

## Bacillus subtilis GDYA-1로부터 분리한 benzoic acid의 식물병원성 곰팡이에 대한 항균활성

윤미영<sup>1,2</sup> · 서국화<sup>3</sup> · 이상현<sup>3</sup> · 최경자<sup>1</sup> · 장경수<sup>1</sup> · 최용호<sup>1</sup> · 차병진<sup>2</sup> · 김진철<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한국화학연구원 친환경신물질연구그룹, <sup>2</sup>충북대학교 식물의학과, <sup>3</sup>(주)지디

### Antifungal Activity of Benzoic Acid from Bacillus subtilis GDYA-1 against Fungal Phytopathogens

Mi-Young Yoon<sup>1,2</sup>, Kook Hwa Seo<sup>3</sup>, Sang Heon Lee<sup>3</sup>, Gyung Ja Choi<sup>1</sup>, Kyoung Soo Jang<sup>1</sup>, Yong Ho Choi<sup>1</sup>, Byeongjin Cha<sup>2</sup> and Jin-Cheol Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ecofriendly New Materials Research Group, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-605, Korea

<sup>2</sup>Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

<sup>3</sup>Green Dynamics Corp., Gwang-Ju 506-253, Korea

(Received on May 25, 2012; Revised on June 14, 2012; Accepted on June 15, 2012)

A bacterial strain antagonistic to some fungal phytopathogens was isolated from the stem of a Persimmon tree in Yeongam, Korea. This bacterium was identified as *Bacillus subtilis* by 16S rRNA gene sequencing and designated as *B. subtilis* GDYA-1. In *in vivo* experiment, the fermentation broth exhibited antifungal activities against *Magnaporthe oryzae* on rice plants, *Phytophthora infestans* on tomato plants, and *Puccinia recondita* on wheat plants. We isolated one antifungal compound and its chemical structure was determined by mass and <sup>1</sup>H-NMR spectral data. The antifungal substance was identified as benzoic acid. It inhibited mycelial growth of *M. oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, and *P. capsici* with minimum inhibition concentration (MIC) values, ranging from 62.5 to 125 µg/ml. Moreover, the substance effectively suppressed *Phytophthora* blight of red pepper caused by *P. capsici* in a pot experiment. To the author's knowledge, this is the first report on the antifungal activity of benzoic acid against phytopathogenic fungi. Benzoic acid and *B. subtilis* GDYA-1 may contribute to environmental-friendly protect crops from phytopathogenic fungi.

**Keywords** : Biological control, Biopesticides, Plant diseases

## 서론

지금까지 농작물의 보호를 위해서 유기합성 농약을 기초로 한 화학방제 시스템이 주가 되어 왔으나, 친환경농업에 대한 관심이 집중되면서 다양한 미생물을 이용한 식물병 방제 방법이 활발히 연구되고 있다(Park, 2011). 식물병원균에 대한 미생물의 항균 기작으로는 진균의 세포벽을 분해하는 용균작용(Kim 등, 1997; Leoffler 등, 1986; Woo 등, 2007), 생육공간에서 영양분과 같은 생육에 필

요한 인자와 경쟁함으로써 병원균의 생육 및 증식을 억제하는 경쟁적 길항작용이 있으며(Jung 등, 2006; Neilands, 1984; Paulitz와 Loper, 1991; Scher과 Baker, 1982), 이 중에서 병원균의 생장을 직접적으로 억제하는 항생물질의 생산에 의한 길항작용이 생물학적 방제법으로 가장 널리 이용되고 있다(Katz와 Demain, 1977; Omura, 1992).

특히, 식물병에 대한 생물적 방제제로 많이 사용하고 있는 *Bacillus* 속 균주들은 인간에게 비병원성이고, 내생 포자를 가지고 있는 Gram 양성 세균으로 유전자 조작이 가능하며 배양이 용이한 특성을 가지고 있다. 뿐만 아니라 protease, amylase, glucanase 및 cellulase 등의 각종 효소나 다양한 구조를 지닌 항균활성물질 그리고 아미노산 등을 생산하는 것으로 보고되어 있어 산업적으로 중요한

\*Corresponding author

Phone) +82-42-860-7436, Fax) +82-42-861-4913

Email) kjinc@kriict.re.kr

속으로 생물 산업에서 숙주균으로 활발히 이용되고 있다 (Schallmey 등, 2004). 식물병에 대한 생물적 방제제로 *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. subtilis* 등이 이용되고 있으며, *B. subtilis*에 관한 연구가 가장 많이 보고되고 있다. Thu Hang(2005)은 *B. subtilis* S1-0210을 이용한 *Botrytis cinerea*의 균사 생육 저해활성을 확인하였고, Lee 등(2006)은 *B. subtilis* 122와 *Trichoderma harzianum* 23 수화제를 이용하여 마늘 흑색썩음균핵병의 생물학적 방제효과를 보고하였다. Nam 등(2009)은 *B. subtilis* KB-401로부터 감귤 검은점무늬병인 *Diaporthe citri*의 균사생장과 포자발아 억제활성을 확인하였고, Nam 등(2010)은 *B. subtilis* KB-401 수화제를 이용하여 오이 흰가루병 방제효과를 확인하였다. Lee 등(2011)은 *B. subtilis* S54 균주를 이용한 고추 역병과 탄저병의 생물학적 방제에 대해 보고하였다.

