

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001028-01

과제번호 108018-3

세균 적정 밀도 인식 체계 연구 및 이용 기술 개발
(Studies on bacterial quorum sensing system for
the development of biocontrol agent)

한국생명공학연구원

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “세균 적정 밀도 인식 체계 연구 및 이용 기술 개발에 관한 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2011년 12월 5일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 김 창 진(책임연구원)

세부연구책임자 : 김 종 평(책임연구원)

연 구 원 : 박 동 진(책임기사)

연 구 원 : 이 재 찬(객원선임연구원)

연 구 원 : 권 미 경(박사후 연구원)

연 구 원 : 주 윤 정(석사후 연구원)

연 구 원 : 장 종 옥(박사과정)

연 구 원 : 강 혜 영(석사과정)

연 구 원 : 장 용 하(석사후 연구원)

협동연구기관명 : (주)흙살림

협동연구책임자 : 주 영 직(과장)

연 구 원 : 양 병 근(부장)

연 구 원 : 김 봉 주(사원)

연 구 원 : 유 영 미(사원)

보고서 요약서

과 제 명	세균 걱정 밀도 인식 체계 연구 및 이용 기술 개발				
	Studies on bacterial quorum sensing system for the development of biocontrol agent				
주관연구기관	한국생명공학연구원		주 관 연 구 책 임 자	한국생명공학연구원	
참 여 기 업	(주)홍살림		김 창 진		
총연구개발비 (480,000,000)	계	480,000,000	총 연구 기간	2008. 6. 25 ~ 2011. 6. 24	
	정부출연 연구개발비	360,000,000	총 참 여 연구 원 수	총 인 원	13명
	기업부담금	120,000,000		내부인원	9명
	연구기관부담금			외부인원	4명
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <p>세균은 신호물질(autoinducer)을 매개로 서로 통신할 수 있는 독특한 신호전달체계(quorum sensing system, 걱정밀도 인식체계)를 가지고 있으며, 병원성 세균은 숙주를 효과적으로 감염시키기 위해 이러한 신호물질을 통해 세균 간 신호전달체계를 가동함으로써 병을 일으키고 있음이 밝혀져 왔다. 배추무름병의 병독성 유전자들의 발현 유도는 N-acyl homoserine lactone(AHL) 신호전달 기작에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으며 세균간 신호전달 체계의 조절 및 이용 기술은 돌연변이 내생균의 출현을 근원적으로 감소시키는 신개념 생물학적 제어 방법이 될 수 있을 것이다. 본 연구에서는 배추무름병균을 방제하기 위하여 토양 방선균으로부터 신호전달저해(QSI: quorum sensing inhibition) 활성균주를 스크리닝하여 우수 균주를 선발하고, 신호전달저해 활성 최적화와 기작 연구를 통하여 새로운 개념의 생물학적 방제제를 개발하고자 하였다.</p> <p>○ 연구결과</p> <ul style="list-style-type: none"> · 토양으로부터 신호전달저해(quorum sensing inhibition) 활성 우수균주인 AR54, AN090571, AN090072 균주를 선발함 · 배양배지의 탄소원, 질소원 선발 및 혼합 비율 조정에 의한 선발균주의 QSI 활성을 최적화 함 · AN090571 균주로부터 QSI 활성물질 pieridicin을 분리 정제하여 구조 분석함 · 신호전달 제어 작용기작 연구로 AN090072의 배추무름병균 병원성 관련 효소 저해활성 및 AHL 분해능을 확인하였고 AHL 분해 관련 유전자 탐색 및 분해 효소 정제 함. · 선발 균주 AN090571, AN090072의 제제화 및 제제의 특성·안전성 시험결과 독성 없음 확인 · 배추 절편시험에서 선발 균주의 배추무름병 발병 억제능을 확인함 					
색 인 어	한 글	쿼럼센싱, 신호전달저해, 생물학적 방제, 배추무름병, 미생물농약			
	영 어	Quorum sensing(QS), N-acyl homoserine lactone(AHL), AHL acylase, biotic pesticide, <i>Streptomyces</i> sp.			

요 약 문

I. 제 목

세균 적정 밀도 인식 체계 연구 및 이용 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

세균은 신호물질(autoinducer)을 매개로 서로 통신할 수 있는 독특한 신호전달체계(quorum sensing system, 적정밀도 인식체계)를 가지고 있으며, 병원성 세균은 숙주를 효과적으로 감염시키기 위해 이러한 신호물질을 통해 세균 간 신호전달체계를 가동함으로써 병을 일으키고 있음이 밝혀져 왔다. 그람음성세균의 신호물질은 N-acyl homoserine lactone(AHL) 계열의 화합물로 알려져 있으며, AHL에 의해 조절되는 신호전달 기작은 배추 무름병의 병독성 유전자들의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다. 최근 작물병 제어를 위하여 항생제 및 다양한 약제들이 사용중이나 이들에 대한 내성을 지닌 병원균들이 출현함으로써 병 방제에 실패한 경우들이 발생하고 있다. 따라서 세균간 신호전달 체계의 조절 및 이용 기술은 돌연변이 내성균의 출현을 근원적으로 감소시키는 신개념의 생물학적 제어방법이 될 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 배추 무름병균을 방제하기 위하여 토양 방선균으로부터 신호전달저해(quorum sensing inhibition) 활성균주를 스크리닝하여 우수 균주를 선발하고, 이들 균주들의 신호전달저해 활성 최적화와 기작 연구를 통하여 새로운 개념의 생물학적 방제제를 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 신호전달저해(quorum sensing inhibition)활성 우수 균주 스크리닝
- 선발 균주의 생물막(biofilm) 형성 저해 활성 검정
- 선발 균주의 식물세포벽 분해효소 활성 검정
- 선발 균주의 동정(형태학적·생리생화학적·분자계통분류학적 분석)
- 선발 균주의 배양특성 검정 및 신호전달 저해 활성 최적화
- 선발 균주 활성 물질 분리정제 및 구조분석
- 신호전달 제어 작용기작 연구
 - 배추 무름병균 병원성 관련 효소 저해활성 검정
 - AHL 분해능 검정
 - AHL 분해 유전자 탐색 및 분해효소 정제
- 선발 균주 제제화 및 시제품의 독성·안전성 평가
- 생물학적 방제제로 효과 검증

IV. 연구개발결과

○ 활성 우수 균주 선발

토양으로부터 신호전달저해(quorum sensing inhibition) 활성 우수 방선균을 선발하기 위하여 *Chromobacterium violaceum* CV026 균주를 이용해 well-diffusion assay 방법으로 스크리닝하였다. 약 4500여개의 방선균 배양 상등액을 분양받아 1, 2차 스크리닝을 거쳐 최종적으로는 일반 미생물 3종에 대해 항균활성이 없는 AR54, AN090571 그리고 AN090072의 세 균주를 선발하였다.

○ 활성 우수 균주의 분류동정

주사전자현미경(SEM: scanning electron microscope)으로 관찰을 통한 형태학적 특성 분석과 International Streptomyces Project(ISP)에 따른 생리생화학적인 특성분석 및 16S rRNA sequence 분석을 통하여 각각의 균주는 *Kitasatospora* sp. AR54, *Streptomyces* sp. AN090571 그리고 *Streptomyces* sp. AN090072로 명명하여 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다.

○ 물질 분리 정제 및 구조 분석

선발된 균주를 G. S. S. 배지에서 배양한 후 배양 상등액을 ethyl acetate로 추출한 다음 감압농축하여 silica gel column chromatography를 이용하여 분리하였다. 활성 물질은 HPLC를 통하여 확인하였다. 순수 분리된 활성물질은 ¹H-NMR, HMBC spectrum, COSY, ESI-MS spectrum 등의 방법으로 구조 분석하였고, 그 결과 *Kitasatospora* sp. AR54와 *Streptomyces* sp. AN090571 모두 piericidin A임을 확인하였다.

○ 독성평가

급성 경구, 급성 경피 및 급성 어독성 안전성 평가 결과 모든 투여동물에서 사망례는 관찰되지 않았고, 시험물질과 연관된 일반증상도 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서도 대조군과 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 또한 모든 생존동물에 대한 부검결과에서도 특이한 병리학적 소견은 관찰되지 않았으며 어독성 III급의 평가를 받았다.

○ *E. carotovora*에 대한 방제능 확인

세 균주의 배양액 혹은 그 추출물을 배추 절편 혹은 pot에서 방제능을 확인한 결과 *Kitasatospora* sp. AR54와 *Streptomyces* sp. AN090571는 *E. carotovora*에 대한 방제능이 떨어졌지만, *Streptomyces* sp. AN090072는 추출물에서는 방제능이 떨어졌으나 배양액 자체에서 방제능이 우수하다는 것을 확인하였다.

○ 관련 유전자의 탐색 및 효소 기작 연구

QS 저해 기작을 연구하기 위하여 *Streptomyces* sp. AN090072의 관련 유전자를 탐색 중이며, AN090072의 acylase 추정 유전자 염기서열 분석 결과, 방선균의 일종인 *Catenulispora acidiphila* DSM 44928 유래의 GCN5-related N-acyltransferase와 77% 정도의 유사성을 보였다. AN090072에 대한 더 많은 유전자 분석 결과를 통해 방선균 유래의 새로운 QS 저해 효소의 개발 연구가 가능할 것이라 사료된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

가. 특허 성과

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록번호
2006년	아실 호모세린 락톤의 경쟁적 저해활성을 가지는 키타사토스포라 속 AR030054	한국생명공학연구원	대한민국	2006-8905 (2006. 1. 27)	724770 (2007. 5. 28)
2006년	아실호모세린락톤의 경쟁적 저해활성을 가지는 피에리시딘 A1	한국생명공학연구원	대한민국	2006-31058 (2006. 4. 5)	743672 (2007. 7. 23)
2010년	적정밀도 인식억제활성을 가지는 신규스트렙토마이세스 속 균주	한국생명공학연구원	대한민국	2010-21863	

나. 논문 및 포스터 게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2008	Proteolytic activity from a alkali-thermotolerant <i>Streptomyces gulbargensis</i> sp. nov.	S. G. Dastager	Agasar Dayanand	Wen-Jun Li, Chang-Jin Kim, Jae-Chan Lee, Dong-Jin Park, Xin-Peng Tian, Q. S. Raziuddin	Current Microbiology	57(6)	국외	SCI
2008	Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to <i>Plasmodiophora brassicae</i>	Sun Og Lee	Jin-Cheol Kim	Gyung Ja Choi, Yong Ho Choi, Kyoung Soo Jang, Dong-Jin Park, Chang-Jin Kim	Journal of Microbiology and Biotechnology	18(11)	국내	비SCI
2009	First report of powdery mildew on trident maple caused by <i>Sawadaea nankinensis</i> in Korea	H. B. Lee	H. B. Lee	C. J. Kim, H. Y. Mun, J. P. Hong, and D. A. Glawe	Plant disease	93(2)	국외	SCI

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내 외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	ACC deaminase producing strain ST45 confers resistance to high salt stress in plant	Hyeon Seong Yoon	Chang-Jin Kim	Jin Hee Choi, Jae-Chan Lee, Dong-Jin Park, Chang-Keun Sung	한국식물병리학회		국내	SCIE
2010	Isolation and Identification of <i>Streptomyces</i> sp. AN090571 Producing Quorum Sensing Inhibitor	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Jin Hee Choi, Jae-Chan Lee, Dong-Jin Park	한국미생물학회		국내	SCI
2010	Analysis of Quorum Sensing Inhibitor Produced by <i>Streptomyces</i> sp. MSL12	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Jin Hee Choi, Jae-Chan Lee, Dong-Jin Park	한국농약과학회		국내	비SCI
2010	Isolation and Identification of <i>Streptomyces</i> sp. AN090072 Producing Quorum Sensing Inhibitor	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Mi-Kyung Kwon, Jae-Chan Lee, Dong-Jin Park	한국식물병리학회		국내	SCIE
2011	Quorum sensing inhibition by <i>Streptomyces</i> sp. AN090072 as quenching of <i>Erwinia carotovora</i>	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Mi-Kyung Kwon	한국식물병리학회		국내	SCIE

다. 활용 계획

일차적으로 배추무름병에 약제 내성을 유발하지 않거나 극복하는 생물농약으로 활용 가능하며 더 나아가 약제 내성 주요 원인인 생물막(biofilm) 형성을 억제하는 신규 의약품 생물소재로도 확대 적용 가능할것으로 판단됨.

SUMMARY

Traditional biological control of plant pathology is based on compounds that kill or inhibit growth of plant pathogens, but, this ways occur resistance pathogens. Therefore, this problem requires another approach and we focus on Quorum Sensing (QS). QS is community genetic regulation mechanism that controls microbiological functions of medical, agricultural and industrial importance. Many of the virulence factors needed to make this transition are regulated by cell-to-cell communication. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* is a gram-negative bacteria phytopathogen that causes soft-rot diseases in various commercially important plants, including Chinese cabbage. In gram-negative bacteria, which are responsible for most plant diseases, the most common QS signals are N-acyl homoserine lactones (AHLs).

To screen novel quorum sensing inhibitor(QSI) from actinomyces, we used *Chromobacterium violaceum* CV026 as a test organism and we selected an actinomyces designated AR54, AN090571 and AN090072. A comparative 16S rRNA gene sequence analysis revealed that three strains are most closely related to members of the genus *Kitasatospora* and *Streptomyces*. The isolate was characterized morphologically and physiologically by the given methods in the international *Streptomyces* project. We investigated media optimization and culture condition of the three strains for the high activity of QSI.

Kitasatospora sp. AR54 and *Streptomyces* sp. AN090571, for the isolation and purification of the active compound, it was extracted by ethyl acetate and purified by silica gel, sephadex LH-20 open column chromatography, thin layer chromatography and HPLC.

Streptomyces sp. AN090072 was increased QS inhibitor activities were investigated against Chinese cabbage soft rot disease by treatment of *Streptomyces* sp. AN090072 *in vivo*. As a result, QS inhibitor produced by AN090072 to inhibit pathogenic of *E. carotovora*. In this study evidenced the capacity of AN090072 and its supernatant and/or enzyme as quorum sensing inhibition activity in *E. carotovora*, and we will study how to promising potential to use quorum sensing signals as molecular target for disease control, thereby broadening current approach for prevent of plant bacterial infection.

CONTENTS

Chapter 1. INTRODUCTION	
Section 1. Objectives and importance of the project	12
Section 2. Contents and scope of the project	12
Chapter 2. STATE OF THE ART.....	13
Chapter 3. RESULT OF THE PROJECT	
Section 1. <i>Kitasatospora</i> sp. AR54 strain with quorum sensing inhibition activity	
1. QS inhibition activity of AR54 strain	22
2. Bio-film inhibition activity	23
3. Purification of QSI active compound	24
4. Structure and characterization of QSI active compound purified	26
5. Identification	27
6. Cultural characteristics	28
7. Plant cell wall degradation enzyme(PCWDEs) activity test	29
8. Cabbage soft rot disease controlling effect	31
Section 2. <i>Streptomyces</i> sp. AN090571 strain with quorum sensing inhibition activity	
1. Additional screening of QSI activity isolates	
A. Selection of AN090571 strain	32
B. Plant cell wall degradation enzyme(PCWDEs) activity test	33
2. Identification	
A. Morphological characteristics	34
B. Physiological & biochemical characteristics	35
C. Phylogenetic analysis	37
3. Cultural characteristics	
A. Carbon utilization	38
B. Medium optimization	38
4. Purification & structure analysis of QSI active compound	
A. Purification of QSI active compound.....	39
B. structure analysis of QSI active compound	39
5. Formulation	42
6. Toxicity and safety assessment	43

Section 3. <i>Streptomyces</i> sp. AN090072 strain with quorum sensing inhibition activity	
1. Additional screening of QSI activity isolates	
A. Selection of AN090072 strain	54
B. Plant cell wall degradation enzyme(PCWDEs) activity test	54
2. Identification	
A. Morphological characteristics	54
B. Physiological & biochemical characteristics	56
C. Phylogenetic analysis.....	57
3. Cultural characteristics	
A. Carbon utilization	57
B. Medium optimization	58
C. QSI activity test by medium optimizing	60
D. AHL inhibition activity comparisons of AN090072 strain with similar strains of the phylogenetic	61
4. Formulation	62
5. Toxicity and safety assessment	63
6. Mode of actions of AN090072 strain	
A. Bio-film inhibition activity	74
B. QSI activity test for strain CV026	75
C. Virulence enzyme activity inhibition of <i>Erwinia carotovora</i>	76
D. AHL inhibition activity.....	76
E. Cloning of AHL degradation related gene	79
F. Purification of AHL degradation related enzyme	81
7. Cabbage soft rot disease controlling effect	82
Capter 4. ACHIEVEMENT AND CONTRIBUTION OF THE PROJECT	84
Capter 5. PRODUCT AND APPLICATION PLAN OF THE PROJECT	85
Capter 6 SCIENCE AND TECHNOLOGY INFORMATION	86
Capter 7. REFERENCE	87

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	
제 1 절	연구개발의 목적, 필요성	12
제 2 절	연구개발의 범위	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황	
제 1 절	생물 농약 국외 기술개발 현황	13
제 2 절	생물 농약 국내 기술개발 현황	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	
제 1 절	QS 저해 활성 우수 균주 <i>Kitasatospora</i> sp. AR54	
1.	QS 저해 활성을 가진 AR54 균주의 선발	22
2.	균주의 생물막 형성 저해 활성	23
3.	균주의 활성물질의 분리 정제	24
4.	균주의 활성물질 구조 및 특성	26
5.	균주의 동정	27
6.	균주의 배양 특성	28
7.	균주의 식물세포벽분해효소(PCWDEs) 활성 검정.....	29
8.	균주의 배추 무름병 억제능 조사	31
제 2 절	QS 저해 활성 우수 균주 <i>Streptomyces</i> sp. AN090571	
1.	QS 저해 우수 균주 추가 선발	
가.	균주 선발	32
나.	균주의 식물세포벽분해효소(PCWDEs) 활성 검정	33
2.	균주의 동정	
가.	균주의 형태학적 특성	34
나.	균주의 생리·생화학적 특성	35
다.	균주의 분자계통분류학적 분석	37
3.	균주의 배양 특성	
가.	균주의 탄소원 및 질소원 이용성 조사	38
나.	균주의 최적 배지 선정	38
4.	균주의 활성물질 분리정제 및 구조분석	
가.	균주의 활성물질 분리정제	39
나.	균주의 구조분석	39
5.	균주의 제제화	42
6.	제제의 독성 및 안전성 평가	
가.	마우스에 대한 급성경구 투여 독성 실험	43
나.	랫드에 대한 급성경피 투여 독성 실험	46
다.	담수어류 영향 시험	49

제 3 절 QS 저해 활성 우수 균주 <i>Streptomyces</i> sp. AN090072	
1. 추가 스크리닝을 통한 QS 저해 우수 균주 선발	
가. 균주 선발	54
나. 균주의 식물세포벽분해효소(PCWDEs) 특성 파악	54
2. 균주 동정	
가. 균주의 형태학적 특성	54
나. 균주의 생리·생화학적 특성	56
다. 균주의 분자계통분류학적 분석	57
3. 균주의 배양 특성 및 배양 최적화	
가. 균주의 탄소원 및 질소원 이용성 조사	57
나. 균주의 탄소원 및 질소원 최적화	58
다. 균주의 배양 최적화에 따른 QS 저해 활성 검정	60
라. 균주의 계통 발생학적 유사 균주와 AHL 저해능 비교	61
4. 균주의 제제화	62
5. 균 제제의 독성 및 안전평가	
가. 마우스에 대한 급성경구 투여 독성 실험	63
나. 랫드에 대한 급성경피 투여 독성 실험	66
다. 담수어류 영향 시험	69
6. 균주의 작용기작 연구	
가. 균주의 생물막 형성 저해능 검정	74
나. 균주의 CV026에 대한 QS 저해 활성 검정	75
다. 균주의 배추 무름병균 병원성 관련 효소 저해 활성 검정	76
라. 균주의 AHL 분해능 검정	76
마. AHL 분해 관련 유전자 탐색	79
바. Ammonium sulfate 침전법을 통한 AHL 분해 효소의 정제	81
7. 균주의 배추 절편 및 pot 실험을 통한 무름병 방제능 확인	82
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	
제 1 절 연구개발의 최종목표	84
제 2 절 연차별 연구개발 목표내용 및 달성도	84
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	
제 1 절 연구개발 성과	85
제 2 절 성과활용 계획	85
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	86
제 7 장 참고문헌	87

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

세균은 신호물질(autoinducer)을 매개로 서로 통신할 수 있는 독특한 신호전달체계(quorum sensing system, 적정밀도 인식체계)를 가지고 있으며, 병원성 세균은 숙주를 효과적으로 감염시키기 위해 이러한 신호물질을 통해 세균 간 신호전달체계를 가동함으로써 병을 일으키고 있음이 밝혀져 왔다. 그람음성세균의 신호물질은 N-acyl homoserine lactone(AHL) 계열의 화합물로 알려져 있으며, AHL에 의해 조절되는 신호전달 기작은 배추무름병의 병독성 유전자들의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다. 최근 작물병 제어를 위하여 항생제 및 다양한 약제들이 사용중이나 이들에 대한 내성을 지닌 병원균들이 출현함으로써 병방제에 실패한 경우들이 발생하고 있다. 따라서 세균간 신호전달 체계의 조절 및 이용 기술은 돌연변이 내성균의 출현을 근원적으로 감소시키는 신개념의 생물학적 제어방법이 될 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 배추무름병균을 방제하기위하여 토양 방선균으로부터 신호전달저해(quorum sensing inhibition) 활성균주를 스크리닝하여 우수 균주를 선발하고, 이들 균주들의 신호전달저해 활성 최적화와 기작 연구를 통하여 새로운 개념의 생물학적 방제제를 개발하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 범위

- 신호전달저해(quorum sensing inhibition)활성 우수 균주 스크리닝
- 선발 균주의 생물막(biofilm) 형성 저해 활성 검정
- 선발 균주의 식물세포벽 분해효소 활성 검정
- 선발 균주의 동정(형태학적·생리생화학적·분자계통분류학적 분석)
- 선발 균주의 배양특성 검정 및 신호전달 저해 활성 최적화
- 선발 균주 활성 물질 분리정제 및 구조분석
- 신호전달 제어 작용기작 연구
 - 배추무름병균 병원성 관련 효소 저해활성검정
 - AHL 분해능 검정
 - AHL 분해 유전자 탐색 및 분해효소 정제
- 선발 균주 제제화 및 시제품의 독성·안전성 평가
- 생물학적 방제제로 효과 검증

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 생물 농약 국외 기술개발 현황

- 선진국에서는 친환경농업정책의 일환으로 정부로부터 정책적 후원을 받으면서, 독자적으로 미생물과 천연물을 선발하거나 대학 및 연구소로부터 아웃소싱을 통하여 우수한 후보물질을 확보하여 생물농약을 개발하고 있다.
- 생물농약의 시장은 도입단계를 지나 성장초기 단계로서 전 세계적으로 친환경정책 및 안전한 농산물에 대한 관심이 증가함에 따라 폭발적으로 시장이 신장하리라 기대되고 있으며 Santander Investment (1998)에 의하면 매년 약 20%씩 시장이 신장할 것으로 추정하고 있다. 2001년 현재 세계 농약 시장의 약 2%인 5.8억불이었으나(표 1), OECD국가를 중심으로 한 친환경농업정책으로 인하여 그 시장규모가 2013년에는 세계 농약시장의 약 15%인 45억불에 달할 것으로 추정되고 있다(Santander Investment, 1998). 한편, 국내의 경우 생물농약처럼 위장되어 4종 복합비료로 판매되는 미생물제제를 포함한 국내 생물농약 시장은 약 400억원 정도로 추정되고 있으며, 2010년에는 전체 농약 시장의 10% 규모인 1,200억원(근거: 친환경농업 정책에 의거하여, 2010년에 유기농산물의 비중이 전체 농산물의 10%를 차지한다고 가정할 때), 그리고 2015년에는 전체 농약 시장의 15%정도인 1,800억 원 정도에 이를 것으로 추정된다(그림 1).

표 1. 2001년 지역별 세계 생물농약 시장(million US \$)

	Europe	NAFTA	Latin America	Africa	Africa	Oceania	Total
Macrobials	60	80	10	5	20	15	190
Microbials:							
- Bacteria	20	90	10	5	15	30	170
- Virus	6	4	5	1	3	2	21
- Fungi	5	15	10	1	7	6	44
Subtotal	31	109	25	7	25	38	235
Others(biorationals):							
- Natural products	20	42	10	3	12	10	97
- Semiochemicals	6	25	4	3	15	3	56
Subtotal	26	67	14	6	27	13	153
Total	117	256	49	18	72	66	578

(by Michel Guillon, International Biocontrol Manufacturer's Association, France)

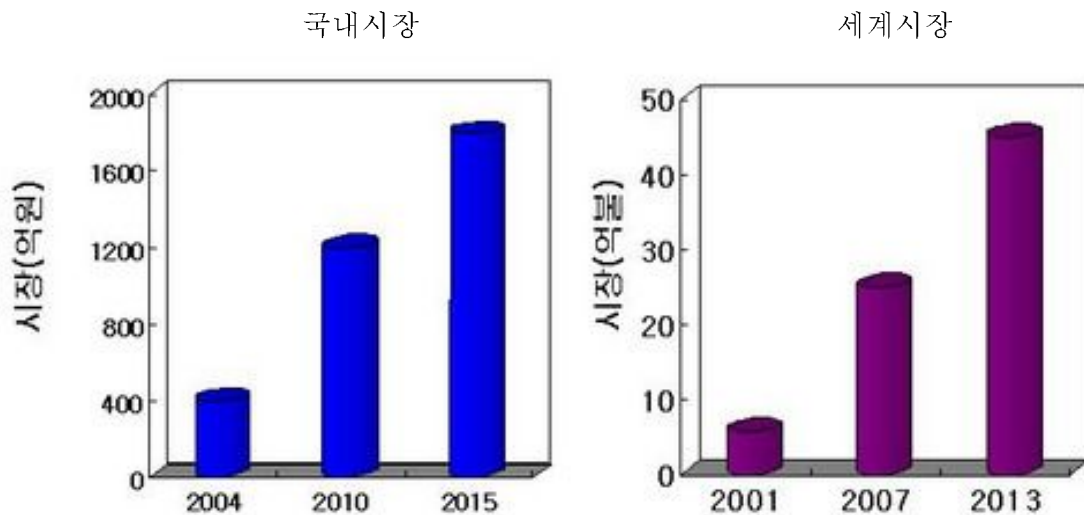


그림 1. 생물농약의 국내시장 및 세계시장 전망

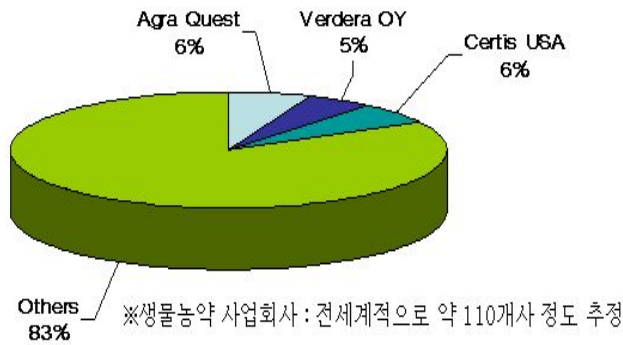
- 전세계 생물농약 시장은 연평균 9.9%의 증가세를 보이고 있으며, 2005년도의 경우 전체 농약시장의 2.5%(700 M\$)의 시장을 형성하고 있음. 2010년도에는 친환경 농산물의 수요확대 기반을 통해 전체 농약시장의 4.3%까지 확대될 것으로 예측 된다 (표 2).

