

Streptomyces sp.가 生産하는 Penicillinase에 關한 研究 (第3報) 菌株의 同定

都在浩·金相達
韓國人蔘煙草研究所
(1982년 7월 15일 수리)

Studies on Penicillinase Produced by *Streptomyces* sp. (Part 3) Identification of the Strain

Jae Ho Do and Sang Dal Kim
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute
Seoul, Korea
(Received July 15, 1982)

Abstract

A microorganism, YS-40 strain which powerfully produced penicillinase was isolated from soil. The morphological and cultural characteristics of the strain; spore chain, spore surface, aerial mass color, melanoid pigment, reverse side pigment, other soluble pigment, and physiological properties were investigated. As the results of various examinations, the strain YS-40 was identified to be similar to *Streptomyces bobili* except the spore chain and the utilization of L-rhamnose among the various carbon sources.

序 論

放線菌으로부터 penicillin을 強力히 分解하는 菌株 YS-40을 土壤에서 分離, 選別하여 이 菌株가 生産하는 penicillinase의 最適生産條件 및 酵素學的인 基本性質에 對해서는 이미 報告한 바가 있다.^{1, 2)}

Penicillinase는 cephalosporinase와 더불어 β -lactamase 係 酵素라고 불리어 지는데 이들 酵素는 抗生物質의 作用으로 penicillin, cephalosporin과 같은 β -lactam 係 抗生物質에 對한 抵抗性이 있는 微生物이 생기게 됨으로서 發見되었다. Penicillin과 cephalosporin에 對한 *Legione-*

*lla pneumophila*의 in vitro에서의 抵抗性^{3, 4)}, Legionnaire's pneumonia 患者에 對한 β -lactam antibiotics의 臨床的治療失敗⁵⁾, aerobic gram-negative bacteria의 藥劑抵抗性으로서 β -lactamase 生産의 役割⁶⁾ 등에 對한 많은 報告가 있는데 이러한 β -lactam 係 抗生物質에 對한 微生物의 藥劑低抵抗性은 permeability barrier⁷⁾, penicillin binding protein의 變化⁸⁾ 등에 起因될 수도 있으나 거의 β -lactamase의 生産⁹⁾이 原因이 된다고 생각되어진다. 一般적으로 penicillinase 등의 β -lactamase 生産은 β -lactam 係 抗生物質 耐性菌인 gram-negative 및 gram-positive bacteria⁹⁾⁻¹¹⁾에서 生産되나 *Streptomyces*屬 菌株

에 대해서는 거의 연구된 바 없다.

本報에서는 penicillinase를 強力히 分泌 하는 YS-40 菌株을 分離하여 *Streptomyces bobili*의 類綠菌으로 同定하였기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

供試菌

本 實驗에 使用한 菌株은 前報¹에서 報告한 바와 같이 土壤에서 分離한 *Streptomyces* YS-40 菌株을 使用하였다.

培養 및 形態의 特性 觀察

本菌의 aerial mass color, reverse side color 및 melanoid 色素 以外的 可溶性色素의 判定은 Shirling과 Gottlieb等¹⁸이 행한 것과 같이 yeast extract-malt extract agar, oatmeal agar, inorganic salts-starch agar, glycerol-asparagine agar의 平板 및 斜面培地에서 14日間 培養하면서 調査하였다. Melanoid 色素의 判定도 역시 Shirling과 Gottlieb의 方法¹⁸에 依해 peptone-yeast extract iron agar, tyrosin agar, melanin formation medium¹⁹의 斜面培地에서 14日間, tryptone-yeast extract broth 培地에서 4日間 培養하면서 觀察하였다.

Spore chain은 glycerol-asparagine agar 培地에서 14日間 28°C에서 培養한 供試菌을 光學顯微鏡(Nikon Labophot 型)으로 檢鏡하고 spore surface의 檢査는 yeast extract-malt extract agar 培地에서 14日間 28°C에서 培養한 供試菌의 胞子를 採取하여 2% Phosphotungstic acid (pH 7.2)에 懸濁시켜 folmbar를 입힌 grid위에 塗布하고 1分間 室溫에 放置하였다가 잘 乾燥시켜 電子顯微鏡(Hitachi model HU-11E-1)으로 觀察하였다.

