

보 문

항진균활성 violacein 색소를 생산하는 *Collimonas* sp. DEC-B5 균주의 분리 및 특성

이예림¹ · Robert J. Mitchell² · 황경숙^{1,3*}

¹목원대학교 미생물나노소재학과, ²울산과학기술대학교 나노생명화학공학부, ³목원대학교 미생물생태자원연구센터

Isolation and characterization of antifungal violacein producing bacterium *Collimonas* sp. DEC-B5

Ye-Rim Lee¹, Robert J. Mitchell², and Kyung-Sook Whang^{1,3*}

¹Department of Microbial & Nano Materials, College of Science & Technology, Mokwon University, Daejeon 35349, Republic of Korea

²School of Nano-Bioscience and Chemical Engineering, Ulsan National Institute of Science and Technology, Ulsan 44919, Republic of Korea

³Institute of Microbial Ecology and Resources, Mokwon University, Daejeon 35349, Republic of Korea

(Received June 10, 2016; Revised June 22, 2016; Accepted June 27, 2016)

ABSTRACT: Forty-nine pigments were extracted from the collections of 106 pigment producing bacteria from the plant rhizosphere soil. Antibacterial activity test was performed in the subjects of the extracted pigments with plant pathogenic bacteria including *Xanthomonas axonopodis* and *Xanthomonas campestris*, and with plant pathogenic fungi including *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, and *Fusarium oxysporum*. The yellow pigment by *Chryseobacterium* sp. RBR9 and the red pigment by *Methylobacterium* sp. RI13 showed the antibacterial activities against *Xanthomonas axonopodis* and *Xanthomonas campestris*. The violet pigment by *Collimonas* sp. DEC-B5 showed the antibacterial activity as well as the antifungal activities against *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*. Especially, the violet pigment inhibited the growth of *Botrytis cinerea* more than 65% at MIC 20 µM. Upon the HPLC analysis result for the isolation of pigment with antifungal activity, violacein (91.6%) and deoxyviolacein (8.4%) were isolated for the pigment by *Collimonas* sp. DEC-B5. The production amount of the pigment was increased more than 10 times higher when D-mannitol 1.5% and yeast extract 0.2% were added as the nitrogen source to SCB medium. This study suggests that produced violacein by *Collimonas* sp. DEC-B5 will be effective to control strawberry gray-mold rot fungi by its preventive activity.

Key words: *Botrytis cinerea*, antifungal pigment, bacterial pigment, gray-mold rot fungi, violacein

색소는 식품, 의약품 그리고 화장품 등 다양한 분야에 사용되고 있다. 합성색소는 착색력이 좋고 값이 싸서 가장 많이 이용되고 있다. 석탄이나 석유에서 추출한 타르색소, 코치닐 추출 색소 및 캐라멜 색소는 알레르기, 천식, 간 독소 등을 일으키고 유전자 손상을 가져온다고 보고되면서 합성색소의 안전성에 관해 논란이 대두되고 있다(Kobylewski and Jacobson, 2012). 최근 합성색소의 안전성에 대응할 만한 천연색소의 연구 개발이 활발히 진행되고 있다(Griffiths, 2005). 천연색소는

일반적으로 광물, 곤충, 식물, 동물 그리고 미생물에서 추출하여 사용한다. 특히 미생물 색소는 착색력이 높고 계절에 영향을 받지 않아 대량 추출이 가능하며 균질성 높은 생산물을 얻을 수 있어 합성색소의 대안이 될 수 있다(Ryu and Kim, 2000; Malik et al., 2012).

색소를 생산하는 대표적인 미생물로 *Agrobacterium aurantiacum*이 생산하는 핑크색의 astaxanthin과 *Monascus purpureus*가 생산하는 빨간색의 monascus, *Ashbya gossypii*가 생산하는 riboflavin 그리고 *Blakeslea trispora*가 생산하는 carotenoid 색소는 FDA로부터 안전성을 인정받아 식품착색제로 널리

*For correspondence. E-mail: kswang@mokwon.ac.kr;
Tel.: +82-42-829-7593; Fax: +82-42-829-7598

이용되고 있다(Venil *et al.*, 2013). 또한, *Rhodococcus equi*, *Bradyrhizobium* sp. ORS278, *Corynebacterium nigricans*, *Chromobacterium violaceum*, *Janthinobacterium lividum*, *Flavobacterium columnare* 등이 생산하는 beta-carotene, melanins, canthaxanthin, violacein, zeaxanthin, carotenoids, melanins, prodigiosin 그리고 flexirubin 색소는 항균, 항암, 항산화 등의 다양한 생리활성능이 보고되어 의약품으로 개발하기 위한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다(Kim *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2003; Konovalova *et al.*, 2007; Malik *et al.*, 2012; Venil *et al.*, 2013).

최근 친환경 농업에 대한 관심이 높아지면서 환경생태계에 피해가 적고 병 방제효과가 높은 생물농약 개발을 위해 다양한 천연소재에 관한 연구가 진행되고 있다(Guo *et al.*, 2009; Jang *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2012). 현재까지 보고된 생물농약 개발 사례를 보면 미생물자체를 이용하거나 미생물에서 유래한 항생물질, 효소저해제, 면역조절제 등 다양한 종류의 천연생리활성물질이 생물농약 개발을 위한 선도물질로 개발되었다(Ordentlich *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 2001).

