

발간등록번호
11-1543000-000661-01

Cyclic lipopeptide의 생산능이 증대된 길항 미생물
*Bacillus*의 개발 및 산업화

(Development and industrialization of antagonistic
microorganism *Bacillus* to enhance the productivity
of cyclic lipopeptide)

한국생명공학연구원

농림축산식품부

발간등록번호
11-1543000-000661-01

Cyclic lipopeptide의 생산능이 증대된 길항 미생물
*Bacillus*의 개발 및 산업화

(Development and industrialization of antagonistic
microorganism *Bacillus* to enhance the productivity
of cyclic lipopeptide)

한국생명공학연구원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Cyclic lipopeptide의 생산능이 증대된 길항 미생물 *Bacillus*의 개발 및 산업화”에 관한 연구과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 11월 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 김 성 옥

세부연구책임자 : 김 성 옥

연 구 원 : 김 영 태, 김 성 인

연 구 원 : 이 원 정

협동연구기관명 : (주)그린바이오텍

협동연구책임자 : 이 재 호

연 구 원 : 조 민 섭, 김 종 협

연 구 원 : 원 석 민, 최 기 현

요 약 문

I. 제 목

Cyclic lipopeptide의 생산능이 증대된 길항 미생물 *Bacillus*의 개발 및 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

오래 전부터 품종 개량, 비료 투입, 토양 개량, 화학적으로 합성된 농약의 사용 및 영농의 기계화 등은 오랫동안 인류의 식량생산과 작물보호에 크게 이바지하여 왔다. 그러나 반복적인 농약의 사용과 과다한 화학비료의 투입으로 인해 토양의 산성화와 농산물의 잔류독성 및 환경오염 등으로 인해 많은 사회적인 문제가 대두되고 있고, 국내에서도 2013년까지 현재 사용하고 있는 화학농약과 화학비료의 사용량을 40%를 감축할 예정으로 있어 농약과 비료의 사용량을 감소시키면서 농산물의 생산성을 증가시키기 위한 생물학적 제제 이용 연구가 활발해 지고 있다. 이러한 연구는 이미 오래 전부터 유용 세균을 대상으로 광범위하게 진행되어 왔고 초기의 연구에서는 질소고정, 인산의 가용화, 항생물질의 생산과 식물생장 조절제 등과 같은 식물과 세균의 상호작용에 대한 생리적인 면에 치중하였다. 이렇게 식물의 질병을 억제하거나 생장을 촉진하는 능력을 나타내는 여러 종류의 길항 미생물들이 오래 전부터 연구되어 왔으며 *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp. 및 *Trichoderma* sp. 등 수 많은 미생물들이 생물학적 방제의 가능성을 나타내어 길항작용이 우수한 길항 미생물들의 분리와 분자생물학적인 방법을 이용한 균주의 개량이 시도되고 있다. 특히 최근에는 well-being 문화의 확산으로 인해 청정 농산물을 요구하는 소비자들의 수요가 나날이 증가하고 있고, 유기 합성농약을 대체할 수 있는 유일한 대안인 생물학적 방제제에 대한 관심이 나날이 증가되고 있어 길항작용이 뛰어난 미생물의 확보가 시급한 실정이다.

이러한 추세에 따라 국내 토양으로부터 분리한 6종류의 iturin을 생산하고, 여러 종류의 식물 병원성 곰팡이에 대해 강한 항균활성을 나타내는 길항 미생물 *B. subtilis* 균주를 이용하여 iturin 생산능이 증대된 균주를 개발하고자 한다. 또한 분자 수준에서 길항 미생물 *Bacillus* 균주의 개량을 시도하여 균주 개발에 대한 과학적인 근거를 제공하고 산업화 활용 가능성을 타진하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 1). 조사를 통한 iturin 高生産 돌연변이주의 확보
- 2). 상업적인 제품에 활용되고 있는 *Bacillus* 균주와 iturin 高生産 돌연변이주의 항균활성 비교

- 3). 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 균주로부터 얻은 iturin 생합성 유전자의 염기서열 결정과 2차 대사산물의 분석
- 4). Iturin 高生産 돌연변이주를 이용한 iturin 생합성 관련 유전자 변이 조사
- 5). NGS 염기서열 결정으로 확인된 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 point mutation에 따른 iturin 생합성 유전자의 발현 양상 비교 분석
- 6). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 *Botrytis cinerea*에 대한 포자 발아 억제 효과
- 7). 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 장기 보존에 따른 항균력 변화 가능성 조사
- 8). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54와 야생주의 iturin 생산능 비교
- 9). Site-directed mutagenesis 형질전환 벡터의 제조
- 10). 분자 수준에서 iturin 생합성 유전자와 site-directed mutagenesis를 이용한 *B. subtilis* 균주의 개량

IV. 연구개발 결과

- 1). 자외선 조사를 통한 iturin 高生産 돌연변이주의 확보

야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis*로부터 유래된 자외선 돌연변이주 M1891과 UV4-II 균주를 이용하여 더욱 더 iturin 생산능이 증대된 돌연변이주를 얻기 위하여 2.80 mW/cm²로 자외선을 처리하고 0.1% 이내의 생존율을 나타내는 적정 처리 시간을 조사하여 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* M1891는 25분, UV4-II 균주는 30분으로 정하였다.

Iturin 생합성능이 증대된 자외선 돌연변이주를 선별하기 위하여 자외선으로 처리한 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* M1891과 UV4-II 균주 현탁액을 평판 배지에 도말하고 평판 위에 *F. oxysporum* 현탁액이 함유된 soft agar를 분주하고 25°C 에서 배양하여, 변이주 30,000여종의 집락으로부터 자외선으로 처리하기 전의 모 균주보다 2-3배 항균력이 증대된 자외선 돌연변이주 No. 54를 선별하였다.

- 2). 상업적인 제품에 활용되고 있는 *Bacillus* 균주와 iturin 高生産 돌연변이주의 항균 활성 비교

자외선 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* No. 54 균주의 항균력과 상업적으로 사용되고 있는 제품 (Serenade 2종, 에코제트 1종, Kodiak 1종)으로부터 분리한 *B. subtilis* 균주들과의 항균력을 비교하였다. 분리한 각각의 균주를 iturin 생산배지를 이용하여 30°C에서 72시간 동안 진탕배양하고 여과한 상등액을 *F. oxysporum*이 함유된 평판을 이용하여 활성 검정을 행한 결과 선별한 No. 54 돌연변이주가 다른 기존 제품에 사용된 균주보다 더 강한 저해 활성을 나타내어, 이 균주를 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 균주로 명명하였다.

3). 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 균주로부터 얻은 iturin 생합성 유전자의 염기서열 결정과 2차 대사산물의 분석

이전 연구를 통해 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079의 genomic library로부터 염기서열 결정을 통해 6개의 ORF로 구성되어 있는 37,645 bp의 iturin 생합성 유전자를 확보하고 GenBank에 기탁하였다 (GenBank accession No. KC454625). 이 유전자 가운데 ORF3에 해당되는 중간 부위에 mini-Tn10 transposon이 삽입된 mutant-10 돌연변이주는 야생주에 비해 iturin 생합성이 현저하게 감소한 것을 HPLC를 통해 확인하였으며, 또한 야생주는 6 종류의 iturin (iturin A~F)을 생산하는 것을 LC-MS를 통해 재확인하였다. 야생주로부터 얻은 iturin 생합성 유전자의 각 ORF들을 최근의 database를 이용하여 비교해 본 결과 ORF2~ ORF5은 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 균주의 surfactin synthetase 유전자들과 99%로 상동성을 나타내었다. 비록 야생주의 ORF들이 *B. amyloliquefaciens* 균주의 surfactin synthetase들과 높은 상동성을 나타내었으나, ORF3에 mini-Tn10을 삽입하여 얻은 iturin-less 돌연변이주에서는 야생주에 비해 iturin의 생성능이 30% 정도 감소하였고, LC-MS를 통해서도 야생주는 6종류의 iturin을 생성하는 것을 재확인하였기 때문에 야생주로부터 얻은 생합성 유전자는 iturin 생합성 유전자로 추정되었다.

야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 균주와 mutant-10 균주가 iturin 이외에 다른 cyclic lipopeptide를 생산하는지의 여부를 HPLC와 LC-MS를 이용하여 조사한 결과 야생주와 mutant-10 균주 모두에서 iturin 이외에 소량의 surfactin도 함께 생산한다는 것을 알 수 있었으나 생산량은 iturin에 비해 매우 미약하였다. 또한 mini-Tn10 유래의 spectinomycin 저항성 유전자가 삽입되어 야생주보다 iturin 생산량이 30% 감소된 mutant-10 돌연변이주에서는 검출된 surfactin 양이 야생주보다 오히려 2배 정도 더 많이 검출되었다. 이러한 결과들을 종합해볼 때 비록 야생주로부터 얻은 iturin 생합성 유전자가 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*의 surfactin synthetase 유전자와 높은 상동성을 나타내었으나, 이 유전자는 surfactin 생합성 유전자가 아니고 iturin 생합성 유전자로 사료되었다.

4). Iturin 高生産 돌연변이주를 이용한 iturin 생합성 관련 유전자 변이 조사

Iturin 생산능이 증대된 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 돌연변이주를 이용하여 야생주보다 항균활성이 증진된 원인을 분자수준에서 규명하기 위하여, Next Generation Sequencing (NGS)을 실시하고, 야생주의 iturin 생합성 유전자 37,645 bp와 비교하여 돌연변이가 일어난 부위를 비교분석하였다. 자외선 돌연변이주 BSM54에서는 iturin 생합성 유전자 중 6곳에서 야생주와 다른 point mutation을 발견하였는데, ORF1 upstream에서 1곳 (M1), ORF2 부위에서 5곳 (M2-M6) 등 모두 6 부위에서 다른 염기로 치환된 것을 알 수 있었다. 또한 돌연변이가 일어난 6곳 중 ORF1의 upstream region에 나타난 M1 point mutation은

돌연변이가 일어난 부분의 mRNA secondary structure에 변화를 가져올 것으로 예측되었다. 이러한 결과로부터 M1 point mutation은 ORF 앞쪽 promotor에 대한 변화로써 transcription 단계에서 iturin 생합성에 영향을 나타낼 가능성이 있는 반면에 M3 point mutation은 translation 후 얻은 최종 유전자 산물에 따른 phenotype의 변화로 나타날 가능성이 있을 것으로 예상되었다.

5). Iturin 高生産 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 point mutation에 따른 iturin 생합성 유전자의 발현 양상 비교 분석

자외선 조사를 통해 얻은 iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54를 이용하여 iturin 생합성 관련 유전자 ORF1부터 ORF5까지 각 ORF들의 발현양이 증가하였는지의 여부를 야생주와 비교하였다. 먼저 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54와 야생주 *B. subtilis*를 LB 배지를 이용하여 30°C에서 24, 48 및 72시간 간격으로 배양하여 얻은 total RNA를 분리정제하고, cDNA를 합성한 후 real-time PCR을 행하였다. 그 결과 자외선 돌연변이주 BSM54의 ORF2~ORF5의 발현량은 48시간 이후 야생주와 비교해볼 때 상대적으로 더 증가하였으며, 특히 ORF2~4에서는 매우 커다란 차이를 나타내어, iturin 高生産 돌연변이주 BSM54는 point mutation에 의한 유전자의 변이로 iturin 생합성에 관련된 유전자들이 모두 야생주보다 그 발현량이 증대됨을 알 수 있었다.

6). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 *Botrytis cinerea*에 대한 포자 발아 억제 효과

자외선 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54와 야생주 *B. subtilis*를 iturin 생산배지에서 3일 동안 배양하여 염산으로 처리하고 생성된 침전물을 중화시킨 후 다시 butanol로 처리하여 얻은 butanol 분획물을 감압 농축하였다. 포자 발아를 억제하는지를 조사하기 위하여 잣빛 곰팡이병 원인균인 *Botrytis cinerea*의 포자를 10^6 spores/ml가 되도록 현탁하고, butanol 분획물을 각각 125~500 μ g/ml가 되도록 첨가하여 hole slide glass를 이용하여 25°C에서 6시간 동안 배양한 후 현미경으로 포자 발아 유무를 관찰하였다.

동일한 농도인 125 μ g/ml의 butanol 분획물 처리구에서는 돌연변이주 BSM54와 야생주 간에 *B. cinerea*의 포자 발아 억제에 커다란 차이를 나타내지 않았으나 250 μ g/ml의 butanol 분획물 처리 시에는 돌연변이주 BSM54가 야생주에 비해 2배 이상 더 강하게 포자 발아를 억제하였다. 특히 500 μ g/ml 처리 시에는 야생주에서는 43.5%의 포자 발아 억제율을 나타낸 반면 BSM54 균주에서는 포자 발아가 전혀 일어나지 않아, 250 μ g/ml 이상의 동일 농도에서는 돌연변이주 BSM54가 야생주보다 *B. cinerea*의 포자 발아를 더 강하게 억제하였다.

7). 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 장기 보존에 따른 항균력 변화 가능성 조사

Iturin 高生産 자외선 돌연변이주 BSM54를 보존하는 동안 돌연변이가 일어나기 전의 상태인 revertant로 복귀하는 지의 여부를 조사하기 위하여 자외선 돌연변이주 BSM54를 glycerol에 stock하여 -70°C 냉동고에 보존하면서 2개월 이후부터 1개월 간격으로 최대 2년 까지 저장 기간에 따른 항균력의 변화를 *F. oxysporum*에 대한 생육 저지환의 크기로 측정하고 야생주와 비교하였다. 자외선 돌연변이주 BSM54의 항균력은 저장 기간에 따라 다소 항균력에 근소한 차이를 나타내었으나, 전반적으로 보관 2개월부터 2년까지의 기간 동안 항균력에 커다란 차이를 나타내지 않았다.

8). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54와 야생주의 iturin 생산능 비교

야생주 *B. subtilis*와 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 butanol 추출물을 감압 농축하여 얻은 butanol 분획물에 함유되어 있는 iturin 화합물의 생산능을 HPLC와 authentic iturin A 화합물을 이용하여 비교 분석하였다. 야생주와 돌연변이주 BSM54의 butanol 분획물의 HPLC 크로마토그램으로부터 iturin 생산능을 정량적으로 분석한 결과 야생주와 돌연변이주는 butanol 분획물 가운데 iturin이 각각 4.175%와 8.716%로 나타나 동일 조건에서 돌연변이주 BSM54로부터 생산된 iturin의 양이 야생주보다 약 2배 더 증가하였다.

9). Site-directed mutagenesis용 형질전환 벡터의 제조

야생주 *B. subtilis*에 자외선 돌연변이주 M1 point mutation 대상 부위를 포함하는 ORF1 region을 클로닝하기 위해 primer ORF1_u-f (5' -TAATCGCCGTCAGTTCCTCG-3')와 ORF2-r (5' -TTCTCATCGACTCATACCGC-3') 및 Accu Power Pfu PCR Premix를 사용하여 약 1.8 kb의 PCR 산물을 얻었다. PCR 산물과 pUC19 vector를 모두 *EcoRI*으로 절단한 후 4°C에서 16시간 ligation 반응을 실시하고 *E. coli* DH5a competent cell에 형질전환 하였다. 이렇게 얻은 pBSM54-orf1을 다시 *BamHI*과 *XbaI*으로 double digestion하고, pIC333으로 부터 위와 동일한 제한효소 처리로 얻어진 spectinomycin resistance gene cassette을 ligation하여 pBSM5-orf1-sp 형질전환 벡터를 제조하였다.

10). 분자수준에서 돌연변이가 일어난 iturin 생합성 유전자와 site-directed mutagenesis를 이용한 야생주 *B. subtilis* 균주의 개량

Iturin 高生産 돌연변이주인 BSM54의 iturin 생합성능을 더욱 더 증진시키기 위하여 point mutation 이 일어난 6곳의 site 가운데 아미노산 치환이 일어나지 않은 부위 중 먼저 iturin 생산에 영향을 미칠 것으로 예상되는 M1 point mutation 부위의 염기를 대상으로 site-directed mutagenesis를 시도하였다. 앞서 proofreading DNA polymerase를 이용한 PCR로 얻은 M1 point mutation site를 포함한 ORF1

유전자 부위와 QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit 및 mutagenic primer들을 이용하여 site-directed mutagenesis를 위한 형질전환 벡터 pBSM54-orf1-sp-1을 최종적으로 제조하였다.

야생주 *B. subtilis* 균주를 site-directed mutagenesis를 이용하여 형질전환하기 위하여 야생주를 modified Spizizen 배지에 배양하고, 580 nm에서 흡광도가 1.0일 때 배양액과 형질전환 벡터 pBSM54orf1-sp-1을 혼합하고, 60 µg/ml의 spectinomycin이 첨가된 LB 배지에 도말하여 생육한 집락들을 1차 선별하였다. 또한 선별한 집락을 대상으로 형질전환 유무를 확인하기 위하여 orf1-f3, spcfl, spc-f2, hxlr1 및 hxl-r2 primer들을 이용하여 PCR을 수행하고 대조구와 동일한 크기의 PCR 산물이 검출된 저항성 집락들을 먼저 선별하였다. 선별된 형질전환주의 단일 집락들을 iturin 생산배지에 배양하고 얻은 상등액을 *F. oxysporum*이 함유된 검정용 평판배지에서 활성검정을 행한 결과 형질전환주 T1과 T6는 야생주보다 *F. oxysporum* 균주를 이용한 활성검정 시 생육 저지환의 크기가 더 증가하였다.

한편 야생주와 형질전환주 T1 및 T6로부터 생산된 iturin을 정량적으로 비교하기 위하여 각 균주를 30°C에서 3일간 배양하고 얻은 상등액의 부탄올 추출물을 HPLC로 분석한 결과 site-directed mutagenesis를 통해 얻은 형질전환주 T1과 T6의 iturin 생산능이 야생주보다 각각 16%와 22% 더 증가하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

Iturin 생합성능이 증대된 자외선 돌연변이주 BSM54의 genomic DNA를 분리하여 Next Generation Sequencing을 실시하고, 야생주의 iturin 생합성 유전자 37,645 bp와 비교하여 iturin 생합성 관련 유전자 중 6 부위에서 야생주와 다른 point mutation을 발견하였다. 또한 돌연변이주 BSM54는 각 ORF들의 발현량이 대체적으로 야생주보다 많았고, *Botrytis cinerea*를 대상으로 한 포자 억제 시험에서도 야생주보다 2배 이상 더 강하게 포자 발아를 억제하였으며, iturin 생산량도 HPLC 분석 시 야생주보다 2배나 더 증가하였다. 이외에 야생주에 자외선 돌연변이주의 M1 point mutation이 일어난 부위를 site-directed mutagenesis시켜 얻은 형질전환주에서도 야생주보다 *F. oxysporum* 평판 배지에서 생육 저지환의 크기가 더 크게 나타나 iturin 高生産 돌연변이주 BSM54의 point mutation이 일어난 M1 위치의 변이된 염기가 iturin 생산능 증대에 관여한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과들을 바탕으로 향후에는 iturin 생합성 유전자를 이용한 길항 미생물 *B. subtilis* 균주의 개량이나 자외선 돌연변이주를 이용한 생물학적 방제제 개발에 활용하고자 하며, 다른 한편으로는 iturin과 surfactin의 synergic effect를 이용하여 항균력이 증대된 생물학적 방제제 개발에 활용하고자 한다. 이러한 일련의 시도가 원활하게 진행되면 향후 화학합성 농약 사용량의 감축으로 인해 우려되고 있는 농작물의 생산성 감소에 효율적으로 대처할 수 있는 생물학적 방제제 개발과 응용에 효과적인 수단이 될 수 있을 것으로 사료된다.

SUMMARY

I. Subject

Development and industrialization of antagonistic microorganism *Bacillus* to enhance the productivity of cyclic lipopeptide

II. Objectives and Significance

The improvement of seeds, the use of chemical fertilizers and agrochemicals, the improvement of soils, and the mechanization of farming have been contributed to the foodstuff production and the crop protection for the human being for a long time. On the contrary, the acidification of soils, the remaining toxicity, and the environmental pollution, which are caused by the repeated use of agrochemicals and the use of the excess amount of chemical fertilizers have become a social problem. In Korea, the amount of agrochemicals and chemical fertilizers used was due to be reduced by 40% until 2013. Thus, there was a great need for the research to develop biological control agents to enhance the production of agricultural products while reducing the amount of agrochemicals and chemical fertilizers required. In fact, research to achieve these goals had been conducted, mainly utilizing useful bacteria. At the beginning, studies were focused on the physiology for plant-bacteria interaction such as nitrogen fixation, solubilization of phosphorous, the production of antibiotics and plant growth regulators. Various kinds of antagonistic microorganisms, which show the ability to prevent the plant diseases and to activate the growth of plant, were investigated and microorganisms such as *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp., and *Trichoderma* sp. represent the possibility of such biological control. More recently, the isolation of useful antagonistic microorganisms and the improvement of microorganisms using genetic approach have been on trial. Especially, the necessity of clean crop productions, which are recently prompted by the spread of well-being culture among the consumers has gradually been increased. Moreover, the needs for the biological control agents as only alternatives for synthetic organic chemicals are greater than before. Thus, the acquisition of microorganisms with the outstanding antagonistic action against phytopathogens is highly demanded.

With such background, this work was initiated to develop biological control agents with increased iturin production by using the *Bacillus*, which produced the six types of iturins with antifungal activity against various phytopathogenic fungi. We have tried to improve the activity of the antagonistic microorganism, *Bacillus* and to provide the scientific basis for the development of the *Bacillus* strain with high-yielding iturin production on molecular levels, and then to examine the possibility of practical use of this strain.

III. Scope of the study

1. Establishment of iturin high-yielding mutant by UV irradiation
2. Comparison of antifungal activities between commercial products and UV mutant producing iturin
3. Sequence determination of iturin biosynthesis genes from the wild-type *B. subtilis* subsp. *krietiensis* and the analysis of secondary metabolites
4. Identification of gene mutations associated with iturin biosynthesis from iturin high-yielding mutant *B. subtilis* BSM54
5. Comparison of expression levels of iturin biosynthesis genes associated with point mutation from iturin high-yielding mutant *B. subtilis* BSM54
6. Suppressive effects of iturin high-yielding mutant *B. subtilis* BSM54 on spore germination of *Botrytis cinerea*
7. The possibility of change of antifungal activity of UV mutant *B. subtilis* BSM54 during the storage period
8. Comparison of the iturin production from iturin high-yielding mutant *B. subtilis* BSM54 and wild-type *B. subtilis* strains
9. Construction of transformation vector for site-directed mutagenesis
10. Improvement of wild-type *B. subtilis* strain on the molecular level using the point mutated iturin biosynthesis gene through the site-directed mutagenesis

IV. Results

1. Establishment of iturin high-yielding mutant by UV irradiation

To obtain the UV mutant with increased iturin production by using the UV mutant M1891 and UV4-II derived from wild-type *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis*, ultraviolet ray was irradiated with 2.80 mW/cm² and the optimal treatment time of ultraviolet ray that showed the 0.1% survival rate was examined. The treatment times of *B. subtilis* subsp. *krietiensis* M1891 and UV4-II strains were determined as 25 min and 30 min, respectively.

To select the iturin high-yielding UV mutants from these two strains, the culture broths of M1891 and UV4-II strains were spreaded and grown on LB plate and overlaid with the soft agar containing *Fusarium oxysporum*, and then incubated at 25°C for 2 days. A UV transformant BSM54 was selected from the colonies of 30,000 transformants which showed 2-3 fold increased antifungal activity over that of mother strains.

2. Comparison of antifungal activities between commercial products and UV mutants producing iturin

The antifungal activity of UV mutant *B. subtilis* subsp. *krietiensis* No.54 was compared with that of the *B. subtilis* strains isolated from commercial products. The isolated strains were cultivated in the iturin production medium at 30°C for 72 hrs using a rotary shaker and filtered. The supernatants were used in bioassays against *F. oxysporum*. The mutant No. 54 showed a stronger inhibitory activity than commercial products and it was designated as *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 strain.

3. Sequence determination of iturin biosynthesis genes obtained from wild-type *Bacillus subtilis* and the analysis of second metabolites

The iturin biosynthesis genes, which are consisted of six ORFs and 37,645-bp sequence in length, determined by sequence analysis from the genomic library of *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079 in previous study were obtained and deposited in GenBank under accession number KC454625. The mutant-10 strain in which mini-Tn10 transposon was inserted into the ORF3 of iturin biosynthesis gene exhibited markedly lower antifungal activity against *F. oxysporum* than the wild-type strain on HPLC analysis. The wild-type strain-specific iturin A-F peaks were reconfirmed on LC-MS analysis. Each ORF of the iturin biosynthesis gene obtained from wild-type strain was compared with the database published recently. The iturin biosynthesis genes from ORF2 to ORF5 showed 99% homologies with the surfactin synthetase genes of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946 strain. Even though these ORFs showed a high similarity to the surfactin synthase genes of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, the iturin-less mutant, which has a disrupted putative iturin biosynthesis gene, exhibited about 30% decrease in iturin production. In addition, the wild-type strain-specific iturin A-F peaks were detected on LC-MS analysis. From these results, the putative iturin biosynthesis genes obtained from the wild-type strain were thought to be iturin biosynthesis genes.

To check the possibility that the wild-type and the mutant-10 strains might produce any other cyclic lipopeptides, the second metabolites of these two strains were also analyzed by HPLC and LC-MS. Although several surfactin peaks on HPLC analysis were detected in both the wild-type and mutant-10 strains, the amounts of surfactin produced were quiet less than that of iturin. Notably the surfactin produced by the mutant-10 strain, which showed 30% decrease in iturin production over wild-type strain, was two-fold greater than that of the wild-type strain. These results suggested that the gene clusters identified in the genome of wild-type *B. subtilis* subsp. *krietiensis* are involved in iturin, but not surfactin biosynthesis, even though these genes showed high similarities to the surfactin synthase genes of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

4. Identification of gene mutation associated with iturin biosynthesis from iturin high-yielding mutant *B. subtilis* BSM54

To examine the cause of increased antifungal activity in the iturin high-yielding UV mutant BSM54 strain on the molecular level, NGS sequencing for the iturin biosynthesis genes of mutant strain was performed and the mutation sites were identified by comparing with the 37,645-bp sequences of iturin biosynthesis genes from the wild-type strain. Six types of point mutations in the iturin biosynthesis genes of the mutant BSM54 strain were found. One point mutation (M1) was detected in the upstream region of ORF1 and 5 other mutations were noted in the ORF2 region (M2 - M6). Among them, the M1 point mutation found in the upstream region of the ORF1 was predicted to cause the change of mRNA secondary structure. The M1 point mutation, which is located in the promoter in front of ORF, was expected to have the influence on iturin biosynthesis at the transcription stage, whereas M3 point mutation was likely to be responsible for the change of phenotype in accordance with final gene products obtained after translation.

5. Comparison of the expression levels of iturin biosynthesis genes associated with point mutation from iturin high-yielding mutant *B. subtilis* BSM54

To investigate whether the changes in the expression of each ORF had occurred, the expression levels of ORF1 to ORF5 associated with iturin biosynthesis from iturin high-yielding UV mutant BSM54 were compared with those of the wild-type strain. Total RNAs of mutant BSM54 and wild-type strains were isolated after cultivating at 30°C for 24, 48, and 72 hrs in LB broth. The real-time PCRs of cDNAs synthesized with purified RNAs were performed. The expression levels from ORF2 to ORF5 in UV mutant BSM54 strain were significantly increased over that of the wild-type strain after 48 hrs. Especially, the remarkable differences of expression levels between mutant BSM54 and wild-type strains were observed in the ORF2 to ORF4. The increased expressions of mutant BSM54 strain were found to be due to the point mutations of genes associated with iturin biosynthesis.

6. Suppressive effects of iturin high-yielding mutant *B. subtilis* BSM54 on spore germination of *Botrytis cinerea*

The suppressive effects of UV mutant BSM54 and wild-type strains on the spore germination of *Botrytis cinerea* were examined as follows. The culture broths cultivated for 3 days were precipitated with hydrochloride, neutralized, fractionated with butanol, and then evaporated *in vacuo*. The spore concentration of *B. cinerea*, the causative agent of cucumber gray mold, was

adjusted to reach 10^6 spores/ml and aliquots of the butanol fractions were added into each hole slide glass to be in a range of 125-500 $\mu\text{g/ml}$. The slide glasses were incubated at 25°C for 6 hrs and the spore germination rates were observed under the microscope.

Both UV mutant BSM54 and wild-type strains did not show the significant differences in groups treated with butanol fractions at the same concentration of 125 $\mu\text{g/ml}$, but the mutant BSM54 strain at the concentration of 250 $\mu\text{g/ml}$ inhibited the spore germination over 2-fold stronger than that of the wild-type strain. Especially, the spore suppressive rate of the wild-type strain was 43.5% at the concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$, whereas the spore germination in mutant strain did not completely occur at the same concentration. The mutant BSM54 strain showed a stronger suppressive activity on the spore germination of *B. cinerea* at the same concentration of over 250 $\mu\text{g/ml}$.

7. The possibility of change on the antifungal activity of UV mutant BSM54 strain during the storage period

To investigate whether the revertants, which are returned to original conditions through back mutation, appeared during the storage in the -70°C freezer in glycerol stocks, the changes of antifungal activities of the mutant strain were measured. The diameter of growth inhibition zones on bioassay against *F. oxysporum* was compared with the wild-type strain at intervals of one month from 2 months up to 2 years, The antifungal activities of mutant BSM54 strain showed the narrow margins during the storage periods, but the activities of the strain from 2 months to 2 years did not show significant differences.

8. Comparison of the iturin production from wild-type *B. subtilis* and iturin high-yielding mutant BSM54 strains

The production capacities of iturin in butanol fractions evaporated *in vacuo* from the butanol extracts of wild-type and mutant BSM54 strains were analyzed by HPLC and compared with authentic iturin A used as control. The amounts of iturins in each butanol fraction obtained from wild-type and mutant BSM54 strains were calculated as 4.175% and 8,716% from the quantitative analyses of HPLC chromatograms, respectively. Thus, the production capacity of iturin produced from the mutant BSM54 strain was about 2-fold higher than that of wild-type strain.

9. Construction of transformation vector for site-directed mutagenesis

To clone the ORF1 region containing M1 point mutation site in the UV mutant BSM54

strain into the wild-type *B. subtilis*, the 1.8-kb PCR products were obtained by using the primer ORF1_u-f(5' -TAATCGCCGTCAGTTCCTCG-3'), ORF2-r (5' -TTCTCATCGACTCATACCGC-3'), and Accu Power Pfu PCR Premix. Both PCR products and pUC19 vector were digested with *EcoRI*, ligated at 4°C for 16 hrs, and the aliquots of suspension was added to the competent cell of *E. coli* DH5α used in transformation. The pBSM54-orf1 transformants obtained was double-digested with *Bam*HI and *Xba*I. The isolated insert was ligated with spectinomycin resistance gene cassette digested with the same restriction enzymes as previously described from the pIC333 vector to constructed the pBSM54-orf1-sp vector for transformation.

10. Improvement of wild-type *B. subtilis* strain on the molecular level using the point mutated iturin biosynthesis gene through the site-directed mutagenesis

To further increase the production capacity of iturin using iturin high-yielding mutant BSM54, site-directed mutagenesis was performed by using the gene of M1 point mutation region without the exchange of the amino acid among the six point mutation sites. The transformation vector pBSM54-orf1-sp-1 for site-directed mutagenesis was finally constructed using the ORF1 region containing M1 point mutation site obtained by PCR with proofreading DNA polymerase earlier, the QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit, and mutagenic primers.

To transform the wild-type *B. subtilis* strain by site-directed mutagenesis, the strain was cultivated until the absorbance of 0.1 at 580 nm was obtained in modified Spizizen medium. The aliquots of culture broth were then added to transformation vector pBSM54-orf1-sp-1. The suspension were spreaded on LB agar containing 60 µg/ml of spectinomycin and the colonies grown on the medium were primarily selected. The transformants were analyzed by PCRs with the orf1-f3, spcf1, spc-f2, hxlr1, and hxl-r2 primers and the resistant colonies that produced the PCR products of the same size as control were finally chosen. The single colonies of transformants selected were cultivated in the iturin production medium and the antifungal activities of the supernatants were examined on bioassays against *F. oxysporum*. The transformants T1 and T6 have exhibited larger growth inhibition zones than that of wild-type strain.

To compare the contents of iturin produced from the wild-type strain and transformants T1 and T6, these strains were cultivated at 30°C for 3 days and the butanol extracts of supernatants were quantitatively analyzed by HPLC. The iturin production of transformants T1 and T6 obtained by site-directed mutagenesis was increased 16% and 22% over the wild-type strain, respectively.

V. Prospects for application

Six point mutations were discovered through the NGS sequencing of the genomic DNA isolated from UV mutant BSM54 and the comparison of iturin biosynthesis genes between wild-type and iturin high-yielding UV mutant BSM54 strains. The expression levels of each ORF of UV mutant BSM54 strain were higher than that of the wild-type strain, with greater than 2-fold inhibitory activities over the wild-type on spore germination of *Botrytis cinerea*. The iturin production of the mutant BSM 54 strain has increased 2-fold over the wild-type strain on HPLC analysis. The transformants obtained from wild-type strain with the M1 point mutation of UV mutant BSM 54 strain by site-directed mutagenesis have exhibited a larger growth inhibition zone than that of wild-type strain on bioassay against *F. oxysporum*. From these results, it was found that the mutated gene of M1 site occurred by the point mutation in iturin high-yielding mutant BSM54 strain was associated with the increase of iturin production. The results of the study would lead to the improvement of antagonistic microorganism *B. subtilis* strain and development of biological control agents using UV mutants. In addition, the development of biological control agents with increased antifungal activities using the synergic effect of iturin and surfactin will be investigated. When a series of trial has progressed successfully, development and application of biological agents may provide effective means to cope with decrease in crops production, which would incur due to the reduced agrochemical usage required in the future.

CONTENTS

Development and industrialization of antagonistic microorganism *Bacillus* to enhance the productivity of cyclic lipopeptide

Chapter 1. Introduction	21
Chapter 2. State of the Art Report	32
Chapter 3. Contents and Results of Research	39
1. Methods of research	39
2. Contents of research	40
(1). Cultivation of antagonistic microorganism, <i>Bacillus</i> and Preparation of assay plates----	40
1). Strains, culture media, and plasmids	40
①. Strains used	40
②. Media-----	40
③. Plasmids and vectors-----	40
2). Preparation of agar plates for bioassay	40
①. Preparation of bioassay plate for <i>F. oxysporum</i>	40
(2). <i>In vitro</i> assay of antagonistic microorganism, <i>Bacillus</i> -----	41
①. Examination of growth inhibition by culture broths-----	41
(3). Selection of iturin mutants by UV irradiation-----	41
①. Induction of mutant strains by UV irradiation-----	41
②. Selection of mutants and <i>in vitro</i> assay-----	41
③. Comparison of antifungal activities between commercial products and UV mutants-----	42
(4). The possibility of change on the antifungal activity of the UV mutant of <i>B. subtilis</i> during the storage period-----	43
(5). Identification of the mutation occurred in the iturin biosynthesis genes from iturin high-yielding UV mutant <i>B. subtilis</i> -----	43

①. Isolation of genomic DNA-----	43
(6). Comparison of expression levels of iturin biosynthesis genes associated with point mutation from iturin high-yielding mutant <i>B. subtilis</i> BSM54-----	43
(7). Suppressive effects of iturin high-yielding mutant <i>B. subtilis</i> BSM54 on spore germination of <i>Botrytis cinerea</i> -----	44
(8). Comparison of the iturin production from wild-type <i>B. subtilis</i> and iturin high-yielding mutant BSM54 strains-----	45
(9). Analysis for the possibility of secondary metabolites production other than iturin-----	46
(10). Improvement of wild-type <i>B. subtilis</i> on the molecular level using the point mutated iturin biosynthesis gene through the site-directed mutagenesis-----	47
①. Construction of transformation vector for site-directed mutagenesis-----	47
②. Improvement of wild-type strain by site-directed mutagenesis-----	48
③. Comparison of the iturin production from wild-type <i>B. subtilis</i> and transformants obtained by site-directed mutagenesis-----	49
3. Results -----	51
(1). Establishment of iturin high-yielding mutant by UV irradiation-----	51
(2). Comparison of antifungal activities between commercial products and UV mutants producing iturin-----	53
(3). Sequence determination of iturin biosynthesis genes obtained from wild-type <i>B. subtilis</i> and the analysis of second metabolites-----	55
(4). Identification of gene mutation associated with iturin biosynthesis from iturin high-yielding mutant <i>B. subtilis</i> BSM54-----	62
(5). Comparison of the expression levels of iturin biosynthesis genes associated with point mutation from iturin high-yielding mutant <i>B. subtilis</i> BSM54-----	64
(6). Suppressive effects of iturin high-yielding mutant <i>B. subtilis</i> BSM54 on spore germination of <i>Botrytis cinerea</i> -----	65

(7). The possibility of change on antifungal activity of the UV mutant BSM54 strain during the storage period-----	67
(8). Comparison of the iturin production from wild-type <i>B. subtilis</i> and iturin high-yielding mutant BSM54 strains-----	67
(9). Construction of transformation vector for site-directed mutagenesis-----	67
(10). Improvement of wild-type <i>B. subtilis</i> strain on the molecular level using the point mutated iturin biosynthesis gene through the site-directed mutagenesis -----	71
 Chapter 4. Accomplishment and contribution -----	 79
 Chapter 5. Prospects for application -----	 82
 Chapter 6. Science and technology information collected from foreign countries through the project-----	 83
 Chapter 7. Status of research facilities and equipment-----	 86
 Chapter 8. References -----	 87

목 차

Cyclic lipopeptide의 생산능이 증대된 길항 미생물 *Bacillus*의 개발 및 산업화

제 1 장	연구개발과제의 개요-----	21
제 2 장	국내외 기술개발 현황-----	32
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과-----	39
1.	연구 수행 방법 -----	39
2.	연구내용	40
가.	길항작용을 나타내는 <i>Bacillus</i> 의 배양과 검정용 병판의 조제	40
(1).	사용 균주와 매지 및 플라스미드-----	40
(가).	사용 균주 -----	40
(나).	매지 -----	40
(다).	플라스미드 및 벡터	40
(2).	검정용 병판 매지의 조제 -----	40
(가).	<i>F. oxysporum</i> 병판의 조제-----	40
나.	<i>Bacillus</i> 균주들의 <i>in vitro</i> 활성 검정-----	41
(1).	배양 상등액에 의한 생육억제 조사	41
다.	자외선 처리에 의해 <i>iturin</i> 생합성이 증대된 돌연변이 균주의 선발 -----	41
(1).	자외선 처리에 의한 돌연변이주의 유발-----	41
(2).	변이주의 선발 및 <i>in vitro</i> 활성 검정-----	41
(3).	기존 생물학적 방제제와 선별한 자외선 돌연변이주의 항균력 비교-----	42
라.	자외선 돌연변이주 장기 보관에 따른 항균력 변화 가능성 조사	43
마.	자외선 돌연변이주를 이용한 <i>iturin</i> 생합성 유전자 변이 확인-----	43
(1).	Genomic DNA의 분리-----	43

바. Iturin 高生産 돌연변이주 BSM54의 point 돌연변이에 따른 iturin 생합성 유전자의 발현 양상 분석	43
사. Iturin 高生産 돌연변이주 BSM54의 <i>Botrytis cinerea</i> 에 대한 포자 발아 억제 효과	44
아. Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> BSM54와 야생주 <i>B. subtilis</i> 의 iturin 생산능 비교	45
자. 야생주 <i>B. subtilis</i> 로부터 iturin 이외의 다른 2차 대사산물의 생산 가능성 조사	46
차. 돌연변이된 iturin 생합성 유전자와 site-directed mutagenesis를 이용한 야생주의 개량	47
(1). Site-directed mutagenesis용 형질전환 벡터의 제조	47
(2). Site-directed mutagenesis를 이용한 야생주의 개량	48
(3). Site-directed mutagenesis를 통해 얻은 형질전환주와 야생주 <i>B. subtilis</i> 의 iturin 생산능 비교	49
3. 연구결과	51
가. 자외선 조사를 통한 iturin 高生産 돌연변이주의 확보	51
나. 상업적인 재원에 활용되고 있는 <i>Bacillus</i> 균주와 iturin 高生産 돌연변이주의 항균 활성 비교	53
다. 야생주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> 균주로부터 얻은 iturin 생합성 유전자의 염기 서열 결정과 2차 대사산물의 분석	55
라. Iturin 高生産 돌연변이주를 이용한 iturin 생합성 관련 유전자 변이 조사	62
마. NGS 염기서열 결정으로 확인된 자외선 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> BSM54의 point mutation에 따른 iturin 생합성 유전자의 발현 양상 비교 분석	64
바. Iturin 高生産 돌연변이주 BSM54의 <i>Botrytis cinerea</i> 에 대한 포자 발아 억제 효과	65
사. 자외선 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> BSM54의 상기 보존에 따른 항균력 변화 가능성 조사	67
아. Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> BSM54와 야생주의 iturin 생산능 비교	67
자. Site-directed mutagenesis용 형질전환 벡터의 제조	67

차. 분자수준에서 point mutation이 일어난 iturin 생합성 유전자와 site-directed

mutagenesis를 이용한 야생주 *B. subtilis* 균주의 개량 71

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도-----79

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획-----82

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보-----83

제 7 장 연구시설·장비 현황 86

제 8 장 참고문헌-----87

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

오래 전부터 품종 개량, 비료 투여, 도양 개량, 화학적으로 합성된 농약 등은 인류의 식량 생산과 작물 보호에 크게 이바지해 왔으나,¹⁾ 약제 내성균의 출현과 농산물의 잔류독성 및 환경 오염 등으로 인해 많은 사회적인 문제가 대두되고 있어 선진 각국에서는 점차 그 사용이 제한되고 있다.^{2,3)} 특히 1992년 6월 브라질에서 개최된 유엔 환경개발회의(UNCED)에서 현재 사용되고 있는 유기 합성 농약의 25-75%를 절감시키기 위한 규제 움직임이 처음으로 시작된 이래 21세기에 들어오면서 우리나라를 포함한 OECD 국가를 중심으로 화학합성 농약과 합성 비료의 사용량을 2013년까지 40%를 감축하려는 움직임을 나타내고 있다.⁴⁾ 또한 소득 수준의 향상으로 유기 농산물을 포함한 친환경 농산물에 대한 소비가 증가하여, 2009년에는 3조 4,117억원, 2010년에는 3조 6,506억원, 2011년에는 3조 9,678억원으로 추정되었으며, 2020년에는 전체 6조 6,283억원이 될 것으로 전망되고 있다 (표 1).⁵⁾ 전 세계의 유기농 재배 면적도 2005년부터 매년 증가 추세를 나타내어, 2013년도에 4,080만 헥타르에서 2018년도에는 5,470만 헥타르로 증가할 것으로 예측되고 있다(그림 1).⁶⁾ 이외에 well-being 문화의 확산으로 인해 청정 농산물을 요구하는 소비자들의 수요가 나날이 증가하고 있어 유기 합성농약을 사용하지 않는 유기 농법이나 유기 합성농약을 대체할 수 있는 유일한 대안인 생물학적 방제제에 대한 관심이 나날이 증가되고 있다.

생물학적 방제는 식물에 질병을 일으키는 미생물을 길항 작용이 있는 다른 미생물을 이용하여 방제하는 것을 말하며 가장 대표적인 미생물 농약은 미생물 자체를 직접 이용하거나 미생물을 이용하여 각종 식물 병원균과 농작물에 해를 주는 곤충, 응애, 선충 등의 해충 및 잡초 등을 방제하는데 주로 사용되고 있다. 이러한 미생물 농약은 유기합성 농약과 비교해 볼 때 사용된 미생물이 적절한 환경조건 하에서 스스로 생육할 수 있어 약효의 지속성을 기대할 수 있고, 숙주의 특이성이 크며, 생태계에 영향이 적고, 안전성이 높고, 저항성 유발을 나타내지 않는다는 장점이 있는 반면, 약효의 발현이 늦고, 유통과 보존에 많은 어려움이 있다는 단점이 있다.⁷⁾ 이처럼 미생물을 농약으로 이용하려는 발상은 미생물의 여러 특성 중 미생물의 다양한 능력과 활성을 이용하고자 하며, 또 다른 하나는 자연으로부터 얻은 미생물을 이용하면 자연계에 존재하지 않는 화학 합성된 화학물질보다도 생태학적으로 더 안전하다는데 기초를 두고 있다.⁷⁾ 이러한 생물학적 방제 연구는 1900년대 초부터 시작되어 그 동안 많은 종류의 세균, 곰팡이를 이용하여 식물 병원균을 억제하려고 많은 노력을 기울여 왔다.^{8,9)} 그러나 도양 속의 생태계가 복잡하고 식물체와 미생물 간에는 복잡한 상호 작용이 연관되어 있기 때문에 그 동안 연구 결과들이 매우 미진하였으나, 최근 들어 식물체와 미생물 간의 상호작용들이 하나씩 밝혀지고 있고 분자생물학 등 생명공학 기술의 발달로 인해 괄목할 만한 결과들이 발표되기 시작하여 2010년에 미국에서만 미생물 농약 약 73종이 등록되었으며(표 2),¹⁰⁾ EU에서는 38종이 등록되었다(표 3).¹¹⁾ 전 세계 미생물 유래 생물농약 시장 규모는 2012년도에 3.35억 불, 2013년도에 3.573억불이었으며, 2018년도에는 4.9억불에 도달할 것으로 예상되고 있고,

Table 1. The prospect of market shares for environmentally-friendly agricultural products in accordance with certification stages

(단위: 억원)

항목	2008	2009	2010	2011	2014	2015	2016	2020
유기농	2,536	2,426	3,521	4,118	5,782	6,563	7,226	10,306
무농약	9,193	13,178	15,026	18,449	28,026	32,426	39,249	55,976
저농약	20,198	18,514	17,958	17,112	14,814	14,122	-	-
전체	31,927	34,117	36,506	39,678	48,622	53,111	46,475	66,283

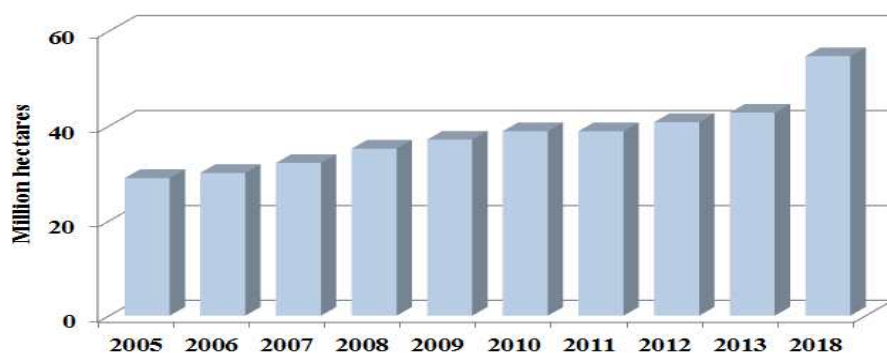
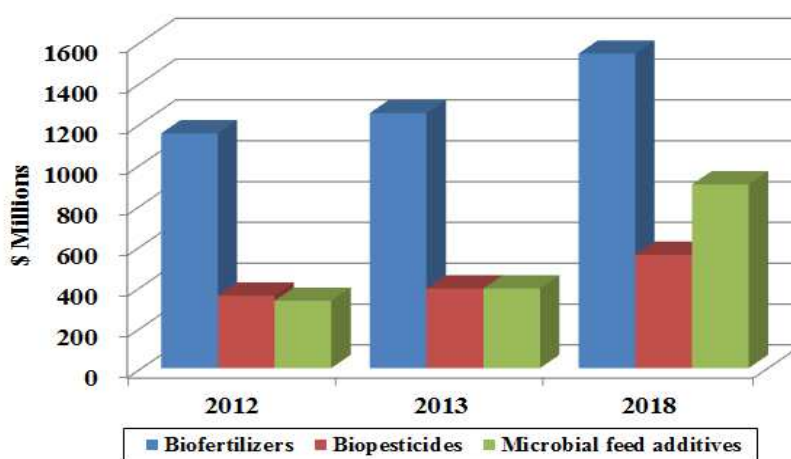


Fig. 1. Global trends in organically farmed areas 2005-2018.

*Source; Microbial Products: Technologies, Applications and Global Markets (BCC Research, 2013)



* Source; Microbial Products: Technologies, Applications and Global Markets (BCC Research, 2013)

Fig. 2. Global agricultural markets for products made from microbes by application type, 2012-2018.

