

## 식물근부균 *Fusarium solani* 에 길항하는 생물방제균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1의 유전공학적 개발

임호성 · 김상달\*

영남대학교 응용미생물학과

### Increased Antifungal Activity with Genetic Development of Antagonistic *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 against *Fusarium solani*

Lim, Ho-Seong and Sang-Dal Kim\*

Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Gyongsan 713-749, Korea

For the genetic development of more powerful antagonistic *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 as a biocontrol agent against soilborne plant pathogenic *Fusarium solani* causing root rot of many important crops, mutants improving the productivity of chitinase were obtained by mutation with UV radiation or NTG treatment. *P. stutzeri* YPL-M26 (UV mutant) and *P. stutzeri* YPL-M178 (NTG mutant) could improve the productivity of chitinase by 2.5 and 2.0 times, and its antifungal activity by 1.7 and 1.5 times, respectively. The antifungal mechanism of *P. stutzeri* YPL-M26 was caused by lysis of the fungal cell wall by hydrolytic enzymes such as chitinase. The antifungal activity of crude chitinase of *P. stutzeri* YPL-M26 on the mycelial growth of *F. solani* was observed to be much higher than that of the original strain. The enzymes produced by *P. stutzeri* YPL-M26 were the same as the original strain in enzymatic properties such as optimal pH and temperature.

근채류 식물의 뿌리는 각종 토양유래 식물병원균에 의해 매년 막대한 손실을 입고 있다(1, 2). 지금까지는 이러한 식물병원균의 피해를 방지하기 위해 각종 농약에 의한 화학적 방제법(3, 4)이 사용되어 왔으나 심각한 공해문제, 토양오염문제, 농약잔류문제 등 그 피해가 막심한 바 수년 전부터 생태계의 조절적 역할을 하는 미생물간의 상호관계를 이용하는 생물학적 방제법(2, 5-11)이 모색되어 왔다. 본 연구진에서도 식물근부병 발병억제를 위해서 강력한 생물방제균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1을 저병해 인삼경작지 토양으로부터 분리하였으며, 식물근부균 *Fusarium solani*에 대한 그 생육억제기작이 chitinase를 주로 하는 균체외막 가수분해효소들에 기인된다는 것을 이미 보고한 바 있다(12, 13).

본 연구에서는 보다 강력한 생물방제균을 유전적으로

로 육종함으로써 식물근부균 *F. solani*에 의한 농작물의 손실을 보다 더 효율적으로 방지할 수 있을 것으로 기대하여 억제기작의 원인이 되는 chitinase 등 외막분해효소의 생산능력을 돌연변이시킴으로써 억제력이 증강된 생물방제균으로 육종하고자 하였으며, 육종된 변이주의 방제기작도 함께 검토하였다.

#### 재료 및 방법

##### 사용균주 및 배양

본 실험에 사용한 근부억제균은 저병해 인삼경작지 토양으로부터 분리, 동정된 생물방제균주 *P. stutzeri* YPL-1 균주이었으며(12), 억제물질생산을 위해서는 chitin-peptone 배지 즉, 0.5% glucose, 0.2% peptone, 0.2% chitin, 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.05% NaCl(pH 6.8)로 조제하여 억제균을 접종한 뒤 30°C에서 84 시간 진탕배양한 후 그 원침상등액을 사용하

Key words: Mutation, Chitinase, *Pseudomonas stutzeri*, *Fusarium solani*, Biocontrol

\*Corresponding author

였다. 그리고 식물근부균 *F. solani* 는 Difco 제 potato dextrose agar (PDA) 배지를 이용해 28°C에서 3일간 배양하여 사용하였으며 억제력측정시험에서는 Difco 제 potato dextrose broth (PDB)를 이용해 160 rpm으로 진탕배양하였다.

#### 길항균의 돌연변이 유발 및 선발

생물방제균으로 선발된 모균주 *P. stutzeri* YPL-1을 ultraviolet (UV)나 *N*-methyl-*N'*-nitrosoguanidine (NTG)로 돌연변이시켰다. UV로 처리할 경우 Toshiba 제 10 W UV lamp를 30 cm 거리에서 30 초간 조사하여 돌연변이를 유발시켰으며, NTG로 처리할 경우 (14) 100 µg/ml의 NTG를 함유하는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)를 37°C에서 30 분간 처리하여 변이를 유발시켰다. UV나 NTG 처리로 얻은 돌연변이주를 chitin 함유배지의 clear zone 크기로 일차 선별한 후 chitinase 효소생산능을 효소활성도 측정법 (15)으로 재확인하였다.

