

## Nalidixic Acid 내성인 *Salmonella typhimurium*의 녹차 폴리페놀과 Nalidixic Acid에 의한 살균상승 효과 및 세포반응

임예지 · 조윤석 · 오계현\*  
순천향대학교 생명공학과

본 연구는 항생제인 nalidixic acid (NA)에 내성이 있는 *Salmonella typhimurium*에 대한 녹차폴리페놀(TPP)과 NA의 시너지적 살균효과와 세포반응을 조사하기 위하여 수행되었다. 초기세포밀도  $10^7$  cell/ml의 *S. typhimurium*에 대한 살균효과는  $>3,500 \mu\text{g/ml}$  TPP와  $<256 \mu\text{g/ml}$  NA에서 조사하였다. NA 감수성인 *S. typhimurium*은  $3,500 \mu\text{g/ml}$  TPP 또는  $256 \mu\text{g/ml}$  NA의 농도에서 6시간 이내에 완전히 제거되었으나, 동일한 조건하에서 NA 내성 *S. typhimurium*은 일부만이 살균되었다. 그러나 NA 감수성인 *S. typhimurium*에 대한  $3,000 \mu\text{g/ml}$  TPP과  $32 \mu\text{g/ml}$  NA의 병용, 그리고 NA 내성인 *S. typhimurium*에 대한  $3,500 \mu\text{g/ml}$  TPP과  $64 \mu\text{g/ml}$  NA의 병용으로 5시간 이내에 완전한 살균효과를 나타내었다. 스트레스 단백질이 이들 *S. typhimurium*에 대한 스트레스원으로서 TPP와 NA에 대한 반응으로 유도되었다. SDS-PAGE와 Western blot에 의하여 그 단백질들은 70-kDa의 DnaK와 60-kDa의 GroEL로 동정되었다. 스트레스에 의해 유도된 단백질은 TPP나 NA의 노출량에 비례하여 증가하였다. 주사전자 현미경 분석에 의하여 TPP나 NA에 의해 처리된 세포는 세포표면에 구멍이 나고, 불규칙적인 막대모양으로 관찰되었다.

**Key words** □ nalidixic acid, *S. typhimurium*, synergic effect, tea polyphenols

최근 의학과 산업이 발달함에도 불구하고 전 세계적으로 *Salmonella*에 의한 식중독 발병이 증가하고 있다(2, 20, 25, 26). *Salmonella*는 가장 중요한 장염 세균으로 이 균에 의한 감염은 *Salmonella typhi*와 *S. paratyphi* A, B 및 C군에 의한 장티푸스 살모넬라증(typhoidal salmonellosis)과 세균성 식중독의 주 원인균에 의한 비 장티푸스성 살모넬라증(non typhoidal salmonellosis)이 있다(8, 29). 최근 5년간 혈청형의 비 장티푸스성 질병이 증가 추세이며 항생제 내성균의 출현이 문제가 되고 있다. 최근들어 nalidixic acid에 대한 내성에 관한 보고들이 해마다 증가 추세이며, ACSSuT (ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamide, tetracycline)에 내성을 나타내는 *S. typhimurium* DT104의 출현이 빈번히 나타나고 있다(1). 특히 한국에서 분리되는 *Salmonella*와 같은 장내세균들은 quinolone계 항생제에 대한 내성이 세계에서 가장 높은 지역 중의 한 곳으로 알려져 있다(5). Nalidixic acid는 quinolone계 항생제로 quinolone 핵과 핵의 3번 위치에 카복실기(carboxyl group)를 가지며, quinolone 핵에 piperazinyl group과 fluorine이 부가되어 세균의 필수효소인 DNA gyrase의 A subunit에 일차적으로 작용하여 DNA 복제를 방해하여 살균효과를 나타내며, 대부분의 요로감염 병원성균, 소화기감염 병원성균, 포도상 구균 및 다제 내성을 가지는 그람음성 간균 중 광범위하고 강력한 항균효과를 가진다고 알려져 있다(18, 23, 28, 30).

차(tea)는 전 세계적으로 널리 소비되어지는 가장 대중적인 천연 음료이다(31). 녹차는 flavanols, flavandiols, flavanoid, phenolic acid 등의 polyphenol류를 함유하고 있는데, 대부분의 녹차의 polyphenol류는 catechin으로 잘 알려진 flavanol류이다(10). 몇 가지 주요한 녹차의 catechin은 (+)-catechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate 등으로 catechin의 효과는 혈중 콜레스테롤 억제, 항균작용, 혈압상승 억제, 혈당억제, 항산화 작용, 혈소판 응집 억제, 항암작용 등이 있는 것으로 알려져 있는데, 이러한 작용의 대부분은 녹차의 폴리페놀 성분이 기인하는 것으로 보고되고 있다. 특히, TPP의 살균효과는 여러 종류의 세균들에서 보고되었지만, 어떠한 기작으로 세포의 생존에 영향을 미치는지는 확실히 밝혀지지 않았다(11, 12, 13, 24). 항생제의 병용 투여는 내성 균주의 발현 빈도를 현저히 감소시킬 수 있으며, 단독으로 투여하였을 경우에 독성이나 부작용이 있는 항생제는 병용하여 투여량을 줄일 수 있으므로 독성을 감소시킬 수 있으며, 세균의 복합 감염 시에는 보다 넓은 항균 범위를 갖는다는 보고가 있다(28, 29).