표 2. 세계 생물농약 시장현황

구 분	2003	2004	2005	2010	연성장률
생물농약	468	562	672	1,075	9.9%
합성농약	27,144	26,600	26,076	24,205	-1.5%
합계	27,612	27,162	26,748	25,280	-1.1%
생물농약 비율	1.69%	2.07%	2.51%	4.25%	

출처 : The New Biopesticide Market (Business Communications Company, Inc., Jan. 2006)

- 세계적으로 생물농약에 대한 개발기술은 110여개 회사 중 3개 회사가 major player 역할을 하고 있으며, 대기업보다는 주로 벤처기업이나 중소기업체에 의해 주도적으로 진행되고 있고 주로 미생물을 이용하여 개발하고 있다. 1998년 현재 188개의 생물농약이 개발되었으며 이중에서 60종이 미생물농약으로서, 곰팡이와 세균이 각각 36.7%와 31.7%로 우위를 점하고 있다. 연간 500억원 이상의 매출이 비교적 큰 규모의 회사로는 Valent BioSciences, Certis USA, Koppert 등이 있으며, 작지만 성공적인 회사로 평가받고 있는 AgraQuest, BioWorks 및 E-nema 등이 있다. 그리고 혁신적인 기술을 확보하고 있는 Pasteuria BioSciences, Exosect 등이 주목을 받고 있으며 최근에는 BASF, Syngenta, Sumitomo 등 글로벌 다국적 기업들의 기술 이전 및 자체 기술개발도 시도되고 있다 (그림 2).



출처 : The New Biopesticide Market (Business Communications Company, Inc., Jan. 2006)

그림 2. 세계 주요 생물농약 개발업체 현황

- 현재 미국 EPA에는 76개의 미생물농약과 113개의 생화학농약(Biochemical pesticides)이 등록되어 있으며(표 3), 미국의 경우에는 천적이 생물농약에 포함되어 있지 않으며, 선진 3개국(미국, 영국, 일본)의 생물농약 중에서 미생물농약과 생화학농약의 비율은 각각 46%와 36%로서 전체의 82%를 차지하고 있다. 유럽의 경우 미생물농약이 112개가 등록되어 시판되고 있으며, 천연물농약은 58개가 등록되어 있고, Semiochemicals, 즉 반합성화합물 농약이 56개가 등록되어 있다.
- 2006년 현재 등록되어 있는 생물농약들에는 살충제가 72%, 살균제가 15%, 제초제가 5%, 식물생장조절제가 4%, 그리고 기타가 4%를 차지하고 있으며 미생물을 이용한 기술이 다수 적용되고 있다 (표 4). 따라서 본 연구계획에 따른 작물병해 발생 신호 저해하는 미생물방제제가 개발 된다면 선진국 수준 이상의 생물농약 개발이 될 것이다.

표 3. 주요 국가의 생물농약 제품 등록 현황(2004년 농약연찬회 자료)

국가	미생물농약	생화학농약	Semiochemicals	계	비고
미국	76	113	-	189	2002. 04
영국	96	51	54	201	2001. 12
일본	35	-	25	60	2002. 07
한국	9	-	-	9	
계	216	164	79	459	
비율	47 %	36 %	17 %	100 %	

표 4. 해외 생물농약 개발현황 (한국기술은행, 2006)

대상생물	살충제	살균제	제초제	생장조절제	기 타
등록 수	135	29	10	7	7
이용생물	미 생 물	페로몬/생화학		천 적	기 타
등록 수	60	45		40	43

제 2 절 생물 농약 국내 기술개발 현황

- 국내에서 미생물농약과 생화학농약에 대한 연구는 1980년대에 태동하여 1987년에는 인삼 뿌리썩음병 방제용 바이코나의 개발을 시작으로 지금까지 몇 가지 미생물농약이 개발되어 있으나 본격적인 생물농약 연구개발은 1990년대 후반부터 이루어졌으며, 한국화학연구원과 한국생명공학연구원, 농업과학기술원 등의 연구소, 경상대학교, 순천대학교, 강원대학교, 서울대학교 등의 대학교, 그리고 (주)동부한농화학, (주)그린바이오텍, (주)비아이지, (주)LG생명과학 등의 기업체에서 개별적으로 연구를 진행해 오고 있으나 선진국 대비 70%정도의 수준에 있는 실정이며, 대량 발효 공정 기술 및 제제/제형화 기술은 선진국 수준에 비하여 크게 부족한 편이다 (그림 3).

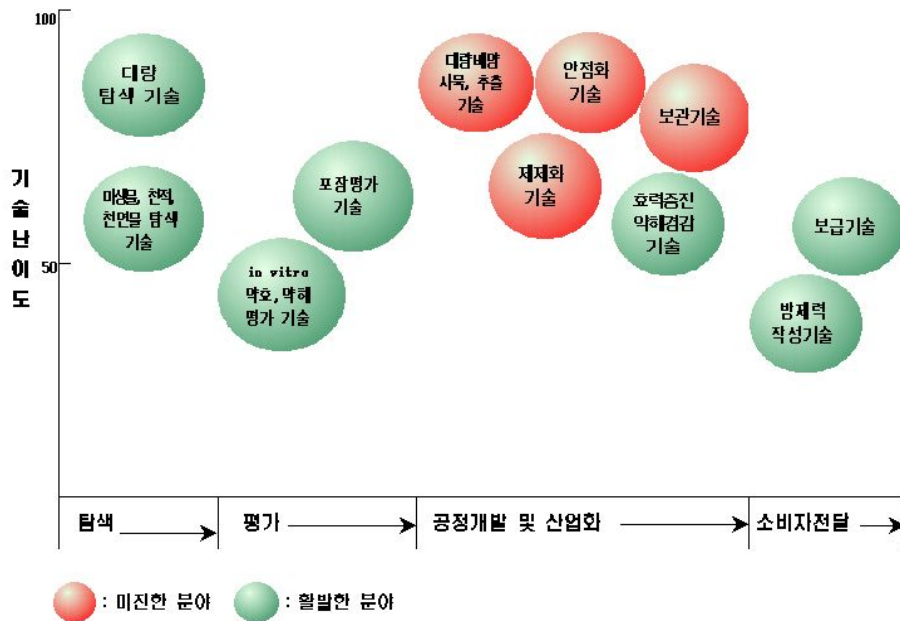


그림 3. 국내 생물농약 개발기술 분야별 연구현황

- 연구개발 초기에는 우수한 미생물 또는 신규 기능성 천연소재의 확보에 중점을 두었으나, 최근에는 대량생산 및 제형화 등의 기술접목이 시도되고 있음. 하지만 여전히 산/학/연의 개발전략에 대한 공유부재로 인해 초기단계의 기술개발에만 치우친 경향이 크며, 산업화와 밀접하게 관련된 기술인 생산 및 제형화에 대한 부분은 여전히 해결해야 될 과제로 남아 있다 (표 5).

○ 국내 농약산업은 외국으로부터 농약원제를 수입한 유기합성 농약이 대부분이며, 2002년도 현재 수입은 3억4천만불(원제 2억 7천만불, 완제 3천 6백만불, 합성원료 3천만불)로서 수입의존도는 78.3%에 이르고 있다. 현재 국내 생물농약 시장은 300억원 정도로 화학농약에 비하여 크지 않으나 친환경 농업의 확대로 '2010년에는 800억원대 이상의 시장으로 확대될 것으로 예측된다 (그림 4).

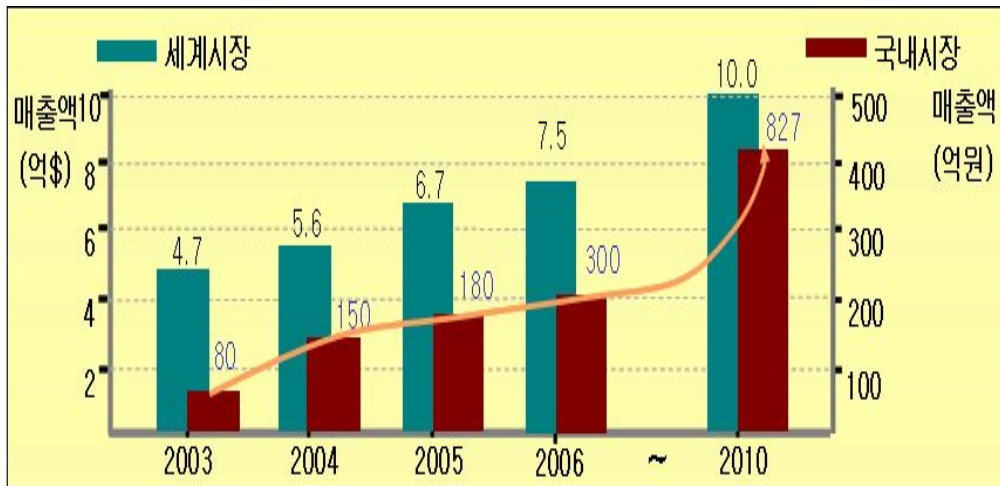


그림 4. 국내외 생물농약 시장규모

표 5. 국내 생물농약 개발기술 현황

세 부 기 술	선 진 국	국 내 수 준
미생물탐색기술	100 %	90 %
천적탐색기술	100 %	90 %
천연물탐색기술	100 %	60 %
약효평가기술	100 %	95 %
약해평가기술	100 %	95 %
방제력확립기술	100 %	100 %
대양배양기술 (액체, 고체배양)	100 %	50 %
대량사육기술(곤충)	100 %	50 %
대량추출기술(천연물)	100 %	60 %
안정화제제기술	100 %	60 %
효력증진제제기술	100 %	60 %
약해경감기술	100 %	60 %
작용기구 구명기술	100 %	20 %
병원성평가기술	100 %	50 %

출처: 농업/식량 TRM (2003)

- 현재 국내에 등록된 생물농약은 살충제 14품목, 살균제 5품목 등 총 19품목으로 살충제가 살균제보다 3배 정도 높은 개발현황을 보이고 있다. 살충제에 비해 살균제 품목들은 시장에서 뚜렷한 입지를 확보하지 못한 실정이다 (표 6).

표 6. 국내 주요 친환경 제품(생물농약) 개발현황

주요업체		주력품목	제품특성
중소업체	그린바이오텍	솔빛채, 강토	살충제, 토양개량
	고려바이오	응삼이, 응칠이, 컴캣	살충제
	비아이지	선초 등	살충제
	흙살림	미생물제	토양개량
대형업체 (대기업)	경농	- (개발단계)	-
	삼공	바이봉	(살균제)
	아리스타	- (개발단계)	-
	동부하이텍	토박이, 엑스텐, 에코제트, 세레모니	살충제, 기능성

- 국내의 미생물농약에 대한 국내연구는 2001년에 미생물농약의 등록을 위한 guideline이 마련되었기 때문에 생물농약으로 개발된 것은 10종 미만이며, 비료로 등록되어 미생물제제들로 판매되고 있는 것으로는 1999년 12월 현재 국내에서는 34개의 회사에서 57개의 품목이 미생물제제로 등록되었는데, 실제로 유통되고 있는 미생물제제는 90여종 이상으로 추정되고 있다 (표 7).

표 7. 국내 미생물농약의 등록현황

개발	상 표	미 생 물	적용병해충	개발회사
국내 개발	솔빛채	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i>	배추좀나방	그린바이오텍
	탑시드	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	흰가루병	"
	셀러스	<i>Bacillus subtilis</i>	갯빛곰팡이병	"
	큐펙트	<i>Ampelomyces quisqualis</i>	흰가루병	"
	썬이프그로	<i>Streptomyces colombiensis</i>	잎집무늬마름병	KIBC
	마이코싸이드	<i>S. goshikiensis</i>	갯빛곰팡이병	"
	토박이	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i>	배추좀나방	동부한농
해외 개발	슈리사이드	<i>B. thuringiensis</i>	복숭아심식나방	수입
	영일비티	<i>B. thuringiensis</i>	나방류	
	스콜피온	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i>	나방류	
	비오칸	<i>B. thuringiensis</i>	배추좀나방	
	바이오비트	<i>B. thuringiensis</i>	나방류	
	툰업	<i>B. thuringiensis</i>	배추좀나방	
	그물망	<i>B. thuringiensis</i>	배추좀나방	
	엠펜릴	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i>	배추좀나방	
	비결	<i>B. thuringiensis</i>	과좀나방	
	삼공비티	<i>B. thuringiensis</i>	나방류	
	마이충	<i>B. thuringiensis</i>	나방류	
	미성살충탄	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i>	나방류	

- 이 밖에도 현재 국내에서는 살충, 살균 효과가 있다고 알려져 있는 친환경농자재는 기술력의 부족으로 생물농약으로 등록되지 않고 생물농약으로의 개발 중에 제품화되어 유통되고 있는 제품들로서, 500-1,000여개 제품들이 있는 것으로 추정되고 있으며, 퇴비 생산 업체를 포함하여 200개가 넘는 업체가 있는 것으로 추정되고 있다.
- 국내의 농업용 미생물 살균제 개발 연구는 외국에 비해 매우 미진하나 그동안 몇몇 대학과 연구소에서 연구를 수행하여 항균물질로서 알려진 기지화합물인 iturin과 그의 몇몇 화합물의 이용가능성이 보고되었으며(Son 등, 1994; Lee 등, 1994) 농진청에서 길항미생물 *Bacillus subtilis* 균주를 이용한 미생물 농약 AC-1을 등록한 바 있다 (최 등, 1994).
- 국내에서는 복 등(1997)이 광범위 살균제로서 고정화 미생물 농약을 개발한 바 있으며, 유전 공학기법으로 항생물질 고 생산균주를 제작한 후 피막화 미생물 살균제를 만들어 엽면 처리용 광범위 식물병 방제용 미생물 제제를 개발 중에 있음. 그러나 아직도 제제화 기술 및 미생물 제제의 실용화율은 외국에 비해 매우 낮은 실정이다.
- 국내에서 미생물에 의한 각종 병방제 연구사례를 보면 비병원성 세균 및 곰팡이를 이용한 세균성 시들음병 및 고추역병(황과 김, 1992), 길항 미생물을 이용한 오이 및 딸기의 *Fusarium* 시들음병(문 등, 1995), 사탕무우의 모잘록병 등의 방제에서 보고된 바 있으며, 박 등(1989)이 *Trichoderma harzianum*과 *Enterobacter allomerans*를 이용 고추묘에 처리한 후 병방제 효과가 있음을 보고한 바 있으며, *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus subtilis*를 이용한 고추 역병방제제를 개발 중에 있으며, 배 등(1990)은 오이 덩굴쪄김병 억제에 관한 근권 정착 능력이 있는 *Gliocladium virens*와 *Pseudomonas putida*의 협력효과에 관한 연구를 수행한 바 있으며, 신 등(1990)은 길항 미생물을 이용 시설재배 딸기 눈마름병 방제를 시도한 바 있고, 이 등(1990)은 수도 진균병 방제에 *Pseudomonas* sp.를 이용한 바 있고, 박 등(1992)이 *Pythium* blight 및 *Rhizoctonia solani*에 의한 뿌리썩음병인 brown patch 및 large patch를 방제하기 위하여 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* 3균주와 *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* 균 3균주로 복합 미생물제제를 만들어 처리한 바 *Pythium*균에는 완전한 방제효과를 그리고 그 이외의 다른 균에도 상당히 방제효과가 높은 것으로 보고한 바 있으나 실용화 수준에는 아직 미치지 못하는 것으로 판단된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구에서는 약제 내성을 유발하지 않거나 극복할 수 있는 신개념 생물학적 방제제 개발을 위해 토착 방선균을 분리하고 이를 이용하여 식물 병원성 미생물의 Quorum sensing(QS; 정족수 인식)을 저해제를 탐색하고자 하였다.

QS 저해 기작에는 여러 종류가 있는데 그 중 하나가 AHL antagonist(길항제)이다. 그 대표적인 예로는 *Delisea pulchra*가 생산하는 halogenated furanone이 있는데, 본 연구에서는 QS 저해 활성 균주로 분리한 *Kitasatospora* sp. AR54와 *Streptomyces* sp. AN090571가 생산하는 piericidin A가 QS 저해활성에 관여하는 것을 확인하였다. 그러나 이 물질은 *Chromobacterium violaceum* CV026의 QS 저해 활성은 우수하였으나, 배추 무름병 QS 저해에는 직접적인 활성을 나타내지 않았다. 그 이유는 AR54 균주는 식물세포벽 분해 효소인 pectate lyase를 가지고 있었기 때문이며, 추가로 스크리닝된 AN090571 균주의 경우에는 식물 세포벽 분해 효소는 없었으나 식물 검정에서 마찬가지로 좋은 효과가 나타나지 않았다. 이는 지금까지 QS 저해 물질들이 많이 밝혀졌음에도 불구하고 QS 저해의 넓은 스펙트럼을 가지지 못하는 것과 비슷한 결과이다. 그러나 오히려 이러한 결과는 목적 미생물을 제외한 토양 내 여러 공생 미생물에는 영향을 주지 않는다는 장점이 될 수 있다. 비록 AR54와 AN090571 균주가 *E. carotovora*의 QS 저해에는 적합하지 못하지만, 다른 식물 병원성 미생물 및 동물 병원성 미생물 QS 저해제로의 확대 가능성은 충분할 것으로 사료된다. 이에 따라 AR54와 AN090571 균주의 이용성에 대해서는 계속적으로 고찰 중이며, 앞의 두 균주보다 *Erwinia carotovora*의 QS 저해에 효과적인 AN090072를 재선발 하게 되었다.

QS 저해의 다른 기작 중 하나로는 효소에 의한 QS 저해가 있으며 그 예로는 *Arthrobacter* 의 효소에 의한 AHL 분해로 병원성을 조절하는 연구가 있다. 새로 선발한 *Streptomyces* sp. AN090072 균주 또한 AHL 분해 효소에 의한 QS 저해 기작을 가지는 것으로 판단되며 AN090072 균주는 치료제보다는 예방제로서의 생물학적 방제제로 유용할 것으로 사료된다.

제 1 절 QS 저해 활성 우수 균주 *Kitasatospora* sp. AR54

1. QS 저해 활성을 가진 AR54 균주의 선발

*E. carotovora*의 autoinducer인 *N*-3-oxohexanoyl homoserine lactones(3-oxo-C₆-HLS, OHHL)에 대한 저해 활성 균주를 선발하기 위하여 well-diffusion assay 방법을 이용하였다. 4,500여개의 방선균 배양 상등액을 한국생명공학연구원 미생물자원센터로부터 분양받아 사용하였고, 그 중 QS 활성이 가장 뛰어난 AR54 균주를 선발하였다 (Fig. 1).

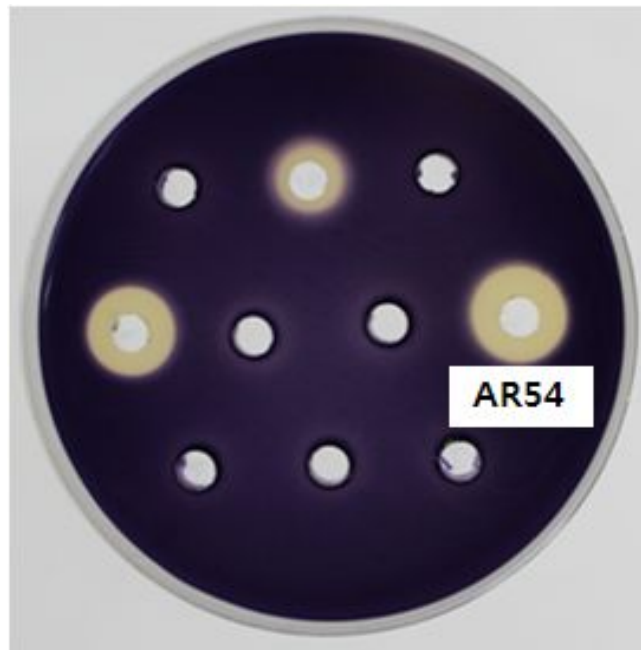


Fig. 1. QS inhibition activity of AR54

2. AR54 균주의 생물막 형성 저해 활성

AR54 균주가 항생제 내성의 원인이 되는 병원성 미생물의 생물막 형성에 대한 저해 활성을 갖고 있는지 알아보기 위하여 병원성 미생물인 *Pseudomonas marginalis* KACC 10466에 AR54 균주 배양 상등액을 희석배율에 따라 접종하여 배양한 후, 형성된 생물막을 염색하여 흡광도로 측정하였다. 그 결과, Fig. 2와 같이 AR54 균주 배양 상등액의 희석배율이 높아질수록 생물막 형성 농도가 높아지는 것으로 보아 AR54 균주가 생물막 형성을 저해함을 알 수 있었다. 따라서 AR54 균주가 생산하는 물질은 QS를 저해하는 물질임을 확인하였다.

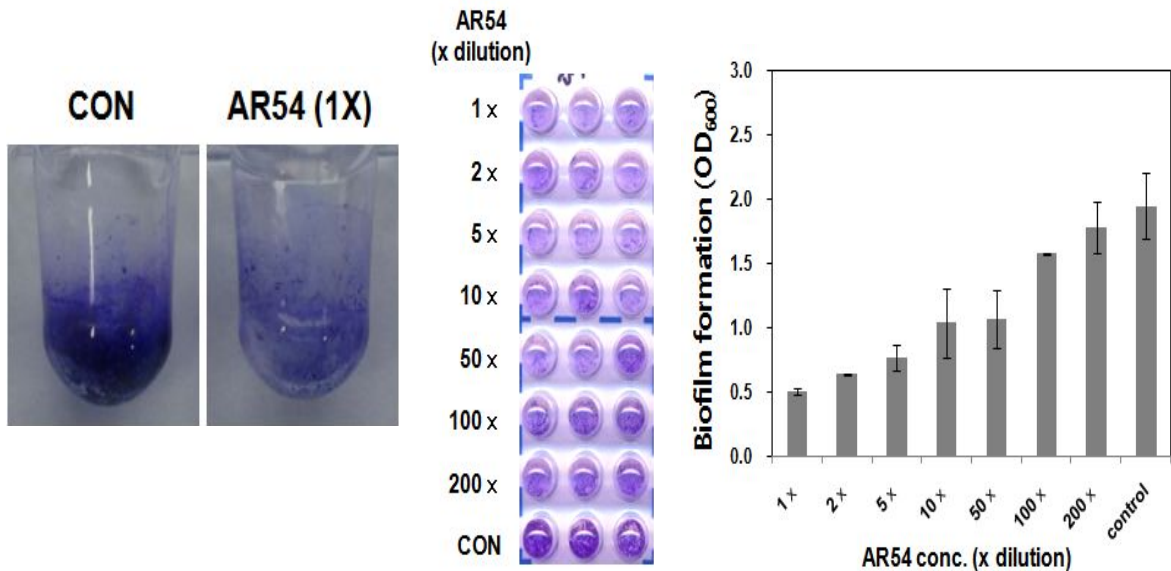


Fig. 2. Biofilm formation of *Pseudomonas marginalis* and its inhibition by AR54

3. AR54 균주로부터 활성물질의 분리 정제

AR54 균주를 G.S.S.(Glucose 20g, Soluble starch 10g, Soybean meal 25g, Beef extract 1g, Yeast extract 4g, NaCl 2g, K₂HPO₄ 0.25g, CaCO₃ 2g, pH 7.2, 1L 기준) 배지에서 28°C, 7일간 배양한 후 배양 상등액을 동량의 ethyl acetate로 추출한 다음 감압 농축하여 silica gel column chromatography를 이용하여 분리하였다. 활성물질은 ODS column chromatography를 통하여 HPLC(HITACHI D-2500)로 확인하였으며 YMC ODS, Φ 250X4,6 mm의 column을 사용하여 40% acetonitrile을 이동상으로 하여 분석하였다. 분리 과정 중의 분획들에 대하여 CV026 plate assay를 통하여 QS 저해 활성을 확인하며 활성 물질을 분리정제 하였고 정제 수율은 1.6 mg/L 였다(Fig. 3, 4, 5).

