

분리세균에 의한 ochratoxin 생성 *Aspergillus* spp.의 성장 및 독소생성 저해

황지선^{ID} · 최호영^{ID} · 송홍규*^{ID}

강원대학교 생명과학과

Inhibition of growth and toxin production of ochratoxigenic *Aspergillus* spp. by isolated bacteria

Ji-Seon Hwang^{ID}, Ho-Yeong Choi^{ID}, and Hong-Gyu Song*^{ID}

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

(Received July 25, 2019; Revised August 14, 2019; Accepted August 14, 2019)

Ochratoxin A (OTA) that is one of mycotoxins produced mainly by *Aspergillus* spp. is a common contaminant of stored grains and poses health hazards to human and livestock. The aim of this study is to explore the ability of isolated bacteria *Bacillus subtilis* AF13 and *Streptomyces shenzhenensis* YR226 to inhibit growth and OTA production of 3 ochratoxigenic *Aspergillus* strains. The antifungal activity against mycelial growth and sporulation of *Aspergillus* strains was examined by coculture with AF13 and YR226 on potato dextrose agar plate. AF13 and YR226 reduced 77.58 and 78.48% of fungal colony radius, respectively, and both strains inhibited fungal sporulation up to 99% in 10 days of incubation. YR226 also reduced more than 91% of spore germination of 3 fungal strains. When *Aspergillus* strains were cocultured with AF13 or YR226 in yeast extract sucrose medium, mycelial growth and OTA production decreased in all three fungal strains. In particular, AF13 completely inhibited the mycelial growth of *A. alutaceus* and inhibited its OTA production by 99%, and YR226 also reduced mycelial growth and toxin production up to 99%, respectively. Antimicrobial substances produced by AF13 and YR226 included siderophore, chitinase, protease, β -1,3-glucanase and biosurfactant. These results suggest that AF13 and YR226 can be used in a biological method to prevent valuable crops against mycotoxigenic fungi, and therefore decrease economic damage in agriculture and feed industry.

Keywords: *Bacillus subtilis* AF13, *Streptomyces shenzhenensis* YR226, antifungal activity, antifungal substances, ochratoxin A

진균 독소(mycotoxins)는 사상성 진균에 의해 생성되는 2차 대사산물로서 포유류 및 조류에게 독성을 유발하는 것으로 알려진 400개 이상의 진균 독소가 존재하는 것으로 추산되며 (Bosco and Mollea, 2012), 특히 aflatoxin, ochratoxin, fumonisin 등이 큰 문제가 되고 있다. 그 중 ochratoxin은 A, B와 C의 형태로 존재하며, *Aspergillus* 속(*Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* 등)과 *Penicillium* 속(*Penicillium verrucosum* 등)에 의해 생성될 수 있는데(Zhong *et al.*, 2014), 특히 ochratoxin A (OTA)는 곡류, 코코아, 올리브, 커피, 맥주와 향신료를 포함한 다양한 식품, 음료 및 사료에서의 오염이 보고되고 있다(Birzele *et al.*, 2000; Fazekas *et al.*, 2002). OTA는 광범위한 오염 분포를 나타내며, 동물과 인간에게 신장 독성, 기형 유발, 태아 독성, 면역 독성, 유전 독성 및 신경독성을 보이고, 열에 안정적이어서 일반적인 조리과 가공 후에도 제거되지 않는다(Wangikar *et al.*, 2005). 이에 국제암 연구 기관(International Agency for Research on Cancer)은 OTA를 발암유발 가능 물질 2군으로 분류하였으며(IARC, 1993), 우리나라 또한 엄격한 규제 기준을 정하여 식품과 농산물에서 0.5~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하로 규제하고 있다(KFDA, 2017).

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

OTA를 제어하는 가장 효과적인 방법은 OTA 생성 진균의 생장을 억제하여 식품과 사료에서의 OTA 생성을 원천적으로 차단하는 것이며, 그 중 유용 미생물을 이용하여 생물학적으로 병원균을 방제하는 것이 유망한 방법으로 간주된다(Xiong *et al.*, 2017). 특히 *Bacillus* 속의 균주들은 다양한 항진균물질을 생성하여 항진균제로 잠재적인 특성을 나타낸다(Pérez-García *et al.*, 2011). *Streptomyces* 속의 nystatin 같은 항진균 항생물질을 포함하여 많은 2차 대사산물을 생성하며(Brautaset *et al.*, 2000), 다양한 *Aspergillus* 속을 억제하는 항진균 활성이 보고된 바 있다(Thenmozhi *et al.*, 2013). 이 연구에서는 보다 효율적인 OTA 생성 진균의 생장과 OTA 생성 억제를 위해, 토양시료에서 분리된 세균 균주의 OTA 생성 *Aspergillus* spp.에 대한 항진균능과 항진균물질 및 OTA 생성 억제능을 조사하였다.

