

***Streptomyces lydicus* YSK-681이 생산하는 메치실린 내성 황색 포도상구균에 유효한 항생물질의 정제 및 특성**

김중배 · 이동희* · 신운섭** · 고춘명**

상지대병설전문대학 식품영양과, 건국대학교 미생물공학과*,
연세대학교 원주의과대학 미생물학교실**

Purification and Characteristics of an Antibiotic against MRSA from *Streptomyces lydicus* YSK-681

Jung-Bae Kim, Dong-Heui Yi*, Woon-Seob Shin, Choon-Myung Koh****

Department of Food & Nutrition, Sangji Junior College, Wonju 220-702, Korea

**Department of Microbiological Engineering, Konkuk University, Seoul 133-702, Korea,*

***Department of Microbiology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju 220-701, Korea*

Abstract

An antibiotic for methicillin resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) produced by *Streptomyces lydicus* YSK-681 was extracted by chloroform, and then purified by the C₁₈ reversed-phase HPLC and silica gel column HPLC. The molecular weight of the purified antibiotic were determined from the FAB analysis MS as m/z 1022.4 and 1036.4(M+H)⁺, indicating that the isolated antibiotic consisted of two similar compounds with the molecular weight difference of 14 m/z value. With the aid of the various nuclear magnetic resonance(NMR) spectroscopic techniques such as ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT and HMQC spectroscopy, the characteristics of functional groups were deduced as the hydroxyl group and leucine. The MIC values of the purified antibiotic were observed at 1~32 µg/ml against Gram-positive bacteria compared to >125 µg/ml against Gram-negative bacteria or fungi. The antibiotic was active at 8 µg/ml of MIC₉₀ against 129 clinical isolates of MRSA. The antibiotic showed no cytotoxicity against P388, HeLa, and S180 at the concentration of 500 µg/ml.

Key words : antibiotics, MRSA, MIC, *Streptomyces lydicus* YSK-681.

서 론

Penicillin과 streptomycin의 실용화 이후 방선균을 대상으로 새로운 항생물질의 탐색이 시작되어 1940년대 후반에 chloramphenicol, chlortetracycline, oxytetracycline 등이 개발되었고, 1952년 악성 종양 세포에 큰 감수성을 나타내는 actinomycin C, carzinophillin, mitomycin C를 비롯하여 chromomycin, neocarzinostatin, bleomycin, daunomycin, adriamycin 등의 항종양성 항생물질, 1970년대에 들어와서 면역 억제 작용을 갖는 항진균 물질인

cyclosporin A와 rapamycine 등이 개발되었다. 이후 다양한 기능을 갖는 생리 활성물질이 미생물로부터 많이 발견되었고, 이와 관련된 연구가 활발히 진행되어 현재까지 1만 여종의 항생물질이 알려져 있다¹⁾. 최근에는 항암제, 항바이러스제, 면역 억제제 및 증강제, 에이즈 치료제, 그 밖의 고혈압, 당뇨병 치료제 등의 새로운 생리 활성물질이 개발되고 있다²⁾. 그러나 감염증에 사용되는 항균제는 계속되는 감염증의 내성화로 인한 새로운 약제 개발이 요구되는 악순환을 반복하고 있으며, 인간과 미생물 사이에 양보할 수 없는 생존 경쟁을 하고 있다. 특히 메치실린내성 황색

