

## 항곰팡이성 항생물질을 생산하는 균주의 분리 및 동정

신영준 · 정명주 · 박정욱\* · 주우홍\* · 정영기†

동의대학교 미생물학과

\*창원대학교 생물학과

### Isolation and Identification of a Bacterium Producing Antifungal Antibiotic

Young-Joon Shin, Myung-Ju Jung, Jeong-Uck Park\*, Woo-Hong Joo\* and Yong-Kee Jeong†

Dept. of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea

\*Dept. of Biology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

#### Abstract

A bacterium prohibiting the growth of fungus *Botrytis cineria* KT 433 was isolated and identified from soil. The isolated strain was gram positive, aerobic bacteria with cream color, round and mucoid. It showed rod form of  $0.45 \times 1.1 \mu\text{m}$  at the cultivated for 24 hrs and the ellipsoidal endospore were observed after culturing for 72 hrs. The optimum growth temperature and pH were  $35^\circ\text{C}$  and pH 5.0~8.0, respectively. It could assimilate dextrin, maltose, glucose, mannose, ribose and cellobiose as a sole carbon source. The isolated was confirmed to be a *Bacillus* sp. strain from the findings. The antibiotic from the isolated strain was stable up to  $121^\circ\text{C}$ . The strain, especially, showed specific activity for mold and yeast. However, there was not significant antibacterial activity.

**Key words:** antifungal agent, antibiotic, *Botrytis cineria*, thermostable antibiotic

#### 서 론

농업의 발전을 위해 화학비료 및 화학합성 농약을 사용하면서 소득증대에 크나큰 역할을 하였음에도 불구하고 심각한 환경문제를 야기시켰다. 화학합성 농약을 사용한 농산물의 기피와 농산물 시장 개방에 따른 경쟁력 증가를 위해 무공해 생물학적 방제법의 필요성이 대두되면서 미생물에 의한 식물병원균의 발병억제 방법이 연구되고 있다. 항진균성 항생물질은 병원성 진균의 생육을 저지하여 진균성 질병을 치료하기 위한 의약품으로 개발되기도 하고, 식물병원균을 방제하기 위한 농약용 항생물질로도 많이 개발되고 있다. 또한 최근에는 식품의 곰팡이에 의한 부패를 막기 위하여 무독 내열성 항곰팡이 항생물질의 개발에도 주목하고 있다. 실제 항곰팡이성 항생물질의 개발은 심각한 환경오염을 막기 위한 대체농약 개발의 필요성 때문에 농업에 응용하기 위한 목적으로 가장 먼저 연구가 행해졌다(1-5). 1958년 Watanabe 등이 *Streptomyces*의 대사산물에서 버도열병에 선택적 효과가 있는 blasticidin을 분리하였으며(6,7), 1964년 Umezawa 등은 *Streptomyces kasugaensis*의 대사산물 중 항진균성 항생물질인 kasugamycin을 분리하여 실용화하였다(8). 그 외 polyoxin, validamycin, leptomycin,

phosmidosine 등의 항진균성 항생물질이 있으나(9-14), 완전히 실용화되기까지는 독성 등 여러 문제점을 가지고 있으며, 이들 대부분이 방선균 및 곰팡이를 생산 균주로 하는 대사산물이다. 세균에 의해 분비되는 항진균성 항생물질로는 *Bacillus subtilis*가 생산하는 iturin(15,16), bacillomycin(17,18), mycosubtilin(19,20) 등이 있으며, *Pseudomonas*가 생산하는 pyrrolinitrin(21,22)과 pyoluteorin(23) 등이 있을 뿐이며 그 실용화의 노력도 아주 미약하다. 본 연구에서는 여러 가지 피해의 원인이 되는 곰팡이의 제거나 곰팡이 감염질환의 치료제로 사용할 수 있는 항진균성 항생물질을 토양으로부터 분리하여 동정하였기에 보고하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 항진균성 물질 생산 균주의 분리 및 선별

토양을 채취하여 LB 고체 평판배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar)에서 균을 분리한 후, 2.4% potato dextrose agar(PDA)에 자란 버도열병균인 *Botrytis cineria* KT 433을 검정균으로 항진균성 물질을 분리하는 균단을 순수분리해 1차 screening하였다.

