

항 MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) 활성을 나타내는 *Streptomyces* sp. DG-2

Streptomyces sp. DG-2 with Anti-MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) Activity

정성윤*

Seong-Yun Jeong*

대구가톨릭대학교 의생명과학과, 경북 경산시 하양읍 하양로 13-13, 38430, 대한민국

Department of Biomedical Science, Daegu Catholic University, Gyeongsan-si 38430, Republic of Korea

(Received 7 December 2017, Revised 27 December 2017, Accepted 28 December 2017)

Abstract We isolated marine bacterium, isolate DG-2 which produces the antibiotics against MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). This isolate DG-2 was examined by its morphological, biochemical properties, and 16S rRNA sequencing analysis. And then, isolate DG-2 was identified to the genus *Streptomyces*. Therefore, this isolate was designated as *Streptomyces* sp. DG-2. *Streptomyces* sp. DG-2 grew relatively well at 25°C, pH 7.0, and NaCl 1.0%. For the pre-purification of the bioactive compounds, DG-2 was fermented in 30 L PPES-II medium, and the culture filtrates of DG-2 was extracted by ethyl acetate. The ethyl acetate extract of DG-2 showed the significant anti-MRSA and antibacterial activities.

Keywords : Antibacterial, Anti-MRSA activity, Crude extract, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

서 론

포도상구균 *Staphylococcus aureus*는 화농성 감염을 일으키는 그람 양성 구균으로 심내막염, 뇌수막염, 폐렴, 골수염, 폐혈증 등의 감염질환의 원인균이다. 이러한 감염질환의 최초 항생제는 1928년 플레밍에 의해 발견된 penicillin으로, 1939년 처음으로 penicillin G가 임상에서 치료약으로 사용되었다. Penicillin G는 그람 양성 세균과 *Neisseria*속 세균, 매독균인 *Treponema pallidum* 등에 효과가 있었다. 그러나 항생제의 오남용으로 인하여 penicillin에 내성을 가진

PPSA (penicillinase producing *S. aureus*)가 나타나게 되었고, 이에 1959년 penicillinase에 가수분해 되지 않는 생합성 penicillin인 methicillin을 사용하였지만 *S. aureus*는 항생제의 무분별한 사용증가로 항생제에 대한 저항성 증가시켜 methicillin에 내성을 가지는 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) 균주들이 나타나 전 세계적으로 감염율이 증가 되었다.

MRSA는 methicillin을 분해하는 β -lactamase의 생산이 아니라 β -lactam 계열 항생물질과 결합력이 약한 새로운 세포벽 합성 효소(penicillin binding protein, PBP)의 생산에 의하여 내성이 일어나며[1], 4종

* 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/>)

류의 PBP중 분자량 78,000의 PBP 2'가 β -lactam 계열의 항생물질과 친화성이 낮기 때문에 다른 PBP가 β -lactam 계열의 항생물질에 저항을 받아도 세포벽 합성이 가능하였다[5].

MRSA의 치료제로서 glycopeptide 제제인 vancomycin을 사용하였으나 1996년 일본에서 vancomycin에 감수성이 낮아진 *S. aureus* (hetero-vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*: hVISA)가 처음 보고[9]된 후, 미국과 유럽에서도 vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA)가 확인되어[10], 새로운 항생제의 개발이 절실한 실정이다. 또한 최근 현재 존재하는 모든 항생제에 대한 내성을 보유한 *S. aureus* 및 연쇄상구균이 출현하여 super bacteria라는 명칭을 얻었으며, 항생제 내성 문제는 인간의 건강에 심각한 위협이 되기에 이르렀다. 또한 병원감염인 HA-MRSA (Hospital acquired MRSA)와 지역사회감염인 CA-MRSA (Community acquired MRSA)가 증가하는 실정이다[2]. 발병률은 일본, 홍콩, 미국 등에서 50% 이상의 높은 비율로 나타나며, 국내 MRSA 분리 빈도 또한 70%선으로 매우 심각한 수준으로[6], 미국 질병통제 센터(CDC)는 2005년 보고서를 통해 매년 2백만 명이 병원에서 감염되고 그 중 9만 명이 내성균에 의해 사망한다고 보고한 바 있다[16].

지구에서 바다는 70%를 차지하고 지구 생명체의 80% 이상이 바다에 서식하고 있으며[8], 해양은 토양에 비해 다양한 환경조건을 가진 특수한 환경으로 해양에서 MRSA에 활성을 가지는 미생물들을 탐색한다면 기존의 항생물질들과 구조 또는 작용 메커니즘이 다른 새로운 항생물질을 개발 할 가능성이 매우 높을 것이다[7]. 지금까지 많은 항생물질들은 대부분 토양 미생물로부터 분리된 천연물질이지만[4], 최근 선진국들은 해양미생물 유래 천연물질을 집중적으로 연구를 하고 있다[15].

