

Bacillus amyloliquefaciens IUB158-030이 생산하는 항진균물질의 분리와 항균활성

김혜영 · 이태수*

인천대학교 생물학과

Isolation of Antifungal Substances by *Bacillus amyloliquefaciens* IUB158-03 and Antagonistic Activity against Pathogenic Fungi

Hye Young Kim and Tae Soo Lee*

Department of Biology, University of Incheon, Incheon, 402-749, Korea

(Received April 30, 2009. Accepted June 29, 2009)

ABSTRACT: For the control of pathogenic microorganisms, *Bacillus* spp. were isolated from diseased pepper fruits in Korea. Among them, *Bacillus* sp. IUB158-03 showed high inhibitory effect on mycelial growth and spore germination of *C. gloeosporioides* and *Botrytis cinerea*. The strain was identified as *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 based on its physiological, biochemical characteristics and Microlog analysis. The highest level of antifungal substances by *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 were obtained when the bacterium was cultured in medium containing 2% soluble starch, 3% yeast extract, 0.5% tryptone, 0.5% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, and 1% NaCl (pH 6.0) at 25°C for 72 hrs. The antifungal substances were purified by butanol extraction, silica gel column chromatography, preparative thin layer chromatography, and high performance liquid chromatography. The purified antifungal substance was confirmed R_f 0.27 by TLC. This substance exhibited antifungal activity against *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternaria* of plant pathogenic fungi and *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Cryptococcus neoformans* of human pathogenic fungi.

KEYWORDS: Antifungal substances, *Bacillus amyloliquefaciens*, culture condition, pathogenic fungi

식물병의 방제는 작물의 수량과 품질을 향상시키고, 인구 증가에 따른 식량자원의 공급량을 증가시킨다는 면에서 중요성이 부각되고 있다. 지금까지 식물병원균의 피해를 방지하기 위해 각종 농약에 의한 화학적 방제법이 널리 이용되어 왔다(Cook *et al.*, 1985). 그러나 농약의 과다 사용으로 인한 난분해성 물질의 잔류에 의한 공기, 토양, 지하수의 오염으로 환경과 생태계 파괴, 인축독성 등 많은 문제점들이 야기되었다. 이러한 화학적 방제법으로 인한 부작용에 효과적으로 대처할 수 있는 방법으로 생태계에서의 미생물 간의 상호관계를 이용한 친환경적인 생물학적 방제법이 모색되었다(Burpee and Goulty, 1984; Yoshie *et al.*, 1993). 자연계에서는 미생물이 생장과정에서 다른 미생물 생장을 저해하거나 죽이는 2차 대사산물인 항생물질을 생산하며(Waksman and Heinrich, 1943), 10,000여종 항생물질의 분리원을 조사한 결과 이 중 방선균으로부터 분리된 것이 64%, 세균과 곰팡이로부터 분리된 것이 각각 13%, 23%인 것으로 나타났다(Berdy, 1989).

식물병원균에 대한 미생물의 항균 기작으로는 진균의 세포벽을 가수분해하는 효소인 chitinase의 생성(Lifshitz

et al., 1986)과 β -glucanase를 생산하여 식물병원균의 세포벽을 분해시키는 용균작용, siderophore를 분비하여 식물병원균의 생장을 저해하는 경쟁적 길항작용(Kloeper *et al.*, 1980)이 있으며 이 중에서 병원균의 생장을 직접적으로 억제하는 항생물질의 생산에 의한 길항작용이 생물학적 방제법으로 가장 널리 이용되고 있다(Huang and Chang, 1975; Mandeel and Baker, 1993).

식물병의 방제법에 이용되는 진균으로는 *Trichoderma* spp., *Gliocladium virens*, *Laetisaria arvalis*, *Coniothyrium miniformis*, *Pythium ultimum*, *Talaromyces flavus*, *Sporidesmium sclerotivorum* 등이 알려져 있으며(Adams, 1990), 길항세균으로는 *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Agrobacterium* spp., 방선균은 *Streptomyces* spp.가 가장 널리 이용되고 있다(Baker *et al.*, 1983; Becker, 1993).

최근에는 *Bacillus* spp.가 항균물질과 독성물질을 세포 밖으로 분비하여 병원성 진균에 길항작용을 나타내는 물질들을 생산한다는 연구가 보고되었다(Zuber *et al.*, 1993). 대표적인 균주로는 *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymixa* 등이 알려졌다. *B. subtilis*는 이미 외국에서 인축에 대한 안전성이 입증되어 생물학적 방제제로 널리 이용되고 있다(Backhouse and Stewart

*Corresponding author <E-mail: tslee@incheon.ac.kr>

1989; Baker *et al.*, 1983). 또한 부속 토양에서 분리한 *B. subtilis* NB22가 생산하는 iturin계 물질이 진균의 세포막 인지질에 작용하여 세포막의 물리적 특성을 변화시킴으로써 세포막의 기능을 파괴하여 살균작용을 나타내는 것으로 알려졌다(Maget-Dana *et al.*, 1985; Besson *et al.*, 1978). 현재 *B. subtilis*를 이용한 미생물 제제로는 Kodiak (Gustafson), Botkiller 등이 상품명으로 등록되어 사용되고 있다(Fravel *et al.*, 1998; Brannen and Kenney, 1997).

현재 전 세계적으로 길항미생물을 이용하여 개발된 미생물제제는 약 40 종류가 등록되어 있다. 하지만 아직 시장 점유율이 2% 미만으로 낮은 실정이며, 최근 우리나라에서도 미생물 농약은 농산물에 대한 잔류독성의 염려가 없고, 농업생태계를 교란하지 않는다는 장점이 알려지면서 미생물제제를 이용한 생물학적 방제법에 대한 관심이 높아지고 있다(Shen *et al.*, 2002). 그러나 우리나라는 식물병 방제에 이용하는 미생물제제의 대부분을 수입에 의존하고 있어서 외화 낭비가 심하고, 이들 미생물이 우리의 기후 풍토와 토양환경에 적응하는 능력이 결여되어 효과를 충분히 발휘하지 못하는 경우가 많다.