최근에는 항생제와 천연물의 병용으로 항생제의 항균효과를 증대시키는 연구가 활발히 진행되고 있다. Tetracycline 계열인 oxytetracycline에 대하여 내성을 가지는 *Bacillus* 종, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 등을 인삼의 주요성분인 safonin과 oxytetracycline으로 병용 처리한 결과, safonin과 oxytetracycline의 상호작용으로 인하여 oxytetracycline에 내성인 *Bacillus* 종과 *S. aureus*에 효과적인 항균 활성을 나타내었다(14). 천연 허브로 널

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-41-530-1353, Fax: 82-41-530-1350  
E-mail: kyeheon@sch.ac.kr

리 알려진 로즈마리(rosemary)가 구강에 존재하는 *Streptococcus* 종에 대하여 항균 활성이 있다는 보고된 바 있으며(27), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)에 대해 TPP의 구성성분인 EGCG와  $\beta$ -lactam계 항생제의 상승효과에 대해 보고된 바 있다(33). 또한 녹차성분인 EGCG와 ECG가 *Helicobacter pylori*에 대해서 효과적인 항균 작용이 있다고 보고되었다(32).

우리 연구실에서는 녹차추출물인 차폴리페놀(tea polyphenols; TPP)에 노출된 *E. coli*에서 나타나는 여러 가지 세포반응을 조사하고 프로테오솜을 분석한 바 있다(7). 본 연구는 장내세균이면서 nalidixic acid에 내성을 지닌 *S. typhimurium*이 TPP 단독으로 노출되었을 때와 nalidixic acid와 TPP를 병용처리 하였을 때의 항균효과를 비교하였으며, TPP에 의해 유도되는 스트레스 단백질인 DnaK와 GroEL의 유도를 SDS-PAGE와 Western blot을 통하여 조사하였다. 또한 이 세균이 TPP나 nalidixic acid에 노출되었을 때 일어나는 세포의 외부 형태 변화를 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 균주의 확보와 배양조건

본 연구에서 사용된 항생제 내성 *S. typhimurium* 균주는 병원의 환자로부터 분리한 총 10균주를 대상으로 하였다. 항생제 내성 *S. typhimurium*은 Mueller-Hinton broth에 접종하였고, 감수성 검사의 표준 균주로 America Type Culture Collection (ATCC)에서 구입한 *E. coli* ATCC 25922와 식중독 원인균인 *S. typhimurium* ATCC 14028을 사용하였다. 이 균주들은 Luria-Bertani media (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride)에 각각 접종 한 후, 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다.

### Nalidixic acid와 TPP 최소억제 농도(MIC) 측정

Nalidixic acid의 감수성 시험은 CLSI (Committee for Clinical Laboratory Standards: CLSI)에서 권장하는 방법에 따라 한천 희석법으로 시행하였다(16). 대상 균주를 한천 배지에 계대배양하고, 18~24시간 후에 성장한 세균집락을 0.5 McFarland의 혼탁도의 세균 현탁액으로 만들었다. Nalidixic acid 단독으로 4  $\mu$ g/ml~512  $\mu$ g/ml의 농도와 TPP 250  $\mu$ g/ml~1,500  $\mu$ g/ml의 농도를 nalidixic acid와 병합한 Mueller-Hinton 한천 배지(Difco, USA)를 준비하고, 0.5 McFarland의 세균 현탁액을 10배 희석한 후, 2  $\mu$ l를 취하여 성장 대조군부터 시작하여 저농도, 고농도의 배지 순으로 접종하였다. 이것을 37°C에서 24시간 배양한 후 세균의 성장을 관찰하였다. 상기 과정을 3회 반복하여 최소억제농도(MIC)를 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 nalidixic acid와 TPP 병용 처리시 항균력을 나타내는 균주를 선택하여 실험 대상 균주로 하였다.

### TPP와 nalidixic acid에 대한 균주의 time-kill 조사

세균에 대한 TPP와 nalidixic acid의 살균효과를 조사하기 위하여 time-kill 검사를 실시하였다. 세균을 액체배지에 접종한 후, 대수생장기를 거치면서 파장 660 nm에서 혼탁도가 1.0일 때, 원

심 분리용 튜브에 넣고 4°C를 유지하면서 2,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 균체는 100 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척하였다. 준비된 다양한 농도의 TPP에 동일한 양의 균체를 접종하였다. 또한 Muller-Hinton broth에 nalidixic acid를 단독 또는 TPP와 혼합하여 넣고, 초기 접종액이 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> cfu/ml이 되도록 접종한 후, 1시간 간격으로 고체배지에 100  $\mu$ l씩 평판도말하여 37°C에서 배양한 후 형성된 집락을 계수하였다. Nalidixic acid 또는 TPP 단독으로 처리하였을 때와 nalidixic acid와 TPP를 병용처리 하였을 경우에 농도와 노출 시간에 따른 세균의 생존율을 각각 분석하였다.

### TPP에 대한 세균의 스트레스 충격반응

스트레스 충격실험은 Flattery-O'Brien 등의 방법으로 실시하였다(9). TPP에 의한 세균의 스트레스 충격실험을 위하여 액체 배지에서 배양한 세균을 2,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리하였다. 원심 분리 후 얻어진 균체를 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척하였고, 세척 후 다시 원심 분리를 실시하여 얻어진 균체를 다양한 농도의 TPP에 동일한 양을 접종하여 현탁하였다. 분당 150회 회전하는 37°C 배양기에서 배양하면서 일정한 시간 간격으로 TPP 충격 반응을 주었다.

### 단백질 획득 및 단백질 정량

세균을 TPP에 노출시킨 후 4°C를 유지하면서, 2,000 $\times$ g에서 10분간 원심 분리하여 얻어진 균체를 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척하였다. 그 후 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 균체를 현탁하여 4°C를 유지하면서, 5 W로 30초간 10회 반복하면서 파쇄하여 단백질을 추출하였다. 세포를 파쇄한 후 4°C를 유지하면서 3,500 $\times$ g로 30분간 원심분리한 후 단백질을 포함하고 있는 상등액을 취해 Bradford 방법을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다(4). 1 ml의 Bradford 용액에 bovine serum albumin (BSA)을 각각 10  $\mu$ g, 20  $\mu$ g, 30  $\mu$ g씩 첨가하여 5분간 반응시킨 후, 595 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 추출한 시료의 정량 값이 표준 곡선의 범위를 벗어나지 않도록 1 ml의 Bradford 용액에 적당량 첨가한 후, 흡광도를 측정하여 단백질 정량을 실시하였다.

