



## *Bacillus subtilis* DS660과 *Paenibacillus polymyxa* DS842의 항균활성

이다솔  · 송흥규\* 

강원대학교 생명과학과

### Antimicrobial activities of *Bacillus subtilis* DS660 and *Paenibacillus polymyxa* DS842

Da-Sol Lee  and Hong-Gyu Song\* 

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

(Received August 6, 2018; Revised October 5, 2018; Accepted October 19, 2018)

This study was carried out to isolate soil bacteria with antimicrobial activity and evaluate antimicrobial substances produced by isolated bacteria. Among many isolates *Bacillus subtilis* DS660 and *Paenibacillus polymyxa* DS842 showed high antimicrobial activities against 6 species of microbial residents on human skin and 3 species of pathogenic bacteria. DS660 and DS842 showed 15.3~26.8 and 11.3~27.5 mm of inhibition zone diameter, respectively on nutrient agar medium against most target bacteria and fungi. DS660 and DS842 produced  $57 \pm 8$  and  $170 \pm 15$   $\mu\text{mol/ml}$  of siderophore, respectively as an antimicrobial substance. Analysis of ethyl acetate extract of culture supernatants of DS660 and DS842 suggested production of glycolipid biosurfactant which reduced surface tension of culture supernatant of DS660 and DS842 from 60.0 to 40.3 and 30.3 mN/m, respectively. DS660 and DS842 also showed  $169.2 \pm 9.9$  and  $357.2 \pm 13.7$  nmol/min/mg protein of  $\beta$ -1,3-glucanase activity, respectively, and hydrolyzed cell wall components of 3 bacterial species. These results suggest that *B. subtilis* DS660 and *P. polymyxa* DS842 may be utilized as an environment-friendly biocontrol agent against some skin microbes and pathogenic bacteria.

**Keywords:** *Bacillus subtilis* DS660,  $\beta$ -1,3-glucanase, *Paenibacillus polymyxa* DS842, antimicrobial activity, biosurfactant, siderophore

미생물은 매우 다양한 환경과 조건에서 살 수 있으며 따라서 미생물 번식으로 인한 문제가 우리 주변에서 끊임없이 제기되고 있다. 화장품의 경우 다양한 세균과 진균이 이용될 수 있는 유, 무기물을 다량 함유하고 있어 미생물 오염 가능성이 상존하며(Ku *et al.*, 2013), 이를 사용하는 인간에 큰 문제를 초래할 수 있다(Behravan *et al.*, 2005). 실제 2005년에서 2008년 사이에 유럽지역에서 화장품 173종류가 회수되었는데 그 중 대부분이 *Pseudomonas aeruginosa*에 오염되었고, 일부에서 *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*와 *Klebsiella* sp.이 검출되었다(Lundov and Zachariae, 2008). 위와 같은 병원균 또는 기회적 병원균들은 패혈증, 전신감염, 만성기도 감염증, 각막염 등을 일으킬 수 있을 정도로 심각한 영향을 미칠 수 있다(Behravan *et al.*, 2005). 식품의 경우에는 *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*와 일부 병원성 *Escherichia coli* 등과 같은 세균의 번식이 인간의 건강을 위협할 수 있을 뿐만 아니라, 경제적 손실을 초래할 수 있다(Jiang *et al.*, 2012). 현재 이런 미생물 오염을 제어하기 위하여 식품이나 화장품 산업에서는 프로피온산(propionic acid), 나이신(nisin), 파라벤(paraben) 등의 첨가물을 이용하고 있는데, 빠른 활성 감소, 피부 부작용 유발 등의 문제가 있어 대체 항균물질에 대한 관심이 증가하고 있다(White and Groot, 2006). 대체 항균물질 후보에는 미생물 유래 항균물질이 있는데, 대표적으로는 생물계면활성제, 박테리오신 등이 있으며(Jiang *et al.*, 2012; Sharma and Saharan, 2014), 그 외에 다양한 세포벽 분해효소

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

와 siderophore가 알려져 있다(Nagarajkumar *et al.*, 2004).

