

황토로부터 분리한 *Bacillus licheniformis*의 항진균 chitinase 생산과 효소 특성

한귀환¹, 봉기문¹, 김종민¹, 김평일², 김시욱^{1*}

Production and Characterization of Antifungal Chitinase of *Bacillus licheniformis* Isolated from Yellow Loess

Gui Hwan Han¹, Ki Moon Bong¹, Jong Min Kim¹, Pyoung Il Kim², and Si Wouk Kim^{1*}

접수: 2014년 4월 19일 / 게재승인: 2014년 5월 8일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, we isolated two novel chitinase producing bacterial strains from yellow loess samples collected from Jullanamdo province. The chitinase producing bacteria were isolated based on the zone size of clearance in the chitin agar plates. Both of them were gram positive, rod (2~3×0.3~0.4 μm), spore-forming, and motility positive. They were facultative anaerobic, catalase positive and hydrolyzed starch, gelatin, and casein. From the 16s rRNA gene sequence analysis, the isolates were labeled as *Bacillus licheniformis* KYLS-CU01 and *B. licheniformis* KYLS-CU02. The isolates showed higher extracellular chitinase activities than *B. licheniformis* ATCC 14580 as a control. The optimum temperature and pH for chitinase production were 40°C and pH 7.0, respectively. Response Surface Methodology (RSM) was used to optimize the culture medium for efficient production of the chitinase. Under this optimal condition, 1.5 times higher chitinase activity of *B. licheniformis* KYLS-CU02 was obtained. Extracellular chitinases of the two isolates were purified through ammonium sulfate precipitation and anion-exchange DEAE-cellulose column chromatography. The specific activities of puri-

fied chitinase from *B. licheniformis* KYLS-CU01 and *B. licheniformis* KYLS-CU02 were 7.65 and 5.21 U/mg protein, respectively. The molecular weights of the two purified chitinases were 59 kDa. Further, the purified chitinase of *B. licheniformis* KYLS-CU01 showed high antifungal activity against *Fusarium* sp.. In conclusion, these two bacterial isolates can be used as a biopesticide to control pathogenic fungi.

Keywords: Chitinase, Yellow loess, *Bacillus licheniformis*, Antifungal activity, Biopesticide

1. INTRODUCTION

전 세계적으로 환경오염 및 잔류농약 등 부작용 때문에 화학농약 및 비료 사용을 줄이는 친환경농업정책이 적극 추진되고 있으며, 이에 따라 친환경 농업에 대한 공감대가 형성되고 화학농약 및 비료의 사용과 판매량이 큰 폭으로 감소되고 있는 추세이다 [1]. 최근 농작물에 발생하는 병·해충 및 잡초를 제거하기 위하여 천연물, 천적 및 유익한 미생물을 활용한 생물농약이 대안으로 제시되고 있다. 생물농약은 진균 및 세균 등 살아있는 미생물을 이용한 농업용 미생물방제제로서 화학농약에 비해 안전성이 높은 미생물을 원료로 하기 때문에 인체 및 환경에 대한 독성이 없거나 그 수준이 매우 낮으며, 지속적으로 사용할 경우에도 잔류성, 내성발생, 약해가 거의 없어 지속적인 친환경농업 실천에 매우 적합한 제제로 평가 받고 있다 [2].

¹조선대학교 공과대학 환경공학과

¹Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
Tel: +82-62-230-6649, Fax: +82-62-225-6040
e-mail: swkim@chosun.ac.kr

²전남생물산업진흥원 생물방제연구원

²Biol Control Research Institute, Gokseong 516-944, Korea

생물농약은 다양한 식물병원성 곰팡이에 대해 효과를 나타내는 항진균 미생물을 활용한 생태학적 방제 원리를 이용한다. 그 종류로는 β -glucanase 및 chitinase 등의 진균 세포벽 가수분해효소를 이용한 용균작용과 항진균성 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해시키는 항생작용 및 *Pseudomonas* sp.가 분비하는 철 (Fe^{3+}) 성분 특이 결합물질인 siderophore에 의해 식물병원성 곰팡이의 생육을 저해하는 경쟁적 항진균 작용을 이용한 방제방법 등이 보고되었다 [3, 4]. 균체 외벽 가수분해효소 생산을 통한 식물병원성 곰팡이의 생장억제를 위한 항진균 작용은 곰팡이의 밀도를 줄임으로써 식물생장촉진이나 농산물의 수확량 증대를 위해 친환경적인 생물학적 방제법이라 할 수 있다.

식물병원성 곰팡이의 세포벽 주성분은 chitin으로 이루어져 있다 [5]. 식물병원성 곰팡이의 세포벽을 이루고 있는 chitin은 N-acetyl-D-glucosamine이 β -1,4 결합을 하고 있는 mucopolysaccharide의 일종으로 cellulose의 glucose 잔기 중 C-2의 hydroxyl이 acetyl-amino기로 치환된 화학구조식을 가지고 있다 [6]. Chitinase는 N-acetyl- β -1,4-glucosamine linkage를 가수분해하며, 작용기작에 따라 chitin 및 chitodextrin의 N-acetyl- β -1,4-glucosamine linkage를 무작위로 절단하는 endochitinase와 chitobiose를 단량체인 N-acetylglucosamine으로 분해하는 N-acetyl glucosaminidase 그리고 chitin 사슬의 비환원성 말단으로부터 이당체인 diacetyl chitobiose 또는 그 이상의 단위체로 절단하는 exo-chitinase 등 세 종류가 알려져 있다. 이러한 chitinase는 항진균 작용을 위한 생물농약 뿐만 아니라 식품, 의약품 등에서도 널리 이용되고 있다 [7].

