

발간등록번호

11-1543000-000993-01

황토 유래 친환경농업용 다기능성 미생물제재 개발 및 산업화

(Development of eco-friendly multi-functional microbial agents solated from loess and their applications to agriculture)

조선대학교 산학협력단

농 립 축 산 식 품 부

요 약 문

I. 제 목

황토 유래 친환경농업용 다기능성 미생물제제 개발 및 산업화

II. 연구성과 목표 대비 실적

본 과제는 황토유래 1) 유용 미생물자원의 분리 및 등록 2) 작물 병원균 방제용 미생물 선별 3) 식물 성장촉진/토양 활력증진용 미생물 선별 4) 항균물질의 분리·정제, 활성 검증 및 최적단 분석기를 통한 분자구조 규명 5) 농업용 미생물제제의 대량생산공정 확립 및 제형화 6) 유용물질의 유전공학/생화학적 기법을 통한 생산기술 개발 7) 시제품의 제작 8) 시제품의 적용 매뉴얼 개발 등을 목표로 하였다.

이와 같은 목표를 두고 과제를 수행한 결과 다양한 식물병 유발 곰팡이에 대한 억제 효과를 보이는 많은 종류의 균주를 분리 동정 하였으며 (*Bacillus* 27종, *Paenibacillus* 2종, *Brevibacillus* 1종, *Acromobacter* 1종), 곰팡이 세포벽 구성성분인 키틴을 분해하는 능력을 갖는 균주도 다수 분리/동정 (*Paenibacillus* 14종, *Bacillus* 3종, *Chromobacter* 1종) 하였다.

이렇게 분리된 균주들로부터 항균물질의 분리·정제법을 개발하고, 그 분자 구조를 규명하였다. 또한 해당 물질을 생산하는 균주의 대량배양을 위한 배지 최적화, 발효조건 확립 후 pot assay와 포장시험을 통해 미생물제제의 효능을 검증하였다. 이렇게 개발된 미생물제제의 적절한 활용을 위해 사용 매뉴얼을 작성하였다

황토로부터 분리된 유용미생물이 생산하는 유용물질의 대량생산을 위한 다른 방법으로 화학적 기법을 적용한 인공합성법을 개발하여 유용물질의 대량합성을 위한 기반기술을 확보하였다. 결과적으로 본 과제의 초기 목표의 대부분을 달성하고 연구결과를 통하여 SCI급 논문 3편과 비SCI급 논문 1편을 게재하였고, 관련 특허를 2건 출원하였으며, 1 종류의 미생물제제 시제품을 개발하였고, 2개의 관련업체에 기술이전을 하였으며, 생산 판매에 관하여 논의 중이다. 또한 본 과제를 통하여 7명의 석박사급 인력도 배출하였다.

Ⅲ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 목적

황토는 일반 토양에 비해 유기물 함량이 부족한 다소 척박한 환경임에도 불구하고 다양한 분야에 활용되고 있다. 본 연구는 척박한 조건에서 서식하는 황토 미생물의 경우 특정 효소와 대사산물을 생산할 가능성이 매우 높다”는 점에 착안하여 “황토에서 분리한 유용미생물 및 대사산물을 이용한 작물 병해충 방제용 친환경농자재”을 개발하고 실용화하려는 것이다. 황토 서식 미생물자원을 활용한 다기능성 친환경농자재 개발 및 실용화·산업화를 위해

- 1) 황토로부터 다수의 미생물자원 확보
- 2) 농자재로서의 기능성 및 효능 평가
- 3) 기능성 미생물의 대사산물 및 작용부위 규명
- 4) 대량생산용 배지 선별 및 발효조건 확립
- 5) 현장 적용을 통한 제품화 및 실용화를 최종목적으로 하였다.

2. 필요성

1) 정치적인 측면

친환경농업정책으로 토양미생물제제 생산량이 증가하면서, 국내 미생물농약 시장 규모는 매년 빠르게 증가하고 있는 추세이다. 전 세계적으로 생물농약 시장은 도입단계를 지나 성장 초기 단계로서 친환경정책 및 안전한 농산물에 대한 관심이 폭발적으로 증가함에 따라 시장이 더욱 확대될 것으로 전망된다.

2) 경제적인 측면

○ 친환경농업 확산에 따라 최근 국내외의 화학농약과 화학비료 판매량은 큰 폭으로 감소되고 있는 실정이다.

○ 화학농약의 경우 2009년 판매 물량은 전년 대비 평균 25~30% 감소하였으며, 화학비료는 평균 16~20% 감소된 것으로 조사되었다(2009년 전남도청 친환경과 발표자료).

○ 일본의 경우 2010년 화학농약 판매액은 전년도 대비 17% 감소세를 보였다(농약공업회).

○ 중국에서는 살충제 사용량의 감소추세로 일부 성분은 최대 40%까지 감소할 것으로 예측된다(중국국립농업신문).

○ 세계 미생물농약 시장규모는 2010년 3억 달러, 2011년 3.2억 달러, 2016년에는 4억 달러로 5년간 연평균 성장률은 4.8%로 전망된다.

○ 세계 농수축산용 미생물 시장 (미생물농약, 미생물비료 및 사료첨가제 포함) 규모는 2010년 16억 달러, 2011년 17억 달러, 2016년 24억 달러로 예상되며 연평균 성장률이 6.9%로 전망된다.

3) 사회적인 측면

- “친환경 농·축산업”에 대한 공감대가 형성되고 농업인들이 이를 실천하면서 화학농약/비료, 항생제 사용과 판매량이 큰 폭으로 감소하고 있는 추세이다.
- 화학농약 오남용은 토양 및 환경오염·파괴, 토양 내 유익곤충/미생물 치사, 약제 내성 병해충 출현, 식품 내 농약 잔류물 존재 등 국민보건을 위협하는 치명적인 요소로 작용하고 있다.
- 현재 국내에서 유통되고 있는 1,000여개의 미생물제제, 생화학제제의 경우 무분별하게 유통되고 있어 국가 차원에서 효능 검토 및 관리가 절실히 필요한 상황이다.
- 친환경 농자재의 경우 대개 사용목적이 광범위하고 대부분 유기성 물질로서 주성분의 최소량, 유해성분의 최대량 등 객관적인 규격 제시가 어려우며 약효 발현 주성분, 살충, 살균효과가 불분명하다.
- 범정부차원에서 생물농약 분야 R&D 지원을 위해 2007년 확대 시행키로 한 ‘천적활용 원예작물 해충방제사업계획’에 의하면 2017년까지 시설원예재배면적 50%(5만 ha)를 천적방제로 유도하기 위해 4,020억 원의 사업비 투자 예정이다.

4) 기술적인 측면

- 황토의 효능은 건축재료, 양어장 정화, 적조제거, 가축사료 첨가제, 황토방, 황토침대, 음식발효, 농작물 경작 등 다양한 분야에서 검증되어 사용되고 있다. 그러나 황토에 존재하는 미생물자원을 발굴하여 친환경농자재(유용미생물제제)로 사용하고자 하는 시도는 전혀 보고된 바가 없다.
- 일본 미생물학자 히가 테루오 교수가 “유용미생물”을 처음 개발(1982년)한 이후 국내에서도 다양한 분야에 적용하고자 하는 노력이 있어왔다.
- 현재 유통되고 있는 미생물제제의 경우 대부분 일반 토양에서 분리한 균주를 사용하고 있다.
- 황토는 일반 토양에 비해 유기물 함량이 부족한 다소 척박한 환경임에도 불구하고 다양한 분야에 활용되고 있다. 본 연구는 척박한 조건에서 서식하는 황토 미생물의 경우 특정 효소와 대사산물을 생산할 가능성이 매우 높다”는 점에 착안하여 “황토 서식 유용미생물을 탐색·발굴하고, “작물 병원균과 병해충 방제”를 목적으로 각각의 용도에 맞게 최적의 배합조건을 갖춘 “유용미생물 및 대사산물”을 시제품으로 개발하고자 하였다.
- 본 연구는 황토에서 분리한 기능성 미생물 및 이들이 생산하는 대사산물을 이용한 작물생장촉진, 병해충 방제 분야의 최초의 연구개발이다.

IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 황토 유래 유용미생물 분리·동정

- 1) 광주·전남지역의 논밭으로부터 다수의 황토 시료 채취.
- 2) 황토 시료로부터 키틴 분해 미생물 및 작물 병해충 방제용 기능성 미생물 분리, 16S rRNA 염기서열 분석에 의한 미생물 동정.

2. 유용미생물의 병해충 억제 활성 조사

- 1) 다양한 작물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성 및 작용 스펙트럼 조사.
- 2) 작물 해충(진딧물, 응애)에 대한 살충효과 검증.

3. 유용미생물의 대사산물 분리·정제 및 대사산물 동정

- 1) 다양한 분리·정제기법(Ion exchange, Gel filtration, HPLC 등)을 통하여 미생물 유래 기능성 대사산물 분리정제.
- 2) 최첨단 분석 장비(Mass spectrometry, NMR 등)를 이용한 유용 미생물 생산 항진균활성 대사물질의 동정

4. 유용미생물의 대량배양 조건 확립 및 활성 균체성분/대사산물의 대량생산 방법 개발

- 1) 선발된 미생물의 대량배양을 위한 최적배지 및 발효조건 확립.
- 2) 화학합성 및 유전공학을 이용한 생리활성물질의 대량 합성기법 모색.

5. 미생물제제의 현장적용 및 시제품 개발

- 1) 대량배양에 의해 생산된 미생물제제의 약효·약해 시험
- 2) 미생물제제 시제품의 친환경농자재로 제품등록 추진.

V. 연구개발결과

1. 황토 유래 유용미생물 분리, 동정

광주광역시, 전남(나주시, 무안군, 해남군, 영암군 등)의 논밭으로부터 총 165점의 황토 시료를 채취하였다. 이들 황토 시료로부터 분리한 미생물과 작물 병원성 곰팡이 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*)의 대량배양 방법에 의해 항진균활성을 보인 길항미생물 총 30여 종을 선발하였으며, 이들은 *Bacillus* 속 (27종), *Paenibacillus* 속 (2종), *Brevibacillus* 속 (1종), *Acromobacter* 속 (1종)으로 각각 동정되었다.

또한 분리한 미생물들을 colloidal chitin 배지에 도달한 후 clear zone (투명 환) 생성여부를 조사한 후, 곰팡이 세포벽(키틴질) 분해효소 (chitinase) 활성이 우수한 *Paenibacillus* 속 (14종), *Bacillus* 속 (3종), *Chromobacter* 속 (1종)을 선발, 동정하였다.

2. 유용미생물의 병해충 억제 활성 조사

선발된 길항미생물들은 시들음병 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*), 균핵병 (*Sclerotinia sclerotiorum*), 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*), 역병 (*Phytophthora capsici*), 잣빛곰팡이병 (*Botrytis cinerea*), 검은무늬병 (*Alternaria alternata*)에 대해 다양한 항진균활성 스펙트럼을 나타내었다. 특히 선발된 미생물 중 *Bacillus* 속 (3종), *Paenibacillus* 속 (3종)은 chitin 분해 능력 뿐 아니라 시들음병 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*)에 대한 항진균활성이 매우 우수한 것으로 조사되었다.

또한 *Paenibacillus elgii* 34-6과 *Chromobacter* sp.의 경우 점박이용애에 대해 매우 높은 살충효과를 보였다. 그러나 선발된 미생물들의 경우 진딧물에 대한 살충효과는 상대적으로 매우 낮은 수준으로 조사되었다.

이와 더불어, 3종의 작물 세균병 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*)에 대해 항진균활성이 우수한 *Bacillus subtilis* MRS6-1과 *B. methylotrophicus* GM2 균주를 선발하였다.

3. 유용미생물의 대사산물 분리·정제 및 최적배지 선발

1) *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1로부터 항진균활성 대사산물 분리·정제 및 동정

광주광역시와 전라남도 지역의 황토에서 분리한 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주는 *Fusarium*을 포함한 작물 병원성 곰팡이에 대해 강력한 항진균활성을 보였다. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주의 배양상등액을 LC-MS 및 다양한 구조분석 기기를 이용하여 분석한 결과 여러 종류의 cyclic lipopeptide로 구성되어 있는 것을 확인하였으며, 그 중 항진균활성이 탁월한 펩타이드 fengycin을 유기용매 추출법 및 다양한 크로마토그래피를 이용해 분리·정제하였다.

2) *Paenibacillus elgii* BC34-6 으로부터 항진균활성 대사산물 분리·정제 및 동정

전라남도 해남군에서 채집한 황토로부터 항진균활성이 뛰어난 BC34-6 균주를 분리하였으며, 16S rRNA 유전자 분석에 의해 *Paenibacillus elgii*로 동정하였다. BC34-6 배양상등액은 다양한 종류의 작물 병원성 곰팡이에 대해 강력한 활성을 보였으며, 유기용매 추출법, 액체 크로마토그래피 등의 기법을 이용하여 분리·정제하였다. 분리 정제된 항진균활성 물질을 LC-MS를 통해 분석한 결과 4종류의 pelgipeptin 유도체 (pelgipeptin A~D)인 것으로 확인하였다.

3) *Paenibacillus kribbensis* CU01로부터 항진균활성 대사산물 분리·정제 및 동정

황토로부터 분리한 강력한 항진균활성을 갖는 *Paenibacillus kribbensis* CU01 균주의 배양상등액으로부터 액체 크로마토그래피를 이용한 항진균물질의 정제법을 정립하고 분리·정제된 물질의 구조분석을 위하여 LC-MS, MALDI-TOF MS를 이용하였다. 그 결과 *Paenibacillus kribbensis* CU01 균주는 기존 *Paenibacillus polymyxa*에서만 생산된다고 보고된 fusaricidin 계열의 항진균물질을 생산하는 것을 확인하였다.

4) 황토로부터 분리한 키틴분해 미생물로부터 chitinase 분리·정제

Colloidal chitin agar 배지를 이용하여 분리한 다양한 종류의 키틴분해 미생물을 동정하고, 각각 균주의 배양 상등액으로부터 키틴분해 효소를 황산암모늄 침전법으로 침전시킨 후 액체 크로마토그래피법을 이용한 분리하였다.

5) 유용미생물의 최적배지 선발 및 대량배양조건 확립

항진균활성 펩타이드를 생산하거나 또는 chitinase 활성이 우수한 길항미생물들을 대상으로 대량생산을 위한 최적배지 선발과 발효조건을 확립하였다. *Paenibacillus elgii* BC34-6의 경우 최소배지 (M9 배지 : Na_2HPO_4 6g, KH_2PO_4 3g, NaCl 0.5g, NH_4Cl 1g/L)에 1% sucrose, 0.5% yeast extract를 각각 탄소원과 질소원으로하여 최적배지를 선발하였고, 500L 발효기 (30°C, 120rpm, 60시간)에서 배양한 결과 생균수는 $\geq 1 \times 10^8$ cfu/ml로 조사되었으며, 우수한 항진균활성을 나타내었다. *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2의 경우 chitinase 생산을 위한 최적 탄소원과 질소원은 각각 chitin powder, tryptone임을 밝혔으며, 500L 발효기에서 배양한 결과 생균수는 $\geq 1 \times 10^8$ cfu/ml이며, 90% 이상 내세포자를 형성하였다. 또한 *Paenibacillus chinjuensis* 31-3의 경우 LB 배지에 0.2% colloidal chitin을 첨가하였을 때 최대의 chitinase 활성과 생균수를 확인하였다.

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주가 생산하는 fengycin의 대량생산을 위한 최적 배양 조건을 연구한 결과, 25°C의 낮은 온도보다 37°C에서 균주의 성장이 더 빨랐으며, 온도에 따른 fengycin의 생성량을 비교해 보았을 때에도 25°C에서는 fengycin의 발현이 거의 일어나지 않은 반면, 37°C에서는 시간이 지남에 따라 fengycin의 발현량이 지속적으로 증가하는 패턴을 관찰할 수 있었다. 따라서 fengycin의 대량생산을 위한 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주의 배양은 37°C가 최적온도이었다.

Paenibacillus kribbensis CU01은 배양 최적화를 통하여 Fe^{2+} , Mn^{2+} 와 같은 금속이온이 첨가된 최소배지에서 기존에 보고된 fusaricidin 생산량 (~수십mg/l)에 비해 10배 이상의 생산량 (~200mg/l)을 보이는 배지조건을 확립하였다. 또한 시간별 fusaricidin 생산량을 측정하여 최적 배양시간도 확인하였다.

4. Cyclic lipopeptide의 합성법 개발

강력한 항진균활성을 갖는 cyclic lipopeptide의 인공적인 합성법을 개발하기 위해 고체상 펩타이드 합성법 (SPPS)에 기초한 화학 합성법을 개발하고 화학합성법으로 만들어진 cyclic lipopeptide의 품질 측정을 위한 LC-MS 조건을 확립하였다.

5. 미생물제제 개발 및 *in vitro* 활성 검정

최적배지를 사용하여 대량배양된 *Paenibacillus elgii* BC34-6의 고추 탄저병에 대한 병 방제 효과를 조사하였다. 대조구로 현재 유통되고 있는 유기농자재 목록공시 제품 2종 (J사 제품, H사 제품)을 사용하였다. 초기에는 큰 차이는 보이지 않았으나, 병 발생 일주일 후 처리구 별로 확실한 병 방제 효과를 나타냈다. *P. elgii* BC34-6과 2종의 유통제품 모두 병 방제효과가 관찰되었다. 특히 *P. elgii* BC34-6의 경우 현재 판매되고 있는 제품들보다 고추 탄저병에 대한 방제 효과가 탁월한 것으로 밝혀졌다.

또한 *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2 균주의 고추 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*)에 대한 병 방제가 및 약해시험을 실시하였다. 최적배지와 상업용 TSB 배지에서 배양된 각각의 미생물 배양액을 200배, 500배 희석한 후 병 방제 효과를 검정하였다. 최적배지의 경우 200배, 500배 희석한 모든 처리구에서 탄저병에 대한 방제 효능을 확인하였으며, TSB 배지의 경우 200배액에서는 높은 방제효과를 보였지만 500배액에서는 효과가 없었다. 또한 배양액을 처리한 결과 낙엽, 고사, 갈변 등 어떠한 증상도 관찰되지 않아 작물에 대한 약해가 없는 것으로 판단되었다.

다양한 항진균활성을 갖는 *Paenibacillus kribbensis* CU01의 배양액을 고추에 처리하고 잣빛 곰팡이병을 유발시켰을 때 대조구에 비해 70%이상 병 발생률이 감소함을 확인하였다.

항진균활성 또는 chitinase 활성을 보인 4종 선발 균주 (*P. chinjuensis* 31-3, *P. elgii* BC34-6, *P. chitinolyticus* 35-2, *Chromobacterium* sp.)의 복숭아혹진딧물과 점박이용애에 대한 살충효과를 조사하였다. *P. elgii* BC34-6과 *Chromobacterium* sp.의 경우 점박이용애에 대해 높은 살충효과를 보였으나, 진딧물에 대한 방제효과는 전혀 없음을 확인하였다.

6. 미생물제제 사용 매뉴얼 개발 및 제품등록.

황토에서 분리한 *Paenibacillus elgii* 34-6 배양액의 고추 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*) 방제를 위한 포장에서의 사용 매뉴얼은 다음과 같다. 1) 대량생산된 미생물제제 (1×10^8 cfu/ml)를 200배 희석한 후 작물 재식 전에 토양 (200평 기준, 1L 사용)에 살포하여 토양 살균, 2) 200배 희석액을 작물 재식 3주 후 경엽 살포, 3) 1주 간격으로 재 살포, 4) 병 발생 징후가 보일 경우 1주에 2~3회 살포.

미생물제제의 경우 내생포자를 형성하여 보존에 큰 어려움은 없으나, 직사광선이 없는 서늘한 곳에 보관한다. 또한 가급적 화학농약과 병행해서 사용은 피한다.

Paenibacillus elgii 34-6 제제는 유기농자재 목록 공시 등재 예정이다.

또한 작물 성장촉진 효과가 탁월한 *Bacillus subtilis* MRS6-4 미생물제제는 제품등록 하였으며(미생물비료, 명칭 : 풍년가), 오이와 토마토에 대한 사용 매뉴얼은 다음과 같다. 1) 대량생산된 미생물제제 (1×10^8 cfu/ml)를 200배 희석한 후 작물 재식 전에 토양 (200평 기준, 1L 사용)에 살포하여 토양 내 우점하게 함, 2) 200배 희석액을 작물 재식 3주 후 관주 살포, 3) 1주 간격으로 재 살포, 4) 꽃이 필 무렵 사용 중단.

미생물제제의 경우 내생포자를 형성하여 보존에 큰 어려움은 없으나, 직사광선이 없는 서늘한 곳에 보관한다. 또한 가급적 화학비료와 병행해서 사용은 피한다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 황토에서 분리한 유용미생물제제 개발

본 연구에서 개발한 황토 유래 기능성 미생물은 다양한 종류의 작물 곰팡이 병 및 점박이응애 방제용 균주들이며, 현재까지 황토에서 분리한 미생물을 이용한 친환경 미생물제제로 이용하고자 하는 시도는 전무한 실정이다. 본 연구에서는 작물 병해충 방제 효능이 우수한 황토 유래 기능성 미생물의 선별, 대량생산용 실용화배지 및 최적 배양조건 확립 등 유용미생물의 실용화 공정 기술을 개발하였다. 이러한 기술들은 다른 우수한 미생물의 실용화·산업화 연구에 확산되어 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

2. 작물 병해충 방제용 *Paenibacillus elgii* BC34-6의 미생물제제 개발

본 연구에서 개발된 *Paenibacillus elgii* BC34-6 균주는 다양한 종류의 작물 곰팡이병 및 점박이응애 방제용 미생물제제로 효능이 우수하나, 현재까지 *Paenibacillus* strain을 이용한 미생물제제는 *Paenibacillus polymyxa* 균주가 유일한 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 *P. elgii* BC34-6 균주의 실용화 목적으로 대량생산용 (500L 발효기 이용) 최적배지 개발, 발효조건 확립 및 산업화 공정 기술 (내생포자 형성 유도)을 개발하였으며, 이러한 일련의 기술들은 다른 우수한 *Paenibacillus* strains의 미생물제제 개발에 유용하게 적용될 것으로 생각된다. 위의 결과들을 특허출원 및 2개 기업에 기술이전 하였으며, 친환경 유기농자재 목록공시 등록 후 농가에 보급할 예정이다.

또한 학문적으로도 본 연구에서 얻어진 *P. elgii* BC34-6 균주가 생산하는 항진균 펩타이드의 정제 및 작용기작 연구 결과들은 관련분야 국제저명학술지에 게재할 예정이다.

3. 키틴분해 미생물을 활용한 작물 병충해 방제제 개발

본 연구를 통해 황토로부터 분리한 *Paenibacillus chinjuensis* 31-3, *Paenibacillus elgii* BC34-6, *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2, *Chromobacterium* sp.의 경우 저비용 고효율 대량생산용 실용화배지 개발을 통해 키틴분해 활성이 우수한 것으로 조사되었으며, 작물 병해충 (곰팡이 병, 점박이응애) 방제용 미생물제제로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 농가 현장적용을 위한 실용화배지 개발 및 대량생산 배양공정 등 이러한 기술들은 다른 우수한 키틴분해 미생물의 유기농자재 개발에 적용되어 크게 확산될 것으로 생각된다.

또한 학문적으로도 본 연구에서 도출된 *Paenibacillus* strains 유래 chitinase에 대한 추가적인 연구가 진행되면 우수한 논문게재 및 특허출원 가능성이 높다. 이러한 병해충 방제용 chitinase에 대한 이화학적 특성 및 작용 스펙트럼 규명은 친환경 유기농자재로 개발 가능성이 높을 것으로 판단된다.

4. 세균병 방제 및 작물 성장촉진용 미생물제제 개발

본 연구를 통해 개발된 *Bacillus subtilis* MRS6-4와 *Bacillus methylotrophicus* GM2 균주 및 배양상등액의 경우 3종의 작물세균병 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*)에 대해 항균활성이 우수한 미생물제제로서 대량생산용 실용화배지 개발과 발효조건을 확립하였으며, 이러한 기술은 작물의 세균병 방제용 미생물제품 공정개발에 확산되어 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 특히 *Bacillus subtilis* MRS6-4 균주는 작물 성장촉진에도 효과가 우수하여 미생물비료로 등록하였으며, 화학비료 대체제로 농가 현장 보급을 통해 친환경농업을 확대하는데 일조할 것으로 생각된다.

또한 학문적으로도 본 연구에서 얻어진 *Bacillus* strains이 생산하는 항균활성 펩타이드 및 작물 성장촉진용 생리활성물질의 규명 등 추가적인 연구를 통해 논문게재 및 특허출원할 예정이다.

5. 개발 미생물제제와 사용 매뉴얼은 수요자 교육과 컨설팅 및 친환경 농산물 생산에 이용

본 연구에서 개발된 모든 미생물제제는 대형발효기 (500L 이상)를 이용한 대량생산과 내생 포자 형성을 유도한 공정기술 개발을 통해 1년 이상 안정성이 확보되는 것으로 판단된다. 또한 미생물제제를 농가 현장에서 직접 사용할 수 있게 사용 매뉴얼이 개발되어 있어 친환경 농산물 생산을 위한 교육용 교재 및 컨설팅에 활용이 가능할 것이며, 고부가가치 친환경 농산물 생산 및 농가 소득증대에 기여할 것으로 사료된다.

SUMMARY

(영문요약문)

I . Title

Development and application of multi-functional microbial agents for eco-friend agriculture using effective microorganisms isolated from yellow loess

II . Research results against goals

The objectives of this research were as follows: 1) isolation and registration of useful microbial resources, 2) screening of microorganisms for the control of crop pathogens, 3) screening of microorganisms for plant growth promotion/soil vitality promotion, 4) isolation and purification of antimicrobial substances, verification of their activities, and determination of molecular structures using state-of-the-art techniques, 5) establishment of mass production and formulation of agricultural microbial agent, 6) development of production technology of useful materials by genetic/biochemical techniques, 7) production of prototypes, 8) manual development for the prototype.

We isolated many kinds of strains which show inhibitory effects on plant pathogenic fungi, including genus *Bacillus* (27 sp.), *Paenibacillus* (2 sp.), *Brevibacillus* (1 sp.), *Acromobacter* (1 sp.), and also isolated the strains which have the ability to degrade chitin, which is one of fungal cell wall constituents, including genus *Paenibacillus* (14 sp.), *Bacillus* (3 sp.) and *Chromobacter* (1 sp.).

We developed the extraction and purification methods for the antimicrobial substances from the thus-isolated strains, and the molecular structures were analyzed. In addition, we established the optimum conditions to cultivate the strain producing the materials and developed microbial agents based on this developed method. The manuals were prepared to apply to the appropriate use of the microbial agents.

An artificial chemical synthesis techniques for the mass production of useful substances were also developed. As a result, the initial goals of the research were almost achieved: and two SCI and one non-SCI research papers were already published and two more papers will be published through this research. And two patents were filed. We developed one prototype

microbial agents and transferred our technology to two related companies and will discuss their production. In addition, eleven master- and doctoral-level personnel were produced through this project.

III. The purpose and requirement of R&D

1. Purpose

This research focused on the development, commercialization, and industrialization of crop pathogen control agent using microorganisms and their metabolites isolated from loess. The main idea is that “Loess microorganisms that live in harsh conditions are likely to produce specific enzymes and metabolites that are helpful and friendly to Farming Products” .

In order to accomplish this purpose:

- 1) Acquisition of a number of microbial resources from loess
- 2) Validation of functionality and efficacy as agro-materials
- 3) Identification of the active microorganism metabolites and their active sites
- 4) Optimization of medium condition for mass production and establishment of fermentation conditions
- 5) Commercialization by field application

2. Requirement

1) Political aspects

According to the increase of the production of soil microorganism by eco-agriculture policy, domestic microbial pesticide market is increasing rapidly every year. Global biopesticide market is expected to grow as a growth stage beyond the initial steps and then the market will be explosively growing due to interest in safe agricultural products.

2) Economical aspects

○ On account of the spread of environmentally friendly agriculture, domestic sales for chemical pesticides and fertilizer are significantly reduced compared to the previous year.

○ In the case of chemical pesticides, the sales volume were decreased by 25-30% a year on average. In the case of chemical fertilizer, sales volume were decreased up to an average 16-20% (2009 Jeonnam provincial government).

○ In Japan, sales of pesticides in 2010 showed a 17% decline compared to the previous year (Pesticides Association).

○ In China, it is expected to decrease some ingredients sales up to 40% due to the decline of pesticide usage (China National Agricultural Newspaper).

○ World microbial pesticide market is \$300 million in 2010, \$320 million in 2011, and will be \$400 million in 2016. The market is expected to be an average annual growth rate of 4.8%.

○ World microbial market size for agriculture and fisheries (microbial pesticides, including microbial fertilizer and feed additives) is \$1.6 billion in 2010, \$1.7 billion in 2011, and will be \$2.4 billion in 2016. It is expected to be an average annual growth forecast to 6.9%.

3) Social aspects

○ “Eco-agriculture and animal husbandry” is the consensus idea among the farmers and the usage of chemical pesticides, fertilizers, and antibiotics are decreasing.

○ Misuse of chemical pesticides acts as deadly threats to public health such as soil pollution, environmental destruction, beneficial insects, soil/microbial lethal, and drug-resistant pest outbreaks.

○ About 1000 microbial agents currently in circulation in the country have been indiscriminately distributed. Therefore the management and the efficacy review are urgently needed at the national level.

4) Technical aspects

○ Efficacy of loess are verified and it has been used in various fields including construction materials, fish farm cleaning, removing red tide, animal feed additives, ocher room, ocher beds, and fermented foods. However, attempts to discover the microbial resources that exist in the loess to be used as an environmentally friendly farming products (useful microbial agent) has not been reported at all.

○ Since Japanese microbiologist Higa Teruo developed “beneficial microorganisms” (1982), there have been efforts to apply the various sectors in the country.

○ In the case of microbial agents that are currently on the market, the most common isolates are from soil.

○ Despite the loess is the somewhat barren environment and organic matter content is low compared to regular soil, this research was started based on the idea “The loess microorganisms that live in harsh conditions are likely to produce specific enzymes and metabolites”. The loess is useful in view of the points to discover, explore, and develop microorganisms as a prototype for “plant pathogens and pest control”.

○ This study is the first research project that the functional microbial isolated loess and their metabolites were used to the plant growth promotion and the field of pathogen control.

IV. R&D contents and scope

1. Isolation and identification of beneficial microorganisms from yellow loess

1) Collection of a large number of loess samples from the fields of Gwangju and Jeonnam areas.

2) Isolation of chitin lytic and pest control microorganism from loess samples and microbial identification based on 16S rRNA sequencing.

2. Investigation of inhibitory activity of beneficial microorganisms against pests

1) Investigation of antifungal activity and mode of action against various crops pathogenic fungi

2) Investigation of insecticidal effects on crop pests (aphids, mites).

3. Isolation, purification, and identification of metabolites of beneficial microorganisms

1) Purification of functional microbial metabolites using various separation and purification techniques (Ion exchange, Gel filtration, HPLC, etc.)

2) Identification of antibacterial metabolites produced by beneficial microorganisms using state-of-the-art instruments (Mass spectrophotometry and NMR, etc.)

4. Development of microbial culture conditions for mass production and large production of active substance/metabolite of useful microorganisms

1) Establishment of the optimum medium and fermentation conditions for the mass culture of the selected microorganisms.

2) Method development of mass production of active metabolites using a chemical synthesis and genetic engineering.

5. Development of prototype and field application of microbial agents

1) Test of activity of microbial agent prepared by mass culture

2) Registration of prototype of microbial agent as an environmentally friendly bio-control agent.

V. R&D results

1. Isolation and identification of yellow loess-derived microorganisms

165 yellow loess soil samples were collected from the fields of Gwangju and Jeonnam Province (Naju, Muan, Haenam, Yeongam-gun, etc.). 30 species showing antifungal activity were isolated from the loess samples using a symmetry culture method. The isolated microbes were identified as *Bacillus* (27 species), *Paenibacillus* (2 species), *Brevibacillus* (1 species), and *Acromobacter* (1 species). In addition, 18 species showing chitinase activity were isolated using the formation of clear zone on colloidal chitin medium. *Paenibacillus* (14 species), *Bacillus* (3 species), and *Chromobacter* (1 species) were identified.

2. Investigation of inhibitory activity of beneficial microorganisms against pests

The selected microorganisms exhibited a wide range of antifungal activity against Fusarium Wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*), brown rot (*Sclerotinia sclerotiorum*), anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), epidemic (*Phytophthora capsici*), gray mold (*Botrytis cinerea*), and black blotch (*Alternaria alternata*). In particular, *Bacillus* (3 species), *Paenibacillus* (3 species) were very effective to wilt (*Fusarium*), as well as chitin lytic activity. *Paenibacillus elgii* 34-6 and *Chromobacter* sp. showed a very high insecticidal activity against *T. urticae*. However, the effect of the selected microbial insecticide for aphids was relatively low. In addition, *Bacillus subtilis* MRS6-1 and *B. methylotrophicus* GM2 exhibited an excellent antibacterial activity against three kinds of crop bacteria (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*).

3. Purification of metabolites of useful microorganisms and optimization of culture media

1) Purification and identification of antimicrobial metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 isolated from loess of the Jeollanam-do area showed a strong antifungal activity against plant pathogenic fungi including *Fusarium*. From the culture media of *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1, several types of cyclic lipopeptides which showed a strong antifungal activity were confirmed by LC-MS analysis. The peptides were purified using organic solvent extraction and various chromatographies.

2) Purification and identification of antimicrobial metabolites from *Paenibacillus elgii* BC34-6

The outstanding antifungal active BC34-6 strain was isolated from the loess of South Jeolla Province Haenam. The strain was identified as *Paenibacillus elgii* by 16S rDNA gene analysis. BC34-6 culture supernatant showed a strong activity against a variety of plant pathogenic fungi. The antifungal active substances were purified using organic solvent extraction and liquid chromatography. The purified antifungal substances were identified as

four types of pelgipeptin derivatives (pelgipeptin A ~ D).

3) Purification and identification of antimicrobial metabolites from *Paenibacillus kribbensis* CU01

Paenibacillus kribbensis CU01 having a strong antifungal activity was isolated from yellow soil and the antifungal active materials were purified and analyzed by liquid chromatography, LC-MS, and MALDI-TOF MS. As a result, *Paenibacillus kribbensis* CU01 produced antimicrobial substance fusaricidin.

4) Purification of chitinases from chitin lytic microorganisms

A variety of chitin lytic microorganisms were isolated using colloidal chitin media. Chitinases were purified from the culture broth of the bacteria using ammonium sulfate precipitation and liquid chromatography.

5) Establishment of the optimal culture and mass production condition for useful microorganism

We established the optimal conditions for the fermentation and the mass production of high antagonistic microorganisms. For *P. elgii* 34-6, minimal medium (M9 culture medium, 6 g of Na₂HPO₄, 3 g of KH₂PO₄, 0.5 g of NaCl, 1 g of NH₄Cl / L) in 1% sucrose, 0.5% yeast extract as nitrogen source and a carbon source was selected for the optimal medium. It was found that the number of cell is reached up to more than 1x10⁸ cfu/ml using 500L fermenter. The culture media exhibited an excellent antifungal activity. The optimal medium composition for chitinase production by chitin lytic microorganism was established. In the case of *P. chitinolyticus* 35-2, it was revealed that the optimal carbon and nitrogen sources for each of the chitinase production are chitin powder and tryptone, respectively. The number of cells was reached up to ≥1x10⁸ cfu/ml using 500L fermenter, and more than 90% of cells formed endospores. In the case of *P. chinjuensis* 31-3, addition of 0.2% colloidal chitin into the LB medium induced a maximum number of viable cells and high chitinase activity. The study of optimal culture conditions for the mass production of fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 strains revealed that the growth of the strain at a temperature of 37 °C was faster than at lower temperature of 25 °C. The production of fengycin was also faster at higher culture temperature. Therefore, cultivation of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 for mass production of fengycin require a higher optimum temperature which is approximately 37 °C. The addition of metal ions such as Fe²⁺, Mn²⁺ into the culture media showed tenfold or more production (~ 200 mg/L) compared to the existing reported fusaricidin production. The optimal incubation time was also confirmed by hourly output measurement.

4. Development of cyclic lipopeptide synthesis

To develop artificial cyclic lipopeptide with a strong antifungal activity, we developed the

solid phase peptide synthesis method for cyclic peptide and established the LC-MS conditions for the quality control of the cyclic lipopeptide made by chemical synthesis.

5. Development of microbial agent and *in vitro* activity assays

Using the optimal medium, we investigated the effects on the pepper anthracnose disease by large amounts of cultured *P. elgii* 34-6. For control group, the current distribution products (manufactured by J. Inc, and H. Inc.) were used. Initially it did not show a big difference, however it exhibited a certain disease control effects caused by treatment after the disease. Effective disease control by both *P. elgii* 34-6 and the distribution of two products was observed. In particular, *P. elgii* 34-6 is more effective for the prevention of anthracnose pepper than the commercial materials. In addition, the disease control of *P. chitinolyticus* 35-2 was tested for pepper anthracnose (*Colletotrichum coccodes*). The microorganisms were cultured in optimal and commercial TSA medium with 200- and 500-fold diluted media. Both 200- and 500-fold diluted optimal media showed high activity, whereas only 200-fold diluted TSA media showed high inhibitory activity with anthracnose. In addition, the result of treatment of culture media did not induce any symptoms such as browning, dead leaves, indicating no weakening of the crop. The treatment of *Paenibacillus kribbensis* CU01 having a variety of anti-fungal activity reduced at least 70% of fungal botrytis cinerea disease when compared to the control treatment to pepper. We investigated the insecticidal effects of 4 kinds selected strains showed high antifungal activity or chitinase activity (*P. chinjuensis* 31-3, *P. elgii* 34-6, *P. chitinolyticus* 35-2, *Chromobacterium* sp.) on green peach aphid and spotted spider mite. The *P. elgii* 34-6 and *Chromobacterium* sp. showed a high insecticidal effect on spotted spider mite but no on aphid at all.

6. Manual development and product registration for microbial agent.

User's manual of the packaging of *Paenibacillus elgii* 34-6 culture medium for pepper anthracnose (*Colletotrichum coccodes*) control is as follows: 1) 200-fold dilution of mass-produced microbial agent (1×10^8 cfu/ml) and spray to sterilize the soil before the crop planting (661 m², 1L use), 2) spray the 200-fold diluted sample in three weeks after crops planted, 3) re-spraying every week, and 4) 2-3 times spraying a week if you show signs of a disease occurs. In the case of microbial agents, there is no difficulty to preserve due to formation of endospores, but it should be stored in a cool place without direct sunlight. In addition, the chemical pesticide use should be avoided as much as possible in parallel. *Paenibacillus elgii* 34-6 agent is going to be registered to the disclosure of the list of organic materials. In addition, the microbial agent *Bacillus subtilis* MRS6-4 was registered as a product (microbial fertilizer, Name: pungnyeonga). The instruction manual for cucumbers and tomatoes as follows: 1) 200-fold dilution of mass-produced microbial agent (1×10^8 cfu/ml), then spray before the crop planting (661 m², 1L use, make it dominant in the soil), 2) drenching spray 200-fold diluted sample in three weeks after crop planting, 3) re-spraying every week, and 4)

stop when flowers come out. In the case of microbial agents, there is no difficulty to preserve due to formation of endospores, but it should be stored in a cool place without direct sunlight. In addition, the chemical pesticide use should be avoided as much as possible in parallel. the *Bacillus subtilis* MRS6-4 agent is going to be registered to the disclose of the list of organic materials.

VI. Research achievements and their utilization plan

1. Development of useful microbial agents isolated from yellow loess

In this study, we developed loess-derived functional microorganisms for the control of a wide variety of crops fungal disease and spotted spider mite, which has not been attempted at all. In addition, we developed a practical process technology to use the useful microorganisms for effective crop pest control through an excellent selection of loess-derived microbial and optimization of culture conditions for mass production. These techniques are considered to make the practical use and industrialization of other superior microorganisms.

2. Development of microbial agents for control of crop pests using *Paenibacillus elgii* 34-6

The *P. elgii* 34-6 agent developed in this study is very effective to a variety of crops fungal disease and spotted spider mite. However *Paenibacillus* strain has not been known so far except *P. polymyxa* strains. In this study, we developed an optimal medium, industrialization process technologies (induction of endogenous spore formation), and fermentation conditions for the practical purpose of mass production of *P. elgii* 34-6 strains (500L fermenter used). It is considered to be applied to the development of a microbial agent using the *Paenibacillus* strains. We applied a patent and transferred the technology to two different companies. The organic and eco-friendly materials will be registered to the Disclosure to distribute to farmers. In addition, we are studying the mechanism of action of the antifungal peptides produced by *P. elgii* 34-6 and expect to publish the results to eminent international journals.

3. Development of microbial agents for control of pests using chitinase-producing microorganisms

In this study, the loess-derived *Paenibacillus chinjuensis* 31-3, *P. elgii* 34-6, *P. chitinolyticus* 35-2, *Chromobacterium* sp. showed strong chitin lytic activity for practical use through the cost-effective mass production and medium development. This can be utilized for microbial biocontrol agent. These techniques are applied to the process of organic materials

developed in another excellent microbial degradation of chitin, which is thought to be spread widely. In addition, further researches on chitinase of *Paenibacillus* strains will make high quality paper publication and patent application. These physicochemical properties and spectral identification of the chitinase action for prevention are considered to develop eco-friendly organic materials.

4. Development of microbial agents for bacteria disease control and plant growth promotion

In this study, we developed *Bacillus subtilis* MRS6-1 and *B. methylophilus* GM2 strains to control three kinds of crops bacterial disease (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines*, *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, *Xanthomonas campestris* pv. *Pruni*). This technique is considered to apply to the product development process for bacterial disease control in crops. In particular, *Bacillus subtilis* MRS6-1 was registered as a microbial strain which is particularly effective in promoting good fertilizer to grow crops. Therefore chemical fertilizers will be replaced by these eco-friendly agents. In addition, it is expected to publish several research papers and apply patent through additional studies on these microorganisms.

5. Microbial agents and the instruction manual will be used for consumer education, consulting and production of eco-friendly agricultural products

All microbial agents developed in this study were determined to be stable more than one year through the mass production and a process leading to endospores forming technology using a large fermenter (500L or lager). In addition, manuals have been used to develop a microbial agent available directly from the farm site and will be utilized in the training materials and consulting for environmentally-friendly agricultural production.

CONTENTS

Chapter 1 Project introduction and goals	-----1
Chapter 2 Current status of technology trends	-----3
Chapter 3 Research content and results	-----7
Chapter 4 Results against goals and contribution to related field	-----188
Chapter 5 Achievement and application	-----194
Chapter 6 New scientific information collected from abroad	-----203
Chapter 7 Research instruments and facilities	-----203
Chapter 8 Laboratory safety management	-----204
Chapter 9 Reference	-----206

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과목표	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	3
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	7
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	188
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	194
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	203
제 7 장	연구시설·장비 현황	203
제 8 장	연구실 안전관리 이행실적	204
제 9 장	참고문헌	206

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 황토 유래 기능성 미생물 활용 배경 및 전망

황토는 지구 지표면의 약 10%를 덮고 있으며, 특히 우리나라의 경우 30%가 황토로 이루어져 있다. 황토의 주요 성분은 실리카 (SiO_2), 알루미나 (Al_2O_3), 철분, 마그네슘, 나트륨, 칼륨 및 다양한 광물로 구성되어 있다. 황토 1g에는 일반 토양에 비해 적은 수 (2×10^8 cfu/g)의 미생물만이 살고 있으나 다양한 효소들 (카탈라아제, 디 페놀 옥시다아제, 사카라아제, 프로티아제 등)의 순환작용이 일어나고 있다.

황토의 효능은 토양개량, 농작물 경작, 질병 치료, 건축 재료, 양어장 정화, 적조 제거, 가축 사료첨가제, 황토방, 황토 침대, 음식 발효 등 실생활의 다양한 분야에서 사용되어지고 있다. 그러나 황토에 존재하는 미생물자원을 발굴하여 친환경농자재 (유용미생물제제)로 사용하고자 하는 시도는 전혀 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구는 일반 토양에 비해 유기물 함량이 부족한 다소 척박한 환경임에도 불구하고 다양한 분야에 활용되고 있는 황토의 효능은 “척박한 조건에서 서식하는 황토 미생물의 경우 특정 효소와 대사산물을 생산할 가능성이 매우 높다”는 점에 착안하여 “유용미생물 및 대사산물을 이용한 작물 병해충 방제용 친환경농자재” 개발 및 실용화·산업화이다.

황토 서식 미생물자원을 활용한 다기능성 친환경농자재 개발 및 실용화·산업화를 위해

- 1) 황토로부터 다수의 미생물자원 확보
- 2) 농자재로서의 기능성 및 효능 평가
- 3) 기능성 미생물의 대사산물 및 작용부위 규명
- 4) 대량생산용 배지 선별 및 발효조건 확립
- 5) 현장 적용을 통한 제품화 및 실용화를 최종목적으로 하였다.

2. 친환경농업의 현황 및 전망

가. 정치적인 측면

친환경농업정책으로 토양미생물제제 생산량이 증가하면서, 국내 미생물농약 시장 규모는 매년 빠르게 증가하고 있는 추세이다. 전 세계적으로 생물농약 시장은 도입단계를 지나 성장 초기 단계로서 친환경정책 및 안전한 농산물에 대한 관심이 폭발적으로 증가함에 따라 시장이 더욱 확대될 것으로 전망된다.

나. 경제적인 측면

친환경농업 확산에 따라 국내의 화학농약과 화학비료 판매량은 전년 대비 큰 폭으로 감소되고 있는 실정이다. 화학농약의 경우 판매 물량은 전년 대비 평균 25~30% 감소하였으며, 화학비료는 평균 16~20% 감소된 것으로 조사되었다(2009년 전남도청 친환경과 발표자료). 세계 미생물농약 시장규모는 2010년 3억 달러, 2011년 3.2억 달러, 2016년에는 4억 달러로 5년간 연

평균 성장률은 4.8%로 전망된다. 또한 세계 농수축산용 미생물 시장 (미생물농약, 미생물비료 및 사료첨가제 포함) 규모는 2010년 16억 달러, 2011년 17억 달러, 2016년 24억 달러로 예상되며 연평균 성장률이 6.9%로 전망된다.

다. 사회적인 측면

친환경농축산업에 대한 공감대가 형성되고 농업인들이 이를 실천하면서 화학농약, 화학비료, 항생제 사용과 판매량이 큰 폭으로 감소하고 있는 추세이다. 화학농약과 화학비료의 오남용은 토양 및 환경오염·파괴, 토양 내 유익곤충/미생물 치사, 약제내성 병해충 출현, 식품 내 농약 잔류물 존재 등 국민보건을 위협하는 치명적인 요소로 작용한다. 따라서 안전한 먹거리 공급을 통한 국민 건강, 보전에 기여하고자 범정부차원의 노력이 절실히 요구된다. 현재 국내에서 유통되고 있는 친환경 농자재의 경우 사용목적이 광범위하고 대부분 유기성 물질로서 주성분의 최소량, 유해성분의 최대량 등 객관적인 규격 제시가 어려우며 약효발현 주성분, 살충, 살균효과가 불분명하게 유통되고 있어 국가차원에서 효능 검토 및 관리가 절실히 필요한 상황이다.

라. 기술적인 측면

황토의 효능은 건축재료, 양어장 정화, 적조제거, 가축사료 첨가제, 황토방, 황토침대, 음식 발효, 농작물 경작 등 다양한 분야에서 검증되어 사용되고 있다. 그러나 황토에 존재하는 미생물자원을 발굴하여 친환경농자재(유용미생물제제)로 사용하고자 하는 시도는 전혀 보고된 바가 없다. 현재 유통되고 있는 미생물제제의 경우 대부분 일반 토양에서 분리한 균주를 사용하고 있다. 따라서 본 과제는 황토에서 분리한 기능성 미생물 및 이들이 생산하는 대사산물을 이용한 작물 성장촉진, 병해충 방제 분야의 최초의 연구개발이다.

제 2 절 연구개발의 목표

본 과제는 황토유래 1)유용 미생물자원의 분리 및 등록, 2)작물 병원균 방제용 미생물 선별, 3)식물 성장촉진/토양 활력증진용 미생물 선별, 4)항균물질의 분리·정제, 활성 검증 및 최첨단 분석기를 통한 분자구조 규명, 5)농업용 미생물제제의 대량생산공정 확립 및 제형화, 6) 유용물질의 유전공학/생화학적 기법을 통한 생산기술 개발, 7) 시제품의 제작, 8) 시제품의 적용 매뉴얼 개발 등을 목표로 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 생산 및 시장 현황

1. 작물 병해충 미생물제제의 국내외 현황 및 전망

가. 3P 분석을 통한 대상기술의 국내 현황

국내의 경우 작물 생육촉진 및 병해충 방제를 목적으로 미생물을 이용한 연구개발과 시제품 생산에 대학, 연구소 및 기업체의 많은 연구진들이 집중하고 있다. 현재 연구개발을 통해 생산된 후 유통되고 있는 제품의 경우 대부분이 작물 생육촉진용 미생물비료로 등록되어 있다. 미생물비료의 경우 유효함량 ($\geq 10^6$ /ml, g) 충족 시, 병원성 미생물 불검출 시 쉽게 등록할 수 있는 반면에 약해, 약효를 보증할 수 없는 제품들이 무분별하게 난무되고 있어 관련 정부기관의 제도적인 장치가 필요하다.

작물 병 방제용 미생물살균제로 총 17개 제품이 국내에 등록되어 있다. 그 중 4개 제품은 수입 제품이며, 13개 제품이 국내 연구진들에 의해 개발된 것이다. 17개 제품의 경우 대부분 (13개 제품)이 *Bacillus* 속 균주 (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* 등)이며, 2개 균주는 방선균 *Streptomyces* 속 (*Streptomyces lydicus*), 그리고 나머지는 각각 *Paenibacillus polymyxa* 와 *Ampelomyces quisqualis* 균주이다. 그러나 과거에는 대부분의 연구진에 의해 흰가루병을 비롯한 지상부 병해에 효과적인 제품 개발에 치중하였으나, 최근에 몇몇 연구소, 대학 및 기업체를 중심으로 고추 역병, 토마토 시들음병, 토마토 꽃마름병, 배추 뿌리혹병 등 토양병해 방제용 미생물농약 기술 개발에 집중적인 연구를 하고 있는 것으로 나타났다.

위에서 언급한 바와 같이 국내의 경우 다양한 미생물 자원을 이용한 친환경 작물 병 방제용 기술 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있음에도 불구하고 대부분의 연구 성과들이 아직까지 실용화·산업화에는 성공하지 못하고 있는 실정이다. 이러한 이유는 연구실에서 매우 좋은 결과를 얻었음에도 실제 제품 생산을 위한 대형발효기 등 설비 부족, 전문적인 운영인력 및 기술력 부재, 제형화 기술 부족 등이 주요 원인으로 나타났다.

미생물 자원을 활용한 작물 해충 방제의 국내 기술은 주로 Bt 균주가 생산하는 내독소 살충단백질을 사용하는 것이 주류를 이루고 있다. 그러나 위의 기술은 주로 섭식성 나방류 방제에 초점이 맞춰져 있으며, 진딧물을 비롯한 흡즙성 해충 방제를 목적으로 미생물제제를 이용한 생물농약 제품은 현재까지 국내에는 전무한 상황이다. 따라서 기능성 미생물 자원 및 식물 추출물을 혼용한 효과적인 제품 개발에 역점을 둘 필요성이 있다.

나. 3P 분석을 통한 대상기술의 국외 현황

국외의 경우 미생물 자원과 식물 추출물을 활용한 친환경 병해충 방제를 목적으로 다수의 제품 개발 및 현장 활용이 매년 꾸준히 증가하고 있다. 미생물살균제의 경우 다양한 종류의 세균과 곰팡이를 이용한 제품이 개발되어 현재 상용화되고 있다. 세균을 이용한 대표적인 미생물 제품의 경우 대부분 *Bacillus* 속과 *Pseudomonas* (*Burkholderia* 속 포함) 속 미생물이다. 곰팡이를 이용한 미생물살균제의 경우 *Trichoderma harzianum*, *Ampelomyces quisqualis* 균주가 대표적인 것으로 개발되어 상용화되고 있다. 미생물을 이용한 작물 해충 방제용 제품 개발의 경우

Metarhizium anisopliae, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Paecilomyces* 속 및 *Hirsutella* 속 등이 대표적인 살충성 미생물로 알려져 있다. 최근 미국 EPA의 연구 분석 동향에 의하면 미생물농약의 경우 세균을 이용한 경우가 가장 많이 차지하고 있으며, 진균과 바이러스를 이용한 생물농약의 개발이 증가하고 있는 추세이다.

또한 다양한 종류의 식물 (멸구슬, 굴나무, 제충국, 향부자, 사초, 강황, 측백나무 등)로부터 추출한 생리활성물질을 이용한 해충 방제 기술이 주류를 이루고 있다. 친환경 소재를 이용한 작물 해충 방제의 국외 현황은 제형화 기술, 식물 유래 후보 물질 선별, 미생물 유래 활성물질을 활용한 제제개발 등 질적 수준이 매우 높으며 글로벌 마케팅에 주력하고 있다. 특히, 국외의 경우 미생물제품 개발에 있어 생균수를 고려한 기술보다 미생물이 생산하는 2차 대사산물을 원재료로 이용하는 제형화 기술 개발에 역점을 두고 있다.

제 2 절. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

가. 국내 제품 생산 및 시장 현황

2008년 기준 국내 친환경 채소류 생산에 사용되는 금액은 1.08조원으로 집계되었으며, 그 중 채소류 병해충 방제에 약 280억 원의 비용이 소요되는 것으로 조사되었다. 국내 개발 및 수입 미생물살균제 시장은 2009년 약 45억 원으로 조사되었으며, 그 중 국내 개발 미생물살균제가 약 41억 원을 차지하고 있다. 위와 같이 친환경농업에 소요되는 비용이 매년 꾸준히 증가함에도 불구하고, 친환경 재배 시 심각한 문제로 대두되고 있는 토양 전염병을 방제할 수 있는 적절한 수단과 제품이 부족하여 친환경농업을 포기하는 농가가 늘어나고 있다. 따라서 토양 전염병에 대한 방제가가 높은 미생물살균제 개발을 통해 높은 시장성을 확보할 수 있을 것으로 판단된다. 국내 시장을 종합해 보면, 앞으로 화학농약을 포함한 전체 농약시장 1조 3천 2백억 원 중 생물농약 시장이 차지하는 금액은 약 820억 원으로 예상하며, Bt를 제외한 살충제 시장 320억 원, 살균제 시장 186억 원, 천적 시장 258억 원, 제초제 시장 7억 원 정도로 생물농약이 차지하는 비율은 전체 농약시장의 7% 정도를 형성할 것으로 생각된다.

나. 국외 제품 생산 및 시장 현황

국외 미생물농약 제품 중 가장 큰 시장은 Bt균을 이용한 미생물살충제로서 2005년 348백만 달러로 전체 생물농약 시장의 52%를 차지하였다. 또한 미생물살균제의 대표적인 베스트셀러는 미국 AgraQuest사의 Serenade 제품으로 2009년에 1억 달러 이상을 판매한 것으로 알려졌다.

(1) 미국

미국의 생물농약 시장은 Certis-USA, AgraQuest를 비롯한 중소 기업체들이 선두 주자 역할을 하고 있다. 최근에는 FMC, BASF 등 글로벌 농약회사들이 미국 내 주요 벤처회사를 인수 합병하여 전 세계적으로 글로벌 마케팅을 강화, 추진하고 있는 실정이다. 이들 글로벌 화학농약 회사들은 기존에 벤처회사들이 보유했던 대표적인 미생물제품 (살균제, 살충제)들을 기반으

로 전 세계의 글로벌 사업을 진행할 예정이다.

(2) 유럽

유럽의 경우 Koppert사의 천적을 이용한 제품과 시설원예 분야에 적용할 수 있는 미국에서 개발된 다양한 생물농약을 유통 판매하는 다수의 기업들이 있다. 이들 기업들은 매년 전시회와 회의를 개최하여 생물농약에 관한 전반적이고 다양한 정보들을 상호 교환하고 있다. 특히, 유럽의 경우 생물농약 개발에 소요되는 시간과 비용이 전 세계 어느 지역보다 많으며, 최근에는 개발된 제품의 독성에 대한 자료 제출 등 요구수준이 강화되고 있는 추세이다.

(3) 중국

중국 생물농약 사용은 2001년 국가발전개혁위원회의 생물기술 산업화 프로젝트에 생물농약 산업화개발이 포함되면서 본격화되었다. 생물농약 산업화 세부항목으로 진균제제의 산업화가 첫 번째로 채택되었으며, 정부 차원의 꾸준한 지원으로 2001년 13개의 생물농약산업화제품이 등록되었다.

(4) 세계시장 종합

전 세계 생물농약 시장은 2001년 현재 세계 농약시장의 약 2%인 5.8억 달러였으며, 매년 꾸준한 증가 추세를 보여 2005년 전체 농약시장의 2.5% 점유율, 2010년 4.3%의 시장 점유율로 10억 7,500만 달러의 시장을 형성하였다. 각국의 화학농약 사용 절감에 의한 친환경농업 정책으로 인하여 미생물농약 시장 규모가 2013년에는 세계 농약시장의 약 15%인 45억 달러에 도달할 것으로 예상된다 (Santander Investment, 1998).

2. 산업화를 통한 기대효과

위에서 언급한 내용을 토대로 국내에서도 글로벌 경쟁력을 지닌 저비용 고효율의 미생물제품을 개발하고 지원하여 전 세계 시장에 진출하는데 주력해야 할 것으로 사료된다. 본 연구를 통해 개발된 미생물제품들은 세계 시장의 수요에 충족되는 것으로 추가 연구에 의해 다양한 종류의 작물 병원성 곰팡이 및 응애 방제제로서의 제품 등록이 가능할 것으로 판단된다. 더불어, 화학농약과 화학비료의 오남용으로 인한 환경 및 생태계파괴, 잔류독성 등 부작용을 대체할 수 있는 신개념의 바이오소재 개발이 절실하며, 기능성 미생물자원을 활용한 작물 보호제 개발에 따른 화학농약 대체효과 또한 매우 클 것으로 예상된다.

본 연구를 통해 개발된 미생물제품들의 직접 경제효과를 측정하기 위한 산정기준은 다음과 같다.

가. 작물 병원성 곰팡이 방제제 (가칭 제품명 : 진균탄)

460억 원 (병원성 곰팡이 방제제 시장 : 시들음병 146억 원, 균핵병 80억 원, 역병 46억 원, 갯빛곰팡이병 108억 원, 탄저병 80억 원) x 7.9% (전체 농산물 대비 친환경농산물 최근 3년간 평균 시장성) x 20% (대상 병해 방제용 자재의 예상 시장성) = 약 7.8억 원/년

나. 응애 방제제 (가칭 제품명 : 응애박멸)

390억 원 (응애 방제용 친환경농자재 시장) x 7.9% (전체 농산물 대비 친환경농산물 최근 3

년간 평균 시장성) x 20% (대상 해충 방제용 자재의 예상 시장성) = 약 6.2억 원/년

다. 작물 세균병 방제제 (가칭 제품명 : 잔토 클리너)

130억 원 (모잘록병, 무름병 등 작물 세균병 방제제 시장) x 7.9% (전체 농산물 대비 친환경 농산물 최근 3년간 평균 시장성) x 20% (대상 세균병 방제용 자재의 예상 시장성) = 약 2.1억 원/년

라. 미생물비료 (제품명 : 풍년가)

411억 6천만 원 (토양미생물제제 비료 시장) x 7.9% (전체 농산물 대비 친환경농산물 최근 3년간 평균 시장성) x 20% (대상 작물 생육용 자재의 예상 시장성) = 약 6.5억 원/년

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과				23	230	
경제적 파급효과				230	2,300	
부가가치 창출액				230	2,300	
합 계				483	4,830	

※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치

※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치

※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. 황토 유래 기능성 미생물 분리 및 동정

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

가. 황토 서식 미생물 확보

지역, 환경, 작물 종류별로 특이적인 다양한 종류의 황토 시료를 광주광역시, 전남 (나주시, 무안군, 해남군, 영암군 등)의 논밭으로부터 총 165점 채취하였다. 각각의 황토 시료는 무균 처리된 지퍼백 및 50ml conical tube에 채취 후 냉장 보관하였다. 황토에 서식하는 다양한 종류의 미생물을 분리하기 위하여 황토 1g을 멸균 증류수 또는 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) 9ml에 현탁하여 십진법으로 연속 희석한 후 30분 동안 실온에 방치하였다. 희석된 각각의 시료 상층액 100 μ l를 Tryptic Soy Agar (TSA), Luria-Bertani Agar (LB agar), Nutrient Agar (NA), de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS agar) 배지에 도말하였다. 도말된 각각의 plates를 30~37 $^{\circ}$ C에서 48시간 이상 배양한 후 배지 종류별, 형태별로 다른 종류의 미생물을 분리한 후 30% glycerol stock에 저장하여 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 본 연구의 병해충 방제용 유용미생물 선발 균주로 사용하였다.

나. 작물 병해충 확보, 배양 및 보존

작물 곰팡이병 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* KACC 40031 (시들음병), *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 40457 (균핵병), *Colletotrichum coccodes* KACC 40009 (탄저병), *Botrytis cinerea* KACC 40574 (갯빛곰팡이병), *Phytophthora capsici* KACC 40157 (역병), *Alternaria alternata* KACC 40019 (검은무늬병) 균주를 농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원정보센터로부터 분양 받아 본 연구에 사용하였다. 5종 곰팡이의 배양, 포자형성 및 보존을 위해 Potato Dextrose Agar (PDA) 배지를 사용하였다. 곰팡이 균주의 포자형성 유도과 차후 연구를 위한 보존 목적으로 PDA slant 배지에 접종·도말한 후 25~30 $^{\circ}$ C에서 7~10일 동안 배양하면서 포자형성 유무를 관찰하였다. 포자가 형성된 곰팡이 균주는 4 $^{\circ}$ C 냉장고에 stock 보존하면서 연구진행에 사용하였다.

또한 3종의 작물 세균병 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* KACC 11151 (콩 불마름병), *Xanthomonas euvesicatoria* 173-1 (고추 세균성점무늬병), *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* MAFF 301420 (복숭아나무 세균성구멍병) 균주를 농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원정보센터로부터 분양 받아 항세균활성이 있는 길항균주 선발에 사용하였다. 이들 3종의 세균은 TSA 배지에 도말한 후 30 $^{\circ}$ C에서 2일 동안 배양한 후 30% glycerol stock에 저장하여 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 본 연구를 수행하는데 사용하였다.

황토에서 분리한 미생물의 작물 해충에 대한 살충효과를 검정하기 위하여 복숭아혹진딧물 (*Myzus persicae*)과 점방이응애 (*Tetranychus urticae*)를 다음과 같이 사육하였다. 90 x 15mm petri dish에 실험용 탈지면을 깔아준 뒤 5주 정도 자란 고추 (복숭아혹진딧물 기주)와 강낭콩 (점방이응애 기주) 잎을 2 x 3cm 크기로 잘라 잎 아랫면이 위를 향하도록 엮어 주었고 주변은 핀셋을 이용하

여 솜 벽을 만들어주었다. 사육실에서 누대 사육된 점박이응애와 복숭아혹진딧물을 미소봇 (1호)을 이용하여 petri dish당 각각 20마리씩 접종하였다 (균주별 20마리, 3반복, 실험곤충 2종).

다. 작물 병해충 방제용 미생물 선발 및 동정

총 165점의 황토 시료로부터 분리한 400여 종의 균주 중에서 72종을 1차 선발한 후 작물 병원성 곰팡이 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* KACC 40031 (시들음병), *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 40457 (균핵병)에 대한 항진균활성을 조사하였다. 1차적으로 선발된 세균들의 항진균활성 정도를 조사하기 위해 PDA plate의 중앙에 병원성 곰팡이를 접종한 후 30°C, 1-2일 동안 배양하여 균사 성장을 관찰하였다. 병원성 곰팡이의 균사 성장이 1cm 정도 확인되었을 때 균사 주변에 각각의 세균을 접종하여 2-3일 동안 추가 배양한 후 균사 성장 저해정도를 판단하였다.

또한 황토로부터 분리한 *Bacillus* 속, *Paenibacillus* 속 균주들의 작물 세균병 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* KACC 11151, *Xanthomonas euvesicatoria* 173-1, *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* MAFF 301420에 대한 항진균활성을 조사하였다. 각각의 병원성 세균 (10^4 /ml)을 TSA plates에 도말한 후 *Bacillus*, *Paenibacillus* 속 균주들을 접종하여 30°C, 2-3일 동안 배양하면서 clear zone 생성 여부를 관찰하여 병원성 세균에 대한 항진균활성 유무를 판단하였다.

더불어 복숭아혹진딧물과 (*Myzus persicae*)과 점박이응애 (*Tetranychus urticae*)에 대한 황토 유래 균주들의 살충효과를 조사하였다. 미생물살충제 후보균으로 선발한 균주들을 2-3일 동안 액체배양한 후 희석하여 미생물배양액 시료 (50ml)를 준비하였다. Petri dish에 준비된 기주식물 앞에서 미리 사육되고 있는 복숭아혹진딧물과 점박이응애에 미생물배양액 시료를 포물선을 그리듯 분무하였다. 분무 후 햇볕이 들지 않는 장소에서 음건하였으며, 기주식물의 건조 방지 및 실험곤충의 탈출을 방지하기 위해 탈지면에 멸균증류수를 충분히 적셔주었다. 24, 48, 72시간 간격으로 미생물배양액을 3회 처리 후 실험곤충의 생사 유무는 해부현미경 하에서 미소봇 (1호)으로 건드려 1cm 이상 이동한 경우 살아있는 것으로 확인하였다.

작물 병해충 방제용 유용미생물로 선발된 균주들은 16S rRNA 유전자 서열 분석 및 유연관계 규명을 통해 동정하였으며, 30% glycerol stock에 저장하여 -80°C에서 보관하면서 본 연구 수행에 사용하였다.

라. Chitinase 생산 균주 분리

곰팡이 세포벽, 해충 알 껍질, 그리고 애벌레 표피 구성성분인 키틴질을 분해하는 chitinase 생산 능력이 우수한 미생물을 황토로부터 분리하고자하였다. 황토 1g을 멸균 증류수 또는 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) 9ml에 현탁하여 강력하게 진탕한 후 30분 동안 실온에 방치하였다. 각각의 시료 상층액 1ml을 colloidal chitin agar 배지 (1% swollen chitin 500ml, Na_2HPO_4 2g, NaCl 1g, NH_4Cl 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, Yeast extract 0.1g, Agar 15g/liter)에 도말한 후 30-37°C, 1-2주 동안 배양하면서 균체 주변의 clear zone 생성을 관찰하였다. 균체 주변에 Clear zone 생성이 확인된 균주를 1차 선발하였으며, 각각을 TSB (tryptic soy broth) 배지에서 2일 동안 배양한 후 균체를 회수하여 colloidal chitin 배지에 재접종하여 1주일 동안 배양한 후 clear zone 크기에 따라 chitinase 생산 균주로 최종 선발하였다.

2. 연구개발 결과

가. 작물 병해충 방제용 미생물 분리, 동정

광주광역시, 전남 (나주시, 무안군, 해남군, 영암군 등) 지역에서 채취한 총 165점의 황토 시료로부터 400여 종의 균주를 배지 종류, 형태학적, 성장 특성에 따라 분리하여 보존하였다. 분리한 400여 종의 균주 중 72종을 선발하여 적합한 조건 (배지, 온도 등)에서 활성화시킨 후 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* KACC 40031 (시들음병)에 대한 항진균활성을 조사하였다. 그 결과 총 21종의 균주가 항진균활성이 우수한 것으로 판단되었으며 (그림 1.1), 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 *Bacillus* 속 (18종), *Paenibacillus* 속 (2종), *Brevibacillus* 속 (1종)으로 동정되었다 (표 1.1).

또한 *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 40457 (균핵병)에 대해 항진균활성이 우수한 10종의 균주를 최종 선발하였으며 (그림 1.2), 16S rRNA 염기서열 분석 결과 *Bacillus* 속 (9종)과 *Acromobacter* 속 (1종)으로 동정되었다 (표 1.2).

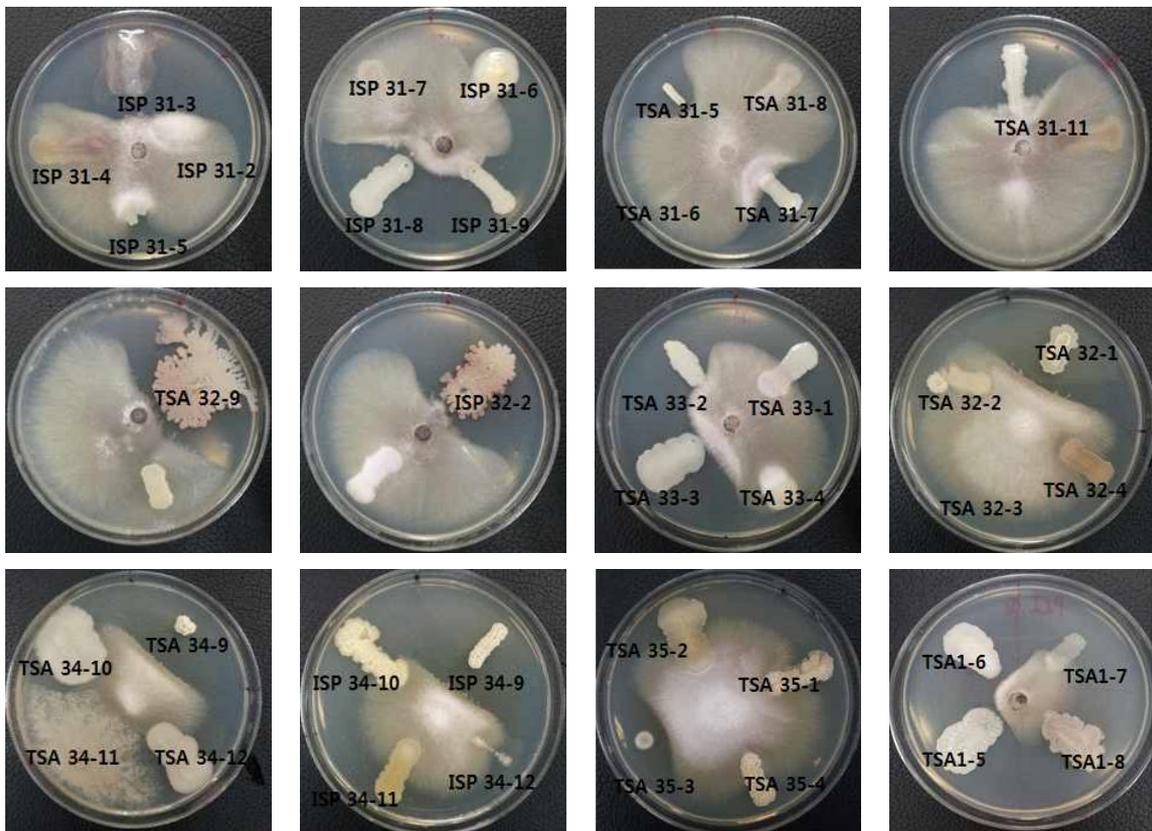


그림 1.1. *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*에 대한 항진균활성 기능성 미생물 선발.

표 1.1. *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*에 대한 항진균활성 균주 동정

Isolates	Identification
ISP 31-3	<i>Paenibacillus kribbensis</i>
ISP 31-8	<i>Bacillus cereus</i>
ISP 31-9	<i>Bacillus anthracis</i>
ISP 32-2	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
ISP 34-9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>
TSA 31-5	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
TSA 31-7	<i>Bacillus thuringiensis</i>
TSA 31-11	<i>Bacillus cereus</i>
TSA 32-1	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
TSA 32-9	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
TSA 33-2	<i>Bacillus pseudomycooides</i>
TSA 33-3	<i>Bacillus cereus</i>
TSA 34-9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>
TSA 35-3	<i>Paenibacillus pabuli</i>
TSA 66-5	<i>Bacillus anthracis</i>
TSA 66-2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>
TSA 66-5	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
TSA 77-4	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
TSA 77-10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>
TSA 61-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>
ISP 68-3	<i>Bacillus methylotrophicus</i>

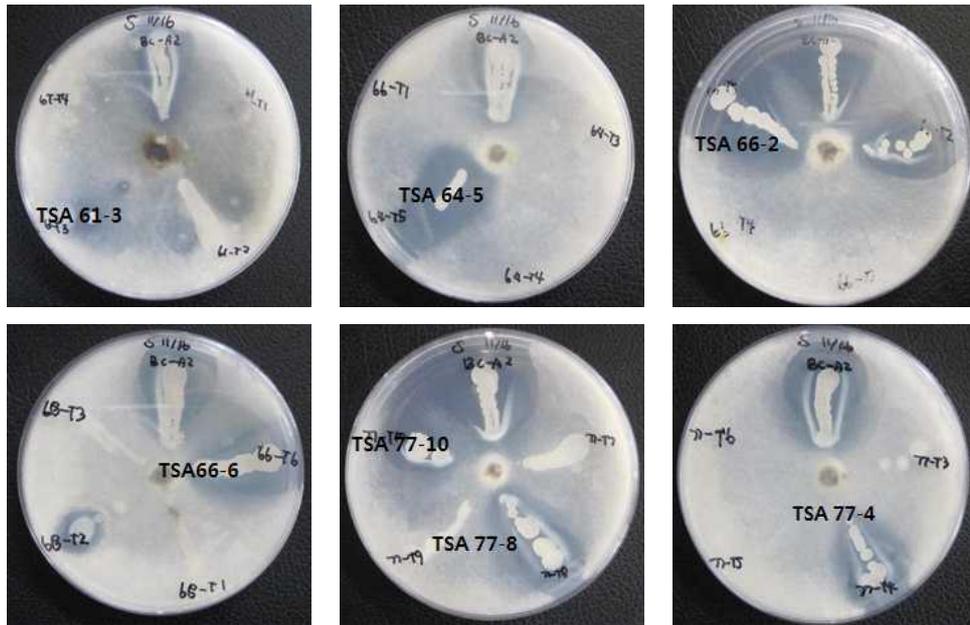


그림 1.2. *Sclerotinia sclerotiorum*에 대한 항진균활성 기능성 미생물 선발.

표 1.2. *Sclerotinia sclerotiorum*에 대한 항진균활성 균주 동정

Isolates	Identification
TSA 61-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>
TSA 64-5	<i>Bacillus anthracis</i>
TSA 66-2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>
TSA 66-5	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
TSA 77-4	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
TSA 77-10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>
ISP 66-2	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
ISP 66-3	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
ISP 1-5	<i>Bacillus tequilensis</i>
ISP 1-8	<i>Achromobacter insolitus</i>

나. Chitinase 생산 미생물 분리, 동정

작물 병원성 곰팡이 및 해충 (진딧물, 해충) 방제용 미생물제제 개발을 목적으로 chitinase 생산 능력이 우수한 기능성 미생물을 황토로부터 분리하였다. Colloidal chitin agar plates에 황토로부터 분리한 균주들을 접종하여 배양한 후 균체 주위에 생성되는 clear zone 크기에 따라 chitinase 생산 균주로 선발하였다. 그 결과 총 18종의 균주를 최종 선발하였으며 (그림 1.3), 16S rRNA 염기서열 분석에 의해 *Paenibacillus* 속 (14종), *Bacillus* 속 (3종), *Chromobacterium* 속 (1종) 으로 분석되었다 (표 1.3).

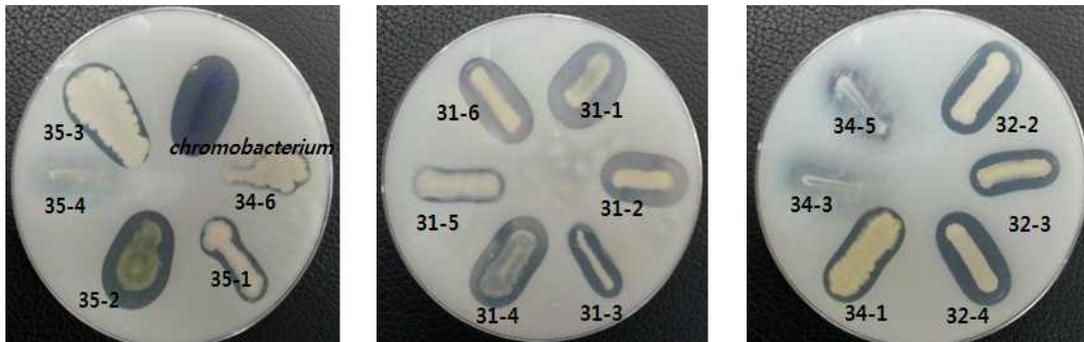


그림 1.3. 황토로부터 chitinase 활성이 우수한 미생물 선발.

표 1.3. Chitinase 활성이 우수한 황토 유래 미생물 동정

Isolates	Identification	Antifungal activity
31-1	<i>Paenibacillus pabuli</i>	
31-2	<i>Paenibacillus pabuli</i>	
31-3	<i>Paenibacillus chinjuensis</i>	o
31-4	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	
31-5	<i>Paenibacillus elgii</i>	o
31-6	<i>Paenibacillus pabuli</i>	
32-2	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	
32-3	<i>Paenibacillus pabuli</i>	
32-4	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	
34-1	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	
34-3	<i>Bacillus anthracis</i>	
34-5	<i>Bacillus cereus</i>	
34-6	<i>Paenibacillus elgii</i>	o
35-1	<i>Paenibacillus ehimensis</i>	
35-2	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	
35-3	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	
35-4	<i>Bacillus cereus</i>	
	<i>Chromobacterium</i> sp.	

제 2 절. 미생물 유래 기능성 대사산물 분리 및 활성 검정

1. 연구개발 수행 내용

가. 유용미생물 유래 대사산물 분리 및 항진균활성 검정 (*in vitro*)

작물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성이 탁월한 황토 유래 균주들을 대상으로 유기용매를 이용한 항진균 펩타이드 분리를 시도하였다. 미생물 배양액 (500ml)을 원심분리하여 제공된 순수 배양상등액을 모은 후 클로로포름 (250ml)을 첨가하여 40~60분 동안 강렬하게 교반하였다. 배양상등액과 클로로포름 혼합액을 50ml 튜브에 분주하여 10,000rpm, 40분 동안 원심분리하여 펩타이드가 포함된 추출액을 얻었다. 항진균 펩타이드가 포함된 배양 추출액을 증발건조기 (evaporator)를 사용하여 농축한 후 증류수 5ml에 녹여 항진균활성 시험에 사용하였다.

항진균 펩타이드가 함유된 조추출물 (crude extract)의 항진균활성은 시들음병 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*), 균핵병 (*Sclerotinia sclerotiorum*), 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*)을 대상으로 검정하였다.

클로로포름 추출에 의해 얻어진 crude extract로부터 HLB cartridge를 이용하여 항진균 펩타이드를 부분 정제하였으며, 그 후 항진균 펩타이드의 정제 및 정확한 분자량 측정은 액체크로마토그래피-질량분석기 (reverse-phase HPLC/Mass spectrometer)를 이용하여 수행하였다.

나. Chitinase 분리, 정제 및 병해충 방제 활성 검정 (*in vitro*)

Colloidal chitin agar 배지에서 clear zone 생성이 탁월한 균주들을 대상으로 황산암모늄 침전법으로 chitinase 분리, 정제를 수행하였다. 탄소원으로 colloidal chitin이 함유된 액체배지 (100ml)에 각각의 균주를 접종한 후 30°C, 3일 동안 배양하였다. 미생물 배양액을 원심분리하여 제공된 순수 배양상등액에 60%, 85% ammonium sulfate를 첨가한 후 4°C, 24시간 방치하였다. 각각의 시료를 원심분리용 튜브 (50ml)에 옮겨 10,000rpm, 20분 동안 원심분리하여 chitinase가 포함된 pellet 형태의 crude extract를 얻었다. Sodium phosphate buffer (pH 6.5)로 crude extract를 녹인 후 동일한 buffer로 24시간 동안 투석하여 탈염반응을 진행하였다. 탈염된 crude extract를 사용하여 작물 병원성 곰팡이 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (시들음병), *Colletotrichum coccodes* (탄저병), *Botrytis cinerea* (잿빛곰팡이병)에 대한 항진균활성을 조사하였다. 또한 복숭아 흑진딧물과 점박이응애를 대상으로 chitinase crude extract의 작물 해충에 대한 살충 효능을 검정하였다.

