

## Bacillus subtilis AH18의 고추역병 방제능과 Siderophore<sub>AH18</sub>의 구조분석

우상민 · 김상달\*  
영남대학교 응용미생물학과

**Structural Identification of Siderophore<sub>AH18</sub> from *Bacillus subtilis* AH18, a Biocontrol agent of Phytophthora Blight Disease in Red-pepper. Woo, Sang-Min and Sang-Dal Kim\*.** Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Gyeongsan 721-749, Korea – The siderophore (siderophore<sub>AH18</sub>) of *Bacillus subtilis* AH18 was determined to be one of catechol type and purified by using Amberlite XAD-2, Sephadex LH-20 chromatography, and reversed-phase HPLC. The siderophore<sub>AH18</sub> was identified bacillibactin with its structure by GC-MS, <sup>1</sup>H-NMR, and <sup>13</sup>C-NMR. Siderophore<sub>AH18</sub> (bacillibactin) had been confirmed its molecular weight of 883 and chemical structure of (2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine)<sub>3</sub>. Purified siderophore<sub>AH18</sub> showed strong biocontrol ability towards the spore of *Phytophthora capsici* on PDA and able to effectively suppress (55%) *P. capsici* causing red-pepper blight in the pot *in vivo* test.

**Key words:** Bacillibactin, PGPR (plant growth promoting rhizobacterium), siderophore, *Bacillus subtilis* AH18

### 서 론

급속한 사회발전과 더불어 환경오염 문제가 야기되면서 모든 생활에서 환경 친화적으로 시선을 돌리고 있고, 농업 또한 친환경 농법들이 성행하고 있다. 그 중에서도 미생물 제제를 이용한 미생물농법이 많이 연구, 개발되어 농가에서 많이 활용되어지고 있다[12, 16, 20, 22].

길항미생물을 이용하여 식물의 질병을 방제하는 생물학적 방제 연구는 1980년대 중 후반부터 인삼 뿌리썩음병을 시작으로 지금까지 많은 연구가 진행되어 왔다. 유용 토착미생물을 분리, 선별하여 미생물제제로 활용하는 환경친화적인 미생물농법은 최근 국민들의 소득향상으로 인한 친환경 농산물의 소비가 급증하고 있어 농가에서도 미생물제제의 사용이 증가하고 있는 추세이다.

미생물제제에 의한 생물방제 기작은 크게 5가지로 구분되며, 첫 번째는 식물병원성 진균의 세포벽을 분해하는 용균작용[8, 28, 45], 두 번째는 *Bacillus* sp.[18, 26, 43], *Penicillium* sp.[3], *Pseudomonas* sp.[15, 20], *Streptomyces* sp.[11, 21, 36] 등이 생산하는 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해하는 항생작용, 세 번째는 식물병원균에 기생하면서 식물에 대한 진균의 병원성을 억제하는 기생작용[25], 네 번째는 생육공간에서 영양분과 같은 생육에 필요한 인자를 경쟁함으로써 병원균의 생육 및 증식을 억제하는 경쟁적 길항작용[13, 23, 27, 31, 32, 35], 마지막으로 미생물이

생산하는 exopolysaccharide(EPS), lipopolisaccharide(LPS), salicylic acid(SA), hydrogen cyanide(HCN), 2,3-butanediol 등의 물질들에 의해서 식물의 면역기능을 활성화하여 병에 대한 저항성을 유도하는 유도저항성 작용[24, 30, 34, 40] 등을 들 수 있다.

이런 기작들 중에서 Siderophore는 가용성이며 저분자(1.0 kDa 미만)물질로 철 이온(Fe<sup>3+</sup>)과 친화성이 높은 2차 대사 산물이다. 많은 미생물들이 siderophore를 생산하여 철 이온(Fe<sup>3+</sup>)과 결합 후 철수송계(high-affinity iron-transport system)를 이용해 세포내로 수송하며, 그 철 이온(Fe<sup>3+</sup>)을 미생물의 생육에 이용한다[7, 24]. 미생물이 생육에 필요로 하는 철(Fe)의 양은 미생물 종마다 차이는 있으나 0.3~4.0 μM 정도이다[41]. 토양 내 철분성분이 1~6%로 풍부하다 할지라도 미생물들이 필요로 하는 양은 충분하지 않으며, 모든 토양 미생물간의 경쟁적 요인이 될 수밖에 없다[2, 4]. 그리하여 많은 미생물들이 철 이온(Fe<sup>3+</sup>)의 경쟁에서 우위를 선점하기 위해 siderophore를 생산하며, 이런 siderophore에는 철 이온(Fe<sup>3+</sup>)을 결합하는 작용기에 따라 catechol type와 hydroxamate type로 크게 2종류로 분류된다. catechol type의 siderophore는 agrobactin, anguibactin, azotochelin, enterobactin, parabactin, vibriovactin 등이 속하며, hydroxamate type에는 coprogen, ferrichrome, ferrioxamine, nocardamine 등이 속한다. 최근에는 citrate-hydroxamate type의 aerobactin, arthrobactin, schizokinen과 quinoline type의 pseudobactin, pyoverdine 등이 보고되고 있다[7, 9, 33, 42]. 미생물에 의한 siderophore의 생산은 철 이온(Fe<sup>3+</sup>)의 경쟁으로 인해 타 미생물의 생육이 억제되기도 하며, 이를 이용해 siderophore를 생산하는 미생물을 이용, 생물방제에 이용하

\*Corresponding author

Tel: 82-53-810-2395, Fax: 82-53-810-4663

E-mail : sdkim@yumail.ac.kr

러는 연구가 활발히 진행되었다[13, 14, 17, 20, 23, 27, 29].

또한 식물성장촉진능과 식물병원성 진균의 방제능을 동시에 가지는 PGPR(plant growth promoting rhizobacterium) 균주에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다[13, 14, 19]. PGPR이란 plant growth promoting rhizobacterium으로 식물의 성장을 촉진하는 근권미생물들을 의미하며, 식물의 성장을 직·간접적으로 조절하는 기작이 있다. 식물의 성장을 간접적으로 조절하는 기작은 위에서 설명한 생물방제(biological control) 기작과 동일하며, 직접적으로 조절하는 기작으로는 인산가용화, 질소고정, 식물성장촉진 호르몬 생산(auxin, cytokinin, gibberelin), 에틸렌 조절 등이 알려져 있다[7, 13, 14, 19, 27, 38]. 지금까지 많은 PGPR 균주들이 보고되었고 이는 다음과 같다.

본 연구에서는 기존의 보고한 *Bacillus subtilis* AH18의 siderophore의 영양원과 고추역병의 방제능을 조사하였으며, 생산된 siderophore의 정제를 통한 구조를 해명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

본 균주는 식물성장촉진 호르몬인 auxin과 식물병원성진균의 생육을 억제하는 siderophore를 생산하는 plant growth promoting rhizobacterium(PGPR)인 *Bacillus subtilis* AH18 [13]을 사용하였다. 그리고 생물방제실험에 이용된 식물병원성진균은 고추역병을 유발하는 *Phytophthora capsici*를 영양고추시험장에서 분양받아 이용하였다.

