

Serratia plymuthica AL-1이 생산하는 chitinase에 의한 대파 흑색썩음균핵병균의 생육억제

김진호 · 최용화 · 강상재¹ · 김영훈 · 주길재^{2*}

상주대학교 식물자원학과, ¹원예학과
²경북대학교 농화학과

Growth Inhibition of *Sclerotium Cepivorum* Causing Allium White Rot by *Serratia plymuthica* Producing Chitinase

Jin-Ho Kim, Yong-Hwa Choi, Sang-Jae Kang¹, Young-Hun Kim and Gil-Jae Joo^{2*}

Dept. of Plant Resource, and ¹Dept. of Horticulture, Sangju National University, Sangu 742-711, Korea
²Dept. of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

An allium rhizobacterium *Serratia plymuthica* AL-1 was previously selected as a biocontrol agent of allium white rot. The chitinase from *S. plymuthica* AL-1 produced in medium containing colloidal chitin was purified by ammonium sulfate precipitation (40~70%), affinity adsorption, column chromatography on DEAE-sephadex A-50 and sephadex G-200 gel filtration. The enzyme was purified 10.8-fold with a yield of 7.3% from the starting culture broth. The purified chitinase gave a single band on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, its molecular weight was estimated to be 55 kDa. The optimum pH and temperature of the purified enzyme were pH 5.5 and 55°C, respectively and it is stable up to 50°C and maintains around 90% of its activity for 60min. The enzyme were activated by Ca²⁺, Mn²⁺ and Mg²⁺ and inhibited by Cu²⁺, SDS, p-CMB, MIA, respectively. The purified chitinase showed broad spectrum of antifungal activities against plant pathogenic fungi *Sclerotium cepivorum*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phoma* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium solani*, *Fusarium oxysporium* f. sp. *niveum* but rarely inhibited *Phytophthora capsici* and *Pythium ultimum*. The purified chitinase from *S. plymuthica* AL-1 caused swelling, lysis, decoloration and degradation of the hyphal tips of *S. sclerotiorum* causing allium white rot. It suggest that *S. plymuthica* AL-1 chitinase play an important part in the bifunctional chitinase / lysozyme activity.

Key words – *Allium*, *Sclerotium cepivorum*, *Serratia plymuthica*, antagonistic bacterium, white rot, chitinase, purification

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 053-950-6854, Fax: 053-950-6853
E-mail : gjoo@knu.ac.kr

서 론

Chitin은 N-acetyl-D-glucosamine의 β (1-4) 중합체로서 muco 다당류의 일종이며 해양무척추동물, 곤충, 곰팡이 등에 의해 생합성되며, chitinase (EC 3.2.1.14)에 의해 분해된다. 식물병원성 곰팡이들 중에는 세포막이 chitin질로 구성된 병원균도 존재하므로 chitinase에 이들 세포막이 분해되면 병원균은 생육이 억제된다[2].

Chitinase를 생산하는 많은 미생물 중에는 *Serratia* 속 [23] 미생물도 포함된다. 토양 내에 서식하는 *Serratia* 속 미생물은 *Serratia marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. rubidaea*, *S. ficaria*, *S. adorifera*, *S. grimesii* 등이 있으며, 이들은 폐렴, 폐화농증, 패혈증, 요로 감염증, 수막염, 복막염, 창상 감염 등의 많은 감염증을 일으키는 것이 밝혀져 있다[7]. 이처럼 *Serratia* 속 미생물은 대부분 병원균으로서 인식되고 있으나 실제 환경농업에 도움이 되는 미생물도 존재한다. *Serratia plymuthica*는 주로 밀, 귀리, 오이, 옥수수, 식물박, 토마토 등의 근권에서 분리되었으며[3,4,7], 지금까지 심각한 병을 일으키는 미생물로는 인식되지 않았으나 간혹 생선가공 공장[16] 또는 콘택트 렌즈[20]를 오염시키는 미생물로 보고되었다. 그러나 식물뿌리에 친화적인 미생물이며 병원성 곰팡이에 대한 길항력이 높아 생물학적 방제에 이용하려는 연구도 진행되고 있다[27].

Serratia 속 미생물에 의한 생물학적 방제 연구로는 Berg [4]가 토마토의 버티실리움 시들음병을 유발하는 *Verticillium dahliae*와 모잘록병균 *Rhizoctonia solani* 등의 곰팡이에 높은 길항력을 가졌다고 보고한 경우와 Kloepper 등[11]이 오이 탄저병균 *Collectotrichum orbiculare*, McCullagh 등[18]이 오이 피티움 뿌리썩음병균, Stanley 등[27]이 양배추 병원성 진균에 길항력을 가지고 있음을 보고한 경우 등이 있다.

