

## 고추역병균 *Phytophthora capsici*를 방제하는 길항균주 *Bacillus megaterium* KL39의 선발과 길항물질

정희경 · 김상달\*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

**Purification and Characterization of an Antifungal Antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a Biocontrol Agent of Red-Pepper *Phytophthora* Blight Disease. Jung, Hee-Kyoung and Sang-Dal Kim\*.**  
*Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea – For the biological control of Phytophthora blight of red-pepper caused by *Phytophthora capsici*, an antibiotic-producing plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) *Bacillus* sp. KL 39 was selected from a local soil of Kyongbuk, Korea. The strain KL 39 was identified as *Bacillus megaterium* by various cultural, biochemical test and API<sup>®</sup> and Microlog<sup>®</sup> system. *B. megaterium* KL 39 could produce the highest antifungal antibiotic after 40 h of incubation under the optimal medium which was 0.4% fructose, 0.3% yeast extract, and 5 mM KCl at 30°C with initial pH 8.0. The antifungal antibiotic KL 39 was purified by Diaion HP-20 column, silica gel column, Sephadex LH-20 column, and HPLC. Its RF value was confirmed 0.32 by thin-layer chromatography with Ethanol:Ammonia:Water = 8:1:1. The crude antibiotic KL39 was active against a broad range of plant pathogenic fungi, *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia oryzae*, *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alteranria kikuchiana*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*. The purified antifungal antibiotic KL39 had a powerful biocontrol activity against red-pepper phytophthora blight disease with *in vivo* pot test as well as the strain *B. megaterium* KL 39.*

**Key words:** Biocontrol, antifungal antibiotic, *Phytophthora capsici*, *Bacillus megaterium*

토양전염을 통한 식물병원성 진균의 피해 중 고추역병은 토양병원성 진균병으로 물빠짐이 나쁜 지대 또는 경사지 밭에서 자주 발생되고 있으며 특히 장마 중 빗물에 의해 전염이 심하다[1]. 매년 고추연작지에서 고추역병의 발병율은 꾸준히 증가하고 있으며, 이들의 방제를 위해 다양한 화학농약이 주로 사용되어지고 있다[7, 13, 21]. 그러나 화학농약은 그 독성과 저항성 병원균의 출현, 생태계의 부정적 영향, 유기농산물에 대한 소비자의 요구증가 등 심각한 폐해로 인해 그 사용량이 점차 감소되고 있다[19, 20].

화학농약의 대체방안으로 생물농약이 대두되고 그 중 미생물의 길항작용[2, 12]을 이용하여 생태학적으로 병원균의 활동을 억제하며 근권토양 중 식물병원균에 대한 길항미생물 분포나 밀도를 증가시키는 미생물농약이 출현하였다. 미생물농약의 길항작용은 항생물질에 의한 항생작용[6, 8, 10, 11, 17, 16], siderophore를 통한 Fe<sup>3+</sup>에 대한 경쟁적 길항작용[14, 15, 16], 식물병원성 진균세포벽 가수분해효소[3] 등으로 크게 3가지로 나누어 볼 수 있다. 그러나 방제제로서 이용하기에는 siderophore나 외막가수분해 효소에 의한 길항작용

은 물질의 안정성이 항생물질에 비해 다소 떨어져 제제화 및 실제 토양에서 그 능력을 발휘하는데 어려움이 있다.

따라서 본 연구에서는 항진균 항생물질을 생산하는 길항균주에 의한 고추역병의 방제를 목적으로 우리나라 기후와 토양특성에 적합한 적응복원력을 가지며 고추역병균을 강하게 억제하는 길항균주를 선발하고 그 길항균주가 생산하는 항생물질의 생산조건을 검토하고 항생물질의 정제를 통해 역병방제 미생물의 제제화 및 농용항생물질 제제화의 기초를 마련 하고자하였다.

### 재료 및 방법

#### 길항균주의 분리 및 선발

지역 토양내 우점, 토착, 복귀능이 강한 길항균주를 선발하기 위해 경북 지역의 자연농법 저병해 경작지 토양을 분리원으로 하였다. 항생물질을 생산하는 *Bacillus* 속의 균주를 분리하기 위하여 80°C water bath에서 30분간 열처리하고 Nutrient agar배지(NA)에 접종하여 생존하는 균주를 분리하였다. 분리된 균주들을 대상으로 고추역병균 *P. capsici*를 방제할 수 있는 길항균주의 분리·선발을 위하여 Potato dextrose agar(PDA)에서 대치배양(parcing culture)을 실시하여 큰 억제거리를 형성하는 균주들을 분리하였다.

\*Corresponding author

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

### 발육 저지대 측정법

PDA에서 병원균과 선발길항균주와의 발육저지 거리를 측정하기 위하여, 식물병원성 진균 *P. capsici*를 직경 6 mm 크기의 culture disc로 접종하고 28°C에서 24시간 배양한 후 3 cm 떨어진 곳에 길항세균 *Bacillus* sp. KL 39를 확산접종하고 28°C에서 계속 배양하여 병원성진균의 성장 억제거리를 확인하였다.

