

## 슈도모나스 sp. X-8의 베타락타마제 억제제의 생산 조건과 특성

김경자<sup>#</sup> · 김태성

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

(Received August 19, 1997)

### Production Conditions and Characterization of $\beta$ -Lactamase Inhibitor from *Pseudomonas* sp. X-8

Kyoung-Ja Kim and Tae Sung Kim

Dept. of Life Science, Soonchunhyang University, Onyang, 337-880, Korea

**Abstract**—Identification of a soil microorganism strain X-8, producer of  $\beta$ -lactamase inhibitor, based on its morphological, physiological, biochemical and chemotaxonomical characteristics was performed. The strain X-8 was identified as *Pseudomonas* sp. The  $\beta$ -lactamase inhibitor produced by this strain was highly achieved in fermentation medium contained glucose 0.5%, urea 0.25%,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.5%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5%,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01%,  $CuSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $MnSO_4$  0.02%. The  $\beta$ -lactamase inhibitor was not extracted by organic solvent such as n-butanol and ethyl acetate but remained in aqueous layer. The n-butanol extract showed antimicrobial activity against *M. smegmatis*. The  $\beta$ -lactamase inhibitor was stable at pH 7.0~8.0 and 4°C for 24 h. The  $\beta$ -lactamase inhibitor was bound on ion exchanger Diaion WA-30 and HP-20 and eluted with 2 N-NH<sub>4</sub>OH and acetone, respectively.

**Keywords** □  $\beta$ -lactamase inhibitor, *Pseudomonas* sp.

베타락탐계 항생제<sup>1,2)</sup>는 감염질환의 치료에 사용되는 전체 항생제의 약 50%정도를 차지하고 있으며 지금까지 개발된 항생제중 가장 약효가 우수하고 안전한 항생제로 평가되고 있다. 그러나 최근 내성균<sup>3)</sup>의 발현으로 이들 항생제를 무력하게 만들고 있다. 베타락탐계 항생제에 대해 세균이 내성을 획득하게 되는 기전<sup>4)</sup>은 세균이 베타락탐타마제<sup>5,6)</sup>를 생산하여 이들 항생제의 기본 골격 구조인 베타락탐 고리를 가수분해시켜 활성을 없애거나 또는 세균의 세포막 성분의 변화로 인해 항생제가 세포내로 침투를 못하는 경우<sup>6)</sup>, 또는 세균이 항생제가 작용하는 target site인 페니실린 결합 단백질을 변화시킴으로써<sup>7)</sup> 내성을 획득하는 방법등이 보고되고 있다. *E. coli*와 같은 장내 그람 음성 bacilli에서 발견되는 내성은 위의 내성

기전중 베타락탐타마제의 생산<sup>8,9,10)</sup>에 의한 것이며 이중 TEM-1<sup>11)</sup>이 가장 널리 알려진 베타락탐타마제이다. TEM-1은 암피실린과 같은 페니실린류는 분해할 수 있으나 3세대 세파계 항생제와 monobactam, carbapenem 등은 분해하지 못하였다. 그러나 최근 ceftazidime 등과 같은 3세대 세파계 항생제도 분해할 수 있는 새로운 TEM type 베타락탐타마제들이 *Enterobacteriaceae*속 균주중에서 보고 되고 있다.<sup>12,13)</sup> *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Citrobacter freundii*이외에 *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Salmonella* spp, *Serratia marcescens* 등에서 발견되는 extended-spectrum 베타락탐타마제는 감염 질환의 치료에 큰 위험이 되고 있다. 이러한 베타락탐타마제에 대한 억제제로서<sup>14,15,16,17)</sup> 현재까지 알려진 것들로는 *Streptomyces clavuligenus*에서 분리된 clavulanic acid<sup>1,18,19,20,21)</sup>와 *Streptomyces olivaceus*에서 분리된 olivanic acid<sup>22)</sup>를 비롯하여 다른 *Streptomyces*의

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0418-530-1352 (팩스) 0418-530-1350

