

식물병원진균을 길항하는 chitinase 생산성 생물방제균 *Bacillus amyloliquefaciens* 7079의 선발과 chitinase 생산조건

한옥경 · 이은탁 · 김상달*
영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

Chitinase of Multifunctional Antagonistic Bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* 7079 against Phytopathogenic fungi. Han, Ok-Kyung, Eun-Tag Lee, and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, College of Natural Resources, Yeungnam University, Kyongsan, 712-749, Korea – An indigenous antagonistic bacterium *Bacillus* sp. 7079 was isolated from a local soil sampled at Kyongju area in Korea. The strain has strong antagonistic ability which was originated from multifunctional mechanisms of chitinase and antibiotic, and is a powerful antagonistic biocontrol agent against red-pepper rotting fungus *Phytophthora capsici* and wilt fungus *Fusarium oxysporum*. The chitinase might degrade the cell wall of *Fusarium* species. The selected *Bacillus* sp. 7079 was identified as a *Bacillus amyloliquefaciens* 7079. The maximal production of the chitinase from *B. amyloliquefaciens* 7079 were obtained in chitin-yeast extract medium containing 0.7% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, 0.05% sodium citrate, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% yeast extract and 0.1% colloidal chitin after cultivation for 3 days at pH 7.0 and 30°C. The best carbon and nitrogen sources for the production of the chitinase from *B. amyloliquefaciens* 7079 were determined to be 0.1% colloidal chitin and 0.15% proteose peptone NO. 3, respectively. The antagonistic activity of *B. amyloliquefaciens* 7079 was confirmed using *P. capsici* by *in vivo* pot test with red-pepper plant (*Capsicum annum* L.).

Key words: Antagonistic bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens*, antifungal chitinase

최근 전세계적으로 연구가 활발히 이루어지고 있는 생물농약은 미생물을 이용한 것이 그 축을 이루면서 매년 크게 발전을 거듭하고 있다. 그러나 생물농약은 현지의 기후 풍토나 토양환경 조건에 지배를 받을 수밖에 없는 생물체로써 해당 지역 환경에 따른 활성의 차이가 크다고 할 수 있다. 따라서 우리나라 기후나 토양환경에 맞는 생물농약 개발의 필요성이 자연스럽게 대두되고 있다. 생물농약 즉, 식물근부병균 등 여러 가지 식물병원성 진균에 대한 길항균주를 이용한 생태학적 생물방제방법에는 진균 외막가수분해효소를 이용한 식물병원균의 세포벽을 분해시키는 용균작용, 항진균성 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해시키는 항생작용(antibiosis), 그리고 대부분 근권 *Pseudomonas* sp가 분비하는 철(Fe^{3+}) 성분 특이 결합물질인 siderophore에 의해 식물병원균의 생육을 저해하는 경쟁적 길항작용(competitive antagonism)을 이용한 방제방법이 있다[16]. 이중 식물병원균의 세포벽을 분해시키는 용균작용은 chitinase 중심으로 연구가 활발히 진행 중에 있으며, 이러한 chitinase는 동식물, 곤충, 어패류 등에 넓게 존재하

며, 미생물로는 *Serratia*[2,20], *Pseudomonas*[11,16], *Streptomyces*[9], *Aeromonas*[4,8], *Bacillus*[1,19], *Enterobacter*[15], *Aspergillus*[5], *Penicillium*[17], *Trichoderma*[6] 등에 존재하는 것으로 알려져 있다. 또한 chitinase의 분리, 정제 및 유전자에 관한 연구가 국내외적으로 많이 보고되어 있으며, 현재까지 수십종의 유전자가 cloning 되어 있다[3,6,10,14]. 특히 식물병원성 진균의 외막에 함유된 chitin 성분의 효소적 분해기작을 활용하여 작물의 병해를 방제하는 생물학적 방제가 효과적인 방법으로 알려져 있다[10,14,12,18].

이에 본 연구에서는 우리 지역 토양환경에 오랜 세월 토착해 살고 있는 토착길항균주를 분리·선발하고 다시 지역으로 돌아가서도 토착·우점화를 통해 적응력이 있고 두가지 이상의 길항기작을 가지는 길항균주를 선발하고자 하였다. 그 일환으로 경북 경주지역에서 토착길항미생물을 이용하여 자연농법을 수행하고 있는 저병해 경작지로부터 시드름병의 원인균인 *Fusarium oxysporum*과 고추역병균 *Phytophthora capsici*에 강한 길항력을 보이는 균주중 항진균성 항생물질과 chitinase를 동시에 생성하는 강력한 복합기능의 길항균주를 최종 분리하고자 하였으며, chitin 분해효소의 생산능이 높은 세균을 선발하고, 선정된 균주의 최적 효소 생산 조건을 검토하였다.