전보[10]에서 대파의 흑색썩음균핵병균 (*Sclerotium cepivorum*)에 대해 높은 길항력을 가진 길항균 *Serratia plymuthica* AL-1을 분리·동정하였으며, colloidal chitin을 첨가한 배지에서 chitinase가 유도생산 되었고, 대파 흑색썩음균핵병균에 길항력을 가지는 것은 세포 외로 분비되는 분자량 10,000 이상의 chitinase와 분자량 10,000 이하의 활성물질에 의해 길항력을 가지고 있음을 보고하였다.

지금까지 밝혀진 *S. plymuthica*는 histamine[16], sucrose isomerase[29,30]를 생성하는 미생물로 연구가 많이 진행되

어 있다. 생물학적 방제에 관한 연구로는 Thaning 등[28]이 감자, 강낭콩, 담배, 메밀 등에서 균핵병을 유발하는 *Sclerotinia sclerotiorum*에 길항하는 물질이 존재함을 보고하였으며, McInroy 등[19]은 목화화 사탕옥수수의 내생미생물 (endophytes)로 존재함을 확인하였다. 그러나 아직 까지 대파 흑색썩음균핵병균 *S. cepivorum*에 대한 생물학적 방제는 보고되지 않았다.

따라서 본 연구는 대파 흑색썩음균핵병균에 길항력을 지닌 *S. plymuthica* L-1의 길항 메커니즘을 확인하기 위해 *S. plymuthica* L-1이 생산하는 세포외 chitinase의 특성 및 *S. cepivorum*의 생육억제 현상을 조사하였다.

재료 및 방법

병원성 곰팡이 및 길항균 *Serratia plymuthica* AL-1의 배양

본 실험에 사용한 대파의 흑색썩음균핵병균 (*Sclerotium cepivorum*)은 농촌진흥청 식물병리과에서 분양 받았으며, 이 병원균은 5~20℃에서 생육이 가능한 저온 병원성 곰팡이로서 potato dextrose agar (PDA, Difco Co.)배지에 20℃ 이하에서 배양하여 균핵을 형성시킨 후 이를 수집하여 4℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 그 외 각종 병원성 진균으로 고추 검은무늬병균 (*Alternaria alternata* ATCC 13963), 고추 역병균 (*Phytophthora capsici* TJ-28), 고추 탄저병균 (*Colletotrichum gloeosporioides* ATCC 32097), 고추 흰별무늬병균 (*Stemphylium solani* TJ-54), 도라지 줄기마름병균 (*Phoma* sp. TJ-66), 무 모잘록병균 (*Pythium ultimum* KCTC 6481), 오이 균핵병균 (*Sclerotinia sclerotiorum* TJ-72), 수박 덩굴썩음병 (*Fusarium oxysporium* f. sp. *niveum* KCTC 16341) 등 병원성 곰팡이들은 경북대 농생물학과, 농촌진흥청 및 한국과학기술원 유전자은행 등에서 분양받아 PDA 배지에 28℃에서 배양하여 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

길항균 *Serratia plymuthica* AL-1[10]은 chitinase 생성균으로 대파 근권에서 분리한 저온미생물로서 1%의 colloidal chitin을 첨가한 tryptic soy broth (TSB) 배지에 접종하여 20℃로 3일간 배양하여 4℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

길항력조사

대파 흑색썩음균핵병균 *S. cepivorum*에 길항하는 *S. plymuthica* AL-1과 또는 병원균과 *S. plymuthica* AL-1 chitinase와의 길항력 조사는 대치배양법 (pairing plate culture)으로 하여 생육억제환의 생성 유무로 조사하였다. PDA 배지에서 키운 흑색썩음균핵병, 검은 무늬병, 덩굴썩김병 등의 병원균 고체배양 덩어리 (1×1 cm)를 1% colloidal chitin을 첨가한 PDA 배지 1/3 가장자리에 올려놓고 길항균 *S. plymuthica* AL-1도 반대편 1/3 지점에 한 백금이 접종하여 15℃에서 7~10일간 배양한 후 병원균의 균사체의 생장억제 정도 (inhibition zone)를 조사하여 생성된 clear zone의 길이로 길항력을 조사하였다. 그 외 각종 병원성 진균과 정제효소와의 길항력도 상기와 동일한 방법으로 접종하였으나 길항균체를 접종 대신 paper disc (지름 10mm)에 효소를 스며들게 하여 28℃에서 배양한 후 길항력을 조사하였다.

Colloidal chitin의 조제 및 chitinase의 활성측정

Crude chitin (Sigma Co., C-7170) 100g에 cold conc. HCl 2 l를 가하여 4℃에서 12시간 교반한 후, 95% cold ethanol 2 l를 가하여 생성된 colloidal chitin을 6,000×g에서 10분간 원심분리 (Beckman Co., model L8-55M)하여 회수하고 증류수로 희석한 후 5N NaOH로 pH를 중화시키고 증류수로 수회 세척하여 회수된 colloidal chitin을 건조하여 효소의 기질로 사용하였다. Chitinase 활성측정은 인산완충액 (0.05M Na₂HPO₄-KH₂PO₄ buffer, pH 7.0)에 colloidal chitin을 0.5%로 현탁시킨 기질용액 0.5ml에 인산완충액 1ml을 넣은 후 효소액 0.2ml를 첨가하여 45℃에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후 DNS (dinitrosacylic acid)법 [21]으로 환원당량을 측정하였다. 효소활성 1 unit는 시간당 colloidal chitin으로부터 1 μM의 N-acetyl-glucosamine을 생성시키는 효소량으로 환산하였다.