*B. subtilis*에 의해 생산되는 항균물질들은 생합성 기작에 따라 ribosomal peptide antibiotics와 nonribosomal peptide antibiotics의 두 종류로 분류할 수 있으며, subtilin, subtilosin A, sublancin은 ribosomal peptide antibiotic에 속하며 항세균활성이 보고되었고, iturin, surfactin, fengycin, plipastatin, bacilysin, phosphono-oligopeptide, rhizocin 등은 nonribosomal peptide antibiotics에 속하며 항세균 및 항진균활성이 보고되었다(Stein, 2005). *B. subtilis*는 이미 외국에서 인축에 대한 안전성이 입증되어 생물학적 방제제로 널리 이용되고 있으며, 현재 *B. subtilis*를 이용한 Serenade(AgraQuest, Davis, CA, USA), Kodiak (Gustafson, Plano, TX, USA), Subtilex(Beker Underwood, Ames, IA, USA)는 미생물 살균제로 개발되어 종자처리제나 엽면살포제로서 식물병 방제에 활용되고 있다(Lange 등, 1993; Powel과 Jutsum, 1993).

본 연구에서는 전라남도 영암지역의 감나무 줄기로부터 분리한 *B. subtilis* GDYA-1 균주를 이용하여 다양한 식물병에 대한 *B. subtilis* GDYA-1의 *in vivo* 항균활성을 조사한 다음, 항진균활성을 나타내는 물질을 분리·동정하였다. 또한 동정한 항균물질 benzoic acid의 *in vitro* 및 *in vivo* 항균활성을 조사하여 *B. subtilis* GDYA-1 균주의 미생물 살균제로서의 가능성을 타진하였다.

## 재료 및 방법

**사용 균주.** 전라남도 영암지역의 감나무 줄기로부터 분리한 *B. subtilis* GDYA-1를 사용하였다. GDYA-1 균주는 20% glycerol에 현탁하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 실험에 이용하였다.

**시약.** Benzoic acid 표준품은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였다. 표준용액의 조제 및 시료의 추출용매(methanol, ethyl acetate, acetonitril, *n*-butanol, chloroform)는 Merck사(Darmstadt, Germany)의 HPLC급을 사용하였고, phenylacetic acid, streptomycin sulfate, trifluoroacetic acid는 Sigma사의 특급시약을 사용하였다.

**분리균주의 동정.** 선발된 균주의 동정은 형태학적 특성으로 그람 염색 및 포자 형성 관찰을 통하여 일차적으로 균주를 동정하였으며, 16S rRNA 유전자 염기서열 결정과 균체 세포벽의 지방산 조성은 Microbial Identification System(MIS, HP6890 GC, Microbial ID, USA)을 이용하여 분석한 후 최종적으로 분리균주의 동정을 시행하였다. 분리균주의 16S rRNA 유전자 sequencing은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 분리균주의 chromosomal DNA의 분리는 benzyl chloride 방법을 변형하여 수행하였으며(Heng 등, 1993), 16S rRNA 유전자 염기서열 분석은 Universal PCR primer 27F(5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5-GGTTACCTTGTACGACTT-3')로 합성하여 분리균의 16S rRNA 유전자 단편을 PCR로 증폭한 후 PCR 산물은 PCR product purification kit(Qiagen, USA)를 사용하여 정제하였으며, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열은 DDBJ/NCBI/Genebank와 Ribosomal Database Project II (RDP II)의 database에서 상동성을 검색하여 분석하였다.

***In vivo* 항균활성 검정.** 다양한 식물병에 대한 접종 하루 전 *B. subtilis* GDYA-1 균주의 배양액 처리에 따른 예방효과를 조사하였다. 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병, 밀 붉은녹병, 보리 흰가루병, 고추 탄저병을 포함한 7가지 식물병을 대상으로 실험하였다. 우선, *B. subtilis* 균주를 tryptic soy broth(TSB; Beckton Dickinson and Co., MD, USA)에 접종한 다음  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 3일간 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양액을 증류수로 3배씩 희석한 40 ml의 희석액에 Tween 20을  $250\ \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가한 후, 대상 식물인 벼와 토마토, 밀, 보리 그리고 고추에 각각 처리하고 풍건한 다음 실온에서 1일 동안 방치하였다. 벼의 경우 전착력을 증진하기 위하여 배양액을 살포하기 4시간 전에 Tween 20을  $250\ \mu\text{g/ml}$ 의 용액을 미리 살포한 다음 상온에 건조하였다. 실험에 사용한 벼와 토마토, 밀, 보리 그리고 고추는 지름 4.5 cm의 플라스틱 포트에 수도용 상토 또는 원예용 상토를 70% 정도 채운 후, 종자를 파종하여  $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ 의 온실에서 1주 내지 4주간 재배하였다. 배양액 처리 하루 후에

처리된 각각의 식물체에 병원균을 접종한 후 3일 내지 8일 후에 발병도를 조사하였다(Cho 등, 2006; Kim 등, 2001). 각각의 실험은 3반복으로 실시하였고, 실험은 두 번 반복하여 실시되었다.

