

## Bacillus sp. TBM912가 생산하는 항균물질

주우홍\* · 한수지<sup>1</sup> · 최용락<sup>2</sup> · 정영기<sup>3</sup>

창원대학교 생물학과, <sup>1</sup>피츠버그대학교 약학과, <sup>2</sup>동아대학교 생명자연과학부, <sup>3</sup>동의대학교 생명융합과학과

Received January 5, 2004 / Accepted January 15, 2004

**Antifungal Compound Produced by *Bacillus* sp. TBM912.** Woo-Hong Joo\*, Su-Ji Han<sup>1</sup>, Young-Lak Choi<sup>2</sup> and Yong-Kee Jeong<sup>3</sup>. Department of Biology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea, <sup>1</sup>Department of Pharmacy, University of Pittsburgh, Pittsburgh PA, 15260 USA, <sup>2</sup>Faculty of Natural Resource and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, <sup>3</sup>Department of Life Science and Biotechnology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – A continuous enrichment culture procedure was used to isolate bacteria from various soil sources capable of suppressing large patch disease of turfgrass. Six isolates consistently suppressed large patch in turfgrass, and ranged in the spectrum of extracellular enzymes that they expressed. The best disease-suppressing isolate, TBM912, expressed protease, CMCase, and pectinase activity and inhibited the growth of *Rhizoctonia solani* and *Botrytis cinerea* in vitro. Here we show that this strain also produces an antibiotic that was identified by TLC, SDS-PAGE and HPLC analysis as lipopeptide.

**Key words** – *Bacillus* sp., antifungal compound, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, Disease-suppression

미생물이 생산하는 항생물질은 의약품, 식품 및 농업용 등으로 널리 사용되고 있으며, 의약품으로는 항세균제, 항진균제, 항바이러스제 및 항종양제로서 다양한 물질이 탐색되어 실제로 사용되고 있다. 많은 항생물질 중 lipopeptide계 항생물질은 의약품으로서의 용도 외에 화학계면활성제에 비교하여 생분해력을 가지면서도 저독성인 특징이 있고, 극한의 온도나 pH에서도 안정성을 가지므로 토양과 수질 오염원의 생물학적 정화에 이용가능하다. 또한 다양한 식물병원성 미생물에 대하여 효과가 있으므로 생물학적 병해방제에도 유용하며, 식품, 사료첨가제 및 화장품 등으로도 산업적으로 다양하게 사용될 수 있다[7]. 그래서 lipopeptide계 항생물질을 산업적으로 활용하기 위한 방안은 다양한 측면에서 연구되고 있다.

그 중에서 산업적으로 부가가치가 높은 분야는 미생물농약 개발 분야로서 먼저 미생물이 생산하는 물질의 항균작용을 검증하여 각종 식물병원성 진균에 적용하는 것이다. 화학적 농약보다는 환경에 대하여 친화적으로 화학농약을 대체할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 둘째는 날로 증가되고 있는 유류오염과 각종 화학물질(PAH 등) 오염으로부터 토양과 수질을 보호하기 위한 분야로서 lipopeptide계 물질을 사용하면 처리효율을 높일 수 있는 등 많은 이점이 있으므로 오염된 환경을 정화하는 생물학적 환경처리기술에의 이용이다.

이러한 과정을 통하여 일부 안전성면에서 인체에 무해한 물질은 임상적인 검증을 통하여 의약품으로 개발되고 있다. 현재 lipopeptide계 물질로 많은 물질이 분리, 연구되어 알려

져 있으나 다양한 토착미생물이 생산하는 신기능 및 고기능성 물질의 분리 및 대량생산 체제에 대한 연구는 미흡하므로 경제성이 있는 제품의 산업적인 생산을 위하여 많은 투자와 연구개발이 절실히 요구되고 있다. 최근에는 생명공학기술을 이용하여 lipopeptide계 물질 생산관련 유전자의 해석이 이루어지고 있으나 관련 유전자의 도입에 의한 형질전환 균의 개발수준은 초기 단계에 불과하다. 따라서 생명공학 기술을 이용하여 기능성이 뛰어나면서 효율적으로 lipopeptide계 물질을 생산할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

본 실험에서는 항균, 항바이러스 등 여러 측면에서 유용하며, 폐수정화 및 난분해성 물질의 정화능을 가지는 lipopeptide계 물질을 생산하는 미생물을 잔디병해를 일으키는 식물병원균 저해능을 marker로 하여 토양으로부터 분리, 탐색하였으며, 항균물질을 분리, 그 성질을 보고하고자 한다.

