

페니실린과 세파로스포린系 抗生劑의 生合成

金 慶 子 · 具 洋 謨

서울대학교 藥學大學

(Received July 25, 1983)

Kyoung Ja Kim and Yang Mo Goo

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Biosynthesis of Penicillins and Cephalosporins Antibiotics

Abstract—Penicillins and cephalosporins are biosynthesized from L- α -amino adipic acid, L-cysteine and L-valine. A tripeptide, LLD- δ -(α -amino adipyl)cysteinylvaline(LLD-ACV) was isolated from fermentation broths of *Cephalosporium acremonium* as well as of *Penicillium chrysogenum* and it was proved that the LL- δ -(α -amino adipyl cysteine was formed first in mycelia, to which valine would be connected to give LLD-ACV. However, several points are still unsolved; first, what mechanism is involved in the configurational change from L-valine to D-valine, second, what kind of cyclization mechanism gives a β -lactam ring and a thiazolidine ring and third, what is the pathways for the ring expansion from penicillins to cephalosporins. At present, it seems clear that LLD-ACV is cyclized to give isopenicillin N, which is transformed to penicillin N and further to cephalosporin C. Other hydrophobic penicillins, including benzyl penicillin and penicillin V, are formed from isopenicillin N by acyl-exchange reactions catalyzed by penicillin transferase, rather than by acylation reaction on 6-aminopenicillanic acid(6-APA), which was isolated from the fermentation broth of *P. chrysogenum* and which would be formed by hydrolysis of δ -(α -amino adipyl)amido moiety at the C-6 position in isopenicillin N or penicillin N by penicillin acylase. Acylation of 6-APA is catalyzed also by penicillin acylase, but the reaction is proved not to be involved in penicillin biosynthesis. Understanding the biosynthesis of penicillins and cephalosporins would provide solutions to increase in fermentation yields of penicillins, especially of cephalosporins and a solution to biological production of 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) which is of importance in pharmaceutical industry. Still regulation mechanisms in penicillin and cephalosporin biosynthesis are unveiled at all.

1929년에 Fleming에 의하여 발견된 페니실린이 1940년대부터 항균제로 임상에 사용되었으며, 페니실린에 관계되는 화학적인, 생물학적인 연구가 다방면으로 진행되어 왔다.^{1,2)} 페니실린계통의 β -lactam 항생제가 항균 효력이 넓고 강할 뿐 아니라 독성이 거의 없고 상품으로서 매우 중요하여 조그만 β -lactam 구조를 중심으로 하는 유기화학적인 연구는 커다란 sensation을 불러 일으켜 왔다. 병균에 의한 질병에 페니실린계통의 약이 현재 60% 이상 사용되고 있어서 페니실린이나 cephalosporin에 대한 생물학적인 연구도 매우 중요한 위치를 차지하여 왔다. 특히 시중에 팔리고 있는 β -lactam 항생제들은 발효공학에 의하여 얻은 페니실린 G나 cephalosporin C, 또는 다른 몇몇 β -lactam 항생제들에서 부터 일정한 유기화학적인 변형과정에 의하여 생산되고 있어서 이 약들의 원료가 되는 페니실린 G나 cephalosporin C의 발효문제는 공업적으로 매우 중요하다. 지금 현재 페니실린 G는 *Penicillium chrysogenum*의 산업종들의 1l broth 배양에서 약 50g이 생산되는데 cephalosporin C의 경우는 약 10g 정도가 생산되고 있다.³⁾ Cephalosporin C의 경우는 모두

α -aminoadipyl결가지를 가지고 있는 유도체로 생산되는데, 페니실린 G와는 달리 이 결가지 제거에 더 많은 공정과정이 필요하다. 그리하여 cephalosporin C를 더 싸게 효율적으로 생산시키는 문제는 아직까지도 중요한 연구 과제가 되어 있다. 최근에는 유전공학을 cephalosporin 계통의 항생제 생산에 응용할 가능성도 매우 다양하게 추구되고 있다. Cephalosporin의 생산에 대한 유전공학을 응용하기 위해서는 무엇보다 먼저 cephalosporin 생합성 과정에 대한 연구가 필요한데, 특히 페니실린 N을 생산하지 않는 organism의 개발이나 aminoadipyl기 대신에 다른 결가지를 가진 cephalosporin의 생산문제나, 또는 효소를 사용하여 aminoadipyl기를 제거시키는 문제는 cephalosporin을 생산하는 많은 회사의 중요한 연구 과제가 되고 있다. 페니실린이나 cephalosporin C의 생합성 과정은 매우 오랫동안 연구되어 왔으나 아직도 많은 부분이 알려지지 않고 있다. 특히 페니실린이나 cephalosporin의 핵은 같은 생합성 과정에 의하여 형성된다고 생각되고 있다. 그러나 최근에 clavulanic acid⁴⁻⁶⁾, thienamycin^{7,8)}을 비롯한 많은 종류의 olivanic acid들이 자연에서 발견되었는데⁹⁻¹³⁾, 이들 β -lactam항생제들은 페니실린이나 cephalosporin과는 다른 새로운 과정에 의해 생합성되는 것으로 생각된다.^{4,5,14,15)}

Penicillin은 *P. notatum*과 *P. chrysogenum* 등을 포함한 몇가지 *Penicillium* mold에서, 그리고 *Aspergillus*, *Malbranchea*, *Cephalosporium*, *Emercellopsis*, *Paecilmyces*, *Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Anizopis*, *Arachmomyces*, *Diheterospora*, *Scopulariopsis*, *Spirodium* 등의 eukaryotic organism과 prokaryotic organism인 *Streptomyces*에서 발견되었다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 페니실린은 일반적으로 hydrophobic 페니실린과 hydrophilic 페니실린으로 크게 나눌 수 있는데, hydrophobic 페니실린으로는 benzyl

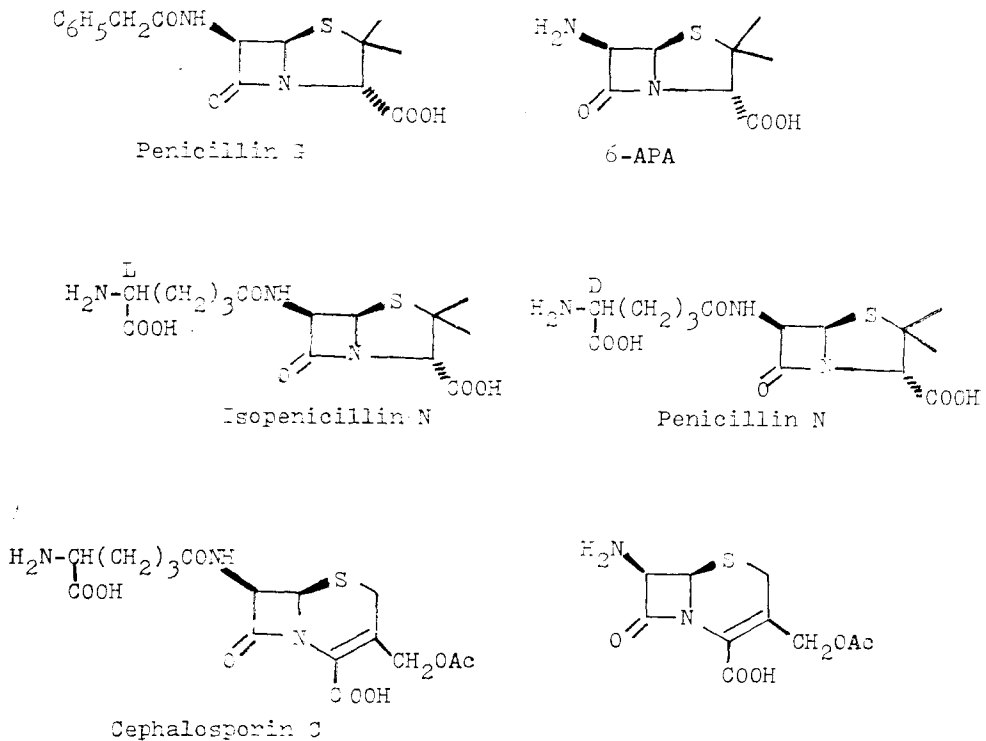


Fig. 1—The structures of penicillin G, penicillin N, isopenicillin N, 6-APA, cephalosporin C and 7-ACA.

페니실린을 포함한 α -aminoadipyl기를 가지고 있지 않는 페니실린이 여기에 속하며, hydrophilic 페니실린은 α -aminoadipyl기를 갖는 페니실린 N이나 isopenicillin N이 여기에 속한다. Hydrophilic 페니실린인 penicillin N을 생성시키는 미생물은 결코 hydrophobic 페니실린을 생성시키지 않으며, hydrophobic 페니실린을 생성시키는 organism을 성장시킨 broth에서 hydrophilic 페니실린인 isopenicillin N이 매우 소량 발견되었다.^{19,20)} Eukaryotic organism인 *Penicillium*, *Cephalosporium* sps.들과 *Aspergillus* sps.들을 포함한 다른 fungi들은 benzylpenicillin과 2-pentenylpenicillin 등과 같은 비극성 결가지를 가진 penicillin과 δ -linked-L- α -aminoadipyl결가지를 가진 isopenicillin N^{21,22)}을 생성시키는데²³⁾, 페니실린의 결가지가 될 precursor를 미디어에 첨가시키지 않을 때는 6-aminopenicillanic acid(6-APA)를 생성시킨다.²⁴⁾ *Cephalosporium* sp.들은 D- α -aminoadipyl 결가지를 가진 penicillin N²⁵⁾과 cephalosporin C²⁶⁾를 생성시키는데, 이들은 non-polar한 결가지를 가진 penicillin, 6-APA나 7-aminocephalosporanic acid(7-ACA)는 생성시키지 않는 것으로 알려져 있다.

1971년 전에는 cephalosporin을 생성시키는 organism들로는 *Cephalosporium*, *Emercellopsis* sps.들에 국한되었으나 최근에는 *Anixiopsis*, *Arachnomyces*, *Diheterospora*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, *Spiroidium* 그리고 *Streptomyces* sps.들도 cephalosporin이나 이의 유도체들을 생성시키는 것으로 보고 되었다.²⁷⁻²⁹⁾ Eli Lilly³⁰⁾와 Merck회사³¹⁾에서 prokaryotic organism인 *Streptomyces* sp.들도 cephalosporin 유도체를 생성시키는 것을 발견하였는데, 이들은 penicillin N과 cephalosporin C의 C-7 위치에 수소대신 methoxy기가 치환되고 C-10 위치에 acetyl기 대신에 carbamoyl기나 α -methoxy-*p*-hydroxycinnamoyl기를 가진 cephamycin을 생합성 한다.

