

## $\beta$ -lactam계 항생물질 저항성을 지닌 *Bacillus* sp. J105 균주로부터 분리되는 베타 락탐 분해효소의 정제 및 특성

조경순 · 강병원<sup>1</sup> · 서민정<sup>2</sup> · 이영춘<sup>2</sup> · 이재현<sup>3</sup> · 주우홍<sup>4</sup> · 최영현<sup>5</sup> · 임학섭<sup>6</sup> · 김정인<sup>7</sup> · 서권일<sup>8</sup> · 정영기<sup>2,6\*</sup>

부산광역시 보건환경연구원, <sup>1</sup>동아대학교 BK21 실버바이오 사업단, <sup>2</sup>동아대학교 생명공학과, <sup>3</sup>동아대학교 유전공학과, <sup>4</sup>창원대학교 생물학과, <sup>5</sup>동의대학교 한의과대학 생화학교실, <sup>6</sup>(주)천년약속 바이오연구소, <sup>7</sup>인제대학교 식품생명과학부, <sup>8</sup>순천대학교 식품영양학과

Received April 8, 2008 / Accepted May 2, 2008

**Purification and Characterization of  $\beta$ -Lactamase Secreted from *Bacillus* sp. J105 Strain having  $\beta$ -Lactam Antibiotics Resistance.** Kyeong Soon Cho, Byoung Won Kang<sup>1</sup>, Min Jeong Seo<sup>2</sup>, Young Choon Lee<sup>2</sup>, Jai Heon Lee<sup>3</sup>, Woo Hong Joo<sup>4</sup>, Yung Hyun Choi<sup>5</sup>, Hak Seob Lim<sup>6</sup>, Jeong In Kim<sup>7</sup>, Kwon Il Seo<sup>8</sup> and Yong Kee Jeong<sup>2,6\*</sup>. Public Health and Environment Institute of Pusan, Pusan 613-104, Korea, <sup>1</sup>BK21 Center for Silver-Bio industrialization Project, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, <sup>2</sup>Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, <sup>3</sup>Department of Genetic Engineering, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, <sup>4</sup>Department of Biology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea, <sup>5</sup>Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dong-eui University, Busan 614-052, Korea, <sup>6</sup>Department Biointitute, MILLENNIUM PROMISE CO., LTD., Gijang-gun, Busan 619-962, Korea, <sup>7</sup>School of Food and Life Science, Inje University, Gimhae 621-749, Korea, <sup>8</sup>Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea -  $\beta$ -Lactamase, secreted from *Bacillus* sp. J105 strain was purified to a single band on SDS-PAGE by ammonium sulfate precipitation, ion exchange column chromatography and gel-filtration. The molecular weight of the purified enzyme was 31 kDa on SDS-PAGE and its isoelectric point was 7.35. Optimal pH and temperature for enzymatic reaction were 5 and 40°C, respectively. As a result of total amino acid composition analysis of the purified enzyme, Gly and Ala were occupied 14.1 and 13.3 mole %, respectively. *K<sub>m</sub>* and *V<sub>max</sub>* value of purified enzyme were 1.33 mM and 0.36 mM/ml using ampicillin as a substrate, respectively.

**Key words :** Antibiotics, *Bacillus* sp. J105,  $\beta$ -lactamase,  $\beta$ -lactam, enzyme purification

### 서 론

$\beta$ -Lactam계 항생물질은 아민기와 카르복실기가 분자 내 탈수반응에 의하여 형성된 4원환의  $\beta$ -lactam 고리를 기본골격으로 하는 약물로서 임상에 널리 사용되고 있지만 세균은 이들에 대하여 여러 경로를 통하여 저항성을 나타내고 있다[3,24].  $\beta$ -lactam계 항생물질에 대한 저항성은  $\beta$ -lactam계의 작용점인 세균의 세포벽에 존재하는 penicillin binding protein (PBP)과  $\beta$ -lactam계 항생물질을 불활성화 시키는  $\beta$ -lactamase에 의해 나타난다[5,11,15]. 이들 두 단백질은 서로 성질이 다르지만 그 작용점은 다 같이 serine으로 알려져 있으며, 1차 아미노산 배열의 상동성이 매우 높기 때문에 같은 기원의 효소로 부터 분화된 것으로 추측하고 있다[6,9].  $\beta$ -Lactamase에 의한 세균의 저항성은 효소 작용점인 serine 잔기가  $\beta$ -lactam 고리와 에스터 결합을 형성하여  $\beta$ -lactam 고리를 개환시킴으로써 나타난다[4,17,26].  $\beta$ -Lactamase는 활성부분의 주요 구성성분에 따라 serine- $\beta$ -lactamase와 metallo- $\beta$ -lactamase로 분류되고 있다

[1,20]. Serine- $\beta$ -lactamase는 classes A, C, D로 세분화 되어 있고 metallo- $\beta$ -lactamase는 class B로 분류된다. 이 중에서 임상적으로 중요한 A class의 효소에는 *Staphylococcus aureus*계의 효소와 *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*등에 존재하는 plasmid 유래의 효소가 있다. C class의 효소는 염색체에 의하여 생산되는 것으로 *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Enterobacter*속의 박테리아에 존재한다. C class의  $\beta$ -lactamase는 모든 *E. coli*에 존재하지만 *E. coli*중에서 약물 저항성에 결정적으로 관여하는 것은 C class보다 A class의 plasmid성 효소가 중요한 것이 차이점이라 하겠다[18]. B class의 효소는 metal enzyme으로서 희귀하게 나타나는 것이다. 이들은 *Bacteroides*속 세균과 *P. maltophilia*에서 발견되고 있는데 이들 B class의 효소는 imipenem과 같은 carbapenem을 비롯하여 대부분의  $\beta$ -lactam계 항생제를 폭 넓게 가수분해 한다고 알려져 있다[7]. 지금까지  $\beta$ -lactamase는 임상 중심의 병원미생물을 주로 연구대상으로 삼아 왔으나, 그 이외에도 *Mycobacterium*속 세균, *Streptomyces*속 세균, 효모 등 여러 종류의 미생물로부터 분리되고 있다[10,13,21,23,25]. 이에 본 연구는 필자 등이 자연에서 분리한 그람 양성 박테리아로써 다양한  $\beta$ -lactam계 항생제에 대한 저항성의 폭이 넓으며 minimal inhibitory con-

\*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7557, Fax : +82-51-206-0848

E-mail : ykj9912@dau.ac.kr

centration (MIC)가 높은 것으로 알려진 *Bacillus* sp. J105 [2]로부터 생산되는  $\beta$ -lactamase를 단백질 차원에서 정제하고 정제 효소의 제반 성질을 파악하여 특성을 조사함으로써 기존의 병원미생물을 대상으로 한 연구에서 벗어나 새로운 약물 저항 기작을 밝히는 기초 연구의 일환으로 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 배양 및 조효소의 조제

