

최 종
연구보고서

흰가루병 특이적 lipopeptides 생산 균주의 특성
규명 및 응용에 관한 연구

Study on the Characterization of Lipopeptides
Producing Strain for Powdery Mildew and
Its Application

전남대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “**흰가루병에 특이적 lipopeptides 생산 균주의 특성 규명 및 응용에 관한 연구**”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 9월 01일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 지 연 태

세부연구책임자 : 지 연 태

세부연구책임자 : 박 노 동

세부연구책임자 : 배 동 규

연 구 원 : 김 옥 란

연 구 원 : 허 선 미

연 구 원 : 노 상 명

연 구 원 : 신 영 님

연 구 보 조 : 조 경 현

연 구 보 조 : 배 형 우

연 구 보 조 : 백 형 옥

연 구 보 조 : 지 명 심

연 구 보 조 : 김 옥

연 구 보 조 : 이 지 연

연 구 보 조 : 안 지 선

연 구 보 조 : 주 완 택

요 약 문

I. 제 목

흰가루병 특이적 lipopeptides 생산 균주의 특성 규명 및 응용에 관한 연구

II. 연구개발 목적 및 필요성

1. 연구개발 필요성

가. 연구개발의 목적 및 필요성

1) 기술적측면

● 식물 병원균 방제를 위한 화학합성 농약 사용량 증대는 내성 균주의 출현을 유발하고 더불어 농약 사용량은 날로 증가하고 있다. 이에 따라 내성 균주를 방제하기 위하여 새로운 종류의 합성 농약 수요는 날로 증가하고 있다. 화학 합성 농약은 생분해성과 선택성이 낮아 생태계를 파괴함은 물론 토양에 축적되어 먹이 사슬을 통해 사람과 가축에 직·간접적인 피해를 준다. 21세기 농업은 더욱더 건강하고 안정성이 높은 농산물과 식품에 대한 수요가 크게 증가하게 될 것이다. 많은 국가에서 농약 사용량 기준을 더욱 엄격히 규제하고 있으며, 특히 농약 잔류량 검사가 강력히 시행되고 있다. 이는 화학 농약의 사용량을 줄여야함을 의미하고 이에 따라 농산물 수확량은 감소하게 될 것이다. 농산물 수확량을 증가시키는 방법은 우수한 품종 개량이 뒤를 받쳐 주어야 하는데 전통적인 육종 방식으로 병저항성 품종을 얻는 데는 5년~10년의 장기간이 필요로 하다. 이에 반해서 유전자 변형에 의한 병저항성 품종 개량은 단시간에 이를 수 있으나 GMO에 대한 안정성 문제에 대한 논란이 끊이지 않고 있다. 그러므로 가장 현실적인 방법은 화학 합성 농약에 비해 인간의 건강과 환경에 해가 적은 저독성이며 생분해성인 생물학적 방제(biological control) 방법으로 이를 대체하는 것이다. 즉, 식물 병원균의 생물학적 방제는 다양한 미생물들이 생산하는 물질들에 의해서 이루어지므로 화학합성 농약을 대체할 수 있는 유일한 대안이라 할 수 있다. 본 연구과제에

서는 고추, 수박, 오이등에 만연하고 있는 흰가루병 특이적인 ① *Bacillus sp.* CMB 26 균주의 특성을 규명하고, ② 농업현장에 적용할 수 있는 미생물 제재화를 기하고, ③ 식물 병원균에 특이적인 lipopeptide의 분자 구조를 해석하고 그의 응용 가능성을 검토하고자 한다.

2) 경제·산업적 측면

● 통상산업부의 통계에 따르면 생물산업 규모는 2000년 3조에서 매년 50%씩 고성장이 기대되고 있다. 미국등 선진국에서는 생물산업에 대한 투자가 매년 급격히 증가하고 있다. 특히 미국에서는 생물 방제를 위해 1990년에 연방 정부에 National Biological Control Institute(NBCI)를 설립하여 본격적인 투자와 연구가 시도되고 있음. 또한 몇몇 주에서는 주립대학과 연계하여 생물학적 방제에 대하여 활발한 연구와 현장 실험을 병행하고 있다. 2000년 10월 현재 미국에서 식물 병원균의 생물학적 방제용으로 상용화 되고 있는 상품은 Kodiak등 42개 제품이 세균과 곰팡이 길항균들을 생균제나 또는 발효제품을 이용 제조하여 판매하고 있다. 본 연구과제에서 연구대상으로 삼은 흰가루병(Powdery mildew)에 관한 농약제품은 판매되지 않고 있었음. 본 과제에서는 저독성으로 생분해성이며 흰가루병에 탁월한 미생물 제재를 대량 생산하고자 한다.

3) 사회·문화적 측면

● 세계 농약의 20%를 생물농약으로 대체하자는 “리우 환경회의 협약” 이후 세계적으로 화학 합성 농약 사용을 줄이려는 추세가 뚜렷하다. 우리 나라에서도 농산물의 잔류 농약에 대한 검사가 강화되고 있으며, 소비자들 또한 무공해 농산물에 민감하게 대응하고 있어 저독성 생물 농약의 개발이 절실히 요구되고 있다. 농산물의 국제 경쟁력 재고에도 생물 농약 대체는 크게 공헌 할 것으로 기대되며, 수출품뿐만 아니라 국내소비자 들에게 우량 농산물을 공급할 수 있어 국민 보건향상에 기여할 것이다 독성이 강한 합성농약을 사용함에 따라 토양에 잔류 축적될 뿐만 아니라 농산물에 흡수 이행되므로 이를 섭취한 인간이나 동물에 축적되므로 이에 대한 피해가 크다. 그러므로 농산물 생산 증대를 위해 농약이 필수적으로 필요하다. 때문에 무독성이며 생분해성인 식물 병원균 방제용 농약 개발이 절실히 요구되고 있다. 2000년 10월 현재 미국의 경우 생물 농약으로 옥수수, 토마토, 고추 등에 발생하

는 *Pythium ultimum*(모잘록병), *Rhizoctonia solani*(문고병), *Fusarium oxysporum*(시들음병), *Phytophthora capsici*(역병), *Sclerotium rolfsii*(균핵병) 등등의 병원균 방제에 생균제와 단백질 제제등 42개 제품이 출하되어 이용되고 있다.국내의 동부한농에서는 무독성의 AC-1과 Biobact를 개발 이용 직전에 있다. 미국, 일본, EU 등 많은 나라에서 생물 농약을 개발하고 있으나, 특정 병원균에 대해서만 방제능이 있어 다양하고 특이적인 병의 방제 효과에 많은 문제점을 가지고 있다. 특히 *Pseudomonas*속과 같은 Gram(-) 세균은 발효 후 균체나 제품을 냉장 또는 냉동 보관해야 하는 등 제품 보관, 관리에 비용이 많이 든다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 내용

가. 연구개발 내용

● 본 연구팀은 오이 흰가루병에 가장 강력하고 토마토 역병(*Phytophthora infestans*), 사과 겹무늬 썩음병(*Botryosphaeria dothidea*), 오이 잿빛 곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 벼 문고병(*Rhizoctonia solani*)등에도 길항력을 갖는 균주로 CMB 26을 선발하였다.

본 연구에서는 다음과 같은 연구를 수행하고자 한다.

- 1) 흰가루병에 특이적 미생물 CMB26 의 특성 규명
- 2) CMB26이 생산하는 lipopeptides의 구조 분석
- 3) lipopeptides의 항균력 시험
- 4) 균주의 lipopeptides 특성 규명
- 5) CMB26의 16s rRNA 유전자의 염기서열 분석
- 6) lipopeptide 대량생산체계 확립

나. 연구개발 범위

- ◎ 흰가루병에 특이적 미생물 CMB26 의 특성 규명
 - 16s rRNA full length sequencing에 의한 균주 동정
 - Biolog, Bergy's manual에 의한 균주 동정

- ◎ CMB26이 생산하는 lipopeptides의 구조 분석
 - acid precipitation, Methanol 추출, HPLC에 의한 순수 분리
 - lipopeptides의 구조분석 ; GC, NMR, IR, MALDI-TOF에 의한 구조분석

- ◎ lipopeptides의 항균력 시험
 - *Bacillus* sp CMB 26은 예비 실험 결과 적어도 3종류 이상의 항균물질을 생성하는 것으로 조사되어져 이들 물질의 순수 분리 및 항균성 조사
 - 항균 활성 검색
 - 항균 생성능 증대 mutant 선발

- ◎ lipopeptide 대량생산체계 확립
 - 최적 발효조건 확립 ; 탄소원, 질소원, pH, 온도 등
 - Jar fermentation에 의한 pilot 생산
 - 미생물 제재를 위한 최적 물질 screening
 - 미생물 제제의 완성
 - 포장실험에 대한 미생물 제제의 효능 검색
 - 미생물 제제 처리에 의한 병발생을 조사

IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

1. 연구결과

가. CMB26의 특성 규명

CMB26 균주를 동정하기 위하여 23s, 16s, 5s rRNA genes의 염기서열을 분석하

였다. sequencing 한 염기서열은 4871 nucleotide 였다. 염기서열중 1번부터 1533번 까지 염기서열은 16s rRNA, 1825번부터 4656번 까지는 23s rRNA, 47282번부터 4817번 까지는 5s rRNA로 나타났다. 전체 염기서열은 NCBI에서 비교 분석한 결과 새로운 *Bacillus sp.* 으로 밝혀졌다.

나. 항균 활성 검색

Bacillus sp. CMB26 배양액의 항균 활성을 조사한 결과 토마토 역병 (*Phytophthora infestans*), 고추탄저병(*Collectotrichum gleosporioides*), 사과 겹무늬 썩음병 (*Botryosphaeria dothidea*), 오이 잿빛 곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 오이 시들음병 (*Fusarium oxysporum*), 오이 흰가루병(*Sphaerotheca fuliginea*), 수박 만고병 (*Mycosphaerella melonis*), 벼 문고병(*Rhizoctonia solani*) 및 대장균 *Escherichia coli* 0157 등에 탁월한 효과를 보여주었다.

다. *Bacillus sp.* CMB26 변이주 선발

본 연구팀은 CMB26의 lipopeptides 생산량을 증대시키고 유통과정에서 오염을 방지하기 위하여 다음과 같은 변이주를 선발하였다.

1) lipopeptide 생산량 증대 변이주 선발

lipopeptide는 곰팡이를 사멸시킬 뿐만 아니라 생산 균주인 *Bacillus* 에 대해서도 독성을 나타내 죽게 된다. 본 연구에서는 고농도의 lipopeptide에서도 내성을 갖는 변이주를 개발하였다. 변이주는 야생형에 비하여 2배의 생산량 증대를 보였다.

2) 유통과정에 적합한 변이주 개발

미생물 제제는 보통 액체상태로 유통되어지고 있다. 살균되지 않은 용기에 담아 오래 보관할 경우 오염 문제가 따른다. 이러한 오염문제를 해결하는데 가장 적합한 물질로 목초액을 선정하였다. 목초액은 천연물로서 친환경 농자재로 널리 쓰이는데, 유통용기에 목초액을 첨가 하였을때 오염되지 않음이 확인 되었다.

그러나 목초액(1.8%)이 존재하면 CMB26도 30%가 사멸됨이 확인 되었다. 그러므로 본 연구에서는 1.8%의 목초액에서도 저항성을 갖는 변이주를 선별 하였다.

라. lipopeptide 구조 분석

1) lipopeptides의 순수 정제

최소배지에서 72시간 배양한 다음 원심분리하여 상등액을 모은후 3N HCl을 첨가하여 pH2.0으로 조정한 다음 4℃에서 3시간 정치시켰다. 원심분리하여 침전물을 얻은후 chloroform/methanol(2:1 v/v)에 녹여 진공건조시킨후 methanol에 녹여 TLC와 reverse-phase HPLC를 수행하여 활성이 있는 peak을 분획한 다음 MALDI-TOF/MS를 수행하였다. 또한 아미노산 조성, lactone bond 확인 및 GC를 이용한 지방산을 분석하였다.

2) cyclic lipopeptide의 분자량

HPLC 결과 3개의 major peak에서 항균성이 나타났고 이중 활성이 가장 높은 peak no.3의 분자량과 구조 및 특성에 대하여 집중 연구하였다. peak no.3의 분자량은 MALDI-TOF 분석결과 1447Da 이었고, 이 물질은 식물성 곰팡이병원균, *Escherichia coli* 0157. ac88과 배추흰나비 애벌레(*Pierisrape crucivora*)에 대하여 항균, 항충 효과를 나타냈다.

3) cyclic lipopeptide의 구조

peak no.3의 아미노산 조성은 L-Glu, D-Orn, L-쪽, D-allo-쪽, D-Ala, D-Val, L-Pro 및 L-Ile 이었고 그들의 조성비는 각각 3 : 1 : 2 1 : 1 : 2 : 1 : 1이었다. 이 물질은 *Bacillus* 속 균주가 내는 cyclic lipopeptide인 fengycin과 같은 조성이었다.

4) fengycin 유도체의 지방산 분석

정제된 lipopeptide의 지방산 구조를 확인하기 위하여 순수 분리된 lipopeptide에 6N HCl을 가하여 150℃에서 하룻밤 반응시켜 peptide를 완전히 가수분해시킨다음 지방산만을 추출하여 GC/MS를 이용, 구조를 분석하였다. m/z 92, 108과 151(Mclafferty rearrangement) peak는 3-piconyl 유도체 지방산 이었다. 이 물질은 m/z 359에 이중결합을 가진 C17 지방

산으로 확인되었다. 또한 이 물질은 m/z 290과 316사이에 13Da 차이를 갖는 이중 결합이 포함되었다. 이러한 결과는 기존의 알려진 fengycin이나 plipastatins과는 전혀 다른 신규 물질임이 밝혀졌다. 기존의 fengycin은 탄소 2-3 또는 3-4 사이에 이중 결합이 하나 있고 14번 탄소 위치에 methyl 기가 있으나 신규 정제된 lipopeptide는 탄소 13번과 14번 사이에 (m/z 303, 316) 이중 결합이 하나있고 methyl 기가 없었다.

본 연구에서 정제된 항생물질은 기존의 상업적으로 판매되고 있는 lipopeptide인 iturin 과 surfactin 보다도 항균 활성이 월등히 높은것으로 밝혀졌다.

라. 미생물 제제의 최적생산 체계 구축

1) 최적발효조건 확립

구조 분석 결과 peptide가 존재한다는 것에 착안하여 M9 최소배지에 20 종류의 아미노산(20mg/ℓ)을 첨가 하였을때 페닐 알라닌에 의해서 lipopeptide가 유도됨을 확인 하였다.

2) 최적배지

M9 최소배지를 기본으로 하여 가장 적합한 탄소원은 0.4% glucose 였고, 최적 질소원은 0.4% $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4\text{CaCl}_2$ 의 농도는 5mM이었다.

3) 미생물 제제 효능 검색

상업적으로 사용하기 위하여 500ℓ Jar fermentor에 CMB26을 대량배양하여 포장 실험을 수행하였다. 본제품은 “가루탄”이란 상표명으로 광주광역시로부터 승인 받아 제품을 출시하였다.

2. 활용에 대한 건의

가. 미생물 농약의 등록절차 간소화

미생물제제 농약은 현행법상 3년의 현장실험을 거쳐 승인을 받을 수 있으므로 검증기간이 오래걸리고 비용이 많이 소요된다. 그러므로 국가기관에 위탁하여 짧은 시간에 검

증 대행을 하여 줌으로써 시간과 경비를 감축시킬 수 있을 것으로 사료된다.

나. 친환경 농업 정책의 확대

WTO 체제 출범후 DDA가 체결 되므로써 더 이상 우리나라 농업은 설 땅이 없게 되었다. 이를 극복할 수 있는 대안의 하나가 친환경 유기 농업 일 것이다. 그러므로 이에 대한 국가적 지원이 체계적이고 적극적으로 이루어 질수 있도록 하여야 할 것이다.

SUMMARY

Surfactants and emulsifiers are integral to many industrial, agricultural and food processes. Most of the compounds are chemically synthesized, and it is only in the past few decades that surface-active molecules of biological origin have been described. Their surfactant and emulsification properties result from the presence of both hydrophilic and hydrophobic regions on the same molecule ; aggregates form and accumulate at surface boundaries, thus separation the two phases.

Recently, biological control is improving to use like described biosurfactants. As passed time, the damages of agricultural products were increasing by several pathogens. Although some new agricultural chemical reagents (fungicides, insecticides, pesticides etc) have been introduced lately, many problems still remain unsolved those chemical reagents were very stable and indecomposable on soils. For above reasons, nowadays, many biological control methods to pathogens have been researched. Using microbial producing lipopeptide is one of them. Lipopeptide has cyclic structure and very stable on heating and bio-decomposable, and there lipopeptide has an antifungal, antibacterial, anticancer activities. In this study, we were isolated novel bacterium which was strong antagonistic activity and separated lipopeptide from this microorganism, and analyzed detached lipopeptide's structure.

In this study, we isolated novel bacterium which was strong antagonistic activity and its properties characterized, against multi plant pathogenic fungi. For isolation of the antagonistic compound responsible for antifungal and antibacterial, strain *Bacillus sp.* CMB 26 was cultured on modified M9 broth for 4 days at 37°C. Cell free culture broth were acidified to pH 2.0 with 3N HCl and centrifuged. The precipitate was extracted

using solvent (Chloroform:MeOH = 2:1) and then isolated reverse phase HPLC. Active fractions, which were identified by paper disk method test against multi plant pathogenic fungi. We were isolated lipopeptide by HPLC and had characteristics of lipopeptides and MW were 1081 and 1465 by MALDI-TOF/MS. Lipopeptide has cyclic structure and very stable on heating and bio-decomposable, and there lipopeptide has an antifungal, antibacterial activities and presume to amino acid composition were E, Y, T, D, R, Q. Scanning Electron Microscopy showed the antimicrobial lipopeptide act on the cell wall of *E. coli* O157 : ac88 and *Colletotrichum gloeosporioides*. The structure of lipopeptide were determined by interpretation GC/MS and ESI-MS/MS.

1. Screening of Bacteria for Antibiotic Activity

For the selection potential antagonists which inhibits to *C. gloeosporioides* KACC 40689, over one hundred ninety isolates of bacteria were initially isolated from soil. The isolates were screened against *C. gloeosporioides* KACC 40689 and about 15% showed antagonistic effect.

Among the isolates, eight strains were selected as the producer of antifungal agents and a strain with a broad spectrum of antifungal activity in vitro test designated as CMB 26.

This strain exhibited a strong antifungal effect on several major phytopathogens including *Phytophthora infestans*, *Botryosphaeria dothidea*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella melonis*, *Rhizoctonia solani*.

2. Identification of the Antagonistic Bacterium

We are sequenced of CMB26's total rRNA genes nucleotide. CMB26's total rRNA were 4817 base pairs. (16s' forehead part and 5s' stern part did not become sequencing). Among them 1 - 1533 is 16s rRNA, and 1825 - 4656 is 23s rRNA, and 4728 - 4817 is 5s rRNA. Result NCBI blast search, it's homology with *Bacillus subtilis*

subsp. subtilis str. 168 complete genome is 16s rRNA in 99%, 23s rRNA in 98– 99% be, and 5s rRNA has identity of 100%. Usually, CMB26 is thought is *Bacillus subtilis*' kind because see as uniformity stalk if 16s rRNA has identity more than 99%. But, intergenic rRNA between 16s rRNA and 23s rRNA *Bacillus amyloliquefaciens* and 98% is equal and can speak as new specise that CMB26 is not proved so far because can not speak that is equal with what part of some stalk as intergeinc sequence between 23s–5s rRNA is pitiful.

