T0002085

최 종
연구보고서

GOVP1200508747

새로운 유용세균(*Xenorhabdus nematophila*)을 이용한 미생물농약 개발

(주) 비 아 이 지

농 림 부

자료출처 : 새로운 유용세균(Xenorhabdus nematophila)을 이용한 미생물농약 개발 / 농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “새로운 유용세균(*Xenorhabdus nematophila*)을 이용한 미생물농약 개발” 과제 (협동연구과제 “공생세균의 살충기작과 생물시험 검정 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 28 일

주관연구기관명 : (주) 비아이지
총괄연구책임자 : 정 종 상
세부연구책임자 : 정 종 상
연 구 원 : 김 판 경
연 구 원 : 문 선 주
연 구 원 : 박 형 근
연 구 원 : 박 종 철
연 구 원 : 차 광 호
협동연구기관명 : 안동대학교
협동연구책임자 : 한 상 찬
연 구 원 : 이 영 근
연 구 원 : 김 용 균
연 구 원 : 조 성 환
연 구 원 : 이 선 영

위탁연구기관명 : 상주대학교
위탁연구책임자 : 최 용 화

요 약 문

Ⅰ. 제 목

새로운 유용세균(*Xenorhabdus nematophila*)을 이용한 미생물농약 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

곤충병원선충 (entomopathogenic nematode: EPN)은 장내에 곤충병원세균 (entomopathogenic bacteria)을 공생시키고, 대상 곤충 혈강 (hemocoel)으로 침입한다. 침입한 감염태 선충은 곤충 혈강에서 장내 공생세균을 배출하게 된다. 곤충 혈강으로 나온 세균은 자신과 공생기주인 선충을 보호하기 위해 곤충의 면역저하 (immunodepression)를 야기한다. 이후 대상 곤충을 치사에 이르게 하고, 치사된 곤충체에서 세균이 성장하고, 또한 이들 세균에서 분비된 다양한 분해효소의 도움으로 선충의 발육이 도모된다. 이후 증식된 선충은 다시 장내에 공생세균을 가지게 되고, 치사된 곤충 사체를 뚫고 나와 다음 대상 곤충을 찾게 된다. 이상의 선충-세균-곤충의 3종류의 생물체가 엮어내는 상호방어 및 공격 물질을 통해 이들의 상호 작용을 이해하고 또한 해충방제, 항생물질 및 면역저하물질 등 다양한 부분으로 응용될 수 있다.

본 연구기관을 중심으로 EPN의 기내배양기술이 개발되어 대량증식이 가능하여졌고, 제노랍두스네마토필라 (*Xenorhabdus nematophila*: Xn)의 PLA2에 대한 곤충 면역억제 기능이 밝혀진 기존 연구위에 이 세균을 이용하여 새로운 미생물제제를 개발하고 자 본 연구가 수행되었다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

Xn 유래 새로운 미생물제제 개발은 크게 3가지 방향에서 접근되었다. 첫째로, 국내 EPN 유래 다양한 곤충병원세균 확보로 미생물제제 개발의 범위 확대를 꾀하였다.

본 연구기간 동안에 기존의 *Steinernema carpocapsae* 이외에 *S. monticolum*과 *Heterorhabditis megidis*의 곤충병원선충이 새로이 채집되었다. 후자는 본 연구를 통해 국내에서 최초로 보고하게 되었다. 이들의 공생세균이 분리되었다. *S. monticilum*은 *X. koreana* (신종), *H. megidis*는 *Photorhabdus temperata temperata*를 각각 분리 동정하였다. 둘째로, 이들 세균들의 배양액이 갖는 살충 및 살비 효과가 분석되었다. 본 연구에서 분리된 모든 곤충병원세균의 배양액은 높은 살충력 (insecticidal activity) 및 살비력 (acaricidal activity)을 보유하였다. 이들중 Xn의 배양액이 가장 높은 효과를 보였으며, 이 배양액의 실내 및 포장 조건에서 탁월한 살충 및 살비력이 입증되었다. 셋째로, Xn 배양액으로부터 면역억제 및 살충물질의 분리가 이뤄졌다. PLA2 억제를 생물검정 종말점으로 하여 Xn 배양액의 물질분리를 시도한 결과 3개의 단일 물질 분획구에서 높은 활성을 보였다. 이들은 각각 benzylideneacetone (BZA), PEAK 2 (현재 구조동정중) 및 PT (proline-tyrosine)의 물질로 밝혀졌다. BZA와 PT는 모두 특이적으로 PLA2를 억제시켰으며, 높은 살충 및 살비력을 보였다.

살충 유효성이 입증되면서 제품화를 위한 연구가 병행되었다. ANU-Xn101의 경제성을 고려한 대량 생산 최적화가 이뤄졌다. 생산된 균주와 배양액은 각각 제제화가 이뤄지고, 포장 시험을 거쳐 각각 'IMB01'와 'IMB02'로 시제품이 완성되었다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 본 연구를 통해 채집된 국내 곤충병원선충과 이로부터 분리된 곤충병원세균은 모두 균주특허를 출원하였다: *H. megidis* (특허출원: 10-2003-0030070), *P. temperata temperata* (ANU101 균주) (특허출원: 10-2003-0036133), *X. nematophila* (ANU-Xn101 균주) (특허출원중).

2. 시제품 'IBM02'와 'IBM08'의 나비목 해충 방제용으로 농약 등록 시험 및 상품화가 추진된다.

3. Xn 배양액의 살비 효과는 이에 대한 생화학농약으로의 산업화가 기대된다. 생화학농약으로 등록하기 위해서 선결조건인 유효 살비 성분이 BZA과 PT가 포함된다는

것을 밝힌 상황으로 생화학농약의 등록과 농약제품화로 기대된다.

4. BZA과 PT의 높은 살충 및 살비 효과는 이들 물질의 단독 농약 등록 및 제품화가 기대된다.

5. BZA과 PT의 높은 PLA2 억제 능력은 비단 곤충 뿐만 아니라 척추동물의 PLA2 억제로도 판명되었다. 이는 새로운 의약 소염물질로도 산업화 가능성을 보여 주고 있다. 이에 대한 산업화 추진 전략이 필요하다.

SUMMARY

Ⅰ. TITLE

Development of Microbial Pesticides Using New Entomopathogenic Bacteria, *Xenorhabdus nematophila*

Ⅱ. SCOPE AND RATIONALE

Entomopathogenic nematodes (EPN) have their symbiotic bacteria in the intestine. When the infective juveniles enter a target insect, they release the bacteria into the insect hemoceol. The released bacteria inhibit insect immune reaction to protect their host nematodes and themselves, which leads to an immunodepressive state within the infected insect hemoceol. Then the bacterial development causes septicemia and kill the insects. They also secrete various antimicrobial materials and enzymes for development of their host nematodes. The developed nematodes habor the bacteria in their intestine and escape the insect cadaver to look for another target insects. This tripartite interactions among bacteria-nematode-insect can be applied to develop new microbial pesticides, antibiotics, and immunodepressive agents.

Previous studies strongly suggests the presence of insecticidal and immunodepressive agents coming from *Xenorhabdus nematophila*. This study was aimed to develop new microbial pesticides using *X. nematophila*.

Ⅲ. RESULTS

Three strategies were devised to develop new microbial pesticides using

entomopathogenic bacteria. First approach was to broaden our microbila agent spectrum to collect entomopathogenic bacteria in Korea, where little effort had been focused on collecting the entomopathogenic bacteria. We collected and identified two entomopathogenic nematodes, *Steinernema monticolum* and *Heterorhabditis megidis*. The latter nematode was firstly reported in Korea by this research. From these EPNs, we isolated and identified their symbiotic bacteria, *Xenorhabdus koreana* sp. nov. and *Photorhabdus temperata temperata*, respectively. Both bacteria were firstly reported in Korea. Second approach was to verify the insecticidal and acaricidal activities of the culture media of X. nematophila and other bacteria. The culture broth of *X. nematophila* had significantly potent insecticidal and acaricidal activities. Third approach was to identify the useful compounds from the culture broth. Using PLA2 inhibition as an endpoint, three purified fractions were obtained, where two peaks were identified as benzylideneacetone (BZA) and proline-tyrosine (PT), and the other peak was under chemical identifiection. Both BZA and PT had potent PLA2 inhibitory, insecticidal, and acaricidal activities.

The promissing effectivenesses of ANU-Xn101 and byproducts led to proceed experimental steps for their commercialization. We developed a technique to optimize economically a large scale production of the bacteria. Formulation techniqe was developed and led to introduce two pilot products of 'IMB01' and 'IMB02' after field assessment in their effectiveness to control insect pests.

Ⅳ. REMARKS

1. All the entomopathogenic nematodes and bacteria identified in this study were under patent process: *H. megidis* (Patent submission: 10-2003-0030070), *P. temperata temperata* (ANU101) (Patent submission: 10-2003-0036133), and *X. nematophila* (ANU-Xn101) (Preparation of patent process).

2. Pilot products of IBM02 and IBM08 needs to be registered as commercial

insecticides against lepidopteran pests.

3. The culture broth of *X. nematophila* can be commercialized by a biochemical biopesticide because we verified the acaricidal compounds (BZA and PT) in the extract.

4. Both BZA and PT had potent insecticidal and acaridial activities and can be commercialized as pesticides.

5. Both BZA and PT inhibited insect PLA2 which would be similar to secetory PLA2 type of vertebrates. This opens a possibility of new anti-inflamatory drugs. This approach is promissing and should be followed-up.

CONTENTS

Chapter 1 Research background

Chapter 2 Current related researches and techniques

Chapter 3 Research scopes and results

Chapter 4 Research yields and application

Chapter 5 Research extension program

Chapter 6 References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

곤충병원선충에서 유래되는 곤충병원세균은 면역억제 (Park and Kim, 2000), 세포치사효과 (Cho and Kim, 2004), 항생물질 분비 능력 (Forst et al., 1993; Ji et al., 2004) 및 살충능력 (Akhurst, 1980, 1986) 등이 보고되고 있다. 이런 다양한 능력이 한 생물종으로부터 파생되는 지를 이해하기 위해서는 이 세균이 나타내는 곤충-선충-세균의 삼각 (tripartite) 생활환을 이해할 필요가 있다 (김과 박, 1998 참조).

이들 곤충병원세균은 장내세균과 (Enterobacteriaceae)에 속하며, 곤충병원선충 (entomopathogenic nematode: EPN)과 공생관계를 가지고 있다. 즉, 감염태 EPN의 장내에 이들 세균들이 존재하게 된다. 대상곤충의 출현에 따라 감염태 선충이 곤충 혈강내로 침입하게 되고, 여기서 장내 공생세균을 곤충 혈강으로 배출하게 된다.

곤충의 혈강에는 척추동물의 혈액과 림프액이 혼재해 있는 혈림프 (hemolymph)가 자리하고 있다. 혈림프는 구성상 혈장 (plasma)과 혈구 (hemocyte)로 구분되고, 척추동물의 혈액이 갖는 산소운반 능력 이외에 거의 유사한 기능을 가지고 있다. 특히 혈구세포는 선충 또는 세균과 같은 외래 침입자에 대한 세포성 면역반응 (cellular immune reactions)을 보유하고 있으며, 혈장에는 다양한 항생물질을 가지고 체액성 면역반응 (humoral immune reactions)을 발휘하고 있다.

이러한 곤충 면역반응은 외래자의 인식 (recognition), 면역 중개 (mediation) 그리고 면역 반응 (reaction)으로 단계적으로 이뤄지고 있다 (Gillespie et al., 1997). 곤충의 면역계가 외래 침입자의 인식을 어떻게 하는지에 관하여서는 확실하지 않다. 다만 척추동물의 주조직적합성복합체 (major histocompatibility complex: MHC)의 표면단백질과 특이적 항원구조 (epitope)에서 나타나는 T cell에 기인한 특이적 외래 침입자 인식반응은 없지만, 혈구 세포 표면이나 혈장에 병원체의 특징적 구조를 인식할 수 있는 인식단백질 (lectin류, integrin 등)이 이 일을 담당하고 있다. 병원체의 특징적 구조는 세균벽에 특유적인 peptidoglycan, 그람음성균의 외막에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS), 진균에 특이적인 β-1,3-glucans 및 β-1,3-mannans 등으로

이러한 유형 (pattern)을 인식하는 것이 곤충의 비자기 인식으로 여겨지고 있다 (Janeway, 1994). 탄소수 20개로 구성된 eicosanoid류는 세균 침입에 대해서 특이 주요한 면역 중개자로 여겨지고 있다 (Stanley, 2000). 세포막 성분인 인지질로부터 PLA2 (phospholipase A2)의 효소 작용으로 탄소수 20개의 불포화지방산인 아라키도닉산 (arachidonic acid: AA)이 생성되고, AA는 다시 COX (cyclooxigenase)나 LOX (lipoxygenase)의 도움을 받아 더욱 산화되어, eicosanoid류로 전환된다. 이외에 곤충의 cytokine에 해당하는 PSP (plasmatocyte spreading peptide)가 과립혈구로부터 인식후 부정형혈구로 면역 중개하여, 부정형혈구의 구조변화를 통한 외래인자 부착을 조정하는 것으로 알려지고 있다 (Clark et al., 1997). 면역반응은 라이소자임, 세크로핀과 같은 항생물질에 의한 체액성 면역 반응 이외에 혈구세포가 직접 참여하는 소낭형성 (nodulation), 식균작용 (phagocytosis) 및 피막형성 (encapsulation)이 나타나게 된다.

침입한 선충과 이들로 부터 방출된 공생세균이 갖는 당면한 문제는 곤충의 혈림프로부터 면역방어기작이다. 이에 대처하는 방법으로 일반적으로 변원체들은 면역인식 회피 (evasion), 억제 (depression) 및 내성 (tolerance)의 기작들을 발휘하게 된다 (Dowds and Peters, 2001). 그러나 이들의 정확한 구분은 매우 힘들어, 실제로 이러한 기작들이 상호 어우러져서 나타나는 면역억제 (immunodepression) 현상으로 보여지게 된다. 제노랍두스네마토필라 (*Xenorhabdus nematophila*: Xn)의 경우 PLA2를 대상으로 면역억제를 유도한다 (Park and Kim, 2000). Xn에 의한 PLA2억제는 비록 외래 병원균의 침입을 혈구세포가 인식하여도 AA방출 억제로 eicosanoid류가 생성되지 않아 면역반응으로 이어지지 않게 된다.

면역작용을 억제시킨 후, Xn은 직접적 세포치사반응을 유도하게 된다. 특히, 혈구세포의 치사는 결국 혈구에 기인한 면역반응을 비가역적으로 억제하게 되는 결과를 초래하게 된다. 한편 Xn에 기인한 곤충의 면역억제는 자연계에서 다른 병원체의 침입을 허용할 수 있게 된다. 공생선충의 발육은 공생세균 단독의 monoxenic 조건을 요구하기 때문에, 유사 세균종 또는 분류학적으로 매우 이종 형태의 세균 및 진균까지도 억제시킬 수 있는 항생물질의 분비가 필요하게 된다. 궁극적으로 이러한 과정속에서 감염된 곤충은 치사에 이르고 선충의 발육에 최적 조건속에서 선충은 발육하여 다음 세대를 출현하게 한다.

기존 연구를 통해 곤충병원선충의 기내배양기술과 제품화기술을 통해 대량의 선충 증식과 보관이 가능하게 하였다 (박 등, 1998; 한 등, 1999; 이 등, 2000a; 이 등, 2000b; 이 등, 2000c). 국내 채집된 *Steinernema carpocapsae* 선충으로부터 Xn이 분리 동정되었고 (Park et al., 1999), Xn 단독으로 혈강에 주입할 경우 혈구 세포의 패혈증을 유발하고 궁극적으로 곤충치사 효과를 유발한다는 것을 밝혔다 (Park and Kim, 2000). 또한 Xn은 파밤나방 (*Spodoptera exigua*)의 PLA2를 억제한다는 것이 eicosanoid류 생성회로의 특이적 억제자들을 이용하여 밝혔다. 또한 Xn의 살충능력은 선충 이외에 혈강내로 침입시키게 할 수 있는 벡터를 고안하게 했으며, 본 연구팀에서는 비티농약을 이용하여 이러한 Xn에 대한 벡터 능력을 확인시켰다.

이상의 기존 연구를 바탕으로 본 과제는 Xn과 같은 유용 공생세균을 이용하여 새로운 미생물제제를 개발하는 데 연구 목표를 두었다. 이러한 목표를 달성하기 위해서

(1) 다양한 곤충병원세균 확보
(2) 곤충병원세균 배양액의 살충 및 살비 능력
(3) 곤충병원세균 배양액 유래 살충 및 살비 물질 분리 및 동정

의 세부 전략 목표를 세웠다. 이를 달성하기 위해 각각 특수한 목적 분야 전문화된 3개의 기관이 과제를 이루었다. 안동대학교에서는 기존의 연구를 바탕으로 곤충병원세균의 살충기작 및 스크리닝 연구, 상주대학교에서는 유용물질의 분리 및 동정 그리고 (주) 비아이지에서는 Xn의 산업화 생산 공정 기술 개발 및 과제 총괄을 맡았다.

제 2 장　국내외 기술개발 현황

본 과제에서 추구하는 미생물제제는 생물농약의 범주에 들어가고 이에 대한 정의와 개발 현황 및 시장성을 살펴보면서 본 과제가 갖는 산업형 전략을 소개한다.

과거 녹색혁명의 주도적 역할을 담당하여온 화학농약은 농작물 생산성에 혁명을 가져올 수 있을 정도 중요한 역할을 담당하였지만, 저항성 및 인축에 대한 독성으로 사용규제가 커지게 되었다. 더욱이 인류와 생태계에 주는 농약의 장기적 환경호르몬 (“내분비계교란물질”) 피해는 화학농약의 사용에 규제를 한층 높였다. 이러한 여건 속에 화학농약의 등록은 막대한 개발 비용과 기간을 요구하고 있어서 상품화 이후 돌아올 산업적 이윤을 고려해보아도 경제성이 어렵게 되어 있다.

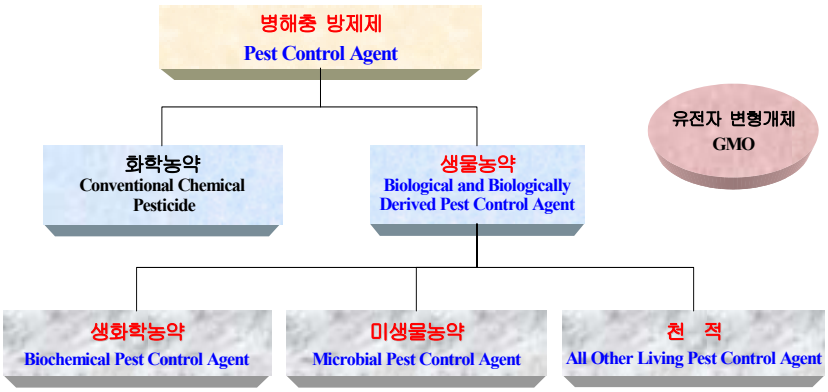
생물농약은 생명체 또는 생명체 유래 물질에 기인한 것으로 대상 병해충에 특이적 작용 특성을 갖는 것으로 인축은 물론이고 환경에 안전하다. 생물농약은 생물산업체 전체를 놓고 볼때, 인공종자나 형질변환 동식물과 함께 바이오에너지 및 자원 범위에 분류된다 (산업연구원, 2000). 농촌진흥청 고시 미생물농약등록시험법 (2000년)과 농약관리법시행령 (2003년)에서 보다 정확한 생물농약의 정의를 가질 수 있다.

표) 생물농약의 정의

[미생물농약등록시험법, 농촌진흥청 고시 (제2000-22호)] 제2조[정의] 이 기준에서 정하는 미생물농약이란 작물보호를 위하여 사용하는 진균, 세균, 바이러스 및 원생동물 등의 살아있는 미생물을 이용한 농약을 말한다.
[농약관리법시행령, 대통령령 제18015호 2003. 06. 25] “미생물농약”을 “생물농약”으로 한다. 환경친화적 생물농약인 생화학농약의 개발을 유도하기 위하여 생물농약이 농촌진흥청장이 정한 안전성기준에 적합한 경우.....

크게 생물농약은 미생물농약, 생화학농약, 유전자변형생명체, 천적 및 페로몬으로 나뉘게 된다. 가장 많은 부분을 차지하는 것이 미생물농약이고 생화학농약의 시장진출이 크게 기대되고 있다. 현재 전 세계적으로 생물농약의 시장은 증가 추세에 있으며,

국내에서도 생물농약에 대한 등록 절차를 간소화시켜 작년부터 생물농약의 등록 및 등록중인 약제 수가 증가하고 있다.



제1절 국내 생물농약 관련 시장

국내 생물산업 총 생산량은 10년 전부터 꾸준히 증가하여 1993년과 2000년의 시장 규모를 비교하여 보면, 약 5배의 증가를 보였다. 그러나, 생물농약이 속한 바이오에너지 및 자원 분야는 약 160배의 증가를 보여 생물산업 중에서 가장 성장 속도가 빠른 분야이다.

생물농약이 속한 분야가 국내 총 생물산업 8개 분야에서 차지하는 비율을 알아보기 위해 2001년 자료를 분석하였다. 지난 10년간 폭발적 증가속에서 생물농약이 속한 바이오에너지 및 자원분야는 총 시장 규모에서 6.8%를 차지하게 되었고, 금액면에서 797억원을 보였다. 이 산업의 발전 속도를 볼 때 향후 10년간 더욱 기하급수적으로 늘어날 전망이다.

표) 국내 생물산업분야별 시장규모 (한국생물산업협회, 2001)

분 야	금액 (억)	비율 (%)
생물의약	5,679	48.2
바이오식품	822	7.0
생물화학	1,552	13.2
생물환경	646	5.5
바이오에너지 및 자원	797	6.8
생물공정	1,882	16.0
생물검정 및 생물정보	337	2.9
생물전자	68	0.4

생물농약이 속한 바이오에너지 및 자원분야는 시장규모에서 생물농약/비료과 사료/동물제제로 양분된다. 이러한 소분야별 시장 규모를 분석하여 보면, 생물농약과 비료는 전체 바이오에너지 분야 시장 규모에서 약 14%를 차지하였다. 이중 약 30%는 수입에 의존하였다.

표) 국내 바이오에너지 및 자원분야 시장 규모 (2001년) (단위: 억원)

분 야	구 분	판매규모		합 계
		국산제품	수입제품	
바이오에너지 및 자원	생물농약/비료	77.53	33.73	111.26
	사료/동물제제	554.94	130.75	685.69
	소 계	632.47	164.48	796.95

제2절 세계 생물 농약 시장

지금까지 전 세계의 생물농약은 살충제인 Bt제가 주요 품목을 차지하고 있다. 여기에 일반 미생물제제가 약 30%를 차지하고 있다. 이러한 생물농약 시장은 과거 3-4년의 자료를 보면 연평균 약 48%의 높은 성장을 보이고 있다. 특히 Bt를 제외한 기타 미생물제제의 증가가 매우 폭발적으로 증가하여 왔다.

표) 세계 생물농약 시장 (단위: 백만 $)

연도	Bt제	기타 미생물제	계
'96 -'97	70	15 - 20	85 - 90
1998	90	30	120
1999	100	30 - 35	130 - 135
2000	110	40	150
평균 증가율(%)[1]	41.5	70.2	48.0

[1] 평균증가율 r = antilog[{logX_n - logX_0}/n], n = 연도수

(CPL Sci. Biopesticides)

우리나라와 유사한 환경과 식생활을 가지고 있는 이웃 일본의 병해충방제 생물농약시장을 살펴본다. 생물농약의 시장은 전체 농약시장에 0.34%에 불과하다. 이는 3년전의 0.27%에 비해 꾸준히 증가하고 있는 추세에 있다. 내용면에서 살충제가 전체의 90%이상을 차지하고 있고, 이중 70-80%는 Bt제가 차지하고 있다. 이러한 경향은 세계 전체 시장과 마찬가지로 생물농약 시장에 있어서 현 시장과 미래 시장의 분할을 예측하게 한다.

제3절 국내 생물농약 관련 산업체 동향

국내 중·대기업 수준의 생물산업 기업체수를 살펴보면서 분야별 기업 동향을 분석하여 본다. 생물농약이 속한 바이오에너지 및 자원 범위의 기업체는 전체 생물 산업 업체수에서 약 10%를 차지하고 있다. 이는 가장 기업체수가 많은 생물의약 업체수에 비하면 적지만, 발전 가능성을 살펴볼 때 결코 적지 않은 크기라고 볼 수 있다. 오히려 추후 산업의 잠재력을 고려해 본다면 매우 초기 단계의 이 분야 산업 크기라고 간주할 수 있다.

또한 인위적 분류상 어려움 때문에 생물농약의 범주는 바이오에너지 및 자원 분야를 초월할 수 있다. 즉, 생물화학, 생물검정, 생물전자의 범위에도 생물농약이 차지하는 부분이 있기 때문에 관련 산업체의 크기는 이 보다 더 방대하다고 볼 수 있다.

표) 국내 생물산업 기업체 현황 (한국생물산업협회, 2002)

분 야	업 체 수	비 율 (%)
생물의약	149	33.1
바이오식품	69	15.3
생물화학	56	12.5
생물환경	54	12.0
바이오에너지 및 자원	45	10.0
생물공정	37	8.2
생물검정 및 생물정보	22	4.9
생물전자	18	4.0

제 4 절 국내외 기술개발 동향 및 수준

농약은 작물보호의 수단이다. 이에 대한 기술의 변천사를 살펴보면 60년대 이전은 고전적 방제 수단을 중심으로한 원시적 작물보호 기술을 보였다. 이후 DDT, 유기인계, 카바메이트계 및 피레스로이드계의 유기 합성 화학농약이 개발되면서 작물보호의

획기적 전기를 맞게 되며 녹색혁명을 주도하였다. 그러나 화학농약의 인축 및 환경에 대한 문제점은 안전한 농산물을 소비자가 요구하게 되고, 규제 강화에 따른 대안적 작물보호 기술을 요구하게 되었다. 이렇게 해서 등장한 것이 생물농약이고 이에 대한 약효는 화학농약에 비해서 낮으나, 낮은 위해성으로 점차 선호도가 높아지는 실정이다. 그러나 생물농약의 최대 약점이라 할 수 있는 약효는 생명공학 기술이 발달되면서 제고되고 있으며, 이를 통한 생물농약 기술의 발달은 지속적으로 기대된다.

표) 작물보호 기술의 변천

	~1960	~1980	~2000	2000~
작물보호 방향	고전적 농업	생산성 향상	품질 향상	안전 농산물
보호 기술	비과학적 재래방제	화학농약 (고약효, 고독성)	화학농약 (고약효, 저독성)	화학농약 (고약효, 저독성)
대체 기술			생물농약 (불안정 약효)	생물농약 (안정 약효)

친환경육성법이 1997년 12월에 발효되었으며, 화학농약 (원제 기준)의 사용을 1997년 대비하여 2005까지 30%를 줄이겠다는 목표를 갖게 되었다. 이를 위해서 친환경재배 면적을 10,000 ha에서 2005년에는 75,000 ha까지 증가시키겠다는 실행방안을 제시하였다.

전세계적으로 생물농약의 산업화 사례를 살펴보면, 포식성 천적농약을 제외하고 미생물농약, 생화학농약 및 유용유전자를 통해 개발이 활발히 진행되었다. 특별히 생화학농약의 유용성분과 상품화개발이 가장 눈에 띄게 나타났다. 현재 미국의 EPA 보고에 따르면 182종의 유효성분을 이용하여 992종의 상품이 개발되었다. 이중 생화학농약은 유효성분이 117종, 상품화가 765종으로 전체에서 각각 64%, 77%를 차지하였다. 특히, 식물체 추출물, 페로몬, 식물성장조절제의 개발이 가장 많은 품목을 차지하였다.

미생물농약의 경우는 세균류를 이용한 생물농약이 가장 많은 수를 차지하였고, 진균과 바이러스를 이용한 생물농약의 개발이 증가하려고 한다.

표) 생물농약 산업화 사례 (EPA, 2002)

생물농약종류	유효성분	제품수
미생물농약		
세균	31	171
효모균	1	1
진균	15	29
원생동물류	1	3
바이러스류	6	9
생화학 농약		
식물체 추출물	18	106
식물성장조절제	24	256
페로몬	36	219
기피제	16	94
기타 생화학 농약	23	90
유용 유전자		
유전자 변형세균	5	8
유전자 변형 식물체	6	9
계	182	991

이러한 생물농약의 개발 추이를 살펴보기 위해 연도별 생물농약 출원 빈도를 살펴보았다. 전체 농약 출원건수중에서 약 10%를 차지하였으나, 해마다 전체 농약대비중이 높아 약 20%에 이르도록 증가했다. 이러한 추세는 생물농약의 등록 절차가 분명하여지면서 더욱 늘어날 전망이다.

표) 연도별 전체 농약중 생물농약 출원비율 (특허청, 2003)

구 분	93-94	95-96	97-98	99-00	01-02
생물농약출원(건)	34	40	83	70	106
농약출원(건)	383	416	625	507	588
생물농약 출원비율(%)	8.9	9.6	13.3	13.8	18.0

출원된 생물농약 기술들을 살펴보면, 살충제 개발 방향이 가장 많은 것을 알 수 있다. 이는 앞으로 생물농약 산업화를 위해서 이 분야에 가장 연구 투자를 집중적으로 해야 될 방향성을 보여준다. 또한 기업체와 일반 연구소에서 집중적으로 개발에 노력을

경주하고 있는 것을 알 수 있고, 대학은 기업체와 공동으로 개발하는 것을 알 수 있다. 이를 통해서 볼때 추후 생물농약의 개발은 이들 세 분야에서 특정 생물농약 상품화를 놓고 공동으로 연구 개발을 시도하는 것이 개발의 성공률을 높이는 것이라는 것을 짐작하게 한다.

표) 국내 생물농약관련 주요 특허출원 현황

특허출원번호	특허출원명	출원인
10-2002-0322240	페니실리움 속 F70614(KCTC8918P)와 a_글루코시다제 저해제	한국생명공학연구원
10-2002-0356993	비티 함유 미생물 살충제 조성물	동부한농화학(주)
10-2001-0316146	병해충에 길항작용을 갖는 미생물을 포함하는 농약조성물	동부한농화학(주)
10-2002-0332357	등얼룩풍뎅이 유충방제용 바실러스 파릴리애 및 그를 이용한 등얼룩풍뎅이 유충방제법	삼성애버랜드(주)
10-2001-0313671	항균활성을 갖는 크리프토카르야 아로마키타 추출물	롯데제과(주)
10-2002-0350391	식물에서 추출한 살비성 조성물	(주)네츄로바이오텍
10-2001-0294023	작물의 병해방제용 균주, 이를 함유하는 미생물 제제 및 그 용도	(주)그린바이오텍
10-2001-0299763	잿빛곰팡이병균의 중복기생균인 신규 아크레모니움 스트릭툼균주 및 이를 이용한 잿빛곰팡이병의 생물학적 방제방법	한국화학연구원
10-2002-0317666	슈도모나스 플루오레슨스바이오바1PEB111	강원도
10-2001-0312330	키티나이제 생산성 길항균주 세라티아 프로테아마쿠란스 3095 및 이를 이용한 생물학적 방제법	영남대학교
10-2000-0068944	제노랍두스 네마토필러스를 이용한 살충방법 및 생물농약 조성물	안동대/비아이지
특2002-0039055	제노랍두스 네마토필러스 미생물제제의 마이크로캡슐화 방법 및 그 제제와 이를 이용한 생물농약 조성물	안동대/비아이지
10-2003-0030070	헤테로랍디티스 메기디스 KCTC10453 BP	안동대/비아이지

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

본 과제를 수행하는 데 있어서 공통되고 주요한 연구 방법을 먼저 소개한다.

가. 곤충 인지질분해효소 (PLA2)의 활성 분석

㈀ GC 분석 조건

50% 에탄올에 녹아있는 arachidonic acid (AA) 1 ㎍을 Hewlett-Packard SD 6890 gas chromatography (San Fernando, CA, USA)에 주입을 한 후 AA의 단일 피크가 나타나는 부분의 retention time을 조사하였다. GC 분석을 위해 75% 에탄올에 표면 살균된 파밤나방 5령 유충의 조직 (혈구세포, 지방체, 장)이 마이크로 튜브로 수거되었다. 수거된 각 조직들은 homogenizing buffer [50 mM PBS (pH 7.0), 0.45 M NaCl]에서 세 번 씻겨졌다. 그리고 glass-glass homogenizer에서 추출된 조직들이 micelle이 될 때까지 충분히 파쇄되었다. 그리고 4℃의 1,000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액은 4℃의 30,000 g에서 30분간 다시 원심분리하여 분리된 침전물과 상층액은 각각 GC 분석을 위한 membrane과 PLA2 rich fraction으로 이용되었다. 분리된 membrane과 PLA2 rich fraction의 양은 Bradford (1972) 단백질 측정법으로 조사되었다.

㈁ 곤충에서 분리한 PLA2 특성

각 조직 (혈구세포, 지방체, 장)에서 분리된 membrane (500mg)에 대해서 PLA2 rich fraction의 농도 (0.5, 1, 2, 4 mg)별로 처리하였을 때 유리되는 AA의 양과 배양시간 (5, 15, 30, 60분)에 따라서 처리를 하였을 때 유리되는 AA의 양 및 열처리를 한 PLA2 rich fraction을 처리하였을 때 유리되는 AA의 양을 조사하였다.

㈂ 공생세균의 AA 유리에 대한 억제효과

지방체에서 분리된 membrane (500 mg)과 PLA2 rich fraction (4 mg)을 이용하여 공생세균에 의해서 유리되는 AA의 양을 조사하였다. 공생세균은 PBS를 이용해서 현탁액 상태로 농도 (10^1, 10^2, 10^4, 10^6 cfu/㎕)별로 준비가 되었고, membrane과 PLA2 rich fraction이 처리된 마이크로 튜브에 각 세균 농도의 현탁액을 10㎕씩 처리하여 30

분간의 반응시간을 거치 후 유리되는 AA의 양을 조사하였다. 또한 공생세균 (10^6 cfu/㎕)을 90℃에서 30분간 열처리하여 membrane (500mg)과 PLA2 rich fraction (4mg)이 처리된 마이크로 튜브에 세균 현탁액을 10㎕씩 처리하여, 살아있는 세균 (10^6 cfu/㎕)과 열처리하여 죽은 세균에 의해 유리되는 AA의 양을 비교하였다. 또한 공생세균을 28℃에서 2일간 배양한 배양액 (tryptic soy broth, Difco, USA)과 ethyl ether를 이용해서 배양액에서 분리한 organic fraction을 PLA2 rich fraction이 처리된 마이크로 튜브에 각각 10㎕씩 처리하여 30분간의 반응시간을 거치 후 유리되는 AA의 양을 조사하였다.

㈑ PLA2 억제물질의 AA 유리에 대한 억제효과

특이적 PLA2 억제물질인 dexamethasone (DEX) [(11, 16)-9-fluoro-11, 17, 21-trihydroxy-16-methylpregna-1, 4-dione], cytosolic PLA2 (cPLA2) 억제물질인 methylarachidonyl fluorophosphate (MAFP), secretory PLA2 (sPLA2) 억제물질인 *p*-bromophenacyl bromide (BPB)를 50% 에탄올에 녹인 후 membrane (500 mg)과 PLA2 rich fraction (4 mg)이 처리된 마이크로 튜브에 10㎕씩 처리하여 30분간의 반응시간을 거친 후 유리되는 AA의 양을 조사하였다.

나. 곤충 혈구세포에 대한 영향

㈎ Apoptosis 조사 (GLD 활성, nucleus 응축)

Glucose dehydrogenase 효소의 활성조사는 Lovallo (2002)의 방법에 의해서 수행되었다. 파밤나방 5령 유충에서 추출된 10 ㎕의 혈림프는 990 ㎕의 2, 6-dichloroindophephenol (DCIP) reagent (50 μM Tris-HCl, pH 7.0, 1 M D-glucose, 1 μM DCIP) 시약과 45분간 28℃에서 반응한 후 분광광도계를 이용하여 600 nm의 흡수도에서 활성이 측정되었다.

Nucleus 응축에 관한 조사는 시간대 (0, 4, 8, 12 시간)별로 PBS에 현탁된 공생세균 (10^7 cfu/㎖) 2 ㎕를 파밤나방 5령 유충에 접종한 후 혈구세포를 분리하였으며, TEM (EM 109, Zeiss, Germany)을 이용하여 과립혈구의 미세구조를 관찰하였다.

㈏ 시간대별 혈구세포치사 작용

공생세균에 의한 혈구세포의 영향을 조사하기 위해 시간대 (0, 4, 8, 12 시간)별로 PBS에 현탁된 공생세균 (10^7 cfu/㎖) 2 ㎕를 파밤나방 5령 유충에 접종한 후 10 ㎕의 혈림프를 분리하여 0.04% trpypan blue 용액과 1:1 (v:v)로 혼합한 후 25℃에서 5분간 반응되었다. 그리고 반응된 혈림프는 혈구개산반에서 시간대별로 0.04% methylen blue 용액에 염색된 혈구세포와 혈구세포 종류별 염색된 혈구세포 비율을 조사하였다.

다. 곤충 인지질분해효소 (PLA2)의 활성 억제물질 탐색

㈎ 부탄올을 이용한 공생세균 배양액에서의 PLA2 활성 억제 물질 추출

공생세균을 28℃에서 24시간 동안 TSB에서 배양한 후 10,000 g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 이용하였다. 먼저 배양액의 상층액과 부탄올을 같은 양으로 분획깔대기에 섞은 후 organic fraction과 aqueous fraction으로 분리되었다. 그리고 회전농축기를 이용하여 organic fraction은 건조되었다. 부탄올 추출물질들은 silica gel chromatography에서 클로르포름/메탄올을 농도별 [99:1 (v:v) → 0:100 (v:v)]로 처리하여 20개의 세분화된 물질로 분리하였다. 이 중에서 PLA2 활성 억제 효과가 있는 물질들은 hydrophobicity에 따라 더욱더 세분화되었다 (Fig. 1). 세분화된 물질들은 모두 50% 에탄올에 녹여줘서 10,000 ppm의 농도로 준비되었다.

㈐ PO 활성을 통한 PLA2 활성 간접 측정 방법

PLA2 억제물질 탐색을 위한 방법은 안동대학교 농생물학과 곤충생리실에서 개발된 곤충혈액을 이용한 PO 활성을 통한 PLA2 활성 간접 측정 방법을 통하여 분석하였다. PO 활성 측정법은 방법은 다음과 같다. 10,000 ppm으로 준비된 공생세균 추출 물질들을 1 ㎕씩 1.5 ㎖의 마이크로 튜브에 처리한 후 파밤나방에서 수거된 혈액 10 ㎕를 처리하였고, 혈액에서 laminarin (Sigma, USA) 1 ㎕를 항원으로 이용하여 면역반응을 유도하였다. 위에 설명된 소량의 반응물들을 저속으로 원심분리하여 마이크로 튜브의 하층부에 모이도록 한 후 8분 동안 실온에서 인위적인 체액성 면역반응을 유발하였다. 반응 후 PO와 반응할 수 있는 기질 L-DOPA (Sigma, USA) 1 ㎍이 용해되어 있는 PBS (pH 7.0) 982 ㎕에 반응물들을 처리하여 PO 활성을 495 nm의 파장에서 5분 간격으로 3번 측정하였다 (Kim et al., 2001). PLA2 억제율은 □□[(A-B)/A]×100□□의 공식을 이용하여 계산하였다. A는 무처리로써 50% 에탄올이 처

리된 것이며, B는 공생세균의 억제물질을 처리한 것이다.

㈃ GC를 이용한 PLA2 활성 억제 측정

앞서 기술한 GC 이용방법을 이용하여 10,000 ppm의 농도의 공생세균 추출물질 10 ㎕를 처리하여 유리되는 AA의 양을 조사하였다. 무처리구는 50% 에탄올을 이용하였다.

