

이학 석사 학위 논문

MRSA(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)에
유효한 항균물질을 생산하는 해양세균의 분리



2007년 2월

부경대학교 대학원

미생물학과

장동욱

이학 석사 학위 논문

MRSA(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)에
유효한 항균물질을 생산하는 해양세균의 분리

지도교수 이 원 재

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2007년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

미 생 물 학 과

장 동 욱

장동욱의 이학석사학위논문을 인준함

2006년 12월 22일

주 심 : 이 학 박 사 이 명 숙 ①

위 원 : 이 학 박 사 김 군 도 ①

위 원 : 농 학 박 사 이 원 재 ①

목차

Abstract	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 시료채취	6
2. 항균물질 생산균의 분리	6
3. 세균의 동정	6
3.1. 형태학적, 생화학적 특성	6
3.2. 16S rRNA gene sequencing 분석	10
3.2.1. 시료로부터 total genomic DNA 분리	10
3.2.2. Primers 합성	11
3.2.3. PCR 반응	11
3.2.4. DNA 절편 정제 (Elution)	11
3.2.5. Ligation	12
3.2.6. Competent bacterial cell 준비	12
3.2.7. Transformation	12
3.2.8. Plasmid DNA mini-prep	13
4. 분리균의 생육 및 항균물질 생산 최적조건	13
4.1. 생육도 및 항균물질의 활성 측정	13
4.2. 온도의 영향	14
4.3. pH의 영향	14
4.4. NaCl의 영향	14
4.5. 배양시간에 따른 균의 생육과 항균물질의 활성	14
5. Crude antibiotics의 준비	14
6. 최소억제농도	15
7. Crude antibiotics의 적용범위	15
8. Crude antibiotics의 안정성 조사	16

8.1. pH 안정성	16
8.2. 열 안정성	16
III. 결과 및 고찰	17
1. 항균물질 생산균의 분리 및 동정	17
2. <i>Pseudomonas</i> sp. UJ-6의 생육 및 항균물질 생산 최적조건	23
2.1. 온도의 영향	23
2.2. pH의 영향	23
2.3. NaCl의 영향	24
2.4. 배양시간에 따른 균의 생육과 항균물질의 활성	24
3. 최소억제농도	24
4. Crude antibiotics의 적용범위	30
5. Crude antibiotics의 안정성 조사	33
5.1. pH 안정성	33
5.2. 열 안정성	33
IV. 요약	36
V. 감사의 글	37
VI. 참고문헌	38

Isolation of marine bacteria producing antibiotics against MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)

Dong-uk chang

Department of Microbiology, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the most important pathogens that cause suppuration, abscess formation, a variety of pyogenic infection, and even fatal septicemia in human beings. *S. aureus* is proved to be susceptible to the earliest antimicrobial substance. However, as antibiotic use increased, staphylococcal resistance rapidly developed. MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), having resistance of which was due to penicillin-binding protein 2a (PBP2a) production, was isolated in the early 1960s. MRSA is resistant to not only methicillin and other β -lactams but also to many other antibacterial agents. Since MRSA exhibits multidrug resistance, it has been emerging worldwide as one of the most important hospital and community pathogens. Therefore, in effort to discover new agents needed to treat the MRSA, we screened bacteria that originated from the marine environment for anti-MRSA activity.

In order to isolate the marine bacteria producing antibiotics against MRSA, seawater was collected from the coastal water in Ulsan. One strain of marine bacteria, showing strong antibiotic activity for MRSA, was isolated by testing disk diffusion method (NCCLS, 2002). This microorganism was tested by examining its morphological, biochemical properties and analysis of 16S rRNA gene sequencing for identification. Isolated strain was tentatively identified to be *Pseudomonas* sp. and designated as *Pseudomonas* sp. UJ-6.

The optimum culture conditions of *Pseudomonas* sp. UJ-6 for growth and production of antibiotics against MRSA were initial pH 7, 1% NaCl and 200 rpm

agitation at 25°C. Also *Pseudomonas* sp. UJ-6 relatively grew in conditions which were 20-30°C, pH 5-9, NaCl 0-3%. The MIC (Minimum Inhibitory Concentration) value against MRSA (KCTC 40510) of the crude antibiotics produced by *Pseudomonas* sp. UJ-6 was estimated as 160 $\mu\text{l}/\text{ml}$. Spectrum of antimicrobial activity was evaluated by examining crude antibiotics to standard strains which are gram positive strains - MRSA (KCTC 40510), *Staphylococcus aureus* (KCTC 1927), *Streptococcus pyrogenes* (KCTC 3096), *Enterococcus faecalis* (KCTC 2011), *Bacillus subtilis* (KCTC 1028) and *Mycobacterium smegmatis* (KCTC 1057) and gram negative strains - *Vibrio parahaemolyticus* (KCTC 2729), *Salmonella typhimurium* (KCTC 1925), *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1637) and *Escherichia coli* (KCTC 1682). MRSA (KCTC 40510) and *B. subtilis* (KCTC 1028) did not grow on plate including 160 $\mu\text{l}/\text{ml}$ of crude antibiotics and the others of gram positive strains did not grow at 640 $\mu\text{l}/\text{ml}$. Gram negative strains did not grow at 640 $\mu\text{l}/\text{ml}$ except *V. parahaemolyticus* (KCTC 2729). The crude antibiotics produced by *Pseudomonas* sp. UJ-6 was stable within the pH range of 3-8 and temperature range of 4°C-121°C. This crude antibiotics appears to have considerable potential by its stability.

I. 서론

인류가 병원성 세균의 존재를 알게 된 시기는 겨우 19세기이며, 그 이전의 사람들은 원인도 모른 채 세균에 의해 목숨을 잃을 만큼 세균감염증은 고대로부터 인류에게 가장 위협적인 질병 중의 하나이다. 또한 항균제가 개발되기 이전에는 수많은 사람들이 포도상 구균, 연쇄상 구균 등에 의한 비교적 간단한 창상감염으로도 사망하였다. 특히 황색 포도상 구균 (*Staphylococcus aureus*)은 그람 양성 구균으로 주변 환경에 널리 분포되어 있으며 가검물에서 가장 흔히 분리되는 균종 중의 하나로 조직 침윤성이 높아 (조, 1995) 농가진, 피부감염증, 식중독, 폐렴, 결핵, 패혈증, 뇌수막염 등의 광범위한 감염질환의 원인균으로 알려져 있다 (John, 1982 ; Jawetz *et al.*, 1987 ; Lyon *et al.*, 1983 ; Varald *et al.*, 1984).

그러나 1928년 Fleming에 의해 penicillin이 처음 발견된 이후, 제 2차 세계대전을 계기로 현대적인 개념의 항균제로서 처음으로 임상에 사용된 penicillin은 감염 질환을 가진 수많은 환자의 생명을 구함으로써 기적의 약 (miracle drug)으로 여겨졌다 (Pappler and Perlman, 1979 ; 홍, 1992). 수백 종의 항균제가 계속적으로 개발되는 가운데 인류의 사망률은 눈에 띄게 낮아졌고, 1967년 미국정부는 “감염증의 극복”을 선언하기도 하였다. 반면, 지구상에 존재하는 병원성 세균들은 항균제가 만들어지기 시작하면서부터 항균제에 끊임없이 노출되어 왔으며 이에 대하여 항균제에 내성을 발현시켜 왔다. 특히 methicillin에 내성을 나타내는 MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)는 methicillin 뿐만 아니라 “최후의 항균제”로 알려진 vancomycin을 제외한 대부분의 항균제에 내성을 나타내는 다제내성 (multidrug resistance)의 특성을 가지고 있으며 (Brown and Reynold, 1980 ; Hartman and Tomsz, 1984 ; Kozarsky *et al.*, 1986) 감염 후 사망률 또한 높아 임상적인 치료가 매우 어려운 것으로 알려져 있다 (Lorian, 1991). 그리고 성장조건에 영향을 받으며 매우 복잡한 유전적 배경을 가지므로 보통 항균제 검사로는 검출해 내기가 어려우며, 신생아실이나 수술실 등에서 면역이 저하된 개체의 경우 기회 감염 등과 관련된 치명적인 전신성 감염에 높은 빈도를 차지하고 있어 병원 내 감염으로 사망이나 장애에 이르는 대부분의 환자가 이 세균에 의해 감염되었다고 해도 무방하다 (Bradley *et al.*, 1991 ; Haley *et al.*, 1982 ; Thampsoa *et al.*, 1982 ; Peakock *et al.*, 1980).

제 1세대 항균제인 penicillin을 비롯한 β -lactam계 항균제는 peptidoglycan을 생합성하는 효소인 세포신장 및 격막형성에 관여하는 penicillin binding

proteins (PBPs)와 공유적으로 결합하여 결과적으로 PBPs를 불활성화시킴으로써 세균의 세포벽 합성을 저해하는 항균활성물질이다. 그러나 1950년대 항균제가 폭넓게 사용되면서 곧 β -lactamase 생성균 즉, β -lactam계 항균제에 내성을 가지는 내성세균이 출현하게 되었다. 때문에 이들 내성세균에 의한 감염증을 치료할 목적으로 penicillinase resistant β -lactam 항균물질인 methicillin이 개발되었고 β -lactamase에 의해 유발된 내성세균에 대한 치료가 가능하게 되었다 (Okazaki, 1987). 그러나 또 다시 methicillin에 내성을 나타내는 MRSA가 출현하게 되었고 이들 균주는 β -lactamase에 의한 내성과는 또 다른 내성기작을 가지고 있음이 밝혀졌다 (Boyce and Medeiros, 1987 ; Song *et al.*, 1987 ; Ubukata *et al.*, 1985 ; Kreiswirth *et al.*, 1993 ; Matthews and Tomasz, 1990). 이 새로운 내성기작은 β -lactam계 항균물질에 낮은 친화력을 지닌 PBP 2a에 의하여 유발된다 (Beck *et al.*, 1986 ; Brown and Reynold, 1980 ; Suzuki *et al.*, 1978). PBP 2a는 β -lactam계 항균물질과 친화성이 낮아 이들 항균물질에 의하여 불활성화 되지 않기 때문에 지속적인 세포벽 합성이 가능한 것으로 생각되어지고 있다 (Jonge *et al.*, 1992).