### 항진균 활성 측정

선발 길항균주가 생산한 항진균성 항생물질에 의한 *P. capsici* 생육의 길항정도를 측정하기 위해 먼저 길항세균을 broth 배지에서 28°C, 48시간 미리 배양하여 10,000xg에서 15분간 원심분리한 상등액을 80°C에서 20분간 열처리 후 2.4% Potato dextrose broth(PDB)에 10% vol으로 첨가하고 *P. capsici*의 zoospore를 접종하여 28°C에서 72시간 진탕 배양하였다. 건조 중량을 미리 무게를 측정해 놓은 Whatman No. 2 filter paper에 *P. capsici*의 배양액을 여과 후 80°C에서 건조시켜 증가된 중량을 *P. capsici* 균체의 발육량으로 측정하여 항진균 활성을 조사하였다.

### 길항균주의 동정

선발된 길항균주 *Bacillus* sp. KL 39의 분류학적 동정을 위해 Biolog사의 동정시스템 MicroLog<sup>®</sup>4.01C, API<sup>®</sup> CHB-50 test 및 각종 생화학적 성장검사를 하고, 투시형 전자현미경(transmission electron microscope, TEM)으로 그 형태를 관찰하였다. 그 후 이를 바탕으로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology색인[4]을 이용하여 최종 동정하였다.

### 항생물질 생산을 위한 배지조건

Davis minimal medium(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, Glucose 0.5%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01%, glucose 0.1%)에 glucose를 제외시키고 10종의 탄소원 arabinose, fructose, lactose, xylose, glucose, raminarin, maltose, saccharose, glycerol, galactose을 1.0%씩 첨가하여 30°C에서 3일간 균을 배양한 후, 그 원침 상등액을 80°C에서 20분간 열처리하고 균체량 측정법에 따라 항진균 활성도를 조사하였다. 길항균주의 생육은 배양액을 연속희석 후 그 희석액을 Nutrient agar에 100 μl를 도말하고 30°C에서 24시간 배양하여 나타난 colony를 계수하였다. 결정된 최적의 탄소원에 대하여 0.1~1.0%까지 농도별로 *Bacillus* sp. KL 39의 항생물질 생산능과 길항균주의 생육을 조사하였다.

질소원의 경우 Davis minimal medium에 질소원인 ammonium sulfate를 제외시키고 앞의 결과에서 선택된 탄소원을 최적 농도로 넣어 준 후 13종의 무기 및 유기 질소원 tryptone, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, KNO<sub>3</sub>, Proteose peptone No.3,

yeast extract, bacto peptone, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, urea, malt extract, beef extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 0.5%씩 첨가하고 길항 균주의 생육과 항생물질 생산에 대한 영향을 조사 후 0.1~0.5% 농도에서 항진균활성과 균주의 생육을 조사하였다. 무기염의 경우 Davis minimal medium에 무기염을 제거하고 각종 13종의 무기염 FeCl<sub>3</sub>, BaCl<sub>2</sub>, RbCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, KCl, LiCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>을 5 mM 농도로 넣어주고 pH 7.0으로 조정 후 *P. capsici*에 대한 길항능 및 길항균주의 생육을 조사하였다.

### 항생물질 생산을 위한 pH, 온도 및 배양시간

1 N NaOH, 1 N HCl로 pH 3.0~10.0로 적정된 Nutrient broth에 전 배양된 *Bacillus* sp. KL 39를 접종하고 24시간 배양된 배양 상등액을 80°C에서 30분간 열처리하여 cellulase 활성을 불활성화 시킨 후 항생물질 생산능을 조사하였다. 항생물질 생산에 대한 온도의 영향 조사를 위해 20~50°C에서 *Bacillus* sp. KL 39를 24시간 배양 후 최적 항생물질 생산능을 조사하였다.

배양시간에 따른 길항균주의 항생물질 생산능은 항생물질 생산 최적배지에 1% 길항균주의 전 배양액을 접종 후 2시간 간격으로 배양액을 회수하여 상기의 발육 균체량법으로 항생물질 활성을 조사하였으며 길항균주의 성장도는 spectrophotometer(HITACH U-2000)을 이용하여 600 nm에서 균탁도를 측정하였다.

### 항진균성 항생물질의 정제

길항세균으로부터 생산된 항진균성 항생물질을 대량으로 정제하기 위하여 앞에서 조사된 최적 배양조건으로 10 L 배양 후 그 배양액을 원심분리하고 상등액을 동량의 *n*-butanol 첨가하여 활성물질을 용매층으로 이행 시킨 후 50°C 이하에서 감압농축하였다. 이어 감압농축된 추출물을 Diaion HP-20 column, Sephadex LH-20 column, silica-gel column을 이용하여 column chromatography를 수행 후 각 단계별로 TLC를 이용하여 정제도와 활성밴드를 확인하고 HPLC로 정제 순도를 검증하였다. 정제시 각 단계별 활성측정은 각 분획을 *P. capsici*의 유주자를 회수하여[21] 도말한 후 여지 disc 방법으로 항진균활성을 조사하였다.