### 균주의 배양 및 배지

*B. subtilis* AH18의 배양조건 확인은 nutrient medium (Difco Co. U.S.A.)을 사용하였으며, 탄소원과 질소원에 따른 siderophore의 생산 확인용 배지는 Davis minimal medium ( $K_2HPO_4$  0.7%,  $KH_2PO_4$  0.2%,  $(NH_4)_2SO_4$  0.1%, glucose 0.1%, sodium citrate 0.05%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01%)을 사용하였다. Siderophore의 정제에는 M9 minimal medium (5 X M9 salts( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  6.4%,  $KH_2PO_4$  15%, NaCl 0.25%,  $NH_4Cl$  0.5%) 200 mL, 1 M  $MgSO_4$  2 mL, 20% glucose 20 mL, 1 M  $CaCl_2$  0.1 mL, total 1 L)을 사용하였다[33]. 액체배양은 전배양액을 0.1% (v/v) 접종하여 30°C에서 160 rpm으로 24시간 진탕배양 하였고, 균주 보존용 고체배양은 nutrient agar에 30°C 항온기에서 24시간 배양하였다.

*P. capsici*의 포자생산용 고체배양은 V8 juice agar(V8 juice(Vegetable juice, Campbell soup company) 163 mL,  $CaCO_3$  4 g, agar 20.0 g, total 850 mL)을 사용하였고, 액체배양은 PDB(Potato Dextrose Broth) medium(Difco Co. U.S.A.)을 이용하였다. 또한 액체배양조건은 25°C에서 160 rpm으로 진탕배양 하였고, 균주 보존용 고체배양은 PDA 배지에 접종하여 25°C 항온기에서 배양하였다.

### 사용식물 및 토양

본 연구에 사용한 식물로는 고추(*Capsicum annum* L., 부촌-Semins Korea Co., 오륜-Seoul Seed Co.)을 이용하였으며, 고추 이식용 pot는 홍농 3공 컵 포트(90.0×90.0×70.0 mm)를 사용하였다. 생물방제력 확인을 위한 식물이식용 토양은 TKS2(Floragard, Germany)를 autoclave(121°C, 30분)하여 사용하였다.

### *B. subtilis* AH18이 생산하는 siderophore type 분석

*B. subtilis* AH18이 생산하는 siderophore의 characterization을 확인하기 위해 catechol type의 확인은 Arnow assay [1]로 hydroxamate type은 Csaky assay[5]로 확인하였다. Arnow assay 방법[1]은 *B. subtilis* AH18의 균체를 제거한 배양상등액 1 mL에 0.5 N HCl 1 mL, nitrite-molybdate reagent 1 mL를 첨가 후 1 M NaOH 1 mL를 첨가하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. Csaky assay방법[5] 역시 균체를 제거한 배양상등액 1 mL에 6 N  $H_2SO_4$  1 mL를 첨가하여 130°C에서 6시간 동안 가수분해하였으며, 여기에 3 mL sodium acetate solution, 1 mL sulfanilic acid solution, 0.5 mL iodine solution를 각각 첨가하여 5분 후 1 mL sodium arsenite solution, 1 mL  $\alpha$ -naphthylamine solution을 첨가하고 마지막으로 10 mL의 증류수를 첨가하여 30분 반응 후 526 nm에서 흡광도를 측정하였다. Arnow assay와 Csaky assay 측정 시 표준시약은 Sigma-Aldrich Co., U.S.A.사의 2,3-dihydroxybenzoic acid와 hydroxylamine-HCl를 각각 사용하였다.

### *B. subtilis* AH18이 영양원에 따른 siderophore의 생산 확인

*B. subtilis* AH18이 생산하는 siderophore의 최적생산조건을 조사하기 위해 Davis minimal medium에 탄소원과 질소원을 달리하여 최적 영양원을 조사하였다. 탄소원과 질소원에 따른 *B. subtilis* AH18의 siderophore의 생산을 조사하기 위해서 Davis minimal medium중 glucose와  $(NH_4)_2SO_4$  대신 15가지 탄소원과 17가지의 질소원을 각각 0.1%로 첨가한 Davis minimal medium 100 mL에 전배양한 *B. subtilis* AH18을 접종한 후, 30°C에서 4일간 진탕배양 후 Arnow assay 방법[1]으로 siderophore의 생산을 조사하였다.

### *B. subtilis* AH18이 생산하는 Siderophore의 정제 및 구조분석

*B. subtilis* AH18이 생산하는 siderophore(siderophore<sub>AH18</sub>)를 정제하기 위해 Payne의 방법[33]을 이용하였다. M9 minimal medium을 pH 6.0으로 적정 후 전배양액을 접종하여 30°C에서 4일간 배양 후 원심분리하여 균체를 제거하고 6 N HCl로 배양 상등액을 pH 2.5로 적정 후 4°C 냉장고에 24시간 침지하였다. 그 후 다시 원심분리 하여 침전물을 제

거하고 Amberlite XAD-2 adsorption column chromatography에 siderophore를 흡착시키고, column의 2배 volume의 0.1 N HCl로 씻었다. 그 후 100% MeOH를 이용해서 siderophore를 탈착시킨 후 40°C에서 감압농축하여 MeOH를 제거하고 소량(5 mL)의 MeOH를 넣어 siderophore를 추출하였다. 추출한 siderophore는 Sephadex LH-20 column chromatography에서 분리 후 Arnow assay 방법[1]으로 활성을 나타내는 fraction만 취하였으며, 이를 2회 반복 수행하였다. 그리하여 획득한 단일 peak의 활성부위는 C<sub>18</sub> reversed-phase column을 이용한 HPLC(Shimadzu Co. Japan, 100% methanol-0.1% phosphoric acid(1:1, v/v), flow rate: 2 mL/min)로 정제를 확인하였다(Fig. 1). 정제된 siderophore<sub>AH18</sub>의 질량분석은 Hybrid Tandem Mass Spectrometer (Waters Co., Quadrupole-TOF MS system, U.S.A.)를 이용하였으며, 구조분석을 위한 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR은 FT-NMR(Varian Inc., 600MHz, Australia)을 이용하였다.

**정제된 siderophore<sub>AH18</sub>의 생물방제능 확인**

정제된 siderophore<sub>AH18</sub>의 활성 확인은 *P. capsici*의 유주자(zoospores)를 대상으로 발아억제능을 관찰하였다. *P. capsici*의 zoospores는 윤 등의 방법[45]으로 포자를 회수하였다.

회수된 포자를 혈구계산기(Haemocytometer, Marienfeld, Germany)로 확인 후 400개의 포자를 PDA에 도말하였으며, 여지 disc 위에 200 ug의 정제된 siderophore<sub>AH18</sub>를 접종하여 25°C의 항온기에서 배양하면서 포자의 발아억제를 확인하였다.

