

방선균이 생산하는 Cephalosporin 내성 병원성 *Pseudomonas*에 유효한 항생물질

방 병 호 · 하 병 조
서울보건대학 부설 보건과학연구소

An Antibiotic from Actinomycetes Becoming Effective for Cephalosporin Resistant Pathogenic *Pseudomonas* sp.

Byung-Ho Bang and Byung-Jo Ha
Institute of Health Research, Seoul Health College

Abstract

We isolated actinomycetes LAM-98-80 as strain producing an effective antibiotic for cephalosporin resistant pathogenic *Pseudomonas* sp. and identified as *Streptomyces* sp. LAM-98-80 from cultural and physiological characteristics. We investigated the optimal culture conditions for production of an antibiotic becoming effective for cephalosporin-resistant pathogenic *Pseudomonas* sp. It was found that 1.5% soluble starch and 1.0% yeast extract were good as carbon and nitrogen source, respectively. The production of antibiotic was also activated by 0.04% Mn^{2+} as 80% degree. The optimum initial pH on production of antibiotic was pH 7.0. The culture condition for the maximal productivity of the antibiotic was at 30°C for 5 days. The cephalosporin-resistant pathogenic *Pseudomonas* sp. as test bacteria was revealed to resist antibiotic of cepha families, but revealed to not resist those of β -lactam families, ampicillin and amoxicillin. Partial purified antibiotic was stable for the pH from 3 to 9, and was also stable when treated at 70 °C for 1 hour. This antibiotic was effective against all gram positive and negative bacteria but was not effective against molds and yeasts.

Key words : antibiotic, pathogenic *Pseudomonas* sp., cephalosporin-resistant bacteria.

서 론

세팔로스포린계 항생물질은 세계 항생제 시장에서 매출규모가 아주 크고 널리 쓰이고 있는 페니실린계열 항생제보다 안정성이 높고 항균작용범위가 넓다¹⁾. 그러나 병원성 *Pseudomonas*가 이 계열의 항생물질에 내성을 갖는 균이 발견되고 있어 문제가 되고 있다^{2,3)}.

*Pseudomonas*는 Gram(-)의 호기성 간균으로 각종 항생물질에 대한 내성을 가진 기회감염균으로 인체의 면역저항성이 약해졌을 경우 병원균으로 전환하며 대부분이 병원성을 가지고 있다⁴⁾. 병원성 *Pseudomonas*는 모든 만성적인 질병을 갖은 환자나 심한 부상을 입은 환자 등에 감염되었을 경우 생명을 위협할

수 있다. 그래서 β -lactam계 항생물질과 quinolones로 치료하고 있으나 근래에 들어서 이들 약제에 내성을 갖은 균들이 출현빈도가 계속 높아져서 치료에 많은 어려움이 따르고 있다.

항생물질의 생산은 영국의 Alexander Fleming경⁵⁾이 처음으로 *Penicillium notatum*으로부터 Penicillin을 발견한 이후 많은 항생물질이 발견, 개발되었으나 이들의 남용으로 내성균이 속출되기 시작하였으며 penicillin의 내성은 penicillinase를 분비하는 황색 포도상구균이 출현한 이후 methicillin이 개발되었으며 불과 2년만에 methicillin내성 황색 포도상구균의 발견이 보고되었으며⁶⁾ 내성균 출현에 대응한 항생물질은 1960년경부터 포도상구균에 유효한 methic-

Corresponding author : Byung-Ho Bang

illin, cloxacillin, cephalothin, cephaloridine이 등장하였고 이 약제에 비감수성인 *Pseudomonas* 균을 지표로 한 제2, 3의 세대인 Cephem 계열 항생물질이 개발되었으나 오히려 내성균주는 증가되었다⁷⁾.