본 실험에서는 해양에서 항 MRSA활성을 나타내는 해양 방선균 DG-2 균주를 분리하여 생화학적 특성 등을 조사하여 동정하고, 조추출물의 항균활성을 측정함으로써 새로운 항균물질로서의 기초 자료를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

해양미생물의 분리 및 표준균주의 배양

MRSA에 항균활성을 나타내는 균주를 분리하기

위해, 울산 앞바다의 표층 해수를 멸균된 marine bacteria 채수기(MB sampler)로 무균적으로 채수하였다. 채수한 해수 시료로부터 서로 다른 콜로니를 형성한 45개의 균주들을 분리하였으며, 이 균주들은 해수를 넣은 nutrient agar (NA; difco, USA) 배지에 3차 희석 배양한 후 단일 집락을 확인하여 순수 분리하였다. 순수 분리한 균주들 중에서 항MRSA 활성이 있는 균주들을 우선적으로 선별하여 본 실험을 진행하였다.

항MRSA 활성 측정을 위한 MRSA 표준균주는 한국 미생물 배양 센터(Korea Culture Center of Microorganisms, Seoul, Korea)에서 분양받은 MRSA KCCM 40511 균주 및 동아대학교에서 분리한 MRSA 임상 분리균주인 DA 8과 DA 16 균주를 이용하였다. 또한 항균활성 실험을 위하여 한국 생물자원 센터(Korean Collection for Type Cultures, Daejeon, Korea)에서 분양받은 *Aeromonas hydrophila* KCTC 2358, *Bacillus subtilis* KCTC 1028, *Legionella briminghamensis* KCTC 2007, *Mycobacterium smegmatis* KCTC 2002 및 *Shigella flexneri* KCTC 2008 균주들과 한국 미생물 배양 센터에서 분양받은 *Pseudomonas reactants* KCCM 42882 균주를 대상으로 실험을 진행하였다. 실험에 사용된 균주들은 nutrient broth (NB; difco, USA) 배지와 PPES-II 배지[18]를 사용하여 25~30°C에서 배양하였다.

분리균주들의 항MRSA 활성 측정

분리균주들의 항MRSA 활성을 검정하기 위하여 45개의 분리균주들의 배양농축액을 이용하여, 디스크 확산(disk agar diffusion assay)법[13]으로 측정하였다. 즉 먼저 trypticase soy broth (TSA)에 본 실험의 MRSA 표준균주인 MRSA KCCM 40511 균주를 18시간 배양 후 분광광도계(VERSA MAX, USA)를 이용하여 660 nm에서 흡광도(optical density)를 측정한 후 희석하여 0.3으로 맞췄다. TSA 평판배지에 희석된 MRSA KCCM 40511 균주배양액 100 μ L를 첨가하고 도말한 후 6 mm paper disk를 올렸다. 전배양한 45개의 분리균주들의 배양농축액을 2-fold serial dilution하여 paper disk에 5 μ L씩 분주하여 잘 흡수되게 한 후, 25°C에서 48시간 배양 후 생육 저해환(inhibition zone)의 직경(mm)을 측정하여 항MRSA 활성을 비교분석하였다. 예비실험 결과, 항MRSA

활성을 보인 5개의 균주 중 가장 우수한 활성을 보인 균주를 선별하여 DG-2로 명명하였다.

DG-2 균주의 동정

MRSA에 대한 가장 높은 활성을 보인 DG-2 균주의 동정을 위하여 MacFaddin [12]의 방법에 준하여 형태적, 생리적, 생화학적 특성들을 조사하였다. 또한 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene을 이용하여 염기서열 분석을 수행하였다[3]. 즉 선별된 DG-2 균주를 PPES-II 배지에서 18시간 배양한 후 DNA 추출 키트(AccuPrep™ Genomic DNA extraction kit, Bioneer, Korea)를 사용하여 total genomic DNA를 추출하여 template로 사용하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer 쌍은 49F (5'-AGAATTCTNANACATGCAAGTCGAICG-3')와 1492R (5'-GIGGATCCGGYTACCTTGTACGACTT-3')을 사용하였다. 이때 forward primer의 5'에는 제한효소 EcoRI의 인식부위를, reverse primer의 5'에는 BamHI의 인식부위를 첨가하였다.