식물의 근권은 미생물의 보고로 다양한 토양미생물이 식물 뿌리 및 뿌리주변에 서식하면서 미생물군집을 형성하고 다양한 미생물생태학적 활동을 통해 식물에 영향을 미치고 있다. 특히 근권 내 식물병원균과의 길항작용을 통해 식물을 보호한다는 근권 미생물군집의 기능이 밝혀지면서 많은 연구자들에게 식물 근권토양은 새로운 생리활성물질을 탐색하는 중요한 서식처로 인식되어왔다(Atlas and Bartha, 1998; Hackl *et al.*, 2004). 본 연구에서는 다양한 종류의 식물 근권 토양으로부터 색소생성 균주 다양성을 확보하고 세균색소의 식물병원성곰팡이에 대한 항진균활성능을 평가하여 식물병 방제제로서의 색소 특성을 검토하고자 한다.

재료 및 방법

토양 시료 채취

식물 토양시료는 충남 공주시의 비트(*Beta vulgaris*), 당근(*Daucus carota*), 우엉(*Arctium lappa*) 농가와 전남 담양의 죽녹원에서 대나무(*Phyllostachys bambusoides*) 그리고 전남 보성 녹차 재배농장에서 차나무(*Camellia sinensis*)로부터 토양시료를 채취하였다. 채취한 각 시료는 polyethylene vinyl에 넣어 4°C에 보존한 후 24시간 이내에 실험하였다.

색소생성 균주 분리

채취한 토양 시료는 10 g 정량하여 90 ml의 멸균수에 넣고

초음파 파쇄기(Vibra cell VCX750, Sonics & Materials, Inc.)를 이용하여 30 W에서 2분간 분산 처리하였다. 분산 처리한 토양현탁액 1 ml을 9 ml의 멸균수에 순차적으로 희석한 후 trypticase soy agar (TSA), starch casein agar (SCA), nutrient agar (NA) 그리고 Luria agar (LA) 배지에 각각 100 µl씩 도말 접종하였다. 토양시료를 접종한 배지는 28°C에서 7일간 배양한 후 색소생성 세균콜로니를 각각 순수 분리하였다. 순수 분리된 색소생성 균주는 glycerol 보존법을 이용하여 20% glycerol에 현탁하고 -80°C에 보존하였다.

색소생성 균주로부터 색소 추출

세균색소 추출을 위하여 색소 생성 세균을 TSB 배지에 접종하고 28°C, 120 rpm에서 7일간 배양하였다. 보라색 색소를 생성하는 세균의 경우, SCB 배지에 접종하여 28°C에서 7일간 정지배양하였다. 배양된 세균세포는 원심분리기(High speed refrigerated 22k, Hanil, Co.)를 이용하여 9,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 균체를 수거하였다. 수거한 균체에 methanol을 첨가하여 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 색소를 추출하였고 균체가 완전히 탈색 될 때까지 반복하였다. 색소 추출액은 회전진공농축기(Rotary evaporator N-1000, Eyela)를 이용하여 농축한 후 건조하였다.

색소의 항진균성 검증

세균색소의 식물병원성 세균에 대한 항진균성 검증은 고추점무늬병원균(*Xanthomonas axonopodis* KACC 12867) 그리고 흑마병원균(*Xanthomonas campestris* KACC 10913)을 대상으로 수행하였다. 상기의 식물병원성 세균 검증균주를 LA 배지에 도말접종하고 methanol에 녹인 각 색소를 disc paper에 100 µl씩 흡수시킨 후 접종한 배지에 올려 24시간 배양하였다. 세균색소에 의해 disc paper 주위에 형성된 생육저지대(growth inhibitor clear zone)를 관찰하고 항세균 색소로 판정하였다.

식물병원성 곰팡이에 대한 항진균성 검증은 딸기잰빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea* KACC 40573), 고추탄저병원균(*Colletotrichum acutatum* KACC 40042) 그리고 시들음병원균(*Fusarium oxysporum* KACC 40031)을 검증 균주로 사용하였다. 세균색소를 methanol에 녹여 disc paper (지름: 8 mm, Whatman, Co.)에 100 µl씩 흡수시킨 후 PDA (Potato dextrose agar) 배지에 올려놓았다. 세균색소를 처리한 배지 중앙에 지름 5 mm 크기로 자른 검증 곰팡이 단편 조각을 올려 각각 7일간 배양한 후, disc paper 주위에 형성된 생육저지대(growth inhibitor clear zone)를 확인하였다(Rollas *et al.*, 1993).

색소생성 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열분석

색소생성 균주의 계통학적 위치를 결정하기 위해 16S rRNA 유전자 염기서열 분석은 순수 배양된 단일 colony를 주형으로 사용하여 직접 PCR 증폭을 수행하였다. 직접 PCR 증폭을 위하여 primer는 *E. coli* 16S rRNA 유전자를 주형으로 한 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3') primer를 사용하였다. 단일 colony를 주형으로 사용하여 10× PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μM primer, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Solgent, Co.) 를 잘 혼합하여 반응시켰다. 염기서열 분석을 위한 16S rRNA 유전자의 PCR 반응은 Perkin Elmer (GeneAMPR PCR system 9700, Applied Biosystems)를 이용하여 94°C에서 2분간 반응 후, 94°C에서 30초, 54°C에서 40초, 72°C에서 1분 반응을 30회 반복하여 수행하였으며 72°C에서 5분간 반응시킨 후 4°C로 내려 종료하였다. 증폭된 PCR 산물은 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc.)으로 정제한 후 ABI 3730XL capillary DNA sequencer (Applied Biosystems)를 사용하여 PCR 산물의 염기서열 분석을 수행하였다. 결정된 16S rRNA 염기서열의 상동성은 NCBI/RDP/GenBank database의 BLAST program을 이용하여 비교하였다.