3. Production of lipopeptide

The antibiotic lipopeptides produced by *Bacillus* sp. CMB 26 were detected by extraction each 4 hours. At 92 h, at the middle of stationally phase, the concentration of lipopeptides reached its highest level.

5. Antibiotic Activity

The purified lipopeptides significantly suppressed *C. gloeosporioides* KACC 40689 *in vivo* bioassay. Typical hyphae of *C. gloeosporioides* KACC 40689. Whereas the treated with purified lipopeptides(100ug/ml) hyphae of *C. gloeosporioides* KACC 40689.

The cell-free lipopeptide produced from *Bacillus* sp. CMB 26 were examined in respect to controlling Powdery mildew in cocomber in pots. A plant which was treated with plant pathogen alone(Fig. 7A). While a plant on leaf treated with lipopeptide was healthy and no symptom was observed until 14 days. In treatment cocumber's leaf, Powdery mildew's spore is shrinking.

And in the bacteria, while control is very health, most of all adding lipopeptide(10ug/ml) in culture broth is death. We can confirm according to this result that lipopeptide may be action the membrane of target cells.

6. Structural analysis of Antibiotic compound

1) Mass spectrometry

B. subtilis sp. CMB 26 was found to produce cluster centered around a peak at m/z 1477 when analyzed by MALDI-TOFMS. Significantly, the lipopeptide was present in samples obtained from vegetative cells. Analysis of the cell-free supernatant, extracted from the culture medium, also showed the presence of the lipopeptides. They are characteristic of *B. subtilis* sp. CMB 26 in all stages of its life cycle. The biomarkers were also produced in different growth media(Data not shown) and showed the highest intensity in spores that were grown in modified M9.

The lipopeptide cluster was isolated from the cell-free culture supernatant of continuously growing cells as described in the experimental section. Isolation was accomplished using C_{18} solid-phase extraction cartridges. The lipopeptides completely eluted when the cartridge was washed with methanol. MALDI mass spectral analysis revealed a cluster containing five molecules centered around an intense peak at m/z 1477. Eight peaks at m/z 1435, 1449, 1463, 1477, 1491, 1505, 1519, and 1533 differing by 14 Da, suggested a series of homologous molecules. The molecule at m/z 1506 is 28 Da above the last peak in this series. Based on the pattern of mass differences and the amphiphilic nature of the lipopeptides, they were tentatively assigned as a family of closely related lipopeptides that varied in their fatty acid chain length. The purified lipopeptides with protonated molecular masses of 1463, 1477 and 1505 Da were subjected to mild alkaline hydrolysis. Each molecule yielded a new product, with protonated masses of 1482, 1496 and 1524 Da, respectively. The mass gain of 19 Da observed for each product was assigned to hydrolysis of a lactone(Fig. 10). This result indicated that each molecule contained a cyclic peptide domain, analogous to previously characterized microbial lipopeptides. In addition, one mass unit was hypothesized to be added by conversion of Gln or Asn to Glu or Asp. To determine the number of carboxylic acid groups, the open form of each lipopeptide was esterified and its mass checked by MALDI-TOFMS. The masses of all three compounds increased by 56 Da upon esterification, suggesting the presence of four carboxyl groups in each peptide domain. One carboxyl group was assigned to the C-terminal position of the peptide. The remaining carboxyl groups were assigned to three glutamic or aspartic acid residues.

2) Amino Acid analysis

An antibiotic compound had the amino acid composition : L-Glu, D-Orn, L-Tyr, D-allo-Thr, D-Ala, D-Val, L-Pro, and L-Ile in a molar ratio of 3:1:2:1:1:2:1:1. The purified lipopeptide showed the same amino acid composition as fengycin, but differed slightly in fatty acid composition,

in which the double bond was at carbons 13-14 (m/z 303, 316) and there was no methyl group. This lipopeptide can function as a biocontrol agent, and exhibits fungicidal, bactericidal, and insecticidal activity. Expecially compared with surfactin and iturin, the lipopeptide from *Bacillus* sp. CMB26 showed stronger antifungal activity against phytopathogenic fungi. This lipopeptide is a candidate for the biocontrol of pathogens in agriculture.

3) Fatty Acid analysis

The fatty acid was cleaved from the most abundant lipopeptide (1477 Da) and derivatized as described in the Experimental section. It was subjected to electron ionization using GC/MS. Peaks observed at m/z 92, 108 (base peak) and 151 (McLafferty rearrangement) are characteristic of 3-picolynyl derivatives of fatty acids.⁶ The molecular ion was identified at m/z 359, suggesting a C17 fatty acid with one double bond. Working backwards from the molecular ion, one can see loss of the terminal CH₃ group and a series of fragment ions 14 Da apart that reflect cleavages between all the ethylene groups in the fatty acid chain. There is a gap of 28 Da between the ions at m/z 330 and 302, characteristic of a branched fatty acid with an *anti-iso* methyl group located at the carbon atom before the gap. Overlapping gaps of 26 Da occurring between m/z 190 and 164 and m/z 177 and 151, respectively, are assigned to reflect a mixed population of 3,4 and 2,3 double bond species. This suggests that a hydroxyl group at position 3 had been dehydrated in the gas chromatograph. This behavior is consistent with the behavior of standard 3-hydroxyhexadecanoic acid. The corresponding free fatty acid is proposed to be a 3-hydroxy-14-methylhexadecanoic acid. When the incremental mass of this moiety (269 Da) is subtracted from the mass of the composite m/z 398.3 ions, the remaining mass is 129.2 Da. Hence the N-terminal amino acid is glutamate. The bond between the C18 fatty acid and glutamate is assigned as an amide linkage, because it was stable to the mild alkaline hydrolysis conditions that cleave esters. The fatty acid was released by extreme acid hydrolysis, known to cleave amide linkages. If glutamic acid is also the N-terminal amino acid in the 1464 and 1506 Da species, then 3-hydroxy, C16 and 3-hydroxy, C17 fatty acids would be present, respectively.

7. Optimization of the Production of lipopeptide

We could confirm that produced lipopeptide's amount increases density of calcium is low as experiment result. Most suitable medium condition confirmed that glucose and

NaNH₄HPO₄, which concentrate is 0.4% (v/v), CaCl₂'s density is 5mM in lipopeptide's production conclusively. Also, it confirmed that addition of peniylalanine causes fair effect in lipopeptide's production.

8. Large culture of CMB26 Strain and field test

For the field test, we were cultured CMB26 strain in 500L jar fermentor on the M9 minimal medium containing 0.4% glucose at 37oC for 48hours at 150rpm. Culture broths were sereal diluted, and added with 0.2% of triton X-20 and treated in cucumber and pepper in infected phytopathogens. After 2days, pathogens were effectively controlled in 100-300 diluted broth. This lipopeptide is a candidate for the biocontrol of pathogens in agriculture.

CONTENTS

CHAPTER 1. Introduction -----	21
Part 1. Needs of study -----	21
Part 2. Objectives and contents of study -----	24
CHAPTER 2. Trends of Technical Development in the Related Scientific Area -----	27
CHAPTER 3. Research Methods and Results -----	28
Part 1. Charactrization of CMB 26 strain -----	28
1. Isolation of strain-----	28
2. Morphological observation of CMB 26-----	31
3. Identification of CMB 26-----	32
Part 2. Establishment of opticalproduction and fermentation condition -----	37
1. Establishment of opticalproduction and fermentation condition--	37
2. Establishment of system for optimal production of microbial compounds-----	42
3. Study on the inducer for antifungal compounds-----	44
Part 3. Analysis of structure of antifungal compounds -----	48
1. Analysis of structure of antifungal compounds-----	48
2. Agricultural application of lipopeptide-----	61
3. Effect of insecticidal of extracts-----	64
4. Possibility for soil improvement of CMB 26-----	66

Part 4. Establishment of large culture system-----	67
1. Establishment of large culture system-----	67
Part 5. Field test-----	69
1. Field test-----	69
Part 6. Paper, special permission and improvement of commodities-----	71
CHAPTER 4. Achievement Evaluation-----	73
Part 1. Degree of achievement on research plan-----	73
Part 2. Contribution to the related scientific area-----	74
CHAPTER 5. Practical Application of the Results-----	76
CHAPTER 6. Scientific Information Collected through the Project--	77
CHAPTER 7. References-----	78

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요-----	21
제 1 절 연구개발의 필요성-----	21
1. 기술적인 측면-----	21
2. 경제·산업적 측면-----	22
3. 사회·문화적 측면-----	23
제 2 절 연구개발 목적과 범위-----	24
1. 연구개발 목적-----	24
2. 연구개발 내용-----	24
제 2 장 국내외 기술개발 현황-----	27
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과-----	28
제 1 절. CMB 26의 균주 특성-----	28
1. 균주의 분리-----	28
2. CMB 26 균주의 형태적 관찰-----	31
3. 균주의 동정-----	32
제 2 절 항균물질 생산 발효 최적 조건 확립-----	37
1. 항균 물질 생산 발효 최적 조건 확립-----	37
2. 미생물 제재의 최적 생산 체계 구축-----	42
3. 항진균물질 유도 물질 탐색-----	44
제 3 절 항진균 물질의 구조 분석-----	48
1. 항진균 물질의 구조 분석-----	48
2. Lipopeptide류의 농업에 응용-----	61

3. 추출물의 항충효과-----	64
4. 토양 개량제로써의 이용 가능성-----	66
제 4 절 대량 배양체계 확립-----	67
1. 대량 배양체계 확립-----	67
제 5 절 현장실험-----	69
1. 현장 실험-----	69
제 6 절 논문, 특허 및 상품개발-----	71
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	73
제 1 절 목표달성도-----	74
제 2 절 관련 분야 기여도-----	74
1. 미생물 농약 개발 가능성 확인-----	74
2. CMB 25 균주의 항균 효과 분석-----	74
3. lipopeptide 대량 생산 체계 확립-----	74
4. CMB 26 균주의 rRNA 유전자 분석-----	74
5. 대량 생산 체계 확립-----	75
6. 미생물 제재의 실용화 기술 개발-----	76
제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획-----	76
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보-----	77
제 7 장 참고문헌-----	78

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적인 측면

가. 식물 병원균 방제를 위한 화학합성 농약 사용량 증대는 내성 균주의 출현을 유발하고 더불어 농약 사용량은 날로 증가하고 있다.

나. 이에 따라 내성 균주를 방제하기 위하여 새로운 종류의 합성 농약 수요는 날로 증가하고 있다.

다. 화학 합성 농약은 생분해성과 선택성이 낮아 생태계를 파괴함은 물론 토양에 축적되어 먹이 사슬을 통해 사람과 가축에 직·간접적인 피해를 준다.

라. 21세기 농업은 더욱더 건강하고 안정성이 높은 농산물과 식품에 대한 수요가 크게 증가하게 될 것이다. 많은 국가에서 농약 사용량 기준을 더욱 엄격히 규제하고 있으며, 특히 농약 잔류량 검사가 강력히 시행되고 있다. 이는 화학 농약의 사용량을 줄여야함을 의미하고 이에 따라 농산물 수확량은 감소하게 될 것이다.

마. 농산물 수확량을 증가시키는 방법은 우수한 품종 개량이 뒤를 받쳐 주어야 하는데 전통적인 육종 방식으로 병저항성 품종을 얻는데는 5년~10년의 장기간이 필요로 하다. 이에 반해서 유전자 변형에 의한 병저항성 품종 개량은 단시간에 이를 수 있으나 GMO에 대한 안정성 문제에 대한 논란이 끊이지 않고 있다.

바. 그러므로 가장 현실적인 방법은 화학 합성 농약에 비해 인간의 건강과 환경에 해가 적은 저독성이며 생분해성인 생물학적 방제(biological control) 방법으로 이를 대체하는 것이다.

사. 즉, 식물 병원균의 생물학적 방제는 다양한 미생물들이 생산하는 물질들에 의해서 이루어 지므로 화학합성 농약을 대체할 수 있는 유일한 대안이라 할 수 있다.

아. 본 연구과제에서는 고추, 수박, 오이등에 만연하고 있는 흰가루병 특이적인 ① *Bacillus* sp. CMB 26 균주의 특성을 규명하고, ② 농업현장에 적용할 수 있는 미생물 제재화를 기하고, ③ 식물병원균에 특이적인 lipopeptide의 분자 구조를 해석하고 그의 응용 가능성을 검토하고자 한다.

2. 경제·산업적 측면

가. 통상산업부의 통계에 따르면 생물산업 규모는 2000년 3조에서 매년 50%씩 고성장이 기대되고 있다.

나. 미국등 선진국에서는 생물산업에 대한 투자가 매년 급격히 증가하고 있다.

다. 특히 미국에서는 생물 방제를 위해 1990년에 연방 정부에 National Biological Control Institute(NBCI)를 설립하여 본격적인 투자와 연구가 시도되고 있음. 또한 몇몇 주에서는 주립대학과 연계하여 생물학적 방제에 대하여 활발한 연구와 현장 실험을 병행하고 있다.

라. 2000년 10월 현재 미국에서 식물 병원균의 생물학적 방제용으로 상용화 되고 있는 상품은 Kodiak등 42개 제품이 세균과 곰팡이 길항균들을 생균제나 또는 발효제품을 이용 제조하여 판매하고 있다.

마. 본 연구과제에서 연구대상으로 삼은 흰가루병(Powdery mildew)에 관한 농약 제품은 판매되지 않고 있었음. 본 과제에서는 저독성으로 생분해성이며 흰가루병에 탁월한 미생물 제재를 대량 생산하고자 한다.

3. 사회·문화적 측면

가. 세계 농약의 20%를 생물농약으로 대체하자는 “리우 환경회의 협약” 이후 세계적으로 화학 합성 농약 사용을 줄이려는 추세가 뚜렷하다.

나. 우리나라에서도 농산물의 잔류농약에 대한 검사가 강화되고 있으며, 소비자들 또한 무공해 농산물에 민감하게 대응하고 있어 저독성 생물 농약의 개발이 절실히 요구되고 있다.

다. 농산물의 국제 경쟁력 재고에도 생물 농약 대체는 크게 공헌 할 것으로 기대되며, 수출품뿐만 아니라 국내소비자 들에게 우량 농산물을 공급할 수 있어 국민 보건향상에 기여할 것이다

라. 독성이 강한 합성농약을 사용함에 따라 토양에 잔류 축적될 뿐만 아니라 농산물에 흡수 이행되므로 이를 섭취한 인간이나 동물에 축적되므로 이에 대한 피해가 크다.

마. 그러므로 농산물 생산 증대를 위해 농약이 필수적으로 필요하다. 때문에 무독성이며 생분해성인 식물 병원균 방제용 농약 개발이 절실히 요구되고 있다.

제 2 절 연구개발 목적과 범위

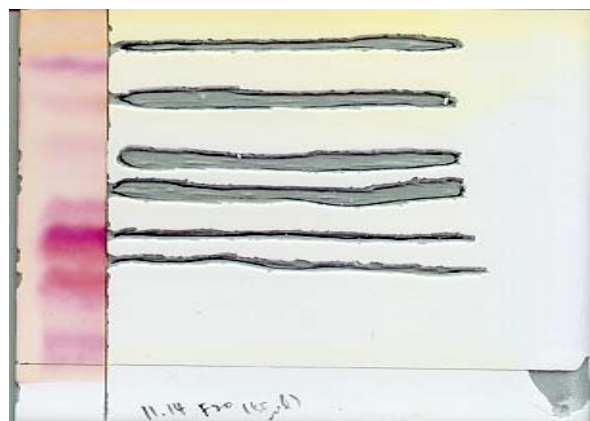
1. 연구개발 목적

본 연구팀은 오이 흰가루병에 가장 강력하고 토마토 역병(*Phytophthora infestans*), 사과 겹무늬 썩음병(*Botryosphaeria dothidea*), 오이 잿빛 곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 벼 문고병(*Rhizoctonia solani*)등에도 길항력을 갖는 균주로 CMB 26을 선발하였다. 그리하여 흰가루에 특이적인 미생물 CMB26의 특성을 규명하고, CMB26이 생산하는 lipopeptide에 의한 항균력을 시험해 보고 이 항균력을 가진 물질을 대량 생산할 수 있는 체계를 확립을 목표로 한다.

2. 연구개발 내용

오이 흰가루병에 가장 강력하고 토마토 역병(*Phytophthora infestans*), 사과 겹무늬 썩음병(*Botryosphaeria dothidea*), 오이 잿빛 곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 벼 문고병(*Rhizoctonia solani*)등에도 길항력을 갖는 균주로 CMB 26을 선발하였다. CMB 26을 Biolog 분석과 16s rRNA의 부분 염기 분석 결과 *Bacillus* sp임을 밝혔으며, 이를 *Bacillus* sp CMB 26으로 명명하였다.

Bacillus sp CMB 26 배양액은 가압멸균 후에도 항균성능이 확인되었고, 배양 상등액을 산으로 침지시킨 다음 MetOH로 추출, 6N HCl을 첨가 후 autocleave한 후 그리고 6N HCl로 처리한 다음 n-hexane으로 추출하여 농축시킨 다음 TLC를 행하였을 때 6개의 band가 UV 조사나 Ninhydrin 반응에 의해서 검출되었다(그림 2)



왼쪽 ; 0.2% ninhydrin, 오른쪽 ; UV
그림 1 CMB 26 배양액 추출물의 TLC

이상의 결과로부터 본인들은 *Bacillus* sp CMB26이 생산하는 항진균성 물질은 lipopeptides일 것으로 추론하고 있다.

이에 따라 다음과 같은 연구를 수행하고자 한다.

가. 흰가루병에 특이적 미생물 CMB26 의 특성 규명

- 1) 16s rRNA full length sequencing에 의한 균주 동정
- 2) Biolog, Bergy's manual에 의한 균주 동정
- 3) 흰가루병 방제 우수균주 screening
- 4) lipopeptides 생성능 우수 mutant의 특성 규명

나. CMB26이 생산하는 lipopeptides의 구조 분석

- 1) acid precipitation, Methanol 추출, HPLC에 의한 순수 분리
- 2) lipopeptides의 구조분석 ; GC, NMR, IR, MALDI-TOF에 의한 구조분석
- 3) lipopeptides의 amino acid sequence 결정
- 4) lipopeptides의 fatty acid 종류 결정
- 5) 변형 lipopeptides의 제조, 구조결정, 특성 규명

다. lipopeptides의 항균력 시험

- 1) *Bacillus* sp CMB 26은 예비 실험 결과 적어도 3종류 이상의 항균물질을 생성하는 것으로 조사되어져 이들 물질의 순수 분리 및 항균성 조사
- 2) 항균 활성 검색

라. lipopeptide 대량생산체계 확립

- 1) 최적 발효조건 확립 ; 탄소원, 질소원, pH, 온도 등
- 2) Jar fermentation에 의한 pilot 생산
- 3) 미생물 제재를 위한 최적 물질 screening

- 4) 미생물 제제의 완성
- 5) 포장실험에 대한 미생물 제제의 효능 검색
- 6) 미생물 제제 처리에 의한 병발생율 조사

마. 미생물 제제의 현장 실험

- 1) 미생물 제제 대상 물질 검색 및 효능 분석
- 2) 미생물 제제의 생존 기간 조사
- 3) 미생물 제제 처리에 의한 병 발병율 조사
- 4) 현장 적용에 의한 효과 검증

제 2 장 국내외 기술개발 현황

* 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

○ 2000년 10월 현재 미국의 경우 생물 농약으로 옥수수, 토마토, 고추 등에 발생하는 *Pythium ultimum*(모잘록병), *Rhizoctonia solani*(문고병), *Fusarium oxysporum*(시들음병), *Phytophthora capsici*(역병), *Sclerotium rolfsii*(균핵병) 등등의 병원균 방제에 생균제와 단백질 제제등 42개 제품이 출하되어 이용되고 있다.

