



Burkholderia sp. OS17의 항균활성 증진을 위한 배양최적화

남영호¹ · 최아영¹  · 황병수² · 정유진^{1*} 

¹국립낙동강생물자원관 배양기술개발부, ²국립낙동강생물자원관 산업소재화연구부

Antimicrobial activities of *Burkholderia* sp. strains and optimization of culture conditions

Young Ho Nam¹, Ahyoung Choi¹ , Buyng Su Hwang², and Eu Jin Chung^{1*} 

¹Culture Techniques Research Division, Nakdonggang National Institute of Biological Resources (NNIBR), Sangju 37242, Republic of Korea

²Bioresources Industrialization Research Division, Nakdonggang National Institute of Biological Resources (NNIBR), Sangju 37242, Republic of Korea

(Received June 4, 2018; Revised September 19, 2018; Accepted October 8, 2018)

In this study, we isolated and identified bacteria from freshwater and soil collected from Osang reservoir, to screen antimicrobial bacteria against various pathogenic bacteria. 38 strains were isolated and assigned to the class *Proteobacteria* (22 strains), *Actinobacteria* (7 strains), *Bacteroidetes* (6 strains), and *Firmicutes* (3 strains) based on 16S rRNA gene sequence analysis. Among them, strain OS17 showed a good growth inhibition against 5 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strains and *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Filobasidium neoformans*. As a result of the 16S rRNA gene sequence analysis, strain OS17 show the high similarity with *Burkholderia ambifaria* AMMD^T, *B. diffusa* AM747629^T, *B. tettitorii* LK023503^T 99.8%, 99.7%, 99.6%, respectively. We investigated cell growth and antimicrobial activity according to commercial culture medium, temperature, pH for culture optimization of strain OS17. Optimal conditions for growth and antimicrobial activity in strain OS17 were found to be: YPD medium, 35°C and pH 6.5. When the strain was cultured in LB, NB, TSB, R2A media at 20°C and 25°C, the antimicrobial activity did not show. Culture filtrate of strain OS17 showed antimicrobial activity against 5 MRSA strains, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, and *Filobasidium neoformans* with inhibition zones from 2 to 8

mm. Optimal reaction time was 48 h in YPD medium, 100 rpm and 0.3 vvm in 2 L-scale fed-batch fermentation process for antimicrobial activity. Culture optimization of strain OS17 can be improved on antimicrobial activity. Therefore, the antimicrobial activity of *Burkholderia* sp. OS17 had potential as antibiotics for pathogens including MRSA.

Keywords: *Burkholderia* sp., *Staphylococcus aureus*, antimicrobial activity, methicillin-resistant

항생물질이란 모든 생물을 죽이거나 성장을 억제시키는 물질을 말하며 이러한 물질로 만든 약을 항생제(antibiotics) 또는 항균제(antimicrobial agents)라는 용어가 함께 사용되고 있다. 1960년도 들어서면서부터 전 세계적으로 항생제 내성균이 출현하면서 현재는 항생제 내성균과도 대항할 수 있는 미생물의 새로운 대사물질을 찾기 위한 노력이 계속되고 있다. 항생제의 발견은 인류의 골치거리였던 감염병 치료에 큰 역할을 하였고, 많은 과학자들은 머지않은 미래에 감염병 정복을 예상하였다. 그러나, 현실적으로 항생제내성균에 의한 감염병이 발생하면서 인류는 해결할 수 없는 난제에 봉착하게 되었다(Saga and Yamaguchi, 2009).

미생물은 잠재력이 있는 유용한 대사산물을 생산하는 종들

*For correspondence. E-mail: eujene@nnibr.re.kr;
Tel.: +82-54-530-0961; Fax: +82-54-530-0969

이 널리 알려져 있으며, 특히 *Burkholderia* 속(genus)은 넓은 범위의 항균제를 생산할 수 있는 것으로 알려져 있다(Vial *et al.*, 2008; Mahenthiralingam *et al.*, 2011). 잘 알려진 종류로는 pyrrolnitrin (Cartwright *et al.*, 1995), altericidins (Kirinuki *et al.*, 1977), cepacin A와 cepacin B (Parke *et al.*, 1984), pseudoanes과 cepacidines A와 B (Meyers *et al.*, 1987), pseudane (Homma *et al.*, 1989), phenazine (Cartwright *et al.*, 1995), cepaciamides A와 B (Jiao *et al.*, 1996), quinolinone (Moon *et al.*, 1996), lipo-peptides와 AFC-BC11 (Kang *et al.*, 1998), CF661 (Quan *et al.*, 2006)를 포함한다.

또한, *Burkholderia* 속(genus)은 *Pseudomonas* 속의 RNA homology group II의 멤버로 최초 밝혀진 속이다(Yabuuchi *et al.*, 1992). 몇몇 *Burkholderia* 종은 식물·동물 병원균, 이차대사 산물을 생산하는 길항미생물로 알려져 있으며 식물생장 촉진 효과도 확인되었다(Vandamme *et al.*, 2007; Suárez-Moreno *et al.*, 2012; Farh Mel *et al.*, 2015). 특히, *Burkholderia ambifaria*는 작물의 질소흡수를 증진시켜 생장을 촉진하는 역할을 한다 (Parra-Cota *et al.*, 2014). 또한, 항진균 효과가 있는 cyclic lipopeptides인 burkholdines를 분리하여 생물학적 방제의 재료로 이용가치를 인정받고 있다(Tawfik *et al.*, 2010).

