

Chitinase를 생산하는 길항미생물 *Serratia* sp. 3095의 선발과 *Fusarium* 속에 대한 항진균성

이은탁 · 김상달*

영남대학교 응용미생물학과

초 록 : 경주지역의 토양으로부터 *Fusarium* 속 식물병원균에 길항력을 갖는 chitinase 생산성 길항미생물을 분리할 수 있었으며, 이를 분류학적으로 동정하여 본 결과 *Serratia proteamaculans* 3095로 동정할 수 있었다. 이 균주가 생성하는 chitinase의 생성조건을 조사한 결과 탄소원으로 colloidal chitin이 가장 좋았으며 그 최적 농도는 0.15%이었고, glucose에 의해 chitinase 생산 유도를 억제받는 효소임을 알 수 있었다. 질소원에 의한 영향은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{Cl}$, peptone 등에 의해 chitinase 생산성이 증가되었고, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와 peptone을 각각 0.1%씩 첨가하였을 때 chitinase 생산이 가장 좋았다. 또한 시드름병균 *Fusarium oxysporum*을 대상으로 *in vitro*, *in vivo* pot 실험을 통해 *Serratia* sp. 3095의 강한 방제력을 검증할 수 있었다. (1999년 2월 22일 접수, 1999년 5월 28일 수리)

서 론

1950년대 부터 급속하게 성장해온 합성농약이 세계 식량생산에 크게 기여해왔지만, 이의 남용에 따른 폐해가 속출하고 있어 각종 규제가 강화되고 있다. 이러한 상황에서 유기합성농약의 시장은 점차 감소하고 있는 반면 신규 생물농약시장은 활기를 띠고 있다. 이에 우리 토양에 맞는 생물농약 개발의 필요성이 대두되고 있으며, 전세계 농약시장의 0.5%점유에 불과한 생물농약시장이 향후 더욱 확대될 것으로 보여 이를 뒷받침할 수 있는 빠른 기술개발의 필요성이 요구되고 있으며, 현재의 합성 농약시장을 대체 할 수 있는 미생물 유래의 무독성 천연 길항물질이나 유용 길항미생물들을 이용하는 생물방제법의 연구 개발이 활발해질 것으로 예측된다.¹⁻³⁾

생물농약은 식물병원성 진균의 세포벽을 붕괴하는 외막가수분해효소의 작용과 항진균성 물질과 같은 항생물질의 작용등의 생물방제기작에 기초를 두고 있다. 이 중에서 식물병원성 진균의 외막 가수분해효소의 하나인 chitinase는 생태계에 널리 존재하는 chitin(poly-N-acetylglucosamine)을 가수분해하여 식품산업, 제약산업, 농업 및 환경분야에서도 널리 이용되고 있으나,^{4,6)} 미생물 특히 *Streptomyces*,⁷⁻⁹⁾ *Serratia*,¹⁰⁻¹³⁾ *Pseudomonas*,¹⁴⁾ *Aeromonas*,¹⁵⁾ *Bacillus*,^{16,17)} *Acinetobacter*,¹⁸⁾ *Vibrio*¹⁹⁾ 등의 세균과 *Trichoderma*,²⁰⁾ *Aspergillus*,²¹⁾ *Mucor*,²²⁾ *Mycothecium*,²³⁾ *Candida*,²⁴⁾ *Saccharomyces*²⁵⁾ 등의 진균에 넓게 분포하는 것으로 알려져 있는데, 최근 식물성 chitinase가 식물병원균의 생육을 억제한다는 보고²⁶⁾와 세균유래성 chitinase가 식물질병 방제기작을 나타낸다는 보고들^{13,14)}이 활발히 나오고 있다.

따라서 본 연구에서는 식물병원성 진균중 뿌리썩음병이나 시들음병의 원인이 되는 *Fusarium* 속의 식물질병을 방제할 수 있는 길항미생물을 경상북도 경주지역에서 병해가 적은 경작지 토양을 토양원으로 하여 분리하고, 이중 강력한 chitinase를

생산하는 길항균주를 선발하고, 이를 동정을 하였으며, 이 균주가 생산하는 chitinase에 의한 생물방제력을 *in vitro*, *in vivo* pot 실험을 통해 확인함으로써 우리나라의 자연환경에 적합한 토착생물방제균을 자원화하는데 목적을 두었다.