항진균 색소의 최소저해농도

항진균활성능이 판정된 색소는 575 nm에서 흡광도를 측정 한 후 Mendes 등(2001)이 밝힌 흡광계수에 따라 계산하여 농도를 측정하였다. 색소를 10 μM, 20 μM, 60 μM, 130 μM 그리고 260 μM 농도로 조절하고 100 μl씩 disc paper에 각각 분주하여 항진균 색소의 최소저해농도를 측정하였다. 최소억제농도의 측정에는 disc paper법에 따라 수행하였다. 배지 중앙에 지름 5 mm 크기로 자른 곰팡이(*Botrytis cinerea* KACC 40573, *Colletotrichum acutatum* KACC 40042)의 단편 조각을 접종하고 곰팡이의 일정 간격 4곳에 disc paper (지름: 8 mm, Whatman, Co.)를 정렬하였다. 배양 후에 생성된 clear zone의 지름(cm)을 측정하여 최소저해농도(MIC)를 판정하였다.

항진균 색소의 동정

항진균활성 색소의 동정은 HPLC 1200 (Agilent)을 이용하여 동정하였으며 시료는 건조된 색소를 ethanol에 녹여 사용하였다. 분석에 사용된 column은 C-18 column (Hypersil ODS, 5 μm, 250 × 4.6 mm)으로 30°C에서 분석을 수행하였다. 이동상은 50% ethanol (HPLC Grade, Sigma-Aldrich)를 사용하였고 Agilent 1260 Infinity ELSD를 사용하여 575 nm 파장의 흡

광도를 이용하여 검출하였다(Choi et al., 2015).

항진균 색소 생산 최적배양조건

최적 탄소원과 질소원을 조사하기 위하여 무기염 기초배지 (M9 배지) 100 ml에 10종류의 탄소원(D-mannitol, galactose, D-glucose, D-fructose, inositol, mannose, ribose, D-xylose, D-arabitol, glycerol) 1%와 13종류의 질소원(L-tryptophane, L-cysteine, L-histidine, L-phenylalanine, L-proline, L-alanine, L-tyrosine, L-glutamic acid, beef extract, yeast extract, tryptone, potassium nitrate, peptone, DL-methionine)을 0.1%씩 각각 첨가하여 28°C에서 7일간 배양하였다. 최적 배양매지 선정을 위하여 Reasoner's 2A broth (R2B), starch casein broth (SCB), trypticase soy broth (TSB), nutrient broth (NB) 그리고 Luria broth (LB) 액체 배지 100 ml에 각각 접종한 후 28°C에서 7일간 배양하였다. 각 배지에서 배양된 세균세포를 원심분리하고 methanol을 첨가하여 색소를 추출하였다. 추출한 색소는 575 nm에서 흡광도(UV-1650PC, SHIMADZU)를 이용하여 농도를 측정하여 색소생성능을 비교하였다. 통계분석결과는 평균과 표준편차로 표시하였다. 색소 추출 실험 결과는 3회 반복 실험하고 SPSS Statics 19.0 (SPSS Inc.)를 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

색소생성 균주의 분리

색소를 생성하는 대표적인 구근류(비트, 당근, 우엉)의 근권토양과 항진균활성이 높게 평가되고 있는 대나무, 녹차나무의 근권토양 시료를 채취하였다. 채취된 토양 시료를 TSA, NA, LA 평판에 접종한 후 평판상에 형성된 색소생성 콜로니를 분리하였다. 각 평판 배지에 형성된 콜로니 중 노란색 78균주, 주황색 15균주, 분홍색 8균주, 빨간색 2균주, 갈색 2균주 그리고 보라색 1균주를 각각 분리하여 총 106개의 색소생성 균주를 수집하였다.

세균색소의 식물병원균에 대한 항진균활성

순수 분리된 106개의 색소생성 균주 중 색소 생성능이 우수한 균주로부터 노란색(33개), 주황색(12개), 분홍색, 빨간색, 갈색 그리고 보라색 세균색소 총 49개를 획득하였다. 이들 49개 세균색소를 대상으로 대표적인 식물병원성 세균인 고추점무늬 병원균(*Xanthomonas axonopodis*), 흑마병원균(*Xanthomonas campestris*)과 식물병원성 곰팡이인 딸기잰빛곰팡이병원균

Table 1. Isolation of pigment producing bacteria in rhizosphere soil

Samples	No. of pigment producing bacteria						Total
	Yellow	Orange	Pink	Red	Brown	Violet	
Beet	45	11	2	1	-	-	59
Carrot	10	1	2	-	-	-	13
Burdock	9	2	1	-	1	-	13
Bamboo	6	1	2	-	1	-	10
Green tea	8	-	1	1	-	1	11
Total	78	15	8	2	2	1	106

Table 2. Antimicrobial activities confirmed of bacterial pigments

Test organisms	Bacterial pigment					
	Yellow (33)	Orange (12)	Pink (1)	Red (1)	Brown (1)	Violet (1)
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	4	-	-	1	-	1
<i>Xanthomonas campestris</i>	4	-	-	1	-	1
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	-	-	-	1
<i>Collectotrichum acutatum</i>	-	-	-	-	-	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	-	-	-

