

항진균성 방선균 *Promicromonospora* sp. KH-280이 생산하는 Chitinase와 항생물질에 의한 시드름병균 *F. oxysporum*의 생육억제

한길환 · 이창은¹ · 김상달*
영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과, ¹원예학과

Antagonistic Role of Chitinase and Antibiotic Produced by *Promicromonospora* sp. KH-28 toward *F. oxysporum*. Han, Kil-Hwan, Chang-Un Lee¹, and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, ¹Department of Horticulture, College of Natural Resources, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea – Antagonistic *Promicromonospora* sp. KH-28 isolated from a suppressive soil could produce a chitinase and a antifungal antibiotic for the biocontrol ability. The chitinase and the antibiotic appeared to inhibit plant pathogens of *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Alternaria kaki*, *Fusarium solani*, *Stemphylium* sp. and *Pseudomonas fluorescens*. The antibiotic produced from the strain was identified as a antifungal substance of 503 dalton having a pyrimidine skeleton with an aliphatic side chain. The *Promicromonospora* sp. KH-28 was able to suppress effectively *F. oxysporum* derived-fusarium wilt of red-pepper plant in the pot *in vivo* test.

Key word : *Promicromonospora* sp., multifunctional biocontrol agent, chitinase, antibiotic

농업의 발전은 화학비료 및 화학농약의 사용을 증가시켰으며 화학농약의 과다사용은 식물병원균의 화학농약에 대한 저항능 획득, 농산물의 잔류독성, 토양의 산성화, 인축의 독성, 천적에 미치는 영향과 식수원의 오염 및 생태계 파괴 등 그 피해가 날로 심각해지고 있다. 따라서 이와 같은 화학농약에 의한 극심한 부작용으로부터 벗어나기 위한 대체 방제방법으로 토양내의 길항미생물에 의한 식물병원균의 억제방법인 생물방제법이 연구되고 있다[1]. 길항미생물을 이용한 진균병의 생물방제 기작은 진균성 식물병원균의 세포벽을 구성하는 chitin, β -1,3-glucan 등의 외막물질을 chitinase, glucanase 등의 가수분해효소를 이용하여 분해, 억제하는 방제기작[7, 12]과 blastidin S, validamycin, kasugamycin, polyoxin 등의 길항미생물이 생산하는 항진균성 항생물질을 이용하여 식물병원균의 생육을 직접적으로 억제하는 항생기작이 있다[4, 5, 9, 10]. 또한 토양환경내에 병원성진균의 생육에 필요한 무기염류(Mg^{2+} , Fe^{2+}) 등을 경쟁적으로 결합흡수함으로써 타 병원성 진균의 생육을 저해하는 경쟁기작 등이 있다[2, 8, 11]. 이러한 여러가지 길항기작중에 외막가수분해효소인 chitinase 나 항생물질은 방선균에 의해 대부분 생산되어 이용되고 있다.

본 연구에서는 토양 내에서 병원성 진균을 특이적으로 강력하게 저해하는 길항미생물을 자연농업을 하는 저병해 경작지 토양으로부터 분리 선발하여 식물병원균 *Fusarium oxysporum*에 의한 토양전염성 고추 시드름병 방제에 유효함을 확인하였고, 이를 위해 길항방선균 *Promicromonospora*

sp. KH-28로 그 분류학적으로 동정한 전보[3]에 이어 그 방제력이 외막가수분해 효소인 chitinase 생산능과 항생물질 생산능의 두가지 길항능력에 기인됨을 밝혔다. 또한 길항작용의 원인물질인 항생물질을 분리하여 그 구조를 추정하였다. 아울러 실제 토양내에서의 방제효과를 *in vivo* pot 실험으로 확인함으로써 활용성을 확인할 수 있었다.