재료 및 방법

생물방제균의 분리 및 선발

경주 아화 지역의 토양을 분리원으로 하여 멸균 생리식염수에 10⁻²까지 현탁, 희석하고, 이를 LB 한천배지에 0.1 ml씩 도말봉으로 접종하여, 30°C에서 1일간 배양시켰다. 이 colony들을 K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, sodium citrate 0.05%, MgSO₄ · 7H₂O 0.01%, peptone 0.1%, colloidal chitin 1%(pH 7.0)의 조성으로 이루어진 chitin 함유 한천배지에 점적(toothpick replica)하여 chitin 분해환을 형성하는 균주를 선발하였으며, 또한 *Fusarium solani*와 *Fusarium oxysporum*을 대상으로 선발균과의 대치배양(pairing culture)을 실시하여 균사를 용해하는 길항현상을 확인하였다.

계대배지 및 배양

본 실험에 사용된 균주 *Serratia* sp. 3095의 계대는 King'B 한천배지를 사용하여 30°C에서 2일간 배양한 후 4°C에서 보관하였고, 장기 보관을 위해 King'B broth에 1일간 키운 후 15%가 되도록 멸균한 glycerol을 첨가하여 -70°C에서 동결 보관하였다.

*F. solani*와 *F. oxysporum*의 계대는 potato dextrose agar (PDA) 배지를 사용하여 28°C에서 일주일간 배양 후 실온(24°C)에 보관하면서 사용하였다.

길항미생물의 동정

Chitinase 생산성 길항미생물의 동정을 위해 API® test (bioMerieux)와 Biolog사의 동정시스템(MicroLog™ 3), 그리고

찾는말 : 길항미생물, *Serratia* sp., antifungal, chitinase
*연락처

각종 생화학적 성장검사를 사용하였고, 전자현미경(transmission electron microscope)으로 그 형태를 관찰하였다. 이를 바탕으로 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology²⁷의 색인을 이용하여 최종 동정하였다.

Chitinase 생산과 조효소액 제조

Chitinase 생산은 chitin-minimal 배지(CM) 즉, peptone 0.1%, K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, sodium citrate 0.05%, MgSO₄ · 7H₂O 0.01%, colloidal chitin 0.15%에서 3일간 배양하여 chitinase를 생산하였고, 이를 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 그 원침상등액을 회수하였다. 이 원침상등액을 Amicon Centriprep[®] 10으로 잔류당 및 분자량 10,000이하 저분자물질을 제거하여 조효소액을 만들었다.

Chitinase 활성 측정

Chitinase 활성 측정은 pH 7.5의 0.07 M Na₂HPO₄-KH₂PO₄ buffer(phosphate buffer)에 colloidal chitin을 0.5%로 현탁시킨 기질용액 0.5 ml에 phosphate buffer(pH 7.5) 1 ml을 넣은 후 효소액 0.2 ml를 첨가하여 45°C에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후 DNS²⁸법으로 환원당량을 측정하였다. 효소활성 1 U는 시간당 colloidal chitin으로부터 1 μM의 N-acetylglucosamine을 생성시키는 효소량으로 환산하였다.

방제기작 확인

선발된 길항균주의 길항기작이 chitinase와 같은 고분자 물질인지 또는 항생물질과 같은 저분자물질에 기인하는지를 확인하기 위하여 선발된 길항균을 CM배지에 접종하여 30°C에서 3일간 진탕배양하고 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 회수하였으며 상등액을 Amicon Centriprep[®] 10으로 분자량 10,000이하 저분자물질과 고분자물질로 나누어 각각을 45 ml PDB에 5 ml씩 첨가한 후 *F. oxysporum*를 접종하여 2일간 배양하여 세포건조중량법(dry cell mass)에 의해 억제력을 확인하였다. 또한 열에 민감한 효소단백과 같은 물질인지를 확인하기 위하여 배양상등액을 80°C에서 30분간 중탕한 후 그 잔존 길항력을 확인하였다. 각 실험에 항진균 활성을 가지는 항생물질 생산균주를 대조구로 하였다.

In vitro 실험

Chitinase 생산 길항미생물 *Serratia* sp. 3095의 생물방제력을 전자현미경으로 관찰하기 위하여 potato dextrose broth (PDB) 50%에 King's B broth 50%를 혼합하여 pH 6.0으로 조정된 배지에 *F. oxysporum*를 접종하여 30°C에서 24시간 진탕 배양한 후 *Serratia* sp. 3095를 추가 접종하였으며, 이를 30°C에서 48시간 동안 진탕배양하여(dual culture) *F. oxysporum*의 균사 변형 현상을 전자현미경을 통해 확인하였다.

