

***Pseudomonas aeruginosa*에 의해 생성되는 Cephalosporinase의 특성**

이동준 · 이호용* · 최영길

한양대학교 생물학과 *상지대학교 생물학과

**Properties of Cephalosporinase Produced by
*Pseudomonas aeruginosa*****Lee, Dong-Jun, Ho-Yong Lee* and Yong-Keel Choi**

Department of Biology, Hanyang University,

*Department of Biology, Sangji University

Abstract: In order to investigate the properties of cephalosporinase, a strong antibiotic resistant strain(H 112) was isolated from *Pseudomonas aeruginosa*.

The extracted enzyme had the following characteristics. Optimum temperature was 45°C and unstable over 55°C, and optimum pH was 8.5. Cephalosporinase activity was not inhibited by metal ions such as Mn^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} , Fe^{+++} , and EDTA. But it was inhibited by some antibiotics such as carbenicillin, cefoxitin, cefotaxime, cefamandole, cefoperazone, and SDS. The V_{max} values of the enzyme were 100 at cephaloridine and 2.8 at cefoperazone, respectively. The molecular weight of cephalosporinase was estimated to be about $37,500 \pm 3,000$ by high performance liquid chromatography and nitrocefin reaction.

Key words: Cephalosporinase, *Pseudomonas aeruginosa*

항생제 내성기작은 크게 항생제의 비환산화, 투과성 저하 및 작용부위의 변질 등으로 구분되는데 이 중 항생제 분해효소의 기작은 특히 많은 연구의 초점이 되어왔다(Ayliff, 1965; Hirai *et al.*, 1980).

*Pseudomonas aeruginosa*의 항생제 내성기작은 오랜기간 동안 세균자체의 적응에 의한 것으로 판단되었으나, 이후 유도물질에 의해 유도되는 β -lactamase(Sabath *et al.*, 1965)와 균주 내에 constitutive 형태로 존재하는 β -lactamase(Newsome *et al.*, 1970)가 발견됨으로 *Pseudomonas aeruginosa*의 항생제 내성은 이러한 효소에 의한 것으로 판단되었다. 이들 β -lactamase는 주로 penicillin계 항생물질을 분해하는 penicillinase와 주로 cephalosporin계 항생물질을 분해하는 cephalosporinase

(CSase)로 구분되며 이들의 작용에 의해 세균이 penicillin계 및 cephalosporin계 항생제에 대해 내성을 갖는 것으로 밝혀졌다(Jack and Richmond, 1970). 현재 *Pseudomonas aeruginosa*에서 생성되는 β -lactamase는 CSase로 보고 되었으며(Sawai *et al.*, 1968), 특히 species specific β -lactamase임이 밝혀졌다(Newson *et al.*, 1970; Garber and Friedman, 1970; Hirai *et al.*, 1980). 이에 본 실험에서는 국내에서 분리 동정된 20 strains의 *Pseudomonas aeruginosa* 중 anti-*Pseudomonas* drug에 내성이 강한 균주를 선택하여 이들이 분비하는 CSase의 특성을 연구하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험균주 및 배양

한양대학교 부속병원에서 분리 동정한 20 strains의 *Pseudomonas aeruginosa*를 분주받아 한천배지 희석법 (Koneman *et al.*, 1979)에 의해 anti-*Pseudomonas* drug에 저항성이 가장 강한 균주를 선택하였다. 접종 균체수는 1×10^6 /petri dish되게 한 후 37°C에서 배양하여 균체 형성이 가장 좋은 균주를 분리하였다. 선택된 균주는 nutrient broth에서 최초 균체수가 1.4×10^7 /ml 되게 접종시켜 37°C의 항온수조에서 80 rpm의 속도로 진탕 배양 하였다.

감수성 검사

사용균주에 대한 감수성 검사는 Broth dilution susceptibility test (Koneman *et al.*, 1979) 방법으로 측정하였다. 항생제가 포함된 nutrient broth에 균체수가 10^6 /ml 되게 접종하여 37°C의 항온수조에서 80 rpm으로 20시간 진탕배양 하여 carbenicillin, penicillin G, cephaloridine, cefoperazone에 대한 감수성 여부를 측정하였다.