MRSA는 1961년 영국에서 Jevons에 의해 처음 발견된 후 세계 각처에서 보고되기 시작했고, 이후로 20년 동안 MRSA의 비율은 유럽 여러 나라에서 1-2% 비율로 증가하였으며, 북유럽의 스페인, 프랑스, 이탈리아에서는 30-40%까지 나타났다 (Voss *et al.*, 1994). 일본에서는 1990년 초에 59.1-67.3%가 분리 되었다고 보고된바 있으며 국내에서도 MRSA의 분리율이 점차 증가되어 1995년에 50%를 넘어 평균 62.1%로 나타났으며 현재 종합병원 환자에서 76% 이상의 분리율을 보이고 있다 (Patel *et al.*, 1989 ; 이 등, 1993 ; 김 등, 1993). 처음 MRSA가 발견되었을 그 당시에는 널리 퍼질 것 같지 않았지만 현재 전 세계로 퍼져나가 폐결핵만큼 치명적인 결과를 일으키고 있다. MRSA 분리율의 증가원인은 병원 내 감염뿐만 아니라 교통의 발달과 무분별한 항균제 사용에 있다. 지난 20년간 축산분야와 양식분야가 큰 시설에 집중적으로 이루어지면서 이미 많은 항균제가 사료와 질병의 예방을 목적으로 무분별하게 사용되었고 지속적인 항균제의 노출은 내성세균의 확산을 야기시켰다. 때문에 지역사회에서도 MRSA 감염 환자가 증가하고 있어 이에 대한 대책이 시급한 실정이다 (Murakami *et al.*, 1991 ; Voss *et al.*, 1994).

MRSA에 대한 치료제의 개발에 관한 연구는 새로운 anti-MRSA 항균물질의 개발 (Yasuhiro *et al.*, 1993 ; Kimito *et al.*, 1990 ; Harold *et al.*, 1989 ; Atsushi *et al.*, 1988 ; Matsuo *et al.*, 1994)에 관한 연구와 기존의 항균제들의 병용 투여 등에 관한 연구 (Ishii *et al.*, 1994 ; Yamaguchi *et al.*, 1994)가 주로

이루어지고 있으나 큰 성과를 거두지는 못하였다. 그러므로 MRSA에 선택적이고 강한 항균활성을 가지는 새로운 항균물질의 개발이 시급한 과제라고 할 수 있다. 또한 현재까지 항균물질의 검색은 주로 방선균과 같은 토양미생물을 대상으로 이루어졌지만 토양과는 비교적 특수한 환경이라고 할 수 있는 해양에서 서식하는 미생물을 대상으로 MRSA에 항균활성을 가지는 항균물질을 검색한다면 기존의 항균물질과는 다른 구조나 작용 메커니즘을 가지는 새로운 항균물질을 개발할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 MRSA에 유효한 항균활성물질을 탐색하고자 해양에서 분리한 세균을 대상으로 MRSA에 강한 항균활성을 나타내는 균주를 분리, 동정하였으며 분리된 균주가 생산하는 천연의 항균물질에 대하여 연구하였다.



II. 재료 및 방법

1. 시료채취

시료는 울진 근해에서 15개의 정점 (Fig. 1)을 중심으로 각 정점의 표층수를 Niskin 개량형 채수기인 MB채수기를 이용하여 180℃에서 2시간 건열멸균한 광구병으로 채취하였다. 채수한 시료는 ice-box에 보관하여 연구실로 옮겨 실험에 사용하였다.

2. 향균물질 생산균의 분리

채취한 모든 시료를 Fig. 2의 방법과 같이 십진법으로 희석하여 PPES-II (Taga, 1968) (Table 1) 평판배지에 평판도말법 (Buck and Cleverdon, 1960)으로 접종하여 20℃에서 1주일간 배양한 후, 형성된 특징적인 형태의 colony를 모두 선별하여 순수분리 하였다. 선별된 해양미생물을 대상으로 MRSA (KCTC 40510)를 피검균으로 하여 향균활성을 나타내는 균을 선별하였다. 즉, MRSA (KCTC 40510)를 도말한 Mueller Hinton agar (Difco) 배지에 백금선으로 colony를 접종하여 37℃에서 배양한 후, 생육저지대 (clear zone)를 형성하는 균을 1차 선별하였다. 2차선별은 disc diffusion method (NCCLS, 2002)를 이용하였다. 즉, 10 ml의 Mueller Hinton agar배지에 MRSA를 현탁한 0.5% 반유동 한천배지로 중층하였다. 여기에 1차 선별된 균의 배양액을 원심분리 (12,000 rpm, 4℃, 20min)하여 pellet은 버리고 상등액의 20 μ l를 가하여 건조시킨 직경 6mm의 paper disc를 올려놓고, 이를 4℃ 냉장고에서 3시간 방치한 후 37℃ 배양기에서 24시간 배양하여 우수한 생육 저지대를 형성하는 균을 최종 선별하였다.

3. 세균의 동정

3.1. 형태학적, 생화학적 특성

분리된 세균의 형태를 관찰하기 위해 분리균을 PPES-II agar 사면배지에 접

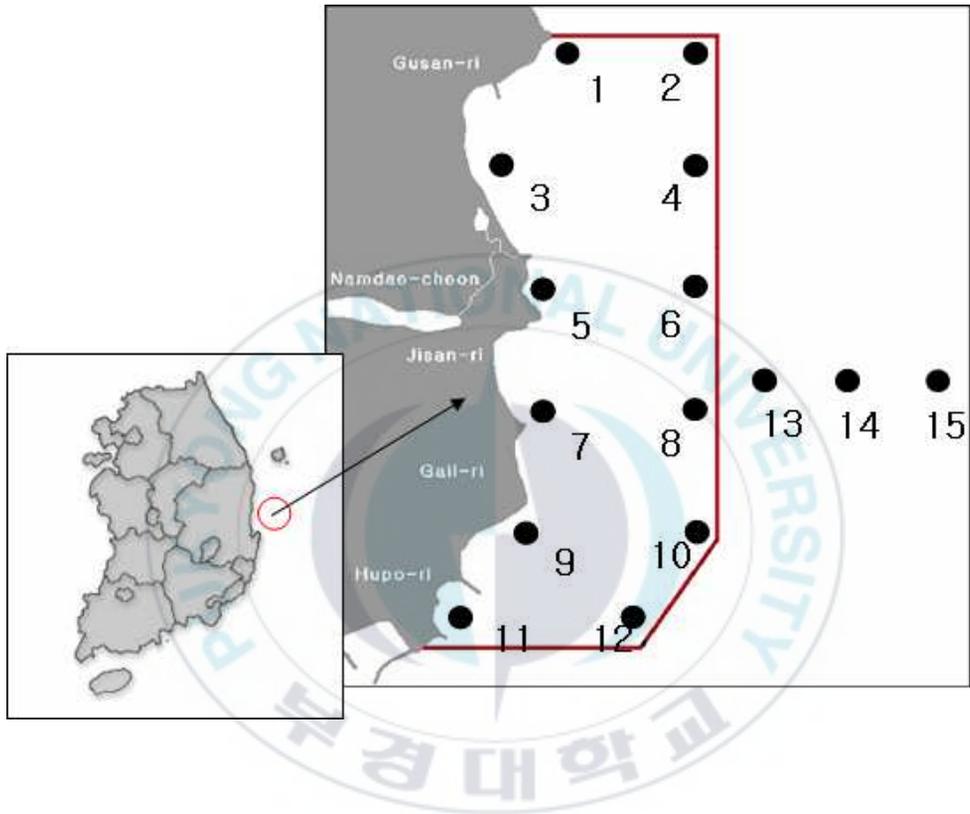


Fig. 1. Location of sampling stations of coastal area in Uljin.

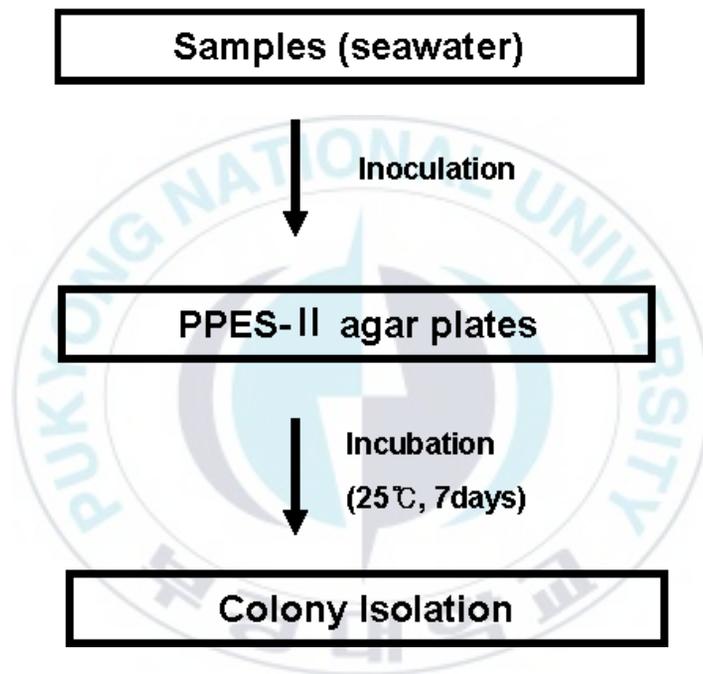


Fig. 2. Isolation scheme for marine bacteria.

Table 1. The composition of PPES-II medium (Taga, 1968)

Polypeptone	2.0g
Bacto Soytone	1.0g
Proteose Peptone No.3	1.0g
Bacto Yeast Extract	1.0g
Ferric Citrate (0.1%)	10.0ml
Bacto Agar	15.0g
Seawater	1000ml
Final pH	7.6±0.2

중하여 20℃에서 48시간 동안 preculture 시킨 후, 증식한 세균을 PPES-II broth가 20 ml 포함된 100 ml 삼각 플라스크에 접종하였고, shaking incubator (20℃)에서 200 rpm의 속도로 24시간 배양하였다. 대수증식기의 배양액을 Gram staining에 사용하였고, Microbiological Applications (Benson, 1990)의 방법으로 수행하였으며 광학현미경 (Zeiss Co. RMS 16)으로 검경하였다. 형태적인 특징은 전자현미경 (Transmission electron microscope)을 이용하여 관찰하였다. 분리균의 생화학적 특성을 알아보기 위한 실험은 Manual of methods for general bacteriology (Gerhardt *et al.*, 1981)와 Biochemical tests for identification of medical bacteria (MacFaddin, 1980)의 방법에 준하여 수행하였다.

