

β -Lactamase 阻害能이 있는 放線菌의 選別

姜 熙 日 · 金 榮 一 · 朴 榮 柱

柳韓洋行 中央研究所

(Received February 4, 1984)

Screening of Microorganisms Having Inhibitory Activity against Beta-lactamase

Heui Il Kang, Young Il Kim, and Young Joo Park

Yu Han Research Center, Yu Han Corporation, Ahn-Yang 171, Korea

Abstract—Microorganisms having beta-lactamase inhibitory activity were selected from soil samples collected from 63 spots throughout the country. Screening procedures consist of two steps. Those are growth inhibition test of penicillinase-producing *Staphylococcus aureus* by double-layered agar plate containing penicillin G as a substrate, and that of penicillin sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 in the similar condition including penicillinase. Finally, a strain was selected from a soil sample of Pa-Ju, Kyeong-gi Do. This strain was classified as a *Streptomyces* sp. by ISP(International Streptomyces Project) and Bergey's manual.

항생물질로서 중요한 위치에 있는 β -lactam계 항생물질은 낮은 독성과 세포벽 합성을 저해하는 選擇的 作用때문에 臨床에 많이 이용되고 있다. 최근에는 penam, cephem, oxacephem, carba-cephem, carbapenam 및 monobactam 등의 β -lactam계 항생물질을 개발하고자 微生物學的, 化學的 研究가 활발하다.¹⁾ 한편 이러한 β -lactam계 항생물질에 耐性を 지니는 병원균이 출현하게 되고 이들 내성균주들이 β -lactamase를 분비함으로써 耐性を 획득한다는 사실이 밝혀진 이래 이 不活性化 酵素에 대한 많은 연구가 수행되었다. 이와 관련하여 biological origin의 강력한 β -lactamase 저해제를 발견하려는 연구²⁾ 결과 clavulanic acid^{3,4)}를 비롯하여 izumenolide,^{5,6)} olivanic acids^{3,7-9)}, PS-5계열¹⁰⁻¹²⁾, C-19393 S₂, H₂¹³⁻¹⁵⁾ 및 M4854등이 *Streptomyces*, *Micromonospora*, mould 등의 균주에서 발견되었다. 본 연구실에서는 이러한 研究動向에 따라 토양으로 부터 다수의 방선균을 분리하였고 분리균에서 β -lactamase 저해능이 있는 균주를 효과적으로 選別하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

實驗 方法

試料土壤 및 放線菌 分離—전국 63개 지역의 山野, 河川, 경작지등에서 채취된 試料(5g)를 잘 고른후 45ml의 멸균생리식염수에 희석, 진탕하고 Bacto-Actinomycete isolation agar (Difco) 배지 위에 塗抹하여 28~30°C에서 7일간 배양하였다. 외부형태가 서로 다른 放線菌株를 분리하여 yeast extractmalt extract agar에 보존하였다.

分離菌의 抗生能力 測定—이들 분리균에 대해서 G⁺, G⁻ 세균 및 곰팡이의 시험균(9종)에 대한 抗菌力을 平板培養法으로 調査하였다. β -lactamase 저해능을 가진 菌株의 選別을 위해서는 페니실린 내성의 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* NIH)와 감수성의 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538을 사용하였다. 이들 2菌株의 penicillin-G(1,580 IU/mg)에 대한 최소 성장억제농도(MIC)를

Table I—Characteristics of two strains of *Staphylococcus aureus* used in this experiment.

| Strain | MIC | β -Lactamase | Activity (unit) ^a |
|----------------------------|------------|------------------------------|------------------------------|
| <i>S. aureus</i> NIH | 62.5~125.0 | +(constitutive) ^b | 0.5 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 6538 | 0.06~0.5 | \pm^c | 0.027 |

a; One unit of β -lactamase activity is equivalent to the hydrolysis of $1\mu\text{mole}$ of penicillin G/min at $\pm 37^\circ\text{C}$, pH 7.0.

