J. Exp. Biomed. Sci. 13 (2007) 47-53

# Growth Inhibition Profile of an Antibacterial Entity from *Paenibacillus* DY1 Isolated from Korean Soil against Multidrug Resistant Enteric Bacterial Strains and Its Characterization

**Eun-Seok Shin[2], Sun-Il Kwon[3] and Kwan-Hee Yoo[1†]**

[1]*Department of Biology, Sangji University, Wonju 220-702, Korea.*
[2]*Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea.*
[3]*Department of Clinical Pathology, Daegu Health Science College, Daegu 702-722, Korea.*

Due to wide abuse of antibiotics both in human and livestock use, the advent and spread of multidrug resistant (MDR) pathogens becomes a serious health problem all over the world. Since the development of new antibiotics is at a standstill in pharmaceutical industry, the choice of therapeutic antibiotics is getting narrower. In this study, in an effort to search new antibiotics, the antimicrobial activity of *Paenibacillus* DY1 isolated from Korean soil was characterized on its growth inhibition spectrum against various health threatening MDR strains, with its stability and chemical structure. Extracellular culture filtrate of *Paenibacillus* DY1 effectively inhibits the growth of all the tested MDR enteropathogenic *Eshcherichia coli*, enterohemolytic *E. coli*, and enterotoxigenic *E. coli* strains, at a similar level to that on the nonresistant control *E. coli* strains. It showed significant growth inhibition effect against the causative agents of class one legal communicable disease, MDR *Salmonella typhi*, MDR *Salmonella paratyphi* A, food poisoning bacteria, MDR *Salmonella typhimurium*, and other MDR *Salmonella* spp. The growth of all of 10 different MDR *Shigella* spp. strains and 6 different *Vibrio* spp. strains tested was also inhibited. The antimicrobial activity of *Paenibacillus* DY1 was well preserved after heat treatment, and was also stable in both alkaline and acidic environment. The antimicrobial activity was partially purified with Diaion HP20 column and TLC. By NMR study, the putative structure of the activity was postulated as an alkane having hydroxyl groups.

**Key Words:** Multidrug resistant (MDR), *Paenibacillus* DY1, Antibiotics, Inhibition, *E. cloi*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, Stability, Structure

## 서 론

여러 가지 항생제에 동시에 저항성을 나타내는 다제내성 *Staphylococcus* 균주가 1950년대에 보고된 (Lepper, 1953) 이래로 세계적으로 많은 종류의 다재내성균이 등장하고 있다. 국내에서도 다제내성균에 대한 보고가 다수 있었으며, 항생제 내성 정도가 점점 심각해지고 있다. Penicillin계 항생제인 methicillin이 임상에 사용되면서 methicillin에 내성을 가지는 황색포도상 구균인 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)가 영국에서 보고된 (Waxman et al., 1983) 후 꾸준히 확산되어 현재 미국병원에서 분리되는 40~50%의 *Staphylococcus aureus* (SA)는 methicillin 내성을 보인다 (VRSA database, NIAID NIH USA, 2007). Vancomycin은 현재까지 페니실린 및 세파계 항생제 내성균주 치료에 가장 효과적으로 사용되었으나 내성을 가지는 균주가 국내외적으로 증가하고 있다 (Lecercq et al., 1988; Cheong, 1997; Hiramatsu et al., 1997; Quirk, 2002; Lee, 2006). Vancomycin에 완전히 저항성인 VRSA는 아직 보고되지 않았지만 4배 분량의 vancomycin에 반응하지 않는 SA는 보고되었다 (VRSA data base NIAID NIH USA, 2007). 국내에서는 병원에서 항생제의 처방이 줄어들고 있다고 하나, 수의사의 처방이 없이 가축용으로 항생제가 사료와 혼합되어 무분별하게 대량으로 사용되고 있어 큰 문제가 되고 있다. 이러한 항생제의 남용으로 우리나라에서 반코마이신에 고도내성을 가진 VRSA의 출현이 예견되고 있는 상황이다 (Kim et al., 2006).

제3세대 cephalosporin에 내성인 *E. coli*와 *Klebsiella pneumonia* (Jacoby, 1991), *Enterobacter cloaceae*, *Citrobacter freundii* 및 *Serratia marcescens* (Livemore, 1995)가 보고되었으며, fluo-