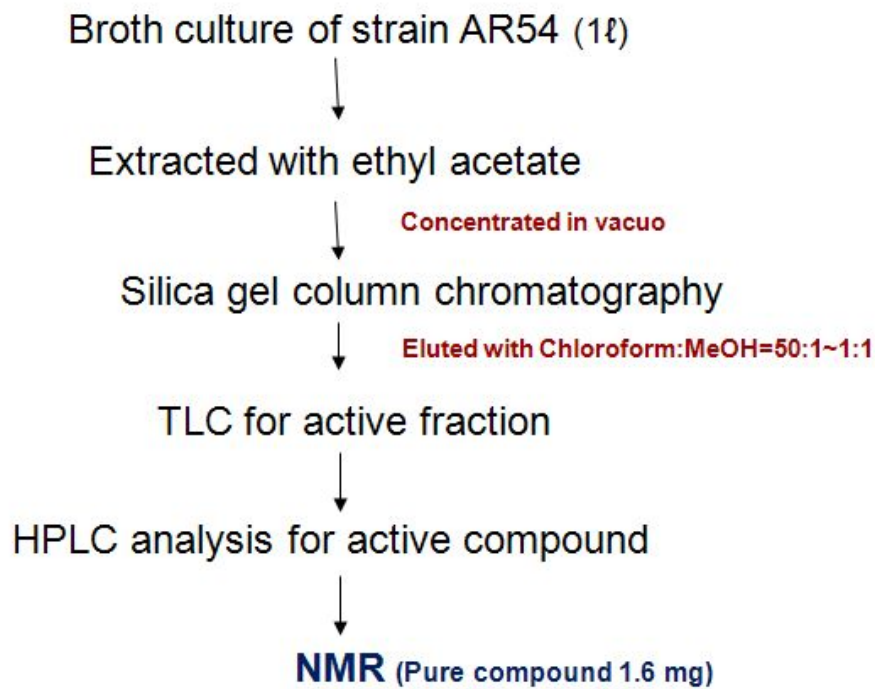


Fig. 3. Purification steps for active compound piericidin A1 from AR54

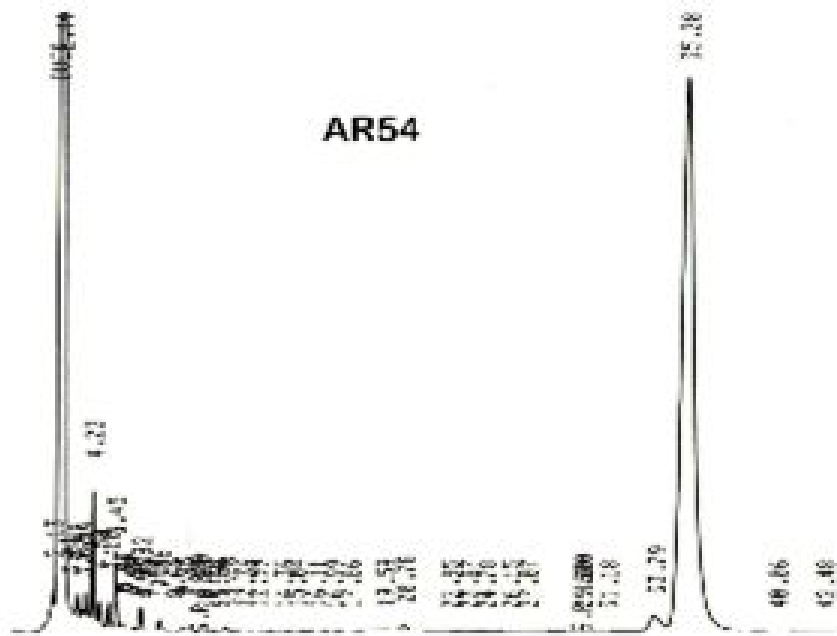


Fig. 4. HPLC chromatogram of piericidin A1 and AR54

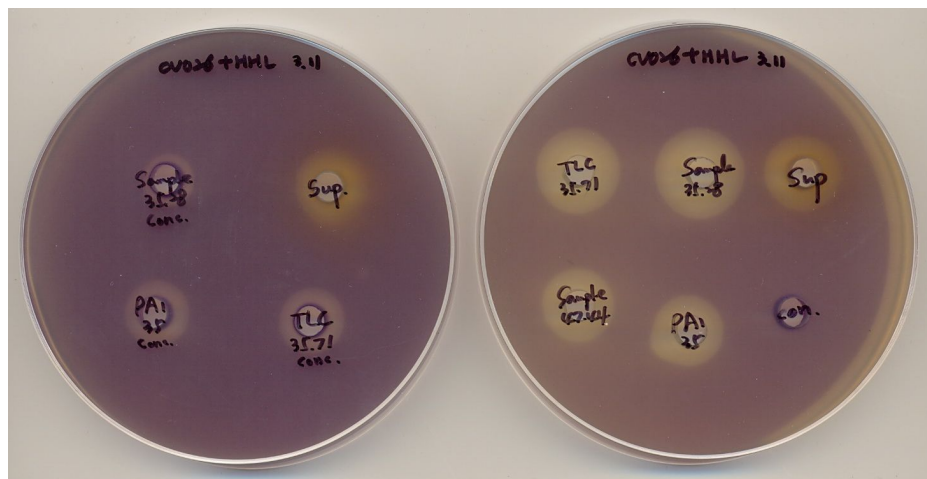


Fig. 5. QS inhibition activity of each steps in the process of purification of AR54 culture supernatant

4. AR54 균주의 활성물질 구조 및 특성

$^1\text{H-NMR}$, HMBC(Hetero Multiple Bond Correlation) spectrum, ESI-MS spectrum 분석을 통하여 이 화합물이 benzamide계 물질인 piericidin A1임을 확인하였으며 QS 저해 활성은 가지고 있고, 식물세포벽분해효소(Plant Cell Wall Degrading Enzymes, PCWDEs) 활성은 없는 것을 확인하였다.

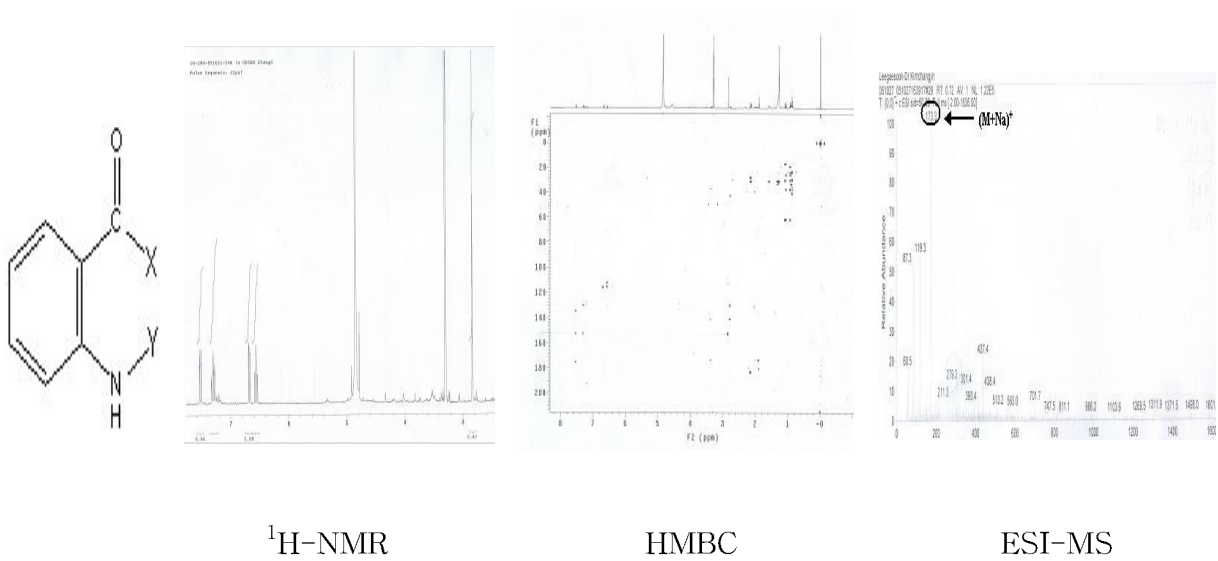


Fig. 6. Structure analysis of active compound

5. AR54 균주의 동정

형태 및 생리·생화학적인 특성분석과 16S rRNA sequence 분석을 통하여 *Kitasatospora* 속에 속하며 *Kitasatospora kifunensis* DSM 6307^T, *Kitasatospora nipponensis* HKI 0315^T 및 *Kitasatospora azatica* NBRC 13803^T과 99.7%, 99.5%, 99.1%의 유사도를 보였다(Fig. 7).

또한 아래의 30종류의 탄소원을 이용하여 산을 생성하였으며 esterase, esterase lipase, lipase, valine arylamidase, trypsin, acid phosphatase 등의 효소활성을 나타내었다.

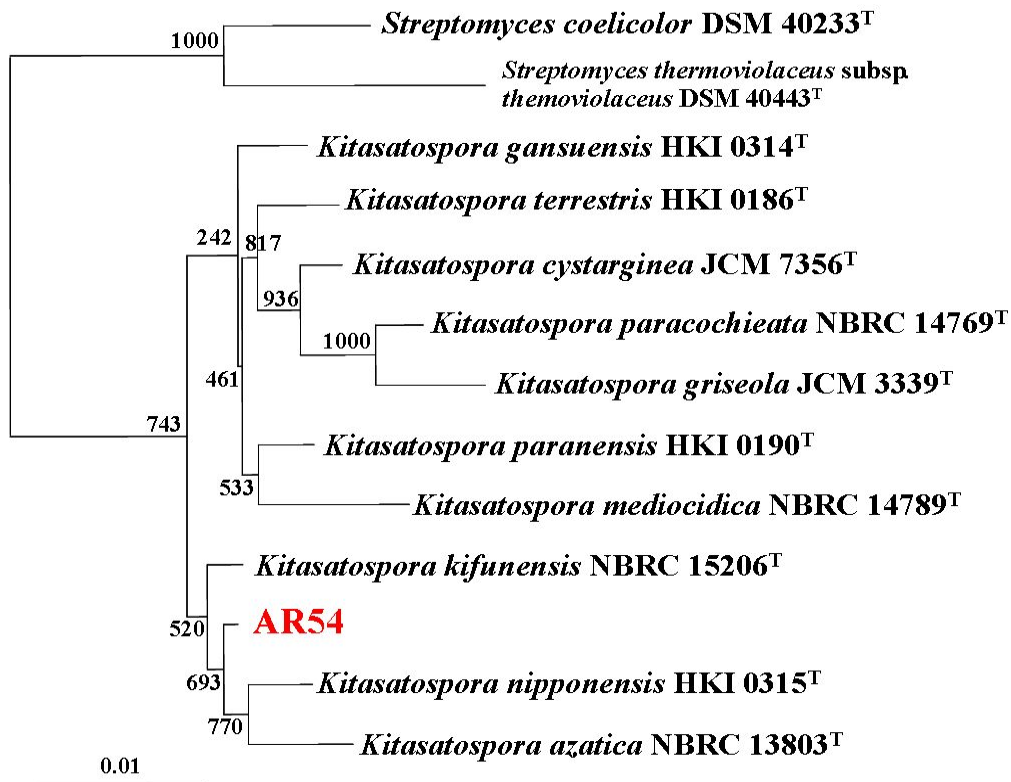


Fig. 7. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences showing the position of strain AR54

6. AR54 균주의 배양 특성

AR54의 배양 특성을 확인하기 위하여 BIOLOG사의 phenotype microarray를 이용하여 탄소원 및 질소원 이용성을 조사하였다. 190종류의 탄소원과 95종류의 질소원에 대한 실험 결과 아래에 열거한 40종류의 탄소원 및 33종류의 질소원을 이용하는 특성을 보였으며, 이러한 결과를 통해 대량생산을 위한 최적배지선정 및 배양특성과약에 활용하고자 한다.

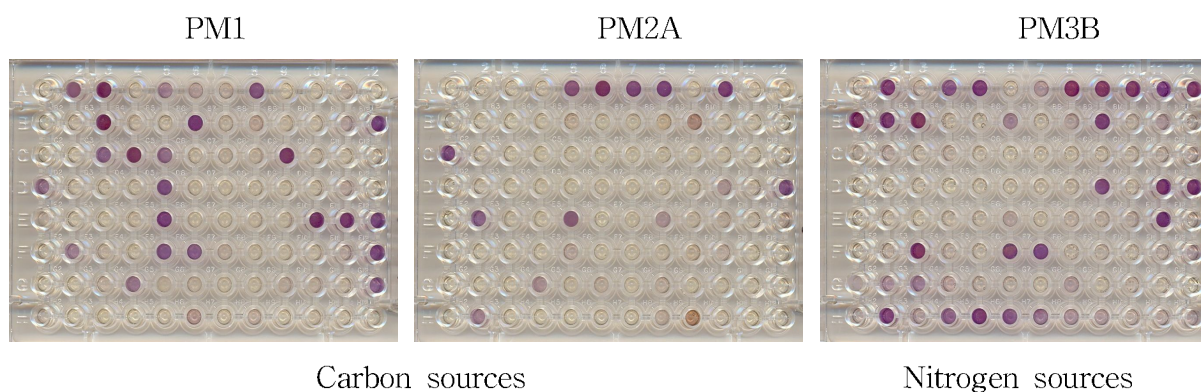


Fig. 8. Analysis of utilization of carbon and nitrogen sources by phenotype microarray

Carbon sources: L-Arabinose, N-Acetyl-D-Glucosamine, Succinic Acid, D-Galactose, L-Proline, Glycerol, D-Gluconic Acid, L-Glutamic Acid, D,L-Malic Acid, D-Ribose, Tween 20, α -D-Glucose, L-Asparagine, Tween 40, Tween 80, Maltotriose, 2-Deoxy Adenosine, Adenosine, Citric Acid, Fumaric Acid, Bromo Succinic Acid, Inosine, L-Threonine, L-Malic Acid, L-Lyxose, γ -Cyclodextrin, Dextrin, Gelatin, Glycogen, Laminarin, Gentiobiose, γ -Amino Butyric Acid, Butyric Acid, Caproic Acid, D-Glucosamine, β -Hydroxy Butyric Acid, Oxalomalic Acid, L-Arginine, L-Phenylalanine, Dihydroxy Acetone

Nitrogen sources: Ammonia, Nitrate, Urea, L-Alanine, L-Arginine, L-Asparagine, L-Aspartic Acid, L-Cysteine, L-Glutamic Acid, L-Glutamine, Glycine, L-Histidine, L-Lysine, L-Phenylalanine, L-Proline, Ethanolamine, Putrescine, Agmatine, Glucuronamide, N-Acetyl-DGlucosamine, Adenosine, Guanine, Guanosine, Xanthine, Xanthosine, Uric Acid, Alloxan, γ -Amino-NButyric Acid, Ala-Gln, Ala-Gly, Ala-His, Ala-Leu, Ala-Thr

7. AR54 균주의 식물세포벽분해효소(PCWEDs) 활성 검정

식물 무름병의 병원균인 *Erwinia carotovora*는 식물 세포벽분해효소를 생산하여 병을 일으키는 것으로 알려져 있다. AR54 균주가 QS 저해 우수 활성을 가졌을 지라도 식물체에 병원성을 나타낼 수 있으므로 세포벽분해효소 활성을 조사하였다. 그 결과 *E. carotovora*는 pectate lyase, cellulase 및 protease 활성을 나타내었고, AR54 균주 또한 pectate lyase 및 protease 활성을 가지고 있었다(Table 1, Fig. 9). 따라서 무름병 방제를 위해 AR54를 식물체에 적용할 경우, 배양액 중에 존재하는 세포벽분해효소에 의해 식물에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각되었다. AR54 균주 배양액을 60분 끓이거나 autoclave 하였을 때 세포벽분해효소 활성이 사라지는 결과를 확인할 수 있었고 (Fig. 10) 이후 실험에서는 효소 실활 배양액을 사용하였다.

Table 1. PCWDEs activity of *E. carotovora* and AR54

PCWDEs	Pectate-lyase	Cellulase	Protease
<i>Erwinia carotovora</i>	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp. AR54	+	-	+

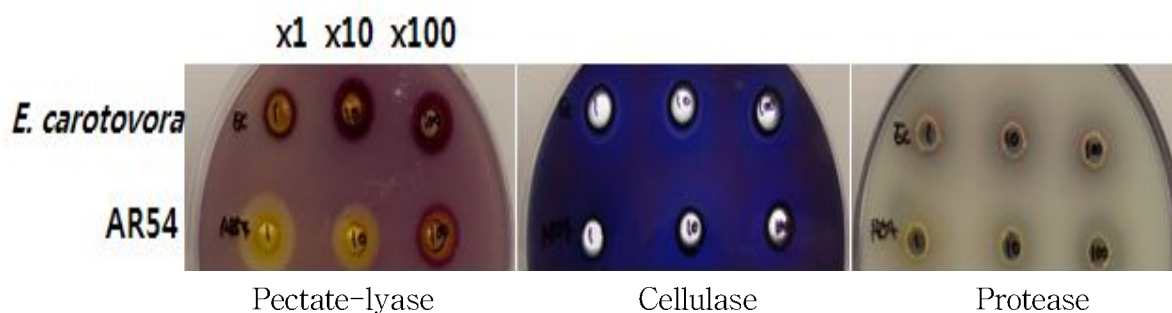


Fig. 9. Enzyme(PCWDEs) activity of *E. carotovora* and AR54

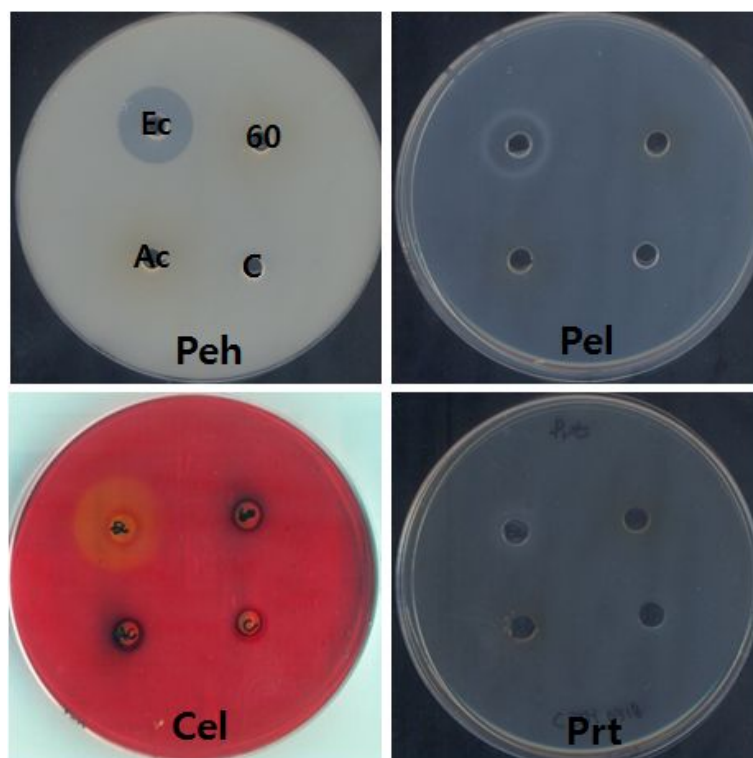


Fig. 10. Extracellular enzyme(PCWDEs) activity of *E. carotovora* and AR54 Pectate lyase isozymes (**Pels**), Polygalacturonase (**Peh**), Cellulase (**Cel**), Protease (**Prt**)
Ec, *Erwinia carotovora*; 60, boiled AR54 (60min. 100°C); Ac, autoclaved AR54; C, D.W.

8. AR54 균주의 배추 무름병 억제능 조사

AR54 균주 배양액을 autoclave하여 효소를 실활 시킨 후 접종 처리하여 발병억제능력을 조사하였다. 배추 절편에 10^7 CFU/ml의 *E. carotovora* 를 처리하고, 여기에 실활 시킨 AR54 배양액을 원액, 1/10 희석, 1/100 희석 농도로 처리한 다음 방제효과를 검정해 본 결과, 원액을 처리한 실험구와 1/10희석하여 처리한 실험구에서 발병 억제효과가 나타났으나(Fig. 11), 배추절편에 병원균을 두 가지 농도로 (10^8 CFU/ml, 10^7 CFU/ml) 처리하고, 반복실험 해 본 결과에서는 오히려 positive control 만큼 병이 진전되는 결과를 보이기도 하였다. 또한, 배추 유묘를 대상으로 pot 상에서 활성을 검정해 본 결과 역시 배양액 처리구에서 positive control 만큼 병이 진전되는 결과를 보였다. 따라서 AR54의 경우 병발신호물질 억제에 의한 발병 억제효과에 있어서 실제 *in vivo* 상에서는 재현성이 낮은 것으로 판단되어, 추가로 균주를 선별하기로 하였다.

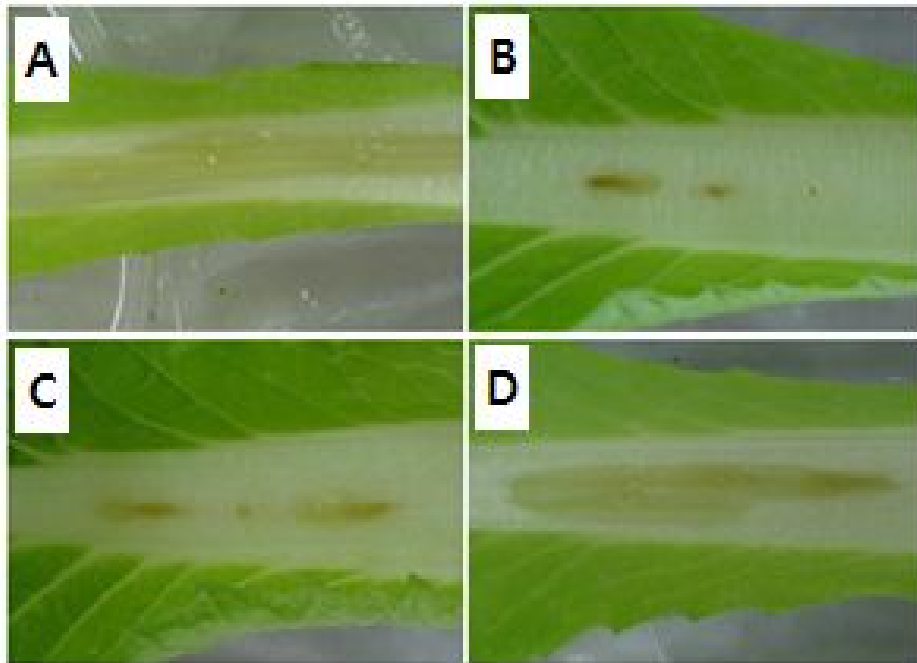


Fig. 11. Inhibition of *E. carotovora*, incubated on the surface of cabbage section with AR54

A, Positive control (*Ec* 10^7 CFU/ml); B, *Ec*+AR54 배양액 원액; C, *Ec*+AR54 배양액 1/10희석;
D, *Ec*+AR54 배양액 1/100

제 2 절 QS 저해 활성 우수 균주 *Streptomyces* sp. AN090571

1. QS 저해 우수 균주 추가 선발

가. AN090571 균주 선발

*E. carotovora*의 autoinducer인 *N*-3-oxohexanoyl homoserine lactones(3-oxo-C₆-HLS, OHHL)에 대한 저해활성을 조사함으로써 추가로 균주선발을 실시하였다. 활성균주를 선발하기 위하여 well-diffusion assay 방법을 이용하여 2,800여개의 방선균 배양 상등액을 한국생명공학연구원 미생물자원센터로부터 분양받아 사용하였다. 1차 스크리닝에서 140개의 활성균주를 선발하였고, 2차 스크리닝은 1차에서 선발된 균주에 대하여 재현성 실험을 실시하여 32개의 활성균주를 선발하였다. 이렇게 선정된 32개의 균주는 그람음성 세균인 *Escherichia coli* KCTC 1924와 *Salmonella typhimurium* KCTC 1926 및 그람양성 세균인 *Bacillus subtilis* KCTC 1021에 대한 항균활성 테스트를 하였다. 그 결과, 5종의 균주 AN090072, AN090538, AN090571, AN090898 및 AN080149가 QS 저해 활성을 가지면서 동시에 3종의 검정균에 대하여 모두 항균 활성이 없는 것(Table 2)으로 확인되었으며, 재현성 실험을 통하여 AN090571 균주를 선발하였다 (Fig. 12).



Fig. 12. Inhibition activity of violacein production from culture supernatants

1, Positive control (AR54); 2, AN080149; 3, AN090072; 4, AN090538; 5, AN090571; 6, AN090898; 7, Negative control (D.W)

나. AN090571 균주의 PCWDEs(세포벽분해효소) 활성 검정

*E. carotovora*가 생산하는 PCWDEs의 효소활성을 선발균주인 AN090571에서 측정해보았다. Polygalacturonase (**Peh**), Pectate lyase isozymes (**Pels**), Cellulase (**Cel**), Protease (**Prt**) 효소활성을 측정한 결과 AN090571에서는 효소활성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 식물 무름병균의 방제용으로 적절한 것으로 판단되었다.

Table 3. PCWDEs activity of AN090571

PCWDEs	Polygalacturonase	Pectate lyase isozymes	Cellulase	Protease
AN090571	-	-	-	-

Table. 2. The result of antimicrobial activity of strains against test organisms

Strain no.	Test organisms			
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. typhimurium</i>	
1	AN090072	X	X	X
2	AN090126	○	○	○
3	AN090155	○	○	○
4	AN090240	○	○	○
5	AN090314	○	○	○
6	AN090372	○	X	○
7	AN090445	○	○	○
8	AN090522	○	○	○
9	AN090531	○	○	○
10	AN090538	X	X	X
11	AN090571	X	X	X
12	AN090633	○	○	X
13	AN090642	○	○	X
14	AN090807	○	○	○
15	AN090813	○	○	X
16	AN090898	X	X	X
17	AN090939	○	○	○
18	AN080149	X	X	X
19	AN080422	○	X	X
20	AN080425	○	X	X
21	AN080481	○	X	○
22	AN080638	○	○	X
23	AN080828	○	○	X
24	AN081160	○	○	X
25	AN081183	○	○	X
26	AN081628	X	○	○
27	AN081646	X	○	○
28	AN081731	○	○	X
29	AN081760	○	○	X
30	AN081777	○	○	X
31	AN081781	○	○	X
32	AN081842	○	○	X

2. AN090571 균주의 동정

선발된 AN090571 균주를 “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”과 “Manual for the Identification of Medical Bacteria”에 따라 균주의 형태학적, 생리·생화학적 특성을 조사하였다

가. AN090571 균주의 형태학적 특성

28°C, 7일간 베넷(Bennett’s) 배지 상에서 자란 AN090571은 회색을 나타내었고(Fig. 13), 주사전자현미경(SEM:scanning electron microscope)으로 관찰한 결과 0.6~0.8 μm 정도 크기의 egg type 포자가 나선형으로 길게 연결된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig 14).