b; Constitutive production of β -lactamase was determined on soluble starch plate containing nutrient agar (1%).²²⁾

c; Negligible

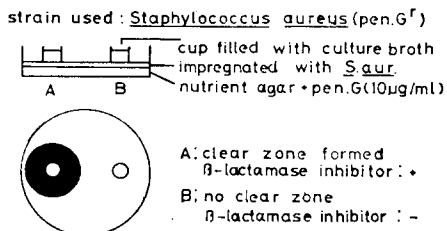
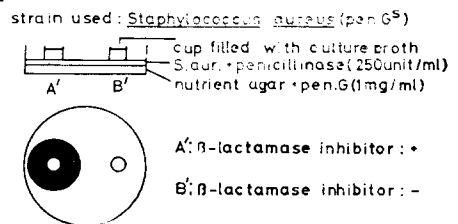
Table II—Media used for selection (g/l).

| Seed culture | | Fermentation #1 | | Fermentation #2 | |
|---------------|------|-----------------|-----|---|------|
| Yeast extract | 1.0 | Glucose | 5.0 | Maltose | 20.0 |
| Beef extract | 1.0 | Glycerol | 5.0 | Soybean meal | 12.0 |
| Casitone | 2.0 | Soluble starch | 5.0 | Malt extract | 12.0 |
| Glucose | 10.0 | Beef extract | 5.0 | Na_2SO_4 | 0.5 |
| pH 7.0 | | Sodium chloride | 5.0 | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.01 |
| | | Peptone | 5.0 | CaCO_3 | 0.5 |
| | | Soybean meal | 5.0 | pH 7.0 | |
| | | Dried yeast | 5.0 | | |
| | | pH 7.0 | | | |

two-fold diluted penassay broth로, β -lactamase 생성 및 그 활성은 acidometric test, iodometric assay¹⁹⁾로 실시하였다. 시험균의 특성을 Table I에 표시하였다.

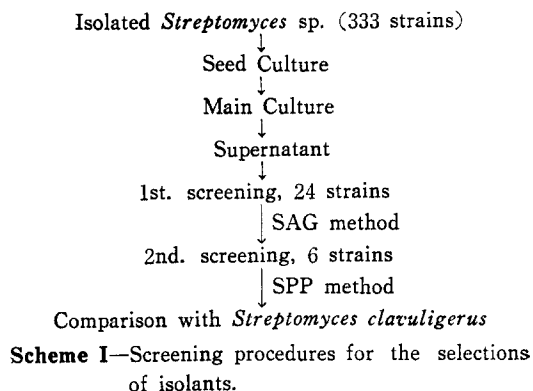
β -Lactamase 저해능이 있는 菌株의 一次 選別—250ml flask에 Bennet's broth 50ml를 넣고 YM slant에 보존중인 분리균을 접종, $28\sim 30^\circ\text{C}$ 에서 2일간 진탕(180rpm) 한것을 種菌으로 사용하였다. 종균배양액 2.5ml를 100ml의 배지(발효배지 #1, Table II)에 접종, 동일조건으로 5일간 배양한 뒤 원심분리(5,000g, 10min)한 상징액을 시료로 하여 그 상징액중의 β -lactamase 저해능이 있는 물질의 존재여부를 Fig. 1에서 도시한대로 生育阻止環의 有無 및 크기로서 비교하였다.

β -Lactamase 저해능이 있는 菌株의 2차 選別—1차 選別된 분리균주를 동일한 조건으로 종균 배양시키고 발효배지 #2 (Table II)에서 배양후 그 상징액을 사용하여 Fig. 2에 도시한대로 peni-

SAG method**Fig. 1**—SAG method.**SPP method****Fig. 2**—SPP method.

cillinase (250 unit/ml, Difco)를 첨가하여 Fig. 2에서 도시한대로 生育阻止環의 생성 및 크기를 관찰하였다. clavulanic acid를 생성하는 균주로 보고된^{3,4)} *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064를 對照菌으로 사용하여 그 阻害能을 상 호비교하였다. (Scheme I)

選別된 菌株의 分類—β-lactamase에 저해능이 있는 菌株로 選別된 菌株를 分類하기 위해 ISP(International Streptomyces Project) 方法으로 形態的 特性, 培養特性, 糖利用性 및 生理的 特性들을 조사하였다. 또한 diaminopimelic acid의 異性體를 paper chromatography^{20,21)}로 확인하고 胞子表面은 顯濁液을 走査電子顯微鏡(Mode S-450, Hitachi Ltd.)으로 觀察하였다.