*논 문 접 수: 2007년 1월 22일
수정재접수: 2007년 3월 12일
†교신저자: 유관희, (우) 220-702 강원도 원주시 우산동 660, 상지대학교 이공대학 생명과학과
Tel: 033-730-0433, Fax: 033-730-0430
e-mail: khyoo@mail.sangji.ac.kr

roquinolone에 내성을 갖는 내성균도 증가하고 있다 (Bush et al., 1995). 국내에서 분리된 *Shigella*속 세균들은 다수가 ampicillin, streptomycin, tetracycline, chloramphenicol 등의 항생제에 내성을 나타냈다 (Kim, 2003). 항생제 내성 및 다제내성 세균의 증가로 앞으로 세균감염 치료가 더욱 어려워질 것으로 예측되고 있다. 이와 같이 기존의 항생제들에 대한 내성이 증가함에 따라 새로운 항생제의 개발이 절실한 상황이다. 신약개발의 비용을 절감하고 기간을 단축하려는 제약회사들은 그 동안 combinatorial chemistry와 high throughput에 치중하였다. 그러나 지난 15년간 단 하나의 lead structure도 제시하지 못하였다. 이에 따라 신약개발에 있어서 과거 소홀히 했던 새로운 천연물의 탐색에 다시 주목하게 되었다 (Kim et al., 2006). 새로운 천연항균물질을 탐색하기 위한 다양한 연구가 시도되고 있으며 황기종자 (Koo et al., 1998), 복숭아 미이과 (Lim et al., 2000), 표고버섯 (Kim et al., 2003) 등에서 항균활성을 보이는 물질이 보고되었다. 세균으로부터 천연항생물질을 개발하고자 하는 노력도 지속되어 국내에서 VRSA의 생장을 억제하는 방선균이 보고되었다 (Lee et al., 2003; Oh et al., 2005). 최근 새로운 항균제 lead structure로 다국적 제약사 Bayer Pharma Research에서 A54556 complex (Brotz-Oesterhelt et al., 2005)를 보고하였고, Merck Research Laboratory에서 platensimycin synthase (Wang et al., 2006)를 보고하였다.

본 연구는 항생제 개발에 필요한 새로운 항균물질이나 lead structure를 발굴하고자 하는 노력의 일환으로 수행되었다. Paenibaillus속의 미생물은 polymyxins, polyxin, paenibacillin 등의 항균물질을 생산하는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서는 일부의 Paenibacillus 균을 미생물 농약으로 개발하고자 세균성 풋마름병 (Suk et al., 2006), 고추역병 (Oh et al., 2005) 등의 방제용으로 연구되었으나, 아직 토착 Paenibacillus 균으로 새로운 항균물질후보를 찾기 위한 연구를 시도한 바는 없다. 본 연구에서는 한국의 토양에서 분리한 *Paenibacillus polymyxa*의 근연종으로 동정된 *Paenibacillus* DY1 strain (Shin et al., in press)의 항균력을 조사하였으며, 시험균주로서 임상적으로 중요한 대표적인 다제내성 병원균 (식중독 세균 및 1군 법정전염병균)을 사용하였다. 아울러 *Paenibacillus* DY1 strain의 항균활성물질을 부분적으로 정제하여 대략적인 구조를 밝혔다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용된 균주

*Paenibacillus* DY1 strain의 항균활성을 알아보기 위하여 Table 1에서 Table 4까지 기재된 균주를 사용하였다. 대조균주로 항생제 내성이 없는 *Escherichia coli* ATCC 25922 균주를 사용하였다. 다제내성 대장균으로는 enterohemolytic *E. coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) 및 enteropathogenic *E. coli* (EPEC)를 사용하였다 (Table 1). 다제내성 *Salmonella*는 Table 2에 나타난 9개의 각기 다른 *Salmonella* 균주를 사용하였고, 다제내성 *Shigella*로는 Table 3에 나타난 10개의 각기 다른 *Shigella* 균주를 사용하였다. *Vibrio* 균주는 Table 4에 나타난 7종의 균주를 사용하였다.

### 2. 항균활성 측정 (Disk diffusion method)

TSB (Trypticase soy broth 40 g/L, yeast extract 6 g/L)에서 배양된 *Paenibacillus* DY1 strain의 상층액을 0.22 μm membrane filter로 여과시킨 후 여과액을 8배로 증발 농축하여 직경 6 mm disk filter paper에 60 μl를 떨어뜨린 후 건조시켰다. 시험에 사용된 표준균주와 항생제 내성균주들은 MacFarland 0.5로 탁도를 맞추어 각각 TSA (Trypticase soy agar 40 g/L, yeast extract 6 g/L) 평판배지에 면봉을 이용하여 골고루 접종하였다. 이 TSA 배지에 잘 건조한 여과액 disk를 올려놓고 37℃에서 18시간 동안 배양한 후 성장억제환의 직경을 측정하였다.

