

작물병원성 곰팡이에 대한 *Bacillus licheniformis* KMU-3의 항진균활성과 배양조건

박성민 · 한선희¹ · 유대식*
계명대학교 미생물학과, ¹대구보건대학 안경광학과

Culture Conditions and Antifungal Activity of *Bacillus licheniformis* KMU-3 against Crop Pathogenic Fungi. Park, Sung-Min, Sun-Hee Han¹, and Tae-Shick Yu*. Department of Microbiology, Keimyung University, Taegu 701-704, Korea, ¹Department of Ophthalmic Optics, Daegu Health College, Taegu 702-722, Korea – *Bacillus licheniformis* KMU-3 shown a strong antifungal activity was isolated from Swedish forest soils. *B. licheniformis* KMU-3 produced a maximum level of antifungal substance under incubation aerobically at 24°C for 24 hours in LB broth containing 1.0% sodium acetate, 1.0% ammonium sulfate at 180 rpm and initial pH adjusted to 8.0. Chloroform extraction of culture broth was confirmed inhibitory zone by plate assay and Rf value 0.49 substance by thin layer chromatography (TLC) represented high antifungal activity against *Rhizoctonia solani* AG-1. This substance also exhibited against *Rhizoctonia solani* AG-4, *Colletotrichum orbiculare*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium oxysporum*, and *Fusarium graminearum*.

Key words: *Bacillus licheniformis* KMU-3, *Rhizoctonia solani* AG-1

Bacillus 속은 오랜 세월동안 식품 및 각종 발효산업에서 널리 사용되어진 속주세포로써 산업적으로 중요한 속이다. *Bacillus* 속에는 다양한 종이 있고 이 중 대부분이 비 병원성이며 비교적 유전자조작이 용이하며 배양이 간단하고 단 백질이나 대사산물을 잘 분비하기 때문에 발효에 의한 물질 생산용 속주로 적합한 균주로 사용되어져 왔다. 오늘날 상업적으로 생산되는 *Bacillus* 발효산물로는 연간 전체 효소생산의 절반 이상에 이르는 각종 효소[1], 항생물질[8], 살충제[2], 식품 풍미개선제용인 nucleotides와 nucleosides[3], 그리고 아미노산[12] 등이 있다.

*Bacillus*속이 생산하는 항진균물질들은 종에 따라 다양하여 *B. subtilis*가 생산하는 것에는 subtilin, surfactin, rhizotocins, alboleutin, bacillomycin, bacilysin, botycin, fengycin, iturin, mycosubtilin 등으로 *Bacillus* 속에서 가장 많은 보고가 있으며, *B. licheniformis*로부터의 bacitracin, *B. brevis*로부터의 brevistin, edeines, gramicidin, gramicidins 등이, *B. circulans*로부터의 polypeptins, EM49, *B. mesentericus*로부터의 esperin, *B. polymyxa*로부터의 tridecaptins 등이 있다. 이들 대부분은 peptide antibiotics라고 알려져 있으며 이 물질들의 생물학적, 분자생물학적 특성에 관한 많은 연구들이 보고되고 있다. *Bacillus* 속의 많은 항진균물질들 중 *B. licheniformis*로부터는 bacitracin이 보

고되고 있는데, 이는 branched cyclic peptide antibiotic으로 D형 아미노산 4개를 지닌 12개의 peptide로 각각 249, 335, 380 KDa으로 알려져 있다[14].

이러한 *Bacillus* 속과 다른 미생물이 생산하는 효소들을 이용한 산업적인 측면 중, 생물농약으로 이용하고자하는 연구는 현재 활발하게 진행되고 있으며, 매년 크게 발전을 거듭하여 올해에는 세계농약 시장의 10%를 차지할 것으로 기대되고 있다. 화학농약의 대체방안으로 대두되고 그 중 미생물의 길항작용을 이용하여 생태학적으로 병원균의 활동을 억제하며 근권토양 중 식물병원균에 대한 길항미생물의 분포나 밀도를 증가시키는 미생물농약은 항생물질에 의한 항생작용[5, 6, 7], siderophore를 통한 Fe³⁺에 대한 경쟁적 길항작용[9, 10, 11], 식물병원성 진균세포벽 가수분해효소[13] 등으로 크게 3가지로 나누어 볼 수 있다.