효소 특성의 측정

효소 생성의 유도

배양 균주가 생성하는 CSase의 origin을 알기 위하여 균주 접종 7시간 후 균체수의 흡광도 값이 620 nm에서 1.0에 도달하였을 때 penicillin G를 5mg/ml 되게 처리하여 2시간 경과 후 수회하여 분쇄한 후 효소 활성도를 측정하여 origin을 판단하였다.

효소 추출

균주 접종 9시간 경과 후 4°C에서 $8,000 \times g$ 로 10분간 원심분리 (Beckman, JA-21) 하여 수회하였으며 0.1M 인산완충용액 (pH 7.2) 으로 두 번 세척한 후 Fujii-kuriyama 등 (1977)의 변법에 의해 추출하였다.

효소 활성도 측정

Cephalosporinase의 항생제에 대한 활성도는 분광광도법 (Ross *et al.*, 1973)에 의해 측정하였다. 효소 활성도 단위는 30°C, 0.05M 인산완충용액 (pH 7.2)에서 1분당 기질 $1 \mu M$ 을 분해하는 효소의 활성도를 1 unit로 정하였으며 단

백질 정량은 Lowry 등 (1951)의 방법에 의해 측정하였다.

효소의 특성

억제제의 영향; Minami 등 (1980)의 방법에 의해 몇종의 억제제와 금속이온을 사용하여 효소에 대한 활성도의 저해 효과를 측정하였다. 억제제로는 EDTA, SDS, carbenicillin, cefoperazone, cefotaxime, cefamandole, cafoxitin을 사용하였고 금속이온은 Mn^{++} ($MnCl_2$), Cu^{++} ($CuSO_4$), Fe^{++} ($FeSO_4$), Fe^{+++} ($FeCl_3$)를 사용하였다.

온도 및 pH의 영향; Yaginuma 등 (1973)의 방법에 의해 반응온도는 25°C에서 65°C까지 5°C 간격으로 측정하였으며 pH는 pH 6.0에서 pH 9.0까지 pH 0.5 간격으로 측정하였다.

Michaelis 상수 및 V_{max} 측정; 기질의 농도 변화에 따른 효소의 반응을 측정하여 Lineweaver-Burk plot's에 의하여 구하였다.

효소의 분자량 결정; HPLC (Waters Associates, Inc)와 Nitrocefin (Glaxo Group Research Ltd) 발색반응 (Kim *et al.*, 1984)를 이용하여 측정하였다. Column은 protein column 1-125 (7.8×300 mm, Waters), 이동상으로는 0.05M 인산완충용액 (pH 7.2), 용출율은 1.0ml/min, 280 nm에서 측정하였다. HPLC에 의해 용출된 용액을 30초 간격으로 분획하여 0.05M 인산완충용액 (pH 7.2) 2.5 ml와 Nitrocefin 용액 100 μl 를 넣어 30°C에서 1시간 반응시킨 후 490 nm에서 발색의 정도를 측정하여 CSase의 존재를 확인한 후 용출시간에 대한 분자량을 측정하였다.

결과 및 고찰

균주분리 및 감수성 검사

한천배지 희석법에 의해서 접종된 20종의 균주중 H 112 strain만이 Table 1에서 나타낸 것과 같이 carbenicillin과 cefoperazone 함유 배지에서 가장 많은 균체 형성의 특징을 보여 anti-*Pseudomonas* drug에 대한 저항성이 가장 큰 것으로 나타나 H 112 strain을 실험균주로 사용하였다. 실험균주와 비교균주로 채택한 H108

Table 1. Resistance effect of *Pseudomonas aeruginosa* strains against cefoperazone and carbenicillin.