Table 2. Microbial pesticides registered in United States.¹⁰⁾

	Taxus	Products	Targets
Bactericides			
<i>Agrobacterium radiobacter</i> k84	Bacterium	Galltrol - A	Crown gall disease
<i>Pantoea agglomerans</i> C9-1	Bacterium	BlightBan C9-1	Fire blight
<i>Pantoea agglomerans</i> E325	Bacterium	Bloomtime	Fire blight
Bacteriophage of <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	Virus	AgriPhage	Bacterial speck
Bacteriophage of <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Virus	AgriPhage	Bacterial spot
Fungicides			
<i>Bacillus licheniformis</i> SB3086	Bacterium	EcoGuard	Fungal diseases
<i>Bacillus mycoides</i> isolate J	Bacterium	BacJ	<i>Cercospora</i>
<i>Bacillus pumilus</i> GB 34	Bacterium	GB34	Seedling diseases- <i>Pythium</i> and <i>Rhizoctonia</i>
<i>Bacillus pumilus</i> QST 2808	Bacterium	Sonata	Powdery mildew, downy mildew and rusts
<i>Bacillus subtilis</i> GB03	Bacterium	Companion Kodiak	<i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i>
<i>Bacillus subtilis</i> MBI 600	Bacterium	Histick N/T Pro-Mix with Biofungicide	Damping off
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>amyloliquefaciens</i> FZB24	Bacterium	Taegro	<i>Fusarium</i> and <i>Rhizoctonia</i> wilt diseases
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> Tx-1	Bacterium	Spot-Less	Turf fungal diseases
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 63-28	Bacterium	At-Eze	Soil and seed borne fungi
<i>Pseudomonas syringae</i> ESC 10	Bacterium	Biosave 10LP	Post harvest diseases
<i>Pseudomonas syringae</i> ESC 11	Bacterium	Bio-Save 11LP	Post harvest diseases
<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	Bacterium	Mycostop Biofungicide Mycostop Mix	Fungi causing damping off, stem and crown rots
<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC 108	Bacterium	Actinovate Actino-Iron	Fungi causing damping off, stem and crown rots
<i>Ampelomyces quisqualis</i> M10	Fungus	PowderyGon	Powdery mildew
<i>Aspergillus flavus</i> AF36	Fungus	<i>Aspergillus flavus</i> AF36	<i>Aspergillus flavus</i> producing aflatoxin
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 21882	Fungus	Afla-guard	<i>Aspergillus flavus</i> producing aflatoxin
<i>Coniothyrium minitans</i> CON/M/91-08	Fungus	Contans	<i>Sclerotinia minor</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<i>Gliocladium catenulatum</i> J1446	Fungus	Prestop	Seed borne, and soil borne diseases
<i>Muscodor albus</i> QST 20799	Fungus	Arabesque	Post harvest diseases
<i>Pseudozyma flocculosa</i> PF-A22 UL	Fungus	Sporodex	Powdery mildew
<i>Trichoderma asperellum</i> ICC 012 and <i>Trichoderma harzianum</i> (<i>gamsii</i>) ATCC080	Fungus	Tenet Bioten Remedier	Soil borne diseases
<i>Trichoderma harzianum</i> ATCC 20476	Fungus	Binab	Wound healing
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai T-22	Fungus	PlantShield RootShield T-22 Planter box	Seed and foliar diseases
<i>Trichoderma harzianum</i> T-39	Fungus	Trichodex	Soil and foliar diseases
<i>Trichoderma polysporum</i> ATCC 20475	Fungus	Binab T	Soil and foliar diseases
<i>Ulocladium oudemansii</i> U3	Fungus	BOTRY-Zen	<i>Botrytis</i> and <i>Sclerotinia</i>
<i>Verticillium albo-atrum</i> WC S850	Fungus	DutchTrig	Dutch elm disease
Bacteriophage of <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	Virus	AgriPhage	Tomato leaf spot
<i>Candida oleophila</i> O	Yeast	NEXY	Post harvest fruit molds
Fungicides/bactericides			
<i>Bacillus subtilis</i> QST713	Bacterium	Serenade	Foliar fungal and bacterial diseases
Herbicides			
<i>Bacillus cereus</i> BP01	Bacterium	MepPlus	Plant growth regulator
<i>Alternaria destruens</i> O59	Fungi	Smolder	Herbicide - dodder
<i>Chondrostereum purpureum</i> PFC 2139	Fungus	Chontrol Paste	Herbicide - stump sprout inhibitor
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f.sp. <i>aeschynomene</i> ATCC 202358	Fungus	LockDown	Herbicide - northern jointvetch
<i>Puccinia thlaspeos</i> woad (dyer's woad rust)	Fungus	Woad Warrior	Herbicide - Dyer's woad

Table 2. Microbial pesticides registered in United States.¹⁰⁾

Insecticides			
<i>Bacillus popilliae</i>	Bacterium	Milky Spore Powder	Japanese beetle grubs
<i>Bacillus sphaericus</i> Serotype H5a5b strain 2362 ATCC 1170	Bacterium	VectoLex	Mosquito larvae
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aiizawai</i> NB200	Bacterium	Florbac	Moth larvae
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	Bacterium	BMP	Mosquito and black flies
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> EG2215	Bacterium	Gnatrol Aquabac	Mosquito, flies
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aiizawai</i> delta-endotoxin in killed <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bacterium	M-Trak	Colorado potato beetle
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aiizawai</i> GC-91	Bacterium	Agree WG	<i>Plutella</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	Bacterium	Thuricide Thuricide Forestry Wilbur-Ellis BT 320 Dust Dipel Deliver Biobit HP Foray Javelin WG Green Light Hi-Yield Worm Spray Ferti-Lome Bcnide Britz BT Worm Whipper Security Dipel Dust	Lepidopteran larvae
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> BMP 123	Bacterium	BMP123	Lepidopteran larvae
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG2348	Bacterium	Condor	Lepidopteran larvae
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG7841	Bacterium	Crymax	Lepidopteran larvae
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i>	Bacterium	Novodor	Colorado potato beetle
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG7826	Bacterium	Lepinox WDG	Lepidopteran larvae
<i>Beauveria bassiana</i> 447	Fungus	Baits Motel Stay-a-while	Ants
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 74040	Fungus	Naturalis L	Various insects
<i>Beauveria bassiana</i> GHA	Fungus	Mycotrol ES Mycotrol O Bctanigard 22WP BctaniGard ES	Various insects
<i>Beauveria bassiana</i> HF23	Fungus	balEnce	House fly
<i>Metarhizium anisopliae</i> F52	Fungus	Tick-Ex	Ticks and grubs
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> A popka 97	Fungus	PFR-97	White fly and thrips
<i>Nosema locustae</i>	Protozoan	Nolo-Bait Semaspore Bait	Grasshopper and crickets
<i>Anagrapha falcifera</i> nucleopolyhedrosis virus	Virus	CLV-LC	Lepidopteran larvae
<i>Cydia pomonella</i> granulosis virus	Virus	CYD-X	Codling moth
Gypsy moth nucleopolyhedrosis virus	Virus	Gypchek	Gypsy moth
<i>Helicoverpa zea</i> nucleopolyhedrosis virus (previously <i>Heliothis zea</i> NPV)	Virus	GemStar	Cotton bollworm, tobacco budworm
Indian meal moth granulovirus (<i>Plodia interpunctella</i> GV)	Virus	FruitGuard	Indian meal moth
<i>Mamestra configurata</i> nucleopolyhedrosis virus (107308)	Virus	Virosoft	Bertha armyworm
<i>Spodoptera exigua</i> nucleopolyhedrosis virus	Virus	Spod-X	Beet armyworm
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yeast	Bull Run	Fly attractant
Nematicides			
<i>Bacillus firmus</i> I-1582	Bacterium	BioNem	Nematodes
<i>Pasteuria usgae</i>	Bacterium	Econem	Nematodes
<i>Myrothecium verrucaria</i>	Fungus	DiTera	Nematodes
<i>Paecilomyces lilacinus</i> 251	Fungus	MeloCon WG	Nematodes
Virucides			
Zucchini yellow mosaic virus – weak strain	Virus	AgroGuard-Z	Zucchini yellow mosaic virus

Table 3. Microbial pesticides active ingredients registered in the European Union with representative products that are registered in at least one Member State as of 2010.¹¹⁾

Bactericides			
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Bacterium	Blossom Protect*	Fire blight, postharvest diseases in apples
Fungicides			
<i>Phlebiopsis gigantea</i> (several strains)	Bacterium	Rotstop*	Conifer root rots
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Bacterium	Cedomon Cerall	<i>Pyrenophora teres</i> , <i>Pyrenophora graminea</i> , <i>Tilletia caries</i> , <i>Septoria nodorum</i> , <i>Fusarium</i> spp.
<i>Pseudomonas</i> sp. DSMZ 13134	Bacterium	Proradix*	Root rots
<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	Bacterium	Mycostop	<i>Fusarium</i> wilt, <i>Botrytis</i> grey mold, root rot, stem rot, stem-end rot, damping off, seed rot, soil borne damping off, crown rot, <i>Rhizoctonia</i> , <i>Phytophthora</i> , wilt, seed damping off, early root rot
<i>Ampelomyces quisqualis</i> AQ10	Fungus	AQ10	Leaf diseases
<i>Candida oleophila</i> strain O	Fungus	*	Post harvest diseases
<i>Coniothyrium minitans</i> C ON/M-91-05	Fungus	Contans WG	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Sclerotinia minor</i>
<i>Gliocladium catenulatum</i> J1446	Fungus	Prestop Prestop Mix	Damping off, gummy stem blight, grey mold, root rot, stem rot, wilt, storage diseases, foliar diseases, seed rot
<i>Pseudozyma flocculosa</i> PF-A22 UL	Fungus	Sporodex *	Powdery mildew
<i>Pythium oligandrum</i>	Fungus	Polyversum	Root rots
<i>Trichoderma aspellerum</i> (ICC012) (T25) (TV1) (formerly <i>T. harzianum</i>)	Fungus	Tenet	Fungal infections (<i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Rhizoctonia</i>)
<i>Trichoderma asperellum</i> (T34)	Fungus	*	<i>Fusarium</i> spp.
<i>Trichoderma atroviridae</i> IMI 206040 (formerly <i>T. harzianum</i>)	Fungus	Binab T Pellets	<i>Botrytis cinerea</i> , pruning wound infection <i>Chondrostereum purpureum</i>
<i>Trichoderma atroviride</i> I-1237	Fungus	Esquive*	Fungal infections (<i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Rhizoctonia</i>)
<i>Trichoderma gamsii</i> (formerly <i>T. viride</i>) (ICC080)	Fungus	Remedier	Fungal infections (<i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Rhizoctonia</i>)
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai T-22 ITEM 108 or KRL-AG2	Fungus	Trianum P	Root diseases
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai T-39 (IMI 206039)	Fungus	Trichodex Rootshield	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Collectotrichum</i> spp., <i>Fulvia fulva</i> , <i>Monilia laxa</i> , <i>Plasmopara viticola</i> , <i>Pseudoperonospora cubensis</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<i>Trichoderma polysporum</i> and <i>T. harzianum</i>	Fungus	Binab T Vector	Fungal pathogens, fairy ring, <i>Botrytis</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Didymella</i> , <i>Chondrostereum</i> , <i>Heterobasidium</i>
<i>Verticillium albo-atrum</i> (WCS850) (formerly <i>Verticillium dahliae</i>)	Fungus	Dutch Trig	Dutch elm disease

Table 3. Microbial pesticides active ingredients registered in the European Union with representative products that are registered in at least one Member State as of 2010.¹¹⁾

Fungicides/bactericides			
<i>Bacillus subtilis</i> QST713	Bacterium	Serenade	Fire blight, <i>Botrytis</i> spp.
Insecticides			
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> GC-91	Bacterium	Turex	Lepidoptera pests
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> AM65	Bacterium	VectoBac	Sciarids
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1	Bacterium	Dipel WP	Lepidoptera pests
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> ABTS 351, PB 54, SA 11, SA 12, and EG 2348	Bacterium	Batik Delfin	Lepidoptera pests
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> BMP 123	Bacterium	BMP 123 Prolong	Lepidoptera pests
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> NB 176	Bacterium	Novodor	Coleoptera pests
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 74040	Fungus	Naturalis L	Thrips, whitefly, mites
<i>Beauveria bassiana</i> GHA	Fungus	Botanigard	Whiteflies, aphids, thrips
<i>Lecanicillium muscarium</i> (Ve6) (former <i>Verticillium lecanii</i>)	Fungus	Mycotal Vertalec	Whiteflies, thrips, aphids (except the Chrysanthemum aphid: <i>Macrosiphoniella sanborni</i>)
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> Apopka 97	Fungus	Preferal WG	Greenhouse whiteflies (<i>Trialeurodes vaporariorum</i>)
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> Fe 9901	Fungus	Nofly*	Whiteflies
<i>Adoxophyes orana</i> BV-0001 granulosis virus	Virus	Capex*	Summer fruit tortrix (<i>Adoxophyes orana</i>)
<i>Cydia pomonella</i> granulosis virus	Virus	BioTepp	Codling moth (<i>Cydia pomonella</i>)
<i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrosis virus (HearNPV)	Virus	*	<i>Helicoverpa armigera</i>
<i>Spodoptera exigua</i> nucleopolyhedrosis virus	Virus	Spod-X GH	<i>Spodoptera exigua</i>
<i>Spodoptera littoralis</i> nucleopolyhedrosis virus	Virus	*	<i>Spodoptera littoralis</i>
Nematicides			
<i>Paecilomyces lilacinus</i> PL 251	Fungus	BioAct WG	Common plant parasitic nematodes
Virucides			
Zucchini Yellow Mosaic Virus, weak strain	Virus	Curbit	Yellow mosaic virus

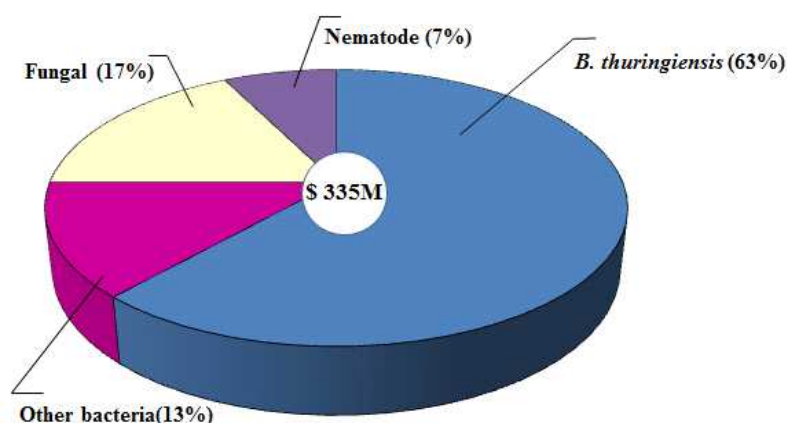


Fig. 3. Global microbial pesticide market by segment, 2013.

*Source; Microbial Products: Technologies, Applications and Global Markets (BCC Research, 2013)

2013년부터 2018년까지 연평균 성장률이 6.5%에 도달될 것으로 예측되고 있다(그림 2).¹²⁾ 2013년도의 3.573억불 중 세균이 75%를 점유하였으며, 이 중에서도 *Bacillus thuringiensis*에 의한 살충제가 대부분을 차지하였으며, 나머지는 곰팡이가 17.5%, 선충류(nematode)가 7.5%를 나타내었다고 알려졌다(그림 3).¹³⁾ 이에 비해 미생물 비료 시장은 2012년도에 11.5억불, 2013년도에 12억불이었으며 2018년도에는 15.4억불로 증가할 것으로 전망되고 있다.¹²⁾

지금까지 가장 성공적인 생물학적 방제의 예는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의해 발병하는 과수 뿌리병인 crown gall의 방제이다.¹³⁾ 이 식물병은 화학합성 농약으로는 방제가 불가능하나 *Agrobacterium radiobacter*가 생산하는 agrocin이라는 항생물질이 *A. tumefaciens*의 침입을 억제하는 것이 알려지게 되었고, 그 후 유전공학 기법을 이용하여 *A. radiobacter*를 개량한 몇 가지 제품이 개발되어 전 세계 시장의 상당 부분을 점유한 것으로 추측된다. 또 다른 성공 사례는 *Pseudomonas fluorescens*를 이용한 밀의 뿌리썩음병 방제 연구로 미국의 USDA와 Washington 주립대학 연구팀이^{14~17)} 10여년에 걸친 연구를 통해 밀의 뿌리썩음을 야기하는 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*에 강력한 길항작용을 나타내는 *P. fluorescens*를 도양으로부터 분리하는 데 성공하였다. 이 길항 미생물을 밀의 종자에 처리하여 파종하였을 경우 밀의 수확량이 10~20% 증가함을 확인하였는데, 이러한 효과는 *Pseudomonas*가 생산하는 phenazine계^{18,19)}와 2,4-diacetyl phloroglucinol 항생물질¹⁹⁾에 의한 것으로 밝혀졌다. 8년에 걸친 포장 실험을 통해 드러난 실패 시기와 지역에 따른 방제 활성의 차이점을 극복하기 위해 연구팀은 유전공학 기법을 도입하여 phenazine계 항생제 생산과 관련된 *Pseudomonas* sp.의 유전자 발현을 극대화하여 밀 뿌리 썩음병 방제 효과의 불규칙성을 극복하는 데 성공하였다.^{20,21)}

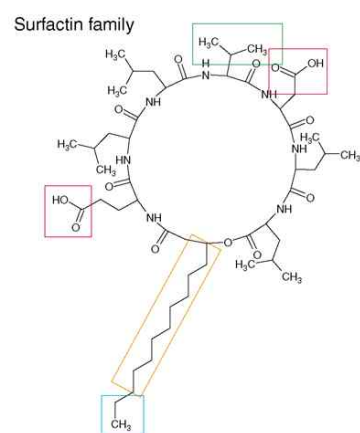
*Bacillus*속 균주들은 내생 포자를 갖고 있는 Gram 양성 세균으로 각종 세균과 곰팡이에 항균 활성을 나타내는 많은 화합물들이 보고되었으며,²²⁾ 각종 효소나 살충제 및 정밀 화학제품 생산 등 산업적으로도 널리 이용되어 왔다. 특히 *B. subtilis*는 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Lactobacillus* sp. 등과 더불어 미국 식품의약국 (FDA)에 의해 인체와 환경에 부해한 미생물로 간주되고 있어 안전성이 높고 환경친화적인 농산물 생산에 적합한 미생물이라고 알려졌다.²³⁾ 또한 *Bacillus* 균주들은 다양한 cyclic lipopeptide를 생산하며 이러한 cyclic lipopeptide들은 크게 3그룹 즉 iturin family, surfactin family 및 fengycin family로 나눌 수 있으며, 각각의 구조들은 그림 4와 5에 나타내었다.²⁴⁾ Iturin A와 C, bacillomycin D, F, L, LC 및 mycosubtilin은 대표적인 iturin family 계열의 대표적인 화합물들로, heptapeptide가 14~17개의 β -아미노 지방산에 연결되어 있다. Iturin의 생물학적 활성은 surfactin과는 차이가 있으며, 다양한 효모와 진균류에 대해 광범위하게 항진균 작용을 나타내고, 극히 일부의 세균에 대해 항세균활성을 나타내나 항바이러스 활성은 나타내지 않는다고 알려져 있다. 또한 iturin의 작용기작은 ion-conducting pore를 형성하여 osmotic perturbation에 기반하고 있고, surfactin처럼 세포막을 파괴하거나 가용화하지는 않는다고 알려졌다.²⁵⁾ Surfactin family는 cyclic lactone ring 구조를 형성하기 위하여 heptapeptide가 β -hydroxy 지방산에 연결되어 있는 구조이며,²⁶⁾ surfactin은 강력한 biosurfactant로 세포막의 지방층에 단단히 결합하여 membrane integrity을 방해한다고 알려졌다.²⁵⁾ Fengycin family에는 fengycin A와 B (이 화합물은 또한 plipastatin으로도 불리운다)를 포함하는 데 이 화합물들은 내부에 lactone ring과 β -hydroxy 지방산 사슬을 지닌 lipodecapeptide이다. Fengycin은 iturin과 surfactin보다 밀 haemolytic하나 filamentous 진균류에는 강력한 항균력을 나타낸다고 알려져 있으며, 작용기작은 세포막의 지방층에 작용하여 세포막의 구조와 permeability에 변화를

일으키는 것으로 알려졌다.²⁵⁾ 또한 surfactin과 iturin,²⁷⁾ surfactin과 fengycin²⁸⁾ 및 iturin과 fengycin²⁹⁾ 서로 synergistic하게 작용한다고 알려져 있다. Cyclic lipopeptide를 생산하는 *Bacillus* 균주 중 대표적으로 *B. subtilis*를 이용하여 개발된 미생물 제제로는 EcoGuard, Kodiak, HiStick, Serenade, Sonata 및 Taegro 등¹⁰⁾이 있으며 이들은 주로 종자 처리제나 post-harvest, 야채 등의 부패 방지용으로 사용되고 있다. 이전에도 미국 USDA의 Dr. Pusey 연구팀은 바실러스 섭틸리스가 많은 식물병에 대해 억제효과가 있는 것을 발견하였으며,³⁰⁾ Phae 등도 퇴비용 부속 모양으로부터 식물 병원균에 광범위한 억제효과를 나타내는 바실러스 섭틸리스 NB22 균주를 분리하고 그 활성 성분이 이류린계 물질임을 증명하였다.³¹⁾ 특히 2,000년대 초반에 AgraQuest Co.에서 등록한 Serenade는 *Bacillus subtilis* QST713 균주를 이용하여 살균제와 항세균제로 25개국에서 등록되어 다양한 제품들이 판매되고 있으며,³²⁾ 연간 1억불 이상을 수출한다고 알려져 있다. 또한 *Bacillus* 균주가 생산하는 다양한 lipopeptide들의 직접적인 항균활성 이외에 병원균에 의한 biofilm 형성을 억제하거나 유도 전신 저항성(ISR, induced systemic resistance)이라는 식물체 내 방어 기작을 유도하여 식물병을 억제하는 데에도 기여한다고 알려졌다.^{28,33)} 최근에는 *B. subtilis* 균주가 생산하는 flagellin-like 단백질이 *Botrytis cinerea*에 강한 지해활성을 나타낸다고 보고하였으며,³⁴⁾ *Bacillus amyloliquefaciens* 균주도 토마토 모양병 유래의 *Ralstonia solanacearum*에 의한 세균성 시들음병과 토마토 흰가루병을 전신성 획득 저항성(systemic acquired resistance)을 유도하여 억제한다고 보고하였다.³⁵⁾ 이처럼 *B. subtilis* 균주가 많은 식물병과 각종 식물 병원균의 억제에도 효과적이라고 알려지면서, 현재에도 널리 이용되고 있으며, *Bacillus*속 균주 이외에도 식물병원균 방제에 효과적인 미생물로는 *Trichoderma*속의 미생물들(*T. harzianum*, *T. viride*, *T. sp.*, *T. hignorum*, *Gliocladium virens* 등)이 많이 보고되었다.^{36,37)}

이러한 길항 미생물들이 식물체에 유용성을 부여하는 대표적인 기작으로는

- ① 항생물질과 같은 2차 대사 산물의 생산, ② 철분을 포집할 수 있는 siderophore의 생산, ③ 병원균의 세포벽을 분해하는 효소의 생산, ④ 병원 미생물의 군체에 기생, ⑤ 병원 미생물과 영양분이나 시식 공간의 경쟁 유발, ⑥ 미생물의 기생으로 숙주 식물체에 저항성을 유도하는 등 미생물의 기능을 이용하여 식물체의 잎이나 모양 속에서 병원 미생물의 생육을 억제하거나 숙주에의 감염을 지해하여 병이 발생되지 않도록 한다고 알려져 있다.⁷⁾

한편 농업 생산성을 증가시키기 위하여 오래 전부터 유용세균을 대상으로 광범위하게 진행되어 온 미생물 이용 연구에서는 질소고정, 인산의 가용화, 항생물질의 생산과 식물 성장 조절제 등과 같은 식물과 세균의 상호작용에 대한 생리적인 면에 치중하여 왔다.³⁸⁾ 그러나 70년대에 접어들면서 식물병학 분야에 생태학이 접목되면서 생태학적인 측면에서 식물과 병원균 및 환경인자 사이의 상관관계를 다루기 시작하였다. 특히 종자에 살포한 특정된 근권 세균들이 뿌리에 부착되어 식물의 성장을 촉진한다는 보고로 인해 식물체에 유용성을 나타내는 미생물들을 plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)라고 부르게 되었다.^{39,40)} PGPR 특성을 나타내는 균주들은 뿌리에 공생하는 공생균과는 달리 식물 주변의 근권 모양에 주로 분포되어 있고 일부는 식물의 뿌리 또는 뿌리 내부에 분포하여 식물의 성장 촉진과 질병 억제에 직·간접적으로 관여하고 있다. 이 균주들은 식물 성장 조절제를 생산하거나 영양분 집취를 촉진하여 직접적으로 식물의 생육을 촉진하기도 하고,⁴¹⁾ 모양 유래 병원균이나 유해한 근권 세균류로부터 식물체를 보호하기 위해 siderophore를 생산하거나 항생물질을 생산하여 간접적으로 식물



Variants

Esperin** L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu-COOH
 Lichenysin*** L-XL₇-L-XL₂-D-Leu-L-XL₄-L-Asp-D-Leu-L-XL₇
 Punilacidin L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp-D-Leu-L-XP₇
 Surfactin L-Glu-L-XS₂-D-Leu-L-XS₄-L-Asp-D-Leu-L-XS₇

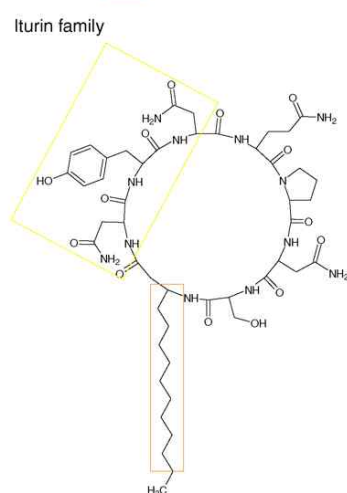
** the β-carboxyl of Asp₅ is engaged in the lactone
 *** or halobacillin
 XL₁ = Gln or Glu; XL₂ = Leu or Ile; XL₄ and XL₇ = Val or Ile;
 XP₇ = Val or Ile;
 XS₂ = Val, Leu or Ile; XS₄ = Ala, Val, Leu or Ile; XS₇ = Val, Leu or Ile

Length and branching of the acyl chain

i-C₁₃, *ai*-C₁₃, *n*-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅

i-C₁₄, *n*-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅

n, linear
i, iso
ai, anteiso



Bacillomycin D L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Pro-L-Glu-D-Ser-L-Thr
 Bacillomycin F L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Thr
 Bacillomycin L L-Asp-D-Tyr-D-Asn-L-Ser-L-Gln-D-Ser-L-Thr
 Bacillomycin LC* L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Ser-L-Glu-D-Ser-L-Thr
 Iturin A L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser
 Iturin A_L L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser
 Iturin C L-Asp-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser
 Mycosubtilin L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Ser-L-Asn

* or bacillopeptin

n-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅

i-C₁₆, *i*-C₁₇, *ai*-C₁₇

n-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅

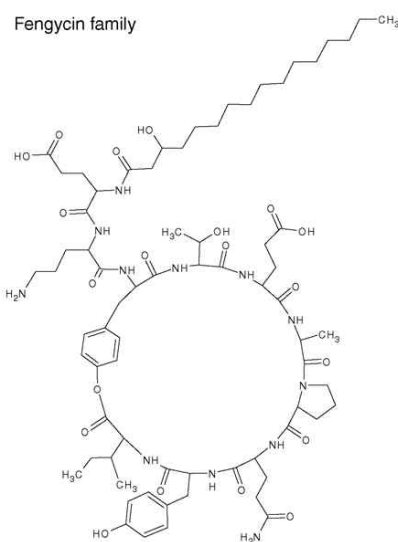
n-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅, *i*-C₁₆

n-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅

n-C₁₆, *i*-C₁₆

n-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅

n-C₁₆, *i*-C₁₆, *ai*-C₁₇



Fengycin A** L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile
 Fengycin B** L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile
 Plipastatin A L-Glu-D-Orn-L-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-D-Tyr-L-Ile
 Plipastatin B L-Glu-D-Orn-L-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-D-Tyr-L-Ile

** double bond between carbons 2-3, 3-4 or 13-14 were reported for some acyl chains

ai-C₁₅, *i*-C₁₆, *n*-C₁₆

ai-C₁₅, *i*-C₁₆, *n*-C₁₆, C₁₇

n-C₁₆, *ai*-C₁₇

n-C₁₆, *ai*-C₁₇

Fig. 4. Structures of representative members and diversity within the three lipopeptide families synthesized by *Bacillus* species. Boxed structural groups are those that were shown to be particularly involved in interaction with membranes and/or are supposed to be important for biological activity in addition to the cyclic nature of the molecular.

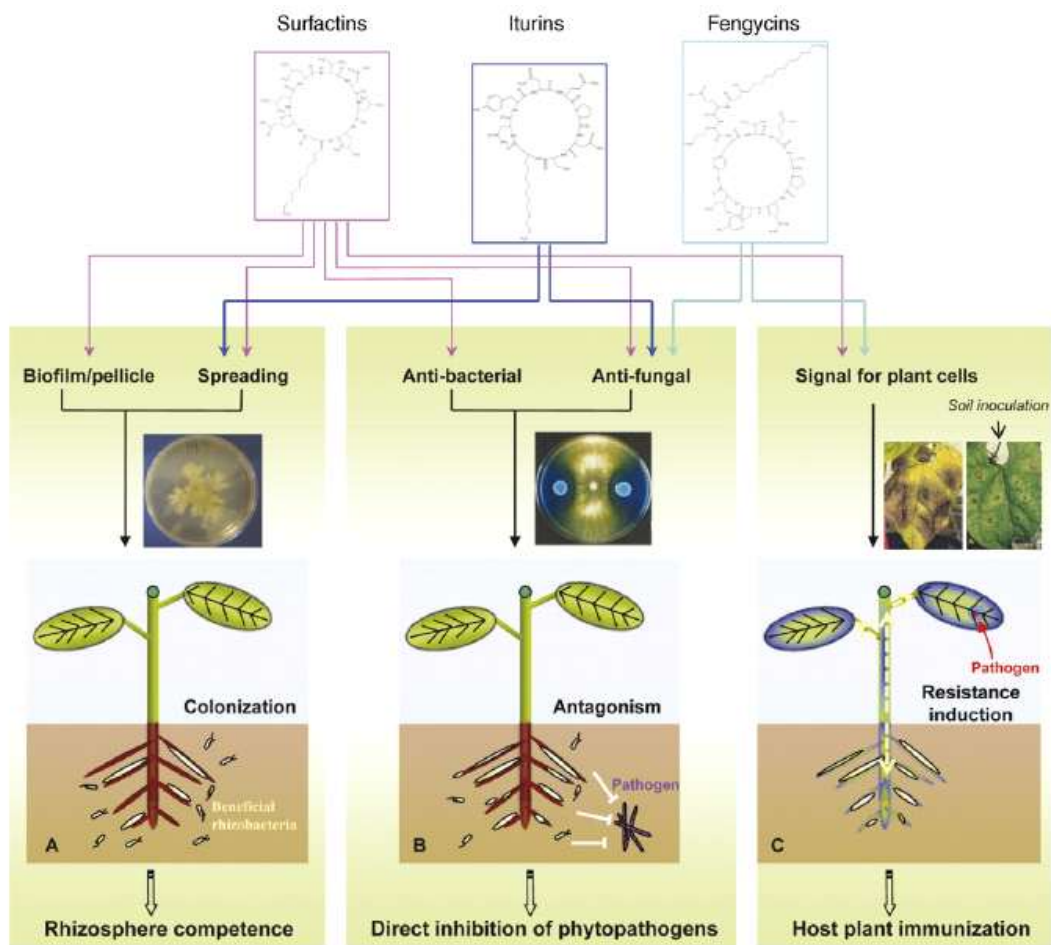


Fig. 5. Overview of *Bacillus* lipopeptide interactions in the context of biological control of plant diseases. From left to right, the three photographs show bacterial spreading, fungal growth inhibition through the production of fungitoxic compounds by blue bacterial cells and leaf disease reduction following inoculation of the beneficial bacterium on roots. They illustrate how to get experimental indications about the potential involvement of one particular strain in the three phenomena schematically represented in A, B, and C. Establishment in biofilm and/or microcolonies of the rhizobacterium is represented in A, B represents direct antibiosis that can be exerted by the established biocontrol strain toward pathogens sharing the same microenvironment. In C, the arrows illustrate the emission of a signal following perception of the rhizobacterium at the root level. This signal moves over the entire plant leading to some systemic reinforcement allowing pathogen restriction at distal sites of infections (Trends Microbiol., 16: 115-125, 2008)

의 생육을 촉진한다고 알려져 있으며,^{42,43)} 또한 몇몇 PGPR 특성을 나타내는 근권 세균들은 식물체 내에 전신 저항성(systemic resistance)을 유도하여 여러 식물 병원균으로부터 식물체를 보호한다고 보고하고 있다.^{38,44)} 이러한 PGPR 특성을 나타내는 대표적인 균주로는 *Pseudomonas* 속의 균주들도 이 균주들은 근권 토양의 특수하고 한정된 natural niche에서 생태계와 조화를 이루다가 적절한 환경이 조성되면 농작물의 생육을 촉진하거나 질병 발생을 억제하는 등 식물체에서 활성 발현의 특이성이 알려지고 있다.^{45,46)}

이와 같이 오랫동안 미생물을 이용한 생물학적 방제제의 개발에 많은 노력을 해 왔으나 아직도 유기합성 농약에 비해 그 시장 규모도 작고, 항균 활성 또한 매우 미약한 실정이다. 그러나 점차 유기합성 농약의 사용 규제도 인해 이를 대체할 생물학적 방제제에 대한 필요성이 나날이 증대되고 있고, 또한 2000년대 후반에는 점차 그 시장 규모도 4.9억불도 확대되고 연평균 성장률도 6.5% 이상으로 증가하여 일반 농약의 10% 이상을 차지할 것으로 예측되고 있으며, 현재에도 일부의 길항 미생물들이 미생물 단독 또는 화학합성 농약과 함께 사용되고 있어 길항 작용이 뛰어난 미생물의 확보가 시급한 실정이다. 이러한 길항 미생물을 이용하는 생물농약 이외에도 pheromone 농약과 선충 농약 등과 같은 생물농약 시장도 증가 추세에 있으며 최근에는 바이러스를 이용한 생물농약 개발도 시도되고 있기 때문에 약효가 우수한 생물농약의 개발 필요성이 꾸준히 요구되고 있다.

이러한 추세에 따라 국내 토양으로부터 분리한 길항 미생물을 이용한 생물농약 소재를 개발하기 위하여 분리한 길항 미생물 중 여러 종류의 식물 병원균에 광범위하게 강한 항균력을 나타내어 미국 특허를 획득한 6종의 iturin을 생산하는 야생주 *Bacillus* 균주를 이용하여 iturin 생산능을 증가시키기 위하여 자외선 처리에 의한 돌연변이주를 제조하고 그 특성을 조사하였다. 다른 한편으로는 iturin 생산량이 증대된 자외선 돌연변이주의 iturin 생합성 유전자를 NGS (next generation sequencer)로 분석하여 돌연변이가 일어난 부위를 동정하고, 분자수준에서 site-directed mutagenesis에 의한 균주 개량을 시도하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 외국의 경우

생물학적 방제 연구는 1900년 초부터 많은 종류의 세균과 곰팡이를 이용하여 식물병원균을 억제하려고 많은 노력을 기울여 왔다. 지금까지 보고된 생물학적 방제제의 대부분이 *Agrobacterium* sp, *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Streptomyces* sp. 등의 세균류와 *Gliocladium virens*, *Trichoderma* sp. 등의 곰팡이를 이용한 개발 연구들이다. 이 분야 연구는 최근에 특히 활발하게 전개되고 있고, 2018년도에는 약 4.9억불의 시장을 형성할 정도로 매년 6.5%의 성장을 나타낼 것으로 예측되고 있으며, 미생물 비료 시장은 2012년도에 11.5억불, 2013년도에 12억불이었으며 2018년도에는 15.4억불로 증가할 것으로 전망되고 있다.¹²⁾

미생물에 의한 병해충 방제의 기본 개념은 병원 미생물에 유해한 생리활성물질의 생산, 병원 미생물의 군체에 기생, 병원 미생물과 영양분이나 서식 공간의 경쟁 및 미생물의 기생에 의해 숙주 식물체에 저항성을 유도하여 병원 미생물의 생존이나 활동을 억제시켜 숙주의 간연을 방지하는 데 있다.⁷⁾ 이러한 작용기작에 따른 여러 방제 사례 중 먼저 영양 군체에 기생하여 생물학적 방제에 이용한 사례로는 길항 미생물 *Bdellovibrio* 군주를 이용한 *Pseudomonas syringae* 방제, *Bacillus*, *Serratia* 등의 세균을 이용한 *Phytophthora* 난포자나 *Sclerotium*의 군핵 억제, *Gliocladium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Verticillium* 등의 사상균이 여러 종류의 병원 사상균 기관에 기생하여 생물 방제 효과를 나타낸다고 보고하고 있다(표 3).

항생물질을 이용한 생물학적 방제로 가장 성공적인 사례로는 *Agrobacterium radiobacter*를 이용한 식물뿌리의 crown gall 예방이다.¹³⁾ 식물의 crown gall 발병은 *Agrobacterium tumefaciens* 라는 토양 세균에 의해 발생하는 과수의 뿌리병이다. 이 병의 예방에는 화학 농약은 전혀 효과가 없는 데 다행히 길항 미생물 *Agrobacterium radiobacter*가 생산하는 agrocin이라는 항생물질이 *A. tumefaciens*의 침입을 억제한다는 것이 밝혀졌고 유전공학 기법을 이용하여 개량된 *A. radiobacter*를 이용한 몇 가지 제품이 개발되었으며, 전 세계 시장에서 700억원 정도를 선유한 것으로 추정된다(제품명 : Nogall, Norbac, Galltrol). 또 다른 성공적인 연구가 진행되고 있는 분야는 *Pseudomonas fluorescens* 등을 이용한 식물질병 예방 분야이다. 특기할 만한 발전은 미국 U.S.D.A. Washington State University 연구팀에 의한 밀의 뿌리썩음병 방제 연구로 예로 들 수 있다. Weller,⁴⁷⁾ Weller 및 Cook,⁴⁸⁾ Cook,⁴⁹⁾ Cook 등⁵⁰⁾은 10여년에 걸친 연구를 통해서 밀의 뿌리에 부착해서 생활하는 근권 미생물로서 밀의 뿌리질병을 일으키는 곰팡이 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*에 강력한 길항작용을 나타내는 *Pseudomonas fluorescens* 군주를 토양으로부터 분리하는 데 성공하였다. 길항 미생물을 밀의 종자에 처리하여 파종하였을 경우 밀의 수확량이 10~20% 증가함을 확인하였으며, 8년에 걸친 포장실험을 통해서 밝혀진 것을 보면 어떤 때는 병 방제 효과가 좋고, 어떤 때는 방제 효과가 적으며, 지역에 따라 편차가 심한 제품 성능의 불규칙성을 나타내었다. 밀의 뿌리 썩음병 방제에 효과를 나타내는 요인으로서 *Pseudomonas*가 생산하는 phenazine계 항생물질^{18,19)}과 2,4-diacetylphloroglucinol이란 항생물질인 것으로 밝혀내고¹⁹⁾ 유전공학 기법을 도입하여 phenazine계 항생제

Table 3. Examples of modes of action exhibited by potential biological disease control agents.

Antagonists		Pathogens
영양균체에 기생(Parasitism or predation of hyphae)		
세균	<i>Arthrobacter spp.</i> <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	<i>Pythium debaryanum</i> <i>Pseudomonas syringae</i>
사상균	<i>Gliocladium catenulatum</i> <i>Pythium acanthicum</i> <i>Pythium oligandrum</i> <i>Talaromyces flavus</i> <i>Trichoderma hamatum</i> <i>Trichothecium roseum</i>	<i>Fusarium spp.</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 多數 多數 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Pythium spp.</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Puccinia horiana</i> , <i>Spaerotheca fuliginea</i>
내구 생존기관에 기생(Parasitism of predation of propagules)*		
세균 또는 방선균	<i>Actinoplanes spp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Serratia marcescens</i>	<i>Phthophthora megasperma</i> <i>Sclerotium cepivorum</i> <i>Sclerotium rolfsii</i>
사상균	<i>Gliocladium spp.</i> <i>Nectria inventa</i> <i>Talaromyces flavus</i> <i>Trichoderma spp.</i> <i>Verticillium biguttatum</i>	多數 <i>Alternaria brassicae</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 多數 <i>Rhizoctonia solani</i>
항생(Antibiosis)		
세균 또는 방선균	<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Erwinia herbicola</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Streptomyces friseoviridis</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 多數 <i>Fusarium oxysporum f. sp. dianthi</i> <i>Phytophthora cactorum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Verticillium dahliae</i> <i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>
사상균	<i>Gliocladium virens</i> <i>Penicillium frequentans</i> <i>Talaromyces flavus</i> <i>Trichoderma spp.</i>	<i>Pythium ultimum</i> <i>Monilinia laxa</i> <i>Verticillium dahliae</i> <i>Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans</i>
경합(Competition)		
세균 또는 방선균	<i>Alcaligenes sp.</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. dianthi</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>F. oxysporum</i> , <i>F. oxysporum f. sp. cucumerinum</i>
사상균	<i>Fusarium oxysporum</i> (non-pathogenic) <i>Pythium nunn</i> <i>Rhizoctonia solani</i> (non-pathogenic) <i>Trichoderma harzianum</i>	<i>F. oxysporum f. sp. cucumerinum</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>F. oxysporum f. sp. melonis and vasinfectum</i>

생산과 관련된 *Pseudomonas* sp.의 유전자 발현을 극대화하여 밀의 뿌리 썩음병 방제 효과의 불규칙성을 극복하였다.^{20,21)} 또한 철분을 포집하는 siderophore 항생물질을 생산하는 형광성 *Pseudomonas*를 이용한 *Fusarium*균 방제와 각종 항생물질을 생산하는 *B. subtilis*, *Pseudomonas cepacia*, *Streptomyces*속의 방선균, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Talaromyces* 및 *Trichoderma* 등의 사상균을 이용한 생물학적 방제도 보고되고 있다. 또 다른 길항 작용의 사례로는 *Alcaligenes*, *Pseudomonas* 등의 세균을 이용한 *Fusarium*이나 *Pythium* 등의 방제와 비병원성 *Pythium*에 의한 병원성 *Pythium*에 대한 방제효과가 미생물의 경쟁에 의한 것이라고 보고하고 있다(표 3).⁷⁾ 이외에 미생물이 기주 식물에 기생하여 식물체의 저항성을 유도하는 사례로는 *B. subtilis*에 의한 carnation의 *Fusarium*병 방제와 *Colletotrichum lagenarium*에 의한 오이의 탄저병 방제에 *Pseudomonas syringae*를 이용하였으며, carnation의 *Fusarium*병을 방제하기 위하여 *Pseudomonas*나 *Serratia*를 이용하여 저항성을 유도하였다. 또한 미국 U.S.D.A.의 연구팀은 *B. subtilis*가 생산하는 항생물질이 복숭아의 brown rot 원인균인 *Monilinia fructicola*를 억제하는 것을 발견하고 과수 저장중의 부패 방지제도 개발하기 위한 연구를 시도하였으며,⁵¹⁾ 미국 USDA의 Dr. Pusey 연구팀은 바실러스 셉틸리스가 많은 식물병에 대해 억제효과가 있는 것을 발견하였고,³⁰⁾ Phae 등도 퇴비용 부속 도양으로부터 식물 병원균에 광범위한 억제효과를 나타내는 바실러스 셉틸리스 NB22 균주를 분리하고 그 활성 성분이 iturin계 물질임을 증명하였다.³¹⁾ 특히 2,000년대 초반에 AgraQuest Co.에서 등록한 Serenade는 *Bacillus subtilis* QST713 균주를 이용하여 생산되며 살균제와 항세균제도 25개국에 등록되었고, 현재 용도에 따라 다양한 제품들이 판매되고 있으며,³²⁾ 연간 1억불 이상을 수출한다고 알려져 있다. 또한 *Bacillus* 균주가 생산하는 lipopeptide들의 대부분이 병원성 진균류에 대해 항균 활성을 나타내나, 일부 바실러스 균주들은 *Xanthomonas campestris*와 같은 식물병원성 세균류에도 길항 작용을 나타낸다고 보고하고 있다.^{52,53)} 이외에도 *Bacillus* 균주가 생산하는 다양한 lipopeptide 들은 직접적인 항균활성 이외에 병원균에 의한 biofilm 형성을 억제하거나 유도전신 저항성이라는 식물체 내 방어기작을 유도하여 식물병을 억제하는 데에도 기여한다고 알려졌다.^{28,33)} 최근에는 *B. subtilis* 균주가 생산하는 flagellin-like 단백질이 *Botrytis cinerea*에 강한 지해활성을 나타낸다고 보고하였으며,³¹⁾ 또 다른 *Bacillus* 균주인 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주도 토마토 토양병 유래의 *Ralstonia solanacearum*에 의한 세균성 시들음병과 토마토 흰가루병을 전신성 획득 저항성을 유도하여 억제한다고 보고하였다.³⁵⁾ 이와 같이 *B. subtilis* 균주는 여러 종류의 항생물질뿐만 아니라 각종 효소들을 생산하는 특징으로 인해 많은 연구자들의 주목을 받아 왔고, *S. cerevisiae* 및 *Lactobacillus* sp. 등과 더불어 미국 식품의약국에 의해 인체 및 환경에 무해한 균주로 인정받고 있다.²³⁾ *B. subtilis*를 이용하여 개발된 미생물 살균제로는 BacJ, EcoGuard, GB34, Kodiak, Histick, Serenade, Sonata 및 Taegro 등 8종이 미국에서 등록되어 상업적으로 이용되고 있고, EU에서는 Serenade 1종만이 등록되어 있으며(표 1, 2) 이들은 주로 종자 처리제나 post-harvest, 야채 등의 부패 방지용으로 널리 쓰이고 있다. 이처럼 *B. subtilis* 균주가 많은 식물병과 각종 식물 병원균의 억제에도 효과적이라고 알려지면서 현재에도 널리 이용되고 있으며, *Bacillus*속 균주 이외에도 식물병원균 방제에 효과적인 미생물로는 *Trichoderma*속의 미생물들(*T. harzianum*, *T. viride*, *T. sp.*, *T. hignorum*, *Gliocladium virens* 등)이 많이 보고되었다.^{36,37)}

한편 *Bacillus* 균주가 생산하는 cyclic lipopeptide 항생물질인 iturin이 오래 전부터 널리

이용되어 왔으나 분자 수준에서 iturin 생합성 유전자에 대한 분자 수준에서의 연구는 거의 이루어져 있지 않다가, 2000년대에 접어들면서 일본 연구팀에 의해 야생주 *B. subtilis* RB14 균주로부터 iturin A가 보고되었고,⁵⁴⁾ 독일 연구팀은 *B. subtilis* ATCC 6633 균주로부터 mycosubtilin의 생합성 유전자를 보고하였다.⁵⁵⁾ 또한 *B. amyloliquefaciens* FEZ42 균주의 유전체와 lipopeptide 분석을 통해 이 균주가 생산하는 lipopeptide는 surfactin, bacillomycin D 및 fengycin이라고 보고하였으며,^{56,57,58)} 4'-phosphopantetheine transferase 유전자인 *sfp* 유전자가 결여되어 surfctin을 생산하지 못하는 *B. subtilis* 168 균주에 iturin A operon을 horizontal transfer시켜 *sfp* 유전자를 도입시키면 iturin 생산균주도 전환된다는 연구 결과도 보고하고 있다.⁵⁹⁾ 이외에도 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946의 유전체 분석결과 이 균주가 iturin A의 ronribosomal 합성에 대한 gene cluster를 함유한다고 보고하는 등⁶⁰⁾ 그동안 미진하였던 이 분야 연구가 최근들어 활성화되고 있는 실정이다.

한편 70년대에 접어들면서 식물병학 분야에 생태학이 접목되면서 생태학적인 측면에서 식물과 병원균 및 환경인자 사이의 상관관계를 다루기 시작하였고, 특히 종자에 살포한 특정된 근권 세균들이 뿌리에 부착되어 식물의 생장을 촉진한다는 보고로 인해 식물체에 유용성을 나타내는 미생물들을 plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)라고 부르게 되었다.^{21,22)} PGPR 특성을 나타내는 균주들은 뿌리에 공생하는 공생균과는 달리 식물 주변의 근권 도양에 주로 분포되어 있고 일부는 식물의 뿌리 또는 뿌리 내부에 분포하여 식물의 생장 촉진과 질병 억제에 직·간접적으로 관여하고 있다. 이 균주들은 식물 생장 조절제를 생산하거나 영양분 선취를 촉진하여 직접적으로 식물의 생육을 촉진하기도 하고,²³⁾ 도양 유래 병원균이나 유해한 근권 세균류도 부터 식물체를 보호하기 위해 siderophore를 생산하거나 항생물질을 생산하여 간접적으로 식물의 생육을 촉진한다고 알려져 있으며,^{24,25)} 또한 몇몇 PGPR 특성을 나타내는 근권 세균들은 식물체 내에 전신 저항성(systemic resistance)을 유도하여 여러 식물 병원균으로부터 식물체를 보호한다고 보고하고 있다 (표 4).^{20,26)} 이외에 생물농약의 범주에 포함되고 있는 생화학 농약인 미생물 유래의 농입용 살균제는 지난 1950년대 후반부터 시작되어 개발된 blasticidin S,⁶¹⁾ kasugamycin,⁶²⁾ polyoxin⁶³⁾ 및 validamycin 등⁶⁴⁾이 그 당시에 사용되던 유기 합성계 농약을 대체 하면서 활성화되기 시작하였으며, 이러한 살균제들은 아직도 식물병 방제용으로 널리 사용되고 있는 실정이다.

이와 같이 생물농약으로 사용되고 있는 미생물 제제들은 종류도 다양하고 여러 가지 용도로 이용되고는 있으나 아직도 화학합성 농약에 비해 약효도 미약하고 그 시장규모도 미미한 실정이나 우리나라를 포함한 OECD 국가를 중심으로 화학합성 농약과 합성 미묘의 사용량을 2013년까지 40%를 감축할 예정으로 있기 때문에 화학농약을 대체할 수 있는 유일한 대안인 생물 농약 시장도 점차 확대될 것으로 예측된다. 이러한 추세에 따라 생물학식 방제제의 단점을 극복하기 위하여 분자 수준에서 균주를 개량하거나 제제화 기술 개발을 통해 약효를 증진시키고, 생산단가를 낮추고, 제품의 저장기간을 늘려 상품화 기술을 향상시키는 데 주력하여야 할 것으로 사료된다.

2. 국내의 경우

국내에서 미생물농약에 대한 연구는 1980년대를 전후로 기초적인 연구가 시작되어 1980년대 중반 인삼뿌리썩음병 방제연구를 시작으로 주요 작물의 모잘록병, 역병, 잣빛곰팡이병 등의 방제연구가 한국생명공학연구원, 한국화학연구원, 농업과학기술원 등의 국공립연구기관과 대학 및 산업체(동부한농, 그린바이오텍 비아이지, 고려 바이오 등)에서 수행되어 왔다. 2003년도에 국내 최초로 ㈜그린바이오텍에 의해 오이 흰가루병 방제용 탐시드엑상 수화제 (*B. polymyxa* AC-1)와 매추 쏘나방 방제용 솔잎채 액상수화제 (*B. thuringiensis*)등이 미생물 농약으로 등록된 이래 2012년 12월 현재 37종의 미생물 농약과 2종의 생화학농약을 포함하여 39종의 생물농약이 등록되어 시판되고 있다(표 5). 이 중 살균제 25종 가운데 19종이 국내에서 개발되었고, 6종은 수입되었으며, 살충제 13종 중 6종이 국내에서 개발되었고 7종은 수입되었으며, 등록된 제초제 1종은 수입된 제품이라고 알려졌다. 국내 천연물 농약 시장의 규모는 2012년 약 800억원 규모를 차지하고 있고, 연간 6.2%의 성장률을 나타내고 있으며, 2016년에는 1,029억원 규모에 도달될 것으로 전망되고 있다.⁶⁵⁾ 특히 국내에서는 21세기에 들어오면서 다른 OECD 국가와 마찬가지로 합성농약을 40% 감축하려는 친환경정책이 일환으로 2001년과 2005년에 각각 미생물 농약과 생화학농약에 대한 등록규정이 마련되면서 본격적인 상업화 연구가 진행되고 있으나, 선진국에 비해 품목 수나 기술면에서 아직은 많은 격차가 있는 실정이나 향후 이 분야에 대한 관심과 연구가 증가할 것으로 예측되고 있다.

국내에서도 2006년 국립농업과학원을 중심으로 식물의 병 저항성을 유도하는 *Bacillus vallismortis* EXTN-1 균주를 이용하여 생물농약이 개발되었는데 이 균주는 식물이 가지고 있는 자체 방어기작을 활성화시켜 식물이 자체적으로 병 저항성을 나타내고, 식물 생육 촉진 효과도 나타낸다고 보고되었다. 이 균주는 동부한농으로 기술 이전되어 2006년부터 10여종의 관련 제품을 출시하고 있으며 관련 제품의 총 매출이 연가 100억 원에 이른다고 알려져 있다.³²⁾ 또한 한국생명공학연구원에서도 다양한 식물 병원균에 저해활성을 나타내는 *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* 균주를 국내 토양으로부터 분리하고, 이 균주의 저해활성은 cyclic lipopeptide인 6종의 iturin 화합물에 의한 것임을 밝히고 국내와 미국에서 특허를 획득하였으며, 이 균주의 iturin 생산능을 증가시키기 위하여 이 균주가 생산하는 iturin 생합성 유전자를 클로닝하여 iturin 생합성에 관여하는 37,645 bp에 해당되는 연기배열을 분석하고 그 특성을 분석하였다.

이와 같이 항진균 활성을 나타내는 iturin은 이미 오래 전에 발견된 cyclic peptide이며 여러 종류의 인체 및 식물 병원균에 광범위한 항진균 활성을 나타내어 매우 흥미로운 항생물질이나 그 생합성 유전자는 2000년대 이후에 일부 *Bacillus* 균주에게서 보고되고 있는 실정이다. 또한 생물농약에 이용되는 길항 미생물 제제들은 대부분 야외 포장에서 사용 시 외기 온도, 습도, 자외선 및 기타 여러 환경요인에 따라 대부분의 활성에 커다란 차이를 나타내어 재현성을 유지하는 데 많은 문제점이 있었다. 따라서 항진균활성의 변화를 최소화하기 위하여 분자 수준에서의 균주의 개량, 전달체계의 개선 등 여러 가지 시도가 현재에도 이루어지고 있기 때문에 이러한 일련의 시도들이 성공되면 생물농약으로 이용되는 미생물 제제의 저해 활성이나 지속성 등이 많이 향상되어 유기합성 농약을 대체하는 데 많은 기여를 할 것으로 사료된다.

Table 5. List of biopesticides registered in Korea as of December 31, 2012.

