

## D-Alaninepeptidase에 의한 세균의 삼투압 및 항생제에 대한 취약성 증가

송진수 · 이영남<sup>1,\*</sup>

충북대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>1</sup>충북대학교 바이오연구소

삼투압 환경에서 D-alaninepeptidase가 세균의 생존에 미치는 영향을 D-alaninepeptidase에 노출시킨 세균의 생존율로 살펴본바, 균을 D-alaninepeptidase와 삼투압에 동시에 노출시켰을 때, 균의 생존율이 대조군에 비하여 현저히 감소되었는데, 그람 양성 균보다 그람 음성 간균의 생존감소율이 더욱 컸다. D-Alaninepeptidase와 높은 삼투압 환경에 노출시킨 균의 경우, 삼투압에만 노출시킨 대조군에 비하여 균체의 와해 또는 손상을 받은 비정형적 균의 수가 많이 증가했음을 주사전자현미경으로 관찰하였다. D-Alaninepeptidase와 항생제에 동시에 노출시킨 세균들(항생제 내성 균주 포함)의 항생제(gentamycin, vancomycin, kanamycin)에 대한 감수성을 원판확산법으로 살펴본바 D-alaninepeptidase에 노출시킨 세균들의 항생제 감수성이 증가하는 추세였는데 *Proteus vulgaris* 균주들의 vancomycin에 대한 감수성 증가는 괄목할 만하였다. 따라서 D-alaninepeptidase에 의하여 세균벽이 취약해져 삼투압이나 항생제 같은 외적 환경에 균이 민감해지는 것으로 사료된다.

**Keywords** □ antibiotic susceptibility, D-alaninepeptidase, malformed cells, osmotic pressure, survival

세균은 다른 생명체에서는 볼 수 없는 독특한 성분으로 이루어진 펩티도글리칸으로 된 세포벽을 지니고 있다. 세균의 세포벽은 외부 환경의 변화로부터 균을 보호하는 매우 중요한 구조로 세포벽에 이상이 생기면 생명력에 큰 손상을 받는다. 세균의 세포벽은 N-acetylglucosamine  $\beta$ -1,4 acetylmuramic acid-tetrapeptide의 중합체인 펩티도글리칸층이 서로 transpeptidation으로 연결된 견고한 구조로 균이 주변 삼투압 변화에 견딜 수 있도록 한다(15, 26, 30). 세포벽 성분의 tetrapeptide를 구성하는 아미노산은 세균의 종에 따라 차이가 있지만, 모든 세균 벽구조의 disaccharide-peptide subunit 말단에는 다른 생명체에서는 볼 수 없는 D-alanine이 존재한다. 세포벽 합성의 전구물질인 N-acetylglucosamine  $\beta$ -1,4 acetylmuramic acid-pentapeptide로 peptide의 말단에는 D-ala-D-ala가 있으며, transpeptidation으로 펩티도글리칸층과 층이 서로 연결되어 세포벽 구조를 만들 때, 최말단의 D-alanine은 떨어져 나간다. 따라서 disaccharide-pentapeptide의 말단 부위에 있는 D-ala-D-ala dipeptide는 펩티도글리칸의 transpeptidation에 꼭 필요한 것이다(15). 만일 D-alanine dipeptide 합성이 부실하거나 또는 D-alanine peptide 결합이 끊어져 D-ala-D-ala dipeptide에 차질이 생기면, 펩티도글리칸층의 형성이 원활치 못하여 부실한 세포벽이 만들어질 것이며 따라서 세포벽 합성이 제대로 이루어지지 않아 세균은 외적 환경 변화에 취약해질 수 있다.

미생물성 질환 치료 약제에 대한 내성균의 증가는 매우 심각한 보건 문제로 내성균에 대한 대책이 절실하다(2, 4, 11, 12,

27, 29, 33, 40). 내성균의 제어대책으로 내성균에 탁월한 효과를 보이는 새로운 약제 또는 구조를 변환시킨 유도체의 개발이나, 약효를 상승시킬 수 있는 보조 물질의 개발이 수행되고 있다(17, 19, 20, 23, 24, 28, 35, 39, 44). 균의 약제 내성은 여러 가지 기작으로 구현되고 있는데(3, 9, 21, 31, 34, 37, 38), 약제 내성균의 제어는 궁극적으로 균체 안의 약물이 유효농도에 다다르지 않고는 기대할 수 없을 것이다. 따라서 약제의 유효농도를 고양하는 방법으로 세균의 세포벽을 부실하게 하는 물질을 생각할 수 있으며, 세포벽이 부실하면 약물의 유입이 늘어날 뿐만 아니라 균이 외적, 내적 환경 변화에 적절히 대응하지 못하여 생명력이 취약해 짐으로(increase in susceptibility) 항생물질과 세균의 세포벽을 부실하게 만드는 물질을 병용하면 항균성의 상승효과(synergistic effect)를 볼 수 있을 것이다(5).