재료 및 방법

OTA 생성 진균 및 진균 억제 세균 균주

OTA 분해능이 있는 71개의 토양분리 균주를 대상으로 한국 미생물 보존센터(Korea Culture Center of Microorganisms)에서 분양받은 OTA 생성 진균(*Aspergillus awamori* KCCM 32316, *Aspergillus fresenii* KCCM 60465 및 *Aspergillus alutaceus* KCCM 60421)에 대한 항진균능을 조사하였다. 그 중 진균 성장 억제능이 가장 높은 두 균주를 선별하였는데 이들은 이미 OTA 생분해능이 높다고 보고된 *Bacillus subtilis* AF13과 *Streptomyces shenzhenensis* YR226이었으며(Choi and Song, 2019), 이 두 균주를 대상으로 여러 항진균활성을 조사하였다. 균주 배양에 이용된 배지는 nutrient agar (NA), potato dextrose agar (PDA) (Difco Lab) 및 15% yeast extract sucrose (15% YES) (yeast extract 20 g, sucrose 150 g, MgSO₄ 0.5 g, 증류수 1 L, pH 6.5)이었다. 진균은 PDA 배지에서 배양하여(7일, 30°C), 포자를 0.05% (v/v) Tween 80 용액으로 회수하고 Neubauer chamber (Paul Merienfeld GmbH & Co.)를 이용하여 계수하여 사용하였다.

항진균활성

Agar spot assay: 항진균능의 유무를 조사하기 위해 수행된 agar spot assay는 Sangmanee와 Hongpattarakere (2014)의 방법을 수정하여 수행하였다. 선 배양한 세균 균주의 배양액은 분광광도계(Shimadzu UV-1700)를 이용하여 OD₆₀₀을 1.0으로 보정하여(AF13과 YR226 개체수는 각각 7.45×10^7 과 1.57

$\times 10^5$ CFU/ml) 배지 중앙 두 점에 5 μ l씩 점적 후 배양하였으며(48시간, 37°C), 집락이 형성되지 않은 경우 최대 120시간까지 배양하였다. 집락이 형성된 배지 위에 진균의 최종 포자 농도를 10^5 spores/ml로 맞춘 0.8%의 한천이 함유된 10 ml의 PDA 배지를 부어 굳힌 후, 배양하였다(30°C, 120시간). 세균 균주의 진균 생장과 포자 생성의 저해 여부로 항진균능을 판별하였다.

진균 생장 및 포자 생성 저해: 독소 생성 진균의 생장 및 포자 생성 저해에 대한 선별 균주의 효과는 Veras 등(2016)의 방법으로 평가하였다. 균주를 선 배양한 액체배지를 원심분리(1,900 \times g, 30분, 4°C; UNION 5KR, Hanil Science)하여 회수 후, 0.85% NaCl에 재현탁하여 이용하였다. 각 세균 현탁액은 15 ml의 액체 상태의 PDA와 섞어 Petri dish에 부어 굳힌 뒤, 중앙에 멸균된 paper disc (지름 5 mm)를 올리고 진균 포자 현탁액 (10^6 spores/ml) 10 μ l를 paper disc에 접종하였다. 대조구는 세균 없이 동일한 조건으로 수행하였고, 모든 평판 배지는 25°C에서 10일 동안 배양하며 진균 집락의 반경을 24시간마다 측정하여 진균 생장 저해를 조사하였다. 또한 이 배지에서 자라난 진균의 포자를 15 ml의 Tween 80 (0.05%, v/v) 용액으로 회수하고 Neubauer chamber를 이용하여 계수하여 포자 생성 저해를 정량하였다.

포자 발아 억제: 진균 포자의 발아 저해에 대한 선별 균주의 효과를 조사하기 위해 Veras 등(2016)의 방법을 수정하여 수행하였다. 800 μ l의 15% YES 배지가 담긴 1.5 ml 미세원심분리관에 진균 포자 현탁액(10^6 spores/ml) 100 μ l와 세균 현탁액 (10^7 CFU/ml) 100 μ l를 첨가하였으며, 대조구는 세균 현탁액 대신 0.85% NaCl 용액을 100 μ l 첨가하여 수행하였다. 모든 실험구는 25°C에서 24시간 동안 배양 후 포자 발아 정도를 광학 현미경($\times 400$)으로 관찰하였다. 발아관의 길이가 포자의 지름과 같거나 길 때, 발아한 것으로 간주하였고, 각 실험구 당 무작위로 포자 100개를 관찰하여 포자 발아율을 계산하였다.

액체배지에서 진균 생장과 독소 농도 변화: 액체배지에서 진균 생장과 독소 농도 변화에 대한 선별 균주의 효과는 El-Gendy와 Marth (1981)의 방법을 수정하여 조사하였고, 독소 분석은 Xiong 등(2017)의 방법을 수정하여 평가하였다. 멸균된 15% YES 배지 45 ml에 세균 균주의 포자 현탁액(10^6 spores/ml) 1%와 세균 배양액(10^7 CFU/ml) 10%를 동시에 접종하였으며 대조구는 포자 현탁액만 접종하였다. 모든 실험구는 30°C에서 5일간 배양(200 rpm, 암조건)하였으며, 24시간 주기로 복식 시료로부터 Whatman 여과지 No. 1으로 진균 균사체를 걸러냈다. 균사체의 건조 중량은 흡 후드에서 질량 변화가 없을 때까지 건조시킨 후 측정하여 균사 생장 저해를 정량하였다.