### 식물병원성 진균에 대한 항생물질의 항균 spectrum

핵과류 잣빛곰팡이병원균 *M. fructicola*, 잣빛곰팡이균 *B. cinerea*, 도열병균 *P. oryzae*, 탄저병균 *C. gloeosporioides*, 줄기썩음병균 *R. solani*, 시드름병균 *F. oxysporum*과 배 겹은무늬균 *A. kikuchiana*, 근부병균 *F. solani*를 대상으로 각종 식물병원성 진균들에 대해 저해 활성을 조정제 수준의 항생물질을 이용하여 발육 균체량법으로 그 항진균활성을 조사하였다.

**길항미생물의 in vivo pot 방제력 재검증**

선발된 길항세균 *B. megaterium* KL 39이 실제 토양에서 고추역병균 *P. capsici*에 방제력을 발휘하는지 여부를 검증하기 위하여 서울 종묘의 Red horn종의 고추(*Capsicum annuum*)를 대상 기주 식물로 하여 상토로 발효: 퇴비:모래를 2:1:1로 섞은 것을 사용하여 28°C, 70% 습도를 유지한 항온 항습실에서 고추묘를 직경 15 cm pot에 이식하여 3일간 정착시킨 후, 미리 V8 주스 한천배지에서 배양, 형성시킨 *P. capsici*의 유주자를 회수하여 관주 접종한 후, 1일간 습실처리(28°C, 습도 70%)하고 여기에 선발된 방제균 및 조정제 수준의 항생물질을 처리하여 항온 항습실에서 키우면서 주기적으로 고추역병의 발병 억제력을 확인하였다.

**결과 및 고찰**

**균주의 선발 및 배양**

경북지역의 자연농업 수행 저병해 경작지 토양에서 토착 세균을 50여 주 분리할 수 있었고, 이들 중 *Bacillus* 속으로 추정되는 균주를 약 20여 주 분리할 수 있었다. 이 들을 대상으로 고추역병균 *P. capsici*와 대치배양과 발육균체량 측정법을 실시하여 고추역병균생육에 우수한 길항능을 가지는 생물방제균주 *Bacillus* sp. KL 39를 선발하였다.

**선발 길항균주의 동정**

선발된 토착길항균주의 분류학적 동정을 위해 전자현미경(×10,000)관찰과 Gram 염색 결과와 몇몇 생화학적 성상 실험을 바탕으로 한 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [4] 조사와 Biolog사의 동정시스템(Microlog<sup>®</sup>4.01C), API<sup>®</sup> test를 이용하여 최종 동정하여 본 결과 API<sup>®</sup> test는 *B. megaterium*에 67.6%의 근연성을 보이며, Microlog<sup>®</sup>4.01C에서는 *B. megaterium*로 97% 상동성의 가까운 동정 결과를 나타내어 본 연구에 선발된 *Bacillus* sp. KL 39는 최종적으로 *B. megaterium*으로 동정하였다(Table 1).

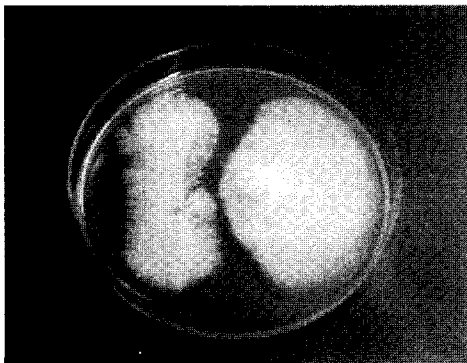


Fig. 1. Inhibition of the growth of *Phytophthora capsici* by *Bacillus* sp. KL39 on PDA. Left, *Bacillus* sp. KL39; Right, *Phytophthora capsici*.

Table 1. Identification of *Bacillus* sp. 39 on their physiological and biochemical characteristics.

Characteristics		<i>Bacillus megaterium</i>	Strain KL39
Morphology <sup>a</sup>		Rod	Rod
Gram stain		+	+
Motility		+	+
Catalase		+	+
VP		-	-
Acid form	glucose	+	+
	L-Arabinose	d	d
	D-xylose	d	d
	D-manitol	d	d
Gas from glucose		-	-
Hydrolysis of	casein	+	+
	gelatin	+	+
	starch	+	+
Utilizaion of citrate		-	-
Nitrate reduced of nitrite		d	+
Formation of indole		-	-
Growth at pH 6.8 nutrient broth		+	+
Growth at	10°C	+	+
	30°C	+	+
	40°C	d	+
	50°C	-	+
API <sup>®</sup> CHB50 test		<i>Bacillus megaterium</i> (67.6%)	
Biolog (Microlog <sup>®</sup> 4.01C) system		<i>Bacillus megaterium</i> (97%)	

+; 90% or more positive, -; 10% or less negative, d; 11-89% positive, a; Observation with transmittance electron microscopy (TEM, 10,000).