**In vivo pot test를 통한 *B. subtilis* AH18의 생물방제력 확인**

*B. subtilis* AH18의 식물병 방제력을 검증하기 위해 윤 등의 방법[45]으로 고추를 대상 기주식물로 식물방제실험을 실시하였다. 고추를 평균상토 200 g를 이용해 pot(90.0×90.0×70.0 mm)에 이식하였으며, 고추역병균인 *P. capsici*의 zoospore(2×10<sup>2</sup> spores/pot)를 관주접종하고, 여기에 *B. subtilis* AH18을 10<sup>7</sup> CFU/pot로 관주 처리하여 28°C, 70% 항온습실에서 키우면서 주기적으로 발병을 확인하였다. 위 방제실험은 병원성 균만을 처리한 pot와 병원성균과 길항균을 함께 처리한 pot를 비교하여 방제율을 확인하였으며, 방제능의 재현성 확인은 실험구와 대조구 모두 고추가 이식되어 있는 20개의 pot을 대상으로 7회 반복하여 확인하였다.

**결과 및 고찰**

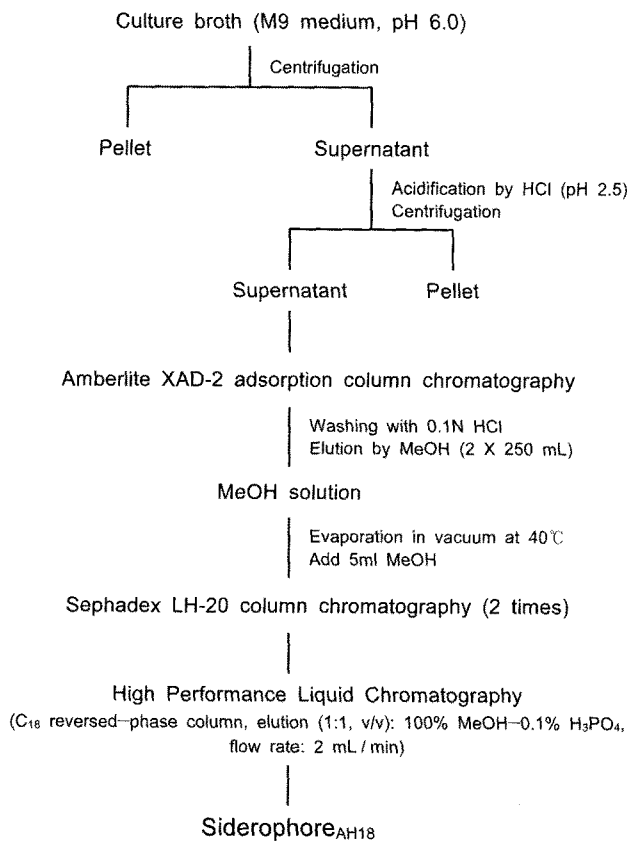
***B. subtilis* AH18이 생산하는 siderophore의 type 확인**

*B. subtilis* AH18이 생산하는 siderophore는 catechol type의 siderophore를 생산하는 것으로 확인하였다(Table 1). 이는 지금까지 알려진 *Bacillus* spp.들이 생산한다고 보고된 catechol type의 siderophore[6, 10, 39, 44]와 유사한 것으로 생각된다.

**탄소원과 질소원에 따른 siderophore의 생산 확인.**

Davis minimal medium에서 glucose를 제거하고 15종의 탄소원을 0.1%로 첨가하여 *B. subtilis* AH18의 균 생육과 siderophore의 생산을 조사하였다. 그 결과 균 생육은 starch, trehalose, glucose 순이었고, siderophore의 생산은 mannitol 첨가 시 가장 높았으며 trehalose, amylose 순이었다(Table 2). Siderophore 생산의 경우 단당류나 다당류보다 이당류의 첨가 시 상대적으로 생산이 높았다.

질소원의 경우 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 제거하고 17종의 질소원을 0.1%로 첨가하여 *B. subtilis* AH18 균주의 생육과 siderophore의 생산을 조사한 결과, tryptone과 alanine의 첨가 시 *B. subtilis* AH18의 생육이 우수하였으며, siderophore의 생산은 asparagine, NH<sub>4</sub>Cl, alanine 첨가 순으로 생산이 높았다(Table 3). 질소원의 경우 유기 질소원의 첨가가 무기 질소원의 첨가보다 균 생육과 siderophore의 생산이 높았다. 이로 보아 *B. subtilis* AH18의 토양내 처리시 유기 질소원을 첨가해주면 식물성장촉진능과 생물방제능이 상승효과를 가져올 것으로 사료된다.



**Fig. 1. Purification scheme of the siderophore from *B. subtilis* AH18.**

**Table 1. Characterization of the siderophore produced by *B. subtilis* AH18.**

Strain	CAS liquid assay <sup>1</sup>	Arnow assay <sup>2</sup>	Csaky assay <sup>3</sup>	Reference
<i>B. subtilis</i> AH18	0.147 ± 0.017 <sup>4</sup>	49.08 ± 2.71	0	This study
<i>P. fluorescens</i> GL20	0.092	0	26.49	Lee <i>et al.</i> , 1999

Strain was grown at 30°C for 96 h in nutrient medium.

<sup>1</sup>Siderophore production was determined by measuring the decrease in absorbance at 630 nm by the method of Padgyne[37].

<sup>2</sup>The presence of catechol type siderophore was detected at 510 nm by the method of Arnow[1]. The value is the concentration of 2,3-dihydroxybenzoic acid equivalents (µg/L).

<sup>3</sup>The presence of hydroxamate type siderophore was detected at 543 nm by the method of Csaky[5]. The value is the concentration of hydroxylamine equivalents (µg/L).

<sup>4</sup>Standard deviation.

**Table 2. Effect of carbon sources on the production of siderophore from *B. subtilis* AH18.**

Carbon sources <sup>1</sup>	Cell growth (600 nm)	Final pH	Siderophore (µg/L)
Control <sup>3</sup>	0.387 ± 0.026 <sup>4</sup>	7.262 ± 0.012	9.4 ± 0.3
Mannose	0.212 ± 0.018	7.248 ± 0.014	12.4 ± 0.7
D(-)-Fructose	0.226 ± 0.016	7.214 ± 0.016	11.6 ± 0.6
D(+)-Galactose	0.143 ± 0.021	7.414 ± 0.011	3.7 ± 0.2
Sucrose	0.220 ± 0.018	7.221 ± 0.009	15.8 ± 0.3
D(+)-Maltose	0.245 ± 0.017	7.263 ± 0.007	12.4 ± 0.4
Trehalose	0.446 ± 0.021	7.281 ± 0.008	20.8 ± 0.5
Mannitol	0.363 ± 0.027	7.232 ± 0.012	32.9 ± 0.8
Lactose	0.120 ± 0.011	7.401 ± 0.011	4.5 ± 0.4
Dextran	0.113 ± 0.009	7.389 ± 0.010	3.0 ± 0.2
Starch	0.474 ± 0.025	7.194 ± 0.016	15.6 ± 0.5
Amylose	ND <sup>5</sup>	7.273 ± 0.014	17.6 ± 0.8
α-Cellulose	ND	7.380 ± 0.013	4.0 ± 0.03
D(-)-Arabinose	0.118 ± 0.013	7.430 ± 0.010	3.5 ± 0.2
D(+)-Xylose	0.240 ± 0.018	7.347 ± 0.007	3.2 ± 0.1

<sup>1</sup>Carbon sources (0.1%) were added to the basal medium (0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% sodium citrate·2H<sub>2</sub>O, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O).

