

Streptomyces sp. 가 生産하는 Penicillinase 에 関한 研究

(第二報) *Streptomyces* sp. YS-40 이 生産
하는 Penicillinase 의 酵素学的 性質

都在浩 · 金相達
韓國人蔘煙草研究所
(1982년 7월 15일 수리)

Studies on Penicillinase Produced by a *Streptomyces* sp. (Part 2) Enzymatic Characteristics of the Penicillinase Produced by *Streptomyces* sp. YS-40.

Jae Ho Do and Sang Dal Kim

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute Seoul, Korea

(Received July 15, 1982)

Abstract

A strain of *Streptomyces* sp. (YS-40) which was able to produce penicillinase, was isolated from soil and the enzymatic characteristics of this enzyme were investigated. The crude enzyme was obtained with the fractionation by 80% cold acetone. The optimal temperature and pH of this enzyme was 45°C and 5.0 respectively. The stable pH range of the enzyme was between pH 5.5 and 8.0 at 37°C. By heat treatment at 60°C and 80°C for 10 min, the remained relative activities were about 50%, 30% respectively. The activity of the enzyme was inhibited by Cu^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} but Co^{++} , Li^{+} , Ca^{++} , Mg^{++} , Ba^{++} did not affect. Among 11 chemical reagents, ethylenedi aminetetraacetic acid disodium salt (EDTA-2Na), sodium dodecyl sulfate (SDS) and sodium fluoride inhibited the enzyme activity.

序 論

Penicillinase (β -lactamase I: Penicillin amido- β -lactamhydrolase, EC 3, 5, 2, 6) 는 β -lactam antibiotics 의 β -lactam ring 을 加水分解하는 酵素로서 1940年 Abraham¹⁾ 등이 *E. coli*, *M. lysodeikticus* 및 Gram positive bacteria 가 生成하는 酵素가 penicillin 을 不活性化 시킨다는 事實

을 發見한 後 이 酵素를 penicillinase 라고 命名했으며 penicillin 의 β -lactam ring 의 peptide linkage 가 加水分解되면 penicilloic acid 가 生成된다는 것도 밝혀졌다.²⁾ β -lactamase 는 여러가지 bacteria 에 依해서 生成되며^{3,4)} enzyme induction^{3,4)} enzyme secretion,⁷⁻¹²⁾ transfer of genetic elements,^{13,14)} immunoassay¹⁵⁾ 등의 分野에는 많은 研究가 되어 있다. Penicillinase 는 分子量이

15,000~35,000 程度인 比較的 低分子 酵素蛋白으로서 주로 *S. aureus*, *B. licheniformis*, *B. cereus* 및 *E. coli*를 利用하여 얻고 있다.

Gram positive bacteria는 inducible enzyme 이며 Gram negative bacteria는 constitutive enzyme으로 生成되는데^{16,17} 이 두가지 酵素에 對해서는 많은 報告가 있으나^{18,19} *Streptomyces* sp.가 生成하는 penicillinase에 對해서는 몇몇 報告가 있을 뿐이다.^{20,21}

本 實驗에서는 土壤에서 分離한 *Streptomyces* 屬에 屬하는 한 菌株는 選別하여 이 菌株가 生産하는 penicillinase의 여러가지 酵素學的 特性을 調査하여 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

供試菌株 및 酵素生成用 培地

本 實驗에 使用한 菌株와 酵素生成用 培地는 前報²²와 같다.

菌株의 培養

1000 ml Erlenmeyer flask에 酵素生成用 培地 200 ml를 加하여 殺菌한 後 菌의 胞子를 接種하여 30°C에서 4日間 定置培養하였다.

粗酵素液의 調製

培養濾液을 冷 acetone (-20°C)으로 80% 飽和시켜 -20°C에서 2時間 定置한 後 12,000×g에서 30分間 遠心分離하였다. 이때 生成된 沈澱을 0.2M phosphate buffer (pH 7.0)로 一定比率로 稀釋하여 粗酵素液으로 使用하였다.