2. 연구개발 결과

가. *Paenibacillus elgii* BC34-6 생산 대사산물 분리 및 항진균활성 검정

Paenibacillus elgii BC34-6 균주가 생산하는 항진균활성 대사산물 분리 및 이들의 활성을 검정하였다. 배양상등액을 회수하여 황산암모늄 침전과 클로로포름 추출법에 의해 protein (chitinase)와 peptide를 얻은 후 작물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성을 조사하였다. 각각의 시료는 (a) 배양상등액, (b) 100°C, 15분 가열 배양상등액, (c) 클로로포름 추출액, (d) 황산암모늄 침전 후 투석된 시료(MW 10,000 cut-off), (e) 황산암모늄 침전, (f) 황산암모늄 침전 후 투

석된 여액을 준비하였다. 모든 시료에서 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (시들음병), *Sclerotinia sclerotiorum* (균핵병), *Colletotrichum coccodes* (탄저병)에 대한 항진균활성이 관찰되었으며, 특히 클로로포름 추출액(c)과 황산암모늄 침전 시료(e)의 경우 강력한 항진균활성을 검정할 수 있었다 (그림 2.1). 또한 각각의 시료를 대상으로 chitinase 활성을 조사한 결과 (d) 황산암모늄 침전 후 투석된 시료(MW 10,000 cut-off)에서 가장 높은 chitinase 활성을 보였으며, (e) 황산암모늄 침전 시료를 100℃, 15분 가열한 경우 chitinase 활성은 상실되었으나 항진균활성은 유지되는 것으로 조사되었다 (표 2.1). 따라서 *P. elgii* 34-6 균주의 항진균활성과 관련된 대사산물은 chitinase 보다는 peptide 성분으로 판단되었다.

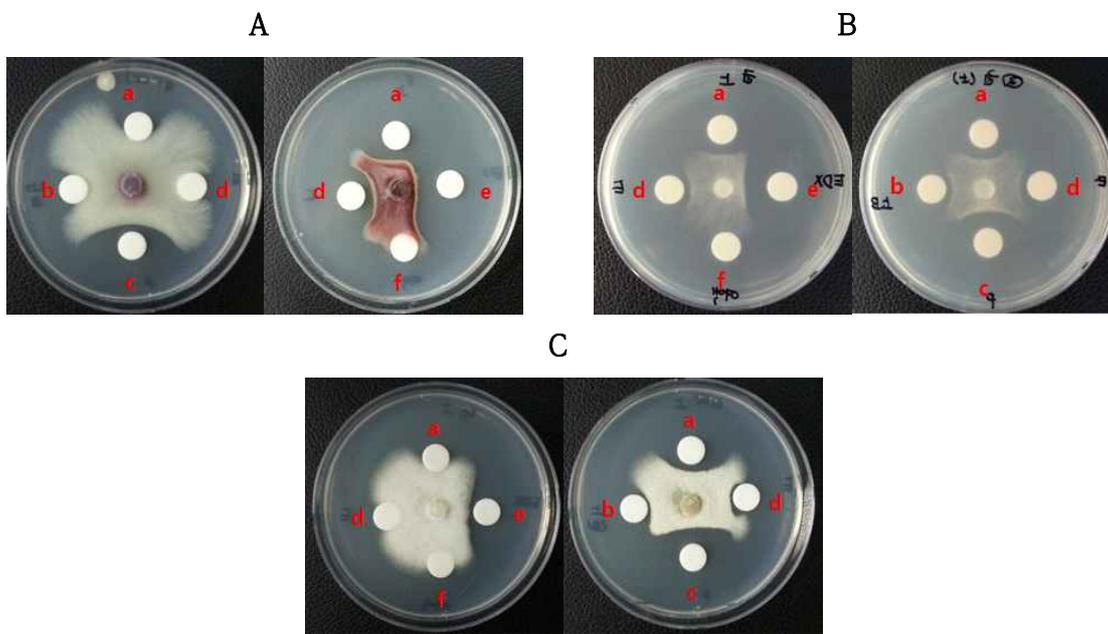


그림 2.1. *Paenibacillus elgii* BC34-6가 생산하는 대사산물의 항진균활성. *Paenibacillus elgii* BC34-6의 배양상등액으로부터 황산암모늄 침전, 클로로포름 추출법에 의해 대사산물을 분리한 후 작물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성을 조사하였다. (a) 배양상등액, (b) 100℃, 15분 가열 배양상등액, (c) 클로로포름 추출액, (d) 황산암모늄 침전 후 투석된 시료 (MW 10,000 cut-off), (e) 황산암모늄 침전, (f) 황산암모늄 침전 후 투석된 여액. (A) *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, (B) *Sclerotinia sclerotiorum*, (C) *Colletotrichum coccodes*.

표 2.1 *Paenibacillus elgii* BC34-6 유래 대사산물의 항진균활성 및 chitinase 활성

구분	시료	항진균활성	효소활성(μmol/ml)
a	배양상등액	○	0.14
b	100℃, 15분 가열 배양상등액	△	-
c	클로로포름 추출액	◎	0.15
d	황산암모늄 침전 후 투석	△	0.98
e	황산암모늄 침전	◎	0.09
f	황산암모늄 침전 후 투석된 여액	×	0.04

* 항진균활성 정도는 ◎≥○≥△≥× 순으로 표시하였다.

액체크로마토그래피-질량분석기를 이용하여 항진균활성 펩타이드를 분리한 후 분자량을 측정하였다. 그 결과 1073.9 (pelgipeptin A), 1088.0 (pepgipeptin C, D), 1102.4 Da (pelgipeptin B)로 확인되었다 (그림 2.2).

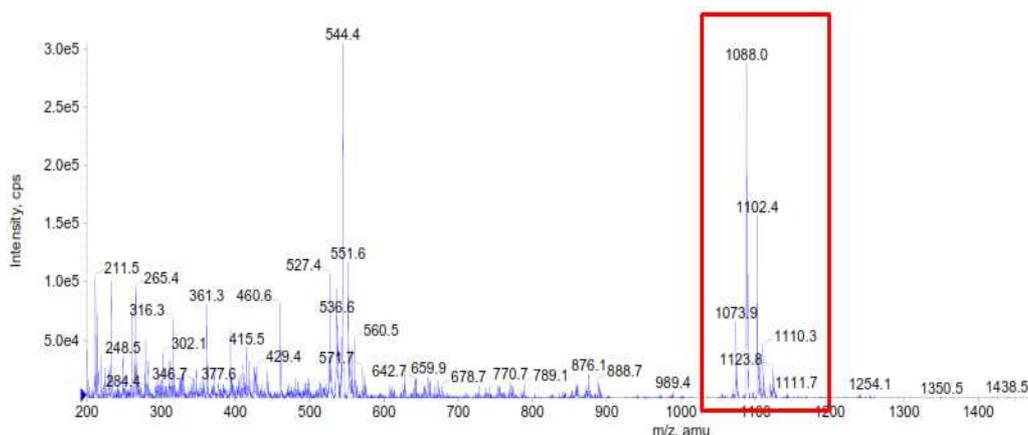


그림 2.2. *Paenibacillus elgii* BC34-6 유래 항진균 펩타이드 분리 및 질량 분석. 배양상등액으로부터 클로로포름 추출 후 액체크로마토그래피-질량분석기를 이용하여 항진균활성 펩타이드를 분리한 후 정확한 분자량을 분석하였다.

위의 결과들은 「식물병 방제 활성을 지닌 패니바실러스 엘기 BC34-6 균주」로 특허 출원하였으며 (그림 2.3), (주)마이크로자임과 영농조합법인 양지엔텍에 기술이전을 실시하였다(그림 2.4~7).

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2014.10.06
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2014-0134009 (접수번호 1-1-2014-0948664-40)
출원인명칭 재단법인 전남생물산업진흥원(2-2006-038590-8)
대리인성명 권오식(9-2003-000620-6)
발명자성명 김홍일 서민경 정민영 이병두 오병준 김시욱
발명의명칭 식물병 방제 활성을 지닌 패니바실러스 엘기 B C34-6 균주

특 허 청 장

<<안내>>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 경정신청서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 인원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
* 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
* 미크특허상표형의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미크특허상표형에 [전자특허청허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

발급일자 : 20130322

1/3

그림 2.3 「식물병 방제 활성을 지닌 패니바실러스 엘기 BC34-6 균주」의 특허출원 통지서.

기술실시보고서						
(단위 : 원)						
연구개발과제 현황	사업명	생명산업기술개발		연구과제번호	112008-3	
	연구과제명	황토 유래 유용미생물 탐색 및 제제의 현장 시험을 통한 실용화 방안 모색				
	연구기관명	생물방제연구원	연구책임자	오병준	참여기업명 (주)마이크로자임	
	연구협약일	2014. 8. 10.	연구기간	2012. 8. 10. ~ 2015. 8. 9.		
	연구개발비	정부출연금	기업부담금	기타 ()	계	
180,000,000		-	-	180,000,000		
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	패니바실러스 옌지 BC34-6 균주 및 이를 이용한 작물 병 방제용 제품생산에 대한 제반사항				
	계약(활용)일	2014. 11. 21.	실시(활용)기간	2014. 11. 21. ~ 2022. 11. 20.		
	지재권 종류	특허출원	실시권 유형	통상실시권		
	* 지재권이 특허(출원,등록) 인 경우	명 칭	식물병 방제 활성을 지닌 패니바실러스 옌지 BC34-6 균주			
		번호	출원번호 10-2014-0184009	일 자	2014. 10. 6.	
	실시(활용)기관	기관명	(주)마이크로자임	기관유형	중소기업	
		주 소	전라남도 곡성군 입면 입면로 437	대 표 자	심영근	
		사업자번호	409-86-19995	전화번호	061-363-0607	
부서(담당자)		심영근	e-mail	microzyme@daum.net		
기술료산성내역						
기 술 료	정액기술료		경상기술료		기타 조건	
	징수(납부)예정일	징수(납부)금액	착수기본료	징수(납부)예정일		징수(납부)금액
			매출에 따른 기술료	-	-	
				징수(납부)시작일	결산일	
				2016. 1. 1.	매년 12월	
				징수(납부)종료일	징수율	
계		2022. 11. 20.	매출액의 (3)%			
기타특기사항						
<p style="text-align: center;">국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시계약이 체결되었음을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(기술이전시). 2. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> <p style="text-align: center;">2014년 11월 26일</p>						

그림 2.4 기술실시보고서(((주)마이크로자임)

기술실시보고서							
(단위 : 원)							
연구개발과제 현황	사업명	생명산업기술개발		연구과제번호	112003-3		
	연구과제명	황토 유래 유용미생물 탐색 및 제제의 현장 시험을 통한 실용화 방안 모색					
	연구기관명	생물방제연구원	연구책임자	오병준	참여기업명	(주)마이크로자임	
	연구협약일	2014. 8. 10.	연구기간	2012. 8. 10. ~ 2015. 8. 9.			
	연구개발비	정부출연금	기업부담금	기타 ()	계		
180,000,000		-	-	180,000,000			
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	패니바실러스 엘지 BC34-6 균주 및 이를 이용한 작물 병 방제용 제품생산에 대한 제면사항					
	계약(활용)일	2014. 11. 21.	실시(활용)기간	2014. 11. 21. ~ 2022. 11. 20.			
	지재권 종류	특허출원	실시권 유형	통상실시권			
	* 지재권이 특허(출원,등록) 인 경우	명 칭	식물병 방제 활성을 지닌 패니바실러스 엘지 BC34-6 균주				
		번호	출원번호 10-2014-0134009	일 자	2014. 10. 6.		
	실시(활용)기관	기관명	양지엔텍		기관유형	영농조합법인	
		주 소	전라남도 담양군 담양읍 태봉로 97		대 표 자	권명희	
		사업자번호	409-86-09105		전화번호	061-383-9100	
부서(담당자)		기획실(권세환실장)		e-mail	kdeogja11@hanmail.net		
기술료산정내역							
기 술 료	정액기술료		경상기술료			기타 조건	
	징수(납부)예정일	징수(납부)금액	착수기본료	징수(납부)예정일	징수(납부)금액		
			매출에 따른 기술료	징수(납부)시작일	결산일		
				징수(납부)종료일	징수율		
	계				매출액의 ()%		
기타특기사항							
<p style="text-align: center;">국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시계약이 체결되었음을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(기술이전시). 2. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> <p style="text-align: center;">2014년 11월 26일</p>							

그림 2.5 기술실시보고서(((주)양지엔텍)

표준 기술 이전 계약서

권리권자 (재)전남생물산업진흥원 생물방제연구원(이하 "갑"이라 함)과 실시권자 (주)마이크로자임(이하 "을"이라 함)은 "갑"이 개발한 "패니바실러스 옐지 BC34-6 균주 및 이를 이용한 작물 병 방제용 제품생산에 대한 제반사항" 관련 지식재산권 (이하 "계약기술"이라 함)을 "을"에게 일정한 조건에 따라 기술이전을 위해 다음과 같이 계약을 체결한다.

다 음

제1조 (용어의 정의) 본 계약서에 사용되는 다음 각 호에 기재되어 있는 용어는, 다른 특별한 언급이 없는 한, 각각 다음의 의미를 갖는다.

- ① "계약기술"이란 "갑"이 개발하여 보유하고 있는 "패니바실러스 옐지 BC34-6 균주 및 이를 이용한 작물 병 방제용 제품생산에 대한 제반사항" 관련 지식재산권에 한정하여 말한다.
- ② "계약 제품"이라 함은 "계약기술"을 사용하여 생산되는 식물 병 방제용 모든 제품(시제품 및 원료포함)을 말한다.
- ③ "생산 개시"라 함은 "을"이 "계약기술"을 이용하여 "계약 제품"을 최초로 생산하는 것을 말하며, 제조공정개발, 시제품생산, 원료생산 및 제품양산화의 모든 단계를 포함한 것을 의미하며 그 해당 일을 "생산 개시일"이라 한다.
- ④ "실시"라 함은 이전한 기술의 전부 또는 일부를 적용하여 제조공정개발, 시제품 생산, 원료생산 및 제품화 전 단계에 본 기술이 활용됨을 의미한다.

제2조 (계약기술의 이전 및 기술전수 지도기간)

- ① "갑"은 농림수산식품기술기획평가원 생명산업기술개발사업(과제명 : 황토 유래 친환경 농업용 다기능성 미생물제제 개발 및 산업화) 수행과 관련된 연구 성과 "패니바실러스 옐지 BC34-6 균주 및 이를 이용한 작물 병 방제용 제품생산에 대한 제반사항" 지식재산권에 한정하여 "계약기술"을 "을"에게 계약일로부터 1개월 이내에 이전하기로 한다. 단, 새로운 파생기술에 대하여는 한정하지 아니한다.
- ② "계약기술"의 기술사용기간은 기술실시계약일로부터 8년으로 "갑"과 "을"의 상호협의 하에 지식재산권 존속기간까지 연장이 가능하다.(농림축산식품 연구개발사업 운영규정 제 34조 제 2항)

그림 2.6 표준기술이전계약서((주)마이크로자임)

② 본 계약은 “갑”과 “을”간 기술실시에 관한 기본적인 사항을 규정한 것으로 이전에 “갑”과 “을”간의 모든 문서에 우선한다. 또한 본 계약과 관련 있는 다른 협의나 계약은 이 계약서에 언급되고 서면으로 작성되어 권한 있는 당사자의 서명이 없는 한 그 효력은 없다.

③ 본 계약의 체결을 증명하기 위하여 본 계약서 2부를 작성하여 양 당사자가 각각 기명 날인한 후 각각 1부씩 보관하기로 한다.

2014. 11. 21.

<p>(갑) (재)전남생물산업진흥원 생물방제연구원</p> <p>(을) (주)마이크로자임</p>	<p>대표자 : 오 병 준 (인)</p> <p>기술이전책임자 : 김 평 일 (인)</p> <p>대표자 : 심 영 근 (인)</p> <p>기술이전책임자 : 심 영 근 (인)</p>
---------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------

그림 2.6 표준기술이전계약서((주)마이크로자임)

표준 기술 이전 계약서

권리권자 (재)전남생물산업진흥원 생물방제연구원(이하 "갑"이라 함)과 실시권자 영농조합법인 양지엔텍(이하 "을"이라 함)은 "갑"이 개발한 "패니바실러스 엘지 BC34-6 균주 및 이를 이용한 작물 병 방제용 제품생산에 대한 제반사항"관련 지식재산권 (이하 "계약 기술"이라 함)을 "을"에게 일정한 조건에 따라 기술이전을 위해 다음과 같이 계약을 체결한다.

다 음

제1조 (용어의 정의) 본 계약서에 사용되는 다음 각 호에 기재되어 있는 용어는, 다른 특별한 언급이 없는 한, 각각 다음의 의미를 갖는다.

- ① "계약기술"이란 "갑"이 개발하여 보유하고 있는 "패니바실러스 엘지 BC34-6 균주 및 이를 이용한 작물 병 방제용 제품생산에 대한 제반사항"관련 지식재산권에 한정하여 말한다.
- ② "계약 제품"이라 함은 "계약기술"을 사용하여 생산되는 식물 병 방제용 모든 제품(시제품 및 원료포함)을 말한다.
- ③ "생산 개시"라 함은 "을"이 "계약기술"을 이용하여 "계약 제품"을 최초로 생산하는 것을 말하며, 제조공정개발, 시제품생산, 원료생산 및 제품양산화의 모든 단계를 포함하는 것을 의미하며 그 해당 일을 "생산 개시일"이라 한다.
- ④ "실시"라 함은 이전한 기술의 전부 또는 일부를 적용하여 제조공정개발, 시제품 생산, 원료생산 및 제품화 전 단계에 본 기술이 활용됨을 의미한다.

제2조 (계약기술의 이전 및 기술전수 지도기간)

- ① "갑"은 농림수산식품기술기획평가원 생명산업기술개발사업(과제명 : 황토 유래 친환경 농업용 다기능성 미생물제제 개발 및 산업화) 수행과 관련된 연구 성과 "패니바실러스 엘지 BC34-6 균주 및 이를 이용한 작물 병 방제용 제품생산에 대한 제반사항" 지식재산권에 한정하여 "계약기술"을 "을"에게 계약일로부터 1개월 이내에 이전하기로 한다. 단, 새로운 파생기술에 대하여는 한정하지 아니한다.
- ② "계약기술"의 기술사용기간은 기술실시계약일로부터 8년으로 "갑"과 "을"의 상호협의 하에 지식재산권 존속기간까지 연장이 가능하다.(농림축산식품 연구개발사업 운영규정 제 34조 제 2항)

그림 2.7 표준기술이전계약서((주)양지엔텍)

제14조 (중요사항의 변경) "을"이 본 계약 체결 후 법인의 주소 등 중요 사항을 변경하였을 경우에는 이를 지체 없이 "갑"에게 통보하여야 하며, 그 불이행으로 인한 "갑"의 착오는 "을"의 항변으로부터 면책된다.

제15조 (해석) 본 계약에 명기되지 아니하였거나 본 계약서 내용의 해석상 의미가 있는 사항에 대하여는 쌍방의 합의에 의하여 결정된다.

제16조 (분쟁해결) 본 계약의 내용이나 혹은 쌍방의 의무 이행과 관련하여 분쟁이나 이견이 발생하는 경우 "갑"과 "을"은 이를 상호 협의하여 원만히 해결토록 노력하여야 하며, 이러한 분쟁이나 이견이 해결되지 않은 경우에는 "갑"의 관할 주소지 관할법원의 결정을 따른다.

제17조 (계약의 효력)

- ① 본 계약의 효력은 쌍방이 서명 날인한 날부터 유효하다.
- ② 본 계약은 "갑"과 "을"간 기술실시에 관한 기본적인 사항을 규정한 것으로 이전에 "갑"과 "을"간의 모든 문서에 우선한다. 또한 본 계약과 관련 있는 다른 협의나 계약은 이 계약서에 언급되고 서면으로 작성되어 권한 있는 당사자의 서명이 없는 한 그 효력은 없다.
- ③ 본 계약의 체결을 증명하기 위하여 본 계약서 2부를 작성하여 양 당사자가 각각 기명 날인한 후 각각 1부씩 보관하기로 한다.

2014. 11 . 21 .

(갑) (재)전남생물산업집진흥원 생물방제연구원

대표자 : 오 병 준 (인)

기술이전책임자 : 김 평 일 (인)

(을) 영농조합법인 양지엔텍

대표자 : 권 명 희 (인)

기술이전책임자 : 권 세 환 (인)

그림 2.7 표준기술이전계약서((주)양지엔텍)

나. *Brevibacillus laterosporus* TSA 31-5 유래 대사산물 분리 및 항진균활성 검증

작물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성이 우수한 균주를 황토에서 분리하였으며, 16S rRNA 염기서열 분석 결과 *Brevibacillus laterosporus*으로 동정되었다 (그림 2.8). 작물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성은 조사는 *B. laterosporus* TSA 31-5 균주의 배양액을 paper disk에 집적한 후 평판 대치배양 방법으로 조사하였다. *Sclerotinia cepivorum* (흑색썩음균핵병), *Colletotrichum coccodes* (고추 탄저병), *Botrytis cinerea* (갯빛곰팡이병), *Phytophthora capsici* (역병)을 사용하였다 (그림 2.9).

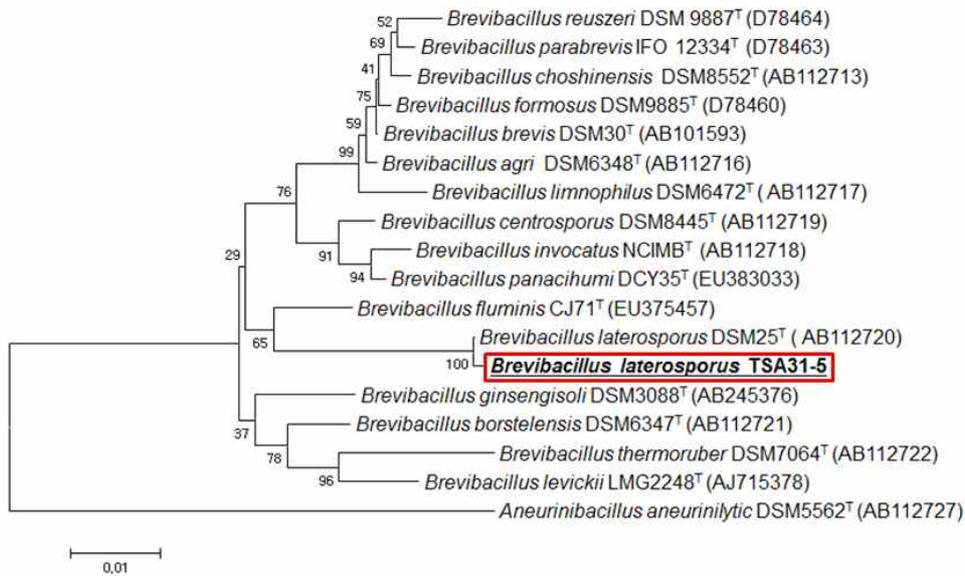


그림 2.8. *Brevibacillus laterosporus* TSA 31-5 균주의 phylogenetic tree.

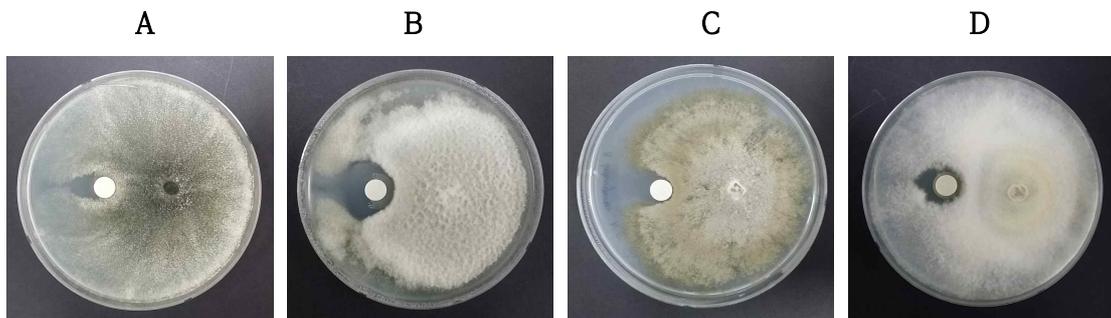


그림 2.9. *Brevibacillus laterosporus* TSA 31-5 균주의 항진균활성.

Brevibacillus laterosporus TSA 31-5 배양액과 작물 병원성 곰팡이를 평판 대치 배양한 후 균사 성장 억제를 조사하였다. A) *Sclerotinia cepivorum*, B) *Colletotrichum coccodes*, C) *Botrytis cinerea*, D) *Phytophthora capsici*.

또한 *B. laterosporus* TSA 31-5가 생산하는 항진균 펩타이드의 분리를 수행하였다. TSB (tryptic soy broth)에서 배양된 상등액으로부터 클로로포름 추출에 의해 얻은 crude extract의 경우 작물 병원성 곰팡이에 대해 우수한 항진균활성을 나타냈다 (그림 2.10). 클로로포름 추출에 의해 얻어진 crude extract를 HLB cartridge에 적용하여 부분 정제한 후, 액체크로마토 그래피-질량분석기를 이용하여 유효 성분의 펩타이드 분리, 정제 및 정확한 분자량 분석을 시도하였다. 그 결과 펩타이드로 추정되는 총 17개의 main peaks을 얻었다 (그림 2.11).

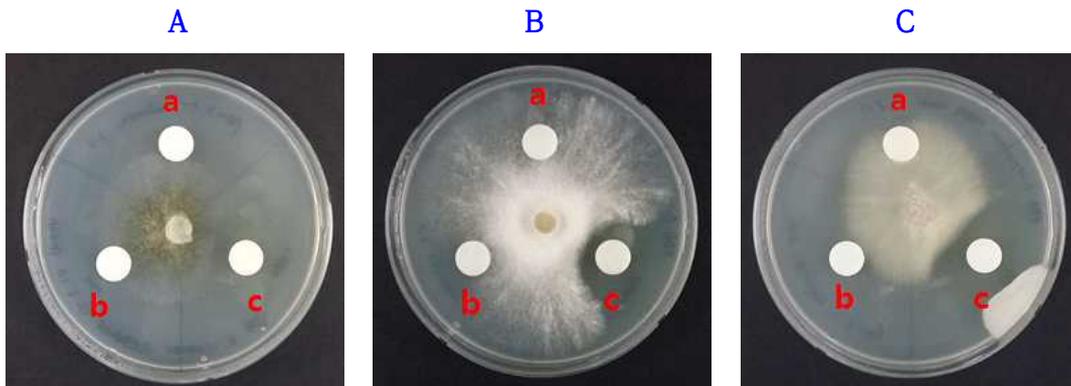


그림 2.10. *Brevibacillus laterosporus* TSA 31-5 배양상등액의 유기용매 추출 후 crude extract의 항진균활성. 배양상등액으로부터 클로로포름 추출한 crude extract의 작물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성을 조사하였다. *Botrytis cinerea* (A), *Phytophthora capsici* (B), *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicle-lycopersici* (C)을 병원성 곰팡이로 사용하였다. a) 증류수, b) 배양상등액, c) 클로로포름 추출 crude extract.

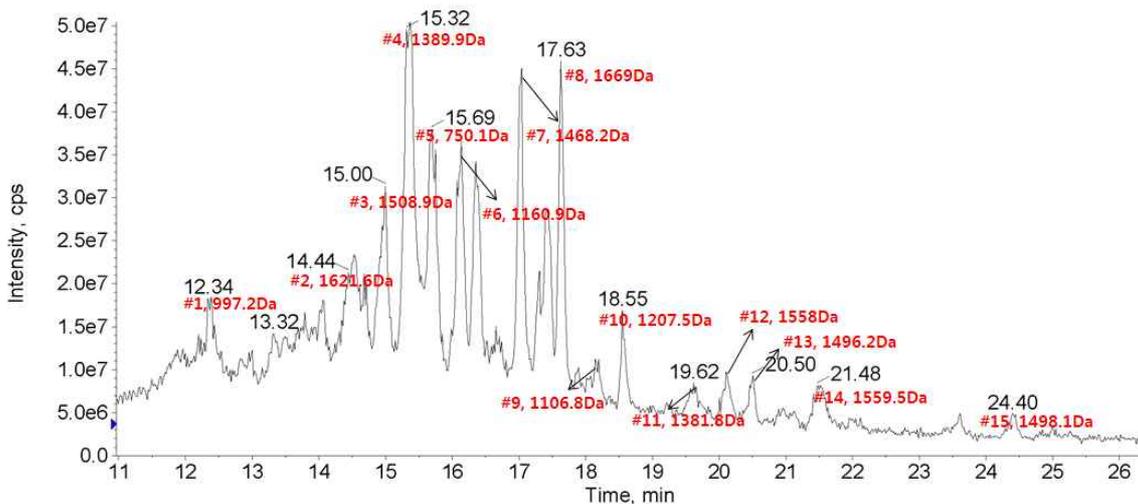


그림 2.11. *Brevibacillus laterosporus* TSA 31-5 유래 항진균 펩타이드 분석. *B. laterosporus* TSA 31-5 배양상등액을 클로로포름 추출, HLB cartridge를 이용하여 부분 정제한 후 액체크로마토그래피-질량분석기를 이용하여 펩타이드 프로파일을 조사하였다. 펩타이드로 추정되는 총 15개의 주요 peaks을 확인할 수 있었다.

다. Chitinase crude extract의 작물 병원성 곰팡이 성장 저해 검정 (*in vitro*)

Paenibacillus chinjuensis 31-3, *Paenibacillus elgii* BC34-6, *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2 균주로부터 chitinase 분리, 정제를 수행하였다. 우선 각각 균주의 배양상등액으로부터 황산암모늄 침전 (60%, 85%)에 의해 얻어진 chitinase가 포함된 crude extract를 사용하여 작물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성을 조사하였다. *P. chinjuensis* 31-3과 *P. elgii* BC34-6의 경우 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*과 *Botrytis cinerea*에 대해 항진균활성을 보였으며, *P. chitinolyticus* 35-2의 경우 유일하게 *Colletotrichum coccodes*의 균사 성장을 저해했다 (그림 2.12).

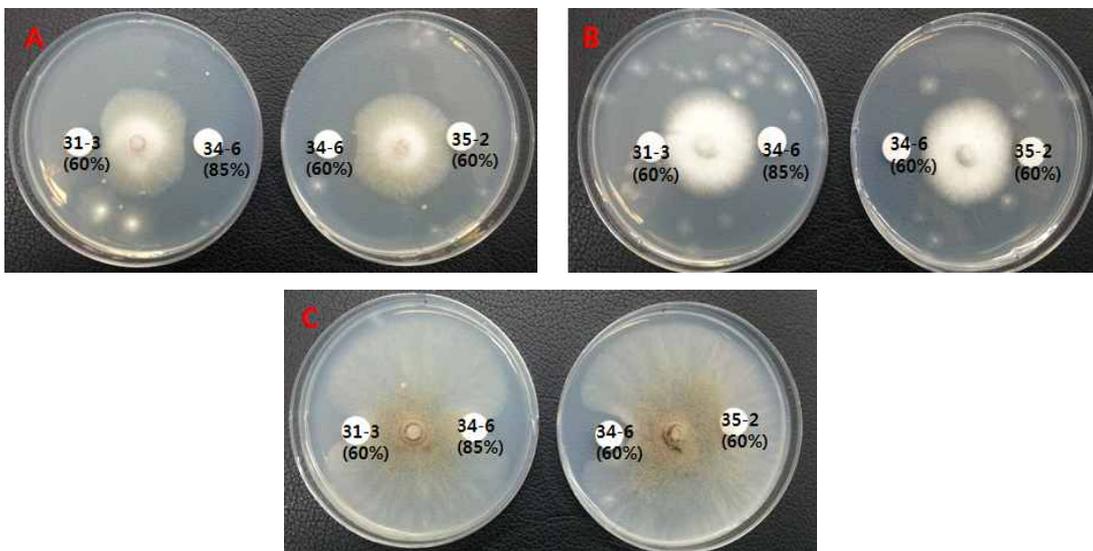


그림 2.12. Chitinase crude extract의 항진균활성 조사. 황산암모늄 (60%, 85%) 침전에 의해 *Paenibacillus* 속 균주들의 배양상등액으로부터 얻어진 crude extract의 항진균활성을 조사하였다. A) *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, B) *Colletotrichum coccodes*, C) *Botrytis cinerea*.

라. 작물 세균병 방제용 *Bacillus* 속 균주의 활성 검정 (*in vitro*)

작물 세균병 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* KACC11151 (콩 불마름병), *Xanthomonas euvesicatoria* 173-1 (고추 세균성점무늬병), *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* MAFF 301420 (복숭아나무 세균성구멍병) 방제를 목적으로 2종의 *Bacillus* 속 (*Bacillus subtilis* MRS6-4, *B. methylotrophicus* GM2)을 황토로부터 분리하였다. 각각의 *Bacillus* 속 균주를 배양한 후 균체와 배양상등액을 사용하여 작물 세균병들에 대한 저해 능력을 조사하였다. 그 결과 균체와 배양상등액 모두 강력한 항균효과를 나타냈다 (그림 2.13~14).

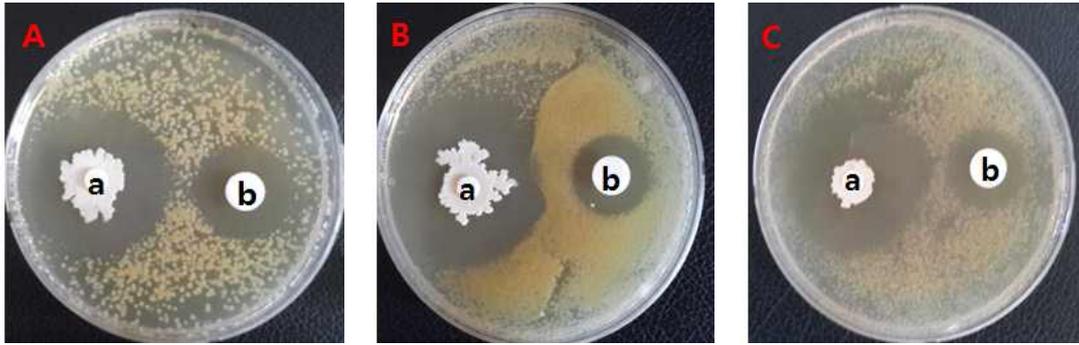


그림 2.13. *Bacillus subtilis* MRS6-4 균주의 작물 세균병 저해 효과. *B. subtilis* MRS6-4을 TSB 배지에서 배양한 후 균체와 배양상등액의 세균병 저해 능력을 조사하였다. 균체와 배양상등액 모두 3종의 작물 세균병에 대한 탁월한 저해 능력을 나타냈다. A) *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, B) *Xanthomonas euvesicatoria*, C) *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. a) *Bacillus subtilis* MRS6-4 균체, b) 배양상등액.

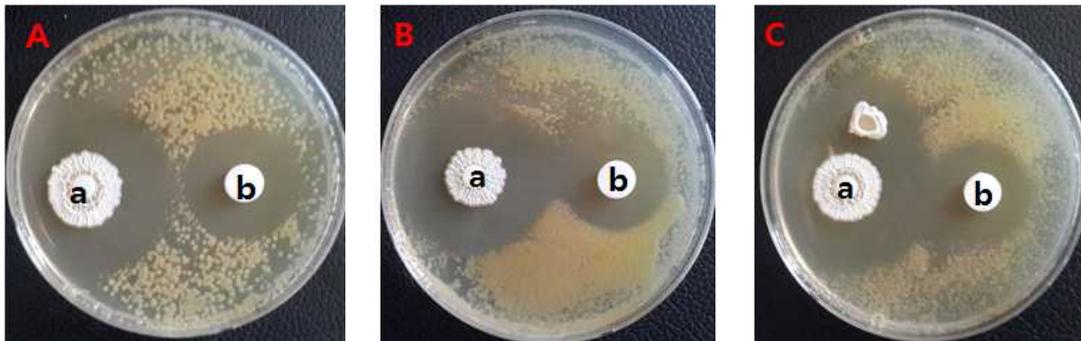


그림 2.14. *Bacillus methylotrophicus* GM2 균주의 작물 세균병 저해 효과. *B. methylotrophicus*를 TSB 배지에서 배양한 후 균체와 배양상등액의 세균병 저해 능력을 조사하였다. 균체와 배양상등액 모두 3종의 작물 세균병에 대한 탁월한 저해 능력을 나타냈다. A) *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, B) *Xanthomonas euvesicatoria*, C) *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. a) *Bacillus methylotrophicus* GM2 균체, b) 배양상등액.

마. *Bacillus subtilis* MRS6-4 유래 대사산물 분석

작물 세균병에 대한 저해 능력이 탁월한 *Bacillus subtilis* MRS6-4 균주가 생산하는 항균활성 대사산물을 분석하였다. 배양상등액으로부터 클로로포름 추출한 crude extract를 HLB cartridge로 부분 정제한 후 액체크로마토그래피-질량분석기를 이용하여 분석하였다. 그 결과 itulin (1043, 1057 m/z), fengycin (1478, 1505 m/z), surfactin (1008, 1022, 1036 m/z)로 확인되었다 (그림 2.15).

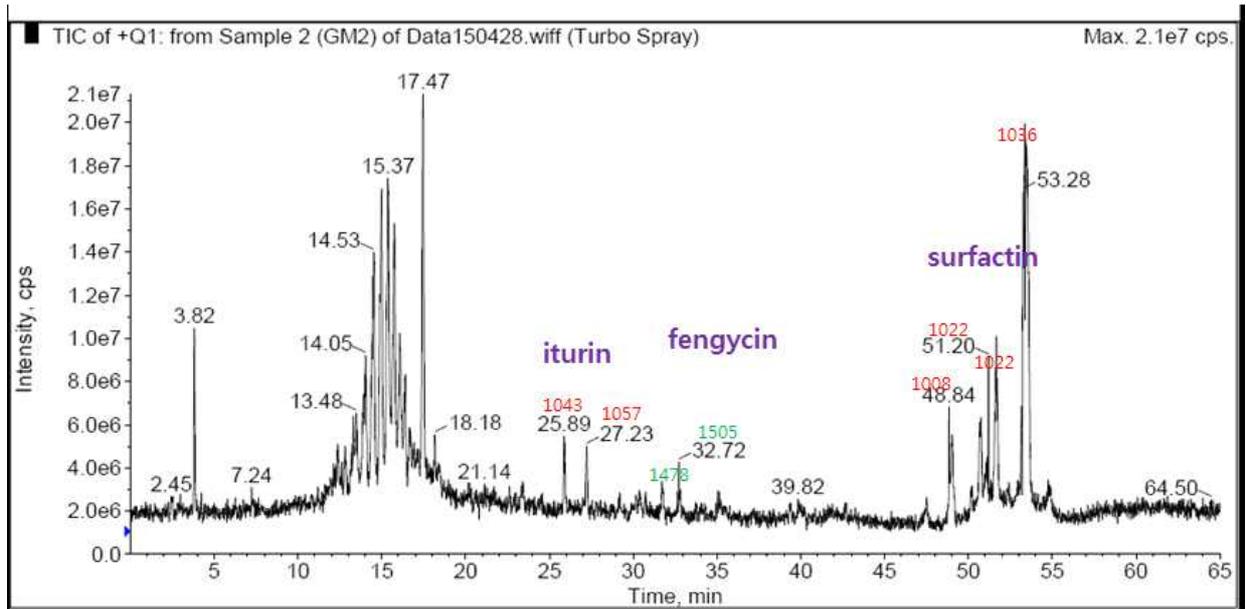


그림 2.16. *Bacillus subtilis* MRS6-4 유래 항균활성 대사산물 분석. *B. subtilis* MRS6-4의 배양 상등액을 클로로포름 추출, HLB cartridge를 이용하여 부분 정제한 후 액체크로마토그래피-질량분석기를 이용하여 항균활성 물질을 분석하였다. Itulin (1043, 1057 m/z), fengycin (1478, 1505 m/z), surfactin (1008, 1022, 1036 m/z)을 확인하였다.

제 3 절. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1로부터 항균물질 대사산물 분리정제

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

작물병의 방제는 작물의 수량, 품질을 향상시키고 인구 증가에 따른 식량자원의 공급량을 증가시킨다는 측면에서 중요하다 (Kim and Lee, 2009). 현재까지 식물병원균의 피해를 방지하기 위한 방편으로 각종 농약에 의한 화학적 방제법이 널리 이용되어 왔으나 (Cook *et al.*, 1985) 농약의 과다 사용으로 인한 토양, 공기, 지하수 등의 오염으로 생태계 파괴, 인축독성 등 많은 문제가 대두되었다. 이러한 화학적 방제법으로 인한 부작용에 효과적으로 대처할 수 있는 방안으로 생태계에서의 미생물 간 상호관계를 이용하여 친환경적인 생물학적 방제법이 모색되었다 (Burpee and Goult, 1984; Yoshie *et al.*, 1993). 미생물에서 cyclic lipopeptide (환형/고리형 리포펩타이드)는 항진균 reagent의 핵심적인 구성요소이다 (M, Ongena *et al.*, 2008). 생리활성 천연물은 생물학적 활성이 다양하게 나타내는 크고 구조적 특징을 갖는 화합물의 라이브러리를 구성하며, 사실 이들 중 다수는 약학적인 용도로 사용되어 왔다 (Salas and Mendez, 2007). 또한, 미생물에서 *Bacillus* 종의 몇 속은 곰팡이 세포벽을 붕괴시킬 수 있는 생물학적 활성 물질을 생산할 수 있다 (Tserkovniak *et al.*, 2009; Glick *et al.*, 1999; Dunne *et al.*, 1993). 고리형 리포펩타이드의 아미노산은 아마도 protease의 작용을 저해하는 것으로 보이는 D형 및 비천연의 아미노산을 주로 많이 가지고 있는 것으로 널리 알려져 있다 (Schneider *et al.*, 2014). 이러한 고리형 리포펩타이드는 고리형의 polypeptide에 긴 alkyl chain으로 연결되어 소수성을 띄고 있다 (Katz *et al.*, 1977). 따라서 이러한 구조적 특성으로 인하여, 리포펩타이드는 병원균의 지질막을 대상으로 하여 물질의 투과성은 증가시키고 병원균을 죽인다. *Bacillus* 균주는 iturin-, fengycin-, surfacin-형태의 리포펩타이드를 포함한 항진균 활성을 가지는 다양한 고리형 리포펩타이드를 생산한다 (Ongena and Jacques, 2008; Moyne *et al.*, 2004). 식물 곰팡이 병원균에 대해 화학농약으로 관찰된 것과 비교 하였을 때 고리형 리포펩타이드는 식물 곰팡이 병원균에 대해 화학농약으로 관찰된 것과 비교 하였을 때 강하고 폭넓은 스펙트럼을 가진 항균활성, 낮은 독성 및 생분해에 대해 이러한 고리형 리포펩타이드는 대안적 생물학적 방제제로서 상당한 주목을 받고 있는 실정이다 (Romano *et al.*, 2011). 특히, 최근 몇 년간 *Bacillus* 균주가 생산하는 lipopeptide 중 iturin A와 surfactin과 같은 길항력을 가진 항생물질을 병원균을 억제할 수 있는 생물학적 방제제로써 이용하는데 상당한 각광을 받고 있다 (Bais *et al.*, 2004). 이러한 양친매성 환형의 biosurfactant (생리계면활성제)는 낮은 독성, 높은 생분해성과 친환경적 특성 등 많은 장점을 가지고 있다 (Kim *et al.*, 2004; Monteiro *et al.*, 2005). *Bacillus* 종은 항생제와 같은 항균 활성과 매우 다양한 구조의 넓은 스펙트럼을 가지고 이차 대사 산물을 생산하는 흥미로운 균주이다. 따라서 이들은 의료적으로 적용할 수 있기에 가치가 높다. *Bacillus* 균주는 비 리보솜으로 합성된 다양한 작은 항균펩타이드 (<2000 Da) 뿐 아니라 유전자 인코딩 항생제를 생산한다 (Moyne *et al.*, 2004; Barakate *et al.* 2002). 항진균 물질을 포함한 생물학적 활성 분자를 생성할 수 있는 것으로 잘 알려져 있기도 하다 (Yun-Feng *et al.*, 2012; Caldeira *et al.*, 2011; Zhenzhen *et al.*, 2010). 따라서 본 연구에서는 미생물 유래 천연생리활성물질 개발 및 연구를 위해 황토로부터 식물병원균에 활성을 가진 항진균 관련 균주를 selection하고 물질을 분리하였다. 활성에 관한 연구는 다양한 생물방제법에 대하여 규명하고 차후 대량배양

을 통한 보급에 관한 연구의 일환 등을 목표로 수행하고자 하였다.

본 연구에서는 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주를 대상으로 주요 항진균 물질 분리를 위한 과정으로 silica gel을 이용한 ethyl acetate 추출물과 HP-20을 이용한 ethanol 추출물로 항균 활성을 조사하면서 식물병원균에 대한 활성을 중점적으로 다루고자 한다.

광주광역시, 나주시, 무안군, 해남군, 영암군을 포함한 지역에서 총 165점의 황토 시료를 확보하였다. 채취된 황토시료는 각 1g으로 멸균수 9ml에 현탁하여 10배 희석시킨 후 TSA (Tryptic soy agar) 배지에 고르게 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 균주 보관은 20% 글리세롤 (glycerol)이 첨가된 배지에 담아 -80°C에 보관하였다. 황토에서 분리된 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주의 DNA를 분리하여 gyrase A 유전자 (*gyr A*) 염기서열을 분자계통분류학 방법으로 분석한 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 으로 동정되었으며 한국미생물자원센터 (Korean Agricultural Culture Collection, KCTC)에 기탁 완료하였다. 이에 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주의 항진균활성을 확인하기 위해 LB (Luria-Bertani) 배지 (트립톤 10 g, 염화나트륨 10 g, 효모추출물 5 g, 증류수 1L)에서 180rpm, 37°C의 조건하에서 18시간 배양하였다. 그 결과 BC 32-1이 생산하는 다양한 cyclic lipopeptide 물질을 LC-MS 분석으로 확인하였으며 그 중 항진균 (항곰팡이) 활성이 가장 강한 fengycin 펩타이드를 유기용매 추출법 및 다양한 크로마토그래피 분석법을 이용하여 분리정제 할 수 있었다. 분리 정제된 fengycin은 항진균 활성연구 및 구조 분석 등의 실험 등의 샘플로 사용하였다.

가. 항균 활성을 나타내는 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주의 배양 조건

단일 콜로니 집락 형태를 보이는 많은 균주들 중에서, 본 시험에 공시된 항진균 방제용 균주들의 효능을 일괄적으로 검증하여 항진균 활성이 있는 균주만을 선별하기 위해 시들음병인 후사균 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* (KACC 40031))에 강한 활성을 보이는 균주를 확인하고 분리하였다. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1의 항진균활성을 확인하기 위해 LB 배지 (트립톤 10g, 염화나트륨 10g, 효모추출물 5g, 증류수 1L)에서 180rpm, 37°C, 24시간 동안 배양하였고 대조군으로 다른 주 (strain)인 BC32-2, BC32-3 및 BC32-4도 배양하였다. 배양 후 상기 각각의 *Bacillus* sp.를 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* 배양 배지에 접종하였다. 더불어 검증된 항진균 효능을 바탕으로 종균 배양 혹은 대량 배양 시 최적 배지 선발을 위해 고영양배지에서 온도별 항진균 효능을 조사하였다. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1의 최적 생육 온도를 확인하기 위해 TSB (Tryptic soy broth)에서 각각 (A) 30°C 와 (B) 37°C 에서 배양하였다. 이 균체액을 21,055 x g로 10분 동안 원심분리 하여 0.45µm로 여과한 상등액 (좌)을 8mm의 페이퍼 디스크 (paper disc)를 사용하여 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* (KACC 40031) 배양 배지에 TSB 배지를 대조군(우)으로 하여 동량의 100µl로 확인한 결과, 37°C에서 클리어 존 (clear zone)이 더 크음을 확인할 수 있었다. 이에 37°C를 항진균활성 최적 온도로 사용하였다.

게놈 DNA (Genomic DNA) 추출은 HiGene™ Genomic DNA Prep Kit (Biofact Co., Daejeon, South Korea)를 사용하였으며, PCR 반응은 2µl genomic DNA, 각 primer 당 1.5µl (5 pmol), 14 µl 증류수, 1µl PCR premix (Bioneer Co., Daejeon, South Korea) 반응 혼합물을 이용하였다. 선별된 균주의 유전학적 특성을 확인하기 위한 자이레이스 (gyrase) A 유전자 (Chun *et al.*, 2000) 분석은 *gyr AF* (5' -CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT-3') 및 *gyr AR* (5' -CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3') 세트 프라이머를 증폭에 이용하였다. Polymerase

Chain Reaction (PCR)은 다음과 같은 조건에서 실시하였다. 초기 변성 (denaturation) 단계는 95 °C에서 5 분, 그리고 95°C에서 1분에서 30 cycle 후 53°C에서 40초 또는 1 분간 어닐링 (annealing)하고 72°C에서 1분 후 최종 신장 단계 (elongation step)는 72°C에서 10분간 반응하였다. PCR 수행 후 순화된 PCR 산물은 ABI 3700 automated DNA sequencer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 본 균주와 GenBank DB 유래의 유전자서열은 Clustal X windows interface v. 2.1(Larkin *et al.*, 2007)과 BioEdit software v. 7.2.5.를 이용하여 분석하였다. 유전자 정렬은 MEGA v. 6.0 (Tamura *et al.*, 2013)을 이용하였으며 Kimura' s two-parameter distance model 을 이용하여 계통도를 작성하여 근연관계를 파악하였다.

나. BC32-1 균주의 *in vitro* 활성 검정

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주를 고영양배지인 LB (Luria-Bertani) 배지 (트립톤 10 g, 염화나트륨 10 g, 효모추출물 5 g, 증류수 1L)에서 180rpm, 37°C의 조건으로 18시간 이상 배양하였다. 식물 병원성 곰팡이인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* (KACC 40031)는 Korea Agriculture Type Culture Collection Center (수원)에서 분양받아 이용하였다. 식물 병원성 곰팡이는 25±3°C에서 3±2일 동안 PDA (Potato Dextrose Agar, BD) 배지에서 성장시켜 사용하였다.

다. BC32-1 균주 배양액의 항균물질 동정

항균물질이 들어있는 것으로 보이는 활성이 있는 분획의 항균물질을 순수하게 분리하기 위하여 C₁₈ 컬럼 (Waters μBondapak C₁₈ 3.9 × 300 mm)을 이용한 역상 (reversed-phase) HPLC (Shimadzu 10AD, Japan)를 실시하였다. 0.1% TFA를 함유한 5% ACN에 0.1% TFA를 함유한 95% ACN까지 1분당 1ml씩 50분간 농도 구배를 주어 흘러넘으로써 분리도를 관찰하였다. 정제 결과는 230nm에서 흡광도의 변화로 시료의 용출을 확인하였고, 각 분획별로 물질을 모아 동결 건조 시킨 후 최소량의 methanol에 녹여 이중 100μl를 이용하여 항진균활성을 확인하였다. 활성이 있는 분획은 다시 0.1% TFA를 함유한 22% ACN에 0.1% TFA를 함유한 72% ACN까지 1분당 10ml씩 25분간 농도 구배를 주어 흘러넘으로써 분리 정제하였다. 한편 LC-MS 분석 조건은 표 3.1에 나타내었으며, Mass spectra는 200-1800의 범위에서 positive ion mode로 m/z 값을 나타내었다.

표 3.1 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 배양액 LC-MS 분석 조건

Operating condition	
HPLC system	Waters Delta prep 4000
Mass system	AB Sciex API 2000
Column	Hypersil Luna C ₁₈ (4.6 × 250 mm)
Solvent	A : 100% H ₂ O containing 0.1% formic acid B : 100% Acetonitrile containing 0.1% formic acid
Method	5%-65% for 30 min
Detector	UV _{230 nm}
Flow rate	1ml/min

라. 유기용매를 이용한 배양액으로부터 항균물질 추출 및 silica gel 컬럼을 이용한 항균물질 분리·정제

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주의 항진균활성 물질을 추출하기 위해 에틸아세테이트 (Ethyl acetate) 유기용매를 사용하였다. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주를 완전배지인 LB 배지 (트립톤 10g, 염화나트륨 10g, 효모추출물 5g, 증류수 1L)에서 180rpm, 37°C, 24시간 동안 배양하였다. 4,585 x g로 10분간 원심분리하여 상등액을 취한다음 에틸아세테이트 (Ethyl acetate)와 1:3 (v/v)의 비율로 물리적인 힘으로 강하게 섞어주며 추출한 후 분별깔때기에 거치하여 sodium sulfate (anhydrous granular, Junsei, Japan)로 물 층을 제거한 후 진공 증발기 (vacuum evaporator)로 증발시켰다. 증발된 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주는 최종적으로 chloroform:methanol 9:1 (v/v)의 비율의 solvent로 최소량 (약 2ml)으로 녹여 0.2µm 유기용매용 syringe filtration하여 사용하였다. 컬럼 충전제로 silica gel을 사용하였으며, 샘플의 약 200배 정도의 무게를 채서 100°C에서 16시간 건조 후 컬럼에 packing 해 주었다. 이후 sample을 loading하고 Chloroform:Methanol을 9:1 (v/v), 8:2 (v/v), 7:3 (v/v), 6:4 (v/v), 5:5 (v/v), 4:6 (v/v), 3:7 (v/v), 2:8 (v/v), 1:9 (v/v)의 농도구배를 주어 methanol의 양을 늘리면서 항균물질을 elution 하였다. 각 분획이 완료되면 진공 증발기 (vacuum evaporator)로 증발시켜 식물병원성 곰팡이의 생육저해 정도를 확인하는 시료로 사용하였다.

마. Diaion HP-20 컬럼을 이용한 항진균활성 물질 분리·정제

Ethyl acetate 유기용매를 이용하는 한편, 보다 빠르고 효과적인 항균물질을 분리·정제하기 위한 방법으로 Diaion HP-20 컬럼을 이용하여 항균물질 분리·정제 분석법을 모색하였다. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주의 항진균성 활성물질의 정제를 위해 LB 배지 (트립톤 10g, 염화나트륨 10g, 효모추출물 5g, 증류수 1L)에서 180rpm, 37°C, 24시간 동안 배양하였고, 배양 후 4,585 x g, 4°C, 10분간 원심분리 하여 균체를 제거한 상등액을 얻었다. 상등액으로부터 배지 성분을 제거하고 항균 물질을 분리하기 위해 Diaion HP-20 (제조원: 미쓰비시케미칼) 수지를 이용하여 크로마토그래피를 실시하였다. 먼저 HP20의 불순물을 제거하기 위하여 MeOH과 EtOH을 이용하여 순차적으로 세척한 후 증류수를 이용하여 다시 세척하였다. 세척이 완료

된 HP20 800ml 을 컬럼에 충전하고 Sea sand를 약 5cm 넣어 다시 증류수 6L로 세척하였다. 이어서 배양액을 4L loading하고, 증류수 10L로 세척하여 배지 성분을 제거하고 에탄올 (EtOH) 0% EtOH, 20% EtOH, 40% EtOH, 60% EtOH, 80% EtOH, 100% EtOH을 차례로 용리시켜 분획을 받아내었다. 증발기를 사용하여 감압 농축시키고 최소량의 methanol 농도로 녹여낸 다음 0.20 μ m 2mm non-sterile hydrophilic syringe filter (MACHEREY-NAGEL)를 이용하여 여과하였다. 여과된 샘플은 0.1% TFA (trifluoroacetic acid)을 함유한 50% ACN에 녹여 0.2 μ m non-sterile single use syringe filter (RC-membrane, PP-housing, Sartorius)에 여과하고 LC-Mass로 분석하여 활성물질의 유무를 확인하였다. 이때의 RP-HPLC 분석조건은 표 3.2에 나타내었다.

표 3.2 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 배양 상등액 Diaion HP-20 컬럼 후 LC-MS 분석조건

Operating condition	
HPLC system	Shimadzu UFLC
Mass system	AB Sciex API 2000
Column	ACE 5 C ₁₈ -300 (2.1 × 50 mm)
Solvent	A : 100% H ₂ O containing 0.1% formic acid
	B : 100% Acetonitrile containing 0.1% formic acid
Method	5%-65% for 30 min
Detector	UV ₂₃₀ nm
Flow rate	1ml/min

이후, 후사름 (*Fusarium*), 잿빛곰팡이병균 (*Botrytis*) 및 탄저병균 (*Colletotrichum*)에 대해 용리한 상등액을 평판 대치 배양하는 방법으로 식물 병원성 곰팡이의 균사 성장 저해정도로 측정하였으며 전혀 저해하지 못하거나 저해가 거의 일어나지 않는 경우는 X, 0.5mm 이상 저해 시 ○로 표시하였다. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1의 항진균성 활성물질을 상기 항진균활성이 나타나는 80% 에탄올로 용리하여 분획한 상등액으로부터 정제하였다.

바. RP-HPLC를 이용한 항균물질 분리정제

증발기를 사용하여 완전히 증발시키고 최소량의 methanol 농도로 녹여낸 다음 0.2 μ m 2mm non-sterile hydrophilic syringe filter (MACHEREY-NAGEL)를 이용하여 여과하였다. 여과 후 최소량의 methanol 농도로 녹여낸 다음 0.1% TFA (trifluoroacetic acid)을 함유한 50% ACN에 녹여 0.2mm non-steriles, Sartorius)에 여과하였다. 여과액은 C₁₈컬럼 (Waters μ Bondapak C₁₈ 3.9 × 300 mm)을 이용한 역상 (reversed-phase) HPLC (Shimadzu 10AD, Japan)를 사용하여 분리정제하였다. 이때, 0.1% TFA를 함유한 100% 물을 buffer A로, 0.1% TFA를 함유한 100% ACN을 buffer B로 사용하면서, 5% ACN에 95% ACN 까지 1분당 1ml씩 50분간 농도 구배를 주어

흘러줌으로써 분리 정제하였다. 정제 결과는 230nm에서 흡광도의 변화로 시료의 용출을 확인하였고, 각 분획별로 물질을 모아 동결건조 시킨 후 최소량의 methanol에 녹여 100 μ l를 이용하여 항진균 활성을 확인하였다. 그 결과 활성이 있는 단일 피크 (single peak)를 얻어 잘 정제된 것을 알 수 있었다.

2. 연구개발 결과

가. 항진균활성을 나타내는 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주의 분리 및 배양 조건

단일 콜로니 형태의 많은 균주들 중에서 일차적으로 시들음병인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 강력한 항진균활성을 보이는 균주들을 확인하여 분리하였다. 그 결과 그람 양성균의 많은 균주를 분리하였으며, 특히 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1의 항진균활성을 확인하기 위해 LB 배지 (트립톤 10g, 염화나트륨 10g, 효모추출물 5g, 증류수 1L)에서 180rpm, 37 $^{\circ}$ C, 24시간 동안 배양하였고 대조군으로 다른 주 (strain)인 BC32-2, BC32-3 및 BC32-4도 배양하였다. 배양 후 상기 각각의 *Bacillus* sp.를 시들음병 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031) 배양 배지에 접종하였으며, 그 결과 유일하게 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주에서 항진균활성이 나타났다 (그림 3.1). 분리한 DNA로부터 *gyrA* 유전자 (*gyrA*) 염기서열을 분석하여 분자계통분류학 방법을 통해 동정하였다. 그 결과 기존에 알려진 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 아종과 99.6% (885/889 bp)의 매우 높은 유사도를 나타내었다 (그림 3.3). *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BC32-1의 *gyrA* 염기서열은 그림 3.2와 같다. 본 균주의 동정결과 바실러스 아밀로리퀴페이션스 플랜타리움 (*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*)임을 확인하였다. 동정된 미생물을 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BC32-1로 명명하여 한국생명공학연구원 유전자원센터 (KCTC)에 기탁하였다 (수탁번호: KCTC 12729BP). 더불어 검증된 항진균 효능을 바탕으로 종균 배양 혹은 대량배양 시 최적배지 선발을 위해 다양한 고영양배지에서 온도별 항진균 효능을 조사하였는데 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1은 많은 완전 배지 중에 TSA (Tryptic soy agar) 및 LB (Luria-Bertani) 배지에서만 오로지 형태적 차이를 보이는 단일 콜로니 (single colony)를 확인하였으므로 이를 최적배지로 선별 분리하여 TSA (Tryptic soy agar)배지에 도말 (streaking)하여 형태 (morphology)를 관찰하였다. 또한 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1의 최적 생육 온도를 확인하기 위해 TSB (Tryptic soy broth)에서 각각 그림 (A) 30 $^{\circ}$ C 와 (B) 37 $^{\circ}$ C 에서 배양하였다. 배양액을 21,055 x g로 10분간 원심분리 하여 0.45 μ m로 여과한 상등액 (좌)을 8mm의 페이퍼 디스크 (paper disc)를 사용하여 후사름 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* (KACC 40031))배양 배지에 TSB 배지를 대조군(우)으로 하여 동량의 100 μ l로 확인한 결과, 37 $^{\circ}$ C에서 클리어 존 (clear zone)이 더 큼을 확인할 수 있었다 (그림 3.4). 이에 37 $^{\circ}$ C를 후사름 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031)에 대한 항진균활성 최적 온도로 사용하였다.

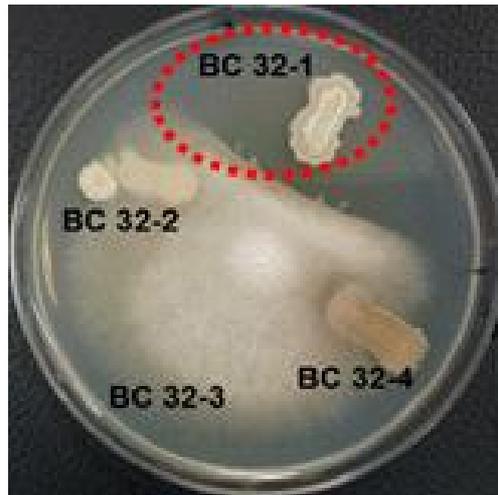


그림 3.1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 강력한 활성을 보이는 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주.

```

1  tgaagccggt  tcacagacgg  attttgtacg  caatgaatga  tttaggcatg  accagtgaca
61  aaccatataa  aaagtctgcc  cgtatcgtcg  gtgaagttat  cggtaagtac  catccgcacg
121  gtgactcagc  ggttttacgaa  tcaatgggtca  gaatggcgca  ggattttaac  taccgctaca
181  tgcttgttga  cggacacggc  aacttogggt  cggttgacgg  cgactcagcg  gcogcogatg
241  gttacacaga  agcgagaatg  tcaaaaatcg  caatggaaat  tctgcgtgac  attacgaaag
301  acacgattga  ctatcaagat  aactatgacg  gttcagaaag  agagcctgcc  gtcatgccat
361  cgagatttcc  gaatctgctc  gtaaaccggg  ctgccggtat  tgcggtcggg  atggcgacaa
421  acattcctcc  gcatcagctt  ggagaagtca  ttgaaggcgt  gcttgccgta  agtgagaatc
481  ccgagattac  aaaccaggag  ctgatggaat  acatcccggg  cccggatttt  ccgactgctg
541  gtcagatttt  gggccggagc  ggcattccgca  aggcattatga  atccggacgg  ggatcaatca
601  caatccgggc  taaggctgaa  atcgaagaga  catcatcagg  aaaagaaaga  attattgtta
661  cggaacttcc  ttatcaggtg  aacaaagcga  gattaattga  aaaaatogca  gatcttgctc
721  gagacaaaaa  aatcgaagga  attaccgacc  tgcgagacga  atccgaccgt  aacggaatga
781  gaatcgtcac  tgagatccgc  cgtgacgcca  atgctcacgt  cattttgaat  aacctgtaca
841  aacaaacggc  cctgcagacg  tctttoggaa  tcaacctgct  ggcgctcgtt  gacggacagc

```

그림 3.2. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1의 *gyr A* 유전자 염기서열.

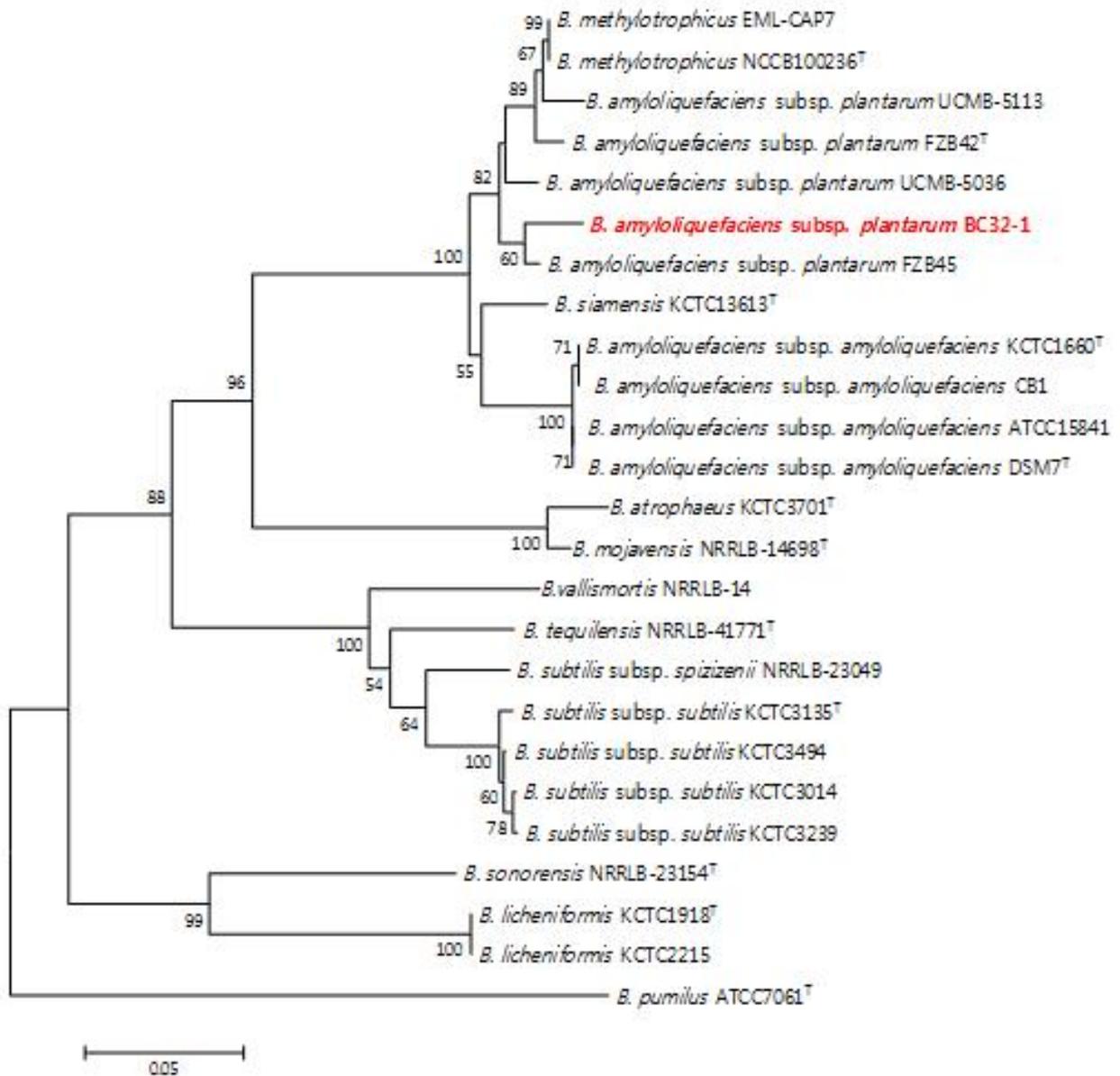


그림 3.3. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1의 계통발생분석.

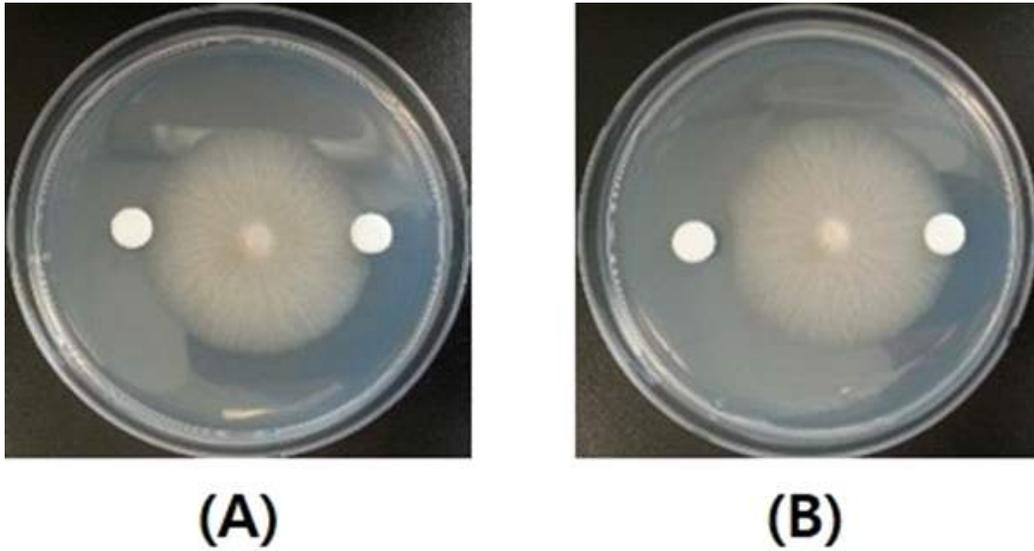


그림 3.4. 시들음병 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031)에 대한 항진균활성 최적 온도 (A) 30°C 와 (B) 37°C

나. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주의 *in vitro* 활성 검정

황토에서 분리된 균주들의 항진균활성을 측정하기 위해 PDA plate에 병원균의 균사체를 포함한 0.5cm 직경의 한천 디스크를 배치하고, *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주를 도말하였다. 균주의 길항력은 식물병원균의 곰팡이 균사를 저해하는 정도를 육안으로 측정하였다. 그 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주 자체로부터 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 강력한 항진균활성이 있음을 확인하였다 (그림 3.5).



그림 3.5. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주의 항진균활성.

다. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주 배양액의 항진균활성 물질 동정

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주를 LB 배지에서 배양한 배양상등액으로부터 LC-MS 분석법을 이용하여 분자량 분석을 시도하였다. 그 결과, iturin, surfactin, fengycin 등의 다양한 고리형 지질 펩타이드가 포함된 것을 알 수 있었다 (그림 3.6).

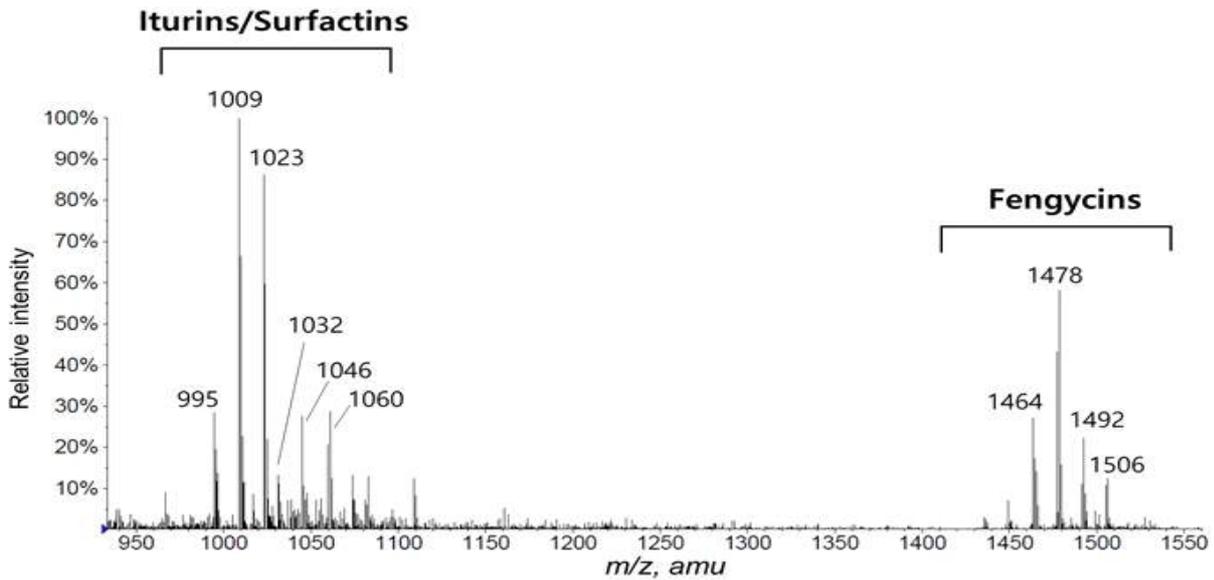


그림 3.6. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 배양액 추출물의 LC-MS 분석 결과.

라. 유기용매를 이용한 항진균 물질 추출 및 silica gel 컬럼을 이용한 분리·정제

여러 가지 유기용매 및 침전법 등의 분석방법을 모색하며 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주가 생산하는 다양한 고리형 지질펩타이드 (cyclic lipopeptides)성 항진균 물질을 추출하기 위해 다양한 방법으로 수행하였으며, 최적 조건을 간략히 정리하면 그림 3.7.의 scheme 과 같다.

한편, 실리카겔 컬럼을 이용하여 chloroform:methanol을 9:1 (v/v), 8:2 (v/v), 7:3 (v/v), 6:4 (v/v), 5:5 (v/v), 4:6 (v/v), 3:7 (v/v), 2:8 (v/v), 1:9 (v/v)의 농도구배를 주어 methanol의 양을 늘리면서 항진균 물질을 분리·정제한 결과 chloroform:methanol의 비율이 6:4 (v/v), 5:5 (v/v), 4:6 (v/v) 이었을 때 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 대한 항진균 활성이 효과적임을 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 방법은 유기용매를 너무 많이 소비하는 한편 fraction이 용출되어 진공 증발기로 증발시켜 RP-HPLC로 정제하여 crude peptide를 획득하기까지의 분석시간이 지나치게 길다는 단점이 있다. 따라서 이 방법을 보완하기 위해 다음의 Diaion HP-20 컬럼을 이용한 항진균물질 분리·정제를 고안하게 되었다.

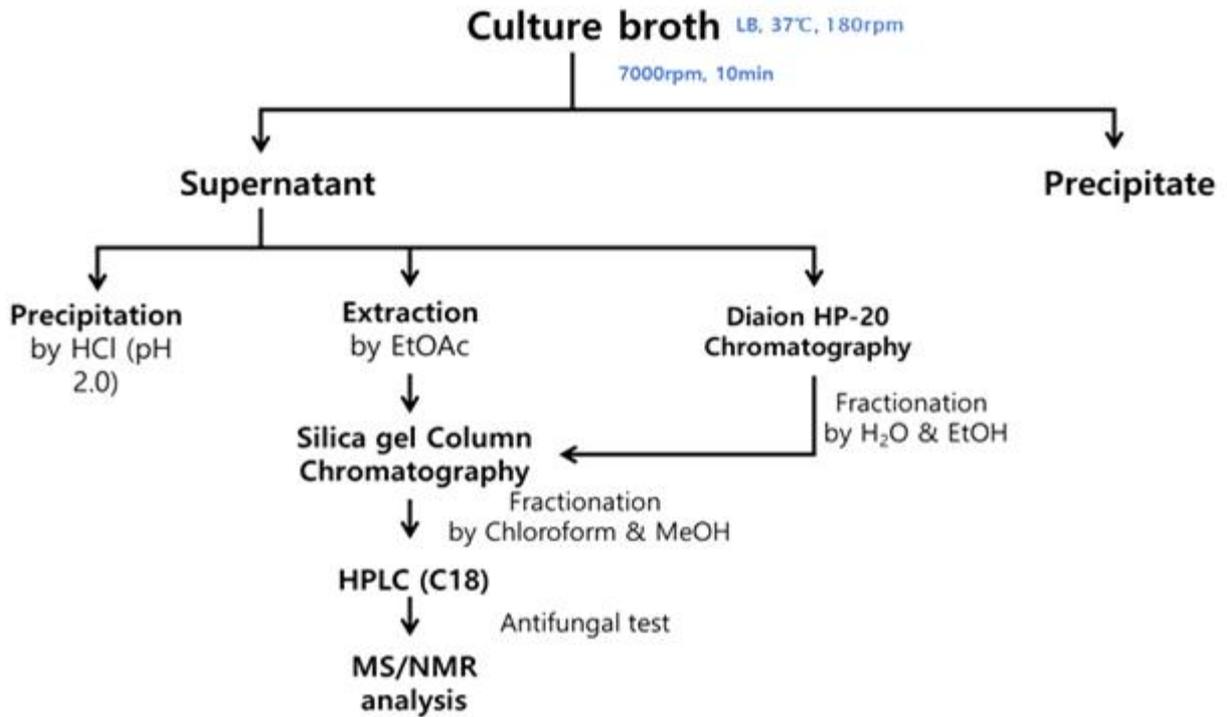


그림 3.7. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1이 생산하는 항균물질 정제를 위한 scheme.

마. Diaion HP-20 컬럼을 이용한 항균물질 분리·정제

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주로부터 항균물질을 분리하기 위한 효과적인 방법은 앞서 기술한 실리카겔 컬럼을 이용한 방법보다 Diaion HP-20 컬럼을 이용한 항균물질 분리·정제가 효율적이었다. 즉, *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주의 항진균 효과는 에탄올 80%의 elution에서 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 강력한 항진균활성이 있음을 확인하였다 (표 3.3).

표 3.3 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1의 Diaion HP-20의 항진균 활성 에탄올 농도

Fractions	Ethanol	Antifungal activity
1	0%	X
2	20%	X
3	40%	X
4	60%	X
5	80%	O
6	100%	X

바. RP-HPLC를 이용한 항균물질 분리·정제

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주의 배양액 추출물을 최종적으로 RP-HPLC를 이용하여 정제하였다. 즉, 에틸아세테이트로 추출된 샘플을 최소량의 methanol에 녹여 시료로 사용하였으며, 이때 50% ACN에 0.5% TFA가 함유된 buffer를 첨가해 pH가 약 2.0되는 것을 확인 한 후 15,000rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 샘플의 상등액을 0.2 μ m syringe filtration하여 25 μ l의 시료를 loading하여 HPLC에 주입한 후 230nm에서 흡광도의 변화로 시료의 용출을 확인하였다 (그림 3.8). 기기는 역상 (reversed-phase) HPLC를 사용하여 sunfire C₁₈ analytical column (4.6 mm \times 250 mm)을 분석용 컬럼으로 사용하여 peak retention time (피크 머무름 시간)을 관측하였다. 이때, 0.1% TFA를 함유한 95% 물에 5% ACN을 buffer A로, 0.1% TFA를 함유한 95% ACN에 5% 물을 buffer B로 사용하면서, 5% ACN에 95% ACN의 농도로 1분당 1ml씩 15분간 농도 구배를 주며 항균물질을 분리정제 하였다.

분석 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주로부터 최종적으로 정제된 물질은 고리형 지질펩타이드인 1032, 1046, 1060 m/z의 iturin-type, 1464, 1478, 1492, 1506 m/z의 fengycin-type, 1009, 1023, 1037 m/z의 surfactin-type의 3가지로 확인되었으며 분자량은 다음과 같다. 이러한 질량 값은 지방산의 사슬 길이가 동종 분자에서 유래된 14 혹은 28Da의 차이와 연관되어 있다 (표 3.4).

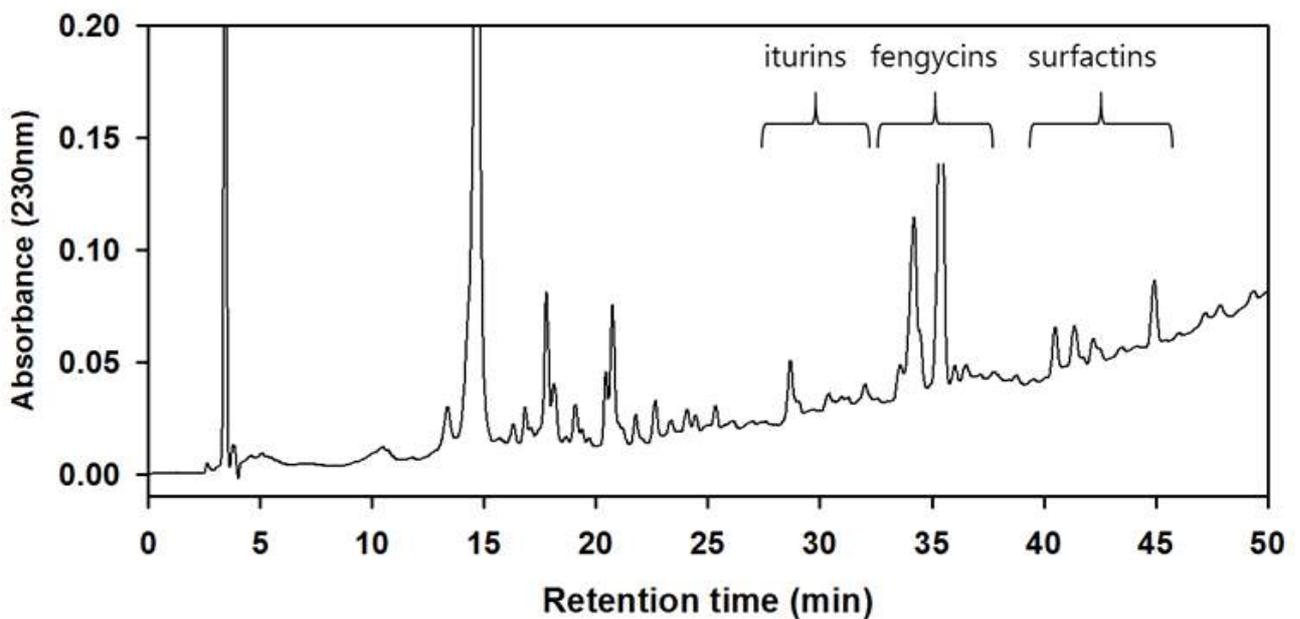


그림 3.8. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 배양액으로부터 HPLC를 이용한 펩타이드 분석.