<sup>2</sup>Davis minimal medium (0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% sodium citrate·2H<sub>2</sub>O, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% glucose).

<sup>3</sup>Standard deviation.

<sup>4</sup>ND: not determined.

#### *B. subtilis* AH18의 정제 및 포자발아 억제 활성 확인

*B. subtilis* AH18이 생산하는 catechol type의 siderophore (siderophore<sub>AH18</sub>)은 Amberlite사의 XAD-2 column과 Sephadex LH-20 column으로 분리 및 정제하였다(Fig. 2, 3). 정제한 siderophore<sub>AH18</sub>는 HPLC상에서 단일 물질임을 확인하였으며(Fig. 4), 정제된 siderophore<sub>AH18</sub>를 *P. capsici*의 유주자(zospores)가 도말된 PDA에 여지 disc를 이용해 포자발아 억제능을 확인할 수 있었다(Fig. 5). Catechol type의 siderophore는 주로 *Bacillus* spp.에서 생산하는 것으로 보고 되어있으며, 이들은 주로 2,3-dihydroxybenzoate에 다양한 아미노산들이 결합된 구조들이 있으며, 이 중에서 2,3-dihydroxybenzoylglycine과 2,3-dihydroxybenzoic acid(Itoic

**Table 3. Effect of nitrogen sources on the production of siderophore from *B. subtilis* AH18.**

Nitrogen sources <sup>1</sup>	Cell growth (600 nm)	Final pH	Siderophore (µg/L)
Control <sup>3</sup>	0.371 ± 0.021	7.363 ± 0.006	14.6 ± 0.5
KNO <sub>3</sub>	0.424 ± 0.014	7.276 ± 0.014	4.0 ± 0.1
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.215 ± 0.018	7.154 ± 0.013	14.6 ± 0.4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.601 ± 0.010	7.318 ± 0.011	16.8 ± 0.6
NaNO <sub>3</sub>	0.350 ± 0.016	7.380 ± 0.017	3.2 ± 0.2
NaNO <sub>2</sub>	0.235 ± 0.003	7.347 ± 0.026	3.0 ± 0.2
NH <sub>4</sub> Cl	0.496 ± 0.014	7.21 ± 0.022	24.5 ± 0.3
Alanine	1.065 ± 0.011	7.401 ± 0.015	23.5 ± 0.5
Asparagine	0.563 ± 0.006	7.500 ± 0.024	26.5 ± 0.1
glutamic acid	0.576 ± 0.008	7.170 ± 0.015	14.3 ± 0.6
Urea	0.555 ± 0.009	7.605 ± 0.023	14.6 ± 0.6
Proteose peptone No.3	0.640 ± 0.011	7.560 ± 0.032	24.0 ± 0.3
Bacto peptone	0.516 ± 0.021	7.330 ± 0.015	14.8 ± 0.4
Tryptone	1.156 ± 0.018	7.423 ± 0.024	22.0 ± 0.2
Yeast extract	0.574 ± 0.010	7.623 ± 0.018	9.6 ± 0.5
Beef extract	0.357 ± 0.015	7.305 ± 0.021	18.6 ± 0.2
Malt extract	0.071 ± 0.009	7.357 ± 0.014	4.2 ± 0.3

<sup>1</sup>Nitrogen sources (0.1%) were added to the basal medium (0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% glucose, 0.05% sodium citrate·2H<sub>2</sub>O, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O).

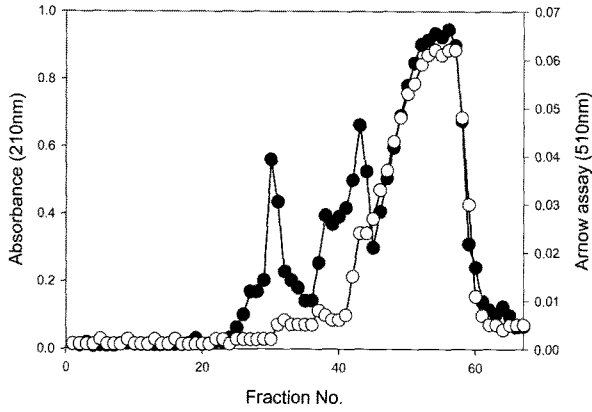
<sup>2</sup>Davis minimal medium (0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% sodium citrate·2H<sub>2</sub>O, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% glucose).

<sup>3</sup>Standard deviation.

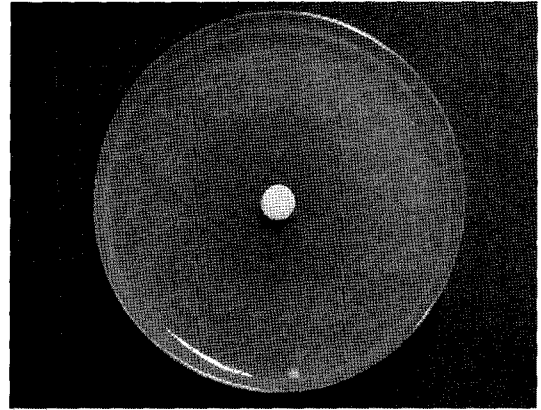
acid) 그리고 2,3-dihydroxybenzoylglycyl threonine들이 알려져 있다[2, 4, 11]. 따라서 *B. subtilis* AH18이 생산하는 siderophore 역시 2, 3-dihydroxybenzoate의 유도체로 추정되어진다.