MRSA 내성 *Staphylococcus aureus*에 대해 효과적으로 작용하는 연구는 Katsuhisa⁸⁾ 등과 Ruichi⁹⁾ 등이 *Streptomyces*를 대상으로 연구를 하였으며 Masayuki¹⁰⁾ 등은 *Actinomyces*를 대상으로 연구를 하였다. 그러나 병원성 *Pseudomonas*에 대해 효과적으로 작용하는 항생제 생성에 관한 연구는 국내외로 거의 진무한 상태이다. 따라서 본 연구의 목적은 cephalosporin계 항생물질에 강한 내성을 가지고 있으며 기회균으로 각종 환자에 감염되어 생명에 치명적 악영향을 끼치는 병원성 *Pseudomonas*에 대해 효과적으로 작용하는 항생물질을 개발하기 위한 기초연구로서 방선균을 대상으로 하여 항생물질 생산균을 분리 선별하고, 물질생산 조건을 검토한 후 생산된 항생물질을 조정제하여 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 내성 *Pseudomonas*의 분리

서울시내 각 종합병원으로부터 내성균을 분양받아 제3세대 cepha계 항생물질에 대한 내성이 가장 큰 균주를 Brain-Heart infusion agar 배지에서 2-fold method¹¹⁾로 선별하여 시험균으로 사용하였다. 즉 각 항생물질 농도가 1~500 μ g/ml 되도록 2배씩 계단 희석하여 평판 배지를 만들고 여기에 시험균을 접종하여 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 18시간 배양후 MIC를 측정하였다. 내성균주의 판정은 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)에 준하였다.

2. 방선균의 분리

서울, 경기 일원의 산림 부식토에서 토양을 채취하여 증류수에 현탁하고 상등액 층을 균분리용 기본 배지(soluble starch 1%, peptone 0.1%, yeast extract 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, agar 1.8%, pH 7.0)를 사용하여 3단 희석법으로 접종 배양하였다. 육안으로 형태학적 특성을 관찰하여 방선균이라고 생각되는 균주 약 269종을 분리하였다. 분리된 균주는 oatmeal배지(I.S.P No.3)에 배양하여 냉장고에 보관하고 1개월마다 계대 배양하면서 본 실험에 사용하였다.

3. 항생물질 생성균의 분리

1차 screening에는 항생제를 얻기 위하여 cephalosporins 내성 병원성 *Pseudomonas* sp.를 시험균으로 사용하였으며 먼저 분리용 한천배지 평판상에 직선상으로 접종, 희선배양하고 검정균을 이것과 직각 방향으로 직선상으로 접종하여 37 $^{\circ}$ C의 배양기에서 3일간 배양하였다. 분리주가 시험균에 대해 유효한 항균성 물질을 분비하고 있으면 분리주의 균락 근처에는 시험균이 생육하지 않는다. 이 생육 저지대의 길이로서 각 시험균에 대한 항균력을 추정하였다. 그리고 2차 선별은 Bauer¹²⁾ 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 1차 분리된 균주는 분리용 기본배지에 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 3일간 진탕 배양한 후 거름종이로 여과하였다. 배양 여액 20 μ l를 직경 8mm, 두께 0.5mm의 paper disc에 흡수시켜 실온에서 완전히 건조시킨 후 시험균주를 도말한 Mueller-Hinton agar(Difco)배지에 올려놓고 항생물질이 배지에 확산되도록 냉장고에서 3시간 방치한 다음 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 18시간 배양하여 저지대의 형성이 큰 균주 방선균 LAM 98-80을 2차로 최종선별하였다.

4. 균체량의 측정

배양액을 거름종이로 여과하고 충분한 양의 증류수로 세척한 후 105 $^{\circ}$ C 건조기에서 24시간 건조 후 건조중량(dry cell weight, DCW)을 측정하였다.

5. 항균 활성의 측정

항생제의 항균 활성은 직경 9cm 배양 접시에 15ml의 Mueller-Hinton Agar(MHA)배지를 가하여 굳힌 평판배지에 시험균을 1백금이 현탁한 0.5% 반유동 한천배지를 중층하고 직경 8mm, 두께 0.5mm의 종이 원판(paper disc)에 20 μ l의 시료를 가하고 건조시켜 배지 위에 올려놓고 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 3시간 방치한 뒤 30 $^{\circ}$ C 배양기에서 24시간 배양한 후 형성되는 생육 저지대(clear zone)의 직경을 측정하여 원의 넓이로 환산하였다.