생성물들인 carbapenem 유도체들은 모두 항균력뿐만 아니라 베타락타마제에 대하여 억제제 성질을 소유하고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>23, 24, 25)</sup> 베타락타마제의 억제제들로서는 이 밖에도 6 $\beta$ -bromopenicillanic acid, 6 $\alpha$ -chloropenicillanic acid sulfone, penicillanic acid sulfone<sup>26)</sup>, quinacillin sulfone, 6-aminopenicillanic acid sulfone, 6 $\beta$ -(acylamino)penicillanic acid sulfone, 6-acetylmethylenepenicillanic acid (Ro15-1903)와 Woodward's penem, sulbactam<sup>19, 27)</sup> (CP-45,899)과 그의 ester 및 clabam 유도체들이 알려져 있다.<sup>28)</sup> 그의 *Staphylococcus aureus*의 베타락타마제에 대하여 억제활성을 갖는 단백질이 최초로 *Streptomyces gedanensis*에서 발견되었으며 *Streptomyces clavuligerus*<sup>29)</sup>에서는 17.5 kDa의, *Streptomyces exfoliatus* SMF19에서는 33 kDa의 베타락타마제 억제 단백질이 분리되었다.<sup>30, 31)</sup> 본 연구에서는 베타락타마제에 의한 베타락타마제 항생제에 대한 내성을 억제하기 위해 베타락타마제 억제제를 생산하는 균주를 토양으로부터 분리하여 특성을 조사하였으며, 억제제 생산의 최적 조건을 조사하고 억제제 분리를 위한 기초 자료로 흡착제와 이온교환수지에 대한 흡착성 여부와 각종 유기용매에 대한 추출성 여부 및 온도, pH에 대한 안정성 등을 조사하였다.

### 실험방법

**토양균 분리** - 충남 근교 와 경기도, 서울 근교의 토양을 채취하여 용달에 퍼서 1주일간 잘 말린 다음, 멸균 증류수로 희석한 후에 actinomycetes 분리 배지, starch-casein-nitrate agar 배지와 AS-1 배지에 도말시킨 다음 28°C에서 7~10일간 배양하였다. 각 배지에 자란 집락을 외적 집락 모양, 색깔 또는 agar 배후색에 따라 분류하여 agar plug에 옮겨 순수 배양하였다.

**분리주의 형태학적 특성 및 배양학적 특성 조사** - 베타락타마제 억제제 생산 정도가 가장 높은 균주를 골라 NBA 배지에 도말하여 30°C에서 7일간 배양후에 생긴 집락을 광학 현미경으로 관찰하고, 주사 현미경으로 포자의 사슬 형태와 크기등을 조사하였다. 배양학적 특성은, 여러 배지에 키워 성장 정도, 가용성 색소 형성, 멜라닌 생성 유무등을 조사하였다.

**분리주의 생리학적 특성 조사** - 분리주의 당 이용성과 젤라틴 액화력, 전분 분해력등을 Shirling and

Gottlieb (1964)<sup>32)</sup>의 방법으로 조사하고, 황화 수소 생성은 Kuster and Williams<sup>33)</sup>의 방법에 따라 행하였다. 그외의 특성은 'Manual for Identification of Medical Bacteria'에 따라 일반적인 방법에 따라 조사하였다.

**분리주의 항균력 조사** - 균주 상등액 및 균주 상등액을 n-hexane, chloroform, benzene, ethyl acetate 등의 용매로 추출후에 감압증발하여 농축시킨 다음 ethanol에 10 mg/ml 농도로 녹여 40  $\mu$ l 취하여 직경이 8 mm인 종이 디스크에 적시고, 용매를 날려보낸 뒤 검사 대상균주가 접종되어 있는 한천 배지에 얹었다. 이 배양 배지를 4°C에서 30분간 확산시킨 후 30°C에서 17시간 배양하여 성장이 억제된 영역의 직경을 측정하였다. 검정균주로는 *M. smegmatis*와 *C. albicans*를 이용하였다.

**베타락타마제 억제제 생산 배지** - Sodium glutamic acid 2.5 g, glycerol 10.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 1.0 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01%, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>를 각 0.02% 농도로 이중 증류수 1 l에 녹여 멸균후 베타락타마제 억제제 생산 배지로 사용하였다. Glycerol 대신에 각종 탄소원(glucose, lactose, fructose, sucrose)으로 베타락타마제 억제 활성을 비교하였으며, sodium glutamic acid 대신에 각종 유기 질소원(pharmamedia, tryptone, yeast extract, bacto peptone, casamino acid) 및 무기 질소원(NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, urea)을 첨가하여 베타락타마제 억제 활성을 비교하였다. 배지의 pH는 pH 4.0에서 pH 10.0 까지 변형시켜 조사하였다.

**베타락타마제 억제제 생산 균주의 분리 및 베타락타마제 억제 활성 조사** - 베타락타마제 억제제 생산 균주를 토양균으로부터 찾기 위하여, 순수 분리한 토양균을 베타락타마제 억제제 생산 배지에 5~7일간 키운 다음 원심분리한 상등액을 40  $\mu$ l 취하여 종이 디스크에 묻혀 말린 후, 베타락타마제를 생산하는 *K. pneumoniae* (ATCC 15380)와 penicillin G(50  $\mu$ g/ml)를 함유한 nutrient 아가 배지위에 얹고 4°C에서 30분간 둔 다음 30°C에 하루 동안 배양하여 억제 영역이 나타나는 균주를 베타락타마제 억제제 생산 균주로 간주하고, 그 중에서 억제 직경이 가장 큰 균주를 골라 억제제 생산의 최적 조건을 확립하였다. 베타락타마제 억제제 생산 정도는 흡광도(UV) 측정법에 의해 측정하였으며 베타락타마제에 의해 베타락탐 고리가 깨어짐으로 해서 기질로 넣어 준 penicillin G의 경우 235 nm에서 흡광도 감소가 일어나

