

Article

여러 식물병원성 진균을 억제하는 *Streptomyces costaricanus* HR391의 항진균능

김혜령 · 송홍규*

강원대학교 생명과학과

Antifungal activity of *Streptomyces costaricanus* HR391 against some plant-pathogenic fungi

Hae-Ryoung Kim and Hong-Gyu Song*

Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

(Received September 19, 2016; Revised November 15, 2016; Accepted November 16, 2016)

ABSTRACT: In this study *Streptomyces* strains were isolated from soils and their antifungal activities and involved mechanisms were investigated. Among over 400 isolates of actinomycetes, *Streptomyces costaricanus* HR391 was selected as a potential antagonist to control several plant-pathogenic fungi. *S. costaricanus* HR391 inhibited mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and *Rhizoctonia solani* by 26.5, 26.2, 21.2, and 23.8%, respectively compared to those of uninoculated control after 7-day incubation on PDB medium. *S. costaricanus* HR391 produced 89 μ M of siderophore, and showed fungal cell wall-degrading activity including 0.46 μ mol/min/mg of chitinase and 0.83 μ mol/min/mg of β -1,3 glucanase. *S. costaricanus* HR391 secreted 87.49 mg/L of rhamnolipid, and produced 9.49 mg/L and 4.3 mM of lipopeptide, iturin A and surfactin, respectively, all they are membrane-disrupting biosurfactants. It also produced antimicrobial peptide and antibiotics phenazine. In addition to antifungal substances, *S. costaricanus* HR391 secreted plant growth-promoting phytohormones, zeatin, gibberellins and IAA. These results suggest that *S. costaricanus* HR391 may be utilized as an environment-friendly biocontrol agent against some important pathogenic fungi.

Key words: *Streptomyces costaricanus* HR391, antifungal activity, plant growth promotion, plant-pathogenic fungi

최근 전 세계적으로 건강뿐만 아니라 환경재해와 환경오염에 대한 우려로 인해 안전한 먹거리에 대한 소비자의 관심이 높아지고 있으며 그에 따라 친환경농산물에 대한 선호도가 커지며 친환경농산물 재배를 위한 생물농약과 같은 생물학적 방제에 대한 관심과 연구가 증가하는 추세이다(Roberts *et al.*, 2005). 수많은 화학농약의 악영향에 비해 생물학적 방제법은 식물병에 효과적이면서도 친환경적이고 지속가능한 대체방법으로 *Bacillus*, *Pseudomonas*와 비병원성 *Fusarium*과 같은 다양한 미생물을 이용한 식물병원균 방제를 위한 연구가 수행되고 있다(Faheem *et al.*, 2015).

생물학적 방제에 사용되는 미생물의 항균기작은 미생물에

의한 직접적 길항작용과 식물의 면역기능을 활성화하여 저항성을 유도하는 간접적 길항작용으로 나눌 수 있다(Berendsen *et al.*, 2012). 직접적인 길항작용에 의한 생물학적 방제는 생물제어제가 분비하는 계면활성제, 세포벽 가수분해효소 등의 물질에 의한 용균작용, 철이온에 대한 높은 친화력을 가지고 병원균과 경쟁하여 생장을 억제하는 siderophore와 같이 영양분과 기질에 대해 경쟁하여 길항작용을 나타내거나 병원균에 기생하여 생육을 저해하는 기생 작용이 있을 수 있다(Arunachalam *et al.*, 2013). 또한 병원성 진균의 생장을 직접적으로 억제하는 항생물질을 생산하여 진균을 죽이거나 생육을 정지시킬 수 있다(Kamensky *et al.*, 2003). 그러나 식물 질병의 생물학적 방제에 사용되는 생물제어제는 병원성 진균과 작물 종류에 따라 다양한 결과를 보이며 일부만이 완전한 방제가 가

*For correspondence. E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr;
Tel.: +82-33-250-8545; Fax: +82-33-259-5665

능하기 때문에 보다 효율적인 방제 미생물을 탐색해야 한다.

토양에 존재하는 주된 미생물 중 하나인 방선균은 균사형태를 띠고 형태분화를 하는 그람 양성 토양미생물이며 항생제, 항암제, 면역억제제로 대표되는 다양한 종류의 이차대사산물을 생산한다(Boukaew and Prasertsan 2014). 또한 식물병원균으로부터 뿌리를 보호하고 indole-acetic acid (IAA)와 같은 여러 식물 호르몬을 분비하여 식물체의 발달에 영향을 주기도 한다(Kalbe *et al.*, 1996). 특히 전체 토양 방선균의 50%를 차지하는 *Streptomyces* spp.는 의학 및 산업적으로 유용한 항생물질의 75-80%를 생성한다고 보고되고 있다(Mellouli *et al.*, 2003). 현재 농작물의 진균병원체에 대한 생물학적 방제에는 고초균, 녹농균, 광합성균 등으로 대표되는 다양한 유용미생물을 사용하고 있으나 아직까지 항진균성 방선균의 연구와 활용은 미비한 상태이다(Palaniyandi *et al.*, 2013). 이에 본 연구에서는 4가지 주요 식물병원성 진균을 대상으로 항진균성 방선균을 분리하고 여러 항진균물질 생성능을 조사하여 생물 제어제로 활용할 수 있는 균주를 선발하고자 하였다.