#### Siderophore<sub>AH18</sub>의 구조분석.

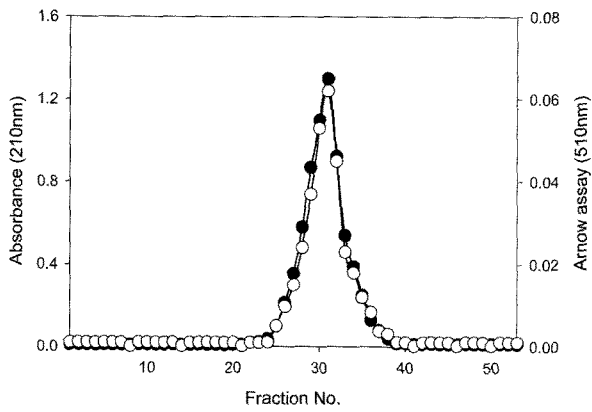
Siderophore<sub>AH18</sub>의 구조를 Quadrupole-TOF MS system과 NMR spectrum을 통해 분석하였다. 그 결과 <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ) spectrum에서는 6.71(1H, t, J=10.2 Hz, H-3, 3', 3''), 6.91(1H, dd, J=9.6 Hz, H-4, 4', 4''),



**Fig. 2.** Sephadex LH-20 gel filtration column chromatography (first) of the siderophore from *B. subtilis* AH18. ●, cell growth; ○, siderophore.

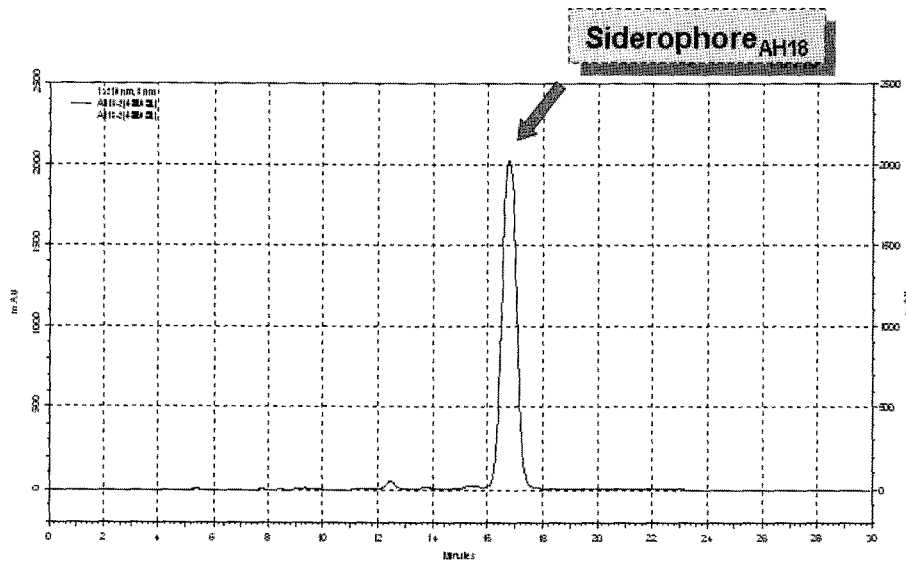


**Fig. 5.** Inhibition of red-pepper blight causing *P. capsici* zoospores by purified siderophore<sub>AH18</sub> on PDA.



**Fig. 3.** Sephadex LH-20 gel filtration column chromatography (second) of the siderophore from *B. subtilis* AH18. ●, cell growth; ○, siderophore.

7.30(1H, dd,  $J=10.0$  Hz, H-5, 5', 5''), 4.01(1H, dd,  $J=10.2$  Hz, H-8, 8', 8''), 4.37(1H, dd,  $J=9.9$  Hz, H-10, 10', 10''), 5.49(1H, q,  $J=10.0$  Hz, H-12, 12', 12''), 1.29(6H, dd,  $J=40.4$  Hz, H-13, 13', 13'')로 나타났으며(Fig. 6, 9),  $^{13}\text{C}$ -NMR(600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) spectrum에서는 148.2(C-1, 1', 1''), 146.0(C-2, 2', 2''), 116.0(C-3, 3', 3''), 118.8(C-4, 4', 4''), 118.6(C-5, 5', 5''), 118.5(C-6, 6', 6''), 168.6(C-7, 7', 7''), 42.9(C-8, 8', 8''), 171.7(C-9, 9', 9''), 58.0(C-10, 10', 10''), 170.2(C-11, 11', 11''), 71.2(C-12, 12', 12''), 16.1(C-13, 13', 13'')로 나타났고(Fig. 7, 9), Hybrid tandem mass spectrometer(Q-TOF MS system) 분석결과 883의 분자량을 확인하였다(Fig. 8). 이상의 결과들을 종합하면 siderophore<sub>AH18</sub>은 (2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine)<sub>3</sub>로 구성된 bacillibactin으로 확인되었다(Fig. 9). 이는 Glick 등과



**Fig. 4.** HPLC pattern of siderophore<sub>AH18</sub> purified from *B. subtilis* AH18. Siderophore<sub>AH18</sub> produced by *B. subtilis* AH18 were analyzed by HPLC (SHIMADZU Co., LC-10A, Japan), and using a  $\text{C}_{18}$  reversed-phase column (250×4.6 mm). Sample (20  $\mu\text{L}$ ) were eluted (1:1, v/v) with 100% methanol : 0.1% phosphoric acid. The flow rate was 2 mL/min. There were detected by UV-absorption at 210 nm.

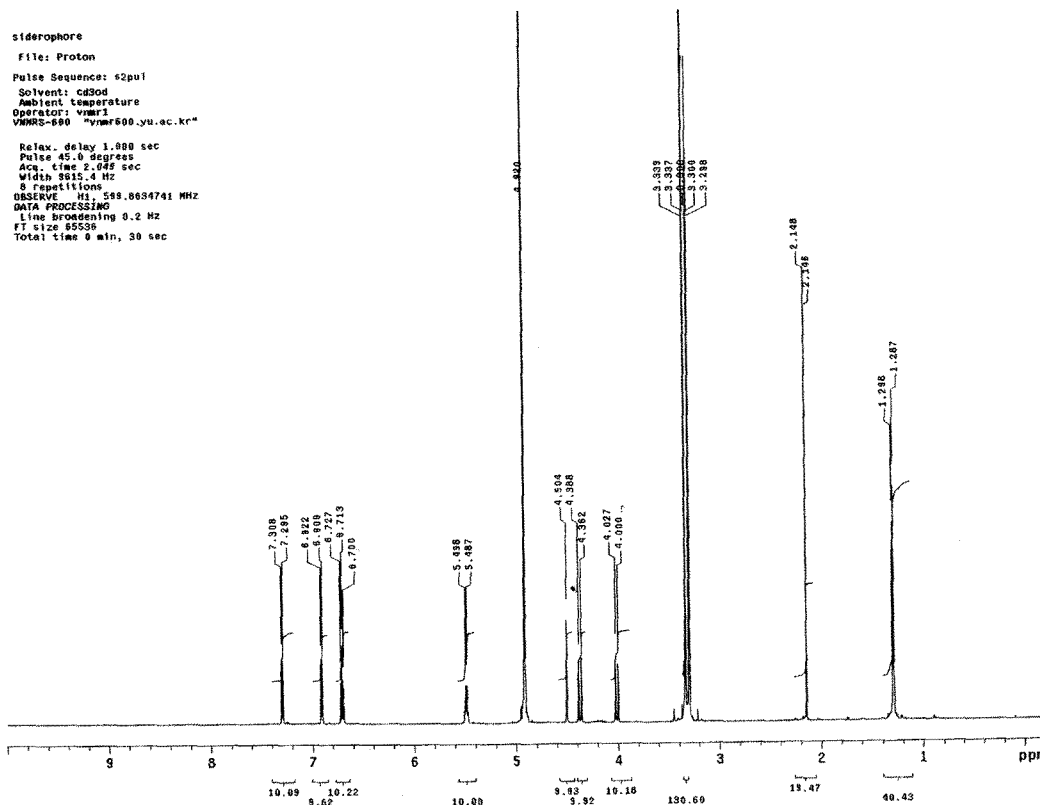


Fig. 6. <sup>1</sup>H-NMR spectrum (600 MHz) of the siderophore<sub>AH18</sub>.