○ 국내의 동부한농에서는 무독성의 AC-1과 Biobact를 개발 이용 직전에 있다.

○ 미국, 일본, EU 등 많은 나라에서 생물 농약을 개발하고 있으나, 특정 병원균에 대해서만 방제능이 있어 다양하고 특이적인 병의 방제 효과에 많은 문제점을 가지고 있다.

○ 특히 *Pseudomonas*속과 같은 Gram(-) 세균은 발효 후 균체나 제품을 냉장 또는 냉동 보관해야 하는 등 제품 보관, 관리에 비용이 많이 든다.

○ 본 연구팀이 예비 실험하여 얻은 *Bacillus* sp. CMB 26 균주와 발효액 및 유기용매 추출물은 여러 병원성 곰팡이에 대해서 길항력이 있고, 특히 흰가루병에 특이적인 길항력을 갖고 있음이 밝혀졌으나, 이 균주에 대한 특성과 발효 최적 조건, 길항력을 갖는 물질의 모체, 유전자 발현 조절 기작등이 밝혀져 있지 않으므로 대량 생산을 하기 위하여는 이에 대한 기술 연구가 수행되어야 함.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. CMB 26의 균주 특성

1. 균주의 분리

전라남도일대에서 수집한 토양중에서 150여종의 미생물을 LB agar plate(yeast extract 0.5%, tryptone 1%, NaCl 1%, agar 1.5%)에서 분리한 후 분리된 미생물중 항곰팡이능을 갖는 균주중 우수한 길항력을 갖는 11종을 2차 선별하고 CMB 05, CMB 06, CMB 07, CMB 26, Anti 1, Anti 4, L 1, L 4, Ca 1, Ca 2, CMB 32라 명명하였다.

2차 선별된 11종의 균주들중 흰가루병에 탁월한 길항력을 나타내는 균주를 선별하기 위하여 전남대학교 농과대학 실험 온실에서 실험을 수행하였다. 흰가루병은 자연발생시켜 2차 선별된 11종의 균을 LB medium에 배양하여 1회 옆면 시비 후 흰가루병의 발병 진행 상태를 확인하였다. 대조구(positive control)로 시중에서 판매되고 있는 흰가루병 방제약제인 더마니를 사용하였다. 실험 결과 11균중 CMB 26이 다른 균에 비하여 방제 기능이 탁월하였으며, CMB26균주 배양액은 화학합성 농약인 더마니에 비해서도 4배나 흰가루병(powdery mildew)방제에 효과가 우수함이 확인되었다 (표1, 그림. 1,2).

즉, 배양액을 처리 하지 않은 대조구에서는 흰가루병이 만연되었으나 처리구에서는 24시간 후부터 발병이 감소하기 시작하였고 72시간 이후에는 완전히 치료되었었고 더 이상 흰가루병의 발병이 확산되지 않았다.

Table 1. Antifungal activity of isolated bacteria from soil on cucumber leaves of Powdery mildew *Sphaerotheca fuliginea*

옆번호 처리구	After 5 days																				발병도		
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		전	후	증감 (후-전)
	전	후	전	후	전	후	전	후	전	후	전	후	전	후	전	후	전	후					
Negative Control	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	3	4	2	4	2	3	85	97.5	12.5
Positive Control (더마니)	4	3	4	1	4	2	4	4	4	3	4	4	3	3	3	4	2	3	2	2	85	72.5	-12.5
CMB 05	4	1	4	2	4	2	4	2	4	2	3	4	3	2	3	2	2	3	2	1	82.5	52.5	-30
CMB 06	4	1	4	3	4	2	4	4	4	4	4	4	3	2	3	2	2	1	2	2	85	62.5	-22.5
CMB 07	4	1	4	4	4	2	4	3	4	3	4	3	3	2	3	2	2	2	2	1	85	57.5	-27.5
CMB 26	4	0	4	0	4	1	4	1	4	1	4	0	3	2	3	3	2	2	1	1	82.5	27.5	-55
Anti 1	4	3	4	4	4	4	4	4	4	3	4	3	3	2	3	3	2	1	2	2	85	72.5	-12.5
Anti 4	4	3	4	4	4	4	4	3	4	3	3	4	3	4	3	4	2	1	2	2	82.5	80	-2.5
L 1	4	0	4	2	4	3	4	3	4	2	4	2	3	2	3	2	2	1	2	1	85	45	-40
L 4	4	1	4	1	4	2	4	2	4	2	4	3	3	3	3	4	2	4	2	2	85	60	-25
Ca 1	4	3	4	3	4	3	4	4	4	2	4	3	3	3	3	2	2	2	2	2	85	67.5	-17.5
Ca 2	4	2	4	2	4	1	4	4	4	2	4	2	3	3	3	3	2	3	2	3	85	62.5	-22.5
CMB 32	4	0	4	1	4	2	4	3	4	2	4	2	3	2	3	2	2	1	2	1	85	40	-45



Fig 2. Antifungal activity of CMB 26 against superinfection on cucumber leaves of powdery mildew *Sphaerotheca fuliginea* (left side ; no treatment, 24hrs after treatment, 72hrs after treatment)

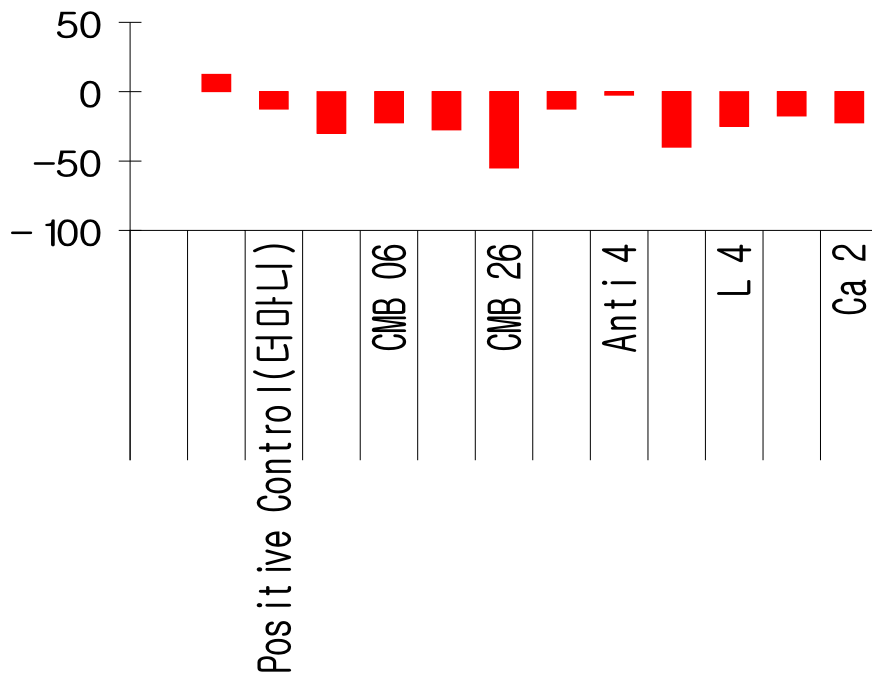


Fig 3. Disease progress by *Sphaerotheca fuliginea* after treatment

2. CMB 26 균주의 형태적 관찰

순수 분리한 *Bacillus sp.* CMB 26 균주를 LB medium에 배양하여, SAM(Scanning Electron Microscope ; JSM 5410LV)을 이용하여 형태를 관찰하였다.

SAM 전자 현미경 관찰 결과 간균형태의 bacilli form을 확인 할 수 있었다. 또한 여러 개의 편모가 존재하는 것을 TEM(Transmission Electron Microscope)으로 확인 할수 있었다(그림3A, 3B).

이들 1차 선별된 11종의 균주들중에 최종 선별된 CMB 26을 흰가루병이 발병된 오이에 옆면 시비하였을 때 처리 하루만에 흰가루병의 병징이 사라지기 시작했고, 6일째되는 날에는 완전히 흰가루 곰팡이가 사라지는 것을 확인하였다. 이로서 CMB26균주는 흰가루병에 특이적인 길항력을 균주로 확정 이후 연구에 주요 균주로 사용하기로 하였다.

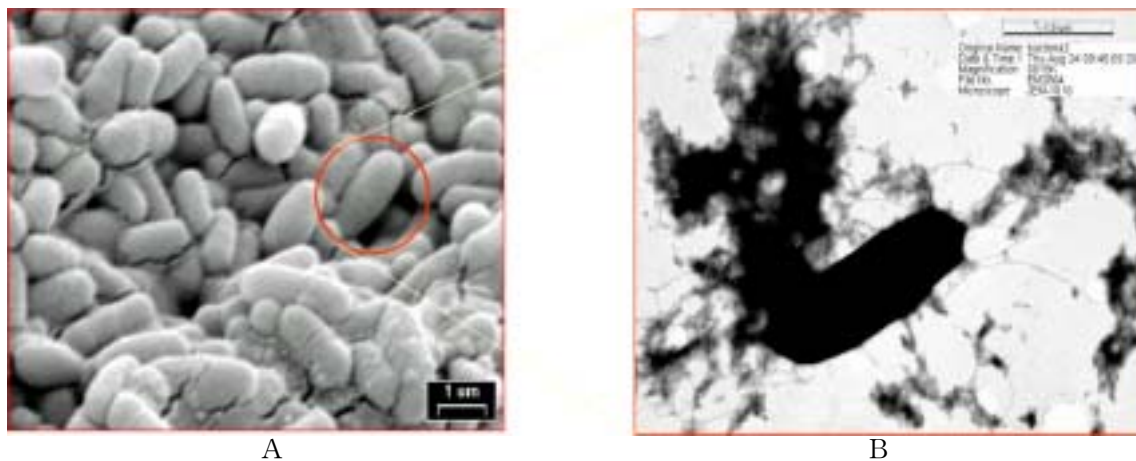


Fig. 3. Shape of CMB26 astrain using SAM(Scanning Electron Microscope) and TEM(Transmission Electron Microscope)
(A: SEM, B: TEM)

3. 균주의 동정

가. 16s rRNA 염기서열 분석

흰가루병에 탁월하게 길항력을 갖는 균주 CMB 26을 동정하기 위하여 Biolg 분석을 시행하였으나 실험상 조건에 따라 일정한 결과를 나타내지 못하였으므로 본 연구에서는 16s rRNA의 염기서열 분석을 통하여 동정을 수행 하고자 하였다. Genomic DNA 추출은 phenol 추출법을 이용하였다. 추출된 genomic DNA를 template로 하여 다음과 같이 PCR을 수행하였다. 4쌍의 primer(표 2)를 가지고 PCR을 수행(94℃ 10분 → (94℃ 30초→59℃ 30초 →72℃ 30초 : 30cycle) → 72℃ 7분 → 4℃ ∞)한 후, 전기영동을 통하여 증폭된 DNA band를 확인 다음 T-easy vecter에 ligation(Promega Co.)하여 대장균에 도입하여 증식시킨 후, 플라스미드 DNA를 추출하고 전기영동을 통하여 원하는 밴드의 크기를 확인한 후 염기서열을 분석하였다. 염기 서열 분석은 전남대학교 기초과학지원 센터 광주 분소에 의뢰하였다. 16s rRNA 유전자의 염기서열 분석결과 1533개로 구성되었음을 확인하였다. 이 자료를 미국 국립보건원의 NCBI에서 운영하는 Blast program에서 분석한 결과 16s rRNA 염기의 1번~320번 nucleotide까지는 *Bacillus subtilis*와 99.8% homology를 보였고 321~1510번 까지의 염기서열은 *Bacillus cereus*와 99.7%, *B. thuringiensis*와는 99.7%, *B. anthracis*와는 97.5%의상동성을 보였다. 이 결과를 NCBI 유전자 은행에 등록하였다(NCBI GenBank 등록 : 등록번호 AY048851http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list_uids=15822789&dopt=GenBank). CMB 26균주의 16S rRNA gene의 염기서열의 상동성을 비교한 결과는 *B. subtilis*와는 95~97%, *B. cereus family group*에 속해있는 *B. anthracis*, *B. thuriengiensis*, *B. cereus*균주들과는 97%의 상동성을 보여 지금까지 밝혀진 어느 균주로도 분류가 되지 않는 신종 *Bacillus* 속균으로 생각되어 CMB26 라이보솜 유전자(rRNA genes)인 16s rRNA, 23s rRNA, 5s rRNA 및 이들 유전자들의 사이에 존재하는 2개의 intergenic transcribed region의 전체 전체 염기서열을 분석하고자하였다.

Table 2. Designed primer sequences for CMB26 16s rRNA sequencing

구 분	염 기
Primer 1	5' - TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC
	5' - CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
Primer 2	5' - GGCCCAGACTCCTACGGGAGG
	5' - CAGTTACAGACCAGAGAGTCG
Primer 3	5' - GGAACACCAGTGGCGAAGGCG
	5' - CGTCATCCCCACCTTCCTCCG
Primer 4	5' - GTGACTGCCGGTGACAAACCG
	5' - CGCACCTTCCGATACGGCTAC

나. CMB26 균주의 Ribosomal RNA 유전자의 전체 염기 서열 분석

식물 병원균인 곰팡이 및 흰가루병에 탁월하게 방제능을 갖는 균주를 분리하여 CMB 26 이라 명명하고, 이를 동정하기 위하여 16s rRNA의 전체 염기서열 분석을 통하여 동정을 하였다. 그러나 16s rRNA 염기 서열의 분석만으로는 이 균주의 정확한 동정이 어려운 점을 감안하여 전체 Ribosomal RNA의 염기 서열을 분석하였다.

CMB26의 full genome에서 rRNA부분에 해당하는 부위를 500개 nucleotide 단위가 되게 PCR로 증폭을 한 다음 T-easy vector 에 클로닝 한 후 sequencing 한 결과, CMB26의 전체 rRNA 유전자들의 염기는 4817로 이루어 졌음을 확인하였다(16s의 앞부분 일부와 5s의 뒷부분 일부는 sequencing 되지 않았다). 그중 1-1533은 16s rRNA, 1825- 4656은 23s rRNA 이고, 4728-4817은 5s rRNA이었고 이들 사이의 intergenic region의 염기서열 일부는 tRNA 로 이루어 졌음을 확인하였다. 이들을 NCBI의 BLAST program에서 비교 분석해본 결과 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168* complete genome 서열의 16s rRNA와는 99%, 23s rRNA는 98%에서 99%, 그리고 5s rRNA는 100%의 identity를 나타냈다. 그러나 intergenic region의 염기서열의 상동성은 *Bacillus amyloliquefaciens* 에 비해서 상동성이 낮았다. 16srRNA와 23s rRNA 사이의 intergenic rRNA염기서열 상동성은 *Bacillus amylo-liquefaciens*와 98%동일하고, 23s와 5s rRNA 사이의 intergeinc sequence는 딱히 어느 종의 어느 부분과 동일하다고 할 수 없기 때문에 CMB26은 지금까지 밝혀지지 않은 새로운 *Bacillus* 종이라 할 수 있다(그림 3,4).

다. *Bacillus sp.* CMB 26 변이주 선발

본 연구팀은 wild type의 CMB 26이 생산하는 lipopeptide의 양으로는 경제성이 맞지 않는다고 사료되어 항균물질 대량 생산을 위한 변이주를 만들기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 돌연변이원(mutagen)으로는 EtBr과 UV를 사용하였다.

항균물질 대량 생산을 위한 변이주 선별 mark로는 5-methyltryptophan과 5-fluoro tryptophan, B-thienylalanine과 같은 방향족 아미노산 구조 유사체(structural analog)를 사용하였다. 이는 다음장에서 밝혀질 lipopeptide의 구조 성분중 밝혀질 peptide의 성분중 타이로신(tyrosine)이 존재한다는 것과, 최소 배지중 phenilalanine 첨가시 항균물질이 대량 생산한다는 사실에 근거한것이다. 아미노산 아날로그 저항성 변이주들은 야생균주에 비하여 생산량이 50% 향상되었다.

미생물 제제는 통상 유통과정중 액체상태로 유통하게되고 배양액을 담은 용기가 멸균되지 않으면 시간이 경과함에 따라서 길항력이 현저히 떨어지게된다. 그러므로 본 연구에서는 가장 값싸게 오염을 예방 할 수 있는 방법으로 목초액을 첨가하는 것이 현실적으로 경제적인 방법임을 알 수 있었다. 이러한 근거를 바탕으로 목초액 첨가에 따른 오염 정도를 조사한 결과 1.5%의 목초액이 오염방지를 위하여 적정 농도임을 알수 있었다. 이에따라 잡균의 오염 방지를 위하여 1.8%의 목초액이 첨가되어도 생존 가능한 저항성 변이주를 선발하였다

제 2 절 항균물질 생산 발효 최적 조건 확립

1. 항균 물질 생산 발효 최적 조건 확립

미생물제제를 생물학적 방제제로 사용하기 위해서는 두 가지 점을 고려하여야한다. 첫째는 총 균수로 배양액 중 영양 성장균이나 포자형태의 생존 균수이다. 생존 균수가 많을수록 방제효과가 탁월하다. 둘째는 배양액중의 항균물질의 농도이다. 즉, 농도가 높을수록 병균을 사멸시키는 효율이 높다. 이 둘을 종합하여 정리하면 배양액 중 생균수가 많고(10⁹), 항균물질의 농도가 높아야만 항균효과가 뛰어나다. 그러나 위의 두 가정은 서로 역설적인 상관관계를 내포하고있다. 즉, 배양중 초기에는 균수가 증가하여 대수기에 이르게 될 때 항균 물질은 생성되기 시작하게 된다. 항균 물질은 곰팡이를 죽게할 뿐만아니라 어느 일정 농도이상으로 세포내에 축적되면 생산균주 자체도 항균 물질에 의해 해를 입게되는 독성 물질로 작용하게되므로 이를 간과해서는 않된다. 그러므로 이러한 상황을 고려하여 발효 최적조건을 확립하지 않으면 않된다.

가. 탄소원

미생물 제제 생산 체계 구축을 위하여 *Bacillus sp.* CMB 26의 최적 발효 조건을 확립하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 기본으로 M9 salt를 이용하여 단일 탄소원을 일정량(0.4%) 배지에 첨가한 후 미생물의 생육 정도를 확인하였다. 실험결과 sobitol, maltose, glycine, sucrose보다 glucose를 탄소원으로 더 잘 이용하는 것이 관찰되었다(표 4).