재료 및 방법

항진균성 방선균 균주의 분리과 동정

강원도 춘천시 일대에서 토양시료를 채취하여 0.85% NaCl 용액으로 연속희석 하여 starch casein nitrate agar 배지(SCN; soluble starch 10.0 g, KH_2PO_4 2.0 g, casein 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, CaCO_3 0.02 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, actidione 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, agar 15 g, 1 L 증류수, pH 7.0)와 Olson's agar 배지(sodium caseinate 2.0 g, asparagine 0.1 g, sodium propionate 4.0 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mg, glycerin 5.0 g, actidione 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, agar 15 g, 1 L 증류수, pH 7.0)에 접종하여 7~14일 동안 30°C에서 압조건에서 배양 후 사상성 형태의 집락을 순수분리하고 현미경으로 균사를 조사하였으며 분리한 균주들은 Bennett agar 배지(glucose 10 g, beef extract 1 g, yeast extract 1 g, peptone 2 g, agar 15 g, 1 L 증류수)에 희석배양 하여 4°C에서 보관하였다.

분리한 균주 중 항진균 활성이 가장 높은 균주를 HR391라고 명명하였으며 형태학적 및 효소학적 특징을 분석하고(Shirling and Gottlieb, 1966; Faheem *et al.*, 2015) Bennett agar 배지에 배양하여 (주)마크로젠에 16S rDNA 염기서열 분석을 의뢰하였다. 분석된 염기서열 결과는 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 등록 균주들과 상동성을 비교하여 동정하였다.

항진균 활성 조사

식물 병원성 진균류인 시들음병 병원체(*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*), 덩굴쪄김병 병원체(*F. oxysporum* f. sp. *niveum*), 시들음병 병원체(*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 그리고 잎집 무늬마름병 병원체(*Rhizoctonia solani*)에 대한 항진균 활성을 조사하기 위해 disc plate diffusion method를 이용하였다. Potato dextrose agar (PDA; Difco Lab; 39 g, 1 L 증류수) 배지의 양쪽 끝에 Bennett agar 배지에 배양하여 자라난 식물병원성 진균을 직경 1 cm의 cork borer를 이용하여 잘라낸 disc와 분리균주 HR391 disc를 두어 대치한 실험균을 만들어 배양하여(30°C, 7 일) 생육 저지환(inhibition zone)의 유무와 크기를 조사하였다(Loqman *et al.*, 2009).

균주 성장 시 분비한 항진균물질에 의한 항진균 활성을 조사하기 위해 HR391 균주를 glucose-yeast extract-malt extract (GYM; glucose 4 g, yeast extract 4 g, malt extract 10 g, 1 L 증류수, pH 7.0) 배지 40 ml에 선배양 하고 OD₆₀₀이 1이 되도록 보정한 후 새로운 LB 배지(Difco Lab)에 10% 접종하여 배양하였다(72 h, 30°C, 150 rpm). 배양액은 원심분리(3,400 × g, 30 min, 4°C)하여 상등액을 회수하고 potato dextrose broth (PDB, Difco Lab) 배지와 혼합하여 총 100 ml이 되도록 상등액을 1, 10, 20과 25 ml 첨가하고 대조군으로는 상등액 대신 GYM배지를 첨가하였다. 상등액을 포함한 PDB에 직경 1 cm의 cork borer를 이용하여 잘라낸 4가지 식물병원성 진균이 각각 자라난 PDA disc를 넣어 배양하였다(5일, 30°C, 150 rpm). 배양액은 Whatman No. 2 여과지로 여과한 후 60°C에서 2시간 건조하여 건조균체량을 측정하였다(Boukaew and Prasertsan, 2014).

항진균물질 생성능 조사

Siderophore: HR391 균주의 siderophore 분비 유무를 chrome azurol S (CAS) 한천 평판에서 배양을 통해 정성적으로 확인한 후(Gopalakrishnan *et al.*, 2011) 균주를 King's B medium (KB; peptone 20 g, glycerin 10 ml, KH_2PO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, 1 L 증류수, pH 7.2)에 배양하면서 생성된 siderophore는 dihydroxy benzoic acid를 이용한 표준곡선으로 정량분석 하였다(Nagarajkumar *et al.*, 2004).