() bacterial pigments

(*Botrytis cinerea*), 고추탄저병원균(*Colletotrichum acutatum*) 그리고 시들음병원균(*Fusarium oxysporum*)에 대해 생육저해 시험을 수행하였다. 식물병원성 세균에 대한 항세균 활성 검정결과, 노란색 색소 33개 중 4개의 색소, 빨간색 색소 그리고 보라색 색소는 *Xanthomonas axonopodis* 그리고 *X. campestris*에 대하여 반지름 1-7 mm의 생육저지대를 형성하는 특징을 나타내었다. 항진균 활성의 경우, 총 49개의 세균색소 중 보라색 색소만 *C. acutatum*에 반지름 2 mm의 생육저지대를 형성하였으며, *B. cinerea*에 대하여 반지름 6 mm의 생육저지대를 형성하는 항진균활성을 나타내었다. 본 연구에서 분리한 보라색 색소는 항세균활성과 항진균활성을 모두 갖는 매우 특징적인 색소로 확인되었다(Table 2).

항진균활성 색소생성 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열분석

항진균활성 색소를 생성하는 우수 균주로 선발된 노란색 색소생성 균주(RBR9), 빨간색 색소생성 균주(RI13) 그리고 보라색 색소를 생성하는 DEC-B5 균주의 계통학적 위치를 검토하기 위하여, 16S rRNA 유전자 염기서열을 결정하고 NCBI/RDP/GenBank의 database와 상동성을 확인하였다. 노란색 색소를 생성하는 4균주 중 항세균활성능이 가장 우수한 RBR9 균주는 *Chryseobacterium indoltheticum* LMG 4025^T (AY468448)와 100% 상동성을 나타내었다. 계통 해석을 통해 밝혀진 *C.*

indoltheticum 균주가 생성하는 노란색 색소는 flexirubin 색소로 보고된 바 있다(Wu *et al.*, 2013). 세균색소 flexirubin은 항진균활성능이 우수하여 생물학적 방제제로 사용되고 있다(Kim *et al.*, 2012).

빨간색 색소를 생성하는 RI13 균주는 *Methylobacterium thiocyanatum* DSM 11490^T (AB175646)과 99.8%의 상동성을 나타내었다. 본 연구에서 *M. thiocyanatum*로 동정된 세균과 동일한 세균 중에는 carotenoid 색소를 생성하는 균주로 밝혀진 바 있다(Wood *et al.*, 1998). 그 밖에 메틸영양세균인 *M. populi*, *M. radiotolerans* 그리고 *M. marchantiae* 등의 *Methylobacterium* 속에 속하는 세균 중에는 빨간색 계통의 색소를 생성하고 이들 색소는 carotenoids 색소임을 밝혔다(Green and Bousfield 1983; Van Aken *et al.*, 2004; Konovalova *et al.*, 2007). 이들 빨간색 계통의 carotenoids 색소는 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. 그리고 *Pseudomonas aeruginosa*에 항진균활성이 있다고 보고되었다(Selvameenal *et al.*, 2009).

보라색 색소를 생성하는 DEC-B5 균주의 경우, *Collimonas* 속의 *C. pratensis* Ter91^T (AY281137), *C. arenae* NCCB 100031^T (AY281146) 그리고 *C. fungivorans* Ter6^T (AJ310394)와 98.7-98.5%의 상동성을 나타내었다(Table 3). 향후 다상분류법 실험을 통해 분류학적 특성을 밝히고 *Collimonas* 속의 신규미생물을

로 제안하고자 한다. 노르웨이의 Hakvåg 등(2009)은 *Collimonas* sp. CT_MP11E8 균주가 생산하는 보라색 색소는 violacein임을 밝혔고, *E. coli*, *S. aureus* 그리고 *Mycobacterium tuberculosis* 등의 병원성 미생물에 대하여 항세균활성이 있다고 보고하였다. 반면, *Collimonas* sp.가 생산하는 보라색 색소에 대한 항진균활성능은 보고된 바 없다. 본 연구에서 항진균활성이 있는 보라색 색소를 생성하는 *Collimonas* sp. DEC-B5 신종 균주의 분리는 색소생성 세균의 다양성 확보에 매우 큰 의미가 있다고 판단된다.

항진균 색소의 최소저해농도 검정

상기의 연구에서 선별된 세균색소 중 식물병원성 곰팡이 (*Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*)에 대하여 항진균 활성을 나타낸 보라색 세균색소의 특성을 평가하기 위하여 *B. cinerea*와 *C. acutatum*에 대한 최소저해농도를 검정하였다. 보라색 색소의 농도를 10 μ M, 20 μ M, 60 μ M, 130 μ M, 그리고 260 μ M 농도를 각각 첨가하여 *B. cinerea*에 대한 항진균 활성능을 확인한 결과, 10 μ M의 색소에서는 3.4%의 낮은 성장 억제

능을 보였으나 20–260 μ M의 색소에서 65–69.2%의 생육억제 효과를 나타내었다(Fig. 1A and B). 한편, 보라색 색소의 *C. acutatum*에 대한 최소저해농도를 확인한 결과, 10 μ M, 20 μ M, 60 μ M에서는 1% 미만의 미약한 항진균력을 나타내었으며, 130 μ M, 그리고 260 μ M 농도에서 16.2%, 19.7%의 성장억제효과를 나타내었다(Fig. 1C and D). 이상의 결과로부터 *Collimonas* sp. DEC-B5균주가 생성하는 보라색 세균색소는 딸기잰빛곰팡이병원균(*B. cinerea*)에 높은 항진균활성을 갖는 항진균활성 색소로 판정되었다.

