

토양에서 분리한 *Paenibacillus polymyxa* DY1의 항균활성물질 생산을 위한 배양조건 최적화

신 은 석 · 권 순 일¹ · 유 관 희^{2,*}

울산대학교 의과대학 내과학교실, ¹대구보건대학 임상병리과,
²상지대학교 생명과학과

Optimization of Culture Conditions for the Production of Antibacterial Activities by *Paenibacillus polymyxa* DY1 Isolated from Soil

Eun-Seok Shin, Sun-Il Kwon¹ and Kwan-Hee Yoo^{2,*}

Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Ulsan,

¹Department of Clinical Pathology, Daegu Health College,

²Department of Biology, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract – In a previous study, a new antibacterial activity was found from *Paenibacillus polymyxa* DY1 isolated from Korean soil, which showed a good growth inhibition against various multidrug resistant enteric bacteria. Thus the effect of nutritional factors and physicochemical conditions on the growth of *P. polymyxa* DY1 cells and the production of antibacterial activity were evaluated in this study. For the growth of *P. polymyxa* DY1 cells the optimum condition reaches by incubating at 35°C for 48 hours by shaking at 180 rpm in the basal medium containing 0.6% dextrose, 1.4% ammonium phosphate dibasic, 0.9% peptone, 2.4% glutamine, and 2 mM sodium molybdate with initial pH 8.0. A maximum level of antibacterial activity was obtained when *P. polymyxa* DY1 was incubated at 35°C for 48 hours by shaking at 180 rpm in the basal medium with initial pH 8.0 containing 1% dextrose, 1.5% ammonium sulfate, 1.1% casamino acid, 1.9% aspartic acid, and 2 mM ferrous sulfate.

Key words : *Paenibacillus polymyxa* DY1, antibacterial, growth, culture

서 론

국내외적으로 각종 항생제에 대한 다제내성균이 증가하여 세균감염증 치료가 어려워지고 있다. 기존 항생제에 대한 내성의 증가로 인해 새로운 항생제의 개발이

절실히 지고 있으며, 새로운 항균물질이나 leader structure를 발굴하고자 하는 다양한 노력이 이루어지고 있다 (Kunin 1993; Lim *et al.* 2000; Kim *et al.* 2006).

Paenibacillus 속의 균들은 다양한 종류의 항균물질을 생산하고 있으며 이 속에서 새로운 항균물질들이 지속적으로 보고되고 있다. *Paenibacillus elgii*에서 광범위한 항미생물 효과가 발견되었고 (Kim *et al.* 2004), *Paenibacillus circulans*와 *Paenibacillus polymyxa*에서 *Campylo-*

* Corresponding author: Kwan-Hee Yoo, Tel.033-730-0433,
Fax. 033-730-0430, E-mail. khyoo@mail.sangji.ac.kr

*bacter jejuni*를 억제하는 bacteriocin이 보고되었으며 (Sve-toch *et al.* 2005), *Paenibacillus* sp. strain B2에서 항균 peptide가 보고되었고 (Selim *et al.* 2005), *Paenibacillus polymyxa*에서 새로운 lantibiotic과 polymixin을 생산하는 균주가 보고되었다 (He *et al.* 2007).

선행연구에서 새로운 항균물질을 생산하는 *Paenibacillus* 속의 균을 한국의 토양에서 분리하였다. 이 균은 *Paenibacillus polymyxa*로 동정되었고 *Paenibacillus polymyxa* DY1으로 명명되었다 (Shin *et al.* 2007a). *P. polymyxa* DY1은 다제내성을 가지는 다양한 장내세균에 대하여 항균력을 나타내어 장내세균 치료제로서의 잠재력을 보여주었다. 항균활성 양상과 분리제한 항균활성물질의 구조를 분석한 결과 hydroxyl기를 가지고 있는 alkane으로 나타났으며, 지금까지 보고된 항생물질과 다른 새로운 물질로 추측되었다 (Shin *et al.* 2007b). 본 연구에서는 *P. polymyxa* DY1의 성장과 항균물질의 생산을 위한 배지의 영양조성과 적정 농도를 평가하였다. 균체 성장과 항균물질 생산의 관계, 최적배양 온도, 초발 pH 등을 조사하여 최적 배양조건을 탐색하였고, *P. polymyxa* DY1의 새로운 항균물질생산을 위한 배양학적인 기초정보를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지