표 3.4 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1로부터 최종 정제된 고리형 지질펩타이드

Fractions	Lipopeptide type	Molecular mass [M + H] ⁺
1		1032
2	Iturin	1046
3		1060
4		1464
5	Fengycin	1478
6		1492
7		1506
8	Surfactin	1009
9		1023
		1037

제 4 절. *Paenibacillus elgii* BC34-6으로부터 항진균활성 대사산물 분리·정제

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

황토는 항진균활성을 나타내는 균주가 다수 존재할 것으로 예상되며, 국내 황토로부터 다양한 종류의 작물 병 방제 물질을 생산하는 균주를 분리하여 친환경농자재로 활용할 수 있을 것으로 예상된다.

본 연구에서는 전라남도 해남군의 황토로부터 다양한 종류의 작물 병원성 곰팡이에 활성이 뛰어난 균주를 분리하여 16S rRNA 유전자 분석으로 분석하였다 (Ding *et al.*, 2011). 그 결과 *Paenibacillus elgii* BC34-6으로 동정되었다. *Paenibacillus* 종은 1993년 51개의 *Bacillus* 종에서 16S rRNA gene sequence 비교 분석 후 새로운 종으로 정의되었으며 (Ash *et al.*, 1993), 환경오염 (Hura *et al.*, 1999; Kovach *et al.*, 2000)과 식품오염 (Mercier & Manker 2005) 및 식물독성과 같은 여러 가지 문제들을 야기하는 화학합성 농약의 사용을 줄이기 위한 효과적인 방법으로 사용되고 있다 (Chen *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2005). 이러한 미생물 또는 그 파생물을 이용한 생물학적 방제에 대한 관심은 점차 증대되고 있는 추세이며 (Cook *et al.*, 1996), 이미 여러 미생물들이 살균제로써 US Environmental Protection Agency (EPA)에 등록되었다 (Wu *et al.*, 2010).

P. elgii BC34-6 배양상등액은 *Fusarium oxysporum* f.sp.radicis-lycopersici KACC 40031, *Rhizoctonia solani* AG-1 KACC 40101을 비롯한 다양한 작물 병원성 곰팡이에 대해 강력한 활성을 보였으며, LC-MS로 분석한 결과 4종류의 Pelgipeptin 유도체들을 생산하는 것을 알 수 있었다 (Ding *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2010). 이와 더불어 Pelgipeptin 유도체들의 다양한 활성 및 활성기작, 구조에 대한 연구를 시행하기 위해 대량배양을 시도하였다. 배양 시 사용하는 배지에 따라 균체 수와 활성물질의 생산 정도가 달라질 수 있기 때문에, 우선적으로 배지와 pH, 온도 등의 조건을 변경해가며 활성물질 생성이 극대화된 최적배지를 찾고, 선별된 최적배지로 20 L의 대량배양을 실시하였다. 대량 배양된 균주는 Diaion HP-20 Column을 이용하여 1차적으로 분리·정제 하였으며, 보다 순수하게 물질을 분리 정제하기 위해 Reverse-Phase high-pressure liquid chromatography로 2차 정제를 실시하였다. 활성물질의 분석은 LC-MS를 이용하였으며, 분리된 pelgipeptin 유도체들은 활성연구 및 구조연구에 사용되었다.

가. 항진균활성을 나타내는 *Paenibacillus elgii* BC34-6 의 배양 조건

(1) 배지

Paenibacillus elgii BC34-6 균주는 완전배지인 TS (Pancreatic Digest of Casein 17g, Papaic Digest of soybean 3g, Dextrose 2.5g, Sodium Chloride 5g, Dipotassium phosphate 2.5g/liter) 액체 배지를 사용하여 종균배양 하였다. 본 배양은 최소배지인 M9 (Na₂HPO₄ 6g, KH₂PO₄ 3g, NH₄Cl 1g, NaCl 0.5g/liter, 1% sucrose, 0.5% yeast extract) 배지를 사용하였다.

(2) 최적배양조건

Paenibacillus elgii BC34-6 균주를 멸균된 TS (Pancreatic Digest of Casein 17g, Papaic Digest of soybean 3g, Dextrose 2.5g, Sodium Chloride 5g, Dipotassium phosphate 2.5g/liter) 배지에 접종하여 30°C 에서 150rpm으로 48시간 동안 배양하였다. 다시 M9 (Na₂HPO₄ 6g, KH₂PO₄ 3g, NH₄Cl 1g, NaCl 0.5g/liter, 1% sucrose, 0.5% yeast extract) 액체 배지에 접종하여 30°C 에서 150rpm으로 5일 동안 배양하였다.

나. *Paenibacillus elgii* BC34-6 균주의 *in vitro* 활성 검정

(1) 배양상등액의 활성조사

P. elgii BC34-6 배양액을 4,585 x g에서 30분 동안 원심분리하여 균체를 제거하고 8µm filter paper (Whatman, China, 185mm)로 감압필터한 후 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (시들음병)이 접종되어 있는 PDA (Potato Starch 4g, Dextrose 20g, Agar 15g/liter)배지 paper disk (ADVANTEC, Japan, 6mm)에 100µl dropping하여 25°C 에서 3-5일 동안 배양한 후 균사 성장 억제를 조사하였다.

다. *Paenibacillus elgii* BC34-6 균주 배양상등액의 항진균물질 동정

P. elgii BC34-6 배양상등액으로부터 항진균물질을 동정하기 위해 M9 (Na₂HPO₄ 6g, KH₂PO₄ 3g, NH₄Cl 1g, NaCl 0.5g/liter, 1% sucrose, 0.5% yeast extract)배지 30°C 에서 150rpm으로 5일 동안 배양하였다. 21,055 x g에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 0.1% trifluoro acetic acid (Merck, for spectroscopy)를 포함하고 있는 50% acetonitrile (Merck, for isocratic grade for liquid chromatography)을 가해 pH 2.0로 조절하고 0.2µm syringe filter (RC-membrane, PP-housing, Sartorius)한 후 LC-MS 분석용 시료로 사용하였다. 이 때 분석 조건은 아래 표 4.1에 나타내었으며, Mass spectra는 200-1800의 범위에서 positive ion mode로 m/z 값을 나타내었다.

표 4.1 *Paenibacillus elgii* BC34-6 배양액으로부터 항진균물질의 LC-MS 분석 조건

Operating condition	
HPLC system	Waters Delta prep 4000
Mass system	AB Sciex API 2000
Column	Hypersil Luna C ₁₈ (4.6 × 250 mm)
Solvent	A : 100% H ₂ O containing 0.1% formic acid B : 100% Acetonitrile containing 0.1% formic acid
Method	5%-65% for 30 min
Detector	UV _{230 nm}
Flow rate	1ml/min

라. Diaion HP-20 컬럼을 이용한 항균물질 분리·정제

대량 배양한 *P. elgii* BC34-6 배양액을 4,585 x g에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거하고 8µm filter paper (Whatman, China, 185mm)로 감압필터 하였다. 그 후 배양액의 배지 성분을 제거하고 항균물질을 분리하기 위해 Diaion HP-20 (IONTEC, korea) 컬럼을 실시하였다.

먼저 HP-20의 불순물을 제거하기 위해 methano (DUKSAN, korea)과 ethanol (DUKSAN, korea)을 이용하여 순차적으로 세척한 후 증류수를 이용하여 다시 세척하였다. 세척이 완료된 HP-20 800ml을 컬럼에 충전하고 Sea sand (DAE JUNG, 15-20 mesh)를 약 5cm 넣어 다시 증류수 6L로 세척하였다. 이 후 감압필터한 배양 상등액을 4L loading하고, 증류수 10L로 세척하여 배지 성분을 제거, EtOH (20, 40, 60, 80, 100 %)을 차례로 용리시켜 분획을 받아내었다. 이어 증발기를 사용하여 감압 농축시키고 최소량의 메탄올 농도로 녹여낸 다음 0.2µm 2mm non-sterile hydrophilic syringe filter (MACHEREY-NAGEL)를 이용하여 여과하였다. 이 후 0.1% TFA를 함유한 50% ACN에 녹여 0.2mm non-sterile single use syringe filter (RC-membrane, PP-housing, Sartorius)에 여과하여 LC-MS 분석용 시료로 사용하였다. 이 때 분석 조건은 표 4.2에 나타내었다.

표 4.2 *Paenibacillus elgii* BC34-6 배양상등액의 Diaion HP-20 컬럼 후 LC-MS 분석조건

Operating condition	
HPLC system	Shimadzu UFLC
Mass system	AB Sciex API 2000
Column	ACE 5 C ₁₈ -300 (2.1 × 50 mm)
Solvent	A : 100% H ₂ O containing 0.1% formic acid B : 100% Acetonitrile containing 0.1% formic acid
Method	5%-65% for 30 min
Detector	UV _{230 nm}
Flow rate	1ml/min

마. RP-HPLC를 이용한 항균물질 분리·정제

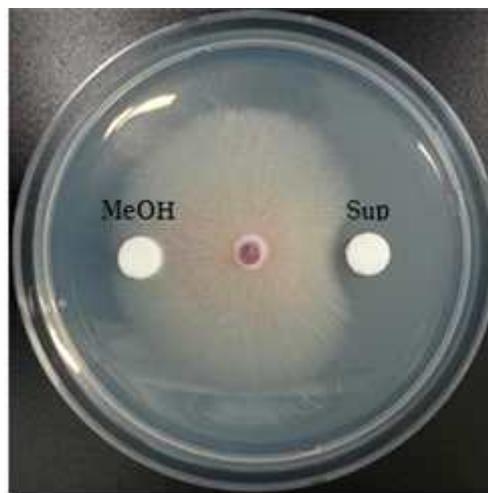
활성이 제일 강한 80% EtOH 분획의 항균물질을 순수하게 분리하기 위해 C₁₈ 컬럼 (Waters µBondapak C₁₈ 3.9 × 300mm)을 이용한 RP-HPLC (Shimadzu UFLC, Japan)를 실시하였다. 0.1% TFA를 함유한 15% ACN에 0.1% TFA를 함유한 75% ACN까지 1분당 10ml씩 20분간 농도 구배를 주어 흘러넘으로써 분리 정제하였다.

정제 결과는 230nm에서 흡광도의 변화로 시료의 용출을 확인하였고, 각 분획별로 물질을 모아 동결건조 시킨 후 최소량의 메탄올에 녹여 이 중 100µl를 이용하여 항균 활성을 확인하였다. 활성이 있는 분획을 다시 0.1% TFA를 함유한 30% ACN부터 0.1% TFA를 함유한 55% ACN까지 1분당 10ml씩 40분간 농도 구배를 주어 흘러넘으로써 최종 분리 정제하였다.

2. 연구개발 결과

가. *Paenibacillus elgii* BC34-6 균주의 *in vitro* 활성 검정

P. elgii BC34-6 배양액을 4,585 x g에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거하고 8 μ m filter paper (Whatman, China, 185mm)로 감압필터한 후 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (시들음병)이 접종되어 있는 PDA (Potato Starch 4g, Dextrose 20g, Agar 15g/liter)배지 paper disk (ADVANTEC, Japan, 6mm)에 100 μ l dropping하여 25 $^{\circ}$ C에서 3-5일간 배양한 후 생육억제를 조사하였다. 그 결과 배양상등액에서 시들음병원균에 대한 활성이 나타남을 알 수 있었다 (그림 4.1).



KACC 40031
Fusarium oxysporum f.sp. *radicis-lycopersici*

그림 4.1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 대한 *P. elgii* 배양상등액의 항균 활성.

나. *Paenibacillus elgii* BC34-6 균주 배양상등액의 항균물질 동정

P. elgii BC34-6 배양상등액의 항균물질을 LC-MS를 이용하여 분석하였다. 0.1% TFA (Merck, for spectroscopy)를 포함하고 있는 50% ACN (Merck, for isocratic grade for liquid chromatography)을 가해 pH 2.0로 조절하고 0.2 μ m syringe filter (RC-membrane, PP-housing, Sartorius)한 후 분석하였다. 그 결과 *P. elgii* BC34-6 균주가 생산하는 4종류의 Pelgipeptin 유도체 (pelgipeptin A, B, C, D)를 동정하였다 (그림 4.2, 표 4.3).

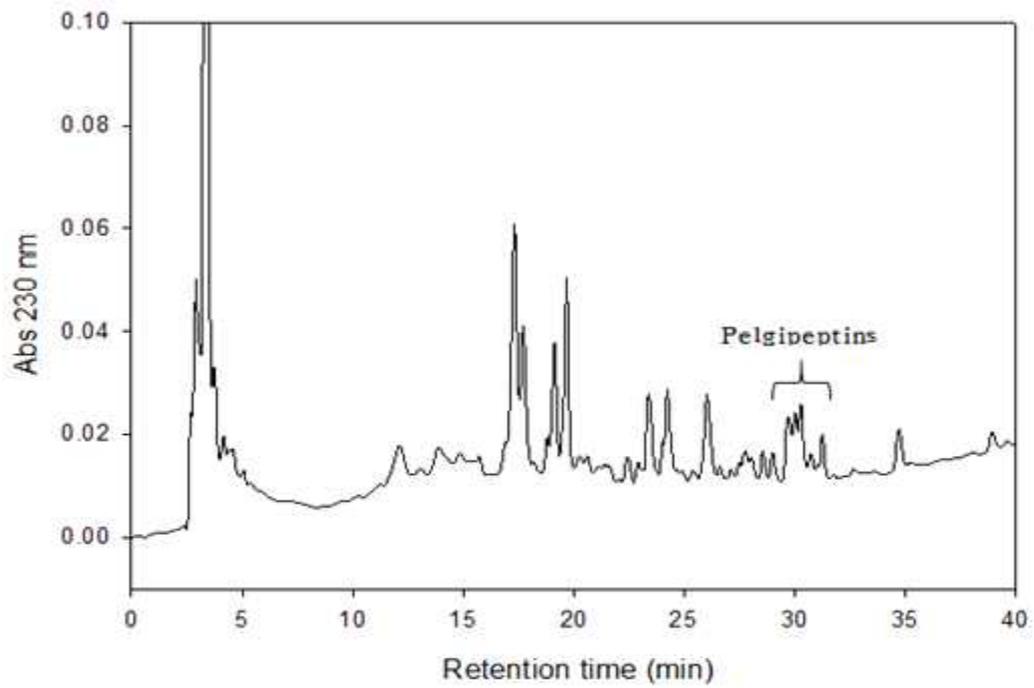


그림 4.2. *Paenibacillus elgii* BC34-6 배양여액의 HPLC 분석결과.

표 4.3 Pelgipeptin 유도체들의 분자량

Lipopeptide type	Molecular mass [M + H] ⁺
Pelgipeptin A	1073.3
Pelgipeptin B	1101.4
Pelgipeptin C	1087.4
Pelgipeptin D	1087.4

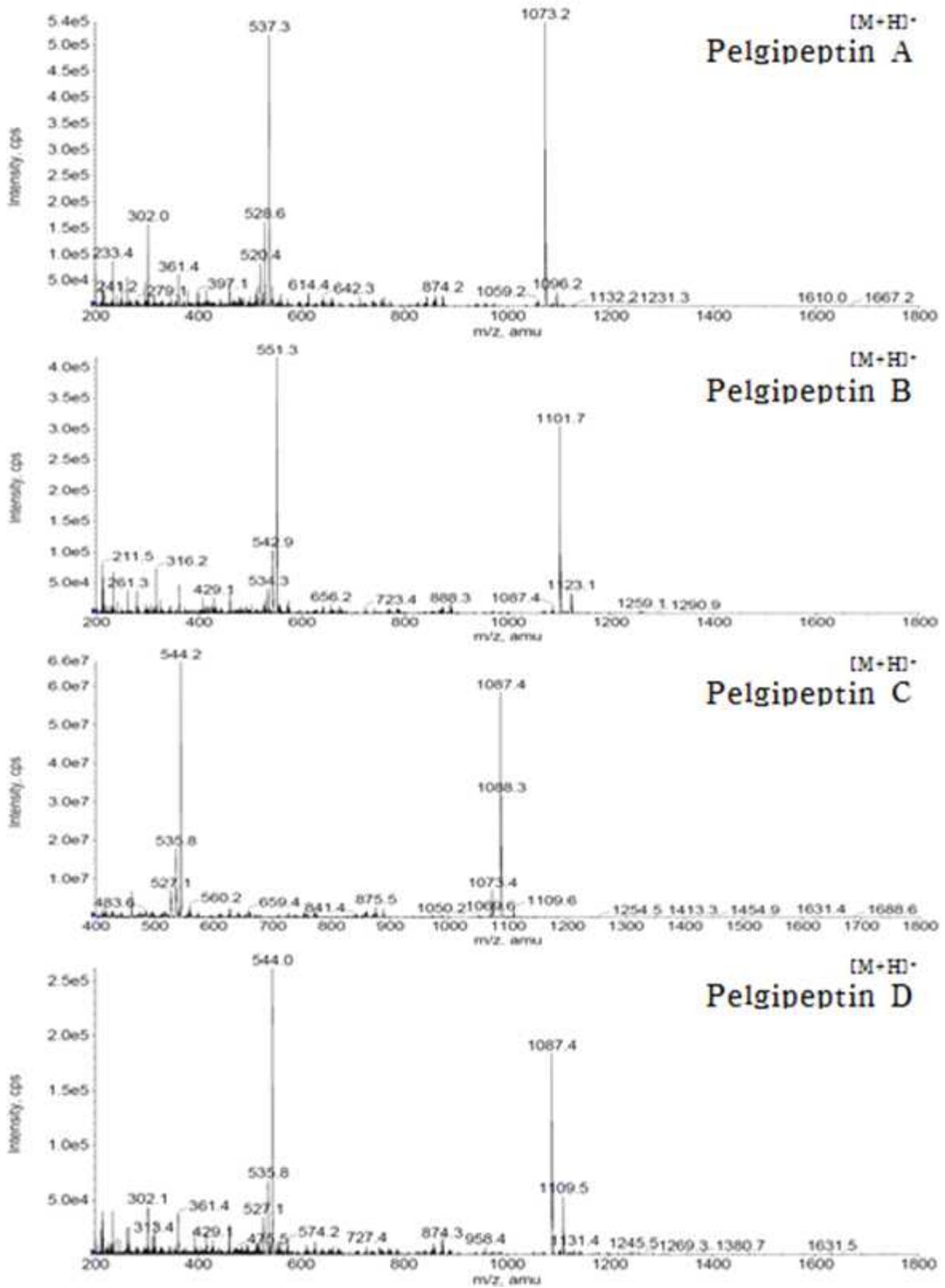


그림 4.3. *Paenibacillus elgii* BC34-6 배양여액에서 확인된 pelgipeptin 유도체들의 분자량.

다. Diaion HP-20 컬럼을 이용한 항균물질 분리·정제

세척된 HP-20 800ml를 충전한 컬럼에 배양상등액 4L를 loading하고 증류수 10L로 세척, 배지 성분을 제거하였다. 이 후 EtOH (20, 40, 60, 80, 100%)을 차례로 용리시켜 분획을 받아 증발기를 사용하여 감압 농축시켰다. 농축시킨 결과 60% EtOH 분획은 2.7g, 80% EtOH 분획은 3g을 얻을 수 있었다.

얻어진 분획은 최소량의 메탄올 농도로 녹여낸 다음 0.2 μ m 2mm non-sterile hydrophilic syringe filter (MACHEREY-NAGEL)를 이용하여 여과하였다. 이 후 0.1% TFA를 함유한 50% ACN에 녹여 0.2mm non-sterile single use syringe filter (RC-membrane, PP-housing, Sartorius)에 여과하여 LC-MS 분석용 시료로 사용하였고, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (시들음병)이 접종되어 있는 PDA (Potato Starch 4g, Dextrose 20g, Agar 15g/liter)배지 paper disk (ADVANTEC, Japan, 6mm)에 100 μ l dropping하여 25 $^{\circ}$ C에서 3-5일간 배양한 후 생육억제를 조사하였다. 그 결과 60% EtOH 분획과 80% EtOH 분획에서 강한 활성이 나타남을 알 수 있었다 (그림 4.4, 그림 4.5).

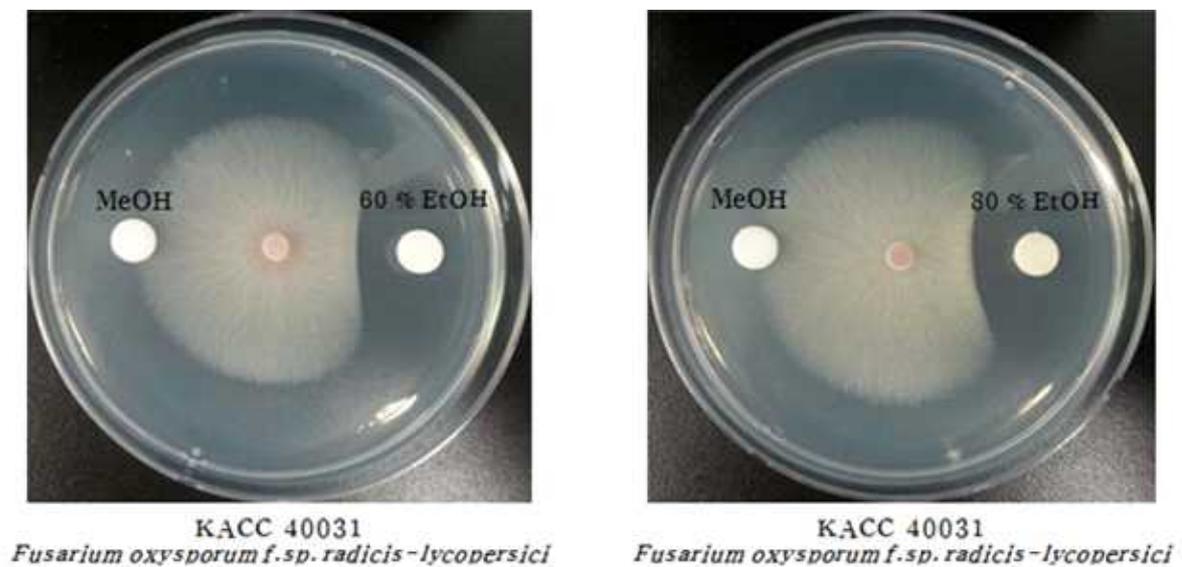


그림 4.4. *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* KACC 40031에 대한 HP-20 컬럼의 60% EtOH 분획과, 80% EtOH 분획의 항진균활성.

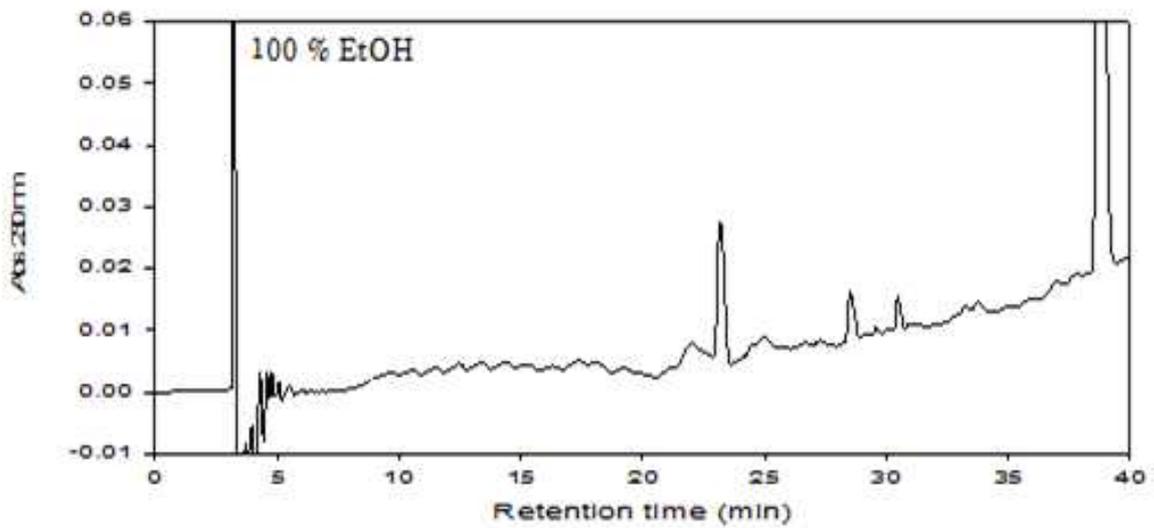
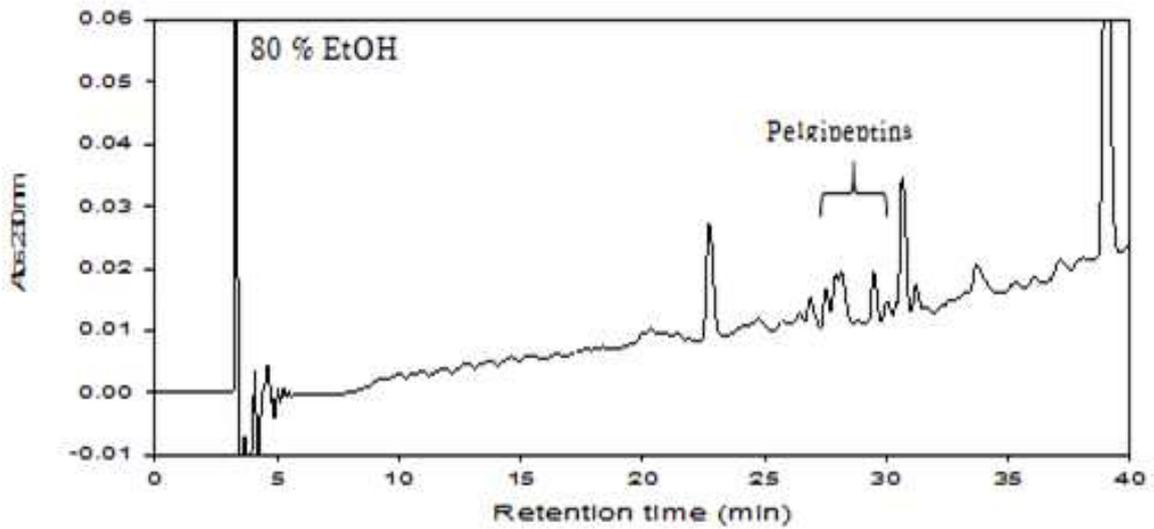
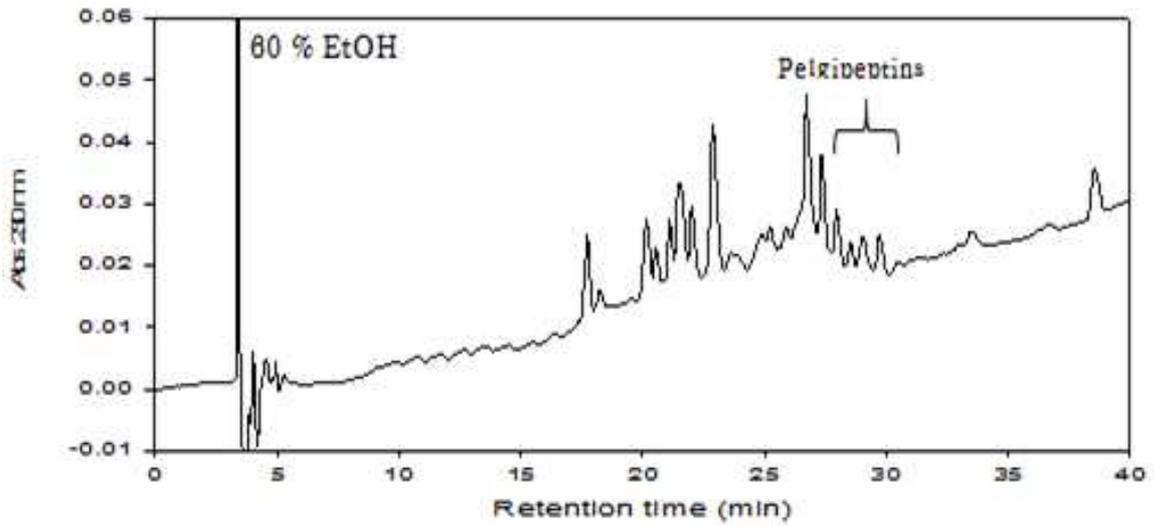


그림 4.5. Diaion HP-20 column의 60% EtOH, 80% EtOH, 100% EtOH 분획의 HPLC.

라. RP-HPLC를 이용한 항균물질 분리·정제

활성이 제일 강한 80% EtOH 분획의 항균물질을 순수하게 분리하기 위하여 C₁₈컬럼 (Waters μ Bondapak C₁₈ 3.9 × 300mm)을 이용한 RP-HPLC (Shimadzu 10AD, Japan)를 실시하였다. 0.1% TFA를 함유한 15% ACN에 0.1% TFA를 함유한 75% ACN까지 1분당 10ml씩 20분간 농도 구배를 주어 흘러넘으로써 분리 정제하였다 (그림 4.6).

정제 결과는 230nm에서 흡광도의 변화로 시료의 용출을 확인하였고, 각 분획별로 물질을 모아 동결건조 시킨 후 최소량의 메탄올에 녹여 이 중 100 μ l를 이용하여 항균 활성을 확인하였다. 활성이 있는 분획을 다시 0.1% TFA를 함유한 30% ACN부터 0.1% TFA를 함유한 55% ACN까지 1분당 10ml씩 40분간 농도 구배를 주어 흘러넘으로써 최종 분리 정제하였다. 그 결과 활성이 있는 단일 피크를 얻어 잘 정제된 것을 알 수 있었다 (그림 4.7).

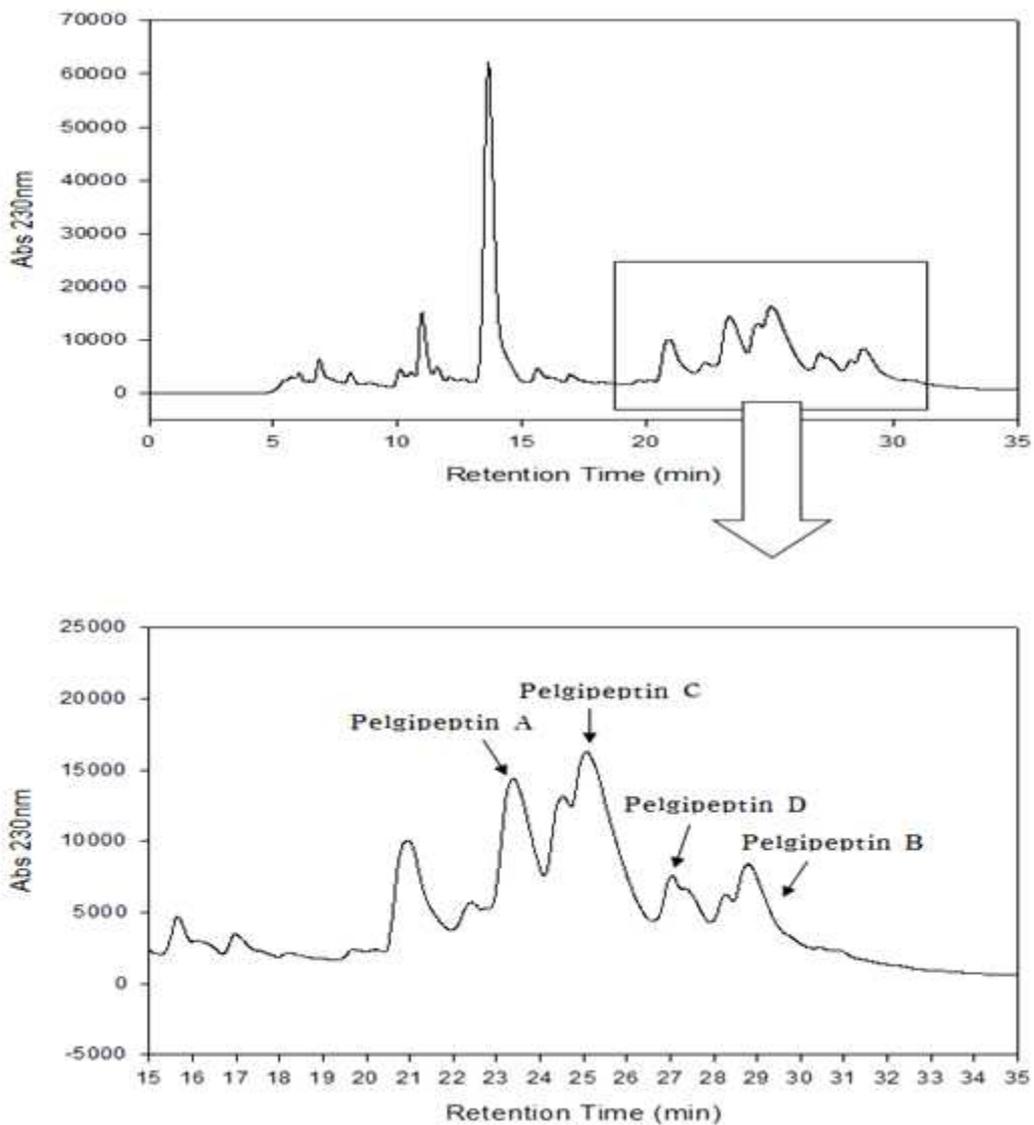


그림 4.6. Pelgipeptin A, B, D의 HPLC 분리 정제.

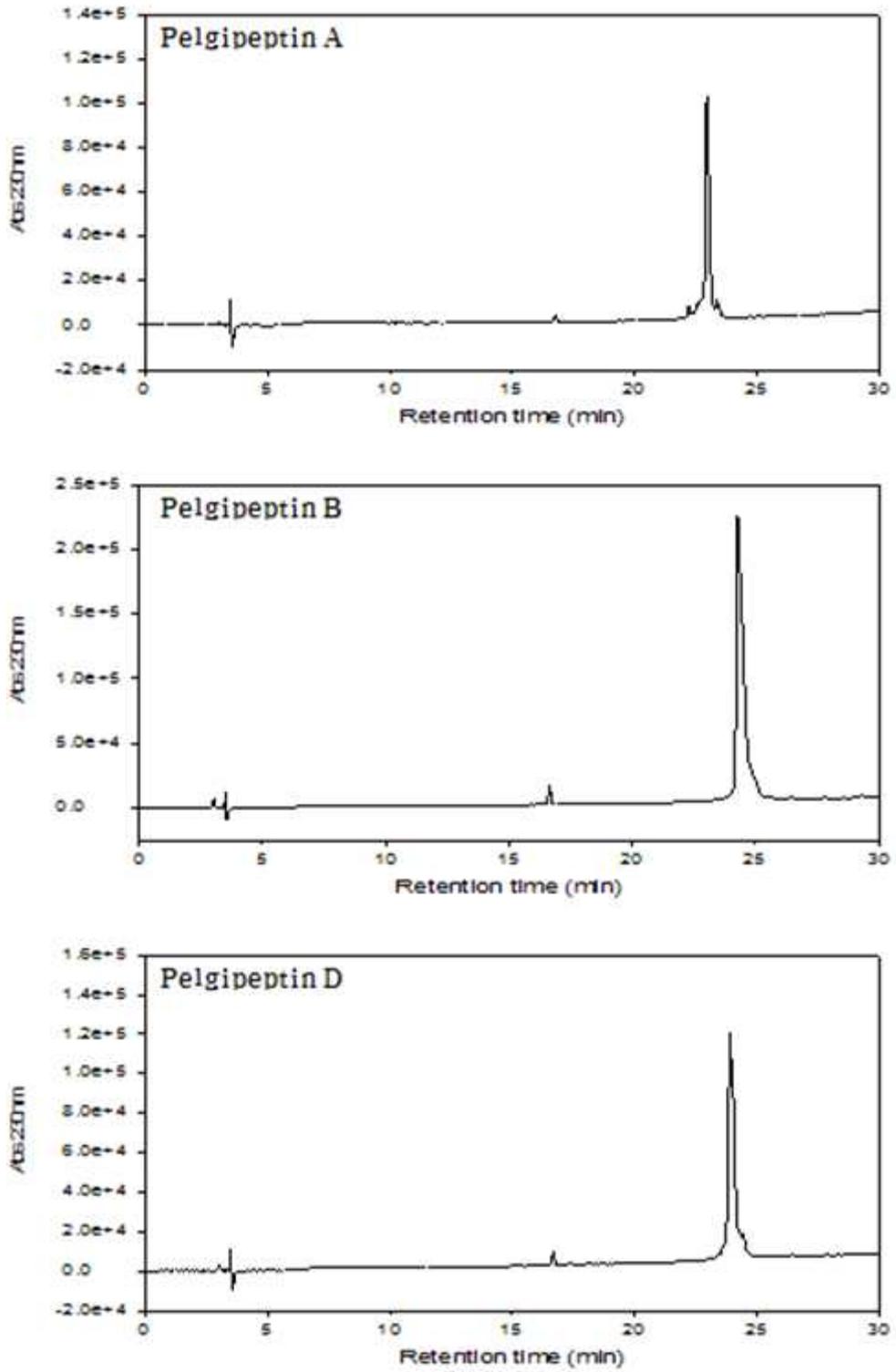


그림 4.7. HPLC로 순수하게 분리된 Pelgipeptin A, B, D.

제 5 절. 황토로부터 분리한 키틴분해 미생물로부터 키틴분해효소 분리·정제

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

황토에서 분리한 키틴분해활성을 갖는 미생물의 키틴을 주성분으로 한 고체 Agar plate에서 키틴 분해에 의해 clear zone을 형성하는 미생물을 대상으로 선별하였다. 그 중 가장 강력한 키틴분해 활성을 갖는 미생물 2종을 선별하여 키틴분해효소의 유무와 분리정제를 시도하였다. 16S rRNA 분석으로 각 미생물을 동정하였으며 최적 키틴배지를 준비하여 키틴분해효소가 최대로 발현되는 배양조건을 찾았다. 배양 후 배양상층액을 황산암모늄 침전법에 의해 단백질을 침전시키고 Ion chromatography와 Gel chromatography를 사용하여 분리·정제를 시도하였다. 그 결과 최종 키틴분해 활성을 갖는 순수한 단백질을 확보할 수 있었다.

가. 황토로부터 키틴분해 미생물 분리, 동정

키틴분해 활성을 갖는 미생물을 분리하기 위하여 광주광역시, 나주시, 무안군, 해남군, 영암군을 비롯한 다수의 지역에서 총 165점의 황토 시료를 확보하였다. 황토 시료로부터 키틴분해 활성을 갖는 유용미생물을 분리하였다. 균주의 동정은 분자계통분류학적 방법으로 실시하였으며, 20% 글리세롤이 첨가된 배양배지에 담아 -80°C에서 보존하였다.

염기서열 분석 방법은 다음과 같다. DNA의 분리는 배양한 균체를 모아 STES Buffer (0.4M NaCl, 0.2M Tris-HCl, pH 7.6, 0.01M EDTA, 1% SDS) 100ml에 현탁하였다. 시료에 glass bead를 첨가하여 5분간 TOMY (micro tube mixer MT-360)로 파쇄하여 세포질을 용출시켰다. 세포 용출액을 TE Buffer (pH 8.0) 200ml, phenol/chloroform 200ml에 현탁하여 12,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다.

분취한 상층액에 RNaseA 5ml를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 chloroform을 첨가하여 12,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리한 시료의 상층액을 ethanol로 2회 세척한 후 건조 (vacuum dry: SpeedVac)하였다.

최종적으로 회수한 DNA는 멸균 증류수에 보존하였다. 준비한 DNA 시료로부터 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 *Chromobacterium violacein*와 *Paenibacillus chitinolyticus*임을 확인하였다.

나. 키틴분해활성을 나타내는 *Chromobacterium* sp.와 *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2의 배양

키틴분해활성 미생물 배양 조건을 확립하기 위해 M9 배지를 기반으로 한 액체 배지 조건을 확립하였다. LB 배지를 이용하여 100ml의 예비 배양을 한 다음 1L의 키틴배지에 접종하여 5일 동안 배양하였다. 대량배양용 배지는 colloidal chitin이 포함된 M9 배지를 사용하였다. *Chromobacterium violacein*은 균체 수가 증가함에 따라서 짙은 보라색을 띠기 때문에 쉽게 세균의 성장을 확인 할 수 있었으며, 매일 배양액의 키틴분해효소 발현 정도를 확인하기 위해 키틴 고체 plate에 세포를 제거한 배양액만 도말하여 확인하였다. 그 결과 약 5일 정도 배양 후 최대의 키틴분해 활성을 보였다.

다. 미생물 배양액으로부터 키틴분해효소 추출

5일간의 키틴분해활성 미생물의 배양 후 원심분리에 의해 배양된 세포와 분해되지 않은 고체 키틴을 제거 하였다. 세포를 제거한 배양액은 약 40% 황산암모늄을 첨가하여 배양액에 포함되어 있는 키틴분해 효소를 침전시켜 단백질만 원심분리에 의해 정제하였다. 침전된 단백질은 SDS-PAGE를 통해 분석하였으며, 그 결과 매우 다양한 단백질이 배양액에 포함 되어 있는 것을 확인 할 수 있었다.

라. 크로마토그래피를 이용한 키틴분해효소 정제

황산암모늄 침전 법에 의해 배양액으로부터 분리한 단백질은 투석에 의해 이온교환 크로마토그래피 초기 Buffer (sodium phosphate, pH 6.5)로 용해시켜 이온교환크로마토그래피 시료를 준비 하였다. 이온교환크로마토그래피는 양이온 크로마토그래피와 음이온 크로마토그래피를 두 가지 모두 시도해 보았으며, 그 중 Q 컬럼을 이용한 음이온 크로마토그래피에 의해 단백질의 분리가 잘 일어나는 것을 확인 할 수 있었다.

음이온 크로마토그래피의 용매는 A: sodium phosphate, pH 6.5, B: sodium phosphate, pH 6.5, 1M NaCl를 사용하였으며, gradient 조건은 B%를 0-100%까지 100분간 농도 구배를 주어 10ml 씩 fraction을 받아내었다.

음이온 크로마토그래피 후 키틴분해 활성이 있는 fraction을 다시 최종 겔크로마토그래피를 이용하여 순수한 키틴분해효소로 분리 정제 할 수 있었다.

2. 연구개발 결과

가. 키틴분해효소 분리 · 정제

황토에서 분리된 *Chromobacterium violacein* 과 *P. chitinolyticus* 35-2는 강력한 chitinase 활성을 가지고 있어 외벽의 주 성분인 chitin으로 되어 있는 곰팡이에 대한 항진균활성을 보인다.

아래 그림 5.1은 chitin agar plate를 이용한 chitin 분해 실험으로 그림에서 볼 수 있듯이 *Chromobacterium* sp.와 *P. chitinolyticus* 35-2는 chitin을 빠르게 분해하여 투명하고 큰 clear zone을 형성한다.

*Chromobacterium violaceum*의 유전자 분석 결과 5개의 chitinase 유전자가 발견되었다. 각각의 chitinase유전자가 발현된 chitinase는 분자량이 33kDa에서 85kDa에 이르기까지 다양한 크기를 갖는 것을 볼 수 있으며, 특히 다양한 pI를 보임으로서 chitinase 간에도 서로 상이한 특이성을 보일 것으로 예상 된다 (표 5.1).

*Chromobacterium violacein*은 배양 시 chitinase를 세포 밖으로 분비하여 배양액 속의 chitin을 분해하여 탄소 source로 이용한다. *Chromobacterium violacein*의 배양액 속에 chitinase가 다량 포함되어 있어 아래의 그림 5.2와 같은 scheme에 따라 chitinase 분리 · 정제를 시도하였다.

• *Chromobacterium violacein* • *Paenibacillus chitinolyticus*

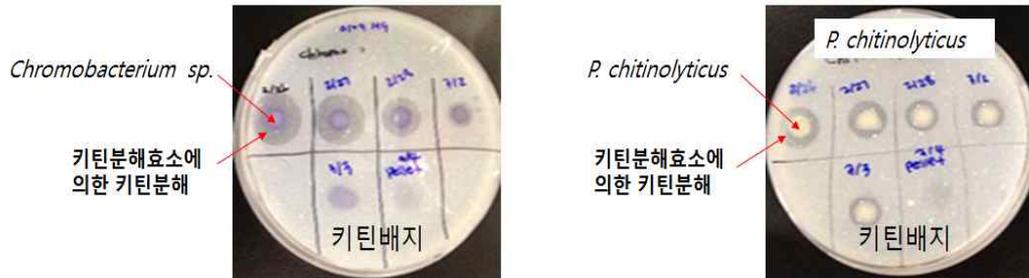


그림 5.1. 키틴분해효소에 의한 키틴분해 활성.

표 5.1 *Chromobacterium violacein*의 키틴분해효소 유전자

	NCBD seq.	Putative function	Amino acids	Molecular weight	PI
1	NP 901567.1	Endochitinase	439	49206.9	7.53
2	NP 902406.1	Chitinase	315	33764.6	5.32
3	NP 902605.1	Chitinase	439	45718.5	8.88
4	NP 902986.1	Chitinase	791	84527.4	6.52
5	NP 903910.1	Chitinase	540	58345.0	8.69

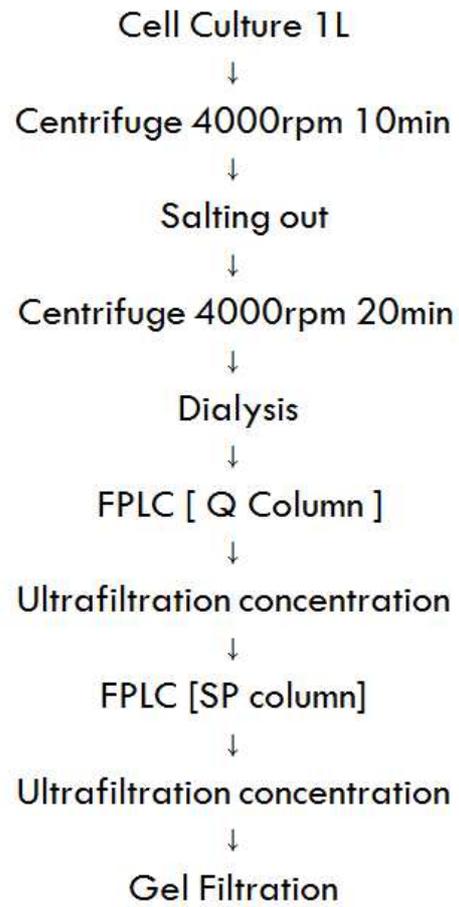


그림 5.2. 키틴분해 효소 분리·정제.

(1) 키틴분해 효소의 분리·정제

이온교환크로마토그래피를 이용한 정제를 위해 배양액의 단백질을 황산암모늄으로 침전 후 이온교환크로마토그래피 초기 Buffer (sodium phosphate, pH 6.5)로 dialysis 하였다.

양이온과 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 분석한 결과 chitinase를 포함한 단백질 샘플은 음이온교환 비드에 결합하는 것을 볼 수 있어서 대량의 물질분리를 위해 음이온교환크로마토그래피를 사용하고 Gel filtration을 이용하여 분리하였다 (그림 5.3~4).

키틴 분해 활성을 나타내는 *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2와 *Chromobacterium violacein*에 서 위와 같은 방법으로 키틴분해효소 단백질을 최종 분리정제 하였다. 그림 4.4의 SDS-PAGE 와 같이 최종 순수한 단백질로 정제 되었으며 각각의 분자량은 60kDa 와 50kDa 정도의 단백 질로 예상된다.

Anion Ex (Q)

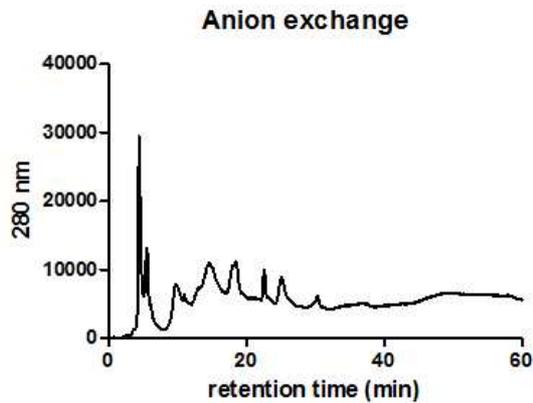


그림 5.3. 이온교환 크로마토그래피에 의한 키틴분해효소 정제.

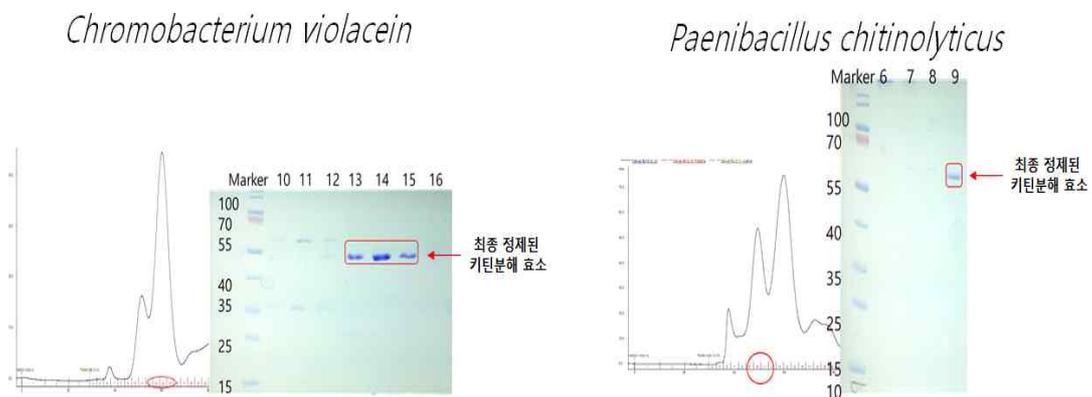


그림 5.4. 최종 분리 정제된 키틴분해 효소의 gel filtration과 SDS-PAGE analysis.

제 6 절. 황토로부터 분리한 *Bacillus* 속 세균이 생산하는 Chitinase

1. 연구개발 수행 및 방법

생물농약은 다양한 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균활성 균주를 이용하여 생태학적으로 방제하고 있다. 그 종류에는 β -glucanase 및 chitinase 등의 진균 외막 가수분해효소를 이용한 식물병원균의 세포벽을 분해시키는 용균작용 및 항진균성 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해시키는 항생작용과 *Pseudomonas* sp.가 분비하는 철 (Fe^{3+}) 성분 특이 결합물질인 siderophore에 의해 식물병원성 곰팡이의 생육을 저해하는 경쟁적 항진균 작용을 이용한 방제방법 등이 있는 것으로 보고되고 있다 (Mahadevan, *et al.*, 1997; Raaijmakers *et al.*, 1995). 이 중 균체 외막 가수분해효소의 생산을 통한 식물병원성 곰팡이의 성장억제를 위한 항진균 작용은 식물병원성 곰팡이의 밀도를 줄임으로써 식물생장촉진이나 농산물의 수확량 증대를 위해 친환경적인 생물학적 방제법이라 할 수 있다. 따라서 식물병원성 곰팡이의 세포벽 주성분이 chitin으로 이루어진 것에 착안하여 외막가수분해효소 중 chitinase를 이용하고자 한다 (Boller, *et al.*, 1983). 식물병원성 곰팡이의 세포벽을 이루고 있는 chitin은 N-acetyl-D-glucosamine이 β -1,4 결합을 하고 있는 mucopolysaccharide의 일종으로 cellulose의 glucose 잔기 중 C-2의 hydroxy가 acetyl-amino기로 치환된 화학구조식을 가지고 있다 (Cabib, 1987) (그림 6.1). Chitinase는 식물병원성 곰팡이 세포벽을 이루고 있는 chitin의 N-acetyl- β -1,4-glucosamine linkage를 가수분해하며, 작용기작에 따라 chitin 및 chitodextrin의 N-acetyl- β -1,4-glucosamine linkage를 무작위로 절단하는 endo형과 chitinase, chitobiose를 단량체인 N-acetyl glucosamine으로 분해하는 N-acetyl glucosaminidase 그리고 chitin 사슬의 비환원성 말단으로부터 이당체인 diacetyl chitobiose 또는 그 이상의 단위체로 절단하는 exo형 chitinase 등 세 종류가 알려져 있다. 이러한 chitinase는 항진균 작용을 위한 생물농약뿐만 아니라 식품, 의약품 등에서도 널리 이용되고 있다 (Wiwat, *et al.*, 1999).

Chitinase 생산 미생물에 관한 연구는 *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Enterobacter*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Trichoderma* 및 *Vibrio* 등에 존재하는 것으로 알려져 있다 (Hiraga, *et al.*, 1997; Christodoulou, *et al.*, 2001; Lee, *et al.*, 2000). *Trichoderma* sp.의 경우, 한 가지 이상의 작용 기작이 알려져 있고 식물병원성 곰팡이를 방제하여 식물을 보호하는데 효과적인 것으로 알려져 있다 (Cruz, *et al.*, 1992). *Bacillus* sp.는 높은 온도 내성, 액체배양 시 빠른 성장, 저항성포자의 형성 등 대량생산이 용이하기 때문에 많은 연구자들의 관심을 모으고 있으며, 미국 식품의약국 (FDA)에 의해 인체 및 환경에 무해한 미생물로 인정받고 있다 (이영근, 외, 2003). 하지만 이러한 항진균 세균은 대부분 수입이거나 버섯 및 콩과 같은 작물을 재배하는 일반토양으로부터 분리·개발 되었다. 우리나라의 토양은 객토, 사립토 및 미립토 등과 같이 여러 형태로 존재하고 있으며, 그 중 황토는 우리나라 국토면적 30%의 비율을 차지하고 있다. 황토는 일반토양에 비해 적은 수의 미생물 (2×10^8 CFU/g)이 서식 중으로, 비교적 척박한 환경조건을 갖고 있다. 하지만 척박한 환경에서 서식하는 황토 미생물의 경우 특정 효소와 대사산물을 생산할 가능성이 높을 것으로 예상되며, 다양한 실험을 통하여 생물의 성장에 좋은 영향을 미치는 것으로 조사되고 있다. 하지만 현재까지 국내에 보고된 바에 따르면 황토를 이용한 미생물 제제 성능 및 생물농약에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다 (황진영, 외,

2000). 따라서, 본 연구에서는 일반토양에 비해 척박한 황토에서 친환경 및 친생태적 방제능을 갖는 항진균 작용균주 중 chitinase를 생산하는 미생물을 분리하여, 그 특성을 동정한 후 chitinase 최적 생산 조건을 선정하고 chitinase를 순수 정제한 다음 항진균 제재로 이용할 수 있는지의 가능성을 탐색하고자 한다.

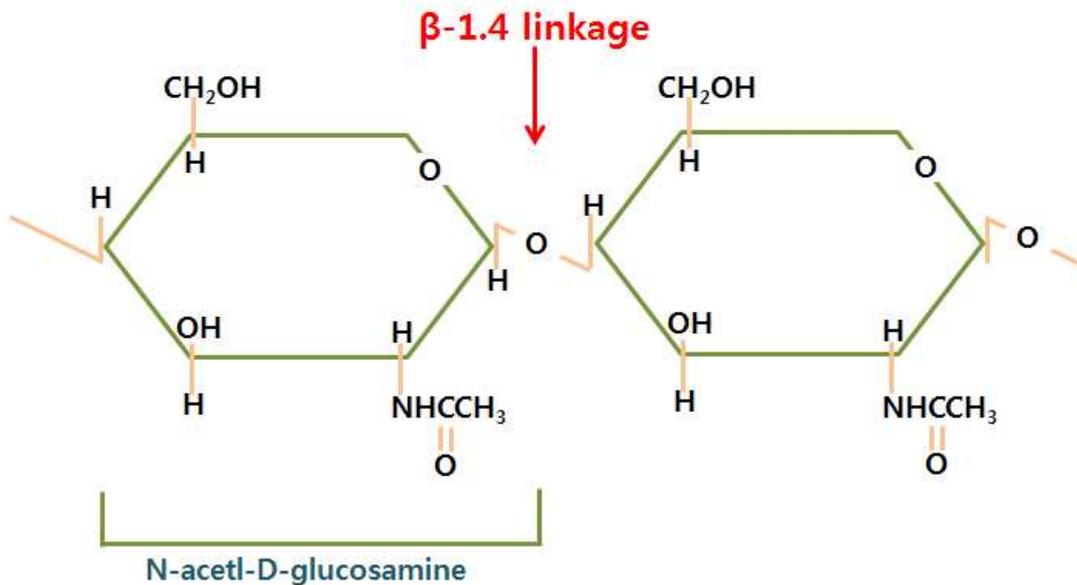


그림 6.1. Chitin의 구조.

가. 사용균주 및 배지

(1) 사용균주

본 연구에서 대조균으로 사용된 균주는 생물자원센터 (KCTC)에서 분양 받은 *Bacillus licheniformis* ATCC 14580을 사용하였으며, 항진균 실험을 위하여 농업유전자원센터 (KACC)로부터 식물병원성 곰팡이 7종을 분양을 받아 사용하였다 (표 6.1). 각 실험균 곰팡이 종은 탄저병, 줄기마름병, 뿌리썩음병 및 시들음병 등과 같은 식물병원성 곰팡이를 대상으로 하였다.

표 6.1. 실험에 사용한 병원성 곰팡이

No	Strains	KACC No.	Diseases
1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	40003	Anthracoise (탄저병)
2	<i>Alternaria alternata</i>	40019	Leaf spots (잎마름병)
3	<i>Fusarium culmorum</i>	42099	Root rot (뿌리썩음병)
4	<i>Fusarium oxysporum</i>	40031	Fusarium wilt (덩굴썩김병)
5	<i>Fusarium</i> sp.	40050	Wilt disease (시들음병)
6	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	40457	Blight (마름병)
7	<i>Sclerotium cepivorum</i>	40582	Root rot (뿌리썩음병)

(2) Chitin 배지

(가) Chitin powder

본 실험은 폐 게 껍질을 이용하여 chitin powder 및 colloidal chitin으로 제작하여 배지의 탄소원으로 이용하였다. 폐 게 껍질은 열수에서 충분히 세척하여 건조시켰으며, 건조시킨 폐 게 껍질은 믹서를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄한 폐 게 껍질은 ethanol 용액에 침지시켜 80°C에서 2시간 동안 교반 반응시켜 색소를 분리 제거하였다. 단백질 및 회분의 제거는 1N의 KOH용액을 사용하여 80°C에서 2시간 반응시킨 후 증류수로 세척하였으며, 1N의 HCl 용액으로 상온에서 1시간 반응시켜 회분 및 미네랄을 제거하고, 증류수로 3회 세척하여 건조시켜 chitin powder를 확보하여 실험에 이용하였다 (Jeon, *et al.*, 2000).

(나) Colloidal chitin

폐 게 껍질을 이용하여 생산한 chitin powder 50g을 500ml의 85% H₃PO₄에 첨가하여 교반기에서 2시간 동안 교반하였다. 150 mesh (Ø 100µm)의 sieve를 이용하여 혼합액으로부터 colloidal chitin을 분리하였다. 분리되어진 colloidal chitin 용액 (pH 2)으로부터 H₃PO₄을 제거하기 위하여 동일 용량의 증류수 (500ml)를 첨가하여 5000 x g에서 30분간 5~6회 세척을 반복수행하여 최종 colloidal chitin (pH 4)을 확보하였다. Colloidal chitin의 함량은 최종 colloidal chitin 20ml을 filter (Whatman

No. 1)에 여과 한 후 filter를 65°C 에서 8시간 건조시켜 무게를 측정하였다. 측정된 무게를 (A)와 같이 계산하여 colloidal chitin을 1% (w/v)로 한 후 본 실험에 사용하였다.

$$\% \text{ (w/v) of chitin} = (\text{final weight} - \text{initial weight}) \times 100/20$$

. (A)

(다) Chitin 배지

Chitin 배지는 기본 배지로 standard minimum medium (Na₂HPO₄ 2g, KH₂PO₄ 1g, NaCl 0.5g, NH₄Cl 1g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, CaCl₂ · 2H₂O 0.1g)을 사용하였으며, 폐 게 껍질로부터 생산한 colloidal chitin을 농도별로 첨가하여 chitinase 생산 실험에 사용하였다. 또한 배양초기 성장 단계의 미생물에 영양공급과 함께 질소원으로 사용하기 위해 0.1g의 yeast extract를 첨가하여 사용하였다.

나. 시료채취 및 균주분리

(1) 시료 채취

황토시료로부터 chitinase 생성하는 미생물을 분리하기 위하여, 전라남도 7개 시·군에서 황토를 이용하여 감자, 콩, 배추, 고구마 및 마늘 등을 경작하고 있는 경작지를 대상으로 황토시료를 채취하였다 (표 6.2).

표 6.2. 사용한 황토 시료의 채취 장소

Site	Sample No.
전라남도 무안군 외현화 마을 황토 농장	A-1
전라남도 무안군 외현화 마을 고추밭	A-2
전라남도 무안군 황토클리닉	A-3
전라남도 무안군 현경면 황토현	A-4
전라남도 무안군 현경면 콩밭	A-5
전라남도 영암군 신북면 감자밭	A-6
전라남도 영암군 미암면 농협 감자밭	A-7
전라남도 장흥군 관덕길 황토밭	B-1
전라남도 보성군 응치면 입구 고구마밭	B-2
전라남도 해남군 산이면 상등 배추밭	B-3
전라남도 해남군 대상마을 고구마밭	B-4
전라남도 나주시 봉황면 칠천리 고구마밭	B-5
전라남도 나주시 봉황면 철야마을 마늘밭	B-6
전라남도 화순군 전남대병원 앞 배추밭	B-7

(2) 황토 성분 분석

실제로 채취한 황토시료의 성분 분석을 위해 Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP)를 이용하여 황토의 성분을 분석하였다. ICP-MS (Perkin Elmer, ELAN DRC) 분석을 위한 전처리는 0.5g 황토시료에 200 μ l의 증류수, 700 μ l HNO₃를 혼합한 후 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 보관하였다. 2ml HCl를 혼합 황토시료에 첨가하여 150 $^{\circ}$ C에서 2시간 처리한 뒤, filter (Whatman No.2)를 이용하여 부유물질을 제거한 후 증류수를 이용하여 최종적으로 10ml로 하여 ICP-MS 분석 시료로 사용하였다.

(3) Chitinase 생산 균주 선별

Chitinase 생산 균주를 분리하기 위하여 0.5% chitin을 첨가한 chitin 선택배지를 사용하였다. 1차적으로 우점종 미생물을 선별하기 위해 test tube에 chitin 배지 10ml와 수집한 황토 샘플 0.1g을 혼합한 후 30 $^{\circ}$ C에서 14일간 배양하였다. 2차 선별균주를 분리하기 위해 14일간 배양 한 1차 배양액을 연속 희석법을 이용하여 1.0 x 10⁻⁶~10⁻⁷까지 희석하였으며, 희석한 각 샘플은 고체선택 배지에 도말하여 30 $^{\circ}$ C에서 14일간 배양하였다. Chitinase 생산 균주 선별 기준은 불투명한 배지에서 clear zone을 형성하며 성장하는 균주를 기준으로 선별하였다. 선별된 균주들은 보관을 위해 복합배지인 LB 배지에 3회의 계대배양을 거친 후 glycerol과 1:1 비율 (v/v)로 혼합하여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

다. 균주동정

(1) 분자생물학적 특징

(가) Genomic DNA 분리

Chitinase 생산균주의 유전학적 특성 조사를 위하여, 각 균주를 LB 배지에서 배양온도 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하여 cell pellet을 확보하여 genomic DNA추출에 사용하였다. 추출 과정은 균체를 멸균된 증류수로 두 번 세척하고 10ml의 solution I (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 재현탁 하였다. 여기에 1ml의 lysozyme 용액 (50 mg/ml)과 0.5ml RNase (2 mg/ml) 및 0.1ml proteinase K (50mg/ml)을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치한 다음 0.6ml의 10% SDS solution을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치 하였다. 반응액에 1ml의 mercaptoethanol을 가한 후 반응액의 0.5배에 해당하는 3M sodium acetate solution (pH 5.2)을 가하여 반응액에 동량의 chloroform을 처리하였다. 이후 15,000 x g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였고, 이렇게 얻은 상등액에 0.6배에 해당하는 isopropanol을 가한 후 chromosomal DNA pellet을 회수하여 70% ethanol로 세척한 다음 건조하였다. 3ml의 TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)에 녹여 실험에 사용하였다.

(나) 16S rRNA 유전자 서열 분석

선별균주의 유전학적 특성을 확인하기 위하여 16S rRNA의 염기서열 분석을 수행하였다. 각 chitinase 생산균주의 genomic DNA를 template DNA로 사용하였으며, 16S rRNA primer (Forward-5' CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3' Reverse-5' TACCAGGGTATCTAATCC-3')를 이용하여 중합효소연쇄반응 (PCR)을 수행하였다. PCR 조건은 100ng의 DNA 1 μ l, 10pmol

primer 1 μ l, 1% PVP 1 μ l, BSA 1 μ l 및 PCR premix 4 μ l를 혼합하여 최종 반응 부피를 20 μ l로 하였다. 95 $^{\circ}$ C에서 7분간 pre-denaturation하고 총 30cycle (denaturation 95 $^{\circ}$ C에서 45초, annealing 58 $^{\circ}$ C에서 45초, extension 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초)을 반응시킨 후, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 더 반응시켰다. 얻어진 PCR 산물은 pGEM-T-easy vector에 삽입하여 sequence 분석에 사용하였으며, 분석 결과는 MEGA 5.1 program을 이용하여 phylogenetic tree로 나타내었다.

(다) Chitinase gene 확인

선별 한 chitinase 생산 균주를 통해 추출한 genomic DNA를 template로 사용하여 universal chitinase primer (Forward-5' CGTCGACATCGACTGGGARTDBCC-3' , Reverse-5' ACGCCGGTCCAGCCNCKNCCRTA-3')를 이용하여 중합효소연쇄반응 (PCR)을 수행하였다. 중합효소연쇄반응 (PCR) 조건은 100ng의 DNA 1 μ l, 10pmol primer 1 μ l, 1% PVP 1 μ l, BSA 1 μ l 및 PCR premix 4 μ l를 혼합하여 최종 반응 부피를 20 μ l로 하였다. 95 $^{\circ}$ C에서 7분간 pre-denaturation하고 총 30cycle (denaturation 95 $^{\circ}$ C에서 45초, annealing 55 $^{\circ}$ C에서 45초, extension 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초)을 반응시킨 후, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 더 반응시켰다. 증폭 된 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 450 bp의 universal chitinase gene을 확인하였다.

(2) 생리·생화학적 특징

(가) 형태관찰

대조균과 선별균주의 형태적 차이를 조사하기 위해 주사전자현미경으로 관찰을 하였다. 전처리 과정은 LB 배지에서 37 $^{\circ}$ C, 24시간 배양한 배양액을 membrane filter (0.45 μ m)를 이용해 filter 상에 균체를 수집 후, 균체가 포함 된 membrane filter를 고체 LB 배지에 glutaraldehyde solution 2.5% (v/v)를 가하여 고정시켜 배양하였다. 탈수 과정을 위해 membrane filter에서 배양한 균체를 ethanol 농도 50, 60, 70, 80, 90 와 100% (v/v)에 탈수 및 건조과정을 반복하여 전처리를 수행하였으며 주사전자현미경 (Topcon, SM-350)으로 관찰하였다.

(나) 그람 염색

세포벽의 구조는 Burke의 gram 염색법(Hucker &Conn, 1923)에 따라 수행하였다. Slide glass 에 LB 배지에서 37 $^{\circ}$ C, 24시간 배양한 균주를 100 μ l 가한 후 alcohol lamp를 이용하여 균체를 고정시켰다. Crystal violet 용액을 떨어뜨리고 1분 30초간 염색 시킨 후 mordant로 탈색하였다. 95% Alcohol을 이용하여 탈수 한 후 safranin 용액을 떨어뜨리고 30초간 염색하여 시료를 고정액으로 고정한 후 cover glass로 덮고 광학현미경 (Optinity, Infinity3)으로 400배의 배율로 관찰하였다. 균체가 붉은색 또는 보라색으로 염색되었는지를 관찰하였다.

(다) 운동성

선별균주의 운동성 여부를 확인하기 위해 10ml 시험관에 agar (0.5% w/v)를 포함한 LB 배지를 5ml 첨가하여 반유동고체배지로 제작하였다. 균체는 칩 끝에 묻혀 배지에 찢어서 접종을 하였으며, 균체가 자라는 동안 접종부위를 중심으로 바깥쪽으로 퍼져 자라는지, 접종부위에 국한되어 자라는지를 관찰하여 운동성 유무를 결정하였다.

(라) 포자 형성

Spore는 특정한 세균의 체내에 형성되는 원형 또는 타원형의 구조로서 고온, 건조, 물리적·화학적 조건에 대해서 저항력이 강하고 오래 생존한다 (Chada, *et al.*, 2003). Spore가 생기는 균은 *Bacillus*와 *Clostridium* 등으로 알려져 있으며, 선별균주의 spore 형성 유무를 확인하기 위해, LB 배지에 37°C에서 24시간 배양한 균주를 80°C에서 15분간 열처리 하였다. 열처리한 배양액을 37°C에서 다시 배양하여, 균주의 성장여부에 따라 spore의 형성 유무를 결정하였다.

(마) 혐기성 배양

혐기성 배양은 분자상 산소가 없는 상태에서 미생물을 배양하는 것을 말한다. 혐기성균, 특히 편성혐기성 균 (절대혐기성 균)의 배양에는 배지를 공기 중으로 부터 차단, 산소 제거 및 산화환원전위의 저하 등의 조치가 필요하며, anaerobic chamber 또는 고층한천배지를 사용하는 방법으로 구별한다(신현성, 이규식, 2000). 선별 균주는 anaerobic chamber를 이용하여 O₂를 공급하지 않고 LB배지에서 37°C로 72시간 배양하여 성장유무를 결정하였다.

(바) Catalase test

H₂O₂를 물과 산소로 분해 할 수 있는 catalase는 cytochrome의 heme을 prosthetic group으로 가지고 있는 효소로서 호기성 또는 대부분의 조건적 혐기성 세균에 존재하는 것으로 보고되어 있다 (신현성, 이규식, 2000).

LB 배지에서 배양한 균주 배양액 0.5ml에 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) 5ml을 가하여, 즉시 또는 5분정도 후에 기포가 발생하는지 여부를 관찰하였다.

(사) Nitrate reduction

Nitrate 배지 (peptone 10g, potassium nitrate 1g)를 test tube에 넣고 대상균주를 접종한 후 24~48시간 배양하였다. 배양액에 detection solution (0.5%, v/v, α-naphthylamine : 0.8% sulfamilic acid = 1 : 1)을 가하여 분홍·적색을 나타내는 것을 양성반응으로 결정하였다.

(아) Carbohydrate fermentation

세균은 다양한 종류의 탄수화물을 이용하는데, 세균의 종류에 따라 이용 가능한 탄수화물의 종류도 다르다. 따라서 특정 미생물이 어떤 종류의 탄수화물을 이용할 수 있는지가 세균동정의 유용한 기준이 된다 (Bunn, *et al.*, 1975). 선별균주를 carbohydrate media (peptone 5g, NaCl 5g, yeast extract 3g, BTB 0.25g, sugar 10g)에 배양하여 성장여부를 확인하였으며, 탄수화물은 단당류의 glucose D-glucose, L-Arabinose, D-xylose를 이용하였다.

(자) Hydrolysis of casein

단백질 가수분해능을 조사하는 방법의 하나로써, casien이 포함 된 milk agar에 균주를 37°C에서 2일간 배양한 후 clear zone 형성 여부를 판단하였다.

(차) Gelatin liquefaction test

균체 효소인 gelatinase가 gelatin을 액화하는 능력을 시험하는 것이다. 배지는 nutrient gelatin stab 배지 (pH 6.8)를 이용하였다. Gelatin 배지에서 균주를 37°C에 배양 후 그것을 4°C 냉장고에 두었다가 시험관을 기울여 보아 응고 여부를 확인하였다.

(카) Starch hydrolysis

다당류의 starch를 hydrolysis 가능여부를 조사하기 위해 starch를 함유한 배지 (peptone 5g, yeast extract 3g, soluble starch 2g, pH 7)에 선별균주를 배양 후 gram's iodine 용액을 가하였을 시 투명한 환을 형성 여부를 조사하였다.

(타) Citrate utilization

Citrate가 분해되면 oxalacetate와 acetate가 생성되는데 이들은 citrate의 중간대사 산물이며, citrate utilization은 탄소원으로 citrate를 이용할 수 있는지 여부를 검사하는 것이다. Simmon's citrate agar 배지에 균을 접종하여 균의 성장상태와 배지의 색변화로 관찰하였다.

(파) Fatty acid composition

Gas chromatography를 이용한 지방산 분석을 통해 선별균주의 생화학적 균주 동정을 수행하였다. 지방산 분석을 위한 전처리 과정은 37°C TSA에서 24시간 배양한 균주를 loop를 이용하여 균체를 모은 뒤, saponification을 수행하기 위해서 reagent #1 (NaOH 45g, MeOH 150ml, D.W 150ml) 1ml을 첨가하여 5~10초간 vortex하였다. Methylation을 위한 reagent #2 (6N HCl 325ml, MeOH 275ml)용액 2ml를 가한 뒤 5~10초 vortex 하였으며, 80±1°C에서 10±1 분간 반응시켰다. Extraction 과정은 reagent #3 (Hexane 200ml, Methyl tert-butyl ether 200ml) 1.25 ml 첨가하여 10분간 흔들어 준 뒤 상등액을 수집하였다. Reagent #4 (NaOH 10.8 g D.W 900 ml)을 이용하여 washing 하였으며, 전처리 시료는 Gas chromatography (HP6890, MIDI calibration TSBA6 6.10 library)를 이용하여 분석하였다.

라. chitinase 생성 최적 조건

(1) 균주 생장에 따른 chitinase 생산 조사

(가) 검량곡선

Miller의 DNS 측정법을 이용하였으며, N-Acetyl-D-Glucosamine을 이용하여 검량곡선을 작성하였다 (Miller, 1959). DNS 용액은 표 6. 3에 나타내었다.

N-Acetyl-D-Glucosamine을 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 및 100µmol/ml 농도로 50mM phosphate buffer (pH 7.0)에 희석한 후, 각 농도의 N-Acetyl-D-Glucosamine 1.0ml, phosphate buffer (pH 7.0) 1.0ml 와 DNS 용액 2.0ml을 혼합하였다. 혼합액을 100°C에서 5분간 반응시켜준 뒤 적색으로 발색 된 용액을 4000 x g에서 15분간 원심분리하였다. 이 후 상등액을 uv-visible spectrophotometer (Beckman, DU-800)을 이용하여 575nm에서 흡광도를 측정하였다.

표 6.3 DNS용액의 조성

Component	Composition
Potassium sodium tartrate	300g
3,5-dinitrosalicylic acid	10g
2M NaOH	200ml
Total	Distilled water 1L

(나) chitinase 활성 측정

Chitin broth 100ml에 분리 균주를 접종한 후, 37°C에서 교반속도 220rpm으로 7일간 각각 배양하였다. 배양 균주의 chitinase secretion 여부를 확인하기 위하여 배양액을 10,000 x g에서 15분간 원심분리하여 상등액과 균체를 분리하여 각각 chitinase activity를 측정하였다. 배양액의 상등액은 chitinase activity 측정을 위해 전처리 과정이 없이 이용하였으며, 균체는 50mM phosphate buffer (pH 7.0)를 이용하여 washing한 후 sonication 하였다. Sonication한 crude extract를 다시 10000 x g에서 15분간 원심분리하였고, soluble fraction의 chitinase activity를 측정 하였다. chitinase activity 측정방법은 crude enzyme solution 1.0ml에 0.5% colloidal chitin이 용해되어 있는 50mM phosphate buffer (pH 7.0) 1ml을 넣고 37°C shaking incubator에서 60분간 반응시켰다. 반응 시킨 crude enzyme solution에 DNS 용액 2ml을 첨가하여 chitinase 반응을 정지시켜 100°C 끓는 물에서 5분간 발색시킨 후 냉각시켰다. 적색으로 발색된 용액을 4,000 x g에서 15분간 원심분리하고 상등액을 uv-visible spectrophotometer를 이용하여 575nm에서 측정하였다.

(2) 배양 조건에 따른 chitinase 생산 최적화

(가) 온도

선별균주에 대한 chitinase 생산 최적 온도를 조사하기 위해 배양온도를 각각 20, 25, 30, 35와 40°C로 하여 chitin broth에서 5일 동안 220rpm, pH 7의 조건에서 배양한 후 상등액을 이용하여 chitinase activity를 측정하였다.

(나) pH

선별균주에 대한 chitinase 생산 최적 pH를 조사하기 위해 pH 5, 6, 7, 8, 9와 10으로 각각 조절하여 chitin 배지에서 선별균주를 5일 동안 220rpm, 30°C의 조건으로 배양한 후 얻은 상등액으로부터 chitinase activity를 측정하였다.

(다) 반응표면분석법을 이용한 chitinase 생산 배지 및 생산 조건 최적화

Chitinase 생산에 사용되는 배양배지의 조성 최적화 및 배지성분의 효과 평가를 위해 반응표면분석법 중 Plackett-Burman (PB) 및 Central Composite Design (CCD) 실험을 이용하여 분석하였다 (Plackett, Burman, 1946).

Chitin 배지의 배지성분인 Colloidal chitin, yeast extract, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, MgSO₄, CaCl₂ 및 NH₄Cl 중 chitinase activity에 가장 큰 영향을 미치는 인자를 산출하기 위하여 Plackett-Burman를 사용하였다. 각 변수는 성분의 농도를 기준으로 하여 고농도 수준 (+1)과 저농도 수준 (-1)으로 구분하였으며, 각 변수와 농도수준과 배치방법은 표 6.4와 같이 나타내었다. Plackett-Burman을 이용하여 산출된 배지 조성 중 중요인자의 최적농도의 산출은 central composite design을 이용하였다. 중심합성계획법은 중심점 (center point)와 축점 (axial point)을 2k 요인실험에 추가시킨 실험계획으로 중심합성계획의 실험에서는 6개의 중심점과 8개의 축점 및 6개의 외축점으로 구성하였다 (표 6.5). 중심합성계획의 횟수는 20개의 선정된 조건에서 실험을 수행하였다. 각각의 실험인자에 변화에 따른 chitinase 생산량의 반응표면이 곡선으로 나타날 것으로 예상되어 아래와 같은 2차 다항식에 적용 시켰다.

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

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

Plackett-Burman 및 Central Composite Design의 model에 대한 유의성은 design expert program의 통계적 분석 시 P값에 의해 결정되며 P<0.05일 때 유의성이 인정된다. 각각 분석된 통계결과는 분산 분석 (ANOVA)을 이용하여 최적값을 산출하였으며, 최적의 인자 농도의 결정은 2차 다항식의 f값이 최대로 되는 지점을 3차원 반응 표면도와 contour plot을 이용하여 관찰하였다.

