

고정화 효소를 이용한 7 α -hydroxycephalosporin C의 합성

김정근* · 강희일 · 박영훈¹ · 최용진² · 이종욱

유한양행 중앙 연구소, ¹생명공학 연구소, ²고려대학교 생명 공학원

Cephamicin C를 생산하는 몇가지 균주를 사용하여 cephalosporin C로부터 7 α -hydroxycephalosporin C로의 전환력을 조사하였다. 이들 균주중에서 cephalosporin 7 α -hydroxylase의 활성은 *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064가 가장 높게 나타났다. *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064로부터 얻은 조효소액을 정제한 후 activated DEAE-sephacel 레진에 고정화하여 기질인 cephalosporin C로부터 7 α -hydroxycephalosporin C를 생산하였다. 고정화에 의해서 생성된 물질을 ESI-Mass로 측정된 결과, 분자량 431로 나타났다. 또한 ¹H NMR 분석에 의해 고정화 효소에 의해 생성된 물질은 cephalosporin C로부터 얻어진 7 α -hydroxycephalosporin C임을 확인하였다.

Key words □ cephalosporin 7 α -hydroxylase, cephamycin C, 7 α -hydroxycephalosporin C, hydroxylation, *Streptomyces clavuligerus*

곰팡이인 *Cephalosporium acremonium*에 의한 β -lactam 생합성 과정은 cephalosporin C에서 종료 되지만 *Streptomyces*, *Nocardia* 등의 몇몇의 방선균들은 생성된 cephalosporin류를 7 α -methoxycephalosporin 유도체인 cephamycin류로 전환시키는 것으로 알려져 있다(7).

방선균류에 의한 cephalosporin류의 7 α -methoxylation 과정은 2 단계로 진행되는데, 이는 먼저 cephalosporin 7 α -hydroxylase에 의해 7 α -hydroxycephalosporin으로 전환되고(8,10) 다시 methylation에 의해 7 α -methoxycephalosporin가 생성되는데(Fig. 1), 이 반응중에 첨가되는 methoxy기는 산소 분자와 S-adenosylmethionine (SAM)으로부터 공급된 것으로 밝혀졌다(5,6). 한편 O'Sullivan등(5)은 *S. clavuligerus*의 조효소액을 이용하여 cephalosporin C로부터 methoxy기의 도입을, Hood 등(4)은 methoxylation 시 중간 물질인 7 α -hydroxycephalosporin C 존재를 확인하였다.

Cephamicin류는 bacterial cell wall 합성에 관여하는 transpeptidase에 대한 inhibitor로의 작용(2), β -lactamase에 대한 내성이 큰 구조적 특징(3), 임상적으로 중요한 β -lactam 내성 그람음성 세균에 대한 좋은 활성등으로 새로운 7 α -methoxycephalosporin 유도체들을 개발하고자 하는 많은 연구가 있었다. 따라서 많은 연구자들은 반합성 cephamycin항생제의 중간 원료 물질인 cephamycin류의 생산량을 증가시키고자 균주 개량, 발효, 유전자 조작, 생물전환 연구를 수행하였다. 그러나 방선균으로부터 발효에 의한 cephamycin 생산수율은 곰팡이로부터 생산되는 cephalosporin C에 비하여 상당히 낮은 수준에 있다. 또한 화학적인 방법에 의한 7 α -methoxylation은 6~7단계의 복잡하고 까다로운 공정을 필요로 하여 합성 수율이 낮은 뿐 아니라 고가

의 시약을 사용하므로서 제조 원가가 높고 독성물질(PbO₂, lithium methoxide, Hg)의 잔류, 유기 용매 폐기물 처리비용 증가 등의 문제점을 갖고 있다(11).

