

KAERI/RR-3056/2009

방사선이용 생분해성 항진균제 개발

Development of Biodegradable
Fungicide by Radiation

KAERI

한국원자력연구원

제 출 문

한국원자력연구원장귀하

본 보고서를 2009년도 “방사선이용 생분해성 항진균제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010. 01.



KAERI

연구기관명 : 한국원자력연구원

과제책임자 : 이 영 근

참 여 자 : 김 동 섭

요 약 문

I. 제 목

방사선이용 생분해성 항진균제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

II-1) 목 적

방사선을 이용한 미생물 유래의 생분해성 항진균제를 개발

II-2) 필요성

부차적인 환경오염을 유발하는 화학농약을 대체할 수 있는 생분해성 항진균제의 개발이 요구되며, 방사선을 이용하여 항진균성을 향상시킨 돌연변이체 개발 연구가 바람직함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 작물병 방제용 미생물의 분리 및 동정
- 생화학적 생육조건 연구
- 방사선을 이용하여 항진균 활성이 향상된 미생물 돌연변이체 제조
- 항진균성 생물질 분리 및 정제
- 항진균성 생물질 생화학적 특성연구

IV. 연구개발결과

다양한 항진균성 미생물을 분리/동정하였으며, 방사선을 이용하여 항진균성이 향상된 돌연변이체를 유도하였고, 이로부터 작물병 방제용 항진균성 생물질을 확보하여 특성 및 구조를 밝혔다.

- 총 16종의 항진균성 미생물을 분리하였으며(첨부 참조), 이로부터 방사선을

이용하여 항진균 활성을 증강시킨 4종의 돌연변이체를 제조하였음 (*P. lentimorbus* WJ5a17, *Streptomyces* sp. SAR01p151, *B. gladioli* K40415 및 *B. subtilis* YS1175).

- 이중 항진균 활성이 가장 강하고, 야생종보다 41% 활성이 뛰어난 *P. lentimorbus* WJ5a17로부터 2종의 생물질을 분리/정제하고, 구조를 분석하였음.
- ; 분획 No. 9는 proton NMR spectrum, ¹³C spectrum, infrared spectrum, tandem mass spectrum 분석 결과 비교적 큰 분자량을 가지고 있으며, carboxyl기에 alkyl 그룹이 붙은 물질로 판명되었음(Benzenoid family).
- ; 분획 No. 27은 극성 잔기인 당고리를 가지고 있으며, 비교적 큰 분자량을 가진 배당체 화합물로 사료되고 (Glycoside family), 유용한 항생제로 사용이 가능할 것으로 보여지며, 강한 항진균 활성을 가지므로 농업용 항진균제로서의 사용이 유망할 것으로 사료됨.

V. 연구개발결과의 활용계획 및 건의사항

- 발견된 생물질을 원료로 생물제제를 제조하고, 실제 경작지에서 포장시험을 실시한 후 실용화 추진.
- 방사선기술을 바탕으로, 화학농약을 대체하는 친환경적인 생물제제 제조의 기반기술 전파 및 화학비료를 대체하는 생물비료 제조 연구 활성화 기대.

SUMMARY

I. Project Title

Development of Biodegradable Fungicide by Radiation

II. Objective and Objective of the Project

II-1) Objective

Development of biodegradable and microbiological fungicide by radiation

II-2) Objective

It is essential to develop the alternative and biodegradable fungicide instead of chemical pesticide by which substantial environmental pollution could occur. So it is promising to study and develop the mutants of the enhanced antifungal activity by using radiation.

III. Scope and Contents of Project

- Isolation and identification of antiphytogenic microbes
- Research for the biochemical culture condition
- Induction of microbial mutants that have the improved antifungal activity by using radiation.
- Purification of antifungal biomaterials
- Biochemical characterization of antifungal biomaterials

IV. Result of Project

Various antifungal microbes were isolated and identified. Mutants of enhanced antifungal activity were induced by using radiation. Characteristics and structure of antifungal biomaterials derived from these mutants were studied.

- Sixteen antifungal microbes were isolated and 4 antifungal activity

enhanced mutants were induced by using radiation(*P. lentimorbus* WJ5a17, *Streptomyces* sp. SAR01p151, *B. gladioli* K40415 및 *B. subtilis* YS1175).

- *P. lentimorbus* WJ5a17 had 41% higher antifungal activity than the wild type. Two biomaterials related to the antifungal activity from the above mutant were isolated and purified.
- ; Fraction No. 9 was proved to be a family of Benzenoid by the analysis of proton NMR spectrum, ¹³C spectrum, infrared spectrum, and tandem mass spectrum.
- ; Fraction No. 27 was turned out a family of Glycoside by the analysis of proton NMR spectrum, ¹³C spectrum, infrared spectrum, and tandem mass spectrum.

V. Proposal for Applications

- Industrialization is possibly expected to be followed by the verification of the field experiments and fungicide formulae made from the developed antifungal biomaterials.
- Radiation technology and the basic technology of the biopesticide production could be disseminated environmentally-friendly instead of chemical pesticide production technology.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction.....	1
Chapter 2 Current status.....	2
Chapter 3 Project content and result	3
Section 1 Isolation and identification of fungicidal microbes.....	5
Section 2 Research for biochemical growth condition.....	10
Section 3 Mutant induction of the improved antifungal activity by radiation..	12
Section 4 Purification of antifungal biomaterial.....	14
Section 5 Biochemical characterization of antifungal biomaterial.....	15
Chapter 4 Achievement.....	22
Chapter 5 Prospect.....	23
Chapter 6 Reference.....	24

목 차

제 1 장 서론	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	2
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	3
제 1 절 작물병 방제용 미생물의 분리 및 동정	5
제 2 절 생화학적 생육조건 연구	10
제 3 절 방사선이용 항진균성 향상 돌연변이체 유도	12
제 4 절 항진균성 생물질 분리 및 정제	14
제 5 절 항진균성 생물질 생화학적 특성 연구	15
제 4 장 연구개발목표 달성도	22
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	23
제 6 장 참고문헌	24

제 1 장 서론

1. 연구개발의 필요성

산업화와 현대문명의 발달로 환경오염이 가중되고 있다. 농작물의 재배와 관련하여 발생할 수 있는 경작지 오염원중에는 각종 화학합성 농약이 대표적이다. 적은 유효성분 살포량으로도 기존 농약과 대등 혹은 우월한 약효를 나타내면서 환경오염 유발을 최소화할 수 있는 미생물제제를 개발하고 도입하는 것이 시급하다. 이를 위하여, 미생물유래 환경친화적이며 생분해성인 항진균제의 개발이 요구된다.

가. 기술적 측면

- 방사선을 이용한 돌연변이체 유도기술은 유전자조작이나 화학물질을 사용하는 기술의 단점인 환경교란 또는 오염의 가능성이 배제됨.
- 미생물제제의 경우 환경적응을 위한 인위적인 조성물 첨가가 어려운 반면, 생분해성 농약제제의 경우 최소한의 첨가물만으로 제조가 가능하여 효율적인 기술임.

나. 경제·산업적 측면

- 유기농 채소·작물의 효율적 생산이 가능하여 국민의 생활수준 향상에 따른 폭증하는 수요를 충족할 수 있게 되고,
- 한.미 FTA 등 농산물 개방시대에도 국제 경쟁력을 보유한 유기농 산업화가 가능.

다. 사회·문화적 측면

- 유기농의 활성화로 안정적 농업 생산활동 및 국민의 건강 증진에 기여하며,
- 방사선의 유익한 이용의 현실적 이해 및 전파가 가능.