다양한 미생물 중 *Bacillus subtilis*는 지난 50년 동안 항생물질 생산 잠재력을 인정받고 있고, 산업적으로 중요한 효소를 생산하고 있다(Stein, 2005; Ansari *et al.*, 2012). 또한 *Paenibacillus polymyxa*의 경우 인간 병원성 세균, 식물 병원성 세균과 진균에 대한 항균활성이 보고된 바 있다(Seldin *et al.*, 1999; von der Weid *et al.*, 2003). 이에 본 연구에서는 보다 항균성이 강한 균주를 탐색하기 위해 토양에서 분리된 *Bacillus subtilis* DS660와 *Paenibacillus polymyxa* DS842에 대한 항균활성을 평가하고 항균물질을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 항균활성 세균 균주 분리 및 동정

강원도의 여러 지역에서 토양 시료를 채취하고 Luria-Bertani agar (LA) 배지에 시료를 도말하여 배양하였다(30°C, 7일). 배양된 세균 집락으로부터 세균 균주를 순수 분리하였고 다음과 같은 미생물에 대하여 항균활성을 평가하였다: 화장품업계에서 표준 대상미생물로 이용하는 피부 상재균 6종 *Candida albicans* ATCC10231, *Bacillus subtilis* ATCC19659, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC2513, *Escherichia coli* ATCC8739와 경상대학교 병원체 지원은행으로부터 분양받은 *Listeria monocytogenes* GNUH-NCCP 2148, 2637과 2868, *Micrococcus luteus* GNUH-NCCP 2837, 2922와 3683, *Klebsiella pneumoniae* GNUH-NCCP 29, 4149와 4159. 분리 균주를 대상 미생물과 대치 배양한 후 분리 균주 집락 주변에 생긴 저해대를 토대로 균주를 1차 선별하였다.

선별 균주 중 항균활성이 뛰어난 DS660과 DS842는 (주)마크로젠에 의뢰하여 16S rDNA 염기서열을 분석하였으며 미국 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록된 균주와 상동성을 비교하였다. 이후 형태학적 동정, API kit (50CHB와 20E, bioMérieux)를 이용한 생리생화학적 검사를 통해서 균주를 최종 동정하였다.

### 균주의 항균활성

두 균주를 LB 배지에 배양하고 배양액을 원심분리(2,300 × g, 40분)하였다. 대상 미생물이 도말된 nutrient agar (NA) 배지에 cork borer로 10 mm 직경의 홈을 뚫고 배양 상등액을 100 µl 첨가하여 배양 후 저해 직경을 측정하였다(Ansari *et al.*, 2012). 한편 두 균주의 세균 세포벽 용해활성을 조사하기 위하여 *B. subtilis*, *P. aeruginosa*와 *E. coli*의 배양액을 원심분리(2,300 × g,

40분)하여 세포를 수집하였다. 121°C에서 15분간 멸균하여 균을 사멸시킨 후 침전된 성분만을 건조시켜 세포벽 성분이 함유된 분말을 NA 배지에 0.2%로 첨가하여 배지를 제작하였다. 배지에 균주를 희석 배양 후 집락 주변에 생긴 투명환을 토대로 세균 세포벽 용해능을 판단하였다(Lim *et al.*, 2001).

### 항균물질

**계면활성물질**: DS660과 DS842 균주의 배양 상등액을 회수하여 시료로 이용하였다. 유리 페트리접시에 증류수 50 ml를 담고, 원유 20 µl를 떨어뜨리고 배양 상등액 10 µl를 가한 뒤 생긴 투명환의 직경을 측정하였으며(Rodrigues *et al.*, 2006), 표면장력계(514-B2, Itoh Seisakuso)를 이용하여 배양 상등액의 표면장력을 측정하였다(Sharma and Saharan, 2014). 계면활성물질의 추출을 위해 균주 배양 상등액을 pH 2로 보정하고 동량의 에틸 아세테이트를 첨가하였다. 추출된 시료를 감압증발기로 건조시킨 후 소량의 메탄올에 용해하여 thin layer chromatography (TLC) plate (silicagel 60)에 100 µl를 점적하고, 이동상(클로로포름/메탄올/빙초산 = 65:15:2)에 위치시킨 후 전개하였다. 이후 1% ninhydrin, orcinol 및 bromothymol blue로 염색하여 물질의 성질을 판단하였다(Amani *et al.*, 2013).

**Siderophore (catechol type)**: Chrome azurol S(CAS) 배지를 제작하여 10 mm의 홈을 뚫고 균주 배양액을 70 µl 넣은 후 배양하여 황색 환의 형성 유무를 조사하였다. DS660과 DS842 배양 상등액의 pH를 2.9로 보정하고 동량의 에틸 아세테이트를 첨가하여 siderophore 추출 후 동량의 Hathway 반응 용액과 30분간 반응시키고 700 nm에서 흡광도를 측정하였다(Nagarajkumar *et al.*, 2004).