In vivo pot 실험

Chitinase 생산성 길항미생물이 실제 토양에서 식물병원균에 방제력을 발휘하는지 여부를 검증하기 위하여 가지를 대상 기주식물로 실시하였으며, 상토로 발효 : 퇴비 : 모래를 2 : 1 : 1로

섞은 것을 사용하였다. 28°C, 70% 습도를 유지한 항온항습실에서 기주식물 가지가 이식되어 있는 pot에, 미리 PDB에서 배양한 *F. oxysporum*의 포자를 회수하여 관주 접종한 후, 1일간 습실(28°C)처리하고 여기에 선발된 방제균 *Serratia* sp. 3095를 처리하여 하루동안 더 습실배양 하였다. 이를 28°C, 70% 항온항습실에서 키우면서 주기적으로 발병을 확인하였으며, 이때 대조구로 방제균 무처리구와 비교하여 시드름병의 발병억제력을 확인하였다.

결과 및 고찰

생물방제균의 분리

경주 아화지역의 토양으로부터 130종의 세균을 분리할 수 있었고, 이 균주들을 chitin 함유 한천배지에 점적하여 투명환을 크게 형성하는 세균들을 분리한 후, 이들을 대상으로 PDA plate에서 대치법에 의해 항생물질을 생성하여 억제거리를 보이는 것과는 다른 길항현상을 보이는 즉, 근접한 식물근부균 *F. solani*와 시드름병균 *F. oxysporum*의 균사체를 강력히 용해하는 1 균주의 길항세균을 최종 선발하였다(Fig. 1, Fig. 2).

길항미생물의 형태 및 동정

Chitinase 생산성 길항미생물로 분리, 선발된 길항미생물의



Fig. 1. Clear zone formation by the chitinase produced from *Serratia* sp. 3095 in chitin-minimal agar. A: *Serratia* sp. 3095. Cultivation was carried out in the CM for 3 days at 30°C.

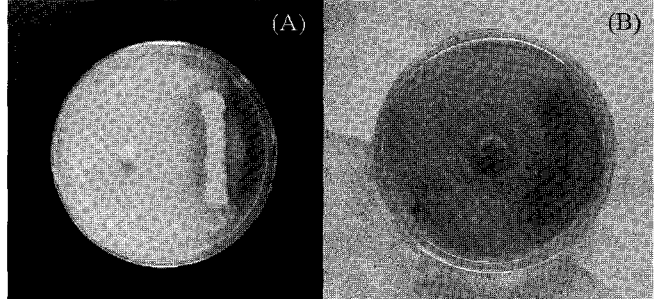


Fig. 2. Growth inhibition of *Fusarium* sp. by *Serratia* sp. 3095 in PDA by pairing culture. (A) *Fusarium oxysporum* + *Serratia* sp. 3095, (B) *Fusarium solani* + *Serratia* sp. 3095.

동정을 위해 그림염색을 실시한 결과 그람음성의 단간균으로 판별되었으며, 그 미세형태를 확인하기 위해 전자현미경으로 관찰한 결과 편모를 가지는 단간균으로 판명되었다. 또한 생화학적 성장시험과 API® test 그리고 Biolog사의 동정시스템을 이용한 결과 *Serratia proteamaculans*에 62.2% 근연성을 보임으로 최종적으로 *S. proteamaculans* biotype Clc 내지는 그 근연종으로 동정하였다(Table 1, Fig. 3).

Chitinase의 생산조건 조사

(1) Colloidal chitin 농도

Chitinase 생산에 첨가된 colloidal chitin의 농도가 미치는 영향을 알아보기 위해 0.3%까지 colloidal chitin의 농도를 변화시켜 CM 배지에 첨가하여 본 결과 Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 서서히 생산량이 증가하다가 0.15%이상에서는 활성의 증가를 볼 수가 없었다. 이 결과는 *Aeromonas salmonicida*¹⁵⁾와 *Streptomyces lydicus*⁹⁾의 경우 각각 1.2%와 2%가 최적 농도라는 보고와는 상당한 차이로 본 균주는 저농도의 colloidal chitin 농도에서 상당히 높은 생산촉진을 받는 균주로 생각된다.