포도상구균(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* : 이하 MRSA)은 methicillin을 분해하는 β -lactamase의 생산이 아닌 β -lactam계열 항생물질과 결합력이 약한 새로운 세포벽 합성 효소(penicillin binding protein, PBP)의 생산에 의하여 내성이 일어나는 것으로 알려져 있다³⁾. 황색 포도상구균은 4종류의 PBP를 갖고 있으며, 분자량의 크기에 따라 PBP 1-4 순으로 명명되어 있다. MRSA는 이들과 다른 종류의 분자량 78,000의 PBP 2'를 생성한다. PBP 2'는 β -lactam계열의 항생물질에 대한 친화성이 낮기 때문에, 다른 PBP가 β -lactam계열 항생물질에 저해를 받아도 세포벽 합성이 가능하다. PBP 2' 유전자는 염색체 상에 존재하지만 본래 가지고 있는 PBP가 변화된 것이 아니고, 외래성 유전자인 것으로 알려져 있다⁴⁾. 근래 여러 약제 남용으로 인하여 MRSA의 분리 비율이 매우 높아지고 있어 이에 대한 대책이 시급한 실정이다⁵⁾. 따라서 본 연구는 이러한 MRSA에 효과적인 새로운 항생물질을 개발하고자 검색 단계에서 임상 가검물에서 분리한 다제내성을 갖는 MRSA를 시험균으로 사용하여 이에 유효한 항생물질을 생산하는 방선균을 토양에서 분리, 선별하였다. 선별된 YSK-681의 배양액으로부터 생산되는 항생물질을 분리·정제하였으며, 이에 대한 물리, 화학적, 생물학적 특성 등을 조사하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 항균 활성의 측정

항균 활성 측정은 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P를 시험균으로 사용하여 paper disc법으로 측정하였다⁶⁾. 즉 15ml의 Mueller-Hinton agar(MH A)배지에 시험균 1백금이를 현탁한 0.5% 반유동 한천배지로 중층하였다. 여기에 20 μ l의 시료를 가하여 건조시킨 직경 4mm의 paper disc를 올려놓고 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 3시간 방치한 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 18시간 배양하여 형성되는 생육 저지대(clear zone)의 직경을 측정하고 정제된 항생물질 표준 그래프와 비교 정량하였다. 최소발육 억제농도(minimal inhibitory concentration, 이하 MIC)와 최소 살균 농도(minimal bactericidal concentration, 이하 MBC)의 측정은 2단 희석법에 의하여 측정하였다⁷⁾.

2. 항생물질의 정제

5 μ l 삼각플라스크에 항생물질 생산 배지인 1% sol-

uble starch, 0.5% peptone, 0.05% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O(pH 8.0) 1 μ l을 넣어 가압 멸균한 후 미리 배양한 종균액 50ml을 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 2일간 진탕 배양(진폭 7cm, 70회/분)하였다. Chloroform을 배양여액의 20%가 되도록 가한 후 2회 반복 추출하여 감압농축하여 소량의 chloroform에 녹인 후 chloroform으로 평형된 silica gel(70~230 mesh, for chromatography, Merck) column에 주입하였다. 200ml chloroform으로 씻고 chloroform : ethylacetate(50 : 50 v/v) 혼합용매로 용출시키면서 분획하였다. 분획한 활성 부분을 모아 speed vac(cold vacuum evaporation)으로 감압 건조 후 chloroform 2ml로 용해시켜 원심 분리하여 상등액을 HPLC(Gilson 505B, France)시료로 사용하였다. Silica gel prep-column(1.0 \times 25.0cm, YMC, Japan)에 500 μ l의 시료를 주입하여 chloroform : methanol(98 : 2 v/v) 혼합용매로 분당 3ml씩 용출시키면서 254nm에서 검출하였다. Silica gel HPLC에서 분리된 활성 부분은 다시 감압 건조시킨 후 50% acetonitrile를 소량 가하여 용해시켰다. 용해된 시료를 원심 분리하여 상등액은 prep-ODS column(ODS AQ, 2.5 \times 25.0cm, 5 μ m, YMC, Japan)을 사용하여 HPLC로 분리하였다. 1회 시료 주입량은 500 μ l이었으며, acetonitrile : water(1 : 1 v/v)혼합용매로 분당 5ml씩 용출시켜 223 nm에서 검출하였다. ODS-HPLC에서 활성 부분을 분취하여 감압농축시킨 후 GPC-HPLC를 사용하여 최종 정제하였다. 사용한 GPC column은 Diol-120 silica column(0.8 \times 50cm, 5 μ m, YMC, Japan)이었으며, acetonitrile : water(3 : 7 v/v) 혼합용매로 분당 1ml씩 용출시키면서 223nm에서 활성물질을 검출하였다. 항생물질 정제 과정은 Fig. 1. 과 같다.