Antibiotics Strain No.	Cefoperazone		Carbenicillin	
	20 µg/ml	30 µg/ml	4 mg/ml	6 mg/ml
H 101	++	++	+	-
102	+	-	-	-
103	+	+	-	-
104	+	+	-	-
105	+	-	-	-
106	++	+	-	-
107	+	+	-	-
108	-	-	-	-
109	+++	+++	+	+
110	++	++	-	-
111	-	-	-	-
112	+++	+++	++	++
113	+	-	-	-
114	+	+	-	-
115	+++	+++	-	-
116	-	-	-	-
117	++	++	-	-
118	-	-	-	-
119	+	+	-	-
120	++	+	+	-

+++;100 colony formed, ++;10-100 colony formed, +;1-10 colony formed, -;no colony formed. Cells were incubated at 37°C for 24hr.

strain의 감수성 검사 결과 penicillin G와 cephaloridine 처리시 두 strain 모두 이들 항생제에 대해 높은 내성을 지니고 있는 것으로 판단 되었으나, carbenicillin 처리시 비교균주와 실험균주의 MIC는 현격한 차이를 보였으며 이는 Yaginuma 등(1973)의 실험 결과 0.2mg/ml 및 Labia 등(1977)의 결과 4mg/ml보다도 월등히 높았으며 (Table 2), 위의 결과로 미루어 본 실험균주는 anti-pseudomonas drug에 대해 매우 높은 내성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

cephalosporinase 유도

Table 3에서와 같이 본 실험에서는 penicillin G를 처리한 결과 처리균이 비처리균에 비해 기질로 cephaloridine 사용시 효소 활성도가 24

Table 2. Minimum inhibitory concentration of *Pseudomonas aeruginosa* H112.

Strain	Antibiotics	MIC (µg/ml)
PAH108	Penicillin G	15,360
	Carbenicillin	120
	Cephaloridine	15,360
	Cefoperazone	15
PAH112	Penicillin G	15,360<
	Carbenicillin	7,680<
	Cephaloridine	15,360<
	Cefoperazone	960<

배, cefoperazone 사용시 3배 상승함을 볼 수 있어 본 균주가 분비하는 CSase는 유도형임을 알 수 있었다.

cephalosporinase의 특성

억제제의 영향

Cephalosporinase의 효소 활성도는 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 1.0mM 농도의 Cu⁺⁺와 Mn⁺⁺에 의해 5~12%만 저해 되었으며 Fe⁺⁺, Fe⁺⁺⁺에 의해서는 전혀 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 또한 동일 농도의 EDTA에 의해서는 6%정도 저해되는 것으로 보아 이는 CSase에 보결분자단이 존재하지 않거나 존재하더라도 강하게 결합되어 있는 것으로 추측할 수 있었다. 1.0mM SDS에 의해 효소 활성도는 100% 억제되어 SDS에 의해 CSase가 쉽게 파괴됨을 알 수 있었다. carbenicillin, cefoxitin, cefo-

Table 3. Inducing effect of CSase from *Pseudomonas aeruginosa* H 112.

	Enzyme activity (U/mg of protein)			
	Cephaloridine		Cefoperazone	
Control	12.59	(1)	3.39	(1)
Inducer treatment	302.65	(24)	10.13	(3)

Enzyme was induced with penicillin G. Enzyme activities against cephaloridine and cefoperazone in sonically disrupted cells were assayed spectrophotometrically by measuring the decrease in absorbance at 260nm. One unit of the enzyme activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzed 1µmol of the substrate in 1min at 30°C. Control;not inducer treatment.