이러한, 항균물질을 생산할 수 있는 미생물산업이 각광을 받으면서 대장균, 효모 등 미생물들의 유용물질 생산성을 높일 수 있는 배양조건, 정제공정 등의 최적화 연구의 중요성이 대두되었다. 이전의 많은 연구결과에 따르면 환경요인, pH, 온도, 공기량 등의 배양조건이 미생물의 세포생장성과 항생물질 생산에 영향을 줄 수 있다(Guerra-Santos *et al.*, 1986; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008).

본 연구의 목적은 항생물질을 생산하는 담수미생물을 발굴하고 항균활성을 증진시킬 수 있는 배양조건을 최적화하는 것이다.

본 실험을 위하여 경북 상주시 중동면의 축산농가 인근 오상저수지(36°26'22"N 128°16'40"S)에서 하천수와 퇴적토를 채취하였다. 수질환경은 멀티수질측정기인 YSI (556MPS)를 이용하여 측정하였다. 채취한 시료는 0.85% (w/v) NaCl 용액에 연속 희석하여 Reasoner's2A agar (R2A, Difco) 고체배지에 도말한 후, 25°C에서 3일간 배양하였다. 균체의 다양한 형태적 특성에 따라 각각 분리하고, 계대배양 과정을 거쳐 순수 분리하였다. 유전자 분석서비스는 Macrogen에 의뢰하여 진행하였다. 미생물의 핵산은 Qiagen DNeasy Tissue Kit를 이용하여 추출하였고, 16S rRNA 유전자의 증폭은 universal primer (27F, 5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3'와 1492R, 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3')를 사용하였다. EzBioCloud

(Yoon *et al.*, 2017)를 사용하여 연관성이 높은 유전자 서열을 획득, 비교 및 분석을 진행하였다. Multiple alignment는 CLUSTAL X program을 사용하여 수행하였다(Thompson *et al.*, 1997). 그 이후에 BioEdit program (Hall, 1999)을 사용하여 염기서열들을 정렬하고, 계통수는 MEGA 7 program (Kumar *et al.*, 2016)에서 제공하는 neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987), maximum-likelihood (Felsenstein, 1985) 그리고 maximum-parsimony (Fitch, 1971) algorithms을 이용하여 그렸다. 순수 분리된 미생물의 16S rRNA 유전자의 상동성은 EzBioCloud를 통해 계산하였다. Bootstrap values는 1,000 replicates를 만들어 계산하였다(Felsenstein, 1985).

항균활성 보유 미생물의 생장 가능한 배양조건과 최적 생장조건을 확인하기 위하여 배지, 온도, pH 테스트를 수행하였다. Reasoner's2A agar (R2A, Difco), Tryptic Soy Agar (TSA, Difco), Marine Agar (MA, Difco), Luria Bertani (LB, Difco), Nutrient broth (NB, Difco)의 상용화된 고체배지를 사용하여 미생물을 희석평판법으로 접종한 뒤, 30°C에서 3일간 정치배양 후 배지종류에 따른 성장여부를 육안으로 관찰하였다. 온도는 고체배지에 균주를 접종한 후에 4°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C에서 3일 배양 후 육안으로 성장여부를 확인하였다. pH는 4~12까지 0.5 간격으로 액체배지의 pH를 조절한 후 균주를 접종하고 28°C, 180 rpm으로 3일간 배양 후 육안으로 성장여부를 확인하였다.

순수분리한 미생물 중 항균활성 보유 미생물을 탐색하기 위해 10종의 표적미생물을 사용하였고, 각 미생물들은 항생제내성균주은행(ARM), 한국미생물보존센터(KCCM), 생물자원센터(KCTC), 농업유전자원정보센터(KACC)에서 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCARM 3089·3090·3091·3095와 KCCM 40510, *Bacillus cereus* KCTC 3624, *Bacillus subtilis* KACC 10111, *Escherichia coli* KCTC 2443, *Filobasidium neoformans* KATC 7902를 분양 받았다. 표적 미생물을 30°C, 24시간 액체배양 한 뒤, 배양액을 분광광도계를 이용하여 OD₆₀₀값 0.4~0.5로 희석 후 100 µl를 고체배지에 도말하였다. 그 후 순수분리한 균주를 도말배지 위에 streaking 한 후 28°C, 24시간 정치배양 후 주변의 억제지대 (clear zone) 관찰을 통해 1차로 항균활성 보유 미생물을 확인하였다. 선발된 미생물을 30°C, 48시간, 130 rpm으로 진탕배양한 후, 배양상등액을 필터(0.22 µm 크기)로 여과하였다. 배양여액 400 µl를 종이디스크(paper disc)에 올려 완전건조 후 표적미생물도 도말된 고체배지에 올려 28°C, 24시간 정치배양 후 억제지대(inhibition zone)를 확인하였다. 최종 선발한 항균미생물의 최적 배양조건 설정을 위해 배지, 온도, 초기 pH

별 생육 및 항균활성을 조사하였다. 초기 배양조건은 선발된 항균미생물을 종균(seed culture)으로 3% (v/v)로 접종하여, 28°C, 100 rpm으로 2일간 배양하였다. 배지는 LB, NA, TSB, YPD, R2A, Bennett's의 상용화된 배지를 사용하여 배지종류별 생육 및 항균활성을 확인하였다. 온도는 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C에서 온도별로 배양하였으며, pH는 5.5~8.5까지 0.5 간격으로 배지의 초기 pH를 조절한 후 각각의 최종 배양물의 생육 및 항균활성을 확인하였다. 위의 배양조건 결과를 바탕으로 5 L fermenter를 이용한 시간대별 배양액의 항균활성 확인하여 가장 효율적으로 항균물질을 생산할 수 있는 배양시간을 선정하였다. 항균미생물의 배지와 온도별 HPLC 패턴을 확인하기 위해 6개 배지에 5 ml씩 배양한 뒤, 에틸아세테이트로 2번 추출 후 농축하여 샘플로 사용하였다. HPLC는 Agilent 1260 system과 254 nm 검출파장을 사용하였으며, 분석방법은 C18 컬럼(Agilent Extend-C18 5u 250 × 4.6 mm), 유속 1 ml/min, 이동상은 물(A): 아세토니트릴(B) 기울기 조건(0~5 min: 5% B, 5~45 min: 5~95% B, 45~55 min: 95% B)를 주어 10

μl씩 주입하여 분석을 진행하였다.