### 3. 항균활성의 온도에 대한 안정성

각각 10℃, 20℃, 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃, 90℃ 및 100℃에서 *Paenibacillus* DY1 strain 항균활성물질이 들어있는 여과액을 60분 동안 정치시킨 후, disc에 60 μl를 점적하고 이를 *E. coli* ATCC 25922 균주가 도포된 TSA 배지상에 놓고 37℃에서 18시간 배양한 후 생장억제대 투명환의 직경을 측정하였다. 경시적인 변화를 관찰하기 위하여 여과액을 80℃에서 각각 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 70분, 80분, 90분, 100분, 110분, 120분 정치시킨 후 동일한 방법으로 생장억제대의 직경을 측정하였다.

### 4. 항균활성의 pH에 대한 안정성

각 pH 완충액은 acetate buffer로 pH 3, 4, 5의, phosphate buffer로 pH 6, 7, 8의, Tris-Cl buffer로 pH 9, 10, 11의 완충액을 만들어 사용하였다. 각각의 pH 완충액 50 μl를 *Paenibacillus* DY1 strain 항균활성물질이 들어 있는 여과액 50 μl와 혼합한 후 40℃에서 60분간 방치시킨 다음 *E. coli* ATCC 25922 균주가 도포된 TSA 배지상에서 생장억제대의 직경을 측정하였다.

### 5. 항균활성물질의 분리 및 정제

*Paenibacillus* DY1 strain 배양액을 4℃에서 8,000 x g로 10분간 원심분리 후, 상등액을 취하여 Diaion HP-20 columm chromatography를 행하고 이중 항균활성이 있는 ether 추출물 분획을 취하여 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하였

**Table 1.** Growth inhibition test of the culture filtrate of *Paenibacillus* DY1 strain against multidrug resistant *E. coli* strains by disc diffusion method

| *E. coli* strains | Resistant antibiotics (Total number of resistant antibiotics) | Inhibition zone (Diameter in mm) |
|---|---|---|
| *E. coli* ATCC 25922 | None | 14 |
| EHEC 03-36 | AM, CF, CIP, TIC (4) | 12 |
| EHEC 03-37 | AM, SAM, C, GM, SXT, TIC, TE (7) | 12 |
| EHEC 03-38 | None | 14 |
| EHEC 03-39 | NA, SXT, TE (3) | 13 |
| EHEC | None | 12 |
| ETEC 2-2 | AM, AN, SAM, CF, CIP, GM, NA, SXT, TIC (9) | 12 |
| ETEC | None | 11.5 |
| ETEC 04-12 | AM, SAM, CF, SXT, TIC (5) | 12 |
| ETEC 04-9 | AM, SAM, CF, GM, SXT, TIC (6) | 11 |
| ETEC 04-13 | AM, SAM, CF, GM, SXT, TIC (6) | 12 |
| EPEC 02-1 | AM, SAM, CF, C, NA, S, SXT, TIC, TE, AMC (10) | 15 |
| EPEC | None | 12 |
| EPEC 02-2 | S, TE (2) | 13 |
| EPEC 02-3 | AM, SAM, CF, CRO, TIC, TE, AMC (7) | 13 |
| EPEC 02-6 | AM, CF, TIC, TE (5) | 13 |

AM : ampicillin, C : chloramphenicol,
GM : gentamicin, S : streptomycin,
TE : tetracycline, NA : nalidixic acid,
CIP : ciprofloxacin, CRO: ceftriaxone,
CF : cephalothin, K : kanamycin,
SXT : sulfamethoxazole/trimetoprim,
SAM: ampicillin/sulbactam,
TIC : ticarcillin, FOX: cefoxitin,
AMC: amoxicillin/clavulanic acid, AN : amikacin

다. 농축된 시료를 thin layer chromatography (TLC, $CHCl_3$: Methanol = 1:50)를 행한 후, 항균활성이 있는 분획을 NMR (Virian Mercury 300 MHz)로 분석하였다.

## 결 과

### 1. 항균활성의 측정

*Paenibacillus* DY1 strain의 배양여액으로 시행한 disk diffusion method 시험에서 4가지 종류의 항생제에 내성을 갖는 장출혈성 대장균 EHEC 03-36과 7종류의 항생제에 내성을 나타내는 장출혈성 대장균 EHEC 03-37에 대하여 12 mm의 성장억제대를 보였다 (Table 1). 이는 항생제 내성이 없는 대조균주 EHEC 03-38과 *E. coli* ATCC 25922 균주가 나타낸 생장억제대인 14 mm와 가까웠다. 주요 식중독 원인균으로 국내에서 분리되고 있는 4가지 종류의 다제내성 장독소형 대장균 ETEC에도 11~12 mm의 성장억제환을 나타내, 비내성 ETEC의 생장억제환 11.5 mm와 유사하였다. 그리고 2~10종류의 항생제에 내성을 나타내고 있는 4종류의 장병원성 대장균 EPEC에도 13~15 mm 크기의 생장억제대를 나타냈으며, 대조균인 비내성 EPEC의 생장억제대인 12 mm와 유사한 항균력을 보여주었다 (Table 1).