生理 및 生化學的 特性觀察

澱粉加水分解力, indole生成力, H₂S 生成力, nitrate還元力, catalase 生成力을 調査하였으며²¹ casein 加水分解力은 脫脂乳를 加한 (10% V/

V) nutrient agar 平板에, gelatin 加水分解力은 gelatin을 0.4% 加한 nutrient agar 平板에 供試菌을 劃線接種하여 28°C에서 11日間 培養한 後 15% HgCl₂가 含有된 1.8N-HCl溶液을 加하여 生成된 透明帶의 有無로서 判定하였다. Milk coagulation은 glucose-asparagine 液體培地에 脫脂乳를 10% 添加하여 菌을 接種한 後 10日間 培養하여 凝乳有無로서 判定하였다.

한편, streptomycin에 對한 生育阻害性은 glucose-asparagine 液體培地에 streptomycin을 0.5, 10, 20, 50, 100 μg/ml가 되게 加하여 菌을 接種하여 14日間 培養하면서, 耐鹽性은 Czapek培地에 NaCl의 濃度를 1~12% 되게 해서 14日間 培養하여 그 生育度를 調査하였다. 또 streptomycin 以外 여러가지 抗生物質이 本菌의 生育에 미치는 影響을 調査하기 위하여 β-lactam 係, aminoglycoside 係, phenicol 係, tetracycline 係 抗生物質을 glucose-asparagine 液體培地에 10 μg/ml의 濃度로 添加하여 菌을 接種한 後 28°C에서 4日間 培養하면서 菌의 生育狀態를 觀察하였다.

糖利用性 檢定은 Pridham and Gottlieb¹⁸의 基礎培地를 10Lbs에서 10分間 殺菌한 後 糖類를 1%가 되게 添加하여 121°C에서 15分間 再殺菌하여 菌을 接種하였다. 이를 28°C에서 14日間 培養하면서 그 生育度를 觀察하였다.

分離菌의 同定

本菌의 同定은 주로 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology¹⁹, ISP Strain Key²⁰, Shirling and Gottlieb²¹의 方法에 따랐다.

結果 및 考察

培養 및 形態의 特性

Oatmeal agar, inorganic salts-starch agar, sucrose-nitrate agar, starch agar, glycerol-glycine agar 培地에서 菌을 14日間 培養하면서 그 特性을 調査한 結果 aerial mass color는 white 였고 reverse side color는 yellow-brown 이었으나 glucose asparagine agar, glucose-peptone agar에서는 dark blue로 나타났다. 한편,

melanoid色素 以外の 可溶性色素은 yellow-brown이었으며 peptone-yeast extract-iron agar, tyrosine agar, melanin formation medium¹⁶⁾, tryptone-yeast extract broth에서 melanoid pigment의 生成을 調査해 본 結果 peptone-yeast extract-iron agar 培地에서는 black이었으며 tryptone-yeast extract broth에서는 培養 1日째에는 dark violet, 2日째에는 violet, 4日째에는 pale brown이었다. Tyrosine agar, melanin formation medium에서는 生成되지 않았다. 此外 여러가지 培地에서 培養한 特徴을 調査한 結果는 Table 1과 같다.

本菌을 glycerol-asparagine agar 및 yeast-extract-malt extract agar 培地에서 14日間 培養하여 光學顯微鏡과 電子顯微鏡으로 spore chain과 spore surface를 觀察한 結果, spore chain은 rectus-flexibilis & rectinaculum-apertum의 複合型이었으며 (Fig. 1) spore surface는

smooth type이었다. (Fig. 2). 그리고 培養上의 特性과 形態의 特性을 要約하면 Table 2와 같다.

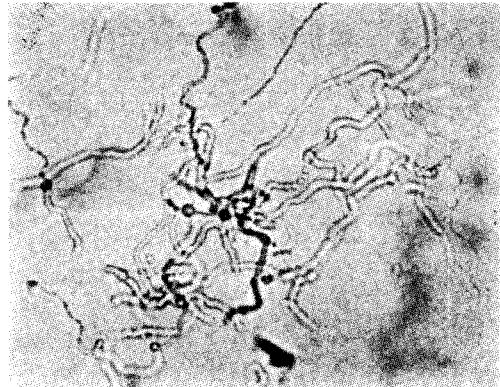


Fig 1. Spore Chain of *Streptomyces* sp. Strain YS-40 on Glycerol-Asparagine Agar after 14 days Culture at 28°C (x 400) Note; RF & RA