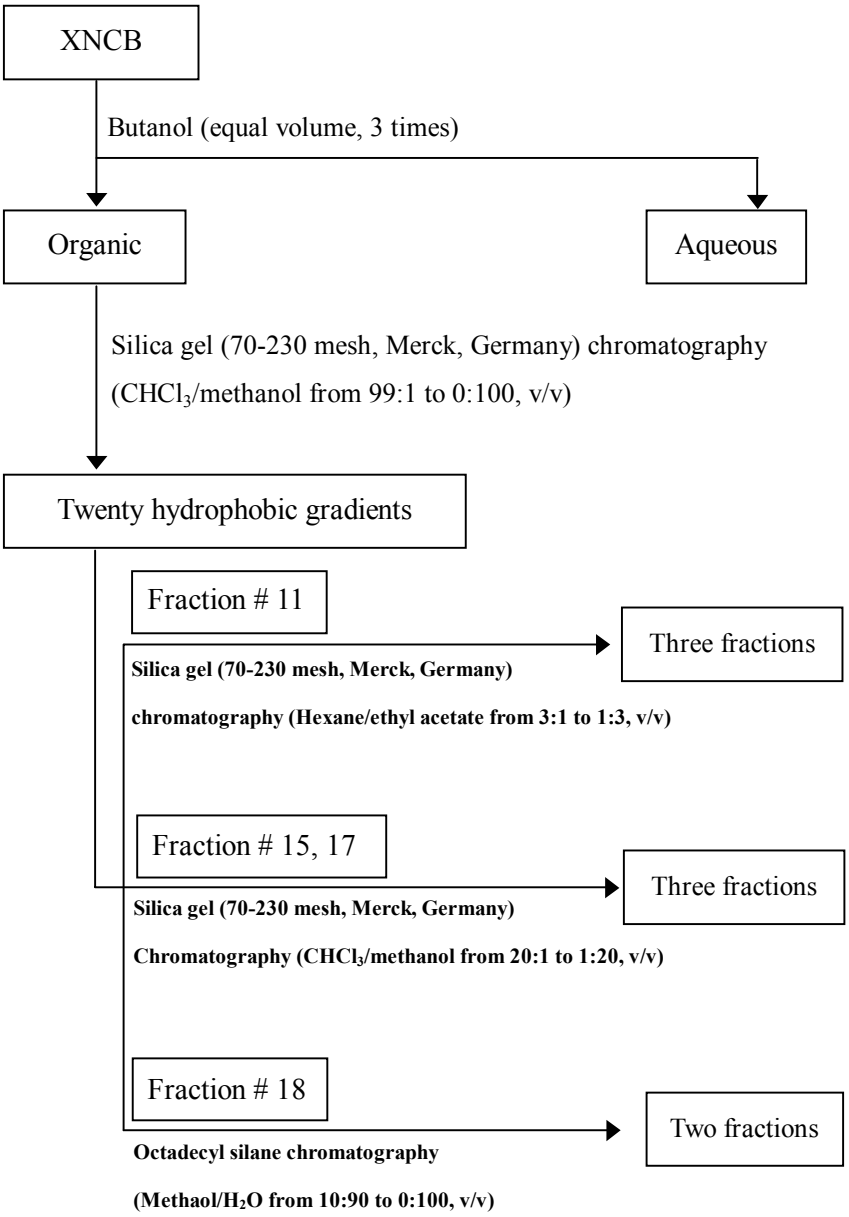


Fig. 1. A purification procedure of phospholipase A2 inhibitor synthesized by *Xenorhabdus nematophila*

라. Apoptosis 유발 물질 탐색

㈀ 부탄올을 이용한 공생세균 배양액에서의 apoptosis 유발 물질 추출

Apoptosis 유발물질의 추출은 앞서 기술한 PLA2 억제물질 추출방법과 동일하였다.

㈁ *In vitro* apoptosis 관찰

곤충혈구세포를 이용한 생물검정법은 3마리의 파밤나방 5령 유충에서 얻어진 혈액 속에 존재하는 혈구세포를 이용하여 세포치사현상을 조사하였다. 먼저 곤충의 혈액을 1.5 ㎖의 마이크로 튜브에 수거한 후 6,500 rpm에서 3분간 원심분리하여 혈장을 제거하고 혈구세포만 수거하였다. 수거된 혈구세포들은 500 ㎕의 Insect Grace′s medium (Sigma, USA)을 이용해서 혈장을 두 번 정도 씻어내고 마지막에는 혈구세포들이 500㎕의 Insect grace′s medium 속에 현탁되었다. 이 때 혈구세포 수는 20 ㎕당 약 100개의 세포가 존재하도록 Insect Grace′s medium을 이용해서 세포 수를 조절하였다. 그리고 슬라이드 글라스 위에 20 ㎕의 혈구세포가 처리된 Grace′s insect medium과 10,000 ppm의 농도로 준비된 공생세균 추출물질 10 ㎕를 처리하여 35℃의 과습한 상태의 배양기에서 3시간 동안 반응을 시킨 후 혈구세포의 세포치사형태 (apoptotic body)를 도립현미경 (Olympus, Japan)상에서 관찰하였다. 세포치사형태는 세포표면이 불규칙한 모양으로 변화는 것 (blebbing)과 소포 형태가 나타나는 것 (vesicles)으로 정하였다.

마. 항균물질 분리

㈀ 분석 미생물

*X. nematophilus*는 *Steinernema carpocapsae Pochon*에서 분리하여(Park *et al*., 1999) 안동대학교 농생물학과 곤충생리실험실의 동결건조 상태로 보관중인 것을 사용하였다. *X. nematophilus*는 TSA (bacto tryptone, 17g; bacto soytone, 3g; bacto dextrose, 2.5g; sodium chloride, 5g; dipotassium phosphate, 2.5g; deionized H_20, 1L) 배지에 30℃에서 250rpm으로 2일간 배양하였다. 식물병원세균들은 서울대와 안동대 세균실험실에서 보관중인 균들을 NA (beef extract, 3g; peptone, 5g; agar 15g; deionized H_20, 1L) 배지에 28℃에서 2일간 배양하였다.

㈏ 항균 물질 분리

공생세균을 28℃에서 24시간 동안 TSB에서 배양한 후 10,000 g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 이용하였다. 먼저 배양액의 상층액과 부탄올을 같은 양으로 분획깔대기에 섞은 후 organic fraction과 aqueous fraction으로 분리되었다. 그리고 회전농축기를 이용하여 organic fraction은 건조되었다. 부탄올 추출물질들은 silica gel chromatography에서 클로르포름/메탄올을 농도별 [99:1 (v:v) → 0:100 (v:v)]로 처리하여 20개의 세분화된 물질로 분리하였다. 이 중에서 항균물질들은 hydrophobicity에 따라 더욱더 세분화되었다. 세분화된 물질들은 모두 50% 에탄올에 녹여서 10,000 ppm의 농도로 준비되었다.

㈐ 항균력 테스트

공생세균에서 분리된 물질은 한국에서 중요 식물에 병을 일으키는 식물병원세균을 대상으로 항균력을 측정하였다. 사면 배양된 식물병원세균에 살균증류수 10 ml를 가하여 세균현탁액을 만들었다. 이 세균현탁액을 NA배지에 0.5 ml 씩 붓고, 삼각초자봉을 이용하여 골고루 폈다. 세균현탁액이 완전히 마른 후, 펀치를 이용하여 여과지를 직경 6mm되게 잘라 각 항생물질을 충분히 적셨다. 세균현탁액이 완전히 마른 평면배양기 위에 항생물질을 농도별(10,000ppm, 5,000ppm, 1,000ppm 500ppm, 250ppm, 125ppm)로 control로는 50%에탄올을 적신 여과지절편을 각각 놓았다. 30℃의 항온기에서 2일간 배양한 후 세균이 자라지 못한 지역의 직경을 측정하였다.

바. 곤충병원선충 (*Heterorhabditis megidis)*의 분리 동정과 유용성 제고

㈎ 토양으로부터 선충의 분리

경북 안동과 경기도 화성의 산림토 (밤나무 흙)를 실험실로 가져와서 깔대기(Baermann funnel)법으로 선충을 분리하여, 선충 부유물을 꿀벌부채명나방 (*Galleria mellonella*) 5령충에 뿌려 주었다. 그리고 곤충병원선충에 의하여 죽은 기주체를 White trap을 설치하여, 감염태 유충을 확보하였다.

㈏ 선충의 분류

① 형태적인 분류 (CLSM, SEM)

실험에 사용된 감염태 유충과 수컷은 Seinhorst법에 의하여 선충을 탈수시키고 나서, glycerin용액에 표본을 제작한 후, confocal laser scanning microscope (CLSM)에서 측정이 이루어 졌다. 선충의 외부 형태를 확인하기 위하여 scanning electron microscope (SEM)가 사용되었으며, 4% 글루타 알데하이드 와 2% 포르말린으로 전고정 후, 2% 오시미움 테트옥사이드 용액에 후 고정 되었다. 그리고 에탄올에서 완전히 탈수과정을 거친 후, 액체 이산화 탄소에 건조 시키고, 골드 코팅을 실시한 후, 15kV에서 검경하였다.

② 분자생물적인 분류 (리보좀 DNA의 ITS 영역 분석)

0.5g의 선충을 호모지나이저로 분쇄한 후, 페놀/클로로폼 추출 방법에 기인하여 선충의 전체 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 두개의 프라이머인 5□□-TTGATTACGTCCCTG CCCTTT-3□□과 5□□-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3□□를 사용하여 PCR기기를 사용하여 ITS영역을 증폭하였다 (PCR 조건: 94℃에서 1분, 46℃에서 1분, 그리고 72℃에서 2분 과정을 35회 반복). PCR 생성물은 pGEM cloning을 거쳐서 순수한 DNA를 선발하였다. 그리고 DNA 시컨싱 전문업체에 의뢰하여 시컨싱 작업을 수행하였으며, DNA star 프로그램에서 분석하였다.

㈃ 선충의 병원성

분리된 선충의 병원성을 확인하기 위하여, 페트리 디쉬 (높이 3cm, 직경 9cm)에 필터 페이터를 깐 후, 1ml안에 0-800마리의 감염태 유충이 포함된 선충 부유물을 뿌리고 나서, 3마리의 대상 해충을 처리하였다. 반복은 5 반복으로 실행하였으며, 살충력은 72시간까지 확인 하였고, 반수치사농도 (LC_{50}: 48h)는 probit 분석 프로그램을 사용하였다.

㈄ 선충의 생리적인 특성

기주체 내에서 선충의 생활사를 확인하기 위하여, 본 실험에서 가장 감수성 기주로 확인된 파밤나방 (*Spodoptera exigua*)5령충을 사용하였다. *H. megidis* Andong에 감염된 파밤나방을 화이트 트랩을 설치한 후, 25℃ 항온기 상에 보관하였다. 그리고 2틀 간격으로 3마리의 기주체를 해부하여, 기주체 안과 밖의 선충태를 확인하였다.

사. 곤충병원세균 (*Photorhabdus temperata temperata)*의 분리 동정과 유용성 제고

㈀ 세균 분리 및 동정

경북 안동시 송천동 안동대학교 뒷산 밤나무 아래 토양을 채집하여 꿀벌부채명나방과 파밤나방 5령충에 접종하여 메기디스곤충병원선충 (*Heterorhabditis megidis* KCTC10453BP)을 분리하였다. 이 선충 감염태(400마리)를 250ppm 스트렙토마이신이 포함된 0.06% NaOCl 용액에서 30분간 표면소독한 후 균질기로 선충 전체를 마쇄하였다. 이 추출물을 다음의 표 1의 배지(MacConkey agar™배지)를 사용하여 형광을 발하는 밝은 핑크색의 세균을 분리하였다. 이들 세균을 표 2의 NBTA 배지에 올려 놓은 후 콜로니를 둘러싸는 흰색띠를 형성하는 녹색 콜로니를 다시 분리하였다. 또한 동일한 분리 방법으로 선충에 감염된 꿀벌부채명나방과 파밤나방의 혈액으로부터도 유사 균주를 분리하였다.

맥콘키 아가 배지(MacConkey agar 배지)에서 붉고 형광이 나는 콜로니를 선발하여, TSB(Tryptic soy broth) 배지상에서 12시간 (30℃) 배양한 후, 전체 지노믹(genomic) DNA를 추출하였다 (참고: Sambrook et al., 1989). PCR 프라이머는 웨이스버그(Weisburg, 1991) 등이 고안한 것을 사용하여, 16S rDNA 영역을 증폭하였다. 포워드 프라이머(Forward primer) 와 리버스 프라이머(Reverse primer)는 각각 5′-GAA GAG TTT GAT CAT GGC TC-3′ 와 5′-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3′ 을 사용하였다. PCR 증폭을 위한 샘플링은 10 ×PCR 완충액(buffer) 5 ㎕, 2.5 mM dNTP 4 ㎕, 25 pmol 포워드 프라이머 2 ㎕, 25 pmol 리버스 프라이머 2 ㎕, 5U/㎕ 택 폴리머라제(Taq polymerase) 1㎕, 주형 DNA(template DNA) 2 ㎕, 증류수 34 ㎕, 그리고 미네랄 오일 20 ㎕ 를 각 튜브에 혼합하였다. PCR (PTC-100 MJ Research, Minnesota, USA) 조건은 94℃에서 1 분, 68℃에서 1 분, 그리고 72℃에서 1 분씩 35회 반복하였다. 상기 PCR 생성물들을 TA 벡터 (pGEM™, Promega, Madison, USA)에 삽입시키고, Top 10, *E. coli* 에 형질전환 시켰다. X-Gal + IPTG / LB + Amp 배지에 도말 한 후, 푸른색 콜로니를 miniprep을 실시하였다. 이렇게 분리된 rDNA에 대해 서열분석(Sequencing)을 실시하였다.

㈁ Ptt에 대한 파밤나방의 Nodulation 형성

살아있는 세균과 95℃에서 5분간 열처리된 세균을 파밤나방 5령에 접종 한 후 시

간(0h, 4h, 8h, 12h)별로 현미경을 이용하여 nodule의 수를 관찰하였으며 P.T.T의 세균 농도(10^1 10^2 10^3 $10^4$$10^5$)를 희석 평판법을 이용하여 측정 한 후 파밤나방 5령에 접종 후 8시간 경과 뒤에 nodule을 관찰하였다.

㈐ Ptt의 면역 억제 효과 분석

① PO 활성에 대한 효과

살아있는 세균과 열처리된 세균(10^8 cfu/$\mu\ell$)을 파밤나방 5령에 접종 한 후 8시간 후에 파밤나방의 혈액 10 ul를 마이크로 튜브에 담은 후 8분 동안 상온에서 처리 후 PO와 반응 할 수 있는 기질 L-DOPA(Sigma, USA) 1 ug이 용해 되어 있는 PBS(PH 7.0) 988 ul를 처리하여 PO활성을 495 nm의 파장에서 5분 간격으로 3번 측정하였다.

② 혈구와 세균의 Binding assay

살아있는 세균과 열처리된 세균(10^8 cfu/$\mu\ell$)을 PBS(1X)로 세척후 Safranin 0 로 세균을 염색한 후 PBS(1X)로 3번 세척하여 준비하고 파밤나방 5령의 혈액을 6000rpm으로 원심 분리시켜 혈장을 제거하고 혈구세포만 수거하였다. 수거된 혈구세포들은 500 ul의 insect Grace's medium (Sigma, USA)을 이용해서 3번 씻고 500 ul의 insect Grace's medium에 현탁 되어 준비되었다. 슬라이드 글라스 위에 10 ul의 혈구세포가 처리되고 염색된 세균을 각각 10 ul씩을 처리하여 37℃의 습도가 있는 배양기에서 3시간 동안 반응 시켰다. 그리고 현미경으로 binding 된 세균의 수를 관찰하였다.

㈑ Ptt가 eicosanoid pathway를 억제 시킬 가설에 대한 검정

특이적 PLA2 억제물질인 50% 에탄올에 녹아있는 dexamethasone (DEX) 1ug과 PLA2 활성물질인 50% 에탄올에 녹아 있는 arachidonic acid(AA) 1ug를 이용하여 살아있는 세균과 열처리된 세균을 파밤나방에 접종하거나 혈액에 처리하여 nodulation과 PO활성, 그리고 혈액에 Binding된 세균의 수를 관찰하였다.

아. 공생세균 *Xenorhabdus nematophilus*의 파밤나방에 대한 cecropin의 억제

㈎ 파밤나방의 cecropin 유전자 클로닝

열처리된 세균(94℃에서 5min)을 파밤나방(3마리)에 접종하여 fatbody를 수거하였다. fatbody에서 TRI Reagent를 이용하여 RNA를 뽑은 후 oligo dT primer를 이용하여 cDNA를 합성하였다. degenerate primer(Secec-A: 5′-ATHYTDWBCTTCGTSTTCGC-3′ Secec-B: 5′-ARRTGGAARNTMTTCAAGAA-3′)와 oligo dT primer를 이용하여 PCR을 95℃에서 2분 94℃에서 1분 48℃에서 1분 72℃에서 1분 72℃에서 10분으로 설정하여 수행하였다. RT-PCR생성물은 pGEM-T easy vector (Promega)에 크로닝되었다. 카이젠 컬럼을 이용하여 수거한 후 sequencing회사에 의뢰하여 염기 서열을 받았다. 염기서열의 비교를 위해서 DNA star를 이용하여 기존에 알려져 있던 cecropin과의 상동성을 비교하였다.

㈏ 감염혈액의 세균성장 억제력 분석

파밤나방 5령에 살아있는 세균과 열처리된 세균을 접종한 후 시간별(0, 2, 4, 8 시간)로 혈액을 수거하였다. 사면 배양된 세균 (*Escherichia coli*와 *Enterococcus faecalis*)에 살균증류수 10ml를 가하여 세균현탁액을 만들었다. 이 세균현탁액을 LB배지에 0.5 ml를 붓고 삼각초자봉을 이용하여 골고루 편 후 세균현탁액이 완전히 마른 뒤 수거한 혈액들과 control로 무처리된 혈액을 적신 6mm의 여과지 절편을 각각 놓는다. 30℃의 항온기에서 2일간 배양 후 세균이 자라지 못한 지역의 직경을 측정하였다.

자. 배양 조건 및 세포의 성장도 분석

㈎ 당농도의 분석

발효가 진행되는 상태에서 발효조내 배양액에 미생물에 의해 섭취되는 포도당 농도를 조사하기 위하여 Glucose-lactate ananlyzer (YSI, USA)를 사용하여 분석하였다. 발효조로부터 일정량을 일정시간 간격으로 채취하여 원심분리한 후에 배양상층액을 Glucose-lactate analyzer (YSI, USA)로 측정하여 glucose 소모양상을 조사하였다.

㈏ 균체농도 측정

균체농도를 측정하기 위하여 spectrophotometer (UVICON 430, Kontron Instruments, Italy)를 사용하였다. 즉, 배양액을 멸균증류수로 희석하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 건조 균체무게(Dry cell weight, DCW)는 발효조에서 10ml를 취하여

원심분리후에 상등액은 버리고 생리 식염수로 반복 세척한 다음 일정량의 증류수에 현탁하여 95℃에서 40~50 시간 건조 시킨후 desiccator에 보관하면서 측정하였다. 이 결과로 calibration curve를 작성한 다음 OD(optical density)수치를 DCW로 환상 하였다.

㈐ 생균수 측정

생균수 측정은 시료를 serial dilution하여 TS agar plate상에서 발생하는 colony를 계수하여 측정하였다.

㈑ 탄소원 및 질소원 그리고 peptone에 대한 영향

다양한 탄소원과 질소원 및 peptone를 가지고 균주의 성장에 대한 영향을 조사하여 보았다. M9 minimal medium를 기본배지와 control 배지로 사용하였다. 탄소원은 1%, 질소원은 0.1%를 사용하여 균주의 성장 정도를 조사하였다.

㈒ 실험계획 및 통계분석

중요 배양인자인 배양시간, 탄소원 및 질소원의 농도, 그리고 $(NH_4)_2SO_4$농도 비율등의 독립변수의 변화가 효소 생산성에 미치는 영향을 반응표면 분석법을 이용하여 분석하였다. 각각의 실험인자 변화에 다른효소 생산성의 반응표면이 곡선으로 나타날 것으로 예상되어 2차 다항식을 사용하였다.

$$Y=\beta_o+\sum_{i=1}^{4}\beta_i X_i+\sum_{i=1}^{4}\beta_{ii}X_i^2+\sum_{i=1}^{4}\sum_{j=i+1}^{3}\beta_{ij}X_iX_j$$

Y : response variable　　β_o : Intercept

β_i, β_j: regression coefficients　　X_i, X_j : Independent variables

실험결과는 SAS(statistical analysis system)를 이용하여 통계학적으로 분석하여 독립변수(배양시간, 탄소원 및 질소원의 농도, 그리고 $(NH_4)_2SO_4$농도)에 대한 회귀 방정식을 얻음으로써 각각의 반응조건들에 대한 상호영향을 검토하고 균체 생산을 위한 최적 배지 조건을 구하였다.

㈅ 5L jar fermentor에서의 최적화 연구

위의 기초 실험을 기본으로 하여 5L jar fermentor (한국발효기, 한국)을 이용하여 최적화 연구를 수행하였다. 발효 방식은 Batch, Intermitant fed batch, fed batch등의 발효 방식으로 배양공정을 최적화 하였다.

㈆ 300L Pilot plant scale 에서의 발효·생산공정의 최적화 연구

Pilot plant scale에서의 배양공정의 최적화을 위하여 생명공학연구원 산업화 지원실 300L (KFC300; Korea Fermentor Co., Korea)를 사용하였다. 5L에서 최적화한 배지와 배양조건을 가지고 배양하였다. 배지 성분(%)은 glucose 2, yeast extract 4, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4, K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4$ 0.1, $MnSO_4$ 0.007, NaCl 0.25, trace sol. 0.1㎖등을 사용하였으며 feeding을 위하여 Glucose와 yeast extract를 사용하였다. 배양조건은 pH는 7.5, 온도는 30℃로 유지하였으며 aeration은 0.2~1vvm 그리고 agitaiton은 50~350rpm까지 사용하여 배양 중 배지 내 용존산소(DO)를 10% 이상으로 유지하도록 하였다. 발효 수행시 배지내 pH는 NH_4OH(Industrial grade; Duck san chemical)를 사용하여 조절하였으며 발효기 내부 압력은 0.2bar를 유지 하였다. Feeding medium의 feeding을 위하여 feeding pump (*MasterFlex* 7550-10, Cole-Parmer Instrument Co.)와 silicon tubing (*MasterFlex* precision tube size # 96400-16, Cole-Parmer Instrument Co.)를 사용하여 feeding 하였다.

㈇ 2500L Pilot plant scale 에서의 발효·생산공정의 최적화 연구

5L와 300L에서 이루어진 결과를 2500L에서 재현하고자 다음과 같이 발효를 수행하였다. 1차 종배양은 본 발효의 5L flask에 2L vol.으로 Tryptic Soy Broth로 준비하고 배양온도는 30℃, 140rpm에서 12시간 배양하여 준비하였다. 2차종배양은 300L에서 배양온도는 30℃로 조절하고 pH는 NH_4OH와 함께 7.5로 조절 유지하였다. 2차 종배양은 배양 12시간 경과하여 working vol. 1000L의 배지가 준비된 2500L 발효조로 멸균라인을 통하여 접종하였다. 산업용 배지 성분(%)과 기타 배양조건은 300L와 같이 했다. 2500L 발효조에서의 배양공정의 최적화을 위하여 생명공학연구원 산업화 지원실 2500L (KFC2500; Korea Fermentor Co., Korea)를 사용하였다. 이 실험을 위해 사용한 발효기는 2차 종배양을 위한 pilot plant scale발효조인 300L와 본 배양을 위한 2500L발효조의 geometric 구조는 Fig. 2 에 자세히 나타내었다. 발효조의 impeller type은 Fed-batch시 발효조 내에서 mixing에 가장 효과적인 제일 하부 1단 impeller

는 six-blade type(43%) 그리고 중간부와 상부 impeller는 six-blade pitched type(43%)를 사용하였다. Six-blade pitched type(43%)의 pitched angle은 30°로 된 impeller를 사용하였다

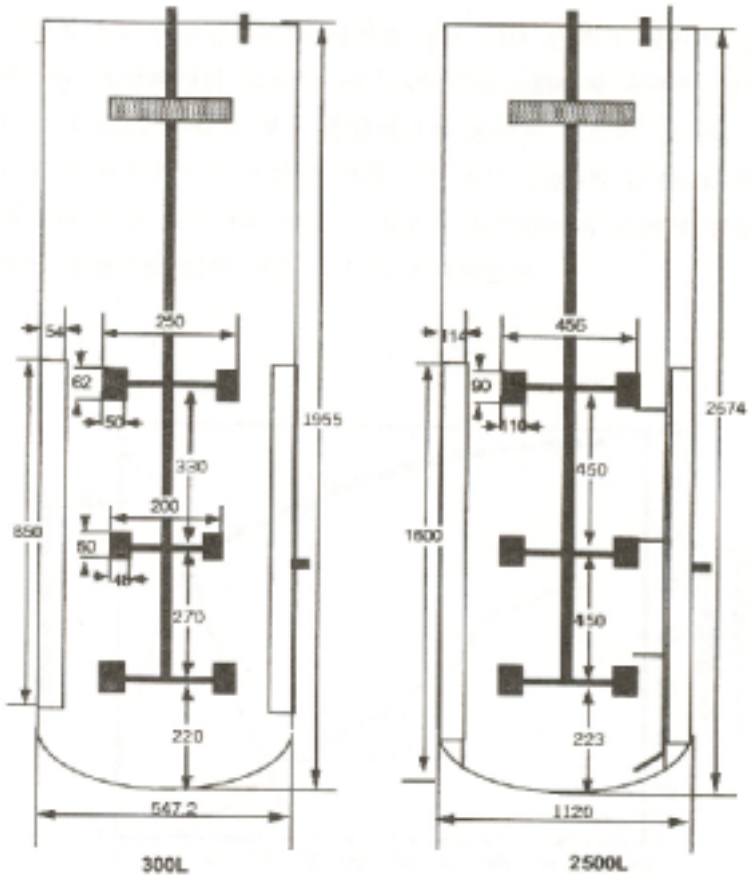


Fig. 2. Geometirc structure of 300L and 2500L fermentor for the *Xenorhabdus nematophilus* culture (the numbers indicate the scale in millimeter).

차. 균주의 제제화 연구

㈀ 정제공정

산업용 원심분리 공정은 basket centrifuge, multi-chamber centrifuge, decanter centrifuge, disc bowl centrifuge, tubular-bowl centrifuge방식 등 주로 5가지 방식을 사용하고 있다. Separator centrifuge 방식은 긴 원통형 회전 rotor에 시료를 연속적으로 주입시켜 고형질은 rotor내벽에 모이도록 하고 액상은 rotor 밖으로 나오도록 고안된 장비이다. 단위시간당 처리용량은 시료에 따라 시간당 약24L/hr이다. 단점은 rotor 내에 고형질이 쌓이면 이를 제거하기 위해 운전을 중단 해야한다. VMF는 membrane의 vibration을 이용하여 세포등의 고형물과 상층액을 분리하는 방식으로 720L/hr의 처리 능력을 가지고 있어 매우 효율적인 장비이다. 2500L발효 후 발효액에서 세포를 수거하기 위해 membrane filtration 방식인 VMF(vibration membrane filtration)를 사용하였다.

㈁ 균주 안정화 연구

균주 보호제 또는 피막제로 다양한 재료를 사용하여 균주를 안정화 시키고자 하였다

① Encapsulation and spray drying

기능성 고분자 및 다당류는 균주를 capsulation 시키고 열 스트레스를 최소화시킬 수 있어야 하고 균주 안정성이 우수하여야 한다. 따라서 Sun-cap, skim-milk, levan, sodium-alginate, PVP, arabic gum, glucan, trehalose, curdlan, sorbitol, sucrose, pectin, 키토산 등을 사용하여 이 물질들이 hot spray dry 과정 중의 열 안정성에 얼마나 기여하는지에 대한 실험을 수행하였다. Flask culture는 TSB(tryptic soy broth) 배지를 사용하여 30℃, 140rpm에서 12시간 배양시킨 후 원심분리하여 증류수로 2번 washing한 cell을 실험에 사용하였다. 세균수는 희석 평판 도말법 과 부가적으로 hemo cytometer방법를 사용하였다. 각 시료는 10% 수용액 100ml을 만들어 여기에 cell 10ml을 혼합하여 10min homogenizing 후 spray dry 수행하였다. 점도가 높아 10% 수용액을 만들 수 없는 gum류의 경우 5% 미만으로 제조하여 사용하였다. spray dry 가 완료된 후 수득량을 측정하고 c.f.u/g를 측정하였다.

② Freeze drying

동결보존법은 미리 세포를 동결하여 수분의 이동을 억제하여 진공 하에서 대부분의 수분을 승화시킨 후 나머지 얼지 않은 수분을 제거하는 방법이다. 세포는 휴지상태에 도달할 때 까지 저온, 탈수 등의 과정을 거치게 되어 일부가 사멸하거나 장애를 받게 되므로 이러한 손실을 최소화하기 위해 적당한 보호물질을 첨가하여 동결보존시켜야 한다. 첨가되는 물질로는 보통 고분자물질과 저분자물질을 섞어서 만든다. 고분자 물질 또는 이를 함유한 것으로는 혈청, skim-milk, starch dextran, polyvinylpyrrolidone (PVP)등이며 저분자 물질로는 dextrose, sucrose, 유당, meso-inositol 당이나 glutamic acid-Na 등의 아미노산이 이용된다. 고분자 물질 중에서 널리 사용되는 것은 혈청과 skim-milk를 이용한다. 저분자 물질로 첨가되는 당(5~10%) 또는 glutamic acid-Na(5%)는 건조시료와 수분함량이 과도하게 저하되지 않게 수분 완충제로서 작용한다. 동결건조시료의 보존온도가 높은 경우에는 carbonyl 기를 가지고 있지 않는 당을 이용하는 것이 좋다. Spray dry 에서와 마찬가지로 다양한 재료에 대해 안정성을 실험하였다. 사용된 균주와 배양 방법은 동일하며, 시료에 cell을 혼합하는 방법도 동일하다. 혼합된 시료는 -70℃에서 24시간 동안 예비 동결된 다음 freeze dry 장치에서 3~4일 건조시켰다. 세균수 측정은 희석 평판 도말법으로 TSA(tryptic soy agar) 배지에서 시간 경과에 따른 생균 밀도를 조사함으로서 저장 안정성을 측정하였다.

③ 흡착(adsorption)

우수한 흡착 능력과 자외선 차단 효과를 지닌 “white carbon"에 균주를 흡착시켜 안정화 시키는 방법이다.

카. 야외 포장에서 시제품의 살충활성 연구

지역은 경기 남부와 동부, 강원영서 충남북, 전북, 경남북을 대상으로 노지 및 하우스 그리고, 최대한 다양한 작물과 시험해충을 선택하였다. 시험작물은 배추, 청경채, 오이, 파프리카, 무, 브로콜리, 양배추 등 이였으며 시험해충은 목화바둑명나방, 배추흰나비, 거세미나방, 파밤나방, 도둑나방, 배추좀나방 이였다. 시험방법은 난괴법 3반복으로 수행되었으며 약제처리전 사전밀도를 조사하고 약제처리 후 3일차, 7일차 생충수를 조사 하였으며 조사된 생충수를 생충율로 환산하여 방제가를 산출하였다. 또 생충수를 조사할수 없을 경우는 피해과율 및 피해엽율로 조사하여 방제가를 산출하였다. 시험면적은 노지의 경우 처리구당 최대 20㎡ 하우스의 경우는 최대 처리구당 10㎡으로 하

였으며 시험수행방법에 있어서는 최대한 자연발생 조건하에서 진행되었다. 대조약제는 현재 가장 우수하다고 알려진 쎈타리(크롭사이언스) 입상수화제를 2000배 희석하여 사용하였으며 시제품 IMB01과 IMB02를 1000배 희석하여 사용하였다. 시험기간은 2004년 3월부터 동년 8월까지 수행하였다.

타. 물질분리 방법

1) 실험시료는 (주) 비아이지에서 기본배지 TSB에서 배양한 공생세균을 포함한 배양액을 시료로 사용하였다.

2) 시약 및 기기 - ^{1}H- (400 MHz) 및 ^{13}C-NMR(100 MHz) 스펙트럼은 Varian 의 Unity Inova로, IR 스펙트럼은 Perkin-Elmer Model 599B로, EI/MS는 JEOL의 JMSAX 505-WA로 측정하였다. 융점은 Fisher Melting Point Apparatus로 측정하였고 미보정하였다. HPLC는 Waters 사의 Prep.-HPLC를 사용하였고 column은 Prep Nova-Pak C18(19x300mm)를 사용하였다. Column chromatography(c.c.)는 silica gel(70-230 or 230-400 mesh, Merck), ODS gel(70-230 mesh, YMC)를 사용하였다.

3) 추출

공생세균의 배양액에 동량의 n-butanol을 가하여 48시간 동안 상온에서 추출하였다. 추출조작은 재 반복 하였으며 추출 후, 상등액만을 취하여 분액여두에 넣고 H_2O를 가하여 aqueous fraction을 제거한 후 감압·농축하여 추출물을 얻었다.

4) 분리 및 정제

n-Butanol 추출물(32.7 g) 전량을 silica gel column chromatography (230-400 mesh, Merck, Germany)에 충진시킨 후 Chloroform ($CHCl_3$)/methanol (MeOH)의 용매계로 methanol의 비율을 높여가며 순차적으로 용출(step-wise)시켜 20개의 fraction을 얻었다. 각각의 fraction을 대상으로 생물 검정법에 의해 활성 fraction을 평가하여 활성을 나타내는 fraction을 생물검정을 지표로 하여 활성물질을 각각 분리, 정제하였다.

제1절 국내 EPN 유래 곤충병원세균 채집 및 동정

1. ANU-Xn101의 유전적 특이성

국내에서 채집된 곤충병원선충 *Steinernema carpocapsae*로부터 분리되어 동정된 ANU-Xn101 (*Xenorhabdus nematophila*)이 본 연구를 통해 밝혀졌다. 특히 기타 유사한 균주에 비해서 살충 능력이나 살균 능력이 탁월하여 국내 균주의 특이성이 내재하고 있다는 것을 추측하게 했다. 본 연구는 이 균주의 특성을 외국 균주들과 비교하여 유전적 특이성을 밝혀 고유 균주의 성격화를 꾀하는 데 목적을 두었다.

다음은 본 연구에서 분석된 균주들의 집합체들이다.

Table. 1. Entomopathogenic bacteria analyzed for comparison with a Korean isolate

Bacteria	Host nematode	Geographical origin
Xenorhabdus nematophilus K1	*S. carpocapsae*	Korea
Xenorhabdus nematophilus F1	*S. carpocapsae*	France
Xenorhabdus poinarii G6	*S. glaseri*	USA
Xenorhabdus beddingii Q58	*Steinernema* sp.	Australia
Photorhabdus luminescens C1	*Heterorhabditis bacteriophora*	USA

여기서 *Xenorhabdus nematophila* K1은 본 연구에서 분석하는 ANU-Xn101과 동일한 균주이다. 이 균주는 본 연구를 통해서 살충능력이나 살균 능력 및 세포치사 효과에서 매우 탁월한 효능을 보여 기타 유사 균주에 비해서 유전적 특이성을 가지고 있을 것이라는 추측을 갖게 했다. 이를 증명하기 위해 이 균주의 16S rDNA 및 기타 생화학적 특성을 다른 균주와 비교함을 통해 이 균주의 특이성을 입증하려 하였다. 16S rDNA 유전자를 증폭하기 위해 universal primers (Weisburg et al., 1991)가 이용되었다. Forward primer (5'-GAAGAGTTAGATCTTGGCTC-3')와 reverse primer

5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')가 각각 PCR 반응에 이용되었다.

(A)

GGAGA GTTAG ATCTT GGCTC AGATT GAACGCTGGC GGCAG GCCTA ACACA 50

TGCAA GTCGG ACGGT AACAG AGGGG AGCTT GCTCT CTTGC TGACG AGTGG 100

CGGAC GGGTG AGTAA TGTCT GGGAA ACTGC CTGATGGAGG GGGAT AACTA 150

CTGGA AACGG TAGCT AATAC CGCAT AACGT CGCAAGACCA AAGAG GGGGA 200

CCTTC GGGCC TCTTG CCATC AGATG TGCCC AGATGGGATT AGCTA GTAGG 250

TGGGG TAATG GCTCA CCTAG GCGAC GATCC CTAGCTGGTC TGAGA GGATG 300

ACCAG CCACA CTGGA ACTGA GACAC GGTCC AGACTCCTAC GGGAG GCAGC 350

AGTGG GGAAT ATTGC ACAAT GGGCG CAAGC CTGAT GCAGC CATGC CGCGT 400

GTGTG AAGAA GGCCT TCGGG TTGTA AAGCA CTTTC AGCGA GGAGG AAGGT 450

GGTGA ACCTT AATAC GTTCA TCAAT TGACG TTACT CGCAG AAGAA GCACC 500

GGCTA ACTCC GTGCC AGCAG CCGCG GTAAT ACGGAGGGTG CAAGC GTTAA 550

TCGGA ATTAC TGGGC GTAAA GCGCA CGCAG GCGGT TTGTT AAGTC AGATG 600

TGAAA TCCCC GGGCT CAACC TGGGA ACTGC ATTTG AAACT GGCAA GCTAG 650

AGTCT CGTAG AGGGG GGTAG AATTC CAGGT GTAGCGGTGA AATGC GTAGA 700

GATCT GGAGG AATAC CGGTG GCGAA GGCGG CCCCCTGGAC GAAGA CTGAC 750

GCTCA GGTGC GAAAG CGTGG GGAGC AAACA GGATTAGATA CCCTG GTAGT 800

CCACG CTGTA AACGA TGTCG ATTTG GAGGT TGCGCCCTTG AGGCG TGGCT 850

TCCGG AGCTA ACGCG TTAAA TCGAC CCCCT GGGGAGTACG GCCGC AAGGT 900

TAAAA CTCAA ATGAA TTGAC GGGGG CCCGC ACAAGCGGTG GAGCA TGTGG 950

TTTAA TTCGA TGCAA CGCGA AGAAC CTTAC CTACGCTTGA CATCC AGAGA 1000

ATTTC CAGAG ATGGA TTGGT GCCTT CGGGA ACTCTGAGAC AGGTG CTGCA 1050

TGGCT GTCGT CAGCT CGTGT TGTGA AATGT TGGGTTAAGT CCCGC AACGA 1100

GCGCA ACCCT TATCC TTTGT TGCCA GCGGA TCGGGCGGGA ACTCG AGGGA 1150

GACTG CCGGT GATAA ACCCG AGGAA GGTGG GGATG ACGTC AAGTC ATCAT 1200

GGCCC TTACG AGTAG GGCTA CACAC GTGCT ACAATGGCAG ATACA AAGAG 1250

AAGCG ACCTC GCGAG AGCAA GCGGA ACTCA TAAAGTCTGT CGTAG TCCGG 1300

ATTGG AGTCT GCAAC TCGAC TCCAT GAAGT CGGAATCGCT AGTAA TCGTA 1350

GATCA GAATG CTACG GTGAA TACGT TCCCG GGCCTTGTAC ACACC GCCCG 1400

TCACA CCATG GGAGT GGGTT GCAAA AGAAG TAGGTAGCTT AACCT TCGGG 1450

AGGGC GCTTA CCACT TTGTG ATTCA TGACT GGGGTGAAGT CGTAA CAAGG 1500

TAACC GTAGG GGAAC CTGCG GCTGG ATCAC CTCCT T 1536

(B)

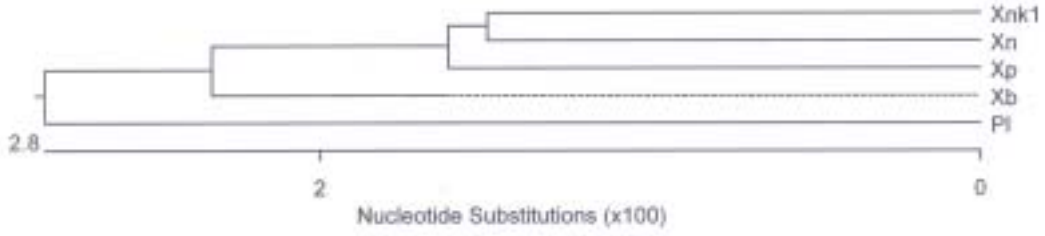


Fig. 3. (A) A full sequence of 16S ribosomal DNA (NCBI access no. AY286478) of *Xenorhabdus nematophilus* K1 isolated from the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae*. The sequence in the box indicates the typical sequence found in 16S rDNA of *Xenorhabdus*. The underlined sequences indicate the primers used for amplification of 16S rDNA of the bacteria. (B) Phylogenetic tree of the selected *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. Numbers on the phylogenetic tree indicate the percentage of similarity index on each branch analyzed by a CLUSTAL W program; Xn K1 (*X. nematophilus* K1): Xn (*X. nematophilus*, NCBI access no. Z76738): Xp (*X. poinarii*, NCBI access no. X82253): Xb (*X. beddingii*, NCBI access no. AY278675), and Pl (*Photorhabdus luminescens*, NCBI access no. AY278652).

ANU-Xn101은 *X. nematophila* 프랑스 균주와 97% 상동성을 보였으며, 기타 Xenorhabdus 종들과는 더 큰 차이점을 보였다. 동일한 종이면서 16S rDNA에서 불과 97%의 상동성은 비교적 유전적 차이가 크다고 볼 수 있다. 이러한 차이점은 균주의 탄소원 요구도나 세포막 지방산 조성에서도 나타났다. 각각의 생화학적 특성은 Midi 회사의 Biolog (Biolog, USA)와 Sherlock (HP 6890, Sherlock, USA) 미생물동정 장치를 통해 분석되었다.