$\beta$ -lactamase 최적 생산 배지[mannitol 1%, soytone 0.5%,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.1%, pH 9] 250 ml를 분주하여 가압 멸균한 후 미리 전배양한 *Bacillus* sp. J105를 2%가 되도록 접종하여 본 배양을 행하였다. 그리고  $\beta$ -lactamase 유도제로서 cloxacillin 300 mg/ml를 첨가하여 30°C에서 24시간 진탕 배양한 후 원심분리(23,000× g, 20 min, 4°C)하여 상등액을 세포의 조효소액으로 사용하였다. 이때 전배양은 500 ml의 shaking flask에 최적 생산배지를 100 ml를 분주하여 멸균한 뒤, 냉장 보관 중이던 균주를 4~5 백금이를 접종하여 30°C에서 15시간 진탕 배양(180 rpm, 15 hr, 30°C)하였다.

### 효소 활성 측정법

본 연구에서는 penicillins과 cephalosporins의 다양한 기질들을 사용할 수 있는 rapid fixed-time assay의 변형법인 iodometric assay method [27]의 방법을 응용하여 효소 활성을 측정하였다. 효소 정제 단계에서 얻어진 각 효소 분획물 1 ml와 0.01 M acetic acid buffer (pH 5.0) 1 ml를 혼합하여 30°C에서 5분간 가온하여 효소를 활성화 시켰다. 동일 buffer에 용해한 0.4%의 ampicillin용액 1 ml를 첨가함으로써 반응을 시작하였다. 반응 후 요오드 시약 5 ml를 첨가함으로써 반응을 정지시켰다(요오드 시약은 0.16 M iodine과 1.2 M potassium iodine용액을 혼합하여 stock용액으로 하고 사용 시에는 pH 4.0의 acetic acid buffer로 50배 희석하여 사용하였다). 반응이 정지된 반응액은 잘 교반하여 실온에서 10분간 방치 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 요오드 시약으로 발색한 후 동량의 효소액을 첨가하여 측정하였다. 측정된 흡광도로 효소활성의 unit (U)는 다음과 같이 계산하였다. 한편  $\beta$ -lactamase 활성의 1 unit는 1분동안 1 mmol의 기질을 가수분해하는 효소량으로 정의하였다.

$$U = \text{가수분해된 기질의 농도} \times 1/T \times 1/V$$

(T: 효소반응 시간, V: 반응액에 첨가된 효소용액의 부피)

### 단백질 농축 및 정량

동결건조법으로 효소 단백질을 농축하였다. 단백질 정량은 spectrophotometer를 사용하여 280 nm에서의 흡광도로 측정하는 방법과 Lowry 등[19]의 방법을 병행하여 측정하였

다. 단백질 표준물질은 bovine serum albumin (Sigma Co.)을 사용하였다.

### 효소의 정제

*Bacillus* sp. J105 균주가 생산하는 세포의  $\beta$ -lactamase의 물리화학 및 효소화학적 성질을 검토하기 위하여 전술한 바와 같이 조효소를 제조하여 다음과 같은 방법에 의하여 정제하였다.

#### Ammonium sulfate 침전

조효소액에 ammonium sulfate를 천천히 첨가하여 80% 포화시킨 다음 4°C에서 20시간 서서히 저어주면서 방치한 후 원심분리(23,000× g, 20 min, 4°C) 하였다. 생성된 침전물을 모아 적당량의 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 용해하여 동일 buffer로 2~3일간 충분히 투석하였다. 투석이 끝난 효소액은 원심분리(23,000× g, 20 min, 4°C)하여 침전물을 제거하고 효소활성을 확인한 후 다음의 정제 과정에 사용하였다.

#### DEAE-sephadex A-50 chromatography와 gel filtration

전 단계에서 얻은 효소액을 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)로서 충분히 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-50 column (3×15 cm, Sigma Co.)에 흡착시켰다. 그 후 비 흡착 단백질 및 불순물을 동일 buffer로서 충분히 세척하여 제거한 후 0~0.2 M까지의 NaCl 함유 Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 linear-gradient elution하여 흡착 단백질을 시간 당 약 16 ml 정도로 분획 용출하였다. 각 분획마다 효소활성과 단백질 양을 측정하여 다음 활성이 가장 강한 분획을 모아 투석한 후 농축하여 다음 정제과정에 사용하였다. 0.1 N의 NaCl이 함유된 동일한 buffer로서 평형화시킨 Sephadex G-200 (Sigma Co.) 이 충전된 column (2×90 cm)을 사용하여 gel filtration을 행하였다. 유속을 시간 당 8 ml 정도로 하여 1 분획에 2 ml 씩 분취하여 효소활성과 단백질을 측정하여 활성 분획물을 취하였다.

#### Mono S (FPLC) column chromatography

10 mM acetate buffer (pH 5.0)로 충분히 평형화시킨 Mono S column을 동일한 buffer로 충분히 세척하였다. 효소액은 0.5 ml/min의 유속으로 단백질을 흡착시키고 미흡착 단백질은 동일한 buffer 50 ml로서 세척하였다. 용출은 0.2 M NaCl이 함유된 동일한 buffer로 행하여 효소활성을 측정하여 활성 분획물을 취하였다. 활성 분획물은 투석에 의하여 염을 제거시킨 다음 농축하여 사용하였다.

#### SDS-PAGE에 의한 분자량

SDS-PAGE는 Laemmli [14]와 Weber [29]의 방법에 따라 12% (w/v) polyacrylamide와 0.1% (w/v) SDS가 포함된 separating gel과 4% (w/v) polyacrylamide와 0.1% (w/v) SDS가 함유된 stacking gel을 만들어 사용하였다. 100 volt에

약 6시간 동안 전기영동한 후 coomassie blue로 gel을 염색하여 단백질 band를 확인하였다. 정제된  $\beta$ -lactamase의 분자량은 Bio-Rad의 low molecularweight standard (lysozyme: 14.4 kDa, soybean trypsin inhibitor: 21.5 kDa, carbonic anhydrase: 31 kDa, ovalbumin: 45 kDa, bovin serum albumin: 66.2 kDa)를 사용하여 측정하였다.