**항균물질의 분리.** 식물병원균에 대해 항균활성을 가진 *B. subtilis* GDYA-1 균주로부터 항균물질의 분리를 실시하였다. *B. subtilis* GDYA-1 균주를 TSB 배지에서 3일간 30°C, 150 rpm으로 5 l를 배양하였다. 배양액(5 l)을 8,000 rpm, 10 min, 4°C로 원심분리하여 균체와 상정액을 분리하였다. 분리된 상정액을 ethyl acetate, *n*-butanol 순서로 각각 2회 추출 및 분획하여 ethyl acetate 추출물과 *n*-butanol 추출물을 얻었고, 이를 methanol로 100 mg/ml과 300 mg/ml 농도로 용해한 다음 벼 도열병균에 대하여 생물검정을 실시하였다. 벼 도열병균에 대한 생물검정은 7일간 25°C, 150 rpm으로 potato dextrose broth(PDB: Beckton Dickinson and Co.) 배지에 배양한 도열병균을 blender를 이용하여 10초간 마쇄한 다음, 마쇄액을 potato dextrose agar(Beckton Dickinson and Co.) 배지에 1% 접종하고 잘 흔들어준 다음 48-well plate에 990 µl씩 분주하였다. 각 시료를 최종 농도가 1,000과 3,000 µg/ml이 되도록 처리하였고, 25°C에서 3-4일간 배양한 다음 최소저해농도를 조사하였다.

그 결과 ethyl acetate 추출물이 활성을 나타내는 것을 확인하였고, 이로부터 항균물질을 분리하기 위하여 preparative TLC를 이용하였다. 분획물을 전개용매(chloroform:methanol:water=30:9:1, v/v/v)로 전개한 후 8개의 분획물로 나누었고, 이것을 상기에서 제시한 *in vitro* 실험방법을 통해 실험을 실시하였다. 그 결과 8개의 분획물중 2번 분획물에서 항균활성이 나타나는 것을 확인하였고 최종적으로 compound A라 명명한 물질을 순수하게 분리하였다. 분리한 물질 compound A의 순도를 조사하기 위하여 다음과 같은 조건으로 HPLC 분석을 실시하였다; column: Symmetry C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm), 용출용매: 10% acetonitrile+0.1% trifluoroacetic acid: acetonitrile+0.1% trifluoroacetic acid, 분석조건: 10% B에서 50% B로 15분간 gradient 분석 후 100% B로 5분간 gradient 분석, 유속: 1 ml/min, 주입량: 10 ml, 검출과장: 272 nm.

**기기분석.** 분리한 물질의 구조를 동정하기 위하여 질량분석 및 핵자기공명분석을 실시하였다. 질량분석은 electron impact(EI)와 chemical ionization(CI) mode로 질량분석기(JEOL JMS-DX303; JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 Bruker AMX-500(500 MHz) NMR spectrometer(Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten, Germany)로 측정하였고, tetramethylsilane(TMS)를 internal standard로 이용하였다.

***In vitro* 항균활성 검정.** 벼 도열병균(*Magnaporthe oryzae*), 벼 잎집무늬마름병균(*Rhizoctonia solani*), 토마토 잿빛곰팡이병균(*B. cinerea*), 고추 탄저병균(*Colletotrichum coccodes*), 오이 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*), 무 위 황병균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*), 고추 역병균(*Phytophthora capsici*) 등 7개의 식물병원성 곰팡이에 대한 성장 저해활성을 조사하였다. 검정용 배지로는 PDB배지를 사용하였고, 48-well plate에 PDB 배지를 990 µl 분주한 후 10 µl의 시료를 처리한 후 각각의 식물 병원성 곰팡이의 agar plug를 접종하였다. 대상 식물병원균의 성장속도에 따라 3일 내지 5일간 배양한 다음 최소저해농도(MIC)를 측정하였으며, 3반복으로 실시하였다(Yoon 등, 2011).

**고추 역병 방제 효과 검정** 고추 역병에 대한 방제효과 실험은 20°C의 oatmeal(oatmeal 60 g, agar 12.5 g, D.W. 1 l) 배지에서 배양한 고추 역병균(*P. capsici*)의 공중 균사를 제거하고, 25°C에서 24시간 형광등을 쬐어 유주자낭을 형성시켰다. 멸균수로 수확한 고추 역병균의 유주자낭의 농도를 1×10<sup>4</sup> sporangia/ml로 조절한 후 4°C에 1시간 보관하여 유주자를 유출시킨 다음, 유주자 현탁액을 주당 약 30 ml씩 엽면 분무 접종하였다. 분무 접종한 후 25°C의 습실상에서 1일간 습실 처리하고 25°C의 항온습실(광:암=12 h:12 h)에서 배양하여 발병을 관찰하였다. 발병 지수는 고추 역병이 발병하지 않았을 때 0, 엽면 면적률이 1%에서 5%의 발병 지수를 1로 하고, 병반면적률이 5.1%에서 25% 정도일 때의 발병지수를 2, 25.1%에서 50%일 경우를 3, 50% 이상일 때를 4로 결정하였다. 동일한 실험을 5반복으로 2회 실시하였다.