† To whom all correspondence should be addressed

1차 screening에 의해 분리된 균들을 LB broth에서 액체 배양하여 *B. cineria* 포자 현탁액을 도달한 PDA 평판배지에서 생육억제 활성을 나타내는 균주만을 순수 분리함으로써 2차 screening하였다. 이 중에서 항균력이 가장 크고 열에 대한 안정성이 높았던 균주를 선택하여 항진균성 물질 생산 균주로 하였다.

#### 항진균성 물질의 생산

항진균성 물질 생산을 위한 배지로는 LB 액체 배지를 사용하였으며, 35°C에서 1일간 전배양한 후 본배양액에 1%(v/v)접종하여 35°C에서 1일간 160 rpm으로 진탕 배양한 다음, 원심분리한 상등액을 실험에 사용하였다.

#### 검정균의 포자 현탁액 조제

검정균(*B. cineria* KT 433)을 20°C에서 10일간 배양하여 포자가 흑색으로 착색되던 한 plate당 10 mL의 생리식염수를 가해 포자를 현탁시킨 후, 그 현탁액을 eppendorf tube에 1 mL씩 분주하여 4°C에서 보관하면서, 사용시 200 µL를 PDA 평판배지에 도달한 후 활성측정에 이용하였다.

#### 항진균 활성의 측정

항진균 활성을 측정하기 위해 agar hole법을 사용하였다(24) 즉, 투명대 형성 방법의 일환으로 *B. cineria* KT 433 포자현탁액을 도달한 PDA 평판배지상에 원형의 agar hole을 만든 후 활성물질 100 µL를 투여하고 *B. cineria* KT 433의 최적 온도인 20°C에서 3~4일간 배양시킨 후 길항균의 가장자리와 곰팡이 균사사이의 거리를 측정하여 그 생육 억제환의 지름을 비교하였다.

#### 온도 안정성

배양상등액을 100°C에서 30분, 100°C에서 60분 및 121°C에서 15분간 열처리한 후 agar hole법에 의한 항곰팡이 활성을 측정하여 분리한 항생물질의 열안정성을 검토하였다

#### 항균활성

항균활성은 세균, 효모, 곰팡이를 대상으로 *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10798, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522, *Saccharomyces cerevisiae* SEY 2102, *Fusarium solani* BT 510 및 *Botrytis cineria* KT 433 등 총 7종을 사용하였다. 사용 배지는 세균은 LB 배지, 유산균은 MRS 배지, 효모는 YPD 배지 그리고 곰팡이는 PDA 배지를 사용하였고, 항균활성의 검정은 agar hole법으로 측정하였다. 각각의 배지에 상기의 미생물 배양액 100 mL를 도달하고 평판의 중앙에 hole을 만들어 실험균주의 배양액을 hole에 넣어 확산시켜 세균은 37°C에서 18시간, 효모는 30°C에서 24시간, 곰팡이는 25°C에서 3일간 배양하여 hole 주위의 투명대의 크기(mm)로 항균범위를 검토하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 항곰팡이성 항생물질 생산균주의 분리

항곰팡이성 항생물질을 생산하기 위해서 Fig 1과 같이 *B. cineria* KT 433을 검정균으로 사용하여 균체와 배양여액이 검정균의 생육을 저해하는 활성을 갖는 균주를 항곰팡이성 항생물질 생산 균주로 선택하였다.

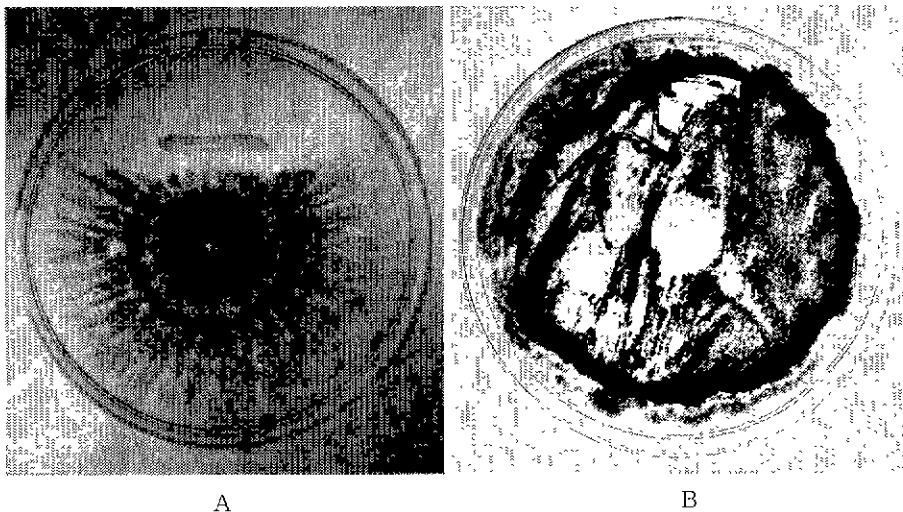


Fig. 1. Antifungal activity by the isolated strain (A) and the culture broth (B).