*Corresponding author

Tel. 82-53-810-2395, Fax. 82-53-811-4319
E-mail: sdkim@ynucc.yeungnam.ac.kr

재료 및 방법

생물방제균주의 분리 및 선발

경주 인근 지역의 토착 길항미생물을 이용하는 자연농법의 저병해 경작지 토양을 분리원으로 하여 항진균성 항생물질을 생산하는 길항미생물 중에서 chitinase 생산능을 가진 길항미생물을 분리하고자 하였다. 채취한 토양을 멸균 생리식염수에 10^{-2} 까지 현탁, 희석하고, 이를 LB 한천배지에 0.1 ml씩 도말하여 30°C에서 1일간 배양하였다. 이들을 시드름병의 원인균인 *Fusarium oxysprum*과 고추역병균 *Phytophthora capsici*를 대상으로 대치배양을 실시하여 억제거리를 나타내는 균들을 대상으로 chitinase 생산성 균주의 분리를 하고자 하였다. 이를 위하여 이들 colony를 chitin yeast extract medium(CY) 한천배지 즉 0.7% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, 0.05% sodium citrate, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% yeast extract, 0.1% colloidal chitin 그리고 1.5% agar를 첨가하여 pH 6.8로 조정된 배지에 toothpick하여 chitin 분해환을 형성하는 균주를 chitinase 생산성 균주로 선택하여 분리하였다.

계대배지 및 배양

본 실험에 사용된 균주 *Bacillus* sp. 7079의 계대는 Nutrient 한천배지를 사용하여 30°C에서 2일간 배양한 후 4°C에서 보관하며 사용하였다.

*F. oxysprum*과 *P. capsici*의 계대는 potato dextrose agar(PDA) 배지를 이용하여 28°C에서 일주일간 배양한 후 실온에 보관하면서 사용하였다. *P. capsici*의 유주자(zospore) 수확은 V8 주스배지(V8주스 20%, $CaCO_3$ 0.4%, agar 2%)에 *P. capsici*를 6 mm 크기의 disc로 접종하여 28°C에서 5일간 배양하여 plate의 가장자리까지 균사를 성장시킨 후에 도말봉으로 기균사를 밀어주고 형광등에서 10 cm 떨어진 곳에서 빛을 쬐어주며 24시간 동안 추가 배양시켜 포자를 생성시켰으며, 여기에 멸균 생리식염수를 5 ml를 넣은 후에 멸균 붓으로 유주자를 회수하였다[7].

생물방제균의 동정

선발된 생물방제균주의 분류학적 동정을 위하여 API® 50CH (Analytical Products, France) test와 각종 생화학적 성상 검사 그리고 MicoLog™ system (Biolog, Release 4.0)을 이용하여 동정하였고, 길항세균의 형태관찰을 위하여 투사형 전자현미경(Transmittance electron microscope, TEM)으로 그 형태를 관찰하였다. 이를 기초로 하여 Bergey's manual of systematic bacteriology의 색인에 따라 최종 분류 동정하였다.

발육저지대 측정법(대치배양)

PDA에서 식물병원균과 선발균주와의 발육저지 거리를 측정하기 위하여 시드름병의 원인균인 *F. oxysprum*과 고추역

병균 *P. capsici*를 6 mm 크기의 disc로 접종을 실시하여 28°C에서 24시간 배양한 후 3 cm 떨어진 곳에 분리된 길항미생물을 백금이로 획선하여 28°C에서 계속 배양하면서 병원성 진균 *F. oxysprum*과 *P. capsici*의 성장이 억제되는 것을 확인하였다[7,11,12].

Colloidal chitin 제조

Colloidal chitin 제조를 위하여 chitin(Sigma) 15 g을 4°C HCl 원액(35% 이상) 150 ml에 혼탁시킨 후 4°C에서 24시간 처리하였다. 이를 가아제와 whatmann paper No.1으로 여과하여 액상을 추출하였다. 이에 4°C 증류수를 1.5 l 첨가하여 추출액에 녹아있는 colloidal chitin을 침전시켰다. 이를 4°C에서 12시간 두어 colloidal chitin을 완전히 침전시킨 후 상등액을 버리고 4°C의 증류수 2 l로 반복하여 세척 후, 침전시켜 pH 5.0 이상이 될 때까지 세척하였다. 이를 5 N KOH를 이용하여 pH 7.0으로 조정하여 colloidal chitin을 제조하였고 이를 1/15 M phosphate buffer(pH 7.5)에 혼탁시켜 효소반응 기질로 이용하였다.