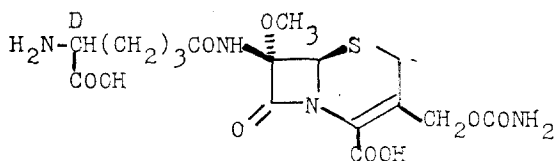


Fig 2—The structure of cephamycin C

Penicillin N과 cephalosporin C를 생성하는 organism들을 조사하여 보면 cephalosporin C를 생성하는 fungi나 *Streptomyces* sps.들은 항상 penicillin N을 생성하나 penicillin N을 생성하는 모든 organism들은 항상 cephalosporin C를 생성하지는 않는다. 이러한 관계는 *Cephalosporium* 속의 변이종에서 더욱 명백해졌는데, penicillin N-positive이고 cephalosporin C-negative인 변이종은 발견되었으나 penicillin N-negative이고 cephalosporin C-positive인 변이종은 발견되지 않았다. 이런 사실에서 보면 cephalosporin C와 penicillin N은 모두 같은 생합성과정에 의하여 얻어지며, isopenicillin N이 먼저 생성되고 이 isopenicillin N이 penicillin N으로 epimerization되고³²⁾, cephalosporin C는 penicillin N에서 생성되고, 그리고 isopenicillin N의 acyl기가 치환되어 penicillin G나 다른 hydrophobic한 penicillin으로 생합성되는 것으로 생각된다. 그러나 아직도 페니실린이나 cephalosporin의 생합성에 대해서는 많은 의문점이 남아 있다. 최근 Demain은 *Cephalosporium* sp.의 cell free extract를 사용하여 penicillin N을 cephalosporin C로 변형시켰지만 아직도 다른 단순한 페니실린들을 생물공학적으로 cephalosporin 유도체로 효율적으로 바꿀 수 있는 가능성은 매우 희박하다.

현재 페니실린과 cephalosporin 생합성 과정에 대한 넓은 측면을 고려하여 볼때, cephalosporin 제통의 약 생산에 원료가 되는 7-ACA를 cephalosporin C를 생성시켜서 이를 분리하여 유기화학적 반응에 의하여 얻지않고, 페니실린 G와 같이 7-위치의 acylamido기의 precursor가 되는 물질을 직접 배양액에 가하여 cephalosporin 항생제 약들을 얻든지 또는 6-APA의 생산과 같이 효소

를 이용하여 cephalosporin C를 가수분해 시켜서 7-ACA를 얻을 수 있는 방법의 개발에는 여러 가지 풀지 못한 문제들이 남아 있지만, 이들 공정과정의 개발은 β -lactam 항생제를 생산하는 많은 회사들의 주요한 관심이 되고 있다.³³⁾ 초기에 페니실린이나 cephalosporin의 생합성에 관한 연구는 이들의 생산효율도를 증가시키기 위한 조직적인 연구에서 비롯되었다.

페니실린과 Cephalosporin 항생제들의 생합성 Precursor들

초기에 동위원소를 사용하여 페니실린과 cephalosporin 항생제들의 생합성 precursor들을 조사하였을 때, penicillin은 *P. chrysogenum*에 의해 cystein, valine과 결합자가 될 carboxylic acid로부터 생합성되고³⁴⁾, penicillin N, cephalosporin C와 cephamycin들은 각각 *Cephalosporium acremonium* 또는 *Streptomyces clavuligerus*에 의해 α -aminoadipic acid, cystein과 valine들에서 부터 β -lactam의 기본 골격이 생합성 된다는 것이 밝혀졌다.^{35,36)} Cephalosporin C의 C-10 위치의 acetoxy기의 acetyl기는 acetate에서 부터, 그리고 cephamycin의 7-methoxy기의 methyl기는 methionine에서 부터 유래된다는 것이 알려져 있다.³⁷⁻³⁹⁾ 일반적으로 eukaryote의 β -lactam항생제 생산 organism에서는 α -aminoadipic acid가 lysine생합성의 중간체임에 반해 prokaryote에서는 이것이 lysine에서 부터 생성되고 있다.³⁷⁻³⁹⁾

동위원소 희석(isotopic dilution)실험을 포함한 동위원소 아미노산을 사용한 실험에서 penicillin의 D-valine 부위는 L-valine에서, 그리고 penicillin N, cephalosporin C 또는 cephamycin들의 C-7 위치의 amino기의 D- α -aminoadipyl 결합자는 L- α -aminoadipic acid에서 부터 생합성됨이 밝혀졌다.⁴⁰⁻⁴²⁾ 현재에도 어느 단계에서 이 L-아미노산이 D-configuration으로 바뀌는가 하는 문제는 해결되지 못하고 있다.

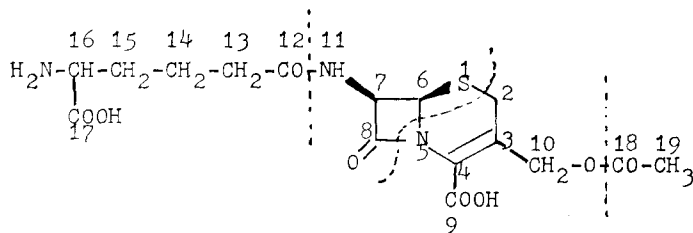


Fig. 3—Numbering on cephalosporin C and its building blocks.

a. Valine

D, L-valine-1-¹⁴C의 L형이 D형보다 훨씬 빨리 penicillin이나 cephalosporin에 incorporation되는 때, 이는 L-valine이 D-valine보다 페니실린이나 cephalosporin의 더 나은 precursor라고 생각할 수 있으나, 달리는 L-valine보다 D-valine이 mycelium에 천천히 흡수되지만 더 빨리 페니실린이나 cephalosporin에 incorporation될 가능성도 있다. L-valine이 D-valine보다 훨씬 빨리 흡수된다는 것이 밝혀져 있다.⁴²⁻⁴³⁾ 그리고 D, L-valine을 feeding시켜 얻은 protein의 valine을 분석한 결과 모두 L-valine이었는데⁴¹⁾ 이는 penicillin에만 D-valine이 존재하고 단백질 합성에는 L-valine만이 이용됨을 알 수 있다. ¹⁵N-L-valine이 penicillin분자의 valine 부분에 incorporation되는 속도와 mycelial protein으로 전환되는 속도가 동일함이 증명되었는데⁴¹⁾, 이는 valine에서 ¹⁵NH₂가 떨어져 나오지 않고 configuration이 변화됨을 의미하고 있다. ¹⁵N-L-valine은 benzylpenicillin의 N-4 위치에만 incorporation됨이 ¹⁵N NMR spectroscopy에 의하여 증명되었다.⁴⁴⁾ 이 실험에서

L-valine이 페니실린에 incorporation될 때 질소원자가 retention되는 것도 증명되었다. 또 ^{15}N -D, L-valine과 $2\text{-}^{14}\text{C}$ -D, L-valine을 동시에 benzylpenicillin에 incorporation시키면 ^{15}N 의 회색도가 ^{14}C 의 회색도보다 상당히 높았는데^{45,46)}, 이는 D-valine이 L-configuration으로 변화된 후에 페니실린에 incorporation 되는데 이 configuration 변화과정에서 어느정도 회색이 일어났을 의미하고 있다.

Benzylpenicillin은 일반적으로 phenylacetic acid, cystein, valine으로 대사되고 valine은 다시 glycine과 acetone, 또는 isopropanol로 대사된다는 것이 알려져 있어서^{47,48)} 페니실린의 valine moiety가 glycine과 acetone 혹은 isopropanol에서 생합성 될 가능성이 있다. 더구나 washed *P. chrysogenum*에 이들을 가하여 주었을 때 다량의 valine이 생성되었으며, 이 organism에 cystein이나 valine을 첨가시킨 것보다 acetone, isopropanol 혹은 glycine을 첨가시킨 media에서 benzylpenicillin을 더 많이 생산하였다.⁴⁸⁾ 이 결과에서 valine이 penicillin으로 incorporation될 때 glycine과 acetone으로 분해된 후 thiazolidine고리의 D-valine부분으로 재결합되는 것으로 제안하였다 (Fig. 4 참조).

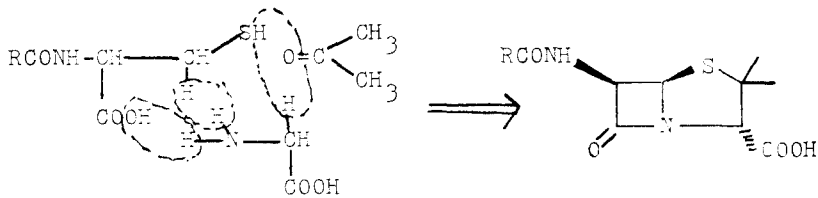


Fig. 4—A hypothetical biosynthetic pathway to penicillins.

그러나 $2\text{-}^{14}\text{C}$ -D, L-valine이나 $(\text{U-}^{14}\text{C})\text{-L-valine}$ 이 penicillin의 valine부분으로 95%이상 incorporation되는 것으로 보아 valine의 골격이 깨어지지 않고 그대로 incorporation되고 있음을 암시하고 있어서^{45,46)} 이 가정은 페니실린 생합성의 주된 pathway가 되지 않음이 명백하다. Cephalosporin 생합성 연구에서도 $1\text{-}^{14}\text{C}$ -D, L-valine이 *Cephalosporium* sp.에 의해 cephalosporin C의 valine부분에 90%정도 incorporation되고 나머지 10%의 ^{14}C 은 α -aminoadipic acid와 cystein 부분에 존재함을 보고 하였다.⁴⁹⁾

$2\text{-}^3\text{H}$ -D-혹은 L-valine을 $(\text{U-}^{14}\text{C})\text{-L-valine}$ 혹은 $1\text{-}^{14}\text{C}$ -D-valine과 혼합하여 feeding 시킬때 valine의 C-2 위치의 tritium이 페니실린 생합성 과정에서 제거됨이 밝혀졌다.⁵⁰⁾ 또한 α -수소치환 반응에 의하여 $2, 3\text{-}^3\text{H}_2\text{-L-valine}$ 에서 $3\text{-}^3\text{H}$ -D, L-valine을 얻어 $1\text{-}^{14}\text{C}$ -D, L-valine과 함께 phenoxy-methylpenicilline에 incorporation시키면 tritium은 ^{14}C 이 incorporation되는 양의 2% 정도만 남아 있는 것으로 나타난다⁵¹⁾ 것을 보면 valine의 C-2 위치와 C-3 위치의 수소가 모두 제거되는데, 이때 valine이 penicillin으로 변형될 때 수소가 C-3에서 C-2로 분자내 shift할 가능성도 배제되고 있다 (Fig. 5). 즉 페니실린 생합성에 있어서 이러한 hydrogen shift에 의하여 valine의 C-2 위치의

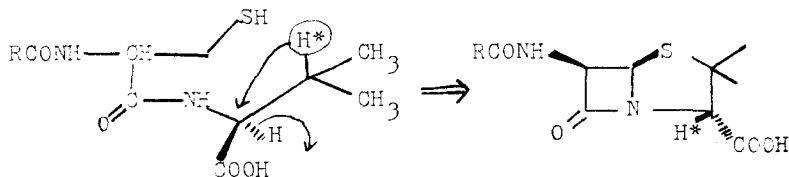


Fig. 5—A possible hydrogen shift during penicillin biosynthesis.

configuration이 inversion 되어서 L에서 D-configuration되는 과정은 배제할 수 있다.

