

최 종  
연구보고서

감자의 조기성장촉진과 억제 효능을  
나타내는 신규 미생물 *Bacillus* sp.  
MJM-002의 실용화 연구  
(Study of *Bacillus* sp. MJM002 on the  
growth promotion of potato and  
inhibition activity)

명 지 대 학 교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “감자의 조기성장촉진과 억제효능을 나타내는  
신규 미생물 *Bacillus* sp. MJM-002의 실용화 연구”과제의  
최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 일

주관연구기관명 : 명지대학교

총괄연구책임자 : 서 주 원

세부연구책임자 : 이 용 상

세부연구책임자 : 양 영 열

연 구 원 : 성 금 화 외 16인

협동연구기관명 : 농업생명공학연구원

협동연구책임자 : 권 순 우

# 요 약 문

## I. 제 목

감자의 조기성장촉진과 세균병억제효능을 나타내는 신규 미생물 *Bacillus* sp. MJM002의 실용화 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

세계에서 재배되고 있는 여러 식량작물 중, 감자는 약 130여 개국에서 재배되며, 생산량은 연간 2억 8천만톤('98)으로 생산량으로는 옥수수,벼, 밀 다음으로 4위, 재배 면적으로는 8위를 차지하고 있는 주요작물이다. 따라서 인류의 식량문제를 해결하는데 대단히 중요하며, 생리·생태적 특성으로 보아 그 재배면적이 크게 늘어날 수 있는 성장 작목으로서, 그 증산가치는 다른 어느 작목보다도 앞서가는 작목이 될 것이다. 하지만 농업기반이 매우 취약한 우리나라의 여건속에서, 감자의 국제경쟁력은 너무도 취약하여 선진국과 비교해 볼 때 수량면에서는 50~60% 수준이고 생산비는 5배나 높은 실정이며, 건물율과 가공수율 모두 80% 수준으로 매우 낮은 실정이다.

또한, 농작물의 병해충에 의한 피해는 더욱 심화되고 있으며 특히, 감자의 경우 상품성을 저하시키는 주된 질병 유발원으로는 무름병(*Erwinia cartovora*)과 풋마름병(*Ralstonia solanacearum*) 및 더덩이병(*Streptomyces* spp.) 등의 세균에 의한 병과 바이러스와 곰팡이에 의한 병 등이 있다. 그중 세균병은 전세계의 감자 재배지역에서 발생하며 감자의 연작지에서 특히 심한 것으로 알려져 있고, 최근 국내에서는 품종에 따라 차이가 있기는 하지만, 평균 30~40%의 세균병 이병율이 나타나며, 심한 경우 발생율이 60~70%에 이르러 상품성을 저하시키고 농가 소득에 큰 피해를 입히고 있어, 건전 종서 생산 및 수량감소를 초래하는 피해를 주고 있는 실정이다.

따라서 본 과제에서는 통일한국의 식량작물로서의 감자의 생산량 증대 및 상품성 향상기술을 개발하고자 국내 토양으로부터 감자의 생산성에 중요한 조기성장촉진 효과와 생산량과 상품성에 큰 영향을 미치는 세균병을 억제하는 효과를 나타내는 미생물을 분리하여, 미생물이 생산하는 생리활

성물질의 생합성 및 기능을 연구하여 생산성 증진 기술에 활용하고, 생산량과 상품성에 영향을 나타내는 세균병 유발을 방지하는 물질 및 유전자를 분리하여 우리나라 고유 유전자원을 확보함을 물론, 유기합성 농약 사용으로 인한 폐해를 감소시킬 수 있는 생물농약을 개발하고자하였다.

### Ⅲ. 연구개발내용 및 범위

구분		연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2001)	제1세부과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 감자 조기성장 유도 물질을 균주로부터 분리</li> <li>▷ 감자 조기성장을 유도하는 물질의 작용 효과 시험</li> </ul>
	제2세부과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 감자 세균병 억제인자를 균주로부터 분리</li> <li>▷ 감자 세균병 toxin을 분해하는 미생물을국내 토양으로부터 분리하여 균주 동정</li> <li>▷ 감자 조기성장 촉진물질이나 세균병 억제인자를 분리하는 균주 개발</li> </ul>
	제3세부과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ <i>Bacillus</i> sp. sunhua가 생산하는 성장촉진물질과 감자에 존재하는 내생 지베렐린의 동정하여 아직 알려지지 않은 생합성 경로 규명</li> <li>▷ 동정한 지베렐린 및 생합성 저해제를 식물체에 투여하여 괴경 형성의 촉진 및 저해 효과를 규명</li> </ul>
	제1협동과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 감자 조기 성장촉진이나 세균병원균 저해 효과가 있는 균주 동정</li> <li>▷ 감자 세균병원균 저해 물질 생산을 위한 발효 및 배지조건 검토</li> </ul>
2차년도 (2002)	제1세부과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 감자 성장촉진 유도 물질의 분리 정제</li> <li>▷ 감자 성장촉진을 유도하는 물질의 생물 검정법 확립</li> </ul>
	제2세부과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 감자 세균병 억제인자의 구조 규명</li> <li>▷ 감자 세균병 toxin 분해 균주의 분해 기작 규명</li> <li>▷ 감자 세균병 toxin 분해 효소의 기능 확립 및 특성 연구</li> </ul>
	제3세부과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 일장조건에 따른 괴경형성의 양상과 지베렐린의 생성 관계 해명</li> <li>▷ 괴경의 비대 성장시의 지베렐린의 생성 및 그 역할 규명</li> </ul>
	제1협동과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 감자 세균병원균 저해 물질의 분리 정제</li> <li>▷ 천연 항생 물질로서의 신규성 및 신규 용도성 시험</li> </ul>

3차년도 (2003)	제1세부과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 성장촉진물질의 작용기작과 미생물 유래의 감자 조기 성장 유도물질로서의 용도성 시험.</li> <li>▷ 성장촉진유도물질의 생산 체계를 확립(제 2세부 및 협동과제와 협력).</li> </ul>
	제2세부과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 감자 세균병 억제 인자 및 감자 세균병 toxin 분해를 지정하는 유전자의 확보 및 이를 이용한 근원적 질병 방제 전략 수립.</li> <li>▷ 감자 세균병 toxin 분해 효소 유전자를 감자 세균병 내성 감자 종자 생산 유전자원으로 활용가능성 타진.</li> </ul>
	제3세부과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 감자 조기성장 촉진인자와 감자 지베렐린 생합성 조절로 감자 생산성증대 기술개발</li> <li>▷ 기능이 밝혀진 유전자를 이용한 괴경형성의 시기 조절 및 괴경 비대를 위한 기반 기술 확보함.</li> </ul>
	제1협동과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 농업용 항생 물질 실용화를 위한 제재화 가능성 검토.</li> <li>▷ 포장실험을 통한 활성 물질 생산균주의 생산 체계 시험</li> </ul>

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1) 연구 결과

본 연구는 감자의 상품성 향상기술을 개발하고자 상품성에 큰 영향을 미치는 세균병을 억제하는 효과를 나타내는 생리활성물질을 생산하는 미생물을 분리하고, 감자 성장을 조절하는 생리활성물질의 생합성 및 기능을 추적하여 생산성 증진 기술에 활용하여 유기합성 농약 사용으로 인한 피해를 감소시킬 수 있는 생물농약을 개발하는 것을 목적으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

- ▶ 감자 더듬이 병이 많이 발생하는 지역을 선택하여 그 중에 더듬이 병원균인 방선균을 억제하는 *Bacillus* sp. MJM002를 분리하였으며, 지속적인 연구를 통하여 MJM002와 유사하며 더 활성이 좋은 sunhua라는 미생물을 분리연구하였다. 16S rRNA의 분석을 통하여 이 미생물이 *Bacillus*임을 확인하고, *Bacillus* sp. sunhua라 칭하였다. NMR, MS를 통하여 더듬이병 병원균을 억제하는 물질이 iturin

A, Macrolactin A로 동정되었다. Pot assay와 포장실험을 통하여 생물 방제 능력을 조사한 결과, 감염율을 약 40%의 감소시켜 실용화의 기반 기술을 확보하였다. 이러한 결과는 특허 출원 및 국제 논문에 발표하였다.

- 국제논문: Biological control of common scab disease by an antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua. (2004년) J. applied microbiology (accepted)

- 특허: 감자 더뎡이병을 억제하는 신규한 마실리스 균주, 상기 균주가 생산하는 항생물질 및 이를 함유하는 미생물 제제(특허 출원번호10-2004-0061072)

- ▶ *Bacillus* sp. sunhua에서 확인된, 식물 성장 촉진 물질은 기기분석 결과 두 가지임이 확인되었다. 지속적인 식물성장 촉진 균주를 토양에서 *Penicillium*속 2종 분리하였으며, 식물성장 촉진 물질이 지베렐린임을 GC/MS로 확인하였다. 본 균주는 *Bacillus* sp. sunhua 생물농약의 실용화 단계에서 적당한 성장을 촉진하는 토양 미생물로서 동시에 투여할 수 있는 유용한 균주이다.
- ▶ 감자 재배토양으로부터 thaxtominA 를 30%이상 분해하는 균주를 15종 분리하여 16s rRNA를 통하여 동정하였다. 그 중에서 *Bacillus*로부터 thaxtomin A를 분해하는 효소유전자를 함유한 plasmid를 분리하였다. 이로서 더뎡이병을 완화시킬 수 있는 유용 유전자원 확보의 기반을 마련하였다.
- ▶ GC/MS를 사용하여 GA<sub>53</sub>, GA<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>4</sub>와 GA<sub>1</sub> 5종류의 내생 GAs이 단일처리한 감자식물체에서 확인되었다. 생합성 저해제 실험 결과로부터 감자의 괴경형성에는 내생 지베렐린의 생합성에 깊이 관여하며, 괴경 형성을 저해하는 활성 GAs으로는 탄소수 3위에 수산화기가 일어난 GA<sub>1</sub>으로 추정되었다. G<sub>20</sub>에서 활성형 GA<sub>1</sub>으로 변환하는 3β-hydroxylase 유전자를 분리하여 *E.coli* 에서 과대 발현하고 GC/MS로 그 생화학적 기능을 확인하였다. 이로서 감자의 괴경형성을 조절할 수 있는 유용 유전자원을 확보하였다.

## 2) 활용에 대한 건의

본연구에서 분리한 *Bacillus* sp. sunhua는 현재까지 알려진 더뎡이

병 방제 미생물보다 높은 효과를 가졌으며 그 활성본체가 iturin A 와 macrolactin A로 확인되었다. 일년 반에 걸친 pot 및 포장실험에서 현장 적용 가능성을 검토한 결과 40%의 감염율을 감소시켜 생물농약으로서 발전할 가능성이 매우 높다는 점에서 획기적이다. 본 연구에 대한 활용에 대한 건의는 다음과 같다.

- ▶ 본 연구 과제에서 축적될 것으로 기대되는 식물병 독소의 무독화와 환경친화적인 천연물 농약의 실용화 기술은 다른 많은 작물 질병에 대한 방제 방법을 수립하는 데에 유효한 지표가 될 수 있다.
- ▶ 농업용 생물 산업에서의 제제화에 관한 연구, 실용화에 관한 연구 등이 수행되어 국내에서도 다수의 신규 천연물 농약이 실용화에 성공될 수 있도록 후속연구가 필요하다.
- ▶ 본 연구에 의하여 개발되는 천연물 농약은 1차적으로 감자 세균병 방제 농약으로 사용되어 농업 생산성 및 소득 증대에 이바지 할 것이며, 감자를 주식으로 하는 여타 국가에 수출할 수 있도록 장기적인 지원이 필요하다.
- ▶ 그리고 본 연구에서 분리한 식물 조기성장촉진 물질을 생산하는 균주 및 감자괴경 형성을 조절하는 유용 유전자원은 향후 감자의 고품질 다수확 재배기술에 활용될 가능성이 매우 높아 후속연구가 필요하다.



## SUMMARY

### (영문요약문)

A bacterium strain that can inhibit the disease of potato was isolated from the soil. This strain was also found to be able to promote the growth of potato, and thus was studied for the development of biological control agent.

▶ A further developed bacterium strain, named sunhua, was isolated from the field with low infection rate of common scab disease after the finding of MJM002. This bacterium was identified as a *Bacillus* species by 16S rRNA gene sequence analysis and was designated *Bacillus* sp. sunhua. The antibiotics that it produced were identified as iturin A and macrolactin A. This strain decreased the infection rate by 40% in pot assay. These results are going to be published in *Journal of Applied Microbiology*.

▶ Plant-growth promoting compounds produced by *Bacillus* sp. sunhua were identified as two compounds by GC/MS. Another active compound produced by two other microbes which also promoted the plant growth was identified as giberellin(GAs). These strains can be used as plant-growth promotion agents together with *Bacillus* sp. sunhua.

▶ Fifteen strains that can degrade higher than 30% thaxtomin A were isolated from the soil, and were identified by 16S rRNA analysis. Plasmids containing the genes encoding the enzymes that can degrade the thaxtomin A was isolated from the *Bacillus* strain that can degrade the thaxtomin A.

▶ Five endogeneous GAs (GA53, GA19, GA20, GA4 and GA1) were found in the stem and leaves of potato plant. The tuber growth has close relationship with biosynthesis of self-resistant GAs in our study. Inhibition of growth was found to be caused by GA1. The gene for 3 $\alpha$ -hydroxylase that can change G20 to GA1 were isolated and transformed to *E. coli* and the transformant's production of GA1 was identified by GC/MS.

# CONTENTS

## (영문목차)

1. Introduction
2. The present state of the technology
3. Result
4. Achievement and contribution
5. Application plan
6. Information of overseas science and technology
7. References

## 목 차

제1장 연구개발과제의 개요.....	1
1. 개발기술의 필요성.....	1
제2장 국내외 기술개발현황.....	7
제3장 연구개발수행 내용 및 결과.....	9
제1절 1차년도 연구 수행방법 및 결과.....	10
제2절 2차년도 연구 수행방법 및 결과.....	27
제3절 3차년도 연구 수행방법 및 결과.....	42
제4장 목표달성도 및 관련분야의 기여도.....	73
제5장 연구개발결과의 활용계획.....	75
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	76
제7장 참고문헌.....	78

# 제 1장 연구개발과제의 개요

## 1. 연구개발과제의 필요성

UN통계에 의하면 현재 세계의 기아인구는 5~10 억명에 달하며 서기 2003년에 100억 명으로 추정되는 세계인구의 식량문제를 해결하기 위해서는 현재 식량 생산량의 80%이상의 증수가 요구되는 바, 이를 해결하기 위해서는 생명공학기술을 이용한 식량작물의 생산성 증대 및 상품성 개량이 유일한 돌파구로 사료된다.

세계에서 재배되고 있는 여러 식량작물 중, 감자는 약 130여 개국에서 재배되며, 생산량은 연간 2억 8천만톤('98)으로 생산량으로는 옥수수,벼, 밀 다음으로 4위, 재배 면적으로는 8위를 차지하고 있는 주요작물이다. 따라서 인류의 식량문제를 해결하는데 대단히 중요하며, 생리·생태적 특성으로 보아 그 재배면적이 크게 늘어날 수 있는 성장 작목으로서, 그 증산가치는 다른 어느 작목보다도 앞서가는 작목이 될 것이다. 하지만 농업기반이 매우 취약한 우리나라의 여건속에서, 감자의 국제경쟁력은 너무도 허약하여 선진국과 비교해 볼 때 수량면에서는 50~60% 수준이고 생산비는 5배나 높은 실정이며, 건물율과 가공수율 모두 80% 수준으로 매우 낮은 실정이다. 더 나아가 북한은 식량위기로 인해 '감자농사혁명'이라는 방침으로 감자재배면적을 확대하여 춘궁기의 식량문제 해결에 노력하고 있으나 불리한 재배조건-생육온도, 재배시기-으로 인하여 수량 증대와 내병성, 조숙성인 감자를 필요로 하고 있다. 따라서 통일한국을 대비한 식량문제 해결에 토지생산성이나 열량(cal) 생산면에서 다른 어떤 식량작물보다 우수한 감자에 대한 연구가 더욱 많이 이루어져야 한다.

감자는 저칼로리이고 알칼리성 건강식품이며, 가공산업의 발달로 다양한 가공품이 생산되면서 소비가 계속 증가되고 있어 가공감자인 튀김감자와 감자칩, 그리고 감자전분의 소비는 증가될 여지가 많으나 많은 양을 수입에 의존하고 있고 국내의 총생산량은 거의 변동이 없는 실정이다. 감자의 고품질, 안전다수성 품종 및 재배기술을 개발 보급함으로써 감자의 국제경쟁력을 향상시켜 감자수입을 대체하여 감자생산농가의 소득증대에 많은 노력을 기울여야 한다.

농작물의 병해충에 의한 피해는 더욱 심화되고 있으며 특히, 감자의

경우 상품성을 저하시키는 주된 질병 유발원으로는 무름병(*Erwinia cartovora*)과 풋마름병(*Ralstonia solanacearum*) 및 더덩이병(*Streptomyces* spp.) 등의 세균에 의한 병과 바이러스와 곰팡이에 의한 병등이 있다. 그중 세균병은 전세계의 감자 재배지역에서 발생하며 감자의 연작지에서 특히 심한 것으로 알려져 있고, 최근 국내에서는 품종에 따라 차이가 있기는 하지만, 평균 30~40%의 세균병 이병율이 나타나며, 심한 경우 발생율이 60~70%에 이르러 상품성을 저하시키고 농가 소득에 큰 피해를 입히고 있어, 건전 종서 생산 및 수량감소를 초래하는 피해를 주고 있는 실정이다. 이에 따른 유기합성농약사용의 증가로 농업생산비 증가는 물론 농약에 의한 환경오염 역시 큰 사회문제로 대두되고 있어, 생물농약의 개발은 매우 시급한 실정이다.

따라서 본 과제에서는 통일한국의 식량작물로서의 감자의 생산량 증대 및 상품성 향상기술을 개발하고자 **국내 토양으로부터 감자의 생산성에 중요한 조기생장촉진 효과와 생산량과 상품성에 큰 영향을 미치는 세균병을 억제하는 효과를 나타내는 미생물**을 분리하여, 미생물이 생산하는 생리활성물질의 생합성 및 기능을 추적하여 생산성 증진 기술에 활용하고, 생산량과 상품성에 영향을 나타내는 세균병 유발을 방지하는 물질도 연구하여 유기합성 농약 사용으로 인한 폐해를 감소시킬 수 있는 생물농약 개발로 상품성을 향상시키고자 하였다.

## 2. 기술적 측면

### ▶ 생리활성물질 처리에 의한 감자 괴경 확대를 위한 연구

- 일부작물(벼, 토마토)에서는 식물내생 호르몬의 생합성과 물질생산 관계가 밝혀져 작물생산 기술 개발이 시도되고 있음.
- 감자의 생육단계별 분화 및 성장조절 메카니즘에 작용하는 내생호르몬의 동정과 기작을 밝혀 고유기능의 강화와 물질생산을 증대.
- 감자 괴경형성기에 관여하는 식물 호르몬의 생성, 이동 및 역할에 대한 연구와 기술확립을 통하여 재배 과정중에 나타나는 괴경형성의 생리장해(중심공동, 2차휴면, 2차생장) 발생 경감대책 수립이 가능함.
- 감자의 괴경형성 억제물질로 알려진 지베렐린을 중심으로, 화학 및 생화학적으로 괴경형성 기작의 규명.

▶ **미생물이 생산하는 감자의 성장 촉진제**

- 감자의 조기성장을 유도하는 물질에 대한 연구가 식물에서 뿐 만 아니라 미생물에서도 시도되고 있음.
- 미생물 유래 감자의 조기성장 촉진과 내성호르몬 조절로 인위적으로 괴경 비대 착생이 조절 가능하여 감자 생산량을 증대할 수 있음

▶ **감자의 세균병 및 질병 독소를 억제하는 인자 및 유전자원 확보**

감자의 상품성을 저하시키는 주된 질병유발원으로는 무름병(*Erwinia arotovora*)과 썩음병(*Ralstonia solanacearum*) 및 더뎡이병(*Streptomyces* spp.) 등의 세균병이 알려져 있으며, 또한 바이러스와 곰팡이가 그 원인이 되기도 한다. 특히 세균이 일으키는 더뎡이병은 전세계의 감자 재배지역에서 발생하며 감자의 연작지에서 특히 심한 것으로 알려져 있다.

- 병을 방제함에 있어 길항균을 이용한 방법은 실험실에서 우수한 균주가 포장에서 정착을 못하는 단점으로 인해 새로운 방법 즉, 식물병 독소의 무독화에 대한 연구가 필요함.
- 식물병 독소(fusaric acid, albicidin 등)의 무독화에 대한 연구가 대사물질로의 사용, 또는 구조의 변환 또는 작용기의 치환등의 방법으로 이루어지고 있다.
- 감자 세균병 억제물질 및 식물병 독소(thaxtomin)의 무독화에 대한 국내연구는 식물병독성 무독화라는 기술 축적에 크게 기여하게 될 것임.
- 감자 더뎡이병 독소(thaxtomin)는 4-nitrotryptophan과 phenylalanine으로 이루어진 cyclic dipeptide의 구조이며, 이에 대한 생성 기작을 이해 함으로서 독소제거에 보다 효과적인 방법을 도입할 수 있음.
- Thaxtomin을 탄소원이나 질소원으로 이용하는 미생물들을 선발하고 가장 우수한 효소 생성균주로부터 유전자를 분리하여 이를 감자의 분자유종의 유전자원으로 확보할 수 있다.

▶ **감자의 상품성 향상을 위한 생물농약 개발**

농작물의 병해충에 의한 피해는 더욱 심화되고 있으며, 이에 따른 농약

사용의 증가로 농업생산비 증가는 물론 농약에 의한 환경오염 역시 큰 사회문제로 대두되고 있어 환경친화적인 작물보호제 즉, 생물농약의 개발은 매우 시급한 실정이다. 본 과제 수행을 통하여 감자 세균병 방제용 생물농약 개발을 성공적으로 완료함으로써 농업용 생물 산업에서의 핵심기술을 축적하고, 이를 실용화하여 농업 생산성 개선에 기여하고자 한다.

- 최근의 작물 질병 방제 전략에 있어서 가장 높은 관심도를 받고 있는 것이 ‘생물 농약’ 이라 할 수 있다.
- 하나의 생물 농약이 개발되기 위해 다양한 전문적인 기술 축적이 이루어져야 하는 첨단 기술 분야라고 할 수 있다.
- ‘생물 농약’ 은 작물 질병 원인균에 길항성을 갖는 특이 미생물을 토양에 적용하고 정착하도록 유도하여 본질적으로 작물의 질병 저항성을 제고하는 방법이다.
- 생물 농약에 대한 개발은 기존의 합성 농약에 저항성을 보이는 작물 병원균에 대처하기 위한 방법으로서, 기술적 측면에서 뿐 만 아니라 경제·문화적인 측면에서도 높은 가치를 인정받는 분야라고 할 수 있다.
- 현재 상용화되어졌거나 상용화를 위한 연구가 활발히 진행되어지고 있는 생물 농약의 모두가 미생물의 특이 천연 물질 생산 능력에 기초한 것이다. 따라서, 본 과제의 연구에서 분리된 감자 세균병원균 저해균주를 생물 농약으로 개발한다면 근본적인 감자 세균병 방제 방법을 확립할 수 있을 것으로 기대된다.

▶ **천연물·생물 농약 적용 기술 확립**

본 단계의 연구에서는 농업용 유용 물질의 대량 생산 기술을 포함하여 신규 생물 농약 개발에 관한 전반적인 기술 축적에 크게 기여할 수 있으리라 사료된다.

- 천연물·생물 농약 개발을 위한 대량 배양 및 생산 체계 확립.
- 천연물·생물 농약 실용화를 위한 토양에의 적용 기술 확립.