세포벽성분 분해효소: HR391 균주의 chitinase 활성을 측정하기 위해 colloidal chitin이 함유된 배지에서 배양 후 원심분리하여 세포를 회수하여 dinitrosalicylic acid method (DNS method)를 이용하여 활성을 측정하였다(Nelson, 1944). 또한 β -1,3-glucanase 활성은 laminarin이 첨가된 배지에서 균주를 배양 후 세포를 회수하여 laminarin과 반응시키는 DNS method를

이용하여 정량하였다(Park *et al.*, 2012).

Antimicrobial peptide: 지질막에 결합하여 미생물의 막을 파괴하는 것으로 알려진 antimicrobial peptide (AMP)의 항진균 활성을 조사하였다. HR391 균주를 LB 배지에서 배양하여 원심분리 후 Xu 등(2013)의 방법에 따라 AMP를 추출하고 회전 증발농축기로 농축시키고 동결건조기로 건조시켰다. 추출된 AMP를 PDB 배지에서 배양한 식물병원성 진균 배양액에 첨가하여 배양하면서 OD₆₀₀을 측정하여 항진균 활성을 조사하였다(Xu *et al.*, 2013).

생물계면활성제: 균주의 생물유화제(bioemulsifier) 생성 측정을 위해 균주를 GYM 배지에 배양하면서 24시간 간격으로 배양액을 원심분리하여 유화활성을 측정한 후(Khopade *et al.*, 2012) 상등액을 oil displacement method (Kalyani *et al.*, 2014)를 통해 생물계면활성제 생성을 확인하였다. Rhamnolipid 여부를 조사하기 위해 mineral salt 배지(Wang *et al.*, 2010)에 HR391 균주를 배양하고 ethyl ether로 추출 후 Orcinol assay를 수행하였으며 표준물질로 L-rhamnose를 이용하여 정량하였다(Kalyani *et al.*, 2014).

또 다른 항진균성 생물계면활성제인 lipopeptide 생성 조사를 위해 optimized medium for lipopeptide production (MOLP; peptone 30 g, saccharose 20 g, yeast extract 7 g, citric acid 10 mg, KH₂PO₄ 1.9 g, 1 L 증류수, pH 7.0)에 HR391 균주를 배양하고 원심분리하여 상등액을 회수한 후 butanol을 이용하여 lipopeptide 성분을 추출하고 thin layer chromatography (TLC)의 분석시료로 사용하였다. 각 시료는 PLC silicagel 60 F₂₅₄ plate (Merck)의 하단으로부터 30 cm가 되는 지점에 점적하였고 spot 간의 거리는 옆 시료에 의해 방해받지 않도록 2 cm 이상 차이하도록 하였다. 또한 전개용매는 chloroform-methanol-water (65:25:4)를 사용하였으며 전개가 끝난 TLC plate는 건조시킨 후 증류수를 뿌려 관찰하였다(Afsharmanesh *et al.*, 2014). 표준물질로 surfactin과 iturin A (Sigma Chemical Co.)를 희석하여 함께 분석하였으며 표준물질과 동일한 retention factor (RF) 값을 갖는 분획을 긁어내어 HPLC (Breeze model, Waters)로 항진균물질을 분석하였다(Wang *et al.*, 2010).

항생물질: HR391 균주에서 방선균들이 흔히 분비하는 항생물질인 phenazine의 생성능을 조사하기 위하여 PDA 배지에 균주를 5일 배양 후 유기용매를 이용한 방법으로 추출하여 (Laursen and Nielsen, 2004) phenazine (Sigma Chemical Co.) 표준물질과 함께 TLC를 수행하고 표준물질과 동일한 RF값의 분획을 긁어 methanol에 녹여 항진균 활성을 조사하였다. 항진균 활성 조사 후 phenazine을 정량하기 위해 methanol 추

출물을 분석시료로 이용하여 HPLC를 수행하였는데 Kamensky 등(2003)의 분석 조건을 따랐다.

식물호르몬 생성능 조사

HR391 균주의 식물생장 촉진능을 조사하기 위하여 식물호르몬인 indole-3-acetic acid (IAA), gibberellin과 zeatin의 생성능을 Karadeniz 등(2006)의 방법을 이용하여 측정하였다. 균주를 brain heart broth (BHB; peptone 27.5 g, glucose 2 g, sodium chloride 5 g, Na₂HPO₄ 2.5 g, 1 L 증류수, pH 7.0) 배지에서 3일 배양 후 원심분리(3,000 × g, 30 min, 4°C)하여 상등액을 회수하고 호르몬 산화 방지제인 butylated hydroxy toluene을 첨가한 후 ethyl acetate로 추출하여 농축 후 HPLC로 분석하였으며 각각의 표준물질을 이용하여 정량하였다(Karadeniz *et al.*, 2006).