☿ 6.4 Values for the Plackett–Burman design and design matrix (trials No. 1 to 12)

Variable	Component	-1 Value (g/L)	+1 Value (g/L)
X ₁	Colloidal chitin	0.50	3.00
X ₂	Yeast extract	0.05	0.03
X ₃	Na ₂ HPO ₄	0.50	3.00
X ₄	KH ₂ PO ₄	0.50	2.00
X ₅	NaCl	0.25	1.00
X ₆	MgSO ₄	0.25	1.00
X ₇	CaCl ₂	0.25	1.00
X ₈	NH ₄ Cl	0.50	2.00

Trial No.	Colloidal chitin X ₁	Yeast extract X ₂	Na ₂ HPO ₄ X ₃	KH ₂ PO ₄ X ₄	NaCl X ₅	MgSO ₄ X ₆	CaCl ₂ X ₇	NH ₄ Cl X ₈
1	-1.00	-1.00	-1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	-1.00
2	+1.00	-1.00	-1.00	-1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00
3	+1.00	+1.00	+1.00	-1.00	-1.00	-1.00	+1.00	-1.00
4	-1.00	+1.00	+1.00	+1.00	-1.00	-1.00	-1.00	+1.00
5	-1.00	+1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	+1.00	-1.00
6	-1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00
7	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00
8	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	+1.00
9	+1.00	+1.00	-1.00	-1.00	-1.00	+1.00	-1.00	+1.00
10	+1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	+1.00	-1.00	-1.00
11	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	+1.00	-1.00	-1.00	-1.00
12	-1.00	-1.00	+1.00	-1.00	+1.00	+1.00	-1.00	+1.00

X₁-X₈: medium components; (+1): high level; (-1): low level

⌘ 6.5 Experimental range and level of the independent variables of culture medium

Variable	Symbol code	Range and levels (g/L)				
		-1.41	-1	0	+1	+1.41
Colloidal chitin	X ₁	2.18	3.00	5.00	7.00	7.82
KH ₂ PO ₄	X ₄	0.30	0.50	1.00	1.50	1.71
MgSO ₄	X ₆	0.15	0.25	0.50	0.75	0.85

	Trial No.	X ₁	X ₄	X ₆
Fractional 2 ⁴ factorial design	1	-1.00	-1.00	-1.00
	2	+1.00	-1.00	-1.00
	3	-1.00	+1.00	-1.00
	4	+1.00	+1.00	-1.00
	5	-1.00	-1.00	+1.00
	6	+1.00	-1.00	+1.00
	7	-1.00	+1.00	+1.00
	8	+1.00	+1.00	+1.00
Star point	9	-1.41	0.00	0.00
	10	+1.41	0.00	0.00
	11	0.00	-1.41	0.00
	12	0.00	+1.41	0.00
	13	0.00	0.00	-1.41
	14	0.00	0.00	+1.41
Central point	15	0.00	0.00	0.00
	16	0.00	0.00	0.00
	17	0.00	0.00	0.00
	18	0.00	0.00	0.00
	19	0.00	0.00	0.00
	20	0.00	0.00	0.00

마. chitinase 정제 및 특징

(1) chitinase 정제

Chitinase를 정제하기 위하여 Chitin 배지 100ml에서 37°C, 220rpm으로 5일간 배양한 배양액을 10,000 x g에서 20분간 원심분리하였다. 단백질을 포함한 효소는 황산암모늄 농도에 따라 석출되는 원리를 이용하여, 상등액에 황산암모늄을 각각 30, 50, 70, 85% 용해시켜 농도별로 10,000 x g에서 20분 동안 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 황산암모늄에 의해 침전된 chitinase를 포함한 단백질을 50mM phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시킨 뒤 dialysis cassette (10,000 MWCO)를 이용하여 4°C에서 50mM phosphate buffer (pH 7.0)에 24시간 dialysis를 수행하였다. Buffer 교체는 8시간 간격으로 3회 실시하였다. Dialysis를 수행한 chitinase를 포함한 단백질을 DNS 측정법을 이용하여 chitinase activity를 측정하였다. 가장 높은 농도의 chitinase activity를 나타내는 dialysis sample을 SDS-PAGE를 수행하여 분자량을 확인하였다.

황산암모늄 침전법을 이용하여 1차 정제한 chitinase fraction으로부터 고순도 chitinase를 정제하기 위하여 ion-exchange chromatography (Bio-rad, BioLogic Duo flow)를 수행하였다. DEAE-cellulose anion-exchange column에 buffer A (50mM phosphate buffer, pH 7.0)로 평형화시킨 후 1차 정제된 chitinase를 포함한 단백질을 주입하고 10X column volume의 buffer A로 wash 후 60분간 buffer B (1M NaCl, 50mM phosphate buffer, pH 7.0)로 linear gradient (buffer A 100% → buffer B 100%, 유속 4 ml/min)를 주어 2ml씩 fraction을 받았다. Ion-exchange chromatography를 수행하여 얻은 각 fraction은 SDS-PAGE를 통하여 정제도를 확인하였다.

(2) chitinase 특성 조사

(가) chitinase 활성에 미치는 온도의 영향

토양은 계절의 변화에 따라 다양한 온도를 나타낸다. 따라서 chitinase를 생물농약 제제로 개발 및 적용 시 효율비교를 위한 chitinase 최적 활성 온도 및 chitinase의 열안정성에 대해 조사하기 위해 chitinase 활성 측정 온도를 각각 20, 30, 40, 50과 60°C로 하여 교반배양기에서 60분간 동안 220rpm, pH 7에서 반응 시킨 후 DNS 측정법을 이용하여 chitinase activity를 측정하였다.

(나) chitinase 활성에 미치는 pH의 영향

토양은 성질에 따라 다양한 pH를 나타낸다. 따라서 chitinase를 생물농약 제제로 개발 및 적용 시 효율비교를 위한 chitinase 활성의 최적 pH를 조사하기 위해 chitinase 활성 측정 pH를 각각 5, 6, 7, 8, 9와 10으로 하여 교반배양기에서 60분 동안 220rpm, 37°C에서 반응 시킨 후 DNS법을 이용하여 chitinase activity를 측정하였다.

(다) chitinase 안정성 조사

Chitinase를 실제 생물농약으로 이용하고자 하였을 때 chitinase의 안정성 및 효율을 비교하기 위하여 금속이온 및 화학저해제의 영향에 대하여 조사하였다. 조사대상으로는 FeSO₄, ZnSO₄, CuCl₂, CoCl₂, CaCl₂, 및 HgCl₂를 각각 0.2mM 농도로 하여 37°C에서 30분간 chitinase와 반응 시킨 후, chitinase activity를 측정하였다.

바. 정제 chitinase 이용한 항진균활성

(1) 대치배양을 통한 항진균활성

Chitinase 생산 균주로부터 분리·정제한 chitinase의 항진균활성을 확인하기 위하여 농업유전자원정보센터 (KACC)에서 분양 받은 7종의 식물병원성 곰팡이를 potato dextrose 고체배지 (potato starch 4g, dextrose 20g, agar 15g)에 접종하여 25°C에서 3~5일간 배양하였다. 식물병원성 곰팡이의 균사체가 중심부로부터 0.5cm정도 뺀어 나올 때 paper disc를 이용하여 정제한 chitinase를 100μl를 2회에 걸쳐 접종하여 3~5일간 배양 후 항진균활성을 확인하였다.

(2) 식물 병원성 곰팡이 저해율 조사

고체배지에서 곰팡이 저해율을 측정하기 위해 정제된 chitinase 1mg/ml를 PD 배지에 혼합하여 고체배지를 제작하였다. 혼합한 PD 고체배지에 농업유전자원정보센터 (KACC)에서 분양 받은 4종의 식물병원성 곰팡이 *Fusarium. sp.*, *F. culmorum*, *C. gloeosporioides* 및 *A. alternata*를 3~5일간 배양하여 식물병원성 곰팡이의 성장 정도를 측정하였다 (E). Chitinase를 첨가하지 않는 PD 고체배지에 식물병원성 곰팡이를 배양한 것을 대조군으로 하여 중심부로부터 성장한 균사체의 평균 성장 길이 (C)를 확인하였으며, 다음과 같은 식에 따라 식물병원성 곰팡이 활성 저해율을 측정하였다.

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

2. 연구개발 결과

가. 황토 성분 분석

황토는 일반토양에 비하여 Fe²⁺ 이온이 다량 포함되어져 있다고 알려져 있다 (황진연, *et al.*, 2000). 본 실험에서는 전라남도 7개 시·군의 황토시료를 채취하여 ICP-MS기기를 이용하여 Zn, Fe, K, Ca, Mg, Mn, Cr, Ni 및 Si의 분석을 수행하였다. 그 결과 아래 표 6.6과 같은 결과를 확인하였으며, 분석한 모든 황토시료에서 Fe이 일반 토양에 비하여 100배 이상 높은 것으로 나타났다. 반면 Ni과 Si와 같은 양이온의 농도는 낮게 나타났다. 즉 본 실험에서 이용된 모든 황토시료의 경우 일반 토양에 비하여 미생물의 성장에 적합하지 않은 조건임을 알 수 있었다.

표 6.6 황토시료의 금속이온 분석

Sample number	Concentration of metals (mg/kg of soil)								
	Zn	Fe	K	Ca	Mg	Mn	Cr	Ni	Si
A-4	62.6	20660.0	2657.0	1312.0	2252.0	221.7	16.7	7.1	38.4
A-5	62.6	21320.0	2510.0	1348.0	2012.0	263.7	23.5	11.1	35.3
A-6	48.2	18770.0	1980.0	1600.0	2040.0	319.4	21.0	9.3	41.0
A-7	38.9	23100.0	1693.0	514.0	1417.0	270.3	27.6	15.4	34.7
B-1	55.6	22330.0	2786.0	2804.0	2567.0	184.9	19.2	6.8	40.2
B-2	30.0	15030.0	1215.0	795.3	1147.0	162.3	17.6	7.0	41.0
B-3	80.4	14060.0	495.6	274.4	1604.0	321.3	5.9	1.2	34.6
B-4	64.2	21040.0	1914	3171.0	2092.0	256.7	26.3	13.0	34.8

나. chitinase 생산 균주 선별

전라남도 7개 시·군의 황토시료로부터 chitinase 생산 균주를 선별하기 위하여 0.5% (w/v) chitin 선택배지를 이용하여 30℃에서 14일 동안 진탕배양을 수행하였다. 이후 chitin agar배지에서 연속희석법을 이용하여 30℃에서 14일 동안 배양하여 단일 colony를 확보하였다. 이들 단일 colony를 chitin이 첨가된 배지에서 배양하여 clear zone을 형성 여부를 확인하여 2차선별을 수행하였다. 그 결과 각 황토 시료로부터 총 9종의 clear zone을 형성하는 colony를 확보하였다. 각 분리한 colony로부터 생선된 clear zone의 크기와 대조균으로 사용한 *Bacillus lichemiformis* ATCC 14580로부터 생성된 clear zone의 크기를 비교 분석하였다. 그 결과 최종적으로 이 중에서 빠른 성장속도와 chitinase 활성이 높은 전라남도 무안군과 해남군에서 수집한 황토로부터 분리한 strain A-5, B-4를 본 실험에 사용하였다 (그림 6.2).

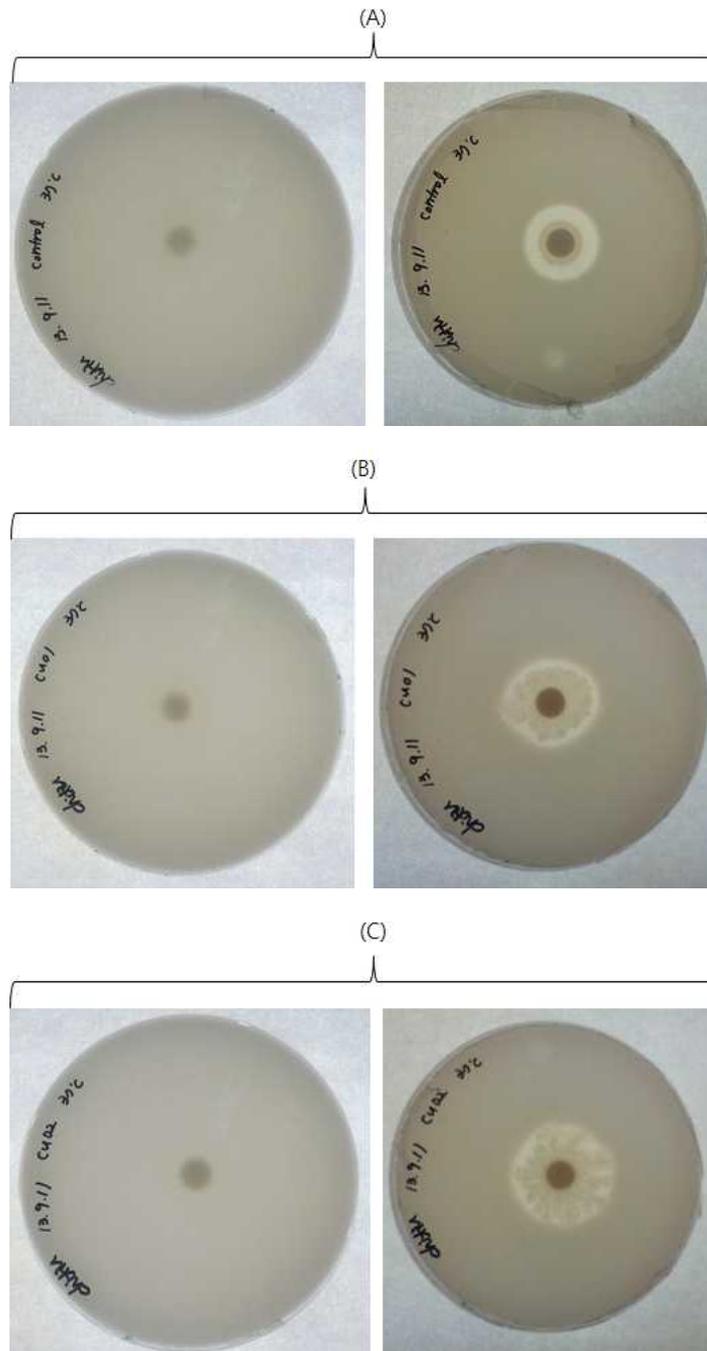


그림 6.2. Screening of chitinase producing bacteria on chitin agar plates.
 A; *Bacillus lichemiformis* ATCC 14580, B; strain A-5, C; strain B-4.

다. 균주 동정

(1) 분자생물학적 특징

(가) 16S rRNA 유전자 서열분석

선별균주의 유전학적 특성을 확인하기 위하여 16S rRNA의 염기서열 분석을 수행하였다. 각 chitinase 생산균주의 genomic DNA를 template DNA로 사용하였으며, 16S rRNA primer (Forward-5' CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3' Reverse-5' TACCAGGGTATCTAATCC-3')를 이용하여 중합효소연쇄반응 (PCR)을 수행하였다. 얻어진 PCR 산물은 pGEM-T-easy vector에 삽입하여 sequence 분석에 사용하였다. 선별균주의 16S rRNA 염기서열의 분석결과를 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 gene bank database와 비교·분석한 결과와 MEGA 5.1 program을 사용하여 phylogenetic tree를 분석한 결과, 각각 *B. lichemiformis* ZHU-1 및 *B. lichemiformis* W61 균주와 99%의 상동성을 나타내었다 (그림 6.2, 그림 6.3). 따라서, *B. lichemiformis* 균주 중 chitinase를 생산하는 것으로 조사되어 있는 *B. lichemiformis* ATCC 14580를 chitinase 활성실험의 대조균으로 하여 본 실험에 사용하였다 (Veith *et al.*, 2004).

분석한 선별균주는 NCBI GenBank에 등록하였으며, 선별 균주의 strain을 각각 *Bacillus licheniformis* KYLS-CU01 (NCBI GenBank accession NO : KF111800) 와 *Bacillus licheniformis* KYLS-CU02 (NCBI GenBank accession NO : KF111801)로 명명하였다.

```
1  GGGGGGACGT TTTCCGGATT TTGGGCGTAA GCGCGCGCAG GCGGTTTCTT AAGTCTGATG
61  TGAAAGCCCC CGGCTCAACC GGGGAGGGTC ATTGGAAACT GGGGAACTTG AGTGCAGAAG
121  AGGAGAGTGG AATTCCACGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA GATGTGGAGG AACACCAGTG
181  GCGAAGGCGA CTCTCTGGTC TGTAAC TGAC GCTGAGGCGC GAAAGCGTGG GGAGCGAACA
241  GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACGCCGTA AACGATGAGT GCTAAGTGTT AGAGGGTTTC
301  CGCCCTTTAG TGCTGCAGCA AACGCATTAA GCACTCCGCC TGGGGAGTAC GGTCGCAAGA
361  CTGAAACTCA AAGGAATTGA CGGGGGCCCG CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTCG
421  AAGCAACGCG AAGAACCCTTA CCAGGTCTTG ACATCCTCTG ACAACCCTAG AGATAGGGCT
481  TCCCCTTCGG GGGCAGAGTG ACAGGTGGTG CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
541  GTTGGGTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCAGCA TTCAGTTGGG
601  CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAATCATCA
661  TGCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGGC AGAACAAAGG GCAGCGAAGC
721  CGCGAGGCTA AGCCAATCCC ACAAATCTGT TCTCAGTTCG GATCGCAGTC TGCAACTCGA
781  CTGCGTGAAG CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
841  GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACGAC GAGAGTTTGT AACACCCGAA GTCAGTGAAG
901  TAACCTTTTG GAGCCATCTG CCGAAAGTGG GACAGATGAT TGGGGTGAAA TCGTACAAAG
961  GTAACCGGTA GGTGGACTT TTTTGTAGCC GTGTTTTTTA TGGGGCTTCC CCTTTGGGGG
1021  CCCCATCGTA ATGGGAGGGG TTTGTTTTTC CCCCCCAAC GGGGTTGTGT TTAAGAGGCG
1081  ATAAATCCCT CCCCCAGGC GGGGGGCGGT TGGACCTAAA TTGACTTTC TTTGGATGGGG
1141  AGAAAATTAA GTGGGGGCGC CGCCGTAAAA AAAAAGAAGG A
```

그림 6.2. Multiple sequence alignment of 16S rRNA sequence of *B. licheniformis* CU02.

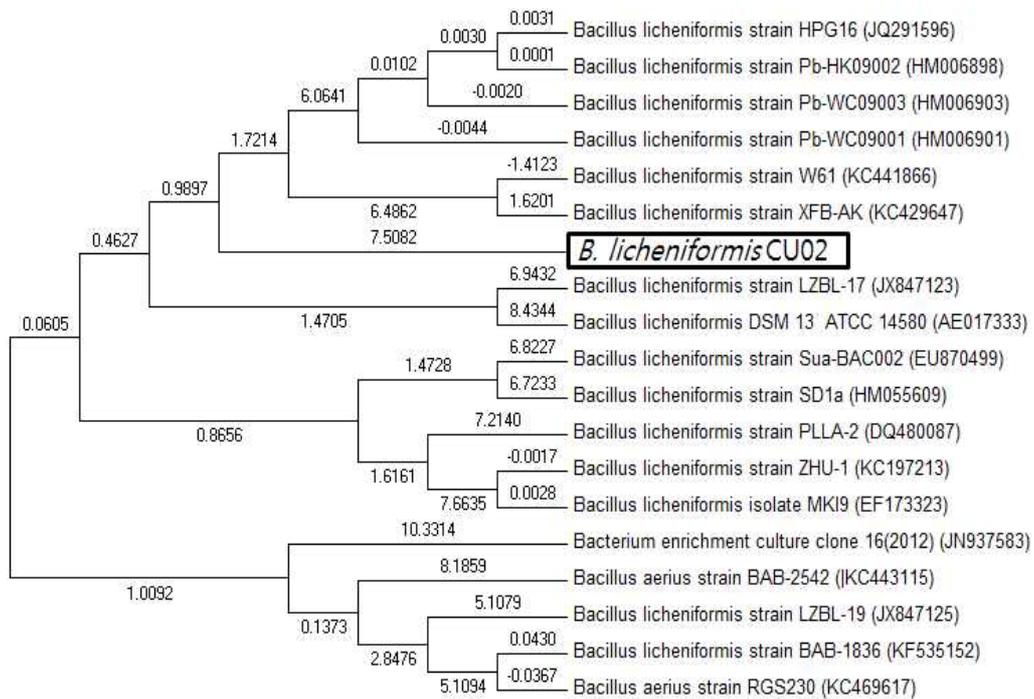
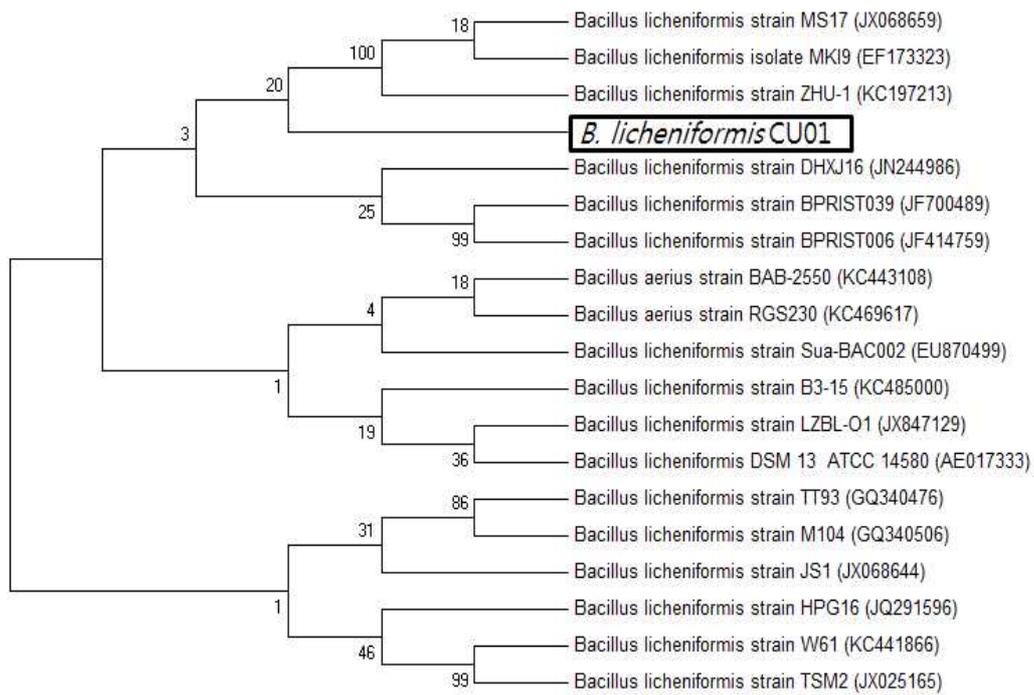


그림 6.3. Phylogenetic tree of *B. licheniformis* CU01 and *B. licheniformis* CU02.

(나) chitinase 유전자 확인

선별균주의 유전학적 특성 중 chitinase gene 확인하기 위하여 chitinase 생산균주의 genomic DNA를 template DNA로 사용하였으며, universal chitinase primer (Forward-5' CGTCGACATCGACTGGGARTDBCC-3' , Reverse-5' ACGCCGGTCCAG CCNCKNCCRTA-3')를 이용하여 중합효소연쇄반응 (PCR)을 수행한 결과 450bp의 chitinase gene 을 확인 할 수 있었다 (그림 6.4). *B. licheniformis* ATCC 14580의 chitinase gene 1689bp의 상보적인 부분을 이용하는 universal primer의 특징상 chitinase gene 존재여부만 확인하였으며, 향후 chitinase gene의 전체 sequence 분석을 통해 *B. licheniformis* ATCC 14580의 chitinase gene과 비교가 요구된다 (Veith *et al.*, 2004).

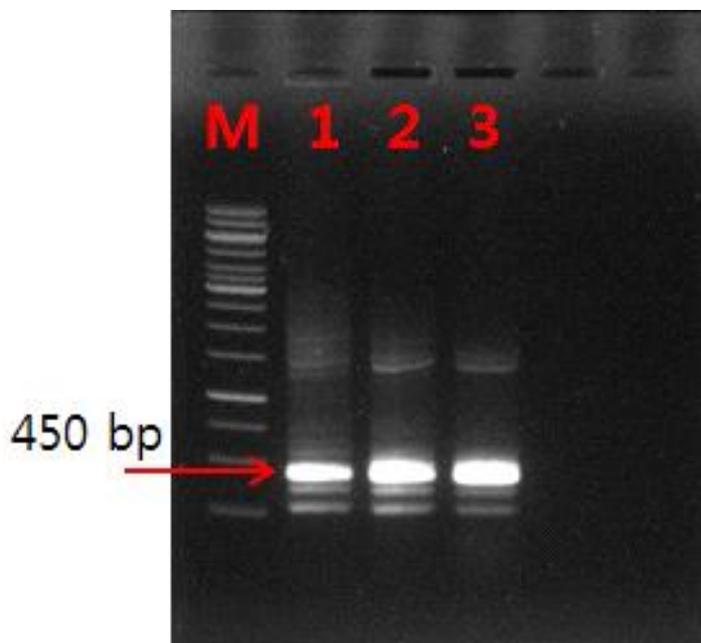


그림 6.4. Universal chitinase gene, 450bp. Symbol: M, size marker; lane 1, *B. licheniformis* (ATCC 14580); lane 2, *B. licheniformis* CU01; lane 3, *B. licheniformis* CU02.

라. 생리·생화학적 특징

(1) 생리·생화학적 특징

선별 균주의 Gram 염색을 한 결과 선별균주 모두 gram 양성이었으며, 주사전자현미경을 이용하여 미세형태를 관찰한 결과 균체의 길이와 폭은 각각 5~6 μ m 와 3~4 μ m로 주모성의 편모를 가진 단간균이었다 (그림 6.5). 운동성이 있었으며, 4spore를 생성하여 80 $^{\circ}$ C의 고온에서도 내성을 나타내었다. 산소를 이용하여 ATP를 합성하는 동시에, anaerobic에서 성장가능한 조건

부혐기성이었으며, cytochrome을 포함하는 호기성균과 통성 혐기성균에서 존재하는 catalase를 생성하였다. 탄수화물은 단당류인 D-glucose와 D-xylose는 분해 가능하였지만 L-Arabinose는 분해하지 못하였다. 또한, 다당류인 starch는 분해 가능하였으며 casein 분해, 젤라틴 액화반응을 나타내었다. 질산환원작용을 하였으며, 알칼리하에서 탄소원으로 이용할 수 있는 citrate 이용능력이 조사되었다. 이러한 각종 생리·생화학적 특징을 통한 결과 *Bacillus licheniformis* 특성과 가장 가까운 특성을 나타내었다 (김현정, 1998) (표 6.7).

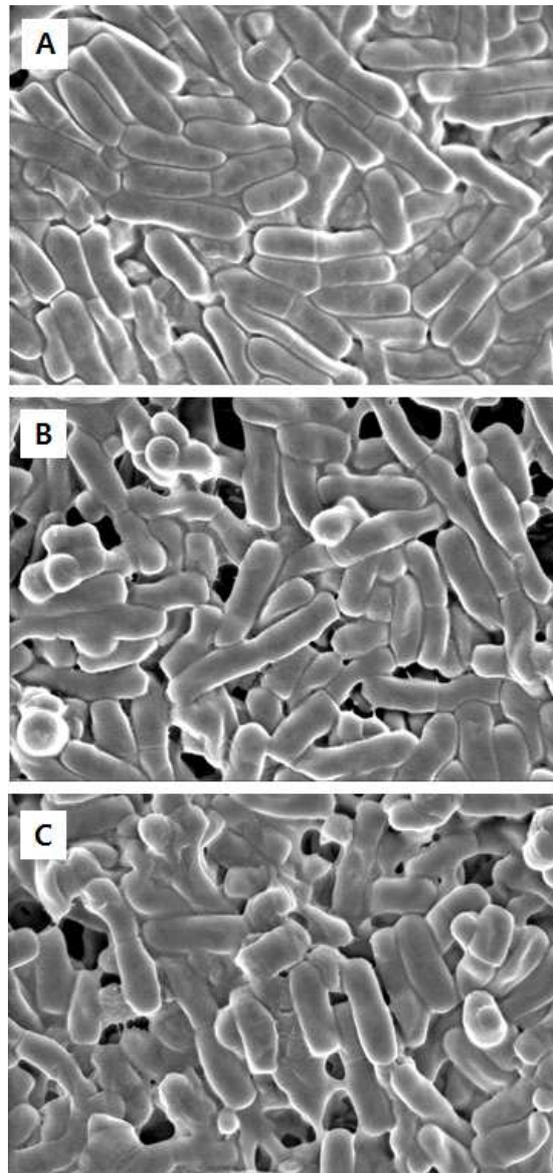


그림 6.5. Morphology analysis of bacterial cells under scanning electron microscope. A; *B. licheniformis* ATCC 14580, B; *B. licheniformis* CU01 and C; *B. licheniformis* CU02.

☿ 6.7 Biochemical characterization of bacterial isolates

Characteristics	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
	<i>licheniformis</i>	<i>licheniformis</i>	<i>licheniformis</i>
	ATCC 14580	CU01	CU02
Gram stain	+	+	+
Spore formation	+	+	+
Cell shape	rod	rod	rod
Cell size	3~4 μ m	3~4 μ m	3~4 μ m
	× 5~6 μ m	× 5~6 μ m	× 5~6 μ m
Motility	+	+	+
Colony appearance	irregular, clear white	irregular, clear white	irregular, clear white
Temperature for growth	20~50°C	20~50°C	20~50°C
Anaerobic growth	+	+	+
Catalase	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+
Acid from	D-glucose	+	+
	L-Arabinose	-	-
	D-xylose	+	+
Hydrolysis of	casein	+	+
	gelatine	+	+
	starch	+	+
Utilization of citrate	+	+	+

(2) Fatty acid composition

균체의 지방산은 세포 지질의 필수 구성성분으로 10~24개 정도의 carbon chain으로 이루어져 있으며 그들의 길이, 이중결합의 위치, 치환기 등이 다양하여 미생물의 분류에 중요한 기준이 되고 있다 (Sasser, 1990).

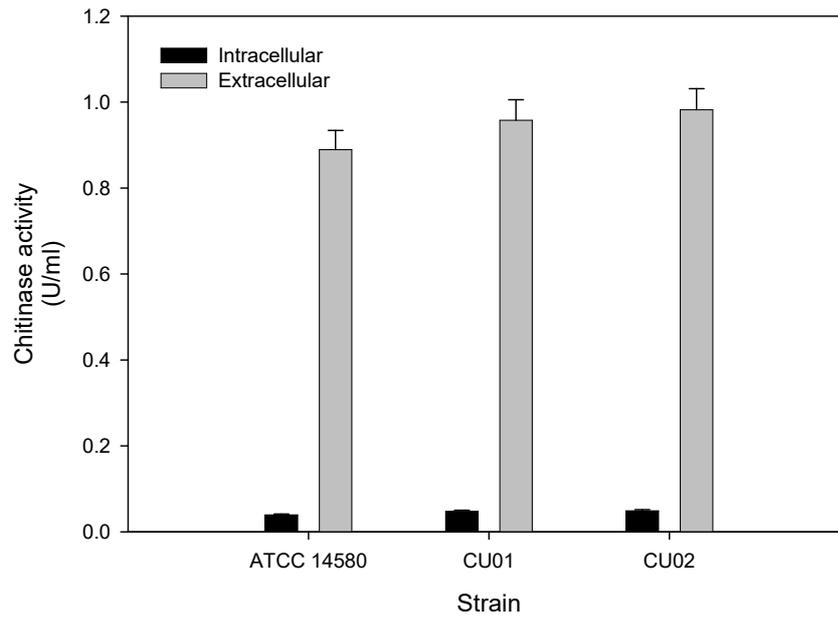
Gas chromatography (HP6890)를 통해 *B. licheniformis* CU01과 *B. licheniformis* CU02의 지방산 조성 분석을 하여 선별된 균주의 지방산 분포를 확인하였다. *B. licheniformis* CU01은 15:0 iso (28.57%), 15:0 anteiso (37.12%), 17:0 anteiso (12.27%), 17:0 iso (13.36%), 16:0 iso (2.86%)와 16:0 (2.49%)로 구성되었으며, *B. licheniformis* CU02는 15:0 iso (27.76%), 15:0 anteiso (31.35%), 17:0 iso (12.98%), 17:0 anteiso (14.07%), 16:0 iso (3.27%)와 16:0 (3.16%)로 구성되어 있었다. 주 지방산은 iso- 및 anteiso-branched 구조가 많이 함유되어 있는 구조로서, MIDI calibration을 이용한 결과를 대조균주인 *B. licheniformis*와 유사한 지방산 조성을 나타내었다 (표 6.8) Roberts, *et al.*, 1994).

표 6.8 Cellular fatty acid composition of *B. licheniformis* strain

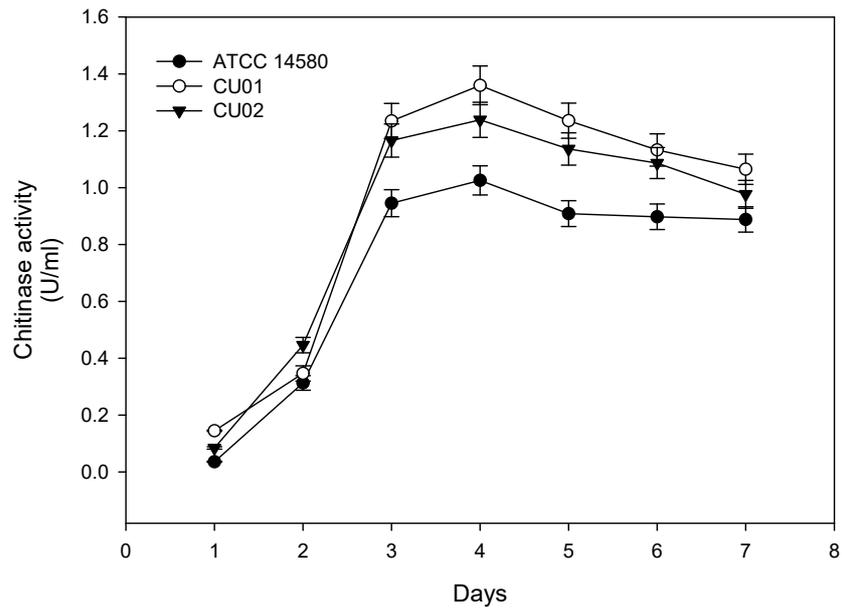
Fatty acid	Cellular fatty acid composition (%)		
	<i>B. licheniformis</i> (n=5)	<i>B. licheniformis</i> CU01	<i>B. licheniformis</i> CU02
14:0 iso	1.31 ± 0.44	0.45	0.55
15:0 iso	28.87 ± 2.69	28.57	27.76
15:0 anteiso	37.75 ± 2.58	37.12	31.35
16:0 iso	4.42 ± 10.72	2.86	3.27
16:0	3.91 ± 0.53	2.49	3.16
17:0 iso	6.99 ± 1.06	13.36	12.98
17:0 anteiso	11.30 ± 0.93	12.27	14.07

n= *B. licheniformis* strains (ATCC 14580, NRRL B-642, NRRL B-960, NRRL B-1001, NRRL B-14224).

Unit은 1분 동안 colloidal chitin에서 1 μ mol의 N-acetyl-D-glucosamine을 생성되는 것을 1 unit으로 하였다.



chitinase를 생산하였고, *Bacillus circulans*의 경우 3일의 최대 chitinase 생산과는 유사한 생산성을 나타내었다 (Roberts, *et al.*, 1994).



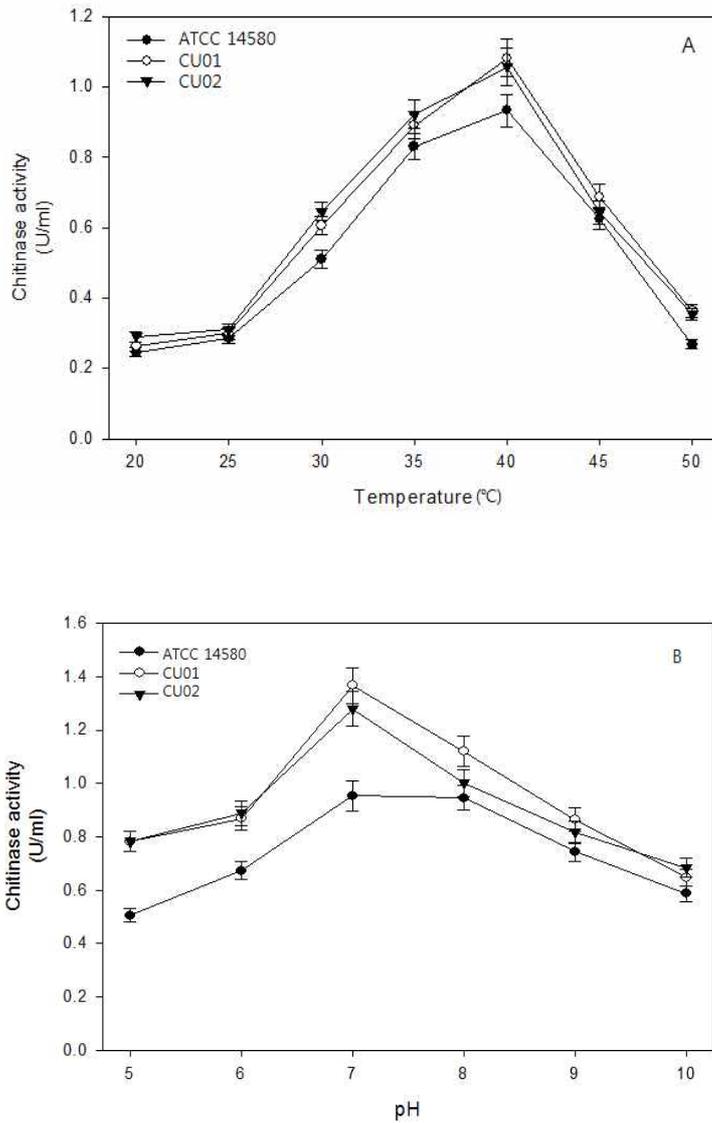


그림 16.9. Effect of temperature (A) and pH (B) on chitinase activity.

(나) 배양 pH에 따른 chitinase 생산량 조사

Chitinase의 생산에 pH가 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 초기 pH를 5.0~10.0까지 조절된 chitin 배지에 선별균주를 접종하고 30°C에서 5일간 진탕배양 후 *B. licheniformis* ATCC14580, *B. licheniformis* CU01 와 *B. licheniformis* CU02의 chitinase activity를 측정된 결과는 다음과 같다. pH 5에서 0.5048, 0.7826 및 0.7826U/ml, pH 6에서 0.6725, 0.8676 및 0.8884U/ml, pH 7에서 0.9536, 1.3667 및 1.2797U/ml, pH 8에서 0.9459, 1.1193 및 1.0029U/ml, pH 9에서 0.7435,

0.8647 및 0.8164U/ml, pH 10에서 0.5865, 0.6474 및 0.6846U/ml으로 나타났다 (그림 6.9). 최대 chitinase 생산량은 pH 7.0에서 나타내었으며, 최소 chitinase 생산량은 pH 5에서 나타났다. 또한 최적 pH에서 선별 균주는 대조군에 비해 각각 14% 및 13%의 높은 chitinase 생산량을 나타내었다.

(다) 반응표면모델을 이용한 최적 chitinase 생산 배지 최적화

Chitin 생산 배지의 조성 중 실제 chitinase 생산에 가장 많은 영향을 미치는 인자를 확인하기 위하여 Plackett-Burman 방법을 이용하여 최적값을 산출하였다 (표 6.9). Quadratic 모델식을 적용하여 ANOVA 분산 분석을 수행한 결과 표 6.10에 나타낸바와 같은 모델식의 분산분석 결과를 도출할 수 있었으며, 모델식의 유효도 (P value)는 0.0067으로 매우 유효한 것을 알 수 있었다. 또한 사용된 8개의 독립변수의 유효값을 분석한 결과 각각 X_1 (colloidal chitin), X_4 (K_2HPO_4) 와 X_6 ($MgSO_4$)는 99.38%, 73.33% 및 99.24%로 분석되었다. 또한 NaCl의 경우 분산분석의 결과에서는 95.41%의 다소 높은 유효도를 나타 내었으나 실제 chitinase activity를 측정 한 결과에서는 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인할수 있었다. 따라서 이후 각 인자의 최적농도를 도출하기 위한 central composite design에는 X_1 (colloidal chitin), X_4 (K_2HPO_4) 와 X_6 ($MgSO_4$)를 독립변수로 사용하였다.

Central composite design은 각 독립변수를 colloidal chitin, K_2HPO_4 와 $MgSO_4$ 로 요인변수들을 -1.41, -1, 0, 1, 1.41 의 5개로 부호화하여 각 레벨에 따른 chitinase activity를 측정하였으며, 반응변수에 미치는 독립변수의 영향은 표 6.11에서 나타낸 바와 같다. 중심합성계획법의 통계학적 결과는 주어진 변수의 유의 확률값에 따라 통계적 유의성이 결정된다. 일반적으로 변수의 유의 확률(Probability value, P value) 값이 0.05보다 작으면 각 변수간의 효과 차이가 유의성을 가진다고 하며, 0.01보다 작으면 매우 유의하다고 한다. 분석된 최적 모델식은 아래 나타낸 바와 같다.

$$\text{Chitinase activity} = 84.08 + 1.22 X_1 - 6.77 X_4 + 19.82 X_6 - 15.49 X_1X_4 + 5.34 X_1X_6 - 3.68 X_4X_6 - 25.23 X_1^2 - 14.87 X_4^2 + 5.84 X_6^2$$

표 6.12의 분산분석 자료에 따르면 모델식의 유의확률이 0.0054로서 매우 유의성을 가진다고 할 수 있다. 이차회귀식에 따른 R^2 값은 0.8401으로 나타났다. 모델식의 R^2 값은 다소 낮게 나타났다. 그 이유는 본 실험의 최적 산출 값인 chitinase activity의 경우 기질로 사용한 독립변수 colloidal chitin에 종속이기 때문이다. 각 실험군에서 나타난 결과를 종합한 결과 모델식이 낮은 R^2 값은 전체 모델식에서 도출된 최적값에 영향이 크지 않을것으로 판단되어 위 모델식을 최적화도출 모델로 결정하였다.

모델식에 따라 colloidal chitin 과 K_2HPO_4 그림 6.10 (A)와 colloidal chitin 과 $MgSO_4$ 그림 6.10 (B) 및 colloidal chitin 과 $MgSO_4$ 그림 6.10 (C)의 독립변수 간의 상호 관계를 분석하여 3D plot 으로 나타내었다.

각 독립변수들의 최적 값을 산출한 결과 colloidal chitin = 0.28 (1.23 g/L), K_2HPO_4 = -0.50 (0.88 g/L)와 $MgSO_4$ = 1.00 (1.00 g/L) 나타났다. 모델식의 결과를 검증하기 위하여 기존의 chitin 배지와 산출된 값에 근거한 최적 chitin 배지에서 무슨무슨 균주를 배양하여 chitinase activity를 측정하였다. 그 결과 기존의 배지에서 비하여 최적화된 배지를 사용하였을 경우 약

1.5배의 활성이 높음을 알 수 있었다.

표 6.9 Plackett-Burman design matrix (trials No. 1 to 12) with corresponding result

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

표 6.10 Analysis of variance of quadratic model

Source	SS	DF	MS	F-Value	Prob > F	CL (%)
Model	12611.04	4	3152.76	9.07	0.0067	
Colloidal chitin	5196.46	1	5196.46	14.95	0.0062	99.38
KH ₂ PO ₄	506.02	1	506.02	1.45	0.2667	73.33
NaCl	2144.68	1	2144.68	6.17	0.0419	95.41
MgSO ₄	4763.86	1	4763.86	13.71	0.0076	99.24
Residual	2432.23	7	347.46			
Cor Total	15043.28	11				

R² = 0.8383; CV = 17.14%, SS, sum of squares; DF, degrees of freedom; MS, mean squares; CL, confidence level; Adj. R² = 0.7459

☒ 6.11 Experiment design used in RSM studies by using three independent variables with six center point

	Trial No.	X ₁	X ₄	X ₆	Chitinase activity (U/100ml)
Fractional 2 ⁴ factorial design	1	-1.00	-1.00	-1.00	31.01
	2	+1.00	-1.00	-1.00	24.25
	3	-1.00	+1.00	-1.00	32.75
	4	+1.00	+1.00	-1.00	26.52
	5	-1.00	-1.00	+1.00	42.41
	6	+1.00	-1.00	+1.00	119.41
	7	-1.00	+1.00	+1.00	91.83
	8	+1.00	+1.00	+1.00	44.54
Star point	9	-1.41	0.00	0.00	30.77
	10	+1.41	0.00	0.00	29.32
	11	0.00	-1.41	0.00	71.93
	12	0.00	+1.41	0.00	29.61
	13	0.00	0.00	-1.41	73.04
	14	0.00	0.00	+1.41	111.35
Central point	15	0.00	0.00	0.00	88.10
	16	0.00	0.00	0.00	93.96
	17	0.00	0.00	0.00	84.68
	18	0.00	0.00	0.00	86.13
	19	0.00	0.00	0.00	86.47
	20	0.00	0.00	0.00	72.22

표 6.12 Analysis of variance of quadratic model

Source	SS	DF	MS	F-Value	Prob > F
Model	15609.03	9	1734.34	5.84	0.0054
Residual (error)	2970.50	10	297.05		
Lack of Fit	2714.16	5	542.83	10.59	0.0108
Pure Error	256.34	5	51.27		
Total	18579.53	19			

$R^2 = 0.8401$; $CV = 27.13$, SS, sum of squares; DF, degrees of freedom; MS, mean squares; Adj. $R^2 = 0.6962$

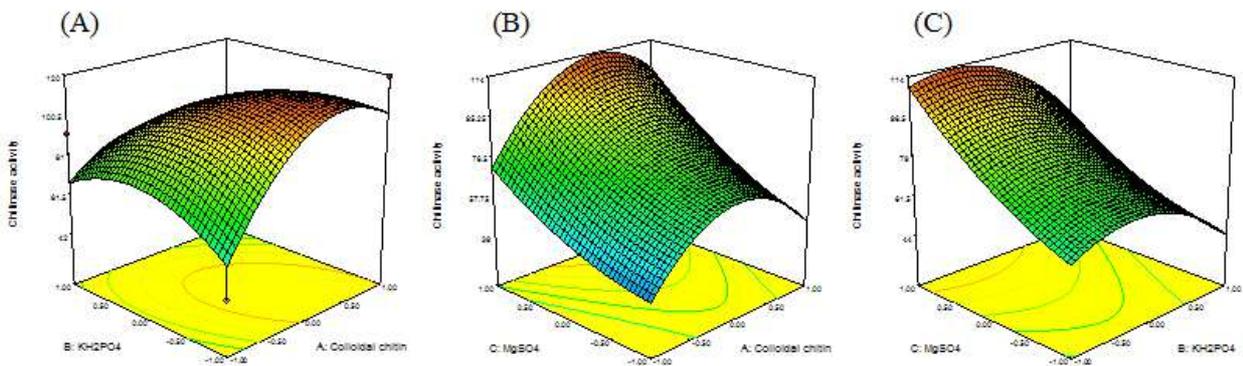


그림 6.10. Response surface plot showing the effect of pH and Temperature and also their mutual effect on the chitinase (U/ml).

바. chitinase 정제 및 특징

(1) chitinase 정제

황산암모늄 농도에 따라 chitinase를 포함하는 단백질이 침전되는 원리를 이용하였다. 황산암모늄의 농도는 30, 50, 70 및 85% (w/v)로 하였으며, 50mM phosphate buffer (pH 7.0)을 이용하여 dialysis한 샘플을 DNS 측정법으로 측정하였다. 그 결과 황산암모늄 농도 70%에서 가장 높은 activity를 나타내었으며, SDS-PAGE를 수행하여 59kDa의 chitinase 분자량을 확인하였다 (그림 6.11). *Bacillus licheniformis* ATCC 14580가 생산하는 chitinase의 종류는 현재까지 chitinase I (89kDa), II (76kDa), III (66kDa)와 IV (59kDa)로 알려져 있으며 (Takayanagi, *et al.*, 1991), 본 연구에서는 chitinase IV (59kDa)를 생산하는 *B. licheniformis*의 chitinase를 분리 및 정제하였다. 황산암모늄 침전법으로 1차 정제된 chitinase를 포함한 단백질을 DEAE-cellulose anion-exchange column으로 ion-exchange chromatography를 수행하였다. 그 결과 총 90 fraction을 얻었으며, 각 fraction을 농축하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 대조군 *B. licheniformis* ATCC 14580는 12~17분, 선별균주 *B. licheniformis* CU01과 *B. licheniformis* CU02는 각각 12~24분과 13~31분 사이의 fraction에서 59kDa의 chitinase가 용출된 것을 확인할 수 있었다 (그림 6.12).

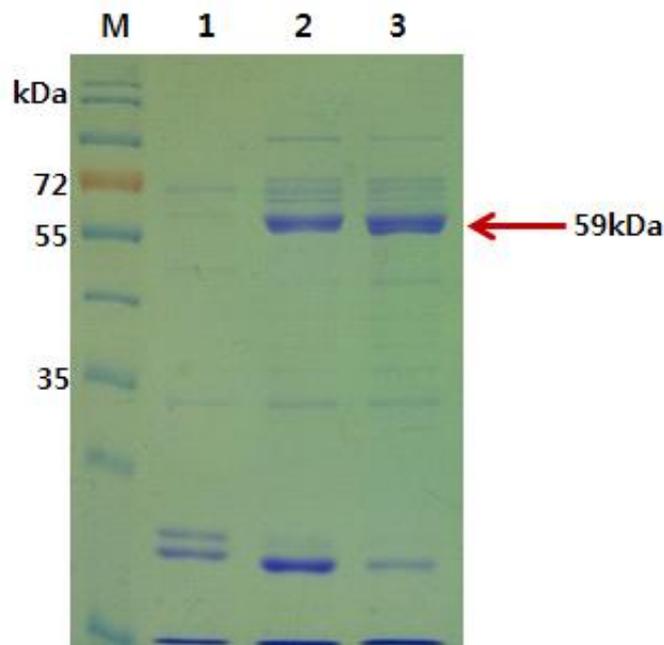


그림 6.11. SDS-PAGE analysis of partially purified chitinase using ammonium sulfate precipitate concentration of 70%. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, *B. licheniformis* ATCC 14580; lane 2, *B. licheniformis* CU01; lane 3, *B. licheniformis* CU02.

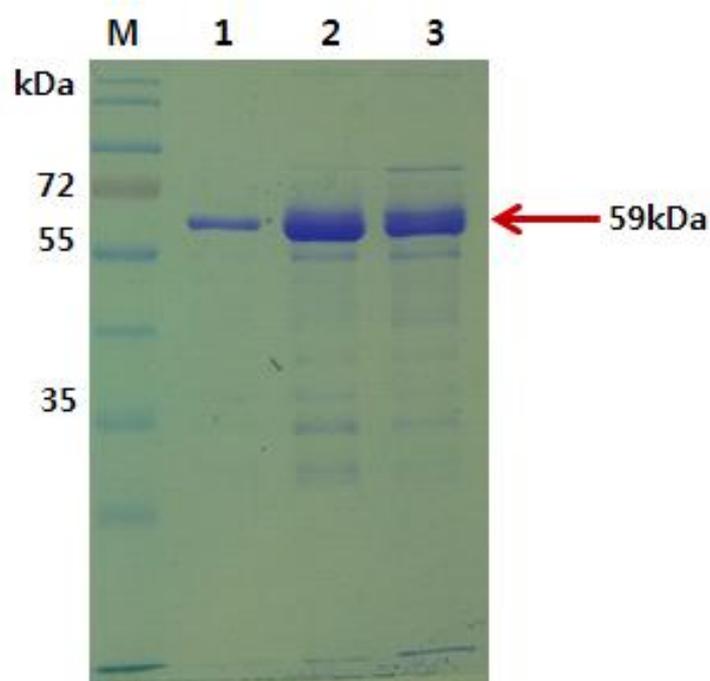


그림 6.12. SDS-PAGE analysis of purified chitinase obtained from anion-exchange DEAE-celulose column. Symbol: M, molecular weight marker; lane 1, *B. licheniformis* ATCC 14580; lane 2, *B. licheniformis* CU01; lane 3, *B. licheniformis* CU02.

(2) chitinase 특성 조사

(가) chitinase 활성에 미치는 온도의 영향

Chitinase 활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 20~60°C까지의 범위에서 조사한 결과 대조군 *B. licheniformis* ATCC 14580 및 각 선별균주 *B. licheniformis* CU01과 *B. licheniformis* CU02는 40°C에서 0.9667, 1.2322 및 1.1693U/ml로 최대 활성을 나타내었다. 선별균주는 대조군에 비해 0.2655 및 0.2026U/ml 높은 생산량을 나타내었으며 (그림 6.13), 20°C에서는 최대 활성의 약 73%를 나타내어, 기온이 높은 봄·여름철 향진균 제재로 응용하는데 어려움이 없을 것으로 예상된다.

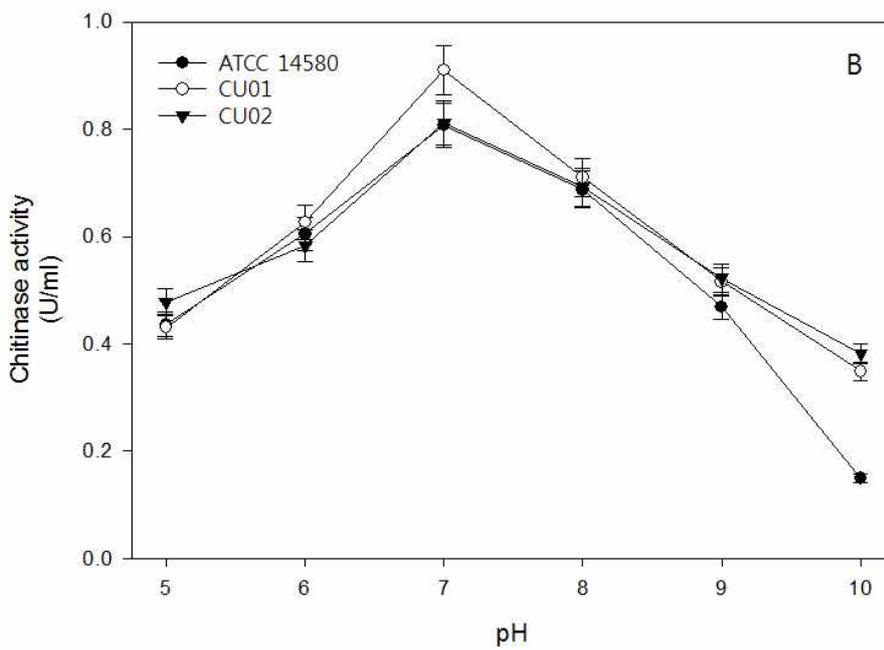
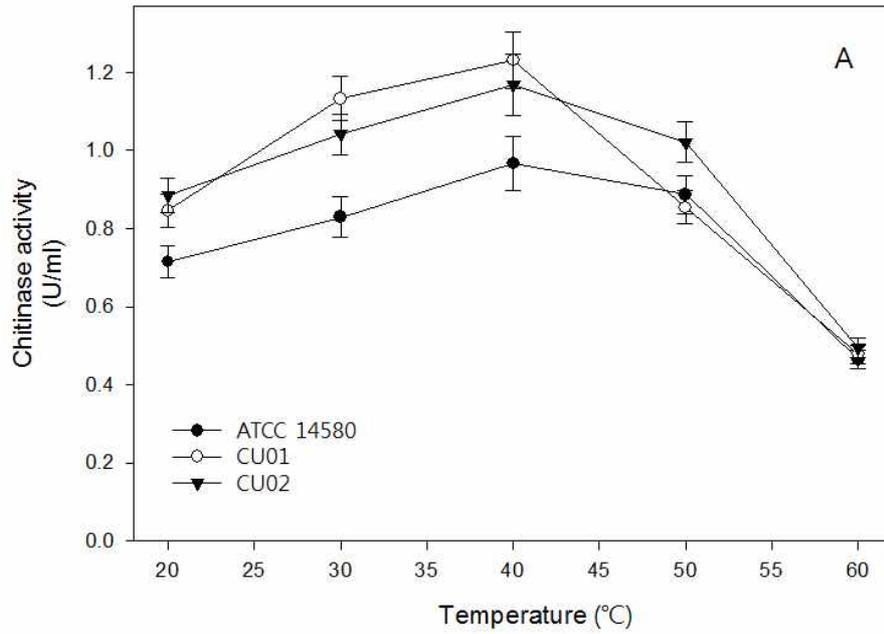


그림 6.13. Effect of temperature (A) and pH (B) on purified enzyme chitinase stability.

(나) chitinase 활성에 미치는 pH의 영향

Chitinase 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 pH 5.0~10.0까지의 범위에서 활성을 측정하였다. 조사결과 대조군 *B. licheniformis* ATCC 14580 및 각 선별균주 *B. licheniformis* CU01과 *B. licheniformis* CU02는 pH 7에서 0.9536, 1.3667과 1.2797U/ml로 최대활성을 나타내었으며, 균주가 최적성장하는 pH와 유사한 것으로 나타났다 (그림 6.13). 또한 pH 6에서 최대 활성의 약 61%를 나타내었으며, 약 산성인 경작지에 항진균 제재로 응용 가능할 것으로 예상된다.

(다) chitinase 안정성 조사

Chitinase를 실제 생물농약으로 이용하고자 하였을 때 토양의 안정성 및 효율 비교를 위하여 금속이온 및 화학저해제의 영향에 대하여 조사한 결과, CuCl_2 에 대해서는 비교적 낮은 안정도를 나타내었으며, FeSO_4 에 대해서는 안정성이 높게 조사되었다. 본 연구에 사용되었던 황토 시료는 Fe의 함량이 일반토양에 비해 100배 높게 함유되어 있으므로 FeSO_4 에 대한 안정성이 높은 것으로 예상된다 (그림 6.14).

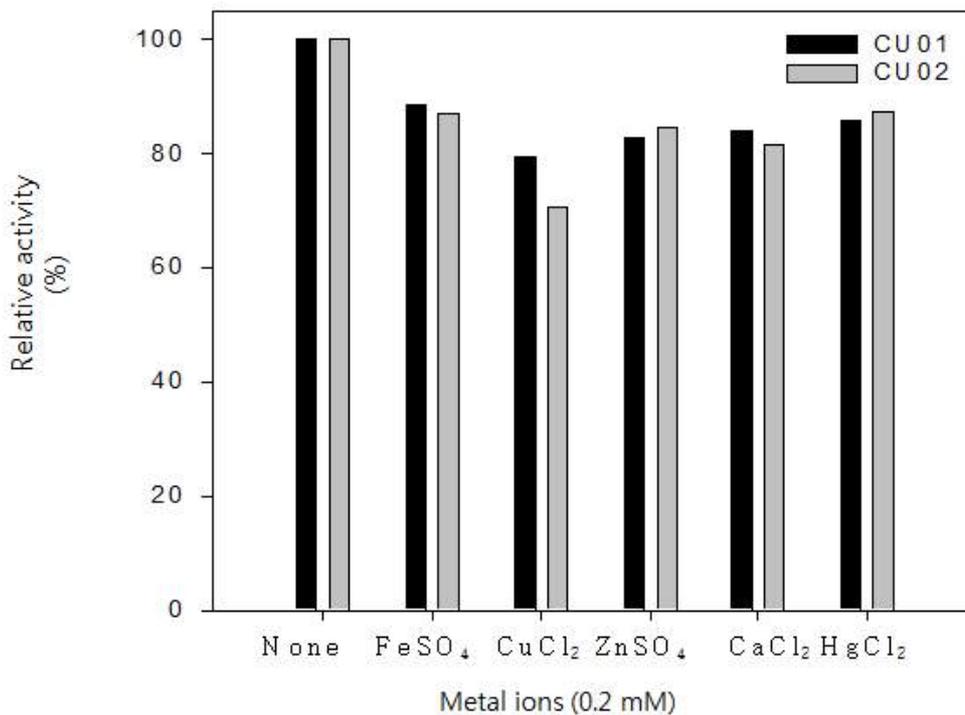


그림 6.14. Effect of metal ion on chitinase activity.

(라) Specific activity

Chitinase 활성을 단백질의 단위중량당으로 나타내기 위해 chitinase의 비활성 정도를 조사하여 나타내었다. 최적조건을 선정된 chitin 배지 100ml에 대조균 *B. licheniformis* ATCC 14580와 선별균주 *B. licheniformis* CU01, *B. licheniformis* CU02을 37°C, pH 7에서 배양하였다. 상등액의 chitinase 비활성 정도를 측정된 결과 *B. licheniformis* ATCC 14580와 선별균주 *B. licheniformis* CU01, *B. licheniformis* CU02는 각각 정제하지 않은 crude enzyme에서 4.23, 2.78 및 2.73U/mg의 높은 비활성도를 나타내었다. 황산암모늄 침전을 이용한 1차 정제에서는 6.21, 4.45 및 4.27U/mg으로 조사되었으며, anion-exchange를 이용한 정제에서는 6.34, 7.65 및 5.21 U/mg로 *B. licheniformis* CU01은 *B. licheniformis* ATCC 14580 보다 높은 specific activity를 나타내는 것으로 조사되었다. 최종적으로 crude enzyme에서 정제한 chitinase를 yield는 11, 17 및 14%로 나타냈다 (표 6.13-15).

표 6.13 Summary of the purification process of chitinase from *B. licheniformis* ATCC 14580

Purification step	Total Protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	21.50	91.02	4.23	1	100
Ammonium sulfate precipitate (70%)	6.82	42.32	6.21	1.47	46
DEAE-cellulose chromatography	1.66	10.51	6.34	1.50	11

☒ 6.14 Summary of the purification process of chitinase from *B. licheniformis* CU01

Purification step	Total Protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield
Crude enzyme	44.97	125.3	2.78	1	100
Ammonium sulfate precipitate (70%)	13.75	61.25	4.45	1.60	49
DEAE-cellulose chromatography	2.86	21.85	7.65	2.75	17

☒ 6.15 Summary of the purification process of chitinase from *B. licheniformis* CU02

Purification step	Total Protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield
Crude enzyme	41.27	115.21	2.73	1	100
Ammonium sulfate precipitate (70%)	10.89	46.48	4.27	1.56	40
DEAE-cellulose chromatography	3.01	15.68	5.21	1.90	14

사. chitinase를 이용한 항진균활성

(1) 대치배양을 통한 항진균 활성 조사

정제한 chitinase를 이용하여 식물병원성 곰팡이 7종을 대상으로 고체배지에서 성장한 식물 병원성 곰팡이의 항진균 활성을 수행한 결과 4종의 식물병원성 곰팡이 *A. alternata* (A), *F. oxysporum* (B), *F. culmorum* (C) 및 *C. gloeosporioides* (D) 에서 식물병원성 곰팡이에 대해 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다. 식물병원성 곰팡이의 성장을 억제하는 lipopeptide의 iturin 및 fengycin과 같은 물질과는 달리 chitinase는 진균 외막 가수분해 효소로서, 곰팡이 외벽에 용균작용을 한다. 따라서 항진균 활성은 그림 6.15와 같이 식물병원성 곰팡이 세포벽이 chitinase에 의해 용균되어 식물병원성 곰팡이에 대해 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다 (표 6.16).

(2) 식물병원성 곰팡이 저해율 조사

Chitinase를 혼합한 PD 고체배지에서 배양한 식물병원성 곰팡이 균사체의 성장률과 대조군으로 사용한 식물병원성 곰팡이 균사체 성장률을 비교하여 조사하였다. 그 결과 chitinase를 혼합한 PD 고체배지에서 식물병원성 곰팡이의 성장률이 저해되는 것을 확인 할 수 있었다. Chitinase에 의한 각 식물병원성 곰팡이의 저해율은 *Fusarium* sp.가 73.5%로 가장 활성 저해가 잘되는 것으로 조사되었으며, *A. alternata*, *C. gloeosporioides* 및 *F. culmorum*은 각각 24.8%, 24.4% 및 13.6%의 저해율을 나타내었다.

표 6.16 Inhibition of fungal strains by purified chitinase

No	Strains	Pathogenic	Inhibition
1	<i>C. gloeosporioides</i>	Anthraxnose (탄저병)	+
2	<i>A. alternata</i>	Leaf spots (잎마름병)	+
3	<i>F. culmorum</i>	Root rot (뿌리썩음병)	+
4	<i>F. oxysporum</i>	Fusarium wilt (덩굴썩음병)	+
5	<i>F. sp.</i>	Wilt disease (시들음병)	+
6	<i>S. sclerotiorum</i>	Blight (마름병)	-
7	<i>S. cepivorum</i>	Root rot (뿌리썩음병)	-

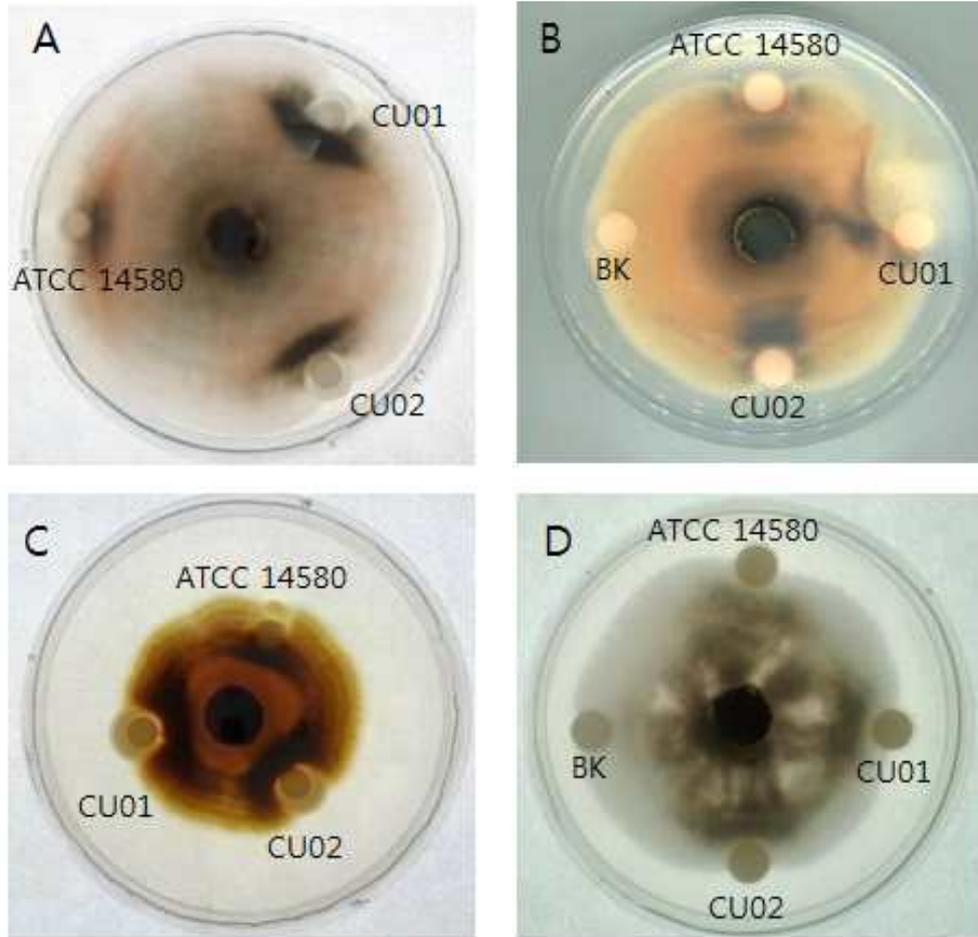


그림 6.15. Inhibition of fungal strains by purified chitinase. Symbol: BK; blank, 50mM phosphate buffer, CU01; *B. licheniformis* ATCC 14580, CU02; *B. licheniformis* CU01, D; *B. licheniformis* CU02.

제 7 절. 항균활성 미생물 (*B. amyloliquefaciens* BC32-1 *P. elgii* BC34-6)의 cyclic lipopeptide의 활성기작 연구

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

가. Fengycin의 식물 병원성 곰팡이에 대한 항균효과

미생물의 배양액으로부터 분리 정제된 cyclic lipopeptide인 fengycin과 pelgipeptin 펩타이드에 대한 다양한 항균활성 연구를 진행하였다. 세균을 대상으로 한 항균활성, 식물 병원성 곰팡이를 대상으로 한 항곰팡이 활성, 세포 독성 실험 및 항균활성 기작 연구 등을 테마로 연구를 진행하였다. Fengycin 펩타이드는 곰팡이에 대한 강한 활성을 보여 차후 식물 병원성 곰팡이에 대한 친환경 제제로써 매우 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 사료된다.

이에 반해 pelgipeptin 펩타이드는 곰팡이뿐만 아니라 세균에 대해서도 broad한 활성을 나타내어 (Muto *et al.*, 2003; Klevens *et al.*, 2007), 그람 음성과 양성 균 및 다재내성균인 MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)에 대하여 성장저해 최소농도를 조사하였다. 더 나아가 항균 활성기작에 대한 연구를 하기위해 형광 dye를 넣은 인공 막 liposome을 제작하여 dye leakage 실험을 진행하였으며 (Areum *et al.*, 2015), *staphylococcus aureus*균을 이용한 membrane depolarization 실험 또한 진행되었다 (Mija Ahn *et al.*, 2014). 이와 더불어 pelgipeptin 유도체들의 잠재적인 위험성과 안전성 문제를 시험하기 위하여 세포독성에 대한 연구도 진행하였다 (Jacob *et al.*, 2014; Ganesan Rajasekaran *et al.*, 2015).

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주의 배양액 추출물을 최종적으로 RP-HPLC를 이용하여 정제하였다. 즉, ethyle acetate로 추출된 샘플을 최소량의 methanol에 녹여 시료로 사용하였으며, 이때 50% ACN에 0.5% TFA가 함유된 buffer를 첨가해 pH가 약 2.0되는 것을 확인 한 후 15,000rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 샘플의 상등액 만을 0.2 μ m syringe filtration하여 5ml의 시료를 loading하여 HPLC에 inject한 후 230nm에서 흡광도의 변화로 시료의 용출을 확인하였다. 기기는 역상 (reversed-phase) HPLC (Waters)를 사용하였고 waters C₁₈ prep column을 사용하여 peak retention time (피크 머무름 시간)을 관측하며 분석하였다. 이때, 0.1% TFA를 함유한 95% 물에 5% ACN을 buffer A로, 0.1% TFA를 함유한 95% ACN에 5% 물을 buffer B로 사용하면서, 5% ACN에 65% ACN의 농도로 1분당 1ml씩 30분간 농도 구배를 주며 항균물질을 분리정제 하였다. 그 결과, 최종적으로 정제된 물질은 고리형 지질펩타이드인 iturin, fengycin, surfactin의 3가지로 확인되었으며 이들의 고유한 피크 머무름 시간을 이용하여 peak를 prep하였다. 분리 정제하여 얻어진 crude 고리형 지질펩타이드 샘플은 회전 증발시켜 최종 용매로 methanol로 재용해시켜 사용하면서 마찬가지로 대조군으로도 methanol을 사용하였다. 이러한 고리형 지질펩타이드의 식물병원성 곰팡이에 대한 항곰팡이 활성을 측정하기 위해 식물 병원성 곰팡이인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031는 Korea Agriculture Type Culture Collection Center (수원)에서 분양받아 이용하였다. 식물 병원성 곰팡이는 25 \pm 3 $^{\circ}$ C에서 3 \pm 2일 동안 PDA (Potato Dextrose Agar, BD) 배지에서 성장시켜 사용하였고, PDA의 정중앙에 후사톱을 약 5mm의 크기로 접종하여 각 샘플들을 대조군 포함 동량의 100 μ l씩 loading하여 평판대치 배양하였다. 펩타이드의 항진균 효과는 포자가 펩타이드에 의해 자라지 않는 clear zone을 육안으로 관측하였다.

나. Fengycin A, Fengycin B의 최저저해농도 (MIC)

Fusarium oxysporum f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 강력한 활성을 보이는 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주로부터 분리된 fengycin은 두 종류의 A와 B로 밝혀졌다. Fengycin A와 fengycin B의 항진균활성을 가늠하기 위한 방편으로 시들음병인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031으로부터 분리한 포자를 현탁액으로 만들어 각 fengycin의 최저저해농도를 시험하였다. 즉, Haemocytometer를 사용하여 10^4 cell/ml 단위로 포자현탁액을 제조하여 사용하는 한편 96 well plate에 동량의 PDB 배지에 접종하였다. fengycin A와 fengycin B는 같은 농도로 각 $400\mu\text{g/ml}$ 의 초기농도로 제조하여 serial dilution하였다.

다. Fengycin B의 시들음병에 대한 농도별 활성 실험

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주로부터 강한 항진균 활성을 가지는 fengycin B만을 추출하여 시들음병에 농도별 활성을 확인하였다. 즉, Fengycin B를 methanol에 녹여 $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 설정하고 각 농도별로 시들음병 곰팡이에 대치 접종 후 배양시켜 육안으로 활성을 확인하였다.

라. Fengycin B의 시들음병 이외의 식물 병원성 곰팡이에 대한 활성 실험

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주로부터 강한 항진균활성을 가지는 fengycin B만을 추출하여 시들음병 뿐 아니라 *Botrytis cinera* (젓빛곰팡이병), *Phytophthora capsici* (역병), *Sclerotinia sclerotiorum* (균핵병), *Alternaria porri*, *Embellisia allii* 등 다양한 식물 병원성 곰팡이에 대해 활성을 시험하였다. 즉, Fengycin B를 methanol에 녹여 $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 설정하고 각 $200\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 각 곰팡이에 대치 접종 후 배양시켜 육안으로 활성을 확인하였다.

마. Pelgipeptin A의 항균효과

순수하게 분리된 pelgipeptin 펩타이드 중 pelgipeptin A의 항균활성을 시험하기 위해 micro-broth method를 이용하여 96 multi-well microtiter plate에 minimum inhibitory concentration (MIC) 시험을 시행하였다.

먼저 LB broth 배지 5ml에 시험균주를 37°C 에서 180rpm으로 18시간동안 배양하였다. 이 배양액을 접종원으로 LB배지 5ml에 1%되게 접종하여 600nm에서 흡광도가 0.5가 될 때까지 37°C 에서 180rpm으로 약 3시간동안 배양하였다. 흡광이 0.5가 되었을 때 1% peptone으로 희석하여 2×10^6 CFU/ml이 되도록 하였다.

Pelgipeptin A의 처리농도는 초기농도 $128\mu\text{g/ml}$ 부터 serial dilution하여 사용하였으며, 37°C 에서 18시간동안 배양한 후 성장을 저해시키는 최소농도를 조사하였다.

바. Pelgipeptin A의 항균 작용 기작 및 독성 연구

Pelgipeptin A가 membrane target 펩타이드 인지의 여부를 확인하기 위하여 형광 dye가 들어있는 인공 막인 liposome을 제작하여 인공 막이 파괴될 때의 형광을 측정하는 dye leakage 실험과 *staphylococcus aureus*균을 이용하여 세포막의 탈분극이 일어날 때의 형광을 측정하는 membrane depolarization 실험을 시행하였다.

(1) Dye leakage assay

실험에 사용된 liposome의 제작은 다음과 같다. PE/PG 7:3에 Chloroform 1-2ml을 넣어 농축시킨 후 다시 질소 건고하여 하루 동안 동결 건조시켰다. 그 후 Buffer (10mM Tris + 0.1% EDTA + 150mM NaCl, pH 7.4) 1ml에 용해시켜 vortex-shaking 시켜주고, membrane-bound kit를 이용하여 liposome의 크기를 같게 만들어 준 후 gel filtration하여 사용하였다.

먼저 큐벳에 Buffer (10mM Tris + 0.1% EDTA + 150mM NaCl, pH 7.4)를 채우고, 제작한 liposome을 넣어주었다. Baseline이 안정화되면, 60초 후에 peptide를 처리하고 1000초가 될 때 detergent를 처리하였다. 지표물질로는 membrane target peptide인 Melittin과 LL37을, membrane non-target peptide로는 bufforin 2를 사용하였다. Excited 파장은 490nm, Emission 파장은 520nm로 측정하였고, 동일한 방법으로 2반복을 하여 평균값을 구하였다.

(2) Membrane depolarization assay

*Staphylococcus aureus*균을 LB배지 100ml에 배양하여 600nm에서 흡광이 0.5일 때 Buffer (20mM Glucose + 5mM HEPES, pH 7.4)로 세척하였다. 세척한 후 842 x g에서 10분간 원심분리하고, 위 과정을 한 번 더 반복하였다. 그 후 Buffer (20mM Glucose + 5mM HEPES + 10mM KCl, pH 7.4)에 완전히 용해시켜 희석하였다. 큐벳에 준비된 균주를 넣고 60초 후에 dye를 넣어주었다. 400초가 될 때 peptide를 처리하고, 1000초가 될 때 detergent를 처리하였다. 지표물질로는 membrane target peptide인 Melittin과 LL37을, membrane non-target peptide로는 bufforin 2를 사용하였다. Excited 파장은 620nm, Emission 파장은 670nm로 측정하였고, 동일한 방법으로 2반복을 하여 평균값을 구하였다.

Pelgipeptin 유도체들의 잠재적인 위험성과 안정성 문제를 시험하기 위하여 세포독성에 대한 실험을 추가적으로 진행하였다.

(3) Hemolysis assay

용혈현상을 측정하기 위하여 갓 채취한 혈액을 PBS buffer로 세척하고 374 x g에서 5분간 원심분리하여 혈장을 제거하였다. 채취된 적혈구는 micro-broth method를 이용하여 96 multi-well microtiter plate에 시행하였다. 처리된 샘플은 37°C에서 60rpm으로 1시간동안 충분히 현탁시켰다. peptide는 초기농도 200µM부터 serial dilution하였고, 양성지표물질로는 Triton과 Melittin이 음성지표물질로는 PBS를 사용하였다. 405nm에서 흡광을 측정하였으며, 동일한 방법으로 2반복을 하여 평균값을 구하였다.

$$\% \text{ Hemolysis} = [A_{\text{peptide}} - A_{\text{PBS}}] / [A_{\text{Triton}} - A_{\text{PBS}}] * 100$$

2. 연구개발 결과

가. Fengycin의 식물 병원성 곰팡이에 대한 항균효과

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1이 생산하는 iturin, fengycin, surfactin 등의 다양한 고리형 지질펩타이드 중, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 대해서는 오로지 fengycin만이 강한 항곰팡이 활성을 보였다. 따라서 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1로부터 정제된 고리형 지질펩타이드의 식물병원성 곰팡이에 대한 항곰팡이 활성은 그림 7.1과 같다.

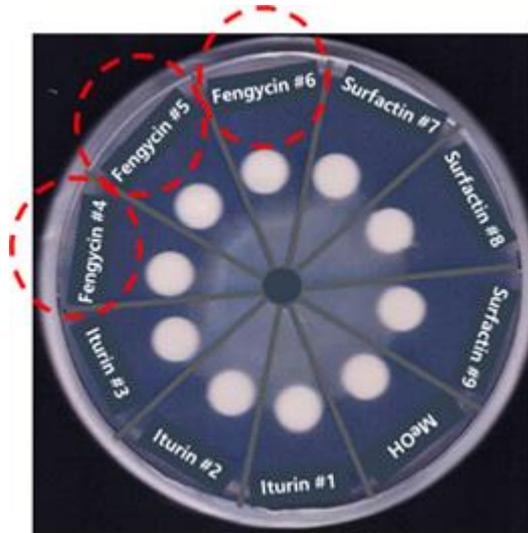


그림 7.1. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1이 생산하는 fengycin의 *F. oxysporum*에 대한 강한 항진균 효과.

나. Fengycin A, Fengycin B의 최저저해농도 (MIC)

Fusarium oxysporum f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 강력한 활성을 보이는 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주로부터 분리된 fengycin은 두 종류의 A와 B로 밝혀졌다. Fengycin A와 fengycin B의 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 대한 항균 활성을 통해 특히 fengycin B (50 μ g/ml)가 fengycin A (450 μ g/ml)보다 약 9배 정도의 활성이 뛰어남을 알 수 있었다.

다. Fengycin B의 시들음병에 대한 농도별 활성 실험

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주로부터 강한 항진균 활성을 가지는 fengycin B만을 추출하여 methanol에 dissolve하여 각 농도별로 시들음병 곰팡이에 대치 접종 후 배양시켜 육안으로 활성을 확인한 결과 1.0 μ g/ μ l부터 시들음병 곰팡이인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 활성을 나타냄을 알 수 있었다 (표 7.1, 그림 7.2).

표 7.1 Fengycin B의 시들음병인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 대한 농도별 활성

Concentration (μg)	Activity
BK (control)	-
0.1	-
0.5	-
1.0	+
5.0	+
10	+
50	+
100	+

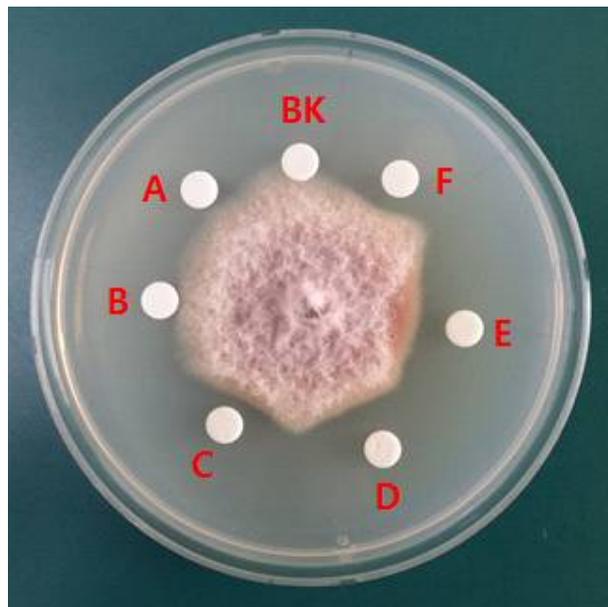


그림 7.2. Fengycin B의 시들음병인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 대한 농도별 활성.