#### 생육억제능 측정

**생육억제거리 측정** : 근부균 *F. solani*에 대한 모균주 및 변이주의 생육억제능을 조사하기 위해 chitin 함유한 PDA plate의 중앙에 먼저 별도로 배양한 *F. solani*의 PDA culture로부터 직경 5 mm의 cork borer를 사용하여 *F. solani* 균사체의 원형 agar piece를 무균적으로 옮겨 1일간 배양시킨 후 PDA plate의 가장자리 1 cm 간격에 길항균의 하룻밤 배양한 액 5 µl를 접종하여 28°C에서 배양시키면서 서로간의 증식선단까지의 거리 즉, 생육억제거리를 측정하여 비교하였다.

**균체증식량 측정** : Chitin-peptone 배지에서 배양한 모균주 및 변이주의 배양물을 12,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 그 상등액을 2.64% PDB에 membrane filter (0.45 µm)로 무균적으로 첨가한 후 근부균 *F. solani* 균사체의 원형 agar piece를 균일하게 접종하여 28°C, 160 rpm에서 5일간 진탕배양한 후 Toyo filter paper No.2로 여과, 건조하여 그 균체량을 측정, 비교하였다.

**균사체환크기 비교법** : Chitin-peptone 배지에서 배양한 모균주 및 변이주의 배양물을 12,000 rpm에서 20 분간 원심분리한 후 그 상등액을 균기 직전의 PDA plate에 10% 되게 무균적으로 첨가하여 굳힌 후, 별도로 4일간 배양한 PDA plate culture로부터 *F. solani* 균사체의 원형 agar piece를 plate 중앙에 옮긴 후 28°C에서 배양하여 동심원형으로 증식한 *F. solani* 균사체환의 직

경을 측정, 비교하였다.

#### 효소활성도 측정법

모균주 및 변이주의 효소생성을 위해 chitin-peptone 배지를 이용하여 30°C에서 160 rpm으로 84 시간 진탕배양시킨 배양액을 4°C, 12,000 rpm으로 20 분간 원심분리하여 그 원침상등액을 ammonium sulfate로 완전포화시켜 얻은 침전물을 하룻 동안 Sigma 제 cellulose dialysis sack (MW 12,000)으로 투석시켜 그 내액을 효소액으로 사용하였다. Chitinase 활성도 측정을 위해서는 Bemiller 법 (16)에 의해 조제한 colloid chitin을 기질로 하여 50°C에서 4 시간 진탕반응시킨 후 Somogyi-Nelson 법 (15)에 의해 생성된 환원력을 측정하였으며 시간당 10 µg의 glucose가 생성되는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다. Lamminarinase 활성도 측정을 위해서는 laminarin을 기질로 하여 40°C에서 2 시간 진탕반응시킨 후 chitinase와 동일한 방법으로 효소활성도를 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 우수변이주의 선발

근부길항균 *P. stutzeri* YPL-1 균주의 *F. solani*에 대한 생육억제현상이 chitinase를 주로 하는 외막가수분해 효소라는 것 (12, 13)이 확인되었으므로, 이들 효소의 생산능을 증강시킴으로써 보다 강력한 생물방제균을 유전적으로 육종하기 위해 UV나 NTG를 이용하여 선발된 모균주를 돌연변이시킴으로써 chitinase 생성능이 증강된 우량변이균주를 선발할 수 있었다. Chitin plate 상의 colony 주위의 clear zone 크기 비교법에 이어 배양여액의 효소활성도 측정으로 모균주로부터 chitinase 생성능이 증강된 변이주 *P. stutzeri* YPL-M1 (UV), *P. stutzeri* YPL-M26 (UV), *P. stutzeri* YPL-M178 (NTG)를 최종 선발하였다. Chitinase 생성능이 증강된 변이주가 과연 근부균 *F. solani*에 대한 생육억제현상도 증강되었는지를 확인하기 위해 모균주와 변이주를 대상으로 그 생육억제거리 측정법 및 배양여액을 첨가한 균체중량 비교법에 의해 조사해 보았다. 그 결과 Table 1과 같이 chitinase 생성능이 2.5 배, 2.0 배 정도로 증강된 우량변이주 *P. stutzeri* YPL-M26과 *P. stutzeri* YPL-M178을 얻을 수 있었으며 동시에 이 변이주들은 증강된 chitinase 생성능과 비례해서 근부균에 대한 생육길항력도 증강되었는데 즉, 근부균 *F. solani*에 대한 그 억제력이 모균주에 비해 169%, 152% 정도로 증강된 우량변

