

## *Bacillus subtilis*에서 분비되는 *Colletotrichum gloeosporioides* 생장 저해물질 생산에 미치는 배양조건의 영향

조수진 · 차병진<sup>1</sup> · 신광수\*

대전대학교 이과대학 미생물학과, <sup>1</sup>충북대학교 농과대학 환경원예학부

## Effect of Culture Parameters on the Production of Growth Inhibitory Substance of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Bacillus subtilis*

Soo-Jin Cho, Byeong Jin Cha<sup>1</sup> and Kwang-Soo Shin\*

Department of Microbiology, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

<sup>1</sup>School of Environmental Biology and Horticulture, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received June 2, 2004)

**ABSTRACT:** The effect of culture parameters on the production of *Colletotrichum gloeosporioides* growth inhibitory substance from *Bacillus subtilis* was investigated. The maximal growth inhibition zone was observed in the medium of pH 7.0. Among the tested carbon sources, glucose showed the largest growth inhibition zone above two fold than other carbon sources. Ammonium sulfate and organic nitrogen sources were effective on the production of growth inhibitory substance. Luria Bertani (LB) medium was the best on the production of antifungal substance from *B. subtilis*.

**KEYWORDS:** *Bacillus subtilis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, Red pepper anthracnose

*Colletotrichum gloeosporioides*는 고추 역병균과 더불어 우리나라 고추 생산에 커다란 저해요인 중의 하나인 고추 탄저병균으로 매년 고추의 10% 이상이 수확시기에 감염되어 농가에 큰 피해를 끼치고 있다. 국내에서는 *Colletotrichum* 속에 속하는 5종이 분리 동정된 바 있으며 (Park et al., 1991), 이 중에서도 *C. gloeosporioides*가 고추 탄저병을 유발하는 강력한 병원균으로 보고된 바 있다 (Park and Kim, 1992). 현재까지 국내에서 진행된 고추 탄저병에 대한 연구는 주로 살균제 및 병원균에 대한 고추의 저항성에 관한 것이 대부분이었으며 (Park et al., 1988), 병원균에 생태학적 특성에 관한 연구가 일부 보고되어 있으나 (Chang and Chung, 1985; Chung and Lee, 1986; Park and Kim, 1994), 미생물을 이용한 생물학적 방제에 대한 연구는 미진한 실정에 있다.

*Bacillus* 속 균주들은 alboleutin, bacitracin, iturin, surfactin 등 각종 세균과 진균에 항균 활성을 나타내는 많은 화합물을 생산하는 것으로 보고되어 있으며 (Zuber et al., 1993), 각종 효소, 생물농약 및 정밀 화학제품 생산 등 산업적으로 널리 이용되어 왔다. *Bacillus*를 이용하여 개발된 미생물 제제로는 종자 소독제, 야채류의 부패방지제 등이 있으며, 특히 복숭아 brown rot의 원인균인 *Monilia*

*fructicola*의 생장을 억제하는 것을 발견하고, 과수 저장 중의 부패 방지제 개발의 가능성이 보고된 바 있다 (Gueldner et al., 1988). 한편, Cho et al. (2003)은 최근에 *C. gloeosporioides*의 생장을 억제하는 길항 미생물을 분리하고 각종 생화학적 특성 분석과 16S rDNA 분석을 통해 *Bacillus subtilis* KS03으로 동정하고, 이들이 생산하는 주된 항균물질이 iturin A인 것으로 규명한 바 있다. 이에 따라 본 연구에서는 상기 균주를 이용하여 각종 배양조건이 항균 물질 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

병원균인 *C. gloeosporioides* BA19는 충북대학교 농과대학 환경원예학부 차병진 교수로부터 분양 받아 사용하였으며, PDA(potato dextrose agar) 배지에 접종하여 30°C에서 배양한 후 4°C에서 보관하였다. 길항세균인 *B. subtilis* KS03(KACC 91059)은 본 실험실에서 벵짚으로부터 분리하여 보관하고 있는 균주로 nutrient agar 배지에서 30°C의 조건으로 배양하여 사용하였다. 배양조건 조사를 위한 배지의 조성은 glucose 10 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, NaCl 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.35 g, MgSO<sub>4</sub> 1 g, CaCl<sub>2</sub> 0.05 g, FeCl<sub>3</sub> 1.25 mg 및 증류수 1 l이었으며, 탄소원의 영향을 조사할 경우는 glucose 대신에 여러 가지 탄소원을 10 g/l씩 첨가하였으며, 질소원의 경우도 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 대신에 여러 가지 질소원을 2 g/l씩 첨가하였다. 길항세균을 배양한 후 일정시간 간격으로 배양액을 취한 후, 12 N HCl로 pH

\*Corresponding author <E-mail: shinks@dju.ac.kr>

2.0으로 조절하고 원심분리하여 침전물을 얻었다. 각 침전물에 메탄을 1 ml를 가하여 침전물을 녹인 후 다시 원심분리하여 상등액을 얻어 병원균 성장저해 활성 측정에 사용하였다(Tsuge *et al.*, 2001). PDB(potato dextrose broth)에서 4일간 액체 배양한 병원균을 0.1 ml 취하여 PDA 배지에 도말하고, 준비된 길항세균 배양 추출물 50 µl가 접종된 paper disk(8 mm)를 배지 위에 올려놓고 30°C에서 4일 동안 배양한 후 형성되는 저해환의 직경을 측정하였다.

