

해양 방선균 유래 항 Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* 물질의 활성 및 상승 효과

Activity of Anti-Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Compound Derived Marine Actinomycetes and Its Synergistic Effect

정성윤*

Seong-Yun Jeong*

교수, 대구가톨릭대학교 바이오메디컬학과, 경상북도 경산시, 38430, 대한민국

Professor, Department of Biomedical, Daegu Catholic University, Gyeongsan 38430, Korea

(Received 24 Nov 2022, Revised 21 Dec 2022, Accepted 30 Dec 2022)

Abstract We isolated marine actinomycetes, strain D-5 which produces anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (anti-MRSA) compound. *Streptomyces* sp. D-5 relatively grew well in the 20~25°C, pH 8.0, and NaCl 3.0%. The ethyl acetate extract of D-5 culture was separated by C₁₈ ODS open column and reverse phase HPLC to yield anti-MRSA compound. The molecular weight of this compound was determined to be 898 by a Liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS). Compared with penicillin G, this compound showed significant anti-MRSA activity. It also exhibited an inhibition zone of 26 mm at a concentration of 64 µg/disk and an inhibition zone of 16 mm at a concentration of 16 µg/disk against the MRSA KCCM 40511. Furthermore, the co-treatment of HPLC peak 5 compound and vancomycin caused a more rapid decrease in MRSA cells than each compound alone. It showed 86.8% growth inhibition activity within 12 hours at a low concentration of 50 µg/mL during co-treatment, and 97.1% growth inhibition activity within 48 hours against MRSA KCCM 40511. Taken together, our results suggest that *Streptomyces* sp. D-5 and its anti-MRSA compound could be employed as a potent agent in MRSA infection.

Keywords : Anti-MRSA activity, Marine actinomycetes, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Purification, Synergistic effect

서론

항생제란 미생물이 생산하는 물질로 다른 미생물의 성장을 저해하여 증식을 억제하거나 사멸시

키는 물질이다. 그러나 항생제의 오·남용은 세균이 항생제 내성을 획득하게 되는 원인이 되어 다제내성균의 출현으로 이어져, 오늘날 모든 국가의 중요한 건강 및 경제 문제로 대두되고 있다[1].

* Corresponding author
Phone: +82-53-850-3772 Fax: +82-53-850-3727
E-mail: jsymicro@cu.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

최초의 항생제는 1928년 Fleming에 의해 발견된 페니실린으로, 1939년 페니실린 G가 임상에서 치료약으로 사용되었으며, 특히 그람 양성 세균에 효과가 있었다. 페니실린이 널리 사용되면서 페니실린 분해효소(penicillinase 또는 β -lactamase)를 가진 세균들이 출현하여, 페니실린에 내성을 가진 PPSA (penicillinase producing *Staphylococcus aureus*)가 나타났다. 이 문제를 해결하기 위해 1959년 페니실린의 분자구조를 변형하여 penicillinase에 가수분해되지 않는 methicillin을 개발하였다. 그러나 methicillin을 사용한 지 1년도 되지 않아 methicillin에 내성을 가지는 황색포도상구균 즉, MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)가 1961년 영국에서 발견되었고, 세계적으로 이 균주에 대한 감염률이 증가되었다[2]. 세계 보건 기구(WHO)가 발표한 새로운 항생제 개발이 필요한 병원체 목록 중에서 MRSA 균주는 일반 대중에게 가장 잘 알려져 있을 것이다[3].

*S. aureus*는 화농성 감염을 일으키는 그람 양성 구균으로 심내막염, 뇌수막염, 폐렴, 골수염 및 패혈증 등의 전신 감염을 일으키는 감염 질환의 원인균이다. MRSA는 methicillin을 분해하는 β -lactamase를 생산하는 것이 아니라, β -lactam 계열 항생물질과 결합력이 약한 새로운 세포벽 합성효소 PBP (penicillin binding protein)를 만들어 내성을 가진다[4]. 이로 인해 MRSA는 methicillin에만 내성을 보이는 것이 아니라 모든 β -lactam계 항생제에 다제내성을 가지게 된다. 또한 의료시설에서 주로 감염을 일으키는 HA-MRSA (hospital acquired MRSA)가 80% 이상인 것으로 보고되고 있다[5]. 특히 병원에서 HA-MRSA는 β -lactam계 항생제 및 여러 계열의 항생제에도 노출되기 쉬우므로 다제내성 MRSA가 출현할 가능성이 더욱 커지게 된다[6].

Streptomyces 속은 다양한 2차 대사산물을 생산

하며 항생물질의 보고이다. *Streptomyces*가 분비하는 최초의 항생제는 streptomycin으로 1943년 Waksman이 발견하였으며 결핵 치료에 효과가 있었다. 이후 *Streptomyces* 속에서 aureomycin, chlortetracycline, erythromycin, gentamicin, kanamycin, lincomycin, neomycin, rifamycin, terramycin 등의 우수한 항생제들이 발견되었으며, 특히 MRSA 치료제인 vancomycin도 *S. orientalis*에서 발견되었다. 현재 상용화된 항생제의 60% 이상을 *Streptomyces* 속이 생산하고 있으며[7], 새로운 항생제 개발원으로서 그 가치가 매우 크다. 지금까지 *Streptomyces* 속에서 유래한 잠재적 항 MRSA 물질은 120여 종 이상이 보고되고 있다. 가장 큰 그룹은 polyketides (PKS) 계열이며, 그 다음이 non-ribosomal peptides (NRPS) 계열이며, 나머지는 alkaloids, PKS/NRPS 및 PKS/terpenoids 계열이다[8].