(2) 배양시간

Chitinase 생산에 배양시간이 미치는 영향을 알아보기 위해

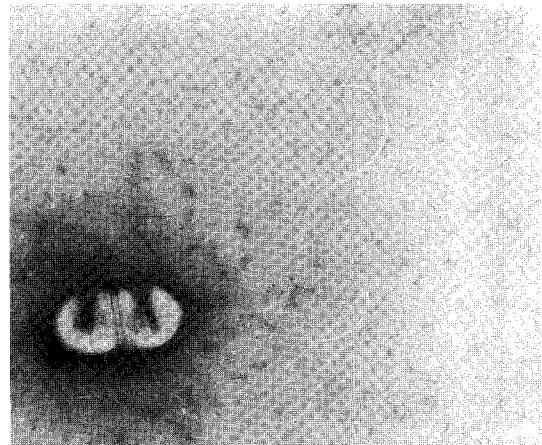


Fig. 3. Morphological observation of *Serratia* sp. 3095 by transmission electron microscopy.

여 CM 배지에서 배양 일자별로 chitinase 생산성을 검토한 결과 3일간 배양한 경우 그 생산력이 둔화됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이는 *A. salmonicida*¹⁵⁾와 *S. lydicus*⁹⁾의 경우 각각 2일과 6일과는 다소 차이가 있으나 *Serratia marcescens*¹¹⁾와 *Bacillus circulans*¹⁶⁾의 3일과는 유사한 결과이었다.

Table 1. Identification of the *Serratia* sp. 3095 isolated as an antagonistic bacterium against *Fusarium* sp.

Test	Microorganism	Strain 3095	<i>S. proteamaculans</i>		<i>S. marcescens</i>
			biotype Clc	biotype RB	
Gramstain		-	-	-	-
Motility		+	+	+	+
Flagella		+	+	+	+
Oxidase		-	-	-	-
Indole production		-	-	-	-
Methyl red test		+	d	d	[-]
Voges-Proskauer test		+	+	+	+
Hydrogen sulfide production		-	-	-	-
Ureahydrolysis		-	-	-	[-]
Carbohydrate degradation					
Glucose		+	+	+	+
Maltose		+	+	+	+
Lactose		d	-	-	-
Sucrose		+	+	+	+
Acid production from D-glucose		+	+	+	+
Nitrate reduction		+	+	+	+
Citrate utilization		+	+	+	+
Gelatin hydrolysis		+	+	+	+
L-Arabinose utilization		+	+	+	-
D-Mannitol utilization		+	+	+	+
D-Mannose utilization		+	+	+	+
L-Rhamnose utilization		+	d	d	-
D-Sorbitol utilization		+	[+]	[+]	+
Adonitol utilization		-	-	-	d
Arginine hydrolysis		-	-	-	-
Esculin (β-glucosidase)		+	+	+	+
Malate utilization		+	d	d	ND
L-Rhamnose utilization		-	-	+	ND
Identification			<i>S. proteamaculans</i> biotype Clc		

Symbol : +, 90% or more positive ; -, 10% or less positive ; d, 11~89% positive ; [+], positive in 3~7 days ; ND, no data available.

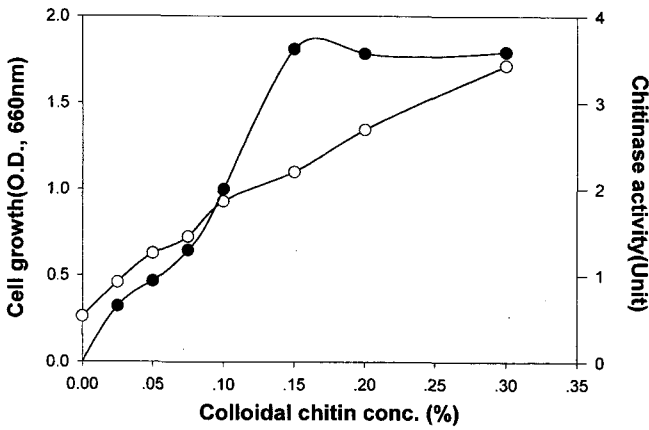


Fig. 4. Effect of colloidal chitin concentration on the production of chitinase from *Serratia* sp. 3095. ● - ● : Chitinase activity, ○ - ○ : Cell growth.