이에 본 연구에서는 우리나라의 환경에 적응하여 토착화와 우점화가 용이한 항진균성 *Bacillus* spp.를 선발하기 위하여 탄저병균에 감염된 고추열매에서 *Bacillus* spp.를 순수 분리한 후 식물병원균에 대한 항진균력이 우수한 *Bacillus* spp. 균주를 선발하고 동정하였다. 또한 선발된 균주의 항진균 물질의 생산을 위한 최적배지와 배양조건을 규명하고 생산된 항진균 물질을 분리·정제하여 식물과 인체에 병원성을 나타내는 진균을 대상으로 항진균 효과를 검정하였다.

재료 및 방법

시료의 채집

시료는 경기도, 인천시, 충청남·북도, 전라남·북도, 경상북도 및 제주도 등 전국 60개 지역의 고추 재배지에서 탄저병균에 감염된 고추열매를 채집한 후 실험실로 옮겨 4°C에 보관하면서 *Bacillus* spp.균주를 분리하여 실험에 이용하였다.

실험균주의 순수분리

Bacillus spp.균주를 선택적으로 분리하기 위하여 채집한 시료 중 병반 주변 부위 1 g을 도려내 멸균수 5 ml를 넣은 살균 막자사발에서 마쇄하고 80 ml의 멸균수가 들어 있는 삼각플라스크에 넣어 80°C의 항온수조에서 30분간 열처리하여 일반 세균을 제거 한 후 NA배지가 들어 있는 3개의 사레에 각각 이 시료 액 1 ml를 분주하여 고르게 접종하고 25°C에서 48시간 배양하였다. 접종한 배지에 균총이 형성되면 희선 접종 방법을 이용하여 2~3회 새로운 배지에 옮겨 균을 순수 분리하였다. 순수 분리한 균이 *Bacillus* spp.인 것을 확인하기 위하여 Schaeffer-Fulton (Harold, 1990)법을 이용하여 내생포자를 염색한 후 1,000X

배율의 현미경으로 내생포자 형성 여부를 검정하였다.

항진균물질을 생산하는 *Bacillus* spp.의 선발

순수분리된 *Bacillus* spp.의 항진균물질 생산 여부를 탐색하기 위하여 고추열매에 병원성을 나타낸 *Colletotrichum gloeosporioides* 균주와 고추와 오이에 병원성이 있고 여러 종류의 살균제에 대한 저항성을 나타내는 *Botrytis cinerea* 균주를 서울대학교 식물병원성 곰팡이 유전자은행으로 부터 분양받아 실험에 사용하였다.

병원진균의 균사 생장억제력 검정

균사의 생장억제력을 확인하기 위하여 PDA(potato dextrose agar; potatoes infusion 20%, Bacto dextrose 2%, Bacto agar 1.5%, Difco, USA)배지의 중앙을 *Bacillus* spp.로 희선 접종한 후, PDA에서 7일간 배양한 *C. gloeosporioides*와 *B. cinerea*를 직경 5 mm의 cork borer로 절단하여 배지 중앙에 희선 접종된 항진균 *Bacillus* spp.와 20mm 간격으로 대치 배양한 다음, 25°C에서 5일 동안 배양하여 생장 저지대를 mm단위로 측정하여 균사의 생장 억제력을 나타내는 *Bacillus* spp. 균주들을 일차적으로 선발하였다(Schiewe and Mendgen, 1992).

병원진균의 포자발아 억제력 검정

선발된 균주들을 대상으로 포자발아 억제력을 확인하기 위하여 *C. gloeosporioides*와 *B. cinerea*를 PDA에서 14일 배양하여 포자가 형성되면 *C. gloeosporioides*의 포자 현탁액 $1 \sim 5 \times 10^6$ conidia/ml, *B. cinerea*의 포자현탁액 $1 \sim 5 \times 10^{10}$ conidia/ml로 준비하여 이 중 1 ml를 PDA배지가 들어있는 사레에 분주하여 유리병으로 고르게 접종하였다. 그리고 균사 생장에 저해를 나타낸 *Bacillus* spp.는 LB (Luria-Bertani; tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, Difco, USA)배지에 접종하여 25°C에서 180 rpm으로 2일 동안 진탕 배양한 후, 원심분리하여 회수한 상등액 50 μ l를 paper disc(Avantec, 8 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd. Japan)에 적신 후 대조균주의 포자 현탁액이 접종된 PDA배지의 중앙에 올려놓고 25°C에서 3일 동안 배양하여 paper disc 둘레에 나타난 생장 저지대의 직경을 mm로 측정하였다(Victor and Editor, 1991).

항진균물질 생산 *Bacillus* spp. 균주의 동정

항진균물질 생산 균주를 동정하기 위하여 Bergey's Manual의 방법에 따라 그람염색, 내생포자염색, 형태, 운동성, 당분해능 등의 생리·생화학적 특성을 분석하였다(Holt *et al.*, 1994). 또한, Biolog사(Biolog, Inc. USA)에서 개발한 Biolog MicroLog 3, 4.01 version kit의 실험결과를 분석하여 *Bacillus*의 종을 동정하였다.