**선발된 길항미생물의 길항기작**

선발된 *B. megaterium* KL 39가 생산하는 억제물질이 항생물질의 특성인 저분자 물질인지, 효소단백과 같은 고분자 물질인지를 알아보기 위하여 Amicon사의 Centriprep<sup>®</sup>-10으로 분자량 10,000기준으로 *B. megaterium* KL 39 배양 상등액을 고분자와 저분자로 나누어 *P. capsici*에 대한 각각의 방제력을 확인한 결과 Table 2와 같이 고분자와 저분자 공히 40%이상의 길항력을 보였다. 또한, 저분자 분획을 80°C에서 20분간 열처리한 후 잔존 항생력을 확인한 결과 열처리 전의 저분자 분획의 활성에 비해 95% 이상의 길항력을

Table 2. Characteristics of the antifungal substance of *Bacillus* sp. KL39 which suppresses *P. capsici*.

Fraction	Inhibition rate
Culture filtrate	100(%)
Butanol ext. sol	43.5
Inhibition by High M.W.(>10K)fraction	41
Inhibition by low M.W(<10K) fraction	48
Heating(80°C, 20 min) of low M.W(<10K) fraction	46

\*Inhibition percentage = {1 - (mycelial growth of treatment/mycelial growth of control)}×100.

유지하였다. 이상의 결과로 미루어보아 *B. megaterium* KL 39가 생산하는 길항물질은 고분자와 저분자 각각의 길항물질이 양쪽 모두 고추역병균을 길항하는 것이었다.

또한 고분자의 기작을 규명하기 위해 식물병원성 진균의 세포벽 물질인 chitin, cellulose,  $\beta$ -1,3 glucan을 기질로 DNS법[3]을 통하여 그 효소 생산성을 조사한 결과, cellulase 생산능이 아주 우수하였다(Table 3). 따라서 본 길항균주는 유기용매 *n*-Butanol에 추출되며 내열성 저분자인 항생물질 [8, 11]과 함께 cellulase의 용균작용에 의해 고추역병균에 대한 길항력을 나타낸다고 확인되었다.

**항생물질 생산을 위한 최적배지조건**

배지에 사용되는 영양원에 따른 항진균성 항생물질 생산의 영향을 조사하여 본 결과 탄소원으로 glycerol, galactose를 제외하고 다양한 종류의 탄소원을 *B. megaterium* KL 39는 잘 이용하였으며, 항생물질 생산성과 경제성을 고려한다면 대량배양의 최적 탄소원으로 fructose가 최적이었다. 또한 fructose 농도별로 *B. megaterium* KL 39의 항생물질 생산성을 조사한 결과, 0.4% 농도에서 그 생산성이 우수하였으며 다른 보고[11]와 마찬가지로 0.5% 이상에서는 catabolite repression으로 인해 항생물질 생산성이 오히려 감소하였다.

질소원에 대한 *B. megaterium* KL 39의 항생물질 생산성을 조사하여 본 결과 항생물질 생산성에 있어서 질소원에 상당히 의존적이었으며 유기질소원 및 무기질소원의 큰 차이는 없었으나 길항세균의 성장과 항생물질 생산능이 유기질소원이 대체로 더 양호하였다. 이는 *Bacillus* sp가 생산하는 항생물질의 다른 보고[8, 11, 17]들과 비슷한 결과였다. 그러나 타 보고들에 비해 본 균주는 무기질소원의 이용율이 다소 높아 토양에서 무기태 질소를 충분히 이용하여 항생물질 생산을 충분히 유도할 것이라 사료되며 다소 질소질이 부족한 토양에서는 그 능력이 다소 떨어질 것이라 추정된다. 다양한 질소원들 중 Proteose peptone NO<sub>3</sub>-, yeast extract는 질소원들 중 가장 높은 항생물질 생산성을 보였으며 yeast extract의 농도가 0.3% 배지에 첨가시 항생물질 생산성이 가장 우수하였다.

*B. megaterium* KL 39는 무기염으로 KCl, MgCl<sub>2</sub> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, BaCl<sub>2</sub> 등이 우수한 항생물질 생산성을 나타

**Table 3. Hydrolytic enzymes produced by antagonistic bacterium KL39.**

Enzyme	Substrate	Activity
Chitinase	Colloidal chitin	7 (U)
1,3-glucanase	Lamirarin	2
Cellulase	CMC <sup>a</sup>	91

\*1 unit of 1  $\mu$ g produced reducing sugar for 1 hr reaction determine with DNS method.

<sup>a</sup>: Carboxy methyl cellulose.

