

*Streptomyces* sp. 가 生産하는 Penicillinase 에 관한 研究  
(第一報) *Streptomyces* sp. YS-40 에 依한 Penicillinase 의 生産條件

都在浩 · 金相達 · \*李東羲  
韓國人蔘煙草研究所  
\*建國大學校 工大 微生物工學科  
(1982년 6월 17일 수리)

Studies on the Penicillinase Produced by a *Streptomyces* sp.  
(Part I). Optimal Conditions for the Penicillinase  
Production by *Streptomyces* sp. YS-40.

Jae Ho Do, Sang Dal Kim and \*Dong Heui Yi  
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute Seoul, Korea  
\*Department of Microbiological Engineering Kon-kuk University, Seoul, Korea  
(Received June 17, 1982)

**Abstract**

Studies were carried out to investigate the optimal culture conditions for the production of penicillinase using a strain of *Streptomyces* sp. isolated from soil, YS-40.

Among the carbon and nitrogen sources, glucose and L-asparagine increased the penicillinase production. The addition of  $Mn^{++}$ ,  $Ca^{++}$  and  $Li^+$  increased the enzyme production, but depressed by  $Fe^{+++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Ag^{++}$ ,  $Ba^{++}$  and  $Sn^{++}$ . L-Leucine slightly increased the enzyme production but L-histidine, L-methionine depressed. Among the vitamins riboflavine, *i*-inositol, hesperidine, niacin-amide, biotin, folic acid, DL- $\alpha$ -lipoic acid increased the enzyme formation. The addition of cephradine, cephalexin, ampicillin, cloxacillin more increased the enzyme formation than that of other  $\beta$ -lactam antibiotics and antibiotics. Optimal pH and temperature on the enzyme formation was pH 7.0 and 28°C respectively. Amount of the enzyme production reached at maximum with incubation for 3 days on the optimal condition.

**序 論**

1940年 Penicillin의 發見은 곧 이어 penicillin을 不活性化시키는 penicillinase의 發見을 招來했으며<sup>1)</sup> 이러한 penicillinase는 Gram-positive 및

Gram-negative bacteria<sup>2)</sup> actinomycetes<sup>4,5)</sup>, yeast<sup>6)</sup>, blue-green algae<sup>7)</sup> 등에 依해서 生産되고 있다. 1950年代에는 Gram陽性細菌의  $\beta$ -lactamase 에 對한 많은 研究가 遂行되었으며 1960年代末에는 Gram陰性細菌의  $\beta$ -lactamase 에 對한 研究가

확실히 進行되었다. 이 酵素의 利用分野로서는 penicillin shock 治療<sup>8</sup>, penicillin 含有 牛乳의 cheese 製造時<sup>9</sup>, yogurt start culture<sup>10</sup> 等の 여러가지 目的에서 應用되고 있다. 本報에서는 *Streptomyces* 屬 菌株가 生成하는 penicillinase 의 生産에 미치는 炭素源, 窒素源, vitamin, amino 酸, 抗生物質 等の 各種 生産條件에 對해서 檢討한 바를 報告하는 바이다.

### 材料 및 方法

#### 供試菌株의 分離 및 選別

本 實驗에 使用한 菌株는 서울 近郊의 土壤에서 分離한 約 200餘種의 放線菌 中에서 penicillinase 를 強力하게 分泌하는 菌株(YS-40)一株를 選別하였다. 菌株의 分離 및 酵素生産用 培地の 組成은 Table 1과 같으며 本 菌株는 孢子型으로 滅菌된 土壤에서 保存하였다.

Table 1. Composition of Media

Medium for Stock Culture	
Glucose	2.0% (v/v)
Peptone	0.1%
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1%
NaCl	0.05%
Agar	2.0%
pH	7.0
Medium for Enzyme Production	
Glucose	2.0%
Asparagine	0.1%
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1%
NaCl	0.05%
pH	7.0

#### 培養方法

Table 1의 酵素生産用 培地를 基本培地로하여 培地成分檢討試驗에 使用하였다. 500ml Erlenmeyer flask에 培地 100ml씩 分注하여 121°C 에서 15分間 殺菌한 後 供試菌의 孢子層을 3loop씩 接種하였다. 培養溫度 30°C로 調節된 회전진탕 배양기(200rpm)를 使用하여 4日間 진탕배양하였다.