3. 이화학적 성질 및 기기 분석

정제된 본 항생물질의 용해성을 조사하기 위하여 benzene, hexane, chloroform, ethylacetate, acetonitrile, ethanol, methanol, water 등의 용매를 사용하였으며, R_f의 값은 TLC plate(Silica F₂₅₄, Merck)에서 상층 전개법으로, 전개용매는 butanol : formic acid : water(12 : 1 : 1 v/v/v), ethylacetate : 28% ammonia water : acetone(10 : 10 : 8 v/v/v), chloroform : ethylacetate(9 : 1 v/v), chloroform : acetonitrile(8 : 2 v/v), chloroform : methanol(98 : 2 v/v),

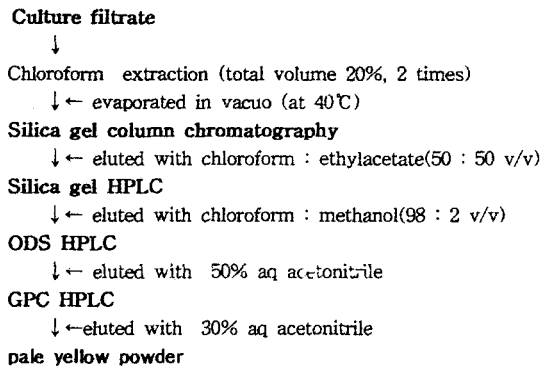


Fig. 1. Purification procedure of the antibiotic from the culture broth of *Streptomyces lydicus* YSK-681.

benzene : acetone(7 : 3 v/v)을 사용하였다. 전개 후 dry oven에서 용매를 건조시켜 UV lamp에서 용매에 대한 이동성을 조사하였다⁹⁾. 본 물질의 구성 성분을 조사하기 위하여 2M TFA(trifluoroacetic acid)를 가하여 100°C에서 2시간 동안 가수분해하여 ninhydrin, DNS, anthrone, diphenylamine, phenol sulfuric acid와 iodine 반응을 조사하였다. 분자량 측정은 3-nitrobenzyl alcohol의 matrix를 사용하여 spectrum type normal ion(MF-linear) mode의 FAB⁺ mass spectrometer(VG-VSEQ, VG analytical, UK)의 positive방법으로 분석하였다¹⁰⁾. 적외선 분석(infrared spectrum)은 유발에 정제된 본 항생물질 3mg과 KBr 20mg을 함께 넣고 혼합하여 가능한 미세한 입자가 되도록 분쇄하였다. 분쇄된 시료 일정량을 취한 후 600kg의 압력을 가하여 지름 10mm의 투명한 원형 pellet으로 성형하여 IR 시료로 하여 FT-IR기기(Shimadzu IFS 40)로 측정하였다. UV-visible spectrum은 acetonitrile 용매에 녹여 파장 190~400nm영역에서 UV-visible spectrophotometer(Shimadzu UV-120A, Japan)를 사용하여 흡수 spectrum을 조사하였다. 광회전성은 정제된 물질 5mg을 acetonitrile 10ml 용액에 녹여 길이 10cm cell에 넣고 20°C에서 나트륨 광원을 사용하여 선광성을 조사하였다¹¹⁾. 융점 측정은 Fisher melting point analyzer를 사용하여 측정하였다. Nuclear Magnetic Resonance(NMR) 분석은 정제된 시료 30mg을 deuterium chloroform(CDCl₃) 용매에 녹여 600MHz의 자기장에서 ¹H, ¹³C, COSY(Correlated Spectroscopy), DEPT, HMQC(Heteronuclear decoupling Multi-Quan-

tum Coherence) NMR spectrum을 조사하였다¹²⁾. 사용 기종은 Bruker model 600이었다. Amino acid 분석은 6N HCl용액 0.8ml를 시료 용기에 가하여 N₂ 가스로 2분 동안 채운 후 110°C에서 24시간 가수분해하여 분석용 ODS column(C₁₈, 4μm, 0.4×15.0cm)를 사용하여 HPLC(Pico-Tag system, Waters) 아미노산 자동 분석기로 254nm에서 17분 동안 용출된 아미노산을 분석하였다¹³⁾.