**β-1,3-Glucanase**: Peptone-bouillon-yeast 배지에 DS660과 DS842 균주를 희석배양하고 집락 주변에 생긴 투명환으로 효소 생성 여부를 판단하였다(Kang *et al.*, 1977). 효소 정량분석을 위해 LB 배지에서 DS660과 DS842를 배양 후 상등액 250 µl, 0.1 M 인산염 완충액(pH 5.5) 500 µl와 0.2% laminarin (Sigma Aldrich Co.) 500 µl를 혼합하고 2시간 동안 40°C 항온수조에서 반응시켰다. 그리고 이후 시료는 dinitrosalicylic acid 방법을 이용하여 분석하였다(Nagarajkumar *et al.*, 2004).

## 결과 및 고찰

### 항균활성 세균 균주 분리 및 동정

영월 토양시료에서 분리한 DS660 균주와 삼척의 대금굴 토

양시료에서 분리한 DS842 균주를 다양한 미생물과 함께 배양하였을 때 대부분의 대상 미생물을 억제하는 항균활성을 나타내었다. DS660과 DS842 균주의 16S rDNA 염기서열 분석 시 각각 NCBI 등록 균주 중 *Bacillus subtilis* 168 및 *Paenibacillus*

*polymyxa* DSM36과 99.0%의 상동성을 나타내었다. 이후 형태학적 조사와 API kit를 이용한 생리 생화학적 검사를 수행하였는데 두 균주가 각각 95.8과 95.3%로 bioMérieux사의 API kit 동정 기준인 80% 이상의 기준을 만족하였다(Table 1). 따라

**Table 1.** Biochemical characteristics of strain DS660 and DS842 by using API kit

Characteristic	<i>Bacillus subtilis</i>	DS660	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	DS842
Gram stain	+	+	+	+
Morphologie	rod	rod	rod	rod
Optimum temperature (°C)	29	30	29	30
Control	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+
Erythritol	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+
L-Xylose	-	-	+	-
Adonitol	-	-	-	-
β-Methyl-xylopyranside	-	-	-	+
Galactose	-	-	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	+	-
Dulcitol	-	-	-	-
Inositol	+	+	-	-
Mannitol	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	-	-
α-Methyl-D-mannopyranside	-	-	-	+
α-Methyl-D-glucoside	+	+	+	+
N-Acethyl-glucosamine	-	-	-	-
Amygdaline	+	+	+	+
Arbutine	+	+	+	+
Esculine	+	+	+	+
Salicine	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Lactose	-	+	+	+
Melibiose	-	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+
Inuline	+	-	+	-
Melezitose	-	-	-	-

Table 1. Continued

Characteristic	<i>Bacillus subtilis</i>	DS660	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	DS842
D-Raffinose	+	+	+	+
Starch	+	+	+	+
Glycogen	+	+	+	+
Xylitol	-	-	-	-
β-Gentiobiose	+	+	+	+
D-Turanose	+	-	+	+
D-Lyxose	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-
Gluconate	-	-	-	+
2-Keto-gluconate	-	-	-	-
5-Keto-cluconate	-	-	-	-
2-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	+	+	+	+
L-Arginine	-	-	-	-
L-Lysine	-	-	-	-
L-Omithine	-	+	-	-
Trisodium citrate	-	+	-	-
Sodium thioisulfate	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-
L-Tryptophane (TDA)	-	-	-	-
Indole (IND)	-	-	-	-
Sodium pyruvate	+	-	+	-
Gelatin (Bovine origin)	+	+	+	+
D-Glucose	-	-	-	-

서 두 균주를 *Bacillus subtilis* DS660과 *Paenibacillus polymyxa* DS842로 명명하였다. 이 균주들의 염기서열은 GenBank에서 각각 MG745873과 MF403069의 등록번호를 받았으며, 균주는 Korean Collection for Type Cultures에서 각각 KCTC18521P와 KCTC18528P의 기탁번호를 받았다.