2. 연구개발 목표 및 내용

가. 연구개발 목표

- 항진균성 미생물 확보
- 항진균성 향상 미생물 개발 및 생물질 연구

나. 연구개발 내용

- 작물병 방제용 미생물의 분리 및 동정
- 생화학적 생육조건 연구
- 방사선을 이용하여 항진균 활성이 향상된 미생물 돌연변이체 제조
- 항진균성 생물질 분리 및 정제
- 항진균성 생물질 생화학적 특성연구

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 방사선을 이용한 돌연변이체 유도 연구는 세계적으로 전무하고, 본 연구실에서 1997년 이후 수행되어 왔음. 섬유소분해 증강.소멸 돌연변이체(*Pleurotus ostreatus*), 니켈저항성 증강.소멸 돌연변이체(*Entrobacter* spp.), 납결합성 증강.소멸 돌연변이체(*Acinotobacter* spp.), 등.
- 1960년대 벼의 고사병에 효능이 있는 blasticidin-S와 kasugamycin을 발견하였고, 의료용 항진균제인 griseofulvin이 미생물로부터 발견되어 사용됨.
- 1970년대에는 괄목할만한 polyoxin과 validamycin이 일본에서 발견되어 대부분의 벼의 병해 방제에 사용됨 (*Streptomyces* spp.).
- 1990년대부터 *Pseudomonas* spp.로부터 분리된 phenylpyrrole과 *Strobilurus tenacellus*로부터 분리된 strobilurin이 함유된 상품이 널리 사용되고 있음.
- 항진균 활성을 갖는 미생물 균주를 이용한 미생물제제는 동부한농에서 2000년에 처음으로 제품을 출시. Ecobiomed(주) 등 총 6개 벤처기업이 토양부숙제, 토양첨가제 등의 미생물제제를 개발하여 상용화를 추진중. 이와 같이 미생물제제는 지금까지 세계적으로 180여종 800여 품목이 개발중이나 미생물유래 항진균성 생물질 개발은 미약한 상태임.
- 방사선을 이용한 돌연변이 유도 및 응용기술 개발이 편리하고 환경친화적임에도 선행연구가 없다는 이유로 초기 단계에 있음.
- 미생물자체를 사용하는 농약의 개발이 시도되고 있으나(미생물제제), 누적된 사용으로 인하여 대상 병원균에 대해 저항성을 보유하게 되는 경향이 있음(*Bacillus subtilis*에 대한 *Botrytis cinerea*의 저항성 생성). 또한, 환경에 시비하였을 때 활성이 있는 균집수를 일정하게 유지하기가 힘들고, 뿐만아니라 실온에서의 저장 후에도 안정적인 활성을 유지할 수 있는 보조조성물의 조합이 여의치 않은 상태임. 따라서 이러한 단점이 저감된 생분해성.항진균성 생물질의 개발이 필요함.
- 미생물유래 생분해성 항진균성 물질의 발견이 쉽지도 않고, 발견되어도 기존에 알려진 것이거나 복합체 형태로 되어 있어서 분리.정제가 어려운 실정임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

미생물을 이용한 생물학적 방제 연구는 1990년대 초부터 세균과 곰팡이를 이용한 식물병원성 진균류 제어연구에 집중되어 수행되어오고 있다. 현재까지 알려진 미생물 살균제제의 대부분은 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Agrobacterium*, *Burkholderia* 등의 세균과 *Trichoderma*, *Gilocladium*, *Fusarium*과 같은 진균으로부터 유래한 것이다(Fravel 등, 1998). 현재 40여개에 달하는 미생물 살균제가 등록된 상태이며 대부분의 제품들은 토양전염성인 *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Phytophthora* 등의 식물병원성 진균류의 방제용 제품으로서 시장점유율이 아직 미비한 실정이다. 식물병원성 곰팡이들에 대하여 길항성을 보이는 미생물들은 각종 대사산물과 세포벽 분해효소들을 분비하여 길항작용을 하는 것으로 알려져 있다(Fravel 등, 1998). 또한 병원균이 접근할 수 없도록 미리 식물 표면을 점유하여 새로운 장벽을 형성하거나 필수 영양물질을 먼저 섭취함으로써 병원균의 생장을 억제하기도 한다. *B. subtilis*의 경우, iturin 계열의 항생물질을 분비하여 복숭아 brown rot의 병원균인 *Monilinia fructicola*을 억제하였고(Arrendale 등, 1988) *B. subtilis* NB22를 분리하여 그 활성 물질의 성분이 iturin A 물질임이 증명되었다(Ohno 등, 1996). *Pseudomonas*의 경우, 밀에 뿌리병을 일으키는 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*에 강력한 길항작용을 보이는 *P. fluorescens*을 토양에서 분리하는데 성공하였고(Weller, 1988; Cook, 1992; Weller 등, 1986), phenazine계(Keel 등, 1992; Thomashow 등, 1990) 및 2,4-diacetylphloroglucinol이란 항생물질이 밀의 뿌리썩음병 방제에 효과를 보이는 요인임이 밝혀졌다(Keel 등, 1992). *Trichoderma*의 경우, 키틴을 분해하는 chitinase을 생산하여 체외로 분비함으로써 병원성 진균의 세포벽을 분해함으로써 병원성 진균의 방제에 효과를 나타내는 것으로 알려졌다. 최근 Myxobacteria에서 발견된 soraphen 화합물이 진균류의 acetyl-CoA carboxylase를 억제하여 항진균 효과를 나타냄으로써(Gerth 등, 1994), 진균류의 tubulin(Butters 등, 1995), 미토콘드리아 호흡, 포도당 수송과 연관된 인산화 대사(Arima 등, 1965) 등이 새로운 살균제 탐색의 대상이 되고 있어 이들의 생리 활성을 억제하는 화합물들을 미생물이 분비하여 항진균 작용을 할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 식물체가 생성하는 chitinase (PR-3)와 osmotin (PR-5) 등의 PR 단백질(Lorito 등, 1996; Yun 등, 1997)을 비롯한 식물체 유래 항진균 단백질(Mauch 등, 1988)에 대한 관심 또한 증가되고 있는 실정이다.

*B. subtilis*는 높은 온도 내성, 액체 배양 시 빠른 성장, 저항성포자의 형성 등 대량생산이 용이하기 때문에 많은 연구자들의 관심을 모으고 있으며, *Saccharomyces cerevisiae* 및 *Lactobacillus* sp. 등과 더불어 미국 식품의약국

(FDA)에 의해 인체 및 환경에 무해한 미생물로 인정받고 있다. 따라서 안전하고 환경 친화적인 농산물 생산에 기여할 수 있는 유익한 미생물이라 할 수 있다. 현재 *B. subtilis*는 주로 토양전염성 식물병 방제용 종자처리제나 수확 후 야채 등의 부패방지용으로 사용되고 있다(Fravel 등, 1998; Brannen 등, 1997).

항진균성 미생물의 기능을 개량하고 특성을 연구하기 위해서는 야생형으로부터 유전자 돌연변이체를 확보해야 효과적이다. 이러한 목적으로 종래에 주로 이용되는 화학적 돌연변이원인 EMS(ethylmethane sulfonate), EtBr(ethidium bromide), MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 등은 인체에 치명적인 발암원으로 판명되어 그 사용이 극히 제한되고 있으며, UV를 이용한 돌연변이체 유도는 그 효율이 낮은 것으로 알려져 있다. 방사선은 생체고분자에 여기와 이온화를 일으키며, 적은 조사량에서도 비교적 큰 효과를 일으켜 다양한 구조적 변화를 초래하여 기능의 변화를 가져온다. 방사선은 생체고분자의 주사슬결합을 분해하거나 분자사이의 화학적 결합인 가교를 형성한다(von Sonntag, 1987). UV나 X-ray의 특성과는 달리 감마선은 투과력이 크고 선량의 강도가 커 조작의 시행횟수를 최대한 줄일 수 있어 시간과 경제적 효과 또한 뛰어나다. 생물은 감마선과 같은 이온화 방사선에 노출되면 세포 내 DNA에서 다양한 돌연변이가 야기된다 (Hutchinson, 1985; Halliwell 등, 1991; Becker 등, 1993). DNA에 나타나는 여러 종류의 손상은 한 가닥 절단(single strand break, SSB), 두 가닥 절단(double strand break, DSB), 염기 손상, 염기 손실, 변성대(denatured zone) 형성, 분자 내 가교형성, DNA-단백질 가교형성 등이다(Cerutti, 1974). 이처럼 방사선에 의해 생체고분자인 DNA에 변화가 유도되면 세포 내 DNA 회복 기작이 작동하여 회복되거나 일부의 변화는 회복되지 못하여 DNA 서열의 변화를 초래하는 원인이 된다. 감마선을 이용하여 균주의 돌연변이를 유도하는 방법은 물리적 힘을 이용한 유전자 조작방법이다. 방사선은 진화 과정을 통해 얻게 되는 유전적 변이를 단시간에 생물의 유전자에 축적시키는 효과를 주게 된다(Lee 등, 2000). 따라서 방사선 조사로 생성된 돌연변이체는 환경적응성이 높고 생태계 교란의 위험성이 미미할 것으로 추정 된다(Lee 등, 2000). 기존의 화학합성농약은 대부분 유기인 제제의 난분해성 물질로 단기간의 농산물 증산에는 도움을 주나 토양에 잔류하여 토양의 오염을 야기하고 토양 내 유용 영양원의 생물학적 최적 이용비율 및 분해능을 변화시켜 일차적으로는 토양 내에 존재하는 미생물의 성장을 억제하여 식물의 생장에 필요한 유용영양원 및 에너지원의 mineralization에 영향을 받게 된다. 따라서 이차적으로는 이러한 요인들에 의한 작물의 생산량이 감소와 비례하여 농가의 소득에 큰 영향을 미치게 된다. 따라서 미생물이나 미생물의 생산 물질을 이용한 미생물제제의 개발 및 농업에의 이용은 시

대적 흐름이며, 21세기를 주도할 생명과학산업 분야의 한 축을 형성한다.