實驗結果 및 考察

放線菌 및 β-lactamase 저해능이 있는 菌株의 選別—63개 지역에서 採取된 토양시료로 부터 333株의 放線株을 분리하였으며, 이들을 액체배양하여 SAG법(Fig. 1) 및 SPP법(Fig. 2)으로 β-lactamase 저해제 생산균주를 檢索한 결과 選別된 6株의 抗菌作用 및 β-lactamase 저해능 시험 결과는 Table III과 같다. 強力한 β-lactamase 저해제인 clavulanic acid를 생산하는 *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064를 분리된 6株와 동일조건에서 배양하고 SPP法으로 生育저지환의 크기를 비교하여(Table IV) 이 중 억제효과가 제일 큰 SYK-19를 β-lactamase 저해제를 생산하는 균주로 選定하였다.

Table III—Antibiotic activities and β-lactamase inhibition activities of selected strains.

| Strains (SYK-) | 19 | 132 | 135 | 153 | 201 | 255 |
|--|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>Sarcina lutea</i> FDA 9041 | + | + | + | + | + | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | + | + | + | + | + | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | + | + | + | + | + | - |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 | - | + | + | + | + | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 | - | - | - | + | + | - |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 | - | - | + | - | - | - |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | - | + | + | + | - | - |
| <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 | - | + | - | + | - | - |
| <i>Aspergillus oryzae</i> N.K. | - | + | - | + | - | - |
| SAG method | + | + | + | + | + | + |
| SPP method | + | + | + | + | + | + |

+ : positive
 - : no active

Table IV—Inhibition zone of *S. clavuligerus* ATCC 27064 and selected strains.

| Strain | Zone(mm) | Strain | Zone(mm) |
|------------------------|----------|---------|----------|
| <i>S. clavuligerus</i> | 25.2 | SYK-153 | 16.9 |
| SYK-19 | 40.4 | -201 | 27.8 |
| -132 | 18.6 | -255 | 15.8 |
| -135 | 19.9 | | |

SPP method was used.

Table V—Growth characteristics of SYK-19 strain on various media.

| Media | Characteristics | Media | Characteristics |
|--|--|--|--|
| Yeast extract-malt extract agar (ISP. No. 2) | G : abundant AM : gray SM : dark gray S P : — | Peptone-yeast extract iron agar (ISP. No. 6) | G : moderate AM : pale gray SM : gray S P : — |
| Oat meal agar (ISP. No. 3) | G : abundant AM : dark gray SM : gray S P : — | Tyrosine agar (ISP. No. 7) | G : moderate AM : gray SM : gray S P : — |
| Inorganic salts-starch agar (ISP. No. 4) | G : good AM : gray SM : gray S P : — | Nutrient agar | G : poor AM : yellowish white SM : yellow S P : — |
| Glycerol-asparagine agar (ISP. No. 5) | G : abundant AM : gray SM : gray S P : — | | |

G : growth, AM : aerial mycelium, SM : substrate mycelium, SP : soluble pigment.

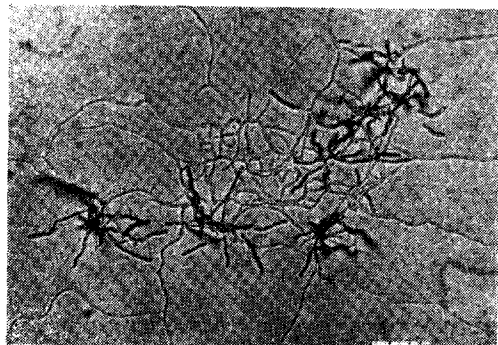


Fig. 3—Photomicrograph of *Streptomyces* SYK-19 viewed on inclined cover slip on yeast extract-malt extract agar, 30°C for 14 days. Optical microscope ($\times 400$).

최종선별된 균주 SYK-19의 分類—1) 培養上の 特性 ; nutrient agar를 제외한 其他 8種의 배지에서는 대체적으로 생육이 좋았으며 특히 yeast-malt extract agar, oatmeal agar, glycerol-asparagine agar에서 잘 자랐다. 각종 배지에서의 生育程度, 氣菌絲 및 基底菌絲의 色, 水溶性 色素 形成등을 살펴 본 결과는 Table V와 같았다.

