

Escherichia 屬 細菌의 Penicillin Acylase 生産에 關한 研究

姜孝源 · 李周旻 · 裴 武*

(建國大學校 微生物工學科 · *韓國科學技術研究所 應用微生物研究室)
(1980년 2월 22일 수리)

Studies on the Penicillin Acylase Production of Genus *Escherichia*

Hyo Won Kang, Joo Kyung Lee and Moo Bae*

(Department of Microbiological engineering, Kon Kuk University, Seoul,

*Applied Microbiology Lab., Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea)

(Received February 22, 1980)

Abstract

In order to investigate penicillin acylase produced by a strain of Genus *Escherichia*, 47 strains of Genus *Escherichia* were isolated and examined to the extent of the inactivation of penicillins and the ability of 6-amino penicillanic acid (6-APA) production.

Among them, 12 strains were found to produce penicillin acylase and to form 6-APA.

The strain No. 11 of the isolates was selected to be the most excellent one producing the acylase. Optimum culture conditions for the production of the acylase of the strain were found as follows: pH at 7.6~8.0, time on 18 hrs, temperature at 34 to 38°C. And effective levels of the medium were found to be contained 0.3% phenylacetic acid, 1.0% yeast extract, 1.0% peptone and 0.3% L-glutamate. And, the production of the acylase by the isolate was strongly inhibited by 1% glycerol and the growth was remarkably retarded by the addition of 1.0% *n*-butylacetate.

The acylase was extracted from the isolate and the crude enzyme of the acylase was prepared and the characteristics of the enzyme were primarily examined in optimum pH, temperature, stabilities and reaction time.

緒 論

β -Lactam 系 抗生物質의 工業的인 生産을 위한 酵素가 利用되고 있다. 例를 들면 penicillin G acylase는 benzylpenicillin을 分解하여 6-amino penicillanic acid (6-APA)와 phenylacetic acid로 變化시키는데 利用된다.

6-APA는 天然 penicillin보다 임상적으로 탁월한 治療效果를 가지는 새로운 semisynthetic penicillin을 合成하는 基礎物質이다.

Penicillins에서 6-APA를 生産하는 데는 微生物學的方法도 利用되고 있으며 이 방법은 penicillin acylase의 酵素反應을 利用한다¹⁾.

P. acylase에 關한 最初의 報告는 1950年 Saka-guchi²⁾等에 의해 *Penicillium chrysogenum*과 *Asp. oryzae*의 菌糸에 存在하며, penicillin G를 6-APA와 phenylacetic acid로 加水分解한다고 發表했고 Rolinson³⁾等이 bacteria를 起源으로한 P. acylase를 *Escherichia coli*의 細胞원탁액에서 얻었다고 報告했다. Bauer⁴⁾等은 *E. coli* ATCC 9637의 P. acylase活性이 phenylacetic acid와 yeast extract

添加培地에서 增加했다고 發表했다. Sikyta⁵⁾ 등은 이 菌株의 연속배양에서 ammonium phenylacetate 의 添加效果를 主張했다. Pruess⁶⁾ 등도 *E. coli* ATCC 9637의 *P. acylase* 生産에 있어서 lactic acid 의 peptone 의 效果에 對해 報告했다. 또 Szentirmai⁷⁾ 는 *E. coli* Nyl/3-67 의 *P. acylase* 生合成의 carbonic acid 添加效果와 代謝産物에 의한 抑制效果를 發表했다. Self⁸⁾ 등은 glutamic acid 添加에 의한 *E. coli* ATCC 9637의 *P. acylase* 生産에 關係 報告하였다.

本研究에서는 6-APA 를 生産할 目的으로 化學的인 方法보다 經濟的인 것으로 알려진 微生物學的 方法에 對해 檢討했다.

즉 6-APA 의 生産에 必要한 *P. acylase* 를 얻기 위해 *E. coli* 를 分離, 同定했다.

이 菌株로부터 酵素生産을 위한 培養條件을 檢討하고, 얻어진 酵素의 酵素學的 特性을 研究하여 그 結果를 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 大腸菌의 分離와 同定

P. acylase 生産에 使用할 *E. coli* 의 分離는 경기도 평택 近方의 河水 및 土壤, 人糞, 飲食店의 下水 등에서 試料를 채취하여 B. B. L. manual⁹⁾, standard methods for the examination of water and sewage¹⁰⁾ 등의 *E. coli* 分離方法에 따랐다.

