

인간 피부 상재균과 병원성 세균에 대한 *Paenibacillus elgii* DS381과 그 항균물질의 항균활성

이다솔^{ID} · 송홍규^{*ID}

강원대학교 생명과학과

Antimicrobial activity by *Paenibacillus elgii* DS381 and its antimicrobial substances against microbial residents on human skin and pathogenic bacteria

Da-Sol Lee^{ID} and Hong-Gyu Song^{*ID}

Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

(Received May 15, 2018; Revised July 6, 2018; Accepted July 9, 2018)

This study was carried out to evaluate effects of antimicrobial substances produced by isolated soil bacteria. Among two thousands of bacterial isolates *Paenibacillus elgii* DS381 exhibited high antimicrobial activities against several microbial residents on human skin and pathogenic bacteria. DS381 showed 15.3~26.0 mm inhibition zone diameter against all target bacteria and yeast in agar well diffusion test. Antimicrobial peptide produced by DS381 indicated low minimum inhibitory concentration (0.039–5.000 mg/ml). DS381 produced biosurfactant such as lipopeptide, and surface tension of culture supernatant of DS381 reduced from 60.0 to 40.3 mN/m. DS381 also showed 1.56 ± 0.13 U/ml of chitinase activity. These results suggest that *Paenibacillus elgii* DS381 may be utilized as an efficient biocontrol agent against some important human skin microbes and pathogenic bacteria.

Keywords: *Paenibacillus elgii* DS381, antimicrobial activity, antimicrobial peptide, biosurfactant

인간의 피부에는 다양한 미생물이 존재하는데 이들의 대부분은 인간에 해를 미치지 않으며 오히려 다양한 도움을 주기도

하지만 *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*와 일부 병원성 *Escherichia coli* 등과 같은 세균이나 *Candida albicans* 같은 진균은 기회적 병원체로서 인간의 건강을 위협할 수 있다(Wong *et al.*, 2000; Behravan *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2012). 다양한 미생물이 이용될 수 있는 유, 무기물을 다량 함유하고 있는 화장품의 경우 미생물 오염 가능성이 상존하며(Ku *et al.*, 2013), 미생물 번식에 의해 이를 사용하는 인간에 심각한 문제를 초래할 수 있다(Behravan *et al.*, 2005). 이러한 문제 때문에 미생물 오염으로 화장품이 리콜되는 사례도 빈번하게 일어나고 있는 실정이며(Wong *et al.*, 2000; Lundov and Zachariae, 2008), 국내에서도 테스트 화장품에서 *Bacillus subtilis*와 인간에 병원성을 나타낼 수 있는 *Staphylococcus* sp., *Candida* sp., *Micrococcus* sp. 등의 미생물이 다수 검출되었다는 보고가 있다(Lee, 2017). 따라서 화장품 내 미생물 오염을 방지하는 방부시스템을 향상시키는 것이 중요하다. 이러한 미생물 오염을 방지하기 위해 항균활성 범위가 크고 넓은 pH와 온도 범위에서 안정한 paraben 등의 화학합성 방부제를 많이 사용하는데 인간에 피부염, 알러지 등을 유발할 수 있고 피부에 잔류할 수 있다(White and Groot, 2006). 따라서 독성이 없고, 사람에게 해를 끼치지 않는 천연항균물질을 이용한 미생물 제어에 대한 관심이 최근 증가하고 있으며 또한 의학

*For correspondence. E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr;
Tel.: +82-33-250-8545; Fax: +82-33-259-5665

품 분야에서는 화학기반의 항생제를 생물유래 물질로 전환하거나 미생물 자체 혹은 미생물 대사산물을 이용한 항균제 시장 진출 전략을 강화하고 있다(Kim *et al.*, 2018).

미생물에 의해서 생산된 항균물질에는 biosurfactant, bacteriocin 등이 있으며(Jiang *et al.*, 2012; Sharma and Saharan, 2014), 이외에도 미생물에 의해서 생산된 항균, 항진균 물질인 다양한 효소 및 siderophore 등이 보고되었다(Nagarajkumar *et al.*, 2004). 이에 본 연구에서는 항균활성 세균을 분리하여 여러 인간 피부 상재균 및 오염 가능성이 있는 다양한 병원성 세균에 대하여 항균 및 항진균 활성을 평가하고, 항균물질 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

항균활성 세균 균주 분리 및 동정

춘천 지역 삼림에서 채취한 토양 시료를 Nutrient agar (NA), Luria-Bertani agar (LA) 배지에 배양하고 계대하여 세균 균주를 순수 분리한 후 다음의 미생물에 대한 항균 활성을 평가하였다: 화장품업계에서 흔히 조사하는 피부 상재균 6종(*Candida albicans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*), 경상대학교 병원체 자원은행[Gyeongsang National University Hospital Branch of the National Culture Collection for Pathgens (GNUH-NCCP)]으로부터 분양받은 균주(*Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*). 선별한 균주는 (주)마크로젠에 의뢰하여 염기서열을 분석하였으며 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록된 세균 균주와 상동성을 비교하고, 형태학적 동정, 최적 생장온도, 영양원 조사 및 API kit (50CHB와 20E, Biomerieux)를 이용한 생리생화학적 검사를 통해서 균주를 동정하였다.