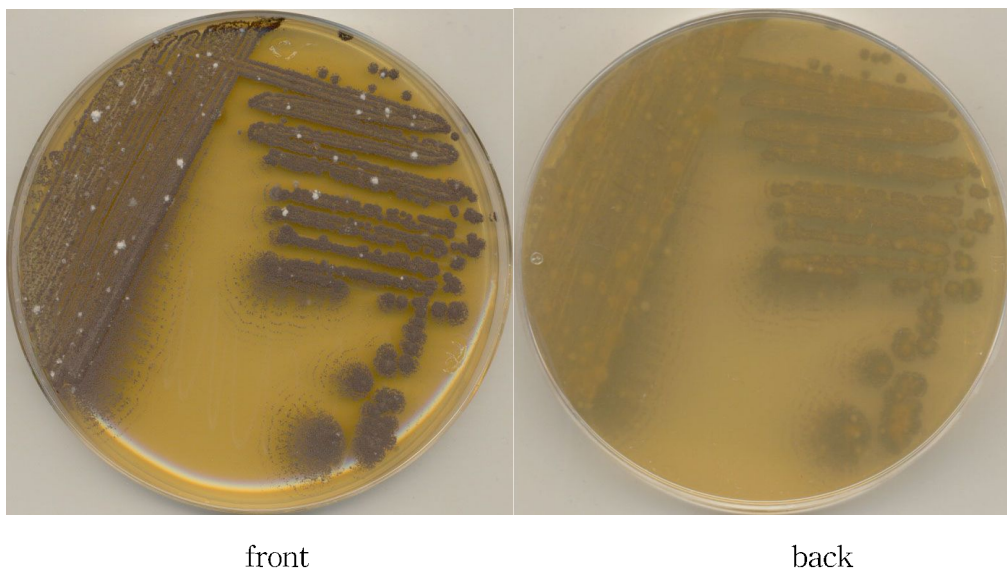


Fig. 13. Morphological characteristics of AN090571

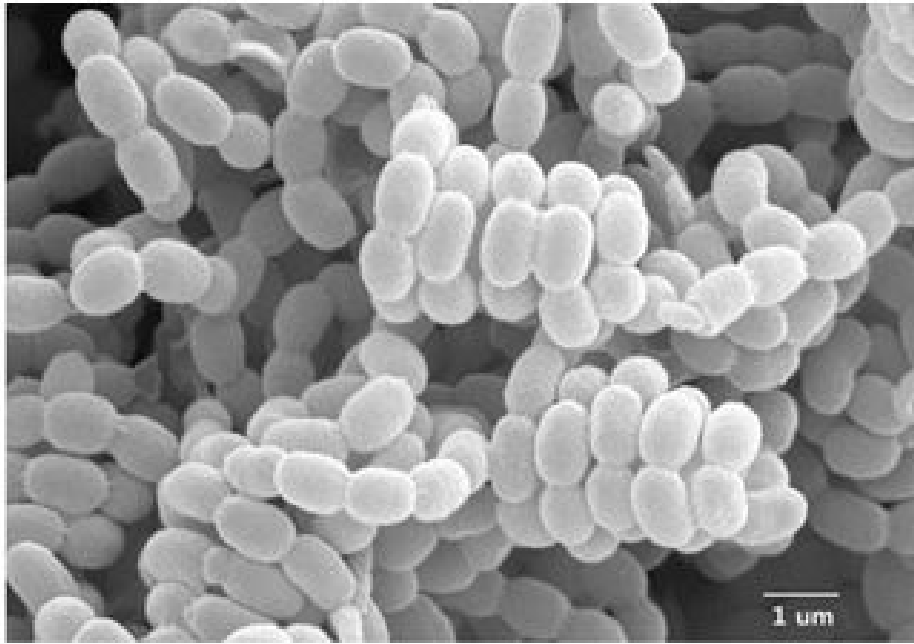


Fig. 14. Scanning electron micrograph of selected strain AN090571 on Bennett's agar medium at 28°C for 7 days. Bar, 1.0μm.

나. AN090571 균주의 생리·생화학적 특성

International Streptomyces Project(ISP)에 따라 여러 가지 배지상에서 AN090571의 특성을 확인하였다. 그 결과 ISP2 배지에서도 Bennett's 배지처럼 회색으로 자랐고, 갈색이나 검정색의 melanoid pigment를 형성하지는 않았다. 또한 Table 4에서와 같이 ISP4, ISP5 및 ISP7 배지에서 잘 자라지 않았으며 배지종류에 따라 성장 정도의 차이를 보였다. 포자 덩어리 색깔은 배지조건에 따라 노란색에서 회색의 균사였고, 반뎃면도 노란색에서 회색을 나타냈으며 모든 배지에서 비확산성의 색소를 생산하지 않았다(Table 4). 또한, glucose 및 rhamnose는 잘 이용하였으나, arabinose, sucrose, xylose, inositol, mannitol, fructose, raffinose 및 cellulose는 이용하지 못하였다(Table 5).

Table 4. Cultural characteristics of a selected strain AN090571

Medium	Spore mass color	Reverse side color	Growth	Soluble pigment
ISP2 agar	grey	grey	abundant	none
ISP3 agar	grey	grey	moderate	none
ISP4 agar	poor	poor	poor	none
ISP5 agar	poor	poor	poor	none
ISP6 agar	white	yellow	abundant	none
ISP7 agar	poor	poor	poor	none

Table 5. Carbon utilization of selected strain AN090571

Carbon sources	AN090571
D-Glucose	+
L-Arabinose	±
Sucrose	±
D-Xylose	±
Inositol	±
D-Mannitol	±
D-Fructose	±
α-L-Rhamnose	+
D-Raffinose	±
Cellulose	±

Culture condition was at 28°C for 5 days on the basal medium (0.2% peptone, 0.1% yeast extract and 0.1% beef extract)

다. AN090571 균주의 분자계통분류학적 분석

염색체 DNA상의 16S rRNA는 두 개의 알려진 universal primer[Forward primer는 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*E. coli* 16S rRNA positions 8-27), Reverse primer는 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'(*E. coli* 16S rRNA positions 1492-1513)]를 사용하여 증폭하였다. 증폭이 확인된 PCR 산물은 염기서열 반응을 위해서 QIAquick PCR purification kit(Qiagen사)를 사용하여 정제하였고 자동염기서열 분석 장치 (Applied Biosystems model 377 automatic RNA sequencer)를 이용하여 염기서열 분석을 수행하였다. 선발된 균주의 16S rRNA 염기서열은 미국 NCBI의 BLAST를 사용하여 기존에 등록된 다양한 세균들과 상응하는 유전자의 염기서열을 CLUSTAL W software를 사용하여 비교하였고, 분자계통학적 계통수의 작성은 PHYLIP 프로그램 패키지를 사용하여 수행하였다. AN090571 균주의 16S rRNA 염기서열에 대하여 NCBI(National Center for Biotechnology Information) BLAST 결과, *Streptomyces* 속에 속하였고 *Streptomyces misionensis* NBRC 13063^T 균주와 99.01%의 유사도를 나타내었다(Fig. 15). 또한, 계통수 상에서도 위의 유사도와 일치하게 나타났으며 *Streptomyces* sp. AN090571로 명명하여 2010년 2월 8일에 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였으며, KCTC11638BP 기탁번호를 부여받았다.

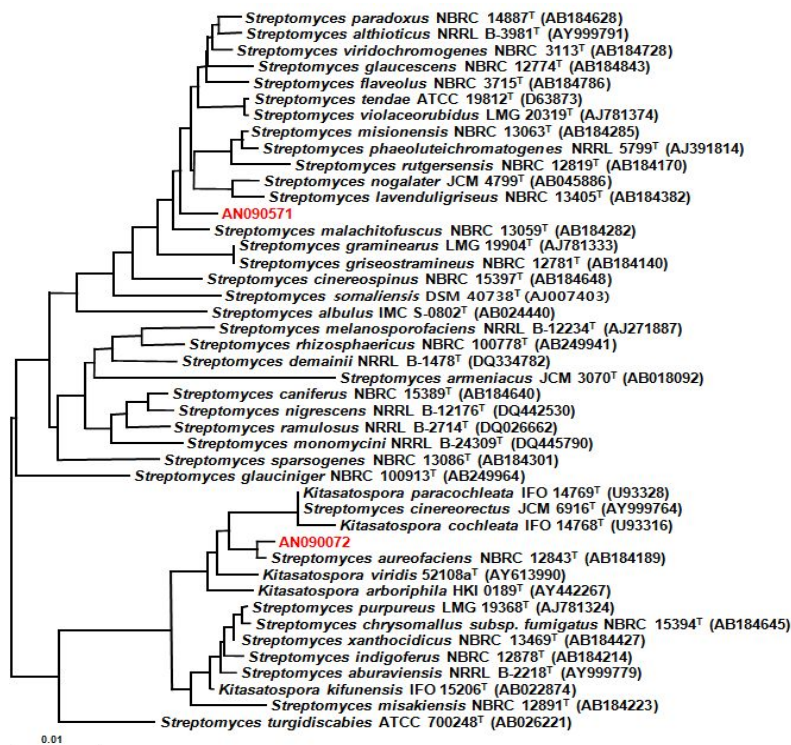


Fig. 15. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships based on 16S rRNA gene sequences of selected strains AN090072, AN090571 and other related taxa. The scale bar is equal to 0.01 changes per nucleotide position.

3. AN090571 균주의 배양 특성

가. AN090571 균주의 탄소원 및 질소원 이용성 조사

AN090571로부터 QS 저해 물질을 대량생산하기 위한 최적배지를 선정하기 위하여 탄소원 및 질소원 이용특성에 대한 실험을 하였다. BIOLOG사의 phenotype microarray를 이용하여 190종류의 탄소원과 95종류의 질소원에 대한 실험결과 아래에 열거한 21종류의 탄소원 및 2종류의 질소원을 이용하였다. 이러한 이용성을 통해 대량생산을 위한 최적 배지 선정 및 배양 특성 파악에 활용하고자 하였다 (Fig. 16).

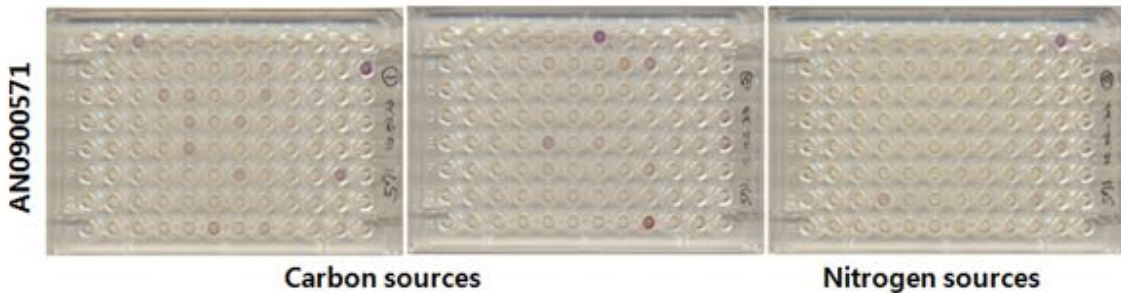


Fig. 16. Analysis of utilization of carbon and nitrogen sources by phenotype microarray

Carbon sources: N-Acetyl-D-Glucosamine, L-Aspartic Acid, L-Glutamic Acid, D-Ribose, Tween 20, Acetic Acid, Tween 40, α -Keto-Butyric Acid, Tween 80, Propionic acid, D-Cellobiose, L-Lyxose, Glucuronamide, Pyruvic Acid, Gelatin, Arbutin, 2-Deoxy-D-Ribose, D-Glucosamine, 4-Hydroxy Benzoic Acid, Sorbic acid, Dihydroxy Acetone

Nitrogen sources: L-Cysteine, Alloxan

나. AN090571 균주의 최적 배지 선정

AN090571로부터 QS 저해 활성이 높은 최적배지를 선정하기 위하여 탄소원 및 질소원 이용성에 대한 실험을 하였다. GSS를 기본배지로 하며, 실험에 이용한 탄소원은 glucose, xylose, fructose, galactose, mannose, arabinose, rhamnose, lactose, maltose, molasses, raffinose, starch, cellulose, dextrin, inulin, maltodextrin, glycerol, solbitol, mannitol, inositol이며, 그 중 maltodextrin을 탄소원으로 이용했을 때 QS 저해 활성이 가장 높았다.

질소원은 yeast extract, beef extract, malt extract, fish meal, soytone, soybean meal, tryptone, asparagine, N-Z amine, corn steep liquor, ammonium sulfate, ammonium acetate, NaNO_3 , Urea이며, 그 중 N-Z amine을 질소원으로 이용했을 때 QS 저해 활성이 가장 높았다 (Fig. 17).

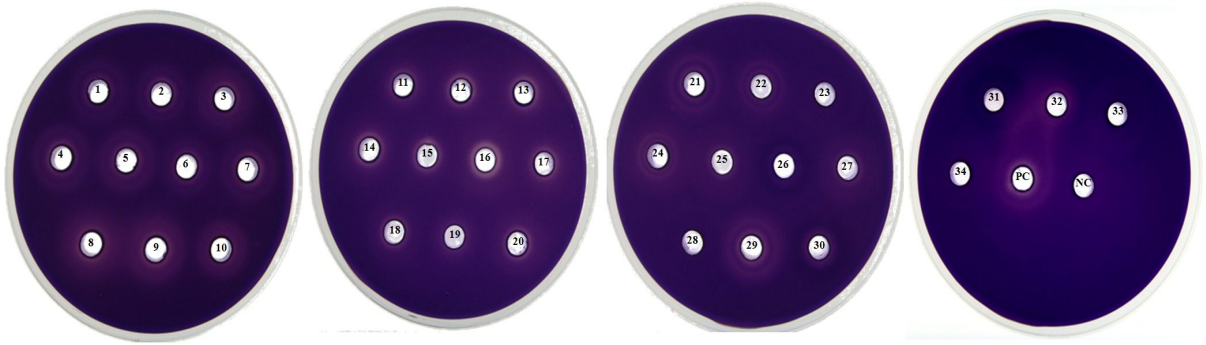


Fig. 17. Selection of optimal carbon and nitrogen source for the production of QSI from AN090571

Carbon sources; 1, Glucose; 2, Xylose; 3, Fructose; 4, Galactose; 5, Mannose; 6, Arabinose; 7, Rhamnose; 8, Lactose; 9, Maltose; 10, Molasses; 11, raffinose; 12, Starch; 13, Cellose; 14, Dextrin; 15, Inulin; 16, Maltodextrin; 17, Glycerol; 18, Solbitol; 19, Mannitol; 20, Inositol

Nitrogen Sources 21, Yeast extract; 22, Beef extract; 23, Malt extract; 24, Fish meal; 25, Soytone; 26, Soyeam meal; 27, Tryptone; 28, Asparagine; 29, N-Z amine; 30, Corn steep liquor; 31, Ammonium sulfate; 32, Ammonium acetate; 33, NaNO₃; 34, Urea; PC, Positive control(GSS); NC, Negative control(D.W)

4. AN090571 균주의 활성물질 분리정제 및 구조분석

가. AN090571 균주의 활성물질 분리정제

QS 저해 활성을 가지는 물질을 분리 정제하기 위하여 Fig. 18의 과정으로 실험을 수행하였고 각 단계마다 CV026 plate assay 방법으로 활성을 확인하였다. AN090571의 배양 상등액을 동량의 ethyl acetate로 2번 추출한 다음 감압 농축하여 silica gel column chromatography와 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 분리하였다. 활성물질은 ODS column chromatography를 통하여 HPLC로 확인하였으며 YMC ODS, ϕ 250 × 4.6 mm의 column을 사용하여 70% acetonitrile로 분석하였다 (Fig. 19). 분리과정 중의 분획들 중에서 Rt=27min 분획에서 QS 저해 활성을 확인하였다.

나. AN090571 균주의 활성물질 구조분석

HPLC로 정제된 ¹H-NMR, HMBC(Hetero Multiple Bond Correlation) spectrum, COSY, ESI-MS spectrum 분석을 통하여 이 화합물이 benzamide계 물질인 piericidin A1임을 확인(Fig. 20) 하였으며 CV026에 대한 QS 저해 활성을 가지고 있었다.

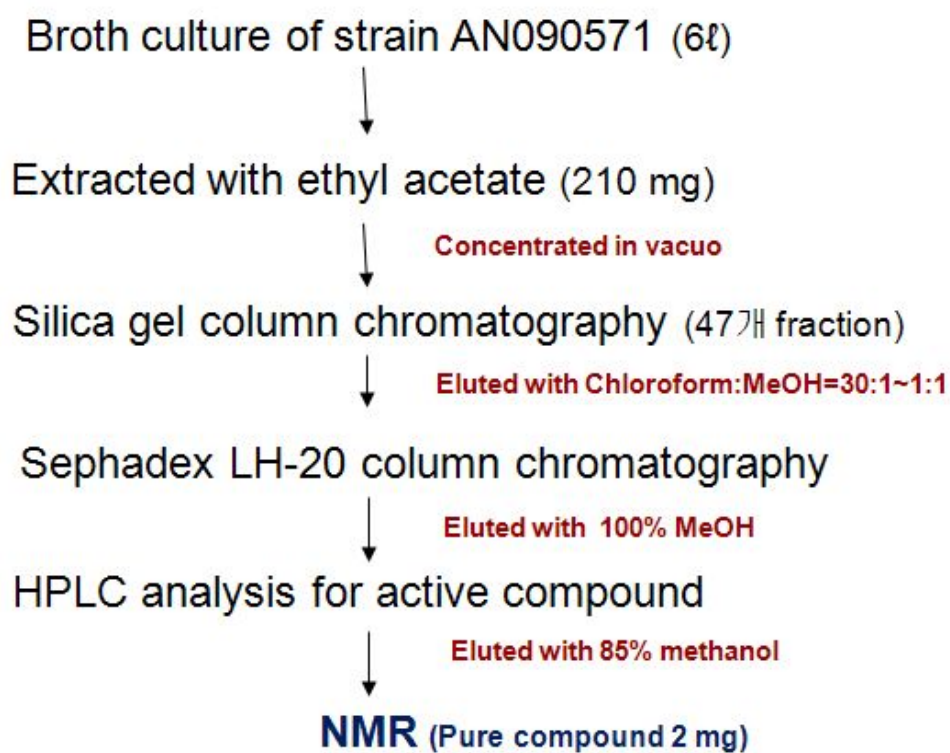


Fig. 18. Purification scheme for active compound

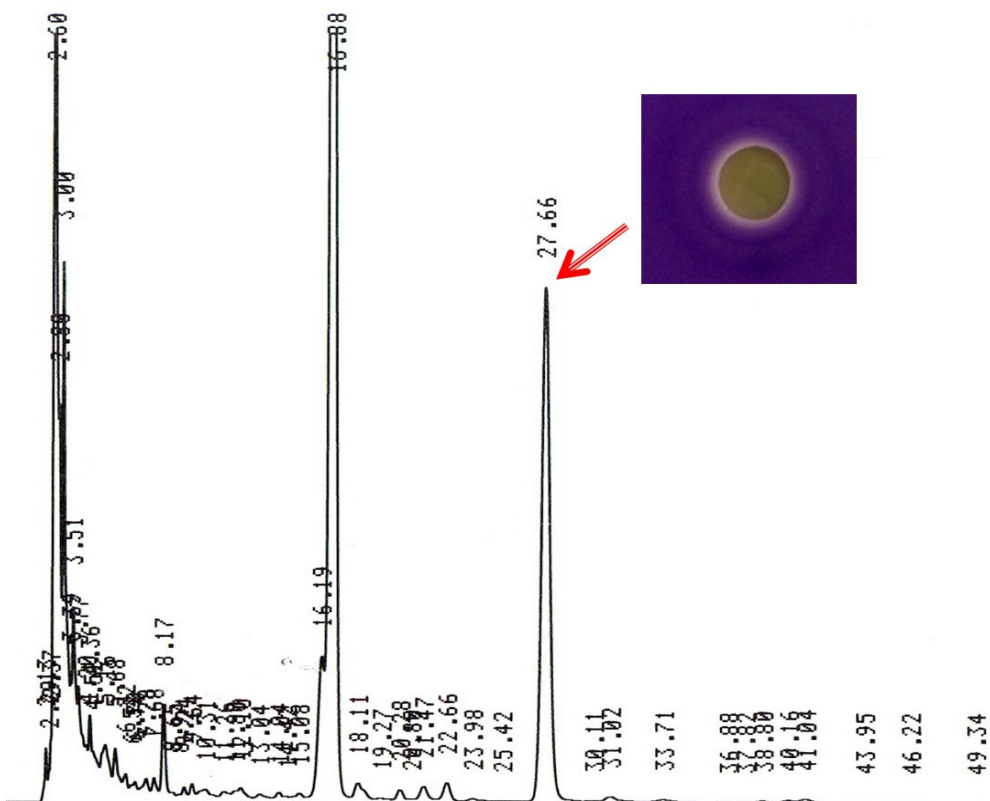


Fig. 19. HPLC chromatogram of AN090571

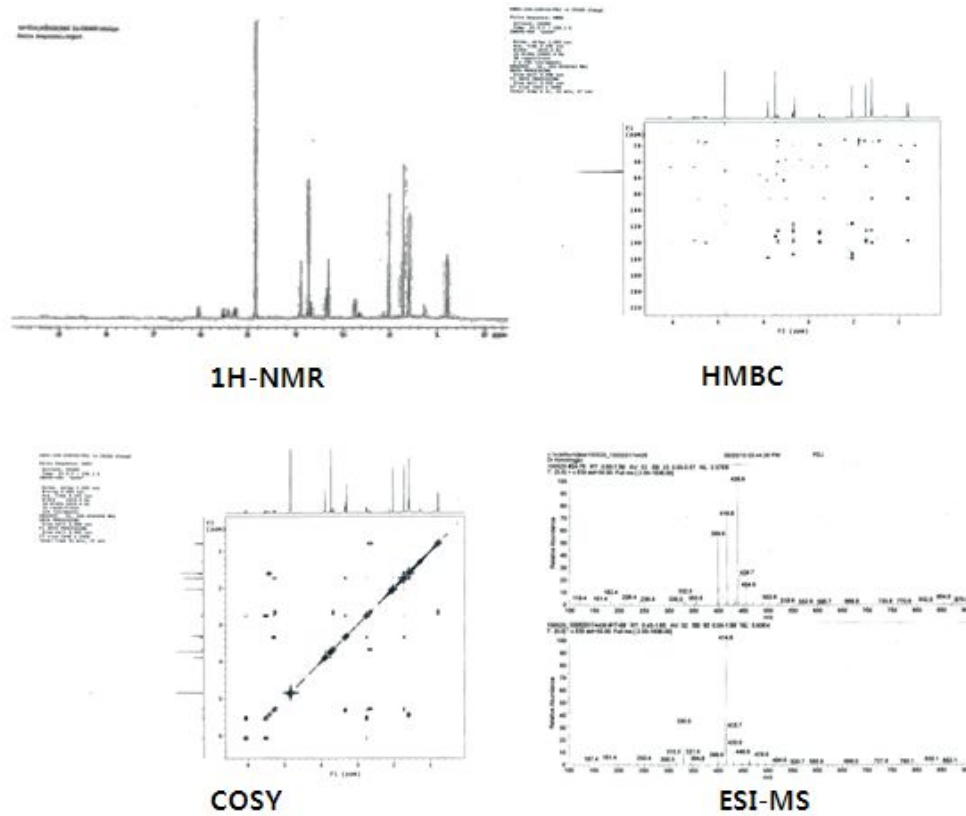


Fig. 20. Structure analysis of active compound

5. AN090571 균주의 제제화

AN090571의 독성평가 시험을 위해서 Table 6과 같은 방법으로 제제화 하였다. 제제의 구성성분으로는 활성균주의 지지체 및 보호제로서 이용되며 균주가 지속적으로 활성을 내기 위한 입제의 주성분으로서 pyrophyllite를 이용하였고, 분산제로서 white carbon, 계면활성제로는 WP700, 증량제로는 WP280B를 이용하였다. 이렇게 만들어진 제제는 CV026을 이용한 활성 검정에서 15 ppm 이상에서 QS 저해능을 보였다.

Table 6. Formulation of microbial agent

components	g
Ethyl acetate extract	0.3
Pyrophyllite	139
White carbon	30
WP700	10
WP280B	20
Total	200

6. AN090571 균 제제의 독성 및 안전성 평가

가. AN090571의 마우스에 대한 급성 경구 투여 독성실험

1) 재료 및 방법

가) 시험물질의 조제 및 분석

시험물질은 설정된 투여농도에 맞게 멸균증류수로 현탁 후 조제하여 투여하였다. 시험물질의 안정성 및 균질성 분석은 별도로 시행하지 않았다.

나) 시험계

(1) 동물종(계통) : CrljOri:CD1(ICR) mice

(2) 입수 및 투여시 동물수(성별), 주령 및 체중범위

입수시 : 11마리(수컷)/11마리(암컷), 4주령, 18~25 g/15~19 g

투여시 : 10마리(수컷)/10마리(암컷), 5주령, 24~32 g/22~25 g

(3) 시험계 선정이유

농촌진흥청 고시 제 2009-19호 “농약의 등록기준”에 마우스를 사용하도록 되어 있으며 ICR 계통은 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과와 해석과 평가가 용이하여 선택하였다.

(4) 균 분리

순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 균 분리하였다.

균분리시 균 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

다) 시험군 및 투여방법

(1) 시험군

- 기초시험

예비 및 본시험에 앞서 실시한 기초 시험이므로 암·수 각각 2,500 mg/kg B.W.의 약량으로 설정하여 시험을 실시하였다(Table 7).

Table 7. Test group

군	시험물질	성	동물번호	투여약량 (mg/kg B.W.)	투여액량 (mL/kg B.W.)
G1	멸균증류수 (대조군)	Male	1101~1105	0	10
		Female	2101~2105		
G2	AN090571 (시험군)	Male	1201~1205	2,5000	10
		Female	2201~2205		

(2) 투여경로

시험물질인 농약의 노출예상경로가 경구이므로 경구 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 경구로 투여하였다.

(3) 대조군의 설정

시험물질 조제시 멸균증류수에 현탁하여 조제하였기 때문에 멸균증류수를 용매 대조군으로 설정하였다.

(4) 투여액량 설정

투여액량은 투여 군별 공히 10 mL/kg B.W.로 설정하여 투여시 반드시 흔들어 준 후 투여하였다.

(5) 시험물질의 투여

(가) 사료의 절식

투여개시 3~4시간 전부터 사료를 공급하지 않았고, 음수는 공급하였다.

(나) 투여방법

마우스용 경구 투여용 주사기를 이용하여 체중측정치를 기준으로 시험물질 조제 액량을 산출한 후, 경구 투여 경로를 이용하여 위내에 1회 강제 투여 하였다. 시험물질 투여는 시험물질조제 후 30분 내에 투여하였다.

라) 관찰항목

(1) 일반증상 관찰

약제 처리 후 4시간까지는 매 시간마다 일반증상을 관찰하였고 그 다음날부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 관찰하였다.