는데 억제제에 의해 이 흡광도 감소가 어느 정도 억제 되는지를 조사하였다. 0.97 ml phosphate buffer(0.1 M, pH 7.0)에 10  $\mu$ l 균주 상등액과 10  $\mu$ l의 베타락타마제 (5 U)를 첨가한 다음 37°C에서 10분간 preincubation 시켰다. 그 후에 10  $\mu$ l의 penicillin G(50 mg/ml)을 첨가한 다음 37°C에서 5~10분간 235 nm에서 흡광도 변화를 조사하였다. 이때 control은 균주 상등액 대신 균심지 않은 배지의 상등액을 넣어 반응시켰다.

이때

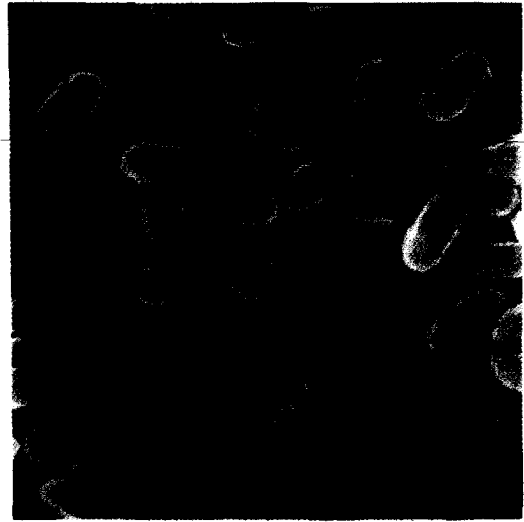
$$\text{inhibitory activity} = \frac{\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{control}}} \times 100(\%)$$

로 정하였다.

**베타락타마제 억제제의 분리 및 특성 조사** - 우선 베타락타마제 억제물질이 균체내와 외에 어느정도 존재하는지의 여부를 알기 위하여 배양액을 10,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액과 균체를 분리하였다. 0.85% NaCl로 3회세척 및 원심분리한 균체에 대하여 1배 부피의 acetone을 첨가하여 추출후 여과하였다. Acetone 추출 후 감압농축하여 소량의 물에 녹인 시료의 억제 활성을 조사하였다. 원심분리한 상등액의 유기용매 추출성을 조사하기 위하여 상등액의 pH를 2, 7, 10으로 조절하고 ethyl acetate와 n-butanol을 사용하여 3회씩 추출하여 나온 유기용매층과 증화시킨 수층의 억제 활성을 조사하였다. 또한 상등액의 온도와 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 4°C, 50°C에서 24시간 후, 100°C에서 15분후에 잔존 활성을 조사하고 상등액의 pH를 pH 4-pH 10으로 조정한 후에 24시간 방치한 다음 증화하여 잔존 활성을 조사하였다. 또한 상등액의 흡착제 및 이온교환수지에 대한 흡착 여부를 조사하기 위하여 Diaion WA-30, Diaion WK-20, Diaion HP 20을 각각 5 ml씩 취하고 상등액을 동량 섞은 후 4°C에서 4시간 후에 흡착 여부를 상등액에서 조사한 후에 Diaion WA-30, WK-20의 경우는 2 N NH<sub>4</sub>OH로 10시간 정도 방치한후에 용출되는지를 조사하였고 Diaion HP-20의 경우는 acetone으로 역시 10시간 정도 방치한 후에 용출되는지를 조사하였다.

### 결과 및 고찰

**균주의 동정** - 베타락타마제 억제 활성이 가장 높은



**Fig. 1**— Scanning electron micrograph of the isolated Strain X-8 cultured on NBA medium for 7 days. The bar equals 1.0  $\mu$ m.

