

632.952
L2931

최	종	# 295138-3
연구보고서		

**생물학적 제어와 환경보전을 위한
미생물살균제의 상업적 개발**

Industrial development of Microbial Fungicide for
Biological Control and Environmental Conservation

주관연구기관명 : 배재대학교
 총괄연구책임자 : 이 기 성
 연 구 원 : 이 기 성
 연 구 원 : 최 창 원
 연 구 원 : 김 영 백
 협동연구기관명 : 충남대학교
 협동연구책임자 : 김 균 언
 협동연구기관명 : 동부한농화학(주)
 협동연구책임자 : 강 태 섭

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “생물학적 제이와 환경보전을 위한 미생물살균제의 상업적 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 14.

주관연구기관명 : 배재대학교
총괄연구책임자 : 이 기 성
연 구 원 : 이 기 성
연 구 원 : 최 창 원
연 구 원 : 김 영 백
협동연구기관명 : 충남대학교
협동연구책임자 : 김 균 언
협동연구기관명 : 동부한농화학(주)
협동연구책임자 : 강 태 섭

여 백

요 약 문

I. 제 목

생물학적 제어와 환경보전을 위한 미생물살균제의 상업적 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 구미 선진국은 타국의 기술개발 규제에 의한 독점적 지배체제의 유지를 시도하고 있으며, 새로운 농약 및 신품종 개발 등의 농업분야에 있어서도 선진국의 독점적 시장지배가 계속되어 이에 따른 기술 및 제품에 대한 royalty가 급속히 상승하고 있다. 이렇게 급변하는 국제환경의 변화에 대처하기 위해서는 농업 및 환경분야의 신기술의 소유가 필수적이므로 이의 연구 개발 또한 적극적으로 추진되어야 할 것이다.

농업분야에 기여할 수 있는 생물공학적 신기술의 개발 방향은 농업 생산의 안정성 향상, 환경 보전, 농업 생산물의 부가가치 증진 등 양적, 질적 생산성을 향상시키는데 있으며, 이를 위해서는 저공해 천연 생물농약의 개발, 농산물의 안정적 생산 및 쾌적한 환경 보존을 위한 병충해 저항성 작물의 육종 등에 대한 연구가 선행되어야 할 것이다.

환경보호와 생태계 보전에 관한 Green Round 협약이 국제적 관심의 대상이 되면서, 과다한 농약 등의 남용은 심각한 문제로 대두되고 이를 대체하여 식물병 방제에 이용될 수 있는 무공해 biocide의 개발은 국제적 경쟁이 치열한 하나의 핵심 분야로 등장하고 있다. 특히 기존 농약에 의한 환경오염 문제를 극복하기 위해 생산, 저장 및 적용이 용이하고 병원균을 효과적으로 억제하는 길항 미생물의 선발과 생물활성물질의 분리 및 개량을 통한 산업화는 매우 시급한 과제의 하나이다. 따라서 본 연구는 항진균 활성을 가진 길항 미생물의 탐색 및 활성물질의 산업화라는 명제 하에 다음과 같은 목적을 갖고 수행되었다.

- 1) 새로운 항진균 활성 미생물농약 개발 및 생산
- 2) 새로운 항진균제 개발
- 3) 다기능적 미생물제제인 bio-controller 개발

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발의 최종목표는 항진균 활성세균과 이로부터 생성되는 항진균 생리활성물질 (항진균 약제, 항진균 효소 등)의 특성을 파악하여 새로운 bio-controller와 biocide를 개발하는데 필요한 기초 및 응용적인 생물학적 연구를 수행하고 이들을 상품화시키는 것이며 이를 위해 다음과 같은 연구내용 및 범위를 설정하였다.

1) 항진균 활성세균 탐색 및 항진균제의 특성규명:

- ① 고전적 탐색방법에 의한 항진균 미생물의 분리와 동정
- ② 항진균 효소의 분획, 정제 및 특성
- ③ 항진균제의 생성조건, MIC 및 활성시험

- ④ in vivo 및 in vitro 길항 test에 의한 항진균 활성물질의 활성도 측정
- ⑤ 농약 분해능 및 viability를 통한 환경보전능 조사
- ⑥ MAPK 클로닝 및 assay에 의한 target site screening
- ⑦ 세균의선별 및 조합, 세균흡착제 선정, 보조제 선정, 흡착증강제 선정, 영양염류 조성 결정, 환경내 생존률 조사, 환경내 항진균 활성능 조사, 활성세균과 진균 그리고 식물 간의 상호작용 조사, formulation의 완성을 통한 환경친화형 다기능적 미생물농약(제제) 개발

2) 항진균 물질의 정제 및 구조분석

- ① 분획, PAGE, LC, TLC, HPLC, GC/MS, NMR 등을 이용한 정제 및 구조분석

3) 항진균 물질의 작용기작 및 독성조사

- ① 세포벽 분해 또는 생체화합물 합성억제를 통한 항진균 물질의 작용기작 조사
- ② 항진균 물질 및 효소의 효능시험, cytotoxicity, 피부자극실험 및 동물실험을 통한 전반적인 독성조사

4) 항진균 활성물질 합성유전자의 클로닝 및 분자생물학적 규명

- ① genomic DNA 분리 및 library construction을 통한 항진균 효소 및 항진균 물질 합성유전자의 클로닝
- ② mutagenesis를 이용한 유전자 산물의 성격규명
- ③ PCR을 이용한 target site로서의 진균류 MAPK 유전자 클로닝
- ④ 항진균 활성 펩타이드 서열에 근거한 항진균 합성유전자의 클로닝 및 과대발현

5) 항진균 활성물질, 세균 및 미생물농약(제제)의 포장활성실험

- ① intact cell culture 및 culture extract의 적용실험
- ② 온실, 소포장, 대포장 실험
- ③ 고정화 실험
- ④ 퇴비화 (유기물질 분해능, 농약분해능; 환경보전 및 오염저감화 기능) 조사
- ⑤ 활성물질 보조제 개발

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1) 연구결과의 기대효과

본 과제에의 연구결과를 잘 활용할 경우 다음과 같은 기대효과를 충족시킬 수 있다.

① 기술적 측면

- 균주탐색, 활성검색, 제제기술, 화합물의 환경 평가 기술, 독성 평가 기술, 공정화 기

술 등이 선진국 수준으로 올라간다.

- 미생물농약 (제제), 다기능적 bio-controller에 대한 독창적인 formulation이 구축된다.
- 특히, target site screening technology (MAPK system 이용)가 확립되어 국제적으로도 창의적이며 절대적 우위를 점할 수 있는 전혀 새로운 기술력을 보유하게 된다. 진균류에 있어서 MAPK system의 분자생물학적 연구는 다양한 환경 stress에 대한 신호전달체계를 규명 할 수 있기 때문에, 진균류 환경 내 성장과 생존에 대한 귀중한 요소들을 파악할 수 있으며, 또한 기초생명과학의 독창적인 학문적 기틀을 제공할 수 있다.
- 외국의 기술 의존도 및 선진국에서의 기술 종속 관계에서 탈피한다.
- 국내의 기술 개발로 인한 신농약 개발의 기술이 축적되었기 때문에 지속적인 신농약·살균제 및 미생물농약(제제)의 제품이 탄생된다.

② 경제산업적 측면

- 경제적 측면에서는 국내에서 사용하는 농약을 자체 조달로 외화를 절약하게 되며 신농약의 수출로 외화 획득의 효과가 있다. 신농약은 그 특허가 종료되는 20여년간 세계 시장에서 독점적으로 판매되기 때문에 경제적으로 고부가가치 상품을 창출하는 것이다. 사회적으로는 UR 및 WTO 체제하에서 농산물 시장의 개방에 대비하고, 주로 하우스 시설 내에서 채소, 원예작물 같은 특수 작물을 재배하는 우리 농민들에게 선택성 저공해 농약을 공급함으로써 그들의 건강을 보호해 주는 측면과 저공해 내지는 무공해 농약의 개발은 환경보전의 의미가 크다 하겠다.
- 특히, 환경친화형, 다기능적, 무공해, 무독성 길항미생물제제 및 미생물농약이 개발됨으로써 환경보전에 필수적인 Biocontroller로서 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 유기농법에 접목될 수 있기 때문에 시장성이 넓고, 고부가가치를 나타낼 수 있고 경제 산업적으로도 매우 중요하다.
- 세계 2대 농약회사인 Monsanto사가 작년도부터 화학농약의 생산을 중단키로 한 사실은, 미생물제제 (미생물농약, 미생물살균제)의 개발에 대한 중요성을 시사한다. 이러한 시대적 배경 하에서 본 과제가 추구하는 궁극적 목표가 3차년도 연구종료시점에 이룩되었기 때문에 경제, 산업적인 영향은 지대할 것으로 예측된다(현재 상업화 준비 완료, 시제품 완성, 등록준비 진행 중).

2) 활용방안

본 연구로부터 얻어진 결과들에 대하여 구체화된 활용계획을 요약하면 다음과 같다.

- ① 본 연구로부터 탐색분리된 16종의 항진균활성세균은 미생물농약, 미생물제제 그리고 항진균제 생산개발에 이용될 것이다(미생물농약, 미생물제제는 99년 6월경에 생산시판될 예정임).
- ② 항진균활성세균 KL1114로부터 생성되는 분자량 530인 물질(KLMBF-①)은 신규선도 화합물일 가능성이 높다. 분자구조식이 밝혀지면 곧바로 물질특허출원과 동시에 유기

- 합성 및 유도체합성을 시도하여 다양한 약제개발 및 생산에 이용될 것이다. 항진균물질 KLMBF-②~④ (분자량 1045, 1058, 1074)도 역시 같은 목적으로 활용될 것이다.
- ③ 항진균활성물질 중 분자량 3kDa과 5kDa의 폴리펩타이드는 농약용으로는 물론이고 의약품 항진균제로의 개발에 이용될 것이다.
 - ④ 분자량 3kDa, 5kDa, 41kDa, 20kDa의 항진균 폴리펩타이드 합성유전자를 식물체에 재조합시켜 항진균활성 형질전환식물체를 제조하는데 이용될 것이다.
 - ⑤ 세균 유래의 항진균활성 폴리펩타이드에 관한 연구는 국내외적으로 초유의 일로서, 3kDa, 5kDa, 41kDa, 20kDa의 폴리펩타이드는 N-말단의 아미노산서열이 이미 결정되었고, 특히 41kDa의 경우 완전한 유전자의 클로닝은 물론이고 과대발현까지 성공하였으므로 항진균활성이 증진된 변형폴리펩타이드를 제조할 수 있다.
 - ⑥ 항진균활성효소를 분리, 정제한 결과 분자량이 45 KDa, 55 KDa, 59 KDa, 100 KDa 이상인 chitinolytic enzyme (Chit 45, Chit 55, Chit 59, Chit 100↑)으로 판명되었다. Chit 45, -55, -59는 exo-chitinase로, Chit 100↑는 endo-chitinase (chitobiosidase)로 밝혀졌다. 이들 세균 유래 항진균 효소 연구결과는 항진균활성 형질전환 식물체 구축에 필요한 기초자료로 이용될 수 있다.
 - ⑦ 현재까지 개발보고된 것과는 구성성분이 전혀 다르게 미생물농약 및 제제의 formulation이 완성되었다.
 - ⑧ 원제 제조 및 공정과정이 새롭게 확립되어 제조방법과 생산기술이 국내기업에 이전될 뿐만아니라 그 기술은 외국에 수출할 수도 있다.
 - ⑨ 본 연구로부터 개발된 미생물제제 (및 농약)은 병원성진균류를 방제하는 biocontroller로서 이용될 뿐만아니라, 독성유기화학 농약분해능과 유기물 분해능력이 뛰어나기 때문에 다기능적 환경친화형 토양개량제, 퇴비부숙제, 환경정화제 등으로 이용될 수 있다.
 - ⑩ 본 연구에서 클로닝된 MAPK(mitogen activated protein kinase)유전자는 표적부위탐색체계를 구축하는데 이용할 것이다(표적부위탐색체계를 이용하면 강력한 신규항진균물질을 쉽게 선별 도출할 가능성이 높다). MAPK 표적부위 탐색체계구축기술은 국내외기업에 기술이전하는데 높은 royalty를 받을 수 있는 신규기술력이기 때문이다.
 - ⑪ 본 연구에서 항진균활성을 잃은 (AF⁻) 돌연변이체는 AF⁻ 합성유전자의 특성 및 조절 연구에 관한 기초 및 응용연구에 폭 넓게 활용할 수 있다.
 - ⑫ 저비등점의 휘발성 항진균활성물질을 생성하는 KL1179 등의 균주는 잔디브라운패치병 방제에 탁월한 효능을 보여 잔디보호용 미생물농약(제제)에 활용할 것이다.
 - ⑬ 요컨대, 본 연구로부터 저공해, 선택성 항진균제 및 미생물농약과 제제가 개발되었기 때문에 기술이 국내기업에 이양되고 제품이 생산되어 국내작물의 보호는 물론, 농업생산성을 제고시킬 뿐만 아니라 세계시장에 수출되어 외화획득에 기여하여 국가 경제에 이바지하게 될 것이다. 또한 기반기술과 경험의 축적은 본 항진균제 및 미생물농약 제제에 국한되지 않고 농약전반 및 지속적인 신물질 개발에 이용됨으로써 신제품(신농약, 신의약)의 계속적인 창출이 가능하다.

SUMMARY

Final Goals of the Proposed Research

- (1) Development and production of new microbial biocides working on fungi
- (2) Development of new antifungal compounds
- (3) Development of bio-controllers that are multi-functional microbial biocides

Contents of the Research

- (1) Screening and characterization of the antifungal bacteria and compounds
- (2) Purification and structural analysis of the antifungal compounds
- (3) Action mechanisms and cytotoxicity of the antifungal bacteria and compounds
- (4) Molecular cloning and characterization of the genes involved in the synthesis of the antifungal compounds including polypeptides
- (5) Field test of the antifungal compounds, bacteria and microbial biocides manufactured in pilot scales.

Results and their application plan

- (1) Each of sixteen isolates of the antifungal bacteria screened out in this project will be applied to manufacture microbial biocides, microbe-based products and antifungal compounds (final version of the microbial biocides and microbe-based products will be available for sale on June 1999).
- (2) It is very possible that KLMBF-① (Mw. 530), one of the compounds isolated from the antifungal bacteria KL1114 be a new leading compound. As soon as the chemical structure of the compound is revealed, patentship will be filed for. In addition, we will try to synthesize the compound and its derivatives, which could be used for the development and the production of new drugs. Other antifungal compounds KLMBF-②-④ (Mw. 1045, 1058, 1075) will be used for a same purpose.
- (3) Amongst the antifungal compounds, both the 3kDa and 5kDa small polypeptides can be used for the development of the antifungal compounds in the agricultural and medicinal fields.
- (4) Recombinant techniques will be applied to construct transgenic plants expressing gene encoding antifungal polypeptide, 3kDa, 5kDa, 41kDa, and 20kDa, respectively.
- (5) N'-terminal amino acid sequences of four polypeptides, 3kDa, 5kDa, 41kDa and 20kDa, have been determined. Especially, whole gene encoding 41kDa polypeptide has been cloned and overexpressed. Therefore, mutant polypeptides with enhanced antifungal activities can be designed and tested. This type of research on antifungal polypeptides from antifungal bacteria has never been reported internationally.

(6) Purification of the antifungal enzymes has demonstrated the polypeptides with molecular weight of 45kDa (Chit 45), 55kDa (Chit 55), 59kDa (Chit 59), and more than 100kDa (Chit 100 ↑) to be chitinolytic enzymes. Three polypeptides, Chit 45, Chit 55, Chit 59, are classified as an exo-chitinase, whereas Chit 100 ↑ is found to be an endo-chitinase (chitobiosidase). These results could be served as basic data for the construction of antifungal transgenic plants.

(7) Totally new formulation of the microbial biocides and microbe-based products has been developed, which is quite different from the established one in their composition.

(8) Establishment of a new method for the synthesis of raw materials and manufacturing process allow this technology to be transferred to the domestic companies, as well as to be exported to foreign countries.

(9) The microbial biocides and microbe-based products developed from this research can be used as bio-controllers in order to remove plant pathogenic fungi. Due to their excellent degradation capability for agricultural and/or organic chemicals, they also can be used to improve soil quality environment-friendly, to ferment compost and to clean up the environment.

(10) A MAPK (mitogen activated protein kinase) gene cloned in this research will be used to establish the target site screening system (the system will allow a easy screening for new antifungal compounds) because this is a new technology which guarantees a high royalty when transferred to the domestic and foreign companies.

(11) AF⁻ (antifungal activity negative) mutants can be used for the basic and applied research on the characterization and regulation of the AF⁻ gene.

(12) The antifungal KL1179 isolate synthesizes volatile antifungal compounds with low melting point and demonstrates very effective control of brown patch disease of grasses. Therefore it will be used as a microbial biocide for the protection of grasses.

(13) In conclusion, very selective antifungal compounds, environment-friendly microbial biocide, and microbe-based products with low degree of environmental contamination have been developed. This technology will be transferred to domestic companies to make qualitative products, which will protect plants from pathogenic diseases and increase the crop yield. It will also contribute to a nation's economy when exported to the world market. The accumulation of experience and basic will also allow the constant development of new emerging compounds.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction

Section 1. Purpose and significance of the research plan

1. Requisite of the research plan
2. Current situation and problems in domestic and foreign technology
3. Future prospect
4. Validity of technology transfer

Section 2. Contents and scope of the research plan

1. Final goal of the proposed research
2. Annual contents and scope of the research plan
3. major contents and scope of the research plan for 3 years

Chapter 2. Screening and identification of antifungal bacteria

Section 1. Introduction

Section 2. Screening

Section 3. Activity spectrum of antifungal bacteria

Section 4. Classification of antifungal activity

Section 5. Activity assay of antifungal compounds

Section 6. Action mechanism of antifungal bacteria

Section 7. Characterization and identification of antifungal bacteria

Section 8. Field test of antifungal bacteria

Chapter 3. Structural analysis of antifungal compounds

Section 1. Introduction

Section 2. Characterization and purification of enzymes having antifungal activity

Section 3. Purification and structural analysis of antifungal compounds

Section 4. Purification of antifungal polypeptides

Section 5. Structural analysis of antifungal polypeptides

Chapter 4. Cloning and molecular biology of the gene involved in the synthesis of antifungal compounds

Section 1. Introduction

- Section 2. Construction and characterization of the AF⁻ mutants lacking antifungal activity
- Section 3. Cloning of the gene encoding peptides with antifungal activity
- Section 4. Overexpression and purification of the antifungal proteins

Chapter 5. Cloning of the MAPK family genes from plant pathogenic fungi

- Section 1. Introduction
- Section 2. MAPK family gene cloning by construction of genomic library
- Section 3. MAPK family gene cloning by PCR amplification

Chapter 6. Development of the environment friendly & multi-functional microbial biocide and microbe-based product

- Section 1. Introduction
- Section 2. Selection of antifungal bacteria
- Section 3. Optimal condition for the production of antifungal compounds
- Section 4. Development of Biomatrix to maintain activity of antifungal bacteria
- Section 5. Development of antifungal bacteria-Biomatrix (BM) Complex as microbial biocides
- Section 6. Stability of the microbial biocide manufactured in pilot scale
- Section 7. Field test of microbial biocide manufactured in pilot scale
- Section 8. Cytotoxicity and animal toxicity of antifungal bacteria

Chapter 7 Environmental conservation and purification capability

- Section 1. Introduction
- Section 2. Degradation capability for organics
- Section 3. Resistance and degradation capability for agrochemicals

Chapter 8. Suggestion for the application

- Section 1. Expected impacts
- Section 2. Application scheme

목 차

제1장 서론 -----13

제1절 연구개발의 목적과 중요성

- 가. 연구개발의 필요성
- 나. 국내외 관련기술의 현황과 문제점
- 다. 앞으로의 전망
- 라. 기술도입의 타당성

제2절 연구개발 내용 및 범위

- 가. 최종 연구목표
- 나. 연차별 연구개발 내용 및 범위
- 다. 3개년 주요 연구개발 내용범위

제2장 항진균 활성세균의 탐색 및 동정 -----19

제1절 서론

- 제2절 미생물의 탐색
- 제3절 항진균활성세균의 활성스펙트럼
- 제4절 항진균활성의 특성 구분
- 제5절 항진균물질의 활성도 측정
- 제6절 항진균활성세균의 작용기작
- 제7절 항진균활성세균의 특성 및 동정
- 제8절 항진균활성세균의 포장활성실험

제3장 항진균활성물질 구조분석 -----39

제1절 서론

- 제2절 항진균효소의 특성 및 정제
- 제3절 항진균활성물질 정제 및 구조분석
- 제4절 폴리펩타이드성 항진균활성물질의 정제
- 제5절 폴리펩타이드성 항진균활성물질의 구조분석

제4장 항진균 활성물질 합성유전자의 Cloning 및 Molecular biology --65

제1절 서론

- 제2절 항진균활성세균의 돌연변이체(AF⁻) 제조 및 특성
- 제3절 펩타이드성 항진균물질 합성유전자의 클로닝

제4절 항진균활성 단백질의 과대발현 및 분리정제

제5장 병원성 진균류의 MAPK family 유전자의 클로닝 ----- 77

제1절 서론

제2절 Genomic library로부터 MAPK family 유전자의 클로닝

제3절 PCR을 통한 MAPK family 유전자의 클로닝

제6장 환경친화형 · 다기능적 미생물농약(제제) 개발 ----- 83

제1절 서론

제2절 세균의 선별

제3절 항진균활성물질 생성의 최적조건 확립

제4절 항진균세균의 항진균활성 유지체계용 Bio-matrix 개발

제5절 항진균활성세균-Biomatrix(BM) Complex 미생물 농약개발

제6절 미생물농약 시제품의 안정성 측정

제7절 미생물농약 시제품의 포장활성 실험

제8장 항진균활성세균의 독성조사

제7장 환경보전과 점화능력 ----- 103

제1절 서론

제2절 유기물 분해능

제3절 농약내성 및 분해능

제8장 활용에 대한 건의 ----- 111

제1절 기대효과

제2절 활용방안

제 1 장 서론

제1절 연구개발의 목적과 중요성

가. 연구개발의 필요성

1) 연구의 배경

현재 전세계는 UR의 타결 및 WTO 체제의 출범과 함께 새로운 무역질서가 구축되고 있으며, 국내적으로는 IMF체제 하에 국가경제난도 극복해야 되는 실정에 있다. 이러한 체제하에서 선진 각국간에는 기술우위 확보를 위한 경쟁이 심화되고 있다. 또한 선진국은 타국의 기술개발 규제에 의한 독점적 지배체제의 유지를 시도하고 있으며, 새로운 농약 및 신제품 개발 등의 농업분야에 있어서도 선진국의 독점적 시장지배가 계속되어 이에 따른 기술 및 제품에 대한 royalty가 급속히 상승하고 있다. 이렇게 급변하는 국제환경의 변화에 대처하기 위해서는 농업 및 환경분야의 신기술의 소유가 필수적이므로 이의 연구 개발 또한 적극적으로 추진되어야 할 것이다.