### SDS-PAGE와 Western blot

추출한 단백질은 Bollag 등의 방법에 따라 SDS-PAGE를 실시하였다(3). Separating gel은 12%의 acrylamide gel을 사용하였으며, stacking gel은 4%의 acrylamide gel을 사용하였다. 전기영동 후 gel은 staining solution (0.1% coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 2시간 염색하였고, destaining solution I (10% methanol, 10% glacial acetic acid)와 destaining solution II (5% methanol, 7% glacial acetic acid)로 탈색하였다. 스트레스 충격단백질 (stress shock proteins; SSPs)의 분석을 위하여 Sambrook 등의 방법에 따라 Western blot을 실시하였다(22). 본 실험에 사용한 1차 항체는 anti-DnaK와 anti-GroEL monoclonal antibody (StressGen Biotechnologies Corp., Victoria,

Canada)을 사용하였으며, 2차 항체는 anti-mouse IgG HRP conjugate (Promega, Madison, USA)을 사용하였다. 항원 항체 반응을 검출하기 위해 ECL kit (Amersham International plc., Buckinghamshire, England)를 사용하여 X-ray film (AGFA, Belgium)에 현상한 후 SSPs 발현을 분석하였다.

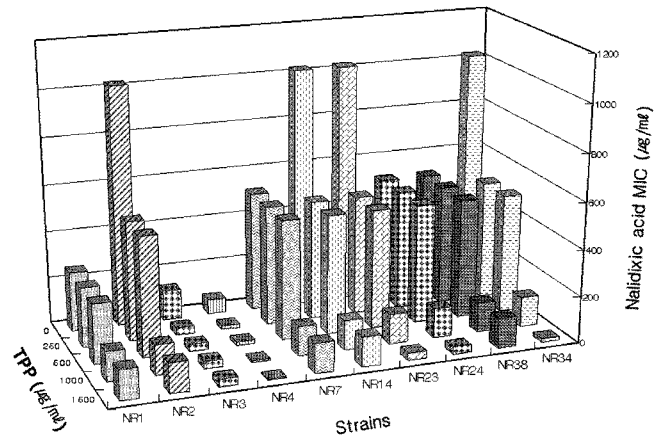
**주사전자현미경을 이용한 세포 외부형태 관찰**

TPP와 nalidixic acid에 노출된 세균의 세포 외부 형태의 변화를 알아보기 위하여 Cho 등의 방법에 따라 주사전자현미경을 이용하였다(7). 세균을 액체배지에 접종한 후, 원심분리하여 얻어진 균체를 각각 5,500 µg/ml 농도의 TPP, 1,000 µg/ml 농도의 nalidixic acid, 2,500 µg/ml 농도의 TPP와 500 µg/ml 농도의 nalidixic acid에 접종하여, 37°C에서 6시간 노출시켰다. 노출시킨 후, 배양액을 원심 분리하여 균체를 회수하고, 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 2회 세척하였다. 100 mM phosphate buffer (pH 7.2)에 희석하여 만든 2.5% glutaraldehyde (Grade I, Sigma, St. Louis, USA)로 처리한 후, 동일한 buffer로 희석한 1% osmium tetroxide로 고정하였다. 고정된 세포는 30%~95%의 알코올에서 연속적으로 탈수시켰다. 100%의 알코올에서 2회 최종 탈수하고 100% hexamethyl disilazane에서 반응시켜 공기 중에서 건조하였다. 건조시킨 membrane filter를 slide glass 위에 부착한 후, sputter coater (IB-3, Giko Engineering Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 golding coating한 후 Hitachi S-2500C 주사전자현미경(Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

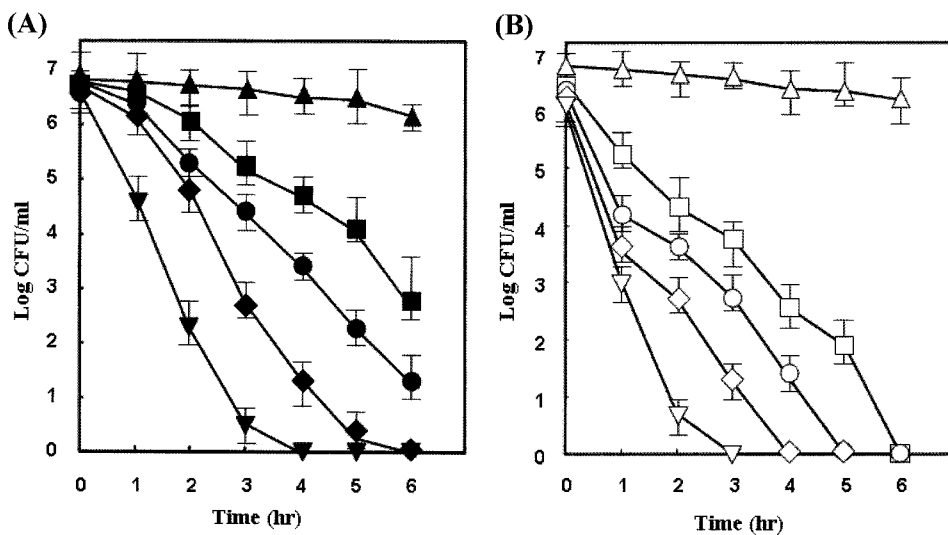
**Nalidixic acid와 TPP 최소억제농도(MIC) 측정**

Nalidixic acid에 대한 최소억제농도 실험 결과, 대상 균주 중 최소억제농도가 32 µg/ml 이상인 10개의 내성 *S. typhimurium* 균