P. polymyxa DY1 균주의 항균활성을 알아보기 위하여 성장억제 시험 표준균주로 *Escherichia coli* ATCC 25922를 사용하였다. 보존배지로 Nutrient Agar (NA) 배지를, 증균배지로 Nutrient Broth (NB)와 Brain Heart Infusion (BHI), 성장곡선 및 항균활성생산 시험용으로 Trypticase

Soy Broth (TSB)를 사용하였다. 균주배양과 항균물질 생산을 위한 최적 배지 조성 탐색을 위하여 Basal Medium (BM, 기초배지)을 기본적인 조성으로 사용하였다. BM은 1 L당 (NH₄)₂SO₄ 2.0 g, NaCl 5.0 g, KH₂PO₄ 1.35 g, MgSO₄ 1.0 g, CaCl₂ 0.05 g, FeCl₃ 0.00125 g을 함유하였다.

2. 균체 성장곡선

P. polymyxa DY1 균주를 두개의 TSB 100 mL (250 mL 삼각플라스크)에 접종한 후, 35°C에서 48 hrs 동안 각각 진탕배양과 정지배양을 하였다. 배양중 6시간 마다 배양액의 일부를 취하여 600 nm에서 Optical density (OD, 흡광도)를 측정하였다. OD 600 nm의 값이 1.0일 때부터 배양액을 희석하여 TSA 배지에 도말하고 37°C에서 18시간 배양한 후, 다음날 집락의 수를 세었다.

3. 항균활성물질 생산 곡선

두개의 TSB 100 mL (250 mL 삼각플라스크)에 각각 *P. polymyxa* DY1 균주를 접종하고 35°C에서 48시간동안 각각 정지배양과 진탕배양을 하였다. 접종 후 6시간 간격으로 5 mL의 배양액을 취하여 원심분리한 후 상층액을 취하였다. 항균제 감수성 시험에 사용하는 *Escherichia coli* ATCC 25922를 BHI 배지에서 18시간 배양 후, 멸균된 면봉을 이용하여 NA 평판배지의 표면에 골고루 도말한 다음 그 표면을 건조시켰다. 원심분리 상층액을 50 µL를 NA 표면에 떨어뜨린 후 18~24시간 반응시킨 후 생성된 억제대 (투명대)의 직경을 측정하였다.

4. 최적생장을 위한 영양원의 선별 및 최적농도 확인

Table 2에 나타난 각 주요 영양원이 *P. polymyxa* DY1의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 각각의 기초배지

Table 1. Nutritional sources tested in this study

Nutrients	Substances	
Carbon sources	Monosaccharides	Fructose, Xylose, Mannose, Galactose and Dextrose
	Disaccharides	Maltose, Saccharose, Lactose and Cellobiose
	Polysaccharides	Raffinose, Soluble starch, Dextrine and Na-carboxymethylcellulose
	Sugar alcohols	Ethanol, Inositol, Glycerol, Adonitol and Salicine
Nitrogen sources	Inorganic nitrogens	Ammonium chloride, Ammonium oxalate, Ammonium phosphate monobasic, Ammonium phosphate dibasic, Ammonium nitrate, Ammonium sulfate and Sodium nitrate
	Organic nitrogens	Peptone, Tryptone, Soytone, Yeast extract, Malt extract, Urea and Casamino acid
	Amino acids	L-asparagine, L-glutamic acid, Arginine, Methionine, Valine, Histidine, Proline, Aspartic acid, Cysteine, Leucine, Glutamine and Threonine
Minerals	Potassium chloride, Barium chloride, Calcium chloride, Cobalt chloride, Lithium sulfate, Manganese sulfate, Magnesium sulfate, Zinc sulfate, Ferric sulfate, Silver nitrate, Sodium molybdate, Potassium phosphate and Ferrous chloride	

50 mL (250 mL 삼각플라스크)에 조사하고자 하는 영양원을 1% 씩 첨가하고, pH를 8.0으로 맞춘 후, *P. polymyxa* DY1 균주를 접종하였다. 35°C에서 150 rpm으로 24시간 배양한 후, OD (600 nm) 값으로 생장을 측정하였다. 최적 영양원을 선별한 후, 이들의 최적농도를 조사하였다. 기초배지에 각 최적영양원을 0.1~2.0% (아미노산은 0.1~2.7%)로 첨가한 후, *P. polymyxa* DY1 균주를 접종한 후, 최적영양원을 조사하는 방법과 동일한 방법으로 최적농도를 조사하였다.