자연생태계 중요한 구성원인 미생물은 생명 활동의 결과로 다양한 대사산물을 생산하는데, 이러한 대사산물 가운데 효소제, 항생물질, 항암제 등 생리 활성 물질이 많아 생리활성물질의 보고로서 미생물의 가치가 널리 인식되고 있다(32). 약제 내성 균주에 대한 치료대책의 일환으로 미생물 질환 치료 약제의 효과를 향진하는 항균활성 향진물질(enhancer of antibiotic activity)을 탐색하는데 항균활성 향진물질의 후보로 세균 세포벽 성분의 하나인 D-alaninepeptide를 분쇄하여 세균 세포안으로 약물의 수송을 도와 줄 수 있는 D-alaninepeptidase를 들 수 있다. 본 연구실에서는 토양에서 분리한 단백분해효소 생산성이 탁월한 *Bacillus amyloliquefaciens* CMB01을 보고하였다(13). *B. amyloliquefaciens* CMB01은 대한민국 특허를 지녔는데(특허 제0450687호), 이 균주에서 D-alaninepeptide를 가수분해하는 D-alaninepeptidase를 정제하여 효소의 특성을 발표한 바 있다(41, 42). 본 논문에서는

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 043-261-2301, Fax: 043-264-9600  
E-mail: ynlee@chungbuk.ac.kr

몇몇 세균을 *B. amyloliquefaciens* CMB01에서 정제한 D-alanine-peptidase와 gentamycin 등 수종의 항생제로 함께 처리했을 때 균의 항생제에 대한 감수성에 변화가 있는지를 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 균주의 배양 및 시약

배지는 Difco 제품(Detroit, USA)을, 시약 등 기타 재료는 대부분 Sigma Chem Co. (St. Louis, USA) 또는 BBL (BBL products, Baltimore, USA)에서 구입하였다. 삼투압 노출 실험에 사용한 균은 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* CM, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *P. vulgaris* CCARM (gentamycin 내성 균주, MIC<0.5 µg gentamycin/ml)이며 LB배지(tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%, pH 6.8)에서 균을 배양하였다. 항생제 감수성 실험에는 상기의 균뿐만 아니라, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853와 항생제내성균주은행(서울여자대학교소재, <http://www.knmrc.or.kr>)에서 분양받은 임상분리 항생제 내성 균주인 *S. aureus* CCARM (vancomycin 내성 균주, MIC 0.5 µg vancomycin/ml), *P. aeruginosa* CCARM (gentamycin 내성 균주, 128 µg gentamycin/ml)도 함께 사용하였다. D-Alaninepeptidase는 *B. amyloliquefaciens* CMB01의 초음파 세포 분쇄액(sonic cell free extract)을 황화암모늄으로 단백을 분획한 후, MonoQ anion exchange chromatography, Sephadex G-200 gel filtration을 거쳐 순수 정제한 것을 사용하였다(42).

### Osmotic stress에 노출된 균의 성장곡선의 변화

LB 액체배지(10 ml)에 균을 접종하고 37°C에서 24시간 진탕 (150 rpm) 배양하여 균액을 마련하였다. 각각 1%, 5%, 10%의 NaCl이 첨가된 LB 액체배지(100 ml/250 ml 플라스크)에 준비된 균 액을 1 ml씩 동량 접종하고 위와 같은 조건으로 배양하며 1 시간마다 광학 밀도(OD<sub>600</sub>)를 측정하여 균의 성장곡선을 구하였다. 각 균의 성장을 허용하는 최대 NaCl의 농도로 균주의 삼투압에 대한 내구성의 정도를 판단하였다.

### Osmotic stress와 D-alaninepeptidase에 노출된 균의 생존율

각 균의 성장을 허용하는 농도의 NaCl (*S. aureus* ATCC 25923: 10%, *P. vulgaris* CM strain: 1%, *K. oxytoca* ATCC 8724: 5%, *P. vulgaris* CCARM: 5%)과 D-alaninepeptidase 효소를 100 unit/ml, 200 unit/ml 첨가한 LB 액체배지(5 ml)에 각기 24시간 배양된 균액을 1 ml씩 동량 접종한 후 37°C에서 18시간 배양하였다. 배양 균액을 멸균된 0.85% NaCl액으로 적절히 희석한 후 희석 균액의 일정량을 LB 고체배지에 골고루 도말하고 37°C에서 24시간 동안 배양하여 형성된 집락수(colony forming unit)를 계수하여 균의 생존율을 구하였다. 각 희석 균액에 대하여 3배수 실험을 하였다.

### D-Alaninepeptidase와 항생제의 병용시 항생제에 대한 균의 감수성 변화

*S. aureus* ATCC 25923, *P. vulgaris* CM, *K. oxytoca* ATCC 8724, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. fluorescens* ATCC 1397, *P. syringae* KCTC 1823, *K. aerogenes* (SHV-1) 1976E와 항생제 내성균주은행(<http://www.knmrc.or.kr>)에서 분양받은 *S. aureus* CCARM (vancomycin 내성), *P. aeruginosa* CCARM (gentamycin 내성), *P. vulgaris* CCARM (gentamycin 내성)의 항생제에 대한 감수성을 원판 확산법으로 측정하였다. 항생제 원판(직경 6 mm)으로 gentamycin (10 µg), kanamycin (30 µg), vancomycin (30 µg)(BBL products, Baltimore, USA)을 사용하였다. LB나 tryptic soy broth에서 24시간 배양한 균액 100 µl를 LB 고체배지에 골고루 도말하고 그 위에 효소 5 unit를 첨가한 항생제 원판을 무균 조각으로 올려놓고 37°C에서 24-48시간 배양 후 항생제 원판 주변의 균의 성장 저지환의 크기를 측정하였다. 대조 실험으로 효소액 첨가 원판, 효소액 무첨가 항생제 원판을 사용하였다. 모든 과정을 같은 조건으로 3번 이상 반복하였다(22).