항진균물질 생산을 위한 최적 배지 선발

분리 동정된 *B. amyloliquefaciens* IUB153-03으로부터

항진균물질 생산을 위한 최적 배지를 선발하기 위하여 LB 배지 100 ml를 기본 배지로 하여 탄소원에 대해서는 L(+)-arabinose, dextrin, D-fructose, D(+)-galactose, glucose, glycerol, lactose, maltose, mannitol, D(+)-raffinose, sucrose, soluble starch, D-sorbitol, xylose를 각각 1% 씩 첨가하였으며, 질소원은 arginine, beef extract, casamino acid, casitone, malt extract, polypeptone, soytone, tryptone, yeast extract 각각 1% 씩 첨가하고, 인산염 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 를 각각 0.5% 씩 첨가한 후 각각 25°C에서 180 rpm으로 72시간 진탕 배양한 후 생장 정도와 항진균 활성을 조사하였다.

항진균물질의 생산에 미치는 pH의 효과

초기 pH가 *B. amyloliquefaciens* IUB153-03의 항진균 물질 생산에 미치는 효과를 조사하기 위하여 최적 배지 (soluble starch 2%, yeast extract 3%, tryptone 0.5%, NaCl 1%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5%) 100 ml에 1N HCl 과 1N NaOH로 pH를 4.0~10.0으로 조정하여 25°C에서 180 rpm으로 72시간 진탕 배양한 후 공시균의 생장과 공시균이 생산한 물질의 항진균 활성을 조사하였다.

항진균물질 생산을 위한 최적 배양온도 및 배양시간

B. amyloliquefaciens IUB153-03이 최적배지에서 항진균 물질의 생산을 위한 최적 배양온도와 배양시간을 밝히기 위해 최적배지 100 ml에 *B. amyloliquefaciens* IUB153-03 균주를 접종하여 108시간 동안 25°C에서 180 rpm으로 진탕 배양하면서 12시간 간격으로 9차례 균의 생장 정도와 항진균 활성을 조사하였다.

항진균물질의 분리 및 정제

B. amyloliquefaciens IUB153-03이 생산하는 항진균물질의 정제를 위해 이 균을 최적 액체배지에 접종하여 25°C에서 180 rpm으로 72시간 동안 진탕 배양한 후 10,000 rpm으로 30분간 원심 분리한 후 상등액을 회수하여 butanol과 물 (1 : 1)로 3회 반복 분획한 다음, butanol 층만을 회수하여 농축기(N-1, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 감압 농축한 후 동결건조(Operon Co., Korea)하여 항진균성을 나타내는 조추출물질을 얻었다(Fig. 1). 그리고 조추출물을 methanol에 용해시킨 후 1차, 2차 column(Φ 2.5 × 70 cm)에는 silica gel column chromatography(Kiesel gel 60, 70~230 mesh, 80 g)를 이용하여 butanol-acetone-water(4 : 6 : 1, v/v/v)용출하였으며, 3차 분리할 때에는 column (Φ 1.5 × 70 cm)에 ethyl acetate-methanol-water(50 : 18 : 5, v/v/v)로 하여 각 분리된 분획을 얻어 감압 농축하고, 동결 건조한 후 *C. glaucosporioides*를 대상으로 항진균 활성을 조사하였다(Fig. 2). 항진균활성을 나타내는 분획을 얻어 TLC plate (Kiesel gel 60 F254, Merk, Germany)에 점적한 후 butanol-acetone-water(4 : 6 : 1, v/v/v)로 전개하여 UV

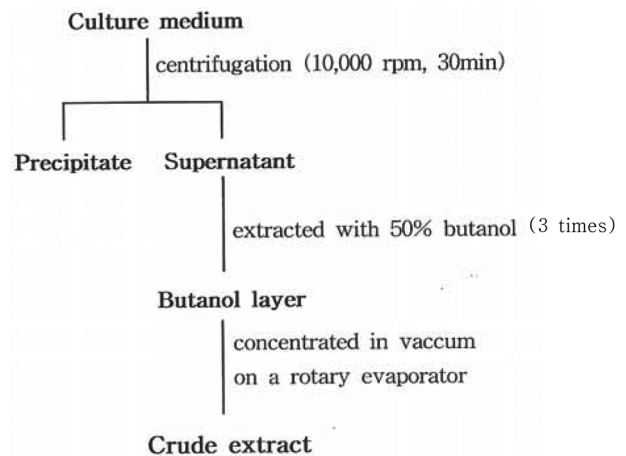


Fig. 1. Extraction procedure of crude antifungal substances produced by *B. amyloliquefaciens* IUB158-03.

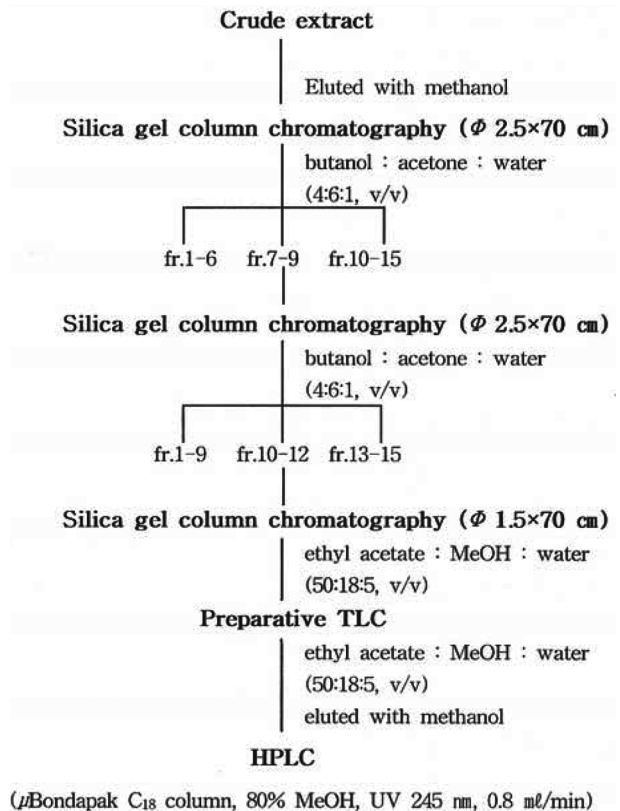


Fig. 2. Procedure of purification of antifungal substances produced by *B. amyloliquefaciens* IUB158-03.