본 연구진은 방사선을 이용한 생물 폐자원의 재이용에 관한 연구를 수행하는 과정에서 돌연변이를 이용한 유용한 폐자원 분해균주 개발 및 청정사료화 기술을 확립하였다. 이러한 기술을 바탕으로 청정사료화와 각종 농작물의 재배 시 문제되는 각종 유해곰팡이를 효과적으로 방제할 수 있는 방사선을 이용한 미생물제제의 개발은 폐자원의 효율적 이용과 이를 통한 환경오염원의 분해의 부가적 기능뿐만 아니라 농업의 생산성 향상에 기여할 것이며, 원자력의 평화적 이용에 대한 대국민홍보에도 필수적이다.

국내외적으로 항진균 활성 세균의 돌연변이체(활성 소실 혹은 증가된 특성을 갖는)의 유도에 관한 연구는 전무한 실정이다. 특히, 방사선 조사시설이 필요하고 방사성 동위원소를 이용해야 하는 특수성으로 인해 소수의 선진국에 국한되어 방사선 처리기술이 연구되고 있으며 미생물에 관련해서는 주로 식품이나 의료기기 등의 멸균에 이용되고 있고, 유용균주의 돌연변이 유도기술에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 다만 국내의 본 연구진에 의해서 유용 돌연변이체를 유발한 연구가 유일하다(Lee 등, 2000). 본 연구는 다양한 미생물로부터 새로운 항진균 활성을 나타내는 생물질을 탐색하고, 방사선으로 항진균 활성이 증강된 돌연변이체를 유도하여, 관련 생물질을 이용한 식물병원성 진균의 방제 및 환경 친화적 생물제제로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

제 1 절 작물병 방제용 미생물의 분리 및 동정

1. 재료 및 방법

염전수 및 토양 시료로부터 미생물을 분리하고자 염전수는 100 μ l를 NA(nutrient agar, Difco, USA)배지에 도말하였다. 토양시료는 멸균식염수 10 ml에 1 g을 넣어 2시간 교반한 후 침전시키고 그 상등액 100 μ l를 NA배지에 도말하였다. 각 도말한 배지를 3일간 37 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C 및 25 $^{\circ}$ C에서 배양하였다(VS-1203PF-N, Vision scientific Co.). 이후 형태적으로 특징적인 균주들을 순수 분리하여 항진균 활성 탐색을 위한 후보 균주로 이용하였다. 후보균주들은 *Candida albicans*와 16 종의 식물병원성 균주들을 대상으로 항진균 활성을 검정하였다. 항진균 활성 spectrum을 조사하기 위한 식물병원성 진균 16 종(*Alternaria alternata* KACC 40020, *Alternaria solani* KACC 40570, *Botrytis cinerea* KACC 40573, *Botryosphaeria dothidea*, *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804, *Colletotrichum higginsianum* KACC 40807, *Fusarium oxysporum* KACC 40239, *Mycosphaerella melonis*, *Phytophthora capsici* KACC 40158, *Phytophthora melonis* KACC 40193, *Phythium ultimum*

KACC 40705, *Pyricularia grisea* KACC 40415, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani* KACC 40124, *Rhizoctonia solani*(BP), *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 40923)은 한국농업과학기술원 농업미생물보존센터(KACC)로부터 분양받았다. 분리된 향진균 세균들은 생화학적 특성을 파악하기 위한 API CHB 분석은 API 50 CH 동정 키트(bioMerieux, USA)를 이용하여 분석하였으며, 순수 분리된 균체를 배지에 풀어 균액을 만든 후 49 가지의 스트립에 분주하고 배양하면 배양기간 동안 발효된 탄수화물이 산을 생성하고 pH를 떨어뜨린다. 배지에는 pH 인디케이터가 들어있어서 색의 변화로 양성/음성을 판독할 수 있으며, 이 결과로부터 동정하였다.

2. 결과 및 논의

다양한 환경으로부터 기존에 분리한 *C. albicans*에 대한 향진균 활성을 갖는 16종의 세균들과 함께 새로운 미생물 자원들을 확보하였다. 버섯 폐배지로부터 K1, K3와 K4, 온천수로부터 YS1, 삼림토양으로부터 J5171, J5272와 J5274, 해양 흙으로부터 WJ5와 WJ6, 해조류로부터 SAR01, 비닐하우스 토양으로부터 VS3, 갯벌로부터 DM1와 DM3 그리고 남해 해변에서 채취한 흙으로부터 NH6, NH10와 NH21 균주를 확보 하였다. 전라북도 부안(곰소)부근의 염전수 및 토양 시료로부터 미생물을 분리하고자 염전수는 100 μ l를 NA(nutrient agar, Difco, USA)배지에 도말하였고, 토양시료는 멸균식염수 10 ml에 1 g을 넣어 2시간 교반한 후 침전시키고 그 상등액 100 μ l를 NA배지에 도말하였다. 각 도말한 배지를 3일간 37 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C 및 25 $^{\circ}$ C에서 배양하여 형태적으로 특징적인 균주들을 순수 분리하여 향진균 활성을 탐색하였다.

API 50CHB kit를 이용한 생화학적 동정 분석을 통하여 K1 및 K3 균주는 *Bacillus circulans*(각각 78.8%와 75.0% 상동)로, J5171, J5272 및 J5274는 *B. cereus*(각각 99.8%, 99.9%와 99.8% 상동)로 각각 동정되었으며, VS3 균주는 *Bacillus marcerans*(99.9% 상동)로 DM3 균주는 *Bacillus licheniformis*(71.0% 상동)로 각각 동정되었고, NH6 균주는 *Bacillus subtilis*(92.1% 상동)와 NH21 균주는 *Bacillus licheniformis*(63.3% 상동)로 동정하였다. FAME 분석을 통하여 YS1 균주는 *Bacillus subtilis*(83.9% 상동)로 동정하였고 K4 균주는 *Burkholderia gladioli*(41.1% 상동)로 동정하였다. WJ6 균주는 API 50CHB와 FAME 분석결과 *Bacillus subtilis*(각각 61.0%와 60.7%의 상동)로 동정하였다. WJ5 균주는 FAME 분석과 16S rDNA 염기서열분석 결과 *Paenibacillus lentimorbus*(각각 75.3%와 99% 상동)로 동정하였다. SAR01 균주는 FAME 분석과 16S rDNA 염기서열 분석 결과 *Streptomyces* sp.(각각 57.5%와 99% 상동)로 동정하였다(Table 1).

이들의 향진균 활성 스펙트럼을 조사한 결과, *Burkholderia gladioli* K4, *B.*

circulans K1, *B. subtilis* YS1, *P. lentimorbus* WJ5, *B. licheniformis* DM3와 *B. licheniformis* NH21은 시험한 식물 병원성 진균 모두에 대해 항진균 활성을 보였다. *B. circulans* K3 균주는 *Phythium ultimum*(뿌리썩음병원진균)을 제외한 11 종의 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성을 나타냈다(Table 2). 그러나 삼립토양으로부터 분리한 *B. cereus* J5171, J5272 및 J5274 균주는 5-6 종의 식물병원성 진균에 대해서만 항진균 활성을 보였으며, *Streptomyces* sp. SAR01 균주 또한 7 종의 진균에 대해서 항진균 활성을 보였다. 현재까지 *Bacillus* 속과 *Pseudomonas* 속의 일부 균주가 식물병원성 진균에 대해 비교적 효과적인 생물조절제 후보로 보고되었다(Yu 등, 2002; Wang 등, 2002). *Streptomyces* 속 균주의 경우 *Rhizoctonia* 속과 *Phythium* 속 식물병원성 진균 방제에 관련한 항진균 물질과 유전자 연구가 많이 진행되었다(Jones 등, 1996; Sabaratnam 등, 2002). *Burkholderia* 속 균주의 경우는 *Fusarium* 속과 *Rhizoctonia* 속 식물병원성 진균에 국한된 방제효과에 대해서만 연구되고 있다(Peix 등, 2001). 일반적으로, 작물의 병해는 특정 병원성 진균에 의해 특이적으로 발병하는데, 작물의 성장기를 통틀어 볼 때 여러 종류의 병원성 진균에 의한 감염위험에 노출되게 마련이다. 따라서 비교적 넓은 활성 스펙트럼을 갖고 있는 K1, K3, K4, YS1 및 WJ5 균주들은 다양한 식물병원성 진균에 의한 병해를 복합적으로 방제할 수 있을 것으로 사료된다.

전라북도 부안(곰소)부근의 염전수 및 토양 시료에서 분리한 균주들은 *Candida albicans*와 16 종의 식물병원성 균주들을 대상으로 항진균 활성이 검증되었다. 그 결과 10 종의 항진균 활성균주를 신규로 분리하였다.