균주의 항균활성

세균 또는 효모에 대한 항균활성 평가를 위해 분리세균 균주를 LB 배지에 배양하고 배양액을 원심 분리하였다. 대상 미생물이 도말된 NA 배지에 10 mm 직경의 well을 뚫고 배양 상등액을 100 μ l 첨가하여 배양 후 저해 직경을 측정하였다(Ansari *et al.*, 2012). 균주의 세균 세포벽 용해활성은 다양한 세균의 배양액을 원심 분리하여 세포 성분을 수집하고, 121°C에서 15분간 멸균 후 NA 배지에 0.2%로 첨가하여 배지를 제작하고(Lim *et al.*, 2001), 배지에 균주를 희석 배양 후 집락 주변의 투명대를 조사하였다.

항균물질 분석

단백질성 항균물질: DS381 균주를 1 L LB 배지에 배양하여 배양 상등액 1 L 당 ammonium sulfate를 300 g 첨가한 뒤 정지하였다(4°C, overnight). 원심분리 후 단백질성 물질을 회수하고 동결 건조하였다.

대상 세균과 진균 포자(10^7 /ml)에 대한 단백질성 항균물질의 minimum inhibitory concentration (MIC)는 대상 미생물에 단백질성 항균물질을 다양한 농도로 처리하고 생장이 나타나지 않은 최소 농도로 결정하였다(AI-Ani *et al.*, 2015). 단백질성 항균물질의 항균효과를 평가하기 위해 대상 미생물을 $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml로 보정하였고 배양액에 1 MIC로 항균 물질을 처리하고 배양하였다. 이후 0, 4, 8, 24시간 간격으로 채취하여 생균수를 계수하여 그 감소양상을 조사하였다(AI-Ani *et al.*, 2015). 항균 물질 처리 후 세포질 물질이 유출되는 양상은 인산완충용액으로 세척한 다양한 대상 미생물(10^7 CFU/ml) 세포에 1 MIC로 DS381 균주의 단백질성 항균물질을 첨가한 후 평가하였다. 0, 4, 8, 24시간 간격으로 시료를 채취하여 0.22 μ m 여과막으로 여과하고 260 nm에서 흡광값을 측정하여 0시간 대비 DNA 유출 양상을 비교하였다(Lou *et al.*, 2011).

계면활성물질(lipopeptide): 균주 배양 상등액의 계면활성 성질을 판단하기 위해 Petri dish에 증류수 50 ml를 담고, crude oil 20 μ l를 떨어뜨리고 상등액을 10 μ l 가한 뒤 생김 투명환을 측정하였다(Rodrigues *et al.*, 2006). 배양 상등액의 표면장력은 표면장력계(514-B2, Itoh Seisakuso)를 이용하여 측정하였다(Sharma and Saharan, 2014).

균주가 생산하는 계면활성물질의 성질을 판단하기 위해 배양 상등액을 pH 2로 보정하고 ethyl acetate를 첨가하여 추출하였다. 이 시료를 thin layer chromatography (TLC) plate (silica gel 60, 70-230 mesh; Merk)에 점적하고, 이동상(chloroform/methanol/glacial acetic acid=65:15:2)으로 전개하고 이후 다양한 시약을 이용하여 물질의 성질을 판단하였다(Murugan and Rengaswamy, 2011).

Lipopeptide 성질을 나타내는 물질을 silica gel column chromatography (Naing *et al.*, 2014)를 이용하여 분획하였다. 먼저 배양 상등액에 동량의 *n*-butanol을 첨가하여 추출하고, 소량으로 농축시키고 silica gel (Kieselgel 60) column에 2 ml의 시료를 올리고 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 를 이동상으로 하여 시료를 분획하였다. 분획한 시료 중 항균활성을 나타낸 1개의 분획물을 강원대학교 공동실험실습관에 의뢰하여 Autoflex speed TOF/TOF (Bruker daltonics)를 이용하여 분자량을 분석하였다.

Chitinase : Colloidal chitin이 탄소원으로 첨가된 배지에 균주를 희석 배양한 후 집락 주변에 생긴 투명대를 토대로 chitinase 생산을 정성적으로 판단하였다. 이후 배양 상등액 1 ml를 1% chitin이 첨가된 50 mM sodium phosphate buffer 1 ml과 반응시키고 dinitrosalicylic acid method을 이용한 환원당 분석을 통해 정량하였다(Nagpure and Gupta, 2013).

Protease : 균주를 LB 배지에서 배양하고 배양상등액을 회수하여 1% casein 용액과 함께 반응시키고(60°C, 15 min), 20% trichloroacetic acid로 반응을 종료시켰다. 원심분리 후 280 nm에서 상등액의 흡광값을 측정하였고, tyrosine을 이용하여 표준곡선을 작성하여 정량하였다(Ghorbel *et al.*, 2003)

결과 및 고찰

항균활성 세균 균주 분리 및 동정

춘천 지역 토양 시료로부터 분리한 DS381 균주는 다양한 미생물과 대치배양 하였을 때 대부분의 대상 미생물을 제어하는 항균활성을 나타내었다. DS381 균주의 16S rRNA 유전자

염기서열은 NCBI 등록 균주 중 *Paenibacillus elgii* SD17, *Paenibacillus elgii* NBRC 100335와 99%의 상동성을 나타내었다. DS381 균주는 그람양성 간균의 특성을 지니며, 30°C, 호기성 조건, sorbitol, D-manitol, glycerol의 탄소원, ammonium sulfate, tryptone, malt extract 등의 질소원 조건 하에서 높은 성장과 활성을 나타내었다. 이러한 결과와 API kit (50CHB, 20E)를 이용한 생리 생화학적 특성(결과 미제시)을 통해서 DS381 균주를 *Paenibacillus elgii* DS381로 명명하였다. 이 균주의 염기서열은 GenBank에 등록하였으며(Accession No. MG746396), 균주는 KCTC에 기탁하였다(KCTC18520P). *Paenibacillus* sp.는 항균활성 물질과 다양한 진균 세포벽 성분 분해효소(β -1,3-glucanase, cellulase, chitinase, protease)를 생산한다고 알려져 있다(Budi *et al.*, 2000).