### D-Alaninepeptidase와 삼투압 스트레스에 노출된 세균의 형태 관찰

D-Alaninepeptidase와 삼투압 스트레스에 노출된 세균의 형태를 전자현미경으로 관찰하였다. 하룻밤 동안 LB 배지에서 자란 *S. aureus*와 *P. vulgaris* CCARM을 각각 균의 성장을 허용하는 최대 농도의 NaCl (각각 10%, 5%)이 첨가된 LB 액체배지에 2-3 ml를 접종한 후 이에 효소액(100 unit/ml)을 첨가하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 원심분리 (12,000 × g, 20 min, 4°C)한 후 얻어진 균체를 LB 고체배지에 균층이 보이도록 도말하였다. 균이 도말된 배지를 7 mm × 7 mm 크기로 도려내어 2.5% glutaraldehyde액에서 3시간 동안 1차 고정된 후 100 mM 인산완충액(pH 7.2)으로 2회 세척하였다. 1% osmium tetroxide액에서 1시간 동안 2차 고정된 후 상기 완충액으로 2회 세척하였다. 고정된 시료를 ethanol 농도를 높여가면서 탈수시켰다(13). 준비된 시료를 sputter coater (IB-3, Giko Co., Japan)로 gold coating한 후 주사전자현미경(S-2500C Hitachi, 충북대학교 공동실험실습관)으로 균의 형태를 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

감염균의 항생제에 대한 내성은 본래 균이 지닌 구조나 대사 경로 등 고유 성질에 따른 내재적 내성(intrinsic resistance)이 있기도 하지만 대부분은 항생제 사용 이후 후천적으로 획득된 것(acquired resistance)이다(43). 따라서 내성을 획득한 균을 효과적으로 제어하기 위하여 새로운 약제의 탐색이나, 기존 약제의 구조를 변형시킨 유도체를 개발하려는 연구가 부단히 진행되고 있다. 한편 기존 약제의 약효를 고양시킬 수 있는 보조 물질이나 균체 안으로 수송되는 약물의 유효농도를 높이는 방안도 내성균 제어 대책이 될 수 있는데, 이런 연구는 거의 없다. D-Alanin-

peptidase는 세균의 펩티도글리칸벽의 구조를 부실하게 할 수 있는데 균은 세포벽이 부실하면 외적, 내적 환경 변화에 적절히 대응할 수 없다(15, 26). 동·식물계에 흔히 존재하는 peptidase는 L-stereospecific peptidase이며 L-stereo-specific peptidase에 관한 연구는 다수 있다(36). D-Stereospecific peptidase 존재는 세균 등 일부 생명체에게만 국한되어 있는데, D-stereospecific peptidase에 관한 연구보고는 그리 많지 않다. Asano 등(6)은 *Ochrobactrum anthropi*에서, Baek 등(10)은 호열성 *Bacillus* 속 세균에서 D-stereospecific aminopeptidase를 분리 보고하였다. 특히 Asano 등(7)은 *O. anthropi*에서 분리한 D-aminopeptidase의 구조가 *Streptomyces* R61의 carboxypeptidase DD (penicillin 결합 단백질)와 *E. coli* K-12의 class C  $\beta$ -lactamase와 구조가 유사함을 보고하면서 세균에서 얻은 D-aminopeptidase를 penicillin을 인식하는 효소 균의 하나라고 제안하였다(7, 8). 한편 Fanuel 등(18)은 *O. anthropi*가 D-alanyl-p-nitroanilide에 효소 활성을 보이는 D-alaninepeptidase를 2종 가지고 있음을 보고하였으나 세균에서 분리한 D-alaninepeptidase가 세균 세포벽의 구조 유지에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구 보고는 없다. 따라서 본 연구자들은 *B. amyloliquefaciens* CMB01에서 정제한 D-alaninepeptidase가 세균의 삼투압 스트레스나 항생제에 대한 취약성에 영향을 주는지를 알아보았다.

우선 각기 다른 농도의 NaCl이 첨가된 액체 LB 배지에서 균을 배양하면서 균들의 성장을 허용하는 최대 NaCl의 농도를 알아본바(Fig. 1), *S. aureus*는 알려진 바와 같이 높은 삼투압 환경

에서도 잘 성장하였으며(1), 약제 내성이 없는 *P. vulgaris* CM 균주는 삼투압에 매우 민감함을 관찰하였다. 그러나 약제내성 균주인 *P. vulgaris* CCARM 균주와 *K. oxytoca*는 5% NaCl이 함유된 배지에서도 잘 자랐으며, 특히 약제내성 균주 *P. vulgaris* CCARM은 10% NaCl이 함유된 배지에서도 성장하는 것으로 보아 높은 삼투압을 감당할 수 있는 것으로 사료되었다. 또한, *P. vulgaris*의 약제내성 균주와 비내성 균주가 보여준 서로 다른 osmotic stress 대응 양상이 흥미로웠다. 임상분리 약제내성 *S. aureus*의 경우 고도 내성 균주와 중간 정도 내성 균주의 세포벽 구조에 큰 차이가 있다는 보고가 있어(38), 약제내성 균주인 *P. vulgaris* CCARM의 높은 염 삼투스트레스에 대한 내구성도 약제내성으로 인한 균의 세포벽 구조의 변화와 상관성이 있는 것으로 사료되었다.