결과 및 고찰

1. 물질 정제

Streptomyces lydicus YSK-681이 생산하는 MR-SA에 유효한 항생물질의 정제는 항생물질 생산용 액체 배지에 미리 배양한 종균을 5%가 되도록 접종하여 30°C에서 2일간 진탕 배양하여 여과한 후 배양액의 20%가 되도록 chloroform을 가하여 2회 추출하였다. 추출된 활성물질을 감압농축하여 chloroform에 완전히 용해시킨 후 silica gel column으로 활성물질을 분획(8ml/fraction)하였다. 활성 부분을 모아 감압 농축한 후 chloroform 3ml 가하여 용해시켜 silica gel prep-column을 사용하여 HPLC로 분리하여(retention time : 23min) 단일 피크의 옅은 노란색의 활성물질을 얻었다. Speed vacuum centrifuge로 농축한 후, prep-ODS column을 사용하여 HPLC로 분리한 물질은 27.3분에 단일 피크로 분리되었으며, GPC column을 사용하여 HPLC로 최종 분리하였고(Fig. 2), 활성 부분은 18.5분대에 용출되었다. 배양액 10ℓ로부터 최종 정제하여 13mg의 노란색 결정물질을 얻었다.

2. 이화학적 특성

각종 유기용매를 사용하여 용해성을 조사하여 본 결과 chloroform, ethylacetate, acetonitrile, ethanol에는 잘 녹았으나, methanol에 약간, 그 밖의 benzene, hexane, water에는 잘 녹지 않았다. TLC상의 R_f값은 chloroform : methanol(98 : 2 v/v)에서 0.15, benzene : acetone(7 : 3 v/v) 0.27, chloroform : acetonitrile(8 : 2 v/v) 0.34, chloroform : ethylacetate(9 : 1 v/v) 0.47, ethylacetate : ammonia water : acetone(10 : 10 : 8 v/v) 0.56, butanol : formic acid : water(12 : 1 : 1 v/v)에서 0.82이었으며, 자외선 조사(254nm)에서 형광성을 나타내었다. 본 물질의 구성 성분을 조사하기 위하여 2M TFA(100°C, 2 hr)로 가수

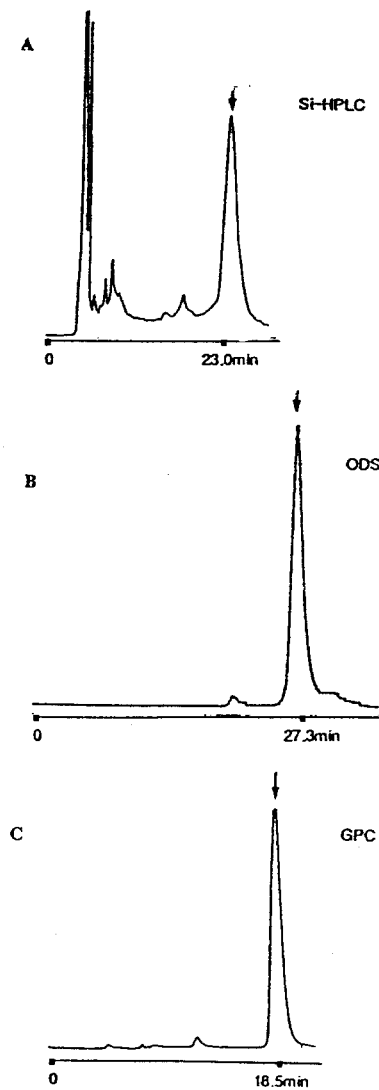


Fig. 2. HPLC chromatograms of the antibiotic.

- A. Column: YMC-pack SIL(1.0×25cm, 5 μ m, 120 Å) Elution solvent: chloroform: methanol (98:2 v/v), Flow rate: 3ml/min, Detection: 254nm.
- B. Column: YMC-pack ODS AQ(2×25cm, 5 μ m, 120 Å) Elution solvent: acetonitrile: water (50:50 v/v), Flow rate: 5ml/min, Detection: 223nm.
- C. Column: YMC-pack Diol-60(0.8×50cm, 5 μ m, 60 Å) Elution solvent: acetonitrile: water (30:70 v/v), Flow rate: 1ml/min, Detection: 223nm.