Chitinase 생산과 조효소액 제조

Chitinase 생산은 CY를 이용하여 30°C, 170 rpm으로 3일간 진탕배양하여 첨가한 colloidal chitin이 완전히 분해된 후에 배양상등액 회수를 위하여 8,000 g에서 20분간 원심분리하여 그 배양상등액을 회수하였다. 이 배양상등액을 Amicon Centriprep®10으로 잔류당 및 분자량 10,000 이하 저분자물질을 제거 농축하여 조효소액으로 이용하였다.

Chitinase 활성 측정

Chitinase의 활성 측정은 DNS법[18]에 의해서 측정하였다. 즉, colloidal chitin 용액 0.5 ml와 1/15 M phosphate buffer(pH 7.5) 1 ml에 효소액 1 ml를 가해 45°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 용액 0.5 ml를 첨가하여 반응을 정지시켜 100°C의 끓는 물에서 10분간 중탕시킨 후 냉각시켰다. 그 후 반응액을 3,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 잔존 colloidal chitin을 제거하고 540 nm에서 활성을 측정하였다. 효소 활성 1 Unit는 시간당 colloidal chitin으로부터 1 μM의 N-acetylglucosamine을 생성시키는 효소량으로 환산하였다.

선발균주의 in vivo pot 실험

선발된 길항세균이 실제 토양에서 식물병원균에 방제력을 발휘하는지 여부를 검증하기 위하여 고추(*Capsicum annuum*)를 대상 기주식물로 하여 그 방제력 검증을 실시하였으며, 상토로 발효 : 퇴비 : 모래를 2 : 1 : 1로 섞은 것을 사용하였다. 28°C, 60% 습도를 유지한 항온항습실에서 3엽기의 고추묘를 직경 15 cm pot에 이식하여 7일간 정착시킨 후, 미리 V8 주스 한천배지에서 배양·형성시킨 *Phyto-*

*phthora capsici*의 유주자를 회수하여 약 500개/ml의 유주자를 2 ml 관주 접종한 후, 1일간 습실처리(28°C, 습도 70%)하고 여기에 선발된 방제균을 4.0×10⁸/ml의 균수로 5 ml 처리하여 하루동안 더 습실배양하였다. 이를 28°C, 60% 항온항습실에서 키우면서 주기적으로 발병을 확인하였으며, 이때 대조구로 방제균 무처리구와 비교하여 고추역병의 발병억제력을 확인하였다.

결과 및 고찰

생물방제균의 분리 및 선발

경주 인근 지역에서 자연농법의 저병해 경작지 토양을 채취하여 100여종의 세균을 분리하였고, 이들을 시드름병의 원인균인 *F. oxysprum*과 고추역병균 *P. capsici*를 대상으로 대치배양을 실시하여 두 병원성 진균에 모두 억제거리를 나타내는 균주를 분리하였다(Fig. 1). 이 균주들을 CY 한천배지에 접종하여 chitin 분해환을 형성하는 균주를 최종적으로 chitinase 생산성 균주로 선발하였다(Fig. 2).

생물방제균의 동정

선발된 길항세균의 동정을 위해 Gram 염색을 한 결과 Gram 양성균의 간균이었으며, 투사형 전자현미경으로 미세형태를 관찰한 결과 편모를 가진 단간균이었다(data not

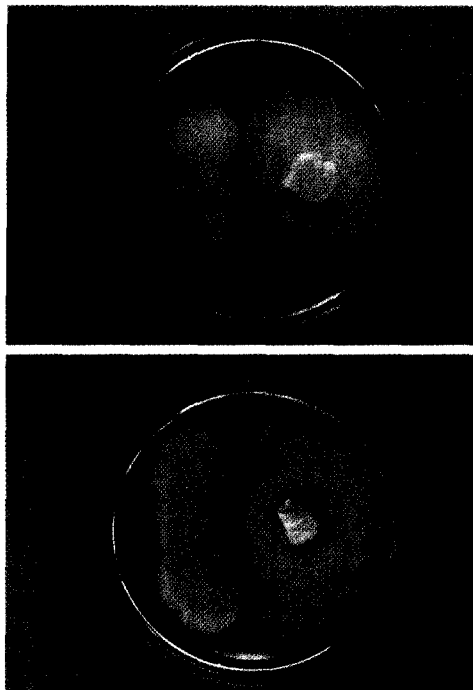


Fig. 1. Inhibition of the growth of *Fusarium oxysprum* and *Phytophthora capsici* by *Bacillus* sp. 7079 by pairing culture on PDA.