PCR 반응은 AccuPower PCR Premix (Bioneer, Korea)를 사용하여 Minicycler (MJ Research, USA)로 실시하였다. 먼저 94°C에서 1분, 61°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 30회 반복하여 DNA를 증폭시키고, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension시켜 PCR 반응을 종결시켰다. 정제된 16S rRNA의 PCR 반응물을 pGEM-T vector (Promega)에 ligation시켜 반응물을 미리 준비한 200 µL의 XL1-blue competent 세포에 형질전환 시킨 후 alkaline lysis mini-prep 방법[17]으로 plasmid를 mini-prep하였다.

이와 같이 16S rRNA 분석을 통하여 염기서열을 결정된 후 미국 국립 생명공학 정보센터(National Center for Biotechnology Information)의 GeneBank database에서 가장 상동성이 높은 균주들과 염기서열을 비교하였다. 염기서열을 Clustal W program으로 정렬한 후, MEGA 5 package [19]를 이용하여 계통도를 작성하였다. 계통학적 유연관계에 대한 통계적 안정성을 검증하기 위하여 1,000회의 resampling에 근거한 bootstrap 분석을 수행하였다.

DG-2의 최적성장 조건 탐색

DG-2 균주의 성장에 미치는 최적 온도, pH 및

NaCl 농도는 각 구간별로 PPES-II 배지에서 전배양한 초기배양액을 각각의 배지에 1%로 접종하여 25°C에서 배양한 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하여 균증식을 조사하였다. 성장곡선은 PPES-II 배지에 최적 배양조건(25°C, pH 7.0, NaCl 1.0%)으로 접종하여, 암환경에서 교반배양하면서 48시간 후에 흡광도를 측정하여 구하였다.

DG-2 조추출물의 항MRSA 및 항균 활성 측정

미생물 분리 후 냉장 보관되어 있던 DG-2 균주를 NA 배지에 희석배양한 후 단일 집락을 확인하고 이를 100 mL의 NB 배지에 접종하여 전배양하였다. 전배양액을 PPES-II 액체배지 30 L에 재접종하여 최적 배양 조건인 25°C, pH 7.0 및 1.0% NaCl 농도에서 180 rpm으로 7일간 배양하였다. 세균 배양액을 8,000×g로 10분간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 pore size 0.2 µm polycarbonate membrane filter로 여과하였다. 이 배양여과액을 ethyl acetate (Duksan, Korea)와 1:1로 혼합하고 ethyl acetate로 3회 반복 추출하여 rotary evaporator (Eyela, Japan)로 감압 농축하여 ethyl acetate 조추출물을 얻었다.

이 조추출물의 항MRSA 활성을 측정하기 위하여 조추출물을 MeOH에 녹여 상기의 디스크 확산법 [13]으로 측정하였다. 즉, MRSA KCCM 40511, 동아대학교 임상 분리 MRSA 균주인 DA 8과 DA 16 균주가 도말된 NA 배지에 조추출물을 160 µg/disk의 농도부터 2-fold serial dilution하여 paper disk에 분주한 후 25°C에서 48시간 배양 후 생육 저해환(inhibition zone)의 직경을 측정하였다. 이 때 대조구에는 동량의 MeOH (Duksan, Korea)를 사용하였다. 또한 그 외 그람 양성 및 그람 음성 미생물들에 대한 항균활성도 상기의 방법으로 비교 측정하였다.

조추출물의 안정성 확인

DG-2 균주가 생산하는 항MRSA 물질의 정제를 위한 특성 파악을 위하여, DG-2 조추출물의 열 안정성 및 pH 안정성을 다음과 같이 조사하였다. 상기의 ethyl acetate 조추출액을 4, 20, 40, 60, 80, 100°C에서 24시간 방치한 후, MRSA KCCM 40511 균주배양액(4.8×10⁶ cells/mL)에 5%가 되도록 접종하여 항MRSA의 상대 활성을 비교 측정하였다. 이 때 대조

구로 조추출액 대신 동량의 신선한 NB 배지를 첨가하였으며, 가장 활성이 높았던 4°C를 기준으로 상대 활성을 측정하였다.

또한 DG-2 균주가 생산하는 물질의 pH 안정성을 알아보기 위해서, 최적조건에서 배양한 DG-2의 ethyl acetate 조추출액을 pH 2.0~9.0으로 조절하여 24시간 동안 실온에 정치한 후, 다시 pH를 7.0으로 조절하여 상기와 동일한 방법으로 항MRSA 상대 활성을 비교 측정하였다. 이때 pH는 50 mM sodium acetate 완충용액(pH 2.0~5.0)과 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0~10.0)를 사용하여 조절하였다. 또한 대조구에는 각각의 pH에 따라서 조추출액을 포함하지 않은 완충용액을 첨가하였다. 이 때 모든 실험은 5회 반복 실험을 통하여 결과를 산출하였다.