본 연구를 통하여 2016년 3월 17일 낙동면 오상저수지에서 물과 주변 흙시료에서 각 24주씩 총 48균주들을 분리하였고, 중복되는 10종을 제외하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석으로 오상저수지에서 분리한 미생물들은 *Proteobacteria*강(22종), *Actinobacteria*강(7종), *Bacteroidetes*강(6종), *Firmicutes*강(3종)으로 구성되어 있었다(Table 1). 오상저수지의 환경분석 결과, 수온은 14.5°C, pH 7.8, DO 11.4 mg/L, 전기전도도는 330 μs/cm로 측정되었다. 순수분리된 38종의 균주를 대상으로 항균활성 보유 미생물을 탐색한 결과, OS17 균주가 희선평판법과 배양여액을 이용한 paper disc법 모두에서 항균활성을 확인하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석에 의한 계통분석을 통해 OS17 균주가 *Burkholderia ambifaria* AMMD^T, *Burkholderia diffusa* AM747629^T, *Burkholderia tettitorii* LK023503^T와 각각 99.8%, 99.7%, 99.6%의 상동성을 보였고 *Burkholderia* 속(genus)에 속하는 종(species)으로 확인하였다(Fig. 1). OS17 균주의 생장이 가능한 배지, 온도, pH를 탐색하고 최적 성장조

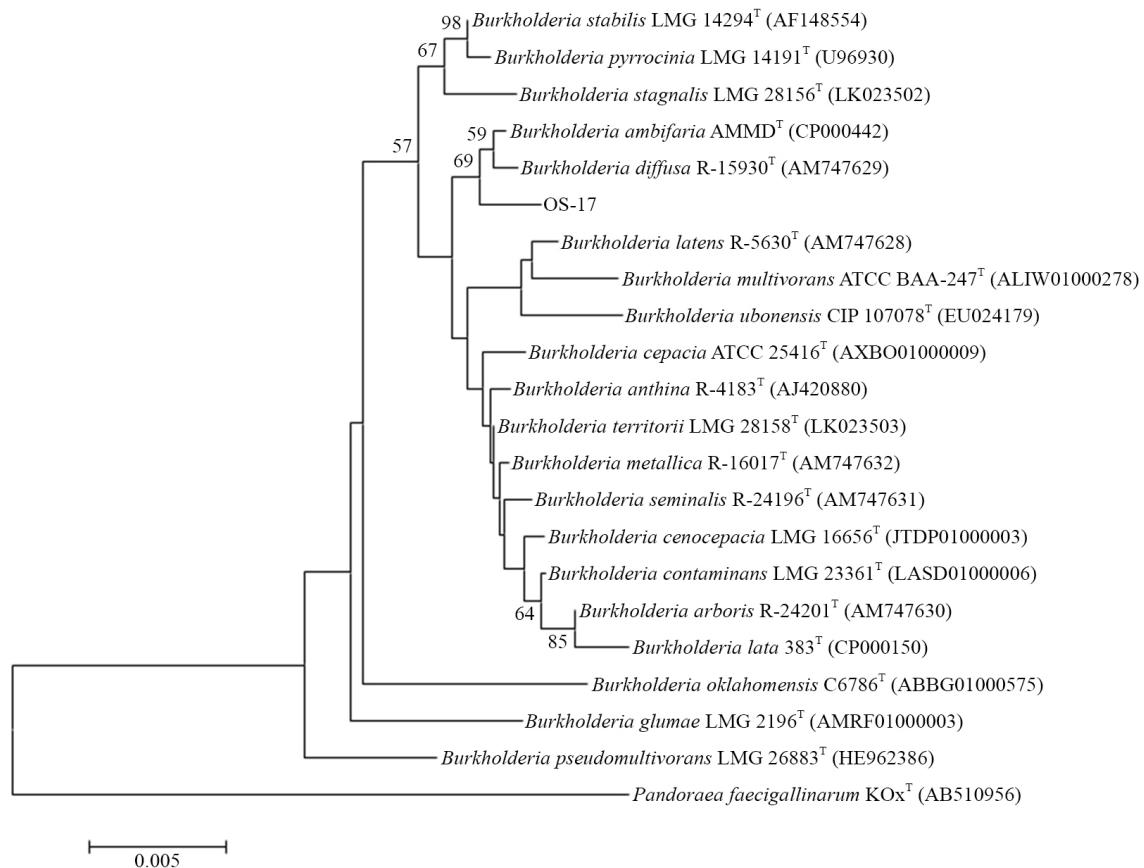


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationships among isolates belonging to the order *Burkholderia* sp. OS17 and related taxa. Numbers at nodes indicated bootstrap percentage (above 50%) based on 1,000 resampled data sets. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