5. 항균활성물질을 생산을 위한 영양원의 선별 및 최적농도 확인

각 영양물질이 항균활성물질 생산에 영향을 미치는 영향을 조사하고자 pH 8.0으로 맞춘 기초배지 50 mL (250 mL 삼각플라스크)에 Table 1에 나타난 각 영양원을 1% 첨가한 후, *P. polymyxa* DY1을 접종하여 35°C에서 48시간동안 150 rpm으로 진탕배양하였다. 배양 후, 배양액을 항생제 감수성시험 표준균주인 *E. coli* ATCC 25922 균주가 도말되어 있는 NA 배지에 50 µL를 직접 떨어뜨리거나 (drop method), 혹은 50 µL를 6 mm disk에 떨어뜨려 건조시킨 후 배지위에 놓고 (disk method), 35°C에서 24시간 배양시킨 후 생육억제대인 투명환의 직경을 측정하였다. 투명환이 가장 크게 나온 성분을 최적영양원으로 선택하였으며, 선택된 성분의 농도를 0.1~2.0% (아미노산은 0.1~2.5%)로 조정된 배지에서 *P. polymyxa* DY1을 배양한 후, 최적영양원을 조사하는 방법과 동일하게 최적농도를 조사하였다.

6. 초발 pH 및 배양온도의 생장에 대한 영향

P. polymyxa DY1 균주의 생육에 적합한 pH를 조사하기 위하여 최적화 과정을 거쳐서 만들어진 Optimized Synthetic Medium (OSM) II (Table 2)의 pH를 0.1 N HCl 과 0.1 N NaOH로 조정하였다. 이 배지에 *P. polymyxa* DY1을 접종하여 35°C에서 24시간 배양하였다. 최적 생장온도를 조사하기 위하여 *P. polymyxa* DY1 균주를 pH 8.0의 OSM II 배지 (Table 2)에 접종한 후, 각기 다른 온도의 항온기에서 24시간 배양하였다.

결 과

1. 균체 생장곡선과 항균활성 생산곡선 (진탕배양 및 정치배양)

TSB 배지에서 배양한 *P. polymyxa* DY1의 생균수는,

Table 2. Cell growth and production of antibacterial activity of *P. polymyxa* DY1 in NB, BHI, Optimized Synthetic Medium (OSM) I and OSM II

Media	Items	Growth (OD 600 nm)	Inhibition zone diameter (mm)	
			Disk method	Drop method
NB		0.427	6	6
BHI		1.729	6	6
Optimized Synthetic Medium I*		0.950	18	22
Optimized Synthetic Medium II**		0.440	15	20

*Optimized Synthetic Medium I: The Basal Medium in Table 1 containing 1% dextrose, 1.5% (NH₄)₂SO₄, 1.1% casamino acid, 1.9% aspartic acid, and 2 mM FeSO₄.

**Optimized Synthetic Medium II: The basal medium in Table 1 containing 1% dextrose, 1.5% (NH₄)₂SO₄, 1.9% aspartic acid, and 2 mM FeSO₄.

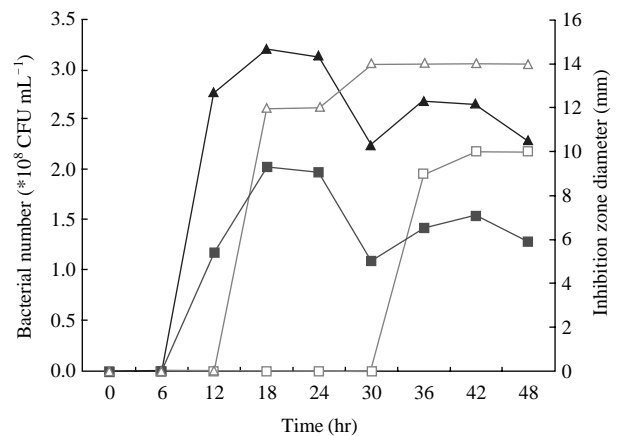


Fig. 1. Effect of aeration on the cell growth and production of antibacterial activity of *P. polymyxa* DY1 (▲ : colony forming units (CFU) of shaking culture, ■ : CFU of stationary culture, △ : Inhibition zone diameter of shaking culture, □ : Inhibition zone diameter of stationary culture).