Table. 2. Characters of carbon source utility of the tested entomopathogenic bacteria[1]

Group	Carbon sources	Reaction[2]				
		XnK1	XnF1	Xp	Xb	Pl
Ⅰ	bromo succinic acid, α-keto butyric acid, tween 40, D,L-lactic acid, L-alanine, tween80, α-D-glucose, L-proline, L-asparagine, D-mannose, hydroxy-L-proline, glucuron amide, D-galactose, L-aspartic acid, L-arabinose, quinic acid, α-amino butyric acid, L-glutamic acid, succinic acid	+	+	+	+	+
Ⅱ	D-alanine	+	+	+	−	−
Ⅲ	L-pyroglutamic acid, β-hydroxy butyric acid,sebacic acid	−	−	+	+	+
Ⅳ	D-fructose, inosine, dextrin, citric acid, uridine, gentiobiose,sucrose, L-alanyl-glycine, D-trehalose, maltose, methyl pyruvate, glucose-6-phosphate	+	+	−	−	−
Ⅴ	L-histidine, cis-aconitic acid, formic acid, putrescine	+	−	+	−	−
Ⅵ	Alaninamide	−	+	+	−	−
Ⅶ	I-erythritol, D-melibiose, p-hydroxy phenylacetic acid, β-methyl D-glucoside, thymidine, N-acetyl-D-galactosamine, phenyl ethylamine, D-galacturonic acid, m-inositol, D-glyconic acid, N-acetyl-D-glucosamine, D-serine,adonitol, D-glucuronic acid, urocanic acid, L-serine, glycerol, xylitol, D,L-α-glycerol phosphate, D-mannitol, glycyl-L-aspartic acid, L-fucose, D-psicose, mono-methyl succinate, glycose-1-phosphate	+	−	−	−	−
Ⅷ	α-keto butyric acid, L-threonine	−	−	+	−	−
Ⅸ	Cellobiose	−	+	−	−	−

[1] XnK1 (*Xenorhabdus nematophila* K1), XnF1 (*X. nematophila* F1), Xp (*X. poinarii* G6), Xb (*X. beddingii* Q58), and Pl (*Photorhabdus luminescens* C1)

[2] '+' > 30% , '-' < 30%

Table. 3. Characters of fatty acid composition of the tested entomopathogenic bacteria[1]

Fatty acid	Composition (%)				
	XnK1	XnF1	Xp	Xb	Pl
10:0	0.70	-	-	-	-
12:0	3.96	2.56	5.92	4.74	2.94
12:0 2OH	0.23	-	2.23	2.09	-
12:0 3OH	-	-	2.93	3.18	-
13:0	-	-	0.56	-	-
13:0 2OH	0.52	-	-	-	-
13:1 AT 12-13	-	-	-	0.44	-
14:0	3.68	7.05	0.80	0.61	5.49
14:0 2OH	4.32	-	-	-	-
15:0	0.42	-	1.71	0.89	-
15:0 ISO	-	-	-	-	2.26
15:1 W8C	-	-	0.44	-	-
16:0	30.61	33.88	12.93	13.02	28.99
16:0 3OH	-	-	-	1.36	-
17:0	0.28	-	2.55	1.89	-
17:0 CYCLO	11.88	-	-	-	-
17:0 ISO	-	-	-	-	1.45
ISO 17:1 W9C	-	-	-	-	2.26
ANTEISO 17:1 W9C	-	-	-	-	1.22
17:1 W8C	-	-	14.65	6.39	-
18:0	1.67	-	1.02	1.82	4.58
18:0 3OH	-	-	-	0.82	-
18:1 W9C	2.64	4.00	35.47	40.15	10.84
18:1 W7C	12.65	20.74	2.24	0.91	12.06
19:0 ISO	0.55	-	-	-	-
19:0 CYCLO W8C	2.71	-	-	-	-

[1] XnK1 (*Xenorhabdus nematophila* K1), XnF1 (*X. nematophila* F1), Xp (*X. poinarii* G6), Xb (*X. beddingii* Q58), and Pl (*Photorhabdus luminescens* C1)

이상의 두 생화학적 분석 결과는 ANU-Xn101 균주가 유사 균주들과 생화학적 균주

특성에서 차이가 있음을 나타내고 있다. 다음 유용성 검정을 위해 살충력을 비교하였다. 살충력 검증은 파밤나방 5령충을 대상으로 혈강내로 주입하였을 때, 나타나는 반수치사 세균 농도로 비교하였다.

Table. 4. Pathogenicities of the test entomopathogenic bacteria1 against the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* when they were injected into the hemocoel

Bacteria	N	LD_{50}[2] (95% C.I.)	Slope ± SD
XnK1	30	75.36 (27.50-202.49)	1.69 ± 0.49
XnF1	30	1408.32 (524.71-3948.11)	1.64 ± 0.46
Xp	30	3990.16 (1577.37-9782.88)	2.15 ± 0.66
Xb	30	$>10^5$	-
Pl	30	$>10^5$	-

[1] XnK1 (*Xenorhabdus nematophila* K1), XnF1 (*X. nematophila* F1), Xp (*X. poinarii* G6), Xb (*X. beddingii* Q58), and Pl (*Photorhabdus luminescens* C1)

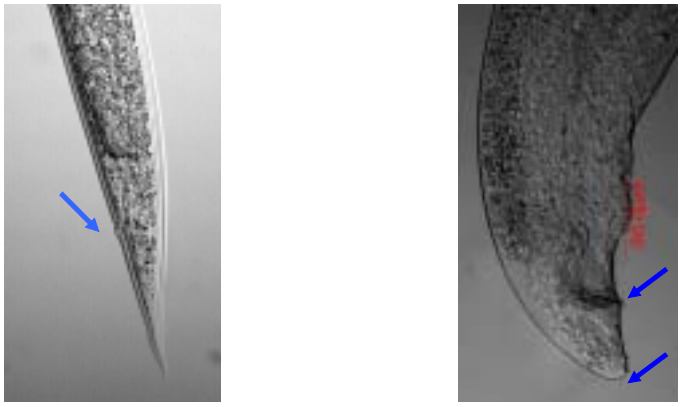
[2] Median lethal concentration of the bacteria in colony-forming unit (cfu)

비교한 곤충병원세균중에서 *Xenorhabdus* 속 균주가 파밤나방에 대한 살충력이 높았으며, ANU-Xn101 균주는 동일 종의 외국 균주에 비해 약 20배 높은 살충력을 지닌 것으로 판명되었다. 이는 국내 ANU-Xn101이 살충 유용물질의 생산성 및 종류에 있어서 타 균주에 비해 차이가 있음을 의하며, 이에 대한 원인체규명은 새로운 유용물질을 동정하게 한다. 이를 위해서 본 연구에서 ANU-Xn101로부터 살충, 살균, 항생물질 및 면역저하 물질의 규명이 뒤따랐다. 또한 국내에서 곤충병원선충으로부터 새로운 곤충병원세균을 동정하는 시도도 아울러 병행하였다.

2. 제노랍두스코리아나 (*Xenorhabdus koreana*) 균주 동정

국내 곤충병원선충을 주기적으로 채집하였다. 주로 안동을 중심으로 토양 채취를 시도하였으며, Baermann 깔때기법 (이 등, 2000c)으로 토양중 선충을 분리하였고, 분리된 선충은 꿀벌부채명나방 (*Galleria mellonella*)이나 파밤나방 (*Spodoptera exigua*)을 증식 기주로 (한 등, 1999) 곤충병원선충을 선별하였다.

먼저 국내에만 존재한다고 보고된 Steinernema monticolum이 다시 본 연구팀에의해 안동에서 채집되었다. 다음은 이 선충의 수컷 꼬리 구조를 보여 주고 있다.



A. Tail of Infective juvenile: arrow indicate anus
B. Tail of adult male (first generation): arrow indicate spicule and mucron

다음은 이 선충의 종 동정을 위해서 분류학적 외부 구조 모습 및 측정치를 분석하였으며, rDNA의 ITS (internal transcribed spacer) 염기서열을 분석하였다. ITS 염기서열 분석에는 universal primers (Vrain et al., 1992)인 forward primer (5′-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3′)과 reverse primer (5‘-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3’)를 이용하여 PCR로 증폭되었다.

Table. 5. Pathogenic symptoms of *Steinernema monticolum* that was collected in Andong

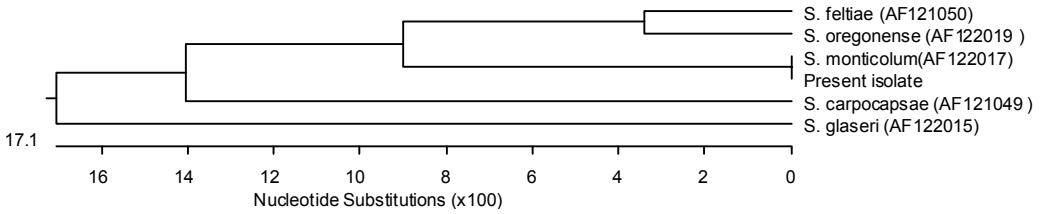
Characters	Symptoms	
	Isolate	*Steinernema* spp.
Insecticidal activity	Positive	Positive
Cadaver color	Brown	Brown
Bioluminescence	Negative	Negative

Table. 6. Taxonomic morphological characters of *Steinernema monticolum* that was collected in Andong

Characters (㎛)	Infective juveniles		Male adults (one generation)	
	Isolate (n=20)	*S. monticolum*	Isolate (n=5)	*S. monticolum*
Body length	827.4(753-877)	706 (612-821)	1246.1(1136-1341)	1600 (1360-1840)
Body width	52.4(42-62)	37 (32-46)	121.4(110-128)	160 (117-206)
Distance from head to EP	59.0(58-59)	58 (54-62)	78.1(68-82)	94 (75-115)
Esophagus length (ES)	136.4 ± 8.2 (125-145)	124 (120-131)	165.9(160-172)	166 (152-184)
Tail length	92.4 ± 7.3	77 (71-95)		
Spicule length			64.6(56-68)	70 (61-80)
Gubernaculum length			34.5(31-41)	45 (35-54)
Anal body width			51.0(49-57)	
D %			47.4(42-54)	55 (49-61)

```
TTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGTTGTTTC      60
GAGAAAAGCGGAGACTGTTGCTTAGAGCGTTTTCGGACGACCTTAGCGGCGAGAACCGCG     120
TTAATCGAAACGGCTTGAACCGGGCAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC     180
GGAAGGATCATTATTGAGCTAATACTTTGATCTTTAGAGTTGGAATCTCGCTGGTTGGGT     240
TTCTAAGCGTGTTTTTTCACTCACTGAACGGCTTTGATCGGTTTCTATAGATGTTTGGAG     300
CAGTTGTATGAGCGTGACTGTGGTGATGAACATTTGAGTCAATTTTAATTGACTAGAATT     360
AAAGAAATATGCAAGACTCGCCGATCTAAACAAAACTTTCAATAACATTTGTAAAATATT     420
TGACTGCACCAGCCGTAGGTGTAATTAAAAGATTTATCAAGTCTTATCGGTGGATCACTC     480
GGTTCGTAGTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCGTGAATTGCAGACATA     540
TTGAACGCTAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTT     600
GGTTGAGGGTCGATTAATTCGTAACTTGCAGTCGGCTTTGACTGTTTTTTCGATTAGTTA     660
CTTTTTTGCGAAAGAGAGTACCTTTTCGGCATGCAATAATTGTAGTTTAATTTTCGAGCA     720
GTGCGTACTGTTCGAGAACTATCGCTAAAATTCTGCAGTTGGTTGTTGACGCGTTTCTTG     780
TCGACTGACGTGTACGGATTCGTACGTGTGTTTCTACAAAAGTCAGTGCAACTAGTGGGA     840
TTTGAAAATTTTTCGATTTACGACCTCAACTCAAGCAAGATTACCCGCTGAACTTAAGCA     900
TATCAGTAAGCGGAGGAAAAGAAACTAACTAGGATTTCCTTAGTAACGGCGAGTGAAA      958
```

Putative rDNA region	Location
18S rDNA	≤ 193
ITS - 1	194 - 457
5.8S rDNA	458 - 614
ITS - 2	615 - 859
26S rDNA	≥ 860



	Percent identity (%)				
	S. monticolum (AF 122017)	*S. oregonense* (AF 122019)	*S. feltiae* (AF 121050)	*S. carpocapsae* (AF 121049)	*S. glaseri* (AF 122015)
Present isolate	100	81.3	81.2	75.8	74.9

Fig. 4. ITS sequence of *Steinernema monticolum* collected in Andong

이상의 형태적 결과와 ITS 결과는 안동에서 채집된 곤충병원선충이 *Steinernema monticolum*과 동일하다고 판명되었다. 파밤나방에 대한 살충력을 분석하였다.

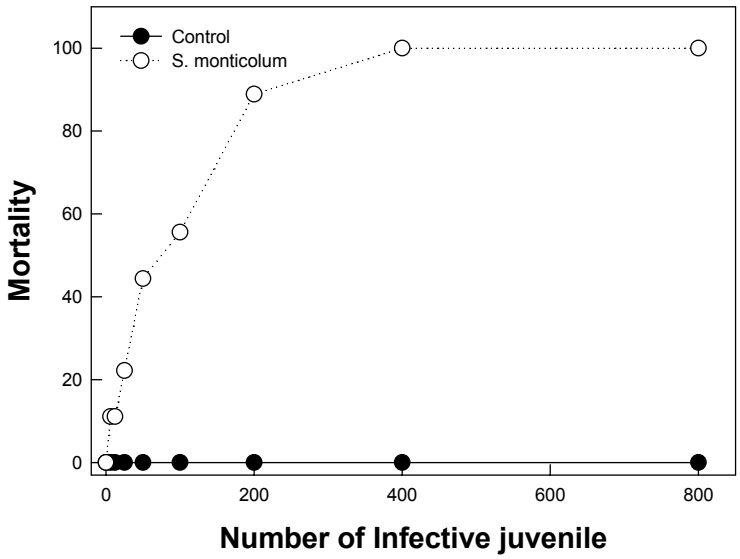


Fig. 5. Toxicity of *Steinernema monticolum* against 5th instar larvae of *Spodoptera exigua*

파밤나방 5령충에 대해서 *S. monticolum* 감염태의 반수치사수가 54.6 (31.1-92.7) 마리로 나타났다. 이는 *Steinernema carpocapsae*와 유사한 반수치사농도를 기록하여 유사한 유용 생명체의 동정을 의미했다. 이러한 곤충에 대한 치사력은 이 세균이 가지고 있는 공생세균에 의존하기 때문에 이에 대한 분리 및 동정이 실시되었다.

세균의 분리는 선충에 감염된 곤충의 혈장에서 TSB 선택배지를 통해 분리되었다. 분리된 세균의 속 동정 결과는 다음과 같이 catalase에 대해서 음성이고, 형광을 보유하지 않는 것으로 선충에 공생하는 세균 중 *Xenorhabdus* 속에 속하는 것으로 동정되었다.

Table. 7. Genus identification characters of the bacterial isolate from the infective juveniles of *Steinernema monticolum* Andong strain

Characters	*Xenorhabdus*	*Photorhabdus*	Present isolate
Catalase	-	+	-
Bioluminescence	-	+	-

발육온도별 세균 생육 상황은 32℃의 임계온도를 기록하였다. 이는 X. bovienni와 유사한 온도 발육 상황을 보였다.

Table. 8. Physiological and morphological characteristics used to identify the species of the symbiotic bacterium isolated from *Steinernema monticolum*

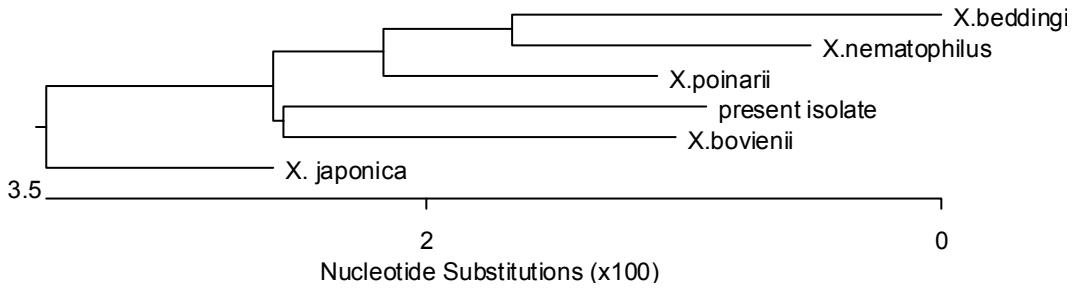
Characters	*X. nematophila*	*X. bovienii*	*X. poinarii*	*X. beddingii*	Present isolate
Host	*S. carpocapsae*	*S. feltiae* *S. intermedium* *S. affine* *S. kraussei*	*S. glaseri* *S. cubanum*	Unidentified *Steinernema* spp.	*S. monticolum*
Gram strain	-	-	-	-	-
Upper threshold (growth)	35℃	32 ℃	40 ℃	39 ℃	32 ℃
Oxidase production	-	-	-	-	-
Oxygen requirement	facultative	facultative	facultative	facultative	facultative

정확한 종 동정을 위하여 세균 동정에 일반적으로 이용되는 16S rDNA의 염기서열을

분석하였다. 염기서열과 기존의 *Xenorhabdus* 속의 16S rDNA와 비교한 결과 상호간 매우 낮은 (97% 이하) 상동성을 보였다. 이는 *S. monticolum*에서 분리된 *Xenorhabdus* sp. 균주가 기존에 알려지지 않은 새로운 종임을 나타내고 있다.

```
GGAGAGTTAG ATCTTGGCTC AGATTGAACG CTGGCGGCAG GCCTAACACA     50
TGCAAGTCGA GCGGCAACGG CAGGAAGCTT GCTTCCTGGC CGGCGAGCGG     100
CGGACGGGTG AGTAATGTCT GGGGATCTGC CCGATGGAGG GGGATAACCA     150
CTGGAAACGG TGGCTAATAC CGCATGACCT CTGAGGAGCA AAGTGGGGGA     200
CCTTCGGGCC TCACGCCATC GGATGAACCC AGATGGGATT AGCTAGTAGG     250
TGAGGTAACG GCTCACCTAG GCGACGATCC CTAGCTGGTC TGAGAGGATG     300
ACCAGCCACA CTGGGACTGA GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC     350
AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGCGCAAGC CTGATGCAGC CATGCCGCGT     400
GTATGAAGAA GGCCTTCGGG TTGTAAAGTA CTTTCAGCGG GGAGGATGGC     450
GTGAAGTTTA ACAGACTTTA CGATTGACGT TACCCGCAGA AGAAGCACCG     500
GCTAACTCCG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGGAGGGTGC AAGCGTTAAT     550
CGGAATTACT GGGCGTAAAG CGCACGCAGG CGGTCAATTA AGTTAGATGT     600
GAAATCCCCG GGCTTAACCT GGGAACTGCA TCTAAAACTG ATTGGCTAGA     650
GTCTCGTAGA GGGGGGTAGA ATTCCACGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG     700
ATGTGGAGGA ATACCGGTGG CGAAGGCGGC CCCCTGGACG AAGACTGACG     750
CTCAGGTGCG AAAGCGTGGG GAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC     800
CACGCTGTAA ACGATGTCGA TTTGGAGGTT GTGCCCTTGA GGCGTGGCTT     850
CCGGAGCTAA CGCGTTAAAT CGACCGCCTG GGGAGTACGG CCGCAAGGTT     900
AAAACTCAAA TGAATTGACG GGGGCCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT     950
TTAATTCGAT GCAACGCGAA GAACCTTACC TACTCTTGAC ATCCAGCGAA     1000
TCCTTTAGAG ATAGAGGAGT GCCTTCGGGA ACGCTGAGAC AGGTGCTGCA     1050
TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT TGTGAAATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA     1100
GCGCAACCCT TTTCCTTTGT TGCCAGCACG TAATGGTGGG AACTCAAGGG     1150
AGACTGCCGG TGATAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA     1200
TGGCCCTTAC GAGTAGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCA GATACAAAGA     1250
GAAGCGACCT CGCGAGAGCA AGCGGAACTC ATAAAGTCTG TCGTAGTCCG     1300
GATTGGAGTC TGCAACTCGA CTCCATGAAG TCGGAATCGC TAGTAATCGT     1350
AGATCAGAAT GCTACGGTGA ATACGTCCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC     1400
GTCACACCAT GGGAGTGGGT TGCAAAAGAA GTAGGTAGCT TAACCTTCGG     1450
GAGGGCGCTT ACCACTTTGT GATTCATGAC TGGGGTGAAG TCGTAACAAG     1500
GTAACCGTAG GGGAACCTGC GGCTGGATCA CCTCCTT                   1537
```

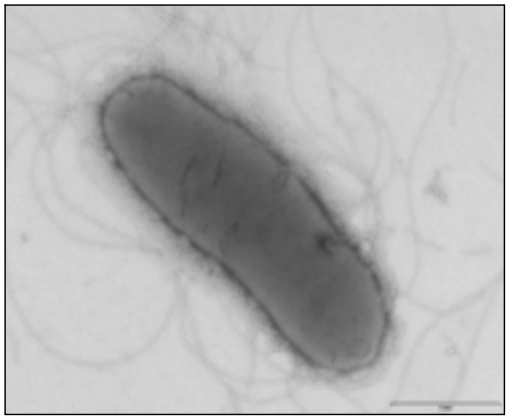
Fig. 6. A full sequence of 16S ribosomal DNA of a novel *Xenorhabdus* sp. insolated from the infective juveniles of *Steinernema moticolum* Andong strain



	Percent identity (%)				
	X. nematophila	*X. beddingii*	*X. bovienii*	*X. poinarii*	*X. japonica*
Present isolate	96.4	95.7	96.8	96.6	96.4

Fig. 7. The phylogenetic tree with selected *Xenorhabdus* spp. on NCBI

아래 그림은 이 세균의 전자현미경 사진으로 전형적 *Xenorhabdus*가 가지고 있는 구조를 보이고 있다.



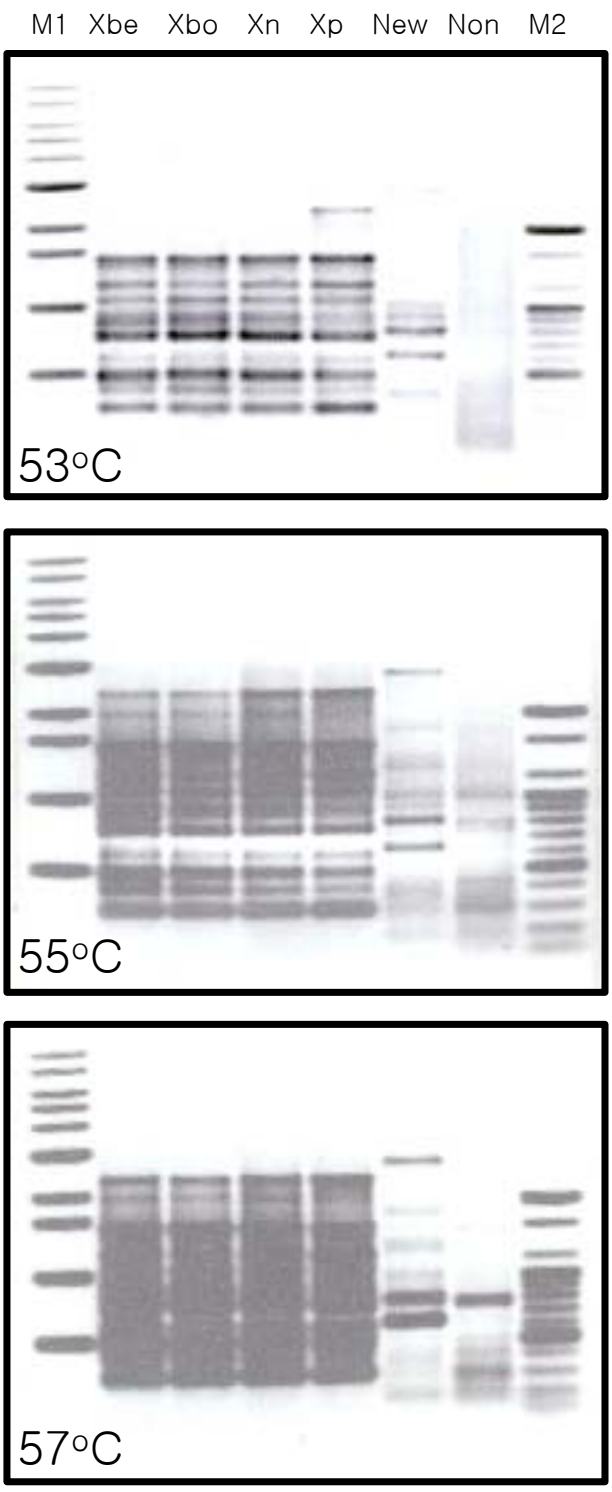


Fig. 8. Universally primed-PCR (UP PCR) pattern of *Xenorhabdus* sp. ('New') isolated from *Steinernema monticolum*. 'Xbe', 'Xbo', 'Xn', and 'Xp' represent *X. bedingii, X. bovienii, X. nematophila,* and *X. poinarii*, respectively. 'M1' and 'M2' represent 1 kb and 100 kb molecular weight markers, respectively. 'Non' sample did not have any DNA template. PCR products were visualized with ethidium bromide staining.

이 균주가 새로운 종이라는 것을 밝히기 위해 random primer를 이용한 변형된 RAPD 방법으로 (Nielsen and Lübeck, 2002) 유전적 상동성을 밝혔다. UP-PCR (universally primed-PCR) 방법을 이용한 세균의 상동성을 비교하였다. 이때 UP-primer는 L45 (5′-GTAAAA CGACGG CCAGT-3′)가 이용되었다. PCR 조건은 3가지 다른 annealing 온도를 이용하여 온도별 증폭상황을 비교하였고, 비교 세균 균주로서 Xenorhabdus에 속한 4개 균주와 비교하였다. 이 결과 *Steinernema monticolum*에서 비롯된 공생세균은 다른 *Xenorhabdus* 종들과는 상이한 PCR 증폭 형태를 보였다. 이러한 연구를 통해 이 균주를 *Xenorhabdus koreana* sp. n. 로 신칭하게 되었다. 이 균주는 파밤나방에 주입하였을 때 20시간이 지나면 100%의 살충력을 보였다.

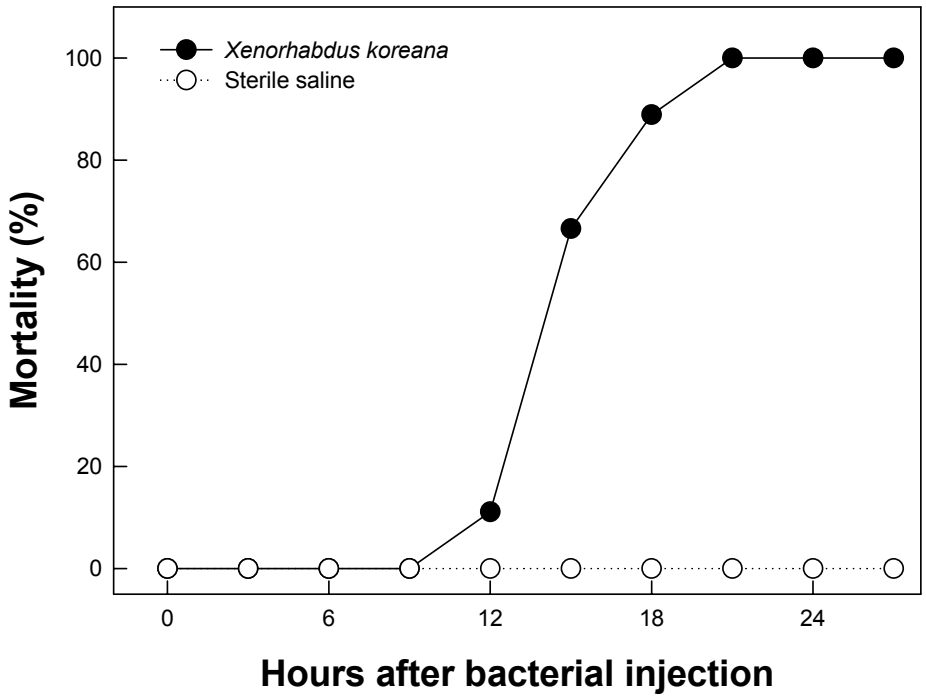


Fig. 9. Insecticidal activity of *Xenrhabdus koreana* on the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* when 10^6 colony-forming units of the bacteria were injected into the hemocoel.

3. 포토랍두스템페라타템페라타 (*Photorhabdus temperata temperata*) 균주 동정

가. 곤충병원선충 (*Heterorhabditis megidis)*의 분리 동정과 유용성

곤충병원선충 (Entomopathogenic nematode: Steinernematidae and Heterorhabditidae)이 전 세계적으로 발견되었으며, 생물적 방제 인자로서 널리 사용되어 지고 있다. 본 실험은 한국 자생의 곤충병원선충 확보와 활용 방안 모색을 목적으로 한다.

경북 안동과 경기도 화성 지역에서 곤충병원선충이 분리되었다. 두 지역에서 채집된 선충에 의하여 죽은 기주체는 *Heterorhabditis* spp.에서 나타나는 것과 유사한 병징을 나타냄을 확인하였다.

Table. 9. Pathogenic characteristics of *Galleria mellonella* larvae infected with the nematode isolate

Characters	Symptoms	
	Isolate	*Heterorhabditis* spp.
Insecticidal[1]	Positive	Positive
Cadaver color	Red-brick	Red-brick
Bioluminescence	Positive	Positive

[1]against *Galleria mellonella* 5th instar larvae

종 동정을 위하여, 콘포칼 현미경으로 측정된 형태적 특징들이 1987년 Poinar et al.이 보고한 *H. megidis* 와 비교 동정되었다.

Table. 10. Species identification of *Heterorhabditis* sp. isolate (unit: ㎛)

특 징	감염태 유충		수컷 성충	
	분리된 선충 (15마리)	*H. megidis*[5]	분리된 선충 (15마리)	*H. megidis*[6]
체장	768	768	1110	1000
체폭	38	29	50	47
두부-배설공까지 거리	127	131	151	156
반전된 정소 길이	-	-	162	138
교접자 길이	-	-	55	49
부자 길이	-	-	20	21
꼬리 길이	130	119	36	39
a[1]	20	26	22	19
c[2]	6	6	31	26
GS %[3]	-	-	37	43
E %[4]	94	110	-	-

[1]a: 체장 / 체폭, [2]c: 체장 / 꼬리 길이, [3]GS %: 부자 길이 / 교접자 길이 ×100, [4]E %: 두부에서 배설공까지 거리 / 꼬리 길이 ×100. [5, 6] Poinar et al., 1987

이러한 결과를 직접적으로 보여주는 그림은 안동에서 채집된 곤충병원선충의 형태적인 특징들을 SEM, CLSM, LM을 통하여 얻었다. 이러한 형태적 특징 분석은 채집된 곤충병원선충이 *Heterorhabditis*에 속하며 *H. megidis* 종과 동일한 분류학적 특징을 가지고 있다는 것을 제시하고 있다.

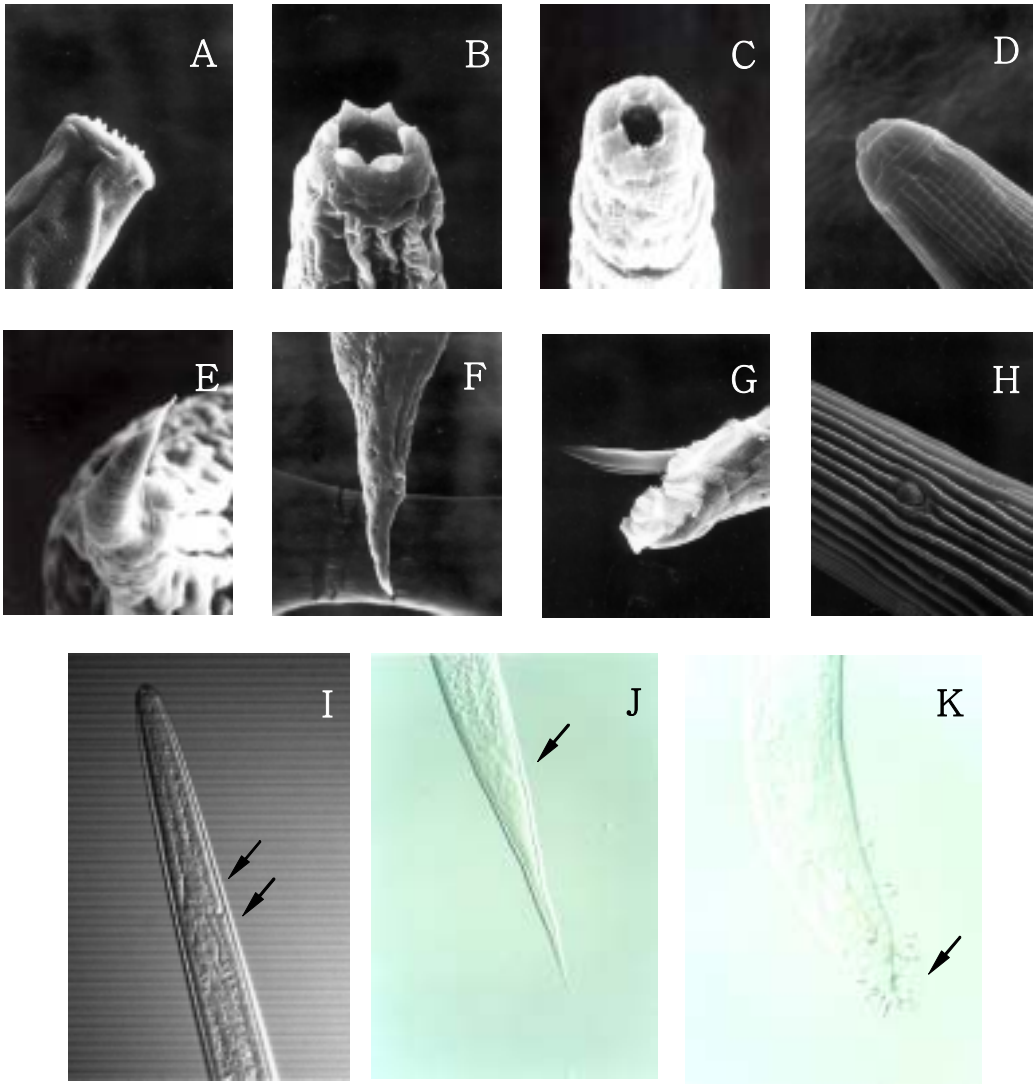


Fig. 10. *Heterorhabditis megidis* Andong의 형태사진: 주사전자 현미경 (A-H), 콘포칼 현미경 (I), 광학 현미경 (J, K), A: 자웅동체 암컷의 두부 (×3,000), B: 암컷의 두부 (×4,000), C: 수컷의 두부 (×5,000), D: 감염태 유충의 두부 (×5,000), E: 자웅동체 암텃의 꼬리 (×2,000), F: 암컷의 꼬리 (×1,000), G: 수컷의 꼬리 (×2,000), H: 감염태 유충의 항문과 측선 (×5,000), I: 감염태 유충의 두부: 위 화살표는 신경환, 아래 화살표는 배설공 (×600), J: 감염태 유충의 꼬리: 화살표는 항문 (×400), K: 수컷의 꼬리: 화살표는 교접낭과 생식돌기 (×400).

그리고 정확한 선충 종 동정을 위하여, 선충 리보좀 DNA의 ITS영역을 분석한 결과, 안동계통, 화성계통의 경우 각각 1047개, 1051개의 염기가 클로닝되었다. 이 영역 안에는 *Caenorhabditis elegans*와 비교하여 부분적 18S, ITS-1, 5.8S, ITS-2, 그리고 부분적 26S rDNA 영역이 포함되어 있었다.

Putative rDNA region	**Location**
18S rDNA	≤ 191
ITS - 1	192 - 575
5.8S rDNA	576 - 727
ITS - 2	728 - 947
26S rDNA	≥ 948

TTGATTACGT CCCTGCCCTT TGTACACACC GCCCGTCGCT GTCGGGGACT 50
GAGCTGTTTC GAGAAGAGTG GAGACTGCTG TATCGGGGCT TTCGGGCTCT 100
GGTATGATGG AAACCATTTT AATCGCAATG GCTTGAACCG GGCAAAAGTC 150
GTAACAAGGT ATCTGTAGGT GAACCTGCAG ATGGATCATC G**CTGAAAACC** 200
TTATGGTTAT GCTTTGGTCA CGAGAGATCG GTGCTACCGG AATCAGGCTT 250
GCTCCTGATT TCGATCGGTG TCTCACCCCC ATCTAAGCTC TCGGAGAGGG 300
TGTCTAATCC CAATCGGGAG TCGCTTTGAG TGACGGCAAT GAGGATTGGG 350
TGTGCCATAC CCCATACGTG GGGTAGAGCA TAGACGTTAA GAACAGTGCT 400
CGGACTGTCG CCTCACCAAC CGTCGATTAC TGGTGGCTAT GAGTGACTTC 450
GGTCACTCGA GATCTGCTAT GCAGAGAGTC TCAATGAGTT GTTCGTCCAA 500
CCGCCGGTGT CGATAGAAAT TTTTTCCTAT TAACTTGTTT CCTGATTCGT 550
GTTAATACAT TTTGGCACAA TGTATTAGCT TCAGCGATGG ATCGGTAGAT 600
TCGCGTATCG ATGAAAAACG CAGCAAGCTG CGTTATTTAC CACGAATTGC 650
AGACGCTTAG AGTGGTGAAG TTTTGAACGC ACAGCGCCGT CGGGTTTTCC 700
CTTCGGCACG TCTGGCTCAG GGTTGTT**TAG AGTACTGCGG TGTTGCTGCG** 750
AAAGTAGCAA TGTCGAGTGT CGAACGGCGT TAGTGTTTGC TACTGGCCCC 800
GTTCTAGTTC CGAATATTGG CAACATGTCG TCACGTCTTC GTGACGACGC 850
CGTAGAGAGT ATAAGTCTGT ACCTGTGGAT GTGTAGCGTA TGAAATATGA 900
TGCTTCCCAT ACATAGCGAG GAGGTGCTTC TTATACTATC TTGCTTATGC 950

AACCTGAGCT CAGTCGTGAT TACCCGCCGA ACTTAAGCAT ATCATTCAGC 1000

GGAGGAAAAG AAACTAACTA GGATTCCCTT AGTAACGGCG AGTGAAA 1047

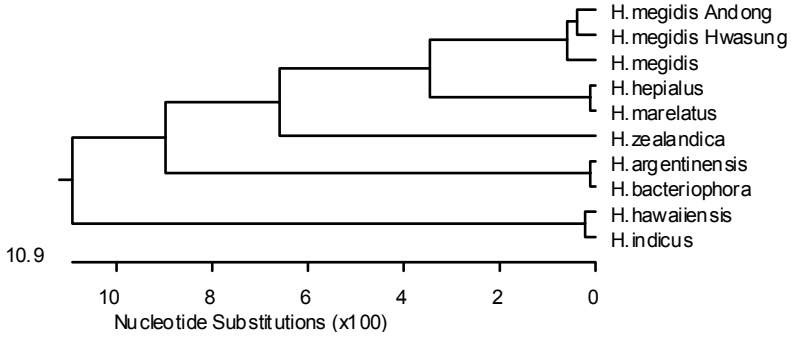


Fig. 11. DNA sequence of rDNA internal transcribed spacer (ITS) of *Heterorhabditis megidis* Andong and its phylogenetic analysis

한국에서 분리된 *H. megidis* 2개의 계통간에는 7개의 염기가 차이가 났다: 18S rDNA영역에서 1개의 염기전환 (transversion), ITS-1 영역에서 2개의 염기전위 (transition), 3개의 염기전환, 그리고 5.8S rDNA영역에서 1개의 염기전환이 일어났음을 확인하였다. 그리고 두 계통간에는 ITS-1과 ITS-2 영역에서 각각 4개 그리고 2개의 공백이 나타났다.

Table. 11. Ribosomal DNA (rDNA) sequence analysis of *Heterrhabditis megidis* Andong and *H. megidis* Hwasung: point and deletion mutations

	Putative rDNA region				
Mutation & Gap	18S rDNA	ITS-1	5.8S rDNA	ITS-2	26S rDNA
Transition	-	2	-	-	-
Transversion	1	3	1	-	-
Gap	-	4	-	2	-

이상의 결과를 바탕으로 한국에서 분리된 곤충병원선충은 *H. megidis* (NCBI access number: AF029711)와 가장 높은 유사도를 가짐으로서, *H. megidis* (AY293284)로 동정한다. 이는 국내 이 선충종의 최초 기록에 해당된다.