分離用 培地로는 Difco (USA) 의 lactose broth, brilliant green bile broth, nutrient agar, macconkey agar, endo agar, 및 eosine methylene agar 를 使用하였다. 分離된 菌株의 同定은 Bergy's manual 8th ed.¹¹⁾, identification of Enterobacteriaceae¹²⁾ 中の *E. coli* 同定法에 따라 分離菌의 生化學的 特性에 의해 同定하였다.

2. Penicillin acylase 生産菌株의 選別

P. acylase 生産菌株의 選別을 위해, 分離, 同定된 各菌株의 penicillin G (Meiji Seika, Japan) 와 ampicillin (Yung Jin Pharm. Korea) 에 對한 抗菌力을 測定하였다. 여러가지 濃度의 penicillins (1~500 $\mu\text{g/ml}$) 이 포함된 液體培地를 5 ml 씩 試驗管에 넣고, 여기에 nutrient broth (37°C) 에서 12時間 前培養한 各各의 培養液을 0.1 ml 씩 接種하고 37°C 에서 12時間 攪拌培養 (240 rpm) 하여 penicillins 의 最少發育阻止濃度를 測定하였다.

分解된 penicillins 의 量은 Sutherland¹³⁾ 의 agar diffusion 法으로 殘存 penicillin 量을 測定하여 계산하였다.

P. acylase 生産菌株는 T. L. C. 로서 6-APA 를 檢出하여 判定하였다.

가장 強力한 *P. acylase* 活性을 갖는 菌株의 選別은 *P. acylase* 를 生産하는 菌株를 nutrient broth (37°C) 에서 12時間 前培養시켰다.

이 培養液을 0.1% -phenylacetic acid 添加培地와 無添加培地, 各 100 ml 에 1 ml 씩 接種하여 37°C, 12時間 攪拌培養 (240 rpm) 하였다. 이 培養液에 penicillin G (1 mg/ml) 를 添加하여 37°C 에서 4時間 反應시켰다. 反應液中의 6-APA 는 T. L. C 로 再確認하고 後述하는 6-APA 의 定量法에 따라 6-APA 의 生成이 가장 많은 菌株를 選別하였다.

3. 分析方法

1) T. L. C. 에 의한 6-APA 의 確認法

反應에 의해 生成된 6-APA 의 確認은 培養液을 I. E. C 遠心分離機 (5200 rpm) 로 遠心分離하여 上澄液을 thin layer 에 spotting 하여 永進藥品의 6-APA 와 比較하였다. 전개용매로는 ethylacetate; $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$; H_2O ; HAC (30; 35; 35; 0.2) 를 使用하였다.

2) 6-APA 의 定量法

6-APA 의 定量은 Batchelor¹⁴⁾ 등의 hydroxylamine 法에 따랐다. *P. acylase* 1 unit 는 pH 8.0 의 0.2 M-phosphate buffer 에 溶解시킨 1% -penicillin G 를 37°C 1時間에 1 μmole 分解하는데 必要한 酵素量으로 하였다.

3) 菌體量의 測定

菌體量의 測定은 培養法을 遠心分離하여 菌體를 millipore filter⁵ (FG, 0.2 μm) 로 여과하여 dry oven 에서 102°C 로 恒量이 될때까지 乾燥하여 菌體量을 秤量하였다.

4. Penicillin acylase 의 生産과 調製

가장 強力한 *P. acylase* 活性을 갖는 菌株의 菌體懸탁액 1.0 ml 를 取해 phenylacetic acid 0.1%, sodium glutamate 0.1%, yeast extract 2.0%, KH_2PO_4 0.3%, K_2HPO_4 0.7% 가 함유된 培地 100 ml 에 接種하여 37°C 에서 24時間 攪拌培養하여 *n*-butylacetate 를 1.0% 되게 添加하여 菌體成長을 中止시키고 遠心分離로 菌體만을 收集하여 生理食鹽水로 세척후 pH 8.0 인 0.2 M-phosphate

buffer 100 ml 에 현탁시켜 ultra sonicator (millipore, USA)를 사용하여 50 kHz 0°C 에서 30 秒間 菌體를 파괴하여 細胞內酵素를 抽出하여 遠心分離에 의해 菌體를 除去하고 上澄液을 酵素源으로 하여 0°C 에서 保存하였다.