(2) 사망률

모든 동물에 대해 매일 사망동물이나 빈사상태에 있는 동물의 유무를 관찰하였다.

(3) 체중변화

체중은 시험물질 투여직전, 투여 후 7일 및 14일에 측정하였다.

(4) 부검시 육안적 소견

시험 종료시 모든 생존동물은 외관검사를 실시한 후 부검하여 육안적인 이상 소견을 검사하였다.

마) 자료의 통계처리

시험기간동안의 체중측정결과에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위해 F 검정을 실시하였고, 분산이 동질하여 시험물질 투여군과 대조군간의 유의성을 알아보기 위해 Student t-test를 실시하였다.

2) 결과

가) 사망률 및 LD₅₀

관찰기간 동안 2,500 mg/kg B.W. 의 투여농도에서 사망례가 관찰되지 않아 LD₅₀ 값은 2,500 mg/kg B.W. 이상으로 판단된다(Table 8).

Table 8. Mortality and clinical signs (Acute oral gavage of AN090571)

Group	Dose (mg/kg)	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead/total)
G1	0	10	NAD	0% (0/10)
G2	2,500	10	NAD	0% (0/10)

NAD: No Abnormality Detected

나) 일반증상관찰

관찰기간 동안 암·수 모든 투여군에서 투여에 기인한 일반증상은 관찰되지 않았다(Table 8).

다) 체중변화

시험기간 중 생존동물에 대한 체중변화에 있어서 투여군과 대조군간의 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 9).

Table 9. Mean body weights (Acute oral gavage of AN090571)

Group	Dose (mg/kg)	Sex	No	Day(s) after administration		
				0	7	14
G1	0	Male	5	28.97±2.15	32.42±1.97	34.89±3.11
		Female	5	24.79±1.81	26.48±2.01	27.79±2.31
G2	2,500	Male	5	30.12±1.62	34.26±2.61	37.42±3.37
		Female	5	24.37±1.25	26.83±1.60	27.64±0.81

No : Number of animals

라) 부검시 육안적 소견

모든 생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 모든 시험동물에서 투여에 기인된 특이한 증상은 관찰되지 않았다(Table 10).

Table 10. Necropsy findings (Acute oral gavage of AN090571)

Findings	Number of animals	G1 (0 mg/kg)		G2 (2,500 mg/kg)	
		Male	Female	Male	Female
		NAD	20	5	5

NAD : No Abnormalities Detected

3) 고찰 및 결론

이 실험은 ICR계 마우스를 사용하여 기초시험으로 2,500 mg/kg B. W. 투여군과 용매 대조군을 두어 1회 경구 투여한 후 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다. 본 시험결과 2,500 mg/kg B. W.에서 모든 투여동물에서 사망례는 관찰되지 않았고, 시험물질과 연관된 일반증상도 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서도 대조군과 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 또한 모든 생존동물에 대한 부검결과에서도 특이한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 마우스를 이용한 AN090571의 경구 투여에 대한 LD₅₀은 2,500 mg/kg B. W. 이상으로 판단된다.

나. AN090571의 랫드에 대한 급성 경피 투여 독성실험

1) 재료 및 방법

가) 시험물질의 조제 및 분석

시험물질은 설정된 투여농도에 맞게 멸균증류수로 현탁 후 조제하여 투여하였다. 시험물질의 안정성 및 균질성 분석은 별도로 시행하지 않았다.

나) 시험계

(1) 동물종(계통) : CrI:CD(SD) Rat, SPF

(2) 입수 및 투여시 동물수(성별), 주령 및 체중범위

입수시 : 11마리(수컷)/11마리(암컷), 7주령, 180~250 g, 120~150 g

투여시 : 10마리(수컷)/10마리(암컷), 8주령, 260~290 g, 160~200 g

(3) 시험계 선정이유

농촌진흥청 고시 제 2009-19호 “농약의 등록기준”에 랫드를 사용하도록 되어 있으며 SD 계통은 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석과 평가가 용이하여 선택하였다.

(4) 군 분리

순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 군 분리하였다.

군 분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

다) 시험군 및 투여방법

(1) 시험군

-기초시험

예비 및 본시험에 앞서 실시한 기초 시험이므로 암·수 각각 2,000 mg/kg B.W.의 약량으로 설정하여 시험을 실시하였다.

Table 11. Test group

군	시험물질	성	동물번호	투여약량 (mg/kg B.W.)	투여액량 (mL/kg B.W.)
G1	멸균증류수 (대조군)	Male	1101~1105	0	5
		Female	2101~2105		
G2	AN090571 (시험군)	Male	1201~1205	2,000	5
		Female	2201~2205		

(2) 투여경로

시험물질인 농약의 노출예상경로가 피부이므로 피부 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 피부로 투여하였다.

(3) 대조군의 설정

시험물질 조제시 멸균증류수에 현탁하여 조제하였기 때문에 멸균증류수를 용매 대조군으로 설정하였다.

(4) 투여액량 설정

투여액량은 투여 군별 공히 5 mL/kg B.W.로 설정하여 투여시 반드시 흔들어서 후 투여하였다.

(5) 투여방법 및 투여횟수

시험물질 처리를 위해 투여 전날 시험동물의 등부위의 체모를 가급적 넓게 피부가 손상되지 않도록 제모하였으며, 시험물질의 도포면적은 체표면적의 10% 정도 (랫드: 4cm×5cm)로 하였다. 제조된 시험물질을 제모한 부위에 고르게 도포하고 시험물질의 유실을 막기 위해 비자극성 테이프로 24시간 고정시켜 주었다. 시험물질을 도포한 다음 24시간 후 도포물을 제거하고 피부에 남아있는 시험물질을 증류수로 잘 닦아 주었다.

라) 관찰항목

(1) 일반증상 관찰

약제 처리 후 4시간까지는 매 시간마다 일반증상을 관찰하였고 그 다음날부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 관찰하였다.

(2) 사망률

모든 동물에 대해 매일 사망동물이나 빈사상태에 있는 동물의 유무를 관찰하였다.

(3) 체중변화

체중은 시험물질 투여직전, 투여 후 7일 및 14일에 측정하였다.

(4) 부검시 육안적 소견

시험 종료시 모든 생존동물은 외관검사를 실시한 후 부검하여 육안적인 이상 소견을 검사하였다.

마) 자료의 통계처리

시험기간동안의 체중측정결과에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위해 F 검정을 실시하였고, 분산이 동질하여 시험물질 투여군과 대조군간의 유의성을 알아보기 위해 Student t-test를 실시하였다.

2) 결과

가) 사망률 및 LD₅₀

관찰기간 동안 2,000 mg/kg B.W. 의 투여농도에서 사망례가 관찰되지 않아 LD₅₀ 값은 2,000 mg/kg B.W. 이상으로 판단된다(Table 12).

Table 12. Mortality and clinical signs (Acute transdermal application of AN090571)

Group	Dose (mg/kg)	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead/total)
G1	0	10	NAD	0% (0/10)
G2	2,000	10	NAD	0% (0/10)

NAD: No Abnormality Detected

나) 일반증상관찰

관찰기간 동안 암·수 모든 투여군에서 투여에 기인한 일반증상은 관찰되지 않았다(Table 12).

다) 체중변화

시험기간 중 생존동물에 대한 체중변화에 있어서 투여군과 대조군간의 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 13).

Table 13. Mean body weights (Acute transdermal application of AN090571)

Group	Dose (mg/kg)	Sex	No	Day(s) after administration		
				0	7	14
G1	0	Male	5	270.7±9.3	328.9±21.9	375.2±30.6
		Female	5	169.3±3.9	195.7±6.8	215.9±11.0
G2	2,000	Male	5	276.4±6.7	326.5±15.0	381.8±18.6
		Female	5	169.0±9.3	191.6±11.6	209.5±13.1

No : Number of animals

라) 부검시 육안적 소견

모든 생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 모든 시험동물에서 투여에 기인된 특이한 증상은 관찰되지 않았다(Table 14).

Table 14. Necropsy findings (Acute transdermal application of AN090571)

Findings	Number of animals	G1 (0 mg/kg)		G2 (2,000 mg/kg)	
		Male	Female	Male	Female
NAD	20	5	5	5	5

NAD : No Abnormalities Detected

3) 고찰 및 결론

이 실험은 SD계 랫드를 사용하여 기초시험으로 2,000 mg/kg B. W. 투여군과 용매 대조군을 두어 1회 경피 투여한 후 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다. 본 시험결과 2,000 mg/kg B.W.에서 모든 투여동물에서 사망률은 관찰되지 않았고, 시험물질과 연관된 일반증상도 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서도 대조군과 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 또한 모든 생존동물에 대한 부검결과에서도 특이한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 랫드를 이용한 AN090571의 경피 단회 투여시 LD₅₀은 2,000 mg/kg B. W. 이상으로 판단된다.

다. AN090571의 담수어류 영향시험

1) 재료 및 방법

가) 시험물질 조제

시험물질은 부형제인 시험용수를 이용하여 현탁시켜 조제하였다.

나) 시험계

(1) 시험생물 : 송사리 (*Oryzias latipes*)

(2) 시험어의 전장 및 체중

시험어의 체중 및 전장은 시험종료 후 대조구와 처리구에서 각각 10마리씩을 취해 조사하였고 결과는 평균 및 표준편차로 나타내었다.

-시험어의 전장 : 2.56 ± 0.20 cm

-시험어의 체중 : 0.16 ± 0.03 g

(3) 시험어계의 선택사유

본시험에 사용된 송사리는 “농촌진흥청고시 제 2010-9호, [별표 13] 환경생물독성시험기준과방법, 생화학농약 13-3-2. 담수어류영향시험”에 명시된 공시어종으로 널리 사용되고 있으며, 비교할 많은 시험기초자료가 축적되어 있어 선택하였다.

(4) 순화 및 절식

시험 시작 7일전에 50 L의 수조로 100마리의 시험어를 이동시켜 순화를 시작하였고, 시험과 동일한 환경 하에서 순화를 실시하였다. 순화기간 중 치사어가 발생하지 않고 건강상태가 양호하여 시험에 사용하였다. 절식은 시험개시 24시간 전부터 실시하였다.

다) 시험방법

(1) 시약의 조제 : 시험물질 10.000 g을 정확히 평량하여 100 mL의 volumetric flask에 넣고 시험용수를 가하여 완전히 현탁될 때까지 충분히 교반시켜 시험물질용액 (stock solution, 100000 mg/L)을 조제하였다. 시험물질용액 (stock solution) 0.5000 mL을 정확히 취하여 12.5 L의 시험수조에 넣고 시험용수를 전량 5 L가 되도록 가하여 완전히 현탁될 때까지 충분히 교반시킨 후 시험용액 (test solution)으로 사용하였다.

(2) 시험농도 : 본시험에 앞서 96시간동안 실시한 예비시험결과 최고 농도인 10.00 mg/L에서 치사가 일어나지 않아 10.00 mg/L의 농도에서 한계시험 (limit test)을 실시하였다.

(3) 대조구 설정

음성대조구 : 시험용수인 지하수로 음성대조구를 설정하였다.

양성대조구 : Pentachlorophenol sodium salt (Fluka, Lot No. 427620/1)를 양성대조물질로하여 0.20, 0.30, 0.45, 0.68 및 1.01 mg/L (공비 1.5)의 설정농도(nominal concentration)로 시험한 결과를 적용하였다. (2010-01-26 ~ 2010-01-30).

(4) 노출조건 : 12.5 L 용량의 원통형 유리수조 (28 cm H. × 24 cm ϕ)에 10 L의 시험용액을 투여하였으며, 시험어수는 각각 10마리씩을 반복 없이 처리하였다. 노출환경은 사육조건과 동일하게 수온은 (21 ~ 25) °C, 광조건 16시간, 암조건 8시간으로 유지하였다. 시험개시 24시간 전부터 시험종료시까지 사료급여는 중단하였다.

라) 관찰항목

(1) 일반증상 및 치사수 관찰 : 모든 시험수조에 대하여 시험시작 직후 (2시간), 24

시간, 48시간, 72시간 및 96시간 경과시에 일반중독증상, 특이증상 및 치사어 관찰을 실시하였다. 치사어의 판정은 공시어에 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 간주하였다.

(2) 시험용수의 수질 검사 : 시험기간 중 수질검사는 시험물질 처리 직후부터 24시간 간격으로 모든 수조에서 pH, DO 및 수온을 조사하였다. pH와 수온은 Sartorius사의 PP-15 pH meter를 사용하였고, DO는 Orion research Incorporated의 810A+ DO meter를 사용하여 측정하였다.

(3) LC₅₀ 산출 및 NOEC : 시험물질 투여 후 48 및 96시간 경과시 치사개체가 없었으므로 반수치사농도 (LC₅₀) 및 신뢰한계는 산출하지 않았다. 무영향농도 (NOEC)는 중독증상이 없고 치사어가 발생하지 않는 최고 시험농도로 표시하였다.

2) 결과

가) 일반증상 및 치사수

예비시험결과에 따라 10.00 mg/L의 시험농도에서 한계시험 (limit test)을 실시한 결과 48시간, 96시간 경과시 치사어가 관찰되지 않았다(Table 15).

시험기간 중 대조구와 처리구에서 일반중독증상 및 특이증상은 관찰되지 않았다 (Table 16).

Table 15. Cumulative mortality of *Oryzias latipes*

Concentration (mg/L) ¹⁾	Number of fish	Number of dead fish				Mortality (%)	
		24h	48h	72h	96h	48h	96h
Control	10	0	0	0	0	0	0
10.00	10	0	0	0	0	0	0

1) Active ingredient

Table 16. Abnormal response

Concentration (mg/L) ¹⁾	Abnormal response			
	24h	48h	72h	96h
Control	NOR ²⁾	NOR	NOR	NOR
10.00	NOR	NOR	NOR	NOR

나) 정시적 수질변화

시험기간 중 pH는 평균 7.98 (7.74 ~ 8.27)이었고, DO는 평균 6.76 mg/L (5.29 mg/L ~ 8.26 mg/L)이었다. 수온은 평균 (23.0 ± 0.4) °C (22.5 °C ~ 23.7 °C)이었다. (Table 17, 18, 19).

Table 17. Change of pH

Concentration (mg/L) ¹⁾	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	8.27	8.18	8.09	7.94	7.95
10.00	8.25	7.74	7.74	7.81	7.82

1) Active ingredient

Table 18. Change of water temperature (Unit : °C)

Concentration (mg/L) ¹⁾	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	23.0	22.5	23.0	23.1	23.1
10.00	22.9	23.7	23.3	22.5	23.1

1) Active ingredient

Table 19. Change of DO (Unit : mg/L)

Concentration (mg/L) ¹⁾	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	8.26	7.52	6.86	6.29	5.80
10.00	8.23	7.26	6.43	5.69	5.29

1) Active ingredient

3) 고찰 및 결론

이 시험은 담수어류(송사리, *Oryzias latipes*)에 대한 영향시험을 96시간 동안 지수식으로 실시하여 농도 당 노출어류 10마리에 대한 생사수, 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사하였다. 본 시험은 “농촌진흥청고시 제 2010-3호, [별표 13] 환경생물독성시험 기준과방법, 생화학농약 13-3-2. 담수어류영향시험” (2010-02-09)에 따라 수행되었다. 시험농도(nominal concentration)는 10.00 mg/L로 하여 시험을 실시하였으며, 시험농도에 대한 별도의 분석은 시행하지 않았다. 시험기간 중 치사가 일어나지 않는 최대 농도는 10.00 mg/L였고, 대조구 및 처리구에서 일반중독증상 및 특이사항은 관찰되지 않았다.

체중은 평균 (0.16 ± 0.03) g, 전장은 평균 (2.56 ± 0.20) cm 이었다. pH는 평균 7.98 (7.74 ~ 8.27) 이었고, DO는 평균 6.76 mg/L (5.29 mg/L ~ 8.26 mg/L) 였으며, 시험기간의 평균수온은 (23.0 ± 0.4)°C (22.5°C ~ 23.7°C) 이었다. Table 20의 결과 AN090571의 48시간 LC₅₀ 값은 10.00 mg/L 이상으로 어독성 III급으로 확인되었다.

Table 20. LC50 values of *Oryzias latipes*

Observation Time	LC ₅₀ (mg/L)	95% confidence limits (mg/L)	NOEC ¹⁾ (mg/L)
48 hours	> 10.00	-	10.00
96 hours	> 10.00	-	10.00

1) No observed effect concentration

이상의 독성평가 결과, *Streptomyces* sp. AN090571 균주는 생물농약으로써 사용이 가능하다고 사료된다. 또한, *E. carotovora*에 대한 적용성은 낮았지만 식물 뿐만아니라 사람에게도 치명적인 여러 병원성 미생물의 QS 저해제로 신규 의약품으로의 용도 확대도 가능할 것이라 사료된다. 이에 따라 *Streptomyces* sp. AN090571 균주의 넓은 이용성을 고려중에 있다.

제 3 절 QS 저해 활성 우수 균주 *Streptomyces* sp. AN090072

1. 추가 스크리닝을 통한 QS 저해 우수 균주 선발

가. AN090072 균주 선발

AR54와 AN090571 두 균주의 후속 균주를 스크리닝 하기 위하여 CV026에 대한 QS 저해 활성을 조사함으로써 추가 균주 선발을 하였다. 스크리닝 방법은 AN090571과 같은 방법으로 1차, 2차 스크리닝 후 항균 활성 검정을 실시하였고 그 결과는 Table 2, Fig 12 와 같다.

나. AN090072 균주의 PCWDEs(세포벽분해효소) 특성 파악

선발 균주인 AN090072가 식물 자체에 병원성을 나타내는지 확인하기 위하여 *E. carotovora*가 생산하는 것으로 알려진 PCWDEs의 효소활성을 선발균주인 AN090072에서 측정해보았다. Polygalacturonase (**Peh**), Pectate lyase isozymes (**Pels**), Cellulase (**Cel**), Protease (**Prt**) 효소활성을 측정한 결과 AN090072에서는 효소활성이 없는 것으로 나타났으며 따라서 식물 무름병균의 방제용으로 적절한 것으로 판단되었다.

Table 21. PCWDEs activity of AN090072

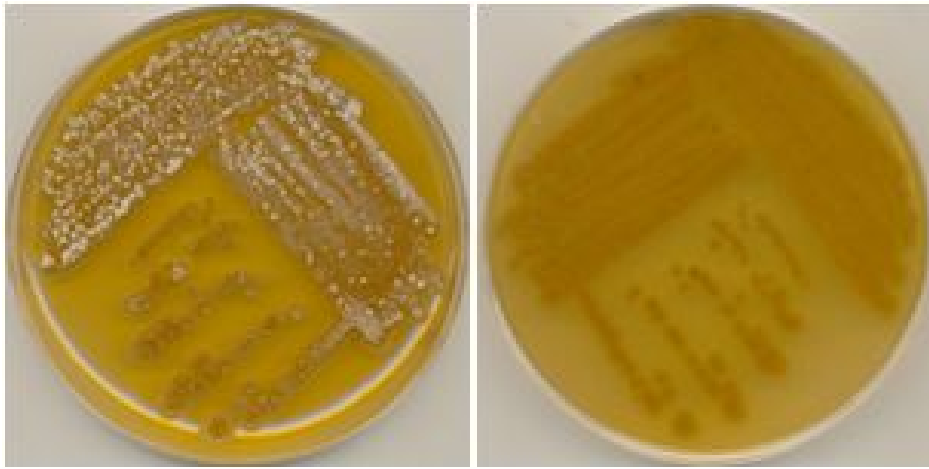
PCWDEs	Polygalacturonase	Pectate lyase isozymes	Cellulase	Protease
AN090072	-	-	-	-

2. AN090072 균주 동정

선발된 AN090072 균주를 “Bergy’s Manual of Determinative Bacteriology”과 “Manual for the Identification of Medical Bacteria”에 따라 균주의 형태학적, 생리·생화학적 특성을 조사하였다.

가. AN090072 균주의 형태학적 특성

28°C, 7일간 베넷(Bennett’s) 배지 상에서 AN010072는 흰색 균총과 포자를 형성하였으며 (Fig. 21), 주사전자현미경(SEM:scanning electron microscope)으로 관찰한 결과 호기적 균사상에 원통형의 0.8~1.0 μm 크기의 포자가 나선형으로 연결되어 형성되었다(Fig 22).



front

back

Fig. 21. Morphological characteristics of AN090072

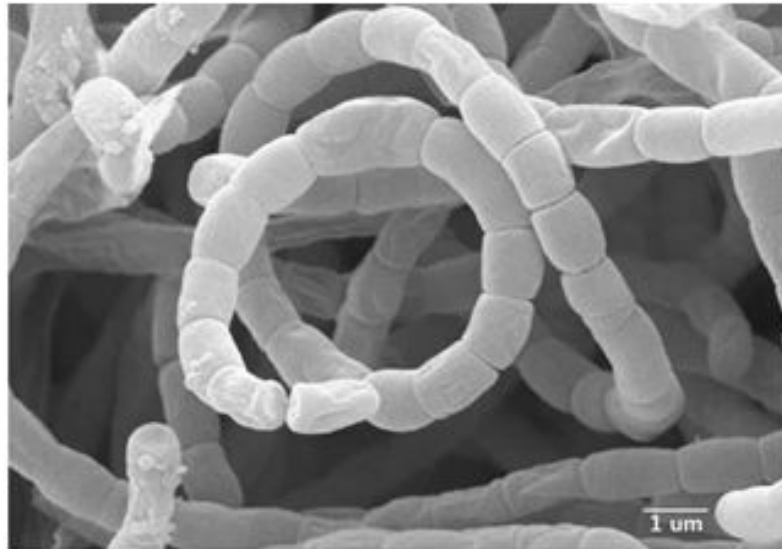


Fig. 22. Scanning electron micrograph of selected strain AN090072 on Bennett's agar medium at 28°C for 7 days. Bar, 1.0μm.

나. AN090072 균주의 생리·생화학적 특성

ISP2 배지에서도 Bennett's 배지 처럼 흰색으로 자랐으며 또한, 갈색이나 검정색의 melanoid pigment를 형성하지 않았다. International Streptomyces Project(ISP)에 따라 여러 가지 배지상에서 분석한 결과 Table 22에서와 같이 배지종류에 따라 잘 성장하였으며 수용성 색소를 생성하였다. 포자 덩어리 색깔은 배지조건에 따라 노란색에서 회색의 균사였고, 반대면도 같은 색의 균사를 보였다. 또한 glucose, arabinose, sucrose, xylose, inositol, mannitol, fructose, rhamnose, raffinose 및 cellulose 모두 잘 이용하였다 (Table 23).

Table 22. Cultural characteristics of a selected strain AN090072

Medium	Spore mass color	Reverse side color	Growth	Soluble pigment
ISP2 agar	grey	grey	abundant	none
ISP3 agar	light yellow	light yellow	abundant	brown
ISP4 agar	gray	redish brown	abundant	yellow
ISP5 agar	brownish white	brownish white	abundant	none
ISP6 agar	yellow	yellow	moderate	yellow
ISP7 agar	white	brown	abundant	redish brown

Table 23. Carbon utilization of selected strains AN090072

Carbon sources	AN090072
D-Glucose	+
L-Arabinose	+
Sucrose	+
D-Xylose	+
Inositol	+
D-Mannitol	+
D-Fructose	+
α -L-Rhamnose	+
D-Raffinose	+
Cellulose	+

Culture condition was at 28°C for 5 days on the basal medium (0.2% peptone, 0.1% yeast extract and 0.1% beef extract)

다. AN090072 균주의 분자계통분류학적 분석

염색체 DNA상의 16S rRNA는 두 개의 알려진 universal primer[Forward primer는 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*E. coli* 16S rRNA positions 8-27), Reverse primer는 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'(*E. coli* 16S rRNA positions 1492-1513)]를 사용하여 증폭하였다. 증폭이 확인된 PCR 산물은 염기서열 반응을 위해서 QIAquick PCR purification kit(Qiagen사)를 사용하여 정제하였고 자동염기서열 분석 장치 (Applied Biosystems model 377 automatic RNA sequencer)를 이용하여 염기서열 분석을 수행하였다. 선발된 균주의 16S rRNA 염기서열은 미국 NCBI의 BLAST를 사용하여 기존에 등록된 다양한 세균들과 상응하는 유전자의 염기서열을 CLUSTAL W software를 사용하여 비교하였고, 분자계통학적 계통수의 작성은 PHYLIP 프로그램 패키지를 사용하여 수행하였다. AN090571 균주의 16S rRNA 염기서열에 대하여 NCBI(National Center for Biotechnology Information) BLAST 결과, *Streptomyces aureofaciens* NBRC 12843^T 균주와 99.50%의 유사도를 나타내었다 (Fig. 15). 또한, 계통수 상에서도 위의 유사도와 일치하게 나타났으며 *Streptomyces* sp. AN090072로 명명하여 2010년 2월 8일에 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였으며, KCTC11637BP 기탁번호를 부여받았다.

3. AN090072 균주의 배양 특성 및 배양 최적화

가. AN090072 균주의 탄소원 및 질소원 이용성 조사

AN090072의 최적배지를 선정하기 위하여 탄소원 및 질소원 이용특성에 대한 실험을 하였다. BIOLOG사의 phenotype microarray를 이용하여 190종류의 탄소원과 95종류의 질소원에 대한 실험결과 아래에 열거한 35종류의 탄소원 및 40종류의 질소원을 이용하였다. 이러한 이용성을 통해 QS 저해를 위한 최적배지선정 및 배양특성파악에 활용하고자 한다. (Fig. 23).