것으로 판명된 균주 X-8의 전자 현미경 관찰은 Fig. 1과 같고, 균체의 크기는 0.5~0.6  $\mu$ m  $\times$  1.2~1.4  $\mu$ m이며, 분류학적 특성을 조사한 결과는 Table I에 나타내었다. 본 균주는 Gram 음성균이고 운동성이 없는 간균으로 포자를 형성하며, 황화 수소 형성능, catalase와 urease test에서는 양성인 반면 indole 형성능과 MR-, VP-

**Table I**— Taxonomical properties of the strain X-8

<b>Morphological</b>	
Gram stain	negative
Shape	rod
Cell size	1.0~1.2 $\times$ 1.9~2.1 $\mu$ m
Motility	non motile
<b>Physiological</b>	
Optimum temperature	30°C
Oxidase	-
Catalase	+
Urease	+
Methyl red test	-
Voges-Proskauer reactio n	-
Indole test	-
Casein hydrolysis	+
Starch hydrolysis	+
Tyrosine hydrolysis	-
H <sub>2</sub> S production	+
Gelatin liquefaction	+
Acid production from	
glucose	+
lactose	+
maltose	+
sucrose	+

test, oxidase test 등에서는 음성을 보였으며 starch, casein, gelatin 을 가수분해하였다. Lactose, glucose, maltose 와 saccharose 등의 당류에서 산을 생성하는 증온균으로 *Pseudomonas*와 같으므로 *Pseudomonas* X-8균으로 명명하였다.

**분리주의 항생제 감수성 검사** - Ampicillin(10 µg), streptomycin(10 µg), cephalothin(30 µg), neomycin(30 µg), tetracyclin(30 µg) 이 함유된 종이디스크로 항생제 감수성 검사를 한 결과, tetracyclin, streptomycin과 neomycin에 감수성을 나타내었으며 ampicillin과 cephalothin 에는 저항성을 나타내었다. 베타락타마제 항생제에 저항성을 나타내는 것은 균주가 생산하는 베타락타마제에 의한 것으로 간주된다.

**분리주 X-8의 배양액의 추출 용매에 따른 항균력 검사** - 균주 X-8을 베타락타마제 억제제 생산 배지에서 4일간 키운 후 상등액과 상등액을 n-butanol 과 ethyl acetate 로 추출한 다음 감압 증류하여 10 mg/ml 농도로 에탄올에 녹여 *C. albicans*와 *M. smegmatis*에 대한 항균력을 조사한 결과, Table II에서 보는 바와 같이 n-butanol 추출액에서 *M. smegmatis*에 대한 항균 활성이 나타났으나 수층에는 항균 활성이 나타나지 않았다. Ethyl acetate추출액의 경우에는 *C. albicans*에 대한 항균 활성이 중화시킨 수층에서 나타났다. 이와 같이 서로 다른 항균 물질이 이 균주 상등액으로 생산 분비되는 것으로 생각되며 베타락타마제 억제제와 다른 물질인지 여부를 조사하기 위하여 추출 용매에 따른 베타락타마제 억제 활성을 조사하였다.

**분리주 X-8의 배양액의 추출 용매에 따른 베타락타마제 억제 활성** - 균주 X-8을 베타락타마제 억제제 생산

**Table II**— Effect of organic solvent extracts of supernatant of *Pseudomonas* sp. X-8 on the antimicrobial activity

Solvents	Test strains	Inhibition zone (mm)*		
		pH 2.0	pH 7.0	pH 10.0
Butanol (aqueous)	<i>C. albicans</i>	10	12	-
	<i>M. smegmatis</i>	-	-	-
Butanol (organic)	<i>C. albicans</i>	-	11	9
	<i>M. smegmatis</i>	14	14	20
Ethyl acetate (aqueous)	<i>C. albicans</i>	-	14	13
	<i>M. smegmatis</i>	-	-	9
Ethyl acetate (organic)	<i>C. albicans</i>	-	-	-
	<i>M. smegmatis</i>	-	-	-

\* 8 mm paper disk

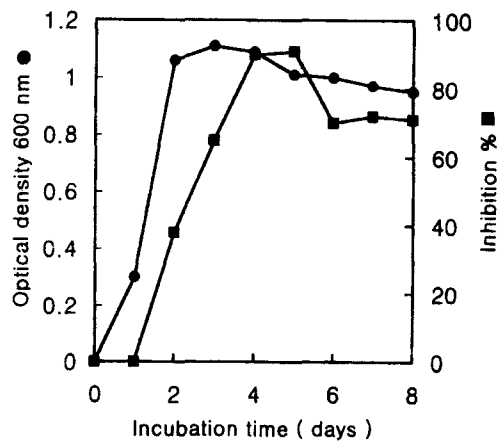
**Table III**— Effect of organic solvent extracts of supernatant of *Pseudomonas* sp. X-8 on  $\beta$ -lactamase inhibitor activity

Solvents	Inhibition zone (mm)*		
	pH 2.0	pH 7.0	pH 10.0
Butanol(aqueous)	13	17	12
butanol(organic)	-	-	-
Ethyl acetate(aqueous)	10	15	11
Ethyl acetate(organic)	-	-	-

\* 8 mm paper disk against *K. pneumoniae* producing  $\beta$ -lactamase.