### 균주의 항균활성

생활에 영향을 미치는 중요한 미생물을 대상으로 *B. subtilis* DS660과 *P. polymyxa* DS842 배양 상등액의 항균활성을 조사하였을 때, 두 균주 모두 피부상재균인 *Candidia albicans* ATCC10231, *Bacillus subtilis* ATCC19659, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC2513, *Escherichia coli* ATCC8739와 *Aspergillus niger* ATCC16404의 성장을 억제하였고, 추가적으로 DS842 균주는 병원성 세균

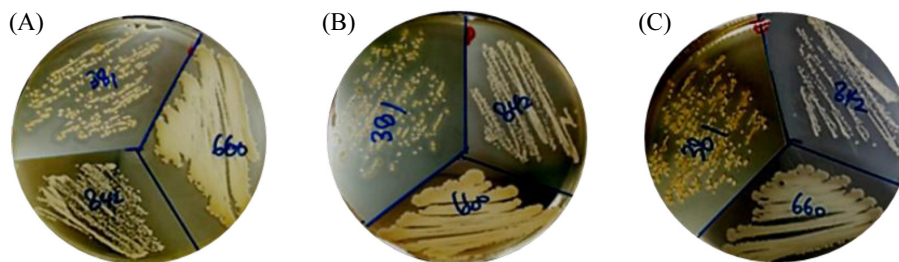
인 *Klebsiella pneumoniae* 세 균주(GNUH-NCCP 29, 4149와 4159), *Listeria monocytogenes* GNUH-NCCP2148와 *Micrococcus luteus* GNUH-NCCP2837과 2922 두 균주의 성장을 억제하였다(Table 2). 그 중에서도 특히 두 균주의 배양 상등액은 *Staphylococcus aureus* ATCC6538을 26 mm 이상의 억제 직경으로 저해하였는데 이는 *Bacillus subtilis* KIBGE IB-17이 *Staphylococcus aureus* ATCC6538과 음용수에서 분리한 *Pseudomonas aeruginosa*와 *Escherichia coli* 균주에 대해 각각 0, 0과 18 mm의 억제 직경을 나타낸 결과(Ansari *et al.*, 2012)와 비교할 때 대상 균주가 다르기는 하지만 항균활성이 유사하거나 더 뛰어났다. DS842 균주의 경우 *Bacillus licheniformis* M104 균주가 생산하는 계면활성 물질이 *Listeria monocytogenes* ATCC19115와 *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031에 활성을 나타내지 못한 결과(Gomaa, 2013)나 *Bacillus amyloliquefaciens*

**Table 2.** Inhibition of target organism by culture supernatant of *B. subtilis* DS660 and *P. polymyxa* DS842 as determined by the agar well diffusion test

Target organism	IZD* (mm)		Target Organism	IZD (mm)	
	DS660	DS842		DS660	DS842
<i>C. albicans</i> ATCC10231	17.0 ± 2.6	20.0 ± 0.0	<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP2148	ND**	11.3 ± 0.5
<i>B. subtilis</i> ATCC19659	15.3 ± 2.5	18.6 ± 0.5	<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP2637	ND	ND
<i>S. aureus</i> ATCC6538	26.8 ± 2.5	27.5 ± 1.2	<i>L. monocytogenes</i> GNUH-NCCP2868	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i> KCTC2513	25.3 ± 1.1	12.6 ± 1.5	<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP2837	ND	20.0 ± 0.0
<i>E. coli</i> ATCC8739	17.6 ± 0.5	21.0 ± 0.0	<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP2922	ND	25.2 ± 0.0
<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP29	ND	14.0 ± 0.0	<i>M. luteus</i> GNUH-NCCP3683	ND	ND
<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP4149	ND	11.6 ± 1.1	<i>A. niger</i> ATCC16404	23.3 ± 1.5	27.3 ± 3.0
<i>K. pneumoniae</i> GNUH-NCCP4159	ND	11.3 ± 0.0			

\* IZD, inhibition zone diameter

\*\* ND, No inhibition zone

**Fig. 1.** Digesting of cell wall components of *B. subtilis* (A), *P. aeruginosa* (B), and *E. coli* (C) by *B. subtilis* DS660 and *P. polymyxa* DS842.

An6이 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853과 *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883에 억제 활성을 나타내지 못한 것 (Ayed *et al.*, 2015)과 비교하여 더 폭넓게 대상 미생물을 제어 하였다. 또한 두 균주의 항균활성은 *Paenibacillus polymyxa* SCE2가 *Escherichia coli* HB101과 *Micrococcus* sp.에 활성을 보이지 못한 결과보다 우수하며, *Staphylococcus aureus* RN450에 대해서는 유사한 활성을 나타내었다(Seldin *et al.*, 1999). 추가적으로 *Bacillus subtilis* MIR 15가 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*와 *Candida utilis*를 저해하지 못한 이전의 보고된 결과(Perez *et al.*, 1992)와 비교하여 DS660과 DS842 균주의 항균활성이 뛰어나다고 할 수 있다.