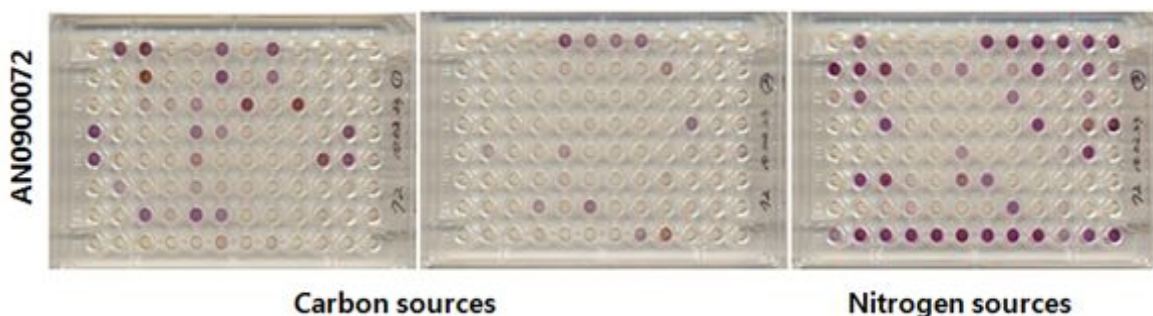


Fig. 23. Analysis of utilization of carbon and nitrogen sources by phenotype microarray

Carbon sources: L-Arabinose, N-Acyl-D-Glucosamine, D-Galactose, L-Proline, Glycerol, D-Gluconic acid, D-Xylose, D-Fructose, α -D-Glucose, L-Asparagine, Tween 40, α -Keto-Glutaric acid, Sucrose, L-Glutamine, Tween 80, Maltotriose, 2-Deoxy adenosine, Citric acid, L-Serine, L-Alanine, L-Alanyl-Glycine, L-Lyxose, Pyruvic acid, γ -Cyclodextrin, Dextrin, Gelatin, Glycogen, 2-Deoxy-D-Ribose, γ -Amino-Butyric acid, Caproic acid, D-Glucosamine, L-Arginine, L-Histidine, Putrescine, Dihydroxy acetone

Nitrogen sources: Ammonia, L-Alanine, L-Arginine, L-Asparagine, L-Aspartic acid, L-Cystein, L-Glutamic acid, L-Glutamine, Glycine, L-Histidine, L-Isoleucine, L-Leucine, L-Lysine, L-Phenylalanine, L-Proline, L-Threonine, L-Tryptophan, L-Valine, D-Serine, L-Homoserine, L-Pyroglutamic acid, Ethanolamine, Putrescine, Adenine, Adenosine, Guanine, Guanosine, γ -Amino-N-butyric acid, Ala-Asn, Gly-Gln, Ala-Glu, Ala-Gly, Ala-His, Ala-Leu, Ala-Thr, Gly-Asn, Gly-Gln, Gly-Glu, Gly-Met, Met-Ala

나. AN090072 균주의 탄소원 및 질소원 최적화

AN090072로부터 QS 저해 활성이 높은 최적배지를 선정하기 위하여 탄소원 및 질소원 이용성에 대한 실험을 하였다. GSS를 기본배지로 하여, 사용한 탄소원은 glucose, xylose, fructose, galactose, mannose, arabinose, rhamnase, lactose, maltose, raffinose, starch, cellulose, dextrin, inulin, maltodextrin, glycerol, solbitol, mannitol, inositol이며, 그 중 xylose를 탄소원으로 사용했을 때 QS 저해 활성이 가장 좋았다 (Fig. 24). 탄소원에서 활성이 좋은 xylose를 1%로 고정된 후 질소원으로 yeast extract, beef extract, malt extract, soytone, soybean meal, tryptone, asparagine, ammonium sulfate, ammonium acetate, NaNO_3 , Urea를 사용하였을 경우 그 중 soybean meal을 질소원으로 사용 했을 때 QS 저해 활성이 가장 좋았다 (Fig. 25).

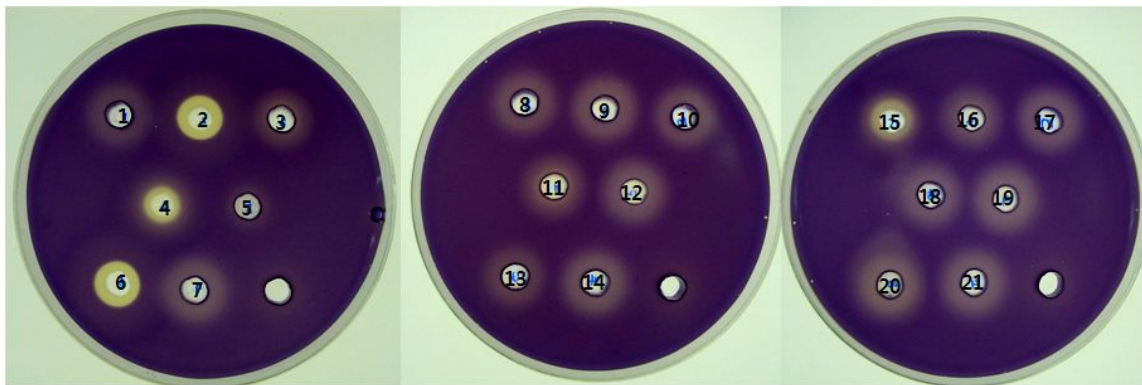


Fig. 24. Selection of optimal carbon source for the production of QSI from AN090072
 1, glucose; 2, **xylose**; 3, fructose; 4, galactose; 5, mannose; 6, arabinose; 7, rhamnase; 8, lactose; 9, maltose; 10, raffinose; 11, starch; 12, cellulose; 13, dextrin; 14, inulin; 15, maltodextrin; 16, glycerol; 17, solbitol; 18, mannitol; 19, inositol; 20, GSS(control); 21, carbon source 제외(control)

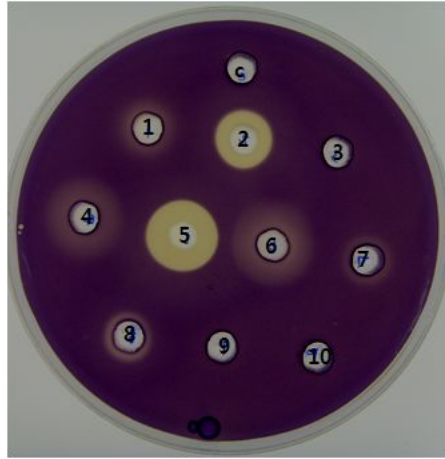


Fig. 25. Selection of optimal nitrogen source for the production of QSI from AN090072
 1, yeast extract; 2, beef extract; 3, malt extract; 4, soytone; **5, soybean meal**; 6, tryptone; 7, asparagine; 8, ammonium sulfate; 9, ammonium acetate; 10, NaNO₃; C, control (nitrogen source 제외)

또한 탄소원과 질소원의 최적 비율을 설정하기 위해서 xylose와 soybean meal 농도를 0.5:0.1, 0.5:0.5, 0.5:1, 1:0.1, 1:0.5, 1:1, 2:0.1, 2:0.5, 2:1로 하여 QS 저해 활성을 보았다. 그 결과 탄소원인 xylose와 질소원인 soybean meal의 비율이 2:0.5일 때 QS 저해 활성이 가장 좋았다 (Fig. 26).

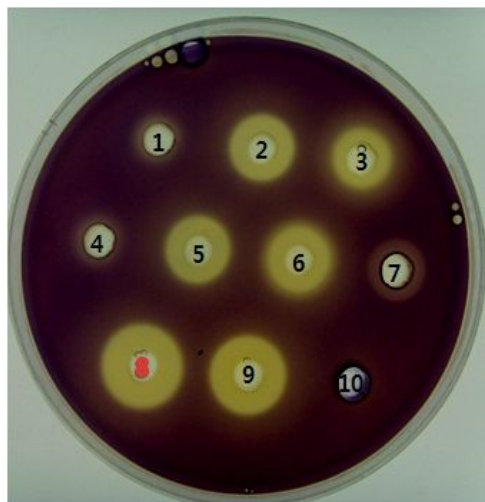


Fig. 26. Selection of optimal carbon source and nitrogen source ratio for the production of QSI from AN090072

1, 0.5:0.1; 2, 0.5:0.5; 3, 0.5:1; 4, 1:0.1; 5, 1:0.5; 6, 1:1; 7, 2:0.1; **8, 2:0.5**; 9, 2:1 10, D. W. (control)

다. AN090072 균주의 배양 최적화에 따른 QS 저해 활성 검정

AN090072로부터 QS 저해의 효율적인 생산을 위하여 최적화 된 배지에 AN090072 seed 를 1% 되게 접종한 후 10일 동안 날짜별로 활성을 확인하였다. Seed 접종 후 2일부터 활성이 증가하여 3 ~ 8일 쯤 QS 저해 활성이 가장 높으며, pH가 떨어지면서 활성도 함께 감소하였다. 이러한 결과는 방선균의 일반적 특성인 긴 배양기간을 단축할 수 할 수 있을 것으로 생각 된다 (Fig. 27).



1~10: each days

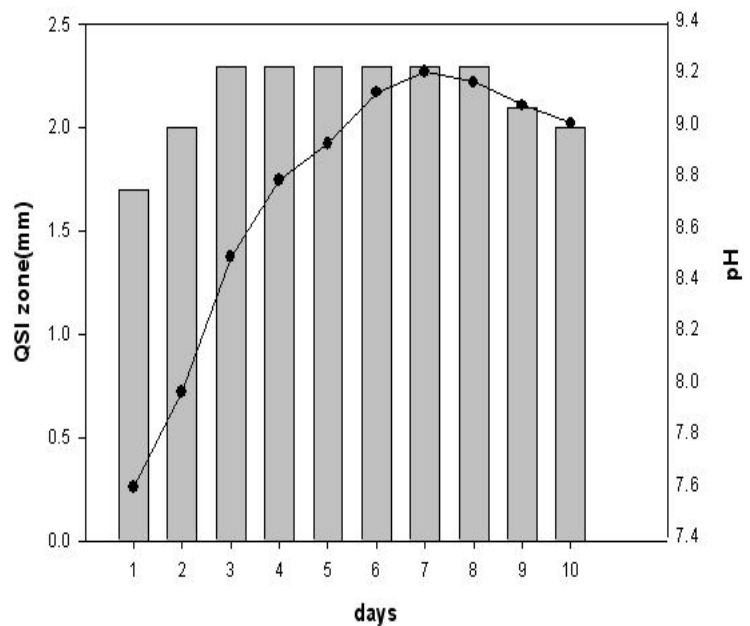


Fig. 27. Characterization of the QS inhibition activity and pH to date

라. AN090072 균주의 계통 발생학적 유사 균주와 AHL 저해능 비교

AN090072와 계통 발생학 적으로 유사도가 높은 표준균주들의 QS 저해제 가능성을 알아보기 위하여 *Streptomyces purpures*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces xanthocidicus* 3균주를 KCTC(Korean Collection for Type Culture)로부터 분양받아 QS 저해 활성을 비교 하였다(Table 24). 그 결과 *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces xanthocidicus* 균주에서도 QS 저해 활성이 검정되었으나 AN090072는 유사도가 높은 3종의 방선균보다 QS 저해제로서의 활성이 훨씬 높은 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 28).

Table 24. The list of type strain by quorum sensing inhibition test

KCTC No.	Name	Similarity (%)
9075	<i>Streptomyces purpures</i>	98.86
9697	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	99.50
19978	<i>Streptomyces xanthocidicus</i>	98.92

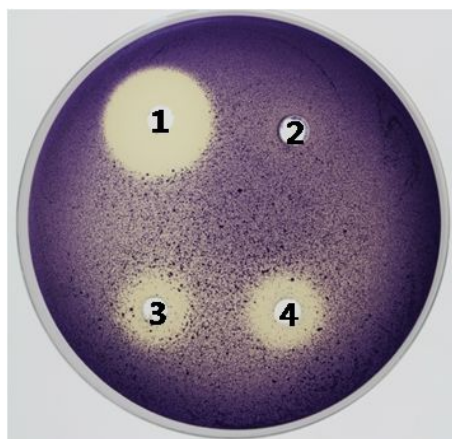


Fig. 28. Compare of quorum sensing inhibition of AN090072 and type strains.

1, *Streptomyces* sp. AN090072; 2, *Streptomyces purpures*; 3, *Streptomyces aureofaciens*; 4, *Streptomyces xanthocidicus*

4. AN090072 균주의 제제화

활성균주 AN090072의 독성평가 시험을 위해서 아래와 같은 방법으로 제제화 하였다. 제제의 구성성분으로는 활성균주의 지지체 및 보호제로서 이용되며 균주가 지속적으로 활성을 내기 위한 입제의 주성분으로서 pyrophyllite를 이용하였고, 분산제로서 white carbon, 계면활성제로는 WP700, 증량제로는 WP280B를 이용하였다 (Table 25). 이렇게 만들어진 제제는 CV026을 이용한 활성 검정에서 200 ppm 이상에서 QS 저해능을 보였다.

Table 25. Formulation of microbial agent

components	g
Ethyl acetate extract	0.42
Pyrophyllite	139
White carbon	30
WP700	10
WP280B	20
Total	200

5. AN090072 균 제제의 독성 및 안전성 평가

가. AN090072의 마우스에 대한 급성 경구 투여 독성실험

1) 재료 및 방법

가) 시험물질의 조제 및 분석

시험물질은 설정된 투여농도에 맞게 멸균증류수로 현탁 후 조제하여 투여하였다. 시험물질의 안정성 및 균질성 분석은 별도로 시행하지 않았다.

나) 시험계

(1) 동물종(계통) : CrIjOri:CD1(ICR) mice

(2) 입수 및 투여시 동물수(성별), 주령 및 체중범위

입수시 : 11마리(수컷)/11마리(암컷), 4주령, 18~25 g/15~19 g

투여시 : 10마리(수컷)/10마리(암컷), 5주령, 24~32 g/22~25 g

(3) 시험계 선정이유

농촌진흥청 고시 제 2009-19호 “농약의 등록기준”에 마우스를 사용하도록 되어 있으며 ICR 계통은 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석과 평가가 용이하여 선택하였다.

(4) 균 분리

순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 균 분리하였다. 균 분리시 균 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

다) 시험군 및 투여방법

(1) 시험군

-기초시험

예비 및 본시험에 앞서 실시한 기초 시험이므로 암·수 각각 2,500 mg/kg B.W. 의 약량으로 설정하여 시험을 실시하였다.

Table 26. Test group

군	시험물질	성	동물번호	투여약량 (mg/kg B.W.)	투여액량 (mL/kg B.W.)
G1	멸균증류수 (대조군)	Male	1101~1105	0	10
		Female	2101~2105		
G2	AN09072 (시험군)	Male	1201~1205	2,500	10
		Female	2201~2205		

(2) 투여경로

시험물질인 농약의 노출예상경로가 경구이므로 경구 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 경구로 투여하였다.

(3) 대조군의 설정

시험물질 조제시 멸균증류수에 현탁하여 조제하였기 때문에 멸균증류수를 용매 대조군으로 설정하였다.

(4) 투여액량 설정

투여액량은 투여 군별 공히 10mL/kg B.W.로 설정하여 투여시 반드시 흔들어진 후 투여하였다.

(5) 시험물질의 투여

(가) 사료의 절식

투여개시 3~4시간 전부터 사료를 공급하지 않았고, 음수는 공급하였다.

(나) 투여방법

마우스용 경구 투여용 주사기를 이용하여 체중측정치를 기준으로 시험물질 조제 액량을 산출한 후, 경구 투여 경로를 이용하여 위내에 1회 강제 투여 하였다. 시험물질 투여는 시험물질조제 후 30분 내에 투여하였다.

라) 관찰항목

(1) 일반증상 관찰

약제 처리 후 4시간까지는 매 시간마다 일반증상을 관찰하였고 그 다음날부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 관찰하였다.

(2) 사망률

모든 동물에 대해 매일 사망동물이나 빈사상태에 있는 동물의 유무를 관찰하였다.

(3) 체중변화

체중은 시험물질 투여직전, 투여 후 7일 및 14일에 측정하였다.

(4) 부검시 육안적 소견

시험 종료시 모든 생존동물은 외관검사를 실시한 후 부검하여 육안적인 이상 소견을 검사하였다.

마) 자료의 통계처리

시험기간동안의 체중측정결과에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위해 F 검정을 실시하였고, 분산이 동질하여 시험물질 투여군과 대조군간의 유의성을 알아보기 위해 Student t-test를 실시하였다.

2) 결과

가) 사망률 및 LD₅₀

관찰기간 동안 2,500 mg/kg B.W. 의 투여농도에서 사망례가 관찰되지 않아 LD₅₀ 값은 2,500 mg/kg B.W. 이상으로 판단된다(Table 27).

나) 일반증상관찰

관찰기간 동안 암·수 모든 투여군에서 투여에 기인한 일반증상은 관찰되지 않았다 (Table 27).

다) 체중변화

시험기간 중 생존동물에 대한 체중변화에 있어서 투여군과 대조군간의 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 28).

Table 27. Mortality and clinical signs (Acute oral gavage of AN090072)

Group	Dose (mg/kg)	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead/total)
G1	0	10	NAD	0% (0/10)
G2	2,500	10	NAD	0% (0/10)

NAD: No Abnormality Detected

Table 28. Mean body weights (Acute oral gavage of AN090072)

Group	Dose (mg/kg)	Sex	No	Day(s) after administration		
				0	7	14
G1	0	Male	5	30.40±1.19	34.53±1.54	37.38±1.67
		Female	5	23.70±0.69	26.38±0.62	28.48±1.36
G2	2,500	Male	5	28.66±3.10	32.13±4.20	34.47±4.25
		Female	5	23.98±0.84	25.92±1.56	27.80±1.34

No : Number of animals

라) 부검시 육안적 소견

모든 생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 모든 시험동물에서 투여에 기인된 특이한 증상은 관찰되지 않았다(Table 29).

Table 29. Necropsy findings (Acute oral gavage of AN090072)

Findings	Number of animals	G1 (0 mg/kg)		G2 (2,500 mg/kg)	
		Male	Female	Male	Female
NAD	20	5	5	5	5

NAD : No Abnormalities Detected

3) 고찰 및 결론

이 실험은 ICR계 마우스를 사용하여 기초시험으로 2,500 mg/kg B. W. 투여군과 용매 대조군을 두어 1회 경구 투여한 후 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다. 본 시험결과 2,500 mg/kg B. W.에서 모든 투여동물에서 사망례는 관찰되지 않았고, 시험물질과 연관된 일반증상도 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서도 대조군과 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 또한 모든 생존동물에 대한 부검결과에서도 특이한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 마우스를 이용한 AN090072의 경구 투여에 대한 LD₅₀은 2,500 mg/kg B. W. 이상으로 판단된다.

나. AN090072의 랫드에 대한 급성 경피 투여 독성실험

1) 재료 및 방법

가) 시험물질의 조제 및 분석

시험물질은 설정된 투여농도에 맞게 멸균증류수로 현탁 후 조제하여 투여하였다. 시험물질의 안정성 및 균질성 분석은 별도로 시행하지 않았다.

나) 시험계

(1) 동물종(계통) : CrI:CD(SD) Rat, SPF

(2) 입수 및 투여시 동물수(성별), 주령 및 체중범위

입수시 : 11마리(수컷)/11마리(암컷), 7주령, 180~250 g, 120~150 g

투여시 : 10마리(수컷)/10마리(암컷), 8주령, 260~290 g, 160~200 g

(3) 시험계 선정이유

농촌진흥청 고시 제 2009-19호 “농약의 등록기준”에 랫드를 사용하도록 되어 있으며 SD 계통은 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석과 평가가 용이하여 선택하였다.

(4) 군 분리

순화기간을 거친 후 건강한 동물 중에서 체중을 기초로 하여 군 분리하였다.

군 분리시 군 평균체중과 표준편차를 계산하여 균등성 여부를 확인하였다.

다) 시험군 및 투여방법

(1) 시험군

-기초시험

예비 및 본시험에 앞서 실시한 기초 시험이므로 암·수 각각 2,000 mg/kg B.W.의 약량으로 설정하여 시험을 실시하였다.

Table 30. Test group

군	시험물질	성	동물번호	투여약량 (mg/kg B.W.)	투여액량 (mL/kg B.W.)
G1	멸균증류수 (대조군)	Male	1101~1105	0	5
		Female	2101~2105		
G2	AN090571 (시험군)	Male	1201~1205	2,000	5
		Female	2201~2205		

(2) 투여경로

시험물질인 농약의 노출예상경로가 피부이므로 피부 노출시의 안전성을 평가하기 위하여 피부로 투여하였다.

(3) 대조군의 설정

시험물질 조제시 멸균증류수에 현탁하여 조제하였기 때문에 멸균증류수를 용매 대조군으로 설정하였다.

(4) 투여액량 설정

투여액량은 투여 군별 공히 5 mL/kg B.W.로 설정하여 투여시 반드시 흔들어진 후 투여하였다.

(5) 투여방법 및 투여횟수

시험물질 처리를 위해 투여 전날 시험동물의 등부위의 체모를 가급적 넓게 피부가 손상되지 않도록 제모하였으며, 시험물질의 도포면적은 체표면적의 10% 정도 (랫트: 4cm×5cm)로 하였다. 제조된 시험물질을 제모한 부위에 고르게 도포하고 시험물질의 유실을 막기 위해 비자극성 테이프로 24시간 고정시켜 주었다. 시험물질을 도포한 다음 24시간 후 도포물을 제거하고 피부에 남아있는 시험물질을 증류수로 잘 닦아 주었다.

라) 관찰항목

(1) 일반증상 관찰

약제 처리 후 4시간까지는 매 시간마다 일반증상을 관찰하였고 그 다음날부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 관찰하였다.

(2) 사망률

모든 동물에 대해 매일 사망동물이나 빈사상태에 있는 동물의 유무를 관찰하였다.

(3) 체중변화

체중은 시험물질 투여직전, 투여 후 7일 및 14일에 측정하였다.

(4) 부검시 육안적 소견

시험 종료시 모든 생존동물은 외관검사를 실시한 후 부검하여 육안적인 이상 소견을 검사하였다.

마) 자료의 통계처리

시험기간동안의 체중측정결과에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위해 F 검정을 실시하였고, 분산이 동질하여 시험물질 투여군과 대조군간의 유의성을 알아보기 위해 Student t-test를 실시하였다.

2) 결과

가) 사망률 및 LD₅₀

관찰기간 동안 2,000 mg/kg B.W. 의 투여농도에서 사망례가 관찰되지 않아 LD₅₀ 값은 2,000 mg/kg B.W. 이상으로 판단된다(Table 31).

Table 31. Mortality and clinical signs (Acute transdermal application of AN090072)

Group	Dose (mg/kg)	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead/total)
G1	0	10	NAD	0% (0/10)
G2	2,000	10	NAD	0% (0/10)

NAD: No Abnormality Detected

나) 일반증상관찰

관찰기간 동안 암·수 모든 투여군에서 투여에 기인한 일반증상은 관찰되지 않았다 (Table 31).

다) 체중변화

시험기간 중 생존동물에 대한 체중변화에 있어서 투여군과 대조군간의 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 32).

Table 32. Mean body weights (Acute transdermal application of AN090072)

Group	Dose (mg/kg)	Sex	No	Day(s) after administration		
				0	7	14
G1	0	Male	5	287.7±9.4	349.9±23.3	409.5±20.1
		Female	5	169.4±8.6	190.2±11.8	212.3±13.4
G2	2,000	Male	5	277.8±10.7	324.7±11.6	384.9±18.0
		Female	5	169.0±8.1	192.4±14.6	213.7±14.0

No : Number of animals

라) 부검시 육안적 소견

모든 생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취시켜 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 모든 시험동물에서 투여에 기인된 특이한 증상은 관찰되지 않았다(Table 33).

Table 33. Necropsy findings (Acute transdermal application of AN090072)

Findings	Number of animals	G1 (0 mg/kg)		G2 (2,000 mg/kg)	
		Male	Female	Male	Female
NAD	20	5	5	5	5

NAD : No Abnormalities Detected

3) 고찰 및 결론

이 실험은 SD계 랫드를 사용하여 기초시험으로 2,000 mg/kg B. W. 투여군과 용매 대조군을 두어 1회 경피 투여한 후 14일간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다. 본 시험결과 2,000 mg/kg B. W.에서 모든 투여동물에서 사망례는 관찰되지 않았고, 시험물질과 연관된 일반증상도 관찰되지 않았고, 체중변화에 있어서도 대조군과 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 또한 모든 생존동물에 대한 부검결과에서도 특이한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 랫드를 이용한 AN090072의 경피 단회 투여시 LD₅₀은 2,000 mg/kg B. W. 이상으로 판단된다.

다. AN090072의 담수어류 영향시험

1) 재료 및 방법

가) 시험물질 조제

시험물질은 부형제인 시험용수를 이용하여 현탁시켜 조제하였다.

나) 시험계

(1) 시험생물 : 송사리 (*Oryzias latipes*)

(2) 시험어의 전장 및 체중

시험어의 체중 및 전장은 시험종료 후 대조구와 처리구에서 각각 10마리씩을 취해 조사하였고 결과는 평균 및 표준편차로 나타내었다.

시험어의 전장 : 2.62 ± 0.18 cm

시험어의 체중 : 0.17 ± 0.02 g

(3) 시험어계의 선택사유

본시험에 사용된 송사리는 “농촌진흥청고시 제 2010-9호, [별표 13] 환경생물독성시험기준과방법, 생화학농약 13-3-2. 담수어류영향시험”에 명시된 공시어종으로 널리 사용되고 있으며, 비교할 많은 시험기초자료가 축적되어 있어 선택하였다.

(4) 순화 및 절식

시험 시작 7일전에 50 L의 수조로 100마리의 시험어를 이동시켜 순화를 시작하였고, 시험과 동일한 환경 하에서 순화를 실시하였다. 순화기간 중 치사어가 발생하지 않고 건강상태가 양호하여 시험에 사용하였다. 절식은 시험개시 24시간 전부터 실시하였다.

다) 시험방법

(1) 시약의 조제 : 시험물질 10.000 g을 정확히 평량하여 100 mL의 volumetric flask에 넣고 시험용수를 가하여 완전히 현탁될 때까지 충분히 교반시켜 시험물질용액 (stock solution, 100000 mg/L)을 조제하였다. 시험물질용액 (stock solution) 0.5000 mL을 정확히 취하여 12.5 L의 시험수조에 넣고 시험용수를 전량 5 L가 되도록 가하여 완전히 현탁될 때까지 충분히 교반시킨 후 시험용액 (test solution)으로 사용하였다.

(2) 시험농도 : 본시험에 앞서 96시간동안 실시한 예비시험결과 최고 농도인 10.00mg/L에서 치사가 일어나지 않아 10.00 mg/L의 농도에서 한계시험 (limit test)을 실시하였다.

(3) 대조구 설정

음성대조구 : 시험용수인 지하수로 음성대조구를 설정하였다.

양성대조구 : Pentachlorophenol sodium salt (Fluka, Lot No. 427620/1)를 양성대조물질로하여 0.20, 0.30, 0.45, 0.68 및 1.01 mg/L (공비 1.5)의 설정농도 (nominal concentration)로 시험한 결과를 적용하였다 (2010-01-26 ~ 2010-01-30).