**통계처리.** 모든 결과는 PROC GLM procedure(SAS institute, Cary, NC)를 사용하여 통계 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준편차(SD)로 표시하였고, 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 F 값을 구하고 Duncan's multiple range test(*P*=0.05)를 이용하여 대조군과 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다.

## 결과 및 고찰

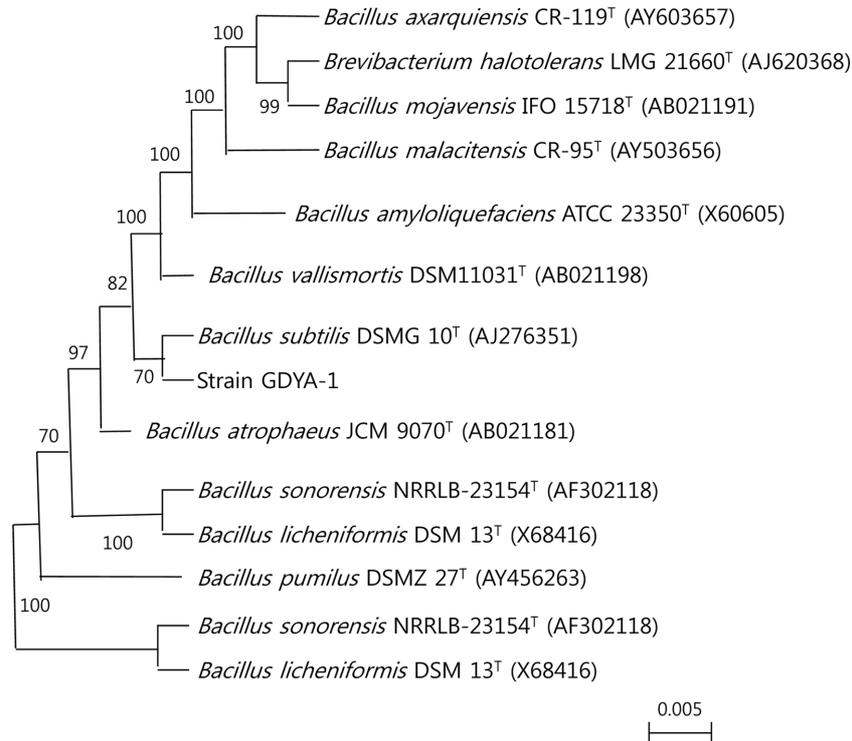
**길항미생물 동정.** 최종 선별한 항진균 활성을 가지는 균주인 GDYA-1를 nutrient broth agar(Beckton Dickinson and Co.) 배지를 이용하여 30°C에서 2일간 순수 배양한 후 생화학적 특성을 조사하였다. 그 결과, 내생포자를 형성하는 Gram positive의 간균이었으며, 16S rRNA 유전자 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석결과, *Bacillus* sp.

의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서, *B. subtilis* DSM 10T(AJ276351)와 99.56%의 상동성을 나타내었다. 이상의 방법으로 동정한 결과 *B. subtilis*로 동정되었기 때문에 본 연구자들에 의해 *B. subtilis* GDYA-1로 명명되었다(Fig. 1).

**In vivo 항균활성 검정.** *B. subtilis* GDYA-1 균주의 배양액을 원액, 1/3, 1/9과 1/27로 희석하여 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 역병, 토마토 잿빛곰팡이병, 밀 붉은녹병, 보리 흰가루병 및 고추 탄저병의 7가지 식물병

에 대하여 *in vivo* 항균활성 검정을 실시하였다. 그 결과, *B. subtilis* GDYA-1 균주 배양액의 원액은 시험한 7가지 식물병중에 밀 붉은녹병에 대해 87%의 방제활성을 보였으며, 벼 도열병, 토마토 잿빛곰팡이병에 대해 75%, 고추 탄저병에 대해 65%의 방제활성을 보였다. 배양액을 1/3로 희석하여 살포한 경우에는 밀 붉은녹병 및 고추 탄저병에 대해서만 65% 이상의 활성을 보였고, 다른 식물병에 대해서는 비교적 낮은 방제활성을 보였다(Table 1).

**항균물질의 구조 동정.** *B. subtilis* GDYA-1 균주의 ethyl



**Fig. 1.** Phylogenetic tree for strain GDYA-1 and related organisms based on 16S rRNA sequences. The distances were calculated using the neighbor-joining method. Bootstrap values based on 1,000 replications are indicated above the branches and the scale bar represents 0.05 nucleotide substitutions per site.

**Table 1.** *In vivo* antifungal activities of the fermentation broth of *Bacillus subtilis* GDYA-1 against seven phytopathogens<sup>a</sup>

Dilution	Control value (%) <sup>b</sup>						
	RCB <sup>c</sup>	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM	RPA
Fermentation broth	75a	31a	45a	75a	87a	0a	65a
3-fold	25b	19b	36b	21b	67b	0a	65a
9-fold	0c	0c	45a	21b	20c	0a	25b
27-fold	0c	0c	45a	7c	0d	0a	0c

<sup>a</sup>Seedlings were inoculated with spores or mycelial suspensions of the test organism 1 day after various dilutions of the fermentation broth from *Bacillus subtilis* GDYA-1 were sprayed on the leaves to run off.