Table. 12. Species identification of *Heterorhabditis megidis* Andong (NCBI access number: AY293284) by comparing DNA sequence of rDNA internal transcribed spacer-1 (ITS-1)

Heterorhabdidis spp.[1]	*H. megidis* Andong				
	Nuceotides (bp)	Homology (%)	Gaps (%)	Identity (bits)	E value
H. megidis [1a]	566	98	0	1013	0.0
H. hepialus [1b]	570	91	3	670	0.0
H. marelatus [1c]	570	91	3	662	0.0
H. bacteriophora [1d]	331	92	1	418	e-114
H. argentinensis [1e]	331	92	1	418	e-114
H. zealandica [1f]	333	91	0	414	e-112
H. indicus [1g]	170	98	0	313	3e-82
H. hawaiiensis [1h]	170	98	0	313	3e-82

[1]NCBI ID number: [a]AF029711, [b]AF029709.1, [c]AF029713, [d]AF029708, [e]AF029706.1, [f]AF029705.1, [g]AF029710, [h]AF029707.1.

네 종류의 나비목 유충에 대하여 병원성을 확인한 결과, 파밤나방 (*S. exigua*)의 경우, 선충의 반수치사농도가 4.6마리로서 가장 큰 감수성을 나타냄을 확인하였고, 누에와 같이 기주체의 몸집이 큰 경우에는 93.8마리로서 비교적 많은 수의 선충이 필요함이 밝혀졌다.

Table. 13. Pathogenicity of *Heterorhabditis megidis* Andong against lepidopteran species

Species (fifth instar)	LC_{50}, IJs	95% CI	Slope
Spodoptera exigua	4.6 c	1.0 - 8.2	1.7 ± 0.6
Galleria mellonella	20.4 b	14.5 - 29.0	2.3 ± 0.4
Plodia interpunctella	59.1 a	30.4 - 81.7	4.2 ± 1.5
Bombyx mori	93.8 a	53.2 - 150.4	1.4 ± 0.3

H. megidis Andong의 생리적 특성을 조사하기 위하여, 가장 감수성으로 나타난 파밤나방 5령충을 대상으로 실험한 결과, 처리 6일 후에 자웅동체 암컷이 출현하였다. 그로부터 약 2틀 후에 자웅이체 암, 수가 출현함을 확인 하였으며, 이들은 교미를 한 후, 암컷의 몸을 뚫고 새로운 감염태 유충이 출현하였다. 이와 함께 기주체의 영양원이 고갈이 됨으로서, 18일 이후에는 선충의 출현이 종료되었다. 이와 비교하여 볼 때, Fig. 25.에서 볼 수 있듯이, 기주체의 몸집이 클수록 감염태 유충의 출현 시기가 조금 늦추어지는 경향을 확인할 수 있고, 이와 대조적으로 감염태 유충의 출현수가 현저히 증가함을 확인하였다.

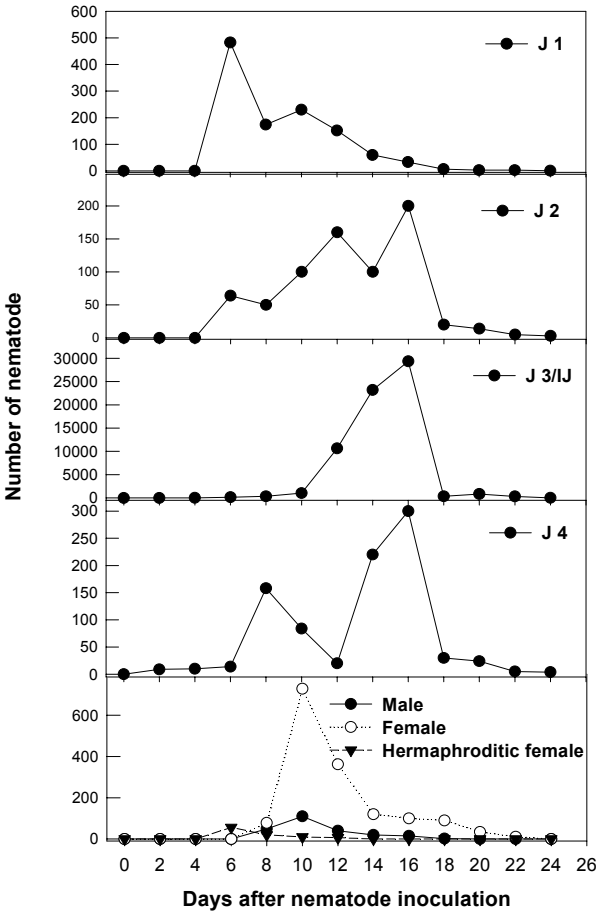


Fig. 12. Life cycle of *Heterorhabditis megidis* Andong in the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*

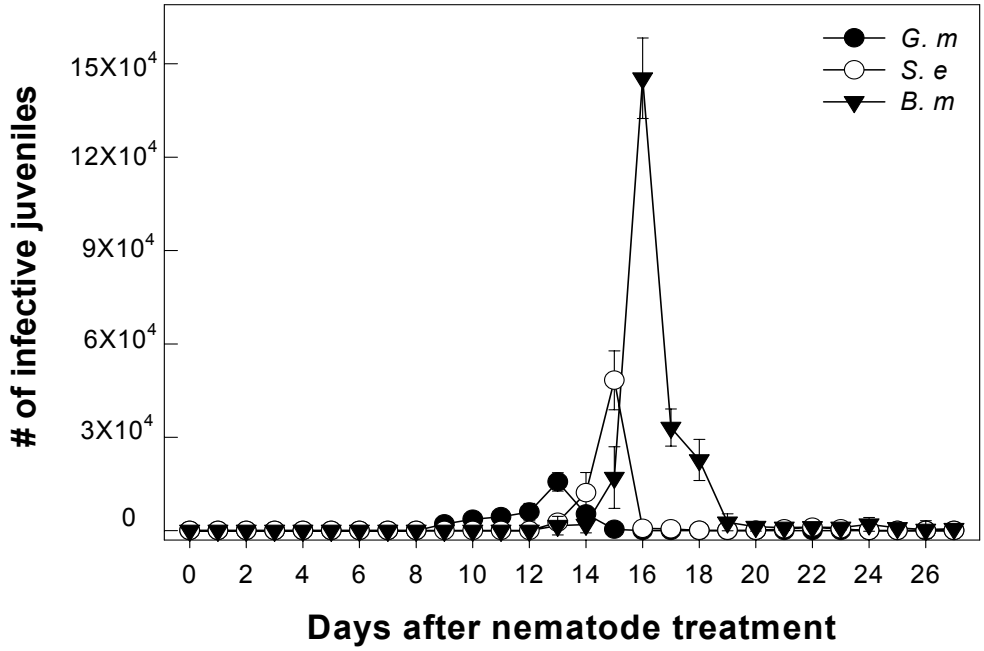


Fig. 13. Production of infective juveniles of *Heterorhabditis megidis* in *Galleria mellonella* (Gm), *Spodoptera exigua* (Se), and *Bombyx mori* (Bm)

이상의 결과를 요약하면 곤충병원선충 (Entomopathogenic nematode: Steinernematidae and Heterorhabditidae)은 각각, 장내에 *Xenorhabdus, Photorhabdus* 라고하는 공생세균을 가진다. 그럼으로서, 선충이 자연개구부 혹은 표피를 뚫고 기주체를 침입한 후, 혈강에 도착하여 공생세균을 분비한다. 그로 인하여, 세균이 기주체의 면역 기능을 마비시키고 패혈증을 유발하여 치사시킨다. 이와 같은 역할을 통하여, 이들은 생물적 방제인자로서 활용되고 있음이다. 현재 한국에서 채집된 곤충병원선충의 경우, Steinernematidae: *Steinernema carpocapsae, S. glaseri, S. monticolum*, and Heterorhabditidae: *Heterorhabditis bacteriophora* 이상의 4개 종이 보고된 바이다. 본 연구를 통하여 *H. megidis*가 추가로 국내 서식종으로 보고되고 생물적 방제인자로서 그 활용성을 증명하였다.

나. 곤충병원세균 (*Photorhabdus temperata temperata*) 분리 동정과 유용성

국내 채집되고 동정된 *Heterorhabditis megidis*에서 공생세균이 앞에서 기술한 방법 (*Xenorhabdus koreana*의 경우)에 따라 분리되었다. 분리된 세균은 간상의 모양을 보이며 편모를 지녔다.

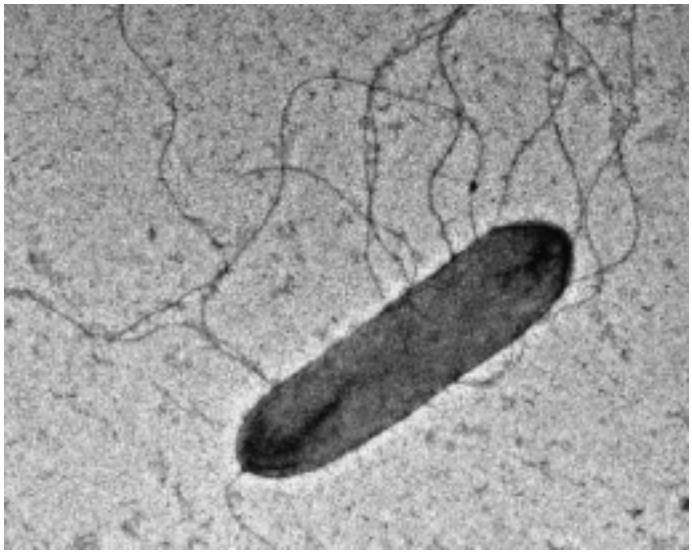


Fig. 14. TEM photo of the bacterial isolate from the symbiotic nematode, *Heterorhabditis megidis*

분리된 균주의 형태적 특징이 분류학적 특징을 중심으로 분석되었다. 이러한 특징들 중에서 특히 형광과 기주 특성은 이 균주가 *Photorhabdus* 속에 속한다는 것을 나타내고 있다.

Table. 14. Physiological and morphological characteristics used to identify the symbiotic bacterium isolated from infective juvenile of *Heterorhabditis megidis*

Characters	*Photorhabdus*[1]	Present isolate
Host	*Heterorhabditis* spp.	*Heterorhabditis megidis*
Gram strain[2]	-[5]	-
Oxidase production[3]	-	-
Oxygen requirements[4]	Facultatively anaerobic	Facultatively anaerobic
Methyl red test	-	d
Indole production	d	d
Shape	Rod	Rod
Cell length (㎛)	4.0-10.0	4.6-9.6
Cell width (㎛)	0.8-2.0	0.95-1.22
Flagella type	Peritrichous	Peritrichous
Mortility	Sinusoidal motility	Sinusoidal motility

[1] Detail of *Photorhabdus* were described in Bergey's manual (Krieg and Hort, 1984).

[2] Gram strain test used with 3% KOH after 24hours incubation on TSA.

[3] Oxidase test used with 1% Dimethyl-p-phenylendiamine hydrochloride after 48h incubation on TSA. [4]Oxygen requirements test used after 48h incubation on TSA.

[5] +: positive reaction, -: negative reaction, d: weak reaction

Table. 15. Dichotomous identification characters of the bacterial isolate from *Heterorhabditis megidis* with closely related bacterial species.

Characters	*Photorhabdus*[1]	*Xenorhabdus*	Present isolate
Catalase[2]	+[4]	−	+
Bioluminescence[3]	+	−	+

[1] Detail of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* were described in Bergey's manual (Krieg and Hort, 1984).

[2] Catalase production test used 3% H_2O_2 after 48hours incubation on TSA.

[3] Bioluminescence checked in dark condition on TSA.

[4] +: positive reaction, −: negative reaction.

이상의 형태학적 특징들을 토대로 16S rDNA의 염기서열을 분석한 결과 *Photorhabdus temperata temperata* 로 판명되었다.

```
GAAGAGTTTG ATCATGGCTC AGATTGAACG CTGGCGGCAG GCCTAACACA    50
TGCAAGTCGA GCGGTAACAG GAAAGTGCTT GCACTTTTGC TGACGAGCGG   100
CGGACGGGTG AGTAATGTCT GGGGATCTGC CCGAGGGCGG AGGATAACCA   150
CTGGAAACGG TGGCTAATAC CGCATAATGT CGCAAGACCA AAGTGGGGGA   200
CCTGAAAGGG CCTCACGCCC GCGGATGAAC CCAGGTGGGA TTAGCTAGTC   250
GGTAGGGTAA TGGCCTACCG AGGCGACGAT CCCTAGCTGG TCTGAGAGGA   300
TGACCAGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA   350
GCAGTGGGGA ATATTGCACA ATGAGCGCAA GCCTGATGCA GCCATGCCGC   400
GTGTATGAAG AAGGCCTTCG GGTTGTAAAG TACTTTCAGC GGGGAGGAAG   450
GGTTTAGCCT GAACAGGGTT GAATTTTGAC GTTACCCGCA GAAGAAGCAC   500
CGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGGGT GCAAGCGTTA   550
ATCGGAATGA CTGGGCGTAA AGCGCACGCA GGCGGTCAAT TAAGTTAGAT   600
GTGAAATCCC CGGGCTTAAC CTGGGAACGG CATCTAAGAC TGGTTGGCTA   650
GAGTCTCGTA GAGGGGGGTA GAATTCCATG TGTAGCGGTG AAATGCGTAG   700
AGATGTGGAG GAATACCGGT GGCGAAGGCG GCCCCCTGGA CGAAGACTGA   750
CGCTCAGGTG CGAAAGCGTG GGGAGCAACC AGGATTAGAT ACCCTAGTAG   800
TCCACGCGGT AAACGATGTC GATTTGGAGG TTGTTCCCTA GAGGAGTGGC   850
TTCCGGAGCT AACGCGTTAA ATCGACCGCC TGGGGAGTAC GGCCGCAAGG   900
TTAAAACTCA AATGAATTGA CGGGGGCCCG CACAAGCGGT GGAGCATGTG   950
GTTTAATTCG ATGCAACGCG AAGAACCTTA CCTACTCTTG ACATCCAGAG  1000
AAGACCACAG AGATGTGGTT GTGCCTTCGG GAGCTCTGAG ACAGGTGCTG  1050
CATGGCTGTC GTCAGCTCGT GTTGTGAAAT GTTGGGTTAA GTCCCGCAAC  1100
GAGCGCAACC CTTATCCTTT GTTGCCAGCG CGTGATGGCG GGAACTCAAA  1150
GGAGACTGCC GGTGATAAAC CGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAGTCAT  1200
CATGGCCCTT ACGAGTAGGG CTACACACGT GCTACAATGG CGGATACAAA  1250
GTGAAGCGAC CTCGCGAGAG CAAGCGGAAC ACATAAAGTC TGTCGTAGTC  1300
CGGATTGGAG TCTGCAACTC GACTCCATGA AGTCGGAATC GCTAGTAATC  1350
GTAGATCAGA ATGCTACGGT GAATACGTTC CCGGGCCTTG TACACACCGC  1400
CCGTCACACC ATGGGAGTGG GTTGCAAAAG AAGTCGGTAG CTTAACCTGT  1450
AGGAGGGCGC TGACCACTTT GTGATTCATG ACTGGGGTGA AGTCGTAACA  1500
AGGTAACCGT AGGGGAACCT GCGGCTGGAT CACCTCCTT              1539
```

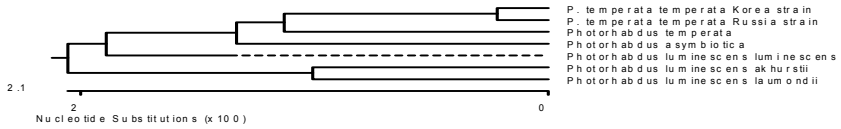


Fig. 15. 16S rDNA nucleotide sequence of the isolate from the symbiotic nematode, *Heterorhabditis megidis*

*Photorhabdus temperata subsp. temperata*에 대한 기주 곤충의 살충기작을 인지질 분해 효소인 phospholipase A2 (PLA2)의 활성에 초점을 맞추었다. PLA2는 외래물질의 침입을 받은 기주곤충에서 세포성 면역반응을 중계해주는 면역중계물질(eicosanoid)을 생합성하는 첫 번째 단계이다. 이 단계의 억제 반응이 궁극적으로 세포성 면역 반응을 결핍시켜 기주를 치사시킬 수 있다는 가설을 토대로 실험하였다.

1. Ptt에 대한 파밤나방의 혈구소낭 형성

살아있는 세균과 95℃에서 5분간 열처리된 세균을 파밤나방 5령에 접종 한 후 시간(0h, 4h, 8h, 12h)별로 혈구소낭의 수를 관찰하였을 때, 4시간 이후에서 부터 소낭의 수가 현격하게 차이가 나는 것을 볼 수 있었다.

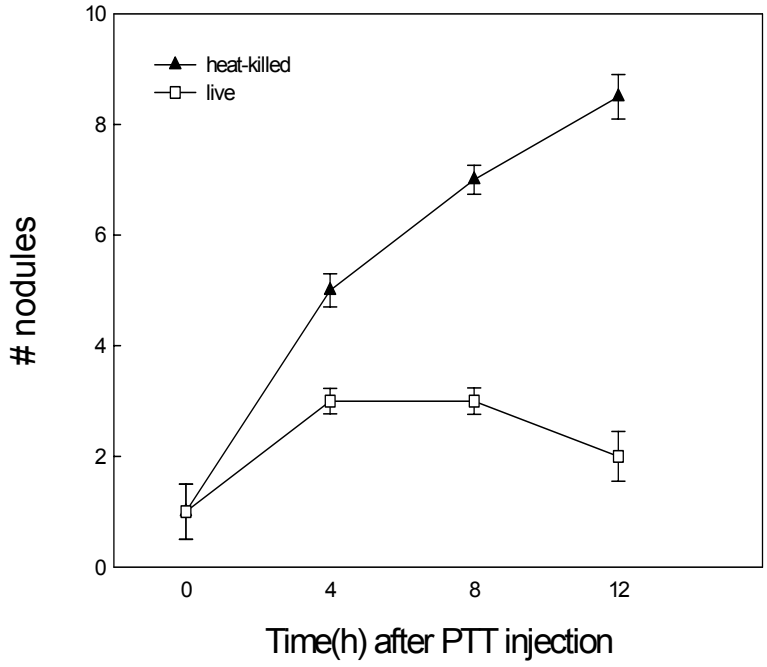


Fig. 16. Immunodepressive effect of *Photorhabdus temperata temperata* (nodulation: time course)

8시간에 Ptt의 세균 농도 (10^1 10^2 10^3 $10^4$$10^5$)를 달리하여 접종 후 소낭 형성수를 관찰하였을 때, 열처리된 세균은 소낭의 수가 증가하는 반면, 살아있는 세균을 처리하였을 때는 소낭의 수가 적은 것을 알 수 있었다.

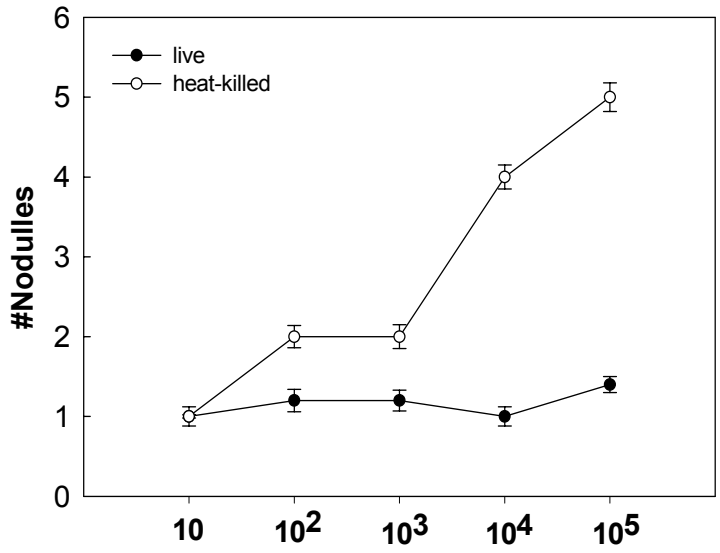


Fig. 17. Immunodepressive effect of *Photorhabdus temperata temperata* (nodulation: dose-response)

2. Ptt의 면역 억제 효과 분석

(1) PO 활성에 대한 효과

PO의 활성을 측정하였을 때 열처리된 세균은 활성이 높은 반면 살아있는 세균은 활성이 낮은 것을 볼 수 있었다.

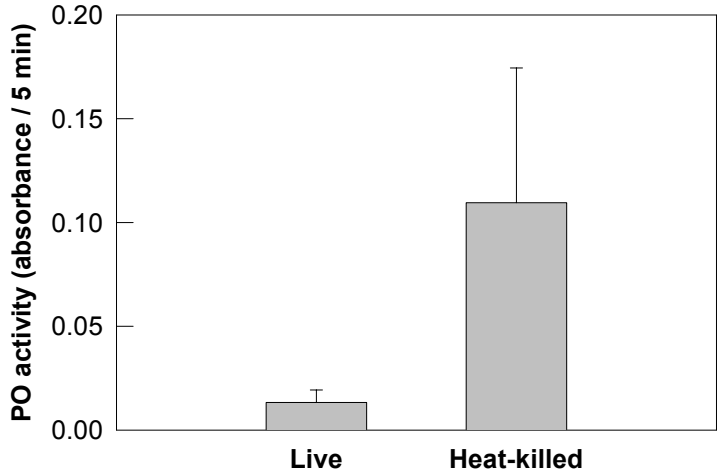


Fig. 18. Immunodepression effect of *Photorhabdus temperata temperata* (activation of phenoloxidase)

(2) 혈구의 세균 인식 반응 분석 (Binding assay)

혈구세포의 세균 인식 능력을 분석하기 위해서 염색된 세균을 슬라드그라스 위에 고정된 혈구에 반응시킨 후, 비특이적 결합을 제거하기 위해 3회 세척하였다. 이후 염색된 세균에 결합되어 있는 혈구세포를 판별하여 혈구세포의 세균 인식능력을 분석하였다.

이 결과, 열처리되어 죽은 Ptt 세균은 혈구세포에 잘 인식되는 반면, 살아있는 Ptt 세균은 인식능력이 현저하게 낮아진다는 결론을 얻을 수 있었다.

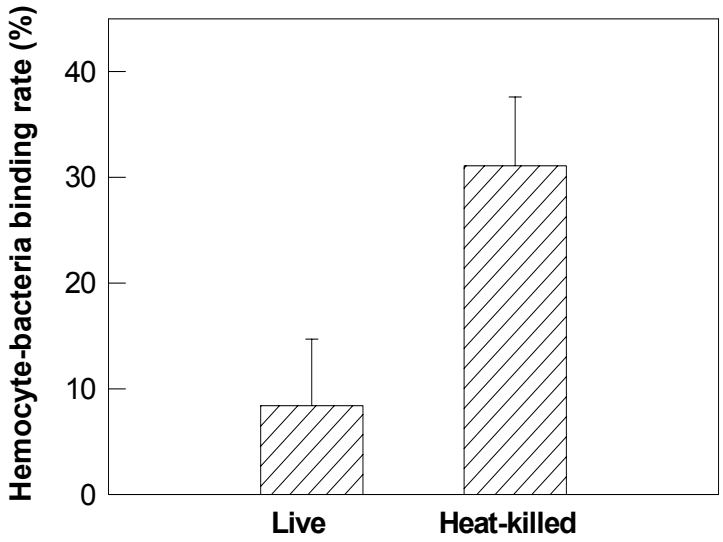


Fig. 19. Immunodepressive effect of *Photorhabdus temperata temperata* (binding assay)

(3) Ptt가 eicosanoid pathway를 억제 가설에 대한 검정

살아있는 세균과 열처리된 세균을 접종하였을 때 nodulation과 PO 활성, 그리고 혈액과 세균의 binding의 차이가 나타남을 앞에서 알 수 있었다. PLA2의 특이적 억제자인 dexamethasone (DEX)을 열처리된 세균을 접종 한 곳에 처리했을 때, nodule의 수가 감소하는 것을 볼 수 있었고, 살아있는 세균에서는 nodule의 수가 적었었는데 특이적 활성물질인 arachidonic acid(AA)을 처리하였을 때는 nodule이 증가하는 것을 볼 수 있었다.

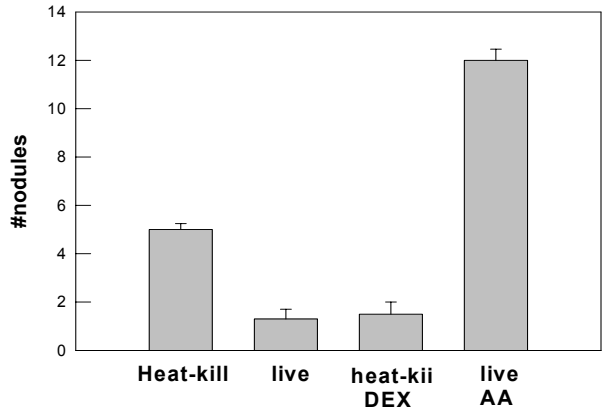


Fig. 20. PLA2 inhibitory effect of *Photorhabdus temperata temperata* (nodulation)

이러한 PLA2 억제 효과는 혈구소낭 형성과 같이 PO 활성에 있어서도 같은 결과를 나타내었다.

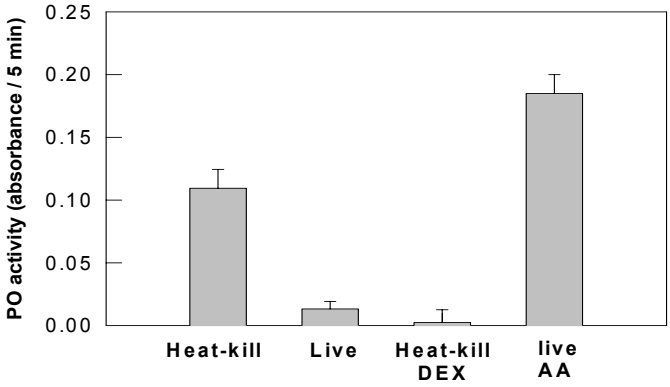


Fig. 21. PLA2 inhibitory effect of *Photorhabdus temperata temperata* (PO activation)

혈액과 세균의 binding에서도 앞의 nodulation과 PO 활성과 같은 결과를 나타내었다.

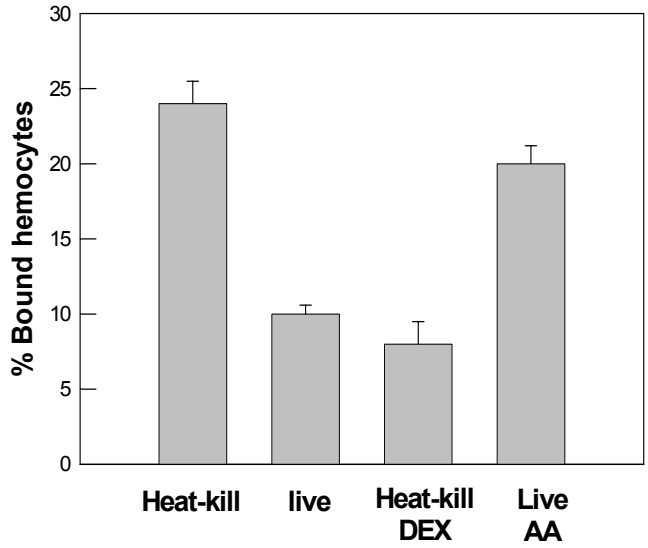


Fig. 22. PLA2 inhibitory effect of *Photorhabdus temperata temperata* (binding assay)

이상의 결과들을 종합하면, 국내에서 채집한 곤충병원선충 *Heterorhabditis megidis*으로부터 분리한 *Photorhabdus temperata temperata*의 곤충병원세균은 곤충에 대해서 높은 병원력과 면역억제 능력이 확인되었다. 이를 이용한 새로운 미생물제제를 개발할 필요가 있다.

제2절 제노랍두스네마토필라 (ANU-Xn101) 배양액의 살충 및 살비 효과

1. ANU-Xn101 배양액의 비티 상승 효과

Xn 유래 물질의 작용은 곤충의 면역억제 및 세포치사효과를 보이기 때문에 기존의 생물농약의 효과를 제고시킬 수 있다고 판단하였다. Xn의 감염 부위가 곤충 혈강이기 때문에 섭식후 혈강속으로 Xn 물질을 침입시키기 위해 비티 농약을 선택하였다.

비티 농약 (비티 아이자와이 과립수화제, 센타리, 전진산업)에 대한 파밤나방 (*S. exigua*)의 감수성이 먼저 분석되었다. 감수성 결과 LC20 농도의 비티를 결정하였다. 또한 Xn을 TSB 배지에서 48시간 배양한 후 세균 세포 (cell) 층과 배양액 (supernatant) 층으로 나누고 각각을 동결건조시켰다.

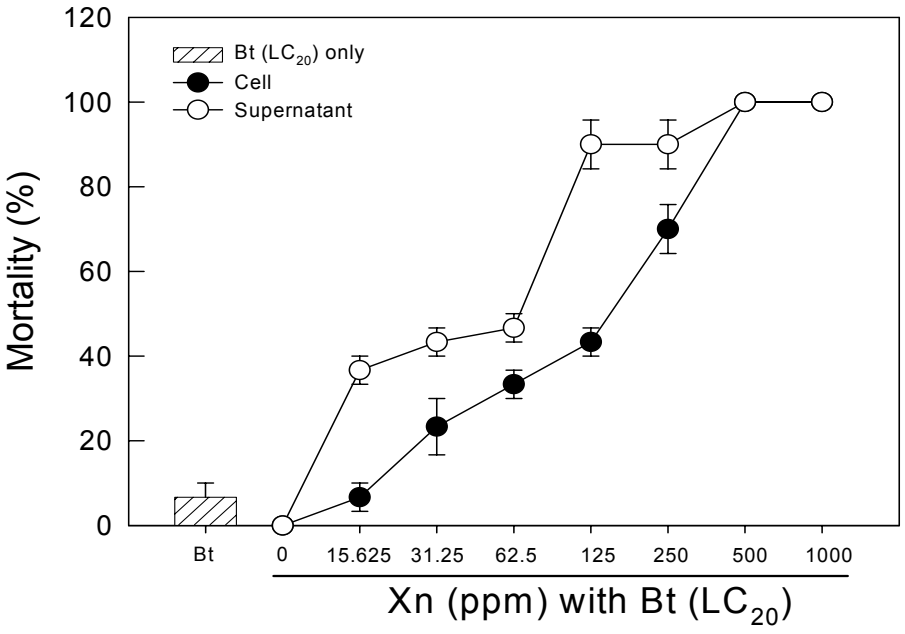


Fig. 23. Synergistic effect of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis aizawai* (Bt) at LC_{20} concentration against 2nd

instar larvae of *Spodoptera exigua*. After 48h culture of Xn, the cells and the supernatant culture media were separated and freeze-dried.
Xn 유래 세균이나 배양액 모두는 비티 농약의 살충력에 대해서 높은 상승 효과를 작용하였다. 이 결과를 Xn의 반수치사약량 (LC_{50}) 및 반수치사시간 (LT_{50})으로 나타내고 비교하였다.

Table. 16. Toxicity of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis aizawai* (Bt) at LC_{20} concentration against 2nd instar larvae of *Spodoptera exigua*. After 48h culture of Xn, the cells and the supernatant culture media were separated and freeze-dried.

Xn treatment with Bt		Toxicity parameter[1]		
		Median (95% range)	Slope	X^2
Cell	LC_{50}, ppm	103.3 (79.1 - 136.2)	1.88 ± 0.24	97.61
	LT_{50}, days	0.7 (0.5 - 0.9)	5.60 ± 1.23	86.49
Culture media	LC_{50}, ppm	37.2 (16.5 - 78.4)	1.66 ± 0.39	88.36
	LT_{50}, days	0.9 (0.7 - 1.1)	6.35 ± 1.16	0.85

[1] LC50 and LT50 represent a median lethal concentration and time, respectively.

반수치사약량을 비교하여 보면, Xn의 배양액이 세균 보다도 약 2 배 이상의 높은 활성을 지니고 있다는 것을 알 수 있다.

다음은 배양액 포장 적용시험에 앞서 포트실험에서 처리 약량 분석을 실시하였다. 땅콩 (높이 약 10 ㎝, 폭 15 ㎝)을 각 포트에 심고, 파밤나방 2령충을 20마리씩, 5령충은 10 마리씩 3반복으로 접종하였다. 이후 포트당 Bt + Xn (LC_{20} + LC_{98})의 농도로 조제된 혼합액을 10 ㎖, 20 ㎖, 30 ㎖로 살포액을 증가시켜 가면서 살포하였다.

비티와 Xn의 혼합 처리액은 처리 살포액량에 관계없이 Xn 배양액은 파밤나방의 2령과 5령충에 대해서 높은 살충력을 발휘하였다. 2령충의 경우 처리 2일후에 100%의 방제 효과를 보인 반면, 5령충은 3일 경과후 100% 방제 효과를 보였다.

Table 17. Pot assay of a mixture of *Bacillus thuringiensis aizawai* (Bt) at LC_{20} concentration and *Xenorhabdus nematophila* (Xn) at LC_{98} concentrationon on the insecticidal activity against *Spodoptera exigua*

Spray amount (㎖) of Bt + Xn mixture	Mean mortality ± SD (%) after treatment		
	1 day	2 days	3 days
		2nd instar (n = 60)	
0	0.0 ± 0.0	1.67 ± 6.7	-
10	91.7 ± 2.9	100.0 ± 0.0	-
20	96.7 ± 2.9	100.0 ± 0.0	-
30	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	-
		5th instar (n = 30)	
0	3.3 ± 5.8	6.7 ± 5.8	6.7 ± 5.8
10	63.3 ± 5.7	90.0 ± 10.0	100.0 ± 0.0
20	90.0 ± 10.0	96.7 ± 5.8	100.0 ± 0.0
30	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0

이상의 두 실내 시험 결과 Bt+Xn 혼합제의 효과가 입증되었다. 이를 바탕으로 야외 포장시험에 파밤나방을 대상으로 적용하였다. 포장시험은 난괴법 3반복으로 시험설계되었다. 각 땅콩 (높이 약 10 ㎝, 폭 15 ㎝)을 반복으로 파밤나방 2령충을 20마리씩, 5령충은 10 마리씩 접종하였다. 이후 각 땅콩 주당 Bt + Xn (LC_{20} + LC_{98})의 농도로 조제된 혼합액을 10 ㎖, 20 ㎖, 30 ㎖로 살포액을 증가시켜 가면서 살포하였다.

비티와 Xn의 혼합 처리액은 처리 살포액량에 관계없이 Xn 배양액은 파밤나방의 2령과 5령충에 대해서 높은 포장 살충력을 발휘하였다. 포트시험과 유사하게 2령충의 경우 처리 2일후에 100%의 방제 효과를 보인 반면, 5령충은 3일 경과후 100% 방제 효과를 보였다.

Table 18. Field assay of a mixture of *Bacillus thuringiensis aizawai* (Bt) at LC_{20} concentration and *Xenorhabdus nematophila* (Xn) at LC_{98} concentrationon on the insecticidal activity against *Spodoptera exigua*

Spray amount (㎖) of Bt + Xn mixture	Mean mortality ± SD (%) after treatment		
	1 day	2 days	3 days
		2nd instar (n = 60)	
0	20.0 ± 5.0	33.3 ± 5.8	-
10	91.7 ± 2.9	100.0 ± 0.0	-
20	95.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	-
30	95.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	-
		5th instar (n = 30)	
0	6.7 ± 5.8	13.3 ± 5.8	13.3 ± 5.8
10	80.0 ± 10.0	93.3 ± 5.8	93.3 ± 5.8
20	86.7 ± 5.8	93.3 ± 5.8	93.3 ± 5.8
30	90.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0

이상의 실내 및 포장 결과는 Xn 배양액 동결건조물이 비티 살충력을 뚜렷하게 상승시키는 것으로 판명되었다.

2. ANU-Xn101 배양액 단독 살충 및 살비 효과

가. ANU-Xn101의 단독 살충효과

ANU-Xn101을 발효 조건 배지 (1 L 배양액 기준으로 glucose 20 g, $MgSO_4$ 1 g, Yeast extract 40 g, K_2HPO_4 1 g, $(NH_4)SO_4$ 4 g, NaCl 2.5 g, $MnSO_4$ 0.07 g)에서 대량생산 후, 세포층과 배양액층으로 나누었다. 각각을 동결건조시킨 후 파밤나방 2령충에 대해서 살충력을 검증하였다.

Table 19. Toxic effect of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) on 2nd instar larvae of *Spodoptera exigua*. After 48h fermentation of Xn, the cells and the supernatant culture media were separated and freeze-dried.

Cell dose (ppm)	Number of larvae	Mortality(%) after treatment			
		24h	48h	72h	96h
			Cell		
0	30	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
15.625	30	16.67±3.33	56.67±3.33	83.33±3.33	100.0±0.00
31.25	30	26.67±3.33	66.67±3.33	86.67±8.82	100.0±0.00
62.5	30	33.33±3.33	76.67±3.33	93.33±3.33	100.0±0.00
125	30	43.33±3.33	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00
250	30	46.67±3.33	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00
500	30	46.67±3.33	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00
1000	30	63.33±3.33	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00
			Culture media		
0	30	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
15.625	30	13.33±3.33	73.33±3.33	83.33±3.33	100.0±0.00
31.25	30	26.67±3.33	76.67±3.33	93.33±3.33	100.0±0.00
62.5	30	36.67±3.33	93.33±3.33	100.0±0.00	100.0±0.00
125	30	46.67±3.33	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00
250	30	56.67±3.33	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00
500	30	60.00±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00
1000	30	70.00±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00

Table 20. Median lethal dose (LC_{50}) of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) against 2nd instar larvae of *Spodoptera exigua*. After 48h fermentation of Xn, the cells and the supernatant culture media were separated and freeze-dried.

Time after treatment	LC_{50}, ppm	Slope	X^2
		Cell	
24h	357.9 (184.03-1227.19)	0.62 ± 0.15	37.33
48h	15.2 (5.96-22.85)	1.71 ± 0.43	78.15
72h	3.7 (0.00-10.39)	1.35 ± 0.56	57.61
		Culture media	
24h	196.9 (119.97-363.78)	0.83 ± 0.16	55.95
48h	8.6 (1.31-15.03)	1.76 ± 0.53	75.34
72h	6.7 (0.00-12.34)	2.50 ± 1.11	85.19

이상의 결과는 ANU-Xn101 단독으로 파밤나방에 대해서 살충효과를 보이고 있다는 것을 나타낸다. 그러나 두 분리된 시료에서 배양액이 세균 자체보다 살충력이 높게 나왔다. 이는 살충물질이 세균으로부터 파생되어 배양액으로 분비된다는 사실을 제시하고 있다. 이러한 세균배양액 단독의 살충효과는 앞에서 보았던 비티 상승 효과를 독성학적으로 설명하여 줄 뿐만 아니라, 직접적 생물농약 개발 응용으로 연결될 수 있다.

나. ANU-Xn101의 단독 살비효과

ANU-Xn101 균주의 배양액에 대한 단독의 살비 효과를 분석하였다. 원형엽분석법 (Leaf disk assay, 반지름 = 1.5 ㎝)을 통하여 처리액에 침지된 잎을 건조후 점박이응애 (*Tetranychus urticae*) 성충을 대상으로 급성 독성을 분석하였다. 이때 배양액은 48시간 배양후, 냉동건조시킨 분말형의 제제로 소정의 농도로 증류수 희석하여 시험에 이용하였다.

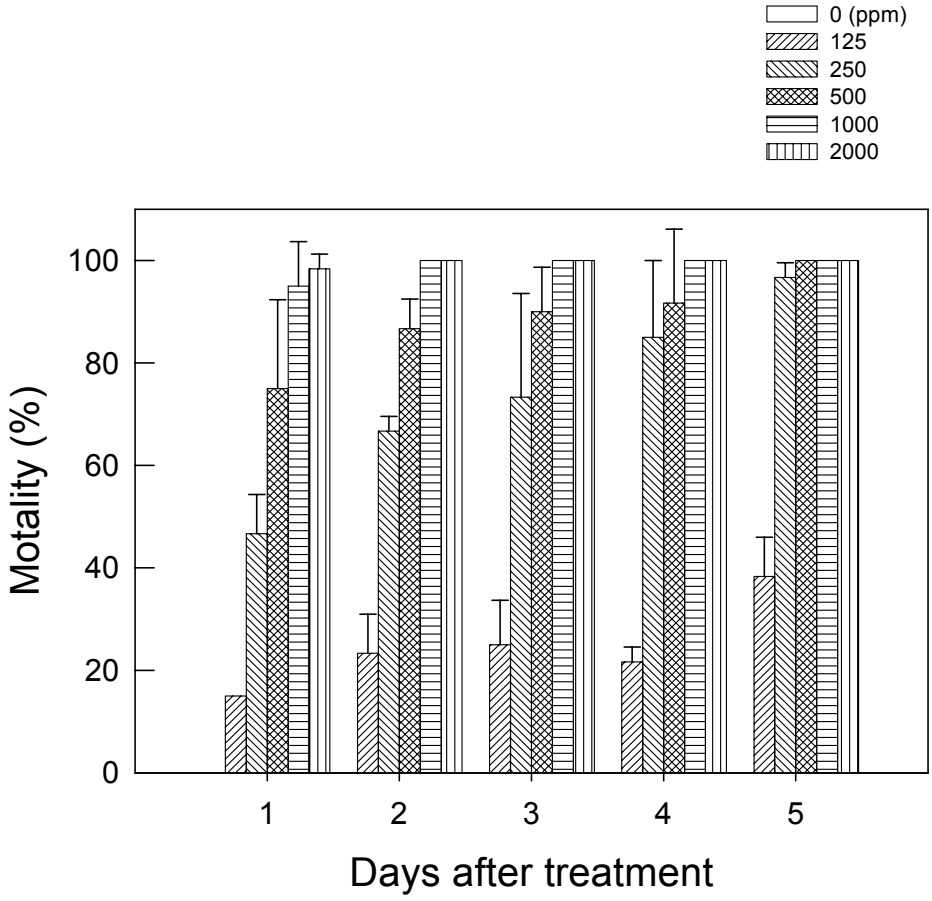


Fig. 24. Acute toxicity of culture medium of *Xenorhabdus nematophila* ANU-Xn101 against adults of *Tetranychus urticae*.