Chitinase 생산 미생물에 관한 연구는 *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Enterobacter*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Trichoderma* 및 *Vibrio* 등에서 이루어져 왔다 [8-10]. *Trichoderma* sp.의 경우 한 가지 이상의 작용기작이 알려져 있고 식물병원성 곰팡이를 방제하여 식물을 보호하는데 효과적인 것으로 알려져 있다 [11]. *Bacillus* sp.는 높은 온도 내성, 액체 배양 시 빠른 성장, 저항성포자의 형성 등 대량생산이 용이하기 때문에 많은 연구자들의 관심을 모으고 있으며, 미국 식품의약국 (FDA)에 의해 인체 및 환경에 무해한 미생물로 인정받고 있다 [12]. 하지만 이러한 항진균 세균은 대부분 작물을 재배하는 일반토양으로부터 분리·개발되었다. 우리나라의 토양은 객토, 사립토 및 미립토 등과 같이 여러 형태로 존재하고 있으며, 그 중 황토는 우리나라 국토면적의 30% 비율을 차지하고 있다. 황토는 일반 토양에 비해 비교적 척박한 환경조건을 갖고 있기 때문에 적은 수의 미생물 (2×10^8 CFU/g)이 서식하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 국내에 보고된 황토를 이용한 미생물 제재 성능 및 생물농약에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다 [13].

본 연구에서는 일반토양에 비해 척박한 황토에서 친환경 및 친생태적 방제능을 갖는 항진균 작용균주 중 chitinase를 생산하는 미생물을 분리·동정하고 chitinase 최적 생산 조건을 확립함으로써 항진균 제제로 이용할 수 있는지의 가능성을 탐색하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Chitinase 생산 균주의 분리 동정 및 선별

Chitinase 생산 균주의 분리 및 선별을 위해 전라남도 7개 시군에서 황토를 이용하여 작물을 재배하고 있는 17개소 경작지의 황토를 수집하였다. 수집된 황토시료를 각 종류별로 0.1 g씩 chitin 배지 (Na_2HPO_4 2 g, KH_2PO_4 1 g, NaCl 0.5 g, NH_4Cl 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 g, yeast extract 0.1 g, colloidal chitin 0.5%, per liter) 10 ml에 접종 후 30°C에서 14일간 1차 배양한 후 chitin agar배지에 희석 도말하여 30°C에서 14일간 2차 배양하였다. Chitinase 생산 균주는 불투명한 chitin agar 배지에서 chitin 분해환(clear zone)의 형성 여부로 선별하였다. 선별된 chitinase 생산 균주의 분류학적 동정을 위하여 API 50CH (Analytical Products, France) test, 각종 생화학적 성상검사 및 전자주사현미경 (scanning electron microscope, SEM)으로 그 형태를 관찰하였다. 이를 바탕으로 Bergey's manual of systematic bacteriology의 색인에 따라 최종 분류 동정하였다.

2.2. Colloidal chitin의 제조

Colloidal chitin은 폐 계 껍질 1 kg에 ethanol 3 L, 1 N HCl 2 L와 1 N NaOH 2 L를 각각 첨가하여 색소 및 회분을 제거한 분말을 제조하여 사용하였다. Chitin 분말 10 g을 85% H_3PO_4 100 ml에 2시간 동안 현탁시킨 후 혼합액을 150 mesh (ϕ 100 μ m)의 여과지를 이용하여 85% H_3PO_4 로부터 분해되지 않은 잔존 chitin을 제거하였다. Colloidal chitin 혼합액의 H_3PO_4 를 제거하기 위하여 증류수 1 L를 첨가하여 7,500 \times g에서 30분간 원심분리시킨 후 상등액을 제거하고, pH 4.0 이상이 될 때까지 세척을 반복하였다. 세척된 colloidal chitin 20 ml를 Whatman No. 1 (ϕ 11 μ m) 여과지로 상등액을 제거한 후 65°C에서 8시간 건조시켜 colloidal chitin 분말을 제조하여 사용하였다 [14].

2.3. Chitinase 활성 측정

Chitinase 활성은 chitin broth 100 ml에 분리 균주를 접종한 후, 37°C에서 교반속도를 220 rpm으로 하여 7일간 각각 배양한 다음 DNS법으로 측정하였다 [15]. 0.5% (w/v) colloidal chitin 1.0 ml에 crude enzyme solution 1.0 ml를 가해 37°C에서 60분 동안 반응시킨 후 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 용액 2.0 ml를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응을 정지한 혼합액을 100°C에서 5분간 발색시킨 후 반응액을 2,000 \times g에서 15분 동안 원심분리하여 잔존 colloidal chitin을 제거하고 575 nm에서 활성을 측정하였다. 환원당 농도는 N-acetyl-D-glucosamine (NAG)을 표준물질로 하여 정량하였다. 이때 효소 활성 1 Unit은 1분 동안 colloidal chitin으로부터 1 μ mole의 N-acetyl-D-glucosamine을 생성시키는 효소량으로 환산하였다. 배양 균주의 chitinase secretion 여부를 확인하기 위하여 배양액을 10,000 \times g에서 15분간 원심분리하여 상등액과 균체를 분리하여 각각 chitinase activity를 측정하였다. 배

양액의 상등액은 chitinase activity 측정을 위해 전처리 과정 없이 이용하였으며, 균체는 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)를 이용하여 세척한 후 sonication 하였다. Sonication한 crude extract를 다시 10,000×g에서 15분간 원심분리하였고, soluble fraction의 chitinase activity를 측정하였다.