<sup>b</sup>Control value (%) =  $100 \times (\text{disease severity of untreated plants} - \text{disease severity of treated plants}) / \text{disease severity of untreated plants}$ . Each value represents the mean  $\pm$  standard deviation of two runs with three replicates each. Control values with the same lower case letter's are not significantly different ( $P=0.05$ ) in each column, according to the Duncan's multiple range test.

<sup>c</sup>RCB: rice blast, RSB: rice sheath blight, TGM: tomato grey mold, TLB: tomato late blight, WLR: wheat leaf rust, BPM: barley powdery mildew, RPA: red pepper anthracnose.

acetate 추출물로부터 분리한 compound A의 구조를 동정하기 위하여 EI 질량분석을 실시하였다. 그 결과 molecular ion [M<sup>+</sup>]이 m/z 122에서 나타났으며, 특징적인 분절이온이 m/z 105([M-17]<sup>+</sup>, base peak), 77(M-45), 51(M-71)에서 나타났다(Fig. 2). CI 질량분석을 실시한 결과 [M+H]<sup>+</sup> 이온이 123에서 나타남에 따라 분자량이 122로 결정되었다. 이 항균물질의 구조를 확인하기 위하여 CDCl<sub>3</sub>를 용매로 사용하여 <sup>1</sup>H-NMR 분석을 실시한 결과, δ<sub>H</sub> 8.10(2H, d, J=7.5 Hz, H-3,5), 7.58(2H, t, J=7.5 Hz, H-2,6), 7.34(1H, t, J=12.5, 7.5 Hz, H-1), 3.48(1H, s, -OH)에서 proton이 관찰되었다. 이상의 질량분석과 핵자기공명분석 결과 분리한 compound A는 분자식이 C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>이고, 분자량이 122인 benzoic acid로 동정되었다(Fig. 2).

Liang(1998)에 의해서 Bacillus속 균주와 Lactobacillus속 균주로부터 benzoic acid의 생성에 대한 보고가 있었을 뿐만 아니라 다른 학자들에 의해서 Bacillus속 균주에 의한 benzoic acid 생산에 대한 연구는 전무한 실정이다.

**Benzoic acid 생산 여부 확인.** 분리한 benzoic acid가 B. subtilis GDYA-1 균주로부터 생산된 물질인지를 확인하기 위하여 표준물질로 benzoic acid를 사용하여 상기 나타낸 방법으로 HPLC 분석을 실시하였다. 그 결과, B. subtilis GDYA-1 균주를 배양하기 전 배지에서는 benzoic acid가 검출되지 않는 것을 확인하였으며, B. subtilis GDYA-1 균주를 배양한 후의 배지에서는 benzoic acid가 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이 배양액을 ethyl acetate로 분획한 시료에서도 benzoic acid가 검출되는 것

을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 B. subtilis GDYA-1 균주는 benzoic acid를 생산하는 것을 알 수 있었다.

Sieber 등(1995)이 보고한 바에 의하면 저분자량의 carboxylic acid들은 대사과정 중 쉽게 생성될 수 있는 물질들로 미생물에 의한 대사산물로 생성되기도 한다고 보고하였다. Hwang 등(2001)은 Streptomyces humidus로부터 benzoic acid 유도체인 phenylacetic acid와 sodium phenylacetate의 생산을 확인하였으며, Kim 등(2004)은 청국장으로부터 분리된 B. licheniformis가 생산하는 phenylacetic acid의 항균활성을 보고하였다. 또한 Yang 등(2011)은 Bacillus sp. BS107 균주가 유도저항성인자로서 2-aminobenzoic acid를 생산한다고 보고하였다.

**Benzoic acid의 in vitro 항균활성 검정.** B. subtilis GDYA-1 배양액으로부터 분리한 benzoic acid의 다양한 식물병원성 곰팡이에 대한 균사생장 저해효과를 구조가 유사하면서 항균활성물질로 알려진 phenylacetic acid와 비교하였다. 각각의 물질은 methanol에 6.25, 12.5, 25와 50 mg/ml 수준으로 용해한 후 최종농도가 62.5, 125, 250과 500 µg/ml이 되도록 처리하였다. 그 결과, 전체적으로 benzoic acid는 phenylacetic acid에 비하여 높은 균사생육 저해 활성을 보였다(Table 2). 두 물질은 난균강균인 P. capsici에 대하여 가장 강한 균사생육저해활성을 보였고, MIC는 62.5 µg/ml였다. Benzoic acid는 M. oryzae, R. solani 그리고 S. sclerotiorum에 대해 각각 125, 125 및 250 µg/ml의 MIC를 보였다. 다른 병원성 곰팡이에 대해서는 500 µg/ml 이상의 MIC를 보였다. Nascimento 등(2000)은 benzoic acid가 Klebsiella pneumoniae와 Escherichia coli에 대해 우수한 항균활성을 나타낸다고 보고하였으며, Amborabé 등(2002)은 benzoic acid에 의한 Eutypa lata의 균사생장 억제효과를 보고하였다. 뿐만 아니라 benzoic