Up: *Bacillus* sp. 7079 + *Fusarium oxysprum*.
Down: *Bacillus* sp. 7079 + *Phytophthora capsici*.

shown). 또한 API[®] 50CH test와 각종 생화학적 성장검사 그리고 MicoLog[™] system을 이용한 동정 결과 Biolog사의 data base에서 *Bacillus amyloliquefaciens*에 가장 근연종으로 동정이 되었다(Table 1).

Chitinase 생산에 미치는 pH, 온도 및 배양시간의 영향

Chitinase의 생산에 pH가 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 초기 pH를 5.0에서 12.0까지 조절한 CY 배지에

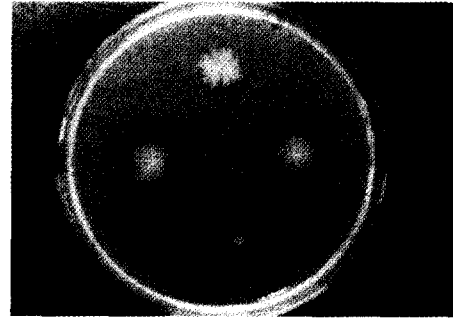


Fig. 2. Clear zone formation by *Bacillus* sp. 7079 on chitin-yeast extract agar.

A, *Bacillus* sp. 7079; Up and down, control strain
Cultivation was carried out in the chitin-yeast extract agar for 3 days at 30°C.

Table 1. Identification of the *Bacillus* sp. 7079 isolated as an antagonistic bacterium against phytopathogenic fungi

Characteristics	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Strain 7079
Gram stain	+	+
Motility	+	+
VP-TEST	+	+
Catalase TEST	+	+
Acid from D-Glucose	+	+
L-Arabinose	-	-
D-Xylose	-	-
D-Mannitol	d	-
Gas from glucose	-	-
Hydrolysis of casein	+	+
gelatine	+	+
starch	+	+
Utilization of citrate	+	+
Nitrate reduced of nitrite	+	+
Formation of indole	-	-
Growth at pH 6.8 nutrient broth	+	+
5.7	+	+
Growth at 10°C	d	-
30°C	+	+
40°C	+	+
50°C	d	-

Symbol: +, 90% or more positive; -, 10% or less positive; d, 11-89% positive

균을 접종하고 30°C에서 3일간 진탕배양한 결과 균의 성장은 pH 7.0까지 큰 차이는 없었으나 효소생산성은 약 23% 정도의 생산성 차이를 보였다(Fig. 3). 그러나 pH 6.0에서는 pH 7.0에 비해 약 67% 정도의 생산성을 보임으로써 우리나라와 같이 약산성의 경작지에서 본 시험균주가 chitinase 생산에 큰 영향을 보이지 않을 것으로 추정된다.

Chitinase의 생산에 온도가 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 CY에서 초기 pH를 7.0으로 조절한 후 20-45°C 까지 5°C 간격으로 3일간 진탕배양한 결과 30°C에서 최대 활성을 나타내었다(Fig. 4). 이는 일반적으로 알려진 *Bacillus*의 성장온도에서 chitinase 생산성이 정상적으로 유지됨으로써 우리나라 경작시기의 기온에서 chitinase의 실제 경작지에서 분비성에 큰 장애가 없을 것으로 추정된다.

Chitinase의 생산에 배양시간이 어떤 영향을 미치는지 알

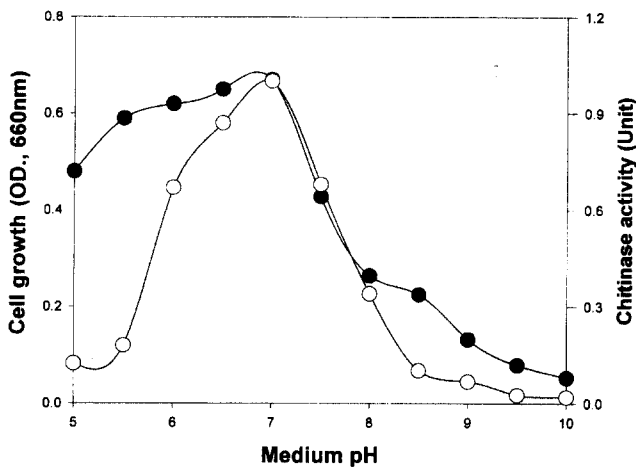


Fig. 3. Effect of pH on the chitinase production from *Bacillus* sp. 7079.

-●-: Cell growth, -○-: Chitinase activity.