**$\beta$ -lactam 항생물질들에 대한 효소의 기질 특이성**

Penicillin계 6종류, cephalosporin계 3종류의 항생물질을 기질로 하여 항생물질 희석 buffer로 2%가 되도록 희석한 각 기질 용액 2 ml에 0.5 mM 효소액 1 ml를 첨가하고 30°C 항온기에서 40분간 반응시킨 후 iodine 시약 5 ml를 가하여 실온에서 10분간 방치하였다(cefazolin은 30분간 방치). 그리고 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 기질 특이성에 대한 비활성을 백분율로 환산하였다[22].

**효소 활성에 대한 금속 이온 및 효소 저해제의 영향**

2.0 mM 농도의 각종 금속이온 및 효소 저해제 0.6 ml와 기질액 0.4% ampicillin 1 ml를 30°C에서 5분간 가온한 후 0.5 mM 효소액 0.4 ml를 첨가하고 같은 온도의 항온기에서 30분간 반응시켰다. 즉, 효소 반응 시 최종 농도가 1.0 mM이 되도록 이들 공시 화합물을 첨가하였다. 그리고 iodine 시약 5 ml를 가하고 최종 반응 용량이 8 ml가 되도록 0.01 M acetic acid buffer (pH 5.0) 1 ml를 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다.

**Kinetics**

정제 효소의 ampicillin에 대한 반응 초속도를 계산한 다음 Lineweaver-Burk plot method [16]에 의한  $K_m$ 치와  $V_{max}$ 를 산출하였다.

**등전점**

등전점은 0.2% ampholine (pH 3.5~10과 pH 2.5~4 ampholites를 1:2로 혼합)을 사용한 5% polyacrylamide gel isoelectric focusing에 의하여 측정하였다. Identical gel은 pH gradient 검정용과 protein 확인용을 사용하였다.

**아미노산 조성의 분석**

정제 효소액은 증류수를 외액으로 하여 투석을 행하고 원심분리(23,000× g, 10 min, 4°C)한 후 침전물을 제거하고 농

축하였다. 약 1 mg의 시료를 1% phenol이 함유된 6 N HCl을 가하여 110°C에서 24, 48, 72시간 가수분해 시켰다. 가수분해된 정제 효소는 아미노산 자동분석기(Perkin-Elmer Co.)에서 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**$\beta$ -lactamase의 정제**

모든 정제과정은 4°C나 실온 이하에서 실시하였으며, 각 정제 단계의 개요를 Table 1에 나타내었다. Ammonium sulfate를 30%~80%까지 포화시켜 효소활성 단백질의 침전을 가장 좋은 분획을 선택한 결과 80% 포화분획이 효과적이었다. 이 침전물은 원심분리(23,000× g, 20 min, 4°C)에 의하여 회수한 다음 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 녹여 투석하였으며, 이 과정에서 배양액의 조효소에 비하여 약 23배 정도로 단백질 정제의 효과가 있었다. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography과정에서 흡착된 효소 단백질은 0~0.2 M의 NaCl로서 용출시킨 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 약 0.08 M의 NaCl농도에서 활성 단백질이 용출되었다. 각 분획의 활성은 0.01 M acetate buffer (pH 5.0)를 사용하여 측정하였다. Sephadex G-200 gel filtration 과정에서는 전단

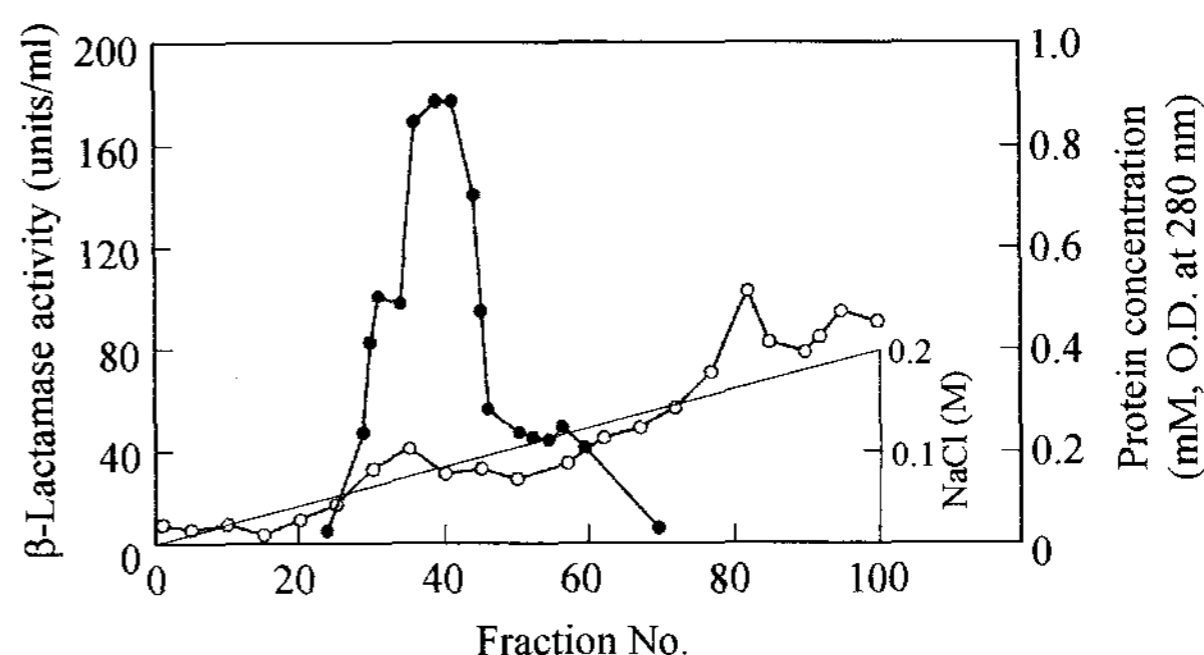


Fig. 1. Elution profile of ion exchange chromatography on DEAE-sephadex A-50 of *Bacillus* sp. J105  $\beta$ -lactamase. Enzyme solution was applied onto a column of DEAE-sephadex A-50 equilibrated with 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.5). Flow rate: 16 ml/hr, Fraction volume: 3 ml,  $\beta$ -lactamase activity ●, protein concentration ○.

Table 1. Purification of extracellular  $\beta$ -lactamase from *Bacillus* sp. J105

Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture supernatant	920,000	9370.0	98	1.0	100.0
Ammonium sulfate precipitate	680,000	302.4	2,249	22.9	73.9
DEAE-Sephadex A-50 chromatography	470,000	39.3	11,959	122.0	51.1
Sephadex G-200 gel filtration	360,000	14.2	25,352	258.7	39.1
Mono S chromatography (FPLC)	230,000	2.4	95,833	977.9	25.0

계 ion exchange과정보다 약 2배정도의 정제 효과를 보였다. 효소의 수율에 있어서는 약 40% 이하로 떨어졌으나 전체적인 정제 효과는 약 260배 정도가 되었다. Mono S (FPLC)에서의 최종 정제 효과는 약 1,000배 가까운 비율로 매우 높았다(Fig. 2).