OTA 추출을 위해 각 배양액을 250 ml 분별 깔때기에 담고 100 ml의 chloroform을 넣어 진탕하였다(20분, 300 rpm). 진탕 후 chloroform은 flat bottom flask로 모두 옮겨 담았으며, 이 과정을 2회 반복하였다. 회전 감압 증발기로 chloroform을 모두 증발시키고(55°C), 70% methanol (v/v)을 첨가하여 재용해시킨 후, 시린지 필터(Hyundai micro, 0.2 µm, hydrophobic)로 여과하여 high performance liquid chromatography (HPLC; Younglin, YL9100 HPLC System)로 Symmetry C18 column (150 × 4.6 mm) (Waters Co.)을 이용하여 분석하였다. 분석에 이용한 이동상은 물/아세트나이트릴/초산(99:99:2, v/v)이며, column oven의 온도는 30°C, 시료 주입량은 20 µl, 유속은 1 ml/min으로 하여 형광 검출기(FLD; Agilent Technologies, 1260 Infinity, 333 nm excitation, 460 nm emission)을 이용하여 15분간 분석하였다. 검량선은 OTA 표준물질(Cayman Chemical Co.)로 작성하여 OTA를 정량하였다.

항진균물질

Siderophore: Chrome azurol S (CAS) agar 배지에 well을 뚫어 균주 배양 상등액 70 µl를 넣은 후 배양하여(30°C, 암 조건, 48 시간) 투명 혹은 노란색 환의 형성 유무로 siderophore 생성을 조사하였다(Schwyn and Neilands, 1987). 정량분석을 위해 24 시간마다 배양 상등액을 pH 2.0으로 보정 후, 동량의 ethyl acetate로 진탕하였다. 유기상 5 ml와 Hathway 용액 5 ml의 반응(30 min, 암조건) 후 분광광도계(Shimadzu UV-1700, Shimadzu Co.)로 OD₇₀₀을 측정하였으며, dihydroxy benzoic acid를 이용하여 표준곡선을 작성해 정량하였다(Nagarajkumar *et al.*, 2004).

Chitinase: 균주의 chitinase 생성능은 colloidal chitin을 탄소 원으로 첨가한 배지에 균주를 희석 배양하여(7일) 집락 근처 투명대 형성 유무로 정성분석 하였다. 정량분석은 basal salt 배지에 균주를 배양하여 회수한 상등액 500 µl에 1% colloidal chitin이 첨가된 인산나트륨 완충액(50 mM, pH 7) 500 µl를 혼합하여 반응시켜(1 h, 37°C) DNS 용액을 첨가한 뒤 생성된 산물인 N-acetylglucosamine의 농도를 OD₅₇₅로 측정하였다(Nagpure and Gupta, 2013). 효소 활성 1 U은 60분간 1 ml당 1 µmol의 산물을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

Protease: 균주를 2% skim milk agar (Difco Lab.)에 희석 배양하여 집락 주변 투명대로 protease 생산 여부를 판단하였다. Protease 활성 조사를 위해 24시간마다 균주 배양 상등액을 회수하여 1% gellatin이 함유된 인산칼륨완충액(50 mM, pH 6.8)과 반응(1 h, 30°C) 후 15% trichloroacetic acid 용액으로 반응

을 중지시켰다. 그 후 원심분리하여 상등액의 OD₂₈₀을 측정하여 그것을 0.01 증가시키는 효소의 양을 1 U로 정의하였다 (Maria Fedatto *et al.*, 2006).

β-1,3-Glucanase: Peptone-bouillon-yeast agar (Difco Lab.)에 균주를 희석 배양 후 형성된 집락 주변 투명대를 통해 β-1,3-glucanase의 생성을 판단하였으며 이를 토대로 정량실험을 실시하였다. 균주 배양 상등액 450 µl에 기질로 laminaran을 1% 첨가하여 반응시킨 후(10 min, 40°C), DNS 용액 200 µl를 첨가하여 100°C에서 3분간 반응시키고 냉각하여 반응을 종료시켰다. 시료의 OD₅₅₀을 측정하고 효소의 활성은 1% laminaran을 이용하여 40°C에서 1분당 1 mmol의 glucose를 생산하는 효소의 양을 1 U로 정의하였다(Marcello *et al.*, 2010).

계면활성물질: 균주 배양 상등액의 계면활성을 조사하기 위해 원유에 배양 상등액을 떨어뜨려 원유가 넓게 퍼지는지 관찰하였고(Rodrigues *et al.*, 2006), 배양 상등액의 표면장력은 표면장력계(Model 514-B2, Itoh Seisakuso)를 이용하여 LB 배지와 비교하였다. 균주가 생산하는 계면활성물질의 잔기를 조사하기 위해 배양 상등액의 pH를 2.0으로 보정하여 동량의 ethyl acetate로 추출하고 감압증발하여 농축시켰다. 농축 시료를 thin layer chromatography plate (silica gel 60, 70~230 mesh; Merck)에 점적하여 이동상(chloroform : methanol : glacial acetic acid = 65 : 15 : 2, v/v)으로 전개 후 ninhydrin과 bromothymol blue 시약으로 각각 단백질과 지방 잔기를 조사하였고(Sharma and Saharan, 2014), 당 잔기는 이동상(chloroform : methanol : water = 65 : 15 : 2, v/v)으로 전개 후 orcinol 시약으로 염색하여 물질의 성질을 판단하였다(Nayak *et al.*, 2009).