Table 1. Cultural Characteristics of *Streptomyces* sp. strain YS-40

Medium	Growth	Aerial mycelium	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar	E	Pinkish white	Brownish grey
Oatmeal agar	M	White	None
Inorganic salts-starch agar	P	White	None
Glycerol-asparagine agar	G	Pale pink	None
Sucrose-nitrate agar	E	White	None
Glucose-asparagine agar	M	Pinkish white	None
Peptone-beef extract agar	M	Greyish pink	Brownish pink
Potato dextrose agar	G	Greyish pink	Brownish grey
Nutrient agar	P	Limpid grey	None
Starch agar	G	White	None
Tryptone-yeast extract broth	G	Grey	Pale brown
Tyrosine agar	E	White	None
Potato plug	E	Greyish white	Brownish yellow
Glycerol-glycine agar	E	White	None
Glucose-yeast extract-beef-peptone agar	G	Reddish brown	Reddish brown
Peptone-yeast extract-iron agar	M	Black	Black
Melanin formation medium*	P	Limpid grey	None

Growth; E:excellent, G:good, M:moderate, P:poor

The strain was cultured in various kinds of media at 28°C for 14 days.

*The composition of melanin formation medium was yeast extract 0.1%,

L-tyrosine 0.1%, NaCl 0.85%, agar 1.6%, pH7.0.



Fig 2. Electronmicrograph of Spore Surface of *Streptomyces* sp. Strain YS-40 on Yeast Extract-Malt Extract Agar after 14 days Culture at 28°C
A;x8,500, B;x29,000
Note;Smooth surface

生理 및 生化學的 特性

本菌의 生理 및 生化學的 特性을 調査한 結果 澱粉과 gelatin은 加水分解할 수 있었으나 casein은 分解할 수 없었다. Indole을 生成하지 않았으며 H₂S와 catalase를 生成하였고 nitrate를 還元시킬 수 있었으며, milk를 coagulation시켰다.

Table 2. Morphological Characteristics of *Streptomyces* sp. Strain YS-40

Morphological	Characteristics
Colony surface	Powdery
Spore chain	RF & RA
Spore surface	Smooth
Aerial mass color	White
Melanoid pigment	Not always
Reverse side color	Yellow-brown+blue
Other souble pigment	Yellow-brown

한편 streptomycin을 5μg/ml를 添加한 培地에서 전혀 生育하지 않았으며 NaCl tolerance를 調査한 結果 5% 濃度까지 生育하였으나 時間이 경과함에 따라 7%에서도 弱하긴 하지만 生育이 可能하였으며 8% 이상에서는 生育하지 않았다. 또 本菌의 最適 pH는 7.0이었고 最適溫度는 28°C이었다. (Table 3)

Penicillin G 이외에 12種의 抗生物質을 添加한 培地에서 本菌의 生育狀態를 調査하여 本菌株의 抗生劑에 對한 耐性을 調査해 본 結果는 Table 4와 같다.

抗生物質의 作用機作別로 보면 細胞壁 合成을 阻害하는 β-lactam系 抗生物質, mRNA의 50S ribosome 附着을 阻害하는 phenicol系 抗生物質 30S와 mRNA 結合을 阻害하는 tetracycline 系 抗生物質에 依해서는 本菌의 生育이 거의 阻害를 받지 않았으나 mRNA의 機能을 阻害한다고 알려진 streptomycin, kanamycin을 添加했을 때에는 전혀 菌이 生育하지 않았다. 그러므로 本菌은 β-lactam系 抗生物質에 對해서는 強한 耐性을 가지고 있는 동시에 phenicol系, tetracycline系 抗生物質에도 耐性을 나타내었으나 aminoglycoside系인 streptomycin이나 kanamycin에 對해서는 感受性菌으로 생각되어진다.

本菌의 糖利用性을 調査한 結果는 Table 5와 같다. 大部分의 糖을 利用할 수 있었으나 D-mannitol, salicin은 전혀 利用하지 못하였으며 L-rhamnose는 極히 弱하게 利用하였다.