BA2 균주와 GOM4 균주는 식물 병원성 진균 *C. gloeosporioides*, *C. higginsianum*, *F. oxysporum*, *P. ultimum*에 대하여 항진균 활성을 나타내었다. BA2 균주의 경우는 *F. oxysporum*에 대한 활성은 없었으나, *C. gloeosporioides*, *C. higginsianum*에 강한 활성을 나타내었으며, *P. ultimum*에 대하여 가장 강한 활성을 나타내었다. 한편, GOM4 균주는 *C. gloeosporioides*, *C. higginsianum*, *F. oxysporum*에 강한 활성을 나타내었으며, *P. ultimum*에 대하여 가장 강한 활성을 나타내었다.

Table 1. Identification of microbial strains by FAME and/or API analysis

Strains	Identification	% Homology	Analysis method	Isolated locus
K1	<i>Bacillus circulans</i>	78.8	API	Mushroom compost
K3	<i>Bacillus circulans</i>	75.0	API	Mushroom compost
J5171	<i>Bacillus cereus</i>	99.8	API	Mt. Jiri soil
J5272	<i>Bacillus cereus</i>	99.9	API	Mt. Jiri soil
J5274	<i>Bacillus cereus</i>	99.8	API	Mt. Jiri soil
YS1	<i>Bacillus subtilis</i>	83.9	FAME	Yusong hot spring
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	51.7		
WJ5	<i>Bacillus lentimorbus</i>	75.3	FAME	Wooljin seaside
	<i>Panibacillus macerans</i>	49.0		
	<i>Bacillus subtilis</i>	61.0		
WJ6	<i>Bacillus subtilis</i>	60.7	FAME	Wooljin seaside
	<i>Bacillus lentimorbus</i>	54.8		
K4	<i>Burkholderia</i>	41.1	FAME	Mushroom compost
	<i>Burkholderia gladioli</i>	41.1		
SAR01	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	57.5	FAME	Deachon seaweed
	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	53.6		
VS3	<i>Bacillus marcerans</i>	99.9	API	Vinyl house soil
DM3	<i>Bacillus licheniformis</i>	71.0	API	Deachon seaside
DM1	NI	-	-	Deachon seaside
NH6	<i>Bacillus subtilis</i>	92.1	API	Namhae seaside
NH10	NI	-	-	Namhae seaside
NH21	<i>Bacillus licheniformis</i>	63.3	API	Namhae seaside

NI: no identification.

Table 2. Antifungal spectra of 16 bacteria isolated from various environments

Plant pathogenic fungi	Antifungal activities							
	K1	K3	K4	YS1	SAR0 1	J5171	J5272	J5274
<i>Alternaria alternata</i>	NT	NT	NT	+	+	+	+	+
<i>Alternaria solani</i>	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>Botrytis cinerea</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Mycosphaella melonis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Phytophthora capsici</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pythium ultimum</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Pyricularia grisea</i>	+	+	+	NT	+	-	-	-
<i>Pyricularia oryzae</i>	+	+	+	NT	NT	NT	NT	NT
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	+	+	+	NT	+	+	+
<i>Rhizoctonia solani(BP)</i>	+	+	+	+	NT	NT	NT	NT
<i>Sclerotini sclerotiorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

Plant pathogenic fungi	Antifungal activities							
	WJ5	WJ6	VS3	DM1	DM3	NH6	NH1 0	NH2 1
<i>Alternaria alternata</i>	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>Alternaria solani</i>	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>Botrytis cinerea</i>	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	-	-	-	NT	-	-	+
<i>Mycosphaella melonis</i>	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>Phytophthora capsici</i>	+	-	-	+	+	NT	NT	NT
<i>Pythium ultimum</i>	+	-	+	-	NT	NT	NT	NT
<i>Pyricularia grisea</i>	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>Pyricularia oryzae</i>	NT	-	NT	-	+	+	+	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>Rhizoctonia solani(BP)</i>	NT	-	NT	-	NT	NT	NT	NT
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+	-	-	-	+	+	+	+

+: inhibition; -: non inhibition; NT: no test

제 2 절 생화학적 생육조건 연구

1. 재료 및 방법

항진균성 균주와 이들의 돌연변이체 균주인 WJ5, WJ5a17, SAR01, SAR01p151, K4, K40415, YS1 및 YS1175를 NB배지에서 12 시간 배양한 균주 WJ5(1.87×10^7 cfu/ml), WJ5a17(1.89×10^7 cfu/ml), SAR01(5.39×10^6 cfu/ml), SAR01p151(6.83×10^6 cfu/ml), K4(2.67×10^{11} cfu/ml), K40415(5.57×10^{11} cfu/ml), YS1(2.56×10^7 cfu/ml) 및 YS1175(2.81×10^7 cfu/ml)을 희석하여 각각 다음 괄호와 같이 명명하였다.

야생형 WJ5를 멸균 증류수를 이용하여 순차적으로 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} 의 농도로 희석하여 1.87×10^6 (WJ5-1), 1.87×10^4 (WJ5-3), 1.87×10^2 (WJ5-5), 1.87×10^0 (WJ5-7), 방사선 돌연변이체 WJ5a17을 희석하여 1.89×10^6 (WJ5a17-1), 1.89×10^4 (WJ5a17-3), 1.89×10^2 (WJ5a17-5), 1.89×10^0 (WJ5a17-7)라고 하였다. SAR01은 5.39×10^5 (SAR01-1), 5.39×10^3 (SAR01-3), 5.39×10^1 (SAR01-5), 5.39×10^{-1} (SAR01-7), SAR01p151은 6.83×10^5 (SAR01p151-1), 6.83×10^3 (SAR01p151-3), 6.83×10^1 (SAR01p151-5), 6.83×10^{-1} (SAR01p151-7)라 하였으며, K4는 2.67×10^{10} (K4-1), 2.67×10^8 (K4-3), 2.67×10^6 (K4-5), 2.67×10^4 (K4-7), K40415는 5.57×10^{10} (K40415-1), 5.57×10^8 (K40415-3), 5.57×10^6 (K40415-5), 5.57×10^4 (K40415-7)라고 명명하였다. YS1은 2.56×10^6 (YS1-1), 2.56×10^4 (YS1-3), 2.56×10^2 (YS1-5), 2.56×10^0 (YS1-7) 및 YS1175는 2.81×10^6 (YS1175-1), 2.81×10^4 (YS1175-3), 2.81×10^2 (YS1175-5), 2.81×10^0 (YS1175-7)으로 하였다.

식물병원성 진균인 R.s는 한국농업과학기술원 농업미생물 보존센터로부터 분양 받은 원 균주를 PDA배지에서 1 주일 배양 후 PDB(potato dextrose broth, Difco, USA)배지로 옮겨 1 주일 배양한 액을 bead beater(Biospec Products, INC. USA)로 60 초간 균사를 분쇄한 후 멸균 증류수로 10 배 희석(2.73×10^5 cfu/ml)하였으며, 미리 준비한 각 농도별 WJ5, WJ5a17, SAR01, SAR01p151, K4, K40415, YS1 및 YS1175와 10 배 희석된 R.s를 PDB배지에 혼합 접종하여 배양하였고, 각각 접종직 후, 6, 12, 24 및 48 시간 배양 후 WJ5, WJ5a17, SAR01, SAR01p151, K4, K40415, YS1 및 YS1175는 NA배지에서 배양하였고, R.s는 hemacytometer(American Optical co. USA) 및 PDA에 Kanamycin $10 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 배지에서 배양 후 형성된 colony를 계수 하였다(Lee 등, 2001; Wang 등, 2002).

2. 결과 및 논의

K4를 PDB배지에서 1일간 배양한 액을 순차적으로 10^{-1} ($3.75 \times 10^9/\text{ml}$), 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} 의 농도로 희석하였다. 식물병원성균인

*Rhizoctonia solani*는 구입한 원 균주(KACC 40411)를 PDA(DIFCO) 배지에서 1 주일 배양 후 PDB(DIFCO) 배지로 옮겨 1 주일 배양한 액을 bead beater(Biospec Products, INC. U.S.A.)로 60 초간 균사를 분쇄한 후 10배 희석($2.73 \times 10^5/\text{ml}$)하였으며, 미리 준비한 각 농도별 K4와 10배 희석된 *R. solani*를 PDB배지에 혼합접종하여 배양하였고, 따로 K4를 각각 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} 와 *R. solani* 10^{-1} 의 농도로 하여 PDB 배지에서 배양하여 각각 접종당일, 1, 2, 3, 4 및 5일간 배양한 후 K4는 PDA배지, *R. solani*는 PDA 배지에 Kanamycin 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 배지에서 colony count를 하였다.

