

Chitinase 생산 저영양세균의 분리 및 계통분류학적 특성

김주진 · 김민영 · 구분성 · 유상홍 · 여윤수 · 박인철 · 김윤지¹ · 이종화² · 황경숙^{1,2*}
농촌진흥청 농업생명공학연구원 미생물기능팀, ¹목원대학교 생명산업학부, ²미생물생태자원연구소

인삼 근권토양으로부터 분리된 총 640 저영양세균 중 유일한 탄소원으로 colloidal chitin을 첨가한 배지에서 투명 환을 나타낸 8 균주를 선별하였다. 대부분의 균주가 chitin의 형광성 유사체인 4-methylumbelliferyl D-N,N'-diacetylchitobioside (MUF-diNAG)을 분해하였고, CR-42균주의 경우 4-methylumbelliferyl-D-glucosaminide (MUF-NAG)를 분해하였다. 이들 chitinase 생산균주의 16S rDNA 염기서열을 결정하여 계통학적 위치를 확인한 결과 5개의 주요한 계통군: proteobacteria γ -subdivision (3 균주), proteobacteria β -subdivision (1 균주), Actinobacteriaceae (1 균주), Bacillaceae (1 균주) 그리고 Bacterioidetes (2 균주)로 분류되었다. 이들 분리균주 중 WR164와 CR18 균주는 16S rDNA 염기서열의 유사도가 미배양 및 미동정 등록균주와 97% 미만으로 나타나 신 규미생물로 제안할 수 있는 균주로 예상되었다. 한편 CR2와 CR75 chitinase 생산균주는 인삼 탄저 병원균인 *Colletotrichum gloeosporioides*의 성장을 저해하는 것으로 나타났다.

Key words □ chitinase, *Colletotrichum gloeosporioides*, MUF-diNAG, MUF-NAG, oligotrophic bacteria

최근 점진적으로 확대되고 있는 농산물 수입 개방에 따라 농업의 경쟁력 제고가 어느 때보다 중요한 과제로 떠오르고 있다. 화학비료 사용량이 지속적으로 늘면서 그로 인한 부작용이 확대되는 현실은 비단 우리나라만의 문제가 아니다. 화학비료의 과다 사용과 그로 인해 도래할 재앙을 회피하기 위한 국제사회의 노력도 점차 강화되고 있다. 유엔환경개발회의(UNCED)는 각국의 화학농약 사용량을 25%씩 줄이도록 권장하고 있으며, 우리나라도 2010년까지 화학비료는 40%, 합성농약은 50%까지 사용량을 감축시키겠다고 발표한 바 있다. 화학농약과 합성농약의 사용량을 대폭 감축하면서도 농업생산력을 유지하기 위해서는 대체농약의 개발이 불가피한 바, 생물농약은 화학비료와 합성농약을 대체할 유일한 대안이라고 할 수 있다.

그리하여 이미 1980년대부터 세계의 우수한 기업들도 막대한 수익이 보장된 생물농약 개발을 위한 투자를 아끼지 않고 있다. 우리나라에서는 생물농약 매출이 전체 농약시장 매출의 0.16%에 불과한 상태이지만, 향후 생물농약의 점유율은 급속하게 증가할 것으로 예상된다.

미생물을 이용한 생물방제법으로 chitin을 분해할 수 있는 가수분해효소에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(8, 9, 10, 12, 26, 32). Chitin은 β -(1,4) N-acetyl-D-glucosamine의 다량체로서 각종 갑각류의 외피, 곰팡이 세포벽의 구성성분이다. 이러한 chitin을 분해하는 효소에는 chitin의 N-acetyl-1,4-glucosamine linkage를 임의로 가수분해하여, chitin 올리고당을 생산하는 endochitinase (EC 3.2.1.14), N,N'-diacetylchitobiose를 분해하는

chitobiase (EC 3.2.1.30), chitin의 비환원성 말단으로부터 chitobiose 또는 N-acetylglucosamine을 생산하는 exochitinase 등이 보고 되었다(5).

해양 및 토양으로부터 분리된 키틴분해 미생물의 대부분은 방선균으로 이들 방선균 중 *Streptomyces griseus*, *S. orientalis*, *S. erythraeus*로부터 chitinase 정제효소가 시판(Sigma) 되고 있다(4, 24, 30). 키틴분해 세균의 동정에 관한 보고는 비교적 미흡한 형편으로 *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Vibrio* 등이 보고 되었다. 특히 *Enterobacter liquefaciens* CDC2149-57, *Serratia marcescens* QM B1466 및 Monreal과 Reese에 의해 분리된 30종의 균주가 강력한 chitinase 생산균주로 알려져 있다(21). 그러나 이 같은 다수의 발견에도 불구하고 낮은 활성, 독성, 저항성 등으로 인하여 실용적으로 이용할 수 있는 물질은 소수에 불과하다. 최근 들어 이 같은 문제를 해결하기 위한 여러 방안이 모색되어지면서 희귀미생물의 분리 및 배양법 등이 검토되고 난배양성 미생물로부터 chitinase를 분리하기 위한 메타게놈 연구가 활발히 진행되고 있다(18, 19, 20).