**길항 세균의 성장저해능.** 병원균이 도말된 배지위에 *B. subtilis* KS03의 배양여액을 접종한 결과, 뚜렷한 저해환이 형성되었으며, 저해환 주위에는 병원균이 과사하여 검게 변한 또 다른 띠가 형성되는 것을 관찰할 수 있어 (Fig. 1), 길항세균 배양액에 병원균의 성장을 억제하는 물질이 존재함을 알 수 있었다.

**pH의 영향.** 배지의 초기 pH를 각각 5.0, 6.0, 7.0 및 8.0으로 조절하여 *B. subtilis*를 배양한 후, 60, 90 및 120 시간 후에 배양액을 취하여 병원균의 성장 저해능을 측정 한 결과(Fig. 2), pH 7.0에서 제일 높은 활성을 보여 저해환의 직경이 1.7 cm 정도였다. 이전 연구에 의하면 상기 균주를 LB(Luria Bertani) 배지에서 배양하였을 경우 길항세균의 성장곡선이 사멸기에 도달한 시기인 60시간 이후에 성장 저해능이 높게 나타났으며(Cho *et al.*, 2003), 배지의 초기 pH는 중성에 가까웠다. 따라서 이후의 실험은 배지의 pH를 7.0으로 조절하였고, 배양액의 추출시기도 60시간 이후로 하여 실험을 행하였다.

**탄소원의 영향.** 질소원은 ammonium sulfate로 고정하

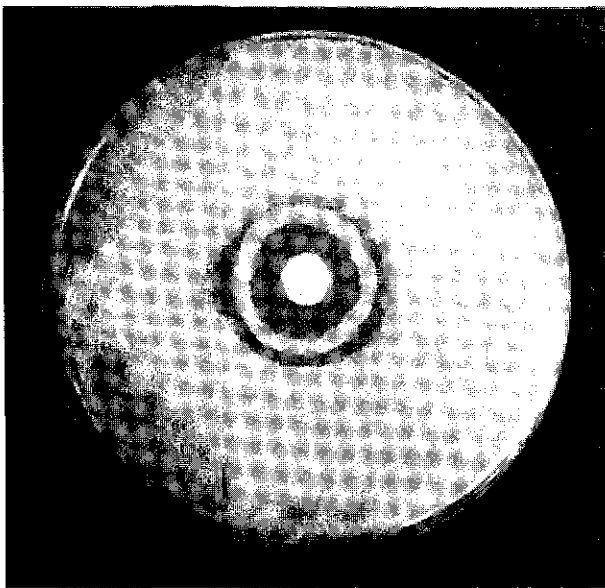


Fig. 1. Growth inhibition zone of *Colletotrichum gloeosporioides* formed by culture filtrate of *Bacillus subtilis* KS03.

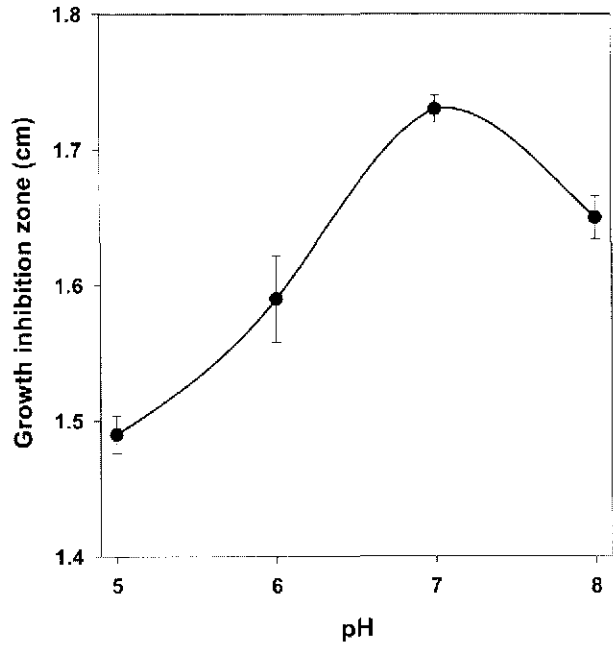


Fig. 2. Effect of initial media pH on the production of *Colletotrichum gloeosporioides* growth inhibitory substance from *Bacillus subtilis* KS03.