酵素活性度 測定

前報²²의 方法에 依해서 620mm에서 吸光度를 測定하여 對照區와의 差를 相對活性으로 나타내었다.

結果 및 考察

溫度의 影響

本 酵素의 最適作用溫度를 調査하기 위하여 5°C 間隔으로 30°C~50°C 사이의 條件에서 酵

素反應시켜 본 結果는 Fig. 1과 같다. β -lactamase의 作用最適溫度가 30°C 였다는 Goldner,²³ Yamagishi²⁴ 등의 報告나 35~40°C라는 Manson의 結果,²⁵ 45~55°C 사이에 最高活性을 나타내었다는 Novick,²⁶ Royce²⁷ 등의 結果를 考慮해 볼 때 β -lactamase의 最適作用溫度는 30~55°C 사이 이나 本 酵素는 45°C라는 比較的 높은 溫度에서 그 活性이 最大가 되었다.

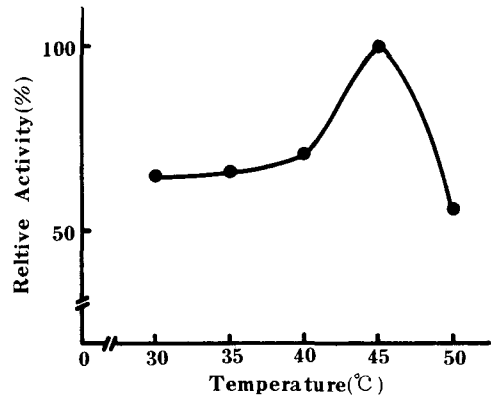


Fig. 1. Effect of Temperature on Enzyme Reaction

The enzyme activities were measured in 0.2M phosphate buffer (pH 7.0) at various temperatures.

pH의 影響

本 酵素 活性에 미치는 pH의 影響을 調査하기 위하여 McIlvaine buffer 및 Clark and Lubs solution을 使用하여 反應液의 pH를 3.5~9.0까지 調節한 後 酵素活性을 調査하여본 結果 Fig. 2와 같이 pH 5.0에서 最高의 活性度를 나타내었다. 이는 基質에 따라 作用 最適pH가 다소 差異는 있겠지만 Richmand²⁸의 benzyl penicillin을 使用한 경우 gram positive bacteria의 β -lactamase의 最適活性 pH가 6.0~7.0 이었다는 報告에 비해 다소 낮은 편이었으며 또 一般的으로 gram negative bacteria의 β -lactamase 들의 作用 最適pH가 5.0~8.5사이에서 位置한다는 報告^{29,30}들을 감안해 볼때 本 酵素는 普遍的인 β -lactamase의 作用 pH範圍 中에서 比較的 酸性 쪽에 位置하는 것 같다.

熱 安定性

本 酵素의 熱安定性을 調査하기 위하여 pH

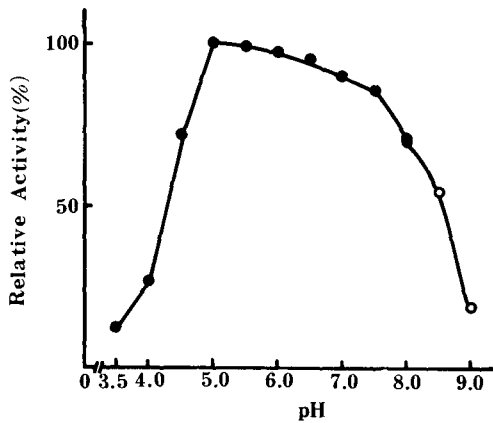


Fig. 2. Effect of pH on Enzyme Reaction

The enzyme activities were measured at various pH 3.5-8.0 (●—●) : McIlvaine buffer, pH 8.0-9.0 (○—○) : Clark and Lubs buffer.