균주의 항균활성

다양한 미생물을 대상으로 *P. elgii* DS381 배양 상등액의 항균활성을 조사하였을 때, DS381 균주는 다양한 그람 양성 그람 음성 세균, 효모를 포함한 모든 대상 미생물에 항균활성을 나타내었다. 특히 *M. luteus* GNUH-NCCP2922에 대하여 최대 26 mm 이상 직경의 성장 저해대를 나타내었으며, *C.*

Table 1. Inhibition of target organism by culture supernatant of *P. elgii* DS381 as determined by agar well diffusion test

Target organism	IZD ^a (mm)	Activity ^b	Target organism	IZD (mm)	Activity
<i>C. albicans</i> ATCC10231	21.6 ± 0.5	+++	<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP4159	18.0 ± 1.0	++
<i>B. subtilis</i> ATCC19659	24.3 ± 1.1	+++	<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP2148	20.3 ± 0.5	++
<i>S. aureus</i> ATCC6538	24.6 ± 4.1	+++	<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP2637	21.3 ± 0.5	+++
<i>P. aeruginosa</i> KCTC2513	16.3 ± 0.5	++	<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP2868	21.3 ± 1.1	+++
<i>E. coli</i> ATCC8739	20.0 ± 0.0	++	<i>S. epidermidis</i> GNUH-NCCP44	24.0 ± 0.0	+++
<i>E. faecalis</i> GNUH-NCCP3728	18.6 ± 4.0	++	<i>S. epidermidis</i> GNUH-NCCP579	23.6 ± 0.5	+++
<i>E. faecalis</i> GNUH-NCCP3738	15.3 ± 1.5	+	<i>S. epidermidis</i> GNUH-NCCP672	23.6 ± 0.5	+++
<i>E. faecalis</i> GNUH-NCCP3788	19.0 ± 1.0	++	<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP2837	21.0 ± 1.0	+++
<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP29	18.0 ± 1.1	++	<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP2922	26.0 ± 1.0	++++
<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP4149	19.0 ± 1.1	++	<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP3683	21.3 ± 1.5	+++
<i>A. niger</i> ATCC16404	23.6 ± 0.3	+++			

^aIZD: inhibition zone diameter

^bNo inhibition zone: -, 11~15 mm; +, 16~20 mm; ++, 21~25 mm; +++, 26 mm <; ++++

albicans, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. epidermidis*에 대하여 20 mm 이상의 억제직경을 나타내었다 (Table 1). 이는 *B. subtilis* KIBGE IB-17의 항균활성과 비교할 때 *L. monocytogenes*에 대하여 21 mm의 억제직경을 보인 것과 유사하였지만, *S. aureus* ATCC 6538와 식수에서 분리한 *P. aeruginosa*와 *E. coli*에 대한 억제 직경이 각각 0, 0과 18 mm인데 비해 훨씬 더 큰 억제 활성을 나타내었다 (Ansari *et al.*, 2012). 또한 *Bacillus amyloliquefaciens* An6가 *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. niger*, *E. faecalis*에 활성을 나타내지 못한 결과 (Ayed *et al.*, 2015)와 비교하여 DS381의 항균활성이 우수하였다. 한편 같은 속의 *Paenibacillus alvei* AN5 균주가 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*에 활성을 나타내지 못한 보고 (Alkotaini *et al.*, 2014)와 달리 폭넓은 항균활성을 나타내었다. 또한 진균(*A. niger*)에 대해서도 23 mm 이상의 높은 항진균 활성을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 보아 DS381은 다양한 그람양성, 음성세균, 효모, 진균을 모두 저해하는 높은 항균활성을 나타낸다고 할 수 있다. 이는 같은 종의 *Paenibacillus elgii* BG6 균주가 다양한 그람양성과 그람음성 세균 및 진균에 항균활성을 나타내었던 보고 (Wu *et al.*, 2010)와 유사한 폭넓은 항균활성이었으며, Guo *et al.* (2012)와 Naing *et al.* (2014) 연구의 *Paenibacillus* sp.이 다양한 세균과 진균에 항균활성을 나타낸 결과와도 유사하였다.

열-사멸 처리된 피부 상재균의 성분을 0.2% 포함하고 있는 한천 배지에서 DS381 균주의 세균 세포벽 용해능을 조사하였는데 *B. subtilis*, *P. aeruginosa*와 *E. coli*의 세포벽을 용해하는 것으로 나타났다. 이는 *M. luteus*를 대상으로 한 연구 (Lim *et al.*, 2001)에서 표적 세균 주변에 투명한 생성 결과와 유사하였다. 따라서 위의 3종의 대상 세균의 세포벽을 용해하는 결과로 판단할 수 있다.