Table 4. Effect of temperature and carbon source on *Bacillus sp.* CMB26's growth

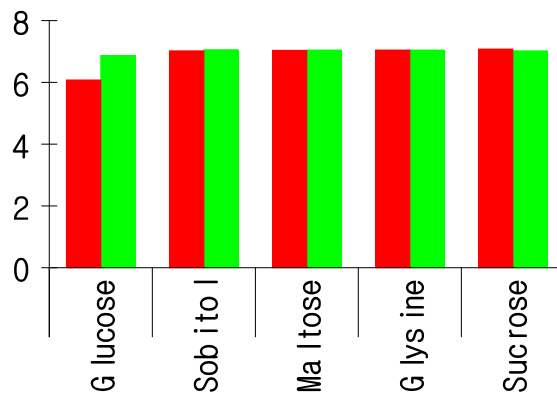
구분	온도	Glucose	Sobitol	Maltose	Glycine	Sucrose
OD ₆₀₀	37℃	1.5667	0.4487	0.3881	0.2461	0.4756
	28℃	1.1282	0.2987	0.2657	0.3472	0.2694

나. 온도 및 pH

위의 실험을 통하여 *Bacillus sp.* CMB 26의 발효에 최적인 탄소원은 glucose임이 확인되었다. 즉, M9 salt에 glucose를 0.4%로 첨가한 후 각각 28°C와 37°C에서 배양(120rpm)시켜 *Bacillus sp.* CMB 26의 생장을 확인한 결과 37°C에서 배양한 것의 생육이 28°C에서 배양한 것보다 뛰어남을 확인하였다. 5일 동안 37°C에서 배양하는 동안 pH 변화를 관찰하였다. pH는 6.8에서 7.0 정도로 거의 변화가 없음을 관찰되었다(표 5).

Table 5. Effect of temperature and carbon source on change of pH

구분	온도	Glucose	Sorbitol	Maltose	Glycine	Sucrose
pH (72시간 후)	37°C	6.08	7.02	7.04	7.05	7.08
	28°C	6.87	7.06	7.05	7.05	7.02



다. 질소원

위의 실험에서 100ml씩을 취해 일련의 과정을 거쳐 lipopeptide를 추출한 후 TLC를 이용하여 생산되는 lipopeptide의 양을 확인하였다(그림 6). 실험결과 M9 medium에 기본으로 들어가는 ammonium sulfate가 다른 질소원을 첨가한 배지에서 배양한 배양액 보다 항균물질인 lipopeptide의 생산량이 현저하게 더 많음이 확인되었다.

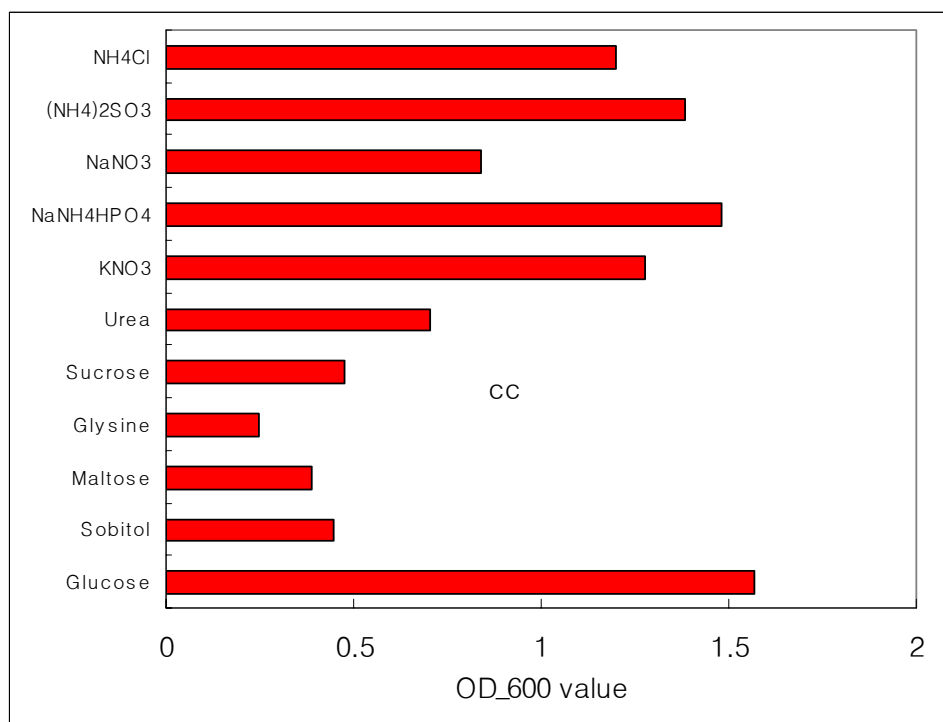


Fig. 6. Effect of nitrogen and carbon source on *Bacillus sp.* CMB26's growth

라. 공기량

Jar Fermentation의 기본 조건을 확립하기 위하여 *Bacillus* sp. CMB 26의 성장에 aeration이 미치는 영향을 확인하고자 다음과 같은 실험을 수행하였다. 500ml 삼각 flask에 M9 medium을 각각 50ml, 100ml, 200ml, 300ml, 400ml씩 채운후 전날 LB medium에 배양한 종배양액을 1/100으로 하여 접종한 후 37°C shaking incubator에서 150rpm으로 배양시킨후 그 생육 정도를 spectrophotometer를 이용하여 확인하였다(그림 7). 실험결과 aeration이 원활하게 이루어지는 조건에서 생육이 더 활발함을 확인 할 수 있었다.

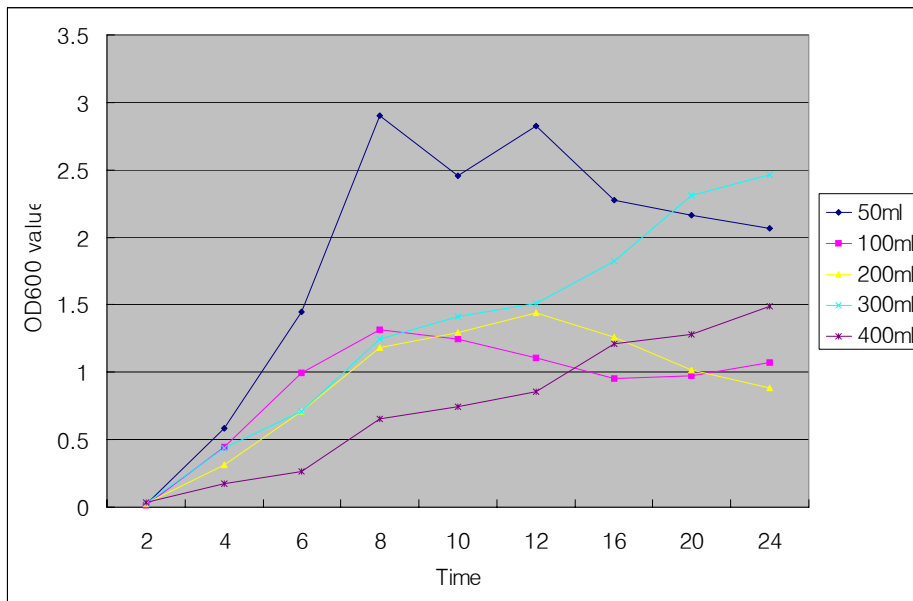


Fig 7. Effect of aeration on *Bacillus* sp. CMB26's growth

마. CMB26균주의 배양기간에 따른 항균물질의 생성

CMB26균주는 M9최소 배지에서 배양 12시간부터 대수기가 시작되어 48시간에 정지기에 이르렀으며 항균물질은 20시간부터 생성되기 시작하여 84시간째에 최고에 이르렀다(그림 8). 미생물수가 감소함에 따라 항균물질의 생성량도 감소함을 보여주었다. 이러한 원인은 항균물질이 CMB26 균주에도 독성을 나타내기 때문인것으로 생각된다.

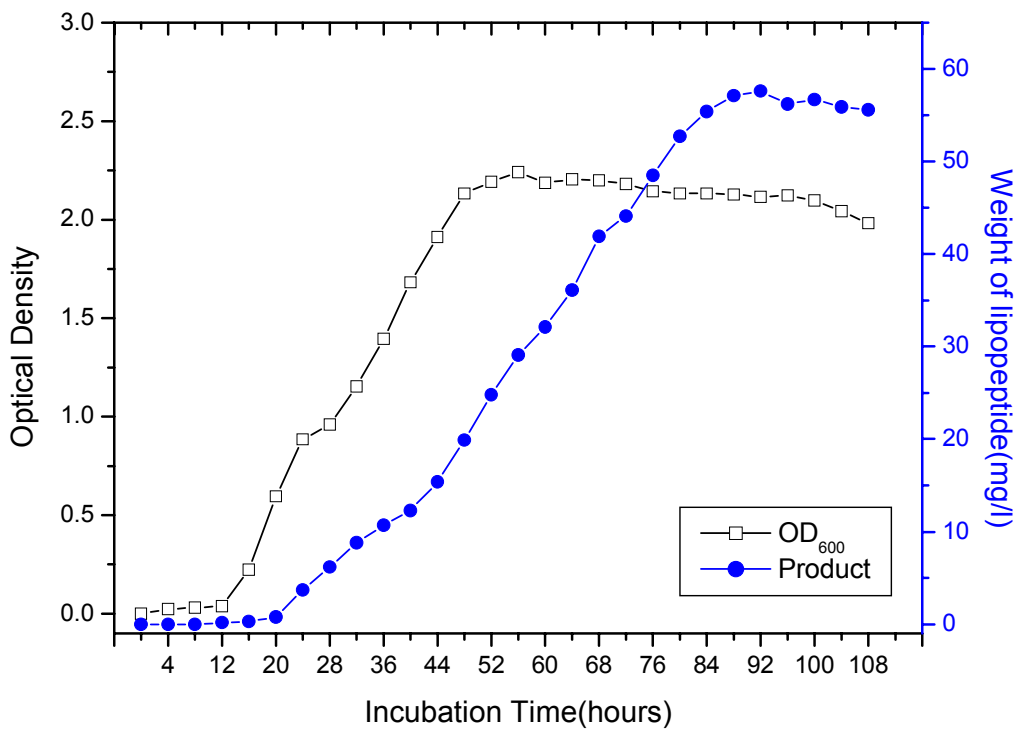


Fig. 8. The relation between the cell density of *Bacillus* sp. CMB 26 and the concentration of the lipopeptide.

2. 미생물 제재의 최적 생산 체계 구축

가. Jar fermentation에 의한 발효최적 조건 확립

미생물 제재 생산 체계 구축을 위하여 *Bacillus sp.* CMB 26의 최적 발효 조건을 확립하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 예비 실험결과를 토대로 탄소원은 glucose를 질소원으로는 $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ 을 이용하여 5l jar fermentation을 이용하여 발효의 최적 조건을 확립하였다. 배양은 37°C에서 수행하였다. 또한 그 외의 다른 factor에 영향을 확인하기 위하여 배지내 첨가되는 칼슘의 농도를 조정해보았다. 실험결과 칼슘의 농도가 낮을수록 생산되는 lipopeptide의 양이 증가함을 확인할 수 있었다(그림9). 결론적으로 lipopeptide의 생산에 최적 배지 조건은 0.4%의 glucose와 $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ 및 5mM CaCl_2 의 농도임을 확인하였다.

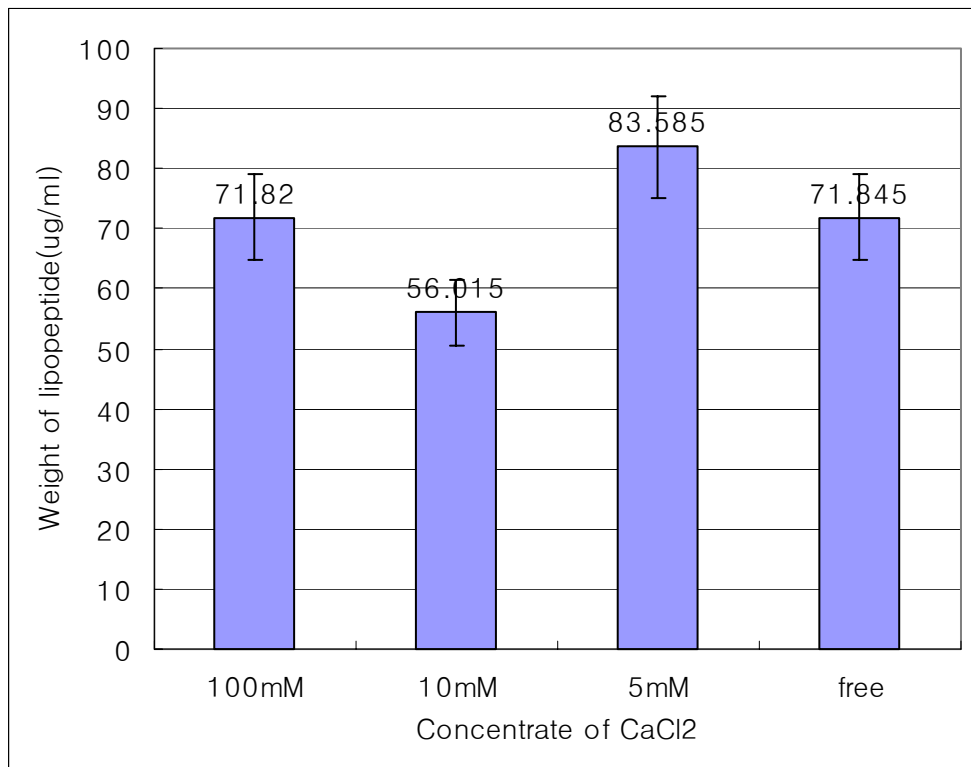


Fig. 9. Effect that concentrate of CaCl_2 goes mad to a production of lipopeptides

실험결과, Jar fermentation을 이용하여 발효시킬 때 일반적인 플라스크 배양법에 비해 세포수는 2배정도, 생산되는 lipopeptide의 양은 1.7배 정도 증가함을 확인할 수 있었다(표 6)). 본 연구팀은 이외에도 초기접종량을 달리하면서 배양하는 실험을 수행하였으며(그림 8), 또한 glucose feeding 실험을 수행하였으나, 대조군보다 생산량이 증가하지는 않았다.

Table 6 Cell OD value and weight of produced lipopeptide.

	OD value	생산되는 lipopeptide 양
플라스크	1.2	4.9mg/100ml
Jar fermentor	2.1	8.2mg/100ml

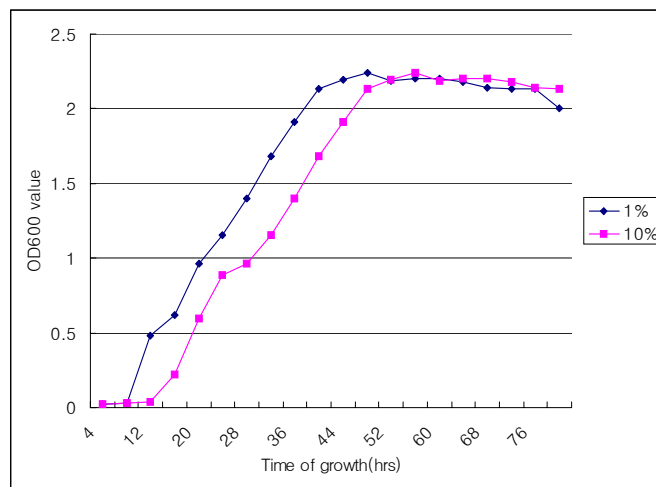


Fig. 8 According to inoculation volume growth rate of CMB 26

대량생산을 하여 산업화에 이용하기 위하여는 경제성 문제를 고려하지 않을수가 없다. 결론적으로, 본 실험에서 M9을 이용한 부분은 가장 값싼 재료로 최대의 효과를 얻기 위함이다. 다른 문헌 자료를 토대로 확인하여 본 결과, 대부분 완전배지를 이용하여 생산량을 증가시켰는데, 이는 원재료 가격의 상승을 초래하여, 최종 산물의 가격인상을 유도하게되어 산업화에 적절하지 못하다고 사료된다.

3. 항진균물질 유도 물질 탐색

발표된 연구 논문을 통하여 아미노산이 항진균물질의 생산을 촉진시켜준다는 근거에 의해 본 연구팀은 각각의 아미노산을 M9 salt+glucose(0.4%)에 첨가 후 멸균하여 종배양액을 20 μ l 접종하여 37°C에서 진탕하면서 72시간 배양하여 각각의 배양액을 6,000rpm으로 20분간 원심분리 후 pore size 0.45 μ m 시린지 filter을 이용하여 filtration 한 후 PDA에 각각의 배양액이 10%가 되게 첨가하여 plating하여 고추 탄저병균인 *Collectotrichum gloeosporioides*를 이식한 후 28°C에서 곰팡이의 성장환의 크기를 측정하여 항곰팡이능을 확인하였다. 20가지의 아미노산중에 페닐알라닌을 첨가해준 실험구에서 다른 실험구에서보다 항곰팡이능이 뛰어난 것을 관찰할 수 있었다(그림 10, 표7). 따라서 본 연구팀은 lipopeptide 생산이 페닐알라닌에 의해 촉진됨을 확인하였다. 또한 lipopeptide의 생산량이 최대가 되는 페닐알라닌의 적정 농도를 확인하고자 하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. M9 기본배지에 탄소원으로 glucose를 기본으로 하여 페닐알라닌을 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 15 μ g/ml, 20 μ g/ml, 30 μ g/ml 그리고 최대로 500 μ g/ml을 각각 첨가하여 5일동안 37°C에서 배양한 후 일련의 과정을 통하여 lipopeptide를 정제한후 TLC를 통하여 lipopeptide의 농도를 확인 하였다. 실험결과 페닐알라닌을 30 μ g/ml 첨가해주었을 때 생산되는 lipopeptide의 양이 최대가 됨을 확인하였다(그림 11).