### 실험 및 방법

#### 항균활성 우수 미생물의 분리

각종 토양으로부터 부식토를 채취하여 먼저 집적배양하였으며, 희석평판법으로 각종배지에 도말하여 생성된 콜로니를 1차 선별하였다. 이들을 대상으로 식물병원성 진균의 생육을 저해하는 효과에 기초하여 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 단일 콜로니가 생성되도록 수차례 계대배양을 실시하여, 잔디 및 식물 병원성 진균류인 *Rhizoctonia solani* AG2-2와 *Botrytis cineria*에 대한 항진균 활성이 뛰어난 미생물을 분리하였다[5,6,10].

#### 분리 균주의 등정 및 특성 조사

균주 동정을 위해 분리균주의 생리생화학적 성질을 상법

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-279-7443, Fax : +82-55-279-7449

E-mail : whjoo@changwon.ac.kr

에 의거 조사하였으며[2,8], 또한 배양온도 및 배양배지의 초기 pH 차이에 따른 균주의 생육 특성을 조사하였다.

**16S 리보솜DNA 염기 서열 결정**

보다 정확한 균주동정을 위하여, 각 균주에서 염색체 DNA를 분리하여 primer 1 (5'-GAGTT TGATC CTGGC TCAG-3' [position 9 to 27 *E.coli* 16S rRNA])과 primer 2 (5'-AGAAA GGAGG TGAT CAGCC-3' [position 1542 to 1525 *E.coli* 16S rRNA])를 사용하여 PCR 방법으로 16S 리보솜 DNA를 증폭시켜 염기서열을 결정하였다. 이들의 상동성과 진화학적 거리에 기초하여 균주를 동정하였다.

**항균활성 균주의 세포벽 분해관련 효소 분비 조사**

길항균의 길항기작 중의 하나는 병원성 진균의 세포벽을 이루고있는 물질의 분해나 생성 저해를 통하여 일어난다는 기작이 알려져 있다[1,3,9]. 따라서 분리된 균주의 길항작용 기작을 밝히기 위한 기초 실험으로 세포벽 분해관련 효소의 생성유무가 육안으로 관찰되는 한천확산법(agar diffusion method)으로 pectinase, cellulase, CMCase, xylanase, chitinase 및 protease 활성 유무를 확인하였다[4,11].

**항균물질의 추출**

LB 액체배지 250 ml에 균주를 전배양한 액을 1/100 vol. 이 되게 접종하여 37°C에 180rpm 으로 3일간 진탕배양하였다. 배양한 균주를 6,000 rpm, 4°C에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 얻어 분비한 항균물질로서 추출하였다.

**항균물질의 분리 및 활성확인**

분리균주의 배양액을 원심분리한 배양여액에 pH 2.0이 될 때까지 농염산을 가하였다. 이 반응액을 4°C에서 수시간 반응시켜 침전시킨 후, 원심분리하였다. 생성된 침전물을 10배의 methanol로 진탕하여 추출한 뒤, 감압 농축하여 암갈색의 조추출물을 얻었다. 건조된 조추출물은 녹여서 병원균의 길항능력을 확인하기 위한 inhibition zone 시험에 사용하였다. 추출된 항균물질의 병원균 생육저해 활성을 disc 활성 inhibition zone으로 조사하였다. 이후 분리된 조추출물을 소량의 methanol에 녹여 silica gel column을 사용하여 methanol로서 용출시켜서 4 ml의 분획을 분취하였으며, 받은 각 분획의 활성을 측정하였다. 그리고 Thin layer chromatography (TLC)에 의하여 chloroform/methanol/water (65:25:4)의 전개용매를 사용하여 분리, UV 존재하에서 관찰하였고, ninhydrin 염색액과 지질 발색 시약으로 발색조사하였으며, 대표적인 lipopeptide인 surfactin (Sigma, Co.)을 High Performance Liquid Chromatography (HPLC), SDS-PAGE로 동시에 흘려 항균물질을 결정하였다. HPLC를 통한 surfactin분석에는 Hypersil BDS C18 역상칼럼이 이용되었고, acetonitrile/water의 적정비율(60:40)을 이동상으로 분당 0.5 ml의 flow

rate 조건에서 수행되었다.

