이탈리아의 Enichem S.p.A. 회사에서는 *Pseudomonas* sp. NCIMB40560 유래의 glutaryl acylase를 재조합 *E. coli*에서 5000 units/L broth(cell mass= 60g wet wt/L)로 생산하였다(Bianchi 등, 1997). 효소 고정화를 위한 담체로는 oxirane-acrylic resin인 Eupergit C, controlled pore glass인 CPG-10, anion-exchange resin인 Amberlite IRA-904 등이 사용되기도 하였지만, 1,2-diaminoethane을 처리한 Amberlite XAD7-NH_2 가 우수하였다(Table 5).

Glutaryl acylase의 유전자 배열이 밝혀진 것은 일본에서 발견된 *Pseudomonas* sp. GK16, *Pseudomonas* sp. C427, *Pseudomonas* sp. A14, *Pseudomonas* sp. SE83, *Pseudomonas diminuta* N176, *Pseudomonas diminuta* V22, Bacillus laterospous J1 등이 있으며, 중국에서 발견된 *Pseudomonas* sp. 130와 *P. nitroreducens*, 그리고 국내에서는 *Pseudomonas*

Table 5. Immobilization of Gl-7ACA acylase on different carriers.

Carrier (trade name)	Protein bound (%)	Expressed activity(U/g)	Reference
Eupergit C	80-82%	0.23	Nikolov & Danielsson, 1994
DEAE-Sepharose	50-55%	0.11	
CPG-10	84-87%	0.25	
Amberlite IRA-904	68-72%	0.18	
Doulite A365	86.8	0.7	Bianchi 등, 1997
Amberlite XAD7-NH_2	84.4	14.8	

diminuta KAC-1이 있다(김 & 윤, 1997). 대부분의 glutaryl acylase는 penicillin acylase와 같이 signal peptide-αsubunit-spacer peptide-βsubunit으로 구성되어 있으나, *P. diminuta* N176의 효소와 같이 signal peptide와 spacer peptide가 없는 것도 있고, *B. laterospous* J1의 효소와 같이 single unit 로 구성된 것도 있다(Table 6). *Pseudomonas* sp. GK16 유래의 glutaryl acylase는 처음에는 74kDa polypeptide로 발현된 후 signal peptide가 제거되면 70kDa protein으로 되었다가 Gly198과 Ser199사이에서 auto-splicing 이 일어나서 αsubunit와 βsubunit으로 분리된다. 그 다음 βsubunit의 N 말단의 Ser199에 의하여 αsubunit 부위에 있는 Gly189-Asp190 사이에서 절단이 일어나서 Asp190-Gly198의 spacer peptide가 분리된다(Lee 등 1996; Lee & Park, 1998). 이런 이유로 glutaryl acylase의 유전자를 *E. coli*에서 발현시킬 때 signal peptide를 제거하지 않으면 효소의 활성이 잘 나타나지 않는다(김 & 윤, 1997). Glutaryl acylase의 αsubunit와 βsubunit가 개별적으로는 acylase 활성을 나타내지 못하며, α, β-subunit를 각각 발현시켜 *in vitro* 에서의 protein folding을 유도했을 때는 효소의 활성이 나타났다(김 & 윤, 1997). Glutaryl acylase의 αsubunit의 N 말단 부위는 효소 활성에 큰 영향을 미치지 않지만(Li 등 1999), βsubunit의 N 말단부위의 아미노산 배열은 효소의 활성에 큰 영향을 미치기 때문에 각 효소의 아미노산 배열의 상동성이 비교적 높은 편이다(Table 7). 중국에서 발견한 *Pseudomonas* sp. 130 유래의 glutaryl acylase는 일본에서 발견한 *Pseudomonas* sp. GK16과 C427의 glutaryl acylase와 95% 이상의 상동성이 있다(Li 등, 1998). *Pseudomonas* sp. 130 유래의 glutaryl acylase 역시 β-subunit N 말단에 있는 Serβ1이 활성중심에 있으며, Table 8에서와 같이 Gly-Ser peptide bond에서 Gly를 다른 아미노산으로 변경하면 subunit splicing이 전혀 나타나지 않음으로서 Gly 역시 auto-splicing에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(Li 등 1999).

