

BIOKONVERSI SEFALOSPORIN C MENJADI ASAM 7-AMINOSEFALOSPORANAT DENGAN SEFALOSPORIN ASILASE

Bioconversion of Cephalosporin C into 7-Aminocephalosporanic Acid with Cephalosporin Acylase

Dudi Hardianto^{1*}, Bima Wedana Isdiyono², Fransiskus Xaverius Ivan²

¹Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, BPPT, Gedung LAPTIAB 611-612 Kawasan Puspiptek Tangerang Selatan, Banten 15314

²Universitas Surya, Unity Tower Building, Jl. Boulevard Gading Serpong, Kav. M5 No. 21, Summarecon Serpong, Curug Sangereng, Tangerang, Banten 15810

*E-mail: dudi.hardianto@bppt.go.id

ABSTRACT

*Cephalosporins are the most widely used class of β -lactam antibiotic in the world and clinically active against gram positive and gram negative bacteria. Cephalosporin C (CPC) is naturally produced by fungus *Cephalosporium acremonium*. CPC has moderate antibacterial activity with minimum inhibitory concentration values of 25-100 $\mu\text{g/mL}$ and 12-25 $\mu\text{g/mL}$ for gram-positive and for gram-negative bacteria, respectively. CPC can be converted into 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) as intermediate compound for cephalosporin derivatives by two-steps or one-step enzymatic method. Two-step enzymatic method uses D-amino acid oxidase (DAAO) to produce glutaryl-7-amino cephalosporanic acid (GL 7-ACA) for the first step and GL-7-ACA acylase to produce 7-ACA for the second step. One-step enzymatic method uses CPC acylase to convert CPC into 7-ACA directly. Some microorganisms produce CPC acylase, such as *Pseudomonas sp.*, *Bacillus megaterium*, *Aeromonas sp.*, dan *Arthrobacter*. A natural CPC acylase has low activity and genetic engineering was used to increase its activity.*

Keywords: *Cephalosporin, cephalosporin acylase, 7-ACA, genetic engineering, mutation*

ABSTRAK

Sefalosporin merupakan antibiotik golongan β -laktam yang paling banyak digunakan di dunia dan secara klinis aktif terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Sefalosporin C merupakan sefalosporin alami yang dihasilkan oleh kapang *Cephalosporium acremonium*. Sefalosporin C mempunyai aktivitas antibakteri moderat dengan nilai konsentrasi hambat minimum 25-100 $\mu\text{g/mL}$ untuk bakteri gram positif dan 12-25 $\mu\text{g/mL}$ untuk bakteri gram negatif. Sefalosporin C dapat diubah menjadi asam 7-aminosefalosporinat (7-ACA) sebagai senyawa antara untuk pembuatan turunan sefalosporin dengan metode enzimatik secara dua atau satu tahap. Produksi 7-ACA secara enzimatik dapat menggunakan metode dua tahap dan satu tahap enzimatik. Metode enzimatik secara dua tahap menggunakan enzim asam D-amino oksidase (DAAO) untuk menghasilkan asam glutaryl-7-aminosefalosporinat (GL-7-ACA) pada tahap pertama dan menggunakan asam glutaryl-7-aminosefalosporinat asilase untuk menghasilkan 7-ACA pada tahap kedua. Metode enzimatik secara satu tahap menggunakan sefalosporin asilase untuk mengubah CPC menjadi 7-ACA secara langsung. Beberapa mikroorganisme penghasil sefalosporin asilase yaitu *Pseudomonas sp.*, *Bacillus megaterium*, *Aeromonas sp.*, dan *Arthrobacter*. Aktivitas CPC asilase alami sangat rendah dan rekayasa genetik digunakan untuk meningkatkan aktivitasnya.