내었으며 이들은 주로 식물생장인자들로 토양에 많이 시비하는 비료성분이어서 토양에 충분히 잔류하고 있으므로 본 길항세균은 쉽게 이들의 이용하여 항생물질을 생산할 수 있을 것으로 추정된다. 또한 무기염들 중 길항세균의 성장과 항생물질 생산성은 떨어지나 Ca 이온은 다소 촉진하였다.

**배양 pH, 온도, 시간에 따른 항진균성 항생물질 생산성**

배양온도는 균 성장은 25°C가 가장 좋았으나 생산성은 30°C가 가장 좋은 것으로 나타났다. 또한 20~45°C까지 그 생산성이 60% 이상 충분히 유지되며 균주의 생육 또한 양호한 것으로 보아 본 길항균주는 제세화하여 시비시 겨울 하우스 재배의 낮은 온도나 여름철 노지의 높은 온도에서도 그 항생물질 생산능 및 생육을 충분히 유지 할 것으로 추정된다.

배양 pH에 따른 길항세균 *B. megaterium* KL 39의 균 성장도와 길항물질 생산성은 pH 3~10까지 조사한 결과 균 성장 및 생산성은 pH 8에서 가장 좋았다. 또한 pH 5~10까지 *P. capsici*에 대하여 50%이상 항진균 활성을 보였으며, 본 길항균주의 항생물질 생산능은 pH 다소 높은 약알칼리나 pH가 낮은 약산성에서도 큰 영향을 받지 않았으며 산성이나 알칼리 범위의 pH에서 배양 후 그 pH는 중성으로 유도되어 있었다. 이는 우리나라 토양이 구성상 산성의 특징을 가지며 화학농약, 비료의 사용으로 더욱이 더 산성화되어 있어 유기농 재배시 사용되는 농자제들이 몇 가지를 제외하고는 모두 알칼리성 자제들이거나 자체가 산성의 성질이 있더라도 용해시 중성 또는 약 알칼리의 성질의 나타내는 자제들임을 감안할 때 이들에 의해 길항균주의 생육 및 생산능이 커다란 영향을 미치지 않을 것으로 사료 될 수 있다.

배양시간에 따른 길항세균 *B. megaterium* KL 39의 균 성장도와 길항물질 생산성은 균 성장은 18시간에 최고를 보였으며, 생산능은 40시간에 이르러 최고의 생산능을 보였다. 이를 바탕으로 항생물질 정제시 항생물질 생산을 위한 최적 배지에 18시간 전 배양액을 첨가하고 40시간을 항생물질 생산의 최적배양 시간으로 결정하였다.

**항진균성 항생물질의 정제**

길항세균 *B. megaterium* KL 39로부터 생산된 항진균성 항생물질을 대량으로 분리 정제하기 위하여 조사된 최적 생

**Table 4. Culture conditions of *Bacillus megaterium* KL39 for the maximal production of antifungal antibiotic KL39.**

Incubation temperature		30°C
Initial pH		pH 8.0
Incubation time		40 hour
Antibiotic producing medium	Carbon source	0.4% fructose
	Nitrogen source	0.3% yeast extract
	Salt source	5 mM KCl

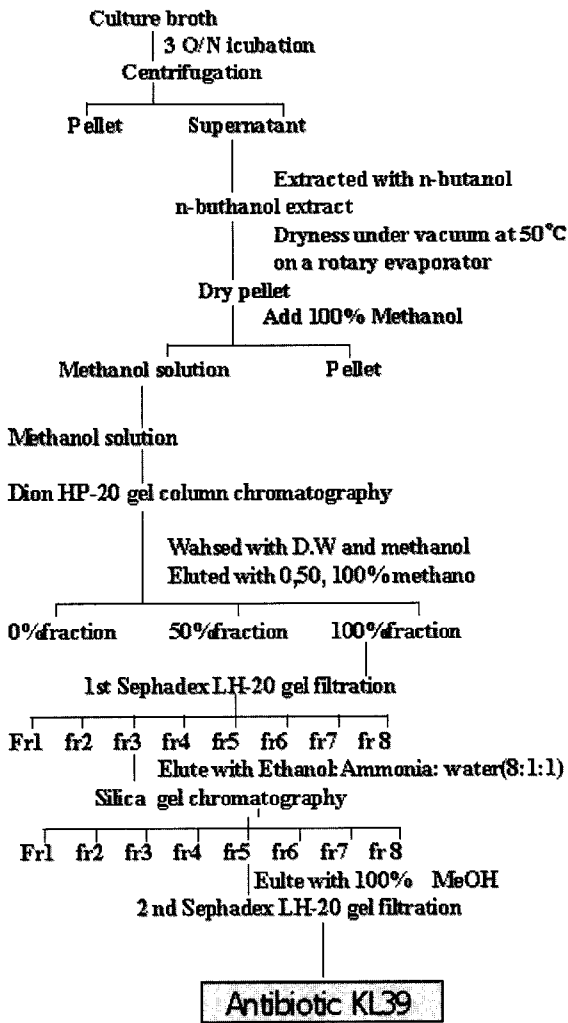


Fig. 2. Purification of antibiotic KL39 from culture broth of *B. megaterium* KL 39