결과 및 고찰

항진균성 방선균 균주의 분리 및 항진균 활성 측정

춘천시 일대에서 분리한 약 400여 개의 방선균 분리균주 중 4가지 주요 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성이 우수한 균주를 최종 선별하고 HR391이라고 명명하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 HR391 균주는 *Streptomyces costaricanus*의 type strain NBRC 100773과 99.0%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다(GenBank Accession No. KT 438922). HR391 균주의 형태학적 특징을 조사한 결과 포자를 생성하는 그람양성 사상균이었으며 Bennett 배지에서 48시간 배양 후 배지 속으로 신장하는 영양균사의 모습을 볼 수 있었으며 72시간 이후에는 기균사가 배지 위로 올라와 회갈색 포자를 형성하였다. HR391 균주는 urea를 첨가한 Christensen 배지에서 urea 분해 시 생성된 NH₄에 의한 pH 상승으로 phenol red가 첨가된 배지색을 붉은색으로 변화시키는 높은 urease 활성을 나타냈다. 또한 hydrogen peroxide를 분해하여 약간의 거품을 생성하는 정도로 catalase 활성을 보였다.

Disc plate diffusion method를 이용하여 식물병원성 진균을 *S. costaricanus* HR391과 함께 7일간 대치 배양하여 형성된 생육 저지환의 반경은 *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*와 *Rhizoctonia solani*에 대하여 각각 19.1, 18.9, 15.3과 17.2 mm이었으며 비접종 대조군과 비교할 때 각각 26.5, 26.2, 21.2 및 23.8%를 저해하였다. 이 결과는 유사한 조건의 방법을 이용할 때 *Alcaligenes faecalis* S18과 *Bacillus cereus* S42가 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*에 대해 나타난 12.37과 11.87 mm

(Abdallah *et al.*, 2016)나 *R. stolonifer* VBAM1에 대한 *Lactococcus lactis* 균주들이 나타낸 1.2-1.4 cm (Ghosh *et al.*, 2015)의 저지 환보다 훨씬 높은 저해능이다. 또한 *S. costaricanus* HR391의 배양 상등액을 첨가한 PDB 배지에서 병원성 진균을 접종하고 5일간 배양하여 병원성 진균의 균사체 성장 저해능을 조사하였는데 전체 배지의 25%가 되게 균주 상등액을 첨가하였을 때 대조군에 비해 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 생장을 $99.05 \pm 0.78\%$ 저해시켰으며 *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*와 *R. solani*도 25%의 상등액 첨가 배지에서 대조군에 비해 균사체 생장이 각각 64.57 ± 0.06 , 45.27 ± 0.01 과 $54.23 \pm 1.62\%$ 감소하였다(Table 1). 심지어 전체 배지의 1%로만 균주 상등액을 첨가하였을 때에도 모든 병원성 진균에서 20~30%의 성장 저해능을 나타냈다.

항진균능 물질 생성능

Siderophore: *S. costaricanus* HR391의 여러 항진균 물질 중 먼저 토양 내 미량 존재하는 필수 원소인 철을 선택적으로 흡수하여 병원성 진균의 억제와 동시에 식물체에 철을 공급하여 식물 성장을 촉진하는 siderophore를 조사하였다. CAS 한천 평판법을 통해 정성적으로 탐색한 결과 황색환을 형성하며 활성

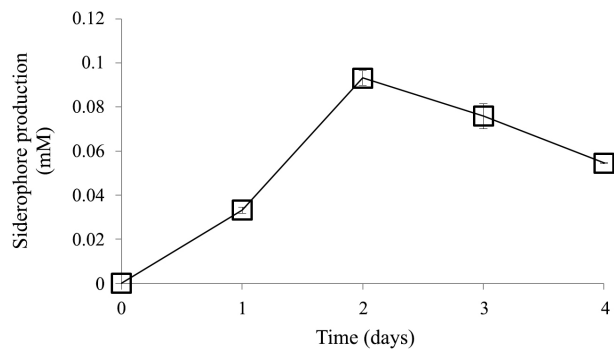


Fig. 1. Siderophore production by *S. costaricanus* HR391 in King's B medium during 4 days.

을 나타낸 HR391 균주를 대상으로 siderophore 생성을 정량하였다. HR391 균주는 48시간째에 최대 0.098 mM의 siderophore를 생성한 후 천천히 감소하였는데(Fig. 1) 이는 12~13 μM 을 생성한다고 보고된 3가지 *Pseudomonas fluorescens* 균주보다 매우 높은 생성량이었다(Nagarajkumar *et al.*, 2004).