**Table 1. Improvement of antifungal activity of the selected mutants against *F. solani*.**

Strain <sup>a</sup> (mutagen)	Chitinase		Antifungal activity	
	Activity (Unit)	Relative (%)	Fungal dry wt.(%) <sup>b</sup>	Antagonistic distance <sup>c</sup> (%)
YPL-1	15.5	100.0	50.8	100.0
YPL-M1 (UV)	26.1	168.5	74.0	137.5
YPL-M26 (UV)	38.5	248.4	85.0	168.8
YPL-M178 (NTG)	30.5	196.8	77.0	151.6

<sup>a</sup> The bacteria was grown in chitin-peptone medium at 30°C for 84 hr

<sup>b</sup> 100%-relative dry weights of *F. solani* with culture filterates of the bacteria to a control (H<sub>2</sub>O) in PDB after 5 days incubation at 28°C

<sup>c</sup> Distance between the edges of the bacteria colony and fungal mycelium after 5 days incubation at 28°C

**Table 2. Increased system of chitinase production of the mutants.**

Strain	Cell growth (OD, 660 nm)	Extracellular protein (OD, 280 nm)	Chitinase production (u/ml)
YPL-1	0.855	0.319	14.7
YPL-M1	0.858	0.506	24.3
YPL-M26	0.867	0.538	36.6
YPL-M178	0.870	0.514	29.0

이주를 유전적으로 육종할 수 있었다.

**우수변이주의 chitinase 생산증강 기구**

Chitinase 활성이 증강된 변이주의 chitinase 생산증강 원인이 chitinase 생산량이 증강된 것인지, chitinase 효소의 active site 변형 등 효소분자 자체의 변화에 의한 활성도 증가인지를 알아보기 위해 배양 후 증식된 균량과 생산된 단백질의 양과 chitinase 활성도를 비교해 본 결과는 Table 2와 같았다. 이 결과에서 균체증식량의 증가나 효소분자 자체의 변형에 의해서라기 보다는 단위 균체량당 생산되는 효소단백질의 양이 증가함을 알 수 있었다. 이는 선발된 본 우량변이주는 유도효소인 chitinase(17)의 생산조절 유전자 중 생산억제에 관여하는 조절부위의 유전자에 돌연변이가 일어나서 생산능이 증강된 것으로 추측된다. 이 결과는 김 등(18, 19)이 돌연변이에 의한 한국 재래식 간장 및 된장에서 분리한 특항생성 *Bacillus* sp.의 유전적 육종연구에서 우량발효균주의 amylase와 protease의 활성도 증강 system이 본 균주의 효소생산 증강 system과 유사함을 알 수 있다.

**증강변이주의 억제기작**

돌연변이에 의해 chitinase 생산능이나 길항능이 증강

된 변이주 *P. stutzeri* YPL-M26이 가지는 근부균 *F. solani*에 대한 생육억제기작이 모균주 *P. stutzeri* YPL-1과 같이 chitinase와 같은 고분자물질에 의한 것인가를 알아보기 위해 변이주 배양상등액의 투석내액 및 alcohol 침전상등액 그리고 열처리된 배양여액으로 조사해 본 결과 Table 3과 같이 변이주의 배양상등원액에 비해 투석내액이 4.5% 정도의 억제력만 상실되었음을 알 수 있었다. 또한 alcohol 침전상등액의 경우 84.5%나 그 억제력이 상실되었는데 이러한 결과로 미루어 보아 약간의 저분자물질의 가능성도 함유되어 있다고 생각할 수 있겠으나 dialysis 중의 가수분해효소의 활성상실이나 alcohol 침전상등액의 잔여 alcohol에 의한 가능성을 감안해 본다면 chitinase 증강균주로 육종된 본 변이주도 근부균 *F. solani*에 대한 생육억제기작이 모균주 *P. stutzeri* YPL-1과 같이 고분자물질의 외막가수분해효소에 의한 것으로 확인되었다.