3.2. 16S rRNA gene sequencing 분석

확실한 동정을 위하여 선별된 균주의 16S rRNA gene sequencing 분석을 수행하였다 (Moyer *et al.*, 1994).

3.2.1. 시료로부터 total genomic DNA 분리

AccuPrep™ Genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 사용하여 total genomic DNA를 추출하였다. 즉, 멸균된 1.5 ml tube에 배양액 1 ml의 시료를 넣고 14,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 침전시킨 다음, pellet을 취하여 200 μ l의 lysis buffer를 첨가하였다. 여기에 20 μ l의 proteinase K를 첨가하여 잘 혼합한 후, 56℃에서 1시간 반응시켰다. Cell이 완전히 lysis되고 나면 짧게 spin-down한 후, 200 μ l의 Binding buffer를 시료에 넣고 60℃에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 tube에 100 μ l의 isopropanol을 넣고 5초 정도 가볍게 vortex하여 섞어준 다음 10초 정도 spin down하였다. 시료를 2 ml collection tube에 결합시킨 binding column에 옮긴 후, 8,000 rpm에서 1분간 원심 분리하였다. 500 μ l의 Washing buffer 1을 넣고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 여기에 500 μ l의 Washing buffer 2를 tube에 넣고 8,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하였다. Binding column을 1.5 ml collection tube에 옮긴 후 70℃ water bath에서 미리 데운 elution buffer 200 μ l를 넣고 5분간 상온에 방치한 후 8,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하여 elution하였다. 이를 1% agarose gel에 전기영동하여 genomic DNA를 확인하였고, PCR 반응의 주형으로 사용하였다.

3.2.2. Primers 합성

16S rRNA 유전자의 증폭을 위하여 사용된 primer쌍은 Moyer 등 (1994)에 의해 고안된 것을 사용하였다. 이들 primer쌍은 eubacteria의 16S rRNA 유전자에서 잘 보존된 부분의 염기들로서 *Escherichia coli* 16S rRNA의 49-68, 1510-1492 위치에 해당되는 degenerate primer들로 만들어졌다. 추가로 forward primer의 5'에는 제한효소 *EcoRI*의 인식부위를 첨가하였고, reverse primer의 5'에는 *BamHI*의 인식부위를 첨가하였다. 본 연구에서 사용한 oligonucleotide는 아래와 같다.

Forward primer :

5' AGAATTCTNANACATGCAAGTCGAICG 3' (27-mer)

Reverse primer :

5' GTGGATCCGGYTACCTTGTTACGACTT 3' (27-mer)

N : degenerate including 4 nucleotides

Y : degenerate including pyrimidines

3.2.3. PCR 반응

PCR 반응은 AccuPower PCR Premix (Bioneer)를 사용하여 실시하였다. PCR 반응물의 조성은 10 pmol forward primer 3 μ l, 10 pmol reverse primer 3 μ l, template DNA 3 μ l, 3차 멸균 증류수 41 μ l를 첨가하여 50 μ l의 반응 혼합물을 만들어 잘 혼합하여 반응을 진행시켰다. PCR 운행은 Minicycler (MJ Research, U.S.A)에서 실시하였다. 처음 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 30초, 62°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 35회 반복하여 DNA를 증폭시키고, 마지막으로 72°C에서 7분간 extension time을 주어 PCR 반응을 종결시켰다. 이를 1% agarose gel에 전기영동하여 DNA를 확인하였다.

3.2.4. DNA 절편 정제 (Elution)

PCR 반응물을 1% agarose gel, 0.5×TBE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)에서 전기영동하여 band를 확인한 후, 확인된 band를 잘라내어 1.5

ml microcentrifuge tube에 넣었다. 여기에 6 M NaI (6 M sodium Iodine) 600 μ l를 넣고 50°C에서 5분간 gel을 녹였다. gel이 완전히 녹은 것을 확인한 후, glass milk 8 μ l를 넣고 rotator에서 20분간 반응시켰다. 이를 다시 14,000 rpm에서 5초간 centrifuge하고 pellet을 취하였다. Washing solution (1 M NaCl 40 ml, 1 M Tris-Cl 4 ml, 0.5 M EDTA 2 ml, 3차 증류수 54 ml) 500 μ l를 넣고 pipetting으로 씻고, 5초간 centrifuge하여 pellet를 취하였으며 씻어내는 과정을 2회 하였다. 남아있는 alcohol을 날려버리기 위해 vacuum에서 5-10분간 방치하였다. 이를 다시 45°C에서 3분간 방치하고 나서 3차 증류수를 20 μ l를 넣고 섞어준 후, 14,000 rpm에서 1분간 centrifuge하여 상등액을 취하였다. 상등액 1 μ l을 취하여 1% agarose gel에서 전기영동하여 band를 확인하였다.

3.2.5. Ligation

정제된 16S rDNA의 PCR 반응물을 pGEM-T vector (Promega)에 연결하였다. DNA 3 μ l, T vector 1 μ l, ligase 1 μ l, buffer (2X) 5 μ l를 사용하여 volume을 10 μ l로 맞춘 후에 상온에서 2시간 반응시켰다.

3.2.6. Competent bacterial cell의 준비

LB agar 배지에 키운 *E. coli* XL-1 Blue를 3 ml의 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕배양하고, 이를 다시 10 ml coning tube에 4 ml의 LB 액체배지에 재접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 배양된 균의 1 ml를 취하고 5000 rpm에서 5분간 centrifuge하여 상등액을 버리고, 침전된 세포들을 4°C로 냉각된 800 μ l의 CaCl₂ (50 mM)를 넣고 ice에서 20분간 resuspension 하였다. 이를 다시 5000 rpm에서 3분간 centrifuge하여 상등액을 버리고, 200 μ l의 CaCl₂ (50 mM)를 넣고 resuspension하여 사용하였다.

3.2.7. Transformation

10 μ l의 ligation 반응물을 미리 준비한 200 μ l의 XL1-blue competent cell과 혼합하여 ice에 30분간 방치한 후, 42°C에서 90초간 heat shock를 주고 재빨리 ice에서 5분간 방치하였다. 이를 LB 배지 800 μ l를 첨가하여 37°C에서 45분 동안 진탕배양 하였다. 이를 다시 5000 rpm에서 3분간 centrifuge하여 상등액을 버리고 LB 배지 200 μ l를 넣어 resuspension 하였다. 이를 Amp가 첨가된

Mackonkey agar 배지에 도말하여 37℃ 배양기에 18시간 배양한 다음, 4℃에 두어 색깔이 확실해지면 white colony만을 선택하여 LB (Amp+) broth에 접종하여 plasmid를 mini-prep 하였다.

3.2.8. Plasmid DNA mini-prep

Plasmid DNA는 alkaline lysis mini-prep방법 (Sambrook, 1989)으로 분리하고 제한효소로 잘라 삽입된 DNA 절편을 확인하였다. 확인된 plasmid는 RNase를 처리하고 phenol : chloroform 정제과정을 거쳐 OD₂₆₀에서 농도를 측정한다. 다음 염기서열 분석에 사용하였다.

4. 분리균의 생육 및 항균물질 생산 최적조건

분리균의 생육도와 항균물질의 생산에 대한 최적조건을 알아보기 위하여 온도, pH, NaCl의 농도를 단계별로 조정된 100 ml의 PPES-II broth에 균을 배양하였다. 각 단계별로 균의 생육도는 흡광도로 측정하였고, 항균물질의 활성은 균의 배양상등액을 첨가하여 피검균인 MRSA (KCTC 40510)의 생육저해율을 구하여 알아보았다.

4.1. 생육도 및 항균물질의 활성 측정

생육도의 측정은 분광광도계 (Shimadzu, UV-160)를 이용하여 640nm에서 측정하였다. 항균물질의 생산 정도는 상기의 피검균인 MRSA (KCTC 40510)의 배양액을 10 ml Mueller Hinton broth에 2% 접종하고, 분리균의 배양액을 원심분리 (12,000 rpm, 4℃, 20 min)한 후 제균 처리한 항균물질 (배양상등액)을 2% 첨가하여 37℃에서 6시간 배양하여 피검균의 생육도를 640nm에서 측정함으로써 항균물질의 피검균에 대한 생육저해율을 아래와 같이 구하였다.

$$\text{Inhibitory Rate} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100$$

(C₀, Control O.D. ; C, 항균물질 처리 후 배양한 O.D.)

4.2. 온도의 영향

배양온도를 4℃에서 50℃까지 단계별로 조정하여 분리균을 배양 (pH 7, 1% NaCl)하면서 균의 생육도 및 MRSA (KCTC 40510)에 대한 생육저해율을 측정하여 균의 항균물질 생산 최적온도를 알아보았다.

4.3. pH의 영향

분리균의 생육 및 항균물질 생산 최적 pH를 결정하기 위하여 배지의 초기 pH를 4-10까지 단계별로 조정하여 배양 (25℃, 1% NaCl)한 후, 균의 생육도와 생육저해율을 측정하였다.

4.4. NaCl의 영향

분리균의 생육과 항균물질 생산에 미치는 NaCl의 농도별 영향을 알아보기 위하여 NaCl의 농도를 1-10%까지 농도별로 배양 (25℃, pH 7)하면서 균의 생육도 및 항균력을 측정하였다.

4.5. 배양시간에 따른 균의 생육과 항균물질의 활성

조사된 생육 및 항균물질 생산 최적 배양조건을 적용하여 3ℓ의 PPES-II broth에 전배양액을 2%가 되도록 접종한 후, 0-72시간까지 배양하면서 매 2시간마다 균의 생육도와 항균력을 측정하여 시간의 경과에 따른 균의 생육과 증식하면서 생산하는 항균물질의 활성에 대해 알아보았다.

5. Crude antibiotics의 준비

본 균주가 생산하는 항균물질의 특성을 알아보기 위하여 crude antibiotics를 준비하였다. 항균물질 생산을 위한 전배양 및 본배양 배지로 PPES-II broth을 사용하였다. 전배양은 100 ml의 삼각 flask에 50 ml의 PPES-II broth를 넣고

균을 접종한 후, 25℃에서 24시간 동안 200 rpm으로 진탕배양 하였다. 본배양은 5 ℓ의 PPES-II broth에 일정량의 전배양액을 12,000 rpm (4℃)에서 20분 동안 원심분리한 후, 균을 멸균된 0.85%의 생리식염수로 두 번 세척하였고, O.D. (640nm)가 1.0이 되도록 동일한 생리식염수로 현탁하여 본배양액의 2%가 되도록 접종하였다. 본 배양 조건은 충분한 항균물질 생산을 위해 상기의 최적조건 하에서 48시간 동안 배양하였으며, 이를 5,000 rpm (4℃)에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리된 상등액을 취하여 0.2 μm의 여과지를 통과시켜 여과하고 이를 autoclaving함으로써 균에 의한 영향을 제거한 후, 10배로 농축시킴으로써 crude antibiotics를 준비하였다.