지금까지 항생물질의 탐색은 토양 미생물을 대상으로 한 연구가 많았으며, 다제내성균을 제어하기 위해서는 새로운 구조와 메커니즘을 가지는 항생물질의 개발이 절실하다. 오늘날, 해양미생물에서 새로운 항생물질들이 많이 발견되어 선진국에서는 해양미생물 유래 천연물을 집중적으로 연구하고 있다[9]. 해양 환경은 일반적으로 독특한 화학 구조를 가지는 방선균 또는 미생물을 보유할 가능성이 큰 잠재적 자원이며[10], 토양에 비해 다양한 환경조건을 가지므로 기존의 항생물질과 다른 구조 및 작용 기작을 가지는 새로운 물질이 발견될 가능성이 매우 높다[11].

따라서 본 연구에서는 해양 방선균 *Streptomyces* 속에 속하는 D-5 균주를 분리하여 그 형태적, 생리적, 생화학적 특징을 조사하였다. 또한 이 균주가 생산하는 항 MRSA 물질을 정제하여 순수 분리하고, 분자량을 측정 후, 항 MRSA 활성을 포함하여 다양한 병원성 세균에 대하여 항균 활성

을 확인하였다. 특히 본 실험에서 분리한 물질과 vancomycin과의 상승 효과를 검토함으로써 항생제 내성을 극복할 수 있는 해결 방안의 기초자료를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 해양 방선균의 분리 및 사용된 표준균주

MRSA를 포함하는 병원성 세균에 대해 강력한 항균 활성을 나타내는 해양미생물 균주를 분리하기 위해, 포항 앞바다의 표층 해수를 멸균된 MB 채수기로 무균적으로 채수하였다. 해수 샘플을 십진희석법으로 희석하여 PPES-II (yeast extract 1 g, proteose peptone 1 g, polypeptone 2 g, soytone 1 g, 0.1% ferric citrate 10 mL, seawater 1 L, and initial pH 7.6) 배지[12]에 평판도말법으로 도말하여 20°C에서 7일간 배양 후, 형성된 특징적인 형태의 colony 들을 모두 선별하였다. 분리한 균주들은 PPES-II 배지에 3차 희석한 후, 단일 집락을 확인하여 순수 분리하였다. 순수 분리한 균주들 가운데 가장 항 MRSA 활성이 우수한 균주를 선별하여 D-5라 명명한 후 본 실험을 수행하였다.

선정 균주의 MRSA에 대한 항균력 측정을 위한 균주들은 Korea Culture Center of Microorganisms (KCCM; Seoul Korea)에서 분양받은 1종(MRSA KCCM 40511)과 동아대학교 병원에서 임상 분리한 MRSA 2 균주(DA 8과 DA 16)를 이용하였다. 또한 Korean Collection for Type Cultures (KCTC; Daejeon Korea) 등에서 pathogenic bacteria 7종을 분양받아 항균 실험을 진행하였으며, 균주들은 다음과 같다; *Aeromonas hydrophila* KCTC 2358, *Bacillus subtilis* KCTC 1028, *Legionella birminghamensis* KCTC 2007, *Shigella flexneri* KCTC 2008, *Mycobacterium smegmatis* KCTC 2002, *Pseudomonas reactants* KCCM 42882, *Klebsiella pneumoniae*

e ATCC 2007. 실험에 사용된 균주들은 nutrient broth (NB; difco, USA)를 사용하여 20°C에서 배양하였다.

2. 항 MRSA 활성 측정 및 우수 균주의 선별

순수 분리한 해양 미생물들의 항 MRSA 활성은 PPES-II 배지에서 배양한 각 미생물 배양액 추출물들을 MeOH에 녹여 disk agar diffusion assay법 [13]으로 측정하였다. MRSA KCCM 40511 균주가 도말된 NA 배지에 각 미생물 배양액 추출물들을 160 µg/disk의 농도부터 2진 희석하여 직경 6 mm의 paper disk에 접종한 후, 20°C에서 48시간 배양 후 생육 저해환 (inhibition zone)의 직경을 측정하였다. 이때 양성 대조군으로 β-lactam계 항생제인 ampicillin (Merck, Germany) 또는 페니실린 G (Merck, Germany) 및 glycopeptide계의 vancomycin (Merck, Germany)을, 음성 대조군으로 동량의 MeOH (Duksan, Korea)를 넣어주었다. 그 결과가 가장 우수한 항 MRSA 활성을 보인 D-5 균주를 선별하여 이후 실험을 진행하였다.

3. D-5 균주의 동정

가장 우수한 항 MRSA 보인 D-5 균주의 동정을 위한 실험 방법은 다음과 같다. 먼저 D-5 균주의 형태적 특징은 ISP (International *Streptomyces* Project) 배지[14], NA 배지 및 modified Bennett's 배지[15] 등에서 20°C에서 7일간 배양하며 관찰하였다. 기증 균사(aerial mycelium)와 기질 균사(substrate mycelium)의 색깔은 ISCC-NBS color charts [16]를 참고하여 결정하였다. 멜라닌 색소(melanin pigments)는 ISP-6 배지에서 관찰하였다.

D-5 균주의 성장에 미치는 최적 온도, pH 및 NaCl 농도를 알아보기 위해 Shirling과 Gottlieb의 방법[14]에 따라 D-5 균주를 ISP-2 배지에서 배양하였다. Urease 활성은 Christensen's medium [1

7]에서 결정하였고, nitrate reduction은 ISP-2 배지에서 Lanyi의 방법[18]에 따라 행하였다. 효소 활성은 API ZYM kits (bioMérieux, France)를 이용하였고, 탄소 이용능은 Shirling과 Gottlieb의 방법[14]에 따라, 각 탄소원을 1% (w/v) 포함하는 ISP-9 배지를 이용하였다. 그 외의 기본적인 실험은 MacFaddin의 방법[19]을 따랐으며 형태적, 생리적, 생화학적 특성들을 종합하여 속 level까지 동정하였다.