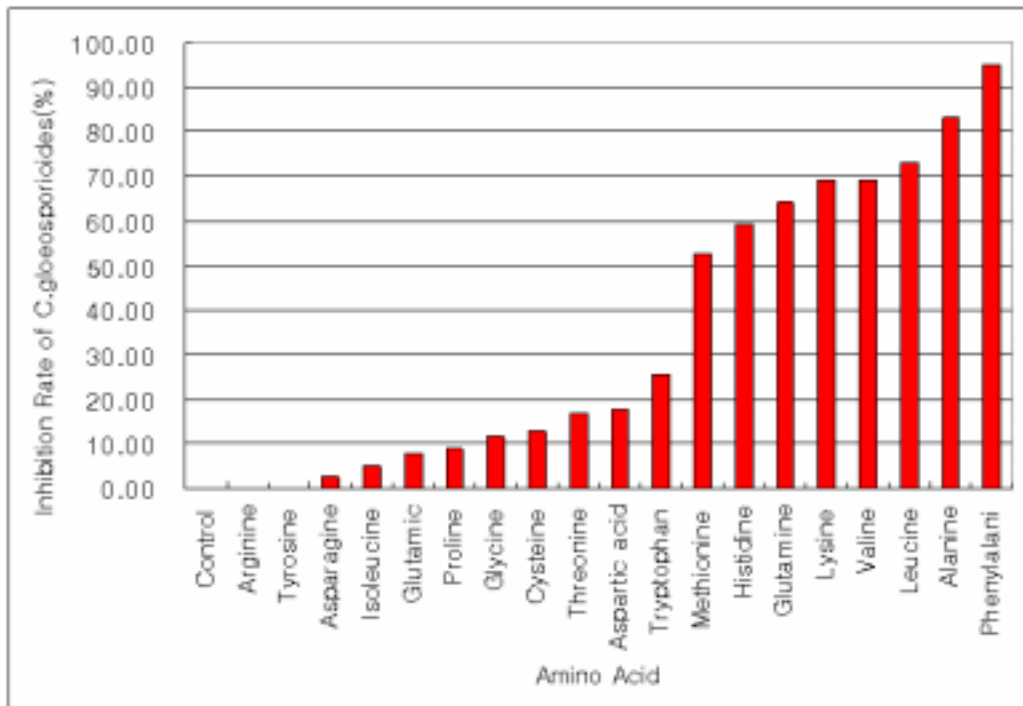
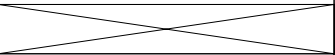


Figure 10. Antifungal effects of CMB26 against *C. gloeosporioides* on the M9 minimal medium containing amino acid

Table 7. Antifungal effects of CMB26 against *C. gloeosporioides* by added culture with each amino acid

Amido Acid		Antagonism on <i>C.g</i> (단위:mm)	비 고
Alanine	A	13	
Arginine	R	78	
Asparagine	N	76	
Aspartic acid	D	64	
Cysteine	C	68	
Glutamic acid	E	72	
Glutamine	Q	28	
Glycine	G	69	
Histidine	H	32	
Isoleucine	I	74	
Leucine	L	21	
Lysine	K	24	
Methionine	M	37	
Phenylalanine	F	4	
Proline	P	71	
Serine	S		무첨가
Threonine	T	65	
Tryptophan	W	58	
Tyrosine	Y	80	
Valine	V	24	
Glucose		73	
MeOH		74	
Control		78	
비 고		180hrs	

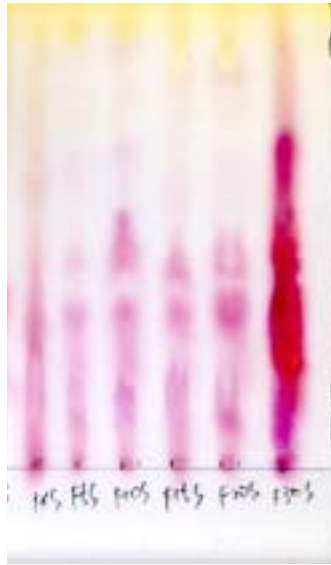


Fig. 11. TLC of lipopeptide by various concentrations of phenylalanine
(left side ; control, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 15 μ g/ml, 20 μ g/ml, 30 μ g/ml)

제 3 절 항진균 물질의 구조 분석

1. 항진균 물질의 구조 분석

가. 순수 분리 정제

본 연구에서는 TLC 분석하였을 때 발색제로 Ninhydrin을 사용하였을 때 노란색의 반응이 일어났고 황산으로 발색 시켰을 때 흑색의 반응이 나타나 peptide와 지방산이 함께 존재하는 것으로 lipopeptide 로 추론 할수 있었다. *Bacillus sp.* CMB 26이 생산하는 항균물질을 순수 분리하기 위하여 먼저 LB medium을 이용하여 37℃에서 overnight 배양한 종배양액을 modified M9 medium에 1/1000 접종하여 37℃에서 5일간 배양하였다. 배양후 원심분리기를 이용하여 cell을 제거한 후 남은 여액을 가지고 다음 실험을 수행하였다. 먼저 여러 가지 유기용매를 이용하여 용매추출법에 의한 추출을 시도하였다. 또한 HCl을 이용하여 acid precipitation를 이용하여 lipopeptide를 순수 분리하고자 하였다. 실험 결과 lipopeptide의 순수 분리는 acid precipitation가 가장 효율적임을 확인할 수 있었다. 이렇게 얻어진 추출물을 TLC 및 HPLC를 통하여 lipopeptide를 순수 분리 정제 하였다. 이상의 정제 과정을 그림 12에 나타냈다.

Culture *Bacillus* sp. CMB 26 Modified M9 broth at 37°C
for 4days with shaking 120 rpm

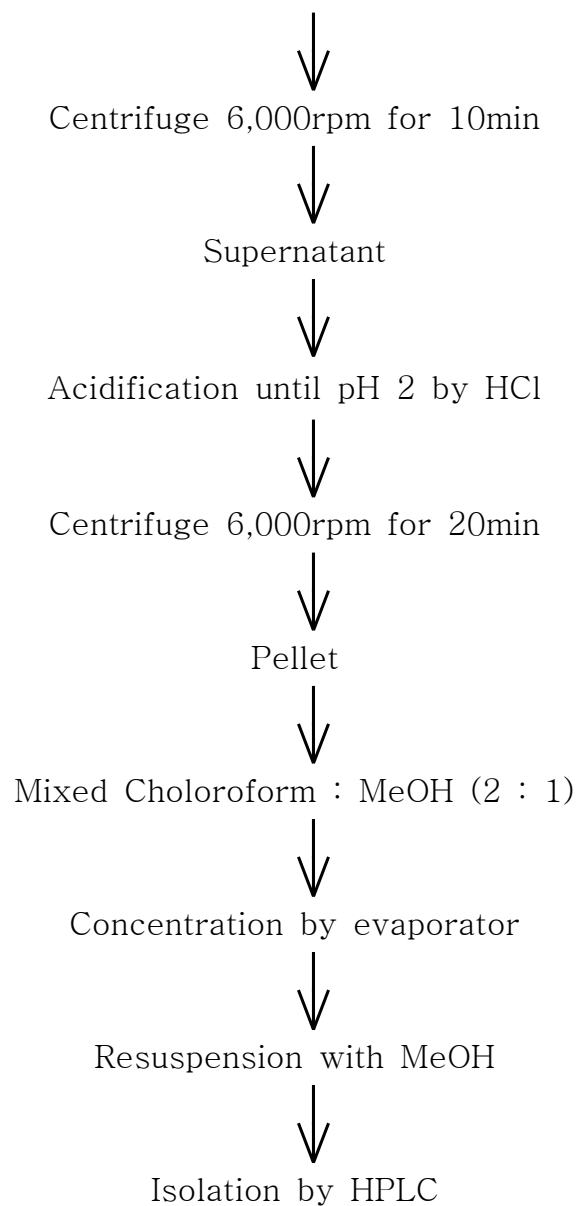


Fig. 12. Process for Extration and purification of antibiotic compound which
produced by *Bacillus* sp. CMB 26.

나. 항균성 검색

Crude extract를 TLC를 올려본 결과 5개의 band를 관찰되었다. 각각의 band를 다시 농축하여 항곰팡이능을 측정해본 결과 2번째 band에서 항균 활성이 관찰 되었다(그림 13). 또한 HPLC 결과 broad한 peak 패턴을 확인할 수 있었다. 그래서 본 연구팀은 HPLC에서 2'30"부터 25'30"까지 30초 간격으로 fraction을 받아 농축한 후 곰팡이에 대한 항균력(test균 : *C. gloeosporioides* 외 8종)을 확인한 결과, retention time이 14분(fraction No. 22)일 때 받은 sample이 가장 항균력이 높은 것을 확인할 수 있었다(표 8). 따라서 계속해서 분획을 받은 후 농축하여 TLC로 순도를 확인(그림 14)하였다. 이상의 결과로 TLC 3번째 band와 HPLC fraction No. 22번(peak no 3) 을 확인할 수 있었고, HPLC를 이용하여 fraction을 받은 후 농축하여 다음의 구조 분석을 수행하였다.

그림 15의 peak no3 분획의 항균활성이 가장 높았으므로 본 연구의 항균물질 분석재료로 사용하였다(그림 14,15,16).

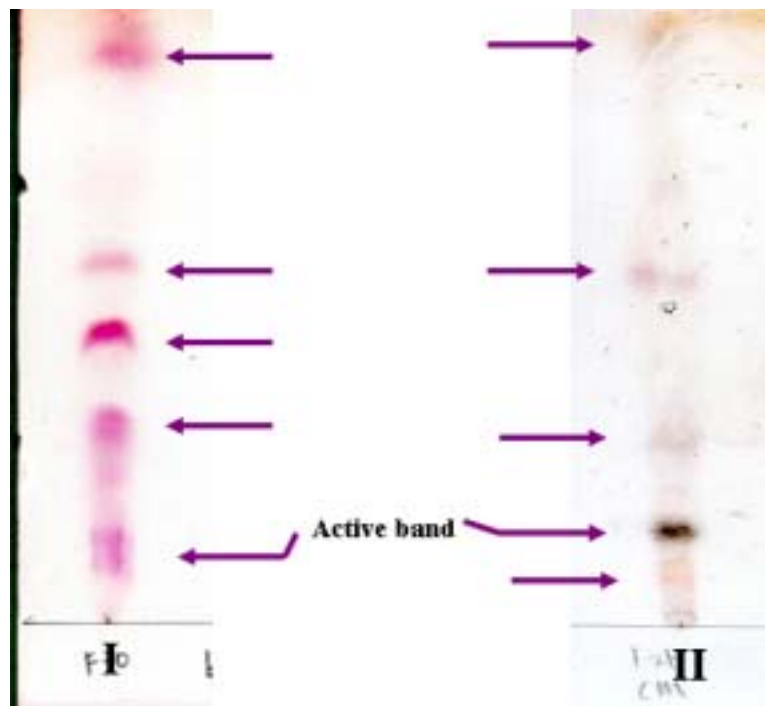


Fig. 13. TLC Profile of 1st extract from Bacillus sp. CMB 26 culture broth

Lane I : Staining with 0.2% nihydriin

Lane II : Staining with 30% H₂SO₄

Table 8. Antifungal activity of each HPLC fraction against various plant pathogens

Target Organism Fraction No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Botryosphaeria dothidea</i>															
<i>Mycosphaerella melonis</i>															
<i>Collectotrichum gloeosporioides</i>								1	2	1	1				
<i>Fusarium oxysporum</i>								1	1	1					
KACC 40802 <i>C.coccodes</i>															1
KACC 40014 <i>C.dematium</i>															
KACC 40689 <i>C.gloeosporioides</i>						1						1	1	1	1
KACC 40700 <i>C.acutatum</i>						1									1
<i>E.coli</i> XL1-blue			1	1	1	1						2			3
Target Organism Fraction No.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	1				1	3	2	1							
<i>Mycosphaerella melonis</i>				1	2	4	5	3	3	2					
<i>Collectotrichum gloeosporioides</i>				3	3	4	4	3	2	1	1	1	1	1	1
<i>Fusarium oxysporum</i>					1	3	2	1	1	1	1	1			
KACC 40802 <i>C.coccodes</i>				2	3	4	5	2	2	2	2	1	1	1	1
KACC 40014 <i>C.dematium</i>				1	2	3	2	1	1	1	1	1	1		
KACC 40689 <i>C.gloeosporioides</i>	1			1	2	3	2	1	1	1	1	1	1	1	
KACC 40700 <i>C.acutatum</i>					1	3	3	2	1	1	1	1	1		1
<i>E.coli</i> XL1-blue				1	1						2	2	4	3	3
Target Organism Fraction No.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	1	1	1								1				
<i>Mycosphaerella melonis</i>											1				
<i>Collectotrichum gloeosporioides</i>	1	1	1												
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	1													
KACC 40802 <i>C.coccodes</i>	1											1			
KACC 40014 <i>C.dematium</i>												1			
KACC 40689 <i>C.gloeosporioides</i>				1	1	1					1				
KACC 40700 <i>C.acutatum</i>	1	1			1	1					3				
<i>E.coli</i> XL1-blue	2	2	3	4	4	4	4	4	4	1	1	3	3	1	2

TLC spectrum

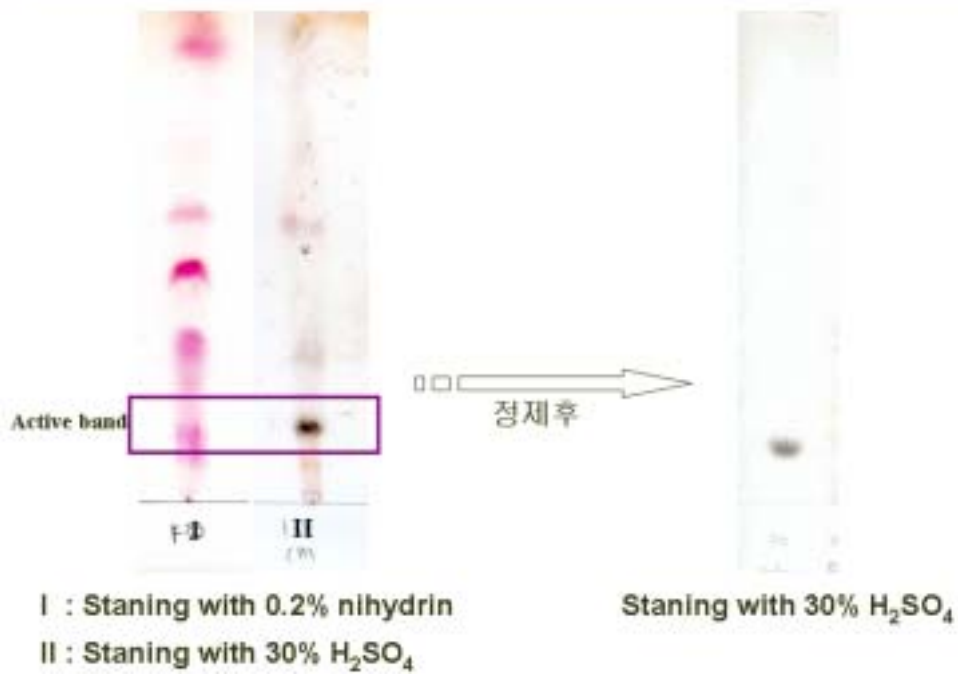


Fig 14. TLC of eluted of active band

- Left : Lane I : TLC of Crude Extract Stained with 0.2% ninhydrin
Lane II : TLC of Crude Extract Stained with 30% H₂SO₄
Right : TLC of Eluted peak no3 after HPLC

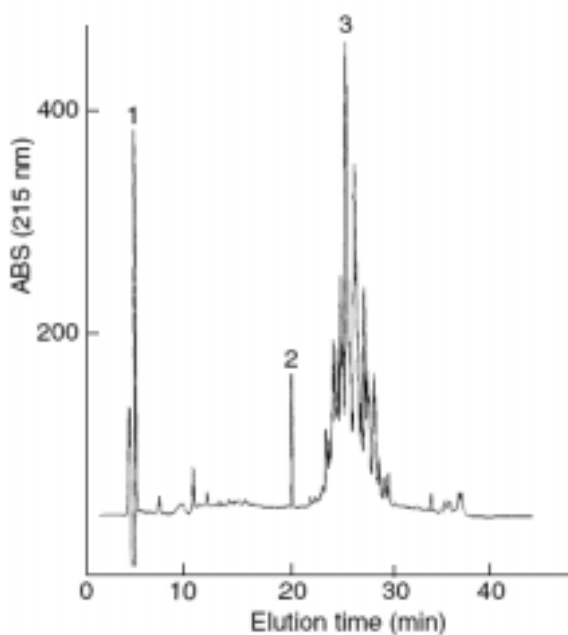


Fig. 15 HPLC chromatogram of compounds obtained from *Bacillus sp* CMB26 culture supernatant after precipitation by adjusting pH with 3 N HCl and extraction using chloroform/methanol(2:1,v/v)

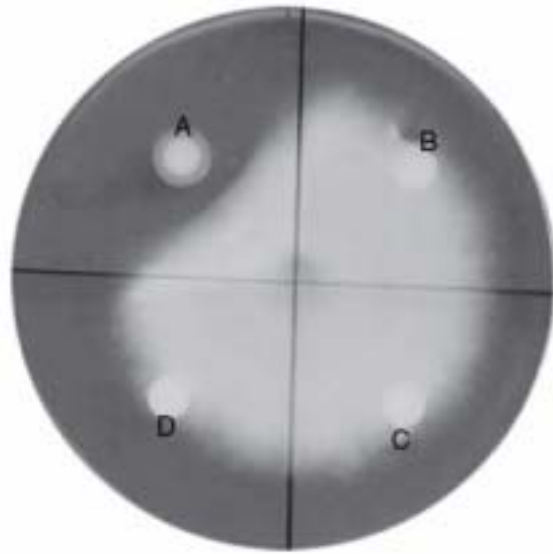


Fig. 16. Antifungal activity of the fractions obtained from three peaks. Peak no. 3 showed only antifungal activity against phytopathogenic fungi including *C. gloeosporioides*.

(A) Peak no. 3; (B) peak no. 1; (C) peak no. 2. Water (D) was used as a negative control

다. 항균물질의 구조 분석

1) 아미노산 조성확인

순수 분리된 항균물질의 구조를 분석하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저 순수 분리 정제된 항균물질을 6N HCl로 처리한 다음 n-hexane으로 추출하여 농축시킨 후 TLC를 전개시켜 lipid의 분리를 확인하였다(그림 14). 이렇게 lipid chain이 떨어져 나간 peptide의 아미노산 조성을 확인하기 위하여 HCl을 가하여 120℃에서 하루밤 반응시켜 peptide를 완전히 가수분해 시킨후 HPLC를 이용하여 아미노산 조성을 확인 하였다. 분석결과 N L-Glu, D-Orn, L-Tyr, D-allo-Thr, D-Ala, D-Val, L-Pro and L-Ile 로 분석되었고 이들의 비는 각각 3 : 1 : 2 : 1 : 1 : 2 : 1 : 1로 fengycin과 유사한 조성이었다(표8).

Table 8. Amino acids and their estimated molars in 1.0 M of compound from Bacillus sp. CMB 26 by amino acid composition analysis

Compound	Molar of residue per molar of compound							
	Glu	Orn	Tyr	Thr	Ala	Val	Pro	Ile
lipopeptide	2.53	-	1.11	0.62	0.6	1.11	0.66	0.54

2) 항균물질의 분자량 측정

항균 물질의 분자량을 측정하기 위하여 HPLC로 정제하여 MALDI-TOF 분석결과 결과 항균물질은 하나의 lipopeptide가 아닌 두 개의 lipopeptide가 존재함을 확인할 수 있었다(그림 17,18). 각각의 분자량은 1081Da와 1477Da로 확인되었고, 두 물질 모두 항곰팡이 활성이 강함을 확인하였다.