**분자량**

본 정제 효소를 Bio-Rad의 low molecular weight marker와 함께 전기영동 하여 Rf치를 구하여 표준곡선에 의한 분자량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 정제된 효소의 분자량은 31 kDa 이었다. Wu는 *B. subtilis*가 채외로 분비하는  $\beta$ -lactamase의 분자량이 33.5 kDa과 30.7 kDa이고 *B. cereus*가 분비하는  $\beta$ -lactamase의 분자량은 33.5 kDa과 31 kDa임을 보고하고 있다[30]. 또한, *Staphylococcus*속의 한 균주로부터 Jan은 분자량이 32 kDa과 28.8 kDa의  $\beta$ -lactamase가 존재하는 것을 보고 하여[8] Gram 양성 균주들은 대개 30 kDa 전후의 분자량을 가진  $\beta$ -lactamase가 존재하는 것으로 사료되어 본 균주에서 생성되는 효소의 분자량도 이들 효소의 분자량과 거의 유사한 크기임을 나타내었다. 그러나 이에 비하여 Gram 음성균이 생성하는  $\beta$ -lactamase의 경우는 거의 세포내성으로 *Enterbacter cloacae*의 경우 분자량이 44 kDa과

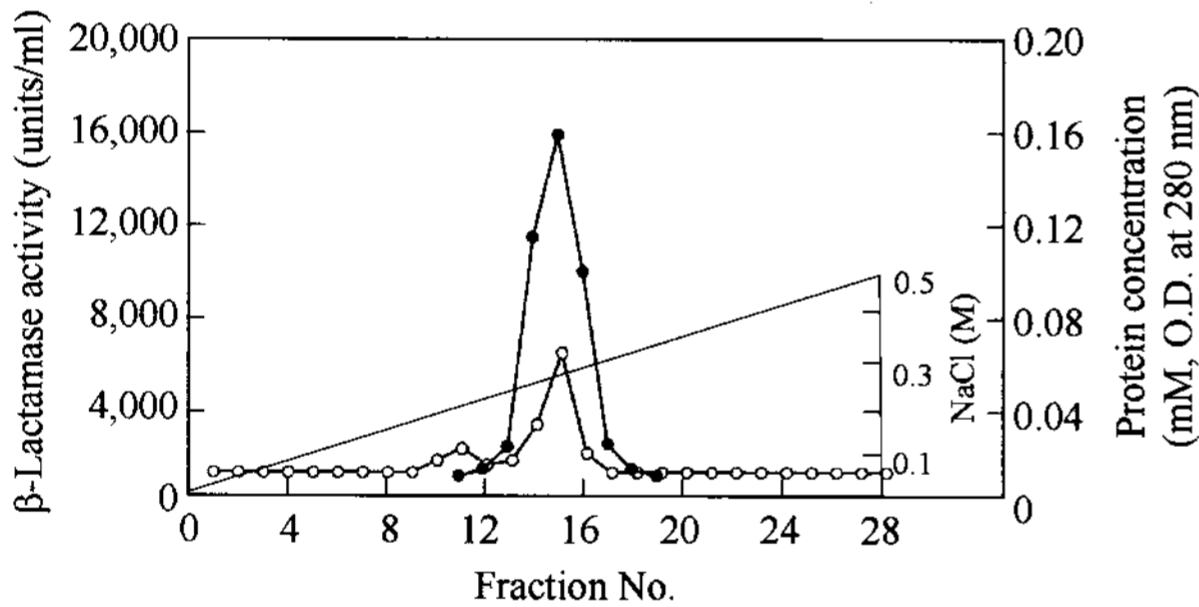


Fig. 2. Ion exchange column chromatography (Mono S, FPLC) profile of *Bacillus* sp. J105  $\beta$ -lactamase. Enzyme solution was applied onto a column of Mono S equilibrated with 0.01 M acetate buffer (pH 5.0).  $\beta$ -lactamase activity ●, protein concentration ○.

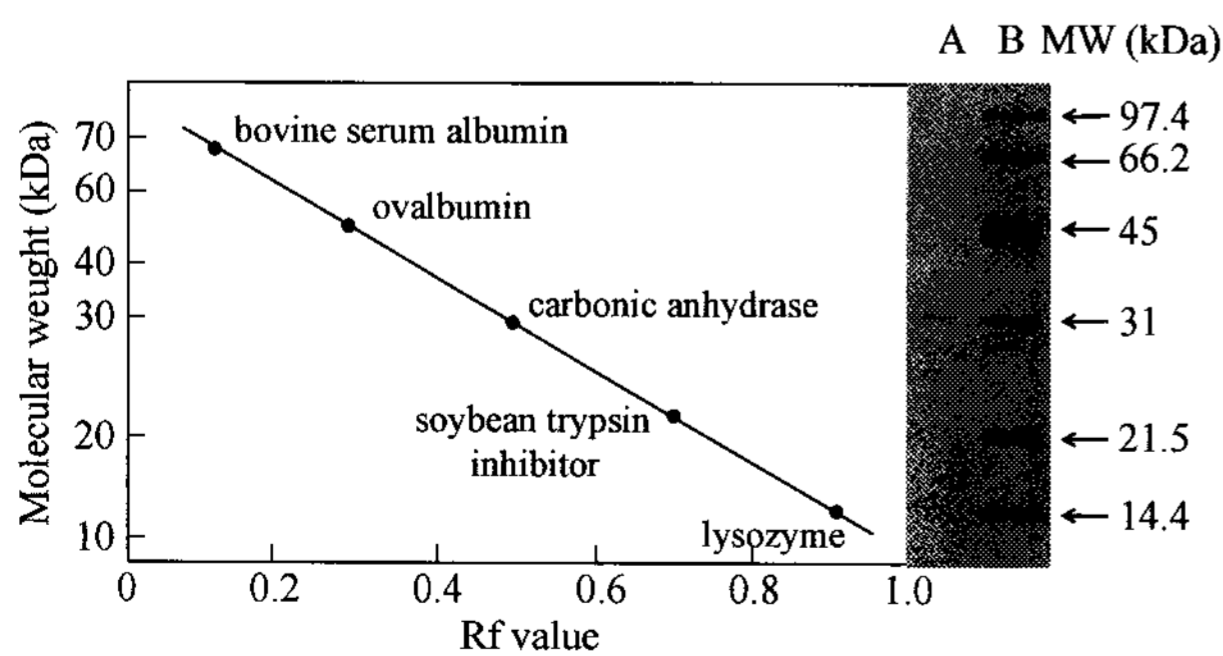


Fig. 3. Molecular weight of (A) Purified  $\beta$ -lactamase and (B) low molecular weight marker protein on SDS-PAGE.