라. Fengycin B의 시들음병 이외의 식물 병원성 곰팡이에 대한 활성 실험

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주로부터 강력한 항진균활성을 가지는 fengycin B만을 추출하여 시들음병 뿐 아니라 *Botrytis cinera* (잿빛곰팡이병), *Phytophthora capsici* (역병), *Sclerotinia sclerotiorum* (균핵병), *Alternaria porri*, *Embellisia allii* 등 다양한 식물 병원성 곰팡이에 대해 활성을 시험하였다. 즉, Fengycin B를 methanol에 녹여 10 μ g/ μ l로 설정하고 각 200 μ g/ μ l의 농도로 각 곰팡이에 대치 접종 후 배양시켜 육안으로 활성을 확인한 결과 *Botrytis cinera* (잿빛곰팡이병), *Alternaria porri*, *Embellisia allii*에 활성이 있음을 확인하였다 (표 7.2, 그림 7.3).

표 7.2 Fengycin B의 *Phytophthora capsici* (역병), *Botrytis cinera* (잿빛곰팡이병), *Alternaria porri*, *Embellisia allii*, *Sclerotinia sclerotiorum* (균핵병)에 대한 농도별 활성 (2)

KACC no.	Strain	Activity
40157	<i>Phytophthora capsici</i>	-
40574	<i>Botrytis cinera</i>	+
42999	<i>Alternaria porri</i>	+
44708	<i>Embellisia allii</i>	+
40457	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-

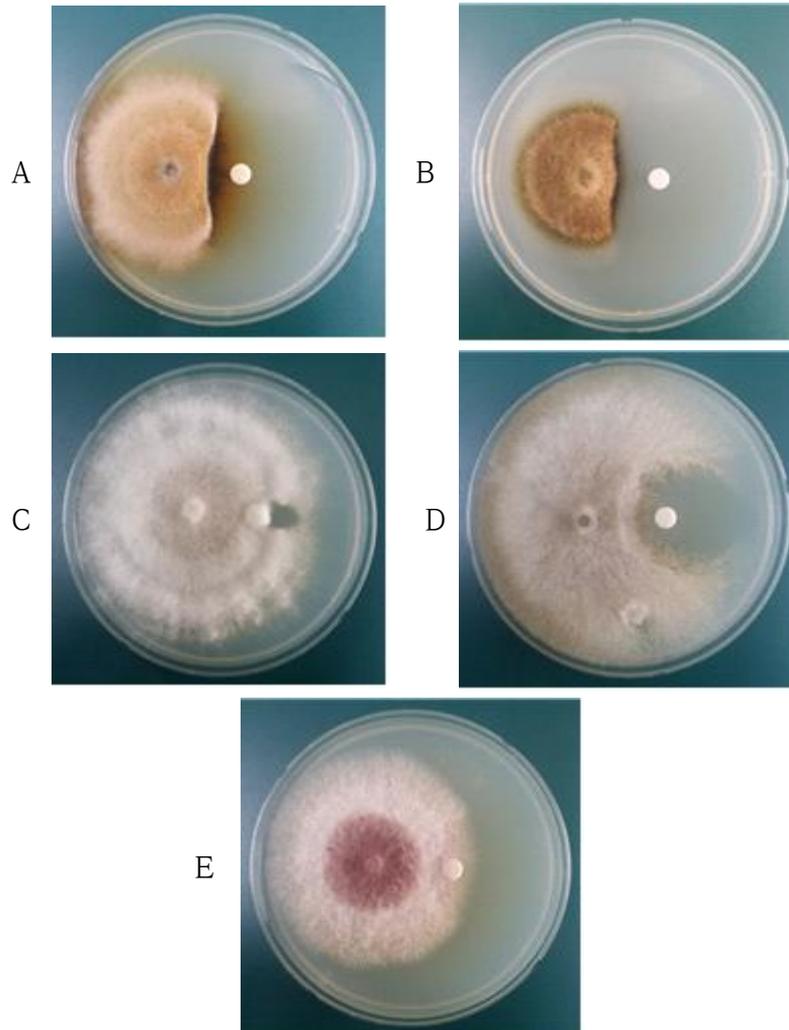


그림 7.3. Fengycin B의 *Botrytis cinera* (젓빛곰팡이병), *Alternaria porri*, *Embellisia allii*, *Sclerotinia sclerotiorum* (균핵병)에 대한 활성. A: *Alternaria porri*, B: *Embellisia allii*, C: *Phytophthora capsici* (역병), D: *Botrytis cinera* (젓빛곰팡이병) E: *Sclerotinia sclerotiorum* (균핵병).

마. Pelgipeptin 의 식물 병원성 곰팡이에 대한 길항효과 (그림 7.4~5)

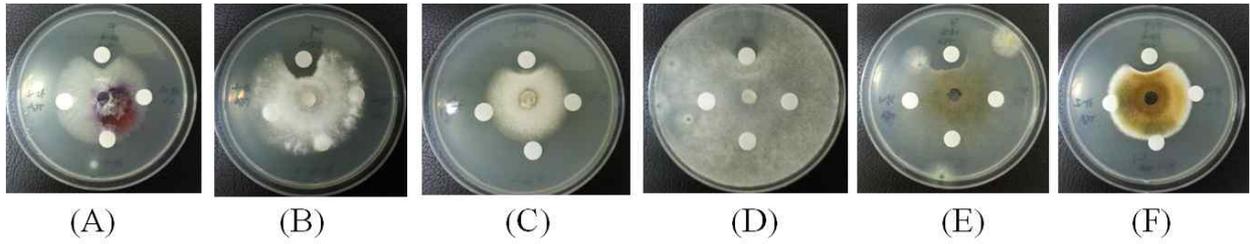


그림 7.4. *P. elgii* BC34-6 배양 상등액의 식물병원성균에 대한 항균활성, 위쪽 상단이 *P. elgii* BC34-6 배양상등액.

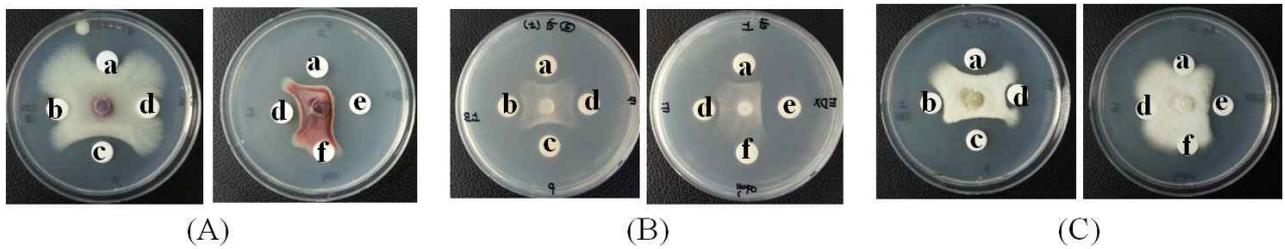


그림 7.5. *P. elgii* BC34-6 배양상등액의 각 분획별 항진균활성 결과.

바. Pelgipeptin A의 항균효과

순수하게 분리된 pelgipeptin A의 항균활성을 시험하기 위하여 micro-broth method를 이용하여 96 multi-well microtiter plate에 MIC 실험을 시행하였다. Pelgipeptin A의 농도는 초기농도 128 μ g/ml부터 serial dilution하여 사용하였으며, 37 $^{\circ}$ C에서 18시간동안 배양한 후 성장을 저해시키는 최소농도를 조사하였다. MIC 측정을 통해 최종 분리정제된 pelgipeptin A가 항생제 내성균주를 포함한 모든 시험균주에 대해 강한 항균 활성이 있는 것으로 확인되었다 (표 7.3).

표 7.3 Pelgipeptin A의 MIC 결과

Bacteria strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$) Pelgipeptin A
Gram-negative	
<i>E.coli</i>	2
<i>P. aeruginosa</i>	4
<i>Salmonella typhimurium</i>	4
Gram-positive	
<i>Bacillus subtilis</i>	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	4
MRSA	
CCARM 3089	8
CCARM 3090	8
CCARM 3095	8

사. Pelgipeptin 유도체들의 항균 작용 기작 및 독성 연구

Pelgipeptin A가 membrane target 펩타이드 인지 여부를 확인하기 위하여 형광 dye가 들어있는 인공 막인 liposome을 제작하여 인공 막이 파괴될 때의 형광을 측정하는 dye leakage 실험과 *staphylococcus aureus*균을 이용하여 세포막의 탈분극이 일어날 때의 형광을 측정하는 membrane depolarization 실험을 시행하였다.

Dye leakage 실험 결과 membrane target 펩타이드인 Melittin의 경우, 펩타이드를 처리하자마자 세포막이 파괴되면서 급격한 수직 곡선을 그리며 형광을 띄는 것으로 관찰되었으며, 세포막을 target으로 하지 않는 buforin 2의 경우 펩타이드를 처리하여도 형광을 띄지 않다가 detergent인 triton을 처리하자 형광을 띄는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 LL37의 경우 Melittin에 비하여 완만한 곡선을 그리며 세포막을 파괴시키는 것으로 확인되었고, pelgipeptin A는 LL37보다 조금 더 느린 세포막 파괴를 보였다. 그러나 펩타이드 처리에 의해 인공 세포막이 파괴되는 것을 관찰 할 수 있었고, 이러한 결과는 pelgipeptin A가 세포막을 target으로 하여 항균활성을 나타낸다고 알 수 있다 (그림 7.6).

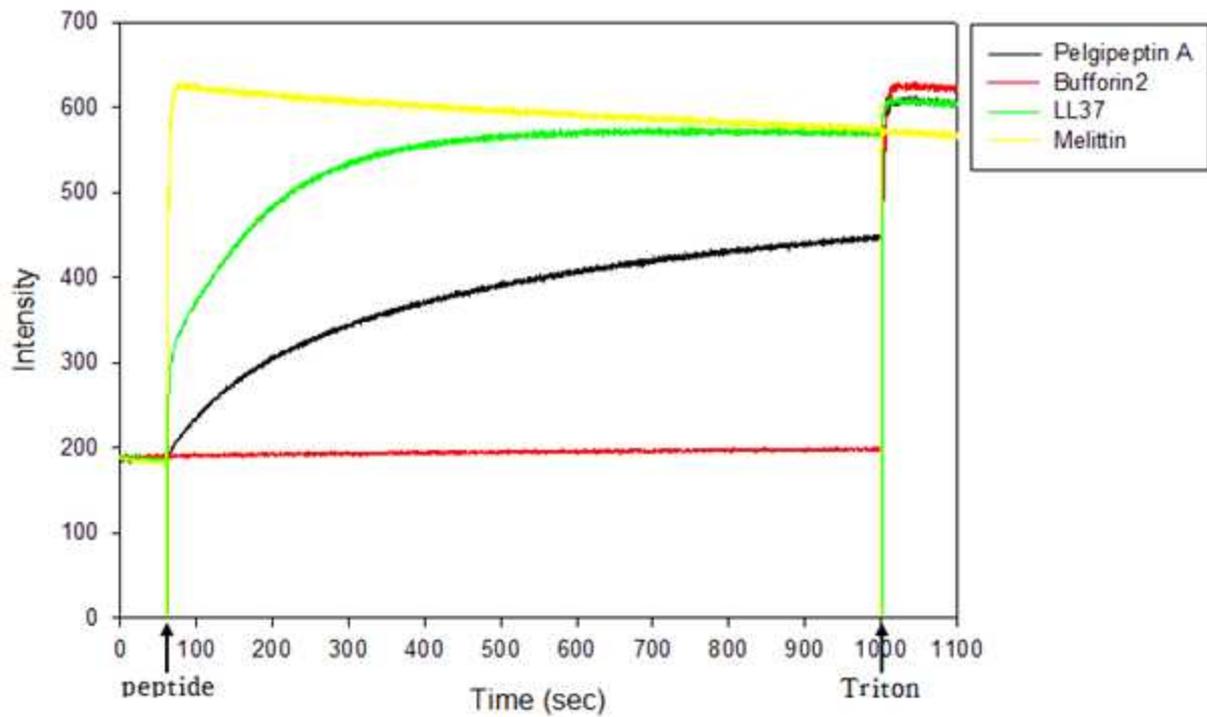


그림 7.6. Pelgipeptin A의 dye leakage assay 결과.

Membrane depolarization 실험 결과 *staphylococcus aureus*균에 대하여 membrane target 펩타이드인 Melittin의 경우, 펩타이드를 처리하자마자 세포막이 파괴되면서 탈분극이 일어나 급격한 수직 곡선을 그리며 형광을 띄는 것으로 관찰되었으며, 세포막을 target으로 하지 않는 buffonin2의 경우 펩타이드를 처리하여도 형광을 띄지 않다가 membrane target 항생제인 Gramicidin을 처리하자 탈분극이 일어나 형광을 띄는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 LL37의 경우 Melittin에 비하여 완만한 곡선을 그리며 세포막을 파괴시키는 것으로 확인되었고, pelgipeptin A는 LL37보다 조금 더 느린 세포막 파괴를 보였다 (그림 7.7).

이러한 결과는 dye leakage 실험과 더불어 pelgipeptin A가 membrane을 target으로 하여 항균활성을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

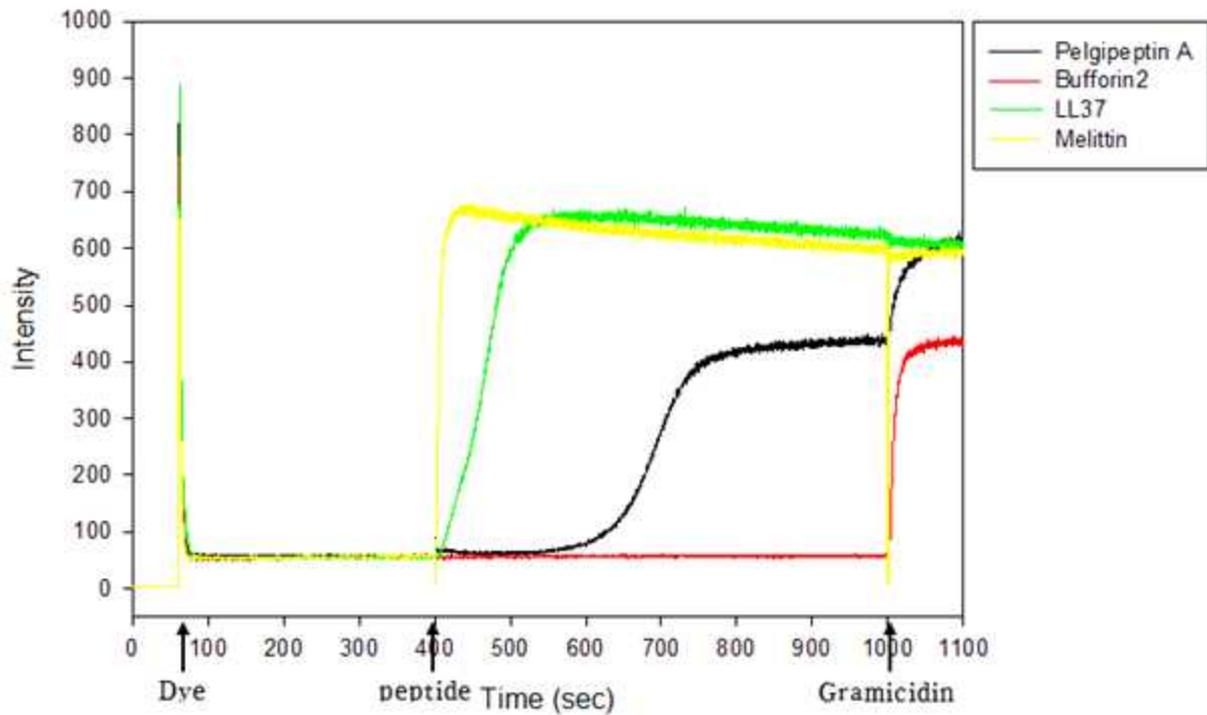


그림 7.7. Pelgipeptin A의 membrane depolarization assay 결과.

Pelgipeptin family의 잠재적인 위험성과 안정성 문제를 시험하기 위하여 세포독성에 대한 실험을 진행하였다. 용혈현상을 측정하기 위해 갖 채취한 혈액에서 혈장을 제거하여 적혈구만을 사용하였고, 펩타이드를 처리하여 37°C에서 60rpm으로 1시간동안 충분히 현탁 시켰다. Membrane을 target으로 하는 Melittin의 경우, 25 μ M을 처리하였을 때 거의 90%에 가까운 용혈현상을 보였으며, 이는 Melittin이 세포막을 파괴하는 강력한 활성을 지녔지만 세포에 대한 독성 또한 강하다는 것을 의미하고 있다.

이에 반해 pelgipeptin A의 경우는 200 μ M을 처리하여도 50% 이하의 비교적 약한 용혈활성 즉 약한 독성을 보였으며, 이는 차후에 pelgipeptin A가 보다 안정한 항균활성 물질로써 사용될 수 있다는 것을 시사하고 있다. Pelgipeptin B의 경우는 50 μ M까지 급격한 용혈현상을 보이나, 그 후 200 μ M까지는 용혈현상이 거의 증가하지 않는 것으로 관찰되었다. Pelgipeptin D의 경우는 펩타이드 농도가 증가함에 따라 꾸준히 용혈현상이 증가하여 200 μ M을 처리하였을 때 거의 100%에 가까운 용혈현상이 나타남을 확인할 수 있었다 (그림 7.8).

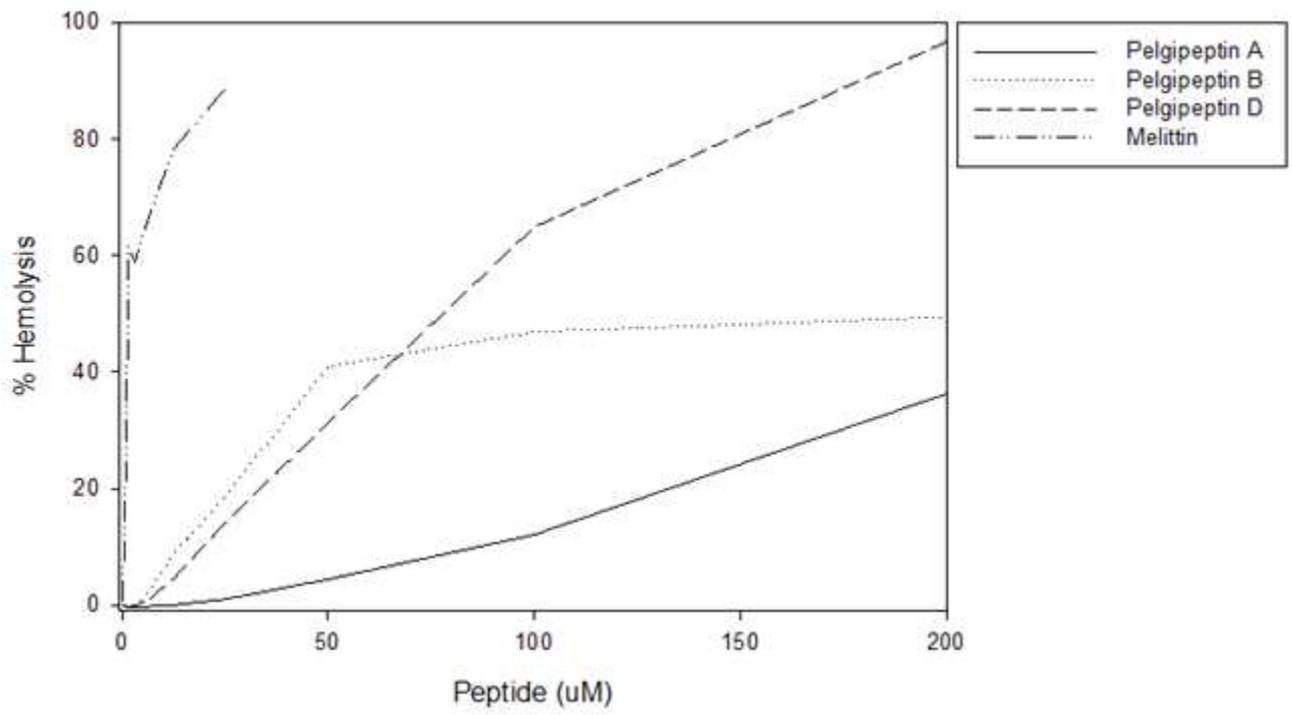


그림 7.8. Pelgipeptin A, B와 D의 hemolysis assay 결과.

제 8 절. cyclic lipopeptide의 구조 규명

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주는 이투린 (iturin), 펜지신 (fengycin), 서펙틴 (surfactin) 등의 cyclic lipopeptide를 생산한다 (그림 8.1).

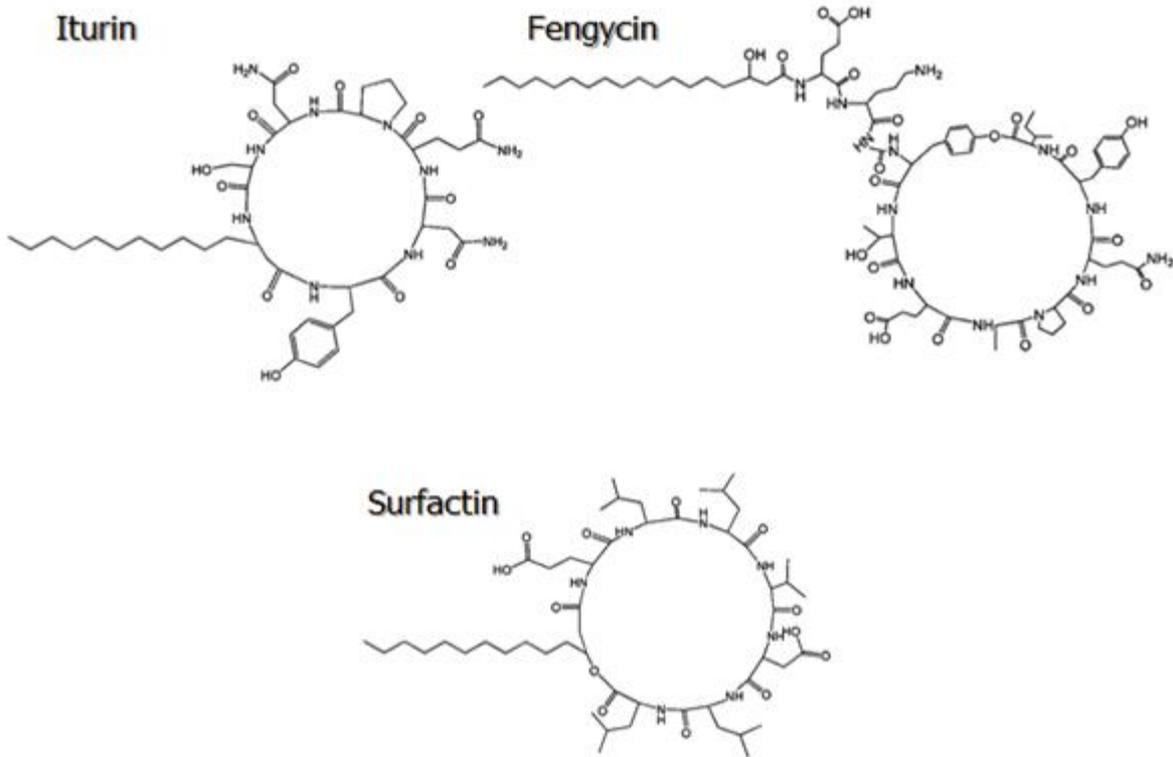


그림 8.1. Iturin, fengycin, surfactin의 기본 구조.

본 연구에서는 LC-MS에 의해 약 10여종의 cyclic lipopeptide를 확인하였으며 그 중 항공팡이 활성이 가장 좋은 fengycin 펩타이드에 대한 구조분석을 진행하였다. LC-MS/MS에 의해 fengycin 펩타이드는 A와 B형 두 가지의 펩타이드 고리 구조를 가지고 있었으며 펩타이드에 길이가 다른 lipid 사슬이 결합된 형태로 존재하였다. 추가적으로 CD, UV, FT-IR, NMR 등의 분석법을 이용하여 fengycin 분자의 구조적 연구를 진행하였다. 차후 이러한 구조적 특성이 유발하는 대사산물로 인한 생리활성의 차이에 기인하는 효과를 가늠해 볼 수 있다.

순수하게 정제된 pelgipeptin의 1차 구조, 2차 구조, 3차 구조에 대한 연구를 진행하였다. 먼저 아미노산 서열을 분석하기 위하여 Cyclic 형태인 peptide에 KOH를 처리하여 ring을 open 시켜 linear한 형태로 만들었다. SPE-column(Waters, Sep-Pak C₁₈ cartridge)을 통해 첨가된 KOH를 제거하고 LC-MS/MS를 이용하여 아미노산 서열분석을 실시하였다. 2차 구조 유무의 여부는

SDS (sodium dodecylsulfate)와 TFE (trifluoroethanol)를 첨가 후 Circular Dichroism (CD)를 측정하여 분석하였으며 (Eunjung Lee *et al.*, 2014, Kathi *et al.*, 2013), 3차 구조를 규명하기 위하여 Bruker AVANCE 600 MHz를 이용하여 289K에서 2D Nuclear magnetic resonance (NMR) 스펙트럼을 측정하였다 (Wixia Sun *et al.*, 2015).

가. Fengycin 의 구조 분석

(1) LC-MS/MS

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주가 생산하는 여러 가지 고리형 지질펩타이드 중에 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 강한 활성을 가진 fengycin을 대상으로 집중적인 연구를 수행하였다. 먼저 LC-MS를 이용하여 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주가 생산하는 fengycin만을 획득하였다. 샘플의 상등액을 0.2 μ m syringe filtration하여 5ml의 시료를 loading하여 HPLC에 주입한 후 230nm에서 흡광도의 변화로 시료의 용출을 확인하였다. 기기는 역상 (reversed-phase) HPLC를 사용하였고 waters C₁₈ prep column을 사용하여 peak retention time (피크 머무름 시간)을 관측하며 분획하였다. 이때, 0.1% TFA를 함유한 95% 물에 5% ACN을 buffer A로, 0.1% TFA를 함유한 95% ACN에 5% 물을 buffer B로 사용하면서, 5% ACN에 65% ACN의 농도로 1분당 1ml씩 30분간 농도 구배를 주며 fengycin만을 분리정제 하였다. 이 시료를 대상으로 MS-MS (API 2000)하여 fengycin A와 B의 fragment를 비교할 수 있었다. 나아가 CD와 UV, FT-IR, NMR등의 분석기법을 통해 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주가 생산하는 fengycin A와 fengycin B의 분자 구조를 규명하였다.

(2) Circular Dichroism (CD)

Fengycin A와 Fengycin B가 아미노산 2차 구조를 가지는지의 여부를 조사하기 위하여 2가지 조건으로 나누어 Circular Dichroism을 측정하였다. 첫 번째 조건은 SDS를 1mM부터 10mM까지 첨가, 두 번째 조건은 10% TFE부터 50% TFE까지 첨가하여 비교 분석하였다. 실험된 peptide의 농도는 100 μ M이며, 10mM Sodium phosphate (pH6.0) 첨가하여 분석하였다. 실험파장은 190nm부터 260nm까지 조사하였다.

$$[\theta]_{MR} = \frac{\theta}{10 \times l \times C \times n}$$

θ = 흡광도

l = cell의 두께

C = sample 농도

n = amino acid 수

(3) Ultraviolet (UV) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

분자량이 1,506 m/z인 fengycin의 경우 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* KACC 40031에 대해 가장 높은 항균 활성을 나타내었다. 때문에 이 샘플을 대상으로 UV와 FT-IR 분광법을 사용하여 fengycin의 구조적 특성을 조사하였다. Fengycin의 UV 스펙트럼은 photodiode array detector (Shimadzu SPD-M10Avp, Shimadzu, Japan)를 이용하여 190 ~ 330nm의 파장으로 조사하였다. Fengycin의 지질 펩타이드의 성질은 상기 IR 분광법을 통해 확인하였다. IR 샘플은 methanol에 용해시키고 IR 스펙트럼을 FT-근적외선 분광기 (FT-near infrared spectrometer, FT-NIR; Spotlight400TM, Perkin Elmer, UK)를 사용하여 측정하였다.

(4) 2D Nuclear magnetic resonance (NMR) 분광학

Fengycin A와 Fengycin B의 3차 구조를 규명하기 위하여 2D NMR 실험을 시행하였다. Bruker AVANCE 600 MHz 를 이용하여 289K에서 실험을 진행하였다. Fengycin A와 Fengycin B를 99.9% DMSO-d₆로 녹여 5mM의 농도로 만든 샘플에 10mM Sodium phosphate, D₂O와 증류수를 첨가하여 298K에서 2D Double Quantum Filter-correlation spectroscopy (DQF-COSY), Total Correlation Spectroscopy (TOCSY), Nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY)를 측정하였다.

나. Pelgipeptin A의 구조 분석 (LC-MS/MS, CD, NMR 등)

(1) LC-MS/MS

Pelgipeptin A의 아미노산 서열을 규명하기 위하여 LC-MS/MS를 시행하였다. Cyclic 형태인 펩타이드에 1M KOH 처리하여 overnight시켰다. Linear한 형태로 ring이 open되었는지 LC-MS를 이용하여 물 분자가 첨가된 예상 분자량을 확인 후, SPE 컬럼(Waters, sep-pac, C₁₈ Cartridge)을 이용하여 KOH를 제거하였다. 그 후 5% TFA를 첨가하여 pH 2로 조절하였다. 이를 0.2µm non-sterile single use syringe filter(RC-membrane, PP-housing, Sartorius)로 여과하여 LC-MS/MS 분석용 시료로 사용하였다. 이 때 분석 조건은 표 8.1에 나타내었다.

표 8.1 Pelgipeptin A의 LC-MS/MS 분석조건

Operating condition	
HPLC system	Shimadzu HPLC
Mass system	AB Sciex API 2000
Column	Sunfire C ₁₈ (4.6 × 250 mm)
Solvent	A : 100% H ₂ O containing 0.05% TFA B : 100% Acetonitrile containing 0.05% TFA
Method	5%-65% for 30 min
Detector	UV _{230 nm}
Flow rate	1ml/min
Injection volume	20 μ l
Range	200 - 1800
Polarity	Positive

(2) Circular Dichroism (CD)

Pelgipeptin A가 2차 구조를 가지는지의 여부를 조사하기 위하여 2가지 조건으로 나누어 Circular Dichroism을 측정하였다. 첫 번째 조건은 SDS(sodium dodecylsulfate)를 1mM부터 10mM까지 첨가, 두 번째 조건은 10% TFE (trifluoroethanol)부터 50% TFE까지 첨가하여 비교 분석하였다. 실험된 peptide의 농도는 100 μ M이며, 10mM Sodium phosphate (pH 6.0)첨가하여 분석하였다. 실험파장은 190nm부터 260nm까지 측정하였다.

(3) 2D Nuclear magnetic resonance (NMR) 분광학

Pelgipeptin A의 3차 구조를 규명하기 위하여 2D Nuclear magnetic resonance (NMR) 스펙트럼을 측정하였다. Bruker AVANCE 600MHz를 이용하여 289K에서 실험을 진행하였다. 1mM pelgipeptin A에 10mM Sodium phosphate, D₂O와 증류수를 첨가하여 2D Double Quantum Filter-correlation spectroscopy (DQF-COSY), Total Correlation Spectroscopy (TOCSY), Nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY)를 측정하였다.

2. 연구개발 결과

가. Fengycin 의 구조 분석

(1) LC-MS/MS

분획 5의 1478과 1492Da의 fengycin의 화학구조는 지질 펩타이드의 구성과 구조의 특성에 따라 빠르고 적절한 LC-MS/MS를 통해 분석하였다. fengycin A는 1080과 966의 조각 이온을 생성할 수 있고 fengycin B는 1108과 994의 이온을 생성한다. ESI-MS/MS로 1478과 1492 m/z를 분석한 결과 1478의 이온 전구체로부터 1080과 996에서 조각 이온을 보였으며, 1492의 이온 전구체로부터 1108과 994에서 조각이온을 보였다. 이러한 결과는 1478 m/z와 1492 m/z가 각각 C₁₇ fengycinA와 C₁₆ fengycin B임을 나타낸다 (그림 8.2).

(2) Circular Dichroism (CD)

fengycin A와 fengycin B가 2차 구조를 가지는지의 여부를 조사하기 위하여 2가지 조건으로 나누어 Circular Dichroism을 측정하였다. 첫 번째 조건은 SDS를 1mM부터 10mM까지 첨가, 두 번째 조건은 10% TFE부터 50% TFE까지 첨가하여 비교분석하였다. 그 결과 그 결과 fengycin A와 fengycin B는 특정 2차 구조를 갖지 않는 random 형태인 것으로 확인되었다 (그림 8.3).

(3) Ultraviolet (UV) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

Fengycin의 UV 스펙트럼은 photodiode array detector (Shimadzu SPD-M10Avp, Shimadzu, Japan)를 이용하여 190 ~ 330nm의 파장범위를 측정하였다. 지질 펩타이드는 단백질과 펩타이드의 특성을 나타내는 220 ~ 240nm 파장사이에 최대 흡광도를 나타내었다. fengycin의 지질 펩타이드의 성질은 상기 IR 분광법을 통해 확인하였다. IR 샘플은 methanol에 용해시키고 IR 스펙트럼을 FT-근적외선 분광기 (FT-near infrared spectrometer, FT-NIR; Spotlight400TM, Perkin Elmer, UK)를 사용하여 측정하였다. 그 결과 약 3,370cm⁻¹, 1,670cm⁻¹ 및 1,540cm⁻¹에서의 흡광도 특성은 화합물의 펩타이드 결합을 함유하는 것으로 나타났고, 2,930cm⁻¹ 과 2,860cm⁻¹ 흡광대역에서는 지방족 사슬이 존재함을 확인하였으며, 1190cm⁻¹ 과 1140cm⁻¹에서는 esters의 C-O-C 진동과 관련이 있다. 또한 IR 스펙트럼은 fengycin 타입의 지질 펩타이드에 관해 이전에 보고되었던 결과들과 일치함을 확인하였다 (그림 8.4).

(4) 2D Nuclear magnetic resonance (NMR) 분광학

Fengycin A와 Fengycin B의 3차 구조를 규명하기 위하여 2D NMR을 측정하였다. Bruker AVANCE 600MHz를 이용하여 289K에서 실험을 진행하였다. 그 결과 298K에서 2D Double Quantum Filter-correlation spectroscopy (DQF-COSY), Total Correlation Spectroscopy (TOCSY), Nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY)를 측정하였다. TOCSY 스펙트럼은 90ms의 등방성 mixing time으로 MLEV-17 pulse scheme을 이용하여 기록하였다. NOESY 스펙트럼은 200과 300ms의 mixing time으로 기록하였다. NMR 데이터 처리 및 분석은 NMRPipe와 NMRView를 사용하여 수행하였다 (그림 8.5).

분획 5의 fengycin A와 fengycin B의 모든 proton resonance assignment는 2D NMR sequential assignment 분석법을 통해 결정하였다. 아미노산 spin 시스템의 확인은 DQF-COSY와

TOCSY 실험을 통해 scalar coupling 패턴에 입각하여 관찰되었고, NOESY로 측정된 결과로 보충하였다. Sequence-specific assignment는 NOESY 스펙트럼으로부터 얻었고 아래의 그림에 나타내었다. Fengycin A와 Fengycin B의 순차적인 $daN(i, i+1)$ NOE는 NOESY 스펙트럼으로 298K에서 200ms의 mixing time으로 관찰하였다. Intraresidue NH-C^αH cross-peaks은 Fengycin A는 검은선으로, Fengycin B는 빨간선으로 나타내어 아미노산을 standard single-letter 약어로 표기하였다 (표 8.2).

그 결과로, Fengycin A와 Fengycin B의 구조적 차이는 오직 하나의 6번째 잔기인 아미노산이다. 즉, Fengycin A의 Ala이 Fengycin B의 Val으로 치환되었다. Proline들이 backbone에서 amide proton을 가지고 있지 않기 때문에, 7번째 잔기인 Pro의 NMR peak은 finger print region에서 누락되었으며 NOESY 스펙트럼에서 NOE에 기반을 둔 assign을 하게 되었다. NOESY 스펙트럼에서 Fengycin A의 Ala과 Fengycin B의 Val 6는 명확하게 확인되었고 Fengycin A와 Fengycin B의 거의 모든 proton chemical shift는 2D NMR 스펙트럼에서 분리된다.

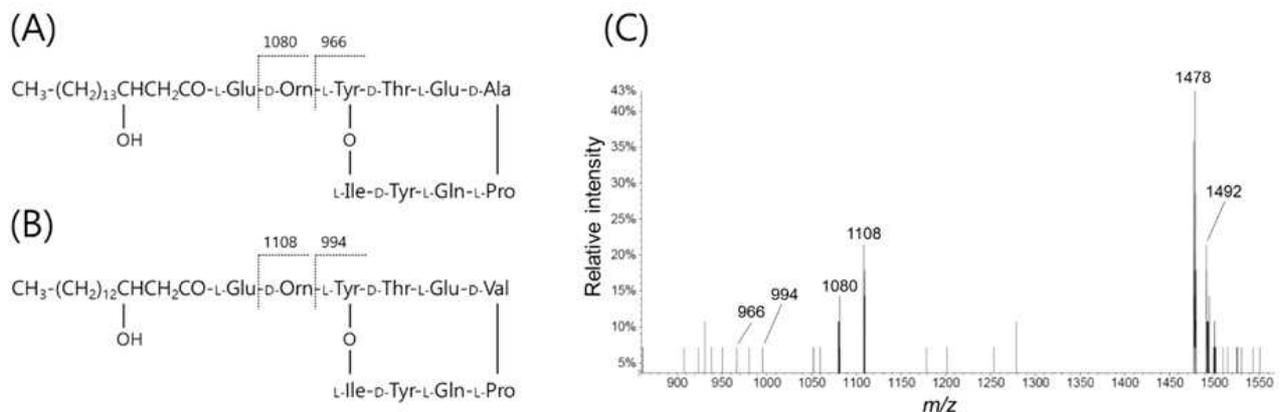


그림 8.2. (A) Fengycin A (product ions m/z 1080 and 966)와 (B) Fengycin B (product ions m/z 1108 and 994)의 fragmentation. (C) 1478 m/z 인 fengycin A와 1492 m/z 인 fengycin B의 protonated molecules $[M + H]^+$ MS 스펙트럼.

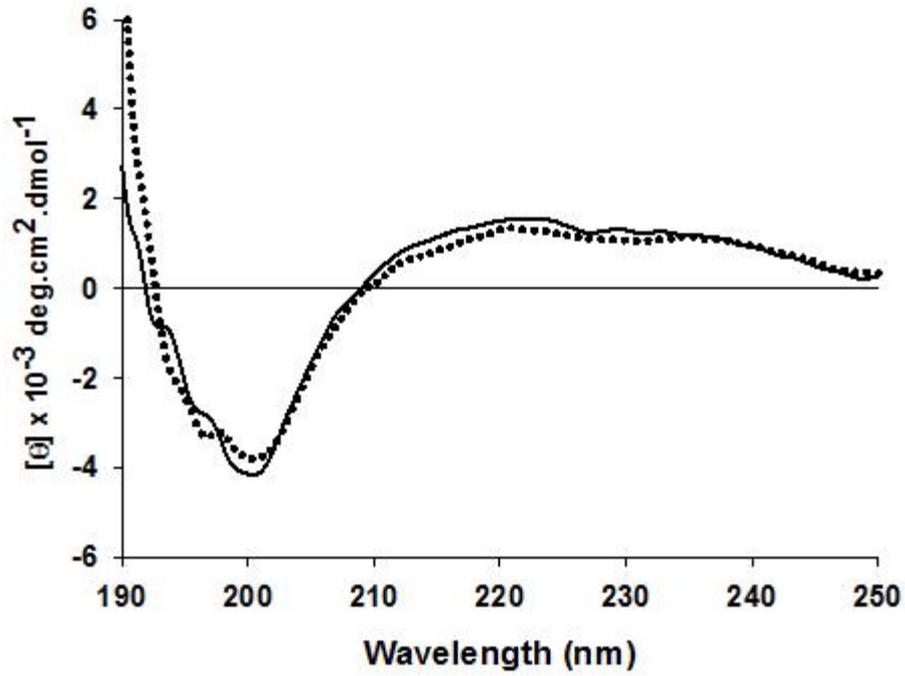


그림 8.3 Circular dichroism (CD) 를 이용한 Fengycin A(실선) 와 Fengycin B(점선)의 2차 구조 분석.

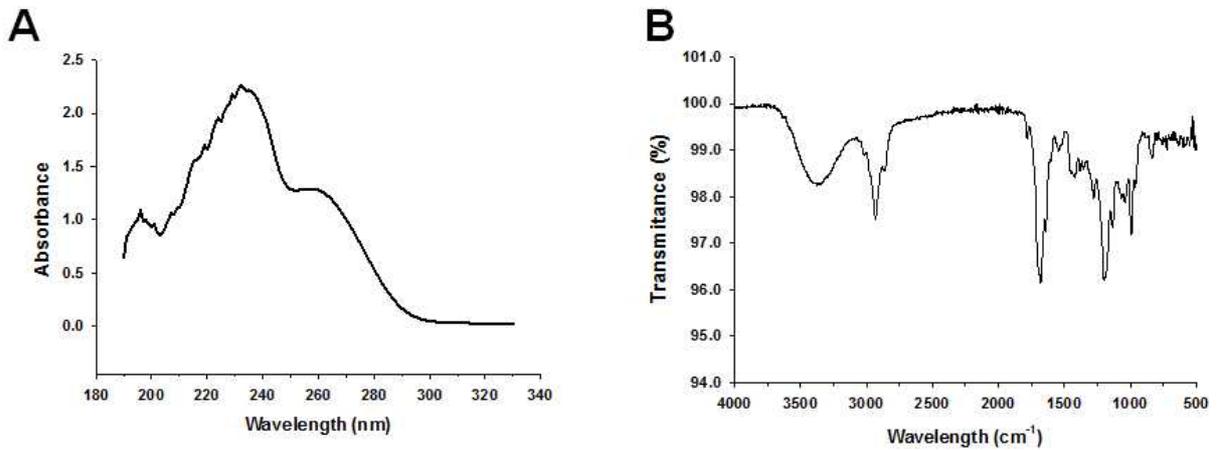


그림 8.4. Fengycin B 의 UV (A) 와 FT-IR (B) 분석을 통한 지질펩타이드 구조를 확인.

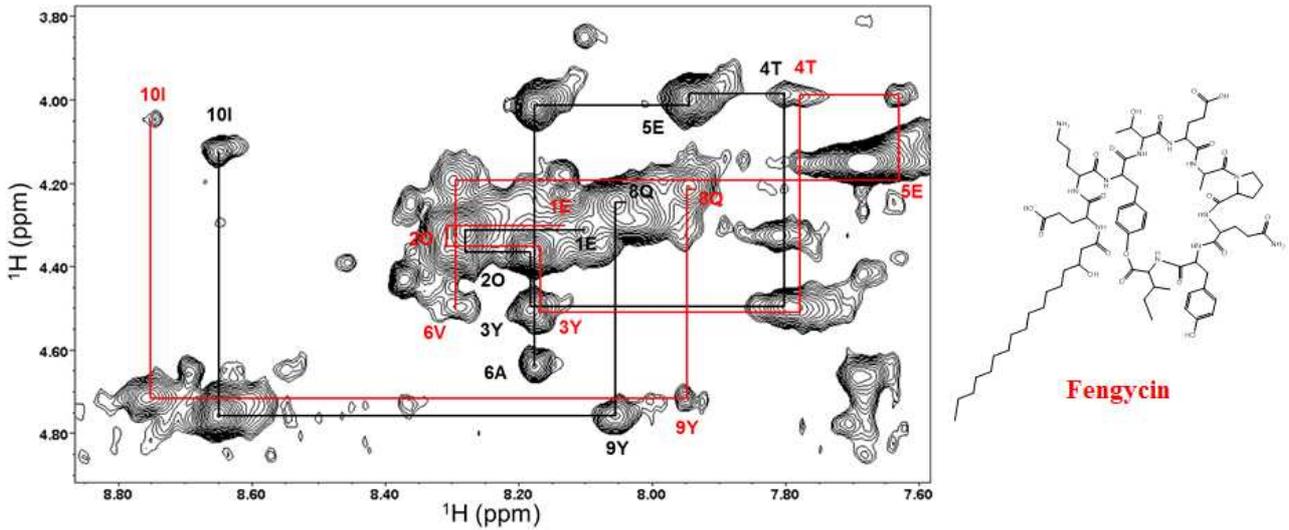


그림 8.5. 298K에서 200ms의 mixing time으로 관찰된 Fengycin A와 Fengycin B의 $\alpha N(i, i+1)$ NOE가 순차적으로 연결된 NOESY 스펙트럼.

표 8.2. 2D NMR 분석을 통한 Fengycin A와 Fengycin B의 proton chemical shifts

Peptide	Sequence	HN	H α	H β	Others
Fengycin A	Glu1	8.1	4.32	1.81, 1.94	H γ : 2.34, 2.28
	Orn2	8.28	4.36	1.59	H γ : 1.79; H δ : 2.82, H ϵ : 7.69
	Tyr3	8.18	4.5	2.89, 2.94	H δ : 7.22, H ϵ : 6.99
	aThr4	7.79	3.99	3.55	H γ 2: 0.81
	Glu5	7.94	4.01	1.87, 2.07	H γ : 2.4, 2.24
	Ala6	8.17	4.64	1.17	
	Pro7		4.3	2.13	H γ : 1.78, 1.83; H δ : 3.50
	Gln8	8.03	4.24	1.76	H γ : 2.22; H ϵ 2: 7.34, 6.84
	Tyr9	8.05	4.76	2.84	H δ : 7.05, H ϵ : 6.69
	Ile10	8.65	4.12	1.84	H γ 12: 1.37; H γ 13: 1.12; H γ 21: 0.9; H δ 11: 0.86
Fengycin B	Glu1	8.13	4.3	1.79, 1.94	H γ : 2.27, 2.34
	Orn2	8.31	4.38	1.6	H γ : 1.8; H δ : 2.84; H ϵ : 7.69
	Tyr3	8.17	4.51	2.87, 3.02	H δ : 7.22; H ϵ : 6.99
	aThr4	7.78	3.99	3.55	H γ 2: 0.8
	Glu5	7.69	4.18	1.96	H γ : 2.28
	Val6	8.3	4.5	2.1	H γ : 0.91
	Pro7		4.3	2.13	H γ : 1.78, 1.83; H δ : 3.50
	Gln8	7.94	4.2	1.76	H γ : 2.24; H ϵ 2: 7.34, 6.84
	Tyr9	7.95	4.71	2.87	H δ : 7.05, H ϵ : 6.69
	Ile10	8.76	4.05	1.84	H γ 21: 0.94; H δ 11: 0.86

나. Pelgipeptin A의 구조 분석 (LC-MS/MS, CD, NMR 등)

(1) LC-MS/MS

Pelgipeptin A의 아미노산 서열을 규명하기 위하여 LC-MS/MS를 시행하였다. Cyclic 형태인 펩타이드에 1M KOH 처리하여 overnight시켰다. Linear한 형태로 ring이 open되었는지 LC-MS를 이용하여 물 분자가 첨가 된 예상 분자량을 확인 후, SPE 컬럼(Waters, sep-pac, C₁₈ Cartridge)을 이용하여 KOH를 제거한 후 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다.

그 결과 그림 8.6 같은 아미노산 서열을 확인 할 수 있었다.

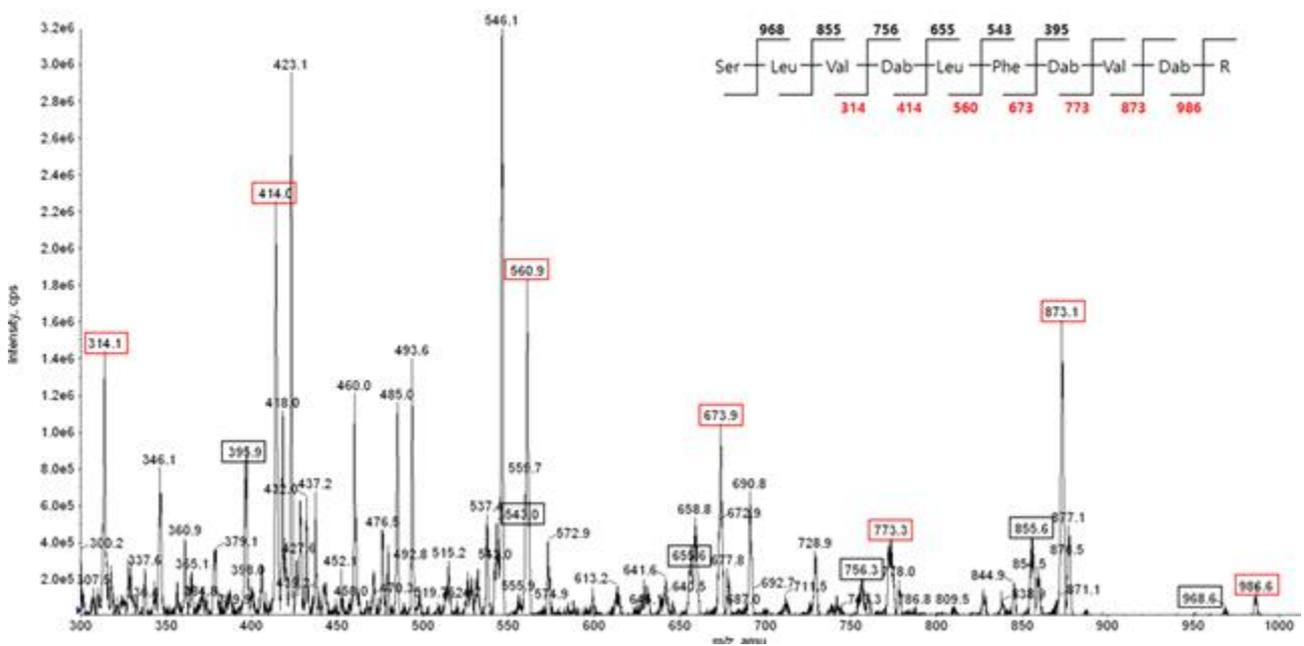


그림 8.6. Pelgipeptin A의 LC-MS/MS 결과.

Pelgipeptin A는 9개의 아미노산 Dab-Val-Dab-Phe-Leu-Dab-Val-Leu-Ser으로 이루어져있으며, 짧은 lipid chain을 갖고 있다 (그림 8.7).

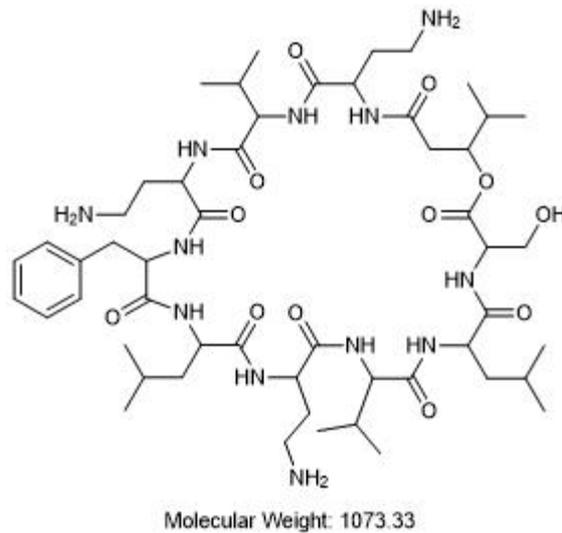


그림 8.7. Pelgipeptin A의 1차 구조.

(2) Circular Dichroism (CD)

Pelgipeptin A가 2차 구조를 가지는지의 여부를 조사하기 위하여 2가지 조건으로 나누어 Circular Dichroism을 측정하였다.

먼저 펩타이드가 특정 2차 구조를 가질 때, 접힘 구조를 유도하기 위하여 1mM ~ 10mM의 SDS(sodium dodecylsulfate)를 첨가하여 측정하였는데, pelgipeptin A는 약 196nm에서 negative minimum을 보이며 특정구조를 갖지 않는 random한 형태로 관찰되었다 (그림 8.8).

두 번째로 α -helix 구조를 유도하기 위하여 10% TFE (trifluoroethanol)부터 50% TFE 까지 첨가하여 비교분석하였다. 그 결과 SDS를 첨가했을 때와 마찬가지로 약 196nm에서 negative minimum을 보이며 특정구조를 갖지 않는 random한 형태로 관찰되었다 (그림 8.9).

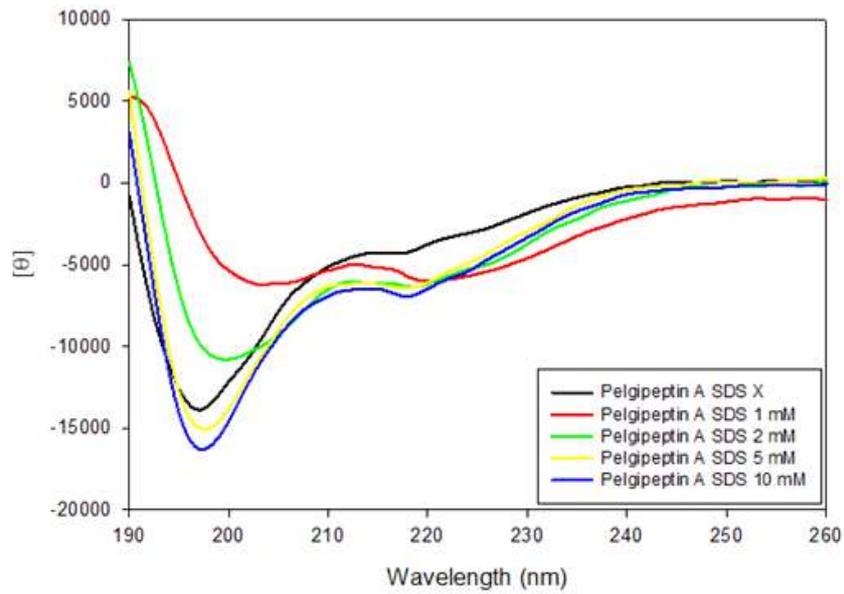


그림 8.8. SDS를 첨가하여 측정된 pelgipeptin A의 CD 결과.

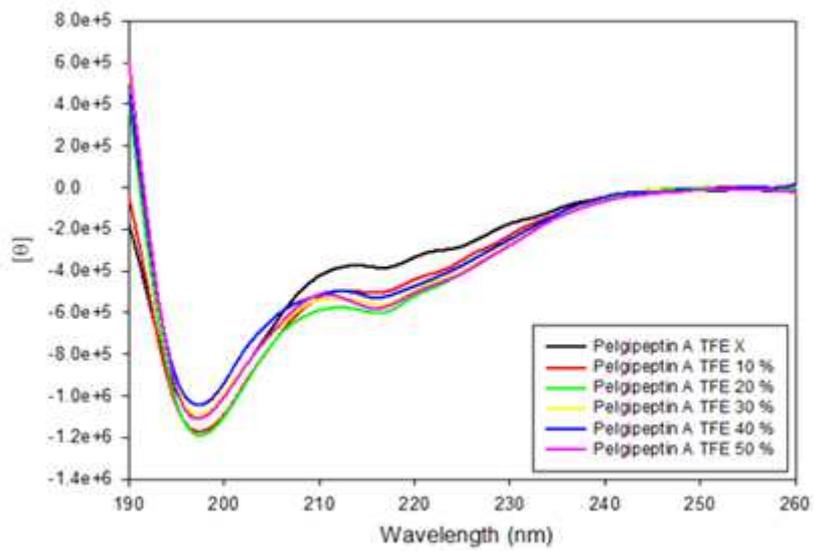


그림 8.9. TFE를 첨가하여 측정된 pelgipeptin A의 CD 결과.

(3) 2D Nuclear magnetic resonance (NMR) 분광학

Pelgipeptin A의 3차 구조를 규명하기 위하여 2D Nuclear magnetic resonance (NMR) 스펙트럼을 측정하였다. Bruker AVANCE 600MHz 을 이용하여 289K에서 실험을 진행하였다.

1mM pelgipeptin A에 10mM Sodium phosphate, D₂O와 증류수를 첨가하여 DQF-COSY, TOCSY, NOESY 정보를 얻을 수 있었다 (그림 8.10).

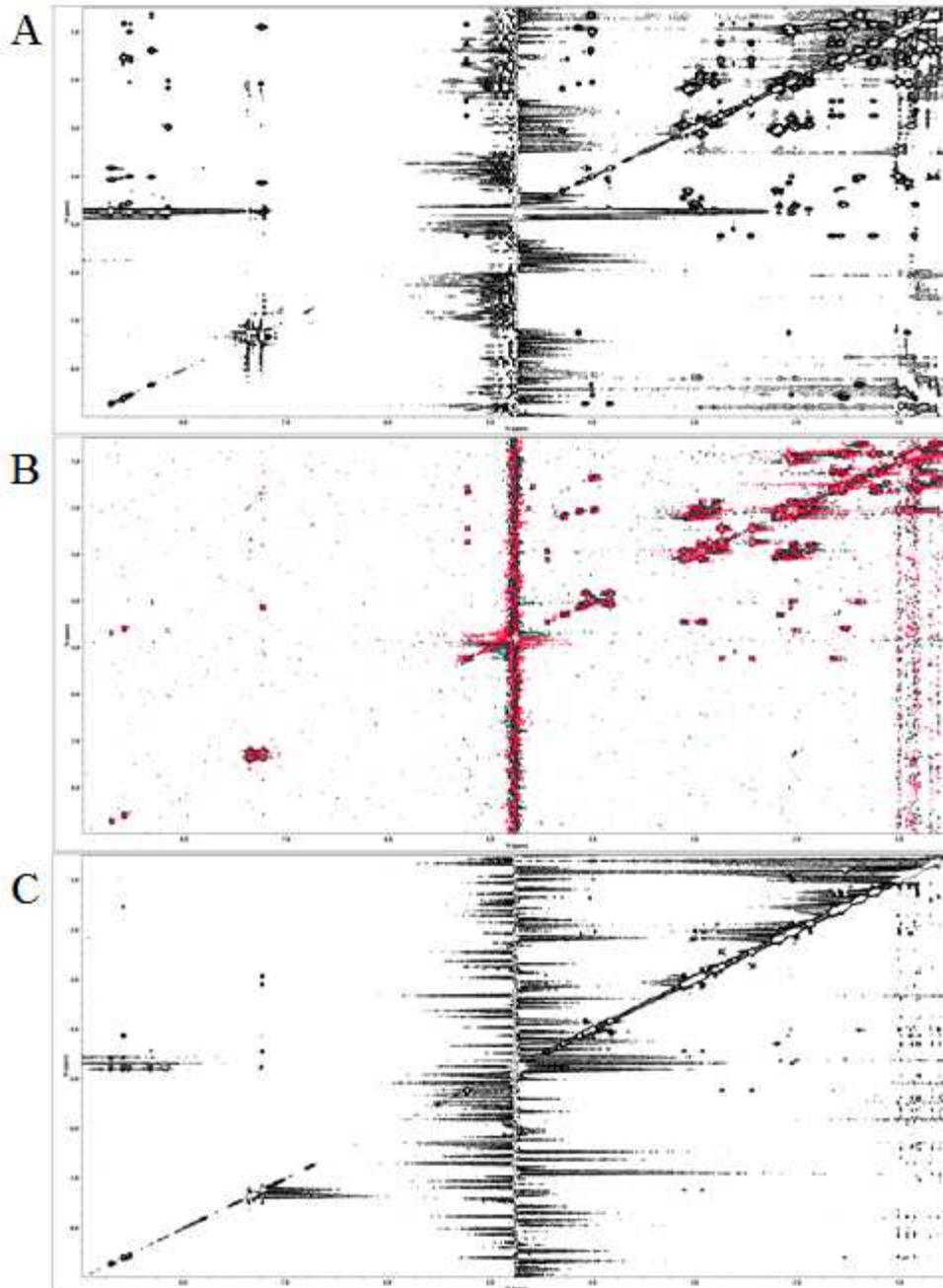


그림 8.10. Pelgipeptin A의 2D Nuclear magnetic resonance (NMR) 스펙트럼. A; pelgipeptin A의 TOCSY spectrum, B; pelgipeptin A의 DQF-COSY spectrum, C; pelgipeptin A의 NOESY spectrum.

제 9 절. cyclic lipopeptide 대량생산을 위한 최적 배양조건 검토

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

가. Fengycin 대량생산을 위한 BC32-1 균주의 최적배양 조건

항곰팡이 활성이 가장 좋은 fengycin (fengycin)의 대량생산을 위한 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주의 최적 배양조건을 확립하기 위한 방편으로 온도에 따른 fengycin의 발현량을 정량하였다. 그 결과로 25°C 보다 37°C의 높은 온도에서 균주의 성장이 더 빨랐으며 따라서 온도에 따른 fengycin의 생성량을 비교해 보았을 때에도 25°C에서는 fengycin의 발현이 거의 일어나지 않은 반면, 37°C에서는 시간이 지남에 따라 fengycin의 발현량이 지속적으로 증가하는 패턴을 관찰할 수 있었다. 따라서 fengycin의 대량 생산을 위한 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주의 배양은 37°C 정도의 최적온도가 필요하다는 결론을 도출할 수 있었다.

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주가 생산하는 항균물질의 대량 생산을 위한 최적 성장조건을 검토하는 방안으로 최적 배양온도 조건을 확립할 수 있었다. *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1를 LBA 배지에 streaking하여 단일 콜로니를 얻은 후, 5ml의 LB 액체 배지에 접종하여 100ml의 삼각 플라스크에 동량의 LB 액체배지에 subculture 하여 각각 25°C, 37°C의 온도 하에서 180rpm으로 배양시키며 시간별로 (2시간) 600nm 흡광도에서 1일 동안 성장곡선 (growth curve)을 관측하였다.

나. Fengycin 정량 방법

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주의 성장곡선을 관측하는 한편, 동시에 BC32-1 균주의 배양액을 소량 취해 100% ACN에 0.5% TFA가 함유된 buffer와 동량을 vortexing한 후 pH가 약 2.0되는 것을 확인 한 후 15,000rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 샘플의 상등액을 0.2 μ m syringe filtration하여 50 μ l의 시료를 loading하여 HPLC에 주입한 후 fengycin을 정량하였다. 즉, 여과액은 역상 (reversed-phase) HPLC (Shimadzu 6AD, Japan) 기기를 사용하여 shim pack C₁₈ analytical column (4.6 mm \times 250mm)을 분석용 컬럼으로 사용하여 fengycin의 고유한 peak retention time (피크 머무름 시간)을 관측하였다. Fengycin의 피크 머무름 시간은 고유한 한편 시간별로 다르기 때문에 피크의 면적을 계산하여 시간에 따른 fengycin의 고유량을 정량하였다. 이때, 0.01% TFA를 함유한 100% 물을 buffer A로, 0.01% TFA를 함유한 100% ACN을 buffer B로 사용하면서, 35% ACN에 0.05% TFA를 함유한 75% ACN의 농도로 1분당 1ml씩 20분간 농도 구배를 주어 흘려주어 230nm에서 흡광도의 변화로 시료의 용출을 확인하였다. 한편, blank로는 100% 물에 0.05% TFA가 함유된 solvent를 사용하였다.

2. 연구개발 결과

가. Fengycin 대량생산을 위한 BC32-1 균주의 최적배양 조건

Bacillus amyloliquefaciens BC32-1 균주의 성장곡선을 관측한 결과 25°C에 비해 37°C에서 보다 빠른 성장곡선을 보였다. 이 결과에 따라 *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 균주의 최적 생육온도는 37°C임을 알 수 있었다 (그림 9.1).

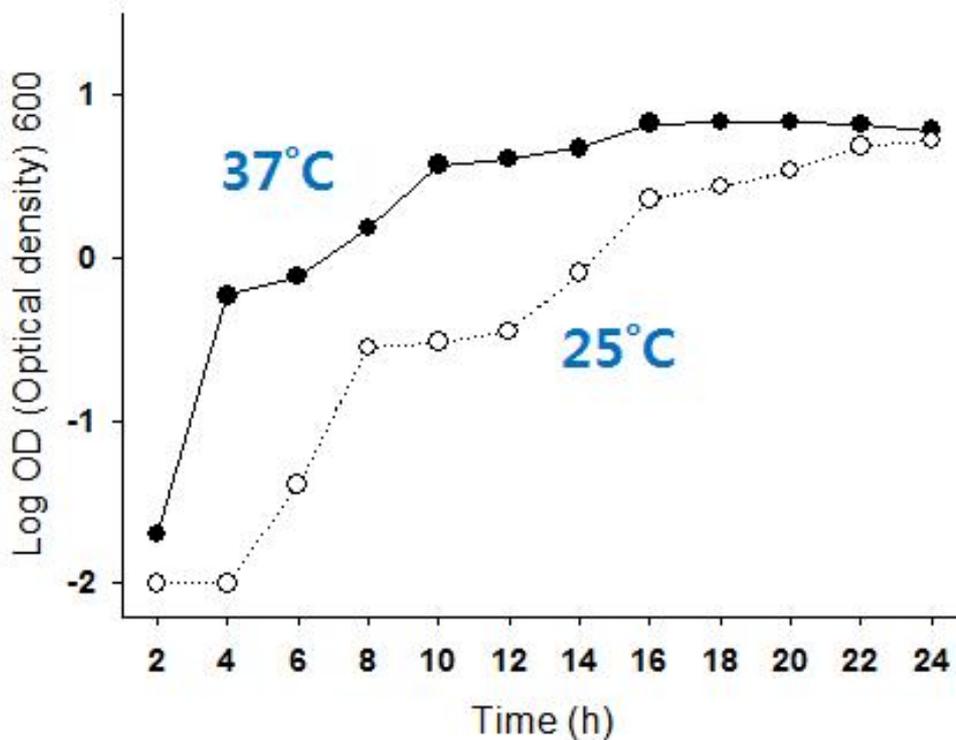


그림 9.1. 항균물질 대량생산을 위한 BC32-1 균주의 최적 생육온도.

나. Fengycin B 정량 방법

Fengycin의 피크 머무름 시간은 고유한 한편 시간별로 다르기 때문에 피크의 면적을 계산하여 시간에 따른 fengycin의 고유량을 정량하였다. 즉 정제된 fengycin B를 이용하여 5, 10, 15, 20, 25 μ g/ml의 농도로 standard curve를 작성하였다 (그림 9.2). 이를 바탕으로 온도에 따른 fengycin B의 생산량을 관측할 수 있었다. 그 결과, fengycin B는 25°C에서는 거의 변화가 없는 반면 37°C에서 시간이 지남에 따라 생산량이 비례한다는 결론을 도출할 수 있었다 (그림 9.3).

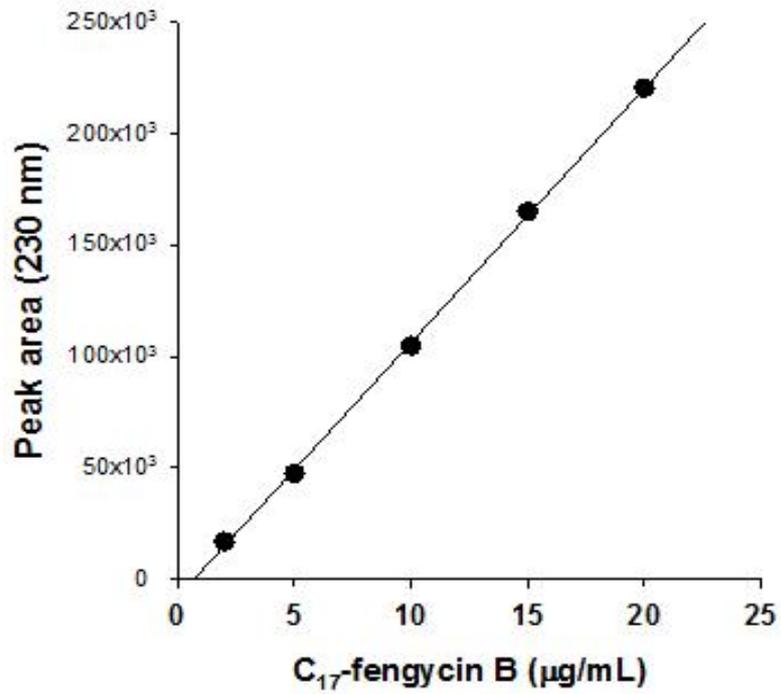


그림 9.2. 항균물질 정량을 위한 검량선.

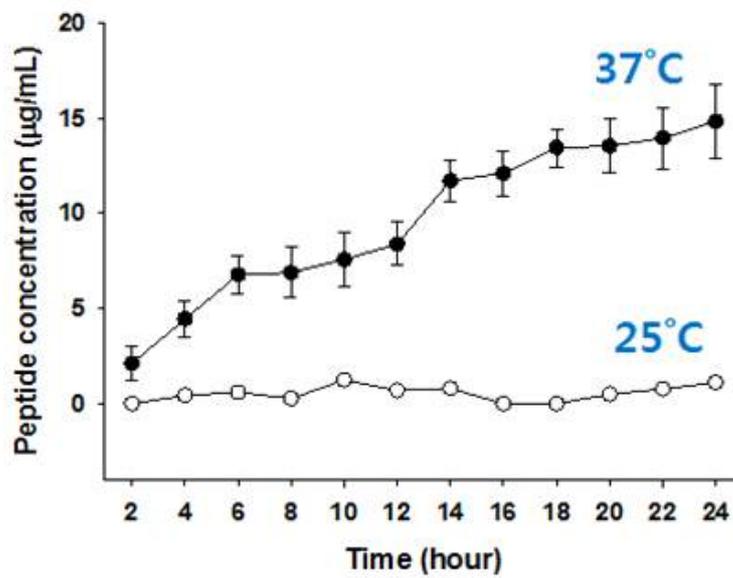


그림 9.3. 온도에 따른 fengycin B의 생산량.

제 10 절. 황토로부터 분리한 *Paenibacillus kribbensis* CU-01의 항진균 활성 검사 및 동정

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

식물 병원성 곰팡이에 대하여 항진균활성이 있는 미생물을 분리하기 위하여 전라남도 해남군 일대의 고구마 재배지에서 황토를 채취하여 실험에 이용하였다. 채취된 황토시료 1g을 멸균수 9ml을 이용하여 현탁하였다. 이렇게 현탁된 황토시료를 연속 희석법을 이용하여 $1.0 \times 10^{-3} \sim 10^{-4}$ 까지 희석하였으며, 희석한 샘플은 고체배지인 Tryptic soy 고체배지 (TSA)에 도말하고 30°C에서 정치 배양하여 나타난 콜로니를 다시 TSA에 도말하여 3회의 계대배양을 거친 후 Tryptic soy 액체배지 (TSB)에서 배양하였다. 분리된 균주의 보관을 위하여 25% glycerol stock을 만들어 -80°C의 deep freezer에 보관하여 사용하였다.

황토에서 분리된 균주들의 식물병 유발 곰팡이에 대한 항진균활성을 확인하기 위하여 농업유전자원센터 (KACC)로부터 식물병원성 진균 5종을 분양 받아 사용하였다. 항진균 활성 검사는 분양받은 식물병원성 곰팡이를 potato dextrose 고체배지 (PDA)의 중앙에 접종하고 멸균된 paper disc를 동일 배지의 주변에 배치한 후 황토에서 분리된 균주를 TSB에서 배양한 배양액을 접종하여 25°C에서 정치배양하여 항진균활성을 검정하였다.

항진균활성을 나타낸 균주는 16S rRNA sequence분석을 통하여 분자생물학적 계통 분류를 하고 투과전자현미경 (TEM)을 이용한 형태관찰 및 그람염색, 운동성 유무, spore형성 혐기성 배양, Urease 분해능 검정, Nitrate 환원력 검정, Oxidase 화성 검정, Casein 가수분해능 조사, Gelatin 액화능 시험, Starch 분해능 조사, API kit를 통한 균주 동정실험 등을 통하여 생리·생화학적 특징을 관찰하여 균주를 동정하였다.

가. 황토에 서식하는 균주의 분리

전라남도 해남군 고구마 경작지에서 황토시료를 채취하여 4°C에서 보관하고, 채취된 황토시료 1g을 멸균수 9ml을 이용하여 현탁하였다. 이렇게 현탁된 황토시료를 연속 희석법을 이용하여 $1 \times 10^{-3} \sim 10^{-4}$ 까지 희석하였으며, 희석한 샘플은 고체배지인 Tryptic soy 고체배지 (TSA)에 도말하고 30°C에서 2일간 정치 배양하였다. 배양 후 고체배지에서 많은 콜로니가 형성되었다. 이렇게 나타난 콜로니를 다시 TSA에 도말하여 3회의 계대배양을 거친 후 Tryptic soy 액체배지 (TSB)에서 배양하였다. 분리된 균주의 보관을 위하여 25% glycerol stock을 만들어 -80°C의 deep freezer에 보관하여 사용하였다.

나. 분리 균주의 항진균 활성 검정

황토에서 분리된 균주들의 식물병 유발 곰팡이에 대한 항진균활성을 확인하기 위하여 농업유전자원센터 (KACC)로부터 식물병원성 진균 5종을 분양 받아 사용하였다 (표 10.1). 항진균 활성 검사는 분양받은 식물병원성 곰팡이를 potato dextrose 고체배지 (PDA)의 중앙에 접종하고, 곰팡이가 접종된 주변부에 황토에서 분리된 균주를 TSB에서 배양한 배양액을 접종하고 25°C에서 정치배양하여 항진균활성을 검정하였다.

표 10.1 본 연구에서 사용한 식물병 유발 곰팡이.

No	Strains	KACC No.	Diseases
1	<i>Botrytis cinerea</i>	40574	갯빛 진균병
2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	40003	탄저병
3	<i>Phytophthora capsici</i>	40157	역병
4	<i>Fusarium oxysporum</i>	40031	시들음병
5	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	40457	균핵병

다. 항진균활성 균주의 동정

항진균 활성을 나타낸 균주는 16S rRNA sequence 분석을 통하여 분자생물학적 계통 분류를 하고 투과전자현미경 (TEM)을 이용한 형태관찰 및 그람염색, 운동성 유무, spore 형성 혐기성 배양, Urease 분해능 검정, Nitrate 환원력 검정, Oxidase 화성 검정, Casein 가수분해능 조사, Gelatin 액화능 시험, Starch 분해능 조사, API kit를 통한 균주 동정실험 등을 통하여 생리·생화학적 특징을 관찰하여 균주를 동정하였다.

(1) 분자생물학적 특징

(가) 16S rRNA 유전자 염기서열 분석

선별된 균주의 유전학적 특성을 확인하기 위하여 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 수행하였다. 선별된 균주의 genomic DNA를 template DNA로 사용하였다. Genomic DNA추출은 선별된 균주를 TSB 배지에서 배양온도 30°C에서 2일 동안 배양하여 cell pellet을 확보하여 사용하였다. 추출 과정은 균체를 멸균된 증류수로 두 번 세척하고 10ml의 solution (50mM glucose, 10mM, EDTA, 25mM Tris-HCl, pH 8.0)에 재현탁 하였다. 여기에 1ml의 lysozyme 용액 (50mg/ml)과 0.5ml RNase (2mg/ml) 및 0.1ml proteinase K (50mg/ml)을 첨가하여 37°C에서 1시간 방치한 다음 0.6ml의 10% SDS solution을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 방치 하였다. 반응액에 1ml의 mercaptoethanol을 가한 후 반응액의 0.5배에 해당하는 3M sodium acetate solution (pH 5.2)을 가하여 반응액에 동일량의 chloroform을 처리하였다. 이후 15,000 x g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였고, 이렇게 얻은 상등액에 0.6배에 해당하는 isopropanol을 가한 후 chromosomal DNA pellet을 회수하여 70% ethanol로 세척한 다음 건조하였다. 3ml의 TE

buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)에 녹여 실험에 사용하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열을 MacroGen kit (Promega Co.)를 이용하여 Polymerase Chain Reaction (PCR)으로 증폭시켰다. 두 개의 universal primer set인 16S Forward (27F-5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 16S Reverse (1492R-5'-GTTTACCTTGT TACGACTT-3')을 이용하였다. Denaturation, annealing, extension을 각각 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 2분간 수행하였다 (김효운, 2006). PCR product를 DNA purification kit (QIAGEN Inc.)로 순수 분리한 후, Solgent Co.에 의뢰하여 sequencing 하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열은 NCBI GenBank network service의 BLAST program을 이용하여 data 검색을 하였다 (Saitou and Nei, 1987).

(2) 생리·생화학적 특징

(가) 형태관찰

선별균주의 형태를 추가적으로 조사하기 위해 전계방사형 투과전자현미경 (FE-TEM ; Field Emission Transmission Electron Microscope)으로 관찰을 하였다. 전처리 과정은 tryptic soy 고체배지에서 배양한 균주를 0.7x0.7 cm의 크기로 잘라내어 에펜도르프 튜브 (ependorf tube)에 고정액 [2% GA (Glutaraldehyde) + 2% PA(Paraformaldehyde) in 0.05M cacodylate buffer pH7.2]을 1ml 넣어주어 실온에서 4시간동안 고정한다. 고정된 샘플은 원심분리기 (Hanil., Supra 22K, Korea)를 이용하여 15분 동안 0.4 x g의 조건으로 샘플을 침전시키고 고정액의 상등액 부분을 제거한 후 샘플이 들어있는 에펜도르프 튜브에 0.05M cacodylate buffer로 20분 간격으로 3회 교환하여 세척하였다. 그 후 1% OsO₄ (in 0.05M cacodylate buffer pH 7.2)로 실온에서 1시간 고정 후 0.05M cacodylate buffer pH 7.2로 20분 간격으로 3회 세척하였다. 고정액을 제거한 시료가 들어있는 에펜도르프 튜브에 0.05M cacodylate buffer로 20분 간격으로 3회 교환하여 세척하였다. 세척이 완료된 샘플을 30%, 50%, 70%, 90%, 95% ethyl alcohol로 20분 간격으로 탈수하였다. 그 후 최종적으로 100% ethyl alcohol로 20분 간격으로 2회 탈수하였다. 탈수된 균주는 0.2um membrane filter에 시료를 필터링한 후 임계점 건조하였다. 건조된 샘플은 gold coating 후 3~15kv의 가속전압 조건하에서 FE-TEM (JEOL, JSM-2100F, Japan)으로 선별된 균주의 형태를 관찰하였다.

(나) Gram staining

세포벽 염색은 Hucker 등의 gram 염색법 (Hucker, *et al.*, 1923)에 따라 수행하였다. Slide glass에 TSB 배지에서 배양한 균주를 100µl 가한 후 alcohol lamp를 이용하여 균체를 고정시켰다. 고정된 균체에 2% (w/v) crystal violet 용액을 떨어뜨리고 1분 30초간 염색시킨 후 착염제로 탈색하였다. 95% Alcohol을 이용하여 탈수한 후 2.5% (w/v) safranin O 용액을 떨어뜨리고 30초간 대비염색한 후 cover glass로 덮고 광학현미경 (OLYMPUS BX40, Japan)으로 1,000배의 배율로 관찰하였다. 균체가 붉은색 또는 보라색으로 염색되었는지를 관찰하였다.

(다) Motility

선별균주의 운동성 여부를 확인하기 위해 10ml 시험관에 agar (0.5% w/v)를 포함한 TSA 배지를 5ml 첨가하여 반유동고체배지로 제작하였다. 균체는 침 끝에 묻혀 배지에 찰라서 접종을 하였으며, 균체가 자라는 동안 접종부위를 중심으로 바깥쪽으로 퍼져 자라는지, 접종부위에 국한되어 자라는지를 관찰하여 운동성 유무를 결정하였다.

(라) Spore formation

Spore는 특정한 세균의 체내에 형성되는 원형 또는 타원형의 구조로서 고온, 건조, 물리적·화학적 조건에 대해서 저항력이 강하고 오래 생존한다 (Chada, *et al.*, 2003). Spore가 생기는 균은 *Bacillus*와 *Clostridium* 등으로 알려져 있으며, 선별균주의 spore 형성 유무를 확인하기 위해, TSA 배지에 30℃, 48시간 배양한 균주를 slide glass에 도말하여 고정 표본을 만든 후에 포자 생성 염색법으로 포자 생성유무를 확인하였다. 먼저 80℃로 끓는 물이 담긴 비이커 위에 표본을 올려놓고, 5% (w/v) malachite green 염색액을 부어 5분간 염색시킨 후 증류수로 수세하고 20초 동안 2.5% (w/v) safranin O로 대조 염색한 후 다시 수세하여 공기 중에 건조시켜 광학현미경에서 1,000배로 관찰하였다. 녹색으로 염색된 포자가 관찰되는 균을 포자형성양성으로 판정하였다.

(마) Anaerobic fermentation

혐기성 배양은 분자상 산소가 없는 상태에서 미생물을 배양하는 것을 말한다. 혐기성균, 특히 편성혐기성 균 (절대혐기성 균)의 배양에는 배지를 공기 중으로 부터 차단, 산소 제거 및 산화환원전위의 저하 등의 조작이 필요하며, anaerobic chamber 또는 고층한천배지를 사용하는 방법 등을 이용한다(신현성, 이규식, 2000). 선별 균주는 anaerobic chamber를 이용하여 O₂를 완전 제거한 상태에서 TSA 배지에서 30℃로 48시간 배양하여 성장유무를 결정하였다.