Table 1. Strains obtained from Osang reservoir

Strains	Isolation source	Closest type strain (accession number, similarity)
OS-1	Soil	<i>Brevundimonas subvibrioides</i> (ADB01000034, 98.9%)
OS-2	Soil	<i>Agromyces ramosus</i> (X77447, 99.1%)
OS-3	Soil	<i>Erythromicrobium ramosum</i> (AF465837, 99.7%)
OS-5	Soil	<i>Microbacterium pumilum</i> (AB234027, 99.6%)
OS-6	Soil	<i>Hydrogenophaga palleronii</i> (AF019073, 98.8%)
OS-7	Soil	<i>Nocardioides plantarum</i> (AF005008, 98.8%)
OS-8	Soil	<i>Flavobacterium glaciei</i> (DQ515962, 99.23%)
OS-9	Soil	<i>Sphingopyxis contaminans</i> (HG008904, 99.7%)
OS-10	Soil	<i>Fibrella aestuarina</i> (HE796683, 99.7%)
OS-11	Soil	<i>Janthinobacterium lividum</i> (Y08846, 92.9%)
OS-12	Soil	<i>Rhodiferax antarcticus</i> (AF084947, 98.5%)
OS-13	Soil	<i>Pseudomonas psychrophila</i> (AB041885, 100%)
OS-14	Soil	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313, 99.9%)
OS-15	Soil	<i>Plantibacter flavus</i> (AJ310417, 99.8%)
OS-16	Soil	<i>Bacillus indicus</i> (JGVU01000 003, 99.86%)
OS-17	Soil	<i>Burkholderia ambifaria</i> (CP000442, 99.8%)
OS-18	Soil	<i>Altererythrobacter xinjiangensis</i> (HM028673, 95.7%)
OS-19	Soil	<i>Albidiferax ferrireducens</i> (CP000267, 99.1%)
OS-20	Soil	<i>Sphingomonas mali</i> (Y09638, 99.43%)
OS-21	Soil	<i>Kaistia soli</i> (EF592609, 98.27%)
OS-22	Soil	<i>Microbacterium testaceum</i> (X77445, 99.7%)
OS-23	Soil	<i>Polaromonas aquatica</i> (AM039830, 99.4%)
OS-24	Soil	<i>Rhizobacter fulvus</i> (AB245356, 99.8%)
OW-1	Surface water	<i>Arthrobacter oryzae</i> (AB279889, 99.8%)
OW-2	Surface water	<i>Pseudomonas moorei</i> (AM293566, 99.9%)
OW-4	Surface water	<i>Runella slithyformis</i> (CP002859, 97.9%)
OW-6	Surface water	<i>Emticicia sediminis</i> (KF309174, 97.8%)
OW-7	Surface water	<i>Rhizobium alvei</i> (HE649224, 96.43%)
OW-9	Surface water	<i>Rhodiferax saidenbachensis</i> (AWQR01000064, 98.8%)
OW-10	Surface water	<i>Brevundimonas bullata</i> (D12785, 98.9%)
OW-12	Surface water	<i>Arthrobacter scleromae</i> (AF330692, 99.2%)
OW-13	Surface water	<i>Fibrella aestuarina</i> (HE796683, 92.9%)
OW-14	Surface water	<i>Flectobacillus lacus</i> (DQ112352, 99.3%)
OW-16	Surface water	<i>Polaromonas jejuensis</i> (EU030285, 99.1%)
OW-20	Surface water	<i>Undibacterium seohonense</i> (KC735151, 99.2%)
OW-22	Surface water	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> (JQMX01000001, 99.8%)
OW-23	Surface water	<i>Caenimonas terrae</i> (GU181268, 98.0%)
OW-24	Surface water	<i>Leptothrix cholodnii</i> (X97070, 97.3%)

건을 확인하였다. OS17 균주는 R2A, TSA, MA, LB, NA 고체 배지에 모두 자랐으며, TSA와 LB에서 육안상 가장 잘 자랐다. 또한, 이 균주는 배양온도 10°C에서 45°C까지 생장이 가능했고, 20~35°C까지 육안상 가장 잘 자랐다. pH는 pH 4.5에서 12까지 생장이 가능했고, pH 5~11.5까지 육안상 가장 잘 자랐다.

항균활성 증진을 위한 배양배지 최적화 연구를 위해 상용 배지 LB, NB, TSB, YPD, R2A, Bennett's 배지에서 균주 생육량과 pH를 측정하였다. 가장 높은 생육을 보인 배지는 LB, TSB, YPD 배지로 OD값이 각각 5.6, 5.1, 3.5로 확인되었고, R2A 배지에서는 OD값이 1.1로 가장 낮은 생육을 보였다(Fig.

2A). OS17 균주는 배지에 따른 생육의 차이가 많이 났다. OS17 균주의 *S. aureus* CCARM 3089·3090·3091·3095, *S. aureus* KCCM 40510, *E. faecalis* KCCM 11814, *B. cereus* KCTC 3624, *B. subtilis* KACC 10111, *E. coli* KCTC 2443, *F. neoformans* KCTC 7902 10종에 대하여 성장억제거리를 측정하였다. OS17 균주는 YPD 배지와 Bennett's 배지에서 높은 항균활성을 나타냈으며, LB, NB, TSB, R2A 배지의 배양액은 항균활성이 전혀 없었다(Fig. 2B). 항균활성을 보였던 2개 배지의 조성 및 함량은 YPD 배지(dextrose 2%, yeast extract 1%, peptone 2%)와 Bennett's 배지(dextrose 1%, yeast extract 0.1%, proteose peptone No.3 0.2%)로 함량차이만 있을 뿐 조성이 유사하다. YPD 배지가 Bennett's 배지보다 활성이 더 좋은 이유는 함량이 더 높은 차이로 예측된다. 이 결과로 OS17 균주의 항균물질 생산에 적합한 배지의 조성 및 적절한 함량 예측이 가능하다.