3. Cephalosporin C acylase

Pseudomonas diminuta N176(Aramori 등 1991a), *Arthrobacter viscosus* ATCC 53594(Lein 1991), *Aeromonas* sp. ACY95 (Dehpande 등 1997; Ambedkar 등 1997) 등의 균주는 cephalosporin C에 대한 효소 활성은 나타나지만 Gl-7ACA에 대한 활성과 비교할 때 약 3% 미만으로 매우 미약하다. 이 효소들의 CPC에 대한 기질 특이성을 개선하기 위해서는 site-directed muta-

Table 6. Summary of glutaryl acylases. The numbers mean the molecular masses of the precursor or subunits in kDa, while the sizes of signal peptide and spacer peptide are indicated by residual amounts of amino acids(aa).

Precursor (kDa)	Signal (aa)	α-subunit (kDa)	spacer (aa)	β-subunit	Source	Reference
70	29	16	ND	54	*Pseudomonas* sp. GK16	Matsuda & Komatsu, 1985
70	ND	16	10	54	*Pseudomonas* sp. 130	Li 등 1999
70	27	16	8	54	*Pseudomonas* sp. C427	Ishii 등 1994
89	29	28	ND	61	*Pseudomonas* sp. A14	Aramori 등 1991b
80	-	22	ND	58	*Pseudomonas* sp. SE83 [Acy II]	Matsuda 등 1987a,b
80	-	22	-	58	*Pseudomonas diminuta* N176	Aramori 등 1991b
80	-	22	ND	58	*Pseudomonas diminuta* V22	Aramori 등 1991b
64	-	40	ND	22	*Pseudomonas* sp. SE83 [AcyI]	Matsuda 등 1987a,b
64	-	40	ND	22	*Pseudomonas* sp. V22	Ishiye & Niwa 1992
70	27	70			*Bacillus laterospous* J1	Aramori 등 1991c

ND: not determined, signal peptide: -, no signal or spacer peptide.

Table 7. N-terminal amino acid sequences of glutaryl-7ACA acylases from various bacteria.

Strain	Enzyme	N-terminal amino acid sequence α-Subunit	β-Subunit	Reference
P. diminuta V22	Gl-7ACA acylase	NAPVPVPRVAD	TTHVYVADAMG	Ishiye & Niwa 1992
Pseudomonas sp. SE83	Gl-7ACA acylaseI	NAPVPVPRVAB	TTHVTVADAMG	Matsuda 등 1987
Pseudomonas sp. SE83	Gl-7ACA acylaseII	TMAAKTDREAL	SNNWAVAPGRT	Matsuda 등 1987
P. diminuta N176	CPC acylase	TMAANTDRAVL	SNNWAVAPGRT	Aramori 등 1991a
Pseudomonas sp. C427	Gl-7ACA acylase	LAEPTSTPQAP	SNSWAVAPGKT	Kohsaka 1994
Pseudomonas sp. GK16	Gl-7ACA acylase	EPTSTPQAPIA	SNSWAVAPGKT	Matsuda & Komatsu 1985
Pseudomonas sp. A14	Gl-7ACA acylase	ADTAPSATPPS	SNNWVISPQKS	Aramori 등 1991b
B. laterosporus	Gl-7ACA acylase	QSEQWKAEEL (single peptide)		Aramori 등 1991c
P. nitroreducens	Gl-7ACA acylase	VTLDGGAVAAD	TTHFSIVDKDG	Lee 등 1998

Table 8. Processing and glutaryl acylase activities of *Pseudomonas* sp. 130(Li 등 1999).

Precursor	Processing	Activity(%)
wild-type	+	100
Sβ1->T	+	0
Sβ1->C	-	0
Sβ1->A	-	0
G(-1)->A	-	0
G(-1)->L	-	0
G(-1)->I	-	0
G(-1)->T	-	0
G(-1)->D	-	0
G(-1)->P	-	0
G(-1)->K	-	0
G(-1)Sβ1->AT	-	0
G(-1)Sβ1->TT	-	0
G(-1)Sβ1->ET	-	0

The activities of enzymes are expressed as 100% = 21.5 $umolmin^{-1}mg^{-1}mM^{-1}$.
Sβ1 represented the first residue of the β-subunot and G(-1) the lase residue of spacer peptide.

genesis에 의한 단백질 구조 또는 기능의 변경이 필요하다. 일본의 Fujisawa 회사에서는 단백질공학 기술로 *P. diminuta* N176 acylase의 CPC에 대한 기질 특이성을 약 2배 정도 개선하였다.