토양 중에는 다종다양한 미생물이 존재해 있지만 그 대부분이 분리되지 못한 상태이다. 지금까지 분리되어 연구된 세균은 비교적 고농도 영양조건에서 급속히 증식하는 미생물이 대부분이었는데, 저농도 영양조건 하에서 더디게 증식하는 세균이 자연환경 중에 다수 존재한다고 여러 미생물생태학자들에 의해 밝혀지면서 자연생태계에 분포해 있는 저영양성 세균(oligotrophic bacteria)에 대한 연구가 활발히 전개되고 있다(14, 16, 22, 23, 33). 이들 저영양성 세균은 분리하기도 어렵고, 설사 분리되었다 하더라도 배양이 잘 되지 않거나, 배양도중에 소멸되어버리는 경

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-829-7593, Fax: 042-829-7590
E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr

우가 많기 때문에 분류 또는 생리적 특성에 관하여 충분히 해명되어 있지 못한 실정이다(22, 34).

저영양성 미생물은 통상농도의 고영양 배지에서는 잘 분리되지 않기 때문에 생리활성물질 탐색에도 거의 이용되지 않았다. 따라서 저영양성 세균을 이용한 생리활성물질 탐색은 기존에 밝혀진 물질과는 구조적으로 다른 독특한 신규 화합물 혹은 합성을 위한 선도물질의 개발 가능성이 높을 것으로 사료되어 본 연구에서는 인삼 근권토양으로부터 분리된 저영양성세균 중 키틴분해효소(chitinase) 생산능이 우수한 저영양성세균을 선발하고 계통분류학적 특성을 검토하여 향후 식물병원균 생물학적방제 등에 활용하기 위한 기초연구를 수행하였다.

재료 및 방법

토양시료

한방·인삼의 도시인 금산군의 인삼 재배면적은 전국 12,015 ha 중, 출경작 포함 1,610 ha로 전국 대비 13%에 상당한다(2003년 12월 기준). 공동연구자는 금산 인삼 재배지역의 다양한 토양 중 3년근 인삼재배토양을 대상으로 인삼 근권토양으로부터 시료를 채취하고, polyethylene vinyl bag에 넣은 후 실험실로 운반하였다.

배지

액체영양(Nutrient broth: NB) 배지와 NB배지를 희석한(Diluted nutrient broth: DNB)배지를 사용하였다. NB배지의 조성은 beef extract, 10 g; peptone, 10 g; NaCl, 5 g; distilled water, 1000 ml 이며 pH 7.0~7.2로 조정하였다. 그리고 NB 배지를 10^{-1} 배, 10^{-2} 배, 10^{-3} , 10^{-4} 배로 증류수에 희석한 4종류의 희석 DNB 배지를 사용하였다.

저영양성세균의 분리

DNB 평판배지 위에 형성된 집락체로부터 토양세균을 각각 순수분리 하여, 10 ml의 DNB 액체배지에 분리 균주를 전배양한 후 통상농도의 10^{-1} NB, 10^{-2} NB, 10^{-3} NB 및 10^{-4} NB배지에 접종하여 28°C, 1주일간 배양 후 증식능을 판정하였다. 통상농도의 NB 배지에서 증식하지 못하는 세균 중 10^{-1} ~ 10^{-4} 배로 희석한 배지에서 증식하는 세균을 저영양성세균으로 순수분리 하였다(33, 34). 순수 분리된 저영양성세균은 20% 글리세롤이 첨가된 배지에 넣어 -80°C에서 보존하였다.

Chitinase 생산균주의 선발

인삼밭 토양에서 분리한 저영양성세균을 대상으로 chitinase 생산균을 선발하였다. chitinase 생산균주를 선발하기 위해 0.02% beef extract, 0.01% NaCl, 0.02% peptone, 0.01% yeast extract이 함유된 기초배지에 1% (w/v) wet colloidal chitin을 첨가한 평판배지를 사용하였다. 습윤한 상태의 colloidal chitin의 조제는 Lockwood 방법을 변형하여 조제하였다(13). Chitin (Sigma, St. Louis, USA) 40 g을 진한 염산 400 ml을 가하여 50°C에서 교반

시킨 다음 4°C의 증류수 1 liter를 첨가한 후 침전물을 pH가 5가 될 때 까지 증류수로 세척하여 사용하였다.

인삼밭 토양으로부터 분리한 저영양성세균을 상기의 colloidal chitin 평판배지에 접종한 후 균체 주위에 생성된 투명환의 유무로서 chitinase 생산능을 확인하였으며, 투명환의 크기를 비교 관찰하여 크게 형성된 균주를 chitinase 생산성 균주로 선발하였다.