Table 21. Median lethal dose of culture medium of *Xenorhabdus nematophila* ANU-Xn101 against adults of *Tetranychus urticae*

Time after treatment	LC_{50}, ppm	Slope	X^2
1 day	> 2,000	-	-
3 days	32.9 (3.9-74.4)	1.11 ± 0.27	62.88
5 days	< 32.9	-	-

이상의 결과는 ANU-Xn101의 세균 배양액 단독으로 5일 이내에 100%에 가까운 높은 살비력을 보유하고 있다는 것을 의미하고 있다.

실내 분석에서 확인된 ANU-Xn101 세균 배양액의 살비력을 포장 조건에서 시험하였다. 사과에 발생한 점박이응애에 대해서 급성 독성 분석을 기존의 상용화된 살비제와 비교하여 분석하였다.

Table 22. Control effect of *Xenorhabdus nematophila* culture media on adults of *Tetranychus urticae* (3 days after treatment) in apple orchard. The control effects of two commercial acaricides were compared.

Test chemicals	Mite population before spray per apple tree	Survival (%)				Significance (DMRT)	Control efficacy (%)
		I	II	III	Mean		
Xn culture media (500 ppm)	498.3	4.8	1.4	0.8	2.3	a	97.7
Spirodiclofen 36WP (500 ppm)	606.3	18.1	15.2	9.9	14.4	a	85.4
Fluacrypyrim + Tetradifon WP (500 ppm)	405.3	2.0	6.2	7.4	5.2	a	94.7
Control	473.7	98.0	106.0	91.2	98.4	b	-

Table 23. Control effect of *Xenorhabdus nematophila* culture media on adults of *Tetranychus urticae* (7 days after treatment) in apple orchard. The control effects of two commercial acaricides were compared.

Test chemicals	Mite population before spray per apple tree	Survival (%)				Significance (DMRT)	Control efficacy (%)
		I	II	III	Mean		
Xn culture media (500 ppm)	498.3	0.0	0.2	0.2	0.1	a	99.9
Spirodiclofen 36WP (500 ppm)	606.3	12.2	5.9	3.3	7.1	a	91.5
Fluacrypyrim + Tetradifon WP (500 ppm)	405.3	4.7	4.7	6.9	5.4	a	93.5
Control	473.7	90.8	79.4	58.1	83.1	b	-

ANU-Xn101의 배양 용액이 사과 점박이응애에 대해서 포장 조건에서 500 ppm으로 분무할 경우 일주일 경과후 99.9%의 방제 효율을 기록했다. 이러한 방제 효과는 현재 응애약으로 시판하고 있는 두 응애 약제의 방제 효율에 비해서 우수한 것으로 판명되고 있다.

ANU-Xn101 배양액이 어떻게 응애에 살비 효과를 보일 수 있는 지에 대해서는 현재로서 알 수 없다. 가능한 가설로서 Xn이 갖는 높은 항생 효과가 응애의 장내에 공생하는 미생물들에게 억제효과를 주어 영양학적으로 고갈된 응애의 생육억제 효과로서 생각해 볼 수 있다.

이 배양액중에 존재하는 살비 효과 물질을 검증하는 것이 살응애 효과를 설명하는 데 유익할 수 있다.

제3절 제노랍두스네마토필라 (ANU-Xn101) 유래 살충 및 살비 물질 동정 및 효과

제1, 2 차년도의 연구 결과로 (상주대와 안동대 공동연구) ANU-Xn101 배양액으로부터 분리 동정된 두 물질 (benzylideneacetone (BZA)과 proline-tyrosine (PT))의 파밤나방 2령충에 대한 살충력을 분석하였다. 먹이침지법을 이용하여 1㎠ 크기의 인공사료를 조제된 처리 용액에 침지 및 건조 후 파밤나방에게 투여하였다.

Table 24. Toxic effects of benzylideneacetone (BZA) and proline-tyrosine (PT) derived from the culture media of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) on 2nd instar larvae of *Spodoptera exigua*.

Dose (ppm)	Number of larvae	Mortality(%) after treatment			
		24h	48h	72h	96h
			BZA		
0	30	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
15.625	30	16.67±3.33	63.33±3.33	86.67±3.33	100.0±0.00
31.25	30	16.67±3.33	66.67±3.33	93.33±3.33	100.0±0.00
62.5	30	23.33±3.33	73.33±3.33	96.67±3.33	100.0±0.00
125	30	26.67±3.33	73.33±6.67	100.0±0.00	100.0±0.00
250	30	33.33±6.67	76.67±3.33	100.0±0.00	100.0±0.00
500	30	36.67±6.67	83.33±6.67	100.0±0.00	100.0±0.00
1000	30	40.00±5.77	90.00±5.77	100.0±0.00	100.0±0.00
			PT		
0	30	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
15.625	30	13.33±3.33	43.33±3.33	76.67±3.33	100.0±0.00
31.25	30	33.33±3.33	53.33±3.33	86.67±3.33	100.0±0.00
62.5	30	33.33±6.67	60.00±0.00	93.33±3.33	100.0±0.00
125	30	43.33±3.33	63.33±3.33	96.67±3.33	100.0±0.00
250	30	40.00±5.77	63.33±3.33	100.0±0.00	100.0±0.00
500	30	43.33±6.67	66.67±3.33	100.0±0.00	100.0±0.00
1000	30	46.67±3.33	76.67±3.33	100.0±0.00	100.0±0.00

Table 25. Toxicities of benzylideneacetone (BZA) and proline-tyrosine (PT) derived from the culture media of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) on 2nd instar larvae of *Spodoptera exigua*.

Time after treatment	LC_{50}, ppm	Slope	X^2
	BZA		
24h	3196.05 (722.72-7052496.0)	0.44 ± 0.16	19.27
48h	3.47 (0.00-16.85)	0.45 ± 0.16	7.95
72h	3.09 (0.00-9.50)	1.53 ± 0.71	62.09
	PT		
24h	954.44 (306.79-164299.20)	0.41 ± 0.15	10.50
48h	24.97 (0.37-70.76)	0.41 ± 0.15	2.76
72h	4.96 (0.20-11.50)	1.41 ± 0.44	61.94

두 물질은 파밤나방에 대해서 모두 높은 살충력을 지녔다. 처리 1일후부터 살충효과가 나타났으며 2일이후 부터는 안정된 살충효과를 보였다. 이를 기준으로 두 물질을 비교하여 보면 통계학적으로 (95% 신뢰구간의 중복 여부) 차이가 나지 않는다는 것을 알 수 있다. 이들 물질의 살충 효과는 물질 단독으로 농약 등록이 가능하지만, 배양액 살충효과의 원인물질을 설명하여 주는 차원에서 배양액을 응용한 생화학농약의 등록화를 가능하게 한다.

이러한 결과를 바탕으로 두 물질의 포장 방제력을 분석하였다. 포장시험은 파밤나방이 발생한 땅콩포장에서 500 ppm의 세균 배양액, BZA, PT를 엽면 살포하였다. 조사시기는 실내 결과에서 보는 72시간을 기준으로 성적을 조사하였다.

Table 26. Control effect of *Xenorhabdus nematophila* culture media and identified compounds on larvae of *Spodoptera exigua* (3 days after treatment) in soybean field. The control effect of one commercial biopesticide was compared.

Test chemicals	Mean larvae/ replication	Survival (%)				Significance (DMRT)	Control efficacy (%)
		I	II	III	Mean		
Xn culture media (500 ppm)	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	a	100.0
BZA (500 ppm)	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	a	100.0
PT (500 ppm)	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	a	100.0
Bt (500 ppm)	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	a	100.0
Control	10.0	6	5	7	6.0	b	-

대조약제로서 생물농약의 일종인 비티 농약은 500 ppm에서 파밤나방에 대해서 100% 방제 효과를 보였다. 본 과제에서 추출한 배양액과 두 물질도 같은 농도에서 100% 살충력을 보유하여 이들 약제의 새로운 살충제로서 개발이 유망되고 있다.

비티농약의 상승효과를 보였던 ANU-Xn101 배양액의 효과를 물질로서 증명하기 위해 두 물질을 각각 비티와 혼합하여 파밤나방에 처리하였다. BZA과 PT는 모두 비티에 대해서 높은 협력 작용을 나타내는 것으로 나타났다. 이러한 혼합효과는 두 가지 기작으로 설명이 가능하겠다. 첫째로 두 물질이 갖는 단독 살충효과이다. 이는 이전의 결과에서 기술하였다. 둘째로 이 물질은 배양액에서 추출되었고, 이는 이 세균이 곤충에 침입하였을 때, 곤충 체강내로 분비되어 직접적으로 곤충의 살충 효과에 영향을 주었을 것으로 판단된다. 즉, 비티는 이 물질이 곤충의 체강내로 이전을 도와주고, 이전된 물질은 곤충의 살충 효과를 빠르게 진행될 수 있도록 영향을 주었다고 판단된다.

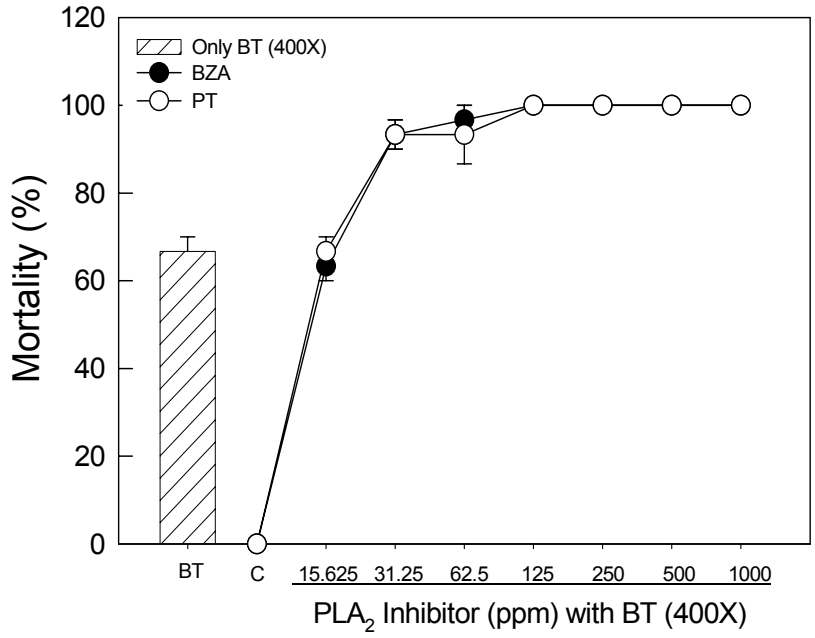


Fig. 24. Synergisitic effect of bezylideneacetone (BZA) and proline-tyrosine (PT) on insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* against 2nd instar larvae of *Spodoptera exigua*

이상의 결과는 Xn 배양액이 Bt에 대해서 협력 효과를 주었다는 결과에 대해서 원인 물질이 BZA과 PT일 수 있다는 근거를 제공하고 있다. 이러한 기능 물질의 원인 규명은 생화학농약으로 본 추출물을 등록시킬 수 있다는 것을 의미하고 있다.

이 두 물질의 점박이응애에 대한 살비 효과가 분석되었다.

Table 27. Toxic effects of benzylideneacetone (BZA) and proline-tyrosine (PT) derived from the culture media of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) on adults of *Tetranychus urticae.*

Dose (ppm)	N	Mortality(%) after treatment					
		1 day	2 days	3 days	4 days	5 days	6 days
				BZA			
0	30	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
125	30	1.1 ± 1.9	21.1 ± 7.0	32.2 ± 5.1	73.3 ± 26.7	93.3 ± 11.5	98.7 ± 2.3
250	30	7.8 ± 1.9	32.2 ± 12.6	33.3 ± 6.7	75.5 ± 16.8	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
500	30	15.5 ± 6.9	34.4 ± 5.1	68.9 ± 30.1	95.6 ± 7.7	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
1000	30	55.6 ± 2.0	97.8 ± 3.9	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
2000	30	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
				PT			
0	30	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.00±0.00	0.0 ± 0.0
125	30	6.7 ± 7.6	20.0 ± 5.0	21.7 ± 2.9	31.7 ± 7.6	43.3 ± 14.4	45.0 ± 13.2
250	30	8.3 ± 2.9	16.7 ± 7.6	18.3 ± 5.8	26.7 ± 7.6	35.0 ± 10.0	43.3 ± 20.2
500	30	11.7 ± 2.9	16.7 ± 2.9	18.3 ± 2.9	33.3 ± 12.6	45.0 ± 18.0	60.0 ± 27.8
1000	30	10.0 ± 5.0	23.3 ± 2.9	25.0 ± 8.7	41.7 ± 2.9	53.3 ± 10.4	68.3 ± 16.1
2000	30	20.0 ± 5.0	23.3 ± 2.9	30.0 ± 5.0	48.3 ± 2.9	58.3 ± 12.6	73.3 ± 22.5

Table 28. Toxicities of benzylideneacetone (BZA) and proline-tyrosine (PT) derived from the culture media of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) on adults of *Tetranychus urticae.*

Time after treatment	LC_{50}, ppm	Slope	X^2
	BZA		
3 days	244.09 (91.86-645.04)	2.76 ± 0.89	22.37
6 days	< 125	-	-
	PT		
3 days	> 2000	-	-
6 days	252.34 (105.49-406.59)	0.71 ± 0.18	1.52

이상의 결과는 두 물질이 점박이응애에 대해서 높은 살비력을 가지고 있다는 것을 보여 준다. 이 두 물질 중에서 benzylideneacetone이 proline-tyrosine 보다 높은 활성을 가지고 있다고 보였다. 그러나, 배양액으로 처리한 결과에서는 이 두물질의 단독처리들보다도 낮은 반수치사약량을 보유하는 것으로 나타나서, 이 두 물질 이외에 살비력을 높여주는 제3의 물질이 배양액에 존재하는 것으로 여겨진다.

제4절 기타 곤충병원세균 유래 배양액의 살충 및 살비 효과

ANU-Xn101 배양액의 살충 및 살비 효과는 유사한 곤충병원세균에 대한 비교 분석을 요구했다. 본 연구를 통해 국내에서 채집되고 분리 동정된 두 종의 선충 공생세균 (*Xenorhabdus koreana* (Xk)와 *Photorhabdus temperata temperata* (Ptt))에 대해서 살충 및 살비 효과가 분석되었다.

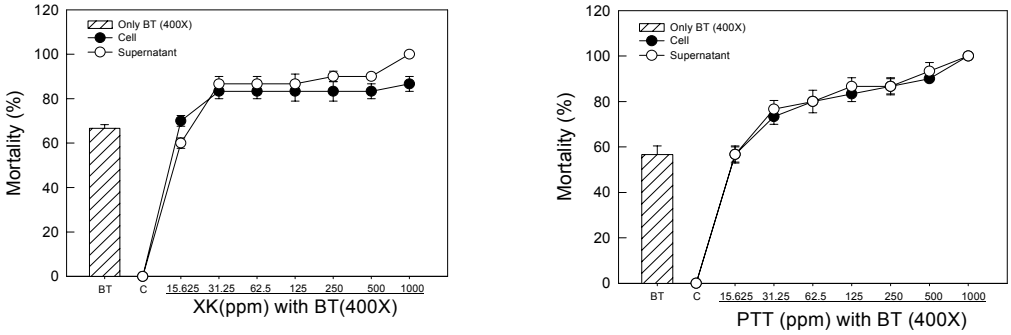


Fig. 25. Synergistic effects of *Xenorhabdus koreana* (Xk) and *Photorhabdus temperata temperata* (Ptt) on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis aizawai* (Bt) at LC_{60} concentration against 2nd instar larvae of *Spodoptera exigua*.

두 세균은 모두 세포층과 배양액층 모두에서 파밤나방에 대한 비티 살충력을 제고시키는 효과를 보유하였다. 이는 ANU-Xn101과 같이 세균이 분비한 살충물질에 기인한 것으로 미뤄진다.

두 세균의 배양액을 이용하여 점박이응애 (Tetranychus urticae)에 대해서 살비 효과를 검정하였다. 원형엽분석법 (Leaf disk assay, 반지름 = 1.5 ㎝)을 통하여 처리액에 침지된 잎을 건조후 점박이응애 (*Tetranychus urticae*) 성충을 대상으로 급성 독성을 분석하였다. 이때 배양액은 48시간 배양후, 냉동건조시킨 분말형의 제제로 소정의 농도로 증류수 희석하여 시험에 이용하였다.

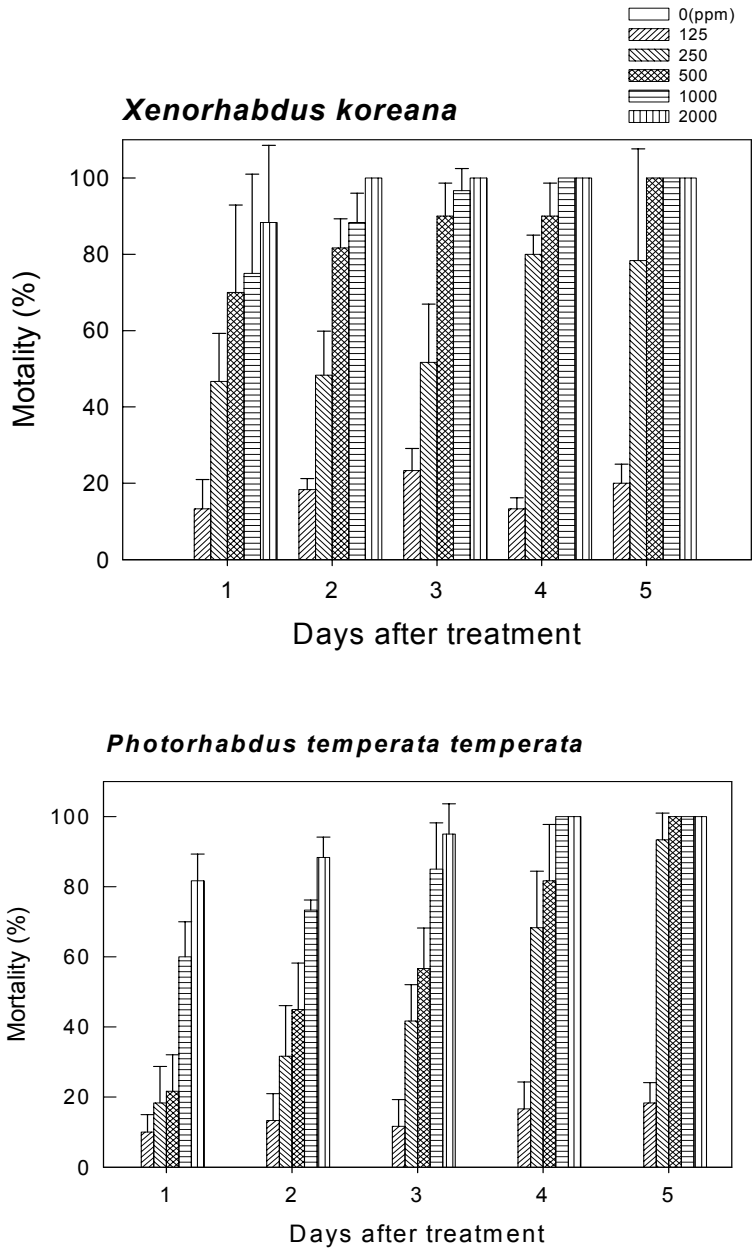


Fig. 25. Acaricidal effect of two entomopathogenic bacteria (*Xenorhabdus koreana* and *Photorhabdus temperata temperata*) on adults of *Tetranychus urticae*

두 곤충병원세균 (*Xenorhabdus koreana* and *Photorhabdus temperata temperata*)의 배양액은 점박이응애에 대해서 높은 급성 독성을 보였다. 이러한 배양액의 효과는 이들이 분비하는 물질에 기인될 수 있다는 것이 앞에서 설명한 *Xenorhabdus nematophila*의 결과에서 짐작할 수 있다.

제5절 Xn 유래 물질의 면역억제 효과

Xn은 세포성 면역 뿐만 아니라 체액성 면역도 억제하였다. 곤충의 cecropin류 항생단백질은 그람음성균의 세균 감염에 대한 체액성 면역방어 기구로 알려져 있다. Cecropin은 바로 antimicrobial peptides의 일종으로, 누에에서 처음으로 발견되었으며 transgenic plant로 이용된 예가 있다. 이 단백질은 35-37개 정도의 아미노산으로 되어있고, A, B, D의 세가지 형태가 보고되었다. 공생세균은 곤충에 접종하였을 때 이 cecropin류에 의해 죽지 않고 빠르고 강력한 살충 효과를 나타낸다. 이 현상에서 공생세균이 cecropin을 억제시킬 것이라는 가설을 토대로 실험하였다.

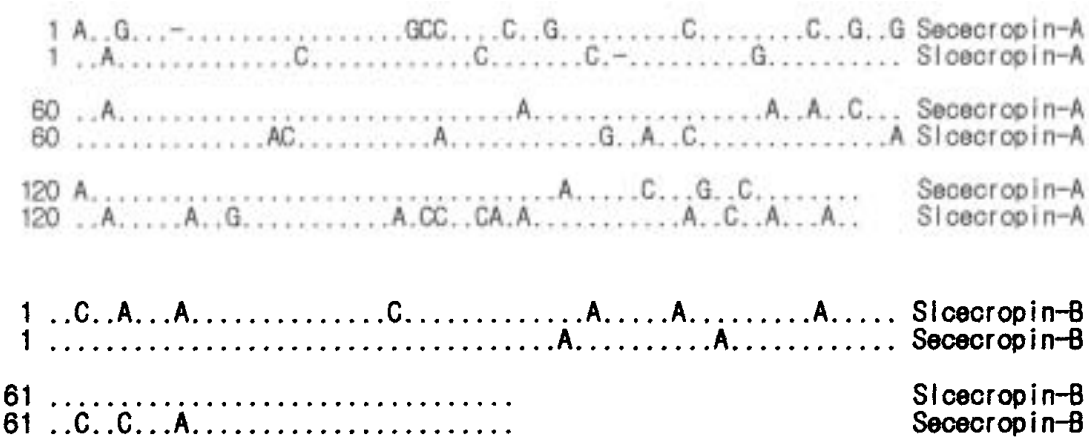


Fig. 27. Nucleotide sequences of cecropin genes from *Spodoptera exigua*

RT-PCR을 이용한 유전자 클로닝에서 cecropin 유전자는 두 종류가 얻어졌다. Cecropin A는 *Spodoptera litura*와 비교하였을 때, 염기서열에서 71.6%의 상동성을 나타내었으며 Cecropin B는 87.1%의 상동성을 나타내었다.

그람 음성균(*E.coli*)과 그람 양성균(*Enterococcus faecalis*)에 실험하였을 때 그람 음성균에서만 효과를 나타내었다. 열처리된 세균을 접종한 혈액은 억제 효과를 나타내는 반면 살아있는 세균을 접종 한 혈액은 열처리된 혈액 보다 낮은 억제효과를 보였다.

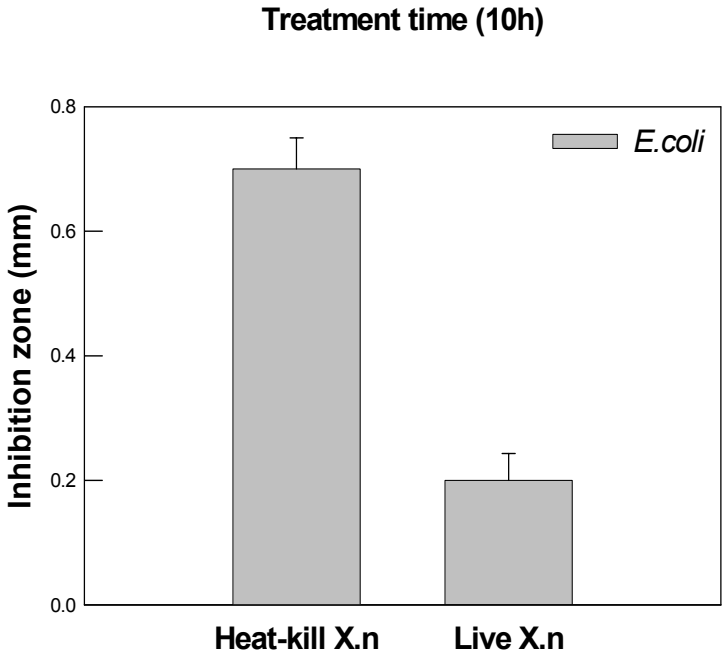


Fig. 28. Inhibition effect of the hemolymph infected with heat-killed *Xenorhabdus nematophila* on the growth of *Escherichia coli*. The hemolymph infected with live *X. nematophila* showed significantly decreased antibacterial activity.

이상의 결과를 종합하면, Xn은 소낭 형성 억제와 같은 세포성 면역억제 뿐만 아니라 cecropin과 같은 항생단백질 활성을 억제시키는 것으로 나타났다.

그러나, 본 연구를 통해 Xn의 병원기작중에서 가장 두드러지게 밝혀진 것이 이 세균의 곤충 면역 중개 반응 억제이다. 이러한 면역 중개 반응억제는 인지질 분해 효소의 일종인 phospholipase A2 (PLA2)의 활성저해이다. PLA2는 eicosanoid류의 생합성의 초기 물질인 arachidonic acid (AA)를 형성시켜, 이후 이어지는 산화반응을 통해 면역의 중개자인 다양한 eicosanoid류를 형성하게 한다.

제1, 2차 연구를 통해 Xn은 직접적으로 곤충의 PLA2를 억제한다는 것을 밝혔다. 다

양한 결과중에서 곤충의 세포막 인지질 성분을 분석하고, PLA2를 추출하고, 이후 추출된 PLA2가 Xn에 의해 억제된다는 사실이 직접적인 결과라고 할 수 있다.

또한 제1, 2차 연도에서 Xn 분비하는 PLA2 억제 물질에 대해서 상주대학교와 공동으로 화합물 분리 및 동정을 시도하였다. 이렇게 해서 얻어진 두 물질이 지금까지 살충 및 살비 효과로서 분석해온 benzylideneacetone (BZA)과 proline-tyrosine (PT)의 두 물질이다.

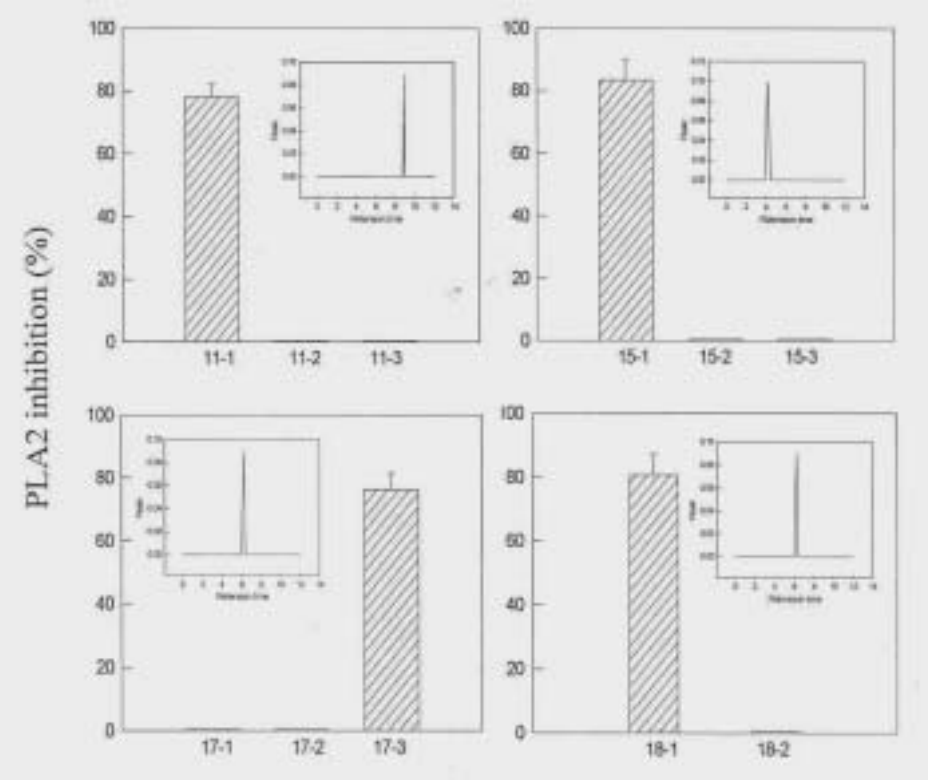


Fig. 29. Two compounds, benzylideneacetone (BZA, fraction #11-1) and proline-tyrosine (PT, fraction #17-3/#18-1).

이 두 물질의 세포성 면역억제 반응이 소낭 형성 (nodulation) 반응으로 분석되었다.

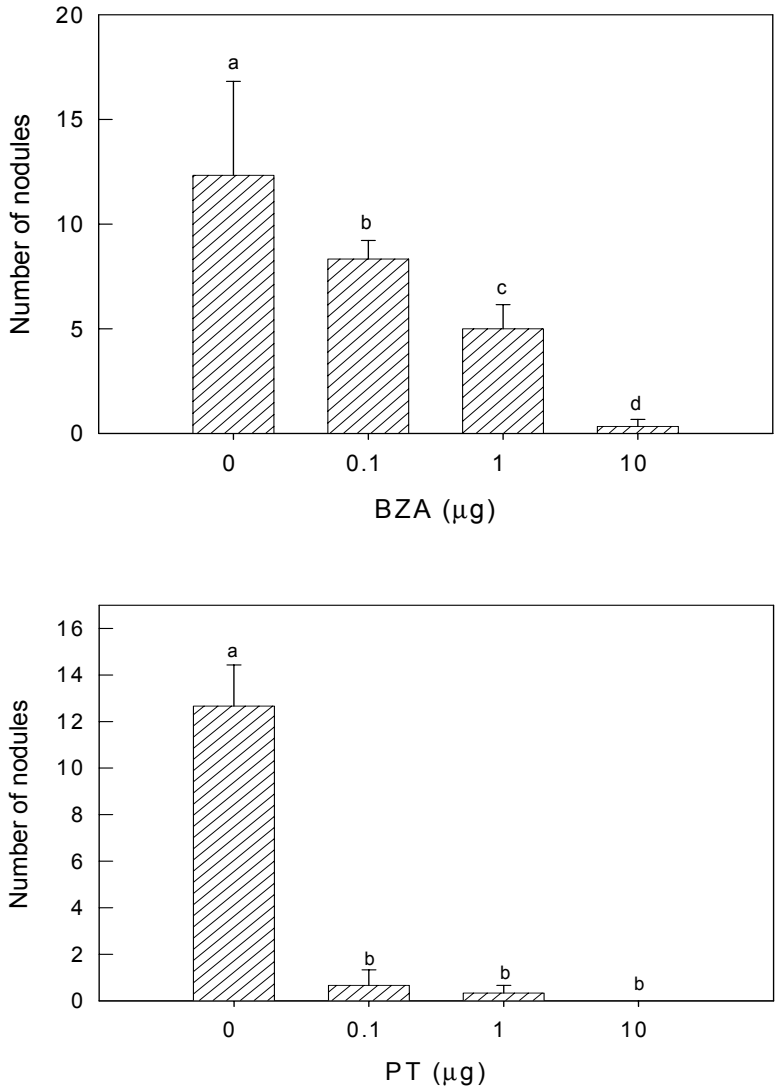


Fig. 30. Inhibitory effects of benzylideneacetone (BZA) and proline-tyrosine (PT) on hemocyte nodulation in *Spodoptera exigua*

두 물질은 모두 낮은 농도에서도 파밤나방 혈구세포의 소낭 형성 반응을 억제시켜, 세포성 면역반응을 억제시킨다는 사실을 뒷받침하고 있다.

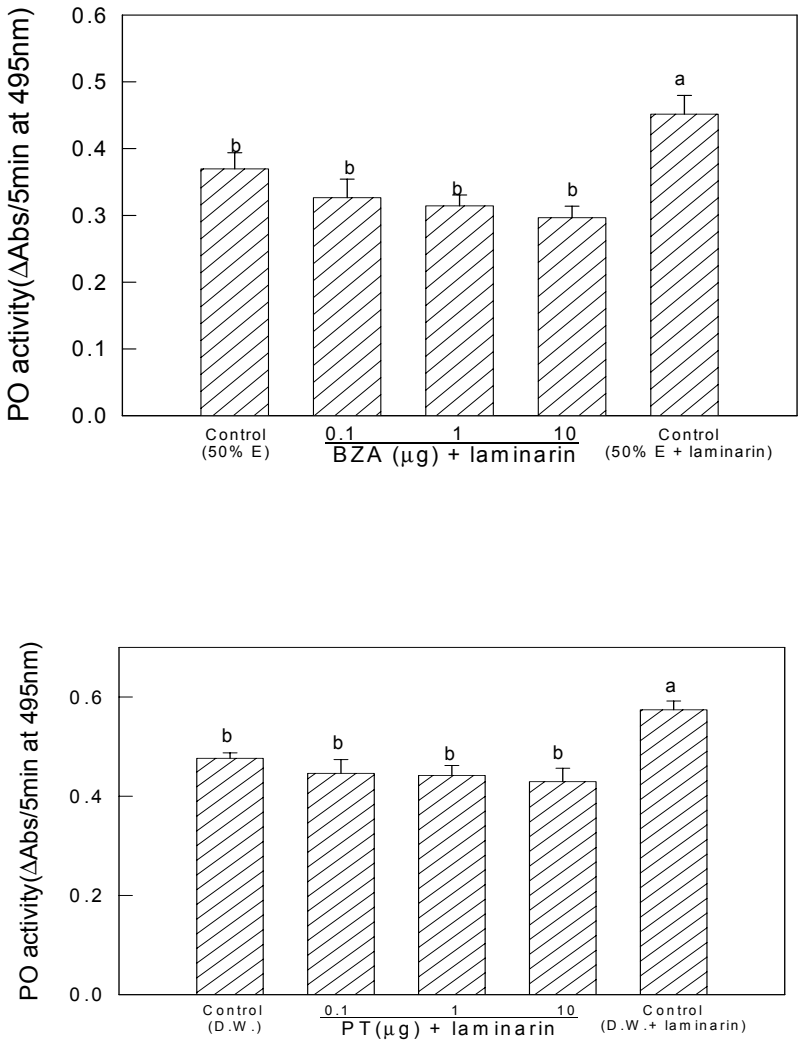


Fig. 31. Inhibitory effects of benzylideneacetone (BZA) and proline-tyrosine (PT) on phenoloxidase (PO) activation in *Spodoptera exigua*

이 두 물질은 또한 laminarin과 같은 항원에 대해서 PO 활성화 유도를 억제시키는 것으로 나타났다. 즉, 이 두 물질은 면역반응의 두 가지 형태인 세포성 면역반응과 체액성면역반응을 모두 억제시키는 것으로 나타났다.

제3차년도에서 이 두 물질이 직접적으로 PLA2 활성을 억제하는 지를 다양한 종말점을 이용하여 분석하였다. 먼저 곤충의 지방체 세포막 추출물과 PLA2 추출물 혼합액에 두 물질을 각각 첨가시킨 후 AA의 방출여부를 gas chromatography로 분석하였다.

Table 29. Inhibition of arachidonic acid release from fat body membrane preparation by PLA2 inhibitors purified from culture broth for *Xenorhabdus nematophilus*.

Hydrolyzed fatty acids	Control	PLA2 extract containing (peak area, x100)				
		50%EtOH	11-1	15-1	17-3	18-1
14:0	0.0±0.0	0.1±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.1	0.1±0.1
16:0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
16:1	0.1±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
16:2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
18:0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
18:1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
18:2	0.7±0.0	0.4±0.2	0.5±0.1	0.3±0.0	0.10±0.2	0.1±0.2
20:4	7.3±6.4	68.8±9.8	8.5±1.1	9.6±1.1	7.7±2.0	6.0±5.9

이상의 결과는 두 물질 (#11-1, #17-3/#18-1)은 AA (20:4)의 방출을 뚜렷하게 억제한다는 것을 밝히고 있다.

다음은 이 두물질이 각각 농도별로 PLA2 억제 효과를 분석하였다. 기존의 연구는 파밤나방에서 PLA2 억제와 PO (phenoloxidase) 활성억제와는 직접적 관련성이 있다고 밝혔다. 이러한 기능적 연결고리를 이용하여 PLA2의 활성 억제를 분석이 용이한 PO 활성을 통해서 분석하였다.

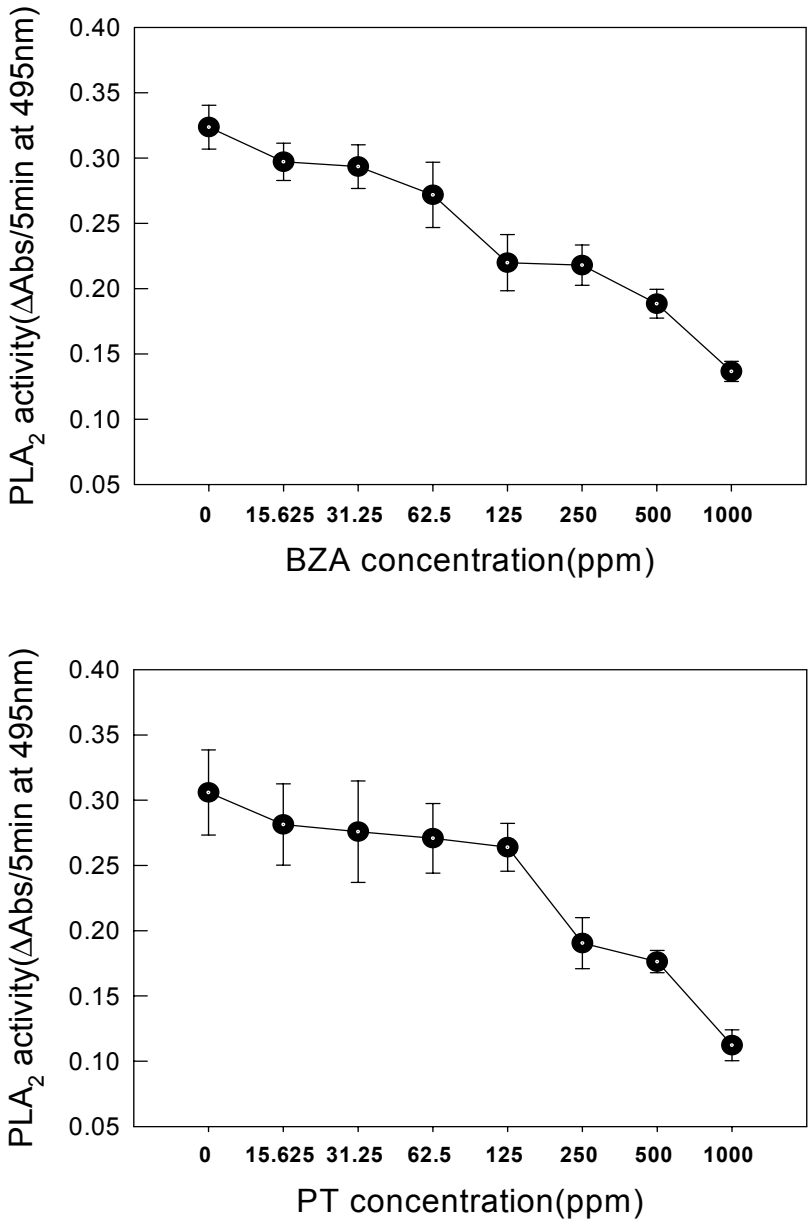


Fig. 32. Inhibitory effects of benzylideneacetone (BZA) and proline-tyrosine (PT) on PLA2 activity which were indirectly measured by linked enzyme activity of phenoloxidase in *Spodoptera exigua*

낮은 농도의 BZA과 PT에서도 파밤나방의 혈구세포 PLA2는 억제되었다. 이때 두 물질의 협력 작용에 대해서 가설을 세웠다. 즉, 곤충 면역에 관여하는 PLA2가 이종 이사이라면, 이 두 물질이 각각에 대해서 선택성을 가진다는 가설이다. 이러한 결과는 두 물질이 서로 다른 PLA2를 억제시킬 수 있다는 결과이다. 이를 증명하기 위해 동일량의 단독 또는 혼합 억제제를 준비하여 억제 효과를 비교하였다.