45 kDa이었고[23] *E. coli*와 *P. mirabilis*등의  $\beta$ -lactamase는 분자량이 각각 24 kDa과 21.5 kDa으로 보고된 바가 있다[28].

**pH 안정성 및 최적 반응 pH**

pH 안정성은 정제 효소액을 각종의 buffer로 pH를 2~11로 조절하여 4°C에서 24시간 방치한 후 효소의 잔존 활성을 측정함으로써 알 수 있었다(Fig. 4). 효소 안정성이 80% 이상을 유지하는 pH 범위는 5~7로서 pH의 안정 범위는 그렇게 넓은 것이 아니었다. 반면에 pH 4~11까지의 범위에 걸쳐 약 50% 이상의 안정성을 유지하는 특성을 보였다. 그러나 pH 3 이하에서는 급격히 실활 하며 pH 2에서는 완전히 실활 되었다. 또한, 효소 활성의 pH 의존성을 검토하기 위하여 각각의 buffer를 사용하여 효소 반응액의 pH를 3~10으로 단계적으로 조절하고 그 효소 활성을 측정하였다. 그 결과, 본 효소의 최적 반응 활성을 갖는 pH는 5.0이었으며 pH 4와 6에서도 90% 이상의 활성을 나타내었다(Fig. 4).

**온도 안정성 및 최적 반응 온도**

본 정제 효소의 온도 안정성과 최적 반응 온도를 Fig. 5에 나타내었다. 정제 효소액 0.3 ml를 포함한 0.01 M acetate buffer (pH 5.0) 2 ml를 각 온도 즉 10°C~70°C까지의 각 온도에서 30분간 열처리한 후 10°C에서 잔존 활성을 측정한 결과, 본 정제 효소는 10°C에서 40°C까지는 90% 이상의 활성을 유지하는 안정성을 보였으나 50°C 이상에서는 급속히 감소하여 70°C에서는 완전히 실활 되었다. 또한, 효소의 최적 반응 온도를 측정하기 위하여 정제 효소액 0.3 ml가 함유된 상기의 buffer 2 ml에 0.4% ampicillin 기질액 1 ml를 첨가하여 20°C에서 70°C까지 단계적으로 반응 온도를 조절한 항온기에서 30분간 효소 반응을 행한 후 급랭하여 iodine 시약 5 ml를 가하여 실온에서 10분간 방치한 후 540 nm에서 흡광도를

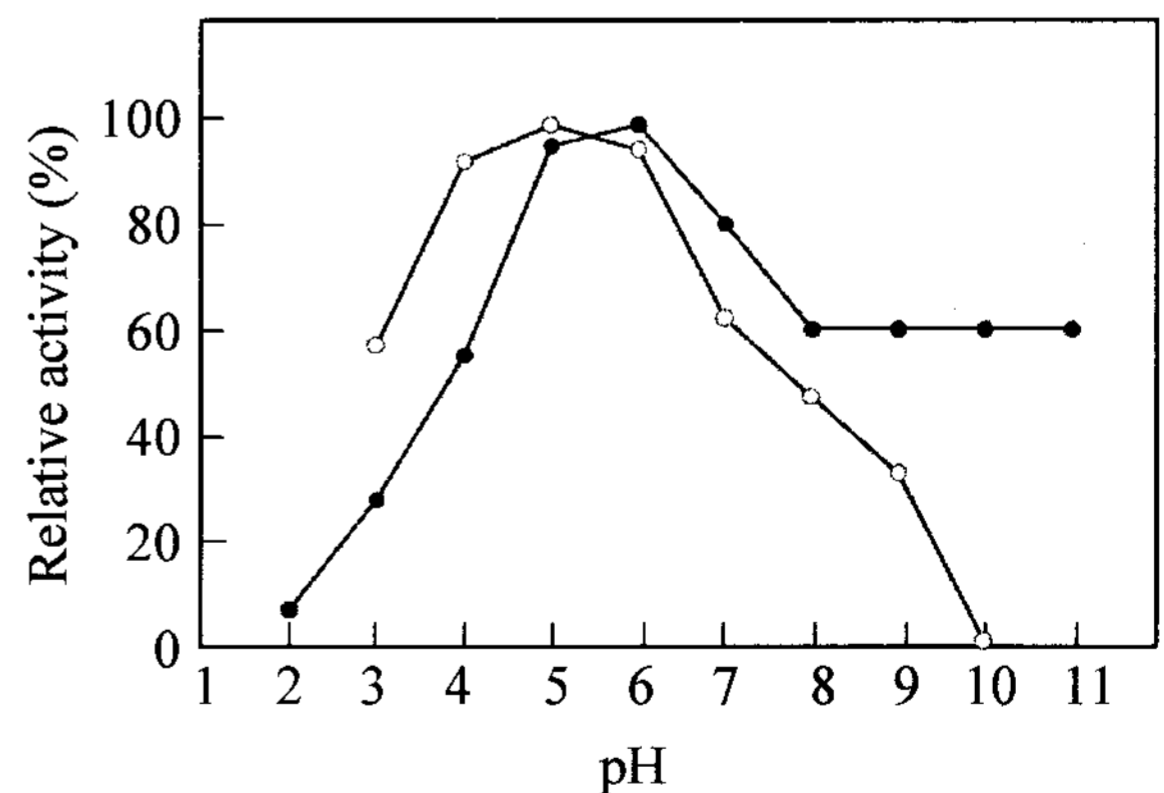


Fig. 4. Effect of pH stability (●) and optimal pH (○) of purified  $\beta$ -lactamase. Buffer system used were 0.03 M sodium acetate (pH 2~5), 0.03 M sodium phosphate (pH 6~7), 0.03 M Tris-HCl (pH 8), 0.03 M glycine-NaOH (pH 9~10) and 0.03 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11).