#### 酵素活性度 測定

Microiodometric method<sup>11</sup>에 依해서 測定하였다. 즉, 0.2% soluble starch 溶液에 iodine 試藥(0.08M iodine reagent in 3.2M potassium iodide) 0.15ml를 加한 starch-iodine 溶液 1.0ml에 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) 0.8ml와 0.2 mM penicillin G (4,000,000 unit/vial, Hoechst Remedial Ind. Co.) 1.0ml를 加하여 37°C에서 5分間 前處理 시킨 後 酵素液 0.2ml를 加하여 37°C에서 10分間 反應시켰다. 이 溶液을 620mm에서 吸光度를 測定하여 對調區와의 吸光度의 差異가 0.01이 될때의 酵素量을 1 unit로 하였다.

#### 菌體量測定

培養液을 filter paper(Toyo No. 2)로 여과한 後 증류수로 3回 세척하여 105°C 건조기에서 5時間 乾燥하여 重量을 測定하였다. 아울러 菌의 生育狀態를 目測으로 生育이 좋은 것으로 부터 卍, 卍, 卍, + 식으로 表示하였다.

#### 試藥

Vitamin, amino 酸, 糖은 Sigma 社의 製品을 使用하였으며 抗生物質은 penicillin-G, penicillin-V, streptomycin(한독약품), ampicillin, cephaloridine, oxytetracycline(종근당), cefazolin, kanamycin(동아제약), cephradine(日盛新藥), methicillin(한울), cephalexin(보령제약), cloxacillin(영진약품)을 使用하였다. 그 外 本 實驗에 使用된 試藥은 特級을 使用하였다.

#### 結果 및 考察

##### 酵素生産에 미치는 炭素源의 影響

本 酵素生産에 미치는 炭素源의 影響을 調査하기 위하여 單糖類 및 多糖類를 2%가 되도록 培地에 添加하여 培養한 結果 Table 2와 같다. glucose 添加가 本 酵素의 生成을 가장 크게 促進하였으며 그 다음이 cellobiose, maltose 順으로 생산되었다. maltose 의 添加는 glucose 添加區의 절반정도 밖에 미치지 못하였고 특히 raffinose 添加로는 1/10밖에 生産되지 않았다. 이 結果로 미루어 보아 放線菌培養에 一般적으로 많이

使用되는 glucose-asparagine 培地の glucose 는 菌의 生育에서 뿐만 아니라 酵素生成에도 가장 큰 影響을 미친다고 생각된다.

### 酵素生産에 미치는 窒素源의 影響

Glucose 를 2% 加한 基本培地에 各種 窒素源의 濃度를 0.1%가 되게 添加하여 菌의 成長度와 酵素生産能을 調査한 結果는 Table 3 과 같다. 窒素源中에서 L-asparagine 을 使用한 것이 가장 우수하였으며 有機窒素源을 使用했을 때에는 無機窒素源을 使用했을 때보다 菌의 生育이나 酵素生成能이 全般的으로 우수하였으며

그중에서 peptone의 添加가 L-asparagine을 使用한 对照區에 비해 74%程度로 가장 우수하였다. 한편 無機窒素源中에서는  $NH_4H_2PO_4$ 가 菌의 生育이나 酵素生成이 우수하였다.

### 酵素生産에 미치는 金屬鹽의 影響

本 酵素生産에 미치는 金屬鹽의 影響을 調査하기 위하여 基本培地에 金屬鹽을 1 mM 濃度가 되게 添加해서 培養한 結果는 Table 4와 같다.

金屬鹽을 添加하지 않은 區에 比해서  $MnCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $LiCl$ 의 添加順으로 酵素生産을 增加 시

Table 2. Effect of Carbon Source on the Penicillinase Production

Carbon Source	Growth	Final pH	Relative Activity (%)
Raffinose	++	8.1	7
D-Glucose	++++	6.9	100
D-Galactose	++++	6.9	53
L-Rhamnose	+	7.8	27
Sucrose	++++	7.8	44
Maltose	++++	7.8	59
Lactose	++++	7.1	43
Cellobiose	++++	7.1	95
Inulin	++++	7.8	28
Starch	++++	7.0	50

The concentration of carbon source was 2.0% in basal medium and cultured for 4 days at 30°C. The enzyme activity was detected by microiodometric method at 37°C.

Table 3. Effect of Nitrogen Source on the Penicillinase Production.