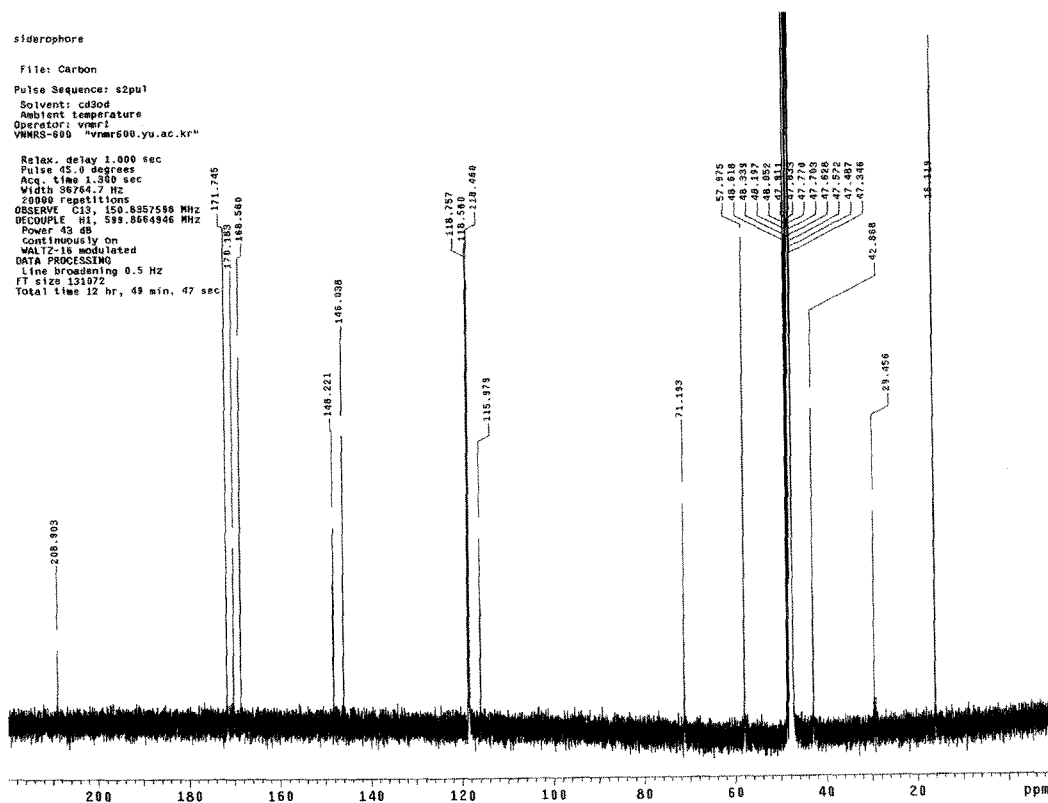


Fig. 7. <sup>13</sup>C-NMR spectrum (600 MHz) of the siderophore<sub>AH18</sub>.

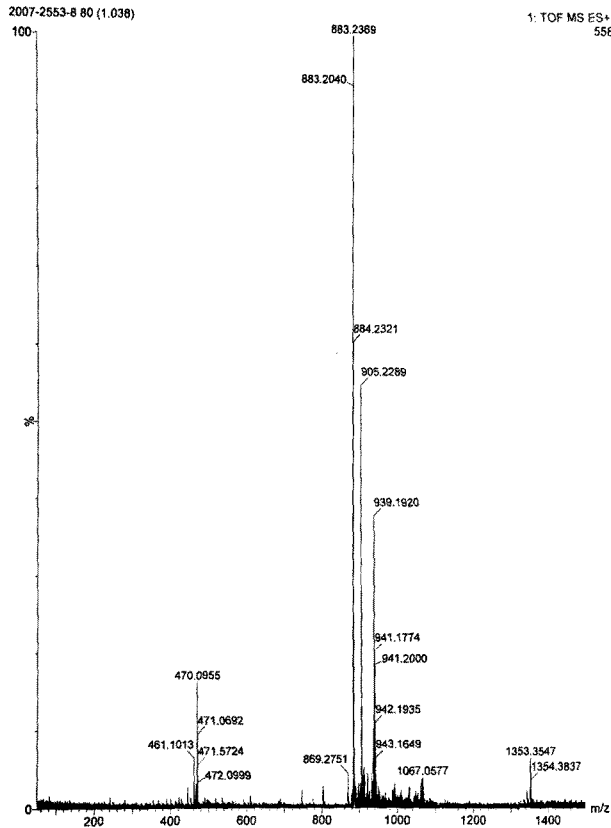


Fig. 8. Quadrupole-TOF MS spectrum of the siderophore<sub>AH18</sub>.

Miethke 등이 보고[7, 11]한 *Bacillus subtilis*가 생산한다고 보고된 siderophore와 동일하였다.

**In vivo pot test에서 고추역병의 방제능 확인.**

*B. subtilis* AH18[13, 42]과 고추역병을 유발하는 *P. capsici*를 대치배양을 통한 *P. capsici*의 균사생장 억제능 측정결과 강력한 억제능을 관찰하였다(Fig 10). 그리고 고추를 이식한 in vivo pot test에서 고추역병에 대한 방제력 (55%)을 확인하였다(Fig. 11). 식물성장촉진 생물방제균인 *B. subtilis* AH18을 미생물비료로 경작지에 적용한다면 토양전염성 질병의 방제와 함께 그들이 생산하는 옥신류로 인한 작물의 생육촉진으로 친환경 농산물의 수확시기를 당김으로 농가에 수익 증대 효과를 줄 수 있을 것으로 사료된다.