### 항곰팡이성 항생물질 생산균주의 동정

토양으로부터 분리한 항곰팡이성 항생물질 생산균주의 동정을 위해 형태학적, 배양학적, 생화학적 특징을 조사하였다. 형태적 특징으로 LB평판에서 분리 균주의 집락은 크림색의 둥근 점질성이었으며, gram 염색결과 양성으로 나타났다. 내생포자의 존재를 알아보기 위하여 24시간과 72시간 배양한 균주를 전자현미경상에서 관찰한 결과, Fig. 2에 나타난 바와 같이 24시간 배양한 영양세포는  $0.45 \times 1.1 \mu\text{m}$  크기의 간균 형태를 나타내었으며 72시간 배양한 세포는 타원형의 내생포자를 세포중앙에 가지고 있음을 알 수 있었다(Table 1). 분리 균주의 배양학적, 생화학적 특징을 확인한 결과 최적 성장온도는  $35^\circ\text{C}$ 였으며,  $50^\circ\text{C}$ 와  $10^\circ\text{C}$ 에서는 생육하지 않았고, pH는 5.0에서 8.0까지 높은 생육을 보였으며, 생육을 위해 많은 산소를 요구하는 호기성균이었다. 당, 유기산 및 아미노산

이용능 분석결과 dextrin, maltose, glucose, mannose, ribose, cellobiose 등은 이용하였으나, glycogen, inulin, mannan, rhamnose, xylitol를 비롯한 대부분의 유기산과 아미노산은 이용하지 못하였다(Table 2).

이상과 같은 결과로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 따라서 확인, 동정한 결과 *Bacillus*속으로 확인되었으며, 따라서 본 균주를 *Bacillus* sp. YJ-63으로 명명하였다.

### 온도 안정성

분리한 항생물질의 온도 안정성은 Fig. 3과 같이  $100^\circ\text{C}$ 와  $121^\circ\text{C}$ 에서 열처리하지 않은 시료와 동일한 활성을 보여 높은 온도에서도 안정성을 보여서 식물병원균의 방제에 유리한 항생물질로서 충분한 효과가 있을 것으로 사료된다(25) 뿐만 아니라, 본 항진균 항생물질은 고온에 안정하므로 식품가공시 천연방부제로 이용할 수 있는 가능성이 크다고 사료된다. Date는 생략하지만 본 물질은 배양한 비장세포에 적용해 본 결과 전혀 독성을 보이지 않았으므로 동물에 경구 투여시에도 독성문제는 없을 것으로 사료된다.

### 항균활성

*Bacillus* sp. YJ-63으로부터 생산된 항생물질의 항균활성은 Table 3과 같이 세균에는 전혀 활성을 나타내지 않으나, 효모와 곰팡이에는 활성을 보였다. 특히 식물균

Table 1. Morphological characteristics of the isolated strain

Formation	Characteristics
Colony shape	Round
Colony surface	Dull
Colony color	Cream
Gram stain	Positive
Cell shape	Rod
Width of rod	$0.45 \mu\text{m}$
Length of rod	$1.1 \mu\text{m}$
Endospore shape	Ellipsoidal
Endospore position	Central



Fig. 2. Transmission electron micrographs of antifungal antibiotic producing bacteria cultured for 24 hrs (A) and 72 hrs (B).