K4의 초기 cell량은 2.7×10^5 cfu/ml 이상의 농도에서 혼합 접종한 R.s는 48 시간 이후 더 이상 자라지 못하였으며, K4의 경우 접종 24 시간 후부터 농도가 급격히 증가하는 경향이였다. 초기 접종 량에 상관없이 48 시간 이후 6.86×10^{12} – 1.86×10^{13} cfu/ml의 수준에 도달하였다. 따라서 K4를 포함하는 제제를 만들 경우 cell량이 2.7×10^5 cfu/ml 이상만 되어도 충분한 농도라고 판단된다. 항진균성 세균의 농도별 식물 병원성진균에 대한 최소저해농도를 결정하기 위하여 *B. subtilis*의 농도를 10, 20, 30, 40 및 50%일 때 저해율을 각각 조사하여 각각에 대한 저해율이 약 39, 41, 62, 68 및 85%이었다고 하였는데(Wang 등, 2002) 본 연구에서는 72 시간 후에는 90%이상의 저해효과가 있었다.

KAERI

제 3 절 방사선이용 항진균성 향상 돌연변이체 유도

1. 재료 및 방법

항진균 활성이 있는 야생형 균주 *Paenibacillus lentimorbus* WJ5(WJ5), *Streptomyces* sp. SAR01(SAR01), *Burkholderia gladioli* K4(K4) 및 *Bacillus subtilis* YS1(YS1)을 전배양된 각 항진균 세균 1 ml을 microcentrifuge tube에 넣고 이온화 방사선(^{60}Co irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd., dose rate : 920 Gy/hr)을 조사하였다. 95%의 치사율을 보이는 방사선 조사선량에서 생존한 균체를 동물병원성 진균인 *Candida albicans*가 미리 도말된 NA(nutrient agar, Difco, USA) 배지에 접종하여 1 일 배양 후, 형태적 특징 및 항진균 활성에 변화를 보이는 특징적인 균주를 돌연변이체 후보 균주로 선정하였다. 이후, 액체 배양을 한 후, *C. albicans*가 미리 도말된 NA배지에 세균 배양액을 각 20 μl 씩 paper disc(5 mm diameter, Advantec, Toyo)에 접종하여 1 일 동안 배양한 후, 야생형 균주에 비하여 항진균 활성이 증가된 균주를 방사선 조사에 의해 유도된 돌연변이체로 선정하여 각각 *P. lentimorbus* WJ5a17(WJ5a17), *Streptomyces* sp. SAR01p151(SAR01p151), *B. gladioli* K40415(K40415) 및 *B. subtilis* YS1175(YS1175)로 명명하였고 항진균 활성이 상실된 돌연변이체 *P. lentimorbus* WJ5m4(WJ5m4)를 선별하여 식물병원성 진균 8 종에 대한 활성 검증을 하였다.

실험에 사용한 식물병원성 진균은 *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804(C.g), *Colletotrichum higginsianum* KACC 40807(C.h), *Fusarium oxysporum* KACC 40239(F.o), *Phytophthora capsici* KACC 40475(P.c), *Pythium ultimum* KACC 40705(P.u), *Rhizoctonia solani* KACC 40124(R.s), *Rhizopus stolonifer*(R.st) 및 *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 40923(S.s)으로 한국농업과학기술원 농업미생물 보존센터(KACC)로부터 분양 받았다(Table 1). PDA(potato dextrose agar, Difco, USA)배지에 식물병원성 진균을 agar plug상태로 접종하고 균사의 직경이 2 cm정도 자랐을 때 미리 NB(nutrient broth, Difco, USA)배지에 배양한 WJ5, WJ5a17, SAR01, SAR01p151, K4, K40415, YS1 및 YS1175 균주 각각의 액체 배양액 20 μl 를 paper disc에 접종하여 27°C에서 1~3 일간 대치배양 후 활성대의 형성을 관찰하였다.

2. 결과 및 논의

항진균 활성이 있는 균주 *Paenibacillus lentimorbus* WJ5(WJ5), *Streptomyces* sp. SAR01 (SAR01), *Burkholderia gladioli* K4(K4) 및 *Bacillus subtilis* YS1(YS1)을 50 Gy에서 25 kGy의 이온화 방사선을 조사하였다. 95%의 치사율을 보이는 방사선 조사선량에서 생존한 균체를 동물병원성 진균인 *C. albicans*가 미리 도말된

NA 배지에 접종하여 1 일 배양 후, 형태적 특징 및 항진균 활성에 변화를 보이는 특징적인 균주를 돌연변이체 후보 균주로 선정하였다. 돌연변이체 후보 균주로 선정된 각 균주들은 각각 *P. lentimorbus* WJ5a17 (WJ5a17), *Streptomyces* sp. SAR01p151 (SAR01p151), *B. gladioli* K4 0415 (K40415) 및 *B. subtilis* YS1175 (YS1175)로 명명하였고 식물병원성 진균 8 종에 대한 항진균 활성 검증을 한 결과 SAR01은 R.s에 대하여 항진균활성이 강하게 나타났으며 C.g, C.h에 대하여는 SAR01p151의 활성이 강하게 나타났으며(17%), WJ5a17는 WJ5 대비 C.g, C.h, F.o, R.s 및 R.st에 대하여 평균 활성이 41% 증가하였다. K40415는 K4 대비 C.g, C.h, F.o, P.c, P.u, R.s 및 R.st에 대하여 평균 활성이 18% 증가하였으며, YS1175은 YS1 대비 C.g, C.h, F.o, P.c, R.s 및 R.st에 대하여 평균 활성이 22% 증가하였다. 이 결과는 여러 가지 작물에 각종 병을 일으키는 식물병원성 진균에 대하여 WJ5, SAR01, K4, YS1과 이들의 돌연변이 균주들이 광범위한 진균에 대하여 성장억제 효과가 있음을 보여준다. Kim 등(1995)은 최근 병원성 진균과 대치배양 하여 나타나는 활성존의 크기로 병원성 진균에 대한 활성검증을 하였으나 주로 대상이 되는 식물병원성 진균들은 1~2 종에 대하여 활성 검증을 하였으며 이처럼 광범위한 활성 검증을 한 연구결과는 없다.

The logo for KAERI (Korea Atomic Energy Research Institute) is centered on the page. It features the word "KAERI" in a bold, sans-serif font. Above the text is a stylized graphic consisting of several curved lines and dots, resembling a molecular structure or a network diagram.

제 4 절 항진균성 생물질 분리 및 정제

1. 재료 및 방법

분리/동정한 항진균성 세균 중 *Bacillus* sp. 로부터 항진균 활성 물질을 분리하고, 그 특성 및 구조분석을 실시하였다.

각 균주를 37°C에서 5일간 NB 배지에서 각 500 ml씩 배양한 후, 각각의 배양액을 100 ml 취하여 동량의 butanol 및 ethyl acetate(EtOAc)를 처리한 후 overnight 하였다. 활성법에 따라 물 층, butanol층, EtOAc층을 감압 농축하여 추출하였다. 물 층에서 농축된 물질은 물에 녹인 후, 다른 두 유기용매 층에서 농축된 물질은 methanol에 녹인 후, 각 50 μ l를 Paper disc 접종 방법으로 *Candida. albicans*에 대한 항진균 활성을 측정하였다.

2. 결과 및 논의

항진균성 물질은 크게 배양 상등액의 butanol 추출 물질, ethyl acetate 추출 물질, 수용성 물질의 3가지 분획으로 확인하였다. Butanol 추출 분획에서는 K1과 K1-1004 균주와 YS1, YS1-1001 균주만이 항진균 활성이 나타났으나 항진균 활성은 미미하였다. K1-1001과 YS1-1006은 butanol 추출 분획에서 항진균 활성을 잃은 돌연변이체로 확인되었다. YS1-1006 균주는 야생형 균주인 YS1과는 달리 단백질과 부탄올 추출 분획에서 항진균 활성을 잃은 돌연변이균주로 항진균 물질 정제 및 구조분석에 대한 대조균주로서의 활용가치가 높을 것으로 판단된다. Ethyl acetate로 추출하여 감압 농축한 물질 분획에서는 분리 균주 모두 항진균 활성을 나타냈으며, 이 중 미미한 항진균 활성을 보인 K1균주와 K4 균주와는 달리 다른 항진균 세균, 즉 YS1 균주와 K3 균주의 돌연변이 균주에서 높은 항진균 활성이 나타났다. K3 균주에서 가장 높은 활성을 보였으며 돌연변이 균주들은 야생형인 K1과 YS1 균주에 비해 항진균 활성이 높게 나타났다.

*B. subtilis*로부터 bacteriocin인 subtilin과 subtilosin이 분리 동정된바 있다. Subtilin은 선형의 lantibiotics이며, subtilosin은 cyclic bacteriocin으로 생리적으로 후전자 변화들을 거쳐 class I 이나 class II의 bacteriocin으로 만들어진다. 이들은 펩티드성의 항균 물질로 추출 후 농축은 극성용매인 5 mM NH_4HCO_3 -2-propanol을 이용한다.

이러한 용매 추출에 의한 비단백질 분획 물질의 항진균 결과를 종합해보면, 비단백질성 항진균 단백질은 지용성이며 특히 ethyl acetate 층에서 분리된 항진균 활성이 높은 것으로 보아 fat나 wax 등의 중성지방산일 가능성이 큰 것으로 사료된다.