### 3. 경제·산업적 측면

- ▶ 최근 감자의 소비증가로 가공용 감자의 수입이 증가하는 실정이므로 감자의 고품질 안전다수성 품종 및 재배기술을 개발 보급함으로써 감자의 국제경쟁력을 향상시켜 감자수입을 대체하고 감자생산농가의 소득증대에 기여할 수 있다.
- ▶ 최근 국내에서는 품종에 따라 차이가 있기는 하지만, 평균 30~40%의 감자 세균병 이병율이 나타나며, 심한 경우 발생율이 60~70%에 이르러 상품성을 저하시키고 이에 따라 농가 소득에 큰 피해를 입히고 있으며, 건전 종서 생산 및 수량 감소를 초래하는 피해를 주고 있는 실정이다.
- ▶ 감자 세균병을 방제하는 미생물 및 이의 대사산물을 생물 농약 및 천연물 농약으로 실용화하면 연간 수십 억원의 농약 수입 대체 효과가 있을 것으로 기대된다.
- ▶ 방제의 기작에 대한 학문적 기초와 실용화 연구과정에서의 연구성과를 종합적으로 관련지음으로서 신규 농약으로서의 국제적 신뢰도를 축적할 수 있다.
- ▶ 본 실용화 기술은 농업 생산성을 개선하여 농민 소득을 증진시키고 나아가 기술로서 국가 경쟁력의 향상에 기여할 수 있으며, 이는 국내 농업 생산 구조의 효율성을 증대하는 데에도 이바지할 수 있을 것으로 사려된다.

### 4. 사회·문화적 측면

- ▶ UN통계에 의하면 현재 세계의 기아인구는 5~10억 명에 달하며 서기 2003년에 100억 명으로 추정되는 세계인구의 식량문제를 해결하기 위해서는 현재 식량생산량의 80%이상의 중수가 요구되며 이를 해결하기 위해 생물공학기술을 이용한 식량작물의 생산성증대가 유일한 돌파구로 인정된다.
- ▶ 천연물·생물 농약은 자연 상태의 토양에서 분리된 미생물에서 유래한 것으로서 유기합성 농약에 반하여 독성에 관한 문제가 없을 것



으로 사료된다: 본 연구과제에서 개발될 천연물농약 및 생물농약은 저독하고 안전한 식량 생산 체계 수립에 이바지 할 것이다.

- ▶ GR대비 및 OECD 농업환경지표개발과 연계하여 잔류 원인이 없는 방제 기술의 확보가 시급한 실정이다.
- ▶ GR이 실행될 때 우리 나라 농업에 미치게 될 유기 합성계 농약의 엄격한 사용 규제 지침으로 인한 환경 및 작물체내 독성문제의 종합적 관리 측면에서도 천연물·생물 농약의 개발은 시급하다 할 수 있다.
- ▶ 본 연구는 국내 존재 토양 미생물의 산업화 기술 축적을 위한 첨단 연구이다.
- ▶ 농업 생산 작업에서의 효율성 및 안전성 확보는 농업 환경 및 문화의 선진화에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

## 제 2장 국내외 기술개발 현황

### 1. 국내 관련 기술 현황 사회·문화적 측면

- ▶ 국내에서는 감자의 괴경형성 및 비대에 대한 생리적 연구결과 보고는 있으나, 화학, 생화학 및 분자 생물학적인 연구는 미비하다
- ▶ 국내에서는 천연물 및 생물 농약에 대한 연구 결과가 학술적인 차원에서 보고되어진 바는 있으나, 신규 물질에 대한 보고와 실용화는 미비한 상태이다.
- ▶ 유용 미생물 자원의 분리 및 기능에 관한 연구의 미흡으로 국내에 독점권을 가진 유용한 유전자 및 물질개발에 대한 국가경쟁력의 약화가 심각하므로 많은 인력과 연구비의 투자가 시급한 실정이다.
- ▶ 국가 연구기관과 대학간의 유기적인 연구가 절실함에도 불구하고 이러한 공동 연구 체계가 미약하다.
- ▶ 신규 물질의 개발과 실용화에는 많은 시간과 연구비가 소요되기 때문에 기업에서는 연구투자를 기피하고 있는 실정이다.
- ▶ 유용 미생물 자원의 확보 및 그 실용화에 대한 국내의 기술 축적은 미미한 상태이며, 이에 따라 연구 투자 의지가 부족하여 선진국과의 기술 격차가 심화되고 있는 실정이다.

### 2. 국외 관련 기술 현황 사회·문화적 측면

- ▶ 괴경 형성 및 비대를 유도하는 연구가 유럽을 중심으로 활발히 진행되고 있다. 괴경 형성 유도물질로 식물의 생리활성물질인 자스몬산이 제기되고 있으나, 고농도에서만 괴경 유도 활성을 보이는 등 아직 불명한 점이 많다.
- ▶ GR 실행시 요구되는 엄격한 환경 규제를 만족할 수 있는 생물 농약의 중요성에 기초하여 그 연구 개발이 급속히 진행되고 있는 것이 세계적인 추세이다.
- ▶ 노동 집약적인 농업에 의존하는 일본이 현재 수준의 식량 자급도를 유지할 수 있는 것은 새로운 천연물 농약의 개발을 위한 집중적인

연구 투자가 있었기 때문이다. 그 결과로서 polyoxin, kasugamycin 과 validamycin 이 1960 년도 후반에 개발되어 산업화되었으며, 최근 예도 보다 경제적이고 저독 안전한 농약의 개발에 많은 연구 노력을 투여하고 있다.

- ▶ 농업 선진국인 미국의 경우 *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Trichoderma* 중 유래 20 여종의 미생물 원제가 작물 질병 방제 용도로 이미 등록되어 있으며, 이들 대부분이 1990 년도에 집중적으로 이루어졌다. 최근에도 생물 농약의 개발을 위한 이론적인 연구 및 그 실용화를 위한 응용적인 측면의 연구가 활발히 진행되고 있다.
- ▶ 최근에 감자 세균병의 발병 기작을 이해하고 이에 기초하여 이의 생물학적인 방제 기술을 확립하고자 하는 연구가 국외 연구 집단에 의하여 활발히 진행되어지고 있는 실정이나 아직은 농약 원제로서 등록되어진 예는 없다.

## 제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 연구개발수행내용

구 분		연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2001)	제1세부과제	▷ 감자 조기성장 유도 물질을 균주로부터 분리 ▷ 감자 조기성장을 유도하는 물질의 작용 효과 시험
	제2세부과제	▷ 감자 세균병 억제인자를 균주로부터 분리 ▷ 감자 세균병 toxin을 분해하는 미생물을국내 토양으로부터 분리하여 균주 동정 ▷ 감자 조기성장 촉진물질이나 세균병 억제인자를 분비하는 균주 개발
	제3세부과제	▷ <i>Bacillus</i> sp. sunhua가 생산하는 성장촉진물질과 감자에 존재하는 내생 지베렐린의 동정하여 아직 알려지지 않은 생합성 경로 규명 ▷ 동정한 지베렐린 및 생합성 저해제를 식물체에 투여하여 괴경 형성의 촉진 및 저해 효과를 규명
	제1협동과제	▷ 감자 조기 성장촉진이나 세균병원균 저해 효과가 있는 균주 동정 ▷ 감자 세균병원균 저해 물질 생산을 위한 발효 및 배지조건 검토
2차년도 (2002)	제1세부과제	▷ 감자 성장촉진 유도 물질의 분리 정제 ▷ 감자 성장촉진을 유도하는 물질의 생물 검정법 확립
	제2세부과제	▷ 감자 세균병 억제인자의 구조 규명 ▷ 감자 세균병 toxin 분해 균주의 분해 기작 규명 ▷ 감자 세균병 toxin 분해 효소의 기능 확립 및 특성 연구
	제3세부과제	▷ 일장조건에 따른 괴경형성의 양상과 지베렐린의 생성 관계 해명 ▷ 괴경의 비대 생장시의 지베렐린의 생성 및 그 역할 규명
	제1협동과제	▷ 감자 세균병원균 저해 물질의 분리 정제 ▷ 천연 항생 물질로서의 신규성 및 신규 용도성 시험

3차년도 (2003)	제1세부과제	▷ 성장촉진물질의 작용기작과 미생물 유래의 감자 조기 성장 유도물질로서의 용도성 시험. ▷ 성장촉진유도물질의 생산 체계를 확립 (제 2세부 및 협동과제와 협력).
	제2세부과제	▷ 감자 세균병 억제 인자 및 감자 세균병 toxin 분해를 지정하는 유전자의 확보 및 이를 이용한 근원적 질병방제 전략 수립. ▷ 감자 세균병 toxin 분해 효소 유전자를 감자 세균병 내성 감자 종자 생산 유전자원으로 활용가능성 타진.
	제3세부과제	▷ 감자 조기성장 촉진인자와 감자 지베렐린 생합성 조절로 감자 생산성증대 기술개발 ▷ 기능이 밝혀진 유전자를 이용한 괴경형성의 시기 조절 및 괴경 비대를 위한 기반 기술 확보함.
	제1협동과제	▷ 농업용 항생 물질 실용화를 위한 제제화 가능성 검토. ▷ 포장 실험을 통한 활성 물질 생산균주의 생산 체계 시험

## 제1절 1차 년도 연구 수행방법 및 수행결과

- ① 본 과제의 신청 당시 *Bacillus* sp. MJM002를 분리하여 감자 성장 촉진 효과와 세균병 저해 효과가 있는 예비 실험 결과를 얻었다.
- ② 과제 선정 후 지속적인 더닝이병 저해 균주를 탐색하여 과제 명에서 사용한 *Bacillus* sp. MJM002보다 2배나 더닝이병 방지 효과를 가진 *Bacillus* sp. sunhua를 분리하여, 이 후 실험을 실시하였다.

### 1. 제1세부과제: 미생물이 생산하는 감자의 성장 촉진제 개발

- ▶ 감자 성장촉진을 유도하는 물질의 생물검정법 확립  
 국내토양에서 분리한 미생물이 생산하는 물질의 감자 성장 촉진효

과를 알아보았다. 예비실험으로 토양에 괴경을 심어 발아하는 감자괴경에 직접 배양액을 처리하여 그 성장효과를 조사하였다. 그 결과 배양액 처리구에서 감자의 줄기성장이 촉진되는 것이 관찰되었다 (그림 1). 그러나 계속된 반복실험에서 배양액 처리시 감자줄기의 현저한 촉진은 재현성이 보이지 않았다. 이 실험결과를 재검증하기 위하여 균주 배양액을 이용하여 *in vitro*에서 감자 성장촉진효과와 토마토 줄기생장효과에 대해 생물검정을 시도하였다. 먼저 암소 4℃에서 2개월 이상 저장하여 내생 휴면 종료 후의 감자괴경을 25℃ 암소에서 1-3주간 정지하여 싹을 틔운 후, 30cm 정도 길이의 황화줄기를 육성하였다. 이 황화 줄기로부터 절간을 포함한 1cm 가량의 절편을 검정 재료로 사용하였다. 배지는 기본 white 배지를 사용하고 배양액을 이 배지에 첨가하여 절편을 이식하였다. 이식한 절편을 25℃ 암소에서 3주간 배양한 후, 괴경화 또는 비대한 줄기 수를 측정하여 성장 유도 활성화에 의한 효과를 검증하였다. 그 결과 배양액을 처리한 구가 무처리구(배지)에 비하여 큰 차이가 없었다. 다음으로 토마토씨를 재료로 균주 배양액에 의한 토마토줄기 촉진효과를 검증하였다. 농우바이오의 선명토마토씨를 먼저 70% EtOH에 살균하였고 이를 autoclave한 유리 plate에 30개씩 준비하였다. 그리고 growth chamber (2100 lux, 낮: 28℃, 밤:23℃)에서 동일하게 발아한 토마토 씨를 가지고 magenta에 옮겨 배양액을 농도별로 처리하였다. 감자와 마찬가지로 배양액을 처리한구에서 대조구에 비해 11% 성장효과를 나타내었다 (그림2). 이러한 결과들을 보아 토양중에 직접 발아하는 감자괴경에 배양액을 처리하여 줄기가 현저히 성장효과를 보이는 예비실험결과는 배양액에 의한 효과와 토양중의 다른 미생물 또는 다른 기작에 의하여 일시적으로 유도되었던 생리현상으로 사료된다. 그래서 생물농약의 실용화 단계에서 적당한 성장을 촉진하는 토양 미생물의 분리가 필요하다.



그림 1. *Bacillus sp. sunhua* 배양액 처리에 따른 감자 성장촉진 효과

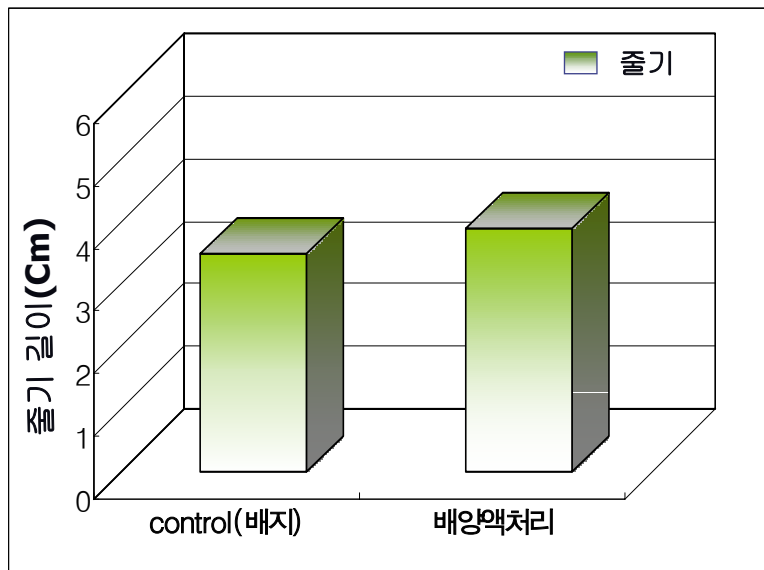


그림 2. 배양액처리시의 토마토 줄기의 성장효과

## 2) 제 2세부과제 : 감자의 세균병 및 독소를 억제하는 인자 및 유전자원 확보

### 가) 감자 세균병 억제인자를 분리

1차 년도에는 감자 세균병 억제인자를 찾기 위하여 먼저 감자 질병을 일으키는 원인 균으로 알려진 *S. scabiei*와 더랭이병의 원인물질인 Thaxtomin A를 확보하는데 주력하였다. 따라서 Thaxtomin A를 대량 생산 하는 *S. scabiei*를 확보하였다. 현재는 Thaxtomin A를 대량생산하여 국내외 토양으로부터 Thaxtomin A를 분해하는 균주를 탐색하고 있으며 toxin에 대한 분해 효과 실험을 진행 중에 있다. 일차적으로 미생물로부터 Thaxtomin A를 얻기 위해 oat meal broth 배지 구축을 확립하였다. Thaxtomin A생산 여부확인을 위해 HPLC를 수행한 결과 그림 4의 A, B에서 생산된 Thaxtomin A를 확인하였다. 그림 4의 A는 control로 분양 받은 순수 Thaxtomin A의 크로마토그램이고 B는 *S. scabiei*로부터 생산된 Thaxtomin A 분획의 크로마토그램을 나타낸다 (그림 3). 이러한 결과를 바탕으로 감자의 세균병 억제인자를 2차 년도에 분리하고자 한다.

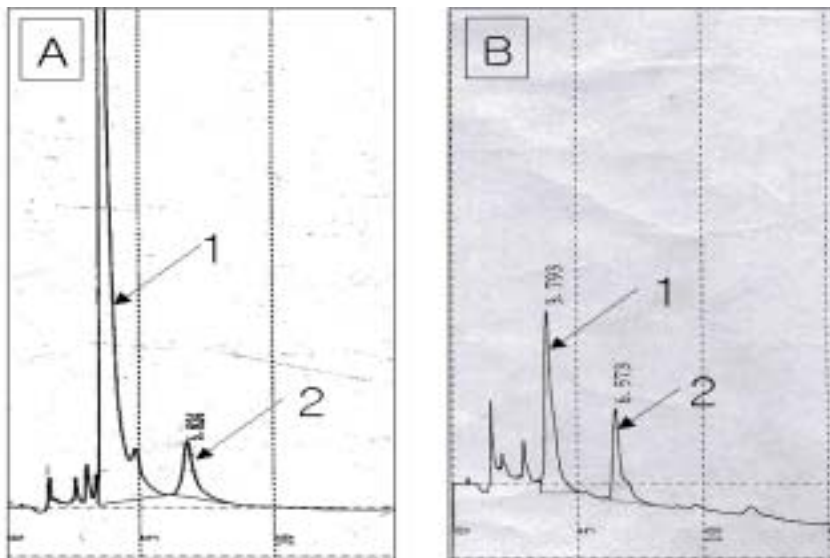


그림 3. HPLC를 통한 Thaxtomin A 생산 여부 확인  
( peak2 : Thaxtomin A)



나) 감자 세균병 억제하는 미생물을 국내 토양으로부터 분리

제주도 감자토양으로부터 분리한 *Bacillus sp. sunhua*와 *Bacillus sp.* 8개, 중국토양에서의 미생물 5개를 Screening 하여 감자 세균병 toxin을 분해하는지를 bioassay 하였다. 각각의 미생물들을 30℃에서 배양한 후 상등액을 가지고서 paper disc를 올려놓은 GYM agar plate에 loading 하였다. 그 결과 *Bacillus sp. sunhua*가 *Streptomyces scabiei* 길항을 확인하였으며 또한 감자 세균병 toxin인 Thaxtomin A를 분해하는지도 확인 중에 있다 (그림 4). 1차 년도에 실시한 세균병 길항균 또는 Thaxtomin A를 분해하는 세균은 *Bacillus sp. sunhua*외에는 없었다. 현재 더덩이병을 완화시키는 것으로 예상되는 29개의 세균에 대한 Bioassay를 진행하고 있다.



1. *Bacillus sp. sunhua*, 2. DB 202, 3. WB 700

그림 4. 세균병을 억제하는 *Bacillus sp. sunhua*의 길항 test

### 3) 제 3세부과제 : 생리활성물질 조절에 의한 감자괴경 확대를 위한 연구

가) 감자에 존재하는 내생 지베렐린(GAs) 동정하여 아직 알려지지 않은 생합성 경로 규명

감자 괴경형성을 비롯하여 감자 생활환 전체에 대한 내성 GAs의 역할을 밝히기 위한 동정과 생합성 경로를 규명하였다. 먼저 감자 수미 경엽으로부터 HPLC, GC/MS를 통하여 5개(GA<sub>53</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>19</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>1</sub>)의 GAs를 동정하였다. 그런 후 동정된 GAs의 생합성 경로를 추적해 본 결과 고등 식물에서 현재 일반적으로 여겨지고 있는 경로와 같이 13-OH와 13-H의 두 생합성 경로가 감자의 경엽에서도 존재한다는 것을 규명하였다 (그림 5). 13-H 경로의 활성화로 생각되어지는 GA<sub>4</sub>의 동정은 이번이 처음이다 (표 1).

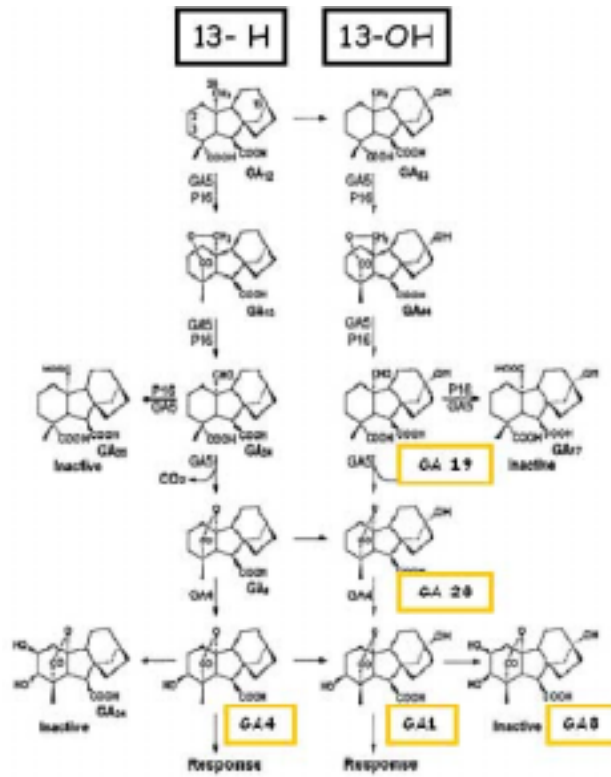


그림 5. 감자의 지베렐린 생합성 예상 경로

표 1. 감자로부터 지베렐린(GAs) 동정

GA	HPLC fractions	KRI <sup>b</sup>	Ion m/Z <sup>c</sup> (relative abundance)
GA53	35-36	2505	448(64), 419(15), 416(20), 386(35), 251(25)
GA20	28-30	2490	418(100), 403(19), 375(75), 359(25), 301(25)
GA19	31-33	2598	462(8), 434(100), 402(33), 375(50), 374(55)
GA4	35-36	2510	418(15), 386(20), 328(25), 289(40), 284(100)
GA1	20-21	2679	506(100), 448(12), 376(15), 313(12), 235(5)

<sup>a</sup>MeTMSi, methylester trimethylsilylether <sup>b</sup>KRI, Kovats Retention Index <sup>c</sup>m/z, mass/charge

나) 동정한 지베렐린 및 생합성 저해제를 식물체에 투여하여 괴경 형성의 촉진 및 저해효과를 규명

동정된 5개(GA<sub>53</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>19</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>1</sub>) GAs이 괴경 형성에 어떤 영향을 주는지 규명하기 위해 동정된 5개 GAs을 직접 식물에 투여하여 괴경 형성에 대한 활성도를 측정하였다. 그 결과 괴경 형성 저해는 GA<sub>1</sub>이 가장 높았고, 그 다음이 GA<sub>20</sub>, GA<sub>19</sub> 순으로 괴경형성 저해 활성도를 나타냈다. 이는 GA<sub>1</sub>의 경우 C-3에 수산기를 가졌기 때문이다. 그러나 GA<sub>8</sub>에서는 GA<sub>1</sub>에 비하여 괴경 형성 저해 활성이 매우 낮았다. 이런 결과는 C-2위치에 수산화가 일어난 비 활성형으로 전환되었기 때문으로 추정된다. 그리고 감자 괴경형성을 저해하는 활성을 가진 지베렐린은 C-3에 수산기가 있는 지베렐린인 것으로 시사되었다. 생합성 과정의 상부(ent - Kaurene 산화단계)를 저해하는 Uniconazol과의 공존 하에서의 GA<sub>20</sub>과 GA<sub>1</sub>같이 괴경 형성 저해활성이 높은 것으로 보아 GA<sub>20</sub> 과 GA<sub>1</sub>로 변환되어진 후에 활성을 나타낸 것으로 추정된다. Prohexadione공존 하에서도 GA<sub>20</sub> 이 대조구와 비거하여 저해활성을 나타내는 것은 처리시기와 방법상의 문제, 또는 Prohexadione이 GA<sub>20</sub>로부터 GA<sub>1</sub>에의 변환을 완전히 Block하지 못하는데에서 기인한 것으로 사료된다. 이상의 결과들로부터 감자의 괴경 형성에는 내생 GAs의 생합성이 깊이 관여하며, 괴경 형성을 저해하

는 활성 GAs으로는 탄소수 3위에 수산화가 일어난 GA<sub>1</sub>으로 추정된다 (표 2).