Chitinase의 정제

S. plymuthica AL-1이 생성하는 chitinase를 정제하기 위하여 균주를 1%의 colloidal chitin을 첨가한 TSB 배지에 접종하여 20℃로 3일간 배양하고 그 배양액 5 l을 crude enzyme으로 하여 정제에 사용하였다. Crude enzyme에 (NH₄)₂SO₄ 40%를 가하여 4℃에서 4시간 방치하고 이를 원

심분리 (6,000 g×15 min)하여 침전물을 버리고 다시 (NH₄)₂SO₄를 가하여 70% 되게 포화시킨 후 하루밤 침전시킨 후 다시 원심분리 (6,000 g×15 min)하여 침전물을 회수하고 50mM 인산완충액(pH 7.0) 200ml에 녹여 조효소액으로 사용하였다.

Affinity adsorption은 조효소액을 chitinase unit당 20~80 μg (dry weight)이 되도록 colloidal chitin을 첨가하여 4℃에서 2시간 동안 교반시켜면서 흡착시켰다. Chitinase가 흡착된 colloidal chitin을 5,000 g에서 20분간 원심분리한 후 침전된 colloidal chitin을 50mM 인산완충액 (pH 7.0)에 세척한 뒤 30℃에서 4시간 탈착시켜 chitinase를 회수하였다.

Affinity adsorption에 의해 회수된 효소는 동일 완충액으로 미리 평형화되어 있는 DEAE-sephadex A-50 column (2.0×40 cm)에 충전하였고, 이때 비흡착 단백질을 제거하기 위해 0~0.5M NaCl로 직선 농도 구배법으로 용출시키고 시간당 30ml, tube 당 3ml로 분획하였다.

DEAE-sephadex A-50 column에서 효소활성이 높은 분획만 모은 효소용액을 sephadex G-200 column (3.0×130 cm)에 충전한 뒤 평형시킨 다음 겔여과를 수행하여 시간당 20ml, tube 당 3ml로 분획하였다.

단백질 농도 및 chitinase의 분자량 측정

단백질은 소의 혈청 알부민 (bovine serum albumin, BSA)을 표준 단백질로 하여 UV 280nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 한편 정제된 효소의 순도검정 및 분자량 측정은 Laemmli의 방법[12]에 따라 SDS-PAGE로 결정하였다. 이때 분자량 측정을 위한 표준단백질은 phosphorylase b (94,000Da), bovine serum albumin (67,000Da), ovalbumin (43,000Da), carbonic anhydrase (30,000Da) trypsin inhibitor (20,100Da) 등 Pharmacia 사의 제품을 구입하여 일정량 혼합하여 사용하였다.

결과 및 고찰

S. plymuthica AL-1이 생산하는 chitinase의 정제

S. plymuthica AL-1으로부터 얻어진 세포의 chitinase를 crude enzyme으로 하여 (NH₄)₂SO₄ 40%~70%, affinity adsorption, DEAE-sephadex A-50 chromatography,

sephadex G-200 gel filtration 과정으로 정제한 결과, Table 1에서와 같이 최종수율 7.3%, 효소의 비활성도는 각각 64.20 units/mg, 정제도는 19.8배로 정제하였다

정제효소의 분자량 측정

정제된 chitinase를 SDS-PAGE를 수행하여 Fig. 1에 나타난 바와 같이 단일밴드를 확인할 수 있었으며, 표준단백질로 비교한 결과 약 55 kDa으로 추정되었다. 이러한 chitinase의 분자량은 *Penicillium oxalicum* [26]의 chitinase 54.9 kDa과는 비교적 유사한 결과를 가졌으나 *Serratia marcescens* [6]의 52kDa, *Aspergillus fumigatus* [9]의 50kDa, *Aeromonase salmonicida* [13]의 20kDa, *Ewingella americana* [24]의 33kDa와는 차이를 나타내었다.