산배지에 *B. megaterium* KL 39의 10 L 배양액을 원심분리한 후 원침 상등액에 동량의 *n*-butanol을 첨가하여 활성물질을 *n*-butanol층으로 이행시킨 후 이행된 항균활성물질을 50°C 이하에서 농축하고 다시 100% methanol에 녹이고 이를 항생물질 정제를 위한 항진균 항생물질의 조정제액으로 회수하였다. 이때 용액에 녹지 않는 물질은 Whatman No.2로 filtration하여 제거하여 용해성 물질과 비용해성 물질 각각에 대하여 길항력을 확인한 결과 길항력이 용매 분획에 있었다(Fig. 2).

이 가용성 물질을 Diaion HP-20 흡착 chromatography (2.5 cm×75 cm)를 통해 0%, 50%, 100% methanol로 용출시켜본 결과 100% methanol에 용출된 부분에서 대부분의 길항력을 확인 할 수 있었으며 이를 50°C에서 감압 농축하여 Sephadex LH-20 gel chromatography(2.5 cm×10 cm)를 5 min/ml 속도로 실시하고 3가지 물질의 혼합을 확인하였다. 활성분획을 모아 silica-gel chromatography(2.5 cm×75 cm)

를 5 min/ml 속도로 실시하여 분획별로 길항력을 test하여 길항물질을 추적하여 활성분획을 모아 50°C에서 감압농축하여 다시 2차 Sephadex LH-20 gel chromatography(2.5 cm×75 cm)를 5 min/ml 속도로 실시하여 ammonia:water:EtOH (1:1:8)를 이동상으로 silica-gel prep TLC를 iodine vapor로 발색한 결과 Rf 0.34의 단일 물질임을 확인할 수 있었다 (Fig. 2, 3). 단일 수준의 물질을 70% acetone를 용매로 C18 column으로 reversed phase HPLC상에서 15분간 분석 결과 retention time이 3.2분인 단일 peak를 얻을 수 있었다 (Fig. 4).

정제된 항진균성 항생물질 KL39의 활성

정제된 항생물질이 포자 발아의 저해하는 것인지 균사 생

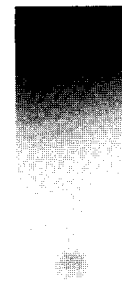


Fig. 3. Thin layer chromatography of the active fraction purified from 2nd Sephadex LH-20 gel chromatography. \*Detection of the antibiotic KL39 on TLC under iodine vapor (Rf=0.34 with Ammonia: Water : Ethanol=1:1:8).

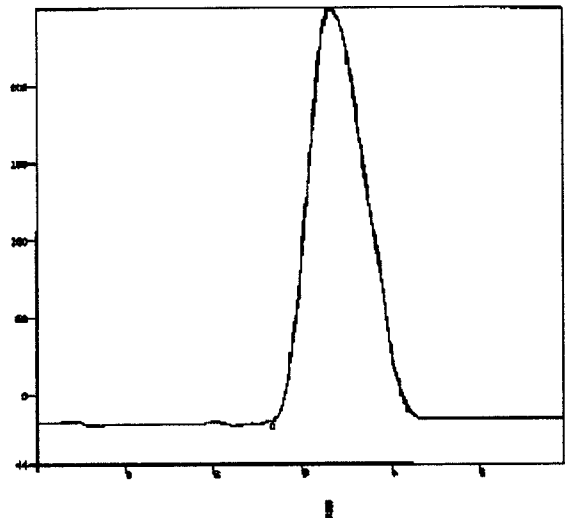


Fig. 4. HPLC pattern of the antibiotic KL39 purified from *B. megaterium* KL39.

육을 억제하는 것인지를 조사하기 위해 *P. capsici*의 유주자를 회수하여 도말 한 PDA에 정제된 항생물질 KL39을 여지 디스크에 150 µg을 놓고 28°C에서 배양시킨 결과 본 항생물질은 *P. capsici* 포자 발아를 억제하였으며 상기와 같은 농도로 여지 디스크에 항생물질을 흡수시키고 디스크 모양으로 적출된 *P. capsici*의 배양평판을 PDA에 접종하여 28°C에서 균사생육의 저해를 조사 한 결과 본 항생물질은 고추 역병균 균사의 생육도 저해하였다(Fig. 5).

**항진균성 항생물질 KL39의 항진균 spectrum**

본 길항균주가 생산하는 조정제 수준의 항생물질 KL39는 핵과류 잿빛곰팡이병원균 *M. froeticola*, 잿빛곰팡이균 *B. cinerea*, 도열병균 *P. oryzae*, 탄저병균 *C. gloeosporioides*, 줄기썩음병균 *R. solani*, 시드름병균 *F. oxysporum*과 배 검은무늬균 *A. kikuchiana*, 근부병균 *F. solani*과 같은 각종 식물병원성 진균의 균사 생육을 강력히 저해하여 광범위한 활성을 보였으며, 특히 *B. cinerea*, *F. oxysporum*에 대하여 그 활성이 *P. capsici*보다 더 우수하여 본 길항균주 및 항생물질이 시드름병, 잿빛곰팡이병의 병해 방제에도 이용가능성이 있음을 추정 할 수 있다(Table 5).