Chitinase 활성 측정

Chitinase 효소생산을 위한 배지는 한천을 첨가하지 않은 colloidal chitin 액체배지를 사용하였으며, 28°C에서 3일간 정치배양하여 원심분리한 후 얻어진 배양 여액을 조효소원으로 하여 효소활성을 검정하였다. Endochitinase와 exochitinase의 활성을 비교하기 위하여 96 microwell plate에 각각 균체와 배양 상등액을 분주하고 기질로 4-methylumbelliferyl-D-glucosaminide (MUF-NAG)과 4-methylumbelliferyl-D-N,N'-diacetylchitobioside (MUF-diNAG)를 50 mM 농도 첨가하여 28°C에서 반응시킨 후 UV하에서 형광 여부를 관찰하였다(5, 25).

16S rDNA 염기서열 분석

DNA의 추출 및 정제: Chromosomal DNA의 분리는 benzyl chloride 방법(36)을 변형하여 수행하였다. 균체에 500 μ l의 TE buffer (100 mM Tris-HCl, 40mM EDTA, pH 8.0)를 첨가하여 잘 현탁 시킨 후 100 μ l의 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)와 300 μ l의 benzyl chloride (Katayama Chemicals Co.)를 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시켰다. 균체에 10 μ l의 3M sodium acetate (pH 5.2)를 첨가한 후 잘 혼합한 후 4°C, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮기고 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 혼합액을 첨가하고 10분간 교반한 다음 4°C, 15,000rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 tube로 옮기고 위와 같은 방법으로 chloroform/isoamylalcohol (24:1) 혼합액을 2회 처리하였다. 최종적으로 얻은 상층액에 동량의 2-propanol을 첨가한 후 30분간 정치하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 4°C에서 15,000rpm로 15분간 원심분리하고 냉동 보존된 70% ethanol과 100% ethanol로 각각 세척한 다음 진공건조 시켰다. 최종적으로 50 μ l의 멸균 증류수를 첨가하여 DNA를 추출하여 전기영동(Mupid-21, Cosmo Bio)으로 확인하였다.

16S rDNA의 PCR 증폭: 16S rDNA를 증폭하기 위해서 사용한 primer는 20F (*E.coli* 16S rRNA 부분의 10-25bp)와 1540R (*E.coli* 16S rRNA 부분의 1542-1525bp) 이었다(5, 17). PCR은 다음 조건에 따라 이루어졌다. 94°C 5분간 반응한 다음 94°C denaturation 1분, 55°C annealing 1분, 72°C extension 1분을 30회 반복하고, 72°C에서 10분간 final extension을 실시하였다. Thermal cycler는 Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems)를 이용하였다. 생성물은 1% agarose gel, 0.5 \times TBE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001M EDTA)에서 100V, 25 mA로 30분 전기영동하여 EtBr (ethidium bromide)로 15분간 염색하여 UV하에서 확인하고, Qiagen PCR Purification

Kit (Qiagen Inc.)로 정제하였다.

16S rDNA 염기서열 분석 및 계통도 작성 : 정제한 16S rDNA를 주형으로 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequencing PCR은 BigDye 5 μ l, 3.2 μ M 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3') primer 1 μ l, 16S rDNA sample 1 μ l (90 ng)에 총량이 20 μ l가 되도록 멸균된 3차 증류수를 sequencing PCR tube에 넣고 잘 혼합한 후 다음 조건에 따라 cycle sequencing 반응을 실시하였다. 96°C에서 30초, 43°C에서 30초 그리고 60°C 4분으로 25회 반복하였다. PCR 산물에 냉동 보존된 100% ethanol 50 μ l와 3M sodium acetate (pH 5.2) 2 μ l를 첨가한 후 15,000rpm에서 25분간 침전시켰다. 250 μ l의 70% ethanol로 세척하여 건조시킨 후 TSR (template suppression reagent) 20 μ l를 첨가하여 95°C에서 2분 동안 denaturation 한 후 얼음위에서 냉각시켰다. ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)를 사용하여 결정된 16S rDNA (500~580bp) 염기서열의 homology는 DDBJ/NCBI/GenBank database의 Blast program을 이용하여 비교하였다. 각 염기서열의 alignment는 Clustal X algorithm(29)을 이용하여 병렬로 정렬하였고, 근린 결합법에 의거(27) chitinase 생산균주의 계통분류학적 위치를 결정하였다.

결과 및 고찰

저영양세균의 분리

희석영양(DNB)배지로부터 분리한 균주 중에는 통상농도의 NB 배지에서는 증식이 현저히 저해되는 균주가 다수 포함되었다. 통상농도의 NB에서 증식하지 않고 DNB 배지에서만 증식 가능한 세균으로, 10^{-4} 배로 희석한 배지에서 증식 가능한 세균을 저영양세균으로 분리하였다. 저영양세균이란 일반적으로 알려진 세균이 증식할 수 없을 정도로 희석된 저영양배지에서도 양호한 증식을 나타내는 세균으로, 배지 1리터당 1 mg 이하의 유기탄소원을 함유하는 배지에서 증식 가능한 세균을 저영양세균으로 정의하고 있다(23, 33). 본 실험에서 사용한 NB배지의 경우, 배지 중의 유기탄소 함유량은 7550 mg C/l로 10^{-4} 배로 희석한 배지에서는 약 1 ppm의 유기탄소원이 포함되었다고 할 수 있다. 따라서 상기의 저영양세균의 기준을 고려해 본다면 10^{-4} 배로 희석한 배지에서 증식한 세균은 저영양세균(oligotrophic bacteria)이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 인삼 근권토양으로부터 640개의 저영양세균을 순수분리 하였다.