연번	용도	제조 수입	취급분야	품목명	등록규격(%)
1	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스디비비1501 수화제	1×10 ⁹ cfu/g
2	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스디비비1501 입제	1×10 ⁶ cfu/g
3	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스시제어-9 액상현탁제	1×10 ⁷ cfu/ml
4	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스엠27 고상제	2×10 ⁸ cfu/g
5	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스엠비아어600 수화제	2×10 ¹¹ cfu/g
6	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스와이1336 수화제	1×10 ⁹ cfu/g
7	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스이디블유42-1 액상현탁제	1×10 ⁷ cfu/ml
8	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스제이케이케이238 액상제	5×10 ⁷ cfu/ml
9	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스지비365 수화제	3×10 ⁷ cfu/g
10	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스지비365 액상수화제	1×10 ⁷ cfu/ml
11	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스케이비401 유상현탁제	2×10 ⁷ cfu/ml
12	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스케이비401 유상현탁제	2×10 ⁷ cfu/ml
13	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스케이비시1010 수화제	1×10 ⁵ cfu/g
14	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스큐에스티713 수화제	5×10 ⁹ cfu/g
15	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스큐에스티713 액상수화제	1×10 ⁹ cfu/g
16	살균	제조	미생물	바실루스아밀로리퀴파시엔스케이비시1121 수화제	1×10 ⁶ cfu/g
17	살균	제조	미생물	바실루스아밀로리퀴파시엔스케이비시1121 수화제	1×10 ⁶ cfu/g
18	살균	수입	미생물	바실루스푸밀루스큐에스티2808 액상수화제	1×10 ⁹ cfu/g
19	살균	제조	미생물	스트렙토마이세스코시킴시스티블유와이이324 액제	1×10 ⁵ cfu/ml
20	살균	제조	미생물	스트렙토마이세스콜롬비엔시스티블유와이이20 액제	1×10 ⁴ cfu/ml
21	살균	제조	미생물	실플리실리움라멕리콜라비씨피 수화제	5×10 ⁷ cfu/g
22	살균	제조	미생물	알벤도마이세스퀴스칼리스에이큐94013 수화제	1×10 ⁷ cfu/g
23	살균	수입	미생물	트리코디마아드도비라이드에스케이티-1 수화제	1×10 ⁸ cfu/g
24	살균	제조	미생물	트리코디마하지아눔와이씨459 고상제	1×10 ⁸ cfu/g
25	살균	제조	미생물	패니바실루스폴리딕사에이시-1 액상수화제	5×10 ⁶ cfu/ml
26	살충	제조	미생물	부나크로스푸름다우마쉴케이비시3017 고상제	1×10 ⁴ cfu/g
27	살충	수입	미생물	뷰메리아바시아나지에이치에이 유상현탁제	1×10 ⁸ cfu/ml
28	살충	수입	미생물	뷰메리아바시아나디비아어-1 액상제	1×10 ⁶ cfu/ml
29	살충	수입	미생물	비디아이자와이 액상수화제	8.5 BIU/kg
30	살충	수입	미생물	비디아이자와이 입상수화제	35,000 DBMU/mg
31	살충	제조	미생물	비디아이자와이엔티423 수화제	1×10 ⁹ cfu/g
32	살충	제조	미생물	비디아이자와이엔티423 액상수화제	1×10 ⁸ cfu/ml
33	살충	제조	미생물	비디아이자와이지비413 액상수화제	1×10 ⁷ cfu/ml
34	살충	제조	미생물	비티쿠르스타키 수화제	16 BIU/kg
35	살충	수입	미생물	비티쿠르스타키 액상수화제	10%
36	살충	수입	미생물	비티쿠르스타키 입상수화제	64 BIU/kg
37	살충	수입	생화학	아자디락틴 입제	0.15 %
38	살충	제조	미생물	패실로마이세스퓨보소도세우스디비비-2032 수화제	5×10 ⁷ cfu/g
39	제초	수입	생화학	뿔라르곤산 유제	53 %

*Source: 농촌진흥청 홈페이지(http://rda.go.kr/board/board.do?catgId=menu_id=ofc&boardId=openda)

Table 6. Current Status of the types of microorganism-induced disease resistance in plants

Species, strain	Pathosystem
<i>B. subtilis</i> sp.	Cotton/Meloidogyne
GBO3	Cucumber/Erwinia, beetle; Arabidopsis/Erwinia
IN937b	Tomato/Cucumber mosaic cucumovirus (CMV), Tomato mottle virus (TMV)
S499	Cucumber/Colletotrichum Tomato/Pythium Bean/Botrytis
FZB-G	Tomato/Fusarium
BacB	Sugar beet/Cercospora
<i>B. pumilus</i> SE34	Tobacco/Peronospora; Arabidopsis/Pseudomonas; Cucumber/beetle; Tomato/Fusarium; Phytophthora, CMV; TMV
T4	Tobacco/Pseudomonas; Arabidopsis/Pseudomonas
INR-7	Loblolly pine/ Cronartium Cucumber/ beetle
203-6	Sugar beet/Cercospora
<i>B. amyloliquefaciens</i> IN937	Tomato/CMV, TMV; Cucumber/beetle; Arabidopsis/Erwinia
EXTN-1	Tobacco/Pepper mild mottle virus (PMV); Cucumber/Colletotrichum Arabidopsis/PMV
<i>B. thuringiensis</i>	Berliner Coffee/Hemileia
<i>B. mycoides</i> BacJ	Sugar beet/Cercospora
<i>B. pasteurii</i> C-9	Tobacco/Peronospora
<i>B. sphaericus</i> B43	Potato/nematode
<i>B. cereus</i> B1	White clover/nematode

*Source: 박경석. 2011. 미생물 농약의 개발현황과 바실러스 미생물의 중요성. 공업화학 전망, 14(4): 1~11.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 연구 수행 방법

국내 토양으로부터 각종 식물 병원균에 광범위한 길항작용을 나타내는 *Bacillus subtilis* 균주를 분리하고 그 특성을 조사하여, 이 균주가 6종류의 iturin A~F를 생산하는 것을 확인하고 *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079로 명명한 후 1992년에 미국 특허를 획득하였다. 그 후 이 균주를 이용하여 iturin 생합성에 관여하는 iturin 유전자를 클로닝하기 위하여 genomic library screening을 통해 30~40 kb에 해당하는 cosmid 클론을 얻은 후 iturin 생합성 유전자를 클로닝하고, 연기서열을 결정하여 iturin 생합성에 관여하는 유전자가 37,645 bp에 달한다는 것을 규명하고, 그 특성을 조사한 후 iturin 생합성 유전자에 대한 연기서열을 GenBank에 기탁하고 기탁번호 KC454625를 부여받았다. Iturin은 이미 오래 전에 보고된 cyclic peptide 항생물질이나 iturin 생합성 유전자에 대한 정보는 2,000년대에 들어 본격적으로 고고되기 시작하였고, 현재 사용되고 있는 미생물 유래 생분농약의 대부분은 *Bacillus* 균주가 차지하고 있으며,²⁴⁾ 21세기에 들어오면서 우리나라를 포함한 OECD 국가를 중심으로 화학합성 농약과 합성 비료의 사용량을 대폭적으로 감축하려는 움직임이 나타나고 있다. 이처럼 화학합성 농약을 대체하고 농업 생산성을 유지할 수 있는 생물 농약의 중요성이 점점 증대되고 있는 추세에 따라 당실에서 보유하고 있는 6종류의 iturin을 생산하는 *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079 균주를 이용하여 iturin 생산능이 증대된 길항미생물 *Bacillus* 균주를 개발하고 산업화하기 위하여 두 가지 방향으로 접근을 시도하였다. 먼저 *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079 균주를 기존에 많이 알려진 자외선 처리방법에 따라 균주 개량을 시도하여 iturin 생산능이 증대된 돌연변이주를 여러 단계를 거쳐 선별하고, 기존에 상업적으로 사용되고 있는 시판 제품에 함유된 *Bacillus* 균주와 항균력을 비교하여 가장 우수한 항균력을 나타내는 돌연변이주를 선발하였다. 다른 한편으로는 자외선 처리에 의해 iturin 생산능이 증대된 돌연변이주의 어느 부분에 변이가 일어나서 iturin 생산능이 증대되었는지를 분자수준에서 규명하기 위하여 돌연변이주의 iturin 생합성 유전자 부위를 NGS(next generation sequencing)를 통해 연기서열을 분석하여, 일단 iturin 생합성 유전자 부위를 대상으로 돌연변이가 일어난 부위를 동정하고, point mutation이 일어난 부위를 대상으로 site-directed mutagenesis를 하여 균주 개량 가능성을 다진하였다. 또한 야생주 *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079가 생산하는 2차 대사산물 중 6종류의 iturin 이외에 다른 cyclic lipopeptide가 생산되는지의 여부를 HPLC와 LC-Mass를 이용하여 분석하였으며, 이외에도 자외선 돌연변이주가 생산하는 iturin 생산능이 야생주보다 어느 정도 증가되었는지를 HPLC로 분석하였다.

2. 연구내용

가. 길항 작용을 나타내는 *Bacillus*의 배양과 검정용 병판의 조제

(1). 사용 균주와 매지 및 플라스미드

1). 사용 균주

Iturin 생산 균주는 한국생명공학연구원 산업바이오소재연구센터에서 이미 오래 전에 분리하여 미국 특허를 획득한 야생주 *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079를 이용하였다. 상업적으로 판매되고 있는 제품에 사용된 *Bacillus* 균주와의 항균력을 비교하기 위하여 관련 제품들(Kodiak, Serenade, 에코제트, Cellus 등)에 함유되어 있는 *Bacillus* sp. 균주들을 분리하여 야생주와 동일한 방법으로 배양하였다.

항균력을 조사하기 위한 피검균으로는 가지과 식물의 시들음병 원인균인 *Fusarium oxysporum*을 사용하였으며, 이들의 배양 및 검정용 병판 제조 시에는 potato dextrose agar를 사용하였다.

2). 매지

Bacillus subtilis 균주와 자외선 돌연변이주의 배양은 LB (Bacto-tryptone 10 g, Bacto-yeast extract 5 g, sodium chloride 10 g/liter) 매지를 사용하였다. *Bacillus subtilis* 균주들의 활성물질 생산 매지로는 복합 (sucrose 30 g, soytone 10 g, yeast extract 5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ 2 g, MnCl₂ 4 mg, CaCl₂ 5 mg, FeSO₄ · 7H₂O 25 mg, pH 7.0/liter) 매지를 사용하였으며, 형질전환 시에는 Spizizen (50% glucose 10 ml, 2% casein hydrolysate 10 ml, 10% yeast extract 10 ml, 1M MgCl₂ 2.25 ml, KH₂PO₄ 6 g, K₂HPO₄ 14 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, Na citrate 1 g, MgSO₄ 0.2 g/liter) 매지⁶⁶⁾를 사용하였다.

3). 플라스미드 및 벡터

야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 균주의 homologous recombination을 위한 vector 및 site-directed mutagenesis를 위한 vector construction 시에는 pUC19 vector와 pIC333 vector⁶⁷⁾의 spectinomycin 항생제 저항성 유전자를 이용하였다.

(2). 검정용 병판매지의 조제

(가). *Fusarium oxysporum* 병판의 조제

Potato dextrose agar 매지에서 자란 *F. oxysporum* 균주를 potato dextrose broth에 접종하고 25°C에서 2~3일 동안 진탕 배양하여 멸균한 waring blender로 균질화 시키고 혼합

도 (A_{550nm})를 1.5로 조절한 후 일정량을 멸균하여 50°C로 조절된 potato dextrose agar 50 ml에 균액 10 ml를 분주하여 균일하게 혼합하고 potato dextrose agar를 미리 분주하여 제조해 놓은 base layer 위에 병판의 크기에 따라 5~10 ml씩 overlay하여 검정용 병판을 제조하였다.

나. *Bacillus* 균주들의 *in vitro* 활성 검정

(1). 배양 상등액에 의한 생육억제 조사

LB 한천배지에서 신선하게 자란 *Bacillus* 균주들의 단일 집락들을 모아 LB broth 매지에 접종하고 30°C에서 200 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 다시 LB 그로스 배양액을 iturin 생산용 복합매지에 전체 용량의 2%가 되도록 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 72시간 동안 배양하였다. 배양액을 8,000 × g에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거하고 0.2 μ m membrane filter를 통과한 상등액을 paper disk에 각각 250 μ l씩 첨가하여 *F. oxysporum* 검정용 병판 매지에 올려놓고 25°C에서 1~3일간 배양한 후 피검균의 생육억제 정도를 조사하였다.

다. 자외선 처리에 의해 iturin 생합성이 증대된 돌연변이 균주의 선발

(1). 자외선 처리에 의한 돌연변이주의 유발

야생주 *B. subtilis* subsp. *kriectiensis* 균주를 LB 병판에 streak한 후, 30°C에서 하룻밤 동안 배양하여 얻은 단일 집락을 2 ml의 LB broth에 접종하여 30°C, 200 rpm 에서 16~18 시간 동안 배양한 후, 이 배양액을 집종원으로 LB매지 100 ml에 1%되게 접종하여 550 nm에서 흡광도가 0.6이 될 때까지 배양하였다. 배양액을 8,000 × g에서 10분간 원심분리하고 균체를 세척용 완충액(5 mM caffeine, 0.1M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.03% tween 80)으로 2회 세척하여 $A_{550nm}=0.4$ 로 조절한 후 현탁액 일정량을 시계접시에 1.5 ml씩 분주하여 UV box (그린 6) 내부의 병판 위에 올려놓고, 25 cm 상단의 10W short wave UV lamp 1개와 15 W short wave UV lamp 2개가 장착된 UV box를 이용하여 전체 UV 조사량이 2.80 mW/cm^2 이 되도록 처리하였으며, 처리시간 별로 생존율을 조사하여 생존율 0.1% 범위 내의 조건을 확립하였다.

(2). 변이주의 선발 및 *in vitro* 활성 검정

자외선으로 돌연변이 시킨 야생주 *B. subtilis* subsp. *kriectiensis* 균주 중 자외선 처리에 의해 iturin 생합성능이 증대된 돌연변이주를 선발하기 위하여 자외선으로 처리한 야생주 *B. subtilis* subsp. *kriectiensis* 현탁액을 병판 매지 당 100~200개의 집락이 생육할 수 있도록 희석하여, 항균력 검정용 병판매지에 직접 도말하였다. 도말한 병판 위에 일정 농도로



Fig. 6. Photograph of UV box used in this study.

조실한 *Fusarium oxysporum* 현탁액이 함유된 soft agar을 분주하여 굳힌 후 25°C에서 1~2일간 배양하였다. 배양 후 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 균주의 활성과 비교하여, 생육 지지환이 증가된 변이주들 1차 선발하였으며, 선발된 변이주들은 iturin 생산용 복합매지에서 48~72시간 동안 진탕 배양하여 15,000 × g에서 원심분리하였다. 균체를 여과한 후 상등액만을 *F. oxysporum*이 함유된 병판 위에 스테인레스로 만든 cylinder(외경 8 mm, 높이 10 mm, Fisher Co.)을 올려놓고, 250 μl씩 여과한 상등액을 cylinder 내부에 첨가하여, 25°C에서 1~2일간 배양한 후 생육 지지환의 증가 여부를 조사하여,⁶⁸⁾ 최종적으로 야생주 *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079 균주보다 2-3배 항균력이 증대된 자외선 돌연변이주 BSM54를 선발하여 이후 실험을 진행하였다.

(3). 기존 생물학적 방제제와 선별한 자외선 돌연변이주의 항균력 비교

야생주 *Bacillus subtilis* 균주를 자외선으로 처리하여 최종 선발한 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54 균주의 항균력과 기존에 생물학적 방제제로 상업적으로 등록되어 시판 중인 4종 (Serenade 2종, 에코제트 1종, Kodiak 1종)의 제품으로부터 단계별로 희석 배양하여 분리한 *Bacillus* 균주들을 LB broth 매지에 접종하고 30°C에서 200 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 다시 LB broth 배양액을 iturin 생산용 복합매지에 전체 용량의 2%가 되도록 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 72시간 동안 배양하였다. 배양액을 8,000 × g에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 paper disk에 각각 250 μl씩 첨가하여 *F. oxysporum* 검정용 병판 매지에 올려놓고 25°C에서 1~3일간 배양한 후 자외선 돌연변이주와 시판 제품에서 분리한 균주들과의 항균력을 조사하였다.

라. 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 장기 보관에 따른 항균력 변화 가능성 조사

자외선 돌연변이주의 single colony를 신선한 LB broth 매지에 접종하여 30°C에서 하룻밤 배양한 후 glycerol과 섞어 최종 농도가 20%가 되도록 한 후 -70°C에 보존하면서 2개월 이후부터 1개월 간격으로 최대 2년까지 보관하면서 보관 기간에 따른 항균력의 변화를 조사하기 위하여 일정한 기간마다 보관 중인 균주를 신선한 LB agar 매지에 recovery하고 생육한 single colony를 iturin 생산매지에 3일간 배양하여 *F. oxysporum*에 대한 항균력의 변화를 조사하였다.

나. 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54를 이용한 iturin 생합성 유전자 변이 확인

(1). Genomic DNA의 분리

Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54를 이용하여 야생주 *B. subtilis* 보다 항균 활성이 증진된 원인을 분자수준에서 규명하기 위하여 BSM54의 gDNA를 분리하였다. 자외선 돌연변이주 BSM54의 단일 집락을 각각 25 ml의 LB broth 매지에 접종하여 30°C, 250 rpm으로 대수기 후반 ($A_{600}=1.0-2.0$)까지 배양하여 $8,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 얻은 균체를 10 ml의 lysis 완충액 (50 mM EDTA, 0.1 M NaCl, pH 7.5)으로 세척한 후 다시 10 mg의 lysozyme을 첨가한 4 ml의 lysis 완충액으로 현탁시키고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 다시 20% (w/v) sarkosyl 0.3 ml를 첨가하여 5분간 반응시킨 후 4 ml의 TE 완충액으로 포화시킨 phenol 4 ml을 첨가하여 잘 혼합한 후 4°C, $10,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 DNA층을 분리하였다. 이렇게 얻은 상층액을 phenol/chloroform으로 다시 추출하여 DNA층을 분리한 뒤, 0.1 volume의 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 2.5 volume의 냉각된 ethanol을 첨가하고 원심분리하여 DNA를 침전시키고, 침전된 DNA를 70% ethanol로 세척하여 풍건한 후 최종적으로 TE 완충액에 용해하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

자외선 돌연변이주 BSM54의 genomic DNA 염기서열은 대전에 소재한 Solgent Co.에 Next Generation Sequencing (454 Pyrosequencing) 분석을 의뢰하여 얻었으며, 이 genomic DNA 염기서열 중 돌연변이가 일어난 iturin 생합성 유전자 부위의 동정은 이미 앞서 확보한 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 균주의 iturin 생합성 유전자 37,645 bp와 비교하여 돌연변이가 일어난 부위를 동정하였다.

바. Iturin 高生産 돌연변이주 BSM54의 point 돌연변이에 따른 iturin 생합성 유전자의 발현 양상 분석

자외선 조사를 통해 얻은 iturin 高生産 돌연변이주 BSM54를 대상으로 iturin 생합성 관련 유전자 ORF1부터 ORF5까지 5개의 ORF들을 이용하여 각 ORF들의 발현량이 야생주보다 증가하였는지의 여부를 비교하였다. 먼저 자외선 돌연변이주 BSM54와 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis*를 iturin 생산 매지 (sucrose 30 g, soytone 10 g, yeast extract 5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4$ 2 g, $MnCl_2$ 4 mg, $CaCl_2$ 5 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 25 mg, pH 7.0/liter)를 이용하여 30°C에

시 하룻밤 진탕배양한 배양액을 동일한 새 매지에 2%가 되도록 접종하고, 24, 48 및 72시간 간격으로 배양한 후 그 배양액 일부를 채취하여 Trizol (Invitrogen Co.) 용액으로 처리하여 전체 RNA를 분리하였다. 얻은 전체 RNA에 DNaseI (Takara Co.)으로 처리하여 30분간 배양한 후 다시 Trizol로 재정제하여 RNA 추출 과정 중에 유입될 수 있는 genomic DNA들을 모두 제거하였으며, 최종적으로 얻어진 전체 RNA로부터 iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 또한 각각의 iturin 생합성에 관련된 ORF 유전자들의 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)에 이용한 PCR 프라이머들은 아래 표 7에 나타내었다.

Real-time PCR은 위에서 얻은 각 cDNA 샘플 1.5 µg에 대하여 Light Cycler 1.5 (Roche Co.)와 LC FS Master Plus SYBR Green (Roche)를 이용하여 실시하였다. 증폭 조건은 95°C에서 10초, 60°C에서 15초 및 72°C에서 15초로 하여 모두 45 cycle을 수행하였다. 각 ORF에 대한 상대적 발현량의 계산은 내부 대조 유전자 (internal control gene)로 사용된 *gyrB*의 Ct값을 각 ORF의 Ct값으로부터 공제한 delta Ct값을 구한 후 다시 그 값으로부터 가장 큰 delta Ct값을 공제한 delta delta Ct값을 구하여 $2^{-(\text{delta delta Ct})}$ 값으로 나타내었다.

Table 7. Primer sequences used in real-time PCR analysis

ORFs	Primer Sequences
ORF1	5'-CCGTGATAGGCGGGAAGT-3'
	5'-GGAGGGACGACAGGGTAAAC-3'
ORF2	5'-CGGCGGTATGAGTCGATG-3'
	5'-GCTTGCTTGCCTCGTCAC-3'
ORF3	5'-AGACCGAGGAGGAACAGCAG-3'
	5'-CAGCAGGGACGTTGTAGCTC-3'
ORF4	5'-GACCGGTCAAGCTGTTTCG-3'
	5'-CTTCATCAGCGCCTGGAC-3'
ORF5	5'-CCCGCTCCACACCTATCTTC-3'
	5'-CTGTGGCCGAACAGGACA-3'
<i>gyrB</i>	5'-GGCTCTCGGGACAGGAAT-3'
	5'-GGCGGCTGAGCAATGTAG-3'

사. Iturin 高生産 돌연변이주 BSM54의 *Botrytis cinerea*에 대한 포자 발아 억제 효과

자외선 조사를 통해 얻은 iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54 균주와 야생주 *B. subtilis*의 잣빛곰팡이병 원인균인 *Botrytis cinerea*의 포자 발아 억제 효과를 조사하기 위하여 자외선 돌연변이주 BSM54와 야생주를 LB broth 매지에 접종하고 30°C에서 200 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 다시 LB broth 배양액을 iturin 생산용 복합 매지에 전체 용량의 2%가 되도록 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 72시간 동안 배양한 후 배양한 배양액에 5N HCl을 가해 pH 3으로 조절하고 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 염산으로 처리한 배양액을 원심 분리하여 생성된 침전물을 Tris buffer (pH 7.0)로 중화하고, 3차 증류수로 희석시킨 후 동량의 butanol을 가하여 현탁하고, 다시 4°C에서 하룻밤 방치하여 생성된 상등액을 회수하였으

며, 이와 같은 추출 과정을 모두 3회 반복하여 얻어진 butanol 분획물을 모두 모아 간압농축하였다. 한편 잿빛 곰팡이병 원인균인 *Botrytis cinerea*의 포자를 얻기 위하여 *B. cinerea* 균주를 potato dextrose agar 매지에 streak하여 25°C에서 7일 동안 배양한 후, 얻은 *B. cinerea* 균주를 potato dextrose broth 매지에서 3일 동안 배양하여 얻은 포자를 신선한 potato dextrose broth 배지로 희석하여 약 10^6 포자/ml가 되도록 포자 농도를 조절하고, 여기에 간압 농축된 야생주와 돌연변이주 BSM54 butanol 분획물을 각각 125, 250 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 포자 현탁액에 첨가한 후 습실 처리한 hole slide glass에 주입하여 25°C에서 6시간 배양한 후 현미경으로 발아 유무를 관찰하였다.

아. Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54와 야생주 *B. subtilis*의 iturin 생산능 비교

Iturin 高生産 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54와 야생주 *B. subtilis*의 iturin 생산능을 비교하기 위하여 돌연변이주 BSM54와 야생주를 LB broth 매지에 접종하고 30°C에서 200 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 다시 LB broth 배양액을 iturin 생산용 복합 매지에 전체 용량의 2%가 되도록 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 72시간 동안 배양한 후 배양한 배양액에 5N HCl을 가해 pH 3으로 조절하고 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 염산으로 처리한 배양액을 원심분리하여 생성된 침전물을 중화하고, 3차 증류수로 희석시킨 후 동량의 butanol을 가하여 현탁하고, 다시 4°C에서 하룻밤 방치하여 생성된 상등액을 회수하였으며, 이와 같은 추출 과정을 모두 3회 반복하여 얻어진 butanol 분획물을 한꺼번에 모아 간압 농축하여, 야생주 *B. subtilis*로부터 0.7434 g, 돌연변이주 BSM54로부터 0.7326 g을 얻었다. BuOH 분획물 가운데 매지 성분이 혼합되어 있어 비교분석을 용이하게 하기 위하여 Amberlite XAD-7HP gel (Sigma aldrich, USA) column chromatography를 실시하였다. 먼저 XAD-7HP gel의 불순물을 제거하기 위하여 acetone과 MeOH을 이용하여 순차적으로 세척한 후 증류수를 이용하여 다시 세척하였다. 세척 후 0.1N HCl을 이용하여 pH 2까지 낮추고 다시 증류수로 세척하고, 0.1N NaOH를 이용하여 pH를 12로 조정하고 다시 증류수로 세척하였다. 재생 완료된 XAD-7HP gel을 column에 충전하고 야생주 *B. subtilis*와 자외선 돌연변이주 BSM54 유래의 BuOH 분획물을 각각 증류수에 용해시켜 loading하였다. 예비 실험에서 XAD-7HP column을 이용하여 각각의 시료를 H₂O, 30% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH 및 100% MeOH 순으로 분획하여 HPLC로 비교한 결과, 매지성분은 H₂O 분획 층에서 모두 회수되어 본 실험에서는 H₂O 분획과 MeOH 분획으로 나누었으며, MeOH 분획을 다시 간압 농축하여 야생주 (0.2507 g)와 돌연변이주 BSM54 (0.2459 g) 분획물을 얻었다. 각각 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis*와 iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 XAD-7HP column 분획물을 이용하여 iturin 화합물에 대한 생산능을 HPLC (high performance liquid chromatography, Agilent 1100 equipped with VWD detector and ALS autosampler)와 authentic iturin A 화합물을 이용하여 비교하였으며, authentic iturin A는 Sigma Co.에서 구입하여 대조구로 사용하였다. 분리과정을 상세히 기술하면 야생주와 BSM54의 XAD-7HP column 분획물을 메탄올로 희석한 후 membrane filter (0.45 μm , 13 mm, Merck Millipore, Germany)로 여과한 다음 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 이 때 HPLC 분석 조건은 아래 표 8에 나타내었으며, 야생주와 BSM54로부터 생성된 iturin 화합물들은 HPLC의 머무름 시간(retention time)과 LC-MS

(LC-MS, LCQ Deca XP ion trap mass spectrometer, Thermo Finnigan, U.S.A.)는 표 9에 나타낸 분석 조건을 이용하여 비교하였다. Mass spectra는 50~2,000의 범위에서 positive ion mode로 m/z 값을 나타내었다.

Table 8. HPLC conditions for qualitative analysis of iturin A

Item	Operating condition
HPLC system	Agilent 1100 HPLC system equipped with VWD detector and ALS autosampler
Column	YMC-Pack Tri art C18 (5 μ m, 4.6 I.D. \times 250 mm, YMC Inc., USA)
Solvent	A; H ₂ O, B; 100% Acetonitrile a Linear gradient elution from A to B for 60 min
Detector	UV _{210nm}
Flow rate	0.8 mL/min

Table 9. LC-MS conditions for molecular weight analysis of iturin A

Item	Operating condition
HPLC system	Nanospace SI-2 (Shiseido, Tokyo, Japan)
Column	Acentis Express C18 (1.7 μ m, 2.1 I.D. \times 150 mm, Supelco)
Solvent	A: 95% H ₂ O containing 0.1% formic acid, B: 95% Acetonitrile containing 0.1% formic acid 80% of A/ 20% of B for 5 min 80~20% of A/20~80% of B for 35 min 20% of A/80% of B for 10 min 20~80% of A/80~20% of B for 5 min 80% of A/20% of B for 15 min a Linear gradient elution from A to B for 70 min
Detector	UV _{210nm}
Flow rate	0.8 mL/min

자. 야생주 *B. subtilis*로부터 iturin 이외의 다른 cyclic lipopeptide의 생성 여부 조사

야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis*가 생산하는 6종류의 iturin 화합물 이외에 다른 cyclic lipopeptide를 생산하는지의 여부를 조사하기 위하여, 야생주를 LB broth 매지에 접종하고

30°C에서 200 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 다시 LB broth 배양액을 iturin 생산용 복합 매지에 전체 용량의 2%가 되도록 집중하여 30°C에서 200 rpm으로 72시간 동안 배양한 후 배양한 배양액에 5N HCl을 가해 pH 3으로 조절하고 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 염산으로 처리한 배양액을 원심분리하여 생성된 침전물을 중화하고, 3차 증류수로 희석시킨 후 동량의 butanol을 가하여 현탁하고, 다시 4°C에서 하룻밤 방치하여 생성된 상등액을 회수하였으며, 이와 같은 추출 과정을 모두 3회 반복하여 얻어진 butanol 분획물을 모두 모아 감압 농축하여 야생주 *B. subtilis*로부터 1.0013 g을 얻었다. BuOH 분획물 가운데 매지 성분이 혼합되어 있어 비교분석을 용이하게 하기 위하여 Amberlite XAD-7HP gel (Sigma Aldrich, USA) column chromatography를 실시하였다. 먼저 XAD-7HP gel의 불순물을 제거하기 위하여 acetone과 MeOH을 이용하여 순차적으로 세척한 후 증류수를 이용하여 다시 세척하였다. 세척 후 0.1N HCl을 이용하여 pH 2까지 낮추고 다시 증류수로 세척하고, 0.1N NaOH를 이용하여 pH를 12로 조성한 후 다시 증류수로 세척하였다. 재생 완료된 XAD-7HP gel을 column에 충전하고 야생주 *B. subtilis* 유래의 BuOH 분획물을 각각 증류수에 용해시켜 loading하고 얻은 MeOH 분획을 다시 감압 농축하여 야생주로부터 0.1971 mg을 얻었다. 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis*의 XAD-7HP column 분획물을 이용하여 iturin 이외에 다른 cyclic lipopeptide를 생산하는지의 여부를 HPLC와 authentic iturin A 및 surfactin 화합물을 이용하여 비교하였으며, authentic surfactin도 Sigma Co.에서 구입하여 대조구로 사용하였다. 분리과정을 상세히 기술하면 야생주와 BSM54의 XAD-7HP column 분획물을 네탄올로 희석한 후 membrane filter (0.45 µm, 13 mm, Merck Millipore, Germany)로 여과한 다음 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 이 때 HPLC 분석은 C₁₈ column (YMC-pack Pro, 4.6 × 250 mm, 5 µm, YMC Inc., USA)을 이용하여 210 nm에서 UV detector로 검출하였다. 분리 시에는 1 ml/ml의 유속으로 CH₃CN (A)/ 0.05% TFA in water (B)의 gradient 조건으로 다음과 같이 용출하였다. 즉 20~60% of A/80~40% of B (v/v) for 50 min, 60~80% of A/40~20% of B (v/v) for 5 min, 80~100% of A/20~0% of B (v/v) for 30 min, 100% of A/0% of B (v/v) for 3 min 및 20% of A/80% of B (v/v) for 2 min.의 조건으로 분리하였다. 야생주로부터 생성된 iturin 이외의 화합물들은 HPLC의 머무름 시간(retention time)과 LC-Mass를 이용하여 비교하였으며, LC-MS 분석 시에는 Phenomenex C₁₈ column (1.0 × 150 mm, 5 µm, Phenomenex, U.S.A.)을 사용하여 다음과 같이 용출하였다. 분리 시에는 0.5 µl/ml의 유속으로 0.1% formic acid를 포함하고 있는 CH₃CN (A)/0.1% formic acid를 포함하고 있는 water (B)를 이용하여 다음과 같이 용출하였다. 즉 35% of A/65% of B (v/v) for 5 min, 35~100% of A/65~0% of B (v/v) for 75 min, 100% of A/0% of B (v/v) for 5 min, 100~35% of A/0~65% of B (v/v) for 5 min 및 35% of A/65% of B (v/v) for 10 min.의 조건으로 분리하였다. Mass spectra는 50~2,000의 범위에서 positive ion mode로 m/z 값으로 나타내었다.

차. 돌연변이된 iturin 생합성 유전자와 site-directed mutagenesis를 이용한 야생주의 개량

(1). Site-directed mutagenesis용 형질전환 벡터의 제조

Iturin 高生産 차외선 돌연변이주인 *B. subtilis* BSM54의 point mutation이 일어난 6곳의 site

가운데 아미노산 치환이 일어나지 않은 부위 중, 먼저 iturin 생산에 영향을 미칠 것으로 예상되는 promoter 부근의 M1 point mutation 위치의 염기를 대상으로 site-directed mutagenesis를 시도하기 위한 형질전환 벡터를 제조하였다.

야생주 *B. subtilis*로부터 M1 point mutation site 대상 부위를 포함하는 ORF1 region을 클로닝하기 위해 primer ORF1_u-f (5' -TAATCGCCGTCAGTTCCTCG-3')와 ORF2-r (5' -TTTCATCGACTCATACCGC-3') 및 AccuPower Pfu PCR Premix (Bioneer, Korea)을 이용하여 약 1.8 kb의 PCR 산물을 얻었다. 이때 PCR 조건은 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 2분의 반응을 30회 반복하였으며, 증폭시킨 PCR 산물과 pUC19 vector를 모두 *EcoRI*으로 절단한 후 4°C에서 16시간 ligation 반응을 실시하였다. Ligation시킨 recombinant plasmid는 *E. coli* DH5α competent cell (RBCBioscience)에 형질전환하였으며, 이렇게 얻은 plasmid pBSM54-orf1을 다시 *Bam*HI과 *Xba*I으로 double digestion하고, pIC333으로부터 위와 동일한 제한효소 처리로 얻어진 spectinomycin resistance gene cassette을 ligation하여 최종적으로 pBSM54-orf1-sp 벡터를 제조하였다.

(2). Site-directed mutagenesis를 이용한 야생주의 개량

Iturin 高生産 지외선 돌연변이주인 *B. subtilis* BSM54의 point mutation이 일어난 6곳의 site 가운데 아미노산 치환이 일어나지 않은 부위 중, 먼저 iturin 생산에 영향을 미칠 것으로 예상되는 promoter 부근의 M1 point mutation 위치의 염기를 대상으로 site-directed mutagenesis를 시도하였다. 구체적으로 위에서 제조한 pBSM54-orf-sp 벡터를 대상으로 QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent, U.S.A.)를 이용하여 site-directed mutagenesis를 실시하였다. 10 ng의 pBSM54-orf1-sp 벡터와 각 50 pmoles/μl의 mutagenic primer (표 10), *PfuUltra* HF DNA polymerase (2.5 U/μl), dNTP mix, reaction mix 및 기타 reagent를 혼합한 후 Thermal cycler (iCycler, Bio-Rad)를 이용하여 95°C, 1분 경과 후 95°C에서 50초, 50°C에서 50초, 68°C에서 7분 동안 반응시키는 cycle을 18회 반복하고, 다시 68°C에서 7분간 더 반응하였다. 최종적으로 이와 같이 제조한 site-directed mutagenesis된 재조합 형질전환 벡터 pBSM54-orf-sp-1을 이용하여 야생주 *B. subtilis*에 형질전환 하였다. 야생주 *B. subtilis* 균주를 LB 병판배지에서 신선하게 배양하여 얻은 단일 집락을 2 ml의 Spizizen 배지(50% glucose 10 ml, 2% casein hydrolysate 10 ml, 10% yeast extract 10 ml, 1M MgCl₂ 2.25 ml, KH₂PO₄ 6 g, K₂HPO₄ 14 g, (NH₂)SO₄ 2 g, sodium citrate 1 g, MgSO₄ 0.2 g, 증류수 1 liter)에 접종하고 37°C, 200 rpm에서 16~18시간 배양하였다. 다시 접종 균액이 1% 되도록 신선한 동일 배지에 접종하고 배양하면서, 580 nm에서 흡광도가 1.0일 때 배양액 0.5 ml과 약 1 μg의 site-directed mutagenesis된 재조합 형질전환 벡터를 혼합하고, 1시간 동안 진탕배양 하였다. 진탕배양한 후, 60 μg/ml의 spectinomycin이 함유된 LB 병판배지에 도말하고, 37°C에서 24 시간 동안 배양하여 생육한 spectinomycin 저항성 클로니를 순수 분리하였다. Site-directed mutagenesis가 발생한 형질전환주의 선발은 열색체 내에 상동 재조합 (homologous recombination)된 부분을 선별적으로 증폭할 수 있는 orf1-f3 (5' -ACGCCATGTATAAGTGGGGA-3'), spc-r2(5' -CCACCATTACTGCTGAC-3'), spcf1 (5' -TATCGGGGAGAGTGTGAT-3'), hxlrl (5' -AACCTTGAAACACGGGCA-3'), spcf2 (5' -CAAAGGTGAAAGCACT-

CG-3') 및 hxl2 (5'-TGATCTTCAAGCAGAAGG-3') 등의 PCR primer들을 이용하여 95°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초로 하여 모두 30 cycle이 되도록 PCR을 수행하여, 증폭 산물이 얻어지는 콜로니들을 형질전환주로 선발하였다. 1차 선발된 형질전환주를 대상으로 *F. oxysporum* 활성검정을 통해 야생주에 비해 항균력이 증대된 형질전환주를 2차 선발하기 위하여 1차 선발된 형질전환주의 단일 집락을 LB 액체매지에 접종하여, 30°C에서 200 rpm으로 16시간 동안 배양하고, 다시 앞서 기숙한 iturin 생산용 복합 매지에 전체 볼륨의 2%가 되도록 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 72 시간 동안 배양하였다. 배양 후 8,000 × g에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 활성 검정용 *F. oxysporum* 균주를 함유한 평판매지에 멸균한 스테인레스 cylinder를 올려놓고, 그 내부에 배양 상등액을 각각 250 µl씩 첨가하여 25°C에서 1~3일간 배양한 후 *F. oxysporum*에 대한 생육 억제 정도를 조사하였다.

Table 10. Mutagenic Primer sequences used in site-directed mutagenesis

Site-directed Mutation	Mutagenic Primer Sequences
T (thymine)	5'-GGCAATGCGCT T TGTTTCAGCA-3'
	5'-TGCTGAAACA A AGCGCATTGCC-3'
C (cytosine)	5'-GGCAATGCGCT C TGTTTCAGCA-3'
	5'-TGCTGAAACA G AGCGCATTGCC-3'
A (adenine)	5'-GGCAATGCGCT A TGTTTCAGCA-3'
	5'-TGCTGAAACA T AGCGCATTGCC-3'

(3). Site-directed mutagenesis를 통해 얻은 형질전환주와 야생주 *B. subtilis*의 iturin 생산능 비교

Iturin 高生産 자외선 돌연변이주 의 M1 point mutation이 일어난 부위를 야생주에 site-directed mutagenesis시켜 얻은 *B. subtilis* T1과 T6 형질전환주들과 야생주 *B. subtilis*의 iturin 생산능을 비교하기 위하여 site-directed mutagenesis 형질전환주와 야생주를 LB broth 매지에 접종하고 30°C에서 200 rpm으로 16시간 동안 배양하였다. 다시 LB broth 배양액을 iturin 생산용 복합 매지에 전체 용량의 2%가 되도록 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 72시간 동안 배양한 후 배양한 배양액에 5N HCl을 가해 pH 3으로 조절하고 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 염산으로 처리한 배양액을 원심분리하여 생성된 침전물을 중화하고, 3차 증류수로 회석시킨 후 동량의 butanol을 가하여 현탁하고, 다시 4°C에서 하룻밤 방치하여 생성된 상등액을 회수하였으며, 이와 같은 추출 과정을 모두 3회 반복하여 butanol 분획물을 얻었다. 이러한 과정을 거쳐 얻은 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 형질전환주 T1과 T6 부탄올 분획물을 감압농축하여 얻은 T1-1 (26.9 mg), T1-2 (34.7 mg), T6-1 (38.5 mg) 및 T6-2 (25.6 mg)을 이용하여 XAD-7HP column chromatography를 실시하였다. XAD-7HP gel을 증류수로

swelling시킨 뒤 open column (1.8 x 1.8 x 20 cm)에 충전하고, 각 샘플을 증류수에 용해시켜 gel에 loading하고 증류수와 메탄올을 이용하여 용출된 분획 중 MeOH 분획물들을 다시 갇압 농축하여 T1-1 (17.5 mg), T1-2 (17.22 mg), T6-1(16.19 mg) 및 T6-2 (13.61 mg) 분획물들을 얻은 후 각 분획물을 80% MeOH에 용해하여 5 mg/ml의 동일 농도로 맞추어 위에 기술한 방법대로 HPLC를 실시하고, 정량 시에는 각각의 평균값을 구하였다.

3. 연구결과

가. 자외선 조사를 통한 iturin 高生産 돌연변이주의 확보

(1). 자외선 처리에 의한 돌연변이주의 유발

1990년대 초반 확보한 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis*로부터 유래된 자외선 돌연변이주 M1891과 UV4-II 균주를 이용하여 더욱 더 iturin 생산능이 증대된 돌연변이주를 다시 얻기 위하여 자외선 처리를 시도하였다. 각각의 균주들을 LB 배지에서 하룻밤 동안 배양한 배양액을 신선한 동일 배지에 1%되게 접종하여 550 nm에서 흡광도가 0.6 될 때까지 배양하고, 원심분리한 균체를 caffein을 함유한 세척용 완충액으로 세척하여 $A_{550nm}=0.4$ 로 조절한 현탁액을 시계접시에 1.5 ml씩 분주하여 그림 6에 나타낸 자체 제작한 UV box 내부의 원판 위에 올려놓았다. 시계 접시 위 25 cm 상단에 장착된 자외선 등(10W 단파장 자외선 등 1개, 15W 단파장 등 2개)을 이용하여 전체 UV 조사량이 2.80 mW/cm^2 되도록 처리시간 별로 0.1% 이내의 생존율을 나타내는 적정 처리시간을 조사한 결과 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* M1891은 25분, UV4-II 균주는 30분 처리 시에 0.1%의 생존율을 나타내어 처리시간은 각각 25분과 30분으로 정하였다 (그림 2, 3).

(2). 변이주의 선발 및 *in vitro* 활성 검증

자외선으로 돌연변이 시킨 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* M1891과 UV4-II 균주 중 자외선 처리에 의해 iturin 생합성능이 증대된 돌연변이주를 선발하기 위하여 다시 자외선으로 처리한 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* M1891과 UV4-II 균주 현탁액을 병판 매지 당 100~200개의 집락이 생육할 수 있도록 희석하고, 병판에 도말하였다. 도말한 병판 위에 일정 농도로 조절한 *F. oxysporum* 현탁액이 함유된 soft agar를 분주하여 굳힌 후 25°C에서 1~2일간 배양하였다. 배양 후 자외선으로 처리하기 전의 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* M1891과 UV4-II 균주들의 활성과 비교하여, 생육 저지환이 증가된 변이주를 1차 선발하였으며, 선발된 변이주들은 앞서 기술한 iturin 생산매지를 이용하여 72시간 동안 진탕 배양하여 원심분리하고, 균체를 여과한 상등액 만을 *F. oxysporum*이 함유된 병판 위에 일정량씩 loading하여, 25°C에서 1~2일간 배양한 후 생육 저지환의 증가 여부를 조사하였다. 그 결과 30,000여종의 집락으로부터 최종적으로 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* UV4-II 균주보다 2-3배 항균력이 증대된 자외선 돌연변이주 No. 54 균주를 선발하였다.

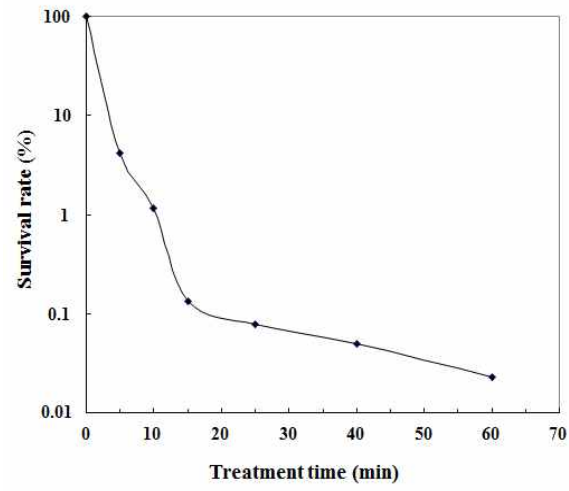


Fig. 7. Survival curve of *B. subtilis* M1891 mutant obtained upon UV irradiation.

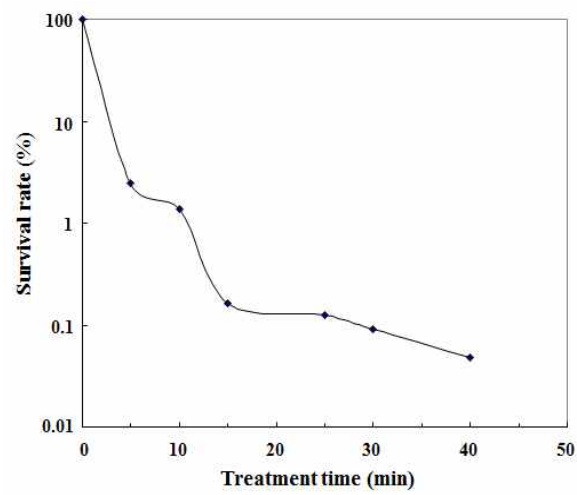


Fig. 8. Survival curve of *B. subtilis* UV4-II mutant obtained upon UV irradiation.

나. 상업적인 제품에 활용되고 있는 *Bacillus* 균주와 iturin 高生産 돌연변이주의 항균활성 비교

(1). 상업적으로 판매되고 있는 기존 제품 속의 미생물 생균수 조사

현재 국내·외에서 판매되고 있는 biological control agents 중 *Bacillus subtilis* 유래의 상업적인 제품 4종(Serenade 2종, 에코제트 1종, Kodiak 1종)을 이용하여 제품 속에 내재되어 있는 미생물의 숫자를 viable count를 이용하여 조사하였다. 그 결과 일부 제품에서는 제조된 지가 오래 되었는에도 불구하고 상당한 양의 생균수가 검출되었으며, 4종의 제품 모두에서 검출된 생균수는 제품에 따라 다소 차이를 나타내었으나 대체적으로 $2.25 \times 10^{10} \sim 5.89 \times 10^{11}$ CFU/g이 검출되었다 (표 11).

Table 11. Number of microorganisms isolated from commercially available biological control products by viable count

Products	No. of viable count (CFU/g)	Remarks
Serenade (powder)	1.79×10^{11}	2000년산 미국 제품
Serenade (liquid)	5.89×10^{11}	멕시코산 제품 (2012. 10. 31까지 유효)
에코제트 (powder)	9.9×10^{11}	Serenade 원제를 국내에서 제제화 (2009. 10. 31까지 유효)
Kodiak	2.25×10^{10}	2000년대 초반 미국 제품으로 추정됨

(2). 상업적으로 판매되고 있는 기존 제품과 자외선으로 처리하여 얻은 돌연변이주와의 항균력 비교

B. subtilis subsp. *krietiensis* UV4-II 균주를 자외선으로 처리하여 1차 선발한 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* No. 54 균주의 항균력과 상업적으로 등록된 생물학적 방제제로 4종 (Serenade 2종, 에코제트 1종, Kodiak 1종)의 제품으로부터 분리한 *B. subtilis* 균주들과의 항균력을 비교하였다. 분리한 각각의 균주를 iturin 생산매지를 이용하여 72시간 동안 진탕배양하고, 원심분리하여 균체를 여과한 후 상등액 만을 *F. oxysporum*이 함유된 병판 위에 일정방향 loading하고, 25℃에서 2일간 배양한 후 생육 저지환의 크기를 조사하였다. 그 결과 대부분의 균주들은 11.17~14.5 mm의 생육 저지환을 나타내었으나 선발한 No. 54 돌연변이주는 16.45 mm의 생육 저지환을 나타내어 다른 기존 제품에 사용된 균주보다 더 강한 저해활성을 나타내어 (그림 9, 표 12), 이 균주를 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 균주로 명명하였다.

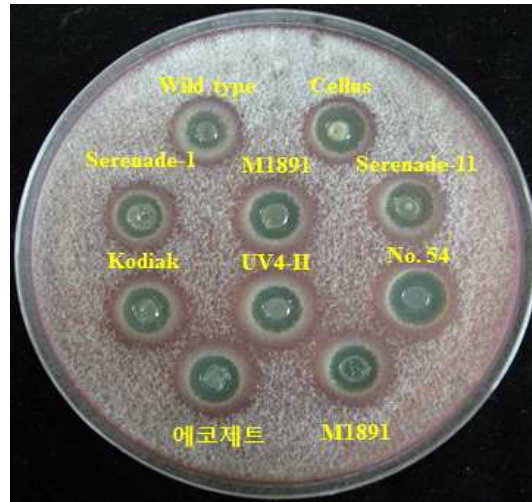


Fig. 9. Comparison of antifungal activities between commercial products and UV mutants producing iturin against *F. oxysporum*.

Table 12. Comparison of antifungal activities between commercial products and mutants against *F. oxysporum*

Items	Inhibition zone (mm)
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> (Wild type)	11.17
Serenade-1	13.20
Serenade-11	13.73
에코제트	14.28
Kodiak	13.75
Cellus	13.58
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> M1891	14.50
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> UV4-II	14.35
** <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> No. 54	16.45

* Serenade-1: 2001년도 제품, Serenade-11: 2011년도 제품, Cellus: (주)그린바이오텍 회사 제품

** No. 54 : *B. subtilis* subsp. *krietiensis* UV4-II 균주를 UV 처리하여 얻은 돌연변이주

*** M1891: 야생주의 UV 돌연변이주, UV4-II: 야생주를 UV로 처리한 돌연변이주

다. 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 균주로부터 얻은 iturin 생합성 유전자의 열기서열 결정과 2차 대사산물의 분석

(1). Iturin 생합성 유전자의 열기서열 결정 및 iturin 화합물의 분석

야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079는 당실에서 분리하여 미국 특허를 받은 균주로 (미국 특허 등록번호 5,155041, 1992. 10. 13) 이전 연구를 통해 야생주의 genomic library로부터 cosmid 클론을 얻은 후 열기서열 결정을 통해 6개의 ORF로 구성되어 있는 37,645 bp의 iturin 생합성 유전자를 확보하고(그림 10) GenBank에 KC454625로 기탁하였다. 이 유전자가 iturin 생합성 유전자인지의 여부를 확인하기 위하여, ORF3에 해당되는 중간 부위에 mini-Tn10 transposon을 삽입시킨 mutant-10 돌연변이주를 얻은 후 iturin 생성 여부를 확인한 결과 이 돌연변이주는 야생주에 비해 iturin 생합성이 30% 정도 현저하게 감소한 것을 HPLC를 통해 확인하였으며 (그림 11D), 또한 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis*가 iturin A~F까지 6 종류의 iturin을 생산(그림 11A, 11C)하는 것을 LC-MS를 통해 재확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 각 ORF들을 최근의 database를 이용하여 유사성을 비교해 본 결과 ORF1은 *B. amyloliquefaciens*의 HTH-type transcriptional activator 유전자와 99%의 상동성을 나타내었다(GenBank Accession #HE 617159.1). 이외에 ORF2로부터 ORF5는 각각 *B. amyloliquefaciens*의 surfactin synthetase A, B, C 및 D 유전자 (GenBank Accession #HE617-159.1)와 99%가 동일하였으며, ORF6는 *B. amyloliquefaciens*의 aspartate aminotransferase A 유전자 (GenBank Accession #HE617159.1)와도 99%가 동일하였다 (표 13). 비록 야생주의 ORF들이 *B. amyloliquefaciens* 균주의 surfactin synthetase들과 99%의 상동성을 나타내었으나, 앞서 언급한 바와 같이 ORF3에 mini-Tn10을 삽입하여 얻은 iturin-less 돌연변이주에서는 야생주에 비해 iturin의 생성능이 30% 정도 감소하였고, LC-MS를 통해서도 야생주는 6종류의 iturin을 생성하는 것을 재확인하였기 때문에, 야생주로부터 얻은 생합성 유전자는 iturin 생합성 유전자로 추정되었다. 또한 야생주로부터 얻은 iturin 합성에 중추적인 역할을 할 것으로 추정되는 ORF2와 ORF3의 각각 유전자 크기가 10 kb에 이르는 점을 고려해볼 때, *B. amyloliquefaciens*의 surfactin synthetase 유전자와 1%의 차이점을 나타내었는데도 서로 생산되는 물질이 달라질 수 있는지 더욱 더 분석하면 매우 흥미있는 결과를 도출할 수 있을 것으로 사료된다.

(2). Iturin 이외의 다른 2차 대사산물의 생산 가능성 분석

야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079 균주가 6종류의 iturin 이외에 다른 cyclic lipopeptide를 생산하는지의 여부를 조사하기 위하여 앞서 연구내용에 기술한 방법대로 야생주를 배양하고 염산으로 침전시킨 후 XAD-7HP column을 이용하여 얻은 분획물을 LC-MS로 분석하였으며, authentic surfactin (Sigma Co.)을 대조구로 이용하였다. 그 결과 야생주는 iturin 이외에 소량의 surfactin도 함께 생산한다는 것을 알 수 있었으나 생산량은 iturin에 비해 매우 미약하였다 (그림 11C). 또한 ORF3에 해당되는 중간 부위에 mini-Tn10 transposon을 삽입시킨 mutant-10 돌연변이주에서는 야생주보다 30% 감소한 iturin 이외에 surfactin도 검출되었으나 검출된 양은 야생주보다 2배 정도 더 많이 검출되었다 (그림 11D). 이러한 결과를 종합해볼 때 비록 야생주로부터 얻은 iturin 생합성 유전자가 *B. amyloliquefaciens*의 surfactin synthetase 유전자와 99% homology를 나타내었으나 야생주와 돌연변이주 mutant-10을 이용한 2차 대사산물의 분석 결과 이 유전자는 iturin 생합성 유전자로 사료되었으며, 야생주로부터 검출된 2차 대사산물을 표 14에 나타내었다.

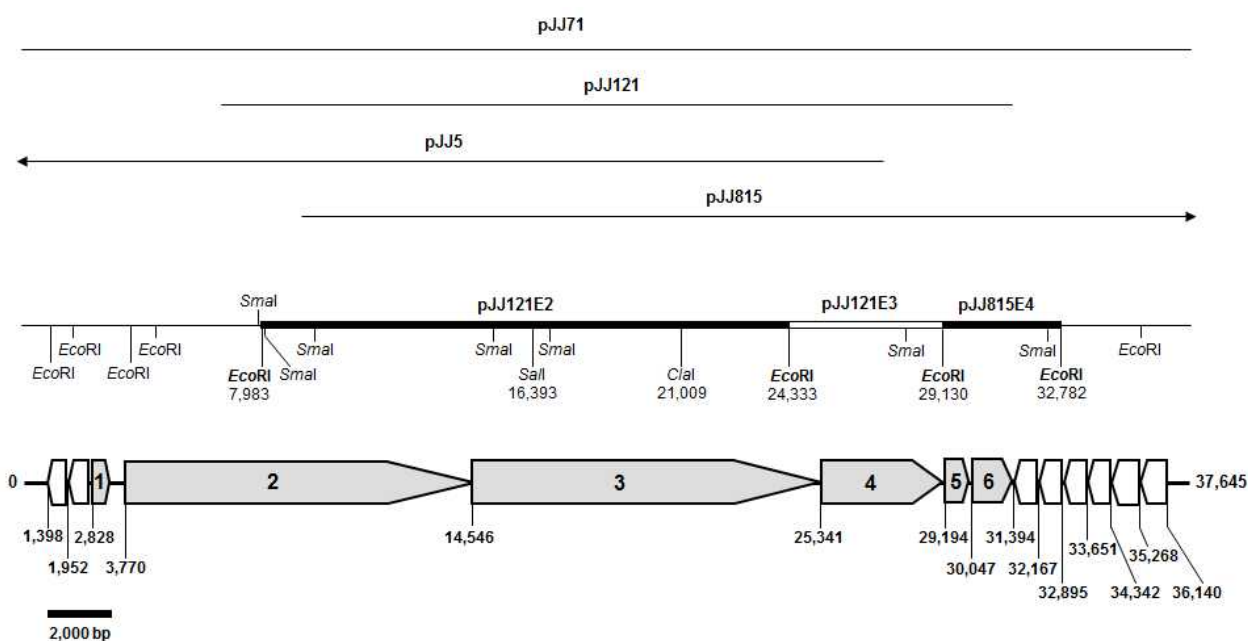


Fig. 10. The ORF and restriction map of clone pJJ71.

*ORFs of putative iturin biosynthesis gene are designated 1, 2, 3, 4, 5, and 6.