Nitrogen source	Growth	Final pH	Relative Activity (%)
L-Asparagine	++++	6.8	100
Yeast Extract	++++	7.2	63
Beef Extract	++++	7.1	51
Peptone	++++	7.0	74
$NH_4H_2PO_4$	++	6.1	36
$(NH_4)_2SO_4$	+	6.4	20
$NH_4Cl$	++	6.3	22
$NH_4NO_3$	+	6.7	13

The concentration of nitrogen source was 0.1% in basal medium containing of 2% glucose and cultured for 4 days at 30°C. The enzyme activity was detected by microiodometric method at 37°C.

**Table 4. Effect of Metal Salt on the Penicillinase Production**

Metal salt	Growth	Final pH	Relative Activity (%)
None	++++	6,0	100
LiCl	++++	6.0	107
FeCl <sub>3</sub>	++++	6.2	50
CaCl <sub>2</sub>	++++	6.0	109
FeCl <sub>2</sub>	++++	6.5	83
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	+	5.1	100
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	++++	5.6	95
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	++++	6.3	69
MgSO <sub>4</sub>	++++	6.9	84
ZnCl <sub>2</sub>	+++	4.7	55
AgNO <sub>3</sub>	±	6.3	73
BaCl <sub>2</sub>	++++	5.7	62
SnCl <sub>2</sub>	++	4.2	44
MnCl <sub>2</sub>	++++	6.2	137

Metal salt was added with concentration of 1mM to the medium and cultured for 4 days at 30°C.

**Table 5. Effect of Amino Acid on the Penicillinase Production**

Amino acid	Growth	Final pH	Relative Activity (%)
None	++++	4.9	100
L-Arginine	+++	3.2	70
L-Glutamic acid	+++	4.6	80
L-Leucine	+++	4.1	105
L-Histidine	++	3.9	22
L-Isoleucine	++++	4.8	102
Hydroxy-L-Proline	++++	4.8	76
Glycine	++++	3.7	93
L-Threonine	++++	4.8	89
L-Aspartic acid	+++	4.9	101
L-Methionine	+++	4.1	28
L-Valine	++	3.4	56
L-Asparagine	++++	4.3	103
L-Phenylalanine	+++	3.7	72
L-Proline	++++	4.8	86
L-Tyrosine	++++	4.8	66
L-Alanine	+++	3.9	75
L-Glutamine	+++	4.4	93
L-Lysine	+++	3.7	91
L-Serine	+	5.7	52
Peptone	+++	4.9	80

The cultivation was carried out with addition of various amino acid in concentration of 0.1% to the medium composed of 2% glucose, 0.2% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% NaCl.

**Table 6. Effect of Vitamin on the Penicillinase Production**

Vitamin	Growth	Final pH	Relative Activity (%)
None	++++	6.5	100
P-Aminobenzoic acid	++	6.3	106
Ascorbic acid	++++	6.5	77
d-Biotin	++	6.4	113
Cyanocobalamin	+++	6.5	105
Niacinamide	+++	6.5	115
Niacin	++	6.3	79
D-Pantothenic acid	++++	6.5	88
Pyridoxal·HCl	++	6.4	99
Pyridoxin·HCl	++++	6.1	106
Pyridoxamine·2HCl	++	6.5	100
Riboflavin	+++	6.4	127
Thiamine·HCl	++	6.2	89
DL- $\alpha$ -Lipoic acid	+++	6.7	110
Folic acid	++	6.5	112
Hesperidin	+++	6.5	117
Inositol	+++	6.5	119

Each vitamin was added with concentration of  $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$  to the medium and cultured for 4 days at  $28^\circ\text{C}$

**Table 7. Effect of Antibiotics on the Penicillinase Production.**

Antibiotics	Growth	Final pH	Relative Activity (%)
$\beta$ -Lactams			
Penicillin series			
Penicillin-G	+++	6.0	89
Penicillin-V	+++	4.3	63
Ampicillin	+++	4.2	114
Cloxacillin	+++	6.0	240
Methicillin	+++	4.4	77
Cephalosporine series			
Cephadrine	+++	4.1	288
Cephalexin	+++	4.1	165
Cefazolin	+++	4.3	91
Cephaloridine	+++	6.0	97
Phenicols			
Chloramphenicol	++	4.5	78
Tetracyclines			
Oxytetracycline	++	4.8	84
None	+++	6.0	100

Each antibiotics was added at a concentration of  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  to the medium and cultured for 4 days at  $28^\circ\text{C}$ .