Illuminator(VL-1.4, VILBER LOURMAT, France)로 254 365 에서 항진균성 활성물질을 비교 분석하였다. 항진균 물질을 Preparative TLC(DE 19713, Analte, Inc., 75 Blue Hen Drice Newark, USA)에 점적한 후 ethyl acetate-methanol-water(50 : 18 : 5, v/v/v)로 전개하여 UV Illuminator를 이용하여 발색되는 모든 spot을 methanol로 용출하여 Speed vac(CC-105, TOMY, Japan)으로 농축한 다음 80% methanol로 용해하여 μ Bondapak C18 column(3.9 × 300 mm,

Waters), UV detector(245 nm, Waters), 0.8 ml/min flow rate 조건으로 10 μ l씩 주입하여 80% methanol로 전개하여 각 분획을 회수하여 향진균 활성을 조사한 후 다시 향진균물질 peak 만을 분리하기 위하여 10 μ l 씩 0.6 ml/min flow rate로 여러 번 HPLC를 수행하여 정제된 향진균물질을 얻었다. 정제된 향진균물질이 단일 물질임을 확인하기 위하여 TLC로 전개한 후 -anisaldehyde로 발색하여 R_f 값의 차이를 확인하였으며, 정제된 향진균물질의 향진균 효과를 액체 배양액과 조추출물과 비교 분석하였다.

향진균물질의 항균력 시험

B. amyloliquefaciens IUB153-03의 배양액으로부터 정제된 향진균물질의 항균력을 알아보기 위하여 서울대 식물병원성 곰팡이 유전자은행에서 분양받은 식물병원균 *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cineria*, *Alternaria alternaria*와 안산1대학 임상병리과에서 분양받은 인체병원성 진균인 *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Cryptococcus neoformans*와 인체 병원성 효모인 *Candida albicans*, 인체병원세균인 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*를 대상으로 실험을 수행하였다. 식물병원균은 PDA, 인체병원성 진균인 *Trichophyton mentagrophytes*와 *Epidermophyton floccosum*은 SDA(sabouraud dextrose agar; neopeptone 1%, dextrose 4%, agar 1.5%)에 접종 후 25°C에서 14일간 배양, *Cryptococcus neoformans*와 *Candida albicans*는 PDB 배지에 접종하여 25°C에서 2일간 배양하였으며, 인체병원성 세균은 LB 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 실험에 사용한 각각의 진균들의 포자 현탁액은 $1 \sim 5 \times 10^6$ conidia/ml로 조절하여 만들었으며, 포자현탁액 1 ml씩을 취하여 식물병원균은 PDA, 인체병원성 진균은 SDA에 도말하였으며, *Cryptococcus neoformans*와 *Candida albicans*는 PDA 배지, 세균은 Müller-Hinton (Difco, USA) 배지에 도말한 후 paper disc 방법을 이용하여 향진균 활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

향진균물질 생산균주의 선발

탄저병원균에 감염된 고추열매에서 총 1,600균주의 *Bacillus* spp.를 순수 분리하였으며, 이 중 *C. gloeosporioides*와 *B. cinerea* 균주의 균사생장을 동시에 억제시키는 46 균주를 1차 선발하였으며, 이들 중 포자의 발아를 억제시키는 20균주를 2차로 선발하고 그 중 생장과 항균력이 가장 우수한 *Bacillus* sp. IUB158-03을 최종 선발하였다.

향진균물질 생산 균주의 동정

향진균물질 생산 균주로 선발된 *Bacillus* sp. IUB158-03을 동정하기 위하여 Bergey's Manual 방법에 의해 형태적,

Table 1. The morphological, physiological and biochemical characteristics of *Bacillus* sp. IUB158-03 isolated from diseased pepper fruit

Characteristics	IUB158-03
Morphology	rod
Motility	+
Catalase	+
Anaerobic growth	+
MR test	-
VP test	+
Acid from D-glucose	+
D-arabinose	-
D-xylose	+
D-mannose	+
Gas from glucose	-
Hydrolysis of casein	+
gelatin	-
starch	+
Utilization of citrate	-
Deamination of phenylalanine	-
Nitrate reduced to nitrite	+
Formation of indole	-
Growth in NaCl 2%	+
NaCl 5%	+
NaCl 7%	+
NaCl 10%	+
Growth at 20°C	+
35°C	+
45°C	+
50°C	+
55°C	+
60°C	+

+, 90% or more of strain are positive

-, 90% or more of strain are negativ

생리·생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 이 균주는 Gram 양성 간균으로 운동성을 보였으며, catalase 양성, D-glucose, D-xylose, D-mannose 발효능을 보였지만, D-arabinose는 발효하지 않았다. 또한 casein, starch 가수분해효소를 생산하며, NaCl 2~10%와 생장온도 20~60°C에서 생장을 보였다. 그리고 BioLog kit를 이용하여 종을 동정한 결과 *Bacillus* sp. IUB158-03는 *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정되어 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03로 명명하였다.

현재까지 국내외적으로 *Bacillus* spp.가 생산하는 향진균물질에 대한 연구가 많이 보고되고 있다(Kharbande *et al.*, 1997). 그 중 *B. licheniformis* N1과 *B. megaterium* N4는 *Alternaria alternata*에 의한 들깨 잎마름병에 대한 생물학적 방제 효과가 보고되었으며(문 등, 1997), *B. licheniformis*는 *C. coccides*에 의해 발생한 고추탄저병을 방제한다는 보고가 있었다(Lim *et al.*, 2002). 또한 *B. amyloliquefaciens* 균주는 배 수확 후 발생하는 gray mold를 억제하는 생물

학적 방제 효과가 보고된 바 있으며(Mari *et al.*, 1996), Wang *et al.*, (2002)은 *B. amyloliquefaciens* V656 균주가 세포벽 분해효소인 chitinase를 생산하여 항진균 활성이 높다고 보고하였다.