2) 形態의 特性 : 잘 발달된 RF(rectus, flexibilis)형의 孢子鎖로서 non-verticillate의 simple form이며 基底菌絲에서의 fragmentation, sclerotium, sporangium 및 運動性 孢子는 觀察할

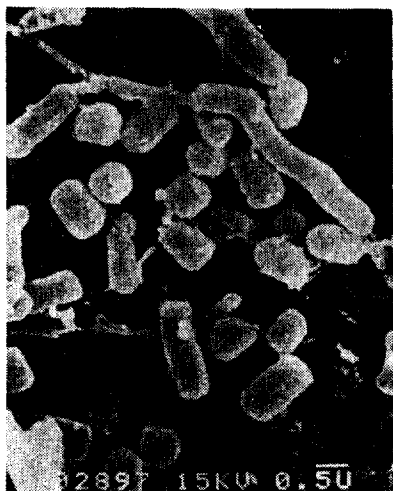


Fig. 4—Smooth spore surface ornamentation of *Streptomyces* SYK-19 on ISP. 2 (yeast extract-malt extract agar), seen with a scanning electron microscope. The organism was grown for 14 days at 30°C.

Table VI—Utilization of carbon compounds by *Streptomyces* SYK-19.

| | | | |
|-------------|---|------------|---|
| D-Glucose | + | Raffinose | — |
| D-Arabinose | + | Rhamnose | — |
| Sucrose | ± | Cellulose | — |
| D-Fructose | + | Salicin | — |
| D-Xylose | + | I-Inositol | — |
| D-Mannitol | + | | |

수 없었다(Fig. 3). 또한 走査顯微鏡 觀察結果 胞子は 球型 또는 圓筒型으로서 크기는 0.5~0.6×0.5~1.2 μ m였으며 表面은 smooth하였다(Fig. 4).

3) 糖利用性: SYK-19의 糖利用性を Pridham & Gottlieb의 基礎培地에서 檢討한 결과는 Table VI와 같으며 이중 glucose, arabinose, rhamnose에서 왕성한 生育을 보였다.

4) 生理的 特性: 각종 배지에서의 生理的 特性은 Table VII과 같이 melanin 色素는 형성하지 않았으며 nitrate 環元力이 있었고 gelatin을 液化시켰다. skim milk 培地에서 투명대를 형성함으로써 peptonization은 陽性이었으나 응고는 시키지 못했다.

5) diaminopimelic acid 異性體: whole cell을 가수분해시킨 후 paper chromatography 하였을 때 SYK-19는 L, L-diaminopimelic acid를 갖고 있었으며 이로 보아 세포벽이 type I에 속함을 알 수 있었다.

이상과 같이 SYK-19는 L,L-DPA를 cell wall에 갖고 있어 ISP의 細胞壁 type I에 속하며 RF (rectus, flexibilis)型的 긴 孢子鎖를 하고 있는 점과 기타 형태적 특성으로 볼 때 genus *Streptomyces*의 한 species로 分類할 수 있다.

Table VII—Physiological characteristics of *Streptomyces* SYK-19 strain.

| | | | |
|-----------------------|------|-----------------------------|--------------------|
| Melanin pigment | — | Nitrate reduction | + |
| Other soluble pigment | — | H ₂ S production | — |
| Gelation liquefaction | + | Diaminopimelic acid | L, L-type (Type I) |
| Milk test | | Growth temperature | 15~37°C |
| peptonization | + | (opt. temp. 30°C) | |
| coagulation | — | | |
| Growth pH | 5~10 | | |
| (opt. pH 6-8) | | | |

結 論

β -lactamase 저해능이 있는 균주를 얻기 위해 전국 63개 지역에서 採取된 土壤으로부터 333株

의 Actinomycetes를 분리하고 이들을 對象으로 檢索하여 그 중의 一株인 SYK-19를 β -lactamase 저해제 생산균주로 선정하였으며 ISP와 Bergey's manual에 의해 genus *Streptomyces*로 분류동정했다.