*B. subtilis* ATCC19659, *P. aeruginosa* KCTC2513과 *E. coli* ATCC8739의 배양액을 각각 원심분리하여 수집한 세포를 고압멸균 후 건조시킨 분말에 각 세균의 세포벽 성분이 다량 포함되어 있다고 판단되었으며 이것이 0.2% 첨가된 NA 배지에

DS660과 DS842 균주를 희석배양 시 집락 주변에 투명대가 형성되었으며(Fig. 1), 따라서 두 균주가 대상 세균의 세포벽 성분을 용해할 수 있을 것으로 추정된다. 이는 인체 피부에 서식하는 *Micrococcus luteus* ATCC4698을 열-사멸 처리하여 얻어진 성분을 이용한 동일한 방법의 연구(Lim *et al.*, 2001)와 유사한 결과이며 이 연구에서도 열 사멸 처리된 세포의 세포벽 성분의 분리 정제 과정은 거치지 않았다.

### 항균물질

**계면활성물질:** 생물계면활성제는 미생물에 의해 생산되어 세포 밖으로 분비되는 물질로 다른 미생물 세포막에 흡착되어 증식을 억제하고 나아가 세포막을 교란시켜서 미생물을 사멸시킬 수 있다. 이러한 계면활성제의 활성 척도인 표면장력 감소와 미생물 생육억제 간에 유의한 관계가 존재한다(Kang *et al.*, 2017). 기름 확산 검사를 통해서 *B. subtilis* DS660과 *P.*



*polymyxa* DS842 배양 상등액의 계면활성 성질을 조사하였는데 원유에 두 균주의 배양 상등액 첨가 시 원유가 퍼져 투명대가 형성되어 두 균주가 계면활성물질을 생산하는 것을 알 수 있었다. 직경이 각각  $5.1 \pm 1.6$ 와  $6.6 \pm 0.3$  cm로 넓게 투명대를 형성하였으며, 이는 다양한 *Bacillus* sp. 균주(Youssef *et al.*, 2004)와 *Alcanivorax dieselolei* B-5 (Qiao and Shao, 2013)의 배양액이 최대 3 cm 범위로 원유를 퍼트리는 결과보다 약 2배 우수한 효과였다.

DS660과 DS842의 계면활성을 조사하기 위해 배양 상등액의 표면장력을 측정하였는데 초기 LB 배지 표면장력 60 mN/m이 배양 24시간 후 35 mN/m 이하로 급격히 감소하였다. 이후 두 균주의 배양 상등액은 168시간까지 표면장력이 서서히 감소하여 각각 최대  $32.3 \pm 0.8$ 과  $30.3 \pm 0.8$  mN/m를 나타내었다. 이는 *Lactobacillus casei* MRTL3이 유산균 배지의 표면장력 53.1 mN/m를 배양 24시간 후 40.7 mN/m로 감소시킨 결과(Sharma and Saharan, 2014)보다 빠르고 크게 표면장력을 낮추며, 다양한 *Bacillus* sp. 균주의 계면활성물질 50~2,000 mg/L 첨가 시 35 mN/m로 표면장력이 감소한 결과(Youssef *et al.*,

2004)보다 우수한 계면활성을 나타내었다. 따라서 DS660과 DS842 두 균주의 계면활성이 항균활성에 크게 기여할 것으로 추정된다.

*B. subtilis* DS660과 *P. polymyxa* DS842가 생산하는 계면활성물질의 성질을 조사하고자 배양 상등액을 에틸 아세테이트로 추출하여 TLC를 수행하고 bromothymol blue로 염색하였다. Bromothymol blue는 anisaldehyde+ammonium molybdate/cerium sulfate와 유사하게 glycolipid 성분과 반응하여 색을 변화시키는데 DS660과 DS842 균주 배양 추출물의 분획물에서도 양성반응을 나타낸 구간이 관찰되었다(Fig. 2). 이는 계면활성을 보인 물질을 TLC로 분획하여 각각 당과 지방산을 염색시키는 염색약을 처리하였을 때 양성반응이 나타난 Amani 등의 결과(Amani *et al.*, 2013)와 일치하여 두 균주에 의해 생산된 계면활성물질은 glycolipid 구조를 가진 물질로 추정할 수 있다. 추가적으로 양성반응을 나타낸 분획물을 굵어 증류수에 용해시킨 후 기름 확산 검사를 수행한 결과, 두 균주 배양 상등액의 계면활성과 유사하게 원유를 퍼트리는 효과를 나타내었다(결과 미제시).