4. 항 MRSA 물질의 정제 및 분자량 측정

순수 분리 후 냉장 보관되어 있던 D-5 균주를 ISP-2 (International *Streptomyces* Project-2) 배지에 희석한 후 단일집락을 확인하고, 이를 100 mL의 ISP-2 배지에 접종하여 20°C, 100 rpm으로 7일간 배양하였다. D-5 균주 배양액 20 L를 ethyl acetate (DUKSAN, Korea)와 1:1로 혼합한 후, 이층 분배하여 3회 반복 추출하고 rotary evaporator (Eyela, Japan)로 감압 농축하여 조추출물을 얻었다. 항 MRSA 활성을 나타낸 ethyl acetate 추출액을 C₁₈ ODS open column (DAISO, Japan)으로 분획하였다. 이때 용매는 D.W., 20% MeOH~100% MeOH 및 dichloromethane을 사용하였다. 용출된 분획들 중에서 가장 우수한 활성을 보인 80% MeOH층을 reverse phase HPLC (YMC-Pack SIL, S-5 µm, 12 nm, 10 x 250 mm; 60~100% MeOH flow rate, 1.0 mL/min UV: 210 nm)를 이용하여 물질들을 분리하였다. HPLC peak 5 물질이 가장 우수한 항 MRSA 활성을 보였으며, acetonitrile을 용매로 HPLC를 반복적으로 행하여 재분리하고, 이것이 순수한 물질임을 확인하였다.

최종 정제된 HPLC peak 5 물질의 분자량은 LC-MS (liquid chromatograph-mass spectrometer)로 측정하였다. LC는 Nanospace SI-2 (Shiseido)를, MS는 LCQ Deca xp (Thermo finnigan)를 사용

하였다. 이때 column은 ascentis express C18 (15 cm x 2.1 mm, 2.7 µm, Supelco)을 사용하였고, 용매는 0.1% formic acid를 포함하는 100% H₂O와 100% acetonitrile (ACN)로 flow rate를 100 µL/min으로 보내고, injection volume을 5 µL로 하여 254 nm에서 60분 동안 용출된 용액을 측정하였다. ESI (electrospray ionization) 이온화법으로 positive와 negative 방법으로 분석하였고, mass 범위는 200~2,000 m/z (mass-to-charge ratio)로 하였다.

5. 항 MRSA 활성 및 항균 활성 측정

HPLC peak 5 물질의 본 실험의 표준 균주들에 대한 항 MRSA 활성과 항균 활성을 측정한 실험 방법은 다음과 같다. 먼저 항 MRSA 활성 측정을 위해 MRSA 표준균주인 MRSA KCCM 40511 균주를 포함하여 MRSA 임상 분리 균주들(DA 8과 DA 16)을 최적 조건으로 배양한 후, NA 배지에 100 µL를 도말배양하고 HPLC peak 5 물질 16 µg을 disk에 접종하여 저해환의 크기를 측정하였다. 또한 KCTC 등에서 분양받은 7종의 그람 양성 및 그람 음성의 병원성 세균들에 대한 항균 활성도 상기와 같은 방법으로 비교 측정하였다.

6. Vancomycin과의 상승 효과 검증

HPLC peak 5 물질과 MRSA의 치료제인 vancomycin을 함께 사용하였을 때의 상승 효과를 검증하였다. 실험을 위한 균주의 선별은 HPLC peak 5 물질에 의해 높은 저해 활성이 나타난 MRSA KCCM 40511, MRSA DA 16 및 *Legionella birminghamensis* KCTC 2007 균주를 선택하였다. NB 배지에서 최적 조건으로 배양한 각 표준균주들의 배양액에, HPLC peak 5 물질과 동량의 vancomycin (Merck, Germany)을 1:1로 넣어서 최종 농도가 50 µg/mL가 되게 하고, 48시간 배양하면서 12시간 간격으로 생균수를 측정하였다. 즉 실험은 상기의 균주들이 대

수증식기에 접어들었을 때 각 항균 물질들을 같은 농도로 첨가하여 활성을 비교하였다. 이때 활성 비교를 위해서 β -lactama계 항생제인 페니실린 G (Merck, Germany)와 glycopeptide계의 vancomycin (Merck, Germany)을 각각 최종 농도가 50 μ g/mL가 되도록 넣어주었으며, 음성 대조군으로 동량의 MeOH (Duksan, Korea)를 넣어주었다. 모든 실험은 5회 반복 실험을 통하여 결과값을 산출하였다.

결과 및 고찰

1. 항 MRSA 균주의 선별 및 동정

포항 앞바다의 해수에서 분리된 균주들 중에서 항 MRSA 활성을 나타낸 균주는 모두 8종이었으며, 가장 우수한 활성을 보인 균주를 D-5라 명명하였다. 이 균주는 방선균의 전형적인 특징을 보여주었으며, Shirling 과 Gottlieb [14]과 MacFaddin의 방법[19] 및 ISP 배지에서 나타난 특징을 바탕으로 분석한 이 균주의 형태적, 생리적, 생화학적 특성은 다음과 같다(Table 1).

D-5 균주는 그람 양성의 사상체로 ISP-2 배지에서 기중 균사와 기질 균사의 색깔은 pale yellow였다. ISP-6 배지에서 melanoid를 형성하지 못하였고, 세포벽의 peptidoglycan 구조는 LL-diaminopimelic acid (LL-DAP) type이었다. 또한 gelatin 액화능, L-tyrosine 가수분해능, urease 생산능, casein 분해능 및 질산염 환원능이 있었다. 탄소 이용능은 L-arabinose는 이용하였으나, D-sorbitol과 salicin은 이용하지 못하였고, β -glucosidase 활성이 있었다. 이러한 결과들을 바탕으로 속 레벨까지 동정한 결과 *Streptomyces* 속으로 판단되어 *Streptomyces* sp. D-5로 명명하였다.