Chitinase 생산균주의 선발

인삼 근권토양으로부터 분리한 640개의 저영양세균을 colloidal chitin이 함유된 평판배지에 접종하여 28°C에서 7일간 배양하면서 집락체 주위에 형성된 투명환(Fig. 1)을 관찰한 결과 12 균주가 chitinase 생산균주로 확인되었다. 이들 chitinase 생산균주 중 집락체 주위에 매우 큰 생육저지대(clear zone)를 형성하는 8개의 균주를 선발하고 chitin analogue를 기질로 하여 chitinase 활성을

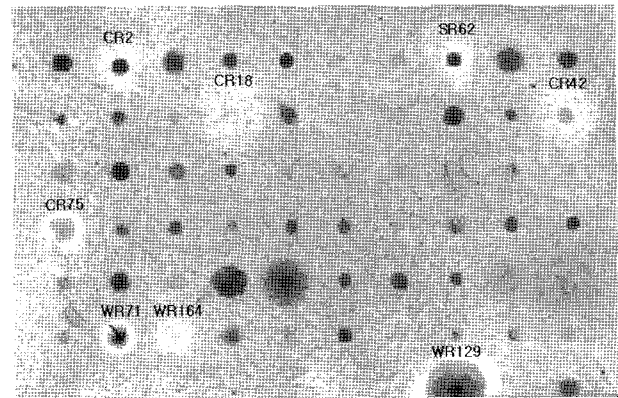


Fig. 1. Halo formation of the chitinase producing oligotrophs around their colonies. 1, CR2; 2, CR18; 3, CR42; 4, CR75; 5, WR71; 6, WR129; 7, WR164; 8, SR62.

측정한 결과, MUF-diNAG에서는 모든 균주가 활성을 보이는 반면 MUF-NAG에서는 CR-42균주만 활성을 보이고 나머지 균주는 활성을 나타내지 않았다(Fig. 2). 이와 같이 CR-42균주가 MUF-NAG와 MUF-diNAG를 모두 분해하는 것으로 보아, CR-42 균주의 경우 고분자화합물인 chitin을 N-acetylglucosamine monomer 단위로 분해하는 exochitinase를 생산하는 것으로 추측되었다. 또한 WR-164균주를 제외한 모든 균주에서 균액과 배양상등액 모두 활성을 나타내어 본 실험에서 분리된 저영양세균 대부분이 세포외효소를 분비하는 것으로 판단되었다.

Chitinase 생산 저영양세균의 계통학적 특성

이들 chitinase 생산 저영양세균의 16S rDNA 염기서열을 결정하여 계통학적 위치를 확인한 결과 5개의 주요한 계통군: proteobacteria γ -subdivision (3 균주), proteobacteria β -subdivision (1 균주), Actinobacteriaceae (1 균주), Bacillaceae (1 균주) 그리고 Bacterioidetes (2 균주)로 분류되었다. Proteobacteria γ -subdivision에 속하는 3개의 균주(SR62, WR162, CR75)로 구성

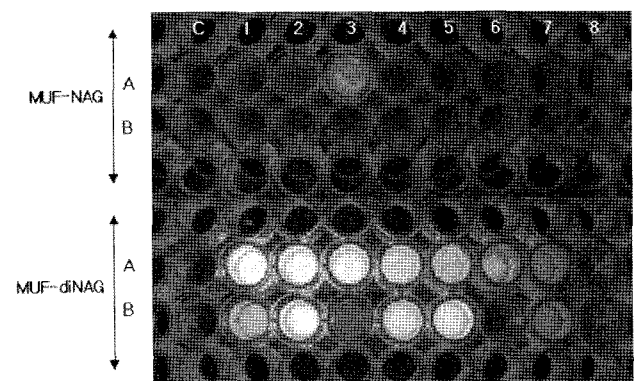


Fig. 2. Pattern of chitinase producing oligotrophic isolates that hydrolyze MUF-chitin analogue. (A) Cultivated broth, (B) Culture supernatant. C, 1/50 nutrient broth; 1, CR2; 2, CR18; 3, CR42; 4, CR75; 5, WR71; 6, WR129; 7, WR164; 8, SR62.

된 cluster I은 *Xanthomonas*, *Lysobacter* 속에 속하였고, proteobacteria β -subdivision에 속하는 CR2 균주는 *Burkholderia* 속에 속하였으며, cluster III(WR71)은 *Bacillus* 속, cluster IV(WR129)는 *Streptomyces* 속, 그리고 cluster V(CR42, CR18)는 *Flexibacter* 속에 속하였다(Fig. 3). 지금까지 보고 된 키틴분해미생물은 심해저, 어류의 소화관, 퇴비 및 경작지토양 등으로부터 분리되었으며 이들 chitinase 생산균주는 대부분이 방선균류로 세균류의 경우 *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Vibrio* 속 등이 보고 되었다(3, 6, 7, 11, 28, 31, 35).