표 2. 지베렐린(GAs)과 생합성 저해제 처리에 의한 괴경형성을

처리구	괴경형성율
Con	96.7±3.3
Uni	96.7±3.3
Uni+GA20	40.0±5.8
Uni+GA1	36.7±3.3
Pro	96.7±3.3
Pro+GA20	76.7±5.8
Pro+GA1	43.3±3.3

con : control, Uni : uniconazole, Pro : prohexadione

#### 4) 제 1협동과제 : 감자의 생산성 및 상품성 향상을 위한 생물 농약 개발

가) 감자 조기 성장촉진과 세균병원균 저해 효과가 있는 균주 동정

##### (1) 배양학적 특성

분리 균주의 배양학적 특성은 표 3과 같다. Nutrient 한천 평판배지에서의 colony 형태는 원형이었고, 색깔은 크림색이었으며, 표면은 광택이 나면서 매끄러운 상태였다. Nutrient 액체배지에서 균체의 생육은 좋았고 균체의 침전현상이 나타났다.

표 3. *Bacillus* sp. sunhua의 형태학적인 특징

Factor	Characteristic
Shape	Rod
Cell size	1.4 $\mu$ m × 2.3 $\mu$ m
Motility	Motile
Flagella	Positive
Spore stain	Positive
Gram stain	Positive

(2) 생리학적인 특성

분리 균주의 생리학적인 특성을 검토한 결과는 표 4와 같다. 생육온도 범위는 20℃~50℃ 이었고, 생육 pH 범위는 pH 5-10이었다. 또한 염 농도가 6% 까지 생육이 가능하였으며, catalase 양성 및 starch, casein, cellulose, esculin 분해능이 있었다. 이상과 같은 분리 균주의 형태학적 특성, 배양학적 특성 및 생리학적인 특성을 검토한 결과 *Bacillus* 속으로 동정되었으며 분리 균주를 *Bacillus* sp. sunhua로 명명하였다.

표 4. *Bacillus* sp. sunhua의 생리학적인 특징

Factor		Characteristics
Temperature range for growth		20~50
pH range for growth		5~10
NaCl tolerance for growth		≤6%
Catalase		+
Oxidase		+
Urease		+
Lipase (Tween 80 hydrolysis)		+
β-Galactosidase		+
Arginine dihydrolase		+
Phenylalanine deaminase		+
Hydrolysis of ;	Starch	+
	Casein	+
	Cellulose	+
	Esculin	-
Indole production		+
H <sub>2</sub> S Production on TSI agar		+
Levan formation from sucrose		+
NH <sub>3</sub> production from arginine		+
NH <sub>3</sub> production from peptone		-
Gelatin liquefaction		+
Utilization of citrate		+
Methyl red test		+
Nitrate reduction		+
Denitrification		+
Action on milk	; Coagulation	-
	Peptonization	+
O-F test		Fermentation
Degradation of tyrosine		-

나) 감자 세균병원균 저해 물질 생산을 위한 발효 및 배지 조건 확립

(1) 배양시간에 따른 영향

TSB배지에서 배양시간에 따른 *Bacillus* sp. sunhua 균주의 생육과 항생물질 생산을 검토한 결과는 표 5와 같다. 균체의 생육은 2일 이후에서 정지기에 도달하였다. 그리고 항생물질 생산은 균체의 생육이 정지기에 도달한 후인 2일에서 최대를 나타내었고 3일 이후에는 점차 감소하였다. 따라서 이 후의 실험에서는, 항생물질 생산을 위한 배양은 2일 동안 행하였다

표 5. 배양시간에 따른 균체의 생육 및 활성 검토

배양시간	DW(g/ml)	배양후 pH	Clear zone( mm)
			<i>Streptomyces scabiei</i>
24시간	0.03	6.95	12.4
48시간	0.05	6.95	22.4
72시간	0.05	6.84	21.3
96시간	0.03	6.85	20.0

\* TSB: Tryptic soy broth(Difco. Co.)

(2) 배양온도의 영향

배양온도에 따른 *Bacillus* sp. sunhua 균주의 생육과 항생물질 생산을 검토한 결과를 표 6에 나타내었다. 이 결과 균체의 생육은 30℃에서 가장 좋았으나 항생물질의 생산은 37℃에서 최대가 되었다. 따라서 *Bacillus* sp. sunhua 균주의 생육과 항생물질 생산은 배양온도에 따라 다른 것을 알 수 있었다.

표 6. 배양온도에 따른 균체 DW 측정 및 항균활성

배양온도(°C)	균체의 DW (g/ml)	Clear zone (mm)
		<i>Streptomyces scabiei</i>
0°C	.	8
25°C	0.01	18.4
30°C	0.04	20.1
37°C	0.03	22.5
50°C	0.01	20.2

(3) 초기 pH의 영향

항생물질 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 표 7에 나타내었다. 초기 pH를 4-10 까지 변화시키면서 항생물질 생산을 검토한 결과 pH 7에서 가장 좋았다.

표 7. 초기 pH 변화에 따른 균체의 생육 및 활성측정

초기 pH	DW(g/ml)	배양후 pH	Clear zone (mm)
			<i>Streptomyces scabiei</i>
3	.	.	8
4	.	.	8
5	0.02	6.75	18.4
6	0.03	6.97	20.2
7	0.04	7.04	22.8
8	0.02	6.95	20.1
9	0.02	6.91	18.0



(4) 탄소원의 영향

항생물질 생산에 미치는 각종 탄소원의 영향을 검토한 결과 표 8과 같이 glucose를 탄소원으로 사용하였을 때 생산이 가장 좋았다. 또한 항생물질 생산을 위한 glucose 농도를 검토한 결과 표 9에서 보는 바와 같이 glucose의 농도를 1.5%(w/v) 첨가하였을 때 가장 좋았으며, 그 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 나타내었다.

표 8. 탄소원에 따른 항생물질 생산 효과

Carbon source	Inhibition zone size (mm)
	<i>Streptomyces scabiei</i>
Control	20.1
Dextrin	18.4
Glucose	24.8
Mannitol	18.2
Sucrose	22.1
Fructose	21.0
Lactose	21.1
Raffinose	18.0
Cellulose	14.0
Galactose	15.0
Maltose	18.0
Soluble starch	23.2
Xylose	19.0

(5) 질소원의 영향

각종 질소원에 따른 항생물질 생산을 검토한 결과를 표 10에 나타내었다. Beef extract를 포함한 모든 유기질소원들은 항생물질 생산에 좋은 효과를 나타낸 반면, KNO<sub>3</sub>를 포함한 모든 무기질소원들은 항생물질 생산에 효과가 없었다. 유기질소원 중 yeast extract를 첨가하였을 때 항생물질의 생산이 가장 현저하게 증가하였다. *Bacillus* sp. 균주에 의한 항생물질 생산을 위해 yeast extract의 농도를 변화시켜 비교한 결과, 표 11에 표시한 바와 같이 0.8%(w/v)를 첨가하였을 때 항생물질 생산이 가장 좋았다. 따라서 이 후의 실험에서는 배지의 질소원으로서 yeast extract를 0.5 %(w/v) 첨가하여 행하였다.

표 9. 질소원에 따른 항생물질 생산 효과

Nitrogen source	Inhibition zone size (mm)
	<i>Streptomyces scabiei</i>
Control	24.5
Beef extract	18.4
Malt extract	19.8
Peptone	18.2
Soybean meal	21.1
Yeast extract	25.8
KNO <sub>3</sub>	8.0
NaNO <sub>2</sub>	8.0
NH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	8.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.0
NH <sub>4</sub> Cl	8.0

표 10. Yeast extract 농도에 따른 항생물질 생산효과

농도(%)	DW(g/ml)	배양후 pH	Clear zone (mm)
			<i>S. scabiei</i>
0.5	0.01	6.64	26.8
1.0	0.02	6.70	25.2
1.5	0.02	6.75	24.8
2.0	0.03	6.97	24.2
2.5	0.04	7.04	23.3
3.0	0.02	6.95	23.4

(6) 무기염류의 영향

Soluble starch 1.5%(w/v), yeast extract 0.5%(w/v)를 첨가한 배지에 각종의 무기염류를 달리하여 항생물질 생산에 미치는 영향을 검토한 결과 표 12에 나타난 바와 같이 KCl이 가장 생산에 좋았다. MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> 및 NaCl 등은 항생물질 생산에 별다른 영향을 미치지 못하였고, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O 및 CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 등의 금속염에 의하여 현저하게 저해되었다. 항생물질 생산을 위한 KCl의 영향을 검토한 결과 표 13에 나타난 바와 같이 0.02%(w/v)에서 항생물질 생산이 가장 높게 나타났고 그 이상의 농도에서는 감소하였다. 이상과 같이 배양조건을 검토하여 *Bacillus* sp. MJM-002 균주의 항생물질 생산을 위한 최적 배지조성을 표 14에 나타내었고 이 배지를 YM배지로 명명하였다.

표 11. 무기염류에 따른 항생물질 생산 효과

Inorganic source	Inhibition zone size (mm)
	<i>Streptomyces scabiei</i>
Control	24.5
BaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	13.5
NaCl	20.5
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.0
KCl	26.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	25.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	24.3
CaCl <sub>2</sub>	20.2
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	18.4

표 12. KCl 농도에 따른 항생물질 생산효과

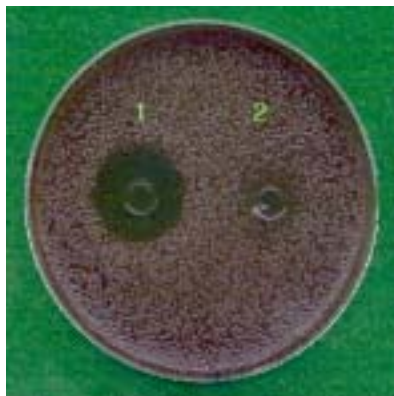
농도(%)	DW(g/ml)	배양후 pH	Clear zone (mm)
			<i>Streptomyces scabiei</i>
0.01	0.01	6.64	25.2
0.02	0.03	6.70	26.8
0.03	0.02	6.75	25.1
0.04	0.01	6.97	24.2
0.05	0.01	7.04	23.3
0.06	0.01	6.95	23.4

표 13. 향생물질생산 최적배지(YM배지)

Ingredient	Concentration (w/v, % )
Glucose	1.5
Yeast extract	0.5
KCl	0.02
pH 7.0, Temperature 37°C	

(7) 향생물질의 발효생산

그림 6에는 *Bacillus* sp. sunhua 균주에 의한 향생물질의 생산을 기본배지-TSB 배지와 최적배지-YM 배지를 사용하여 비교 검토한 결과를 나타내었다. YM 배지를 사용하여 37°C에서 *Bacillus* sp. sunhua 균주를 배양하였을 때 균체의 생육은 배양시간 3일 이후에 정지기에 도달하였으며, 향생물질의 생산은 균체의 대수증식기인 2일이 경과한 후 3일째 최대가 되었다.



1:최적배지 2:TSB 배지

## 제 2절 2차년도 수행방법 및 결과

### 1. 제 1 세부과제

#### 가) 수행방법

1) 이미 확보한 *Bacillus* sp. sunhua 균주로부터 감자 조기성장 유도물질을 분리

- 국내 토양에서 분리된 *Bacillus* sp. sunhua를 37℃, 3일동안 180rpm의 배양조건에서 배양하여 얻어진 배양액을 필터로 균을 제거한다. 그리고 감자 조기성장 유도물질을 분리하기 위해서 여러 가지 유기용매 즉 Hexane, BuOH, 에틸아세테이트(EtOAc)를 사용하였고, 배양여액의 pH를 2, 7, 10으로 조정하고 동량의 유기용매를 가해 교반한 후 물층과 유기 용매층을 구분하였다. 추출후 각각의 물층과 용매층을 감압건조하였다. 그리고 3일 동안 배양기에서 받아시켜 균일하게 발아된 토마토씨에 각각의 물질들을 처리하였다.

2) 감자 성장촉진 유도 물질의 분리 정제

- 감자 성장촉진 유도 물질을 분리 정제하기 위해서 37℃, 180rpm으로 3일간 배양한 후 8,000rpm으로 원심분리하여 얻은 상등액에 에틸아세테이트를 사용하여 3번 추출하였다. 추출액의 농축은 30℃에서 감압건조하였다. 농축된 물질을 silica gel column에 충전하고 이동상을 MeOH로 하여 분획 하였다. 이를 다시 용매에 녹여 reverse phase HPLC를 이용하여 분리하였으며, 이 때 C<sub>18</sub> column을 사용하였고 이동상은 acetonitrile : water(60 : 40)를 사용하였고, 유속 2.0ml/min이었다.

#### 나) 연구결과

##### ▶ 미생물이 생산하는 감자의 성장 촉진제 개발

1) 감자 조기성장 유도 물질을 이미 확보한 *Bacillus* sp. sunhua 균주로부터 분리

- *Bacillus* sp. sunhua가 생산하는 감자 조기성장 유도 물질을 분리하기 위해서 직접 발아하는 토마토씨에 처리하여 생장 조사하였다.

(그림1)에서 보여주는 것은 control인 배양여액과 여러가지 유기용매 즉 Hexane, BuOH, EtOAc를 사용하여 추출하고 각각의 유기용매 추출액은 감압건조시켜 각각의 물질들을 3일동안 배양기에서 발아시켜 균일하게 발아된 토마토씨에 처리하였다. 실험 결과 사용한 유기용매 중 EtOAc 추출액이 가장 효과가 좋았으며, 다음 실험으로는 *Bacillus* sp. sunhua 배양여액을 pH 2, 7, 10으로 조정하고 앞에서 예비실험으로 선택된 EtOAc로 추출하여 pH에 따른 각각의 유기용매층과 물층의 활성을 조사하였다. 그 결과 pH7 유기 용매층에서 감자 조기성장 유도물질이 있음을 확인할 수 있었다(그림2).

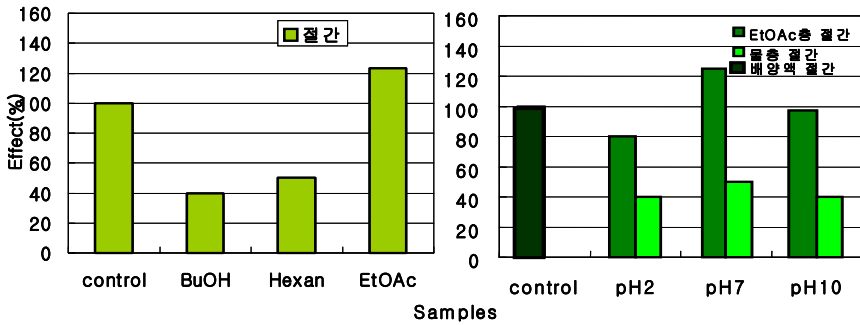


그림 1) 감자 조기성장 유도물질 분리를 위한 예비실험

그림 2) 감자 조기성장 유도물질을 확인

## 2) 감자 성장촉진 유도 물질의 분리정제

- 감자 성장촉진 유도 물질을 분리 정제하기 위해 *Bacillus* sp. sunhua를 37°C, 180rpm으로 3일간 배양한 후 8,000rpm으로 원심분리하여 얻은 상등액을 에틸아세테이트로 3번 추출하여 감압농축하였다. 농축된 물질을 silica gel column에 충전하고 MeOH을 이동상으로 하여 정제하였다. 이를 다시 용매에 녹여 prep HPLC를 수행하여 여러 peak들을 얻을 수 있었다(그림3). 각각 5개 peak들을 분획하여 농축한 다음 발아된 토마토씨에 처리하였다. 그 결과 대조구와 비교하였을 때 분리 정제한 각각의 prep HPLC의 분획들이 성장촉진에 미약한 효과를 보였다. 이런 결과는 분리 정제하는 과정에서 활성의 실활 및 성장촉진물질들이 각각 분산된 것으로 사료된다. 각각의 성장촉진 물질들을 복합적으로 사용한다면 성장촉진효과를 보일 것으로 사료되나 실용화하기에는 부적합 할 것으로 사료되어진다(그림4).

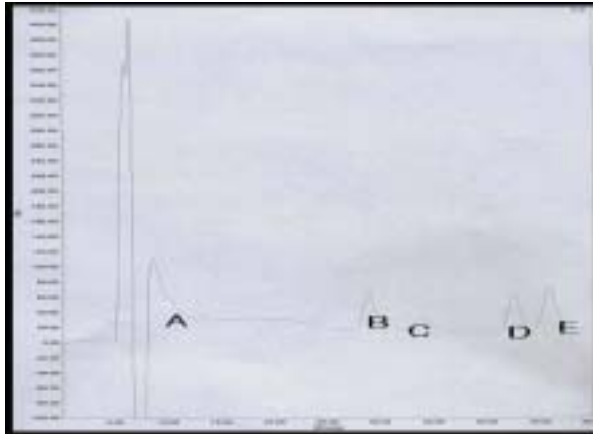


그림 3) 감자 성장촉진 유도 물질을 prep HPLC 분리

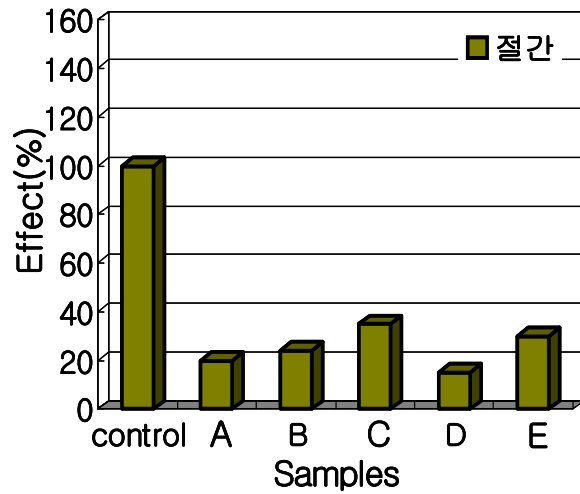


그림 4) 감자 성장촉진 유도물질 처리에 따른 절간 성장 측정



## 2. 제 2 세부과제

### 가) 수행방법

#### 1) 감자 세균병 억제 물질의 규명

- 감자 세균병 억제 물질을 규명하기 위해서 *Bacillus* sp. sunhua의 항생물질 생산조건 및 항생물질 특성조사를 다음과 같이 수행하였다.
- *Bacillus* sp. sunhua의 항생물질 생산조건  
*Bacillus* sp. sunhua의 배양은 TSB배지 (Tryptic Soy Broth) 3ml을 넣은 시험관에 소량 접종한 후 37℃에서 150rpm으로 3일간 배양하였다. 그리고 GYM 배지에 감자 더듬이병인 *Streptomyces scabiei*를 도말한 후 직경 8mm disc에 *Bacillus* sp. sunhua의 상등액을 점적하여 더듬이병균 *S. scabiei*의 성장을 억제하는 clear zone의 유무로 활성을 조사하였다.
- *Bacillus* sp. sunhua가 생산하는 항생물질 특성 조사  
*Bacillus* sp. sunhua가 생산하는 항생물질의 pH에 따른 안전성을 검토하기 위하여 세균 배양액을 0.1N HCl 과 0.1N NaOH로 pH 1 ~ pH 13 까지 조정한 후 4℃에서 20시간 동안 전처리하고 다시 pH 7로 조정한 후 *S. scabiei*를 억제하는 효과를 검증하였다. 그리고 온도에 대한 안정성은 40℃ ~ 120℃까지의 온도에서 30분 동안 (단, 121℃의 경우는 20분)처리한 후 disc방법으로 길항 활성 변화를 조사하였다.

#### 2) 감자 세균병 toxin분해 균주의 분해 현상 규명

- GYM배지를 이용하여 28℃에서 배양된 더듬이병균을 oatmeal broth 500ml에 3%로 접종하고 5일간 배양하여 Thaxtomin A를 생산한 후, HPLC를 이용하여 확인하였다. Thaxtomin A의 열안정성을 이용하여 배양액을 원심 분리하여 균체를 제거한 후, 5ml 씩 시험관에 분주하여 가압 멸균한 다음, 감자밭으로부터 수집한 균주를 각 시험관에 접종하여 3일간 배양한 후 Thaxtomin A 분해활성을 탐색하였다. Thaxtomin A 분해활성을 보이는 세균 및 방선균을 선발하여 배양한 여액을 동량의 Ethyl acetate로 두 번 추출한 후, HPLC를 이용하여 Thaxtomin A의 분해활성을 탐색하였다. 사용된 column은 C<sub>18</sub> column

을 사용하고 용매는 acetonitrile: water(30:70)을 사용하여 유속 1ml/min로 전개하였으며, UV249nm를 이용하여 검출하였다. 선발 균주는 16S rDNA 염기서열을 분석한 후, BLAST를 이용하여 동정하였다.

## 나) 연구결과

### 1) 감자 세균병 억제 물질의 분리

- 감자 세균병 억제 물질을 찾기 위하여 먼저 감자 질병을 일으키는 원인균으로 알려진 *Streptomyces scabiei*와 더뎡이병의 원인 물질인 Thaxtomin A를 확보하는데 주력하기 위해서 Thaxtomin A를 대량 생산 하는 *S. scabiei*를 확보하였다. 그리고 Thaxtomin A를 대량생산하여 국내외 토양으로부터 Thaxtomin A를 분해하는 균주를 탐색하고 있으며 Thaxtomin A에 대한 분해 효과 실험을 진행 중에 있다. 일차적으로 미생물로부터 Thaxtomin A를 얻기 위해 oat meal broth를 선택하였으며 Thaxtomin A생산을 HPLC로 확인한 결과 그림 4의 A, B에서 Thaxtomin A peak를 확인하였다. 그림 4의 A는 control로 분양 받은 순수 Thaxtomin A의 크로마토그래피이고 B는 *S. scabiei*가 생산하는 Thaxtomin A peak를 나타낸다(그림 5). 이러한 결과를 바탕으로 감자의 세균병 억제물질을 3차년도에 분리할 것이다.

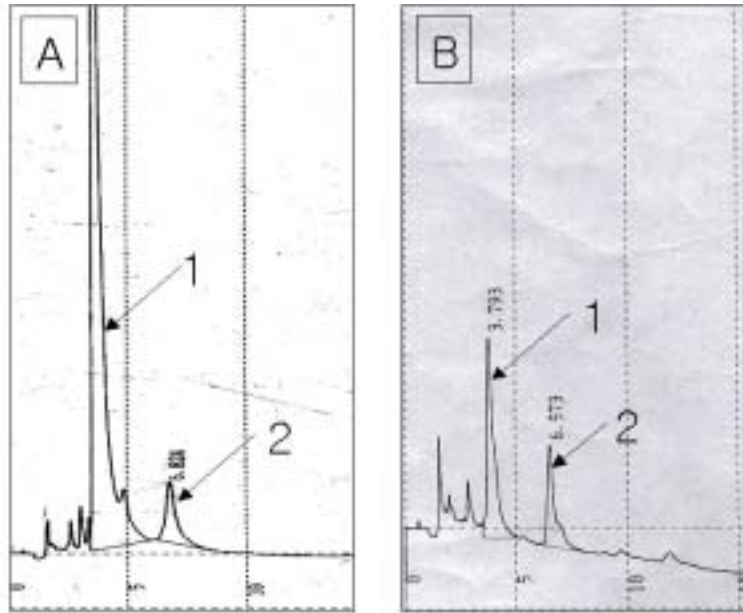


그림 5. HPLC를 통한 Thaxtomin A 생산 여부 확인  
( peak 2 : Thaxtomin A )

- 나) 감자 세균병을 억제하는 미생물을 국내 토양으로부터 분리
- 제주도 감자토양으로부터 분리한 *Bacillus sp. sunhua*와 *Bacillus sp.* 8개, 중국토양에서의 미생물을 screening하여 감자 세균병 toxin을 분해도를 bioassay 하였다. 각각의 미생물들을 30℃에서 배양한 후 상등액을 적신 paper disc를 *Streptomyces scabiei*가 loading되어 있는 GYM 평판배지 위에서 배양하였다. 그 결과 *Bacillus sp. sunhua*가 *Streptomyces scabiei* 길항을 확인하였으며 또한 감자 세균병 toxin인 Thaxtomin A를 분해하는지도 확인 중에 있다 (그림 6). 2차년 도에 실시한 세균병 길항균 또는 Thaxtomin A를 분해하는 세균은 *Bacillus sp. MJM002*외에는 없었다. 현재 더뎡이병을 완화시키는 것으로 예상되는 29개의 세균에 대한 Bioassay를 진행하고 있다.