Sih 연구실과 Lilly 실험실에서 penicillin의 생합성에서 valine의 methyl기의 6개의 수소가 모두 유지된다는 것을 밝혔다.⁵²⁾ D,L-valine-methyl-d₆를 *P. chrysogenum*에 feeding시켜 phenoxymethylpenicillin을 얻어서 이의 methyl ester로 mass spectrum을 얻었는데, 강한 intensity의 이온이 m/e 174와 함께 이온 m/e 174의 intensity의 약 20%에 해당하는 새로운 이온이 m/e 180에 나타났다.^{53,54)} 이 mass spectrum에서 m/e 174와 m/e 180 사이에 다른 유의할 만한 이온들이 나타나지 않는 것으로 미루어 페니실린 생합성에 있어서 isodehydrovaline을 가진 중간체(Fig. 7)는 존재하지 않는다고 간주할 수 있다. 또 D,L-valine-d₆를 *C. acremonium*의 washed cell에 feeding시켜 주면 penicillin N에서는 6개의 중수소가 모두 유지되었고 cephalosporin C에서는 d₄유도체가 약 1%, d₃가 약 10%, d₂가 약 7%, d₁이 약 10% 그리고 d₀가 72% 존재함이 mass spectrum 분석에서 얻어졌다.⁵²⁾ 이 결과로 valine이 cephalosporin C에 incorporation되는 과정에서는 valine의 methyl기의 수소가 교환되고 있음이 명백하다.

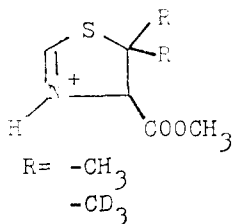


Fig. 6—A fragmented ion(m/e 174) of methyl ester of phenoxymethylpenicillin.

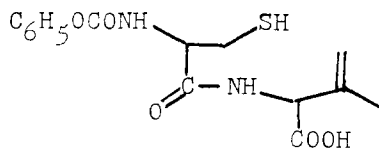


Fig. 7—An intermediate proposed to have an isodehydrovaline moiety in penicillin biosynthesis.

L-[¹⁸O₂]-valine을 *P. chrysogenum*의 mycelia에 feeding 시켜서 얻은 [¹⁸O]-penicillin V의 methyl ester는 GC-MS analysis에서 ¹⁶O₂⁻, ¹⁶O¹⁸O⁻ 그리고 ¹⁸O₂를 함유하는 molecular ion들인 m/e 364, 366 그리고 368의 relative intensity가 100 : 31 : 3으로 나타났다. 그러나 labelling되지 않은 penicillin V의 methyl ester의 경우는 100 : 7 : 0이고 L-[¹⁸O₂]-valine의 경우는 한 isotopically-labelled fragmented ion인 [NH₂=CHCO₂H]⁺의 이온 m/e 74, 76과 78의 relative intensity가 2 : 30 : 100으로 나타나는 것으로 보아 valine의 carboxy-oxygen atom중의 하나가 페니실린 생합성 과정중에 exchange되고 있다.⁵⁵⁾

페니실린이나 cephalosporin이 생합성 될 때 valine의 methyl기가 입체특이성을 가지고 페니실린의 C-2 위치와 cephalosporin C의 C-10 위치에 incorporation되는지 조사하기 위해 chiral valine을 penicillin과 cephalosporin에 incorporation 시켰다.⁵⁶⁻⁶⁰⁾ ¹³C으로 valine의 methyl기에 입체구조적인 특이성을 가지고 labelling된 valine들을 *P. chrysogenum*에 의해 phenoxymethylpenicillin에, *C. acremonium*에 의해 penicilline N과 cephalosporine C에 incorporation 시켰을 때 이들은 ¹³C NMR spectra에서 한 peak의 intensity만 증가시켰다. 따라서 valine은 페니실린과 cephalosporin에 완전히 입체특이성을 유지하면서 incorporation되고 있음이 명백하다. 구체적으로 (3R)-[4-¹³C]-valine은 penicilline의 2-β-methyl기에 ¹³C이 incorporation되었고, (3S)-[4-¹³C]-valine은 페니실린의 2-α-methyl기에 incorporation됨이 밝혀졌다.⁶¹⁾ 이 결과는 또한 valine이 glycine과 acetone으로 변형되고 다시 페니실린으로 생합성되지 않음을 증명하고 있다. C-3 위치의 한 methyl기가 deuteriated C-3 위치의 chiral valine들도 deuterium의 치환이나 상실없이 penicillin N으로 incorporation

됨이 관찰되었고^{62,63,52)} (3R)-[4-¹³C]-valine을 feeding시키면 cephalosporin C의 C-2 위치에, (3S)-[4-¹³C]-valine을 feeding시키면 C-10 위치에 ¹³C이 incorporation 되었다.

b. Cysteine

*P. chrysogenum*이 ³⁵SO₄²⁻가 benzylpenicillin에 incorporation되는 것을 억제시키는 정도를 조사하여 어떤 유황화합물이 페니실린의 생합성 precursor인지 판단하였다.^{64,65)} 이 실험에서 D,L-methionine, L-cysteine과 L-cystine의 유황은 sulfate대신 효과적으로 페니실린 생합성에 이용되었으나 D-cysteine이나 D,L-penicillamine들은 sulfate대신 효과적으로 이용되지 못하였다. 또 가수분해에 의해 L-cysteine을 유리시키는 glutathione도 L-cysteine과 같이 radio active sulfate가 페니실린에 incorporation되는 것을 매우 잘 억제하였다. 또한 D,L-homocysteine, L-cystic acid와 taurine 등은 L-cystine 보다 ³⁵SO₄²⁻가 페니실린에 incorporation되는 것을 잘 억제시키지 못하였고 Fig. 8에 주어진 화합물도 억제효과가 없었다.

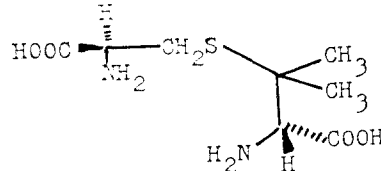


Fig. 8—A precursor examined for penicillin biosynthesis.

페니실린 생합성에 있어서 L-¹⁴C-cystine이 D-¹⁴C-cystine보다 5배나 효과적으로 incorporation 되었다.⁶⁶⁾

D,L-3-¹⁴C-cystine을 benzylpenicillin에 incorporation시킨 후에 산으로 분해시켜 benzylpenicilloaldehyde를 얻으면 radioactivity가 모두 이 화합물에 존재하는데, 이 화합물을 다시 glycine과 탄산가스로 분해시키면 radioactivity는 탄산가스에서 발견되어 ¹⁴C이 모두 페니실린의 C-5 위치에 존재하는 것으로 증명되었다.⁶⁷⁾ 또한 D,L-3-¹⁴C-serine과 2-¹⁴C-glycine도 페니실린에 incorporation시키었다. 이들의 경우에는 C-6 위치에 ¹⁴C을 가진 페니실린을 생성시켰는데, 이는 glycine이 L-serine으로 그리고 L-cysteine으로 생합성되어서 페니실린에 incorporation 되기 때문이다.⁶⁸⁾ (Fig. 9 참조)

¹⁴C-cystine 존재하에서 생합성된 mycelial protein에서 부터 분리된 ¹⁴C-serine의 radio activity가 같은 culture에서 얻은 페니실린에 존재하는 radio activity보다 낮은 것은 cyst(e)ine이 serine보다 더 나은 페니실린의 precursor가 되기 때문인 것으로 생각된다.⁶⁸⁾

3-¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S-D,L-cystine을 benzylpenicillin에 incorporation 시켰을 때 생성된 페니실린의 ¹⁵N/¹⁴C비는 precursor와 거의 같았으나 ³⁵S량은 ¹⁴C에 비해 상당히 높았다.⁶⁹⁾ 이것은 3-¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S-D-cystine이 분해되고 이때 ³⁵S가 새로이 생합성된 ³⁵S-cystine에 incorporation 되어서 페니실린 생합성에 이용됨으로서 나타난 결과로 생각된다. 또한 ¹⁵N의 양은 25% 정도 감소되는 것으로

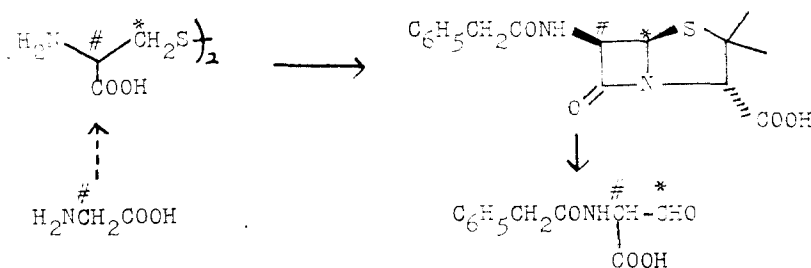


Fig. 9—Incorporation of ¹⁴C-labelled cysteine at C-3 or C-2 to penicillin and its degradation.

나타났는데, 이것은 D-cystine이 L-cystine으로 변화될 때 질소가 어느정도 exchange되는 것으로 생각된다. 이러한 ^{35}S , ^{15}N 과 ^{14}C 을 사용한 cofeeding experiment의 결과로 미루어 볼 때 cystine 분자가 분해되지 않고 그대로 incorporation되는 것이 명백하다.

현재 페니실린의 β -lactam 고리를 형성에는 두가지 경로(Fig. 10)가 제안되고 있는데⁷⁰⁾ A경로에서는 cyst(e)ine C-2 수소가 제거되고 C-3 수소중 적어도 하나가 제거되어야 하며 B경로에서는 cysteine의 C-2 수소와 C-3 수소가 그대로 유지되어야 가능하다. 그러나 2- ^3H -D, L-cystine과 3- ^3H -D, L-cystine을 3- ^{14}C -D, L-혹은 L-cystine과 함께 페니실린에 incorporation 시켰을 때 2- ^3H -와 3- ^3H -cystine 모두 benzylpenicillin에 incorporation 되었으나 ^3H 이 ^{14}C 보다 더 많이 회색되었다. 이 결과에서 cystine의 2- ^3H 이 어느정도 유지되는 것으로 보아 Fig. 10에 주어진 A 경로는 배제할 수 있다. 여기서 얻은 페니실린을 penicilloaldehyde로 분해시키고 산화시킨 후에 가수분해시켜 glycine을 얻고 이를 ninhydrine으로 처리하여 CO_2 와 formaldehyde(C-2로 부터)로 분해시키면 2- ^3H -cystine으로부터 생합성된 페니실린은 tritium을 모두 가지고 있는 formaldehyde를 생성하나 3- ^3H -cystine으로부터 생합성된 페니실린을 분해시켜 얻은 formaldehyde에는 tritium이 발견되지 않았다.⁶⁷⁾ 이 결과로 페니실린의 β -lactam고리 형성 단계에서 C-2 위치의 수소가 새로 부가되는 반응은 일어나지 않고 cystine의 C-3 위치의 수소가 C-2 위치로 이동되지 않는 것이 확실하다.