分離菌의 同定

本菌의 培養上 및 形態學的 特性, 生理 및 生化學的 特性을 綜合하여 Bergey's manual¹⁹, I SP strain key²⁰, The actinomycetes²², Shiring & Gottlieb²¹, Pridham & Lyones²³, Küster²⁴의 方法에 依해 本 菌株와 類似한 性質을 가진 菌을 比較해 보면 Table 6과 같다.

供試菌의 形態 및 生理, 生化學的 特性 特히 糖利用性이 가장 類似한 菌은 *Streptomyces bobili*로 나타났다.

*Streptomyces*屬 菌株의 同定에 가장 重要한 melanoid pigment의 生成에 있어서 *S. bobili*는 항상 生成하지 않는다는 報告¹⁹, negative라는 報告^{20, 21, 24}, positive라는 報告²² 등으로 나타났다.

Table 3. Physiological and Biological Characteristics of *Streptomyces* sp. Strain YS-40

Factor	Characteristics
Starch hydrolysis	positive (5 days)
Gelatin hydrolysis	positive (11 days)
Casein hydrolysis	negative (11 days)
Indole production	negative (5 days)
H ₂ S production	positive
Nirtate reduction	positive (5 days)
Catalase production	positive (48 hrs.)
Coagulation of milk	positive (5 days)
Melanoid pigment	Not always
Optimum pH	7.0
Optimum temperature	28°C
Streptomycin inhibition	positive
NaCl tolerance	≥ 5%, but < 8%

Table 4. Antibiotic Resistance Patterns of YS-40 Strain

Antibiotics	Final concentration (μg/ml)	Growth
<i>β</i> -Lactams		
Penicillin series		
Penicillin G	10	+++
Penicillin G	100	+++
Penicillin V	10	+++
Ampicillin	10	+++
Cloxacillin	10	+++
Methicillin	10	+++
Cephalosporine series		
Cephadrine	10	+++
Cephalexin	10	+++
Cefazolin	10	+++
Cephaloridine	10	+++
Aminoglycosides		
Streptomycin	5	-
Kanamycin	10	-
Phenicol		
Chloramphenicol	10	++
Tetracyclines		
Oxytetracycline	10	++
None		+++

Table 5. Utilization of Carbon Compound

Carbon compound	Growth
No carbon	-
D-Glucose	+
D-Xylose	+
L-Arabinose	+
L-Rhamnose	±
D-Fructose	+
D-Galactose	+
Raffinose	+
D-Mannitol	-
i-Inositol	+
Salicin	-
Sucrose	+
Inulin	+
Cellulose	+
Starch	+ -

+ : utilized, - : not utilized, ± : slightly or not utilized The growth was checked after 14 day culture at 28°C.

며, 本菌에서도 peptone-yeast extract-iron agar 에서는 black, tryptone-yeast extract broth 에는 brown으로 나타났으나 tyrosine agar 에서는 生成되지 않았다. 그의 peptone이나 tyrosine 이 含有된 培地에서 brownish pink, reddish brown, negative로 나타났는 것처럼 항상 melanoid pigment를 生成하지 않았다.

*S. bobili*의 spore chain이 spira,¹⁹⁻²²⁾ rectus-flexibilis 또는 not determined²³⁾로 報告된 反面에 本菌은 rectus-flexibilis 또는 retinaculum-apertum으로 나타났다. 그리고 糖類中에서 本菌이 L-rhamnose를 거의 利用하지 못했으나 *S. bobili*는 利用했다는 것 以外에는 *S. bobili*와 가장 類似하므로 本菌은 *Streptomyces bobili* 내지 그 類縁菌이라고 恩慮된다.

要 約

土壤으로부터 penicillinase를 強力히 分泌하는 放線菌屬 一株를 分離한 後 本菌의 形態學的 特徵, 培養上 및 生理生化學의 特性을 調査하여 同定한 結果 *Streptomyces bobili* 내지 그 類縁菌으로 同定되었다.