1. *Bacillus sp. sunhua*, 2. DB 202, 3. WB 700

그림 6. 세균병을 억제하는 *Bacillus sp. sunhua*의 길항 test

### 3) 감자 세균병 억제인자의 규명

- *Bacillus sp. sunhua*의 항생물질 생산조건 및 항생물질 특성조사  
항생물질생산 조건을 위해서 TSB (Tryptic soy broth: Casein, Soy peptone, Sodium chloride, Dipotassium phosphate, Dextrose) 배지 3ml를 넣은 Test tube에 소량 접종하여 8시간 동안 전 배양 하였다. 본 배양은 100ml 넣은 500ml 삼각플라스크에 전 배양액 100 $\mu$ l를 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 150rpm으로 3일간 배양하였다. 균체의 생육은 12시간에서 최대를 나타내었고 24시간 후부터 점차 감소하였다. 그리고 항생물질은 24시간일 때 생산을 최대 많이 하는 것을 알 수 있었으며 24시간 이후부터는 감소하였다(그림 7). 그리고 항생물질 특성조사에서는 *Bacillus sp. sunhua*가 생산하는 항생물질을 0.1N HCl과 0.1N NaOH 용액을 사용하여 pH 1-14로 조정하고 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 전처리 한 후 다시 pH 7.0로 중화한 뒤 잔존한 활성을 paper disc방법으로 측정할 결과 (그림8)에서 보는 바와 같이 본 항생물질은 산성 조건에서는 불안정하였으나 알칼리성 조건에서는 매우 안정하였다. 열안정성에서는 40 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C, 100 $^{\circ}$ C에서 30분 그리고 121 $^{\circ}$ C에서는 15분간 열처리한 후 *Bacillus sp. sunhua*에 대한 활성을 paper disc방법으로 조사한 결과 표1에 나타난 바와 같

이 열에 비교적 안정하여 80℃에서 30분 동안 열처리하여도 50%이상의 활성을 유지하였으므로 본 항생물질은 열에 비교적 안정한 성질을 가지고 있었다. 따라서 이 결과를 바탕으로 *Bacillus* sp. sunhua가 생산하는 항생물질이 감자 세균병을 억제함을 확인하였다.

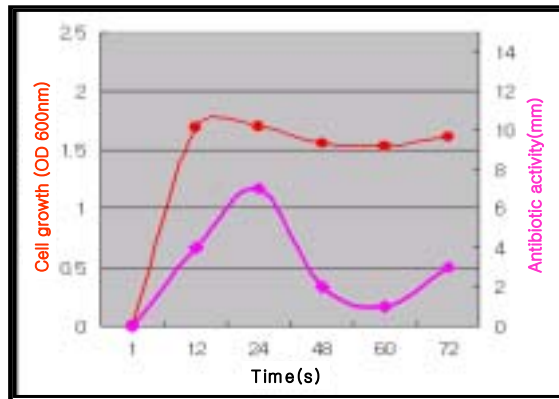


그림 7. *Bacillus* sp. sunhua 항생물질 생산조건

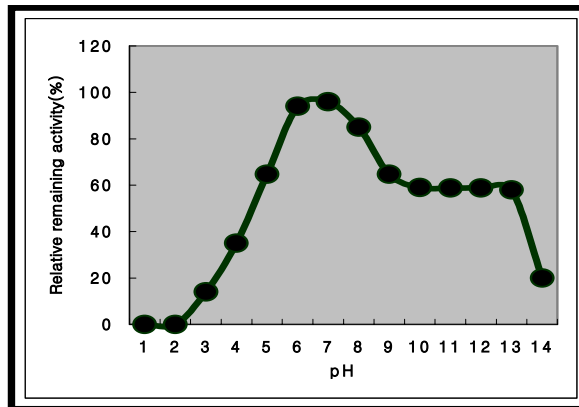


그림 8. *Bacillus* sp. sunhua로부터 생산하는 항생물질의 pH안정성

표 1. *Bacillus* sp. sunhua로부터 생산하는  
항생물질의 열안정성

Temperature (°C)	Relative remaining activity (%)
40	94.1
60	82.3
80	58.8
100	45.0
121	0
Control	100

4) 감자 세균병 toxin분해 균주의 분해 현상 규명

- 본 연도에는 Thaxtomin A(그림9)를 분해하는 활성균주의 새로운 탐색법을 확립하였다. 이는 대량생산이 어려운 Thaxtomin A에 대한 분해활성 연구를 위해 필수적이다. Thaxtomin A의 분해온도(녹는점)가 230°C인 것을 착안점으로 하여 가압멸균한 결과, 그림 6에서처럼 약간의 변화가 있어 분해활성 탐색에는 사용될 수 있었다.

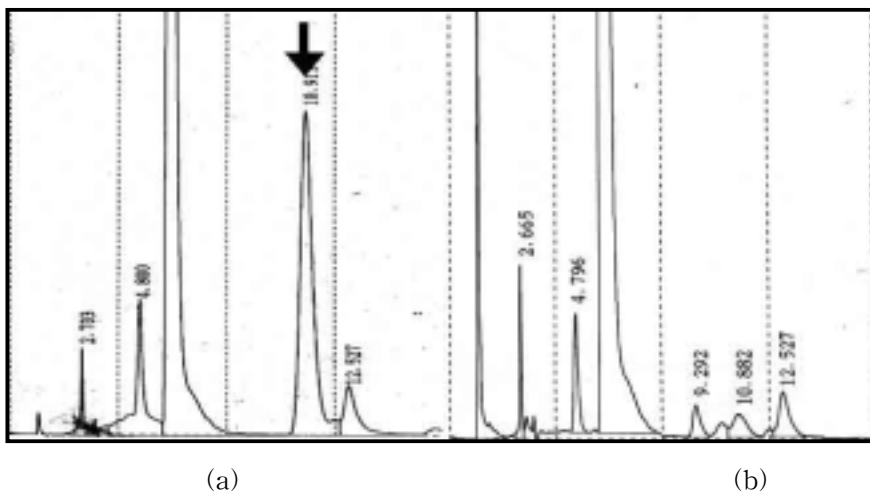


그림 9. Standard Thaxtomin A(a)와 가압멸균한 배양액으로부터 추출한 Thaxtomin A(b)

감자 및 감자밭 토양으로부터 수집한 세균 및 방선균 500여 균주를 이용하여 감자 더듬이병균(*Streptomyces scabiei*)이 생성하는 병원물질인 Thaxtomin A의 분해활성을 탐색한 결과, 제주도 감자밭에서 분리한 방선균(KJO-as2)과 토양세균(B170)은 Thaxtomin A에 대한 분해활성(그림 10)을 나타냄을 HPLC를 이용하여 확인하였다. 분해활성을 보인 방선균, KJO-as2의 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과, *Streptomyces mashuense*와 98.05%의 상동성을 보여 *S. mashuense*와 매우 가까운 종일 것으로 사료된다. 또한 토양세균(B150, B164)은 Thaxtomin A에 대한 분해가 아닌 다른 변화양상(그림 11)을 보였다. 이는 Thaxtomin A의 phenylalanine구조의 -OH 작용기에 glucosylation과 같은 반응이 일어났을 것으로 예측된다. 위의 결과를 바탕으로 3차년 도에는 Thaxtomin A의 변이체를 LC/MS를 이용하여 확인하고 분해 및 첨가의 활성을 보인 방선균과 세균의 동정 및 mutation을 통한 유전자 탐색을 하고자한다.

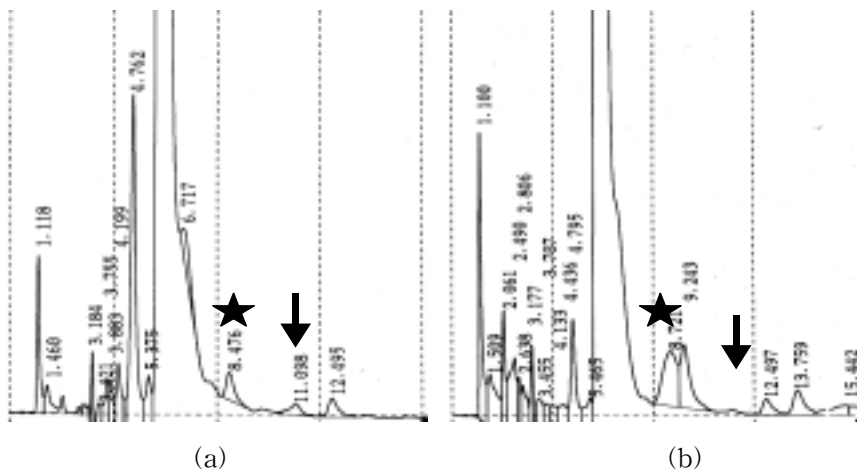


그림 10. 방선균, KJO-as2(a) 및 세균에 의한 Thaxtomin A의 분해활성의 HPLC 검출(b)

↓: Thaxtomin A, ★: Thaxtomin A의 분해예상 변이체

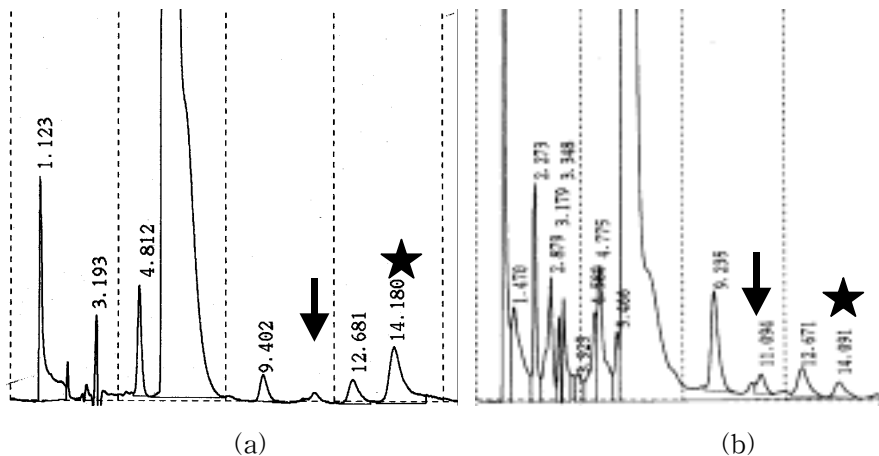


그림 11. 토양세균, B150(a), B164(b)에 의한 Thaxtomin A의 변화양상의 HPLC 검출

↓: Thaxtomin A, ★: Thaxtomin A의 첨가예상 변이체

### 3) 제 3세부과제

#### 가) 수행방법

- 1) 일장조건에 따른 괴경 형성의 양상과 지베렐린의 생성 관계 해명
  - 실험에 사용하는 시료는 경삽 후 장일 조건(18L-6D)에서 15일간 생육한 감자묘를 장일조건과 단일조건(16D-8L)로 분리 생육했다. 대조구시료는 단일조건 처리직전에 채취하였고, 이장 처리 후 1, 2, 3, 5일 별로 분리 채취하여 동결 보존하였다. 동결 건조한 각각의 시료 약 10g을 80%MeOH에서 추출, 여과하여, 여과액에 내부표준물질로서 중수소표식 GA를 첨가하여 GC/SIM법으로 내부표준물질과 시료유래의 이온의 면적 강도비에 따라 내생량을 측정하였다.



2) 괴경의 비대 생장시의 지베렐린의 생성 및 그 역할 규명

- 지베렐린 생성을 확인하고 동정하기 위해서는 예비 정제와 고속 액체 크로마토그래피를 사용하여 얻은 GA분획을 디아조메탄으로 메칠화 한 후, *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetimide (MSTFA, PIERCE)로 80℃에서 30분간 유도체로 변환시켜 GC/MS분석(칼럼: J&W Scientific DB-1, 0.25mm X 15m, film thickness 0.25 $\mu$ m, 캐리어가스: He, 1ml/분, 시료 도입부 온도: 250℃, 칼럼온도: 1분간 80℃를 유지한 후, 245℃까지 30℃/분으로 온도를 높인 후, 다시 300℃까지 5℃/분으로 높이고, 이온화법:EI, 이온화전압: 70eV, 이온화온도: 200℃)을 행했다. 시료와 동시에 탄소수 23-30dml 직상탄화수소를 주입하여 시료와 탄화수소의 Retention time으로부터 Kovat의 Retention time지수(Ref.)를 산출했다.

나) 연구결과

- 1) 일장조건에 따른 괴경 형성의 양상과 지베렐린의 생성 관계 해명
  - GC/SIM을 이용하여 일장에 따른 내생GA를 분석하였다. 이는 15일간 생육한 감자묘를 장일조건과 단일조건(16D-8L)로 분리 생육하였다. 대조구 시료는 단일조건 처리직전에 채취하였고, 일장처리 후 1, 2, 3, 5일 별로 분리 채취하여 동결 보존하였다. 동결 건조한 각각의 시료 약 10g을 80%MeOH에서 추출, 여과하여 여과액에 내부표준물질로서 중수소표식 GA를 첨가하여 GC/SIM법으로 분석결과 분석한 GA<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>1</sub>중에 GA<sub>19</sub>의 양이 일장조건에 관계없이 많은 것으로 나타났다. 그리고 GA<sub>19</sub>와 GA<sub>20</sub>의 내생량은 일장처리에 따라 큰 변화를 나타나지 않았지만 활성형 GA<sub>1</sub>은 단일조건 후 1-2일 사이에 약3배정도 낮은 내생량을 보여 일장이 GA<sub>1</sub>의 내생량을 조절하고 있는 것을 시사하였다(표 2).

표 2 일장조건에 따른 지베렐린 생성관계

day	GA <sub>19</sub>		GA <sub>20</sub>		GA <sub>1</sub>	
	LD	SD	LD	SD	LD	SD
0	3.4±0.2	-	1.5±0.2	-	1.1±0.2	-
1	2.8±0.1	2.8±0.1	1.3±0.1	1.1±0.1	1.1±0.3	0.9±0.1
2	2.9±0.3	3.0±0.3	1.7±0.2	1.2±0.3	1.3±0.2	0.3±0.04
3	3.1±0.2	2.9±0.4	1.4±0.3	1.5±0.4	1.2±0.1	0.2±0.01
5	3.5±0.3	3.2±0.2	1.0±0.1	1.3±0.3	1.4±0.3	0.3±0.1

LD: long-day, SD: short-day

2) 괴경의 비대 성장시의 지베렐린의 생성 및 그 역할 규명

- 괴경의 비대 성장시 지베렐린의 생성에 대해 알아보기 위해서 7일 동안 자란 식물체에 GC/MS로 동정한 13-OH GAs을 투여하여 GAs에 대한 괴경 형성저해율을 조사하였다. GA<sub>1</sub>에서 괴경 형성저해율이 가장 크게 나타났고 그 전구체인 GA<sub>20</sub>과 GA<sub>19</sub>에서도 괴경 형성을 저해했다. 그러나, GA<sub>1</sub>의 C-2위에 수산화가 일어난 GA<sub>8</sub>에서는 GA<sub>1</sub>에 비하여 괴경형성 저해율이 매우 낮았다. 결과적으로 감자의 괴경형성에는 내생 GAs의 생합성이 깊이 관여하며 GAs 생합성의 상부 단계를 저해하면 이들은 장일조건에서도 괴경형성을 유도한다는 것과 감자잎과 줄기중에서 GAs 생합성과정을 통하여 생성된 내생 GAs량이 괴경형성에 영향을 미치는 것을 시사해주고 있다(표 3).

표 3 GAs에 따른 괴경형성 저해효과

GAs	괴경형성율
Con	96.7±3.3
GA19	53.3±3.3
GA20	46.7±3.3
GA1	33.3±3.3
GA8	90.0±5.8

#### 4) 제 1협동과제

##### 가) 수행방법

###### 1) 감자 세균병원균 저해 물질의 분리

- *Bacillus* sp. sunhua로부터 37°C에서 1일간 150rpm 생산된 항생 물질을 대량으로 분리, 정제하기 위하여 배양액 15L를 4°C, 8,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 얻었다. 상등액에 동량의 EtOAc을 첨가하여 활성물질을 EtOAc층으로 이행시킨 후 rotary vacuum evaporator로 농축하였다. 그리고 건조한 분획을 methanol로 녹여서 silica gel 60RP-18( Merck Co., 40~63 $\mu$ m)에 흡착시켜 reverse phase flash chromatography를 수행하였다. 활성있는 fraction 분획을 prep HPLC(waters사)를 사용하여 순수 물질을 분리하였다. prep HPLC시 Symmetry prepTM C18 column으로 이동상은 60% aqueous acetonitrile를 사용하여 1.5ml/min의 속도로 용출시켜 254nm에서 peak를 검출하고, waters사 제품인 refractive index dectector로 각 peak들을 수확하여 농축한 다음, methanol에 녹여 여지 disc방법으로 활성효과를 검토하였다.

###### 2) 천연 항생물질로서의 신규성 및 신규 용도성 확보와 제제화 시험

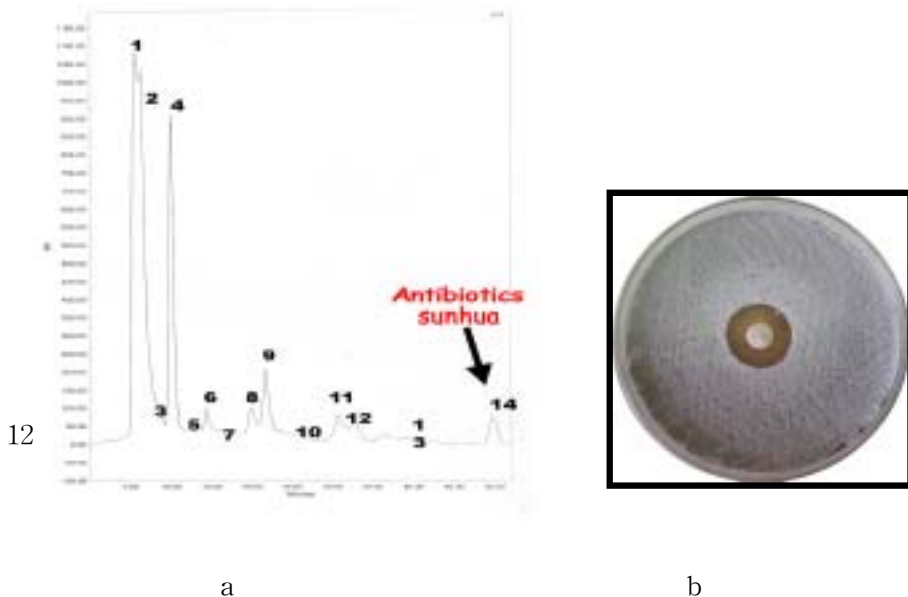
- *Bacillus* sp. sunhua가 생산하는 항생물질의 신규성을 구조결정을 통하여 확인하였다. 따라서 순수한 물질을 D-MeOH에 녹여 서울대학교 기초과학교육연구 공동기기에 의뢰하여 NMR(Bruker, Avance 500)을 분석하였다. 그리고 실제 토양에서 감자 병원균에 방제력을 확인하기위한 제제화 시험을 위해서 농우크린텍(주)에서 판매하고 있는 상토를 사용하여 씨감자가 이식되어 있는 pot에 미리 GYM배지에서 배양한 병원균 *Streptomyces scabiei*를 회수하여 접종한 후, 여기에 방제균 *Bacillus* sp. sunhua를 처리하였다.

## 나) 연구결과

### 1) 감자 세균병원균 저해 물질의 분리

- *Bacillus* sp. sunhua로부터 생산되는 항생물질을 대량으로 분리 정제하기 위하여 15L배양액을 원심분리하여 얻은 상등액에 유기용매 ethyl acetate를 첨가하였다. 이때 활성물질을 ethyl acetate층으로 이행시킨 후 농축하여 이를 silica gel 60RP-18( Merck Co., 40~63 $\mu$ m)에 흡착시켜 reverse phase flash chromatography를 수행 하였다. 활성이 있는 분획을 prep HPLC(waters사)를 사용하여 순수 분리하였다(그림 12-a). prep-HPLC시 Symmetry prepTM C18 컬럼을 사용하였고 용매는 60% aqueous acetonitrile를 사용하여 1.5ml/min의 속도로 용출시켜 254nm에서 peak를 검출하고, waters사 제품인 refractive index detector로 각 peak들을 수확하여 농축한 다음, methanol에 녹여 여지 disc방법으로 활성효과를 검토한 결과 감자 세균병원균을 저해하는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 12).

그림 12 감자세균 병원균을 저해하는 항생물질 분리 및 확인



## 제 3절 3차년도 연구 수행방법 및 결과

### 1. 제 1 세부과제

#### 가) 수행방법

##### 1) 감자조기성장 유도물질을 생산하는 토양 미생물 분리

- 식물 성장 유도물질을 생산하는 토양 미생물을 국내 감자 재배 토양에서 분리하였다. 분리한 미생물을 25℃, 5일동안 150rpm의 배양조건에서 배양하여 얻어 진 배양액을 필터로 균을 제거한다. 그리고 감자조기성장 유도물질을 분리하기 위해서 여러 가지 유기용매 즉 Hexan, BuOH, 에틸아세테이트(EtOAc)를 사용하였고 배양여액의 pH를 2, 7, 10으로 조정하고 동량의 유기용매를 가해 교반한 후 물층과 유기 용매층을 구분하였다. 추출 후 각각의 물층과 용매 추출액은 로타리 에바퍼레이터로 증발시켰다. 그리고 각각의 물질들을 3일동안 배양기에서 발아시켜 균 일하게 발아된 토마토씨에 처리하였다.
- 토마토씨를 재료로 균주 배양액에 의한 토마토줄기 촉진효과를 검증하였다. 농우바이오의 선명토마토씨를 먼저 70% EtOH에 살균하였고 이를 autoclave한 유리 plate에 30개씩 준비하였다. 그리고 growth chamber (2100 lux, 낮: 28℃, 밤:23℃)에서 동일하게 발아한 토마토 씨를 가지고 magenta에 옮겨 배양액을 농도별로 처리하였다.

##### 2) 감자 성장촉진 유도 물질의 분리 정제 및 동정

- 식물 성장촉진 유도 물질을 분리 정제하기 위해서 25℃, 150rpm으로 5일간 배양한 후 8,000rpm으로 원심분리하고 얻은 상등액에 에틸아세테이트를 사용하여 3번 추출하였다. 추출액의 농축은 30℃에서 rotary vacuum evaporator로 수행하였다. 추출, 농축된 물질을 silica gel column에 충전하고 이동상 MeOH를 전개시켜 분획하였다. 이를 다시 용매에 녹여 reverse phase HPLC를 이용하였으며 이때 사용한 column은 C<sub>18</sub>column으로 전개 용매는 acetonitril:water, 유속 2.0ml/ min에서 수행하여 순수

하게 물질을 분리, 정제하였다. 그 일부를 토마토에 처리하여 식물 성장 활성이 있는 분획을 결정하였다.

- 이상의 방법에 의하여 얻어진 활성분획에 대해서는 디아조메탄으로 메칠화 한 후, *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetimide (MSTFA, PIERCE) 로 80°C에서 30분간 유도체로 변환시켜 GC/MS로 분석했다. 시료와 동시에 탄소수 23-30의 직상탄화수소를 주입하여 시료와 탄화수소의 Retention time으로부터 Kovat의 Retention time지수를 산출하여 물질을 동정하였다.

## 나) 연구결과

### 1) 식물성장촉진 균주분리

- 식물의 생장이 같은 지역에 다른 식물 보다 생장이 좋은 식물 뿌리에서 흙을 채취하여 식물성장촉진 균주를 2종류 분리하였다. 16s-rRNA분석을 통하여 2가지 *Penicillium* 속으로 밝혀졌다.