Cluster I의 분리 균주 중 SR62는 *Xanthomonas sacchari*와 97%의 상동성을 나타내었으며, CR75는 *Lysobacter gummosus*와 98%의 상동성을 나타내었다. Cluster II에 속하는 CR2 균주는 *Burkholderia* 속 의 비교균주들과 97% 이상의 상동성을 나타내었고, WR71은 *Bacillus cereus*와 99% WR129는 *Streptomyces*

*speibonae*와 98%, 그리고 CR42는 *Flexibacter elegans*와 98%의 상동성을 나타내었다.

이들 분리균주 중 WR164균주는 *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas* 및 *Pseudoxanthomonas* 속에 속하는 참조균주들과 16S rDNA염기서열의 유사도가 95% 미만의 상동성을 나타내었으며 미배양 및 미동정균주와 97% 미만의 낮은 상동성을 나타내었다(Fig. 4). 또한 CR18 균주는 *Cytophaga/Flexibacter*에 속하는 균주들과 매우 낮은 상동성을 나타내었는데 특히 *Flexibacter japonensis*와 16S rDNA염기서열의 유사도가 96%이었으며 미배양 Bacteroidetes bacterium과 97% 미만의 낮은 상동성을 나타내어 WR164균주와 CR18균주는 계통분류학적으로 신규미생물로 제안할 수 있는 균주로 예상되었다(Fig. 5).

본 연구에서 인삼 근권토양으로부터 분리한 chitinase 생산 저영양세균은 계통분류학적으로 매우 다양한 특성을 나타내는 세균임이 확인되었다. 이들 희귀미생물 중에는 기존에 밝혀진 물질

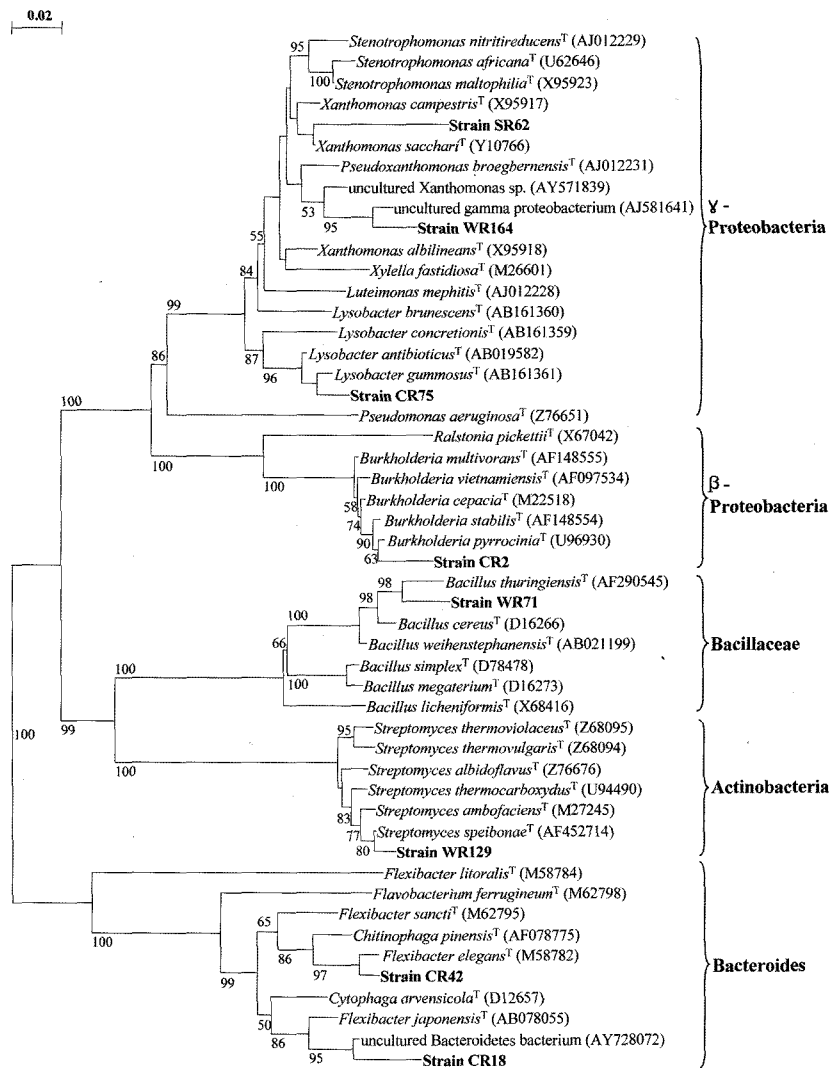


Fig. 3. Phylogenetic tree showing relatedness of chitinase producing oligotrophic bacteria by neighbor-joining grouping of the aligned sequences of the 16S rDNA. Bar indicates 0.02 base substitution per nucleotide.