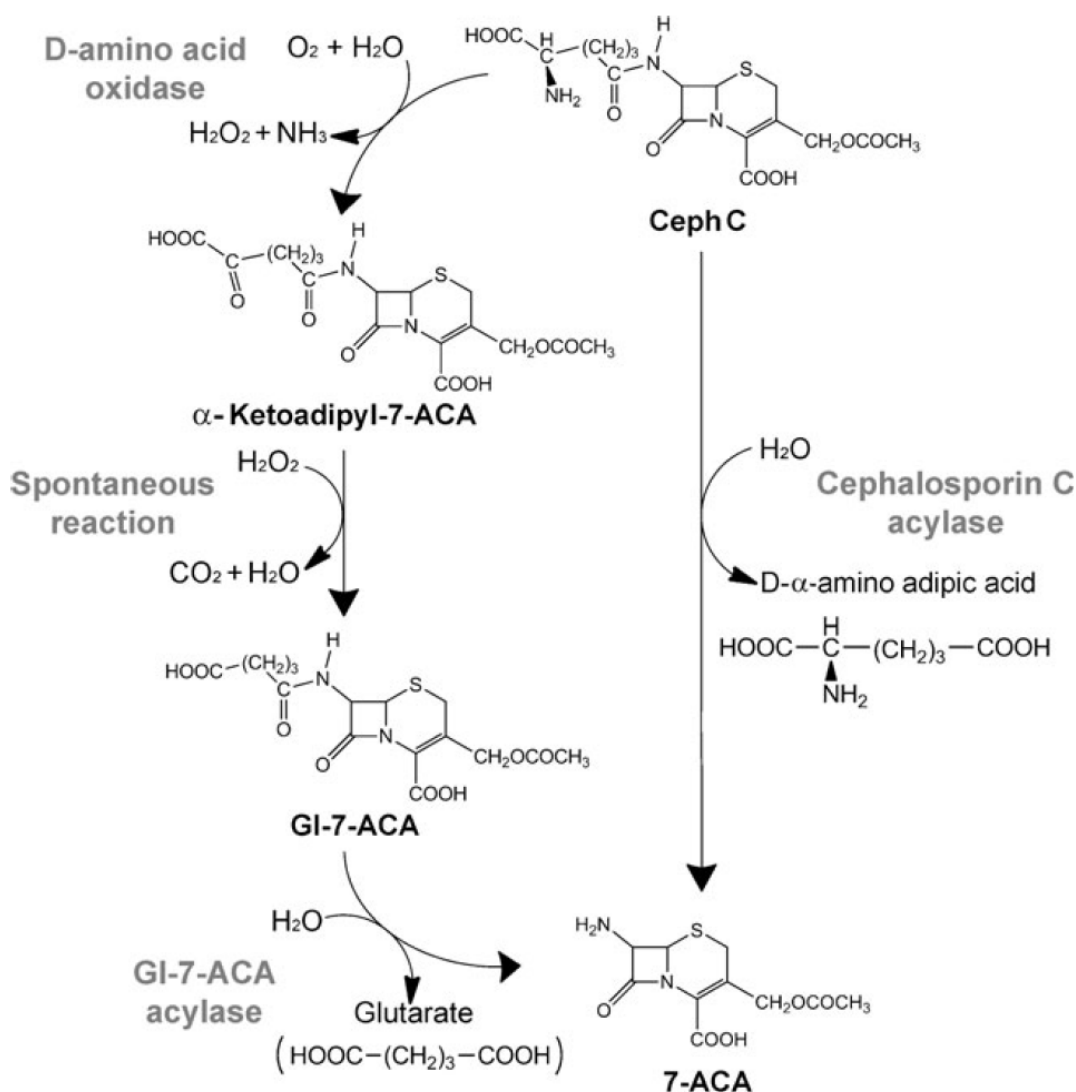
Kata kunci : Sefalosporin, sefalosporin asilase, 7-ACA, rekayasa genetik, mutasi

PENDAHULUAN

Sefalosporin C merupakan antibiotik golongan β -laktam yang dihasilkan oleh kapang *Cephalosporium acremonium* dan ditemukan oleh Giuseppe Brotzu pada tahun 1945 (Jobanputra & Vasait 2015, Pollegioni et al. 2013). Sefalosporin C mempunyai aktivitas antibakteri moderat dengan konsentrasi hambat minimum antara 25-100 $\mu\text{g/mL}$ untuk bakteri gram positif dan 12-25 $\mu\text{g/mL}$ untuk bakteri gram negatif (Pollegioni et al. 2013) sehingga tidak potensial untuk pengobatan (Vasait & Jobanputra 2015). Robert Morin menemukan proses secara kimia untuk mengubah sefalosporin C (CPC) menjadi asam 7-aminosefalosporanat (7-ACA) sebagai prekursor untuk turunan sefalosporin semisintetik (Pollegioni et al. 2013).

