

植物 病原性 絲狀菌에 拮抗력을 갖는 *Serratia marcescens* CK-3의 分離 및 酵素의 性質

김영일 · 이영환 · 김광식 · 박화성 · 전우복 · 이재화 · 김종현

전남대학교 농과대학

초록 : 식물 병원성 사상균 세포벽의 주성분인 chitin을 분해하는 미생물을 토양에서 분리, 선발하여 동정하고 이들의 효소적 성질을 조사하였다. 선발균 *Serratia* (*S*) *marcescens*는 식물 병원성 사상균인 *Fusarium* (*F*) *oxysporum*과 *Rhizoctonia* (*R*) *solani*에 대해 길항력은 갖고 있었으며 효소적으로 chitinase 외에 laminarinase 및 protease 등의 활성을 가지고 있었다. 선발 균주의 chitinase 생산 최적조건은 chitin broth 기본배지의 조성 과 온도 및 배양시간을 변형하여 조사한 결과 colloidal chitin 1.5%, tryptone 0.5%, glucose 1%, peptone 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, NaCl 0.1% (w/v), pH 6.8 배지에서 30°C, 72시간 배양하였을 때이었으며 효소의 *in vitro* 최적 활성조건은 pH 7.5, 50°C이었다. 한편 여러 무기이온 중에서 Ag^+ 와 Mn^{++} 은 효소의 활성을 촉진시켰다(1991년 2월 1일 접수, 1991년 3월 25일 수리).

Chitin은 N-acetyl-D-glucosamine의 β -1,4 결합으로 이루어진 polymer로서 해양 무척추동물, 곤충, 조류 및 진균류 등^{1,2)}에서 생합성되고 있으며 특히 진균류 중 식물 병원성 사상균인 *Fusarium*속, *Rhizoctonia*속 등^{2,3)}의 세포벽이나線蟲의表皮 및 卵 角質部位의 주 성분^{4,5)}을 이루고 있기 때문에 이들을 분해할 수 있는 lytic enzyme에 의한 생물학적 방제의 연구⁶⁻¹⁰⁾가 활발하다. 생물학적 방제의 주요 기작으로는 미생물이 생성하는 항생물질등에 의한 방법¹¹⁾, 병원균과 유용 미생물간의 영양원 경쟁에 의한 방법¹²⁾, 그리고 병원균의 세포벽을 구성하고 있는 chitin, glucan, protein등을 분해하는 lytic enzyme에 의한 방법^{10,13)} 등이 알려져 있다. 항생물질 생성 균주에 의한 방법은 약제 저항성 병원균의 변이주를 유발할 가능성이 있고, 또한 실험포장에서 항생물질의 검출이 확인되지 않으며, 영양원 경쟁 미생물을 이용한 방법도 *in vitro*에서의 활성이 실험포장에서 발현되지 않는 문제를 안고 있다.

한편 lytic enzyme은 대부분 inducible enzyme으로서 기질 첨가에 의해 쉽게 유도되는데 이러한 lytic enzyme 생성의 유도로 유도물질인 chitin등의 직접 사용¹⁴⁾이나 효소생성 균주의 접종에 의한 식물 병원성 사상균등을 방제하는 많은 연구^{15,16)}가 알려져 있다. Chitinolytic enzyme을 생성하는 미생물로는 *Serratia*^{15,17}

¹⁸⁾, *Pseudomonas*¹⁰⁾, *Aeromonas*¹⁴⁾, *Enterococcus*, *Bacillus* 등의 세균³⁾과 *Streptomyces* 등²⁰⁾의 방선균, *Trichoderma*, *Aspergillus* 등의 사상균^{3,8,21)}, 그리고 *Saccharomyces* 등³⁾의 효모등이 알려져 있는데, 식물 병원성 사상균등이 서식하면서 병을 유발하는 근권에서 이들의 빈도수는 낮은 편이다. 따라서 본 연구는 식물 병원성 사상균의 보다 효율적인 생물학적 방제를 위하여 chitinase activity가 우수한 균주를 선발하고 이들 균주의 chitinase gene을 근권 우점 미생물에 cloning하고 자 1차로 chitinase 생성 균주를 토양에서 분리, 동정하고 선발된 균주의 chitinase에 대한 효소학적 성질을 검토하였다.