**Fig. 1.** Effect of the synergy of TPP and nalidixic acid with 10 strains of *S. typhimurium*.

주를 선별하였으며, 이 균주들의 TPP에 대한 최소억제농도는 2,500~3,500 µg/ml 범위에 있는 것으로 나타났다. 이들 균주에 대하여 TPP와 nalidixic acid를 병용 노출시켜 상승효과를 확인한 결과, 500 µg/ml의 TPP에서 nalidixic acid의 최소억제농도가 16~512 µg/ml의 범위에서 측정되었으나, TPP의 농도가 1,000 µg/ml로 증가하면서 nalidixic acid의 최소억제농도는 8~128 µg/ml로 감소하였다(Fig. 1). 특히, 이들 균주 가운데 2균주는 TPP가 1,500 µg/ml의 농도일 때, nalidixic acid의 농도가 8 µg/ml로 급격히 감소되었으며, 다른 3균주는 16 µg/ml 이하의 최소억제농도를 나타내어 전체 균주 중 50%에서 두 화합물의 병용효과에 대한 상승작용을 나타내었다. 나머지 5균주에서는 nalidixic acid가 128 µg/ml 이상의 최소억제농도를 나타내어 두 화합물의 병용 효과가 없는 것으로 나타났다. Zhao 등(33)은 methicillin 내성인 *S. aureus*를 EGCG와 β-lactam계 항생제(예, benzylpenicillin, oxacillin, methicillin, ampicillin, cephalexin)와 서로 병용한 경우



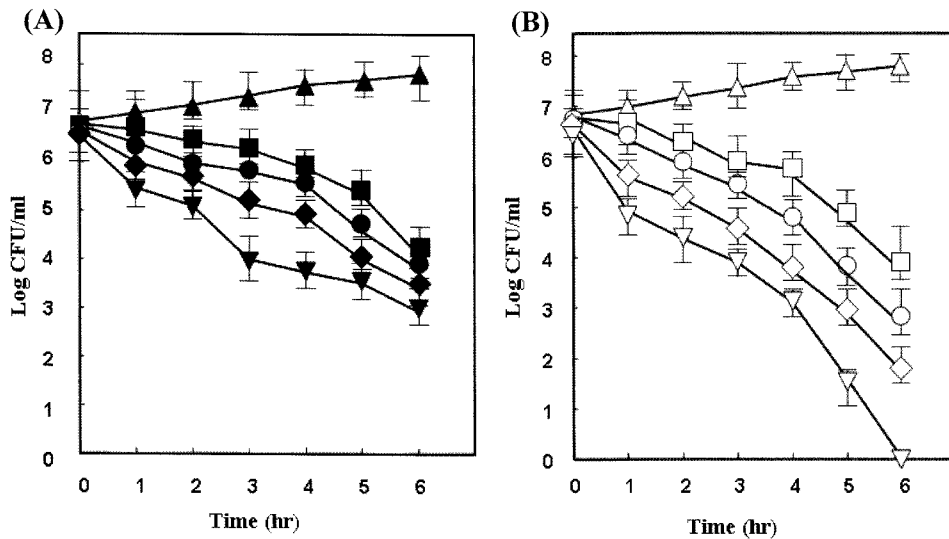
**Fig. 2.** Survival of nalidixic acid-resistant (A) and nalidixic acid-susceptible (B) *S. typhimurium* after TPP shock. The cells were maintained at TPP concentrations of 0 µg/ml (▲, △), 3,500 µg/ml (■, □), 4,500 µg/ml (●, ○), 5,500 µg/ml (◆, ◇), or 6,500 µg/ml (▼, ▽).

에 EGCG 또는 항생제를 단독으로 사용했을 때보다 매우 효과적인 항균 활성을 나타내었다고 보고하였는데, 이는 본 연구에서 얻어진 nalidixic acid 내성인 *S. typhimurium*의 TPP와 nalidixic acid의 병용에 대한 살균 상승효과와 유사한 양상을 나타내었다. 이러한 일련의 결과는 TPP 또는 EGCG가 항생제에 내성을 가지는 세균에게 항생제와 병용 처리하였을 때 내성 세균에서도 효과적인 살균 상승효과가 있음을 확인하였다.

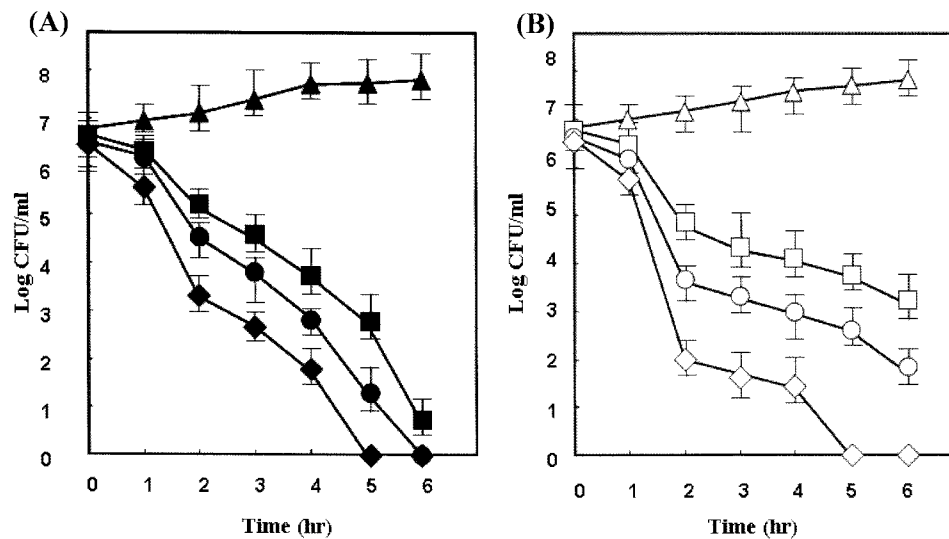
**TPP와 nalidixic acid 대한 균주의 time-kill 조사**