Mekanisme kerja sefalosporin menghambat enzim transpeptidase, enzim yang berperan dalam tahap akhir sintesis lapisan peptidoglikan dinding sel bakteri (Golden et al. 2013).

Antibiotik sefalosporin dibagi menjadi dua kelompok, yaitu: sefalosporin yang berasal dari penisilin G atau V dan sefalosporin yang berasal dari sefalosporin C. Umumnya turunan sefalosporin yang berasal dari penisilin lebih mudah diabsorpsi saluran cerna dibandingkan turunan sefalosporin yang berasal dari sefalosporin C (Barber et al. 2004). Sefalosporin mempunyai spektrum kerja yang luas, secara klinis aktif terhadap bakteri gram positif dan negatif, tahan terhadap enzim β -laktamase, dan lebih aman dibandingkan obat golongan penisilin (Jobanputra & Vasait 2015, Vasait & Jobanputra 2015).



Gambar 1. Biokonversi CPC menjadi 7-ACA secara enzimatik (Pollegioni et al. 2013)

Perkembangan generasi pertama, kedua, dan ketiga dari antibiotik sefalosporin terjadi karena adanya resisten terhadap antibiotik. Sefalosporin generasi pertama aktif terhadap bakteri gram positif. Modifikasi sefalosporin menghasilkan turunan sefalosporin yang mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih baik terutama untuk bakteri yang resisten. Program pengembangan turunan sefalosporin dilakukan oleh beberapa industri farmasi menghasilkan turunan sefalosporin baru yang mempunyai sifat farmakokinetik dan farmakodinamik yang lebih baik dibandingkan dengan generasi sebelumnya (Barber et al. 2004).

PRODUKSI 7-ACA

7-ACA dapat diproduksi secara fisikokimia dan enzimatis (Ren et al. 2014). Secara fisikokimia 7-ACA dihasilkan melalui reaksi deasilasi. Reaksi fisikokimia ini mempunyai banyak kekurangan, diantaranya: memerlukan senyawa organik yang bersifat racun, menghasilkan kuantitas dan kualitas produk yang rendah, memerlukan tahapan reaksi yang banyak sehingga memerlukan waktu dan biaya yang banyak. Reaksi fisikokimia digantikan dengan reaksi enzimatis secara dua tahap (Gambar 1). Tahap pertama enzim asam α -amino oksidase (DAAO) membentuk glutaril asam 7-aminosefalosporinat (GL-7-ACA). Tahap kedua menggunakan enzim GL-7-ACA asilase untuk membentuk 7-ACA (Ren et al. 2014, Shin et al. 2009). Beberapa tahun terakhir ini, ditemukan beberapa bakteri yang menghasilkan enzim CPC asilase untuk konversi CPC secara langsung menjadi 7-ACA (Ren et al. 2014, Vasait & Jobanputra 2015). Produksi 7-ACA secara enzimatis sekarang ini digunakan secara luas. Pasar dunia dari 7-ACA sebagai bahan