또 최근(97년 말) 세계 최대의 농약회사인 Monsanto사가 화학유기 합성농약에 생산을 중단한다는 선언이 있었다. 농업분야에 기여할 수 있는 생물공학적인 신기술의 개발 방향은 농업 생산의 안정성 향상, 환경 보전, 농업 생산물의 부가가치 증진 등 양적, 질적 생산성을 향상시키는데 있으며, 이를 위해서는 저공해 천연 생물농약의 개발, 농산물의 안정적 생산 및 쾌적한 환경 보전을 위한 병충해 저항성 작물의 육종, 그리고 농산물 가공 및 이용 기술의 연구 등을 통하여 고부가 가치의 식품 및 의약품 소재를 개발할 수 있다.

특히 환경보호와 생태계 보전에 관한 Green Round 협약이 국제적 관심의 대상이 되면서, 과다한 농약 등의 남용은 심각한 문제로 대두되고 이를 대체하여 식물병 방제에 이용될 수 있는 무공해 biocide의 개발은 국제적 경쟁이 치열한 하나의 핵심 분야로 등장하고 있다. 기존 농약에 의한 환경오염 문제를 극복하기 위해 생산, 저장 및 적용이 용이하고 병원균을 효과적으로 억제하는 길항 미생물의 선발과 생물활성물질의 분리 및 개량을 통한 산업화는 매우 시급한 과제의 하나이다.

이러한 과제를 성공적으로 수행하기 위해서는 기능성 미생물의 탐색, 생리 생화학적 특성 규명, 생리활성물질의 구조 분석, 관련 유전자의 확인 분리 및 재조합 유전자 도입에 의한 형질전환 식물체의 개발, 생리활성물질의 변형 및 유도체 합성, 환경보전 능력 실험 및 포장 실험 등의 분야에서 국제 경쟁력을 갖춘 산, 학의 관련 분야 학자들간의 공동연구가 필수적이라 하겠다.

따라서 본 연구에서는 항진균 활성을 가진 길항 미생물의 탐색 및 활성물질의 산업화를 위해 “생물학적 제어와 환경보전을 위한 미생물 살균제의 상업적 개발”이라는 과제 하에 다음과 같은 세부 연구를 수행하고자 하였다.

- | |
|---|
| I. 항진균 활성 세균의 탐색 및 항진균 물질의 특성 규명
II. 항진균 물질의 정제 및 구조 분석
III. 항진균 물질의 변형 및 유도체 합성
IV. 항진균 활성물질 합성 유전자의 cloning 및 분자생물학적 특성 규명
V. 항진균 활성물질 및 세균의 포장 활성 실험 |
|---|

2) 연구개발의 필요성

① 기술적 측면

- ① 종전의 제법 개량에 의해 유지되어오던 국내의 농약산업은 87년 물질특허 제도의 도입으로 신물질의 개발없이 외국으로 부터의 수입에 전적으로 의존해야 하기 때문에 기술의 예측화가 예상된다.
- ② WTO 체제하에서 외국농산물과 경쟁하기 위해서 특수작물을 주로 하우스 내에서 재배하는 우리나라의 실정에서는 하우스 내의 환경상 진균에 의한 문제가 야기되기 때문에 새로운 선택성, 저공해 항진균제의 개발이 시급히 요구된다.
- ③ 국내에서 자생하는 미생물로부터 얻어지는 항진균 활성물질 (약제후보물질 및 효소 포함)은 국제적으로 독창적인 신물질을 창출할 수 있는 계기가 되며 이같이 새로운 항진균 활성물질을 분비하는 미생물은 식물병원성 진균을 제어하는 bio-controller로서 이용될 수 있다.

② 경제, 산업적 측면

- ① 전세계의 농약시장은 약 280 억불 (1994)로 전년도 대비 10.1%의 성장율을 보였다. 이중 살균제는 54 억불로 전년도 대비 14.5%의 성장율을 나타낸 품목으로 앞으로 고성장을 계속할 것으로 예상된다.
- ② 우리나라에서 자생하는 미생물로부터 개발된 농약을 사용함으로써 외국농약을 수입하는 경제적 손실을 막을 수 있으며 약효가 우수한 농약은 수출까지 할 수 있는 여건이므로 경제적인 효과가 크다.
- ③ 병충해를 방제하고 농작물을 보호하는 고성능 농약의 개발은 농산물의 증산은 물론이고 우리나라와 같이 점점 감소하는 농업인력의 획기적인 대체효과를 가져온다.

③ 사회, 문화적 측면

- ① 하우스 시설내의 환경은 밀폐되고 습기가 많기 때문에 균의 발생이 심하며 작업자에게도 농약의 피해가 더 많이 발생하므로 저독성, 선택성 살균제의 개발이 시급하다.
- ② 기존 살균제들은 병균들의 내성으로 인하여 매년 더 많은 양을 사용하게 되어 농민들의 건강문제가 야기되고 있다.

나. 국내의 관련기술의 현황과 문제점

- 국내에서 수행되고 있는 연구개발은 초기단계로 Me-too approach로 유도체를 합성하고 있으나 기존 약제에 비하여 효능이 뒤떨어지는 상태이다.
- 대부분의 신농약, 농약 연구는 화학적인 방법으로 수행되고 있으며 탐색되어진 미생물 균주를 직접 이용하여 항진균 활성물질을 개발하여 상품화한 사례는 전무하다
- 그 이유는 합성 기술에 비하여 고급 기술이 뒤떨어져 있기 때문이다.

다. 앞으로의 전망

무공해 biocide는 궁극적으로 시장에 나와 판매가 이루어져 실제로 식물병 방제에 사용되어야 한다. 따라서 미생물 항진균제 개발에 있어서는 target 길항균의 올바른 선정이 매우 중요하며 이것이 개발의 성패를 결정짓는 중요한 관건이 된다. 따라서 target 길항균의 선정에는 다음의 세가지 사항을 필수적으로 고려하여야 한다.

- ① 특허성
- ② 시장성
- ③ 한국적 실정의 감안

여기서 한국적 실정을 감안할 때 다음과 같은 3가지 우선적 선정 조건이 필요하다.

- ① 짧은 개발 기간
- ② 간단한 활성 시험과 독성 시험
- ③ 큰 시장성

무공해 biocide 개발연구는 개발기간이 오래 소요되기 때문에 국내 기업의 개발 능력과 자금 등을 고려하면 최종단계까지 연구를 수행할 수도 있으나 연구 초기 단계에서 외국 기업으로 기술 수출을 하여 돌파구를 찾을 수 있을 것으로 생각된다. 또한 큰 시장성은 기술 수출에 있어서 결정적 역할을 하므로 무공해 biocide의 거대한 시장성은 매우 큰 장점이 될 것이다. 간단한 생물학적 시험은 무공해 biocide의 개발의 경험 및 기술 축적이 미비한 국내 미생물 농약 개발에 아주 중요한 문제로서 대두될 전망이다.

라. 기술도입의 타당성

신물질 개발은 장기간에 걸친 기술, 정보, 경험의 축적으로 이루어지며, 한번의 기술도입으로 그러한 능력을 갖출 수 없으므로, 단발적인 기술도입에 의한 기술의 정립은 불가능하다. 국제적인 기술 보호 여건이나, 이를 극복해야 하는 국내 여건으로 볼 때 국내의 우수 연구진과 국내 기업이 효과적인 연구 공조 체계를 이루어 연구를 진행해야 한다. 장기적인 안목에서는 신물질 창출 연구는 기업 연구소에서 주로 수행되어야 하지만 국내 업체들의 여건과 연구내용의 성격을 고려하면 후보물질 도출까지는 학의 주도로 산이 공동 참여하고, 가능성 있는 후보 물질의 제품개발 단계부터는 기업이 주도하는 것이 바람직하다.

제2절 연구개발 내용 및 범위

가. 최종 연구목표

① 항진균 생리 활성 물질 (항진균 약제, 항진균 효소 포함)을 분리하여 구조를 규명하고 이들로부터 유도체를 합성하여 새로운 biocide를 만들어 낸다. 즉, 선도 화합물이 도출되고 개발 후보 화합물이 선정되면, 화합물의 구조와 활성관계 연구는 물론 독성, 환경영향 평가 시험, 소포장, 대포장 시험을 시행하며 적절한 후보 화합물 생산의 공정성, 경제성을 고려하여, 천연상태로 혹은 유도체로 변형하여 항진균 신농약, 항진균 신의약으로 개발, 상품화한다.

② 항진균 활성 세균 자체는 물론 정제된 항진균 생리활성물질을 적절히 고정화(immobilization)하여 bio-controller로서 적용할 수 있는 상품을 개발한다.

③ 유기물 분해능이 뛰어나고 잔류 독성이 강한 농약류를 분해할 수 있어 퇴비화와 환경 보전 및 정화에 필수적일 뿐 아니라 항진균 활성이 뛰어난 특성을 지닌 유용 미생물을 탐색함으로써 다기능적 bio-controller를 상품화한다.

④ 항진균 활성 물질 (항진균 약제, 효소)의 합성 유전자를 클로닝하고 그 유전자의 염기서열 분석, 돌연변이체 제조, 유전자의 증폭, 유전자의 조절 양상에 관한 연구 등의 분자 생물학적 연구를 통해 생물공학적 대량 발현 시스템을 확립하고 나아가 항진균 활성 물질을 생성할 수 있는 항진균 능력을 가진 형질전환 식물체를 제조한다.

⑤ ④항과 같은 분자 유전학적 연구 기법을 활용하여 항진균생리활성물질 (항진균 효소)의 안정성을 증진시킴으로써 폭넓게 활용될 수 있는 신규 변형 생리활성 물질을 제조한다. 만일 항진균 생리활성 물질 (항진균 약제)의 전구체가 오히려 유도체 합성 또는 변형에 유리할 경우 분자 유전학적으로 돌연변이를 시킴으로써 그 전구물질을 대량 얻도록 한다.

⑥ 광범위한 항진균 활성 스펙트럼을 갖는 후보화합물은 물론, 중간 범위 및 항진균에 선택적으로 좁은 범위의 활성 스펙트럼을 갖는 후보 화합물을 구분하여 연구 개발하고 상품화한다.

①~⑥의 연구 개발 목표 및 내용을 달성하는 데 필요한 항진균 생리활성 후보 화합물의 특성으로는 ㉠독성이 포유동물에 대하여 기존 농약보다 낮고, 식물에 약해가 없으면서, ㉡활성은 기존 농약들에 비하여 뛰어나지만, ㉢잔류성이 적어서 윤작에 영향이 없고 지하수, 토양, 하천수 등에 오염물질로 작용하지 말아야 한다.

나. 연차별 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위	
		연구개발내용	연구개발범위
1차 년도 (1996)	생물학적 제어와 환경보전을 위한 미생물 살균제의 상업적 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 미생물 screening - 항진균제 정제 및 구조분석 - 유도체 합성 - 활성시험(온실) - Molecular biology 	- 항진균활성세균 탐색 및 항진균제의 특성
2차 년도 (1997)	생물학적 제어와 환경보전을 위한 미생물 살균제의 상업적 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 미생물 screening, target site screening - 항진균제 정제 및 구조분석 - 유도체 합성 - 포장실험 - Molecular biology 	- 항진균활성세균을 이용한 미생물제제 개발과 항진균제 구조분석 및 유도체 합성
3차 년도 (1998)	생물학적 제어와 환경보전을 위한 미생물 살균제의 상업적 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 최종후보미생물 및 항진균제 확정(미생물 탐색 검정) - 구조분석(제제개발) - 유도체 합성(공정개발) - 독성 - 활성시험 - Molecular biology 	- 항진균성 미생물제제 및 항진균제 상업적 개발

연구개발결과에 대한 도표, 그림, 사진 등은 대단히 많기 때문에, 또 특허출원에 관련된 대외비 연구결과들은 보호되어야 하기 때문에 많은 연구결과들이 요약되고 생략될 수 밖에 없었다.

다. 3개년 주요 연구개발 내용범위 (및 목표)

세부과제명	연구개발 내용 및 범위	연구개발 목표
항진균 활성세균의 탐색 및 항진균 물질의 특성규명	1.미생물탐색 •분리 •동정 2.항진균효소 •분획 •정제 •특성 3.항진균제 활성조사 •생성조건 •MIC •활성시험 4.항진균의 작용기작 •세포벽분해 •생체화합물합성억제 5.길항 test • <i>in vivo</i> • <i>in vitro</i> 6.환경보전능 •농약분해능 viability 7.Target site screening (MAPKs 클로닝 및 assay) 8.환경친화형 다기능적 미생물제재 개발 •세균선별 및 조합 •세균혼탁제 선정 •보조제 선정 •혼탁증강제 선정 •영양염류 조성 •환경내 생존률 •환경내 항진균 활성능 •활성세균, 진균, 식물의 상호작용 •formulation 완성	① 새로운 기능성 (항진균성) 미생물 농약(제제) 개발 및 생산 ② 새로운 항진균제 개발
항진균 물질의 정제 및 구조분석	9. 항진균제 정제 •용액을 사용한 분취 •HPLC을 이용한 분취 •NMR •GC/MS	① 새로운 기능성 (항진균성) 미생물 농약(제제) 개발 및 생산 ② 새로운 항진균제 개발
항진균 물질의 변형 및 유도체 합성	10.항진균제 변형 11.항진균물질의 유도체합성 12.항진균제의 독성 조사 •항진균물질 및 효소의 효능시험 •Cytotoxicity •피부자극 실험 •동물실험 13.항진균물질의 구조분석 14.산업재산권출원	① 새로운 기능성 (항진균성) 미생물 농약(제제) 개발 및 생산 ② 새로운 항진균제 개발
항진균활성물질 합성유전자의 cloning 및 분자 생물학적 특성 규명	유전자의cloning과 특성분석 •cloning •subcloning •mutagenesis •sequencing •gene regulation •overexpression •MAPKs family cloning, sequencing 및 characterization	① 새로운 기능성 (항진균성) 미생물 농약(제제) 개발 및 생산 ② 새로운 항진균제 개발
항진균 활성물질 및 세균의 포장 활성실험	16.적용실험(포장실험) •온실 •소포장 •대포장 •intact cell culture •culture extract 17.고정화방법 18.Composting 19.활성물질 보조제 개발	① 새로운 기능성 (항진균성) 미생물 농약(제제) 개발 및 생산 ② 새로운 항진균제 개발

제2장 항진균 활성세균의 탐색 및 동정

제1절 서론

항진균제는 크게 salicylic acid, aluminum salt, zinc salt, 요오드, 에탄올, 유기산 (benzoic acid, propionic acid 등)과 같이 표면의 감염부위에 직접 작용하는 국소성 제제 (nonsystemic agent)와 많은 조직과 기관에 흡수 이행되어 작용하는 전신성 제제 (systemic agent)로 대별해 볼 수 있다.

현재 사용되는 전신성 항진균제 계열을 살펴보면, ① phenol-ether 화합물인 griseofulvin (*Penicillium* sp.), ② polyene 계열인 amphotericin B (*Am B*; *Streptomyces nodosus*), hamycin (*Streptomyces pimprina*), nystatin (*Streptomyces noursei*), natamycin, ③ pyrimidine 계열인 flucytosine (5FC), ④ azole 유도체인 miconazole (MON), ketoconazole (KET), fluconazole (FLU), genaconazole (GEN), itraconazole (ITR), saperconazole (SAP), ⑤ peptide 계열인 cilofungin (CIL), saramycetin (*Streptomyces saraceticus*), ⑥ allylamine 계열인 terbinafine (TER), naftifine, ⑦ morpholines 계열인 fenpropimorph 등이 대표적이라 할 수 있다. 따라서 농작물에 가장 큰 피해를 가져다 주는 병원성 진균류의 방제에 관여할 뿐 아니라, 의학적으로 진균 감염증 치료에 실용화할 수 있는 저독성, 특이성, 속효성 항진균제의 개발은 무엇보다 시급한 실정이다. 이들 중 많은 종류의 전신성 항진균제가 미생물로 부터 발견되었고, 이들의 유도체가 많이 활용되고 있으나, 항진균 활성 스펙트럼, 독성 문제 등으로 많은 문제점을 내포하고 있다.

한편, 생물학적 제어(biological control) 방법을 통한 질병 억제에 관여하는 실제적 미생물 대사산물은 항진균제를 포함하여 siderophore, NH_3 , 효소, hydrogen cyanide 등을 들 수 있으며 이들이 길항적 활성을 보인다. 진균류에 대한 생물학적 제어에 활용되는 세균들은 *Pseudomonas fluorescens* (siderophore 생성), *Enterobacter cloacae*, *P. ultimum* (균사 성장 억제, 암모니아 발생), *P. putida* (뿌리감염 병원성 진균류 제어), *P. syringae* (잎에 적용되는 길항 세균) 등을 들 수 있다. 이처럼 항진균 활성을 나타내는 천연 항진균제 개발은 물론 이들 항진균제를 생성하는 세균류들을 생물학적 제어자로서 활용하는 문제가 농학, 약학, 의학 등의 제분야에서 집중적으로 요구되고 있다. 이와 같이 항진균활성세균의 탐색 및 항진균 생리활성 물질의 연구 개발 과제는 시대적 요청에 부응할 뿐 아니라, 부가가치가 매우 높은 생명공학 기술 분야로서, 신농약 개발과 상품화에 일천한 우리나라에서 어떤 분야 보다 먼저 시급히 시도되어야 한다.

제2절 항진균활성 미생물의 탐색

식물병원성 진균류(*Mucor* sp., *Helminthospora* sp., *Fusarium oxysporum cucumerium*, *Fusarium culmorum* 등)에 대한 항진균활성세균을 분리하기 위하여 퇴비,

옥비, 톱밥, 논, 밭, 임야, 하천수, 활성오니 등으로부터 시료를 채취하여 다양한 배지들(NA, Pseudomonase분리용 배지, EMB, 방선균 분리용 배지 등)을 사용하여 1차 순수분리균 115,400개를 분리하였다.

1차 분리균의 항진균활성을 확인하기 위하여 NA, PYE, TYE 배지 등에서 *Mucor* sp., *Helminthospora* sp., *Fusarium oxysporum cucumerium*, *Fusarium culmorum*의 lawn을 간 후 patching 방법으로 1차 순수분리균을 도말하여 항진균활성이 강한 bacteria strain 102개를 2차 선별하였다.

추가적으로 2차년도에는 1차년도에서 선별한 항진균활성세균과는 다른 항진균활성스펙트럼을 보이는 균주를 탐색·선별할 목적으로 1차년도와 다른 환경으로부터 12,700여 균주를 1차 분리한 다음, 종류가 다른 식물병원성 진균류 6종(*Mucor* sp. *Fusarium oxysporum cucumerium*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Pyricularia oryzae*등)과 동물병원성 균류 1종 (*Candida albicans*)을 대상으로 여러차례의 길항 실험을 실시하여 강한 항진균활성을 보이면서 독특한 항진균활성스펙트럼을 보이는 11개의 새로운 항진균활성세균을 최종적으로 추가 선별하였다(KL1314, 1321, 1322, 1326, 1330, 1332, 1367, 1411 및 KLP21, 22, 26).

현재 1, 2차년도에서 탐색·선별되어진 후보미생물들(102+11= 113)은 다음 단계의 여러 가지 실험(동정, 항진균활성스펙트럼, 항진균활성도, 물성, 포장실험, 분리정제 등등)을 거쳐 신규화합물을 생성할 가능성이 높은 균주들을 재차 확인·선별한 결과, 최종 후보대상균주로 22개 세균(KL1112, 1114, 1121, 1136, 1137, 1143, 1176, 1178, 1179, 1187, 1188, 1198, 1105, 1314, 1321, 1326, 1330, 1367, 1411 및 KLP21, 22, 26)을 우선적으로 지정하였다.

제3절 항진균활성세균의 활성스펙트럼

식물병원성 진균류 *Mucor* sp., *Helminthospora* sp., *Fusarium oxysporum cucumerium*, *Fusarium culmorum*등을 대상으로 1차년도에 선별한 102균주들의 항진균활성 스펙트럼을 조사한 결과 아래 도표와 같다.