분해한 후 여러 화학반응 검사를 실시한 결과 ninhydrin과 iodine 반응에서는 양성을 DNS, anthrone, diphenylamine, phenol sulfuric acid 반응에서는 음성으로 조사되었다. 자외선 spectrum에서는 223nm에서 최대 흡광도를 보였으며, 녹는 점(mel-

ting point) 156°C, 선광성(polarity in acetonitrile)은 $[\alpha]_D^{20} +50$ 으로 조사되었다.

기화하기 어려운 유기물질의 이온화 방법으로 많이 사용되는 FAB MS를 사용하여 분자량을 조사한 결과 (M+H)⁺가 m/z 1022.4(P₁), 1036.4(P₂) dalton인 두 개의 물질로 분석되었다(Fig. 3). 두 물질의 차이는 분자량 14, 즉 화학적 구조로 1개의 CH₂ 기(분자량 14) 차이를 보였다¹²⁾. NMR분석은 600 MHz의 자기장에서 ¹H, ¹³C, DEPT, HMQC(Heteronuclear decoupling Multi-Quantum Coherence) NMR spectrum을 조사하였다. ¹H NMR spectrum 분석에서는 4.34~4.68의 R₂CH-O의 H, 5.40~6.16의 olefinic proton 구조가 분석되었다(Fig. 4). ¹³C-NMR spectrum에서는 9.5, 12.6, 20.9, 22.7, 24.3 ppm 부근의 CH₃ 탄소, 36.6, 45.3의 CH₂, 51.7, 69.7, 74.5, 75.6 ppm에서 oxygenate 탄소와 124.1~138.15 ppm의 olefinic 혹은 aromatic에서 유래하는 CH, 그 밖의 수소를 함유하지 않는 탄소가 51.1~59.9 ppm 영역과 136.3, 139.3, 159.7, 169.8, 196.5, 210.8 ppm에서 관찰되었다(Fig. 5). HMQC NMR spectrum의 proton 영역에서는 1.2~1.43에서 CH₂와 CH₃에 결합된 pro-

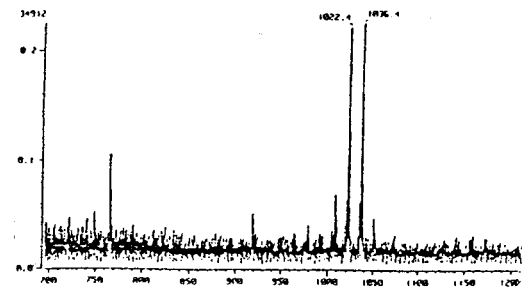


Fig. 3. FAB⁺ mass spectrum of antibiotic in NBA matrix.

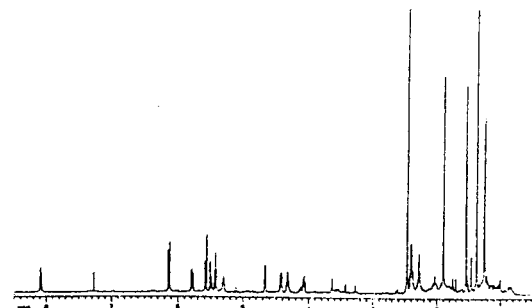


Fig. 4. ¹H-NMR spectrum of the antibiotic. (CDCl₃, 600 MHz)