통계 분석

모든 실험은 3회 반복하였으며, 통계 분석은 SPSS v. 24.0 (IBM SASS statistics 24, USA)를 이용하여 수행하였다. 항진균능과 분해능에서 대조군과 처리군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 Independent two-sample t-test를 통해 조사하였다. 모든 실험에 대해 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 차이가 있다고 보았다.

결과 및 고찰

OTA 생성 진균 억제 세균 균주

OTA 분해 균주 선별을 위한 Coumarin 배지를 이용하여 다양한 출처의 토양 시료에서 분리된 71개의 균주(Choi and Song,

2019) 중 OTA 생성 진균에 대한 항진균능이 가장 우수한 균주는 AF13과 YR226이었다. 두 균주는 (주)코스모진텍에 의뢰하여 얻은 16S rRNA 유전자 염기서열을 미국 NCBI database에 등록된 균주와 비교 시, 각각 *Bacillus subtilis* DSM10 및 *Streptomyces shenzhenensis* 172115와 99.0%의 상동성을 보였다. 선별 균주의 염기서열은 각각 MN305769와 MN305738로 GenBank에 등록하였고, 균주는 생물자원센터(KCTC)에 기탁하였다(KCTC18741P 및 KCTC18742P).

항진균 활성

진균 성장 및 포자 생성 저해: Agar spot assay에서 OTA 생성 진균에 대한 항진균 활성을 확인한 분리균주에 대해 평판배지에서 진균 성장과 포자 생성 저해 활성을 측정하였다. AF13 균주는 대조구에 비하여 *A. alutaceus* KCCM 60421와 *A. fresenii* KCCM 60465의 균사 성장을 각각 77.58%와 63.19% 저해하였으며, 포자 생성을 각각 87.98%와 99.96% 억제하였다. YR226 균주도 이와 유사하게 두 진균의 균사 성장을 대조구에 비해 각각 78.48%와 75.82%, 포자 생성을 각각 98.69%와 99.96% 감소시켰다(Table 1). 이는 AF13과 동일 종인 *Bacillus subtilis* CW14 균주가 OTA 생성 진균의 균사 성장을 30.00% 저해한 것보다 좋은 결과였으며(Shi *et al.*, 2014), *Bacillus* sp.이 OTA 생성 진균인 *A. carbonarius*의 포자 생성을 20.80% 억제한 결과보다 효과적이었다(Veras *et al.*, 2016). *A. awamori* KCCM 32316의 경우 포자 생성 저해는 나타났지만, 균사의 생장이 저해되지 않았다. 독소 생성 진균의 포자 생성이 진균 독소 생성과 관련 있음이 보고된 바 있는데(Brodhagen and Keller, 2006), AF13과 YR226 균주는 *A. awamori* KCCM 32316의 성장을 억제하지 못했지만, 포자 생성을 억제한 것으로 보아 진균 독소 생성을 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

포자 발아 억제: AF13 균주는 OTA 생성 진균 3종의 포자 발아를 대조구에 비해 45% 이상 감소시켰으며, YR226 균주는 *A.*

fresenii KCCM 60465의 포자 발아를 대조구에 비해 최대 99% 억제하였다(Table 2). AF13 균주보다 YR226 균주가 독소 생성 진균의 포자 발아 저해에 더 효과적이었으며, 이는 *Bacillus* sp.가 *Aspergillus* sp. UCO2A의 포자 발아를 완전히 저해한다는 결과보다는 낮은 수치였으나, 다른 3종의 *Aspergillus* sp.의 포자 발아 억제 결과와 유사하거나 높은 값을 나타냈다(Veras *et al.*, 2016). 그리고 포자 발아의 효과적인 저해는 진균의 유도기를 지연시켜, 생존 능력을 감소시킨다는 연구 결과를 뒷받침할 수 있다(Cavaglieri *et al.*, 2005).

액체배지에서 진균 성장과 독소 농도 변화: OTA 생성 진균과 선별 균주 AF13과 YR226을 YES 배지에 동시 접종하여 5일 배양 시, 대조구의 균사 건조 중량은 평균 1.023~1.082 g이었으며 생성된 OTA는 *A. alutaceus* KCCM60421, *A. awamori* KCCM32316과 *A. fresenii* KCCM60465 배양에서 각각 393.72 ± 2.32, 5.95 ± 0.42와 137.16 ± 0.66 µg/L이었다. 처리구의 진균 성장(균사의 건조 중량)과 OTA 농도는 대조구에 비하여 크게 억제되었다. AF13 균주는 3종의 진균의 균사 성장을 97% 이상 저해하였으며, OTA 농도는 대조구에 비해 최대 99% 감소시켰다. YR226 균주는 3종의 진균 성장을 73% 이상 억제하였고, 진균 2종의 OTA 생성을 100% 감축시켰다(Table 3). 3종

Table 2. Inhibiting effect of AF13 and YR226 on spore germination of ochratoxigenic *Aspergillus* strains