재료 및 방법

항진균성 chitinase 생산성 확인 및 길항력

항진균성 방선균주 *Promicromonospora* sp. KH-28[3]을 chitinase 생산배지(colloidal chitin 4 g, K_2HPO_4 0.7 g, $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 g, KH_2PO_4 0.3 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, $MnCl_2$ 1.0 mg, $ZnSO_4$ 1.0 mg, agar 20 g, pH 7.0, 1 l당)의 평판배지 상에서 선발된 균주를 접종, 배양시켜 colloidal chitin의 분해를 clear zone 형성으로 확인하였다. 또한 상기 chitinase 생산용 액체배지에 4일간 배양시켜 원심분리한 후 배양상등액을 황산암모늄으로 침전시켜 Sigma사의 membrane sack(M.W. 12,000)으로 투석시켜 20배 농축, 조정제한 chitinase를 이용하여 활성을 확인하였다. 생산된 chitinase 효소를 이용하여 paper disk 법에 의해 식물병원성 균주에 대한 저해력을 확인하였다.

Chitinase 효소활성은 0.1 M citrate buffer(pH 6.0) 2.0 ml, 0.5%의 colloidal chitin 1.0 ml을 넣고 조효소액 2.0 ml을 첨가하여 40°C에서 1시간 동안 진탕 반응시킨 후 1 ml의 반응액을 100°C에서 15 분간 가열하여 반응을 정지시킨 후 측정하였다. 반응액을 분해되지 않은 chitin과 분리하기 위해 5000 rpm으로 원심분리시킨 후 상등액내의 N-

*Corresponding author

Tel. 82-53-810-2395, Fax. 82-53-811-4319

E-mail: sdkim@yeungnam.ac.kr

acetylglucosamine의 양을 Reissig 등에 의한 방법[6]에 따라 확인하였다. Chitinase 활성의 1 unit는 1 μ M의 N-acetylglucosamine을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

식물병원성 진균 *F. oxysporum* 포자의 현탁액 0.1 ml을 potato dextrose broth(PDB) 배지 100 ml 내에 먼저 접종하여 3일 동안 배양시킨 후 20배 조정제된 chitinase 효소 1 ml를 첨가하여 24시간 배양하여 Whatman No. 2에 여과한 균체의 건조중량을 조사하여 저해력을 확인하였다. 대조구로는 chitinase를 처리하지 않은 *F. oxysporum*의 건조중량의 저해력을 비교, 조사하였다.

항진균성 항생물질의 생산성 및 길항력 확인

항진균성 길항균 *Promicromonospora* sp. KH-28을 항생물질 생산을 위한 배지(glucose 10 g, peptone 2 g, yeast extract 1 g, beef extract 1 g, pH 7.0)에 접종하여 배양시킨 후 그 배양 여액을 *n*-butanol로 추출하고 가압농축기로 25배 농축한 후 식물병원균인 *Fusarium oxysporum*을 대상으로 paper disk 법에 의해 억제력을 확인하였다. 또한 potato dextrose broth(PDB) 배지 100 ml 내에 먼저 증배양한 *F. oxysporum* 0.1 ml을 접종하여 3일 동안 배양시킨 후 농축 조정제 항생물질 1 ml를 투입하여 24시간 배양하여 Whatman No. 2에 여과해서 *F. oxysporum*의 건조중량을 조사하여 저해력을 확인하였다.

식물병원균에 대한 억제범위 확인

대표적인 식물병원균 12종을 이용하여 억제력의 범위를 조사해 1차로 확인한 결과[3] 억제력이 인정된 근부균 *Fusarium solani*, 시드름병균 *F. oxysporum*, 역병균 *Phytophthora capsici*, 점무늬낙엽병 *Alternaria kiki*, 잎마름병 *Stemphylium* sp. 등 5종의 식물병원균을 대상으로 chitinase와 항생물질로 나누어 그 억제력을 조사하였다. 식물병원성 균주를 potato dextrose broth(PDB) 배지 100 ml 내에 증배양액을 0.1 ml을 접종하여 3일 동안 배양시킨 후 *Promicromonospora* sp. KH-28의 배양액으로부터 조정제된 chitinase 효소와 항생물질 1.0 ml를 첨가하여 2일간 계속 추가로 배양한 후 그 생성된 균사체를 여과한 후 균체의 건조중량을 조사하여 저해력을 확인하였다. 저해력은 chitinase와 항생물질을 처리하지 않은 배양균체의 건조중량에 chitinase와 항생물질을 처리한 시료구의 건조중량을 뺀 값을 백분율로 환산하여 나타내었다.