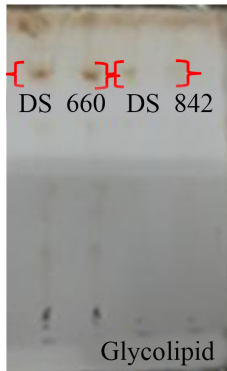


Fig. 2. Glycolipid biosurfactant from *B. subtilis* DS660 and *P. polymyxa* DS842 detected by thin-layer chromatography. TLC plate was sprayed with bromothymol blue.

**Siderophore (catechol type) :** Siderophore는 철과 강력하게 결합할 수 있는 물질로서 미생물이 분비하면 주변 환경의 가용한 철과 결합하기 때문에 인접한 미생물들이 필수 미량원소인 철을 이용하지 못하여 생장이 억제될 수 있다. CAS 배지를 이용한 siderophore의 정성분석에서 DS660과 DS842 균주가 siderophore를 생산한다고 판단되었다. 이를 토대로 dihydroxy benzoic acid로 표준곡선을 작성하여 정량한 결과 DS660과 DS842 균주는 배양 2일차에 각각  $57 \pm 8$ 과  $170 \pm 15$   $\mu\text{mol/ml}$ 의 최대 생산량을 나타내었으며 성장곡선과 일치하는 양상을 보였다(Fig. 3). 이는 *Pseudomonas fluorescens*가 생산하는 siderophore 최대 생산량인 13  $\mu\text{mol/ml}$  보다 훨씬 높았다(Nagarajkumar *et al.*, 2004). 또한 엽권 분리 SBUA 균주가

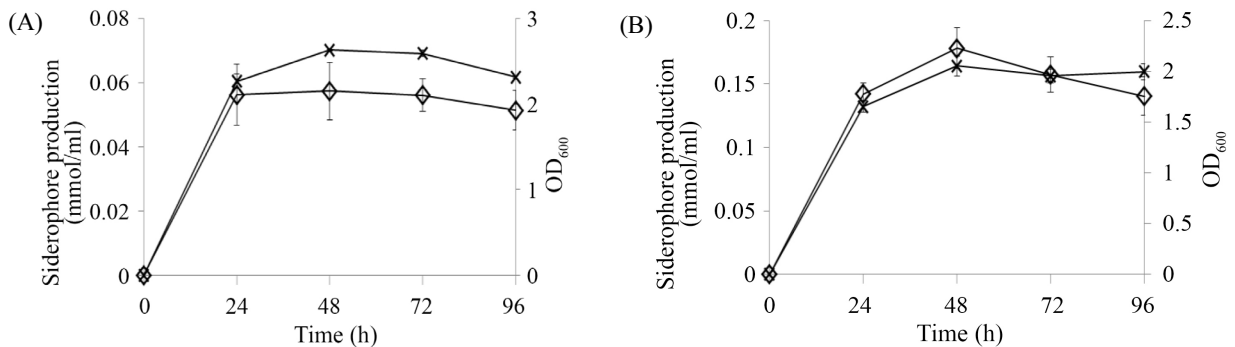


Fig. 3. Siderophore production by *B. subtilis* DS660 (A) and *P. polymyxa* DS842 (B). (x) optical density at 600 nm, (◇) siderophore production (mmol/ml).

0.57 ± 0.001 μmol/ml의 최대 siderophore 생산량을 나타낸 결과(Banik *et al.*, 2016)와 비교하여 DS842의 경우 약 300배 이상의 생산량을 나타내어 주변 미생물이 철을 이용하지 못하게 하여 생장을 저해할 수 있는 우수한 능력을 지녔다고 할 수 있다.