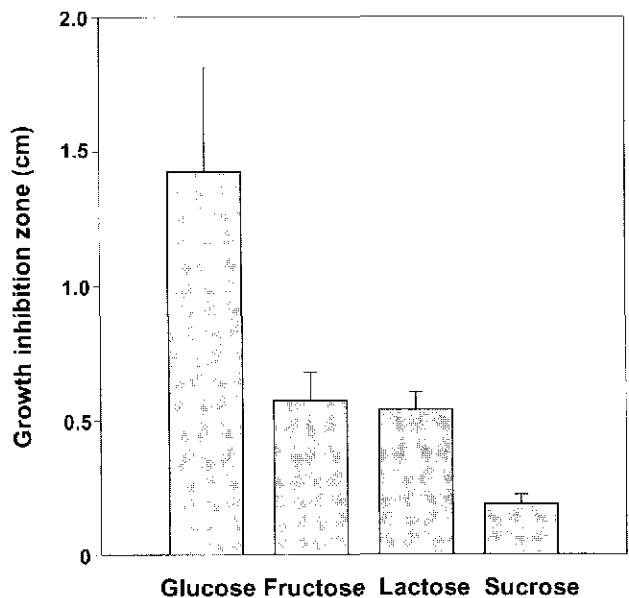


Fig. 3. Effect of various carbon sources on the production of *Colletotrichum gloeosporioides* growth inhibitory substance from *Bacillus subtilis* KS03.

고, 탄소원으로 glucose, fructose, lactose, sucrose, maltose 및 starch를 처리하여 배양한 후, 배양액을 추출하여 병원균의 성장 저해활성을 조사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 glucose를 탄소원으로 처리하였을 경우에서 가장 높은 저해환을 보였으며, fructose와 lactose를 탄소원으로 처리한 배양액에 비해 2배 이상의 저해능을 보였다. maltose와 starch의 경우에는 저해활성이 전혀 관찰되지 않았다.

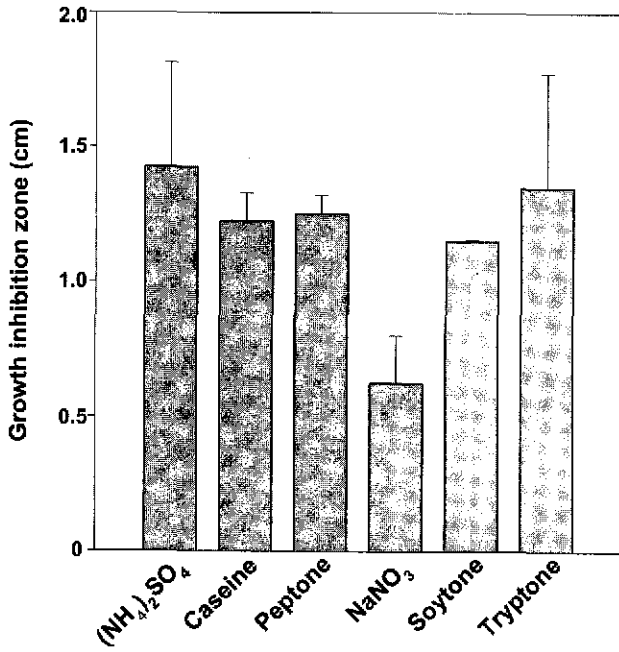


Fig. 4. Effect of nitrogen sources on the production of *Colletotrichum gloeosporioides* growth inhibitory substance from *Bacillus subtilis* KS03.

**질소원의 영향.** 탄소원을 glucose로 하고, 질소원을 달리하여 실험한 결과, ammonium sulfate와 tryptone에서 높은 활성이 나타났으며, sodium nitrate를 제외한 casein,

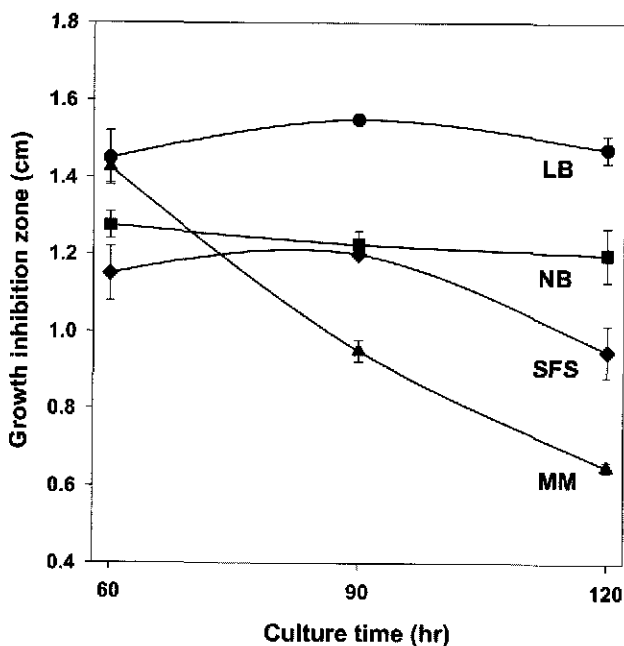


Fig. 5. Effect of various media on the production of *Colletotrichum gloeosporioides* growth inhibitory substance from *Bacillus subtilis* KS03. LB; Luria Bertani medium, NB; nutrient broth medium, SFS; soybean flour-starch medium, MM; minimal medium.