진탕배양의 경우 접종 후 12시간까지 대수기적 성장을 보인 후 둔화되어 18시간에 정지기에 도달하였다. 24시간 후에 감소기가 되어 30시간에 일시적으로 떨어진 후 부분적으로 회복 되었다. 정치배양에서는 18시간까지 대수기를 보였고 이후 정지기가 나타났다. 진탕배양과 정치배양에서 모두 접종 후 18시간 후 정지기가 관찰되었다 (Fig. 1).

진탕배양에서 접종 후 18시간 후부터 12 mm 억제환의 항균활성이 나타났다. 30시간 후에 항균활성이 16 mm 수준으로 올라간 다음 지속되었다. 정치배양에서는 진탕배양보다 훨씬 늦은 36시간에 처음으로 10 mm 크기의 억제환이 나타났다. 항균활성은 성장곡선이 정지기에 도달한지 12시간 후에 나타난 다음 지속되었다. 이에 반하여 진탕배양에서는 정지기에 도달한 후 지연 없이 곧바

로 항균활성이 곧바로 나타났다 (Fig. 1).

2. 탄소원의 영향

기초배지에 Table 1의 18종류의 탄소원을 각각 가하여 만든 배지에 배양한 *P. polymyxa* DY1의 OD를 측정하였다. 단당류 중에서는 dextrose를 첨가한 배지에서 가장 생육이 좋았으며, 이당류 중에서는 fructose와 saccharose가 좋았다. 다당류 중에서는 soluble starch와 dextrin이 함유된 배지에서 생육이 좋았고, sugar alcohol에서는 glycerol 함유배지가 좋았다. 단당류중 galactose, 이당류중 lactose, 다당류중 raffinose, 당알콜중 Na-carboxymethylcellulose가 함유된 배지에서 *P. polymyxa* DY1의 생육이 가장 저조하였다. *P. polymyxa* DY1은 0.6%의 dextrose에서 생육이 가장 좋았으나, 0.7%를 초과하면 생육이 점차 감소하였다 (data not shown). *P. polymyxa* DY1은 dextrose를 1.0% 첨가한 배지에서 가장 높은 항균활성을 보였다 (Table 2). 그러나 1.1% 이상의 농도에서는 항균활성이 급격히 감소하였다.

3. 무기질소원의 영향

Dextrose 0.6%가 함유된 기초배지에 Table 1에 있는 7종의 무기질소원을 각각 1% 첨가한 후 *P. polymyxa* DY1을 배양한 결과, ammonium phosphate dibasic과 ammonium nitrate를 함유한 배지에서 생장이 가장 높았다 (data not shown). Dextrose 0.6%가 함유된 기초배지에 ammonium phosphate dibasic을 질소원으로 가하여 *P. polymyxa* DY1을 배양한 결과, 1.4% 농도에서 생육이 가장 좋았다 (Table 2).

Dextrose 1.0%를 함유한 기초배지에 7종류의 무기질소원을 각각 1% 첨가한 배지에서 *P. polymyxa* DY1의 항균활성을 측정한 결과 무기질소원으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 가장 좋은 것으로 나타났으며, 다른 무기질소원도 대체로 좋은 결과를 나타냈다 (data not shown). Dextrose 1.0%를 함유한 기초배지에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 가한 배지에서 *P. polymyxa* DY1은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5% 에서 가장 높은 항균력을 보였으며, 1.6% 이상에서는 감소하였다 (Table 2).

4. 유기질소원의 영향

1% dextrose와 1.4% ammonium phosphate dibasic를 함유한 기초배지에서 Table 1에 열거된 유기질소원 1%를 가한 배지에서 배양한 결과 peptone을 가한 배지에서 *P. polymyxa* DY1의 생육이 가장 높았으며 malt extract에서 가장 낮았다 (data not shown). *P. polymyxa* DY1은 0.9%

의 peptone을 함유한 배지에서 가장 잘 자랐다 (Table 2).