**β-1,3-Glucanase :** β-1,3-Glucanase는 효모의 세포벽 성분 중 하나인 laminarin과 같은 물질을 분해하며 이를 생산하는 미생물은 진균의 생장을 억제할 수 있다(Fridlender *et al.*, 1993). 효모 세포벽 성분을 포함하고 있는 Peptone-bouillon-yeast 배지에서 배양 3일 이후 DS660과 DS842 균주 집락 주변에 투명대 형성이 관찰되었다. Kang 등(1977)의 연구에서 효모 세포벽 분해 균주 분리 및 2차 선별 모두 위와 동일한 배지가 사용되었고, DS660과 DS842 균주 또한 이 연구의 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 진균의 세포벽 분해는 β-1,3-glucanase를 주축으로 하여 β-1,6-glucanase, mannase, protease 및 phosphomannase 등의 보조 역할로 일어나는데 본 연구에서는 이 중 β-1,3-glucanase에 대한 추가 조사를 수행하였다. 정량 실험에 이용된 laminarin은 β-Glu[1→3] 결합을 주축으로 하여 일부 β-Glu[1→6] 결합이 존재하는 다당류이며 laminarin을 분해하는 laminarinase는 β-1,3-glucanase라고 부르며(Salyers *et al.*, 1977), 이를 생산하는 미생물은 진균의 생장을 제어할 수 있다. Laminarin 첨가 후 dinitrosalicylic acid 방법을 이용하여 β-1,3-glucanase를 정량한 결과 DS660과 DS842 두 균주는 LB 배지에서 배양 1일 차에 각각 169.2 ± 9.9와 357.2 ± 13.7 nmol/min/mg protein의 효소를 생산하였다(Fig. 4). 특히 DS842의 경우 *Pseudomonas fluorescens*가 생산하는 β-1,3-glucanase의 최대치인 200 nmol/min/mg protein (Nagarajkumar *et al.*, 2004) 보다 1.7배 높았으며, 또한 *P. fluorescens* 14개 균주에서 60~200 nmol/min/mg protein 사이의 β-1,3-glucanase 생산과 비교하여 DS660과 DS842의 β-1,3-glucanase 생산이 우수하였다. 이렇게 높은 β-1,3-glucanase의 생산으로 Table 2에 제시된 것처럼 *A. niger*에 높은 항진균 효과가 나타났을 것으로 추측할 수

있고, 결과를 제시하지 않았지만 두 균주는 *A. niger*의 포자 발아도 상당히 우수하게 저해하였다. 진균 세포벽 분해 효소와 진균 생장 저해에 대한 이전 연구(Leelasuphakul *et al.*, 2006)에서 벼시들음병과 마름병을 유발하는 *Pyricularia grisea*과 *Rhizoctonia solani*에 대한 *Bacillus subtilis* NSRS 89-24의 항진균 활성을 보고하였는데 이 균주는 β-1,3-glucanase를 생산하였으며, 항진균 활성에 이 효소가 크게 기여하였다. 따라서 DS660과 DS842 균주의 높은 항진균 활성에도 이 효소가 큰 영향을 미치는 것으로 추정된다.

## 적 요

이 연구에서는 여러 미생물에 항균활성을 갖는 토양세균을 분리하고 그들이 생성하는 항균물질과 그 효과를 조사하였다. 많은 세균 분리균주 중 *Bacillus subtilis* DS660과 *Paenibacillus polymyxa* DS842은 6가지 인간 피부 상재균과 3종의 병원성 세균에 대하여 높은 항균활성을 나타내었다. DS660과 DS842 균주는 대부분의 대상 세균과 진균에 대하여 NA 배지 상에서 각각 직경 15.3~26.8과 11.3~27.5 mm의 생장 저해대를 형성하는 우수한 항균활성을 나타내었다. DS660과 DS842 균주는 siderophore를 생산하였는데 각각 570 ± 8과 1700 ± 15 μmol/ml의 최대 생산량을 나타내었고, 균주 배양 상등액의 에틸 아세테이트 추출물의 분석은 그들의 glycolipid 계면활성물질 생성을 나타내며 이에 의해 배양 상등액의 표면장력을 60 mN/m에서 각각 40.3과 30.3 mN/m으로 현저하게 낮추는 계면활성을 보였다. 또한 두 균주는 169.2 ± 9.9와 357.2 ± 13.7 nmol/min/mg protein의 β-1,3-glucanase 생산을 나타낼 뿐만 아니라 세균의 세포벽 성분을 용해하는 능력을 지녔다. 이러한 결과들은 *B. subtilis* DS660과 *P. polymyxa* DS842가 일부 중요한 인간 피부 상재균과 병원성 세균에 대한 효율적인 생물제어제로 사용될 수 있음을 암시한다.