(바) Urease hydrolysis test

Urea 분해능이 있는 세균의 검정법으로, urea가 분해되어 생성되는 암모니아를 지시약으로 검출한다. Urease는 기질에 의하여 유도되는 효소가 아니며, 특히 이 방법은 urea를 아주 빨리 분해하는 *Proteus* 속의 동정법으로 중요하게 이용되는 방법이다.

(사) Nitrate reduction

Nitrate 배지 (peptone 10g, potassium nitrate 1g)를 test tube에 넣고 대상균주를 접종한 후 24~48시간 배양하였다. 배양액에 detection solution (0.5%, v/v, α -naphthylamine : 0.8% sulfamic acid = 1 : 1)을 가하여 분홍·적색을 나타내는 것을 양성반응으로 결정하였다.

(아) Oxidase test

Gram negative bacteria 중에서 호기성 세균과 조건적 혐기성 세균을 구분하는데 사용하는 실험으로써 환원형의 cytochrome이 전자전달계의 최종 전자수용체인 산소의 의하여 산화되는 과정을 촉매하는 요소인 cytochrome oxidase의 활성 유무를 조사하는 방법으로 사용된다. 검정하고자 하는 균을 영양 한천 평판 배지에 접종하고 30°C에서 2일간 배양 후 95% 에탄올에 1%로 녹인 α -naphthol과 새로 만든 1% dimethyl-p-phenylenediamine oxalate solution의 1:1 혼합액을 평판 배지상의 colony에 몇 방울 가한 후 10-30초 이내에 콜로니가 짙은 청색으로 나타날 때 양성으로 간주하였다.

(자) Casein hydrolysis test

단백질 가수분해능을 조사하는 방법의 하나로써, casien이 포함 된 milk agar에 균주를 37°C에서 2일간 배양한 후 clear zone 형성 여부를 판단하였다.

(차) Gelatin liquefaction test

균체 효소인 gelatinase가 gelatin을 액화하는 능력을 시험하는 것이다. 배지는 nutrient gelatin stab 배지 (pH 6.8)를 이용하였다. Gelatin 배지에서 균주를 37°C에 배양 후 그것을 4°C냉장고에 두었다가 시험관을 기울여 보아 응고 여부를 확인하였다.

(카) Starch hydrolysis

다당류의 starch를 hydrolysis 가능여부를 조사하기 위해 starch를 함유한 배지 (peptone 5g, yeast extract 3g, soluble starch 2g, pH 7)에 선별균주를 배양 후 gram's iodine 용액을 가하였을 시 투명한 환 형성 여부를 조사하였다.

(타) API kit를 이용한 균주 동정

API kit는 biochemical test, assimilation test 그리고 fermentation test를 이용하는 동정법이다. Biochemical test는 saline용액에 시험균을 현탁하여 건조된 기질이 들어있는 kit의 cupules에 접종하여 배양 후 발색시약을 첨가하여 물질의 대사유무를 색의 변화로써 판정하는 방법이다. Assimilation test는 최소배지에 현탁한 시험균을 탄수화물이 유일한 탄소원으로 들어있는 kit의 cupules에 접종 배양한 후 시험균이 이들 당을 이용할 수 있는지 여부를 탁도 변화로써 판정하는 방법이다. 마지막으로 fermentation test는 당으로부터 산을 생산하는 pH의 변화로 판정하는 방법이다. 본 연구에서는 선별된 균주를 이용하여 제조회사의 실행방법 (Biomerieux, API manual Page 90 ~ 95)에 준하여 실시하였다. API 50CHB/E medium에 균을 접종하여 이 균액을 API 50CHB (Biomerieux) kit에 500 μ l 분주하고, 37 $^{\circ}$ C, 1 ~ 2 일 동안 배양하였다. 배양 후 관찰하면서 49종류의 당 이용도 실험 결과를 얻은 후, analytical profile index의 동정용 software를 이용하여 동정하였다.

2. 연구개발 결과

가. 항진균활성 균주의 선별

전라남도 해남군 고구마 경작지에서 채취한 황토시료를 이용하여 1차적으로 *F. oxysporum*에 대해 항진균활성을 보이는 균주 14종을 우선적으로 분리하였으며 분리된 14종의 균주들을 No. 1 ~ 14으로 표시하였다. 14종의 균주들을 이용하여 2차적으로 *F. oxysporum* 한 종의 식물병원성 진균만이 아닌 다수의 식물병원성 진균에서 항진균활성 여부 확인하기 위하여 농업유전자원정보센터 (KACC)에서 분양 받은 5종 중 *F. oxysporum*을 제외한 식물병원성 진균 *C. gloeosporioides*, *P. capsici*, *S. sclerotiorum* 그리고 *B. cinerea*를 이용하여 항진균 활성을 확인하였다 (그림 10.1). 그 결과 최종적으로 분리된 총 14종의 균주들 중 A) *B. cinerea*에서는 No. 2, 3, 4에서 항진균활성이 확인되었으며 B) *C. gloeosporioides*에서는 No. 1, 2, 3, 4, 7에서 항진균활성이 확인되었다. C) *P. capsici* 과 D) *S. sclerotiorum*에서는 No. 2에서만 항진균활성이 확인되었다. 항진균 결과에 따라 No. 2의 분리된 균주에서 5종의 식물병원성 진균 모두에서 항진균활성을 가지고 있는 있음을 확인하였으며 최종적으로 하나의 균주를 선별하여 본 연구를 진행하였다.

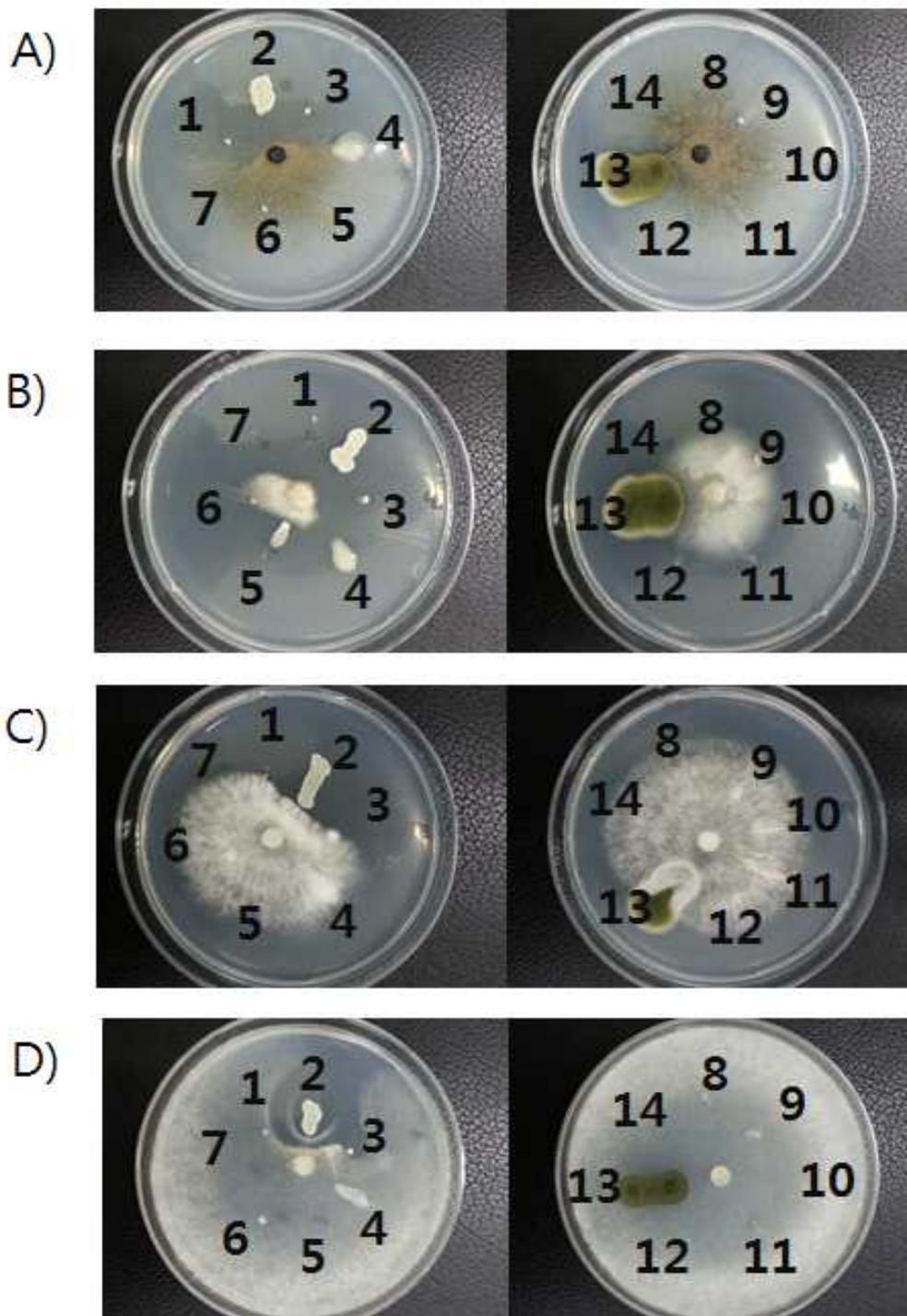


그림 10.1. 분리된 14가지 균주의 향진균활성 실험. A) *B. cinerea*, B) *C. gloeosporioides*, C) *P. capsici*, D) *S. sclerotiorum*

나. 선별된 균주를 이용한 항진균활성 확인

선별된 균주의 순수배양을 통해 균 배양액 (균체)에서의 항진균활성 여부를 확인하였다. 항진균활성 확인 결과 선별된 균주는 분양 받은 5종의 균주인 *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *P. capsici*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* 모두에서 항진균활성이 확인되었다 (그림 10.2).

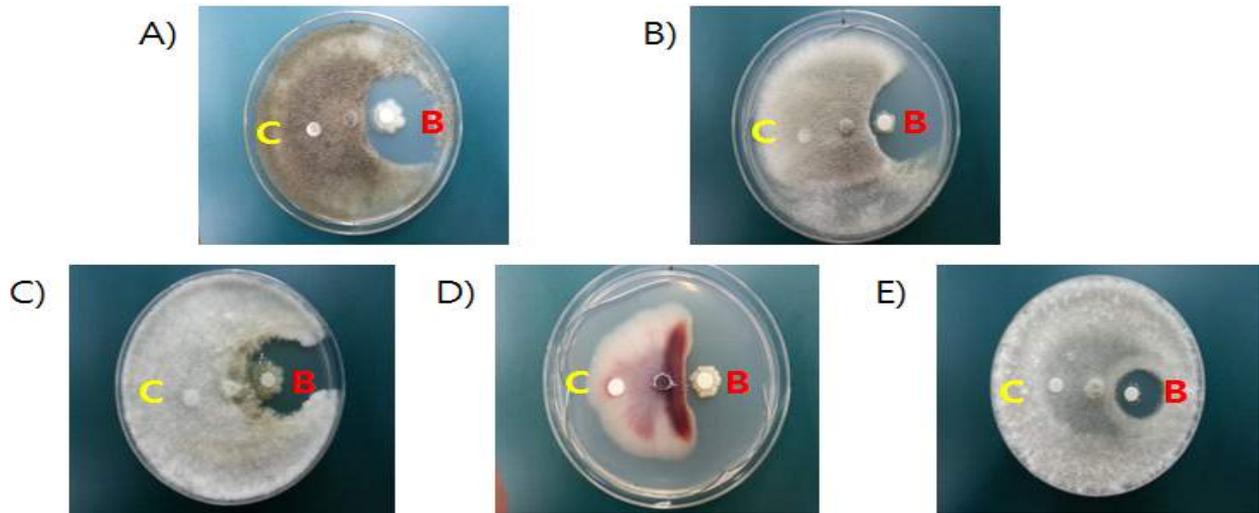


그림 10.2. 선별된 균주의 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균활성 조사. A) *B. cinerea* B) *C. gloeosporioides* C) *P. capsici* D) *F. oxysporum* E) *S. sclerotiorum* Symbol: C, control (fresh medium); B, culture broth of isolated bacteria.

다. 항진균활성이 균주의 동정

(1) 분자생물학적 특징

(가) 16S rRNA 유전자 염기서열 분석

균주의 분류는 과거 Bergey's manual을 기초로 한 형태학적, 생화학적인 특징을 이용하여 분류·동정하였지만 분류 속 (genus)내 종 (species)을 결정하기 위해서 최근에는 16S rRNA 유전자 염기서열분석 방법이 활발하게 이용되어지고 있다. 선별된 균주의 정확한 분류 동정을 하기 위해서 16S rRNA 유전자 상동성을 분석하였다. 선별된 균주 내의 16S rRNA 유전자의 보존되어 지는 부위에 해당하는 primer {27F-16S Forward (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3')와 1492R-16S Reverse (5'-GTTTACCTTGTTACGACTT-3')}를 제작하여 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 수행한 결과 1,448bp의 DNA 중합절편을 얻었다. 이 결과를 Solgent Co., Ltd.에 의뢰하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 얻을 수 있었다 (그림 10.3). 얻어진 유전자 염기서열은

NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 BLAST program을 이용하여 유전자 상동성 검색을 실시하였다. 그 결과 선별된 균주는 *Paenibacillus kribbensis* AM49 균주의 16S rRNA 유전자와 99.52 %의 유사성을 나타내었다. 또한 염기 상동성 검사결과를 가지고 계통유연성 분석 (Phylogenetic Tree Analysis) 프로그램인 MEGA 5.1을 이용하여 phylogenetic tree로 나타내었다 (그림 10.4). 본 연구에서는 선별된 균주를 *Paenibacillus kribbensis* CU01이라 하고 연구를 진행하였다.

```

CGGCGTGCTATACATGCAGTCGAGCGGGGTCATTTAGAAGCTTGCTTCTAAATGACCTAGCGGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCACAAGACAGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAA
TACCCGATACATCCTTTTCTGCATGGGAGAAGGAGGAAAGACGGAGCAATCTGTCACCTTGTTGGAT
GGGCTGCGGGCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCG
GATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTTGGGAGAGTAACTGCTCTCAAGGTGACGGTAC
CTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTG
TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGGCGCTTTTAAGTCTGGTGTTAATCCCGAGGCT
CAACTTCGGGTCGCACTGGAAACTGGAGAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTAA
CTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTTGATACCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCC
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTG
GAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTTTGATCGGTG
TAGAGATAGATCTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGCTTAGTTGCCAGCAGGTGAAGCTG
GGCACTCTAAGCAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTAACAATGGCCGGTACAACGGGAAGCGAAATCGCGAGGTG
GAGCCAATCCTAGAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGG
AATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACCGCCCG
TCACACCAGAGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCCGCAAGGGAGCCAGCCGCCGA
AGGTGGGT

```

그림 10.3. *Paenibacillus kribbensis* CU01의 16S rRNA 유전자 염기서열.

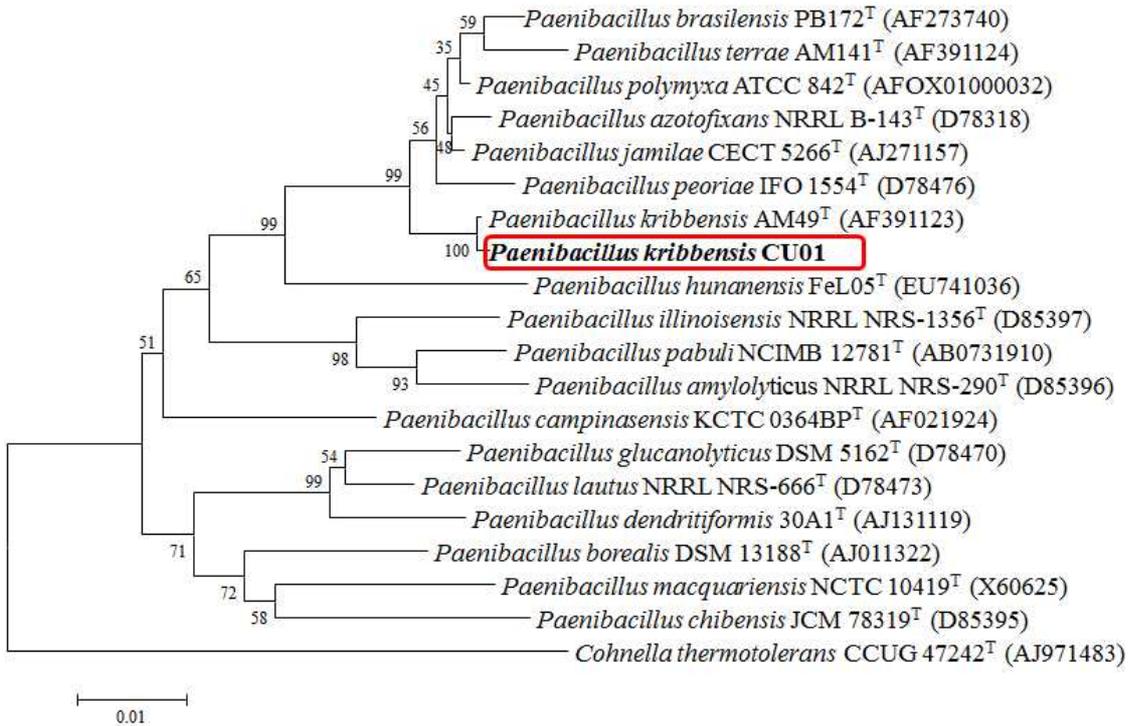


그림 10.4. *Paenibacillus kribbensis* CU01의 16S rRNA 유전자 염기서열에 기초한 계통발생 분석.

(2) 생리·생화학적 특징

(가) 선별된 균주의 동정 및 특징

선별 균주의 Gram 염색을 한 결과 선별균주는 gram(+), 주사전자현미경을 이용하여 미세형태를 관찰한 결과 균체의 폭과 길이는 1.2 x 5.0 μ m의 막대균이었다 (그림 10.5). 내생포자를 형성하였다. 호기 또한 혐기조건에서도 생장이 가능한 조건부혐기성이었다. Nitrite 또는 nitrogen gas를 생성하였으며, 단백질과 starch, casein을 분해할 수 있었다. 하지만 urea는 분해할 수 없었으며, cytochrome oxidase에는 활성이 없었다. Manual of methods for general bacteriology에 준하여, 생화학적 특징을 통해 API 50CH Kit 로 동정하였다. 탄수화물은 단당류인 L-Arabinose, D-Cellobiose, D-Glucose, Lactose, D-mannose, Melibiose, D-Raffinose, L-Rhamnose, D-xylose, D-Trehalose, D-Mannitol, Maltose 그리고 Sucrose는 분해 가능하였지만, D-sorbitol, Adonitol은 분해 하지 못하였다 (표 10.2). 이러한 각종 생리·생화학적 특징을 통한 결과 분리균주는 *P. kribbensis* AM49의 특성과 비슷한 특성을 나타내었다.



그림 10.5. *Paenibacillus kribbensis* CU01의 전자주사현미경 사진. scale bar : 1 μ m.

표 10.2 *Paenibacillus kribbensis* CU01의 생화학적 특성. +, positive; -, negative

Characteristics	Isolate	<i>P. kribbensis</i> AM49
Cell shape	rod	rod
Cell size (μm)	1.2 x 5.0	1.3-1.8 x 4.0-7.0
Oxygen requirement	facultative anaerobic	facultative anaerobic
Endospore staining	+	+
Gram stain	+/-	+/-
Nitrate reduction	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+
Starch hydrolysis	+	+
Urea hydrolysis	-	-
Casein hydrolysis	+	+
Oxidase	-	-
Sole carbone and energy soures		
L-Arabinose	+	+
D-Cellobiose	+	+
D-Glucose	+	+
Lactose	+	+
D-Mannose	+	+
Melibiose	+	+
D-Raffinose	+	+
D-Sorbitol	-	-
L-Rhamnose	+	+
D-Xylose	+	+
D-Trehalose	+	+
D-Mannitol	+	+
Adonitol	-	-
Maltose	+	+
Sucrose	+	+

제 11 절. *Paenibacillus kribbensis* CU01의 항진균활성 물질 생산 및 정제

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

Paenibacillus kribbensis CU01의 항진균활성 물질의 생산을 위하여 TSB 배지 및 M9 배지, modified M9배지를 이용하여 배양하고 배양액으로부터 상등액을 얻어 산침전법 및 유기용매 추출법등을 이용하여 항진균 활성물질을 분리하고자 하였다. 각 배양법으로 생산되고 추출된 물질은 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균활성을 검정하였다. 가장 많은 활성을 나타낸 배양법과 추출법을 이용하여 항진균활성 물질을 추출하고 추출된 물질을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 연구 흐름도는 그림 11.1과 같다.

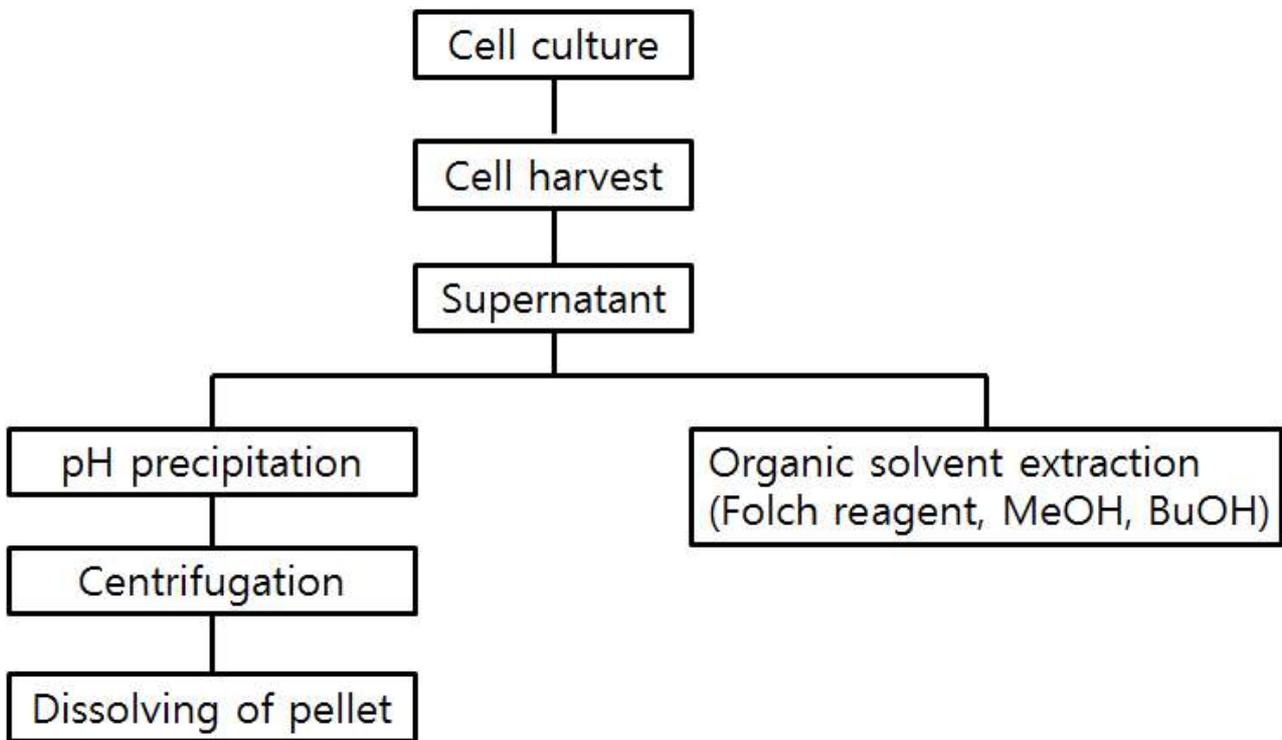


그림 11.1. *Paenibacillus kribbensis* CU01가 생산하는 항진균물질의 분리를 위한 연구 흐름도.

가. *Paenibacillus kribbensis* CU01의 액체배양

Paenibacillus kribbensis CU01의 항진균 능력을 나타내는 물질을 분리 정제하기 위하여 배양조건을 확립할 필요가 있다. 기존의 연구보고에 의하면 많은 종류의 *Paenibacillus*가 항진균 능력을 갖는 물질을 생산하며 (Beatty & Jensen, 2002; Raza *et al.*, 2008), 특히 리포펩타이드와 같은 이차 대사산물로 나오는 것으로 알려져 있다 (Finking & Marahiel, 2004, Cochrane & Vederas, 2014). 이러한 이차 대사산물의 생산은 일반적으로 복합배지 (complex)배지 보다 M9 배지와 같이 기본적인 질소원과 탄소원 및 염류로 이루어진 최소배지에서 많이 생산되는 것으로 보고되고 있다. 또한 망간이나 철과 같은 2가 양이온을 형성하는 금속원소들이 미량 첨가되면 리포펩타이드와 같은 non-ribosomal peptide (NRP)를 합성하는 non-ribosomal peptide synthase (NRPS)의 활성에 영향을 주어 생산량 증가에 많은 영향을 주는 것으로 보고 되어있다 (Kim *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2012, Gu *et al.*, 2005). 따라서 본 연구에서도 일반적으로 세균의 배양에 기본 배지로 사용되는 Luria-Beriani 액체배지 (LB) 이외에 M9 배지 및 $MnCl_2$ 를 100 μ M 첨가하여 30°C 에서 3일간 배양하였다.

나. *Paenibacillus kribbensis* CU01이 생산하는 항진균활성 물질의 추출 및 활성실험

Paenibacillus kribbensis CU01을 다양한 조건에서 200ml씩 배양하였다. 이 배양액을 5,000 x g에서 30분 동안 원심분리 후 상등액을 분리하고 상등액 내의 녹지 않고 뭉쳐져있는 mucoidal material을 따로 분리하였다. 이렇게 준비된 각각의 시료를 동량으로 나눈 후 하나의 시료는 산 침전법을 다른 하나의 시료는 메탄올을 이용한 유기용매 추출법을 이용하여 물질 추출을 하였다. 산 침전법은 낮은 pH에서 리포펩타이드와 같은 작은 물질들이 용매내의 수소농도에 따라 용해도가 낮아지는 방법을 이용하여 물질을 분리하는 기법이다. 본 연구에서는 100ml의 상등액에 5M HCl용액을 첨가하여 상등액의 pH를 2로 맞춘 후 10,000 x g에서 1시간 동안 원심 분리한 후, 침전물을 과량의 메탄올로 3번 녹여내고 이를 Rotatory Evaporator (Buchi)를 이용하여 건조시킨 후 1ml의 메탄올에 용해시켰다. 그리고 나머지 100ml의 상등액과 배양액에 녹지 않고 뭉쳐져 있는 mucoidal material을 각각 동일부피의 메탄올을 첨가한 후 교반기를 이용하여 300rpm으로 30분간 교반하였다. 메탄올과 혼합된 시료를 3,000 x g에서 15분간 원심분리하여 각각 상등액을 얻고 이를 Rotatory Evaporator (Buchi)를 이용하여 건조시킨 후 1ml의 메탄올에 용해시켰다. 이렇게 얻어진 시료를 *S. sclerotiorum*과 *B. cinerea*가 접종된 PDA 배지에 멸균된 10mm paper disc를 이용하여 20 μ l씩 접종하여 25°C 에서 정지배양 후 항진균 실험을 진행하였다.

다. 다양한 유기용매 추출법을 이용한 항진균활성 물질의 추출

산 침전법과 메탄올을 이용한 유기용매 추출법 실험을 통하여 *Paenibacillus kribbensis* CU01은 망간을 첨가한 최소배지에서 항진균 물질을 대량생산하며 특히 대부분의 항진균 물질은 배양액의 원심분리 후 배양액에 녹지 않고 뭉쳐져 있는 mucoidal material에 포함되어 있는 것을 확인하였다. 또한 추출방법에 있어 유기용매를 이용한 추출법이 효율적인 것을 확인하였다. 그러나 메탄올을 이용한 추출법은 배양액과 혼합되어 원심분리 과정에서 따로 분리되지 않아 추후에 농축과정에서 과량의 물을 증발하여야하므로 시간이 많이 드는 단점이 있어 이를 개선하고자 물과 혼합되지 않는 클로로포름이나 부탄올과 같은 유기용매를 이용한 추출법을 개발하고자 하였다.

이전 연구를 통하여 확인된 결과에 따라 *Paenibacillus kribbensis* CU01을 TSB 배지에 접종 후 30℃, 180rpm에서 1일간 배양된 배양액을 종균으로 하여 100uM의 MnCl₂가 첨가된 M9 배지 100ml에 1%의 농도로 접종하고 30℃, 180rpm에서 3일간 배양하였다. 이 배양액을 5,000 x g에서 30분 동안 원심분리 후 상등액 및 침전물을 버리고 상등액 내의 녹지 않고 뭉쳐져 있는 mucoidal material을 따로 분리하여 이를 실험에 사용하였다. mucoidal material을 sonicator (Branson)를 이용하여 균질화 시킨 후 500μl씩 에펜드로프 튜브에 분주하고 분주된 시료에 클로로포름, 부탄올, 메탄올, 멸균수를 각 500μl씩 첨가한 후 voltexer를 이용하여 10분간 혼합하였다. 이렇게 준비된 시료를 12,000 x g에서 10분 동안 원심분리하여 물층과 유기용매층을 각각 분리하여 에펜드로프 튜브에 담아 vaccume dryer (Hanil)를 이용하여 용매를 증발시켰다. 용매가 완전히 증발한 시료에 각각 100μl씩의 메탄올을 첨가하여 재용해시킨 샘플을 이용하여 *S. sclerotiorum*이 접종된 PDA 배지에 멸균된 10mm paper disc를 이용하여 20μl씩 접종하고 이를 25℃에서 정치 배양하여 항진균 능력을 실험하였다.

라. HPLC를 이용한 항진균활성 물질의 분리·정제 및 활성 검증

Paenibacillus kribbensis CU01이 생산한 항진균 물질의 구조 및 특성 분석을 위하여 배양액 으로부터 항진균 물질을 추출, 농축한 시료를 HPLC (Agilent, 1200series)를 이용하여 나타난 주요 fraction을 받아 동일한 부피로 농축 후 항진균활성을 측정하였다 (표 11.1).

표 11.1 *Paenibacillus kribbensis* CU01배양액 추출물의 HPLC 분석조건

Operating condition	
HPLC system	Agilent, 1200series
Column	YMC-Pack ODS-A, (4.6 × 250 mm, 5um, 120A)
Solvent	A : 10% Acetonitrile containing 0.1% TFA B : 100% Acetonitrile containing 0.1% TFA
Solvent program	0~5min : 0% of solvent B 5~45min : 0% to 100% of solvent B(linear gradient) 45~55min : 100% of solvent B
Detector	Phododiode array detector
Detection wavelength	215nm
Flow rate	1ml /min
Injection volume	20μl

마. HPLC 분석조건 최적화

250mm길이의 역상컬럼을 이용한 HPLC분석시 분석시간이 길어(55분) 다수의 시료를 분석하기에 적합하지 않고 HPLC분석 결과 부탄올을 이용한 유기용매 추출법으로 얻어진 시료의 성분이 복잡하지 않아 짧은 길이(150mm)의 컬럼을 이용한 분석을 하더라도 시료의 용출 분해능이 떨어지지 않을 것으로 예상되어 표 11.2와 같은 조건으로 HPLC 분석조건을 최적화 하였다.

표 11.2 HPLC분석 효율 최적화를 위한 HPLC 분석조건

Operating condition	
HPLC system	Agilent, 1200series
Column	ZORBAX SB-C18, (4.6 × 150mm, 5 μ m)
Solvent	A : 10% Acetonitrile containing 0.1% TFA B : 100% Acetonitrile containing 0.1% TFA
Solvent program	0~3min : 0% of solvent B 3~30min : 0% to 100% of solvent B(linear gradient) 30~35min : 100% of solvent B
Detector	Phododiode array detector
Detection wavelength	215nm
Flow rate	1ml/min
Injection volume	20 μ l

바. *Paenibacillus kribbensis* CU01 생산하는 점액성 물질의 규명

많은 종류의 세균들이 배양과정에서 상당량의 Extracellular polysaccharide (EPS)를 생산하는 것으로 보고되고 있으며 세균이 bio-film을 형성하는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Staudt, *et al.*, 2004, Flemming, *et al.*, 2000, Donlan, 2002). *Paenibacillus kribbensis* CU01의 배양액에서 나타나는 점액성 물질도 여러 면에서 EPS와 유사한 특성을 갖고 있고, 특히 항진균활성을 나타내는 물질의 대부분이 여기에 존재하는 것으로 확인되었으므로 해당 점액성물질이 정확히 무엇인지에 대한 연구가 필요하였다.

Paenibacillus kribbensis CU01 배양액을 5,000 x g에서 30분 동안 원심분리 후 점액성 물질을 포함하는 상등액을 얻은 후 동량의 에탄올을 첨가하여 혼합한 후 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 방치하였다. 이를 10,000 x g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 얻고 이를 60 $^{\circ}$ C dry-oven에 넣어 완전히 건조하여 EPS를 얻었다 (Ohno *et al.*, 2000). 그리고 점액성물질만 따로 얻어 vacume dryer로 건조한 후 1mg/ml의 농도로 물에 용해하여 페놀-황산법을 이용하여 탄수화물의 농도를

측정하였다.

얻어진 EPS의 탄수화물을 측정하기 위하여 말토오스를 이용하여 표준용액을 만들고 이를 페놀-황산법을 이용하여 검량선을 작성하고, 준비된 시료의 탄수화물 농도를 측정하였다 (Dubois *et al.*, 1956).

2. 연구개발 결과

가. 배양조건 및 추출법에 따른 항진균 활성 테스트

Paenibacillus kribbensis CU01을 다양한 배지 (LB, M9, M9 with $MnCl_2$)에 1% 접종하여 180rpm, 30°C의 조건으로 3일간 배양한 배양액을 각각 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 그런데 100uM의 $MnCl_2$ 을 첨가한 M9배지의 경우 침전되지 않고 점액성의 물질이 뭉쳐져 있는 현상이 발생하였다 (그림 11.2). 실험에는 상등액과 점액성 물질을 따로 분리하여 추출과정을 진행하였으며 최종적으로 1ml의 메탄올에 녹여 항진균활성 실험에 사용하였다. 그 결과 최대의 활성을 보인 조건은 100uM의 $MnCl_2$ 을 첨가한 M9 배지에서 자란 배양액에서 분리된 점액성 물질에서 최대의 항진균 활성이 나왔으며 pH 침전법 보다 메탄올을 이용한 유기용매 추출법을 이용한 시료가 더 강력한 항진균활성을 보였다. 즉, 최고의 항진균활성을 보인 시료는 100uM of $MnCl_2$ 을 첨가한 M9 배지에서 자란 배양액에서 분리된 점액성 물질을 메탄올으로 추출한 시료였다 (그림 11.3).

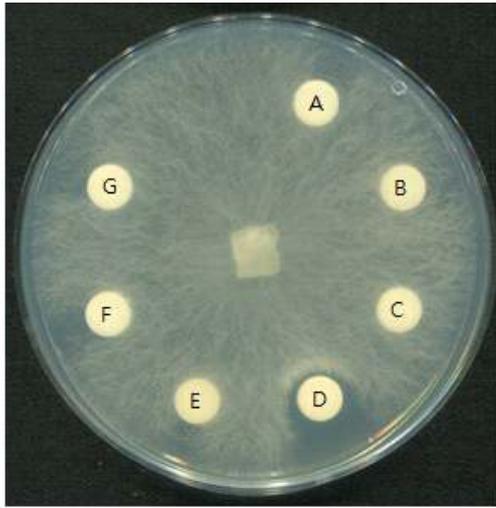


3days culture

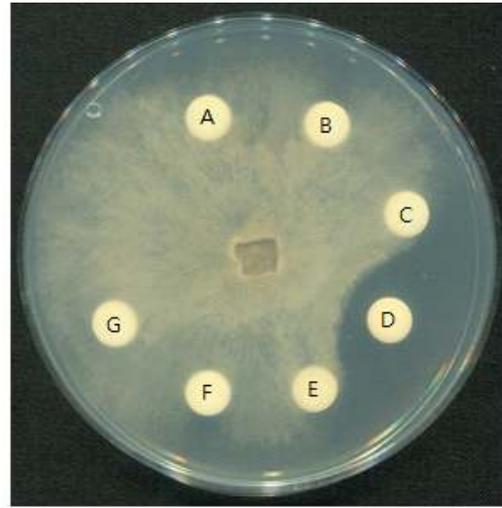


After centrifugation

그림 11.2. 100uM의 $MnCl_2$ 을 첨가한 M9 배지에서 자란 배양액의 비용해/점액성 물질.



KACC 40457 *Sclerotinia sclerotiorum*



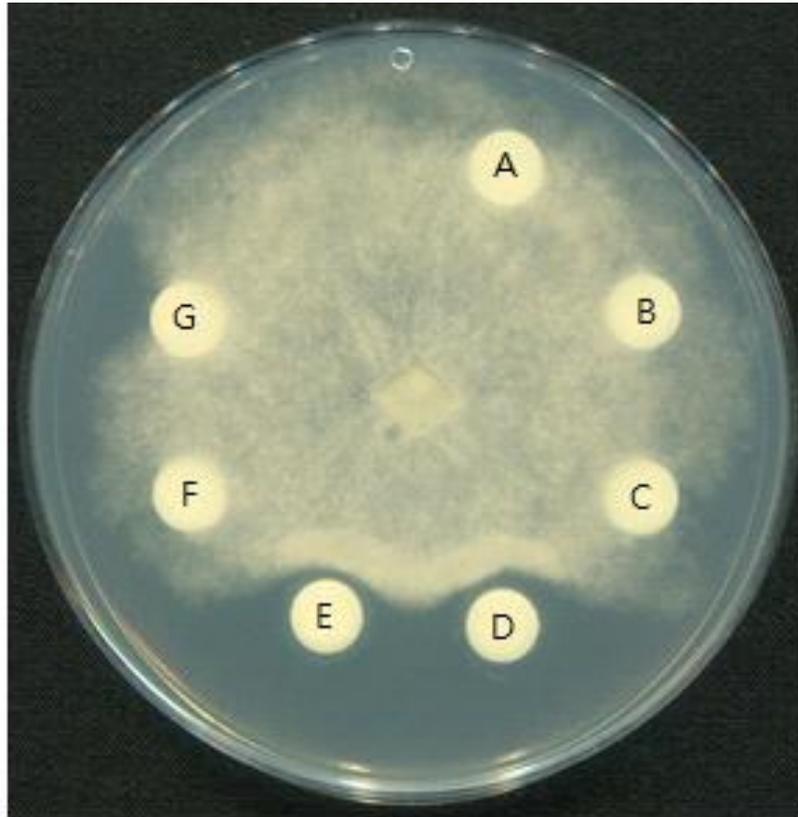
KACC 40574 *Botrytis cinerea*

- A : Control (MeOH)
 B : M9 Medium, supernatant, pH precipitation
 C : M9 with $MnCl_2$, supernatant, pH precipitation
 D : M9 with $MnCl_2$, insoluble mucoidal material, MeOH extraction
 E : LB, with $MnCl_2$, supernatant, pH precipitation
 F : LB, with $MnCl_2$, insoluble mucoidal material, MeOH extraction
 G : LB, with $MnCl_2$, insoluble material after pH precipitation, MeOH

그림 11.3. 배양조건 및 추출법에 따른 향진균활성 조사.

나. 유기용매의 종류에 따른 추출물의 향진균 활성 실험.

Paenibacillus kribbensis CU01 배양액에서 향진균 물질은 대부분 배양액에 녹지 않는 점액성의 물질에 있는 것으로 확인되고 유기용매에 의한 추출이 가능함을 확인하였으나, 사용한 유기용매가 물과 섞이는 메탄올이므로 추출 후 농축과정에서 배지내의 다른 비유효성분이 같이 추출되어 추가적인 정제과정의 어려움이 있고 다량의 물이 함유되어 있으므로 농축의 과정에서도 많은 시간과 에너지가 들게 된다. 따라서 물과 섞이지 않으면서 향진균활성 물질을 잘 추출해내는 용매의 선택이 필요하여 클로로포름, 부탄올 등의 유기용매를 이용한 추출을 통해 얻어진 추출물의 향진균활성 실험결과 부탄올로 추출한 시료가 메탄올 추출 시료와 거의 유사한 향진균 활성을 보였다 (그림 11.4).



Insoluble mucoidal material
KACC 40457 *Sclerotinia sclerotiorum*

- A : Control (MeOH)
- B : Chloroform layer of chloroform extraction
- C : Water layer of chloroform extraction
- D : Supernatant of methanol extraction
- E : Butanol layer of butanol extraction
- F : Water layer of butanol extraction
- G : Supernatant of water extraction

그림 11.4. 다양한 유기용매를 이용해 추출한 시료의 항진균활성 실험.

다. HPLC를 이용한 항진균활성 물질의 분리·정제 및 활성 검증

HPLC를 이용한 항진균활성 물질의 분리·정제를 위해 최적의 검출파장 설정을 위하여 Photodiode array detector로 210~400nm 범위의 파장을 측정된 결과, 5분경에 발생하는 시료 용매 peak를 제외하고 3~4개의 주요 peak만 나타났으며 나타난 주요 peak의 최대 흡광도가 215nm 정도 되어 이후의 HPLC 실험에서는 검출파장을 215nm로 결정하였다 (그림 11.5).

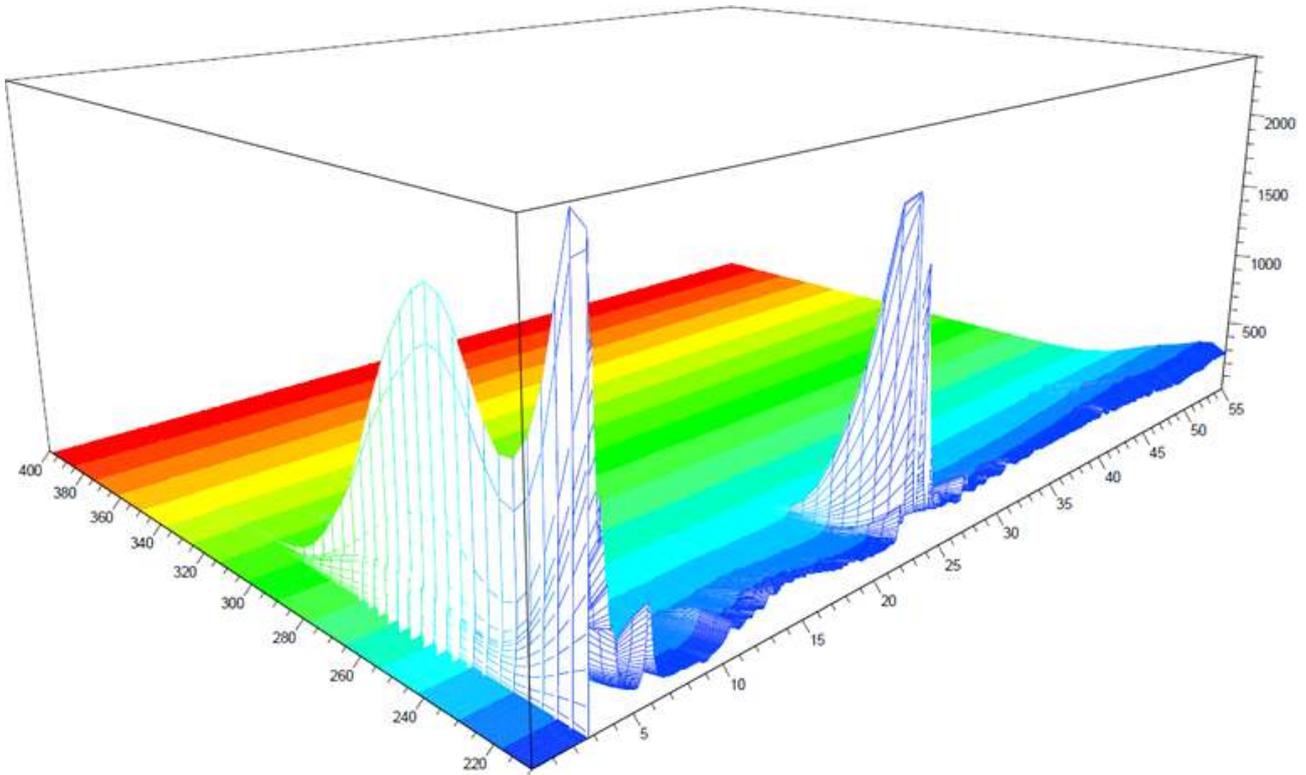


그림 11.5. 200~400nm 범위의 파장에서 측정된 HPLC profile.

HPLC 분석 결과 나타난 7개의 주요 peak를 분취하여 동일한 부피로 농축한 후 항진균활성 실험을 한 결과 22~25분 사이에 용출되는 4~6의 분취액에서 가장 높은 항진균활성이 나타났다 (그림 11.6).

가장 강력한 항진균 활성을 나타내는 4, 5번의 분취액의 정제도를 검증하기 위하여 각 분취액을 HPLC로 분석한 결과 초기 추출액의 HPLC profile에서 나타나는 용출 시간이 동일하게 나타나고 단일 peak로 형성되어 정제가 잘 되었음을 확인할 수 있었다 (그림 11.7).

더불어 *Paenibacillus kribbensis* CU01 배양액의 점액성 물질을 부탄올을 이용하여 연속 추출할 경우 각 단계별 추출물의 HPLC로 분석한 결과 1번의 추출만으로도 대부분의 (90%이상) 항진균활성 물질이 추출됨을 확인할 수 있었고, 배양액의 상등액만을 부탄올로 추출할 때에는 상대적으로 매우 소량의 항진균 물질이 검출되었다 (그림 11.8). 각 추출물의 항진균활성 조사 결과도 이와 유사한 결과를 보였다 (그림 11.9).

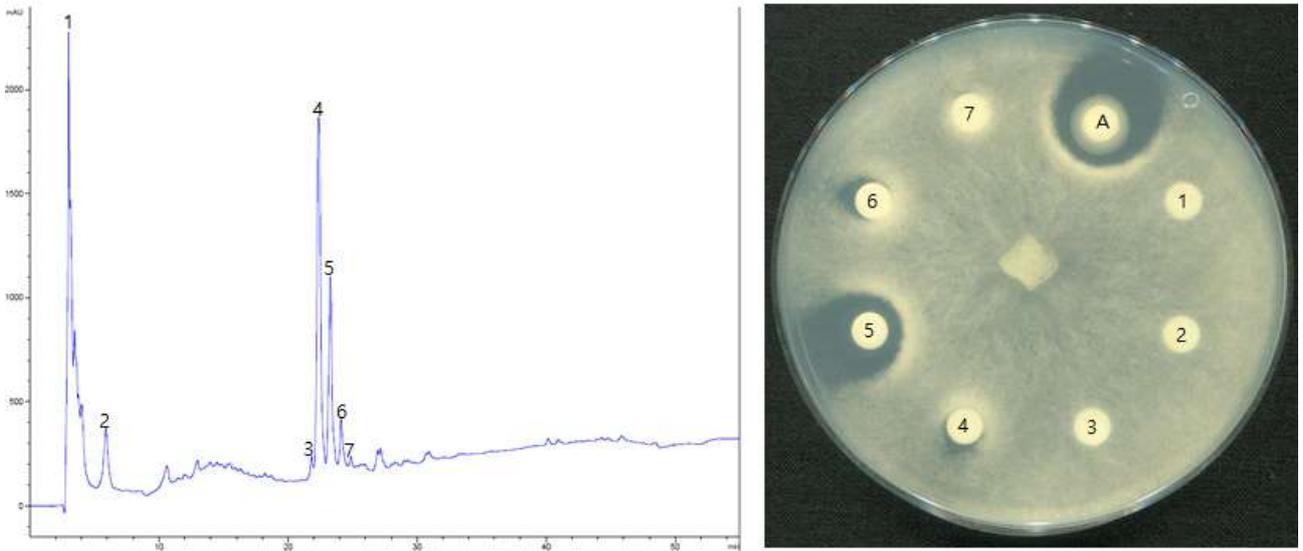


그림 11.6. 215nm에서 측정된 HPLC profile과 각 분취액의 *S. sclerotiorum* KACC 40457에 대한 항진균활성.

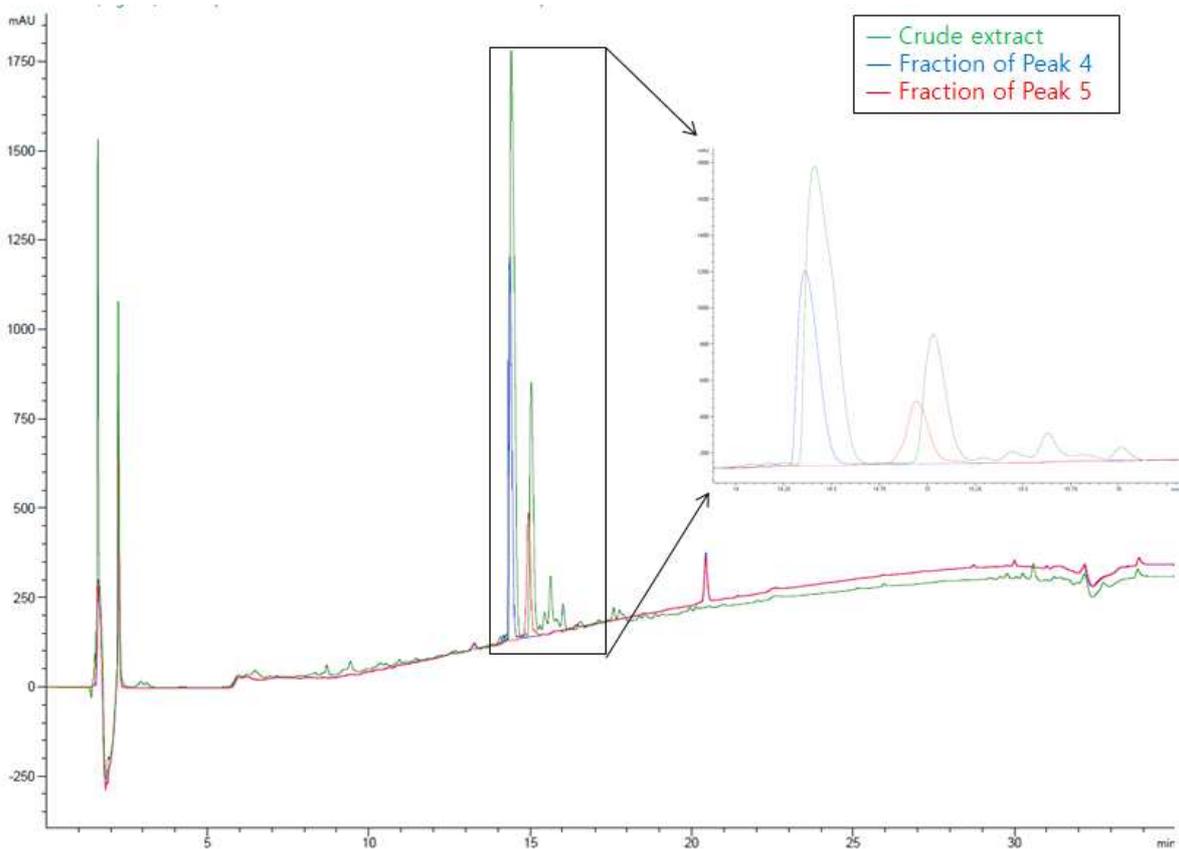


그림 11.7. 항진균활성을 갖는 4, 5번 분취액의 정제도 확인을 위한 HPLC 수행 결과.

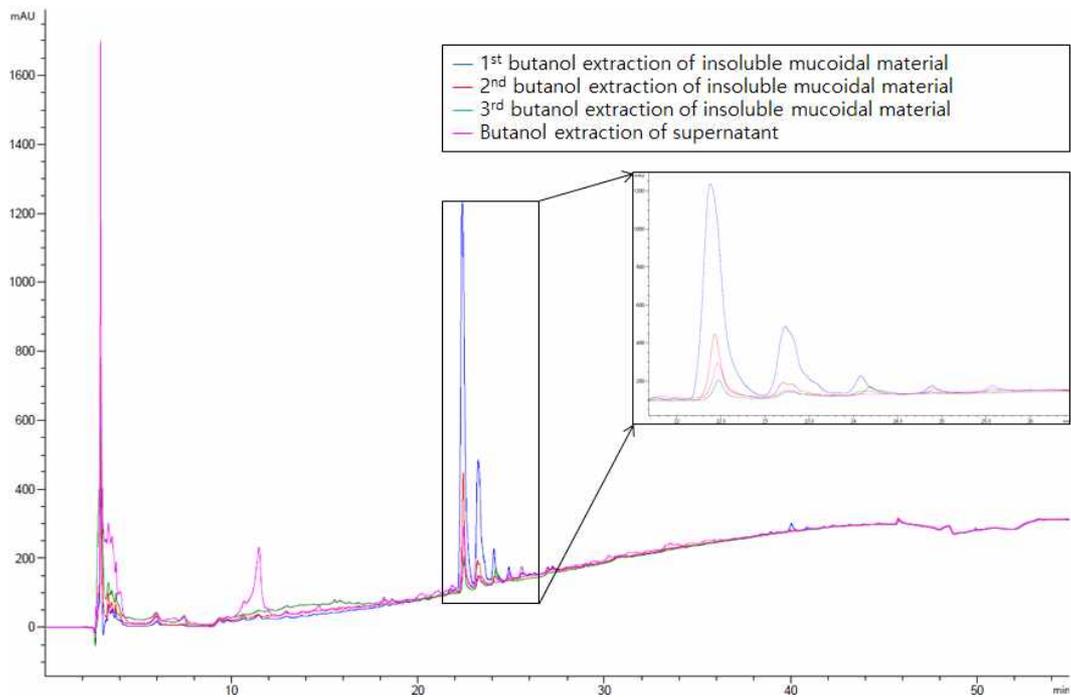
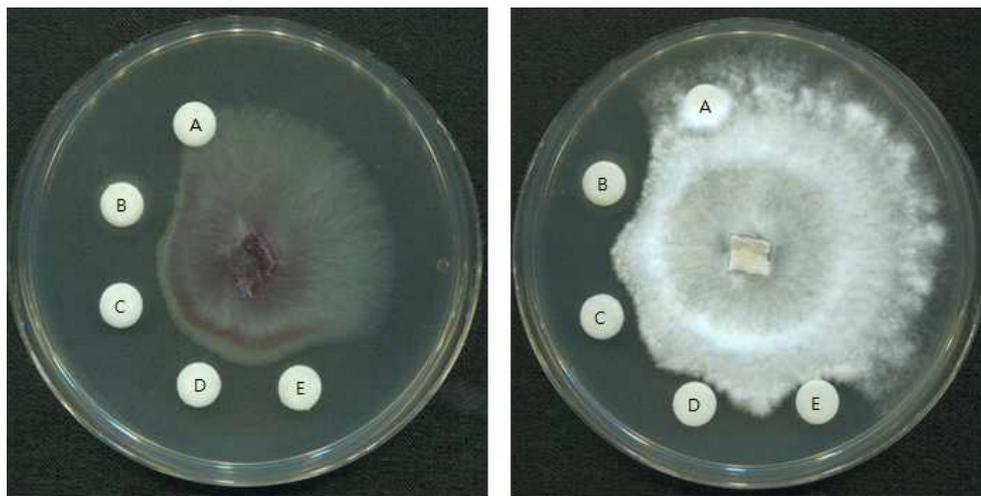


그림 11.8. 점액성 물질의 부탄올을 이용한 연속추출 및 배양 상등액의 부탄올 추출물의 HPLC 분석.



KACC 40031 *Fusarium oxysporum*

KACC 40157 *Phytophthora capsici*

- A : Control (MeOH)
- B : 1st butanol extraction of insoluble mucoidal material
- C : 2nd butanol extraction of insoluble mucoidal material
- D : 3rd butanol extraction of insoluble mucoidal material
- E : Butanol extraction of supernatant

그림 11.9. 점액성 물질의 부탄올을 이용한 연속추출 및 배양 상등액의 부탄올 추출물의 항진균 활성 실험.

라. HPLC 분석조건 최적화

분석시간 단축 및 정제효율 증가를 위한 HPLC 분석조건 최적화를 수행한 결과 분석시간을 시료당 55분에서 35분으로 줄이고 피크간 분리도 감소가 없었으며, 피크의 대칭성에도 영향을 주지 않았다 (그림 11.10).

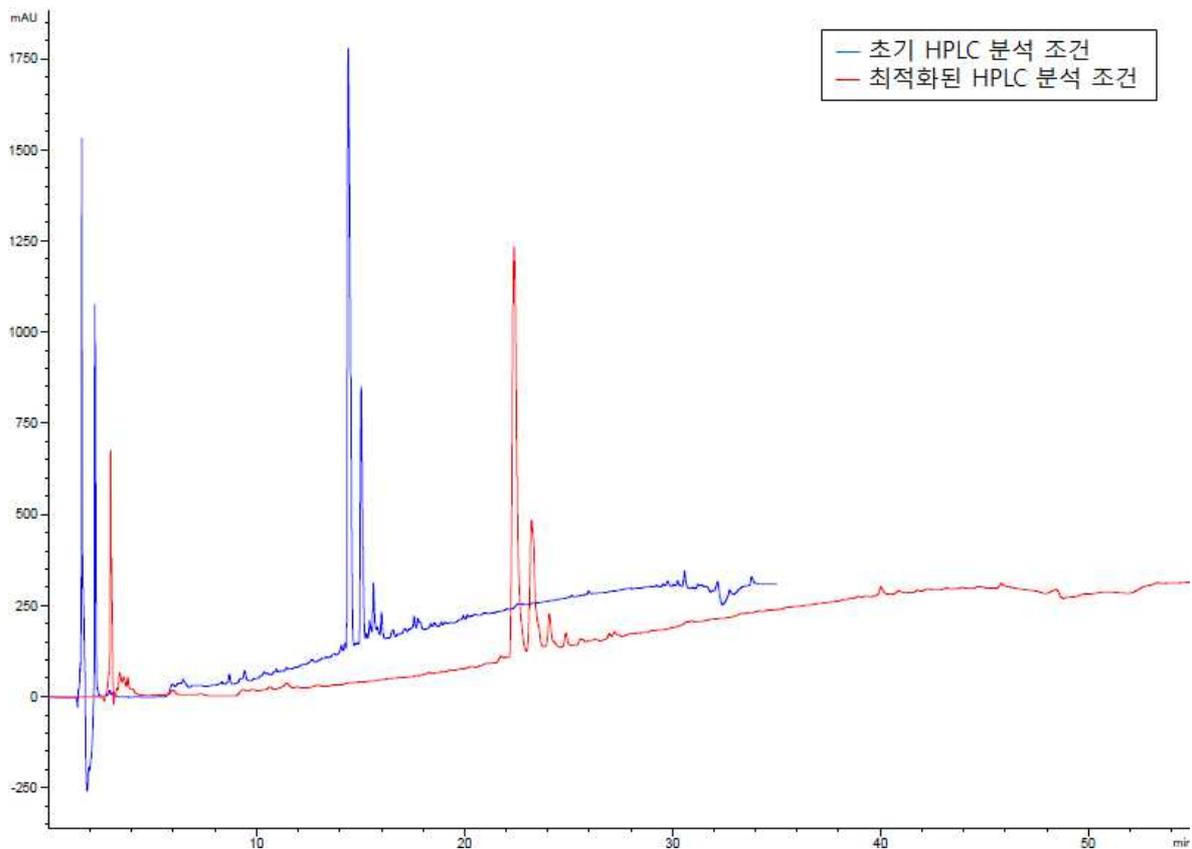


그림 11.10. HPLC 분석조건 최적화.

마. *Paenibacillus kribbensis* CU01 생산하는 점액성 물질의 규명

Paenibacillus kribbensis CU01 배양액에 존재하는 점액성 물질의 규명을 위하여 말토오스를 이용한 표준곡선 (그림 11.11)을 작성하고 망간을 첨가한 M9 배지에서 배양한 배양액으로부터 얻은 EPS의 양을 측정된 결과 배지에서는 약 70 μ g/ml의 탄수화물이 존재하는 것을 확인하였다. 1mg/ml의 농도로 만들어진 점액성 물질의 탄수화물 함량은 약 380 μ g/ml로 전체 무게의 40% 정도만 EPS로 측정되었다. 이는 나머지 중량을 차지하는 물질이 존재하는 것으로 생각할 수 있으며 일반적으로 EPS에는 단백질 및 지질, DNA, humic substance가 존재하는 것으로 알려져 있으므로 (Flemming, *et al.*, 2000, Donlan, 2002, Donlan & Costerton, 2002) 해당 물질을 확인하는 실험을 진행하여야 한다. 또한 어떤 이유에서 *Paenibacillus kribbensis* CU01가 생산하는 항진균 물질이 EPS에 결합하는지에 대한 연구도 진행되어야 한다.

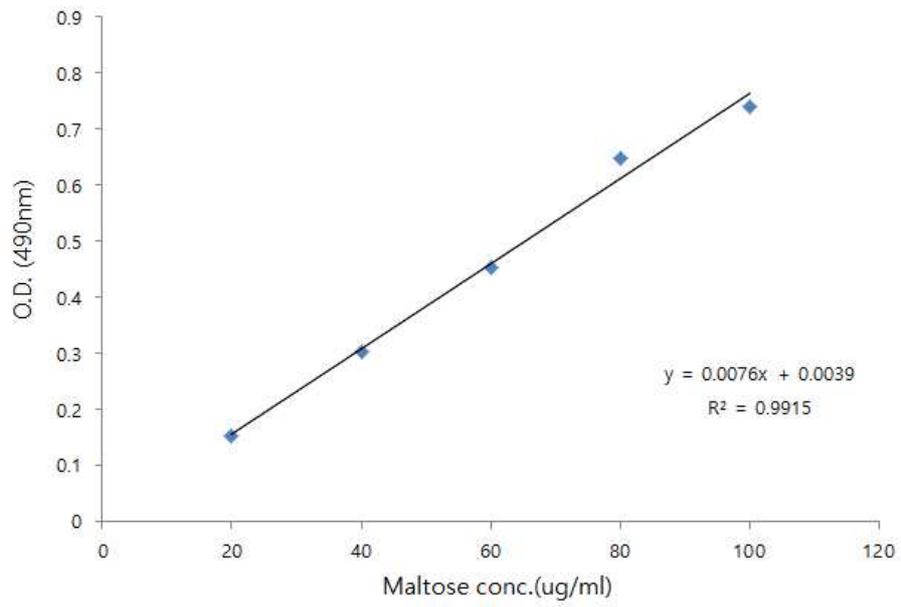


그림 11.11. 페놀-황산법으로 작성한 말토오스 표준시료의 검량선.

제 12 절. *Paenibacillus kribbensis* CU01가 생산하는 항진균활성 물질의 구조 분석

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

다양한 미생물이 생산하는 항생물질 중 lipopeptide의 구조분석에는 다양한 기기가 사용된다. 최근 들어 생물학적 시료의 강력한 구조분석기기로 Mass spectrometry가 많이 사용되고 있다 (Smyth *et al.*, 2010). 본 연구에서도 *Paenibacillus kribbensis* CU01가 생산하는 물질의 분석을 위하여 LC/MS, MALDI-TOF/TOF MS 등의 최신 기기를 이용한 구조 분석을 진행하였다.

구조분석에 사용하기 위한 시료의 준비는 다음과 같다. 먼저 *Paenibacillus kribbensis* CU01를 TSB (Tryptic soy broth)배지에서 배양된 종균을 이용하여 1%의 농도로 MnCl₂가 100uM 첨가된 M9 배지에 접종하였다. 이후 30°C, 180rpm에서 3일간 배양하여 5,000 x g에서 30분 동안 원심분리 후 배양액에 녹지 않고 멎쳐진 점액성 물질만을 수거한 후 동일 부피의 부탄올을 첨가하여 상온에서 3시간 300rpm으로 진탕하였다. 이 혼합물을 분별 깔대기에 넣은 후 3시간 방치 후 부탄올 층만을 분리하였다. 부탄올 층은 rotatory evaporator (Buchi)를 이용하여 건조시킨 후 배양액 대비 1/100 부피의 메탄올을 이용하여 3번 녹여냈다. 이와 같이 추출/농축된 시료를 HPLC를 이용하여 항진균 활성을 갖는 fraction을 분취하여 vacuum dryer로 용매를 증발시킨 후 HPLC injection volume과 동일 부피의 메탄올로 녹인 후 구조분석에 사용하였다.

가. *Paenibacillus kribbensis* CU01가 생산하는 항진균활성 물질의 LC-MS 분석

HPLC를 통해 정제된 시료를 이용하여 표 12.1의 조건으로 LC-MS 및 MS/MS 분석을 하였다.

표 10.1 LC-MS 분석조건

	Operating condition
HPLC system	Shimadzu HPLC
Mass system	AB Sciex API 2000
Column	ZORBAX SB-C18, (4.6 × 150mm, 5μm)
Solvent	A : 100% H ₂ O containing 0.05% TFA B : 100% Acetonitrile containing 0.05% TFA
solvent program	0~3min : 0% of solvent B 3~30min : 0% to 100% of solvent B(linear gradient) 30~35min : 100% of solvent B
Detector	UV detector
Detection wavelength	215nm
Flow rate	1ml /min
Injection volume	20μl
Range	200 - 1800
Polarity	Positive

LC-MS 및 LC-MS/MS 분석결과 fusaricidin 계열의 물질로 예상되었으나 fragmentation이 적절하게 이루어지지 않았다. 이는 cyclic lipopeptide의 구조적 특성 때문인 것으로 생각되어 화학적 처리를 통해 분자구조를 선형화 시키고자 하였다. fusaricidin은 lactone ring구조를 형성한다 (Kajimura & Kaneda, 1996). 이런 구조는 고농도의 염기성 용액을 처리하면 가수분해된다 (alkaline hydrolysis). 실제로 많은 종류의 cyclic lipopeptide의 구조분석을 용이하게 하기 위해 alkaline hydrolysis를 이용한다 (Deng, *et al.*, 2011, Choi, *et al.*, 2008, Kim, *et al.*, 2010). 본 연구에서는 정제된 시료 1mg을 1M KOH 용액 1ml을 처리하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 HPLC를 이용하여 다시 정제하여 사용하였다 (표 12.2).

표 12.2 Alkaline hydrolysis 이후 시료의 정제를 위한 HPLC 조건

	Operating condition
HPLC system	Agilent, 1200series
Column	ZORBAX SB-C18, (4.6 × 150mm, 5µm)
Solvent	A : 10% Acetonitrile containing 0.1% TFA B : 100% Acetonitrile containing 0.1% TFA
Solvent program	0~3min : 0% of solvent B 3~30min : 0% to 100% of solvent B(linear gradient) 30~35min : 100% of solvent B
Detector	Photodiode array detector
Detection wavelength	215nm
Flow rate	1ml/min
Injection volume	20µl

나. *Paenibacillus kribbensis* CU01가 생산하는 항진균활성 물질의 MALDI-TOF/TOF MS 분석

LC-MS/MS 분석결과 시료의 fragment 패턴이 분석에 용이하지 않아 분자구조의 확정이 어려웠다. 따라서 lipopeptide의 분석에 자주 사용되는 MALDI-TOF/TOF MS 분석을 시도하였다. 정제된 시료를 100µg/ml의 농도로 메탄올에 녹여 한국기초과학연구원 (KBSI)에 의뢰하였다. 분석조건은 표 13.3과 같다.

표 12.3 MALDI-TOF/TOF MS 분석조건

Operating condition	
Instrument	Ultraflextreme
Laser	Smartbeam2 (modified Nd:YAG laser, >1 KHz)
Matrix	CHCA(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)
MS range	500~5,000Da
Ion mode	Positive

2. 연구개발 결과

가. *Paenibacillus kribbensis* CU01가 생산하는 항진균활성 물질의 LC/MS 분석

Paenibacillus kribbensis CU01가 생산하는 항진균활성 물질의 LC-MS 분석결과 16.9분경에 용출되는 시료는 883과 897의 주요 m/z 값이 나타났다 (그림 12.1). 그리고 17.5분경에 용출되는 peak의 주요 m/z 값은 987, 911 이었다(그림 12.2)

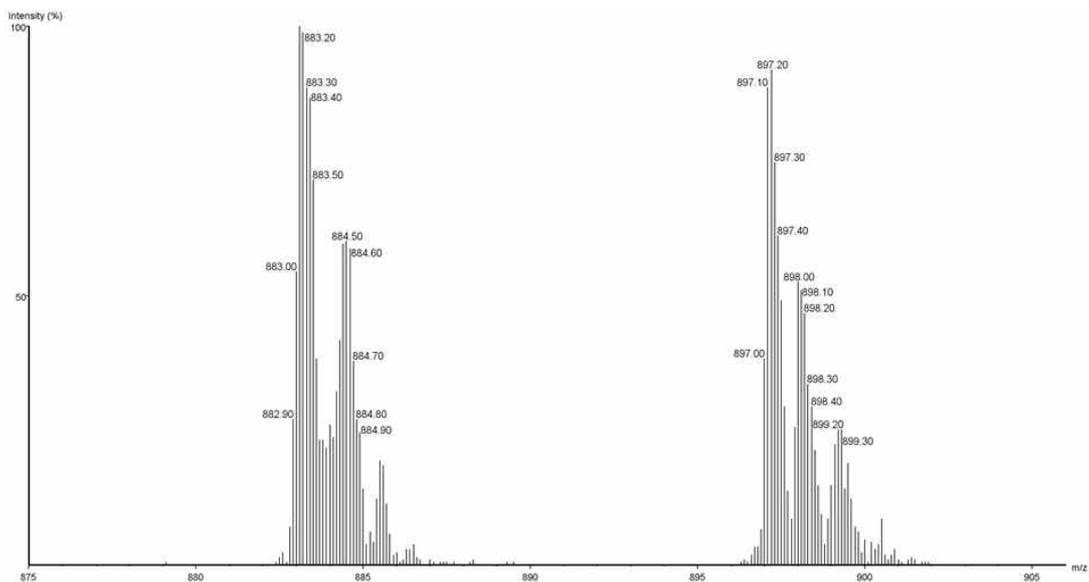


그림 12.1. 16.9min에 용출되는 peak의 LC-MS 데이터.

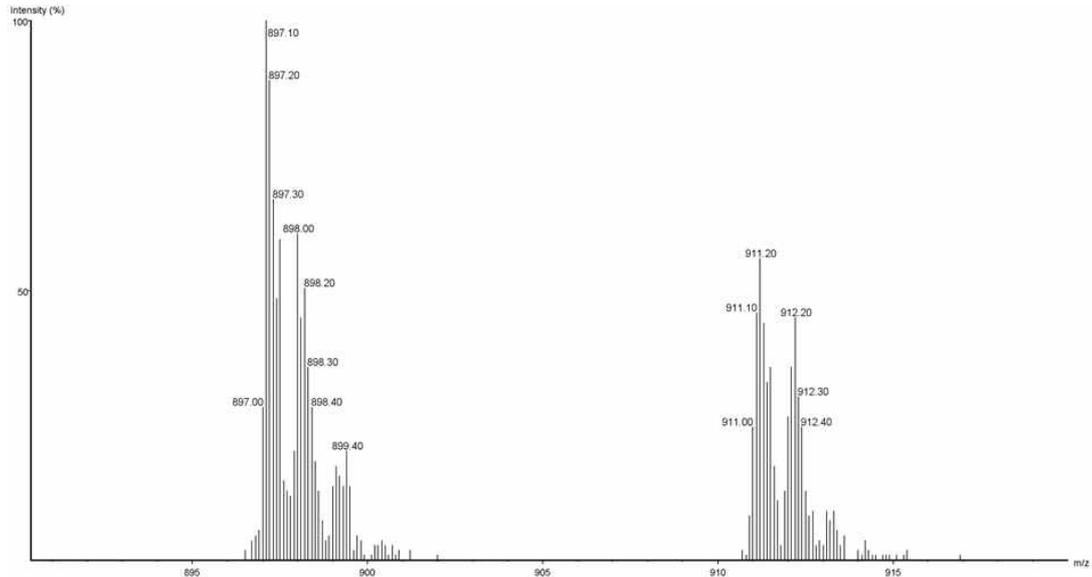


그림 12.2. 17.5min에 용출되는 peak의 LC-MS 데이터

그 결과 항진균활성이 우수한 두 시료의 m/z 는 각각 883과 897로 예상되었으며. 이와 같은 m/z 값을 갖는 물질을 찾아본 결과 fusaricidin A와 B가 $[M+H]^+$ 이 형태일 때 같은 값의 m/z 를 나타내는 것으로 확인되었다. 보다 정확한 동정을 하기 위하여 LC-MS/MS를 수행하였다 (그림 12.3, 그림 12.4). 그 결과 fusaricidin A와 B가 분해되었을 때 공통적으로 나타나는 m/z 256만 매우 높은 intensity로 나타나고 다른 fragment ion은 나타나지 않아 구조 분석에 적합하지 않았다.

구조분석에 용이하도록 alkaline hydrolysis 처리를 한 시료를 LC-MS/MS한 결과는 본래의 구조를 갖는 시료에 비하여 좀 더 다양한 fragment ion이 나타나긴 하였으나 여전히 구조 분석에 충분하지 않았다.

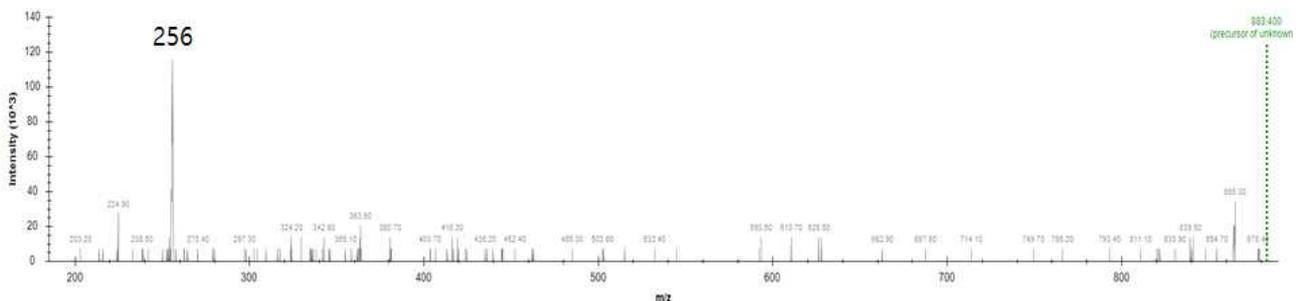


그림 12.3. m/z 883의 MS/MS 분석 결과.

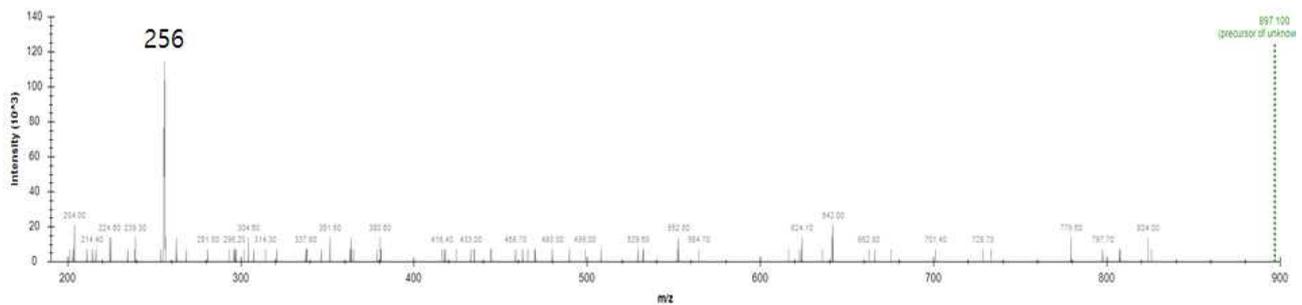


그림 12.4. m/z 883의 MS/MS 분석 결과.

나. *Paenibacillus kribbensis* CU01가 생산하는 항진균활성 물질의 MALDI-TOF/TOF MS 분석

LC-MS/MS 분석결과 fusaricidin 계열의 물질로 추정되었으나 fragment ion의 부족으로 정확한 동정이 어려웠다. 따라서 분석기기를 바꾸어 일반적으로 lipopeptide의 분석에 자주 사용되는 MALDI-TOF MS기기를 사용하기로 하고 동일한 유형의 분석기기 보유기관을 확인해본 결과 한국기초과학지원연구원 (KBSI)에서 보유 및 지원업무를 하고 있어 이 기관에 시료를 의뢰하여 분석결과를 확인하였다. 시료는 항진균활성이 높은 두 분취액을 1:1로 혼합한 시료와 이 시료를 alkaline hydrolysis 한 시료를 사용하였다.

먼저 MALDI-TOF/TOF MS의 결과 intact form의 분자들의 분자량을 확인한 결과 LC-MS의 결과와 유사하였고, 예측한 fusaricidin A와 B의 monoisotopic mass (각각 882.553833Da, 896.569519Da)와 비교한 결과 H⁺로 이온화 되었을 경우 나타날 수 있는 m/z 값에 일치하였다. 그리고 alkaline hydrolysis하여 선형화된 분자의 분자량은 18정도 증가하게 되는데 이에 해당하는 m/z 값도 예상한 값 (m/z 901.6, 915.6)과 일치하게 나타났다 (그림 12.5).

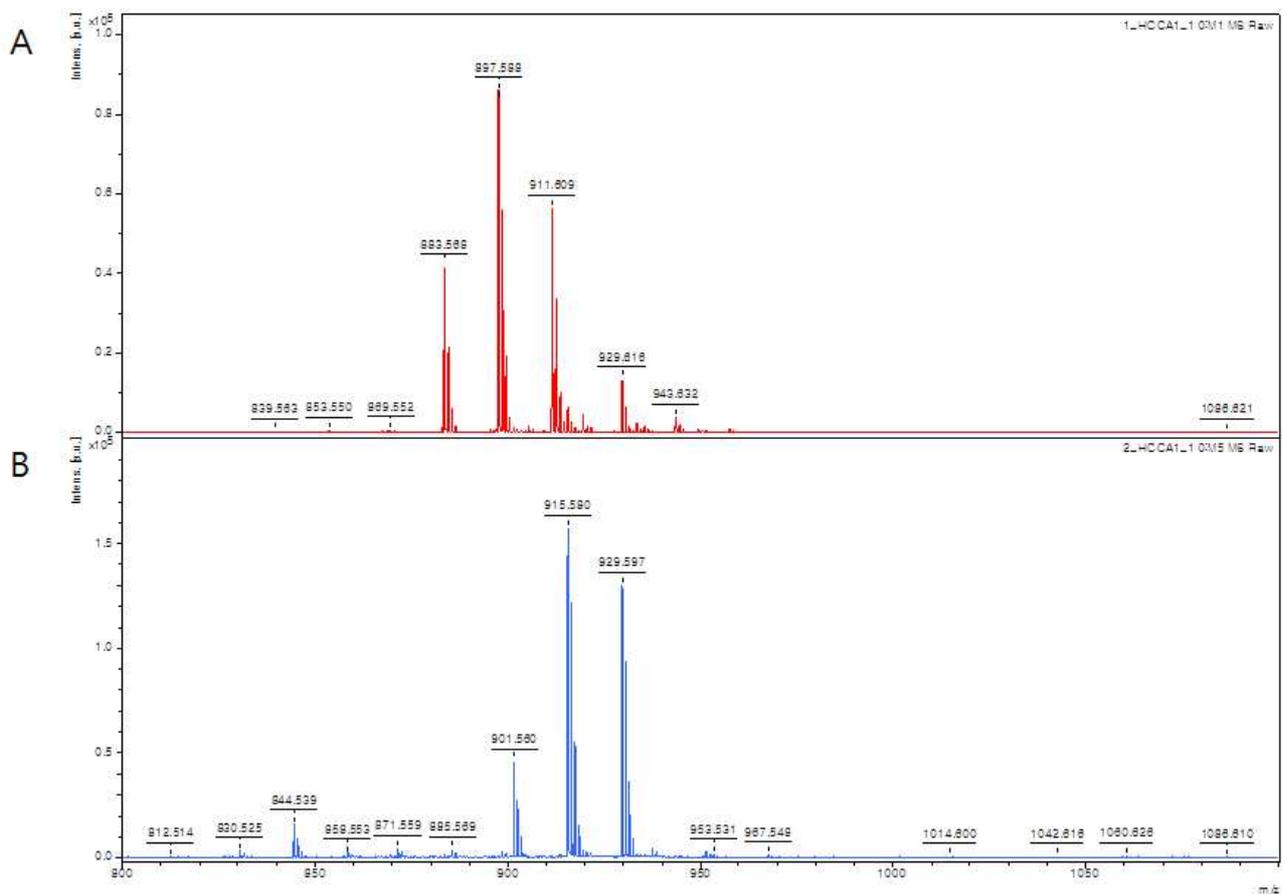


그림 12.5. MALDI-TOF/TOF MS data. A : intact form, B : after alkaline hydrolysis.

MALDI-TOF/TOF MS 데이터 분석 결과 주요 m/z 값은 intact form에서 883.6, 897.6이고 alkaline hydrolysis이후에는 901.6, 915.6이다. 이 m/z 값을 갖는 이온들을 collision-induced dissociation (CID) mode에서 MS/MS 분석하였다.