6. 선별 균주의 배양

항생물질을 생산하기 위하여 분리용 기본배지를 100ml 삼각 플라스크에 20ml씩 분주하고 가압 멸균한 후 항생물질 생산균으로 선별된 방선균 LAM 98-80의 포자를 1백금이 접종하고 30 $^{\circ}$ C 배양기에서 2일간 배양하여 종균으로 사용하였다. 항생물질의 생산은 균분리용 기본배지를 100ml 플라스크에 20ml씩 분주하여 121 $^{\circ}$ C에서 15분 가압 멸균한 후 waring

blender로 균질화한 종균 1ml를 접종하여 30℃ 왕복 진탕기에서 3일간 진탕 배양(진폭 7cm, 70 stroke/min)하였다.

7. 방선균 LAM 98-80의 동정

순수분리한 방선균 LAM 98-80은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology¹³⁾에 준하여 동정하였다.

8. 항생물질의 조정제

배양여액을 ethyl acetate로 추출한 물층을 감압 농축하여 용매를 제거하고 Amberlite IRC-50에 흡착하여 0.5N NH₄OH로 용출하여 1N HCl로 중화(pH 7.0)하고 감압농축하여 황갈색의 조정제된 시료를 얻었다.

9. 시약 및 미생물

사용한 모든 시약은 1급내지 특급을 사용하였다. 그리고 *Escherichia coli* ATCC 11105, *Escherichia coli* ATCC 1633, *Pseudomonas aeruginosa* KCCM 27853(Pathogenic), *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750, *Pseudomonas flava* KCTC 1648, *Pseudomonas putida* KCTC 1644, *Pseudomonas fluorescens* KCTC 2344(Pathogenic), *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus haemolyticus* KCTC 3341, *Streptococcus mutans* KCTC 3283, *Streptococcus intermedius* KCTC 3268, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 7091, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552, *Aspergillus niger* IFO 6633, *Aspergillus oryzae* KCTC 1229 등은 한국과학기술원 생명공학연구소 유전자은행에서 구입하여 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 방선균 LAM 98-80 동정

방선균 LAM 98-80을 동정하기 위해 Table 1의 여러 배지에서 21일간 배양하면서 포자의 착생 및 색상, 집락 뒷면의 색, 가용성 색소 등의 배양학적 특성을 조사하였다. Nutrient agar에서의 집락의 형태는 가루 모양(powdery)이었으며, 광학 현미경을 사용하여 400배에서 포자의 연결상태(spore chain)를 조사한 결과 나선형(spiral)으로 나타났다. Nutrient agar에서 집락의 색은 흰색으로 관찰되었고 나머지 대부분의 배지에서의 집락의 색은 회색계통이었다. 가용성 색소는 모두 관찰되지 않았으며 집락뒷면의 색은 inorganic salts-starch에서는 흰색, peptone-yeast extract agar와 nutrient agar에서는 노란색으로 나타났다. 그 밖의 배지에서는 회색계통의 색으로 관찰되었다(Table 1).

생리적 특성의 실험결과 LAM 98-80 균주는 gelatin 액화력은 없었으며 전분과 casein은 잘 분해하였고 최적온도는 30℃, 최적 pH는 7.0으로 나타났다. 그리고 indole과 H₂S는 생성하지 않았고 urease 시험, methyl red 시험, Voges-Proskauer 시험 등은 양성이었으며 citrate을 이용하였고 catalase 생성을 하였으며, 7% NaCl에서 생육하지 못하였다. 또한 Shirling과 Gottlieb의 방법¹⁴⁾에 의해 탄소원의 이용성을 조사한 결과 glucose, sucrose, fructose, rhamnose, arabinose, inositol을 잘 이용하였으나 cellulose, mannitol은 이용하지 못하였다(Table 2). 형태학적, 배양학적 또는 생리학적 성질을 종합한 결과 분리균주 LAM 98-80은 *Streptomyces* 속으로 추정되어 이 균주를 *Streptomyces* sp. LAM 98-80으로 명명하였다.