또한 D-5의 최적 성장조건을 알아보기 위해 온도, pH 및 NaCl을 농도별로 실험한 결과, 최적 성장 온도는 20~25°C였으며, 최적 pH는 8.0, 최적 NaCl 농도는 3.0%로 나타났다. 또한 pH 5.0에서

Table 1. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of isolate D-5

Tests	Results	Tests	Results
Gram-staining	+	Type of DAP	LL-DAP
Morphology (on ISP-2):		Reduction of nitrate	+
Color of aerial mycelium	Pale yellow	Hydrolysis of L-tyrosine	+
Color of substrate mycelium	Pale yellow	Production of urease	+
Growth at:		Liquefaction of gelatin	+
Temperature range	5~30°C	Degradation of casein	+
pH range	5.0~9.0	Carbon utilization:	
Tolerance on NaCl	0~6.0%	L-arabinose	+
Optimum growth at:		D-sorbitol	-
Temperature	20~25°C,	Salicin	-
pH	pH 8.0,	Enzyme activity (API ZYM):	
NaCl concentration	3.0% NaCl	Trypsin	v
Melanoid formation		β -glucosidase	+
on ISP-6 and 7	-	β -galactosidase	v
		N-acetyl- β -glucosaminidase	v

Note: +, Positive result or growth; -, Negative result or no growth;

v, variable result.

Values in parentheses were read after 5 days.

9.0까지 성장을 보이는 것으로 보아 해양 환경에 잘 적응한 방선균 또는 해양 유래 방선균으로 판단된다.

2. 항 MRSA 물질의 정제 및 활성

Streptomyces sp. D-5 균주를 ISP-2 배지에서 20 L의 용량으로 20°C에서 7일간 배양한 배양액을 원심분리하여 얻은 배양 상등액을 ethyl acetate (E.A.)와 1:1로 혼합한 후, 3회 반복 추출하고 감압 농축하여 E.A. 조추출물 13.6 g을 얻었다. 항 MRSA 활성을 보인 E.A. 조추출물을 C₁₈ ODS open column을 통하여 7개의 분획을 얻었다. 100% MeOH 층 (4.7 g)에서도 약한 활성이 나타났지만, 80% MeOH 층 (1.1 g)에서 가장 높은 항 MRSA 활성이 나타났다. MRSA KCCM 40511에 대하여 80 µg/disk 농도에서 21 mm의 저해환을, 40 µg/disk 농도에서 18 mm의 저해환을, 20 µg/disk 농도에서 13 mm의 저해환을, 10 µg/disk 농도에서 8 mm의 저해환을 보였다(Figure 1).



Figure 1. Anti-MRSA activity of C18 ODS 80% MeOH fraction against MRSA KCCM 40511. The ODS 80% MeOH fraction was purified from ethyl acetate (E.A.) extract. 1, 80 µg/disk; 2, 40 µg/disk; 3, 20 µg/disk; 4,

10 µg/disk.

3. 최종 정제 순수물질의 활성 및 분자량

80% MeOH 층 (1.1 g)을 MeOH를 용매로 reverse phase HPLC를 하여 6개의 peak 분획을 분리하였다(Figure 2). 또한 1차로 분리한 peak 5 분획을 acetonitrile을 용매로 reverse phase HPLC를 반복적으로 행하여 peak 5가 순수물질임을 확인하였으며, 이때 머무름 시간(retention time)은 17.3 분이였다(Figure 3). 이 최종 정제된 순수물질을 HPLC peak 5 물질 (2.3 mg)이라 명명하고 이후 실험을 진행하였다.

HPLC peak 5 물질의 항 MRSA 활성을 측정한 결과는 다음과 같다(Figure 4와 Table 2). MRSA KCCM 40511 균주에 대해서 64 µg/disk 농도에서 26 mm의 저해환을, 16 µg/disk 농도에서 16 mm의 저해환을 나타내었다. 물질의 정제가 진행될수록 점점 높은 활성을 보여주고 있으며, 농도가 높을수록 높은 활성을 보여주었다. 그러나 4 µg/disk의 낮은 농도에서는 활성이 나타나지 않았다.

HPLC peak 5 물질의 분자량을 LC-MS를 이용하여 200~2000 m/z에서 스캔한 결과는 다음과 같다. +ESI 이온화법에서 m/z는 899.3으로, -ESI 이온화법에서 m/z는 897.4로 나타나 분자량은 898로 측정되었다(Figure 5). 본 물질은 1H와 13C NMR (nuclear magnetic resonance) 분석 결과 펩타이드 계열 물질로 추정되나, 향후 2D NMR로 물질구조를 정확히 밝혀야 할 것이다.