7 α -methoxylation의 합성 공정을 생물전환 기술로 대체가 요구되더라도 불구하고 지금까지 고정화 효소 반응에 의해 cephalosporin C로부터 7 α -hydroxycephalosporin C로의 전환에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 cephamycin C 생산 방선균으로부터 cephalosporin 7 α -hydroxylase를 생산하기 위해 균주를 선정한 후 이로부터 생산된 효소를 정제 및 고정화하여 고정화 효소 반응에 의해 생성된 반응산물인 7 α -hydroxycephalosporin C의 구조 확인, 부산물의 생성 여부 및 정제 공정의 개발 가능성등을 검토하고자 하였다.

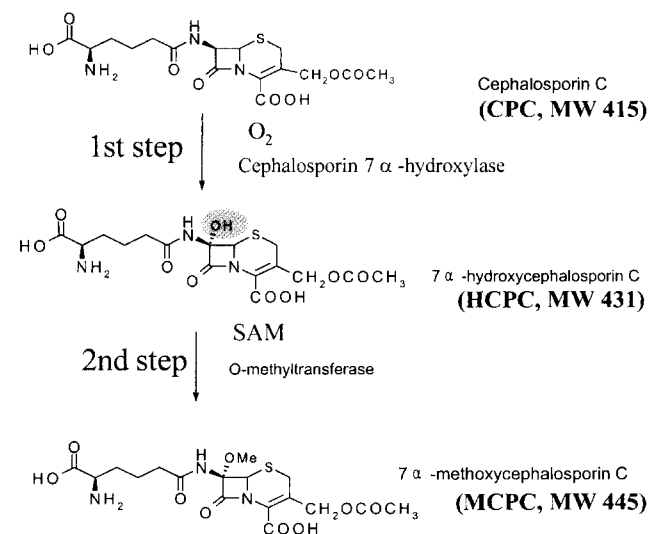


Fig. 1. Pathway for the methoxylation of cephalosporin C by enzyme.

*To whom correspondence should be addressed.
 Tel: 031-452-4111, Fax: 031-456-4418
 E-mail: drugkim2@hanmail.net

재료 및 방법

균주

본 실험에는 *S. clavuligerus* ATCC 27064를 포함한 5 균주를 사용하였다(Table 1).

배양 및 조효소액(cell free extracts)의 제조

5종의 cephamycin 생산 균주는 조효소액 제조를 위해 Tryptic soy broth (starch 1%, glucose 0.5% 첨가)에서 30°C, 100 ml/500 ml flask, 230 rpm (NBS 4330 shaker)으로 40시간 배양하였다. 배양액은 여과지를 사용하여 여과하였으며 수집된 균체에 4 ml의 0.1 M MOPS (3-N-[Morpholino] propanesulfonic acid) buffer (pH 7.4)를 첨가한 후 Branson sonicator를 사용하여 얼음물 속에서 총 1분간 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 원심분리(40,000 g, 30 min, 4°C)하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 제조된 조효소액은 Bradford법에 따라 정량하였고, 약 10-25 mg/ml의 protein을 포함하였다.

효소 반응

Cephalosporin 7 α -hydroxylase의 효소 반응은 0.1 ml FeSO₄ · 7H₂O (10 mM), 0.1 ml L-ascorbic acid (10 mM), 0.1 ml sodium α -ketoglutarate (20 mM), 0.1 ml cephalosporin C (4400 μ g/ml), 0.2 ml cell free extract, 0.4 ml MOPS buffer(0.1 M, pH 7.4)를 가하여 총 1.0 ml를 반응구로 하였다. 반응은 28°C, water bath shaker (NBS G-76, USA)에서 230 rpm으로 격렬하게 진탕하면서 20분간 행하였고, acetic acid를 30 μ l 첨가하여 효소반응을 정지시켰다. 시료를 원심 분리(9,800 \times g, 3분)하여 침전 물질을 제거한 후 상등액을 HPLC로 분석하였다.

반응산물의 분석 및 구조 분석

효소반응 후 acetic acid를 가하여 침전시킨 후 원심 분리하여 얻은 상등액을 Jasco (UV-975, PU-980, AS-951) HPLC system을 사용하여 분석하였다. 분석시 컬럼은 μ Bondapak C₁₈ (3.9 \times 300 mm, Waters), 이동상은 0.2 M NaH₂PO₄ (pH 4.0), 검출 파장은 260 nm, 유속은 1.2 ml/min, 주입량은 20 μ l 이었다.