항균활성 생산에 대한 유기질소원의 영향을 보기 위하여, 1% dextrose와 1.5% ammonium sulfate를 함유한 기초배지에 peptone을 포함한 7종류의 유기질소원을 각각 1% 첨가한 배지에서 배양하였다. 무기질소원은 항균물질 생산에 좋은 영향을 미치는데 반하여, 유기질소원의 경우 오직 casamino acid 만 시험된 무기질소원에 필적하는 항균물질을 생산하였다 (data not shown). 항균활성을 생산을 위한 casamino acid의 최적농도는 1.1%이었다 (Table 2).

5. 아미노산의 영향

아미노산의 *P. polymyxa* DY1의 생육에 대한 영향을 보기 위하여 0.6% dextrose와 1.4% ammonium phosphate dibasic, 0.9% peptone을 함유한 기초배지에서 Table 1에 나타난 12종의 아미노산을 1%씩 가하였다. 글루타민 함유 배지에서 생육이 가장 왕성하였으며, 발린 함유 배지에서 가장 저조하였다 (data not shown). 생육에 대한 글루타민의 최적 농도는 2.4%로 나타났다 (Table 2).

항균활성 생산에 대한 영향을 조사하기 위하여 1% dextrose, 1.5% ammonium sulfate, 1.1% casamino acid가 포함된 기초배지에 Table 1의 12가지 아미노산을 각각 1% 첨가하여 배양한 결과 aspartic acid를 첨가한 배지에서 가장 높은 항균활성이 나타났다 (data not shown). 항균활성물질 생산에 대한 aspartic acid의 최적농도는 1.9%로 나타났다 (Table 2).

6. 무기염류의 영향

무기염류가 균의 생장에 미치는 영향을 보기 위하여 0.6% dextrose, 1.4% ammonium phosphate dibasic, 0.9% peptone, 2.4% glutamine이 포함된 기초배지에 Table 1의 13종류의 무기염류를 각각 1 mM 첨가하여 만든 배지에서 배양한 결과 sodium molybdate에서 생육이 가장 좋았다. Calcium chloride와 magnesium sulfate에서도 유사한 결과를 얻었다 (data not shown). *P. polymyxa* DY1의 생육을 위한 sodium molybdate의 최적 농도는 2 mM이었다 (Table 2).

1% dextrose, 1.5% ammonium sulfate, 1.1% casamino acid, 1.9% aspartic acid가 포함된 기초배지에 Table 1에 있는 13종류의 무기염류를 각각 1 mM 첨가한 결과, ferric sulfate를 첨가한 배지에서 항균물질의 생산이 가장 높았으며, 그 다음으로 magnesium sulfate인 것으로 나타났다 (data not shown). 항균활성 생산을 위한 ferric sulfate의 최적농도는 2 mM이었다 (Table 2).

Table 3. Summary of optimized nutritional ingredients for growth and production of antibacterial activity of *P. polymyxa* DY1, which are to be added to the basal medium in Table 1

Nutritional source	Ingredients for cell growth	Ingredients for production of antibacterial activity
Carbon	Dextrose (0.6%)	Dextrose (1.0%)
Inorganic nitrogen	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (1.4%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1.5%)
Organic nitrogen	Peptone (0.9%)	Casamino acid (1.1%)
Amino acid	Glutamine (2.4%)	Aspartic acid (1.9%)
Mineral salt	Na ₂ MoO ₄ (2 mM)	FeSO ₄ (2 mM)

(Unit): percent (wv⁻¹) or mM in the basal medium in Table 1

7. 최적화 배지와 일반배지에서 항균물질 생산 차이

P. polymyxa DY1을 NB, BHI 그리고 위의 각 영양소에 대한 최적화 작업을 통해서 만들어진 Optimized Synthetic Medium (OSM) I과 II에서 배양하였다 (Table 3). *P. polymyxa* DY1 균주는 BHI 배지에서 가장 잘 자랐으며, casamino acid가 첨가된 OSM I, casamino acid가 없는 OSM II, NB 배지 순으로 성장하였다 (Table 3). 생장억제환의 직경으로 본 *P. polymyxa* DY1의 항균활성의 생산은 OSM I과 OSM II에서 높았다. BHI 배지에서 균의 생장은 뛰어났으나, 항균물질의 생산은 매우 저조하였다. OSM I 배지는 균체의 성장과 항균물질의 생산에 모두 우수한 효과를 나타내었다 (Table 3).