항진균물질 생산을 위한 최적배지 조성

B. amyloliquefaciens IUB158-03이 항진균물질 생산을 위한 최적배지를 선발 하기위해 LB 배지에 탄소원을 각각 1% 씩 첨가하여 성장 정도와 항진균물질의 생산성을 조사한 결과 D(+)-raffinose와 soluble starch가 첨가된 배지에서 가장 높게 나타났다. 두 탄소원의 농도에 따른 항진균물질의 생산을 확인한 결과 2%의 soluble starch가 첨가된 배지에서 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03의 성장과 항진균물질의 생산이 가장 높았다. 따라서 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03의 최적 탄소영양원으로 2% soluble starch가 선발되었다(Fig. 3, 4). 이는 *Botrytis cinerea*에 항균 효과를 보인 *Bacillus* sp. YJ-63 균주의 항진균물질 생산을 위한 최적 배지 조건에서 탄소원으로 1.5% soluble starch를 사

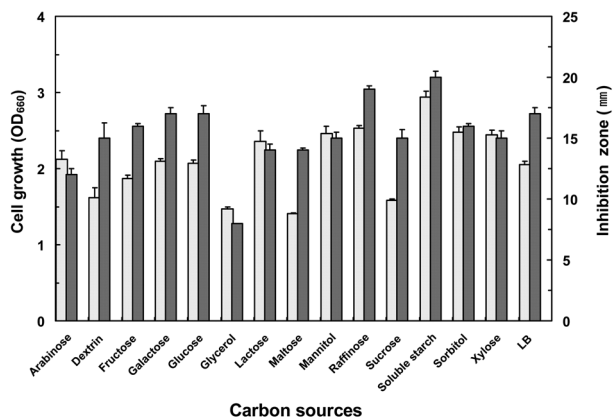


Fig. 3. Growth and antifungal activity of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 cultured in the medium containing various carbon sources (1%).

□: Cell growth ▨: Inhibition zone

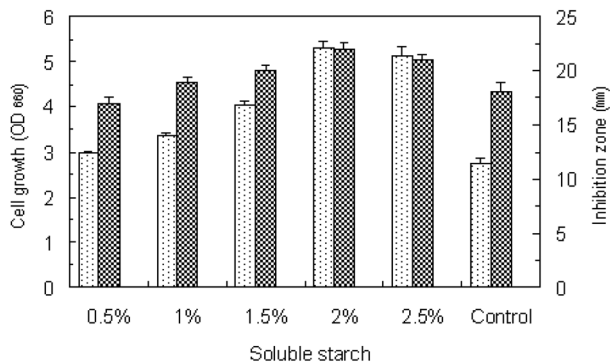


Fig. 4. Growth and antifungal activity of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 in the medium containing various concentrations of soluble starch. Control was grown in LB medium.

□: Cell growth ▨: Inhibition zone

용한 결과와 유사하였다(Jeong *et al.*, 2002). 이 결과는 탄소영양원의 종류에 따라 미생물의 성장과 2차 대사산물의 생산이 크게 영향을 받는다는 연구와 유사한 결과로 사료된다(Lounes *et al.*, 1996).

최적 질소영양원을 선발하기 위하여 2%의 soluble starch를 첨가한 배지를 대조군의 배지로 사용하였으며, 실험군의 배지는 LB 배지에서 yeast extract와 tryptone을 제거한 후 각각 서로 다른 1%의 질소 영양원을 첨가하여 배지를 제조한 후 균의 성장과 항진균물질의 생산성을 조사하였다. 대조군과 실험군을 비교한 결과 균의 생장은 soytone을 첨가한 배지에서 높았으나 길항력은 낮았다. 이에 따라 대조군 배지의 두 질소영양원의 혼합 비율을 조정하여 성장 정도와 항진균물질의 생산성을 조사한 결과 3% yeast extract와 1% tryptone의 혼합한 배지에서 공시균의 생장이 가장 높았으나, 항진균물질의 생산성은 3% yeast extract와 0.5% tryptone을 혼합한 배지에서 더 높게 나타났다. 따라서 3% yeast extract와 0.5% tryptone을 혼합한 질소 영양원을 선발하였다(Fig. 5).

최적의 인산염을 선발하기 위하여 2% soluble starch, 3% yeast extract와 0.5% tryptone, 1% NaCl로 조성된 배지를 대조군으로 하고 여기에 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 등의 인산염을 각각 0.5% 씩 첨가하여 공시균의 성장과 항진균물질의 생산성을 조사하였다. 실험 결과 NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 를 첨가한 경우 대조군과 비슷한 결과를 나타냈으며, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 를 첨가한 경우에는 대조군에 비해 생장은 낮았으나, 항진균 활성은 높게 나타났다(Fig. 6). 이상의 결과로 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 균주의 항진균물질 생산을 위한 최적 인산염으로는 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5%가 선발되었다. 따라서 실험결과에 따라 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 균주의 항진균물질 생산을 위한 최적 배지의 탄소원은 2% soluble starch, 질소원은 3% yeast extract와 0.5% tryptone, 인산원은 0.5% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1%의 NaCl로 밝혀졌다.

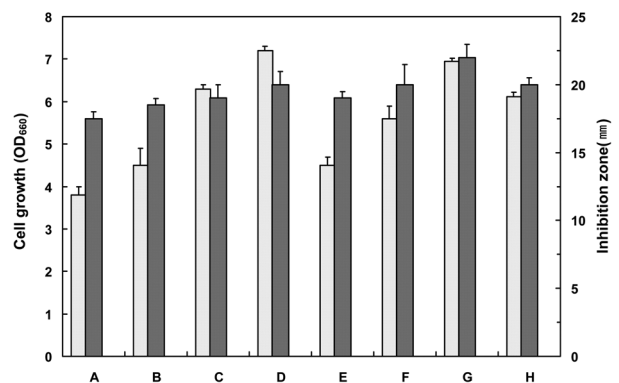


Fig. 5. Growth and antifungal activity of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 in the medium containing various concentrations of yeast extract and tryptone.