**Table 2.** Growth inhibition test of the culture filtrate of *Paenibacillus* DY1 strain against multidrug resistant strains of *Salmonella* spp. by disc diffusion method

| *Salmonella* spp. strains | Resistant antibiotics (Total number of resistant antibiotics) | Inhibition zone (Diameter in mm) |
|---|---|---|
| *Salmonella blockly* | AM, K, NA, S, TIC, TE (6) | 10 |
| *S. enteritidis* 13492 | AM, C, NA, S, TIC (5) | 9 |
| *S. typhimurium* 16850 | AM, C, S, SXT, TIC, TE, AMC (8) | 10 |
| *S. typhimurium* 1298 | AM, C, GM, NA, S, SXT, TIC, TE (8) | 11 |
| *S. typhimurium* 14263 | AN, CF, CRO, FOX, GM, K, NA, S, TE (9) | 10 |
| *S. suberu* | AM, SAM, DF, C, FOX, GM, K, S, SXT, TIC, TE, AMC (12) | 10 |
| *S. paratyphi* A | AM, C, S, TIC, TE (5) | 9 |
| *S. virchow* | AM, CF, FOX, NA, TIC TE, AMC (7) | 10 |
| *S. typhi* | AM, C, NA, S, TIC, TE (6) | 13 |

AM : ampicillin, C : chloramphenicol,
GM : gentamicin, S : streptomycin,
TE : tetracycline, NA : nalidixic acid,
CRO : ceftriaxone, CF : cephalothin,
K : kanamycin, AN : amikacin,
SXT : sulfamethoxazole/trimetoprim,
SAM: ampicillin/sulbactam, TIC : ticarcillin,
FOX : cefoxitin,
AMC: amoxicillin/clavulanic acid

*Paenibacillus* DY1 strain의 배양여액은 6종류의 항생제에 저항성을 나타내는 법정1군 전염병균인 *Salmonella typhi*에 13 mm, *Salmonella paratyphi* A에 9 mm의 생장억제대를 나타냈으며, 식중독균인 다제내성 *Salmonella typhimurium* 16850 및 *Salmonella typhimurium* 1298에도 10~11 mm의 생장억제대를 나타냈고, 다른 다제내성 *Salmonella* spp.에도 9~10 mm의 생장억제대를 보였다 (Table 2). 또한, *Paenibacillus* DY1 strain의 배양여액은 다제내성을 가지고 있는 10종의 *Shigella* 균에 대해 모두 항균활성을 보였으며, 생장억제환은 12~14 mm이었고 (Table 3), 6종의 *Vibrio* 균에도 모두 10~14 mm의

**Table 3.** Growth inhibition test of the culture filtrate of *Paenibacillus* DY1 strain against multidrug resistant strains of *Shigella* spp. by disc diffusion method

| *Shigella* spp. strains | Resistant antibiotics (Total number of resistant antibiotics) | Inhibition zone (Diameter in mm) |
|---|---|---|
| *Shigella sonnei* 16981 | AM, CF, CRO, GM, NA, S, SXT, TIC, TE (9) | 14 |
| *Shigella sonnei* 207 | NA, S, SXT, TE (4) | 12 |
| *Shigella sonnei* 292 | AM, CF, GM, K, NA, S, SXT, TIC, TE (9) | 14 |
| *Shigella sonnei* 2497 | AM, CF, GM, NA, S, SXT, TIC, TE (8) | 14 |
| *Shigella sonnei* 6087 | AM, SAM, DF, FOX, NA, S, SXT, AMC (8) | 13 |
| *Shigella flexneri* 15175 | AM, C, S, SXT, TIC, TE (6) | 14 |
| *Shigella flexneri* 20760 | AM, SAM, C, S, SXT, TIC, TE (7) | 13 |
| *Shigella flexneri* 15176 | AM, SAM, C, S, SXT, TIC, TE (7) | 13 |
| *Shigella dysenteriae* 5177 | S, SXT, TE (3) | 12 |
| *Shigella dysenteriae* 5178 | S, SXT, TE (3) | 12 |

AM : ampicillin, C : chloramphenicol,
GM : gentamicin, S : streptomycin,
TE : tetracycline, NA : nalidixic acid,
CRO : ceftriaxone, CF : cephalothin,
K : kanamycin, FOX : cefoxitin,
SXT : sulfamethoxazole/trimetoprim,
SAM : ampicillin/sulbactam, TIC : ticarcillin,
AMC : amoxicillin/clavulanic acid

생장억제환를 나타냈다 (Table 4).