배지에서 4일간 키운 후 상등액을 n-butanol과 ethyl acetate 로 추출한 다음 감압 증류하여 10 mg/ml 농도로 에탄올에 녹여 베타락타마제 억제 활성을 조사한 결과(Table III), 유기 용매층에서는 베타락타마제 억제 활성이 나타나지 않았으며 수층에서만 억제 활성이 나타나 수용성 물질로 간주하고 억제제 분리를 위하여 흡착제 및 이온교환수지에 대한 흡착성을 조사하였다. 이와 같이 n-butanol 추출액이 *M. smegmatis*에 대한 항균 활성은 있으나 베타락타마제 억제 활성은 없는 것으로 보아 *M. smegmatis*에 대한 항균 활성을 가진 물질과 베타락타마제 억제 활성을 가진 물질이 서로 다른 물질일 것으로 추측된다.

**배양 시간에 따른 베타락타마제 억제 활성** - 균주 X-8을 베타락타마제 억제제 생산 배지에서 배양시간을 달리하여 상등액의 베타락타마제 억제 활성을 조사한 결과 균주의 성장은 2일 후에 최고치에 달하였으나 배



**Fig. 2**— Relationship of growth and  $\beta$ -lactamase inhibitory activity of strain X-8 in  $\beta$ -lactamase inhibitor production medium.

타락타마제 억제 활성은 4~5일에 최대치를 나타내었다(Fig. 2).

**배양 온도와 초기 pH의 영향** - 본 균주의 성장과 생산에 미치는 온도 및 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 베타락타마제 억제제 생산 배지에 균을 접종하여 각 온도별, pH 별로 균의 성장과 억제제 활성을 조사한 결과, 30°C, pH 7.5에서 억제제 생산이 가장 높은 것으로 나타났다.

**탄소원의 영향** - 본균주의 성장과 억제제 활성에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 베타락타마제 억제제 생산 배지에 각종 탄소원을 0.5% 되도록 첨가하여 pH 7.0, 배양 온도 30°C에서 4일간 배양한 결과, glucose, lactose, fructose와 sucrose에서 모두 비슷하게 성장이 좋았으나 glucose에서 베타락타마제 억제 활성이 가장 높았다.

**무기질소원의 영향** - Glucose를 탄소원으로 한 베타락타마제 억제제 생산 배지에 sodium glutamate 대신에  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와 urea와 은 무기질소원을 0.25% 첨가하여 베타락타마제 억제 활성과 균의 성장을 조사한 결과, Urea를 첨가한 배지에서 균주의 성장과 베타락타마제 억제활성이 높았다(Table IV).

**유기질소원의 영향** - Glucose를 탄소원으로 한 베타락타마제 억제제 생산 배지에 sodium glutamate 대신에 각종 유기질소원을 0.25% 첨가하여 베타락타마제 억제 활성과 균주의 성장을 조사한 결과, bacto peptone이 첨가된 배지에서 높은 성장을 및 베타락타마제 억제활성을 보였다.

**Glucose 농도의 영향** - 베타락타마제 억제제 생산 배지에 glucose농도를 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%와 4.0%로 변화시켜 균 성장과 베타락타마제 억제제 생산을 조

사한 결과 0.5%에서 균 성장과 베타락타마제 억제제의 생산성이 가장 높았다. Glucose 농도가 0.1%의 경우에만 균주의 성장이 억제되었고 나머지 0.5%~4.0% 까지 모두 성장은 좋은 것으로 나타났다.

**무기 인산염의 농도의 영향** - 베타락타마제 억제제 생산 배지에  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 의 농도를 0.05%, 0.5%, 1.0%, 2.0%와 4.0%로 변형시켜 베타락타마제 억제제 생산을 조사한 결과, 0.5%에서 균 성장과 억제 활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 무기 인산염의 경우 농도가 높은 경우 cephalosporin C를 비롯한 여러 항생 물질의 생산을 억제하는 것으로 알려져 있다. 베타락타마제 억제제의 경우에는 4.0%의  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 에서도 억제 활성이 크게 감소되지는 않았다(Table V).

**억제제의 분리 및 특성 조사** - 본 베타락타마제 억제제는 acetone 추출을 행한 결과 균체 외부에만 존재한다는 것을 알았으며, pH 7.0~8.0에서 가장 안정하고 pH 4와 10에서 그 활성을 완전히 상실하였다. 온도 안정성을 검토한 결과 50°C에서 24시간 후에는 베타락타마제 억제활성이 65%로, 100°C에서 15분간 가열 하였을 때는 61%로 줄어 들었다. 또한 유기 용매에 대한 추출성을 조사한 결과 억제제가 유기 용매에서는 추출되지 않았으며, 유기 용매에서 추출된 물질들은 베타락타마제 억제 활성은 없었으나 n-butanol추출액의 경우 *M. smegmatis*에 대하여 항균활성을 갖는 것으로 나타났다. 베타락타마제 억제제가 유기 용매에는 추출되지 않았으므로 배양액을 원심분리하여 상등액을 활성탄과 Diaion WA-30, Diaion WK-20, Diaion HP-20과 같은 이온교환수지에 대한 흡착성을 조사한 결과 활성탄에는 흡착되지 않고 Diaion WA-30에 가장 강하게 흡착하고 Diaion HP-20에도 흡착하는 것으로 나타났다. 흡착제와 상등액의 부피비를 달리하여 억제 활성을 조