8. 초발 pH 및 배양온도의 성장에 대한 영향

P. polymyxa DY1은 OSM II 배지에서 초발 pH 8.0의 조건에서 가장 높은 성장을 나타냈다. pH 9 이상의 알칼리 환경에서는 생육이 급격히 떨어졌으며 적정 초발 pH는 7~8이었다 (Fig. 2). *P. polymyxa* DY1 균주는 pH 8.0의 OSM II 배지에서 35°C에서 생장이 가장 왕성하였다. 생육을 위한 배양 적정온도는 25°C에서 35°C인 것으로 나타났다 (Fig. 3).

고찰

정치배양과 진탕배양간의 비교에서 *P. polymyxa* DY1 균은 진탕배양에서 균체의 생장이 더욱 높으며, 항균물질 생산도 빨랐다. 항균활성은 진탕배양에서 접종 후 30시간에, 그리고 정치배양에서 48시간에 정점을 나타내었다 (Fig. 1). 배양경과에 따른 항균물질의 생산을 보았을 때, *Bacillus megaterium* KL-39는 40시간 배양 시 (Geong and Kim 2003), cathepsin B를 생산하는 *Streptomyces leteogriseus* KT-10는 96시간 배양 시 (Han and Kim

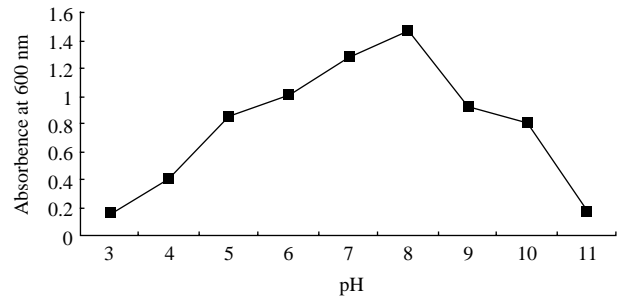


Fig. 2. Effect of initial pH of medium on the growth of *P. polymyxa* DY1.

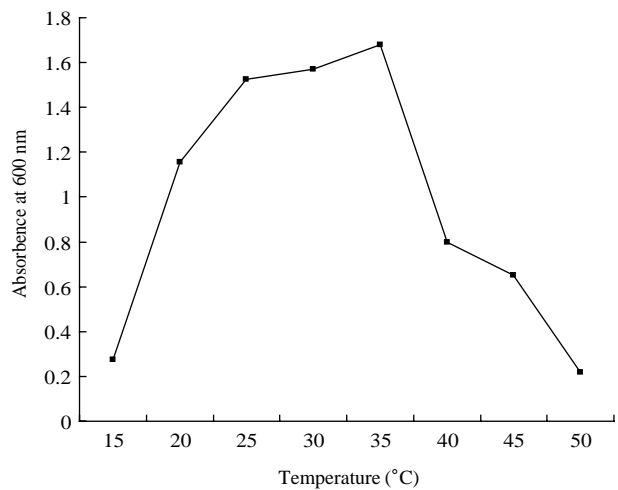


Fig. 3. Effect of incubation temperature on the growth of *P. polymyxa* DY1.

1999), *Clostridium* sp. KH-431 균주는 108시간 배양 시 (Hong *et al.* 1993), 최대의 생산량을 나타내었다. 이 균주들에 비하여 *P. polymyxa* DY1은 비교적 빠른 시간에 항균물질을 생산하였다.

Dextrose는 *P. polymyxa* DY1 균주가 항균활성물질을 생산하는데 가장 좋은 탄소원이었으나, 배지내의 농도가 1.1%를 넘을 때 항균활성물질의 생산이 급격히 점점 감소되는 점으로 미루어 보아 (data not shown), catabolite repression을 일으키는 것으로 보인다. 탄소원의 항균활성 생산에 대한 영향에서, *Streptomyces* KT-10에서 생산되는 cathepsin B는 2% glucose를 첨가 시 생산이 양호하였으며 (Han and Kim 1999), *Clostridium* sp. 균주에서 생산되는 항생물질은 1% glucose 첨가 시 양호하였다 (Hong *et al.* 1990). 그러나 *Pseudomonas aeruginosa*에서 합성되는 PAFS는 3% fructose 첨가 시 (Park *et al.* 2000), *Clostridium* sp. KH-431 균주가 생산하는 항균물질은 sorbitol 첨가 시 생산이 양호하였다 (Hong *et al.* 1993). 서로 다른 항생물질을 생산하는 각각의 균주들은 최적탄

소원과 그 농도에서 차이를 보인다.