**우수변이주에 의한 균사신장 억제율 조사**

Chitinase 생산능이 증강된 길항증강변이주가 과연 근부균 *F. solani*에 대한 균사신장 억제능도 증강되었는지를 확인하기 위하여 chitin 및 laminarin으로 각각 유도시킨 모균주와 변이주의 배양액 원침상등액을 ammonium sulfate로 완전포화, 투석시킨 조효소액 10 µg/ml, 17 µg/ml를 *F. solani* 배양 3일째 첨가하여 근부균에 대한 균사신장 억제능을 균체증식측정법으로 조사하였다. 그 결과 Fig.1과 같이 chitin으로 유도시킨 조효소액을 첨가했을 경우 4일째에 모균주 *P. stutzeri* YPL-1은 72.3% 정도의 생육억제율을 보였으나 변이주 *P. stutzeri* YPL-M26의 경우는 96.8%나 생육억제율을 나타내었다. 그리고 laminarin으로 유도시킨 경우 모균주 효소의 경우 27.7% 정도의 생육이 억제된데 반해 변이주의 경우는 36.2% 정도 그 억제력을 나타내었다. 이

**Table 3. Antifungal mechanism of *P. stutzeri* YPL-M26 against *F. solani*.**

Treatment	Antifungal activity			
	Fungal dry weight		Fungal colony size <sup>a</sup>	
	Inhibition (%) <sup>b</sup>	Relative (%)	Inhibition (%) <sup>c</sup>	Relative (%)
Culture filtrate <sup>A</sup>	89.8	100.0	75.6	100.0
Dialyzed sol. <sup>B</sup>	87.2	97.1	71.1	94.0
Non-protein sol. <sup>C</sup>	12.1	13.5	13.3	17.6
Heat-treated sol. <sup>D</sup>	20.9	23.3	15.6	20.6

<sup>A</sup> The culture of *P. stutzeri* YPL-M26 was grown in chitin-peptone medium at 30°C for 84 hr

<sup>B</sup> Culture filtrate was dialyzed at 4°C for 48 hr through cellulose dialysis sack (MW 12,000)

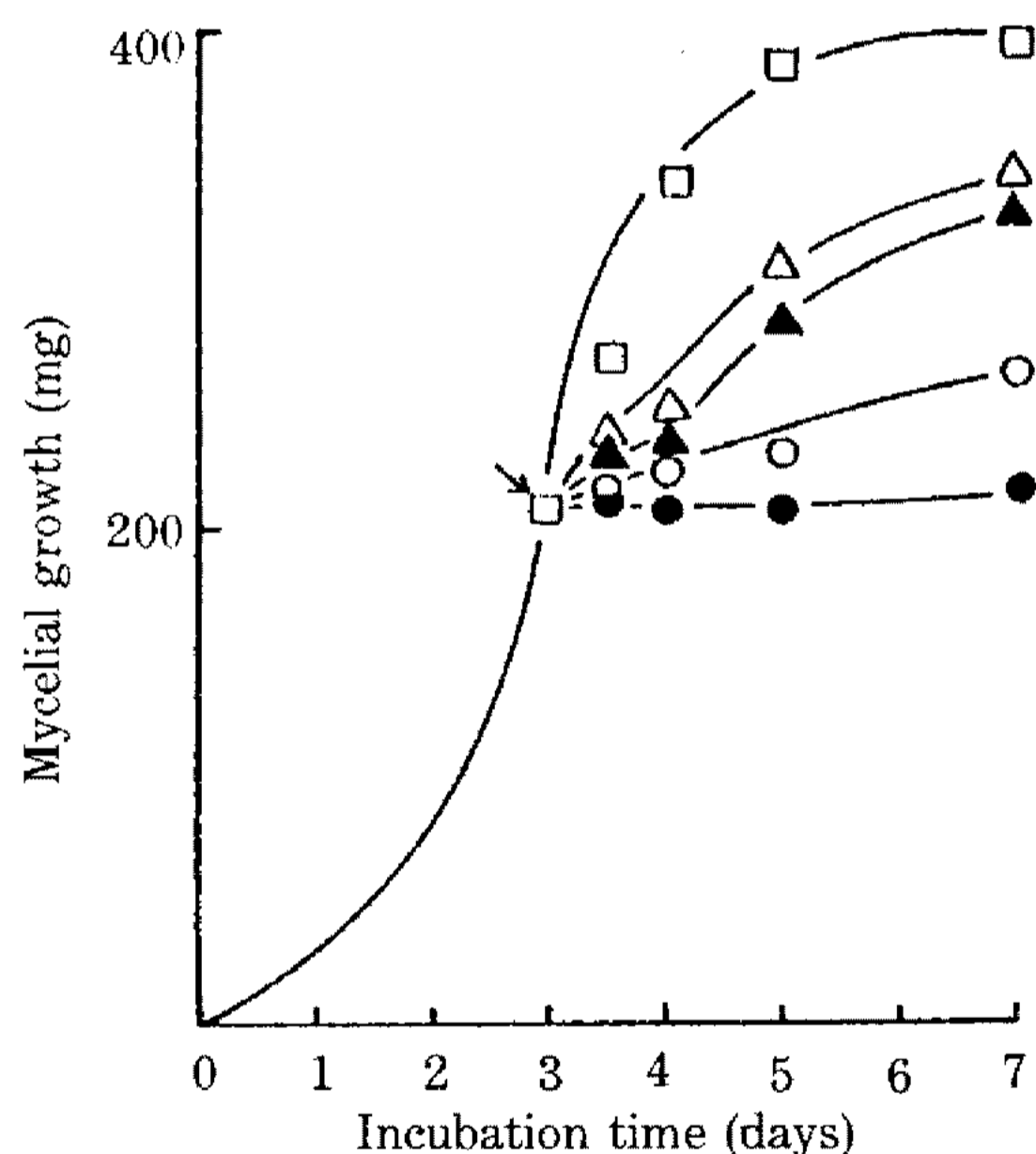
<sup>C</sup> Culture filtrate was precipitated with cold ethanol and the supernatant was concentrated on a rotary evaporator at 55°C