Table 1. Cultural characteristics of Actinomycetes LAM 98-80

Media	Aerial mass color	Reverse side color	Souble pigment
Tryptone-yeast extract agar	Gray	Yellowish brown	None
Yeast-malt extract agar	Gray	Dark gray	None
Inorganic salts-starch agar	Gray	White	None
Glycerol-asparagine agar	Gray	Brown	None
Peptone-yeast extract agar	White gray	Yellow	None
Tyrosine agar	Gray	Gray	None
Nutrient agar	White	Yellow	None
Potato plug	Gray	Gray	None

Spore chain : Spiral, Light microscope (400×), Colony surface : Powdery, The strain LAM 98-80 was cultured in various of media at 30℃ for 21 days.

Table 2. Physiological characteristics of Actinomyces LAM 98-80

Characteristics	Results
Optimum temperature	30°C
Optimum pH	7.0
Starch hydrolysis	+
Casein hydrolysis	+
Gelatin liquefaction	-
Urease test	+
Indole production	-
H ₂ S production	-
Methyl red test	+
Voges Proskauer test	+
Catalase production	+
Citrate utilization	+
NaCl tolerance	≤7%
◎ Growth on sole carbon source	
D-glucose	+
Sucrose	+
D-fructose	+
Cellulose	-
D-Mannitol	-
Rhamnose	+
L-Arabinose	+
i-Inositol	+

+ utilized, - not utilized

2. 탄소원의 영향

배양 생산성에 가장 중요한 영향 요인인 탄소원은 물질 생합성의 기전에 중요한 요소로 작용하고 대사의 촉진과 저해작용을 나타낸다는 것은 많이 알려져 있다. 미생물의 에너지원 및 물질의 탄소골격의 구조로 사용될 수 있는 적합한 탄소원을 조사하기 위하여 100ml 삼각 플라스크에 항생물질 분리용 기본배지 20ml에 각종 탄소원의 농도가 2%가 되도록 첨가하였다. 선별된 *Streptomyces* sp. LAM 98-80의 종균 1ml를 접종하여 30°C 배양기에서 3일간 진탕배양한 후 항균활성을 조사한 결과, soluble starch가 가장 좋은 탄소원이었으며, mannose, lactose, dextrin, sucrose 등의 순으로 생산성이 낮았다(Table 3).

항생물질 생산에 있어서 탄소원의 영향을 조사한 Ruichi 등⁹⁾은 *Streptomyces* 속을 이용한 MRSA에 항균력을 가진 aldecalmycin 생산에서 2.0% galactose와 2.0% dextrin이 우수한 탄소원이었고, Masayuki 등¹⁰⁾은 방선균으로부터 새로운 naphthoquinone의 생산에서 2%-dextrin과 2.0% glycerol이 가장 우수한 탄소원이었고, Katsuhisa 등⁸⁾은 *Strep-*

Table 3. Effect carbon source on the production of antibiotic

Carbon source	Final pH	Growth(DCW mg/10ml)	Relative activity(%)
Glucose	6.5	53	71
Fructose	7.4	71	67
Mannose	7.6	66	87
Galactose	7.5	48	53
Sucrose	8.7	65	83
Lactose	8.6	54	89
Maltose	7.1	60	72
Raffinose	8.2	58	73
Sorbitol	8.2	50	-
Mannitol	7.8	62	-
Glycerol	8.0	49	-
Dextrin	6.8	42	87
Soluble starch	7.6	74	100

*tomyces violaceusniger*의 항생물질인 BE-24566B의 생산에 사용한 탄소원이 2%의 potato dextrin과 0.2% glucose가 가장 우수한 탄소원이었다고 보고하였다. 이러한 결과 등과 비교하여 볼 때 상이한 결과로 각 균주마다 항생물질 생산에 가장 적합한 탄소원이 각각 다른 것으로 나타났다.

그리고 soluble starch의 최적 농도를 조사하기 위하여 분리용 기본배지에 soluble starch 농도를 0.5%~3.0%까지로 하여 항생물질 생산을 조사한 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 1.5%가 가장 좋았다.