제 5 절 항진균성 생물질 생화학적 특성 연구

1. 재료 및 방법

항진균 활성 증강 돌연변이체인 *P. lentimorbus* WJ5a17과 항진균 활성 결여 돌연변이체인 *P. lentimorbus* WJ5-m12를 발효기를 이용하여 37°C, 5일간 NB 배지 9 ℓ에서 호기적 조건으로 배양한 후 7,000 rpm으로 원심분리하여 배양액만을 분리하였다. 분리된 배양액을 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 methanol 순으로 각 1 ℓ씩의 용매를 이용하여 물질을 분리한 후 각 20 ml로 농축하였다. 1차로 농축액 각 100 μl를 Paper disc 접종 방법으로 *C. albicans*에 대한 항진균 활성을 측정하였다. 다음으로 식물 병원성 진균인 *Colletotrichum gloeosporioides*를 대상으로 농축액 각 100 μl를 Paper disc에 접종하여 항진균 활성을 검사하였다. 항진균 활성 물질의 분석은 TLC(thin layer chromatography)를 methanol과 ethyl acetate의 비를 조정하여 수행 후, *A. alternata* KACC 40020를 PDA top agar 배지에 섞어 분사하여, 25°C 3일간 배양한 후 항진균 활성을 보이는 bend로 파악하였다. 항진균 물질의 생성조건을 알아보기 위해 *C. gloeosporioides*와 항진균 및 그 돌연변이 균주를 대치배양한 후 1일과 5일째의 배양액에서 물질을 분리하였다. 대치 배양 시 항진균과 식물병원성 곰팡이의 직접적인 접촉을 막기 위해 0.2 μm 필터를 이용하였으며, *C. gloeosporioides*는 포자를 회수하여 접종하였다. 항진균 활성 물질의 분리는 1차로 silica gel (Sephadex G60)을 이용한 칼럼 크로마토그래피(3×30 cm)를 수행하였다. silica gel은 *n*-hexane으로 충전하였으며, 분획은 먼저 *n*-hexane으로 시료로부터 완전 비극성 물질을 제거한 후 ethyl acetate부터 시작하여 methanol의 비를 높여가며 수행하였다. 이후 TLC(Sephadex GF254)로 순수 분리한 후 NMR과 IR 및 tandem MS 분석을 통하여 구조를 분석하였다. TLC는 ethyl acetate와 methanol의 비를 조정하여 분리하였다.

2. 결과 및 논의

가. 항진균 활성 생물질 분리

P. lentimorbus WJ5a17의 배양액의 용매별 물질 분리 후 항진균 활성 검사 결과 chloroform 및 ethyl acetate 분리 액에서만 항진균 활성을 보였으며, 나머지 분획에서는 항진균 활성이 없었다. 이는 물질이 비교적 비극성 물질로 물에 용해도가 낮을 것으로 사료된다. *P. lentimorbus* WJ5a17와 항진균 결여 돌연변이체인 *P. lentimorbus* WJ5m12의 배양액을 ethyl acetate로 추출하여 항진균 활성 검사결과 야생형 균주인 *P. lentimorbus* WJ5보다 돌연변이체 균주(*P. lentimorbus* WJ5a17)에서 높은(41%) 항진균 활성을 보였으며, 또한 야생형 균주 자체에도 생장억제 효

과를 보였다. 이 결과는 추출액에 endotoxin이 존재하는 것으로 사료되며, 돌연변이체의 경우 외부 병원성 미생물을 인식하는 부위와 endotoxin의 제어 기작이 파괴되어 배양초기부터 계속적으로 endotoxin을 분비하며, 이 분비물이 농축되어 나타난 결과로 사료된다. 물질을 알아보기 위해 ethyl acetate와 methanol의 비를 10:1로 하여 TLC를 한 후 *A. alternata* 로 항진균 활성을 검사한 결과 Rf값이 0.8인 밴드가 항진균 활성을 보이는 물질임을 알 수 있어 비극성 잔기를 가진 낮은 극성 물질일 것으로 사료되었다(Fig. 1).

Gram-positive bacteria들이 생성하는 bacteriocin들은 리보솜에서 생성되는 항균성 polypeptide들이다. 이들 bacteriocin들은 세균의 세포막에 존재하는 양이온 부위를 인식하여 작용하는 것으로 동물이나 식물에는 무해한 것으로 알려져 있다. 최초로 발견된 bacteriocin은 1925년 Andre Gratia가 분리한 colicin V로 열에 안정하며, 펩티드성 물질이다(Juan, 2001). *B. amyloliquefacience*로부터 *R. solani*에 대한 항진균 활성을 가지는 물질인 iturin A를 분리하였다(Yu 등, 2002). Iturin A는 펩티드성 항균 물질로 60-70% methanol에 용해되는 극성의 물질이다. 이상의 결과로 볼 때, 본 연구에서 분리한 항진균 물질은 기존에 알려진 극성의 펩티드성의 항균 물질인 bacteriocin과는 다른 비극성 잔기를 가진 화합물로 사료된다.

Ethyl acetate와 methanol의 비를 조절하여 칼럼 크로마토그래피로 추출액을 분획한 후 항진균 활성 검사결과, 각각 No. 9 와 No. 27의 분획 층에서 항진균 활성을 나타내었다. 분획 No. 9의 경우 chloroform에 녹으며, 물이나 methanol에는 녹지 않는 것으로 보아 아주 비극성의 물질로 사료되며, No. 27의 경우 methanol에 녹으며, ethyl acetate에는 녹지 않는 것으로 보아 비교적 극성이 높은 것으로 사료된다. 이 두 물질은 다시 TLC를 통하여 순수 분리하였으며, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 및 tandem MS로 구조분석을 하였다.

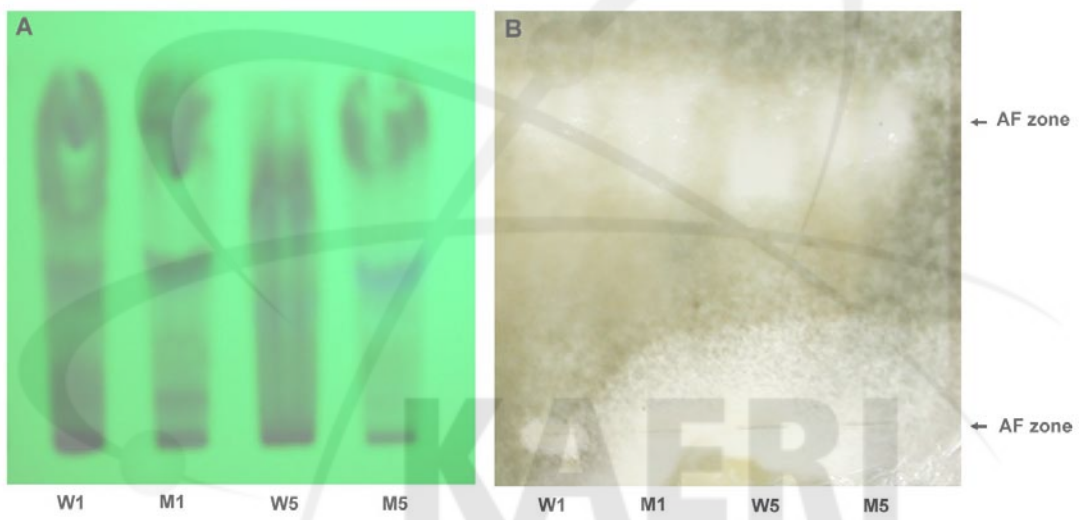


Fig. 1. Antifungal activities of fractionation materials and *P. lentimorbus* WJ5a17 and *P. lentimorbus* WJ5-m12 against *A. alternata*.

나. 항진균 활성 생물질의 구조 분석

분획 No. 9의 항진균 활성 검사결과 *C. albicans*, *A. alternata* 및 *C. gloeosporioides* 모두에 대한 항진균 활성을 가지고 있을 뿐만 아니라 야생형인 *P. lentimorbus* WJ5에 대한 항균 활성도 가지고 있어, 세균 및 곰팡이에 대한 넓은 항균 활성을 보였다. 이것으로 볼 때 분획 No. 9는 *P. lentimorbus* WJ5의 개체군 조절에 이용되는 endotoxin으로 사료되며, 외부 세균 및 곰팡이에 대한 1차 방어수단이 되는 것으로 사료된다.