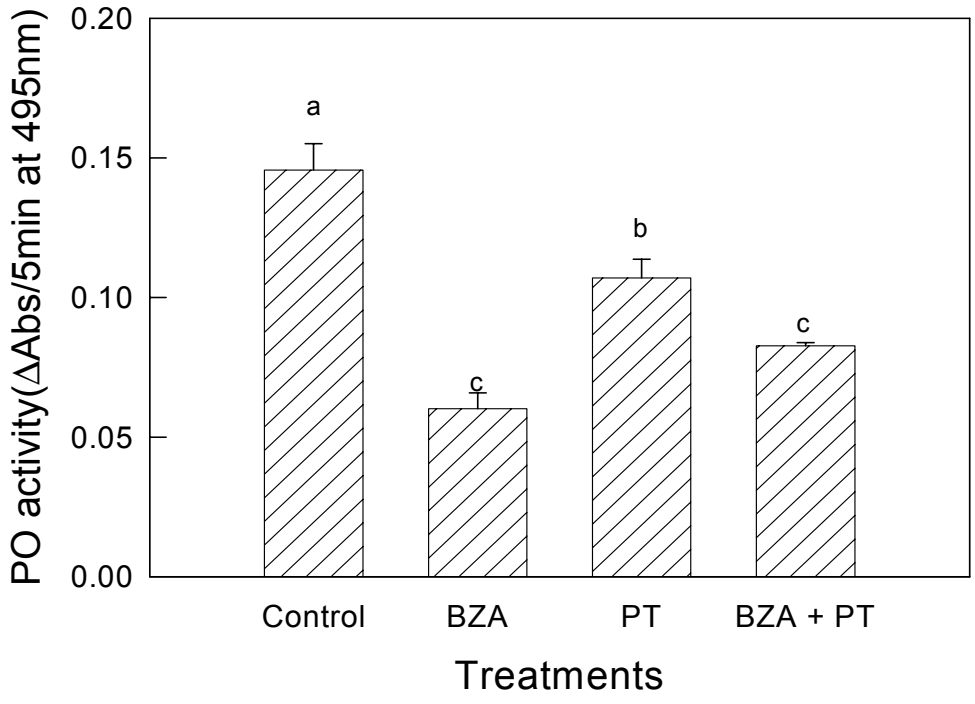


Fig. 33. Any synergistic effect of two PLA2 inhibitors, benzylideneacetone (BZA) and proline-tyrosine (PT) on PLA2 activity which were indirectly measured by linked enzyme activity of phenoloxidase in *Spodoptera exigua*

이상의 결과는 두 물질의 혼합액이 단독 물질의 PLA2 억제보다 높은 억제력을 발휘하지 못했다는 결과를 보여주었다. 이는 곤충의 면역에 관여하는 PLA2가 이종 이상일 수 있다는 가설을 지지하지 못하고 있다.

제6절 곤충병원세균의 세포치사 효과

ANU-Xn101은 곤충의 혈구세포에 대해서 세포치사 효과를 보이는 것으로 2-3차년도 연구 결과로 판명되었다. 이들 결과를 세포 치사 작용이 어떻게 비롯되었는지 그리고 세포치사 진행과정 및 관련 물질의 차례로 서술한다.

자연세포치사 과정을 유발하기 위한 활성산소 (reactive oxygens)의 유래 살펴보기 위해 FAD-linked glucose dehydrogenase (GLD) 활성이 세균 접종후 시간별로 분석되었다. GLD 활성은 공생세균을 접종한 후 2-4시간 사이에 활성이 높아진 후 4시간 이후부터는 활성이 관찰되지 않았으며, 2-4시간 사이의 활성은 무처리구로 PBS를 접종한 혈림프와 비교하여 통계적으로 유의차가 났다.

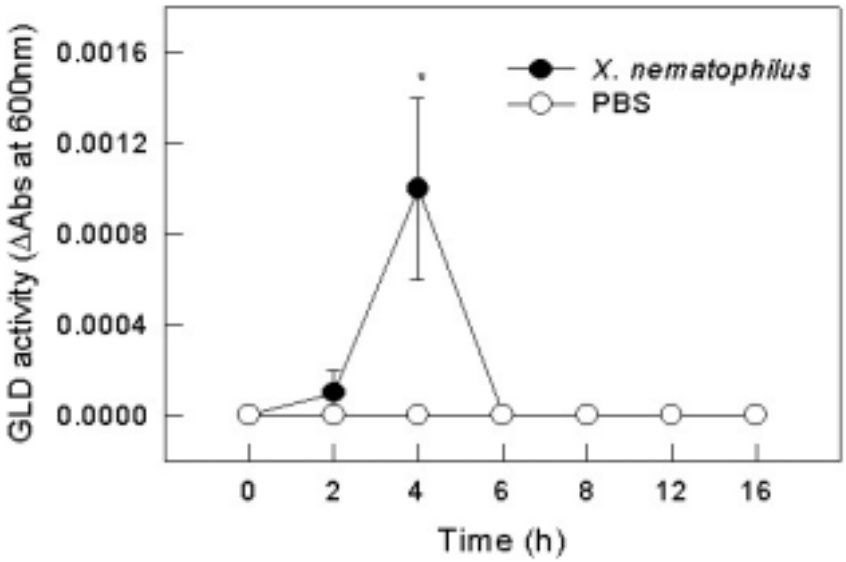


Fig. 34. Temporal activity changes of glucose dehydrogenase after the injection of *Xenorhabdus nematophila* into the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*.

혈구 세포치사의 시간대 조사에서 혈구세포의 nucleus 응축이 공생세균을 접종한 후 4시간부터 발견되었고, 12시간이 되었을 때는 0시간과 비교하여 완전한 혈구세포의 모습을 관찰하기 어려웠다.

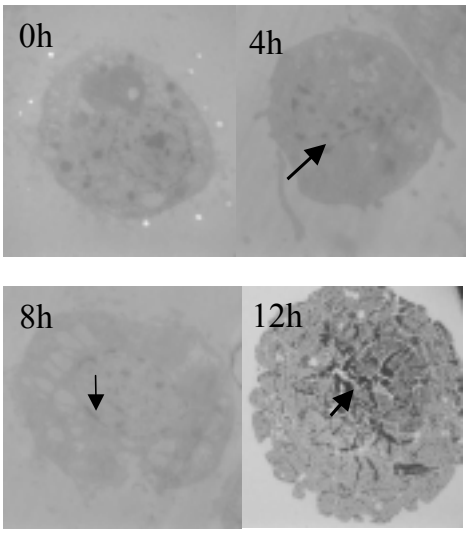


Fig. 35. Photographs of hemocytes of the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophila* by transmittion electron microscope

다음으로 혈구세포중에서 가장 세균에 따른 세포치사 효과가 뚜렷하게 나타난 혈구 집단을 분석하였다. 공생세균을 접종한 후 시간이 지날수록 0.04% trypan blue 용액

에 염색되는 혈구세포의 수가 증가하였다. 이는 살아있는 혈구세포의 수가 점차적으로 감소한다는 의미로서, 공생세균 접종 후 12시간에는 약 29.3%의 혈구세포만이 살아 있었다. 특히 과립혈구는 0시간대와 비교해서 12시간대에는 약 15.8%의 혈구세포만이 살아있어서 공생세균에 의해서 가장 많은 영향을 받은 것으로 조사되었으며, 부정형혈구는 12시간대에 약 48.9%의 혈구세포 많이 살아있었다.

Table 30. Effect of *Xenorhabdus nematophila* on the hemocytes of the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*

Time (h) at post-injection	N[1]	Total live hemocyte[2] count (104/㎖	Remaining live hemocytes		
			GR	PL	Others[3]
			%[4]	%	%
0	3	98.0±3.2 a	100.0±2.5	100.0±0.6	100.0±3.3
4	3	85.3±7.2 b	84.2±3.6	91.4±1.2	89.4±1.2
8	3	47.0±3.6 c	47.0±5.8	70.2±0.6	59.0±4.7
12	3	29.3±6.1 d	15.8±2.1	48.9±0.6	46.0±2.0

[1] Number of measurements.

[2] Live hemocyte was determined by dye-exclusion method

[3] Others represent the hemocytes other than granulocytes (GR) and plasmatocyte (PL).

[4] Percent (%) is calculated by the relative proportion of the remaining hemocyte count at a specific post-injection time divided by the hemocyte count at 0 h.

[5] Means followed by different letters were significantly different at α=0.05.

이러한 곤충 혈구세포에 대한 세포치사 효과는 누에 (*Bombyx mori*)에 대해서도 확인되었다 (Cho and Kim, 2004). 여기에서는 *X. nematophila* 뿐만 아니라 *X. koreana*와 *P. temperata temperata*가 모두 누에의 혈구 세포치사효과를 유발한다는 것이 밝혀졌다.

다음은 ANU-Xn101로부터 유래한 세포치사 유발 물질을 동정하는 작업에 착수하였다. 물질의 분획구는 파밤나방 혈구세포 apoptosis 유발 현상 (membrane

blebbing)을 종말점으로 추적하였다. 세균 배양액을 우선 부타놀에 의해 유기용매층과 물층으로 나누었다. Apoptosis는 유기용매층에서만 나타났다. 다음으로 크로마토그라피 (silica gel, 70-230 mesh, Merck, Germany)를 이용하여 이동상 구배 (CHCl3/methanol, 99:1 → 0:100, v/v) 조건에서 물질 14개 분획구로 분리하였다. 이때 비극성 분획구 (#2)와 극성 분획구 (#12, 14)에서 각각 활성을 보였다. 낮은 sdhehwhrjs에서 활성이 높게 나오는 비극성 분획구 (#2)를 다시 비극성 이동상 구배 (hexane/ethyl acetate, 3:1 → 1:3, v/v)로 다시 9개의 분획구를 받았다. 이때 #2, 3, 8, 9dml 4개 분획구가 활성이 있는 것으로 나타났고, 이중 #3번의 분획구가 낮은 농도에서도 높은 활성을 보였다. 이 분획구에 대한 물질 동정이 이뤄지고 있다.

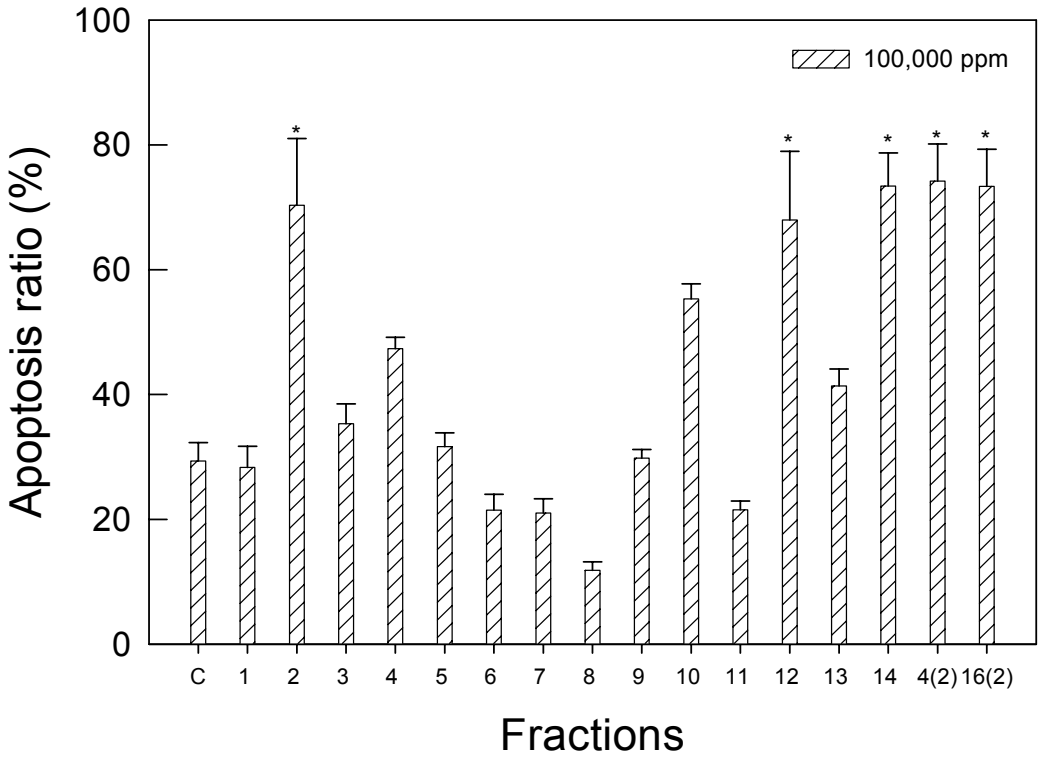


Fig. 36. Apoptosis-inducing factor from *Xenorhabdus nematophila* (ANU-Xn101). The assay used membrane blebbings on the hemocytes of *Spodoptera exigua*.

제7절 제노랍두스네마토필라 (ANU-Xn101)가 생산하는 활성물질 분리정제 및 구조분석

1. 곤충 인지질분분해효소(PLA2)의 활성 억제물질 분리

공생세균의 배양액(5L)에 n-butanol을 가하여 48시간 동안 상온에서 추출하였다. 추출조작은 재반복하였으며 추출 후, 상등액만을 취하여 분액여두에 넣고 H_2O를 가하여 aqueous fraction을 제거한 후 감압·농축하였다. 농축된 butanol 추출물(32.7 g) 전량을 silica gel column chromatography (230-400 mesh, Merck, Germany)에 충진시킨 후 Chloroform ($CHCl_3$)/methanol (MeOH)의 용매계로 methanol의 비율을 높여가며 순차적으로 용출(step-wise)시켰다. 분리된 용리물은 TLC(Thin layer chromatography)상에서 $CHCl_3$/MeOH 10:1의 용매로 전개시킨 후 UV(254 nm, 365 nm)의 흡수양상과 20% 황산으로 발색시 나타나는 점적의 모양에 따라 모아 비극성 분획에서부터 극성분획까지 총 20개의 분획물로 나누었다. 이 분획물에 대한 PLA2 활성억제율을 조사하였다. 그 중 11, 15, 17 및 18이 높은 억제율을 나타냄으로서 이들을 중심으로 정제해 나갔다. 각각의 정제과정은 아래와 같다.

가) Fraction 11 (fig. 37)

분획물 전량을 Silica gel c.c.에 충진시킨 후 hexane/ethyl acetate 3:1의 용매로 용출하여 TLC 상에서의 점적의 모양에 따라 3개의 소분획으로 정제하였다. 하나의 주점적을 확인하여 11-1로 하였고 나머지는 점적이 뚜렷하지는 않았으나 R_f 값에 따라 크게 두개의 분획으로 나누었다. 이들 소분획의 PLA2 활성 억제효과를 측정하였는데, 예상대로 3개의 분획물 중 11-1(5.8 mg)이 가장 뚜렷한 효과를 나타내었다. 최종 정제도를 확인하기 위하여 TLC와 HPLC 분석(fig. 38)을 실시하였으며 R_f 값이 0.55로서 단일점적으로 나타났다. 또한 HPLC 분석에서 one pick로 나타났으며, mass와 NMR 구조 분석을 통해 구조를 동정하였다. HPLC 분석조건은 다음과 같다; column, Nova-Pak C_{18} (3.9×300 mm); solvent, 45% acetonitrile (0.05% acetic acid in H_2O); detection, 282 nm.

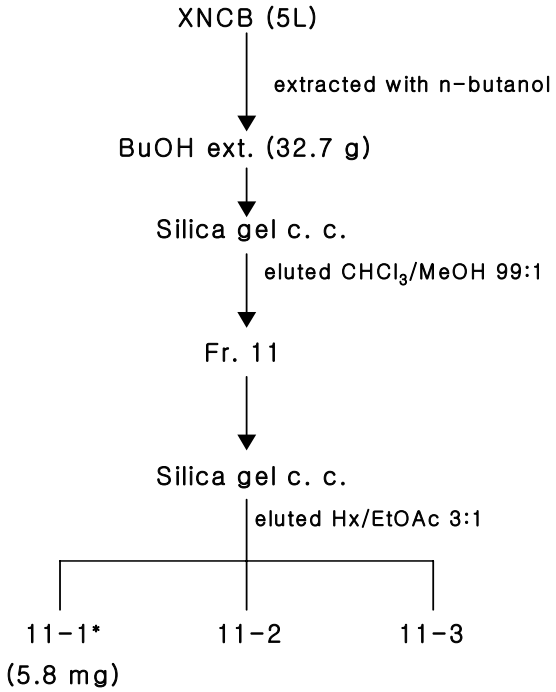


Fig. 37. Schematic procedure for isolation and purification of phospholipase A2 inhibitor Fr.11-1 from *Xenorhabdus nematophilus*

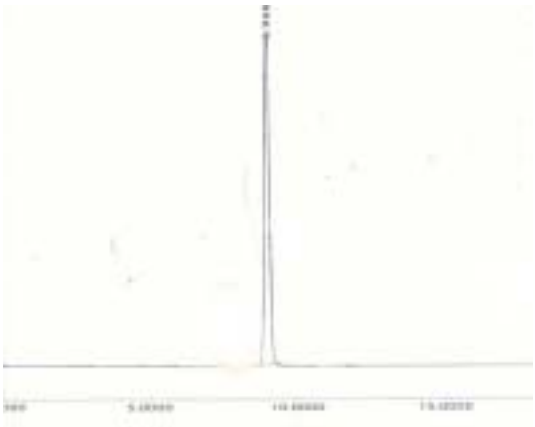


Fig. 38. HPLC chromatogram of fraction 11-1 isolated from *Xenorhabdus nematophilus*

나) Fraction 15 (fig.39)

15번 분획물은 순도가 다소 우수한 상태였으므로 Prep-HPLC를 이용하여 분리하였다. HPLC 용매는 0.45㎛ membrane filter (German S., Michgan, USA)로 여과한 후 진공펌프로 탈기시켜 사용하였다. 시료는 미리 활성화시켜 놓은 Sep-pak C_{18} cartridge에 흡착시킨 다음 재증류수로 세척한 후 50% MeOH으로 용출시켜 농축한 후 사용하였다. HPLC 분리는 고정상으로 Prep Nova-Pak C_{18} (19×300 mm) column을 이용하였고 40% MeOH (0.05% acetic acid in H_2O)을 이동상으로 하였다. 이 때 유속은 10 ml/min 이었으며, UV 검출은 282 nm에서 시행하였다. 두 개의 소분획으로 분리되었으며 각각의 TLC R_f 값은 15-1이 0.17, 15-2는 0.19 으로서 둘 다 단일 점적으로 나타났다. 이 중 PLA2 활성 억제효과를 나타낸 분획은 15-1(7.9 mg)이었으며 정제도를 재확인하기 위하여 HPLC 분석(fig. 40)을 실시하였다. 순도가 99.6%로 확인되어 거의 one compound임을 알았다. Mass와 NMR을 통해 구조를 동정 중이다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다; column, Nova-Pak C_{18} (3.9×300 mm); solvent, 45% acetonitrile (0.05% acetic acid in H_2O); detection, 282 nm.

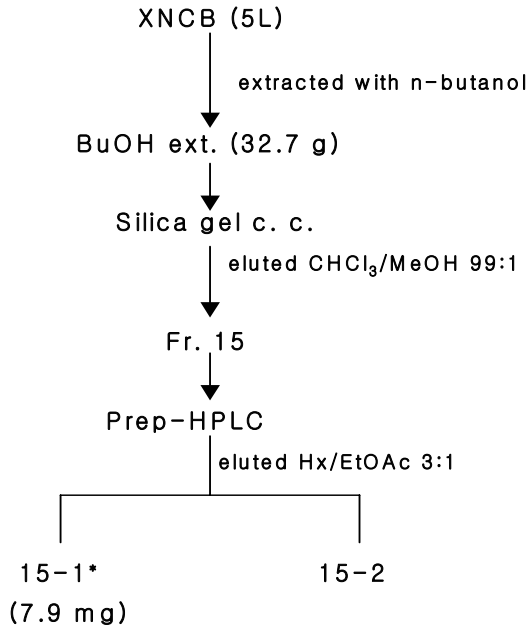


Fig. 39. Schematic procedure for isolation and purification of phospholipase A2 inhibitor Fr.15-1 from *Xenorhabdus nematophilus*

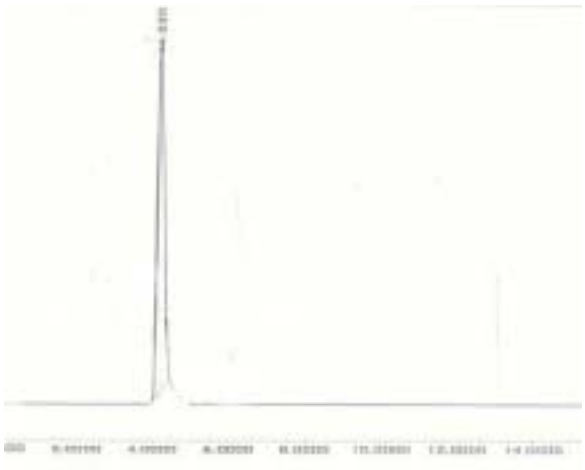


Fig. 40. HPLC chromatogram of fraction 15-1 isolated from *Xenorhabdus nematophilus*

다) Fraction 17 (fig. 41)

17번 분획물을 Silica gel c.c.에 충진시킨 후 $CHCl_3$/MeOH 20:1의 용매로 용출시켜 세 개의 소분획으로 분리하였으며, 이 중 PLA2 활성억제 효과를 나타낸 17-3의 정제도를 더욱 높이기 위하여 Prep-HPLC를 실시하였다. HPLC 분리는 고정상으로 Prep Nova-Pak C_{18} (19×300 mm) column을 이용하였으며 40% MeOH (0.05% acetic acid in H_2O)을 이동상으로 하였다. 이 때 유속은 10 ml/min 이었으며, UV 검출은 282 nm에서 시행하였다. 분리물 중 최종 주물질로 확인된 17-3-2(18 mg)의 정제도를 확인하기 위하여 TLC와 HPLC 분석(fig. 42)을 실시하여 one compound임을 알았다..

HPLC 분석조건은 다음과 같다; column, Nova-Pak C_{18} (3.9×300 mm); solvent, 40% MeOH (0.05% acetic acid in H_2O); detection, 282 nm.

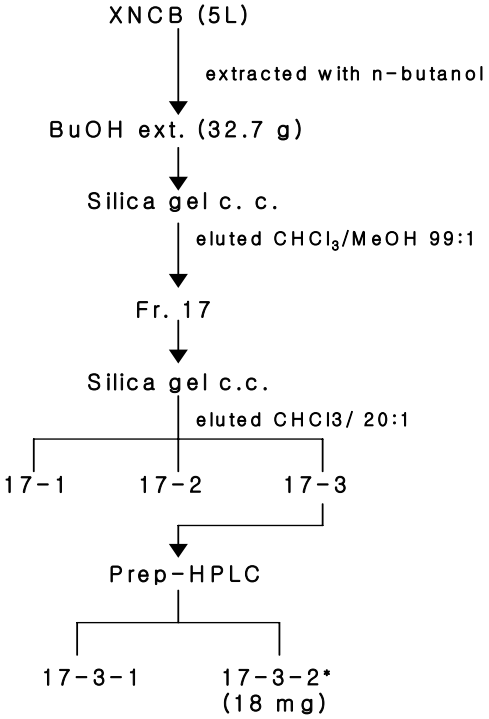


Fig. 41. Schematic procedure for isolation and purification of phospholipase A2 inhibitor Fr.17-3-2 from *Xenorhabdus nematophilus*

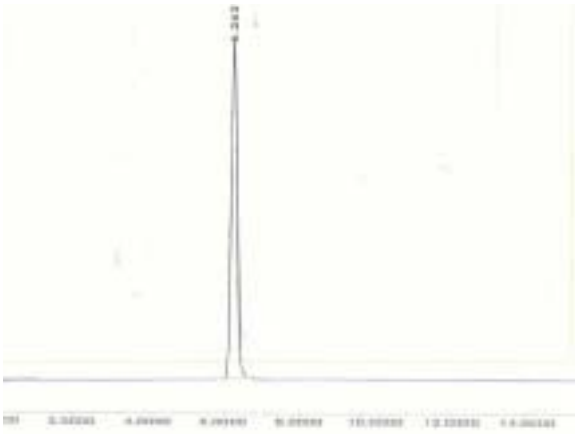


Fig. 42. HPLC chromatogram of fraction 17-3-2 isolated from *Xenorhabdus nematophilus*

라) Fraction 18 (fig. 43)

18번은 역상 chromatography인 ODS c.c.를 이용하여 분리하였다. column에 18번 전량을 충진시킨 후 10% MeOH(in H_2O)에서 100% MeOH으로 순차 용출시켰다. 세 개의 소분획물로 나눈 후 PLA2 활성억제를 조사하여 18-1이 효과가 높음을 확인하였다. 18-1의 정제도를 확인하기 위하여 TLC와 HPLC 분석을 실시하였고 그 결과 18-1은 17-3-2의 R_f value와 retention time의 양상으로 볼 때 동일물질이라 예상되었다. Mass와 NMR을 통해 구조를 동정한 결과 같은 물질로 판명되었다.

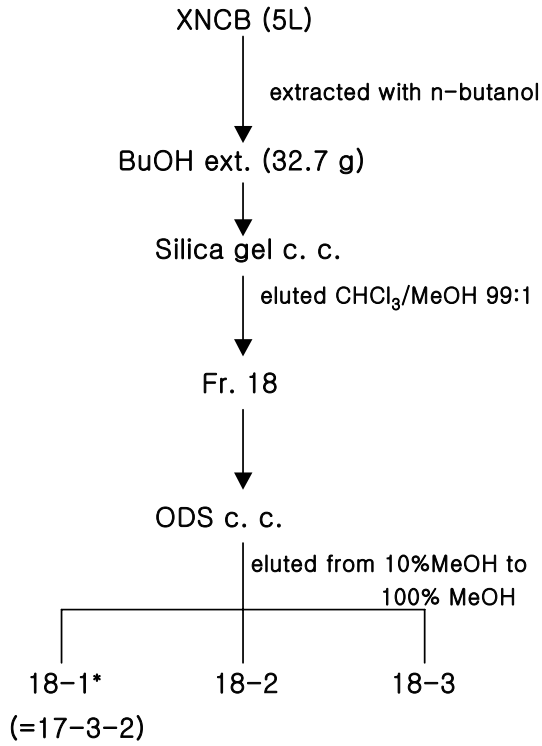


Fig. 43. Schematic procedure for isolation and purification of phospholipase A2 inhibitor Fr.18-1 from *Xenorhabdus nematophilus*

Table 31. R_f values of three compounds isolated from *Xenorhabdus nematophila*
[1]Developed in silica gel by descending method at 25℃ using following solvent system; $CHCl_3$/MeOH (10:1, lower layer)

compounds	R_f values[1]
11-1	0.55
15-1	0.17
17-3-2	0.23

2. 구조 동정 결과

가. BZA(benzylideneacetone) ; fraction #11-1
이 화합물 142℃의 용해점을 가지고 있으며($CHCl_3$-EtOH) 무색이다. 그리고 IR-spectrum으로 α,β-unsaturated ketone(1675 cm^{-1})과 phenyl(1615 cm^{-1})의 흡수 밴드를 확인하였다. Monosubstituted-benzene {(d 7.58, 1H x 2, dd, *J*=7.2, 2.0 Hz), (d 7.39, 1H x 3, m)} 과 *trans*-olefine methines{(d 7.63, 1H, d, *J*=16.0 Hz), (d 6.48 (1H, d, *J*=16.0 Hz))} 과 allyl methyl (d 2.10, 3H, s) 피크를 ^{1}H-NMR spectrum에서 10개의 탄소를 ^{13}C-NMR spectrum로써 확인하였다. phenyl {δ_C 135.84 (s), δ_C 131.13 (d), δ_C 129.86 (x2, d), δ_C 128.99 (x2, d)}, ketone (δ_C 209.86, s), 2개의 olefine methines(δ_C 145.62, δ_C 119.98, both d)과 methyl(d_C30.71, q)carbon를 확인하였다.

Phenyl기에 side chain으로 결합된 구조는 1H-1H COSY와 gHSQC와 gHMBC를 포함하는 2-D NMR 스펙트럼의 해석을 통해 3-butenyl-2-one (Fig. 5B)로 동정되었다. 분자량과 분자식은 저해상도에서 고해상도로 EI/MS를 사용해서각각 146과 C10H10O로 결정되었다. 결과적으로 항균성 화합물은 Benzenoid계열의 trans-4-phenyl-3-buten-2-one로 동정되었으며 이것은 benzylideneacetone 이라고도 불리운다.

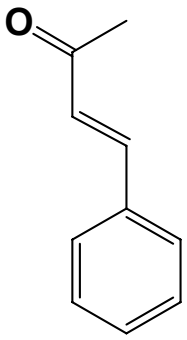


Fig. 44. Chemical structure of the purified antibacterial compound, *trans*-4-phenyl-3-buten-2-one or benzylideneacetone, synthesized and secreted by *Xenorhabdus nematophila* K1. The chemical identification was performed by gas chromatography-mass spectrometry and confirmed by NMR study.

나. PT(proline-tyrosine) ; fraction #17-3, fraction #18-1

proline 이라는 아미노산과 tyrosine 이라는 아미노산이 탈수 축합한 화합물 구조로 동정되었다.

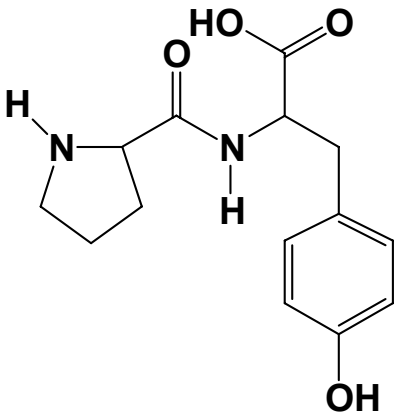


Fig. 45. Chemical structure of the purified antibacterial compound. The chemical identification was performed by gas chromatography-mass spectrometry and confirmed by NMR study.

3. 공생세균으로부터 항균활성 물질의 분리

공생세균의 배양액(5L)에 n-butanol을 가하여 48시간 동안 추출하였다. 상등액만을 취하여 분액여두에 넣고 H_2O를 가하여 aqueous fraction을 제거한 후 감압·농축하였다. butanol 추출물(32.7 g) 전량을 silica gel column chromatography (230-400 mesh, Merck, Germany)에 충진시킨 후 Chloroform($CHCl_3$)/methanol(MeOH)의 용매계로 methanol의 비율을 높여가며 순차적으로 용출(step-wise)시켰다. 분리된 용리물은 TLC(Thin layer chromatography)상에서 전개시킨 후 UV(254 nm, 365 nm)의 흡수양상과 20% 황산으로 발색시 나타나는 점적의 모양에 따라 모아 20개의 분획물로 나누었다. 이 분획물에 대한 항균활성을 조사하였다. 그 중 2, 10 및 11에서 높은 활성을 나타내었으므로 이들을 중심으로 정제해 나갔다. 11번 분획물은 PLA2 활성 억제효과를 함께 나타내어 동시에 분리가 진행되었다. 2번 분획물은 hexane/ethyl acetate 용매계를 이용한 silica gel c.c.를 실시하여 세 개의 소분획물로 분리하였다. 이 중 2-2의 활성이 높게 나타나 현재 분리 진행 중에 있다.

제8절 제노랍두스네마토필라 (ANU-Xn101) 대량배양 공정 최적화

1. 플라스크 및 5L jar fermentor에서 세포 성장 최적화 조건 탐색

가. 탄소원 및 질소원에 대한 영향 조사

공생세균의 탄소원에 대한 영향을 보기 위하여 다양한 탄소원을 대상으로 그 효과를 조사하였다. 대상 탄소원으로는 glucose, fractose, galctose, maltose, sucrose, lactose, cellobiose, xylose, glycerol, arabinose, potato starch, manitol, dextrose을 사용하였다. 그 결과 다음의 Fig. 46와 같이 glactose, mannose, Fractose등의 탄소원을 선호하는 것으로 나타났다. 그러나 이와 같은 탄소원들은 산업용으로 이용하기에는 경제성이 낮다. 따라서 이와 같은 탄소원에 비해 균주의 성장은 비교적 낮지만 가격에서 경쟁력이 있는 glucose을 선정하여 사용하기로 하였다. 산업용으로 쓰는 glucose는 600원/kg으로 일반적인 미생물 배양에 탄소원으로 가장 많이 사용되고 있다.

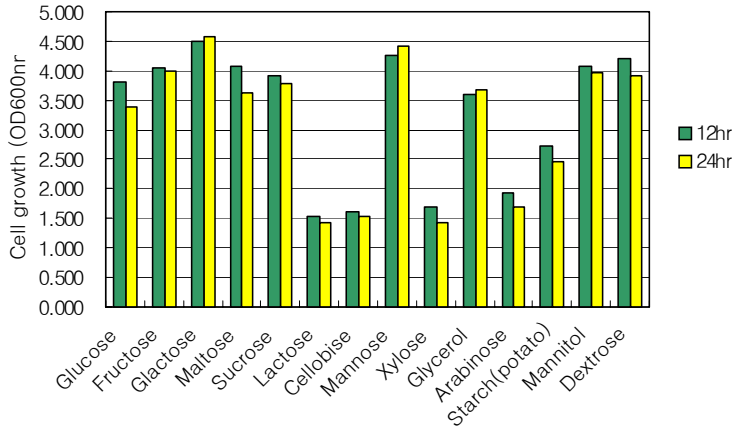


Fig. 46. Effect of various carbon sources on cell mass in the cultivation of *Xenorhabdus nematophilus*

질소원의 효과를 조사하기위하여 soybean meal, proteous peptone, bacto- peptone, peptone G, soytone, tryptone, yeast extract, hydrolyzed casein, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2PO_4$, NH_4Cl, NH_4NO_3등을 사용하였다. 그 결과는 다음의 Fig. 와 같이 yeast extract와 soybean meal등의 이용성이 높은 것으로 나타났다. 따라서 질소원으로는 yeast extract를 선정하여 사용하였다.

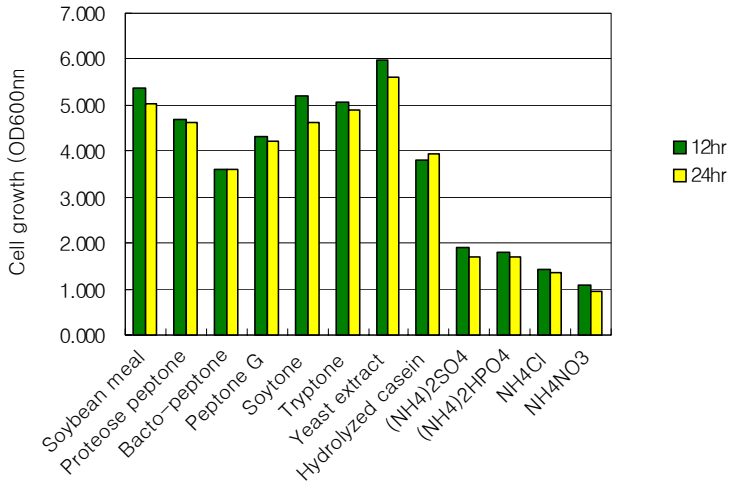
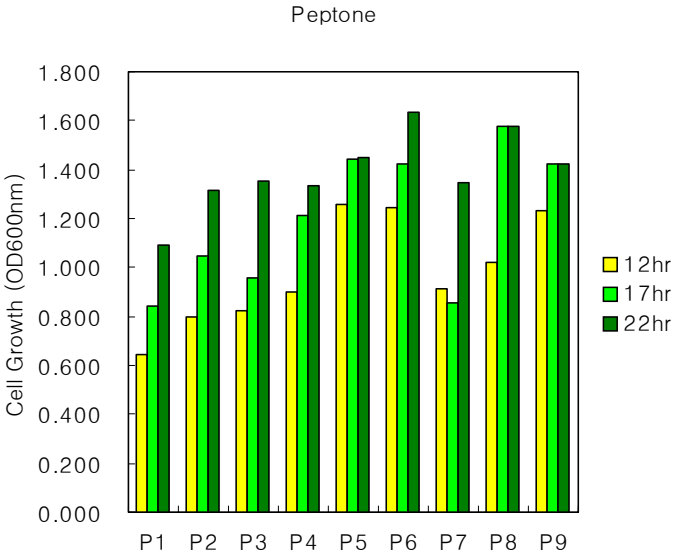


Fig. 47. Effect of various nitrogen sources on cell mass in the cultivation of *Xenorhabdus nematophila*

나. 펩톤의 영향

대량 발효 및 pilot plant에서 미생물 배양시 질소원 및 비타민 영양공급원으로 peptone류의 배지를 많이 사용하고 있다. 따라서 pacreatic digest of gelatin, pancreatic digest of pork heart, pancreatic digest of casein, peptone Q24, fish peptone, broad bean peptone, papaic soy peptone, weat peptone, M9 minimal medium를 control로 사용하였다. 그 결과 다음의 Fig. 48과 같이 broad bean peptone이 가장 효과적으로 나타났다. *Xenorhabdus nematophilus*가 선충공생세균이면서 곤충체내에서 증식하므로 동물성 peptone을 선호할 것으로 기대하였으나 결과는 식물성 peptone를 더 선호하는 것으로 나타났다.



P1: pancreatic digest of gelatin
P2: pancreatic digest of pork heart
P3: pancreatic digest of casein
P4: peptone O-24
P5: Fish peptone
P6: Broad bean peptone
P7: papaic soy peptone
P8: wheat peptone
P9: control

Fig. 48. Effect of various peptone on cell mass in the cultivation of *Xenorhabdus nematophila*

다. 배양pH의 영향

공생세균을 5L jar fermentor(한국발효기, 한국)를 이용하여 pH를 각각 6.0, 6.5, 7.0, 7.5로 NH_4OH와 함께 조절하면서 배양을 한 결과이다. 그 결과 pH 7.5에서 가장 좋은 성장을 보였다.

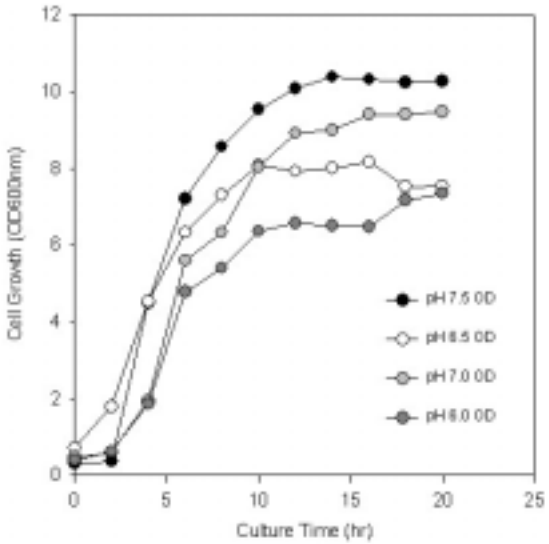


Fig. 49. Grow th of Xn at different pH in enrichment in medium.
cultuer condition : temp. 30℃, aeration 0.25vvm, agitation 100 - 500rpm, culture vol. 2L.

라. 배양온도의 영향

공생세균의 최적 배양 온도를 조사하기 위하여 TSA배지에 공생세균을 접종하고 20, 25, 30, 35℃에 각각 배양을 한 결과 다음의 표와 같다. 공생세균은 30℃에서 가장 잘 자라는 것으로 나타났다 (Table 32). 따라서 배지조건 및 배양 최적화를 위한 실험은 30℃로 조절하여 시행하기로 하였다.

Table 32. Growth of *Xenorhabdus nematophilus* at different temperatures in TSA(Trytic soy agar)

Strain	Growth			
	20℃	25℃	30℃	35℃
Xenorhabdus nematophilus	+	++	+++	++

+; slightly growth, ++; good growth, +++, very good growth

라. 반응표면 분석

본 실험에 이용한 중심합성계획은 Table 33.와 같이 표준화된 값을 사용하여, 전체 39개의 실험조건에서의 각각의 세포 생산성에 대한 결과를 Table 34. 에 나타내었다. 세포의 생산성 결과를 다중회귀분석을 통하여 반응표면방정식 계수 및 상관계수를 결정하였으며, 세포생산성의 상관계수는 0.78~0.88이었다.

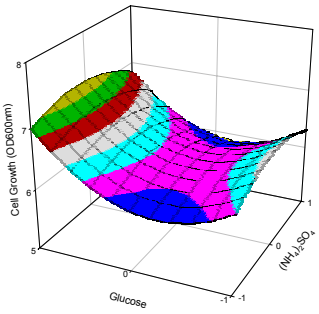
Table 33. Standardization in three levels of each factor in various culture conditions.