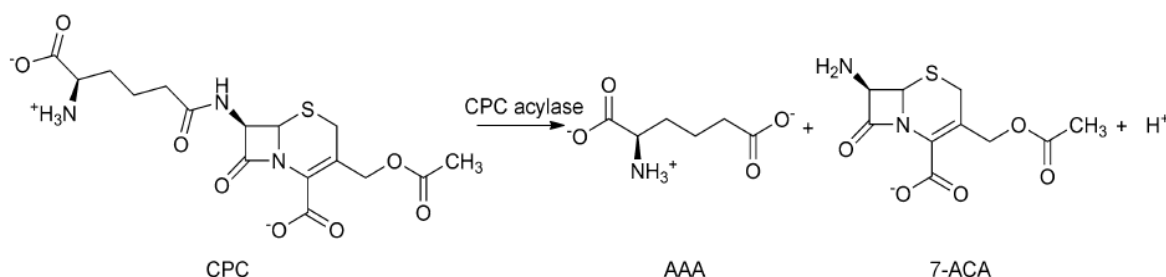
baku antibiotik turunan sefalosporin diestimasi sekitar \$ 400 juta (Pollegioni et al. 2005). Harga 7-ACA antara \$ 115 sampai 130/kg (Elander 2003). Beberapa antibiotik turunan sefalosporin hasil semisintetik dari 7-ACA, antara lain: sefaklor, sefiksim, seftezol, sefotiam, sefazedon, sefazolin, sefoperazon, dan seforadin (Egorov et al. 2000).

PENGHASIL SEFALOSPORIN ASILASE

Sefalosporin asilase merupakan enzim yang berfungsi dalam mengkonversi substrat sefalosporin C (CPC) menjadi asam 7-aminosefalosporinat (7-ACA) (Gambar 2). 7-ACA merupakan senyawa yang menjadi kunci penting dalam memproduksi antibiotik sefalosporin yang hingga saat ini memasuki pangsa pasar antibiotik dunia sebesar 40% (Ren et al. 2014).

Sefalosporin asilase dihasilkan oleh beberapa mikroorganisme, seperti: *Achromobacter xylosoxidans*, *Aeromonas* sp., *Alcaligenes xylosoxidans* MTCC*491, *Arthrobacter viscosus*, *Bacillus laterosporus*, *Flavobacterium* sp., *Micrococcus luteus* NCIM 2170, *Paecilomyces* sp., *Pseudomonas diminuta* N176, *P. cepacia*, *P. putida*, dan *Pseudomonas* sp. 130 (Gaurav et al. 2010, Nupura et al. 2008, Sonawane 2006, Zhang et al. 2014).

Sefalosporin asilase diklasifikasikan ke dalam lima kelas berdasarkan urutan, massa molekul dan sifat enzimatis. Anggota dari setiap kelas memiliki kemiripan yang tinggi berdasarkan spesifisitas substrat dan konservasi urutan (kemiripannya sekitar > 90% dari asam nukleat atau asam amino). Anggota kelas I (P130 dari *Pseudomonas* sp. 130), kelas II (A14 dari *Pseudomonas* sp. A14), kelas III (N176 dari *Pseudomonas* sp. N176) yang menunjukkan aktivitas tertinggi terhadap CPC (4% dibandingkan dengan



Gambar 2. Mekanisme katalisis CPC asilase dalam memproduksi 7-ACA (Xiao et al. 2014)