MALDI-TOF/TOF MS/MS 분석결과 intact form의 이온 (m/z 883.6, 897.6)들은 기존 LC-MS/MS에 비하여 fragmentation은 잘 일어났으나 m/z 256의 intensity가 너무 높게 나와 분석이 어려웠다 (그림 12.6, 그림 12.7).

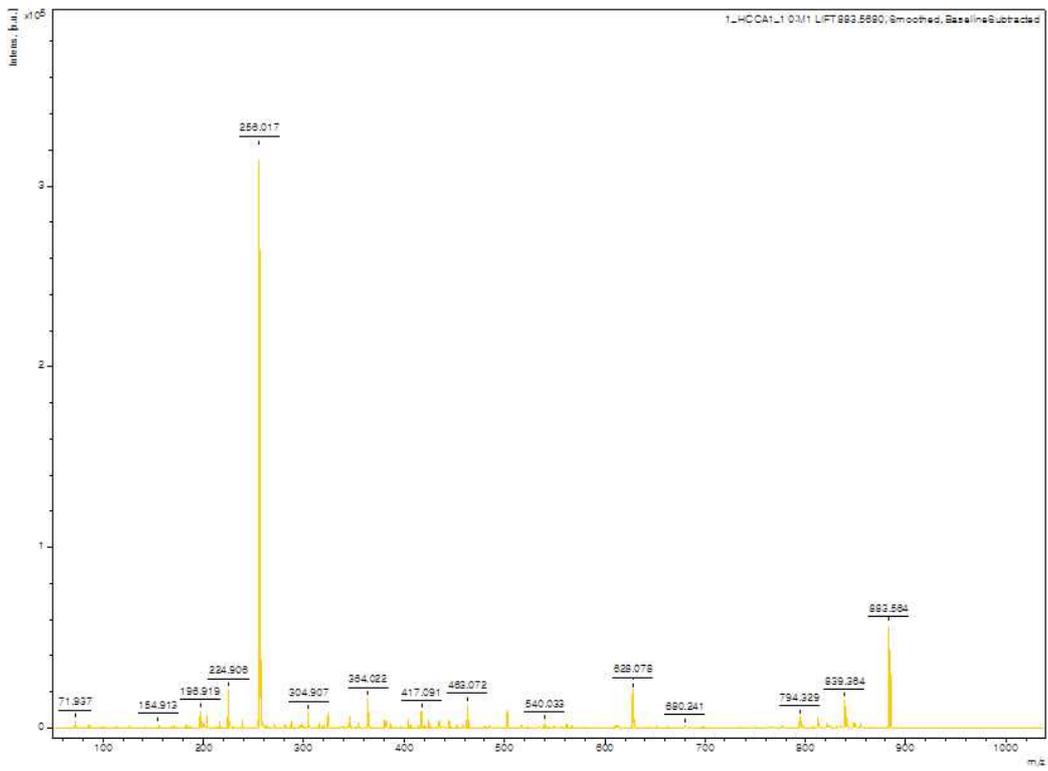


그림 12.6. m/z 883.6의 MALDI-TOF/TOF MS/MS data.

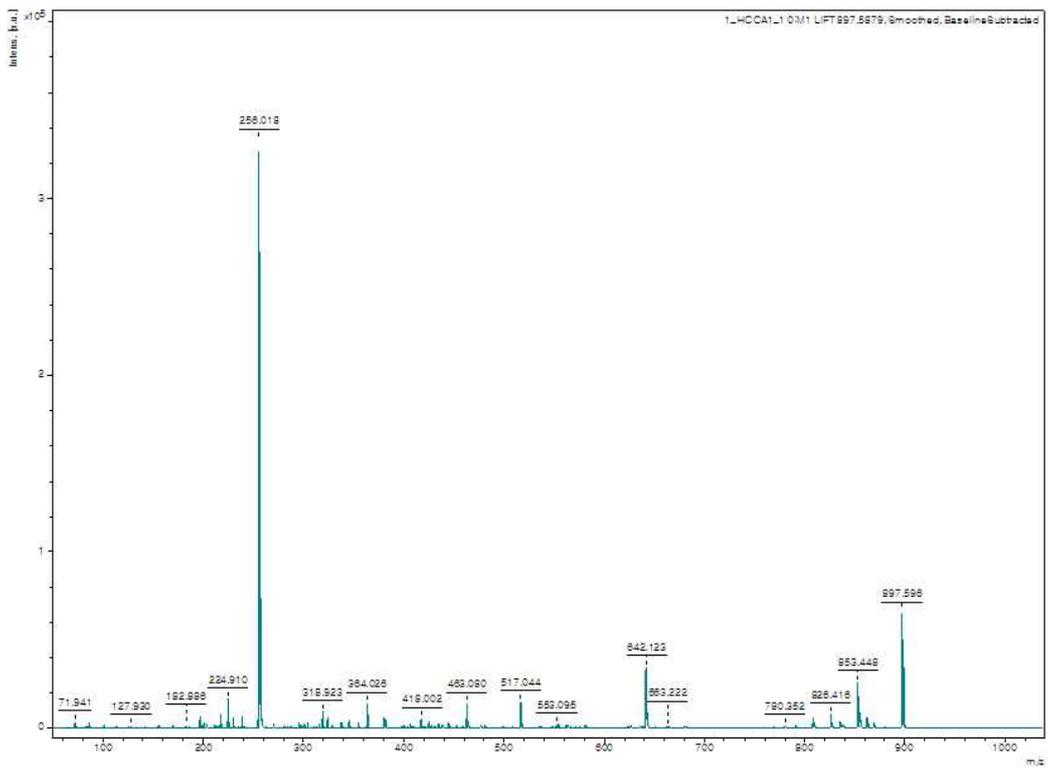


그림 12.7. m/z 897.6의 MALDI-TOF/TOF MS/MS data.

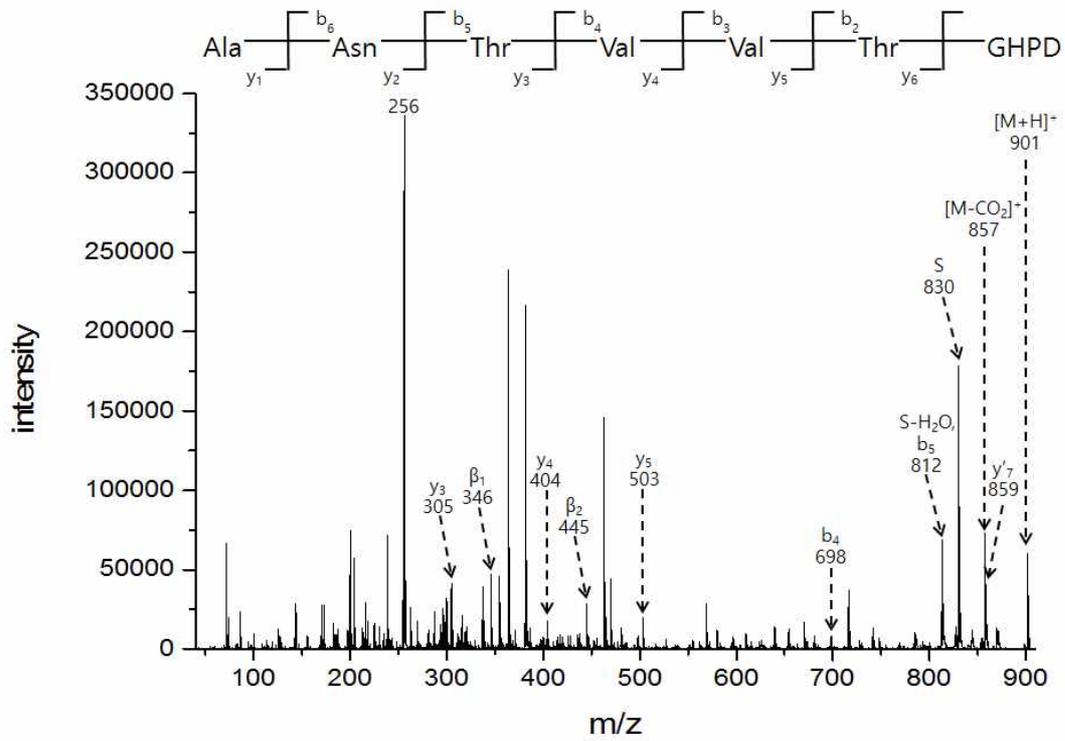


그림 12.9. m/z 901.6의 MALDI-TOF/TOF MS/MS data.

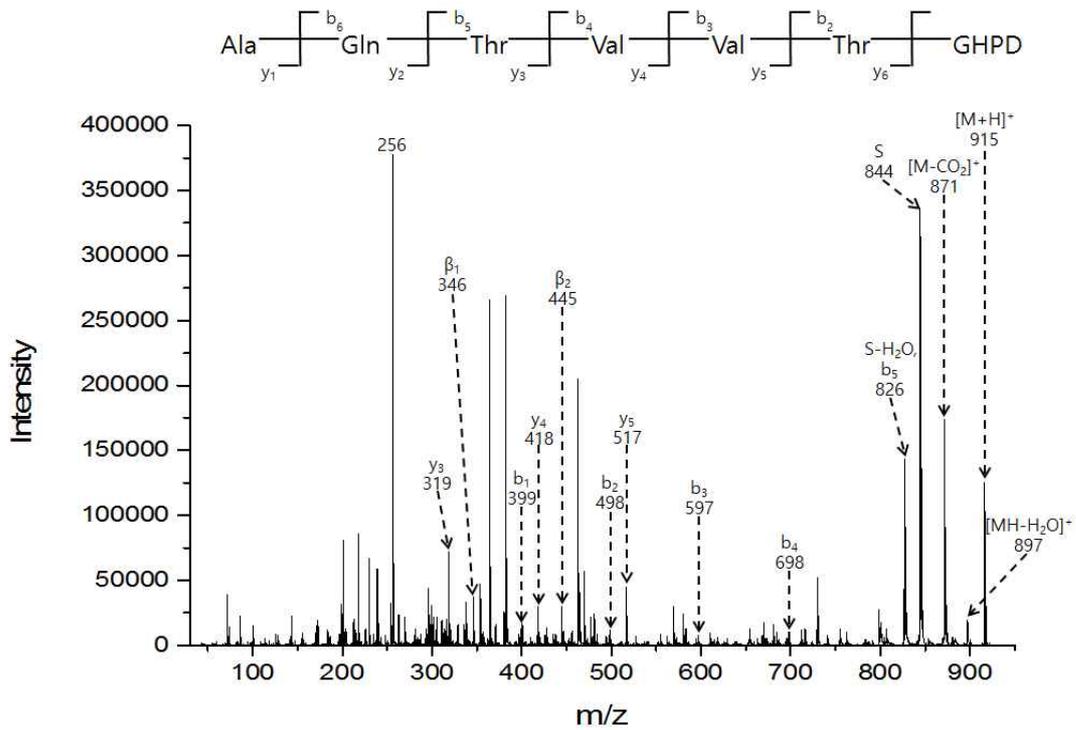


그림 12.10. m/z 901.6의 MALDI-TOF/TOF MS/MS data.

제 13 절. *Paenibacillus kribbensis* CU01이 생산하는 Fusaricidin A와 B의 최적 생산 조건 확립

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

2차 대사산물로 non-ribosomal protein synthetase (NRPS)이 합성하는 lipopeptide는 +2가 금속이온이 합성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

Paenibacillus kribbensis CU01가 생산하는 Fusaricidin A, B의 생산 최적화를 위해 먼저 각 물질의 검량선을 작성해야 한다. 상용으로 판매하는 시료가 없어 우선 Fusaricidin A와 B를 HPLC로 정제하여 사용하였다. 표준용액에 사용할 Fusaricidin A와 B의 준비과정은 다음과 같다. 먼저 *Paenibacillus kribbensis* CU01를 TSB (Tryptic soy broth)배지에서 배양된 종균을 이용하여 1%의 농도로 $MnCl_2$ 가 100 μ M 첨가된 M9 배지에 접종하였다. 이후 30°C, 180rpm에서 3일간 배양하여 5,000 x g에서 30분 동안 원심분리 후 배양액에 녹지 않고 멎쳐진 점액성 물질만을 수거한 후 동일 부피의 부탄올을 첨가하여 상온에서 3시간 300rpm으로 진탕하였다. 이 혼합물을 분별 깔대기에 넣은 후 3시간 방치 후 부탄올 층만을 분리하였다. 부탄올 층은 rotatory evaporator (Buchi)를 이용하여 건조시킨 후 배양액 대비 1/100 부피의 메탄올을 이용하여 3번 녹여냈다. 이와 같이 추출/농축된 시료를 HPLC를 이용하여 항진균활성을 갖는 fraction을 분취하여 vaccum dryer로 용매를 증발시켰다. 각 시료의 무게를 측정 후 1mg/ml의 농도로 메탄올에 용해한 표준용액을 만들어 사용하였다. 검량선은 표준용액을 희석하여 HPLC를 통해 Fusaricidin A와 B에 해당하는 peak 넓이는 측정하여 작성하였다.

가. 배지 조성에 따른 fusaricidin A, B의 생산량 변화

LB, TSB, M9 배지와 M9 배지에 각각 멸균한 $FeSO_4$, $MnCl_2$, $NiCl_2$, $ZnSO_4$, $CoCl_2$, Na_2MoO_4 를 $1 \times 10^{-4}M$, $1 \times 10^{-5}M$, $1 \times 10^{-6}M$ 첨가한 배지를 종류별로 3×10ml씩 만들고 여기에 0.1%의 *Paenibacillus kribbensis* CU01를 접종하였다. 접종 후 30°C, 180rpm에서 3일간 배양한 후, 배양액에 10ml의 부탄올을 첨가하여 3시간 동안 진탕하여 혼합하였다. 이 시료를 5,000 x g에서 30분 동안 원심분리 후 부탄올 20 μ l를 취하여 HPLC로 분석하였다 (표 13.1.).

나. 배양 시간에 따른 fusaricidin A, B의 생산량 변화

M9 배지에 멸균한 $FeSO_4$ ($1 \times 10^{-4}M$), $MnCl_2$ ($1 \times 10^{-6}M$), $NiCl_2$ ($1 \times 10^{-6}M$), $ZnSO_4$ ($1 \times 10^{-5}M$), $CoCl_2$ ($1 \times 10^{-5}M$), Na_2MoO_4 ($1 \times 10^{-5}M$)을 첨가하여 39×10ml씩 만들고 여기에 0.1%의 *Paenibacillus kribbensis* CU01를 접종하였다. 접종 후 30°C, 180rpm에서 배양하면서 12시간 단위로 3개의 배양액을 취하여 10ml의 부탄올을 첨가하고 3시간 동안 진탕하여 혼합하였다. 이 시료를 5,000 x g에서 30분 동안 원심분리 후 부탄올 20 μ l를 취하여 HPLC로 분석하였다 (표 13.1.).

표 13.1 배지 조성 및 배양 시간에 따른 fusaricidin 생산량 분석을 위한 HPLC 조건

Operating condition	
HPLC system	Agilent, 1200series
Column	ZORBAX SB-C18, (4.6 × 150mm, 5μm)
Solvent	A : 10% Acetonitrile containing 0.1% TFA B : 100% Acetonitrile containing 0.1% TFA
Solvent program	0~3min : 0% of solvent B 3~30min : 0% to 100% of solvent B(linear gradient) 30~35min : 100% of solvent B
Detector	Phododiode array detector
Detection wavelength	215nm
Flow rate	1ml/min
Injection volume	20μl

2. 연구개발 결과

배지 조성 및 배양 조건에 따른 fusaricidin A, B의 생산량을 측정을 하기 위해 검량선의 작성이 필요하였다. 먼저 정제된 fusaricidin A, B를 이용하여 표준용액을 제조하고, HPLC를 이용하여 검량선을 작성하였다(표 13.1).

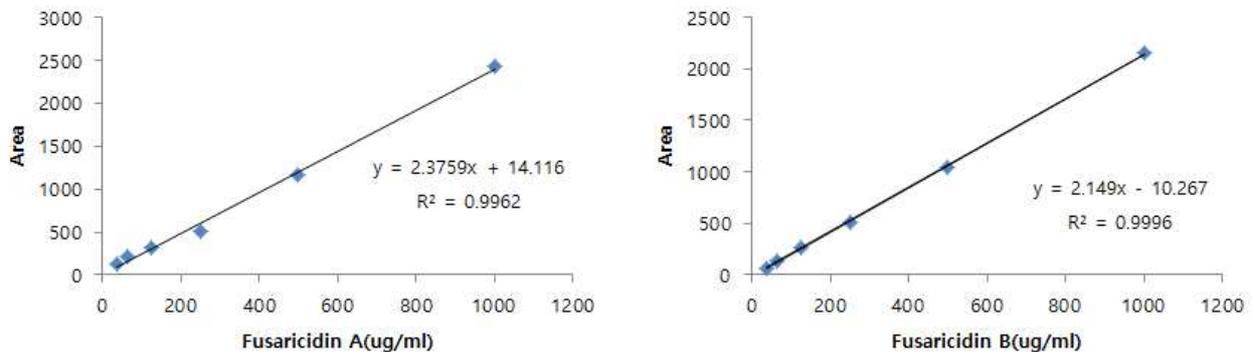


그림 13.1. Fusaricidin A, B의 검량선.

가. 배지 조성에 따른 fusaricidin A, B의 생산량 변화

배지 조성에 따른 fusaricidin A, B의 생산량 변화를 확인한 결과 LB, TSB, M9 배지에서 생산량 (0~30 μ g/ml)은 미미하였고, 금속 양이온이 포함된 화합물을 첨가하였을 경우 농도별로 생산량의 증가가 확연하게 나타났다. 첨가한 물질의 종류별로 가장 높은 생산량을 보인 농도는 다음과 같다. FeSO₄는 1 \times 10⁻⁴M에서, MnCl₂와 NiCl₂는 1 \times 10⁻⁶M에서, ZnSO₄, CoCl₂, Na₂MoO₄는 1 \times 10⁻⁵M에서 가장 높은 생산량 (60~100 μ g/ml)을 보였다 (그림 13.2).

앞선 실험 결과를 바탕으로 각 금속이온 첨가물을 조합하여 실험한 결과 개별적으로 최고 생산량을 보인 농도로 모든 금속이온을 첨가한 결과 최고의 생산량을 보였다 (그림 13.3).

개별 금속이온 첨가 시험에서 FeSO₄, MnCl₂는 최대 생산량을 보이는 첨가 농도의 최적치가 확정되지 않아 추가적으로 실험하였다. 그 결과 MnCl₂는 1 \times 10⁻⁶M에서 최대 생산량을 보이는 것으로 확인 되었으나 FeSO₄의 경우 1 \times 10⁻²M에서도 생산량 증가를 보였다 (그림 13.4). 이러한 첨가 농도에서 세균이 생존하고 2차 대사산물의 생산량이 증가하는 것은 일반적이지 않은 현상으로 실험 결과를 재검증하기 위해 추가적인 실험을 진행하였다. 실험은 FeSO₄를 고온습윤멸균 (Autoclave)과 0.2 μ m 여과지로 여과하여 시료 두 가지를 최종 첨가 농도 1 \times 10⁻¹M, 1 \times 10⁻²M, 1 \times 10⁻³M로 실험하였다. 이는 고온습윤멸균시 철 이온이 산화하여 침전하여 실제 철 이온의 농도가 낮아질 것을 고려한 것이다. 추가하여 FeCl₂를 동일 농도로 제조하여 고온습윤멸균한 시료도 실험에 사용하였다. 그 결과 FeSO₄를 제조하여 여과지로 여과한 시료를 1 \times 10⁻³M의 농도로 첨가하여 배양한 배양액이 최대의 fusaricidin 생산량 (150~250 μ g/ml)을 보였다 (그림 13.5).

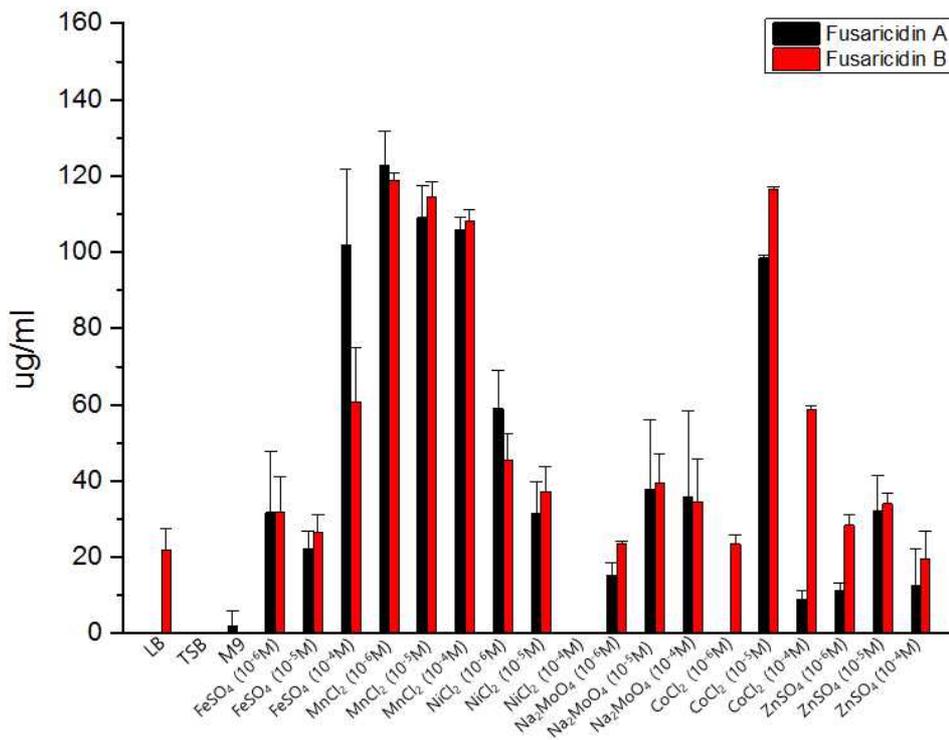


그림 13.2. 배지 종류 및 금속이온 첨가물 농도별 Fusaricidin 생산량.

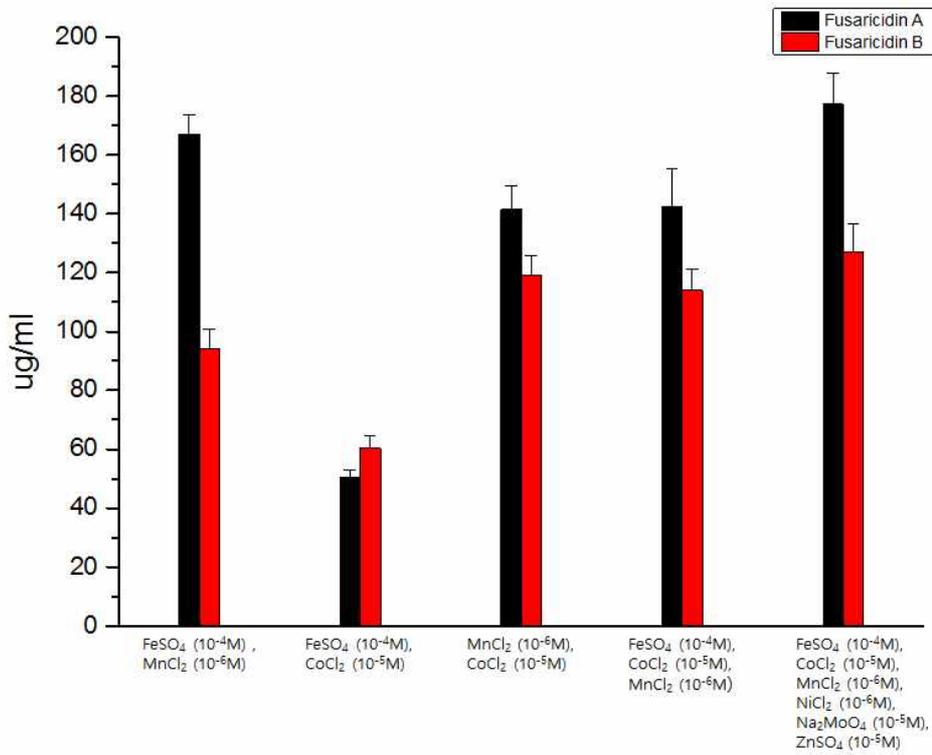


그림 13.3. 혼합된 금속이온 첨가물의 Fusaricidin 생산량.

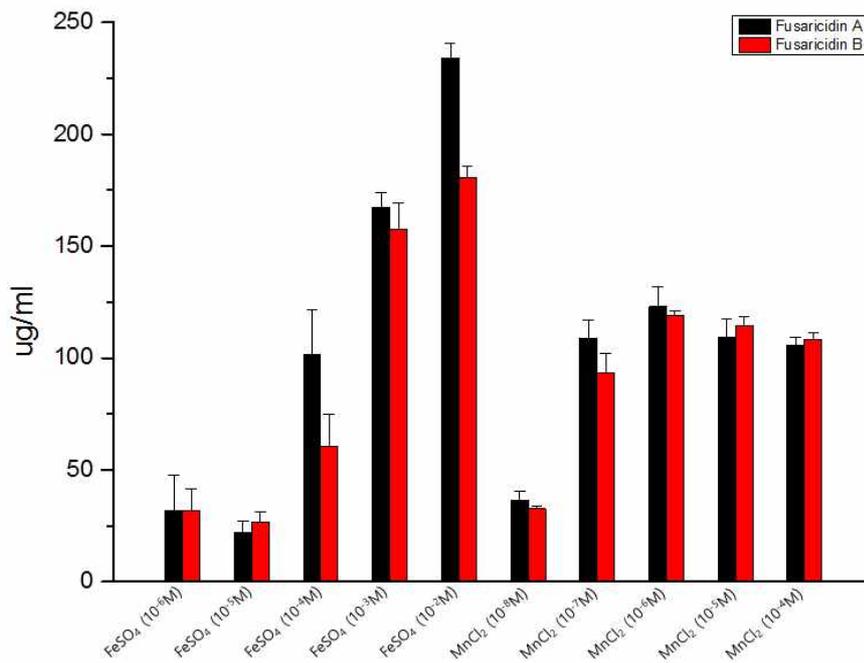


그림 13.4. FeSO₄, MnCl₂의 첨가 농도별 Fusaricidin 생산량.

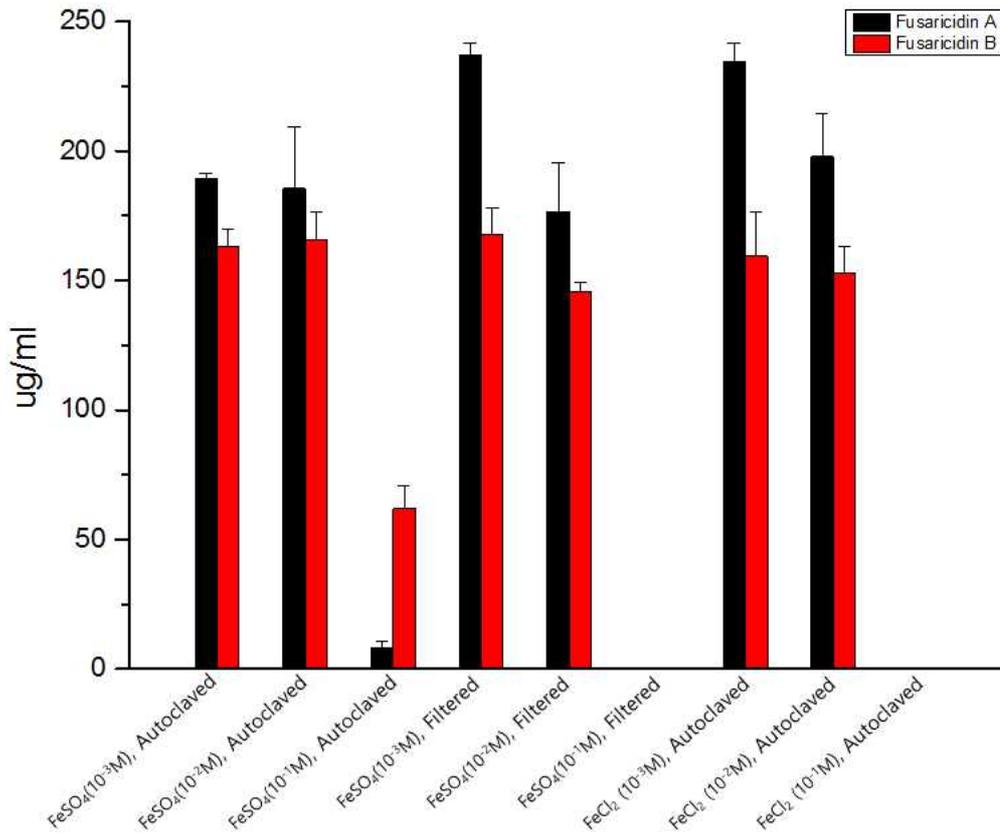


그림 13.5. FeSO₄, MnCl₂의 멸균방법 및 첨가 농도별 Fusaricidin 생산량.

나. 배양 시간에 따른 fusaricidin A, B의 생산량 변화

배양 시간에 따른 fusaricidin A, B의 생산량 변화를 측정된 결과 24시간 배양 후 최대 생산량에 도달하는 것으로 확인되었다 (그림 13.6). 이러한 결과는 비록 10ml 부피의 작은 용량에서 진행된 것 이지만 매우 빠른 시간 안에 이차대사산물의 생산속도를 증가시킨 것이다. 추가적으로 대량배양 시 배양시간 최적화와 실제 세포수와의 상관관계를 연구하여 최대 생산율 (productivity)을 나타내는 조건을 확립하는 연구가 필요하다.

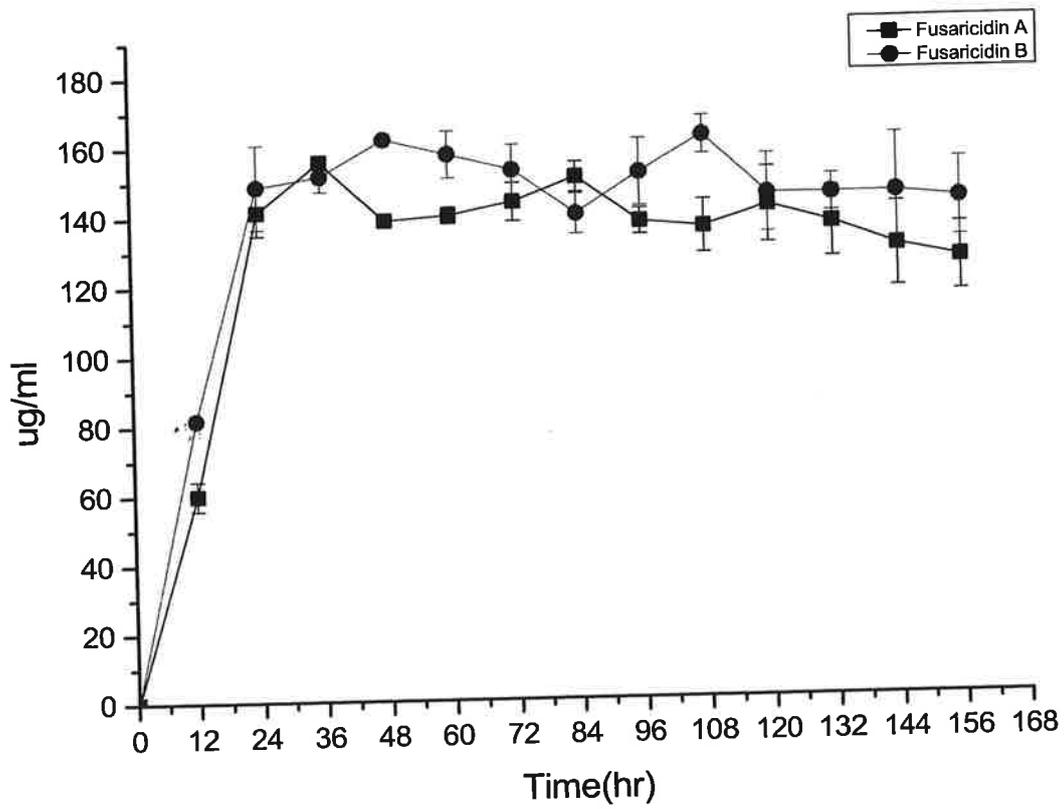


그림 13.6. 배양 시간에 따른 fusaricidin A, B의 생산량 변화.

제 14 절. *Paenibacillus kribbensis* CU01의 병 억제 (ISR) 활성 실험

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

일부 미생물들은 ISR (Induced systemic resistance) 기작에 의해 식물이 병원균에 저항하게 만드는 능력을 갖는 것으로 알려져 있다 (Gavino, *et al.*, 2000; Erwin, *et al.*, 1996; Kamoun *et al.*, 1999). 고추는 다양한 곰팡이 병원균에 의해 많은 피해를 입는 작물로 고추에 병을 일으키는 대표적인 곰팡이는 고추역병을 일으키는 *Phytophthora capsici*, 회색 곰팡이병을 일으키는 *Botrytis cineria* 등이 있다. 고추역병 유발 곰팡이인 *Phytophthora capsici*에 대한 저항성을 갖는 균주 또는 물질에 대한 연구는 보고되어 있으나 (Hausbeck, *et al.*, 2004; Hwang & Kim, 1995), 회색 곰팡이병을 일으키는 *Botrytis cineria*에 저항성을 갖는 미생물과 물질에 대해서는 보고된 연구가 없었다. 본 연구는 *Paenibacillus kribbensis* CU01의 배양액 및 추출물이 고추에 회색 곰팡이병을 일으키는 *Botrytis cineria*에 대한 방제 여부를 확인하기 위한 실험이다.

먼저 *Paenibacillus kribbensis* CU01를 TSB 배지, M9 배지 및 100uM의 $MnCl_2$ 가 첨가된 M9 배지에 동일한 조건으로 배양된 배양액과 100uM의 $MnCl_2$ 가 첨가된 M9 배지에서 배양된 배양액에서 부탄올을 이용하여 추출한 추출물을 건조한 시료를 1mg/ml의 농도로 메탄올에 녹인 시료를 각각 100배 희석하여 자란지 3주된 고추 묘목에 각각 관주하였다. 각 고추 묘목에 *Botrytis cineria*를 동량 접종하여 잿빛곰팡이병을 유도한 후 3주 동안 병 발생률을 관찰하였다.

2. 연구개발 결과

고추의 잿빛곰팡이병 방제 효능 검증 결과 *Paenibacillus kribbensis* CU01을 TSB 배지에서 배양한 배양액이 70% 이상 병 발생을 억제하는 것으로 확인 되었으며, M9 배지 및 100uM의 $MnCl_2$ 가 첨가된 M9 배지에서 배양된 배양액의 경우 20%정도 병이 감소하였다 (그림 14.1, 그림 14.2). *Paenibacillus kribbensis* CU01 배양액 추출물은 10 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때 약 50%의 병 유발 감소가 나타났다. 이러한 결과를 볼 때 fusaricidin A, B는 고추에서 ISR (Induced systemic resistance) 기작에 의해 *Botrytis cineria*의 병 발생을 억제하는 것으로 확인 되었다.

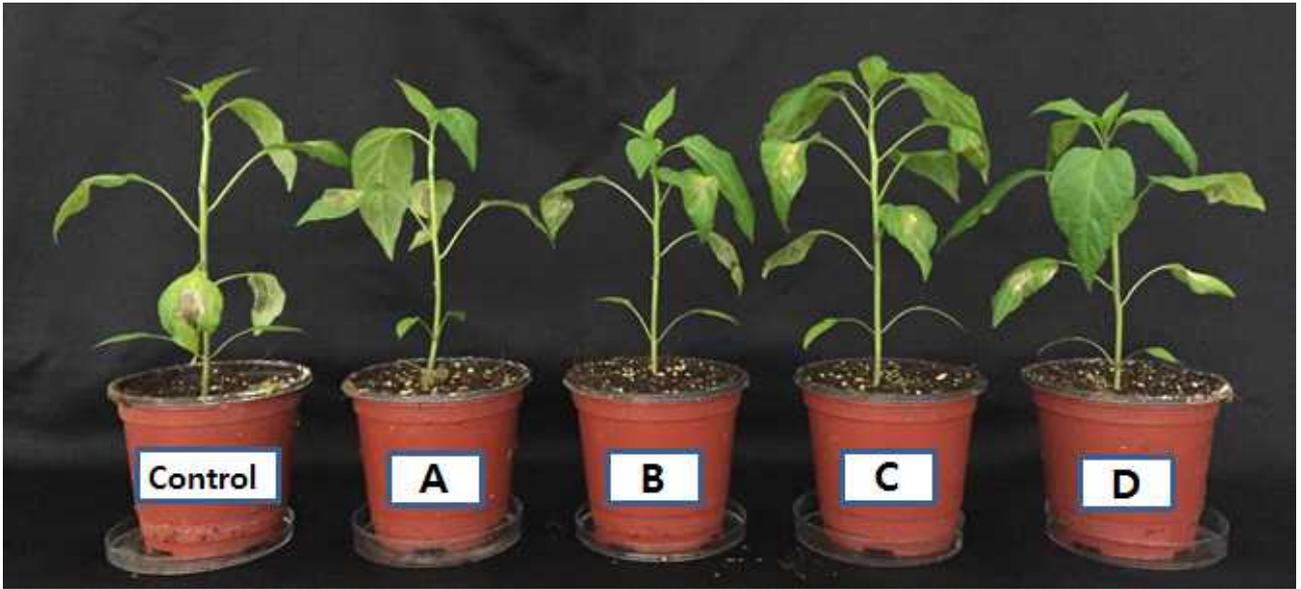


그림 14.1. 고추 잿빛곰팡이병 방제 효능 검정. Control: 관주액 무처리, A: M9 (with 100uM MnCl₂) 배양액 B: M9 배양액, C: TSB 배양액, D: 배양액 추출물 (10μg/ml).

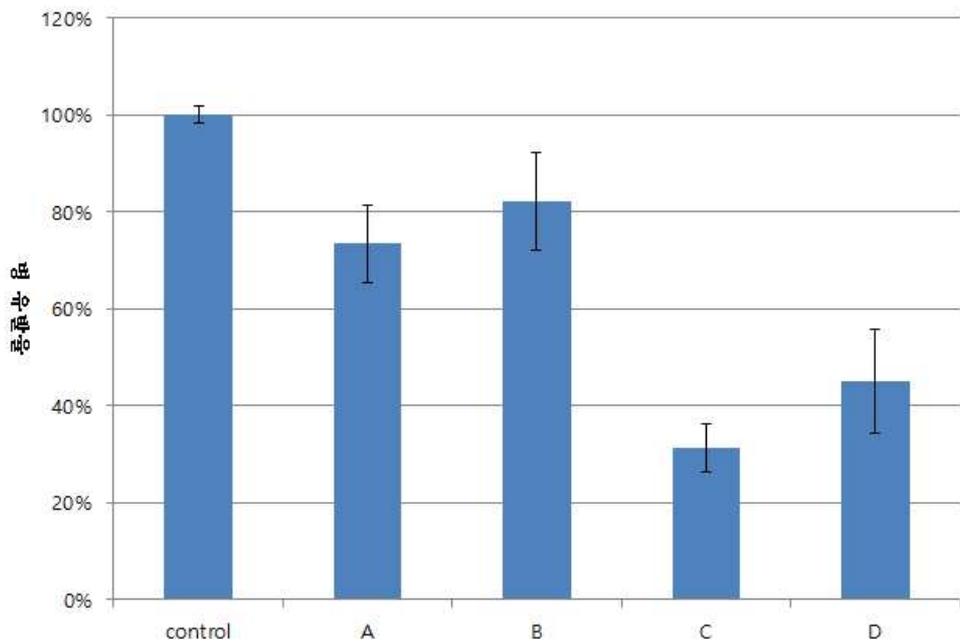


그림 14.2. 고추 잿빛곰팡이병 유발균 (*Botrytis cineria*)에 대한 병 발생 억제 검정. Control: 관주액 무처리, A: M9 (with 100uM MnCl₂) 배양액 B: M9 배양액, C: TSB 배양액, D: 배양액 추출물 (10μg/ml).

제 15 절. cyclic lipopeptide 합성법 개발

1. 연구개발 수행 및 방법

가. 인공 cyclic lipopeptide 합성 방법 개발

본 연구에서는 생리활성 물질의 대량생산 방법을 모색하기 위한 방편으로써 미생물이 생산하는 cyclic lipopeptide의 인공적인 합성법을 개발하기 위해 고체상 펩타이드 합성법 (SPPS)에 기초한 화학 합성법을 개발하였다. 대량합성법의 대상은 고리형 지질펩타이드 중의 하나인 이투린 (iturin)을 대상으로 하였다 (그림 15.1).

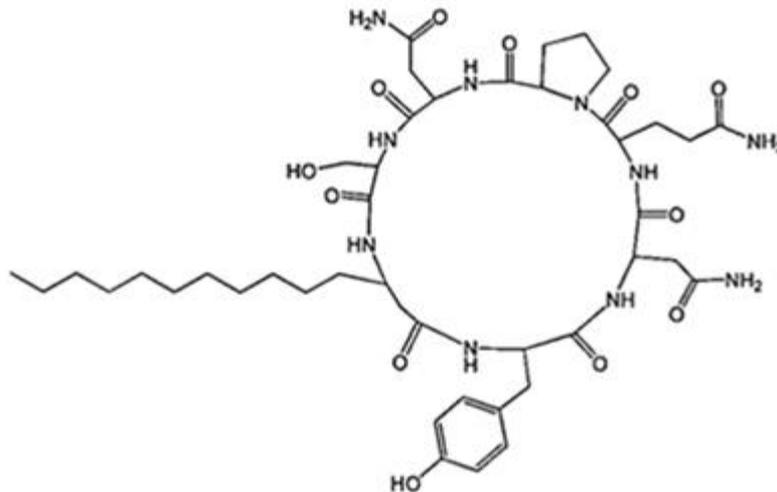


그림 15.1. 대량합성 대상 Iturin 고리형 지질 펩타이드.

즉, cyclic lipopeptide의 펩타이드 부분은 펩타이드 합성법에 의해 먼저 linear로 합성하였고 N-과 C- 말단을 연결하는 고리화 반응을 유발하는 조건을 정립할 수 있었다. 이렇게 만들어진 cyclic 펩타이드는 지질 (fatty acid) 분자를 lysine 가지에 결합시켜 cyclic lipopeptide와 유사한 (mimic) 인공 cyclic lipopeptide 합성법을 개발하게 되었다.

Cyclic peptide synthesis (고리형 펩타이드 합성)를 위해 합성에 필요한 Fmoc-아미노산을 정량하였고, Trityl resin을 사용하였다. Iturin의 염기서열은 N-Y-N-Q-P-N-S의 총 7개 아미노산이며 여기에 C말단에 K를 하나 더 붙여 합성하였다. 합성단계는 기존의 SPPS법에 따라 linear peptide를 합성시켰다. Reaction vessel에 정량된 resin을 넣고 DIC (2M), HOBT(2M)를 첨가하여 아미노산을 activation시킨 후 3시간 이상 coupling 반응시켰다. 후에 DCM과 DMF로 washing 한 후 20% Piperidine으로 Fmoc 보호기를 제거하였다. Trityl cleavage 단계에서는 2%

의 TFA를 처리하여 데시케이트에 건조시키고, Dimethyl ether로 원심 분리하여 침전시킨 후 표면적을 넓혀 증발시켰다. 다음의 cyclization 단계에서는 펩타이드의 합성 scale에 따라 DMF, DCM, 2M DIEA, 2M HoBt, 0.4M HBTu를 정량적으로 첨가한 reagent로 16시간 이상 반응 시켰다. Final cleavage test를 위해 TFA 82.5%, TIS 5%, Phenol 5%, Distilled water 5%, EDT 2.5%를 첨가한 solution을 제조하여 2시간 이상 반응시켰으며, Ethyl ether로 침전과정을 거쳐 crude peptide를 얻을 수 있었다. 얻어진 crude peptide는 LC-MS를 이용하여 순도 (purity)를 확인하였다. 이에 본 연구에서 사용된 고리형 펩타이드의 합성방법에 대한 간략한 scheme은 그림 15.2와 같다.

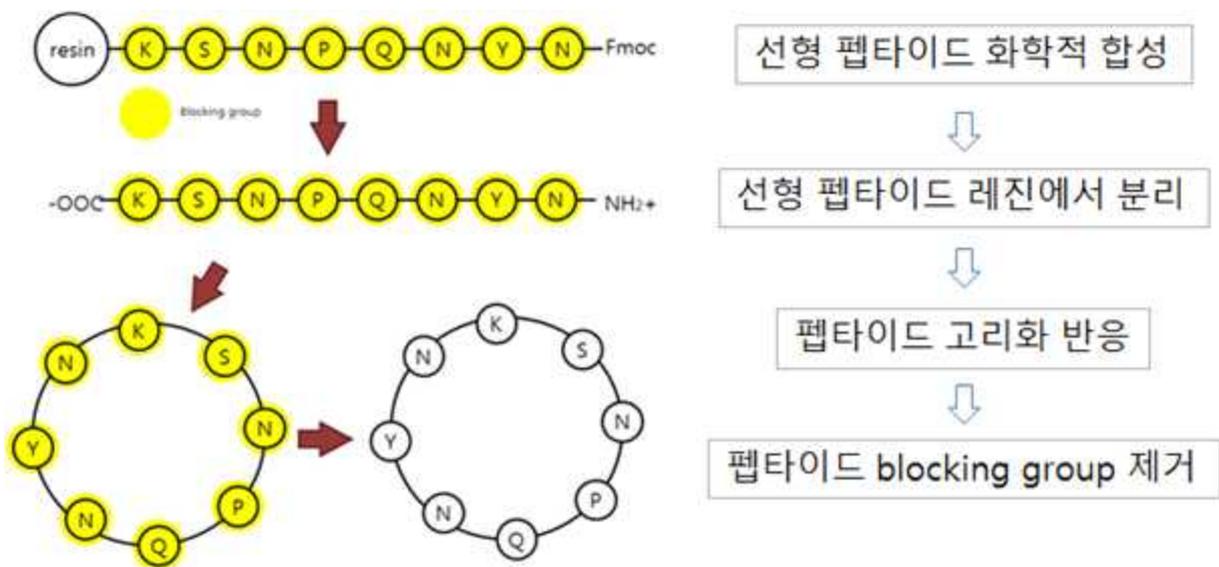


그림 15.2. 본 연구에서 사용된 고리형 펩타이드의 합성 방법.

나. 인공 cyclic lipopeptide 합성 방법 개발에 따른 LC-MS 조건 확립

얻어진 crude peptide는 25%의 ACN에 0.05% TFA가 첨가된 buffer로 녹여 15,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 0.2 μ m로 syringe filtration하였다. 이 샘플을 LC-MS를 이용하여 제대로 cyclization이 되었는지 확인하였다. 기기는 Shimadzu 10AD HPLC와 API 2000을 연결하여 shim pack C₁₈ analytical column (4.6mm \times 250mm)을 분석용 컬럼으로 사용하였다. Mass는 positive mode로 200 ~ 1800의 range *m/z* 조건하에서 시행하였다.

2. 연구개발 결과

가. 인공 cyclic lipopeptide 합성 방법 개발에 따른 LC-MS에 의한 확인

준비된 샘플은 20 μ l 주입하여 ACN을 5%에서 65%까지 30분간 농도구배를 주어 분당 1ml의 flow로 230nm의 흡광도에서 관측한 결과 기존의 linear한 peptide가 cyclization이 잘 된 것을 peak retention time (피크 머무름 시간) 및 고유의 분자량으로 확인할 수 있었다 (그림15.3). 본래의 cyclic lipopeptide의 선형 (linear) 분자량이 964 m/z 일 때 고리화 (cyclization) 되면 물 분자의 분자량 18이 빠지면서 946 m/z 이 된다(그림 15.4).

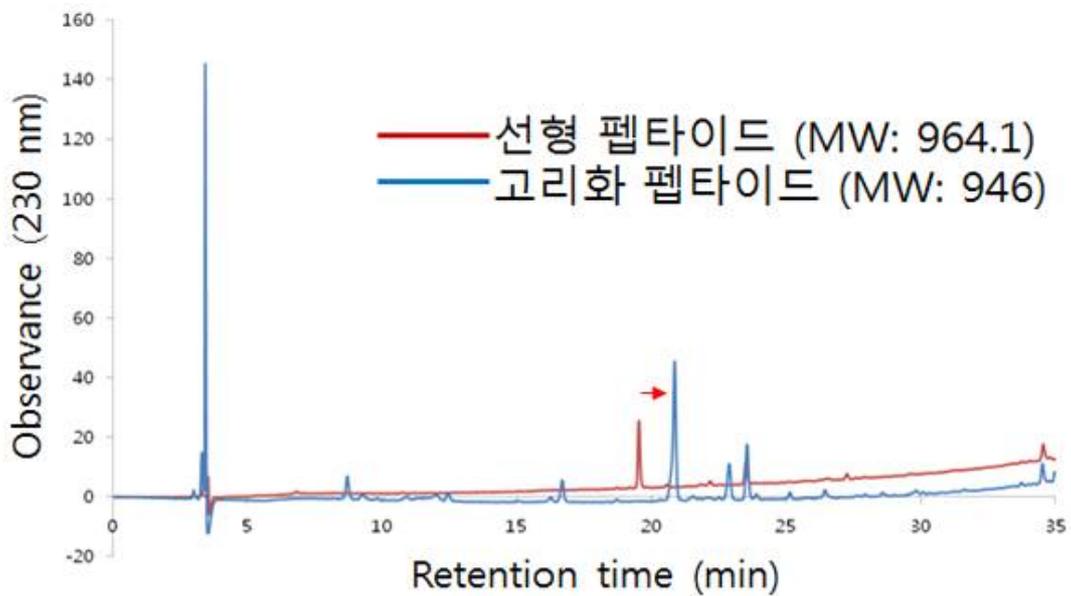


그림 15.3. HPLC 분석에 의한 고리화 펩타이드 합성 확인.

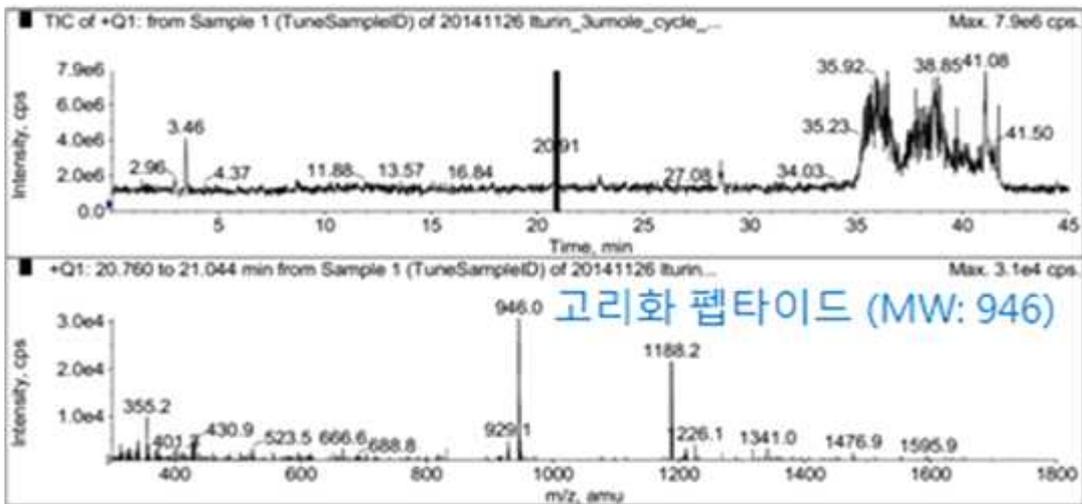


그림 15.4. LC-MS를 이용한 고리화 펩타이드 합성 확인.

제 15 절. 대량생산용 배지 최적화 및 효능 검정

1. 연구개발 수행 내용

황토에서 분리한 유용미생물들의 작물 병해충 방제를 목적으로 저비용 고효율 대량생산을 위한 배지 최적화, 발효조건 확립 및 효능 검정을 수행하였다.

가. *Paenibacillus elgii* BC34-6 대량생산용 실용화 배지 개발

항진균활성과 살충효능이 우수한 *P. elgii* BC34-6 균주를 대상으로 대량생산을 위한 실용화 배지를 개발하고자 하였다. *P. elgii* BC34-6 균주의 대량생산을 위한 최적의 탄소원과 질소원 선별을 진행하였다.

먼저 최적의 탄소원 선별을 위해 M9 최소배지에 0.5% yeast extract와 7종류 탄소원 (glucose, glycerin, sucrose, lactose, corn starch, soluble starch, chitin powder : 10g/liter)을 각각 사용하여 배양한 후 균체 성장정도 및 배양상등액의 항진균활성과 chitinase 활성을 측정하였다. 더불어 대량생산용 질소원 선별을 위해 M9 최소배지에 최적 탄소원으로 선별된 1% sucrose와 5종류의 질소원(yeast extract, tryptone, peptone, soy bean meal, ammonium sulfate : 5g/liter)을 각각 첨가하여 배양한 후 균체 성장정도 및 배양상등액의 항진균활성, chitinase 활성을 측정하였다.

균체 성장정도는 배양액의 흡광도 (OD₆₀₀)와 생균수를 측정하였으며, 배양상등액의 항진균활성 검정은 각각의 배양상등액을 병원성 곰팡이 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (시들음병), *Sclerotinia sclerotiorum* (균핵병), *Colletotrichum coccodes* (탄저병)과 평판 대치 배양을 통해 수행하였다. 또한 각각 배양상등액의 chitinase 활성은 환원당 측정법 (DNS)에 의해 조사하였다.

나. *Paenibacillus elgii* BC34-6 균주의 고추 탄저병 방제 효과 검정 (Pot assay)

고추 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*)에 대한 *Paenibacillus elgii* BC34-6의 방제효과를 검정하기 위하여 plant growth chamber에서 pot assay를 수행하였다. 최적배지에서 배양된 *P. elgii* BC34-6 배양액의 100배 희석한 시료를 5주 정도 자란 고추 묘목에 관주 처리한 후, 고추유묘 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*)을 감염시켰다. 식물 생육에 적합한 온도와 습도를 유지하면서 7일 후 탄저병 발병률을 측정하였다. 현재 시중에 유통, 판매되고 있는 탄저병 방제용 유기농 자재로 등록된 2제품(J사 제품, H사 제품)을 대조구로 사용하였다.

다. *Paenibacillus elgii* BC34-6 균주의 작물 병 방제 효과 검정 (포장시험)

선행 연구들을 통하여 작물 병 방제 활성이 우수한 *Paenibacillus elgii* BC34-6 균주의 고추 탄저병과 고추 세균성점무늬병에 대한 포장시험을 수행하였다. 실제 포장에서 작물 병에 대한 방제효과 검정을 위해 생물방제연구센터 내 온실에서 포장시험을 진행하였다. 대상 작물로 고추를 사용하였고, 온실 내 총 6구, 시설 내 토경재배로 2015년 5월에 정식하였다. 작물 병원균 고추 탄저병 (*Collectotrichum coccodes*)과 고추 세균성점무늬병 (*Xanthomonas euvesicatoria* 173-1)를 사용하였다. 시험구 배치는 각 3구씩 (무처리구 포함) 처리구를 나누었으며, 고추의 재식거리는 주당 15cm 간격으로 검은색 비닐로 멀칭하였다. 먼저, *P. elgii* BC34-6 배양액을 고추에 정착할 수 있도록 200배 희석하여 살포하였다. 병원균 접종을 위해 고추 탄저병은 포자 농도 10⁸ spore/ml, 고추 세균성점무늬병은 10⁸ cfu/ml로 준비한 후 경엽 처리하였다. 병원균 접

중 1주일 후 각각의 병 처리에 대한 병 발병률을 조사하였다.

라. Chitinase 생산 *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2 균주의 배지 최적화

저비용, 고효율의 chitinase 생산을 목적으로 *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2 균주의 배지 최적화 및 작물에 대한 배양액의 약효·약해 시험을 진행하였다. Chitinase 생산용 실용화배지 개발은 modified chitinase 생산 배지를 기본으로 최적의 탄소원과 질소원을 선발하고자 하였다. Modified chitinase 생산 배지에 4종류 탄소원 (powder chitin, colloidal chitin, glucose, soluble starch : 10g/liter)을 각각 첨가한 후 30°C, 3일 동안 배양한 후 상등액과 1% colloidal chitin을 1시간 동안 반응시켜 환원당 측정법 (DNS)으로 chitinase 활성을 측정하였으며, 대량배양 후 생균수 측정 및 내생포자 형성 여부를 관찰하였다. 또한 질소원 선발을 위해 modified chitinase 생산 배지에 5종류 질소원 (yeast extract, tryptone, peptone, soy bean meal, (NH₄)₂SO₄)을 첨가한 후 위와 동일한 방법으로 수행하였다.

마. Chitinase 생산 *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2 균주의 작물 병 방제 효과 검정 (Pot assay)

대량생산용 최적배지에서 배양된 *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2 균주의 배양액을 사용하여 고추 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*)에 대한 방제 효능을 조사하였다. 대조구로는 상용화배지 TSB (tryptic soy broth)에서 배양된 *P. chitinolyticus* 35-2 배양액을 사용하였다. *P. chitinolyticus* 35-2 균주의 배양액을 각각 200배, 500배 희석하여 5주 정도 성장한 고추 묘목에 미리 관주 처리한 후 고추 탄저병균을 감염시켜 1주일 동안 관찰하면서 병 발생 여부를 판단하였다. 미생물제제를 처리하지 않은 무처리구의 경우, 1주일 경과 후 병징이 나타나면서 감염률이 약 70% 이상을 보여 인위적인 병 발생이 원활하게 이루어졌음을 확인하였다. 또한 *P. chitinolyticus* 35-2 균주의 배양액을 처리한 식물체의 낙엽, 고사, 갈변 현상 등 작물에 대한 약해 여부를 추가적으로 검정하였다.

바. 작물 세균병 방제용 *Bacillus* 속 균주의 배지 최적화 및 활성 검정 (*in vitro*)

3종의 작물 세균병에 대한 항균활성이 탁월한 *Bacillus subtilis* MRS6-4, *Bacillus methylotrophicus* GM2 균주의 대량생산을 위한 최적 실용화배지 및 발효조건 개발에 있어서 최우선적으로 고려한 사항은 저비용, 고효율의 유용미생물 대량생산에 기초하였다. 균체 성장 정도는 4시간 간격으로 흡광도 (OD₆₀₀)를 측정하였으며, 최종 배양 후 내생포자 생성률은 60°C, 1시간 동안 가열한 배양액을 LB agar 배지에 도말하여 생균수 측정 방법으로 분석하였다. 또한 작물 세균병에 대한 배양상등액의 항균활성을 조사하였다. TSA (tryptic soy agar) 배지에 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* KACC11151 (콩 불마름병), *Xanthomonas euvesicatoria* 173-1 (고추 세균성점무늬병), *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* MAFF 301420 (복숭아나무 세균성구멍병)을 도말한 후 paper disk에 배양상등액 100μl를 점적하여 30°C, 1~2일 동안 배양하면서 clear zone 생성 여부를 관찰하였다.

사. *Bacillus* 속 균주들의 고추 세균병 방제 효과 검정 (Pot assay)

본 연구의 *in vitro* 조건에서 작물 세균병에 대한 항균활성이 우수한 것으로 판단된 *Bacillus subtilis* MRS6-4, *Bacillus methylotrophicus* GM2 균주들의 pot assay를 통한 고추 세균성점무늬병 (*Xanthomonas euvesicatoria* 173-1) 방제 효과를 조사하였다. 대량생산용 최적배지에서 배양된 *Bacillus* 속 균주의 200배 희석액을 5주 정도 성장한 고추 묘목에 미리 관주 처리 후 고추 세균성점무늬균 (10^8 cfu/ml)을 추가로 경엽 살포하였다. 병원균 접종 1주일 후 각각의 병 처리에 대한 병 발병률을 조사하였다. 미생물제제를 처리하지 않은 무처리구를 대조구로 하였다.

아. *Paenibacillus chinjuensis* 31-3 균주의 RSM 기반 최적배지 개발

Chitinase 생산 및 작물 병원성 곰팡이 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (시들음병)에 대한 항진균활성이 우수한 *Paenibacillus chinjuensis* 31-3 균주의 최적배지 개발을 수행하였다. LB 배지를 기반으로 colloidal chitin 농도를 달리한 5종류 배지 (LB 자체, LB+0.1% colloidal chitin, LB+0.2% colloidal chitin, LB+0.5% colloidal chitin, LB+1% colloidal chitin)에서 배양한 후 시간대별로 배양상등액의 chitinase 활성을 측정하였다.

또한 Plackett-Burman 실험 디자인 방법을 이용하여 각각 요인 (factor)들이 chitinase 활성에 미치는 정도를 파악하였으며, 배지 성분 중 yeast extract, K_2HPO_4 그리고 NH_4Cl 의 최적 농도를 파악하기 위해 response surface methodology (RSM)을 이용하여 요인 결정과 배지 최적화 연구를 수행하였다.

자. *Chromobacterium* sp. 균주의 chitinase 생산 최적 탄소원 선발

Colloidal chitin agar 배지에서 clear zone 생성이 우수한 것으로 확인된 *Chromobacterium* sp. 균주를 해충 방제용으로 개발하고자 chitinase 생산을 위한 최적 탄소원 선발을 수행하였다. 0.1% colloidal chitin, 0.5% yeast extract가 포함된 M9 배지에 7종류 탄소원 (glucose, glycerol, sucrose, lactose, corn starch, soluble starch, chitin powder)을 각각 첨가하여 배양한 후 균체의 성장정도와 환원당 측정법 (DNS)에 의해 chitinase 활성을 측정하였다. 또한 각각의 배양액을 복숭아혹진딧물과 점박이응애에 처리한 후 살충효과를 검정하였다.

2. 연구개발 수행 결과

가. *Paenibacillus elgii* BC34-6 대량생산용 실용화 배지 개발

항진균활성과 살충효능이 우수한 *Paenibacillus elgii* BC34-6 균주의 대량생산을 위한 최적의 탄소원과 질소원을 선발하였다.

최적의 탄소원 선발을 위해 M9 최소배지에 0.5% yeast extract와 7종류 탄소원 (glucose, glycerin, sucrose, lactose, corn starch, soluble starch, chitin powder : 10g/liter)을 각각 사용하여 배양한 후 균체 성장정도 및 배양상등액의 항진균활성과 chitinase 활성을 측정하였다. 균주 성장에 영향을 미치는 최적의 탄소원은 chitin powder, sucrose 순으로 높았으며, 배양상등액의 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (시들음병), *Sclerotinia sclerotiorum* (균핵병), *Colletotrichum coccodes* (탄저병)에 대한 항진균활성과 chitinase 활성은 glycerol, sucrose 순으로 높았다 (표 15.1). 균사 성장을 저해하지 못한 경우 X, 0.2 mm 저해 시 △, 0.4mm 저해 시 ○, 0.5 mm 이상 저해 시 ◎로 표시하였다.

표 15.1 *Paenibacillus elgii* BC34-6의 대량생산용 최적 탄소원 선발

carbon sources (10g/L)	cell growth (OD ₆₀₀)	antifungal activity	chitinase activity(umol/ml)
-	1.18	Δ	0.71
Glucose	1.10	X	-
Glycerin	0.25	⊙	1.50
Sucrose	1.44	⊙	1.16
Lactose	0.88	O	-
corn starch	0.70	X	0.66
soluble starch	0.54	X	-
chitin	1.52	Δ	0.85

또한 대량생산용 최적의 질소원 선발을 위해 M9 최소배지에 최적 탄소원으로 선발된 1% sucrose와 5종류의 질소원 (yeast extract, tryptone, peptone, soy bean meal, ammonium sulfate : 5g/liter)을 각각 첨가하여 배양한 후 균체 성장정도 및 배양상등액의 항진균활성, chitinase 활성을 측정하였다. 균체 성장은 soy bean meal, peptone 순으로 높았으나, 작물 병원성 곰팡이 저해 능력은 상대적으로 높지 않았다. 질소원으로 yeast extract를 사용했을 경우 균체 성장은 높지 않은 반면 항진균활성은 가장 높은 결과를 보였다 (표 15.2). 결론적으로, *Paenibacillus elgii* BC34-6의 대량생산을 위한 최적 탄소원과 질소원은 각각 sucrose, yeast extract로 선발하였다.

표 15.2 *Paenibacillus elgii* BC34-6의 대량생산용 최적 질소원 선발

nitrogen sources (5g/L)	cell growth (OD ₆₀₀)	antifungal activity	chitinase activity(umol/ml)
Yeast extract	1.3	⊙	1.02
Tryptone	1.5	X	-
Peptone	1.61	X	0.8
Soy bean meal	2.51	Δ	0.61
Ammonium sulfate	0.8	X	-

나. *Paenibacillus elgii* BC34-6 균주의 고추 탄저병 방제 효과 검정 (Pot assay)

Pot assay를 통해 *Paenibacillus elgii* BC34-6 균주의 고추 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*)에 대한 방제효과를 검정하였다. 대량생산용 최적배지에서 배양된 *P. elgii* BC34-6 배양액 (1×10^8 cfu/ml)을 100배 희석한 시료를 5주 정도 자란 고추 묘목에 관주 처리한 후, 고추유묘 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*)을 감염시켜 병 방제 효과를 관찰하였다. 1주일 경과 후부터 고추 유묘에서 병증이 나타나기 시작했으며, 무처리구의 경우 70% 이상의 감염률을 보여 병 발생이 원활하게 이루어졌음을 확인하였다. 초기에는 병증 발생에 큰 차이를 보이지 않았으나 시간이 경과할수록 각각의 처리구별로 병 발생 정도가 달랐다. 현재 시중에 유통, 판매되고 있는 고추 탄저병 방제용 유기농자재로 등록된 2개 제품 (J사 제품, H사 제품)을 대조구로 사용하였다. 대조구 2개 제품과 *P. elgii* BC34-6 배양액 모두에서 무처리구에 비해 고추 탄저병 방제 효과가 있었다. 특히, *P. elgii* BC34-6 배양액의 경우 시중 판매 제품들보다 방제효과가 높게 나타났다 (그림 15.1).

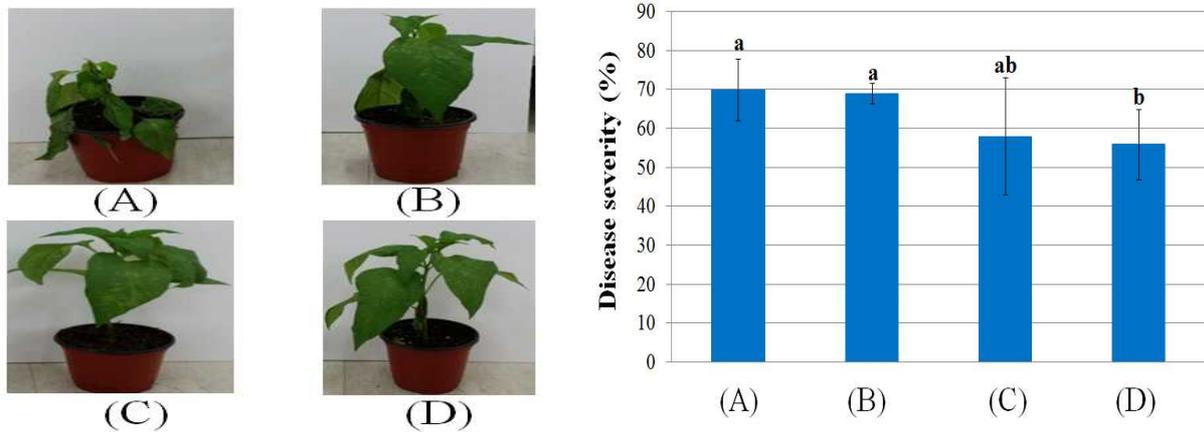


그림 15.1. *Paenibacillus elgii* BC34-6의 고추 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*) 방제 효능 검정. 최적배지에서 대량생산된 *P. elgii* BC34-6 배양액의 고추 탄저병에 대한 방제 효능을 조사하였다. 시중에 유통 판매되고 있는 2개 제품보다 더 높은 병 방제가를 보였다. (A) Control (무처리구), (B) J사 제품, (C) H사 제품, (D) *P. elgii* BC34-6 배양액. a) 병증이 심각한 정도, ab) 병증 중간 정도, b) 병증이 미미한 정도.

다. *Paenibacillus elgii* BC34-6 균주의 작물 병 방제 효과 검정 (포장시험)

작물 병 방제 활성이 우수한 것으로 판단된 *Paenibacillus elgii* BC34-6 균주의 고추 탄저병 (*Collectotrichum coccodes*)과 고추 세균성점무늬병 (*Xanthomonas euvesicatoria*)에 대한 포장시험을 수행하였다 (그림 15.2). 먼저, *P. elgii* BC34-6 배양액을 200배 희석한 후 고추 유묘에 살포하였으며, 1주일 경과 후 각각의 병원균들을 접종하였다. 그 결과 병 발생률 (disease index)은 무처리구의 경우 50% 이상 병 발생이 진행되었으며, *P. elgii* BC34-6 배양액 처리구는 무

처리구에 비해 현저히 낮은 결과를 나타냈다. 또한 작물 병원균들에 대한 병 방제가는 무처리구에 비해 2배 이상 높게 나타났다 (그림 15.3). 위의 결과들로부터 *P. elgii* BC34-6 배양액은 고추 탄저병 및 세균성점무늬병 방제제로서 효과가 우수함을 확인할 수 있다.

고추 유묘 이식



미생물제제 (*P. elgii* 34-6 배양액) 처리



작물 병 접종 후 포장



↓
최종 포장 사진



↓

P. elgii 34-6 배양액 처리 후 병 방제 검정



무처리구

처리구

그림 15.2. *Paenibacillus elgii* BC34-6의 작물 병 방제 포장시험 과정.

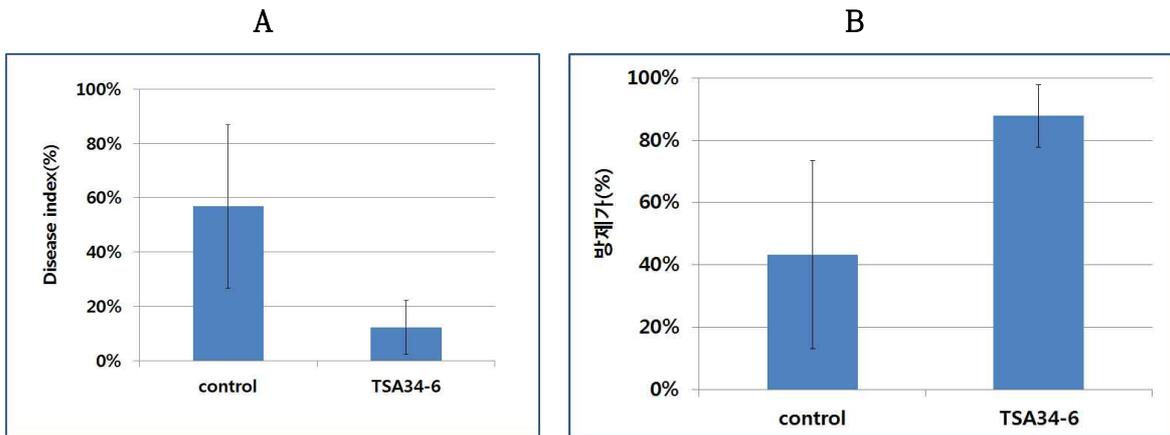


그림 15.3. 포장시험에 의한 *Paenibacillus elgii* BC34-6의 작물 병 방제 효능 검정. 최적 배지에서 대량생산된 *P. elgii* BC34-6 배양액을 사용하여 작물 병 (고추 탄저병, 세균성점무늬병)에 대한 방제 효능을 포장시험을 통해 검정하였다. A) 병 발생률, B) *P. elgii* BC34-6의 작물 병에 대한 방제가.

라. Chitinase 생산 *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2 균주의 배지 최적화

Paenibacillus chitinolyticus 35-2 균주를 대상으로 chitinase 생산에 필요한 최적 탄소원 선별을 수행하였다. Modified chitinase 생산 배지에 탄소원으로 powder chitin, colloidal chitin, glucose, soluble starch를 각각 첨가하여 배양한 후 colloidal chitin agar plates에서 배양상등액의 clear zone 생성과 SDS-PAGE에서 단백질 발현 양상을 조사하였다. 그 결과 powder chitin의 경우 chitinase 활성과 단백질 발현이 높게 관찰되었다 (그림 15.4). 또한 chitinase 생산에 적합한 질소원 선별을 수행한 결과 tryptone이 최적으로 조사되었다. 그러나 tryptone의 경우 대량생산 공정 개발에 있어 가격이 너무 높아 chitinase 생산 효율과 가격 차이를 감안하여 최종적으로 yeast extract를 질소원으로 선별하였다 (그림 15.5). 결론적으로, *P. chitinolyticus* 35-2 균주의 chitinase 대량생산용 배지 조성은 다음과 같이 결정하였다. 0.5% K₂HPO₄, 0.4% MgSO₄·7H₂O, 0.5% NaCl, 0.05% CaCl₂·2H₂O, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.5% Yeast extract, 0.1% chitin powder. 위의 최적배지 조건으로 500L 발효기를 이용하여 300L 대량배양한 결과 1x10⁸ cfu/ml의 균체수를 얻을 수 있었으며, 90% 이상의 내세포자가 유도되었다.

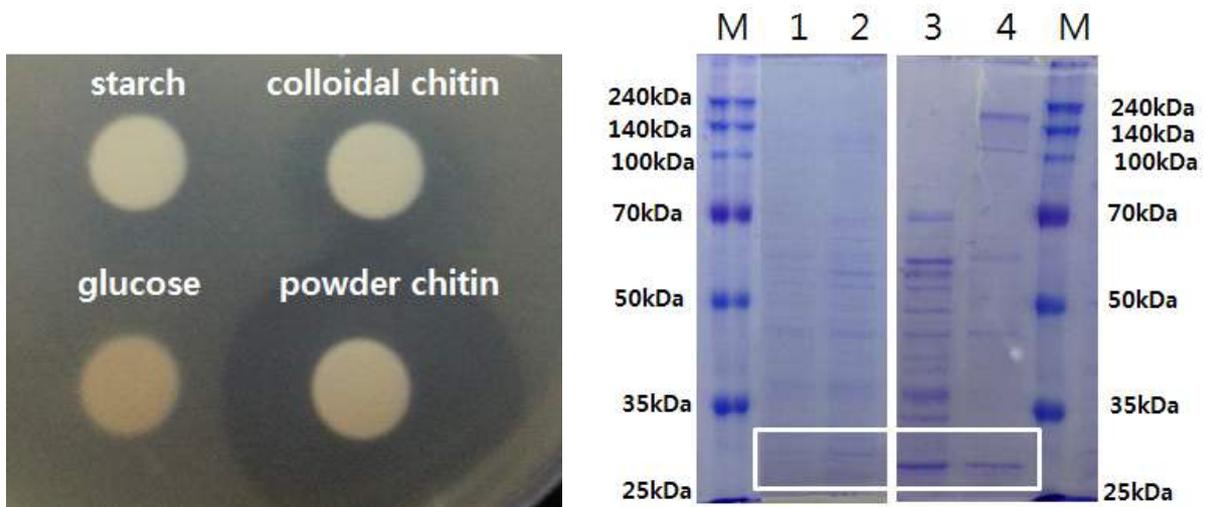


그림 15.4. *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2 균주의 chitinase 대량생산용 최적 탄소원 선별을 위한 chitinase 활성 및 단백질 발현 양상. 4종류의 탄소원을 첨가하여 배양한 후 배양상등액의 colloidal chitin agar plates에서 clear zone 생성 및 SDA-PAGE에서 단백질 발현 정도를 조사하였다. M) size marker, 1) glucose, 2) colloidal chitin, 3) powder chitin, 4) soluble starch.

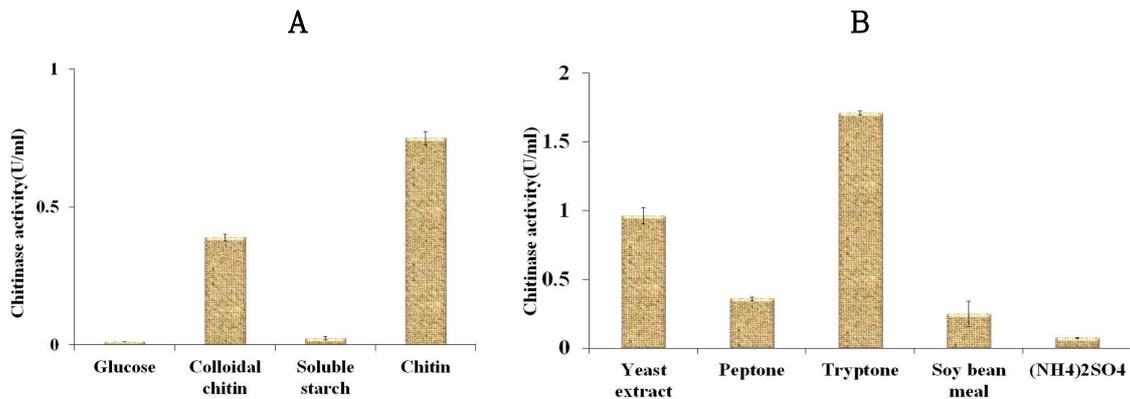


그림 15.5. *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2 균주의 chitinase 대량생산용 최적 탄소원, 질소원 선발. 최적 탄소원으로 powder chitin을 선발하였으며, 질소원은 chitinase 생산에 필요한 효율과 가격을 감안하여 yeast extract로 최종 선발하였다. A) 최적 탄소원, B) 최적 질소원 선발.

마. *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2 균주의 작물 병 방제 효과 검정 (Pot assay)

대량생산용 최적배지에서 배양된 *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2 균주 배양액의 pot assay에 의한 고추 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*) 방제 효능을 검정하였다. 대조구로는 상용화 배지 TSB (tryptic soy broth)에서 배양된 *P. chitinolyticus* 35-2 배양액과 생물방제연구센터에서 연구개발한 *Pseudomonas chlororaphis* O6 균주 배양액을 각각 사용하여 비교하였다 (그림 15.6). 최적배지에서 생산된 *P. chitinolyticus* 35-2 배양액의 경우 200배, 500배 희석한 배양액 모두에서 방제 효능이 있었으나, 대조구로 사용한 *Pseudomonas chlororaphis* O6 보다는 약간 낮은 방제가를 나타냈다. 한편 TSB 배지에서 생산된 *P. chitinolyticus* 35-2 배양액의 경우 200배 희석한 경우 방제 효과가 있었으나, 500배 희석한 배양액에서는 병 방제 효능이 전혀 없었다. 또한 *P. chitinolyticus* 35-2 배양액을 작물에 처리한 후 약해 여부를 관찰한 결과 식물체의 낙엽, 고사, 갈변 등 어떠한 증상도 관찰되지 않아 안전하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

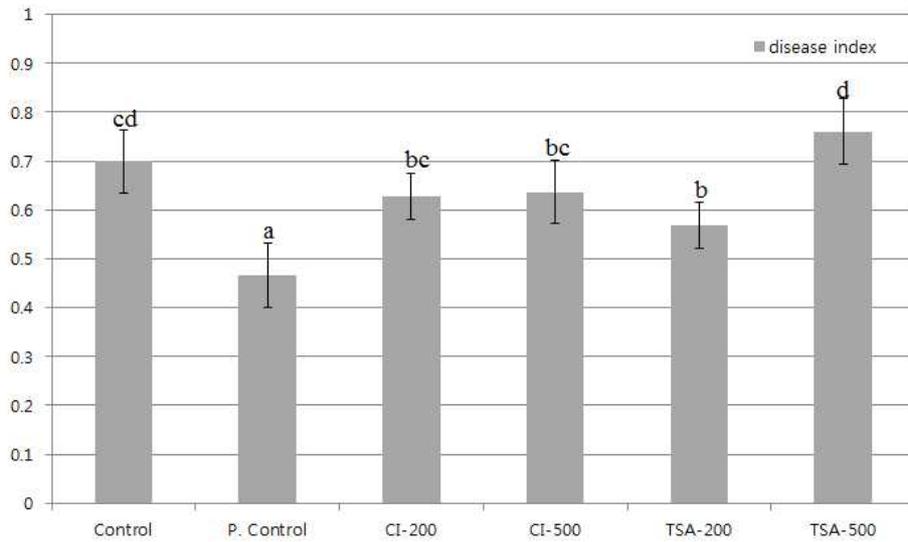
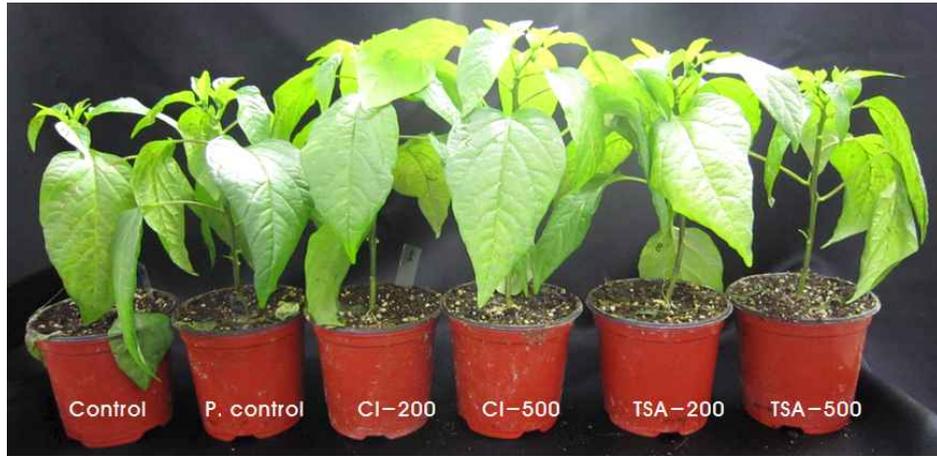


그림 15.6. *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2의 고추 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*) 방제 효능 검정. 최적배지 (CI) 및 상용배지 (TSA)에서 대량생산된 *chitinolyticus* 35-2 배양액 각각을 200 배, 500배 희석하여 처리한 후 고추 탄저병에 대한 방제 효능을 조사하였다. 대조구로 생물방제연구센터에서 개발한 *Pseudomonas chlororaphis* O6 배양액을 사용하여 병 방제가를 비교하였다. Control) 무처리구, P. control) *Pseudomonas chlororaphis* O6 배양액, CI-200) CI 배지 배양액 200배 희석액, CI-500) CI 배지 배양액 500배 희석액, TSA-200) TSA 배지 배양액 200배 희석액, TSA-500) TSA 배지 배양액 500배 희석액. 병증 발생 정도는 $a \leq b \leq bc \leq cd \leq d$ 순으로 나타났다.