각 균의 성장을 허용하는 농도의 NaCl (*S. aureus* ATCC 25923: 10%, *P. vulgaris* CM strain: 1%, *K. oxytoca* ATCC 8724: 5%, *P. vulgaris* CCARM: 5%)과 D-alaninepeptidase를 첨가한 LB 액체배지에 균을 배양하면서 염 삼투스트레스를 받고 있는 균에 대한 D-alaninepeptidase의 영향을 균의 생존율로 알아본바, Fig. 2에서 볼 수 있듯이 D-alaninepeptidase에 노출된 균의 생존율은 노출되지 않은 대조군에 비하여 감소하였으며, D-alaninepeptidase의 활성이 높을수록 생존율의 감소가 현저했는데, D-alaninepeptidase에 노출된 균은 세포벽 구조의 변화로 인해 삼투압에 취약해져 생명활동에 지장을 받는다고 사료되었다. *P. vulgaris*, *K. oxytoca* 같은 그람 음성 간균의 생존율이 그람 양성

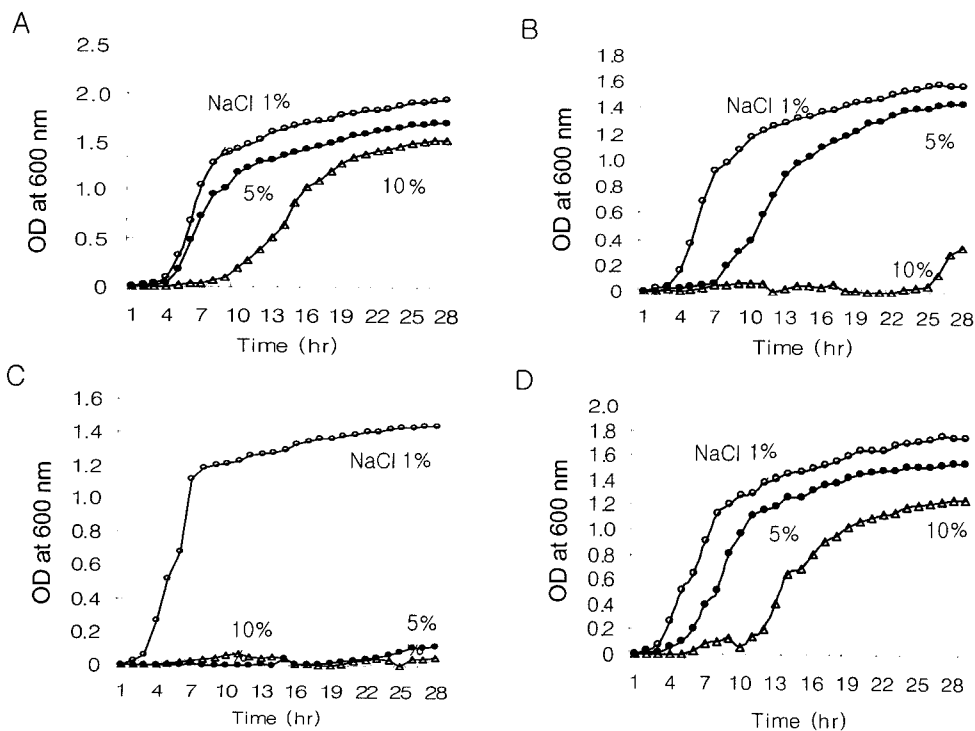
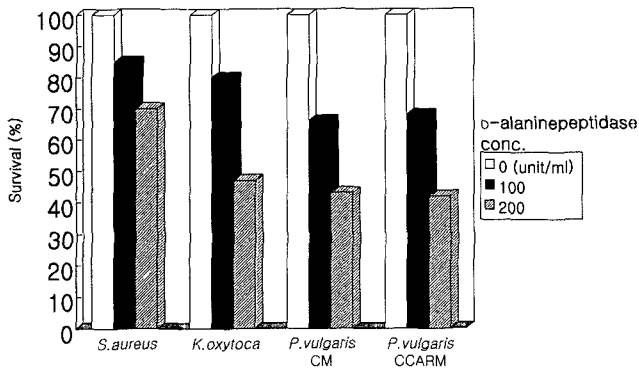


Fig. 1. The growth curve of bacteria at different NaCl concentration. A, *S. aureus* ATCC 25923; B, *K. oxytoca* ATCC 8724; C, *P. vulgaris* CM strain; D, *P. vulgaris* CCARM.