### 2. 항균활성의 온도에 대한 안정성

10℃에서 100℃까지 10℃ 간격으로 각각의 온도에서 항균활성물질이 들어 있는 여과액을 60분 동안 정치시킨 후 *E. coli* ATCC 25922 균주가 도포된 TSA 배지상에서 생장억제대의 직경을 측정하여 온도에 대한 안정성을 조사한 결과, 모든 온도에서 명백한 항균활성을 나타냈으며, 100℃에서도 항균환의 크기는 실온과 큰 차이가 없었다 (data not shown). 생장억제대가 24 mm로 나타난 항균활성물질을 10분에서 120분까지 10분 간격으로 80℃에서 정치시킨 후 생장억제대의 직경을 측정한 결과, 120분간 처리했을 때에도 생장억제대가 초기치의 90% 가량 유지되었다 (Fig. 1).

### 3. 항균활성의 pH에 대한 안정성

pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11의 각각의 pH 완충액 50 μl를 항균활성물질이 들어 있는 여과액 50 μl와 혼합한 후, 40℃에서 60분간 반응시킨 후, 생장억제대를 측정한 결과 pH 3~5 사이에서는 17~23 mm 가량의 억제환을 나타냈고, pH 6~8 사이에서는 14~17 mm 정도의 억제환을 나타냈으며, pH 9~11 사이에서는 14 mm 정도의 억제환을 나타냈다 (data not shown).

**Table 4.** Growth inhibition test of the culture filtrate of *Paenibacillus* DY1 strain against of *Vibrio* spp. by disc diffusion method

| *Vibrio* spp. strains | Inhibition zone (Diameter in mm) |
|---|---|
| *Vibrio vulnificus* | 14 |
| *Vibrio parahaemolyticus* 18853 | 11 |
| *Vibrio parahaemolyticus* 18854 | 11 |
| *Vibrio parahaemolyticus* 18855 | 10 |
| *Vibrio parahaemolyticus* 18857 | 11 |
| *Vibrio parahaemolyticus* 19249 | 12 |
| *Vibrio parahaemolyticus* 19342 | 10 |

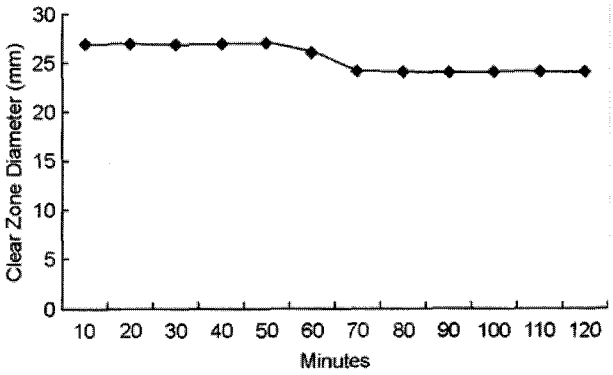


**Fig. 1.** Thermostability of the antimicrobial activity of the culture filtrate of *Paenibacillus* DY1 strain, a time course study of the effect of heat treatment at 80℃ on the growth inhibition ability of the culture filtrate of Paenibacillus DY1 strain against *E. coli* ATCC 25922.

### 4. 항균활성물질의 분리 및 정제

*Paenibacillus* DY1 strain이 생산하는 항균활성물질을 분리하기 위하여, 세균 배양액을 원심분리한 후, 상등액을 Diaion HP-20 columm chromatography하여 ether층 분획을 얻었고, water residue에서 hexane, chloroform 및 ethyl acetate로 차례로 추출하여 각 분획물을 얻었다. 이 4개의 분획물에 대한 항균력을 조사한 결과 ether로 추출한 분획이 가장 항균활성이 좋은 것으로 나타나 (data not shown), 이 ether층 분획물을 감압 농축하여 54 mg의 항균활성물질을 얻었다. 이것으로 TLC를 시행한 결과 4개의 분획을 얻어 각 분획에 대한 항균력을 조사한 결과 최상단부 분획에서 가장 강한 활성을 나타냈다 (data not shown). 이 분획을 NMR (Virian Mercury 300 MHz)로 분석한 결과 (Fig. 2), 0.818, 0.843, 0.870, 0.885