재료 및 방법

Colloidal chitin의 조제

Crude chitin(Sigma, C-3387) 100g에 cold conc. HCl 2,000ml를 가하여 4°C에서 12시간 교반한 후 95% cold ethanol 2,000ml를 가하여 생성된 colloidal chitin을 6,000×g에서 10분간 원심분리(Kuboda KR-200B)하여 회수하고 증류수로 희석한 후 pH가 중화될 때까지 증류수로 세척하여 회수된 colloidal chitin을 효소의 기질로 사용하였다.

균의 분리 및 선발

施設 園藝 連作地 根圈土壤을 0.01M Tris buffer(pH 7.2)에 현탁한 후, chitin 평판배지(colloidal chitin 0.5%, glucose 0.1%, peptone 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, NaCl 0.1%, agar 1.5%, pH 7.0)⁹⁾에 도말 접종하고 30°C에서 5~7일간 培養하면서 colony 주변에 clear zone을 형성하는 균주를 1차로 분리하고 이렇게 분리한 균주를 식물 病原性 絲狀菌인 *F. oxysporum* 및 *R. solani*와 PDA 배지상에서 30°C, 7일간 대치배양한 후 絲狀菌에 대한 沮害力을 갖는 菌株을 2차로 選拔하여 이들의 chitinase activity를 측정하고 이 중에서 활성이 우수한 균주를 최종 선발하였다. 한편 공시 균주로서 *F. oxysporum*과 *R. solani*는 농업기술연구소에서, *S. marcescens* QM B1466은 American Type Culture Collection(ATCC) (Rockville, Maryland, USA)에서 분양받았다.

選拔菌株의 分類 및 同定

最終 選拔된 균주를 The procaryotes²²⁾, Bergey's manual of systematic bacteriology²³⁾, Microbiological method²⁴⁾등에 기술된 方法에 따라 형태학적, 생물학적 및 생화학적 성질등을 檢討하여 동정하였다.

Enzyme activity 및 protein 함량 측정

병원균들의 세포벽 構成成分인 chitin의 분해능력을 調査하기 위해 선발 균주를 배양하여 원심분리한 상등액을 조효소로 하고, colloidal chitin과 laminarine을 기질로 하여 30분간 반응시킨 후 還元糖 定量法²⁵⁾으로 chitinase 및 laminarinase activity를 측정하였다. 주어진 일정 온도에서 효소 활성을 측정할 경우에는 water bath를 사용하여 기질과 반응시켰으며, 주어진 일정 pH에서 효소활성을 측정할 경우에는 선발균주 배양 상등액과 기질의 반응액에 buffer용액의 최종 농도가 0.05M이 되게끔 해당 pH에 적합한 buffer용액을 첨가하여 pH를 교정시켜 반응시켰다(pH 범위에 따라 사용된 buffer 용액의 종류 : pH 4~6 ; citric acid-sodium phosphate, pH 7~8 ; sodium phosphate, pH 9~10 ; glycine-sodium hydroxide).

효소단위는 1시간당 1 μ mole의 N-acetylglucosamine 및 glucose 생성능력을 1 unit로 하였다. 한편 proteinase activity는 Allan 등²⁶⁾의 방법으로 10% azocasein을 기질로 하여 1시간당 1mg azocasein 분해력을 1 unit로 하였다. 또한 배양 시간에 따른 protein

함량의 변화는 Bradford법²⁷⁾으로 290nm wavelength에서 optical density(OD)값을 경시적으로 측정하였다.