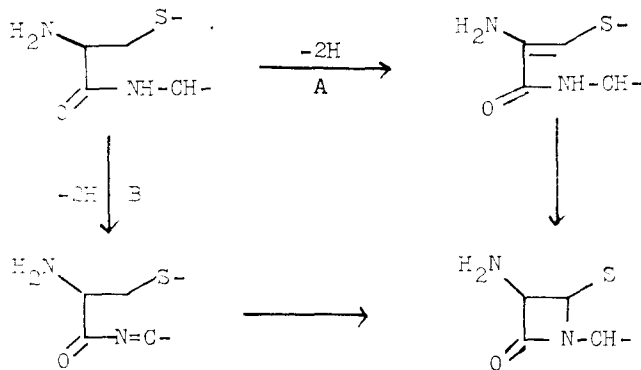


Fig. 10—A proposed β -lactam ring formation mechanism in penicillin biosynthesis.

페니실린 생합성은 2-methylcystine, 3,3-dimethylcystine, S-ethylcystine에 의해 억제되었으나 S-methyl-L-cysteine, S-benzyl-L-cysteine, N-methyl-L-cysteine, 3-methylcystine에 의해서는 억제되지 않았다.^{71,72)} 이는 L-cyst(e)ine만이 직접적인 페니실린 생합성의 precursor가 되고 있음을 암시하고 있다. 또한 cysteine이 *C. acremonium*에서 penicillin N과 cephalosporin C의 precursor로도 작용하며, *S. clavuligerus*에서 cephamycin들의 precursor가 되고 있음이 밝혀졌다.³⁹⁾ 3, 3'- ^{14}C -D, L-cystine과 3, 3'- ^3H -D, L-cystine의 혼합체를 cephamycin C에 incorporation시켰을 때 삼중수소가 ^{14}C 에 비해 약 80%가 cephamycin C에 incorporation되는 것을 보아 cephamycin C의 7 α -methoxy기는 dehydrocysteine을 거쳐 도입되는 것으로는 생각되지 않는다.³⁶⁾

페니실린과 cephalosporin은 이미 설명한 바와 같이 cysteine으로부터 나온 유황원자를 가지고 있는데, 이 cysteine의 sulfur group은 생체에서 sulfate reduction과정^{61,73)}이나, 매우 제한된 과정이지만 reverse transsulfuration 과정을 거쳐 생성된다. *P. chrysogenum*에 의해 생성된 페니실린

린의 sulfur는 주로 sulfate로부터 sulfate reduction pathway를 거쳐 유래되는 반면에, *C. acremonium*에 의해 생성되는 cephalosporin C의 sulfur는 methionine으로부터 reverse transsulfuration pathway를 거쳐 주로 생성된다.⁷⁴⁾ 그러나 *S. lactamdurans*의 경우에는 reverse transsulfuration pathway를 뒷받침할 cystathione-r-lyase가 발견되었다.⁷⁵⁾

L-methionine-³⁵S는 *C. acremonium*에 의해 쉽게 cephalosporin C에 incorporation되고, L-methionine-³⁵S 존재하에서 *C. acremonium*을 성장시키면 ³⁵S-homocysteine과 ³⁵S-cystathionine이 생성됨이 발견되었다. 이러한 사실에서 보아 cephalosporin C의 sulfur는 methionine에서 부터 도입되고 있음을 알 수 있다. D, L-serine-³¹⁴C과 D, L-methionine-³⁵S를 *S. clavuligerus*에 feeding시키면 7-methoxycephalosporin에 incorporation되는 것으로 보아 transsulfuration pathway가 *S. clavuligerus*에서도 지배적인 것으로 나타났으며, methionine의 ¹⁴C-methyl기는 7-methoxycephalosporin의 7-methoxy기로 incorporation되었다.³⁹⁾ Sulfate와 methionine이 cysteine으로 변화되는 과정이 억제된 *C. acremonium*의 한변이종에서 cysteine존재하의 cephalosporin C 생성은 methionine에 의해 증가되었다. Alanylmethionine도 cysteine존재하에서 methionine과 같은 정도로 cephalosporin C의 생성을 activation시키는데⁷⁶⁾, 이때 alanine은 cephalosporin C생성이 아무런 영향을 미치지 않으며 alanylmethionine은 methionine과 같은 효과를 나타내는 것으로 간주할 수 있다. 이러한 결과로부터 methionine이 cephalosporin C의 생성을 촉진시키는 효과는 생합성 regulation mechanism에 영향을 미치기 때문이다. Methionine과 구조가 유사한 non-sulfur화합물인 norleucine도 methionine과 같이 cephalosporin C의 생성을 촉진시켰다.

Morecombe와 Young^{77,78)} 그리고 Aberhart⁷⁹⁾가 C-3 위치에 tritium으로 labelling된 cysteine을 ¹⁴C-cyst(e)ine과 함께 *P. chrysogenum*에 feeding시켜 benzypenicillin에 incorporation시켰을 때 (3R-³H)cyst(e)ine의 tritium은 페니실린에 incorporation되었으나 (3S-³H)-cyst(e)ine의 tritium은 거의 모두 생합성중에 제거되었다. 이는 cysteine의 C-3 위치의 입체구조는 그대로 유지되면서 β-lactam고리가 형성됨을 의미하고 있다. Cephalosporin C의 생성 연구에서도 입체 구조적으로 labelling된 cystein을 incorporation 시켰을 때 같은 결과가 얻어졌다.⁸⁰⁾

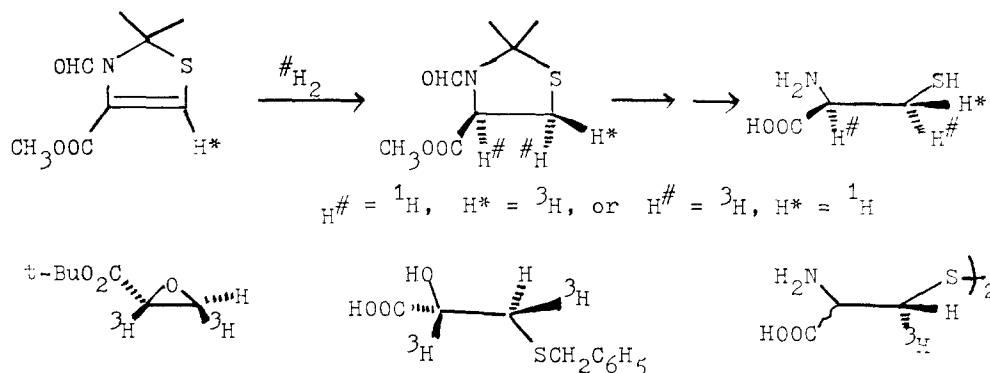


Fig. 11—Synthetic methods to obtain tritiated chiral cysteines.

Young의 실험에서는 페니실린 생합성에서 14%만 cysteine의 3S-³H가 incorporation되는 것이 관찰되었는데, 이것은 mycelia에서 일어나는 다른 생화학 반응에 의하여 tritium의 일부가 제거되거나 입체화학의 특이성이 다소 상실되는 것으로 생각된다. 특히 transamination 반응에 의해

이 cephamycin C에 incorporation되었으며, 다른 cephamycin을 생성하는 *S. lipmanii*에서도 유사한 결과가 얻어졌다. 이는 *Streptomyces* sp.에 의해서는 α , ϵ -diaminopimelate의 decarboxylation 반응에 의해 lysine이 생산되며 이 lysine은 α -aminoadipic acid로 대사되기 때문이다.

Streptomyces sp.의 한 lysine mutant인 LA423은 diaminopimelate decarboxylase가 결여되어 있는데 derepressed된 상태에서 diaminopimelate를 축적시킨다. 또한 L-aspartic acid- ^{14}C 이 LA423 mutant에 의해 diaminopimelate로 incorporation되며 L-lysine-U- ^{14}C 이 cephalosporin에 incorporation되었다. 이러한 결과로 α -aminoadipic acid가 *Streptomyces* sp.에 있어서 lysine의 대사물임이 확실하다.

페니실린과 세파로스포린分子의 形成

a. Tripeptide

아미노산의 precursor들이 어떠한 순서로 결합하여 어떠한 중간체를 경유하여 페니실린이나 cephalosporin으로 생합성되는지는 아직도 확실히 밝혀지지 않고 있다. 1960년 Arnstein과 Morris가 *P. chrysogenum*에서 δ -(α -aminoadipyl)cysteinylvaline을 분리시킨 후에 β -lactam 항생제 생합성의 중간체에 대해 "Tripeptide theory"가 지배적으로 대두되었다.^{82,83} 그후에 Loder와 Abraham도 *C. acremonium*의 균사로 부터 Sulfur를 함유한 3개의 peptide를 분리해 내었는데 주분리물은 peptide P₃로 δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine(LLD-ACV)인 것으로 밝혀졌다.⁸⁴ Peptide P₃에 D-valine이 존재한다는 것은 tripeptide가 형성되기 전이나 혹은 형성되는 동안 L-valine이 D-이성체로 변화된다는 사실을 암시하고 있다. 이 tripeptide는 또한 δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteine과 L-valine으로 부터 broken cell system에 의하여 생합성되었다.⁸⁵

Arnstein과 Morris가 합성한 L-cystinyl- ^{14}C -L-valine은 페니실린으로 incorporation되는 반면 L-cystinyl-D-valine은 항생제나 단백질합성에 이용되지 않았다.^{86,87} 이러한 isotopically labelled L, L-dipeptide가 protein에서 보다 페니실린에 더 많이 incorporation되는 것은 incorporation되기 전에 가수분해되지 않는다는 것을 의미하고 있다. 그러나 페니실린의 radioactivity는 첨가된 dipeptide 보다 상당히 낮고, 또 *P. chrysogenum*의 페니실린 생성 culture에서 cysteinylvaline이 발견되지 않는 것으로 미루어 보아 이 dipeptide가 페니실린 생합성의 주요한 중간체는 아닌 것 같다. 또 이 dipeptide는 mycelia에서 상당히 가수분해되나 ACV-tripeptide는 가수분해되지 않았다. Penicillin N negative mutant들중 일부는 culture broth에 δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine의 dimer를 축적시키고⁸⁸, deacetoxycephalosporin C negative mutant No 20-5도 역시 culture broth에 위의 tripeptide 유도체를 축적시켰다.

Cephalosporium sp.를 sonication시키고 fractionation시킨 후에 생합성 과정을 조사하였는데, 이 때 L- α -aminoadipyl-L-cysteine이 먼저 형성된 후에 L-valine과 결합되고 valine의 입체구조가 LLD-ACV로 변형되었다.^{89,90} L-valine이 LLD-ACV로 생합성 될 때, L-configuration이 D-configuration으로 되지만 C-3 위치의 configuration에는 변화가 없음이 ^{13}C NMR spectroscopy를 사용한 실험에 의하여 증명되었다. 초기에 *P. chrysogenum*에서 얻은 ACV-tripeptide도 *Cephalosporium* sp.의 tripeptide P₃와 같은 LLD-입체구조를 가지고 있는 것으로 밝혀졌다.