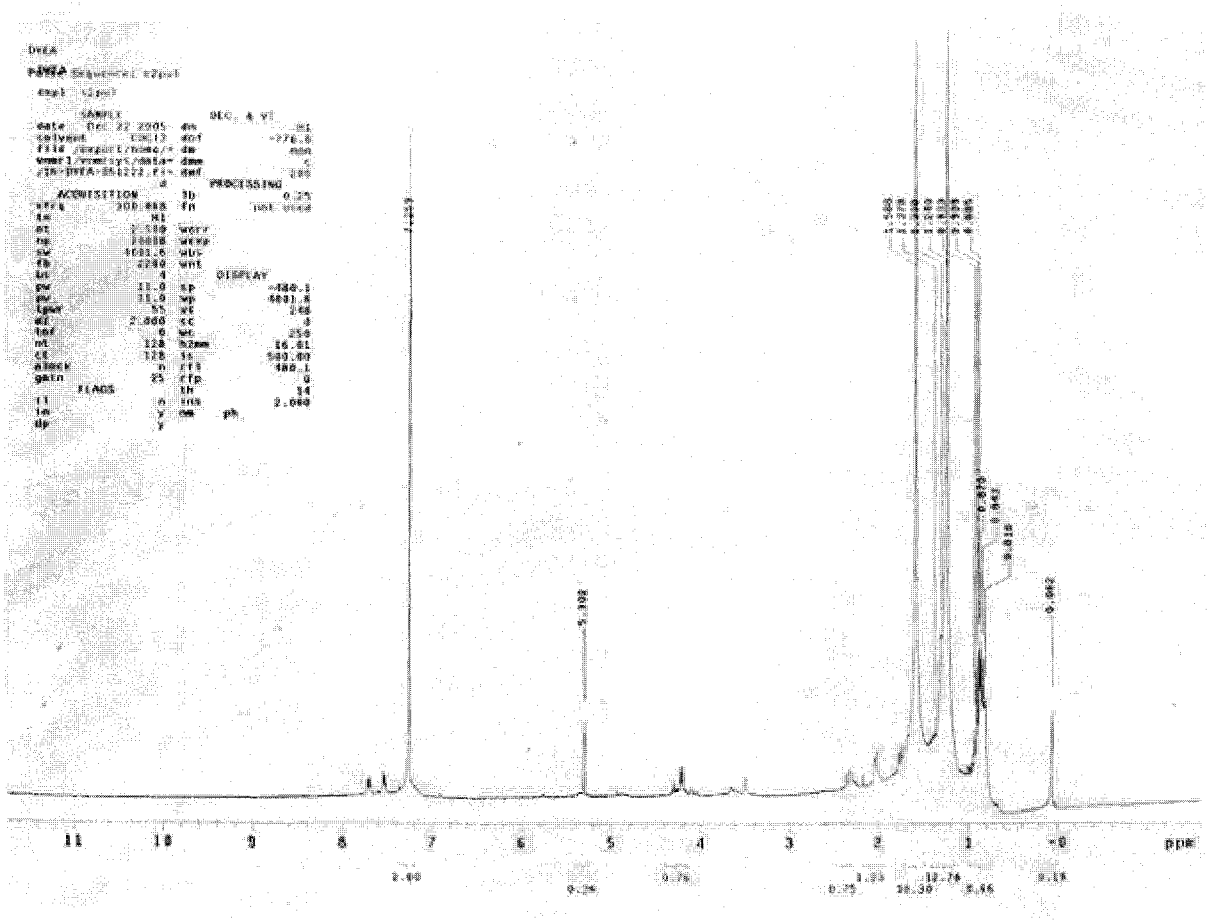

**Fig. 2.** NMR spectrum of the partially purified antimicrobial substance from the culture filtrate of *Paenibacillus* DY1 strain

ppm의 peak에서 탄화수소 (-$CH_2$)기와 1.240, 1.308, 1.378, 1.588 ppm의 peak에서 methyl (-$CH_3$)기, 그리고 5.302 ppm의 peak에서 hydroxyl (-OH)기를 갖고 있는 $CH_3$와 $CH_2$기가 다중으로 연결된 Alkane 계열의 물질로 나타났다.

## 고 찰

*Paenibacillus* DY1 strain의 배양여액은 임상적으로 중요한 각종 다제내성 병원균에 고른 생장억제효과를 보였다 (Table 1~4). 병원성 대장균 (EHEC, ETEC, EPEC)에 대하여 생장억제효과를 보였으며, 법정1군 전염병균인 *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A, 식중독균인 다제내성 *Salmonella typhimurium* 16850 및 *Salmonella typhimurium* 1298의 생장을 억제하였으며, 시험된 10종의 다제내성 *Shigella* 균에 대해 모두 항균활성을 보였다 (Table 1~3). 세균성 이질균은 학교 급식 및 단체급식에서 설사질환을 유발하는 전염성 세균이며, 국내에서는 대부분 *Shigella sonnei*에 의한 세균성 이질이 전염되고 있다. *Shigella*는 여러 종류의 항생제에 다제내성을 나타내 환자치료에서 항생제 선택의 폭이 좁아 치료에 난점이 있다. 또한, 비브리오 패혈증균은 여름철에 익히지 않은 어패류 섭취로 장염비브리오 패혈증을 유발한다. *Paenibacillus* DY1 strain의 배양여액은 시험된 6종의 *Vibrio* 균에 모두 생장억제 효과를 보였다 (Table 4). 이와 같이 *Paenibacillus* DY1 strain의 배양여액은 시험된 주요 다제내성 병원균에 광범위한 스펙트럼으로 항균력을 나타내어 앞으로 다제내성 장내세균의 치료제로서의 잠재력을 보여주었다.