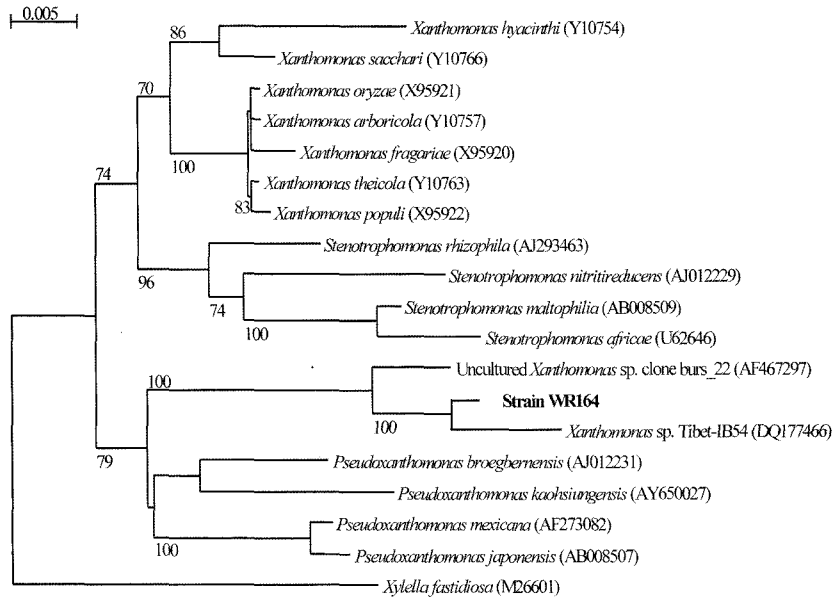


Fig. 4 Phylogenetic relationships of strain WR164 and genera *Xanthomonas* based on similarities of 16S rDNA. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. Bootstrap values are shown at nodes.

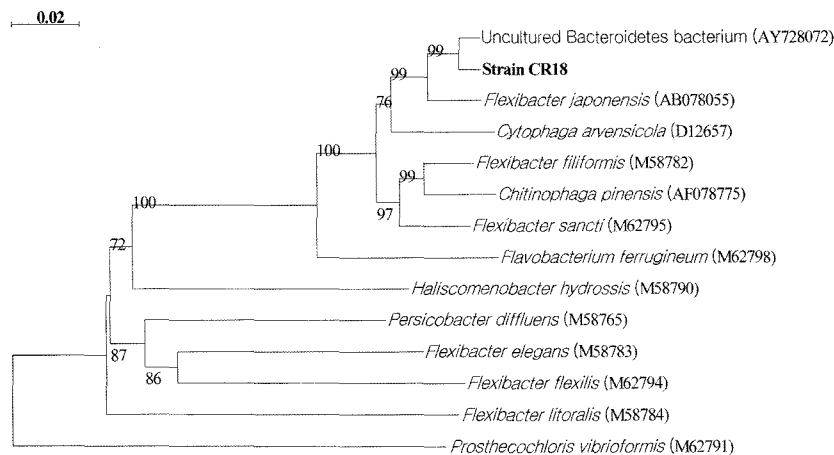


Fig. 5 Phylogenetic relationships of strain CR18 and *Cytophaga*, *Flexibacter* based on similarities of 16S rDNA. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. Bootstrap values are shown at nodes.

과는 구조적으로 다른 독특한 신규 화합물 혹은 합성을 위한 선도물질의 개발 가능성이 높을 것으로 사료되며, 특히 인삼발 근권토양 중에 분포하면서 식물병원성 곰팡이와 길항력을 유지하는 중요한 생태학적 역할을 담당하고 있으리라 사료되었다.

길항력 검정

Chitinase 생산균주로 선별된 저영양세균의 곰팡이에 대한 길항력 확인을 위해 1차적 항균활성(paper disk법)을 조사하였다. 인삼 묘포에서 가장 피해가 심한 탄저병원균으로 알려진 *Colletotrichum gloeosporioides*을 검정균으로 하여 대치 배양한 결과, CR-2와 CR-18 균주에 의해 *Colletotrichum gloeosporioides*의 생육이 강하게 저해되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 6). 다른

chitinase생산 균주에서 곰팡이 생장이 저해 되지 않은 것은 이들이 생산하는 chitinase가 endochitinase가 아니라 exochitinase와 chitobiosidase 활성을 가지고 있어서 세포벽에 있는 chitin의 비환원 말단에 반응하여 분해하는데 어려움이 있을 것으로 추측되었다. 따라서 이런 기질에 대한 특이성과 CR-2, CR-18의 길항력에 관한 연구가 향후 더 심도 있게 수행되어야 할 것으로 사료되었다.