본 연구에서는 스웨덴 산림지역의 토양시료로부터 작물병원성 곰팡이를 억제하는 길항균주를 선별하고 그 길항균주가 생산하는 항진균물질의 생산조건을 검토하고 항생물질의 정제를 하고자 한다.

재료 및 방법

균주선별 및 사용배지

스웨덴 산림지역의 토양시료 30 g을 270 ml의 무균수에 넣어서 shaking incubator로 10분간 진탕배양 후, 항생물질을 생산하는 *Bacillus* 속의 균주를 분리하기 위하여 80°C water bath에서 30분간 열처리하고 LB agar배지(1.0%

*Corresponding author
Tel: 82-53-580-5252, Fax: 82-53-580-5164
E-mail: tsyu@kmu.ac.kr

tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% sodium chloride, pH = 7.0 ± 0.2)에 접종하여 생존하는 균주를 분리하였다. 분리된 균주들을 대상으로 작물병원성 곰팡이를 방제할 수 있는 길항균주의 분리 및 선발을 위하여 PDA(potato dextrose agar, 2.0% dextrose, 0.4% potato starch, 1.5% bacto agar, pH=5.6 ± 0.2)에서 대치배양(paring culture)을 실시하여 항진균활성을 나타내는 균주들을 분리하였다. 발육 저지대를 측정하기 위하여 작물병원성 곰팡이를 직경 6mm 크기의 culture disc로 접종하고 24°C에서 24시간 배양한 후 3cm 떨어진 곳에 선별한 균주를 희석접종하고 24°C에서 계속 배양하여 병원성 진균의 성장 억제거리를 확인하였다. 실험에 사용한 작물병원성 곰팡이는 *Botrytis cinerea* KACC 40573, *Colletotrichum orbiculare* KACC 40808, *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804, *Cladosporium cucumerinum* KACC 40576, *Rhizoctonia solani* AG-1 KACC 40101, *Rhizoctonia solani* AG-4 KACC 40142, *Fusarium graminearum* KACC 41040, *Fusarium oxysporum* KACC40052를 농촌진흥청 농업생명공학연구원 한국농용미생물보존센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양받아 사용하였다.

분리균주의 동정

선발된 길항균주의 분류학적 동정을 위하여 현미경을 통한 형태관찰, 그람염색, catalase 활성측정과 API CHB 50 test(BioMerieux, France) 및 20E kit(BioMerieux, France)를 사용하였다.

항진균물질의 생산을 위한 배양조건

항진균물질의 생산을 위하여 기본배지로 LB broth를 사용하였으며, 배지 종류에 따른 항진균물질의 생산력을 검토하기 위하여 LB broth, YM broth(0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1.0% dextrose), PDB(2.0% dextrose, 0.4% potato starch), TSB(1.7% digest of casein, 0.3% soytone, 0.5% sodium chloride, 0.25% dextrose)배지를 제조하여 pH 7.0으로 조정하여 121°C, 10분간 멸균하였다. 전 배양액은 24시간 전에 LB broth에 단일 콜로니를 접종하여 사용하였다. 각각의 삼각플라스크에 전 배양액 100 μ l 접종한 후, 이들을 30°C, 150 rpm에서 24시간 배양하였다. 항진균활성을 검토하기 위하여 배양액을 10,000 rpm 10분간 4°C에서 원심분리하여 균체를 침전시키고 agar diffusion method로 공기균주를 접종하여둔 PDA plate에 상등액 20 μ l를 접종한 paper disc(Φ 6 mm)에 얹고, 24°C에서 72시간 배양하면서 항진균활성을 관찰하였다.