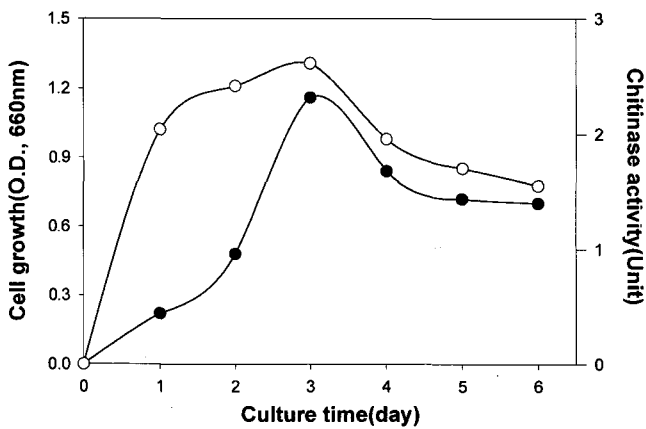


Fig. 5. Effect of culture time on the production of chitinase from *Serratia* sp. 3095. ● - ● : Chitinase activity, ○ - ○ : Cell growth.

(3) 탄소원별 chitinase의 생산특성

Chitinase 생산에 탄소원이 미치는 영향을 알아보기 위해 CM 배지에서 sodium citrate를 제거하고, 각종 탄소원을 각각 0.1%가 되도록 첨가한 후, 30°C에서 3일간 진탕 배양하고, 10,000 ×g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 회수하였으며, 이를 조효소액으로 만들어 chitinase활성을 측정하여 본 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 colloidal chitin의 경우를 제외하고는 거의 chitinase를 생산하지 못하였다. 이 결과로 *Serratia* sp. 3095가 생산하는 chitinase가 colloidal chitin에 의해 유도되는 유도 효소임을 알 수 있었다. 또한 K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, peptone 0.1%, colloidal chitin 0.15%에 각각 0.1%가 되도록 glucose, sodium citrate를 첨가한 후 30°C에서 3일간 진탕 배양하고 동일한 방법으로 chitinase활성을 측정하여 본 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 glucose의 경우 chitinase 생산성이 약 30%정도 감소하였으며, sodium citrate의 경우 오히려 10%정도 상승하여 glucose와 같은 단당이 우선적으로 이용되어 chitinase의 생산을 감소시킴을 알 수 있었다. 이 결과는 *S. lydicus*⁹⁾의 경우 그 생산이 증가하는 현상과는 상이한 결과이지만, *A. salmonicida*¹⁵⁾와 *Aspergillus fumigatus*²¹⁾의 경우 chitinase 생산 배지에 glucose

Table 2. Effect of carbon sources on the production of chitinase from *Serratia* sp. 3095

Carbon sources	Relative activity(%)
Sodium citrate*	0.8
Glucose*	0.2
N-acetylglucosamine*	1.1
Chitin*	0.5
Chitosan*	0.0
Lactose*	3.5
Colloidal chitin*	100.0
Sodium citrate**	108.9
Glucose**	71.3
None**	100.0

*Carbon source(0.1%) was added to the basal medium [K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01% and peptone 0.1%], and then *Serratia* sp. 3095 was cultivated for 3 days at 30°C.

**Glucose(0.1%) or sodium citrate(0.1%) was added to the medium [K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, peptone 0.1% and colloidal chitin 0.15%], and then *Serratia* sp. 3095 was cultivated for 3 days at 30°C.

를 첨가하였을 경우 그 생산이 감소한다는 보고와 같이 *Serratia* sp. 3095가 생산하는 길항성 chitinase가 glucose와 같은 단당에 의해 feed back repression을 받는 것으로 추정된다.

(4) 질소원별 chitinase의 생산특성

Chitinase 생산에 질소원이 미치는 영향을 알아보기 위해 CM 배지에 (NH₄)₂SO₄를 제거하고, 각종 질소원을 각각 0.1%가 되도록 첨가한 후 30°C에서 3일간 진탕 배양하고, 10,000 ×g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 회수하였으며, 이를 조효소액으로 만들어 chitinase 활성을 측정하여 본 결과 Table 3에서 보는바와 같이 (NH₄)₂SO₄, (NH₄)Cl, peptone 등은 무첨가구 보다 chitinase의 생산이 증가되었으나 그의 질소원은 오히려 감소하였다. 이 결과는 *A. fumigatus*²¹⁾의 경우 tryptone과 yeast extract를 첨가하였을 경우 chitinase 생산이 감소하였다는 보고와 일치하나, *A. salmonicida*¹⁵⁾와 *S. lydicus*⁹⁾의 경우 그 생산이 증가한다는 보고와는 상이한 결과이었다.