항진균활성 스펙트럼	항진균 활성 물질		후보 미생물 소계
	항진균제	항진균 효소	
광범위(4-6종류/6종 공시진균류)	13	11	24
중간범위(2-3종류/6종 공시진균류)	13	46	59
특이적(1종류)	7	12	19
후보 미생물 소계	33	69	102

2차년도에 추가적으로 분리한 항진균활성세균을 대상으로 식물병원성 진균류 6종(*Mucor* sp. *Fusarium oxysporum cucumerium*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Pyricularia oryzae*등)과 동물병원성 균류 1종 (*Candida albicans*)에 대한 항진균활성도와 스펙트럼을 분석하기 위하여 병원성 진균류들이 도말된 PDA(Difco co.)배지에 paper disk(직경 6mm)을 이용하여 Nutrient

broth(Difco co.)에서 전배양된 세균배양액을 접종하여 30℃에서 2~3일간 배양한 결과 나타난 항진균활성스펙트럼은 다음 도표와 같다.

항진균 활성 스펙트럼	항진균 활성 물질		후보 미생물의 소계
	항진균제	항진균 효소	
광범위 (4-7종류/7종 공시진균류)	8	1	9
중간범위 (2-3종류/7종 공시진균류)		2	2
후보 미생물 소계	8	3	11

1, 2차년도에는 식물병원성 진균류 6종을 대상으로 항진균 활성스펙트럼을 분석하였지만 3차년도에는 더 많은 공시 식물병원성 진균류를 대상으로 항진균 활성스펙트럼을 분석한 결과, 균주별로 광범위 활성스펙트럼(KL1114, 1143, 1367)을 보인 균과 특이적으로 좁은 범위의 항진균 활성스펙트럼을 나타낸 균으로 확실히 대별할 수 있었다.

항진균활성스펙트럼 분석을 위한 대치 배양실험결과 중 하나의 예를 Fig. 2-3-1에 나타내었다.

제4절 항진균활성의 특성 구분

가) 세포벽 분해효소 분비 균주

1, 2차년도에 선별된 길항세균 중 세포벽(chitin, glucan)을 분해하는 효소에 의해서 항진균활성이 나타나는지 여부를 판단하기 위해 첫째, 형광기질(MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminide, MUF- β -D-glucoside 등)을 이용하여 각각의 효소활성도를 측정하고 둘째, 세포벽 성분을 첨가한 배지를 이용하여 투명대 크기를 비교한 결과 효소활성도가 가장 우수하면서 항진균활성이 높은 9균주(KL1105, 1121, 1162, 1174, 1182, 1188 및 KLP21, 22, 26)를 세포벽분해효소에 의한 항진균활성 후보미생물로 최종 선택하였다.

나) 항진균 생리활성물질 생성균주

1, 2차년도에 탐색·선별한 균주들중 세포벽분해효소의 활성도가 매우 낮거나, 전혀 나타나면서 강한 길항성을 보이는 세균은 항진균생리활성물질(항진균제)을 생성하는 것으로 판별하였다. 이들 세균들중 여러 가지 단계의 실험들(동정, 항진균활성도, 분리 정제 등등)을 거쳐 12개 균주 [1차년도 선정(KL1136, 1137, 1179, 1187, 1189) 및 2차년도 선정(KL1114, 1121, 1143, 1314, 1321, 1326, 1330, 1367)]를 최종적으로 항진균제 생성 후보미생물로 채택하였다.

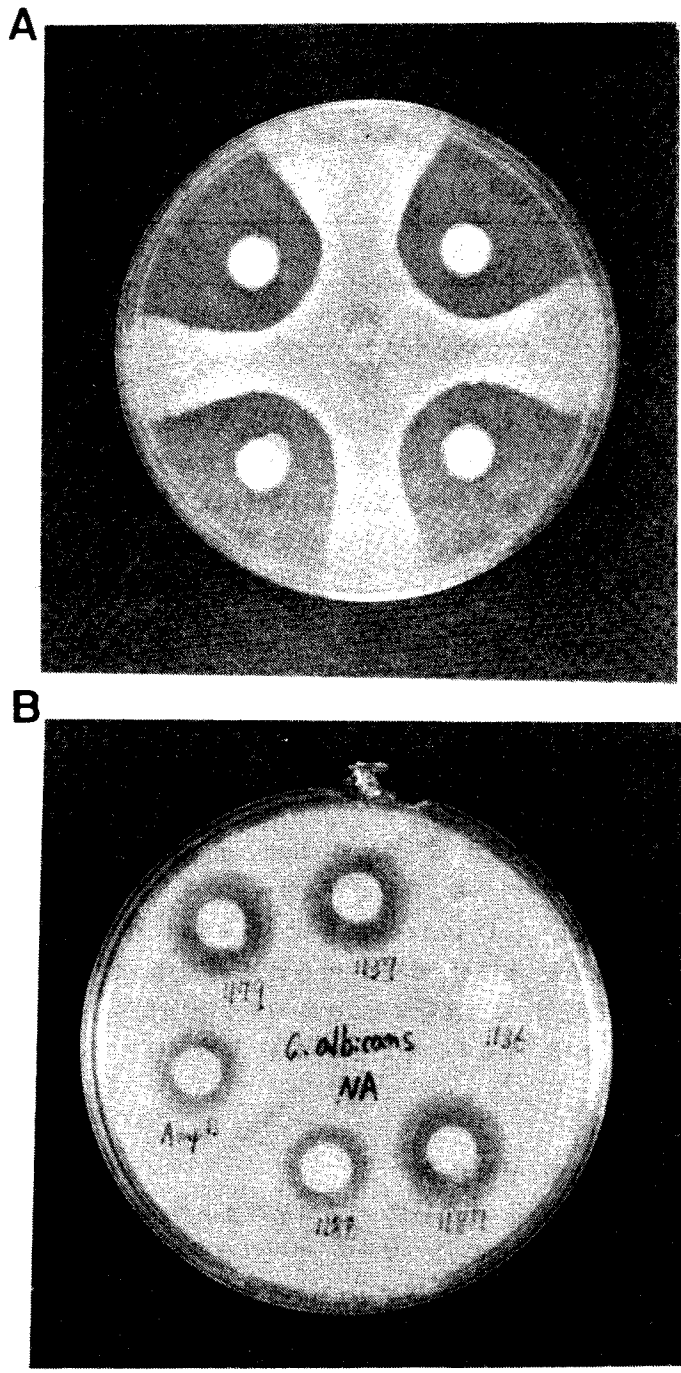


Fig. 2-3-1. Antifungal activity of *Alcaligenes faecalis* KL1179(KCTC 8914P) against pathogenic fungi
A: *Rhizoctonia solani*, B: *Candida albicans*

Table. 2-3-1 Antifungal spectra of antifungal bacteria against several plant pathogenic fungi and one animal pathogenic fungi

Antifungal bacteria	Antifungal activity														
	C. A.	M. S.	P. O.	P. U.	R. S.	B. D.	B. S.	B. C.	C. G.	P. G.	M. M.	P. C.	A. S.	F. O.	S. S.
KL1112	○				○		○	○	○	○	●			○	
KL1114	◎	●	●	◎	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
KL1121	◎	●	●		●		●		●					●	
KL1136		○			○										○
KL1137	●	◎			◎										○
KL1143	◎	◎	◎	◎	◎	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
KL1178	●	●	○		◎										
KL1179	●	●	○		●			○							
KL1188	●	●			●										
KL1314	○	○	●	●	◎	◎	●		○		○	●		◎	◎
KL1321	○	◎	●	○	◎	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
KL1326	○	◎		●	◎	●									
KL1330	○	◎	◎		◎	●	●	●	●	●	●		●	●	●
KL1367	○	◎	●	○	●	●	◎	●	●	●	●	●	●	●	●
KL1105	◎	◎		○		◎					○	◎		◎	
KLP21				○			●				○			○	○

● : very good ◎ : good ○ : small efficacy

C. A. : *Candida albicans*, M. S. : *Mucor* spp.(부패병), P. O. : *Pyricularia oryzae*(벼도열병) P. U. : *Pythium ultimum*(입고병), R. S. : *Rhizoctonia solani*(벼문고병), B. D. : *Botryoshaeria dothidea*(사과부패병), B. S. : *Bipolaris sorokniana*(깨씨무늬병), B. C. : *Botrytis cinerea*(잿빛곰팡이병), C. G. : *Colletotrichum gloeosporioides*(고추탄저병), P. G. : *Pyricularia grisea*(벼도열병), M. M. : *Mycosphaerella melonis*(수박덩굴마름병), P. C. : *Phytophthora capsici*(고추역병), A. S. : *Alternaria solani*(토마토 겹등근무늬병), F. O. : *Fusarium oxysporum*(입고병, 근부병), S. S. : *Sclerotinia sclerotiorum*(균핵병), P. U., R. S., F. O. : 적용작물 다

다) 현재 1, 2차 년도를 통해 선별된 균들은 모두 광범위 활성스펙트럼을 보이거나 특이적으로 강한 항진균활성을 나타내는 세균들이다.(세포벽 분해효소를 내면서 항진균제를 생성하는 세균도 있음: KL1114, KL1121, KL1143)

Table 2-4-1. Isolation of bacteria producing chitinolytic enzyme and antifungal agent

	Chitinase and glucanase ^a	Antifungal agent(compound) ^b
Strain No.	KL1101, 1102, 1103, 1104, 1105 •, 1107, 1108, 1109, 1111, 1113, 1114 ◊, 1116, 1117, 1119, 1121 ◊, 1123, 1124, 1125, 1126, 1127, 1128, 1130, 1131, 1132, 1133, 1134, 1135, 1140, 1141, 1143 ◊, 1147, 1151, 1157, 1158, 1159, 1160, 1162 •, 1163, 1164, 1165, 1166, 1167, 1168, 1169, 1170, 1171, 1172, 1174 •, 1175, 1176, 1177, 1178, 1182 •, 1183, 1184, 1185, 1186, 1188 •, 1190, 1191, 1192, 1193, 1194, 1195, 1196, 1197, 1200, 1201, 1202, KLP21 ◊, KLP22 ◊, KLP26 ◊	KL 1106, 1110, 1112, 1115, 1118,1120, 1122, 1129, 1136 •, 1137 •,1138, 1139, 1142, 1144, 1145, 1146, 1148, 1149, 1150, 1152, 1153, 1154, 1155, 1156, 1161, 1174, 1179 •, 1180, 1181, 1187 •,1189 •, 1198, 1199, 1314 ◊, 1321 ◊, 1322 ◊, 1326 ◊,1330 ◊,1332 ◊,1367 ◊, 1411 ◊
	72개	41개

^a -chitinolytic enzyme-producing bacetria

^b antifungal agent-producing bacteria

• : 1차년도에 선별한 균주, ◊ : 2차년도에 선별한 후보미생물 및 ◊ : 2차년도에 최종후보미생물로 재선별된 균주

제5절 항진균물질의 활성도 측정

가. *in vivo* 길항시험

1차년도에 후보미생물로 선별된 항진균활성물질 생성세균들을 2종의 공시 진균류에 대하여 patching방법과 filter paper disk 방법으로 여러종류의 배지위에서 길항시험하여 투명억제대를 측정하여 상대적인 항진균 활성도를 비교하였는데, 그 결과, 일반적으로 NA, TSA배지에서 강한 길항성을 나타내었으나, 항진균활성세균, 공시진균류, 배지 종류에 따라 항진균활성도가 달라짐을 알 수 있었다.

2차년도에 새롭게 선별된 후보미생물들을 식물병원성 진균류 6종(*Mucor* sp., *Fusarium oxysporum cucumerium*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Pyricularia oryzae*등)과 동물병원성 균류 1종(*Candida albicans*)을 대상으로 항진균활성도를 비교한 결과, 대부분 광범위한 항진균 활성을 나타내었다.

Table 2-5-1. Comparison of antifungal activity of antifungal bacteria on various culture media

Bacteria Strains	Inhibition zone(mm) ^a			
	<i>F. oxysporium cucumerium</i>		<i>Mucor</i> sp.	
	PYE	NA	PYE	NA
KL 1136	1.5	4	<1	4
1137	3	5	0.7	8
1179	3	4	0.2	5
1187	3.5	6	0.2	7

Bacteria Strains	Inhibition zone(mm)													
	<i>F. oxysporium cucumerium</i>							<i>Mucor</i> sp.						
	PDA	SDA	TSA	GM63	GM63+0.05%YE	CZ-dox+0.05%YE	Glu-Mops	PDA	SDA	TSA	GM63	GM63+0.05%YE	CZ+0.05%YE	Glu-Mops
KL 1136	3	1.5	3	<1	1.5	2.0	<1	<1	<1	2.5	<1	<1	<1	<1
1137	3.5	1.5	3.5	<1	2.0	3.0	<1	<1	<1	3.5	<1	<1	<1	<1
1179	4	2	3	<1	2.0	3.5	<1	<1	<1	3.5	<1	<1	<1	<1
1187	2.5	1.5	2	<1	2.0	3.5	<1	<1	1.5	2	<1	<1	<1	<1

Table 2-5-2. Antifungal activity and antifungal spectra of antifungal bacteria

strains	Antifungal activity						
	<i>C. albicans</i> ^a	<i>R. solani</i>	<i>Mucor spp.</i> ^o	<i>B. cinerea</i> ^c	<i>P. oryzae</i>	<i>F.o.cucum-erium</i>	<i>C. gloesporioides</i>
KL1114	++	++	+++	+++	++	+++	+++
KL1121	++	+++	+++	+	+++	+++	+++
KL1143	++	++	++	++	++	+	++
KLP 21	++	-	-	-	+	-	+++
KLP 22	++	-	-	-	++	-	-
KLP 26	++	+	-	-	+	-	+++
KL1314	+	++	+	+	+++	++	++
KL1321	+	++	++	++	+++	++	++
KL1326	+	++	++	+++	++	+++	++
KL1330	+	++	++	++	+++	++	++
KL1367	+	+++	++	+++	+++	++	+++

^a Incubation in NA medium, ^b incubation in TSA(Difco co.) medium, ^c incubation at 20°C

* Inhibition zone: ++:1~2 mm, +++:~4 mm, ++++: > 5mm

나. *in vitro* 길항시험

Nutrient broth(Difco co.)와 Glucose-M63배지에 전배양된 항진균 세균을 NB와 GM63배지에 접종하여 30℃에서 3일간 배양한 후 12000 rpm(4℃)로 원심분리하여 상등액을 40℃에서 rotary evaporator를 이용하여 감압농축하였다. 농축된 배양액을 구경이 0.2 μ m되는 membrane filter로 여과한 후 병원성 진균류가 접종된 고체(PDA) 및 액체배지(NB)에 정량적으로 접종하여 항진균 활성물질의 활성도를 측정하였다. 그 결과, KL1114, KL1121, KL1143 균주들이 생성하여 세포밖으로 분비하는 항진균활성물질(농축된 배양액에 함유된)은 농도를 높일수록(농축된 배양액을 더 첨가할수록)항진균활성이 비례적으로 높게 나타났다(표 1과 2).

Table 2-5-3. Susceptibility test of antifungal agents in agar medium

항진균 세균	배양액 농축율	Inhibition zone(mm)								
		<i>C. albicans</i>			<i>R. solani</i>	<i>Mucor spp.</i>	<i>B. cinerea</i> ^a	<i>P. oryzae</i>	<i>F.o.cucum-erium</i>	<i>C. gloesp-oriodes</i>
KL1114	40배	4.5 ^o	2 ^c	3 ^o	++	+++	+++	+++	+++	+++
KL1121	33배	7	1	4	++	++	+++	-	+	++
KL1143	37배	3	2	3	-	++	-	-	+++	+++
KL1314	33배	0	0	7	-	-	-	-	+	-
KL1321	29배	4	0	0	+	++	++	-	+++	-
KL1326	36배	0	6	0	-	-	-	-	-	-
KL1330	33배	3	0	0	++	+++	+++	+	+++	++
KL1367	33배	2.5	2	0	+	++	++	+	++	+++

*C. albicans*는 NA 배지, *Mucor spp.*는 TSA배지, 나머지 병원균은 PDA에서 활성도 측정, ^a 20℃에서 배양, ^b complete inhibition zone(완전성장억제대) mm, ^c delayed growth zone(지체성장억제대) mm, ^d partial inhibition zone(부분성장억제대) mm
 +: 성장억제대 1~2 mm, ++: 성장억제대 3~4 mm, +++: 성장억제대 5 mm이상

Table 2-5-3. Susceptibility test of antifungal agents in liquid medium

항진균세균	배양액 농축율	항진균 활성도(최소억제농도)								
		0	10	20	40	80	160	320	640	1280
KL1114	40배			±	■	+	+	+	+	+
KL1121	33배			■	+	+	+	+	+	+
KL1143	37배				±	■	+	+	+	+
KL1314	33배									■
KL1321	29배							■	+	+
KL1326	36배							±	■	+
KL1330	33배									■
KL1367	33배					±	■	+	+	+
Amp. B	5mg/ml				■	+	+	+	+	+

NB 3ml에 전배양된 *C. albicans* 100 μ l를 접종한 후 농축액을 10~1280 μ l를 각각 접종
 +:complete inhibition, ±:delayed growth, 대조약제:Amphotericin B, Control:*Candida albicans* ■ : 최소억제농도

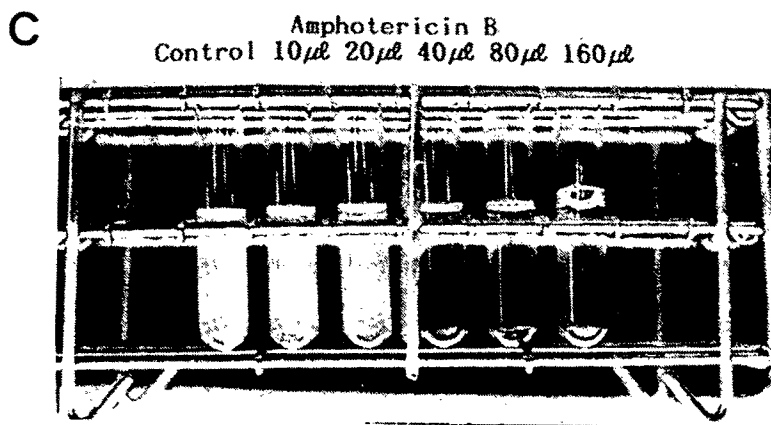
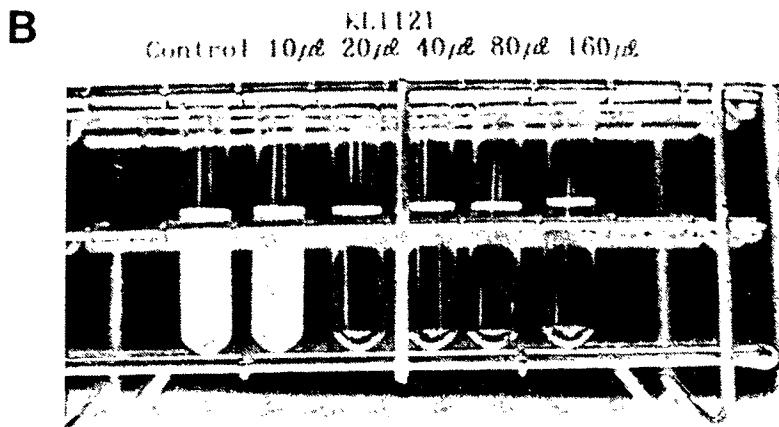
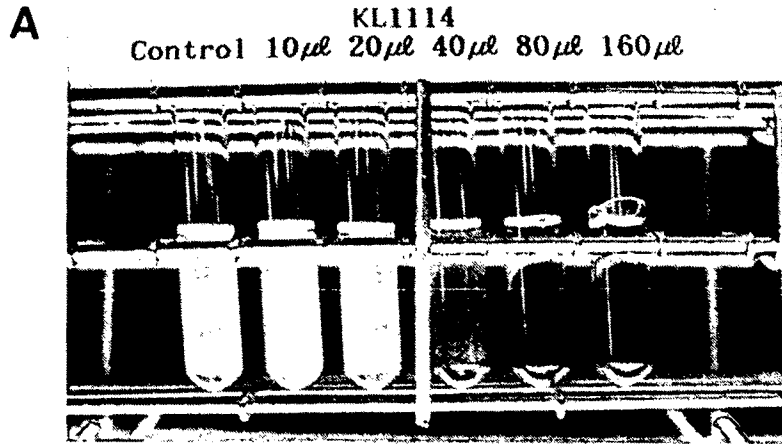


Fig. 2-5-1 Susceptibility testing of antifungal agents in liquid medium
A: KL1114, B: KL1121, C: Control(amphotericin B)

* Inoculation of subcultured *C. albicans* 100 μ l in NB 3ml and then inoculation of concentrated sample according to the concentration.

제6절 항진균활성세균의 작용기작

1차년도 연구에서는 항진균 활성물질의 작용기작을 파악하기 위하여 평판확산법에 의해 형성된 clear region, impaired region(inhibition zone)과 normal region(control)을 SEM(주사전자현미경)과 interference PhotoMicroscope로 관찰한결과, impaired region은 normal region에 비하여 활성물질의 작용에 의해 심하게 군사가 불규칙적으로 절편되어 있고, 또한 포자의 생성도 거의 억제되고, 형태 및 크기도 불규칙하고 손상되어 항진균물질들은 세포벽합성억제, 포자생성억제, 생체내 주요 물질대사 억제 혹은 세포벽 분해와 같은 작용기작을 가진 것으로 예측하였다.

3차 년도에서는 추가적으로 선별된 항진균세균들의 여러종류의 병원균에 대한 항진균 활성 작용기작을 분석하기 위하여 병원성진균이 접종된 고체배지(PDA, TSA)상에서 paper disk를 이용하여 항진균 세균을 병원성 진균류와 30℃에서 3일간 대치배양을 시키면서 병원성 진균류의 성장억제 정도 및 형태를 관찰하고 영양분 경쟁여부 등을 조사하였다. 그 결과, 군사형성 억제, sporulation 유도, 영양분 경쟁 등의 형태로 병원균의 성장을 억제하였다.