6. 최소억제농도

분리된 균주가 생산하는 항균물질에 대한 MRSA의 tolerance를 평가하기 위하여 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002)에서 권장하는 macrodilution method에 따라 최소억제농도 (MIC : Minimal Inhibitory Concentration)를 알아보았다. 먼저 준비된 crude antibiotics를 640 μl/ml에서 10 μl/ml까지 연속적으로 2 fold dilution하여 Mueller Hinton broth에 첨가하였으며 상기의 피검균인 MRSA (KCTC 40510)를 McFarland 0.5가 되도록 맞추고 이 균의 부유액 0.2 ml를 접종하여 총 volume이 2 ml가 되도록 하였다. 성장 대조균으로 MRSA (KCTC 40510)를 항균물질이 들어있지 않은 동량의 Mueller Hinton 배지에 접종하였다. 접종 후, 각각의 배지를 37℃에서 24시간 배양하여, 균의 성장이 억제된 최소 농도를 MRSA (KCTC 40510)에 대한 본 균주가 생산하는 항균물질의 최소억제농도로 결정하였다.

7. Crude antibiotics의 적용범위

시험균주인 MRSA (KCTC 40510)를 비롯한 다른 병원성 세균에 대한 항균활성을 조사하기 위하여 crude antibiotics를 640 μl/ml에서 80 μl/ml까지 한천희석법 (NCCLS, 2002)을 이용하여 첨가한 Mueller Hinton agar배지에 그람 양성균의 경우, 시험균주인 MRSA (KCTC 40510)를 비롯한 *Staphylococcus aureus* (KCTC 1927), *Streptococcus pyogenes* (KCTC 3096), *Enterococcus faecalis* (KCTC 2011), *Bacillus subtilis* (KCTC 1028), *Mycobacterium smegmatis*

(KCTC 1057)의 총 6종을 시험하였으며, 그람 음성균의 경우 *Vibrio parahaemolyticus* (KCTC 2729), *Salmonella typhimurium* (KCTC 1925), *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1637), *Escherichia coli* (KCTC 1682)의 총 4종을 시험하여 분리균이 생산한 crude antibiotics의 효과를 알아보았다. 본 시험은 상기의 시험균주들을 배양하여 백금이로 streak 한 후, 균의 증식에 대한 억제 여부를 관찰하였다.

8. Crude antibiotics의 안정성 조사

8.1. pH 안정성

분리균이 생산하는 crude antibiotics의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 crude antibiotics를 pH 3에서 pH 10까지 1N HCl과 NaOH를 이용하여 적정하여 24시간 동안 실온에서 방치한 후, 항균물질의 잔존 활성을 조사하였다. 항균물질의 잔존 활성은 disc diffusion method (NCCLS, 2002)를 이용하여 알아보았다. 즉, paper disc에 각 단계별로 처리한 20 μ l의 crude antibiotics를 취하여 첨가한 후, 실온에서 건조시켜 MRSA (KCTC 40510)을 현탁한 Mueller Hinton agar를 중층시킨 배지에 올려놓았다. 그리고 37°C에서 24시간 배양하여 형성된 생육저지대 (clear zone)의 diameter를 측정하여 crude antibiotics의 잔존활성을 알아보았다.

8.2. 열 안정성

분리균이 생산하는 crude antibiotics의 온도에 대한 안정성을 조사하기 위하여 4°C, 25°C, 50°C, 75°C, 100°C의 온도 범위에서 60분 동안 열처리하였다. 뿐만 아니라 121°C에서 15분간 열처리하여 crude antibiotics의 잔존 활성을 조사하였다. 잔존활성은 pH 안정성 실험과 동일한 방법으로 알아보았다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 항균물질 생산균의 분리 및 동정

본 연구에서는 울진 근해에서 채수한 해수를 pH 7.6으로 조절된 PPES-II 평판배지에 심진법으로 희석하여 평판도말법으로 접종하여 20℃에서 1주일간 배양한 후 나타난 colony 중 특징적인 형태를 나타내는 1,000여종의 colony를 선별하였다. 이들 선별된 해양미생물들 중에서 MRSA를 도말한 Mueller Hinton agar (Difco) 배지에 백금선으로 colony를 접종하여 생육저지대 (clear zone)를 형성하는 1종의 균주를 분리하였고 (Fig. 3, A), 보다 확실한 균주 선별을 위하여 분리된 균주를 paper disk 확산법을 이용하여 생육저지대의 형성 유무를 확인하여 (Fig. 3, B), MRSA에 항균활성을 나타내는 균을 최종 선별하였다.

선별된 균주는 그람 음성 간균 (Fig. 4)이며 생화학 test를 수행한 결과는 Table 2와 같다. Xylose, galactose, mannose, glucose, arabinose, arginine, lysine, ornithine, citrate, casein, gelatin 액화능, oxidase, catalase, denitrification 반응에서 양성을 나타내었으나 나머지 반응에는 음성을 나타내었다.

정확한 동정을 위해 16S rRNA gene sequencing 분석을 통한 분자생물학적 동정을 실시하였다. Moyer 등 (1994)에 의해 고안된 degenerate primer를 사용하여 PCR 반응물을 제작하였다. 이를 PCR한 후, 1% agarose gel에서 찾고자하는 16S rRNA의 크기인 약 1.4kb의 band를 확인할 수 있었다. 이들 염기 서열을 분석한 결과는 Fig. 5와 같았으며 계통도를 조사한 결과는 Fig. 6과 같았다. 이상의 내용을 분석한 결과 분리된 균주는 *Pseudomonas*속에 포함되었으며, *Pseudomonas synxantha* (KCCM 12210)와 가장 유사하였으나 생화학적 특성에서 xylose와 arabinose의 이용능에서 상반되는 결과(not dated)를 보였으며 결정적으로 *P. synxantha* (KCCM 12210)는 MRSA (KCTC 40510)에 대한 항균활성물질을 생산하지 않는 것으로 밝혀졌다. 따라서 분리된 균주를 *Pseudomonas* sp. UJ-6라고 최종적으로 명명하였다.

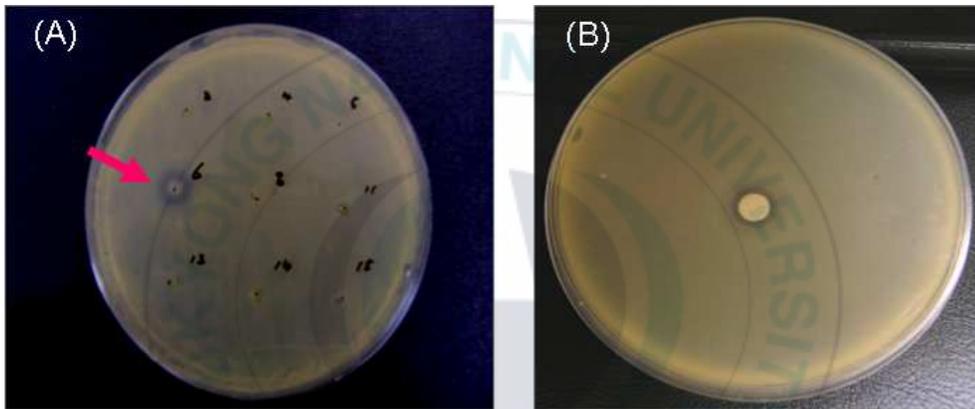


Fig. 3. Inhibitory action of *Pseudomonas* sp. UJ-6 against MRSA (KCTC 40510). (A), First detected clear zone ; (B), Final detected clear zone on paper disc.



Fig. 4. Transmission electron microphotograph of *Pseudomonas* sp. UJ-6.

Table 2. Biological and physiological characteristics of *Pseudomonas* sp. UJ-6.

Test items	Results	Test items	Results
Gram stain	-	Ornithine	+
Xylose	+	MR	-
Fructose	-	VP	-
Rhamnose	-	Indole	-
Galactose	+	Citrate	+
Inositol	-	KIA	K/K
Mannose	+	Casein	+
Mannitol	-	Starch	-
Sucrose	-	Gelatin liquefaction	+
Lactose	-	O/F	+/-
Glucose	+	Oxidase	+
Arabinose	+	Catalase	+
Arginine	+	H ₂ S	-
Lysine	+	Denitrification	+



Fig. 5. Alignment 16S rRNA gene sequences of A, *Pseudomonas synxantha* (KCCM 12210) and B, *Pseudomonas* sp. UJ-6.

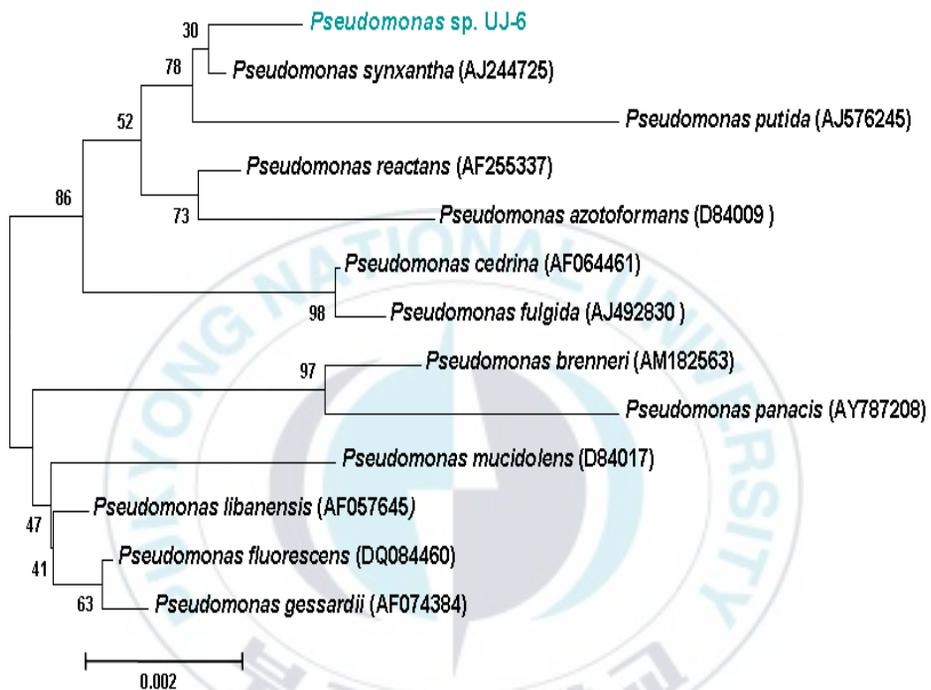


Fig. 6. Phylogenetic tree of *Pseudomonas* sp. UJ-6.