**Table IV**—The effect of inorganic nitrogen compounds on  $\beta$ -lactamase inhibitor activity

Inorganic nitrogen compounds	Incubation time (Days)				
	1	2	3	4	5
	Inhibition zone (mm)*				
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	8	9	11	11	11
$\text{NH}_4\text{Cl}$	8	8	9	10	10
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8	9	11	11	11
Urea	8	11	14	21	21
Sodium glutamate	8	11	13	19	19

\* 8 mm paper disk against *K. pneumoniae* producing  $\beta$ -lactamase.

**Table V**—Effect of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  concentration on  $\beta$ -lactamase inhibitor activity

$\text{K}_2\text{HPO}_4$ concentration (%)	Incubation times (Days)				
	1	2	3	4	5
	Inhibition zone (mm)*				
0.05	8	9	9	10	10
0.5	8	11	14	20	20
1.0	8	11	13	18	18
2.0	8	11	13	17	17
4.0	8	11	13	17	17

\* 8 mm paper disk against *K. pneumoniae* producing  $\beta$ -lactamase.

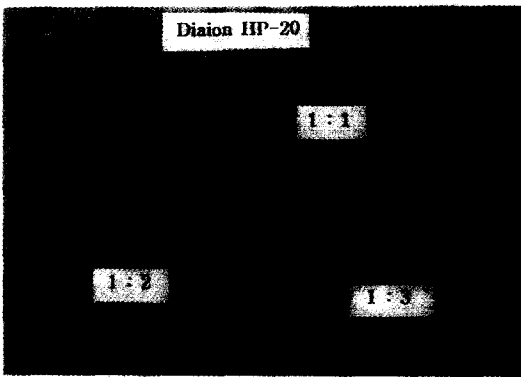


Fig. 3—Effect of ion exchanger ratio on the  $\beta$ -lactamase inhibitory activity (Diaion HP-20)

Table VI—Effect of ion exchanger ratio on  $\beta$ -lactamase inhibitor activity

Ion exchanger	Ion exchanger : Supernatant (V/V)	Inhibition zone (mm)*
WA-30	1:1	30
	1:2	34
	1:3	40
HP-20	1:1	—
	1:2	29
	1:3	32

\* 8 mm paper disk against *K. pneumoniae* producing  $\beta$ -lactamase.

사한 결과 Diaion WA-30과 HP-20의 경우 모두 1:3에서 가장 억제 활성이 크게 나타났다(Fig. 3, Table VI). Diaion WA-30에 흡착된 경우 2N NH<sub>4</sub>OH로 용출시킨 후에 감압증류하고 10 mg/ml이 되게 증류수에 녹인 후 억제 활성을 조사하였으며 Diaion HP-20에 흡착된 경우에는 acetone으로 용출시킨 후 역시 감압증류시켜 증류수에 녹여 억제 활성을 조사하였다. 그후 Diaion WA-30에서 용출시켜 처리한 액을 sephadex G-25를 통과시켜 탈염과정을 거치고 각 용출액을 silica gel TLC판에 점적한 후에 ninhydrin 반응으로 같은 Rf치를 나타내는 것들을 모아 억제제 분리 실험을 수행중이다.

### 결 론

토양균으로부터 베타락타마제 억제제를 생산하는 균주를 선별하여 특성을 조사한 결과, 1.0~1.2×1.9~2.1  $\mu$ m크기의 Gram 음성균이고 운동성이 없는 간균으로