(5) Chitinase 생산을 위한 탄소원과 질소원의 최적농도

K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, sodium citrate 0.05%, colloidal chitin 0.15%에 (NH₄)₂SO₄와 peptone을 각각 0%에서 0.3%가 되도록 첨가한 후 30°C에서 3일간 진탕 배양하여 균체 증식과 chitinase 생산성을 비교 검토한 결

Table 3. Effect of nitrogen sources on the production of the chitinase from *Serratia* sp. 3095

Nitrogen sources	Relative activity(%)
(NH ₄) ₂ SO ₄ *	133.7
Peptone	112.1
Yeast extract	4.6
(NH ₄)Cl	128.7
Tryptone	9.5
None	100.0

*Nitrogen source(0.1%) was added to the medium [K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, sodium citrate 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01% and colloidal chitin 0.15%], and then *Serratia* sp. 3095 was cultivated for 3 days at 30°C.

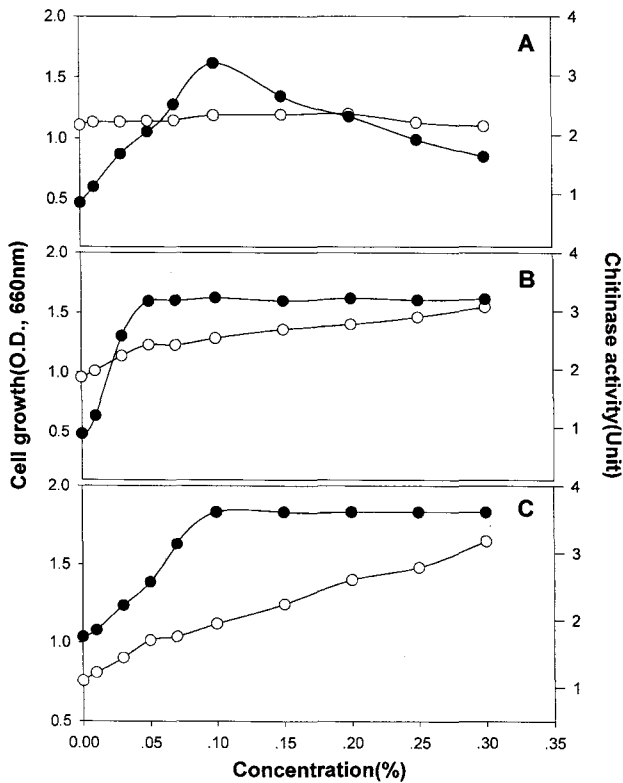


Fig. 6. Effects of the concentration of ammonium sulfate(A), sodium citrate(B), and peptone(C) on the production of chitinase from *Serratia* sp. 3095. ● - ● : Chitinase activity, ○ - ○ : Cell growth.

과 Fig. 6과 같이 $(NH_4)_2SO_4$ 와 peptone 모두 0.1%에서 가장 많은 chitinase 생산력을 볼 수 있었다. 반면 균체 증식력은 $(NH_4)_2SO_4$ 의 경우 큰 차이가 없었으나 peptone의 경우 농도가 증가할수록 서서히 증가하는 경향을 볼 수 있었다.

Sodium citrate의 농도 변화에 따른 chitinase 생산성을 비교 검토하기 위해 K_2HPO_4 0.7%, KH_2PO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, peptone 0.1%, colloidal chitin 0.15%에 sodium citrate를 0%에서 0.3%가 되도록 첨가한 후 30°C에서 3일간 진탕 배양하여 균체 증식과 chitinase 생산성을 비교 검토한 결과 Fig. 6B에서와 같이 0.05%에서 chitinase 생성력의 증가가 일정하게 되었으며, 균체의 증식도는 큰 차이가 없었다.

방제기작 확인

선발된 길항균주의 길항기작이 chitinase와 같이 고분자 물질인지 또는 항생물질과 같은 저분자물질에 기인하는지를 확인하여 본 결과 Table 4와 같이 저분자의 항생물질이 아닌 분자량 10,000 이상의 고분자물질에 의한 길항작용임을 확인하였다. 따라서 이는 chitinase와 같은 고분자물질이면서 열에 민감한 효소단백성 물질임을 알 수가 있었다.

In vitro 길항력 검증실험

Chitinase 생산성 길항미생물 *Serratia* sp. 3095가 *F. oxysporum*의 세포벽을 chitinase의 효소작용으로 파괴하여 생

Table 4. Characteristics of the antifungal agent of *Serratia* sp. 3095 for *Fusarium oxysporum* inhibition

Strain	Inhibition by high M.W.(>10K) fraction	Inhibition by low M.W.(<10K) fraction	Heated residual activity of high M.W. fraction
<i>Pseudomonas</i> sp. 2112*	13.2%	41.5%	36.5%
<i>Serratia</i> sp. 3095	35.2%	5.3%	1.2%

*Antifungal strain *Serratia* sp. 3095 and *Pseudomonas* sp. 2112(antibiotic producing control strain) were cultivated in the CM and King'B broth for 3 days at 30°C, respectively. After centrifugation at 10,000×g for 20 min, the supernatant was used for antifungal assay.