<sup>D</sup> Culture filtrate was heat treated at 80°C for 1 hr

<sup>a</sup> Colony circle diameter of *F. solani* on the treatment of *P. stutzeri* YPL-M26 incorporated into molten PDA after 5 days incubation at 28°C

<sup>b</sup> 100%-relative dry weight of *F. solani* to a control (H<sub>2</sub>O)

<sup>c</sup> 100%-relative colony size of *F. solani* to a control (H<sub>2</sub>O)

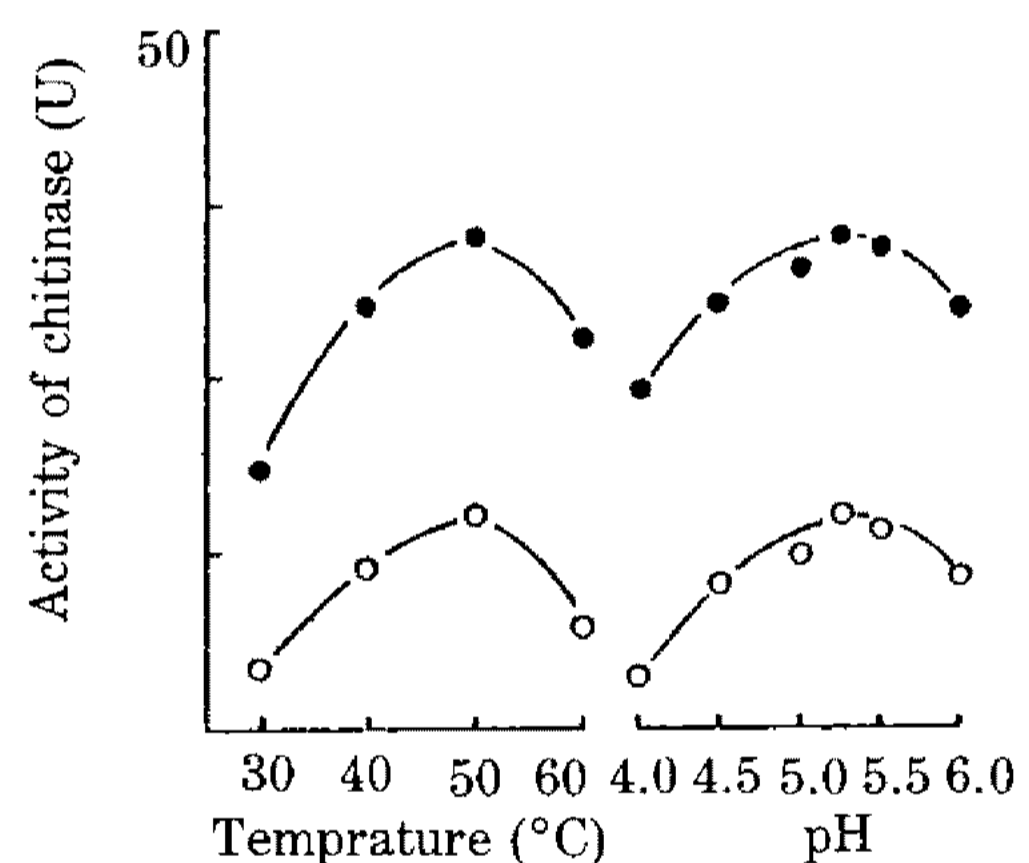


**Fig. 1. Antifungal effect after treatment with lytic enzymes of *P. stutzeri* YPL-1 and its mutant on mycelial growth of *F. solani*.