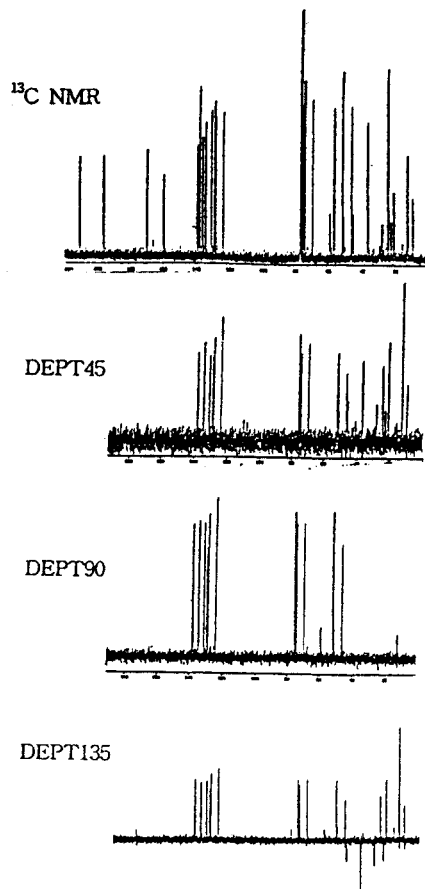


Fig. 5. ¹³C and DEPT NMR spectrum of the antibiotic.(CDCl₃, 600MHz)

ton, 1.5~1.88 ppm에서 CH₃, 2.0에서 CH₃, 2.25~2.50의 CH₂에 결합된 halogen, 4.05~4.45의 R₂CH-O, 4.65 부근과 그 밖의 5.3~6.2 ppm 부근의 alkene으로 추정되는 피크가 조사되었다. 또한 carbon영역(Y축)에서는 9, 12, 22, 25 ppm에서 CH₃, 23, 30, 37, 46 ppm의 CH₂, 47, 51, 70, 74, 76 ppm의 CH, 25~140 ppm 사이에서는 cycloalkene으로 알려진 C, CH가 분석되었다(Fig. 6). DEPT spectrum은 DEPT 45에서 CH, CH₂, CH₃, DEPT 90은 CH, DEPT 135에서는 CH, CH₃이 positive(+), CH₂는 negative(-)의 방법으로 분석하였다. DEPT 90에서 12.67, 46.36, 51.16, 51.73, 59.27, 69.79, 74.51, 75.61, 124.14, 128.54, 129.10, 129.24, 131.21, 134.52, 138.15 ppm에서 15개의 CH구조, DEPT 135의 positive(+)-에서 9.56, 12.67, 12.86, 16.01, 20.91, 24.50 ppm의 CH₃, 22.9, 28.2, 36.4, 46.1 ppm에서 CH₂의 영역에 해당

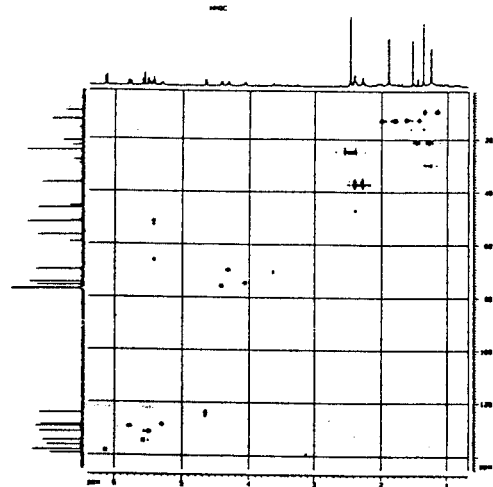


Fig. 6. HMQC NMR spectrum of the antibiotic.(CDCl₃, 600 MHz)

하는 피크가 조사되었다(Fig. 5). 적외선 분석에서는 파장 2887, 2849, 1461, 1337 cm⁻¹영역에서 강한 진동 흡수대를 나타내었다. 2887, 2849cm⁻¹에서 나타난 흡수대는 CH₂, CH₃계열의 신축 진동 흡수대, 1727.25의 carbonyl기 신축 진동, 1678.71의 C=C, 1461.77, 1377.64에서 CH₃, CH₂ group의 C-H의 변각진동, 1264.06, 1160.69, 1014.20에서 phenolic C-O 및 peptide 결합성 C-H기의 변각진동 흡수대로 추정되는 spectrum이 분석되었다(Fig. 7).