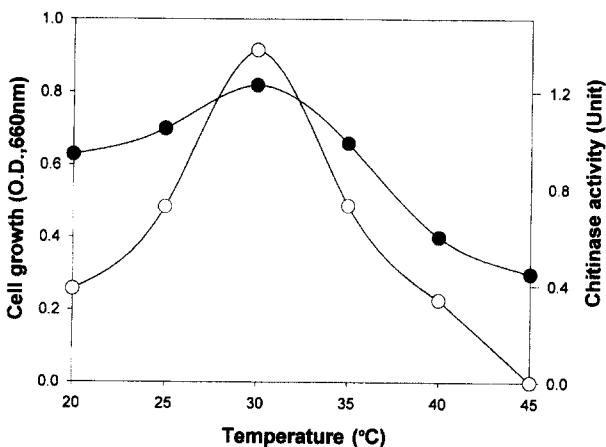


Fig. 4. Effect of temperature on the chitinase production from *Bacillus* sp. 7079.

-●-: Cell growth, -○-: Chitinase activity

아보기 위해 CY 배지에 균을 접종하여 30°C에서 6일까지 배양하여 배양일자 별로 chitinase 생산성을 검토한 결과 3 일째 배양했을 때 최대활성을 나타내었고 그 후 점차 그 생산성이 둔화됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이 결과는 *Serratia marcescens*[20]와 *Bacillus circulans*[21]의 경우 3일이었던다는 보고와는 유사한 생산성을 보였으며, 이는 chitinase가 유도성 효소에 기인하여 초기 저분자 탄소원을 먼저 이용한 후에 chitinase를 생산한 것으로 추정된다.

효소생산에 미치는 탄소원의 영향

Chitinase의 생산에 각종 탄소원이 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 colloidal chitin을 제외시킨 CY 배지에 각종 탄소원을 각각 0.1%가 되도록 첨가한 후 30°C에서 3일간 진탕배양하여 chitinase 활성을 측정하여 본 결과 colloidal chitin의 경우를 제외하고는 거의 chitinase를 생산하지 못하였다(Table 2). 이것으로 chitinase는 다른 탄소원에 의해 유도되는 것이 아니라 colloidal chitin에 의해 유도됨을 확인할 수 있었다. 또한 colloidal chitin의 농도가 chitinase 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 CY 배지에서 colloidal chitin의 농도를 0에서 0.5%까지 변화시켜 균을 배양한 결과 0.1%를 첨가했을 때 최대활성을 나타내었다(Fig. 6). 이러한 결과는 *Aeromonas salmonicida*[8]의 결과와 *Streptomyces lydicus*[9]의 경우 각각 1.2%와 2.0%의 colloidal chitin이 최적농도라는 보고와는 달리 본 균주는 저농도에서도 강력히 chitinase 생산이 유도되는 효소임을 알 수가 있었다.

또한 CYM에 sodium citrate 대신에 glucose와 N-acetylglucosamine을 0.1% 첨가한 후 30°C에서 3일간 진탕배양하여 chitinase 활성을 측정하여 본 결과 glucose에 의해서는 약 90% 가량 생산이 감소되었고, N-acetyl-

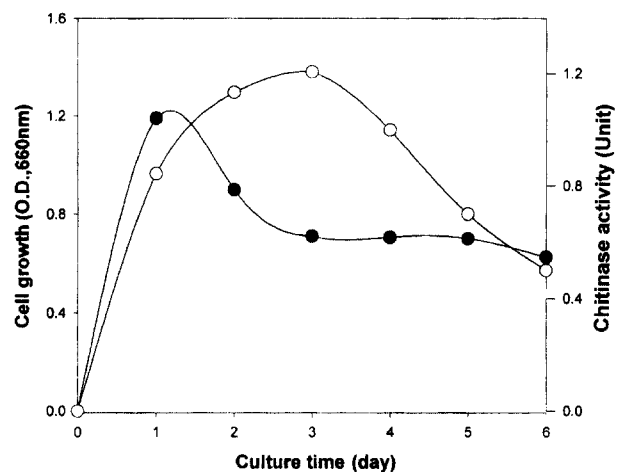


Fig. 5. Effect of culture time on the chitinase production from *Bacillus* sp. 7079.

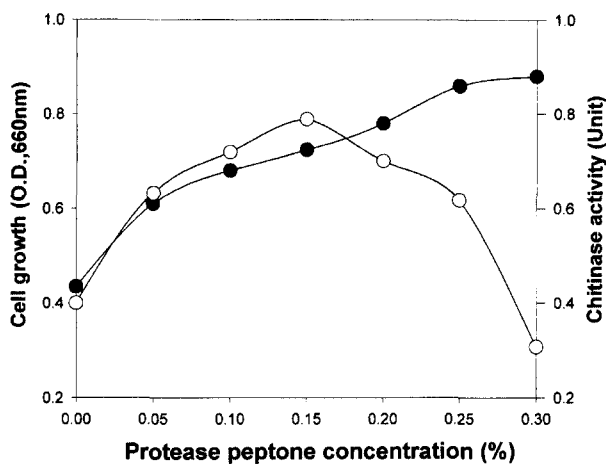
-●-: Cell growth, -○-: Chitinase activity.