**

3-day-old *F. solani* cultures were treated with; 10 $\mu$ g/ml of crude chitinase from *P. stutzeri* YPL-M26 (●), 10 $\mu$ g/ml of crude chitinase from *P. stutzeri* YPL-1 (○), 17 $\mu$ g/ml of crude laminarinase from *P. stutzeri* YPL-M26 (▲), and 17 $\mu$ g/ml of crude laminarinase from *P. stutzeri* YPL-1 (△) or not treated (□).

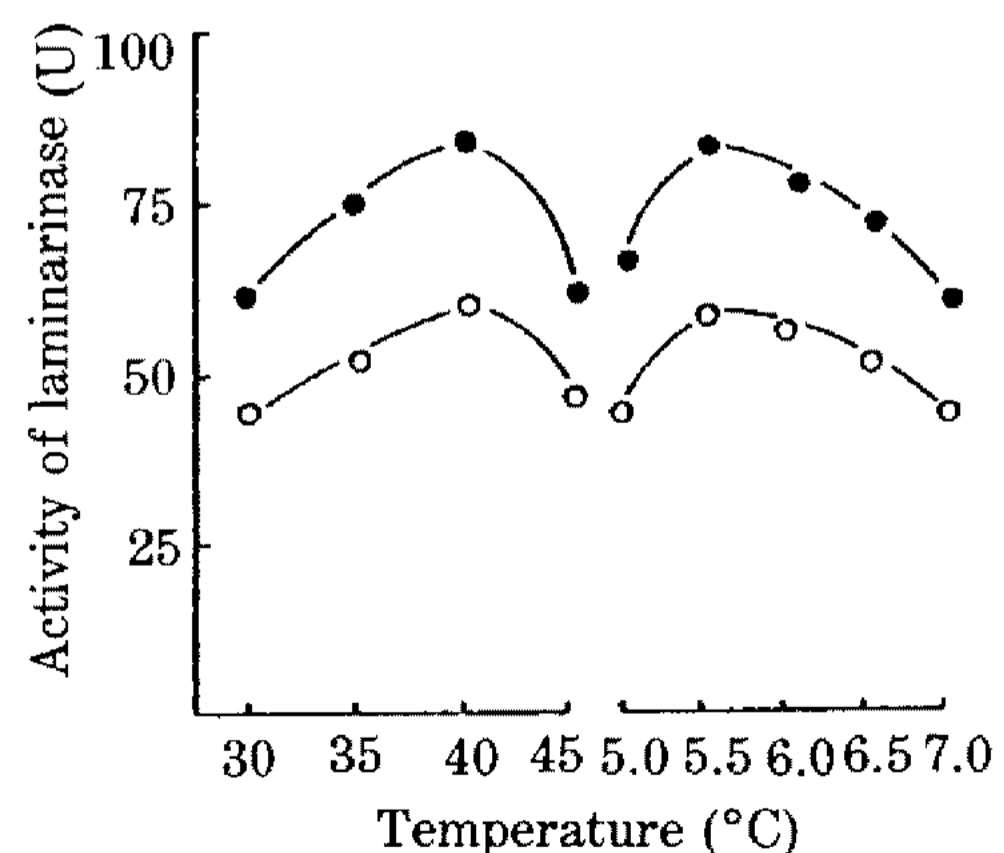
결과로 미루어 보아 균부균 *F. solani*에 대한 길항증강 변이주의 생육억제작용의 주원인은 가수분해효소 중에서도 chitinase가 주원인인 것으로 사료된다.