분획 No. 9의 NMR을 통한 구조분석 결과 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 7-8 mg/kg 사이의 피크와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 120-140 mg/kg의 피크가 존재하는 것으로 보아 aromatic 고리를 가지고 있으며, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 160-170 mg/kg 사이의 피크로 보아 carbonyl기가 존재한다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 7-8 mg/kg 사이의 피크가 대칭구조를 이루고 있다. 이러한 피크는 전형적인 대칭구조 화합물에서 나타나는 것이다. 4-5 mg/kg 사이의 피크가 대칭을 이루고 있는 것으로 보아 benzen 고리에 carboxyl기가 붙어 있고, carboxyl 말단에 CH_2 가 붙어 있는 것으로 판단된다. DEPT135 분석 결과 4차 탄소가 2개 존재하며, $-\text{CH}_2$ 기가 5개 있고 $-\text{CH}$ 혹은 $-\text{CH}_3$ 기가 6개 존재하는 것으로 판명되었다. 또한 암모늄 그룹과 hydroxyl 그룹은 존재하지 않아 완전 비극성물질로 사료된다. IR 분석결과 1000 이하의 흡광도를 갖는 복잡한 피크로 보아 aromatic 고리와 alkyl기가 존재하며, 3000 부근의 흡광도 피크로 볼 때 carbonyl기가 존재함을 알 수 있었다. 그러나 3500부근의 피크가 존재하지 않는 것으로 보아 hydroxyl 그룹은 존재하지 않는 것으로 보인다. Tandem MS 분석결과 분자량은 391로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때, 분획 No. 9의 경우 비교적 큰 분자량을 가지고 있으며, carboxyl기에 alkyl 그룹이 붙은 benzenoid 계열의 물질로 사료된다(Fig. 2).

Benzene 고리를 가진 살균제는 크게 둘로 나뉘는데 ① 비침투성 살균제인 염소치환 방향족 살균제는 주로 토양이나 종자처리제로 사용된다. 여기에는 *Rhizoctonia* sp. 방제에 효과적인 PCNB(pentachloronitrobenzene), *B. cinerea* 방제에 사용되는 Tecnazene, 광범위한 생물학적 작용범위를 갖지만, 사람에게 대한 독성이 낮으며, 포자 발아의 저해에 효과적인 Dichlone가 있다. ② 침투성 유기 살균제는 자낭균, 담자균 및 불완전균 등에 유용한 Benzimidazole과 흰가루병 방제용으로 benomyl 및 노균병 방제용으로 carbendazim 등이 속한다.

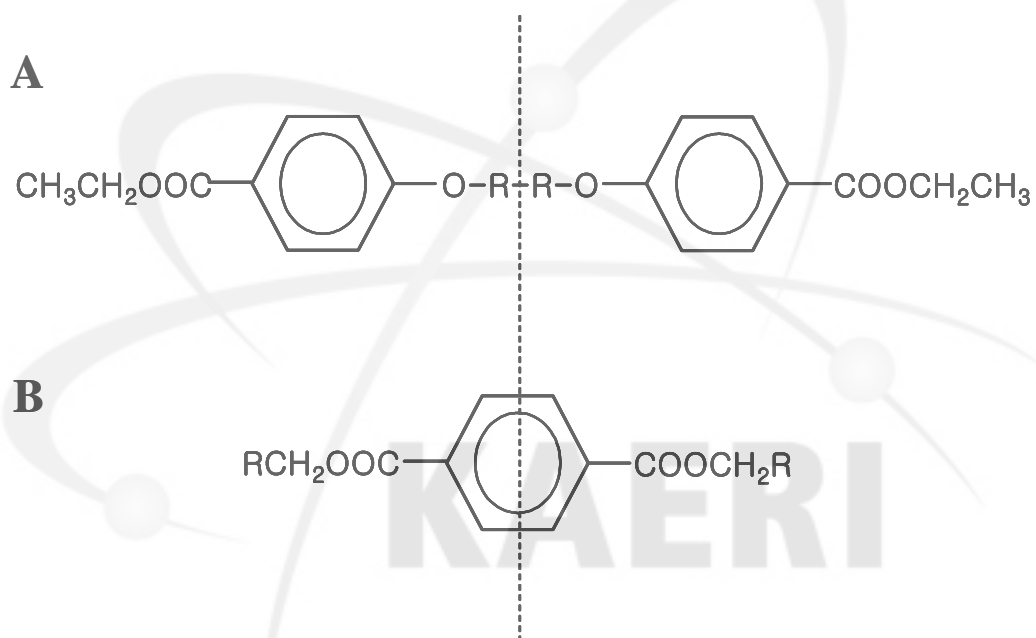


Fig. 2. The structure of a antifungal substance No. 9 (benzenoid family).

분획 No. 27의 NMR을 통한 구조분석 결과 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 3.5-4.5 mg/kg 사이의 피크와 4.8 - 5.0 mg/kg 사이의 hydroxyl 그룹 피크가 존재하는 것으로 보아 당을 가지고 있으며, ^{13}C spectrum에서 100-160 mg/kg 사이의 피크가 존재하지 않는 것으로 보아 aromatic 고리는 존재하지 않는 것으로 보여 진다. 당에 있는 hydroxyl 그룹으로 인하여 이 물질의 경우 비교적 높은 극성을 띠는 것으로 사료되며, 비교적 간단한 구조를 이루고 있을 것으로 사료된다. Tandem MS 분석결과 분자량은 369.25로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때, 분획 No. 27의 경우 극성 잔기인 당고리를 가지고 있으며, 비교적 큰 분자량을 가진 배당체 화합물로 사료된다(Fig. 3).

분획 No. 27의 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성 검사결과 *C. albicans*에 대한 항진균 활성은 보이지 않았으나, *C. gloeosporioides*에 대해서는 강한 항진균 활성을 보였다. 이 결과로 볼때 분획 No. 27이 *P. lentimorbus* WJ5a17의 개체균 조절을 위해 분비되는 endotoxin이 아닌 병원성 곰팡이와의 상호작용에 의해 유도되어져 생산된 항진균 활성 물질로 사료된다. 분획 No. 27의 *Alternaria alternata*에 대한 항진균 활성 검사결과 최소 저해농도는 100 μg 이하로 나타났다.

배당체 그룹을 가진 항생제들은 광범위한 항균 활성을 가지나 곰팡이에 대한 활성은 비교적 약한 편이다. 배당체로 항균 활성을 가지는 것으로는 streptomycin류, neomycin류 및 kanamycin류 등이 있다. Streptomycin류는 주로 *Streptomyces* sp.에 의해 생성되는 것으로 L-streptose, N-methyl-L-glucosamine을 구성단위로 하는 배당체 화합물이다. Neomycin류는 주로 *Streptomyces* sp.에 의해 생성되나 *B. circulans*에서도 ribostamycin 과 butirosin(S)의 생성이 보고되었다. Neomycin에는 D-ribose와 neosamine으로 구성된 것도 있다. Kanamycin류는 3개의 당고리를 주 골격으로 하는 항생물질로 kanamycin A가 주성분이다.

이상의 결과로 볼 때 본 연구의 분획 No. 27은 유용한 항생제로 사용이 가능할 것으로 보여 지며, 강한 항진균 활성을 가지므로 농업용 생물제제로서의 사용이 가능할 것으로 사료된다.

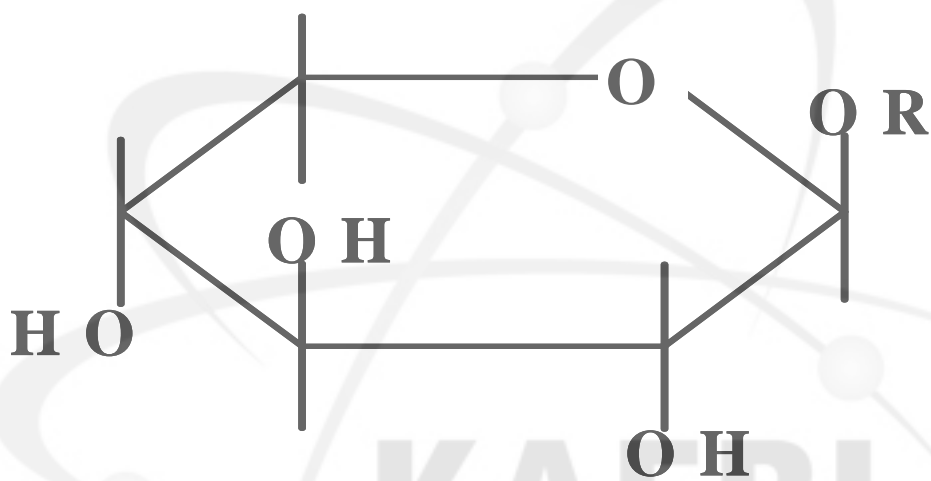


Fig. 3. The structure of a antifungal substance No. 27 (glycoside family).