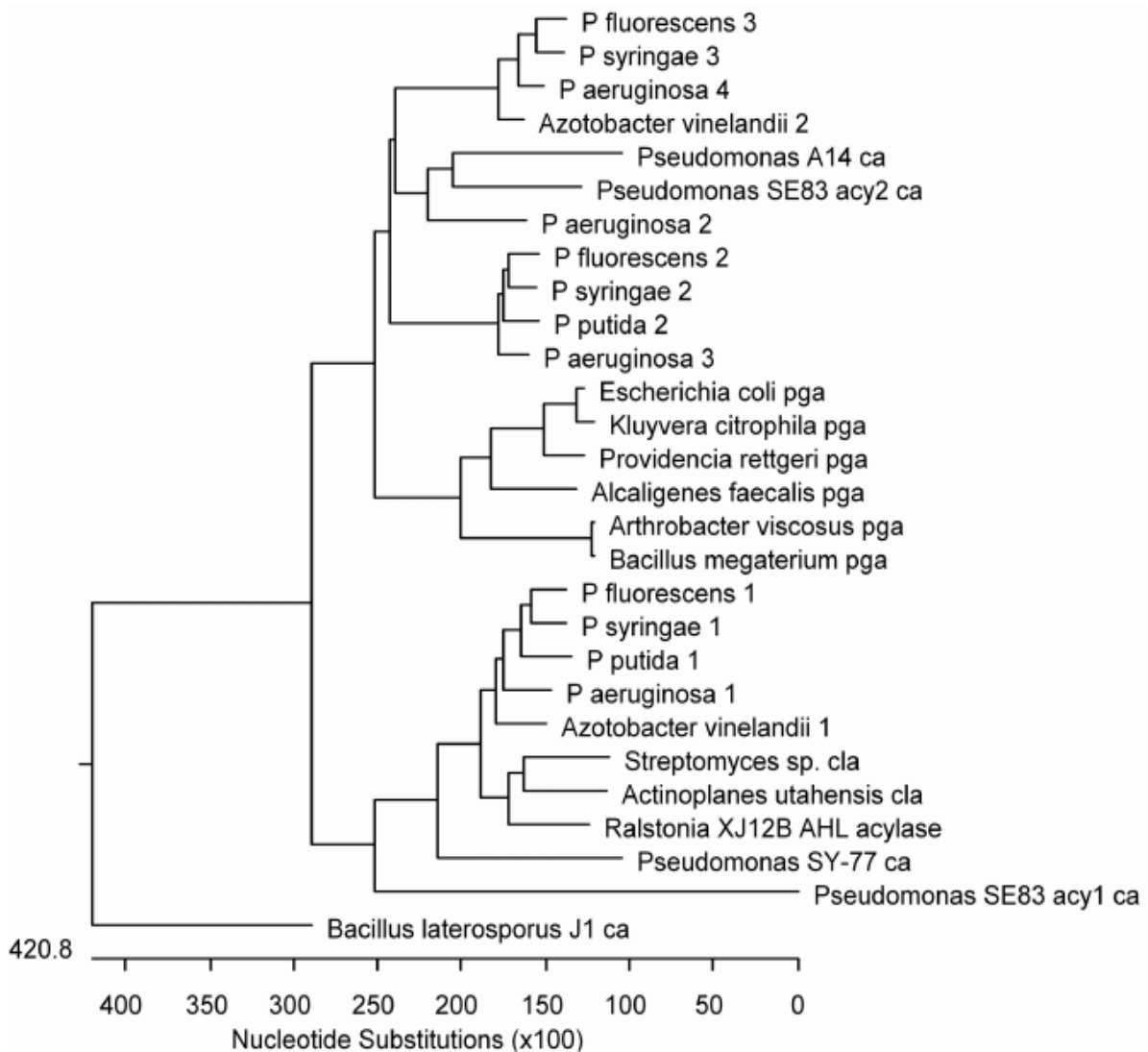
GL-7-ACA), kelas IV (SE83 dari *Pseudomonas* sp. SE83) dan kelas V (*B. laterosporus* J1) (Golden et al. 2013, Kim et al. 2000, Yau et al. 2006). Hubungan kekerabatan dari mikroorganisme penghasil CPC asilase di-tunjukkan pada pohon filogenetik (Gambar 3).