켰으나 그외의 金屬鹽類는 酵素生産을 低下시키든지 또는 아무런 影響을 미치지 않았다. 그중에서  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 는 菌의 生育은 不良하였으나 酵素生産에는 無添加區와 別다른 差異가 없으므로 菌体量에 比해 相對的으로 酵素生産力이 높았다. 重金屬 ion인  $Pb^{2+}$ 가 아주 적은 比率로 減少했다는 事實은 本 菌株의 特別한 性質인 것 같다.

### 酵素生産에 미치는 amino 酸의 影響

各種 amino 酸이 酵素生産에 어떠한 影響을 미치는가를 調査하기 위하여 glucose 2%,  $NH_4H_2PO_4$  0.2%,  $MgSO_4$  0.05%,  $K_2HPO_4$  0.1%, NaCl 0.05%의 組成을 가진 基本培地에 amino 酸을 0.1% 濃度로 添加하여 培養한 後 酵素活性을 測定해 본 結果는 Table 5와 같다.

L-leucine, L-isoleucine, L-aspartic acid, glycine, L-glutamine, L-lysine 등 除外한 거의 모든 amino 酸이 酵素生産을 低下시켰으며 그 중 L-histidine, L-methionine이 가장 크게 低下시켰다.

### 酵素生産에 미치는 vitamin의 影響

本 酵素生産에 미치는 vitamin의 影響을 調査하기 위하여 基本培地를 殺菌한 後 vitamin을 最終濃度  $2.5\mu g/ml$ 가 되도록 無菌的으로 添加하여 培養한 後 酵素活性을 測定한 結果는 Table 6과 같다.

Ascorbic acid, niacin, D-pantothenic acid, thiamine, pyridoxamine을 除外한 거의 모든 vitamin이 酵素生産을 높였으며 그중에서 riboflavin이 無添加區에 比해서 27%의 生産性을 높였다.

### 酵素生産에 미치는 抗生物質의 影響

本 菌株가 penicillinase를 分泌하는 菌이기 때문에 여러가지 抗生物質의 添加가 酵素生産에 미치는 影響을 調査한 結果는 Table 7과 같다. 細胞壁合成을 阻害하는  $\beta$ -lactam 抗生物質中 penicillin 係 抗生物質인 cloxacillin, ampicillin 이 240%, 114%의 酵素生産能을 나타냈으나 penicillin-G, -V, methicillin은 오히려 酵素生産을 低下시켰으며 cephalosporin 係인 cephradine,

cephalexin이 各各 288%, 165%의 酵素生産能을 나타냈다. Cloxacillin의 存在下에서 penicillin-G, cephaloridine의 加水分解를 크게 低下시킨다는 報告가 있으나<sup>12)</sup> 本 實驗에서는 培養基內에 cloxacillin을 添加했을때 240%의 酵素生成能을 나타내었다는 것은 特異한 事實이다. 그외蛋白質合成을 阻害하는 抗生物質인 chloramphenicol과 oxytetracycline은 生育과 酵素生成能을 20~30%씩 低下시켰다. 역시蛋白質合成을 阻害하는 aminoglycoside 係 抗生物質인 streptomycin과 kanamycin은 菌의 生育을 完全히 阻害시켰다.

### 酵素生産에 미치는 pH의 影響

培地의 initial pH가 本 酵素生産에 미치는 影響을 調査하기 위하여 基本培地의 pH를 1N-HCl과 NaOH를 使用하여 pH3.0에서 12.0까지 단계적으로 調節한 後 菌을 接種하여 培養한 結果 Fig.1과 같다. 즉, pH4.0以下와 pH11.0以上에서는 菌의 增殖과 酵素生産이 거의 없었으며 pH7.0에서 菌의 增殖量이나 酵素生産량이 最高에 달했다.