Table 2-6-1 Antifungal action mechanism of antifungal bacteria

병원균	작용기작(항진균세균에 의한 병원균의 성장억제 형태)
<i>Mucor</i> sp.	1114>1321>1143, 영양분경쟁없음, 1136=1137=1179=1187=1188
<i>B. cinerea</i> (오이갯빛곰팡이)	1114≥1326>1367, disk위에 hyphae형성 억제
<i>P. oryzae</i> (벼도열병)	1121,1326,1330,1167,KLP21,1321,1314 ① 영양분경쟁없음 ② 군사성장억제(lysis) ③ 곰팡이 가장자리 억제부위 yellow pigment형성 1367,1411,1112 ① 영양분경쟁
<i>F. o. cucumerium</i>	1114≥1367 ① 1114,1367 black pigmentation(=sporulation 유도) ② 1114 영양분경쟁없음(성장모양에 각이 안생김) ③ 군사성장억제(lysis) 1121>1326>1330>1143 ①1143,1321 black pigmentation ② 1121,1326 영양분경쟁없음 ③ 1411,1321 성장가장자리 제한
<i>C. gloeosporioides</i> (고추탄저병)	1114≥1367 ① 1114,1367 black pigmentation(=sporulation 유도) ② 1114 영양분경쟁없음(성장모양에 각이 안생김) ③ 군사성장억제(lysis) 1321>1121>1326>1314 ① 영양분경쟁없음 1330>1143>1411 ①성장 가장자리 제한(각이 생김)

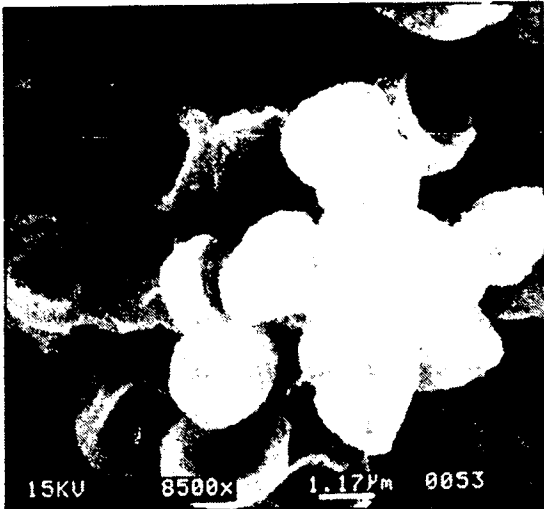
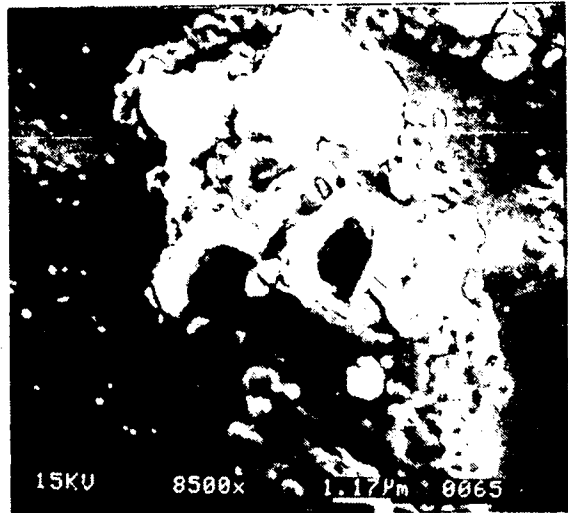
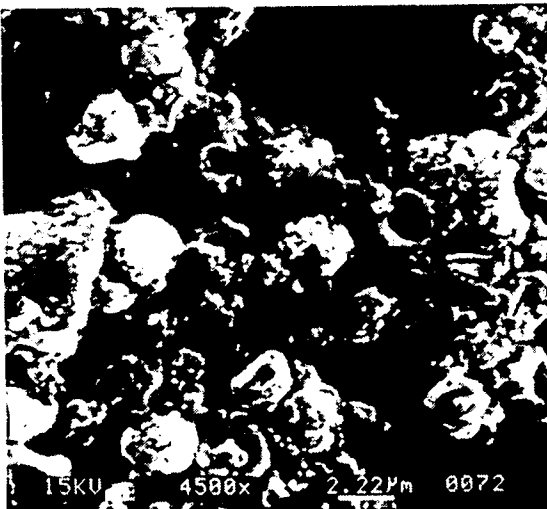
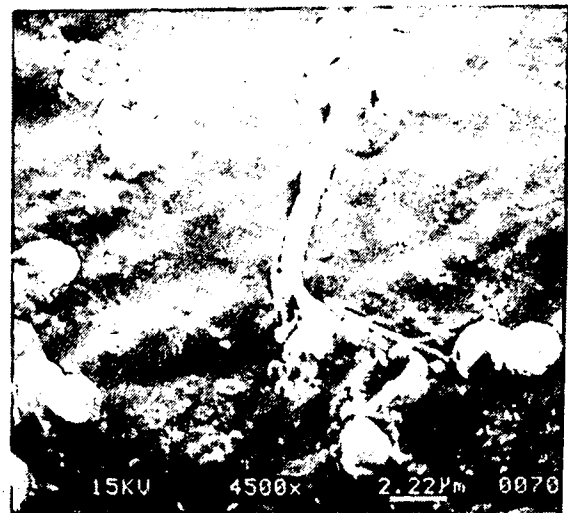
A**B****C****D**

Fig. 2-6-1 SEM photographs showing antifungal action mode of antifungal bacteria against *Aspergillus* sp. Spores are broken down and cell lyses are shown. A: Control(*Aspergillus* sp), normal growth region, B: KL1136, impaired region(inhibition zone), C: KL1179, impaired region(inhibition zone), D: KL1187, impaired region(inhibition zone)

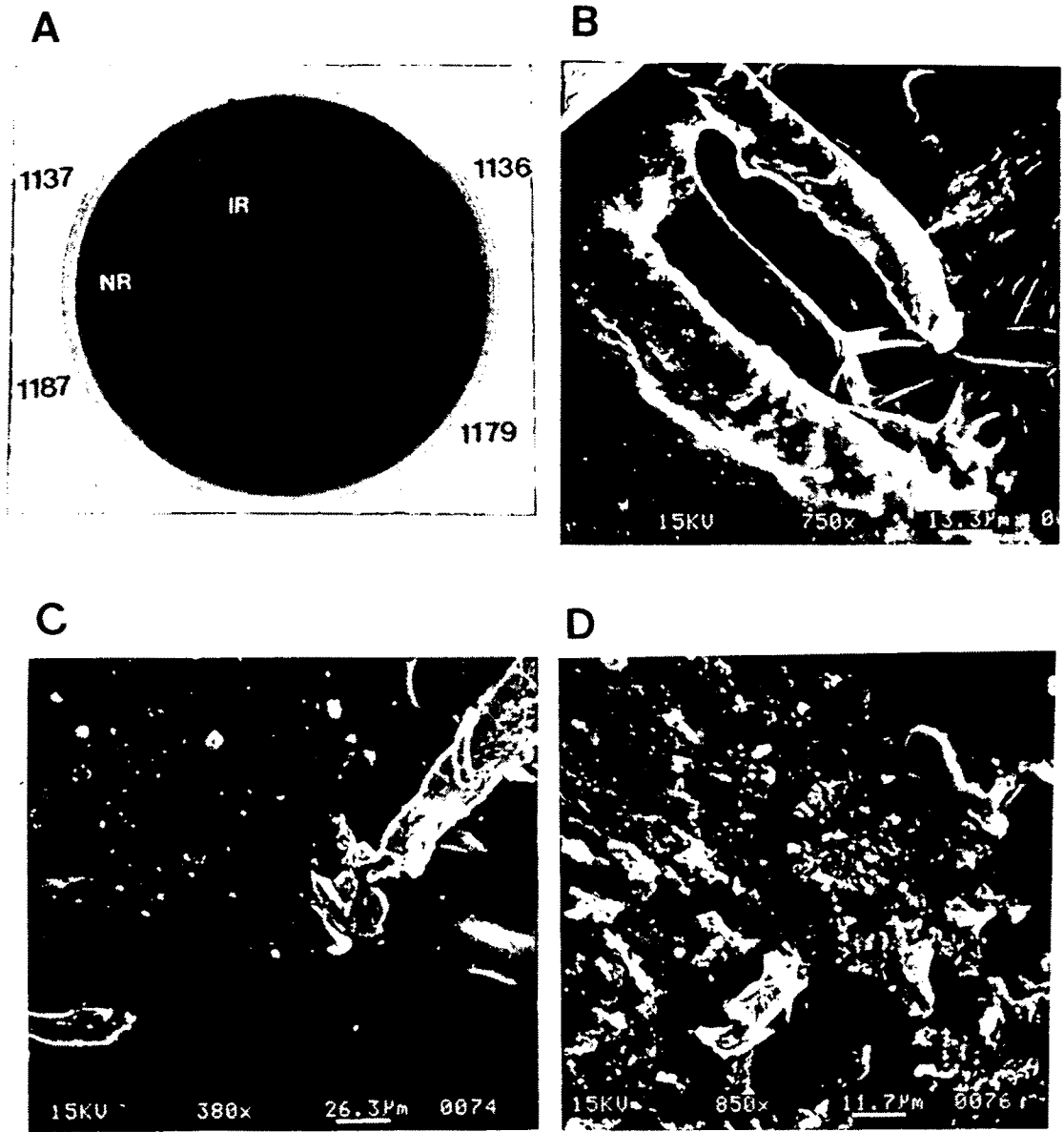


Fig. 2-6-2 SEM photographs showing antifungal action mode of antifungal bacteria against *Mucor* sp.
 A: *Mucor* sp, NR(normal growth region), IR(impaired region), B: *Mucor* sp. normal growth region, C: KL1137, impaired region(inhibition zone), D: KL1179, impaired region(inhibition zone)

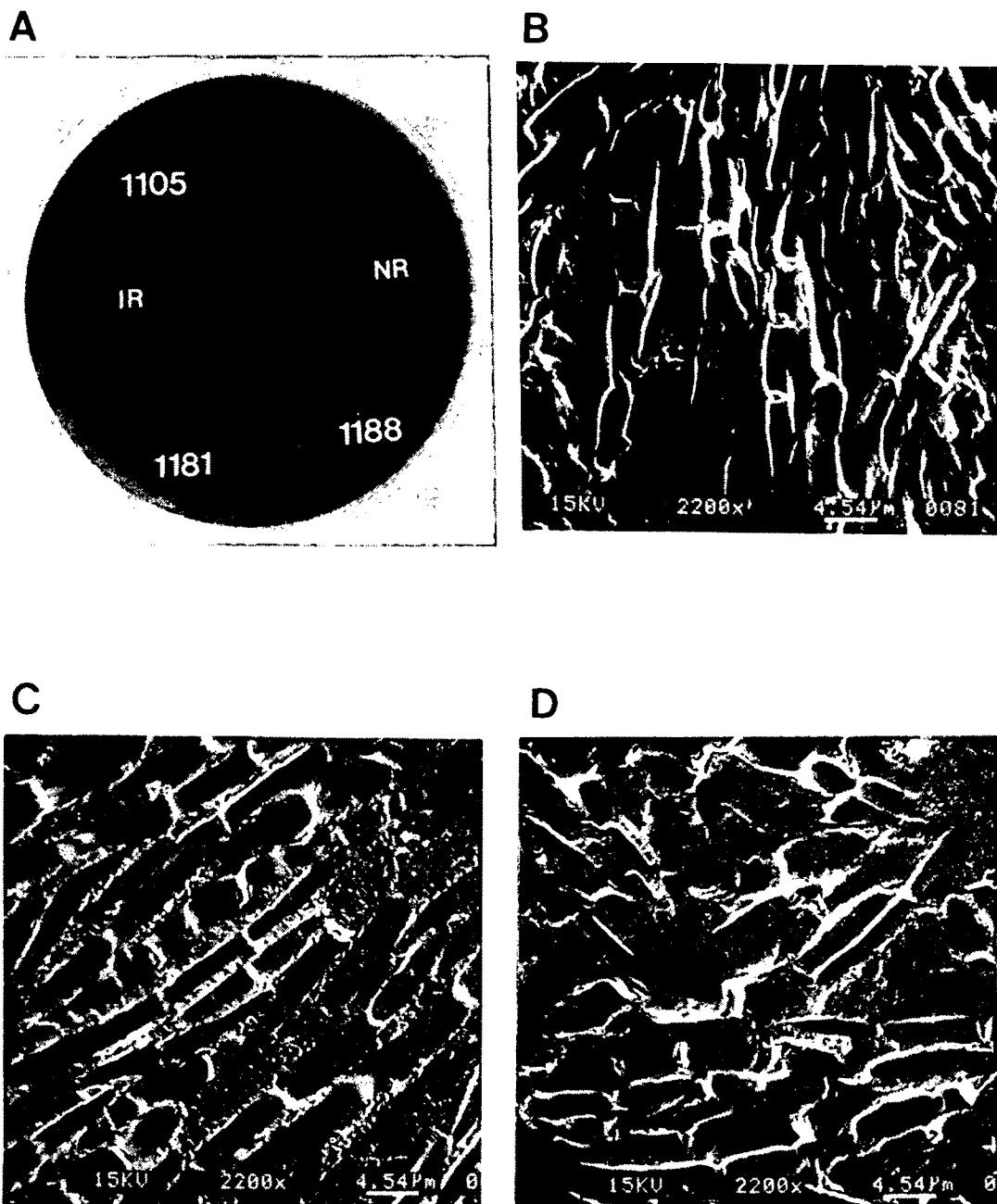


Fig. 2-6-3 SEM photographs showing antifungal action mode of antifungal bacteria against *Fusarium moniliforme*.
 A: *Fusarium moniliforme*, NR(normal growth region), IR(impaired region), B: *Fusarium moniliforme* normal growth region, C: KL1105, impaired region(inhibition zone), D: KLP21, impaired region(inhibition zone)

제7절 항진균활성세균의 특성 및 동정

가. 균주동정

1차년도에 항진균 활성스펙트럼과 특성이 매우 독특한 균주들(52개)에 대하여, 통상적으로 API kit system을 이용하여 Bergey's manual에 의거 동정한 결과, 이들은 기존의 생물학적 방제나 항진균제 생산에 이용된 균주들과는 서로 다른 속(genus)이거나 동일속 경우에도 종(species)이 다른 세균들로 분석되었다. 2차년도 연구에서는 현재 고기능적, 광범위 항진균활성 스펙트럼을 보이거나, 혹은 특정 병원성 진균류에만 활성을 보이는 좁은 범위의 항진균 활성스펙트럼을 보이는 균주에 대하여 약 80여가지 이상의 생리생화학적 동정실험을 더욱 정밀히 행한 결과, 이들은 현재 보고되어 있는 항진균 활성세균과는 전혀 다른 분류군에 속하는 세균들이었다.

1, 2차년도에 식물병원성 진균류 6종에 강한 항진균활성을 나타내는 1차 후보 113세균 균주들 중 52개를 API kit 등으로 예비 동정실험을 시행하였으며 2차적으로 22개 균주를 선별하여 API kit는 물론 추가적으로 약 80여가지 이상의 생리생화학적 동정실험을 더욱 정밀히 수행하였고, 당해 3차년도 연구에서 최종적으로 16개 균주(KL1112, 1114, 1121, 1136, 1137, 1143, 1178, 1179, 1188, 1314, 1321, 1326, 1330, 1367, 1105, KLP21)를 국제공인 동정기관인 네덜란드의 Kluiver laboratory(Faculty of Chemical Technology and Material Science)에 동정을 의뢰한 결과, 16개 균주들 중 KL1114, 1143, 1367 (*Bacillus* sp.)와 KL1136, 1137, 1178, 1179, 1188(*Alcaligenes* sp.) 그리고 KL1314, 1326(*Pseudomonas* sp.)등은 항진균활성능력에 대해서는 현재까지 국내외적으로 보고된 바가 전혀없는 신규성 균주로 확인되었다(특허관련 대외비결과, 최종보고서 요약서에 보고한바 있음).

이들 균주는 ATCC, KCTC 공시 균주들과 균주특성에 있어 여러 가지 형질이 달랐을 뿐아니라, 항진균활성능력에 있어 전혀 달랐다. (이들테면 공시 균주들은 항진균활성능력이 없었다.). 따라서 현재 이들 16개 균주들 중 **항진균활성능과 항진균활성 특이성 그리고 균주의 특성을 고려하여 신규성이 있는 4개의 균주를 균주기탁 국제공인기관인 KCTC(Korea Collection for Type Cultures)에 기탁하여 기탁번호를 부여받았다 (KL1114: KCTC 8913P, KL1179: KCTC 8914P, KL1121: KCTC 8915P, KL1326: KCTC 8916P)**

나. 균주의 특성

본 연구진에 의해 분리동정된, 항진균활성세균들은 동일 학명 일지라도 균주간에 콜로니형태, 색소형성유무, 유기물분해능, 농약분해능, 항진균활성스펙트럼 등에 있어 상당히 다른점이 많았다. 그중 대표적인 예중 하나를 들어보면, 1114균주의 경우, 일정한 성장시기에 도달하면 lysis 현상이 나타나고 일부 세포는 다시 성장이 재개되는 것을 관찰할 수 있었다.

Table 2-7-1. Identity of antifungal bacteria and KCTC numbers

Strains	Scientific Name(종소명 생략)	KCTC No. (기탁번호)
KL1112	<i>Bacillus</i> sp.	
KL1114	<i>Bacillus</i> sp.	KCTC 8913P
KL1121	<i>Pseudomonas</i> sp.	KCTC 8915P
KL1136	<i>Alcaligenes</i> sp.	
KL1137	<i>Alcaligenes</i> sp.	
KL1143	<i>Bacillus</i> sp.	
KL1178	<i>Alcaligenes</i> sp.	
KL1179	<i>Alcaligenes</i> sp.	KCTC 8914P
KL1188	<i>Alcaligenes</i> sp.	
KL1105	<i>Serratia</i> sp.	
KLP21	<i>Serratia</i> sp.	
KL1314	<i>Pseudomonas</i> sp.	
KL1321	<i>Bacillus subtilis</i>	
KL1326	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	KCTC 8916P
KL1330	<i>Bacillus subtilis</i>	
KL1367	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	

그 원인을 규명하고자 투사전자현미경사진(TEM)를 촬영한 결과, Virus particle를 확인할 수 있었다. Viral genomic DNA를 추출하여 Virus DNA를 검출할 수 있었다.

따라서 KL1114는 lyogenized cell 상태로 존재하는데, 항진균활성능력과 스펙트럼에 있어 동일학명을 지닌 KL1143, KL1367에 비하여 월등히 높았다. 이는 virus에 의해 lysis가 일어날 때 항진균활성물질이 세포안에서 합성이 진행되거나 존재하는(미처 분비되지 못한) 것 마저 한꺼번에 용출할 수 있기 때문으로 사료된다. 이러한 특성으로 인하여 미생물농약제조에 이 균주를 사용할 경우 매우 효과적인 제품을 만들 수 있다.

이미 시제품화한 미생물농약 및 제제의 포장활성실험결과 입증되었다(첨부도면 참조). 본 연구에서 개발된 균주들(KL1114, 1121, 1179 등)은 기존의 개발된 타사제품의 미생물제제용 미생물에 비하여 월등히 높은 항진균활성과 넓은 항진균활성 스펙트럼을 나타내었다(첨부도면 참조).