항생물질의 추출 및 정제

항진균성 방선균 *Promicromonospora* sp. KH-28이 생산하는 항생물질을 분리, 정제하기 위해 10 l의 배지에 5일간 배양시킨 배양여액을 Whatman No. 2로 여과한 후 유기용매 *n*-butanol로 추출한 후 *n*-butanol층을 농축하여 증류수로 녹인 후 하루 동안 4°C에서 저장한 후 원심분리한 침

전물을 methanol에 녹여 silica gel column chromatography(Merck Co., 70-230 mesh, 4×20 cm)에 methanol:H₂O =7:3 비율의 용액으로 전개시켰다. 이어서 Sephadex LH-20 column chromatography(Pharmacia, 4×20 cm)를 이용하여 methanol로 용출한 후 농축하였다.

기기 분석

항생물질을 분리, 정제한 후 자외선분광기(UV), thin layer chromatography(TLC), 질량분석기(mass spectrometry, MS), 핵자기 공명분광기(nuclear magnetic resonance, NMR) 등의 분석기기를 이용하여 그 구조를 추정하였다.

식물실험을 통한 생물방제력 조사

항진균성 길항방선균주 *Promicromonospora* sp. KH-28이 토양내에서 실제로 식물병원성균에 저해력을 가지는지 확인하기 위하여 시드름병의 원인균인 *F. oxysporum*을 이용하여 고추(*Capsicum annum* L.)를 발병 기주식물로 조사하였다. 28°C 항온실에서 petri dish 상에 여과지를 2장 정도 간 다음 물을 적신 후 고추 종자를 3일간 발아시킨 후 발아가 되는 묘종만을 선별하여 이용하였다. 멸균시킨 bermuculate가 들어 있는 24구 plastic pot에 이식하여 3 배엽으로 자랐을 때 별도의 다른 멸균한 bermuculate와 유기퇴비를 섞은 토양내에 병원균 및 길항균주를 혼합한 24 구 plastic pot에 이식하여 식물의 생육을 관찰하였다.

결과 및 고찰

항진균성 chitinase와 항생물질 생산에 의한 길항력

항진균성 길항 방선균주 *Promicromonospora* sp. KH-28이 생산하는 chitinase와 항생물질에 의한 각종 식물병원균에 대한 저해력의 차이를 조사하기 위하여 식물병원성 진균 *F. solani*, *F. oxysporum*, *A. kiki*, *Stemphylium* sp. *Phytophthora capsici*에 대상으로 하여 조정제 chitinase와 조정제 항생물질을 처리하여 2일간 배양시킨 후 여과, 건조하여 생육된 균체의 건조중량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1에서와 같이 근부균 *F. solani*는 chitinase 효소에 의한 저해력이 60%로 항생물질에 의한 저해율에 비해 높게 나타났으며 마름병균 *Stemphylium* sp.도 chitinase 효소에 의한 저해율이 45%로 15% 정도의 항생물질에 의한 저해력에 비해 높게 나타났다. 시드름병균 *F. oxysporum*와 역병균 *P. capsici*는 항생물질에 의한 저해율이 74%와 50%로 chitinase 효소에 의한 저해율 60%와 10%에 비해 높게 나타났다. 점무늬 낙엽병균 *A. kiki*는 chitinase와 항생물질에 의한 저해율이 30%로 비슷하게 나타났다. 아울러 타 병원균에 비해 *F. oxysporum* 균주가 선발된 본 방선균주가 생산한 chitinase와 항생물질에 의한 저해율이 가장 높게 나타났다. 본 실험 결과에서 *Promicromonospora* sp. KH-28이