Table 2. Effect of carbon sources on the production of chitinase from *Bacillus* sp. 7079

Carbon source	Relative activity (%)
Sodium citrate*	2.62
Glucose*	33.78
N-acetylglucosamine*	65.43
Lactose*	47.62
Sucrose*	26.53
Cellulose*	7.55
Chitin*	34.45
Chitosan*	8.00
Colloidal chitin*	100.00
Sodium citrate**	98.77
Glucose**	9.88
N-acetylglucosamine**	71.60
None**	100.00

*Various carbon sources (0.1%) were added to the medium [0.7% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.1% yeast extract, pH 6.8]. Cultivation was carried out for 3 days at 30°C.

**Sodium citrate, glucose and N-acetylglucosamine of 0.1% were added to the medium [0.7% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% yeast extract and 0.1% colloidal chitin, pH 6.8]. Cultivation was carried out for 3 days at 30°C.

**Fig. 6. Effect of the concentration of protease peptone No. 3 on the production of chitinase from *Bacillus* sp. 7079.**

-●-: Cell growth, -○-: Chitinase activity.

glucosamine에 의해서는 약 70% 가량 생산이 감소되었다 (Table 2). 이 결과로 본 실험균주는 탄소원으로써 저분자 탄소원을 우선으로 이용을 하며 또한 탄소원으로 이용하기 위하여 colloidal chitin를 분해할 수 있는 chitinase를 유도 생산하는 것으로 추정된다.

Table 3. Effect of nitrogen sources for the production of chitinase from *Bacillus* sp. 7079

Nitrogen source	Relative activity (%)
Beef extract	433.3
Yeast extract	666.7
Proteose peptone No. 3	2588.9
Peptone	1966.7
Tryptone	2466.7
Urea	911.1
NH_4Cl	477.8
$(NH_4)_2SO_4$	400.0
$(NH_4)_2S_2O_8$	0.0
$(NH_4)_2HPO_4$	277.8
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	666.7
$NaNO_2$	577.8
None	100.0

Various nitrogen sources (0.1%) were added to the chitin minimal medium [0.7% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.05% Sodium citrate, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.1% colloidal chitin, pH 6.8]. Cultivation was carried out for 3 days at 30°C.

효소생산에 미치는 질소원의 영향

Chitinase의 생산에 각종 질소원의 영향을 알아보기 위해 CY 배지에서 yeast extract를 제외한 chitin minimal(CM) 배지에 각종 질소원을 각각 0.1%가 되도록 첨가한 후 30°C에서 3일간 진탕배양하여 chitinase 활성을 측정하여 본 결과 $(NH_4)_2S_2O_8$ 에 의해서는 균성장이 거의 되지 않아 효소생산이 저해되었고, 그 외 질소원에 의해서는 무첨가보다 효소생산성이 증가되었다. 특히, proteose peptone NO. 3, tryptone, peptone과 같은 유기질소가 무기질소원보다 chitinase 생산을 더 촉진시키는 것으로 나타났다(Table 3).

Chitinase의 생산을 강력히 촉진하는 유기질소원들을 대상으로 효소 생산을 위한 최적 농도를 알아보기 위해 CM 배지에 proteose peptone NO. 3 또는 tryptone의 농도가 0%-0.3%가 되도록 첨가한 후 30°C에서 3일간 진탕배양하여 chitinase 활성을 측정하여 본 결과 0.15% proteose peptone NO. 3와 0.1% tryptone에서 최대활성을 나타내었다(Fig. 7, 8).

In vivo pot test를 통한 길항작용 검증

다기능 항진균성 길항균주 *B. amyloliquefaciens* 7079가 실제 토양에서 식물병원균에 방제력을 발휘하는지 여부를 검증하기 위하여 고추를 대상 기주식물로 in vivo pot test를 실시하였으며, 28°C, 60% 습도를 유지한 항온습실에서 기주식물 고추가 이식되어 있는 pot에, 미리 V8 주스배지에서 배양하여 수집한 *P. capsici*의 유주자를 회수하여 관주 접종한 후, 1일간 습실처리(28°C, 습도 70%)하고 여기에 선발된 방제균 *B. amyloliquefaciens* 7079를 처리하여