2.4. Chitinase 생산 최적화

Chitinase 생산에 사용되는 배양배지의 조성 최적화 및 배지 성분의 효과 평가를 위해 반응표면분석법 중 Plackett-Burman (PB) 및 Central Composite Design (CCD) 분석법을 이용하였다 (16). Chitin 배지의 구성 성분인 colloidal chitin, yeast extract, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, MgSO₄, CaCl₂ 및 NH₄Cl을 각 독립변수로 하였으며, 성분의 농도를 기준으로 하여 고농도 수준 (+1)과 저농도 수준 (-1)으로 구분하여 각 독립변수별 chitinase 생산에 미치는 영향을 산출하였다. 각 중요 독립변수의 최적농도의 산출은 CCD을 이용하였으며, 중심점 (center point)과 축점 (axial point)을 2k 요인실험에 추가시킨 실험 계획으로, 중심합성계획의 실험에서는 6개의 중심점과 8개의 축점 및 6개의 외축점으로 구성하였다. 중심합성계획의 횟수는 20개의 선정된 조건에서 실험을 수행하였다. 각각의 실험인자의 변화에 따른 chitinase 생산량의 반응회귀곡선은 아래와 같은 2차 다항식에 적용시켰다.

$$f = y_0 + a_1X_1 + a_2X_4 + a_3X_6 + a_{12}X_1X_4 + a_{13}X_1X_6 + a_{23}X_4X_6 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_4^2 + a_{33}X_6^2$$

여기서 f는 chitinase 생산량 (U/ml)을 나타내며 X₁, X₄, X₆는 각각 colloidal chitin, KH₂PO₄, MgSO₄이며 y₀는 절편, a_n은 회귀계수이다. 중심합성계획에 의해 수행한 20개의 조건에서 생산된 chitinase 활성 결과를 design expert 8.0 program을 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 산출하고, 각각 인자간의 상호영향을 조사함으로써 chitinase 생산을 위한 최적의 배지를 조성하였다. 각각 분석된 통계결과는 분산 분석 (ANOVA)을 이용하여 최적값을 산출하였다.

2.5. Chitinase 정제

황토로부터 분리된 각 균주를 chitin배지에 접종하여 37°C, 220 rpm으로 5일간 배양하고 배양액을 4,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 얻었다. 상등액에 ammonium sulfate를 70% 농도가 되도록 용해한 후 10,000×g에서 20분 동안 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. Ammonium sulfate에 의해 침전된 chitinase를 포함한 단백질을 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시킨 뒤 dialysis cassette (10,000 MW CO)를 이용하여 4°C에서 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 24시간 dialysis를 수행하였다. Dialysis를 수행한 chitinase를 포함한 단백질을 DNS 측정법을 이용하여 chitinase activity를 측정하였다. 가장 높은 농도의 chitinase activity를 나타내는 시료를 SDS-PAGE를 수행하여 분자량을 확인하였다.

Ammonium sulfate 침전법을 이용하여 1차 정제한 chitinase

fraction으로부터 고순도 chitinase를 정제하기 위하여 ion-exchange chromatography (Bio-rad, BioLogic Duo flow)를 수행하였다. DEAE-cellulose anion-exchange column에 buffer A (50 mM phosphate buffer, pH 7.0)로 평형화시킨 후 1차 정제된 chitinase를 포함한 단백질을 주입하고 buffer A로 10배의 column volume만큼 wash한 후 60분간 buffer B (1 M NaCl, 50 mM phosphate buffer, pH 7.0)를 linear gradient (buffer A 100% → buffer B 100%, 유속 4 ml/min)로 흘려보내고 용출된 이동상을 2 ml 단위로 분취하였다. Ion-exchange chromatography를 수행하여 얻은 각 분취액은 SDS-PAGE를 통하여 정제도를 확인하였다.

2.6. 정제된 chitinase의 항진균 활성

Chitinase 생산 균주로부터 분리 · 정제한 chitinase의 항진균 활성을 확인하기 위하여 농업유전자원정보센터 (KACC)에서 분양받은 4종의 식물병원성 곰팡이를 potato dextrose (PD) 배지 (potato starch 4 g, dextrose 20 g, agar 15 g)에 접종하여 25°C에서 3~5일간 배양하였다. 식물병원성 곰팡이 (*Fusarium* sp., *Fusarium culmorum*, *Collotrichum gloeosporioides* 및 *Alternaria alternata*)의 균사체가 중심부로부터 0.5 cm 정도 뻗어 나왔을 때 균사체로부터 1 cm 떨어진 배지 위에 멸균된 paper disc을 올려놓고 정제된 chitinase (1 mg/ml) 20 µl를 paper disc에 점적한 후 3~5일간 28°C에서 배양하여 항진균 활성을 확인하였다. 항진균 활성 저해율은 정제된 chitinase (1 mg/ml) 500 µl를 PD 배지 25 ml과 혼합하여 고체배지를 제조하고, 여기에 식물병원성 곰팡이 *Fusarium* sp., *F. culmorum*, *C. gloeosporioides* 및 *A. alternata*를 접종하여 3~5일간 배양한 후 식물병원성 곰팡이의 성장 정도 (E)를 측정하였다. Chitinase를 첨가하지 않은 PD 고체배지에 식물병원성 곰팡이를 배양한 것을 대조군으로 하여 중심부로부터 성장한 균사체의 평균 성장 길이 (C)를 확인하였으며, 다음과 같은 식에 따라 식물병원성 곰팡이 활성 저해율을 측정하였다.

$$\text{Inhibition ratio (\%)} = (C - E) / C \times 100$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chitinase 생산 균주의 선별

황토는 일반토양에 비해 Fe²⁺이온이 다량 포함되어 있는 것으로 알려져 있다 [13]. 본 실험에서는 전라남도 7개 시·군의 황토시료를 채취하여 ICP-MS기기를 이용하여 성분분석을 수행하였고, 실제 모든 황토시료가 일반토양에 비해 Fe²⁺를 100배 이상 고농도로 포함하고 있는 것으로 나타나 일반토양보다 미생물 성장에 적합하지 않은 것으로 사료된다 (data not shown).