(4) 노출조건 : 12.5 L 용량의 원통형 유리수조 (28 cm H. × 24 cm ϕ)에 10 L의 시험용액을 투여하였으며, 시험어수는 각각 10마리씩을 반복 없이 처리하였다. 노출환경은 사육조건과 동일하게 수온은 (21 ~ 25) °C, 광조건 16시간, 암조건 8 시간으로 유지하였다. 시험개시 24시간 전부터 시험종료시까지 사료급여는 중단 하였다.

라) 관찰항목

(1) 일반증상 및 치사수 관찰 : 모든 시험수조에 대하여 시험시작 직후 (2시간), 24시간, 48시간, 72시간 및 96시간 경과시에 일반중독증상, 특이증상 및 치사어 관찰을 실시하였다. 치사어의 판정은 공시어에 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 간주하였다.

(2) 시험용수의 수질 검사 : 시험기간 중 수질검사는 시험물질 처리 직후부터 24시간 간격으로 모든 수조에서 pH, DO 및 수온을 조사하였다. pH와 수온은 Sartorius사의 PP-15 pH meter를 사용하였고, DO는 Orion research Incorporated의 810A+ DO meter를 사용하여 측정하였다.

(3) LC₅₀ 산출 및 NOEC : 시험물질 투여 후 48 및 96시간 경과시 치사개체가 없었으므로 반수치사농도 (LC₅₀) 및 신뢰한계는 산출하지 않았다. 무영향농도 (NOEC)는 중독증상이 없고 치사어가 발생하지 않는 최고 시험농도로 표시하였다.

2) 결과

가) 일반증상 및 치사수

예비시험결과에 따라 10.00 mg/L의 시험농도에서 한계시험 (limit test)을 실시한 결과 48시간, 96시간 경과시 치사어가 관찰되지 않았다(Table 34).

시험기간 중 대조구와 처리구에서 일반중독증상 및 특이증상은 관찰되지 않았다 (Table 35).

Table 34. Cumulative mortality of *Oryzias latipes*

Concentration n (mg/L) ¹⁾	Number of fish	Number of dead fish				Mortality (%)	
		24h	48h	72h	96h	48h	96h
Control	10	0	0	0	0	0	0
10.00	10	0	0	0	0	0	0

1) Active ingredient

Table 35. Abnormal response

Concentration (mg/L) ¹⁾	Abnormal response			
	24h	48h	72h	96h
Control	NOR ²⁾	NOR	NOR	NOR
10.00	NOR	NOR	NOR	NOR

나) 경시적 수질변화

시험기간 중 pH는 평균 8.02 (7.80 ~ 8.27)이었고, DO는 평균 6.89 mg/L (5.62 mg/L ~ 8.26 mg/L)이었다. 수온은 평균 (23.0 ± 0.3) °C (22.5 °C ~ 23.6 °C)이었다(Table 36, 37, 38).

Table 36. Change of pH

Concentration (mg/L) ¹⁾	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	8.27	8.18	8.09	7.94	7.95
10.00	8.16	8.09	7.80	7.93	7.80

1) Active ingredient

Table 37. Change of water temperature (Unit : °C)

Concentration (mg/L) ¹⁾	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	23.0	22.5	23.0	23.1	23.1
10.00	22.7	23.6	23.2	22.6	22.7

1) Active ingredient

Table 38. Change of DO (Unit : mg/L)

Concentration (mg/L) ¹⁾	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	8.26	7.52	6.86	6.29	5.80
10.00	8.06	7.41	6.78	6.33	5.62

1) Active ingredient

3) 고찰 및 결론

이 시험은 담수어류(송사리, *Oryzias latipes*)에 대한 영향시험을 96시간 동안 지수식으로 실시하여 농도 당 노출어류 10마리에 대한 생사수, 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사하였다. 본 시험은 “농촌진흥청고시 제 2010-3호, [별표 13] 환경생물독성시험 기준과방법, 생화학농약 13-3-2. 담수어류영향시험” (2010-02-09)에 따라 수행되었다. 시험농도(nominal concentration)는 10.00 mg/L로 하여 시험을 실시하였으며, 시험농도에 대한 별도의 분석은 시행하지 않았다. 시험기간 중 치사가 일어나지 않는 최대 농도는 10.00 mg/L였고, 대조구 및 처리구에서 일반중독증상 및 특이사항은 관찰되지 않았다. 체중은 평균 (0.17 ± 0.02) g, 전장은 평균 (2.62 ± 0.18) cm 이었다. pH는 평균 8.02 (7.80 ~ 8.27) 이었고, DO는 평균 6.89 mg/L (5.62 mg/L ~ 8.26 mg/L) 였으며, 시험기간의 평균수온은 (23.0 ± 0.3)°C (22.5°C ~ 23.6°C)이었다. Table 39의 결과 AN090072의 48시간 LC₅₀ 값은 10.00 mg/L 이상으로 어독성 III급으로 확인되었다.

Table 39. LC50 values of *Oryzias latipes*

Observation Time	LC ₅₀ (mg/L)	95% confidence limits (mg/L)	NOEC ¹⁾ (mg/L)
48 hours	> 10.00	-	10.00
96 hours	> 10.00	-	10.00

1) No observed effect concentration

이상의 독성평가 결과로 *Streptomyces* sp. AN090072 균주는 생물농약으로서 사용이 가능하다고 사료된다.

6. AN060072 균주의 작용기작 연구

가. AN090072 균주의 생물막 형성 저해능 검정

QS의 결과로 나타나는 생물막 형성은 항생제에 대한 내성을 증가시키게 된다. AN090072 균주가 생물막 형성에 대한 저해 활성능을 갖고 있는지 확인하기 위해서 *E. carotovora*에 AN090072 배양 상등액을 희석 배율에 따라 처리 및 배양한 후, crystal violet 염색 방법을 이용해 흡광도를 측정하였다. 그 결과 *E. carotovora*만 처리하였을 때에 비해 AN090072 처리시 희석 배율에 따라 흡광도가 1/3 수준으로 줄어 생물막 형성이 저해됨을 알 수 있었고, 이는 AN090072가 QS 저해능이 있다는 것을 의미한다 (Fig. 29).

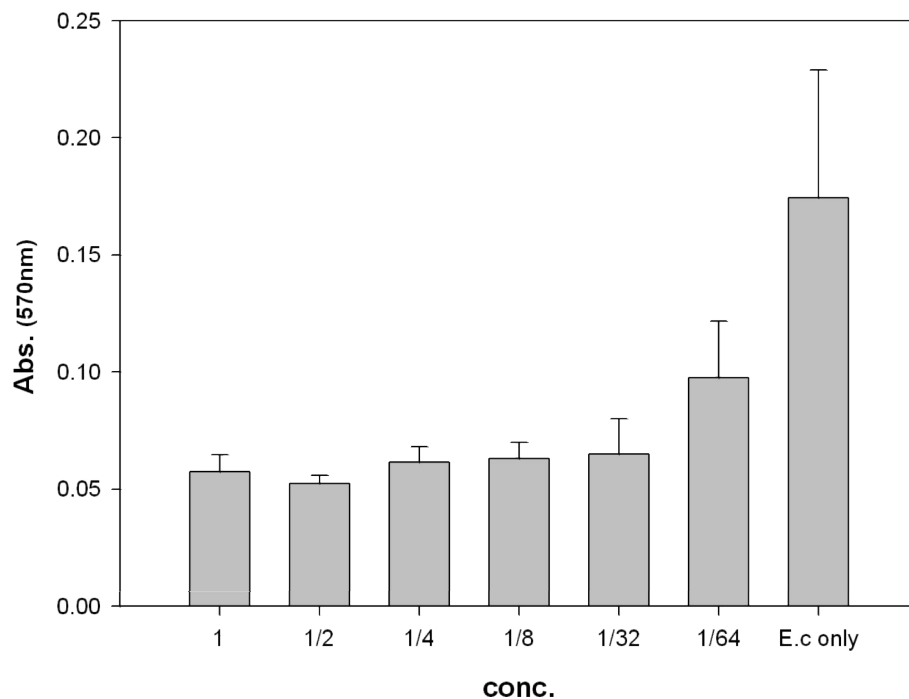


Fig. 29. Inhibition of Biofilm formation of *E. carotovora* by *Streptomyces* sp. AN090072.

나. AN090072 균주의 CV026에 대한 QS 저해 활성 검증

QS 기작에 의해 보라색 색소 형성능이 mutation 된 *Chromobacterium violaceum* CV026 균주를 이용해 AN090072의 QS 저해 활성을 확인하였다. AN090072를 최적화 된 배지에서 배양한 후, 배양액을 동량의 ethyl acetate로 추출하거나 혹은 0.20 μ m syringe filter로 여과하였다. 초기 농도 OD 0.2로 접종한 CV026에 추출물 또는 배양액을 농도별로 처리하고 약 2일간 색의 변화 지연 정도를 확인하였다. 그 결과 CV026만 접종한 control은 16시간이 되면 완전히 보라색으로 변하였고, ethyl acetate 추출물을 농도별로 처리한 실험구에서도 control과 마찬가지로 색이 변하였다. 그러나 여과한 배양액은 16시간이 되어도 색의 변화가 없었으며, 40시간이 되어서야 보라색으로 변하였으며(Fig. 30), 이는 AN090072 균주가 CV026의 QS를 저해한다는 것을 의미하는 결과이다. 또한 ethyl acetate 추출에서는 활성이 없고, 배양액에서만 활성을 보이는 것으로 보아, 이는 효소에 의한 저해라 판단된다.

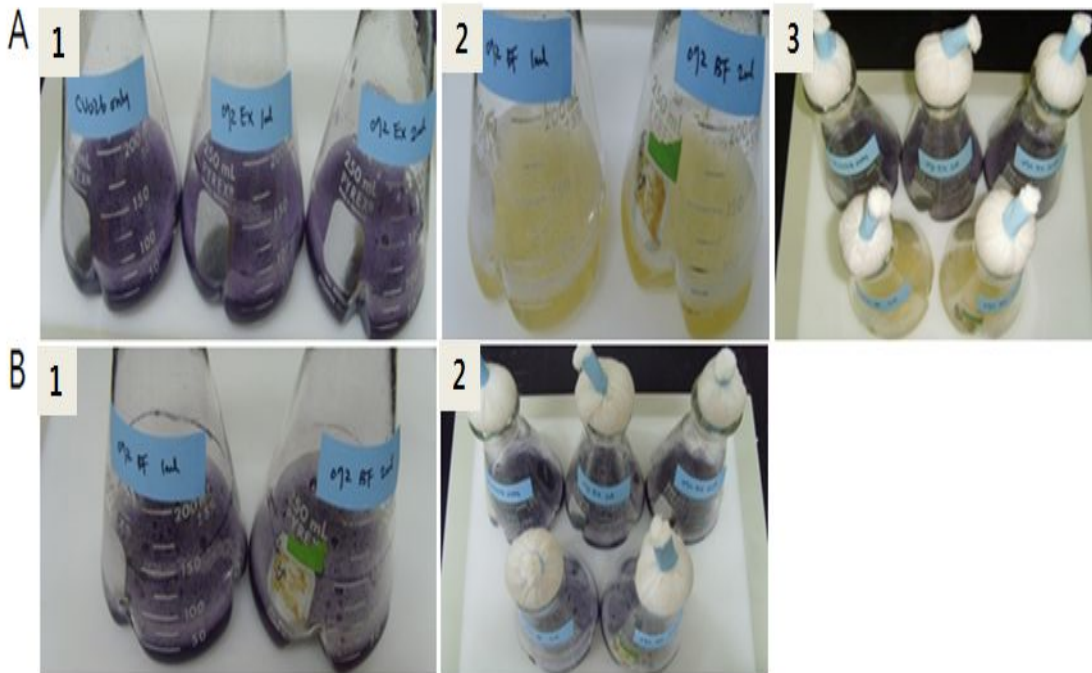


Fig. 30. Quorum Sensing Inhibition of CV026.

A. 16hrs after treatment CV026+AN090072 and control. A-1, control(CV026 only), treatment of AN090072 extract 1ml and 2ml; A-2, treatment of AN090072 filtration 1ml and 2ml; A-3, all, B. 40hrs after treatment CV026+AN090072. B-1, treatment of AN090072 filtration 1ml and 2ml; B-2, all

다. AN090072 균주의 배추 무름병균 병원성 관련 효소 저해 활성 검정

식물 병원성 균주인 *E. carotovora*는 QS 기작에 의해 병원성을 가지는 그람 음성의 세균이다. CV026의 보라색 색소 형성능을 저해하는 실험과 마찬가지로, AN090072의 배양 상등액을 이용하여 QS 저해 활성을 확인하였다. 초기 농도 OD 0.2로 접종한 *E. carotovora*에 최적화 된 배지에서 배양한 AN090072 배양액을 0.20 μm syringe filter로 여과하여 농도별로 처리하였다. 약 2일간 배양하여 *E. carotovora*의 배양액을 샘플링하였고, 원심분리 후 상등액으로 병원성과 관련된 효소인 PCWDEs (pectate lyase, polygalacturonase, cellulase, protease)가 감소하는지 agar plate assay 방법으로 확인하였다 (Fig. 31). 그 결과, *E. carotovora*만 접종한 control은 시간이 지날수록 병원성과 관련된 효소의 양이 증가하였으나, AN090072 배양 상등액을 처리한 처리구에서는 control과 비교하였을 때 병원성 효소의 양이 증가하지 않는 결과를 보였다. 이렇게 PCWDEs의 생산이 저해됐다는 것은 *E. carotovora*의 병원력이 감소했다는 것을 의미한다. 또한, AN090072 자체는 PCWDEs와는 상관이 없는 것으로 보아, 식물체 적용에도 문제가 없음을 알 수 있다. 이는 이전의 보고에서 보고하였던 *Kitasatospora* sp. AR54의 pectate lyase 분비로 인해 식물체 적용에 단점이 있었던 것과는 다른 결과이다.

라. AN090072 균주의 AHL 분해능 검정

앞의 결과에서 언급하였듯이, AN090072의 QS 저해 작용 기작은 이미 *E. carotovora*가 만든 AHL(3-oxo-C6-HSL)을 AHL acylase 효소에 의해 분해하여 그 기작을 방해하는 것이다. 이를 증명하기 위하여 아래와 같은 실험을 수행하였다. 먼저 인위적으로 합성한 AHL을 전체 농도가 10 μM 또는 50 μM 이 되게 AN090072 배양 상등액과 혼합한다. 2일간 30°C에서 140 rpm으로 반응시킨 후, 반응액과 동량의 ethyl acetate로 추출하여 반응 여액에 남아있는 AHL을 회수한다. AHL이 포함되어 있지 않는 CV026 agar plate에 각 추출물을 paper disc로 로딩하여 24시간 배양하였다. 그 결과 Fig. 32-A서와 같이 AHL만 반응시킨 control에서는 시간이 지나도 AHL의 양에 변화가 없는데 반해, AN090072 배양액과 함께 반응 시킨 처리구에서는 시간이 지날수록 AHL의 양이 줄어드는 것을 확인하였다. 또한 같은 추출물을 ODS Thin Layer Chromatography을 이용해 60% methanol로 전개 후 확인했을 때에도 같은 결과가 나왔다 (Fig. 32-B). 이와 같은 결과로 보아, AN090072는 AHL을 분해 또는 구조적으로 변화시키는 acylase 효소를 분비하며, 이미 *E. carotovora*에 의해 만들어진 AHL은 AN090072에 의해 만들어진 AHL acylase에 의해 신호물질로서의 기능이 사라진 것이라 판단된다.

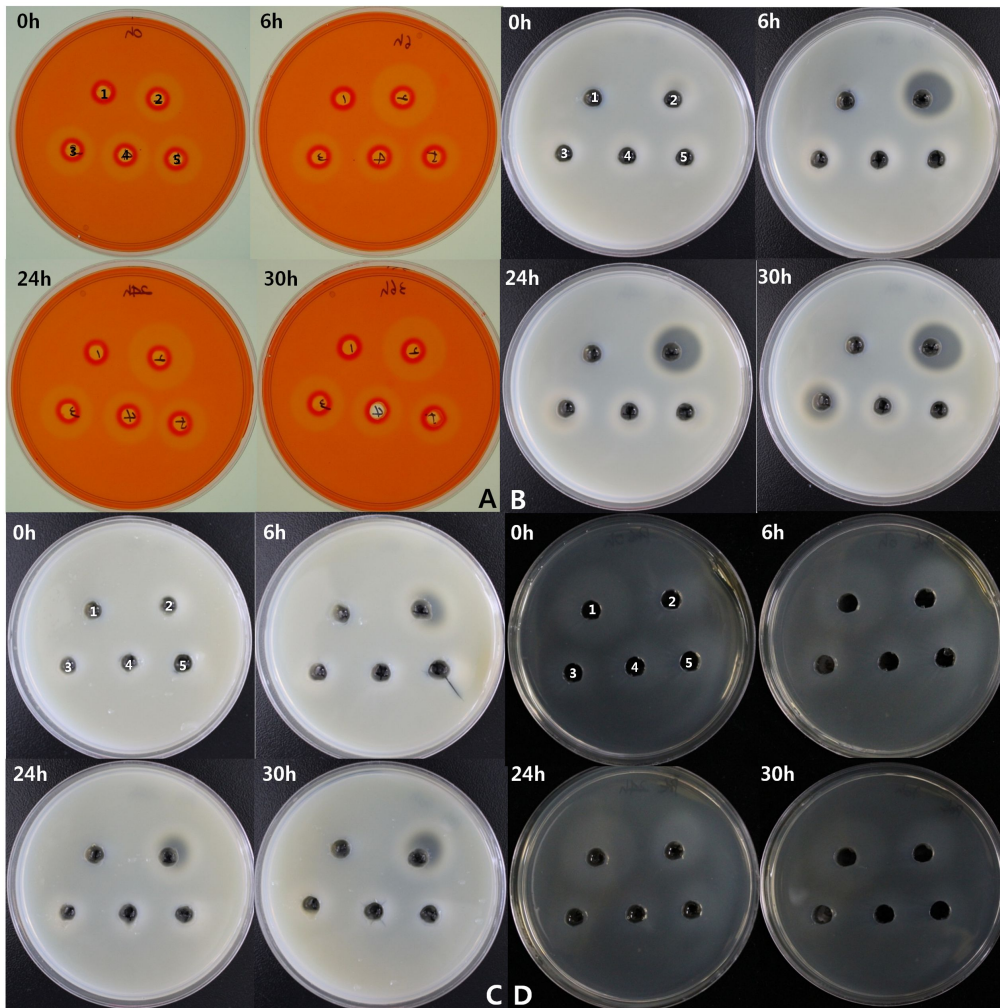


Fig. 31. Agarose plate assays of Plant Cell Wall Degrading Enzymes(PCWDEs) activity. Plates were incubated for 0, 6, 24, 30h at 28°C.

A, Cel(cellulase); B, Pel(pectate lyase); C, Peh(polygalacturonase); D, Prt(proatase)

1, AN090072 supernatant; 2, *E. carotovora* only; 3, *E. carotovora*+supermanat 0.5 ml;

4, *E. carotovora*+supermatant 1 ml; 5, *E. carotovora*+supernatant 2 ml

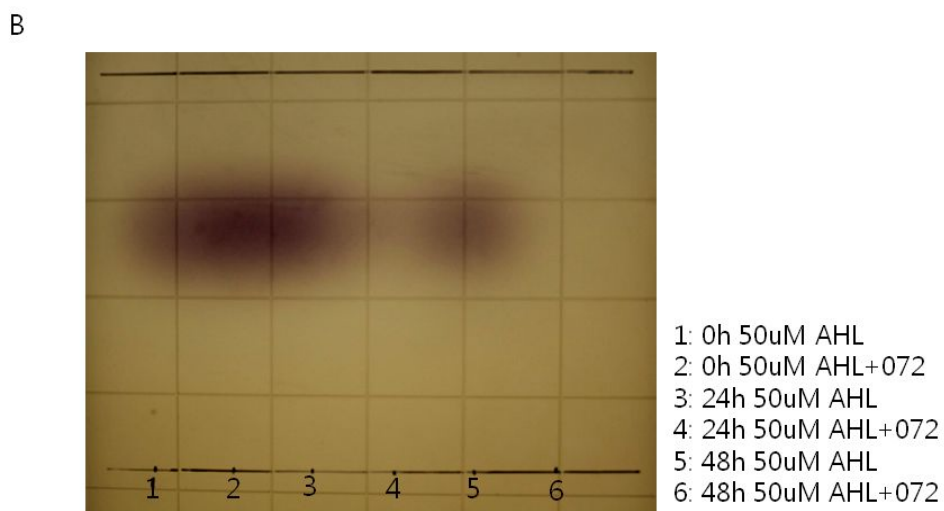
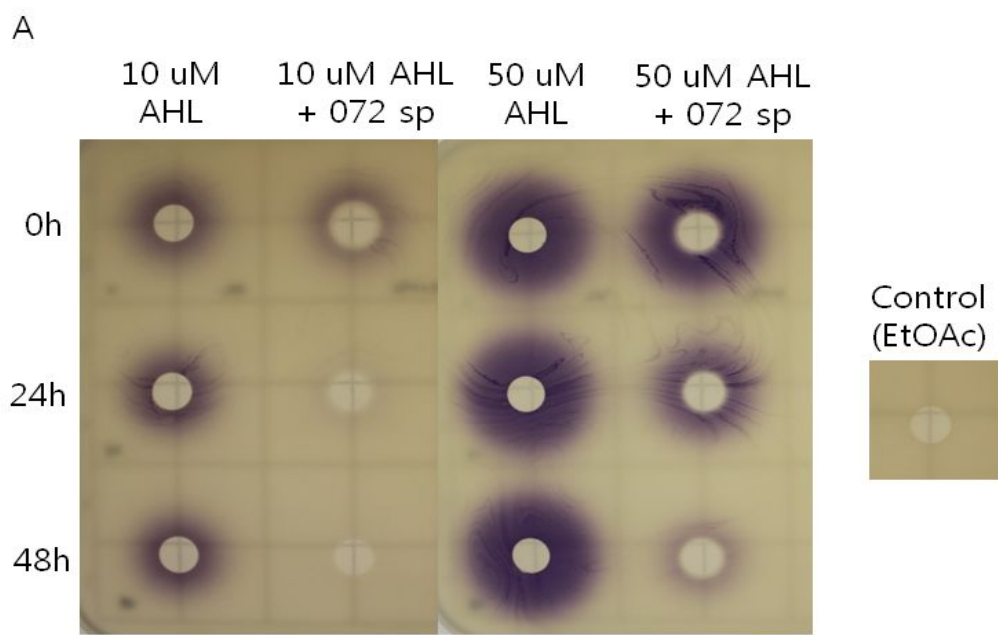


Fig. 32. The AHL acylase degrades AHL in CV026 cultures and inhibits violacein production

마. AHL 분해 관련 유전자 탐색

AHL을 분해하는 효소의 유전자 탐색을 위해 분자생물학적 기법을 이용하였다. AN090072의 genomic DNA를 추출하였고, 이를 이용해 PCR (Polymer Chain Reaction)을 수행하였다. PCR 반응에 사용한 프라이머는 J1, 5'-GCTGCTGCGTACACCTGTCAT-3'과 J2, 5'-CCGCCGCTCGTGCACCCG-3'이고, 반응 조건은 94°C 40초, 58°C 45초, 72°C 45초, 25cycle이다. 그 결과 850 bp, 1000 bp 그리고 약 3000 bp 크기의 유전자를 얻었으며(Fig. 33), 그 중 3000 bp의 유전자를 클로닝 하여 염기서열을 분석하였다(Fig. 34). 염기서열 분석 결과, 방선균의 일종인 *Catenulispora acidiphila* DSM 44928 유래의 GCN5-related N-acyltransferase와 77% 정도의 유사성을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 AN090072 유래의 AHL acylase 유전자의 탐색을 계속적으로 진행 할 예정이다.