고정화 효소에 의해 생성된 7 α -hydroxycephalosporin C는 Flash 40 S system을 이용하여 정제를 행한 후 Electrospray ionization-Mass LC/MSD (Hewlett Packard 1100 series, USA)를 사용하여 분자량을 측정하였다. Source는 ESI, ion mode는 positive, 압력은 40 psi, drying gas 온도는 350°C, drying gas의 유속은 10 ml/min, fragmentor는 60 V의 조건으로 분석하였다. Proton NMR spectrum은 Bruker AMX 500 (500 mHz, 독일)을 이용하여 측정하였다. NMR 측정을 위한 시료는 D₂O에 녹여 5 mm NMR tube에서 측정하여 비교 분석하였다.

효소역가

효소의 역가 1 unit는 기질인 cephalosporin C (90% Sigma chemical Co.)로부터 1 분간, 1 μ g의 7 α -hydroxycephalosporin C를 생성하기 위해 요구되는 효소양으로 정하였다. Specific

activity (U/mg protein)는 단백질 1 mg의 역가로 하였다.

시판되는 7 α -hydroxycephalosporin C가 없어 생성된 1 μ g의 7 α -hydroxycephalosporin C와 1 μ g cephalosporin C의 HPLC peak area는 같다고 정의하였다.

Cephalosporin 7 α -hydroxylase 정제

발효조(30°C, 325 rpm, 0.5 vvm)에서 40시간 배양한 액(4 l)을 여과지를 사용하여 균체를 회수한 후, 약 200 ml MOPS buffer (0.1 M, pH 7.4)를 첨가한 후 얼음물 속에서 파쇄하여 약 230 ml의 조효소액을 조제하였다. 파쇄된 균체는 원심분리 (40,000 g, 30 min, 4°C)하여 상등액(HDL activity 4,898 U, total protein 2,970 mg)을 취하여 정제에 사용하였다.

효소의 정제는 4-6°C 냉장실에서 수행되었으며 모든 buffer와 레진은 충분히 탈기한 후 사용하였다. Cephalosporin C 7 α -hydroxylase의 정제는 DEAE-sephacel, Ammonium sulfate 침전, Sephadex G-75 gel filtration, Affigel blue chromatography를 순서적으로 사용하여 정제하였다(9).

고정화 효소 제조와 반응

DEAE-sephacel (Sigma Chemical Co.)과 Modified XAD-7은 10% glutaraldehyde를 첨가하여 4°C, 150 rpm으로 2시간 교반한 후 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)로 충분히 세척하여 활성화하였다. Modified XAD-7는 23 g의 XAD-7 (Rohm and Hass Co.)에 180 ml의 1,2-diaminoethane을 첨가하여 110°C, 150 rpm에서 8시간 반응을 한 후 증류수와 메탄올로 세척한 후 여과하여 제조하였다(1). Eupergit C (Sigma chemical Co.), CNBr activated sepharose 4 B (Pharmacia Biotech.), Affigel blue (Bio-Rad Lab.)는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 충분히 세척한 후 사용하였다.

고정화 효소 제조는 조효소액으로부터 Sephadex G-75까지 순차적으로 정제된 효소액(150 U, 5.7 mg protein)을 6°C, 15시간 교반하면서 활성화된 레진에 결합한 후 0.5 M NaCl로 세척하여 사용하였다.

고정화 효소의 반응은 5 g의 고정화된 효소에 3 ml FeSO₄ · 7H₂O (10 mM), 3 ml L-ascorbic acid (10 mM), 3 ml sodium α -ketoglutarate (20 mM), 3 ml cephalosporin C (22,000 μ g/ml) 그리고 18 ml MOPS buffer (0.1 M, pH 7.4) 등 총 30 ml의 반응 용액을 100 ml의 baffle flask에 넣고 water bath shaker (G-76, USA)에서 28°C, 230 rpm으로 격렬하게 진탕하면서 20분간 행하였다.