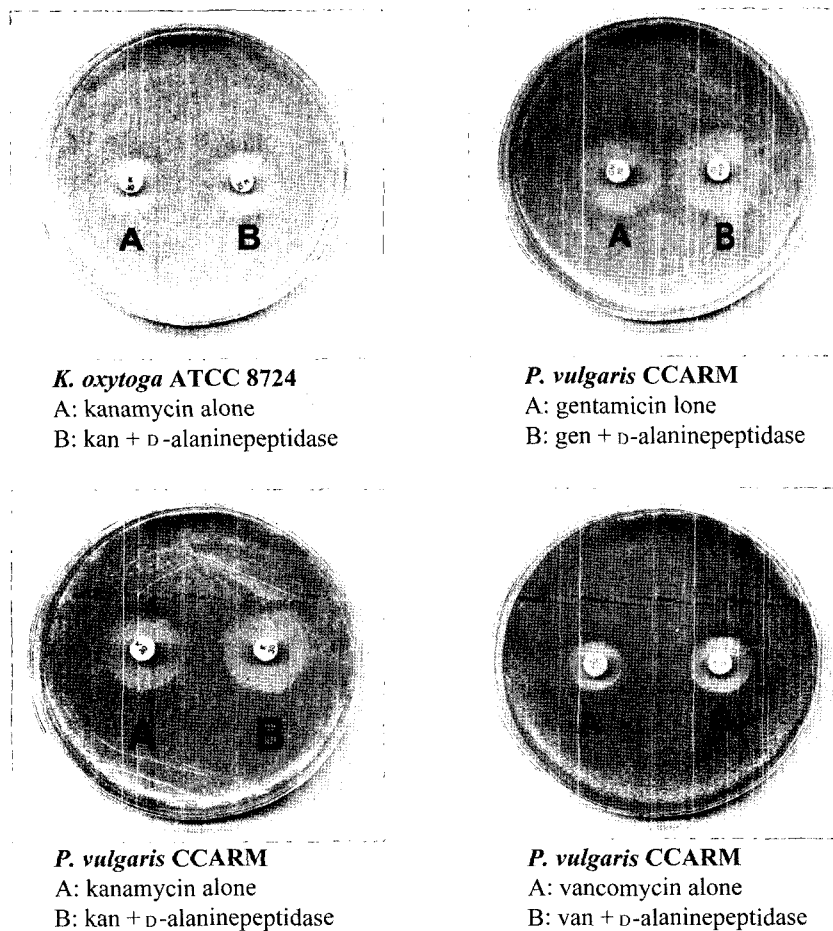


**Fig. 2.** Survival of bacteria exposed to osmotic stress in presence of D-alaninepeptidase. These figures are representative results among three separate experiments.

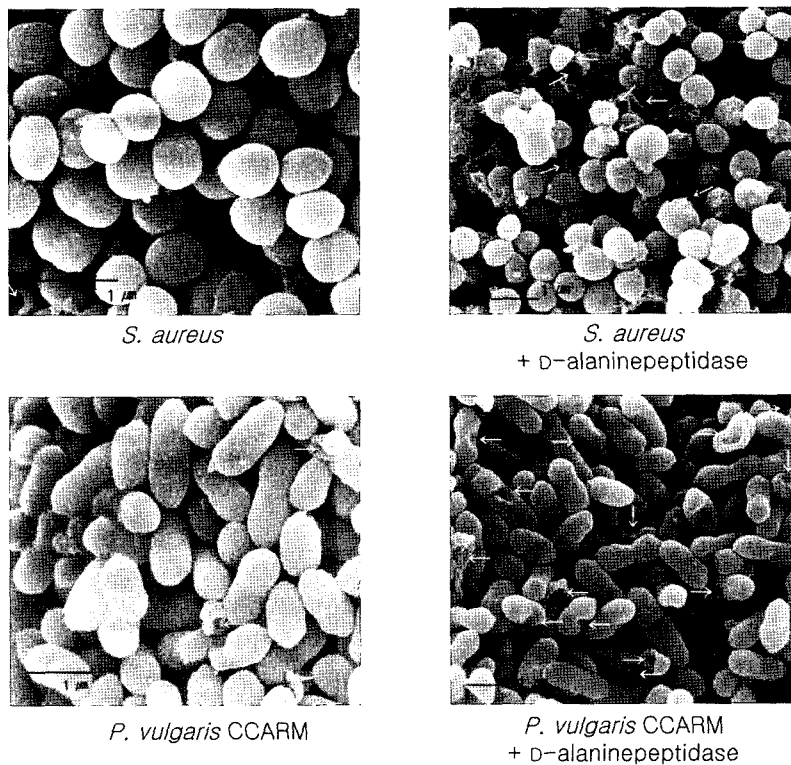
구균인 *S. aureus*의 생존을 보다 현저하게 줄였는데, 이런 차이는 그람 음성 간균과 그람 양성 구균의 펩티도글리칸층의 구조 또는 구성비가 서로 다르기 때문이라 본다(16). 전술한 것처럼 *P.*

*vulgaris*의 약제내성 균주와 비내성 균주의 삼투압 스트레스에 대한 반응 양상이 다름에도 불구하고 성장을 허용하는 농도의 NaCl이 함유된 배지에서 D-alaninepeptidase에 노출된 경우 두 균주는 거의 비슷한 생존율을 보였다.