항진균물질생산에 미치는 탄소원의 영향

항진균물질생산에 미치는 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 arabinose, fructose, glucose, lactose, maltose, mannitol,

sorbitol, starch, sucrose, sodium acetate를 사용하였다. 탄소원의 농도는 기본배지에 각각 1.0%로 첨가하였다.

항진균물질생산에 미치는 질소원의 영향

기본배지에 가장 많은 항진균물질을 생산한 탄소원을 첨가하고, 질소원으로 ammonium sulfate, urea, ammonium phosphate, ammonium chloride, ammonium nitrate, tryptone, malt extract, beef extract, yeast extract, bacto peptone, polypeptone, CLS(corn steep liquor)를 1.0% 첨가하여 배지를 제조하였다.

항진균물질생산에 미치는 배양온도 및 pH의 영향

항진균물질생산을 위한 최적 온도와 pH의 규명은 기본배지에 선택된 탄소원과 질소원을 첨가한 배지를 사용하여 항진균활성을 조사하였다. 배양온도에 따른 항진균활성은 각각의 삼각플라스크에 전 배양액 100 μ l를 접종한 후, 24, 30, 37, 45°C에서 150 rpm, 24시간 배양하여 조사하였다.

pH의 영향은 0.5N NaOH와 0.5N HCl을 사용하여 pH 3.0에서 10.0으로 각각 1.0 단위로 조정하여 24°C에서 150 rpm, 24시간 배양하여 조사하였다.

항진균물질생산에 미치는 진탕속도 및 배양일수의 영향

항진균물질의 생산을 위한 최적배지를 제조한 후, 이들을 정지배양, 50, 100, 150, 180, 200 rpm의 속도로 24°C에서 1일간 배양한 후 작물병원성 곰팡이에 대한 이들의 항진균활성을 관찰하였다.

배양시간에 따른 항진균물질의 생산을 검토하기 위하여 24-72시간동안 배양한 후, 배양액을 24시간마다 sampling 하여 각각의 항진균활성을 검토하였다.

항진균물질의 조정제

길항세균으로부터 생산된 항진균성 항진균물질을 정제하기 위하여 최적 생산배지에서 500 ml 배양한 후, 배양액을 원심분리하고 상등액에 2배 volume의 chloroform을 첨가하여 활성물질을 용매층으로 이행시킨 후, 50°C 이하에서 감압농축하였다. 이어 감압농축된 추출물을 TLC(silica gel 60F₂₅₄, Merck) plate상에 전개하여 확인하였다.

결과 및 고찰

항진균물질 생산 균주의 선발

토양시료에서 분리한 108 균주를 대상으로 작물병원성 곰팡이를 방제할 수 있는 길항균주의 분리 및 선발을 위하여 PDA plate 상에서 대치배양(paring culture)을 실시하여 항진균활성을 나타내는 8개의 콜로니를 최종적으로 분리하였다. 이 중에서 작물병원성 곰팡이에 대하여 가장 우수한 항진균활성을 나타내는 콜로니를 선별하고 KMU-3이라 명명

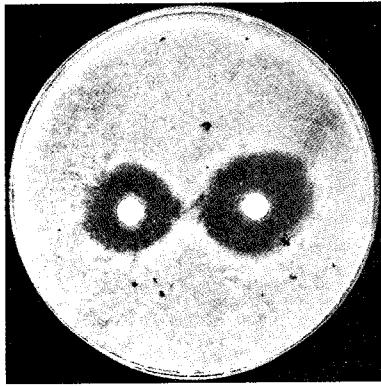


Fig. 1. Inhibition zone of *Rhizoctonia solani* AG-1 by *B. licheniformis* KMU-3 on PDA. Left: cultured broth (20 µl). Right: concentration of cultured broth extracted by chloroform.