황토시료로부터 chitinase 생산 균주를 선별하기 위하여 0.5% (w/v) chitin 선택배지를 이용하여 30°C에서 14일 동안 진탕배양한 후 chitin agar 한천배지에서 배양하여 분해환의

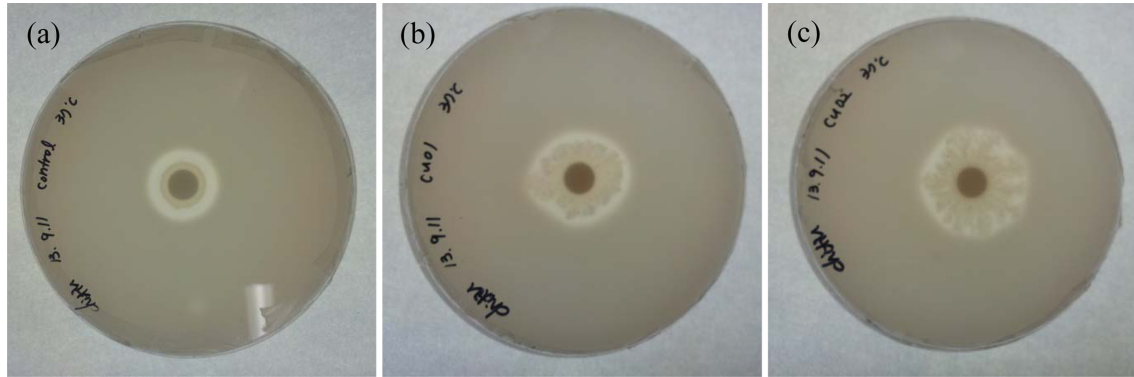


Fig. 1. Bacterial isolates showing clear hydrolysis zone on colloidal chitin agar. (a) *B. lichemiformis* ATCC 14580; (b) *B. licheniformis* KYLS-CU01; and (c) *B. licheniformis* KYLS-CU02.

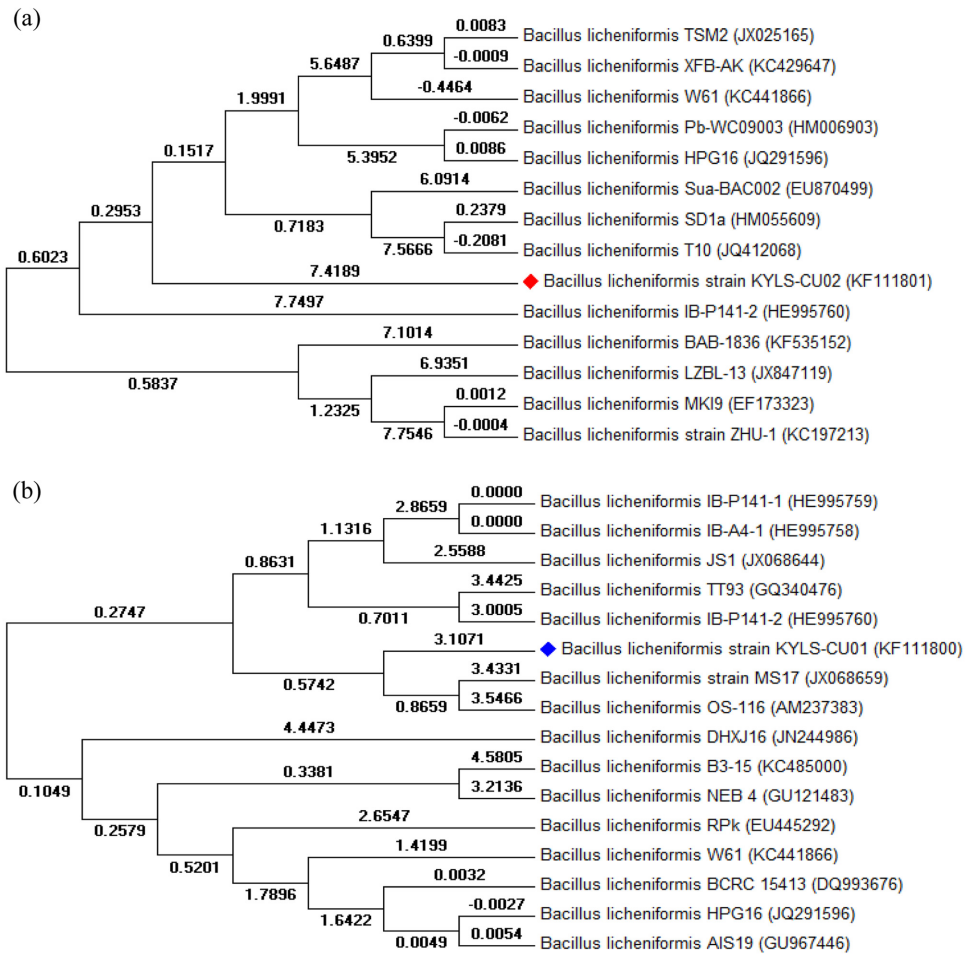


Fig. 2. Phylogenetic relationship analysis of the isolated bacteria (a) *B. licheniformis* KYLS-CU01 (KF111800); (b) *B. licheniformis* KYLS-CU02 (KF111801) by neighbouring-joining analysis of 16SrDNA sequences; the scale represents the evolutionary branch length and the accession numbers of the close relatives were given in the parentheses.

형성 여부를 확인하여 균주를 선별하였다. 각 황토 시료로부터 총 9종의 분해환을 형성하는 균주를 확보하였다. 각 분리한 균주로부터 형성된 분해환의 크기와 대조군으로 사용한 *Bacillus licheniformis* (ATCC 14580)로부터 생성된 분해환의

크기를 비교 분석하여, 전라남도 무안군과 해남군에서 수집한 황토로부터 분리한 strain A-5, B-4에서 대조군보다 성장 속도와 분해환 형성이 빠른 2종의 균주를 선별하였다 (Fig. 1).