Chitinase와 glucanase: 진균의 세포벽을 구성하고 있는 chitin과 β -glucan 같은 성분들을 분해할 수 있는 세포벽 가수분해효소를 통한 용균작용이 또 하나의 항진균 활성이다(Patil *et al.*, 2013). HR391 균주는 chitin-peptone 평판배지에서 집락을 형성하여 chitin을 이용하는 것으로 나타났으며 chitinase 활성은 72시간째에 $0.87 \mu\text{mol glucose min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ 이었는데 이는 *Streptomyces* sp. DA11이 72시간 째에 $1.56 \mu\text{mol glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 의 활성을 보인 것에 비해서는 낮았지만(Han *et al.*, 2008), 최대 $0.85 \mu\text{mol glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 활성을 보인 *Aeromonas schubertii* 균주와는 유사한 활성이었다(Guo *et al.*, 2004). 또 다른 진균 세포벽 가수분해 효소인 β -1,3-glucanase는 HR391 균주가 $0.46 \mu\text{mol glucose min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 의 활성을 보여 여러 균주들과 비교하여 비슷하거나 낮았다(Park *et al.*, 2012).

Antimicrobial peptide: 세포벽 가수분해효소 이외에 지질막에 결합하여 병원균의 막을 파괴한다고 알려진 18~50개의 아미노산으로 이루어진 AMP (Reddy *et al.*, 2004)를 HR391 균주로부터 추출하여 활성을 조사하였다. AMP의 농도가 높아질수록 항진균 활성이 증가하였는데 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 AMP를 배지에 첨가했을 때, *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*와 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*를 각각 11.8, 8.46과 7.35% 억제하였으나(Fig. 2), AMP 농도를 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 높였을 때에도 항진균 활성은 큰 차이가 없었다. 이 결과는 *Lactobacillus plantarum* 으로부터 추출하여 정제한 1~2 mg/ml AMP의 *Aspergillus niger* 등에 대한 성장 억제효과보다는 낮는데(Gupta and Srivastava, 2014) 대상 균주가 다를 뿐만 아니라 본 연구에서 처리한 AMP가 순수정제 되지 않았으며 농도도 훨씬 낮았

Table 1. Effect of addition of culture filtrate of *S. costaricanus* HR391 on suppression of mycelial growth of several plant pathogenic fungi.

Amount of culture filtrate (ml/100 ml PDB medium)	Mean percentage of mycelial growth inhibition \pm standard deviation			
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
0	-	-	-	-
1	23.24 ± 1.85	27.60 ± 3.45	21.30 ± 0.59	30.32 ± 0.79
10	61.82 ± 7.17	34.62 ± 8.13	26.39 ± 5.69	38.58 ± 0.79
20	98.70 ± 0.62	45.52 ± 1.02	36.31 ± 2.88	53.54 ± 8.54
25	99.05 ± 0.78	64.57 ± 0.06	45.27 ± 0.01	54.23 ± 1.62

The effects of culture filtrates on mycelial growth of several plant pathogenic fungi were determined on PDB medium after incubation at 30°C for 5 days.

기 때문인 것으로 추정되며 대량 생산 후 정제하여 진균에 대한 MIC 등을 조사할 필요가 있다.

생물계면활성제: 또 하나의 항진균 기작으로 생물계면활성은 항세균, 항진균, 항바이러스뿐만 아니라 면역 조절분자로 이용되며 백신이나 유전자 치료에도 사용되고 있다(Rodrigues *et al.*, 2006). Olive oil을 사용하여 7일간 24시간 간격으로 측정한 *S. costaricanus* HR391의 유화활성은 배양 1일째 184.44 EU/ml로 최대치를 보인 후 감소하였는데(Fig. 3) 이는 *Nocardiosis* sp. B4와 유사한 수준의 높은 활성이었다(Khopade *et al.*, 2012). 유화활성 확인 후 생물계면활성제 중 glycolipid인 rhamnolipid의 생성을 조사하였는데 HR391 균주는 유화활성과 유사하게 배양 1일째 87.49 mg/L로 가장 높은 농도를 보인 후 감소하였다(Fig. 4). 또 다른 생물계면활성제인 lipopeptide는 지질막 파괴를 통한 병원성 진균의 생육저해뿐만 아니라 표면 장력을 낮추어 생성 균주의 표면에서의 산포가 쉬울 뿐만 아니라 집락 형성을 빠르게 할 수 있어 병원성 진균에 대하여 높은 생장억제활성을

을 보일 수 있다(Afsharmanesh *et al.*, 2014). Lipopeptide 활성을 HR391 배양액 추출물과 lipopeptide 표준물질을 이용한 TLC를 통해 조사하였는데 iturin A, fengycin, surfactin과 미지의 물질을 생성하는 것으로 추정되었으며(Fig. 5A) 각 분획물을 굵어 bioassay를 수행한 결과 iturin A가 가장 높은 항진균 활성을 보였다(Fig. 5B and C). 또한 각 분획물을 동일하게 혼합하여 항진균능을 조사한 결과 단일 분획물의 항진균 활성이 더 높게 나타났으며 표준물질을 혼합한 결과도 동일하게 나타났는데(결과 미제시) Maget-Dana 등(1992)도 이와 유사한 결과를 보고하였다. 항진균 활성이 나타난 iturin A와 surfactin 분획을 HPLC를 이용해 정량한 결과 각각 10.9 ± 0.3 mg/L와 4.3 ± 0.1 mM로 나타났다. 이제까지 iturin A는 오로지 *Bacillus* 속의 균주들만 생성하는 것으로 보고되었으나 최근 해양 퇴적물에서 분리된 *Streptomyces* sp.에 속하는 균주가 항중양 활성을 가지는 iturin A₆를 생성하는 것이 보고된 바 있다(Aftab and Sajid, 2016).