4. 항 MRSA 활성 및 항균 활성

상기의 실험 결과로 HPLC peak 5 물질이 MRSA KCCM 40511 표준균주에 대해 항 MRSA 활성이 높은 것을 확인한 후, 임상에서 분리한 MRSA 균주들에 대한 활성도 비교 측정하였다. Methicillin에 저항성을 보이는 임상 분리 균주인 MRSA DA

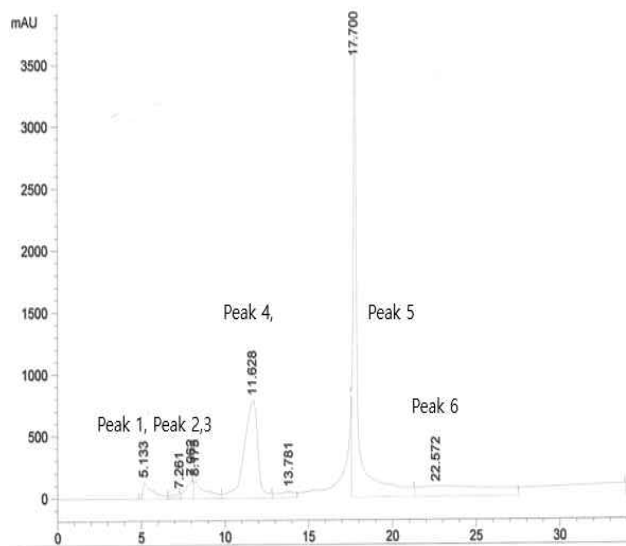


Figure 2. The HPLC chromatogram of ODS 80% MeOH fraction from *Streptomyces* sp. D-5.

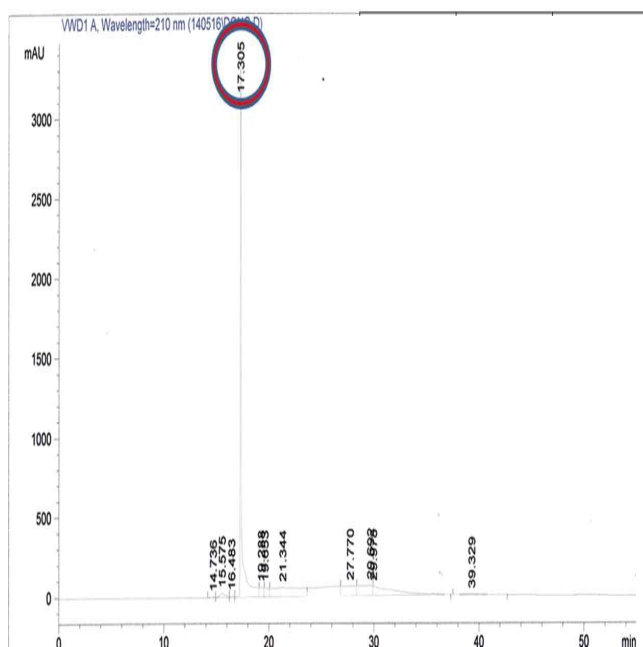


Figure 3. The HPLC chromatogram of HPLC peak 5 compound re-purified by HPLC.

8 균주에 대해 16 µg/disk 농도에서 9 mm의 저해환을, DA 16 균주에 대해 4 mm의 저해환을 보였다(Table 3). 균주에 따라 약간의 차이는 있으나, 비교적 낮은 농도에서도 활성을 보이는 것은 향

후, 항 MRSA 물질 개발의 좋은 재료가 될 것으로 판단된다.

또한 HPLC peak 5 물질이 16 µg/disk 농도에서 병원성 세균들에 대한 항균 활성의 결과도 Tabel 3에 나타내었다. 레지오넬라증을 일으키는 냉방균인 *Legionella birminghamensis* KCTC 2007에 대해 15 mm의 저해환을, 설사를 일으키는 이질균인 *Shigella flexneri* KCTC 2008에 대해 10 mm의

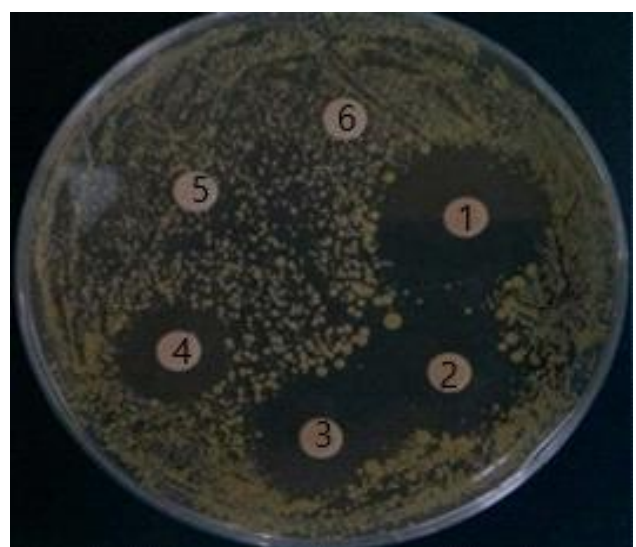


Figure 4. Anti-MRSA activity of HPLC peak 5 compound against MRSA KCCM 40511. The HPLC peak 5 compound was purified by reverse-phase HPLC. 1, 64 µg/disk of peak 5 compound; 2, 32 µg/disk; 3, 16 µg/disk; 4, 8 µg/disk; 5, 4 µg/disk; 6, 2 µg/disk.

Table 2. Anti-MRSA activity of HPLC peak 5 compound of *Streptomyces* sp. D-5 against MRSA KCCM 40511

	Concentration (µg/disk)					
	2	4	8	16	32	64
Inhibition zone diameter (mm) ¹⁾	-	-	14	16	21	26

1) : Disk diameter (6.0 mm) was included.

- : No inhibitory zone was formed.