### 2) 식물성장촉진 물질분석

- 분리한 2가지 *Penicillium*속 토양미생물이 분비하는 식물성장촉진 물질을 동정하기 위해서 미생물 배양액을 용매 분획하여 그것을 토마토에 처리하였다. 그 결과 80%에 활성이 EtOAc fraction에 검출되었다. 이 fraction을 농축한 후 HPLC를 실시하여 각 분획의 일부를 토마토에 처리하여 성장 활성을 측정하였다. 그 결과 Retention time 20-21분(A fraction)과 35-36분(B fraction)에 높은 성장활성을 보였다. 이 분획을 GC/MS로 분석한 결과 GA1, GA3는 A fraction에서 GA4와 GA9은 B fraction에서 동정되었다. 동정된 4종류의 지베렐린을 정량한 결과 이미 잘 알려진 *Gibberella fujikuroi*보다 약 5-10배정도 낮은 것으로 확인되었다. 그러나 생물농약의 실용화 단계에서는 현저한 생육이 오히려 감자의 웃자람을 야기하는 결점이 될 수 있으므로 약간의 성장촉진 효과가 유리한 측면도 있다고 사료된다.

표1 분리한 토양미생물의 배양액부터 지베렐린 동정 및 정량  
(단위 : ng/ml)

	GA1 (A fraction)	GA3 (A fraction)	GA4 (B fraction)	GA9 (B fraction)
<i>Penicillium</i> A	0.27	1.88	2.43	1.96
<i>Penicillium</i> B	0.60	4.00	6.44	3.48

식물생장촉진 물질을 얻기 위해서 HPLC를 통하여 물질을 분리하였다. 분리한 물질을 각각 모아 식물에 처리하였다. 그 중에서 식물 생장촉진 효과가 나타나는 fraction을 선택하여 구조분석을 실시하였다. 그 결과 지베렐린 이라는 물질로 동정되었다.

## 2. 제 2 세부과제

### 가) 수행방법

#### 1) 토양 샘플 채취

- 감자 재배지에 큰 피해를 야기하는 더벵이병원균 (*Streptomyces scabiei*)이 생성하는 독소물질인 Thaxtomin A 분해 균주의 선발을 위해 감자 재배지 토양으로부터 토양 샘플을 채취하였다. 전국적으로 감자 재배지(산간지역, 하천지역, 해안지역, 평야지역)와 더벵이병 발생지 중심으로 토양 샘플을 채취하였으며, 총 64개지역 142개의 sample을 수집하였다(표 2).

2) 감자더듬이 병균 (*Streptomyces scabiei*)

- 본 실험에 사용된 감자 더듬이 병균은 농업생명공학연구원 한국농용

표 2 토양 샘플 채취

지역	지역	채집 sample수
산간지역	26	38
하천지역	15	37
해안지역	18	56
평야지역	5	11
계	64	142

미생물보존센터 (KACC)에서 보존중인 *Streptomyces scabiei* KACC20267를 사용하였다. 본 균주는 thaxtomin A를 많이 생성하는 균주이다. 공시 균주를 GYM agar와 TSA 배지에서 29℃에서 5~7일 동안 배양하였다. 7일 동안 배양된 균주를 GYM broth 배지에 재접종하여 29℃에서, 6~8일 동안 진탕배양 (200rpm)하였다.

가. 배지조성

(1) GYM 배지 조제

Glucose 4g/ℓ

Yeast extract 4g/ℓ

Malt extract 10g/ℓ

pH 7.2

autoclave 121℃ 15min

(2) TSA 배지 조제

Casein 17g/ℓ

Soybean Meal 3g/ℓ

Dextrose 2.5g/ℓ

Sodium chloride 5g/ℓ

Dipotassium phosphate 2.5g/ℓ

Agar 15g/ℓ

autoclave (121℃ 15min)

3) 토양샘플로 부터 균주 분리 및 thaxtomin A 분해균의 선발

- 수집 토양샘플 5g과 멸균수 5ml를 멸균된 tube에 넣고 1시간동안 진탕배양한 후, 30분 동안 정치하였다. 상층액 1ml를 멸균된 tube



에 옮겨 원심분리(6000rpm, 1min)하였다. 상층액 50, 100, 200  $\mu$ l를 Thaxtomin A (TXT A) agar 배지에 도말한 후 29°C에서 4~7일동안 배양하였다. TXT A agar 배지에서 자란 colony를 TSA 배지에 접종하여 29°C에서 2~3일 동안 배양한 후, TSB 배지에 접종하여 2~3일동안 진탕 배양하였다. 배양물을 다시 TXT A broth 배지 5ml에 100 $\mu$ l 접종한 후 29°C에서 10~15일 진탕 배양한 후, thaxtomin A의 감소 여부를 측정하였다. thaxtomin A의 감소여부는 HPLC를 이용하여 측정하였다. thaxtomin A 분해 균주로 선발된 균주는 thaxtomin A의 감소폭이 최소한 30% 이상인 균주를 대상으로 하였다.

#### 가. 배지 조제

##### 1) oat bran broth(OBB) 배지 조제

oat bran 40g/l 을 20분간 끓인 후, 15분간 원심분리(10,000g)한 상층액에 증류수를 첨가하여 1 l로 맞춘 후 멸균 (121°C, 15min)하였다.

##### 2) TXT 의 조제

TXT 배지를 조제하기 위하여 thaxtomin A 생성 균주 KACC20267를 GYM broth에서 배양하였다. GYM 배양액 5%(volume)를 OBB에 접종하여 29°C에서 8~10일 동안 진탕배양 (200rpm) 하였다. cell을 제거하기 위해서 OBB 배양액을 15분간 원심분리(10,000g)한 후 상등액을 취하였다. 상등액을 105°C, 10min 멸균한 후 thaxtomin A의 생성 유무를 HPLC로 확인하였다. 본 배지를 TXT broth 배지로 이용하였다. TXT agar 배지를 조제하기 위해 TXT broth 배지에서 agar 15g/l 을 첨가한 후 다시 105°C 20min 멸균하였다.

#### 4) thaxtomin 감소량을 측정하기 위한 HPLC 조건

- thaxtomin A 감소량을 측정하기 위해 HPLC (Shimadzu 6A)를 이용하였다. TXT broth에서 배양된 배양액(3ml)을 원심분리 (13000rpm, 5min)한 후 cell을 제거하였다. 상등액과 ethyl acetate 2ml을 1시간동안 혼합한 후 30분간 방치하여 상층액을 분리하였다. Column은 Waters  $\mu$ Bondapak C18 3.9  $\times$  300mm을 사용하였다. eluent는 30% acetonitrile (Tedia HPLC grade)를 이용하였다.

UV detector (249nm)를 이용하였고, injection volume은 1회당 2  $\mu$ l로 하였으며, 유속은 1ml/min이고 분석시간은 20분 동안 실시하였다. 본 실험은 샘플 당 3회 반복 실험하였다.

#### 5) Thaxtomin A 분해 균주 선별 및 16S rDNA 염기서열 분석

- HPLC 분석 결과로 부터 15균주의 thaxtomin A 분해 균주를 선별하였다. 이들 균주에 대한 분류학적 특성 평가를 위해 16S rDNA 염기서열을 분석하였다. 16S rDNA의 염기서열 분석은 널리 통용되는 primer (fD1 & rP2)를 이용하여 각 선별균주의 16S rDNA를 증폭한후, PCR 단편을 정제한 다음 본 연구실에서 제작한 direct-sequencing primer(p510r, p357f, p783f, p1037f)(표3)를 사용하여 16S rDNA 전체 염기서열을 분석하였다.

표 3 Primer list

Primer	Sequence positions
fD1	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
rP2	ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT
p510r	TAT TAC CGC GGC TGC TGG CA
p357f	CTA CGG GRS GCA GCA G
p783f	TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC
p1037f	TCG TCA GCT CGT GTC GTG AG

#### 6) 선별 균주의 항생제 저항성 실험

- 선별된 균주에 대하여 항생제 저항성 여부를 실험하였다. 실험에 이용된 항생제는 6가지 (Ampicillin, Carbenicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Streptomycin, Tetracycline) 였으며, 실험에 사용된 항생제 농도는 각각 0.05mg/ml, 0.05mg/ml, 0.034mg/ml, 0.01mg/ml, 0.01mg/ml, 0.005mg/ml 이었다. TSB broth 배지에 접종하여 29°C, 2~3일 동안 진탕배양 (200rpm)하였다.

## 7) plasmid 분리 및 정제, *E. coli* transformation

- QIAGEN Large-Construct Kit을 이용하여 ha7-2-3-1 (*Stenotrophomonas maltophilia*)와 k18-3-5-1(*Stenotrophomonas*. sp)로 부터 plasmid를 분리 하였다. 분리된 plasmid는 Heat shock 방법으로 *E. coli*에 형질 전환되었으며, 형질 전환된 *E. coli*는 항생제(Ampicillin, Carbenicillin, Kanamycin, Streptomycin)가 첨가된 LB agar 배지에서 선발되었다. QIAGEN Large-Construct Kit를 이용해 항생제 내성을 갖는 형질전환 *E. coli*로 부터 plasmid를 분리하였다.

## 8) 배지에서의 *E. coli* 형질전환체의 성장 및 항생제 저항성 실험

- 형질전환된 *E. coli* 의 TXT 배지에서의 성장유무를 관찰하기 위해 TXT broth 에서 37℃, 15일 동안 진탕배양(200rpm) 하였다. 형질전환된 *E. coli*를 항생제 저항성 여부를 실험하였다. 실험에 이용된 항생제는 6가지 (Ampicillin, Carbenicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Streptomycin, Tetracycline) 였으며, 실험에 사용된 항생제 농도는 각각 0.05mg/ml, 0.05mg/ml, 0.034mg/ml, 0.01mg/ml, 0.01mg/ml, 0.005mg/ml 이었다. LB broth 배지에 접종하여 37℃, 2~3일 동안 진탕배양 (200rpm)하였다.

## 나) 연구결과

### 1) 토양 샘플 채취

- 감자 재배지 토양으로부터 토양 샘플을 채취하였다. 강원도 횡성, 평창, 홍천, 정선 지역, 전라북도 무주 남원지역의 경우는 주로 산간지대의 밭토양에서 감자를 재배하였다. 이들 지역중 강원도 대부분과 전북 무주는 더랭이병의 발생이 심한 것으로 나타났고, 전북 남원지역의 경우는 발생이 적은 편이었다. 충청도 청원, 연기, 홍성, 충주시와 경상도 고령, 창녕, 밀양시는 주로 하천 주변과 개팔지를 이용한 가자 재배가 이루어 지고 있었다. 하천주변 토양에서 더랭이병 발생이 비교적 심한 것으로 나타났다. 강원도 강릉시, 전라도 영광, 장흥, 보성, 제주도 북제주와 남제주지역은 해안을 따라 감자를 재배하는 지역으로 구분된다. 대부분의 지역에서 더랭이병이 발생하였다. 전라도 김제시, 경상도 김해시는 평야지역으

로 윤작 위주의 감자재배가 이루어 지고 있었으며, 이들 중 더땡이병 발병이 심한 토양을 중심으로 샘플을 채취하였다. 64개 지역의 전국 감자밭 토양에서 142개의 토양 샘플을 수집 하였다.

2) 토양 sample로부터 균주의 분리

- 142개의 토양 샘플로부터 2,000여점 이상의 미생물을 분리한 후 TXT 배지에서 thaxtomin A 분해 균주를 선발하였다. thaxtomin A를 30% 이상 분해하는 균주 15점을 확보하였다. 선발된 균주들의 분리 지역을 살펴보면 산간지역의 감자 재배지 토양에서 10균주, 해안지역 감자밭 토양에서 5균주가 선발되었다.

3) 선발 균주의 분류학적 특성

- 선발균주의 분류학적 위치를 규명하기 위하여 16S rDNA 염기서열을 분석한 후, GenBank에 BLAST search 하였다.

표 4. BLAST search result

Strain No.	Blast Search	homology(%)
h31-1-3-1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
	<i>Bacillus cereus</i>	99
h31-1-3-2	<i>Bacillus pumilus</i>	99
h31-7-3-1	<i>Pseudomonas putida</i>	99
h31-7-3-2	<i>Bacillus mycooides</i>	100
	<i>Bacillus cereus</i>	99
h31-7-4-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99
ha7-2-3-1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99
ha7-2-3-3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99
ha10-3-2-1	<i>Serratia plymuthica</i>	99
ha10-3-2-2	<i>Bacillus mycoies</i>	99
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
ha10-3-2-3	<i>pantoea agglomerans</i>	99
k7-3-5-1-2	<i>Bacillus cereus</i>	99
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
k18-3-2-3	<i>Mycoplama bullata</i>	99
	<i>B. diminuta</i>	98
k18-3-5-1	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>	98
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98
k24-1-3-1-1	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	99
	<i>Enterobacter amnigenus</i>	98
k24-1-3-1-2	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	99
	<i>Buttiauxella izardii</i>	98

thaxtomin A를 분해하는 균주는 *Bacillus* 속, *Stenotrophomonas* 속, *Pseudomonas* 속 등의 균주인 것으로 밝혀졌다. 이들 중 *Stenotrophomonas* 속에 속하는 ha7-2-3-1, k18-3-5-1 균주 및 *Bacillus* 속 ha10-3-2-2에 대한 실험을 진행시켰다. *Stenotrophomonas maltophilia*는 세포내에 plasmid를 함유하고 있는 것으로 보고(1)된 바 있으며, 함유한 plasmid가 난분해성 물질 분해에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

4) HPLC 측정 결과

- ha7-2-3-1, K18-3-5-1 및 ha10-3-2-2 3균주에 대한 thaxtomin A 분해효과를 살펴보았다.

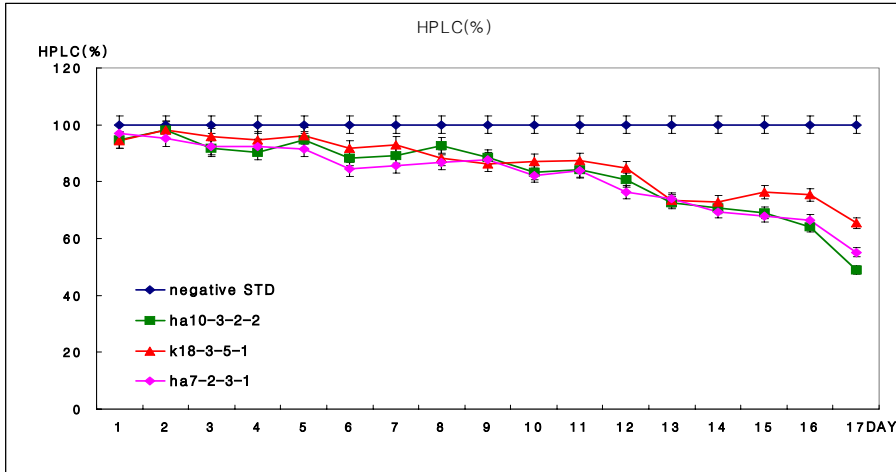


그림 1. 최종 선발된 균주들의 HPLC 결과

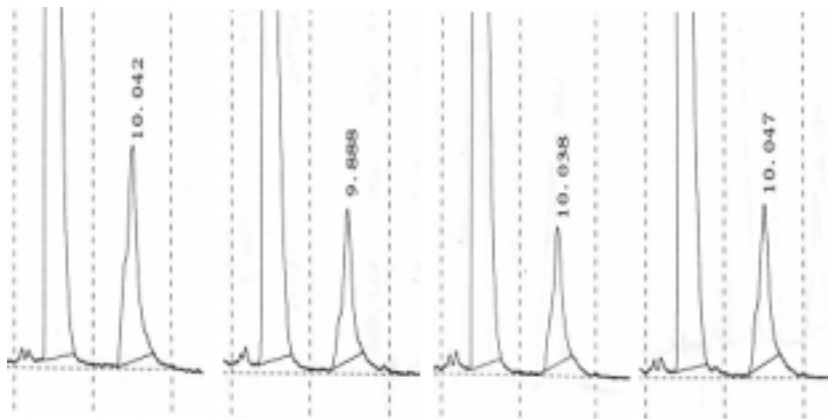


그림 2. HPLC 결과 (배양후 17일)

- A) negative standard    B) ha10-3-2-2    C) ha7-2-3-1    D) k18-3-5-1

5) ha7-2-3-1 & k18-3-5-1 균주의 항생제 저항성 실험

- 항생제 내성 실험 결과, ha7-2-3-1는 Chloramphenicol을 제외한 다른 항생제에서 내성을 보였으며, k18-3-5-1는 Chloramphenicol과 Tetracycline을 제외한 다른 항생제에서 내성을 보였다(그림1).

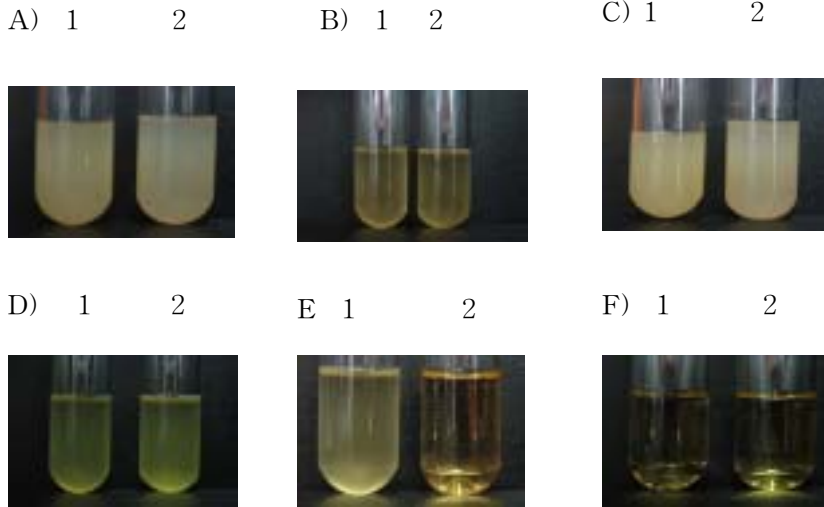


그림3. Negative standard antibiotic test 1) ha7-2-3-1 2) k18-3-5-1

- |                                 |                                    |
|---------------------------------|------------------------------------|
| A) Ampicillin antibiotic test   | B) Carbenicillin antibiotic test   |
| C) Kanamycin antibiotic test    | D) Streptomycin antibiotic test    |
| E) Tetracycline antibiotic test | F) Chloramphenicol antibiotic test |

6) Plasmid isolation

- *Stenotrophomonas maltophilia*는 항생제 저항성이나 난분해성 물질의 분해에 관련되는 유전자가 plasmid에 위치한다는 보고가 있다. 따라서, 본 연구에서 thaxtomin A 분해균주로 선발한 *Stenotrophomonas* 속의 두 균주 (ha7-2-3-1, K18-3-5-1)로 부터 plasmid를 분리하였다(그림4).

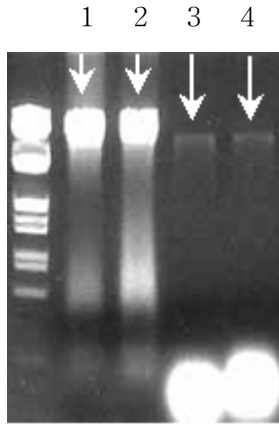


그림 4. Genomic DNA of ha7-2-3-1, 2. genomic DNA of k18-3-5-1, 3. plasmid DNA of ha7-2-3-1, 4. plasmid DNA of k18-3-5-1

7) Plasmid의 *E. coli* Transformation 및 항생제 저항성

- 분리된 plasmid를 *E. coli* DH5 $\alpha$ F' 로 형질전환 하였다. 형질전환 되지 않은 *E. coli*는 항생제 내성 실험 결과, 선발균주와 같이 ha7-2-3-1의 plasmid를 형질전환한 *E. coli*는 Chloramphenicol을 제외한 다른 항생제에서 내성을 보였으며, k18-3-5-1의 plasmid를 형질전환한 *E. coli*는 Chloramphenicol과 Tetracycline을 제외한 다른 항생제에서 내성을 보였다(그림 5). 다시 TXT broth 배지에 접종하였다. 형질전환 되지 않은 *E. coli*는 TXT broth 배지에서 성장하지 않은 반면, 형질전환된 *E. coli*는 배양 6일째 TXT 배지에서 성장하는 것으로 나타났다 (그림 6-A). 이들 형질전환체로부터 plasmid를 추출한 결과는 그림 6-B에 나타내었다.

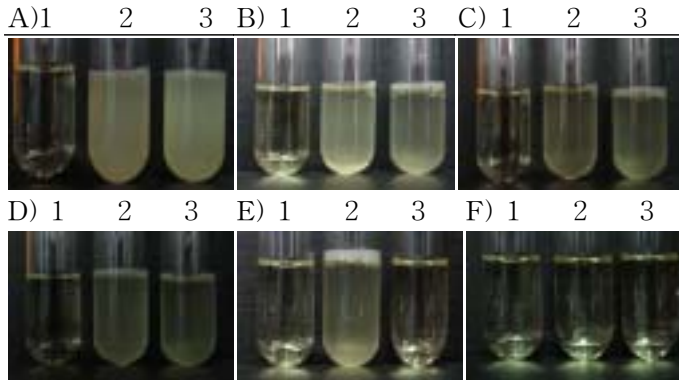




그림5. 1. non-transformed *E. coli*, 2. *E. coli* transformed with plasmid of ha7-2-3-1, 3. *E. coli* transformed with plasmid of k18-3-5-1

- A) Ampicillin antibiotic test                      B) Carbenicillin antibiotic test  
 C) Kanamycin antibiotic test                    D) Streptomycin antibiotic test  
 E) Tetracycline antibiotic test                F) Chloramphenicol antibiotic test

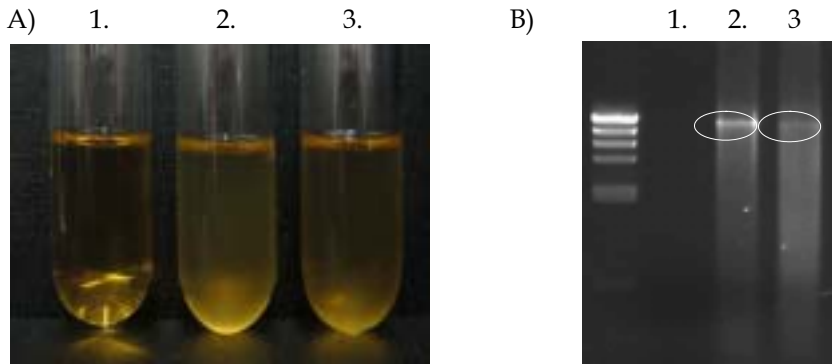


그림 6. A) 1. Non-transformed *E. coli*,  
 2. *E. coli* transformed with plasmid of ha7-2-3-1,  
 3. *E. coli* transformed with plasmid of k18-3-5-1  
 B) 1. plasmid isolated from non-transformed *E. coli*,  
 2. plasmid isolated from *E. coli* transformed with plasmid of  
 ha7-2-3-1,  
 3. plasmid isolated from *E. coli* transformed with plasmid of  
 k18-3-5-1

8) 현재 진행사항

- 현재 plasmid transformation한 *E. coli*를 이용하여 thaxtomin A 분해능에 대한 실험을 진행중에 있음.

### 3. 제 3세부과제

#### 가) 수행방법

##### 1) 유용 GA 생합성 유전자의 분리

###### (1) total RNA 분리 및 cDNA 합성

- 지베렐린 생합성이 왕성히 일어나는 식물 부위로부터 RNA 추출한다. 재료는 액체질소를 첨가하여 마쇄한 다음 RNA extraction buffer 와 phenol/chloroform을 이용 하여 total RNA를 분리한다. mRNA정제는 Promega의 poly A Tract system을 이용하여 제품의 수행방법에 따라 mRNA를 추출한다. cDNA합성은 Stratagene사의 cDNA Synthesis Kit을 이용한다.