Abraham과 그의 공동연구자들은 *P. chrysogenum*의 protoplast 또는 cell free system을 이용하여 LLD-ACV로 부터 페니실린을 생합성하였다. 여기서 ^{14}C -L-valine으로 부터 penicillin N이 생성되는 것보다 radiochemical yield가 훨씬 높아 tripeptide가 분해되지 않고 그대로 페니실린에

incorporation됨이 증명되었다.⁹¹⁾ 또한 *C. acremonium*의 cell free extract를 이용하여 LLD-ACV를 isopenicillin N으로 변형시키었다.^{92,93)} Lenke와 Nash는 cephalosporin C나 penicillin N을 생성하지 못하는 *C. acremonium* tripeptide-negative 변이종과 tripeptide-positive 변이종을 genetic recombination시켜 얻은 heterokaryon으로 penicillin N과 cephalosporin C를 생합성하였는데⁹⁴⁾, 이는 LLD-tripeptide가 cephalosporin C나 페니실린 생합성의 중간체임을 의미하고 있다. 최근에 tripeptide δ -(L-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine이 *C. acremonium*의 cell free system에서 isopenicillin N으로 변형되고^{95,96)} 이 isopenicillin N의 L- α -aminoadipyl기가 epimerase에 의해 epimerization되어 penicillin N으로 변화되는 것으로 생각되고 있다.^{97,98)} 특히 (L- α -amino- δ -adipyl)-L-cysteinyl-D-valine이 *C. acremonium*의 cell free system에서 isopenicillin N으로 변화된다는 것을 ¹³C NMR spectroscopy를 이용하여 증명하였다.⁹⁹⁾ 즉 (L- α -amino- δ -adipyl)-L-[3-¹³C]-cysteinyl-D-valine을 *C. acremonium*의 cell free extract와 함께 n.m.r. probe에서 incubation하면 ¹³C n.m.r. spectrum에서 tripeptide의 labelling된 원자에 의해 나타난 26.7ppm. 위치의 signal은 점점 감소하고 새로운 signal이 67.7ppm에서 나타나 시간에 따라 증가되었다. 67.7ppm.의 signal이 off-resonance proton decoupled spectrum에서 doublet로 나타났으며 이것은 isopenicillin N의 C-5에 기인하는 것으로 판명되었다. 또한 유사한 실험으로 (L- α -amino- δ -adipyl)-L-[3-¹³C]-cysteiny-D-[3-¹³C]-valine을 incubation하는 동안 ¹³C n.m.r.의 signal이 26.7과 31.8ppm에 나타났으며 시간에 따라 intensity가 감소하는 한편 67.7ppm과 65.6ppm에서 isopenicillin N의 C-5, C-2에 기인하는 signal이 나타나 시간에 따라 intensity가 증대되었다.

*S. clavuligerus*의 cell free extract에 의해서도 δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine이 cyclization되어 penicillin-type antibiotic으로 변환된다는 것이 증명되었으며, 이때 cyclization activity에 dithiothreitol과 O₂가 절대적으로 필요하며 ascorbate와 Fe²⁺에 의해 활성이 촉진되었으며 ATP는 필요하지 않는 것으로 밝혀졌다.¹⁰⁰⁾ LLD-ACV에서 isopenicillin N이 생성될 때는 aminoadipyl기의 산소원자들에 산소교환 반응이 일어나지 않는 것으로 보고되었다.¹⁰¹⁾

최근에 cephalosporin C의 생성 organism인 *Cephalosporium acremonium* C-91의 cell free system에 LLD-ACV의 tripeptide를 feeding시킬 때, isopenicillin N이 얻어졌는데, LLD-ACV의 valine 부위가 다른 ethyl 또는 dimethyl LLD-ACV 유도체를 feeding시킬 때도 입체화학적으로 페니실린 유도체를 생합성하는 것이 밝혀졌다.¹⁰²⁾ 이에 대한 설명이 Fig. 13에 주어져 있다. 이

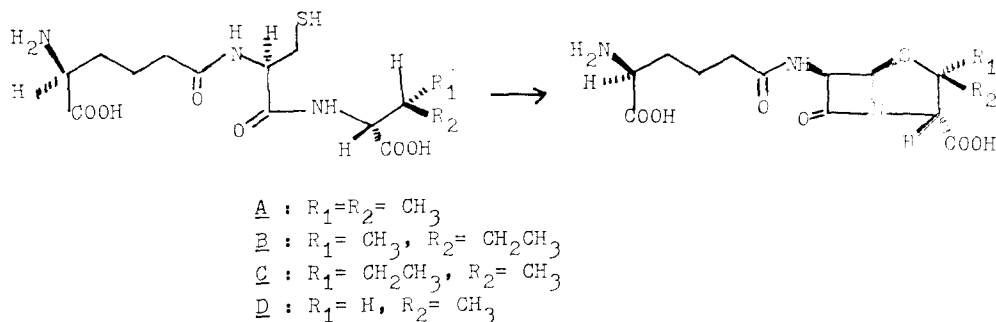


Fig. 13—Biosynthesis of penicillin analogs with an ethyl group or a hydrogen atom instead of the methyl groups at C-2 position from LLD-ACV tripeptide analogs.

실험에서 *C. acremonium*의 페니실린 ring cyclization enzyme은 substrate에 대한 특이성이 약한 것으로 나타 났는데 이들 modified substrate들은 또한 ring formation 효소에 대해 강한 부촉매 작용을 소유하고 있는 것으로 보고되었다. 이 실험은 또한 새로운 페니실린이나 구조적으로 modify된 cephalosporin들을 생합성적인 방법에 의하여 생산할 수 있는 가능성을 제공시켜 주고 있다.

b. 고리形成

Arnstein과 Crawhall⁷⁰⁾, Birch와 Smith¹⁰³⁾는 일찌기 페니실린의 β -lactam고리는 (A) 혹은 (B) pathway로 먼저 생성되고(Fig 14) dehydrovaline 잔기 형성을 포함한 산화 축합 반응이 일어나고 유황원자가 이중결합을 공격하여 penicillamine fragment의 C-3 위치에 D-centre를 가진 thiazolidine 고리를 형성한다고 제안하였다.

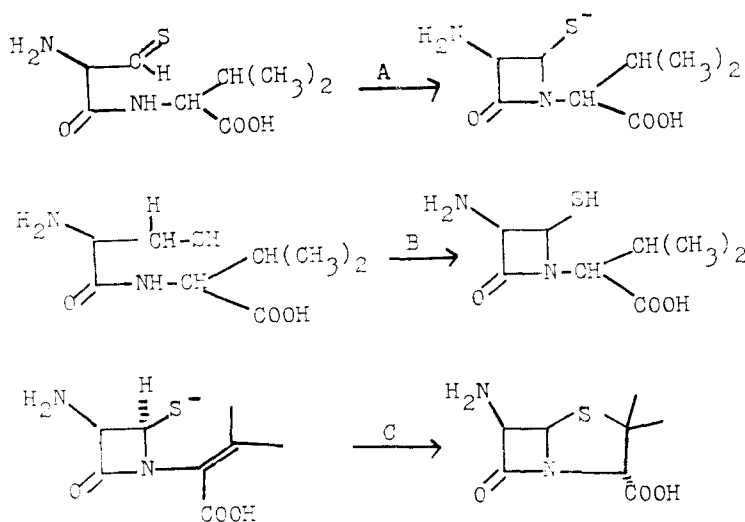


Fig. 14—Hypothetical mechanisms for the formation of the β -lactam ring.

Arnstein과 Crawhall은 tritium으로 incorporation된 cysteine의 α -hydrogen과 β -hydrogen중 하나는 유지된다는 것을 증명하였는데, 이는 β -lactam고리 형성시 dehydrocysteine 중간체는 포함 되지 않음을 의미하고 있다. 또한 *C. acremonium*에 의하여 L- α -aminoadipyl-L-cysteinyl-D-(2-³H)-valine이 incorporation된¹⁰⁴⁾ 페니실린 N에 tritium이 발견 되어서 초기에 제안되었던¹⁰⁵⁾ Fig. 14의 pathway C에 주어진 dehydropeptide 중간체는 페니실린 생합성과정에서 중간체로 포함되지 않음이 명백하여 졌다.¹⁰⁶⁾ 또 다른 중간체로 “cyclic cysteinylvaline” 유도체가 β -lactam고리 형성시 중간체로 될 가능성이 있는지 조사되었다. 그러나 cyclic cysteinylvaline의 ¹⁴C 유도체의 stereoisomer들을 *P. chrysogenum*의 whole mycelium에 feeding시키었는데 페니실린으로 변형되지 않았다.^{107,108)} 이 cyclic dipeptide가 mycelium에 흡수되는지 확실치 모르고 있으나 이 dipeptide가 중간체로 작용할 가능성은 매우 희박한 것 같다. 또 페니실린 고리 형성 pathway로 Fig. 16에 주어진 반응들이 제안되었는데⁷⁰⁾, cysteinylvaline dipeptide가 산화되어 직

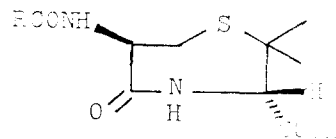


Fig. 15—A proposed cyclic cysteine intermediate.

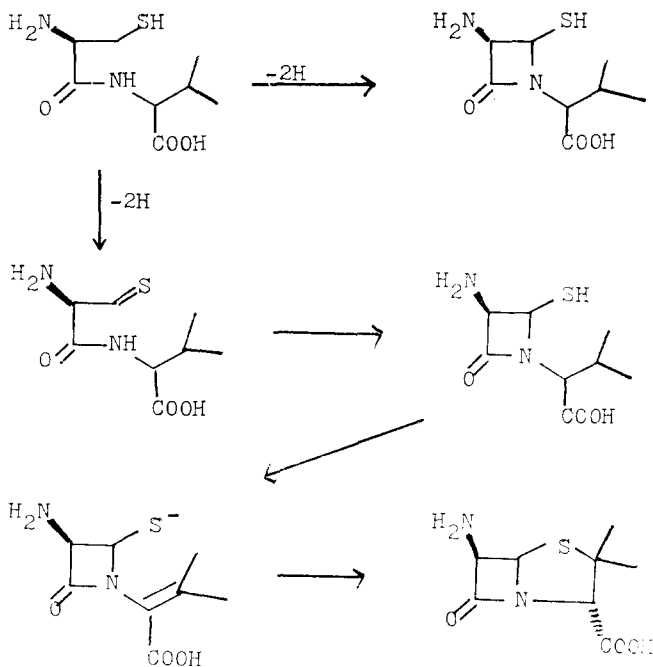


Fig. 16—A proposed biosynthetic route to penicillin.