Toxigenic <i>Aspergillus</i> spp.	Strain	Spore germination inhibition (%)
<i>A. awamori</i> KCCM32316	AF13	45.45 ± 4.63*
	YR226	91.04 ± 2.59**
<i>A. alutaceus</i> KCCM60421	AF13	45.41 ± 11.21*
	YR226	94.12 ± 4.24***
<i>A. fresenii</i> KCCM60465	AF13	56.57 ± 5.82*
	YR226	99.48 ± 0.52***

* significant at $p < 0.05$; ** significant at $p < 0.01$; *** significant at $p < 0.001$

Table 1. Inhibiting effect of AF13 and YR226 on mycelial growth and sporulation of ochratoxigenic *Aspergillus* strains

Toxigenic <i>Aspergillus</i> spp.	Strain	Mycelial growth reduction (%)	Sporulation inhibition (%)
<i>A. awamori</i> KCCM32316	AF13	0.00 ± 0.00	50.01 ± 0.02***
	YR226	0.00 ± 0.33	75.08 ± 0.03***
<i>A. alutaceus</i> KCCM60421	AF13	77.58 ± 0.17***	87.98 ± 0.03***
	YR226	78.48 ± 1.04***	98.69 ± 0.01***
<i>A. fresenii</i> KCCM60465	AF13	63.19 ± 0.17**	99.96 ± 0.00**
	YR226	75.82 ± 0.33***	99.96 ± 0.00**

** significant at $p < 0.01$; *** significant at $p < 0.001$

Table 3. Inhibition of growth and toxin production of *Aspergillus* strains with simultaneous inoculation of strains AF13 and YR226 in 15% YES medium (30°C, 200 rpm, 120 h)

Toxigenic <i>Aspergillus</i> spp.	Strain	Inhibition of fungal growth (%)	OTA decrease (%)
<i>A. awamori</i> KCCM32316	AF13	97.82 ± 0.01*	71.90 ± 0.57*
	YR226	73.36 ± 0.04*	100.00 ± 0.07***
<i>A. alutaceus</i> KCCM60421	AF13	100.00 ± 0.00*	99.41 ± 0.81***
	YR226	99.35 ± 0.01*	99.80 ± 0.45***
<i>A. fresenii</i> KCCM60465	AF13	99.84 ± 0.00*	96.86 ± 2.20
	YR226	82.60 ± 0.03***	100.00 ± 0.05

* significant at $p < 0.05$; *** significant at $p < 0.001$

의 진균에 대해 독소 감축이 가장 효과적인 YR226 균주의 경우, 배양 5일 후에 최대 393.71 µg/L의 OTA를 생성하는 *A. alutaceus* KCCM 60421을 선별 균주와 동시 접종 시, 0.80 µg/L까지 감소시켰다. AF13과 YR226 균주는 높은 OTA 분해 활성도 나타냈기 때문에(Choi and Song, 2019), 진균의 생장을 저해하여 독소 생산도 억제하고, 일부 생성된 진균 독소를 효과적으로 분해하는 것으로 보인다. 하지만 Zhu 등(2014)은 항진균성 효소의 OTA 생성 진균에 대한 항진균능이 배지 조건에서는 효과적이었지만, 실제 작물에 적용하였을 때에는 항진균능이 감소하였다고 보고하였다. 아마 여러 환경 요인이 연관될 수 있을 것으로 추정되며, 따라서 AF13과 YR226 균주도 실제 작물을 대상으로 한 후속연구가 필요하다.

항진균물질

Siderophore: Siderophore는 환경에 존재하는 철 이온과 결합하여 가용성을 감소시켜 병원균의 생장을 저해시킨다고 알려져 있다(Husen, 2003). AF13과 YR226 균주의 배양 상등액은 CAS agar 배지에 뚫은 well에 첨가 시 투명환을 형성하여 siderophore 생산을 나타내었다. AF13과 YR226 균주의 sidero-

phore 생성을 측정하였는데 두 균주 모두 배양 48시간 후 각각 35.4와 96.7 µM의 최대 생산을 보였다(Fig. 1A). 이는 Nagarajkuma 등(2004)이 보고한 14개 *Pseudomonas fluorescens* 균주의 siderophore 생산량보다 모두 높은 결과이다. 특히 14개 균주 중 가장 생산량이 적은 PfMDU12 균주와 YR226 균주의 siderophore 생성량은 약 32배 이상 차이가 난다.

Chitinase: 진균 세포벽의 주성분인 chitin을 분해하는 chitinase는 다양한 식물병원성 진균을 제어할 수 있으며(Parani *et al.*, 2011), 또한 chitinase를 생산하는 미생물은 OTA 생성 진균의 생장도 억제할 수 있다. AF13과 YR226 균주를 colloidal chitin 첨가 배지에서 7일 배양 시 집락 주변에 투명한 환이 생성되어 두 균주의 chitinase 생산을 확인하였다. 이후 24시간 주기로 효소 활성을 측정된 결과, AF13 균주는 배양 72시간째에 1.92 U/ml, YR226 균주는 배양 96시간 후에 2.09 U/ml의 최대 활성을 나타내었다(Fig. 2B). 이는 배양 24시간에 chitinase 최대 활성을 나타낸 *Zymomonas* sp.의 1.68 U/ml보다 각각 14와 24% 더 높았으며(Ong *et al.*, 2017), Rahmawati 등(2016)이 분리한 26균주(1.46 U/ml)와 31균주(0.46 U/ml)의 최대 활성보다 훨씬 높은 결과이다.