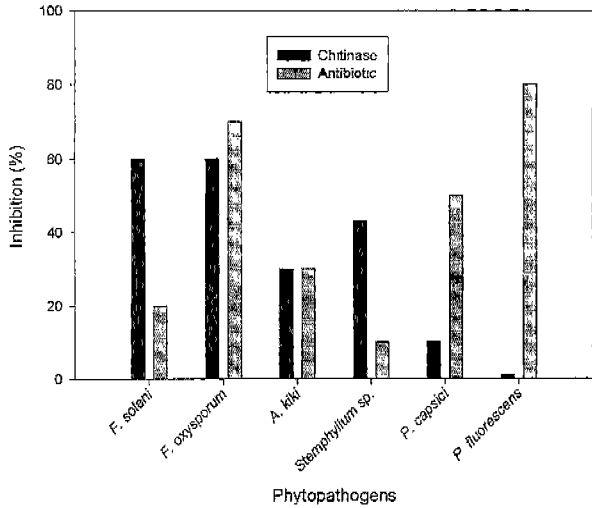


Fig. 1. Antifungal effect of the chitinase and antibiotic produced from *Promicromonospora* sp. KH-28 against various phytopathogens.

The inhibition activity were tested with 1% concentrated chitinase and antibiotic.

생산하는 유도효소인 chitinase와 2차 대사산물인 항생물질이 상호보완적인 관계로서 작용할 때 단일 기작에 의한 억제력에 비해 억제력이 증가된 것이라 사료된다. 또한 세균인 *Pseudomonas fluorescens*에 대한 저해력을 확인하여 본 결과 항생물질에 의한 저해율이 높은 반면 chitinase 효소에 의한 저해는 나타나지 않았다. 따라서 본 균주가 생산한 항생물질은 진균 뿐만 아니라 세균에 대한 항생력도 있다는 것을 알 수 있었다.

항진균성 길항균주의 배양시간별 억제력 차이

항진균성 길항방선균 *Promicromonospora* sp. KH-28 균주가 생산하는 chitinase와 항생물질을 이용하여 시드름병의 원인균인 *F. oxysporum*을 대상으로 배양시간별로 생산된 chitinase와 항생물질 각각에 의한 저해력을 조사하여 본 결과 Fig. 2에서와 같이 나타났다. 접종한 *F. oxysporum*을 3일간 배양시킨 후 조정제된 chitinase와 항생물질을 각각 첨가, 배양하면서 배양된 진균의 건물중량을 확인함으로써 억제력 정도를 조사하였다. 그 결과 chitinase에 비해 항생물질에 의한 저해력이 약간 높게 나타났으며 또한 5일 후 chitinase 효소는 그 저해력이 떨어짐을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 배지내의 대사산물의 축적에 의한 pH 변화 등에 의해 효소 활성이 떨어지는 원인인 것으로 사료된다.