접 β -lactam 고리를 형성하는 pathway나 thioaldehyde 중간체가 형성되어 amide질소에 의해 공격 받는 mechanism도 아직 실험적인 증거는 없다.¹⁰⁹⁾ 더구나 지금까지 thioaldehyde 중간체는 생체내에서 발견되지 않았다. 그러나 azetidin-2-one과 thiazolidine고리 형성시에 cysteine부위의 C-3 위치와 valine 부위의 C-3 위치는 모두 configuration의 retention이 일어난다는^{110-113),58)} 것은 확실하나 Fig. 17에 주어진 생합성과정의 조사가되었으나 positive한 결과는 못 얻었다.¹⁰⁹⁾ 또한

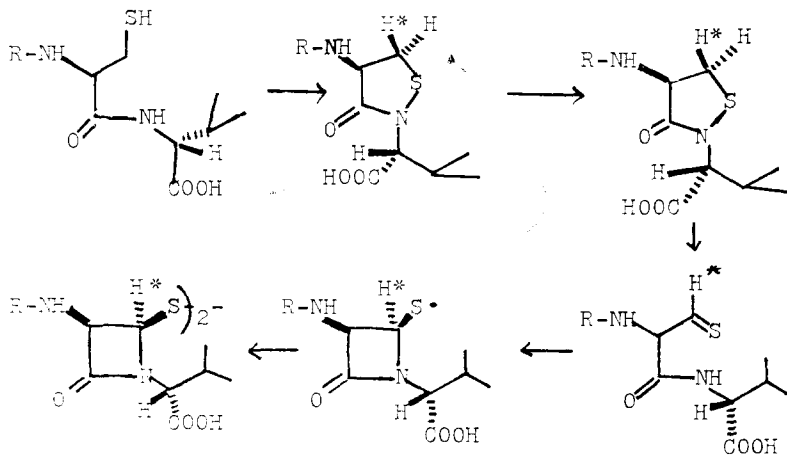


Fig. 17—A hypothetical β -lactam ring formation reaction proposed.

thiazolidine 고리형성 단계가 radical process에 의하여 일어날 가능성도 제안되었고¹¹⁴⁾ 이에 대하여 조사되었으나, 결과는 부정적이다.⁶²⁾ 원래 이 radical mechanism은 model system에서도 증명되었는데 이 mechanism에서는 azetidinone고리 형성 단계로 잘 알려진 isothiazolidine(Fig. 17)고리가 먼저 형성되고^{105,115)} 다시 고리가 열리면서 thioaldehyde를 형성하면서 β -lactam 고리가 얻어지는 radical mechanism인데 이를 조사한 실험에서 이 radical이 포함된 반응에서 β -lactam고리가 얻어지지 않아¹⁰⁹⁾ 이 radical mechanism도 상당히 부정적이다. 최근에는 또, valine 부위의 C-3 위치에 radical이 형성되고 새로운 C-5 결합이 형성된다고 제안되었다.¹¹⁶⁾ 또 Fig. 18에 주어진 monocyclic tripeptide를 *P. Chroysogenum*의 protoplast lysate를 사용하여 δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine에서 분리 얻었다고 주장하였는데 구조적으로 동일성에 이성이 있다고 증명하였다.¹¹⁷⁾

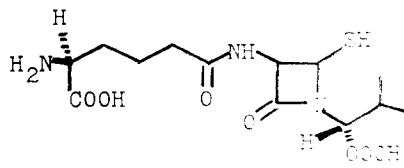


Fig. 18—An intermediate claimed to be isolated from the fermentation broth of *C. acremonium*.

Cephalosporin의 dihydrothiazine고리 형성에 관하여 몇가지 pathway가 제안되었는데, tripeptide에서 α, β -dehydrovaline 유도체 또는 이와 유사한 중간체를 거쳐 페니실린으로 생합성된 후에 고리가 확장되어¹¹⁸⁾ 3-cephem 항생제가 형성되는 pathway가 거의 확실시되고 있다.¹¹⁹⁻¹²¹⁾ 이 pathway는 특히 *C. acremonium*변이종중에 penicillin N을 생성하나 cephalosporin C를 생성하지 못하는 종이 알려져 있고, cephalosporin C를 생성하는 미생물은 모두 penicillin N을 생성하며 cephalosporin C는 positive이나 penicillin N이 negative인 변이종은 지금껏 발견된 일이 없음에 비추어 보아도 penicillin N이 cephalosporin C의 precursor임을 뒷받침해 주고 있다. 더구나 페니실린 N이 cephalosporin C로 변형되는 중간물질로 생각되는 7 β -(5-D-aminoadipamido)-3 β -hydroxy-3 α -methylcephem-4 α -carboxylic acid가 *C. acremonium*의 배양 broth에서 분리되었다.¹²²⁾

Penicillin N과 cephalosporin C를 생성하는 *C. acremonium*의 cell free extract에서 cephalosporin C의 생산이 penicillin N에 의해서는 증대되나 penicillin G나 6-APA에 의해서는 증대되지 않는다. 만일 penicillinase가 medium에 첨가되면 cephalosporin C가 생산되지 않는데 이는 endogenous 또는 exogenous penicillin N이 cephalosporin C로 변화되고 있음을 암시할 수 있다. Cephalosporin C를 생산하지 않거나 penicillin N만을 다량 생산하는 *C. acremonium*의 변이종의 enzyme system을 이용하여 penicillin N을 고리 확장에 의해 deacetoxycephalosporin C로 변화시켰다.^{123,124)} 이때 참가하는 효소는 ATP와 2-oxoglutarate를 필요로 하는 dioxygenase와 비슷한 기능을 가지고 있는 것으로 이야기 되었다. 최근에는 또한 이 *C. acremonium* 변이종의 enzyme system은 isopenicillin N을 penicillin N으로³²⁾ 또는 isopenicillin N도 deacetoxycephalin C으로 변화시킬 수 있음이 h.p.l.c. analysis에서 나타났다.^{126,126)} 그리고 *S. clavuligerus*의 cell free extract를 사용하여 δ -L- α -(aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine(ACV)을 penicillin유도체로 변형시킨 후에 ring expansion enzyme에 의해 cephalosporin C로 변형시킬 수 있음도 보고되었다.^{127,121)} *C. acremonium*과 *S. clavuligerus*의 cell free extract에서 ring expansion enzyme에 Fe⁺²와 ascorbate는 공통적으로 효소활성 촉진효과를 보였으나 이 두 organism의 효소들 사이에는 다른 몇가지 차이점들도 나타났다.¹²⁸⁾ 즉 *C. acremonium*에 있어서 ATP는 효소활성촉진효과가 있었으며, α -ketoglutarate는 별 효과가 없었으나^{129,130)} *S. clavuligerus*에서는 ATP는 오히려 억제효과를 보였으며 α -ketoglutarate는 반드시 필요한 cofactor로 작용하였다. 또한 *C. acremonium*에 있어서는 sonication과 Triton X-

100 처리로 ring expansion enzyme의 활성이 촉진되는 것으로 미루어 membrane-bound enzyme 인 것으로 간주되었으며, *S. clavuligerus*에 있어서는 이러한 처리에 영향을 받지 않고 high speed centrifuge에 의해 침전되지 않는 것으로 미루어 soluble enzyme인 것으로 나타났다.¹²⁸⁾

c. Penicillin Acylase

페니실린을 가수분해시켜 6-aminopenicillanic acid(6-APA)로 만드는 효소가 1950년 Sakaguchi 와 Murao에 의해 *P. chrysogenum*의 mycelial extract에서 처음 보고 되었다.¹³⁰⁾ 몇몇 예외가 있지만 penicillin acylase의 가수분해 효력은 pH7.5~9.0에서 가장 크며 반대로 합성 효력은 pH 5.0~6.0에서 가장 크다. Penicillin acylase의 세포내 위치는 미생물의 종류에 따라 다르지만 곰팡이에 의해 생산되는 penicillin acylase의 대부분은 세포내에 존재한다.¹³¹⁾ 기질 특이성에 있어서는 penicillin G acylase는 페니실린뿐 아니라 여러 아미노산의 N-acyl유도체들을 가수분해하는 등 기질특이성이 별로 없으나, penicillin V acylase는 penicillin분자에만 작용하는 높은 특이성을 가지고 있다. Penicillin acylase는 페니실린 분자에 높은 특이성을 가지나 penicillin N이나 isopenicillin N은 가수분해시키지 못하며 또한 *Cephalosporium* sp.의 발효에서 7-ACA는 발견되지 않았다.

6-APA와 phenoxyacetic acid 혹은 phenylacetic acid로 부터 penicillin V 혹은 G가 생합성되고 또 이들의 역반응도 일어나는 것으로 알려져 있으나, acylase가 isopenicillin N을 가수분해시키지 않는 것으로 알려져 있다. 그리하여 6-APA가 initial precursor로 작용하여 acylation을 거쳐 페니실린으로 변화된다는 제안은 현재 받아들이기 어렵다.⁹¹⁾

Brevibacterium, *Achromocacter*와 *Flavobacterium* 속에서는 cephalosporin C acylase에 의해 deacetyl-7-ACA가 생성된다고 보고되었으나, 실제 cephalosporin C를 7-ACA와 D- α -aminoadipic acid로 가수분해시키는 acylase는 아직 발견되지 않았다. Brannon에 의해 cephamycin C를 생성하는 *S. clavuligerus*에서 cephalosporin을 deacylation시키는 cephalosporin C acetyl esterse가 발견되었는데, 이 효소는 세포외에 존재하는 것으로 밝혀졌다.

1967년 Pruess와 Johnson은 transacylase 혹은 penicillin acyltransferase가 존재하여 pH 8에서 penicillin V,G,K와 X 그리고 dihydropenicillin F의 acyl기를 6-APA와 서로 교환시키는 반응을 sulfhydryl화합물 존재하에서 촉매한다고 보고 하였다.¹³²⁾ 그러나 역시 이 효소에 의해서도 penicillin N의 acyl기는 6-APA와 교환되지 않았다. Penicillin을 다량 생산하는 변이종에서 이 효소의 활성이 높은 것으로 이 효소가 penicillin 생합성에 관여하는 것으로 추측되고 있다. Spencer는 이 enzyme이 penicillin G의 acyl기를 6-APA와의 교환 반응을 촉매할 뿐 아니라 6-APA와 phenylacetyl coenzyme A로 부터 penicillin G를 생합성시킨다고 보고 하였다.¹³³⁾ 또한 Brunner는 side chain을 활성화시키는 side chain coenzyme A ligase를 보고하였으며, 6-APA가 phenyl-, 또는 phenoxyacetic acid의 CoA유도체로 acylation 된다는 것을 보고하였다. 즉 penicillin 생합성의 마지막 단계에서 phenylacetyl CoA ligase에 의해 acetyl radical과 CoA로 부터 걸가지의 precursor가 CoA-activated side chain precursor로 되어 이것이 6-APA를 직접 N-acylation 시킨다고 생각된다.