實驗結果 및 考察

1. 大腸菌의 分離와 同定

채취한 試料를 lactose broth 에 接種하여 개스가 發生되는 菌株를 일차로 分離하였다. 이들을 B. G. B. broth 에 移殖, 培養하여, gas 가 發生되는 菌株를 分離하여 Endo agar 에 移殖시켰을때 pink 色の colony 를 나타냈고, Gram 염색에서 陰性을

나타낸 短桿菌을 lactose broth 에 再接種시켜 37°C 에서 다시 개스가 發生된 菌을 大腸菌群으로 分離한 結果 121株를 얻었다. 分離된 121株中 indole 과 methyl red test 에서 陽性, Voges-Proskauer test, citrate test, urease test, gelatin test 에서는 陰性을 나타냈고, glucose, lactose, mannitol, sorbitol, arabinose 는 醱酵하고 inositol 은 醱酵하지 않는 Gram 陰性인 菌株를 *Escherichia* 屬으로 同定한 結果, 47株를 얻었다.

2. Penicillin acylase 生産菌株의 選別

Escherichia 속으로 同定된 47株에 對해 penicillin G 와 ampicillin 의 最少發育阻止濃度를 測定한 結果는 Table 1 과 같다.

Table 1. Distribution of Minimal Inhibitory Concentration of Ampicillin and Penicillin-G.

M. I. C.	No. of inhibited strains									
	>500	500	250	125	50	25	12.5	5.0	2.5	1.25 ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicillin	4	1	2	1	6	3	2	10	7	11
Penicillin-G	5	1	2	1	12	5	2	5	5	9

*M. I. C. : Minimal Inhibitory Concentration.

이들 47株의 *Escherichia* 속군이 生産한 酵素의 性質을 調査하여 P. acylase 活性을 나타낸 12株를 選別하여 菌株 No. 1~12로 命名하였다.

이들 12株에 對해 penicillins 의 最大發育許用濃度를 調査한 結果, 最高 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 最低 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 인 菌株 No. 4, 5, 11을 選別하였다. 選別된 3株의 P. acylase 活性을 37°C 에서 攪拌培養하여, 測定한 結果 *Escherichia* No. 11 이 enzyme activity 로 96 U/ml of culture 를 얻었다. 따라서 以下の 모든 實驗에서는 *Escherichia* No. 11 을 P. acylase 生産을 위한 試驗菌株로 하였다.

3. Penicillin acylase 의 生産條件

1) 炭素源에 의한 영향

P. acylase 의 生産을 增加시키는 것으로 알려진⁷⁾ carbonic acid 를 添加하여, 無添加했을 때와 specific activity 를 比較한 結果는 Table 2 와 같다.

Table 2 에서 carbonic acid 의 添加에 의해 specific activity 는 모두 增加했으나 0.3% -phenylacetic acid 의 경우, 5.7倍로 最高의 增加를 나타냈다. 이 結果에 따라 酵素生産에 影響을 주는 phenylacetic acid 를 濃度別로 添加하여 24時間 培養한 結果

Table 2. Effect of Carbonic Acids on the Production of P. Acylase by the Strain after 18 h. of Cultivation.

Carbonic acid	Enzyme activity. (U/ml)	Cells weight. (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
None	32	2.60	12.4
Phenylacetic acid (0.1%)	96	2.63	36.5
Phenylacetic acid (0.3%)	217.6	3.06	71.1
Phenoxyacetic acid (0.3%)	210.4	3.11	67.7
Ammonium phenylacetate. (0.3%)	192.0	3.06	62.7
2,4-Dimethoxyphenylacetic acid. (0.3%)	102.4	3.04	33.7
P-methoxyphenylacetic acid. (0.3%)	99.2	3.00	33.1

果는 그림 1 과 같다.

또 phenylacetic acid 의 添加時期에 따른 酵素活性은 그림 2 와 같다.