**결과 및 고찰**

**우수항균미생물 TBM 912의 선발동정**

강원도 일원에서 분리된 균주 중에서 항균활성이 시판중인 A사의 균주보다 우수한 균주로서 TBM 912임을 확인하여 이하의 실험에 선발하여 사용하였다. 이들의 항균활성을 A사 제품과 비교한 결과 잔디 및 식물병원균인 *Rhizoctonia solani* 와 *Botrytis cinerea*에 대하여 다소 우수한 항균활성을 나타냄을 확인할 수 있었고(unpublished data), Fig. 1, 2에서와 같이 상당한 항균활성을 나타내어 우수균주로 선발하였다.

선발된 균주의 생리·생화학적 특성을 조사한 결과를 Table 1에 나타내었으며, 이들의 그람양성, endospore 형성, catalase 양성 등의 성질에 기초하여 Bergey's manual에 따라 특성을 비교해 본 결과, 균주는 *Bacillus* 속인 것으로 추정



Fig. 1. Inhibition of plant pathogenic *Rhizoctonia solani* on PDA agar by strain TBM 912.

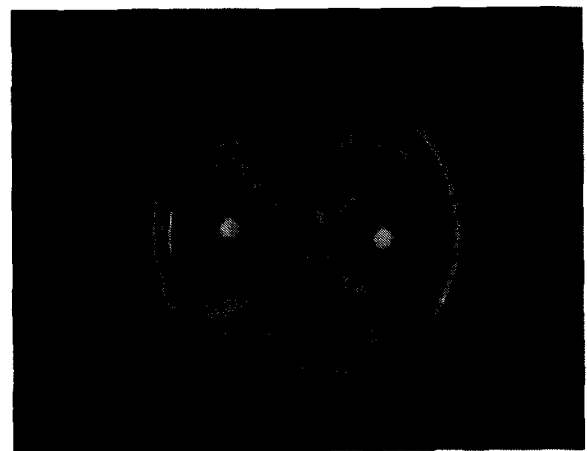


Fig. 2. Inhibition of plant pathogenic *Botrytis cinerea* on PDA agar by strain TBM 912.

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of isolated bacterium

Characteristics	<i>Bacillus</i> sp. TBM 912
Gram strain	+
Cell shape	short rod
Endospore	+
Colony color	white
Catalase	+
Glycerol	+
Erythritol	-
D-arabinose	-
L-arabinose	+
Ribose	+
D-xylose	-
L-xylose	-
Adonitol	-
8-methyl-D-xylose	-
Galactose	-
Glucose	+
Fructose	+
Mannose	+
Sorbose	-
Rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	+
Mannitol	+
Sorbitol	+
α-methyl-D-mannoside	-
α-methyl-D-glucoside	+
N-acetyl glucosamine	-
Amygdalin	-
Arbutin	+
Esculin	+
Salicin	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Lactose	-
Melibiose	+
Sucrose	+
Tregalose	+
Inullin	+
Melezitose	-
Raffinose	+
Starch	+
Glycogen	+
Xylitol	-
Gentiobiose	+
D-turanose	-
D-lyxose	-
D-tagatose	-
D-tagatose	-
D-fucose	-
L-fucose	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-
Gluconate	-
2-ketogluconate	-
5-ketogluconate	-
ONPG	-
Arginine	-
Lysine	-
Ornithine	-
Sodium citrate	-
Sodium thiosulphate	-
Urea	-
Tryptophane	-
Sodium pyruvate	+
Kohn's gelatin	+
NIT	+

되었다. 보다 정확한 동정을 위하여, 균주에서 염색체 DNA를 분리하여 PCR 방법으로 primer (5'-GAGTT TGATC CTG GC TC AG -3'[position 9 to 27 *E.coli* 16S rRNA])과 primer (5'-AGAA A GGAGG TGAT CAGCC-3'[position 1542 to 1525 *E.coli* 16S rRNA])를 사용하여 16S 리보솜 DNA를 증폭시켰다. 그 결과 약 1.5kb의 단편을 얻었으며 아가로스 전기영동으로 확인하였다. 이 단편을 pGEM-T easy 벡터에 서브클로닝하여, 5'-및 3'-말단의 부분적인 염기서열을 결정하였으며(Fig. 3), data bank를 이용하여 상동성을 조사한 결과, 알려진 16S 리보솜DNA와 TBM 912 균주는 *Bacillus subtilis*와 99%의 상동성을 보였다. 따라서 분리 균주를 *Bacillus subtilis*로 동정하였다.