선별균주의 유전학적 특성을 확인하기 위하여 각 chitinase 생산균주의 genomic DNA를 template DNA로 사용하여 16S rRNA 염기서열 분석을 수행하였다. 선별균주의 16S rRNA 염기서열을 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 gene bank database 및 MEGA 5.1 program을 사용하여 분석한 결과, 해남에서 분리한 strain A-5는 *B. licheniformis* ZHU-1와 99%의 상동성을 나타내었으며 (Fig. 2(a)), strain B-4는 *B. licheniformis* W61와 99%의 염기서열 상동성을 나타내었다 (Fig. 2(b)). 선별한 두 균주 모두 동일한 생화학적인 특성을 가지고 있었다. 두 균주 모두 그람 양성의 간균 (2~3×0.3~0.4 μm)이었으며, 운동성을 나타내었다. 또한 포자를 생성하여 80°C의 고온에 내성을 가지고 있었다. 호기적 조건뿐 아니라 혐기적 환경에서 성장가능한 통성혐기성 균주들이었으며, catalase 활성을 나타내었다. D-glucose와 D-xylose로부터 산발효가 가능하였지만 L-arabinose는 이용되지 못하였다. Starch, casein, gelatin을 가수분해하였고 citrate를 이용할 수 있었으며 질산 환원능이 있었다 (Table 1). 이러한 각종 생리·생화학적인 특성을 조사한 결과 *Bacillus licheniformis* 특성과 가장 가까운 특성을 나타내었다 (17). 각각의 균주는 NCBI GenBank에 등록하였으며, strain A-5는 *Bacillus licheniformis* KYLS-CU01 (NCBI GenBank accession NO. KF111800)로, strain B-4는 *Bacillus licheniformis* KYLS-CU02 (NCBI GenBank accession NO. KF111801)로 명명하였다.

3.2. Chitinase 활성도 조사

Bacillus licheniformis KYLS-CU01과 KYLS-CU02를 각각

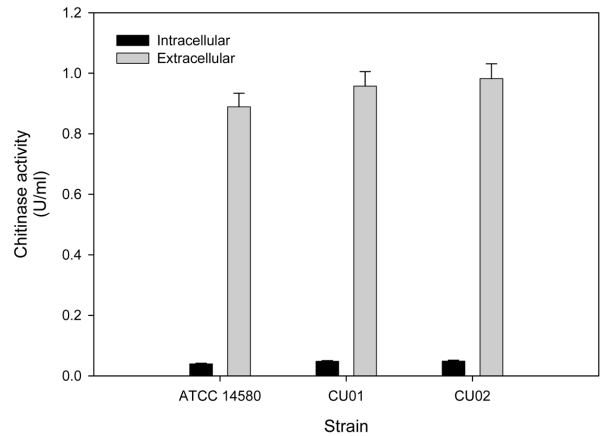


Fig. 3. Intra- and extracellular chitinase activities of *B. licheniformis* strains on colloidal chitin medium.

chitin 배지에서 37°C로 7일간 배양한 후 배양액을 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 균체와 상등액에 대한 chitinase activity를 각각 측정하였다. 균체 내의 chitinase activity를 측정된 결과 *B. licheniformis* ATCC 14580 (대조균), *B. licheniformis* KYLS-CU01 및 *B. licheniformis* KYLS-CU02는 각각 0.0395, 0.0479 및 0.0491 U/ml로 나타났으며, 상등액의 chitinase activity는 *B. licheniformis* ATCC 14580, *B. licheniformis* KYLS-CU01 및 KYLS-CU02는 각각 0.8894, 0.9575 및 0.9821 U/ml로 나타났다. Chitinase는 대부분 균체 외부로 분비된다는 것을 알 수 있었으며, 선별균주 두 종 모두 대조균으로 사

Table 1. Biochemical characterization of chitinase-producing bacterial strains isolated from yellow-loess

Characteristics	<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580	<i>B. licheniformis</i> KYLS-CU01	<i>B. licheniformis</i> KYLS-CU02
Gram stain	+	+	+
Spore formation	+	+	+
Cell shape	rod	rod	rod
Cell size	2~3 × 0.3~0.4 μm	2~3 × 0.3~0.4 μm	2~3 × 0.3~0.4 μm
Motility	+	+	+
Colony appearance	irregular, clear white	irregular, clear white	irregular, clear white
Temperature for growth	20~50°C	20~50°C	20~50°C

Table 2. Plackett-Burman design matrix (trials No. 1 to 12) with corresponding result and analysis of variance of quadratic model

Run Order	Chitin (%), X ₁	Yeast Extract X ₂	Na ₂ HPO ₄ X ₃	KH ₂ PO ₄ X ₄	NaCl X ₅	MgSO ₄ X ₆	CaCl ₂ X ₇	NH ₄ Cl X ₇	Chitinase activity (U/100ml)
1	-1.00	-1.00	-1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	-1.00	106.38
2	+1.00	-1.00	-1.00	-1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	73.48
3	+1.00	+1.00	+1.00	-1.00	-1.00	-1.00	+1.00	-1.00	56.91
4	-1.00	+1.00	+1.00	+1.00	-1.00	-1.00	-1.00	+1.00	47.10
5	-1.00	+1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	+1.00	-1.00	119.57
6	-1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	111.98
7	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	84.88
8	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	+1.00	133.91
9	+1.00	+1.00	-1.00	-1.00	-1.00	+1.00	-1.00	+1.00	128.02
10	+1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	+1.00	-1.00	-1.00	167.755
11	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	+1.00	-1.00	-1.00	-1.00	118.12
12	-1.00	-1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	-1.00	+1.00	176.62

용한 *B. licheniformis* ATCC 14580보다 chitinase activity가 높은 것으로 나타났다 (Fig. 3).