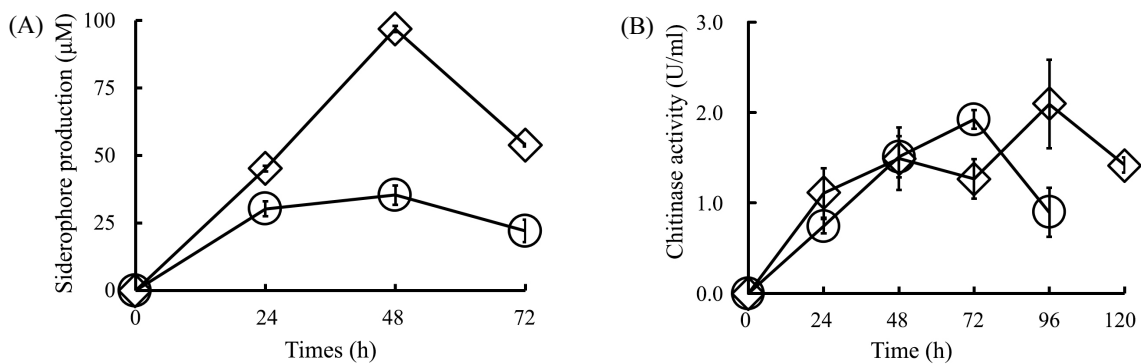


Fig. 1. Catechol siderophore (A) and chitinase (B) production by strains *B. subtilis* AF13 (O) and *S. shenzhenensis* YR226 (◇).

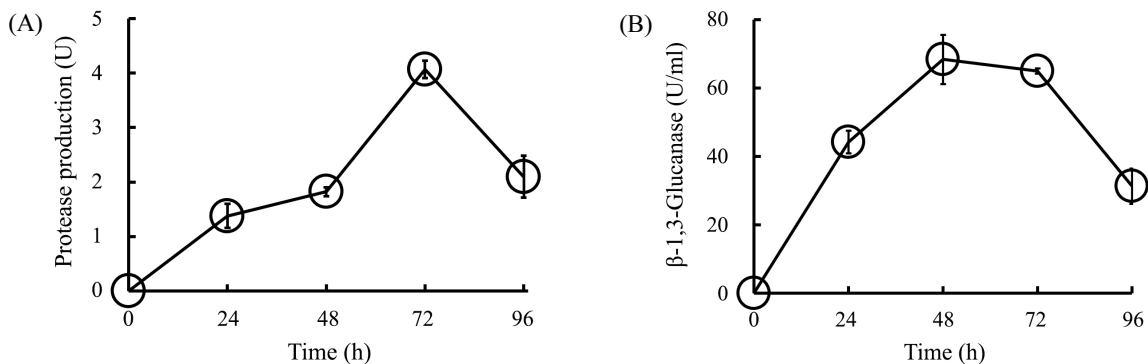


Fig. 2. Protease (A) and β-1,3-glucanase (B) production by *B. subtilis* AF13 (O) during 96 h.

Protease: 세균 균주가 생산하는 protease가 포자 발아 저해 등 직접적인 항진균 활성을 나타내거나(Dunne *et al.*, 2000), 또는 항균능을 지닌 peptide 가수분해물을 생성하여 항균 활성을 나타낼 수 있다(Nagarajkumar *et al.*, 2004). 2% skim milk agar에 AF13과 YR226을 획선 도말한 후 배양 24시간 만에 AF13 주변에 투명환이 관찰되어 protease 활성을 확인한 후 AF13의 protease 생성을 측정하였는데, 배양 72시간에 4.1 U로 가장 높았다(Fig. 2A). 이는 *Xyloella fastidiosa*의 활성과 유사하며(Maria Fedatto *et al.*, 2006), *Stenotrophomonas maltophilia* W81A1과 W81M1 균주의 0.8 및 0.8 U의 활성보다 높았다(Dunne *et al.*, 2000). *Bacillus* 속 세균은 세포 외 protease의 주된 생산자로 알려져 있으며(Pant *et al.*, 2015), *B. subtilis* AF13이 생산하는 protease가 독소 생성 진균을 방제하는 효소로 상업적인 이용 가능성이 기대된다.

β -1,3-Glucanase: β -1,3-Glucanase는 진균 세포벽의 주요 성분인 β -1,3-glucan을 분해하는 효소로서 chitinase와 함께 진균 제어에 중요한 역할을 한다(Fridlender *et al.*, 1993). Peptone-bouillon-yeast agar를 이용한 β -1,3-glucanase 활성 조사 시 YR226 균주는 투명대가 나타나지 않았고 AF13 집락 주변에는 투명대가 형성되어 AF13 균주만의 β -1,3-glucanase 생산이 확인되었다. 정량조사 시 배양 48시간째에 68.4 U/ml의 최대 효소 활성을 나타낸 후 서서히 감소하였다(Fig. 2B). *Trichoderma asperellum* T00의 최대 활성이 약 0.6 U/ml였던 것에 비해(da Silva Aires *et al.*, 2012) AF13 균주는 약 100배 더 높은 β -1,3-glucanase 활성을 나타내었다.