정제효소의 pH 및 온도에 미치는 영향

정제효소의 pH의 영향을 조사하기 위해 50mM sodium citrate buffer (pH 3~6), 50mM phosphate buffer (pH 6~8), 50mM borate-NaOH buffer (pH 8~10)를 사용하여 45°C에서 각 pH 별로 30분간 반응시켜 활성도를 측정한 결과 효소의 반응 최적 pH는 Fig. 2와 같이 약 5.5로 약산성 부근에서 최적활성을 보였다. 또한 pH의 안정성을 조사하기 위해 45°C에서 각기 다른 pH buffer에서 12시간 반응시킨 후 잔존활성을 측정한 결과 pH 5~6 사이의 약산성 부근에서 안정성이 높았으나 pH 4 이하의 산성이나 pH 7 이상의 중성 및 알칼리성에서는 급격히 떨어졌다. 이러한 결과는 *Aspergillus fumigatus*[9] 등 chitinase의 최적 pH가 7.0 부근인 성질과는 아주 다른 차이를 나타내었으나 Monreal 등[23]은 *Serrtia marcescens*의 chitinase의 최대

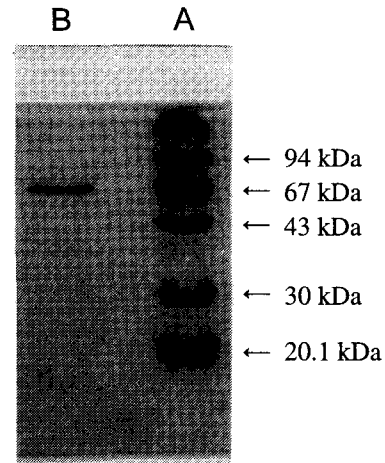


Fig. 1. Electrophoresis profile of purified chitinase by SDS-PAGE. Proteins were resolved on a 10% polyacrylamide gel. These lane were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane A, Standard proteins are phosphorylase b(94,000Da), bovine serum albumin (67,000Da), ovalbumin (43,000Da), carbonic anhydrase (30,000Da) trypsin inhibitor (20,100Da); lane B, the purified chitinase (55,000Da).

활성 pH가 6.4라고 보고했고, Jeuniaux[8]는 *Streptomyces* sp.가 생산하는 chitinase 최대활성 pH는 5.2~6.5 사이라고 보고한 내용과는 유사한 점이 높았다.

Chitinase에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해 20~70°C까지 변화시켜 활성을 조사하였다. Fig. 2와 같이 55°C에서 최적활성을 보였고, 효소를 각 온도별에서 60분간 열처리한 후 잔존활성을 실험한 결과 50°C까지는 90% 잔존활성을 유지하며 안정성을 유지하였으나 60°C에서는 60%

Table 1. Purification of the extracellular chitinase from *S. plymuthica* AL-1

Purification steps	Total proteins (mg)	Total activity (units) ¹⁾	Specific activity (units/mg)	Yeild (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	1,360	4,420	3.25	100.0	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (40~70%)	338	3,669	10.86	83.0	3.3
Affinity adsorption	103	2,156	20.93	38.8	6.4
DEAE-sephadex A-50 column	18	935	51.94	21.2	16.0
Sephadex G-200 gel filtration	5	321	64.20	7.3	19.8

¹⁾One unit of chitinase activity was defined as the amount of the enzyme which liberated 1 μmole of N-actyl-D-glucosamine per 90min at 45°C.

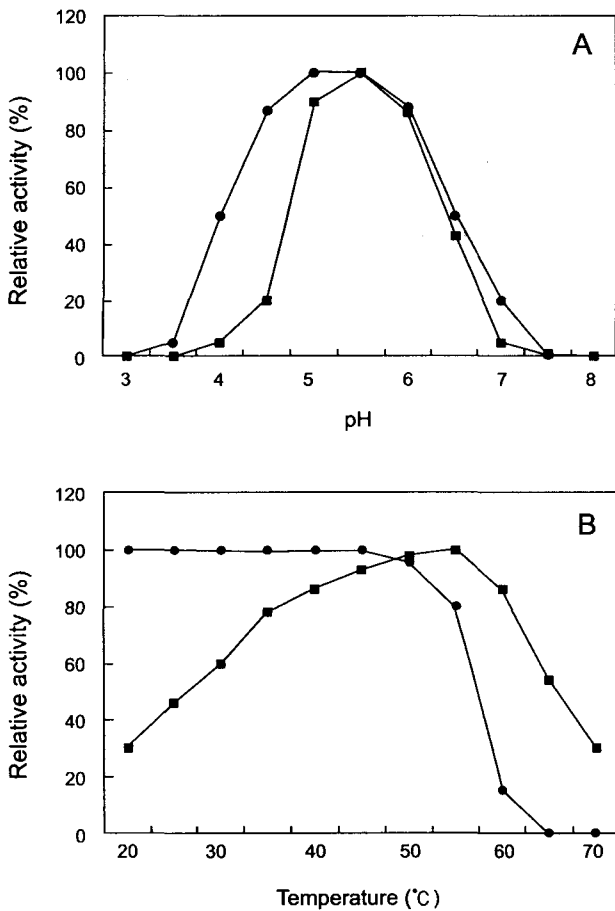


Fig. 2. Effect of pH and temperature of the purified chitinase. The buffers used: pH 3.0~6.0, 50mM sodium citrate buffer; pH 6.0~8.0, 50mM phosphate buffer; pH 8.0~10.0, 50mM borate-NaOH buffer. The purified enzyme was incubated in the various pH range buffers at 45°C for 90min. The enzyme activity was measured in the standard reaction mixture of the various temperature for 90min at pH 5.5. A, Optimal pH (■-■) and pH stability (●-●); B, optimal temperature (■-■) and temperature stability (●-●).