REKAYASA CPC ASILASE

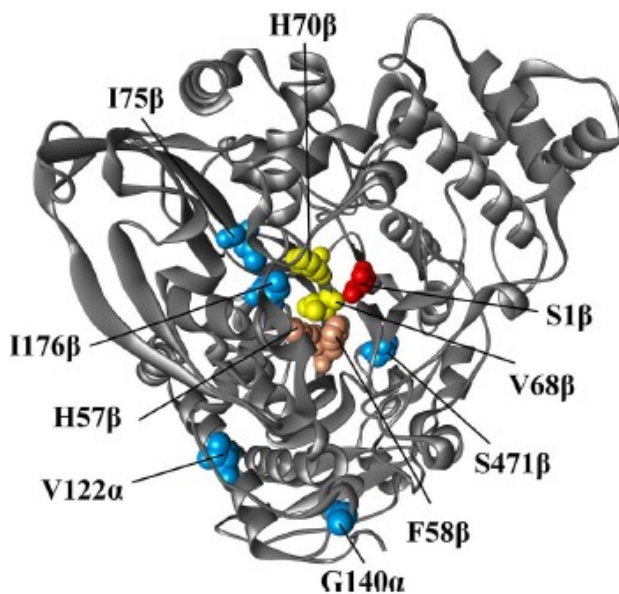
Sefalosporin asilase dari galur mikroorganisme alami mempunyai beberapa kelemahan, diantaranya: spesifisitas yang rendah terhadap CPC dan lebih aktif terhadap GL-7-ACA (sekitar 0-4% dari GL-7-ACA), dapat diinhibisi oleh substrat dan produknya, serta kemampuan hidrolisis CPC asilase tidak cukup aktif untuk memotong ikatan amida yang terletak pada posisi ke-7 dari CPC. Hal ini

menyebabkan terbatasnya penggunaan CPC asilase dalam penerapan industri (Shin et al., 2009, Xiao et al. 2014).

Rekayasa genetika atau mutasi terarah telah dilakukan terhadap sefalosporin asilase untuk meningkatkan aktivitasnya dalam konversi CPC menjadi 7-ACA. Mutasi terarah ini melalui mutasi gen pengkode sefalosporin asilase yang dapat dilakukan dengan cara mengubah konformasi rantai samping dari residu aktif pada enzim. Residu aktif sefalosporin asilase merupakan daerah yang sering dijadikan lokasi untuk penambatan karena residu yang terlibat didalamnya terdiri dari residu katalitik, yaitu, SerB1, HisB23, HisB70 dan AsnB242, dan kunci ikatan residu, yaitu, ArgB24, TyrB32, HisB57 dan HisB178 yang masing-masing memiliki peran penting dalam aktivitas sefalosporin



Gambar 3. Hubungan Kekerabatan mikroorganisme penghasil CPC Asilase dalam Pohon Filogenetik (Sio 2004)



Gambar 4. Model homologi dari sefalosporin asilase SE83 Acyll direpresentasikan dalam bentuk gambar oleh Discovery Studio 2.1 (Accelrys Software Inc., San Diego, CA). Lokasi residu yang dimutasi pada putaran pertama dan kedua dari kumpulan CASTing di tampilkan dalam bentuk bulat berwarna coklat muda dan kuning. Lokasi residu yang dimutasi di kumpulan *site-directed saturation mutagenesis* (SDSM) di tampilkan dalam bentuk bulat berwarna biru muda (Xiao et al. 2014)

asilase (Li et al. 2014). Residu aktif sefalosporin asilase dalam bentuk konformasi 3D dapat dilihat pada Gambar 4.

Hasil mutasi terarah memiliki pengaruh seperti meningkatkan atau menurunkan aktivitas enzim dengan maksud dan tujuan tertentu (Xiao et al. 2014). Rekayasa enzim dapat dilakukan secara *in silico* yaitu menggunakan teknik komputasi dengan bantuan berbagai macam perangkat lunak dengan membuat pemodelan mutasi secara struktural dan eksperimental pada Acyll dari *Pseudomonas* sp. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui mekanisme katalitik mutan sehingga modifikasi enzim akan lebih efisien (Yu 2013).

Mutasi terarah untuk meningkatkan aktivitas sefalosporin asilase sebesar 790% pada mutasi Q50βM-Y149αK-F177βG (Oh et al. 2003). Metode urutan keselarasan, pemodelan homologi, dan penambatan molekuler, struktur sisi aktif dari sefalosporin asilase dan kompleksnya serta mutasi pada daerah sisi aktif dianalisis berdasarkan interaksi ikatan antarmolekul,

halangan sterik, stabilisasi ikatan hidrogen, solvasi, dan kontribusi elektrostatis. Parameter eksperimen katalitik yang diukur, yaitu k_{cat} dan K_m . Pemodelan sefalosporin asilase Acyll dan S12 memberikan bukti bahwa mutasi terarah pada daerah sekitar sisi aktif berkontribusi dalam meningkatkan aktivitas enzim, transisi substrat, dan penurunan energi ikatan reaksi. Berdasarkan penelitian modifikasi *in silico* dari sefalosporin asilase akan efisien jika fokus pada situs asam amino untuk mendapatkan kemampuan transisi pengikatan yang lebih kuat (Yu 2013).