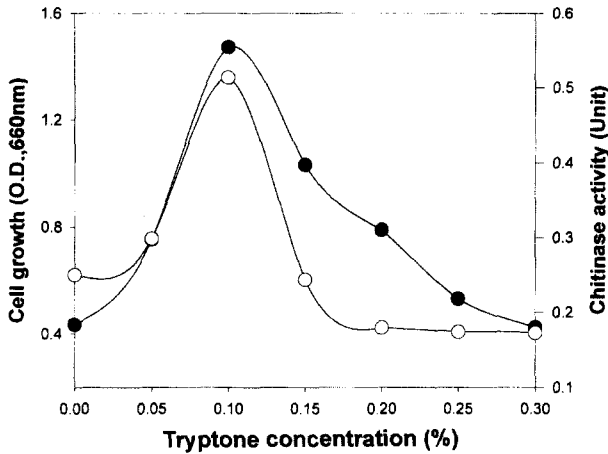


Fig. 7. Effect of the concentration of tryptone on the production of chitinase from *Bacillus* sp. 7079.
 -●-: Cell growth, -○-: Chitinase activity.

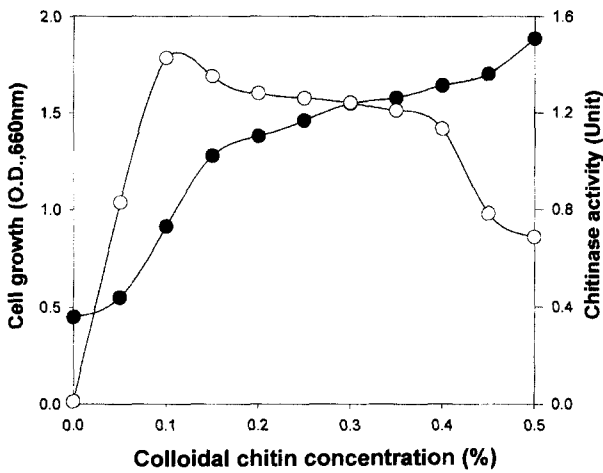


Fig. 8. Effect of colloidal chitin concentration on the production of chitinase from *Bacillus* sp. 7079.
 -●-: Cell growth, -○-: Chitinase activity.

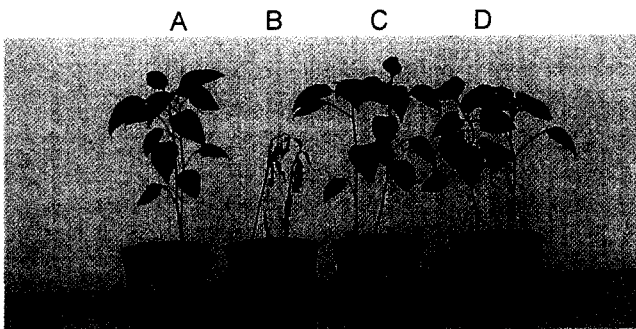


Fig. 9. *In vivo* antifungal activity of *Bacillus* sp. 7079 on the growth of red pepper (*Capsicum annum* L.).
 A, Non treated (control); B, Only *Phytophthora capsici* infected; C, *Phytophthora capsici* + *Bacillus* sp. 7079; D, *Bacillus* sp. 7079 only.

하루동안 더 습실배양하였다. 이를 28°C, 60% 항온습실에서 키우면서 주기적으로 발병을 확인한 결과 Fig. 9에서 볼 수 있는 바와 같이 고추역병균 *P. capsici*에 탁월한 방제력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

요 약

경주 인근 지역의 토양으로부터 식물병원성 진균 *Fusarium oxysprum*과 *Phytophthora capsici*를 동시에 길항할 수 있는 항진균성 항생물질을 생산성 생물방제균을 분리하고, 이 균주들로부터 *Fusarium*속들과 같이 세포벽에 chitin 성분을 함유한 병원진균의 세포벽을 분해하는 chitinase 생산성이 우수한 균주를 분리하고자 하였다. 분리된 생물방제균의 형태학적, 생화학적 및 배양학적으로 동정하여 잠정적으로 *Bacillus amyloliquefaciens* 7079로 동정하였다. 이 생물방제균이 생산하는 chitinase 생산의 최적 조건을 검토하여 본 결과 chitin-yeast extract 배지 (0.7% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.05% sodium citrate, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.1% yeast extract, 0.1% colloidal chitin)에서 배지 pH는 7.0, 배양 온도는 30°C였고, 배양 후 3일이 되었을 때 가장 많은 chitinase를 생산하였다. 또한 0.1% colloidal chitin을 탄소원으로 하여 배양하였을 때 chitinase 생산성이 가장 좋았으며, 0.15% proteose peptone NO. 3 또는 0.1% tryptone을 질소원으로 하여 배양하였을 때 효소 생산이 높게 나타났다. 선발된 생물방제균의 고추를 기주식물로한 *in vivo* pot 시험 결과 고추역병균 *Phytophthora capsici*에 좋은 길항력을 확인할 수 있었다.