3.3. Chitinase 생산 최적 조건의 확립

Chitinase 생산 배지의 조성 중 실제 chitinase 생산에 가장 많은 영향을 미치는 인자를 확인하기 위하여 PB 분석방법을 이용하여 최적값을 산출하였다 (Table 2). Quadratic 모델을 적용하여 ANOVA 분산 분석을 수행한 결과, 모델식의 유효도 (P value)는 0.0067로 매우 유효한 것으로 나타났다. 또한 사용된 8개의 독립변수의 유효값을 분석한 결과 각각 X_1 (colloidal chitin), X_4 (K_2HPO_4)와 X_6 ($MgSO_4$)는 99.38%, 73.33% 및 99.24%로 분석되었다. NaCl의 경우 분산분석의 결과에서는 95.41%의 다소 높은 유효도를 나타내었으나 실제 chitinase activity를 측정된 결과에서는 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 따라서 이후 각 인자의 최적농도를 도출하기 위한 CCD 분석에는 X_1 (colloidal chitin), X_4 (K_2HPO_4)와 X_6 ($MgSO_4$)를 독립변수로 사용하였다. 각 독립변수의 요인변수들을 -1.41, -1, 0, 1, 1.41의 5개로 부호화하여 각 레벨에 따른 chitinase activity를 측정하여 CCD 분석 결과 모델식 (1)과 같은 모델식을 도출할 수 있었다.

$$\begin{aligned} \text{Chitinase activity} = & 84.08 + 1.22 X_1 - 6.77 X_4 + 19.82 X_6 \\ & - 15.49 X_1 X_4 + 5.34 X_1 X_6 - 3.68 X_4 X_6 \\ & - 25.23 X_1^2 - 14.87 X_4^2 + 5.84 X_6^2 \quad (1) \end{aligned}$$

일반적으로 변수의 유의 확률 (Probability value) 값이 0.05보다 작으면 각 변수간의 효과차이가 유의성을 가진다고 하며, 0.01보다 작으면 매우 유의하다고 본다. ANOVA 분산분석에 따라 모델식의 유의 확률이 0.0054로서 매우 높은 유의성을 보였으며, 이차회귀식에 따른 R^2 값은 0.8401로 나타났다. 각 실험군에서 나타난 결과를 종합한 결과 모델식의 낮은 R^2 값은 전체 모델식에서 도출된 최적값에 대해 영향이 크지 않을 것으로 판단되어 위 모델식을 최적화 도출 모델로 결정하였다. 모델식에 따라 colloidal chitin : K_2HPO_4 와 colloidal chitin : $MgSO_4$ 및 colloidal chitin : $MgSO_4$ 의 독립변수 간의 상호 관계를 분석하여 3D plot으로 나타내었다 (Fig. 4). 각 독립변수들의 최적값을 산출한 결과 colloidal chitin = 0.28 (1.23 g/L), K_2HPO_4 = -0.50 (0.88 g/L)와 $MgSO_4$ = 1.00 (1.00 g/L) 나타났다. 모델식의 결과를 검증하기 위하여 기존의 chitin 배지와 산출된 값에 근거한 최적 chitin 배지에서 *B. licheniformis* CU02를 배양한 결과 chitinase activity가 0.13905 ± 0.00295 U/ml로 기존의 배지에서 비하여 약 1.5배의 효소 활성이 높아졌다.

배양온도가 chitinase 생산성에 미치는 영향을 알아보기 위해 배양온도를 각각 20, 25, 30, 35, 40, 45와 50°C로 하여 chitin 배지에서 5일 동안 220 rpm 및 pH 7의 조건에서 배양 후 *B. licheniformis* ATCC 14580, *B. licheniformis* KYLS-CU01 및 *B. licheniformis* KYLS-CU02의 chitinase activity를 각각 측정된 결과 40°C에서 최대 각각 0.9324, 1.0821 및 1.0565 U/ml의