catalase, urease test 및 황화 수소 형성능에서는 양성인 반면에 oxidase, MR-, VP-test 및 indole test에서는 음성을 나타내었고 casein, starch, gelatin을 가수분해하였다. Glucose, lactose, maltose 및 sucrose 등의 당류에서는 산을 생성하는 중온균으로 *Pseudomonas* sp.와 같으므로 *Pseudomonas* sp. X-8로 명명하였다. 균주 X-8의 베타락타마제 억제제 생산의 최적 조건을 조사한 결과 glucose 0.5%, urea를 질소원으로 0.25% 함유하고 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도가 0.5%인 pH 7.5의 베타락타마제 억제제 생산 배지에서 30°C, 4~5일째 억제제 생산이 가장 높았다. 억제제 분리를 위하여 특성을 조사한 결과 n-butanol, ethyl acetate와 같은 유기 용매에는 추출되지 않고 수층에서 억제 활성이 나타났으며 n-butanol 추출액의 경우 *M. smegmatis*에 대한 항균력을 나타내었다. 억제제의 이온 교환수지에 대한 흡착력을 조사한 결과 Diaion WA-30에 가장 강하게 결합하였으며 Diaion HP-20에도 결합하는 것으로 나타났으며 이온교환수지와 상등액의 부피비가 1:3일 때 가장 잘 결합하는 것으로 나타났다. 억제제의 pH 안정성을 조사한 결과 pH 7.0~8.0에서 24시간 안정하였으며 pH 4.0과 pH 10.0에서는 매우 불안정하였다. 온도 안정성을 조사한 결과는 4°C에서는 24시간 동안 안정하였으며 50°C에서 24시간 후에는 약 65%정도 활성을 가졌으며 100°C에서 15분후에는 약 61%의 활성을 유지하였다.

### 문 헌

- 1) Reading, C. and Cole, M. : Clavulanic Acid : A  $\beta$ -Lactam from *Streptomyces Clavuligerus*. *Antimicrob. Agent. Chemother.* **11**, 852 (1977).
- 2) Woodward, R. B. : Recent Advances in the Chemistry of  $\beta$ -lactam Antibiotics. In *Recent advances in the Chemistry of  $\beta$ -Lactam Antibiotics*. Ed., Elks 167-180, Chemical Society (1977).
- 3) Sykes, R. B. and Gorgopapadakou, N. H. : Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics : an overview. In  *$\beta$ -Lactam Antibiotics*. Edited by M. R. Salton and G. D. Shockman. Academic Pre-ss, New York p199 (1981).
- 4) Arisawa, M. and Adam, S. : Mechanism of Inactivation of TEM-1  $\beta$ -Lactamase by 6-Acetylmethyl-enepenicillanic acid. *Biochem. J.* **211**, 447 (1972).

- 5) Kasik, J. E. and Peacham, L. : Properties of  $\beta$ -lactamases produced by three species of mycobacteria. *Biochem. J.* **107**, 657 (1968).
- 6) Misra, K. and Kasik, J. E. : The mechanism of mycobacterial resistance to penicillins and cephalosporin. *Int. J. Clin. Pharmacol.* **3**, 33 (1970).
- 7) Yabu, K., Ochiai, T. and Kaneda, S. : Penicillin-binding proteins in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Letters.* **25**, 307 (1984).
- 8) Beeley, T. N., Gascoyne, V. K., Hunziker, S., Petrusson, S.G., Waley, B., Jaurin, B. and Grundstrom, T. : The inhibition of class C  $\beta$ -lactamases by boronic acids. *Biochem. J.* **209**, 229 (1983).
- 9) Sakurai, Y., Yoshida, Y., Saitoh, K., Nemoto, M., Yamaguchi, M. and Sawai, M. : Characteristica of Aztreonam as a substrate, inhibitor and inducer for  $\beta$ -lactamases. *J. Antibiot.* XLIII, No. 4, 403 (1990).
- 10) Gipin, M. L., Fulston, M., Payne, D. : Isolation and structure determination of two novel phenazines from a *Streptomyces* with inhibitory activity against metallo-enzymes, including metallo- $\beta$ -lactamase. *J. Antibiot.* **48**(10), 1081 (1995).
- 11) Chaibe, E. B., Farzaneh, S., Peduzzi, J., Barthelmy, M. and Labia, R. : An additional ionic bond suggested by molecular modelling of TEM-2 might induce a slight discrepancy between catalytic properties of TEM-1 and TEM-2  $\beta$ -lactamases. *FEMS Microbiol.* **143**, 121 (1996).
- 12) O'Callahan, C. H., Morris, A., Kirby, S. M. and Shingler, A. H. : Novel method for detection of  $\beta$ -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1**, 283 (1972).
- 13) Alati, S. and Mahadevan P. R. : Lipase and penicillinase activity in *Mycobacterium leprae*. *IRCS Med. Sci.* **13**, 290 (1985).
- 14) Brown, A. G., Butterworth D., Cole M., Hanscomb G., Hood, J. D., Reading, C. and Rolinson, G. N. : Naturally-occurring  $\beta$ -lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J. Antibiot.* **29**, 668 (1976).
- 15) English, A. R., Retsema, J. A., Girard, A. E., Lynch, J. E. and Barth, W. E. : CP-45,889, a  $\beta$ -lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of  $\beta$ -lactams : Inhibital bacteriological characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**, 414 (1978).
- 16) Miyamura, K., Takahashi, S., Sezaki, M., Linuma, K., Naganawa, H., Kondo, S., Ohno, M. and Umezawa, M. : Isolation and Structure of a  $\beta$ -Lactamase Inhibitor from *Streptomyces*. *J. Antibiotics.* **30**, 770 (1977).
- 17) Hata, T., Qmura, S., Iwai, Y., Ohno, H., Takeshima, H. and Yamaguch, N. : Studies on Penicillinase Inhibitors Produced by Microorganism. *J. Antibiotics.* **25**, 473 (1972).
- 18) Gutman, A. R., Ribon, V., Leblance, J., Rapid, P. : Convenient Spectrophotometric Method for Determination of Clavulanic Acid. *Anal. Chem.* **57**, 2344 (1985).
- 19) Chin, N. X., Mcelrath, M. J., Neu, H. C. :  $\beta$ -Lactamase Inhibition by Acetylene Penicillanic Acid Compared to that of Clavulanate and Sulbactam. *Chemotherapy.* **34**, 318 (1988).
- 20) Fisher, J., Charnas, R. L. and Knowles, J. R. : Kinetic studies on the inactivation of *Escherichia coli* RTEM  $\beta$ -lactamases by clavulanic acid. *Biochem.* **17**(11), 2180 (1978).
- 21) Payne, D. J., Cramp, R., Winstanley, D. and Knowles, D. J. : Comparative Activities of Clavulanic Acid, Sulbactam and Azobactam against Clinically Important  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **38**, 767 (1994).
- 22) Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G. and Rolison, G. M. : Olivanic Acids, A Family of  $\beta$ -Lactam Antibiotics with  $\beta$ -Lactamase Inhibitory Properties produced by *Streptomyces* species I. Detection, Properties and Fermentation studies. *J. Antibiot.* **32**, 287 (1979).
- 23) Monks, J. and Waley, S. G. : Imipenem as substrate and inhibitor of  $\beta$ -lactamases. *Biochem. J.* **253**, 323 (1988).
- 24) Kahan, K. S., Kahan, F. M., Goegelman, R., Currie, S. A., Jackson, M., Stapley, E. O., Miller, W., Miller, A. K., Hendlin, D., Mochales, S., Hernandez, S., Woodruff, H. B. and irnbaum, J. :