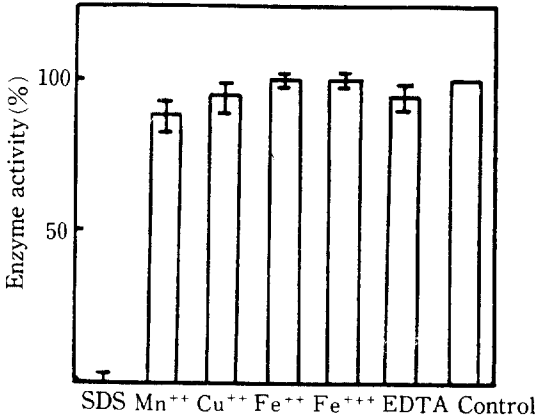


Fig. 1. Effects of metal ions, EDTA and SDS on cephalosporinase activity from *Pseudomonas aeruginosa* H 112. Cephaloridine (100 μ M) was used as a substrate.

taxime, cefamandole은 낮은 농도에 의해서도 효소 활성도를 현저히 저해시켰으며 이는 이들 항생물질들이 CSase와 높은 친화력을 갖기 때문이며 (Yaginuma *et al.*, 1973) 반면 cefoperazone에 대해서는 낮은 친화력을 나타내어 항생제 감수성과 효소-기질간의 친화력과는 서로 관계가 없는 것으로 추측되었다 (Fig. 2).

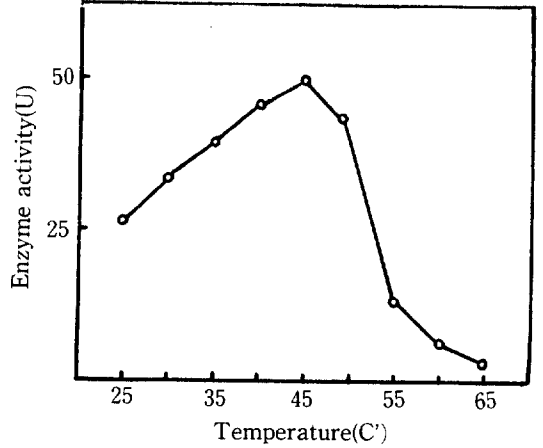


Fig. 3. Effect of temperature on cephalosporinase activity from *Pseudomonas aeruginosa* H 112.

The enzyme solution in 0.05M phosphate buffer (pH7.2) containing 100 μ M of cephaloridine as the substrate was incubated for 10min at indicated temperature and the rate of inactivation was determined spectrophotometric.

온도 및 pH의 영향

Fig. 3, 4에서 나타났듯이 CSase의 효소 활성도는 45 $^{\circ}$ C, pH 8.5에서 최고값을 나타내었으며 50 $^{\circ}$ C 넘어서는 효소 활성도는 급격히 감소

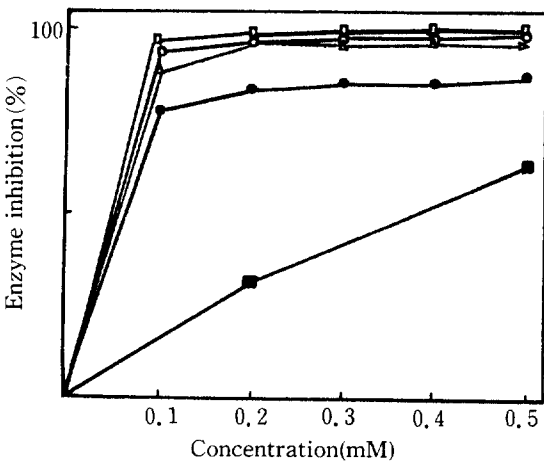


Fig. 2. Effects of different concentration of antibiotics on cephalosporinase activity from *Pseudomonas aeruginosa* H 112.

□-□ : carbenicillin, ○-○ : cefoxitin,
 △-△ : cefotaxime, ●-● : cefamandole,
 ■-■ : cefoperazone.

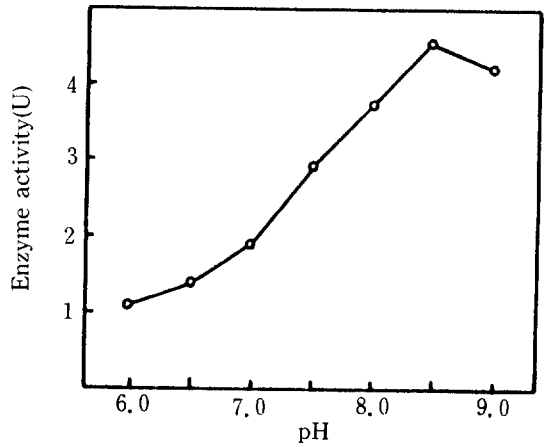


Fig. 4. Effect of pH on cephalosporinase activity from *Pseudomonas aeruginosa* H 112.