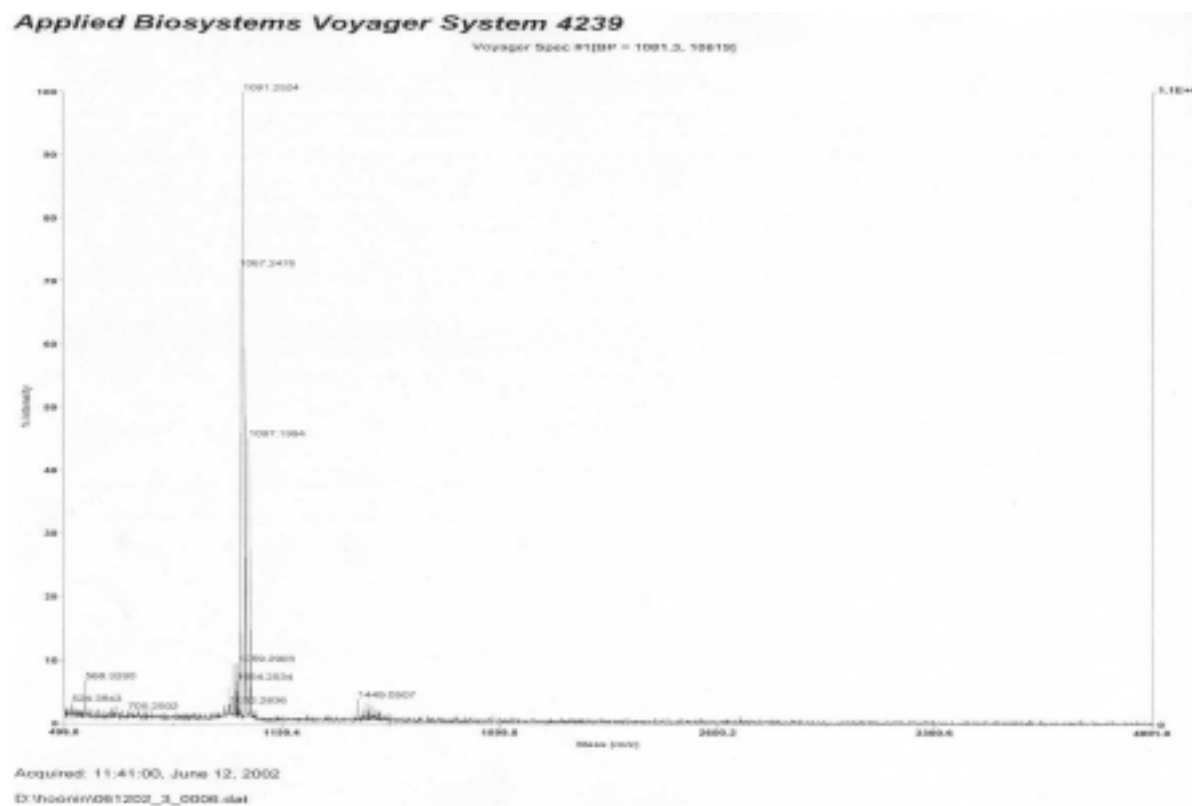


Fig 17. MALDI-TOF profile of HPLC fraction No.25
main pick : 1081 Da

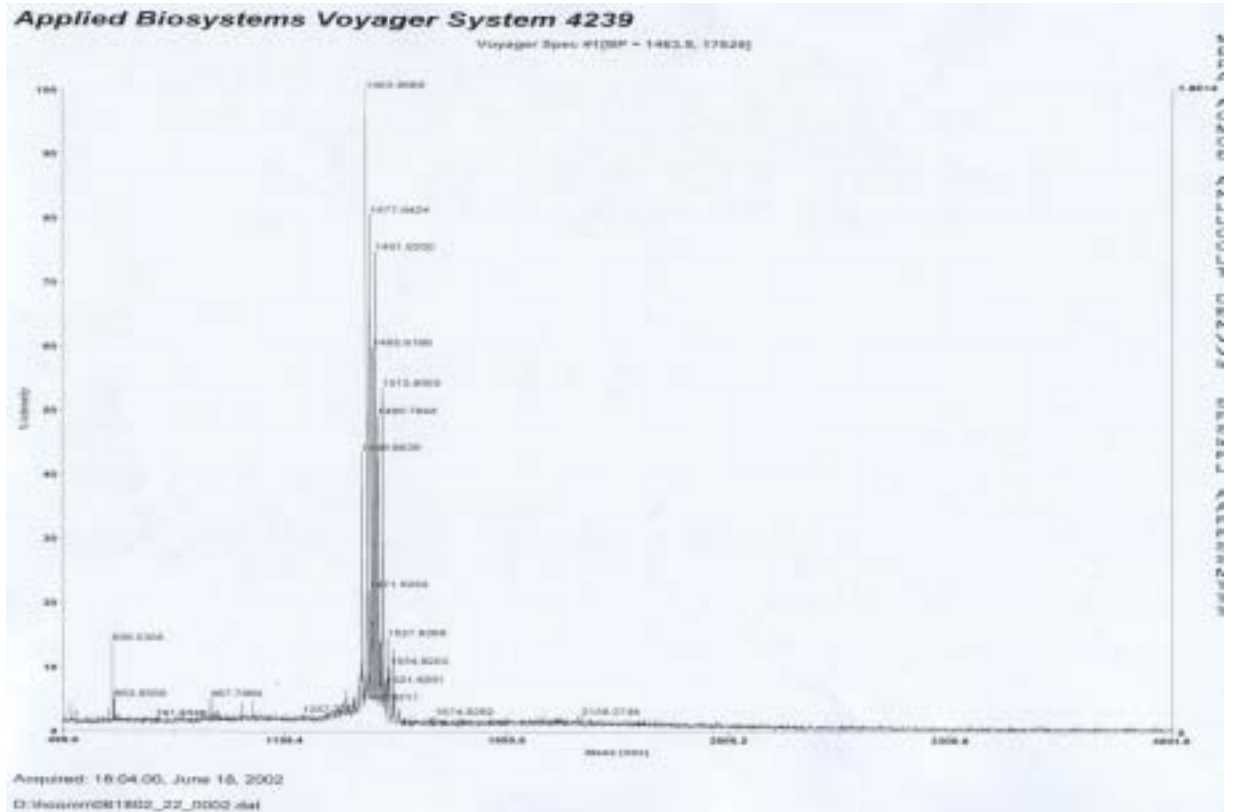


Fig 18. MALDI-TOF profile of HPLC fraction No.29
main pick : 1465 Da

라. Peptide 서열 확인

아미노산 서열을 확인하기 위하여 순수 분리된 lipopeptide를 KOH로 처리하여 cyclic form을 linear form으로 만든후에 MS/MS를 이용하여 그 서열을 분석하였다. 서열 분석결과 Glu-Orn-Tyr-Thr-Glu-[Val/Ala]-Pro-Gln-Tyr-Ile임을 확인하였다(그림 19, 20).

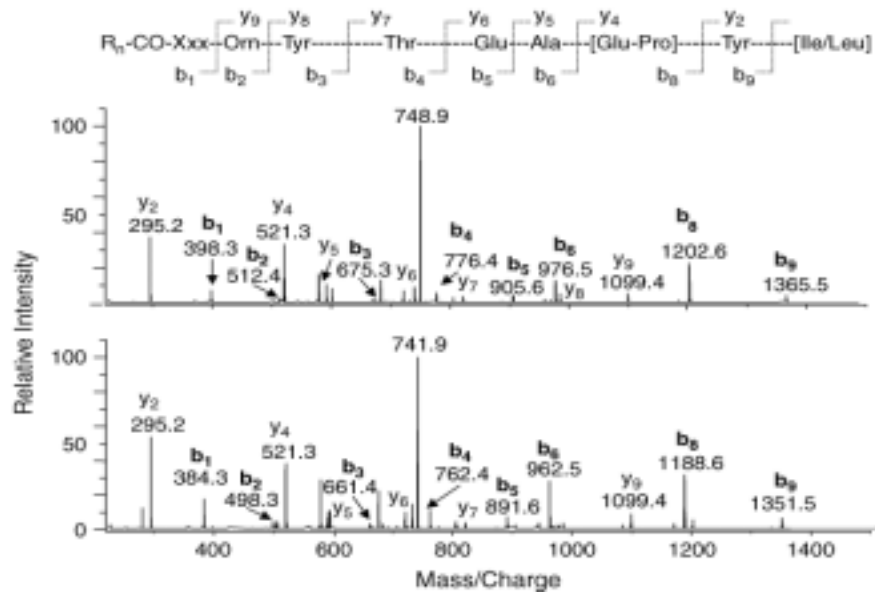


Fig. 19. Nanospray tandem mass spectrometry of hydrolyzed lipopeptides(precursor 1483 and 1497)

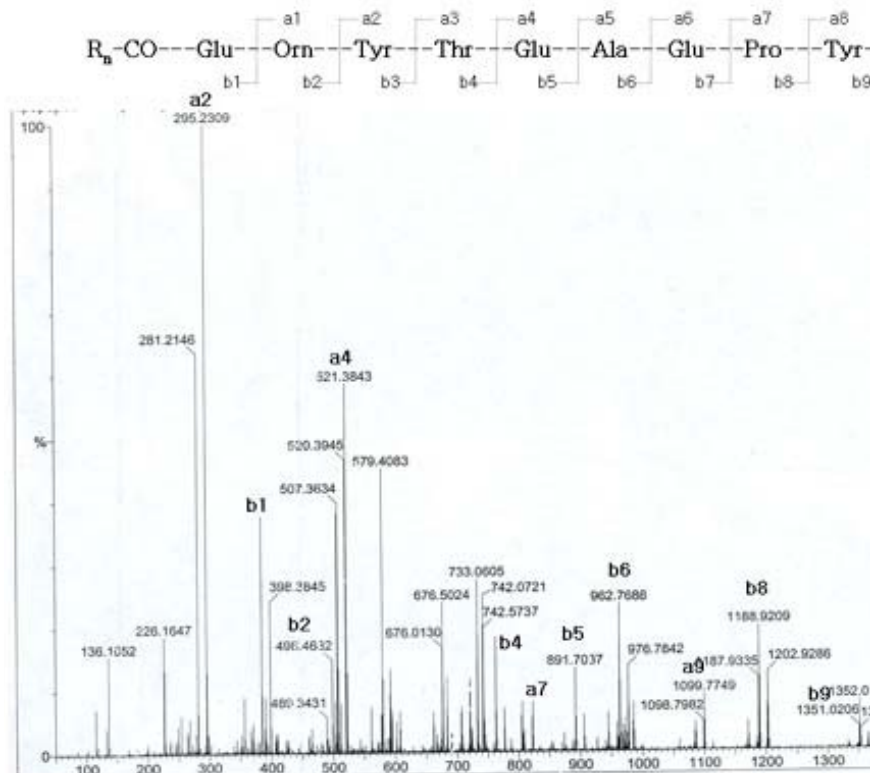


Fig. 20. Nanospray tandem mass spectrometry of hydrolyzed lipopeptides(protonated molecular masses 1496 Da). CID was carried on their respective doubly charged ions at m/z 741.

마. Lactone ring 구조확인

lipopeptide는 peptide의 구조가 아미노산들이 연결되어 ring 구조를 갖는 경우가 있다. 본 연구에서는 lactone ring 구조를 확인하기 위하여 1M KOH용액을 처리하여 하룻밤 정치시킨다음 과량의 KOH을 ZipTig coulum으로 제거하였다. 이 시료를 MALDI-TOF 로 확인하여 lactone ring이 존재함을 확인하였다(그림 21). 즉 KOH를 처리하기전의 분자량은 1477Da이었으나 ring 구조가 깨짐으로서 1496Da으로 증가하였다(그림 21).

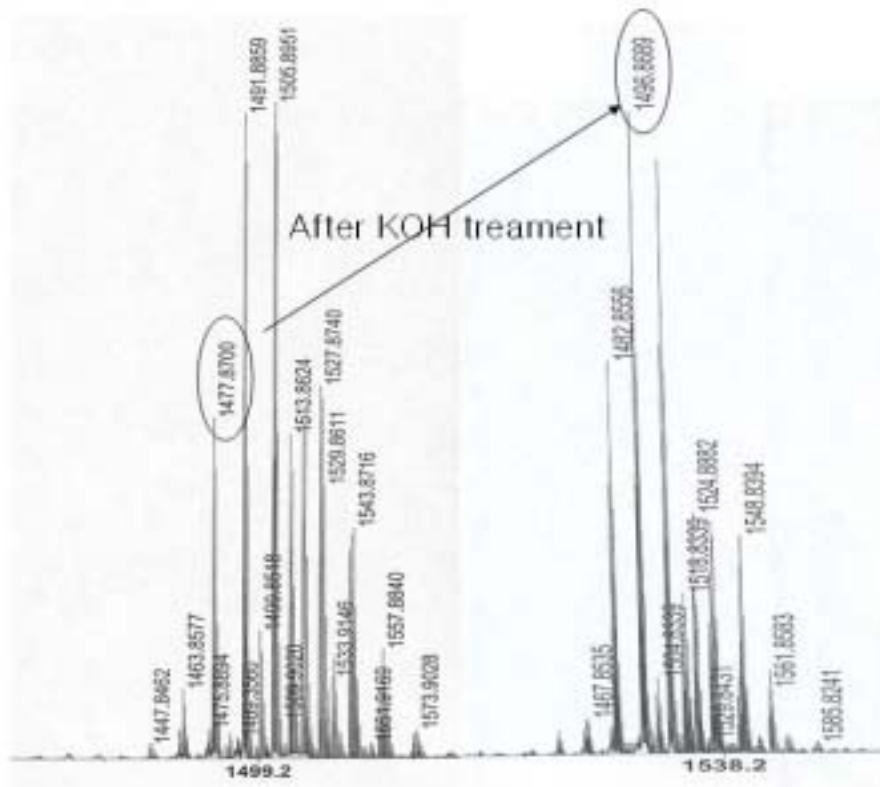


Fig.21. Confirm of lactonering by MALDI-TOFMS

left ; purified lipopeptide, right ; after treatment KOH

바. 지방산 분석

지방산 구조를 확인하기 위하여 순수 분리된 lipopeptide에 6N HCl을 가하여 150°C에서 overnight 반응시켜 peptide를 완전히 가수분해 시킨후 ether을 이용하여 지방산만을 추출하였다. 분리된 지방산을 picolinyl ester로 유도체화 시켜 GC/MS를 이용하여 그 구조를 확인하였다. MALDI-TOF 결과로 단일 물질로 추출된 향균물질을 완전히 건조한 다음 GC/MS로 분석하였다. 1447Da lipopeptide의 GC/MS 분석결과 m/z 92, 108(base peak)와 151(McLafferty rearrangement)에서 관찰된 peak는 3-piconyl 지방산 유도체의 특성을 보여주고 있다. m/z 359에서 발견된 분자이온은 이중 결합이 하나있는 C17지방산임을 보여준다. 또한 지방산 체인의 모든 ethylene기 사이에 절단이 일어나 14Da씩 차이가 나며, 말단에 CH3기가 상실되었음을 보여준다. m/z 330과 302위치의 이온 사이의 28Da gap은 gap 앞의 탄소원자 위치에 *anti-iso* methyl기를 갖는 branched fatty acid의 특성중 하나이다. m/z 190과 164, 177과 151사이의 26Da 중첩 gap은 3,4와 2,3이중결합이 혼재된것에 기인한다. 이러한 결과는 3위치에 hydroxyl 기가 GC과정중 탈수되었기 때문이다. 이러한 행동은 전형적인 3-hydroxyhexadecanoic acid임을 보여준다. 이에 해당하는 지방산은 3-hydroxy-14-methyl hexadecanoic acid으로 추정할 수있다. m/z 393.3구성 질량으로부터 269Da을 제외하면 129.3Da이 남으므로 N-말단 아미노산은 glutamate 이다. 즉, C18지방산과 glutamate 사이의 결합은 amide 결합으로 연결되었다. 왜냐하면 온화한 알칼리 조건하에서 에스터 결합의 가수분해는 안정하며, 지방산은 극단적인 산가수분해에서 아마이드 결합이 끊어지기 때문이다(그림 22).

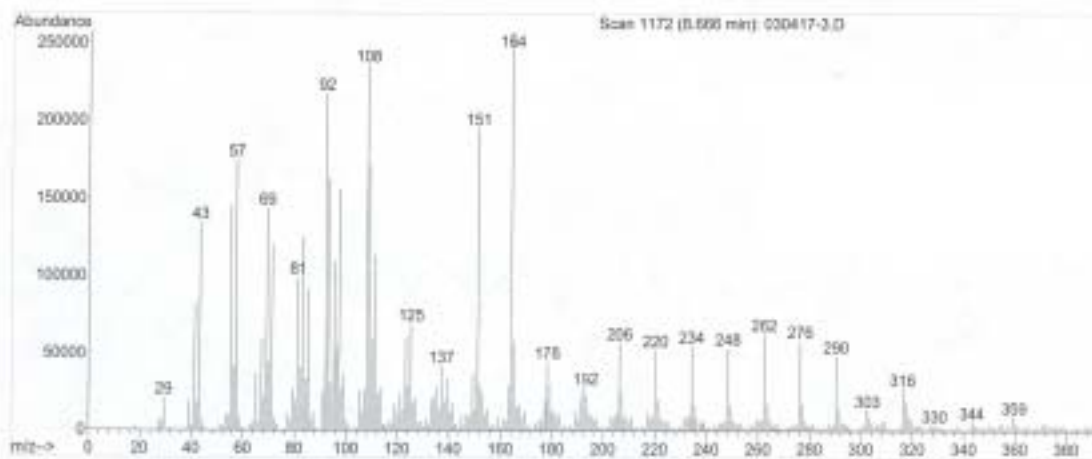
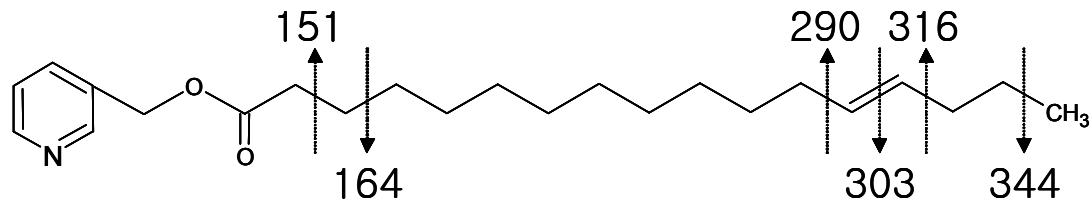


Fig. 22. Electron impact mass spectrum of the 3-picolinyl derivative of the fatty acid released from the $[M+H]^+$ 1477Da lipopeptide, introduced via gas chromatography.

사. 새로운 lipopeptide 의 구조

항균 물질의 구조는 GC/MS분석결과 cyclic lipopeptide의 구조를 갖는 fengycin와 유사한 구조를 갖고 있음이 밝혀졌다. m/z 92, 108과 151(Mclafferty rearrangement) peak는 3-picolinyl 유도체 지방산 이었다. 이 물질은 m/z 359에 이중결합을 가진 C17 지방산으로 확인되었다. 또한 이 물질은 m/z 290과 316사이에 13Da 차이를 갖는 이중 결합이 포함되었다. 이러한 결과는 기존의 알려진 fengycin이나 plipastatins과는 전혀 다른 신규 물질임이 밝혀졌다. 기존의 fengycin은 탄소 2-3 또는 3-4 사이에 이중 결합이 하나 있고 지방산의 14번 탄소 위치에 methyl 기가 있으나 본 연구에서 밝혀진 lipopeptide는 탄소 13번과 14번 사이에 (m/z 303, 316) 이중 결합이 하나있고 methyl 기가 없었다.