**항생물질 KL39와 길항세균 *Bacillus megaterium* KL 39의 *in vivo* 길항력 확인**

고추(*Capsicum annum*)를 대상 기주식물로 하여 28°C,

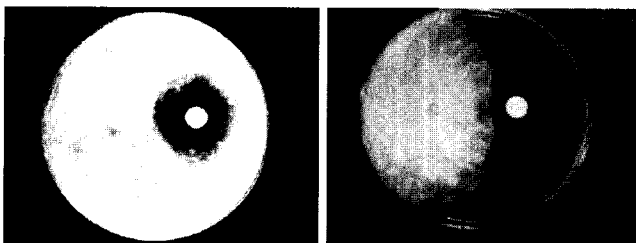


Fig. 5. Antifungal activity of the purified antibiotic KL39 against the zoospores germination and mycellium growth of *P. capsici* on PDA. Left, Inhibition of the zoospores germination of *P. capsici*; Right, Inhibition of the mycellium growth of *P. capsici*.

Table 5. Antifungal spectrum of the antibiotic KL 39 against various plant pathogenic fungi.

Plant pathogen fungi	Main host plant	Plant disease	Inhibition rate (%)
<i>Alteranria kikuchiana</i>	Pear	Black spot	66
<i>Pyricularia oryzae</i>	Cavara	Rice blast	46
<i>Botrytis cinerea</i>	Berry	Gray mold	72
<i>Fusarium solani</i>	Ginseng	Root-rot	56
<i>Fusarium oxysporum</i>	Cucumber	Fusarium wilt	100
<i>Rhizoctonia solani</i>	Cucumber	Damping off	40
<i>Phytophthora capsici</i>	Red pepper	Blight	66
<i>Monilinia fructicola</i>	Prunus	Brown spot	68



Fig. 6. *In vivo* antifungal activity of *B. megaterium* KL 39 against Phytophthora blight of red pepper. Left, *P. capsici* vs *B. megaterium* KL39; Center, Only *P. capsici* infected; Right, Antibiotic KL39 (1 mg) vs *P. capsici*.

70% 습도를 유지한 항온항습실에서 *P. capsici*의 유주자를 회수하여 350개/ml 상당의 유주자를 5 ml 관주 접종한 후 고추역병을 야기시킨 후 그 방제력 검증을 실시한 결과 *B. megaterium* KL 39과 조정제 수준의 항생물질 KL39 1 mg을 처리 한 결과 항생물질뿐만 아니라 길항균 균주 자체도 근권에서 잘 서식하여 고추역병을 억제하였다(Fig. 6). 따라서 본 균주는 항생물질의 생산성에 의한 항생작용으로 미생물제제 생산시, 길항균주가 포함된 배양액으로 제제화를 마련을 할 수도 있을 뿐만 아니라 그 항생물질을 대량 배양시켜 농축된 수화 또는 고화형으로 제제화한 조정제 수준의 항생물질 자체로도 토양에 적용시 길항능이 충분히 발휘 될 가능성이 있다고 사료된다.

**요 약**

항진균성 항생물질에 의한 고추역병의 생물방제에 관한 연구를 위하여 지역 경작지에서 고추역병균 *P. capsici* 생육을 저해는 다기능의 강력한 길항세균을 선발하였다. 선발된 균주는 배양학적, 생리학적, 생화학적 실험과 API®(CHB50) 및 Biolog(Microlog®4.01C) 시스템을 이용하여 동정한 결과 *B. megaterium*와 97% 이상 일치하여 최종적으로 선발된 길항세균을 *B. megaterium* KL 39로 명명하였다. *B. megaterium* KL 39의 *P. capsici*에 대한 길항은 열에 안정하고 *n*-BuOH에 추출이 되는 저분자성 항생물질과 용매에 추출되지 않은 열에 약한 고분자성의 식물병원균 세포벽 가수분해효소인 cellulase에 의한 것으로 확인되었다. 길항균주 *B. megaterium* KL 39가 생산하는 항진균성 항생물질은 *P. capsici*의 포자발아와 균사성장에 큰 영향을 미쳤으며 0.4% fructose, 0.3% yeast extract, 5 mM KCl (pH 8.0)을 포함한 배지에서 30°C, 40시간 배양하였을 때 그 생산성이 최대치를 나타내었다. Diaion HP-20 column, silica gel column, Sephadex LH-20 column과 HPLC에 의해 항생물

질을 정제하였으며 정제된 항생물질은 TLC plate 상에서 Ethanol:Ammonia:Water(8:1:1)로 전개한 결과 RF value가 0.32를 나타내었으며, 단일물질로 정제된 항생물질을 KL39로 명명하였다. 선발된 길항미생물 *B. megaterium* KL 39와 정제된 항생물질 KL39를 가지고 고추를 기주식물로 하여 *in vivo* pot 시험 결과 고추역병균 *P. capsici*에 의해 유발되는 고추역병에 대한 길항력으로 두 가지 모두 고추역병 방제력이 있음을 식물실험에서 확인할 수 있었다.