활성이 가장 좋았던 YPD 배양액에서 *F. neoformans*에 대해서만 억제거리가 2 mm였고, 그 외 표적미생물에 대해서는 억제거리가 4~5 mm였다(Fig. 2B). 항균활성을 나타내는 YPD, Bennett's 배양물은 pH가 3.8~3.9였으며 대사산물로 산성물질이 생성되는 것으로 예상된다. OS17 균주의 최적배지는 YPD로 선정하였고 이후 진행되는 온도, 초기 pH별 생육 및 활성비교 실험은 YPD 배지에서 배양하여 진행하였다.

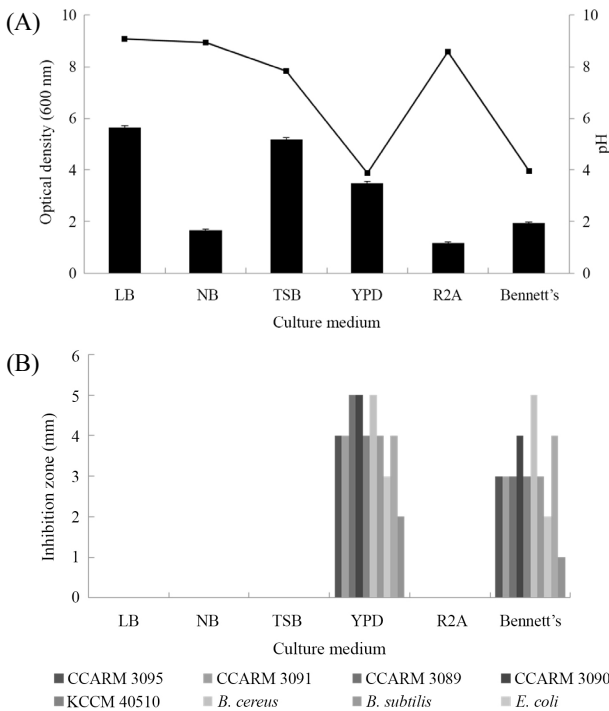


Fig. 2. Growth, pH (A) and antimicrobial activities (B) of *Burkholderia* sp. OS17 according to commercial media.

최적 배지로 선정된 YPD 배지를 이용하여 온도별 생육을 비교하기 위해 생육량과 pH를 측정하였다. 균체성장은 20~35°C 범위에서 OD값이 3.1~3.7로 고르게 잘 성장하였으며 40°C에서는 OD값이 0.1로 생장이 급격히 떨어졌다. 온도에 따른 최종 배양물의 pH는 3.8~5.2 범위로 확인하였다(Fig. 3A). OS17 균주의 항생제내성균과 장내유해미생물 10종에 대한 온도별 항균활성확인 결과, 30°C와 35°C에서만 2~6 mm의 억제거리를 확인하였다. OS17 균주를 35°C에서 배양했을 때 그 배양액 10종의 유해미생물에 대해 가장 활성이 높았으며, 20°C와 25°C 배양액은 전혀 활성이 없었다(Fig. 3B). 따라서, 항균 활성 최적 배양온도는 35°C로 선정하였다.

OS17 균주는 6개 배지 중 YPD와 Bennett's 배지에서만 활성이 있고, 20~40°C 배양온도에 활성 확인 시 30°C, 35°C에만 항균활성을 확인하였다. 배지와 배양온도별 항균활성 차이가 크기 때문에 각 배지·온도별 HPLC 패턴을 확인하였다. 확인 결과, YPD와 Bennett's 배지, 배양온도는 30°C, 35°C 시료에서 머무름 시간 4.9분에 공통적으로 나타나는 peak를 확인할 수 있었다(Figs. 6 and 7).

최적 배지로 선정된 YPD 배지와 최적 배양온도 35°C에서 초기 pH별 생육을 비교하기 위해 생육량과 pH를 측정하였다.

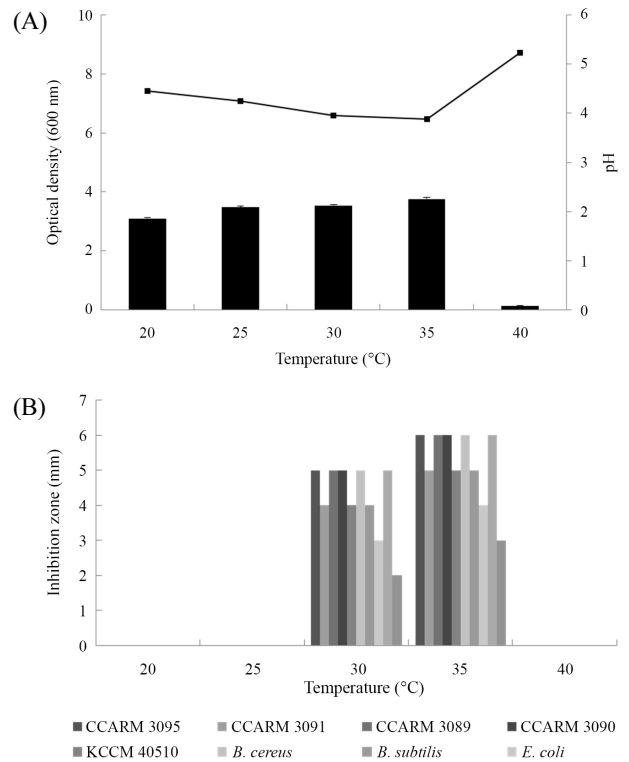


Fig. 3. Growth, pH (A) and antimicrobial activities (B) of *Burkholderia* sp. OS17 according to culture temperature.