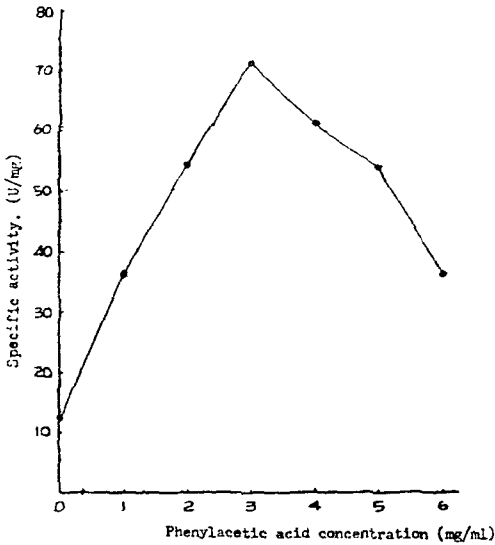


Fig. 1. Effect of Concentration of Phenylacetic Acid on the Production of P. Acylase.

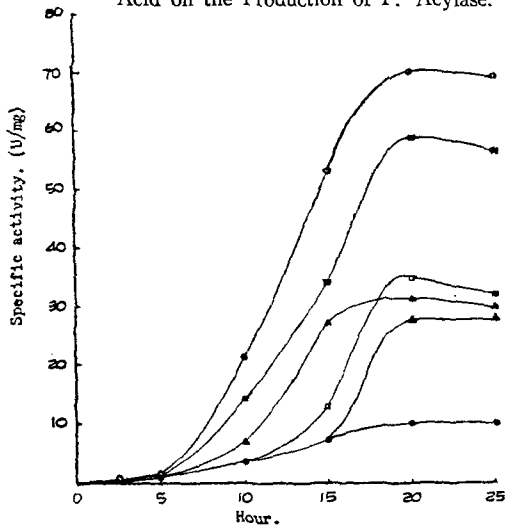


Fig. 2. Effect of Addition Time of Phenylacetic Acid to the Culture on the Production of P. Acylase by the Strain.

- Symbols; ○, 0.3% phenylacetic acid added at start.
 ●, Control without phenylacetic acid.
 ▲, 0.1% phenylacetic acid added at start.
 △, 0.3% phenylacetic acid added at 15 h.
 □, 0.3% phenylacetic acid added at 10 h.
 ■, 0.3% phenylacetic acid added at 5 h.

그림 2에서 培養初期에 添加했을 때 가장 좋은 結果를 얻었다. 그러나 時間的인 間격을 두고 添加했을 때 酵素活性은 모두 增加 傾向을 보여 주고 있다.

2) 窒素源에 의한 영향

P. acylase 生産培地에 여러 種類의 窒素源을 Self⁽⁸⁾ 등의 實驗과 같이 2.0% (w/v) 되게 添加하여 2.0%-yeast extract 를 基準으로 酵素活性을 比較한 結果는 Table 3 과 같다.

Table 3. Effect of Nitrogen Sources on the Production of P. Acylase by the Strain after 18h. of Cultivation.

Nitrogen sources (%)	Enzyme activity (U/ml)	Cells weight (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
Yeast extract (2.0)	96	2.63	36.5
Peptone (2.0)	114.2	2.92	39.1
(NH ₄) ₂ SO ₄ (2.0)	86.0	2.64	32.8
(NH ₄) Cl (2.0)	84.4	2.68	31.5
NaNO ₃ (2.0)	72.1	2.26	31.9
Yeast extract (1.0)	231.7	3.06	75.7
+Peptone (1.0)			

Table 3에서 無機態窒素인 NaNO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄는 酵素活性이 낮았으나 1.0%-yeast extract 와 1.0%-peptone 을 添加한 경우 酵素生産이 높았다.

3) Amino 酸에 의한 영향

P. acylase 生産에 影響을 주는 것으로 알려진 L-glutamic acid, L-alanine, L-glycine 의 影響을 調査한 結果는 Table 4 와 같다.

Table 4의 結果 L-glutamic acid 의 添加가 酵素生産이 좋은 것으로 나타났다. 이 結果에 따라 L-glutamic acid 의 濃度가 酵素生産에 미치는 影響을 調査한 結果, 0.3% (w/v) 近方에서 生産이 가장 좋은 것으로 나타났다.

4) 代謝産物에 의한 영향

P. acylase 生産이 代謝産物이나 polyalcohols에 의해 抑制된다고 Szentirmai⁽⁷⁾가 報告했다. 따라서 이 菌株의 酵素生産에 있어서 glycerol 에 의한 抑制效果를 檢討한 것이 그림 3 이다.