2. *Pseudomonas* sp. UJ-6의 생육 및 항균물질 생산 최적조건

Pseudomonas sp. UJ-6의 생육 및 항균물질 생산에 대한 최적조건을 결정하기 위하여 온도, pH, NaCl 농도에 대한 영향을 알아보았으며, 최적의 조건에서 균의 생육 및 항균활성을 측정된 결과는 다음과 같다.

2.1. 온도의 영향

배양 온도를 4-50℃까지 단계별로 조절하면서 *Pseudomonas* sp. UJ-6의 생육도 및 항균활성을 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. *Pseudomonas* sp. UJ-6는 20-30℃ 범위에서 비교적 높은 증식을 보였으며 최적온도는 25℃ 였다. *Pseudomonas* sp. UJ-6가 증식하면서 생산한 항균물질의 활성을 피검균인 MRSA (KCTC 40510)의 생육저해율로 알아본 결과, 동일한 온도인 25℃에서 84.9%로 가장 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *Pseudomonas fluorescens* S4, *Pseudomonas fluorescens* S65 (김 등, 1996)의 항균물질 최적 생산 조건이 25℃인 것과 유사하였으나, *Pseudomonas aeruginosa* KLP-2 (박 등, 2001), *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM (이 등, 2001), *Pseudomonas reptilivora* (Luis *et al.*, 1972)가 각각 35℃, 30℃, 28℃에서 최적의 생육과 항균물질 생산을 나타내는 것과는 달리 다소 낮은 온도인 것으로 나타났다. 이는 *Pseudomonas* sp. UJ-6가 해양에서 분리되었기 때문인 것으로 사료된다.

2.2. pH의 영향

PPES-II broth의 pH를 4-11까지 단계별로 조절한 후, 배양하여 *Pseudomonas* sp. UJ-6의 생육도 및 항균활성을 측정된 결과는 Fig. 8과 같다. 본 균주는 pH 5-9의 범위에서 활발한 증식을 보였으며 균의 생육과 항균물질 생산에 있어서의 최적 pH는 7로 MRSA (KCTC 40510)의 생육저해율은 87.5%이었다. 이러한 결과는 선행연구의 결과 (김 등, 1996; 박 등, 2001; 이 등, 2001; Luis *et al.*, 1972)가 pH 7에서 가장 높은 생육과 항균물질 생산을 나타낸 것과 동일한 결과였다.

2.3. NaCl의 영향

결정된 온도와 pH 조건으로 배지에 NaCl의 농도를 0-10%까지 달리하여 첨가한 후, 균의 생육도와 항균활성을 측정하여 Fig. 9와 같다. 최적 NaCl의 농도는 1%였으며 NaCl 0-3%까지는 비교적 활발한 성장을 보였다. 항균물질의 활성 또한 1%에서 84.5%로 가장 높게 나타났다. 따라서 본 균주인 *Pseudomonas* sp. UJ-6는 다양한 환경조건에서 적응할 수 있는 해양세균이거나, 육상으로부터 유입되어 해양의 환경에 적응한 세균으로 추정된다.

2.4. 배양시간에 따른 균의 생육과 항균물질의 활성

상기의 실험결과에 의해 결정된 *Pseudomonas* sp. UJ-6의 생육 및 항균물질 생산의 최적조건을 적용하여 3ℓ의 PPES-II broth에 *Pseudomonas* sp. UJ-6를 배양하면서 시간의 경과에 따른 균의 생육도 및 증식하면서 생산한 항균물질의 활성에 대하여 알아본 결과는 Fig. 10과 같다. *Pseudomonas* sp. UJ-6는 0-12시간까지의 유도기와 12-29시간까지의 대수기를 나타내었으며 29시간 이후로 정체기를 보였다. *Pseudomonas* sp. UJ-6가 증식하면서 생산한 항균물질의 활성은 균의 증식이 활발해짐에 따라 함께 증가하는 양상을 보였다.

3. 최소억제농도

Pseudomonas sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics에 대한 MRSA (KCTC 40510)의 tolerance를 평가하기 위하여 macrodilution method (NCCLS, 2002)에 따라 640 $\mu\text{l/ml}$ 에서 10 $\mu\text{l/ml}$ 까지의 농도로 2단 희석하여 최소억제농도 (MIC : Minimal Inhibitory Concentration)를 측정하여 Fig. 11과 같다. MRSA의 증식은 crude antibiotics를 80 $\mu\text{l/ml}$ 의 농도로 첨가한 Mueller Hinton broth에서 현저하게 떨어지는 것으로 나타났으며, 160 $\mu\text{l/ml}$ 의 농도에서는 증식하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 MRSA에 대한 *Pseudomonas* sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics의 MIC value를 160 $\mu\text{l/ml}$ 로 결정하였다.

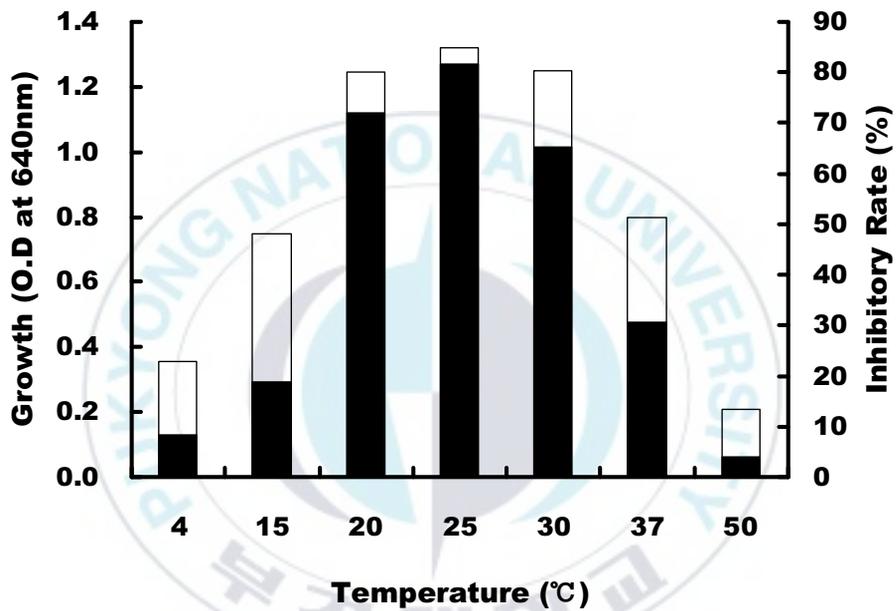


Fig. 7. Effects of temperature on the growth of *Pseudomonas* sp. UJ-6 in PPES-II medium (pH 7, 2% NaCl, 200 rpm) and inhibitory rate of MRSA (KCTC 40510). Black, Cell growth ; white, Inhibition rate.

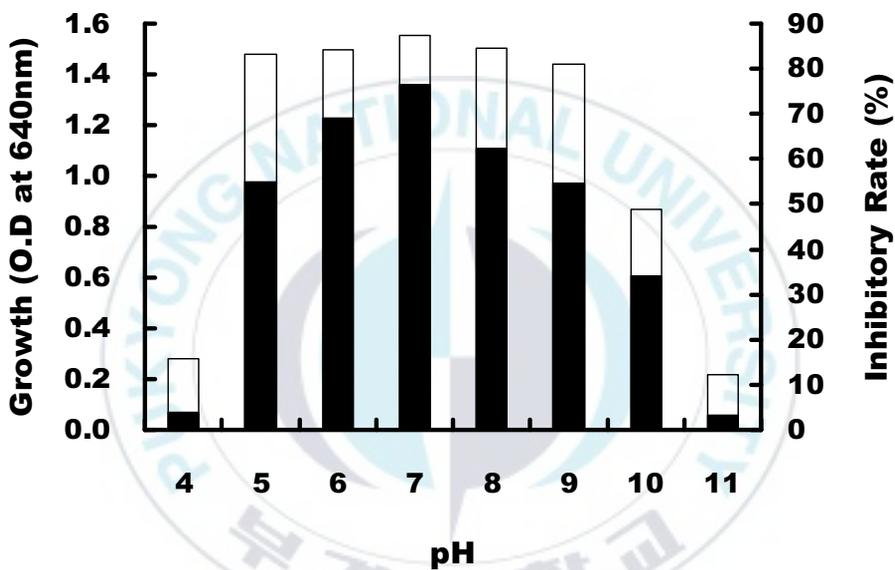


Fig. 8. Effects of initial pH on the growth of *Pseudomonas* sp. UJ-6 in PPES- II medium (25°C, 2% NaCl, 200 rpm) and inhibitory rate of MRSA (KCTC 40510). Black, Cell growth ; white, Inhibition rate.

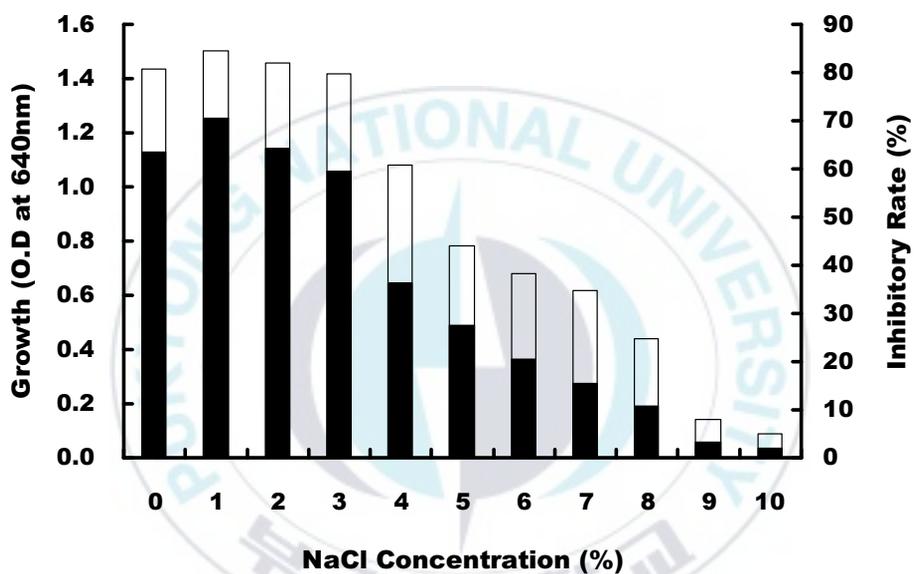


Fig. 9. Effects of NaCl concentration on the growth of *Pseudomonas* sp. UJ-6 in PPES-II medium (25°C, pH 7, 200 rpm) and inhibitory rate of MRSA (KCTC 40510). Black, Cell growth ; white, Inhibition rate.