균체성장은 pH 8.0과 8.5에서 OD값이 7로 가장 잘 성장하였고, pH 5.5~7.5까지는 OD값이 2.8~5.1 범위로 확인하였다(Fig. 4A). OS17 균주의 항생제내성균과 장내유해미생물 10종에

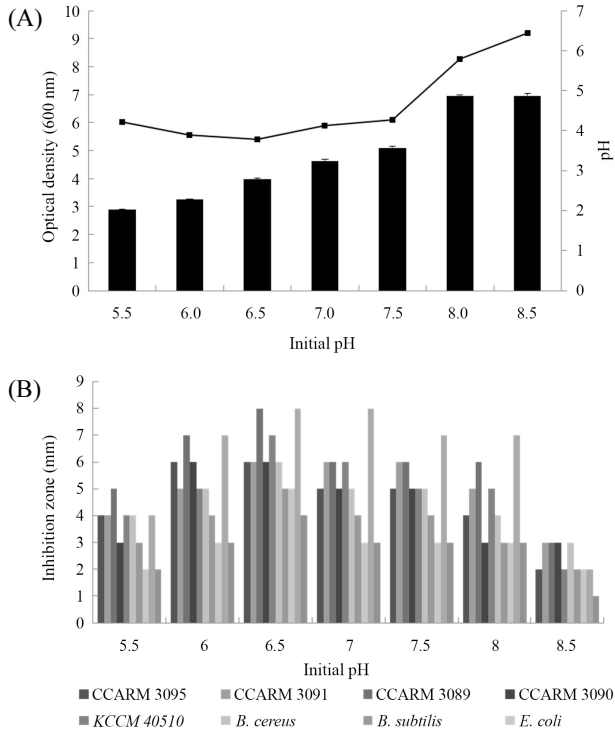


Fig. 4. Growth, pH (A) and antimicrobial activities (B) of *Burkholderia* sp. OS17 according to initial pH.

대한 초기 pH별 항균활성확인 결과, pH 5.5~8.8까지 모두 활성이 있었으며 pH 6.5에서 4~8 mm의 억제거리를 확인하였다. OS17 균주는 초기 pH가 6.5일 때 10종의 유해미생물에 대해 가장 활성이 높았다(Fig. 4B). 따라서, 항균활성 최적 초기 pH는 6.5로 선정하였다.

OS17 균주는 5 L fermenter를 이용하여 최적 배양시간 조건을 확인하였다. 이전 실험결과로 선정된 최적조건으로 YPD 배지, 35°C, 교반속도 100 rpm, 통기량은 0.3 vvm 조건하에 진행하였다. 생육패턴 확인결과, 접종 후 배양 24시간에 정지기로 들어서는 것으로 확인되었으며, 120시간 후에도 OD값은

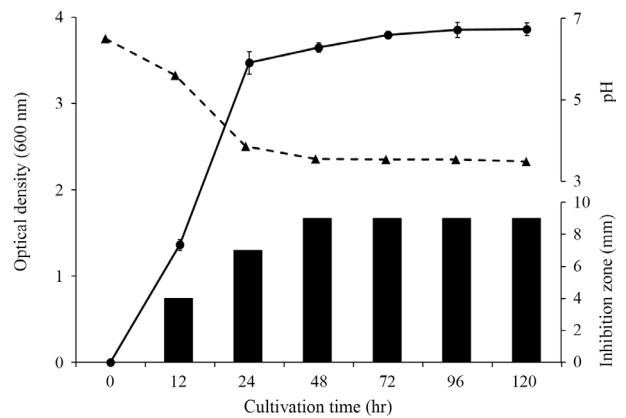


Fig. 5. Growth, pH and antimicrobial activities of *Burkholderia* sp. OS17 according to culture time by 5 L fermenter. Cell growth (●), pH (▲), Inhibition zone (■).