0.1M phosphate buffer was used for the range of pH6.0 to 8.0 and 0.1M Tris-HCl buffer was used for the ranges of pH8.0 to 9.0. On unit of the enzyme activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzed 1 μ mol of the substrate in 1min at 30 $^{\circ}$ C.

되었고 pH 7.0 이하에서도 최고치의 50% 미만의 활성도를 나타내었다. 이와 같은 결과는 Yaginuma 등(1973)에 의해 보고된 결과와 약간의 차이를 나타내었는데 이와 같은 것은 균주 자체 특성에 의해 결정되기 때문인 것으로 판단되었다.

K_m 및 V_{max}

CSase의 cephaloridine에 대한 k_m 값은 39.0 μM 이며 cefoperazone에 대한 k_m 값은 17.5 μM 로 나타났다. V_{max} 값은 cephaloridine에 대한 값을 100으로 하였을 때 cefoperazone에 대한 값은 2.8로 나타나 cephaloridine이 cefoperazone보다 CSase에 쉽게 분해됨을 알 수 있었으며 이와 같은 결과는 항생제에 대한 효소 활성도 및 감수성 검사의 결과와 일치하였다.

분자량

HPLC로 효소용액을 분획하여 Nitrocefin 용액으로 발색반응을 시킨 결과 8분 30초에 용출된 용액에서 CSase의 존재를 확인하였고(Fig. 5), 분자량 표준곡선과 비교하여 분자량의 크기가 $37,500 \pm 3,000$ 임을 알 수 있었다. 다른 Gram 음성세균이 생성하는 CSase의 분자량과 비교한 결과 *E. coli* GN 5482 (Minami *et al.*, 1980)의 39,000, *E. coli* D₃₁ (Sykes and Mathew, 1976)의 38,000, *Proteus morganii* 1510 (Fujii-kuriyama *et al.*, 1977)의 38,000과 거의 동일한 크기임을 알 수 있었으며 *Pseudomonas aeruginosa* GN 918 (Yaginuma *et al.*, 1973)의 $34,000 \pm 2,000$ 보다 약간 큰 것

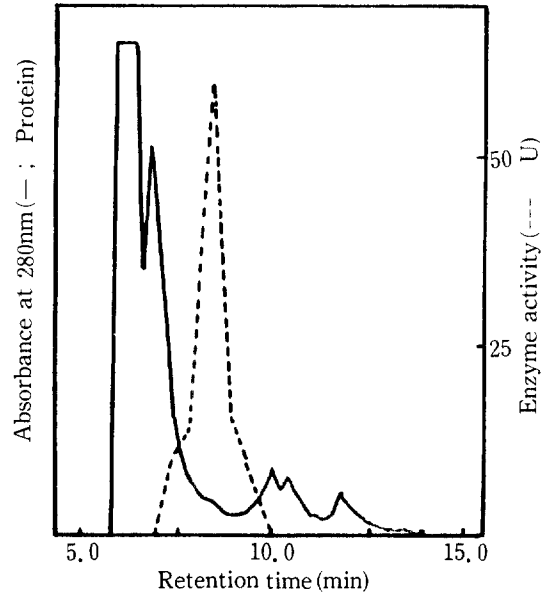


Fig. 5. Identification of the cephalosporinase by HPLC.

Protein(—) was assayed by HPLC, at 280nm. CSase activity(----) was measured by nitrocefin reaction at 30°C for 30 min. One unit of enzyme activity was same as 0.001 absorbance increase at 490nm.

로 판명되었다.

이상의 결과에서 CSase의 특성은 균주에 따라 차이를 나타냄을 알 수 있었으며 이로 인하여 각각의 균주가 cephalosporin계 항생제에 대한 내성의 차이를 나타내는 하나의 원인으로 생각되었다.