Factor	Symbols	Culture Condition			Standardized levels		
Time(hr)	X1	10	12	14	-1	0	1
Glucose	X2	1	1.54	2.31	-1	-0.18	1
Yeast Extract	X3	3	4	5	-1	0	1
$(NH_4)_2SO_4$	X4	0.2	0.4	0.8	-1	0	1

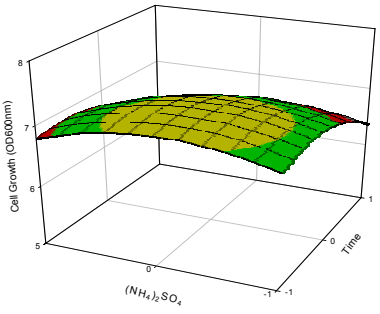
Table 34. Bacterial production over standardized factors in various culture condition

Run No.	Dependent Parmeter				Independent Parameter
	Time(hr)	Glucose(g/L)	Yeast(g/L)	$(NH_4)_2SO_4$(g/L)	
1	-1	-1	-1	-1	5.160
2	-1	-1	-1	1	6.435
3	-1	-1	0	0	6.075
4	-1	-1	1	-1	6.480
5	-1	-1	1	1	6.300
6	-1	-0.18	-1	0	5.370
7	-1	-0.18	0	-1	5.595
8	-1	-0.18	0	1	5.565
9	-1	-0.18	1	0	5.865
10	-1	1	-1	-1	5.835
11	-1	1	-1	1	5.970
12	-1	1	0	0	7.065
13	-1	1	1	-1	7.560
14	0	-1	-1	-1	6.030
15	0	-1	-1	1	6.030
16	0	-1	0	0	6.480
17	0	-1	1	-1	6.225
18	0	-1	1	1	5.625
19	0	-0.18	-1	0	5.655
20	0	-0.18	0	-1	5.880
21	0	-0.18	0	1	5.925
22	0	-0.18	1	0	6.135
23	0	1	-1	-1	6.525
24	0	1	-1	1	6.570
25	0	1	0	0	7.020
26	0	1	1	-1	7.125
27	1	-1	-1	-1	5.910
28	1	-1	-1	1	5.790
29	1	-1	0	0	6.480
30	1	-1	1	-1	5.175
31	1	-1	1	1	5.130
32	1	-0.18	-1	0	5.310
33	1	-0.18	0	-1	5.745
34	1	-0.18	0	1	5.370
35	1	-0.18	1	0	5.955
36	1	1	-1	-1	5.940
37	1	1	-1	1	5.940
38	1	1	0	0	6.870
39	1	1	1	-1	5.595

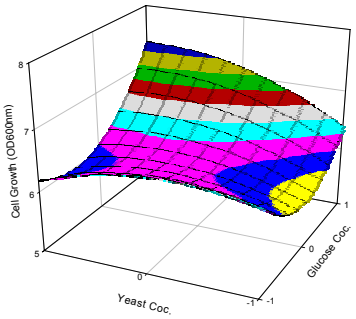
이는 독립변수인 배양시간, 탄소원 및 질소원, $(NH_4)_2SO_4$농도에 따른 세포생산에 관해 잘 설명되고 있음을 알 수 있다. 또한 3차원 그래프로 분석한 결과 Fig. 49.에서 보여주고 있는 것처럼 세포생산에 대한 각각의 변수의 영향을 살펴 볼 수 있었다.



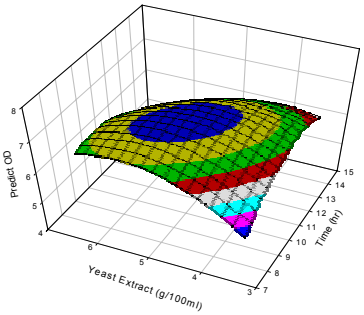
(A)



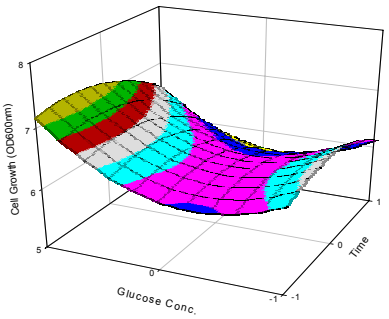
(B)



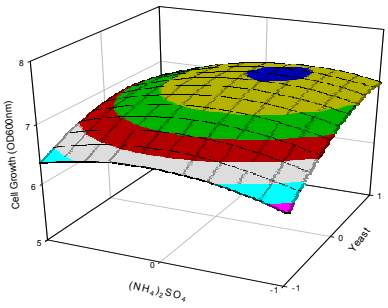
(C)



(D)



(E)



(F)

Fig. 50. 3-D response surface in second scanning to the production of cell according to the variation of carbon source concentration and time(A) and $(NH_4)_2SO_4$ and time(B), yeast extract concentration and time(C), yeast & glucose concentration(D), glucose & $(NH_4)_2SO_4$(E), $(NH_4)_2SO_4$ & Yeast concentration(F).

마. 최적조건에서의 세포 생산성 검토

실험조건인 배양시간, 탄소원 및 질소원의 농도, $(NH_4)_2SO_4$농도 변화에 대한 세포생산성의 반응표면을 분석을 한 결과 최대치를 주는 stationary point가 존재하였고, 이점에서 결정된 최적의 조건을 Table 35.에 나타내었다.

분석결과를 검증하기 위하여 최적조건 결정값의 실험조건에서 배양하여 세포생산성을 분석하여, 그 결과를 Table 35.에 나타내었다. 모든 세포생산성에 관련된 실험값은 예측값보다 아주 근소하게 낮았으나 거의 일치하는 것으로 나타났다. 기존의 TSB에서의 배양조건은 세포의 성장이 3.01으로 나타나는데, 최적조건으로 배양한 결과 6.915로 기존의 배지 조건 보다 약 43.5% 향상됨을 보여 주고 있다.

Table 35. Predicted optimum condition by analysis of response surface.

Factor	X1 Time	X2 Glucose	X3 Y.E	X4 $(NH_4)_2SO_4$	Predicted values
SAS analysis	11.73	2.29	4.18	0.4	6.940
Expeirmental results	11.73	2.29	4.18	0.4	6.915

Y.E: Yeast Extract

바. 5L jar fermentor 에서의 최적화 공정

1) Intermittant fed-batch fermentation

공생세균의 배지 최적화 실험은 탄소원 및 질소원 선정 실험을 통하여 탄소원은 glucose, 질소원은 yeast extract로 선정하였다. 기타 미량원소는 trace elemsent 1ml/L를 첨가하였고 그 외 pH, 온도, agitation aeration등의 여러 가지 발효 parameter를 최적한 결과 최종 배양한 결과 다음의 Fig. 50.과 같이 나타났다. 발효조건은 온도는 25℃, pH는 NH_4OH를 이용하여 7.5로 유지하였다. DO는 agitation은 100~900으로 조정하여 2%이상을 유지하였다. Aeration은 0.5vvm으로 유지하였다. 발효은 intermittent fed-batch방식으로 탄소원인 glucose가 고갈되면 탄소원과 질소원을 각각 20g, 10g를 첨가하여 세포의 성장을 고농도 배양되게 하였다. 이 결과에 의하면 세포의 성장은 76 OD (600nm)로 나타났다. 생균수는 ml당 약 $10^{10\sim11}$정도의 c.f.u.를 나타내었다.

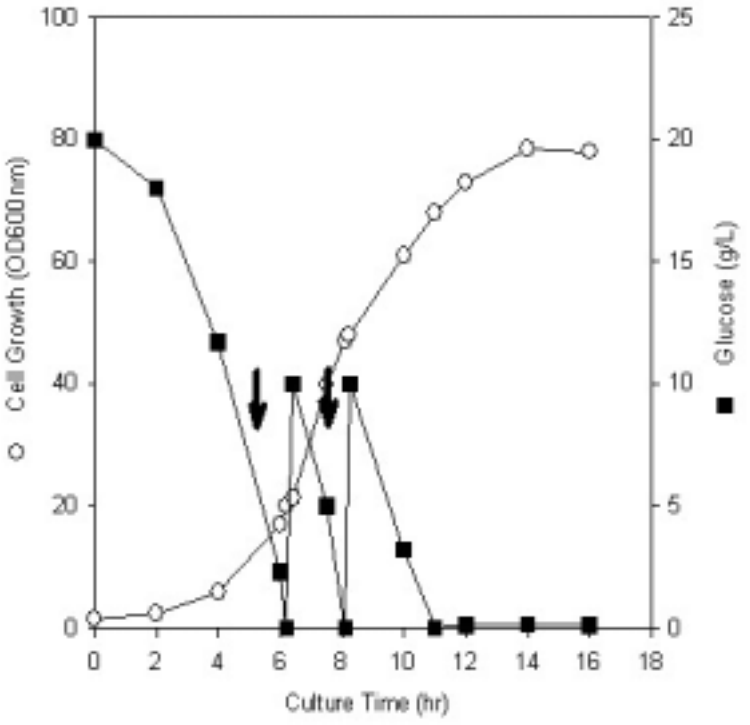


Fig. 51. cell growth pattern and glucose utilization of xenorhabdus nematophilus at enrichment medium. fermentation mode is intermittent fed batch culture.

2) Fed-batch fermentation

위의 배지 및 발효 조건하에서 feeding medium을 80% Glucose, 10% Yeast extract를 넣은 배지를 만들어 탄소원이 고갈된 시점(그래프 중간선)에서부터 공급하기 시작하였다. Feeding rate는 10~12g/L/hr의 속도로 공급하였다. Fig. 52의 윗부분의 그래프는 D-mate(로카스, 한국)프로그램를 이용하여 배양중 pH, 온도, rpm, 용존산소(DO) 등을 on-line으로 monitering 하여 수집한 정보를 나타내었다. 그래프상에서 pH의 값이 설정값과 프로그램에서 수집된 값이 약간의 차이를 보이고 있는 것은 출력값을 전기신호로 받아 다시 수치화하는데서 오는 오차이다. 용존산소는 그래프와 같이 발효조에 20%을 유지하도록 agitation를 순차적으로 높이며 배양하였다. 온도는 최적온도인 30℃ 유지하였다. 그 결과 다음의 그래프와 같이 배양 12시간 경과하여 세포의 성장이 약 110 OD에 이르렀다. 세포건조중량은 약 19g/L에 이르렀다. 비교적 짧은 배양시간에 기대하는 수율의 배양공정을 확립할 수 있었다.

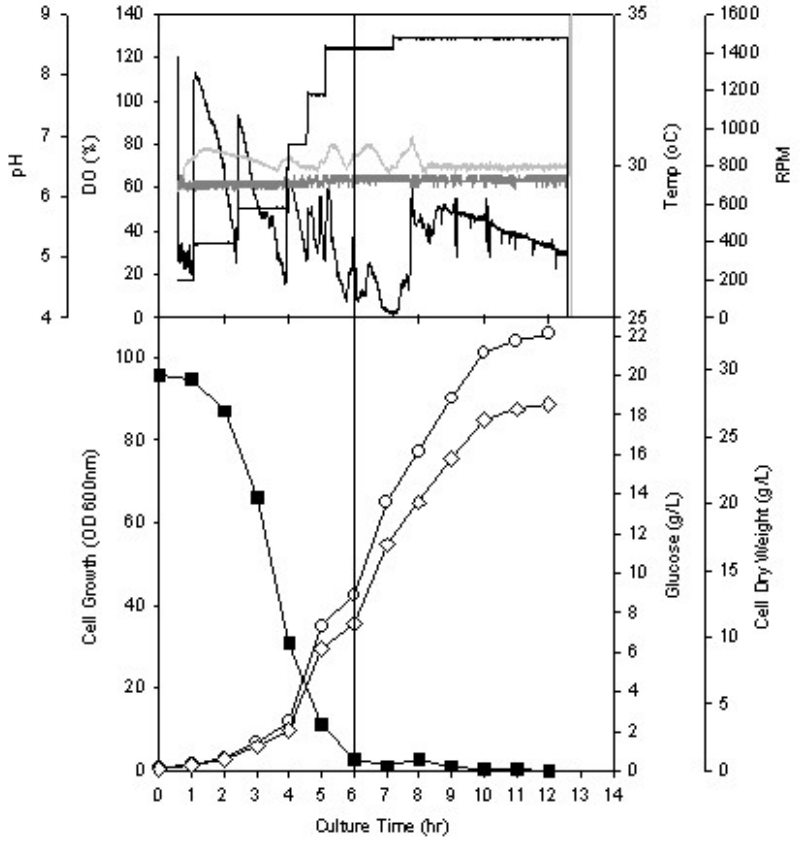


Fig. 52. Fed-batch cultivation by glucose&yeast extract addition.

opened circle;cell OD, opened diamond;dry cell weight, closed square;glucose

2. Pilot plant scale(300L)에서의 배양・생산공정의 최적화

공생세균의 pilot plant scale에서의 배양 공정의 최적화은 산업화를 위한 실험 디자인을 위하여 매우 중요하다. 배지는 산업용으로 사용하여 발효을 시도하였다. Glucose는 삼양제넥스에서 납품하는 유수포도당을 사용하였다. Yeast extract는 Grist brade사 그리고 조흥 등의 제품을 사용하여 균주에 대한 적합성 실험을 하였다. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4, $(NH_4)_2SO_4$, $MnSO_4$등은 대일화공 그리고 NaCl은 한주소금을 사용하였다. 300L Pilot plant scale에서의 발효 최적화 연구는 다음과 같이 이루어 졌다. 1차 발효는 종배양을 30℃ 140rpm에서 11.5시간 배양하여 세포의 성장은 OD600nm에서 약 8.0으로 자란 균주를 2L를 사용하였다. 이 배양된 균주를 working vol. 150L로 준비된 300L pilot plant 배양기에 접종하여 다음과 같이 배양을 시도하였다. 1차 배양은 feeding을 하지 않고 pilot plant 규모에서 5L 배지 와 배양 조건이 어느 정도 일치 하는지를 실험하였다. 5L 배양 조건과 같이 aeration은 0.3에서 1vvm까지 변화 하고 agitation은 50에서 300rpm까지 변환하여 발효조 내의 용존산소를 20%이상으로 유지하여 배양하였다. 그리고 발효조 내 압력은 0.2bar로 유지하였다. 그 결과 다음 그래프와 같이 1차년도 5L배양 결과와 동일한 수준으로 배양 9시간 경과 하여서 최고 약 38 OD(5L 40OD)까지 성장하는 것으로 나타났다. 최고 OD시 세포건조 중량은 L당 약 10.12g으로 나타났다(Fig. 53).

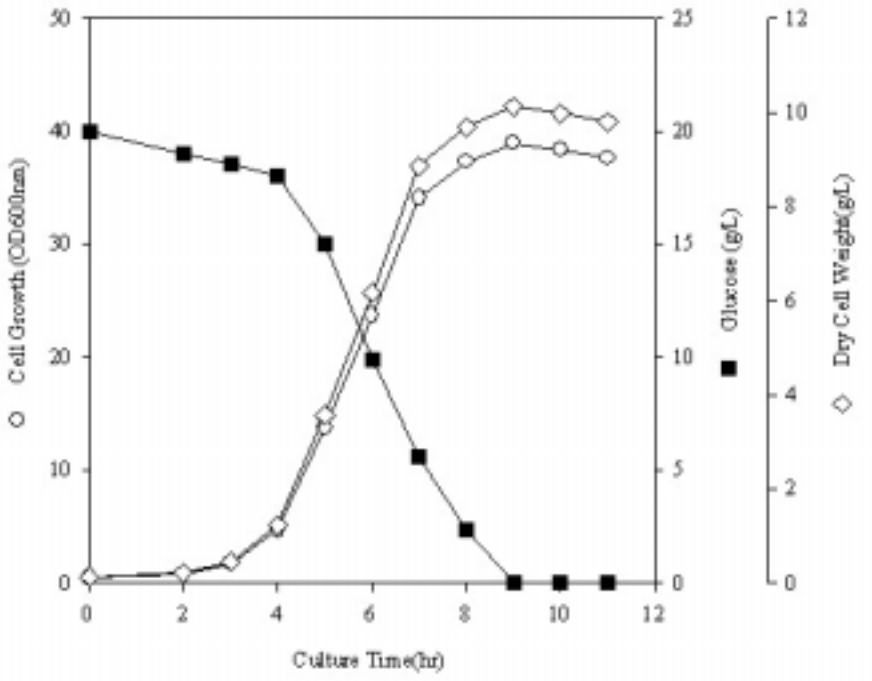


Fig. 53. Cell growth pattern and glucose utilization of *Xenorhabdus nematophilus* at pilot plant scale fermentor.
opened circle;cell OD, opened diamond;cry cell weight, closed square;glucose

2차 배양은 1차 배양과 배지와 배양 조건이 동일한 상태에서 Feeding배지를 glucose가 고갈되는 발효 8시간 경과 이후에 공급하여 발효를 수행하였다. 종배양은 Tryptic soy broth 2L에 접종하여 30℃, 140rpm에서 12시간 동안 배양하여 준비하였다. 종배양 최종 세포의 성장은 7.7 OD까지 성장하였다. Feeding medium 성분은 80% Glucose와 10%의 yeast extract를 합하여 만들었다. 하지만 1차 배양과는 달리 lag phase가 상당히 길어져 지고 세포의 성장이 상당히 둔화되어 자랐다. 세포의 비성장속도가 상당히 느리고 glucose가 고갈된 배양 8시간 경과 이후에 fed-batch fermentation으로 10 L를 glucose 10g/L/hr의 속도로 feeding 하면서 배양을 하였지만 세포의 성장은 배양 13 시간 경과하여 53 OD에 이르고 더 이상 성장을 하지 않았다 (Fig. 53). 이것은 배양시 공업용 yeast extract의 영향이 있는 것으로 나타났다.

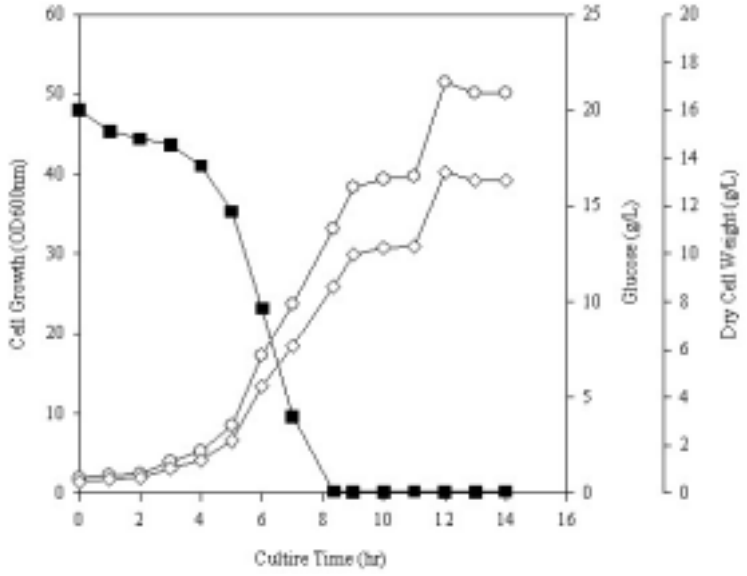


Fig. 54. Cell growth pattern and glucose utilization of *Xenorhabdus nematophilus* at pilot plant scale fermentor.
opened circle;cell OD, opened diamond;cry cell weight, closed square;glucose

3차배양은 feeding medium을 80% Glucose로 준비하였다. 종배양은 Tryptic soy broth(Acumedia) 2L에 5ml접종하여 30℃, 140 rpm의 조건으로 12시간 over night 배양을 하여 준비 하였다. 종배양의 최종 세포성장은 3.71 OD 였다. 300L 발효조 내에 멸균하여 준비된 working vol. 140L complex media에 접종하였다. Fermentaion 방식은 fed-batch 방식으로 탄소원이 고갈된 발효 8시간 경과하여 80% glucose를 10~12g/L/hr의 feeding rate로 공급하면서 배양 하였다. 그 결과 세포의 성장이 발효 14시간 경과 하여 135OD에 이르렀다(결과 미제시). 이때 세포건조중량은 35g/L로 5L 수준을 상회하는 것으로 나타났다.
이 결과은 feeding medium을 glucose 80% & yeast extract 10%을 사용한 5L결과와 위의 2차 배양에서 배양한 결과 보다 좋은 결과를 나타냈다. 5L에서 시약용 yeast를 사용하고 pilot plant 300L 실험에서는 공업용 yeast extract를 사용한 것은 예비 실험 결과로 차이가 있음을 나타냈다(결과 미제시). 다음의 결과에서 pilot plant scale 인 300L 발효조에서 5L jar수준의 균체 생산공정이 완료 되었다.

3. Pilot plant scale(2500L)에서의 배양·생산공정의 최적화

2500L scale에서 working volume 1000L의 배양공정을 최적화하기 위하여 300L pilot plant scale의 조건을 참고하여 발효를 시도하였다. 배양조건은 1차 종배양은 5L flask에 2L의 배지를 준비하여 30℃, 150rpm에서 12시간 배양하여 세포의 성장이 OD 8.3 정도 자란 균주를 2차 배양의 종균으로 사용하였다. 2차 종배양은 300L(Korea Fermentor Co., KFC300)에 working vol. 100L로 준비하고 aeration은 0.5~1vvm, agitation은 50~300rpm 조절하여 배양액 내의 용존 산소를 20%이상 유지 하였다. 온도는 1차 종배양과 같이 30℃, pH는 NH_4OH용액과 함께 7.5로 조절하였다. 발효조내 내부 압력은 0.2bar로 유지하여 12시간 배양한 결과 2차 종배양 후 세포의 성장은 OD 40.2까지 성장하였다. 이와 같이 배양된 2차 종배양된 균주를 300L 발효조에서 2500L 발효조로 멸균라인을 통하여 접종을 하였다. 2500L발효조 배양은 5L와 300L에서와 같은 배지 조건으로 fed-batch fermentation을 시도하였다. 그 결과 세포의 성장은 300L pilot plant scale에서 배양한 결과 비슷한 성장을 나타내 최고 OD 130까지 성장 하였다(Fig. 55)..

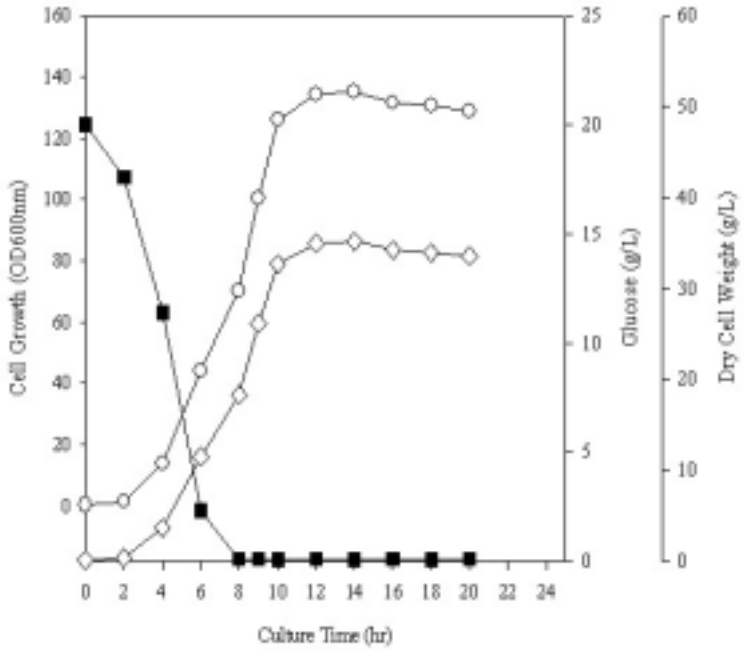


Fig. 55. Cell growth pattern and glucose utilization of Xenorhabdus nematophilus at pilot plant scale fermentor.

opened circle;cell OD, opened diamond;cry cell weight, closed square;glucose

이상의 결과를 종합하면 다음의 표와 같다. 배양12시간 경과시점에서 비교하였고 yield는 사용한 기질 전체에 대하여 생산된 dry cell weight를 가지고 계산하여 비교하였다.

Table. 36. Summary of productivity & yield on culture scale

Culture scale	Culture time (hr)	Cell growth (A600)	DCW (g/L)	Productivity (g/h)	Yield (Yp/s)
Flask	12hr	4.11	1.068	0.089	0.18%
5L	12hr	105.6	27.456	2.280	40.0%
300L	12hr	128.5	33.410	2.784	48.7%
2500L	12hr	121.8	31.668	2.639	45.4%

그리고 단위면적당 생산량을 높이기 위해 2500L 발효조 working vol. 1000L에서 1500L 로 배양부피를 늘려 발효를 수행하였다. 1000L 마찬가지로 정상적으로 발효가 이루어졌다. 따라서, 2500L에서 fed-batch culture 를 통한 최대의 세포 성장을 유도할 수 있었으며 이때의 세포 수는 3.2×10^{10} c.f.u/ml 이상을 유지할 수 있었다. 발효와 제제 그리고 살충활성 실험을 병행하여 수행한 결과 살충활성이 세포 뿐만 아니라 배양액에서 더욱 좋게 나타났다. 이것으로 보아 세포를 고농도로 배양하고 안정적인 제제화를 통해 포장에서 우수한 약효를 가진 미생물 제제를 만드는 일이 하나이고 다음으로는 배양액에 살충성 물질을 많이 분비하는 발효 조건을 탐색하고 제제화하여 생화학 농약을 만드는 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

제9절 제노랍두스네마토필라 (ANU-Xn101) 균주의 제제화 연구 및 시제품 제작

1. 균주 안정화 조건 탐색

가. 캡슐화 및 spray dry 방법을 통한 세포 안정화

spray dry 과정 중에 발생하는 고열에 견딜 수 있는 열 안정성을 부여하는 물질은 찾을 수 없었다. spray dry 전에 사용된 균주의 밀도는 3.4×10^{11} c.f.u/ml 이었다. 각 시료가 녹아있는 100ml에 cell 10ml(총생균수 3.4×10^{12} c.f.u)을 첨가하여 hot spray dry 하였다.

spray dry 효율(회수률)은 시료마다 차이가 많아 나타내지 않았으며, 총 생균수의 계산은 각각의 용액을 제조하데 들어간 시료가 100% spray dry 과정을 거치면서 회수된 것으로 가정하였다. 예를 들면, sun-cap 10% 수용액의 경우 spray dry 후 10g이 회수된 것으로 가정하였다.

Table 37. Effect of various polymer and sugar during hot spray dry process.

	Concentration (%)	c.f.u/g	No. of total viable cells
Sun-cap	10	4.64×10^{7}	4.64×10^{8}
Arabic gum	10	1.48×10^{7}	1.48×10^{8}
Skim-milk	10	6.00×10^{7}	6.00×10^{8}
Trehalose	10	1.17×10^{8}	1.17×10^{9}
Sucrose	10	6.40×10^{7}	6.40×10^{8}
Levan	5	1.80×10^{8}	9.00×10^{8}
Pectin	5	1.26×10^{7}	6.30×10^{7}
PVP	5	3.40×10^{6}	1.70×10^{7}

Table 37. 의 결과를 보면 첨가된 cell의 상당량이 spray dry 과정을 거치면서 사멸된다는 것을 알 수 있다. 예를 들면, sun-cap의 경우 spray dry 과정을 거치기 전의 총

생균수는 $3.4x10^{12}$ c.f.u/ml 이었으나 spray dry 가 끝난 후의 cell 수는 4.64×10^{8} c.f.u/g 로 감소하였다. 그 중에서 가장 좋은 열 안정성을 나타낸 것은 trehalose 였다. 따라서, trehalose가 농도에 따라 열 안정성을 부여하는지의 여부를 실험하였다 (Table 38). 효모의 경우 heat shock을 받을 경우 trehalose를 세포외부에 많이 축적한다는 보고가 있다. 또한, 극한에 생존하는 생물에서도 trehalose의 축적은 보고된 바 있으며, 단백질 제품의 열 안정제로 식품등의 가공에 사용되고 있다.

Table 38. Effect of sugar concentration during hot spray dry process

Treatment	Concentration(%)	c.f.u/g	No. of total viable cells
Sun-cap	10	5.60×10^{6}	5.60×10^{7}
Trehalose	10	2.30×10^{7}	2.30×10^{8}
Trehalose	20	1.60×10^{7}	3.20×10^{8}
Trehalose	30	1.70×10^{7}	5.10×10^{8}

당류의 농도와 열 안정성과는 아무런 상관관계를 나타내지 못하였다. 고분자나 당류 등은 cell이 받는 고온 스트레스를 경감시키지는 못하였다. 즉, spray dry 방법을 이용하여 cell 건조 후 저장 보관하는 방법은 시간과 경비가 적게 소요된다는 측면에서는 유리하나 본 실험에 사용된 균주 *Xenorhabdus nematophila*를 가공하기에는 부적당한 방법으로 판단되었다.

나. Freeze dry 방법을 통한 세포 안정화

Hot spray dry 방법과 동일하게 각 시료와 cell을 처리한 후 -70℃에서 24hr 동안 예비 동결한 다음 freeze dry를 수행하고 40℃ 온도 학대 조건에서 저장 안정성 screening을 수행하였다.

Table 39. Effect of various polymer and sugar on viability of *X. nematophila* formulated by the stabilize process and stored at 40℃ from 0 to 32 days

Treatment	Viability(log10 c.f.u/g) according to length of storage (days)					
	0	2	4	8	16	32
Control	10.89	8.67	8.21	7.64	7.38	6.72
PVP	9.34	7.80	7.32	6.98	6.54	5.91
Trehalose	11.33	10.80	10.67	10.35	9.92	9.51
Na-alginate	10.74	10.14	9.91	9.72	9.55	8.15
Millet jelly	11.21	10.55	10.49	10.39	9.97	8.83

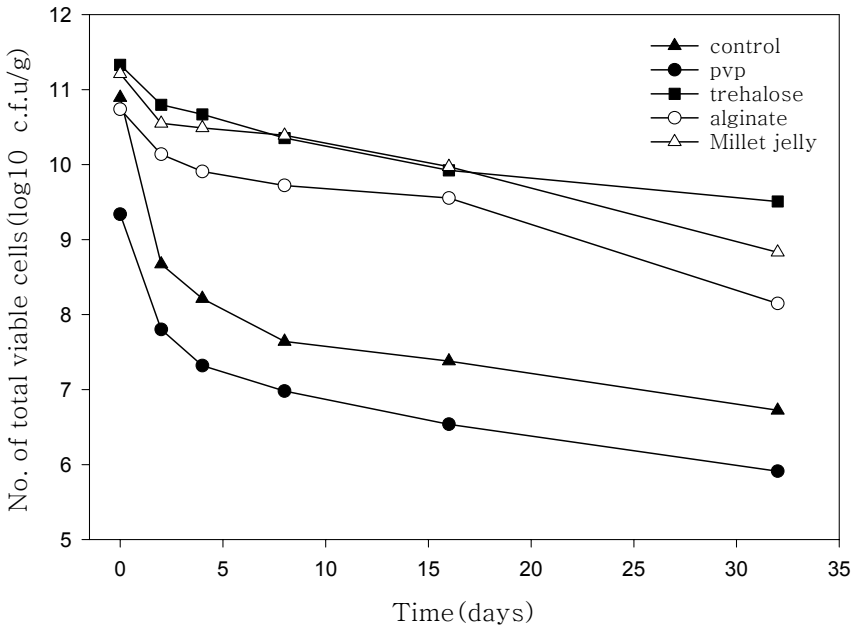


Fig. 56. Change in number of viable cell during storage under 40℃

PVP (polyvinylpyrrolidone)를 제외한 나머지 3종에서 모두 control(무처리)에 비해 시간 경과에 따른 좋은 저장 안정성을 나타냈다. 고분자인 Na-alginate보다는 물엿이나 trehalose에서 더 좋은 저장 안정성을 나타냈다. 이런 결과는 Na-alginate이 농도에 비해 점도가 너무 높아 적은 량만을 물에 녹일 수 있어 cell 보호 효과가 조금 떨어지는 결과는 나타내는 것으로 판단된다. 초기 0 time에서 총 생균수 감소 정도를 보면 freeze dry 과정에서 고분자나 당류가 cell에 어느 정도의 동결 보호효과를 주는지를 알 수 있다. 즉, pvp의 경우 무처리 보다 더 악영향을 주어 총 생균수를 감소시킨다는 것을 알 수 있고, 나머지 3종은 비슷한 결과를 나타냈지만 millet jelly과 trehalose 가 Na-alginate보다는 동결 보호제로서 더 큰 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

Table 40. Effect of various polymer and sugar on viability of *X. nematophila* formulated by the stabilize process and stored at 40℃ from 0 to 32 days

Treatment	Viability(log10 c.f.u/g) according to length of storge(days)					
	0	2	4	8	16	32
Control	10.59	9.00	8.37	8.00	6.97	6.63
PVP	9.01	8.56	8.21	7.79	7.04	6.46
Trehalose	11.27	11.03	10.79	10.51	9.87	9.35
Na-alginate	9.98	8.95	8.65	8.32	8.27	6.93
Millet jelly	11.30	11.04	10.69	10.49	10.25	9.64
Skim-milk	10.79	9.78	9.55	9.00	8.91	8.05
Starch	11.53	10.28	9.88	9.61	9.47	8.90
Guar-gum	9.42	9.10	9.01	8.73	6.73	6.23
Hi-absorbent	10.37	9.60	9.09	8.13	6.47	5.30
Polyacrylamide	10.45	10.26	9.61	7.74	7.21	6.18

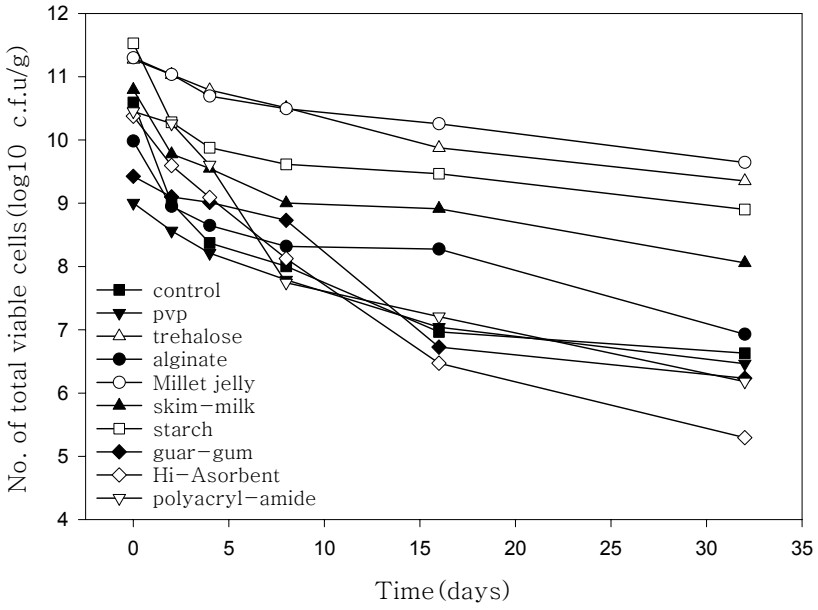


Fig. 57. Change in number of viable cell during storage under 40℃.

Fig. 57. 에서 수행한 재료의 재검증과 동시에 다른 재료를 대상으로 추가한 이번 결과에서도 Fig. 57. 에서와 마찬가지로 대조구(control)보다 당류(trehalose, Millet jelly)에서 좋은 저장 안정성을 나타냈다. 그 밖의 polyacrylamide나 hi-asorbent 등은 pvp와 마찬가지로 대조구(control)보다 더 떨어지는 결과를 나타냈다. 따라서, 좋은 결과를 나타낸 당류에 대해 좀더 조사해 볼 필요성이 있었다 (Table 41)

Table 41. Effect of various sugar on viability of *X.nematophila* formulated by the stabilize process and stored at 40℃ from 0 to 32 days

Treatment	Viability(log10 c.f.u/g) according to length of storge(days)				
	0	4	8	16	32
Control	11.48	8.27	7.70	7.35	6.74
Maltose	11.24	10.68	10.26	9.58	9.00
Sucrose	10.21	5.90	0.00	0.00	0.00
Lactose	9.99	7.28	6.26	5.77	5.14
Xylose	10.12	0	0	0	0
Mannitol	10.49	0	0	0	0

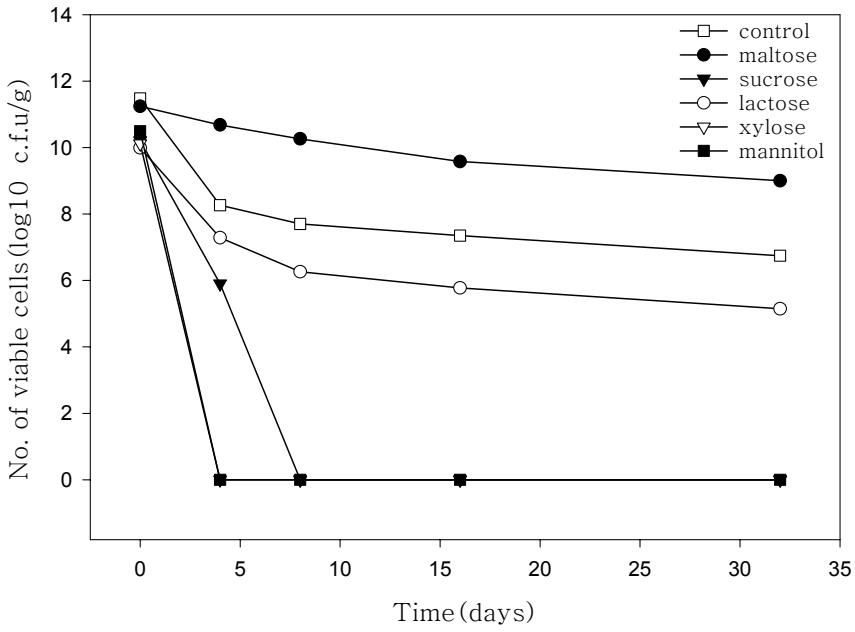


Fig. 58. Change in number of viable cell during storage under 40℃.

그 결과 대부분의 당류가 무처리 보다 저장 안정성이 떨어지는 결과를 나타냈다. 즉,

0 time에서 보면 freeze dry 과정의 동결 보호제로서 역할은 비슷한 결과를 나타냈으나 40℃ 저장 안정성에는 많이 떨어지는 결과를 나타냈다. 표에는 표시하질 않았지만 glucose, fructose 등은 dry가 잘 되질 않았으며, sorbitol은 저장 중에 흡습이 심하여 부적당하였다. sucrose와 xylose는 저장 중에 갈변 현상이 나타났다. 동결보호제로 사용되는 glycerol을 첨가한 시료는 freeze dry가 되질 않았다. 즉, 건조가 되질 않는 문제점이 있다. Maltose가 가장 좋은 저장 안정성을 나타냈으며 이것은 앞에서 물엿이 좋은 저장 안정성을 보인 것과 관계가 있다. 물엿은 50%이상의 maltose와 기타 당으로 구성되어 있다.

Table 42. Effect of various polymer on viability of *X. nematophilus* formulated by the stabilize process and stored at 40℃ from 0 to 64 days.

Treatment	Viability(log10 c.f.u/g) according to length of storge(days)						
	0	2	4	8	16	32	64
Curdlan	9.90	8.58	8.12	7.20	6.50	6.01	5.95
Glucan	12.00	9.79	8.82	8.27	7.78	7.18	5.21
Suncap	12.29	10.58	9.92	9.09	8.79	7.80	5.56
Levan	12.65	11.87	10.78	8.10	7.73	7.30	7.17
Skim-milk	11.86	11.81	10.45	9.66	9.16	8.80	7.69
Control	12.23	10.73	10.19	9.31	8.34	6.96	4.74

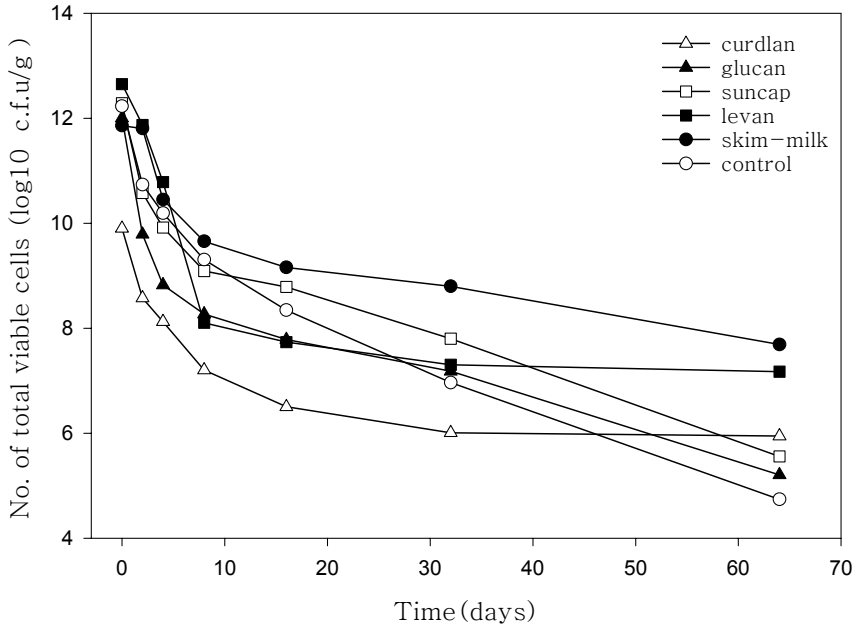


Fig. 59. Change in number of viable cell during storage under 40℃.