항균물질 분석

단백질성 항균물질 : 다양한 미생물의 성장을 억제하는 *P. elgii* DS381 균주의 단백질성 항균물질의 MIC를 조사하였을 때 *C. albicans* ATCC 10231를 포함한 6종의 피부 상재균에 0.078~0.625 mg/ml의 MIC를 나타내었으며, *E. faecalis*에 대해 0.156~1.250 mg/ml, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *S. epidermidis*와 *M. luteus*에 대해 0.039~0.156 mg/ml로 제어에 효과적이었다. 진균인 *A. niger*에 대해서도 0.312 mg/ml의 비교적 낮은 MIC를 나타내었다 (Table 2). 이 결과로 DS381 균주가 생산하는 단백질성 항균물질이 항균 활성의 대부분을 차지하고 있음을 추측할 수 있다. 이는 *Bacillus amyloliquefaciens* An6가 생산하는 bacteriocin이 *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 4698와 *E. faecalis* ATCC 29212에 대해 MIC가 각각 1.25~5 mg/ml이며, *K. pneumoniae* ATCC

Table 2. Minimum inhibitory concentration of antimicrobial substance of *P. elgii* DS381 in broth microdilution method

Target organism	MIC (mg/ml)	Target organism	MIC (mg/ml)
<i>C. albicans</i> ATCC10231	0.625	<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP4159	0.078
<i>B. subtilis</i> ATCC19659	0.078	<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP2148	0.078
<i>S. aureus</i> ATCC6538	0.312	<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP2637	0.078
<i>P. aeruginosa</i> KCTC2513	0.625	<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP2868	0.078
<i>E. coli</i> ATCC8739	0.312	<i>S. epidermidis</i> GNUH-NCCP44	0.078
<i>E. faecalis</i> GNUH-NCCP3728	0.625	<i>S. epidermidis</i> GNUH-NCCP579	0.156
<i>E. faecalis</i> GNUH-NCCP3738	1.250	<i>S. epidermidis</i> GNUH-NCCP672	0.156
<i>E. faecalis</i> GNUH-NCCP3788	0.156	<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP2837	0.078
<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP29	0.078	<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP2922	0.039
<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP 4149	0.078	<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP3683	0.078
<i>A. niger</i> ATCC16404	0.312		

13883, *P. aeruginosa* ATCC 27853과 *A. niger* I1에 활성을 나타내지 못한 결과(Ayed *et al.*, 2015)와 비교하여 DS381 균주의 단백질성 항균물질은 10배 더 많은 대상 미생물에 더 낮은 수치의 MIC값을 나타내어 더 우수한 항균활성임을 알 수 있었다. 또한 이 연구에서 양성 대조군으로 사용했던 bacitracin zinc가 *E. coli* ATCC 25922와 *K. pneumoniae* ATCC 13883에

5 mg/ml 이상, *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 4698, *E. faecalis* ATCC 29212와 *Bacillus cereus* ATCC 11778에 0.156~0.625 mg/ml 그리고 *A. niger* I1 진균에 대해서 활성을 나타내지 못한 것을 감안하면 DS381 균주의 단백질성 항균물질이 항생물질을 대체할 정도로 할 수 있다.

P. elgii DS381 균주의 단백질성 항균물질을 20 종류의 다

Table 3. Growth of diverse microorganisms in the presence of antimicrobial substances (1 MIC) of *P. elgii* DS381

Target organism	Log CFU (colony forming unit)/ml			
	0 h	4 h	8 h	24 h
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6.07 ± 0.12	3.84 ± 0.04	2.34 ± 0.11	ND
<i>B. subtilis</i> ATCC 19659	5.77 ± 0.16	0.92 ± 0.47	0.82 ± 0.43	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	5.58 ± 0.16	1.92 ± 0.08	0.76 ± 0.39	ND
<i>P. aeruginosa</i> KCTC 2513	5.76 ± 0.09	3.20 ± 0.20	2.51 ± 0.26	ND
<i>E. coli</i> ATCC 8739	5.84 ± 0.09	3.56 ± 0.02	3.26 ± 0.14	ND
<i>E. faecalis</i> GNUH-NCCP 3728	6.25 ± 0.05	2.48 ± 0.03	ND	ND
<i>E. faecalis</i> GNUH-NCCP 3738	6.00 ± 0.07	2.26 ± 0.15	ND	ND
<i>E. faecalis</i> GNUH-NCCP 3788	5.78 ± 0.09	4.50 ± 0.02	4.01 ± 0.08	ND
<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP 29	5.81 ± 0.60	4.81 ± 0.05	4.45 ± 0.04	ND
<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP 4149	6.06 ± 0.43	3.32 ± 0.16	2.48 ± 0.35	ND
<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP 4159	5.90 ± 0.10	5.23 ± 0.23	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP 2148	5.91 ± 0.07	1.25 ± 0.14	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP 2637	5.70 ± 0.00	1.25 ± 0.14	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP 2868	5.82 ± 0.14	3.74 ± 0.15	3.59 ± 0.06	ND
<i>S. epidermidis</i> GNUH-NCCP 44	5.69 ± 0.05	1.32 ± 0.20	ND	ND
<i>S. epidermidis</i> GNUH-NCCP 579	6.00 ± 0.00	1.32 ± 0.16	ND	ND
<i>S. epidermidis</i> GNUH-NCCP 672	5.84 ± 0.09	2.45 ± 0.11	1.92 ± 0.08	ND
<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP 2837	6.38 ± 0.07	5.63 ± 0.33	4.80 ± 0.02	ND
<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP 2922	5.95 ± 0.05	5.59 ± 0.03	3.84 ± 0.08	ND
<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP 3683	6.41 ± 0.11	5.68 ± 0.19	5.35 ± 0.02	ND

*ND: not detect

양한 세균과 효모에 대하여 1 MIC로 처리하여 다양한 시간대 별로 개체수 감소 양상을 조사하였다. DS381 균주의 단백질 생성 항균물질은 10^5 ~ 10^6 CFU/ml의 대상 세균을 24시간 내에 모두 사멸시켰다(Table 3). 대상 세균 중 *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. epidermidis* 등의 그람 양성세균의 개체수가 빠르게 감소되었으며 특히 *B. subtilis*, *S. aureus*,