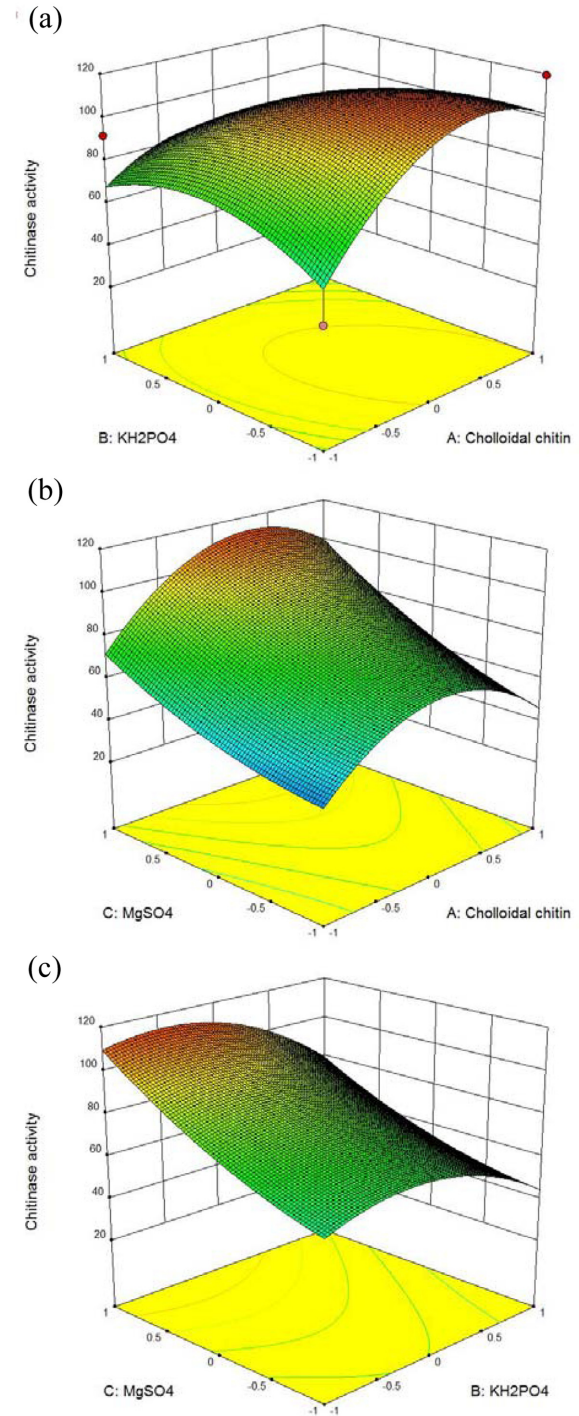


Fig. 4. Response surface plot showing the effect of medium compositions and their synergistic effect on the chitinase activity. (a) KH_2PO_4 and colloidal chitin; (b) $MgSO_4$ and colloidal chitin; and (c) $MgSO_4$ and KH_2PO_4 .

chitinase 활성을 나타내었으며, 20°C에서 가장 낮은 chitinase 활성을 보였다. *B. licheniformis* KYLS-CU02는 대조군 *B. licheniformis* ATCC 14580보다 약 11% 높은 chitinase 활성을 나타내었다. Chitinase의 생산에 대한 pH의 영향을 알아보기

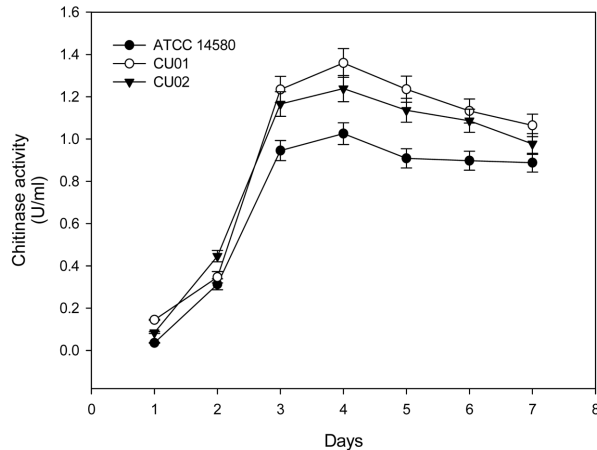


Fig. 5. Time-course changes of the chitinase activities of *B. licheniformis* strains under optimum culture conditions.

위해 초기 pH를 5.0~10.0까지 조절한 chitin 배지에 선별균주를 접종하고 40°C에서 5일간 진탕배양한 후 chitinase activity를 측정할 결과 pH 7에서 가장 높은 효소 활성을 보였다.

이상에서 얻은 최적 배양조건을 이용하여 배양시간에 따른 chitinase 효소의 활성변화를 검토한 결과, *B. licheniformis* KYLS-CU01 및 *B. licheniformis* KYLS-CU02 모두 배양 후 72시간에 최대 성장하였으며, chitinase 효소활성은 96시간에서 최대값을 나타내었다. 즉, 각 선별균주와 대조군의 성장시간에 따른 chitinase 활성을 비교한 결과 *B. licheniformis* ATCC 14580, *B. licheniformis* KYLS-CU01와 *B. licheniformis* KYLS-CU02는 각각 1.0256, 1.3597 및 1.2384 U/ml로 조사되었다 (Fig. 5).

3.4. Chitinase의 정제 및 항진균 활성

Bacillus licheniformis ATCC 14580가 생산하는 chitinase의 종류는 현재까지 chitinase I (89 kDa), II (76 kDa), III (66 kDa)와 IV (59 kDa)로 알려져 있다 [18]. 본 연구에서는 *B. licheniformis*의 chitinase를 분리 및 정제하기 위하여 ammonium sulfate 침전법으로 1차 정제된 chitinase를 포함한 단백질을 DEAE-cellulose anion-exchange column chromatography를 통해 2차 정제하였다. 2차 정제된 효소활성은 *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *B. licheniformis* KYLS-CU01, *B. licheniformis* KYLS-CU02에서 각각 6.34, 7.65 및 5.21 U/mg로 나타났으며, *B. licheniformis* KYLS-CU01이 대조군보다 높은 specific activity를 보였다.

식물병원성 곰팡이의 성장을 억제하는 lipopeptide의 iturin 및 fengycin과 같은 물질과 달리 chitinase는 진균 외벽 가수분해 효소로서, 곰팡이 외벽에 용균작용을 한다. 식물병원성 곰팡이 7종을 대상으로 고체배지에서 항진균 활성을 측정할 결과 정제한 chitinase는 시들음병을 유발하는 *Fusarium sp.*에 대해서는 어느 정도 성장억제 활성을 나타내었으나 그 밖의 곰팡이에 대해서는 억제 효과가 낮게 나타났다 (Fig. 6). Chi-

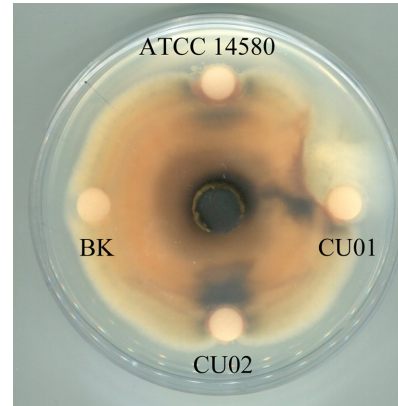


Fig. 6. Antifungal activity of purified chitinase against *Fusarium sp.* Symbols: BK, blank (50 mM phosphate buffer); *B. licheniformis* ATCC 14580; KU01, *B. licheniformis* KYLS-CU01; and KU02, *B. licheniformis* KYLS-CU02.