길항균주 *Promicromonospora* sp. KH-28에 의해 생산된 항생물질의 특성조사

항진균성 길항방선균 *Promicromonospora* sp. KH-28에 의해 생산된 항생물질을 정제하기 위하여 위에서 설명한 방

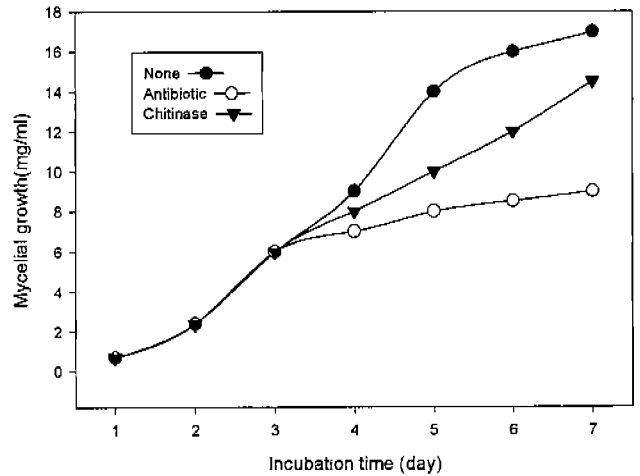


Fig. 2. Antifungal effect of chitinase and antibiotic on the mycelial growth of *F. oxysporum*.

The inhibition activity were tested with 1% concentrated chitinase and antibiotic.

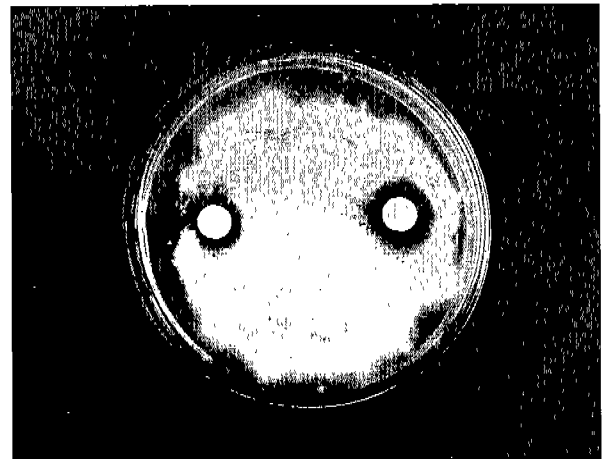


Fig. 3. Antifungal activity of the purified antibiotic KH-28 against *F. oxysporum*.

The purified antibiotic KH-28 was tested with 1.3 mg/ml concentration.

법에 따라 정제하여 얻은 항생물질을 paper disk 법에 의하여 저해력을 조사한 결과 Fig. 3에서와 같이 *F. oxysporum*에 대한 강한 저해력을 확인할 수 있었다. 정제된 항생물질의 이화학적 성질을 조사한 결과 Table 1과 같이 황색의 색소물질로 구성되어 있었다. 또한 정제된 항생물질의 용해특성은 *n*-butanol, methanol, ethanol 등의 용매에서 용해됨을 확인할 수 있었으며, chloroform, toluene, *n*-hexane 등에는 용해되지 않았다. 여러 가지 생화학적 반응에서는 2,4-dinitrohydrazine에 양성반응을 나타내었으며 UV 조사결과 형광색을 나타내었다. 그러나 ninhydrine 반응 등 아미노산 구성물질 확인반응에서는 음성으로 나타났으며 DNS 법에 의한 환원성 실험결과에서도 음성으로 나

Table 1. Physico-chemical properties of antibiotic KH-28 produced from *Promicromonospora* sp. KH-28

Properties	Antibiotic KH-28
Appearance	Orange-brown
Color reaction	
2,4-dinitrohydrazine, I ₂ , H ₂ SO ₄	Positive
ninhydrine, DNS	Negative
Solubility	
<i>n</i> -butanol, methanol, ethanol, <i>n</i> -hexane	Soluble
chloroform, ethylacetate, acetone, ethylether	Insoluble
TLC, R _f	
ethanol:ammonia:H ₂ O (8:1:1)	0.87
methanol:H ₂ O (7:3)	0.74
UV λ ^{MeOH} (nm)	260, 440

타났다. 전개용매를 ethanol:ammonia:water=8:1:1로 하여 silica gel TLC 상에서 전개하여 R_f치를 확인한 결과 0.87로 나타났다. 그리고 UV 흡광 spectrum은 260과 440 nm에서 최대 흡광을 나타내었다.