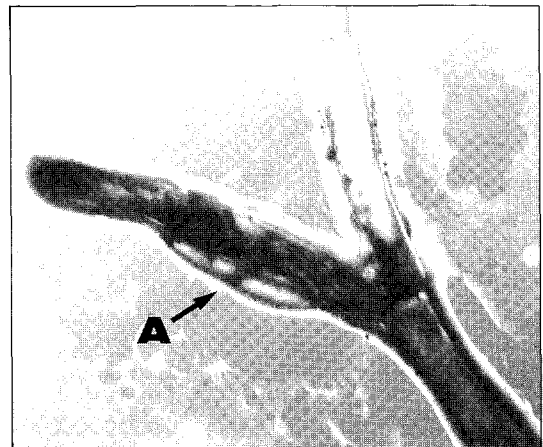


Fig. 7. Swelling of *Fusarium oxysporum* hyphae surface by the culture extract of *Serratia* sp. 3095 on the dual culture. A: Swollen hyphae. Cultivation was carried out at 30°C for 48 hours in 1.2% potato dextrose broth, 1% proteose peptone No. 3, 0.075% K_2HPO_4 , 0.075% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.75% glycerol(pH 6.0).

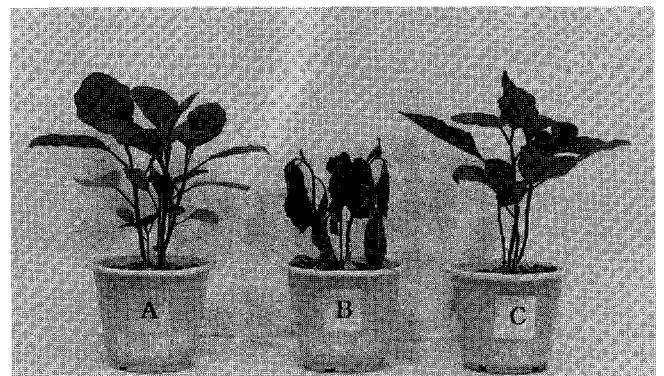


Fig. 8. In vivo antifungal activity of *Serratia* sp. 3095 on egg plant (*Solanum melongena*). (A) Control, (B) *Fusarium oxysporum* infected, (C) *Fusarium oxysporum*+*Serratia* sp. 3095.

물방제력을 가지는가를 확인하기 위하여 dual culture를 실시 하였으며, 이를 전자현미경으로 관찰하여 본 결과 Fig. 7에서 볼 수 있는 바와 같이 *F. oxysporum*의 성장하는 균사의 세포벽이 *Serratia* sp. 3095의 chitinase의 작용으로 변형, 팽창한 모습을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 항생물질을 생산하지 못하는 본 균주의 특성을 감안할 때 chitinase와 같은 균사분해

성 가수분해효소에 기인함을 추정할 수 있다.