균의 항생제 감수성에 대한 D-alaninepeptidase의 영향을 원판 확산법(disc diffusion method)으로 알아본바 D-alaninepeptidase와 항생제를 함께 적용했을 때 전반적으로 균의 성장억제대(growth inhibitory zone)가 증가하였다(Fig. 3). 특히 vancomycin (30 µg)에 의한 *P. vulgaris* CM, kanamycin (30 mg)에 대한 *K. oxytoca* ATCC 8724, gentamycin (10 µg), *K. aerogenes* (SHV-1) 1976E 등의 성장 억제제는 괄목할만하였다(Table 1). 임상분리 항생제 내성 균주 가운데 *S. aureus* CCARM, *P. aeruginosa* CCARM의 경우는 D-alaninepeptidase 처리에 의한 항생제 감수성의 변화를 감지할 수 없었으나, gentamycin에 내성을 지닌 *P. vulgaris* CCARM 균주의 경우 D-alaninepeptidase와 항생제를 병용하였을 때, gentamycin은 물론 실험에 사용한 다른 항생제에 의하여도 균의 성장이 현저하게 억제됨을 관찰하였다. 따라서 D-alaninepeptidase를 처리한 균의 항생제 감수성 변화는 균과 항생제 중



**Fig. 3.** Growth inhibition around antibiotic discs with/without D-alaninepeptidase. Five unit of enzyme was loaded on each antibiotic disc. There was no growth inhibition occurred around disc loaded with only enzyme (data not shown). These figures are representative results among several separate experiments.



**Fig. 4.** SEM of bacteria exposed to osmotic stress in presence of D-alaninepeptidase. Left: *S. aureus* and *P. vulgaris* CCARM grown in medium containing 10% and 5% NaCl, respectively (control). Right: Bacteria grown in medium composing respective concentration of NaCl and D-alaninepeptidase (100 unit/ml). Arrows point out the malformed cells.

류에 따라 다름을 알 수 있었다. 요도감염세균인 *P. vulgaris*는 다수의 항생제에 대하여 내재적 내성(intrinsic resistance)을 지니고 있을 뿐만 아니라 내성을 획득한 균주의 출현도 빈번하여 치

료에 어려움이 많다(14, 25). 따라서 *P. vulgaris*성 질환의 치료효과를 높이기 위한 방안으로 항생제와 D-alaninepeptidase를 병용함도 고려해 볼 수 있다.

**Table 1.** Growth inhibition of bacteria by antibiotics in presence of D-alaninepeptidase

Strain	Antibiotics (AB)	Growth inhibition (dia. in mm)		Remark
		AB alone	AB + D-alapeptidase <sup>a</sup>	
<i>S. aureus</i>	Gen (10 µg)	16.0	17.0	
ATCC 25923	Kan (30 mg)	15.0	16.5	
<i>P. aeruginosa</i>	Gen (10 µg)	16.0	17.0	
ATCC 27853	Kan (30 mg)	NI <sup>b</sup>	NI	
<i>P. vulgaris</i> CM	Gen (10 µg)	18.0	19.0	
	Kan (30 mg)	19.0	20.5	
	Van (30 µg)	14.0	18.0	
<i>K. oxytoga</i> ATCC 8724	Gen (10 µg)	18.0	18.0	
	Kan (30 mg)	15.0	18.0	
<i>K. aerogens</i> (SHV-1) 1976E	Gen (10 µg)	17.0	20.0	
	Kan (30 mg)	15.0	16.0	
<i>S. aureus</i> CCARM	Gen (10 µg)	NI	NI	van <sup>®</sup> clinical isolate (MIC: 0.5 µg/ml)
	Kan (30 mg)	NI	NI	
<i>P. aeruginosa</i> CCARM	Gen (10 µg)	18.0	18.0	gen <sup>®</sup> clinical isolate (MIC: 128 µg/ml)
	Kan (30 mg)	NI	NI	
<i>P. vulgaris</i> CCARM	Gen (10 µg)	20.0	24.0	gen <sup>®</sup> clinical isolate (MIC<0.5 µg/ml)
	Kan (30 mg)	21.0	23.0	
	Van (30 µg)	13.5	17.0	

<sup>a</sup>: 5 unit of D-alaninepeptidase loaded on antibiotic disc (6 mm in diameter). There was no growth inhibition occurred around disc loaded with only enzyme (data not shown). <sup>b</sup>: No growth inhibition.

약제에 민감한 *S. aureus* 균주(ATCC 균주)와 약제 내성 균주인 *P. vulgaris* CCARM을 삼투압 스트레스와 D-alaninepeptidase에 노출시킨 뒤 균들의 형태를 주사전자현미경으로 관찰한바(Fig. 4) 균의 형태에 큰 차이가 있음을 알 수 있었다. *S. aureus*의 경우 D-alaninepeptidase가 없는 10% NaCl에서 자란 균은 대체로 단정한 모양을 지닌 것에 비하여 NaCl과 D-alaninepeptidase에 노출된 균은 손상을 받거나 와해된 것이 다수 관찰되었다. *P. vulgaris*의 경우 D-alaninepeptidase에 노출된 균들은 균체가 찌그러들거나 구멍이 난 것이 현저하게 증가하였음을 볼 수 있었다. 따라서 D-alaninepeptidase에 노출된 세균들은 D-alaninepeptidase에 의하여 세포벽이 연약해져 삼투압 스트레스에 대한 내구성의 줄어들어 생명활동이 지장이 있는 것으로 사료되었다. 따라서 D-alaninepeptidase로 인한 세균의 세포벽 부실은 균을 삼투압 스트레스에 민감하게 하며, 항생물질과 D-alaninepeptidase를 병용하면 삼투압에 취약해진 균체에 대하여 증폭된 항생효과를 기대할 수 있어 항생제를 적게 사용하고도 치료 효과를 기대할 수 있을 것이다. 특히 *P. vulgaris* CCARM 같은 약제내성 그람 음성 세균균주에 대한 대책의 일환이 될 수 있으리라 본다. 그러나 효소의 임상적 이용은 제한적일 수 있어 D-alaninepeptidase를 임상적으로 응용하려면 효소의 특수한 전달 체계(enzyme-antibiotic linked specific delivery system) 및 약물 동태 연구(pharmacodynamics)가 선행되어야 할 것이다.