文 獻

1. T. Yokoda, β -락타마제とその阻害劑. *Nippon Yakuzai-shikai Zasshi*, **34**, 397 (1982).
2. J.V. Uri, P. Actor and J.A. Weisbach, A rapid and simple method for detection of β -lactamase inhibitors. *J. Antibiot.* **31**, 789 (1978).
3. A.G. Brown, D. Butterworth, M. Cole, G.N. Rolinson, Naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J. Antibiot.* **29**, 668 (1976).
4. C. Reading, and M. Cole, Clavulanic acid: a β -lactamase-inhibiting β -lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**, 852 (1977).
5. W.C. Liu, G. Astle, J.C. Wells, Jr., W.H. Trejo, P.A. Principe, M.L. Rethnum, W.L. Parker, O.R. Kocy, and R.B. Sykes, Izumenolide-A novel β -lactamase inhibitor produced by *Micromonospora*. I. Detection, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **33**, 1256 (1980).
6. K. Bush, D.P. Bonner, and R.B. Sykes, Izumenolide-A noble β -lactamase inhibitor produced by *Micromonospora*. II. Biological properties. *J. Antibiot.* **33**, 1262 (1980).
7. D. Butterworth, M. Cole, G. Hanscomb and G.N. Rolinson, Olivanic Acids, A family of β -lactam antibiotics with β -lactamase inhibitory properties produced by *Streptomyces* species. I. Detection, properties and fermentation studies. *J. Antibiot.* **32**, 287 (1979).
8. J.D. Hood, S.J. Box and M.S. Verral. Olivanic acids, A family of β -lactam antibiotics with β -lactamase inhibitory properties produced by *Streptomyces* species. II. Isolation and characterization of the olivanic acids MM4550, MM 13902 and MM 17880 from *Streptomyces olivaceus*. *J. Antibiot.* **32**, 295 (1979).
9. M. Cole, J.D. Hood and D. Butterworth, U.S. Pat. 4, 181, 716 (1980).
10. K. Okamura, S. Hirata, A. Koki, K. Hori, N. Shibamoto, Y. Okumura, M. Okabe, R. Okamoto, K. Kouno, Y. Fukagawa, Y. Shimauchi and T. Ishikura, PS-5, A new β -lactam antibiotic, I. Taxonomy of the producing organism, isolation and properties. *J. Antibiot.* **32**, 262 (1979).
11. M. Sakamoto, H. Iguchi, K. Okamura, S. Hori, Y. Fukagawa and T. Ishikura, PS-5, a new β -lactam antibiotic. II. Antimicrobial activity. *J. Antibiot.* **32**, 272 (1979).
12. K. Okamura, M. Sakamoto, Y. Fukagawa, and T. Ishikura, PS-5, a new β -lactam antibiotics. III. Synergistic effects and inhibitory activity against a β -lactamase. *J. Antibiot.* **32**, 280 (1979).
13. A. Imada, Y. Nozaki, K. Kintata, K. Okonogi, K. Kitano and S. Harada. C-19393 S₂ and H₂, new carbapenem antibiotics. I Taxonomy of the producing strain, fermentation and antibacterial properties. *J. Antibiot.* **33**, 1417 (1980).
14. K. Okonogi, Y. Nozaki, A. Imada and M. Kuno, C-19393 S₂ and H₂, new carbapenem antibiotics II. Inhibitory activity against β -lactamases. *J. Antibiot.* **34**, 212 (1981).
15. Y. Nozaki, F. Kawasima, and A. Imada, C-19393 S₂ and H₂, new carbapenem antibiotics. III. Mode of action. *J. Antibiot.* **34**, 206 (1981).
16. S. Yaginuma, M. Inoue, S. Mitsuhashi, Inhibition of cephalosporin β -lactamase by M 4854-I and M 4852-II. *J. Antibiot.* **33**, 337 (1980).
17. 小谷勝. M4854-I, または-2, ならびその製法. *Jpn. Kokkai Tokkyo Koho*. 80-19008 (1980).
18. E.B. Shirling, and Gottlieb. D, Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**, 313 (1966).
19. A.C. Neu, Antibiotic inactivating enzymes and bacterial resistance. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*. ed. Lorian. V., Williams-Wilkins. Baltimore/London. pp.454-473. (1980).
20. B. Becker, and M.P. Lechevalier, Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.* **12**, 421 (1964).
21. M.P. Lechevalier, and H. Lechevalier, Chemical composition as a criterion in the classification of

-
- aerobic *Actinomycetes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**, 435 (1970).
22. E.J. Vandamme, Penicillin acylase and beta-lactamases. In *Microbial enzymes and bioconversions*. ed. Rose, A.H. Academic Press. London. pp.504-508. (1980).