P. polymyxa DY1은 무기질소원이 유기질소원보다 항균물질의 생산에 더 나은 영향을 보였다(data not shown). 이는 *Bacillus* sp.가 생산하는 항생물질은 무기질소원보다는 유기질소원이 대체로 양호하다는 보고(Kim 1994; Shin 2000)와는 상이하였다. 다른 선행연구에서는 무기질소원(NH₄)₂SO₄ 첨가시(Park 2000), 그리고 NH₄Cl 첨가시 항생물질의 생산이 증가하였다(Hong *et al.* 1990). *P. polymyxa* DY1에서 유기질소원으로 casamino acid 첨가시 항균물질의 생산은 양호하였으나, 그 외 6종류의 유기질소원을 첨가했을 때는 항균물질의 생산이 매우 저조하였다(data not shown). Casamino acid만이 항균물질 생산에 도움이 된다는 결과는 *Clostridium* sp.가 항생물질 생산시 casamino acid 첨가시 양호하였다는 보고와는 일치하였지만(Hong *et al.* 1990), *B. megaterium*은 0.3% yeast extract 첨가시에(Geong and Kim 2003), *Streptomyces* KT-10는 0.3% peptone 첨가시 항생물질을 다량 생산한다는 보고와 상이하였다(Han and Kim 1999). 최적화된 합성배지인 OSM I과 OSM II는 casamino acid의 함유여부에서만 차이가 나는데 casamino acid를 함유하는 OSM I에서 균체의 성장과 항균물질의 생산이 더 높았다(Table 3).

아미노산의 *P. polymyxa* DY1의 항균물질 생산에 대한 영향에서 aspartic acid가 항균물질의 생산을 도왔는데(data not shown), 이는 asparagine 첨가시 항생물질 생산이 증가한다는 보고와 비교된다(Han and Kim 1999). *P. polymyxa* DY1에서 항균활성이 ferric sulfate나 magnesium sulfate를 첨가한 배지에서 높게 나타났는데, 이는 1 mM CaCl₂ 첨가 시 항균물질의 생산이 좋았으며, KCl, MgCl₂, NaCl, BaCl₂ 첨가 시 생산이 양호하였고, CaCl₂ 첨가 시 항균물질 생산이 좋았다는 보고와 비교된다(Hong *et al.* 1990; Hong *et al.* 1993; Han and Kim 1999; Geong and Kim 2003).

이 연구를 통하여 얻어진 최적배지 구성분과 그 농도를 Table 2에 종합하였다. 항균활성의 생산을 위해서는 기초배지에 1% dextrose, 1.5% ammonium sulfate, 1.1% casamino acid, 1.9% aspartic acid, 2 mM ferrous sulfate를 첨가한 배지를 pH 8.0으로 조정하고 35°C에서 30~48 시간동안 진탕배양하는 것이 가장 좋았다. 본 연구는 새로운 항균활성물질을 생산하는 것으로 보고된 *P. polymyxa* DY1(Shin *et al.* 2007a, b)의 항균활성 생산을 위한 최적배지조성과 최적성장 조건을 조사한 기초연구이다. 현재 임상에서 널리 쓰이는 항생제에 대한 내성균의 확산으로 인해 이에 대항할 수 있는 새로운 항생물질을 찾는 요구가 크다. *P. polymyxa* DY1이 생산하는 이 새로

운 항균물질이 이러한 요구에 부응하는 유용한 치료제로 개발이 되기 위해서 항균활성물질 구조의 정밀한 규명과 각종 내성균에 대한 광범위한 항균력 평가가 있따라야 한다. 본 연구는 *P. polymyxa* DY1의 항균물질 생산에 대한 배양학적인 기초 자료를 제공한다.