□: Cell growth ▨: Inhibition zone

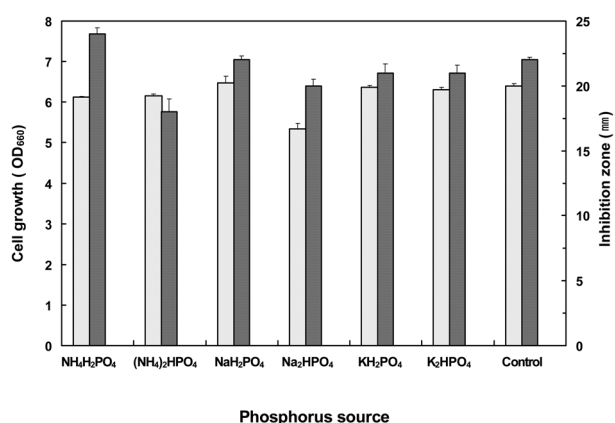


Fig. 6. Growth and antifungal activity of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 in the medium containing various phosphorus sources (0.5%) Control was consisted of 2% soluble starch, 3% yeast extract, 1% tryptone and 1% NaCl.
□: Cell growth ■: Inhibition zone

항진균물질 생산의 최적 pH, 온도 및 배양시간

항진균물질 생산에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 최적 배지에 1N HCl 과 1N NaOH로 pH 4.0~10.0 까지 7단계로 조정하여 공시균을 접종하여 균의 생장 정도와 항진균 물질의 생산성을 조사하였다. 실험 결과 pH 6.0에서 생장과 항진균 물질의 생산이 가장 높게 나타났다(Fig. 7).

공시균의 항진균물질 생산 최적 배양온도와 시간을 알아보기 위해 선발된 최적배지의 pH를 6.0으로 조정하여 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03를 접종하고 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C 등 5단계 온도로 조정된 배양기에서 배양하면서 12시간 간격으로 108시간까지 총 9차에 걸쳐 균의 생장정도와 항진균 활성을 조사하였다. 실험 결과 균의 생장은 25°C에서 48시간 배양할 때 가장 높게 나타났으며, 항진균물질의 생산은 25°C에서 72시간 배양할 때 가장 높았다. 즉, 항진균물질의 생산은 균이 균의 정지기 후인 72시간 배양 후 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 따라서 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 균주의 항진균물질 생산을 위한 최적 배지는 2% soluble starch, 3% yeast extract, 0.5% tryptone, 0.5% NH₄H₂PO₄, 1%의 NaCl이 있으며, 배양 조건은 pH 6.0, 배양온도 25°C 및 배양시간 72시간으로 결정되었다.

항진균물질의 분리 및 정제

항진균물질의 추출을 위해 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 균주를 선발된 최적 배지에 접종하여 배양한 후 상층액을 취해 butanol과 물(1:1)로 혼합하여 butanol 층을 회수하여 동결 건조하여 조추출물을 얻었다. 조추출물을 정제하기 위하여 silica gel column chromatography를 이용하여 각 분획을 얻어 감압 농축하여 TLC plate로 분획을 조사하고 항진균력을 확인 하였으며, 항진균 물질을 좀더 정제하기 위하여 Preparative TLC로 전개한 후 항진균 활성을 나타낸

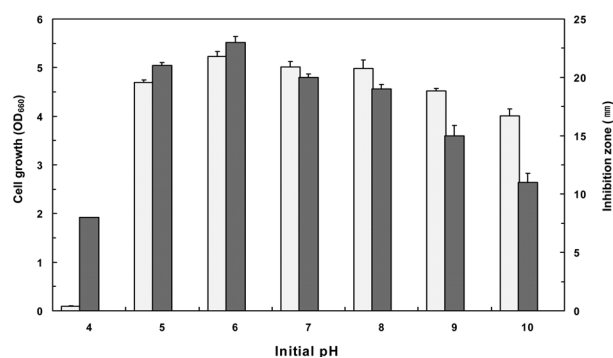


Fig. 7. Effect of initial pH on the growth and production of antifungal activity by *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 under optimal conditions.
□: Cell growth ■: Inhibition zone

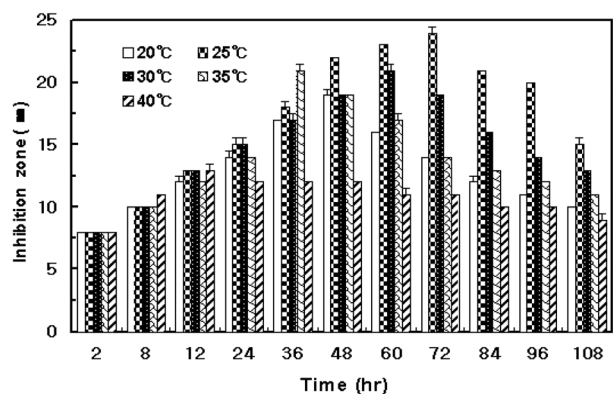


Fig. 8. Effect of temperature and time courses on the production of antifungal substances from *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 in the optimized medium.

spot을 얻어 HPLC를 수행하였다. Preparative TLC로 얻은 물질에서는 retention time이 2.6분, 3.1분, 3.9분, 4.4분인 4개의 peak가 혼합되어 있었으며, 이들 중 retention time이 4.4분인 peak가 항진균물질을 함유하고 있는 것으로 확인 되었다. 정제된 항진균물질을 TLC로 전개한 후 -anisaldehyde로 발색하여 R_f값이 0.27인 것을 확인하였다(Fig. 9). 또한 배양액, 조추출물 및 정제된 항진균물질의 항균활성을 비교한 결과 Fig. 10과 같이 정제된 항진균물질은 높은 항진균력을 나타내었다.