적 요

내성 *P. aeruginosa*에 의해 생성되는 항생물질 파괴효소인 cephalosporinase는 cephaloridine을 기질로 하여 효소활성도는 45°C와 pH 8.5에서 자기 최고의 활성도를 나타내었다. SDS, carbenicillin 및 cephalosporin계 항생제에 의해 효소의 활성도는 현저하게 억제되었으며 효소의 cephaloridine에 대한 V_{max} 값을 100으로 하였을 때 cefoperazone의 V_{max} 값은 2.8로 나타났다. 측정된 효소의 분자량은 $37,500 \pm 3,000$ 이었다. 다른 Gram 음성세균이 분비하는 cephalosporinase와 비교해본 결과 균체 자체의 특성에 의해 cephalosporinase는 서로 다름을 알 수 있었으며 이로 인하여 각각의 균체가 cephalosporin계 항생제에 대한 내성의 차이를 나타내는 하나의 중요한 원인으로 판단되었다.

REFERENCE

1. Ayliff, G.A. 1965. Cephalosporinase and

penicillinase activity of gram-negative bacterial. *J. Gen. Microbiol.* **61** : 43-61.
2. Fujii-Kuriyama, Y., M. Yamamoto and

- S. Sugawara. 1977. Purification and properties of beta-lactamase from *Proteus morganii*. *J. Bacteriol.* **131** : 726-734.
3. Garber, N. and J. Friedman. 1970. Beta-lactamase and the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to various penicillins and cephalosporins. *J. Gen. Microbiol.* **64** : 343-352.
 4. Hirai, K., S. Iyobe, N. Inoue and S. Mitsuhashi. 1980. Purification and properties of a new beta-lactamase from *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17** : 355-358.
 5. Jack, G.W. and N.H. Richmond. 1970. A comparative study of eight distinct beta-lactamase synthesized by gram-negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61** : 43-61.
 6. Kim, Y.T., J.H. Kim and Y.K. Choi. 1984. The sensitivity of *Neisseria gonorrhoea* to antibiotics and its relationship to the treatment results. *J. Hanyang. Med. Coll.* **4**(2) : 425-443.
 7. Koneman, E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell, Jr. and H.M. Sommers. 1979. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. J.B. Lippincott Co., Philadelphia. Toronto. pp. 321-323, pp. 336-338.
 8. Labia, R., M. Barthelemy. 1977. Beta-lactamase produced by a *Pseudomonas aeruginosa* strain highly resistant to carbenicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11** : 785-790.
 9. Minami, S., M. Inoue and S. Mitsuhashi. 1980. Purification and properties of cephalosporinase in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18** : 77-80.
 10. Newsom, S.W.B., R.B. Sykes and M.H. Richmond. 1970. Detection of a beta-lactamase markedly active against carbenicillin in a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **101** : 1079-1080.
 11. Ross, G.W., K.V. Chanter, A.M. Harris, S.M. Kirby, M.J. Marshall and C.H. O'Challaghan. 1973. Comparison of assay technique for beta-lactamase activity. *Anal. Biochem.* **54** : 9-16.
 12. Sabath, L.D., M. Jago and E.P. Abraham. 1965. Cephalosporinase and penicillinase activities of a beta-lactamase from *Pseudomonas pyocyanea*. *Biochem. J.* **96** : 739-752.
 13. Sawai, T., S. Mitsuhashi and S. Yamagishi. 1968. Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of beta-lactamase in gram-negative rod bacteria resistant to α -aminobenzylpenicillin. *Jpn. J. Microbiol.* **12** : 423-434.
 14. Sykes, R.B. and M. Matthew. 1976. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **2** : 115-157.
 15. Yaginuma, S., T. Sawai, H. Ono, S. Yamagishi and S. Mitsuhashi. 1973. Biochemical properties of a cephalosporin beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn. J. Microbiol.* **17** : 141-149.

(Received April 17, 1986)