결과 및 고찰

항균물질 생산 균주 DG-2의 동정

울산 앞바다의 해수에서 분리되어 항MRSA 활성을 나타낸 5개의 균주들 가운데 가장 강력한 활성을

보인 균주를 DG-2라 명명하였다. MacFaddin [12]의 방법을 참고하여 분석한 이 균주의 형태적, 생리적, 생화학적 특성은 다음과 같다(Table 1). 이 균주는 그람 양성의 사상체로 포자의 표면은 smooth하고 직경 0.5~0.9 μm의 포자를 형성하였다. International Streptomyces Project (ISP)의 ISP-6 배지에서 melanoid를 형성하지 못하였고, 세포벽은 LL-DAP type이었다. 또한 H₂S 환원능과 gelatin 액화능이 있었고 전분을 가수분해하고 질산염을 환원시켰다. 탄소 이용능은 D-Glucose, L-Ramnose, D-Fructose 및 D-Sucrose를 이용하였다. 이러한 결과들을 바탕으로 1차적으로 속 레벨까지 동정한 결과 *Streptomyces* 속으로 판단되었다. 이 후 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA 유전자를 이용하여 염기서열을 결정한 후 계통분류학적 유연관계를 조사하였다. 그 결과 DG-2 균주의 16S rRNA 유전자는 *Streptomyces californicus* NRBC 3386 균주의 16S rRNA 유전자와 92.9%의 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 1). 이상의 결과, 본 균주를 *Streptomyces* sp. DG-2로 명명하여 이 후 실험을 진행하였다.

Table 1. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of isolate DG-2.

Tests	Results	Tests	Results
Spore chain morphology	Spirales	Carbon utilization	
Spore surface	Smooth	D-Glucose	+
Spore dimensions (μm)	(0.5 ~ 0.7) x (0.7 ~ 0.9)	D-Xylose	-
Type of DAP	LL-DAP	L-Arabinose	-
Melanoid formation on ISP-6	-	L-Ramnose	+
Glycine	-	D-Fructose	+
Sugar	Glucose, Ribose	D-mannitol	-
Reduction of nitrate	+	D-Sucrose	+
Hydrolysis of starch	+	D-Galactose	-
Production of H ₂ S	+		
Liquefaction of gelatin	+		
Degradation of casein	-		

+, Positive result or growth; -, Negative result or no growth.

Values in parentheses were read after 48 hr.