3. 질소원의 영향

세포의 대사 및 성장에 필요한 질소원의 영향을 조사하기 위하여 각종 질소원을 0.5%씩 첨가한 배지에 *Streptomyces* sp. LAM 98-80을 접종하여 각종 질소원이 항생물질 생산과 균체 성장에 미치는 영향을 조사하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 yeast extract가 가장 좋은 질소원이었으며, yeast extract에 비하여 malt extract가 85%, tryptone이 82%의 상대활성을 나타내었다. 무기질소원인 KNO₃에서는 항생물질 생산이 거의 없었으며 그 밖의 무기질소원에서도 본 균이 거의 항생물질을 생산을 하지 못하였다.

Yeast extract의 최적농도를 조사하기 위하여 분리용 기본배지에 yeast extract 농도를 0.1%~2.0%까지로 하여 항생물질 생산을 조사한 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 1.0%가 가장 좋았다.

Table 4. Optimum concentration of soluble starch

Soluble starch concentration(%)	Growth (DCW, mg /10ml)	Final pH	Relative activity (%)
0.5	35	8.4	48
1.0	49	8.3	82
1.5	58	8.3	100
2.0	72	8.2	88
2.5	62	8.0	75
3.0	47	7.7	60

Table 5. Effect of nitrogen source on the production of antibiotic

Nitrogen source	Final pH	Growth (mg /10ml)	Relative activity(%)
Peptone	8.6	49	72
Tryptone	8.7	42	82
CSP	5.6	30	25
Casein	7.9	31	86
Soybean meal	7.5	40	32
Yeast extract	6.7	62	100
Beef extract	7.4	78	83
Malt extract	5.2	39	85
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.4	22	8
(NH ₄) ₂ HPO ₄	6.8	34	14
(NH ₄) ₂ NO ₃	6.0	32	15
KNO ₃	5.1	22	0

Table 6. Optimum concentration of yeast extract

Concentration (%)	Growth (mg /10ml)	Relative activity(%)
0.1	26	5
0.2	39	61
0.5	58	80
1.0	65	100
1.5	52	76
2.0	41	70

4. 초발 pH의 영향

항생물질 생산에 미치는 초발 pH의 영향을 조사하기 위하여 0.1N HCl과 0.1N NaOH를 사용하여 배지의 pH를 조절하고 고압 멸균한 후 30℃ 배양기에 3일간 진탕배양하여 항생물질 생산성을 조사하였다. 그 결과 Table 7에서 보는 바와 같이 pH 7.0에서 가장 많은 항생물질을 생산하였다. pH 6.0과 8.0에서는 pH 7.0과 비교하여 약 평균 88% 정도 밖에

생산성을 나타내지 못하였다. 그리고 pH 4.0이하와 10.0이상에서는 균체 증식도 항생물질 생산도 다같이 저하되는 전형적인 pH곡선을 나타내었다.

Katsuhisa 등⁹⁾은 *Streptomyces violaceusniger*에서 생산되는 MRSA에 항균력을 갖는 BE-24566B의 생산은 최적 pH 7.2, Ruichi 등¹⁰⁾은 방선균에서 aldecalmycin 생산에 pH 7.0, Satoshi 등¹¹⁾은 macrolide 계열의 항생물질인 sporeamicin A의 생산에서 initial pH 7.0, 그리고 Masayuki 등¹²⁾은 pH 7.4로 조절하여 배양하였을 때 가장 높은 항생물질의 생산성을 나타내었다는 보고와 본 실험 결과와 비교하여 볼 때, 약간의 pH 차이가 있지만 중성 부근에서 물질 생산성이 가장 좋았다는 결과와 유사하였다.

5. 배양 온도의 영향

항생물질 생산의 최적 온도를 검토하기 위하여 배양 온도를 15℃에서 40℃까지 달리하여 생산성을 검토하여 본 결과, Table 8에서 보는 바와 같이 30℃에서 가장 생산성이 우수하였으며 균의 성장도 30℃에서 가장 좋았다. 25℃에서는 항생물질 생산이 82% 정도, 35℃에서는 12% 정도 감소되었으며 40℃에서는 24%의 정도 항생물질 생산이 감소되었다.