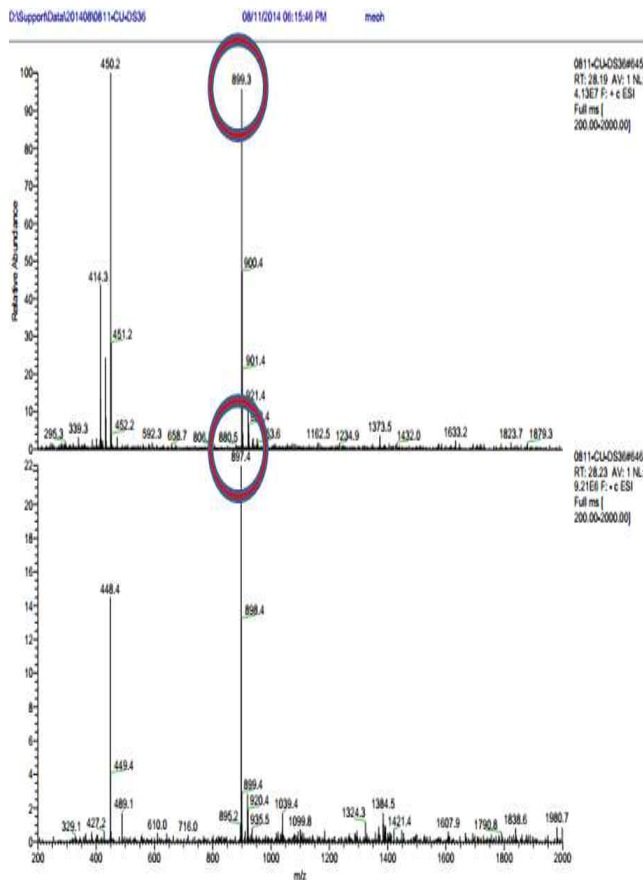


Figure 5. The molecular weight of HPLC peak 5 compound isolated from *Streptomyces* sp. D-5.

저해환을, 폐렴균인 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 2007에 대해 12 mm의 저해환을 보였다. 이상의 결과, 본 실험에서 분리한 물질은 MRSA 3 균주와 병원성 세균 3종에 대해 저해 활성이 뛰어나다는 것을 확인하였다. 그러나 결막염과 홍채염을 유발하는 *Bacillus subtilis*, 결핵균과 유사하지만 치구균인 *Mycobacterium smegmatis*, 출혈성 패혈증을 일으키는 *Aeromonas hydrophila* 및 *Pseudomonas reactants*에 대해서는 16 µg/disk 농도에서 저해환을 형성하지 못하였다. 전체적으로 그람 음성균에 대해서는 대체로 항균 활성을 보이나, 그람 양성균에 대해서는 항균 활성을 보이지 않았다. 이러한 결과는 일반적인 항생제와는 다른 양상으로 새로운 항생제 개발을 위해서는 고무적인 현상으로

Table 3. Antibacterial activity of HPLC peak 5 compound against MRSA (3 strains) and pathogenic bacteria (7 strains). HPLC peak 5 compound was purified by reverse-phase HPLC. 16 µg was loaded on the each disks

Test strains	Inhibition zone diameter (mm) ¹⁾
Gram positive	
MRSA KCCM ²⁾ 40511	16
MRSA DA ³⁾ 8	9
MRSA DA 16	14
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC ⁴⁾ 1028	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i> KCTC 2002	-
Gram negative	
<i>Pseudomonas reactants</i> KCCM 42882	-
<i>Legionella birminghamensis</i> KCTC 2007	15
<i>Aeromonas hydrophila</i> KCTC 2358	-
<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2008	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC ⁵⁾ 2007	12

- 1) Disk diameter (6.0 mm) was included.
 - 2) KCCM: Korea Culture Center of Microorganisms.
 - 3) DA: clinical MRSA isolates from Dong-A University Medical Hospital.
 - 4) KCTC: Korean Collection for Type Cultures.
 - 5) ATCC: American Type Culture Collection.
- : No inhibitory zone was formed.

판단되지만, 더욱 많은 병원성 균주들에 대한 면밀한 검증이 이루어져야 할 것이다.

한편 최근에 Siddharth과 Rai [20]는 해양 방선균 *Nocardioopsis* sp. SCA21이 생산하는 Bis (2-ethylhexyl) phthalate가 300 µg/disk 농도에서 *Bacillus subtilis* ATCC 6633에 대해서 22 mm의 저해환을 MRSA ATCC NR-46171에 대해서 20 mm의 저해

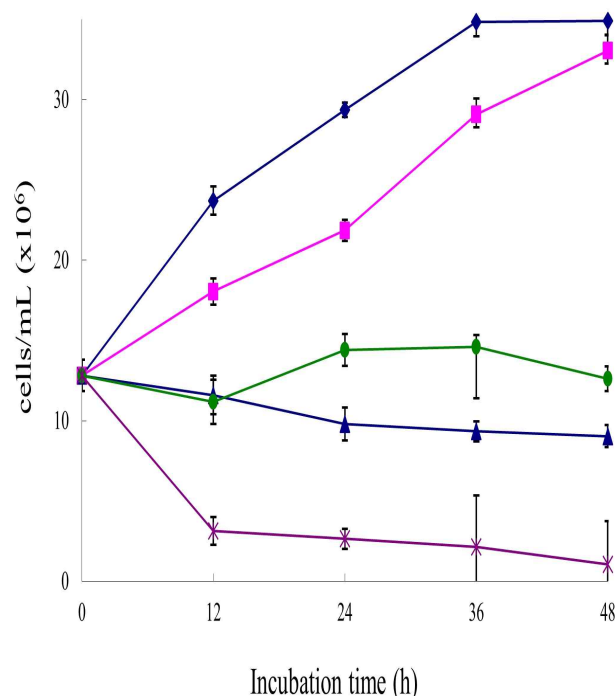
환을 보였으나, *Listeria cytogens* ATCC 13932 및 *Salmonella typhi* ATCC 25241에 대해서는 저해환을 형성하지 못하였다고 보고하였다. 또한 홍해에서(the Red Sea) 분리된 *Streptomyces caelestis* 유래의 citreamicin θ A와 citreamicin θ B가 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 항 MRSA 활성을 보인다는 보고[21]가 있으며, 피지(Fiji)의 해안 퇴적물에서 *Streptomyces* sp. CNT 373로부터 분리된 nosiheptid e가 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 항 MRSA 활성을 보인다는 보고[22]도 있다,

5. Vancomycin과의 상승 효과

Streptomyces sp. D-5의 배양 상등액에서 순수 분리한 HPLC peak 5 물질이 가장 높은 저해 활성을 보인 MRSA KCCM 40511, MRSA DA 16 및 *Legionella birminghamensis* KCTC 2007 균주에 대해서 vancomycin과의 상승 효과를 검증하였다.