제 4 장 연구개발목표 달성도

연구목표	연구결과	달성도(%)
<ul style="list-style-type: none"> ○항진균성 미생물 확보 ○항진균성 향상 미생물 개발 및 생물질 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ○작물병 방제용 미생물 분리 및 동정 (16종) ○방사선이용 항진균 활성이 향상된 미생물 돌연변이체 제조 (4종) ○항진균성 생물질 분리 및 정제 (2건) ○항진균성 생물질 구조 분석 (2건) 	100 %



KAERI

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 발견된 생물질을 원료로 생물제제를 제조하고, 실제 경작지에서 포장시험을 실시한 후 실용화 추진.
- 후속연구기간 상반기에 생물제제의 제제화 연구를 수행하고, 하반기에 포장시험 및 기술이전 수행.
- 생물질 및 생물제제에 대한 특허출원을 완료하고 (현재, 특허출원을 위한 균주 기탁 완료, 2종), SCI 저널에 발표하며, (주)바이프롬 등의 업체에 생산 및 실용화 기술이전 계약체결.
- 방사선기술을 바탕으로, 화학농약을 대체하는 친환경적인 미생물제제 제조의 기반기술 전파 및 화학비료를 대체하는 생물비료 제조 연구 활성화 기대.
- 본 연구과제 분야를 확대하여, 국가시책인 ‘녹색성장’에 적합한 ‘방사선을 이용한 복합기능성 생물비료의 개발’ 등 새로운 과제의 창출/수주를 추진.
- 주로 중소기업체에서 생물제제를 생산하고 있는 실정이어서 국가 차원에서의 부양책을 시행하여야 하며, 저렴한 비용으로 기술이전을 유도하여 실용화를 촉진해야함.

제 6 장 참고문헌

- Arima, K.H., M. Imanaka, A. Kousaka, A. Fukuda, and G. Tamura, 1965. Studies on pyrrolnitrin: Isolation and properties of pyrrolnitrin. *J. Antibiot.* 18: 201-204.
- Arrendale, R.F., R.C. Gueldner, O.T. Chortyk and F.G. Crumley, 1988, Characterization of the amino acids of antifungal peptides from *B. subtilis* by cold on-column injection capillary GC/MS, *Journal of Microbiological Methods*, 8: 249-257.
- Becker, D. and M. Sevilla, 1993. The chemical consequences of radiation damage to DNA. *Adv. Radiat. Biol.* 17:121-180.
- Butters, J. A., S.J. Kendall, I.E. Wheeler, and D.W. Hollomon. 1995. Tubulins: lessons from existing products that can be applied to target new antifungals, pp. 131-142. *In* G.K. Dixon, L.G. Copping and D.W. Hollomon(eds). *Antifungal agents-discovery and mode of action*. Bios Scientific Publisher, Oxford.
- Cook, R.J. 1992. Wheat root health management and environmental concern. *Can. J. Plant Pathol.* 14: 76-85.
- Fravel, D.R., W.J Connick, and J.A. Lewis 1998. Formulation of microorganisms to control plant diseases. pp. 187-202. *In* H.D. Burges(eds). *Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms and nematodes and seed treatments*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London.
- Gerth, K., N. Bedrof, H. Irschik, G. Hofle, and H. Reichenbath. 1994. The soraphens: A family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum*(Myxobacteria). I. Soraphen A1 alpha: fermentation, isolation, biological properties. *J. Antibiot.* 47: 23-31.
- Halliwell, B. and Aruoma, O.I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian cells. *FEBS Lett.* 281: 9-19.
- Hutchinson, F. 1985. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog. Nucleic. Acid Re.* 32: 115-154.
- Jones, C.R. and Samac, D.A. 1996. Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping-off with a disease-suppressive strain of *Streptomyces*. *Biol. control* 7:196-204.
- Juan, C. O., and A. G. Pisabarro. 2001. Classification and mode of action of

- membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* 4: 13-19.
- Keel, C., U. Schnider, M. Maurhofer, C. Voisard, J. Laville, U. Burger, P. Wirthner, D. Haas, and G. Defago. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 4-13.
- Kim, J. W., J. J. Han, Y. N. Choi, J. H. Eom, S. J. Yoon, C. G. Hyun and J. W. Suh. 1995. Cloning and Sequencing of Resistance Determinants to Aminoglycoside Antibiotics from *Streptoalloteichus hindustanus* ATCC 31219. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23(4): 384-389.
- Lee, Y.-K., H.-H. Chang, J.-S. Kim and K.-S. Lee 2000. Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities. *Radiat. Phys. Chem.* 57: 145-150.
- Lee, Y.-K., Kim, J.-K., Song, I.-G., Chung, H.-Y. and Chang, H.-H. 2001. Characteristics of antifungal bacterium, *Bacillus subtilis* YS1 and its mutant induced by gamma radiation, *Kor. J. Microbiol.* 37: 305-311.
- Lorito, M., S.L. Woo, M.D' Ambrosio, G.E. Harman, C.K. Hayes, C.P. Kubicek, and F. Scala. 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Mol. Plant Microb. Interact.* 9: 206-213.
- Ohno, A., T. Ano and M. Shoda, 1996, Use of soybean curd residue, okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22, *Process Biochemistry*, 31: 801-806 .
- Peix, A., Mateos, P.F. Barrueco, C.R., Molina, E.M. and Velazquez, E. 2001. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1927-1935.
- Sabaratnam, S. and Traquair, J.A. 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biol. control* 23: 245-253.
- Thomashow, L.S., D.M. Weller, R.F. Bonsall, and L.S. Pierson III. 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.*

56: 908-912.

von Sonntag, C. 1987. The chemical base of radiation biology. London. Taylor & Francis.

Wang C.-H., I.-L. Shih and S.-L. Wang, 2002, Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*, Enzyme and Microb. Technol., 6119: 1-8.

Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407.

Weller, D.M. and R.J. Cook. 1986. Increased growth of wheat by seed treatment with fluorescent *Pseudomonas*, and implications of *Pythium* control. *Can. J. Plant Pathol.* 8: 328-334.

Yun, D.J., Y. Zhao, J.M. Pardo, M.L. Narasimhan, B. Damsz, H. Lee, L.R. Abad, M.P. D'Urzo, P.M. Hasegawa, and R.A. Bressan. 1997. Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 7082-7087.

Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L. and Bertagnolli, B.L. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* 34: 955-963.

KAERI

서 지 정 보 양 식

수행기관보고서번호	위탁기관보고서번호	표준보고서번호	INIS 주제코드
KAERI/RR-3056/2009			
제목 / 부제	방사선이용 생분해성 항진균제 개발		
연구책임자 및 부서명	이영근, 방사선생명공학연구부		
연구자 및 부서명	김동섭, 방사선식품유종연구부		
출판지	대한민국	발행기관	한국원자력연구원
페이지	32 p.	도표	있음(○), 없음()
출판년			2010
크기			Cm.
참고사항			
공개여부	공개(○), 비공개()		보고서종류
비밀여부	대외비 (X), _ 급비밀		연구보고서
연구위탁기관			계약번호
초록 (15-20줄내외)	<p>부차적인 환경오염을 유발하는 화학농약을 대체할 수 있는 생분해성 항진균제의 개발을 위하여 방사선을 이용하여 항진균성을 향상시킨 돌연변이체 개발 연구를 수행하였다. 작물병 방제용 미생물의 분리 및 동정, 생화학적 생육조건 연구, 방사선을 이용하여 항진균 활성이 향상된 미생물 돌연변이체 제조, 항진균성 생물질 분리 및 정제, 항진균성 생물질 생화학적 특성연구 및 구조를 밝혔다.</p>		
주제명키워드 (10단어내외)	생분해성, 항진균제, 방사선, 돌연변이, 항진균성 생물질		

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET

Performing Org. Report No.	Sponsoring Org. Report No.	Standard Report No.	INIS Code	Subject	
KAERI/RR-3056/2009					
Title / Subtitle	Development of biodegradable fungicide by radiation				
Project Manager and Department	Young-Keun Lee, Radiation application division for biotechnology				
Researcher and Department	Dong Sub Kim, Radiation application division for food and agriculture				
Publication Place	Korea	Publisher	KAERI	Publication Date	2010
Page	32 p.	Ill. & Tab.	Yes(○), No ()	Size	Cm.
Note					
Open	Open(○), Closed()		Report Type	Research	
Classified	Restricted(X), Document	___Class			
Sponsoring Org.			Contract No.		
Abstract (15-20 Lines)	<p>To develop the fungicide which is biodegradable and alternative to chemical pesticide that has an side effect of environmental pollution, Mutant induction of the enhanced antifungal activity was studied by using radiation. Characteristics and structure of antifungal biomaterials derived from these mutants were analysed. Sixteen antifungal microbes were isolated and 4 antifungal activity enhanced mutants were induced by using radiation. <i>P. lentimorbus</i> WJ5a17 had 41% higher antifungal activity than the wild type. Two biomaterials related to the antifungal activity from the above mutant were isolated and purified.</p>				
Subject Keywords (About 10 words)	Biodegradable, Fungicide, Radiation, Mutant, Antifungal biomaterial				