Acytransferase는 세포내(intracellular)에 있거나 penicillin acylase와 결합한 형태(particle bound form)로 존재하는데 큰 차이가 있다.²³⁾ Cephalosporin을 생성하는 *Cephalosporium* sp.에서는 이 효소가 발견되지 않았다. Isopenicillin N은 penicillin acylase의 substrate로 작용하지 않으나 penicillin transferase의 substrate로서는 작용하는 것으로 밝혀졌다.¹³⁴⁾ 최근에 *P. chrysogenum*의 페니

실린 V의 발효 broth에 6-oxopiperidine-2-carboxylic acid가 페니실린 V의 20 mole %만큼 존재하는 것도 발견되었는데 이때 분리된 물질은 racemate였다.¹³⁵⁾

Cephalosporin C의 마지막 생합성 단계는 deacetoxycephalosporin C가 형성되고 deacetylcephalosporin C를 거쳐서 cephalosporin C로 생합성되는 것으로 생각된다.¹³⁶⁾ *C. acremonium*의 wild type 혹은 변이종 81의 cell free extract는 pH 7.0에서 Mg^{2+} , acetyl CoA와 deacetylcephalosporin C 존재 하에서 cephalosporin C가 생성되었는데, 이때 이 반응을 촉매하는 효소를 acetyl CoA: deacetylcephalosporin C acetyltransferase라 명명하였다.^{136,137)} 이 효소의 활성이 결여된 변이종에서 deacetylcephalosporin C가 축적된다. 그리고 최근에 Queener와 Capone, 그리고 Liersch와 그의 공동 연구원들은 deacetoxycephalosporin C를 deacetylcephalosporin C로 hydroxylation시키는 효소를 보고 하였다.^{138,139)} 3-Deacetoxycephalosporin C의 3-methylene 이성체는 페니실린 N을 cephalosporin C를 변경시키는 효소의 강력한 inhibitor로 작용하였으나 스스로는 바뀌지 못하였다.¹⁴⁰⁾

結 論

현재 페니실린은 발효공학에 의하여 매우 싸게 대량 생산되고 있는 항생제이지만, cephalosporin 계통의 항생제 생산과 더불어 생합성에 관한 연구는 많이 되었지만 아직도 불확실한 많은 문제점을 함유하고 있다. 특히 페니실린과 cephalosporin계통의 항생제들은 약으로서 매우 중요한 위치를 차지하고 있어서 이들을 더 효율적으로 생산하기 위해서는 유전공학적 연구를 위하여 gene-enzyme 관계를 확립하여야 하며 이에 관하여 앞으로 더 많은 연구가 필요로 하고 있다. 페니실린이나 cephalosporin계통의 항생제들의 생성과정을 규명하는 것은 아직까지도 원료 생산문제에서 큰 도전의 가치를 가지고 있음이 틀림없다. 더구나 아직도 제 2 차 대사물의 생산에 관한 regulation mechanism이 이해되지 못하고 있어^{141,142)} 이들 regulation mechanism에 대한 많은 연구가 필요하다.

文 獻

1. D.J. Aberhart, *Tetrahedron*, **33**, 1545 (1977).
2. E.P. Abraham, *J. Antibiot.*, XXX Suppl., 1, (1977).
3. Y.M. Goo, *Penicillins and Cephalosporins, Research and Developments*, Seoul National University Press, Seoul, Korea, in press.
4. S.W. Elson and R.S. Oliver, *J. Antibiot.*, **31**, 586 (1978).
5. S.W. Elson and R.S. Oliver, *J. Antibiot.*, **35**, 81 (1981).
6. T.T. Howarth, A.G. Brown and T.J. King, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 266 (1976).
7. G. Albers-Schönberg, B.H. Arison, O.D. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, E.A. Kaczka, R.E. Rhodes, J.S. Kahan, F.M. Kahan, R.W. Ratcliffe, E. Walton, L.J. Ruswinkle, R.B. Morin and B.G. Christensen, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 6491 (1978).
8. D. Rosi, M.L. Drozd, M.F. Kuhrt, L. Terminiello, P.E. Came and S.J. Daum, *J. Antibiot.*, **34**, 341 (1980).
9. S.J. Box, D.F. Corbett, K.G. Robins, S.R. Spear and M.S. Verrall, *J. Antibiot.*, **35**, 1394 (1982).
10. N. Shibamoto, A. Koki, M. Nishino, K. Nakamura, K. Kiyoshima, K. Okamura, M. Okabe, R. Okamoto, Y. Fukagawa, Y. Shimauchi, T. Ishikura and J. Lein, *J. Antibiot.*, **33**, 1128 (1980).
11. P.J. Cassidy, G. Albers-Schönberg, R.T. Goegelman, T. Miller, B. Arison, E.O. Stapley and J. Birnbaum, *J. Antibiot.*, **34**, 637 (1981).
12. T. Ito, N. Ezaki, K. Ohba, S. Amano, Y. Kondo, S. Miyadoh, T. Shomura, M. Sezaki, T. Niwa, M. Kojima, S. Inouye, Y. Yamada and T. Niida, *J. Antibiot.*, **35**, 533 (1982).

13. M. Sakamoto, I. Kojima, M. Okabe, Y. Fukagawa and T. Ishikura, *J. Antibiot.*, **35**, 1264 (1982).
14. C.A. Townsend and A.M. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2873 (1981).
15. C.A. Townsend and A.M. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 1748 (1982).
16. K. Kitano, K. Kintaka, S. Suzuki, K. Katamoto, K. Nara and Y. Nakao, *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1761 (1974).
17. C.E. Higgins, R.L. Hamill, T.H. Sands, M.M. Hoehn, N.E. Davis, R. Nagarajan and L.D. Boeck, *J. Antibiot.*, **27**, 298 (1974).
18. R. Nagarajan, L.D. Boeck, M. Gorman, R.L. Hamill, C.E. Higgins, M.M. Hoehn, W.M. Stark and J.G. Whitney, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2308 (1971).
19. E.J. Vandamme, *Adv. Appl. Microbiol.*, **21**, 89 (1977).
20. J. Shoji, H. Hino, R. Sakazaki, T. Kato, K. Matsumoto, Y. Takahashi and E. Kondo, *J. Antibiot.*, **35**, 1646 (1982).
21. E.H. Flynn, M.H. McCormick, M.C. Stamper, H. De Valeria and C.W. Godzeski, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 4594 (1962).
22. M. Coli and F.R. Batchelor, *Nature*, **198**, 383 (1963).
23. P.A. Lenke and D.R. Brannon, in *Penicillins and Cephalosporins, Chemistry and Biology* Ed. E.H. Flynn, p. 370, Academic Press, New York, (1972).
24. F.R. Batchelor, F.P. Doyle, J.H.C. Nayler and G.N. Rolinson, *Nature*, **183**, 257 (1959).
25. G.G.F. Newton and E.P. Abraham, *Biochem. J.*, **58**, 103 (1954).
26. E.P. Abraham and G.G.F. Newton, *Biochem. J.*, **79**, 377 (1961).
27. E.O. Stapley, M. Jackson, S. Hernandez, S.B. Zimmerman, S.A. Currie, S. Mochales, J.M. Mata, H.B. Woodruff and D. Hendlin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2**, 122 (1972).
28. M.A. Pisano and E.M. Vellozzi, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **6**, 447 (1974).
29. T. Hasegawa, H. Fukase, K. Hantano, H. Iwasaki and M. Yoneda, *Abstr. Annu. Meet. Agric. Chem. Soc.*, Japan, p. 80 (1975).
30. R. Nagarajan, L.D. Boeck, M. Gorman, R.L. Hamill, C.E. Higgins, M.M. Hoehn, W.M. Stark and J.G. Whitney, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 9 (1971).
31. G. Albers-Schönberg, B.H. Arison and J.L. Smith, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 2911 (1972).
32. G.S. Jayatilake, J.A. Huddleston and E.P. Abraham, *Biochem. J.*, **194**, 645 (1981).
33. T. Osono, S. Watanabe, T. Saito, H. Gushima, K. Murakami, I. Takahashi, H. Yamaguchi, T. Sasaki, S. Takamura, T. Miyoshi, Y. Oka, *J. Antibiot.*, **33**, 1074 (1980).
34. H.R.V. Arnstein, *Ann. Rept. Progr. Chem.* (Chem. Soc., London), **54**, 339 (1957).
35. P.W. Trown, B. Smith and E.P. Abraham, *Biochem. J.*, **86**, 284 (1963).
36. J.G. Whitney, D.R. Brannon, J.A. Mabe and K.J. Wicker, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1**, 247 (1972).
37. N. Neuss, C.H. Nash, P.A. Lemke and J.B. Grutzner, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2337 (1971).
38. N. Neuss, C.H. Nash, P.A. Lemke and J.B. Grutzner, *Proc. Roy. Soc.*, London, Ser. B, **179**, 335 (1971).
39. J.R. Kirkpatrick, L.E. Doolin and O.W. Godfrey, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **4**, 542 (1973).
40. A.L. Demain, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **64**, 74 (1956).
41. C.M. Stevens and C.W. Delong, *J. Biol. Chem.*, **230**, 991 (1958).
42. S.C. Warren, G.G.F. Newton and E.P. Abraham, *Biochem. J.*, **103**, 902 (1967).
43. P. Fawcett, P.B. Loder, M.J. Duncan, T.J. Beesley and E.P. Abraham, *J. Gen. Microbiol.*, **79**, 293 (1973).
44. H. Booth, B.W. Bycroft, C.M. Wels, K. Corbett and A.P. Maloney, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 110 (1976).
45. H.R.V. Arnstein and M.E. Clubb, *Biochem. J.*, **60**, 34 (1955).
46. H.R.V. Arnstein and M.E. Clubb, *Biochem. J.*, **65**, 618 (1957).
47. I.R. Shimi and G.M. Iman, *Biochem. J.*, **101**, 831 (1966).
48. I.R. Shimi and G.M. Iman, *Arch. Mikrobiol.*, **60**, 275 (1968).
49. P.W. Trown, M. Sharp and E.P. Abraham, *Biochem. J.*, **86**, 280 (1963).