### 감사의 글

이 연구는 2002년도 충북대학교 연구진흥장려금으로 이루어졌음.

### 참고문헌

- 이동석. 2005. 필수임상미생물학, p. 32-35, 라이프사이언스, 서울.
- 윤은정, 윤종민, 최성숙, 권애란, 심미자, 최응칠. 2006. 임상분리 그람 양성 구균에 대한 MLS계 항생물질의 내성. 약학회지 50, 204-207.
- 윤은정, 김현지, 권애란, 최성숙, 심미자, 최응칠. 2006. 안개형 저지원을 갖는 MLS 내성 황색포도상 구균의 내성 기전. 약학회지 50, 199-203.
- 임상수, 김미광, 민정범, 김민정, 박순남, 황호길, 국중기. 2006. 감염근관에서 분리 배양한 세균의 수종 항생제에 대한 감수성 조사. 미생물학회지 42, 185-194.
- Amsterdam, D. 1992. Susceptibility. p. 161-163. In J. Lederberg(ed.), Encyclopedia of Microbiology. Vol. 4. Academic Press, Tokyo, Japan.
- Asano, Y., A. Nakazawa, Y. Kato, and K. Kondo. 1989. Properties of a noble D-stereospecific aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi*. *J. Biol. Chem.* 264, 14233-14239.
- Asano, Y., Y. Kato, A. Yamada, and K. Kondo. 1992. Structural similarity of D-aminopeptidase to carboxypeptidase DD and  $\beta$ -lactamases. *Biochemistry* 31, 2316-2328.
- Asano, Y., H. Ito, T. Dairi, and Y. Kato. 1996. An alkaline D-stereospecific endopeptidase with D-lactamases activity from *Bacillus cereus*. *J. Biol. Chem.* 271, 30256-30262.
- Babic, M., A.M. Hujer, and R. Bonomo. 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on  $\beta$ -lactamase. *Drug resist. Updates* 9, 142-156.
- Baek, D.H., S.J. Kwon, J.S. Park, S.G. Lee, T.I. Mheen, and M.H. Sung. 1999. Discovery of D-stereospecific dipeptidase from thermophilic *Bacillus* sp. BCS-1 and its application for synthesis of D-amino acid containing peptide. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 646-649.
- Baglan, P., H.G. Bozdayi, M. Ozkan, K. Ahmed, A.M. Bozdayi, and A. Ozden. 2006. Clarithromycin resistance prevalence and *Icea* Gene status in *Helicobacter pylori* clinical isolates in Turkish patients with duodenal ulcer and functional dyspepsia. *J. Microbiol.* 44, 409-416.
- Bambeke, F., M. Chauvel, P.E. Reynolds, H.Y. Fraimow, and P. Courvalin. 1999. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecalis* clinical isolates and revertant mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 41-47.
- Ban. O.-H., S.-S. Han, and Y.N. Lee. 2003. Identification of a potent protease producing bacterial isolate, *Bacillus amyloliquefaensis* CMB01. *Ann. Microbiol.* 53, 95-103.
- Baron, E.J., R.S. Chang, D.H. Howard, J.N. Miller, and J.A. Turner. 1993. Medical Microbiology, A short course, p. 397-399, Wiley-Liss, New York, USA.
- Dmitriev, B., F.V. Toukach, O. Holst, E.T. Rietchel, and S. Ehlers. 2004. Tertiary structure of *Staphylococcus aureus* cell wall murein. *J. Bacteriol.* 186, 7141-7148.
- Dmitriev, B., F. Toukach, and S. Ehlers. 2005. Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. *Trends Microbiol.* 13, 569-574.
- El-Naggari, M.Y., S.A. El-Assar, and S.M. Abdul-Gawad. 2006. Meroparamycin production by newly isolated *Streptomyces* sp. strain MAR01: taxonomy, fermentation, purification and structural elucidation. *J. Microbiol.* 44, 432-438.
- Fanuel, L., I. Thamm, V. Kojanjevacki, B. Joris, C. Goffin, J. Brannigan, J. van Beeumen, and J.M. Frere. 1999. Two new aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi* active on D-alanyl-p-nitroanilide. *Cell Mol. Life. Sci.* 55, 812-818.
- Fathalla, O.A., S.M. Awad, and M.S. Mohamed. 2005. Synthesis of new 2-thiouracil-5-sulphonamide derivatives with antibacterial and antifungal activity. *Arch. Pharm. Res.* 28, 1205-1212.
- Fraise, A.P. 2006. Tetracycline: The answer to beta-lactam and fluoroquinolone resistance? *J. Infec.* 53, 293-300.
- Gill, M.J., N.P. Brenwald, and R. Wise. 1999. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 187-189.
- Harold, J.B. 1985. Antimicrobial sensitivity testing, p. 138-144. In Microbiological Applications. Wm. C. Brown Publishers, New York, USA.
- Hasegawa, T., M. Kakushima, M. Hatori, S. Aburaki, S. Kakimura, T. Furumai, and T. Oki. 1993. Pradimicins T1 and T2, New antifungal antibiotics produced by an *Actinomyces* II. Structure and biosynthesis. *J. Antibiotics* (Tokyo) 46, 598-605.
- Hedge, V., M. Patel, A. Horan, V. Gullo, and J. Marquez. 1992. Macrolactams: A novel class of antifungal antibiotics produced by *Actinomyces* spp. *J. Antibiotics* (Tokyo) 45, 624-632.
- Hoban, D.J., S.K. Bouchillon, J.L. Johnson, G.G. Zhanel, D.L. Bulter, K.A. Saunders, L.A. Miller, J.A. Poupard, and the Surveillance Study Research Group. 2003. Comparative *in vitro* potency of amoxicillin-clavulanic acid and four oral agents against North American clinical isolates from a global surveillance study. *Int. J.*