결과 및 고찰

Cephalosporin 7 α -hydroxylase 생산 우수 균주의 선별

Cephalosporin 7 α -hydroxylase 생산 우수 균주를 선별하기 위하여 5종의 cephamycin 생산 방선균을 ATCC (America type culture collection)로부터 구입하여 조효소액을 제조한 후 cephalosporin 7 α -hydroxylase 활성을 비교하였다. *S. clavuligerus* ATCC 27064는 *S. lipmanii* ATCC 27357보다 cephalosporin 7 α -

hydroxylase specific activity가 30배 높은 것으로 나타나 cephalosporin C를 7 α -hydroxycephalosporin C로 전환하는 효소 생산용 균주로 선정하였다(Table 1).

Cephalosporin 7 α -hydroxylase의 분리 정제

S. clavuligerus ATCC 27064의 발효액(4 l)을 여과후 200 ml MOPS buffer (0.1 M, pH 7.4)를 첨가하여 ultrasonication에 의해 세포를 파쇄하고 이를 원심분리한 200 ml 조효소액으로부터 HDL을 정제한 결과는 Table 2와 같다. 정제된 효소는 전기 영동

Table 1. Comparison of cephalosporin 7 α -hydroxylase in cephamycin producing strains

| Strains | Cephalosporin 7 α -hydroxylase | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| | Specific activity (U/mg protein) | Relative specific activity (%) |
| <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 | 1.80 | 100 |
| <i>S. lipmanii</i> ATCC 3331 | 0.08 | 4.4 |
| <i>S. lipmanii</i> ATCC 27357 | 0.06 | 3.3 |
| <i>S. lipmanii</i> ATCC 43352 | 0.23 | 12.7 |
| <i>N. lactamdurans</i> ATCC 27382 | 0.11 | 6.1 |

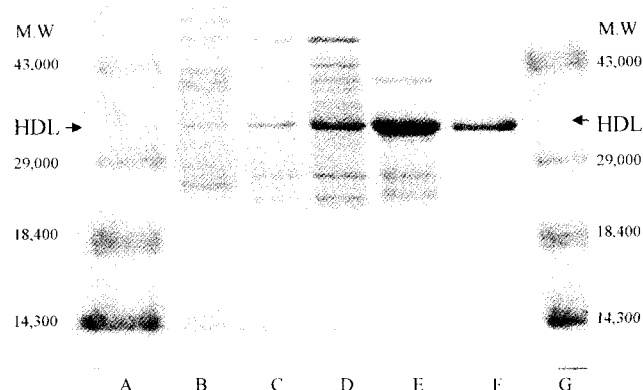


Fig. 2. SDS/PAGE fractions from different steps in the purification of cephalosporin 7 α -hydroxylase. A, G, Marker protein; B, Cell-free extract; C, DEAE-sephacel ion chromatography; D, Ammonium sulfate precipitate (25-65%); E, Sephadex G-75 gel filtration; F, Affi-gel blue chromatography.

Table 2. Purification steps of cephalosporin 7 α -hydroxylase from *S. clavuligerus* ATCC 27064

| Step | Total activity (U) | Total protein (mg) | Specific activity (U/mg) | Purification (fold) | Yield (%) |
|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|-----------|
| Cell-free extract | 4898.8 | 2970.4 | 1.7 | 1.0 | 100 |
| DEAE-sephacel | 1583.2 | 553.0 | 2.9 | 1.7 | 32.3 |
| Ammonium sulfate (25-65%) | 1250.0 | 245.0 | 5.1 | 3.1 | 25.5 |
| Sephadex G-75 | 356.2 | 13.5 | 26.3 | 15.9 | 7.3 |
| Affi-gel blue | 71.2 | 1.6 | 89.0 | 53.9 | 1.5 |

상 단일 단백질 band로 나타났으며 purification fold는 약 53.9, 최종 정제 수율은 1.5%로 순수한 HDL 0.8 mg을 얻었다. HDL의 분자량은 SDS-PAGE에서 약 32,000이었다. 전체 정제공정에 대한 각 단계별 SDS-PAGE결과는 Fig. 2와 같다.