미생물 배양 및 chitinase 안정성 조사

Chitinase의 생성에 미치는 최적 조건을 조사하기 위해서 선발 균주를 chitin broth 기본배지⁹⁾를 기초하여 탄소원, 질소원, 온도, pH 및 배양 일수 등의 조건을 달리한 배지에 배양하였다. 한편 chitinase의 *in vitro* 안정성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위해서 선발 균주 배양 상등액을 취하여 water bath를 이용하여 주어진 온도에서 1시간 정치한 후 동일 온도에서 기질과 30분간 반응시킨 후에 효소 활성을 측정하였다. 또한 chitinase의 *in vitro* 안정성에 미치는 pH의 영향력 조사는 buffer 용액을 이용하여 선발 균주 배양 상등액의 pH를 교정한 후 주어진 pH에서 30분간 정치하고 기질을 첨가하여 30분간 반응시킨 후에 효소 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Chitinase 생산균주의 선발

식물·병원성 사상균 *F. oxysporum* 및 *R. solani* 등의 진균류 세포벽 주성분인 chitin을 분해할 수 있는 균주를 선발하기 위해 chitin 선택배지상에서 chitin 분해력이 있는 250여 세균을 1차로 분리하고, 이들을 다시 PDA²⁴⁾ 배지상에서 *F. oxysporum*과 *R. solani*에 대치배양하여 7일 후 길항력이 인정되는 54균주를 재선발한 후, 다시 chitin broth 기본배지를 이용하여 chitinase activity를 측정하고 효소 역가가 가장 우수한 CK-3를 최종 선발하였다.

균주의 분류 및 동정

선발된 CK-3 균주는 Table 1과 같이 운동성을 갖는 통성 혐기성 간균으로 4°C와 50°C에서 생육하지 않는 Gram 음성균이었다. 또한 *Serratia*속 세균의 특징인 LB 배지에서의 붉은색소 prodigiosin 생성과 catalase activity를 가지고 있었다. 한편 Table 1과 같이 공시 대조 균주 *S. marcescens* QM B1466과 비교 검토한 결과 형태학적, 생물학적 및 생화학적 성질에 있어서 높은 유사성을 보였으며 이러한 결과를 토대로 The procaryotes²²⁾, Bergey's manual of systematic bacteriology²³⁾ 등의 분류기준에 따라 선발 균주를 *S. marcescens* 또는 그 유연균으로 동정하였다.

Table 1. Biological and biochemical characteristics of the isolated strain *S. marcescens* CK-3

Characteristics	<i>S. marcescens</i>	
	CK-3	QM B1466
Morphological characteristics		
Shape	Rod	Rod
Motility	+	+
Gram stain	-	-
Colony shape	Circular, raised	Circular, raised
Colony color on LB agar	pink	red
Spore	-	-
Biological characteristics		
Growth, 4°C	-	-
50°C	-	-
Oxygen requirement	Facultative anaerobic	Facultative anaerobic
Biochemical characteristics		
Oxidase	-	-
Catalase	+	+
V-P test	+	+
Hydrolysis of		
Gelatin	+	+
Starch	-	-
Utilization of		
Glucose	+	+
Arabinose	+	+
Rhamnose	-	-
Fructose	+	+
Sucrose	+	+
Lactose	-	-
Mannitol	+	+
Sorbitol	+	+
Citrate	+	+
Aspartic acid	+	+
Tyrosine	+	+
Serine	+	+
Methionine	-	-
Phenylalanine	-	-
Glycine	-	-
Valine	-	-
Glutamine	+	+
Tryptophan	+	+
Isoleucine	-	-
Asparagine	+	+
Alanine	+	+
Glutamic acid	+	+
Adenine	-	-
Leucine	-	-

+ : Positive, - : Negative.

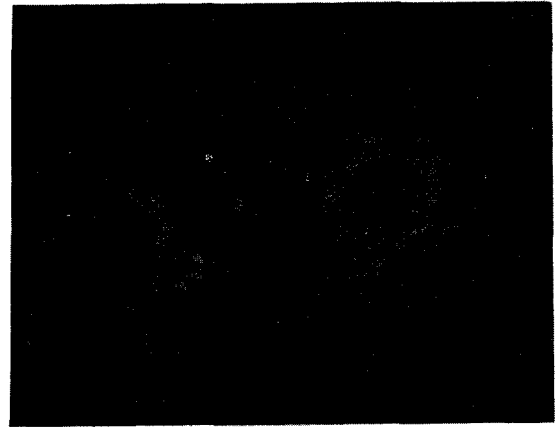


Fig. 1. Observation of antagonistic *S. marcescens* CK-3 against *F. oxysporum*(left) and *R. solani*(right) after 7 days culture on PDA plate at 37°C.