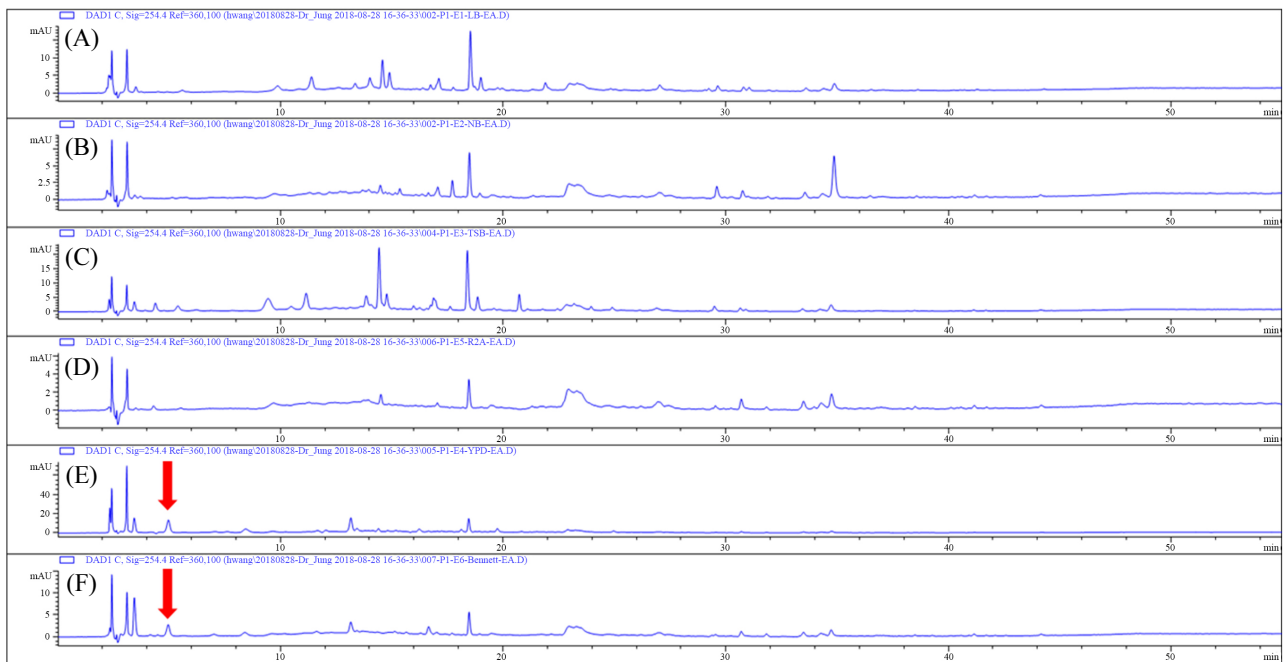


Fig. 6. HPLC profiles of *Burkholderia* sp. OS17 according to commercial media. (A) LB, (B) NB, (C) TSB, (D) R2A, (E) YPD, (F) Bennett's.

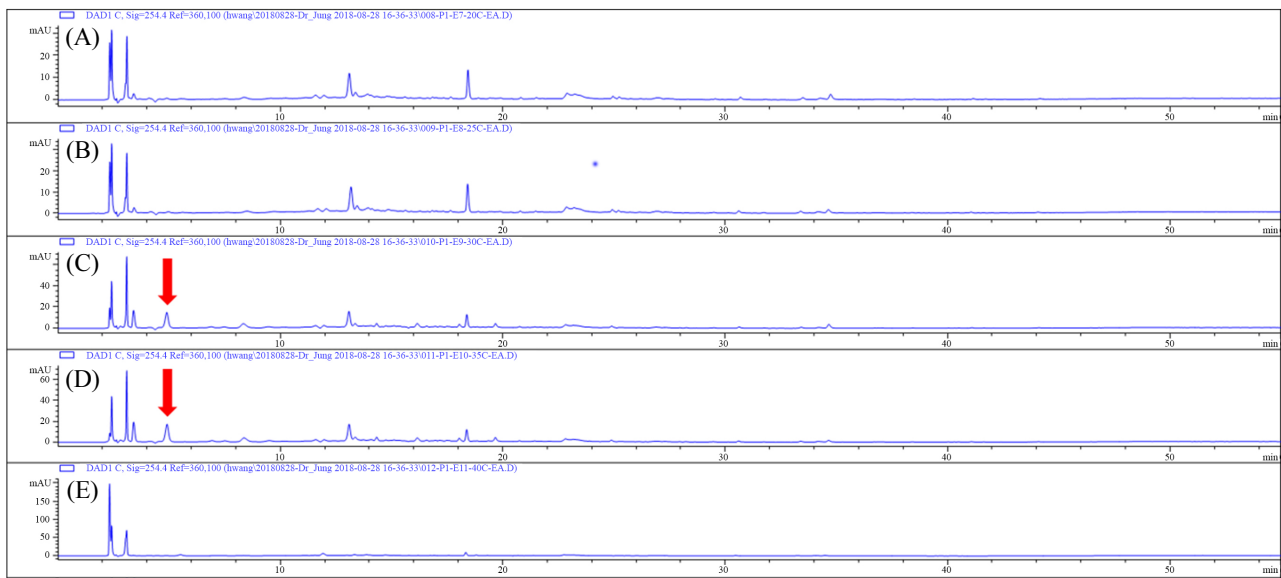


Fig. 7. HPLC profiles of *Burkholderia* sp. OS17 according to culture temperature. (A) 20°C, (B) 25°C, (C) 30°C, (D) 35°C, (E) 40°C.

감소되지 않았다. 시간별로 배양액을 회수하여 *B. cereus* KCTC 3624, *S. aureus* KCCM 4051 대상으로 평판디스크 측정법으로 배양시간별 항균활성을 확인하였다. 확인결과, 48시간 후 항균활성이 가장 좋았으며, 배양 120시간까지 항균활성은 더 증대되지 않고 유지되는 것을 확인하였다(Fig. 5). 활성이 나타나면서 배양액의 pH가 2 가까이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 최적 배양시간은 접종 후 48시간까지 배양하는 것이 가장 효율적으로 항균 유용물질을 생산할 수 있는 조건으로 판단된다.

OS17 균주는 특정배양조건에서 항균활성이 나타났으며, HPLC 분석을 통해 활성을 보유한 피크를 확인하였다. 이에 향후, 공통 피크에서 나타난 항균물질을 순수하게 정제하여 단일 물질로 인해 나타난 것인지 확인하고, 화학적 특성과 구조를 규명하고자 한다. 아울러 세포 및 동물 실험을 통해 인체에 대한 독성여부도 파악하여, 항생제로서의 개발 가능성을 확인하고자 한다.