L. monocytogenes 2균주, *S. epidermidis* 2균주에 대해서 배양 4시간 후 개체수가 2 log CFU/ml로 감소되는 빠른 효과가 나타났다. 또한 *E. faecalis* 2균주, *K. pneumoniae* 1균주, *L. monocytogenes* 2균주 *S. epidermidis* 2균주는 배양 8시간 이내에 모두 사멸하였다. Zou 등(2012)이 보고한 유산균이 생산한 단백질성 항균물질인 nisin과 다양한 약용식물의 항균활성

Table 4. The amount of total nucleotide released from diverse microorganisms in the presence of antimicrobial substances (1 MIC) of *P. elgii* DS381

Target organism	Optical density (260 nm)		
	4 h	8 h	24 h
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.0053 ± 0.0004	0.0054 ± 0.0005	0.0068 ± 0.0006
<i>B. subtilis</i> ATCC 19659	0.0001 ± 0.0002	0.0002 ± 0.0001	0.0004 ± 0.0001
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0.0002 ± 0.0001	0.0003 ± 0.0000	0.0004 ± 0.0001
<i>P. aeruginosa</i> KCTC 2513	0.0001 ± 0.0000	0.0041 ± 0.0006	0.0050 ± 0.0006
<i>E. coli</i> ATCC 8739	0.0000 ± 0.0000	0.0001 ± 0.0001	0.0043 ± 0.0003
<i>E. faecalis</i> GNUH-NCCP 3728	0.0025 ± 0.0003	0.0049 ± 0.0003	0.0054 ± 0.0004
<i>E. faecalis</i> GNUH-NCCP 3738	0.0070 ± 0.0004	0.0090 ± 0.0002	0.0101 ± 0.0002
<i>E. faecalis</i> GNUH-NCCP 3788	0.0030 ± 0.0006	0.0042 ± 0.0002	0.0053 ± 0.0008
<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP 29	0.0000 ± 0.0000	0.0011 ± 0.0002	0.0012 ± 0.0002
<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP 4149	0.0019 ± 0.0002	0.0033 ± 0.0004	0.0060 ± 0.0019
<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP 4159	0.0018 ± 0.0002	0.0021 ± 0.0000	0.0047 ± 0.0009
<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP 2148	0.0013 ± 0.0001	0.0025 ± 0.0001	0.0029 ± 0.0002
<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP 2637	0.0011 ± 0.0002	0.0052 ± 0.0014	0.0049 ± 0.0015
<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP 2868	0.0001 ± 0.0000	0.0009 ± 0.0003	0.0032 ± 0.0010
<i>S. epidermidis</i> GNUH-NCCP 44	0.0006 ± 0.0003	0.0013 ± 0.0003	0.0015 ± 0.0001
<i>S. epidermidis</i> GNUH-NCCP 579	0.0042 ± 0.0003	0.0041 ± 0.0003	0.0079 ± 0.0022
<i>S. epidermidis</i> GNUH-NCCP 672	0.0050 ± 0.0004	0.0050 ± 0.0002	0.0096 ± 0.0005
<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP 2837	0.0000 ± 0.0000	0.0003 ± 0.0002	0.0006 ± 0.0001
<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP 2922	0.0002 ± 0.0001	0.0007 ± 0.0000	0.0021 ± 0.0013
<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP 3683	0.0000 ± 0.0000	0.0001 ± 0.0000	0.0009 ± 0.0001

* $P < 0.001$

성분인 allyl isothiocyanate를 각각 단독으로 *S. aureus*와 *L. monocytogenes*에 처리하였을 때 *S. aureus*가 배양 4시간째, *L. monocytogenes*는 배양 10시간째 생균수가 다시 증가하였지만 본 연구에서 DS381의 단백질성 항균물질은 생균수는 증가하지 않고 항균활성이 오래 유지되었다. 또한 위 연구에서 nisin과 allyl isothiocyanate의 활성 감소를 해결하기 위해 두 물질을 조합하여 균주에 처리했을 때, 각 균주가 배양 10시간째에 사멸한 결과와 비교해도 DS381 균주의 단백질성 항균물질의 활성이 더 우수함을 알 수 있다. 또한 벌독에서 분리한 항균물질 성분인 melittin을 6.2 µg/ml, 그리고 약용식물의 정유 오일에서 분리한 carvacrol 50 µg/ml를 조합하여 *E. coli*에 처리 시 배양 24시간 후에도 개체수가 완전히 사멸하지 못한 결과(Al-Ani et al., 2015)와 비교해도 본 연구 결과가 더 우수하였다.

다양한 대상 미생물에 DS381 균주의 단백질성 항균물질을 1 MIC로 처리하고 세포질 내 nucleotide가 유출되는 결과는 대부분이 time kill assay에서 대상 미생물이 사멸되는 양상과 일치하는 경향을 나타내었다(Table 4). 특히 *C. albicans* ATCC 10231, *E. faecalis*, *S. epidermidis*의 경우 배양 4시간째 상당량의 nucleotide가 유출되었으며, 이를 제외한 균주에 대해서는 배양 8시간 또는 24시간째 높은 nucleotide 유출이 나타났다. 이는 *Sigella dysenteriae*와 *Streptococcus pneumoniae*에 대한 time kill assay에서 균 개체가 배양 1~2시간째의 상당한 사멸 및 nucleotide 유출(Lou et al., 2011)과 유사한 결과이다.