A : *S. marcescens* CK-3, B : *S. marcescens* QM B1466.

사상균에 대한 길항력 및 enzyme activity

선발된 *S. marcescens* CK-3를 공시균주인 *S. marcescens* QM B1466과 PDA 배지상에서 병원성 사상균 *F. oxysporum* 및 *R. solani*와 7일간 대치배양한 결과 Fig. 1과 같이 사상균과 선발균의 접촉 부위에서 저해력을 갖는 것이 관찰되었다. 이러한 *S. marcescens* CK-3의 식물 병원성 사상균 *F. oxysporum* 및 *R. solani*에 대한 길항력은 chitinase activity가 우수한 것으로 알려진 *S. marcescens* QM B1466의 길항력보다 현저히 우수하였다. 한편 *S. marcescens*의 *Sclerotium rolsüi*, *Trichoderma reesei*, 및 *Phycomyces blakesleeanus* 등의 사상균에 대한 길항력은 보고^{18,20)}된 바 있으나 *F. oxysporum* 및 *R. solani*에 대한 길항력은 아직 보고된 바 없는데, *S. marcescens* CK-3의 chitinase activity는 본 실험에서 사용된 chitinase 생성 최적배지에서 27.5unit/ml로 *S. marcescens* QM B1466의 60unit/ml보다는 낮았으나, laminarinase activity는 *S. marcescens* QM B1466의 0.5unit에 비해 35unit/ml로 높았으며, 배양 3일 후의 proteinase activity 또한 공시 대조 균주에서는 경미한데 비해 선발균주는 10unit의 활성을 갖는 것으로 볼 때 *S. marcescens* QM B1466과 선발균주의 길항력 차이는 laminarinase와 proteinase의 협력 작용에 기인하는 것으로 추정된다. 대부분의 진균류의 세포벽이 복합 당단백질로 구성되어 있는 점²⁾으로 보아 단일효소보다는 복합효소에 의한 사상균의

세포벽 용해작용이 생물학적 방제에 보다 효과적일 것으로 생각된다.

효소의 생성 및 활성조건

Chitinase 생성 최적 조건을 찾기 위하여 chitin broth 기본배지에 선발 균주 種배양액 5%(v/v)를 접종하고 여러 온도와 pH에서 배양하면서 chitinase, laminarinase, proteinase 활성 및 단백질 함량을 경시적으로 조사한 결과 Fig. 2와 같이 30°C, pH 6.8에서 배양 3일째에 최대의 단백질 함량과 효소활성을 나타내었다. 이는 Lee등¹⁹⁾의 *Aeromonas*보다는 늦으나 Monreal *et al.*¹⁷⁾과 Cho등²⁸⁾의 *S. marcescens*에서의 6일째보다는 단축된 경향이였다. 한편 탄소원과 질소원이 chitinase 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 chitin broth 기본배지의 조성을 변형하여 선발균주를 배양한 후 chitinase activity를 측정할 결과 Table 2와 Table 3에서처럼 탄소원으로는 chitin과 laminarine, 질소원으로는 tryptone과 yeast extract가 우수하였으며 탄소원의 함량을 변형한 배지를 이용한 결과 탄소원으로 chitin 1.5%를 이용한 변형된 chitin broth 기본배지⁹⁾가 가장 적합하였으며 이는 Monreal 과 Reese¹⁷⁾ 및 Lee 등¹⁹⁾의 보고와 유사하였다. 따라서 본 연구를 위한 chitinase 생성 최적 배지 조건으로는 colloidal chitin 1.5

%, tryptone 0.5%, glucose 1%, peptone 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, NaCl 0.1%(w/v), pH 6.8, 30°C, 72시간이었으며 이러한 조건에서 chitinase의 최대 활성은 chitin broth 기본배지에서보다 50% 증가된 27.5unit였다.