**요 약**

*Bacillus subtilis* AH18균주는 auxin, siderophore 그리고 cellulase를 동시에 생산하는 PGPR 균주이자 생물방제균주로 항진균성 siderophore의 특성을 확인한 결과 catechol type의 siderophore로 확인하였다. Siderophore<sub>AH18</sub>의 정제는 Amberlite XAD-2, sephadex LH-20 column chromatog-

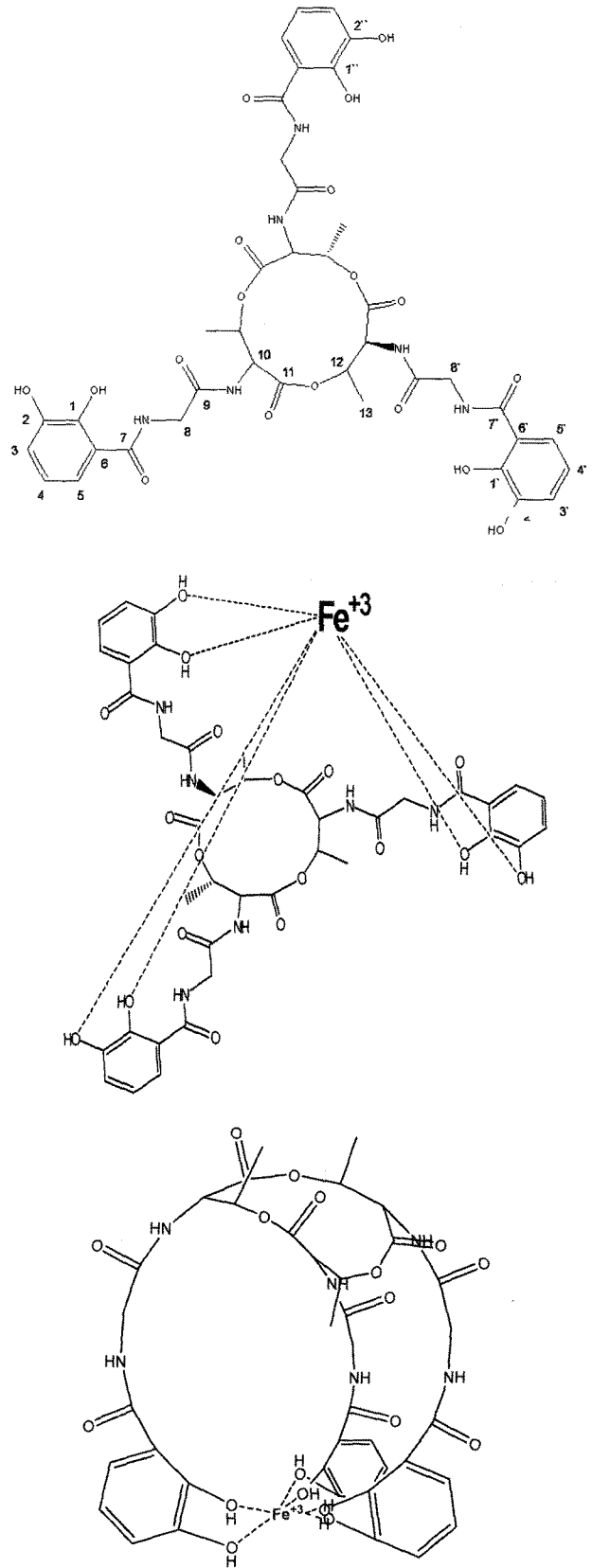


Fig. 9. Chemical structures of the siderophore<sub>AH18</sub>.

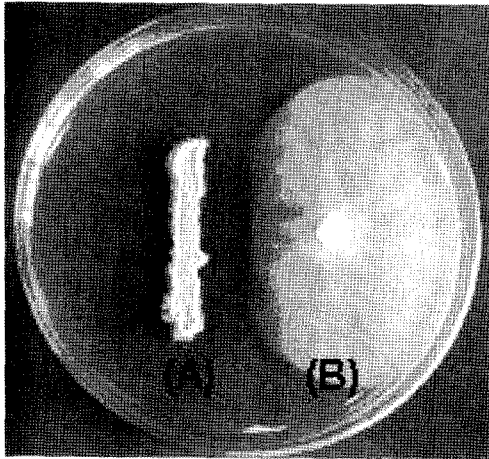


Fig. 10. Growth inhibition of *P. capsici* by *B. subtilis* AH18 on PDA. A, *Phytophthora capsici*; B, *B. subtilis* AH18.

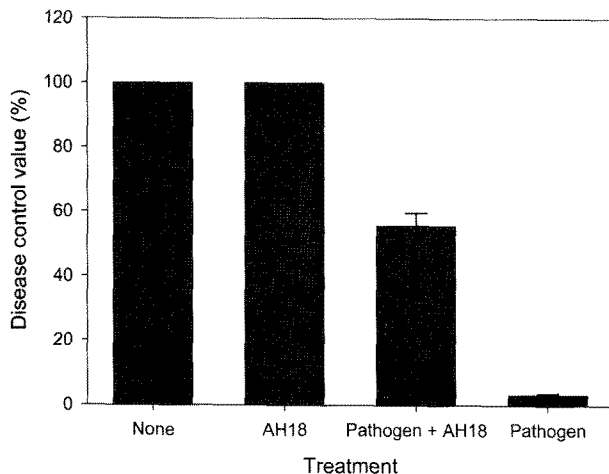


Fig. 11. Suppression of *Phytophthora* blight disease in red-pepper by *B. subtilis* AH18. Error bars represent the standard deviation of seven replications.

raphy 그리고 HPLC를 통해 정제 및 정제여부를 확인하였으며, GC-MS, <sup>1</sup>H-NMR, 그리고 <sup>13</sup>C-NMR을 통해 구조 및 분자량을 확인하였다. 그 결과 *B. subtilis* AH18이 생산하는 siderophore은 분자량 883의 bacillibactin임을 확인하였으며, 포자발아억제활성을 나타냄을 확인하였다. *B. subtilis* AH18은 *P. capsici*에 의한 고추역병을 효과적으로 방제하였으며(방제력 55%), 이는 bacillibactin에 의한 효과가 포함되리라 추측된다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 Biogreen 21 사업(과제번호:105649) 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