5.0에서 37°C, 60°C, 80°C의 各 溫度에서 60分까지 經時的으로 熱処理시킨 後 酵素의 殘存活性度를 測定한 結果는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 本 酵素는 熱에 對하여 比較的 不安定하여 37°C에서 60分間 處理했을 때 44%가 失活되었으며 60°C에서 10分間 處理했을 때에는 約 50%, 80°C에서 10分間 處理했을 때에는 68%의 熱失活을 나타내었는데 이 結果는 *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*의 penicillinase 등이 100°C에서도 상당히 安定하였다

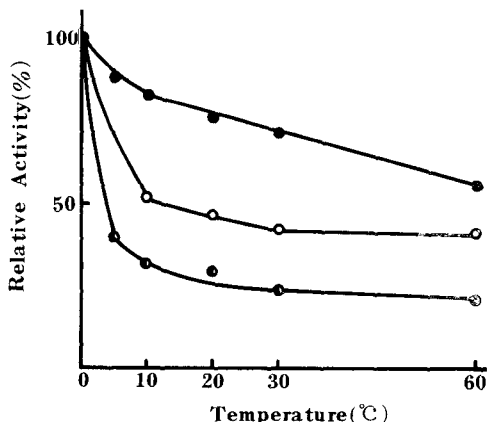


Fig. 3. Effect of Temperature on Stability of Enzyme

The enzyme solutions were treated at 37°C (●—●), 60°C (○—○), 80°C (●—●) for various time. The remaining activity was measured at 45°C, pH 5.0.

는 Manson³³의 結果보다는 熱處理에 對해 弱한 편이었으나 alkalophilic bacillus의 그것이 pH 7.0에서 100°C, 10分間의 熱處理로 15% 程度의 殘存活性을 갖는다는 Sunaga³⁴의 報告나 一般的으로 Penicillinase가 熱에 對해 不安定하다는 報告²⁵ 등과 같이 本 酵素도 熱에 對해서는 比較的 不安定한 酵素였다.

pH 安定性

McIlvaine buffer (pH 3.5~8.0)와 Clark & Lubs solution (pH 8.0~10.0)을 使用하여 37°C에서 各 pH別로 1時間 前處理시킨 後 反應液의 pH를 5.0으로 調節하여 酵素反應시켰으며 그 殘存活性을 調査해 본 結果는 Fig. 4와 같다. 本 酵素는 pH 4.5~8.5의 比較的 넓은 安定性을 가졌는데 이 結果는 安定pH範圍가 3.0~10.0사이의 아주 넓은 範圍였다는 Woodruff의 報告³⁵나 pH 11.0에서도 安定하다는 alkalophilic bacillus의 penicillinase에 對한 Sunaga³⁴ 등의 結果보다는 그 安定pH 領域이 좁았다.

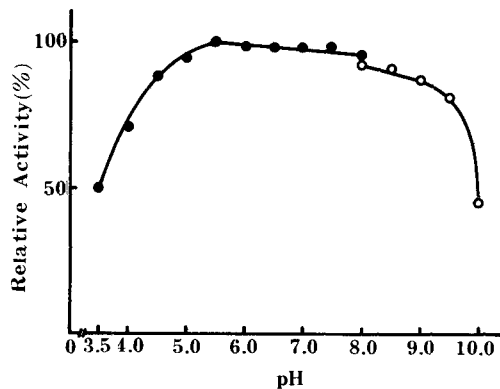


Fig. 4. Effect of pH on Stability of Enzyme

The enzyme solutions were treated in the various pH values at 37°C for 60 min.

pH 3.5- 8.0 (●—●) : McIlvaine buffer.

pH 8.0--10.0(○—○) : Clark and Lubs buffer.

金屬ion의 影響

여러가지 金屬ion이 本 酵素의 活性에 미치는 影響을 調査하기 위하여 金屬鹽을 反應液內의 最終濃度가 10⁻³M이 되도록 添加하여 酵素活性度를 測定한 結果 Table 1과 같이 Cu²⁺이 37%, Mn²⁺14%, Zn²⁺이 11% 程度의 阻害率을 나타냈으나 Co²⁺, Li⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ 등은 本 酵素의 活性에