변이주 생산효소의 효소학적 특성



**Fig. 2. Effect of temperature and pH on the reaction of chitinase produced by *P. stutzeri* YPL-1 and its mutant.**

●; *P. stutzeri* YPL-M26    ○; *P. stutzeri* YPL-1



**Fig. 3. Effect of temperature and pH on the reaction of laminarinase produced by *P. stutzeri* YPL-1 and its mutant.**

●; *P. stutzeri* YPL-M26    ○; *P. stutzeri* YPL-1

선발된 변이주가 생산하는 가수분해효소의 효소학적 특성을 비교함으로써 변이주에서 생산된 효소에 기능적 변화가 동반되었는지를 알아보기 위해 작용최적 pH, 작용최적온도 등을 모균주효소와의 효소적 성질을 비교, 조사해 본 결과 Fig. 2, 3 과 같이 모균주 *P. stutzeri* YPL-1의 효소나 변이주 *P. stutzeri* YPL-M26의 효소 공히 chitinase 활성의 최적반응조건은 50°C, pH 5.3이었으며 laminarinase의 최적반응조건은 40°C, pH 5.5로 모균주나 변이주가 생산하는 효소의 특성에 별다른 차이를 찾아볼 수 없었다. 이는 변이주가 생산한 chitinase 자체에는 전혀 기능적 변화가 일어나지 않았음을 의미하는 것으로 생각된다.

## 요 약

근채류 식물의 근부원인이 되는 식물병원균 *Fusarium solani*의 생육을 강력히 길항하는 생물방제균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1을 모균주로 하여 UV나 NTG로 돌연변이시킴으로써 길항능이 증강된 강력한 생물방제균을 유전적으로 육종하고자 하였다. 그 결과 길항기작의 원인인 외막가수분해효소 chitinase 생산능이 2.5배, 2.0배 정도로 증강된, 동시에 길항능도 모균주에 비해 1.7배, 1.5배 정도로 비례해서 증강된 강력한 우수 길항변이주 *P. stutzeri* YPL-M26(UV)과 *P. stutzeri* YPL-M178(NTG)을 유전적으로 육종할 수 있었다. 길항증강변이주에 의한 *F. solani*의 생육억제기작도 모균주에서와 같이 고분자 물질인 chitinase를 주로 하는 외막가수분해효소에 의한 것으로 확인되었고, 균사신장억제율도 조사해 본 결과 조효소액 첨가 경우 24시간째에는 모균주 경우 87.1% 정도인데 비해 거의 100%의 생육억제율을 나타내는 강력한 생물방제균으로 유전적 육종을 할 수 있었다. 한편 변이주와 모균주의 효소에서 그 최적반응 pH 등 각종 효소학적 특성이 동일하였다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원에 의해 수행되

었음을 감사드립니다.

## 참고문헌

- Alexander, M.: *Introduction to soil microbiology*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York (1977).
- Cook, J.R. and K.F. Baker: *The nature and practice of biological control of plant pathogens*, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. (1983).
- Benson, D.M. and R. Baker: *Phytopathol.*, **64**, 38 (1974).
- Jones, R.K.: Fungicides for bedding plants, *Bedding Plants Inc. News*, **16**, 3 (1985).
- Baker, R.: *Annu. Rev. Phytopathol.*, **6**, 263 (1968).
- Baker, R.: Biological control of plants pathogens, In M.A. Hoy and D.C. Herzog, *Biological control in agricultural IPM systems*, Academic Press, Inc., New York (1985).
- Blakeman, J.P. and N.J. Fokkema: *Annu. Rev. Phytopathol.*, **20**, 167 (1982).
- Cook, J.R.: *Phytopathol.*, **75**, 25 (1985).
- Davison, J.: *Biotechnology*, **6**, 282 (1988).
- Papavizas, G.C. and R.D. Lumsden: *Annu. Rev. Phytopathol.*, **18**, 389 (1980).
- Schroth, M.N. and J.G. Hancock: *Science*, **216**, 376 (1982).
- Lim, H.S. and S.D. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**, 81 (1990).
- Lim, H.S. and S.D. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**, 188 (1990).
- Jeffrey, H.M.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor, Laboratory, p. 125 (1974).
- Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
- Bemiller, J.N.: *Method in Carbohydrate Chem.*, Vol. 5, Academic Press, p. 103 (1965).
- Monreal, J. and E.T. Reese: *Can. J. Microbiol.*, **15**, 689 (1969).
- 김종규, 김상달: 한국농화학회지, **31**, 346(1988).
- 김상달, 김종규: 한국농화학회지, **32**, 148(1989).

(Received June 21, 1990)