의 잔존활성을 나타내었고 그 이상의 온도에서는 효소활성이 거의 실행되는 것으로 나타났다.

정제효소의 금속이온 및 reagents에 대한 영향

Chitinase에 대한 여러 가지 금속이온의 영향을 알아보기 위하여 각종 금속이온을 5mM 되게 정제된 효소액에 첨가하여 상온에서 2시간 동안 방치한 다음 효소활성을 조

사한 결과 Table 2에 나타내었다. Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ 등의 이온은 대략 20% 이상의 효소를 활성화시켰으나 Cu²⁺ 이온은 약 80%의 효소활성을 억제시키는 것으로 나타났다.

효소활성에 미치는 reagents의 영향을 검토하기 위하여 정제 chitinase에 각각의 저해제를 최종 농도가 5mM 되게 첨가하여 효소의 활성을 측정하였다. EDTA에 의해 활성이 저해받지 않아 metallo enzyme이 아니며, serine 특이적인 저해제인 PMSF에 의해 저해받지 않았으며, SDS, p-CMB, MIA 등에 의해서는 효소활성이 저해되었다.

정제효소의 기질 특이성

정제한 chitinase가 기질인 colloidal chitin외에도 어떠한 기질을 이용하는지를 조사하기 위해 키토산 및 키틴 올리고당 유도체를 사용하여 기질 특이성을 조사한 결과,

Table 2. Effects of the various inhibitors and metal ions on the purified chitinase of *S. plymuthica* AL-1

Chemical & metal ions (5mM)	Relative activity (%)
None	100
p-CMB	56
EDTA	98
Hydroxyurea	96
Iodoacetic acid	92
MIA	42
PMSF	94
SDS	30
Sodium azide	96
AgNO ₃	98
BaCl ₂	99
CaCl ₂	121
CuSO ₄ · 5H ₂ O	19
FeCl ₂ · 6H ₂ O	92
MgSO ₄ · 7H ₂ O	119
MnSO ₄ · 7H ₂ O	118
NiCl ₂	90
Pb(CH ₃ COO) ₂	95
SnCl ₂	97
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	98

p-CMB, p-chloromercuribenzoate; EDTA, ethylene diaminetetraacetic acid; MIA, monoiodoacetic acid; PMSF, phenylmethyl sulfonyl fluoride; SDS, sodium dodesyl sulfate.

Table 3과 같이 colloidal chitin, chitin, glycol chitin 등에는 높은 효소활성을 나타내었으나 cellulose, chitosan, laminarin, starch, *N,N'*-diacetylchitobiose 및 *N,N,N'*-triacetylchitotriose 등에는 전혀 반응을 하지 않았다. 따라서 chitinase 활성은 존재하나 chitobiase의 활성은 존재하지 않아 chitobiose를 분해하지 못하였다. 또한 효소반응속도에 대한 기질 농도의 영향을 조사하기 위해 기질인 colloidal chitin 농도를 달리하여 분해도를 측정하여 Line-weaver Burk plot으로 조사한 결과 colloidal chitin에 대한 Km값은 3.26 mg/ml로 나타났다(데이터 미제시). 이와 같은 결과는 *Aeromonas salmonicida* YA7-625[13] chitinase의 Km값 3.68 mg/ml와 비슷한 결과를 나타내었다.

정제효소에 의한 병원성 곰팡이 대한 길항력

PDA 배지에의 1/3 지점에 병원성 곰팡이 단편을 접종하고 반대편 1/3 지점에 정제한 chitinase를 6.4 units (100 µg) 씩 지름 10mm paper disc에 올려놓고 각종 병원균을 대치배양한 결과, Table 4와 같이 대파 흑색썩음균핵병균 (*S. cepivorum*)에 대해서는 생육저지환의 크기가 7mm로 나타났으며, 고추 검은무늬병 (*A. alternata*)은 4mm, 고추 탄저병균 (*C. gloeosporioides*)은 5mm, 도라지 줄기마름병균 (*Phoma* sp.)은 4mm, 고추 흰별무늬병균 (*S. solani*)은 4mm, 오이 균핵병균 (*S. sclerotiorum*)은 3mm, 수박 덩굴썩음병균 (*F. oxysporium* f. sp. *niveum*)은 7mm로 길항력을 조금씩 나타내었으나 고추 역병균 (*P. capsici*)과 무 모잘록병균 (*P. ultimum*)은 길항력이 약하게 나타났다. 대파 흑색썩음균핵병균과 수박

Table 3. Substrate specificity of the purified chitinase from *S. plymuthica* AL-1

Substrate	Relative activity (%)
Cellulose	0
Chitin	91
Chitobiose	0
Chitosan	18
Colloidal chitin	100
Glycerol chitin	45
Laminarin	0
<i>N,N'</i> -Diacetylchitobiose	10
<i>N,N,N'</i> -Triacetylchitotriose	7
Starch	0