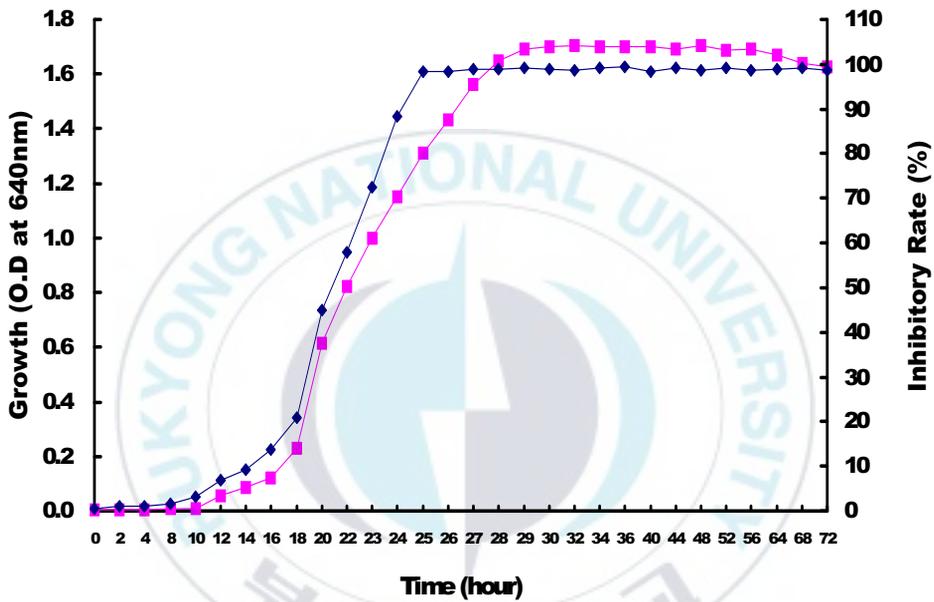


Fig. 10. Time course on the growth of *Pseudomonas* sp. UJ-6 at optimum culture conditions (25°C, pH 7, 1% NaCl, 200 rpm) in PPES-II medium and inhibitory rate of MRSA (KCTC 40510). -■-, Cell growth ; -◆-, Inhibition rate.



Fig. 11. Minimal inhibitory concentration of crude antibiotics against MRSA (KCTC 40510) produced by *Pseudomonas* sp. UJ-6 by macrodilution method. Unit, $\mu\text{l}/\text{ml}$.

4. Crude antibiotics의 적용범위

Pseudomonas sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics의 항균활성 범위를 조사하기 위하여 피검균으로 그람 양성균의 경우, 총 6종 - MRSA (KCTC 40510), *Staphylococcus aureus* (KCTC 1927), *Streptococcus pyogenes* (KCTC 3096), *Enterococcus faecalis* (KCTC 2011), *Bacillus subtilis* (KCTC 1028), *Mycobacterium smegmatis* (KCTC 1057)를 시험하였으며 그람 음성균의 경우, 총 4종 - *Vibrio parahaemolyticus* (KCTC 2729), *Salmonella typhimurium* (KCTC 1925), *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1637), *Escherichia coli* (KCTC 1682)를 시험하였다. 한천희석법 (NCCLS, 2002)에 따라 crude antibiotics를 640 $\mu\text{l/ml}$ 에서 80 $\mu\text{l/ml}$ 까지 희석하여 첨가한 Mueller Hinton agar배지에 상기의 그람 양성균과 음성균을 배양한 colony의 streak 한 후, 균의 증식을 관찰한 결과는 Fig. 12, 13과 같다. 그람 양성균의 경우 80 $\mu\text{l/ml}$ 에서 MRSA (KCTC 40510)의 증식이 control에 비해 현저하게 줄어든 것을 확인하였으며, 160 $\mu\text{l/ml}$ 에서는 MRSA (KCTC 40510)와 *B. subtilis* (KCTC 1028)가 성장하지 않는 것으로 나타났다. 그리고 640 $\mu\text{l/ml}$ 에서는 나머지 4종이 모두 증식하지 않는 것으로 나타나, 결과적으로 *Pseudomonas* sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics는 그람 양성균의 경우 상기의 피검균 6종 모두에 항균활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 그람 음성균의 경우 320 $\mu\text{l/ml}$ 에서 *S. typhimurium* (KCTC 1925), *P. aeruginosa* (KCTC 1637), *E. coli* (KCTC 1682)의 증식이 현저하게 억제되는 것을 확인하였으며, 640 $\mu\text{l/ml}$ 에서는 이들 3종이 모두 증식하지 않는 것으로 나타났지만, *Pseudomonas* sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics는 *V. parahaemolyticus* (KCTC 2729)의 증식에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그리고 그람 양성균의 경우 MRSA (KCTC 40510)가 *S. aureus* (KCTC 1927)보다 crude antibiotics에 더 민감하게 반응하는 것을 확인할 수 있었는데, 이러한 결과는 reengineering된 vancomycin이 기존의 vancomycin에 비해 100배 이상 높은 활성을 나타내는 반면 비내성균에 대한 활성이 떨어지는 결과 (Crowley and Boger, 2006)와 비슷한 이치라고 사료된다. 따라서 이러한 원인을 분석하기 위해서는 *Pseudomonas* sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics의 분리 및 정제뿐만 아니라 구조분석등의 심도있는 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

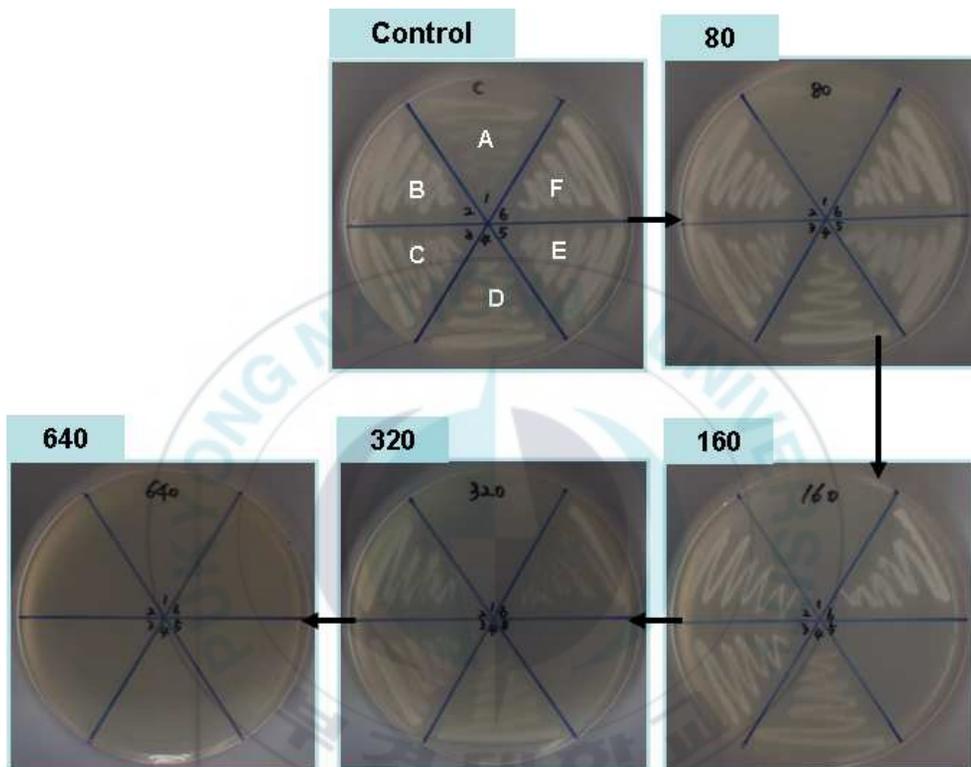


Fig. 12. Antimicrobial activity of crude antibiotics produced by *Pseudomonas* sp. UJ-6 against gram positive strains. A, MRSA KCTC 40510 ; B, *S. aureus* KCTC 1927 ; C, *S. pyrogenes* KCTC 3096 ; D, *E. faecalis* KCTC 2011 ; E, *B. subtilis* KCTC 1028 ; F, *M. smegmati* KCTC 1057 ; Unit, $\mu\text{l/ml}$.

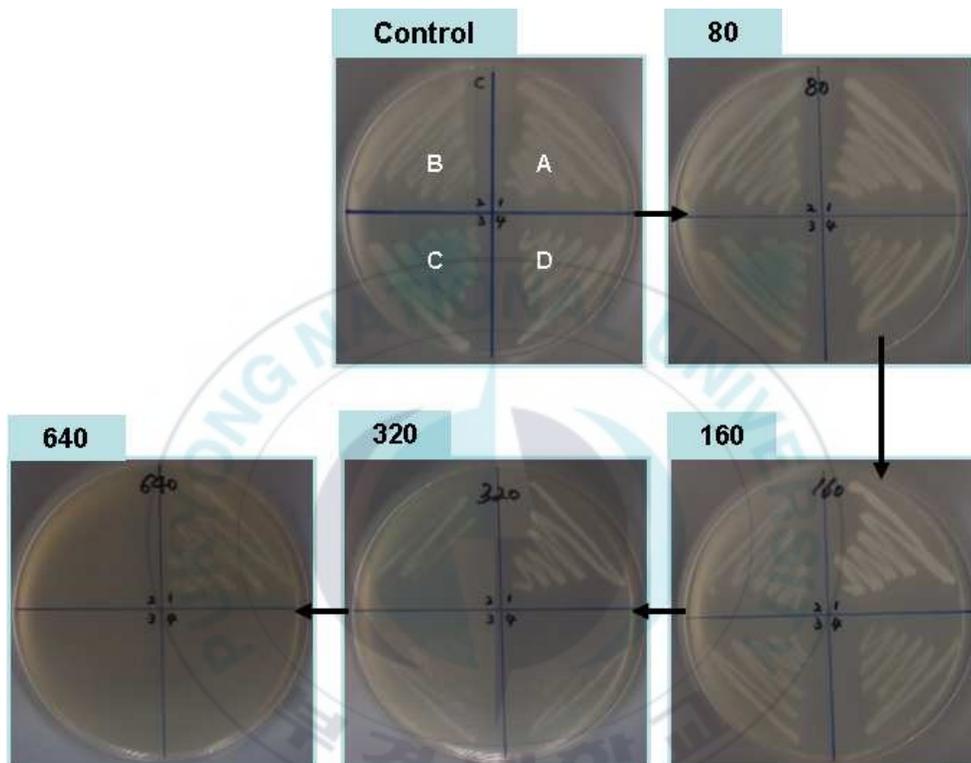


Fig. 13. Antimicrobial activity of crude antibiotics produced by *Pseudomonas* sp. UJ-6 against gram negative strains. A, *V. parahaemolyticus* KCTC 2729 ; B, *S. typhimurium* KCTC1925 ; C, *P. aeruginosa* KCTC 1637 ; D, *E. coli* KCTC 1682 ; Unit, $\mu\text{l/ml}$.