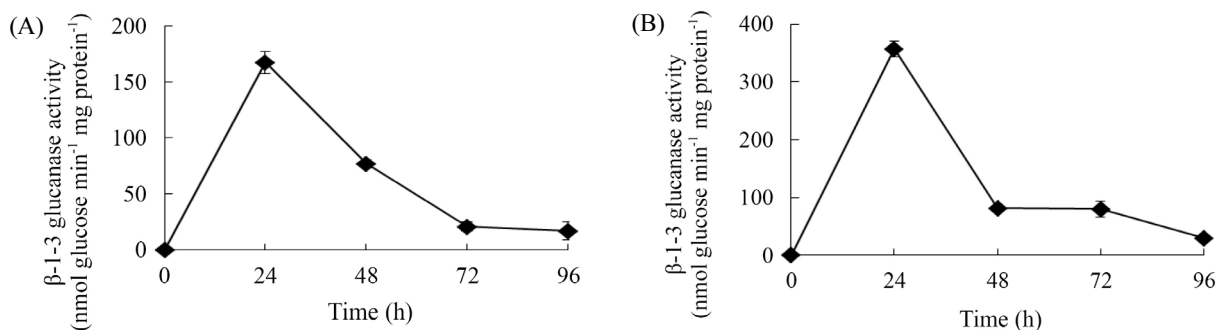


Fig. 4. Change of β-1,3-glucanase activity of *B. subtilis* DS660 (A) and *P. polymyxa* DS842 (B) during incubation in LB medium.

## 감사의 말

본 연구는 2016년도 중소기업 기술혁신개발사업의 지원으로 수행되었습니다(과제번호 C1012548-01-02). 피부상재균과 병원성 세균 균주를 제공해주신(주)레디안과 경상대학교 병원체 자원은행에 감사드립니다.

## References

- Amani H, Müller MM, Syldatk C, and Hausmann R.** 2013. Production of microbial rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 for *ex situ* enhanced oil recovery. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **170**, 1080-1093.
- 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. Pharm. 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. Glob. Antimicrob. Resist.* **3**, 255-261.
- Banik A, Mukhopadhyaya K, and Dangar TK.** 2016. Characterization of N<sub>2</sub>-fixing plant growth promoting endophytic and epiphytic bacterial community of Indian cultivated and wild rice (*Oryza* spp.) genotypes. *Planta* **243**, 799-812.
- Behravan J, Bazzaz BSF, and Malaekheh P.** 2005. Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran. *Int. J. Dermatol.* **44**, 482-485.
- Fridlender M, Inbar J, and Chet I.** 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by a  $\beta$ -1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* **25**, 1211-1221.
- Gomaa EZ.** 2013. Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **56**, 259-268.
- 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 Cont.* **23**, 338-344.
- Kang SY, Lee SR, and Lee CY.** 1977. Microbial production of yeast cell wall lytic enzyme. *Korean J. Food Sci. Technol.* **9**, 97-105.
- 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.
- 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.
- Leelasuphakul W, Sivanunsakul P, and Phongpaichit S.** 2006. Purification, characterization and synergistic activity of  $\beta$ -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Microb. Technol.* **38**, 990-997.
- Lim JH, Min BK, and Cho YK.** 2001. Characterization of the bacterial cell wall lytic enzyme produces by *Aspergillus* sp. HCLF-4. *Korean J. Microbiol.* **37**, 15-20.
- Lundov MD and Zachariae C.** 2008. Recalls of microbiologically contaminated cosmetics in EU from 2005 to May 2008. *J. Cosmet. Sci.* **30**, 471-474.
- 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.
- Perez C, Suarez C, and Castro GR.** 1992. Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15. *J. Biotechnol.* **26**, 331-336.
- 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.
- Salyers, AA, Palmer, JK, and Wilkins, TD.** 1977. Laminarinase (beta-glucanase) activity in Bacteroides from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 1118-1124.
- Seldin L, Silva de Azevedo F, Alviano DD, de Alviano CS, and de Freire Bastos MC.** 1999. Inhibitory activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE2 against human pathogenic micro-organism. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**, 423-427.
- Sharma D and Saharan BS.** 2014. Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. *Int. J. Microbiol.* **2014**, 698713.
- Stein T.** 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* **4**, 845-857.
- von der Weid I, Alviano DS, Santos ALS, Soares RMA, Alviano CS, and Seldin L.** 2003. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 1143-1151.
- White IR and Groot AC.** 2006. Cosmetics and skin care products. In Frosch PJ, Menn T, and Lepoittevin JP. (eds.), Contact Dermatitis, 4<sup>th</sup> ed. Springer, Berlin, Germany.
- Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, and McInerney MJ.** 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **56**, 339-347.