항진균 색소의 동정

공동연구자는 선행연구에서 *Duganella violaceinigra* 균주가 생성하는 보라색 색소를 동정하기 위하여 보라색 색소생성 대표균주 *Janthinobacterium lividum*이 생산한 violacein 표준물질(Sigma-Aldrich, Cat. No. V9389)을 이용하여 비교 분석하였다. *Duganella violaceinigra* 균체로부터 보라색 색소를 추출하여 575 nm에서 흡광도 peak를 측정하고 HPLC 해석한 결과, 6.7 min에 검출된 피크를 violacein으로 동정하였으며

Table 3. 16S rRNA gene sequence analysis of antimicrobial pigment producing bacteria

Strain No.	Closets sequence	Accession No.	Similarity (%)
RBR9	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i> LMG 4025 ^T	AY468448	100.0
RI13	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i> DSM 11490 ^T	AB175646	99.8
DEC-B5	<i>Collimonas pratensis</i> Ter91 ^T	AY281137	98.7

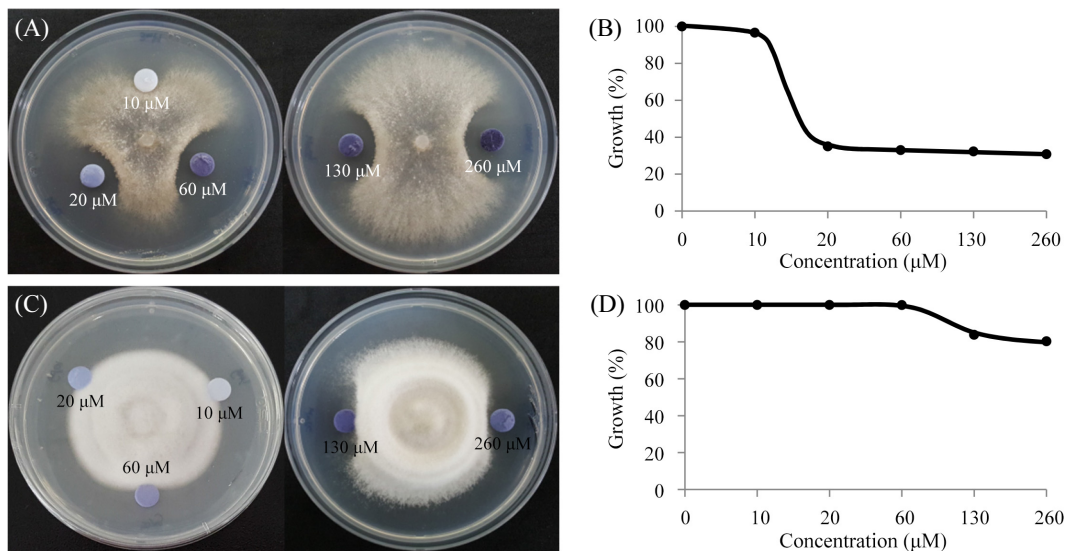


Fig. 1. Minimum inhibitory concentration of violet pigment extracts from strain *Collimonas* sp. DEC-B5. (A) minimum inhibitory concentration of violet pigment against *Botrytis cinerea*, (B) the growth of *Botrytis cinerea* was assayed in the presence of various concentrations of violet pigment, (C) minimum inhibitory concentration of violet pigment against *Colletotrichum acutatum*, (D) the growth of *Colletotrichum acutatum* was assayed in the presence of various concentrations of violet pigment.

7.4 min에 검출된 피크를 deoxyviolacein 색소로 동정하였다 (Choi *et al.*, 2015). 본 연구에서는 *Collimonas* sp. DEC-B5 균주가 생산하는 항진균성 보라색 색소를 동정하기 위해 *Janthinobacterium lividum* 으로부터 생산된 violacein과 deoxyviolacein 을 표준시료로 사용하여 비교 분석하였다. *Collimonas* sp. DEC-B5 균체로부터 보라색 색소를 추출하여 50% 그리고 25%로 희석한 시료를 각각 3반복으로 분석한 결과 violacein (91.6%)과 deoxyviolacein (8.4%)으로 동정되었다(Fig. 2).

지금까지 violacein 색소를 생성하는 미생물은 *Chromobacterium violaceum*, *Janthinobacterium lividum*, 그리고 *Pseudoalteromonas luteoviolacea* 등의 그람음성 세균이 주로 보고되었다(Rettori and Durán, 1998; Pantanella *et al.*, 2007; Yada *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). 이들 세균이 생산하는 violacein 색소는 *Rhynchomonas nasuta*, *Tetrahymena* sp., *Acanthamoeba castellanii* 그리고 *Leishmania amazonensis* 등 항원충 효과가 있다고 보고되었다(Matzen *et al.*, 2004). 항세균활성에 관한 violacein 색소 연구 결과, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *E. coli*, *Enterococcus faecium* 그리고 *S. aureus* 등 광범위한 범위의 세균에 대하여 효과가 입증되었다(Nakamura *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2006). 또한, *Janthinobacterium lividum*이 생산하는 violacein 색소는 *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Biporaris leersiae*, *Botrytis cinerea* 그리고 *Fusarium lateritium* 등에 항균효과가 있음이 보고되었다(Shirata *et al.*, 1997; Brucker *et al.*, 2008). 그러나 *Collimonas* 속의 세균이 생산하는 violacein 색소의 항진균활성