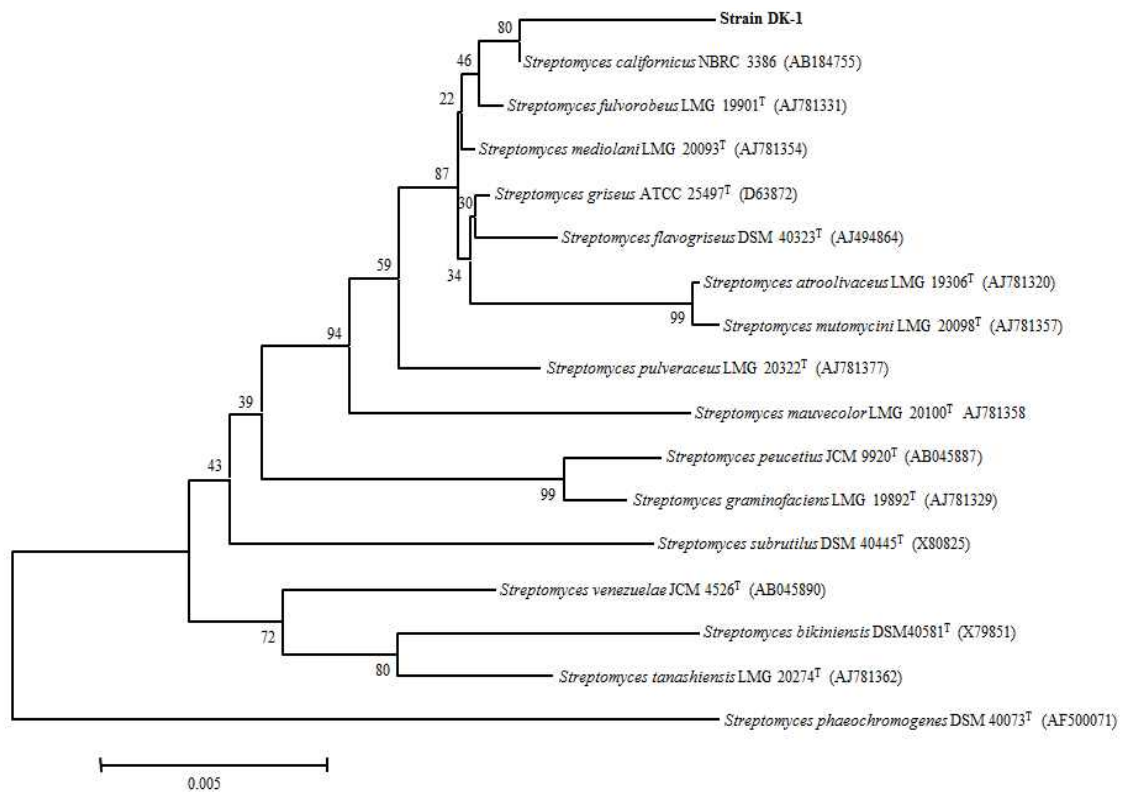


Figure 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of *Streptomyces* sp. DG-2 and closely related members of the genus *Streptomyces*. Number at nodes are levels of bootstrap support based on neighbour-joining analyses of 1,000 replications.

일반적으로 미생물 중 *Streptomyces*와 *Bacillus*는 항생물질의 보고로 잘 알려져 있다. 그람 양성인 *Streptomyces*는 사상체를 가지며 영양분의 고갈이나 외부환경의 변화가 일어나면 균사에 격막을 형성하며, 성장하기에 좋은 환경이 되면 포자가 발아하여 균사를 형성한다[14]. *Streptomyces*는 항생제뿐만 아니라 항암제, 면역 억제제 등 다양한 2차 대사산물을 생산하는데, 최근까지 생리활성물질로서 항생제 테트라사이클린, 항진균제 나이스타틴, 항암제 독소루비신, 면역 억제제 FK506 등이 분리되었으며 현재 상용화되고 있는 항생제의 60% 이상이 방선균으로부터 유래되었다[11].

Streptomyces sp. DG-2의 최적 성장 조건

항MRSA 활성물질을 생산하는 *Streptomyces* sp. DG-2의 최적 성장 조건을 알아보기 위하여 온도, pH 및 NaCl을 농도별로 실험한 결과, 최적 성장 온도는 25°C였으며, 최적 pH는 7.0, 최적 NaCl 농도는 1.0%로 나타났다(Fig. 2-4). 본 균주는 20~30°C에서 높은 성장률을 보였으며, 10°C 이하에서는 잘 자라지 못

하였다. pH 6.0에서 9.0까지의 비교적 넓은 범위의 pH 조건에서도 잘 성장하였으며, NaCl 농도의 경우 0 ~ 2.0%까지의 농도에서 잘 성장하나 7.0% 이상에서는 거의 성장하지 못 하였다. 따라서 DG-2 균주는 해양 방선균이지만 기수역에서 더 좋은 성장을 보이는 육상 유래 방선균으로 추정된다.

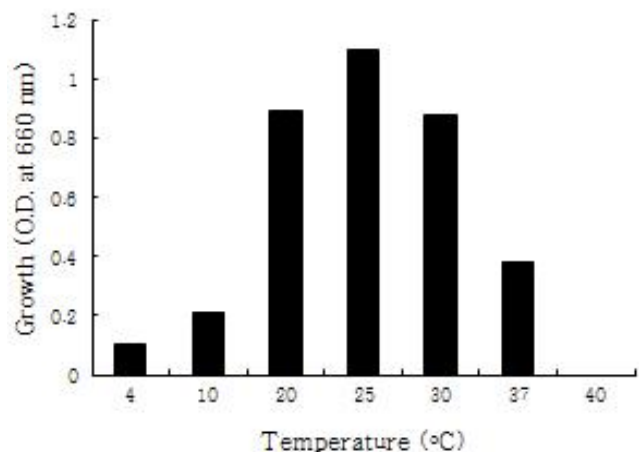


Figure 2. Effects of temperature on the growth of *Streptomyces* sp. DG-2 in PPES-II medium. Cells were incubated for 48 hr (pH 7.0, 1.0% NaCl).

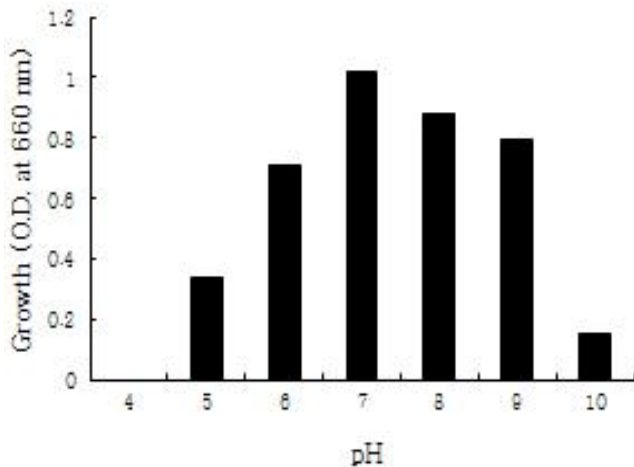


Figure 3. Effects of initial pH on the growth of *Streptomyces* sp. DG-2 in PPES-II medium. Cells were incubated for 48 hr (25°C, 1.0% NaCl).