### 감사의 말

본 연구는 한국과학재단(R05-2001-000-00746-0)지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Akihiro, O., A. Takashi, and S. Makoto. 1992. Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. *Bioche. let.* **14**: 817-821.
- Davison, J. 1988. Plant beneficial bacteria. *Biotechnology* **6**: 282-286.
- Han, O. K. 2001. Purification of chitinase from antagonistic bacterium *Bacillus* sp. 7079 against phytopathogenic fungi and effect of purified chitinase treated chitin on cytokine gene expression in macrophage. *Department of applied microbiology, Graduate school, Yeungnam University.*
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th. *Williams & Wilkins*, U.S.A.
- Ferreira, J. H. S., F. N. Matthee, and A. C. Thomas. 1991. Biological control of eutypalara on grape vine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *J. Phytopathology* **81**: 283-287.
- Kim, K. K., J. G. Kang, S. S. Moon, and K. Y. Kang. 2000. Isolation and identification of antifungal *N*-butylbenzenesulphonamide produced by *Pseudomonas* sp. AB2. *J. antibiotics*. **53**: 131-136.
- Kim, C. J., I. K. Lee, B. S. Yun, and I. D. Yoo. 1993. Concanamycin B, active substance against *Phytophthora capsici* produced by *Streptomyces neyagawaensis* 38D10 strain. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech* **21**: 321-328.
- Kim, H. R. 1994. Antifungal antibiotic of antagonistic bacterium *Bacillus* sp. YH-16 against *Fusarium solani* causing plant root rot. *Department of applied microbiology, Graduate school, Yeungnam University.*
- Kim, S. H., H. J. Suh, and C. O. Kim. 1993. Taxonomy, purification and physicochemical properties of novel antifungal antibiotic AF-011A. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 556-563.
- Kim, Y. S. and S. D. Kim. 1994. Antifungal mechanism and properties of antibiotic substances produced by *Bacillus subtilis* YB-70 as a biocontrol agent. *J. Microbiol. Biotech.* **4**: 296-304.
- Kim, Y. S. 1992. Biocontrol bacteria, *Bacillus subtilis* YB-70 producing the antifungal antibiotics and genetic improvement. *Department of applied microbiology, Graduate school, Yeungnam University.*
- Lee, E. J., K. S. Kim, S. H. Hong, and J. H. Ha. 1995. The mechanism of biological control of *Pseudomonas* spp. against *Fusarium solani* causing plant root-rot disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 91-97.
- Lee, I.-K., C.-J. Kim, S.-D. Kim, and I.-D. Yoo. 1990. Antifungal antibiotic against fruit rot disease of red pepper from *Streptomyces parvullus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech* **18**: 142-147.
- Lee, J. M., H. S. Lim, T. H. Chang, and S. D. Kim. 1999. Isolation of siderophore - producing *Pseudomonas fluorescens* GL7 and its biocontrol activity against root - rot disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech* **27**: 427-432.
- Lim, H. S., J. M. Lee, and S. D. Kim. 2002. A plant growth - promoting *Pseudomonas fluorescens* GL20 - mechanism for disease suppression, outer membrane receptors for ferric siderophore, and genetic improvement for increased biocontrol efficacy. *J. Microbiol. Biotech.* **12**: 240-249.
- Lim, H. S. and S. D. Kim. 1997. Role of siderophores in biocontrol of *Fusarium solani* and enhanced growth response of bean by *Pseudomonas fluorescens* GL20. *J. Microbiol. Biotech.* **7**: 13-20.
- Shin, Y. J. 2000. Isolation, characteristics and structural analysis of the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. *Department of microbiology, Graduate school, Donggeui University.*
- Son, K.W., H.W. Lee, and S. U. Kim. 1994. Production of antifungal lipopeptide iturin by *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **9**: 224-229.
- Suzui, T. 1992. Biological control of soil borne diseases with antagonistic microbes. *Pro. '92 Agric BioTech. Symp. on New BioPesticides*, p55-76.
- Yoo, J. K., K. H. Ryu, J. H. Kwon, and S. S. Lee. 1998. Fungicidal activity of oriental medicinal plant extracts against plant pathogenic fungi. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**: 600-604.
- Yun, G. H., E. T. Lee, and S. D. Kim. 2001. Identification and antifungal antagonism of *Chryseomonas luteola* 5042 against *Phytophthora capsici*. *Kor. J. Appl. Microbiol.* **29**: 186-193.

(Received June 27, 2003/Accepted Aug. 27, 2003)