Phenazine: 방선균이 분비하는 대표적인 항진균성 항생물질

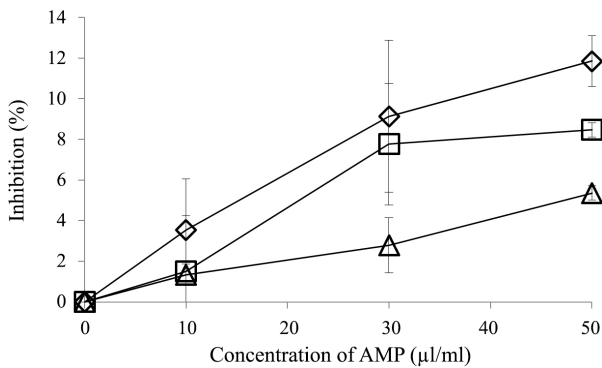


Fig. 2. Inhibition activity against plant-pathogenic fungi with addition of different concentration of antimicrobial peptide produced by *S. costaricanus* HR391. Symbols: (◇) *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici; (□) *F. oxysporum* f. sp. raphani and (△) *F. oxysporum* f. sp. niveum.

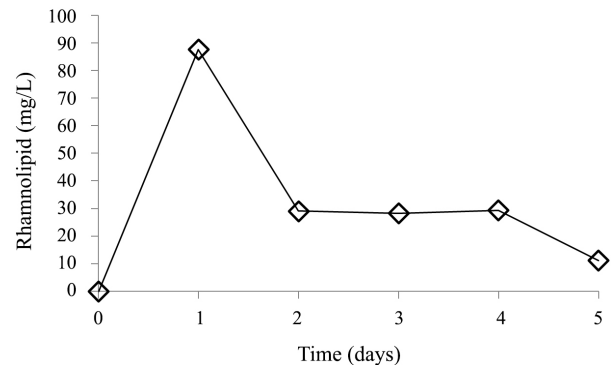


Fig. 4. Rhamnolipid production by *S. costaricanus* HR391 in 2% glycerol added MS medium.

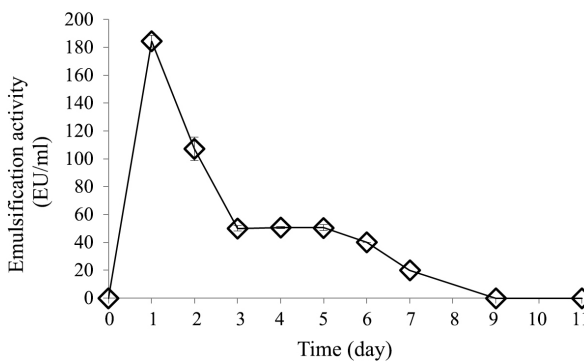


Fig. 3. Emulsification activity of *S. costaricanus* HR391 in GYE medium during 11 days.

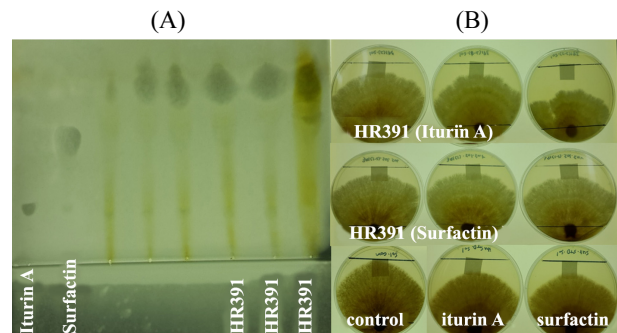


Fig. 5. Thin-layer chromatography (TLC) and bioautographic analysis of lipopeptides of *S. costaricanus* HR391. Surfactin and iturin A were used as positive controls. (A) Butanolic extracts from HR391 was fractionated by TLC and developed with H₂O. (B) Bioautographic analysis of iturin A and surfactin of HR391 against *R. solani*.