계면활성물질: 병원성 미생물의 저항성이 증가함에 따라 새로운 항균 물질로 생물계면활성물질이 주목을 받고 있다(Banat *et al.*, 2010). 미생물이 생산하는 계면활성물질은 화학계면활성제보다 낮은 독성, 높은 생분해성 및 환경 친화성 등 많은 장점을 가지고 있다(Kretschmer *et al.*, 1982). AF13과 YR226 균주의 배양 상등액 모두 원유를 넓게 퍼뜨리는 계면활성을 보였으며, 배양 상등액의 표면장력 측정 시 초기의 63.7 mN/m을 AF13 균주는 배양 48시간에 35.3 mN/m로, YR226 균주는 배양 120시간에 37.0 mN/m로 감소시켰다. 이들이 생산하는 계면활성물질의 성질을 TLC로 조사하였는데, TLC 판을 다양한 염색시약으로 염색하였을 때 AF11 배양액은 ninhydrin과 bromothymol 시약에 양성반응을 보였으며 YR226 배양액은 orcinol, ninhydrin 및 bromothymol 시약 모두에 염색되었다. 특히, Nayak 등(2009)의 전개 조건으로 TLC 수행 시 YR226 추출물에서 *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04가 생산하는 monorhamnolipid의 Rf값과 동일한 결과를 보였으며, 해당 TLC 분석을 증류수에 녹여 항진균 활성 조사 시 진균 성장 억제효과

가 나타났다. 표면 활성 이외에, rhamnolipid는 항세균성, 항진균성 및 항바이러스성을 갖는 것으로 알려져 있다(Stanghellini and Miller, 1997). 또한 blood agar에 세균 균주를 획선 배양하였을 때 AF13 균주에서 용혈 현상이 나타났다(결과 미제시). *B. subtilis* ATCC 21332가 생성하는 계면활성물질인 surfactin이 용혈 활성이 있다고 보고되었는데(Das *et al.*, 2008), AF13 균주도 surfactin의 생산 가능성이 있다. 하지만 AF13과 Y226 균주가 생산하는 정확한 종류의 계면활성물질에 대해서는 추가적인 분석이 필요하다.

적 요

Ochratoxin A (OTA)는 주로 *Aspergillus*가 생성하는 진균 독소의 하나로 저장 곡물의 흔한 오염물질로 인간과 가축의 건강을 위협하고 있다. 본 연구의 목적은 분리 세균인 *Bacillus subtilis* AF13과 *Streptomyces shenzhenensis* YR226의 OTA 생성 *Aspergillus* 균주들에 대한 생장과 OTA 생성 저해능 조사이다. OTA 생성 세균들의 균사 생장과 포자 형성에 대한 항진균활성은 한천 평판에서 AF13과 YR226 균주와의 공동배양에 의해 조사되었다. AF13과 YR226은 10일 배양 중 진균 집락 직경을 각각 77.58%와 78.48% 감소시켰으며, 두 균주 모두 포자 형성을 99%까지 저해하였다. YR226은 또한 세 진균 균주의 포자 발아도 91% 이상 감소시켰다. Yeast extract sucrose 배지에서 *Aspergillus*와 AF13 또는 YR226 균주를 동시배양하였을 때 세 종류 진균 모두 균사체 생장과 OTA 생성이 감소하였다. 특히 AF13은 *A. alutaceus*의 균사체 생장을 완전히 저해하고 OTA 생성은 99% 감소시켰으며, YR226은 균사체 생장과 독소 생성을 99%까지 저해하였다. AF13과 YR226이 생성하는 항진균물질에는 siderophore, chitinase, protease, β -1,3-glucanase와 biosurfactant가 포함된다. 이 결과는 AF13과 YR226이 독소생성 진균으로부터 가치있는 농작물을 보호하는 생물학적 방법으로 이용될 수 있으며, 따라서 농업과 사료 산업에서 경제적 피해를 감소시킬 수 있을 것이다.

감사의 말

본 연구는 중소기업기술정보진흥원의 산학연협력기술개발 사업의 지원으로 수행되었습니다(과제번호 C1013743-01-01).