항진균물질의 항균력 시험

B. amyloliquefaciens IUB158-03이 생산한 항진균물질의 항균력을 Table 9와 같이 식물병원진균인 *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*와 인체 병원성 진균인 *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*에 높은 항진균 활성을 나타냈으나 *Cryptococcus neoformans*에는 낮게 나타났다. 또한 병원성효모인 *Candida albicans*과 병원성 세균인 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*에는 항균활성을 전혀 나타내지 못하였다. 따라서 *B. amyloliquefaciens*

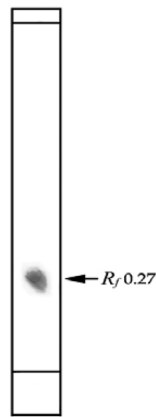


Fig. 9. TLC of the active fraction of the antifungal substance purified from the crude extract of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03.

TLC plates were developed by spraying with ninhydrin and heated at 110°C.

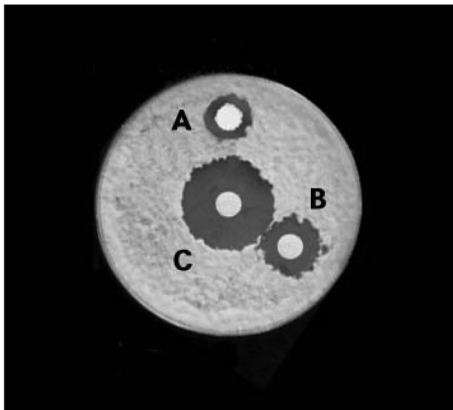


Fig. 10. Inhibition zone of *C. gloeosporioides* spores by antifungal substance purified from the crude extract of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 after 72 hr of incubation. A; Culture filtrates of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 under optimal culture conditions (100 µg/ml) after 72 hr of incubation
B; Crude extract produced from *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 (100 µg/ml) after 72 hr of incubation
C; Antifungal substance purified from the crude extract of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 (50 µg/ml) after 72 hr of incubation

IUB158-03 균주가 생산한 항균물질의 항균활성은 진균에만 선택적으로 나타내었다(Table 2). 이는 기존에 *Bacillus* spp가 생산하는 iturin이 식물병원곰팡이와 세균에 효과가 있다는 연구보고와는 다르게 세균에는 전혀 길항작용을 나타내지 못하고 있기 때문에 iturin과는 다른 계열의 물질일 가능성이 있다고 판단되었다(Gueldner *et al.*, 1988).

따라서 본 연구를 통해 분리된 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03이 생산하는 항진균물질은 식물병원성 진균에 대한 생물학적 방제제로 사용될 수 있는 잠재성이 있다고 판단되었으며, 앞으로 정제된 항진균물질의 화학적 특성과

Table 2. Antimicrobial spectrum of the antifungal substance purified from the crude extract of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03 against various pathogenic microorganisms

Microorganisms	Inhibition zone (mm) ^a
Fungi	
<i>Alternaria alternata</i>	19 ± 0.58
<i>Aspergillus niger</i>	18 ± 0.62
<i>Botrytis cinerea</i>	22 ± 0.82
<i>Fusarium solani</i>	23 ± 0.76
<i>Cryptococcus neoformans</i>	13 ± 0.62
<i>Epidermophyton floccosum</i>	21 ± 0.58
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	21 ± 0.82
Yeasts	
<i>Candida albicans</i>	0
Gram positive bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0
Gram negative bacteria	
<i>Escherichia. coli</i>	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0

^aPaper discs (8 mm in diameter) were treated with 50 µl of the antifungal substance purified and inhibition zone was measured against various microorganisms after 72 hr of incubation

구조를 규명하고 기작을 밝히고자 한다. 또한 세포 및 동물실험을 통해 인체에 대한 독성여부도 파악하고 안정성을 확인하여 미생물제제로서의 개발 가능성을 확인할 예정이다.

적요

병원성 미생물을 방제하기 위하여 국내의 고추 재배지에서 탄저병균에 감염된 고추로부터 *Bacillus*속 균주를 분리하였다. 이들 중 고추탄저병균인 *C. gloeosporioides* 균주와 식물에 회색곰팡이병을 일으키는 *Botrytis cinerea* 균주에 대한 길항작용이 가장 우수한 *Bacillus* sp. IUB158-03을 선발하였다. 선발된 균주의 형태적, 생리·생화학적 특성과 MicroLog 방법을 이용하여 동정된 균주는 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03로 명명하였다. 항진균물질 생산을 위한 최적배지 조건은 2% soluble starch, 3% yeast extract, 0.5% tryptone, 0.5% NH₄H₂PO₄, 1% NaCl의 pH 6.0에서 25°C, 72시간 배양한 추출물에서 가장 높은 항진균활성을 나타내었다. *B. amyloliquefaciens* IUB158-03이 생산한 항진균물질을 butanol로 추출한 후 silica gel column chromatography, preparative thin layer chromatography, and HPLC를 이용하여 항진균물질을 정제하였다. 정제된 항진균물질은 TLC plate 상에서 R_f값이 0.27인 것이 확인되었으며, 이 물질은 식물병원균인 *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cineria*, *Alternata alternaria*와 인체병원성 진균

인 *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Cryptococcus neoformans* 등에만 선택적으로 높은 항진균 활성을 보였다.