Table 7. Effect of initial pH on antibiotic production

Initial pH	Growth (DCW mg /10ml)	Relative activity(%)
4	21	0
5	40	64
6	55	91
7	70	100
8	52	84
9	49	62
10	43	0

Table 8. Effect of temperature on antibiotic production

Temperature (°C)	Growth (DCW mg /10ml)	Relative activity(%)
15	23	28
20	35	59
25	60	82
30	65	100
35	62	88
40	51	76
50	10	0

6. 금속염의 영향

금속 이온이 항생물질 생산과 균체 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 분리용 기본배지에 각종 금속 이온을 최종 농도가 0.1mM이 되도록 첨가한 후 배양하여 균체 증식과 항생물질 생산을 측정하였다. 측정 결과 Mn^{2+} 이온이 비첨가구에 비해 약 80% 정도의 항생물질 생산을 증가시켰으며, Fe^{2+} 와 Mg^{2+} 를 첨가한 경우에도 항생물질의 생산이 약간 증가하는 경향을 보였다. Ag^+ 는 본 균의 항생물질 생산을 거의 저해하였다(Table 9).

Mn^{2+} 이온의 최적 농도를 알기 위하여 0.01%~0.1% 농도로 각각 기본배지에 첨가하여 항생물질의 생산성을 검토하였다. Table 10에서 보는 바와 같이 0.04%의 농도에서 최고의 생성을 나타내었다.

7. 배양 일수의 영향

항생물질의 생산은 2차 대사산물이며 1차 대사산물보다는 배양시간이 긴 것으로 알려져 있다. 따라서

Table 9. Effect of metal ion on production of antibiotic

Metal ion (0.1mM)	Growth (DCW mg /10ml)	Relative activity(%)
None	32	100
Na^+	33	111
Li^+	32	102
Ag^+	12	23
Ca^{2+}	56	129
Mn^{2+}	62	181
Fe^{2+}	87	0
Cu^{2+}	30	0
Mg^{2+}	32	114

Table 10. Optimum concentration of Mn^{2+} on production of antibiotic

Concentration(%)	Growth (DCW mg /10ml)	Relative activity(%)
0	31	43
0.01	34	56
0.02	38	67
0.03	47	82
0.04	60	100
0.05	76	96
0.06	68	79
0.07	60	63
0.08	61	51
0.09	57	2

본 실험에서도 최적 생산 조건인 soluble starch 1.5%, yeast extract 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04%, K_2HPO_4 0.05%를 사용하여 initial pH 7.0으로 조절하여 가압 멸균한 후 선별된 균주인 *Streptomyces* sp. LAM 98-80의 종균 1ml를 접종하여, 30°C 진탕 배양기(진폭 7cm, 70 stroke/min)에서 배양하면서 경시적으로 항균활성, 균의 증식 및 pH의 변화를 측정하였다. 배양시간별로 항균력을 조사하여 본 결과 배양 5일만에 균의 증식과 더불어 최대의 활성을 보였으며 시간이 경과할수록 균체량은 점차로 증가하였지만, 항균활성은 변화가 없었다. 배양액의 pH는 배양 4일까지는 조금 내려갔다가 5일부터 다시 중성으로 상승하여 4일째 초발 pH보다 약간 높은 7.5가 되었다. 이와 같은 결과로 볼 때 선별균주 *Streptomyces* sp. LAM 98-80은 증식 연동형 생산 형태(growth-associate product formation pattern)로 항생물질을 생산하는 것으로 인정된다(Table 11).

8. 시험균인 병원성 *Pseudomonas* sp.의 특성

시험균인 병원성 *Pseudomonas* sp.의 cefadroxil monohydrate, cefamandole nafare, cycloheximide, cephaloridine, ampicillin 및 amoxicillin에 대한 내성을 paper disc¹²⁾법으로 조사한 결과는 Table 12와 같다. cepha 계열인 cefadroxil monohydrate, cefamandole nafare, cycloheximide, cephaloridine에는 내성을 보였고 β -lactam계열인 ampicillin 및 amoxicillin에 대해서는 내성을 나타내지 않았다. 시험균의 내성 실험에 사용된 배지 조성은 peptone 0.5%, beef extract 0.3%를 pH 7.0으로 조절 후 agar 1.8%를 첨가하여 사용 하였다.