Table 1. Effect of Metal Salts on the Enzyme Activity

Metal salt	Relative acitivity
None	100
CoCl ₂ ·6H ₂ O	93
LiCl	95
CaCl ₂ ·2H ₂ O	92
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	100
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	100
MgSO ₄ ·7H ₂ O	92
ZnCl ₂	89
CuSO ₄ ·5H ₂ O	63
BaCl ₂ ·2H ₂ O	93

거의 영향을 미치지 않았다. Cu²⁺이 가장 크게沮害한 결과는 一般적으로 重金属 ion이 酵素活性을沮害한다는 結果는 一致하나 普通 β-lactamase는 特別한 activator나 cofactor를 必要로 하지는 않지만 β-lactamase II는 安定性이나 活性에 Zn²⁺을 必要로 한다는 報告³⁶나 Zn²⁺의 存在에 依해서 β-lactamase의 活性이 增加한다는 Sunaga 等の 報告³⁴와는 相反되는 結果이 있는데 이는 生産菌의 差異에 依한 酵素의 相異함 때문인 것으로 推測된다.

Cu²⁺의 濃度에 依한 影響

金屬ion중에서 Cu²⁺이 10⁻³M에서 37% 程度로 酵素作用을 強하게 沮害시키므로 Cu²⁺의 反應液內의 濃度를 2×10⁻³M에서 10⁻⁷M까지 段階的으

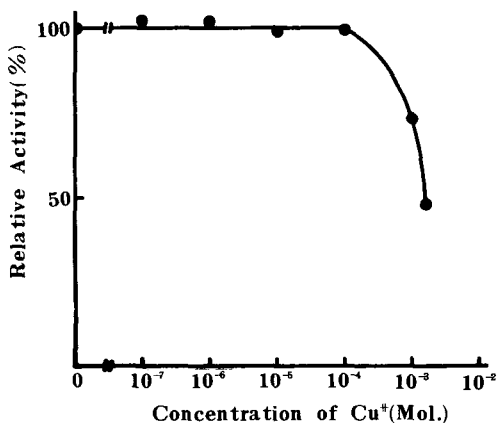


Fig. 5. Effect of Concentration of Cu²⁺ on Enzyme Activity

The final concentration of CuSO₄·7H₂O in the reaction mixture was 2 × 10⁻³M to 10⁻⁷M

로 調製하여 酵素活性을 測定한 結果 Fig. 5와 같이 Cu²⁺의 濃度가 10⁻³M까지는 別다른 影響을 미치지 않았으나 10⁻³M에서는 74%, 2×10⁻³M에서는 49% 程度 酵素作用을 한 것으로 나타났다.

化合物의 影響

O-phenanthroline, EDTA와 같은 chelate 試藥과 monoiodoacetic acid (MIA)와 같은 sulfhydryl試藥外에 몇가지 酵素沮害劑가 酵素活性에 미치는 影響을 調査하기 위하여 各 化合物의 最終反應濃度를 1 mM이 되도록 添加하여 37°C에서 20分間 前處理시킨 後 酵素活性을 測定한 結果는 Table 2과 같다. SDS, EDTA, Sodium fluoride, sodium azide, ε-amino-n-caproic acid 等に 依해서 酵素活性이 상당히 沮害되었으나 MIA, O-phenanthroline, L-cystine, urea, sodium arsenate 等に 依해서는 別 影響을 받지 않았다.

Table 2. Effect of Chemical Reagents on the Enzyme Activity

Chemicals	Relative activity
None	100
Sodium Fluoride	78
ε-Amino-n-Caproic acid	87
Sodium Azide	83
2,4-DNP*	90
EDTA·2Na**	71
SDS***	44
MIA****	92
O-phenanthroline	105
L-Cystine	93
Urea	97
Sodium Arsenate	104

- * 2,4-Dinitrophenol
- ** Ethylenediaminetetraacetic acid di sodium salt
- *** Sodium dodecyl sulfate
- **** Monoiodoacetic acid

The enzyme solution with various chemical reagents was pre-treated at 37°C for 20 min, and the concentration of chemical reagents was 3mM at enzyme pre-treatment. The final concentration of chemical reagents in the reaction mixture was 1mM.