Table 4. Antagonistic effects of the purified chitinase from *S. plymuthica* AL-1 on the plant pathogens

Phytopathogenic fungi	Inhibition zone (mm) ^{a)}
<i>Alternaria alternata</i> ATCC 13963	4
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ATCC 32097	5
<i>Fusarium oxysporium</i> f. sp. <i>niveum</i> KCTC 16341	7
<i>Phytophthora capsici</i> TJ-28	1
<i>Pythium ultimum</i> KCTC 6481	1
<i>Phoma</i> sp. TJ-66	4
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> TJ-72	3
<i>Sclerotium cepivorum</i>	7
<i>Stemphylium solani</i> TJ-54	4

^{a)}Inhibition zone were obtained from clear zone in pairing plate culture with 3 replications. Each phytopathogenic fungi and the purified chitinase from *S. plymuthica* AL-1 were inoculated on PDA medium, the length between the bacterium and paper disc were 5cm. Observations were made 7 days after inoculation on PDA at 28°C (*S. cepivorum* was incubated at 20°C).

덩굴썩음병균은 세포벽이 chitin으로 구성되어있어 길항력을 나타내었으나 세포벽이 chitin질을 가지고 있지 않은 다른 병원균에도 길항력을 가지는 것은 lysozyme의 기능으로 분해되어 세포벽이 용균되는 것으로 추정된다. 또한 고추 역병균과 무 모잘록병균은 세포벽이 cellulose로 구성되어 있어 chitinase에 의해 분해되지 않았지만 lysozyme의 기능으로 아주 적은 길항력을 나타내었다고 판단된다.

정제효소에 의한 *S. cepivorum* 균사의 변화양상

대파 흑색썩음균핵병균의 균사에 미치는 정제 chitinase의 영향을 조사하기 위하여 정제효소 6.4 units (100µg)에 대파흑색썩음균핵병균 *S. cepivorum* 단편 한 덩어리를 넣고 25°C에서 140 시간 반응시킨 후 병원균 균사체의 변화를 광학현미경으로 관찰한 결과, Fig. 3과 같이 나타났다. 정제효소를 넣지 않은 경우에는 균사이 모습이 뚜렷하게 나타났다. 정제효소를 넣고 반응시킨 경우에는 대조구와는 분명하게 차이를 나타내었으며, 균사의 끝이 용균되거나 균사가 팽윤 또는 변색하였고 전체적으로는 분해되는 현상이 있었다. 특히 시간이 경과함에 따라 용균현상이 증가하여 5일 후에는 거의 액체상태로 전환되었다(데이터 미제시).

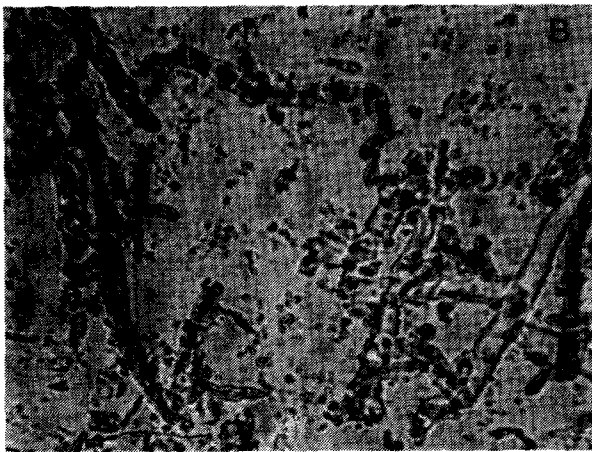
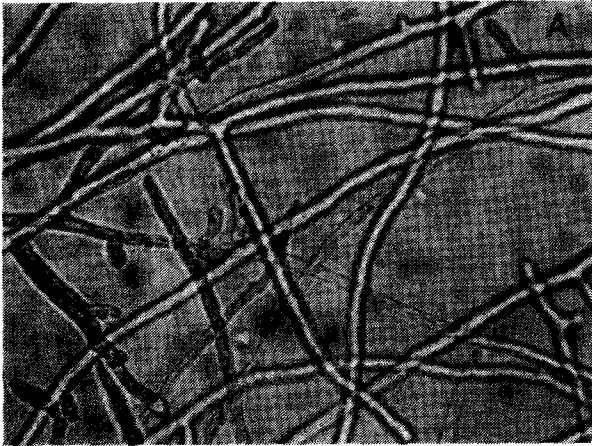


Fig. 3. Hapha lysis and degradation of *Sclerotium cepivorum* by the purified chitinase of antifungal bacterium *S. plymuthica* AL-1. A, Normal mycelia of *S. cepivorum*; B, abnormal swelling, lysis, degradation and decoloration of *S. cepivorum* hyphae grown in presence of purified chi (6.4 units/ μ l).