아미노산 자동 분석기로 본 항생물질의 구성 성분을 조사한 결과 두 종류의 알려진 아미노산인 leucine과 phenylalanine이 분석되었다(Fig. 8). 이 결과는 상기의 물질 반응 검사인 ninhydrin 반응의 결과와 일치하였다. 분자량을 기초로 한 Kitasato database program으로 검색한 결과 1022.4(P₁)와 1036.4(P₂) dalton을 갖고 있는 물질은 검색되지 않았다. 또한 유도체로 추정할 수 있는 P₁, P₂의 분자량

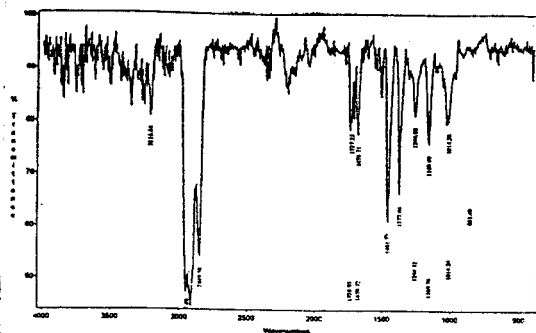


Fig. 7. IR spectrum of the antibiotic in KBr.

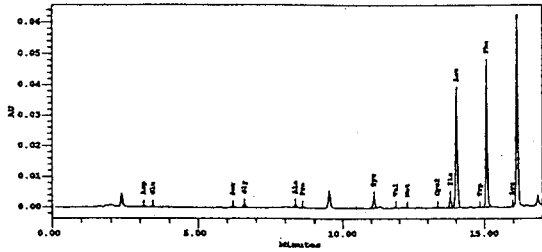


Fig. 8. Chromatogram of amino acid.

에 +Na(P₁, P₂ ; +23), K(P₁, P₂ ; +39)와 -H(P₁, P₂ ; -1)를 가감하여 재차 검색하였으나 일치되는 물질은 없었다. 따라서 물질 구조 분석에 대한 연구가 계속되어야 한다고 사료된다.

3. 생물학적 특성

본 항생물질의 항균 범위를 조사하기 위하여 그람 양성균과 그람 음성균에 대한 MIC와 MBC를 조사하였다(Table 1). 본 항생물질은 그람 양성균에 특이적으로 작용하였으며, 그 중에서 연쇄상 구균에 대하여 가장 우수한 항균력을 나타내었다. 그러나 조사된 모든 그람 음성균에 대해서는 항균 효과가 없었으며, 항진균 효과도 없었다. 또한 MBC와 MIC가 동일한 농도를 나타내어, 본 물질은 살균성 물질임을 알 수 있었다. 포도상구균을 대상으로 항균력 조사한 결과 MIC와 MBC의 차이가 없었으며, 총 129주의 시험주 중 3.08%(4주)가 1 µg/ml에서, 11.4%(11

Table 1. Antimicrobial spectrum of the antibiotic against various microorganisms

Microorganisms	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	32	32
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 27348	32	32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	4
<i>Streptococcus mutans</i>	1	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>125	>125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>125	>125
<i>Salmonella typhi</i>	>125	>125
<i>Proteus vulgaris</i>	>125	>125
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>125	>125
<i>Cryptococcus neoformans</i>	>125	>125

Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration were determined by agar dilution method. Microorganisms were cultivated on the Mueller-Hinton agar at 37°C for 18hrs.

Table 2. Minimum inhibitory concentration of antibiotic against isolated MRSA

	MIC (µg/ml)				
	1	2	4	8	16
Number of strains	4	11	68	42	4
Cumulative percentage(%)	3.08	11.54	63.85	96.15	100

Minimum inhibitory concentration were determined by 2-fold agar dilution method. Strain of *Staphylococcus aureus* were cultivated on the Mueller-Hinton agar at 37°C for 18 hours, and minimum bactericidal concentration values were the same as minimum inhibitory concentration.

Table 3. Cytotoxicity of the antibiotic against tumor cell lines *in vitro*

Cell line	Inhibitory concentration of the antibiotic (µg/ml)
Sarcoma 180	>500
MKN-45	>500
P388	>500
HeLa	>500

주)가 2 µg/ml, 63.8%(68주)가 4 µg/ml에서 균의 성장을 억제시켰다(Table 2). 즉 MIC는 MIC₆₄가 4 µg/ml, MIC₁₀₀ 16 µg/ml이었다. 종양 세포 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여(*in vitro*) 96 well culture plate에 각 세포주를 100 cells/well이 되도록 분주하였다. 본 항생물질을 2배씩 계단 희석하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 배양 후 MTT법으로 세포 독성을 측정할 결과 암세포인 Sarcoma 180, MKN-45, P388 HeLa cell에서 모든 암세포가 500 µg/ml 이상의 농도에서도 독성을 나타내지 않았다(Table 3).