5. Crude antibiotics의 안정성 조사

5.1. pH 안정성

Pseudomonas sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 crude antibiotics를 pH 3에서 pH 10까지 HCl (1N)과 NaOH (1N)를 이용하여 적정하였다. 이를 24시간 동안 실온에서 방치한 후, 항균물질의 잔존 활성을 조사한 결과는 Fig. 14와 같다. Crude antibiotics는 pH 3-8까지의 범위에서는 매우 안정적이었으나 pH 9와 pH 10에서는 항균물질의 잔존활성이 다소 떨어지는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM (이 등, 2001)가 생산하는 항균물질이 pH 3-10까지 안정적인 것에 비해 *Pseudomonas* sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics는 pH 9와 pH 10에서 상이한 결과로 나타났다. 그러나 *Streptomyces* sp. YSK-681 (김 등, 1998)이 생산하는 항균물질의 경우 본 균주가 생산하는 항균물질과 그 양상이 유사하였다. 즉, *Pseudomonas* sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics와 유사하게 산성에서는 안정적이었으나 알칼리에서는 활성이 다소 떨어지는 양상을 보였다.

5.2. 열 안정성

Pseudomonas sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics의 온도에 대한 안정성을 조사하기 위하여 4℃, 25℃, 50℃, 75℃, 100℃, 121℃에서 열처리하여 crude antibiotics의 잔존 활성을 조사한 결과는 Fig. 15와 같다. *Pseudomonas* sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics는 4-121℃까지의 범위에서 활성의 변화가 없었으며 열에 매우 안정적인 것으로 나타났다. 이는 *Streptomyces* sp. YSK-681 (김 등, 1998)이 생산하는 항균물질이 60℃ 이상에서 활성이 약해지는 것에 비해 상당히 안정적인 것이며 *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM (이 등, 2001)이 생산하는 항균물질과 동일한 양상의 결과였다. 기존의 항균제들이 열에 매우 민감하지만 *Pseudomonas* sp. UJ-6가 생산하는 항균물질의 경우에는 열에 안정적인 성격을 보였다. 따라서 보다 발전적인 실험들이 진행된다면 기존의 항균제가 가지는 열에 대한 문제점들을 보완할 수 있을 것으로 생각된다.

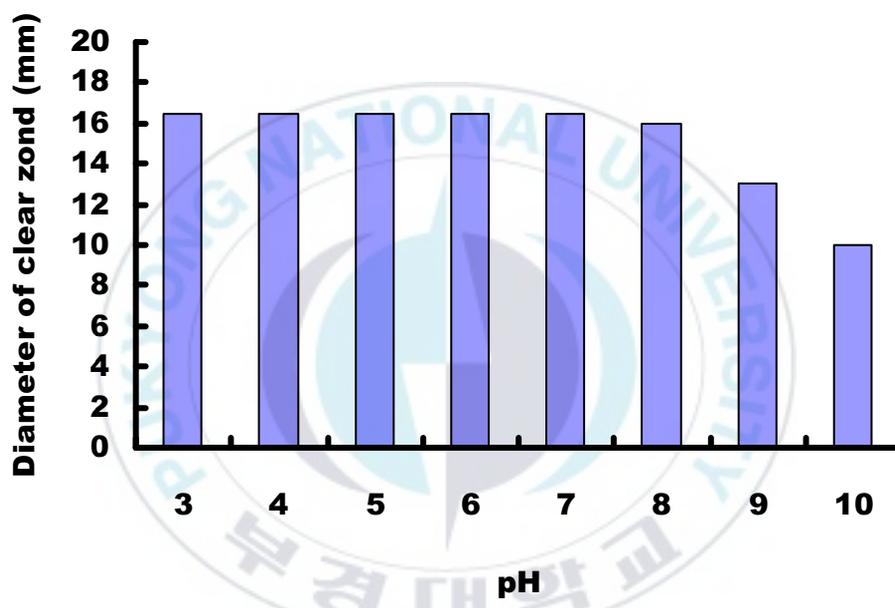


Fig. 14. Effects of pH on the stability of crude antibiotics.

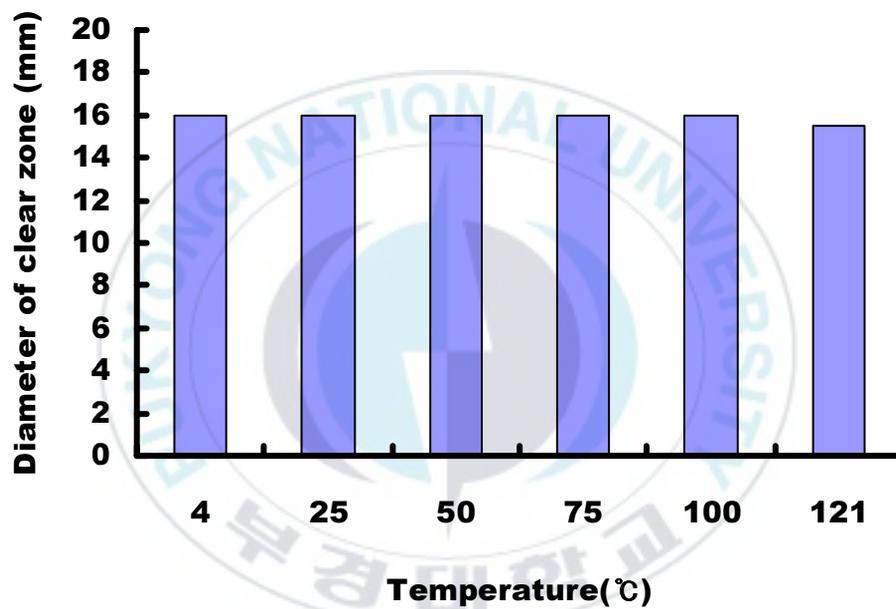


Fig. 15. Effects of temperature on the stability of crude antibiotics .

IV. 요약

MRSA에 항균활성을 나타내는 해양세균을 분리하여 동정하였으며 분리된 균이 생산하는 항균물질을 통하여 MRSA에 감염된 환자의 치료에 사용되고 있는 vancomycin의 대체 치료제의 개발뿐만 아니라 vancomycin과 병용하여 투여함으로써 vancomycin의 사용량을 줄일 수 있는 연구의 기초자료를 제공하고자 연구한 결과는 다음과 같다.

1. 올진 근해에서 1,000여종의 해양세균을 순수 분리하였으며, 이들 세균들의 MRSA에 대한 항균물질 생성능을 disk diffusion method (NCCLS, 2002)에 따른 확인 시험을 통하여 최종적으로 1종을 선별하였다.
2. 항균물질 생산균주의 동정은 형태적, 생화학적 특성과 분자생물학적 방법인 16S rRNA gene sequencing을 통하여 이루어졌고 동정한 결과 *Pseudomonas* 속이었으며, MRSA에 항균물질을 생산하는 균주를 *Pseudomonas* sp. UJ-6로 명명하였다.
3. *Pseudomonas* sp. UJ-6의 생육 및 항균물질 생산에 대한 최적조건은 25℃, pH 7, 1% NaCl이었다.
4. *Pseudomonas* sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics의 MRSA (KCTC 40510)에 대한 MIC (Minimal Inhibitory Concentration)는 160 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 였다.
5. 6종의 그람 양성균과 4종의 그람 음성균을 대상으로 *Pseudomonas* sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics의 항균활성을 조사한 결과, 그람 양성균의 경우 6종 모두에 항균활성을 나타내었으며, 그람 음성균의 경우 4종 중 3종에 항균활성을 나타내었다.
6. *Pseudomonas* sp. UJ-6가 생산하는 crude antibiotics는 4-121℃까지의 온도 범위에서 매우 안정적인 항균활성을 가지며, pH 3-8까지의 범위에서 상당히 안정적이었지만 pH 9과 10에서는 항균활성이 다소 떨어지는 것으로 나타났다.

V. 감사의 글

길고도 짧은 시간이 지났습니다. 어렵고 힘든 순간마다 저에게 많은 힘이 되어주시고 격려를 아끼지 않으셨던 많은 분들이 있었기에 제가 여기까지 올수 있었다고 생각합니다. 그 고마운 마음을 표현하기에는 이 짧은 글로는 부족한 것 같습니다. 고마우신 분도 많고, 걱정을 끼쳐드린 분도 많고, 아무튼 제가 이 논문을 쓰기까지 도움을 주신 분들에 대한 고마운 마음과 아직도 부족함이 많은 죄송스러운 마음을 적어봅니다.

학부과정에서부터 석사 논문이 이렇게 완성되기까지 부족한 저를 끊임없는 이해와 사랑으로 지도 편달을 해주신 이원재 교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 한편으로는 아직도 너무나 부족한 부분이 많아 송구스럽기도 합니다.

부족한 논문을 정성껏 다듬어 주시고 논문수정의 수고를 아끼지 않으신 이명숙 교수님과 김군도 교수님께 감사드리며 학문의 바른길을 제시해 주신 김진상 교수님, 이훈구 교수님, 송영환 교수님, 김영태 교수님, 최태진 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

이 논문이 있기까지 도움과 격려를 아끼지 않으셨던 부산대 강창근 교수님과 수산과학원의 최우정 연구관님, 이원찬 연구관님, 정래홍 박사님, 문효방 박사님, 최민규 박사님, 박성은 박사님, 구준호 박사님, 정대형, 동현, 정길 그리고 선인이라는 회사에서 근무하면서도 항상 정도를 가라고 가르쳐 주셨던 박태준 공장장님, 정성용 과장님, 송병철 과장님께 감사의 말씀을 전합니다.