일반적으로 병원성 진균에 대한 항진균성 역할은 먼저 포자의 발아를 억제하거나[25], 균사를 팽윤시키거나[1,15], 균사 끝을 분해시키거나[5,15,22], 영양원에 대한 경쟁을 억제시키는 방법[32]들이 알려져 있다. Chitinase 활성만 가질 경우에는 균사 끝이 팽윤되는 현상이 주로 나타나며, lysozyme 활성이 나타날 경우에는 세포벽이 용균되어 세포속 내용물이 밖으로 나오는 현상을 볼 수 있다.

S. plymuthica AL-1 chitinase에 의해서는 포자발아 억제, 균사 팽윤, 균사 끝의 분해 등 chitinase 및 lysozyme의 기

능을 다 가지며 항진균성 역할이 우수하게 나타났다. *S. cepivorum*에 작용하는 *S. plymuthica* AL-1 chitinase의 이러한 현상은 *Trichoderma harzianum* endochitinase [17]가 잣빛 곰팡이병균 *Botrytis cinerea* 균사에 처리 될 경우와 동일하게 균사가 용균되거나 팽윤되었고, *Pseudomonas aeruginosa* K-187[31]에 의해 생산된 chitinase와는 아주 비슷한 작용양상을 지니고 있었으며, 특히 chitinase 활성 및 lysozyme의 기능을 둘 다 가지는 경우처럼 *S. plymuthica* AL-1도 chitinase 기능과 lysozyme의 기능을 동시에 가지고 있으므로 균사의 팽윤과 용균현상을 일으키는 것으로 추정된다.

요 약

대파 흑색썩음균핵병균 (*Sclerotium cepivorum*)에 길항력을 가진 *Serratia plymuthica* L-1의 길항 메카니즘을 조사하기 위해 *S. plymuthica* L-1이 생산하는 세포의 chitinase를 정제하여 그 특성을 조사하였다. Colloidal chitin이 함유된 배지에서 생산된 *S. plymuthica* L-1 chitinase는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40~70% precipitation, affinity adsorption, DEAE-sephadex A-50 column chromatography, 및 sephadex G-200 column filtration 과정을 통하여 정제하였다. 정제된 chitinase는 7.3% 회수율과 19.8의 정제도를 나타내었으며, 전기영동시 단일밴드를 얻었으며, 분자량은 55kDa로 나타났다. 정제된 chitinase의 최적 pH 및 온도는 5.5, 55 $^{\circ}$ C 이었고, 온도안정성 조사에서 정제효소는 50 $^{\circ}$ C까지 90%의 잔존활성을 유지하였으나 60 $^{\circ}$ C 이상에서는 급격하게 효소활성이 실패되었다. Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} 등의 이온은 대략 20% 이상의 효소를 활성화시켰으나 Cu^{2+} 이온은 약 80%의 효소활성을 억제시켰고, SDS, p-CMB, MIA 등도 효소활성을 저해하는 작용을 하였으며, colloidal chitin에 대한 Km값은 3.26 mg/ml로 나타났다. 정제효소에 의한 각종 병원균에 대한 생육 억제정도는 흑색썩음균핵병균, 고추 검은무늬병균, 고추 탄저병균, 도라지 줄기마름병균, 고추 흰별무늬병균, 오이 균핵병균, 수박 덩굴썩음병균 등에는 길항력을 나타내었으나 고추 역병균과 무 모잘록병균에서는 길항력이 아주 낮게 나타났다. 정제 chitinase에 의해 대파 흑색썩음균핵병균 *S. cepivorum*의 균사는 팽창과 균사 끝의 용균, 분해 및