우선 MRSA KCCM 40511 균주에 대한 상승 효과를 살펴본 결과는 Figure 6과 같다. MRSA KCCM 40511 균주는 음성 대조군인 MeOH에 전혀 영향이 없었으며, 페니실린 G에도 내성이 있어 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 성장에 영향을 거의 받지 않았다. Vancomycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)은 MRSA KCCM 40511 균주에 대해 약간의 성장 저해 활성은 보였으나, 완전한 사멸능을 보이지는 못했다. HPLC peak 5 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 물질도 성장 저해 활성은 보였지만, vancomycin보다는 조금 약한 활성을 보여주었다. 그러나 같은 양의 HPLC peak 5 물질과 vancomycin을 합쳐서 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 병용 처리하였을 때, 각각의 물질을 단독 처리했을 때보다 우수한 상승 효과를 잘 보여주었다(Figure 6). 즉 병용처리 시 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 낮은 농도에서 12시간 이내에 86.8%의 성장 저해 활성을 보였으며, 48시간 이내에 완전한 사멸을 보이지는 못했지만 97.1%의 성장 저해 활성을 보여주었다. 본 실험에서 분리한 물질

Figure 6. Synergistic effect of HPLC peak 5 compound and vancomycin against MRSA KCCM 40511. Comparison of Anti-MRSA activity of penicillin G, HPLC peak 5 compound, and vancomycin against MRSA KCCM 40511. -◆-, 100% MeOH; -■-, penicillin G (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); -●-, HPLC peak 5 compound (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); -▲-, vancomycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); -X-, HPLC peak 5 compound and vancomycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).



은 vancomycin보다는 활성이 조금 떨어지지만, vancomycin을 보조하는 첨가제로써의 역할은 가능하리라고 판단된다.

그러나 MRSA DA 16 균주에 대해서는 HPLC peak 5 물질이 48시간 이내에 우수한 생육 저해 활성이 관찰되었지만, vancomycin과의 상승 효과에 대해서는 유의한 차이를 확인할 수 없었다(자료 미제시). 이것은 같은 MRSA 균주라도 균주에 따라서 항생물질의 영향이 다르다는 것을 시사하는 것으로, 향후 새로운 항생제 개발을 위해 더욱 많

은 연구가 필요할 것이다. 또한 *Legionella birmin*
ghamensis KCTC 2007 균주에 대해서도 HPLC pe
ak 5 물질은 vancomycin과의 상승 효과를 보이지
못했다(자료 미제시). 그 이유는 HPLC peak 5 물
질 자체는 *Legionella* 세균에 대해서 비교적 우수
한 활성을 보였으나, vancomycin이 그람 음성균
인 *Legionella* 세균에 대한 활성이 낮은 관계로 상
승 효과가 작았던 것으로 판단된다.

기존 항생물질과 새로운 항생물질과의 조합에
의한 상승 효과는 항생물질 개발의 중요한 연구대
상이다[23]. 최근 Cha 등[24]은 cryptotanshinone
과 항생제를 병용처리 했을 때, MRSA에 대한 상
승 효과를 조사하여 ampicillin, oxiccillin 및 vanco
mycin의 각각의 단독 처리 때 보다 병용처리 시
항균 활성의 상승 효과가 높아짐을 보고하였다.

결 론

본 연구의 목적은 항 MRSA 활성을 가지는 해양
미생물을 분리, 동정하고, 항 MRSA 물질을 분리
하여 그 물질의 활성과 상승 효과를 밝히는 것이
다. 본 연구에서 분리한 해양 방선균 D-5 균주는
배양적, 생리적, 생화학적 특성에 기초하여 *Strept*
omyces 속으로 동정되었다. *Streptomyces* sp. D-
5 균주는 전형적인 방선균의 특징을 가졌으며, 그
람 양성의 사상체로 ISP-2 배지에서 기중 균사와
기질 균사를 잘 형성하였다. 또한 melanoid를 형
성하지 못하였고, peptidoglycan 구조는 LL-DAP
type이었다. gelatin을 액화하고 L-tyrosine을 가
수분해하고 urease를 생산하고 casein을 분해하
고 질산염을 환원시켰다. 최적 성장 온도는 20~2
5°C였으며, 최적 pH는 8.0, 최적 NaCl 농도는 3.0%
로 나타나 해양 방선균으로 판단된다.

항 MRSA 물질을 분리, 정제하기 위하여 *Strepto*
myces sp. D-5를 ISP-2 배지에서 7일간 배양하여

배양 상등액을 ethyl acetate로 이층 분배하고, C
₁₈ ODS open column으로 분획한 80% MeOH 층을
역상 HPLC로 최종 정제, 분리하여 HPLC peak 5
물질을 단리 하였다. 이 물질을 LC-MS를 이용하
여 측정된 결과 분자량은 898로 측정되었다.