*S. typhimurium*을 nalidixic acid에 내성인 균주와 감수성인 균주를 구분하여 TPP와 nalidixic acid 단독으로 처리 하였을 때와

이들을 병용하였을 때의 농도와 노출 시간에 따른 생존율을 알아보기 위하여 time-kill 조사를 실시하였다. Nalidixic acid 내성 균주는 5,500 µg/ml의 TPP 농도에서, 감수성 균주는 3,500 µg/ml의 TPP 농도에서 반응하여 생존율이 점차적으로 감소하였으며 6시간 이후에는 집락이 관찰되지 않았다(Fig. 2). Nalidixic acid에서 감수성 균주의 생존율은 256 µg/ml의 농도에서 점차적으로 감소하여 6시간 이후 집락이 형성되지 않았으나, 내성인 균주는 감수성 균주와 동일한 농도의 nalidixic acid에서 감소하는 양상을 나타냈지만 6시간 이후에도 모두 살균되지 않았다(Fig. 3). 또한 TPP와 nalidixic acid를 병용하였을 경우, nalidixic acid에 대하여 내성인 균주는 TPP 3,000 µg/ml와 nalidixic acid 256 µg/ml



**Fig. 3.** Survival of nalidixic acid-resistant (A) and nalidixic acid-susceptible (B) *S. typhimurium* after nalidixic acid shock. The cells were maintained at nalidixic acid concentration of 0 µg/ml (▲, △), 32 µg/ml (■, □), 64 µg/ml (●, ○), 128 µg/ml (◆, ◇), or 256 µg/ml (▼, ▽).



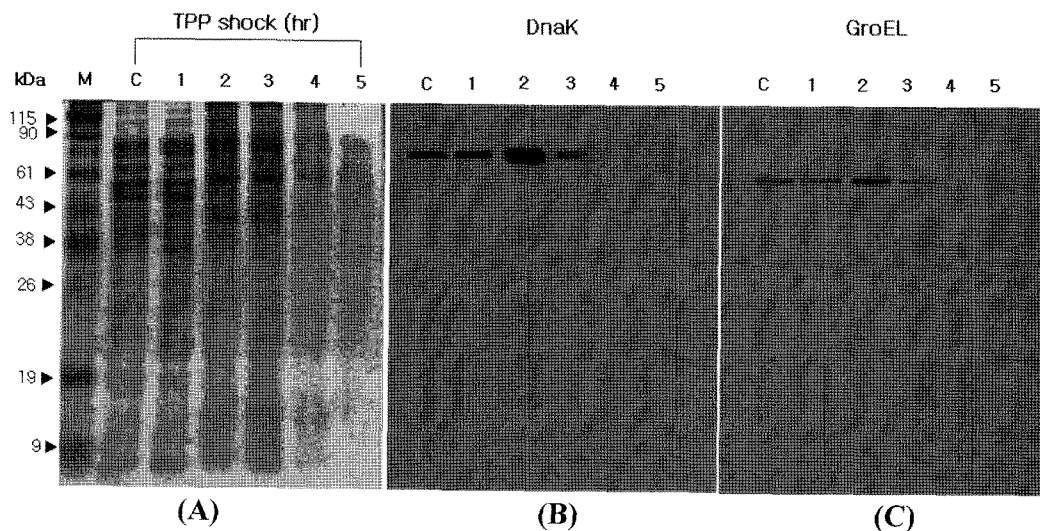
**Fig. 4.** Survival of nalidixic acid-resistant (A) and nalidixic acid-susceptible (B) *S. typhimurium* after TPP and nalidixic acid shock. The cells were maintained at nalidixic acid concentrations of 0 µg/ml (▲, △), 5,500 µg/ml TPP+512 µg/ml nalidixic acid (◆), 3,000 µg/ml TPP+256 µg/ml nalidixic acid (●), 1,500 µg/ml TPP+128 µg/ml nalidixic acid (■), 3,500 µg/ml TPP+64 µg/ml nalidixic acid (◇), 2,000 µg/ml TPP+32 µg/ml nalidixic acid (○), 1,000 µg/ml TPP+16 µg/ml nalidixic acid (□).

의 농도에서 생존율이 점차적으로 감소하여, 6시간 이후에는 모든 세균이 완전히 사멸되었으며, 감수성 균주는 TPP 3,500 µg/ml과 nalidixic acid 64 µg/ml의 농도에서 점차적으로 감소하여 5시간 이후에는 완전히 사멸되었다(Fig. 4). 이를 통해 동일한 nalidixic acid 농도의 항생제를 처리하였을 경우라 할지라도, 노출시킨 TPP의 농도가 증가함에 따라 더 효과적인 살균 효과를 나타내는 것으로 확인되었으며, TPP의 농도가 증가하고 nalidixic acid의 농도는 낮아지더라도 동일한 살균 효과를 나타내었다.