언제나 친형제처럼 아낌없는 조언을 해주신 전정민 박사님, 이재형 박사님, 강지희 박사님, 최용운 선배님 그리고 밤이 늦도록 실험에 도움을 주시고, 함께 의논해 주셨던 이대성 선배님, 서용배 선배님, 윤숙, 귀찮고 귀찮은 일 마다않고 도와준 진희, 혜리, 은주, 현순, 영주, 고은 후배님, 7호관 3, 4층을 오가며 실험할 때 많이 가르쳐주시고 도와주신 정환형, 인영형, 수정, 상은, 태혁 후배님 등 미생물학과 대학원생들과 실험실에 계신 모든 분들께도 감사의 말씀을 전합니다. 항상 나의 든든한 힘이 되어 주었던 종오형과 97학번 동기들에게도 고맙다는 말을 전합니다. 그리고 함께 좋은 추억을 만들었던 재성형, 우성형, 회정, 민, 현연에게도 감사하다는 말을 전합니다.

마지막으로 오늘의 제가 있기까지 저를 지켜봐주시고 격려해 주신 부모님과 가족들 그리고 항상 용기를 북돋워준 사랑스런 현옥에게 이 조그마한 결실을 바칩니다. 끝으로 이 모든 영광을 하나님께 드립니다.

VI. 참고문헌

- 김교창, 도대홍, 김도영. 1996. 채소연부병균 *Erwinia herbicola*의 생육억제균 분리 및 특성. *Korean J. Food & Nutr.*, 9: 275-280.
- 김미나, 정재심, 김봉철. 1993. 원내 감염과 원외감염에서 분리된 원인균의 항균제 감수성 비교. *감염*. 25: 333-42.
- 김중배, 이동희, 신운섭, 고춘명. 1998. 메치실린 내성 포도상구균에 유효한 항생물질을 생산하는 *Streptomyces* sp. YSK-681의 분리 및 수리 동정. *Korean J. Food & Nutr.*, 11: 340-346.
- 박은희, 차인호, 이상준. 2001. 냉각탑수에서 분리한 *Pseudomonas aeruginosa* KLP-2 배양여액의 *Legionella pneumophila*에 대한 항균활성. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 127-133.
- 이경민, 이오미, 차미선, 박은희, 박근태, 손홍주, 이상준. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM에 의한 환경친화적 항균물질의 생산과 특성. *한국환경과학회지*. 11: 33-40.
- 이경원, 정윤섭, 권호현. 1993. 임상검체에서 분리된 세균의 항생제 감수성. *대한화학용법학회지*. 11: 158-68.
- 조동택. 1995. 병원 내 감염 원인균으로서 Methicillin-내성 황색포도상 구균의 중요성. *감염*. 27: 11-3.
- 홍사석. 1992. 이우주의 약리학 강의. 의학문화사. 서울.
- Atsushi, T., O. Ryoichi, Y. Takashi, Y. Horuo, K. Shichi, I. Matsuhisa and M. Susumu. 1988. In vitro and in vivo antibacterial activities of MEI1207, a new oral cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32: 1421-26.
- Beck, W. D., B. Berger-Bachi and F. H. Kayser. 1986. Additional DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of mec. specific

- DNA. J. Bacteriol., 165: 373-78.
- Benson, H. J. 1990. Microbiological Applications ; A Laboratory Manual in General Microbiology, 5th ed. Wm. C. Brown Publishers.
- Boyce, J. M. and A. A. Medeiros. 1987. Role of β -lactamase in expression of resistance by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., 31: 1426-28.
- Bradley, S. F., M. S. Terpenning, M. A. Ramsey, L. T. Zatins, K. A. Jongensen, W. A. Sottile, D. R. Schaberg and C. A. Kauffman. 1991. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Colonization and infection in a long-term care facility. Ann Intern Med., 115: 417-22.
- Brown, D. F. and P. E. Reynold. 1980. Intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus* FEBS. Lett., 122: 275-78.
- Buck, J. D. and R. C. Cleverdon. 1960. The spread plate as a method for enumeration of marine bacteria. Limnol. Oceanogr., 5: 75-80.
- Crowley B. M. and L. Boger. 2006. Total synthesis and evaluating of [Ψ [CH₂NH]Tpg⁴]vancomycin aglycon: reengineering vancomycin for dual D-Ala and D-Ala-D-Lac binding. J. Am. Chem. Soc., 128: 2885-2892.
- Gerhardt, P., R. G. Murray, E., R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips. 1981. Manual of method for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Haley, R. W., A. W. Hightower, R. F. Khabbaz, C. Thomsberry, W. J. Martone, J. R. Alten and J. M. Hughes. 1982. The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in United States hospitals. Possible role of the house staff-patient transfer circuit. Ann Intern Med., 97: 297-308.
- Harold, C. N., N. Andrea and N. Nai-Xun. 1989. In vitro activity and β -lactamase

- stability of new carbapenem SM-7338. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33: 1009-19.
- Hartman, B. J. and A. Tomsz. 1984. Low affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 158: 513-16.
- Ishii, T., Y. Takayama, Y. Takase and Y. Onikasa. 1994. Antibacteriological activities of arbekacin and vancomycin against strain of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Jpn. J. Antibiot.*, 47: 647-54.
- Jawetz, E., J. L. Melnick and E. A. Adelber. 1987. The *Staphylococci*. In review of medical microbiology, 17th ed. p. 217-222.
- John, C. S. 1982. *Medical Microbiology*, 2th ed, Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, p. 189-198.
- Jonge, B. L. M., Y. S. Chang, D. Gage and A. Tomasz. 1992. Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *J. Biol. Chem.*, 267: 11248-54.
- Kimito, U., H. Muneo, Y. Masuhiro, N. Katsuyudi, F. Yasuo, T. Keiko, K. Masatoshi and M. Susumu. 1990. In vitro activity of LJC10627 a new carbapenem antibiotics with high stability to dehydropeptidase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34: 794-1000.
- Kozarsky, P. E., D. Rimland, P. M. Terry and K. Wachsmith. 1986. Plasmid analysis of simultaneous nosocomial outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Control*, 7: 577-81.
- Kreiswirth. B., J. Kornblum. R. D. Arbek, W. Eisner, J. N. Maslow, A. McGeer, D. E. Low and R. P. Novick. 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science*, 259: 227-30.

- Lorian, V. 1991. Antibiotics in laboratory medicine. Bryan, L. E. and A. J. Godfrey. 3rd ed., Chap. 16, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Luis, A. D. R., J. Olivares, M. C. Blesa and F. Mayor. 1972. Antibiotics from *Pseudomonas reptilivora*. Antimicrob. Agents chemother., 2: 186-188.
- Lyon, B. R., W. M. Jhon and R. A. Skurray. 1983. Analysis of plasmid in nosocomial strain of multiple-antibiotics resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., 23: 817-826.
- MacFaddin, J. F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Matsuo, K. and T. Uete. 1994. Clinical laboratory approach to evaluate administration doses of arbekasin. Jpn. J. antibiot., 47: 1041-52.
- Matthews, P. and A. Tomasz. 1990. Insertional inactivation of the mec gene in a transposon mutant of a methicillin-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents chemother., 34: 1777-79.
- Murakami, K., W. Minamide, K. Wada, E. Nakamura, H. Teraoka and S. Watanabe. 1991. Identification methicillin-resistant strains of *Staphylococci* by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 29 (10): 2240-2244.
- Okazaki, T. 1987. Rare *Actinimycetes*-new breed of *Actinomycetes*. J. Microorganism, 3: 453-61
- Pappler, H. J. and D. Perlman. 1979. Microbial Technology. Vol. 1, Academic Press, New York.
- Patel, A. H., T. J. Foster and P. A. Patteer. 1989. Physical and genetic mapping of the protein A gene in the chromosome of *Staphylococcus aureus* 8325 J. Gen. Microbiol., 135: 1799-1807.

- Peacock, J. E., F. J. Marsik and W. P. Wenzel. 1980. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* introduction and spread with in a hospital. Ann. Intern. Med., 93: 536-32
- Seong, C. S. 1997. Identification of microorganism responsible for anaerobic degradation of pentachlorophenol using RFLP analysis of PCR amplified 16S rDNAs. Ph. M. thesis, Inje Univ.
- Song, M. D., M. Wachi, M. Doi, F. Ishino and M. Matsubishi. 1987. Evolution of an inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS lett., 221: 167-71.
- Suzuki, H., Y. Nishimura and Y. Hirota. 1978. On the process of cellular division in *Escherichia coli*. a series of mutants of *E. coli* altered in the penicillin-binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75: 664-68.
- Taga, N. 1968. Some ecological aspects of marine bacteria in the Kuroshio current. Bull. Misaki Mar. Biol. Kyoto Univ., 12: 50-76.
- Thompsoa, R. L., I. Cabezond, R. P. Wenzel. 1982. Pidcruidogy of nosocomial-infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann. Intern. Med., 97: 309-17.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard. 2nd ed. Pennsylvania, NCCLS: M31-A2.
- Ubukata, K., N. Yamashita and M. Konno. 1985. Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococci*. Antimicrob. Agents Chemother., 27: 851-57.
- Varald, P. E., P. Cipriani, A. Foca, C. Greaci, A. Giordano, M. A. Madeduu, A. Oris and P. Roselli. 1984. Identification, clinical distribution and 18 additional antibiotics of clinical *Staphylococcus* isolate nationwide investigation in Italy. J.

Clin. Microbiol., 19: 838-843.

Voss, A., D. Milatovic, C. Wallrauch-Schwarz, V. T. Rosdah and I. Braveny. 1994. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 13: 50-5.

Yamaguchi, S., M. Sibata and H. Takeo. 1994. In vitro combined effect of clindamycin and imipenem against of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Agents Chemotr., 42: 605-9.

Yasuhiro, M., W. Yuji, S. Hiroshi, H. Kazuo, K. Kyoichiro, T. Shuichi and M. Yoshimi. 1993. Excellent activity of FK037 a novel parental broad-spectrum cephalodporin against methicillin-resistant *Staphylococci*. J. Antibiot., 46: 99-119.