9. 항생물질의 pH 안정성

조정제된 항생물질의 pH 안정성을 검토하기 위하

Table 11. Effect of culture time on production of antibiotic

Culture time(day)	Final pH	Growth (DCW mg /10ml)	Relative activity(%)
1	6.6	32	0
2	6.0	53	26
3	6.2	70	66
4	6.5	70	90
5	7.1	68	100
6	7.4	67	98
7	7.5	67	94

Table 12. The characteristics of pathogenic *Pseudomonas* sp.

Antibiotic	Resistance
Cefadroxil monohydrate	resistance
Cefamandole nafare	resistance
Cycloheximide	resistance
Cephaloridine	resistance
Ampicillin	sensitive
Amoxicillin	sensitive

The medium for pathogenic *Pseudomonas* sp. was composed of peptone 0.5%, beef extract 0.3%, agar 1.8% (pH 7.0).

Table 13. pH stability of antibiotic

Treated pH	Remaining relative activity(%)
2	85
3	90
4	97
5	99
6	100
7	100
8	100
9	92
10	12

A little sample melted water was treated in each pH value with broad 50mM Davis buffer solution at 37°C for 1 hours and the remaining activity of the sample was measured.

Table 14. Thermal stability of the antibiotic

Treated temperature(°C)	Relative activity(%)
30	100
40	100
50	100
60	98
70	90
80	76
90	49
100	10

Sample was treated at each temperature for 1 hours in 50mM phosphate buffer(pH 7.0), and the residual activity was measured. The solubility of sample was soluble in water, methanol and ethanol and insoluble acetone, ethylacetate, butanol, chloroform and n-hexane.

여 50mM Davis 광역 완충액 1ml과 임의량의 시료를 소량의 물에 녹인 용액 0.5ml을 혼합하여 37°C에서 1시간 처리후 그 잔존 활성을 측정된 결과는 Table 13과 같다. pH 4에서 9까지는 아주 안정하였으며 특히 강산성에서도 15%정도의 활성을 잃었으며

pH 10 이상에서는 거의 활성을 소실하였다.

10. 항생물질의 열 안정성

조정제된 항생물질의 열 안정성을 검토하기 위하여 pH 7.0, 50mM 인산 완충용액에서 30°C~100°C까지 각 온도에서 1시간 처리 후 그 잔존활성을 측정된 결과, Table 14에서 보는 바와 같이 60°C까지는 안정하였으며 그 이상에서는 서서히 그 활성이 소실되어 갔다. 그리고 이 조정제 시료는 물, methanol 및 ethanol에서는 잘 녹았으며 acetone, ethyl acetate, butanol, chloroform 및 n-hexane에서는 불용이었다.

11. 각 균에 대한 항생작용

조정제한 항생물질의 항균범위를 조사하기 위해 여러 종류의 그람 양성균, 그람 음성균, 효모 및 곰팡이에 대한 항균능을 조사하였다. 그람 음성균인 *Escherichia coli* ATCC 11105, *Escherichia coli* ATCC 1633, *Pseudomonas aeruginosa* KCCM 27853(Pathogenic), *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750, *Pseudomonas flava* KCTC 1648, *Pseudomonas putida* KCTC 1644, *Pseudomonas fluorescens* KCTC 2344(Pathogenic)와 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus haemolyticus* KCTC 3341, *Streptococcus mutans* KCTC 3283, *Streptococcus intermedius* KCTC 3268, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 등 그람 양성 및 음성 세균에서는 모두 활성을 나타냈으며 *Candida albicans* ATCC 7091, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552, *Aspergillus niger* IFO 6633 및 *Aspergillus oryzae* KCTC 1229 등과 같은 진균에서는 항균작용이 없었다.

요 약

병원성 *Pseudomonas*에 유효한 항생물질을 생성하는 방선균 LAM 98-80을 분리하여 형태학적, 배양학적, 생리학적으로 동정한 결과 *Streptomyces* sp. LAM 98-80으로 동정·명명하였다.