Table 13. Comparison of sequence homology of ORFs from clone pJJ71

ORFs (Nucleotide position)	Significant alignment	E value	Identities
ORF1 (2,828~3,181)	(HE617159.1) HTH-type transcriptional activator <i>hxlR</i> , [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	2e-177	352/354 (99%)
	(CP002905.1) HTH-type transcriptional activator <i>hxlR</i> , [<i>Bacillus subtilis</i>]	1e-78	277/350 (79%)
ORF2 (3,770~14,525)	(HE617159.1) Surfactin synthetase A <i>srfA</i> , [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	10,675/10,755 (99%)
	(CP002905.1) Surfactin synthetase subunit 2 <i>srfAB</i> , [<i>Bacillus subtilis</i>]	0.0	7,952/10,823 (73%)
ORF3 (14,546~25,306)	(HE617159.1) Surfactin synthetase B, [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	10,703/10,761 (99%)
	(CP002905.1) Surfactin synthetase subunit 2 <i>srfAB</i> , [<i>Bacillus subtilis</i>]	0.0	8,035/10,808 (74%)
ORF4 (25,341~29,174)	(HE617159.1) Surfactin synthetase C, [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	3,817/3,837 (99%)
	(CP002905.1) Surfactin synthetase subunit 3 <i>srfAC</i> , [<i>Bacillus subtilis</i>]	0.0	3,298/3,804 (87%)
ORF5 (29,194~29,925)	(HE617159.1) Surfactin synthetase thioesterase subunit <i>srfD</i> , [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	730/732 (99%)
	(CP002905.1) Surfactin synthetase thioesterase subunit <i>srfAD</i> , [<i>Bacillus subtilis</i>]	2e-130	527/697 (76%)
ORF6 (30,047~31,357)	(HE617159.1) Aspartate aminotransferase A, [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	1,302/1,311 (99%)
	(AY040867.1) Aspartate transaminase-like protein, <i>aspB3</i> , [<i>Bacillus subtilis</i>]	0.0	1,286/1,311 (98%)

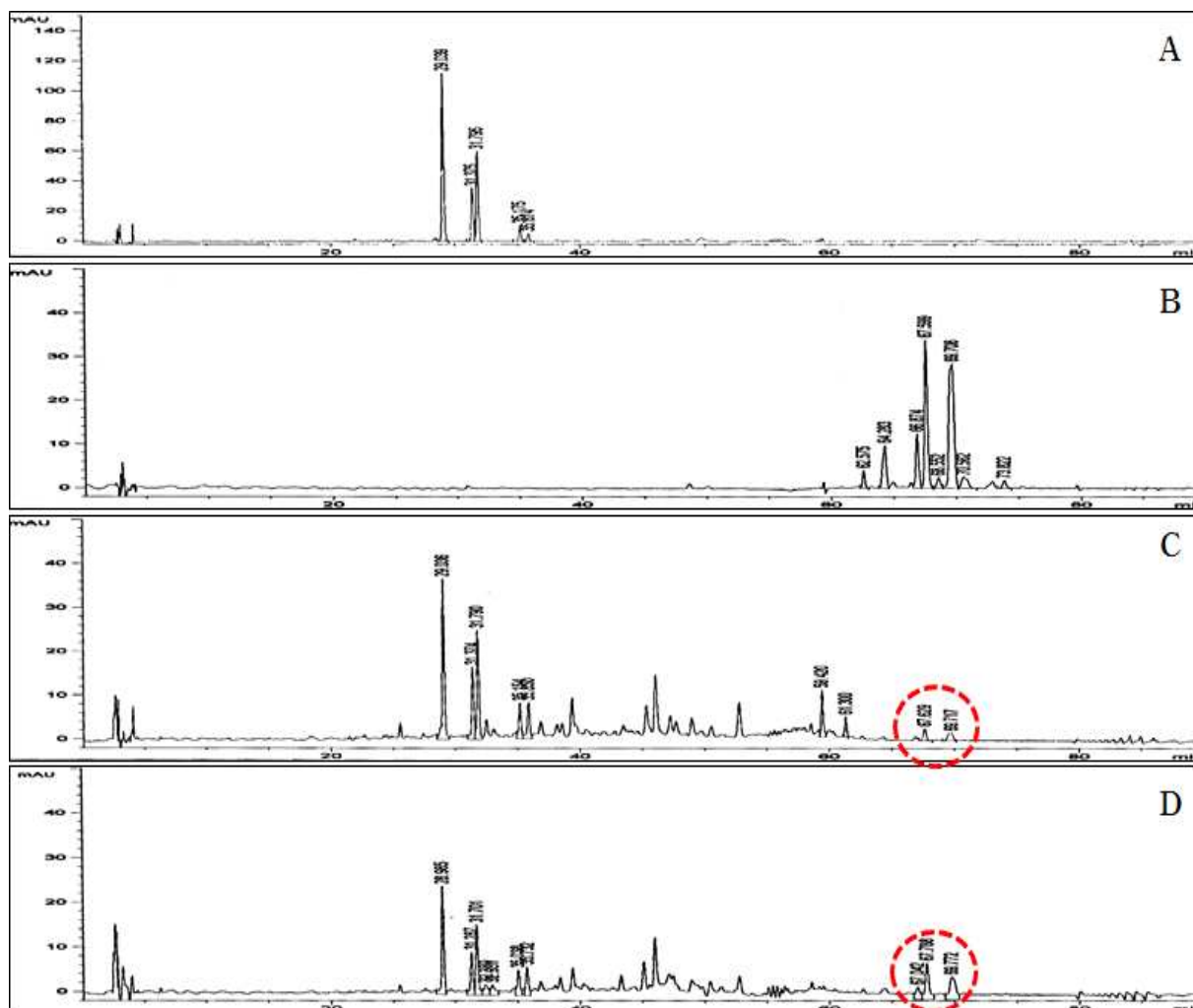


Fig. 11. Qualitative HPLC analyses of the iturin and surfactin compounds produced by the wild-type and mutant-10 *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* strains.

A: Authentic iturin A (500 $\mu\text{g/ml}$), B: Authentic surfactin (500 $\mu\text{g/ml}$), C: Wild-type *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* ATCC55079, D: Mutant-10 strain.

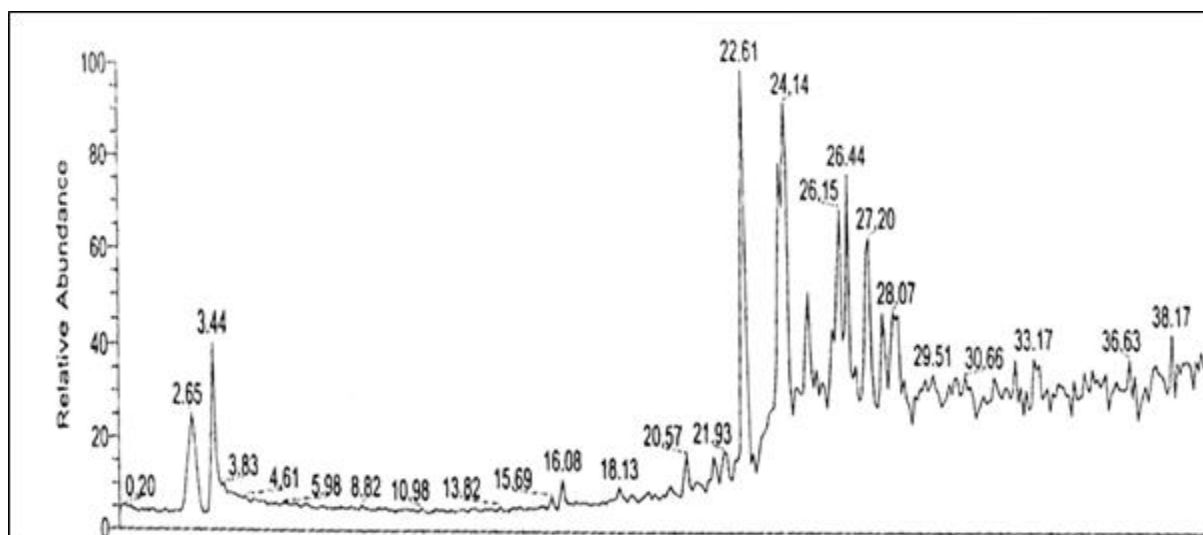


Fig. 12. HPLC chromatograms of the iturin compounds produced by wild-type *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079

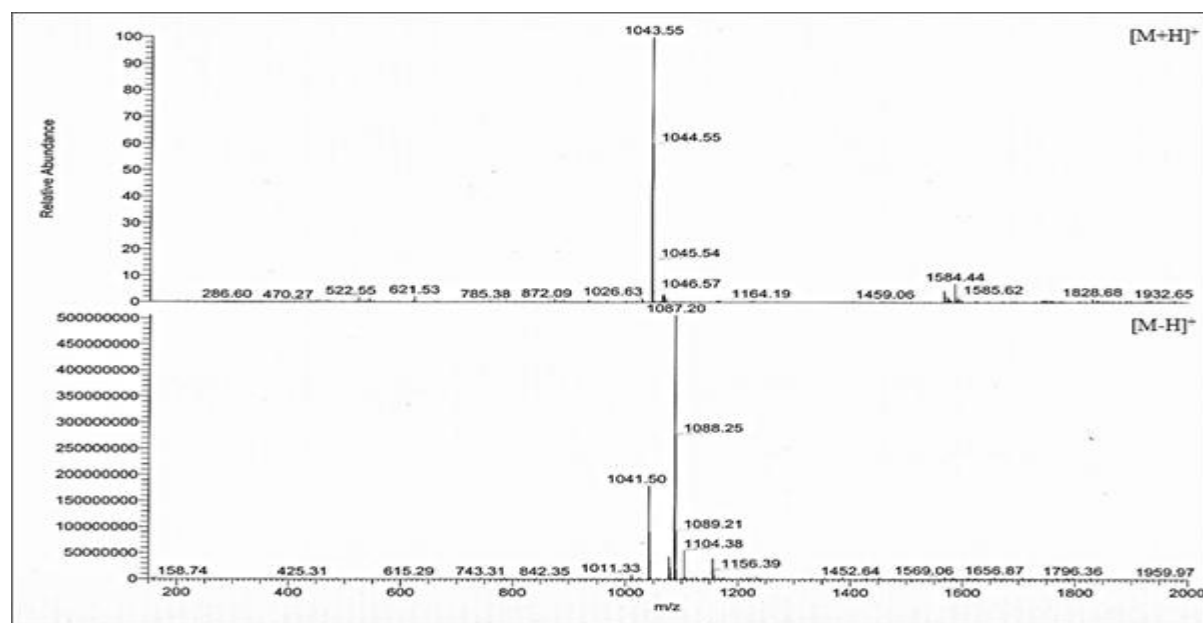


Fig. 13. MS spectrum of iturin A obtained from the peak detected at a retention time of 22.61 min on the HPLC chromatogram in Fig. 12.

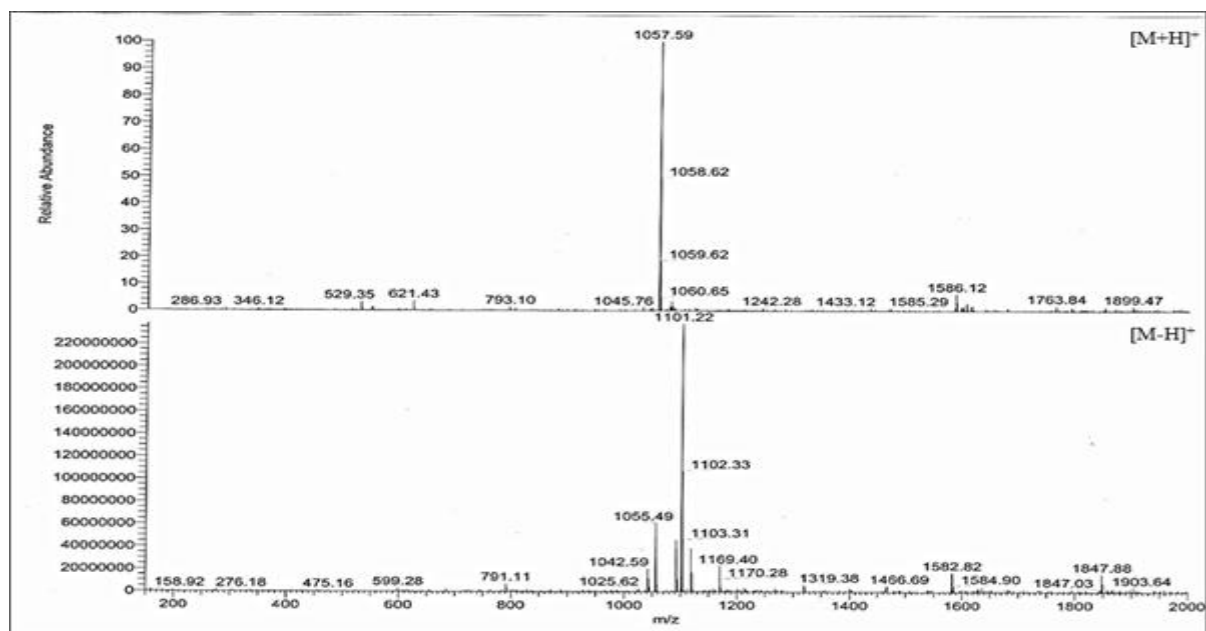


Fig. 14. MS spectrum of iturin B obtained from the peak detected at a retention time of 24.14 min on the HPLC chromatogram in Fig. 12.

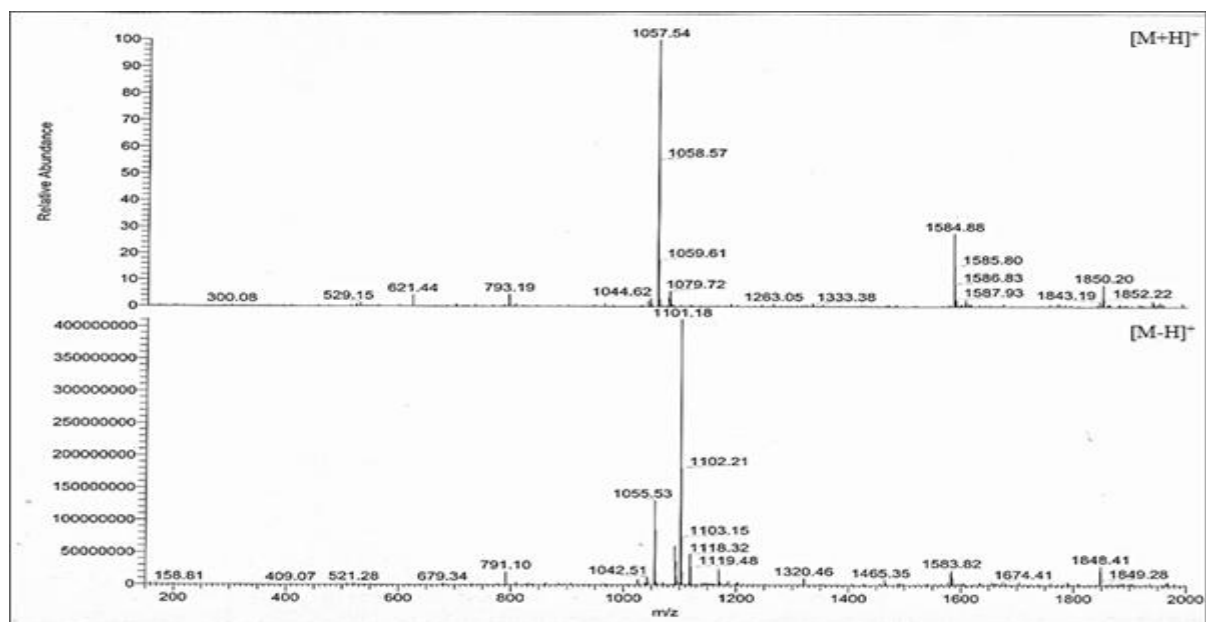


Fig. 15. MS spectrum of iturin C obtained from the peak detected at a retention time of 26.15 min on the HPLC chromatogram in Fig. 12.

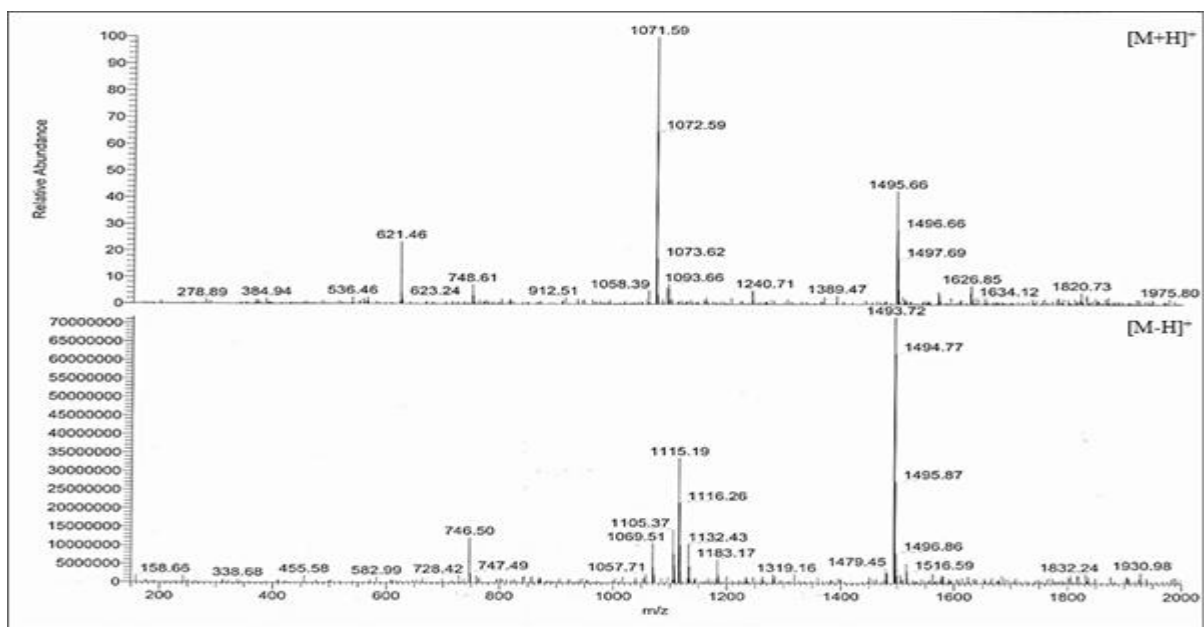


Fig. 16. MS spectrum of iturin D obtained from the peak detected at a retention time of 26.44 min on the HPLC chromatogram in Fig. 12.

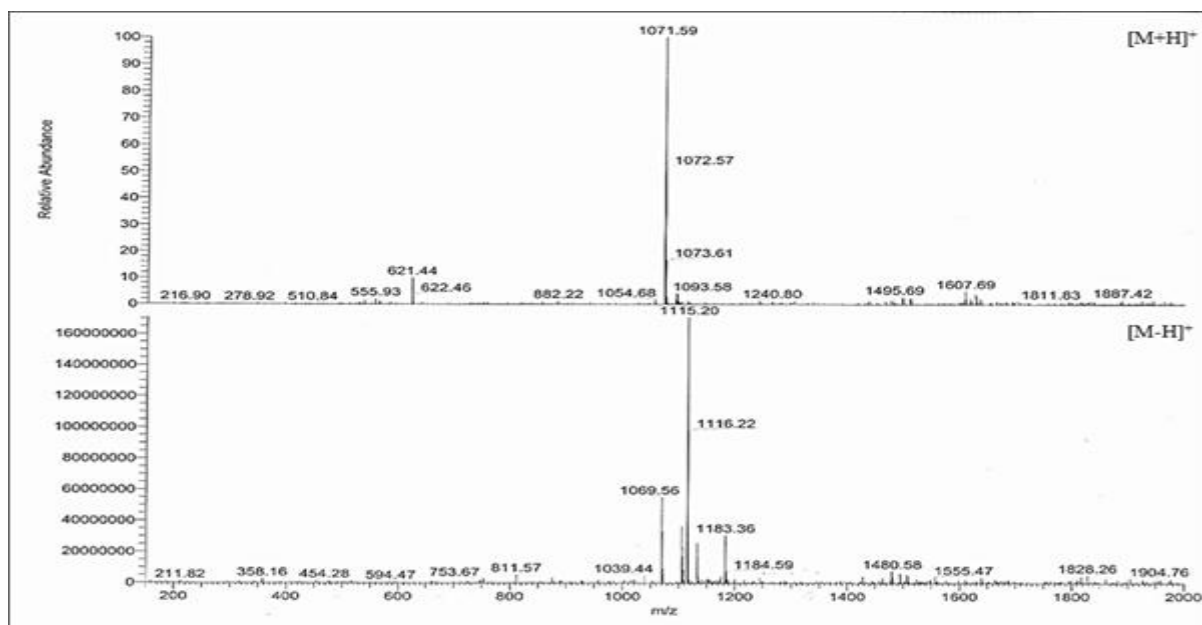


Fig. 17. MS spectrum of iturin E obtained from the peak detected at a retention time of 27.20 min on the HPLC chromatogram in Fig. 12.

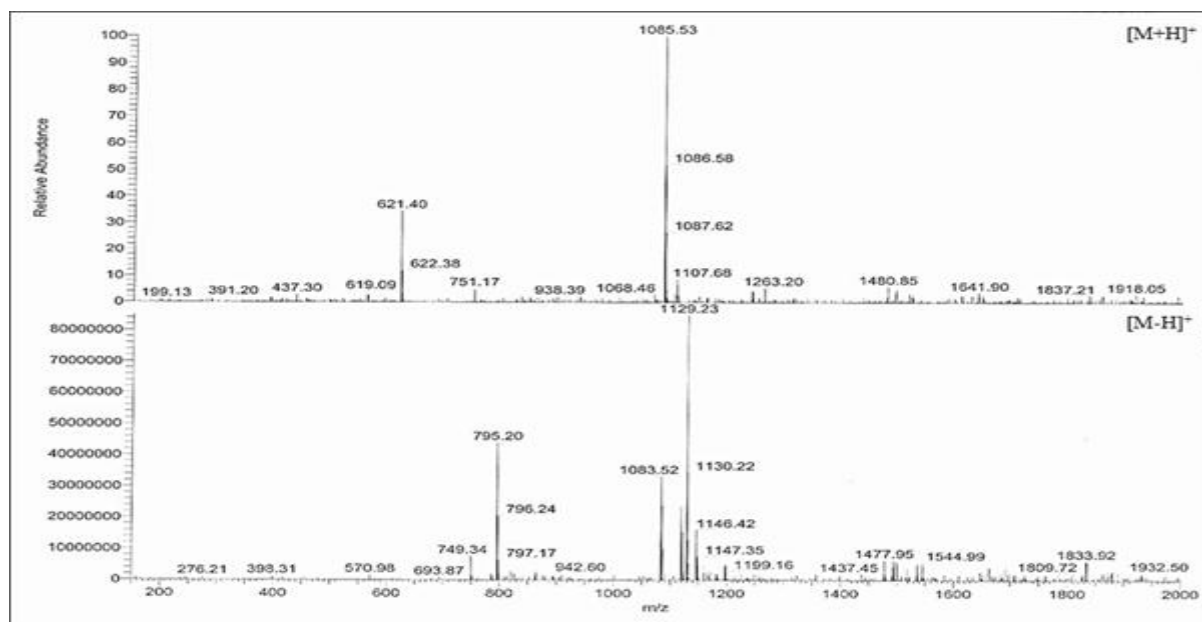


Fig. 18. MS spectrum of iturin F obtained from the peak detected at a retention time of 28.07 min on the HPLC chromatogram in Fig. 12.

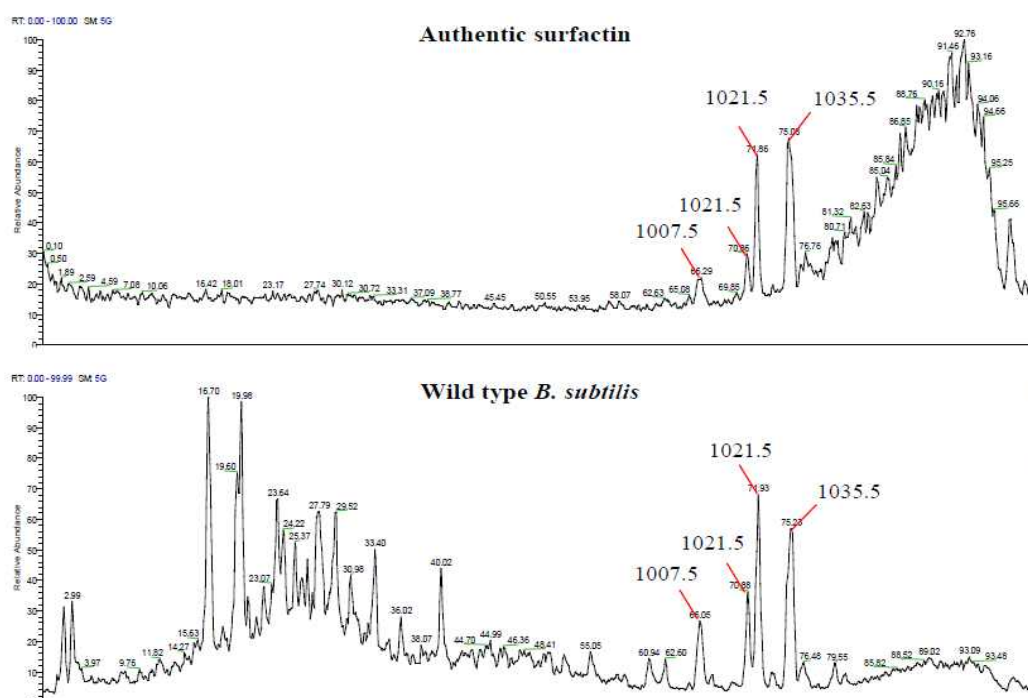


Fig. 19. HPLC spectra and molecular weights of surfactin peaks obtained with authentic surfactin and wild-type *B. subtilis* subsp. *krieciensis* ATCC55079.

Table 14. Cyclic lipopeptide products of the wild-type *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079 strain as detected by LC-MS^a

Product and observed mass peaks(<i>m/z</i>)	Retention time(min)	Assignment
Iturin		
1043.5, 1041.5	22.61	C14-iturin A [M + H, M - H] ⁺
1057.5, 1055.4	24.14	C15-iturin B [M + H, M - H] ⁺
1057.5, 1055.5	26.15	C15-iturin C [M + H, M - H] ⁺
1071.5, 1069.5	26.44	C16-iturin D [M + H, M - H] ⁺
1071.5, 1069.5	27.20	C16-iturin E [M + H, M - H] ⁺
1085.5, 1083.5	28.07	C17-iturin F [M + H, M - H] ⁺
Surfactin		
1008.4, 1006.4	66.05	C13-surfactin [M + H, M - H] ⁺
1022.5, 1020.7	70.88	C14-surfactin [M + H, M - H] ⁺
1022.5, 1020.7	71.93	C14-surfactin [M + H, M - H] ⁺
1036.5, 1034.5	75.23	C15-surfactin [M + H, M - H] ⁺

^a The data were obtained from the supernatant of cells grown in production medium as described in the Materials and Methods. The HPLC peaks presented in Figures 12 and 19 were analyzed by MS spectrometry.

라. Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54를 이용한 iturin 생합성 관련 유전자 변이 조사

Iturin 생산능이 증대된 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 돌연변이주를 이용하여 야생주보다 항균활성이 증진된 원인을 분자수준에서 규명하기 위하여 돌연변이주 BSM54의 genomic DNA를 분리하고, Next Generation Sequencing (454 Pyrosequencing, Solgent, Korea)을 실시한 후 앞서 확보한 야생주의 iturin 생합성 유전자 37,645 bp와 비교하여 돌연변이가 일어난 부위를 비교분석하였다. 그 결과 iturin 생합성 관련 유전자 중 6 부위에서 야생주와 다른 point mutation을 발견하였으며 (그림 20), point mutation의 대부분은 ORF1 upstream에서 1곳 (M1), ORF2 부위에서 5곳 (M2-M6) 등 모두 6 부위에서 다른 연기로 치환된 것을 알 수 있었다 (표 15). 그러나 mRNA transcription과 amino acid translation 후 point mutation의 결과로 아미노산까지 변화한 것은 asparagine이 aspartic acid로 변화된 M3 point mutation 밖에 없었으며, 나머지 M2, M4, M5 및 M6 point mutation은 아미노산의 변화가 없는 silent point mutation인 것으로 사료되었다. 또한 transcriptional activator와 99% 유전정보가 일치하는 ORF1의 upstream region에 나타난 M1 point mutation은 돌연변이가 일어난 부분의 mRNA secondary structure에 변화를 가져올 것으로 예측되었다 (그림 21). 이러한 결과로 볼 때 M3 point mutation은 translation후 일어난 최종 유전자 산물에 따른 phenotype의 변화로 나타날 가능성이 있는 반면 M1 point mutation은 ORF 앞쪽 promoter에 대한 변화로써 transcription 단계에서 iturin 생합성에 영향을 나타낼 가능성이 있을 것으로 예상되었다.

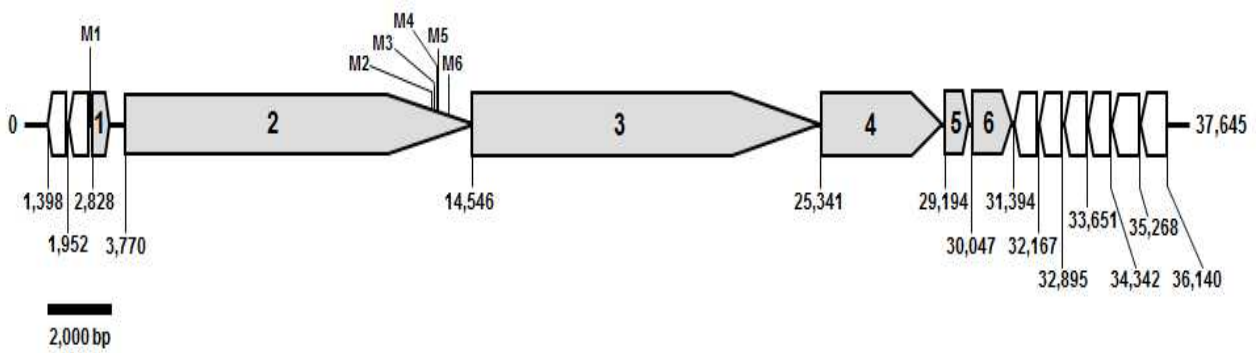


Fig. 20. ORFs and point mutation sites (M1 ~ M6) of putative iturin biosynthetic genes from *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* BSM54 strain.

Table 15. Point mutations on the iturin biosynthesis gene from mutant BSM54 strain

Point Mutation	Change of Nucleotide	Change of Amino acid
M1	G → T	-
M2	T <u>A</u> C → T <u>A</u> T	Tyr → Tyr
M3	<u>A</u> AC → <u>G</u> AC	Asn → <u>Asp</u>
M4	G <u>C</u> C → G <u>C</u> T	Ala → Ala
M5	C <u>A</u> T → C <u>A</u> C	His → His
M6	A <u>C</u> G → A <u>C</u> A	Thr → Thr

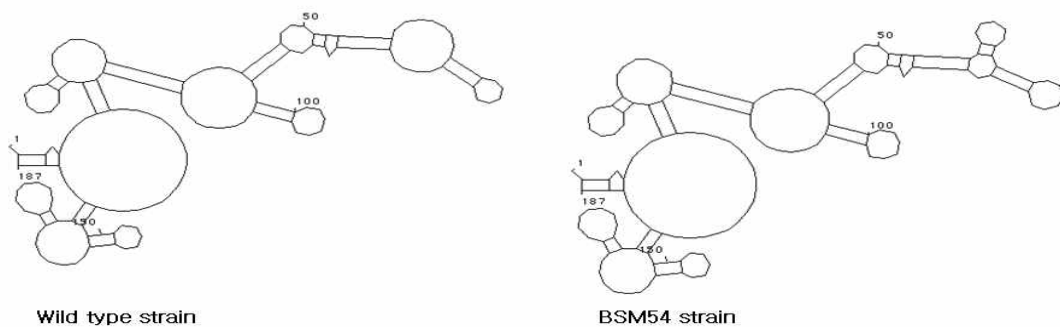


Fig. 21. Possible change of secondary structure in mRNA by point mutation M1 on the upstream region of ORF1 (nucleotide position 2,748) from *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* BSM54 strain

나. NGS 염기서열 결정으로 확인된 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 point mutation에 따른 iturin 생합성 유전자의 발현 양상 비교 분석

자외선 조사를 통해 얻은 iturin 高生産 돌연변이주 *Bacillus subtilis* BSM54 균주를 대상으로 iturin 생합성 관련 유전자 ORF1부터 ORF5까지 5개의 ORF들을 이용하여 각 ORF들의 발현양이 야생주보다 증가하였는지의 여부를 비교 분석하였다 (그림 20). 먼저 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54와 야생주 *B. subtilis*를 LB 매지에 접종하여 30°C에서 하룻밤 진탕배양한 배양액을 iturin 생산 배지에 2%가 되도록 접종하여, 24, 48 및 72시간 간격으로 배양한 후 그 배양액 일부를 채취하여 Trizol (Invitrogen) 용액으로 처리하여 total RNA를 분리하였다. 얻은 total RNA에 DNaseI (Takara)를 처리하여 30분간 배양한 후 다시 Trizol로 재정제하여 RNA 추출 과정 중에 유입될 수 있는 genomic DNA를 모두 제거하였으며, 최종적으로 얻어진 total RNA로부터 iScript cDNA Synthesis Kit(Bio-Rad)를 이용하여 cDNA를 합성하였으며, 또한 각각의 iturin 생합성에 관련된 ORF 유전자들의 real-time PCR에 이용한 PCR primer들은 표 16에 나타내었다.

Real-time PCR은 위에서 얻은 각 cDNA 샘플 1.5 µg에 대하여 Light Cycler 1.5 (Roche Co.)와 LC FS Master Plus SYBR Green (Roche)를 이용하여 실시하였으며, 증폭 조건은 95°C에서 10초, 60°C에서 15초 및 72°C에서 15초로 하여 모두 45 cycle를 수행하였다. 각 ORF에 대한 상대적 발현량의 계산은 internal control gene으로 사용된 *gyrB*의 Ct 값을 각 ORF의 Ct값으로부터 공제한 delta Ct 값을 구한 후 다시 그 값으로부터 가장 큰 delta Ct값을 공제한 delta delta Ct 값을 구하여 $2^{-(\text{delta delta Ct})}$ 값으로 나타내었다. 그 결과 돌연변이주 BSM54의 ORF2, ORF3, ORF4 및 ORF5의 발현량은 48시간 이후 야생주와 비교해볼 때 상대적으로 더 많았으며, 특히 ORF2와 ORF3 및 ORF4에서는 매우 커다란 차이를 나타내었고 (그림 22) 그 차이는 24시간 배양 후부터 나타나기 시작하여, iturin 高生産 돌연변이주 BSM54는 point mutation에 의한 유전자의 변이로 iturin 생합성에 관련된 유전자들이 모두 야생주보다 그 발현량이 증대됨을 알 수 있었다.

Table 16. Primer sequences used in real-time PCR analysis

ORFs	Primer Sequences
ORF1	5'-CCGTGATAGGCGGGAAGT-3'
	5'-GGAGGGACGACAGGGTAAAC-3'
ORF2	5'-CGGCGGTATGAGTCGATG-3'
	5'-GCTTGCTTGCCTCGTCAC-3'
ORF3	5'-AGACCGAGGAGGAACAGCAG-3'
	5'-CAGCAGGGACGTTGTAGCTC-3'
ORF4	5'-GACCGGTCAAGCTGTTTCG-3'
	5'-CTTCATCAGCGCCTGGAC-3'
ORF5	5'-CCCGCTCCACACCTATCTTC-3'
	5'-CTGTGGCCGAACAGGACA-3'
<i>gyrB</i>	5'-GGCTCTCGGGACAGGAAT-3'
	5'-GGCGGCTGAGCAATGTAG-3'

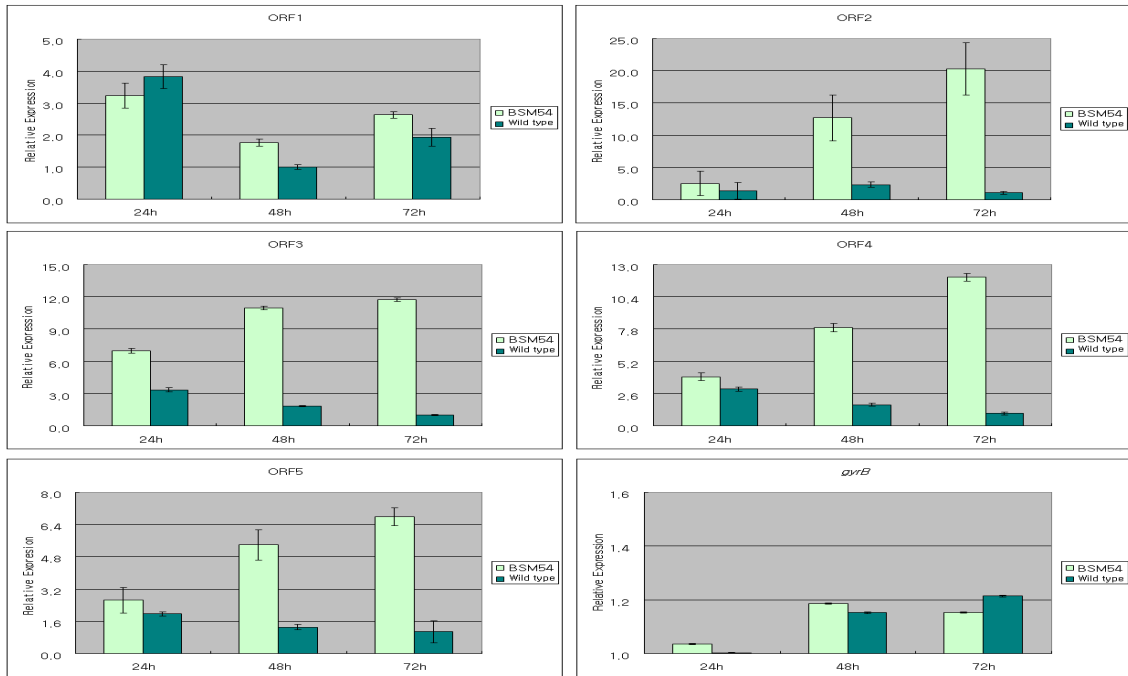


Fig. 22. Analyses of the expression levels of iturin biosynthesis genes using real-time PCR.

바. Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 *Botrytis cinerea*에 대한 포자 발아 억제 효과

자외선 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54와 야생주 *B. subtilis*를 앞서 기술한 iturin 생산매지에서 3일 동안 배양한 후 배양액에 연산을 첨가하여 pH 3으로 조절하고, 4°C에서 하룻밤 방치하여 침전시킨 후 원심분리하여 생성된 침전물을 중화시켰다. 다시 3차 증류수로 희석하고 동량의 butanol을 가하여 현탁시킨 후 다시 4°C에서 하룻밤 방치하여 생성된 상등액을 회수하였으며, 이와 같은 추출 과정을 모두 3회 반복하여 얻어진 butanol 분획물을 모두 모아 감압 농축하였다.

한편 썩빛곰팡이병 원인균인 *Botrytis cinerea*의 포자를 potato dextrose broth 배지로 약 10^6 spores/ml가 되도록 현탁하고, 여기에 감압 농축된 butanol 분획물을 각각 125, 250 및 500 µg/ml가 되도록 첨가한 후 습실 처리한 hole slide glass 안에 분주하고, 25°C에서 6시간 동안 배양한 후 현미경으로 포자 발아 유무를 관찰하고 그 결과를 그림 23에 나타내었다. 동일한 농도인 125 µg/ml의 butanol 분획물 처리구에서는 돌연변이주 BSM54와 야생주 간에 *B. cinerea*의 포자 발아 억제에 커다란 차이를 나타내지 않았으나 250 µg/ml의 butanol 분획물 처리 시에는 돌연변이주 BSM54가 야생주에 비해 2배 이상 더 강하게 포자 발아를 억제하였으며, 특히 500 µg/ml 처리 시에는 야생주에서는 43.5%의 포자 발아 억제율을 나타낸 반면 BSM54 균주에서는 포자 발아가 전혀 일어나지 않아, 250 µg/ml 이상의 동일 농도에서는 돌연변이주 BSM54가 야생주보다 *B. cinerea*의 포자 발아를 더 강하게 억제한다는 것을 알 수 있었다 (그림 24).

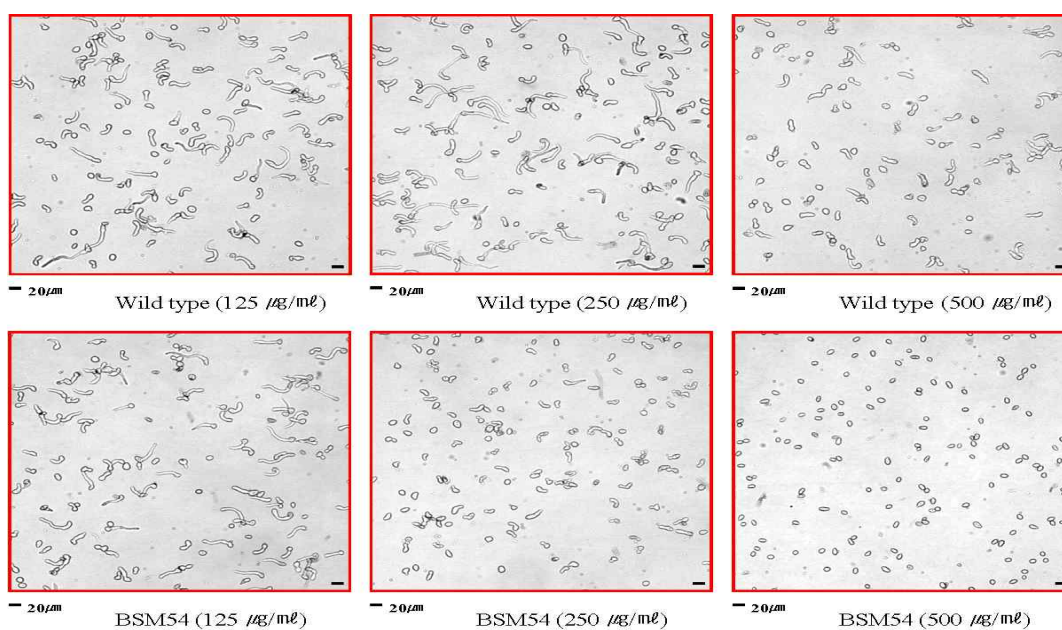


Fig. 23. Photomicrographs of suppression patterns between the wild-type *B. subtilis* and UV mutant BSM54 strains producing iturin on the spore germination of *B. cinerea*.

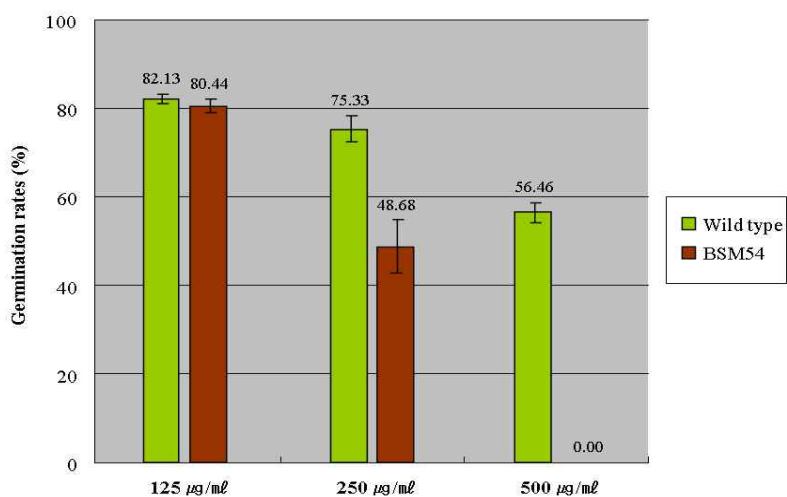


Fig. 24. Comparison of spore germination rates of *Botrytis cinerea* treated with butanol extracts prepared from the culture broths of the wild-type *B. subtilis* and UV mutant BSM54 strains.

사. 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 장기 보존에 따른 항균력 변화 가능성 조사

Iturin 高生産 자외선 돌연변이주 BSM54를 보존하는 동안 돌연변이가 일어나기 전의 상태인 revertant로 복귀하는지의 여부를 조사하기 위하여 자외선 돌연변이주 BSM54를 glycerol에 stock하여 -70°C 냉동고에 보존하면서 2개월 이후부터 1개월 간격으로 최대 2년 까지 지장 기간에 따른 항균력의 변화를 *F. oxysporum*에 대한 생육 지지환의 크기도 측정하고 야생주와 비교한 결과를 그림 25에 나타내었다. 자외선 돌연변이주 BSM54의 항균력은 지장 기간에 따라 다소 항균력에 근소한 차이를 나타내었으나, 전반적으로 보관 2개월 부터 2년까지의 기간 동안 항균력에 커다란 차이를 나타내지 않는다는 것을 알 수 있었다.

아. Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54와 야생주의 iturin 생산능 비교

야생주 *B. subtilis*와 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 butanol 분획물을 감압 농축하여 butanol 분획을 얻은 후 (야생주: 668.1mg, BSM54: 698.8mg) iturin 화합물에 대한 생산능을 HPLC와 authentic iturin A 화합물을 이용하여 비교 분석하였다. 야생주와 돌연변이주 BSM54 butanol 분획물을 methanol로 희석한 후 membrane filter (0.45 μ m, 13 mm, Merck Millipore, Germany)로 여과한 다음 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 이 때 HPLC 분석 조건은 표 17에 나타내었으며, authentic iturin A 화합물은 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였고, 야생주와 돌연변이주로부터 생성된 iturin A는 HPLC의 retention time을 비교하여 확인하였다. 또한 iturin A의 calibration curve는 그림 26와 같이 회귀분석그래프를 작성한 후 iturin A 유도체의 함량을 계산하였다. 야생주와 돌연변이주 BSM54의 butanol 분획물의 HPLC 크로마토그램과 정량적인 iturin 생산능 분석 결과는 각각 그림 27과 표 18에 나타내었다. 이러한 결과들을 종합하여 butanol 분획물의 iturin A 생산능을 조사한 결과 야생주와 돌연변이주는 전체 butanol 분획물 가운데 iturin이 각각 4.175%와 8.716%로 나타나 동일 조건에서 BSM54 돌연변이주로부터 생산된 iturin이 야생주보다 약 2배 더 높은 것으로 나타났다.

자. Site-directed mutagenesis용 형질전환 벡터의 제조

야생주 *B. subtilis*로부터 M1 point mutation (표 14, 그림 20)이 일어난 부위를 포함하는 ORF1 region을 클로닝하기 위해 primer ORF1_u-f (5' -TAATCGCCGTCAGTTCCTCG-3')와 ORF2-r (5' -TTCTCATCGACTCATAACCGC-3') 및 Accu Power Pfu PCR Premix (Bioneer, Korea)를 이용하여 약 1.8 kb의 PCR 산물을 얻었다 (그림 28). 이때 PCR 조건은 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 2분의 반응을 30회 반복하였으며, 증폭시킨 PCR 산물과 pUC19 vector를 모두 *EcoRI*으로 절단한 후 4°C에서 16시간 ligation 반응을 실시하였다. Ligation시킨 recombinant plasmid는 *E. coli* DH5 α competent cell (RBC, Taiwan)에 형질전환 하였다. 이렇게 얻은 pBSM54-orf1을 다시 *BamHI*과 *XbaI*으로 double

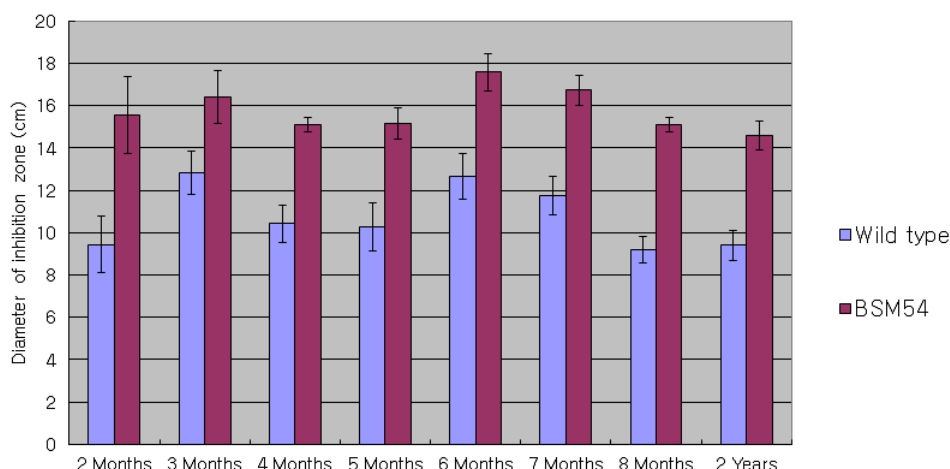


Fig. 25. The change of antifungal activities of the wild-type and UV mutant BSM54 of *B. subtilis* against *F. oxysporum* occurred during the storage period of two years at -70°C .

Table 17. HPLC conditions for quantitative analysis of iturin A from wild-type and UV mutant BSM54 strains

Item	Operating condition
HPLC system	Agilent 1100 HPLC system equipped with VWD detector and ALS autosampler
Column	YMC-Pack Tri art C ₁₈ (5 μm, 4.6 I.D. × 250 mm, YMC Inc., USA)
Solvent	A; H ₂ O, B; 100% Acetonitrile (ACN) a Linear gradient elution from A to B for 60 min 80~40% of A/20~60% of B for 50 min 40~80% of A/60~20% of B for 5 min 80% of A/20% of B for 5 min
Detector	UV _{210nm}
Flow rate	0.8 ml/min
Injection volumn	10 μl

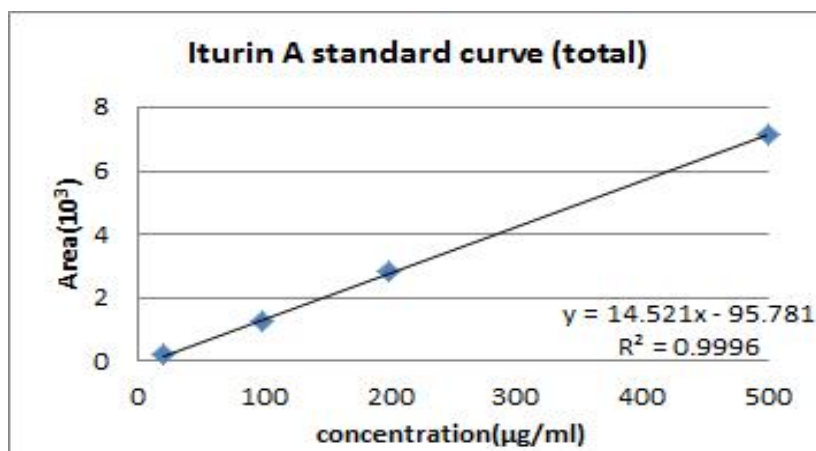


Fig. 26. Calibration curves for quantitative analysis of iturin A

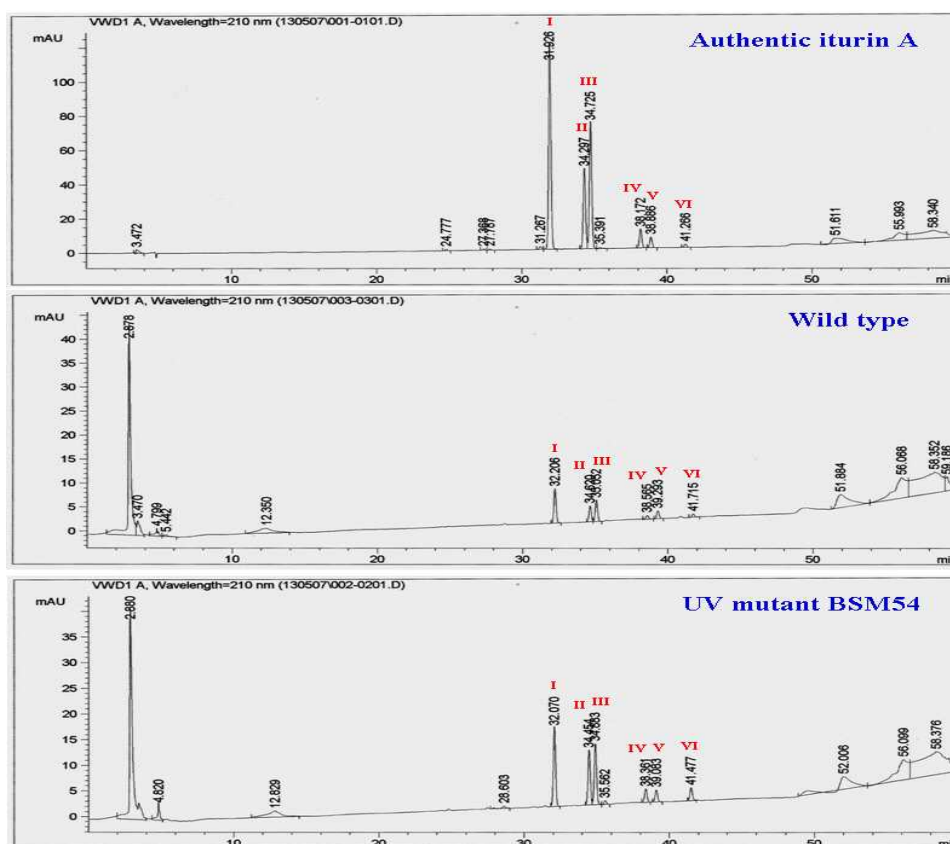


Fig. 27. HPLC analyses of iturin compounds produced by the wild-type *B. subtilis* and UV mutant BSM54 strains.

Table 18. Quantitative analyses of iturin production obtained from each HPLC peak produced by the wild-type *B. subtilis* and UV mutant BSM54 strains.