적 요

새로운 항균물질의 탐색이 활발하다. 선행연구에서 새로운 항균활성물질을 생산하는 세균이 한국토양에서 분리되어 *Paenibacillus polymyxa* DY1으로 동정 및 명명되었으며, 다제내성 장내세균들에 대한 항균활성 특성이 규명되어 새로운 항생물질로서 잠재력을 보여주었다. 본 연구에서 배지의 탄소원, 무기질소원, 유기질소원, 아미노산, 무기염류 등의 영양 조성물과 물리화학적 성장조건이 *P. polymyxa* DY1 균체의 성장과 항균활성 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 균체의 성장을 위하여 기초배지에 0.6% dextrose, 1.4% ammonium phosphate monobasic, 0.9% peptone, 2.4% glutamine, 2 mM sodium molybdate를 가한 후 pH를 8.0으로 조정하고 35°C에서 30~48시간동안 180 rpm으로 진탕배양하는 것이 가장 적합하였다. *P. polymyxa* DY1 항균활성의 생산은 기초배지에 1% dextrose, 1.5% ammonium sulfate, 1.1% casamino acid, 1.9% aspartic acid, 2 mM ferrous sulfate를 가한 배지를 pH 8.0으로 조정하고 35°C에서 30~48시간동안 180 rpm으로 진탕배양하는 조건에서 가장 높았다.

참 고 문 헌

- Gyeong JH and SD Kim. 2003. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of Red-Pepper Phytophthora blight disease. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 235-241.
- Han KH and SD Kim. 1999. Production of cathepsin B inhibitor by *Streptomyces luteogriseus* KT-10. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:458-465.
- He Z, D Kislal, L Zhang, C Yuan, KB Green-Church and AE Yousef. 2007. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. Appl. Environ. Microbiol. 73:168-78.
- Hong SH, JH Ryu, YB Park and JH Ha. 1990. The optimum culture conditions for the production of antibiotics KG-1167A & KG-1167B produced by *Clostridium* sp. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18:286-291.

- Hong SH, MJ Kim, YB Park, JK Lee and JH Ha. 1993. Identification of the antibiotic-producing *Clostridium* sp. KH-431 and purification of the antibiotics Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21:41-46.
- Kim HR. 1994. Antifungal antibiotic of antiagonistic bacterium *Bacillus* sp. YH-16 against *Fusarium solani* causing plant root rot. Department of Applied Microbiology, Graduate School, Youngnam University.
- Kim DS, CY Bae, JJ Jeon, SJ Chun, HW Oh, SG Hong, KS Baek, EY Moon and KS Bae. 2004. *Paenibacillus elgii* sp. nov., with broad antimicrobial activity. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:2031-2035.
- Kim KR, TM Yoon, HJ Kwon and JW Seo. 2006. Trends in development of new antibiotics and antifungal agents. Microorg. Indus. 32:16-20.
- Kunin CM. 1993. Resistance to antimicrobial drugs-a worldwide calamity. Ann. Intern. Med. 118:557-561.
- Lim TH, JM Lee, TH Chang and BJ Cha. 2000. Antifungal activity and identification of an *Actinomycetes* strain isolated from mummified peaches. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28:161-166.
- Park SO, SK Song, KS Yoon, YH Jeong, SJ Lee, YS Jeong and GT Chun. 2000. Enhanced production of antifungal substance (PAFS) biosynthesized by *Pseudomonas aeruginosa* and examination of its physiological characteristics in fermentation. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28:341-348.
- Selim S, J Negrel, C Govaerts, S Gianinazzi and D van Tui-
nen. 2005. Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by *Paenibacillus* sp. strain B2 isolated from the sorghum mycorrhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 71:6501-6507.
- Shin ES, HM Lee, BK Lee, SH Kim, SI Kwon and KH Yoo. 2007a. Identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* DY1 isolated from Korean soil with new antibacterial activity. Korean J. Microbiol. 43:47-53.
- Shin ES, SI Kwon and KH Yoo. 2007b. Growth inhibition profile of an antibacterial entity from *Paenibacillus* DY1 isolated from Korean soil against multidrug resistant enteric bacterial strains and its characterization. J. Exp. Biomed. Sci. 13:47-53
- Shin YJ. 2000. Isolation, characteristics and structural analysis of antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. Department of Microbiology, Graduate School, Donggeui University.
- Svetoch EA, NJ Stern, BV Eruslanov, YN Kovalev, LI Volodina, VV Perelygin, EV Mitsevich, IP Mitsevich, VD Pokhilenko, VN Borzenkov, VP Levchuk, OE Svetoch and TY Kudriavtseva. 2005. Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins. J. Food Prot. 68:11-17.

Manuscript Received: October 17, 2007

Revision Accepted: November 3, 2007

Responsible Editor: Seung Bum Kim