1. Arnow, L. E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* **118**: 531-537.
2. Bergeron, R. J., and J. S. McManis. 1991. *Synthesis of catecholamide and hydroxamate siderophore*. In CRC Handbook of Microbial Iron Chelates, (ed) G. Winkelmann, CRC Press, Boca Raton, Fl. pp. 271-307.
3. Imamura, N., T. Ishikawa, T. Ohtsuka, K. Yamamoto, M. Dekura, H. Fukami, and R. Nishida. 2000. An antibiotic from *Penicillium* sp. covering the cocoon of the leaf-rolling moth, dactyloglypha tonica. *Biosci. Biotech. Bioch.* **64**: 2216-2217.
4. Crosa, J. H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 517-530.
5. Csaky, T. 1948. On the estimation of bound hydroxylamine. *Acta Chem. Scand.* **2**: 450-454.
6. Garner, B. L., J. E. L. Arceneaux, and B. Rowe Byers. 2004. Temperature control of 3,4-dihydroxybenzoate (potocatechuate)-based siderophore in *Bacillus anthracis*. *Curr. Microbiol.* **49**: 89-94.
7. Glick, B. R., C. L. Patten, G. Patten, and D. M. Penrose. 1999. *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria*. Imperial College Press. Canada.
8. Han, K. H., C. U. Lee, and S. D. Kim. 1999. Antagonistic role of chitinase and antibiotic produced by *Promicromonospora* sp. KH-28 toward *F. oxysporum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 349-353.
9. Hider, R. C. 1984. Siderophore mediated absorption of iron. *Struct. Bonding.* **58**: 25-87.
10. Miethke, M., O. Klots, U. Linne, J. J. May, C. L. Beckering, and M. A. Marahiel. 2006. Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **61**: 1413-1427.
11. Jeong, D. H., K. D. Park, S. H. Kim, K. R. Kim, S. W. Choi, J. T. Kim, K. H. Choi, and J. H. Kim. 2004. Identification of *Streptomyces* sp. producing antibiotics against phytopathogenic fungi, and its structure. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 212-215.
12. Jung, H. K., J. C. Ryoo, and S. D. Kim. 2005. A multi-microbial biofungicide for the biological control against several important plant pathogenic fungi. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**: 40-47.
13. Jung, H. K., J. R. Kim, S. M. Woo, and S. D. Kim. 2006. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-Producing biocontrol activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 94-100.
14. Jung, H. K., J. R. Kim, S. M. Woo, and S. D. Kim. 2006. Selection of the auxin, siderophore, and cellulase-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanisms. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**:



- 23-28.
15. Jung, H. K., and S. D. Kim. 2004. Selection and antagonistic mechanism of *Pseudomonas fluorescens* 4059 against phytophthora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 312-316.
  16. Kang, S. J., J. H. Kim, and G. J. Joo. 2005. Isolation of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* and physicochemical properties of compost mixed with microbial formulation. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **23**: 342-350.
  17. Katiyar, V., and G. Reeta. 2004. Improved plant growth from seed bacterization using siderophore overproducing cold resistant mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 653-657.
  18. Kim, K. Y., and S. D. Kim. 1997. Biological control of *Pyricularia aryzae* blast spot with the antibiotic substances produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 396-402.
  19. Kwon, D. H., J. H. Choe, H. K. Jeong, J. H. Lim, G. J. Ju, and S. D. Kim. 2004. Selection and identification of auxin-producing plant growth promoting rhizobacteria having phytopathogen antagonistic activity. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**: 17-21.
  20. Lee, E. T., and S. D. Kim. 2000. Selection and antifungal activity of antagonistic bacterium *Pseudomonas* sp. 2112 against red-pepper rotting *Phytophthora capsici*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 334-340.
  21. Lee, I. K., C. J. Kim, S. D. Kim, and I. D. Yoo. 1990. Antifungal antibiotic against fruit rot disease of red pepper form *Streptomyces parvullus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 142-147.
  22. Lee, J. M., E. S. Do, S. B. Baik, and S. C. Chun. 2003. Effect of organic amendments on efficacy of biological control of seedling damping-off of cucumber with several microbial products. *The Kor. J. Mycol.* **31**: 44-49.
  23. 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. Biotechnol.* **27**: 427-432.
  24. Lee, M. W. 1997. Root colonization by beneficial *Pseudomonas* spp. and bioassay of suppression of *Fusarium wilt* of radish. *The Kor. J. Mycol.* **25**: 10-20.
  25. Lee S. Y., S. B. Lee, Y. K. Kim, and H. G. Kim. 2004. Effect of agrochemicals on mycelial growth and spore germination of a hyperparasite, *Ampelomyces quisqualis* 94013 for controlling cucumber powdery mildew. *Kor. J. Pesti. Sci.* **8**: 71-78.
  26. Leoffler, W. J., S. M. Tschen, N. Vanittanakom, M. Kugler, E. Knorpp, T. F. Hsieh, and T. G. Wu. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F29-3: a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* **115**: 204-213.
  27. 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. Biotechnol.* **12**: 249-257.
  28. Lim, H. S. and S. D. Kim. 1995. The role and characterization of  $\beta$ -1,3-glucanase in biocontrol of *Fusarium solani* by *Pseudomonas stutzeri*. *J. Microbiol.* **33**: 295-304.
  29. Lim, H. S. and S. D. Kim. 1997. Role of siderophore in biocontrol of *Fusarium solani* and enhanced growth response of Bean by *Pseudomonas fluorescens* GL20. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 13-20.
  30. Liu, L., J. W. Kloepper, and S. Tuzun. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology.* **85**: 1064-1068.
  31. Neilands, J. B. 1984. Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiol. Sci.* **1**: 9-14.
  32. Paulitz, T. C. and J. E. Loper. 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Phythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathology.* **81**: 930-935.
  33. Payne, S. M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophore. *Method. Enzymol.* **235**: 329-344.
  34. Ping, L., and W. Boland. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Pla. Sic.* **9**: 263-266.
  35. Scher, F. M., and R. Baker. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium wilt* pathogens. *Phytopathology.* **72**: 1567-1573.
  36. Schottel, J. L., K. Shimizu, and L. L. Kinkel. 2001. Relationships of *in vitro* pathogen inhibition and soil colonization to potato scab biocontrol by antagonistic *Streptomyces* spp. *Biol. Control.* **20**: 102-112.
  37. Schyn, B. and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Anal. Biochem.* **160**: 47-56.
  38. Sturtevant, D. B. and B. J. Taller. 1989. Cytokinin production by *Rhizobium japonicum*. *Plant Physiol.* **39**: 1247-1452.
  39. Temirov, Y. V., T. Z. Esikova, I. A. Kashparov, T. A. Balashova, L. M. Vinokurov, and Y. B. Vinokurov. 2006. A catecholic siderophore produced by the thermoresistant *Bacillus licheniformis* VK21 strain. *Rus. J. Bioorg. Chem.* **26**: 542-549.
  40. van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker, and C. M. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathology.* **36**: 453-483.
  41. Weinberg, E. D. 1974. Iron and susceptibility to infectious disease. *Science.* **184**: 952-956.
  42. Woo, S. M., H. K. Jung, and S. D. Kim. 2006. Cloning and Characterization of a cellulase gene from a plant growth promoting rhizobacterium, *Bacillus subtilis* AH18 against phytophthora blight disease in red-pepper. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 311-317.
  43. Woo, S. M., J. U. Woo, and S. D. Kim. 2007. Purification and characterization of the siderophore from *Bacillus*

- licheniformis* K11, a multi-functional plant growth promoting rhizobacterium. *Kor. J. Microbial. Biotechn.* **35**: 128-134.
44. Woo, S. M. and S. D. Kim. 2007. Confirmation of non-siderophore antifungal substance and cellulase from *Bacillus licheniformis* K11 containing antagonistic ability and plant growth promoting activity. *J. Life. Science.* **17**: 983-989.
45. 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. Microbial. Biotechnol.* **29**: 186-193.

**(Received Oct. 20, 2008/Accepted Nov. 29, 2009)**