tinase를 첨가하지 않은 PD 고체배지에 식물병원성 곰팡이를 배양한 것을 대조군으로 하여 중심부로부터 성장한 균사체의 평균 성장 길이로 활성 저해율을 측정할 결과, *B. licheniformis* KYLS-CU01의 chitinase에 의한 각 식물병원성 곰팡이의 저해율은 *Fusarium sp.*가 73.5%로 가장 높은 성장 저해율을 나타내었으며, *A. alternata*, *C. gloeosporioides* 및 *F. culmorum*은 각각 24.8%, 24.4% 및 13.6%의 낮은 성장 저해율을 나타내었다. 이상의 결과를 바탕으로 본 연구에서 분리한 *B. licheniformis* KYLS-CU01과 *B. licheniformis* KYLS-CU02는 식물병원성 곰팡이에 대해 항진균성을 가지는 chitinase를 생산하였으며, 향후 이를 이용하여 항진균 생물농약으로 이용할 수 있는 가능성이 있음을 확인하였다.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 전라남도 7개 시·군의 황토에서 분리한 chitinase를 생산하는 미생물 중 chitinase 효소활성이 우수한 두 종을 분리하였다. 두 종 모두 형태학적 특징으로는 그림양성의 막대모양 (2~3×0.3~0.4 μm)을 하고 있었으며, 포자를 형성하고, 운동성이 있었다. 분리균주는 호기성에서 성장하며, 혐기성에서도 배양이 가능한 통성혐기성 균이었으며, catalase 활성을 나타내었다. Casein, gelatin, starch를 가수분해하였으며, D-glucose와 D-xylose를 산발효할 수 있으나, L-arabinose는 이용하지 못하였다. 두 종 분리균주의 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Bacillus licheniformis* ZHU-1과 *B. licheniformis* W61에 대해 99% 이상의 상동성을 나타내었고, NCBI GenBank에 기탁하여 *B. licheniformis* KYLS-CU01과 *B. licheniformis* KYLS-CU02로 명명하였다. 선별균주들은 대조군인 *B. licheniformis* ATCC 14580 보다 높은 extracellular chitinase 효소활성을 보였으며, chitinase 생산을 위한 배양의 최적 온도 및 pH는 각각 40°C, pH 7.0이었고, RSM을 통해 산출한 최

적 배지의 조성은 colloidal chitin 1.23 g/L, K_2HPO_4 0.88 g/L와 $MgSO_4$ 1.00 g/L이었다. 정제한 chitinase는 시들음병을 유발하는 식물병원성 곰팡이 *Fusarium* sp.에 대해 세포벽을 용균하여 식물병원성 곰팡이의 성장을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

Acknowledgements

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원 농생명산업기술개발사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다 (과제 번호 112003-3).

REFERENCES

1. Statistics Korea Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs Consumer Policy Division. Use of chemical pesticides and fertilizers. <http://www.ksbb.or.kr>. (2012).
2. Nam, H. S. (2011). Environmentally-friendly agriculture and biotic pesticide. *Korean Industrial Chemistry News* 14: 12-18.
3. Mahadevan, B. and D. L. Crawford (1997). Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces hydicus* WYEC 108. *Enzyme Microb. Technol.* 20: 489-493.
4. Raaijmakers, J. M., M. M. Leeman, P. M. M. Van Oorschot, I. van der Sluis, B. Schippers, and P. A. H. M. Bakker (1995). Dose-response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathol.* 85: 1075-1081.
5. Boller, T., A. Gehri, F. Mauch, and U. Vogeli (1983). Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157: 22-31.
6. Cabib, E. (1987). The synthesis and degradation of chitin. *Adv. Enzymol. Relat. Areas of Mol. Biol.* 59: 59-101.
7. Wiwat, C., P. Siwayaprahm, and A. Bhumiratana (1999). Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No. 4.1. *Curr. Microbiol.* 39: 134-140.
8. 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. Biotechnol. Biochem.* 61: 174-176.
9. Christodoulou, E., F. Duffner, and C. E. Vorgias (2001). Overexpression, Purification, and Characterization of a Thermostable Chitinase (Chi40) from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Protein Expr. Purif.* 23: 97-105.
10. Lee, H. S., D. S. Han, S. J. Choi, S. W. Choi, D. S. Kim, D. H. Bai, and J. H. Yu (2000). Purification, characterization, and primary structure of a chitinase from *Pseudomonas* sp. YHS-A2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 397-405.
11. De la Cruz, J., A. Hidalgo-Gallego, J. M. Lora, T. Benitez, J. A. Pintor-Toro, and A. Llobell (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European J. Biochem.* 206: 859-867.
12. Lee, Y. G., J. S. Kim, B. I. Jang, Y. S. Jang, and H. Y. Lee (2003). Biological control of pythium root rot by radiation induced mutant *Bacillus lentimorbus* WJ5a17. *Korean Soc. Environ. Biol.* 21: 276-285.
13. Hwang, J. Y., M. I. Jang, J. S. Kim, W. M. Cho, B. S. An, and S. W. Gang (2000). Mineralogy and chemical composition of the residual soils from South Korea. *J. Miner. Soc. Kor.* 13: 147-163.
14. Jeon, Y. J., Fereidoon Shahidi, and S. K. Kim (2000). Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Rev. Intl.* 16: 159-176.
15. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
16. Plackett, R. L. and J. P. Burman (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33: 305-325.
17. Kim, H. J. (1998). Studies on isolation of chitinase producing bacteria and purification and characterization from strain. Ph. D. Thesis, University of Ehwa, Seoul, Korea.
18. Takayanagi, T., K. Ajsaka, Y. Takiguchi, and K. Shimahara (1991). Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. *BBA Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1078: 404-410.