P. diminuta N176 acylase는 773 아미노산으로 구성되었으며 α-subunit(Thr1-Gly238)와 β-subunit(Ser239-Ala773)로 되어 있다(Ishii 등, 1995). N176 acylase 유전자를 trp promoter 발현벡터에 클로닝하여 *E. coli*에서 배양할 때 온도를 37℃로 유지하면 inactive precursor protein이 inclusion body 형태로 만들어지기 때문에 배양 온도를 낮추는 것이 필요하다(Noguchi 등 1998).

N176 acylase는 potassium cyanate와 p-chloromercuribenzoic acid(PCMB)을 사용할 때 효소활성을 완전히 상실하였다(Ishii

Table 9. Activities of N176 mutant acylases(Ishii *et al.*, 1995).

Mutation	Activity with(% of the wild-type acylase)	
	Gl-7ACA	CPC
K44Q	102.0	111.0
K73Q	46.9	47.0
K100Q	81.0	106.0
K114Q	86.0	101.0
K170Q	130.0	95.6
K187Q	113.0	91.1
K255Q	107.1	97.0
K301Q	101.0	n.t.
K507Q	102.0	113.9
K629Q	94.2	n.t.
S239C	1.21	0.0

(Values for the wild-type acylase are 46.3 units/mg protein and 1.55 units/mg protein with Gl-7ACA and CPC respectively).

Table 10. Properties of cysteine-to serine mutants(Yamada 등, 1996).

Mutant	Activity(% of wild-type)		
	CPC (pH8.7)	GL-7ACA 、 (pH7.5)	GL-7ACA (pH8.7)
C102S	n.t.	109.0	91.2
C199S	82.0	85.5	91.0
C277S	83.8	79.4	84.5
C305S	83.8	124.0	92.1
C391S	89.5	47.2	84.2
C493S	n.t.	n.t.	100
C496S	90.2	67.4	76.3
C748S	n.t.	55.4	68.8

(Values for the wild-type acylase are 46.3 units/mg protein and 1.55 units/mg protein with Gl-7ACA and CPC respectively. n.t., not tested).

등 1995). 이 결과를 참고로하여 N176 acylase의 활성에 관련이 있는 아미노산을 조사하였다. 먼저 Lys residues를 모두 Gln으로 변경하였을 때 효소활성에 큰 변화가 나타나지 않았으나, β-subunit의 N 말단에 있는 Ser239을 Cys으로 변경한 것은 효소활성을 완전히 상실하였다(Table 9). 따라서 N176 acylase도 N-terminal nucleophile hydrolase super family 에 속한다. N176 acylase에 있는 8개의 free SH기를 갖고 있는 Cys residues를 모두 Ser으로 교체한 결과 C305S 변이효소가 CPC 및 Gl-7ACA에 대한 활성이 증진되었다(Table 10). Tyr270을 Ala, Phe, Leu, Glu, Ser으로 변경한 결과는 효소활성이 25-100% 까지 감소하여 Tyr270 역시 효소 활성에 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다. Tyr270의 위치를 다른 glutaryl acylase나 penicillin acylase와의 단백질 구조를 비교하여 Tyr270 주변의 아미노산을 소수성기로 대체하여 보았다. 즉 Met269와 Ala271 잔기를 Leu, Phe, Tyr기로 대체한 결과

Table 11. Activities of N176 enzyme mutated at Met269, Tyr270 and Ala271(Yamada 등, 1996).

Mutation	Activity with(% of the wild-type)	
	Gl-7ACA	CPC
Y270L	28.1	32.3
Y270F	50.4	46.1
Y270A	70.6	24.3
Y270S	61.7	28.3
Y270E	0.0	0.0
M269L	92.5	107.9
M269F	98.2	165
M269Y	91.5	155
A271L	104	100
A271F	118	56.2
A271Y	101	122.2

(Values for the wild-type acylase are 46.3 units/mg protein and 1.55 units/mg protein with Glutaryl-7ACA and cephalosporin C, respectively).

Table 12. Profile of mutant N176 acylases(Saito, 1997).