하였다. KMU-3의 동정을 위하여 현미경적 관찰과 Gram 염색 결과와 몇몇 생화학적 성상 실험을 바탕으로 한 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[4] 조사와 API CHB 50 test와 20E kit을 사용하여 24-48시간 동안 관찰한 후, API LABplus(V. 3. 3. 3) 프로그램을 이용하여 동정한 결과 이들은 *Bacillus* 속으로 판명되었으며, *B. licheniformis*와 99.4%의 상동성을 나타내었다. 이에 KMU-3를 *B. licheniformis* KMU-3이라 명명하였다. *B. licheniformis* KMU-3은 라이족토니아병을 유발하는 *R. solani* AG-1 KACC 40101에 대하여 가장 높은 항진균활성을 나타내었다(Fig. 1). 그리고 다른 작물병원성 곰팡이에 대한 항진균활성의 스펙트럼을 확인한 결과, *Rhizoctonia solani* AG-4 KACC 40142, *Fusarium graminearum* KACC 40140, *Cladosporium cucumerinum* KACC 40576에 대한 항진균활성도 나타내었다.

기본배지로 LB broth, YM broth, PDB, TSB를 사용하여 항진균활성을 관찰한 결과 Table 1에 나타난바와 같이, LB broth에서 가장 높은 항진균활성을 나타내었다.

항진균물질의 생산을 위한 최적배지조건

기본배지로 LB broth를 사용하여 *B. licheniformis* KMU-3의 항진균물질생산을 위한 다양한 탄소원의 영향을 검토하였다. 전분질과 당류 등의 탄소원을 각각 1.0% 첨가한 기본배지에 공시균주를 접종하여 24시간 30°C, 150 rpm으로 진탕 배양한 후, 생육도를 측정하고, 배양액을 원심분리하여 상등액 20 µl를 paper disc에 얹고, 항진균활성을 72시간 관찰하였다. 그 결과 Table 2에서 나타난 것처럼, *B. licheniformis*

Table 1. Effect of different broth.

Media	Clear zone (Φ mm)
LB	16
YM	12
PDB	0.8
TSB	12

KMU-3은 starch를 첨가한 배지에서 최대 생육을 나타내었으나 항진균활성은 sodium sulfate를 사용한 배지에서 가장 높게 나타내었다.

항진균물질의 생산을 위한 다양한 질소원의 영향을 검토하기 위하여 기본배지인 LB broth에 탄소원으로 1.0% sodium acetate를 첨가한 후, 유·무기질소원을 각각 1.0%씩 첨가하고 pH를 7.0으로 조정하여 사용하였다. *B. licheniformis* KMU-3은 yeast extract를 첨가하였을 때 최대의 생육을 나타내었지만, urea를 첨가한 경우 생육이 일어나지 않는 것으로 미루어보아 urea가 존재할 때 이들의 생육이 저해됨을 알 수 있었으며 향후의 연구에서 이 부분에 대하여 조사해볼 필요성을 나타내었다. 항진균물질의 생산은 Table 3에 나타난 바와 같이 질소원으로 ammonium sulfate를 첨가한 배양액에서 가장 높은 항진균물질의 생산을 나타내었지만 기본배지와 그 차이가 나지 않는 것으로 미루어보아 기본배지에 함유된 질소원 이외의 다른 특이적인 질소원에 대한 요구성은 나타내지 않았다.

온도, pH, 시간에 따른 항진균물질 생산성

B. licheniformis KMU-3의 생육은 37°C가 가장 양호하였

Table 2. Effect of various carbon sources.

Carbon sources	Growth (OD _{660nm})	Clear zone (Φ mm)
Control	1.88	16
Arabinose	1.72	14
Fuctose	1.87	13
Glucose	1.70	14
Lactose	1.80	14
Maltose	1.76	16
Mannitol	1.91	14
Sorbitol	1.76	14
Starch	1.92	13
Sucrose	1.81	14
Sodium acetate	1.46	19

Table 3. Effect of various nitrogen sources.