Peaks	Area / Height (mAU)		
	Authentic Iturin A (200 µg/ml)	Wild type (500 µg/ml)	BSM54 (500 µg/ml)
I	1359.47 / 119.72	79.77 / 7.10	171.40 / 15.17
II	541.53 / 46.46	37.16 / 3.27	121.84 / 10.58
III	859.34 / 73.17	51.46 / 4.42	138.41 / 11.81
IV	133.32 / 10.87	11.78 / 0.82	32.11 / 2.59
V	76.81 / 6.23	21.27 / 1.63	28.77 / 2.32
VI	23.65 / 1.86	9.22 / 0.66	33.20 / 2.52

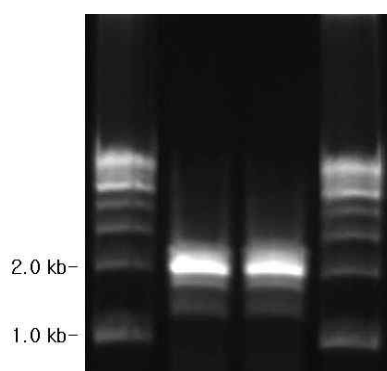


Fig. 28. PCR products of 1.8 kb of ORF1 region from *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* strain obtained using primers ORF1_u-f and ORF2-r.

digestion하고, pIC333으로 부더 위와 동일한 제한효소 처리로 얻어진 spectinomycin resistance gene cassette을 ligation하여 최종적으로 pBSM54orf1-sp 형질전환 벡터를 제조하였다 (그림 29~31).

차. 분자수준에서 point mutation이 일어난 iturin 생합성 유전자와 site-directed mutagenesis를 이용한 야생주의 개량

Iturin 高生産 돌연변이주인 BSM54의 iturin 생합성능을 더욱 더 증진시키기 위하여 NGS sequencing을 통해 돌연변이주의 iturin 생합성 유전자를 분석하고, point mutation이 일어난 6곳의 site 가운데 아미노산 치환이 일어나지 않은 부위 중 먼저 iturin 생산에 영향을 미칠 것으로 예상되는 M1 point mutation (그림 20) 위치의 염기를 대상으로 site-directed mutagenesis를 시도하였다. 또한 site-directed mutagenesis에 이용한 mutagenic primer들은 그림 32에 나타낸바와 같이 제조하였으며, 자외선 돌연변이에 의해 M1 부위의 염기가 G에서 T로 point mutation이 일어났기 때문에 일단 site-directed mutagenesis 시도 시에는 그 외의 염기인 C 또는 A로 치환하여 iturin 생산능의 변화 유무를 관찰하고자 하였다. Site-directed mutagenesis 시에는 앞서 proofreading DNA polymerase를 이용한 PCR로 얻어진 M1 point mutation site를 포함하는 ORF1 유전자 부위를 대상으로 QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent, U.S.A.)와 mutagenic primer들을 이용하여, 위에서 제조한 형질전환 벡터 내에 site-directed mutation이 일어난 부위가 삽입된 형질전환 벡터 pBSM54orf1-sp-1을 최종적으로 완성하였다 (그림 33).

야생주 *B. subtilis* 균주를 site-directed mutagenesis를 이용하여 형질전환하기 위하여 modified Spizizen 배지에 하룻밤 배양한 종균 배양액을 새로운 배지에 1%가 되도록 접종한 후 30°C에서 진탕배양하였다. 580 nm에서 흡광도가 1.0일 때 배양액 0.5 ml와 site-directed mutagenesis용 형질전환 벡터 pBSM54 orf1-sp-1 1 µg을 혼합하여 1시간 동안 진탕배양하고, 60 µg/ml의 spectinomycin이 첨가된 LB 배지에 도말하여 30°C에서 배양하면서 LB 병판에서 생육한 집락들을 1차 선별하였다. Spectinomycin이 첨가된 선택배지에서 1차 선별한 집락들을 대상으로 형질전환 유무를 확인하기 위하여 orf1-f3(5'-ACGCCATGTATAAGTGGGGA-3'), spcf1(5'-ATCGGGGAGAGTGTGAT-3'), spc-f2(5'-CAAAGGTGAAAGCACTCG-3'), hxl1(5'-ACCTTGAAACACGGGCA-3') 및 hxl-r2(5'-TGATCTTCAAGCAGAAGG-3') primer들을 이용하여 PCR을 수행하였다 (그림 34, 35, 36). 그 결과 대조구 (lane 15)와 동일한 크기의 PCR 산물을 나타내는 저항성 집락들을 발견하여 이들을 삼정적으로 형질전환주 (lane 7, 8, 9)로 추정하고 먼저 선별하였다 (그림 34). Site-directed mutagenesis를 통해 원하는 부위의 염기가 치환되었는지의 여부를 조사하기 위하여 선별된 형질전환주의 단일 집락을 LB 액체배지에 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 16시간 동안 배양하고, 다시 앞서 기술된 iturin 생산배지에 전체 볼륨의 2%가 되도록 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 8,000 × g에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 *F. oxysporum* 이 함유된 활성 검정용 병판배지에 멸균한 cylinder을 올려놓고 상등액을 각각 250 µl씩 첨가하여 25°C에서 1~3일간 배양한 후 *F. oxysporum*에 대한 생육억제 정도를 조사하였다 (그림 37). 그 결과 그림 38에 나타낸 바와 같이, site-directed mutagenesis가 일어난 형질전환주 T1과 T6는 *F. oxysporum* 병판 배지에서 생육 저지환의 크기가 각각 평균 12.57 cm 및 평균 11.57 cm를 나타낸 반면 야생주는 평균 10.3 cm을 나타내어 site-directed mutagenesis를

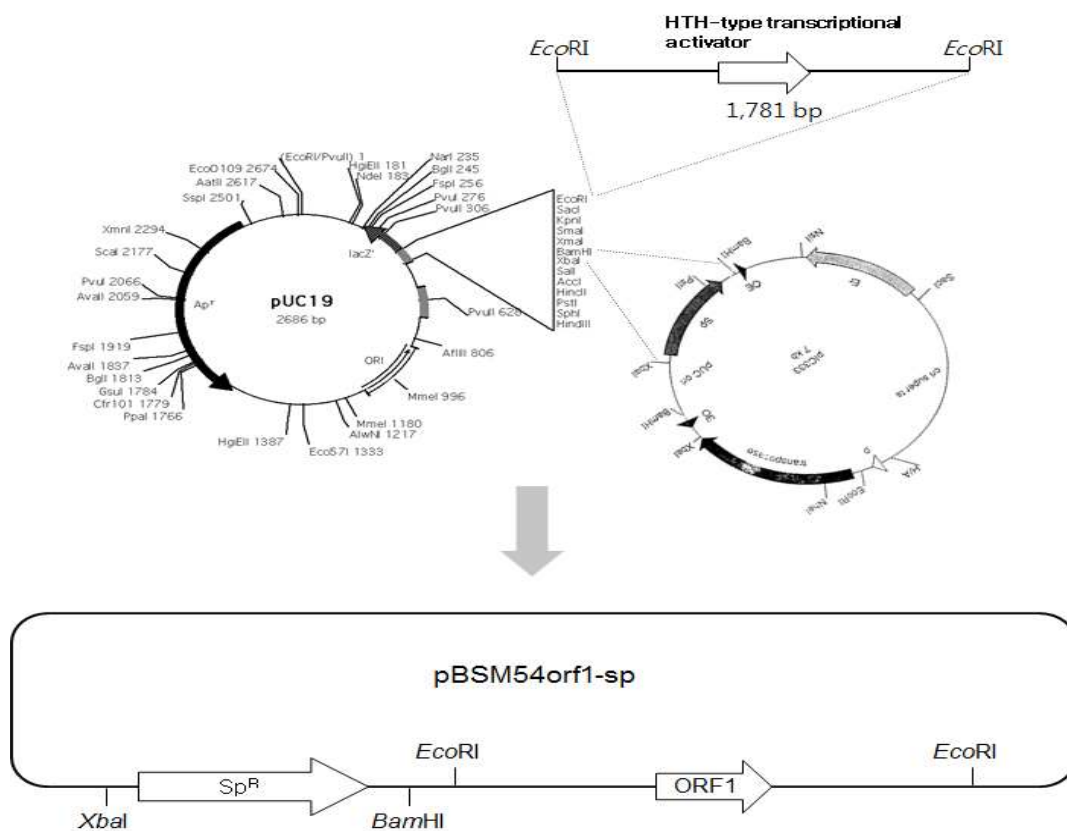


Fig. 29. Construction of transformation vector pBSM54orf1-sp.

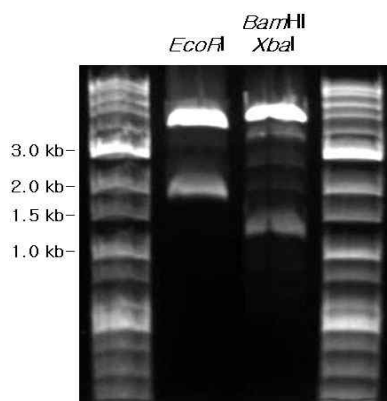


Fig. 30. Restriction enzyme patterns of a transforming vector pBSM54-orf1-sp constructed with pUC19, ORF1 region (*EcoRI*) and spectinomycin resistance gene cassette (*BamHI/XbaI*).

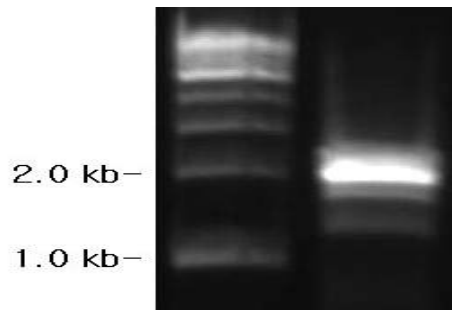


Fig. 31. PCR product of ORF1 region from *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* using primers ORF1_u-f and ORF2-r.

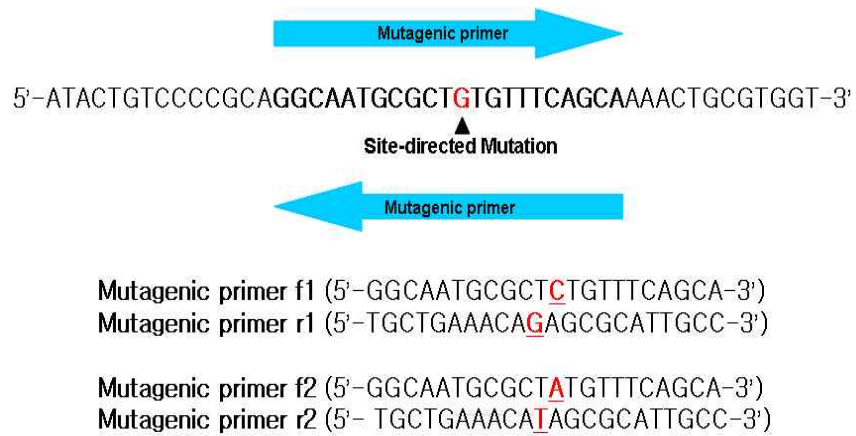


Fig. 32. Mutagenic primer sets for site-directed mutagenesis

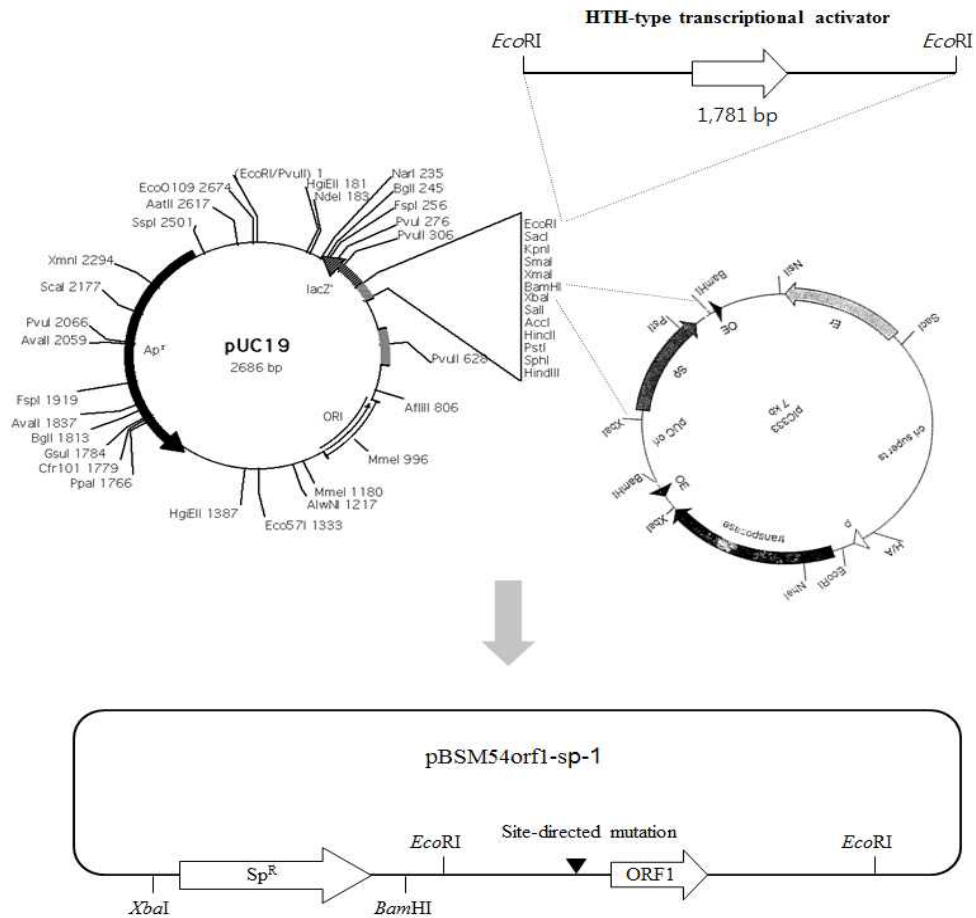


Fig. 33. Construction of vector pBSM54orf1-sp-1 used for site-directed mutagenesis.

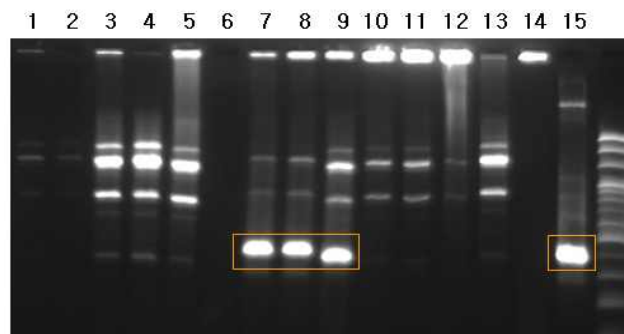


Fig. 34. PCR products amplified with primers *spe-f2* and *hxl-r2* from *B. subtilis* transformants (lane 1~14) grown on media with 100 μg/ml spectinomycin and pBSM54-orf1-sp (lane 15).

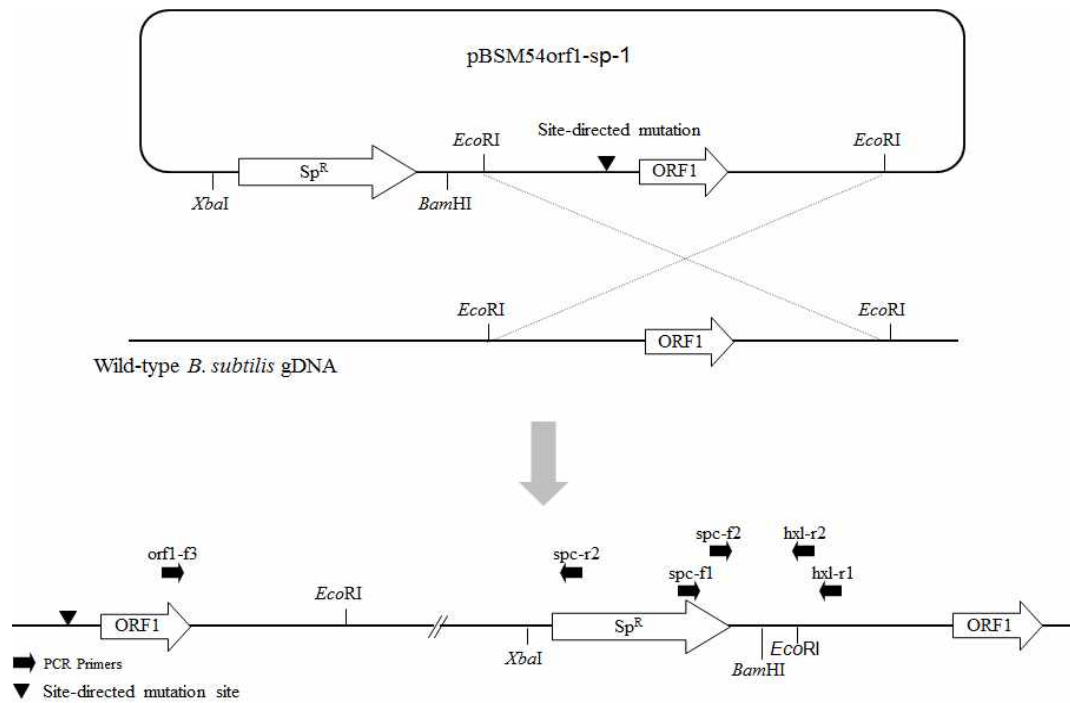


Fig. 35. Schematic diagram of homologous recombination for site-directed mutagenesis and specific primer sets for screening of *B. subtilis* transformants obtained from site-directed mutagenesis

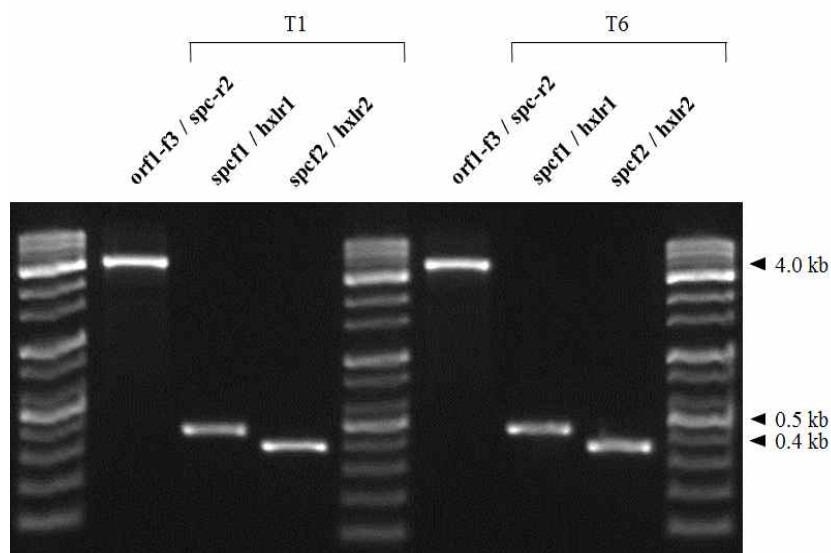


Fig. 36. PCR products amplified from gDNA of *Bacillus subtilis* transformants grown on LB media containing 60 µg/ml of spectinomycin using various specific primer sets.

통해 얻은 형질전환주가 증가된 생육 지지환을 나타내어, iturin 高生産 돌연변이주 BSM54 의 point mutation이 일어난 M1 위치의 변이된 염기가 iturin 생산능 증대에 관여하다는 것을 알 수 있었다. 또한 site-directed mutagenesis가 일어난 형질전환주로부터 point mutation이 일어난 부위의 염기서열을 분석하여 당초 계획하였던 염기치환이 일어난 것을 확인하였다.

한편 야생주와 형질전환주 T1 및 T6로부터 생산된 iturin을 정량적으로 비교하기 위하여 각 균주를 3일간 배양하고 원심분리하여 얻은 상등액의 부탄올 추출물을 HPLC로 분석하였다. 최종 농도를 동일하게 조질하고 HPLC로 분석한 결과 T1 및 T6 균주들은 5종류의 iturin peak (iturin A~E)가 모두 야생주보다 넓은 면적을 나타내었다 (그림 39). 즉 야생주는 각각 5종류 iturin peak의 면적이 평균 3584, 2256, 3333, 937, 1192를 나타낸 반면 T1는 평균 4316, 2608, 3706, 1124, 1388, T6는 평균 4478, 2852, 3949, 1168, 1400을 나타내어 site-directed mutagenesis를 통해 얻은 형질전환주 T1과 T6는 iturin 생산능이 야생주보다 각각 16%와 22% 더 증가하였다. 이러한 결과들을 종합해볼 때 향후에 point mutation이 일어난 M1 부위 (그림 20) 이외에 다른 point mutation이 일어난 부위를 대상으로 single-crossover나 double-crossover에 의한 site-directed mutagenesis를 시도하여 iturin 생산능의 변화 유무를 더욱 더 조사하면, 매우 흥미로운 결과를 도출할 수 있을 것으로 생각된다. 이외에 이러한 일련의 과정들이 순조롭게 진행되어 원하는 형질전환주가 도출되면 최종적으로는 target 유전자 이외에 항생제 내성 유전자나 vector sequence들도 형질전환주로부터 제거할 수 있도록 기술개발도 지속적으로 병행해 나아간다면 iturin 생산능이 증대된 iturin 생산 균주의 개발을 통한 원천기술 확보에도 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

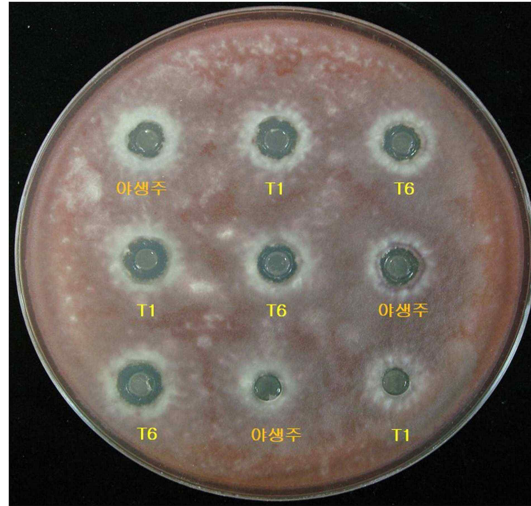


Fig. 37. Antifungal activities of culture broths of the wild-type and transformants T1 and T6 against *F. oxysporum*.

* Wild-type: *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079

T1 and T6: Transformants obtained by the site-directed mutagenesis of wild-type strain.

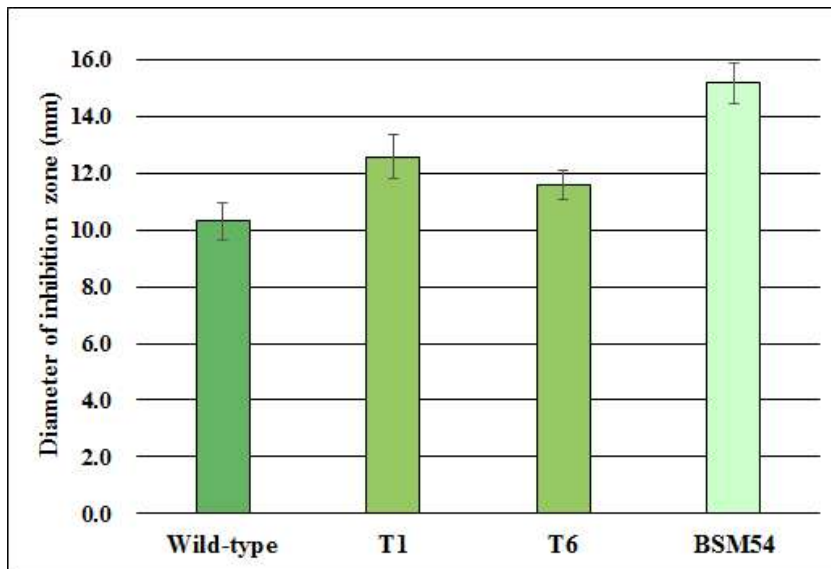


Fig. 38. Comparison of inhibitory effects of the wild-type *B. subtilis* and site-directed mutants T1 and T6 on the growth of *F. oxysporum*.

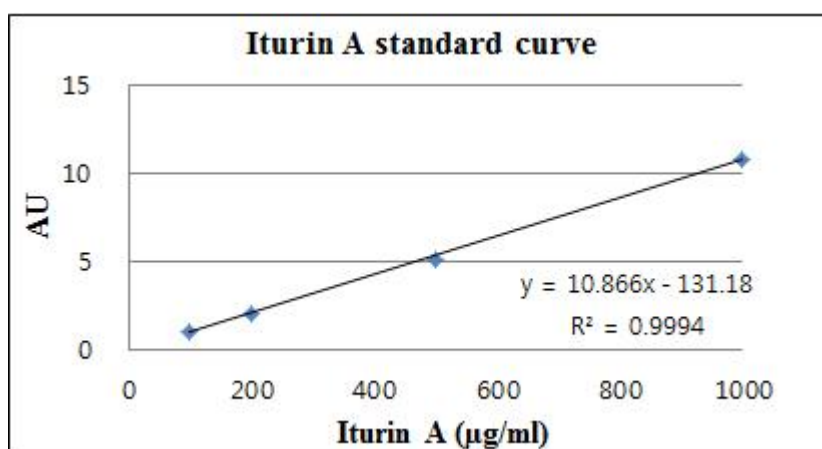
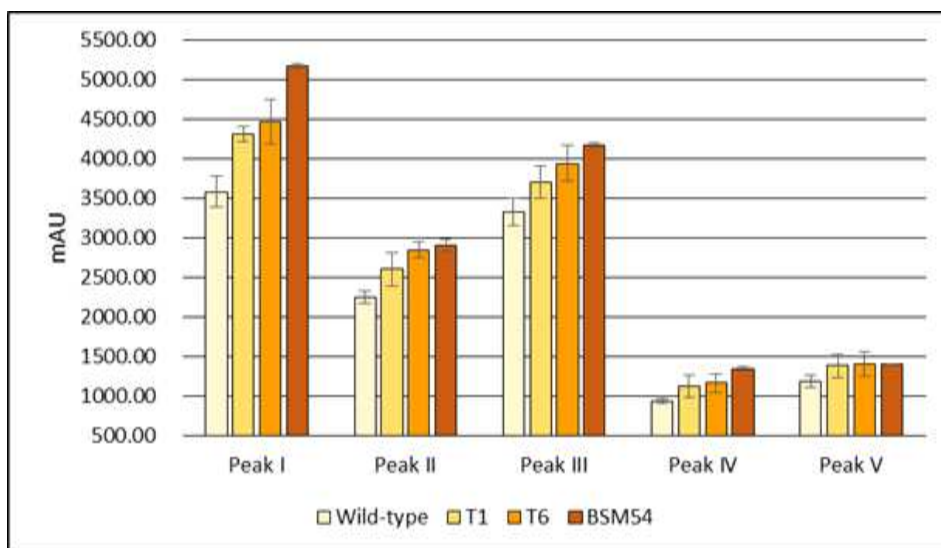


Fig. 39. Comparison of the HPLC peak areas for iturin compounds produced from the wild-type strain and site-directed mutants T1 and T6.

* Each peak I to V indicate the iturin A to E, respectively.

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

농산물의 잔류독성과 약제 내성균의 출현빈도 증가 및 환경오염 등으로 인해 많은 사회적 문제가 대두되고 있어 유기합성 농약의 사용이 점차 제한되고 있고 특히 1992년 6월 브라질에서 개최된 유엔 환경보호 위원회(UNCED)에서 현재 사용되고 있는 유기 합성 농약의 25-75%를 절감시키기 위한 규제 움직임이 처음으로 시작된 이래 21세기에 들어오면서 우리나라를 포함한 OECD 국가를 중심으로 화학합성 농약과 합성 비료의 사용량을 2013년까지 40%를 감축하려는 움직임을 나타내고 있다. 또한 소득 수준의 향상으로 유기 농산물을 포함한 친환경 농산물에 대한 소비가 매년 증가하고 있고, 2020년에는 전체 6조 6,283억원이 될 것으로 전망되고 있다. 이외에 well-being 문화의 확산으로 인해 청정 농산물을 요구하는 소비자들의 수요가 나날이 증가하고 있어 유기 합성농약을 사용하지 않는 유기 농법이나 유기 합성농약을 대체할 수 있는 유일한 대안인 생물학적 방제제에 대한 관심이 나날이 증가되고 있다. 이러한 추세에 따라 국내 토양으로부터 분리한 길항 미생물을 이용한 생물농약 소재를 개발하기 위하여 1990년대 초반 당 연구실에서 분리한 길항 미생물인 *Bacillus subtilis* 균주의 개량을 시도하였다. 이 균주는 6종류의 iturin 화합물 (iturin A~F)을 생산하여 여러 종류의 식물 병원균에 항균활성을 나타내는 것을 발견하고, 1992년에 미국 특허를 획득한 균주이며(미국 특허 등록번호 5,155041, 1992. 10. 13), 최근에 이 균주가 생산하는 새로운 iturin 생합성 유전자에 대한 염기서열을 GenBank에 기탁하였으며 (GenBank accession number KC454625), iturin 생합성 유전자에 대한 국내 특허도 취득하였다. 먼저 이 균주를 이용하여 iturin 생산능이 증대된 iturin 高生産株를 얻기 위하여 자외선 처리에 의한 돌연변이주를 제조하고 그 특성을 조사하였다. 다른 한편으로는 iturin 생산능이 증대된 자외선 돌연변이주의 iturin 생합성 유전자를 NGS (next generation sequencer)로 분석하여 돌연변이가 일어난 부위를 동정하고, 분자수준에서 site-directed mutagenesis에 의한 균주 개량을 시도하였다.

1990년대 초반에 당실에서 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079로부터 얻은 자외선 돌연변이주를 다시 자외선으로 처리하고 0.1%의 생존율을 나타낸 싹락 중에서 *F. oxysporum* 균주를 함유한 병판에서 모 균주보다 키다란 생육 지지환을 나타낸 돌연변이주를 선별하고 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54로 명명하였다. 이 균주를 이용하여 현재 상업적으로 판매되고 있는 생물농약 제품으로부터 유래된 *Bacillus* 균주들을 분리하고 선별한 자외선 돌연변이주 BSM54와 동일한 조건으로 배양하고 얻은 상등액을 대상으로 활성검정을 행하여 항균력을 비교하여 기존 제품에 사용되고 있는 균주보다 더 강한 항균력을 나타내었다.

한편 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079 균주는 이전 연구를 통해 야생주의 genomic library로부터 cosmid 클론을 얻은 후 염기서열 결정을 통해 6개의 ORF로 구성되어 있는 37,645 bp의 iturin 생합성 유전자를 확보하였다. 또한 이 유전자가 iturin 생합성 유전자인지의 여부를 확인하기 위하여, ORF3에 해당되는 중간 부위에 transposon을 삽입시킨 돌연변이주를 얻은 후 iturin 생성 여부를 확인한 결과 iturin 생합성이 약 30% 감소하는 것을 HPLC를

통해 확인하였으며, LC-MS를 통해 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079가 6 종류 (iturin A~F)의 iturin 화합물을 생산하는 것을 재확인하였다. 야생주로부터 클로닝한 iturin 생합성 유전자의 각 ORF들을 최근의 database를 이용하여 상동성을 비교해 본 결과 ORF1이 *Bacillus amyloliquefaciens*의 HTH-type transcriptional activator 유전자와 99%로 동일하였다 (GenBank Accession #HE 617159.1). 또한 ORF2로부터 ORF5는 각각 *B. amyloliquefaciens*의 surfactin synthetase A, B, C 및 D 유전자 (GenBank Accession #HE617159.1)와 99% 동일하였으 며, ORF6는 *B. amyloliquefaciens*의 aspartate aminotransferase A 유전자 (GenBank Accession #HE617159.1)와 99%로 동일하였다. 이외에 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis*가 iturin 이외에 다른 cyclic lipopeptide를 생산하는지의 여부를 조사해 본 결과 야생주에서도 iturin 이외에 소량의 surfactin이 생산되는 것을 최근에 발견하였으나 생산되는 양은 iturin에 비해 매우 미약하였다. 또한 ORF3에 mini-Tn10 transposon이 삽입된 iturin-less 돌연변이주에서는 iturin 생산량이 30% 감소되었으나 surfactin 생산량은 오히려 야생주보다 2배나 증가하였다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 야생주로부터 클로닝한 iturin 생합성 유전자는 iturin 합성에 관여하는 유전자이지 surfactin 합성에 관여하는 유전자는 아니라고 생각되었다. 이러한 선행 연구결과들을 바탕으로 자외선 돌연변이주 BSM54를 대상으로 iturin 생합성 관련 유전자 ORF1부터 ORF5까지 5개의 ORF들을 이용하여 각 ORF들의 발현양이 야생주보다 증가하였는지의 여부를 분자수준에서 비교하였다. 돌연변이주 BSM 54의 genomic DNA를 분리하고, Next Generation Sequencing을 실시한 후 앞서 확보한 야생주의 iturin 생합성 유전자 37,645 bp와 비교하여 돌연변이가 일어난 부위를 분석하여, iturin 생합성 관련 유전자 중 6 부위에서 야생주와 다른 point mutation을 발견하였다. Point mutation의 대부분은 ORF1 upstream에서 1곳 (M1), ORF2 부위에서 5곳 (M2-M6) 등 모두 6 부위에서 다른 연기로 치환된 것을 알 수 있었다. 그러나 mRNA transcription과 amino acid translation 후 point mutation의 결과로 아미노산까지 변화한 것은 asparagine이 aspartic acid로 변화된 M3 point mutation 밖에 없었으며, 나머지 M2, M4, M5 및 M6 point mutation은 아미노산의 변화가 없는 silent point mutation인 것으로 사료되었다. 또한 transcriptional activator와 99% 유전정보가 일치하는 ORF1의 upstream region에 나타난 M1 point mutation은 돌연변이가 일어난 부분의 mRNA secondary structure에 변화를 가져올 것으로 예측 되었다. 이러한 결과로 볼 때 M3 point mutation은 translation후 얻어진 최종 유전자 산물에 따른 phenotype의 변화로 나타날 가능성이 있는 반면 M1 point mutation은 ORF 앞쪽 promotor 에 대한 변화로써 transcription 단계에서 iturin 생합성 관련에 영향을 끼칠 가능성이 있는 것으로 예상되었다. NGS 염기서열 결정으로 확인된 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 point mutation에 따른 iturin 생합성 유전자의 발현 양상을 비교 분석하기 위하여 자외선 조사를 통해 얻은 iturin 고생산 돌연변이주 *Bacillus subtilis* BSM54 균주를 대상으로 iturin 생합성 관련 유전자 ORF1부터 ORF5까지 5개의 ORF들을 이용하여 각 ORF들의 발현양이 야생주보다 증가하였 는지의 여부를 real-time PCR을 수행하여 비교 분석하였다. 그 결과 돌연변이주 BSM54의 ORF2, ORF3, ORF4 및 ORF5의 발현량은 48시간 이후 야생주와 비교해볼 때 상대적으로 많았 으며, 특히 ORF2와 ORF3 및 ORF4에서는 매우 커다란 차이를 나타내었고, 그 차이는 24시간 배양 후부터 나타나기 시작하였다. 이상의 결과로부터 iturin 高生産 돌연변이주 BSM54는 point mutation에 의한 유전자의 변이로 iturin 생합성에 관련된 유전자들이 모두 야생주보다 그 발현 량이 증대됨을 알 수 있었으며, *Botrytis cinerea*를 대상으로 한 포자 억제 시험에서도 야생주

보다 자외선 돌연변이주인 BSM54 균주가 2배 이상 더 강하게 포자 발아를 억제하였고, HPLC로 2차 대사산물을 분석한 결과 자외선 돌연변이주는 야생주보다 iturin 생산량이 2배나 더 높은 것으로 나타났다. 또한 야생주에 자외선 돌연변이주의 M1 point mutation이 일어난 부위를 site-directed mutagenesis 시킨 결과 site-directed mutagenesis를 통해 얻은 형질전환주가 야생주보다 *F. oxysporum* 병환 매지에서 생육 지지환의 크기가 더 크게 나타나, iturin 高生産 돌연변이주 BSM54의 point mutation이 일어난 M1 위치의 변이된 염기가 iturin 생산능 증대에 관여한다는 것을 알 수 있었다. 이외에 site-directed mutagenesis가 일어난 형질전환주로부터 point mutation이 일어난 부위의 염기서열을 분석하여 당초 계획하였던 염기치환이 일어난 것을 확인하였다. 따라서 이러한 결과들을 종합해볼 때 당초 계획하였던 연구목표들을 모두 다 달성하였으며 얻은 결과들을 토대로 향후 iturin 생합성 유전자를 이용한 길항 미생물 *B. subtilis* 균주의 개량이나 자외선 돌연변이주를 이용한 생물농약 제형 개발에 활용할 예정이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

오래 전에 당 연구실에서 국내 도양으로부터 분리한 길항 미생물인 *B. subtilis* 균주가 6종류의 iturin 화합물을 생산하여 여러 종류의 식물 병원균에 항균력을 나타내는 것을 발견하고, 국내·외에서 특허를 취득한 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079를 이용하여 iturin 생합성에 관여하는 유전자를 클로닝하고 염기서열을 결정하여 37,645 bp의 유전자를 확보하고 GenBank에 기탁하였다. 이러한 새로운 iturin 생합성 유전자를 이용하여 길항 미생물 *B. subtilis*를 개량하기 위하여 두 가지 접근방식으로 수행하였다. 하나는 종전에 사용하였던 자외선으로 처리하여 iturin 생합성능이 2배 정도 증대된 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54를 얻고 여러 가지 특성을 분석하였으며, 다른 하나는 2배나 iturin 생합성능이 증대된 자외선 돌연변이주 내 iturin 생합성 유전자 중 어느 부위에 돌연변이가 일어나 iturin 생산능이 증대되었는지를 분자 수준에서 규명하고, 돌연변이가 일어난 부위의 유전자를 활용하여 iturin 생합성능을 증대시키려고 시도하였다. 자외선 돌연변이주 BSM54의 genomic DNA를 분리하고, Next Generation Sequencing을 실시하고, 야생주의 iturin 생합성 유전자 37,645 bp와 비교하여 iturin 생합성 관련 유전자 중 6 부위에서 야생주와 다른 point mutation을 발견하였다. 돌연변이주 BSM54의 각 ORF들을 이용하여 유전자 발현 양상을 real-time PCR로 분석한 결과 ORF2, ORF3, ORF4 및 ORF5의 발현량이 야생주와 비교해볼 때 상대적으로 많았으며, 특히 iturin 高生産 돌연변이주 BSM54는 point mutation에 의한 유전자의 변이도 iturin 생합성에 관련된 유전자들이 모두 야생주보다 그 발현량이 증대됨을 알 수 있었다. 또한 자외선 돌연변이주 BSM54는 *Botrytis cinerea*를 대상으로 한 포자 억제 시험에서도 야생주보다 2배 이상 더 강하게 포자 발아를 억제하였으며, iturin 생산량도 HPLC 분석 결과 야생주보다 2배나 더 증가하였다. 이외에 야생주에 자외선 돌연변이주의 M1 point mutation이 일어난 부위를 site-directed mutagenesis 시켜 얻은 형질전환주에서도 야생주보다 *F. oxysporum* 평판 매지에서 생육 지지환의 크기가 더 크게 나타나 iturin 高生産 돌연변이주 BSM54의 point mutation이 일어난 M1 위치의 변이된 염기가 iturin 생산능 증대에 관여한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과들을 바탕으로 향후에는 iturin 생합성 유전자를 이용한 길항 미생물 *B. subtilis* 균주의 개량이나 자외선 돌연변이주를 이용한 생물학적 방제제 개발에 활용하고자 하며, 다른 한편으로는 iturin과 surfactin의 synergic effect를 이용하여 항균력이 증대된 생물학적 방제제 개발에 활용하고자 한다. 이러한 일련의 시도가 원활하게 진행되면 화학합성 농약의 감축으로 인한 농작물의 생산성 감소에 효율적으로 대처할 수 있는 생물학적 방제제 기반기술의 확립에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 또한 본 과제를 통해 당초 계획하였던 특히 2건(국내 1건, 국외 1건)을 출원하였고 논문 1편을 출판하였으며, iturin 생합성 유전자에 대한 1편의 논문은 현재 투고 중이며, 자외선 돌연변이주에 대한 논문 1편은 작성 중에 있어 조만간 당초 계획하였던 연구실적은 충분히 달성할 수 있을 것으로 예상된다. 이외에 국제학술대회에서 3편의 논문이 발표되었고, 본 실험에 이용한 iturin 생합성 유전자 37,645 bp에 대한 염기서열은 GenBank에 accession number KC454625로 기탁되었으며, 현재 ㈜그린바이오텍과 기술이전을 추진 중에 있어, 본 과제를 통해 얻은 자외선 돌연변이주를 이용한 제품 개발에 활용할 예정이다.

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보

생물농약 소재로 이용되고 있는 대부분의 *Bacillus*속 균주들을 peptide와 fatty acid로 이루어진 lipopeptide 항생물질들을 생산하고 있는 데, 항진균이나 항세균 활성을 나타내는 이러한 lipopeptide 항생물질들은 multifunctional peptide synthetase에 의해 리보솜을 통하지 않고 형성되며, 그 구조에 따라 surfactin 그룹과 fengycin 그룹 및 iturin 그룹으로 분류된다. 이 중 surfactin 그룹과 fengycin은 β -hydroxy fatty acid를 갖고 있다는 점은 같으나 α -amino acid가 각각 7개, 10개로 이루어져 있고, iturin 그룹은 β -amino fatty acid와 7개의 α -amino acid로 구성되어 있다. 본 연구에 이용한 균주는 국내 모양으로부터 분리하여 미국 특허를 획득한 강한 항균활성을 나타내는 균주로서 6종류의 iturin을 생성하는 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis*이며 그 작용기작은 ion-conducting pore를 형성하여 osmotic perturbation에 기반하고 있고, surfactin 처럼 세포막을 파괴하거나 가용화하지는 않는다고 알려졌다. 또한 surfactin과 iturin, surfactin과 fengycin 및 iturin과 fengycin은 서로 synergistic하게 작용한다고 알려져 있다. Cyclic lipopeptide를 생산하는 *Bacillus* 균주 중 대표적인 *B. subtilis*를 이용하여 개발된 미생물 제제로는 EcoGuard, Kodiak, HiStick, Serenade, Sonata 및 Taegro 등이 있고, 이들은 주로 종자 처리제나 post-harvest, 야채 등의 부패 방지용으로 사용되고 있으며, 전 세계 미생물 유래 생물농약 시장은 2018년도에는 약 4.9억불에 도달할 것으로 예상되고 있고, 연평균 성장률이 6.5%에 도달될 것으로 예측되고 있다. 특히 2,000년대 초반에 AgraQuest Co.에서 등록한 Serenade는 *Bacillus subtilis* QST713 균주를 이용하여 살균제와 항세균제로 25개국에서 등록되어 연간 1억불 이상을 수출한다고 알려져 있다. 이외에 *Bacillus* 균주가 생산하는 다양한 lipopeptide들의 직접적인 항균활성 이외에 병원균에 의한 biofilm 형성을 억제하거나 유도. 전신지항성이라는 식물체 내 방어기작을 유도하여 식물병을 억제하는 데에도 기여한다고 알려졌다. 최근에는 *B. subtilis* 균주가 생산하는 flagellin-like 단백질이 *Botrytis cinerea*에 강한 저해활성을 나타낸다고 보고하였으며, *Bacillus amyloliquefaciens* 균주도 토마토 모양병 유래의 *Ralstonia solanacearum*에 의한 세균성 시들음병과 토마토 흰가루병을 전신성 획득 저항성을 유도하여 억제한다고 보고하였다. 이처럼 *B. subtilis* 균주가 많은 식물병과 각종 식물 병원균의 억제에도 효과적이라고 알려지면서, 현재에도 널리 이용되고 있는 실정이다.

Iturin 생합성 유전자에 대한 분자 수준에서의 연구는 1993년도 일본의 Shoda 연구팀이 *B. subtilis* RB-14 균주를 이용하여 iturin A와 surfactin의 합성에 관여하는 *lpa-14*라는 유전자를 클로닝하고 연기서열을 분석한 것이 유일할 정도로 iturin 생합성 유전자에 대한 연구는 매우 미진한데다가, *Bacillus* genome project에 이용된 *B. subtilis* 168 균주는 surfactin을 생산하는 유전자를 가지고 있고, iturin은 생산하지 않는 균주라고 알려졌다. 이러한 정보들을 토대로 당 연구실에서는 1990년대 초반에 iturin 생합성 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 surfactin과 iturin의 분자량과 구조가 유사한 데 착안하여 cyclic peptide의 합성과 peptide와 지방산이 연결되는 과정에도 많은 유사점이 있을 것이라고 추정하고, *Bacillus* genome project의 database로부터 얻은 surfactin 생합성 유전자를 이용하여 iturin 생합성 유전자의 클로닝을 시도하였다. Genomic

library screening 통해 cosmid 클론들을 얻고 그 염기배열을 분석하여 전체 크기가 37,645 bp이고, 6개의 ORF로 이루어진 새로운 iturin 생합성 유전자라고 추정되어 GenBank에 기탁하였다 (GenBank accession number KC454625).

Cyclic lipopeptide 항생물질의 생합성 유전자에 대한 연구는 독일의 Duitman 등이 1999년에 *B. subtilis* ATCC6633 균주를 이용하여 iturin 계열의 lipopeptide antibiotic인 mycosubtilin (C-13-C-16 β -amino fatty acid-L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro- D-Ser-L-Asn)의 생합성 유전자를 클로닝하여 전체 유전자에 대한 염기서열을 분석하고 그 유전자의 특성을 보고하였다. Mycosubtilin 생합성 유전자의 전체 크기는 38 kb이며 *fenF*, *mycA*, *mycB* 및 *mycC* 등 4개의 ORF로 이루어져 있다고 알려졌는데, *mycA*는 peptide synthetase와 amino transferase 및 fatty acid synthetase의 기능을 동시에 수행하여 natural hybrid enzyme으로는 처음으로 보고되었으나, 그 외 전체적인 유전자 구조는 다른 lipopeptide 항생물질의 peptide synthase와 유사하였다. 또한 2001년도 하반기에는 일본의 Shoda 연구팀이 야생주 *B. subtilis* RB14 균주를 이용하여 iturin 생합성 유전자를 클로닝하고 전체적인 염기서열을 분석하였다. *B. subtilis* RB14의 iturin 생합성 유전자는 총 42 kb로 *ituD*, *ituA*, *ituB* 및 *ituC*로 이루어져 있고 *ituD*는 malonyl coenzyme A transacylase를, *ituA*는 fatty acid synthetase와 amino acid transferase 및 peptide synthetase의 3가지 기능을 동시에 갖고 있는 단백질 (449 kDa)을 코딩하며, *ituB*와 *ituC*는 각각 609 kDa와 297 kDa의 peptide synthetase를 코딩하고 있다고 보고하였다. 또한 iturin은 6번째와 7번째의 amino acid가 D-Asn→L-Ser인 데 비해 mycosubtilin은 D-Ser→L-Asn인 점이 다르고, 다른 부분은 모두 동일한 네 각각의 생합성 유전자를 서로 비교해보면 *ituD*와 *ituA* 및 *ituB*는 mycosubtilin 생합성 유전자인 *fenF*, *mycA*, *mycB*와 동일하게 각각 79%의 유사성을 나타내었다. 그러나 *ituC*에 해당하는 *mycC*는 비교적 낮은 유사성(64%)을 나타내고 있어 *ituC*와 *mycC*가 6, 7번째 아미노산을 연결해주는 기능을 하고 있을 것으로 추정된다. 이외에 독일 연구팀이 *B. amyloliquefaciens* FEZ42 균주의 유전체와 lipopeptide 분석을 통해 이 균주가 생산하는 lipopeptide는 surfactin, bacillomycin D 및 fengycin이라고 보고하였으며, 4'-phosphopantetheine transferase 유전자인 *sfp* 유전자가 결여되어 surfctin을 생산하지 못하는 *B. subtilis* 168 균주에 iturin A operon을 horizontal transfer시켜 *sfp* 유전자를 도입시키면 iturin 생산균주로 전환된다는 연구 결과도 보고하고 있다. 이외에도 독일 연구팀이 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946의 유전체 분석결과 이 균주가 iturin A의 nonribosomal 합성에 대한 gene cluster를 함유한다고 보고하는 등 그동안 미진하였던 이 분야 연구가 최근들어 활성화되고 있는 실정이다.

한편 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079로부터 클로닝한 iturin 생합성 유전자는 일본 연구팀에서 보고한 *ituD*, *ituA*, *ituB*와 비교하였을 때 30-40% 정도의 유사성만을 나타내었고, surfactin을 생산하는 *B. subtilis* 168 균주의 surfactin 생합성 유전자와는 70% 정도의 상동성을 나타내나 2012년 독일 연구팀에서 보고한 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946의 surfactin 생합성 유전자와는 99%의 상동성을 나타내었다. 그러나 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079는 6가지 종류의 iturin을 생산하는 것을 HPLC와 LC-MS를 통해 확인하였으며, 또한 야생주 iturin 생합성 유전자의 ORF3 부위에 mini-Tn10 transposon을 삽입시켜 제조한 iturin-less 돌연변이주에서는 iturin 생산량이 30% 감소한 반면, surfactin 생산량은 iturin-less 돌연변이주에서 오히려 야생주보다 2배 정도 더 많이 검출되어, 클로닝한 37,645 bp의 유전자는 surfactin 합성에 관여하는 유전자라기보다는 iturin 생합성에 관여하는 유전자로 생각되었다. 또한 iturin 생합성능이 야생주보다 2배나 증가한 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis*

BSM54의 iturin 생합성 유전자 부위를 NGS로 열기시열을 분석하고 야생주와 비교해본 결과 iturin 생합성 유전자 부위의 6곳에서 point mutation이 일어난 것을 확인하였으며, 이 중에서 promoter 부위에 인접한 M1 point mutation이 일어난 곳의 유전자 부위를 야생주에 site-directed mutagenesis하면 야생주에서도 iturin 생합성능이 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과들을 종합해보면 동일한 구조의 iturin 일에도 불구하고, 본 실험에 이용한 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079가 생산하는 iturin 생합성 유전자는 기존에 보고되지 않은 새로운 iturin 생합성 유전자일 것으로 사료되어 향후 iturin 생합성능 증대뿐만 아니라 새로운 균주 개발에도 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항이 없음.

제 8 장 참고문헌

1. 米原弘編 1991. 抗生物質, p.304-310, 地球社, 東京.
2. Keel, C., B. Koller, and G. Defago (eds.). 1991. Plant Growth Promoting Rhizobacteria-Progress and Prospects, IOBC/WPRS Bull, 14(8): 1-418.
3. Ryder, M. H., P. M. Stephens, and G. D. Bowen.(eds.) 1994. Improving Plant Productivity with Rhizobacteria, CSIRO Division of Soils, Adelaide, Australia.
4. 김진철. 생물농약의 연구개발 동향, p.1-20, 농업생명공학, Bioin 스페셜 WebZin (www.bioin.or.kr), 국가생명공학정책연구센터 (2009. 10).
5. 김창길, 장학균, 장성경 및 김태훈. 2010년 국내·외 친환경농산물의 생산실태 및 시장전망, 정책연구보고, p. 136, 한국농촌경제연구원(2010.12).
6. BCC Research: Bacterial biopesticides, p. 37-38, In: Microbial products: Technologies, Applications and Global Markets, Wellesley, MA 0248, U.S.A. (2013. 8)
7. 山田昌編著 2000. 微生物農藥 - 環境保全形 農藥を めざして-, p.114-135, 全國農村教育協會, 新村印刷株式會社, 東京 (2000).
8. Baker, R. R. and P. E. Dunn(eds.) 1990. New directions in biological control : Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Alan R. Liss, New York.
9. Chet, I.(eds.) 1987. Innovative approaches to plant diseases control. John Wiley and Sons, New York.
10. Braverman, M. 2010 United States. p.74-79, In : The use and regulation of microbial pesticides in representative jurisdictions worldwide (J. T. Kabaluk, A. M. Svircev, M. S. Goettel, S. G. Woo, eds). International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants (IOBC, available online through www.IOBC-Global.org).
11. Gwynn, R. L. and J. Dale. 2010. European Union with special reference to the United Kingdom. p. 24-34, In : The use and regulation of microbial pesticides in representative jurisdictions worldwide (J. T. Kabaluk, A. M. Svircev, M. S. Goettel, S. G. Woo, eds). International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants (IOBC, available online through www.IOBC-Global.org).
12. BCC Research: Agricultural market for microbes and microbial products. p. 26-27, In : Microbial products: Technologies, Applications and Global Markets, Wellesley, MA 0248, U.S.A.(2013. 8)
13. BCC Research: Microbial pesticides, p. 28-36, In : Microbial products: Technologies, Applications and Global Markets, Wellesley, MA 0248, U.S.A. (2013. 8).
14. Kerr, A. 1980. Biological control of crown gall through producing agrocin 84. Plant Dis., 64: 25-30.
15. Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol., 26: 379-407.

16. Weller, D. M. and R. J. Cook. 1986. Increased growth of wheat by seed treatment with fluorescent *Pseudomonads*, and implications of *Pythium* control. *Can. J. Plant Pathol.*, 8: 328-334.
17. Cook, R. J. 1992. Wheat root health management and environmental concern. *Can. J. Plant. Pathol.*, 14: 76-85.
18. Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens.
19. Thomashow, L. S., D. D. 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.
20. 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 bacteria secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5: 4-13.
21. Hara, H., M. Bangera, D. S. Kim, D. M. Weller, and L. S. Thomashow. 1994. Effect of transfer and expression of antibiotics biosynthesis genes on biological control activity of fluorescent *Pseudomonas*. In *Improving Plant Productivity with Rhizobacteria* (M. H. Ryder, P. M. Stephens and G. D. Brown, eds.) p. 247-249. CSIRO Division of Soils, Adelaide, South Australia
22. Thomashow, L.S., Essar, D.W., Fujimoto D.K., Pierson III L.S. Thrane C. and Weller. D.M. 1993. Genetic and biochemical determinants of phenazine antibiotic production by fluorescent *Pseudomonas* that suppress take-all disease of wheat. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, vol.2, E. W. Nester, and D. P. S. Verma (eds.) p.535-541. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
23. Romero-Garcia, S., C. Hernandez-Bustos, E. Merino, G. Gosset, and A. Martinez. 2009. Homolactic fermentation from glucose and cellobiose using *Bacillus subtilis*. *Microb. Cell Fact.*, 8: 23.
24. Ongena M. and P. Jacques. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.*, 16: 115-125.
25. Aranda, F. J., J. A. Teruel, and A. Ortiz. 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochim. Biophys. Acta*, 1713: 51-56.
26. Peypoux, F., J. M. Bonmatin, and J. Wallach. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 553-563.
27. Magnet-Dana, R., L. Thimon, F. Peypoux, and M. Ptak. 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie*, 74: 1047-1051.
28. Ongena, M., E. Jourdan, A. Adam, M. Paquot, A. Brans, B. Joris, J. L. Arpigny, and P. Thonart. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.*, 9: 1084-1090.