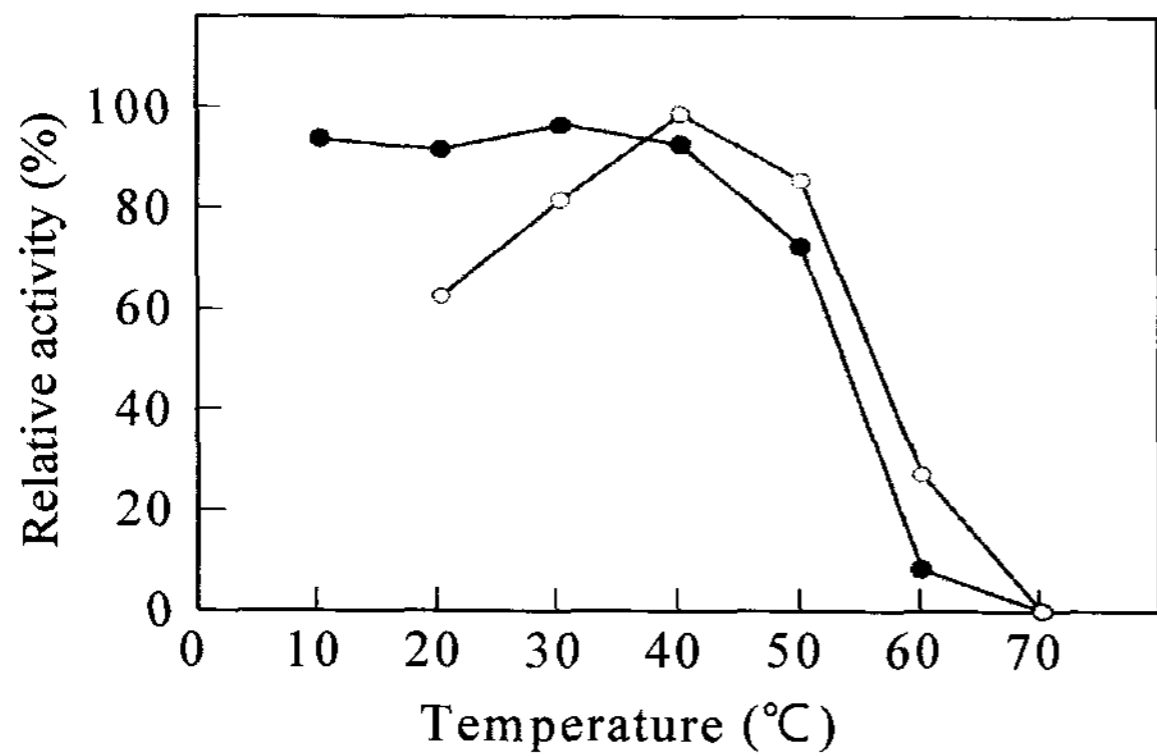


Fig. 5. Effect of temperature stability (●) and optimal temperature (○) of purified β-lactamase. The enzyme solution was incubated in 0.01 M acetate buffer (pH 5.0) at the indicated temperatures for 30 min and residual activity was measured.

측정하여 잔존 활성을 백분율로 산출한 결과, 40°C에서 가장 높은 활성을 보였다. 또한 30°C 및 50°C에서는 80% 이상의 활성을 나타내었다.

**기질 특이성**

정제 효소에 대하여 여러 가지 β-lactam 항생물질들을 기질로 반응시켜 기질 특이성을 검토한 결과는 Table 2에 나타내었다. 여러 약제 중에서 ampicillin이 가장 높은 친화력을 보였으며, 이를 100%로 하였을 때 amoxicillin과 penicillin-G가 73.3, 68.8%로 비교적 친화력이 높은 편이었다. 반면에 cephalosporin계 항생물질은 매우 낮은 친화력을 보였다.

**금속이온 및 저해제의 영향**

금속이온과 EDTA가 효소활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 즉 Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>는 효소활성에 거의 영향을 미치지 않았으나 Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>은 효소활성을 70~80% 이상 저해하였다. 반면에 EDTA는 약 20% 정도 효소활

Table 2. Substrate specificity of β-lactamase on various β-lactam antibiotics

Substrate	Specific activity (units/mg protein)	Relative activity (%)
Ampicillin	2,262	100.0
Penicillin-G	1,555	68.8
Cloxacillin	54	2.4
Amoxicillin	1,659	73.3
Carbenicillin	445	19.7
Piperacillin	522	23.1
Cefazolin	46	2.0
Cefradine	0	0
Cefotaxime	27	1.2

Table 3. Effect of EDTA and various metal ions on the activity of β-lactamase purified from *Bacillus* sp. J105

EDTA and metal ion	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	-	100.0
Ca <sup>2+</sup>	1	99.2
Co <sup>2+</sup>	1	92.0
Cu <sup>2+</sup>	1	17.6
Mg <sup>2+</sup>	1	92.8
Zn <sup>2+</sup>	1	29.6
EDTA	1	118.4
Iodine	0.008	0

성의 증가를 시켰으며 0.008 mM iodine은 효소활성을 완전히 저해시켰다. 또한, 정제된 β-lactamase에 각 농도의 sulbactam (β-lactamase inhibitor)을 넣어 기질(0.4 w/v, ampicillin)과 30°C에서 30분간 반응시켜 그 저해도를 백분율로 산출하여 sulbactam의 정제 효소에 대한 활성저해를 검토한 결과, 본 효소는 0.5 mM의 sulbactam에서 약 60%의 저해를 받고 3 mM에서는 90% 이상의 저해를 받는 것으로 나타났다 (Fig. 6). 이 결과는 Kitzis 등[12]의 보고와 같이 sulbactam의 낮은 농도에서 cephalosporinase가 저해를 받는데 비하여 penicillinase는 높은 농도에서만 저해된다는 보고와 일치하였다.

**Km치와 등전점**

Ampicillin을 기질로 하여 0.2~3 mM 농도별로 0.01 M acetate buffer (pH 5.0)로 희석한 각 농도의 기질 용액 2.8 ml에 동일 농도의 효소 용액 0.2 ml를 첨가하여 30°C 항온기에서 20분간 반응시킨 후 iodine 시약 5 ml를 가하여 실온에 10분간 방치한 후 흡광도 측정으로 동량 효소의 동일시간 반응