HPLC peak 5 물질은 MRSA KCCM 40511 균주
에 대해서 64 µg/disk 농도에서 26 mm의 저해환
을, 16 µg/disk 농도에서 16 mm의 저해환을 나타
내었다. 또한 임상 분리 균주인 MRSA DA 8 균주
에 대해 16 µg/disk 농도에서 9 mm의 저해환을,
DA 16 균주에 대해 4 mm의 저해환을 보였다. 더
욱이 16 µg/disk 농도에서 레지오넬라증을 일으키
는 *Legionella birminghamensis*에 15 mm의 저해
환을, 이질균인 *Shigella flexneri*에 10 mm의 저해
환을, 폐렴균인 *Klebsiella pneumoniae*에 12 mm
의 저해환을 보였다.

MRSA KCCM 40511 균주에 대한 상승 효과를 살
펴본 결과, HPLC peak 5 물질은 vancomycin과 병
용 처리하였을 때, 각각의 물질을 단독 처리했을
때보다 우수한 상승 효과를 잘 보여주었다. 즉 병
용처리 시 50 µg/mL의 낮은 농도에서 12시간 이내
에 86.8%의 성장 저해 활성을 보였으며, 48시간
이내에 97.1%의 성장 저해 활성을 보여주었다. 본
실험에서 분리한 물질은 vancomycin보다는 활성
이 조금 떨어지지만, vancomycin을 보조하는 첨
가 항생제로써의 역할은 가능하리라고 판단된다.
이상의 결과 본 연구에서 순수 분리한 항 MRSA
물질인 HPLC peak 5 물질의 구조를 규명하고, 작
용 메커니즘을 밝히고, 기존 항생물질과의 조합에
의해서 MRSA 및 병원성 균주에 대한 항균 활성의
상승 효과를 보다 면밀히 연구한다면 장차 새로운
항생물질 개발의 기초자료로써 활용 가치가 높을
것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2020년도 대구가톨릭대학교 학술연구비 지원에 의한 것이며 이에 감사드립니다(20201204).

References

- Munita, J. M., Arias, C. A. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* 4, doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Davis, S. L., Perri, M. B., Donabedian, S. M., Manierski, C., Robinson-Dunn, S., Hayden, M. K., Zervos, M. J. 2007. Epidemiology and outcomes of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1705-1711.
- Cecchini, M., Langer, J., Slawomirski, L. 2015. Antimicrobial resistance in G7 countries and beyond: economic issues, policies and options for action. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France, pp 13-18.
- Christopher, G. D., Coffey, T. J., Spratt, B. G. 1994. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to β -lactam antibiotics. *Trends Microbiol.* 2, 361-366.
- Chambers, H. F. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg. Infect. Dis.* 7, 178-182.
- Bassetti, M., Nicco, E., Mikulska, M. 2009. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? *Int. J. Am. Agents.* 34, S15-S19.
- Aitken, M. 2015. Global medicines use in 2020. IMS Institute for Healthcare Informatics, NJ, USA, pp 3-8.
- Kemung, H. M., Tan, L. T. H., Khan, T. M., Chan, K. G., Pusparajah, P., Goh, B. H., Lee, L. H. 2018. *Streptomyces* as a prominent resource of future anti-MRSA drugs. *Frontiers Microbiol.* 9, 1-26.
- Proksch, P., Edrada, R. A., Ebel, R. 2003. Drugs from the sea- opportunities and obstacles. *Mar. Drugs.* 1, 5-17.
- Jose, P. A., Jebakumar, R. S. D. 2014. Unexplored hypersaline habitats are sources of novel actinomycetes. *Front Microbiol.* 5, 242.
- Gulder, T. A., Moor, B. S. 2009. Chasing the treasures of the sea-bacterial marine natural products. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 252-260.
- Taga, N. 1968. Some ecological aspects of marine bacteria in the KuroShio current. *Bul. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ.* 12, 65-76.
- Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard eighth edition (CLSI Document M07-A8). Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, NJ, USA, pp 15-41.
- Shirling, E. B., Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16, 313-340.
- Jones, K. L. 1949. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J. Bacteriol.* 57, 141.
- Kelly, K. L., Judd, D. B. 1965. ISCC-NBS color-name charts illustrated with centroid colors. National Bureau of Standards, Washington, DC, USA, pp 20-99.

17. Christensen, W. B. 1946. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bacteriol.* 52, 461-466.
18. Lanyi, B. 1988. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods Microbiol.* 19, 1-67.
19. MacFaddin, J. F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. (3rd eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp 20-928.
20. Siddharth, S., Rai, V. R. 2019. Isolation and characterization of bioactive compounds with antibacterial, antioxidant and enzyme inhibitory activities from marine-derived rare actinobacteria. *Nocardiosis* sp. SCA21. *Microb. Pathog.* 137, 103775.
21. Liu, L. L., Xu, Y., Han, Z., Li, Y. X., Lu, L., Lai, P. Y. 2012. Four new antibacterial xanthonenes from the marine-derived actinomycetes *Streptomyces caelestis*. *Mar. Drugs* 10, 2571-2583.
22. Haste, N. M., Thienphrapa, W., Tran, D. N., Loesgen, S., Sun, P., Nam, S. J. 2012. Activity of the thiopeptide antibiotic nosiheptide against contemporary strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antibiot.* 65, 593-598.
23. Shiota, S. Shimizu, M., Sugiyam, J., Morita, Y., Mizushima. T., Tsuchiya, T. 2004. Mechanisms of action of corilagin and tellimagrandin I that remarkably potentiate the activity of beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* 48, 67-73.
24. Cha, J. D., Lee, J. H., Choi, K. M., Choi, S. M., Park, J. H. 2014. Synergistic effect between cryptotanshinone and antibiotics against clinic methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Evid.-based Complement Altern.* 450572.