29. Romero, D., A. de Vicente, R. H. Rakotoaly, S. E. Dufour, J. W. Veening, E. Arrebola, F. M. Cazorla, O. P. Kuipers, M. Paquot, and A. Perez-Farcia. 2007. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant Microb. Interact.*, 20: 430-440.
30. Pusey, P. L. 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. *Pest Sci.*, 27: 133-140.
31. Phae, C. G., M. Shoda, and H. Kubota. 1990. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. *J. Ferm. Bioeng.*, 69: 1-7.
32. 박경석. 2011. 미생물 농약의 개발 현황과 바실러스 미생물의 중요성, *공업화학 전망*, 14: 1-11.
33. Bais, H. P., R. Fall, and J. M. Vivanco. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.*, 134: 307-319.
34. Ren, J. J., G. L. Shi, X. Q. Wang, J. G. Liu, and Y. N. Wang. 2013. Identification and characterization of a novel *Bacillus subtilis* strain with potent antifungal activity of a flagellin-like protein. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 2343-2352.
35. Yamamoto, S., S. Shiraishi, Y. Kawagoe, M. Mochizuki, and S. Suzuki. 2014. Impact of *Bacillus amyloliquifaciens* S13-3 on control of bacterial wilt and powdery mildew in tomato. *Pest. Manag. Sci.*, (Epub, Doi10.1002/ps.3837)
36. Lumsden, R. D., J. A. Lewis, and D. R. Fravel. 1995. Formulation and delivery of biological agents for use against soilborne plant pathogens. p.166-182, In: *Biorational Pest Control Agents-Formulation and Delivery* (F. R. Hall and J. W. Barry, eds.), American Chemical Society, Washington, D.C.
37. Fravel, D. R., W. J. Jr. Connick, and J. A. Lewis. 1996. Formulation of microorganisms to control plant diseases. In: *Formulation of Microbial Biopesticides, Beneficial Microorganisms and Nematodes* (H. D. Burges, ed.) Chapman and Hall, London.
38. Liu, L., J. W. Kloepper, and S. Tuzum. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 85: 843-847.
39. Kloepper, J. W., R. Lifshitz, and R. M. Zablotowicz. 1989. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.*, 7: 39-43.
40. Kloepper, J. W. and M. N. Schroth, 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes, p.879-882 in *Proc. Int. Conf. Plant pathog. Bact.*, 4th. Vol.2.
41. Loper, J. E. and M. N. Schroth, 1986. Influence of bacterial sources of IAA on root elongation of sugar beet. *Phytopathology.*, 76: 386-389.
42. Schippers, B., A. W. Bakker, and P. A. H. M. Bakker, 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 25: 339-358.
43. Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with

- bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 26: 379-407.
44. Wei, G., J. W. Kloepper, and S. Tuzun. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81: 1508-1512.
 45. Bayliss, C., B. Lasby, and J. M. Wood. 1993. Mutant derivatives of *Pseudomonas putida* GR12-2R3 defective in nutrient utilization or cell surface structures show reduced ability to promote canola root elongation. *Can. J. Microbiol.*, 39: 1111-1119.
 46. Vandenbergh, P. A. and C. F. Gonzalez, 1984. Method for protecting the growth of plants employing mutant siderophore producing strains of *Pseudomonas putida*. U.S. Patent No. 4,479,936.
 47. Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 26: 379-407.
 48. Weller, D. M. and R. J. Cook. 1986. Increased growth of wheat by seed treatment with fluorescent Pseudomonads, and implications of *Pythium* control. *Can. J. Plant Pathol.*, 8: 328-334.
 49. Cook, R. J. 1992. Wheat root health management and environmental concern. *Can. J. Plant. Pathol.*, 14 : 76-85.
 50. Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31: 53-80.
 51. Gueldner, R. C., C. C. Reilly, P. L. Pusey, C. E. Costello, R. F. Arrendale, R. H. Cox, D. S. Himmelsbach, F. G. Crumley, and H. G. Cutler. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *J. Agri. Food Chem.*, 36: 366-370.
 52. Massomo, S. M. S., C. N. Mortensen, R.B. Mabagala, M. A. Newman, and J. Hockenhull. 2004. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *J. Phytopathol.*, 152: 98-105.
 53. Etchegaray, A., C. de C. Bueno, I. S. de Melo, S. M. Tsai, M. de F. Fiore, M. E. Silva-Stenico, L. A. B. de Moraes, and O. Teschke. 2008. Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Arch. Microbiol.*, 190: 611-622.
 54. Tsuge, K., T. Akiyama, and M. Shoda. 2001. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J. Bacteriol.*, 183: 6265-6273.
 55. Duitman, E. H., L. W. Hamoen, M. Rembold, G. Venema, H. Seitz, W. Saenger, F. Berhard, R. Reinhardt, M. Schmidt, C. Ullrich, T. Stein, F. Leeders, and J. Vater. 1999. The mycosubtilin synthetase of *B. subtilis* ATCC 6633 : A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase and a fatty acid synthetase, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 13294-13299.
 56. Koumoutsis, A., X. H. Chen, A. Henne, H. Liesegang, G. Hitzeroth, P. Franke, J. Vater, and R. Borriss. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal

- synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.*, 186: 1084-1096.
57. Chen, X. H, A. Koumoutsi, R. Scholz, A. Eisenreich, K. Schneider, I. Heinemeyer, B. Morgenstern, B. Voss, W. R. Hess, O. Reva, H. Junge, B. Voigt, P. R. Jungblut, J. Vater, R. Sussmuth, H. Liesegang, A. Strittmatter, G. Gottschalk, and R. Borriss. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat. Biotechnol.*, 25: 1007-1014.
 58. Chen, X. H., A. Koumoutsi, R. Scholz, K. Schneider, J. Vater, R. Sussmuth, J. Piel, and R. Borriss. 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J. Biotechnol.*, 140: 27-37.
 59. Tsuge, K., S. Inoue, T. Ano, M. Itaya, and M. Shoda. 2005. Horizontal transfer of iturin A operon, *itu*, to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer. *Antimicrob. Agent Chemother.*, 49: 4641-4648.
 60. Blom, J., C. Rueckert, B. Niu, Q. Wang, and R. Borriss. 2012. The complete genome of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B496 contains a gene cluster for nonribosomal synthesis of iturin A. *J. Bacteriol.*, 194: 1845-1846.
 61. Takeuchi S., K. Hirayama, K. Ueda, H. Sakai, and H. Yonehara. 1958. Blasticidin S, a new antibiotics. *J. Antibiot.*, 11 : 1-5.
 62. Umezawa, H., M. Hamada, Y. Suhara, T. Hashimoto, and T. Ikekawa. 1965. Kasugamycin, a new antibiotic. *Antimicrob. Agent Chemother.*, 5: 753-757.
 63. Isono, K., J. Nagatsu, K. Kobinata, K. Sasaki, and S. Suzuki. 1967. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. V. Isolation and characterization of polyoxins C, D, E, F, G, H, and I. *Agri. Biol. Chem.*, 31: 190-199.
 64. Isawa, T., Y. Kameda, M. Asai, S. Horii, and K. Mizuno. 1971. Studies on validamycins, new antibiotics. IV. Isolation and characterization of validamycins A and B. *J. Antibiot.*, 24: 119-123.
 65. 중소기업청. 2013 중소기업 통합기술로드맵2 (바이오), p. 336-337.
 66. Anagnostopoulos, C. and J. Spizizen. 1961. Requirments for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 81: 741-746.
 67. Steinmetz, M. and R. Richter. 1994. Easy cloning of mini-Tn10 insertions from the *Bacillus subtilis* chromosome. *J. Bacteriol.*, 176: 1761 - 1763.
 68. Drouhet, E., B. Dupont, L. Improvisi, Ma. Viviani and A. M. Tortorano. 1986. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents, p.31-49, Elsevier, N.Y.

Cyclic lipopeptide 高生産 길항미생물 *Bacillus*의
대량 배양 및 산업화에 관한 연구
(Mass cultivation and industrialization of cyclic
lipopeptide high-yielding antagonistic
microorganism *Bacillus*)

(주)그린바이오텍

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Cyclic lipopeptide의 생산능이 증대된 길항 미생물 *Bacillus*의 개발 및 산업화”에 관한 연구과제(제1협동과제 “Cyclic lipopeptide 高生産 길항 미생물 *Bacillus*의 대량 배양 및 산업화에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2014년 11월 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 김 성 욱

협동연구기관명 : (주)그린바이오텍

협동연구책임자 : 이 재 호

연 구 원 : 조 민 섭, 김 종 협

연 구 원 : 원 석 민, 최 기 현

요 약 문

I. 제 목

Cyclic lipopeptide 高生産 길항 미생물 *Bacillus*의 대량 배양 및 산업화에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

오래 전부터 품종 개량, 비료 투입, 토양 개량, 화학적으로 합성된 농약의 사용 및 영농의 기계화 등은 오랫동안 인류의 식량생산과 작물보호에 크게 이바지하여 왔다. 그러나 반복적인 농약의 사용과 과다한 화학비료의 투입으로 인해 토양의 산성화와 농산물의 잔류독성 및 환경오염 등으로 인해 많은 사회적인 문제가 대두되고 있고, 국내에서도 2013년까지 현재 사용하고 있는 화학농약과 화학비료의 사용량을 40%를 감축할 예정으로 있어 농약과 비료의 사용량을 감소시키면서 농산물의 생산성을 증가시키기 위한 생물학적 제제 이용 연구가 활발해 지고 있다. 이러한 연구는 이미 오래 전부터 유용 세균을 대상으로 광범위하게 진행되어 왔고 초기의 연구에서는 질소고정, 인산의 가용화, 항생물질의 생산과 식물생장 조절제 등과 같은 식물과 세균의 상호작용에 대한 생리적인 면에 치중하였다. 이렇게 식물의 질병을 억제하거나 생장을 촉진하는 능력을 나타내는 여러 종류의 길항 미생물들이 오래 전부터 연구되어 왔으며 *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp. 및 *Trichoderma* sp. 등 수 많은 미생물들이 생물학적 방제의 가능성을 나타내어 길항작용이 우수한 길항 미생물들의 분리와 분자생물학적인 방법을 이용한 균주의 개량이 시도되고 있다. 특히 최근에는 well-being 문화의 확산으로 인해 청정 농산물을 요구하는 소비자들의 수요가 나날이 증가하고 있고, 유기 합성농약을 대체할 수 있는 유일한 대안인 생물학적 방제제에 대한 관심이 나날이 증가되고 있어 길항 작용이 뛰어난 미생물의 확보가 시급한 실정이다.

이러한 추세에 따라 국내 토양으로부터 분리한 6종류의 iturin을 생산하고, 여러 종류의 식물 병원성 곰팡이에 대해 강한 항균활성을 나타내는 길항 미생물 *B. subtilis* 균주를 자외선으로 돌연변이시킨 iturin 高生産 균주를 이용하여 산업화를 위한 대량 배양방법의 확립과 제형화를 통한 시제품을 생산하여, 포장실험과 독성실험을 통해 제품화에 필요한 인자를 확인하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 생물농약용 균주의 선발
2. Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54에 대한 최적 배지조성 디자인

3. Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54의 최적 대량 배양 조건 및 공정 개발
4. Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54를 이용하여 제조한 시제품을 등록하기 위한 약효 및 약해 포장시험
5. Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54를 이용하여 제조한 시제품의 포장시험
6. Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* BSM54를 이용하여 제조한 시제품의 독성시험

IV. 연구개발 결과

1. 미생물 살균제의 산업화 및 제품화를 위해 최소 탄소원 및 질소원, 미량원소 조성비 설계, Pilot (50 liter, 500 liter)규모 및 5,000 liter 산업화 규모 대량 배양공정 설계, 동결 건조 공정 설계, 최적 동결 부재 및 수화제형 개발 완료, 상온 경시 2년 이상 확보 및 이화확성이 양호하였다.
2. 잣빛곰팡이병, 균핵병, 풋마름병 및 시들음병 등에 대한 실내 시험을 완료하였고, 토양 병해에 대한 약효시험결과 방제가가 60% 이상을 나타내었다.
3. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 균주의 여러 식물병 (풋마름병, 시들음병, 잣빛곰팡이병)에 대한 활성을 조사하였으며, 배양조건 확립, 처리방법 개발, 작용기작 규명 등에 대한 연구를 진행하였다.
4. 본 연구를 통하여 개발된 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54는 친환경유기농업자재 등록을 하기 위한 일련의 독성시험을 진행한 결과 독성시험에 적용한 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 AS(액상제)는 모든 시험에서 안전한 물질로 규명되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

Iturin 생합성능이 증대된 자외선 돌연변이주 BSM54는 각 ORF들의 발현량이 대체적으로 야생주보다 많았고, *Botrytis cinerea*를 대상으로 한 포자 억제 시험에서도 야생주보다 2배 이상 더 강하게 포자 발아를 억제하였으며, iturin 생산량도 HPLC 분석 시 야생주보다 2배나 더 증가하였다. 또한 야생주에 자외선 돌연변이주의 M1 point mutation이 일어난 부위를 site-directed mutagenesis시켜 얻은 형질전환주에서도 야생주보다 *F. oxysporum* 평판 배지에서 생육 저지환의 크기가 더 크게 나타나 iturin 高生産 돌연변이주 BSM54의 point mutation이

일어난 M1 위치의 변이된 염기가 iturin 생산능 증대에 관여한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 특성을 가지고 있는 자외선 돌연변이주 BSM54를 주관기관으로부터 제공받아 우선적으로 산업성을 평가하기 위하여 50 liter ~ 5,000 liter 규모의 배양조건을 확립하였고, 이후 여러 제형별 제조 조건을 확립하였으며, 개발된 시제품을 대상으로 인축독성 및 환경독성을 평가하여 안전성과 안정성을 확인하였다. 또한 여러 포장실험을 통하여 약효 및 약해를 확인하여 개발균주의 실효성을 검증하였다. 이러한 일련의 시도가 원활하게 진행된다면 향후 화학합성 농약 사용량의 감축으로 인해 우려되고 있는 농작물의 생산성 감소에 효율적으로 대처할 수 있는 생물학적 방제제 개발과 응용에 효과적인 수단이 될 수 있을 것으로 사료된다.

SUMMARY

I. Title

Mass cultivation and industrialization of cyclic lipopeptide high-yielding antagonistic microorganism *Bacillus*

II. Objectives and Importance of the Research

The improvement of seeds, the use of chemical fertilizers and agrochemicals, the improvement of soils, and the mechanization of farming have been contributed to the foodstuff production and the crop protection for the human being for a long time. On the contrary, the acidification of soils, the remaining toxicity, and the environmental pollution, which are caused by the repeated use of agrochemicals and the use of the excess amount of chemical fertilizers have become a social problem. In Korea, the amount of agrochemicals and chemical fertilizers used was due to be reduced by 40% until 2013. Thus, there was a great need for the research to develop biological control agents to enhance the production of agricultural products while reducing the amount of agrochemicals and chemical fertilizers required. In fact, research to achieve these goals had been conducted, mainly utilizing useful bacteria. At the beginning, studies were focused on the physiology for plant-bacteria interaction such as nitrogen fixation, solubilization of phosphorous, the production of antibiotics and plant growth regulators. Various kinds of antagonistic microorganisms, which show the ability to prevent the plant diseases and to activate the growth of plant, were investigated and microorganisms such as *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp., and *Trichoderma* sp. represent the possibility of such biological control. More recently, the isolation of useful antagonistic microorganisms and the improvement of microorganisms using genetic approach have been on trial. Especially, the necessity of clean crop productions, which are recently prompted by the spread of well-being culture among the consumers has gradually been increased. Moreover, the needs for the biological control agents as only alternatives for synthetic organic chemicals are greater than before. Thus, the acquisition of microorganisms with the outstanding antagonistic action against phytopathogens is highly demanded.

With such background, this work was initiated to develop biological control agents with increased iturin production by using the *Bacillus*, which produced the six types of iturins with antifungal activity against various phytopathogenic fungi. For the industrialization of iturin high-yielding UV mutant *B. subtilis*, we have established the optimal conditions of mass cultivation and various formulation. In addition, we have examined the factors such as stability and toxicity tests necessary for registration of the developed *Bacillus*.

III. Contents and Scope of the Research

1. Development of a new microbial fungicide candidate using newly isolated strain
2. Design of optimal medium composition for iturin high-yielding mutant *B. subtilis* BSM54
3. Development of optimal bulk fermentation and process of iturin high-yielding mutant *B. subtilis* BSM54
4. Evaluation of disease control efficacy of prototype prepared by iturin high-yielding mutant *B. subtilis* BSM54 in fields
5. Field efficacy of prototype prepared by iturin high-yielding mutant *B. subtilis* BSM54
6. Toxicity tests of prototype prepared by iturin high-yielding mutant *B. subtilis* BSM54

IV. Results

1. We have developed several conditions for the optimal cultivation of *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54. The optimum concentrations of carbon source, nitrogen source and micro ingredient in cultivation broth were established, and the optimum cultivation and formulation process (freeze drying method) were designed. The antifungal activities of products did not show significant differences up to 2 years and the physical properties were good.
2. The iturin high-yielding mutant *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 showed high efficacies on gray mold, sclerotinia rot, bacterial rot, and Fusarium wilt diseases. Especially, the strain exhibited 60% efficacies on soilborne diseases.
3. To control the plant diseases such as bacterial wilt, Fusarium wilt, and gray mold, the optimal fermentation conditions, the development of application methods, and the elucidation of action mode for one microbial fungicide, which is prepared from *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54, were examined. We are under development new microbial fungicides using the strain in single or in combination with other antagonistic microorganisms.
4. For the domestic registration of environmentally-friendly agricultural & organic agricultural materials, the toxicities of the iturin high-yielding mutant *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54AS was examined. Through stipulated manner of test, toxicopathological characteristics of *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54AS were investigated. In all items of tests, the *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 AS strain was proved as safety.

V. Prospects for application

The expression levels of each ORF of UV mutant BSM54 strain were higher than that of the wild-type strain, with greater than 2-fold inhibitory activities over the wild-type on spore germination of *Botrytis cinerea*. The iturin production of the mutant BSM 54 strain has increased 2-fold over the wild-type strain on HPLC analysis. The transformants obtained from wild-type strain with the M1 point mutation of UV mutant BSM 54 strain by site-directed mutagenesis have exhibited a larger growth inhibition zone than that of wild-type strain on bioassay against *F. oxysporum*. From these results, it was found that the mutated gene of M1 site occurred by the point mutation in iturin high-yielding mutant BSM54 strain was associated with the increase of iturin production. The results of the study would lead to the improvement of antagonistic microorganism *B. subtilis* strain and development of biological control agents using UV mutants. For the industrialization of iturin high-yielding UV mutant BSM54 provided from the Korean Research Institute of Bioscience and Biotechnology, we have established the optimal conditions of mass cultivation (50 ~ 5,000 liter) and various formulations. The factors such as stability and toxicity tests necessary for registration of the developed *Bacillus* were examined. In addition, we have verified the effectiveness of the developed strains in field conditions of some valuable crops. When a series of trial has progressed successfully, development and application of biological agents may provide effective means to cope with decrease in crops production, which would incur due to the reduced agrochemical usage required in the future.

CONTENTS

Mass cultivation and industrialization of cyclic lipopeptide high-yielding antagonistic microorganism *Bacillus*

Chapter I . Introduction-----	104
Chapter II . State of the Art Report -----	109
Chapter III . Contents and Results of Research -----	114
Chapter IV . Accomplishment and Contribution-----	153
Chapter V . Prospects for application -----	155
Chapter VI . Science and technology information collected from foreign countries through the project-----	156
Chapter VII . Status of research facilities and equipment-----	158
Chapter VIII . References-----	159

목 차

Cyclic lipopeptide 高生産 길항 미생물 *Bacillus*의 대량 배양 및 산업화에 관한 연구

제 1 장	연구개발과제의 개요-----	104
제 2 장	국내외 기술개발 현황-----	109
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과-----	114
1.	연구 수행 방법-----	114
2.	연구내용 및 결과-----	115
가.	Iturin 高生産 돌연변이주의 대량 배양 공정 개발-----	115
(1).	Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 lab scale 최적 조건 확립-----	115
(2).	Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 pilot scale 최적조건 확립-----	116
(3).	Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 plant scale 최적조건 확립-----	121
(4).	Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 공정평가 및 실검-----	124
(5).	Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 생산수율 개선-----	126
(6).	Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM 54의 시제품 개발-----	127
나.	Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54 시제품의 제형화 공정 확립-----	129

(1). Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 제형 다변화의 필요성-----	129
(2). Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 수화제(WP) 제형 제작을 위한 건조 공정의 확립-----	130
다. Iturin 高生産 돌연변이주의 독성 안정성시험-----	138
(1). Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 인축 독성시험----	139
(2). Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 생체 독성시험----	139
(3). Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 생물 활성시험----	140
(4). Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM 54의 유효·유해 미생물 분석시험-----	140
라. Iturin 高生産 돌연변이주 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM 54 시제품의 약효·약해시험-----	140
(1). 딸기 잣빛곰팡이병에 대한 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM 54의 약효 및 약해 시험-----	140
(2). 토마토 잣빛곰팡이병에 대한 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 약효 및 약해 시험-----	142
(3). 고추 역병에 대한 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 약효 및 약해 시험 -----	144
(4). 토마토 풋마름병에 대한 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 약효 및 약해 시험-----	144
(5). 토마토 시들음병에 대한 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54의 약효 및 약해 시험-----	146
(6). 상추 균핵병에 대한 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> 야생주와 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM 54 mutant의 약효 및 약해 시험-----	148

(7). 토마토 시들음병에 대한 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 야생주화

	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM 54 mutant의 약효 및 약해 시험	150
제 4 장	목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도-----	153
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획-----	155
제 6 장	연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보-----	156
제 7 장	연구시설·장비 현황	158
제 8 장	참고문헌-----	159

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

오래 전부터 품종 개량, 비료 투여, 모양 개량, 화학적으로 합성된 농약 등은 인류의 식량 생산과 작물 보호에 크게 이바지해 왔으나,¹⁾ 약제 내성균의 출현과 농산물의 잔류독성 및 환경 오염 등으로 인해 많은 사회적인 문제가 대두되고 있어 선진 각국에서는 점차 그 사용이 제한되고 있다.^{2,3)} 특히 1992년 6월 브라질에서 개최된 유엔 환경보호 위원회(UNCED)에서 현재 사용되고 있는 유기 합성 농약의 25-75%를 질감시키기 위한 규제 움직임이 처음으로 시작된 이래 21세기에 들어오면서 우리나라를 포함한 OECD 국가를 중심으로 화학합성 농약과 합성 비료의 사용량을 2013년까지 40%를 감축하려는 움직임을 나타내고 있다.⁴⁾ 또한 소득 수준의 향상으로 유기 농산물을 포함한 친환경 농산물에 대한 소비가 증가하여, 2009년에는 3조 4,117억원, 2010년에는 3조 6,506억원, 2011년에는 3조 9,678억원으로 추정되었으며, 2020년에는 전체 6조 6,283억원이 될 것으로 전망되고 있다 (표 1).⁵⁾

생물학적 방제는 식물에 질병을 일으키는 미생물을 길항 작용이 있는 다른 미생물을 이용하여 방제하는 것을 말하며 가장 대표적인 미생물 농약은 미생물 자체를 직접 이용하거나 미생물을 이용하여 각종 식물 병원균과 농작물에 해를 주는 곤충, 응애, 선충 등의 해충 및 잡초 등을 방제하는데 주로 사용되고 있다. 이러한 미생물 농약은 유기합성 농약과 비교해 볼 때 사용된 미생물이 적절한 환경조건 하에서 스스로 생육할 수 있어 약효의 지속성을 기대할 수 있고, 숙주의 특이성이 크며, 생태계에 영향이 적고, 안전성이 높고, 저항성 유발을 나타내지 않는다는 장점이 있는 반면, 약효의 발현이 늦고, 유통과 보존에 많은 어려움이 있다는 단점이 있다.⁶⁾ 이처럼 미생물을 농약으로 이용하려는 발상은 미생물의 여러 특성 중 미생물의 다양한 능력과 활성을 이용하고자 하며, 또 다른 하나는 자연으로부터 얻은 미생물을 이용하면 자연계에 존재하지 않는 화학 합성된 화학물질보다도 생태학적으로 더 안전하다는데 기초를 두고 있다.⁶⁾ 이러한 생물학적 방제 연구는 1900년대 초부터 시작되어 그 동안 많은 종류의 세균, 균팡이를 이용하여 식물 병원균을 억제하려고 많은 노력을 기울여 왔다.^{7,8)} 지금까지 가장 성공적인 생물학적 방제의 예는 *Agrobacterium tumefaciens*에 의해 발병하는 과수 뿌리병인 crown gall의 방제이다.¹³⁾ 이 식물병은 화학합성 농약으로는 방제가 불가능하나 *Agrobacterium radiobacter*가 생산하는 agrocin이라는 항생물질이 *A. tumefaciens*의 침입을 억제하는 것이 알려지게 되었고, 그 후 유전공학 기법을 이용하여 *A. radiobacter*를 개량한 몇 가지 제품이 개발되어 전 세계 시장의 상당 부분을 점유한 것으로 추측된다. 또 다른 성공 사례는 *Pseudomonas fluorescens*를 이용한 밀의 뿌리썩음병 방제 연구로 미국의 USDA와 Washington 주립대학 연구팀이^{10~13)} 10여년에 걸친 연구를 통해 밀의 뿌리병을 야기하는 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*에 강력한 길항작용을 나타내는 *P. fluorescens*를 도양으로부터 분리하는 데 성공하였다. 이 길항 미생물을 밀의 종자에 처리하여 파종하였을 경우 밀의 수확량이 10~20% 증가함을 확인하였는데, 이러한 효과는 *Pseudomonas*가 생산하는 phenazine^{14,15)}와 2,4-diacetylphloroglucinol 항생물질¹⁵⁾에 의한 것으로 밝혀졌다. 8년에 걸친 포장 실험을 통해 드러난 실패

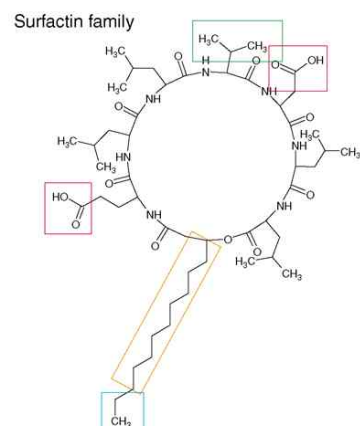
Table 1. The prospect of market shares for environmentally-friendly agricultural products in accordance with certification stages

(단위: 억원)

항목	2008	2009	2010	2011	2014	2015	2016	2020
유기농	2,536	2,426	3,521	4,118	5,782	6,563	7,226	10,306
무농약	9,193	13,178	15,026	18,449	28,026	32,426	39,249	55,976
저농약	20,198	18,514	17,958	17,112	14,814	14,122	-	-
전체	31,927	34,117	36,506	39,678	48,622	53,111	46,475	66,283

시기와 지역에 따른 방제 활성의 차이점을 극복하기 위해 연구팀은 유전공학 기법을 도입하여 phenazine계 항생제 생산과 관련된 *Pseudomonas* sp.의 유전자 발현을 극대화하여 밀 뿌리 썩음 병 방제 효과의 불규칙성을 극복하는 데 성공하였다.^{16,17)}

*Bacillus*속 균주들은 내생 포자를 갖고 있는 Gram 양성 세균으로 각종 세균과 곰팡이에 항균 활성을 나타내는 많은 화합물들이 보고되었으며,¹⁸⁾ 각종 효소나 살충제 및 정밀 화학제품 생산 등 산업적으로도 널리 이용되어 왔다. 특히 *B. subtilis*는 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Lactobacillus* sp. 등과 더불어 미국 식품의약국 (FDA)에 의해 인체와 환경에 무해한 미생물로 간주되고 있어 안전성이 높고 환경친화적인 농산물 생산에 적합한 미생물이라고 알려졌다.¹⁹⁾ 또한 *Bacillus* 균주들은 다양한 cyclic lipopeptide를 생산하며 이러한 cyclic lipopeptide들은 크게 3 그룹 즉 iturin family, surfactin family 및 fengycin family로 나눌 수 있으며, 각각의 구조들을 그림 1과 2에 나타내었다.²⁰⁾ 또한 iturin의 작용기작은 ion-conducting pore를 형성하여 osmotic perturbation에 기반하고 있고, surfactin처럼 세포막을 파괴하거나 가용화하지는 않는다고 알려졌다.²¹⁾ Surfactin family는 cyclic lactone ring 구조를 형성하기 위하여 heptapeptide가 β -hydroxy 지방산에 연결되어 있는 구조이며,²²⁾ surfactin은 강력한 biosurfactant로 세포막의 지방층에 단단히 결합하여 membrane integrity을 방해한다고 알려졌다.²¹⁾ Fengycin family에는 fengycin A와 B (이 화합물은 또한 plipastatin으로도 불리운다)를 포함하는 데 이 화합물들은 내부에 lactone ring과 β -hydroxy 지방산 사슬을 지닌 lipodecapeptide이다. Fengycin은 iturin과 surfactin보다 덜 haemolytic하나 filamentous 진균류에는 강력한 항균력을 나타낸다고 알려져 있으며, 작용기작은 세포막의 지방층에 작용하여 세포막의 구조와 permeability에 변화를 일으키는 것으로 알려졌다.²⁵⁾ 또한 surfactin과 iturin,²³⁾ surfactin과 fengycin²⁴⁾ 및 iturin과 fengycin은²⁵⁾ 서로 synergistic하게 작용한다고 알려져 있다. Cyclic lipopeptide를 생산하는 *Bacillus* 균주 중 대표적으로 *B. subtilis*를 이용하여 개발된 미생물 제제로는 EcoGuard, Kodiak, HiStick, Serenade, Sonata 및 Taegro 등²⁶⁾이 있으며 이들은 주로 종자 처리제나 post-harvest, 야채 등의 부패 방지용으로 사용되고 있다. 특히 2,000년대 초반에 AgraQuest Co.에서 등록한 Serenade는 *Bacillus subtilis* QST713 균주를 이용하여 살균제와 항세균제로 25개국에서 등록되어 다양한 제품들이 판매되고 있으며,²⁷⁾ 연간 1억불 이상을 수출한다고 알려져 있다. 또한 *Bacillus* 균주가 생산하는 다양한 lipopeptide들의



Variants

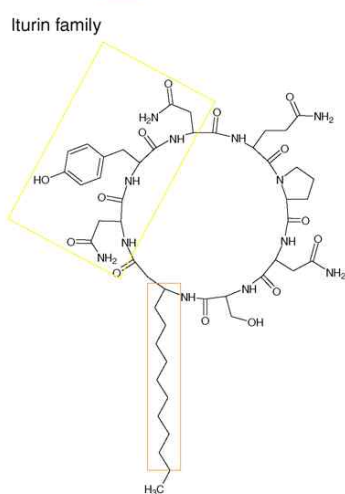
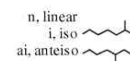
Esperin** L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu-COOH
 Lichenysin*** L-XL₁-L-XL₂-D-Leu-L-XL₄-L-Asp-D-Leu-L-XL₇
 Pumilacidin L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp-D-Leu-L-XP₇
 Surfactin L-Glu-L-XS₂-D-Leu-L-XS₄-L-Asp-D-Leu-L-XS₇

** the β-carboxyl of Asp₃ is engaged in the lactone
 *** or halobacillin
 XL₁ = Gln or Glu; XL₂ = Leu or Ile; XL₄ and XL₇ = Val or Ile;
 XP₇ = Val or Ile;
 XS₂ = Val, Leu or Ile; XS₄ = Ala, Val, Leu or Ile; XS₇ = Val, Leu or Ile

Length and branching of the acyl chain

i-C₁₃, *ai*-C₁₃, *n*-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅

i-C₁₄, *n*-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅



Bacillomycin D L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Pro-L-Glu-D-Ser-L-Thr
 Bacillomycin F L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Thr
 Bacillomycin L L-Asp-D-Tyr-D-Asn-L-Ser-L-Gln-D-Ser-L-Thr
 Bacillomycin LC* L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Ser-L-Glu-D-Ser-L-Thr
 Iturin A L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser
 Iturin A_L L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser
 Iturin C L-Asp-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser
 Mycosubtilin L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Ser-L-Asn

* or bacillopeptin

n-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅

i-C₁₆, *i*-C₁₇, *ai*-C₁₇

n-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅

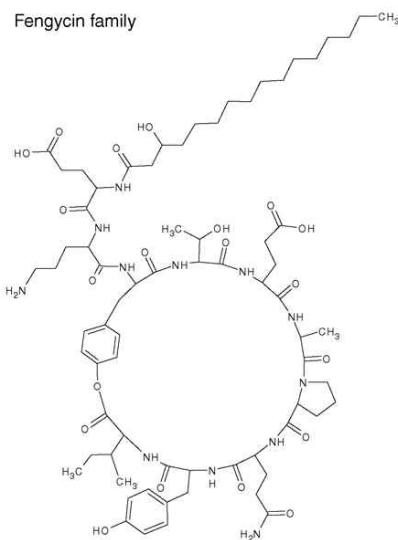
n-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅, *i*-C₁₆

n-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅

n-C₁₆, *i*-C₁₆

n-C₁₄, *i*-C₁₅, *ai*-C₁₅

n-C₁₆, *i*-C₁₆, *ai*-C₁₇



Fengycin A** L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-αThr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile
 Fengycin B** L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-αThr-L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile
 Phipastatin A L-Glu-D-Orn-L-Tyr-D-αThr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-D-Tyr-L-Ile
 Phipastatin B L-Glu-D-Orn-L-Tyr-D-αThr-L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-D-Tyr-L-Ile

** double bond between carbons 2-3, 3-4 or 13-14 were reported for some acyl chains

ai-C₁₅, *i*-C₁₆, *n*-C₁₆

ai-C₁₅, *i*-C₁₆, *n*-C₁₆, C₁₇

n-C₁₆, *ai*-C₁₇

n-C₁₆, *ai*-C₁₇

Fig. 1. Structures of representative members and diversity within the three lipopeptide families synthesized by *Bacillus* species. Boxed structural groups are those that were shown to be particularly involved in interaction with membranes and/or are supposed to be important for biological activity in addition to the cyclic nature of the molecular.

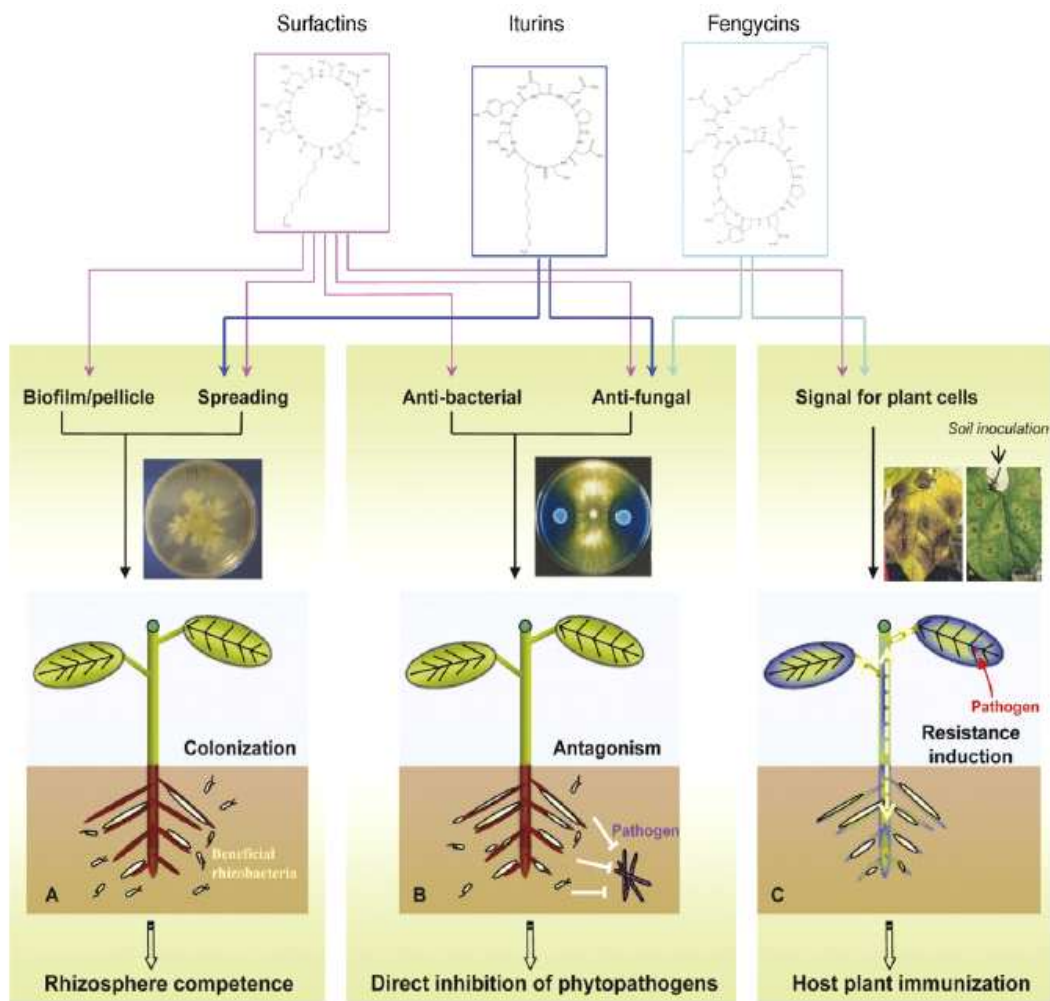


Fig. 2. Overview of *Bacillus* lipopeptide interactions in the context of biological control of plant diseases. From left to right, the three photographs show bacterial spreading, fungal growth inhibition through the production of fungitoxic compounds by blue bacterial cells and leaf disease reduction following inoculation of the beneficial bacterium on roots. They illustrate how to get experimental indications about the potential involvement of one particular strain in the three phenomena schematically represented in A, B, and C. Establishment in biofilm and/or microcolonies of the rhizobacterium is represented in A, B represents direct antibiosis that can be exerted by the established biocontrol strain toward pathogens sharing the same microenvironment. In C, the arrows illustrate the emission of a signal following perception of the rhizobacterium at the root level. This signal moves over the entire plant leading to some systemic reinforcement allowing pathogen restriction at distal sites of infections (Trends Microbiol., 16: 115-125, 2008)

적집적인 항균활성 이외에 병원균에 의한 biofilm 형성을 억제하거나 유도 전신 저항성(ISR, induced systemic resistance)이라는 식물체 내 방어 기작을 유도하여 식물병을 억제하는 데에도 기여한다고 알려졌다.^{24,28)}

이와 같이 오랫동안 미생물을 이용한 생물학적 방제제의 개발에 많은 노력을 해 왔으나 아직도 유기합성 농약에 비해 그 시장 규모도 작고, 항균 활성 또한 매우 미약한 실정이다. 그러나 점차 유기합성 농약의 사용 규제도 인해 이를 대체할 생물학적 방제제에 대한 필요성이 나날이 증대되고 있고, 또한 2000년대 후반에는 실차 그 시장 규모도 4.9억불도 확대되고 연평균 성장률도 6.5% 이상으로 증가하여 일반 농약의 10% 이상을 차지할 것으로 예측되고 있으며, 현재에도 일부의 길항 미생물들이 미생물 단독 또는 화학합성 농약과 함께 사용되고 있어 길항 작용이 뛰어난 미생물의 확보가 시급한 실정이다. 이러한 길항 미생물을 이용하는 생물농약 이외에도 pheromone 농약과 선충 농약 등과 같은 생물농약 시장도 증가 추세에 있으며 최근에는 바이러스를 이용한 생물농약 개발도 시도되고 있기 때문에 약효가 우수한 생물농약의 개발 필요성이 꾸준히 요구되고 있다.

이러한 추세에 따라 국내 도양으로부터 분리한 길항 미생물을 이용한 생물농약 소재를 개발하기 위하여 분리한 길항 미생물 중 여러 종류의 식물 병원균에 광범위하게 강한 항균력을 나타내어 미국 특허를 획득한 6종의 iturin을 생산하는 야생주 *Bacillus* 균주를 이용하여 iturin 생산능을 증가시키기 위하여 주관기관에서 선발한 iturin 고생산 자외선 돌연변이주를 이용하여 대량 배양을 통해 실용화하기 위하여 산업화 공정을 확립하고 시제품 제조와 제형화 및 포장시험을 수행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 외국의 경우

생물학적 방제 연구는 1900년 초부터 많은 종류의 세균과 곰팡이를 이용하여 식물병원균을 억제하려고 많은 노력을 기울여 왔다. 지금까지 보고된 생물학적 방제제의 대부분이 *Agrobacterium* sp, *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Streptomyces* sp. 등의 세균류와 *Gliocladium virens*, *Trichoderma* sp. 등의 곰팡이를 이용한 개발 연구들이다.

미생물에 의한 병해충 방제의 기본 개념은 병원 미생물에 유해한 생리활성물질의 생산, 병원 미생물의 군체에 기생, 병원 미생물과 영양분이나 시식 공간의 경쟁 및 미생물의 기생에 의해 숙주 식물체에 저항성을 유도하여 병원 미생물의 생존이나 활동을 억제시켜 숙주의 감염을 방지하는 데 있다.⁶⁾ 이러한 작용기작에 따른 여러 방제 사례 중 먼저 영양 군체에 기생하여 생물학적 방제에 이용한 사례로는 길항 미생물 *Bdellovibrio* 군주를 이용한 *Pseudomonas syringae* 방제, *Bacillus*, *Serratia* 등의 세균을 이용한 *Phytophthora* 난포자나 *Sclerotium*의 군핵 억제, *Gliocladium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Verticillium* 등의 사상균이 여러 종류의 병원 사상균 기관에 기생하여 생물 방제 효과를 나타낸다고 보고하고 있다 (표 1).

항생물질을 이용한 생물학적 방제도 가장 성공적인 사례로는 *Agrobacterium radiobacter*를 이용한 식물뿌리의 crown gall 예방이다.⁹⁾ 식물의 crown gall 발병은 *Agrobacterium tumefaciens* 라는 토양 세균에 의해 발생하는 과수의 뿌리병이다. 이 병의 예방에는 화학 농약은 전혀 효과가 없는 데 다행히 길항 미생물 *Agrobacterium radiobacter*가 생산하는 agrocin이라는 항생물질이 *A. tumefaciens*의 침입을 억제한다는 것이 밝혀졌고 유전공학 기법을 이용하여 개발된 *A. radiobacter*를 이용한 몇 가지 제품이 개발되었으며, 전 세계 시장에서 700억원 정도를 점유한 것으로 추정된다(제품명 : Nogall, Norbac, Galltrol). 또 다른 성공적인 연구가 진행되고 있는 분야는 *Pseudomonas fluorescens* 등을 이용한 식물질병 예방 분야이다. 특기할 만한 발전은 미국 U.S.D.A. Washington State University 연구팀에 의한 밀의 뿌리썩음병 방제 연구를 예로 들 수 있다. Weller,²⁹⁾ Weller 및 Cook,³⁰⁾ Cook,³¹⁾ Cook 등³²⁾은 10여년에 걸친 연구를 통해서 밀의 뿌리에 부착해서 생활하는 근권 미생물로서 밀의 뿌리썩음병 일으키는 곰팡이 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*에 강력한 길항작용을 나타내는 *Pseudomonas fluorescens* 군주를 토양으로부터 분리하는 데 성공하였다. 길항 미생물을 밀의 종자에 처리하여 파종하였을 경우 밀의 수확량이 10~20% 증가함을 확인하였으며, 8년에 걸친 포장실험을 통해서 밝혀진 것을 보면 어떤 때는 병 방제 효과가 좋고, 어떤 때는 방제 효과가 적으며, 지역에 따라 편차가 심한 제품 성능의 불규칙성을 나타내었다. 밀의 뿌리 썩음병 방제에 효과를 나타내는 요인으로서 *Pseudomonas*가 생산하는 phenazine계 항생물질^{14,15)}과 2,4-diacetylphloroglucinol이란 항생물질인 것으로 밝혀내고¹⁵⁾ 유전공학 기법을 도입하여 phenazine계 항생제 생산과 관련된 *Pseudomonas* sp.의 유전자 발현을 극대화하여 밀의 뿌리 썩음병 방제 효과의 불규칙성을 극복하였다.^{16,17)} 또한 철분을 포집하는 siderophore 항생물질을 생산하는 형광성

Table 1. Examples of modes of action exhibited by potential biological disease control agents.

	Antagonists	Pathogens
영양균체에 기생(Parasitism or predation of hyphae)		
세균	<i>Arthrobacter spp.</i> <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	<i>Pythium debaryanum</i> <i>Pseudomonas syringae</i>
사상균	<i>Gliocladium catenulatum</i> <i>Pythium acanthicum</i> <i>Pythium oligandrum</i> <i>Talaromyces flavus</i> <i>Trichoderma hamatum</i> <i>Trichothecium roseum</i>	<i>Fusarium spp.</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 多數 多數 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Pythium spp.</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Puccinia horiana</i> , <i>Spaerotheca fuliginea</i>
내구 생존기관에 기생(Parasitism of predation of propagules)*		
세균 또는 방선균	<i>Actinoplanes spp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Serratia marcescens</i>	<i>Phthophthora megasperma</i> <i>Sclerotium cepivorum</i> <i>Sclerotium rolfsii</i>
사상균	<i>Gliocladium spp.</i> <i>Nectria inventa</i> <i>Talaromyces flavus</i> <i>Trichoderma spp.</i> <i>Verticillium biguttatum</i>	多數 <i>Alternaria brassicae</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 多數 <i>Rhizoctonia solani</i>
항생(Antibiosis)		
세균 또는 방선균	<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Erwinia herbicola</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Streptomyces friseoviridis</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 多數 <i>Fusarium oxysporum f. sp. dianthi</i> <i>Phytophthora cactorum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Verticillium dahliae</i> <i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>
사상균	<i>Gliocladium virens</i> <i>Penicillium frequentans</i> <i>Talaromyces flavus</i> <i>Trichoderma spp.</i>	<i>Pythium ultimum</i> <i>Monilinia laxa</i> <i>Verticillium dahliae</i> <i>Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans</i>
경합(Competition)		
세균 또는 방선균	<i>Alcaligenes sp.</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. dianthi</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>F. oxysporum</i> , <i>F. oxysporum f. sp. cucumerinum</i>
사상균	<i>Fusarium oxysporum</i> (non-pathogenic) <i>Pythium nunn</i> <i>Rhizoctonia solani</i> (non-pathogenic) <i>Trichoderma harzianum</i>	<i>F. oxysporum f. sp. cucumerinum</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>F. oxysporum f. sp. melonis and vasinfectum</i>

*Pseudomonas*를 이용한 *Fusarium*균 방제와 각종 항생물질을 생산하는 *B. subtilis*, *Pseudomonas cepacia*, *Streptomyces*속의 방선균, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Talaromyces* 및 *Trichoderma* 등의 사상균을 이용한 생물학적 방제도 보고되고 있다. 또한 미국 U.S.D.A.의 연구팀은 *B. subtilis*가 생산하는 항생물질이 복숭아의 brown rot 원인균인 *Monilinia fructicola*를 억제하는 것을 발견하고 과수 지상중의 부패 방지제로 개발하기 위한 연구를 시도하였다.³³⁾ 특히 2,000년대 초반에 AgraQuest Co.에서 등록한 Serenade는 *Bacillus subtilis* QST713 균주를 이용하여 생산되며 살균제와 항세균제로 25개국에 등록되었고, 현재 용도에 따라 다양한 제품들이 판매되고 있으며,²⁷⁾ 연간 1억불 이상을 수출한다고 알려져 있다. 또한 바실리스 균주가 생산하는 lipopeptide들의 대부분이 병원성 진균류에 대해 항균 활성을 나타내나, 일부 바실리스 균주들은 *Xanthomonas campestris*와 같은 식물병원성 세균류에도 길항작용을 나타낸다고 보고하고 있다.^{34,35)} 이외에도 *Bacillus* 균주가 생산하는 다양한 lipopeptide들은 직접적인 항균활성 이외에 병원균에 의한 biofilm 형성을 억제하거나 유도전신 저항성이라는 식물체 내 방어기작을 유도하여 식물병을 억제하는 데에도 기여한다고 알려졌다.^{24,28)}

한편 *Bacillus* 균주가 생산하는 cyclic lipopeptide 항생물질인 iturin이 오래 전부터 널리 이용되어 왔으나 분자 수준에서 iturin 생합성 유전자에 대한 분자 수준에서의 연구는 거의 이루어져 있지 않다가, 2000년대에 접어들면서 일본 연구팀에 의해 야생주 *B. subtilis* RB14 균주로부터 iturin A가 보고되었고,³⁶⁾ 독일 연구팀은 *B. subtilis* ATCC 6633 균주로부터 mycosubtilin의 생합성 유전자를 보고하였다.³⁷⁾ 또한 *B. amyloliquefaciens* FEZ42 균주의 유전체와 lipopeptide 분석을 통해 이 균주가 생산하는 lipopeptide는 surfactin, bacillomycin D 및 fengycin이라고 보고하였으며,^{38,39,40)} 4'-phosphopantetheine transferase 유전자인 *sfp* 유전자가 결여되어 surfactin을 생산하지 못하는 *B. subtilis* 168 균주에 iturin A operon을 horizontal transfer시켜 *sfp* 유전자를 도입시키면 iturin 생산균주도 전환된다는 연구 결과도 보고하고 있다.⁴¹⁾ 이외에도 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946의 유전체 분석결과 이 균주가 iturin A의 nonribosomal 합성에 대한 gene cluster를 함유한다고 보고하는 등⁴²⁾ 그동안 미진하였던 이 분야 연구가 최근들어 활성화되고 있는 실정이다.

이와 같이 생물농약으로도 사용되고 있는 미생물 제제들은 종류도 다양하고 여러 가지 용도로 이용되고는 있으나 아직도 화학합성 농약에 비해 약효도 미약하고 그 시장규모도 미미한 실정이나 우리나라를 포함한 OECD 국가를 중심으로 화학합성 농약과 합성 비료의 사용량을 2013년까지 40%를 감축할 예정으로 있기 때문에 화학농약을 대체할 수 있는 유일한 대안인 생물 농약 시장도 점차 확대될 것으로 예측된다. 이러한 추세에 따라 생물학적 방제제의 단점을 극복하기 위하여 분자 수준에서 균주를 개량하거나 제제화 기술 개발을 통해 약효를 증진시키고, 생산단가를 낮추고, 제품의 저장기간을 늘려 상품화 기술을 향상시키는 데 주력하여야 할 것으로 사료된다.

2. 국내의 경우

국내에서 미생물농약에 대한 연구는 1980년대를 전후로 기초적인 연구가 시작되어 1980년

대 중반 인삼뿌리썩음병 방제연구를 시작으로 주요 작물의 모잘록병, 역병, 잣빛곰팡이병 등의 방제연구가 한국생명공학연구원, 한국화학연구원, 농업과학기술원 등의 국공립연구기관과 대학 및 산업체(동부한농, 그린바이오텍 비아이지, 고려 바이오 등)에서 수행되어 왔다. 2003년도에 국내 최초로 (주)그린바이오텍에 의해 오이 흰가루병 방제용 탐시드액상 수화제(*B. polymyxa* AC-1)와 매추줄나방 방제용 솔잎재 액상수화제(*B. thuringiensis*)등이 미생물 농약으로 등록된 이래 2012년 12월 현재 37종의 미생물 농약과 2종의 생화학농약을 포함하여 39종의 생물농약이 등록되어 시판되고 있다(표 2). 이 중 살균제 25종 가운데 19종이 국내에서 개발되었고, 6종은 수입되었으며, 살충제 13종 중 6종이 국내에서 개발되었고 7종은 수입되었으며, 등록된 제초제 1종은 수입된 제품이라고 알려졌다. 국내 천연물 농약 시장의 규모는 2012년 약 800억 원 규모를 차지하고 있고, 연간 6.2%의 성장률을 나타내고 있으며, 2016년에는 1,029억 원 규모에 도달될 것으로 전망되고 있다.⁶⁵⁾ 특히 국내에서는 21세기에 들어오면서 다른 OECD 국가와 마찬가지로 합성농약을 40% 감축하려는 진화경정책이 일환으로 2001년과 2005년에 각각 미생물 농약과 생화학농약에 대한 등록규정이 마련되면서 본격적인 상업화 연구가 진행되고 있으나, 선진국에 비해 품목 수나 기술면에서 아직은 많은 격차가 있는 실정이나 향후 이 분야에 대한 관심과 연구가 증가할 것으로 예측되고 있다.

국내에서도 2006년 국립농업과학원을 중심으로 식물의 병 저항성을 유도하는 *Bacillus vallismortis* EXTN-1 균주를 이용하여 생물농약이 개발되었는데 이 균주는 식물이 가지고 있는 자체 방어기작을 활성화시켜 식물이 자체적으로 병 저항성을 나타내고, 식물 생육 촉진 효과도 나타낸다고 보고되었다. 이 균주는 동부한농으로 기술 이전되어 2006년부터 10여종의 관련 제품을 출시하고 있으며 관련 제품의 총 매출이 연가 100억 원에 이른다고 알려져 있다.³²⁾ 또한 한국생명공학연구원에서도 다양한 식물 병원균에 저해활성을 나타내는 *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* 균주를 국내 토양으로부터 분리하고, 이 균주의 저해활성은 cyclic lipopeptide인 6종의 iturin 화합물에 의한 것임을 밝히고 국내와 미국에서 특허를 획득하였으며, 이 균주의 iturin 생산능을 증가시키기 위하여 이 균주가 생산하는 iturin 생합성 유전자를 클로닝하여 iturin 생합성에 관여하는 37,645 bp에 해당되는 열기배열을 분석하고 그 특성을 분석하였다.