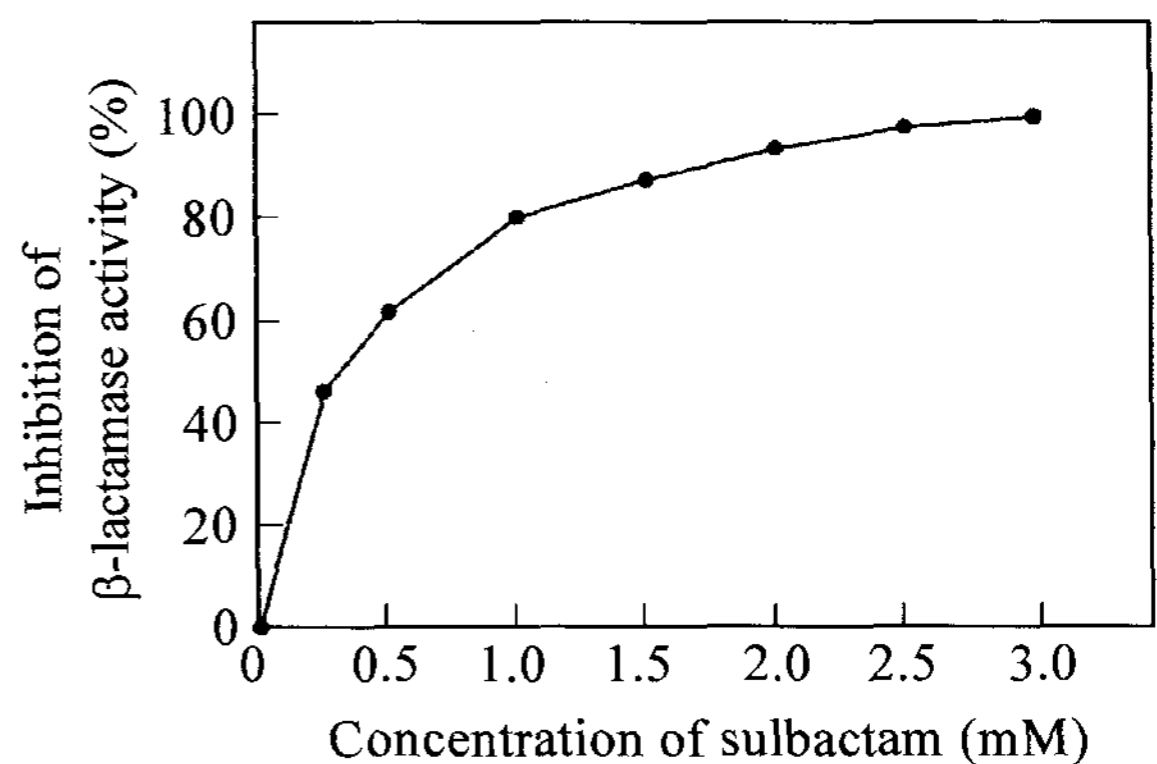


Fig. 6. Inhibition ratio of purified β-lactamase by various concentrations of sulbactam. Sulbactam was added to the assay mixture containing purified β-lactamase and then the enzyme activity was determined. The effect of inhibition was represented as percentage of inhibition.

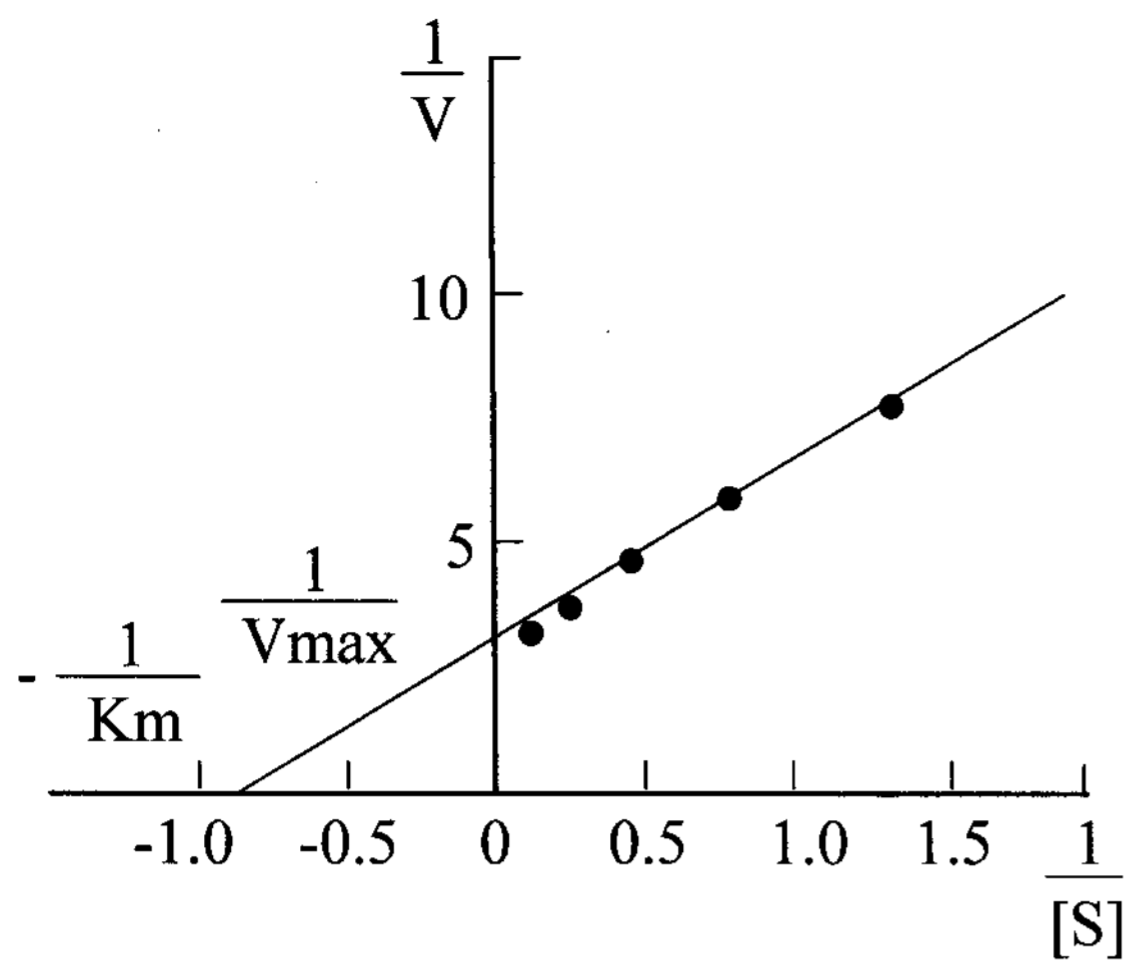


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot on the hydrolysis of ampicillin by *Bacillus* sp. J105  $\beta$ -lactamase. The estimated value of  $K_m$  was 1.33 mM, using ampicillin as a substrate.

으로 분해할 수 있는 기질의 양을 측정하여 Lineweaver-Burk plot로부터 정제된 세포 외  $\beta$ -lactamase의  $K_m$ 값과  $V_{max}$ 값을 산출하였다. 그 결과, ampicillin의  $K_m$ 값과  $V_{max}$ 값은 각각 1.33 mM과 0.36 mM/ml이었다(Fig. 7). 한편, 정제  $\beta$ -lactamase의 등전점은 7.35로 나타났다.