Lipopeptide 계면활성물질 : 생물계면활성제는 미생물이 세포 밖으로 분비하는 계면활성물질로 다른 미생물 세포막에 흡착되어 그 증식을 억제하고 나아가 세포막을 교란시킬 수 있다. 이러한 생물 계면활성제는 다양한 온도와 pH 범위에서 안정하며 인체에 무해하다는 장점을 가지고 있다. 다양한 계면활성물질 중 lipopeptide는 항암, 항바이러스 효과는 물론 모든 미생물이 공통으로 가지는 세포막을 표적으로 하여 다양한 세균, 진균과 난균류의 성장을 저해할만큼 광범위한 항균활성을 나타낸다. 따라서 DS381 균주의 항균활성의 대부분을 lipopeptide 계면활성 물질이 차지하고 있을 것이라고 추정할 수 있다. 또한 계면활성제의 활성 척도인 표면장력과 미생물 생육억제 간에 유의한 관계가 있다고 보고된 바 있다(Kang et al., 2017).

Oil spreading test를 통해서 *P. elgii* DS381 균주 배양 상등액의 계면활성을 조사하였을 때 crude oil에 DS381 균주의 배양 상등액 첨가 시 oil이 퍼져 투명대가 형성되어 DS381 균주의 계면활성제 생산을 알 수 있었다. 퍼진 직경은 5.0 ± 0.6 cm

로 넓어 다양한 *Bacillus* sp. 균주의 배양액이 최대 3 cm 범위로 crude oil을 퍼트리는 것보다 높은 활성이었다(Youssef et al., 2004). 다양한 pH, 염분, 온도 조건에서 *Alcanivorax dieselolei* B-5의 배양액이 3 cm 정도의 투명환을 나타낸 결과(Qiao and Shao, 2013)와 비교해도 DS381 균주의 계면활성이 우수하였다.

P. elgii DS381 균주 배양 상등액의 계면활성을 조사하기 위해 상등액의 표면장력을 측정하였을 때 배양 24시간 후 표면장력이 감소하였으며, 배양 168시간 후에는 초기 60 mN/m를 40.3 ± 0.7 mN/m로 감소시켰는데 이는 다양한 *Bacillus* sp. 균주들의 계면활성과 유사하였다(Youssef et al., 2004). *Alcanivorax dieselolei* B-5의 배양액은 높은 계면활성을 보였으나 이를 균주의 배양 상등액과 세포로 분리했을 때 활성이 사라졌지만(Qiao and Shao, 2013), DS381 균주의 계면활성은 계속 유지되었다.

P. elgii DS381가 생산하는 계면활성제의 성질을 조사하고자 TLC를 수행하였다. DS381 균주의 배양 상등액의 ethyl acetate 추출물을 이용하여 biosurfactant를 분획하고 plate에 1% ninhydrin, orcinol과 bromothymol blue를 처리하여 결과를 관찰하였을 때 DS381 균주는 1% ninhydrin과 bromothymol에 양성반응을 나타내어 lipopeptide의 구조를 가진 것으로 판단되었다. 이는 유사한 추출, 전개 조건을 이용했던 *A. dieselolei* B-5 균주가 생산하는 lipopeptide 계면활성물질의 결과와 동일하였다(Qiao and Shao, 2013). 이 후 silica gel column chromatography를 통해 항균활성을 나타내는 lipopeptide를 분획하여 분자량을 측정 결과 고분자의 4592.269 m/z에서 높은 peak이 관찰되었다(Fig. 1). *Paenibacillus* sp.가 생산하는 lipopeptide 성 항균물질은 항균, 항진균, 항암, 항바이러스 등 폭넓은 활성을 나타내며 polymyxins, octapeptins, polypeptins, iturins, surfactins, fengycins 등이 있는 것으로 보고되었는데(Cochrane and Vederas, 2016) DS381이 생성하는 lipopeptide의 종류에 대한 추가적인 분석이 필요하다.

Chitinase : Chitinase는 진균 세포벽 성분인 chitin을 분해하는 효소이며 이를 생산하는 미생물은 진균의 성장을 억제할 수 있다. 따라서 DS381 균주의 chitinase 생산으로 lipopeptide 항균 효과에 더하여 더욱 효율적으로 진균의 성장을 저해할 수 있을 것으로 생각된다. Chitinase 활성 정성 조사 배지에서 배양 7일차에 DS381 균주의 집락 주변에 투명환이 형성되었으며 이는 DS381 균주가 chitinase를 생산하여 colloidal chitin을 탄소원으로 이용할 수 있음을 나타낸다. 이를 토대로 basal salt 배지에서 chitinase 활성을 정량분석한 결과 DS381 균주는 배양 24시간 후 1.560 ± 0.002 U/ml로 chitinase를 생산하였