그림 3은 여러 濃度의 glycerol (0~15%)을 培養初期에 添加하여 18時間(37°C) 培養後의 酵素活性을 나타낸 것으로 添加濃度의 增加에 따라 酵素活性이 低下되었다. 이때 培地의 pH는 一定하게

Table 4. Effect of Amino Acids on the Production of P. Acylase by the Strain after 18 h. of Cultivation

Amino acid sources (%)	Enzyme activity (U/ml)	Cells weight (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
None	82	2.61	31.4
L-glutamic acid (0.1)	96	2.63	36.5
L-glutamic acid (0.3)	240.9	3.06	78.7
L-alanine. (0.3)	184.4	3.00	61.5
L-glycine. (0.3)	164.0	2.96	55.4

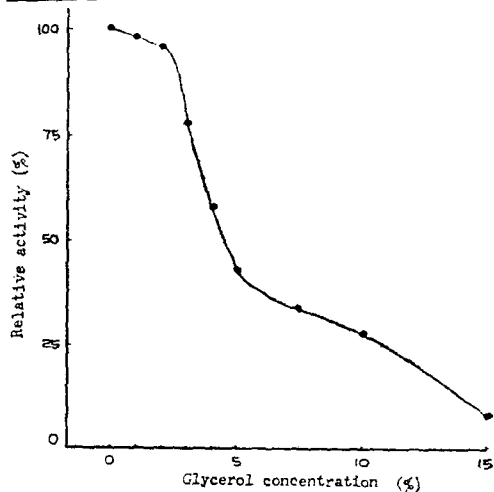


Fig. 3. Effect of Glycerol Concentration on the Production of P. Acylase by the Strain.

8.0을 유지시켰다.

5) 온도 및 pH에 의한 영향

a) 온도에 의한 영향

Nutrient agar에서 12시간(37°C) 前培養한 試驗菌株를 種菌으로 P. acylase 生産培地에서 24時間씩 溫度別로 酵素生産을 比較한 것이 그림 4이다.

그림 4와 같이 이 菌株의 酵素生産은 34~38°C에서 最大였다. 그리고 Henry¹⁵⁾ 등의 報告와 같이 本實驗에서도 24°C 以下の 溫度에서 酵素生産이 抑制되는 것 같다.

b) pH에 의한 영향

生産用 培地の pH를 6.4~8.8로 調節하여 34~38°C에서 18時間 培養시킨 結果는 그림 5와 같다. 그림 5에서 pH 7.6~8.0의 범위에서 酵素生産이 가장 좋았다.

以上の 結果를 綜合하여 分離된 E. coli YJP. No. 11의 P. acylase 生産을 위해서는 phenylacetic

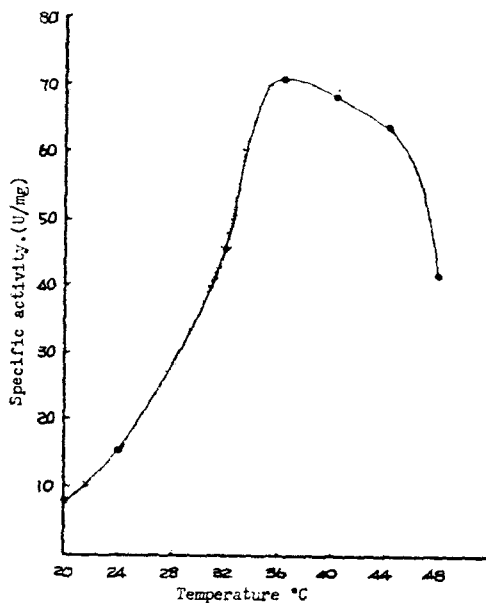


Fig. 4. Effect of Temperature on the Production of P. Acylase by the Strain after 18 h. of Cultivation.

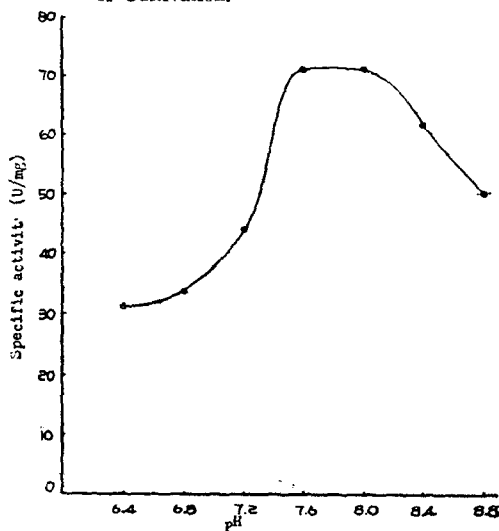


Fig. 5. Effect of the pH on the Production of P. Acylase by the Strain after 18 h. of Cultivation.

acid (0.3%), yeast extract (1.0%), peptone (1.0%) L-glutamic acid (0.3%), K₂HPO₄ (0.3%), KH₂PO₄ (0.7%)의 培地에서 pH 7.6~8.0, 溫度 34~38°C가 가장 適合한 培養條件으로 決定하였다.