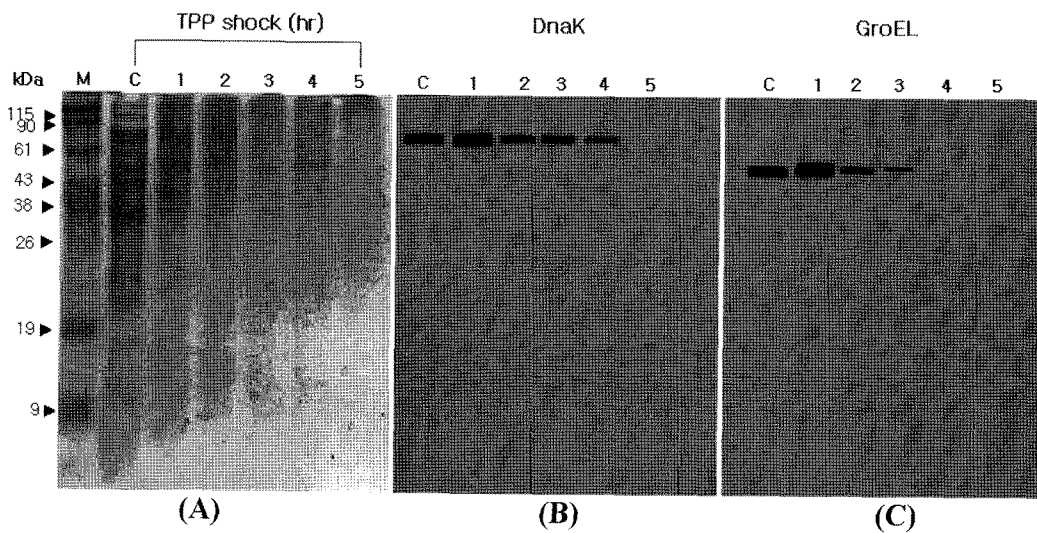
**SDS-PAGE와 Western blot**

*S. typhimurium*을 항생제 감수성 균주는 TPP 농도 3,500 µg/ml와 내성 균주는 TPP 농도 5,500 µg/ml에 노출시켰을 때 나타

나는 총 단백질의 발현 양상을 SDS-PAGE으로 관찰하였으며, 스트레스 충격단백질인 DnaK나 GroEL의 발현 정도를 알아보기 위해 TPP 충격에 의해 유도 발현되는 DnaK와 GroEL를 1시간 간격으로 6시간 동안 조사하였다. 항생제 감수성 균주는 TPP 농도 3,500 µg/ml와 내성 균주는 TPP 농도 5,500 µg/ml에 노출시켰을 때 나타나는 총 단백질의 발현 양상을 SDS-PAGE으로 관찰하였으며, 스트레스 충격단백질인 DnaK나 GroEL의 발현 정도를 알아보기 위해 TPP 충격에 의해 유도 발현되는 DnaK와 GroEL를 1시간 간격으로 6시간 동안 조사하였다. Nalidixic acid 감수성 균주에서 DnaK와 GroEL의 발현은 TPP 노출 후 1시간까지는 큰 변화가 없었으나, 2시간부터는 발현양이 증가하다가, 노출 3시간부터는 발현양이 급격히 감소하였으며, 4시간부터는



**Fig. 5.** Induction of stress shock proteins in nalidixic acid-susceptible *S. typhimurium* treated with 3,500 µg/ml TPP for different times. The SSPs were analyzed by SDS-PAGE (A), and western blot with anti-DnaK (B), and anti-GroEL (C) monoclonal antibodies, respectively.



**Fig. 6.** Induction of stress shock proteins in nalidixic acid-resistant *S. typhimurium* treated with 5,500 µg/ml TPP for different times. The SSPs were analyzed by SDS-PAGE (A), and western blot with anti-DnaK (B), and anti-GroEL (C) monoclonal antibodies, respectively.

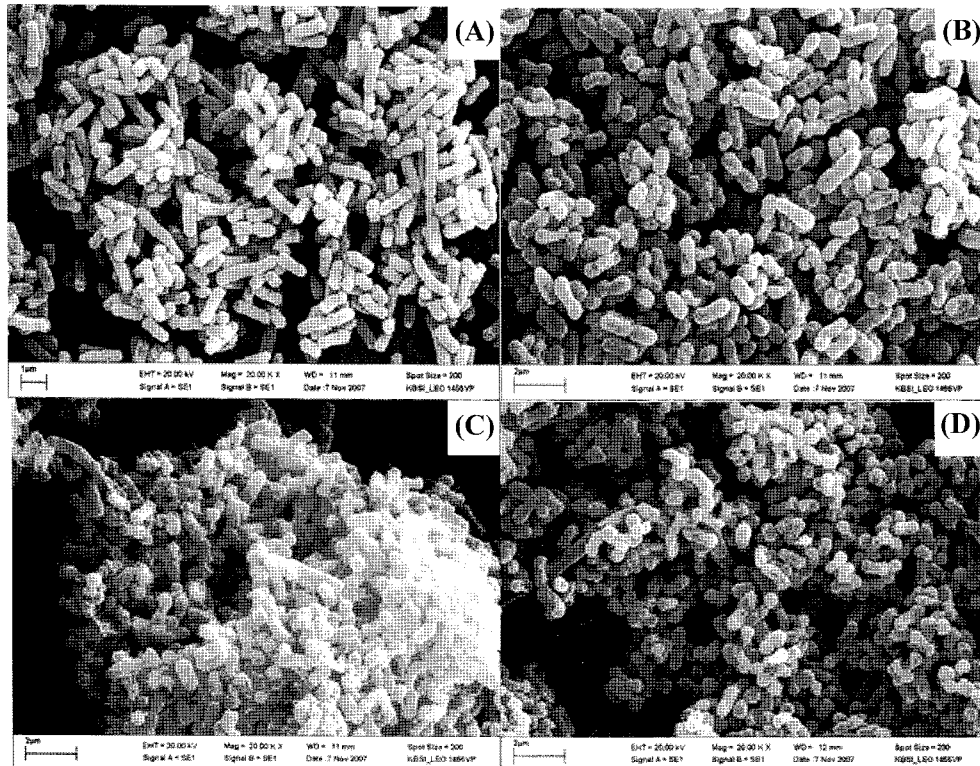
발현되지 않았다(Fig. 5). 내성 균주의 DnaK와 GroEL의 발현은 노출 후 2시간부터 유도되는 양이 증가하다가 그 이후부터 감소하여 4시간이 경과한 후에는 DnaK와 GroEL이 관찰되지 않았다(Fig. 6). 이 실험을 통해서 TPP에 노출된 시간에 따라 유도되는 DnaK와 GroEL을 SDS-PAGE와 Western blot을 통하여 얻어진 결과는 유도된 약 70-kDa DnaK와 60-kDa GroEL이 TPP에 노출된 시간이 증가함에 따라 유도되는 이들 단백질의 양이 증가하였으며, 일정 시간이 경과하면서 유도 단백질은 점차 사라지는 것으로 나타났다. *E. coli*에서는 영양, 온도,  $H_2O_2$  등에 의해 DnaK 단백질의 발현과 역할에 대한 보고가 있었으며, *Bacillus cereus*에서도 온도, NaCl, ethanol, pH 등에 의한 세포의 외부 환경변화에 의해서 열충격단백질(heat shock protein)이 유도되는 것으로 보고되었다(19, 21). 따라서 TPP나 nalidixic acid에 의해서 *S. typhimurium*에서 발현되는 DnaK나 GroEL과 같은 스트레스 충격단백질은 여러 가지 물리화학적 충격에 의해 발현되는 단백질과 동일한 것으로 나타났다.