**항균미생물 TBM 912의 세포벽 분해관련 효소의 분비**

분리균주의 길항작용 기작을 밝히기 위하여 항균미생물 TBM 912가 분비하는 세포벽 분해관련 효소의 생성유무가 육안으로 관찰되는 한천확산법 (agar diffusion method)으로 pectinase, cellulase, CMCase, xylanase, chitinase 및 protease 활성 유무를 확인한 결과, 분리균주 TBM 912 균주에서는 protease, CMCase, pectinase를 분비하였으며, 그 결과 중 pectinase 분비 결과만 Fig 4에 나타내었다. 이 결과에서 세포외 효소는 다수 분비됨이 확인되었으나 식물병원균 세포벽 분해관련 핵심적인 효소인 chitinase 등은 분비되지 않았다. 이 사실에서 분비 효소는 항균효과를 나타내는 주요인자는 아닌 것으로 판단된다.

**항균미생물 TBM 912의 항균물질**

산침전을 통해 methanol 추출에서 530 mg의 물질을 얻었다. 다시 알칼리성 물 60 ml에 완전히 녹였고, Bradford 법으로 단백질량을 측정된 결과 197 µg/ml이었다. 60 ml에 총 단백질성 물질은 12 mg정도이다. 이들 정제 물질의 항균활성도 다시 조사하였다(Fig. 5). 또한 TLC로 전개하여 발색시약(2% ninhydrin in acetone)으로 발색 후 heating하였고, 발색시약 (ethanol: sulfuric acid : 5% phenol (70:20:10))으로 발색 후 heating하여 물질을 확인하였다. Peptide 발색에서 1개가 Rf : 0.28, lipid 발색에서 7개가 Rf : 0.93, 0.68, 0.37, 0.28, 0.23, 0.20, 0.18에서 관찰되었다. 이 중에서 Rf 가 0.28인 spot이 동시에 발색되었으며 이것은 lipopeptide로서 항균활성을 나타내는 균주의 항균활성의 주체로 판단된다. 한편 SDS-PAGE 법으로 대표적인 lipopeptide인 surfactin과 iturin을 시료와 동시에 흘려 비교한 결과, 사용 분리균주는 surfactin과 iturin을 동시에 생산하는 균주로 확인되었으며, surfactin을 iturin보다 많이 생산함을 알 수 있었다. TLC에서 iturin이 극히 소량이므로 관찰되지 않았으며 SDS-PAGE 상에서도 신경을 써야 관찰할 수 있는 정도였다(Fig. 6).