우리나라의 대표적 약용작물인 인삼은 한 곳에서 3-5년 재배해야 하는 작물 생리적 특성을 지니기 때문에 생육 기간 중에 여러 가지 병에 의하여 피해가 매우 심각하다(1). 특히 한국에서 발생하는 주요 인삼병을 일으키는 곰팡이는 *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phoma*,

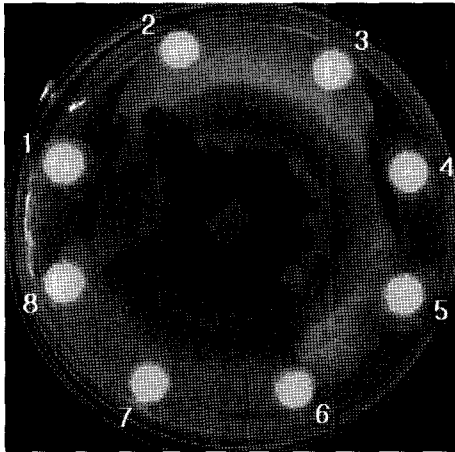


Fig. 6. Inhibition of fungal growth by chitinase producing oligotrophic isolates. 1, CR-2; 2, CR-18; 3, CR-42; 4, CR75; 5, WR71; 6, WR129; 7, WR164; 8, SR62.

Botrytis, *Fusarium*, *Cylindrocarpon* 등에 의해 피해가 큰 것으로 보고 되고 있다(2). 이들은 묘포로부터 본포에 이르기까지 인삼 재배의 전 과정에서 커다란 피해를 입히고 있다. 묘포에서는 생육초기인 4-5월에 Dampin-off가 심각한데, 주로 *Rhizoctonia solani*에 의해 발생한다. seedling-rot을 일으키는 *Pythium*이나 *Phytophthora*의 피해를 통칭하는 묘입고병의 피해는 전체 인삼병 피해의 10% 내외를 차지한다. 생육후기에 *Colletotrichum*에 의한 탄저병의 피해는 가장 심각한 것으로 전체피해의 50%이상을 차지한다. 인삼재배농가는 어쩔 수 없이 병 방제를 위한 농약을 대량 살포해 왔고, 농약사용이 늘수록 저항성 병원균의 출현도 계속 증가되는 악순환이 되풀이되고 있다(1).

미생물을 이용한 인삼병 방제제 개발을 위한 외국의 기술도입, 특히 완제품의 수입은 효과를 거둘 수 없다. 인삼이라는 작물 자체가 우리나라 고유의 토양환경 속에서 가장 잘 재배되는 특성을 지니고 있으며, 인삼병해충도 역시 한국의 토양 속에 자생하는 것으로서 그 나름의 생물학적 특성을 지니고 있기 때문이다. 요컨대, 우리의 토양에 활착하여 우리의 토질과 기후에 맞추어 활동할 수 있는 미생물제제를 개발하기 위해서는 반드시 국내의 토양 속에서 분리해 낸 미생물을 활용할 필요가 있는 것이다.

감사의 말

본 논문은 2005년도 농촌진흥청 바이오그린21사업 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 오승환, 유연현, 김영호, 김기광, 이일호. 1988. 인삼의 재배법 변화에 따른 병해충 발생생태 및 방제연구. 인삼 연구보고서(재배분야, 환경 및 육종분야), p. 3-137. 인삼연초연구소
- 오승환, 유연현. 1996. 인삼의 병. 최신고려인삼(재배편),

- p. 197-241. 한국인삼연초연구소
- 이상표, 김창남, 유주현, 오두환. 1990. *Aeromonas salmonicida* YA7-625에 의한 chitinase의 생산 및 정제. 한국산업미생물학회지. 18, 599-606.
- 中神照太, 外村健三. 1966. 放線菌の生産するキチン分解酵素に関する研究(第1報)分解菌の檢索と培養條件について. 工業技術院醱酵研究所報告. 30, 19-26
- Chernin, L.S., M.K. Winson, J.M. Thompson, S. Haran, B.W. Bycroft, I. Chet, P. Williams, and G.S.A.B. Stewart. 1998. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate analysis and regulation by quorum sensing. *J. Bacteriol.* 180, 4435-4441.
- Chernin, L.S., L. Fuente, V. Sobolev, S. Haran, C.E. Vorgias, A.B. Oppenheim, and I. Chet. 1997. Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 834-839.
- Clarke, P.H. and M.V. Tracey. 1956. The occurrence of chitinase in some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 14, 188-196.
- Dempsey, D.M.A., H. Silva, and D.F. Klessig. 1998. Engineering disease and pest resistance in plants. *Trends Microbiol.* 6, 54-61.
- Downing, K.J., G. Leslie, and J.A. Thomson. 2000. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2804-2810.
- Driss, F., M. Kallassy-Awad, N. Zouari, and S. Jaoua. 2005. Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Appl. Microbiol.* 99, 945-953.
- Felse, P.A. and T. Panda. 1999. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 141-151.
- Hoster, F., J.E. Schmitz, and R. Daniel. 2005. Enrichment of chitinolytic microorganism: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 434-442.
- Hsu, S.C. and J.L. Lockwood. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *Actinomycetes* in water and soil. *Appl. Microbiol.* 29, 422-426.
- Ishida, Y. and H. Kadota. 1979. A new method for enumeration of oligotrophic bacteria in lake water. *Arch. Hydrobiol.* 12, 77-85.
- Johnson, J.L. 1994. Similarity analysis of rRNAs. In: Gerhardt, P., R.G.E. Murray, W.A. Wood, N.R. Krieg (Eds.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp.683-700.
- Kuznetsov, S. I., G.A. Dubinnina, and N.A. Lapteva, 1979. Biology of oligotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 33, 377-387.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, Chichester. pp.115-175.
- Metcalfe, A.C., M. Krsek, G.W. Gooday, J.I. Prosser, and E.M.H. Wellington. 2002. Molecular analysis of a bacterial chitinolytic community in an upland pasture. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5042-5050.
- Matteu, T.C., A.M. Jessica, and L.K. David. 1999. Chitinase from uncultured marine microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2553-2557.
- Matteu, T.C., N.W. Daniel, Y. Liying, and L.K. David. 2000. Selected chitinase genes in cultured and uncultured marine bacteria in the α - and β -subclasses of the proteobacteria. *Appl. Environ.*