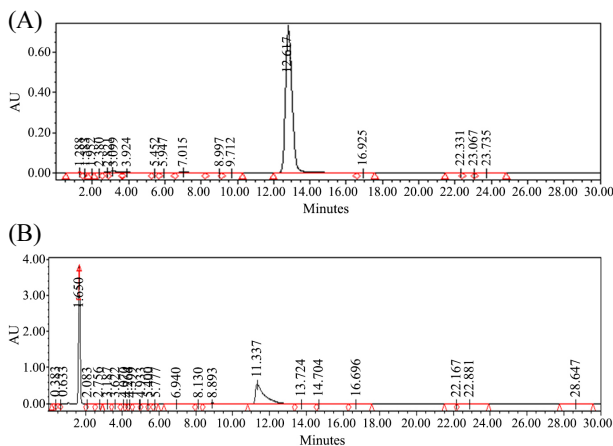


Fig. 6. HPLC analysis of 1 mM phenazine standard stock (A) and crude extract of *S. costaricanus* HR391 (B) (Retention time of phenazine: 11.3~12.9 min).

인 phenazine은 질소를 포함하는 heterocyclic compound이며 작용기의 종류와 위치에 따라 다양한 물리·화학적 특성을 가지며 넓은 작용 범위를 나타내는데 현재까지 100여 개의 천연 phenazine 구조가 알려져 있다(Laursen and Nielsen, 2004). HR391 균주의 phenazine 생성을 HPLC를 이용하여 조사하였는데 phenazine peak는 11.3~12.9분대에 검출되었으며, 5일 배양한 균주 배양액 내의 phenazine을 표준물질을 이용하여 정량한 결과 9.87 ± 0.2 mM로 나타났으며(Fig. 6), 이는 배양조건이 다르지만 약 2.5 mM의 phenazine을 생성한 *Pseudomonas chlororaphis*와 비교하여 매우 높은 결과이다(Chen *et al.*, 2015). Lipopeptide 활성 측정을 위한 배지의 경우 Afsharmanesh 등 (2014)의 방법을 이용하여 *Bacillus* sp.의 lipopeptide 측정에 사용한 MOLP 배지 조성을 따랐으나 향후 MOLP 배지 조성이 방선균의 lipopeptide 생산에도 효과적으로 적용 가능한지에 대한 조사가 필요하다.

식물호르몬 생성능

식물의 생장을 직접적으로 촉진할 수 있는 식물호르몬인 zeatin, gibberellin과 IAA를 *S. costaricanus* HR391의 BHB 배양액 내에서 정량한 결과 배양 72시간 쯤에 각각 0.59 ± 0.01 mM, 2.40 ± 0.20 mM과 46.30 ± 1.50 μ M을 생성하였다. 식물호르몬을 분비하는 *Streptomyces*의 여러 균주들이 보고된 바 있는데 HR391 균주는 밀의 생장을 촉진하는 *Streptomyces*의 3가지 종의 균주보다 IAA 생성은 약 1/4 수준이었지만 gibberellin과 zeatin은 각각 8배 이상으로 많이 생성하였다(Aldesuquy *et al.*, 1998). 항진균 활성을 나타내는 *Streptomyces* 균주로 식물생장촉진능을 동시에 나타내는 균주들은 거의 보고된 바 없으며

로(Palaniyandi *et al.*, 2013) *S. costaricanus* HR391은 식물생장에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

여러 토양에서 분리한 400여 개의 방선균 균주에 대해 4가지 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성을 조사하였으며 그중 *Streptomyces costaricanus* HR391 균주는 PDB 배지에서 식물병원성 진균인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*와 *Rhizoctonia solani*의 균사 생장을 대조군과 비교하여 각각 26.5, 26.2, 21.2와 23.8% 저해하였다. *S. costaricanus* HR391은 항진균물질인 siderophore를 98 μ M을 생성할 뿐만 아니라 유화활성을 나타내며 막지질을 파괴할 수 있는 생물계면활성제인 rhamnolipid와 lipopeptide인 iturin A와 surfactin를 생성하였다. 또한 진균세포막을 분해할 수 있는 chitinase와 glucanase 활성도 나타내었으며 병원균의 막을 파괴하는 AMP와 항생물질 phenazine도 분비하였다. 이외에도 식물생장 촉진활성을 갖는 zeatin, gibberellin과 indole acetic acid 같은 식물호르몬도 생성하였다. 이와 같이 항진균 활성을 나타내는 *S. costaricanus* HR391 균주는 다양한 종류의 항진균 물질의 상승작용과 더불어 높은 생물계면활성이 본 균주의 항진균 활성에 큰 역할을 하는 것으로 보이며 친환경적인 생물학적 항진균제로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 말

본 연구는 “2015년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비로 연구되었음(관리번호-520150401)”

References

- Abdallah, R., Mokni-Tlili, S., Nefzi, A., Jabnoun-Khiareddine, H., and Daami-Remadi, M. 2016. Biocontrol of Fusarium wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. *Biol. Control* **97**, 80-88.
- Afsharmanesh, H., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., and Behboudi, K. 2014. Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* UTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma-irradiation. *Crop Prot.* **60**, 83-92.
- Aftab, U. and Sajid, I. 2016. Antitumor peptides from *Streptomyces* sp. SSA 13, isolated from Arabian Sea. *Int. J. Pept. Res. Ther.* In Press. doi:10.107/s10989-016-9552-6.