이와 같이 항진균 활성을 나타내는 iturin은 이미 오래 전에 발견된 cyclic peptide이며 여러 종류의 인체 및 식물 병원균에 광범위한 항진균 활성을 나타내어 매우 흥미로운 항생물질이나 그 생합성 유전자는 2000년대 이후에 일부 *Bacillus* 균주에게서 보고되고 있는 실정이다. 또한 생물농약에 이용되는 길항 미생물 제제들은 대부분 야외 포장에서 사용 시 외기 온도, 습도, 자외선 및 기타 여러 환경요인에 따라 대부분의 활성에 커다란 차이를 나타내어 재현성을 유지하는 데 많은 문제점이 있었다. 따라서 항진균활성의 변화를 최소화하기 위하여 분자 수준에서의 균주의 개량, 전달체계의 개선 등 여러 가지 시도가 현재에도 이루어지고 있기 때문에 이러한 일련의 시도들이 성공되면 생물농약으로 이용되는 미생물 제제의 저해 활성이나 지속성 등이 많이 향상되어 유기합성 농약을 대체하는 데 많은 기여를 할 것으로 사료된다.

Table 2. List of biopesticides registered in Korea as of December 31, 2012.

연번	용도	제조 수입	취급분야	품목명	등록규격(%)
1	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스디비비1501 수화제	1×10 ⁹ cfu/g
2	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스디비비1501 입제	1×10 ⁶ cfu/g
3	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스시제어-9 액상현탁제	1×10 ⁷ cfu/ml
4	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스엠27 고상제	2×10 ⁸ cfu/g
5	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스엠비아어600 수화제	2×10 ¹¹ cfu/g
6	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스와이1336 수화제	1×10 ⁹ cfu/g
7	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스이디블유42-1 액상현탁제	1×10 ⁷ cfu/ml
8	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스제이케이케이238 액상제	5×10 ⁷ cfu/ml
9	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스지비365 수화제	3×10 ⁷ cfu/g
10	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스지비365 액상수화제	1×10 ⁷ cfu/ml
11	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스케이비401 유상현탁제	2×10 ⁷ cfu/ml
12	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스케이비401 유상현탁제	2×10 ⁷ cfu/ml
13	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스케이비시1010 수화제	1×10 ⁵ cfu/g
14	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스큐에스티713 수화제	5×10 ⁹ cfu/g
15	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스큐에스티713 액상수화제	1×10 ⁹ cfu/g
16	살균	제조	미생물	바실루스아밀로리퀴파시엔스케이비시1121 수화제	1×10 ⁶ cfu/g
17	살균	제조	미생물	바실루스아밀로리퀴파시엔스케이비시1121 수화제	1×10 ⁶ cfu/g
18	살균	수입	미생물	바실루스푸밀루스큐에스티2808 액상수화제	1×10 ⁹ cfu/g
19	살균	제조	미생물	스트렙토마이세스코시킴시스티블유와이이324 액제	1×10 ⁵ cfu/ml
20	살균	제조	미생물	스트렙토마이세스콜롬비엔시스티블유와이이20 액제	1×10 ⁴ cfu/ml
21	살균	제조	미생물	실플리실리움라멕리콜라비씨피 수화제	5×10 ⁷ cfu/g
22	살균	제조	미생물	알렙도마이세스퀴스칼리스에이큐94013 수화제	1×10 ⁷ cfu/g
23	살균	수입	미생물	트리코디마아드도비라이드에스케이티-1 수화제	1×10 ⁸ cfu/g
24	살균	제조	미생물	트리코디마하지아눔와이씨459 고상제	1×10 ⁸ cfu/g
25	살균	제조	미생물	패니바실루스폴리딕사에이시-1 액상수화제	5×10 ⁶ cfu/ml
26	살충	제조	미생물	부나크로스푸름다우마쉴케이비시3017 고상제	1×10 ⁴ cfu/g
27	살충	수입	미생물	뷰메리아바시안나지에이치에이 유상현탁제	1×10 ⁸ cfu/ml
28	살충	수입	미생물	뷰메리아바시안나티비아어-1 액상제	1×10 ⁶ cfu/ml
29	살충	수입	미생물	비디아이자와이 액상수화제	8.5 BIU/kg
30	살충	수입	미생물	비디아이자와이 입상수화제	35,000 DBMU/mg
31	살충	제조	미생물	비디아이자와이엔티423 수화제	1×10 ⁹ cfu/g
32	살충	제조	미생물	비디아이자와이엔티423 액상수화제	1×10 ⁸ cfu/ml
33	살충	제조	미생물	비디아이자와이지비413 액상수화제	1×10 ⁷ cfu/ml
34	살충	제조	미생물	비티쿠르스타키 수화제	16 BIU/kg
35	살충	수입	미생물	비티쿠르스타키 액상수화제	10%
36	살충	수입	미생물	비티쿠르스타키 입상수화제	64 BIU/kg
37	살충	수입	생화학	아자디락틴 입제	0.15 %
38	살충	제조	미생물	패실로마이세스퓨보소도세우스디비비-2032 수화제	5×10 ⁷ cfu/g
39	제초	수입	생화학	뿔라르곤산 유제	53 %

*Source: 농촌진흥청 홈페이지(http://rda.go.kr/board/board.do?catgId=menu_id=ofc&boardId=openda)

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 연구 수행 방법

국내 토양으로부터 각종 식물 병원균에 광범위한 길항작용을 나타내는 *Bacillus subtilis* 균주를 한국생명공학연구원에서 분리하고 그 특성을 조사하여, 이 균주가 6종류의 iturin A~F를 생산하는 것을 확인하고 *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079로 명명한 후 1992년에 미국 특허를 획득하였다. 그 후 이 균주를 이용하여 iturin 생합성에 관여하는 iturin 유전자를 클로닝하기 위하여 genomic library screening을 통해 30~40 kb에 해당하는 cosmid 클론을 얻은 후 iturin 생합성 유전자를 클로닝하고, 염기서열을 결정하여 iturin 생합성에 관여하는 유전자가 37,645 bp에 달한다는 것을 규명하고, 그 특성을 조사한 후 iturin 생합성 유전자에 대한 염기서열을 GenBank에 기탁하고 기탁번호 KC454625를 부여받았다. Iturin은 이미 오래 전에 보고된 cyclic peptide 항생물질이나 iturin 생합성 유전자에 대한 정보는 2,000년대에 들어 본격적으로 보고되기 시작하였고, 현재 사용되고 있는 미생물 유래 생물농약의 대부분을 *Bacillus* 균주가 차지하고 있으며,²⁰⁾ 21세기에 들어오면서 우리나라를 포함한 OECD 국가를 중심으로 화학합성 농약과 합성 비료의 사용량을 대폭적으로 감축하려는 움직임이 나타나고 있다. 이치린 화학합성 농약을 대체하고 농업 생산성을 유지할 수 있는 생물 농약의 중요성이 점점 증대되고 있는 추세에 따라 주관기관에서 보유하고 있는 6종류의 iturin을 생산하는 *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079 균주를 이용하여 iturin 생산능이 증대된 길항미생물 *Bacillus* 균주를 개발하고 산업화하기 위하여 먼저 *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079 균주를 기존에 많이 알려진 자외선 처리방법에 따라 균주 개량을 시도하였다. iturin 생산능이 증대된 돌연변이주를 여러 단계를 거쳐 선별하고, 기존에 상업적으로 사용되고 있는 시판 제품에 함유된 *Bacillus* 균주와 항균력을 비교하여 가장 우수한 항균력을 나타내는 돌연변이주를 주관기관인 한국생명공학연구원에서 선발하였다. 주관기관에서 선발한 iturin 高生産 균주인 *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 균주를 이용하여 50 ~5,000 liter까지의 대량 배양 조건을 확립하고, 시제품 제조와 제형화를 확립하고 포장시험을 수행하였으며 산업화 가능성을 다진하였다. 또한 제품의 안전성과 안정성을 확인하기 위하여 인축 독성 및 환경독성 및 경시 등 다양한 인자에 대한 자료를 확보하였다.

2. 연구내용 및 결과

가. Iturin 高生産 돌연변이주의 대량 배양공정 개발

(1). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 lab scale 최적조건 확립

최종적으로 iturin 돌연변이주로 선발된 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 변이주의 최적 배양 조건을 확립하기 위하여 기존에 검토된 복합배지 (sucrose 30 g, soybean meal 20 g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 5 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 50 mg per liter)와 (주)그린바이오텍에서 개발된 산업화 배지 중 *Bacillus* spp.에 대체적으로 양호한 생산능력을 가지는 GB-BS 배지 및 Davis minimal medium [Glucose 0.5%, K_2HPO_4 0.7%, KH_2PO_4 0.2%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%]을 기본 배지로 하여 carbon sources(glucose, fructose, mannose, maltose, lactose, soluble starch, pectin, xylose, galactose, glycerol, cellulose), inorganic nitrogen sources [NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$, KNO_3 , $(NH_4)HPO_4$, NH_4CO_3 , $NaNO_2$, $NaNO_3$, NH_4NO_3], organic nitrogen sources(yeast extract, tryptone, malt extract, beef extract, peptone, urea, soytone, soybean meal), inorganic salts(Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , $NH_4H_2PO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $NaCl$, KCl , $CaCO_3$, $ZnSO_4$)을 달리하여 최적 배지 후보군을 선정하였으며 (탄소원으로는 glucose, sucrose, soluble starch 등이 우수하였고, 유기 질소원으로는 전반적으로 모두 우수하였으며, 기타 인자로는 K_2HPO_4 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 등이 첨가되었을 경우 우수한 생산능력을 나타내었다), 최적 배지 선정 시 경제성과 배양 수율, 경시 안정성 등을 고려하여 구성된 조성물을 검토하였다⁴³⁾ (표 3).

Table 3. No. 54 변이주의 배지별 영양세포 및 spore 형성 비교

구분	복합배지	GB-BS 배지	Davis 변형 배지
영양 세포수 (CFU/ml)	2.3E+09	4.4E+09	1.7E+09
포자수 (CFU/ml)	>>1.00E+08	>>1.00E+08	>>1.00E+08
<i>F. oxysporum</i> 에 대한 inhibition zone(mm)	16.12	15.98	12.87

그 결과 세 가지 배지 모두 양호한 결과를 나타내었으며, 특히 경제성이나 산업성을 고려하였을 경우 GB-BS 배지를 최적 생산배지로 선정하였다. 이상의 배지를 기초로 기타 환경 인자들의 비교 배양실험을 5 liter jar fermenter를 이용하여 온도별 (20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C), pH별 (pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8) 조건을 확인하였으며, aeration, 내부 압력

조질 등 세부 배양 공정을 확립하였다. Lab scale(5 liter-jar fermenter)상에서 배양 최적 환경인자 별로 조사 한 결과, pH 5.0~8.0 범위에서 생육이 일어났으며 강산성 및 강알칼리 상에서는 cell growth가 거의 일어나지 않았다. 온도는 저온과 고온에서 미약하게 자랐으나 30℃에서 가장 안정적인 생산력을 보였다. 초기 접종농도는 1~5% 모두 우수한 결과를 나타내었으나 경제성을 고려하여 2%의 접종 농도로 설정하여 진행하였다(그림 3). 선정된 최적배지와 환경 인자를 이용하여 5 liter jar fermenter상에서 No.54 변이주의 시간대 별 생육을 확인하였고, culture profile을 작성하기 위하여 배양 중 일정 (2시간 간격) 시간마다 pH, DO, 미생물 총수 및 포자수를 지속적으로 확인하였으며, 시간대 별 샘플의 상등액 내 iturin의 생산량은 *F. oxysporum*의 생육 지지환 (mm)의 크기로 iturin의 생산량을 추정하였다.

Lab scale(5 liter-jar fermenter)상의 culture profile을 작성한 결과 (그림 4), 배양 시작 후 약 1시간 이후부터 증식이 이루어지기 시작하였다. 약 6~16시간 사이에 급속한 증가를 이루었으며 최대 증식기의 총 균수는 2.1×10^9 CFU/ml 수준으로 나타났다. pH의 경우 접종 후 약 6시간까지 떨어지는 경향을 나타내었지만, 6시간 이후부터는 증가하여 pH 7.00~7.20 사이에서 계속 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 포자의 경우 약 60시간 이후에 조금 형성되기 시작하였으며, 약 72시간 이후에 80% 이상 포자를 형성하였으나 시간이 경과하여도 모든 영양세포들이 자로 전환되지는 않았다 (그림 5). 이를 개선하기 위하여 배지의 조건이나 배양 조건을 조정하였으며 추후 iturin 高生産 변이균주를 확보할 경우 최적조건 확립에 적용할 예정이다.

(2). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krieciensis* BSM 54의 pilot scale 최적조건 확립

Pilot scale에서 생산조건 및 parameter를 설정하기 위하여 50 liter (그림 6, 표 4) 및 500 liter fermenter (그림 7, 표 3)를 활용하여 조사하였다. 조사 인자로는 전반적인 배양 상태, 오염 세균, pH, DO 및 미생물 총수 및 포자 수를 지속적으로 조사하였고, 각 시간대별 시료를 대상으로 상등액 내 iturin의 생산량 [*F. oxysporum*의 생육 지지환(mm)의 크기로 iturin의 생산량을 추정]을 확인하였다.

Pilot scale에서 flask culture한 배양액을 seed로 사용하여 배양을 실시하였고, 각 시간별 배양액의 성장수준은 그림 7과 8에 나타내었다. 배양 시작 후 약 18시간까지 균체량이 급격히 증가하였고, 이후 정지기에 접어들었으나 포자 형성시간은 5 liter fermenter 보다 감소하였으나, 산업화하기에는 적합하지 못하여 포자 형성 유도제나 다른 인자를 대상으로 해결책을 모색 중에 있다.

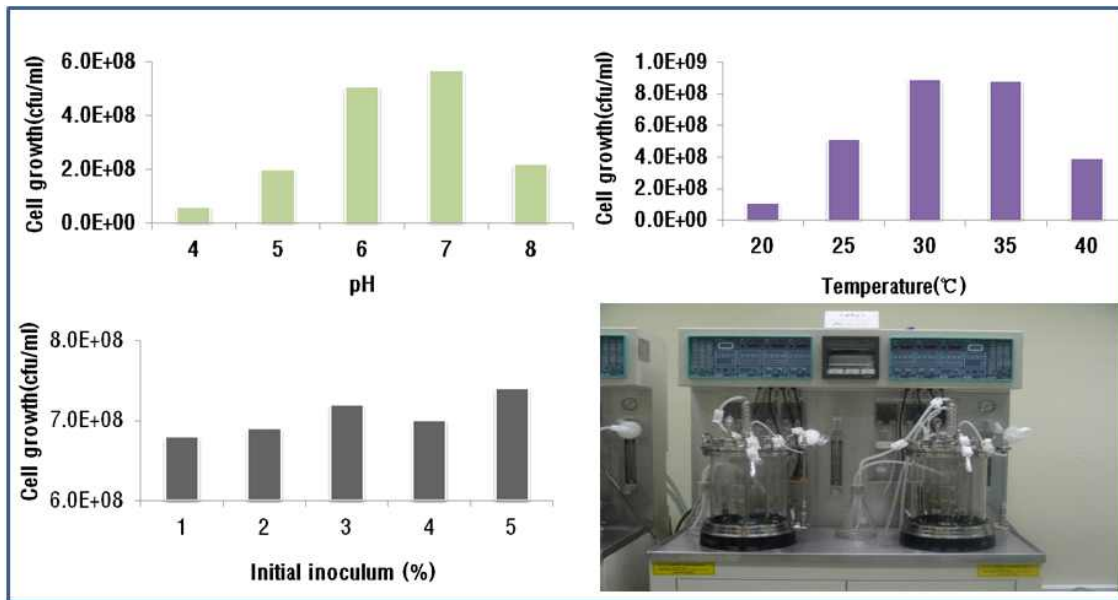


Fig. 3. *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* BSM54의 배양 최적 환경인자 결과

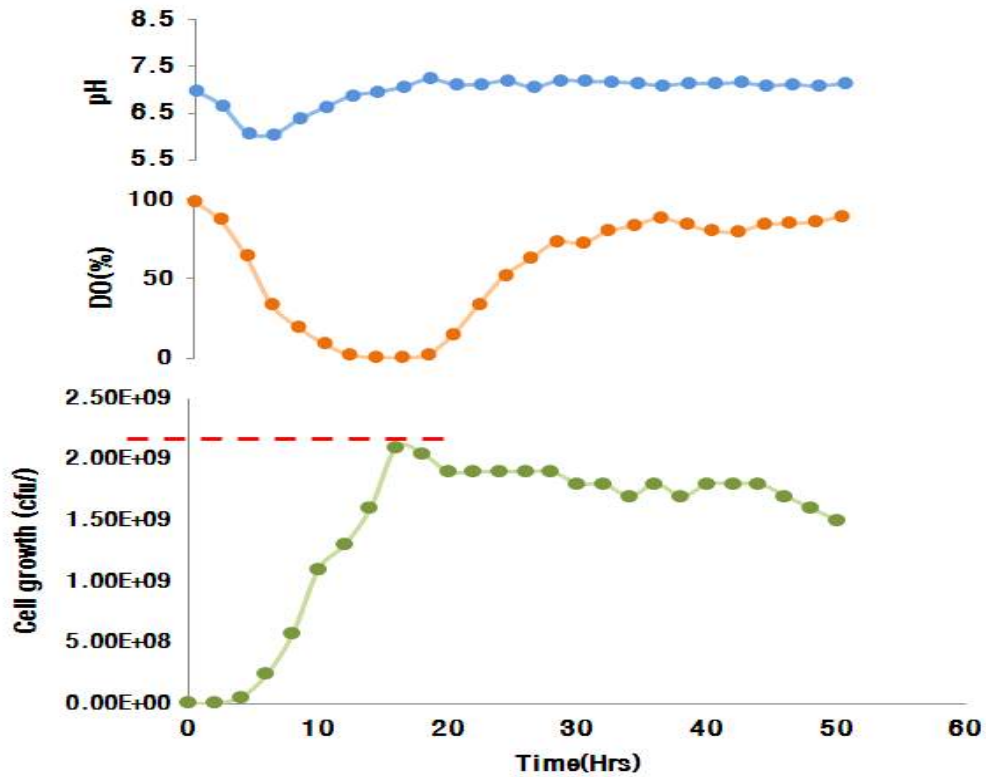


Fig. 4. 5 liter-jar fermenter 상의 *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* BSM54의 생육 patterns

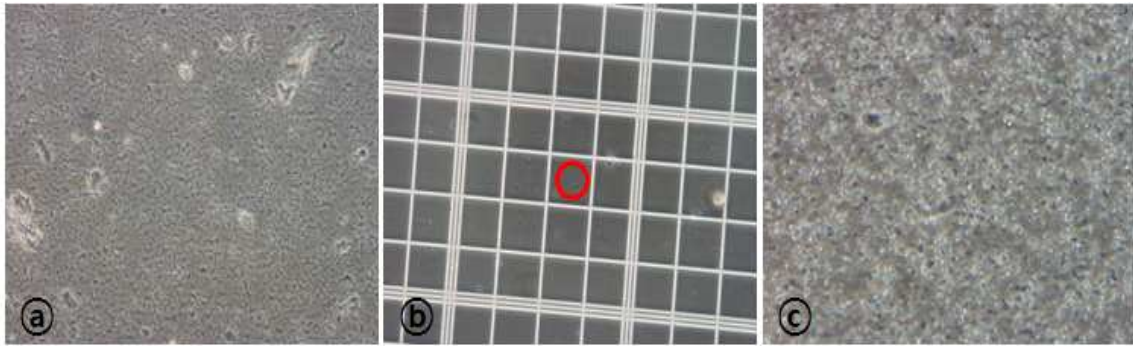


Fig. 5. *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* BSM54의 현미경 사진
 (a): 영양세포, (b) 포자 및 영양세포 크기, (c) 배양종료 후 포자.

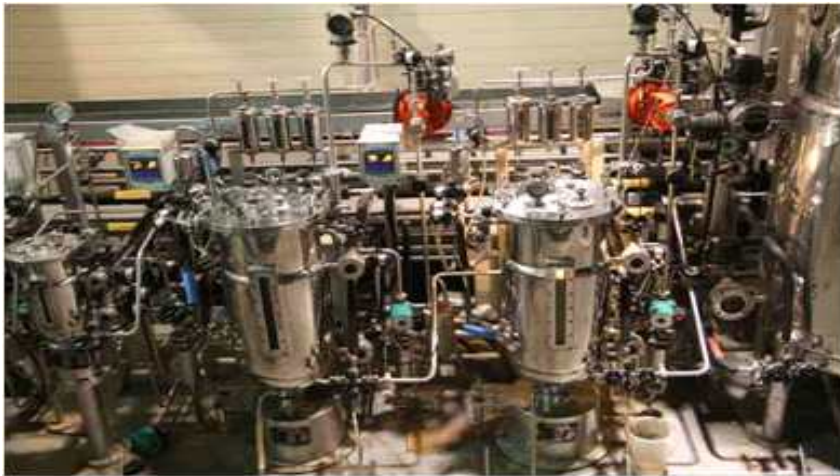


Fig. 6. Photograph of 50 liter pilot scale fermenter used in the study

Table 4. *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* BSM54의 working volume 40 liter의 배양조건

항 목	배양 조건
온도	30℃
Aeration	0.4 - 0.7 vvm
Agitation	100 - 200 rpm
Initial pH	7.0±0.5
내부 압력	0.5 - 0.7 kgf/cm ²
Antifoamer	0.1% silicone oil
pH, 온도 조절	없음
접종농도	2%

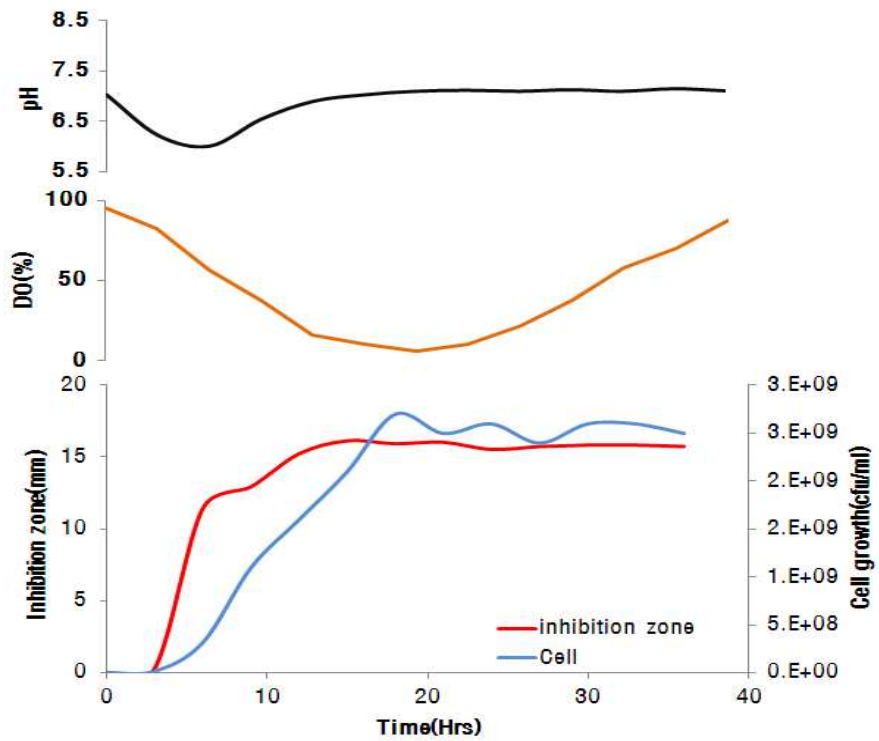


Fig. 7. 50 liter pilot scale fermenter상에서 *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* BSM54의 생육 patterns

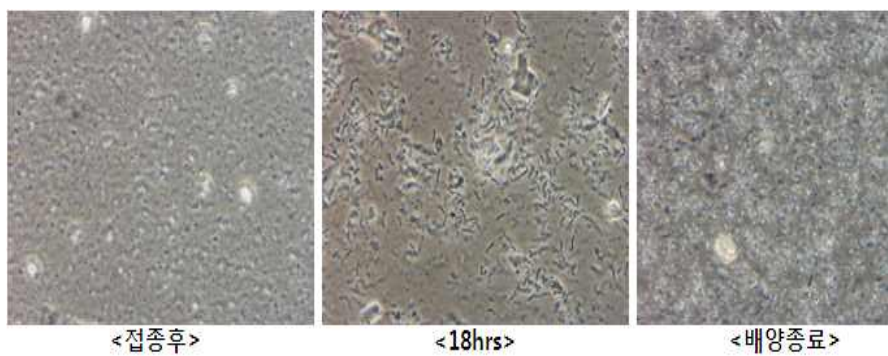


Fig. 8. 50 liter pilot scale fermenter상의 *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* BSM54의 현미경 사진



Fig. 9. 500 liter pilot scale fermenter used in the study

Table 5. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 working volume 300 liter 배양조건

항 목	배양 조건
온도	30°C
Aeration	0,5 vvm
Agitation	120 rpm
Initial pH	7,0±0,5
내부 압력	0,5 kgf/cm ²
Antifoamer	0,1% silicone oil
pH, 온도 조절	없음
접종농도	2%

500 liter fermenter의 경우 50 liter fermenter에서 seed를 배양하여 접종 시 500 liter working volume의 2%를 접종하여 실시하였다. 배양 시작 후 총 균수가 증가하기 시작하여 약 16 시간에 최고 균수에 도달하였으며 이후 큰 변화 없이 포자 형성기에 돌입하는 것으로 나타났다. 산각 플라스크와 lab scale 및 50 liter fermenter에서 생산하는 것보다는 높은 총 균수를 보였으며 (5.5×10^9 CFU/ml), 포자 형성시간 또한 많이 단축된 것을 알 수 있었으나 모든 영양세포가 앞의 결과와 동일하게 포자로 전환되지는 않았다 (그림 10, 11).

(3). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 plant scale 최적조건 확립

Plant scale에서의 culture profile 및 생산 공정 최적화 시험을 토대로 실제 상업화 모델인 plant scale에서의 생산 조건 검토 및 parameter 설정 시험을 실시하였다. 시험용 5,000 liter fermenter는 실제 미생물 농약을 생산하는 설비를 이용하였으며, 배지 조성 및 생산 공정은 pilot scale에서 조성한 조건을 이용하였다. Culture profile을 작성하기 위하여 일정 시간마다 pH, DO, 미생물 총수 및 포자수를 지속적으로 확인하였고, 상등액 내 iturin의 생산량도 확인 하였다[F. oxysporum의 생육 지지환(mm)의 크기로 iturin의 생산량을 추정] (그림 12, 표 6).

Plant scale 에서의 생산 결과에 따라 culture profile을 작성하였다. Seed는 500 liter fermenter에서 배양하여 접종하였으며 접종 후 균이 증가하기 시작하여 약 16시간 경과 후 가장 높은 증가율을 나타내었다 (3.7×10^9 CFU/ml). 또한 문제시되던 포자 형성량의 경우 공정의 단계가 올라갈수록 점점 개선되어 생성된 영양세포 전량이 전환하지는 않으나 약 90% 이상이 형성하는 것을 확인하였다. 좀 더 수율을 올리기 위한 방안은 현재 모색 중에 있으며, 추후 확보될 iturin 高生産 변이주의 산업적 대량 생산 조건 확립에 활용할 수 있을 것으로 사료된다. pH는 초반에 7.05에서 6.01까지 감소하나 6시간 이후부터 증가하여 pH 7.0~7.2 사이의 값을 유지하는 것을 확인하였다. DO의 경우도 총 균수가 늘어남에 따라 급격히 소비량이 증가하였으나 이후 균체량이 감소함에 따라 배양종료시점까지 일정 수준으로 유지되는 것을 나타내었다. 이상의 확보된 profile 자료를 토대로 산업적 대량 생산 공정을 설계하였다 (그림 13). 이상의 생산배지 및 생산 공정은 폐사에서 실제 제품을 생산하는 시스템과 유사하게 설계되었기 때문에 생산 비용적인 면 등 개발비는 경제적으로 생산 가능하리라 사료된다. 그리고 제형화 또한 소비자의 부담을 감안하여 경제성과 약효 안정성에 초점을 두어 연구를 진행할 예정이다.

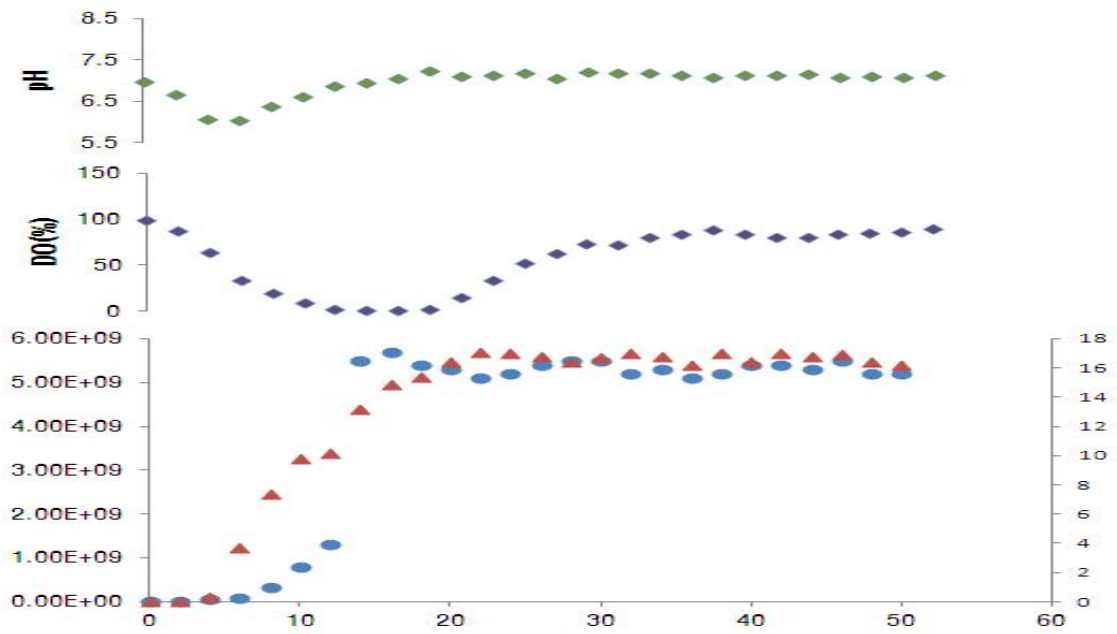


Fig. 10. 500 liter pilot scale fermenter상에서 *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* BSM54의 생육 patterns

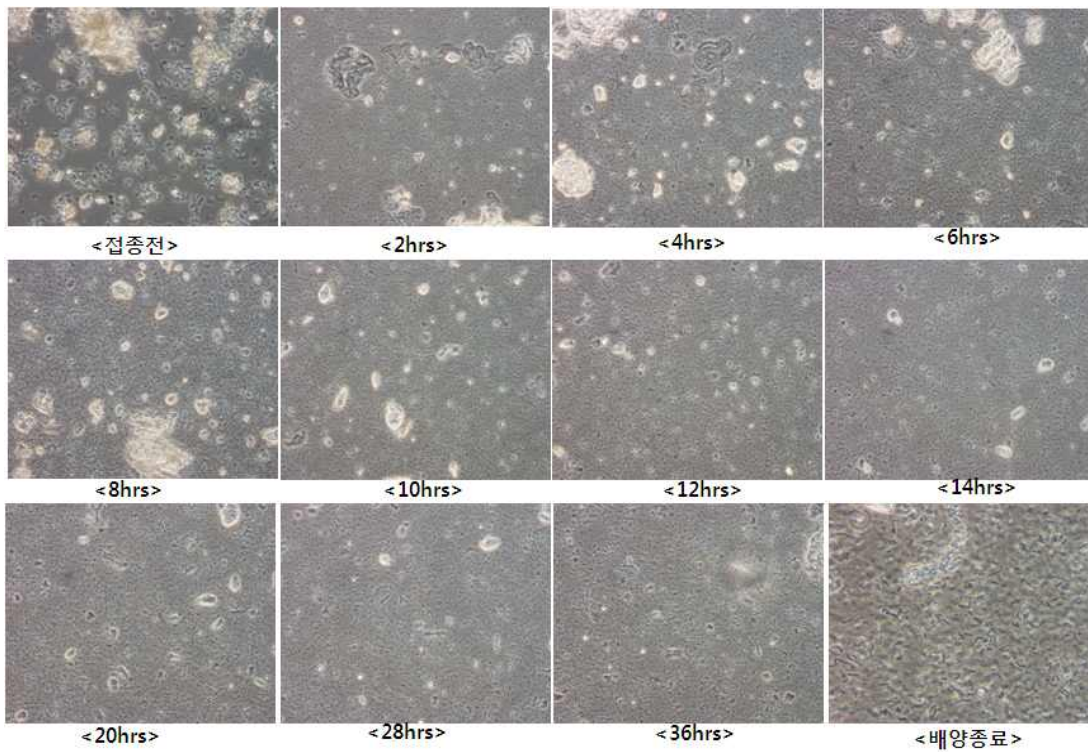


Fig. 11. 500 liter pilot scale fermenter상에서 배양한 *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* BSM54의 현미경 사진



Fig. 12. 5,000 liter plant scale fermenter used in the study

Table 6. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 working volume 3,500 liter 배양 조건

항 목	배양 조건
온도	30℃
Aeration	0.5 vvm
Agitation	50 rpm
Initial pH	7.0±0.5
내부 압력	0.5 kgf/cm ²
Antifoamer	0.1% silicone oil
pH, 온도 조절	없음
접종농도	2%

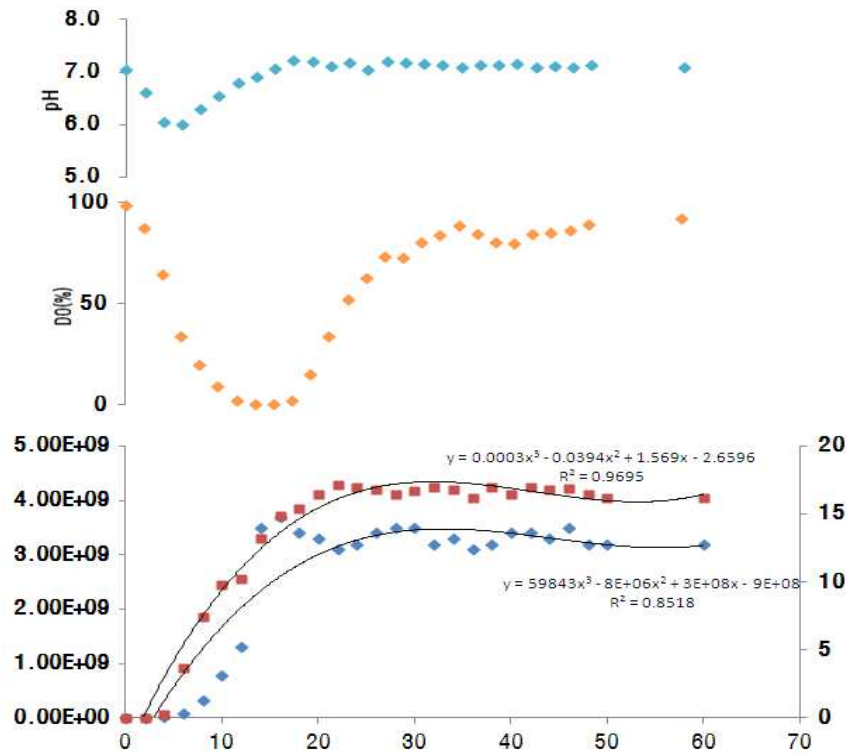


Fig. 13. 5,000 liter plant scale fermenter상에서 *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* BSM54의 생육 patterns

(4). Iturin 高生産 獨연변이주 *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* BSM54의 공정평가 및 절감

Step 1. Agar plate 배양 : Glycerol stock에서 LB plate로 접종. 24시간 이내 30℃ 인큐베이터에서 배양한 후 single colony를 확인하였다.

Step 2. 1st Seed culture (250 ml-△flask/working volume 50 ml)

- A. Medium : LB broth
- B. Cultivation temp. : 30℃
- C. Cultivation time : 12 hrs
- D. RPM : 150 rpm

* Autoclave(121℃, 15min), (step 1)의 agar plate에서 1-2콜로니 접종.

Step 3. 2nd Seed culture (2 ea × 3,000 ml-△flask/working volume 1,000 ml)

- A. Medium : LB broth
- B. Cultivation temp. : 30°C
- C. Cultivation time : 12 hrs
- D. RPM : 150 rpm

* Autoclave(121°C, 15 min), Seeding volume : 2%

Step 4. Main culture (working volume 40 ℓ /50 ℓ -Fermentor)

- A. Medium : GB-BS Broth
- B. Cultivation temp. : 30°C(± 0.5)
- C. Cultivation time : 20 hrs
- D. RPM : 150 rpm
- E. Pressure : 0.5 Kg/cm²
- F. Air : 0.5 vvm

*Autoclave(121°C, 20 min), Seeding volume : 2%

Step 5. Main culture (working volume 300 ℓ /500 ℓ -Fermenter)

- A. Medium : GB-BS Broth
- B. Cultivation temp. : 30°C(± 0.5)
- C. Cultivation time : 20 hrs
- D. RPM : 120 rpm
- E. Pressure : 0.5 Kg/cm²
- F. Air : 0.5 vvm

*Autoclave(121°C, 20 min), Seeding volume : 2%

Step 6. Main culture (working volume 3 ton/5 ton-Fermenter)

- A. Medium : GB-BS Broth
- B. Cultivation temp. : 30°C(± 0.5)
- C. Cultivation time : 36-40 hrs
- D. RPM : 60 rpm
- E. Pressure : 0.5 Kg/cm²
- F. Air : 0.5vvm

*Autoclave(121°C, 20min), Seeding volume : 2.5%

(5). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 생산수율 개선

Plant scale 까지의 배양 공정을 수행한 결과, 목표로 하는 균수에는(1.0×10^9 CFU/ml 이상) 도달하였으나 배양시간의 장기화 문제(spore 형성 시간의 장기화) 등의 문제점이 노출되었다. 이를 보완하기 위하여 기존 설계된 제조 공정도를 조정하였으며 생산 원가 절감 및 효율적인 공정을 위하여 각 공정을 아래와 같이 개선하였다⁴⁴⁾ (표 7).

Table 7. 수율 증진을 위한 배양조건의 개선사항

공정 명	개선 내역
Step 1. Agar plate 배양	
Step 2. 1st Seed culture	미조정
Step 3. 2nd Seed culture	미조정
Step 4. Main culture (40/50 L)	- 생산배지: GB-BS Broth - 배양시간 조정 : 20hrs - Seed접종량: 2%유지 - 기타인자 미조정
Step 5. Main culture (300/500 L)	- 생산배지: GB-BS Broth - 배양시간 조정 : 24hrs->20hrs - Seed접종량: 2%유지 - 기타인자 미조정
Step 6. Main culture (3,500/5,000 L)	- 생산배지: GB-BS Broth->GB-BS Broth-1* - Seed접종량: 2% -> 2.5% - 배양시간 조정 : 40hrs->32hrs - RPM 조정 : 50->65 (DO량 높임) - 기타인자 미조정

* GB-BS roth-1: GB-BS broth의 배지원 종류는 고정, 그 함량의 변화를 줌.

개선한 공정에 따라 pilot, plant scale cultivation을 실시한 결과 미생물의 생육이 증대되었 으며 sporulation의 시간 또한 많이 단축되었다 (그림 14).

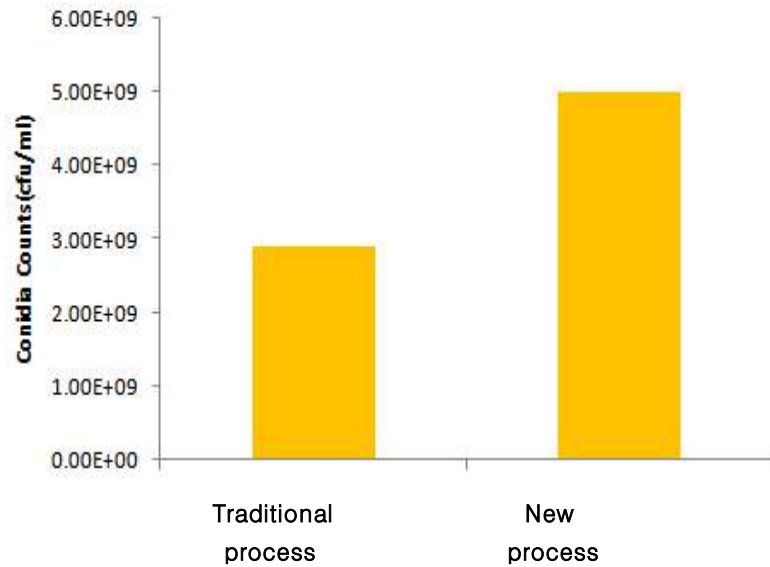


Fig. 14. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 개선된 공정에 따른 포자 형성을 비교

(6). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54의 시제품 개발

Plant scale까지 확립한 Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 대량 배양공정을 기반으로 생산한 배양액을 대상으로 액상제(AS, 미생물 배양원액을 추가적인 제조단계를 거치지 않고 물에 희석하여 사용하거나 배양된 미생물을 액상으로 제제화하여 물에 희석하여 사용하는 제품) 혹은 액상 현탁제(SM, 배양원액 또는 배양된 미생물을 물과 혼합하여 액상으로 제제화한 것으로 물에 희석하여 사용하는 제품)로 하여 제품화 할 경우, 배양 종료 후에 배양액을 바로 포장하면 gas 발생 및 제품 경시의 단기화 등 많은 문제점이 있어 이를 개선할 배양 후 공정을 확립하였다⁴⁵⁾.

(가). pH 조정

Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 균주를 5 ton 배양 후에는 배양물에 외부 미생물로부터 오염이 될 위험성이 높기 때문에 배양 종료 (안정적으로 spore 형성 유·부 확인 후 종료) 직후 배양기 내에서 pH를 적정한 상태로 조정하였다.

(나). 보존제 처리

친환경 유기농자재의 경우 배양 후 대부분의 화학 약제를 첨가할 수 없기 때문에 유기농자재에 사용할 수 있는 원료를 사용하여 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 대량 배양액의 약효의 증진과 제분의 이화학적 성분 적합성, 경시 안정성 등 여러 가지 시너지 효과를 발생시킬 수 있는 보존제로 처리하였다.

(다). 생산 시제품의 적적할 QC 방법 모색

①. 생균수 측정

- 연속희석법(serial dilution)을 이용하여 원하는 농도까지 제분을 희석하였다.
- 희석한 제분을 LB agar에 적량 도달한 후 Incubator (30℃)에서 1~2일 배양 후 colony를 계수하였다.

②. 물리성 측정

- 배양 종료 후 수거한 배양액을 적량 희석하여 입도, 수화성 등을 조사하였다.

③. 보존성 test

- 보존성을 실험할 시료는 30, 40℃에서 보관하여 1, 3, 6, 10, 15주에 pH, 형태적 이상 유무, 총 균수, 항균활성 등을 검사하였다 (표 8).

Table 8. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 QC 검사 기준

검사 내역	기준	합격 판단
외관	색깔, 냄새, 정상	황갈색, 특유의 발효취, 외관상 이상 없음
균수	CFU/ml	기준 보증균수의 10 배수 이상 균수가 나와야 함(경시 감안)
유해 미생물(5종)	검출 유·무	선택 배지상 불검출 (한 종이라도 검출 시 폐기)
활성	Antifungal activity	병원성 곰팡이에 대한 대칭 배양 결과 유의한 활성을 나타내야 함.
이화학적성	분말도, 수화성	물에 희석 시 잘 희석되어야 하며 엉기거나 침전되면 안됨.

이상의 iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 배양액을 처리한 시제품을 액상제(AS) 또는 액상 현탁제(SM)로 하여 실제 병 발생 포장에서 약효·약해를 평가하고, 사용 메뉴얼을 개발하였다. 또한 개발 제분의 산업성을 평가한 후 사업성이 있는 것으로 판단될 경우 다양한 제형의 제품화를 할 것이며, 친환경유기농업자재 북북공시에 등재 또는 천연식물 보호제(구, 미생물농약)에 등록하여, 산업화 할 예정이다(그림 15).

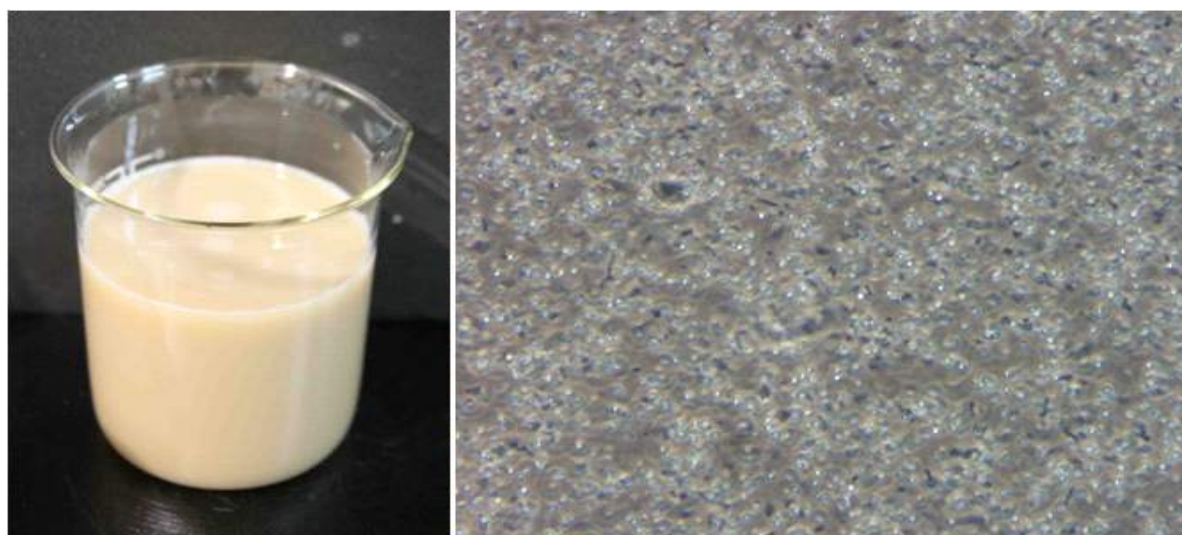


Fig. 15. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 배양액(좌)과 형성된 포자 사진 (우)

나. Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 시제품의 제형화 공정 확립

(1). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54의 제형 다변화의 필요성

미생물 제제는 대상 병해의 특성, 재배 기간 동안의 강수량·기온·습도, 재배 규모 등 다양한 재배 환경에 따라 적용 방법을 다르게 해야 할 필요가 있다^{46,47)}. 이에 따라 미생물 제제의 제형도 액상 수화제(suspension concentrate), 수화제(wettable powder), 과립수화제(water dispersible granule), 입제(granule) 등 다양한 형태로 제조된다. 본 연구 과제에서는 미생물 제제의 산업화를 평가하기 위하여 경제성 및 안정성을 우선으로 하여 1차적으로 액상제 (AS, 미생물 배양원액을 추가적인 제조 단계를 거치지 않고 불에 희석하여 사용하거나 배양된 미생물을 액상으로 제제화하여 불에

희석하여 사용하는 제형) 혹은 액상 현탁제(SM, 배양원액 또는 배양된 미생물을 물과 혼합하여 액상으로 제제화한 것으로 불에 희석하여 사용하는 제형) 제형을 대상으로 앞서 iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 시제품으로 평가하였으며, 추후 연구 개발되어질 수화제 (WP, 분상으로서 물에 희석하였을 때 수화되는 제형), 입제 (GR, 입상으로서 원상태로 사용되는 제형), 입상 수화제 (WG, 과립상으로서 물에 희석하여 사용되는 제형) 또는 고상제 (GM, 미생물 배양액을 고상의 물질에 혼합하거나 흡착시킨 제제로 분제, 입제 및 수화제에 해당되지 않는 제형)를 경제성, 안정성 및 편이성 등을 고려하여 다른 제형의 상품화 가능성의 초적으로 사용할 자료를 확보할 계획이다. 우선 액상제와 함께 현재 소비자들이 가장 많이 이용하는 수화제 (WP) 제형을 제조하기 위하여 최적 조건을 확립하였다.

(2). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 수화제(WP) 제형 제조를 위한 건조 공정의 확립

건조 공정은 액상 배양을 통해 제조된 미생물 배양액을 담체를 이용하여 분말 형태로 제작하는 과정으로 제형 다변화의 첫 단계라 할 수 있다. 본 연구 과제에서는 미생물 제제에 일반적으로 이용하는 건조 공정 중 동결건조법과 분무건조법 (spray-drying), 열풍건조법 (convection oven)을 적용하였다. 본 연구 과제에서 적용한 동결건조법은 진공 동결건조법으로 액상 시료나 다량의 수분을 함유한 재료를 동결시키고, 감압함으로써 얼음을 승화시켜 수분을 제거하여 건조물을 얻는 방법이다. 조각이 저온에서 이루어지므로 열에 약한 물질의 건조법으로 유용하다. 분무건조법은 액상의 원료를 분무, 비립화하여 열풍기류에 접촉시키면 순간적으로 증발, 건조되어 일기에 분립상 제품을 얻을 수 있는 공정이다. 열풍건조법은 일반 oven에서 열을 가해 수분을 증발시키는 원리로 생산 단가 면에서는 가장 저렴하나 열에 불안정한 제형이나 특성을 가진 제형의 경우에는 부적합한 방법이다⁴⁸⁾ (그림 16).



Fig. 16. 건조제형 제조방법 [동결건조기(좌), 분무건조기(중앙), 열풍건조기(우)]

(가). 건조 방법의 결정

Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 액상 대량생산 공정 후 생산된 배양물을 대상으로 제형화를 위한 건조 방법을 조사하였다. 배양 직후 액상 상태에서 제품의 포자수는 안정적인 경향을 나타내었으나, 경시에서는 조금 보완이 필요하여 앞서 배양 종료 후 1차 처리방법과 2차 최적의 보존제 처리에 따라 안정적인 경시를 나타내는 시료를 확보하였다. 그러나 사용현상에서의 편리성, 운반비의 경제성, 약효의 증가 등 여러 문제점을 보완하기 위하여, 적합한 제형화를 진행하고자 하였고, 이를 해결하고자 건조 부재를 이용한 건조를 통한 수화제 형태의 제형화 공정 탐색을 실시하였다. 건조 방법은 동결건조, 분무건조 및 열풍건조의 3가지 방식으로 선정하였으며 유동층 건조법 및 기타 건조 방법은 단가 및 설비 등의 문제로 시험을 실시하지 않았다 (그림 16).

Table 9. 제형화 방법별 장단점 비교

	Freeze dryer(F/D)	Spray dryer(S/D)	Convection oven(C/O)
장점	○ 높은 포자 안정성 ○ 고온 stress 없음	○ 생산단가 비교적 저렴 ○ 높은 이화학적 ○ 대량 생산 가능	○ 단가가 매우 저렴한 ○ 초기 비용이 적게 소요
단점	○ 높은 생산단가 ○ 제조 시간 증가	○ 포자 안정성 낮음 (고온 스트레스)	○ 포자 안정성 낮음 (건조 스트레스) ○ 오염 위험성 높음

표 9에는 각 제형화 방법별 장단점을 비교하였는데, 동결건조법의 경우 포자 경시보존성이나 안정성이 가장 높으나, 생산 단가가 높고 생산하는데 소요되는 시간이 길어서 대량 생산 시 부담이 간다는 단점이 있다. 반면 분무건조 및 송풍건조의 경우 단가가 동결건조에 비해 저렴하지만 온도 및 건조로 인해 포자 안정성이 낮아지는 단점이 있다. 본 시험에서는 위 3가지 방법을 이용하여 건조 시료를 제조한 후 이화학적 및 균수 및 경시 안정성 등을 확인하였다 (그림 17).

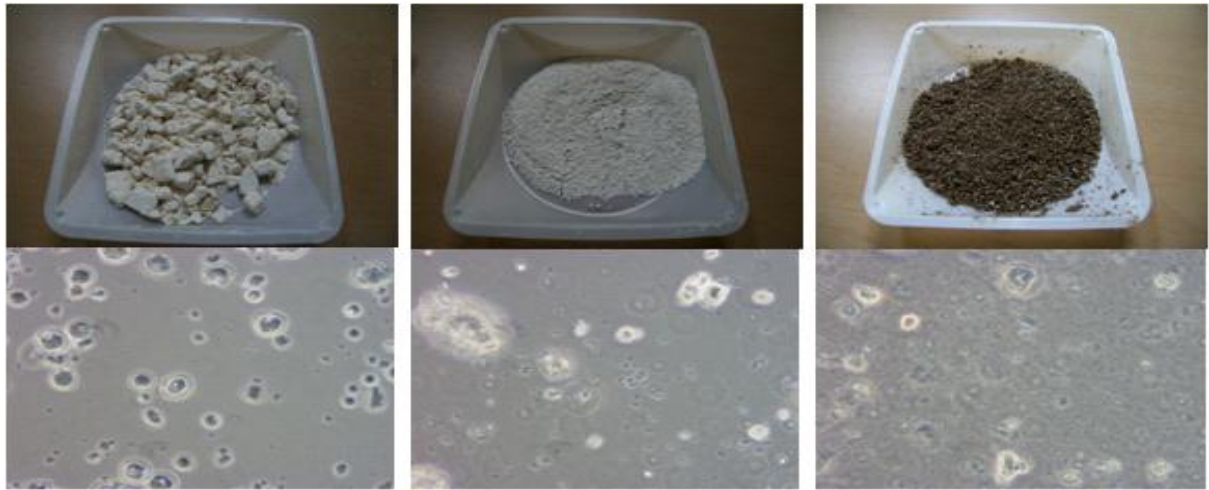


Fig. 17. 건조에 따른 제형별 성장 [동결건조(좌), 분무건조, 송풍건조(우)]

먼저 기본적으로 가장 많이 사용되는 건조 부재를 이용하여 3가지 방법별로 각각 *iturin* 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krichtiensis* BSM 54의 배양액을 혼합시킨 후 건조를 실시하였다. 동결건조의 경우 보조제 20%를 건조 부재로 선정하여 배양액에 혼합 후 1일간 동결한 후 자사에서 일반적으로 사용하는 동결건조 방법을 사용하여 동결건조를 실시하였다. 분무건조의 경우 보조제에 혼합시킨 후 유기물을 포자 안정화제로 첨가하여 자사에서 *Bacillus* sp. 종류의 종균제 제조시 사용하는 분무건조기 조건으로 분무건조를 실시하였다. 열풍건조의 경우 보조제에 혼합시킨 후 50℃ 열풍으로 2일간 건조하여 제조하였다. 각 건조 방법에 따른 시료의 성상은 그림 17에 나타내었다. 제형화 후 포자수를 측정한 결과 초기 액상에 비해 모든 구에서 다소 낮은 포자수가 나타났으며, 특히 열풍건조 제형의 경우 기준 포자수에 크게 미치지 못하는 경향을 나타내었다 (표 10).