Table 43. repeated test of table 42.

	Viability(log10 c.f.u/g) according to length of storage(days)						
	0	2	4	8	16	32	64
Curdlan	10.03	9.80	9.75	9.32	9.19	8.14	5.34
Glucan	10.60	8.63	8.25	7.95	7.65	6.66	5.34
Suncap	10.59	9.87	9.51	8.77	8.45	7.47	5.61
Levan	11.43	10.94	10.52	10.39	9.75	8.66	7.45
Skim-milk	11.07	10.01	9.51	9.22	8.97	8.30	6.65
Control	11.95	10.33	9.52	9.47	8.32	6.98	4.21

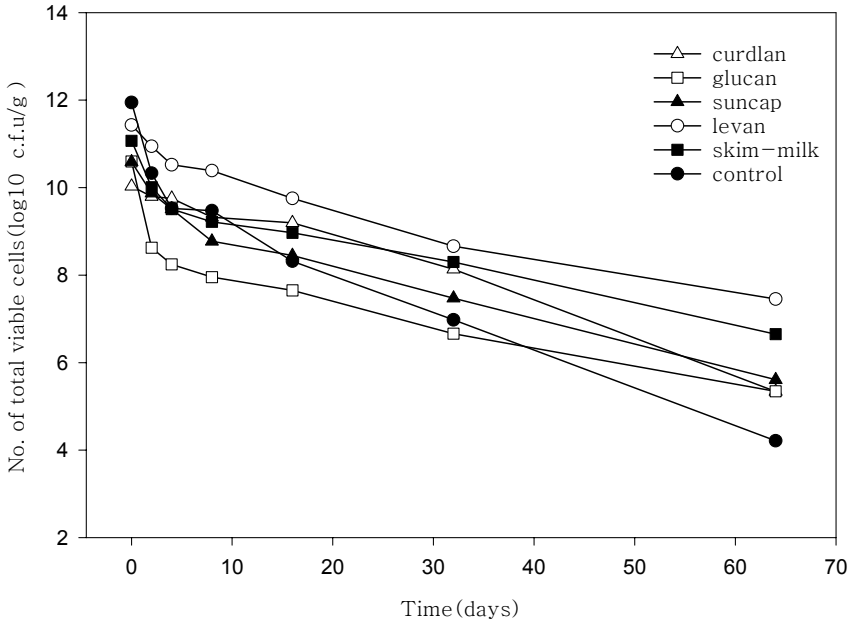


Fig. 60. Change in number of viable cell during storage under 40℃.

위의 Table 42과 43에서 보면 levan solution 과 skim-milk에서 가장 좋은 저장 안정성을 나타냈다. levan solution(levan이 10%이상 녹아있고 나머진 당류와 기타 물질임)에는 levan 이외에 여러 당류가 포함되어 있다. 따라서, 저장 안정성에는 특정 고분자와 당류가 기여하는 것으로 판단된다. skim-milk는 일반적으로 cell 저장시 많이 사용되는 재료 중의 하나이다.

Table 44. Change of viable *X. nematophilus* according to culture length during freeze dry process.

Length of culture(days)	c.f.u/g	
	Before dry	After dry
1	3.7×10^{10}	1.40×10^{11}
2	1.4×10^{10}	4.10×10^{10}
3	1.8×10^{10}	1.02×10^{9}

동일한 량의 cell을 각 culture flask에 접종하고 배양 일수를 달리하여 배양한 다음 harvest하여 freeze dry를 한 결과이다. 배양 일수가 짧을수록 급속 동결에 입는 피해가 적은 것으로 나타났다. freeze dry 전에는 비슷한 cell 수를 유지하였으나 freeze dry를 거치면서 생균 밀도에는 많은 차이를 보였다.

Table 45. Viability according to culture length of *X. nematophila* stored at 40℃ from 0 to 32 days

Length of culture(days)	Viability(log10 c.f.u/g) according to length of storge(days)					
	0	2	4	8	16	32
1	11.08	9.49	8.85	8.49	7.45	7.11
2	10.59	8.86	8.08	7.45	6.41	5.98
3	8.94	7.59	5.93	5.81	5.37	4.54

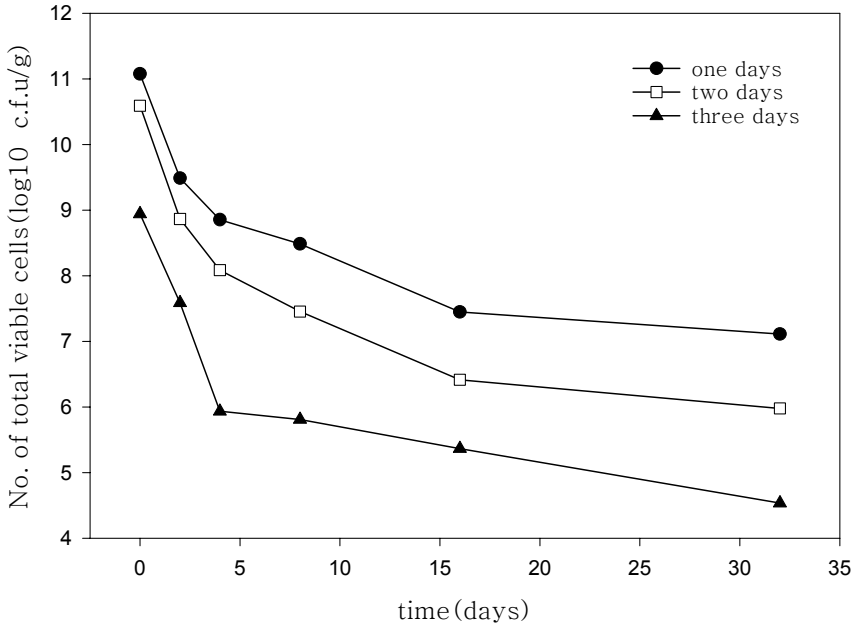


Fig .61. Change in number of viable cell during storage under 40℃.

40℃ 저장 안정성에서도 배양일수가 짧을수록 저장 안정성이 좋은 결과를 나타냈다. 즉, 대수 증식기 이후에 cell 밀도는 점점 감소하며 cell의 활력도 점점 감소하는 것으로 추정된다. 따라서, 배양 초기에 cell 밀도를 최대한 끌어올려 fresh한 cell을 제제화하는 방법이 적당할 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해 보면 본 실험의 대상 균주인 *Xenorhabdus nematophila*를 hot spray dry 방법으로 건조하여 저장하는 것은 cell 사멸률이 너무 높아 적당하지 않은 방법으로 판단된다. 동결건조 (freeze dry)를 통한 건조 방법을 적용하고자 여러 가지 재료에 대해서 dry 과정 중의 안정성과 시간에 따른 저장 안정성을 실험하였다. freeze dry 과정 중에는 pvp 등 몇몇 시료는 악영향을 주어 상당한 cell 감소를 가져왔으며, 반대로 skim-milk, levan solution, millet jelly, maltose, trehalose 등은 좋은

동결보호 효과를 나타냈다. 40℃에서 시간 경과에 따른 저장성 실험에서도 PVP, polyacrylamide, Hi-absorbent, mannitol, xylose 등은 무처리에 비해 더 좋지 않은 저장 안정성을 나타냈으며, skim-milk, levan solution, 물엿, maltose, trehalose 등은 좋은 저장 안정성을 나타냈다. 이상의 결과를 종합해 보면 경제성과 효율을 고려한다면 물엿을 사용하여 안전화 시키는 것이 가장 산업화에 적당한 안정화 제제인 것으로 판단된다.

다. 흡착(adsorption)을 이용한 세포 안정화

보통 technical powder의 희석 및 흡착에 사용되는 물질로서, 주로 광물질 증량제가 이용되며, 주로 벤토나이트, 규조토, Clay, talc, $CaCO_3$, 납석 등이 주로 사용된다. 이상의 광물들은 각각이 가진 특성 때문에 증량제로 많이 사용되나 발효 원액의 직접적인 흡착 능력은 떨어져 사용할 수가 없다. 알려진 powder 중에 가장 좋은 흡착력을 나타내며 자외선 차단 효과도 있는 "white carbon"을 사용하여 발효 원액을 1:1로 흡착하여 원제를 안정화시키는 방법을 사용하였다. 상온 및 40℃ 온도 학대 조건에서 기간별로 c.f.u/g를 관찰한 결과 cell 수가 상당히 빠른 속도로 감소하는 것으로 조사되어 적당하지 않은 방법으로 판단된다 (미보고자료).

2. Bt 균주 선발 및 혼용시험을 위한 농도 결정

다양한 Bt균주들의 시험해충인 배추좀나방 (*Plutella xylostella* L.) 대한 살충활성을 조사하여 본 결과 Fig. 62. 그림과 같이 나타났다. 각각의 Bt균주를 10^4, 10^5, 10^6, 10^7의 세포수로 조절하여 3령충의 배추좀나방 (*Plutella xylostella* L.)에 처리 한 후 48시간 후의 살충활성을 조사한 결과 균주별 살충활성은 큰 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다. 그 가운데에서 한국산(Btk Korea)균주가 가장 활성이 우수한 것으로 나타났다. 따라서 이 균주를 선정하여 *Xenorhabdus nematophila*와 혼용시험를 하는 대상 균주로 선정하였다.

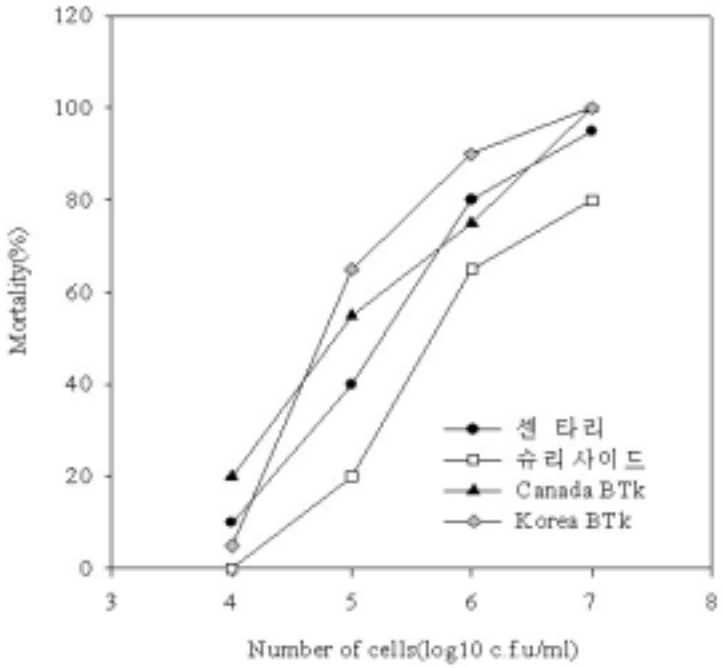


Fig. 62. Mortality of 3rd *Plutella xylostella* on treatment various Btk strain.

선발된 Btk균주를 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 의 세포수로 조절하여 3령충의 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)에 처리 한 후 48시간 후의 살충활성을 조사한 결과 세포수가 10^7이상에서 100% 살충 활성을 나타냈으며 4×10^4 c.f.u/ml에서 LC30값을 나타냈다. 따라서 *Xenorhabdus nematophila*의 혼용시험은 4×10^4 c.f.u/ml농도로 결정하였다.

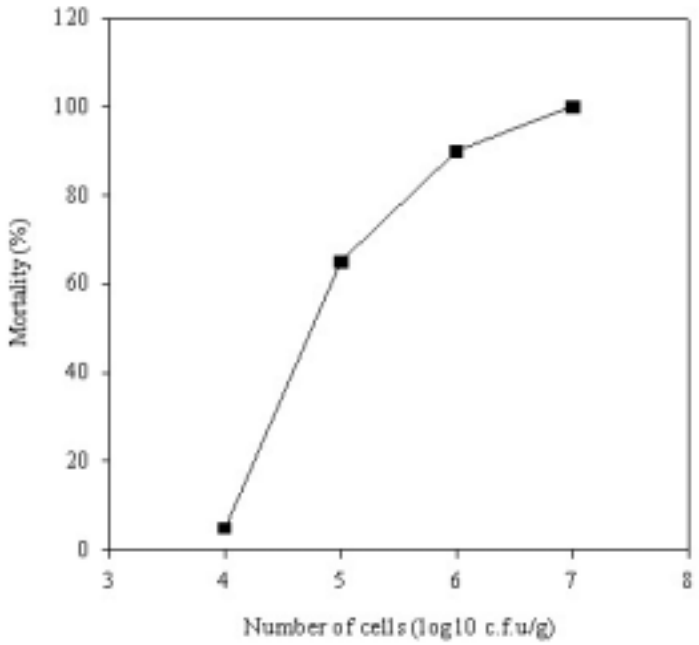


Fig. 63. Insecticidal activity of Bt k korea about *Plutella xylostella*.

*Xenorhabdus nematophila*와 Btk의 혼용실험 결과는 다음의 표와 같다. Btk와 Xn의 혼용시 살충상승효과를 조사하기 위해서 Btk 의 살충활성이 LC30값을 나타내는 농도에서 Xn 배양액의 cell 수를 조절하여 살충활성을 시험한 결과 아래 Table 46.과 같다. Xn 배양액의 cell 수가 10^4 이상 혼합한 처리구에서 살충상승효과가 있는 것으로 나타났으며 Xn 배양액의 cell 수가 10^5에서 높은 상승효과를 나타내는 것으로 조사되었다. 따라서, 상기의 시험결과를 기초로 제제시험의 농도를 결정하였다. Fig 64.는 실내에서 살충활성을 평가하기 위한 시험 방법이다.

Table 46. Synergistic effect of mortality on 3rd *Plutella xylostella* L. treated with *Xenorhabdus nematophila* + Btk.

Treatment (c.f,u/ml)	No of treated insect	After 24hr		Ater 48hr	
		mean/±SD	Control efficacy(%)	mean/±SD	Control efficacy(%)
Btk+Xn(10^6)	50	5.80 ±1.48	58.0	8.80 ±0.84	88.0
Btk+Xn(10^5)	50	5.40 ±1.14	54.0	8.60 ±1.52	86.0
Btk+Xn(10^4)	50	3.20 ±1.79	32.0	4.80±1.30	48.0
Btk+Xn(10^3)	50	2.00 ±0.71	20.0	3.20 ±0.45	32.0
Btk only	50	1.80 ±0.84	18.0	3.40 ±0.89	34.0
No treatmeant	50	0.0±0.00	-	0.0±0.00	-

Fig. 64. Effect of a mixture of Btk+ANU-Xn101 on controling diamondback moth, *Plutella xylostella*

3. 제제화 및 시제품 제작

가. Bt 균주의 안정화

Bt 균주는 2500L 배양조건에서 working vol. 1500L로 최대 성장을 유도하는 변형된 유가식 배양 조건인 배지 성분(%) glucose 2, yeast extract 3, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4, K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4$ 0.1, $MnSO_4$ 0.007, $CaCl_2$ 0.01, trace sol. 0.1㎖ 조건으로 탄소원이 고갈되는 시점에 glucose를 20g/L 로 3회 feeding 하고 마지막 3회 feeding 시에 yeast extract 를 10g/L 로 같이 feeding 하는 방법을 사용하여 OD 120까지 성장시켰으며 80%이상 포자 형성을 유도하였다. 이때의 세포수는 4.0×10^9 c.f.u/ml 이었으며 vibration membrane filter(VMF)방식인 poll sep. 400을 이용하여 포자와 toxin을 1/10 vol. 으로 농축하였다. 여기에 포접 성능이 우수한 변형전분인 "suncap"을 10% 첨가하여 녹인 후 spray dry를 하여 최종 technical powder를 얻었다. 이때의 포자수는 3.4×10^{10} c.f.u/g 를 나타냈다. 이것을 시제품을 만들기 위한 Bt 원제로 사용하였다.

나. *Xenorhabdus nematophila* 의 안정화

다양한 polymer 및 기능성 다당류 등을 이용한 안정화 실험에서 가장 경제적이며 우수한 효과를 나타낸 "물엿"을 이용하여 동결건조 및 장기 보관에 필요한 첨가 보호제로 선정하여 균주를 안정화 시켰다. 대량 발효 조건은 위에서 언급한 것과 같으며 세포 수거는 Bt 와 마찬가지로 VMF로 수획하였으며 여기에 10%의 물엿을 첨가하여 동결건조한 후 분말화 시켜 시제품을 만들기 위한 원제로 사용하였다. 이렇게 제조된 원제의 경우 선행 실험의 40℃ 온도 학대 조건에서 30일 정도 10^9 c.f.u/g 이상을 유지하는 것으로 보아 상온조건에서는 수 개월 정도 안정하게 일정 세포수를 유지 할 것으로 판단된다. 따라서, 시제품에 첨가되는 *Xenorhabdus nematophila* 는 10^9 c.f.u/g 으로 사용하였다.

다. 제제화 및 시제품 제작

Bt 및 *Xenorhabdus nematophila* 원제와 여기에 수화성, 현수성, 접착성, 자외선 차단 효과, 효과 상승 등을 고려한 여러 가지 부가제를 첨가하여 다음 표와 같이 몇 가지 기본 제제를 만들었다. 안동대 결과를 참고하여 Xn cell 과 supernatant 를 구분하여

별도로 제제화 하고 살충효과를 비교 하였다. 안동대의 시험결과는 cell 보다는 supernatant에서 더 강한 살충 효과를 나타냈었다. 시제품을 포장에 살포시 1000배 희석하여 살포하는 것을 기준으로 최종 살포시 세포 농도를 Bt의 경우 10^6 c.f.u/ml 로 *Xenorhabdus nematophilus* 의 경우 제제화의 한계가 있어 10^5 c.f.u/ml 이상으로 제조하였다. 포장에서의 자외선이나 기타 환경에서의 분해를 감안해 다소 높은 농도를 결정하였다.

Table 47. Formulation recipes of Btk + *Xenorhabdus nematophila* using various carrier and additives

구 분	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08
ⓐ Btk 원제	10	10	10	10	10	10	10	10
ⓑ *Xenorhabdus nematophilus* 세포(cell) 원제	20	20	20	20	20	20		
ⓒ *Xenorhabdus nematophilus* 배양액(supernatant) 원제							10	20
ⓓ white carbon에 1:1로 흡착된 tween 20		10		10	10	10	10	10
ⓔ NK-SLS		5	5	5	5	5	5	5
ⓕ NK-DA203W			10					
ⓖ sodium tripolyphosphate		5	5	5	5	5	5	5
ⓗ kaolin						50		
ⓘ Ammonium sulfate	70	50	50	45	45			
ⓙ xanthan gum				5				
ⓚ NK-SDS					5			
합 계	100	100	100	100	100	100	100	100

* ⓑ Xenorhabdus nematophilus cell 동결건조
* ⓒ Xenorhabdus nematophilus supernatant 동결건조
* NK-SLS, NK-DA203W, NK-SDS ; (주)코씰 제품

라. 제제화별 물리성 비교

증량제 및 여러 가지 부자재를 첨가하여 제제화된 시료의 희석 살포시 물리성을 조사하기 위하여 수화성, 현수성, 분말도를 시험하였다.

Table 48. physical properties of formulations tested.

Formulation code	wettability	suspensibility	particle size
F01	++++	++++	passed
F02	++++	+++	passed
F03	++++	+++	passed
F04	+++	+++	passed
F05	++++	+++	passed
F06	++++	++	passed
F07	++++	++++	passed
F08	++++	++++	passed

++++ ; excellent +++ ; moderate ++ ; acepptable + ; unacepptable
particle size was determined by sieve test(325mesh).

제제화된 시료의 수화성과 현수성은 거의 모든 제제에서 비슷하였으나, 황산암모늄이 많이 포함된 제제에서 우수하였다. 이것은 황산암모늄이 물에 상당히 잘 녹는 성질을 나타내기 때문이다. kaolin이 포함된 제제의 경우 현수성이 타 제제에 보다 약간 떨어지는 결과를 나타냈으며, 약제 살포 후 약흔이 많이 남는 단점이 있었다. 한편, 분말도는 모두 양호한 결과를 나타냈다.

4. 제제별 살충활성 실험

가. 제제별 살충효과 비교-실내 실험

제제 선발을 위하여 파밤나방 3령충에 대한 살충활성을 시험한 결과를 보면, Xn cell 원제를 사용하여 제제한 F02 - F06은 기본 제제 F01 보다 살충활성이 높은 것으로 조사되었으나 제제별 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. Xn 배양액 원제를 사용한 F07, F08로 Xn cell 원제를 사용한 제제보다 살충활성이 높은 것으로 조사되었고 Xn 배양액 원제 함량이 높은 F08에서 가장 높은 살충활성을 보였다.

Table 49. Insecticidal activity of several formulations against 3rd instar larvae of *Spodoptera exigua* in a laboratory condition

Treatment (Dilution)	No of treated insect	After 24hr		Ater 48hr	
		mean/±SD	Control efficacy(%)	mean/±SD	Control efficacy(%)
F01	50	4.8±1.92	48.0	6.2±1.10	62.0
F02	50	5.4±2.19	54.0	7.8 ±1.10	78.0
F03	50	5.2±1.79	52.0	7.0 ±1.58	70.0
F04	50	5.8±1.64	58.0	7.4 ±0.89	74.0
F05	50	5.4±1.52	54.0	7.8 ±1.30	78.0
F06	50	5.0±2.70	56.0	7.0 ±1.58	70.0
F07	50	7.0±1.00	70.0	8.8 ±1.10	88.0
F08	50	7.2±2.05	72.0	9.4 ±0.55	94.0
UTC	50	0.0±0.00	-	0.0 ±0.00	-

제제별 실내 실험 결과 제제화된 모든 제제에서 원제에 비해 살충 활성이 좋게 나타났으며, 세포(cell)에서 보다 배양액(supernatant)에서 더 좋은 살충력을 나타냈다. 이것은 안동대에서 이루어진 실험과 같은 결과로 세포가 성장하면서 살충성 물질을 세포 밖으로 분비하는 것으로 판단된다. 따라서, formulation no. 2를 시제품명 IMB01로 formulation no. 8을 시제품명 IMB02로 명명하고 시제품을 제작하여 야외 포장시험을 수행하였다.

나. 제제별 경시변화 - 저장 기간에 따른 살충효과 지속력 비교

선발된 제제 F02와 F08에 대해 상온과 40℃ 온도조건에서 4주, 8주, 12주 동안 방치한 후 파밤나방 3령 유충에 처리하여 약효 지속 효과를 조사하였다. 40,000배로 희석하여 처리하였으며, 5반복으로 조사하였다. 조사는 약제 처리후 48시간 후에 조사하였다.

Table 50. Change of insecticidal activity during storage under room temp. & 40℃

Treatment (Dilution)	No of treated insect	After 4 week		Ater 8 week		Ater 12 week	
		mean/±SD	Control efficacy (%)	mean/±SD	Control efficacy (%)	mean/±SD	Control efficacy (%)
F02A(40,000)	50	7.0±1.00	70.0	7.2±2.17	72.0	7.0±0.71	70.0
F02B(40,000)	50	7.2±1.79	72.0	7.0±1.73	70.0	6.8±0.45	68.0
F08A (40,000)	50	9.6±0.55	96.0	9.4±0.89	94.0	9.0±1.00	90.0
F08B (40,000)	50	9.0±1.41	90.0	9.2±1.79	92.0	9.2±0.84	92.0
UTC	50	0.0±0.00	-	0.0±0.00	-	0.0±0.00	-

* A ; room temperature B ; 40℃.

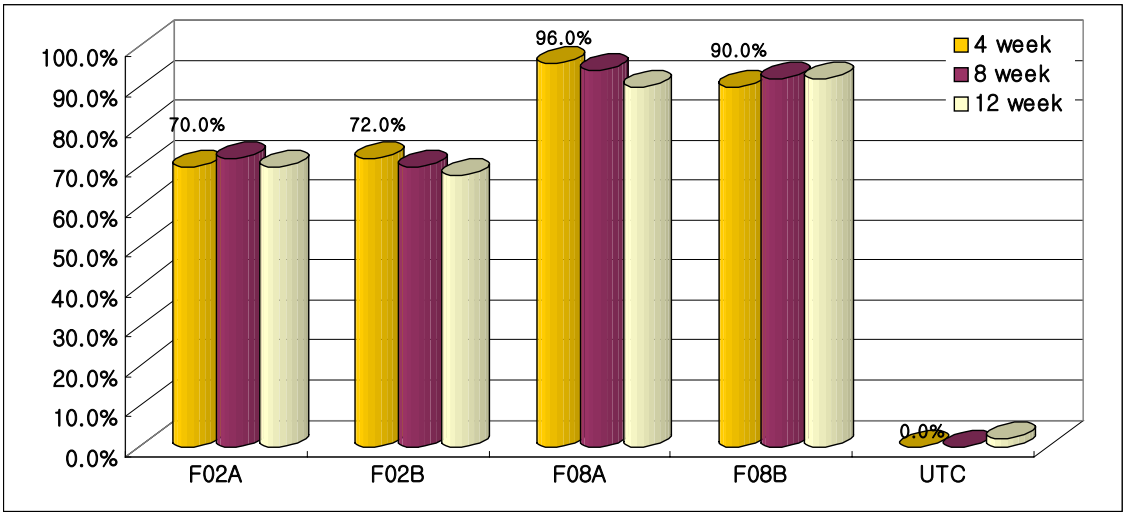


Fig. 65. Change of insecticidal activity during storage under room temp. & 40℃

위의 결과로 보면 저장 기간에 관계 없이 살충력에 큰 변화없이 일정하게 유지되는 것으로 보아 이와 같은 제제를 상업적으로 유통하여도 문제가 없을 것으로 판단된다.

제10절 야외 포장에서 시제품 대한 약효 검증

각각의 균주는 제제화를 통해 안정화 되었고 안동대와 비아이지의 *Xenorhabdus nematophilus*와 Btk의 실내 및 온실 실외 혼용실험 결과를 바탕으로 제조된 몇 가지 제제를 만들어 살충 활성을 실험하였고, 좋은 효과를 나타낸 제제 Formulatin No. 2 와 Formulation No. 8 에 대해 시제품 IMB01과 IMB02로 명명하고 파밤나방 및 기타 해충에 대한 방제효과를 검증하기 위해 지역별 전국 10개의 포장을 선정하여 시제품의 산업화 가능성을 살펴보았다.

Fig. 66. Test product

Table 51. Insecticidal activity of formulation against various insect pest in a field condition.

시험장소	시험해충	처리항목	2일차 방제가	7일차 방제가	비고
경기도 여주	파밤나방 (청경채)	IMB01	64.3	74.3	
		IMB02	77.4	91.5	
		센타리	39.9	91.9	
경기도 용인	파밤나방 (배추)	IMB01	56.2	69.5	
		IMB02	70.4	85.5	
		센타리	32.4	86.3	
강원도 원주	파밤나방 (무)	IMB01	61.0	77.7	
		IMB02	73.4	90.4	
		센타리	36.7	92.4	
경북 성주	도둑나방 (배추)	IMB01	48.7	66.2	
		IMB02	64.5	81.0	
		센타리	27.6	85.0	
충남 금산	배추흰나비 (배추)	IMB01	69.1	85.5	
		IMB02	84.6	96.5	
		센타리	40.1	95.0	
경남 진주	거세미나방류 (파프리카)	IMB01	40.7	51.7	
		IMB02	46.9	62.9	
		센타리	22.9	53.4	
전북 익산	배추좀나방 (브로컬리)	IMB01	71.1	86.6	
		IMB02	80.2	95.2	
		센타리	62.9	98.6	
충북 제천	파밤나방 (양배추)	IMB01	50.7	65.7	
		IMB02	69.9	88.0	
		센타리	31.0	90.2	
경남 함양	목화바둑명나방 (오이)	IMB01	63.7	80.9	
		IMB02	76.0	90.2	
		센타리	45.7	90.4	
경남 산청	파밤나방 (무)	IMB01	60.3	83.1	
		IMB02	70.6	91.6	
		센타리	35.4	92.8	

위 Table 51.에서와 같이 전국 10개 포장, 7개 작물, 6개 나비목 해충에 대하여 살충활성을 시험한 결과 경남 진주 포장에서 수행한 거세미나방류를 제외하고 모든 포장에서 방제가 80%이상의 높은 방제가를 보였으며 IMB02는 대조약제 쎈타리와 비슷한 방제효과를 보였다. 또한 밤나방과 및 다른 과의 나비목 해충에서도 모두 우수한 방제가를 나타내었다. 특히 충남 금산 포장의 배추흰나비의 경우 IMB02의 방제효과는 90%이상으로 쎈타리 2000배 보다 높은 방제효과를 보였으며 또한 속효성도 우수하였다. Fig 67. 보면 무처리의 경우 거의 남아 있는 잎이 없을 정도의 심한 피해를 보였으며 IMB02의 경우는 피해가 경미한 것을 달관 조사를 통하여도 쉽게 관찰할 수 있다. 따라서 시제품 IMB02는 대조약제 쎈타리와 비교하여 살충효과는 차이가 없으나 속효성이 우수함으로 산업화가 가능할 것으로 보인다.

1. 약제처리전

2. IMB02 (약제처리 7일후)

3. 쎈타리 2000배 (약제처리 7일후)

4. 무처리 (약제처리 7일후)

Fig. 67. Control efficacy of IMB02 on lepidopteran pests infesting field cabbage

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

최종목적인 새로운 미생물농약을 개발하기 위한 본 과제의 연도별 연구개발목표는 체계적으로 계획되었고, 연구기관 사이에 유기적 연결속에 연구가 진행되었다. 이를 통해 연도별 연구목표 뿐만 아니라 궁극적 최종목표를 충실히 이행했다.

제 1 차년도는 연구의 전체적 탐색 단계로서 국내에서 분리된 제노랍두스 네마토필라 (*Xenorhabdus nematophila*) 미생물 균주의 대량생산 체계 및 살충 기작의 분석이 계획되었고, 이를 바탕으로 물질 분리의 기초단계가 이뤄지도록 계획되었다. 당해연도에 본 과제는 다양한 탄소원을 비교하며, 탄소원 최적화를 이뤘으며, 발효공정의 시스템을 구비하였다 (주관기관, (주) 비아이지). Xn의 살충기작은 면역억제 기작을 중심으로 PLA2 억제 기작 및 세포독성으로 분리되어 연구되었으며, Xn은 직접적으로 PLA2를 억제함으로 세포성면역억제를 이룬다는 결과를 유도하였다. 또한 Xn은 세포자연치사(apoptosis)를 유발하여, 곤충의 면역세포인 혈구세포를 치사에 이르게 하여 궁극적 면역억제 뿐만 아니라 치사작용에 이르게 한다는 결과를 얻었다 (이상 안동대학교). Xn 배양액의 물질 분리가 시도되었으며, 다양한 살충 및 면역억제 물질이 세균의 배양액에 존재한다는 것을 밝혔다. 또한 이들 분리과정 중에서 일부 분획구에서는 항생물질 활성을 지니고 있다는 것을 밝혔다 (이상 상주대학교).

제 2 차년도에는 유용물질, 유용균주 및 균주안정화 기술 개발이 이뤄졌다. 즉, 주관기관이 보유하고 있는 다양한 균주안정화 기술(냉동건조 및 마이크로 캡슐 기술 등)을 이용한 Xn의 균주안정화 연구가 진행되었다. 또한 세균의 생존력을 제고시키기 위한 다양한 첨가제의 효과가 검정되었다. 새로운 균주 탐색을 위해서 국내 곤충병원선충의 채집이 이뤄졌고, *Steinernema monticolum* 및 *Heterorhabditis megidis* 선충이 채집 및 동정되었다. 또한 이들로부터 공생세균이 분리 및 동정되어 각각 *Xenorhabdus koreana* (신종)과 *Photorhabdus temperata temperata*가 본 연구를 통해 국내에서 최초로 보고되었다. 이 두 균주는 살충 및 면역억제 효과가 있음을 밝혔다. Xn 배양액으로부터 물질 분리가 상주대학교에서 실시되고 생물검정은 안동대학교에서 이뤄지면서 면역억제 물질로서 benzylideneacetone (BZA) 및 proline-typrosine (PT)이 동정되었다. 특히 BZA은 항생능력 및 세포치사효과를 보유하는 것으로 밝혀

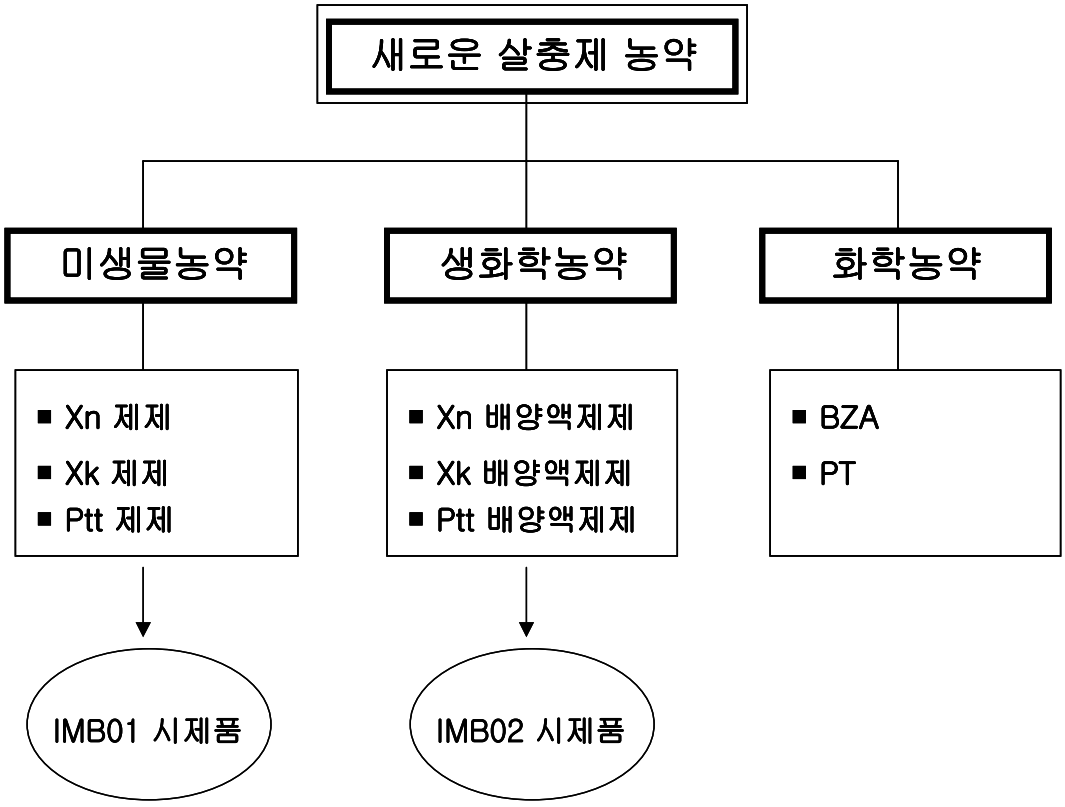
졌다.

제 3 차년도에는 1, 2 차년도의 개발 기술을 토대로 미생물 제제 선발시험 및 야외에서 미생물제제의 살충 및 살비효과가 검정되었고 시제품을 제조하였다. 주관기관에서 개발한 냉동건조 제제화와 상주대학교에서 분리한 물질을 토대로 안동대학교에서 파밤나방과 점박이응애를 대상으로 생물검정이 실시되었다. 세균 뿐만 아니라 세균 배양액 생물제제는 파밤나방과 점박이응애에 대해서 높은 실내 살충 및 살비 효과를 보유하였다. 이를 토대로 야외 땅콩밭에 발생한 파밤나방과 사과밭에 발생한 점박이응애에 살포한 결과 파밤나방에서는 상용화되고 있는 비티농약과 동일한 방제 효과를 보였다. 사과밭의 점박이응애에 대해서는 상용화되는 두 대조약제 보다 우수한 살비 효과를 보였다. 산업화를 위한 시제품 IMB01, IMB02의 저장안정성과 야외 여러 포장에서 나방류에 대한 살충시험을 실시한 결과 저장안정성 및 야외 포장에서 거세미나방을 제외한 나방류에 대해서 살충효과가 우수하다는 결과를 얻었다.

이상의 결과는 본 연구 결과가 본래의 연구 목적을 충실히 달성했을 뿐만 아니라 계획이외의 유용물질 분리의 결과물을 나오게 했다. 본 결과물은 산업화의 직전 단계에 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서 개발하고자 하는 내용은 미생물농약이다. 그러나 본 연구 수행과정에서 다음과 같은 다양한 살충제의 개발이 이뤄졌다.



이상의 개발품을 산업화하는 데는 농약의 등록화과정이라는 단계가 남아있다. 또한 Xk와 Ptt 제제에 대해서는 Xn과 같은 포장 효과 시험이 아직 진행되어야 한다.

화학농약으로서 BZA와 PT 이외에 본 과제에서는 다양한 활성 분획구를 얻었다. 이에 대한 물질 동정이 추후 이뤄져야 하며, 이는 Xk와 Ptt 세균 배양에서도 동일하게 이뤄진다면 보다 다양한 유용물질의 동정이 가능하여지리라 본다.

끝으로 BZA와 PT의 PLA2 억제 효과는 비단 곤충 뿐만 아니라 척추동물의 PLA2에도 효능을 보이고 있다. 이는 이 두 물질이 소염제의 효능을 지닐 수 있다는 추론을 낳게 한다. 국내외 소염제 시장의 규모를 고려하여 볼 때, 이러한 가능성에 대한 추후 연구가 이뤄질 필요가 있다.

제 6 장 참고문헌

1) Akhurst RJ. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. J. Gen. Microbiol. 121: 303-309.

2) Akhurst RJ. 1986. *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii*: its interaction with insect pathogenic nematodes. Syst. Appl. Microbiol. 8: 142-147.

3) Cho S, Kim Y. 2004. Hemocyte apoptosis induced by entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, in *Bombyx mori*. J. Asia-Pacifc Entomol. 7: 195-200.

4) Clark KD, Pech LL, Strand MR. 1997. Isolation and identification of a plasmatocyte
spreading peptide from hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*. J. Biol. Chem. 272: 23440-23447.

5) Dowds BCA and Peters A. 2001. Virulence mechanisms. pp. 79-98. in Entomopathogenic nematode. Ed. Gaugler R. CABI Publishing, UK.

6) Forst S, Dowds B, Boemare N, Stackebrandt E. 1993. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. Annu. Rev. Microbiol. 51: 47-72.

7) Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annu. Rev. Entomol. 42: 611-643.

8) 한상찬. 이성섭. 김용균. 1999. 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner))과 담배거세미나방 (*Spodoptera litura* (Fabricius))에 대한 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae* Weiser)의 감염력 및 증식력. 한응곤지. 38: 255-260.

9) Janeway CA Jr. 1994. The role of microbial pattern recognition in self: non-self discrimination in innate and adaptive immunity. pp. 115-122. in Phylogenetic perspectives in immunity: the insect host defense. Eds. Hoffmann, JA, Janeway CA Jr., Natori S. CRC Press, Boca Raton. FL.

10) Ji D, Yi Y, Kang G, Choi Y, Kim P, Baik N, Kim Y. 2004. Identification of an antibacterial compound, benzyligeneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. FEMS Microbiol. Lett. (In press).

11) 김용균. 박영진. 1998. 곤충병원선충의 살충기작. 안동대농업논문집. 5: 1-22.

12) 이승화. 김용균. 한상찬. 2000a. 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae* Weiser)의 냉동저장법. 한응곤지. 39: 149-152.

13) 이성섭. 김용균. 한상찬. 2000b. 선발 내건제 Keltrol-F를 이용한 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae* Weiser)의 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner))에 대한 엽면살포 방제 효과. 한응곤지. 39: 199-205.

14) 이성섭. 김용균. 한상찬. 2000c. 감염태 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae* Weiser)의 효과적 회수법. 한토동지. 5: 97-100.

15) Nielsen O and Lübeck PS. 2002. Characterization of symbionts of entomopathogenic nematodes by universally primed-PCR (UP-PCR) and UP-PCR product cross-hybridization. FEMS Microbiol. Lett. 215: 63-68.

16) Park Y, Kim Y. 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus,* the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinenerma carpocapsae*. J. Insect Physiol. 46: 1469-1476.

17) Park Y, Kim Y, Yi Y. 1999. Identification and characterization of a symbiotic bacterium associated *Steinernema carpocapsae* in Korea. J. Asis-Pacific Entomol. 2: 105-111.

18) 박영진. 김용균. 이영근. 한상찬. 1998. 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae*)의 최적 보관을 위한 환경 요인. 한토동지. 3: 10-16.

19) Poinar GO, Jackson T, Klein M. 1987. *Heterorhabditis megidis* sp. n. (Heterorhabditidae: Rhabditida) parasitic in the Japanese beetle, *Popillia japonica* (Scarabaeidae: Coleoptera), in Ohio. Proc. Helminth. Soc. Wash. 54: 53-59.

20) Vrain TC, Wakarchuk DA, Levesque AC, Hamilton RI. 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. Fund. Appl. Nematol. 15: 563-574.

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.