#### 주사전자현미경을 이용한 세포 외부형태 관찰

생존율 실험 결과에 따른 치사 농도의 TPP와 nalidixic acid를 각각 단독으로 처리하였을 경우와 아치사 농도의 TPP와 nalidixic acid를 병용처리 하였을 경우에 *S. typhimurium*의 외부 형태의 변화를 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다. TPP나 nalidixic acid에 노출시키지 않은 *S. typhimurium*의 정상적인 모습은 매끈

한 세포표면을 가지는 간균의 형태를 나타내었다. 그러나 5,500  $\mu\text{g/ml}$ 의 TPP, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 nalidixic acid에 6시간 동안 처리한 세포들은 세포에 구멍이 생기거나 움푹 패이고, 표면이 주그러지는 것으로 관찰되었으며, 2,500  $\mu\text{g/ml}$ 의 TPP와 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 nalidixic acid에 6시간 동안 처리한 세포들은 5,500  $\mu\text{g/ml}$ 의 TPP와 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 nalidixic acid를 처리하였을 때 보다 세포의 표면이 더 많이 손상되었음을 관찰 할 수 있었다(Fig. 7). 세포 외부 형태의 변화에 따른 세포 치사에 대한 연구 결과 보고에 의하면, 2,4-D, biphenyl, 4-chlorobiphenyl, 4-hydroxybenzoate 등과 같은 다양한 방향족 화합물에 노출된 세균들의 세포의 표면이 불규칙적으로 변하면서 일그러지는 현상이 보고되었으며, 천연물질인 TPP에 노출된 *E. coli*에서도 유사한 세포 형태 변화가 관찰되었다(6, 7, 15, 17). 동일한 결과가 TPP에 노출된 *S. typhimurium*에서도 관찰되었으며, TPP와 nalidixic acid에 동시에 노출시킨 세포의 외부 형태가 더욱 심하게 변형되는 것을 확인하였다. 이러한 인공이나 천연의 다양한 화합물에 노출된 세균들은 세포 외부형태에 심각한 변화를 초래하여 궁극적으로, 세포가 사멸되는 것이 밝혀졌다.

본 연구를 통해서 nalidixic acid에 내성을 가지는 *S. typhimurium*을 TPP를 이용하여 살균할 수 있었으며, nalidixic acid와 TPP를 병합하여 사용하였을 때, nalidixic acid의 농도를 단독으로 하였을 때 보다 뛰어난 상승살균효과가 확인되었다. 이 결과는 항생제의 오남용으로 인해 문제가 되고 있는 항생제 내성균을 효과



**Fig. 7.** Scanning electron micrographs, (A) untreated cells, (B) cells treated with 5,500  $\mu\text{g/ml}$  TPP for 6 hr, (C) cells treated with 1,000  $\mu\text{g/ml}$  nalidixic acid for 6 hr and (D) cells treated with 500  $\mu\text{g/ml}$  TPP and 500  $\mu\text{g/ml}$  nalidixic acid for 6 hr.