Table 2. Effect of various carbon sources instead colloidal chitin in chitin broth media⁹⁾ on chitinase production after three days culture of *S. marcescens* CK-3 at 30°C

Carbon sources (0.5%, w/v)	Chitinase activity (Unit/ml)	Laminarinase activity (Unit/ml)
Laminarine	21.0	7.2
Glucose	4.3	5.7
Galactose	7.3	6.2
Lactose	7.7	7.1
Starch	5.6	4.2
Fructose	2.6	1.8
Xylose	1.2	1.3
Arabinose	0.7	1.0
Maltose	0.5	0.7
Sucrose	0.8	0.6
Colloidal chitin	15.0	18.7

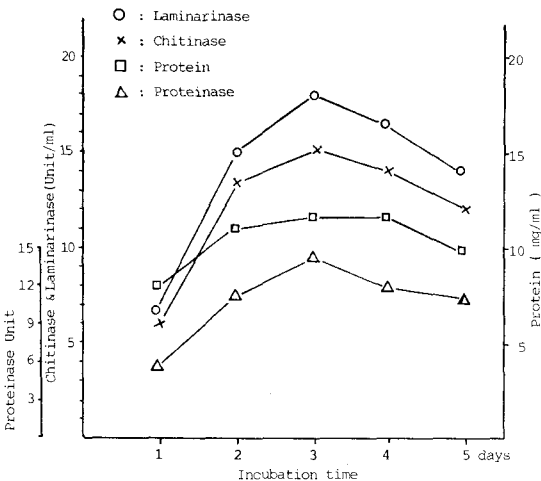


Fig. 2. Time course for production of chitinase, laminarinase, proteinase and protein from the supernatant of *S. marcescens* CK-3 culture medium for 3 days at 30°C.

The enzyme activities and the total protein content from the supernatant of bacteria culture medium were analyzed on days after inoculation.

한편 chitinase의 *in vitro* 활성에 미치는 온도와 pH의 영향을 알아보기 위해 먼저 chitinase 생성 최적 조건하의 선발 균주 배양 상등액을 주어진 일정 pH에서 기질과 30분간 반응시킨 후 효소 활성을 측정 한 결과 pH에 대한 chitinase의 최적 *in vitro* 활성은 Fig. 3에서와 같이 pH 7.5에서 나타났으며 pH에 대한 효소의 안정성을 알아보기 위해 선발 균주 배양 상등액을 기질과 30분간 반응시키기 전에 완충용액으로 pH가 교정된 주어진 pH에서 선발 균주 배양 상등액을 30분간 정치한 결과 pH 5~9 범위에서 안정하였다.

Chitinase의 *in vitro* 활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위해 chitinase 생성 최적 조건하의 선발 균주 배양 상등액을 주어진 일정 온도에서 기질과 30분간 반응시킨 후 효소 활성을 측정 한 결과 Fig. 4에서와 같이 열에 대한 chitinase의 최적 *in vitro* 활성은 50°C에서 나타났으며 효소의 열에 대한 안정성을 알

Table 3. Effect of addition of various nitrogen sources into chitin broth media⁹⁾ on chitinase production after three days culture of *S. marcescens* CK-3 at 30°C

Additive nitrogen sources (0.5%, w/v)	Chitinase activity (Unit/ml)	Laminarinase activity (Unit/ml)
Tryptone	19.1	23.5
Yeast extract	19.0	23.3
Asparagine	18.7	20.2
NH ₄ Cl	18.3	21.3
Urea	15.7	19.6
Ammonium nitrate	14.1	18.2
Ammonium phosphate	14.0	18.8
Ammonium sulfate	13.9	18.1
Potassium nitrate	13.2	17.2