**아미노산 조성**

본 정제 효소의 분자량은 31 kDa 이었으므로 이를 바탕으로 각 아미노산 잔기수를 계산하여 그 결과를 Table 4에 나타내었다. Gly과 Ala의 함량이 각각 14.1과 13.3 mol% 로서 가장 많았고 다음으로는 Glu과 Lys이 각각 10.5와 9.4 mol%

Table 4. Composition of amino acid in purified  $\beta$ -lactamase

Amino acid	mol%	Integral no. of residues/31,000 g
Asp	7.0	18
Thr	5.8	15
Ser	8.2	21
Glu	10.5	24
Pro	0	0
Gly	14.1	36
Ala	13.3	34
Cys	0	0
Val	5.8	15
Met	0	0
Ilu	2.7	7
Leu	8.3	21
Tyr	1.9	5
Phe	2.4	6
His	2.3	6
Lys	9.4	24
Arg	8.3	21

이었다. 그에 비하여 Phe과 His이 각각 2.4와 2.3 mol%로서 낮은 편이고 Tyr의 함량이 1.9 mol%로 가장 적은 잔기량을 나타내고 있었다. 이상에서 살펴본 바와 같이 *Bacillus* sp. J105로부터 유도되는  $\beta$ -lactamase는 매우 큰 흥미를 유발할 수 있는 효소로서 앞으로 이 효소의 inhibitor를 개발함으로써 세균의  $\beta$ -lactam계 항생제에 대한 내성을 줄일 수 있는 약제 개발에 많은 도움이 되리라 기대된다.

**요 약**

*Bacillus* sp. J105 strain으로부터 유도된  $\beta$ -lactamase는 ammonium sulfate 침전, 이온 교환 칼럼 크로마토그래피, 겔 여과 등의 과정을 거쳐 SDS-PAGE에서 단일 band로 정제하였다. 정제된 효소의 분자량은 31 kDa이었으며 등전점은 7.35이었다. 효소반응의 최적 pH와 온도는 각각 5와 40°C이었다. 정제 단백질의 총 아미노산 조성의 분석 결과, Gly과 Ala이 각각 14.1과 13.3 mole%로 가장 많은 아미노산 잔기를 차지하고 있었다. 정제 효소의 ampicillin을 기질로 하였을 때의  $K_m$ 값은 1.33 mM이었고  $V_{max}$ 값은 0.36 mM/ml이었다.

**References**

1. Bush, K., G. A. Jacoby and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1211-1233.
2. Cho, K. S., W. D. Kang, D. H. Kim, H. Beak, H. K. Sung and Y. K. Joung. 1998. Characterization of resistant bacterium against  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Dong-eui univ.* **28**, 403-410.
3. Danziger, L. H. and S. L. Pendland. 1995. Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Am. J. Health-Syst. Pharmacy* **52**, 3-8.
4. Fisher, J. F., S. O. Meroueh and S. Mobashery. 2005. Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem. Rev.* **105**, 395-424.
5. Fu, K. P. and H. C. Neu. 1981. The role of inducible  $\beta$ -lactamases in the antagonisms seen with certain cephalosporin combinations. *J. Antimicrob. Chemother.* **7**, 104-107.
6. Ghuysen, J. M. 1991. Serine-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 37-67.
7. Hashizume, T., A. Yamaguchi and T. Sawai. 1986. Outer membrane permeability of imipenem in comparison with other  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Antibiot.* **1**, 153-156.
8. Jan, E. P., B. L. Masecar and M. J. Jervos. 1988. Characterization and comparison of two penicillinase-producing strains of *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **32**, 122-124.
9. Joris, B. 1988. The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R61 DD-peptidase family. *Biochem. J.* **250**, 313-324.

10. Kasic, J. E. and L. Peacham. 1968. Properties of  $\beta$ -lactamase produced by three species of *Mycobacteria*. *Biochem. J.* **107**, 675-682.
11. Kelly, J. A., O. Dideberg, P. Charlier, J. P. Wery, M. Libert, P. C. Moews, J. R. Knox, C. Duez, C. Fraipont and B. Joris. 1986. On the origin of bacterial resistance to penicillin: Comparison of a beta-lactamase and a penicillin target. *Science* **231**, 1429-1431.
12. Kitzis, M. D., D. Billet-klein, F. W. Goldstein, R. Williamson, G. T. Van Nhieu, J. Carlot and J. F. Acar. 1988. Dissemination of the novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase CTX-1, which confers resistance to broad-spectrum cephalosporins, and its inhibition by  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **32**, 9-14.
13. Kushner, D. J. and C. Broil. 1977. Penicillinase formation by blue green algae. *Microbiology* **112**, 219-223.
14. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
15. Lampe, M. F., J. B. Allan, B. H. Minshew and J. C. Sherris. 1982. Mutational enzymatic resistance of *Enterobacter* species to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **21**, 655-660.
16. Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658-666.
17. Livermore, D. M. 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 557-584.
18. Livermore, D. M., F. Moosdeen, M. A. Lindridge, P. Kho and J. D. Williams. 1986. Behaviour of TEM-1 beta-lactamase as a resistance mechanism to ampicillin, mezlocillin and azlocillin in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **17**, 139-146.
19. Lowry, O. H., N. J. Posebrough, L. A. Farr and R. J. Randal. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
20. Massova, I. and S. Mobashery. 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1-17.
21. Mehta, R. J. and C. H. Nash. 1978.  $\beta$ -Lactamase activity in yeast. *J. Antibiot.* **31**, 239-240.
22. Minami, S., A. Yotsuji, M. Inoue and S. Mitsuhashi. 1980. Induction of  $\beta$ -lactamase by various b-lactam anti-biotics in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **18**, 382-385.
23. Minami, S., M. Inoue and S. Mitsuhashi. 1980. Purification and properties of acephalosporinase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **18**, 853-857.
24. Neu, H. C. 1984. Current mechanisms of resistance to anti-microbial agents in micro-organisms causing infection in the patient at risk for infection. *Am. J. Med.* **76(6A)**, 11.
25. Ogawara, H. 1978. Production and property of  $\beta$ -lactamase in *Streptomyces*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **8**, 402-408.
26. Poole, K. 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 2200-2223.
27. Sawai, T., I. Takahashi and S. Yamagishi. 1970. Iodometric assay method for beta-lactamase with various beta-lactam antibiotics as substrates. *J. Bacteriol.* **13**, 910-913.
28. Sawai, T., M. Kano and K. Tsukamoto. 1982. Characterization of eight  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **152**, 567-571.
29. Weber, K. and M. Osborn. 1971. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel. *Meth. Enzymol.* **26**, 3-27.
30. Wu, W., P. S. F. Mezes, Y. Q. Yanag, R. W. Balacher and J. O. Lampen. 1985. Cloning and sequencing of the  $\beta$ -lactamase I gene of *Bacillus cereus* 5/B and its expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **163**, 487-492.