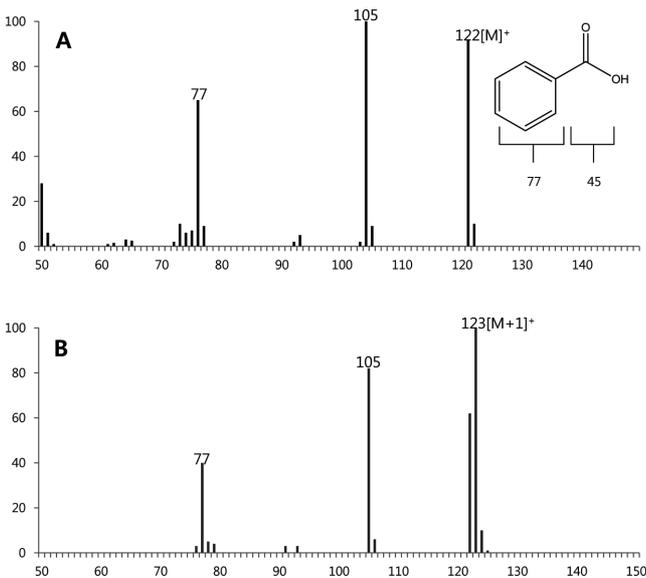


Fig. 2. EI- (A) and CI- mass spectra (B) of an antifungal compound isolated from Bacillus subtilis GDYA-1.

Table 2. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of benzoic acid from Bacillus subtilis GDYA-1 and phenylacetic acid against the mycelial growth of plant pathogens in liquid culture

Pathogen	MIC (µg/ml) <sup>a</sup>	
	Benzoic acid	Phenylacetic acid
Magnaporthe oryzae	125	250
Rhizoctonia solani	125	>500
Botrytis cinerea	>500	>500
Colletotrichum coccodes	>500	>500
Sclerotinia sclerotiorum	250	>500
Fusarium oxysporum	>500	>500
Phytophthora capsici	62.5	62.5

<sup>a</sup>Minimum concentration causing complete inhibition of mycelial growth.

acid 유도체인 lanceaeafolic acid methyl ester는 *Candida albicans*에 대해 최소저해농도가 100 µg/ml로 나타났고 (2002), 후추로부터 분리된 다양한 benzoic acid 유도체들은 *Cladosporium cladosporioides*와 *C. sphaerospermum*에 대해 항균활성이 보고된 바 있다(Lago 등, 2004). 그러나 benzoic acid의 식물병 곰팡이에 대한 항균활성은 본 연구에서 처음으로 보고하는 바이다. 한편, Hwang 등(2001)은 *Streptomyces humidus*로부터 분리한 phenylacetic acid가 고추 역병균에 대하여 *in vitro* 및 *in vivo*에서 활성이 우수하다고 보고하였다. *B. subtilis* GDYA-1로부터 분리된 benzoic acid도 phenylacetic acid와 구조가 유사하기 때문에 고추 역병에 대하여 우수한 효과를 보일 것으로 예상되었다.

**Benzoic acid의 고추 역병 방제효과.** Benzoic acid는 고추 역병에 대해 1,000 µg/ml과 3,000 µg/ml 수준에서 각각 60%와 65%, phenylacetic acid는 11%와 74%의 방제활성을 나타냈고, 대조약제로 사용된 streptomycin sulfate는 74%와 77%의 방제활성을 보였다. 처리된 benzoic acid의 농도가 비교적 높았지만 고추 역병을 방제하기 위해 사용된 대조약제와 거의 유사한 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다(Table 3). 본 연구결과, 고추 역병에 대하여 benzoic acid가 phenylacetic acid보다 효과가 우수하다는 것을 나타낸다.

Lee 등(2005)은 *B. subtilis* HJ927로부터 생산되는 저분자 물질인 3-methylbutyric acid, 2-methylbutyric acid 및 2-hydroxy-3-phenylpropanoate를 분리하였으며, 분리된 물질들을 이용하여 고추 역병에 대한 방제효과를 확인한 바 있다. 뿐만 아니라 Lee 등(2007)은 고추 역병균에 대한

**Table 3.** Suppression of Phytophthora blight disease in red pepper by benzoic acid and phenylacetic acid

Sample	Conc. (µg/ml)	Control value (%) <sup>b</sup>
Benzoic acid	1,000	60a
	3,000	65a
Phenylacetic acid	1,000	11b
	3,000	74a
Streptomycin sulfate	1,000	65a
	3,000	77a

<sup>a</sup>Seedlings were inoculated with spores of the test organism 1 day after spraying with solutions of the each samples.

<sup>b</sup>Control value (%)=100×(disease severity of untreated plants - disease severity of treated plants)/disease severity of untreated plants. Each value represents the mean±standard deviation of two runs with five replicates each. Control values with the same lower case letter's are not significantly different ( $P=0.05$ ), according to the Duncan's multiple range test.