- Microbiol.* 66, 1195-1201.
21. Monreal, J. and E. T. Reese. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 15, 689-696.
 22. Nikitin, D.I. and K.V. Chumakov. 1985. The functional role of oligotrophic microorganisms. In V. Jensen (ed.), *Microbial communities in soil. FEMS Symposium.* 33, 177-189.
 23. Ohta, H. and T. Hattori. 1980. Bacteria sensitive to nutrient broth medium in terrestrial environments. *Soil Sci. Plant Nutr.* 26, 99-107.
 24. Ohtakara, A. (1971) The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Bull. Hiroshima Women's Univ.* 6, 1-12.
 25. Omera, C., B.A. Horwitz, and I. Chet. 2001. A convenient fluorometric method for the detection of extracellular *N*-acetylglucosaminidase production by filamentous fungi. *J. Microbiol. Methods.* 43, 165-169.
 26. Radjacommaré, R., A. Ramanathan, A. Kandan, G.V. Sible, S. Harish, and R. Samiyappan. 2004. Purification and anti-fungal activity of chitinase against *Pyricularia grisea* in finger millet. *World J. of Microbiol. Biotechnol.* 20, 251-256.
 27. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
 28. Sakai, D., A. Yokota, H. Kurokawa, M. Wakayama, and M. Moriguchi. 1998. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3397-3402.
 29. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
 30. Tominaga, Y. and Y. Tsujisaka, 1976. Purification and some properties of two chitinase from *Streptomyces orientalis* which lyse *Rhizopus* cell wall. *Agric. Biol. Chem.* 40, 2325-2333.
 31. Wang S.L. and W.T. Chang. 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 380-386.
 32. Watanabe, T., R. Kanai, T. Tanabe, M. Mitsutomi, S. Sakuda, and K. Miyashita. 1999. Family 19 chitinases of *streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology* 145, 3353-3363.
 33. Whang, K. and T. Hattori. 1988. Oligotrophic bacteria in rendzina a forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 54, 19-37.
 34. Whang, K. and S. Yu. 1995. Growth patterns of soil bacteria in different organic concentrations, and isolation of facultative and obligate oligotrophic bacteria. *The Microorganisms & Industry* 21, 319-324.
 35. Wortman, A.T., C.C. Somerville, and R.R. Cotwell. 1986. Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus*: gene cloning and applications of a chitinase probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 142-145.
 36. Zhu, H., F. Qu, and L. Zhu. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* 21, 5279-5280.

(Received October 6, 2005/Accepted December 15, 2005)

ABSTRACT: Isolation and Phylogenetic Characterization of Chitinase Producing Oligotrophic Bacteria
Soo-Jin Kim, Min-Young Kim, Bon-Sung Koo, San-Hong Yoon, Yun-Soo Yeo, In-Cheol Park, Yoon-Ji Kim¹, Jong-Wha Lee², and Kyung-Sook Whang^{1,2*} (Microbial Function Team, National Institute of Agricultural Biotechnology(NIAB), Suwon 441-707, Korea, ¹Dept. of Biotechnology, ²Inst. of Microbial Ecology and Resources, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea)

Many isolates from soil of Korean ginseng rhizosphere did not show remarkable growth on full strength of the conventional nutrient broth (NB medium) but grew on its 100-fold dilution (DNB medium). Six hundred-forty strains were isolated as oligotrophic bacteria. In the course of screening for new bioactive compounds from oligotrophic bacteria from soil, 8 strains which had appeared to form of clear zone on a medium containing colloidal chitin as a sole carbon source were selected for further studies. Strain CR42 hydrolyzed a fluorogenic analogue of chitin, 4-methylumbelliferyl-D-glucosaminide (MUF-NAG). Most of the culture supernatant of these isolates hydrolyzed 4-methylumbelliferyl-D-N,N'-diacetylchitobioside (MUF-diNAG). The isolates were heterogeneous and categorized to gamma- and beta-proteobacteria, *Bacillaceae*, *Actinobacteria*, and *Bacteroides* by 16S rRNA analysis. Two strains, WR164 and CR18, had a 16S rRNA sequence of 95-96% identical to uncultured bacteria. It was observed that CR2 and CR75 could inhibit the growth of *Colletotrichum gloeosporioides* with hyphal extension-inhibition assay on PDA plate supplemented with 1% colloidal chitin.