감사의 말

본 논문은 1995년도 농림부 농림특정연구과제의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bhushan, B. and G. S. Hoondal. 1998. Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Biotechnol. Lett.* **20**: 157-159.
- Chang, K. I., K. S. Kim, M. J. Cho, S. Y. Lee, and Y. C. Shin. 1992. Molecular cloning of *Serratia marcescens* chitinase gene into *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 129-135.
- Gal, S. W. J. Y. Chol, C. Y. Kim, Y. H. Cheong, Y. J. Choi, S. Y. Lee, J. D. Bahk, and M. J. Cho. 1998. Cloning of the 52-kDa chitinase gene from *Serratia marcescens* KCTC2172 and its proteolytic cleavage into an active 35-kDa enzyme.

- FEMS Microbiol. Lett.* **160**: 151–158.
4. Hiraga, K., L. Shou, M. Kitazawa, S. Takahashi, M. Shimada, R. Sato, and K. Oda. 1997. Isolation and characterization of chitinase from a flake-chitin degrading marine Bacterium, *Aeromonas Hydrophila* H-2330. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 174–176.
 5. Jeong, E. J. and Y. H. Lee. 1995. Isolation of microorganism producing chitinase for chitoooligosaccharides producing, purification of chitinase and its enzymatic characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 187–196.
 6. Jesus De La Cruz, Antonio Hidalgo-Gallego, Jose M. Lora, Tahia Benitez, Jose A. Pintor-Toro, and Antonio Llobell. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Biochem.* **206**: 859–867.
 7. Lee, E. T. 1999. Antifungal mechanisms and genetic development of antagonistic bacterium on the phytopathogenic fungi. *Yeungnam University. Ph. D. Thesis.*
 8. Lee, K. P., C. N. Kim, J. H. Yu, and D. H. Oh. 1990. The production and purification of chitinase from *Aeromonas salmonicida* YA7-625. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 599–606.
 9. Lee, S. M. 1993. Identification and cultural characterization of *Streptomyces lydicus* G-23 for producing chitinase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 6–12.
 10. Lee, H. S., H. J. Lee, S. W. Choi, S. Her, and D. H. Oh. 1997. Purification and characterization of antifungal chitinase from *Pseudomonas* sp. YHS-A2. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 107–113.
 11. Lim, H. S. and S. D. Kim. 1990. Antifungal mechanism of *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 for biocontrol of *Fusarium solani* causing plant root rot. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 81–88.
 12. Lim, H. S. and S. D. Kim. 1994. The production and enzymatic properties of extracellular chitinase from *Pseudomonas stutzeri* YPL-1, as a Biocontrol Agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 134–140.
 13. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426–428.
 14. Ohta, M., T. Yamagami, and G. Funatsu. 1995. Purification and characterization of two chitinase from the leaves of pokeweed (*Phytolacca americana*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 656–661.
 15. Park, J. K., K. Morita, I. Fukumoto, Y. Yamasaki, T. Nakagawa, M. Kawamukai, and H. Matsuda. 1997. Purification and characterization of chitinase (ChiA) from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 684–689.
 16. Paulitz, T. C., and J. E. Loper. 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Phytophthora damping-off* of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathol.* **81**: 930–935.
 17. Rodriguez, J., J. L. Copa-Patino, and M. I. Perez-Leblic. 1995. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium oxalicum* autolysates. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**: 46–49.
 18. St. Leger, R. J., R. M. Cooper, and A. K. Charnley. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1509–1517.
 19. Tantimavanich, S., S. Pantuwatana, A. Bhumiratana, and W. Panbangred. 1998. Multiple chitinase enzyme from a single gene of *Bacillus Licheniformis* TP-1. *J. Ferment. Bioeng.* **85**: 259–265.
 20. Watanabe, T., K. Kimura, T. Sumiya, N. Nikaidou, K. Suzuki, M. Suzuki, M. Taiyoji, S. Ferrer, and M. Regue. 1997. Genetic-analysis of chitinase system of *Serratia marcescens*-2170. *J. Bacteriol.* **179**: 7111–7117.
 21. Watanabe, T., W. Oyanagi, K. Suzuki and H. Tanaka. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* **172**: 4017–4022.

(Received Jul. 20, 2001/Accepted Sep. 10, 2001)