적 요

본 연구는 담수환경에서 항균활성을 보유한 미생물을 발굴하고, 활성 증진을 위해 배양조건을 최적화하는 것이다. 상주시 중동면 오상저수지에서 시료를 채취하여 38종의 미생물을 순수분리하였다. 16S rRNA 염기서열 분석에 근거하여 *Proteobacteria*강(22종), *Actinobacteria*강(7종), *Bacteroidetes*강(6종), *Firmicutes*강(3종)으로 구성되어있는 것을 확인하였다. 메티실린내성 황색포도상구균 등 10종의 유해미생물에

대한 항균활성을 보유한 *Burkholderia* sp. OS17 균주를 선발하였다. 항균활성 증진을 위한 상용배지, 온도, 초기 pH별 생육 및 항균활성 비교실험을 수행하였다. OS17 균주는 YPD 배지, 35°C, pH 6.5로 배양했을 때 가장 활성이 높았다. LB, NB, TSB, R2A 배지와 20°C, 25°C 배양했을 때는 생장은 가능하나 항균활성이 전혀 없었다. 이전결과를 바탕으로 YPD 배지, 35°C에서 배양하면서 5 L fermenter를 이용하여 생육, 항균활성, pH 확인을 통해 배양 48시간을 최적 배양시간으로 선정하였다. 항균활성을 보유한 미생물의 배양 최적화는 항균물질 생산에 영향을 미치고, 이는 상업적 응용에 이점으로 작용할 수 있다.

감사의 말

본 연구는 환경부 산하 국립낙동강생물자원관 연구과제(‘항균미생물을 이용한 항생제내성균 제어연구’, 2018)에서 지원받았음.

References

- Abdel-Mawgoud AM, Abouwafa MM, and Hassouna NA. 2008. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **150**, 305–325.
- Cartwright DK, Chilton WS, and Benson DM. 1995. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

43, 211–216.

- Farh Mel A, Kim YJ, Van An H, Sukweenadhi J, Singh P, Huq MA, and Yang DC.** 2015. *Burkholderia ginsengiterrae* sp. nov. and *Burkholderia panaciterrae* sp. nov., antagonistic bacteria against root rot pathogen *Cylindrocarpon destructans*, isolated from ginseng soil. *Arch. Microbiol.* **197**, 439–447.
- Felsenstein J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.
- Fitch WM.** 1971. Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20**, 406–416.
- Guerra-Santos LH, Kappeli O, and Fiechter A.** 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 443–448.
- Hall TA.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95–98.
- Homma Y, Sato Z, Hirayama F, Konno K, Shirahama H, and Suzui T.** 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.* **21**, 723–728.
- Jiao Y, Yoshihara T, Ishikuni S, Uchino H, and Ichihara A.** 1996. Structural identification of cepaciamide A, a novel fungitoxic compound from *Pseudomonas cepacia* D-202. *Tetrahedron Lett.* **37**, 1039–1042.
- Kang Y, Carlson R, Tharpe W, and Schell MA.** 1998. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3939–3947.
- Kirinuki T, Iwanuma K, Suzuki N, Fukami H, and Ueno T.** 1977. Altericidins, a complex polypeptide antibiotic, produced by *Pseudomonas* sp. and their effect for the control of black spot of pear caused by *Alternaria kikuchiana* Tanaka. *Sci. Rep. Fac. Agric.-Kobe Univ. (Japan)* **12**, 223–230.
- Kumar S, Stecher G, and Tamura K.** 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874.
- Mahenthiralingam E, Song L, Sass A, White J, Wilmot C, Marchbank A, Boaisa O, Paine J, Knight D, and Challis GL.** 2011. Enacyloxins are products of an unusual hybrid modular polyketide synthase encoded by a cryptic *Burkholderia ambifaria* genomic island. *Chem. Biol.* **18**, 665–677.
- Meyers E, Bisacchi GS, Dean L, Liu WC, Minassian B, Slusarchyk DS, Sykes RB, Tanaka SK, and Trejo W.** 1987. Xylocandin: a new complex of antifungal peptides. I. Taxonomy, isolation and biological activity. *J. Antibiot.* **40**, 1515–1519.
- Moon SS, Kang PM, Park KS, and Kim CH.** 1996. Plant growth promoting and fungicidal 4-quinolinones from *Pseudomonas cepacia*. *Phytochemistry* **42**, 365–368.
- Parker WL, Rathnum ML, Seiner V, Trejo WH, Principe PA, and Sykes RB.** 1984. Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. *J. Antibiot (Tokyo)*. **37**, 431–440.
- Para-Cota FI, Pena-Cabriales JJ, de Los Santos-Villalobos S, Martínez-Gallardo NA, and Delano-Frier JP.** 2014. *Burkholderia ambifaria* and *B. caribensis* promote growth and increase yield in grain amaranth (*Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*) by improving plant nitrogen uptake. *PLoS One* **9**, e88094.
- Quan CS, Zheng W, Liu Q, Ohta Y, and Fan SD.** 2006. Isolation and characterization of a novel *Burkholderia cepacia* with strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 1276–1284.
- Saga T and Yamaguchi K.** 2009. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *JMAJ* **52**, 103–108.
- Saitou N and Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Suárez-Moreno ZR, Coutinho BG, Mendonca-Previato L, Previato L, James EK, and Venturi V.** 2012. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microb. Ecol.* **63**, 249–266.
- Tawfik KA, Jeffs P, Bray B, Dubay G, Falkinham JO, Mesbah M, Youssef D, Khalifa S, and Schmidt EW.** 2010. Burkholdines 1097 and 1229, potent antifungal peptides from *Burkholderia ambifaria* 2.2N. *Org. Lett.* **12**, 664–666.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, and Higgins DG.** 1997. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876–4882.
- Vial L, Lepine F, Milot S, Groleau MC, Dekimpe V, Woods DE, and Deziel E.** 2008. *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. *J. Bacteriol.* **190**, 5339–5352.
- Vandamme P, Opelt K, Knochel N, Berg C, Schonmann S, Brandt E, Eberl L, Falsen E, and Berg G.** 2007. *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. *Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2228–2235.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, and Arakawa M.** 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* **36**, 1251–1275.
- Yoon S, Ha S, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, and Chun J.** 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 1613–1617.