요 약

토양에서 분리한 *Streptomyces lydicus* YSK-681이 생산하는 메치실린내성 황색 포도상구균에 유효한 항생물질을 정제하여 물리화학적 특성을 조사하였다. 물질정제는 chloroform으로 추출한 후 silica gel column chromatography, Si, ODS, GPC HPLC 순으로 진행하였다. FAB MS의 분자량 측정결과 m/z 1022.4와 1036.4 (M+H)⁺의 두 개의 피크가 분석되었으며, NMR 분석에서는 -OH와 leucine으로 추정되는 관능기가 조사되었다. 정제된 항생물

질의 MIC는 그람 양성균에 대해서 1~32 $\mu\text{g/ml}$, 그람음성균과 효모에서는 125 $\mu\text{g/ml}$ 이상이였다. 임상에서 분리된 129개의 MRSA에 대한 MIC는 8 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, 암세포인 P388, HeLa, S180에 대한 세포독성은 없었다.

참고문헌

1. 上芳夫, 大村智 : 微生物 薬品化学, 南江堂, 東京 (1995).
2. 大野雅二, 大村智 : 抗生物質研究の最尖端, 東京化学同人, 東京(1987).
3. Christopher, G. D., Coffey, T. J., and Spratt, B. G. : Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to β -lactam antibiotics, *Trends Microbiol.*, 2, 361~366(1994).
4. Gordon, L. A. and Niemeyer, M. : Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in Staphylococci, *Trends Microbiol.*, 2, 343~377(1994).
5. Lyon, B. R. and Skurry, R. : Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*. Genetic basis, *Microbiol. Rev.*, 51, 259~268(1987).
6. 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).
7. Hawkey, P. M. and Lewis, D. A. : *Medical bacteriology*, IRL press, Oxford, England, p. 167~194 (1989).
8. Colin, T. M. and Hodges, R. S. : *High performance liquid chromatography of peptide and protein*, CRC Press, Boston(1991).
9. Joseph, S. B. F. : *Handbook of thin-layer chromatography*, Vol. 55, Marcel Decker, New York(1991).
10. Charles, N. M. and Larsen, B. S. : *Mass spectrometry of biological materials*, Marcel Dekker, New York(1990).
11. 권순경, 신관식, 안병준, 유충규, 임철부, 정병호 : 유기분광학. 자유아카데미, 서울(1989).
12. 박만기 : 분광학적 분석 입문, 자유아카데미, 서울(1994).
13. Findlay, J. B. C. and Geisow, M. J. : *Protein sequencing, a practical approach*, IRL Press, Oxford, England(1989).
14. Ruichi, S., Takahashi, Y., Itoh, S., Shimanaka, 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).
15. Michico, T., Katayama, T., and Inukai, M. : Helvecardins A and B, A novel glycopeptide antibiotics, *J. Antibiotics*, 44, 278~281(1991).
16. Kenji, K., Takenaka, S., Suzuki, H., Morohoshi, T., and Hayashi, M. : Mycinamicin, New macrolide antibiotics, *J. Antibiotics*, 45, 1~9(1992).
17. Hubert, M., Liu, C., Palleroni, N. J., Smallheer, J., Tadaro, L., Williams, T. H., and Blount, J. F. : Azinothricin, A novel hexadepsipeptide antibiotic. *J. Antibiotics*, 34, 17~25(1986).
18. Masayuki, I., Chen, W., Tsuchida, T., Umekita, M., Sawa, T., Naganawa, H., Hamada, M., and Takeuchi, T. : New Naphthoquinone antibiotics from an *Actinomycetes*, *J. Antibiotics*, 48, 1502~1505(1995).

(1998년 6월 10일 접수)