Cephalosporin 7 α -hydroxylase 고정화 레진 선정

8 l의 배양액으로부터 제조된 400 ml의 조효소액을 사용하여 상기의 Sephadex G-75까지의 분리 공정으로 부분 정제된 cephalosporin 7 α -hydroxylase (150 U, 6 mg protein)을 각각의 레진(5 g, wet)에 고정화한 후 HDL의 역가를 평가하였다. 그 결과 activated DEAE-sephacel에 고정화된 HDL의 역가는 55.5 U로 가장 높게 나타나 activated DEAE-sephacel을 고정화 레진으로 선택하였다. 한편 Eupergit C에서의 단백질 흡착율은 48.7%, HDL 역가는 28.7 U를 나타내었고 activated XAD-7에서의 단백질 흡착율은 100% 이었지만 HDL 역가는 0 U로 나타났다(Table 3). 이 고정화 레진에 의해서 cephalosporin C로부터 생산된 반응산물을 HPLC로 분석한 결과, 부산물이 거의 없었으며 C₁₈ reverse phase 컬럼을 사용한 Flash 40 정제시에 고순도, 고수율 분리가 가능하였다.

Flash 40 system을 이용한 7 α -hydroxycephalosporin C의 분리 정제

고정화 반응후 얻어진 액을 여과하여 고정화 효소를 제거하고 이를 60°C에서 감압 농축기로 농축한 후 Flash 40 S (C₁₈ reverse phase resin, 135 grams, 4.0×15.0 cm, Biotage Co., 용출 용매 0.2 M NaH₂PO₄ (pH 4.0), 6 ml/min 유속으로 정제후 HPLC로 분석한 결과, 정제수율 85%, 정제순도 95% 이상으

Table 3. Immobilization of HDL on different carriers

| Resins | Protein adsorption (%) | Expression activity (U) | Expression ratio (%) |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|
| Activated XAD-7 | 100 | 0 | 0 |
| CNBr activated sepharose 4B | 100 | 0 | 0 |
| Affi-gel blue | 94.7 | 30.3 | 20.2 |
| Activated DEAE-sephacel | 100 | 55.5 | 37.0 |
| Eupergit C | 48.6 | 28.7 | 18.7 |

*HDL activity before immobilization: 150 U

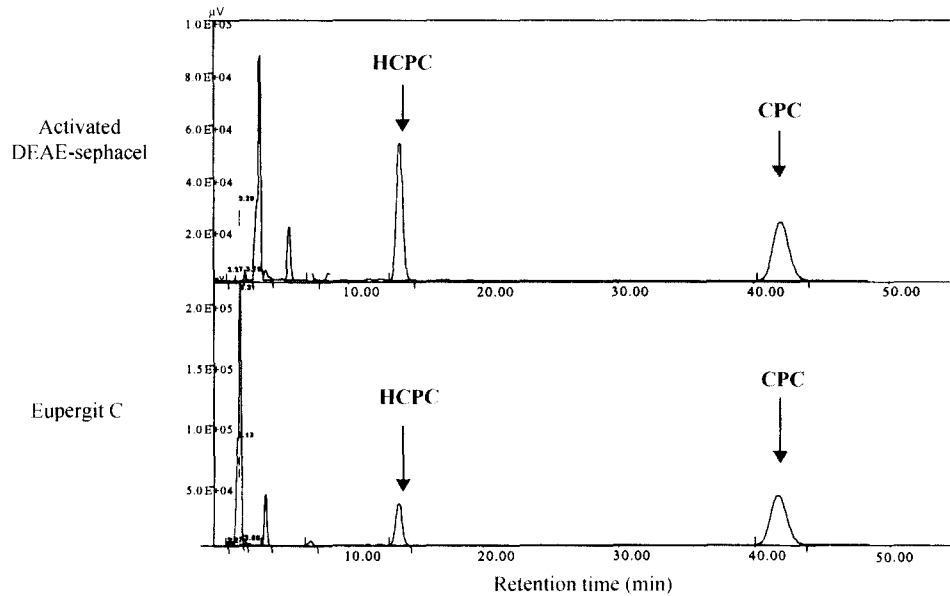


Fig. 3. Production of HCPC by immobilized HDL.