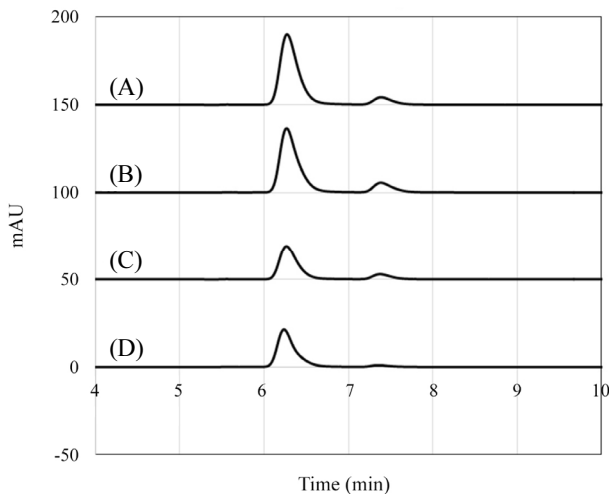


Fig. 2. HPLC analysis of violet pigments extracted from *Collimonas* sp. DEC-B5 cultures showing the predominant presence of violacein (6.7 min) and a small amount of deoxyviolacein (7.4 min). (A) 100% pigment extracted from *Collimonas* sp. DEC-B5, (B) 50% pigment extracted from *Collimonas* sp. DEC-B5, (C) 25% pigment extracted from *Collimonas* sp. DEC-B5, (D) pigment extracted from *Janthinobacterium lividum*.

에 대해서는 보고된 바가 없어 본 연구에서 분리된 *Collimonas* sp. DEC-B5는 항진균활성 violacein의 생산자로서 매우 의미가 크다고 사료된다.

Violacein 색소 생성의 최적배지

보라색 violacein 색소를 생성하는 *Collimonas* sp. DEC-B5 균주를 다양한 종류의 세균 배양배지(R2B, SCB, TSB, NB, LB)에서 7일간 배양하여 색소 생성능을 비교하였다. 이들 다양한 배지 중 SCB 배지가 색소 생성에 가장 우수한 배지로 평가되어 기초배지로 사용하기로 하였다. 기초배지로 선정된 SCB 배지에서 생산한 색소 생산량은 43.2 μ M이었다(Fig. 3).

Collimonas sp. DEC-B5 균주의 색소생성 최적배지를 설계하기 위하여 무기염 배지(M9 배지)에 10종류의 탄소원과 13종류의 질소원을 각각 첨가하여 색소 생산량을 비교하였다. 탄소원의 경우 D-mannitol을 첨가한 배지에서 가장 높은 색소 생성량을 나타내었으며, 질소원의 경우 yeast extract를 첨가한 배지에서 가장 높은 색소 생성량을 나타내어 D-mannitol과 yeast extract를 최적 탄소원과 질소원으로 선정하였다. 최적 탄소원으로 선정된 D-mannitol을 0%, 0.5%, 1%, 1.5%, 그리고 2% 농도별로 첨가한 배지에서 색소 생성능을 비교한 결과, 1.5%의 D-mannitol을 첨가한 배지에서 181.5 μ M 가장 높은 농도의 색소를 생성하였다(Fig. 4A). 최적 질소원의 경우, yeast extract를 0%, 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.25% 그리고 0.3%의 농도로 기초배지에 각각 첨가하여 색소를 추출한 결과, 0.2% yeast extract를 첨가한 배지에서 169.8 μ M의 색소를 생산하였다(Fig. 4B). 특히, SCB 배지에 1.5% D-mannitol을 첨가한 배지와 0.2% 이상의 yeast extract를 첨가한 배지에서 $P < 0.01$ 의 높은 유의성을 나타내었다. 이상의 결과를 토대로

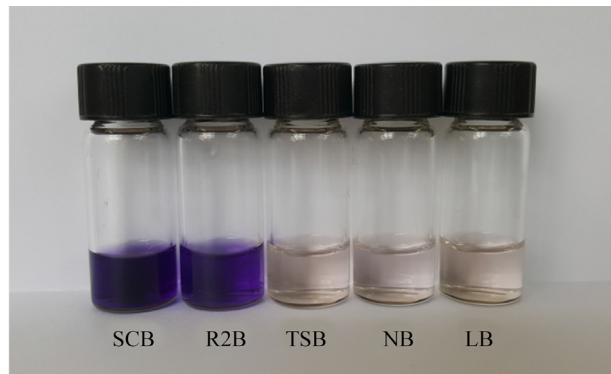


Fig. 3. Comparison of the producing violet pigment by culture media. SCB, starch casein broth; R2B, Reasoner's 2A broth; TSB, trypticase soy broth; NB, nutrient broth; LB, Luria broth.