항진균력이 우수한 *Bacillus* sp. AM-651을 분리하여 항진균성 활성 물질의 생산을 위한 최적조건을 확립하였고, Park 등(2009)은 *B. subtilis* AH18과 *B. licheniformis* K11의 토양미생물 생태에 미치는 영향을 조사하였고, 두 미생물의 처리가 고추 역병 방제에 효과적임을 보여주었다. Lee 등(2011)은 *B. subtilis* S54 균주를 이용하여 *in vitro*와 *in vivo* 조건에서 고추 역병에 대한 항균활성을 확인하였으며 최종적으로 고추 역병을 방제할 수 있는 생물학적 방제제로의 가능성을 제시하였다.

이와 같이 *Bacillus* sp. 균주를 이용한 고추 역병 방제 활성에 대한 연구는 많이 수행되고 있었지만 고추 역병에 대해 활성을 나타내는 물질에 관한 연구는 거의 전무한 실정이다. 본 연구결과를 통해 *B. subtilis* GDYA-1 균주가 항진균활성 물질로서 benzoic acid를 생산한다는 것을 확인하였고, 고추 역병에 대한 benzoic acid의 항균활성을 확인하였다. 현재 benzoic acid는 세계 각국에서 식품에 널리 사용하는 방부제(preservative) 성분으로서, 식품과 음료수, 화장품 등에 단독 또는 혼합되어 광범위하게 이용되고 있다. 따라서 benzoic acid를 생산하는 *B. subtilis* GDYA-1은 인체에 무해하면서도 친환경적으로 고추 역병을 포함한 다양한 식물병을 방제하는데 크게 기여할 것으로 예상된다. Benzoic acid에 의한 식물병원성 곰팡이에 대한 항균활성은 본 연구에서 처음으로 보고하는 바이다.

## 요 약

전라남도 영남지역의 감나무 줄기로부터 다양한 식물병에 대해 방제 효과를 보이는 세균을 분리하였다. 분리 균주는 16S rRNA sequencing의 방법을 이용하여 동정한 결과 *B. subtilis*로 동정되었으며, *B. subtilis* GDYA-1로 명명하였다. *In vivo* 생물검정에서 GDYA-1 액체 배양액은 벼 도열병, 토마토 역병 및 밀 붉은녹병에 항균 활성을 보였다. 액체 배양액으로부터 한 개의 항균물질을 분리하였으며, 질량분석과 핵자기공명분석을 통해 분리한 물질은 benzoic acid로 동정되었다. Benzoic acid는 *M. oryzae*, *R. solani*, *S. sclerotiorum* 및 *P. capsici*의 균사생육을 62.5–125 µg/ml에서 완전히 억제하였다. 또한 benzoic acid는 고추 역병을 효과적으로 방제하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 benzoic acid의 식물병원성곰팡이에 대한 항균활성을 처음으로 보고하는 바이다. Benzoic acid와 *B. subtilis* GDYA-1는 식물병원성곰팡이로부터 작물을 친환경적으로 보호하는데 기여할 것으로 기대된다.

## Acknowledgement

This study was carried out with the support of Cooperative Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No.: 200901OFT102966197), Rural Development Administration, Republic of Korea.