###### (2) PCR을 이용한 유전자 분리

- 식물 또는 다른 생체에서 생합성 유전자들의 염기배열을 이용하여 primer를 작성하여 PCR을 통해 유전자 단편을 분리한다. 목적유전자의 full length는 CLONTECH사의 rapid amplification of cDNA ends(RACE) kit을 이용한다. cDNA에 Marathon adaptor를 결합시켜, adaptor primer와 PCR 법으로 행한다. 5', 3' 말단을 각각 포함한 두 종류의 fragment 를 overlapping 하는 영역을 제한효소로 절단하고 ligation 후 cloning하여 5', 3' 말단을 포함한 목적유전자의 full length를 얻는다.

###### (3) *in vitro* 실험을 통한 생합성 유전자의 기능해석

- 생합성 유전자의 full-length cDNA를 단백질 발현 벡터에 클로닝한다. 유전자가삽입된 벡터를 *E.coli*에 transformation하여 600 nm에서 O.D가 0.5되도록 배양한다. 배양한 *E.coli*를 원심분리하여 침전시킨 후, 상층은 버리고 lysis buffer를 첨가하여실온에서 10분간 반응한다. 용해물을 14,000 rpm으로 원심분리한 후, 상층을 채취하여 지베렐린 변환 확인을 위한 효소 반응액으로 사용한다. 효소 반응액에 방사선으로 표식된 전구체를 첨가하여 30 °C에서 6시간 반응 시킨다. 효소 반응액으로부터 생성물 확인은

방사활성 측정기가 연결된 HPLC를 사용한다. 생성물에 대한 구조 결정은 GC/MS를 사용한다.

2) *in vitro* 생성물의 GC/MS 분석

- 이상의 방법에 의하여 얻어진 GA분획에 대해서는 디아조메탄으로 메틸화 한 후, *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetimide (MSTFA, PIERCE)로 80°C에서 30분간 유도체로 변환시켜 GC/MS분석을 행한다. 시료와 동시에 탄소수 23-30의 직상탄화수소를 주입하여 시료와 탄화수소의 Retention time으로부터 Kovat의 Retention time지수를 산출한다.

나) 연구결과

1) 지베렐린 유전자 alignment

- 감자 cDNA로부터 5'-3' RACE법을 이용하여 감자의 지베렐린 3β-hydroxylase의 유전자를 얻었다. 3β-hydroxylase은 1065bp으로 구성되어 있으며, 355 amino acid로 구성되어 있다. 이것을 다른 지베렐린 생합성 유전자와 alignment 해 보았다.

감자의 지베렐린 생합성 유전자와 같은 가지과인 토마토의 지베렐린 생합성 유전자의 상동성 조사 결과, 토마토의 지베렐린 생합성 유전자끼리는 81.5 %, 감자와 토마토의 지베렐린 생합성 유전자끼리는 99.4 %의 아주 높은 상동성을 보였다.

2) 3β-hydroxylase의 기능 분석

- 3β-hydroxylase의 기능을 분석하기 위하여 GC/MS를 이용하여 GA<sub>20</sub>과 3β-hydroxylase 반응의 생성물을 분석해 보았다. 먼저 생성물인 GA<sub>1</sub>의 standard sample Retention time(RT)은 9.10으로 확인하였다. 3β-hydroxylase와 기질을 첨가하여 120 분 반응한 반응 생성물 역시 RT값 9.10에서 standard와 동일한 pick을 확인하였다.

```

1  MPSTIIS-----QLDLYSIKELPESHANWSSLDGDSRN-THAESI 40
2  MPSTIIS-----QLDLYSIKELPESHANWSSLDGDSRN-THAESI 40
3  MPSTIISDSCRPHNSQKHFDLNSIKELPESHANWSSHDHYTQENSCHFESI 50
   * * * * *
1  FVIDLN----HDHNFVMDTIGHACKTNGAFQIVNHHISHRLLNHMETHTGT 86
2  FVIDLN----HDHNFVMDTIGHACKTNGAFQIVNHHISHRLLNHMETHTGT 86
3  FVIDLDKHHHHHHHHHILDKHIGMACKKNGAFQIIHNSISEKLLQDIEVAGK 100
   * * * * *
1  RLFSLPMQQKLFKAARS5SDGIAGYGVARISSFFDKLHNSGFTTIFGSPLEH 136
2  RLFSLPMQQKLFKAARS5SDGIAGYGVARISSFFDKLHNSGFTTIFGSPLEH 136
3  TLFSLPMQQKLFKAARSFDGVTGYGAARISSFFSKLHNSGFTTIVGSPIEH 150
   * * * * *
1  ARQLNPFYDYNHFCDFVIEEYENEMEKLAGRLMGLMGLGSLGIAKEDVYKAVG 186
2  ARQLNPFYDYNHFCDFVIEEYENEMEKLAGRLMGLMGLGSLGIAKEDVYKAVG 186
3  ARQLNMLKDYHNFCEVIEEYENEMEKLAGRLMGLMGLGSLGITKDDVYKAVG 200
   * * * * *
1  FRS----GSSALQLNSYFACFDFFRAMGLAAHTDSTLLTILHQNHTSGLQ 232
2  FRS----GSSALQLNSYFACFDFFRAMGLAAHTDSTLLTILHQNHTSGLQ 232
3  FPKETKEGCAALQLNSYFACFDFFRAMGLAAHTDSTILTILHQNHTSGLQ 250
   * * * * *
1  VFKEGNGHVTVPLFLGALVIVGDLVHILSNGLYFVYLHRAIVNRTTRHL 282
2  VFKEGNGHVTVPLFLGALVIVGDLVHILSNGLYFVYLHRAIVNRTTRHL 282
3  VYQEGNGHVTVFFPIFGALVYVIGDLLHILSNGLYFVYLHRAVYVNRTRYRL 300
   * * * * *
1  SVAYLYGFFSGVVISPLSKLVDRNPFQNYRPTVNSKEYLOTAKHFDKALS 332
2  SVAYLYGFFSGVVISPLSKLVDRNPFQNYRPTVNSKEYLOTAKHFDKALS 332
3  SVAYLYGFFSGVVISPLSKLVDRNPFQNYRPTVNSKEYLOTAKYFDKALS 350
   * * * * *
1  SVVLCAPRIQFANRMDQSGVQVG 355
2  SVVLCAPRIQFANRMDQSGVQVG 355
3  SVVLCVPLHNSFTDANRMDQSGVQVG 373
   * * * * *

```

그림 7. 본연구의 지베렐린 유전자와 다른 유전자의 alignment 결과  
 (1) 토마토의 지베렐린 3-베타 hydroxylase 2,  
 (2) 감자의 3-베타 hydroxylase,  
 (3) 토마토의 지베렐린 3-베타 hydroxylase 1

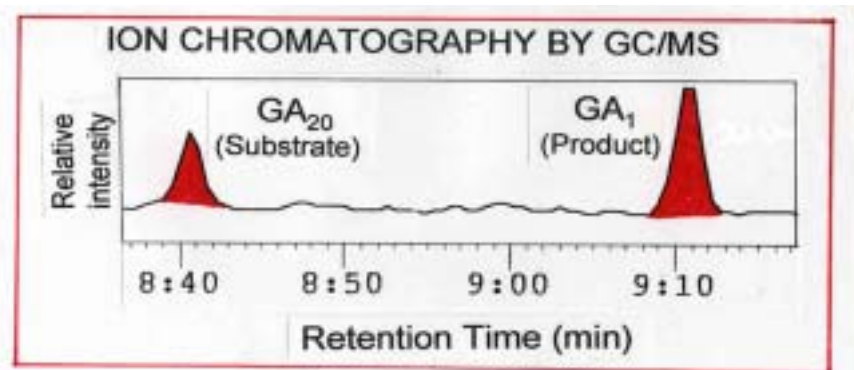


그림 8. GA<sub>20</sub>과 3β-hydroxylase 반응의 생성물을 HPLC를 통해 분석

## 4) 제 1협동과제

### 가) 수행방법

#### 1) 더벵이병 생물방제균의 항생물질 정제 및 구조 분석

- 더벵이병 생물 방제균 *Bacillus* sp. sunhua를 37℃, 150rpm에서 1일간배양한 후 생산된 항생물질을 정제하기 위하여 배양액 15L를 4℃에서 8000rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액을 ethyl acetate(EtOAc) 및 butanol(BuOH)등의 유기용매로 추출 후 silica gel 60 RP-18 chromatography를 거친 후 preparative HPLC에 의하여 정제하였다. chromatography에 이용된 silica gel(40~63 mesh)은 Merck사의 제품을 사용하였으며, 각각 50%, 40%, 30%, 20%, 10% aqueous MeOH, 100%MeOH, 100%Aceton, 100%EtOAc, 100% Hexane을 이용하여 단계적으로 용출하였다. 이때 30% aqueous MeOH에서 *Streptomyces scabiei*를 저해하는 활성이 가장 강하게 나타났다. 이 분획을 preparative HPLC를 이용하여 분리하였으며, 이때 column은 Symmetry prep<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> column을 사용하였으며 60% aqueous acetonitrile을 이동상으로하여 RI detector로 검출하였다. 그리고 HPLC를 거친 분획 각각을 *Streptomyces scabiei* 포자를 도말한 고체배지에 활성물질을 흡착시킨 8mm disc를 올려 놓고 배양하여 disc주위의 억제환의 형성 유무로 확인하였다.

#### 2) Scanning Electron Microscope (SEM) 촬영

- GYM 고체 배지에서 5일간 성장한 *S. scabiei*에 *Bacillus* sp. sunhua 항생 물질을 처리하였을 때 포자와 균사형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Scanning Electron microscope로 촬영하였다. 전처리 과정은 2% paraformaldehyde과 2% glutaraldehyde in 0.05M sodium cacodylate buffer(pH 7.2)를 4℃에서 4시간동안 primary fixation 한다. 그리고 0.05M sodium cacodylate buffer (pH7.2)를 이용하여 4℃에서 10분씩 세 번 세척하였다. Post fixation 으로 1% osmium tetroxide in 0.05M sodium cacodylate buffer (pH7.2)를 사용하여 4℃에서 2시간 동안 처리하였다. 상온에서 증류수로 여러번 씻은후 EtOH 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100%, 100%를 넣어서 탈수한다.

그리고 100% hexamethyldisilazane으로 15분 처리 후 metal stub 위에 mounting 하여 gold coating 한다. 관찰 배율은 가장 형태 분화를 잘 확인 할 수 있는 5000배로 촬영하였으며 JEOL 사의 로 JSM 5410LV (Tokyo, Japan) Scanning Electron Microscope 사용하였다.

### 3) 생물방제균 assay

- 실제 토양 내에서 선발된 길항 균주 *Bacillus* sp. sunhua가 *S. scabiei*를 길항하여 토양에서 감자 더듬이병을 억제 여부를 조사하였다. *S. scabiei* 는 OMB 배지에서 28℃, 7일 동안 배양한 배양액을 준비하였다. 그리고 sample culture를 300rpm에서 10min 동안 centrifuge 하여 얻은 균사체를 30ml 멸균수로 3번정도 resuspended 하여 준비하였다. 감자는 제주도 감자를 사용하여 멸균 증류수로 깨끗이 여러 번 씻은 후 28℃ 항온실에서 감자 싹 지름이 12.5cm 정도 자란 일정한 크기의 비슷한 종묘만 골라 포트에 옮겼다. 이들을 실제 토양에서 *S. scabiei*와 *Bacillus* sp. sunhua를 함께 처리하여 3달 동안 키웠다.

### 4) 더듬이병 방제 포장실험

- 더듬이병이 많이 발생하는 고령지 농업연구소 강릉 농장에서 *Bacillus* sp. sunhuarbs주의 길항능력을 조사하였다. 다음과 같이 *Bacillus* sp. sunhua 배양액을 감자 파종시 1차 처리하였고, 2차 처리는 괴경이 생길 때 처리하였다. 그리고 3차 처리는 괴경이 성숙하는 기간에 처리하였으며 파종후 3개월 뒤에 감자를 수확하였다(그림 9).

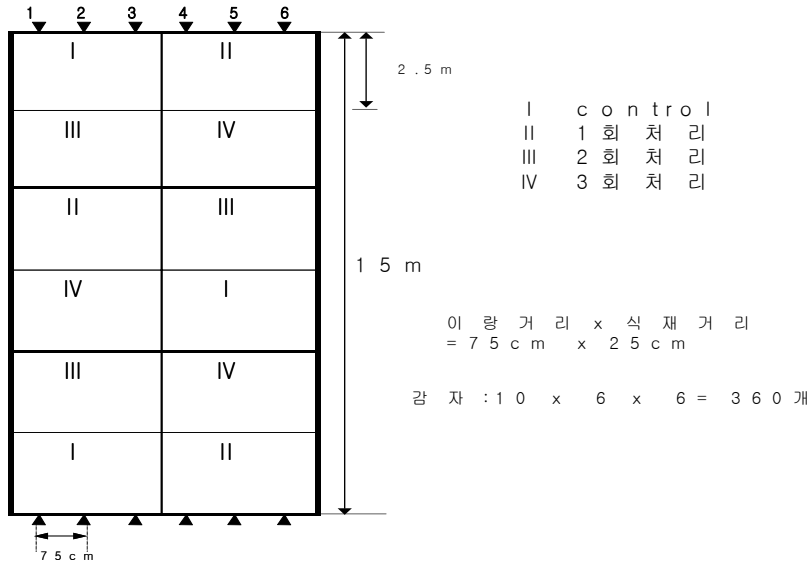


그림 9. 감자 포장 실험 실시 구

나) 연구결과

1) 감자 더듬이병 생물 방제균이 생산하는 항생물질의 구조분석

- 각각의 물질 30% aqueous MeOH, 20% aqueous MeOH를 HPLC를 통해서 분리하여 얻은 최종 정제물질의 구조분석을 위해서  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , HMBC, HMQC과 Mass를 측정하였다. 그 결과 sunhua-A에서 분자량 1043의 iturin A 물질을 확인하였으며, 이 물질이 *S. scabiei*의 포자형성을 저해하는 것을 확인하였다. 또한 sunhua-B에서 분자식이  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$ , 분자량이 425  $(\text{M}+\text{Na})^+$ 인 macrolactin A 물질을 확인하였으며, 이 얻은 물질이 균사 성장과 포자형성을 저해함을 확인 하였다.