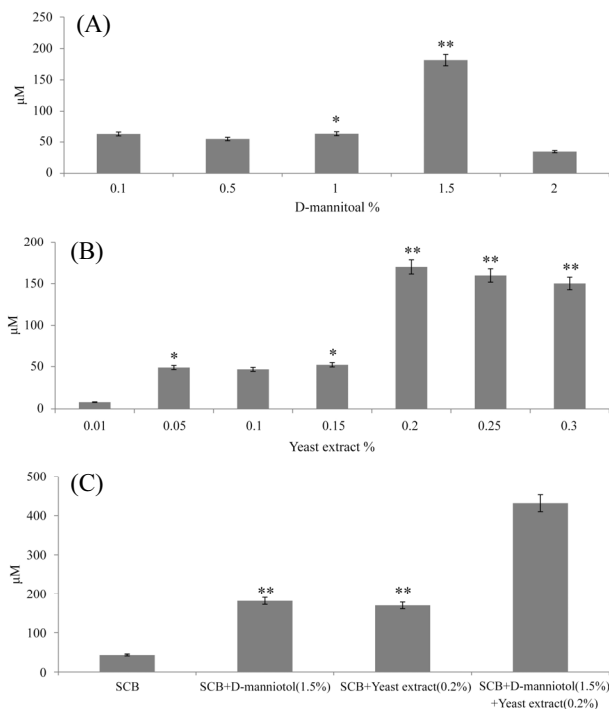


Fig. 4. The producing pigment concentration (μM) by concentration of culture medium. (A) effect of D-mannitol concentration on the pigment production, (B) effect of yeast concentration on the pigment production, (C) selection of optimum medium concentration for the pigment production. The differences between comparison groups were considered statistically significant when $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$.

혼합 첨가하여 7일간 배양한 후 색소 생산량을 조사한 결과 $431.6 \mu\text{M}$ 로 세균 배양배지 SCB 배지에서 생산한 $43.2 \mu\text{M}$ 에 비해 약 10배 이상 높은 생산량을 나타내었다(Fig. 4C).

이상 식물 근권토양으로부터 확보된 색소생성 세균은 다양한 색소산업에 이용될 수 있는 유전자원으로 잠재적 가치가 클 것으로 기대한다. 특히, *Collimonas* sp. DEC-B5 균주가 생성하는 보라색 violacein 색소는 딸기잰빛곰팡이병원균인 *B. cinerea*에 강한 항진균 활성을 나타내었다. 향후, 항진균 violacein 색소의 정제 및 식물병 방제효과 시험을 통하여 violacein 색소를 이용한 천연 생물농약의 개발이 가능하리라 사료된다.

적 요

식물 근권 토양으로부터 색소생성 균주 106균주를 수집하여 색소 생성능이 우수한 균주로부터 노란색(33개), 주황색(12개), 분홍색, 빨간색, 갈색 그리고 보라색 총 49개의 세균색소를 추출하였다. 식물병원균에 대한 항진균활성능이 우수한 색소를 선

발하기 위하여 고추점무늬병원균(*Xanthomonas axonopodis*), 흑마병원균(*Xanthomonas campestris*)과 딸기잰빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*), 고추탄저병원균(*Colletotrichum acutatum*), 그리고 시들음병원균(*Fusarium oxysporum*)을 대상으로 항진균 활성 검정을 수행하였다. 색소생성 *Chryseobacterium* sp. RBR9 균주가 생산하는 노란색 색소와 *Methylobacterium* sp. RI13 균주가 생산하는 빨간색 색소는 *X. axonopodis*와 *X. campestris*에 항세균 활성을 나타내었다. 차나무 토양으로부터 분리된 *Collimonas* sp. DEC-B5가 생산하는 보라색 색소는 항세균 활성과 더불어 *B. cinerea*와 *Colletotrichum acutatum*에 항진균활성을 나타내었다. 특히, 보라색 색소는 최소저해 농도 $20 \mu\text{M}$ 에서 *B. cinerea*를 65% 이상 생육 저해하였다. 항진균활성 보라색 색소를 HPLC 분석한 결과, violacein (91.6%)와 deoxyviolacein (8.4%)으로 동정되었다. 보라색 색소 violacein의 생산량은 SCB 배지에서 $43.2 \mu\text{M}$ 이었고 D-mannitol 1.5%, yeast extract 0.2%를 첨가한 경우 $431.6 \mu\text{M}$ 로 약 10배 높은 색소 생산량을 나타내었다. 본 연구에서 분리된 *Collimonas* sp. DEC-B5가 생산하는 violacein 색소는 딸기잰빛곰팡이병원균 방제제로 활용 가능성이 확인되었다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 농업생명자원관리기관사업 지원에 의해 수행된 연구 결과로 이에 감사드립니다.

References

- Atlas, R.M. and Bartha, R. 1998. Interactions between microorganisms and plants. *Microb. Ecol.* **4**, 99-140.
- Brucker, R.M., Harris, R.N., Schwantes, C.R., Gallaher, T.N., Flaherty, D.C., Lam, B.A., and Minbiole, K.P. 2008. Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon inereus*. *J. Chem. Ecol.* **34**, 1422-1429.
- Chang, J.Y., Lee, H.H., Kim, I.C., and Chang, H.C. 2001. Characterization of a bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* cy2. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 227-233.
- Choi, S.Y., Kim, S., Lyuck, S., Kim, S.B., and Mitchell, R.J. 2015. High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigra* str. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* **5**, 15598.
- Green, P.N. and Bousfield, I.J. 1983. Emendation of *Methylobacterium* (Patt, Cole, and Hanson 1976); *Methylobacterium rhodinum*