Mutant	GL-7ACA(%) (pH7.5)	GL-7ACA(%) (pH 8.7)	CPC(%) (pH8.7)	keto-CPC(%) (pH7.5)
Wild-type	100(26.8 U/mg)	100(46.3 U/mg)	100(1.55 U/mg)	100(18.8 U/mg)
L160A	60.3	64.1	137	128
L160Q	59.3	78.1	107	133
M164A	167	104	76.2	66.8
M164G	167	106	70.3	53.0
M164L	83.8	68.9	122	97.5
M164Q	127	122	23.0	ND
S166A	121	114	135	135
W168Y	114	114	156	98.6
M269F	86.0	107	143	110
M269Y	77.4	90.3	162	108
C305S	124	92.4	83.8	95.6
S166A/M269Y	67.5	88.9	193	122
M269Y/C305S	89.1	94.3	154	117

M269F와 M269Y의 변이효소가 높은 CPC acylase 활성을 보였다(Table 11). 또한 N176 acylase를 hydrogen peroxide와 반응시킬 때 효소활성이 76% 정도 감소하였는데, 이는 Met164가 산화되었기 때문으로인 것으로 밝혀져 Met164를 포함하여 주변의 L160, S166, W168를 각각 point-mutation한 결과 L160A, S166A, W168Y의 변이효소에서 CPC에 대한 활성이 개선되었다(Table 12).

이처럼 하나의 아미노산을 변경할 때 CPC에 대한 효소의 기질 특이성이나 조업안정성이 증진된 부위의 아미노산을 분류하여 두 곳의 위치를 동시에 변경하여 본 결과, S166A/ M269Y, M269Y/C305S의 변이효소가 CPC에 대한 활성이 wild-type보다 각각 193%, 154% 증가하였다(Table 12). 이중에서 M269Y/C305S의 mutant acylase를 담체에 고정하여 25℃의 CPC용액(125mg/50ml)이 들어있는 충전식 생물반응기에서 120분동안 반응시킨 결과 90% 이상의 7-ACA 수율을 얻을수 있었으며, 고정화 효소의 재사용 횟수는 60회 이상까지 가능하였다(Yamada 등 1996).

4. 결론

7-ACA 제조를 위한 기존의 화학공정을 미생물의 효소를 이용한 생물공정으로 대체하기 위해서는 현재로는 D-AAO와 Gl-7ACA acylase 두 효소가 필요하다. 그러나 CPC acylase에 의한 단일 효소반응으로 7-ACA를 생산할 수 있다면 7-ACA의 생물공정의 경제성은 크게 개선될 것이다. 자연계에서 발견되는 CPC acylase의 활성은 산업화에 이용하기에는 활성이 너무 미약하기 때문에 단백질공학 기술로 CPC에 대한 기질특이성을 개선하는 것이 필요하다. 산업화에 필요한 CPC acylase를 개발하기 위해서는 먼저 glutaryl acylase의 활성부위를 파악하는 것이 필요하다. 다행히 glutaryl acylase는 penicillin acylase와 단백질의 3차 구조와 기능이 유사하기 때문에 효소 활성중심이나 활성부위 등을 어느 정도 예측할 수 있다.

P. diminuta N176 acylase는 chemical modification 방법을 사용하여 활성에 중요한 영향을 미치는 아미노산 잔기를 선별하였다. N176 acylase의 S166A/M269Y 변이효소는 CPC에 대한 생물전환율이 처음보다 약 2배로 증가하였으나, CPC에 대한 효소활성은 약 3 U/mg protein으로 Gl-7ACA(46 U/mg protein)에 비하면 여전히 낮은 수준이다. CPC acylase 개발은 이제 겨우 시작 단계이나 그 기대 효과가 매우 큰 만큼 효소활성이 우수한 CPC acylase의 개발을 위하여 앞으로 세계 각국에서 경쟁적으로 연구할 것이다. 필자의 연구실에서도 glutaryl acylase의 3차 결정구조의 자료를 기초로 하여 CPC acylase 개발 연구를 진행하고 있다.