Table 6. Identification of Tested Strain YS-40

Factor	<i>Streptomyces bobili</i>	Tested strain YS-40
Aerial mass color	White ¹⁹⁾ , X ²⁰⁾ White or none ²¹⁻²³⁾	White or none
Malanoid pigment	Not always ¹⁹⁾ Negative ^{20, 21, 24)} Positive ²²⁾	Not always
Reverse side pigment	positive ^{20, 24)} Greyish yellow or reddish grey or pink, reddish brown or reddish orange ²¹⁾	Yellow-brown+blue
Soluble pigment	Negative ^{20, 21, 24)} Brown ²²⁾	Yellow-brown
Spore chain	Spira ¹⁹⁻²²⁾ RF(?) or U ²³⁾	RF & RA
Spore surface	Smooth ^{19-21, 23)}	Smooth
NaCl tolerance	≥ 4 %, but < 7 % ¹⁹⁾	≥ 5 %, but < 8 %
D-Glucose	+	+
D-Xylose	+	+
L-Arabinose	+	+
L-Rhamnose	+	±
D-Fructose	+	+
D-Galactose	+	+
Raffinose	+	+
D-Mannitol	-	-
i-Inositol	+	+
Salicin	-	-
Sucrose	+	+

X : not determined, U : neither chains of spores could be found nor their arrangement determined with any precision.

RF : rectus-flexibilis, RA : rectinaculum-apertum

+ : utilized, - : not utilized, ± : slightly or not utilized

謝 辭

本 菌株의 孢子表面 觀察을 위해 電子顯微鏡 사진촬영을 해 주신 林業試驗場病蟲害部 樹木病理科 이창근과장님과 呂運鴻선생님께 充心으로 感謝드립니다.

參 考 文 獻

- 1) 都在浩, 金相達, 李東義: 韓國産業微生物學會誌, 10, 177(1982)
- 2) 都在浩, 金相達: 韓國産業微生物學會誌, 10, 185(1982)

- 3) Thornsberry, C., C.N. Baker, and L.A. Kirven : *Antimicrob. Agents Chemother.*, **13**, 78 (1978)
- 4) Thornsberry, C., L.A. Kirven : *Curr. Microbiol.*, **1**, 51 (1978)
- 5) Fraser, D. W., T. R. Tsai, W. Orenstein, W.E. Parkin, H. J. Beecham, R. G. Sharrar, J. Harris, G. F. Mallison, S. M. Martin, J. E. McDade, C. C. Shephard, and P. S. Brachman : *N. Engl. J. Med.*, **297**, 1189 (1977)
- 6) Sykes, R. B., and M. Matthew : *J. Antimicrob. Chemother.*, **2**, 115 (1976)
- 7) Barber, M. : *J. Gen. Microbiol.*, **8**, 111 (1953)
- 8) Buchanan, C. C., J. L. Strominger : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 1816 (1976)
- 9) Richmond, M. H., R. B. Sykes : *Adv. Microbiol. Physiol.*, **9**, 31 (1973)
- 10) Ayliff, G. A. J. : *Nature* (London), **201**, 1032 (1964)
- 11) Ayliff, G. A. J. : *J. Gen. Microbiol.*, **40**, 119 (1965)
- 12) Citri, N. : *The Enzymes*, Vol. 4, p. 23~46, In P. D. Boyer (ed). Academic Press Inc., New York (1971)
- 13) Hamilton-Miller, J. M. T. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **13**, 43 (1963)
- 14) Jack, G. W., and M. H. Richmond : *J. Gen. Microbiol.*, **61**, 43 (1970)
- 15) Shirling, E. B., and D. Gottlieb : *Intern. J. System. Bacteriol.*, **16**, 313 (1966)
- 16) Waksman, S. A. : *The Actinomycetes* Vol. II, p. 333, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, U. S. A. (1961)
- 17) 長谷川武治 : 微生物の分類と同定, p. 221 ~ 234, 學會出版, センタ (1975)
- 18) Pridham, T. G., and D. Gottlieb : *J. Bacteriol.*, **56**, 107 (1948)
- 19) Buchaman, R. E., and N. E. Gibbons : *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., p. 748~829, The Williams Wilkins Co., Baltimore, U. S. A. (1974)
- 20) Nonomura, H. : *J. Ferment. Technol.*, **52**, 78 (1974)
- 21) Shirling, E. B., and D. Gottlieb : *Intern. J. System. Bacteriol.*, **18**, 279 (1968)
- 22) Waksman, S. A. : *The Actinomycetes*. Vol. II. p. 182, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, U. S. A. (1961)
- 23) Pridham, T. G., A. J. Lyons, Jr : *Develop. Ind. Microbiol.*, **10**, 183 (1968)
- 24) Küster, E. : *Intern. J. System. Bacteriol* **22**, 139 (1972)