- (Heumann 1962) comb. nov., corrig.; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito & Iizuka 1971) comb. nov., corrig.; and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin & Goodfellow 1979) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 875–877.
- Griffiths, J.C.** 2005. Coloring Foods & Beverages. *Foodtechnology* **59**, 38–44.
- Guo, R., Liu, X., Li, S., and Miao, Z.** 2009. *In vitro* inhibition of fungal rootrot pathogens of *Panax notoginseng* by rhizobacteria. *Plant Pathol. J.* **25**, 70–76.
- Hackl, E., Boltzenstem, S., Bodrossy, L., and Sessitsch, A.** 2004. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **7**, 5057–5065.
- Hakvåg, S., Fjærvik, E., Klinkenberg, G., Borgos, S., Josefsen, K., Ellingsen, T., and Zotchev, S.** 2009. Violacein-producing *Collimonas* sp. from the sea surface microlayer of coastal waters in Trøndelag, Norway. *Mar. Drugs* **7**, 576–588.
- Jang, C.S., Lim, J.H., Seo, M.W., Song, J.Y., and Kim, H.G.** 2010. Direct detection of *Cylindrocarpon destructans*, root rot pathogen of ginseng by nested PCR from soil samples. *Mycobiology* **38**, 33–38.
- Kang, D.W., Ryu, I.H., and Han, S.S.** 2012. The isolation of *Bacillus subtilis* KYS-10 with antifungal activity against plant pathogens. *Kor. J. Pestic. Sci.* **16**, 178–186.
- Kim, S.J., Fhi, J.W., Kang, S.G., and Jung, S.T.** 1997. Characteristics and stability of pigments produced by *Monascus anka* in a jar fermenter. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 60–66.
- Kim, H.S., Sang, M.K., Jung, H.W., Jeun, Y.C., Myung, I.S., and Kim, K.D.** 2012. Identification and characterization of *Chryseobacterium wanjuae* strain KJ9C8 as a biocontrol agent of *Phytophthora* blight of pepper. *Crop Protect.* **32**, 129–137.
- Kobylewski, S. and Jacobson, M.F.** 2012. Toxicology of food dyes. *Int. J. Occup. Environ. Health* **18**, 220–246.
- Konvalova, H.M., Shylin, S.O., and Rokytko, P.V.** 2007. Characteristics of carotenoids of methylotrophic bacteria of *Methylobacterium* genus. *Mikrobiol. Z.* **69**, 35–41.
- Malik, K., Tokkas, J., and Goyal, S.** 2012. Microbial pigments: A review. *Int. J. Microbial. Resour. Technol.* **1**, 361–365.
- Matz, C., Deines, P., Boenigk, J., Arndt, H., Eberl, L., Kjellberg, S., and Jurgens, K.** 2004. Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1593–1599.
- Mendes, A.S., De Carvalho, J.E., Duarte, M.C.T., Duran, N., and Bruns, R.E.** 2001. Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. *Biotechnol. Lett.* **23**, 1963–1969.
- Nakamura, Y., Asada, C., and Sawada, T.** 2003. Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium RT102 strain. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **8**, 37–40.
- Ordentlich, A., Elad, Y., and Chet, I.** 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* **78**, 84–87.
- Pantanella, F., Berlutti, F., Passariello, C., Sarti, S., Morea, C., and Schippa, S.** 2007. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 992–999.
- Rettori, D. and Durán, N.** 1998. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 685–688.
- Rollas, S., Kalyoncuoğlu, N., Sur-Altiner, D., and Yeğenoğlu, Y.** 1993. 5-(4-aminophenyl)-4-substituted-2, 4-dihydro-3H-1, 2, 4-triazole-3-thiones: synthesis and antibacterial and antifungal activities. *Pharmazie* **48**, 308–309.
- Ryu, B.H. and Kim, M.J.** 2000. Production of red pigment from marine bacterium utilizing colloidal chitin. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 264–269.
- Sánchez, C., Braña, A.F., Méndez, C., and Salas, J.A.** 2006. Reevaluation of the violacein biosynthetic pathway and its relationship to indolocarbazole biosynthesis. *ChemBiochem* **7**, 1231–1240.
- Selvameenal, L., Radhakrishnan, M., and Balagurunathan, R.** 2009. Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. *Int. J. Pharm. Sci.* **4**, 499–504.
- Shirata, A., Tsukamoto, T., Yashui, H., Kato, H., Hayasaka, S., and Kojima, A.** 1997. Production of bluish-purple pigments by *Janthinobacterium lividum* isolated from the raw silk and dyeing with them. *J. Sericult. Sci. Jpn.* **66**, 377–385.
- Van Aken, B., Peres, C.M., Doty, S.L., Yoon, J.M., and Schnoor, J.L.** 2004. *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pinkpigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoids* 6nigra DN34). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1191–1196.
- Venil, C.K., Zakaria, Z.A., and Ahmad, W.A.** 2013. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochem.* **48**, 1065–1079.
- Wang, H., Wang, F., Zhu, X., Yan, Y., Yu, X., Jiang, P., and Xing, X.H.** 2012. Biosynthesis and characterization of violacein, deoxy-violacein and oxyviolacein in heterologous host, and their antimicrobial activities. *Biochem. Eng. J.* **67**, 148–155.
- Wood, A.P., Kelly, D.P., McDonald, I.R., Jordan, S.L., Morgan, T.D., Khan, S., Murrell, J.C., and Borodina, E.** 1998. A novel pink-pigmented facultative methylotroph, *Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov., capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources. *Arch. Microbiol.* **169**, 148–158.
- Wu, Y.F., Wu, Q.L., and Liu, S.J.** 2013. *Chryseobacterium taihuense* sp. nov., isolated from a eutrophic lake, and emended descriptions of the genus *Chryseobacterium*, *Chryseobacterium taiwanense*, *Chryseobacterium jejuense* and *Chryseobacterium indoltheticum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 913–919.
- Yada, S., Wang, Y., Zou, Y., Nagasaki, K., Hosokawa, K., Osaka, I., Arakawa, R., and Enomoto, K.** 2008. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Mar. Biotechnol.* **10**, 128.