감사

본 연구는 한국과학재단 특정기초사업(No. 97-0401-0501-3)의 연구비 지원을 받았기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Acunzo, A.D.1., E.D. Alteriis, F. Maurano, E. Battistel, P. Parascandola. 1996. D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*: Immobilization of whole cells in natural polymeric gels for glutaryl-7-aminocephalosporanic acid production. *J. Ferment. Bioeng.* **81**: 138-142.
2. Ambedkar, S.S., B.S. Deshpande, and J.G. Shewale. 1997. Separation of cephalosporin C acylase and penicillin V acylase from *Aeromonas* ACY95 by chemical treatment. *Process Biochem.* **32**: 305-307.

3. Aramori, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, Y. Yokoda, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda, and H. Imanaka. 1991a. Isolation of soil strains producing new cephalosporin acylases. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 227-231.
4. Aramori, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, Y. Yokoda, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda, and H. Imanaka. 1991b. Cloning and nucleotide sequencing of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin C acylase genes from *Pseudomonas* strains. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 232-243.
5. Aramori, I., M. Fukagawa, M. Tsumura, M. Iwami, H. Ono, H. Kojo, M. Kohsaka, Y. Ueda, and H. Imanaka. 1991c. Cloning and nucleotide sequencing of a novel 7β-(4-carboxybutanamido)cephalosporanic acid acylase gene of *Bacillus laterosporus* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 7848-7855.
6. Battistel, E., D. Bianchi, R. Bortolo, and L. Bonoldi. 1998. Purification and stability of glutaryl-7-ACA acylase from *Pseudomonas* sp. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **69**: 53-67.
7. Bianchi, D., P. Golini, R. Bortolo, E. Battistel, R. Tassinari, and P. Cesti. 1997. Immobilization of glutaryl-7-ACA acylase on aminoalkylated polyacrylic supports. *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 368-372.
8. Bianchi, D., R. Bortolo, P. Golini, and P. Cesti. 1998. Enzymatic transformation of cephalosporin C to 7-ACA by simultaneous action of immobilized D-amino acid oxidase and glutaryl-7-ACA acylase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **73**: 257-268.
9. Dehpande, B.S., S.S. Ambedkar, and J.G. Shewale. 1997. Effect of amino acids on the production and activities of cephalosporin C acylase and penicillin V acylase from *Aeromonas* species ACY 95. J. Basic. Microbiol. **37**: 403-405.
10. Duggleby, H.J., S.P. Tolley, C.P. Hill, E.J. Dodson, G. Dodson, and P.C.E. Moody. 1995. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature* **373**: 264-268.
11. Franzosi, G., E. Battistel, I. Gagliardi, and W. Van der Goes. 1995. Screening and characterization of microorgansms with glutaryl-7ADCA acylase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 508-513.
12. Ishiye, M. and M. Niwa. 1992. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the cephalosporin acylase gene of a *Pseudomonas* strain. *Biochim. Biophys. Acta* **1132**: 233-239.
13. Ishii, Y., Y. Saito, T. Fujimura, T. Isogai, H. Kojo, M. Yamashita, M. Niwa, and M. Kohsaka. 1994. A novel 7β-(4-carboxybutanamido)-cephalosporanic acid acylase isolated from *Pseudomonas* strain C427 and its high-level production in *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.* **77**: 591-597.
14. Khang, Y.H. and B.H. Yoo. 2000. Isolation and characterization of a novel soil strain, *Pseudomonas cepacia* BY21, with glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase activity. *Biotech. Lett.* **22**: 317-320.
15. Klei, H.E., G.O. Daumy, and J.A. Kelly. 1995. Purification and preliminary crystallographic studies of penicillin G acylase from *Providencia rettgeri*. *Protein Sci.* **4**: 433-441.
16. Lee, Y.-H., T.-S. Chang, H.-J. Liu, and W.-S. Chu. 1998. An acidic glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase from *Pseudomonas nitroreducens*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**: 113-118.
17. Lee, Y.-S., H.-C. Yang, and S.-S. Park. 1996. Cloning and characterization of GL-7-ACA acylase gene from *Pseudomonas* sp. GK16. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 375-380.
18. Lee, Y.S. and S.S. Park. 1998. Two-step autocatalytic processing of the glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase from *Pseudomonas* sp. strain GK16. *J. Bacteriol.* **180**: 4576-4582.
19. Li, Y., W. Jiang, Y. Yang, G. Zhao, and E. Wang. 1998. Overproduction and purification of glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase. *Protein Expr. Purif.* **12**: 233-238.
20. Li, Y., J. Chen, W. Jiang, X. Mao, G. Zhao, and E. Wang. 1999. In vivo post-translational processing and subunit reconstitution of cephalosporin acylase from *Pseudomonas* sp. 130. *Eur. J. Biochem.* **262**: 713-719.
21. Lien, J. 1991. One-step enzymatic conversion of cephalosporin C and derivatives to 7-aminocephalosporanic acid and derivatives. US patent 4,981,789.
22. Lowe, D.A. 1989. Immobilized beta-lactam acylases. *Dev. Ind. Microbiol.* **30**: 121-130.
23. Matsuda, A. and K.I. Komatsu. 1985. Molecular cloning and structure of the gene for 7β-(4-carboxybutanamido) cephalosporanic acid acylase from a *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* 163: 1222-1228.
24. Matsuda, A., K. Toma, and K. Komatsu. 1987. Nucleotide sequences of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* **169**: 5821-5826.
25. McDonough, M.A., H.E. Klei, and J.A. Kelly. 1999. Crystal structure of penicillin G acylase from the Bro1 mutant strain of *Providencia rettgeri*. *Protein Sci.* **8**: 1971-1981.
26. Murzin, A.G. 1996. Structural classification of proteins: New superfamilies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**: 386-394.
27. Nikolov, A. and B. Danielsson. 1994. Enzymatic transformation of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. Part I: Cultivation of *Pseudomonas syringae* and partial purification and immobilization of 7-β-(4-carboxybutanamido) cephalosporanic acid acylase. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 1031-1036.