Penelitian lain yang menggunakan 8 mutan sefalosporin asilase menghasilkan beberapa informasi baru yaitu pentingnya ikatan hidrogen antara enzim dan substrat. Ikatan hidrogen sefalosporin asilase dengan CPC kurang baik karena ukuran CPC lebih besar dibandingkan dengan GL-7-ACA yang merupakan substrat alami *Pseudomonas* sp. N176 (Li et al. 2014). Oleh karena itu, mutasi yang berfokus pada penghematan ruang untuk mengakomodasi CPC, menyediakan ikatan hidrogen yang cukup dengan kelompok karboksil dan asam amino CPC akan meningkatkan efisiensi katalitik dari sefalosporin asilase terhadap CPC (Li et al. 2014).

HisB57Ser merupakan salah satu mutan yang menghasilkan cukup ruang untuk mengakomodasi CPC, kemudian dispersi elektrostatis juga timbul dari ArgB24 dan HisB178 yang mendorong kelompok asam amino dari CPC untuk lebih dekat dengan atom O16 dari CPC. Oleh karena itu, mutasi yang meningkatkan kondisi elektrostatis dari rantai samping CPC dapat menambah efisiensi katalitik dari sefalosporin asilase terhadap hidrolisis CPC. Mutan dengan aktivitas yang tinggi biasanya memiliki jumlah ikatan hidrogen yang lebih banyak yang terbentuk antara residu dan kelompok fungsional CPC pada sisi aktif. Penelitian ini memberikan informasi desain baru kedepannya untuk efisiensi katalitik yang lebih tinggi terhadap hidrolisis CPC dengan cara memasukkan mutasi yang meningkatkan jumlah ikatan hidrogen dalam sisi aktif sefalosporin asilase untuk menstabilkan tahap transisi, sehingga mengurangi hambatan aktivasi sefalosporin asilase (Li et al. 2014).

KESIMPULAN

Turunan sefalosporin yang diperoleh dari hasil semisintetik prekursor 7-ACA mempunyai spektrum kerja luas terhadap bakteri gram positif dan negatif, stabil terhadap β -laktamase, dan relatif aman dibandingkan dengan golongan penisilin. CPC alami yang diproduksi *Cephalosporium acromonium* dikonversi menjadi 7-ACA secara fisikokimia dan enzimatik. Enzimatik secara dua tahap reaksi banyak digunakan dibandingkan dengan cara fisikokimia. Sekarang ini, penelitian konversi secara enzimatik dengan satu tahap menggunakan CPC asilase berkembang dengan pesat untuk mendapatkan enzim yang mempunyai aktivitas tinggi dari mikroorganisme baru dan dengan cara melakukan mutasi terarah terhadap gen pengkode sefalosporin asilase yang sudah ada.