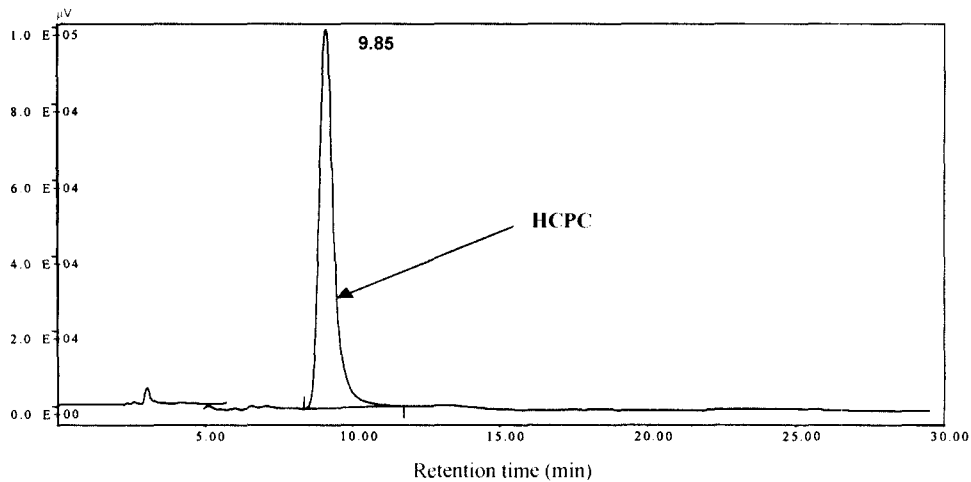


Fig. 4. Separation of 7 α -hydroxycephalosporin C from reaction mixtures.

로 정제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 물질을 SP-207 흡착 레진에 흡착후 증류수로 세척하고 10% 아세톤으로 용출하여 탈염을 한 후 동결 건조하여 구조 확인에 사용하였다.

효소전환으로 생성된 물질의 분자량 및 구조 확인

정제된 물질을 ESI-Mass를 이용하여 분자량을 분석한 결과 (Fig. 5), [M+H]⁺, [M+Na]⁺의 값이 각각 432, 454를 나타내었다. 따라서 효소 전환으로 생성된 물질은 기질인 cephalosporin C (분자량 415)로부터 효소반응에 의해 hydroxyl기가 도입되어 분자량이 16 증가한 물질로 전환되었음이 확인되었다. 또한 정제된 물질과 cephalosporin C를 D₂O에 용해한 후 30°C에서 ¹H-NMR (500 mHz, Bruker AMX)을 이용하여 비교하였다(Fig. 6).

Cephalosporin C는 2-H (3.29, 3.65 ppm), 6-H (5.1 ppm)와 7-H (5.6 ppm)가 관찰되는 반면 효소반응 산물은 2-H (3.29, 3.65 ppm), 6-H (5.1 ppm)는 존재하였지만 7-H (5.6 ppm)는 사라져 7 α -위치의 수소가 다른 분자로 치환되었음을 확인할 수 있었다. ESI-Mass와 ¹H-NMR의 결과로 고정화 효소에 의해 얻어진 물질은 기질인 cephalosporin C로부터 7 α -위치에 hydroxyl기가 도입됨에 의해 생성된 7 α -hydroxycephalosporin C임을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 산업 자원부에서 시행한 공업 기반 기술 사업(과제번호: 981-34-05) 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