*Paenibacillus* DY1 strain 배양여액은 다른 항균력 시험에서, *Vibrio parahemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, ETEC, EPEC, EIEC, 법정1군 전염병을 일으키는 병원체 EHEC, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* 등 16종의 균주에 대하여 생장을 저해하였다. 그러나 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogens*에 대해서는 생장을 저해하지 못하였다 (Shin et al., in press). 소시지에서 분리한 *Paenibacillus polymyxa* 균주가 생산하는 polyxin은 *Staphylococcus aureus*의 생장은 저해하지 못하였으나, *Bacillus cereus*의 생장은 억제하여 (Piuri et al., 1998) *Paenibacillus* DY1이 생산하는 항균물질은 polyxin과

항균활성범위가 다른 것으로 나타났다.

*Paenibacillus*속의 일부 균은 polymyxins을 생산하는 것으로 알려져 있다. Polymyxins는 양전하를 띠는 detergent antibiotics이며, 소수성 꼬리를 가지는 cyclic heptapeptides이다. Polymyxins는 분자량이 1,000~1,200 Da.이며 A, B, D, E 등의 구조가 있다 (Gale et al., 1981). 최근 새로운 antimicrobial peptide인 polymyxin이 *Paenibacillus polymyxa* OSY-DF strain으로부터 분리되어 paenibacillin이라 명명되었다. 분자량이 2,983 Da.인 이 peptide는 다수의 그람 양성균의 생육을 저해하였는데, *Paenibacillus* DY1 strain이 생산하는 항균활성물질과 달리 *Staphylococcus aureus*의 생육도 저해하였다 (He et al., 2007). 상업적인 냉장식품에서 분리된 *Paenibacillus polymyxa*에서 *Clostridium botulinum*의 생육을 저해하는 항균성 peptide가 보고되었는데 고온과 산에 안정하였다 (Girardin et al., 2002).

*Paenibacillus* DY1 strain이 생산하는 항균활성물질은 고온에 대한 열 안정성을 보여주었다 (Fig. 1). 소시지에서 분리한 *P. polymyxa* P13 균주가 생산하는 polyxin도 열에 안정하였다 (Piuri et al., 1998). *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus*가 생산하는 bacteriocin도 100℃에서 30분 처리했을 때 활성이 안정하였으며 (Lee et al., 1994), *Bacillus cereus*가 생산하는 cerein도 90℃에서 15분 동안 처리하였을 때 안정하였다 (Naclerio, 1993). *Paenibacillus* DY1 strain이 생산하는 항균활성물질은 산성과 알칼리성 환경에서 모두 활성을 유지하였다 (data not shown). *P. polymyxa* P13 균주가 생산하는 polyxin은 산에서는 안정하나 알칼리에서는 불안정하여 (Piuri et al., 1998), *Paenibacillus* DY1 strain이 생산하는 항균활성물질과 상이하였다. *Bacillus cereus*에서 생산하는 cerein의 경우에는 pH 3에서 12까지 넓은 범위에서 활성이 안정하였다 (Naclerio et al., 1993). *Paenibacillus* DY1 strain이 생산하는 항균활성물질은 지금까지 보고된 *Paenibacillus*속의 미생물들이 생산하는 항균활성 물질들과 항균 spectrum과 안정성에서 차이가 있는 것으로 나타났다.

*Paenibacillus* DY1 strain이 생산하는 항균활성물질을 NMR로 분석한 결과 (Fig. 2), $-CH_2$기, $-CH_3$기와, -OH기를 갖고 있는 Alkane 계열의 물질로 추측된다. 이 물질의 열 안정성과 산 및 알칼리 안정성으로 보아 분자량이 작은 저 분자 물질로 추정되며, 지금까지 보고된 *Paenibacillus*가 생산하는 peptide계의 항균물질과 다른 것으로 생각되나, peptide 구조의 보유여부는 추후 확인해 보아야 할 것으로 판단된다. *Paenibacillus* DY1 strain이 생산하는 항균활성물질은 임상적으로 문제가 되는 항생물질 내성균에 대한 폭 넓은 저해 작용을 나타내, 새로운 항생제 개발에 있어서 유망한 후보로서의 잠재력을 보여 주었다. 향후 정확한 구조의 확인, 주요 병원균에 대한 효력, 안전성, 다양한 제형의 개발을 위한 물성 확인 등의 연구가 이어져야 할 것이다.