이 균을 이용하여 병원성 *Pseudomonas*에 유효한 항생물질의 최적 생성 조건을 검토한 결과 탄소원으로 1.5%의 soluble starch, 질소원으로는 1.0%의 yeast extract가 가장 양호하였으며 무기염으로 Mn^{2+} 을 0.04%를 첨가로 항생물질의 생성량을 80%나 증가시켰다. 배지의 초기 pH는 7.0, 최적 온도는

30℃ 그리고 배양일수는 5일만에 최고의 생육 및 생성을 나타내었다.

시험균으로 사용한 cephalosporins 내성 병원성 *Pseudomonas*는 cepha계 항생물질에 대하여 내성을 띠었으며 β -lactam계인 ampicillin, amoxicillin에 대해서는 민감하였다.

그리고 조정제한 항생물질의 열과 pH에 대한 안정성을 검토한 결과 70℃에서 1시간동안 안정하였고 pH 3에서 9까지 넓은 범위에서 안정하였다. 각 종균에 대한 항생작용은 그람 양성 및 음성균에 모두 효과적이었으며 진균인 효모와 곰팡이에는 효과가 없었다.

감사의 말

이 논문은 1998년도 서울보건대학 보건과학연구소 연구비에 의하여 수행된 결과로 이에 감사드린다.

참고문헌

1. 박용춘, 김옥현, 임재원, 김영창 : *Cephalosporium acremonium* 변이주가 생성하는 cephalosporin C의 정제, *한국산업미생물학회지*, 20, 178~182 (1992).
2. 이동준, 이호용, 최영길 : *Pseudomonas aeruginosa*에 의해 생성되는 cephalosporinase의 특성, *미생물학회지*, 24, 302~307 (1986).
3. Josefino, L., Miquel, V., Carmen, C., Frederic, M., Pedro, F.V., Rogelio, M. and Francisc, G. : Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Bacteria, Spain, *The New England of Medicine*, 333, 474~481 (1995).
4. Ernest, J., Joseph, L. and Edward, A : Review of medical microbiology, Lange publishers, p. 211~212 (1994).
5. Pepple, H.J. and Perlman, D. : Microbial Technology, Vol. 1, Academic press, New York, (1979).
6. Henry, F.C. : Methicillin-resistant *Staphylococcus*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 1, 173~186 (1988).
7. Barber, M. : Naturally occurring methicillin-resistant Staphylococci, *J. Gen. Microbiol.*, 35, 183~190 (1984).
8. Katsuhisa, K., Nakajima, A. Fuse, H.S. and Suda, H. : A new antibiotic produced by *Streptomyces violaceusniger*, *J. Antibiotics*, 48, 1506~1508 (1995).
9. Ruichi, S., Takahashi, Y. Itoh, S. Shmanaka, K. Kinoshita, N. Homma, Y. Hamada, M. Naganawa, H. and Sawa, T. : Aldecalmycin, A new antimicrobial antibiotic from *Streptomyces*, *J. Antibiotics*, 47, 1266~1272 (1994).
10. Masayuki, I., Chen, W., Tsuchida, T., Umekita, M., Sawa, T., Naganawa, H., Hamada, M. and Takeuchi, T. : New naphthoquinone antibiotics from *Actinomycetes*, *J. Antibiotics*, 48, 1506~1508 (1995).
11. National committee for Clinical Laboratory Standards : Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, Approved Standard M7-A4, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Millanova Pa (1990).
12. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Turck, M. : Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, 493~496 (1966).
13. Stanley, T. Willians : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Willians and Wilkins, Baltimore (1989).
14. Shirling, E.B. and Gottlieb, D. : Method for characterigation of *Streptomyces* species, *Int. J. System. Bacteriol.*, 16, 313~340 (1966).
15. Satoshi, Y., Morishita, A., Ishizawa, K., Murofushi, S., Hayashi, M. and Mutoh, N. : Spiramycin A, A new macrolide antibiotic, *J. Antibiotics*, 45, 599~605 (1992).

(1999년 6월 2일 접수)