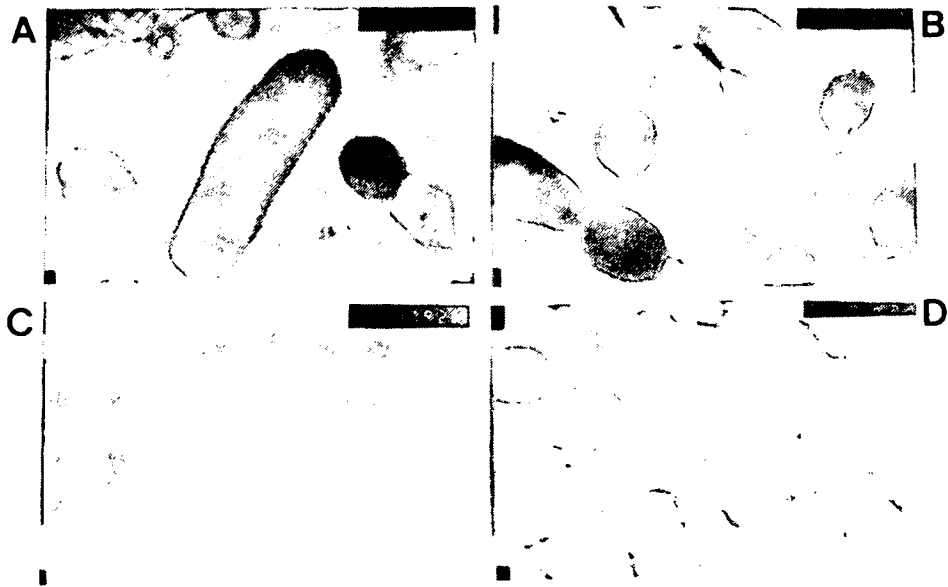
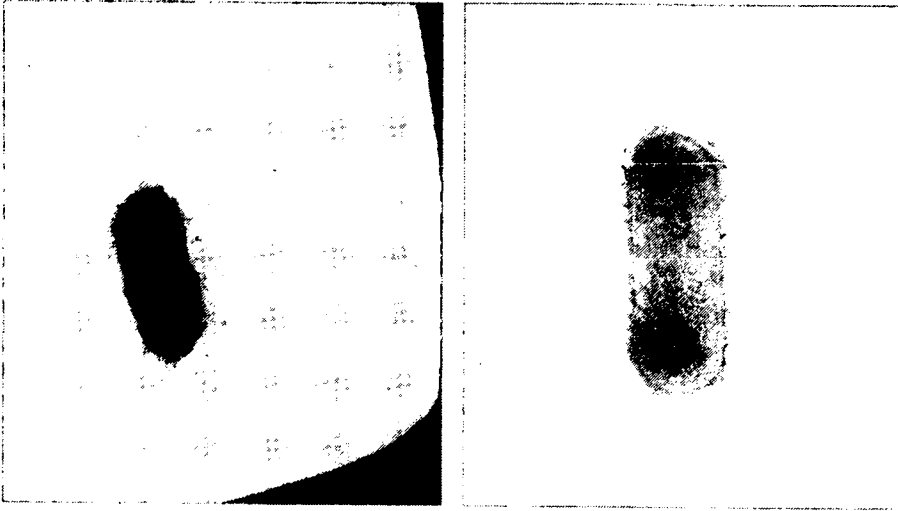


Fig. 2-7-1 SEM photographs showing the lysis *Bacillus* sp. KI1114
A: Normal cell, B: Partially occurred cell lysis, C: virus particle, D: Completely lysed cell

A



B

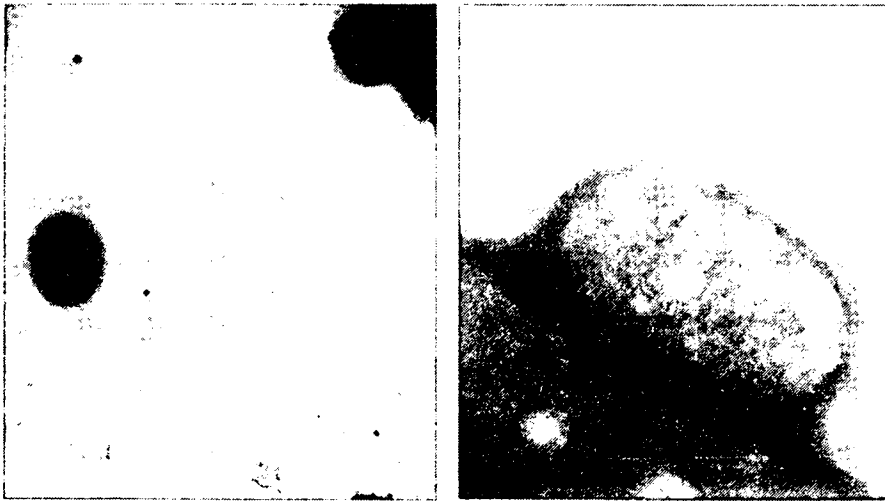


Fig. 2-7-2 SEM photographs showing antifungal bacteria
A: *Bacillus* sp. KL1114, B: *Alcaligenes* sp. KL1179

제8절 항진균활성세균 및 물질의 포장 활성실험

1) 항진균활성세균의 활성실험

① 온실실험

길항미생물로서 선발된 세균이 식물병원성 진균의 생장저해나 발병억제가 가능한가를 탐색하기 위해 실제 온실에서 항진균물질이나 진균의 세포벽분해효소를 분비하는 길항미생물을 병반부위에 직접 처리하여 길항효과가 있는가를 병징의 심화도를 통하여 측정하였다. (0-5 scale, 0 = no visible symptoms; 1 = leaves slightly wilted with brownish lesions beginning to appear on stem; 2 = 30 - 50% of entire plant diseased; 3 = 50 - 70% of entire plant diseased; 4 = 70 - 90% of entire plants diseased; 5 = plant dead).

고추역병을 일으키는 *phytophthora capsici*를 병원균주로 한별고추에 접종한 후 분석한 결과 KL1179, KL1187은 병원균 접종 후 4일 동안 병원균의 병징심화도는 평균 scale 1 정도로 나타나 병발생의 지연을 보여주었다. 또한 고추생산에 심각한 경제적 손실을 주는 고추 탄저병(Anthracnose)의 원인인 *Colletotrichum gloeosporioides* 병원균주를 PDA배지에 배양한 후 잘게 조각을 낸 것을 상처를 낸 고추열매에 직접 접종하였다. *In vitro* assay에서 여러 식물병원성 진균과 길항작용을 하는 것으로 검정된 22가지 공시세균을 NB배지 혹은 TSA배지에 2~3일간 배양한 후 병원균 접종과 동시처리, 1일후 처리, 2일후 처리, 3일후 처리의 방법으로 각각 선발된 균을 100~200 μ l 정도 열매에 직접 처리한 후 길항작용의 정도를 병징의 심화도로 측정하였다. 이 중 균주 KL1114, 1121, 1367은 병원균과 동시처리시 뛰어난 병억제 작용을 보여주었으며, 병원균접종 후 2~3일 후 처리한 것조차 병징을 감소시키거나 병반발달을 지연시켰다. KL1143, 1314, 1321, 1326, 1330, 1411은 병원균과 동시처리시 중간정도의 병억제의 결과를 나타내었고, KL1136, 1137, 1176, 1178, 1179, 1187, 1188, 1198 및 KLP21, 22, 26은 병의 발달이 전혀 억제되지 못했다.

② 포장실험 : 본 연구기간 중(96년 5월 1일~5월 31일) 경북상주에 위치한 오이 비닐하우스 온실재배농가에서 대규모로 발생한 오이 흰가루병, 노균병, 흑성병의 제어를 문의받은 바, 본 연구실험의 균주인 KL1136의 길항능력을 시험하기 위해 일주일간 배양된 균주를 5,000배로 희석하여 병징이 심하게 나타난 엽면에 1주일 간격으로 2회 직접 분무한 결과 흰가루병, 노균병, 흑성병의 병징이 더 이상 증가하지 않았을 뿐더러 병의 확산이 확실히 억제되었다.

또한 KL 1143, KL 1314, KL 1321, KL 1326, KL 1330, KL 1411은 병원균과 동시처리시 병반의 발생을 지연시키는 결과를 나타내었다. 또한 배양된 길항균의 배양여액을 butanol로 추출한 후 이를 농축하여 *Colletotrichum gloeosporioides* 가 접종된 고추열매에 동시처리한 결과 KL 1114 와 KL 1367의 추출액이 지속적으로 강한 억제효과를 나타내었다. 따라서 본 실험균주가 실제 항진균제 생성뿐만 아니라 biological controller로서의 역할도 잘 수행할 수 있다고 판명되었다. 이들 균주를 사용하여 미생물농약 및 제제로 상업화하기 위해 제조한 시제품 AF-BMI-V에 대한 응용 포장실험을 98년 6월부터

다양한 식물과 여러 식물병원진균을 조합하여 (주)동부한농 온실에서 수행하였다(첨부도면 및 6장 참고).

2) 항진균제의 활성시험

① Methyl alcohol로 추출된 물질의 항진균능력 시험 (in petridish assay)

Methyl alcohol로 추출한 물질과 고추탄저병균을 혼합하여 PDA배지에 평판도말한 결과, methyl alcohol추출물질이 더 첨가될수록 고추탄저병균의 생균수는 정확히 비례적으로 감소하였다.

② Methyl alcohol 및 ethyl acetate로 추출한 물질의 활성실험 (in planta assay)

접종 후 7일 후에 항진균활성의 정도를 병징의 심화도 (disease severity)로 측정하였다. 병징의 심화도는 0 에서 3 의 scale로 4단계로 정도에 따라 다음과 같이 나누었다; 0 = no reaction, 1 = necrotic spots visible in treated area, 2 = tissue collapse and necrosis at margins of treated area, 3 = complete collapse and necrosis of the entire treated area.

(경남 밀양 풋고추 실험)

Pathogen + EA 처리	Disease severity *	실험군
5 ul + 50 ul	0	
10 ul + 50 ul	0	
25 ul + 50 ul	0	
50 ul + 50 ul	0	
5 ul + 10 ul	0.3±0.58	I-①
10 ul + 10 ul	0	I-②
25 ul + 10 ul	1.7±1.53	II-①
50 ul + 10 ul	3	II-②

대조구 (pathogen only) 5 ul : 3

* Mean value of 3 replicates

경남 밀양에서 출하된 풋고추에서 항진균활성을 측정한 결과 병원균 5ul, 10ul, 25ul, 50ul 와 MO 50ul를 각각 혼합하여 접종한 고추에서 전혀 병이 발생되지 않았고, MO의 양을 10ul로 줄여 병원균 10ul와 혼합하여 접종한 고추에서도 병이 발생하지 않았다. 그러나 Mo 10 ul를 병원균 25ul 및 50ul 와 각각 혼합하여 접종한 고추에서는 병징이 심화하였다. 따라서 methyl alcohol로 추출한 물질이 탄저병을 억제하는 항진균 효과가 있음이 판명되었다. 이외에, 경남 진주 홍고추, 충남 청양 풋고추를 대상으로한 실험에서도 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

또한 균주들 중 KL1114, 1367, 1330의 배양액을 원심분리하여 상등액을 butanol로 추

출한 액을 농축한 후 *Colletotrichum gloeosporioides*가 접종된 고추열매에 동시처리한 결과, KL1114와 KL1367의 추출액이 강한 억제효과를 나타내었다.

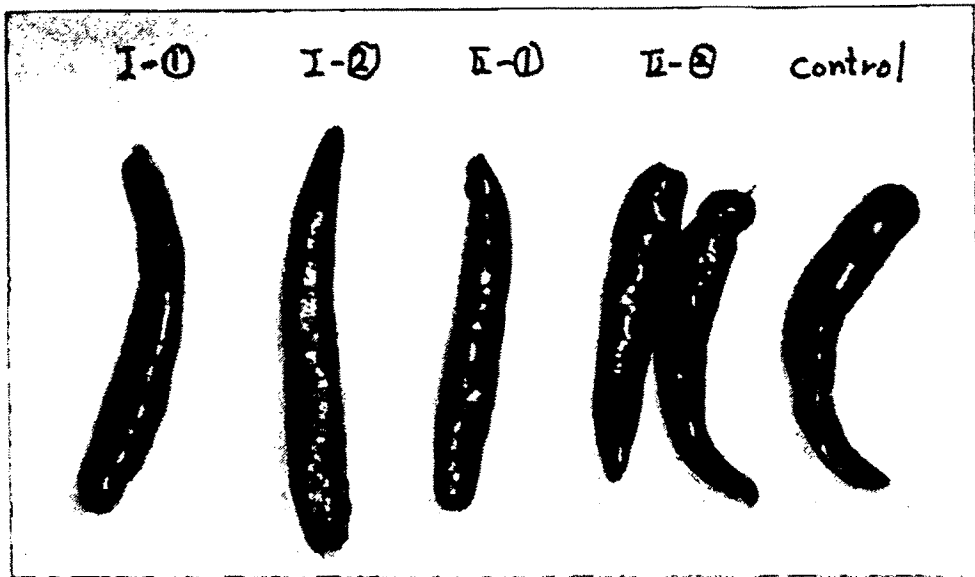


Fig. 2-8-1 Photographs showing antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*

3) 토양내에서의 항진균 활성도 측정

NB medium과 PDB medium에서 각각 3일간(30℃)배양된 항진균활성세균(KL1114, 1121)과 병원균인 벼문고병(*R. solani*)의 배양액을 동량으로 섞어 멸균된 토양에 처리하였고 또한, KL1114와 KL1121의 항진균활성물질(50배 농축한 배양상등액)도 10배로 희석하여 동일한 방법으로 처리하여 3일동안 30℃(*R. solani*)에서 배양한 후, 항진균활성을 관찰하였다. 그 결과 병원균만 배양된 토양(대조구)과 비교하여 항진균활성세균의 배양액과 항진균활성물질을 처리한 구간 모두에서 우수한 병원균억제효과를 나타내었다.

Table 2-8-1. Antifungal activity of antifungal bacteria and antifungal material in the soil

항진균활성세균	처리구간	성장억제효과(%)
		<i>R. solani</i>
KL1114	배양액	90
	농축액	100
KL1121	배양액	95
	농축액	100
대 조 구	무처리	0
	무처리	0

제3장 항진균활성물질의 구조분석

제1절 서론

일반적으로 항진균활성물질(화합물, 항진균효소)은 미생물의 배양액 중에 ppm 단위의 농도로 소량 함유되어 있다. 또 어떤 경우는 여러종류의 항진균물질이 혼재할 수 있다. 이와같이 미량으로 혹은 다양한 형태로 존재하기 때문에 효율적으로 활성물질을 분리정제하지 않으면 좋은 연구결과를 얻기 어렵다. 본 연구에서는 다양한 기법을 이용하여 항진균활성물질을 분리정제하였으며 이들의 구조분석을 시행하였다.

제2절 항진균효소의 특성과 정제

1) 항진균효소(chitinase)의 특성

세포벽 분해를 통한 항진균활성을 나타내는 항진균효소 생성세균(KL1105, 1121, 1162, 1174, 1182, 1188)의 항진균효소의 특성을 보다 깊이 조사하기 위하여 기질의 특이성(세포벽성분의 특이성)은 물론 세포벽분해효소의 활성을 전기영동상에서 탐지하는 한편, 이들 isoenzyme type까지 비교실험하였다.

즉 MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminide, MUF- β -D-N,N'-diacetylchitobioside, MUF- β -D-N,N'-triacetylchitotriose, PNP-N-acetyl- β -D-glucosaminide, PNP- β -D-N,N'-diacetylchitobioside 등을 이용하여 chitinase의 기질특이성 등을 파악하였고, 부분정제 과정을 거쳐서, 전기영동하여 분석한 결과는 다음과 같다.

분자량이 55, 59, 45KDa인 효소(Chit55, Chit59, Chit45)와 100KDa 이상인 효소(Chit100 \uparrow) 등 4 종류의 효소가 검출되었다. Chit55, Chit59, Chit45는 4-MUF-GlcNAc(dimeric chitin derivative)와 4-MUF-(GlcNAc)₂ (trimeric chitin derivative)로부터 4-MUF를 생성하기 때문에 N-acetyl- β -1,4-D-glucosaminidase (exo-chitinase)로 밝혀졌으며, Chit100 \uparrow 은 오로지 4-MUF-(GlcNAc)₂로 부터만 4-MUF를 생성하여 chitobiosidase (endo-chitinase)로 밝혀졌다.

KL1105균주는 Chit55, Chit59, Chit100 \uparrow 등 3개의 키틴분해효소를 세포외로 분비하며, KL921과 KL922균주는 Chit55, Chit59, Chit100 \uparrow 이외에 chit45를 더 분비하고 있다. 그러나 KL926은 Chit100 \uparrow 을 분비하지 않는 것으로 나타나, 균주에 따라서 세포외로 분비하는 키틴분해효소의 종류가 서로 다른 것으로 조사되었다.

strain		KL1105	KL921	KL922	KL926
band pattern		a(55)b(59)d(100 \uparrow)	a(55)b(59)c(45)d(100 \uparrow)	a(55)b(59)c(45)d(100 \uparrow)	a(55)b(59)c(45)
chitino-lytic activity	4-MUF-GlcNAc	+ + -	+ + + -	+ + + -	+ + +
	4-MUF-(GlcNAc) ₂	+ + +	+ + + +	+ + + +	+ + +

2) 항진균효소(chitinase)의 정제

정제과정은 KL1105, KLP21, KL1141, KL1321을 chitin첨가액체배지에서 배양할 때 생성하는 extracellular enzyme를 ammonium sulfate를 이용하여 농축하였고 투석하여 gel chromatography를 시행하여 chitinase의 분자량을 조사하였다. 이를 위하여 투석 농축된 효소추출액을 Sephadex G-100 column(2.5×50cm)에 loading하여 0.15ml/min 유속으로 0.1M phosphate buffer를 흘린후 3ml씩 분획하였다. 이 분획을 총단백질분석과 키틴분해효소의 분석 시료로 사용하였다.

4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosamine (4-MUF-GlcNAc)에 의해 검출되는 키틴분해효소를 N-acetylglucosaminidase 또는 exochitinase라고 하며, 4-Methylumbelliferyl N,N'-diacetyl chitobioside (4-MUF-(GlcNAc)₂)를 분해하여 검출되는 키틴분해효소를 chitobiodase (endochitinase)라고 한다.

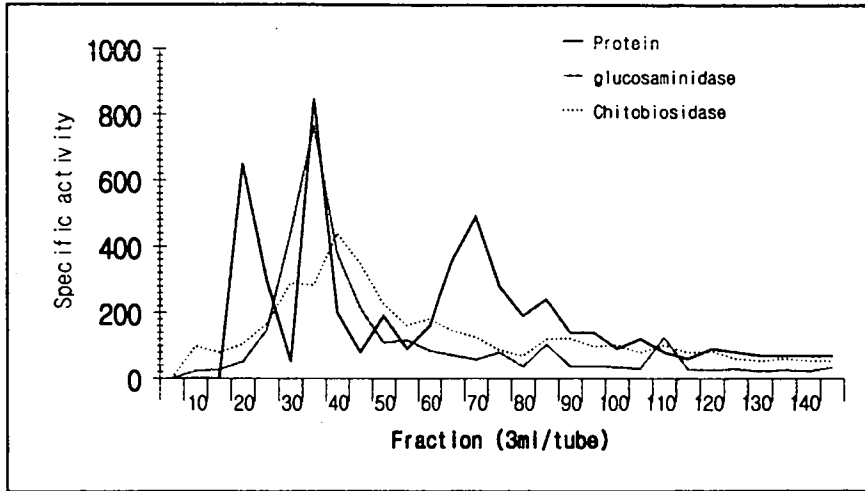
즉, 항진균 효소 생성 세균인 KL1105와 KLP21을 chitin 첨가액체배지에서 배양하여 exochitinase isoenzyme을 조사한 결과 각 균주에 따라서 isoenzyme의 pattern과 양적인 면에서 차이를 보였으며, 배양시간에 따른 isoenzyme pattern의 변화양상도 각기 다른 것으로 조사되었다. 특히, 분자량 55.0kDa의 isoenzyme은 반응기질인 4-methylumbelliferyl-N-Acetyl- β -D-glucosaminide와 4-methylumbelliferyl- β -D-N-N'-diacetylchitobioside를 동시에 분해하는 활성이 있는 것으로 조사되었다. KL1321, 1141, 1367의 경우 extracellular protein에서 exochitinase 성질을 나타내는 band가 각각 1개씩 검출되었으며, intracellular protein에서는 KL1321에서만 검출되었다. endochitinase는 KL1321의 세포의 단백질에서 1개의 band가 검출되었고, intracellular protein은 KL1135의 세포내단백질에서 1개의 band가 검출되었다. 또한 항진균효소인 키틴분해효소의 항진균작용은 SEM(주사현미경) 관찰결과, 병원성 진균류의 세포벽분해과정을 통해 균사가 절편되고, 세포신장이 억제되는 기작을 통해 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다.

3) 항진균효소 생성세균의 항균스펙트럼

분리한 항진균효소 생성균주 중 활성이 강한 12균주에 대한 항진균활성 스펙트럼을 알아본 결과 항진균물질 생성균주와는 달리 특이한 작용기작을 보인다. 독특한 성장억제를 나타낼뿐아니라, 색소형성과 포자형성을 증가시키거나 병원성 진균류의 hypha를 분절시키는 lysis기작을 병행함을 알 수 있었다. 이는 항진균효소(chitinase)가 병원성 진균류에 직접적으로 작용함을 나타낸다. 또한 *Pyricularia oryzae*의 경우 색소형성이 증가하였다.