바. *Brevibacillus laterosporus* TSA 31-5 균주의 병 방제 효능 검정 (Pot assay)

본 연구과제의 선행 연구를 통해 *Botrytis cinerea* (잿빛곰팡이병), *Phytophthora capsici* (역병), *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (시들음병)에 대한 항진균활성이 우수한 것으로 판단된 *Brevibacillus laterosporus* TSA 31-5 배양액을 이용하여 pot assay를 통한 병 방제 효능을 조사하였다. TSB 배지를 사용하여 500L 발효기에서 대량생산된 *B. laterosporus* TSA 31-5 배양액의 100배, 200배 희석한 시료의 고추 잿빛곰팡이에 대한 방제 효능을 검정하였다. 무처리구의 경우 식물체 자체가 완전히 고사되는 반면에, *B. laterosporus* TSA 31-5 배양액 200배 처리구에서는 약간 병증이 관찰되었으며, 100배 배양액 처리구에서는 전혀 병증이 나타나지 않았다 (그림 15.7).

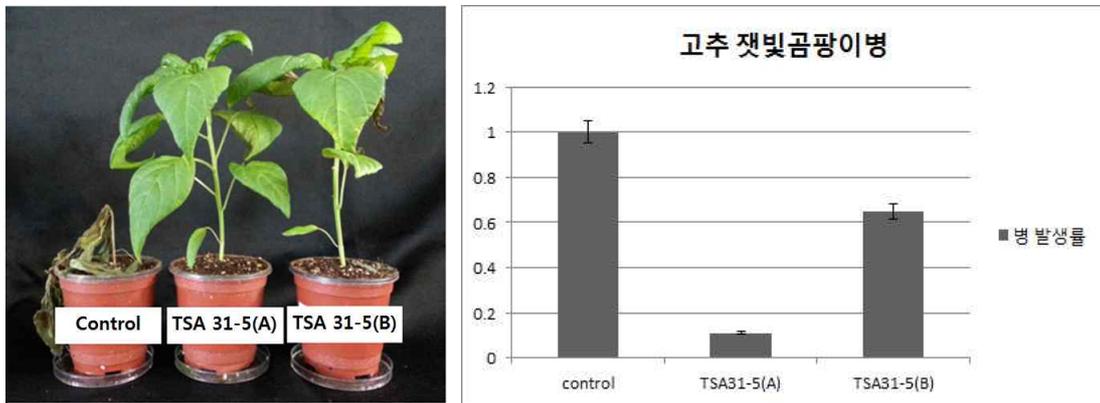


그림 15.7. *Brevibacillus laterosporus* 31-5 배양액의 고추 잿빛곰팡이병 (*Botrytis cinerea*) 방제 효능 검정. TSB 배지에서 대량생산된 *B. laterosporus* 31-5 배양액 각각을 100배, 200배 희석하여 처리한 후 고추 잿빛곰팡이병에 대한 방제 효능을 조사하였다. 무처리구의 경우 식물체가 완전히 고사되었으며, 100배 희석한 *B. laterosporus* 31-5 배양액 처리구는 전혀 병증이 나타나지 않았다. 그러나 200배 희석한 배양액에서는 병증이 약간 발생했다. Control) 무처리구, (A) 100배 희석액, (B) 200배 희석액.

사. 작물 세균병 방제용 *Bacillus* 속 균주의 배지 최적화 및 방제 효과 검정 (Pot assay)

선행 연구를 통해 작물 세균병 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* KACC11151 (콩 불마름병), *Xanthomonas euvesicatoria* 173-1 (고추 세균성점무늬병), *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* MAFF 301420 (복숭아나무 세균성구멍병)에 대한 항진균활성이 탁월한 *Bacillus subtilis* MRS6-4, *Bacillus methylotrophicus* GM2 균주의 대량생산용 최적배지 조성은 다음과 같이 확립하였다. Yeast extract 0.8%, NaCl 0.15%, Glucose 0.6%, K₂HPO₄ 0.25%, Na₂CO₃ 0.05%, MgSO₄ 0.1%. 최적배지를 사용하여 500L 발효기에서 최적 발효조건은 배양온도 30℃, 통기량 0.4~0.5vvm, 교반속도 100~110rpm, 내부압력 0.4kg/cm²으로 확립하였다 (표 15.3). 최적배지 및 발효조건에 따라 22시간 배양 후 내세포자 형성은 90% 이상 유도되었으며, 생균수는 $\geq 1.3 \times 10^9$ cfu/ml로 조사되었다.

표 15.3. 작물 세균병 방제용 *Bacillus* 속 균주의 최적배지 조성 및 발효조건

배지조성	배양 조건
Yeast extract 0.8%	배양온도 30℃
NaCl 0.15%	통기량 0.4 ~ 0.5vvm
Glucose 0.6%	교반속도 100 ~ 110rpm
K ₂ HPO ₄ 0.25%	내부압력 0.4 kg/cm ²
Na ₂ CO ₃ 0.05%	접종량 1%
MgSO ₄ 0.1%	

아. *Bacillus* 속 균주들의 고추 세균병 방제 효과 검정 (Pot assay)

작물 세균병에 대한 항균활성이 우수한 것으로 판단된 *Bacillus subtilis* MRS6-4, *Bacillus methylotrophicus* GM2 균주들의 pot assay를 통한 고추 세균성점무늬병 (*Xanthomonas euvesicatoria*) 방제 효과를 조사하였다. 대량생산용 최적배지에서 배양된 *Bacillus* 속 균주의 200배 희석액을 5주 정도 성장한 고추 묘목에 미리 관주 처리 후 고추 세균성점무늬병균 (10^8 cfu/ml)을 추가로 경엽 살포하여 병 발병률을 조사하였다. 그 결과 전반적으로 모든 미생물 배양액 처리구에서 병 방제 효과가 있었으며, 특히 *B. methylotrophicus* GM2 배양액에서 훨씬 더 좋은 결과를 나타냈다 (그림 15.8). 또한 *B. subtilis* MRS6-4 균주 배양액을 처리한 후 오이와 토마토에 대한 작물 생육 촉진 효과를 조사했다. *B. subtilis* MRS6-4 배양액을 처리한 오이의 경우 무처리구에 비해 잎 면적은 넓어지고 줄기는 길어지는 효과를 보였으며, 토마토의 경우 무처리구에 비해 줄기 수도 많아지고 길이 성장도 촉진되는 효과를 나타냈다 (그림 15.9~10). 위의 결과를 바탕으로 *B. subtilis* MRS6-4 균주를 미생물비료 (명칭 : 풍년가)로 등록하였다 (그림 15.11).

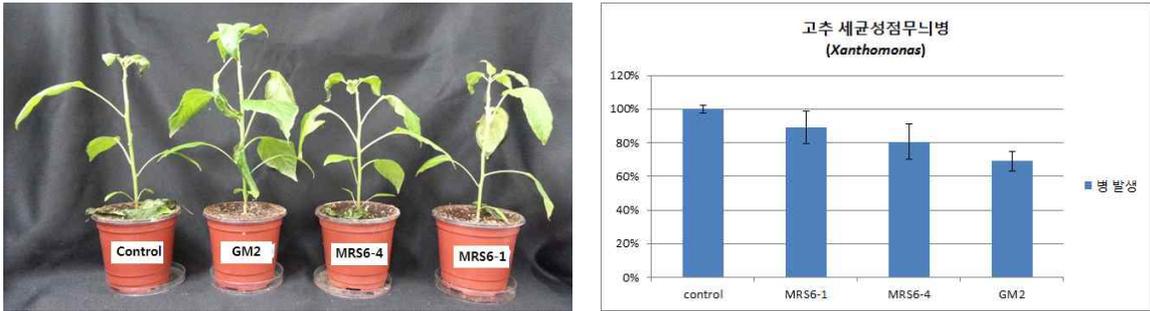


그림 15.8. 2종 *Bacillus* 속 배양액의 고추 세균성점무늬병 (*Xanthomonas euvesicatoria*) 방제 효능 검정. 최적배지에서 대량생산된 *B. subtilis* MRS6-4, *B. methylotrophicus* GM2 배양액 각각을 200배 희석하여 처리한 후 고추 세균성점무늬병에 대한 방제 효능을 조사하였다. 무처리구에 비해 모든 미생물제제에서 병 방제 효과가 관찰되었다. 특히, *B. methylotrophicus* GM2의 경우 병 방제 효능이 탁월하였다. Control) 무처리구, GM2) *B. methylotrophicus* GM2 배양액, MRS6-6) *B. subtilis* MRS6-4 배양액.

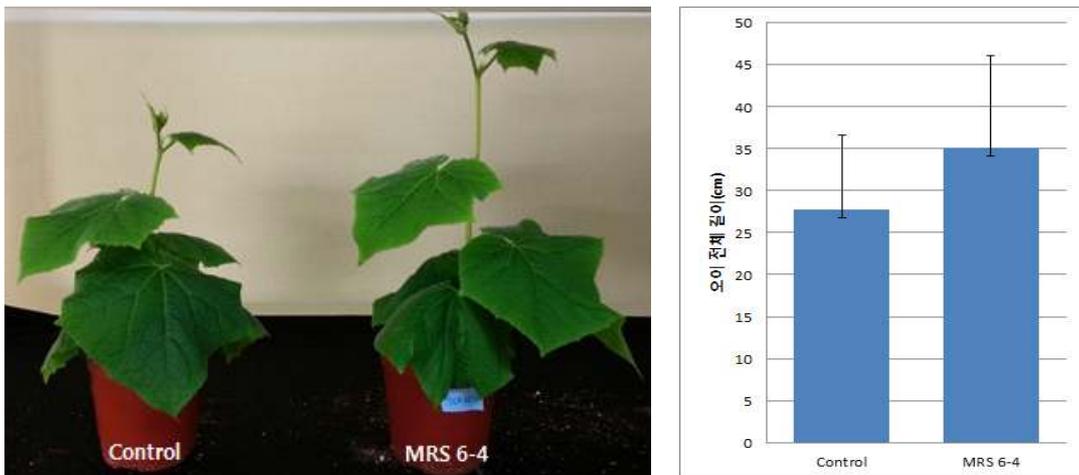


그림 15.9. *Bacillus subtilis* MRS6-4 배양액의 오이 생육 촉진 효과. *B. subtilis* MRS6-4 배양액을 처리한 후 오이 잎 면적과 길이 성장을 측정하였다. *B. subtilis* MRS6-4 배양액을 처리한 결과 무처리구에 비해 약 1.3배 정도의 길이 성장 효과를 나타냈다. Control) 무처리구, MRS6-4) *B. subtilis* MRS6-4 배양액.

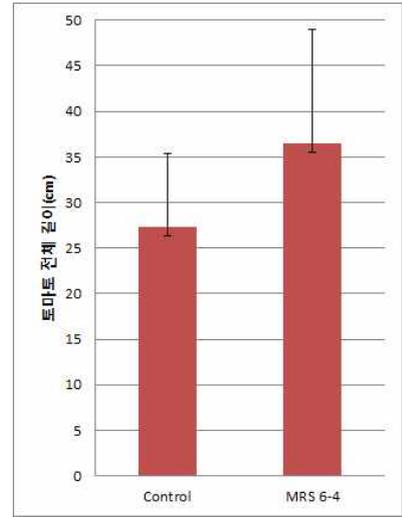


그림 15.10. *Bacillus subtilis* MRS6-4 배양액의 토마토 생육 촉진 효과. *B. subtilis* MRS6-4 배양액을 처리한 후 토마토 줄기 수와 길이 성장을 측정하였다. *B. subtilis* MRS6-4 배양액을 처리한 결과 무처리구에 비해 약 1.4배 정도의 길이 성장 효과를 나타냈다. Control) 무처리구, MRS6-4) *B. subtilis* MRS6-4 배양액.

제 전남 곡성21-가-20301 호

비료생산업 등록증

1. 법인(상호)명 : (재)전라남도생물산업진흥원 생물양제연구센터

2. 주 소 : 전라남도 곡성군 입면 입면로 495

3. 대표자의 성명 : 신현경

4. 대표자의 생년월일 : 1944-12-29

5. 제조장 소재지 : 전라남도 곡성군 입면 입면로 437 (생물양제센터 생산동)

6. 비료의 종류 : 토양미생물제제

「비료관리법」 제11조제1항, 같은 법 시행령 제11조4항 및 같은 법 시행규칙 제7조 제4항에 따라 위와 같이 비료생산업을 등록하였음을 증명합니다.

2015년 09월 11일



전라남도 곡성군수

비료의 종류 및 명칭별 등록사항

연월일	비료의 종류 및 명칭	보증성분량	유해성분량	기타규격	원료 투입비율
20111223	토양미생물제제	Bacillus amyloliquefaciens KB3 : 1 × 10000000	대장균O157:H7 (Escherichia coli O157:H7), 살모넬라(Salmonella spp.), Staphylococcus sp., Bacillus cereus 불검출		Bacillus amyloliquefaciens KB3 100% = 100%
20140602	토양미생물제제 옥편, 옥과	Rhodobacter sphaeroides 1 × 10000000 cfu/ml이상	다음 병원성미생물은 불검출 대장균O157:H7 (Escherichia coli O157:H7), 살모넬라(Salmonella spp.)		Rhodobacter sphaeroides 배양액 원제 100%
20150911	토양미생물제제 풍년가	Bacillus subtilis 1 × 10 ⁶ 이상	1. 다음 병원성미생물은 불검출 대장균O157:H7 (Escherichia coli O157:H7), 살모넬라(Salmonella spp.) 2. 건물중에 대하여 비소 20mg/kg 카드름 2mg/kg 수은 1mg/kg 납 50mg/kg 크롬 90mg/kg 구리 120mg/kg 니켈 20mg/kg 아연 300mg/kg		Bacillus subtilis 100% = 100%

그림 15.11. *Bacillus subtilis* MRS6-4 균주의 미생물비료 (명칭 : 풍년가) 등록.

자. *Paenibacillus chinjuensis* 31-3 균주의 RSM 기반 최적배지 개발

Chitinase 생산 및 작물 병원성 곰팡이 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (시들음병)에 대한 항진균활성이 우수한 *Paenibacillus chinjuensis* 31-3 균주의 최적배지 개발을 수행하였다. LB 배지를 기반으로 colloidal chitin 농도를 달리하여 배양한 후 시간대별로 배양상등액의 chitinase 활성과 균체 성장을 측정하였다. 그 결과 0.2% colloidal chitin을 첨가하여 3일 동안 배양했을 때 최고의 chitinase 활성과 균체 성장을 보였다 (그림 15.12).

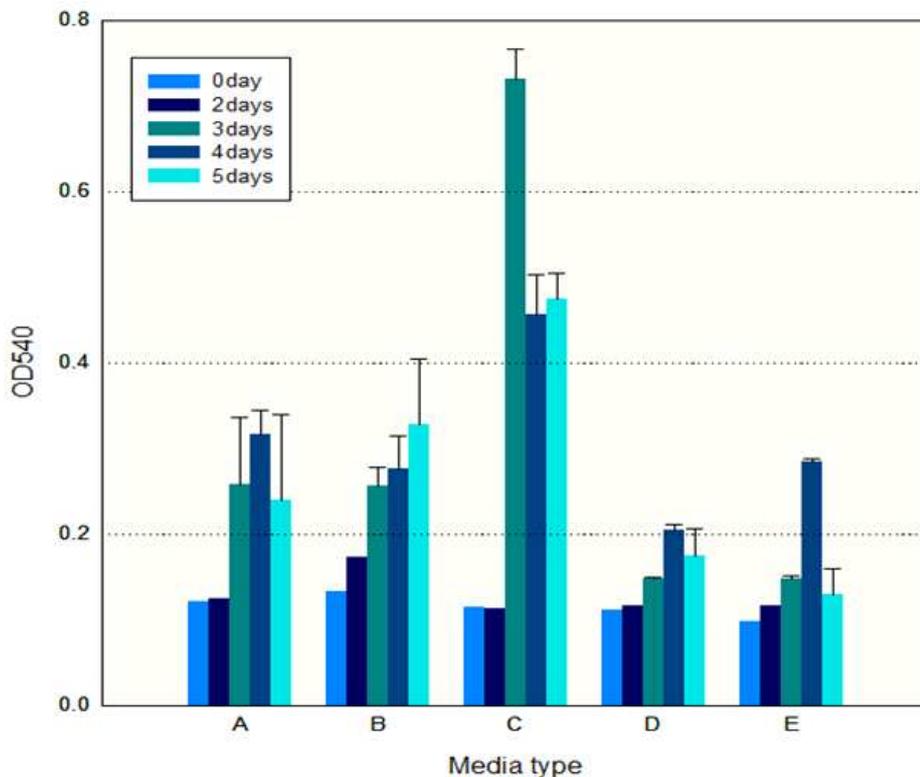


그림 15.12. *Paenibacillus chinjuensis* 31-3 균주의 chitinase 생산용 최적배지 확립. LB 배지를 기본으로 colloidal chitin 함량을 달리하여 배양한 상등액의 chitinase 활성을 DNS 방법에 의해 비교하였다. 0.2% colloidal chitin을 첨가하여 3일 배양한 결과 최대의 chitinase 활성과 균체 성장을 나타냈다. A) LB 배지, B) LB+0.1% colloidal chitin, C) LB+0.2% colloidal chitin, D) LB+0.5% colloidal chitin, E) LB+1.0% colloidal chitin.

위의 결과를 바탕으로 각각 factors의 chitinase 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Plackett-Burman 디자인 방법으로 수행한 결과는 표 15.4~6에 나타났다. 이에 따라 yeast extract, K_2HPO_4 , NH_4Cl 의 최적 농도 확립을 위해 response surface methodology (RSM)에 의해 요인 결정과 배지 조성 최적화를 수행하였다 (그림 15.13).

표 15.4 Plackett-Burman 실험 디자인 방법에 따른 factors 값

Components	Level of components	
	Low (-1)	High (+1)
Tryptone (X ₁ , %)	0	0.25
Yeast extract (X ₂ , %)	0	0.25
NH ₄ Cl (X ₃ , %)	0	0.25
CaCl ₂ (X ₄ , %)	0	0.025
MgSO ₄ (X ₅ , %)	0	0.05
NaCl (X ₆ , %)	0	0.25
KH ₂ PO ₄ (X ₇ , %)	0	0.25
K ₂ HPO ₄ (X ₈ , %)	0	0.25
Temperature (X ₉ , °C)	25	30

표 15.5 Plackett-Burman 실험 디자인 방법에 matrix 디자인과 결과 값 (N=12)

Runs	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	Chitinase activity (Unit/ml)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	0.537±0.076
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1.203±0.050
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	3.640±0.104
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0.828±0.160
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0.371±0.145
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.402±0.123
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	4.063±0.186
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	0.496±0.114
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	0.606±0.101
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1.476±0.017
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	0.464±0.101
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.375±0.121

표 15.6 Plackett-Burman 실험 디자인에 따른 회귀모형 결과

Term	Effect	Coef SE	Coef	T value	<i>Paenibacillus</i> value
Constant		1.2047	0.03372	35.72	<0.001
Tryptone	-0.8052	-0.4026	0.03372	-11.94	<0.001 ^a
Yeast extract	0.9716	0.4858	0.03372	14.4	<0.001 ^a
NH ₄ Cl	0.9111	0.4556	0.03372	13.51	<0.001 ^a
CaCl ₂	0.1129	0.0564	0.03372	1.67	0.12
MgSO ₄	-0.0791	-0.0395	0.03372	-1.17	0.264
NaCl	0.2035	0.1018	0.03372	3.02	0.011
KH ₂ PO ₄	0.0581	0.0290	0.03372	0.86	0.406
K ₂ HPO ₄	-1.1749	-0.5874	0.03372	-17.42	<0.001 ^a
Temperature	1.4308	0.7154	0.03372	21.21	<0.001 ^a
Dummy1	0.2929	0.1464	0.03372	4.34	0.001
Dummy2	-0.2622	-0.1311	0.03372	-3.89	0.002

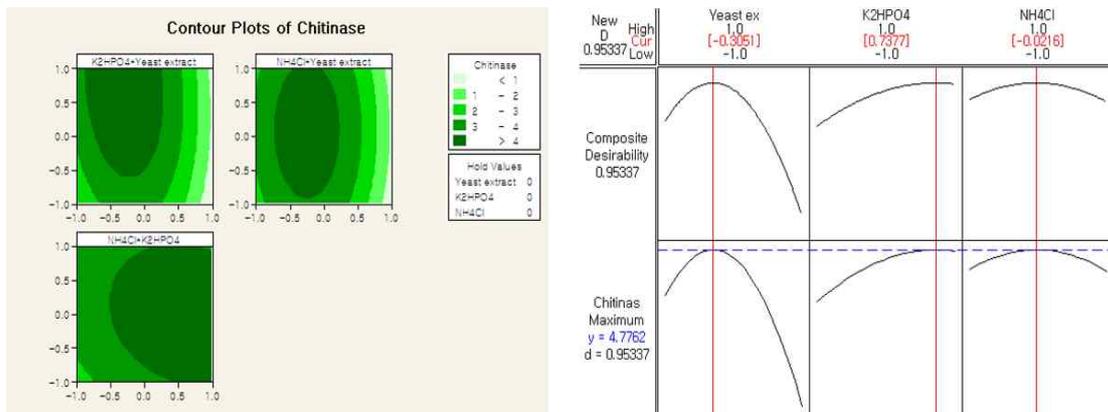


그림 15.13. RSM 에 따른 요인별 최적 농도 결과.

차. *Chromobacterium* sp. 균주의 chitinase 생산 최적 탄소원 선발

선행 연구를 통해 chitinase 활성이 우수한 *Chromobacterium* sp. 균주를 작물 해충 방제용으로 개발하기 위하여 대량생산용 최적배지의 탄소원 선발을 수행하였다. M9 배지+0.1% colloidal chitin+0.5% yeast extract를 기본으로 최적의 탄소원을 선발한 결과 1% powder chitin 첨가 시 최대의 균체 성장과 chitinase 활성을 보였다 (표 15.7).

표 15.7. *Chromobacterium* sp. 균주의 균체 성장과 chitinase 생산용 최적 탄소원 선발

	Carbon sources (10g/L)	Cell growth (OD ₆₀₀)	Chitinase activity (μmol/ml)
C1	-	0.43	0.85
C2	Glucose	1.22	0.03
C3	Glycerin	1.65	1.24
C4	Sucrose	0.39	0.49
C5	Lactose	0.37	0.79
C6	Corn starch	1.35	0.36
C7	Soluble starch	1.79	1.12
C8	Powder chitin	1.93	4.45

카. 황토 유래 유용미생물의 작물 해충 방제 효능 검증

본 연구를 통해 선발된 chitinase 활성이 우수한 *Paenibacillus chinjuensis* 31-3, *Paenibacillus elgii* BC34-6, *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2, *Chromobacterium* sp. 균주를 사용하여 복숭아혹진딧물과 점박이용애를 대상으로 해충 방제 효능을 검증하였다 (그림 15.14). 그 결과 점박이용애에 대한 살충 효과는 *P. elgii* BC34-6과 *Chromobacterium* sp. 처리구에서 높게 나타났다 (그림 15.15). 그러나 복숭아혹진딧물에 대한 해충 방제 효과는 모든 처리구에서 관찰되지 않았다.

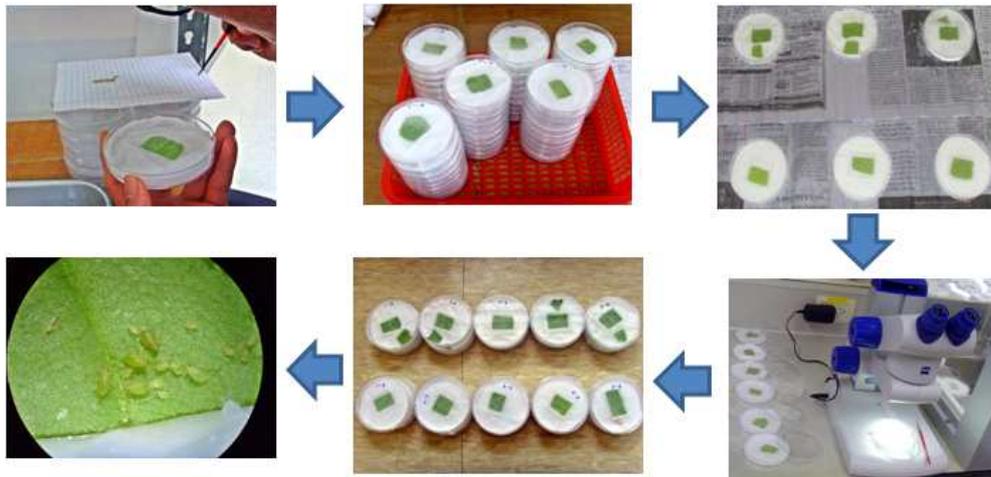


그림 15.14. 황토 유래 미생물을 활용한 작물 해충 방제 효능 검정 과정.

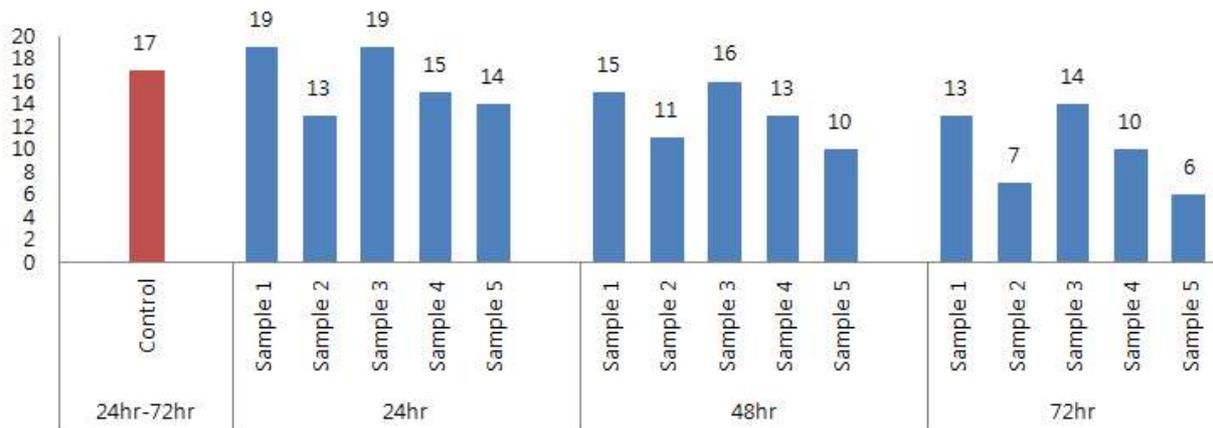


그림 15.15. 황토 유래 미생물을 활용한 점박이응애 방제 효능 검정. 황토 유래 미생물의 배양액을 점박이응애에 살포하여 72시간 경과 후 살충 효과를 관찰하였다. *P. elgii* BC34-6 (sample 2)과 *Chromobacterium* sp. (sample 5)에서 살충 효과가 높게 나타났다. Control) 증류수 처리, Sample 1) *Paenibacillus chinjuensis* 31-3, Sample 2) *Paenibacillus elgii* BC34-6, Sample 3) *Paenibacillus chitinolyticus* 35-2, Sample 4) *Chromobacterium* sp.의 LB 배지 배양액, Sample 5) *Chromobacterium* sp.의 최적배지 배양액.

제 16 절. 시제품 개발 및 사용 매뉴얼 개발

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

황토에서 분리한 *Paenibacillus elgii* 34-6 배양액을 이용한 시제품 개발 및 사용 매뉴얼을 개발하기 위해 기존 pot assay를 통한 연구결과를 분석하여 최적의 사용법을 개발하여 사용 매뉴얼을 작성하였다.

2. 연구개발 결과

가. *Paenibacillus elgii* 34-6 제제

황토에서 분리한 *Paenibacillus elgii* 34-6 배양액의 고추 탄저병 (*Colletotrichum coccodes*) 방제를 위한 포장에서의 사용 매뉴얼은 다음과 같다. 1) 대량생산된 미생물제제 (1×10^8 cfu/m)를 200배 희석한 후 작물 재식 전에 토양 (200평 기준, 1L 사용)에 살포하여 토양 살균, 2) 200배 희석액을 작물 재식 3주 후 경엽 살포, 3) 1주 간격으로 재 살포, 4) 병 발생 징후가 보일 경우 1주에 2~3회 살포한다.

미생물제제의 경우 내생포자를 형성하여 보존에 큰 어려움은 없으나, 직사광선이 없는 서늘한 곳에 보관한다. 또한 가급적 화학농약과 병행해서 사용은 피한다.

Paenibacillus elgii 34-6 제제는 유기농자재 목록 공시 등재 예정이다.

나. *Bacillus subtilis* MRS6-4 미생물제제

작물 성장촉진 효과가 탁월한 *Bacillus subtilis* MRS6-4 미생물제제는 제품등록 하였으며 (미생물비료, 명칭 : 풍년가) 오이와 토마토에 대한 사용 매뉴얼을 다음과 같다. 1) 대량생산된 미생물제제 (1×10^8 cfu/m)를 200배 희석한 후 작물 재식 전에 토양 (200평 기준, 1L 사용)에 살포하여 토양 내 우점하게 함, 2) 200배 희석액을 작물 재식 3주 후 관주 살포, 3) 1주 간격으로 재 살포, 4) 꽃이 필 무렵 사용 중단.

미생물제제의 경우 내생포자를 형성하여 보존에 큰 어려움은 없으나, 직사광선이 없는 서늘한 곳에 보관한다. 또한 가급적 화학비료와 병행해서 사용은 피한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전의 기여도를 기술

제 1 절. 목표달성도

연차별 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 목표 달성도를 아래의 표에 나타냈다. 연차별 연구개발 목표들은 모두 연구계획서의 진도와 같이 일치하여 달성되었으며, 연구의 최종 목표 달성도 역시 표로 나타내어 계획서의 최종목표를 충분히 달성하였다고 생각된다. 다만 광합성세균관련하여 초기 균주분리 이후 농작물에 유용한 기능을 갖는 균주가 없어 해당 균에 대한 연구는 진행하지 못했다.

1. 연차별 연구 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	(제1세부) 황토 서식 유용미생물을 이용한 기능성 농자재 개발	○항균 작용 미생물, chitinase 생산 미생물 분리 발굴 및 난 배양 미생물 탐색 및 발굴	100	<ul style="list-style-type: none"> - 광주 전남 지역을 중심으로 150점의 황토 시료 확보 - 복합배지, 최소배지, 선택배지를 이용한 목적/용도별 유용미생물 자원 탐색 및 발굴 - 후사륨(<i>Fusarium</i>), 균핵균(<i>Sclerotium</i>)에 대한 항진균 활성 <i>Bacillus</i> 4종, <i>Pseudomonas</i> 1종 분리 - Chitinase 생산 미생물 <i>Bacillus</i> 4종, <i>Cohnella</i> 1종, <i>Alloactinosynema</i> 1종 NCBI GenBank 균주 기탁 및 등록 - 메타지노믹스를 이용한 난 배양 미생물 <i>Leifsonia</i> 1종 <i>Chloroflexi</i> 1종 NCBI GenBank 균주 기탁 및 등록
	(제1협동) 황토 유용미생물의 균체성분·대사산물 규명 및 대량생산 방법 개발	○항균물질의 분리·정제 및 활성 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> - 크로마토그래피를 이용한 항균 물질의 분리·정제 - 항균물질의 병원균에 대한 활성 검증

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	(제2협동) 황토로부터 친환경 농업용 기능성 미 생물제제 탐색 및 현장시험을 통한 실용화 방안 모색	○작물병원균 방제용 유용미생물 탐색/발굴 및 효능 검증	100	- 유용미생물 발굴을 위해 광주광역시, 전남 지역에서 165점의 황토 시료 확보함 - <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i> (시들음병)에 대한 항진균활성 <i>Bacillus</i> 18종, <i>Paenibacillus</i> 2종, <i>Brevibacillus</i> 1종 분리·동정함 - <i>Sclerotium sclerotiorum</i> (균핵병)에 대한 항진균활성 <i>Bacillus</i> 9종, <i>Acromobacter</i> 1종 분리·동정함 - Chitinase 생산 및 항진균활성 <i>Bacillus</i> 3종, <i>Paenibacillus</i> 14종 선발 및 pot assay를 통한 병 방제 효능 검증함 - Chitinase 생산 최적 탄소원, 질소원 선발 및 대량생산용 배지 확립함 - 국제학술발표 2건
2차 년도 (2013)	(제2협동) 해충 방제용 미생 물 탐색·발굴	○ 해충 방제용 및 항 곰팡이 활성이 있는 chitinase 생산 균주 탐 색	100	- 작물 병원성 곰팡이에 대한 항진균활성이 우수한 <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> 35-2, <i>Paenibacillus chinjuensis</i> 31-3, <i>Paenibacillus</i> <i>elgii</i> 34-6 선발함 - Collodial chitin agar plate, DNS법에 의해 높은 chitinase 활성 확인함 - 저비용 고효율 chitinase 대량생산용 최적배지 개발함 - <i>Paenibacillus elgii</i> 34-6의 경우 시중 유통·판매 제품보다 병원균 방제 효능이 우수함 - 특허 출원 1건
			100	- 1차년도 분리, 동정한 <i>Paenibacillus elgii</i> 34-6, <i>Chromobacterium</i> sp. 균주의 chitinase 생산용 최적배지 개발함 - 해충 (진딧물과 응애)에 대한 살충활성 검증함 - 위 두 종 모두 응애에 대한 높은 살충효과를 보였으나 진딧물 방제에는 효과가 없음
	(제2협동) 미생물 유래 대사산물 분리, 정제	○ 미생물 유래 항진 균 펩타이드 분리, 정 제	100	- <i>Paenibacillus elgii</i> 34-6이 생산하는 항진균 펩타이드 pelgipeptin 분리, 정제함

구분 (연도)	당초 연구개발의 목표		달성도 (%)	연구개발 결과
2차 년도 (2013)	(제2협동) 작물 성장촉진, 세균병 방제용 미생물 분리	○ 작물 세균병 방제용 유용미생물 분리	100	- 작물 세균병 방제용 <i>Bacillus</i> 속 균주 분리, 동정함 - <i>Bacillus</i> 속 균주들의 작물 성장촉진 효과 조사함
	(제1세부) 식물 성장촉진, 토양 활력증진용 미생물 탐색·발굴	○ 식물 성장 촉진 및 토양 활력증진을 위해 광합성균 탐색 및 유산균 탐색·발굴	70	- Winogradsky column 방법과 succinate broth를 이용한 광합성 세균을 분리함. - 호기적 조건에서 M17배지를 이용하여 유산균으로 추정되는 균주 분리하여 생화학 실험을 거쳐 catalase negative와 gram positive인 균주임을 확인함.
	(제1세부) 미생물제제의 제형화를 위한 배합 조건 개발	○ 반응표면분석법을 이용한 최적 배지 조건 확립	100	- 온도와 pH에 따른 chitinase 생산 최적화 모색 - 반응 표면 모델을 이용한 최적 chitinase 생산 배지의 최적화
	(제1세부) 미생물 유래 대사산물의 발굴	○ 미생물 유래 항진균 펩타이드 분리, 정제 및 특성 규명 및 생산 최적화	100	- <i>Paenibacillus kribensis</i> CU01이 생산하는 항진균 물질의 분리, 정제. - 정제 물질의 항진균 활성 확인
			100	- <i>Paenibacillus kribensis</i> CU01이 생산하는 항진균 물질의 구조분석(fusaricidin A, B) - Fusaricidin의 생산 조건 최적화(배지 조성, 배양 시간 등)
	(제2협동) 황토 서식 유용미생물을 이용한 기능성 농자재 개발	○ 항진균활성, 살충활성 균주의 대량생산용 배지 최적화 및 발효조건 확립	100	- <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> 35-2, <i>Paenibacillus chinjuensis</i> 31-3, <i>Paenibacillus elgii</i> 34-6 대량생산용 (500 L Pilot scale) 배지 개발 및 발효조건 확립함 - 대량생산 미생물제제의 효능 검정함 (pot assay)
(제1협동) 황토 유용미생물의 균체성분·대사산물 규명 및 대량생산 방법 개발	○ 미생물 균체성분/대사산물 분석 및 분자 구조 규명	100	- ¹ H-NMR 기반 미생물 균체성분/대사산물의 프로파일링 연구 - 다차원 NMR을 이용한 균체성분의 분자 구조 규명 - ¹ H과 ¹³ C NMR (HSQC, HMBC, TOCSY, COSY, NOESY)과 mass spectrometry를 접목하여 대사산물의 분자 구조 규명	

구분 (연도)	당초 연구개발의 목표		달성도 (%)	연구개발 결과
3차 년도 (2014)	(제1세부) 황토 서식 유용미생물을 이용한 기능성 농자재 개발	○ 기능성 농자재용 미생물제제의 사용지침서/방제 매뉴얼 개발 및 산업화	100	- <i>Paenibacillus elgii</i> 34-6의 작물 대상 적용 매뉴얼 개발 - <i>Bacillus subtilis</i> MRS6-4 (미생물비료, 명칭 : 풍년가)의 작물 대상 적용 매뉴얼 개발 - 참여기업의 기술이전, 기술이전후 사업화 추진, -희망 관련기업 기술이전 후 사업화 추진
		(제1협동) 황토 유용미생물의 균체성분·대사산물 규명 및 대량생산 방법 개발	○ 생리활성물질의 대량생산 방법 개발	100
	(제2협동) 황토 유래 유용미생물제제의 현장시험을 통한 실용화 방안 모색	○ 특허 출원 및 논문 발표	100	- 개발된 항균/항충 물질의 특허 출원/논문 발표
		○ 미생물제제의 작물 적용 시험	90%	- 기능성 미생물제제의 pot assay, 포장시험을 통한 효능을 검증함 - 미생물제제 처리 후 작물의 약해 시험 완료
		○ 미생물제제의 사용지침서 개발	90%	- 미생물제제의 배양 방법, 보관 방법, 사용 방법, 농도, 시기, 희석수 및 주의사항 등 세부사항이 기록된 사용지침 개발함
		○ 시제품 개발 및 등록	90%	- 제품등록 1건 완료 - 기술이전 2건 완료 - 언론 홍보 1건 완료

제 2 절. 관련분야에의 기여도

1. 기술적 측면에서 기여도

가. 미생물 유래 기능성 물질의 발굴 및 개발기술

우리나라의 토양에서 많은 부분을 황토로부터 유용 미생물을 분리하여 농업용 미생물 제제로 개발하려는 시도가 전무한 실정에서 본 과제를 통하여 다양한 유용 미생물을 분리함과 더불어 해당 최신의 분석 기술을 이용하여 미생물이 생산하는 물질의 분리 및 구조 규명을 하여 향후 미생물 제제의 개발에 있어 보다 효율적인 연구체계를 확립하였다. 또한 유용물질의 화학적 합성 기술을 개발하여 대량 생산의 가능성을 보여줬다.

(1). 미생물 유래의 cyclic lipopeptide 구조 분석 기술

미생물 유래의 대사산물 중 식물병원성 곰팡이에 활성을 나타내는 cyclic lipopeptide 는 gene coding 에 의한 ribosomal 단백질 합성이 아닌 non-ribosomal 단백질 합성에 의해 unnatural 아미노산 구조를 포함하게 되고 고리형의 펩타이드 구조와 다양한 지질이 결합된 형태로 생합성 된다. 이러한 복잡한 구조를 가지는 cyclic lipopeptide 의 구조 분석을 위해 2D NMR, LC-MS/MS 등 분석장비를 이용하여 성공적으로 분자구조를 확인 할 수 있었으며 이러한 확립된 기술을 바탕으로 새로운 미생물에서 분리·동정된 새로운 cyclic lipopeptide 의 구조분석에 활용될 수 있을 것이다.

(2). 활성 펩타이드 대량합성 기술 개발

식물병원성 곰팡이에 활성을 나타내는 천연 cyclic lipopeptide의 구조를 기반으로 한 신규 펩타이드 대량합성 방법을 이용하여 물질의 확보에 어려움이 있었던 문제점을 해결하고, 또한 고효율형 펩타이드를 설계하고 합성할 수 있는 방법을 확립할 수 있었다. 이러한 기술을 바탕으로 기존 방제에 어려움이 있었던 병원균에 대한 친환경 제제 개발이나 제품의 품질관리의 수월성을 확보하고 더 나아가 새로운 cyclic lipopeptide 의 합성에 응용할 수 있을 것이다.

나. 미생물제제의 대량생산용 배지 최적화 및 발효조건 확립

친환경 미생물제제를 생산, 판매하는 대부분 국내 기업의 경우 자금 보유 능력과 기술 수준이 매우 낮은 영세한 기업이 난립하고 있다. 이들 기업들의 특성상 우수한 미생물제제의 대량 생산을 위한 최적배지 및 발효조건 개발은 미미한 수준이며, *Bacillus* 속 균주가 대부분을 차지하고 있다. 또한 단순히 미생물제제의 생균수만 보증하고 대사산물의 효능이 검증되지 않아 친환경 미생물제제 사용 농가들의 신뢰도가 많이 떨어진다. 본 연구과제에서는 친환경 미생물제제로 개발되지 않은 *Paenibacillus* 속 균주들의 대량생산을 위한 배지 최적화, 발효조건 확립을 통해 생균수 보증, 대사산물의 효능 검증 등은 향후 친환경 미생물제제의 개발에 있어 밑거름이 될 것으로 판단된다.

2. 경제적 측면에서 기여도

친환경농업 확산에 따라 국내외의 화학농약과 화학비료 판매량은 매년 큰 폭으로 감소하고

있으며, 친환경 농자재가 이들 화학농약과 화학비료를 대체하고 있다. 그러나 친환경 농자재의 상대적으로 높은 가격은 사용 농가들의 구매력을 떨어뜨리고 있다. 따라서 본 연구에서는 저비용 고효율의 친환경 미생물제제의 개발을 목표로 하였다. 가격 경쟁력과 효능 측면에서 우수한 제품 개발을 원하는 기업에 기술이전을 통해 기업의 영세성을 극복할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 한중 등 FTA 발효로 인해 위축되고 있는 국내 농산물의 국제 경쟁력을 강화 및 고부가가치 농산물 생산으로 생산자의 소득 증대에 기여할 것으로 사료된다.

3. 사회적 측면에서 기여도

친환경농업에 대한 공감대가 형성되고 농업인들이 이를 실천하면서 화학농약, 화학비료, 항생제 사용과 판매량이 큰 폭으로 감소하고 있는 추세이다. 화학농약과 화학비료의 오남용은 토양 및 환경오염·파괴, 토양 내 유익곤충/미생물 치사, 약제내성 병해충 출현, 식품 내 농약 잔류물 존재 등 국민보건을 위협하는 치명적인 요소로 작용한다. 따라서 안전한 먹거리 공급을 통한 국민 건강, 보전에 기여할 수 있다. 또한 효능이 검증된 제품 개발 및 공급을 통해 친환경 미생물제제에 대한 신뢰도가 한층 높아질 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 연구개발 성과

1. 연구개발 성과목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기 타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표	3		4	4		2	2	3				3	
1차년도	목표			1									
	실적				5		1			4			
2차년도	목표	1	2	1									
	실적			1	13								
3차년도	목표	2	2	2		2	2	3				3	
	실적	2	3		11	2		1		3		2	
합 계	목표	3	4	4		2	2	3				3	
	실적	2	3	1	29	2	1	1		7		2	

2. 지식재산권

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
발명특허	식물병 방제 활성을 지닌 패니바실러스 엘기 BC34-6	대한민국	재단법인 전남생물산업진흥원	2014.10.06	10-2014-0134009				
발명특허	식물병 곰팡이 방제를 위한 바실러스아밀로리퀴페이션스 아종 플랜타럼 BC32-1의 활성물질과 이의 정제 및 생산방법	대한민국	이철원 외 4명	2015.06.18	10-2015-0086337				

3. 논문게재 및 학술회의 발표

가. 논문게재

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부(SCI/비SCI)
1	항토로부터 분리한 <i>Bacillus licheniformis</i> 의 항진균 chitinase생산과 효소특성	KSBB Journal	김시욱	29(2), 131-138	대한민국	한국생물공학회	비SCI
2	Isolation and NMR Analysis of Antifungal Fengycin A and B from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BC32-1	BULLETIN OF THE KOREAN CHEMICAL SOCIETY	남지영	36	대한민국	Korean Chemical Society	SCI
3	Structural characterization and temperature-dependent production of C17-fengycinB derived from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BC32-1	Biotechnology and Bioprocess Engineering	남지영	20	대한민국	The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering	SCIE
4	Enhanced method for microbial community DNA extraction and purification from agricultural yellow loess soil	Journal of Microbiology	김시욱	53(11)	대한민국	The Microbiological Society of Korea	SCIE

나. 국내 및 국제 학술회의 발표

국내 및 국제 학술회의 발표					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2013년도 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지움	서민경 외 6	2013.4.10..	광주, 김대중컨벤션센터	국내
2	2013년도 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지움	이병두 외 7	2013.4.10.	광주, 김대중컨벤션센터	국내
3	2013 한국미생물학회연합 국제학술대회	봉기문 외 4	2013.10.17.	서울, 더케이서울호텔	국내
4	2013 한국미생물학회연합 국제학술대회	봉기문 외 3	2013.10.17.	서울특별시	국내
5	2013 한국미생물학회연합 국제학술대회	김현석 외 4	2013.10.17.	서울특별시	국내

국내 및 국제 학술회의 발표					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
6	2013 한국미생물학회연합 국제학술대회	김민식 외 4	2013.10.17.	서울특별시	국내
7	2013 한국미생물학회연합 국제학술대회	봉기문 외 3	2013.10.17.	서울특별시	국내
8	2013 Asian Congress on Biotechnology	김종민 외 3	2013.12.15.	인도, 뉴델리	인도
9	2013 Asian Congress on Biotechnology	정해광 외 4	2013.12.15.	인도, 뉴델리	인도
10	2014년도 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지움	서민경 외 6	2014.4.9.	경주, 현대호텔	국내
11	2014년도 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지움	정민영 외 6	2014.4.9.	경주, 현대호텔	국내
12	2014 한국미생물학회 국제학술대회	김근호 외 3	2014.04.30.	대구광역시	국내
13	2014 한국미생물학회 국제학술대회	김종민 외 4	2014.04.30	대구광역시	국내
14	제16회 대한화학회 광주전남북지부 학술 발표회	남지영 외 1	20140530	전주대학교	국내
15	제18회 한국펩타이드단백질학회	남지영 외 3	20140707	부산해운대 한화리조트	국내
16	2014년도 한국생물공학회 추계학술발표대회 및 국제심포지움	이병두 외 6	2014.10.5.	창원, 컨벤션센터	국내
17	대한화학회	남지영 외 2	20141219	부산대학교	국내
18	한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지움	남지영 외 1	20150416	여수엑스포	국내
19	한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지움	김주은 외 1	20150416	여수엑스포	국내
20	제17회 광주전남북지부학술대회	남지영 외 1	20150529	전남대학교	국내
21	제17회 광주전남북지부학술대회	김주은 외 1	20150529	전남대학교	국내
22	제19회 한국펩타이드단백질학회	남지영 외 1	20150706	태안안면도	국내
23	IUPAC-2015 (국제 순수 및 응용화학연맹-제45회 세계화학의회)	남지영 외 1	20150811	부산벡스코	국내
24	IUPAC-2015 (국제 순수 및 응용화학연맹-제45회 세계화학의회)	김주은 외 1	20150811	부산벡스코	국내

국내 및 국제 학술회의 발표					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
25	제18회 한국펩타이드단백질학회	윤효숙 외 1	20140707	부산해운대 한화리조트	국내
26	2013년도 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지움	봉기문 외 3	20130410	광주김대중 컨벤션센터	국내
27	미국 펩타이드학회	이철원	20130624	미국하와이	국외
28	대한화학회 제 114회 총회, 학술발표회 및 기기전시회	윤효숙 외 1	20141015	광주김대중 컨벤션센터	국내
29	2014 한국생물공학회 추계학술발표대회 및 국제심포지움	김종민 외 3	20141006	경상남도 창원시 창원 컨벤션센터	국내

4. 기술거래 및 기술료

기술거래(이전)					
번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)
1	통상실시권	패니바실러스 엘지 BC34-6 균주 및 이를 이용한 작물 병 방제용 제품생산에 대한 제반사항	(주) 마이크로자임	2014. 11. 21.	경상기술료 매출에 따른 기술료 징수 시작일 : 2016. 1. 1. 징수율 : 매출액의 3%
2	통상실시권	패니바실러스 엘지 BC34-6 균주 및 이를 이용한 작물 병 방제용 제품생산에 대한 제반사항	영농조합법인 양지엔텍	2014. 11. 21.	무상

5. 교육 및 지도활용 내역

교육 및 지도활용 내역				
번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도
1	미생물 대사산물 분석법	대사산물 구조 분석	-미생물 대사산물 분석법의 개요 및 교육 계획 -미생물 배양 기본기술 -최적의 미생물 배양조건 -미생물로부터 대사산물 분리법 -미생물로부터 대사산물 확인	

6. 사업화

기술사업화								
번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	매출 발생여부	제품 매출액	고용창출	R&D 기여율
1	풍년가	작물 성장촉진용 미생물비료	자체 활용	사업화 시작 단계	0	0	0	100

7. 기술 및 제품 인증

기술 및 제품 인증						
구 분	인증분야	인증기관	인증내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증번호		

8. 인력활용/양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
	양성	2013 ~ 2015	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				7			6	1				7	

9. 정책활용 내역

정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)				
번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도

10. 홍보/전시

가. 홍보실적

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	인터넷 신문	아시아경제, 뉴스웨이	전남생물산업진흥원, 황토 추출 작물병 방제 유용미생물 사업화 “생물방제연구원, 개발 기술 양지엔텍 등 지역 기업에 이전	2014. 12. 22.

나. 전시회 등 참여

전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
1	박람회	2015 국제농업박람회	미생물제제(풍년가 등)	전남 나주	2015

다. 기타 활용 및 홍보실적

기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)			
번호	일자	활용명칭	활용내역
1	2015-08-26	미생물제제 사용 메뉴얼	미생물제제 “풍년가” 사용 메뉴얼

11. 기타

가. 국제화 협력성과

국제화 협력성과								
번호	유치기간	국적	학위	전공	파견기간	파견국	학위	전공

나. 타 연구개발사업에의 활용

타 연구개발사업에의 활용					
번호	연구사업명	과제명	책임자	과제발주처 (부처)	활용년도

다. 포상 및 수상 실적

포상 및 수상실적					
종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일자	포상기관

제 2 절. 연구개발 성과활용 계획

1. 실용화 계획

본 연구를 통해 개발된 고추 탄저병 방제제로 효능이 탁월한 *Paenibacillus elgii* BC34-6 미생물제제는 현재까지 개발되지 않은 *Paenibacillus* 속의 균주를 이용한 것으로, 본 연구에서는 이 균주의 균체 수와 항진균 물질의 대량생산 최적배지 개발, 발효공정 확립과 미생물제제의 보존 기간을 향상 시킬 수 있는 기술을 개발하였다. 이러한 기술들은 현재 대부분 미생물제제로 사용되고 있는 *Bacillus* 속 균주가 아니면서도 효능이 우수한 *Paenibacillus* 속을 이용하는 것으로, 향후 친환경 농자재 개발에 확산되어 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 위의 기술들은 2개 기업 ((주) 마이크로자임, 영농조합법인 양지엔텍)에 기술이전 하였으며, 유기농자재 목록 공시 등재 후 2016년부터 시제품 생산과 더불어 농가에 저비용 고효율의 작물 병원성 곰팡이 방제제로 보급 할 예정이다.

또한 오이와 토마토의 성장촉진 효능과 작물 세균병 방제 활성이 우수한 *Bacillus subtilis* MRS6-4, *Bacillus methylotrophicus* GM2 미생물제제의 대량생산을 위한 최적의 발효공정을 개발하였다. *Bacillus subtilis* MRS6-4의 작물 성장촉진 효능을 바탕으로 미생물비료 (명칭 : 풍년가)로 등록하였으며, 이는 오이, 토마토를 비롯한 시설원예 작물에 적용 가능할 것으로 판단된다. 더불어 *Bacillus methylotrophicus* GM2 미생물제제는 작물의 세균병 방제용 유기농자재로 목록 공시할 것이다.

본 연구팀의 협동기관인 전남생물방제센터는 다양한 미생물제제의 생산을 해왔으며 3톤 규모의 생산시설을 갖추어 제품의 본격적인 생산을 위한 준비가 완료되어 있다. 기존 미생물제제의 생산단가 및 생산량에 따른 매출규모를 감안할 때, 개발된 제품을 연간 2만리터 생산하여 판매할 경우 10억 정도의 매출과 50%의 이익률을 보일것으로 예상된다.

국내에서 시판되는 주요 생물농약의 효능 및 가격 등을 비교한 결과, 본 연구팀이 발굴한 *Paenibacillus elgii* BC34-6은 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (시들음병), *Sclerotinia sclerotiorum* (균핵병) *Colletotrichum coccodes* (탄저병)등 다양한 식물병원성 곰팡이에 효과적이며, 또한 응애의 방제에도 효과를 보여 기존 미생물제제에 비하여 광범위한 작용범위를 나타내는 것으로 확인하였다. 그리고 그림 15.1(p.171)에서의 결과에서와 같이 기존 제품에 비하여 강력한 항진균활성을 나타내는 것을 pot assay를 통하여 확인할 수 있었다. 생물방제센터의 대량생산 기술을 고려할 때 기존 미생물제제에 비하여 낮은 비용으로 제품을 생산할 수 있는 이점도 갖고 있다. 이러한 장점등을 고려할 때 실제 제품 생산 및 판매에 있어 미생물제제 시장에서 강한 경쟁력을 갖을 것으로 예상된다.

표. 국내 주요 생물농약 현황

구분	품목명	주성분 함량	상표명	적용병해	가격(원)	사용 희석비율
수입	바실루스 서브틸리스 큐에스713	1×10 ⁹ CFU/g	세레나데	흰가루병, 갯빛곰팡이병, 무름병, 탄저병, 균핵병	38,000/500ml	100~500배
수입	바실루스 서브틸리스 와이1336	1×10 ⁹ CFU/g	바이봉	흰가루병		300~400배
수입	바실루스 무밀루스 큐에티2808	1×10 ⁹ CFU/g	에코센스	역병, 흰가루병, 노균병, 잎도열병		100~250배
국내제조	바실루스 서브틸리스 케이비시1010	1×10 ⁵ CFU/g	재노탄	갯빛곰팡이병	22,000/500ml	500배
국내제조	바실루스 아밀로리퀴파시엔 스 케이비시1121	1×10 ⁶ CFU/g	청마름	풋마름병	22,000/200ml	200배
국내제조	바실루스서브틸리 스 디비비1501	1×10 ⁹ CFU/g	테라스	흰가루병, 잎도열병, 탄저병, 세균성구멍병, 점무늬병		500배
국내제조	바실루스 서브틸리스 케이비401	1×10 ⁷ CFU/g	슈팅스타	흰가루병		400배
국내제조	암펠로마이세스 퀴스칼리스 에이큐94013	1×10 ⁷ CFU/g	큐펙트	흰가루병		200~1000배
국내제조	패니바실루스 폴리믹사 에이시-1	1×10 ⁶ CFU/g	탐시드	흰가루병, 역병, 무름병, 잎도열병		500배
국내제조	바실루스 서브틸리스 제이-9	1×10 ⁷ CFU/g	탐세이버	마름병, 잎마름병		100배

2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획

Paenibacillus elgii BC36-4 미생물제제의 효능과 기술 개발을 바탕으로 「황토 유래 작물 병 방제 유용미생물 기술 사업화」 기사로 아시아경제와 뉴스웨이(2014.12.22.) 등 인터넷 신문에 홍보되었다. 또한 시제품 생산 후에는 농가 현장에서 실증시험을 통해 본 미생물제제의 효능과 사용법 등을 지도·교육할 예정이다.

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

작물 병원성 곰팡이 방제 효능이 탁월한 *Paenibacillus elgii* BC36-4 균주를 이용한 연구 결과를 「식물병 방제 활성을 지닌 패니바실러스 엘기 BC 34-6 균주」 내용으로 특허 출원하였으며 국제저명학술지에 논문 게재 예정이다(2016년 예정). 또한 *Brevibacillus laterosporus* TSA 31-5의 고추 잣빛곰팡이 방제, *Bacillus methylotrophicus* GM2의 작물 세균병 방제 효능 결과도 특허 출원과 논문에 게재할 예정이다.

그리고 *Paenibacillus kribensis* CU01 균주의 연구 결과에 대한 논문 및 특허를 작성중에 있으며 확보한 신규 cyclic lipopeptide 의 구조결정을 진행 중에 있고 그 물질들에 대한 활성기작 연구와 구조 분석 연구가 완료되면 학술논문 발표와 특허출원을 계획 중에 있다(2016년 예정).

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음.

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

해당사항 없음

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

제 1 절. 조선대학교(제1세부)

1. 제1세부 조선대학교 연구팀은 ‘연구실안전환경조성에 관한 법률 제18조(교육·훈련), 동법 시행규칙 제9조(교육·훈련의 시간 및 내용), 실험·실습운영규정 제6조(안전관리)’에 의거하여 매 학기 6시간의 ‘사이버안전교육’을 수료하고, 년 1회 이상 소방안전점검 및 실험실안전점검을 받고 있으며, 실험실 안전관련 외부 전문강사의 강연을 받음.
2. 연구실과 연구원의 연구분야 및 사용 시약에 따른 분류를 통해 연간 1회 기본건강검진과 정밀검진을 시행함.
3. 본 연구실에서 배출되는 유기성, 산·염기 폐 시약들은 각기 지정된 폐수통에 분류되어 주 1회 본교에 위치한 폐수처리시설에서 개별 처리하고 있으며, 병원성 미생물 포함한 미생물 기반 연구실에서 배출되는 폐기물은 개별로 분류하여 미생물 폐기용 팩에 수거하여 멸균 후 밀봉하여 개별 폐기함.
4. 연구실의 대용량 전력이 요구되는 장비들은 개별 전원장치를 설치하여 사용 중이며, 모든 전원공급장치에 누전차단기를 설치하여 전기 과부화로 인한 사고를 미연에 방지함. 분석 및 기타 장비에 사용되는 고압가스는 단단히 결박하여 보관 및 사용 중 이며, 가스누출 경보기를 설치하여 가스누출사고를 미연에 방지함.

제 2 절. 전남대학교(제1협동)

1. 제 1협동 전남대학교 연구팀은 국가의 “연구실 안전환경 조성에 관한 법률”을 준수하여 과학기술분야 연구 활동 종사자(대학생, 대학원생, 연구원, 연구보조원 등)는 연구실 (실험실·실습실 포함) 출입시 안전사고를 예방하고자 연구실 안전교육을 매월 1시간이상 년 12시간 이상 받았다. 실험실 안전을 위해 매년 2회에 걸쳐 안전점검을 실시하였고, 기준에 상응하지 않을 시 즉시 시정조치 하였다. 더불어 가스를 사용하는 장치에 대해서는 정밀안전진단을 실시하였다. 본 연구실에는 개인 안전 보호 장비(방독면, 마스크, 보안경)와 실험실 전용 소화기를 구비하고 개인 장비의 사용법과 소방 안전 교육을 연 2회에 걸쳐 시행하였다. 또한 연구 보조원 전원이 대한산업보건협회에서 실시하는 일반건강검진을 매년 1회 (매년 10월 경) 받고 있다. 이와 같은 안전 조치를 지속적으로 이행하였다.
2. ‘연구실 안전 환경 조성에 관한 법률 제18조(교육·훈련), 동법 시행규칙 제9조(교육·훈련의 시간 및 내용), 실험·실습운영규정 제6조(안전관리)’에 의거하여 매학기 6시간의 ‘사이버안전교육’을 수료하였으며, 이번 학기에도 완료한 상태이다. 또한 년 1회 이상 소방안전점검 및 실험실안전점검 뿐 아니라, 학부 내 실험실 안전관련 외부 전문 강사와 더불어 학과장과의 세미나를

통한 안전교육을 받았다.

3. 본 연구실에서 추출 및 펩타이드 합성에 사용하면서 배출되는 유기성, 산·염기 폐 시약이 많은데, 이를 모두 각기 지정된 후드 안에서 수집하는 한편, 폐수통과 보관실에 분류하였다. 이 폐기물들은 월 2회 본교 및 학과 (자연대)에서 정해진 규정 및 내규에 따라 폐수처리시설 및 운반업체에서 처리하고 있다. 한편, 병원성 미생물 및 면역 실험과 관련하여 배출되는 폐기물은 개별로 분류하여 미생물 폐기용 팩 및 전용 팩에 이중 수거하여 멸균 후 밀봉하여 개별 폐기하였다.

4. 연구실의 대용량 전력이 요구되는 장비 (특히, API 2000)는 개별 전원장치를 설치하여 사용 중이며, 갑작스러운 전원공급이 중단되더라도 기기 및 전원 장치에 이상이 없게 무정전전원장치인 UPS를 부착하였다. 더불어 모든 전원 공급 장치에 누전차단기가 설치되어 전기 과부화로 인한 사고를 미연에 방지하는 한편, 분석 및 기타 장비에 사용되는 고압가스는 가스전용 벨트로 결박하여 사용하고 있다. 또한 연구실에 가스누출 경보기가 설치되어 가스누출사고를 방지할 수 있다.

5. 연구실 및 연구원의 연구 분야 및 사용 시약에 따른 횟수 등을 확고히 조사하고 있으며 이에 따라 관련된 모든 연구원들은 연간 1회 (매년 약 10월 경) 기본건강검진과 정밀검진을 시행 받고 있다.

제 3 절. 전라남도 생물방제센터(제2협동)

1. 제2협동 생물방제연구센터 연구팀은 ‘연구실안전환경조성에 관한 법률 제18조 (교육·훈련), 동법 시행규칙 제9조 (교육·훈련의 시간 및 내용), 실험·실습운영규정 제6조 (안전관리)’ 에 의거하여 매년 12시간의 ‘사이버안전교육’ 을 수료하고, 년 1회 이상 소방안전점검, 실험실안전점검을 받고 있음.

2. 연구실과 연구원의 연구 분야 및 사용 시약에 따른 분류를 통해 매년 기본 건강검진과 정밀 검진을 받고 있음.

3. 본 연구실에서 배출되는 유기성, 산·염기 폐 시약들은 각기 지정된 폐수 저장 탱크에 분류되어 월 1회 폐수처리 전문업체에 위탁하여 처리하고 있으며, 병원성 미생물 포함한 미생물 기반 연구실에서 배출되는 폐기물은 개별로 분류하여 미생물 폐기용 팩에 수거하여 멸균 후 밀봉하여 개별 폐기함.

4. 연구실과 시제품 생산시설의 대용량 전력이 요구되는 장비들은 개별 전원장치를 설치하여 사용 중이며, 모든 전원 공급 장치에 누전차단기를 설치하여 전기 과부화로 인한 사고를 미연에 방지함. 또한 연구 및 시제품 생산 장비에 사용되는 고압가스는 단단히 결박하여 보관 및 사용 중 이며, 가스누출 경보기를 설치하여 가스 누출사고를 미연에 방지함.

제 9 장 참고문헌

제 3 절 참고문헌

- Kim, HY., Lee, TS. (2009). "Isolation of Antifungal Substances by *Bacillus amyloliquefaciens* IUB158-03 and Antagonistic Activity against Pathogenic Fungi." *The Korean Journal of Mycology*. 37(1):96-103.
- Cook, R. J. (1985). "Biological control of plant pathogens: Theory to application." *Journal of Phytopathology*. 75:25-28.
- Burpee, LL., L. G. Goult. (1984). Evaluations of fungicides for control of pink and gray snow mold on creeping bentgrass. pp.6-7, In; Turfgrass Research Annual Report, R. W. Sheard(ed). Univ. of Guelph, Ontario. 38.
- Yoshie, Y., I. Katsushige, U. Yoshihisa, O. Atsuko, T. Kazutoh, K. Ikunoshin and N. Hiroshin. (1993). "Isolation, structures, and antifungal activities of new Aureobasidins." *The Journal of Antibiotics*. 46:1347-1354.
- M, Ongena., P, Jacques. (2008). "*Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol," *Trends in Microbiology*. 16(3):115-125.
- Schneider, T., Müller, A., Miess, H., Gross, H. (2014) "Cyclic lipopeptides as antibacterial agents - potent antibiotic activity mediated by intriguing mode of actions." *International Journal of Medical Microbiology* 304(1):37-43.
- Salas, JA., Mendez, C. (2007). "Engineering the glycosylation of natural products in actinomycetes." *Trends in Microbiology*. 15:219-232.
- Tserkovniak, LS., Roi, AO., Kurdysh, IK. (2009). "Synthesis of amino acids of *Bacillus subtilis* IMV V-7023 in the medium with glycerophosphates." *Mikrobiol. Z journal* 71:218-232.
- Glick, BR., Patten, CL., Holguin, G., Penrose, DM. (1999). "Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria." *Journal of Theoretical Biology*. 190:63-68.
- Dunne, C., Crowley, JJ., Loccoz, YM., Dowling, DN., De Bruijn F., Gara, FO. (1993). "Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity." *Microbiology* 143:3921- 3931.
- Ongena M, Jacques P (2008). "Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*." *Trends in Microbiology*. 16:115-125.
- Moyne, AL., Cleveland, TE., Tuzun, S. (2004). "Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D." *FEMS Microbiology Letters*. 234:43-9.
- Bais, HP., Fall, R., Vivanco, JM. (2004). "Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of

Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production.” *Plant Physiology*. 134:307-319.

Kim, PI., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y., Park, R., Chi, YT. (2004). “Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26.” *Journal of Applied Microbiology*. 97:942-949.

Monteiro L, Mariano RLR, Souto-Maior AM (2005). “Antagonism of *Bacillus* ssp. Against *Xantomonas campestris* pv. *Campestris*.” *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48:23-29.

Barakate, M., Ouhdouch, Y., Oufdou, KH., Beaulieu, C. (2002). “Characterization of rhizospheric soil *Streptomyces* from Moroccan habits and their antimicrobial activities.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18:49-54.

Yun, YE., Q, LI., Gang, FU, Gao, Y., Jian, M., Wei, L. (2012). “Identification of antifungal substance (Iturin A2) produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on southern corn leaf blight.” *Journal of Integrative Agriculture*. 1:90-99.

Caldeira, AT., Santos Arteiro JM, Coelho, AV., Roseiro, JC. (2011). “Combined use of LC-ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051.” *Process Biochemistry*. 46:1738-1746.

Zhenzhen, Z., Qiushuo, W., Kaimei, W., Kemp, B., Changhong, L., Yucheng, G. (2010). “Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components.” *Bioresource Technology*. 101:292-297.

Katz, E., Demain. AL. (1977) “The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions.” *Bacteriological Review* 41(2):449-474.

Romano, A., Vitullo, D., Di Pietro, A., Lima, G., Lanzotti, V. (2011) “Antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO7.” *Journal of Natural Products* 74(2): 145-151.

Chun, J., Bae, KS. (2000) “Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences.” *Antonie Van Leeuwenhoek* 78(2):123-7.

Larkin, MA., Blackshields, G., Brown, NP., Chenna, R., McGettigan, PA., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, IM., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, JD., Gibson, TJ., Higgins, DG. (2007). “Clustal W and Clustal X version 2.0.” *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). “MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0” *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729

제 4 절 참고문헌

Ding, R., Wu, X.C., Qian, C.D. et al., (2011). “Isolation and identification of lipopeptide antibiotics from *Paenibacillus elgii* B69 with inhibitory activity against methicillin-resistant

Staphylococcus aureus.“ *The Journal of Microbiology.* 49(6): 942-9

Ash C., Priest FG & Collins MD (1993). “Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test.” *Antonie van Leeuwenhoek.* 64: 253-260

Hura C, Leanca M, Rusu L & Hura BA (1999) “Risk assessment of pollution with pesticides in food in the eastern Romania area.” *redirect Toxicology Letters* 107: 103-107.

Klevens, R.M., M.A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S.Ray, L.H. Harrison, and et al., (2007). “Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the united states.” *Journal of the American Medical Association.* 298: 1763-1771.

Mercier J & Manker D., (2005) “Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in greenhouse soilless mix by the volatile-producing fungus *Muscodor albus.*“ *Crop Protection* 24: 355-362.

Chen, L., N. Wang, X. Wang, J. Hu, and S. Wang. (2010). “Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10.” *Bioresource Technology* 101: 8822-8827.

Cook, R.J., Bruckart, W.L., Coulson, J.R., Goettel, M.S. et al., (1996). “Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation.” *Biological Control* 7: 333-351.

Wu, X.C., Shen, X.B., Ding, R., Qian, C.D. et al. (2010). “Isolation and partial characterization of antibiotics produced by *Paenibacillus elgii* B69.” *FEMS Microbiology Letters.* 310:32-38.

제 5절 참고문헌

Jacob, B., Kim, Y., Hyun, JK., Park, IS., Bang, JK., Sin, SY. (2014). “Bacterial killing mechanism of sheep myeloid antimicrobial peptide-18 (SMAP-18) and its Trp-substituted analog with improved cell selectivity and reduced mammalian cell toxicity.” *Amino Acids.* 46:187-198.

제 6 절 참고문헌

Mahadevan, B. and D. L. Crawford (1997). “Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108.” *Enzyme and Microbial Technology* 20(7): 489-493.

Raaijmakers, J. M., M. Leeman, et al. (1995). “Dose-response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp.” *Phytopathology* 85(10): 1075-1081.

Boller, T., A. Gehri, et al. (1983). “Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function.” *Planta* 157(1): 22-31.

Cabib, E. (1987). “The synthesis and degradation of chitin.” *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Volume 59: 59-101.

- Wiwat, C., P. Siwayaprahm, et al. (1999). "Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No. 4.1." *Current microbiology* **39**(3): 134-140.
- Hiraga, K., L. Shou, et al. (1997). "Isolation and characterization of chitinase from a flake-chitin degrading marine bacterium, *Aeromonas hydrophila* H-2330." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **61**(1): 174-176.
- Christodoulou, E., F. Duffner, et al. (2001). "Overexpression, Purification, and Characterization of a Thermostable Chitinase (Chi40) from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520." *Protein expression and purification* **23**(1): 97-105.
- Lee, H.-S., D.-S. Han, et al. (2000). "Purification, characterization, and primary structure of a chitinase from *Pseudomonas* sp. YHS-A2." *Applied microbiology and biotechnology* **54**(3): 397-405.
- CRUZ, J., A. HIDALGO-GALLEGO, et al. (1992). "Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*." *European Journal of Biochemistry* **206**(3): 859-867.
- 이영근, 김재성, et al. (2003). "보문: 방사선유도 돌연변이체 *Bacillus lentimorbus* WJ5a17 에 의한 *Pythium* Root rot 의 방제." *환경생물학회지 (환경생물)* **21**(3): 276-285.
- 황진연, 장명익, et al. (2000). "논문: 우리 나라 황토 (풍화토) 의 구성광물 및 화학성분." *한국 광물학회지* **13**(3): 147-163.
- Jeon, Y.-J., F. Shahidi, et al. (2000). "Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods." *Food Reviews International* **16**(2): 159-176.
- Hucker, G. J. and H. J. Conn (1923). "Methods of Gram staining."
- Chada, V. G., E. A. Sanstad, et al. (2003). "Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces." *Journal of bacteriology* **185**(21): 6255-6261.
- 신현성·이규식, (2000) 일반미생물학, 개정판, 형설출판사, P. 585-606
- Bunn, H. F., D. N. Haney, et al. (1975). "Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A 1c." *Biochemical and biophysical research communications* **67**(1): 103-109.
- Miller, G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar."

Analytical chemistry **31**(3): 426-428.

Plackett, R. L. and J. P. Burman (1946). "The design of optimum multifactorial experiments." *Biometrika* **33**(4): 305-325.

Veith, B., C. Herzberg, et al. (2004). "The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential." *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **7**(4): 204-211.

김현정 (1998). "Chitinase를 생산하는 균주분리와 그 균주가 만드는 Chitinase의 정제 및 특성 연구." 국내박사학위논문, 이화여자대학교 대학원.

Sasser, M. (1990). "Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids."

Roberts, M. S., L. Nakamura, et al. (1994). "Bacillus mojavensis sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition." *International journal of systematic bacteriology* **44**(2): 256-264.

Roberts, M. S., L. Nakamura, et al. (1994). "Bacillus mojavensis sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition." *International journal of systematic bacteriology* **44**(2): 256-264.

Takayanagi, T., K. Ajisaka, et al. (1991). "Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1078**(3): 404-410.

제 7 절 참고문헌

Muto, C., J. Jernigan, B. Ostrowsky, H. Richet, W. Jarvis, J. Boyce, and B. Farr. (2003). "Shea guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*." *Infection Control & Hospital Epidemiology* **24**: 362-386.

Areum Shin., Eunjung Lee, Dasom Jeon, Young-Guen Park, Jeong Kyu Bang, Yong-Sun Park, Song Yub Shin, and Yangmee Kim., (2015) "Peptoid-Substituted Hybrid Antimicrobial Peptide Derived from Papiliocin and Magainin 2 with Enhanced Bacterial Selectivity and anti-inflammatory Activity." *Biochemistry* **54**: 3921-3931

Mija Ahn., Binu Jacob., Pethaiah Gunasekaran., Ravichandran N. Murugan., Eun Kyoung Ryu .,

Ga-hyang Lee., Jae-Kyung Hyun., Chaejoon Cheong., Nam-Hyung Kim., Song Yub Shin., Jeong Kyu Bang., (2014) “Poly-lysine peptidomimetics having potent antimicrobial activity without hemolytic activity.” *Amino Acids* 46:2259-269

Ganesan Rajasekaran., a Radhakrishnan Kamalakannanb., Song Yub Shin., (2015), “Enhancement of the anti-inflammatory activity of temporin-1TI-derived antimicrobial peptides by tryptophan, arginine and lysine substitutions.” *Reseach article* 21: 779-785

제 8 절 참고문헌

Eunjung Lee, AreumShin, Ki-Woong Jeong, Bongwhan Jin, Hum Nath Jnawali, Soyoung Shin, Song Yub Shin, Yangmee Kim., (2014), “Role of Phenylalanine and Valine¹⁰ Residues in the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Piscidin-1.” *PLOS ONE*, 9(12): 114453.

Kathi C., Geike., Igor *et al.*, (2013), “What Goes around Comes around-A Comparative Study of the Influence of Chemical Modifications on the Antimicrobial Properties of Small Cyclic Peptides” *Pharmaceuticals* 6: 1130-1144

Wuixia Sun., Yalin Chai et al., (2015), “A natural interruption displays higher global stability and local conformational flexibility than a similar Gly mutation sequence in collagen mimic peptides” *BIOCHEMISTRY* 10: 1021

제 10 절 참고문헌

김효윤 (2006). “국내 토양에서 분리한 *Paenibacillus polymyxa* DY5 균주가 생산하는 항진균 물질에 관한 연구.” 국내박사학위논문, 안동대학교 대학원.

Saitou, N., Nei, M. (1987). “The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.” *Molecular Biology and Evolution* 4(4): 406-425

Hucker, G. J. and H. J. Conn (1923). “Methods of Gram staining.”

Chada, V. G., Sanstad, E. A., Wang, R., and Driks, A. (2003). “Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces.” *Journal of bacteriology* 185(21): 6255-6261.

신현성이규식, (2000) 일반미생물학, 개정판, 형설출판사, P. 585-606

제 11 절 참고문헌

- Beatty, P. H., & Jensen, S. E. (2002). Paenibacillus polymyxa produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against Leptosphaeria maculans, the causative agent of blackleg disease of canola. Canadian Journal of Microbiology, 48, 159-169.
- Raza, W., Yang, W., & Shen, Q. R. (2008). Paenibacillus polymyxa: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. Journal of Plant Pathology, 90, 403-414.
- Finking R, Marahiel MA. Biosynthesis of nonribosomal peptides 1. Annu Rev Microbiol 2004;58:453-488
- Cochrane, S.A., Vederas, J.C.: Lipopeptides from Bacillus and Paenibacillus spp.: a gold mine of antibiotic candidates. Med. Res. Rev. (2014). doi:10.1002/med 21321
- Kim, P.I., Ryu, J., Kim, Y.H., and Chi, Y.T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A Fengycin and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. J. Microbiol. Biotechnol. 20, 138-145.
- Yang, J., Ji, J.Y., Kang, Z.S., and Huang, L.L. 2012. Optimization of fermentation conditions of antifungal lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* E1R-j. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinia. 21, 54-60.
- Gu, X.B., Zheng, Z.M., Yu, H.Q., Wang, J., Liang, F.L., and Liu, R.L. 2005. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. Process Biochem. 40, 3196-3201.
- Staudt C, Horn H, Hempel DC, Neu TR (2004). "Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms". Biotechnol. Bioeng. 88 (5): 585-92
- Flemming, Hans-Curt; Wingender, Jost; Griebe, Thomas; Mayer, Christian (December 21, 2000), "Physico-Chemical Properties of Biofilms", in L. V. Evans, Biofilms: Recent Advances in their Study and Control, CRC Press, p. 20
- Donlan RM (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces". Emerging Infect. Dis. 8 (9): 881-90
- Ohno, N., N. Miura, M. Nakajima and T. Yadomae, (2000). Antitumor 1-3- β -glucan from cultured fruit body of *Sparasis crispa*. Boil. Pharm. Bul., 23: 866-872.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances Analytical Chemistry. 28: 350-356.

Donlan RM, Costerton JW (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms". Clin. Microbiol. Rev. 15 (2): 167-93

제 12 절 참고문헌

T. J. P. Smyth, A. Perfumo, S. McClean, R. Marchant, I. M. Banat (2010). "Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants" In book: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, pp.3687-3704

Kajimura Y, Kaneda M. Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8 taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. J Antibiot 1996;49(2):129-135.

Deng Y., Lu Z., Bi H., Lu F., Zhang C., Bie X. 2011. Isolation and characterization of peptide antibiotics LI-F04 and polymyxin B6 produced by *Paenibacillus polymyxa* strain JSa-9. Peptides. 32(9):1917-23

Choi SK, Park SY, Kim R, Lee CH, Kim JF, Park SH. 2008. Identification and functional analysis of the fusaricidin biosynthetic gene of *Paenibacillus polymyxa* E681. Biochem Biophys Res Commun. 4;365(1):89-95.

Kim, P.I., Ryu, J., Kim, Y.H., and Chi, Y.T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A Fengycin and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. J. Microbiol. Biotechnol. 20, 138-145.

제 14 절 참고문헌

Gavino, P. D., Smart, C. D., Sandrock, R. W., Miller, J. S., Hamm, P. B., Lee, T. Y., et al. (2000). Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States: generation of an aggressive lineage. Plant Disease, 84, 731-735.

Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. St Paul, MN, USA: American Phytopathological Society Press.

Kamoun, S., Huitema, E., & Vleeshouwers, V. G. A. A. (1999). Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response. Trends in Plant Science, 4, 1360-1385.

Hausbeck, M. K., & Lamour, K. H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease*, 88, 1292-1303.

Hwang, B. K., & Kim, C. H. (1995). *Phytophthora* blight of pepper and its control in Korea. *Plant Disease*, 79, 221-227.