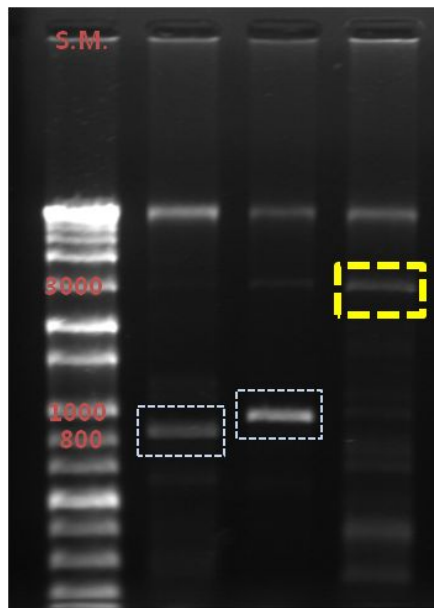


Fig. 33. The PCR amplification of AHL acylase from AN090072

CCGCCGCTCGTGACCCGCTTGAGGTCGTCCGTGTATTGTTGGAGTACATGCGCGGGTCGATCCGTTGCCCCGCTCGAAAAGGCTCGCAG
TTCCTCCGCTTCTGCGGGACGTGTAAGTCGGAAGAGTTTCCAGCCTCCATGCTTCCGTCCTCGAAGTTTCGGAATTGGCCTGCCAGGC
TTCACCATCCAAGTGCACGGAAGGCTCCCGAAGTACGCTCTCGGAATCTCCACGAGGCCCTCGCCGCTGGGTGGCGTGAAGTCGTCGG
TGAGGTTCCCCTGGAACACGAACGTGCCGCGCTCGGAGCGGTAGACGTTGGGGCAGTCGTTCTGACTGCACTCTCCGGAACCACTGCCAT
CGCCCGTGTGGTACGCGGTGTGAGGCCGGACCTCTTGCCATCTCAACTCCCTTGTCTGCGGTCCCGTCGGACCCGCCGAACAGGACG
CTAGAGAGCCGAGCGCGCGTGTCCATGGCGGAAGGCGCTATTCTGTCTTGGACTAAGGATCACGGTCAGGCGTCCAAAGCAGATCAA
TCGGAACGGACAACCTGATCGATCGCCGAAACGTTCCGCGGGTCTGTCTCCTGAACCGCGTCGCTTCATGCCGGCGGCCCTTGCGCCTC
GCAAGGGGCCCGGAACGATTGCGCTATGCCTGCCGAAGTGGTGAACCTCGCCGCGCTTGACGCCTTCGATCCAGAGGGCGAATTCA
CCGGGGTGGTACGATGGTCGAGTCGGGGGCCGCGACTCGCGGATCTCGATCAGGCCCTCGCTGTTGGTGGAGACCTCGACGGAGTTTC
CGCCGTCCTGAGTGCTGCTGGTGGACTTCTGCCACTGCCGAGACATGAGCTACCTCTCCAATTCAGGCCGTGCTTGATGTGTTGGATGA
CTCCCCACGAGTCCCGCTCGCGGTGAGGGCGCGCCGAGGTCTCCGATCTCCGGGCGGAAGTGCCAGTCCGCTGAGGTCCTCGAACCTGC
TCCGGTACGTCGAGTGCTTCGGGGGAGTCGGTGAACCTCGGAGACGCCCGGATGGTCGACCACCACCGTCGACAGCGCGGAGAGGGG
GCTCGGTGATCAGGAACGGCCCGGATAGGAAGGGTGCCTTGACGCTGAAGGGGAAGACCTGGACGGTGACGTTCCGCTTCTGCCCAA
CCTCAAGCAGGTGAGCCAGTTGGTCACGCATGGCCTCTTTCGCGGTGAAGCTCATCAGTAGTGCGGCCTCGTGGATGACGAAGCGGAACT
CGGCCGACTGTGAGGATGCGCTGGCGTTGAGGGCGGAACCGGATGGCGTCTCGATCTGTGCGGCGGACAACGGTGTCTCGCTGTTCT
GGAAGGTCTTTCGGATGTAGTCTCGGTCTGGAGCAGGCCGGGATGAAGAAGGTCTCGTAGTTCAGGTAGGCCTTGTCTGACCAGTGCT
CCTCAACTCTGCGAGGTCCAGCGCAAGGGCGGCACCCGCGCCTGTGCTGGCTCCACCAGCCCTTGGCGTCTGGCGCCGAGCGCTGCAA
GGGTGGCCAGATACTCCTCATCCGTGCAGCCATAGAAGGACGCCAGCGTGCGCATCCGATCTTCGTCAGGCCGGTGCAGCGGCTCGA
TGTGGTTCAACTGCGGGCCGCGCATGACGACGTGTGCGGCGGCTGTCTGCACCGCTTCGTCGGCACCAGCCGGAGACGGCGTAGCTCGG
CGCCGTACCGTCTGACTGACGCTCGCTGACGTGCGCTCGCAGAGCCAACCGTCCGCCCTTCCCGTGACACTGGCAGTGTTGCGCGGAGGG
TCGCGCAGCGCCACCCGATGGGACCCACCGTAGCGGCACTTTCGCGGTGGTGCATTAATGCGGGGGTGGCTCTACCTTAAGTGTGCG
GATCGACTACTGATTGTGATCAGATGCCGAAGTGCACCCCGATTTGTGGGCACGACTGCCGACGTCTGTGCTCCTCGTCGTCGGTGG
GGGAGGCCACGGGTTTCCACTTCTCTCCACGCGGTTCCACTCGACTCAGGGCTGGAGAAAGCCATGTGTCTTCCGAGTTTGTCCC
TCCGGGACCCCTACGCTCCGAGTTCGGCTCGACCTGTCCCGCCGCGCCTTCCCGCATGGTCGGGCGGATCCGCCGATTCTCCGG
GACCTGCTCCACGCCATGGCCTGAACCCGATTGCGCTGCCTCATCCTCTCCGAGCTGGTGACCAACGCCCTGGTCCACGGGGAGGGC
CGACCGGGCGTCACGCTCGAATCGTCTGCGGCGAGCTGCACATCACCGTTTCCGACGCCTCGGGGAACCCGCTCCAGCGACAGGTCCGG
GACGACTCGCGGCCAGTGCCCGGGCCTGGACATCGTGAAGCCCTATCCACGGCTGGGGTGTGCAACTGATCGGCAGCCACGGCAAA
GCGGTGTGGCCGTGGCCAAGTTGGCCGACCGGTGACGACAACGAATGCTCAGCCGCGCAAGGGCGCTCAGCCAGGCGGGACTTGGCGG
CAGGCCACTCATCGGCGAGCATCGAGAAGTAGGCCTGTGCGCCAGGTGCCGGTGGGGCGGAGGCGGTGGCGGCGGAAGGTTCCCTCGT
ACTGGGCGCCGAGGCGGAGGATCGCGTTGCGGGAGCGCTGTTGAGGGCGTCGGTCTTCCAGAAGACGCGGCCATGCCGAGGTCCCTCGA
AGGCGTGGGTGAGCAGCATCAGCTTGGCTCGGTGTTGACCACGGTGCGCCAGACCGAGCGGGCGTACAGGGTGCCGCCGATCTCCAGGT
ACTCGTCTTGGTGTGAGGTCGTAGTAGCCGGTACGCGGACGGCGGTGCCGCTGGCGAGGTGACGGCGGCGAACTCCACGGATTCCG
CGTGGCTCCCTCGGCGATGCGGGCGTGCAGGATCGGCGGAGCTCCTCCTCGGTGGCGGGCGGAGGTTTCATGGTCCAGCGCCAGACCT
CGGGCTCGGAGCCGATGGTGGCCAGAGGTGCGGCGAGATGGTGGCGGCCAGCGGCTCGAGGCGGATGTGGTGGCCGGTGAAGGTGACGG
GTGCACGAGCGGCGG

Fig. 34. Sequence of putative AHL acylase gene of AN090072

바. Ammonium sulfate 침전법을 통한 AHL 분해 효소의 정제

QS 저해 능력이 있는 효소의 정제를 위하여 ammonium sulfate 침전법을 수행하였다. AN090072의 배양 상등액을 4℃ 상태에서 충분히 교반하면서 10~90%의 ammonium sulfate로 침전 및 회수하였다. 각 단계에서 회수된 침전물은 10,000 g, 15 분간 원심분리하여 pellet과 supernatant로 나누었고, pellet은 acetone으로, supernatant는 TCA(Trichloroacetic acid)로 다시 농축 후 SDS-PAGE로 확인 및 CV026을 이용한 QS 저해능을 확인하였다 (Fig. 35, 36).

지금까지 대부분의 연구 결과가 AHL lactonase 위주인 것에 비추어 보았을 때, AHL acylase는 QS 저해제로서의 잠재적 기능을 가진 효소라 할 수 있으며 이를 분리 및 정제하는 것이 앞으로의 중요한 연구 방향이라 사료된다.

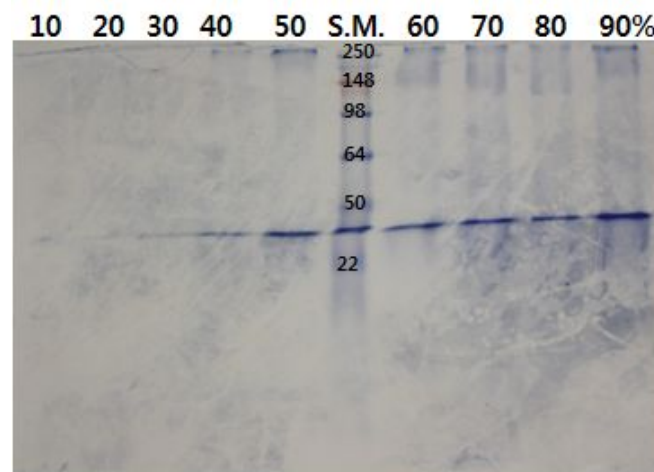


Fig. 35. SDS-PAGE analysis of ammonium sulfate precipitated AHL acylase.

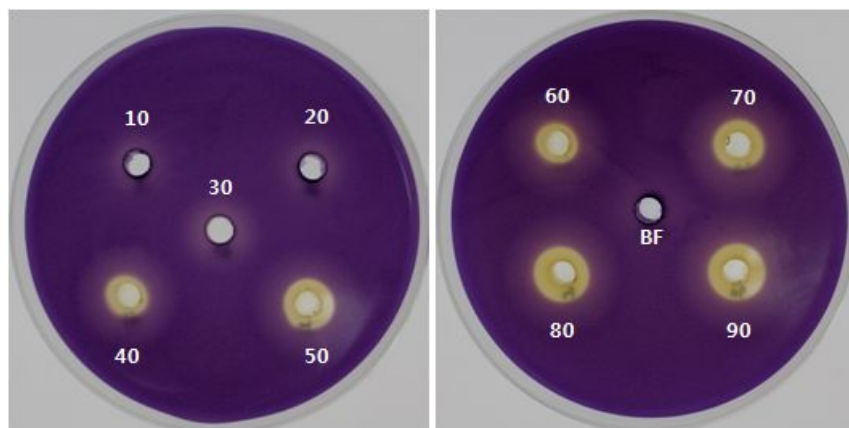


Fig. 36. CV026 assay of ammonium sulfate precipitated AHL acylase (BF: sample buffer)

7. AN090072 균주의 배추 절편 및 pot 실험을 통한 무름병 방제능 확인

식물 병원성 억제 능력을 확인하기 위하여 배추 절편에 *E. carotovora*를 접종하여 인위적으로 발병을 시켰으며, AN090072의 활성을 확인하기 위하여 배추에 함께 처리하였다. 시판되고 있는 배추의 줄기에 바늘을 이용해 상처를 내고, control은 24시간 배양한 *E. carotovora*를 증류수에 현탁하여 1×10^5 cfu/ml, 1×10^6 cfu/ml, 1×10^7 cfu/ml이 되게 접종하였다. 그리고 처리구에는 control과 같은 농도의 *E. carotovora*에 AN090072 배양 상등액을 같이 접종하여 28~30°C의 습기가 많은 조건에서 48시간 방치 한 후 발병정도를 관찰하였다. 병의 발생은 육안으로 관찰하였으며, 시간이 지날수록 *E. carotovora*를 접종한 control이 AN090072를 함께 처리한 처리구보다 더 빨리 무름병 증세가 나타나는 것을 확인하였다 (Fig. 37).

그 결과, AN090072는 기존에 보고하였던 AR54나 AN090571 균주보다 우수한 무름병 억제효과를 가지는 것을 확인하였고, 현재 배추 유묘를 대상으로 Pot 상에서 방제효과를 검정 중에 있다.

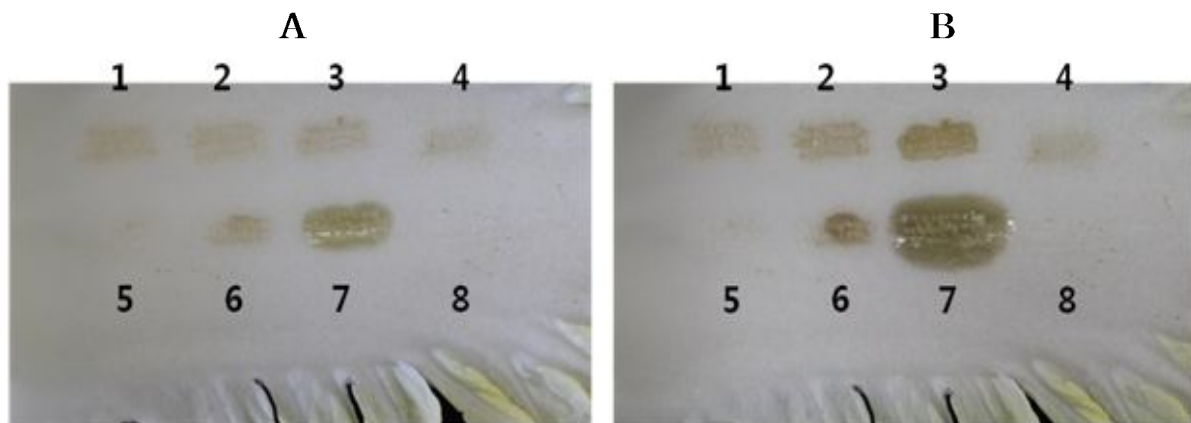


Fig. 37. Chinese cabbage inoculation with *Erwinia carotovora* and quorum sensing inhibition activity of AN090072 to observe maceration.

A, top row are *E. carotovota* + AN090072 supernatant, bottom row are *E. carotovora* only. Photograph 12h after inoculation. B, Same as A, 48h after inoculation.

1, *E.c* 1×10^5 cfu/ml+supernatant 10 ul; 2, *E.c* 1×10^6 cfu/ml + supernatant 10 ul; 3, *E.c* 1×10^7 cfu/ml + supernatant 10 ul; 4, supernatant 10 ul; 5, *E.c* 1×10^5 cfu/ml; 6, *E.c* 1×10^6 cfu/ml; 7, *E.c* 1×10^7 cfu/ml; 8, D.W.

지금까지의 연구결과를 종합하면 *Streptomyces* sp. AN090072 균주는 독성 및 안전성 평가 결과 안전성이 입증되었으며, 제제화 등의 연구경험과 성과가 이미 있고, 절편 테스트 결과 및 관련 유전자 및 효소 연구 결과로 볼 때 *E. carotovora*에 대한 새로운 개념의 QS 저해제로 판단되며, 차후 pot 시험과 포장시험을 거쳐 신규 생물학적 방제제로의 개발이 기대된다. 한편 생물막 형성 저해 연구결과를 볼 때 무름병 외에도 인체를 비롯한 다양한 bio-film 형성 병원균에 대해 확대 적용이 가능할 것으로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발의 최종목표

배추 무름병균을 방제하기 위하여 토양 방선균으로부터 신호전달저해(quorum sensing inhibition) 활성균주를 스크리닝하여 우수 균주를 선발하고, 신호전달저해 활성 최적화와 기작 연구를 통하여 새로운 개념의 생물학적 방제제를 개발하고자 하였다.

- 신호전달저해 활성 우수 방선균 선발
- 신호전달 저해 선발 균주의 활성 최적화
- 신호제어 또는 교란 및 생물학적 방제제를 이용한 병발제어 기작 연구
- 병발 제어 효과 검증 및 신규 친환경 생물소재로의 가능성 검증
- 시제품 형태 제제의 독성 및 안전성 평가
- 식물병원성 세균의 신호전달 작용기작을 연구하여 신호전달 차단에 의한 새로운 개념의 생물학적 방제제 개발

제 2 절 연차별 연구개발 목표내용 및 달성도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도(%)
1차년도	2008	QSI 활성 우수 균주 선발 및 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ QSI 활성 균주 선발 : AR54, AN090571, AN090072 ○ 활성균주 동정 ○ 활성물질의 분리정제 및 구조 분석 	100
2차년도	2009	QSI 활성 최적화 및 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 균주 배양 특성 검정 ○ 활성물질의 분리정제 및 구조 분석 ○ QSI 활성 최적화 연구 ○ AHL 저해 활성 검정 ○ 생물막 형성 저해 활성 검정 ○ 균 제제화 ○ 안전성 평가 	100
3차년도	2010	QSI 활성 기작 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신규한 AHL 분해 유전자 및 효소 탐색 ○ AHL 분해 효소 정제 ○ 배추 무름병 방제능 확인 	95

제 5 장 연구개발 성과 및 성과 활용계획

제 1 절 연구 성과

가. 특허 성과

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록번호
2006년	아실 호모세린 락톤의 경쟁적 저해활성을 가지는 키타사토스포라 속 AR030054	한국생명공학연구원	대한민국	2006-8905 (2006. 1. 27)	724770 (2007. 5. 28)
2006년	아실호모세린락톤의 경쟁적 저해활성을 가지는 피에리시딘 A1	한국생명공학연구원	대한민국	2006-31058 (2006. 4. 5)	743672 (2007. 7. 23)
2010년	적정밀도 인식억제활성을 가지는 신규스트렙토마이세스 속 균주	한국생명공학연구원	대한민국	2010-21863 (2010. 3. 11)	

나. 논문 및 포스터 게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2008	Proteolytic activity from a alkali-thermotolerant <i>Streptomyces gulbargensis</i> sp. nov.	S. G. Dastager	Agasar Dayanand	Wen-Jun Li, Chang-Jin Kim, Jae-Chan Lee, Dong-Jin Park, Xin-Peng Tian, Q. S. Raziuddin	Current Microbiology	57(6)	국외	SCI
2008	Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to <i>Plasmodiophora brassicae</i>	Sun Og Lee	Jin-Cheol Kim	Gyung Ja Choi, Yong Ho Choi, Kyoung Soo Jang, Dong-Jin Park, Chang-Jin Kim	Journal of Microbiology and Biotechnology	18(11)	국내	비SCI
2009	First report of powdery mildew on trident maple caused by <i>Sawadaea nankinensis</i> in Korea	H. B. Lee	H. B. Lee	C. J. Kim, H. Y. Mun, J. P. Hong, and D. A. Glawe	Plant disease	93(2)	국외	SCI
2009	ACC deaminase producing strain ST45 confers resistance to high salt stress in plant	Hyeon Seong Yoon	Chang-Jin Kim	Jin Hee Choi, Jae-Chan Lee, Dong-Jin Park, Chang-Keun Sung	한국식물 병리학회		국내	SCIE
2010	Isolation and Identification of <i>Streptomyces</i> sp. AN090571 Producing Quorum Sensing Inhibitor	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Jin Hee Choi, Jae-Chan Lee, Dong-Jin Park	한국미생물학회		국내	SCI
2010	Analysis of Quorum Sensing Inhibitor Produced by <i>Streptomyces</i> sp. MSL12	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Jin Hee Choi, Jae-Chan Lee, Dong-Jin Park	한국농약 과학회		국내	비SCI
2010	Isolation and Identification of <i>Streptomyces</i> sp. AN090072 Producing Quorum Sensing Inhibitor	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Mi-Kyung Kwon, Jae-Chan Lee, Dong-Jin Park	한국식물 병리학회		국내	SCIE
2011	Quorum sensing inhibition by <i>Streptomyces</i> sp. AN090072 as quenching of <i>Erwinia carotovora</i>	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Mi-Kyung Kwon	한국식물 병리학회		국내	SCIE

제 2 절 성과 활용계획

일차적으로 배추 무름병에 약제 내성을 유발하지 않거나 극복하는 생물농약으로 활용 가능하며 더 나아가 약제 내성 주요 원인인 생물막(biofilm) 형성을 억제하는 신규 의약품 생물소재로 확대 가능

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보

- 토양에서 분리한 그람 양성 세균인 *Bacillus* sp. 로부터 AHL을 분해하는 유전자 (AiiA, autoinducer inhibitor A)를 도입한 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 경우 그 병원성이 상쇄되었고 식물에 도입했을 때 다양한 병원균에 대한 저항성을 보인 연구가 있음.
- 단세포인 세균에 의한 밀도 인식의 도구로 사용 된다고 생각한 정족수 인식 물질인 AHL이 다양한 식물에 의해서도 분비되며 세균들과의 상호 관계에서 중요한 작용을 할 것으로 생각 됨. 더 나아가 미생물의 AHL에 의해 대표적인 콩과 작물인 *Medicago truncatula*의 다양한 단백질 발현이 proteome 연구에 밝혀짐.
- 최근 AHL 신호물질의 효소적 분해를 통한 불활성화를 위해 AHL 분해 균주들을 토양으로부터 분리하며 이들 중 일부 균주들로부터 AHL 분해효소 유전자들이 분리 확인 됨.
- AHL을 lactone ring의 ester 결합을 분해하는 AHL lactonase (AHLase)와 AHL의 lactone ring과 acylside chain 사이의 amide 결합을 분해하는 AHL acylase에 의해 신호물질로서의 기능이 없어진 물질로 분해될 수 있음. 따라서 AHL 분해 관련 효소 연구는 신호전달 체계를 무력화 하는 중요한 방법이 될 수 있음.
- AHL과 구조적으로 유사하여 조절 단백질의 결합부위에 대해 경쟁적으로 결합할 수 있는 AHL 길항제 개발은 anti-QS 전략의 하나가 될 수 있음.
- *Pantoea stewartii*의 AHL synthase의 구조가 밝혀져 inhibitor에 관한 연구가 진행 중.
- 국내 제약회사에서 녹농균을 대상으로 AHL에 대한 항체 구축 연구 개발 중.
- 해양 조류로부터 신호물질 유사체인 furanone을 개발하여 제약회사에서 화학 합성 방법으로 탐색 연구 중.

제 7 장 참고 문헌

1. Afriat. L., C. Roodveldt, G. Manco and D. S. Tawfik (2006) The latent promiscuity of newly identified microbial lactonases is linked to a recently diverged phosphotriesterase. *Biochemistry*. 45: 13677-133686.
2. Andersen, J. B., H. Arne, H. Morten, E. Leo, G. Otto, C. Bjarke Bak, M. Soren, and G. Michael (2001) gfp-Based N-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 575-585.
3. Bassler, B. L. and S. Michael R. (2000) Two-component signal transduction-Intercellular communication in marine *Vibrio* species: Density dependent regulation of the expression of bioluminescence. *AEM Press Washington D. C. USA*. 431-445.
4. Bauer, W. D., U. Mathesius & M. Teplitski. (2005). Eukaryotes Deal with Bacterial Quorum Sensing. The news Magazine of the *A.S.M.* 71, 139-135.
5. Bodman.von, S. B., W. D. Bauer, and D. L. Coplin (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 12.1-12.28.
6. Breck A. Duerkop, John Varga, Josephine R. Chandler, Snow Brook Peterson, Jake P. Herman, Mair E. A. Chychill, Matthew R. arsek, William C. Nierman, and E. Peter Greenberg (2009) Quorum-Sening Control of Antibiotic Synthesis in *Burkholderia thailandensis*. *Journal of Bacteriology*, June 2009, p.3909-3918.
7. Chin-Nung Chen, Chii-Jaan Chen, Chen-Ting Liao and Chia-Yin Lee (2009) A probable aculeacin A acylase from the *Ralstonia solanacearum* GMI1000 is N-acyl-homoserine lactone acylase with quorum-quenching activity. *BMC Microbiology* 2009, 9:89.
8. Chowdhary. P. K., N. Keshavan, H. Q. Nguyen, J. A. Peterson, J. E. Gonzalez and D. C. Haines (2007) *Bacillus megaterium* CYP102A1 Oxidation of Acyl Homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry*. 46: 14429-14437.

9. Dong Y. H., J. L. Xu, X. Z. Li, and L. H. Zhang (2000) AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *PNAS*. 97: 3526-3531.
10. Dong, Y. H., L. H. Wang, J. L. Xu, H. B. Zhang, X. F. Zhang, and L. H. Zhang (2001) Quenching quorum-sensing dependent bacterial Infection by an N-acyl homoserine lactonase. *NATURE*. 411(14): 813-817
11. Dong, Yi-Hu, Zhang, Lian-Hui (2005) Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. *J. Microbiol.*, 43: 101-109
12. Dong. YH.XF Zhang, JL Xu, and LH Zhang (2004) Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 954-960
13. Eglund, K. A. and E. P. Greenberg (2000) Conversion of the *Vibrio fischeri* transcriptional activator, LuxR, to a repressor. *J. Bacteriology*. 182: 805-811.
14. Erickson. D. L., V. L. Nsereko D. P. Morgavi, L. B. Selinger L. M. Rode K. A. Beauchemin (2002) Evidence of quorum sensing in the rumen ecosystem: detection of N-acylhomoserine lactone autoinducers in ruminal contents. *Can. J. Microbiol.* 48: 374-378.
15. Helen, W., S. Swift and P. Williams (2001) Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in gram-negative bacterial. *Current Opinion in Microbiology*. 4: 186-193.
16. Hodgkison. J. T., M. Welch and D. R Spring (2007) Learning the language of bacteria. *ACS Chem Biol.* 2: 715-7.
17. Huang. JJ., Ji Han, LH Zhang, and J R. Leadbetter (2003) Utilization of Acyl-Homoserine Lactone Quorum Signals for Growth by a Soil *Pseudomonas* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5941-5949.
18. Kjelleberg S., D. McDounald, T. B. Rasmussen, and M. Givskov (2008)

Quorum-Sensing Inhibition In chemical Communication among Bacteria. *ASM. Press. Washington DC.* pp393-416.

19. Kjelleberg, S. and S Molin (2002) Is there a role of quorum sensing signals in bacterial biofilms. *Curr. opin. Micribiol.* 5: 254-258.

20. Kim, MH., WC Choi, Ho Kang, JS Lee, BS Kang, KJ Kim, Zygmunt S. Derewenda, TK Oh CH Lee and JK Lee (2005) The molecular structure and catalytic mechanism of a quorum-quenching N-acyl-L-homoserine lactone hydrolase. *Proc. Natl. Acad.*

21. Liu. D., J. Momb, P. W. Thomas, A. Moulin, G. A. petsko, W. Fast and D. Ringe (2008) Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 1. Product-Bound Structures. *Biochemistry.* 47: 7706-7714.

22. Momb, J., C. Wang, D. Liu, P. W. Thomas, G. A. Petsko, H. Guo, D. Ringe and W. Fast (2008) Mechanism of the Quorum-Quenching Lactonase (AiiA) From *Bacillus Thuringiensis*. 2. Substrate Modeling and Active Site Mutations. *Biochemistry.* 47: 7715-7725.

23. Rasmussen, T. B. and M. Givskov (2006) Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Med microbiol.* 296: 149-161.

24. Reverchon. S., B. chantegrel, C. Deshayes, A. Doutheau, N. C. Pttat (2002) New synthetic analogues of N-acyl homoserine lactones as agonists or antagonists of transcriptional regulators involved in bacterial quorum sensing. *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.*, 12 1153-1157.

25. Romero, M., S. P. Diggle, S. Heeb, M. Camara and A. Otero (2008) Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: Identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiol Lett.* 208: 73-80.

26. Shepherd, R. W., and S. E. Lindow (2009) Two Dissimilar N-Acyl-Homoserine lactone acylases of *Pseudomonas syringae* influence colony and biofilm morphology. *Appl Environ Microbiol.* 75: 45-53.

27. Uroz, S. and J. Heinonsalo (2008) Degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi. *FEMS Microbiol Ecol.* 65: 271-278.
28. Zhang, L., L. Ruan and C. Hu (2007) Fusion of the genes for AHL-lactonase and S-layer protein in *Bacillus thurnigiensis* increases its ability to inhibit soft rot caused by *Erwinia carotobora*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74: 667-675.
29. Zhao, C. H. Zeng, Z. Yu and M. Sun (2008) N-Acyl Homoserine Lactonase Promotes Prevention of *Erwinia* virulence With Zwittermicin A-Producing Strain *Bacillus cereus*. *Biotechnology and bioengineering.* 100: 599-603.
30. Zhu, C., Z. Yu and M Sun (2006) Restraining *Erwinia* virulence by expression of N-acyl homoserine lactonase gene pro3A-aiiA on *Bacillus thuringiensis* subsp. *leesis*. *Biotechnol bioeng.* 95: 526-532.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.