- Antimicrob. Agents* 21, 425-433.
26. Hölftje, J.-V. 1998. Growth of the stress bearing and shape maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 181-203.
  27. Johnson, D.M., M.G. Stilwell, T.R. Fritsche, and R.J. Jones. 2006. Emergence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance Program (1999-2003). *Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.* 56, 69-74.
  28. Kim, B.S. and B.K. Hwang. 1993. Production, purification and antifungal activity of antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain B5. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 3, 12-18.
  29. Knapp, J.S., J.M. Zenilman, J.W. Biddle, G.H. Perkins, W.E. DeWitt, M.L. Thomas, S.R. Johnson, and S.A. Morse. 1987. Frequency and distribution in the United States of strains of *Neisseriae gonorrhoeae* with plasmid mediated, high level resistance to tetracycline. *J. Infect. Dis.* 155, 819-822.
  30. Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Packer. 2003. Brock's Biology of Microorganisms (10th), p. 75-79, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.
  31. Mine, T., Y. Morita, A. Kataoka, T. Mizushima, and T. Tsuchiya. 1999. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 415-417.
  32. Omura, S. 1992. The Search for bioactive compounds from microorganisms. Springer-Verlag, Tokyo, Japan.
  33. Ormerod, L.P., J.M. Harrison, and P.A. Wright. 1990. Drug resistance trend in *Mycobacterium tuberculosis*: Blackburn 1985-89. *Tubercle* 71, 283.
  34. Paulsen, I.T., M.H. Brown, and R.A. Skurray. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60, 575-608.
  35. Rajasekaran, A., S. Murugesan, and K. Anandarajagopal. 2006. Antibacterial, antifungal and anticovulsant evaluation of novel newly synthesized 1-[2-(1H-tetrazol-5-yl)ethyl]-1H-benzo[d][1,2,3]triazoles. *Arch. Pharm. Res.* 29, 535-540.
  36. Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, and V.V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 597-635.
  37. Selwyn, Q., T. Imai, Y. Mikami, K. Yazawa, E.R. Dabbs, N. Morisaki, S. Iwasaki, Y. Hashimoro, and K. Furihata. 1999. ADP-ribosylation as an intermediate step in inactivation of rifampin by a Mycobacterial gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 181-184.
  38. Sieradzki, K. and A. Tomasz. 2003. Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 185, 103-110.
  39. Silver, L.L. and K.A. Bostian. 1993. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 377-383.
  40. Sin, E., H.-G. Hong, Y. Ike, K. Lee, Y.H. Park, D.T. Lee, and Y. Lee. 2006. VanB-VanA incongruent VRE isolated from animals and humans in 1999. *J. Microbiol.* 44, 453-456.
  41. Song, J.S. and Y.N. Lee. 2002. Purification and characterization of D-alaninepeptidase from *Bacillus amyloliquefaciens* CMB01. p. 248, Abstr. 9th Int. Sym. Gen. Ind. Microorg. Gyeongju, 2002.
  42. Song, J.S. 2002. Master's Thesis. Chungbuk National University, Cheongju.
  43. Walsh, C. 2003. Natural and producer immunity versus acquired resistance, pp. 91-106. In *Antibiotics, actions, origins, resistance*. ASM Press, Washington DC, USA.
  44. Zhao, P.-J., L.-M. Fan, G.-H. Li, N. Zhu, and Y.-M. Shen. 2005. Antibacterial and antitumor macrolides from *Streptomyces* sp. Is9131. *Arch. Pharm. Res.* 28, 1228-1232.

(Received November 2, 2006/Accepted December 11, 2006)

#### ABSTRACT: D-Alaninepeptidase Increases the Vulnerability of Bacterial Cells to Osmotic Stress and Antibiotics

Jin Sue Song and Young Nam Lee<sup>1,\*</sup> (Division of Life Sciences, College of Natural Sciences and <sup>1</sup>Biotechnology Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea)

D-Alaninepeptidase purified from *Bacillus amyloliquefaciens* CMB01 caused a reduction of survival of *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca*, and *Staphylococcus aureus* placed under the osmotic pressure. D-Alaninepeptidase caused an increase of susceptibility of bacteria to antibiotics. An increased number of malformed cells in bacterial groups exposed to D-alaninepeptidase was observed by scanning electron microscopy. These data suggested that bacterial cells exposed to D-alaninepeptidase resulted in an increase of vulnerability of bacterial cells toward environmental stress, such as osmotic pressure and antibiotic substances.