6) 培養時間에 의한 영향

前述한 培養條件下에서 이 菌株의 菌體量 및 P. acylase 活性의 time course를 測定한 것이 그림 6이다. 그림 6에서 菌體의 增殖은 約 6時間의

log phase 後에 增加하기 始作했고, 이에 따라 酵素도 生産되기 始作했다. 約 18 時間의 培養에서 菌體의 增殖이 最大였고 酵素生産도 最大를 나타냈다. 따라서 이 菌株의 酵素生産을 위한 培養時間은 18 時間으로 定하였다. 한편 이 菌株에 의한 酵素生産은 菌體의 增殖에 比例하는 增殖連動型임을 알수 있었다.

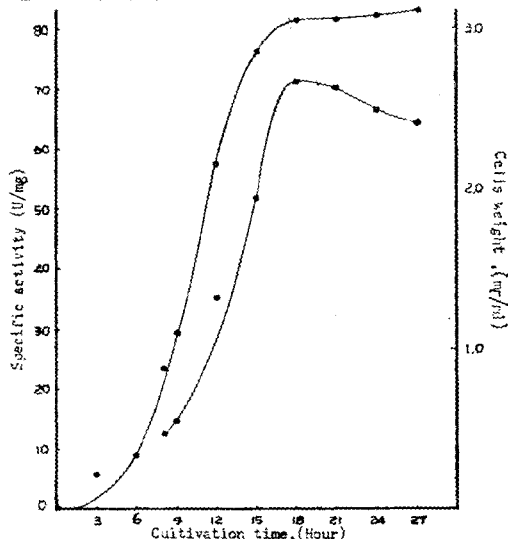


Fig. 6. Time Course of Batch Cultivation by the Strain in the Production of P. Acylase. Symbols: ○ Cells weight ● P. acylase activity.

4. Penicillin acylase 의 反應特性

1) 酵素活性에 對한 pH 의 영향

抽出된 P. acylase 의 pH 는 phosphate buffer 로서 6.0~8.0, Clark and Lube buffer 로서 8.0~10.0으로 調節하였다.

基質은 1.0%-penicillin G 를 使用하여 酵素液 1.0 ml 와 37°C 에서 1 時間 反應시켰을 때 이 酵素의 反應을 위한 最適 pH 는 8.0이었다.

2) 酵素安定性에 對한 pH 의 영향

抽出된 酵素의 pH 를 buffer 로 各各 3.0~11.0 으로 調節하여 室溫에서 5 時間동안 放置시켜, 이들의 pH 를 8.0으로 再調節하여 1%-penicillin G 와 37°C, 1 時間 反應시켰다. pH 8.0의 酵素活性을 基準으로 各 pH 에 對한 相對活性을 調査한 結果, 이 酵素의 pH 에 對한 安定性은 7.0~9.0의 범위였다.

3) 酵素活性에 對한 溫度의 영향

抽出된 酵素를 1% penicillin G 를 基質로 pH 8.0, 0.2 M-phosphate buffer 에서 溫度別로 1 時間

씩 反應시켰을 때의 酵素活性을 調査한 結果, 이 酵素의 反應을 위한 最適溫度는 38°C 近方이었다.

6. Penicillin acylase 에 의한 penicillin G 의 加水分解

pH 8.0, 0.2 M-phosphate buffer 에 溶解시킨 1% penicillin G 를 基質로 37°C 에서 抽出된 酵素와 反應시킨 結果가 그림 7 이다.

이때 反應液의 pH 는 1 N-NaOH 로서 8.0으로 一定하게 유지시켰다.