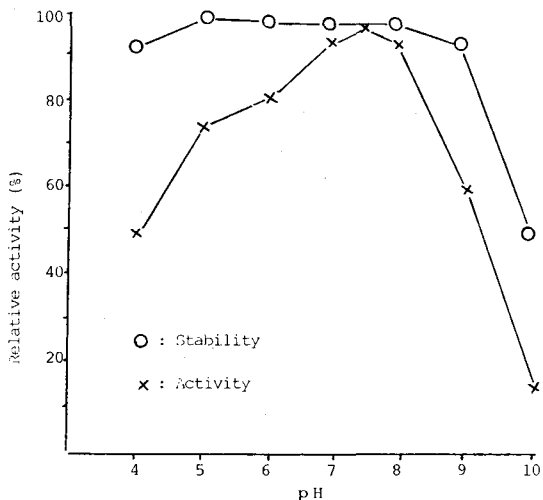


Fig. 3. Effect of pH on the activity and the stability of chitinase from the supernatant of *S. marcescens* CK-3 culture medium for 3 days at 30°C.

For measuring enzyme activity, the supernatant of bacteria culture medium and the substrate was reacted for 30 minutes at a given pH without preincubation. For measuring enzyme stability, the supernatant of bacteria culture medium and the substrate was reacted for 30 minutes with 30 minutes preincubation of the supernatant at a given pH.

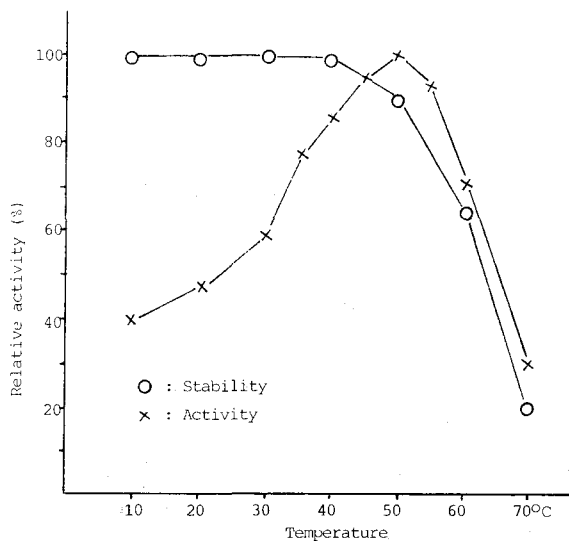


Fig. 4. Effect of temperature on the activity and the stability of chitinase from the supernatant of *S. marcescens* CK-3 culture medium for 3 days at 30°C.

For measuring enzyme activity, the supernatant of bacteria culture medium and the substrate was reacted for 30 minutes at a given temperature without preincubation. For measuring enzyme stability, the supernatant of bacteria culture medium and the substrate was reacted for 30 minutes with 1 hour preincubation of the supernatant at a given temperatures.

기위해 선발 균주 배양 상등액을 기질과 30분간 반응시키기 전에 10°C~70°C 범위의 주어진 온도에서 1시간 정치한 결과 효소의 안정성은 60°C부터 급격히 감소하였다. Chitinase의 *in vitro* 활성에 미치는 무기이온들의 영향을 조사하기 위해 각종 무기염을 효소 반응액내에서 최종 농도가 0.01M로 되도록 첨가하여 효소활성을 측정한 결과 Ag⁺(30°C)와 Mn⁺⁺(20%)이 효소활성을 촉진한 것으로 나타났다(data not shown).

謝 辭

본 연구는 1990년도 문교부 유전공학 학술연구 조성비 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 깊은 감사를 표합니다.