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain

Properties	Results
Optimal growth temperature	35°C
Growth at 50°C	no growth
Growth at 10°C	no growth
Optimal growth pH range	pH 5.0~8.0
Aerobic growth	+
Utilization of Dextrin	-
Glycogen	-
Inulin	-
Mannan	-
Twcen 40	+
Tween 80	+
Maltotriose	-
Maltose	-
Sucrose	+
D-Glucose	+
D-Mannose	+
L-Rhamnose	-
D-Ribose	+
D-Fructose	+
Trehalose	+
Cellobiose	-
D-Gluconic acid	-
β-Methyl glucose	-
Xylitol	-
D-Arabitol	-
L-Lactate	-
D-Malate	-
Pyruvate	+
Succinate	-
L-Asparagine	-
L-Glutamate	-
L-Serine	-

Table 3 Antimicrobial spectra of the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63

Microorganisms	Inhibition zone diameter (mm)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10798	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15522	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SEY 2102	12.5
<i>Fusarium oxysorum</i>	14.0
<i>Botrytis cineria</i>	18.0

유통과정 중 부패진균에 진균에 대한 억제 효과로서도 이용 가능성이 있을 것이라 사료된다(26) 이와같이 식물 병원균의 방제를 위해 과도하게 사용되는 화학농약의 심각한 부작용을 감소시키기 위해 길항미생물을 이용하는 생물학적 방제법의 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 종래의 생물 방제 방법은 그 시행의 복잡성과 방제 효과의 미흡 때문에 아직까지 본격적인 실용화 단계에 진입하지 못하고 있는 실정이다(27). 이러한 문제점을 해결하기 위해 식물종자에 생물방제균을 처리하는 방법(28) 외에 이에 대한 연구가 진행되어 실용화할 필요가 있을 것으로 사료된다.

요 약

곰팡이 *Botrytis cineria* KT 433의 생육을 저지하는 항진균성 물질을 분리하는 균을 토양에서 분리하여 생산 균을 동정하였다 분리균주는 그람양성의 호기성균이었으며, 크림색의 둥근 접질성의 코로니 형태를 나타내었다. 24시간 배양 후 0.45×1.1 μm 크기의 간균 형태를 나타내었으며, 72시간 배양한 세포는 타원형의 내생포자가 관찰되었다 생육을 위한 최적온도는 35°C, 생육 pH범위는 5.0~8.0이었으며, dextrin, maltose, glucose, mannose, ribose, cellosiase 등의 당을 이용하였다. 이상의 결과로부터 분리균주는 *Bacillus*속으로 확인되었으며, 따라서 본 균주를 *Bacillus* sp YJ-63으로 명명하였다. 분리균주에서 생산된 항생물질은 100°C와 121°C에서 안정하였으며, 효모와 곰팡이에서 특이적인 항균활성을 나타내었다.

문 헌

- 1 Suzui, T : Biological control of soilborne diseases with antagonistic microbe. Pro 92 Agric. Biotech. Symp. In *New Biopesticides*, p55-76 (1992)
- 2 Davison, J . Plant beneficial bacteria *Biotechnol.*, **6**, 282-286 (1988)
- 3 Cook, R J . Biological control of plant pathogens : Theory to application *Phytopathol.*, **75**, 25-27 (1985)
- 4 Leong, J : Siderophores, their biochemistry and possible role in biocontrol of plant pathogens *Ann. Rev. Phytopathol.*, **24**, 187-209 (1986)

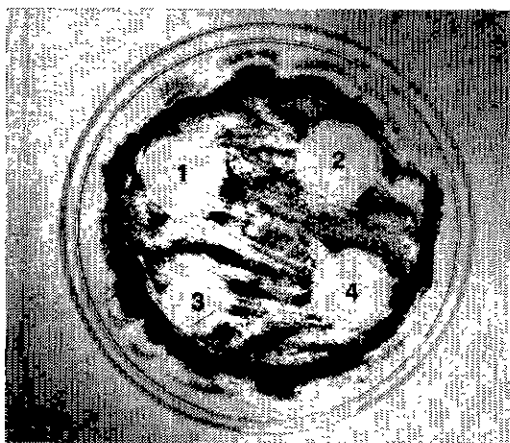


Fig. 3. Temperature stability of the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. 1, no heat; 2, 100°C(30 min). 3, 100°C(60 min); 4, 121°C(15 min)

부병원인 *Fusarium solani* BT 510과 벼도열병균인 *Botrytis cineria* KT 433에 대해서 강한 억제 활성을 나타내었다. 이러한 결과 천연물 농약으로서 뿐만 아니라 식물