peptone 및 soytone과 같은 유기 질소원에서도 비교적 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4).

**각종 배지에서의 저해능.** 상기의 조건에서 최적으로 정해진 탄소원으로 glucose, 질소원으로 ammonium sulfate를 첨가한 최소배지와 시판되고 있는 세균 배양 배지인 NB(nutrient broth), LB 및 콩가루(1%)와 sucrose(3%)를 첨가한 SFS(soybean flour-sucrose) 배지에 *B. subtilis*를 배양하면서 일정시간 간격으로 저해능을 조사하였다(Fig. 5). 가장 높은 저해활성은 LB 배지에서 90시간 배양한 배양액에서 나타났으며, 타 배지에서도 비슷한 시기에 최대의 활성이 나타났다. 그러나 값싼 배지를 개발하고자 시도된 SFS 배지에서의 활성이 비교적 낮게 나타나, 산업화를 위해서는 질소원 등 다른 배양조건의 탐색과 더불어 최적 배양조건이 확립되어야 할 것으로 생각된다. 또한, 본 연구 결과를 이용한 실용적인 고추 탄저병의 생물학적 방제제 개발을 위해서 포장실험, 제형개발 등의 다양한 연구를 시도할 예정이다.

**적 요**

고추 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides*의 생장을 저해하는 물질을 생산하는 세균인 *Bacillus subtilis*의 각종 배양조건을 달리하여 최적 생산 조건을 조사하였다. 병원균 성장 저해물질 생산을 위한 배지의 초기 산도는 pH 7.0이 최적이었으며, 탄소원으로는 glucose를 첨가했을 경우 다른 탄소원에 비해 2배 이상 높은 활성을 보였다. 질소원으로는 유기 질소원일 경우 비교적 높은 병원균 성장 저해활성을 보였으나, 무기 질소원인 ammonium sulfate에서 가장 높은 활성을 보였다. 여러 가지 배지를 사용하여 조사한 결과, LB(Luria Bertani) 배지의 배양액에서 가장 높은 활성이 나타났다.

**감사의 글**

본 논문은 농림부 농업기술개발사업의 지원에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

**참고문헌**

Chang, S. H. and Chung, B. K. 1985. Studies on the varietal resistance and effects of nutrients for fungal growth of pepper anthracnose disease caused by *Colletotrichum dematium* f. sp. *capsici*. *Kor. J. Mycol.* 13: 227-233.  
 Chung, B. K. and Lee, S. B. 1986. Effects of conidial number and nutrition on the germination of conidia in *Colletotrichum dematium* f. sp. *capsici* causing red pepper anthracnose. *Kor. J. Plant Prot.* 25: 41-46.  
 Cho, S. J., Lee, S. K., Cha, B. J., Kim, Y. H. and Shin, K. S. 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium*

- gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**: 47-51.
- Guedner, R. C., Reilly, C. C., Pusey, P. L., Costello, C. E., Arrendale, R. F., Cox, R. H., Himmelsbach, D. S., Crumley, F. G. and Cutler, H. G. 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.
- Park, K. S. and Kim, C. H. 1992. Identification, distribution and etiological characteristics of anthracnose fungi of red pepper in Korea. *Kor. J. Plant Pathol.* **8**: 61-69.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1994. Effect of temperature, relative humidity, and free water period on lesion development and acervulus formation of *Colletotrichum gloeosporioides* on red pepper. *Kor. J. Plant Pathol.* **10**: 34-38.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and Lee, E. J. 1991. Five fungal species associated with anthracnose of red pepper in Korea. *Phytopathology* **81**: 1135.
- Park, W. M., Lee, Y. S., Kim, S. H. and Ko, Y. H. 1988. Biochemical investigation of resistance of green pepper fruit to *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Kor. J. Plant Pathol.* **4**: 290-296.
- Tsuge, K., Akiyama, T. and Shoda, M. 2001. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J. Bacteriol.* **183**: 6265-6273.
- Zuber, P., Nakano, M. M. and Marahiel, M. A. 1993. Peptide antibiotics. Pp 897-916. *In*: Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. and Losick, R. Eds. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. ASM, Washington, D.C.