아. 정제된 lipopeptide의 항균력

본 연구에서 정제된 항생물질의 항균력을 현재 상업적으로 판매되고 있는 lipopeptide인 iturin 및 surfactin과 비교하기 위하여 항균 활성을 비교하였다(그림 23). iturin은 *Bacillus subtilis* 생산하는 항곰팡이능력이 높은 것으로 알려졌고 시그마 (Sigma. Co. USA) 카탈로그 기준 1mg에 12만원에 시판중에 있고 분자량이 1070Da이다. surfactin도 *Bacillus subtilis*가 생산하는 물질로 분자량이 1036 Da으로 연구가 많이 이루어진 물질이다. 세물질의 고추 탄저균에 대한 항균력은 PDA 평판 한천배지에 탄저균을 접종하고 세물질을 paper disk에 각각 10ug 씩 적신 다음 대칭되게 하고 30°C에서 7일간 배양하였다. 그림 23에서 보듯이 본 연구에서 얻어진 fengycin은 다른 두 lipopeptide보다도 항균력이 뛰어나다는 것을 알 수 있었다. 이와같은 결과로부터 fengycin lipopeptide는 곰팡이 방제에 훌륭한 제재로 사용할 수 있음을 보여준다.

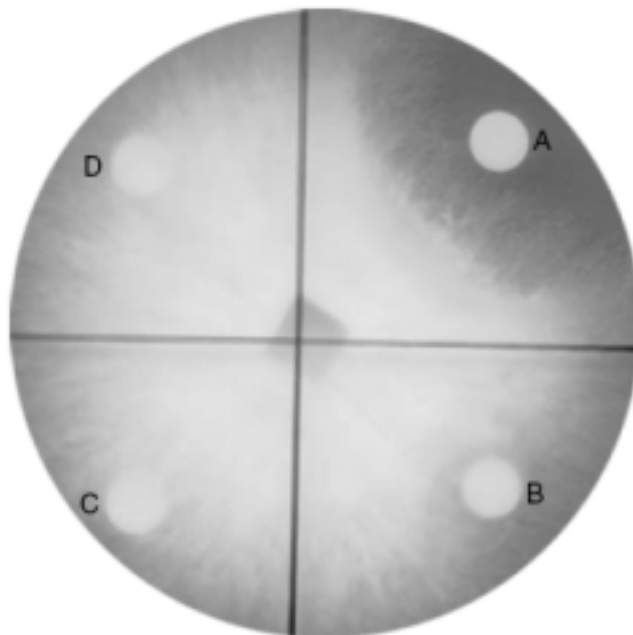


Fig. 23 Comparison of antifungal activity from the purified antibiotic (A), iturin (B) and surfactin (C) against *Colletotrichum gloeosporioides*. Water (D) was used as negative control

2. Lipopeptide류의 농업에 응용

가. 항진균성

순수 분리된 lipopeptide를 가지고, 실험실에서 여러 가지 병원성 곰팡이를 이용하여, 항진균성 실험을 수행하였다. 실험법은 paper disk 법 또는 직접 침지하는 방법을 이용하였다. 실험에 사용된 병원성 곰팡이는 *Botryosphaeria dothidea*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella melonis*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani* 을 이용하였다. 실험결과 실험에 사용된 모든 병원성 곰팡이에 대한 항진균력을 확인할 수 있었다. 그림 24는 정제된 물질을 100배 희석한 용액에 탄저균의 곰팡이를 침지한 후 전자현미경을 촬영한것이다. 전자현미경 사진에서 볼 수 있듯이,탄저균은 필라멘트 형 곰팡이형태로 lipopeptide는 균사의 세포벽에 구멍(pore)를 형성하여 곰팡이에 대한 항진균력이 나타남을 확인할 수 있었다(그림 24).

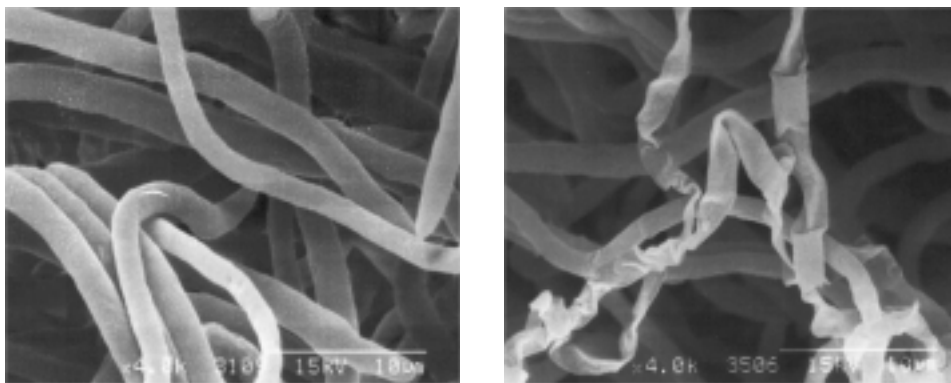


Fig. 24. Antagonism of purified lipopeptide against *Collectotrichum gloeosporioides*
left ; Control, right ; after treat

흰가루병원균은 활물기생진균류임으로, 온실에서 흰가루병에 감염된 오이잎에 정제된 lipopeptide를 살포하였다. 대조군은 1주일후 흰가루병이 만연되었지만 항균물질을 살포한 실험결과는 한번 처리로 일주일 이상 효과가 지속됨을 확인할 수 있었다(그림 25).



Fig. 25. Antagonism of purified lipopeptide against Powdery mildew
left ; Control, right ; after treat

그림 26은 흰가루 곰팡이 포자의 전자현미경 사진으로 이 균은 포자로 감염하는 것으로 알려졌다. 그림 26에서 보듯이 탄저병 곰팡이의 균사와 마찬가지로 흰가루병원균의 포자가 대조군에 비해 상당히 수축되고 포자벽이 파괴되었음을 확인하였다.

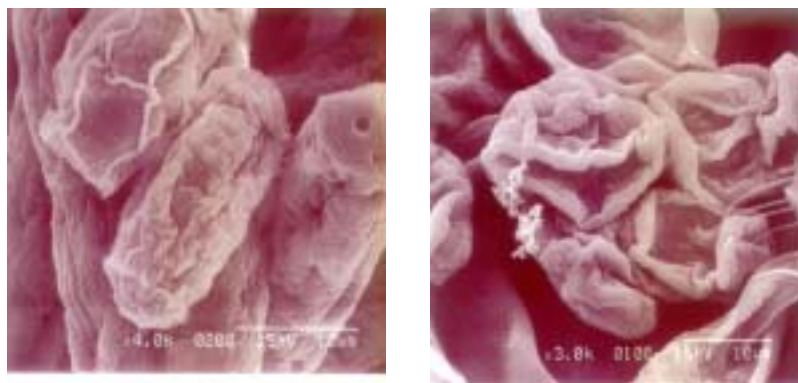


Fig. 26. Antagonism of purified lipopeptide against Powdery mildew's spore.
left ; Control, right ; after treat

나. 항세균성

순수분리된 lipopeptide를 가지고, 실험실에서 병원성 대장균인 *E. coli* O157:ac88을 이용하여 항균 실험을 수행하였다. LB 배지를 이용하여 O157ac88을 배양한 후 순수분리된 lipopeptide를 첨가하여, 3시간 추가 배양한 후 그 결과를 확인하였다. 실험 결과, 병원성 대장균에 대한 항균력을 확인할 수 있었다(그림 27). 그림에서 알수 있듯이 처리 1시간후 완전히 괴사함을 관찰하수 있었다.

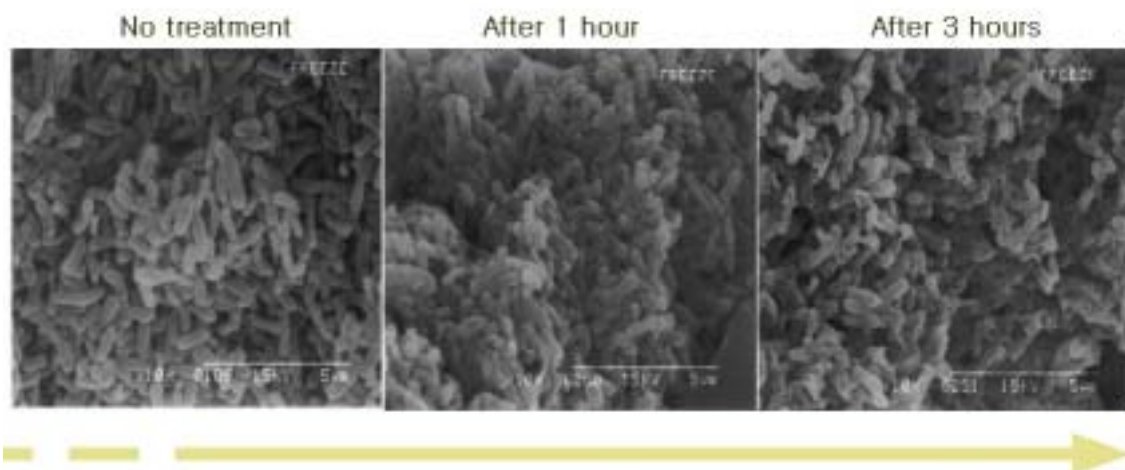


Fig. 27 .Antagonism of purified lipopeptide against *E. coli* O157ac88

left ; Control, right ; after treat 1hr, 3hrs.

3. 추출물의 항충효과

그림 28, 29는 정제물질 1-10%를 매미충과 배추흰나비 애벌레에 대하여 처리한 후 12시간 경과 하였을때 두 곤충 모두 까맣게 죽었으며, 전자현미경으로 관찰 하였을 때 곤충의 막조직이 완전히 파괴되었음을 보여주고있다.

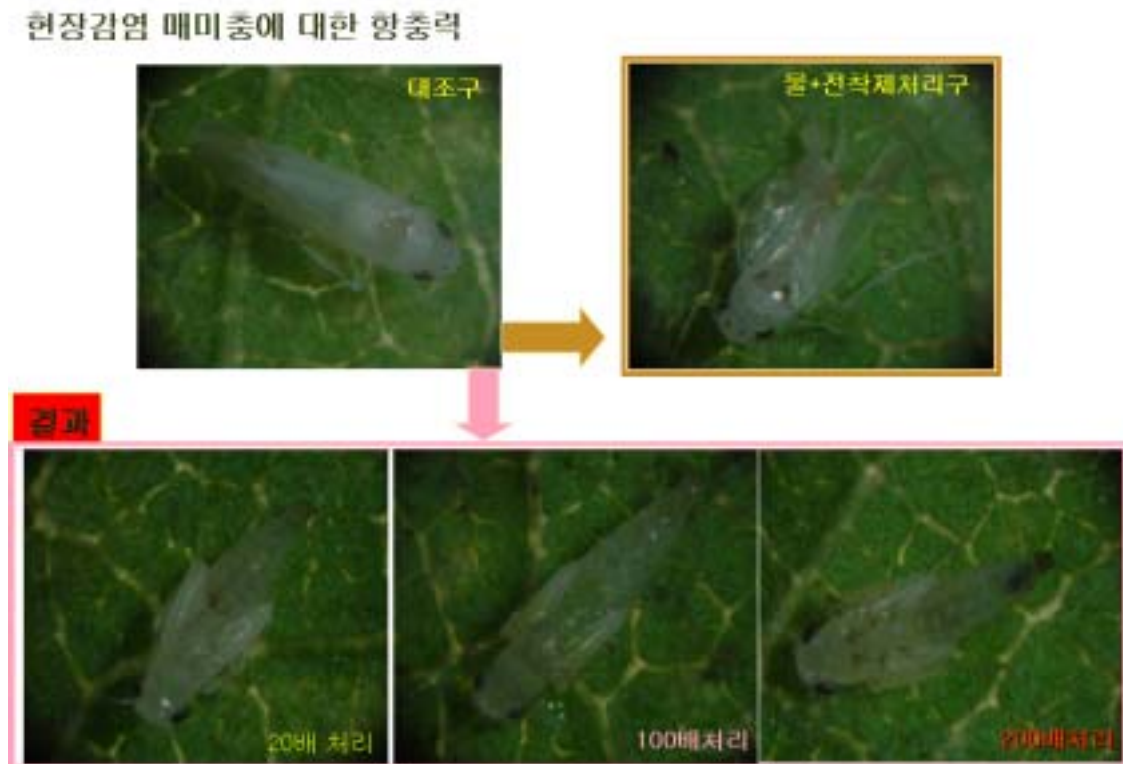


Fig. 28. Scanning electron microscopy and optical microscopy (100· X).

Insecticidal activity of the purified lipopeptide on the insect.

현장감염 배추에벌레에 대한 항충력

- 배추, 1-10%처리후



Fig. 29. Scanning electron microscopy and optical microscopy (100· X).

Insecticidal activity of the purified lipopeptide on the insect.

4. 토양 개량제로써의 이용 가능성

CMB 26균주는 항균 항충성 효능이 탁월하므로 이를 토양 개량제로 이용 가능한지 조사하였다. 즉, 토양에 미생물을 처리하였을때 대부분의 미생물은 토양중에 있는 많은 미생물과 먹이 경쟁하여 수적인 열세 때문에 죽게된다. 그러므로 토양에 처리할 때는 CMB26 균주가 홀로 존재하게 하는 것이 아니라 균총으로 존재하며, 생존이 가능할 때만이 소기의 효과를 기대할 수 있다. 본 연구에서는 배양액에 5%Na-alginate를 첨가한 다음 잘 섞은후 여기에 10% CaCl₂를 첨가하여 CMB 26을 고정화 시켰다(그림 30-1). 고정화된 bead를 CMB 26이 영양원으로 이용 가능한지 조사하기 위하여 영양원이 없는 한천 평판 배지에 bead를 올려 놓고 30℃에서 배양하면서 관찰 하였다(그림 30-2). 60시간후 CMB 26 균주가 자라는 것이 보이고, 78시간 경과후 bead가 분해되어지는 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과로부터 CMB 26을 고정화하여 토양 개량제로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

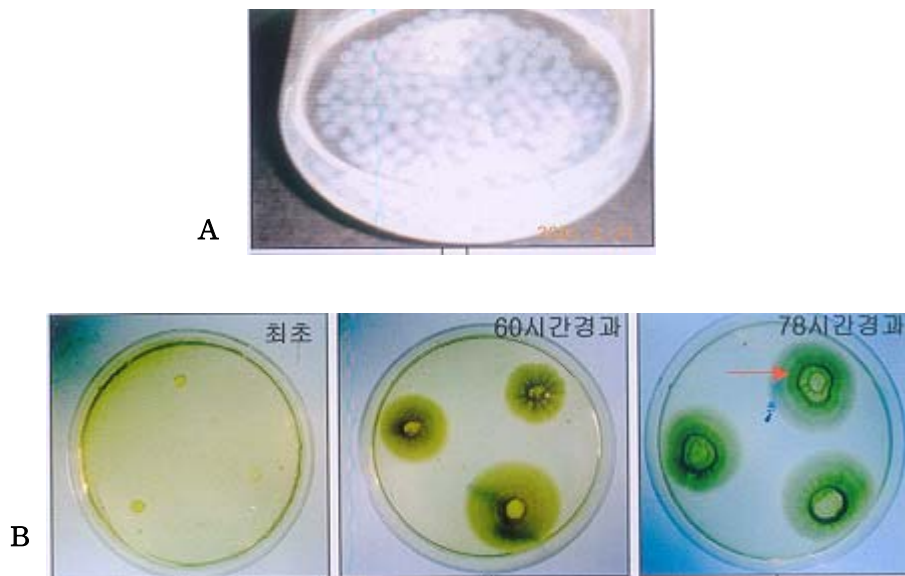


Fig. 30. Housing of CMB 26 in sodium alginate(A) and immobilized beads are utilized for nutrition by CMB 26(B).

제 4 절 대량 배양체계 확립

1. 대량 배양체계 확립

제 2절에서 확립된 최적발효조건을 대량 배양 체계에 응용, 도입하였다.

대량 배양을 위하여 배지 조성을 결정하였다.

배양조건은 다음과 같았다.

◎ Jar fermentor

Capacity : 500L

Working volume : 350L

Medium : M9 - glucose 0.4%

Initial pH : 6.5

rpm : 100-150

DO : 50 - 60%

위 조성으로 48시간 배양한후 진착제로 triton X-100을 0.5%첨가하여 현장 실험을 수행하였다. 오이잎파리에 감염된 잎굴파리가 1일 경과후 사명됨을 광학현미경으로 관찰하였다 (그림31)

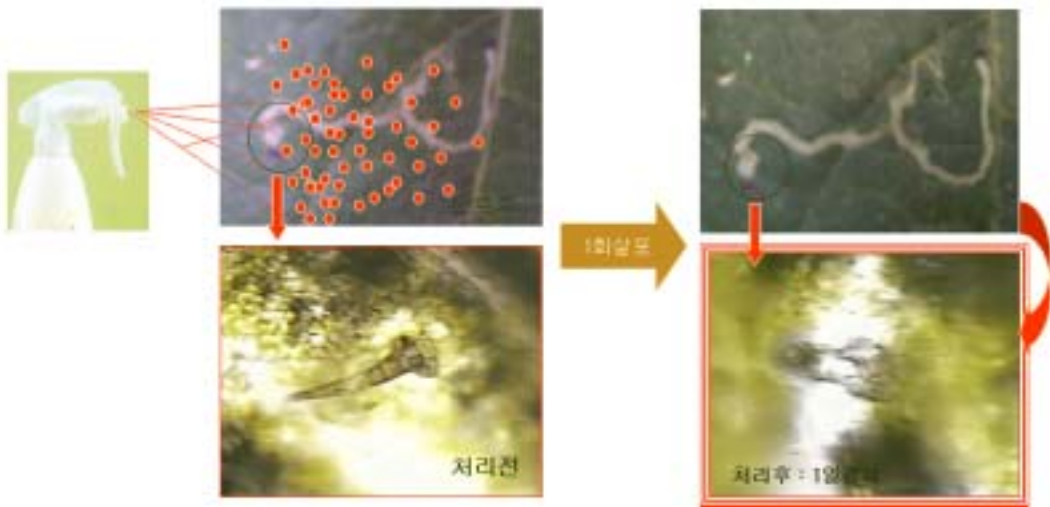


Fig. 31 Effect of diluted culture broth (100-500,X) on the insect

그림 32은 배양액을 선충에 대하여 실험한것이다. 선충의 생활사인 알, 애벌레, 성충등 모두 사멸됨을 확인하였다.