참 고 문 헌

1. Kramer, K. J. and D. Koga : Insect Biochem., 16 (6) : 851(1986)
2. Wessels, J. G. H. and J. H. Sietma : Encycl. Plant Physiol., 13B : 352(1981)
3. Robert, W. K. and C. P. Selitrennikoff : J. Gen. Microbiol., 134 : 169(1988)
4. Mankau, R., S. Das : J. Nematol., 9 : 192(1969)
5. Mian, I. H., G. Godoy, R. A. Shelby and S. Morga-John : Nematropica, 12 :
6. Baker, K. F. and R. J. Cook : Biological control of plant pathogens, The American Phytopathological Soc., p. 433, Minesota(1982)
7. Chang, I. P. and T. Kommedahl : Phytopathology, 58 : 1395(1968)
8. Elad, Y., I. Chet and Y. Henis : J. Biol. Chem., 257 (3) : 1398(1982)
9. 김영일, 김광식, 김용웅 : 한국토양비료학회지, 21 (2) : 129(1988)
10. Lim, H. S. and S. D. Kim : Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 18(2) : 188(1990)
11. Howell, C. R. and R. D. Stipanovic : Phytopathology, 69 : 480(1979)
12. Krupa, S. V. and Y. R. Dommergues : Ecology of root pathogens, Elsevier Sci. Pub. Co., p. 281(1979)
13. Donald, M. Reynold and L. R. Berger : Biochemica Et Biophysica Acta, 29 : 522(1958)
14. Michell, R. and M. Alexander : Soil Science Society Proceedings, 556(1962)
15. Ordentlich, A., Y. Elad and I. Chet : Soil Biol. Biochem., 19(6) : 747(1987)
16. Shapira, R., A. Ordentlich, I. Chet and B. Oppenheim : Phytopathology, 79 : 1246(1989)
17. Monreal, J. and E. T. Reese : Can. J. Microbiol., 15 : 689(1969)
18. Ordentlich, A., Y. Elad and I. Chet : Phytopathology, 78 : 84(1988)
19. Lee, K. P., C. N. Kim, J. H. Yu and D. H. Oh : Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 18(6) : 599(1990)
20. Skujins, J., H. J. Potgieter and M. Alexander : Arch. Biochem. Biophys., 111 : 358(1965)
21. Sivan, A. and I. Chet : J. Microbiol., 135 : 675(1989)
22. Starr, M., H. Stolp, H. Truper, H. G. and Schlegel, H. G. : The prokaryotes; A handbook and identification of bacteria, Springer-Verag, Berlin, Heidelberg, New York(1981)
23. Krieg, N. R., Holt, J. G. : Bergey's manual of systematic bacteriology, Willams & Wilkins, Baltimore (1984)
24. Collins, C. H., Lyne, P. M. : Microbiological method (5th ed), Butterworths, London(1984)
25. Reissing, J. L., J. L. Strominger and L. F. Leloir : J. Biol. Chem., 217 : 965(1955)
26. Allan, B. J. and R. M. W. Stevenson : Can. J. Microbiol., 27 : 1114(1981)
27. Bradford, M. M. : Anal. Biochem., 72 : 248(1976)
28. Cho, M. J., S. W. Gal, J. I. Kim, S. I. Lee and S. Y. Lee : Proc. Mol. Biol. Genet., 5 : 105(1990)
29. Sietsma, J. H. and J. G. H. Wessels : Microbiology, 114 : 99(1979)

Isolation of *Serratia marcescens* CK-3 against phytopathogenic fungi and its enzymatic properties

Yeong-Yil Kim, Young-Hwan Rhee, Kwang-Sik Kim, Hwa-Sung Park, Woo-Bock Chun, Jae-Wha Lee and Jong-Hyun Kim(College of Agriculture, Chonnam Nat'l University, Kwangju 500-757, Korea)

Abstract : *Serratia marcescens* CK-3, decomposing chitin which is a major component of cell wall in phytopathogenic fungi, was isolated from the continuous cropping rhizosphere of pepper and cucumber and its enzymatic property was examined. *S. marcescens* CK-3 was found to have antagonistic effects against *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* and to have complex enzyme systems such as chitinase, laminarinase, and proteinase. The preferable composition of the medium for production of chitinase was found and was as follows : colloidal chitin 1.5%, tryptone 0.5%, glucose 1.0%, peptone 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, and NaCl 0.1% (w/v), pH 6.8. The maximum enzyme production was observed after culture of 72 hours at 30°C using a medium containing the above chemical composition. The optimal pH and temperature for *in vitro* activity of

chitinase from *S. marcescens* CK-3 were pH 7.5 and 50°C, respectively. The enzyme activity increased by metal ions such as Ag^+ and Mn^{++} .