## References

- Amborabé, B.-E., Fleurat-Lessard, P., Chollet, J.-F. and Roblin, G. 2002. Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure-activity relationship. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 1051–1060.
- Andrés, L., Ming, D. S. and Towers, G. H. 2002. Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Piper lanceaeifolium*. *J. Nat. Prod.* 65: 62–64.
- Cho, J.-Y., Choi, G. J., Lee, S.-W., Lim, H. K., Jang, K. S., Lim, C. H., Cho, K. Y. and Kim, J.-C. 2006. *In vivo* antifungal activity against various plant pathogenic fungi of curcuminoids isolated from *Curcuma longa* L. rhizomes. *Plant Pathology J.* 22: 94–96.
- Heng, Z., Feng, Q. and Zhu, H. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* 21: 5279–5280.
- Hwang, B. K., Lim, S. W., Kim, B. S., Lee, J. Y. and Moon, S. S. 2001. Isolation and *in vivo* and *in vitro* antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3739–3745.
- Jung, H. K., Kim, J. R., Woo, S. M. and Kim, S. D. 2006. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-producing biocontrol activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 94–100.
- Katz, E. and Beman, A. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus* chemistry, biogenesis, and possible function. *Bacteriol. Rev.* 41: 449–474.
- Kim, J.-C., Choi, G. J., Park, J.-H., Kim, H. T. and Cho, K. Y. 2001. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Manag. Sci.* 57: 554–559.
- Kim, K. Y. and Kim, S. D. 1997. Biological control of *Pyricularia oryzae* blast spot with the antibiotic substances produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 396–402. (In Korean)
- Kim, Y., Cho, J.-Y., Kuk, J.-H., Moon, J.-H., Cho, J.-I., Kim, Y.-C. and Park, K.-H. 2004. Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean, Chungkook-jang. *Curr. Microbiol.* 48: 312–317.
- Lago, J. H., Ramos, C. S., Casanova, D. C., Morandim, Ade, A., Bergamo, D. C., Cavalheiro, A. J., Bolzani Vda, S., Furlan, M., Guimaraes, E. F., Young, M. C. and Kato, M. J. 2004. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *J. Nat. Prod.* 67: 178–1788.
- Lange, L., Breinbolt, J., Rasmussen, F. W. and Nielsen, R. I. 1993. Microbial fungicides-the natural choice. *Pestic. Sci.* 39: 155–160.
- Lee, G. W., Kim, M. J., Park, J. S., Chae, J.-C., Soh, B. Y., Ju, J. E. and Lee, K.-J. 2011. Biological control of *Phytophthora* blight and anthracnose disease in red-pepper using *Bacillus subtilis* S54. *Res. Plant Dis.* 17: 86–89. (In Korean)
- Lee, H. J., Park, K. H., Shim, J. H., Park, R. D., Kim, Y. W., Hoon, H. B., Cho, J. Y., Kim, Y. C. and Kim, K. Y. 2005. Isolation and identification of low molecular weight compounds produced by *Bacillus subtilis* HJ927 and their biocontrol effect on the late blight of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Korean J. Soil Sci. Fer.* 38: 25–31. (In Korean)
- Lee, J.-B., Shin, J.-H., Jang, J.-O., Shin, K.-S., Choi, C.-S., Kim, K.-W., Jo, M.-S., Jeon, C.-P., Kim, Y.-H. and Kwon, G.-S. 2007. Antifungal activity of *Bacillus* sp. AM-651 against *Phytophthora capsici*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 36: 227–232. (In Korean)
- Lee, S.-Y., Lee, S.-B., Kim, Y.-K. and Hwang, S. J. 2006. Biological control of garlic white rot accused by *Sclerotium cepivorum* and *Sclerotium* sp. using *Bacillus subtilis* 122 and *Trichoderma harzianum* 23. *Res. Plant Dis.* 12: 81–84. (In Korean)
- Leoffler, W. J., Tschén, S. M., Vanittanakom, N., Kugler, M., Knorpp, E., Hsieh, T. F. and Wu, T. G. 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.
- Liang, L. 1998. Benzoic acid produced by selected species of lactic acid bacteria and *Bacillus*. Washington State University, Washington DC, USA. 134 pp.
- Nam, M., Choi, J., Kim, H. J., Lee, J., Lim, K., Kim, Y. G., Kim, H. T. and Jeun, Y.-C. 2010. Controlling activity of *Bacillus subtilis* KB-401 against cucumber powdery mildew caused by *Sphaerotheca fusca*. *Korean J. Pestic. Sci.* 14: 49–53. (In Korean)
- Nam, M., Shin, J. H., Choi, J., Hong, S., Kim, Y.-G. and Kim, H. T. 2009. Identification of Rhizo-bacterium inhibiting *Diaporthe citri* causing citrus melanose. *Korean J. Pestic. Sci.* 13: 332–335. (In Korean)
- Nascimento, G. G. F., Locatelli, J. and Freitas, P. C. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 31: 247–256.
- Neilands, J. B. 1984. Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiol. Sci.* 1: 9–14.
- Omura, S. 1992. The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer-Verlag, Tokyo, Japan. 388 pp.
- Park, K. 2011. Development of biopesticide and role of *Bacillus*

- spp. *KIC News* 14: 1–11. (In Korean)
- Park, K.-C., Lim, J.-H., Kim, S.-D. and Yi, Y.-K. 2009. Effects of phytophthora blight-antagonistic microorganism *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11 on the soil microbial community. *J. Appl. Biol. Chem.* 52: 121–125. (In Korean)
- Paulitz, T. C. and Loper, J. E. 2001. 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.
- Powel, K. A. and Jutsum, A. R. 1993. Technical and commercial aspects of biocontrol products. *Pestic. Sci.* 37: 315–321.
- Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O. P. 2004. Development in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50: 1–17.
- Scher, F. M. and Baker, R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathol.* 72: 1567–1573.
- Sieber, R., Bütikofer, U. and Bosset, J. O. 1995. Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *J. Int. Dairy* 5: 1227–246.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56: 845–857.
- Thu Hang, N. T., Oh, S. O. and Kim, G. H. 2005. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. *Plant Pathol.* 21: 59–63.
- Yang, S. Y., Park, M. R., Lim, I. S., Kim, Y. C., Yang, J. W. and Ryu, C.-M. 2011. 2-Aminobenzoic acid of *Bacillus* sp. BS107 as an ISR determinant against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* SCC1 in tobacco. *Eur. J. Plant Pathol.* 129: 371–378.
- Yoon, M.-Y., Lim, Y. S., Ryu, S. Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Cha, B., Han, S.-S. and Kim, J.-C. 2011. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of decursin and decursinol angelate isolated from *Angelica gigas* against *Magnaporthe oryzae*, the causal agent of rice blast. *Pestic. Biochem. Physiol.* 101: 118–124.
- Woo, S. M., Woo, J. U. and Kim, S. D. 2007. Purification and characterization of the siderophore from *Bacillus licheniformis* K11, a multi-functional plant growth promoting rhizobacterium. *Korean J. Microbial. Biotechnol.* 35: 128–134. (In Korean)