References

- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, and Marchant R.** 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 427–444.
- Birzele B, Prange A, and Krämer J.** 2000. Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters. *Food Addit. Contam.* **17**, 1027–1035.
- Bosco F and Mollea C.** 2012. Mycotoxins in food. pp. 169–200. In Valdez B. (ed.) *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*, IntechOpen, DOI:10.5722/2491.
- Brautaset T, Sekurova ON, Sletta H, Ellingsen TE, Strøm AR, Valla S, and Zotchev SB.** 2000. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem. Biol.* **7**, 395–403.
- Brodhagen M and Keller NP.** 2006. Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Mol. Plant Pathol.* **7**, 285–301.
- Cavaglieri L, Orlando J, and Etcheverry M.** 2005. *In vitro* influence of bacterial mixtures on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B₁ production: effect of seeds treatment on maize root colonization. *Lett. Appl. Microbiol.* **41**, 390–396.
- Choi HY and Song HG.** 2019. Removal of mycotoxin ochratoxin A by isolated bacteria. *Korean J. Microbiol.* **55**, 33–38.
- da Silva Aires R, Steindorff A, Ramada M, de Siqueira S, and Ulhoa C.** 2012. Biochemical characterization of a 27 kDa 1,3- β -D-glucanase from *Trichoderma asperellum* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Carbohydr. Polym.* **87**, 1219–1223.
- Das P, Mukherjee S, and Sen R.** 2008. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1675–1684.
- Dunne C, Moëne-Loccoz Y, de Bruijn FJ, and O'Gara F.** 2000. Overproduction of an inducible extracellular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81. *Microbiology* **146**, 2069–2078.
- El-Gendy SM and Marth EH.** 1981. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. *J. Food Prot.* **44**, 211–212.
- Fazekas B, Tar AK, and Zomborszky-Kovács M.** 2002. Ochratoxin A contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001. *Acta Vet. Hung.* **50**, 177–188.
- Fridlender M, Inbar J, and Chet I.** 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* **25**, 1211–1221.
- Husen E.** 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. *Indones. J. Agric. Sci.* **4**, 27–31.
- International Agency for Research on Cancer (IARC).** 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Vol. 56, pp. 490–523. World Health Organization.
- Korea Ministry of Food and Drug Safety (KFDA).** 2017. Common standards and specification for general food. Food Code (No. 207-57-20170630). p. 41.
- Kretschmer A, Bock H, and Wagner F.** 1982. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkane. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 864–870.
- Marcello CM, Steindorff AS, da Silva SP, Silva Rdo N, Mendes Bataus LA, and Ulhoa CJ.** 2010. Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiol. Res.* **165**, 75–81.
- Maria Fedatto L, Silva-Stenico ME, Etcheagaray A, Pacheco FT, Rodrigues JL, and Tsai SM.** 2006. Detection and characterization of protease secreted by the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiol. Res.* **161**, 263–272.
- 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.
- Nagpure A and Gupta RK.** 2013. Purification and characterization of an extracellular chitinase from antagonistic *Streptomyces violaceusniger*. *J. Basic Microbiol.* **53**, 429–439.
- Nayak AS, Vijaykumar MH, and Karegoudar TB.** 2009. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. *Int. Biodeter. Biodegr.* **63**, 73–79.
- Ong LGA, Lam HK, Lim MY, and Tan TX.** 2017. Process optimization on chitinase production by locally isolated *Enterobacter* sp. and *Zymomonas* sp. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* **8**, 286–289.
- Pant G, Prakash A, Pavani JVP, Bera S, Deviram GVNS, Kumar A, Panchpuri M, and Prasuna RG.** 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *J. Taibah. Univ. Sci.* **9**, 50–55.
- Parani K, Shetty GP, and Saha BK.** 2011. Isolation of *Serratia marcescens* SR1 as a source of chitinase having potentiality of using as a biocontrol agent. *Indian J. Microbiol.* **51**, 247–250.
- Pérez-García A, Romero D, and de Vicente A.** 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 187–193.
- Rahmawati H, Purnomo AJ, Umniyat S, Pramiadi D, and Sari N.** 2016. Identification and characterization of chitinase enzyme producing bacteria from bat guano and its potential to inhibit the growth of fungus *Colletotrichum* sp. cause anthracnose on the chili by *in vitro*. *Int. J. Adv. Agric. Environ. Eng.* **3**, 249–254.
- Rodrigues LR, Teixeira JA, van der Mei HC, and Oliveira R.** 2006. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **49**, 79–86.
- Sangmanee P and Hongpattarakere T.** 2014. Inhibitory of multiple

- antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Control* **40**, 224–233.
- Schwyn B and Neilands JB.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47–56.
- Shi L, Liang Z, Li J, Hao J, Xu Y, Huang K, Tian J, He X, and Xu W.** 2014. Ochratoxin A biocontrol and biodegradation by *Bacillus subtilis* CW 14. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 1879–1885.
- Stanghellini ME and Miller RM.** 1997. Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant Dis.* **81**, 4–12.
- Thenmozhi M, Kannabiran K, Kumar R, and Gopiesh Khanna V.** 2013. Antifungal activity of *Streptomyces* sp. VITSTK7 and its synthesized Ag₂O/Ag nanoparticles against medically important *Aspergillus* pathogens. *J. Mycol. Med.* **23**, 97–103.
- Veras FF, Correa AP, Welke JE, and Brandelli A.** 2016. Inhibition of mycotoxin producing fungi by *Bacillus* strains isolated from fish intestines. *Int. J. Food Microbiol.* **238**, 23–32.
- Wangikar PB, Dwivedi P, Sinha N, Sharma AK, and Telang AG.** 2005. Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B₁ with special reference to microscopic effects. *Toxicology* **215**, 37–47.
- Xiong K, Wang XL, Zhi HW, Sun BG, and Li XT.** 2017. Identification and safety evaluation of a product from the biodegradation of ochratoxin A by an *Aspergillus* strain. *J. Sci. Food Agric.* **97**, 434–443.
- Zhong QD, Li GH, Wang DB, Shao Y, Li JG, Xiong ZH, and Wu YN.** 2014. Exposure assessment to ochratoxin A in Chinese wine. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 8908–8913.
- Zhu C, Shi J, Jiang C, and Liu Y.** 2015. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* *in vitro* and *in vivo* through antagonistic yeasts. *Food Control* **50**, 125–132.