A

KLP21 Extracellular chitinase



B

KL1105 Extracellular chitinase

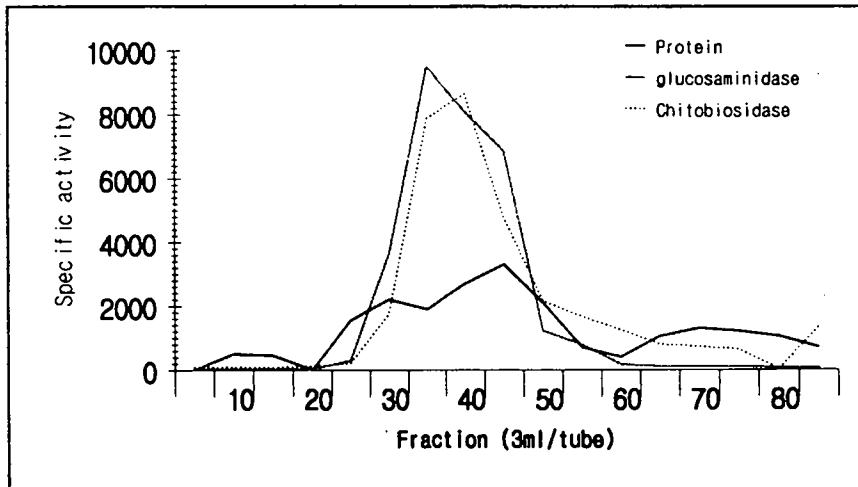
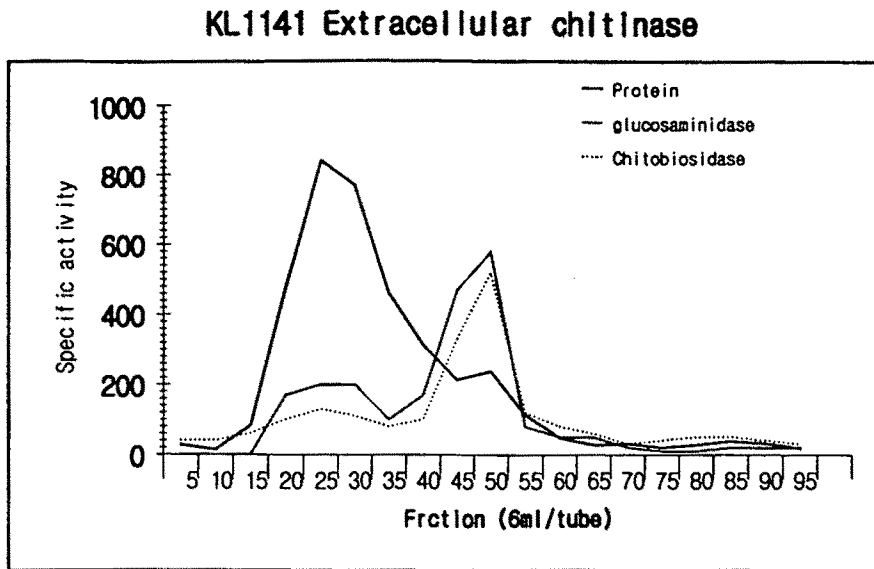


Fig. 3-2-1 Gel-filtration chromatograms on Sephadex G-100 for dialyzed culture filtration of the KLP21(A), and KL1105(B) grown on chitin-containing medium

C



D

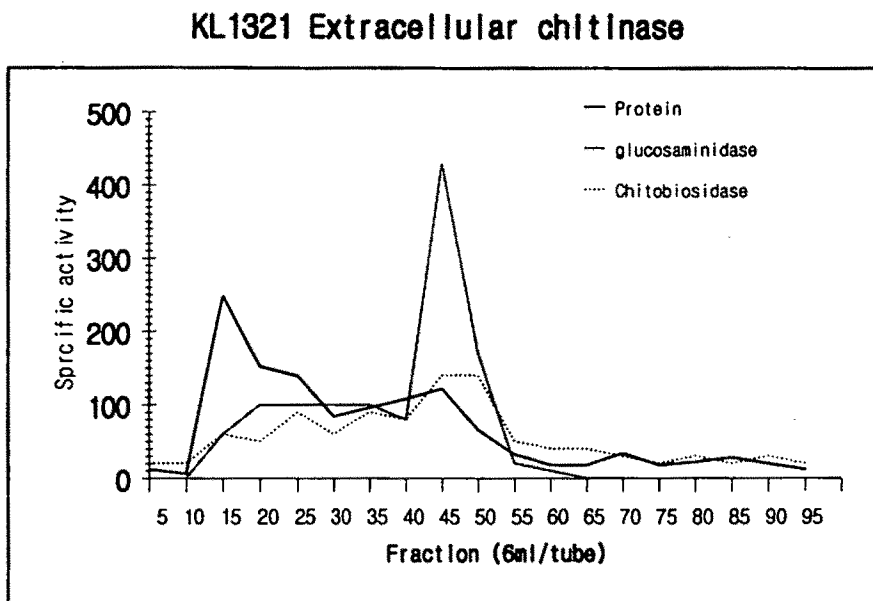


Fig. 3-2-2 Gel-filtration chromatograms on Sephadex G-100 for dialyzed culture filtration of the KL1141(C), and KL1321(D) grown on chitin-containing medium

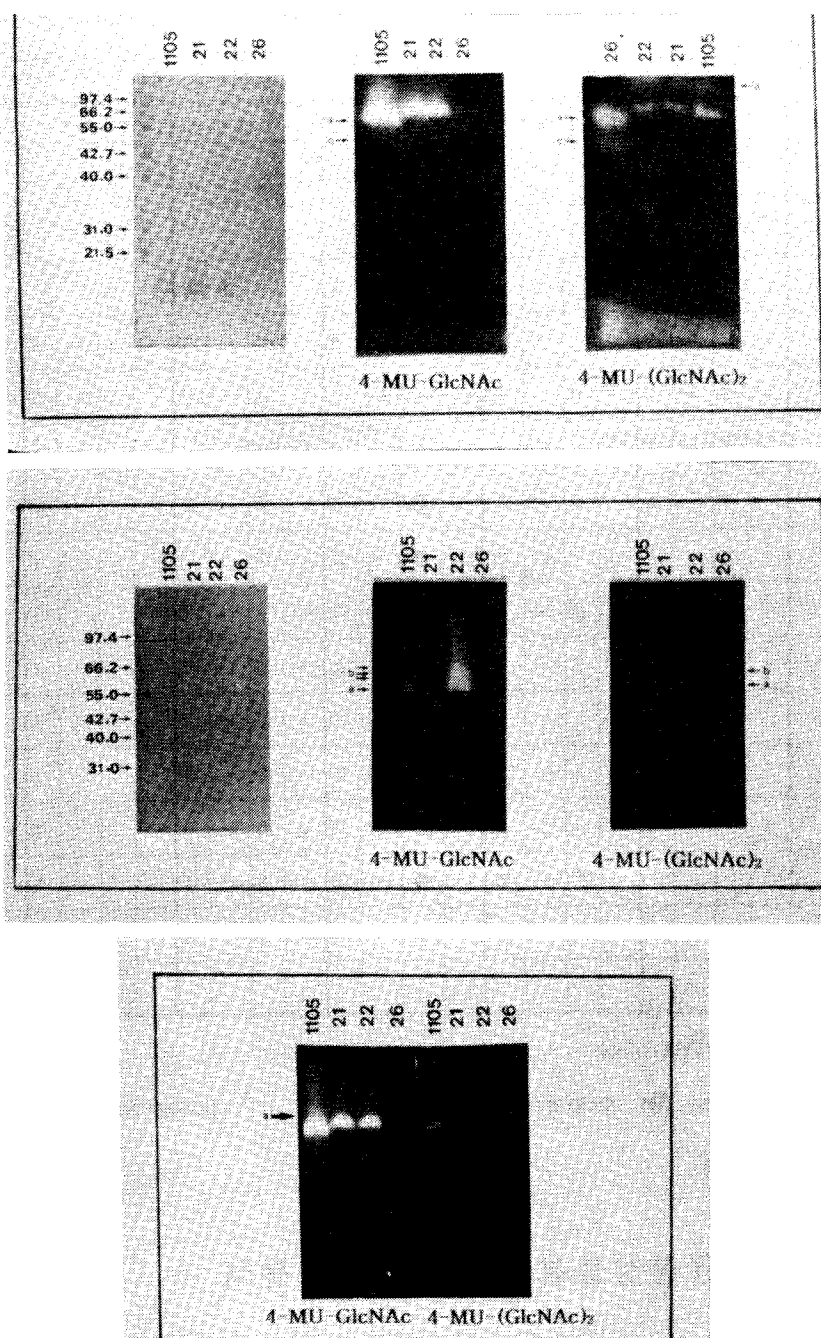


Fig. 3-2-3 Detection of chitinolytic enzyme activity of extracellular and intracellular proteins produced by antifungal bacteria(KL1105 and KLP21) grown on the various media after separation by SDS-PAGE. Chitinolytic enzyme activity was detected with MUF-GlcNAc and MUF-(GlcNAc)₂, after renaturation of SDS polyacrylamide gels.

Table 3-2-1. Antifungal activity (chitinase) of bacteria against various plant pathogens

(단위:mm)

Pathogens	<i>B. cinerea</i>		<i>F.o. cucu</i>		<i>P. oryzae</i>		<i>C. gloes</i>		<i>R. solani</i>		<i>C. albicans</i>	
Temp.	23℃ PDA		30℃ PDA		30℃ PDA		30℃ PDA		30℃ PDA		30℃ NA	
Media												
Bacterias												
1105					*** ⑤	*** ④	** 4	· 2			· 1	· 2
1131	** 3	** 2	+ 1	+ 1	*** ⑧	*** ⑥	** 5	· ②	+ 1	** ⑧	** 2	· 2
1134	** 3	** 2	** 4	· 1	*** ⑧	*** ⑦	** 5	· ①	· 1	** ⑧	** 2	· 2
1135	** 3	** 2	+ 2	· 1	*** ⑤	*** ⑤	** 4	· 1	· 1	** ⑧	** 2	· 2
1141	** 2	** 2	** ③	*** ③	*** ●	*** ⑤	*** ④	** ③		· ③	· 0.5	· 0.5
1143	· 0.5	· 1	** ③	*** ③	*** ●	*** ⑤	· 2		· ①	** 2	· 2	
1147	· 0.5	· 1	** ③	*** ③	*** ●	*** ③	*** ④	** ③		· ③	· 0.2	· 0.2
1162	· 0.5		** ③	*** ③	*** ●	*** 6	*** ⑤	** ⑤		· 2	· 1	· 1
1178					** 6	*** ⑤	+ 2	· ②	· 1	** ⑤	*** 6	*** 6
1191	· 1	** 2	** ③	*** ③	** 5	*** ⑤	*** ③	** ④		· 2	· 0.2	· 0.5
1314	· 1	** 2			*** ⑧	*** ⑤	** 3	** 5	** 2	· ②	*** 3	** 3
1321			+ ②	** ②	*** ●	*** ⑤	*** ③	** ④		· 1	· 0.5	· 0.5
1367	** 3	*** 3	+ ②	** ②	** ●	*** ⑤	*** ④	** ④	· 1	** ⑩	** 2	** 3
KLP21						· 3					** 2	** 3

Inoculation : 100 μ l/plate

○: sporogenesis, ●: sporogenesis, pigment, ⑤: no sporogenesis, pigment, □ : hypha lysis

제3절 항진균활성물질 청제 및 구조분석

가. 저비등점(휘발성) 항진균 물질의 분석

① 휘발성 항진균 물질(volatile antifungal agent) 생성 확인실험

휘발성 항진균 물질을 생성하는지를 확인하기 위해 ferbach flask(100ml)를 서로 실리 콘 튜브(내경 6mm)로 연결하여 한쪽은 NB액체배지에 항진균 세균을 접종하고 다른 한쪽은 PDA고체배지에 *R. solani*를 접종하여 휘발성 항진균 물질에 의해 병원균의 성장력을

관찰한 결과 KL1137과 KL1179가 휘발성 항진균 물질에 의한 병원균의 성장억제효과가 가장 우수하였다

Table 3-3-1. Antifungal activity of volatile materials

strains	pathogen	growth inhibition (% of control)
Control(onlymedium)	<i>Rhizoctonia solani</i>	0 ± 0
KL 1136		30 ± 5
KL 1137		80 ± 0
KL 1179		60 ± 5
KL 1187		30 ± 5
<i>E. coli</i>		10 ± 10

② 휘발성 항진균 물질의 특성

nutrient broth 10ml가 첨가된 배지에 전배양된 각 실험구간(① KL1137, ②KL1179, ③KL1179와 *R. solani* 혼합, ④ *R. solani*)에 따라 각 균주의 배양액 0.1ml를 접종하여 rubber stopper로 밀봉한 채, 30℃에서 3일간 배양한 후, Gas chromatography 분석방법에 따라 휘발성 물질 생성 여부를 분석한 결과, 대조구간 ④(식물성병원균만 배양)에 나타나지 않는 물질들이 실험구간 ①, ②, ③에서 검출됨으로서 이 물질이 항진균 활성을 나타내는 휘발성 물질로 추측하였다(Fig. 3-3-1).

③ 저 비등점(휘발성)항진균활성물질의 분석

① 비등점이 낮은 활성 물질의 구조 및 특성을 파악하기 위하여 *R. solani*, KL1179 균주의 배양상등액을 septum을 사용하여 바이알 내에 밀폐 시킨 후, 기체 층을 주사기로 흡입하여 GC/Mass를 수행하였다. TIC와 각 피크의 mass spectrum을 제시하였다. 다른 분석방법(C, ³¹P-NMR 등)을 위한 시료 확보를 위하여 아래의 분리방법을 수행하였다.

② 저비등점(휘발성) 항진균 활성물질의 분리실험

- 액체질소 trap법 : 동일한 균주들로부터 비등점이 낮은 활성 물질을 분리하기 위한 시도를 하였다. 1ℓ 배양액으로부터 다음과 같은 장치를 이용하였으며 질소를 흘려 보내어 산소의 응축을 방지하였다. 액체 질소에 의하여 응축된 물질이 나타나지 않아 액체질소로 trap하는 실험은 배제하였다.

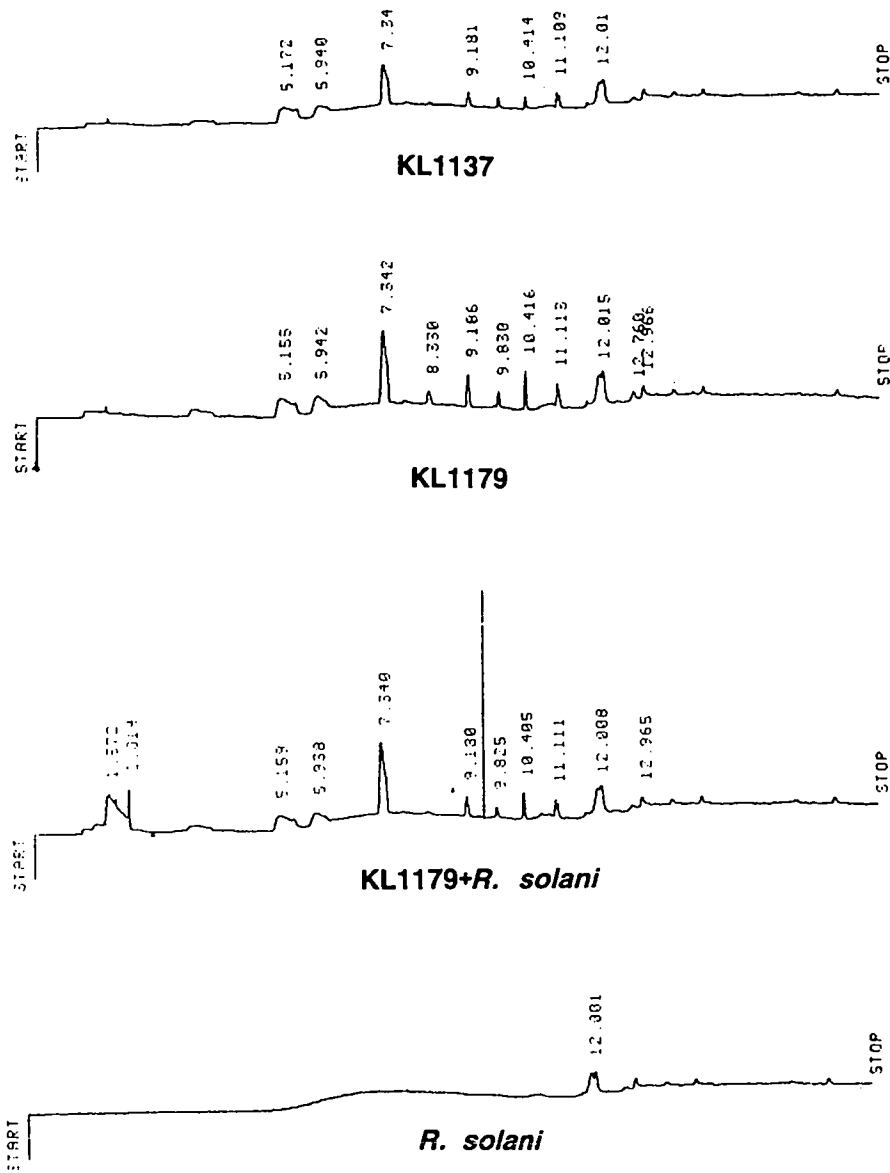


Fig. 3-3-1 Gas chromatograms of metabolite(volatile or non-volatile) produced from antifungal bacteria(KL1137 and KL1179), mixed-culture with pathogenic fungi (*R. solani* + KL1179), and from *R. solani*

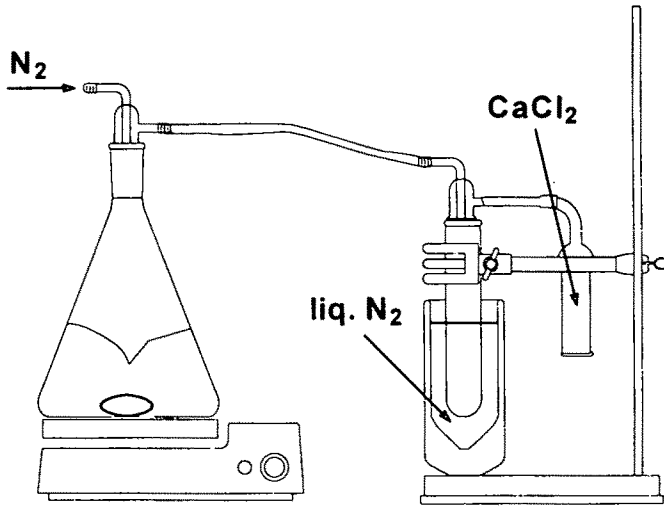


Fig. 3-3-2 Apparatus for trapping volatile materials

결론적으로 휘발성 향진균물질을 생성하는 것으로 판단되는 KL1136, 1137, 1179, 1187 균주들은 1, 2차년도까지 여러 가지 분리실험 등 (액체질소 trap법, 분획법, GC, TIC and Mass spectroscopy 등)을 통하여 그 특성을 확인(2차년도보고서)하였고, TIC와 Mass spectroscopy 결과 database에 있는 화합물과 일치하는 것이 없었다. 현재 NMR 등을 시행하면서 자료분석 중에 있다.

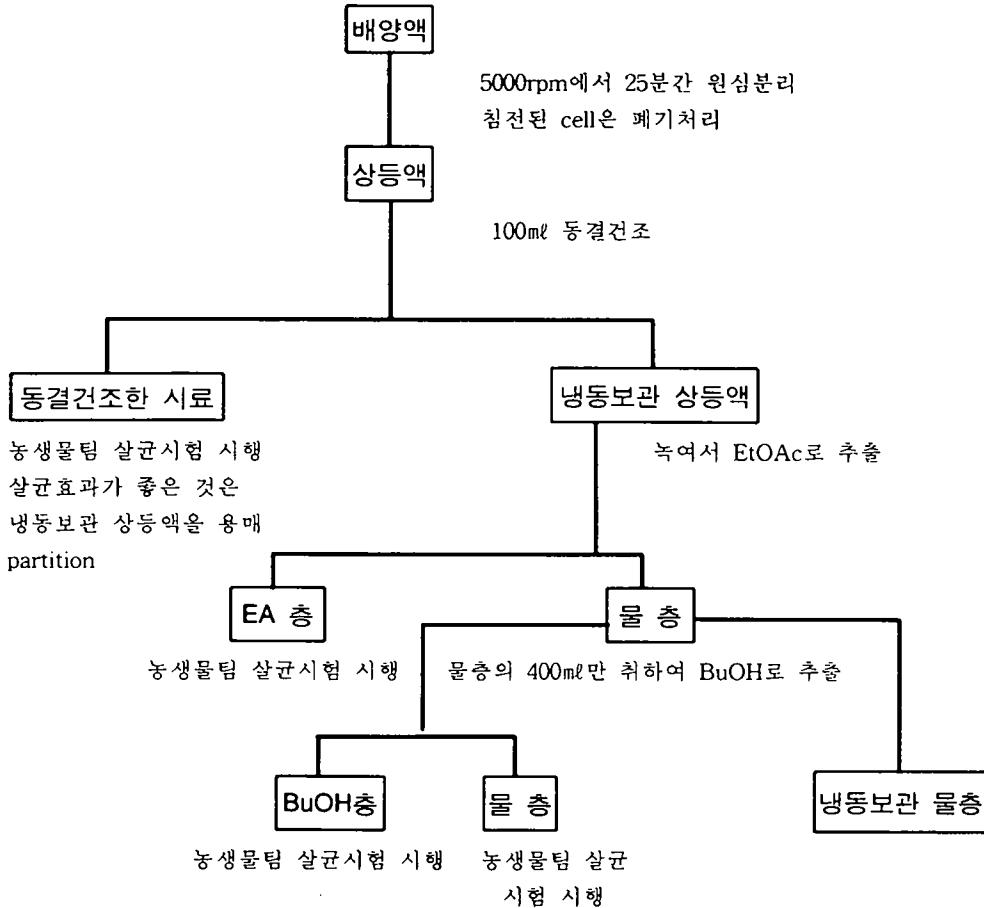
<< 현재 이들 균주들은 *Rhizoctonia solani*는 물론이고 특히 잔디브라운패치병에 방제 효과가 뛰어나기 때문에(기존의 타사제품의 미생물은 전혀 방제효과 없음) 특정병원균 방제에 유용한 균주로 이용될 것이다. : 첨부도면 참고 >>

나. 저분자량의(M.W. 500~1,000 정도) 향진균활성 물질분석

① 향진균계 정제과정 및 분획물의 특성

향진균활성물질을 생성하는 5가지 균주 KL1114, 1136, 1330, 1143, 1121을 대상으로 물질분리 및 생물활성실험을 수행한 결과, GM63배지와 NB배지를 사용하였을 경우에 그 생물검정 결과가 많은 차이가 있었다. NB에서 생물검정을 하였을 경우에는 활성이 주로 Buthanol층에서 나타났으나 GM63배지에서는 다르게 나타났다. GM63배지에서 배양했을 경우에 도열병균에서는 여전히 Buthanol층에서 활성이 나타났으나 다른 균에서는 물층이나 Ethyl acetate층에서도 활성이 나타났다.

< 배양액으로부터 활성물질 분리추출 방법 >



이 실험에서 EA층은 $MgSO_4$ 로 수분을 제거한 뒤 여과하였고 BuOH층과 물층은 여과하여 농축하였다.

특히 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*(오이 시들음병균)에서는 활성이 물층에서 가장 좋게 나타났다. 이것으로 볼 때 2가지 추론을 할 수 있다. 첫째는 KL1114, 1330 균주는 여러가지 활성물질을 분비한다는 것이다. 생물검정 결과 Buthanol, 물, Ethyl acetate 모두에서 활성이 나타났기 때문이다. 둘째는 NB에서 주로 분비되는 활성물질과 GM63배지에서 주로 분비되는 활성물질의 성질이 다르다는 것이다. NB에서 분비되는 활성물질은 주로 Buthanol층에서 추출되며 탄저병균과 도열병균에 큰 활성이 있었다. 그러나 GM63배지에서는 물층에서 분리된 물질이 오이 시들음병균에 가장 활성이 크게 나타났다.