- Aldesuquy, H., Mansour, F., and Abo-Hamed, S. 1998. Effect of the culture filtrates of *Streptomyces* on growth and productivity of wheat plants. *Folia Microbiol.* **43**, 465–470.
- Arunachalam, S., Yang, S., Zhang, L., and Suh, J. 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9621–9636.
- Berendsen, R., Pieterse, C., and Bakker, P. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* **17**, 478–486.
- Boukaew, S. and Prasertsan, P. 2014. Suppression of rice sheath blight disease using a heat stable culture filtrate from *Streptomyces philanthi* RM-1-138. *Crop Prot.* **61**, 1–10.
- Chen, Y., Shen, X., Peng, H., Hu, H., Wang, W., and Zhang, X. 2015. Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting rhizobacterium. *Genomics Data* **4**, 33–42.
- Faheem, M., Raza, W., Zhong, W., Nan, Z., Shen, Q., and Xu, Y. 2015. Evaluation of the biocontrol potential of *Streptomyces goshikiensis* YCXU against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Biol. Control* **81**, 101–110.
- Ghosh, R., Barman, S., Mukhopadhyay, A., and Mandal, N. 2015. Biological control of jackfruit by rhizobacteria and food grade lactic acid bacteria. *Biol. Control* **83**, 29–36.
- Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Kiran, B., Sandeep, D., and Rupela, O. 2011. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of Fusarium wilt of chickpea. *Crop Prot.* **30**, 1070–1078.
- Guo, S., Chen, J., and Lee, W. 2004. Purification and characterization of extracellular chitinase from *Aeromonas schubertii*. *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 550–556.
- Gupta, R. and Srivastava, S. 2014. Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiol.* **42**, 1–7.
- Han, Y., Li, Z., Miao, X., and Zhang, F. 2008. Statistical optimization of medium components to improve the chitinase activity of *Streptomyces* sp. Da11 associated with the South China Sea sponge *Craniella australiensis*. *Process Biochem.* **43**, 1088–1093.
- Kalbe, C., Marten, P., and Berg, G. 1996. Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbiol. Res.* **151**, 433–439.
- Kalyani, A., Girija, S., and Prabhakar, T. 2014. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by *Streptomyces matensis* (NBRC 12889^T) using Plackett-Burman design. *J. Biomed. Pharmac. Res.* **3**, 1–7.
- Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I., and Chermi, L. 2003. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biol. Biochem.* **35**, 323–331.
- Karadeniz, A., Topcuoğlu, S., and Inan, S. 2006. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1061–1064.
- Khopade, A., Biao, R., Liu, X., Mahadik, K., Zhang, L., and Kokare, C. 2012. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination* **285**, 198–204.
- Lausen, J. and Nielsen, J. 2004. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem. Rev.* **104**, 1663–1686.
- Loqman, S., Barka, E., Clément, C., and Ouhdouch, Y. 2009. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 81–91.
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., and Ptak, M. 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* **74**, 1047–1051.
- Mellouli, L., Ameer-Mehdi, R., Sioud, S., Salem, M., and Bejar, S. 2003. Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Res. Microbiol.* **154**, 345–352.
- Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R., and Velazhahan, R. 2004. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res.* **159**, 73–81.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 375–380.
- Palaniyandi, S., Yang, S., Zhang, L., and Suh, J. 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9621–9636.
- Park, J., Kim, J., Park, Y., and Kim, S. 2012. Purification and characterization of a 1,3-β-D-glucanase from *Streptomyces torulosus* PCPOK-0324. *Carbohydr. Polym.* **87**, 1641–1648.
- Patil, N., Waghmare, S., and Jadhav, J. 2013. Purification and characterization of an extracellular antifungal chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its application in protoplast formation. *Process Biochem.* **48**, 176–183.
- Reddy, K., Yedery, R., and Aranha, C. 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents* **24**, 536–647.
- Roberts, D., Lohrke, S., Meyer, S., Buyer, J., Bowers, J., Jacyn Baker, C., and Chung, S. 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soil borne diseases of cucumber. *Crop Prot.* **24**, 141–155.
- Rodrigues, L., Teixeira, J., van der Mei, H., and Oliveira, R. 2006. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids Surf. B* **49**, 79–86.
- Shirling, J. and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **16**, 313–340.
- Wang, Y., Lu, Z., Bie, X., and Lv, F. 2010. Separation and extraction of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 with macroporous resin. *Eur. Food Res. Technol.* **231**, 189–196.
- Xu, D., Wang, Y., Sun, L., Liu, H., and Li, J. 2013. Inhibitory activity of a novel antibacterial peptide AMPNT-6 from *Bacillus subtilis* against *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp. *Food Control* **30**, 58–61.