변색현상을 관찰할 수 있었고 chitinase 기능과 lysozyme 기능을 모두 가지고 있을 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Akihiro, O., A. Takashi and S. Makoto. 1993. Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation. *J. Ferm. Bioeng.* **75**, 23-27.
2. Allan, G. G., L. C. Altman, R. E. Bensinger, D. K. Ghosh, S. Hirabayashi and S. Neogi. 1984. Biomedical applications of chitin and chitosan. pp. 19-36 In Zikakis J. P. (ed), *chitin, chitosan and related enzymes*. Academic Press, Orlando.
3. Alstrom, B. and B. Gerhardson. 1988. Differential reactions of wheat and pea genotypes to root inoculation with growth affecting rhizobacteria. *Plant and Soil* **109**, 263-269.
4. Berg, G. 1996. Rhizobacteria of oilseed rape antagonistic to *Verticillium dahliae*. *J. of Plant Disease and Protection* **103**, 20-30.
5. Elad, Y., I. Chet and Y. Henis. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* **28**, 719-725
6. Gal, S. W., J. Y. Choi, C. Y. Kim, Y. H. Cheong, Y. J. Choi, S. Y. Lee, J. D. Bahk and M. J. Cho. 1998. Cloning of the 52-kDa chitinase gene from *Serratia marcescens* KCTC2172 and its proteolytic cleavage into an active 35-kDa enzyme. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiol. Lett.* **160**, 151-158.
7. Grimont, P. A. D., F. Grimont, H. L. C. Dulong De Ronay and P. H. A. Sneath. 1977. Taxonomy of the genus *Serratia*. *J. of General Microbiol.* **98**, 39-66.
8. Jenuiaux, C. 1978. The distribution and quantitative importance of chitin in animals, proceedings of first international conference on chitin/chitosan. pp. 11-86. Muzzarelli R. A. A. (ed), MIT Sea Grant, Boston.
9. Jeong, E. J. and Y. H. Lee. 1995. Isolation of microorganism producing chitinase for chitooligosaccharides production, purification of chitinase, and its enzymatic characteristics. *Kor. J. Appl. Microbil. Biotech.* **23**, 187-196.
10. Joo, G. J., I. H. Lee and J. H. Kim. 2002. Chitinase production and isolation of *Serratia plymuthica* AL-1 antagonistic to white rot fungi from *Allium fistulosum* roots. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 135-141.
11. Kloepper, J. W., G. Wie and S. Tzun. 1992. Rhizosphere populations dynamics and internal colonization of cucumber by plant growth promoting rhizobacteria which induce systemic resistance to *Collectotrichum orbiculare*. pp. 185-192. In Tjamos E. C., G. C. Papavizas and J. Cook (eds), *Biological Control of Plant Diseases Progress and Challenges for the Future Nato ASI Series a*, Vol. 230, New York, NY:Plenum Press.
12. Laemmi. U. K. 1970. Cleavages of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680~685
13. Lee, K. P., C. N. Kim, J. H. Yu and D. H. Oh. 1990. The production and purification of chitinase from *Aeromonas salmonicida* YA7-625. *Kor. J. Appl. Microbil. Biotech.* **18**, 599-606.
14. Lemanceau, P., P. A. H. M. Bakker, W. J. De Kogel, C. Alabouvette and B. Schippers. 1993. Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporium* F047 and *Pseudobacterium* 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporium* f. sp. *dianthi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 74-82.
15. Lim, S. H. K. S. Kim and S. D. Kim. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent to plant root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 510-516.
16. Lopez-Sabater, E. I., J. J. Rodriguez-Jerez, M. Hernandez-Herrero, and M. T. Moria-Ventura. 1996. Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the barcelona area. *International J. of Food Microbiol.* **28**, 411-418.
17. Lorito, M., A. Di Pietro, C. K. Hayes, S. L. Woo and G. E. Harman. 1993. Antifungal synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Mol. Plant Pathol.* **83**, 721-728.
18. McCullagh, M., R. Utkehde, J. G. Menzies, Z. K. Punja and T. C. Paulitz. 1996. Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for biological control of *Pythium* root of cucumbers grown in rockwool and effects on yield. *European J. of Plant Pathol.* **102**, 747-755.

19. McInroy, J. A. and J. W. Kloepper. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* **173**, 337-342.
20. Midelfart, J., A. Midelfart and L. Bevanger. 1996. Microbial contamination of contact lens among medical students. *CLAO Journal* **22**, 21-24.
21. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
22. Mitchell, R. and M. Alexander. 1965. Lysis of soil fungi by bacteria. *Can. J. Microbiol.* **9**, 169-177.
23. Moneal, J. and E. T. Reese. 1969. The chitinase of *Serratia maecescens*. *Can. J. Microbiol.* **15**, 689-696.
24. Peter, W. I. and J. F. Peberdy. 1997. Production and purification of a chitinase from *Ewingella americana*, a recently described pathogen of the mushroom, *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**, 189-194.
25. Robert, W. K. and C. P. Seliterennikoff. 1988. Plant and bacterial chitinase fiddler in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 168-176.
26. Rodriuez, J., J. L. Copa-patino and M. I. Perez-Leblic. 1995. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium oxalicum* autolysates. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**, 46-49.
27. Stanley, R., M. Brown, N. Pool, D. Rodgeron, C. Sigee, C. Knight, H. Ivin, A. S. Epton and C. Leifert. 1994. Biocontrol of post-harvest fungal diseases on Dutch white cabbage by *Pseudomonas* and *Serratia* antagonists in storage trials. *Plant Pathol.* **43**, 605-611.
28. Thaning, C., C. J. Welch, J. J. Borowicz, R. Hedman and B. Gerhardson. 2001. Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* apothecial formation by the soil bacterium *Serratia plymuthica*: identification of a chlorinated macrolide as one of the causal agents. *Soil Biol. & Biochem.* **33**, 1817-1826.
29. Veronese, T. and P. Perlot. 1998. Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site. *FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters* **441**, 348-352.
30. Veronese, T. and P. Perlot. 1999. Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC15928. *Enzyme and Microbial Technol.* **24**, 263-269.
31. Wang, S. L. and W. T. Chang. 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinase/lysozyme extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 380-386.
32. Weston L. A. 1996. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agronomy J.* **88**, 860-866.

(Received November 29, 2002; Accepted February 18, 2003)