또한 이 분석을 HPLC를 이용, acetonitrile/water (60 : 40)의 이동상으로 surfactin 표준물질과 비교, 분석한 결과를

```

5' CGTTGTAAAC GACGGCCAGT GAATTGTAAT ACGACTCACT ATAGGGCGAA TTGGGCCCGA CGTCGCATGC 70
TCCCGGCCGC CATGGCGGCC GCGGGAATTC GATTGAGTTT GATCCTGGCT CAGGACGAAC GCTGGCGGCG 140
TGCCTAATAC ATGCAAGTCG AGCGGACAGA TGGGAGCTTG CTCCTGATG TTAGCGGCGG ACGGGTGAGT 210
AACACGTGGG TAACCTGCCT GTAAGACTGG GATAACTCCG GGAAACCGGG GCTAATACCG GATGTTTGTT 280
TGAACCGCAT GGTTCAGACA TAAAAGGTGG CTTCGGCTAC CACTTACAGA TGGACCCGCG GCGCATTAGC 350
TAGTTGGTGA GGTAACGGCT CACCAAGGCA ACGATGCGTA GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCACACTG 420
GGACTGAGAC ACGGCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGA CGAAAGTCTG 490
ACGGAGCAAC GCCGCTGAG TGATGAAGGT TTTCGGATCG TAAAGCTCTG TTGTTAGGGA AGAACAAGTG 560
CCGTTCAAAT AGGGCGGCAC CTTGACGGTA CTAACCAGA AAGCCACGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG 630
CGGTAATACG TAGGTGGCAA GCGTTGTCCG GAATTATTGG GCGTAAAGGG CTCGCANGCN GTTCTTAAAG 700
TCTGATGTGA AAGCCCCCG CTCAACCGGG GANGTCAATT GGAAACTGGG GAACCTGAG. .... 759
.....
GCTAACGCAT TAAGCACTCC GCCTGGGGAG TACGGTCGCA AGACTGAAAC TCAAAGGAAT TGACGGGGGC 784
CCGCACAAGC GGTGGAGCAT GTGGTTAAT TCGAAGCAAC GCGAAGAACC TTACCAGGTC TTGACATCCT 854
CTGACAATCC TAGAGATAGG ACGTCCCCTT CGGGGCAGA GTGACAGGTG GTGCATGGTT GTCGTCAGCT 924
CGTGTCGTGA GATGTTGGGT TAAGTCCCGC AACGAGCGCA ACCCTTGATC TTAGTTGCCA GCATTCAAGT 994
GGGCACTCTA AGGTGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAATCA TCATGCCCCT 1064
TATGACCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GGCAGAACA AGGGCAGCGA AACCGCGAGG TTAAGCCAAT 1134
CCCACAAATC TGTTCTCAGT TCGGATCGCA GTCTGCAACT CGACTGCGTG AAGCTGGAAT CGCTAGTAAT 1204
CGCGGATCAG CATGCCCGG TGAATACGTT CCCGGCCCTT GTACACACCG CCCGTCACAC CACGAGAGTT 1274
TGTAACACCC GAAGTCCGTG AGGTAACCTT TTAGGAGCCA GCCGCCGAAG GTGGGACAGA TGATTGGGGT 1344
GAAGTCGTAA CAAGTAGCC GTATCGGAAG GTGCGGCTGG ATCACCTCCT TTCTAA 3' 1400
    
```

Fig. 3. 16S rDNA partial sequence of *Bacillus* sp. TBM 912.

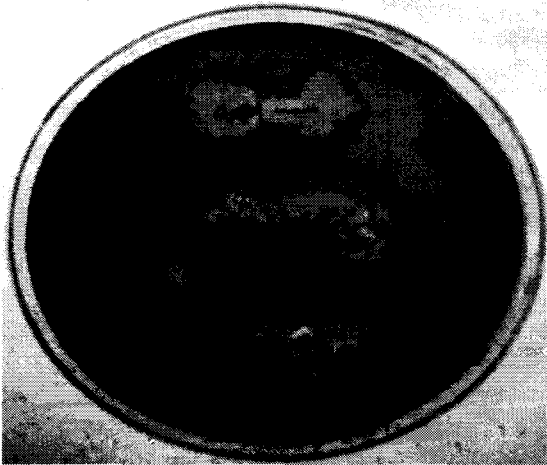


Fig. 4. Detection of pectinase by agar diffusion method. (middle : *Bacillus* sp. TBM 912)



Fig. 5. Inhibition of plant pathogenic *Rhizoctonia solani* on PDA agar by purified antifungal compound. (left: 100 µl (20 µg), right: control (1 M NaOH))

Fig. 7에 나타내었다. 이로써 *Bacillus* sp. TBM 912가 생산하는 대표적인 향균물질의 주체가 surfactin계 물질로 추정되었다.

본 실험에 사용된 분리균주는 농업, 의학 및 공업의 다양한 영역에서 활용될 가능성이 높은 균주로서 지속적으로 그 가

능성을 다양한 분야에서 검증하여 나갈 필요성이 있을 것으로 판단된다.