28. Nikolov, A., B. Danielsson. 1994. Enzymatic transformation of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. Part II: Single-step procedure using a coimmobilized enzyme system. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 1037-1041.
29. Noguchi, Y., H. Yamada, M. Yamaguchi, K. Watanabe, T. Fujimura, Y. Ishii, and Y. Saito. 1998. An approach to high-level production of cephalosporin acylase from *Pseudomonas* strain N176 in *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.* **85**: 634-637.
30. Pollegioni, L., B. Langkau, W. Tischer, S. Ghisla, M.S. Pilone, 1993. Kinetic mechanism of D-amino acid oxidases from *Rhodotorula gracilis* and *Trigonopsis variabilis*. *J. Biol. Chem.* **268**: 13850-13857.
31. Robas, N., H. Zouheiry, G. Branlant, and C. Branlant. 1993. Improved penicillin amidase production using a genetically engineered mutant of *Escherichia coli* ATCC 11105. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 14-24.
32. Saito, Y. 1997. Genetical engineering and strain development for mass production of industrially important secondary metabolites: Production of 7-aminocephalosporanic acid. 한국산업미생물학회 프로시딩(4월 25일), 113-123.
33. Shewale, J.G. and H. Sivaraman. 1989. Penicillin acylase: enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA. *Process Biochem.* **24**: 146-154.
34. Sobotkova, L., V. Stepanek, K. Plhackova, and P. Kyslik. 1996. Development of a high-expression system for penicillin G acylase based on the recombinant *Escherichia coli* strain RE3(pKA18). *Enzyme Microb. Technol.* **19**: 389-397.
35. Sonawane, V.C., R.S. Jolly, and R.M. Vohra. 1996. Cephalosporin modification: An extracellular glutaryl-7-ACA acylase from *Bacillus* sp. *Biotech. Lett.* **18**: 965-968.
36. Sudhakaran, V.K., B.S. Deshpande, S.S. Ambedkar, and J.G. Shewale. 1992. Molecular aspects of penicillin and cephalosporin acylases. *Process Biochem.* **27**: 131-143.
37. Yamada, H., Y. Ishii, Y. Noguchi, T. Miura, T. Mori, and Y. Saito. 1996. Protein engineering of a cephalosporin C acylase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **799**: 74-81.
38. 강용호. 1998. 베타락탐 항생제의 생합성 및 대사공학. *생물산업* **11**: 11-21.
39. 김대원, 윤기홍. 1997. 분리균주 *Pseuomonas diminuta* KAC-1의 Glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase와 유전자 발현 및 이용. *한국산업미생물학회 프로시딩*(10월 25일), 268-277.