Table 10. 건조방법 별 iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54의 포자 생존율 및 이화학적

시험구 명	건조 방법 별 <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54 제형화 결과		
	포자 생존률	이화학적	경시변화
동결 건조	80% 이상	상	상
열풍 건조	30%	하	하
분무 건조	60%	상	중

(나). 건조 부재 선정 시험

기 검토한 건조 방법에 따라 시험 시료를 제조하였으나 모든 시험구에서 원하는 수준의 포자 안정성 및 이화학적 성상 등의 결과를 얻지 못하였다. 이를 보완하고자 각 제형별 최적 건조부재를 탐색하기 위한 시험을 실시하였다.

①. 열풍 건조 부재 선정

열풍건조 제형에 대한 부재 탐색 시험을 실시하였다 (표 11). 담체로는 기존과 마찬가지로 V를 사용하였으며 다양한 부재를 첨가하여 건조 후 포자수를 유지하도록 유도하였다. 시험 결과 부재로 M6을 투입한 구에서 가장 높은 포자수가 나타났으나 모든 구에서 제품화 기준인 1.0E+09 CFU/g 이하로 나타나 실효성이 없을 것으로 판단되었다.

Table 11. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 열풍건조 건조 부재 시험 및 건조 후 포자 안정성 시험

	배 합 비	건조 후 균수(CFU/g)
대조	Cultured Broth	6.8E+09 (건조 전)
1	Cultured Broth 1L + V 1kg	1.0E+06이하
2	Cultured Broth 1L + V 1kg + M1 100g	5.4E+06
3	Cultured Broth 1L + V 1kg + M2 100g	1.0E+06이하
4	Cultured Broth 1L + V 1kg + M3 100g	1.4E+07
5	Cultured Broth 1L + V 1kg + M4 100g	1.0E+06이하
6	Cultured Broth 1L + V 1kg + M5 100g	5.1E+07
7	Cultured Broth 1L + V 1kg + M6 100g	8.0E+07

②. 분무건조 부재 선정

분무건조 제형의 건조 부재 탐색 시험을 진행하였다 (표 12). 열풍건조 제형에서 비교적 양호한 포자 안정성을 보인 원제를 이용하여 분무 건조 시험을 실시하였다. 시험 결과 L1 20%를 투입한 시험 구에서는 자체 분석기준치 이하로 나타나 분무 건조 소재도는 부적합한 것으로 나타났다. 반면 L2 투입구 및 L3 투입구는 제형화하기 어려울 뿐만 아니라 이화학적 성상이 좋지 않아 상입화가 어려울 것으로 판단되었다. 앞서 시험한 소재의 경우 흡습 및 수화성 저조 등 여러 문제로 인해 상입화가 다소 어려울 것으로 판단되어 이화학적 성상을 향상시키기 위해 L4를 담체로 선정 후 투입하였다. L4는 그 특성 상 단위 무게에 대한 부피가 크고 수분 보유력이 뛰어나서 분무건조 담체로 많이 사용되는 소재이다. 시험 결과 L4 10%에 L5 10%를 투입한 시험구에서 가장 높은 포자 안정성을 나타내었으며 비교적 양호한 이화학적 성을 나타내었다 (이상의 소재인 L4와 L5의 경우 폐사에서 제품화에 이용하는 소재로 안정성 및 안전성 등 확인된 원료로써 경제성도 갖춘 뛰어난 소재임). 시험 결과 분무건조 제형을 위한 부재로 L4 10%+L5 10%를 선정하여 경시안정성 시험을 진행하였다. 모든 구에서 제분화 기준인 1.0E+09 cfu/g 이하로 나타나 열풍건조와 동일하게 실효성이 없었으나 분무건조의 경우 동결건조방법에 비하여 짧은 공정시간 및 생산비용을 감안할 경우 폭넓은 부재의 탐색 및 분무조건의 변화를 줄 경우 충분한 가능성을 보이는 방법으로 사료된다. 분무건조 조건의 경우 시료의 상태에 따라 변동하여 설정하였으나 최종 선정된 부재를 기준으로 분무조건은 표 13의 나타내었다.

Table 12. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 분무건조 건조부재 시험 및 건조 후 포자 안정성 시험

	배 합 비	건조 후 균수(CFU/g)
대조	Cultured Broth	6.8E+09 (건조 전)
1	L1 20%	1.0E+06 이하
2	L1 10% + L2 10%	1.8E+07(흡습이 심함)
3	L3 20%	(제형화 불가)
4	L3 10% + L2 10%	7.2E+07(흡습이 심함)
5	L4 10% + L2 10%	1.1E+08(흡습이 심함)
6	L4 10% + L5 10%	8.8E+08
7	L4 10% + L3 10%	4.6E+08(이화학성 下)
8	L4 10% + L1 10%	5.1E+07
9	L4 15%	1.0E+08

Table 13. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 분무건조 조건

항 목	조건 내용
배합비 ^a	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54 배양액(100%) : L4(10%) : L5(10%)
Inlet temp.	190℃
Outlet temp.	90℃
Air pressure	0.6 bar (시료 상태에 따라 변동)
시료 주입량	2.0 liter/hr (시료 상태에 따라 변동)

* a : 배합비 = 시료와 담체의 중량 (Wt)을 기준으로 함

③. 동결건조 부재선정

동결건조 제형의 건조부재 탐색을 실시하였다 (표 14). 동결건조 부재로 폐사에서 *Bacillus* sp. 외 곰팡이 계열 제품 등에 폭넓게 사용되는 자주 사용되는 부재를 선정하여 건조를 실시하였다. 시험 결과 F1-L1과 F3-S1을 부재로 사용한 구에서 가장 높은 포자 안정성을 나타내었다. 그러나 F3-S1을 부재로 사용할 경우 물에 잘 녹지 않아 이화학적 성상에 문제가 생길 수 있어 동결건조를 위한 담체로 F1-L1을 선정하였다.

다음 시험에서는 F1-L1을 보조하기 위한 부제로 F4-T1와 F5-W1를 투입하여 시험을 실시하였다. F4-T1는 생물이체가 지온 및 건조한 환경에 견디기 위해 생성하는 물질도, 결정을 생성하나 상온에서도 흡습성이 적어 상업화가 유리한 물질이다⁴⁹⁻⁵¹). 시험 결과 F5-W1 10%에 F1-L1 5%, F4-T1 5%에서 가장 안정적이었다. 그러나 경시 안정성 부분에서 F5-W1 투입구 전체가 대단히 급격한 포자 감소를 나타내어 F5-W1는 보조제로 부적합하다 판단되어 배제하였다. 단채와 부재의 배합 비율별 실험 결과 배양 종료액 대비 F1-L1과 F4-T1를 20% 대 5%로 할 경우 우수한 결과를 나타내었다. 또한 동결 건조제로 F6-P1과 F7-G1을 각각 1%와 0.25%를 첨가했을 경우 최고 **1.5E+10**까지 올라갔으며 경시 또한 상당히 안정적임을 알 수 있었다 (표 15). 이상의 결과를 바탕으로 동결건조 부재 및 건조제들은 배양 종료액 volume 대비 F1-L1: F4-T1: F6-P1: F7-G1을 20%: 5%: 1%: 0.25%로 할 경우 가장 안정적이며 우수한 건조물을 얻을 수 있었다.

Table 14. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 동결건조 건조 부재 시험 및 건조 후 포자 안정성 시험

	배 합 비	건조 후 균수(CFU/g)
대조	Cultured Broth	6.8E+09 (건조 전)
1	F1-L1 20%	3.1E+09
2	F1-L1 10% + F2 10%	4.0E+09
3	F1-L1 10% + F3-S1 10%	4.8E+09
4	F1-L1 20% + F4-T1 10%	9.4E+09
5	F3-S1 20%	3.5E+09
6	F3-S1 10% + F2 10%	4.3E+09
7	F4-T1 20%	1.5E+09
8	F5-W1 10% + F1 10%	6.9E+08
9	F5-W1 10% + F4-T1 10%	1.1E+09
10	F5-W1 10% + F1-L1 5% + F4-T1 5%	9.5E+09

Table 15. *B. subtilis* subsp. *kriعتiensis* BSM54의 동결건조 동결 보조제 첨가시험

	배합비	건조 후 균수 (CFU/g)	경시안정성 (40℃, 7일)
대조1	F1-L1 20%	3.1E+09	7.4E+08
	F1-L1 20% + F6-P1 1%	3.9E+09	8.2E+08
대조2	F1-L1 20% + F4-T1 5%	8.7E+09	8.1E+09
	F1-L1 20% + F4-T1 5% + F6-P1 1%	9.4E+09	9.0E+09
대조3	F1-L1 20% + F4-T1 5% + F6-P1 1%	9.4E+09	-
	대조구3 + F7-G1 0.25%	1.5E+10	1.4E+10
	대조구3 + F8 5%	8.3E+09	6.2E+09
	대조구3 + F9 5%	6.6E+09	4.1E+09

(다). 각 제형별 약효시험 및 경시 안정성 시험

이상의 각 건조별(열풍건조, 분무건조, 동결건조) 시료를 대상으로 약효시험을 진행하였다. 각 시료는 1차 분쇄하여 500배 (액상제 권장 농도)로 희석하여 약효를 비교하였고 또한 각 제형별로 저온(-20℃), 상온, 고온(40℃, 54℃)하에서 경시 안정성을 모니터링하였다.

(라). 수화제 (WP) 제형 제조를 위한 최적 분쇄공정 설계 시험

건조방법 및 건조 부재 탐색에 따른 각 건조별 최적건조 시료를 분쇄하여 수화제 형태로 제조하기 위해 최적 분쇄 방법을 조사하였다. 미생물 제제의 수화제의 제작을 위해서는 건조 이후 분쇄 과정이 필요한데, 이는 수화제의 이화학 기준 중 입도 크기가 직경 기준 45 μm 이하이고, 325 mesh 계를 통과할 수 있어야 하기 때문이다. 일반적으로 건조 후에는 미생물 제제의 건조물의 입도 크기가 이 기준을 충족할 수 없으므로 분쇄가 필요하나, 미생물 제제의 경우 분말 제조 시 분쇄 공정으로 인해 포자가 파괴되거나 영향을 받을 수 있기 때문에 분쇄 전과 분쇄 후의 포자 상태 등을 고려하여 분쇄 방법을 설정하였다. 가장 많이 사용되는 hammer miller, pin miller, air-jet miller를 이용하여 시료를 분쇄한 후 분쇄 전의 시료와 비교하여 분쇄도를 측정하였다 (표 16).

Table 16. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 분쇄 방법에 따른 입도, 포자 회수율 및 분말도

Miller type	Median Diameter(μm)	100% Pass (μm)	포자회수율 (%)	300 mesh 통과율
Air-jet Mill	6.5	29	79	99
Hammer Mill	9.8	58	88	80
Pin Mill	10.1	44	86	84
Control	-	-	100	57

시험 결과 air-jet miller를 이용하여 분쇄한 시료의 경우 평균 입도가 6.5 μm 수준으로 가장 높게 나타났으며, 300 mesh 기준을 99% 이상 통과하여 수화 시 미생물 농약 기준을 충족하였다. 그러나 분쇄로 인한 포자 손실이 높아 실제 포자 회수율은 79% 수준으로 나타났다. Hammer miller와 Pin miller를 이용하여 분쇄하였을 경우 각각 입도는 9.8, 10.1 μm 수준으로 나타나 300 mesh 기준 80% 이상의 투과율을 나타내었다. 이 경우 포자 회수율은 약 80-84% 수준으로 나타났다. 비용 및 설비의 용이성 등을 고려하여 산업화 최적 분쇄 공정으로 pin miller를 이용하여 조분쇄한 후 일부 미 분쇄된 입자의 경우 air-jet miller를 이용하여 분쇄하는 공정을 설계하였다.

본 공정에 따라 분쇄 횟수 및 속도 등을 설정하기 위해 시험을 실시하였으며, 시험 결과 50 g/min 이하의 속도에서는 분쇄 효율은 높아지나, 비용 및 포자 수율 등이 급격히 증가하였으며, 100 g/min 이상의 속도에서는 분쇄 효율이 떨어져 325 mesh 기준 90% 미만의 분말도를 나타내었다. 또한 air-jet miller를 이용하여 분쇄한 시료의 포자 수율을 측정할 결과 50 g/min 이하의 속도에서는 포자 수율이 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 이에 따라 최종적으로 50 g/min 속도에서 air-jet miller를 이용하여 분쇄하는 공정이 제형화에 가장 적합할 것으로 사료되었다.

이상의 공정을 통하여 개발된 수화제 제형을 이용하여 실내 실험 (경시 안정성, 이화학적 특성 안정화 등)과 실외 실험(포드 실험, 포장 약효·약해 실험, 포장 내 안정성, 화학 농약 혼합 가부 여부, 경시 안정성 등)들을 진행 하였다.

다. Iturin 高生産 돌연변이주의 독성 안정성시험

개발한 iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 액상제 (AS, 미생물

매양원액을 추가적인 제조단계를 거치지 않고 물에 희석하여 사용하거나 매양된 미생물을 액상으로 제제화하여 물에 희석하여 사용하는 제품) 혹은 액상 현탁제(SM, 매양원액 또는 매양된 미생물을 물과 혼합하여 액상으로 제제화한 것으로 물에 희석하여 사용하는 제품) 시제품을 친환경 유기농입자재 목록공시에 등재 수준의 모든 실험 및 분석을 진행할 예정이 있으나 전문기관(농약시험분석기관 수준의 친환경유기농입자재평가 가능기관)에 의뢰할 경우 독성시험 분석료가 상당히 고가인 데다 기존 연구계획 금액을 초과하여 전문기관에 의뢰하지 못하고 자체적으로 전문기관에 상응하는 수준의 시험을 일부 진행하였으며, 추후 본 개발 제품의 산업성을 평가하여 제품화할 경우 전문기관을 통한 분석을 진행할 계획이다.

(1). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *kriectensis* BSM54의 인축 독성시험

친환경유기농입자재 병해충관리용 자재의 경우 인축독성에 대한 분석을 진행하여야 하며 그 항목으로는 급성 경구독성, 급성 경피독성, 피부 자극성, 안 점막 자극성에 대한 평가를 통하여 제품을 상업화하기 위한 안정성 시험을 진행하였다. 그 결과 급성 경구독성의 경우 **IV급**(기준: III급/IV급 이상), 급성 경피 독성의 경우 **IV급**(기준: III급/IV급 이상), 피부 자극성시험의 경우 피부 자극지수 (P.I.I)가 **0.0** (기준: P.I.I 1.0이하), 안 점막 자극성 시험의 경우 안 점막 자극지수(A.O.I)가 **0.0** (기준: A.O.I 10 이하)으로 나타나 인축 독성에 대하여 안정적인 것으로 확인되었다.

(2). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *kriectensis* BSM54의 생태 독성시험

친환경 유기농업자재 병해충 관리용 자재의 경우 생태독성에 대한 분석을 진행하여야 하며 그 항목으로는 급성 어류독성(담수 어류), 꿀벌 급성 접촉독성(개화기 처리 제품, 경영 처리 제품 해당)에 대한 평가를 통하여 제품을 상업화하기 위한 안정성 시험을 진행하여야 한다. 그 결과 급성 어류독성(담수어류) 분석 결과 **IV급 (저독성)**(기준: III급, TER 10 이상)으로 나타났으며, 꿀벌 급성접촉 독성의 경우 사용 추천농도 이상의 농도에서도 안정적인 것으로 나타나 환경독성에서도 안정적인 것으로 조사되었다.

(3). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 생물활성시험

친환경 유기농업자재 병해충 관리용 자재의 경우 5가지 작물을 대상으로 한 약해시험에 대한 평가를 통하여 제품을 상업화하기 위한 안정성 시험을 진행하였다. 그 결과 약해시험 결과 5가지 작물인 고추(슈피마니파), 매추(불암3호), 상추(선풍2호), 오이(싱그런백다다기), 콩(백태) 모두 권장 처리농도와 배양에서 약해가 전혀 없는 것으로 조사되었다.

(4). Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 유효·유해 미생물 분석 시험

친환경 유기농업자재 병해충 관리용자재 중 미생물을 기반으로 제작된 제품의 경우 유효 미생물에 대한 미생물 동정자료-속명, 종명, 균수(CFU/ml or g) 및 유해 미생물 5종에 대하여 안정적, 안전한 제품임을 나타내어야 한다. 유효 미생물 분석 결과 iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 제품 내 유효 미생물은 *B. subtilis* subsp. *krietiensis*도 함량은 6.1×10^9 CFU/ml로 조사되었다. 또한 제품 내 유해 미생물의 함유 여부를 분석한 결과 병원성 대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라(*Salmonella* sp.), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 마실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 모두 불검출되었다.

라. Iturin 高生産 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 시제품의 약효·약해시험

(1). 딸기 잣빛곰팡이병에 대한 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 약효 및 약해 시험

딸기 잣빛곰팡이병은 방제가 쉽지 않은 대표적 난방제성 병해이다. 본 시험은 딸기 잣빛곰팡이병으로 매년 많은 피해를 입고 있는 논산시 가야곡면 옥곡리 무농약 재배농가에 시 진행되었다. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 시제품을 기준으로 1,000배를 정량, 500배를 배양으로 실정하였으며 딸기 잣빛곰팡이병 발생 초기 7일 간격 3회 엽면 살포를 실시하였다 (표 17, 그림 18).

시제품 최종 처리 7일 후 처리구 전주의 이병주율을 조사하였으며 약해시험 결과는 3회 처리 시마다 외관상 딸기 과육 및 엽을 달관 조사하였다. 약효시험 결과, 정량 처리구(1,000배)에서는 60.6%, 배양 처리구 (500배)에서는 67.4%의 높은 방제가를 나타내었으며 (표 18,

그림 18) 약해는 관찰되지 않았다. 균주 자체의 배양액으로도 높은 방제가를 보여 산입화 가능성은 충분히 충족시키는 수치를 나타내었으며, 약효증진 부제의 추가 탐색을 통하여 더 높은 방제가를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 17. 딸기 잿빛곰팡이병 포장실험 처리방법

처 리 구	처 리 방 법
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54 정량	엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 CFU/ml, 1000배 희석, 7일 간격 3회 처리)
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54 배량	엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 CFU/ml, 500배 희석, 7일 간격 3회 처리)
대조구	부처리



Fig. 18. 딸기 잿빛곰팡이병 시험포장 전경, 시작품 엽면 살포 처리, 딸기 잿빛곰팡이병 발병(좌부터)

Table 18. 딸기 잿빛곰팡이병에 대한 *B. subtilis* subsp. *kriктиensis* BSM54 시제품 처리 방제가

처리구	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)	약해시험 결과
	1	2	3	평균			
1,000배	6.2	5.9	7.6	6.6	a	60.6	약해 없음
500배	5.7	5.4	5.2	5.4	a	67.4	
무처리	16.7	17.7	15.5	16.6	b	-	-

C.V-----10.7%

(2). 토마토 잿빛곰팡이병에 대한 *B. subtilis* subsp. *kriктиensis* BSM54의 약효 및 약해 시험

본 시험은 토마토 잿빛곰팡이병으로 매년 많은 피해를 입고 있는 인천 강화 하점면 망월리 관행재배 농가에서 진행되었다. 방문 당시, 토마토 잿빛곰팡이병이 급격하게 이병되고 있는 상황이었으며, *B. subtilis* subsp. *kriктиensis* BSM54 시제품을 기준으로 1000배를 정량, 500배를 배양으로 설정하여 7일 간격 3회 엽면 살포를 실시하였다(표 19, 그림 19). 임대한 포장 내 시험 처리구는 살균제 처리를 금지하여 다 약제의 영향을 차단하였다.

Table 19. 토마토 잿빛곰팡이병 포장실험 처리방법

처리구	처리 방법
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>kriктиensis</i> BSM54 정량	관주 및 엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 CFU/ml, 1000배 희석, 7일 간격 3회 처리)
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>kriктиensis</i> BSM54 배양	관주 및 엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 CFU/ml, 500배 희석, 7일 간격 3회 처리)
대조구	무처리



Fig. 19. 토마토 잿빛곰팡이병 시험 포장전경, 시제품 염면살포 처리, 토마토 잿빛곰팡이병 발병 (좌부터)

시제품 최종 처리 7일 후 처리구 전주의 이병주율을 조사하였으며 약해시험 결과는 3회 처리 시마다 외관상 토마토 과육 및 엽을 달관 조사하였다. 약해시험 결과, 정량 처리구(1,000배)에서는 58.6%, 배량 처리구(500배)에서는 66.7%의 방제가를 나타내었다(표 20, 그림 19). 500배 배량 처리구에서는 기대치의 높은 방제가를 나타내었으나 1,000배 정량에서는 다소 미흡한 방제가를 나타내었다. 하지만 시험 당시, 토마토 잿빛곰팡이병 발생 초를 넘어선 상황을 감안한다면 충분히 높은 방제효과를 나타내어 기존 생물농약 미생물보다 뛰어난 활성을 나타내었다.

Table 20. 토마토 잿빛곰팡이병에 대한 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 시제품 처리 방제가

처리구	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)	약해시험 결과
	1	2	3	평균			
1,000배	15.5	14.7	16.1	15.4	a	58.6	약해 없음
500배	10.7	11.1	15.2	12.4	a	66.7	
무처리	45.0	35.6	30.9	37.2	b	-	-

C.V-----22.7%

(3). 고추 역병에 대한 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 약효 및 약해 시험

본 시험은 경기 화성 봉담면 와우리 관행재배 농가에서 진행하고 있으며 장마가 많이 오는 7월 말에 맞춰 현재 7일 간격 2회 관주처리를 완료하였다. 시제분 처리는 1,000배를 기준량으로 배량 (500배) 처리구까지 구획을 나누었으며 배양액이 골고루 토양 내 침투할 수 있도록 고추 주 인간에 약대를 꽂아 m²당 약 1ℓ를 처리하였다. 약해 여부는 정식한 고추 유묘에 배양액 정량, 배양액 희석 후 연면 살포하여 이상 여부를 조사하였다. 약효 여부는 주가 1회 관주처리 후, 8월 내 고추역병 방제효과를 조사하였으며 고추 유묘에 대한 약해 여부는 관찰되지 않았다. 그러나 고추 역병의 경우 시험포장에서 방제가 별가하기는 발병율(이병주율 15% 이상)이 낮아 결과를 알 수 없었다(그림 20).



Fig. 20. 고추 역병 시험 포장전경, 시작품 관주살포 처리, 시작품 2차 처리 후 시험포장 전경(좌부터)

(4). 토마토 풋마름병에 대한 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 약효 및 약해 시험

본 시험은 토마토 풋마름병으로 매년 많은 피해를 입고 있는 인천 강화 하침면 신봉리 관행재배 농가에서 진행되었다. 방문 당시, 토마토 풋마름병이 급격하게 이병되고 있는 상황이었으며, *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 시제품을 대상으로 1,000배를 정량, 500배를 배량으로 설정하여 7일 간격으로 3회 관주 살포를 실시하였다(표 21, 그림 21). 임대한 포장 내 시험 처리구는 살균제 처리를 금지하여 다 약제의 영향을 차단하였다.

Table 21. 토마토 풋마름병 포장실험 처리방법

치 리 구	치 리 방 법
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM 54 정량	관주 처리(발병 초) (1.0×10^9 CFU/ml, 1,000배 희석, 7일 간격 3회 처리)
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM 54 배양	관주 처리(발병 초) (1.0×10^9 CFU/ml, 500배 희석, 7일 간격 3회 처리)
대조구	무처리

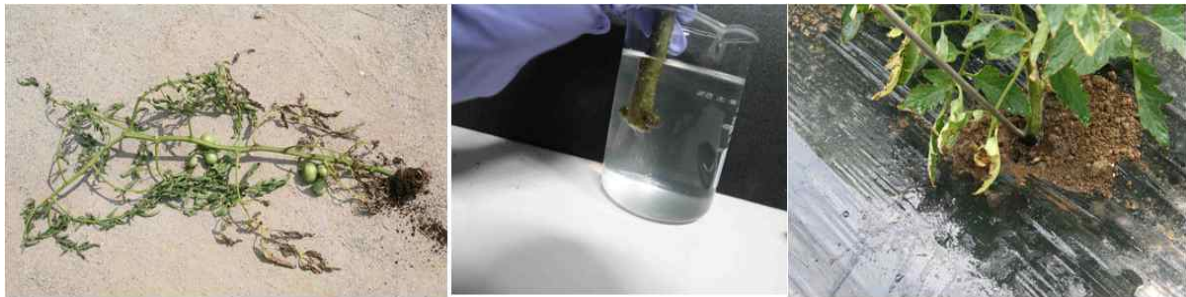


Fig. 21. 토마토 풋마름병 이병주 및 시제품(*B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54) 살포(강화 하점면 신봉리).

약효시험 결과는 시작품의 최종 처리 7일 후, 처리구 전주의 이병주율을 조사하였으며 약해시험 결과는 3회 처리 시마다 외관상 토마토 잎과 과실의 약해 유무를 달관 조사하였으나 특별한 약해는 발생하지 않았다. 약효시험 결과, 정량 처리구 (1,000배)에서는 50.2%, 배양 처리구 (500배)에서는 59.7%의 방제가를 나타내었다. 하지만 이상의 결과는 추후 확인한 결과 농가에서 다 약제와 혼용처리를 1회 한 것이 확인되었으나 무처리구에도 처리를 동일하게 진행된 실험으로 본 결과는 충분한 유의성이 있는 것으로 판단되므로 약효가 있는 것으로 확인되었다 (표 22, 그림 22).

Table 22. 토마토 풋마름병 포장에 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54 배양액 처리 방제가 (강화 하점면)

처리구	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)	약해시험 결과
	1	2	3	평균			
1,000배	12.0	9.5	10.1	10.5	a	50.2	약해 없음
500배	9.3	9.5	6.8	8.5	a	59.7	
무처리	25.3	16.7	21.3	21.1	b	-	-

C.V-----23.5%



Fig. 22. 토마토 풋마름병 무처리구와 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54 처리구 비교

(5). 토마토 시들음병에 대한 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 약효 및 약해 시험

토마토 시들음병은 토마토 재배 시 수확에 직접적으로 영향을 주는 병해도써 토마토 병해 중 주요 병해에 속한다. 본 시험 포장은 토마토 풋마름병 포장(인천 강화 하점면 신봉리) 인근의 포장으로 매년 많은 피해를 입고 있는 곳으로 시설 재배 농가였다. 방문 당시, 토마토 시들음병이 많이 발생한 것은 아니어서 방제가를 구할 정도는 아니었으며 약재의 효과 유무를 확인할 수 있는 포장이었다 (표 23, 그림 23).

Table 23. 토마토 시들음병 포장실험 처리방법

치 리 구	치 리 방 법
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54 정량	관주 처리 (발병 초) (1.0×10^9 CFU/ml, 1,000배 희석, 7일 간격, 3회 처리)
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54 배양	관주 처리 (발병 초) (1.0×10^9 CFU/ml, 500배 희석, 7일 간격, 3회 처리)
대조구	무처리



Fig. 23. 토마토 시들음병 이병포장 및 시제품(*B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54) 살포(강화 하점면).

약효시험 결과 최소 발병율(이병주율, 10%)이하로 발병되어 정확한 조사는 이루어지지 못하였으나 무 처리구 대비 약재 처리구 전주의 이병주율을 조사하였다. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 처리구의 약해시험 결과는 외관상 판단되어지는 약해는 없었으며, 약효 시험 결과, 배양 처리구(500배)에서는 무 처리구 대비 우수한 방제율을 나타내었으며, 정량 (1,000배)의 경우도 방제가를 나타내는 것을 알 수 있었다 (그림 24).



Fig. 22. 토마토 시들음병 무처리구와 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 처리구 비교

(6). 상추 균핵병에 대한 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 야생주와 iturin high-yielding mutant *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 균주들의 약효 및 약해 시험

상추 균핵병은 화학농약으로도 방제가 쉽지 않은 대표적 난방제성 토양 병해이다. 본 시험은 상추 균핵병으로 매년 많은 피해를 입고 있는 경기도 양평군 지평면의 유기농인증 농가에서 진행되었다. 최종 선종된 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 mutant의 방제가를

확인하기 위하여 대조군으로 무처리군과 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 야생주군을 설정하였다. *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 mutant와 야생주의 시제품을 기준으로 1,000배를 정량, 500배를 배양으로 설정하였으며 상추 균핵병 발생 초기 7일 간격 3회 관주와 엽면 살포를 실시하였다(표 24).

Table 24. 상추 균핵병 포장실험 처리방법

처 리 구	처 리 방 법
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54 mutant 정량	관주 및 엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 CFU/ml, 1000배 희석, 7일 간격 3회 처리)
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> 야생주 정량	
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54 mutant 배양	관주 및 엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 CFU/ml, 500배 희석, 7일 간격 3회 처리)
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> 야생주 배양	
대조군(대조약제 : 실리스) (천연식물보호제 등록 제품)	관주 및 엽면 살포(발병 초) (1.0×10^8 CFU/ml, 500배 희석, 7일 간격 3회 처리)
대조군	무처리

약효시험 결과는 시제품의 최종 처리 7일 후, 처리구 전주의 이병주율을 조사하였으며 약해시험 결과는 3회 처리 시마다 외관상 상추 잎의 약해유무를 달관조사 하였다. 약효시험 결과, 정량 처리구(1,000배)에서는 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54 mutant 정량은 62.1%, *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 야생주 정량 54.2%, 배양 처리구 (500배)에서는 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54 mutant 배양은 71.2%, *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 야생주 정량 62.5%의 높은 방제가를 나타내었다. 이는 대조약제로 기존에 시판되어지고 있는 자사의 실리스 제품과 비교한 결과 iturin 생산한량이 증가된 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 mutant의 시제품이 더 우수한 방제가를 가지며, 현장에서도 적용 가능하며 경쟁성이 있는 제품임을 확인 할 수 있었다 (표 25).

Table 25. 상추 균핵병 포장에 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54 처리 방제가 (경기 양평)

처리구	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)	약해시험 결과
	1	2	3	평균			
1,000배 (mutant)	10.5	12.1	12.8	11.8	a	62.1	약해 없음
1,000배 (wild type)	13.9	14.4	14.5	14.3	a	54.2	
500배 (mutant)	8.2	9.3	9.5	9.0	a	71.2	
500배 (wild type)	10.9	11.8	11.7	11.7	a	62.5	
썰러스	11.4	13.1	13.4	12.6	a	60.0	
무처리	32.7	30.4	30.5	31.2	b	-	-

C.V-----9.8%

(7). 토마토 시들음병에 대한 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 야생주와 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54 mutant의 약효 및 약해 시험

본 시험은 작년에 약효시험을 진행하였던 포장으로 시험 당시 최소 발병율로 인하여 정확한 실험 결과를 얻지 못하였던 포장으로 당해 역시 토마토 시들음병이 연속하여 발생한 포장이다. 시험구역은 작년에 약제를 살포한 구역을 피하여 설정하였고, 대조구로는 무처리군과 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 야생주군을 설정하였다. 처리구는 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54 mutant의 시제품을 기준으로 1,000배를 정량, 500배를 매량으로 설정하였으며 발생 초기 7일 간격 3회 관주처리를 실시하였다(표 26).

Table 26. 토마토 시들음병 포장실험 처리방법

치 리 구	치 리 방 법
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54 mutant 정량	관주 처리 (발병 초) (1.0×10^9 CFU/ml, 1,000배 희석, 7일 간격, 3회 처리)
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> 야생주 정량	
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM54 mutant 배양	관주 처리 (발병 초) (1.0×10^9 CFU/ml, 500배 희석, 7일 간격, 3회 처리)
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> 야생주 배양	
대조구(대조약제 : 윌러스) (천연식물보호제 등록 제품)	관주 처리 (발병 초) (1.0×10^8 CFU/ml, 500배 희석, 7일 간격 3회 처리)
대조구	부처리

약효시험 결과는 시제품의 최종 처리 7일 후, 처리구 전주의 이병주율을 조사하였으며 약해시험 결과는 3회 처리 시마다 외관상 약해유무를 달관 조사하였다. 약효시험 결과, 정량 처리구(1,000배)에서는 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54 mutant 정량은 60.4%, *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 야생주 정량은 56.2% 이었으며, 배양 처리구(500배)에서는 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54 mutant 배양은 75.5%, *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 야생주 정량은 62.8%의 높은 방제가를 나타내었다. 대조약재인 자사의 윌러스 제품과 비교한 결과 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54 mutant의 시제품이 더 우수한 방제가를 나타내었다 (표 27).

이상의 포장시험 결과 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54 mutant 균주가 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* 야생주 보다 포장시험 결과가 높게 나타났다. 이는 iturin 高生産 돌연변이 주로 변이된 것을 확인할 수 있었으며, 유사한 제품으로 현재 시판되어지고 있는 자사의 윌러스 보다 향상된 시제품임을 확인하였고, 향후 개선된 제품으로 상품화 또한 가능할 것으로 사료된다.

Table 27. 토마토 시들음병 포장에 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM 54 처리 방제가 (강화 하점면)

처리구	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)	약해시험 결과
	1	2	3	평균			
1,000배 (mutant)	16.2	17.8	16.9	17.0	a	60.4	약해 없음
1,000배 (wild type)	18.2	19.4	18.7	18.8	a	56.2	
500배 (mutant)	10.1	10.9	10.6	10.5	a	75.5	
500배 (wild type)	15.4	16.7	15.8	16.0	a	62.8	
썰러스	15.8	16.5	16.1	16.1	a	62.5	
무처리	42.8	44.1	41.7	42.9	b	-	-

C.V-----6.2%

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연도	세부연구개발 목표	연구개발수행내용	달성도 (%)
1차년도	2011년	Iturin 高生産 길항 미생물 <i>B. subtilis</i> 균주의 산업화 공정 확립	pH, DO, agitation rate, aeration temperature, moisture ratio 등 최적 배양조건 검토	100
			○ 50/500/5,000 l 로의 scale up에 따른 배양공정 조건 검토 ○ 후공정 진행 및 수율 안정화 시험	100
			○ 생산 단가, 배양기간, 수율 등을 고려한 산업화 가능성이 높은 토양병해 방제용 미생물 선발	100
2차년도	2012년	Iturin 高生産 균주의 산업화를 위한 시제품 생산 및 약효 포장 시험(오이 잣빛, 고추 역병 등)	○ 기(既) 확립된 최적생산조건을 기반으로 한 2차 소재탐색(부재 및 보존제 선정). ○ 잣빛곰팡이병, 시들음병, 역병 등 토양 병해가 심한 실제 농가처리를 통한 현장 평가(처리횟수, 농도, 방법 등의 확립, 화학 농약 혼용가부 시험을 통한 최적 사용법 정립)	90
			○ 다양한 제형별 시제품 개발 후 최적 타입 선정(처리제, 증량제 등 최적 소재 탐색) ○ 각 제형별 경시안정성, 산업성, 포장 약효 시험 등 다양한 평가를 통한 최종 적합 소재 선정.	100
		시제품의 안정성확인 (돌연변이주의 안정성 확인)	○ 품질 인증 또는 목록공시 등재 항목 수준의 독성시험 평가를 통한 산업성 평가	100

구분	연도	세부연구개발 목표	연구개발수행내용	달성도 (%)
3차년도	2013년	Iturin 高生産 <i>B. subtilis</i> 균주의 복합 제형을 이용한 <i>in vivo</i> 활성 검정 및 포장시험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 각 제형별 안전성, 안정성 등 산업성 평가 ○ 시들음병, 잿빛 곰팡이병, 역병 등 난방제 토양 병해가 심한 실제 농가 처리를 통한 현장 평가 	90
		Iturin 高生産 길항 미생물 <i>B. subtilis</i> 복합 제형에 대한 산업화 추진 및 사용 매뉴얼 제작	<ul style="list-style-type: none"> ○ 현장 적용을 통한 약효평가 및 문제점 수렴/개선 ○ 적용대상, 처리시기, 사용량, 사용방법 등 사용 매뉴얼 제작-화학농약 혼용 가부 시험 	90
		Cyclic lipopeptide 高生産 <i>B. subtilis</i> 복합 제형에 대한 지적재산권 확보 및 홍보	<ul style="list-style-type: none"> ○ 배지 조성, 배양 조건, 제형화 개발 기술 관련 특허 출원 ○ 대중 매체, 전시회, 농민설명회, 교육 등을 개최하여 홍보(IPET 지원, 개발 홍보 예정) 	90

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

가. 연구성과 목표

구분		(예시)특허		(예시)신품종				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
		출원	등록	품종 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표										
	달성										
2차 년도	목표										
	달성										
3차 년도	목표	1									
	달성	(1)									
계	목표	1									
	달성	(1)									

나. 연구성과 활용 목표

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1					
	달성	(1)	(1)*				

*토양 미생물제제로 1차 등록하였으며, 추가 포장실험 후 천연식물보호제로 등록 추진 예정.

2. 특허 성과: 1건, 출원 진행 중.

국내외 구분	출원인	제목	국가 및 출원/등록구분	출원/등록번호(일자)
국내	(주)그린바이오텍	○ <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM 54의 대량 배양용 배지 조성물 및 이의 배양방법 또는 ○ <i>B. subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> BSM 54를 이용한 식물병 방제 방법 및 수화제 제조 방법	대한민국/출원	2014-***** (2014.10.**)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

생물농약 소재로 이용되고 있는 대부분의 *Bacillus*속 균주들은 peptide와 fatty acid로 이루어진 lipopeptide antibiotic을 생산하고 있는 데, 항진균이나 항세균 활성을 나타내는 이 lipopeptide 항생물질들은 multifunctional peptide synthetase에 의해 리보솜을 통하지 않고 형성되며, 그 구조에 따라 surfactin 그룹과 fengycin 그룹 및 iturin 그룹으로 분류된다. 이 중 surfactin 그룹과 fengycin은 β -hydroxy fatty acid를 갖고 있다는 점은 같으나 α - amino acid가 각각 7개, 10개로 이루어져 있고, iturin 그룹은 β -amino fatty acid와 7개의 α -amino acid로 구성되어 있다. 본 연구에 이용한 균주는 국내 도양으로부터 분리하여 미국 특허를 획득한 강한 항균활성을 나타내는 균주로서 6종류의 iturin을 생성하는 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis*이며 그 작용기작은 ion-conducting pore를 형성하여 osmotic perturbation에 기반하고 있고, surfactin처럼 세포막을 파괴하거나 가용화하지는 않는다고 알려졌다. 또한 surfactin과 iturin, surfactin과 fengycin 및 iturin과 fengycin은 서로 synergistic하게 작용한다고 알려져 있다. Cyclic lipopetide를 생산하는 *Bacillus* 균주 중 대표적으로 *B. subtilis*를 이용하여 개발된 미생물 제제도는 EcoGuard, Kodiak, HiStick, Serenade, Sonata 및 Taegro 등이 있고, 이들은 주로 종자 처리제나 post-harvest, 야채 등의 부패 방지용으로 사용되고 있으며, 전 세계 미생물 유래 생물농약 시장은 2018년도에는 약 4.9억불에 도달할 것으로 예상되고 있고, 연평균 성장률이 6.5%에 도달될 것으로 예측되고 있다. 특히 2,000년대 초반에 AgraQuest Co.에서 등록한 Serenade는 *Bacillus subtilis* QST713 균주를 이용하여 살균제와 항세균제로 25개국에서 등록되어 연간 1억불 이상을 수출한다고 알려져 있다. 이외에 *Bacillus* 균주가 생산하는 다양한 lipopeptide들의 직접적인 항균활성 이외에 병원균에 의한 biofilm 형성을 억제하거나 유도 전신저항성이라는 식물체 내 방어기작을 유도하여 식물병을 억제하는 데에도 기여한다고 알려졌다. 최근에는 *B. subtilis* 균주가 생산하는 flagellin-like 단백질이 *Botrytis cinerea*에 강한 저해활성을 나타낸다고 보고하였으며, *Bacillus amyloliquefaciens* 균주도 토마토 도양병 유래의 *Ralstonia solanacearum*에 의한 세균성 시들음병과 토마토 흰가루병을 전신성 획득 저항성을 유도하여 억제한다고 보고하였다. 이처럼 *B. subtilis* 균주가 많은 식물병과 각종 식물 병원균의 억제에도 효과적이라고 알려지면서, 현재에도 널리 이용되고 있는 실정이다.

Iturin 생합성 유전자에 대한 분자 수준에서의 연구는 1993년도 일본의 Shoda 연구팀이 *B. subtilis* RB-14 균주를 이용하여 iturin A와 surfactin의 합성에 관여하는 *lpa-14*라는 유전자를 클로닝하고 연기서열을 분석한 것이 유일할 정도로 iturin 생합성 유전자에 대한 연구는 매우 미진한데다가, *Bacillus* genome project에 이용된 *B. subtilis* 168 균주는 surfactin을 생산하는 유전자를 가지고 있지만 iturin을 생산하지 않는 균주라고 알려졌다. 이러한 정보들을 토대로 당 연구실에서는 1990년대 초반에 iturin 생합성 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 surfactin과

iturin의 분자량과 구조가 유사한 데 착안하여 cyclic peptide 합성과 peptide와 지방산이 연결되는 과정에도 많은 유사점이 있을 것이라고 추정하고, *Bacillus* genome project의 database로부터 얻은 surfactin 생합성 유전자를 이용하여 iturin 생합성 유전자의 클로닝을 시도하였다. Genomic library screening 통해 cosmid 클론들을 얻고 그 연기배열을 분석하여 전체 크기가 37,645 bp이고 6개의 ORF로 이루어진 새로운 iturin 생합성 유전자라고 추정되어 GenBank에 기탁하였다(GenBank accession number KC454625).

한편 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079로부터 클로닝한 iturin 생합성 유전자는 일본 연구팀에서 보고한 *ituD*, *ituA*, *ituB*와 비교하였을 때 30-40% 정도의 유사성만을 나타내고 있고, surfactin을 생산하는 *B. subtilis* 168 균주의 surfactin 생합성 유전자와는 70% 정도의 상동성을 나타내나 2012년 독일 연구팀에서 보고한 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946의 surfactin 생합성 유전자와는 99%의 상동성을 나타내었다. 그러나 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079는 6가지 종류의 iturin을 생산하는 것을 HPLC와 LC-MS를 통해 확인하였으며, 또한 야생주 iturin 생합성 유전자의 ORF3 부위에 mini-Tn10 transposon을 삽입시켜 제조한 iturin-less 돌연변이주에서는 iturin 생산량이 30% 감소한 반면 surfactin 생산량은 iturin-less 돌연변이주에서 오히려 야생주보다 2배 정도 더 많이 검출되어, 클로닝한 37,645 bp의 유전자는 surfactin 합성에 관여하는 유전자라기보다는 iturin 생합성에 관여하는 유전자도 생각되었다. 또한 iturin 생합성능이 야생주보다 2배나 증가한 자외선 돌연변이주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* BSM54의 iturin 생합성 유전자 부위를 NGS로 연기서열을 분석하고 야생주와 비교해본 결과 iturin 생합성 유전자 부위의 6곳에서 point mutation이 일어난 것을 확인하였으며, 이 중에서 promoter 부위에 인접한 M1 point mutation이 일어난 곳의 유전자 부위를 야생주에 site-directed mutagenesis하면 야생주에서도 iturin 생합성능이 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과들을 종합해보면 동일한 구조의 iturin 임에도 불구하고, 본 실험에 이용한 야생주 *B. subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079가 생산하는 iturin 생합성 유전자는 기존에 보고되지 않은 새로운 iturin 생합성 유전자일 것으로 사료되어 향후 iturin 생합성능 증대뿐만 아니라 새로운 균주 개발에도 활용할 수 있을 것으로 생각되며, 향후 연구를 통하여 최적화된 대량 배양 방법을 통해 다양한 형태의 제형으로 생물농약이 개발되면 여러 식물병 방제에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

제 8 장 참고문헌

1. 米原弘編 1991. 抗生物質, p.304-310, 地球社, 東京.
2. Keel, C., B. Koller, and G. Defago (eds.). 1991. Plant Growth Promoting Rhizobacteria-Progress and Prospects, IOBC/WPRS Bull, 14(8): 1-418.
3. Ryder, M. H., P. M. Stephens, and G. D. Bowen.(eds.) 1994. Improving Plant Productivity with Rhizobacteria, CSIRO Division of Soils, Adelaide, Australia.
4. 김진철. 생물농약의 연구개발 동향, p.1-20, 농업생명공학, Bioin 스페셜 WebZin (www.bioin.or.kr), 국가생명공학정책연구센터 (2009. 10).
5. 김창길, 정학균, 잠정경 및 김태훈. 2010년 국내·외 친환경농산물의 생산실태 및 시장전망, 정책연구보고, p. 136, 한국농촌경제연구원(2010.12).
6. 山田昌編著 2000. 微生物農藥 - 環境保全形 農藥を めざして-, p.114-135, 全國農村教育協會, 新村印刷株式會社, 東京 (2000).
7. Baker, R. R. and P. E. Dunn(eds.) 1990. New directions in biological control : Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Alan R. Liss, New York.
8. Chet, I.(eds.) 1987. Innovative approaches to plant diseases control. John Wiley and Sons, New York.
9. BCC Research: Microbial pesticides, p. 28-36, In : Microbial products: Technologies, Applications and Global Markets, Wellesley, MA 0248, U.S.A. (2013. 8).
10. Kerr, A. 1980. Biological control of crown gall through producing agrocin 84. Plant Dis., 64: 25-30.
11. Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol., 26: 379-407.
12. Weller, D. M. and R. J. Cook. 1986. Increased growth of wheat by seed treatment with fluorescent *Pseudomonads*, and implications of *Pythium* control. Can. J. Plant Pathol., 8: 328-334.
13. Cook, R. J. 1992. Wheat root health management and environmental concern. Can. J. Plant. Pathol., 14: 76-85.
14. Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens.
15. Thomashow, L. S., D. D. 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.
16. 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 bacteria secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol. Mol. Plant-Microbe Interact., 5: 4-13.

17. Hara, H., M. Bangera, D. S. Kim, D. M. Weller, and L. S. Thomashow. 1994. Effect of transfer and expression of antibiotics biosynthesis genes on biological control activity of fluorescent *Pseudomonas*. In *Improving Plant Productivity with Rhizobacteria* (M. H. Ryder, P. M. Stephens and G. D. Brown, eds.) p. 247-249. CSIRO Division of Soils, Adelaide, South Australia
18. Thomashow, L.S., Essar, D.W., Fujimoto D.K., Pierson III L.S. Thrane C. and Weller. D.M. 1993. Genetic and biochemical determinants of phenazine antibiotic production by fluorescent *Pseudomonas* that suppress take-all disease of wheat. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, vol.2, E. W. Nester, and D. P. S. Verma (eds.) p.535-541. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
19. Romero-Garcia, S., C. Hernandez-Bustos, E. Merino, G. Gosset, and A. Martinez. 2009. Homolactic fermentation from glucose and cellobiose using *Bacillus subtilis*. *Microb. Cell Fact.*, 8: 23.
20. Ongena M. and P. Jacques. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.*, 16: 115-125.
21. Aranda, F. J., J. A. Teruel, and A. Ortiz. 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochim. Biophys. Acta*, 1713: 51-56.
22. Peypoux, F., J. M. Bonmatin, and J. Wallach. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 553-563.
23. Magnet-Dana, R., L. Thimon, F. Peypoux, and M. Ptak. 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie*, 74: 1047-1051.
24. Ongena, M., E. Jourdan, A. Adam, M. Paquot, A. Brans, B. Joris, J. L. Arpigny, and P. Thonart. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.*, 9: 1084-1090.
25. Romero, D., A. de Vicente, R. H. Rakotoaly, S. E. Dufour, J. W. Veening, E. Arrebola, F. M. Cazorla, O. P. Kuipers, M. Paquot, and A. Perez-Farcia. 2007. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant Microb. Interact.*, 20: 430-440.
26. Braverman, M. 2010 United States. p.74-79, In : *The use and regulation of microbial pesticides in representative jurisdictions worldwide* (J. T. Kabaluk, A. M. Svircev, M. S. Goettel, S. G. Woo, eds). International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants (IOBC, available online through www.IOBC-Global.org).
27. 박경석. 2011. 미생물 농약의 개발 현황과 바실러스 미생물의 중요성, *공업화학 전망*, 14: 1-11.
28. Bais, H. P., R. Fall, and J. M. Vivanco. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.*, 134: 307-319.
29. Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with

- bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 26: 379-407.
30. Weller, D. M. and R. J. Cook. 1986. Increased growth of wheat by seed treatment with fluorescent *Pseudomonads*, and implications of *Pythium* control. *Can. J. Plant Pathol.*, 8: 328-334.
 31. Cook, R. J. 1992. Wheat root health management and environmental concern. *Can. J. Plant. Pathol.*, 14 : 76-85.
 32. Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31: 53-80.
 33. Gueldner, R. C., C. C. Reilly, P. L. Pusey, C. E. Costello, R. F. Arrendale, R. H. Cox, D. S. Himmelsbach, F. G. Crumley, and H. G. Cutler. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *J. Agri. Food Chem.*, 36: 366-370.
 34. Massomo, S. M. S., C. N. Mortensen, R.B. Mabagala, M. A. Newman, and J. Hockenhull. 2004. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *J. Phytopathol.*, 152: 98-105.
 35. Etchegaray, A., C. de C. Bueno, I. S. de Melo, S. M. Tsai, M. de F. Fiore, M. E. Silva-Stenico, L. A. B. de Moraes, and O. Teschke. 2008. Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Arch. Microbiol.*, 190: 611-622.
 36. Tsuge, K., T. Akiyama, and M. Shoda. 2001. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J. Bacteriol.*, 183: 6265-6273.
 37. Duitman, E. H., L. W. Hamoen, M. Rembold, G. Venema, H. Seitz, W. Saenger, F. Bernhard, R. Reinhardt, M. Schmidt, C. Ullrich, T. Stein, F. Leeders, and J. Vater. 1999. The mycosubtilin synthetase of *B. subtilis* ATCC 6633 : A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase and a fatty acid synthetase, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 13294-13299.
 38. Koumoutsi, A., X. H. Chen, A. Henne, H. Liesegang, G. Hitzeroth, P. Franke, J. Vater, and R. Borriss. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.*, 186: 1084-1096.
 39. Chen, X. H, A. Koumoutsi, R. Scholz, A. Eisenreich, K. Schneider, I. Heinemeyer, B. Morgenstern, B. Voss, W. R. Hess, O. Reva, H. Junge, B. Voigt, P. R. Jungblut, J. Vater, R. Sussmuth, H. Liesegang, A. Strittmatter, G. Gottschalk, and R. Borriss. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat. Biotechnol.*, 25: 1007-1014.
 40. Chen, X. H., A. Koumoutsi, R. Scholz, K. Schneider, J. Vater, R. Sussmuth, J. Piel, and R. Borriss. 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J. Biotechnol.*, 140: 27-37.
 41. Tsuge, K., S. Inoue, T. Ano, M. Itaya, and M. Shoda. 2005. Horizontal transfer of iturin A

- operon, *itu*, to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer. *Antimicrob. Agent Chemother.*, 49: 4641-4648.
42. Blom, J., C. Rueckert, B. Niu, Q. Wang, and R. Borris. 2012. The complete genome of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B496 contains a gene cluster for nonribosomal synthesis of iturin A. *J. Bacteriol.*, 194: 1845-1846.
 43. Stanbury P. F., A. Whitaker, and S. J. Hall. 1999. *Principles of fermentation technology*, p. 93-272, Butterworth-Heinemann, UK.
 44. Butt, T.M., et al. 2001. *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, p. 390, CABI Publishing, UK.
 45. Copping, L. G. 2001. *The Biopesticide Manual*, p. 528, The British Crop Protection Council. UK.
 46. Mollet, H. et al. 2001. *Formulation technology*, p. 434, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
 47. Burges, H. D. 1998. *Formulation of microbial biopesticides*, p. 187-202, Springer-Verlag, New York, LLC.
 48. Adams, G. 2007. The principles of freeze-drying. p. 15-38. In: Day, J. G. and Stacey, G. N. Eds. *Cryopreservation and freeze-drying protocol*. Humana Press Inc., New Jersey.
 49. Cliquet, C. 1999. Influence of culture conditions on production and freeze-drying tolerance of *Paecilomyces fumosoroseus* blastoconidias. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23: 97-102.
 50. Shu-hui, T. C., C. W. van Ingen, and J. A. Stalpers. 2007. Freeze-drying fungi using a shelf-freeze drier, p. 119-126, In: Day, J. G. and Stacey, G. N. Eds. *Cryopreservation and freeze-drying protocol*. Humana Press Inc., New Jersey.
 51. Tan, C. S., C. W. van Ingen, H. Talsma, J. C. van Miltenburg, C. L. Steffensen, Ij. A. Vlug and J. A. Stalpers. 1995. Freeze-Drying of Fungi: Influence of composition and glass transition temperature of the protectant. *Cryobiology.* 32: 60-67.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명 산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.