참고문헌

- 문병주, 강진동, 이재필, 손지희, 차외진, 노성환. 1997. *Bacillus licheniformis* N1과 *B. megaterium* N4을 이용한 들깨 잎마름병 (*Alternaria alternata*) 생물학적 방제. 한국균학회 규학회소식. 12(1):73.
- Adams, P. B. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:59-72.
- Backhouse, D. and A. Stewart. 1989. Ultrastructure of antagonism *Sclerotium cepivorum* by *Bacillus subtilis*. *J. Phytopathology.* 124:207-214.
- Baker C. J., J. Stavelly, R. Tomas, C. A. Myron, S. Janet and S. Macfall. 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phasoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *J. Phytopathology.* 73(8):1148-1152.
- Becker, J. O. 1993. Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. *Pestic. Sci.* 37:355-363.
- Berdy, J. 1989. The discovery of new bioactive microbial metabolites: Screening and identification, In Bushell. M. E. and U. Grafe(ed), Bioactive metabolites from microorganisms, Elsevier, Amsterdam. 3-25.
- Besson, F., F. Peyponx, G. Michel and L. Delcombe. 1978. Mode of action of iturin A, an antibiotic isolated from *Bacillus subtilis* on *Micrococcus luteus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81: 297-304.
- Brannen, P. M. and Kenney D. S. 1997. Kodiak-a successful biological- control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 19:169-171.
- Burpee, L. L. and L. G. Goult. 1984. Evaluations of fungicides for control of pink and gray snow mold on creeping bentgrass. pp.6-7, In; Turfgrass Research Annual Report, R. W. Sheard(ed). Univ. of Guelph, Ontario. 38.
- Cook, R. J. 1985. Biological control of plant pathogens: Theory to application. *J. Phytopathology.* 75:25-28.
- Fravel, D. R., W. J. Connick and J. A. Lewis. 1998. Formulation of microorganisms to control plant diseases. pp. 187-202. In H. D. Burges(eds). Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms and nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London.
- Gueldner, R. C., C. C. Reilly, P. L. Pusey, C. E. Costello, R. F. Arrendale, R. H. Cox, D. S. Himmelbach, F. G. Crumley and H. G. Cutler. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *J. Agri. Food. Chem.* 36:366-370.
- Harold J. Benson. 1990. Microbiological Applications; A Laboratory Manual in General Microbiology. 5th ed. Dubuque, Iowa: Wm. C. Brown Publishers.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H., A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology., 9th, Williams Wilkins, U. S. A.
- Huang, T. C. and M. C. Chang. 1975. Studies on Xanthobacdin, a new antibiotic from *Bacillus subtilis* active against *Xanthomonas*. *Bot. Bull. Acad. Sinica.* 16:137-148.
- Jeong, Y. K., Y. Shin, M. J. Jung, W. H. Joo and J. S. Choi. 2002. Structural analysis of the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30(1):21-25.
- Kharbanda, P. D., J. Yang, P. Beatty, S. Jensen and J. P. Tewari. 1997. Potential of a *Bacillus* spp. to control blackleg and other diseases of canola (Abstracts). *J. Phytopathology.* 87:51.
- Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze and M. N. Schroth. 1980. *Pseudomonas* siderophore: A mechanism explaining disease suppressive soil. *Curr. Microbiol.* 4:317-320.
- Lifshitz, R., M. Y. Windham and R. Baker. 1986. Mechanism biological control of pre-emergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *J. Phytopathology.* 76:720-725.
- Lim, C. S., J. Y. Kim, T. H. Lee, Y. G. Park and Y. H. Han. 2002. Antifungal activity of the isolated *Bacillus licheniformis* against red-pepper anthracnose-causing *Colletotrichum coccides*. *Kor. J. Mycology.* 14(2):73-74.
- Lounes, A., A. Lebrihi, C. Benslimane and G. Lefebvre. 1996. Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: effects of glucose and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:204-211.
- Maget-Dana, R. M. Ptak, F. Peypoux and G. Michel. 1985. Pore-forming properties of a lipopeptide antibiotic: Iturin A. *Biochim. Biophys. Acta.* 815:405-409.
- Mandeel, Q. and R. Baker. 1993. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium wilt* of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *J. Phytopathology.* 81:462-469.
- Mari, M., M. Guizzardi and G. C. Partella. 1996. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. *Biological Control.* 7:30-37.
- Paulitz, T. C. and J. E. Loper. 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Phythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *J. Phytopathology.* 81:930-935.
- Schiewe, A. and K. Mendgen. 1992. Identification of antagonists for biological control of the post harvest pathogens *Pezicula malicorticis* and *Nectria galligena* on apple. *J. Phytopathology.* 134:229-237.
- Shen, S. S., O. H. Choi, S. M. Lee and C. S. Park. 2002. *In vitro* and *in vivo* activities of a biocontrol agent. *Serratia plymuthica* A21-4, against *Phytophthora capsici*. *Plant pathol. J.* 18(4): 221-2240.
- Yoshie, Y., I. Katsushige, U. Yoshihisa, O. Atsuko, T. Kazutoh, K. Ikunoshin and N. Hiroshin. 1993. Isolation, structures, and antifungal activities of new Aureobasidins. *J. Antibiotics.* 46: 1347-1354.
- Victor Lorian, M. and D. Editor. 1991. Antibiotics in laboratory medicine (3nd). Williams & Wilkins. 17-52.
- Waksman, S. A. and A. T. Heinrich. 1943. The nomenclature and classification of the *Actinomycetes*. *J. Bacteriol.* 46: 337-341.
- Wang, S. L., I. L. Shin, Y. W. Liang and C. H. Wang. 2002. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Agric. Food. Chem.* 50: 2241-2248.
- Zuber, P., M. M. Nakano, and M. A. Marahicl. 1993. Peptide antibiotics, Pp 897-916. In A. L. Sonenshein *et al* (ed). *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, American Society for Microbiology, Washington, D. C.