적으로 조절하기 위하여 항생제에 천연살균제로서 TPP를 병용하여 사용함으로써 살균의 상승효과를 가져올 수 있어 내성균에 대한 문제 해결에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. 국립 보건원. 2003. 2차 의료기관 혈액 배양분리균의 항생제 내성 양상 감염병발생정보. 14, 413-419.
2. Bean, N. and P.M. Griffin. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987; Pathogens, Vehicles, and Trends. *J. Food Prot.* 53, 804.
3. Bollag, D.M., M.D. Rozycki, and S.J. Edelman. 1996. Protein methods. 2nd ed. New York, Wiley-Liss, USA.
4. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
5. Choi, S.H., J.H. Woo, J.E. Lee, S.J. Park, E.J. Choo, Y.G. Kwak, M.Y. Kim, M.S. Choi, N.Y. Lee, B.K. Lee, N.J. Kim, J.Y. Jeong, J.S. Ryu, and Y.S. Kim. 2005. Increasing incidence of quinolone resistance in human non-typhoid *Salmonella enterica* isolates in Korea and mechanism involved in quinolone resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 1111-1114.
6. Cho, Y.S., H.Y. Kahng, C.K. Kim, J.J. Kukor, and K.H. Oh. 2000. Physiological and cellular responses of the 2,4-D degrading bacterium, *Burkholderia cepacia* YK-2, to the phenoxyherbicides 2,4-D and 2,4,5-T. *Curr. Microbiol.* 41, 33-38.
7. Cho, Y.S., N.S. Schiller, and K.H. Oh. 2007. Cellular responses and proteomic analysis of *Escherichia coli* exposed to green tea polyphenols. *Curr. Microbiol.* 53, 501-506.
8. Chun, C.H. 1978. Tropical diseases in Korea. past and present. *Kor. J. Infect. Dis.* 10, 29-35.
9. Flattery-O'Brien, J., L.P. Collinson, and I.W. Daews. 1993. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J. Gen. Microbiol.* 139, 501-507.
10. Graham, H.N. 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev. Med.* 21, 334-350.
11. Hii, C.S. and S.L. Howell. 1984. Effects of epicatechin on rat islets of Langerhasns. *Diabetes* 33, 291-296.
12. Huang, Y., A. Zhang, C.W. Lau, and Z.Y. Chen. 1998. Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci.* 63, 275-283.
13. Ikigai, H., T. Nakae, Y. Hara, and T. Shimamura. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta* 1147, 132-136.
14. Kim, H.S., S.S. Han, K.W. Oh, T.S. Jeong, and K.Y. Nam. 1987. Effects of ginseng saponin on the antimicrobial activities of some antibiotics. *Kor. J. Micol.* 15, 87-91.
15. Mendonca, A.F., T.L. Amoroso, and S.J. Knabel. 1994. Destruction of Gram-negative food-born pathogens by high pH involves disruption of the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4009-4014.
16. Committee for Clinical Laboratory Standards. 2007. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 7th ed. Approved standard M7-A5. CLSI, Wayne, PA, USA.
17. Park, S.H., K.H. Oh, and C.K. Kim. 2001. Adaptive and cross-protective responses of *Pseudomonas* sp. DJ-12 to several aromatics and other stress shock. *Curr. Microbiol.* 43, 176-181.
18. Parry, M.F., K.B. Panzer, and M.E. Yukna. 1989. Quinolone resistance. *Am. J. Med.* 87, 12-16.
19. Periago, P.M., W. Shaik, T. Abee, and J.A. Wouters. 2002. Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3486-3495.
20. Roberts, D. 1982. Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1972-1979. *J. Hyg.* 89, 491.
21. Rockabrand, D., T. Arthur, G. Korinek, K. Livers, and P. Blum. 1995. An essential role for the *Escherichia coli* DnaK protein in starvation-induced thermotolerance, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance, and reductive division. *J. Bacteriol.* 177, 3695-3703.
22. Sambrook, J.K., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 2001. Molecular cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor, New York, NY, USA.
23. Stamm, J.M., C.W. Hanson, D.T. Chu, R. Bailer, C. Vojtko, and P.B. Germandes. 1986. *In vitro* evaluation of A-56619 (difloxacin) and A-56620: new aryl-fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29, 193-200.
24. Suzuki, H., A. Ishigaki, and Y. Hara. 1998. Long term effect of a trace amount of tea catechins with perilla oil on the plasma lipids in mice. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 68, 272-274.
25. Todd, E.C.D. 1983. Factors that contributed to foodborne disease in Canada, 1973-1977. *J. Food Prot.* 46, 737.
26. Todd, E.C.D. 1992. Foodborne disease in Canada a 10-year summary from 1975 to 1984. *J. Food Prot.* 55, 123.
27. Tsai, T.H., T.H. Tsai, Y.C. Chien, C.W. Lee, and P.J. Tsai. 2008. *In vitro* antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities. *Food Chem.* 110, 859-864.
28. Wiedemann, B. and M.T. Zuhlsdorf. 1989. Brief report: resistance development to fluoroquinolones in Europe. *Am. J. Med.* 87, 9-11.
29. Wilks, D., M. Farrubgtib, and D. Rubenstein. 1995. The infectious disease manual, 1st ed., p 190-192, Blackwell Science.
30. Wolfson, J.S. and D.C. Hooper. 1985. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28, 581-589.
31. Yang, C.S. and Z.Y. Wang. 1993. Tea and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 1038-1049.
32. Yee, Y.K. and W.K. Marcel. 2000. Anti-*Helicobacter pylori* activity of chinese tea: *in vitro* study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14, 635-638.
33. Zhao, W.H., Z.Q. Hu, S. Okubo, Y. Hara, and T. Shimamura. 2001. Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and  $\beta$ -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1737-1742.

(Received May 21, 2008/Accepted June 23, 2008)

---

**ABSTRACT: Antibacterial Synergic Effect and Cellular Responses of Nalidixic Acid-Resistant *Salmonella typhimurium* Exposed to Tea Polyphenols and Nalidixic Acid**

**Ye-Ji Lim, Yun-Seok Cho, and Kye-Heon Oh\*** (Department of Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-600, Republic of Korea)

The purpose of this work was to investigate the synergically bactericidal effects and cellular responses of green tea polyphenols (TPPs) and nalidixic acid (NA) on nalidixic acid-resistant (NAR) *Salmonella typhimurium*. The bactericidal activities of >3,500 µg/ml TPPs and <256 µg/ml NA were investigated for *S. typhimurium* of which initial cell number was approximately adjusted to  $10^7$  cell/ml. Complete elimination of NAS-*S. typhimurium* was achieved within 6 hr of incubation at the concentrations of 3,500 µg/ml TPP or 256 µg/ml NA, whereas only partial bactericidal effect was achieved under the same conditions. However, the combinations of 3,000 µg/ml TPPs and 32 µg/ml NA against NAS-*S. typhimurium* and 3,500 µg/ml TPPs and 64 µg/ml nalidixic acid against NAR-*S. typhimurium* showed complete removal within 5 hr of incubation. The stress shock proteins (SSPs) were induced at different concentrations of TPP or NA used as stressors against cell culture of *S. typhimurium*. The proteins were identified as 70-kDa DnaK and 60-kDa GroEL by SDS-PAGE and Western blot. SSPs induced by the stressors were found to increase in proportion to the TPPs or NA. Scanning electron microscopy analyses revealed the presence of perforations and irregular rod shape with wrinkled surfaces for cells treated with TPPs or NA.