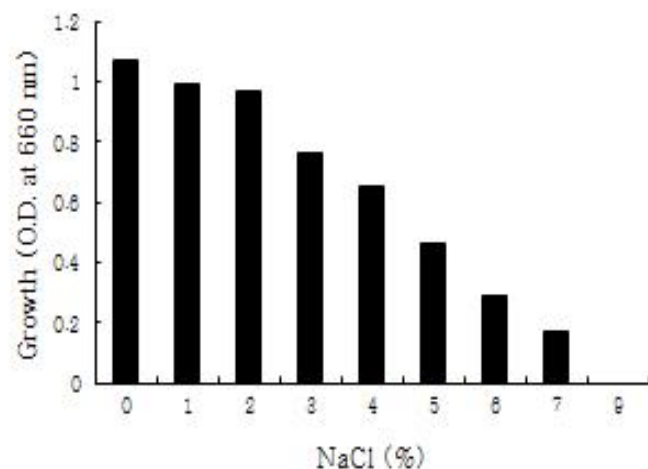


Figure 4. Effects of NaCl concentrations on the growth of *Streptomyces* sp. DG-2 in PPES-II medium. Cells were incubated for 48 hr (25°C, pH 7.0).

Streptomyces sp. DG-2 조추출물의 항MRSA 및 항균 활성

Streptomyces sp. DG-2 균주를 25°C 에서 180 rpm으로 7일간 교반하며 30 L를 배양하였다. 배양액을 ethyl acetate와 1:1 혼합한 후, 3회 반복 추출하여 ethyl acetate층을 회수하고 evaporator (Eyela, Japan)로 감압 농축하여 1.06 g의 조추출물을 얻었다. MRSA KCCM 40511 균주를 NA 배지에 100 µL씩 도말하고 조추출물을 2-fold dilution하여 paper disk에 분주하여 저해환의 크기를 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 즉, 80 µg/disk 농도에서 ethyl acetate 조추출물은 16 mm의 생육 저해환을, 160 µg/disk 농도에서 19 mm

의 저해환을 형성하였다.

또한 80 µg/disk 농도에서 조추출물의 MRSA 임상 분리균주 및 그람 양성/음성균에 대한 활성을 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 조추출물은 80 µg/disk 농도에서 임상분리 MRSA 균주인 DA 8과 DA 16 균주에 대해 각각 10 mm와 14 mm의 저해환을 형성하였다. 또한 *Bacillus subtilis* KCTC 1028에 대해서 15 mm의 저해환을 형성하였다. *Bacillus subtilis*는 고초균으로 고온과 건조에 저항성이 강한 것으로 알려져 있으며, 비병원성이지만 결막염과 홍채염 등 만성 화농증을 일으킬 수 있는 미생물이다. 또한 *Legionella briminghamensis* KCTC 2007에 12.5 mm의 저해환을 형성하였는데, *Legionella briminghamensis*는 레지오넬라증과 이질의 원인균으로 잘 알려져 있다. 그러나 같은 농도에서 *Mycobacterium smegmatis* KCTC 2002 및 *Aeromonas hydrophila* KCTC 2358에 대해서는 저해환을 형성하지 못 하였다. 이상의 결과, 조추출물은 기존의 다른 항생제들과 마찬가지로 그람 음성균 보다 그람 양성균에서 더 높은 활성을 보이는 것으로 판단되었다.

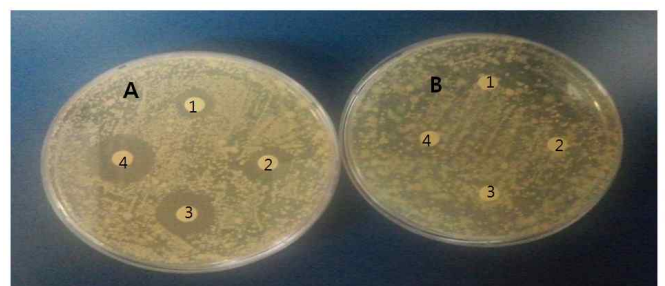


Figure 5. Anti-MRSA activity of crude extract of *Streptomyces* sp. DG-2 against MRSA KCCM 40511. (A) 1, 20 µg/disk; 2, 40 µg/disk; 3, 80 µg/disk; 4, 160 µg/disk; (B) Control: 100% MeOH.