citri 등은³⁷⁾ 효소蛋白質分子的 amino 酸 組成中 cyteine이 存在하지 않는 *B. cereus*의 β -lactamase I의 경우 SH基의 阻害劑로서 使用되는 pCMB에 依해서 효소活性이 阻害된다고 報告했다. Sunaga 等³⁸⁾의 alkalophilic bacillus의 penicillinase의 경우 p-CMB에 依해서는 別 影響을 받지 않았으나 MIA (10mM), urea (6M)에 依해서는 25%, 45% 程度 阻害를 받았다고 報告했는데 比較해서 本 효소는 SDS, EDTA 等에 依해 상당히 큰 阻害를 받았다. 특히 EDTA에 依해서 阻害를 받았으므로 아마도 효소의 構造나 活性에 金屬ion이 關係하는 것으로 推測되어 진다.

EDTA 濃度에 依한 影響

強力한 chelate 試藥인 EDTA에 依하여 本 효소가 阻害를 받기 때문에 EDTA 濃度を 10^{-3} M에서 10^{-7} M까지 段階的으로 調製하여 효소液과 37°C에서 20分間 前處理시킨 後 효소活性을 測定한 結果는 Fig. 6과 같다. 즉, 10^{-4} M까지는 本 효소活性에 影響을 미치지 않았으나 10^{-3} M에서는 約 30% 程度의 효소活性을 阻害시켰다. 그러므로 本 효소는 효소分子構造內에 金屬ion이 弱하게 結合되어 있는 metalloenzyme 인 것으로 推測된다.

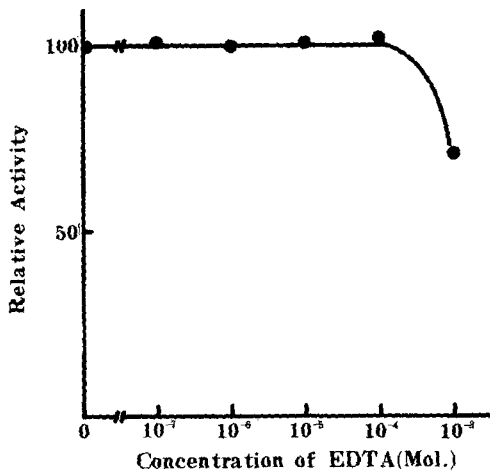


Fig 6. Effect of Concentration of EDTA on the Enzyme Activity

The final concentraion of EDTA in the reaction mixture was 10^{-3} M to 10^{-7} M and the enzyme solution with EDTA were treated at 37°C for 20 min.

要 約

Streptomyces sp. (YS-40)가 生産하는 penicillinase의 효소學的 性質을 調査한 結果는 다음과 같다.

本 효소의 作用 最適溫度는 45°C이며 最適pH는 5.0附近이었다. 熱處理에 對해서는 37°C에서도 不安定하였으며 60°C와 80°C에서 60分間 處理했을 때 各各 60%, 80%가 失活되었으나 安定pH範圍는 4.5~8.5로서 比較的 넓었다. 金屬ion의 濃도가 10^{-3} M로 反應液에 添加되었을 때 Cu^{+2} 의 경우 25% 程度 失活시켰으며 2×10^{-3} M에서는 50% 程度 失活시켰다. SDS에 依해서 強하게 阻害되었으며 EDTA, sodium fluoride에 依해서 弱하게 阻害되었으나 MIA, L-cystine, urea에 依해서는 阻害를 받지 않았다.