## REFERENCES


Brotz-Oesterhelt H, Beyer D, Kroll HP, Endermann R, Ladel C, Schroeder W, Hinzen B, Raddatz S, Paulsen H, Henninger K, Bandow JE, Sahl HG, Labischinski H. Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. Nat Med. 2005. 11: 1082-1087. Epub 2005. Oct 2. Erratum in: Nat Med. 2005. Dec; 11(12): 1361.

Bush K, Jacoby GA, Mederios AA. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. 1995. 39: 1211-1233.

Cheong HJ. Vancomycin resistant *Enterococci*. J Korean Soc Chemother. 1997. 15: 27-43.

Gale EF, Cundliffe E, Reynolds PE, Richmond MH, Waring MJ. The molecular basis of antibiotic action. 2nd ed. John Wiley 1981.

Girardin H, Albagnac C, Dargaignaratz C, Nguyen-The C, Carlin F. Antimicrobial activity of foodborne *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. against *Clostridium botulinum*. J Food Prot. 2002. 65: 806-813.

He Z, Kisla D, Zhang L, Yuan C, Green-Church KB, Yousef AE. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. Appl Environ Microbiol. 2007. 73: 168-78. Epub 2006. Oct 27.

Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 1997. 350: 1670-1673.

Jacoby GA. More extended spectrum β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1991. 35: 1697-1704.

Kim SH. Charcterization and transmission patterns of extended spectrum β-lactamase of the genus *Shigella* in Korea. 2003. Ph.D. thesis, Department of biotechnology, Graduate School, Korea University.

Kim KR, Yoon TM, Kwon HJ, Seo JW. Trends in the development of new antibiotics and antifungal agents. Microorg Indus. 2006. 32: 16-20.

Kim YD, Kim KJ, Cho DB. Antimicrobial activity of *Lentinus edodes* extract. Korean J Food preservation. 2003. 10: 89-93.

Koo BS, Ryu JC, Chung TY, Kim KC. Purification and characterization of natural antifungal protein from astragal seeds (*Astragalus membranaceus*). Kor J Appl Microbiol Biotechnol.

1998. 26: 379-386.

Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med. 1988. 319: 157-161.

Lee JH, Chang HI. Characteristics of the Bacteriocin produced from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Kor J Appl Microbiol Biotechnol. 1994. 22: 7-12.

Lee JY, Yang SY, Ko EJ, Lee SK, Kim SK, Cho WS, Song MD. Isolation of antibiotic substance-producing Actinomycetes for VRSA. Nat Sci Res. 2003. 13: 61-71.

Lee SH. Minimizing antibiotic resistance. Microorg Indus. 2006. 12. 32: 10-12.

Lepper MH, Dowling HF, Jackson GG, Moulton B, Spies HW. Effect of antibiotic usage in the hospital on the incidence of antibiotic-resistant strains among persons carrying *Staphylococci*. J Lab Clin Med. 1953. 42: 832-839.

Lim TH, Lee JM, Chang TH, Cha BJ. Antifungal activity and identification of an *Actinomycetes* strain isolated from mummified peaches. Kor J Appl Microbiol Biotechnol. 2000. 28: 161-166.

Livermore DM. β-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995. 8: 567-584.

Naclerio G, Ricca E, Sacco M, de Felice M. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol. 1993. 59: 4313-4316.

Oh KS, Lee YK, Lee JK, Kim JH. Biopesticides; Physicochemical properties of granular formulation using Paenibacillus sp. AC-1 as a microbial fungicide. Korean J Pesticide. 2005. 9: 262-267.

Oh ST, Lee JJ, Lee JY, Kim JK, Yang SY, Kim YS, Song MD. Isolation and identification of *Streptomyces* sp. producing anti-vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* substance. Kor J Microbiol Biotechnol. 2005. 33: 90-95.

Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. Lett Appl Microbiol. 1998. 27: 9-13.

Quirk M. First VRSA isolate identified in USA. Lancet Infect. Dis. 2002. 2: 510.

Shin ES, Lee HM, Lee BK, Kim SH, Kwon SI, Yoo KH. Identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* DY1 isolated from Korean soil with new antibacterial activity. Korean J Microbiol. 2007. (in press)

Suk JK, Lee SH, Park DH, Cho JM, Hur JH, Kim BS, Lim CK, Ipper NS, Shrestha A. Pest control; effects of a soil-born Paenibacillus spp. strain KPB3 on suppression of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. Korean J Pesticide Science. 2006. 10: 313-319.

VRSA database, NIAID NIH USA, 2007. http://science.education.nih.gov/supplements/ nih1/diseases/activities/ activity5_vrsa-database.htm

Wang J, Soisson SM, Young K, Shoop W, Kodali S, Galgoci A, Painter R, et al. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. Nature 2006. 441: 358-361.

Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of β-lactam antibiotics. Annu Rev Biochem. 1983. 52: 815-829.