In vivo pot실험

Chitinase 생산 길항미생물 *Serratia* sp. 3095가 토양에서 시드름병균인 *F. oxysporum*에 대해 그 생물방제력을 발휘하는지를 확인하기 위해 미리 발아시킨 가지를 대상으로 시드름병의 발병력을 검증하였으며, 그 결과 Fig. 8에서 볼 수 있는 것과 같이 질병 방제력을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 농림부 농림특정연구과제의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- The Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries. (1991) Production, sales and import of agrochemical. Annual Statistic Report of Agriculture, Forestry, and Fisheries, 68-71.
- Korean Association of Agrochemical Industry. (1993) Reduction by pest and pathogen in non-agrochemical cultivation. *Agrochemicals Information* **14**, 13-15.
- Kim, H. J., Park, G. J., Lee, S. G., Jeong, Y. L. and Lee, J. H. (1984) Biological control of ginseng root-rot. Korea Ginseng Research Institute.
- Jun, Y. J., Lee, E. H. and Kim, S. K. (1996) Physiological function of chitin(1). *Kor. J. Chitin Chitosan* **1**(1), 4-13.
- Kim, S. K. (1996) Analysis and synthesis of chitin and chitosan derivatives. *Kor. J. Chitin Chitosan* **1**(1), 20-47.
- Lee, H. S., Lee, H. J., Choi, S. W., Her, S. and Oh, D. H. (1997) Purification and characterization of antifungal chitinase from *Pseudomonas* sp. YHS-A2. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**(2), 107-113.
- Tsujiho, H., Minoura, K., Miyamoto, K., Endo, H., Moriwaki, M. and Inamori, Y. (1993) Purification and properties of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(2), 620-622.
- Okazaki, K., Kato, F., Watanabe, N., Yasuda, S., Masui, Y. and Hayakawa, S. (1995) Purification and properties of two chitinases from *Streptomyces* sp. J-13-3. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**(8), 1586-1587.
- Lee, S. M. (1993) Identification and cultural characterization of *Streptomyces lydicus* G-23 for producing chitinase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 6-12.
- Tom, R. A. and Carroad, P. A. (1981) Effect of reaction conditions on hydrolysis of chitin by *Serratia marcescens* QMB 1466 chitinase. *J. Food Science* **46**, 646-647.
- Reid, J. D. and Ogrydziak, D. M. (1981) Chitinase overproducing mutant of *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**(3), 664-669.
- Monreal, J. and Reese, E. T. (1969) The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* **15**, 689-696.
- Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, I. (1988) The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopath.* **78**, 84-88.
- Lim, H. S. and Kim, S. D. (1994) The production and enzymatic properties of extracellular chitinase from *Pseudomonas stutzeri* YPL-1, as a biocontrol agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**(2), 134-140.
- Lee, K. P., Kim, C. N., Yu, J. H. and Oh, D. H. (1990) The production and purification of chitinase from *Aeromonas salmonicida* YA7-625. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**(6), 599-606.
- Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K. and Tanaka, H. (1990) Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* **172**(7), 4017-4022.
- Woo, C. J., Yun, U. J. and Park, H. D. (1996) Isolation of chitin-utilizing bacterium and production of its extracellular chitinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**(6), 439-444.
- Shin, W. C., Lee, D. S., Kim, T. H., Woo, J. H., Lee, J. M., Kim, J. G. and Hong, S. D. (1995) Isolation and characterization of *Acinetobacter* sp. WC-17 producing chitinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**(2), 80-86.
- Wortman, A. T., Somerville, C. C. and Cotwell, R. R. (1986) Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus*: gene cloning and application of a chitinase probe. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**(1), 142-145.
- Ulhoa, C. J. and Deberdy, F. (1992) Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 236-240.
- Jeong, E. J. and Lee, Y. H. (1995) Isolation of microorganism producing chitinase for chitooligosaccharides producing, purification of chitinase, and its enzymatic characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**(2), 187-196.
- Rast, D. M., Horsch, M., Futer, R. and Gooday, G. W. (1991) A complex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*; properties and function. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2797-2810.
- Vyas, P. and Deshpande, M. (1991) Enzymatic hydrolysis of chitin by *Myrothecium verrucaria* chitinase complex and its utilization to produce SCP. *J. Gen. Microbiol.* **37**, 267-275.
- Dickson, K., Keer, V. C., Hitchcock, A. and Adams, D. J. (1991) Microsomal chitinase activity from *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1073**, 177-182.
- Elango, N., Correa, J. U. and Cabib, E. (1982) Seretary character of yeast chitinase. *J. Biol. Chem.* **257**(3), 1398-1400.
- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U. and Boker, T. (1986) Plant chitinase are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **324**(27), 367-367.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th., *Williams & Wilkins*, U.S.A.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.

Isolation and Antifungal Activity of the Chitinase Producing Bacterium *Serratia* sp. 3095 as Antagonistic Bacterium against *Fusarium* sp.

Eun-Tag Lee and Sang-Dal Kim*(*Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan, 712-749, Korea*)

Abstract : For the selection of an effective antagonistic biocontrol agent, we have isolated an antagonistic bacterium which produced extracellular chitinase, from a local soil of Kyongju, Korea. The selected strain was identified as *Serratia proteamaculans* 3095. The chitinase produced from *Serratia* sp. 3095 showed antifungal activity which can attack the hypha surface of *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. The carbon and nitrogen sources for chitinase production were 0.15% colloidal chitin and 0.1% ammonium sulfate, respectively. Glucose in the chitinase production medium might inhibit the production of chitinase by feed back repression. The antagonistic *Serratia* sp. 3095 also showed a powerful biocontrol activity against *F. oxysporum* through *in vitro* test and *in vivo* pot test.

Key words : antagonistic bacterium, *Serratia* sp., antifungal, chitinase

*Corresponding author