50. F.C. Huang, J.A. Chan, C.J. Sih, P. Fawcett and E.P. Abraham, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 3858 (1975).
51. P. Adriens, H. Vanderhaege, B. Meesschaert and H. Eyssen, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **8**, 15 (1975).
52. H. Kluender, F.C. Huang, A. Fritzberg, H. Schnoes, C.J. Sih, P. Fawcett and E.P. Abraham, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 4054 (1974).
53. E.H. Flynn, in *Cephalosporins and Penicillins, Chemistry and Biology*, Ed. E.H. Flynn, pp.684-685, Academic Press, New York, N.Y., (1972).
54. W. Richter and K. Biemann, *Monatsch Chem.*, **95**, 766 (1964).
55. J.S. Delderfield, E. Mtetwa, R. Thomas and T.E. Tyobeka, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 650 (1981).
56. J.E. Baldwin, J. Lölinger, W. Rastetter, N. Neuss, L.L. Huckstep and N. De La Higuera, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 3796 (1973).
57. J.E. Baldwin, J. Lölinger, W. Rastetter, N. Neuss, L.L. Huckstep and N. De La Higuera, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 6511 (1973).
58. H. Kluender, C.H. Bradley, C.J. Sih, P. Fawcett and E.P. Abraham, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 6149 (1973).
59. R.K. Hill, S. Yan and S.M. Arfin, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 7857 (1973).
60. K. Mislow, R.E. O'Brien and H. Schaefer, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1940 (1962).
61. N. Neuss, C.H. Nash, J.E. Baldwin, P.A. Lenke and J.B. Grutzner, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 3797 (1973).
62. J.E. Baldwin and T.S. Wan, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 249 (1978).
63. D.J. Aberhart, J.Y.R. Chu, N. Neuss, C.H. Nash, J. Occolowitz, L.L. Huckstep and N. De La Higuera, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 564 (1974).
64. C.M. Stevens P. Vohra, E. Inamine and O.A. Roholt, *Fed. Proc.*, **12**, 275 (1953).
65. C.M. Stevens, P. Vohra, E. Inamine and O.A. Roholt, *J. Biol. Chem.*, **205**, 1001 (1953).
66. H.R.V. Arnstein and P.T. Grant, *Biochem. J.*, **57**, 353 (1953).
67. H.R.V. Arnstein and J.C. Crawhall, *Biochem. J.*, **67**, 180 (1957).
68. D.A. Bender, *Amino Acid Metabolism*, pp.126-132, John Wiley and Sons, New York, N.Y., (1975).
69. H.R.V. Arnstein and P.T. Grant, *Biochem. J.*, **57**, 360 (1954).
70. H.R.V. Arnstein and J.C. Crawhall, *Biochem. J.*, **67**, 180 (1957).
71. H.R.V. Arnstein, *Biochem. J.*, **68**, 333 (1958).
72. H.R.V. Arnstein and H. Margreiter, *Biochem. J.*, **68**, 339 (1958).
73. I.H. Segel and M.J. Johnson, *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**, 216 (1963).
74. P.G. Caltrider and H.F. Niss, *Appl. Microbiol.*, **14**, 746 (1966).
75. B.A. Kern and E. Inamine, *J. Antibiot.*, **34**, 583 (1981).
76. S.W. Drew and A.L. Demain, *J. Antibiot.*, **28**, 889 (1975).
77. D.J. Morecombe and D.W. Young, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 198 (1975).
78. D.W. Young, D.J. Morecombe and P.K. Sen, *Eur. J. Biochem.*, **75**, 133 (1977).
79. D.J. Aberhart, L.J. Lin J.Y.R. Chu, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2517 (1975).
80. J.A. Huddleston, E.P. Abraham, D.W. Young, D.J. Morecombe and P.K. Sen, *Biochem. J.*, **169**, 705 (1978).
81. E.P. Abraham, G.G.F. Newton and S.C. Warren, *Proc. Intern. Assoc. Microbiol. Symp. Appl. Microbiol.*, **6**, 79 (1964).
82. H.R.V. Arnstein and D. Morris, *Biochem. J.*, **76**, 357 (1960).
83. S. Wolfe and M.G. Jokinen, *Can. J. Chem.*, **57**, 1388 (1979).
84. P.B. Loder and E.P. Abraham, *Biochem. J.*, **123**, 471 (1971).
85. P.B. Loder and E.P. Abraham, *Biochem. J.*, **123**, 477 (1971).
86. H.R.V. Arnstein and D. Morris, *Biochem. J.*, **71**, 89 (1959).
87. H.R.V. Arnstein and D. Morris, *Biochem. J.*, **76**, 323 (1960).
88. T. Kanzaki, H. Shirafuji, Y. Fujisawa, T. Fukita, K. Nara, K. Kitano and M. Kida, *Abstr. Intern.*

- Symp. Genet. Ind. Microorg.*, 2nd 1974, p. 32.
89. R.L. Baxter, A.I. Scott and M. Fukumura, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 66 (1982).
 90. J.E. Baldwin and T.S. Wan, *Tetrahedron*, **37**, 1589 (1981).
 91. E.P. Abraham, *Biosynthesis and Enzymic Hydrolysis of Penicillins and Cephalosporins*, University of Tokyo Press, Tokyo, Japan (1974).
 92. J.E. Baldwin, B.L. Johnson, J.J. Usher, E.P. Abraham, J.A. Huddleston and R.L. White, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1271 (1980).
 93. G. Bahadur, J.E. Baldwin, L.D. Field, E-M. M. Lehtonen, J.J. Usher and C.A. Vallejo, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 917 (1981).
 94. P.A. Lenke and C.H. Nash, *Can. J. Microbiol.*, **18**, 225 (1972).
 95. J. O'Sullivan, R.C. Bleaney, J.A. Huddleston and E.P. Abraham, *Biochem. J.*, **184**, 421 (1979).
 96. P.A. Fawcett, J.J. Usher, J.A. Huddleston, R.C. Bleaney, J.J. Nisbet and E.P. Abraham, *Biochem. J.*, **157**, 651 (1976).
 97. G.S. Jayatilake, J.A. Huddleston and E.P. Abraham, *Biochem. J.*, **194**, 645 (1981).
 98. T. Konomi, S. Herchen, J.E. Baldwin, M. Yoshida, N.A. Hunt, and A.L. Demain, *Biochem. J.*, **184**, 427 (1979).
 99. J.E. Baldwin, B.L. Johnson and J.J. Usher, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **24**, 1271 (1980).
 100. S.E. Jensen, D.W.S. Westlake and S. Wolfe, *J. Antibiot.*, **34**, 483 (1981).
 101. R.M. Adlington, R.T. Aplin, J.E. Baldwin, L.D. Field, E-M. M. John, E.P. Abraham and R.L. White, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 137 (1982).
 102. G.A. Bahadur, J.E. Baldwin, J.J. Usher, E.P. Abraham, G.S. Jayatilake and R.L. Wolfe, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 7650 (1981).
 103. A.J. Birch and M. Smith, in *Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity*, p.247, Ciba Foundation (1958).
 104. P.A. Fawcett, J.J. Usher and E.P. Abraham, in *The Proceedings of the Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms*, August, 1974, Sheffield, England, Ed. K.D. McDonald, Academic Press, New York, N.Y., (1976).
 105. J.E. Baldwin, S.B. Haber and J. Kitchin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 790 (1973).
 106. J.E. Baldwin, M. Jung, J.J. Usher, E.P. Abraham, J.A. Huddleston and R.L. White, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 246 (1981).
 107. H.R.V. Arnstein and M.E. Clubb, *Biochem. J.*, **68**, 528 (1958).
 108. B. Sjöberg, H. Thelin, L. Nathorst-Westfelt, E.E. van Tamelen and E.R. Wagner, *Tetrahedron Lett.*, 281 (1965).
 109. J.E. Baldwin, A.L. J. Beckwith, A.P. Davis, G. Procter and K.A. Singleton, *Tetrahedron*, **37**, 2181 (1981).
 110. D.J. Aberhart, L.J. Lin, J.Y.R. Chu, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2157 (1975).
 111. D.J. Morecombe and D.W. Young, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 198 (1975).
 112. N. Neuss, C.H. Nash, J.E. Baldwin, P.A. Lenke and J.B. Grutzner, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 3797 (1975).
 113. D.J. Aberhart and L.J. Lin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2320 (1974).
 114. J.T. Groves, G.A. McClusky, R.E. White and M.J. Coon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 154 (1978).
 115. B. Morin, E.M. Gordon and J.R. Lake, *Tetrahedron Lett.*, 5213 (1973).
 116. B. Meesschaert, P. Adriaens and H. Eyssen, *J. Antibiot.*, **33**, 722 (1980).
 117. E.P. Abraham, R.M. Adlington, J.E. Baldwin, M.J. Crimmin, L.O. Field, G.S. Jayatilake and R.L. White, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1130 (1982).
 118. E.P. Abraham and G.G.F. Newton, in "Antibiotics", Eds. D. Gottlieb and P.D. Shaw, Springer-Verlag, Berlin and New York, pp.1-16, (1967).
 119. E.P. Bost and A.L. Demain, *Biochem. J.*, **162**, 681 (1977).
 120. N. Yoshida, T. Konomi, M. Kohsaka, J.E. Baldwin, S. Herchen, P. Singh, N.A. Hunt and A.L. Demain, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **75**, 6253 (1978).

121. D.J. Hook, L.T. Chang, R.P. Elander and R.B. Morin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 258 (1979).
122. R.D. Miller, L.L. Huckstep, J.P. McDermott, S.W. Queener, S. Kukolja, D.O. Spry, T.K. Elzey, S.W. Lawrence and N. Neuss, *J. Antibiot.*, **34**, 984 (1981).
123. M. Kohsaka and A.L. Demain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 465 (1976).
124. H.R. Felix, F.H. Peter and H.J. Treichler, *J. Antibiot.*, **34**, 567 (1981).
125. J.E. Baldwin, J.W. Keeping, P.D. Singh and C.A. Vallejo, *Biochem. J.*, **194**, 649 (1981).
126. J.E. Baldwin, P.D. Singh, M. Yoshida, Y. Sawada and A.L. Demain, *Biochem. J.*, **186**, 889 (1980).
127. S.E. Jensen, D.W.S. Westlake, R.J. Bowers and S. Wolfe, *J. Antibiot.*, **35**, 1351 (1982).
128. S.E. Jensen, D.W.S. Westlake and S. Wolfe, *J. Antibiot.*, **35**, 483 (1982).
129. Y. Sawada, N.A. Hunt and A.L. Demain, *J. Antibiot.*, **32**, 1303 (1979).
130. K. Sakaguchi and S. Murao, *J. Agric. Chem. Soc.*, Japan, **23**, 411 (1950).
131. H. Vandehaeghe, M. Claesen, A. Vlietinck and G. Parmentier, *Appl. Microbiol.*, **16**, 1557 (1968).
132. D.L. Pruess and M.J. Johnson, *J. Bacteriol.*, **94**, 1502 (1967).
133. B. Spencer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 170 (1968).
134. P.A. Fawcett, J.J. Usher and E.P. Abraham, *Biochem. J.* **151**, 729 (1975).
135. S.P. Brundidge, F.C.A. Gaeta, D.J. Hook, C. Sapino, Jr., R.P. Elander and R.B. Morin, *J. Antibiot.*, **33**, 1348 (1980).
136. Y. Fujisawa, H. Shirafuji, M. Kida, K. Nara, M. Yomeda and T. Kanzaki, *Nature*, **246**, 154 (1973).
137. Y. Fujisawa, K. Kitano and T. Kanzaki, *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2049 (1975).
138. S.W. Queener, J.J. Capone, A.B. Radue and R. Nagarajan, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **6**, 334 (1974).
139. M. Liersch, J. Nuesch and H.J. Treichler, *Proc. Symp. Genet. Ind. Microogr.*, 2nd (1974) Abstracts, p. 48.
140. J.E. Baldwin, B. Chakravarti, M. Jung, M.J. Patel P.D. Singh, J.J. Usher and C. Vallejo, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 934 (1981).
141. C.L. Ginther, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**, 522 (1979).
142. Y. Aharonowitz and A.L. Demain, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **14**, 159 (1978).