조추출물의 열과 pH에 대한 안정성

Streptomyces sp. DG-2의 ethyl acetate 조추출물의 열과 온도에 대한 안정성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 즉, 60°C 까지 상대 활성의 차이가 거의 없었으며, 80°C 이상에서는 약간 활성이 떨어지는 경향을 보였으나 100°C 에서도 비교적 높은 활성을 유지하였다. 이상의 결과 DG-2 조추출액의 활성물질은 열에 안정한 내열성 물질로 판단된다. 또한 pH의 경우, 중성과 약염기성에서는 안정하였고, 산성 쪽으로 갈수록 불안정

한 결과를 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 *Streptomyces* sp. DG-2의 추출물은 항MRSA 물질을 함유하고 있을 뿐만 아니라 내열성 물질임을 알 수 있었다.

Table 2. Antibacterial activity of ethyl acetate extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and pathogenic bacteria.

Test bacteria	Concentration (µg/disk)	Inhibition zone diameter (mm) ¹⁾
Gram positive		
MRSA KCCM ²⁾ 40511	80 µg/disk	16
DA ³⁾ 8	80 µg/disk	10
DA 16	80 µg/disk	14
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC ⁴⁾ 1028	80 µg/disk	15
Gram negative		
<i>Pseudomonas reactants</i> KCCM 42882	80 µg/disk	9
<i>Mycobacterium smegmatis</i> KCTC 2002	80 µg/disk	- ⁵⁾
<i>Legionella briminghamensis</i> KCTC 2007	80 µg/disk	12.5
<i>Aeromonas hydrophila</i> KCTC 2358	80 µg/disk	-
<i>Shigella flexnery</i> KCTC 2008	80 µg/disk	7

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

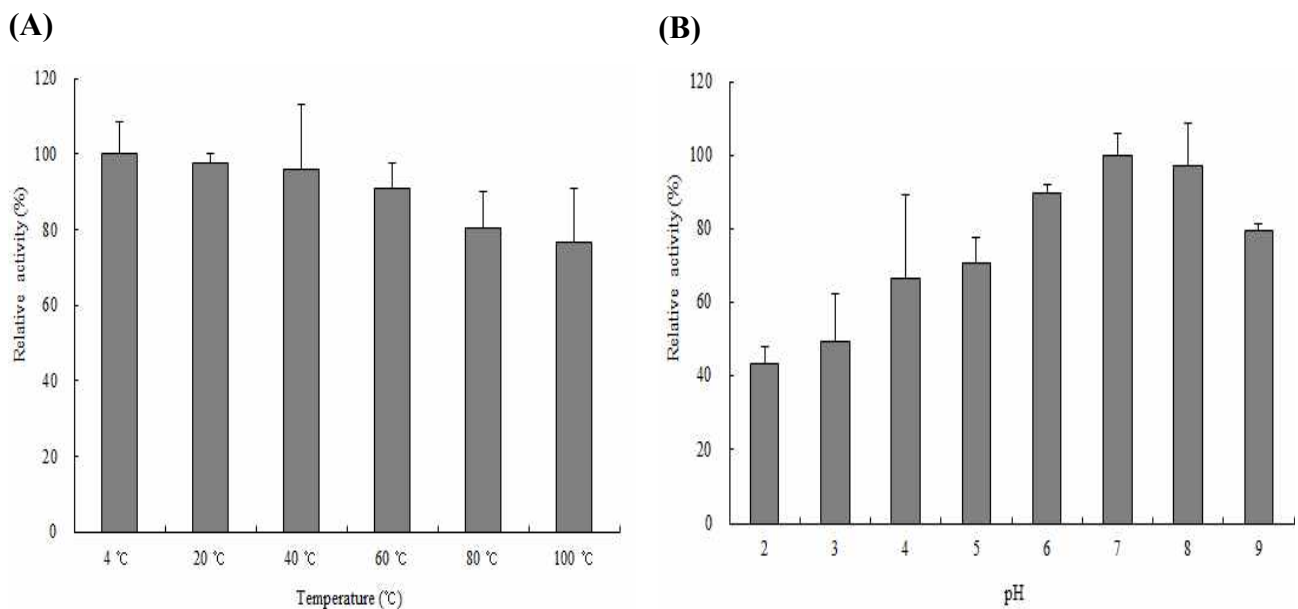


Figure 6. The thermal (A) and pH stability (B) of the ethyl acetate extract of *Streptomyces* sp. DG-2. For the stability test, the extract was incubated at an indicated temperature and pH for 24 hr. After treatment, the anti-MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) activity was estimated. All assays were done in five times.