Nitrogen sources	Growth (OD _{660nm})	Clear zone (Φ mm)
Control	1.60	18
Ammonium phosphate	1.17	10
Ammonium sulfate	1.33	18
Ammonium chloride	1.23	11
Ammonium nitrate	1.29	14
Beef extract	1.49	15
Bactopeptone	1.62	15
CLS	1.52	12
Malt extract	1.40	13
Polypeptone	1.64	15
Tryptone	1.61	15
Urea	0.08	0
Yeast extract	1.71	16

Table 4. Effect of various culture temperature.

Temperature (°C)	Growth (OD _{660nm})	Clear zone (Φ mm)
24	1.46	22
30	1.79	18
37	2.11	0
45	2.05	0

Table 5. Effect of pH.

pH	Growth (OD _{660nm})	Clear zone (Φ mm)
3.0	0	0
4.0	0	0
5.0	1.77	17
6.0	1.79	18
7.0	1.82	22
8.0	1.87	23
9.0	0.34	7
10.0	0	0

Table 6. Effect of agitations.

rpm	Growth (OD _{660nm})	Clear zone (Φ mm)
0	0.40	8
50	0.86	10
100	1.36	12
150	1.52	19
180	1.66	24
200	1.65	20

으나 항진균물질의 생산성은 24°C가 가장 양호한 것으로 나타났다. 공시균주를 24-30°C에서 배양하였을 때 항진균물질은 생산되었지만 37°C 이상에서는 균이 증식이 활발한 것과 대조적으로 항진균물질의 생산이 되지 않는 것으로 미루어보아 특이적인 온도에서 항진균물질의 생산이 이루어진다는 것을 알 수 있었다.

기본배지인 LB broth에 탄소원인 sodium acetate를 1.0% 첨가한 후, 항진균물질의 생산을 위한 pH의 영향을 조사한 결과, 균의 성장 및 항진균물질의 생산성은 pH 8.0에서 가장 높게 나타났으며 pH 3.0, 4.0, 10.0에서는 생육하지 못하였다.

B. licheniformis KMU-3을 항진균물질 생산의 최적배지에 접종한 후, 진탕속도에 의한 항진균물질의 생산성을 조사한 결과, Table 8에서처럼 180 rpm에서 가장 높은 공시균주의 성장 및 항진균물질의 생산성을 나타내었다.

배양 시간에 따른 항진균물질의 생산성은 24시간과 48시간에서 거의 차이를 나타내지 않았으며, 이 결과로 24시간의 배양에 의하여 항진균물질의 최대생산이 이루어진다는 것을 알 수 있었다.

항진균물질의 조정제

항진균물질의 조정제를 위하여 최적생산조건에서 *B. licheniformis* KMU-3을 진탕배양했다. 배양액을 원심분리하

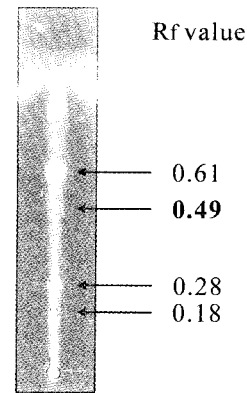


Fig. 2. TLC analysis of chloroform extract. The antifungal compounds were extracted with chloroform and chromatographed on silica gel plate (Silica gel 60 F₂₅₄) with methanol and chloroform (9 : 1).

고 상등액에 2배의 chloroform을 첨가하여 활성물질을 용매층으로 이동시킨 후, 50°C 이하에서 감압농축하였다. 이어 감압농축된 추출물을 1/10 volume의 methanol에 녹인 후, 전개용매로 methanol : chloroform = 9 : 1을 사용하여 TLC로 분석하여본 결과 Fig. 2에서와 같이 UV 365 nm에서 4개의 밴드를 확인할 수 있었다. 전개된 각각의 밴드를 회수하여 methanol에 녹인 후, 다시 감압농축하여 항진균활성을 검토한 결과, Rf 값이 0.49를 나타낸 3번째 위치의 밴드에서 항진균활성을 높게 나타내었다. 그러나, 다른 밴드에서는 항진균활성을 나타내지 않는 것으로 미루어볼 때 *B. licheniformis* KMU-3의 항진균활성은 3번째 밴드의 물질로부터 나타나는 것으로 확인되었다.