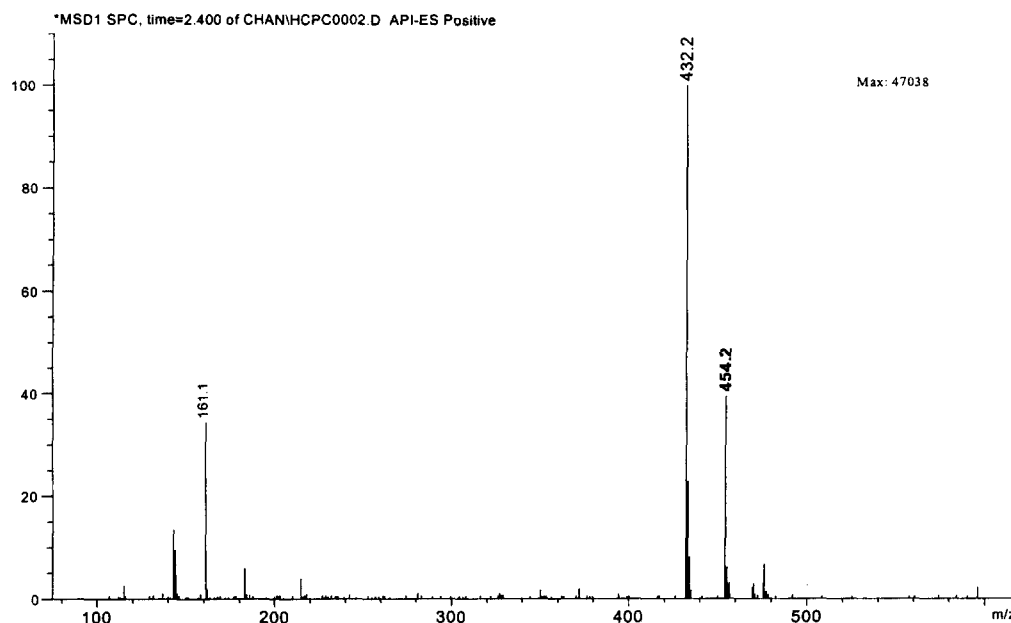


Fig. 5. Electrospray ionization-Mass spectrum of purified 7 α -hydroxycephalosporin C. (Positive ions mode, 40 psi, 350°C, 10 ml/min, 60 V).

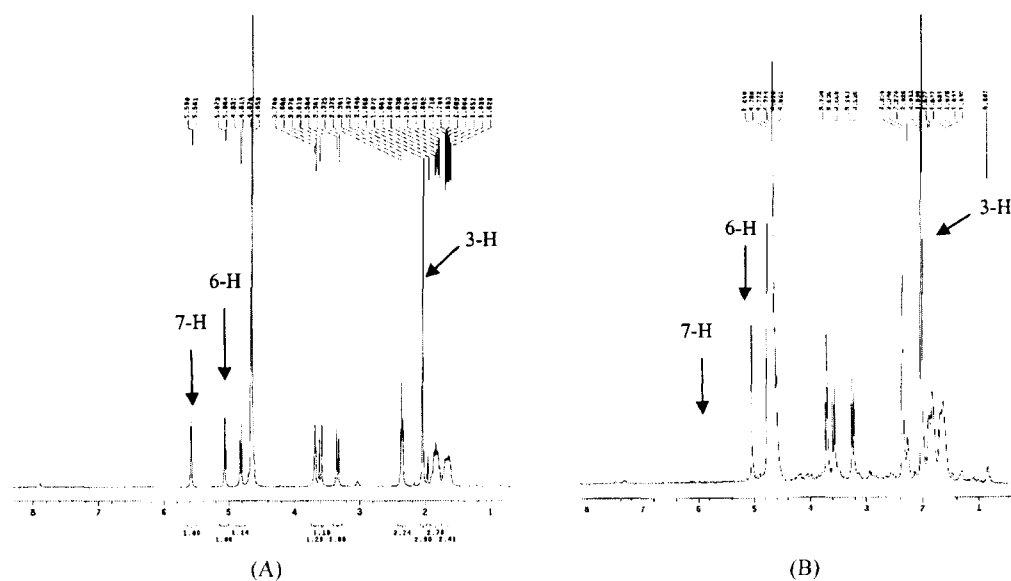


Fig. 6. ^1H NMR spectrum of cephalosporin C and purified 7 α -hydroxycephalosporin C in D_2O . (A), Cephalosporin C; (B), 7 α -hydroxycephalosporin C.