5. Cook, R.J and Baker, K.F. : The nature and practice of biological control of plant pathogens. Ann. Phytopath. Soc., St. Paul., p.539 (1983)
6. Larsen S.H., Berry, D.M., Paschal, J.W and Gilliam, J.M. : 5-Hydroxymethyl blasticidin S and blasticidin S from *Streptomyces setonii* culture A 83094. *J. Antibiot.* (Tokyo), **42**, 470-471 (1989)
7. Yonehara, H., Seto, H., Aizawa, S., Hidaka, T. and Shimazu, A. : The detoxin complex, selective antagonists of blasticidin S. *J. Antibiot.* (Tokyo), **21**, 369-370 (1968)
8. Hotta, K. : Mechanism of multiple aminoglycoside resistance of kasugamycin-producing *Streptomyces kasugaensis* MB273. involvement of two types of acetyltransferases in resistance to astromycin group antibiotics. *J. Antibiot.* (Tokyo), **49**, 682-688 (1996)
9. Zhang, D and Miller, M.J. : Polyoxins and nikkomycins' progress in synthetic and biological studies. *Curr Pharm. Des.*, **5**, 73-99 (1999)
10. Emmer, G, Ryder, N.S. and Grassberger, M.A. : Synthesis of new polyoxin derivatives and their activity against chitin synthase from *Candida albicans*. *J. Med. Chem.*, **28**, 278-281 (1985)
11. Miyamoto, Y. and Ogawa, S. : Total synthesis of (+)-validamycin H. *Carbohydr. Res.*, **223**, 299-301 (1992)
12. Asano, N., Kameda, Y., Matsui, K.S., Horii, H and Fukase, H. : Validamycin, a new pseudo-tetrasaccharide antibiotic. *J. Antibiot.* (Tokyo), **43**, 1039-1041 (1990)
13. Kuhnt, M., Bitsch, F., Ponelle, M., Sanglier, J.J., Wang, Y. and Wolff, B. : Microbial conversion products of leptomycin B. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 714-720 (1998)
14. Uramoto, M., Kim, C.J., Shun-Ya, K., Kusakabe, H., Isono, K., Phillips, D.R. and McCloskey, J.A. : Isolation and characterization of phosmidosine. A new antifungal nucleotide antibiotic. *J. Antibiot.* (Tokyo), **44**, 375-381 (1991)
15. Maget-Dana, R. and Peypoux, F. : Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides : biological and physicochemical properties. *Toxicology*, **87**, 151-174 (1994)
16. Besson, F., Hourdou, M.L. and Michel, G. : Studies on the biosynthesis of iturin, an antibiotic of *Bacillus subtilis*, and a lipopeptide containing beta-hydroxy fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1032**, 101-106 (1990)
17. Eshita, S.M., Roberto, N.H., Beale, J.M., Mamiya, B.M. and Workman, R.F. : Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. *J. Antibiot.* (Tokyo), **48**, 1240-1247 (1995)
18. Tenoux, I., Besson, F. and Michel, G. : Studies on the antifungal antibiotics: bacillomycin D and bacillomycin D methylester. *Microbios.*, **67**, 187-193 (1991)
19. Besson, F. and Michel, G. : Mycosubtilins B and C' minor antibiotics from mycosubtilin-producer *Bacillus subtilis*. *Microbios.*, **62**, 93-99 (1990)
20. Peypoux, F., Pommer, M.T., Marion, D., Ptak, M., Das, B.C. and Michel, G. : Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot.* (Tokyo), **39**, 636-641 (1986)
21. Kirner, S., Hammer, P.E., Hill, D.S., Altmann, A., Fischer, I., Weislo, L.J., Lanahan, M., van Pee, K.H. and Ligon, J.M. : Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.*, **180**, 1939-1943 (1998)
22. Corbell, N. and Loper, J.E. : A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.*, **177**, 6230-6236 (1995)
23. Duffy, B.K. and Defago, G. : Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2429-2438 (1999)
24. Harsh, J.H. : Antibiotic assays-principles and precautions. *Methods in Enzymology*, **43**, 55-69 (1975)
25. 本橋精一, 野村健一. 野菜の病害蟲診断. 農山漁村文化協會, p.306-310 (1979)
26. Lee, E.J., Kim, K.S., Hong, S.H. and Ha, J.H. : The mechanism of biological control of *Pseudomonas* spp. against *Fusarium solani* causing plant root-rot disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 91-97 (1995)
27. Weinhold, A.R. and Bowman, T. : Selective inhibition of the potato scab pathogen by antagonistic bacteria and substrate influence on antibiotic production. *Plant soil*, **28**, 12-24 (1968)
28. Howell, C.R. and Stripanovic, R.D. : Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedling with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathol.*, **69**, 480-482 (1979)

(2000년 7월 14일 접수)