DAFTAR PUSTAKA

- Barber MS, Giesecke U, Reichert A, Minas W (2004) Industrial enzymatic production of cephalosporin-based β -lactams. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 88:179-215
- Egorov AM, Kurochkina VB, Sklyarenko AV, Nys PS (2000) Enzymatic transformation of betalactam antibiotics: Trend of development and approaches to practical implementation. *Biocatalysis Fundament Appl* 41:43-46
- Elander RP (2003) Industrial production of β -lactam antibiotic. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:385-392. Doi: 10.1007/s00253-003-1274-y
- Gaurav K, Kundu K, Kundu S (2010) Biosynthesis of cephalosporin-C acylase enzyme: optimal media design, purification, and characterization. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 38:277-283. Doi: 10.3109/10731199.2010.482036
- Golden E, Paterson R, Tie WJ, Anandan A, Flematti G, Molla G, Rosini E, Pollegioni L, Vrielink A (2013) Structure of a class III engineered cephalosporin acylase: comparisons with class I acylase and implications for differences in substrate specificity and catalytic activity. *Biochem J* 451:217-226. Doi: 10.1042/BJ20121715
- Jobanputra AH, Vasait RD (2015) Cephalosporin C acylase from *Pseudomonas* species: production and enhancement of its activity by optimization of process parameters. *Biocatal Agric Biotechnol* 4:465-470. Doi: 10.1016/j.bcab.2015.06.009
- Kim Y, Yoon KH, Khang Y, Turley S, Hol WGJ (2000) The 2.0 Å crystal structure of cephalosporin acylase. *Structure* 8:1059-1068. Doi: 10.1016/S0969-2126(00)00505-0
- Li Q, Huang X, Zhu Y (2014) Evaluation of active designs of cephalosporin C acylase by molecular dynamics simulation and molecular docking. *J Mol Model* 20:2314. Doi: 10.1007/s00894-014-2314-5
- Nupura H, Asmita T, Sharath B, Asmita P (2008) Media optimization for the production of cephalosporin C acylase from a novel bacterial source: *Alcaligenes xylosoxidans* MTCC*491. *Res J Biotechnol* 3:16-21
- Oh B, Kim M, Yoon J, Chung K, Shin Y, Lee D, Kim Y (2003) Deacylation activity of cephalosporin acylase to cephalosporin C is improved by changing the side-chain conformations of active-site residues. *Biochem Biophys Res Commun* 310:19-27. Doi:10.1016/j.bbrc.2003.08.110
- Pollegioni L, Lorenzi S, Rosini E, Marcone GL, Molla G, Verga R, Cabri W, Pilone MS (2005) Evolution of an acylase active on cephalosporin C. *Protein Sci* 14:3064-3076. Doi: 10.1110/ps.051671705
- Pollegioni L, Rosini E, Molla G (2013) Cephalosporin C acylase: dream and(/or) reality. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:2341-2355. Doi: 10.1007/s00253-013-4741-0
- Ren Y, Lei Y, Zhu Y (2014) Site-directed mutagenesis of cephalosporin c acylase and enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. *Turk J Biochem* 39:51-56. Doi: 10.5505/tjb.2014.48569
- Shin YC, Jeon JYJ, Jung KH, Park MR, Kim

- Y (2009) Cephalosporin C acylase mutant and method for preparing 7-aca using same. Patent US 7592168 B2
- Sio CF (2004) Mutants and homologs of cephalosporin acylase: for antibiotics and antibiosis. Thesis, Rijksuniversiteit Groningen
- Sonawane VC (2006) Enzymatic modifications of cephalosporins by cephalosporin acylase and other enzymes. *Crit Rev Biotechnol* 26:95-120. Doi: 10.1080/07388550600718630
- Vasait RD, Jobanputra AH (2015) Single step bioconversion of cephalosporin C by strain of *Achromobacter* species isolated from rhizosphere soil. *Adv Biores* 6:124-127. Doi: 10.15515/abr.0976-4585.6.3.124127
- Xiao Y, Huo X, Qian Y, Zhang Y, Chen G, Ouyang P, Lin Z (2014) Engineering of a CPC acylase using a facile pH indicator assay. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:1617-1625. Doi: 10.1007/s10295-014-1501-9
- Yau MH, Wang J, Tsang PW, Fong WP (2006) J1 acylase, a glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase from *Bacillus laterosporus* J1, is a member of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily. *580:1465-1471*. Doi: 10.1016/j.febslet.2006.01.069
- Yu R (2013) Modeling and experimental analysis of cephalosporin C acylase and its mutant. *The Open Biotechnol J* 7:30-37. Doi: 10.2174/1874070701307010030
- Zhang J, Yu H, Wang Y, Luo H, Shen Z (2014) Determination of the second autoproteolytic cleavage site of cephalosporin C acylase and the effect of deleting its flanking residues in the α -C-terminal region. *J Biotechnol* 184:138-145. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.05.016