② 5가지 균에 대한 1차 생물검정

5가지 균주를 30℃에서 3일간 NB(nutrient broth)에서 각 2ℓ씩 배양한 후 각각의 배양액을 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 상등액100ml을 Freeze dry하여 나온 물질을 1차 생물검정을 하였다. 생물검정은 *R. solani*, *A. solani*, *P. grisea*, *P. untimeum*, *C. gloeosporioides*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerium* 그리고 *B.dothidea* 등 8가지 병원균을 대상으로 하였으며, cup methods를 이용하여 8가지 균의 군사성장 억제 정도를 측정하였다. 동결건조된 물질을 물에 5000ppm농도로 녹인 후 Stainless cup에 200μℓ씩 처리한 후 *B. cinerea*는 20℃에서 그리고 나머지는 27℃에서 배양한 후 저지원을 관찰하였다. 그 결과, 5가지 균중에서 KL1114, 1367, 1330, 1143, 1121 순으로 활성이 나타났다. 따라서 이 중에서 KL1114, 1367, 1330의 3균을 가지고 계속적인 물질추출 및 생물검정을 진행하였다.

<항진균활성물질의 항진균활성도>

	<i>R. solani</i>	<i>A. solani</i>	<i>P. grisea</i>	<i>P. untimeum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerium</i>	<i>C. albicans</i>
DBN186 (KL1114)	-	++++	++++	-	++++	++	++	-
DBN187 ((KL1121))	-	-	-	-	-	-	-	-
DBN190 (KL1143)	-	-	+	-	+	-	-	-
DBN191 (KL1330)	-	+	++	-	++	+	-	-
DBN192 (KL1367)	-	+++	+++	-	+++	++	-	-

+, ++, +++, ++++ 표시는 생물활성의 상대적인 비교임.

③ 선발된 3가지 균에 대한 물질추출 및 생물검정

선발된 3가지 균 KL1114, 1367 그리고 KL1330의 NB배양액으로부터 Ethyl Acetate, Buthanol 그리고 물을 이용하여 활성물질을 추출하였다. 각각의 용매로 추출한 물질은 Evaporator 또는 Freeze dryer를 이용하여 건조한 후 생물검정을 실시하였다. EA층과 Butanol층에서 추출된 물질은 메탄올에 녹인후 생물검정을 실시하였고, 물층에서 분리된 물질은 물에 녹인후 생물검정을 실시하였다. 생물검정은 5000ppm 농도의 용액을 약 50ul 정도 Paper disk에 흡착시킨 후 여러 병원균에 대한 길항력을 측정하였다. 그 결과, KL1114, 1367 그리고 KL1330 균은 Buthanol층에서 추출되는 활성물질을 주로 분비한다.

<항진균활성물질의 항진균활성도>

	<i>A. solani</i>	<i>P. grisea</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F.oxysporum f.sp. cucumerium</i>	비고(용매)
DBN197 (KL1114, EA)	-	+	-	-	-	메탄올
DBN198 ((KL1114, Bu)	+	+++	+++	++	++	메탄올
DBN199 (KL1114, 물)	-	-	-	+	+	물
DBN200 (KL1367, EA)	/	/	-	-	-	메탄올
DBN201 (KL1367, Bu)	/	/	-	+	+	메탄올
DBN202 (KL1367, 물)	/	/	-	-	-	물
DBN203 (KL1330, EA)	-	-	+	-	/	메탄올
DBN204 (KL1330, Bu)	-	++	+	-	/	메탄올
DBN205 (KL1330, 물)	-	-	-	-	/	물

+, ++, +++ 표시는 생물활성의 상대적 비교임

④ GM63배지에서 배양된 KL1114, 1330균주의 생물검정

Minimal media인 GM63배지를 이용하여 배양된 2가지 균주(KL1114, 1330)의 물질추출 및 생물검정을 수행한 결과, GM63배지의 활성물질 생성 능력은 NB에 비해 뛰어나지 않은 것으로 판단된다.

<항진균활성물질의 항진균활성도>

	<i>R. solani</i>	<i>A. solani</i>	<i>P. grisea</i>	<i>P. untimum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F.oxysporum f.sp. cucumerium</i>	<i>B. dothidea</i>
DBN206 (KL1114, cup)	-	-	/	-	-	-	-	-
paper disk	/	/	-	/	-	-	+	/
DBN207 (KL1330, cup)	-	++	/	-	++	+	-	++
paper disk	/	/	++	/	-	-	+	/

+, ++ 표시는 생물활성의 상대적인 비교임.

⑤ GM63배지에서 배양한 KL1114, 1330의 물질추출 및 생물검정

활성물질을 추출하여 생물검정을 실시한 결과, KL1114와 KL1330의 2균주는 GM63배지에서 여러 층으로 분리되는 활성물질을 분비하였다.

<항진균활성물질의 항진균활성도>

	<i>P. grisea</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>B. dothidea</i>	<i>F. oxysporum f.sp. cucumerium</i>	비교(용매)
DBN208 (KL1114, EA)	-	+	-	+	메탄올
DBN209 ((KL1114, Bu)	++	+	+	+	메탄올
DBN210 (KL1114, 물)	-	+	+	+++	물
DBN211 (KL1330, EA)	-	+	-	+	메탄올
DBN212 (KL1330, Bu)	++	+	+	+	메탄올
DBN213 (KL1330, 물)	-	+	+	+++	물

+, ++, +++ 표시는 생물활성의 상대적 비교임

⑥ TLC에 의한 항진균활성물질 분리와 특성

항진균활성물질을 분리할 목적으로 n-butylalcohol과 ethyle acetate용매로 세포배양액의 상등액으로부터 항진균물질을 추출한 후, *C. albicans*을 대상으로 항진균활성을 확인하였다.

<유기용매로 추출한 항진균활성물질의 항진균활성도 비교>

항진균 세균	유기용매로 분리한 항진균물질 추출물	항진균 활성도(억제환: mm)	
KL1114	Butanol extract	유기층	6
		물 층	0
	Ethyl acetate	유기층	4
		물 층	3
KL1121	Butanol extract	유기층	6
		물 층	0
	Ethyl acetate	유기층	6
		물 층	5
KL1143	Butanol extract	유기층	4
		물 층	0
	Ethyl acetate	유기층	2
		물 층	0.5
KL1321	Butanol extract	유기층	4
		물 층	0
	Ethyl acetate	유기층	0.5
		물 층	0.5
KL1330	Butanol extract	유기층	4
		물 층	2
	Ethyl acetate	유기층	0
		물 층	3.5
KL1367	Butanol extract	유기층	3.5
		물 층	0
	ethyl acetate	유기층	0
		물 층	0.5

균주에 따라 각기 다른 유기용매층에서 활성을 보였으며, 활성을 나타내는 유기층의 extract를 각각 EtOAc : MeOH(5 : 1 v/v)과 CHCl₃ : Me-OH(15 : 1 v/v) solvent system으로 TLC (silica gel)를 수행한 후, plate를 UV(254nm, 300nm)조사한 결과, 균주별로 서로 다른 Rf값을 나타내었다. 또한 항진균활성을 나타내는 물질의 Rf값을 분석하기 위하여 각 band의 silica gel를 긁어서 MeOH로 재추출한 후 TLC bioassay방법을 실시하였다. 그 결과, 항진균활성을 나타내는 band를 확인할 수 있었다.

<전개용매에 따른 항진균활성물질들의 Rf값>

항진균 세균	Rf 값	항진균 활성도 (억제환: mm)
KL1114	0, 0.28	5, 1
KL1121	0, 0.28, 0.40, 0.55	6, 3, 1.5, 1
KL1143	0, 0.3, 0.36	6, 2, 1
KL1321	0, 0.24	7, 6
KL1330	0, 0.14	8, 1.5
KL1367	0, 0.06, 0.22	1.5, 1.1

전개용매: CHCl₃ : MeOH=15:1 v/v

항진균 세균	Rf 값	항진균 활성도 (억제환: mm)
KL1114	0.63	2
KL1121	0, 0.11, 0.33, 0.57	2, 3, 5.5, 7
KL1143	0.53, 0.64	1, 1
KL1321	0, 0.47	5, 6
KL1330	0, 0.16, 0.33, 0.46	6, 4, 1.5, 4
KL1367	0.19, 0.33, 0.58	4, 3, 3

전개용매: EtOAc : MeOH=5:1 v/v

⑦ 저분자량(M.W.500~1100정도)의 항진균활성물질 분석

항진균활성물질을 생성하는 5가지 균주 KL1114, 1326, 1330, 1143, 1121을 대상으로 여러 가지 조건에서 물질분리 및 생물활성실험을 수행하였다(1, 2차년도 보고서).

특히 KL1114에서 생성되는 4종류의 항진균물질(TLC, reverse phase TLC, HPLC 실험을 통하여 확인) 중 비교적 저분자량의 물질을 대상으로 XAD-4, HP20, G-10 column, TLC, prep HPLC 등을 통하여 분리 정제한 후 ¹H NMR, C-NMR, Mass spect.에 적용하였다.

현재 FAB-MS spectrum에서 m/z 531 (M+H)⁺의 molecular ion peak가 관찰되어 분자량은 530 (KLMBF-①)으로 추정되고 있다. 이외의 다른 항진균물질은 Maldi MS spectrum에서 분자량 1045(KLMBF-②), 1058(KLMBF-③), 1074(KLMBF-④)로 나타났

다. 최종보고서 제출전에 분자구조식이 밝혀질 것이다. 특히 분자량이 530인 KLMBF-① 항진균물질은 여태까지 밝혀진 물질 data base에서 보고된 바 없어 신규선택도합물질일 가능성이 매우 높다.

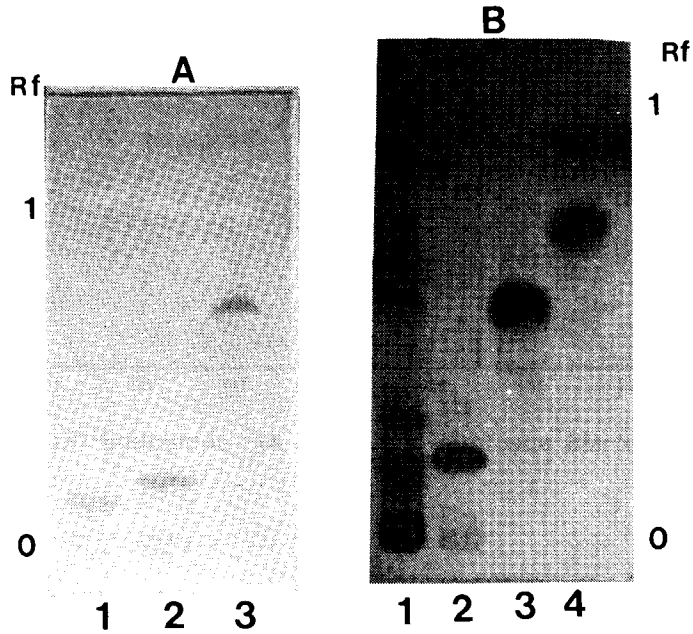


Fig. 3-3-2. TLC chromatogram of purified antifungal substrate from KL1114 when developed with chloroform and methanol(10:1 v/v)
 A: Silica gel TLC plate GF254, lane 1: Rf value 0.22, 2: Rf 0.47, 3: Rf 0.63
 B: Reverse phase TLC plate RP-18F254, lane 1: crude extract, 2: Rf 0.19, 3: Rf 0.54, 4: Rf 0.71

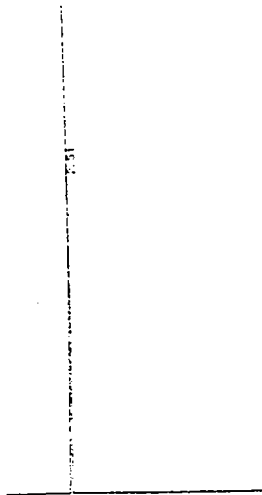


Fig. 3-3-3. HPLC chromatogram of purified antifungal substrate, KL1114-AF
 Column: μ Bondapak C18 column, 0.39×30 cm, Eluent: 80% MeOH, Detection: 240nm, Flow rate: 1.5 ml/min

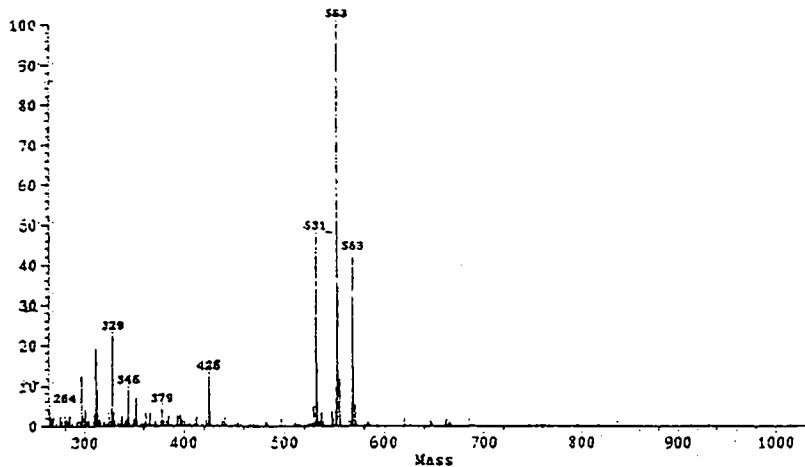


Fig. 3-3-4. FAM-MS spectrum of KL1114 AF⁺ compound (KLMBF-①)

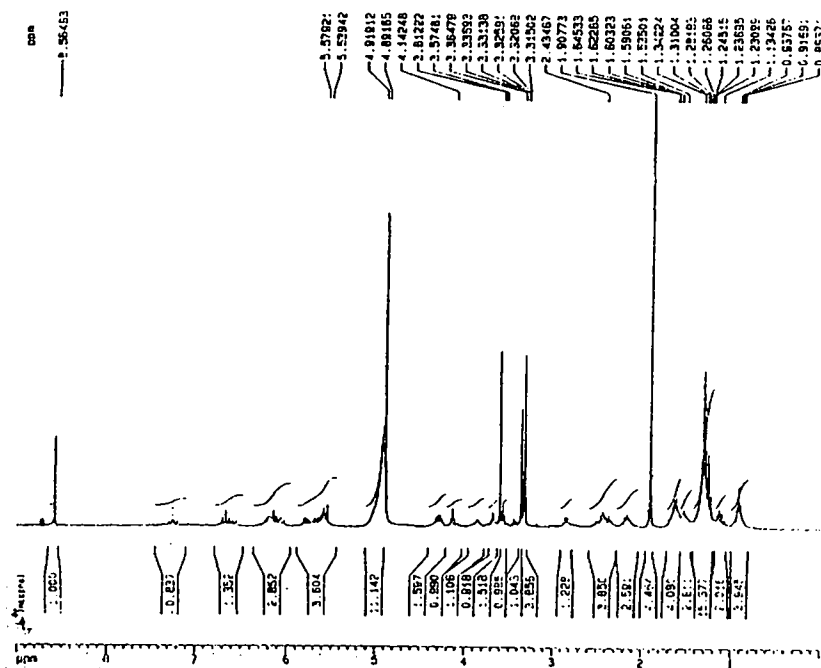


Fig. 3-3-5. 300MHz ¹H-NMR spectrum of KL1114 AF⁺ compound (KLMBF-①)

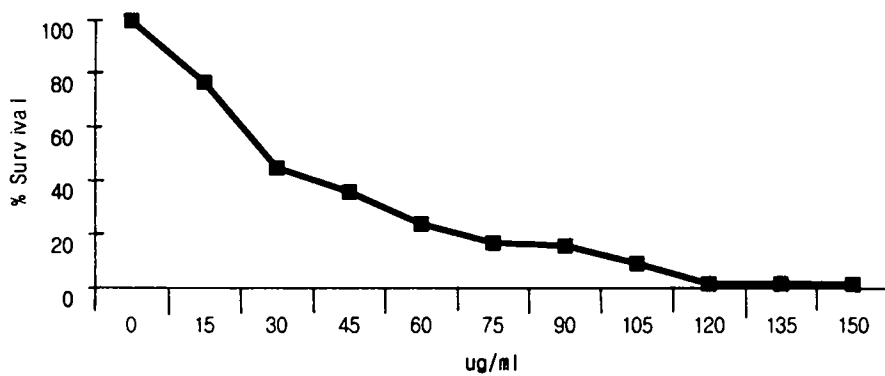
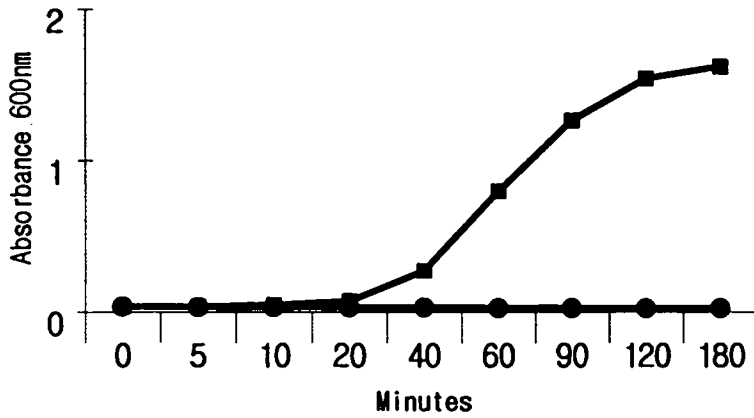


Fig. 3-3-6. Dose-dependent killing of *Candida albicans* by the KL1114 AF compound(KLMBF-①) addition. After incubation at 37°C with shaking for 3 h, the A_{600} was measured. The survival of *C. albicans*(■) was determined by the ratio(%) of the A_{600} of *C. albicans* cultures containing KL1114 AF compound(KLMBF-①) to the A_{600} of cultures without KL1114-AF(KLMBF-①)

A



B

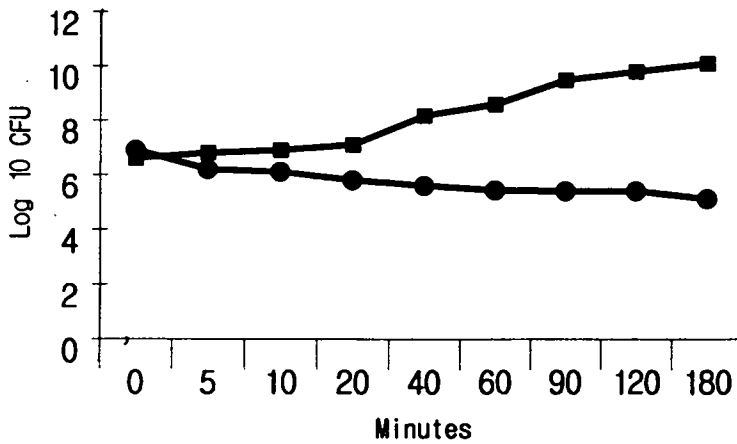


Fig. 3-3-7. Effect of *Bacillus* sp. KL1114 compound(KLMBF-①) on the viability of *C. albicans*. Cultures of *C. albicans*(10^6 cells, initial $A_{600}=0.035$) were incubated with $150\mu\text{g}$ of KL1114 compound(KLMBF-①) per ml , and samples were removed at the times indicated. (A) A_{600} of control cells(■) and cells treated with *Bacillus* sp. KL1114 compound(KLMBF-①)(●), (B) viable cell counts of control cells(■) and cells treated with *Bacillus* sp. KL1114 compound(KLMBF-①)(●).

제4절 폴리펩타이드성 항진균활성물질의 정제

① KL1114의 항진균활성 폴리펩타이드(M.W. 3kDa 및 5kDa) 정제

배양상등액을 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 70% saturation 시킨다음 Sephadex G-50(50 by 2.5cm) column으로 gel filtration를 실시한 후 disc gel electrophoresis, gel eluter system과 Rotofor system을 통하여 항진균단백질을 분리정제하였다. 분리정제된 단백질을 PAGE gel 상에서 혹은 배지상에서 Bioassay를 실시한 결과, 약 3kDa 및 5kDa의 항진균활성단백질을 확인할 수 있었다.