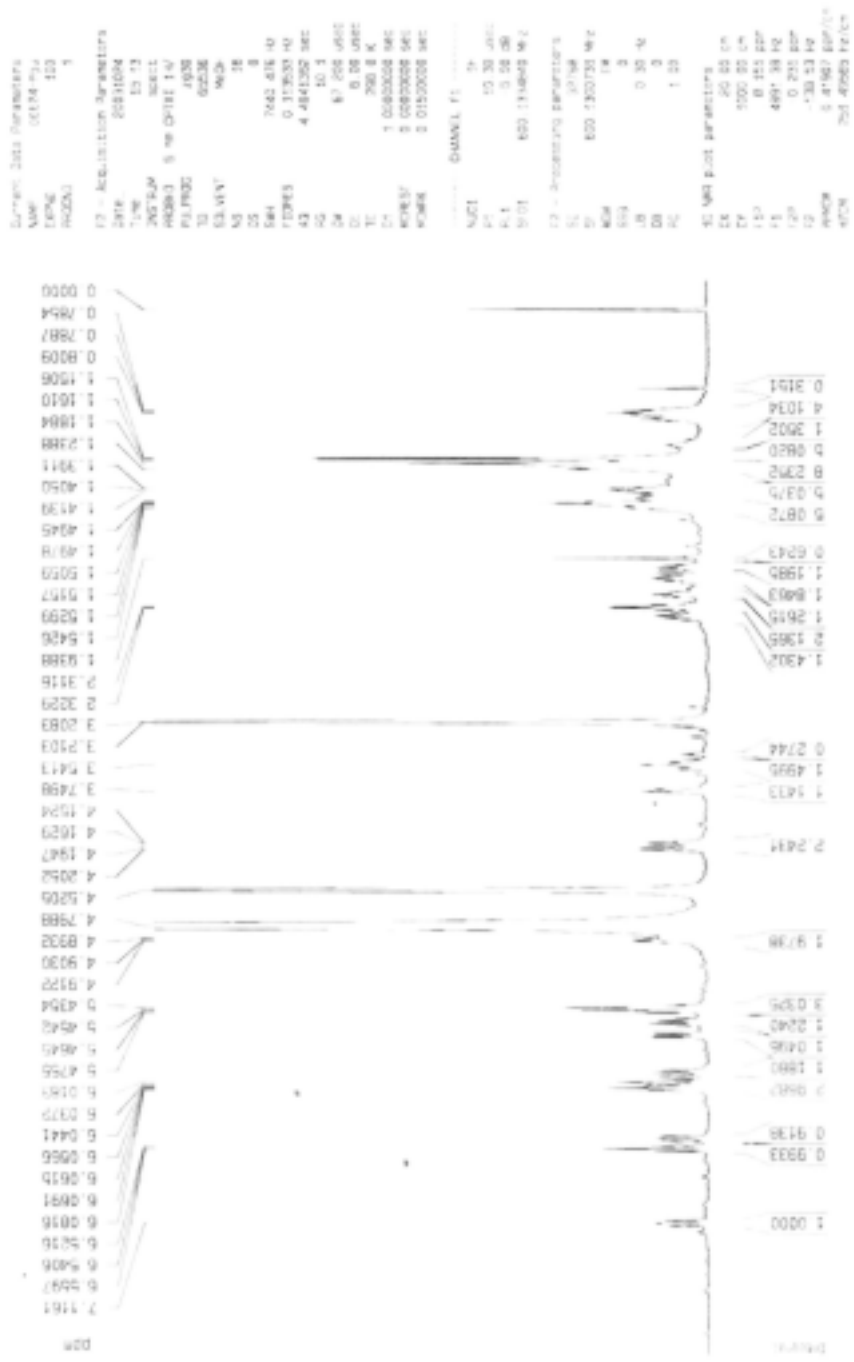


그림 10. sunhua-B 의 <sup>1</sup>H NMR spectrum



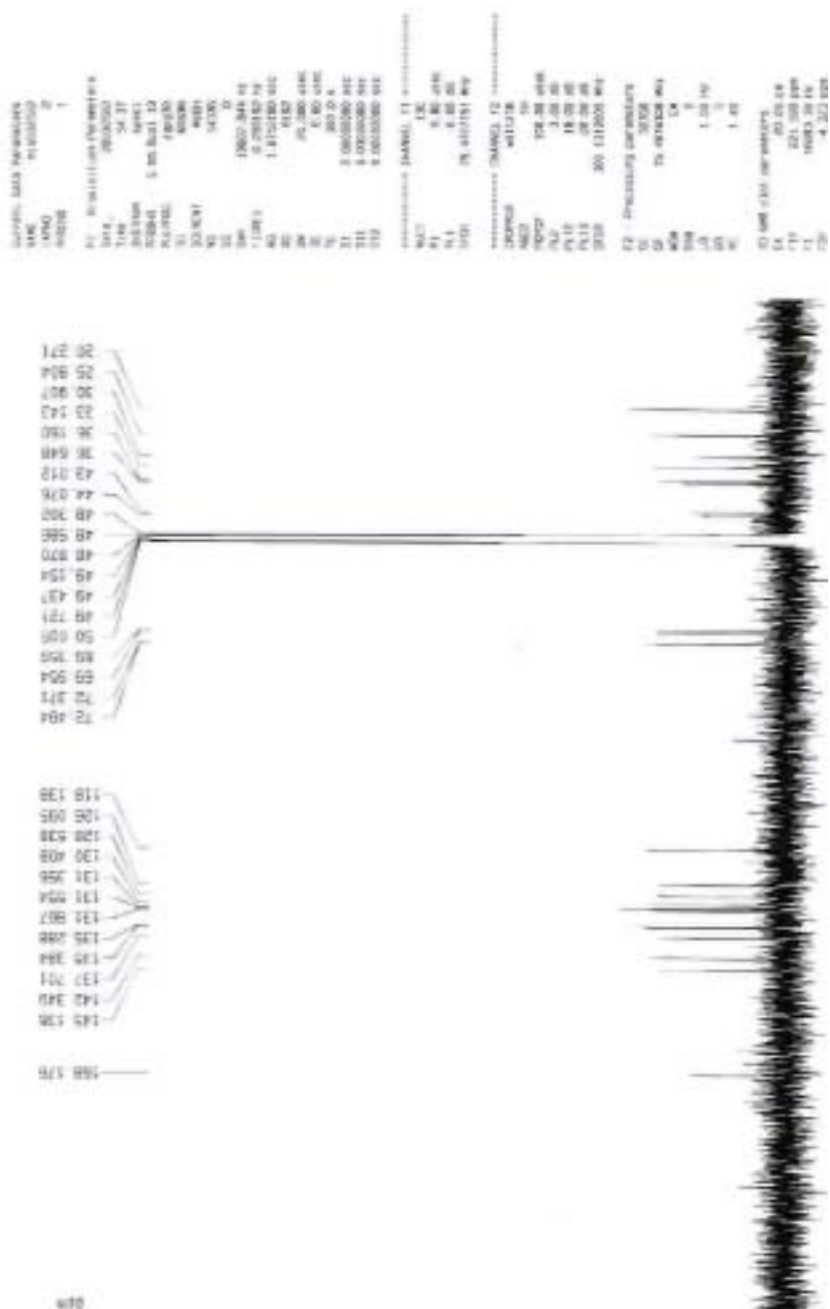


그림 11. sunhua-B의  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum

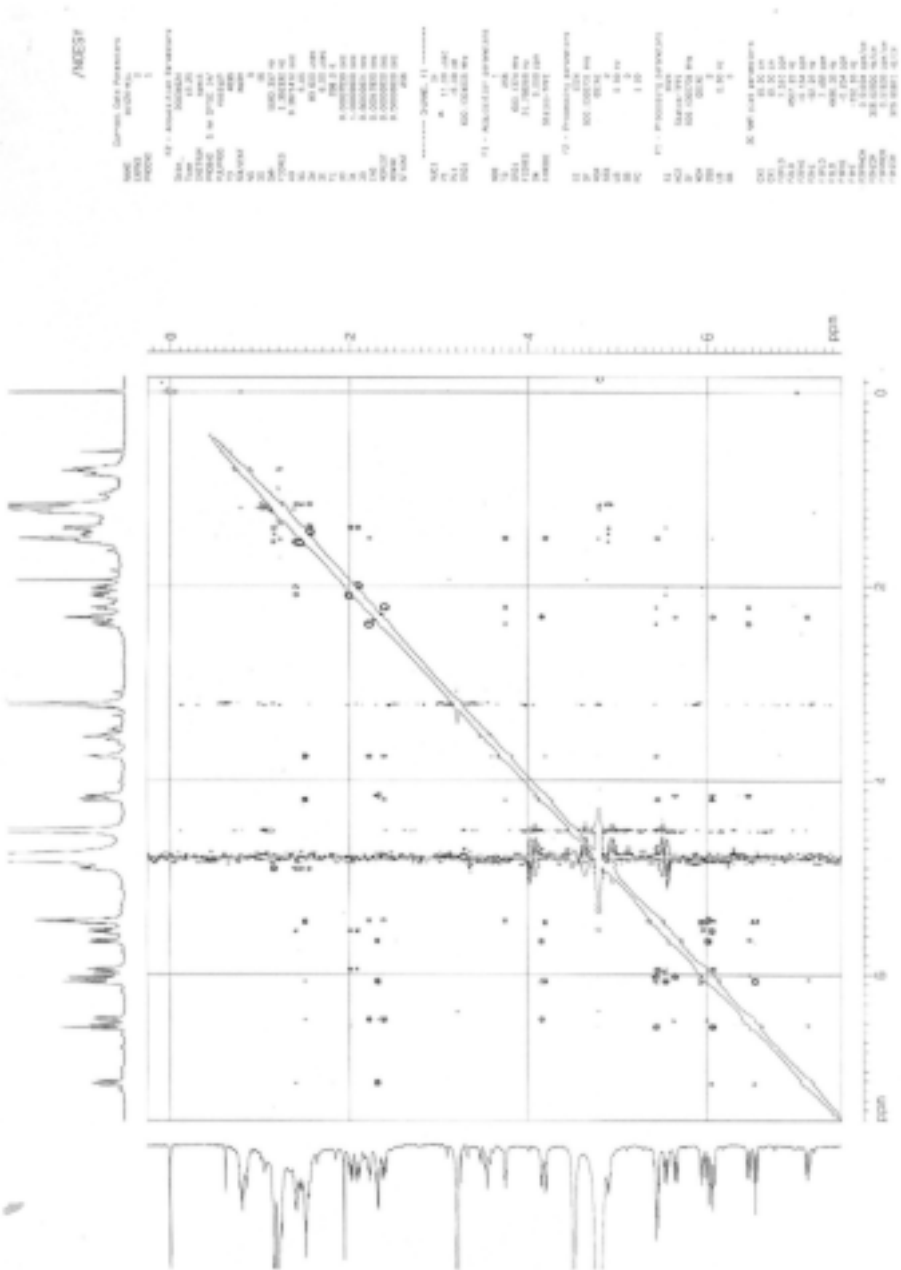


그림 12. sunhua-B의 NOESY spectrum

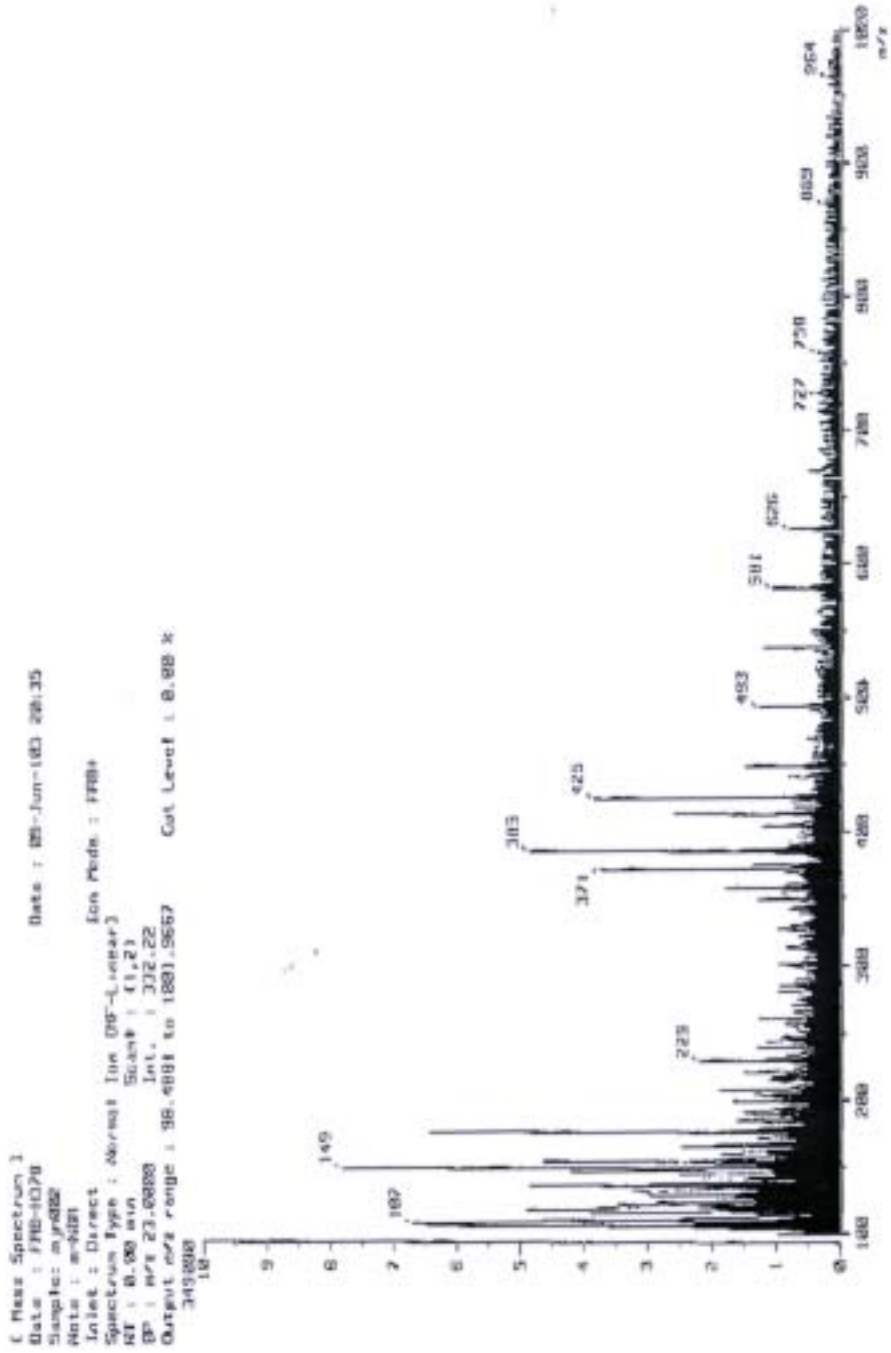


그림13. sunhua-B 의 Mass spectrum

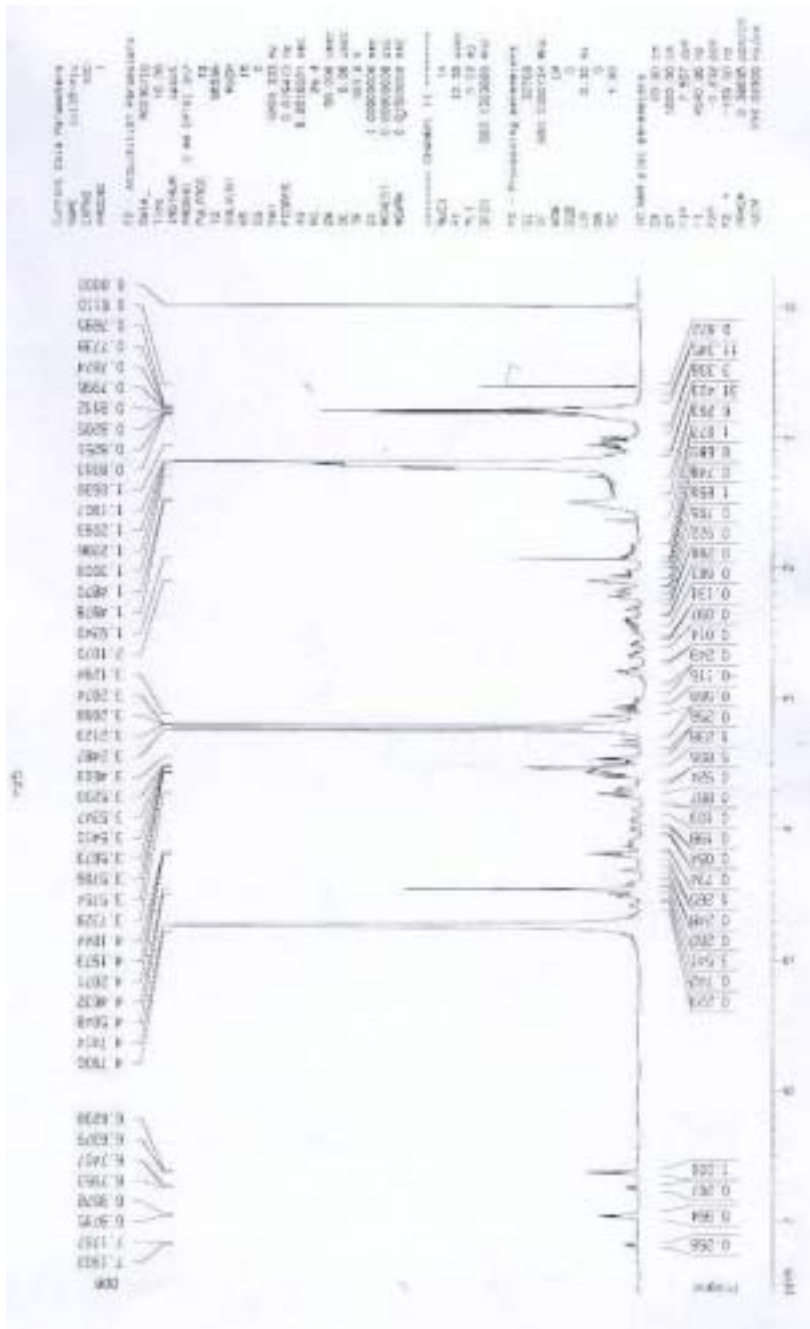


그림 14. sunhua-A의  $^1\text{H}$  NMR spectrum

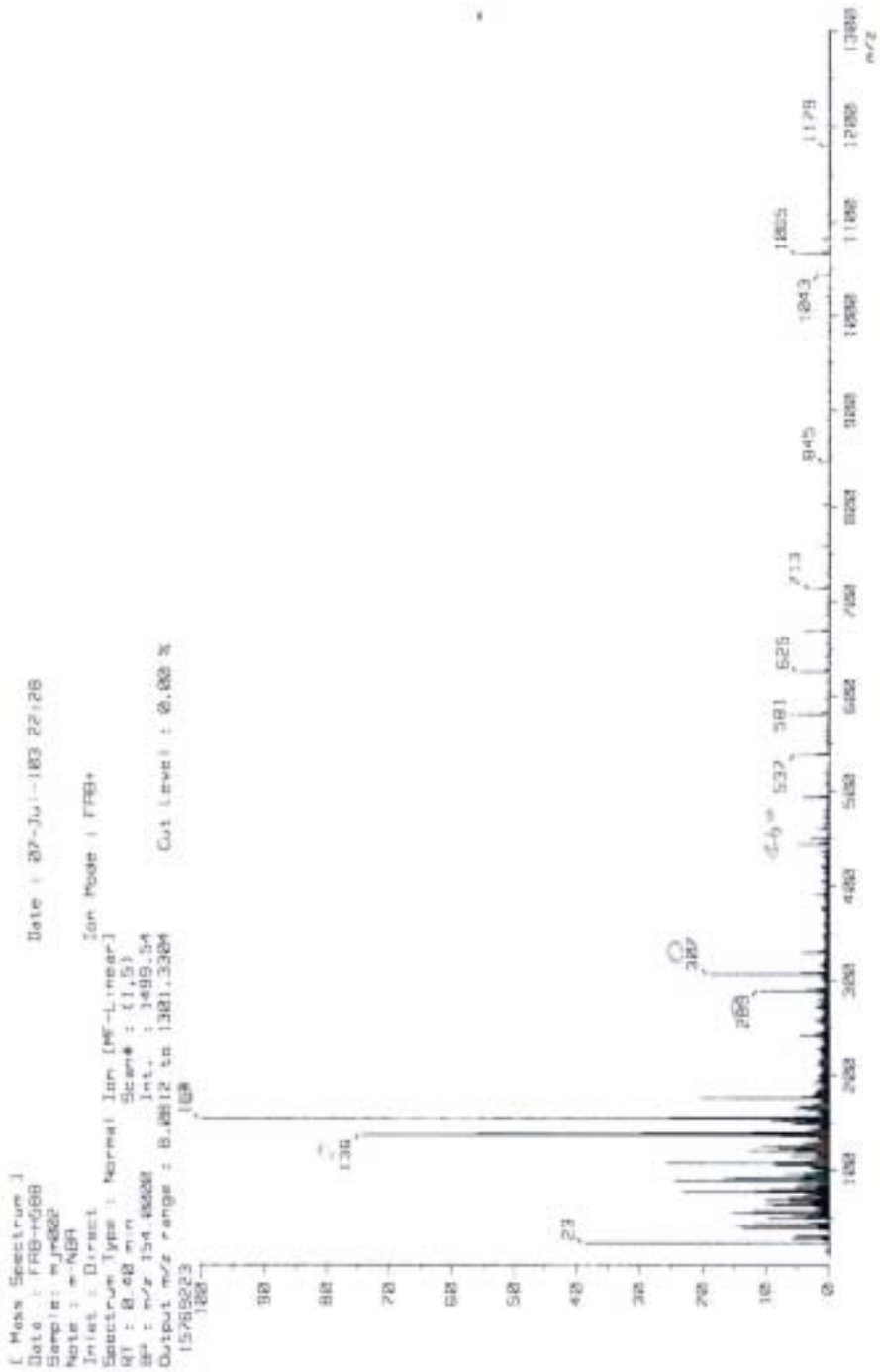


그림 15. sunhua-A의 Mass spectrum

표 5 sunhua-B 와 macrolactin A의 <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR data

Atom	sunhua-B <sup>a</sup>		macrolactin A <sup>b</sup>	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J, Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J, Hz)
1	166.5		166.3	
2	116.4	5.44 (m)	117.8	5.68 (d, 11.2)
3	143.7	6.54 (t, 11.5)	143.7	6.29 (dd, 11.2, 11.5)
4	129.0	7.12 (dd, 11.5, 14.8)	129.4	7.48 (dd, 11.5, 14.9)
5	141.0	6.07 (m)	142.4	5.85 (ddd, 7.2, 7.2, 14.9)
6	41.8	2.31 (m)	42.8	2.30 (m) 2.35 (m)
7	71.1	4.15 (m)	71.2	4.15 (m)
8	136.0	5.66 (dd, 5.8, 15.1)	138.3	5.38 (dd, 4.7, 15.0)
9	124.5	6.47 (dd, 11.1, 15.1)	124.9	6.73 (dd, 11.5, 15.0)
10	130.0	6.02 (m)	130.6	6.04 (dd, 11.2, 11.5)
11	127.0	5.44 (m)	128.6	5.42 (m)
12	35.0	2.22 (m) 2.38 (m)	36.7	2.43 (m) 2.70 (m)
13	67.3	3.75 (m)	68.8	4.03 (m)
14	42.7	1.50 (m)	43.9	1.74 (m) 1.83 (m)
15	68.0	4.20 (m)	69.2	4.62 (m)
16	133.6	5.46 (m)	136.6	5.70
17	129.9	6.07 (m)	131.2	6.35 (dd, 10.6, 15.3)
18	130.3	5.97 (dd, 10.5, 15.0)	129.6	6.08 (dd, 10.6, 14.8)
19	133.6	5.56 (m)	133.7	5.70
20	32.0	1.99 (m) 2.10 (m)	32.3	1.91 (m) 2.06 (m)
21	24.2	1.40 (m)	25.0	1.32 (m)
22	34.2	1.42 (m) 1.56 (m)	35.3	1.32 (m) 1.49 (m)
23	71.0	4.90 (m)	70.8	5.10 (m)
24	18.7	1.15 (d, 6.3)	19.9	1.09 (d, 6.5)

<sup>a</sup> CD<sub>3</sub>OD.  
<sup>b</sup> C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> for <sup>1</sup>H-NMR and CD<sub>3</sub>OD for <sup>13</sup>C-NMR.

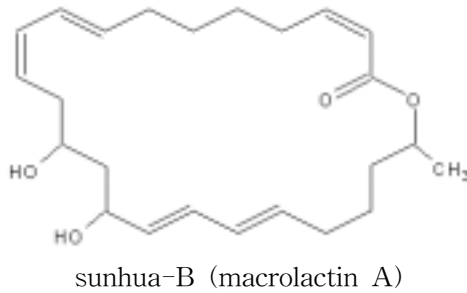
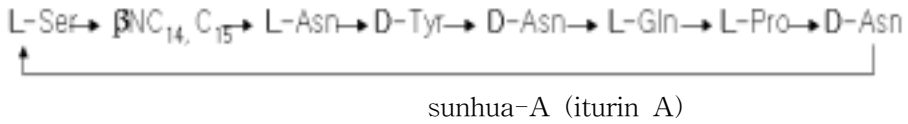
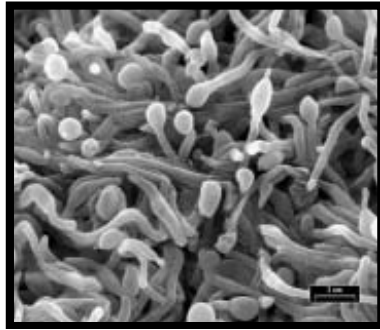


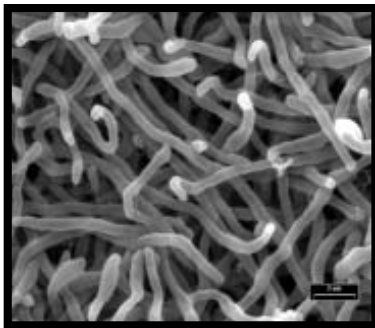
그림16. sunhua-A (iturin A) 와 sunhua-B (macrolactin A)의 구조

## 2) Scanning Electron Microscope 촬영

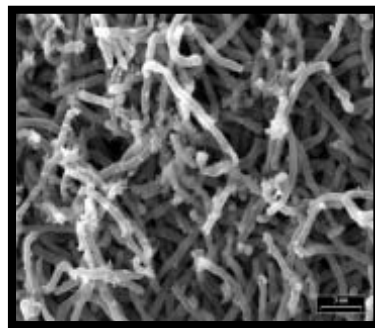
- *Bacillus* sp. sunhua가 생산하는 항생물질이 감자 더듬이병원균 *S. scabiei*의 형태분화에 미치는 영향을 전자현미경을 이용하여 조사하였다. GYM 평판배지에 *S. scabiei*를 도말한 후, 분리 정제된 물질 30% aqueous MeOH 부분의 sunhua-A 과 sunhua-B을 처리하여 *S. scabiei*의 균체 부위를 1cm 크기로 잘라 전자현미경으로 관찰한 결과를 그림17에 나타내었다. 항생물질을 처리하지 않은 *S. scabiei*는 균사와 포자를 뚜렷하게 형성 하였다. 그러나 sunhua-B을 처리한 *S. scabiei*는 포자가 없이 일정하게 형성된 균사를 관찰되었다. 그리고 *S. scabiei*에 sunhua-B물질을 처리하여 미치는 영향을 조사한 결과에서는 *S. scabiei*의 spore를 관찰할 수 없었을 뿐만 아니라 균사가 파괴되어 세포 내 물질이 누출되는 모습을 나타내었다. 이러한 현상은 방제균 *Bacillus* sp. sunhua의 항균성 물질 분비에 의한 길항 작용으로 *Trichoderma*속 곰팡이들이나 *Pseudomonas* 등이 용균 효소를 분비하여 세포벽을 용해하는 길항 작용과는 다를 것으로 사료된다.



a



b



c

그림 17. *Bacillus* sp. sunhua가 생산하는 항생물질에 의한 *S. scabiei*의 형태변화(SEM) (a)무처리구 (b)항생물질 sunhua-A으로 처리한 경우 (c) 항생물질sunhua-B으로 처리한 경우

### 3) 더탱이병 생물방제균의 생물방제력 측정

- 선발된 길항균주 *Bacillus* sp. sunhua가 *S. scabiei*에 감염된 토양 내에서 그 길항 능력이 발휘되어 감자 더탱이병을 억제 할수 있는지 조사하였다. 28℃ 항온실에서 감자싹의 지름이 12.5cm 정도 자란 일정한 크기의 종묘만 골라 멸균된 토양이 담긴 포트에 옮겨서 25℃에서 배양하였다. *Bacillus* sp. sunhua를 처리하지 않은 것, *S. scabiei*만 처리한 것, *Bacillus* sp. sunhua와 *S. scabiei*를 동시에 처리한 것을 3달 동안 배양한 후 길항효과를 확인하였다. 그 결과 감자 더탱이병 감염율이 *S. scabiei*만 처리한 것은 감염율이 75%이었으나 *Bacillus* sp. sunhua와 *S. scabiei*를 동시에 처리한 구에서는 감염율이 35%로 나타났다. 따라서 더탱이병을 40%정도 억제하는 효과를 얻을 수 있었다.



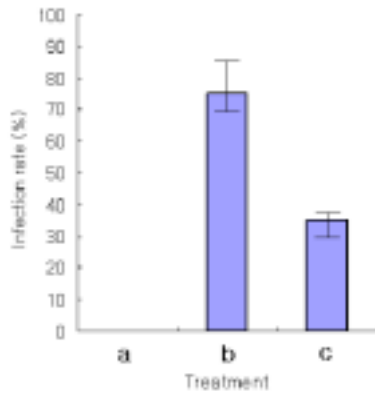


그림 18. 포트에서 감자 더듬이병의 방제 효과를 확인  
 a. 무처리 감자  
 b. *S. scabiei*로 감염 시킨 감자  
 c. *Bacillus* sp. sunhua와 *S. scabiei*를 동시에 처리한 감자

#### 4) 감자 더듬이병 방제 포장 실험

- 더듬이병이 많이 발생하는 고령지 농업연구소 강릉 포장에서 *Bacillus* sp. sunhua의 길항능력을 조사하였다. 그 결과 대조구보다 *Bacillus*의 배양액을 한 번 처리한 구에서 더듬이병이 개선되는 효과를 보였으며, *Bacillus*의 배양액을 세 번 처리한 구에서는 육안으로도 상당히 더듬이병이 억제되어 병반이 줄어든 효과를 관찰할 수 있었다. 그러나 감자 표면의 병반은 세 번 처리한 구에서도 여전히 남아 있어 *Bacillus*의 처리방법과 처리시기 및 제제화에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.



그림 19. 더뎡이병 발병 토양에서 *Bacillus* sp. sunhua의 더뎡이병의 방제 효과 확인 a) 무처리구, b) *Bacillus* sp. sunhua 1회 처리, c) *Bacillus* sp. sunhua 2회 처리, d) *Bacillus* sp. sunhua 3회 처리

#### 5) 더뎡이병 생물방제균의 항균 스펙트럼

- 본 *Bacillus* sp. sunhua 가 생산하는 항생물질은 감자 더뎡이병균 *S. scabiei*에 강한 항균효과를 나타내는 것으로 조사되었지만 다른 식물병원성 진균에 대한 방제력을 검증하기 위하여 항균활성 범위를 조사한 결과를 표6에 나타내었다. 과수의 세균성 궤양병을 일으키는 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, 감자 썩음병을 일으키는 *Fusarium oxysporum*, 점무늬 낙엽병을 일으키는 *Alternaria maliloti*, 감귤 푸른 곰팡이병을 일으키는 *Penicillium digitatum*에 생물학적 방제균주의 항생물질을 처리하였을 때 각종 식물 병원성균을 억제하였다. 흥미있는 것은 감자의 썩음병을 일으키는 *Fusarium oxysporum*에 처리하였을 때 항균활성이 감자 더뎡이병원균 *S. scabiei*를 억제하는 효과와 비슷하였다. 그리고 식물 생육을 촉진시켜주는 미생물인 *Pseudomonas fluorescens*에는 전혀 영향을 주지 않았다. 따라서 생물 방제균 *Bacillus* sp. sunhua 가 생산하는 항생물질은 식물 병원성 미생

물에 대한 항균범위가 넓은 항생물질임을 확인하였다. 특히 토양 내의 유용 미생물에는 영향을 주지 않으면서 식물병을 일으키는 미생물을 억제시키는 활성이 좋았다.