마지막으로 본 분리균주는 안정성 검사에서 정상적인 식물의 활동에는 영향이 전혀 없었고 익충(누에)에도 영향이 없다

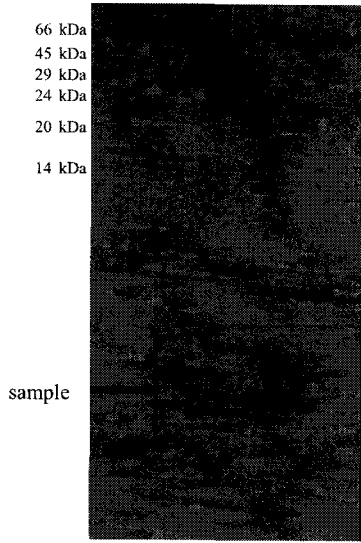
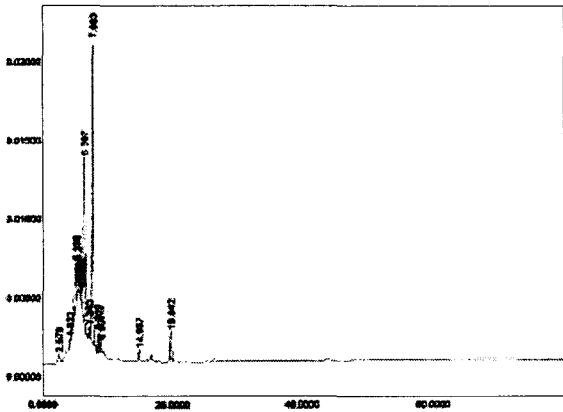
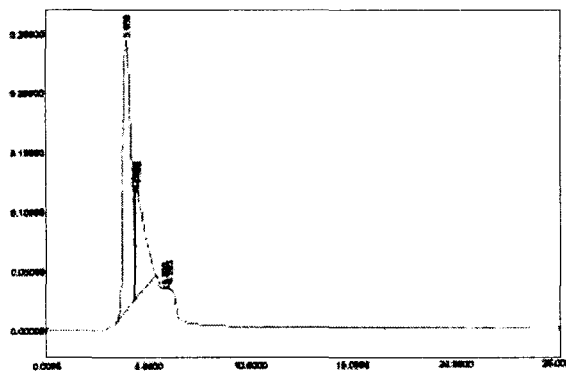


Fig. 6. SDS-PAGE of isolated lipopeptide.



A) Surfactin



B) Fraction of extracts

Fig. 7. HPLC spectra of isolated lipopeptide.

It had a retention time of 5.3 min, standard surfactin had a retention time of 5.3 min. Separation was achieved on a Hypersil BDS C18 reverse-phase column.

는 것이 검증되어 미생물농약소재로 사용될 수 있음이 확인되었다(unpublished data). 토착미생물을 여러 가지 용도로 개발함은 국가 기술의 핵심적인 요소로 특히 토착미생물을 농업적으로 활용함으로써 변화하는 소비자의 기호에 부응하고 나아가 수출을 위한 안전농산물생산으로 외화획득에도 이바지할 수 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 2001년도 경상남도 생명공학산업화과제 연구비와 2002년도 창원대학교 연구비의 지원으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

1. Fridlender, M., J. Inbar and I. Chet. 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by a B-1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* **25**, 1211-1221.
2. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. pp. 559-564, 9th eds., Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
3. Inbar, J. and I. Chet. 1991. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil-borne plant pathogens by this bacterium. *Soil Biol. Biochem.* **23**, 973-978.
4. Lingappa, Y. and J. L. Lockwood. 1961. Chitin media for selective isolation and culture of actinomycetes. *Phytopathology* **52**, 317-323.
5. Nelson, E. B. and C. M. Craft. 1992. A miniaturized and rapid bioassay for the selection of soil bacteria suppressive to *Pythium* blight of turfgrasses. *Phytopathology* **82**, 206-210.
6. Paulitz, T. C., T. Zhou and L. Rankin. 1992. Selection of biological control of *Pythium aphanidermatum* on hydroponically grown cucumber. *Biol. Control* **2**, 226-237.
7. Ron, E. Z. and E. Rosenberg. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* **3**, 229-236.
8. Schaad, N. W. 1988. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 2nd eds. St. Paul: American Phytopathological Society Press.
9. Scher, F. and R. Baker. 1980. Mechanism of biological control in a *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathology* **70**, 412-417.
10. Toyota, K. and M. Kimura. 1993. Colonization of chlamydospores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* by soil bacteria and their effects on germination for rhizosphere bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **25**, 193-197.
11. 山里一英, 宇田川俊一, 兒玉徹 and 森地敏樹. 1986. 微生物の分離法. R&Dプランニング, Tokyo.