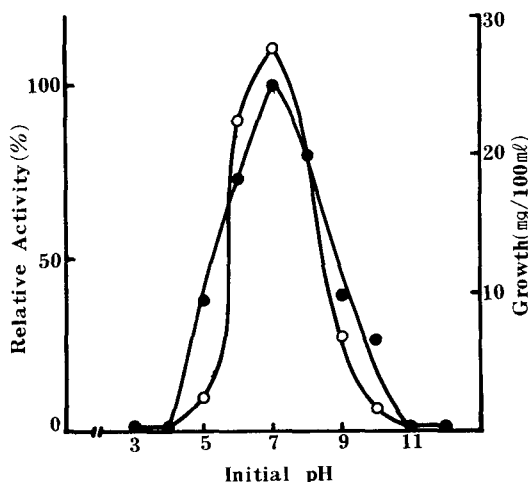


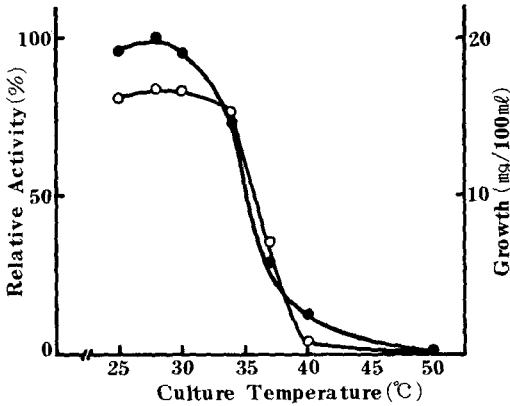
Fig. 1. Effect of Initial pH on the Penicillinase Production.

pH of cultural medium was adjusted with 1N-HCl and NaOH. The cultivation was carried out for 4 days at 30°C.

●—● : relative activity,  
○—○ : cell growth

**酵素生産에 미치는 温度의 影響**

本 酵素生産에 미치는 温度의 影響을 調査하기 위하여 基本 培地에 菌을 接種한 後 25, 28, 30, 34, 37, 40, 50°C의 培養器에서 各各 4日 間 培養하여 酵素生成能을 調査한 結果 Fig. 2와 같이 28°C에서 培養했을때 菌의 增殖이나 酵素生成量이 가장 컸다.



**Fig. 2. Effect of Temperature on the Penicillinase Production.**

After cultivation for 4 days at each temperature, the penicillinase activity was detected.

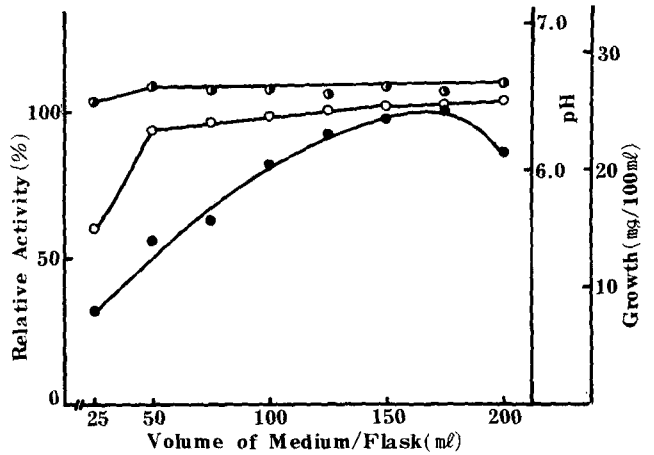
●—● : relative activity, ○—○ : cell growth

**酵素生産에 미치는 通氣效果**

通氣量이 本 酵素生産에 어떠한 影響을 미치는 가를 調査하기 위하여 500ml Erlenmeyer flask에 基本培地를 25ml에서 200ml까지 25ml씩 增量하여 分注하고 本 菌株의 孢子懸濁液을 培養液 25ml마다 0.5ml씩 比例의으로 增量接種하여 28°C 回轉振盪機(200rpm)에서 4日 間 培養하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 培地量이 增加함에 따라 酵素活性이 增加하다가 175ml에서 가장 크게 增加하였다. pH의 变化는 거의 없었으나 菌의 增殖量은 25ml區가 가장 낮았으며 500ml區까지 급속히 增加하여 그 以上에서는 서서히 增加하였다.

**培養時間**

Glucose 2%, L-asparagine 0.1%,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.02%, riboflavin 0.25mg%, cephradine 1 mg%,  $K_2HPO_4$  0.1%, NaCl 0.05%의 組成을 가진 培地를 500ml Erlenmeyer flask에 175

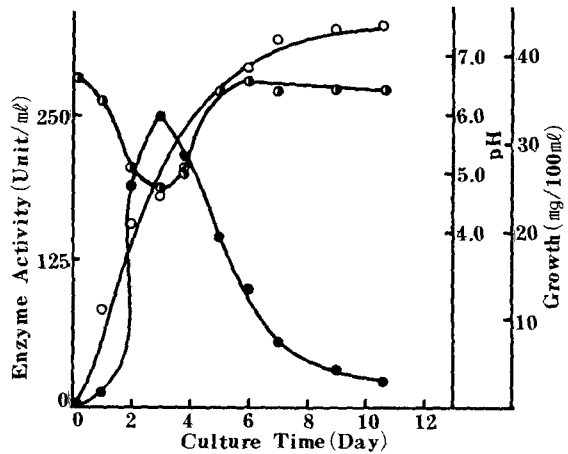


**Fig. 3. Effect of Aeration on the Penicillinase Production.**

Cultivation was carried out on a rotary shaking incubator (200rpm) at 28°C for 4 days.