항진균력을 나타내는 물질에 대한 구체적인 연구는 차후에 진행할 예정이다.

요 약

스웨덴 산림지역의 토양시료로부터 분리한 *Bacillus licheniformis* KMU-3의 작물병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성 및 항진균물질의 생산조건에 대하여 검토했다. *B. licheniformis* KMU-3은 *Rhizoctonia solani* KACC 40101에 대하여 높은 항진균활성을 나타내었다. 항진균물질 생산을 위한 최적배양조건은 탄소원으로 1.0% sodium acetate, 질소원으로는 1.0% ammonium sulfate, 24°C, pH 8.0, 180 rpm, 24시간 진탕배양하였을 때 가장 높은 항진균활성을 나타내었다. TLC 상에서 Rf값이 0.49인 밴드에 나타난 물질에서 항진균활성이 확인되었으며, 이물질은 *Rhizoctonia solani* AG-4 KACC 40142, *Colletotrichum orbiculare* KACC 40808, *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804, *Cladosporium cucumerinum* KACC 40576, *Fusarium graminearum* KACC 41040, *Fusarium oxysporum* KACC 40052에 대하여서도 높은 항진균활성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Arbige, M. V. and W. H. Pitcher. 1989. Industrial enzymology; a look towards the future. *Trends Biotechnol.* **7**: 330-335.
2. Bella, L. A., R. M. Faust, R. Andreus, and G. Steven. 1983. *Molecular Biology of the Bacilli*, pp. 186-210. Academic Press Inc., Orlando, Fla.
3. Demain, A. L. 1987. Production of nucleotides by microorganism, pp. 178-208. *In Primary Products of Metabolism*, vol. 2, Academic Press Inc., London.
4. Holt, J. G., N. R. Kring, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th, Williams & Wilkins, U.S.A.
5. Kim, H. R. 1994. Antifungal antibiotics of antiagonistic bacterium *Bacillus* sp. YH-16 against *Fusarium solani* causing plant root rot. Ph. D. Thesis, Yeungnam University.
6. Kim, S. H., H. J. Suh, and C. O. Kim. 1993. Taxonomy, purification and physicochemical properties of novel antifungal antibiotic AF-011A. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 556-536.
7. Kim, Y. S. and S. D. Kim. 1994. Antifungal mechanism and properties of antibiotic substances produced by *Bacillus subtilis* YB-70 as a biocontrol agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 296-304.
8. Kleinkauf, H. and H. Dohren. 1983. Non-ribosomal peptide formation on multifunctional proteins. *Trends Biochem. Sci.* **8**: 281-283.
9. Lee, J. M., S. H. Lim, T. H. Chang, and S. D. Kim. 1999. Isolation of siderophore producing *Pseudomonas fluorescens* GL7 and its biocontrol activity against root rot disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 427-432.
10. Lim, H. S., J. M. Lee, and S. D. Kim. 2002. A plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* GL20 - mechanism for disease suppression, outer membrane receptors for ferric siderophore, and genetic improvement for increased biocontrol efficacy. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 240-249.
11. Lim, H. S. and S. D. Kim. 1997. Role of siderophores in biocontrol of *Fusarium solani* and enhanced growth response of bean by *Pseudomonas fluorescens* GL20. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 13-20.
12. Priest, F. G. 1989. Products from Bacilli, pp. 293-315. *In Handbook of Biotechnology*, Plenum Press, NY.
13. Shin, Y. J. 2000. Isolation, characteristics and structural analysis of the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. Ph. D. Thesis, Dongeui University.
14. Zuber, P., Nakano, M. M. and M. A. Marahiel. 1993. Peptide Antibiotics, pp. 897-916. *In Bacillus subtilis and other Gram-positive Bacteria*, American Society for Microbiology Press.

(Received Mar. 25, 2005/Accepted May 20, 2005)