참고문헌

- 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.
- Daoust, D.R., H.R. Onishi, H. Wallick, D. Hendlin, and E. O. Stapley. 1973. Cephamycins, a new family of β -lactam antibiotics: antibacterial activity and resistance to β -lactamase degradation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3, 254-261.
- Ho, P.P.K., R.D. Towner, J.M. Indelicato, W.J. Wilham, W.A. Spitzer, and G. A. Koppel. 1973. Biochemical and microbiological studies on 7 α -methoxycephalosporins. *J. Antibiot.* 26, 313-314.
- Hood, J.D., A. Elson, M.L. Gilpin, and A.G. Brown. 1983. Identification of 7 α -hydroxycephalosporin C as an intermediate in the methoxylation of cephalosporin C by a cell free extract of *S. clavuligerus*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1187-1188.
- O'Sullivan, J. and E.P. Abraham. 1980. The conversion of cephalosporins to 7 α -methoxycephalosporins by cell-free extracts of *S. clavuligerus*. *Biochem. J.* 186, 613-616.

6. O'Sullivan, J., R.T. Aplin, C.M. Stevens, and E.P. Abraham. 1979. Biosynthesis of a 7 α -methoxycephalosporin: Incorporation of molecular oxygen. *Biochem. J.* 179, 47-52.
7. Martin, J.F. 1981. Biosynthesis of metabolic products with antimicrobial activities: β -lactam antibiotics, p. 417-424. In Schaal/pulverer(ed.), *Actinomycetes*. Fisher, Stuttgart.
8. Xiao, X., G. Hintermann, A. Hausler, P.J. Baker, A.L. Demain, and J. Piret. 1993. Cloning of a *Streptomyces clavuligerus* DNA fragment encoding the cephalosporin 7 α -hydroxylase and its expression in *Streptomyces lividans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 84-88.
9. Xiao, X., S. Wolf, and A.L. Demain. 1991. Purification and characterization of cephalosporin 7 α -hydroxylase from *S. clavuligerus*. *Biochem. J.* 280, 471-474.
10. Xiao, X., R.J. Bowers, H.S. Shin, S. Wolfe, and A.L. Demain. 1991. Non-radioactive assay and HPLC analysis of cephalosporin C 7 α -methoxylation by cell-free extracts of *S. clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 793-797.
11. Yanagisawa, H.M. Fukushima, A. Ando, and H. Nakao. 1976. Synthesis of 7 α -substituted cephalosporins. V. Novel oxidation procedure for synthesis of 7 α -methoxycephalosporins and 6 α -methoxypenicillins. *J. Antibiot.* 24, 969-975.

(Received May 14, 2001/Accepted June 12, 2001)

ABSTRACT: Synthesis of 7 α -Hydroxycephalosporin C by Immobilized Enzyme

Jeoung-Keun Kim*, Heui-il Kang, Young-Hoon Park¹, Yong-Jin Choi², and Jong-Wook Lee (Yuhan Research Institute, Kunpo 435-715, ¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Taejeon 305-600, ²Graduate school of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

The conversion of cephalosporin C to 7 α -hydroxycephalosporin C was examined with the cell-free extract of several cephamycin producing strains. *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 was the most potent strain for the activity of cephalosporin 7 α -hydroxylase. Partially purified and immobilized cephalosporin 7 α -hydroxylase with resins were used to synthesize 7 α -hydroxycephalosporin C from the substrate, cephalosporin C. The molecular weight of the product isolated from the reaction mixture were determined to be 431 by ESI-Mass. ¹H NMR also support the conversion of cephalosporin C to 7 α -hydroxycephalosporin C by immobilized enzyme.