●—● : relative activity, ○—○ : cell growth  
●—● : final pH

ml씩 加하여 菌을 接種한 後 28°C에서 11日 間 回轉振盪培養(200rpm)하면서 經時的으로 pH의 变化, 菌의 增殖, 酵素生成量을 調査한 結果는 Fig. 4와 같다.



**Fig. 4. Time Course of Penicillinase Production.**

The composition and initial pH of the culture medium was glucose 2%, L-asparagine 0.1%,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.02%, riboflavin 0.25mg%, cephradine 1mg%,  $K_2HPO_4$  0.1%, NaCl 0.05% and pH 7.0. The cultivation was carried out at 28°C with rotary shaking incubator (200rpm).

●—● : relative activity, ●—● : final pH  
○—○ : cell growth

Fig. 4에서 보는 바와 같이 培養時間이 經過함에 따라 pH가 낮아지면서 酵素生成이 급격히 增加하여 培養 3日째 pH는 가장 낮았으나 酵素生成量은 最高에 到達했다. 그후 pH는 다시 높아지면서 酵素活性이 低下되었다. 한편 菌의 增殖은 8~9日에 가장 크게 나타났기 때문에 本 酵素를 얻을 目的으로 培養할 때에는 3日間 培養하는 것이 가장 적당하다는 것을 알 수 있다.

### 要 約

土壤에서 分離, 選別한 *Streptomyces* 屬의 한 菌株가 生産하는 Penicillinase의 最適生産條件을 調査한 結果를 要約하면 다음과 같다.

炭素源으로서 glucose, 窒素源으로는 L-asparagine이 가장 우수했으며 金屬鹽中에서 Mn Cl<sub>2</sub>를 添加했을때 酵素生成을 37% 增加시켰다. Amino 酸中에서 L-leucine이 本 酵素生産을 약간 增加시켰으며 L-histidine L-methionine은 크게 低下시켰다. Riboflavine, *i*-inositol, hesperidine, niacinamide, biotin, DL- $\alpha$ -lipoic acid, folic acid가 酵素生産을 增加시켰으며 抗生物質中에서 cephradine, cephalixin, ampicillin, cloxacillin의 添加가 酵素生成을 크게 增加시켰다. 本 酵素生産의 最適pH는 7.0이며 最適溫度는 28°C였다. 또 500 ml Erlenmeyer flask에서 175 ml의 培地를 加하여 3日間 培養했을때 酵素生成이 最高에 到達했다.

### 參 考 文 獻

- 1) Abraham, E. P., and E. Chain : *Nature*, **146**, 837 (1940)
- 2) Richmond, M. H., and R. B. Sykes : *Adv. Microbial Physiol.*, **9**, 31 (1973)
- 3) Sykes, R. B., and M. Matthew : *J. Antimicrob. Chemother.*, **2**, 115 (1976)
- 4) Ogawara, H. : *Antimicrob. Agents Chemother.*, **8**, 402 (1975)
- 5) Ogawara, H., S. Horikawa, S. Shimada-Miyoshi, and K. Yasuzawa : *Antimicrob. Agents Chemother.*, **13**, 865 (1978)
- 6) Mehta, R. J., and C. H. Nash : *J. Antibiot.*, **31**, 239 (1978)
- 7) Kushner, D. J., and C. Breil : *Arch. Microbiol.*, **112**, 219 (1977)
- 8) 千畑一郎, 土佐哲也 : *發酵と工業*, **38**, 238 (1980)
- 9) Auclair, J. : *Lait*, **31**, 121 (1951)
- 10) Sozzi, T., and M. B. Smiley : *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 862 (1980)
- 11) Hash, J. H. : *Methods in Enzymology* vol. 43, p. 75~77, Academic Press Inc., New York, USA (1975)
- 12) Ogawara, H., K. Maeda, H. Umezawa : *Biochem. Biophys. Acta.*, **289**, 203 (1972)