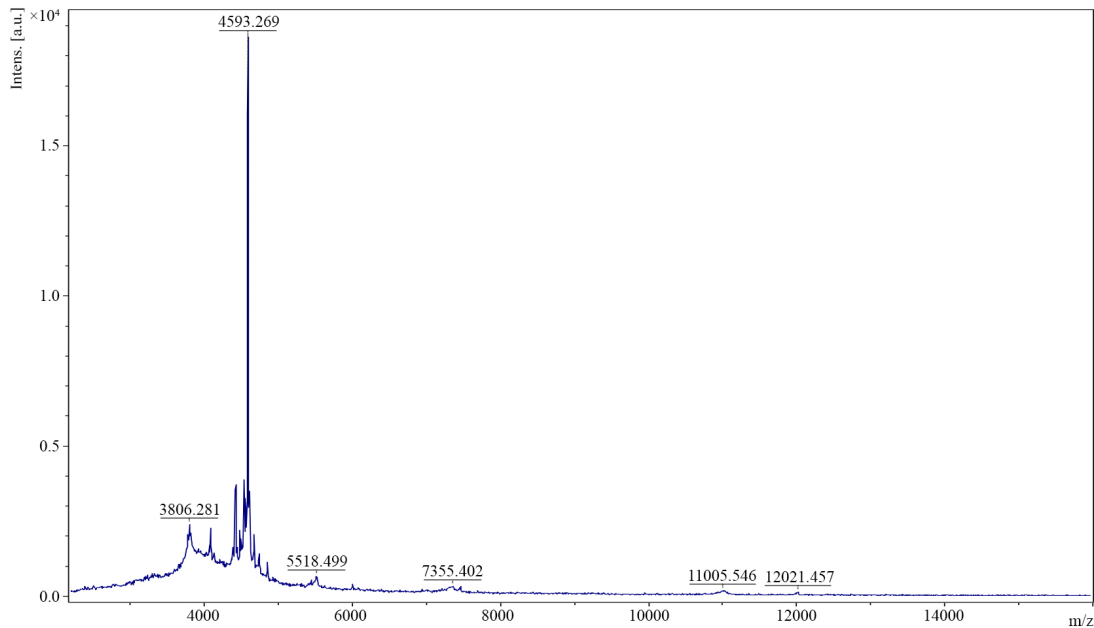


Fig. 1. Mass spectrometry profile of lipopeptide of *P. elgii* DS381.

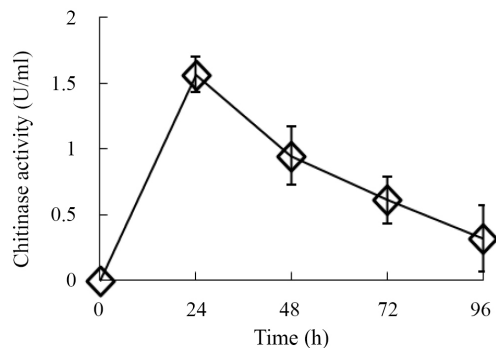


Fig. 2. Chitinase activity of *P. elgii* DS381 in basal salt medium during 96 h.

다(Fig. 2). 이는 *Trichoderma harzianum* 1051 균주와 *Trichoderma* sp.의 최대 활성인 0.39와 0.085 U/ml에 비하여 4~18배 높은 결과이었으며(Marco *et al.*, 2003), 또한 *Penicillium aculeatum* NRRL 2129의 chitinase crude extract의 0.29 U/ml의 활성에 비하여 약 5배 높은 수치이었다(Binod *et al.*, 2005).

Protease : Protease는 산업적으로 중요한 효소 중 하나이며, 식품제조공정 등에서 유용하게 사용된다. Protease는 단백질을 가수분해하여 직접적인 항균능을 나타내거나 항산화 또는 항균 활성을 지닌 peptide 가수분해물을 생성하여 항균활성을 띠게 할 수 있다. Protease 정량 시 DS381 균주는 배양 3일차에 59 mM의 최대 protease를 생산하였고 이후 점차 감소하는 양

상을 나타내었다.

이와 같이 DS381 균주가 생산하는 lipopeptide, chitinase, protease 등 물질의 공동작용으로 인하여 다양한 세균, 진균 등의 생장을 폭넓게 저해하는 항균활성이 나타났을 것이라고 판단된다.

적 요

이 연구는 분리된 토양 세균에 의해 생성된 항균물질의 효과를 평가하기 위해 수행되었다. 2000여개의 세균 분리주 중 *Paenibacillus elgii* DS381이 여러 인간 피부 상재균과 병원성 세균에 대해 높은 항균활성을 나타내었다. DS381 균주는 agar well diffusion test에서 모든 대상 세균과 효모에 대해 15.3~26.0 mm 직경의 저해대를 형성하였다. DS381이 생성한 항균 펩티드는 모든 대상 미생물에 낮은 최소저해농도 (0.039~5.000 mg/ml)를 나타내었다. DS381 균주는 lipopeptide 같은 생물계면활성제 생산을 나타내었는데, 배양 상등액의 표면장력을 60.0에서 40.3 mN/m으로 낮추었다. DS381은 또한 1.56 ± 0.13 U/ml의 chitinase 활성도 나타내었다. 이 결과들은 *P. elgii* DS381이 일부 중요한 인간 피부 상재균과 병원성 세균에 대한 효율적인 생물제어제로 사용될 수 있음을 가리킨다.

감사의 말

본 연구는 2016년도 중소기업 기술혁신개발사업의 지원으로 수행되었습니다(과제번호 C1012548-01-02).