¹H-NMR과 Fab mass를 이용한 기기 분석에 의한 정제 항생물질의 분석결과는 Fig. 4, 5에서 나타났다. ¹H-NMR의 분석 결과 7.713, 7.627, 4.275 ppm의 pick에서 pyrimidine 골격을 가진 구조를 구성하였으며 2.149, 1.884, 1.345, 0.972, 0.867 ppm의 pick에서 긴 aliphatic chain의 수소기를 확인 할 수 있었다. 또한 분자량이 503 dalton의 크기를 가지는 항생물질임을 알 수 있었다. 이와 같은 형태의 항생물질은 alicyclic 유도체로 구성된 항생물질로 추정되며 더 정확한 구조분석에 의한 물질동정은 차후 밝히도록 하겠다.

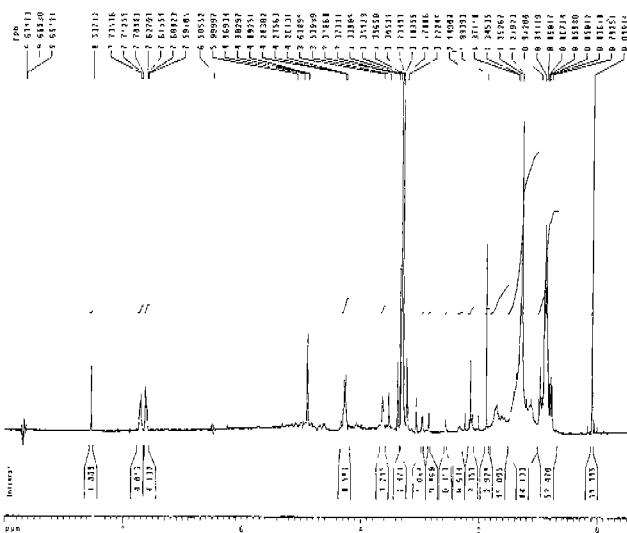


Fig. 4. ¹H-NMR spectrum of antibiotic KH-28 produced from *Promicromonospora* sp. KH-28 (methanol).

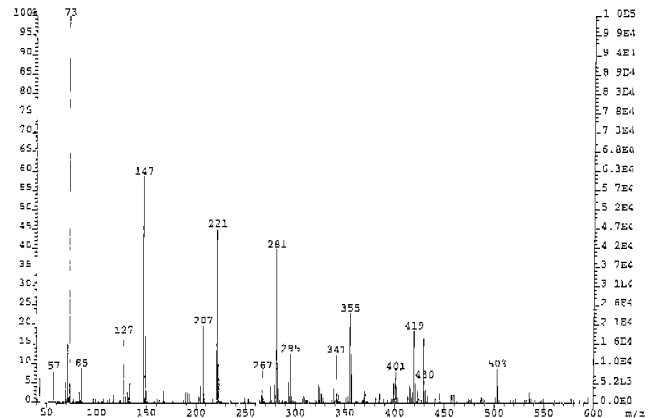


Fig. 5. Fab-mass spectrum of the antibiotic KH-28 produced from *Promicromonospora* sp. KH-28.



Fig. 6. Inhibition of antagonist *Promicromonospora* sp. KH-28 on fusarial wilt of red-pepper plant by *F. oxysporum* in the green house.

Six days after inoculation. A: *F. oxysporum*, B: *Promicromonospora* sp. KH-28 and *F. oxysporum*, C: None.

식물실험을 통한 생물방제력 조사

Chitinase와 항생물질을 동시에 생산하는 선발된 다기능 길항균주 *Promicromonospora* sp. KH-28이 토양내에서 실제로 식물병원균의 발병에 대한 저해력을 가지는지 확인하기 위해 고추(*Capsicum annum* L.)를 발병 기주식물로 하여 시드롬병원균인 *F. oxysporum*을 대상으로 식물생장의 생육도를 단계별로 관측, 조사하였다. 그 결과 Fig. 6에서 나타난 바와 같이 병원균인 *F. oxysporum*을 접종한 A구의 고추식물의 잎은 황갈색으로 변하여 시들어졌으나 병원균인 *F. oxysporum*과 길항균인 *Promicromonospora* sp. KH-28을 혼합 처리한 B 구와 길항균 및 병원균을 접종하지 않은 대조구 C 구의 생육이 좋음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 pot 실험결과로 본 길항균주의 시드롬병원균에 대한 길항력이 뛰어난을 확인할 수 있었다.