- Thienamycin. A new  $\beta$ -lactam antibiotic I. Discovery, Taxonomy, Isolation and Physical properties. *J. Antibiot.* **32**, 1 (1979).
- 25) Basker, M. J. and Osborne, N. F. : 6-(substituted methylene)penems, potent broad spectrum inhibitors of bacterial  $\beta$ -lactamase. I. Racemic 6-ethylidene penems. *J. Antibiot.* XLIII(1), 70 (1990).
- 26) Brenner, D. G. and Knowles, J. R. : Penicillanic Acid Sulfone : An Unexpected Isotope Effect in the Interaction of 6 $\alpha$ - and 6 $\beta$ -Mono-deuterio and 6,6-Dideuterio Derivatives with RTEM  $\beta$ -Lactamase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **20**, 3680 (1981).
- 27) Hanumi, N., Kato, Y., Hashizume, T. and Matsuda, K. : Effects of a  $\beta$ -lactamase inhibitor, Sulbactam, on the activity of carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiot.* **48**(11), 1364 (1995).
- 28) Chen, Y. L., Hedeberg, K. and Guarino, K. : (6R, 8S)-(2-benzimidazolyl)hydroxymethylpenicillanic acid as potent antibacterial agents and  $\beta$ -lactamase inhibitor. *J. Antibiot.* **44**(8), **870** (1991).
- 29) Paradkar, A. S., Petrich, A. K., Leskiw, B. K., Aidoo, K. A. and Jensen, S. E. : Transcriptional analysis and heterologous expression of the gene encoding  $\beta$ -lactamase inhibitory protein from *Streptomyces clavuligerus*. *Gene*, **144**, 31 (1994).
- 30) Doran, J. L., Leskiw, B. K., Aippersbach, S. and Jensen, S. E. : Isolation and characterization of a  $\beta$ -lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces clavuligerus* and cloning and analysis of the corresponding gene. *J. Bacteriol.* **172**, 4909 (1990).
- 31) Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G. and Rolinson, V. : Olivanic acids, A family of  $\beta$ -lactam antibiotics with  $\beta$ -lactamase inhibitory properties produced by *Streptomyces* species I. Detection, Properties and Fermentation studies. *J. Antibiot.* **32**, 287 (1979).
- 32) Shirling, E. B. and Gottlieb, D. : *Streptomyces* Type Culture Projector, Methods Manual., 1 (1964).
- 33) Kuster, E. and Williams, S. T. : Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature*, **202**, 928 (1964).