결 론

최근 병원 감염의 주 원인균이며 기존 항생제에 다제내성을 보이는 MRSA가 심각한 문제가 되고 있다. 다제내성균에 대한 치료제로 vancomycin이나 teicoplanin이 사용되고 있으나 그 사용이 매우 제한적이며, 이들 항생제에 대한 내성균주들도 최근에 많이 출현하여 새로운 항생제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

울산 앞바다의 해수에서 항MRSA 활성을 가진 DG-2 균주를 생리, 생화학적 특성 조사 및 16S rDNA 분석을 통하여 계통분류학적으로 분류한 결과, 본 균주를 *Streptomyces* sp. DG-2로 명명하였다. DG-2 균주의 최적 성장 온도는 25°C였으며, 최적 pH는 7.0, 최적 NaCl 농도는 1.0%로 나타났다. DG-2의 ethyl acetate 조추출물은 MRSA KCCM 40511 균주에 대해서 80 µg/disk 농도에서 16 mm의 저해환을, 160 µg/disk 농도에서 19 mm의 저해환을 형성하였다. 또한 80 µg/disk 농도에서 임상분리 MRSA 균주인 DA 16번에 대해 14 mm의 저해환을 형성하였고, *Bacillus subtilis* KCTC 1028에 대해서 15 mm의 저해환을, *Legionella briminghamensis* KCTC 2007에 12.5 mm의 저해환을 형성하였다. 또한 그람 음성 보다 그람 양성 균주에 높은 항균활성을 나타내었다. *Streptomyces* sp. DG-2의 ethyl acetate 조추출물은 60°C까지 높은 활성을 유지하였고 100°C에서도 비교적 높은 활성을 유지하여 내열성의 항균물질을 가졌음을 알 수 있었고, 이 물질은 중성과 약염기성에 안정한 물질로 판단된다.

이상의 결과 향후 *Streptomyces* sp. DG-2로부터 순수분리 정제된 최종물질의 화학적 특성을 파악하고, 물질의 구조를 NMR을 통하여 규명하고, 작용기작을 밝힌다면 장차 차세대 항생제로서의 개발 가능성이 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 한국연구재단의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다(NRF 2014047543).

References

1. Christopher, G. D., Coffey, T. J. and Spratt, B. G. 1994. Origin and molecular epidemiology of

penicillin-binding-protein-mediated resistance to β -lactam antibiotics. *Trends Microbiol.* **2**, 361-366.

2. Davis, S. L., Perri, M. B., Donabedian, S. M., Manierski, C., Singh, A., Vager, D., Haque, N. Z., Speirs, K., Muder, R. R., Robinson-Dunn, B., Hayden, M. K. and Zervos, M. J. 2007. Epidemiology and outcomes of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. J. Clin. Microbiol.* **45**, 1705-1711.

3. Dunbar, J., Ticknor, L. O. and Kuske, C. R. 2000. Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2943-2950.

4. Faver, B., Hofbauer, B., Hildering, K. S. and Ryder, N. S. 2003. Comparison of *in vitro* activities of 17 antifungal drugs against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4817-4819.

5. Gordon, L. A. and Niemeyer, M. 1994. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in *Staphylococci*. *Trends Microbiol.* **2**, 343-3772.

6. Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J. and Tiemersama, E. 2006. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet.* **368**, 874-885.

7. Gulder, T. A. and Moore, B. S. 2009. Chasing the treasures of the sea-bacterial marine natural products. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 252-260.

8. Hamann, M. T. and Scheuer, P. J. 1993. Kahalide F., a bioactive depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elisia refescens* and the green alga *Bryopsis* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 5825-1826.

9. Hiramatsu, K. 2001. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *J. Infect. Dis.* **1**, 1-16.

10. Howden, B. P., Davies, J. K., Jonhson, P. D., Stinear, T. P. and Grayson, M. L. 2010. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol. Rev.* **23**, 99-139.

11. IMS health. 2009. IMS MIDAS.

12. MacFaddin, J. F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. (2nd eds), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp 36-308.

13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M07-A8. (8th ed), National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

14. Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J. Y., Tomono, A. and Horinouchi, S. 2005. AdpA, a central transcriptional regulator in the a-factor regulatory cascade that leads to

- morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 431-439.
15. Proksch, P., Edrada, R. A. and Ebel, R. 2003. Drugs from the sea- opportunities and obstacles. *Mar. Drugs.* **1**, 5-17.
16. Klevens, R. M., Edwards, J. R., Richards, C. L., Jr Horan, T. C., Gaynes, R. P., Pollock, D. A. and Cardo, D. M. 2007. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep.* **122**, 160-166.
17. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. (2nd eds), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 25-28.
18. Taga, N. 1968. Some ecological aspects of marine bacteria in the Kuroshio current. *Bull. Misaki Mar. Biol. Kyoto Univ.* **12**, 50-76.
19. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genomics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28(10)**, 2731-3739.