요 약

저병해 경작지 토양으로부터 분리한 길항방선균 *Promicromonospora* sp. KH-28은 chitinase와 항생물질의 두 가지 길항기작을 발휘하는 생물방제균주로서 식물병원성 진균인 *Fusarium oxysporum*, *P. capsici*, *A. kiki*, *F. solani*, *Stemphylium* sp. 및 *P. fluorescens*에도 강한 생육억제력을 가진다는 것을 확인하였다. *F. solani*와 *Stemphylium* sp.는 선발균주가 생산한 길항성 chitinase에 의한 억제력이 높게 나타났으며 *P. capsici*, *A. kiki*와 세균인 *P. fluorescens*은 선발균주의 항생물질에 의한 저해력이 높게 나타났다. 정제된 항생물질은 pyrimidine의 골격에 aliphatic chain으로 연결된 alicyclic 유도체로 구성된 분자량이 503 dalton의 항생물질로 추정되었다. 발병 기주식물로 고추를 이용하여 실제 토양내 방제력을 검증한 결과 시드름병의 원인균인 *F. oxysporum*의 발병을 길항방선균주 *Promicromonospora* sp. KH-28 균주가 강력히 방제함을 확인하였다.

감사의 글

이 연구는 농림부의 농림특정연구과제의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Baker, R. 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **6**: 263-294.
- Elad, Y. and R. Baker. 1985. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathol.* **75**: 1047-1052.
- Han, K. H. and S. D. Kim. 1999. Selection and identification of a antagonistic *Promicromonospora* sp. KH-28 producing chitinase and antifungal antibiotic. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**(3): 191-196.
- Isno, K., K. Asahi, and S. Suzuki. 1969. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics VIII. The structure of polyoxins. *J. Am. Chem. Soc.* **91**: 7490-7505.
- Iwasa, T., Y. Kameda, M. Asai, S. Horii, and K. Mizuno. 1971. Studies on validamycins, new antibiotics IV. Isolation and characterization of validamycins A and B. *J. Antibiotics* **24**: 119-123.
- Reissing, J. L., J. L. Strominger, and L. F. Leloir. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of *n*-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* **217**: 959-966.
- Schlumbaum, A., F. Mauch, U. Vogeli, and T. Boller. 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **324**: 365-367.
- Sneh, B., M. Dupler, Y. Elad, and R. Baker. 1984. Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathol.* **74**: 1115-1124.
- Takeuchi, S., K. Hirayama, K. Ueda, H. Sakai, and H. Yonehara. 1958. Blastidin S, a new antibiotic. *J. Antibiotics* **11**: 1-5.
- Umezawa, H., M. Hamada, Y. Suhara, T. Hashimoto, and T. Ilekawa. 1965. Kasugamycin, a new antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **5**: 753-757.
- Vandenbergh, P. A., C. F. Gonzales, A. M. Wright, and B. S. Kunka. 1983. Iron-chelating compounds produced by soil *Pseudomonas*: Correlation with fungal growth inhibition. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 128-132.
- Wessels, J. G. H. and J. H. Sietsma. 1981. Fungal cell walls: A survey, pp. 352-395. In W. Tanner and F. A. Loenrus (eds.), *Plant Carbohydrates II, Extracellular Carbohydrates, Encyclopaedia of Plant Physiology(New Series)*, vol. **13B**. Springer-Verlag, Berlin.

(Received June 5, 1999)