- 상온.임실조건, 분리 : Baermann tunnel Method, 200배 희석 처리후, 1일경과

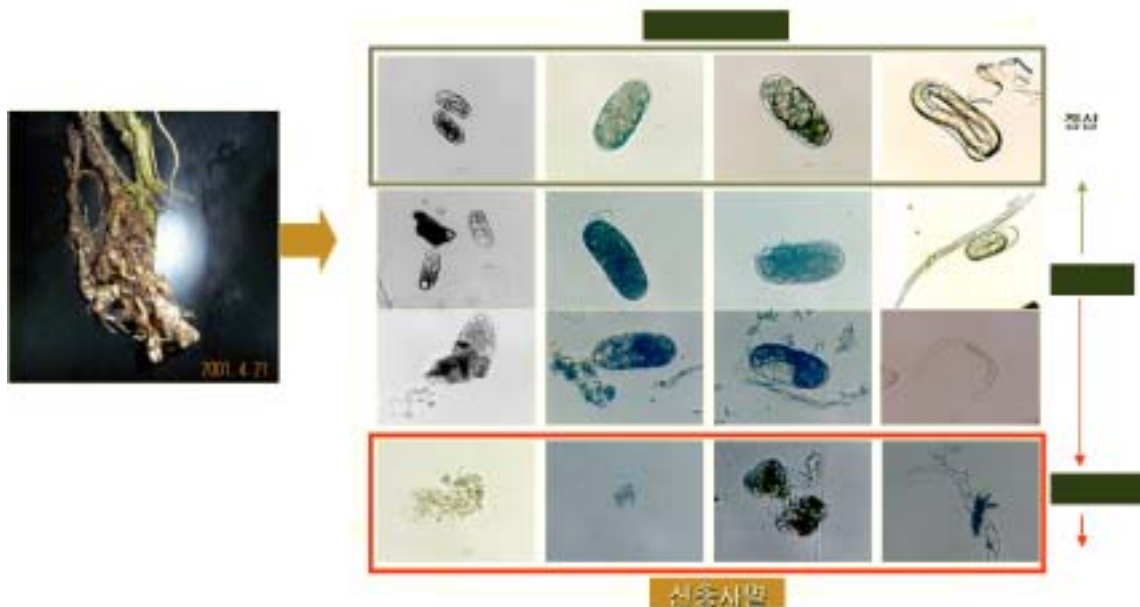


Fig. 32. Effect of diluted culture broth of CMB26 on the insect.

제 5 절 현장실험

1. 현장 실험

대량 배양액을 500배 희석한 후 여기에 전착제를 0.5%가하여 고추 역병과 탄저병이 함께 감염된 전라남도 영광군 대마면 소재의 김관호씨 농장에서 2002년 7월 18일 방제실험을 실시하였다. 그림 33에서 보듯이 이미 감염되었던 역병과 탄저병이 이웃지역으로 전이가 되지 않음을 확인하였다. 또한 이미 감염된 고추 탄저병도 더 이상 병증을 나타내지 않고 병원균이 죽어감을 확인하였다.

-저농도 희석, 엽면 살포시 효과 (500배, 1회)



Fig. 33. Field test on the contaminated with *C. gloeosporioides*

그림 34은 전남대학교 농업생명 과학대학 비닐하우스에 오이 흰가루병이 중증상태로 감염된 오이 이파리에 미생물 제재를 100배 희석하여 살포한 다음 7일 경과한 후의 사진이다. 사진에서 볼수 있듯이 살포하지않은 대조구에서는 흰가루병 포자들이 만연하였지만 처리구에서는 오이잎들이 정상적으로 생육함을 알수 있었다.

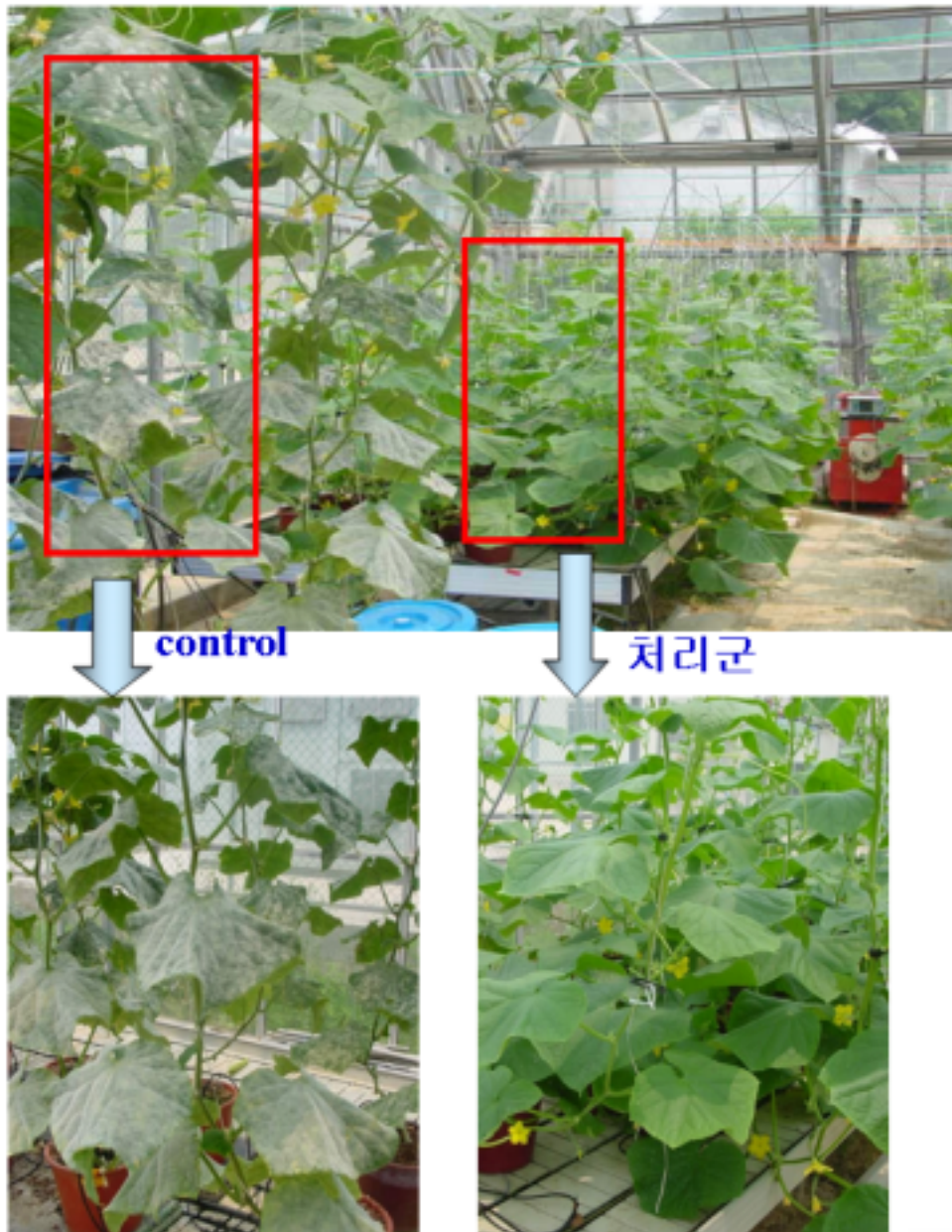


Fig. 34. Effect of CMB26 culture broth on the contaminated powdery mildew

제 6 절 논문, 특허 및 상품개발

1. 논문 구두 발표: 국내 2편

국외 2편(일본, 미국)

2. 논문 발표 : SCI 논문 1편

Journal of Applied Microbiology 2004, 97, 942-949 Purification and characterization Bacillus thuringiensis CMB26 P.I. Kim, H. Bai, D. Bai, H. Chae, S. Chung, Y. Kim, R. Park and Y.-T. Chi

3. 특허 출원 :2건

가. 특허출원 제 49338호(신규한 바실러스속(Bacillus sp.)CMB26균, 이를 이용한 리포펩티드의 제조 방법, 상기 바실러스 속 CMB균 및 /또는 리포펩티드를 유효성분으로 함유하는 식물곰팡이균의 살균제

나. 특허출원 제 48629호(신규한 바실러스속(Bacillus sp.)CMB26균, 이를 이용한 리포펩티드의 제조 방법, 상기 바실러스 속 CMB균 및 /또는 리포펩티드를 유효성분으로 함유하는 식물 해충의 살충제

4. 상품개발

위와 같은 개발결과에 힘입어 본 연구팀은 2002년 8월 (주) NIN이라는 벤처회사를 창립하고 미생물 제제 공장을 준공하였고, 동년 광주 광역시로부터 제4종 미생물 복합 비료로 허가받아 등록번호 제5-나-12-2호 승인 받아 흰가루병 예방제재로 가루탄, 역병, 탄저병 예방제재로 방역탄이라는 이름으로 출시중 회사 경영상 자금난으로 현재 재도약을 도모하고 있다.

•등록번호: 제 111호

작물생장촉진 및 흰가루병예방

가루탄

PCME(포맥스)



흰가루병 예방효과

특성
 신중 미생물에서 얻어진 단백질분해 효소를 이용하여 생장촉진, 내병 내충성 유감물질, 생리장애 해소, 친환경 미생물제제에 의한 고품질안전성 확보, 농약사용량감소제제

사용방법
 - 찬물(1리터)을 500ml 물에 희석하여 골고루 살포
 - 잎면 혹은 관수사용
 - 흰가루병 발생시 2일격에 3회 살포

본제에 사용되는 미생물은 세계공인기관 (FAO)으로 부터 인증으로 인정받은 살사프 균류 유전자이며, 특허로 보호를 받고 있습니다. (신종 Aspergillus CMR26)

(주)한대이엔(생물산업벤처기업)

•등록번호: 제 111호

작물생장촉진 및 역병/탄저병예방

방역탄

PAE(파엑스)



역병·탄저병 예방

특성
 신중 미생물에서 얻어진 단백질분해 효소를 이용하여 생장촉진, 내병 내충성 유감물질, 생리장애 해소, 친환경 미생물제제에 의한 고품질안전성 확보, 농약사용량감소제제

사용방법
 - 찬물(1리터)을 500ml 물에 희석하여 골고루 살포
 - 잎면 혹은 관수사용
 - 역병, 탄저병 발생시 2일격에 3회 살포

본제에 사용되는 미생물은 세계공인기관 (FAO)으로 부터 인증으로 인정받은 살사프 균류 유전자이며, 특허로 보호를 받고 있습니다. (신종 Aspergillus CMR26)

(주)한대이엔(생물산업벤처기업)

•등록번호: 제 111호

작물생장촉진 및 해충방제효과

해충방제



작물생장 및 해충방제효과

특성
 신중 미생물에서 얻어진 단백질분해 효소를 이용하여 생장촉진, 내병 내충성 유감물질, 생리장애 해소, 친환경 미생물제제에 의한 고품질안전성 확보, 농약사용량감소제제

사용방법
 - 찬물(1리터)을 500ml 물에 희석하여 골고루 살포
 - 잎면 혹은 관수사용
 - 유충발생 및 예방시 2일격에 3회 살포

본제에 사용되는 미생물은 세계공인기관 (FAO)으로 부터 인증으로 인정받은 살사프 균류 유전자이며, 특허로 보호를 받고 있습니다. (신종 Aspergillus CMR26)

(주)한대이엔(생물산업벤처기업)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

계 획 :

추진실적 :

연 도	2001년 (1차년도)	2002년 (2차년도)	2003년 (3차년도)	가중치	비 고
세부과제 및 주요내용 ○ CMB 26의 균주 특성 규명 ◦ 항균성 검색 ◦ 우량 변이주 개발 및 특성 규명 ◦ 16s rRNA 염기 서열 분석 ◦ peptide synthethase 유전자 염기 서열 분석				34	
○ lipopeptide의 분체 규명 ◦ 순수 분리 정제 ◦ 항균성 검색 ◦ 아미노산 서열 분석 ◦ 지방산 분석 ◦ 변형 peptide 특성 규명				33	
○ lipopeptide의 ◦ 발효 최적 조건 확립 ◦ Jar fermentation ◦ 변이주를 이용한 대량 생산 ◦ 응용 방안 모색 ◦ 독성, 안정성 검사				33	

제 2 절 관련 분야 기여도

1. 미생물 농약 개발 가능성 확인

WTO 출범과 DDA 협약체결을 앞두고 우리나라 농업이 살길은 친환경 유기농업으로 생산된 농산물을 생산하여 소비자의 욕구를 충족시켜야만 한다. 이러한 점으로 미루어 본 연구에서 개발된 CMB 26 미생물 제제는 항균, 항충제로 사용 될 수 있을 것이다.

2. CMB 25 균주의 항균 효과 분석

CMB 26 균주가 생산하는 항균 물질은 새로운 fengycin 유도체로 기존의 리포펩타이드로 가장 잘 알려진 iturin 보다도 항진균력이 높았다. 또한 본 물질은 항충 효과도 함께 가지고 있었고 대장균 0157 균주에 대하여도 항균력을 가지고 있었다.

3. lipopeptide 대량 생산 체계 확립

항균력은 실제로 갖는 것은 lipopeptide로 그 자체가 CMB 26에 독성을 나타내므로 본 연구에서는 lipopeptide 내성 변이주를 개발하였다. 이 변이주를 이용 값비싼 고가의 fengycin 유도체 물질을 대량 생산 할 수 있게 되었다.

4. CMB 26 균주의 rRNA 유전자 분석

CMB 26 균주의 16s, 23s, 5s rRNA 전체 유전자의 염기서열 분석 결과 4800여 염기로 구성 되었음을 밝혔다. 염기서열 비교 분석 결과 신규 *Bacillus* 종임이 확인 되었다. 미생물

선별에 기여 가능하리라 기대된다.

5. 대량 생산 체계 확립

500 ℓ Jar fermentor를 이용하여 상업적으로 대량 생산 할 수 있는 체계를 확립하였다.

6. 미생물 제재의 실용화 기술 개발

기능성이 우수한 미생물을 보유 하였을때 어떻게 산업화가 가능한지 크게 도움이 되었다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획

1. CMB 26 균주를 이용한 토양 개량제 개발

CMB 26은 항공광이나 해충, 특히 선충에 대하여 길항력을 가지므로 CMB 26을 고정화하여 토양개량제로 이용가능할 것이다.

2. CMB 26은 역병, 탄저병, 흰가루병 등에 강력한 길항력을 나타내므로 잔디밭에서 크게 말썽을 부리는 “과지팻취” 방제에 사용될 가능성이 있다.

3. CMB 26 균주를 친환경 농업에 사용가능할 것이다.

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술
정보

없음

제 7 장 참 고 문 헌

Makkar RS, Rockne KJ. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem.* 2003 Oct;22(10):2280-92.

Parkinson M. Bio-surfactants. *Biotechnol Adv.* 1985;3(1):65-83.

Roongsawang N, Hase K, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S. Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrfactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Chem Biol.* 2003 Sep;10(9):869-80.

Nakhla G, Al-Sabawi M, Bassi A, Liu V. Anaerobic treatability of high oil and grease rendering wastewater. *J Hazard Mater.* 2003 Aug 29;102(2-3):243-55.

Hua Z, Chen J, Lun S, Wang X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. *Water Res.* 2003 Oct;37(17):4143-50.

Nicolas JP. Molecular dynamics simulation of surfactin molecules at the water-hexane interface. *Biophys J.* 2003 Sep;85(3):1377-91.

Deziel E, Lepine F, Milot S, Villemur R. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology.* 2003 Aug;149(Pt 8):2005-13.

Olivera NL, Commendatore MG, Delgado O, Esteves JL. Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora. *J Ind Microbiol*

Biotechnol. 2003 Sep;30(9):542-8. Epub 2003 Aug 01.

Rahman KS, Rahman TJ, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat IM. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour Technol.* 2003 Nov;90(2):159-68.

Garcia-Junco M, Gomez-Lahoz C, Niqui-Arroyo JL, Ortega-Calvo JJ. Biosurfactant- and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids. *Environ Sci Technol.* 2003 Jul 1;37(13):2988-96.

Thaniyavarn J, Roongsawang N, Kameyama T, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S. Production and characterization of biosurfactants from *Bacillus licheniformis* F2.2. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003 Jun;67(6):1239-44.

Neilson JW, Artiola JF, Maier RM. Characterization of lead removal from contaminated soils by nontoxic soil-washing agents. *J Environ Qual.* 2003 May-Jun;32(3):899-908.

Bodour AA, Drees KP, Maier RM. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid Southwestern soils. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jun;69(6):3280-7.

Im JH, Yanagishita H, Ikegami T, Takeyama Y, Idemoto Y, Koura N, Kitamoto D. Mannosylerythritol lipids, yeast glycolipid biosurfactants, are potential affinity ligand materials for human immunoglobulin G. *J Biomed Mater Res.* 2003 Jun 1;65A(3):379-85.

Carrillo C, Teruel JA, Aranda FJ, Ortiz A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Apr 1;1611(1-2):91-7.

Lal B, Gund VG, Gangopadhyay AK, Nadkarni SR, Dikshit V, Chatterjee DK, Shirvaikar R. Semisynthetic modifications of hemiaminal function at ornithine unit of mulundocandin, towards chemical stability and antifungal activity. *Bioorg Med Chem.* 2003 Nov 17;11(23):5189–98.

Bozdogan B, Esel D, Whitener C, Browne FA, Appelbaum PC. Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at the Hershey Medical Center. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Nov;52(5):864–8. Epub 2003 Oct 16.

Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* 2003 Oct 4;362(9390):1142–51.

Roongsawang N, Hase K, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S. Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Chem Biol.* 2003 Sep;10(9):869–80.

Asmer, H. J., S. Lang, F. Wagner, and V. Wrey. 1988. Microbial production, structure, elucidation and bioconversion of sophrose lipid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65:1460–1466.

Asselineau, C., and J. Asselineau. 1978. Trehalose containing glycolipids. *Prog. Chem. Fats Lipids* 16:59–99.

Atlas, R. M. 1993. Bacteria and bioremediation of marine oil-spills. *Oceanus* 36:71–81.

Banat, I. M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technol.* 51:1–12.

Barenschee, E. R., O. Helmling, S. Dahmer, B. Del Grosso, and C. Ludwig. 1990. Kinetic studies on the hydrogen peroxide-enhanced *in situ* biodegradation of hydrocarbons in

water saturated ground zone, p. 77-101. In F. Arendt, M. Hinsenveld, and W. J. van den Brink (ed.), Contaminated soil

,

Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 14. Bar-Ness, R., N. Avrahamy, T. Matsuyama, and M. Rosenberg. 1988. Increased cell surface hydrophobicity of a *Serratia marcescens* NS 38 mutant lacking wetting activity. J. Bacteriol. 170:4361-4364.

Beeba, J. L., and W. W. Umbreit. 1971. Extracellular lipid of *Thiobacillus thiooxidans*. J. Bacteriol. 108:612-615.

Belsky, I., D. L. Gutnick, and E. Rosenberg. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter RAG-1*: determination of emulsifier bound fatty acids. FEBS Lett. 101:175-178.

Benerjee, S. 1991. Biosurfactant for desludging crude/fuel oil storage tank. Chem. Ind. Dig. 4:75-78.

Bernheimer, A. W., and L. S. Avigad. 1970. Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 61:361-369.

Bloomberg, G. 1991. Designing proteins as emulsifiers. Lebensmitteltechnologie 24:130-131.

Boothroyd, B., J. A. Thorn, and R. H. Haskins. 1956. Biochemistry of the ustilaginales. XII. Characterization of extracellular glycolipids produced by *Ustilago* sp. Can. J. Biochem. Physiol. 34:10-14.

Bragg, J. R., R. C. Prince, E. J. Harner, and R. M. Atlas. 1994. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. Nature 368:413-418.

주 의

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