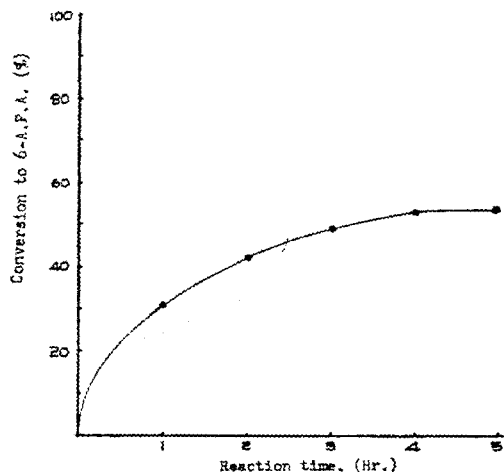


Fig. 7. Hydrolysis of 1%-Penicillin-G by the P. Acylase.

그림 7에서 反應初期에는 급격한 6-APA 의 生成이 나타나지만 反應時間의 경과에 따라 점차 완만해지는 것을 보여주고 있다. 4 時間의 反應에 理論值의 56%가 6-APA 로 變化되었으나, 이것은 反應產物인 6-APA 와 phenylacetic acid 의 蓄積으로 인한 生産物阻害, 또는 非精製된 抽出酵素의 使用때문으로 생각된다.

要約

6-APA 의 生産에 使用할 penicillin acylase 를 生産하는 野生菌株을 分離하여 生理化學的特性을 調査하여 *Escherichia* 속을 同定하였다. Penicillin acylase 生産성이 가장 높은 菌株을 選別하여 培養條件을 調査하고 菌體를 生産하여 酵素를 抽出하여 酵素의 反應特性을 調査한 結果는 다음과 같다.

1. 分離한 121株의 生理化學의 特性에 의해 47株가 *Escherichia* 속으로 同定되고 이들中 12株가

penicillin acylase 活性을 나타냈다.

2. 12株中 가장 強力한 P. acylase 活性을 나타낸 菌株가 *Escherichia* No. 11 이었다.

3. 이 菌株의 酵素生産條件은 炭素源은 0.3%-phenylacetic acid, 窒素源은 1%-peptone 과 1%-yeast extract, amino 酸으로는 0.3%, L-glutamic acid 가 影響을 주었다. 그리고 培地의 pH 는 7.6 ~ 8.0, 培養溫度는 34~38°C, 培養時間은 18 時間이 最適 生産條件이었다.

4. 酵素는 菌體를 超音波에 의해 抽出하여 遠心分離하여 上澄液을 0°C 에서 保存하여 酵素源으로 하였다.

5. 抽出酵素의 反應特性은 最適 反應溫度는 38°C, pH 는 8.0 이었고, 1% penicillin G 를 基質로 37°C 에서 反應시켰을때 4 時間의 反應에서 理論值의 56%가 6-APA 로 變化되었다.

參考 文獻

1. Carrington, T.R. : Proc. Roy Soc. (Lond)., **B179**, 321 (1971).
2. Sakaguchi, K. and Murao, S. : J. Agr. Chem. Soc. Jap. **23**, 311 (1950).
3. Rolinson, G.C., Hart, V., Richards, M. and Chain, E.B. : Nature, **187**, 236 (1960).
4. Bauer, K. and Kaufmann, W. : J. Gen Microbiol., **35**, IV (1964).
5. Sikyta, B. and Slezak, J. : Biotechnol. and Bioeng., **6**, 309 (1964).
6. Pruess, D.L. and Johnson, M.J. : J. Bacteriol., **90**, 1502 (1965).
7. Szentirmai, A. : Appl. Microbiol., **12**, 185 (1964).
8. Self, D.A., Kay, G. and Dunnill, P. : Biotechnol. and Bioeng., **11**, 337, (1969).
9. B.B.L. Manual of Products and Laboratory Procedures. 5th, ed. (1973).
10. American Public Health Asso. and Amer. Water Works Asso. Standard Methods for the examination of water and Sewage. 9th, ed. (1946).
11. Bergy's Manual of determinative Bacteriology., 8th, ed. (1974).
12. Edwards, P.R. and Ewing, W.H. : Identification of Enterobacteriaceae (1962).
13. Sutherland, R.J. : J. Gen. Microbiol., **34**, 85, 1964. 14. Batchelor, R.J., Chain, E. B., Richards, M. and Rolinson, G.N., : Proc. Roy. Soc., **B 154**, 498 (1962).
15. Henry, NG., John, L.T. and Allen, G.M. : J. Bacteriol., **84**, 331 (1962).