參 考 文 獻

- 1) Abraham, E. P., E. B. Chain : *Nature*, **146**, 837 (1940)
- 2) Abraham, E. P., W. Baker, W. R. Boon, C. T. Calam, H. C. Carrington, B. Chain, H. W. Florey, G. G. Freeman, R. Robinson and H. G. Saunders : *The Chemistry of Penicillin* (H. T. Clarke, J. R. Johnson and R. Robinson, eds) p. 10, Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey (1949)
- 3) Citri, N., M. R. Pollock : *Advan. Enzymol.*, **28**, 237 (1966)
- 4) Rauenbusch, E. : *Antibiot. Chemotherapia*, **14**, 95 (1968)
- 5) Pollock, M. R. : *The Enzymes*, 2nd ed., vol. 1, p619 (1959)
- 6) Richmond, M. H. : *Essays Biochem.*, **4**, 105 (1968)
- 7) Lampen, J. O. : *J. Gen. Microbiol.*, **48**, 249 (1967)
- 8) Lampen, J. O. : *J. Gen. Microbiol.*, **48**, 261 (1967)
- 9) Pollock, M. R. : *J. Gen. Microbiol.*, **26**, 239 (1961)
- 10) Pollock, M. R. : *J. Gen. Microbiol.*, **26**, 267 (1961)

- 11) Kusher, D. J., M. R. Pollock : *J. Gen. Microbiol.*, **26**, 255 (1961)
- 12) Kusher, D. J. : *J. Gen. Microbiol.*, **23**, 381 (1960)
- 13) Novick, R. P. : *Bacteriol. Rev.*, **33**, 210 (1969)
- 14) Richmond, M. H. : *Advan. Microbiol. Physiol.*, **2**, 43 (1968)
- 15) Joshi, U., V. Raghavan, G. Zemse, A. Sheth, P. S. Borkar, S. Ramachandran : *Enzyme Labelled Immunoassay Horm. Drugs, Proc. Int. Symp.* p. 233~245, Berlin (1978)
- 16) Mandelstam, J., K. McQuillen : *Biochemistry of Bacterial Growth*, 2nd ed. p. 473~474, Blackwell Scientific Publications, Osney Mead, Oxford (1973)
- 17) Stanier, R. Y., E. A. Adelberg, J. L. Ingraham : *The Microbial World*, 4th ed., p. 304~305, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey (1976)
- 18) Pollock, M. R. : *J. Gen. Microbiol.*, **15**, 154 (1956)
- 19) Ron-Zenziper, E., N. Citri : *Nature*, **198**, 887 (1963)
- 20) Johnson, K., J. Dusart, J. N. Campbell, and J. M. Ghuyssen : *Antimicrob. Agents Chemother.*, **3**, 289 (1973)
- 21) Ogawara, H. : *Antimicrob. Agents Chemother.*, **8**, 402 (1975)
- 22) Do, J. H., S. D. Kim, and D. H. Yi : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **10**, 177 (1982)
- 23) Goldner, M., R. J. Wilson : *Can. J. Microbiol.*, **7**, 45 (1961)
- 24) Yamagishi, S., K. O'Harb, T. Sawai, S. Mitsuhashi : *J. Biochem. (Tokyo)*, **66**, 11 (1969)
- 25) Manson, E. E. D., M. R. Pollock, E. J. Tridgell : *J. Gen. Microbiol.*, **11**, 493 (1954)
- 26) Novick, R. P. : *Biochem. J.*, **83**, 229 (1962)
- 27) Royce, A., C. Bowler, G. Sykes : *J. Pharm. Pharmacol.*, **4**, 904 (1952)
- 28) Richmond, M. H. : *Biochem. J.*, **77**, 112 (1960)
- 29) Ayliffe, G. A. J. : *J. Gen. Microbiol.*, **30**, 339 (1963)
- 30) Smith, J. T., J. M. T. Hamilton-Miller : *Nature*, **197**, 976 (1963)
- 31) Datta, N., M. H. Richmond : *Biochem. J.*, **98**, 204 (1966)
- 32) Lindström, E. B., H. G. Boman, B. B. Steele : *J. Bacteriol.*, **101**, 218 (1970)
- 33) Manson, E. E. D., M. R. Pollock : *J. Gen. Microbiol.*, **8**, 163 (1953)
- 34) Sunaga, T., T. Akiba, K. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 477 (1979)
- 35) Woodruff, H. B., J. W. Foster : *J. Bact.*, **49**, 7 (1945)
- 36) Kuwabara, S., E. P. Abraham : *Biochem. J.*, **103**, 27 (1967)
- 37) Citri, N., N. Zyk : *Biochem. Biophys. Acta*, **99**, 427 (1965)