표 6. 감자 더뎡이병의 생물 방제균의 항균 스펙트럼

Test strains	Inhibition zone (직경 : mm)
<i>Streptomyces scabiei</i>	22
<i>Rhizobium meliloti</i>	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	14
<i>Fusarium oxysporum</i>	20
<i>Alternaria mali</i>	16
<i>Penicillium digitatum</i>	*/-

## 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1)연구의 목표 달성도

구 분	연구목표	평가의 착안점 및 목표달성도		
		평가 착안점	세부 목표 달성도 (%)	최종 달성도 (%)
1차년도 (2001)	감자의 생산성 증대 및 상품성 향상을 위한 미생물 자원을 확보하고 이들의 효과를 시험한다.	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 감자 성장 촉진물질 생산 미생물의 동정 및 생리적 효능 분석</li> <li>○ 지베렐린 생합성 저해제의 투여에 의한 괴경 형성의 양상 규명</li> <li>○ 감자 세균병 억제인자의 동정 및 효과 분석</li> <li>○ 세균병 독소 분해 균주의 질병 방제 효과 검증을 통하여 방제 미생물 선정</li> <li>○ 감자 성장 촉진 및 세균병 저해균주의 배양 기술 개발</li> </ul>	20 20 20 20 20	100
2차년도 (2002)	실용화를 위한 기반을 확립하고 국제적으로 공인 받을 수 있는 학술적 기초를 수립한다.	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 감자 성장 촉진물질의 분리 및 정제</li> <li>○ 감자 괴경의 비대 성장시의 지베렐린의 생성 및 그 조절방안 개발</li> <li>○ 감자 세균병 억제인자의 억제 기작 규명</li> <li>○ 감자 세균병 억제 물질의 분리 및 정제</li> <li>○ 감자 성장 촉진 및 세균병 억제 물질 생산균주의 제재화 가능성 검토</li> </ul>	20 20 20 20 20	100
3차년도 (2003)	감자괴경 조기형성 및 세균병 방제의 천연물 농약 및 생물 농약의 실용화 기술 연구한다.	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 감자 성장 촉진물질의 구조분석 및 생산 체계 검토</li> <li>○ 감자 조기성장과 지베렐린 생합성 조절로 인한 괴경 확대기술 개발</li> <li>○ 감자 세균병 toxin 분해 유전자원 확보 및 활용 전략 수립</li> <li>○ 포장실험을 통한 세균병 방제 균주 실용화 기술 검토</li> </ul>	20 30 20 30	100

## 2) 기술발전에 기여도

친환경 농법에 대한 관심이 커지고 있지만, 아직 국내에서는 화학농약을 대신할 수 있는 미생물 농약의 개발이 미진한 실정이다. 그러나 최근 살균제(오이흰가루병)가 토양 미생물제제로 정부 공인을 받았으며, 고추 역병을 막을 수 있는 미생물이 분리되어 미생물 농약으로 인정받게 될 전망이며 국내외 연구진들의 꾸준한 연구가 수행되고 있다.

본 연구에서 분리한 *Bacillus* sp. sunhua는 현재까지 알려진 더텡이병 방제 미생물보다 높은 효과를 가졌으며 그 활성본체가 iturin A 와 macrolactin A로 확인되었다. 일년 반에 걸친 pot 및 포장실험에서 현장 적용 가능성을 검토한 결과 더텡이병 감염율을 40% 감소시켰을 뿐만 아니라 감자의 마른 썩음병에도 탁월한 효과를 나타내었으므로 감자 전용 생물농약으로서 발전할 가능성이 매우 높다는 점에서 획기적이다. 왜냐하면 감자는 세계에서 재배되고 있는 여러 식량 작물 중 옥수수, 벼, 밀 다음으로 차지하고 있는 주요 작물이며 인류의 식량 문제 해결에 대단히 중요하며 그 증산가치는 다른 어느 작물보다 앞서가는 작물이기 때문이다.

미생물 농약의 경우 토양 정착력 및 토양 내의 다른 미생물과의 경합과 길항으로 토양 생태계에 나쁜 영향을 미칠 수 있으나 *Bacillus* sp. sunhua는 *Rhizobium meliloti*, *Pseudomonas fluorescens*와 같은 유익한 토양 미생물에는 영향을 주지 않는 안정성에 대한 예비결과를 얻었으므로, 아직까지 특별한 감자 더텡이병에 대한 농약이 개발 되지 않은 현 시점에서 향후 본 연구 결과는 감자 더텡이병 방제에 크게 기여할 것으로 판단된다.

## 제 5장 연구개발결과의 활용계획

### 1) 추가연구의 필요성

미생물 농약으로 사용하기 위해 산업 균주 개발이 필요하다. UV mutation 이나 promoter를 조정하는 방법을 통하여 macrolactin A를 대량생산하는 산업균주를 개발한다.

### 2) 타연구에의 응용

본 연구에서 개발한 *Bacillus* sp. sunhua는 더듬이병을 일으키는 *Streptomyces scabiei*만 억제하는 것이 아니라, 마른 썩음병을 일으키는 *Fusarium oxysporum*의 저해효과도 탁월함으로 더듬이병 이외의 다른 감자병의 생물방제제로서도 유용할 것으로 사료된다.

### 3) 사업화 계획

본 연구 과제가 성공적으로 진행될 경우 연구 결과의 실용화를 위해 산업체에 기술이전할 계획이다.

# 1제 6장 연구개발과정에 수집한 해외과학 기술 정보

- ▶ 최근 중국 운남성 星耀生物製品工場(성약생물제품공장), 云南 농업대학 식물병리실험실에서는 中國 농업대학식물보호학원 생물방지실험실과 합작하여 새로운 미생물 농약제품인 "百抗"을 개발했다. 농작물 土傳病害는 분포 지역이 넓고 피해가 크고 방지하기 어려운 식물병해로서 세계 각국에서 보편적으로 발생한다. 관련 전문가의 설명에 따르면 새로운 미생물농약제품 "百抗"은 殺菌濟로서 유효성분"枯草芽 桿菌 B908"의 영양경쟁과 위치에 대한 점령을 통하여 식물을 보호하여 병원체의 침식을 방지하고 병원균을 소멸한다. 이렇게 菌으로 菌을 없애는 방법으로 병해를 방지하고 생산량을 높이는 목적에 도달한다. 새로운 미생물 농약제품 "百抗"은 일종 細菌性 미생물활성농약으로서 원가가 낮고 효과가 좋으며 안정하고 환경 피해가 없고 농작물에 해롭지 않다. 새로운 미생물농약제품"百抗"은 담배, 화초, 밀, 배추 등 土傳病害를 쉽게 받는 농작물에 효과가 좋고 특히 벼 紋枯病에 대한 효과는 70%에 달한다.
- ▶ Auburn 대학의 J. F. Murphy은 식물생장을 촉진하는 근권 미생물이 바이러스에 대한 보호효과도 가져온다는 연구 결과 최근 발표하였다. 이 연구팀은 키토산 전달체로 제형화한 식물생장촉진근권세균(PGPR) 계통들을 둘씩 조합하여 토마토 식물의 생장 촉진과 오이모자이크바이러스(CMV) 감염 저항성을 유도하는 능력을 평가하여 생물제제 처리가 식물생장을 촉진하는 것은 물론이고, CMV 감염으로부터 식물을 보호하는 효과도 있음을 증명하였다.
- ▶ 브라질 비코사연방대학(Federal Univ. Vicosa)의 Reginaldo da Silva Romeiro연구팀은 근권세균이 토마토에 전신저항성 유도함을 밝혀냈다. 토마토 병원세균 *Pseudomonas syringae* pv. tomato에 전신성 유도저항성을 유도하는 능력에 따라 선발된 근권 세균들을 가지고, 각각 토마토에서 지상부에 발생하는 여러 가지 병의 원인이 되는 여러 병원균에 대하여 생물적 방제효과를 시험하여, 잎마름병, 흰가루병, 반점병,

세균성점무늬병의 발병 강도가 낮아진 결과를 보고하였다.

- ▶ 독일 막스플랑크 화학생태학 연구소의 Wilhelm Boland가 이끄는 연구진은 식물 뿌리에 공생하는 세균의 냄새가 식물의 성장을 촉진함을 유명 학회지에 발표하였다. 특정 미생물로부터 나오는 휘발성 냄새물질 (butanediol, acetoin)이 유도전신저항성을 유도를 활성화하여 식물의 성장 촉진하는데, 이것은 지금까지 알려진 식물의 호르몬의 신호전달과는 별개의 기작임을 보고하였다.



## 제 7장 참고문헌

- 1) 배무. 1978. 농업용 항생물질의 현황과 전망. 산업미생물학회지 6: 141-148.
- 2) 大野雅二, 大村智. 1987. 抗生物質研究 最先端. Pp. 16-17. 東京 化學 同人.
- 3) Mortimor, P. S. 1986. Antibiotics. Pp. 234. Springer-Verlag. New York, Inc.
- 4) 田中信男, 中村昭四郎. 1982. 抗生物質大要, Pp. 139. 東京大學出版會.
- 5) 양항승, 이두형, 이승찬. 1990. 신농약. Pp. 180-230. 향문사.
- 6) Umezawa, H., Y. Okami, T. Hashimoto, Y. Suhara, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1965. A new antibiotic kasugamycin. *J. Antibiotics Ser. A* 18: 101-103.
- 7) Ishiyama, T., I. Hara, M. Matsuoka, K. Sato, S. Shimada, R. Izawa, T. Hashimoto, M. Hamada, Y. Okami, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1965. Studies on the preventive effect of kasugamycin on rice blast. *J. Antibiotics Ser. A* 18: 115-119
- 8) Hamada, M., T. Hashimoto, T. Takahashi, S. Yokoyama, M. Miyake, T. Takeuchi, Y. Okami, and H. Umezawa. 1965. Antimicrobial activity of kasugamycin. *J. Antibiotics Ser. A* 18: 104-106.
- 9) Takeuchi, T., M. Ishizuka, H. Takayama, K. Kureha, M. Hamada, and H. Umezawa. 1965. Pharmacology of kasugamycin and the effect on *Pseudomonas* infection. *J. Antibiotics Ser. A* 18:107-110.
- 10) Tanaka, C., T. Nishimura, H. Yamaguchi, C. Yamamoto, Y. Yoshida, K. Sashikata, and H. Umezawa. 1965. Mechanism of

- action of kasugamycin. *J. Antibiotics Ser. A* **18**: 139-144.
- 11) Tanaka, N., Y. Toshida, K. Sashikata, H. Yamaguchi, and H. Umezawa. 1965. Inhibition of polypeptide synthesis by kasugamycin, an aminoglycoside antibiotic. *J. Antibiotics Ser A* **18**: 65-68.
  - 12) Suhara, Y., K. Maeda, H. Umezawa, and M. Ohno. 1965. Chemical studies on kasugamycin II. *J. Antibiotics Ser A* **18**: 184-186.
  - 13) Suhara, Y., K. Maeda, and H. Umezawa. 1965. Chemical studies on kasugamycin III. *J. Antibiotics Ser A* **18**: 187-190.
  - 14) Isono, K., J. Nagatsu, Y. Kawashima, and S. Suzuki. 1965. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. *Agric. Biol. Chem.* **29**: 848-854.
  - 15) Iwasa, T., H. Yamamoto, and M. Shibata. 1970. Studies on validamycins, new antibiotics I. *J. Antibiotics* **23**: 595-602.
  - 16) Iwasa, T., H. Yamamoto, and M. Shibata. 1973. *United States Patent* **3,754,083**.
  - 17) Iwasa, T., E. Higashide, H. Yamamoto, and M. Shibata. 1970. Studies on validamycins, new antibiotics II. *J. Antibiotics* **24**: 107-113.
  - 18) Iwasa, T., E. Higashide, and M. Shibata. 1971. Studies on validamycins, New antibiotics III. Bioassay methods for the determination of validamycin. *J. Antibiotics* **26**: 114-118.
  - 19) Iwasa, T., Y. Kameda, and M. Asai. 1970. Studies on validamycins, new antibiotics IV. *J. Antibiotics* **24**: 119-122.
  - 20) Nishizawa, N., Y. Kando, M. Koyama, S. Omoto, M. Iwata, T. Tsuruoka, and S. Inouye. 1984. Studies on a new nucleoside antibiotic dapiramycin. *J. Antibiotics* **37**: 1-5.

- 21) Vanittanakom, N., and W. Loeffler. 1986. Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiotics* **36**: 888-901.
- 22) Tsuda, K., T. Kihara, M. Nishii, G. Nakamura, K. Isono, and S. Suzuki. 1979. New antibiotic lipopeptin. *J. Antibiotics* **43**: 247-248.
- 23) Satomi, T., H. Kusakabe, G. Nakamura, and T. Nishio. 1982. Neopeptins A and B, new antifungal antibiotics. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 2621-2623.
- 24) Omura, S., H. Tomoda, K. Kimura, and Y. Iwai. 1988. Atpenins, new antifungal antibiotics produced by *Penicillium* sp. *J. Antibiotics* **16**: 1769-1773.
- 25) Ohba, K., H. Nakayama, K. Furihata, A. Shimazu, T. Endo, H. Seto, and N. Otake. 1986. Nitropeptin, a new dipeptide antibiotic possessing a nitro group. *J. Antibiotics* **10**: 709-713.
- 26) Isono, K., K. Kobinata, H. Oikawa, H. Kusakabe, M. Uramoto, K. Ko, T. Misato, S. W. Tai, C. T. Ni, and Y. C. Shen. 1986. New antibiotics, albopeptins A and B. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2163-2165.
- 27) Dobashi, K., N. Matsuda, M. Hamada, H. Naganawa, T. Takida, and T. Takeuchi. 1988. Novel antifungal antibiotics octacosamicins A and B. *J. Antibiotics* **41**: 1525-1541.
- 28) 배무, 고영희, 이화양, 조진호. 1982. *Streptomyces* sp.가 생산하는 항진균성 항생물질에 관한 연구. 한국산업미생물학회지 **10**: 39-43.
- 29) 김경석, 홍수형, 이은주, 박용복, 박용태, 하지홍. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* KGM-100이 생산하는 항생물질의 특성 및 구조. 한국산업미생물학회지 **23**: 98-103.
- 30) 김성기, 이남경, 정태숙, 김영국, 최진자, 복성해. 1991. *Bacillus subtilis* sub sp. *krietiensis*가 생산하는 항진균성 물질 KRF-001의 구조 결정.

- 한국산업미생물학회지 **19**: 598-603.
- 31) 김시관, 김창환. 1989. Acetoxycycloheximide의 생리활성 및 그 생산균주. 한국산업미생물학회지 **17**: 307-312.
  - 32) 서정우, 임용호, 김성호, 현봉철, 김창완, 연창석, 이덕근, 김광표, 정재경, 이철훈. 1993. 신규 항진균물질 AF-011A의 생물학적 활성 및 구조 분석. 산업미생물학회지 **21**: 564-569.
  - 33) 홍수형, 김경석, 이재근, 박용복, 하지홍. 1993. *Clostridium* sp. KH-431이 생산하는 항생물질의 특성 및 구조. 산업미생물학회지 **21**: 47-53.
  - 34) 김성욱, 이지우, 이상환, 복성해. 1991. 토양으로부터 분리한 항진균성 활성을 나타내는 세균의 동정과 그 생물활성. 한국산업미생물학회지 **19**: 337-342.
  - 35) Kannaiyan, S., and N. N. Prasad. 1976. Sheath blight disease control with antibiotics. *Indian J. Plant Prot.* **7**: 127-129.
  - 36) Iloba, C. 1983. Effect of antibacterial antibiotics on the growth of blast fungus *Pyricularia oryzae*. *Indian J. Ecol.* **10**: 270-273.
  - 37) 양호석. 1981. 한국의 항생물질 생산 동향. 미생물과 발효 **5**: 5-8.
  - 38) Yano, K., K. Yokoi, J. Oono, T. Kouda, Y. Ogawa, and T. Nakashima. 1986. Actinopyrenes A, B and C, new physiologically active substances I. *J. Antibiotics* **350**: 32-37.
  - 39) Yoshida, M., M. Ezaki, M. Hashimoto, M. Yamashita, N. Shigematsu, M. Okuhara, M. Kohsaka, and K. Horikoshi. 1989. A novel antifungal antibiotic, FR-900848 I. *J. Antibiotics* **18**: 748-754.
  - 40) Lee, S. M., and B. H. Song. 1983. An Antibiotic against *Bacillus amyloliquefaciens* from *Streptomyces* sp. KM-48. *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.* **11**: 39-45.

- 41) Kawakami, Y., S. Matsuwaka, T. Otani, H. Kondo, and S. Nakamura. 1978. Ileumycin, A new antibiotic against *Glomerella congruata*. *J. Antibiotics* **31**:112-117.
- 42) Shoji, J., H. Ninoo, T. Kato, T. Hattori, K. Hirooka, K. Tawara, O. Shiratori, and Y. Terui. 1990. Isolation of cepafungins I, II and III from *Pseudomonas* species. *J. Antibiotics* **18**: 783-787.
- 43) Sammes, P. G. 1978. Topics in Antibiotic Chemistry. Pp. 61-88. 1st ed. John Wiley and Sons. New York, Inc.
- 44) Agrios, G.N. (1997) *Plant Pathology*, 4th edn. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- 45) Bouchek-Mechiche, K., Pasco, C., Andrivon, D. and Jouan, B. (2000) Differences in host range, pathogenicity to potato cultivars and response to soil temperature among *Streptomyces* species causing common and netted scab in France. *Plant Pathology* **49**, 3-10.
- 46) Cho, S.J., Lee, S.K., Cha, B.J., Kim, Y.H., and Shin, K.S. (2003) Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiology Letters* **223**, 47-51.
- 47) Chun, J. and Goodfellow, M. (1995) A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 240-245.
- 48) Cook, R.J. (1993) Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. **31**, 53-80.
- 49) Doyle, J. J. and Maclean, A. A. (1960) Relationships between Ca:K ratio, pH, and prevalence of potato scab. *Canadian Journal of Plant Science* **40**, 616-619.

- 50) Eckwall E.C. and Schottel, J.L. (1997) Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogenes* strain PonSSII. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **19**, 220-225.
- 51) Eshita, S.M. and Roberto, N.H. (1995) Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. *The Journal of Antibiotics* **48**, 1240-1247.
- 52) Ferreira, J.H.S., Mathee, F.N. and Thomas, A.C. (1991) Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* **81**, 283-287.
- 53) Gustafson, K., Roman, M. and Fenical, W. (1989) The Macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea marine bacterium. *Journal of American Chemical Society* **111**, 7519-7524.
- 54) Healy, F.G., Wach, M., Krasnoff, S.B., Gibson, D.M. and Loria, R.(2000) The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Molecular Microbiology***38**, 794-804.
- (55) Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H., Fujii, Y. (2002) Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry* **61**, 693-698.
- (56) Hiotink, H and Boehm, M (1999) Biological within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* **37**, 427-446.
- (57) Hooker, W.J. (1981) Common scab. In compendium of potato

- disease. ed. Hooker, W.J. J. pp. 33-34. St. Paul, Minn.: American Phytopathological Society.
- (58) Keinath, A.P. and Loria, R. (1989) Population dynamics of *Streptomyces scabies* and other actinomycetes as related to common scab of potato. *Phytopathology* **79**,681-687.
- (59) Kim, H.H., Kim, W.G., Ryoo, I.J., Kim, C.J., Suk, J.E., Han, K.H. Hwang, S.Y. and Yoo, I.D. (1997) Neuronal cell protection activity of Macrolactin A produced by *Actinomadura* sp. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **7**, 429-434.
- (60) Kim, Y.S. and Kim, S.D. (1994) Antifungal mechanism and properties of antibiotic substances produced by *Bacillus subtilis* YB-70 as a biological control agent. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **4**, 296-304.
- (61) Kimura, H., Sashihara, T., Matsusaki, H., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (1998) Novel bacteriocin of *pediococcus* sp. ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. *Annals of New York Academy of Sciences* **864**, 345-348.
- (62) Lawrence, C.H., Clark, M.C. and King, R.R. (1990) Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology* **80**, 606-608
- (63) Levick, D.R., Evans, T.A., Stephens, C.T. and Lacy, M.L. (1985) Etiology of radish scab and its control through irrigation. *Phytopathology* **75**, 568-572.
- (64) Lim, H.S., Kim, Y.S. and Kim, S.D. (1991) *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 510-516.

- (65) Liu, Daqun., Anderson, N. A. and Kinkel, L. L. (1995) Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Phytopathology* **85**, 827-831.
- (66) Liu, Daqun., Anderson, N.A. and Kinkel, L.L. (1996) Selection and characterization of strains of *Streptomyces* suppressive to the potato scab pathogen. *Canadian Journal of Microbiology* **42**, 487-502.
- (67) Loria, R., Bukhalid, R.A. and Fry, B.A. (1997) Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease* **81**, 836-846.
- (68) Moyne, A.-L., Shelby, R., Cleveland, T.E., and Tuzun, S. (2001) Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 622-629.
- (69) Munimbazi, C. and Bullerman, L.B. (1998) Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 959-968.
- (70) Neeno-Eckwall, E.C., Kinkel, L.L. and Schottel J. L. (2001) Competition and antibiosis in the biological control of potato scab. *Canadian Journal of Microbiology* **47**, 332-340.
- (71) Peypoux, F., Guinand, M., Michel, G., Delcambe, L., Das, B.C. and Lederer, E. (1978) Structure of Iturine A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **17**, 3992-3996.
- (72) Pietro, A.D., Gut-Rella, M., Pachlatko, J.P., and Schwinn, F.J. (1992) Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off. *Phytopathology* **82**, 131-135.
- (73) Potter, H.S., Hooker, W.J., Cargo, W., and Stachwick, G.T. (1958)



- Pentachloronitrobenzene and urea-formaldehyde for potato scab control in Michigan. *Plant Disease Reporter* **43**, 633-637
- (74) Raaijmakers, J.M., Vlami, M. and de Souza, J.T. (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**, 537-547.
- (75) Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- (76) Schottel, J.L., Shimizu, K., and Kinkel, L.L. (2001) Relationships of *in vitro* pathogen inhibition and soil colonization to potato scab biocontrol by antagonistic *Streptomyces* spp. *Biological control* **20**, 102-112.
- (77) Strohl, W.R. (1997) *Biotechnology of Antibiotics* 2nd edn. New York: Marcel Dekker, Inc.
- (78) Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- (80) Wells, H.D. (1988) *Trichoderma* as a biocontrol agent. In *Biocontrol of Plant Diseases* ed. Kuerji and K.G. and Garg K.L., J. pp71-82. Florida: CRC Press, Inc.
- (81) Zuber, P., Nakano, M.M. and Marahiel, M.A. (1993) Peptide antibiotics. In *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria ed. Sonenshein A.L. *et al.*, J. pp.897-916. Washington, D.C. : American Society for Microbiology.
- (82) M. B. Avison., C. S. Higgins., C. J. von Heldreich., P. M. Bennett., and T. R. Walsh. 2001. Plasmid Location and Molecular Heterogeneity of the L1 and L2  $\beta$ -Lactamase Genes of

- Stenotrophomons maltophilia*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **45**: 413-419.
- (83) T. R. Walsh., A. P. Macgowan., and P. M. Bennett. 1997. Sequence Analysis and Enzyme Kinetics of the L2 Serine  $\beta$ -Lactamase from *Stenotrophomons maltophilia*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 41:1460-1464.
- (84) M. W. Crowder., T. R. Walsh., L. Banovic., M. Pettit., and J. Spencer. 1998. Overexpression, Purification, and Characterization of Cloned Metallo- $\beta$ -Lactamase L1 from *Stenotrophomons maltophilia*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42: 921-926.
- (85) P.Sanchez., A. Alonso., and J. L. Martinez. 2002. Cloning and Characterization of SmeT, a Repressor of the *Stenotrophomons maltophilia* multidrug Efflux Pump SmeDEF. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46:3386-3393
- (86) E. C. Neeno-Eckwall and J. L. Schottel. 1999. Occurrence of Antibiotic Ressistance in the Biological Control of Potato Scab Disease. Biological control 16:199-208
- (87) G. Lazarovits., J. Hill., R. R. King., and L. A. Calhoun. 2004. Biotransformation of the *Stenotrophomons maltophilia* phytotoxin thaxtomin A by the fungus *Asperillus niger*. Can j microbiol 50:121-126