References

- Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, and Wink M.** 2015. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine* **22**, 245–255.
- Alkotaini B, Anuar N, Kadhum AAH, and Sani AAA.** 2014. Isolation and identification of a new intracellular antimicrobial peptide produced by *Paenibacillus alvei* AN5. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 1377–1385.
- Ansari A, Aman A, Siddiqui NN, Iqbal S, and Qader SA.** 2012. Bacteriocin (BAC-IB17): Screening, isolation and production from *Bacillus subtilis* KIBGE IB-17. *Pak. J. Pharma. Sci.* **25**, 195–201.
- Ayed HB, Maalej H, Hmidet N, and Nasri M.** 2015. Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *J. Global Antimicrob. Resist.* **3**, 255–261.
- Behravan J, Bazzaz BSF, and Malaekheh P.** 2005. Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran. *Int. J. Dermatol.* **44**, 482–485.
- Binod P, Pusztahelyi T, Nagy V, Sandhya C, Szakacs G, Pocsai I, and Pandey A.** 2005. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enz. Microb. Technol.* **36**, 880–887.
- Budi SW, Van Tuinen D, Arnould C, Dumas-Gaudet E, Gianinazzi-Pearson V, and Gianinazzi S.** 2000. Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effect of antagonistic bacterium on cell wall integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *Appl. Soil Ecol.* **15**, 191–199.
- Cochrane SA and Vederas JC.** 2016. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A gold mine of antibiotic candidates. *Med. Res. Rev.* **36**, 4–31.
- Ghorbel B, Sellami-Kamoun A, and Nasri M.** 2003. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enz. Microb. Technol.* **32**, 513–518.
- Guo Y, Huang E, Yuan C, Zhang L, and Yousefa AE.** 2012. Isolation of a *Paenibacillus* sp. strain and structural elucidation of its broad-spectrum lipopeptide antibiotic. *Appl. Environ. Microbiol.* **24**, 3156–3165.
- Jiang J, Shi B, Zhu D, Cai Q, Chen Y, Li J, Qi K, and Zhang M.** 2012. Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. *Food Control* **23**, 338–344.
- Kang BR, Kim YH, Nam HS, and Kim YC.** 2017. Correlation between biosurfactants and antifungal activity of a biocontrol bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* LM11. *Res. Plant Dis.* **23**, 177–185.
- Kim TW, Kim SM, Hwang YM, Kim C, Lee DW, Jun LJ, Jeong JB, Kim YO, Nam BH, and Lee KJ.** 2018. Determination of mass culture method of marine-derived microorganism, *Bacillus* sp. 2-4 (KCCMI 11107p) with antimicrobial activity. *J. Fish. Mar. Sci. Educ.* **30**, 123–131.
- Ku JE, Han HS, and Song JH.** 2013. The recent trend of the natural preservative used in cosmetics. *Asian. J. Beauty Cosmetol.* **11**, 835–844.
- Lee JH.** 2017. Master's thesis. A study of microbiological contamination after use of lip makeup tester. Sookmyung Women's University, Seoul, Korea.
- Lim JH, Min BK, and Choi YK.** 2001. Characterization of the bacterial cell wall lytic enzyme produced by *Aspergillus* sp. HCLF-4. *Korean J. Microbiol.* **37**, 15–20.
- Lou Z, Wang H, Zhu S, Ma C, and Wang Z.** 2011. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *J. Food Sci.* **76**, 398–403.
- Lundov MD and Zachariae C.** 2008. Recalls of microbiologically contaminated cosmetics in EU from 2005 to May 2008. *Int. J. Cosmet. Sci.* **30**, 471–474.
- Marco JLD, Valadares-Inglis MC, and Felix CR.** 2003. Production of hydrolytic enzyme by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches broom of cocoa. **34**, 33–38.
- Murugan G and Rengaswamy P.** 2011. Isolation, screening and production of biosurfactant by *Pseudomonas* sp. isolated from mangrove forest soil using coconut oil cake as substrate. *J. Basic Appl. Biol.* **5**, 251–257.
- Nagarajkumar M, Bhaskaran R, and Velazhahan R.** 2004. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res.* **159**, 73–81.
- Nagpure A and Gupta RK.** 2013. Purification and characterization of an extracellular chitinase from antagonistic *Streptomyces violaceusniger*. *J. Basic Microbiol.* **53**, 429–439.
- Naing KW, Lee YS, Nguyen XH, Jeong MH, Anees M, Oh BS, Cho J, Moon JH, and Kim KY.** 2014. Isolation and characterization of an antimicrobial lipopeptide produced by *Paenibacillus ehimensis* MA2012. *J. Basic Microbiol.* **55**, 857–868.
- Qiao N and Shao Z.** 2013. Isolation and characterization of a novel biosurfactant produced by hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax dieselolei* B-5. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 1207–1216.
- Rodrigues LR, Teixeira JA, van der Mei HC, and Oliveira R.** 2006. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids. Surf. B Biointerfaces* **49**, 79–86.
- Sharma D and Saharan BS.** 2014. Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. *Int. J. Microbiol.* **2014**, 698713.
- White IR and Groot AC.** 2006. Cosmetics and skin care products, pp.

493–506. In Frosch PJ, Menn T, and Lepoittevin JP. (eds.), Contact Dermatitis, 4th ed. Springer, Berlin, Germany.

- Wong S, Street D, Delgado SI, and Klontz KC.** 2000. Recalls of foods and cosmetics due to microbial contamination reported to the U.S. Food and Drug Administration. *J. Food Protect.* **63**, 1113–1116.
- Wu XC, Shen XB, Ding R, Qian CD, Fang HH, and Li O.** 2010. Isolation and partial characterization of antibiotics produced by *Paenibacillus elgii* B69. *FEMS Microbiol. Lett.* **310**, 32–38.

Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, and McInerney MJ. 2004. Comparison of methods to detect bio-surfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **56**, 339–347.

Zou YY, Jung LS, Lee SH, Kim SK, Cho YJ, and Ahn JH. 2012. Enhanced antimicrobial activity of nisin in combination with allyl isothiocyanate against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella boydii*. *Int. J. Food Sci. Technol.* **48**, 324–333.