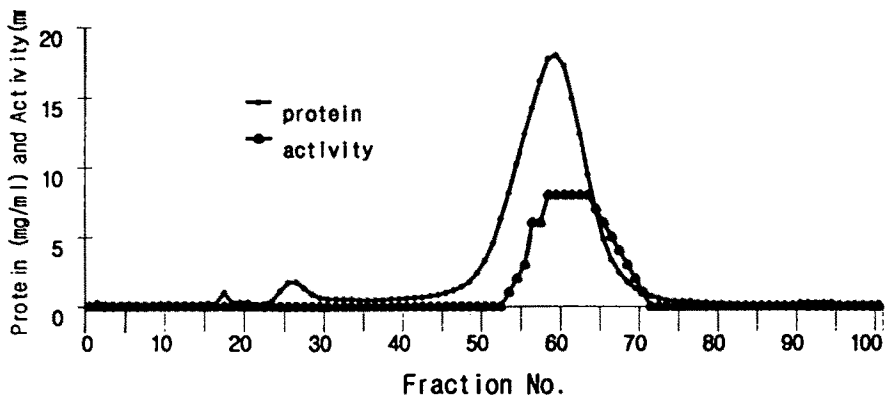


Fig. 3-4-1. Elution profile of low molecular weight of AF^+ polypeptide through Sephadex G-50 gel filtration column. Ammonium sulfate-precipitated supernatant(70%) from KL1114 was chromatographed on a Sephadex G-50 column by using the PBS-6M urea(pH 7.0). Fraction(5ml) were measured by determining the A_{280} (●), and low M.W. of AF^+ polypeptide activity(▲) was determined by the growth inhibition zone of *C. albicans*

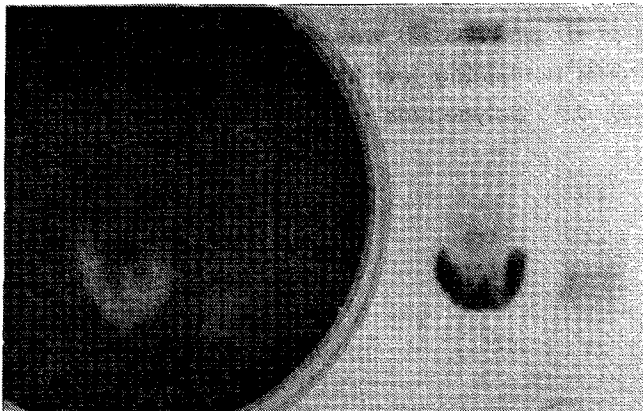


Fig. 3-4-2. SDS-PAGE(16.5% gel) of antifungal protein from KL1114 and Bioassay

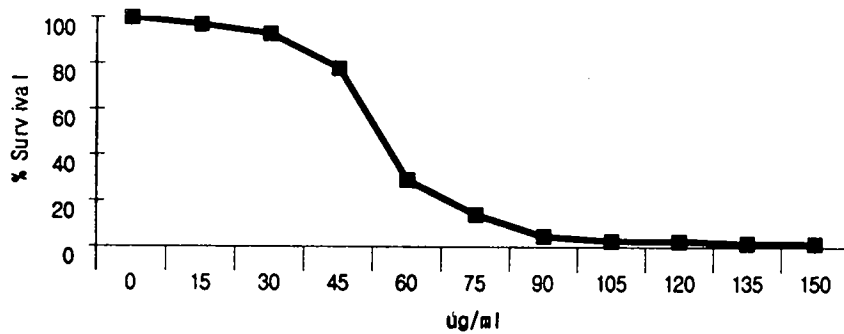
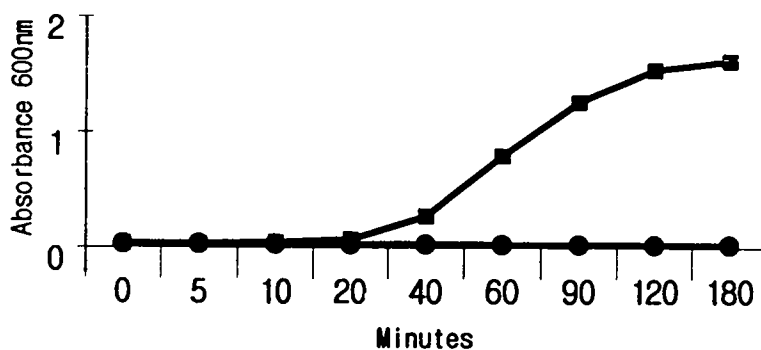


Fig. 3-4-3. Dose-dependent killing of *Candida albicans* by the low M.W.-AF⁺ polypeptide. After incubation at 37°C with shaking for 3 h, the A₆₀₀ was measured. The survival of *C. albicans* (■) was determined by the ratio(%) of the A₆₀₀ of *C. albicans* cultures containing low M.W.-AF⁺ polypeptide to the A₆₀₀ of cultures without low M.W.-AF⁺ polypeptide

A



B

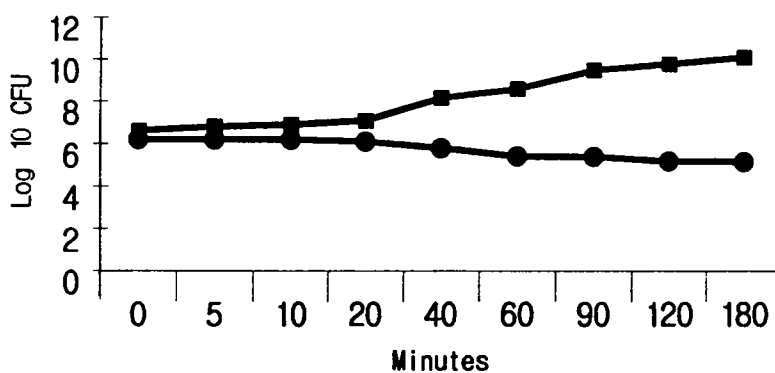


Fig. 3-4-4. Effect of *Bacillus* sp. KL1114 polypeptide on the viability of *C. albicans*. Cultures of *C. albicans* (10^6 cells, initial $A_{600}=0.035$) were incubated with $150\mu\text{g}$ of low M.W.-AF⁺ polypeptide per ml, and samples were removed at the times indicated. (A) A_{600} of control cells (■) and cells treated with low M.W.-AF⁺ polypeptide (●), (B) Viable cell counts of control cells (■) and cells treated with low M.W.-AF⁺ polypeptide (●).

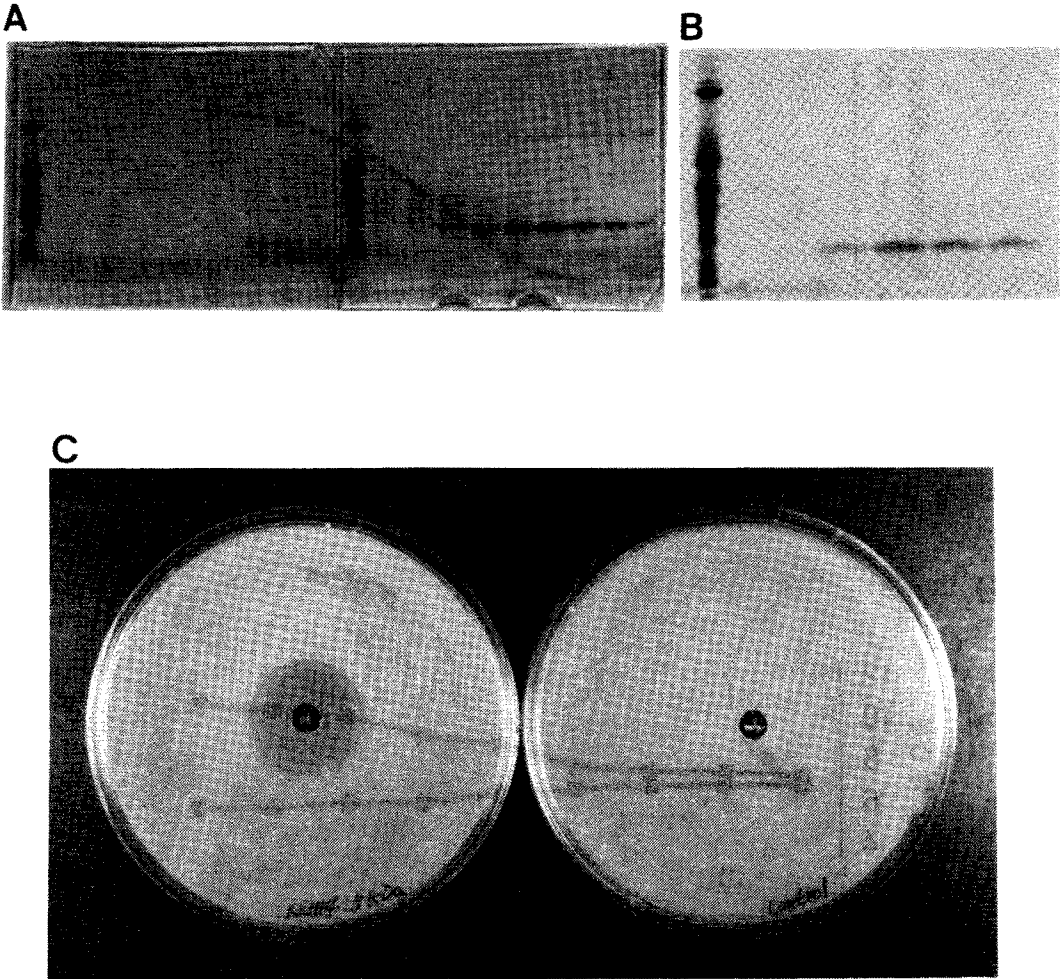


Fig. 3-4-5. Purification of low M.W.-AF polypeptide and antifungal activity
A: partially purified low M.W.-AF polypeptide by Sephadex G-50 column gel filtration
B: Purified low M.W.-AF polypeptide by Disc preparative electrophoresis apparatus
C: Antifungal activity of purified low M.W.-AF polypeptide against *C. albicans*.

② KL1114 (M.W. 41kDa)의 항진균활성 폴리펩타이드 정제

완전하게 lysis가 일어난 배양상등액을 PEG로 침전시킨다음 Sephadex G-100(30 by 1.5cm) column으로 gel filtration를 실시한 후 상기와 같은 방법으로 항진균단백질을 분리하였다. 분리정제된 단백질을 SDS-PAGE상에서 SDS를 제거한 후 항진균활성 Bioassay를 실시한 결과, 약 41kDa정도의 항진균 단백질을 확인할 수 있었다.

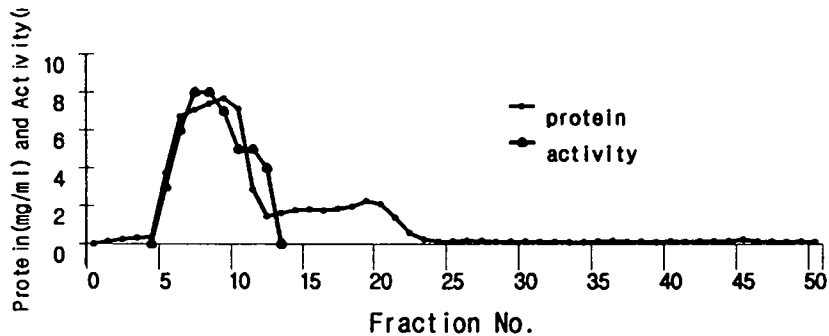


Fig. 3-4-6. Elution profile of low molecular weight of AF⁺ polypeptide through Sephadex G-100 gel filtration column. Ammonium sulfate-precipitated supernatant(70%) from KL1114 was chromatographed on a Sephadex G-100 column by using the PBS-6M urea(pH 7.0). Fraction(5ml) were measured by determining the A₂₈₀(●), and low M.W. of AF⁺ polypeptide activity(▲) was determined by the growth inhibition zone of *C. albicans*

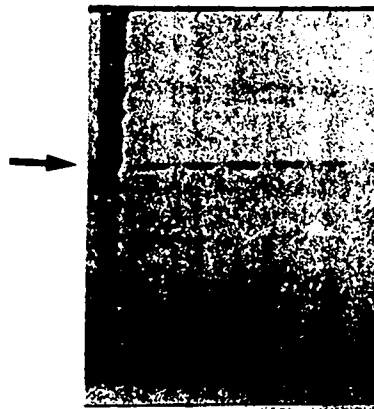


Fig. 3-4-7. SDS-PAGE(12% gel) of antifungal protein from KL1114

③ KL1326(M.W. 20kDd)의 항진균활성 폴리펩타이드 정제

배양상등액을 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 70%로 saturation 시킨다음 Sephadex G-50(50 by 2.5cm) column으로 gel filtration를 실시하여 항진균단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 SDS-PAGE와 Bioassay를 실시한 결과, 항진균활성을 나타내는 분자량이 약 20kDa의 항진균 단백질을 확인할 수 있었다.

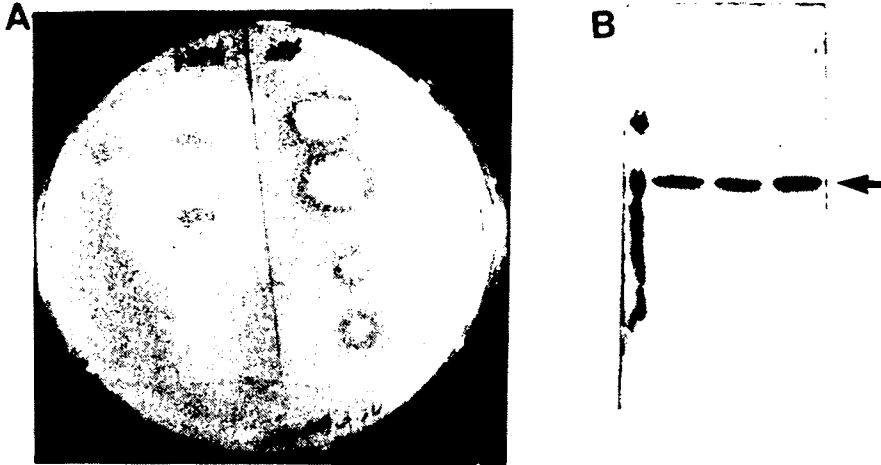


Fig. 3-4-8. SDS-PAGE and antifungal activity of antifungal protein(M.W 20kDa) from KL1326. A: Antifungal activity against *Fusarium oxysporum*
B: SDS-PAGE(16.5%)

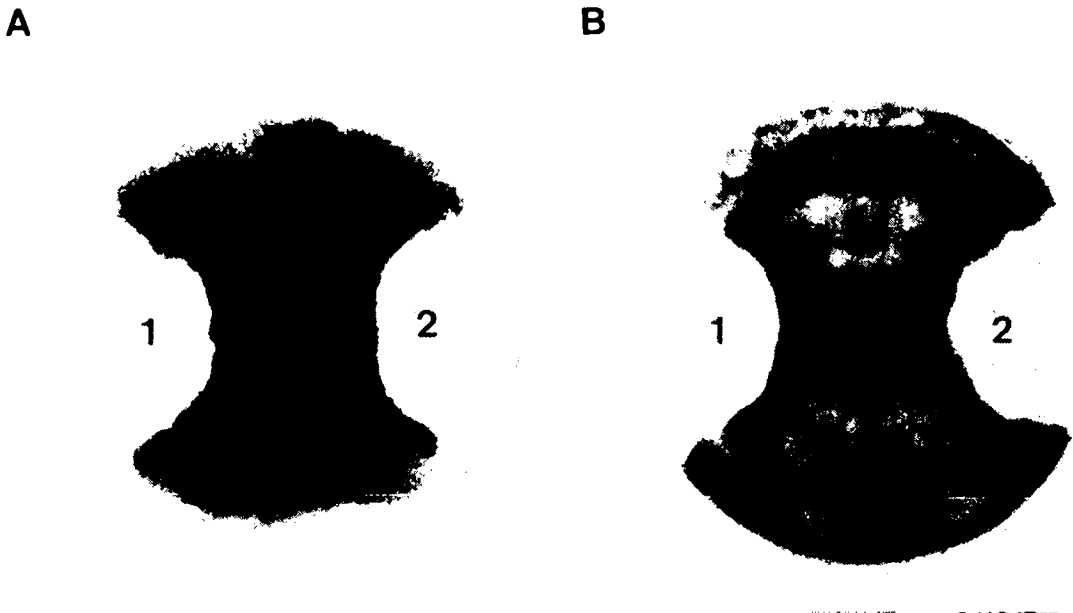


Fig. 3-4-9. Inhibition zone formed on the lawn of *Botryoshaeria dothidea* and *Botrytis cinerea* by the antifungal substrate and low M.W.-AF⁺ polypeptide produced from KL1114. A: *Botryoshaeria dothidea*, B: *Botrytis cinerea*
1: low M.W.-AF⁺ polypeptide, 2: antifungal substrate

제5절 폴리펩타이드성 항진균활성물질의 구조분석

① 항진균활성 세포외분비단백질의 아미노산서열 분석

KL1114 와 KL1326의 두 균주로부터 항진균성 세포외분비단백질이라고 추정되는 분획을 SDS-PAGE gel에서 분리하여 N 말단의 peptide sequencing을 행하였다. N 말단 아미노산 sequence를 가지고 BLAST search를 수행한 결과, KL1114의 약 3 kDa의 단백질은 *Nicotiana*, *Solanum* 등에서 생성되는 Osmotin-like protein (PR-5d)과 *Citrus*의 basic chitinase/lysozyme등과 상동성을 보여 주었다. 또 강력한 항진균활성 폴리펩타이드인 KL1114의 5 kDa의 단백질은 ribosomal protein과 상동성을 나타내었다. ribosomal protein은 tumor suppressor activity를 증가 시킨다는 생물학적 기능을 고려해볼 때 대단히 의미가 크다. 한편 KL1114의 41 kDa의 단백질의 N 말단 아미노산 sequence는 *Bacillus*의 flagellin의 N 말단과 상동성을 보여주었다. KL1326의 20 kDa의 단백질의 N 말단의 아미노산서열은 *Pseudomonas syringae*의 주요한 분비단백질 (autolysin or DNase ?)로 밝혀졌다.

Table 3-5-1. Amino acid sequence and homology comparison of antifungal polypeptide

Strain	M.W. (kDa)	Amino acid sequence	Homology comparison*
KL1114	3	(A/R/G)(Q/H/P)P(M/Q)TVW(N/A/E)AANM	-Osmotin-like protein (PR-5d) in <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Nicotiana sylvestris</i> , and <i>Solanum commersonii</i> ¹⁾ -Basic chitinase/lysozyme in <i>Citrus sinensis</i> ¹⁾
	5	ALHGMVGGKYGANMR	-40S Ribosomal protein S29 in human -Antisense sequence of krev-1, anti oncogene
	41	MRINHNI AALNT	-Flagellin (<i>hag</i> gene product) in <i>Bacillus subtilis</i> ²⁾
KL1326	20	ATPAYMSITGTKQGLITA	-Major exported protein (autolysin or DNase) of <i>Pseudomonas syringae</i> ³⁾

1) 3 kDa protein of KL1114

① Osmotin-like protein (PR-5d) in *Nicotiana*
 3 PQTWAAA 10
 * *****
 11 PYTWAAA 18

② Osmotin-like protein in *Solanum commersonii*

3 PQTWAAA 10
* *****
32 PYTVWAAA 39

③ Basic chitinase/lysozyme in *Citrus sinensis*

3 PQTWAAA 10
* *****
10 PYTVWAAA 17

2) 5 kDa protein of KL1114

① 40S Ribosomal protein S29 in human/Antisense sequence of krev-1, anti oncogene

3 HGMVGKYGANM 13
** *** **
28 HGLIRKYGLNM 38

3) 41 kDa protein of KL1114

Flagellin of *Bacillus subtilis*

1 MRINHNIAALNT 12

1 MRINHNIAALNT 12

4) 20 kDa protein of KL1326

Major exported protein of *Pseudomonas syringae*

1 ATPAYMSITGTKQLITA 18

1 ATPAYMSITGTKQLITA 18

② 상기의 아미노산 서열 정보들은 KL1114의 3kDa 및 5kDa, 41kDa 폴리펩타이드와 KL1326의 20kDa 폴리펩타이드 단백질을 클로닝하는데 필요한 degenerated primer를 제작하는데 매우 중요하다.

③ 본 연구결과 중 KL1114의 3kDa 폴리펩타이드가 식물에서 기원되는 항진균활성 단백질인 osmotin(24 kDa)의 일부 domain과 상동성을 보인 결과는 세계적으로 처음 보고되는 매우 주목할 만한 획기적인 연구성과이다.

④ 3kDa, 5kDa, 41kDa, 20kDa 폴리펩타이드가 세균으로부터 유래하는 현재까지 보고된 바 없는 항진균활성단백질이라는 점이 신규성을 나타낸다.

제4장 항진균 활성물질 합성유전자의 cloning 및 molecular biology

제1절 서론

항진균제를 포함한 항생물질 생합성단계는 대부분 다단계 과정을 통하여 이루어진다. 따라서 여러종류의 유전자가 항생물질합성과 조절에 관여하는 것이 일반적이다 또 항진균활성물질은 그 종류또한 매우 다양하다. 비록 분자생물학적 연구과정이 복잡하고 어려운 일이긴 하지만 항진균물질의 합성에 관여하는 유전자를 연구하는 것은 생합성효율, 균주개량 등 응용측면에서도 대단히 중요하다. 특히 항진균활성물질이 폴리펩타이드성일 경우 합성유전자에 관한 연구는 여러 가지 측면에서 시도할 가치가 매우 높다.

제2절 항진균활성세균의 돌연변이체(AF⁻) 제조 및 특성.

가. 항진균제 활성물질 합성유전자에 대한 돌연변이체의 분리

alkylating agent인 EMS(Ethyl Methanesulfonate)를 돌연변이원으로 사용하여 항진균제 활성물질을 분비하는 균주인 KL1121 및 KL1114에 대하여 농도 및 처리 시간을 조절하여 평균적으로 하나의 유전자에만 돌연변이가 유도되도록 EMS를 처리하였다. 그 결과, KL1114에 대해서는 총 5개의 돌연변이체를 분리하였으며 KL1121에서는 총 4개의 돌연변이체를 분리하였다. 이들 중 고체 및 액체배지하에서 항진균제 활성물질을 외부로 분비하지 못하여 식물병원성 진균류에 대해서 활성을 잃어버린 균주를 2차적으로 선별하여 최종적으로 KL1114의 경우 3개, KL1121의 경우 2개의 돌연변이체를 분리하였다. 진도보고서 제출이후 계속수행된 돌연변이 실험결과 현재 KL1114의 경우 19개, KL1121의 경우 18개의 항진균활성을 잃은 돌연변이체를 확보하였다.

Strain #		<i>C. albican</i>	활성물질 외부분비능력	성장 상태	비 고
KL1114	WT	+++	+++	Good	
	M-1	-	-	Good	이용 가능
	M-2	-	-	Good	이용 가능
	M-3	-	-	Good	이용 가능
KL1121	WT	+++++	+++++	Good	
	M-1	-	-	Good	이용 가능
	M-2	-	-	Good	이용 가능

나. 키틴분해효소 유전자에 대한 돌연변이체의 분리

항진균제로 작용할 것으로 추정되는 분비형키틴분해효소를 합성하는 균주인 KL1105

KLP21 및 KLP26에 대해서 alkylating mutagen인 EMS(Ethyl Methanesulfonate)를 하나의 유전자에만 돌연변이가 유도되는 조건으로 처리한 결과, KL1105의 경우에는 총 9개, KLP21의 경우 3개, KLP26의 경우에는 17개의 키틴분해효소 유전자 돌연변이체를 분리하였다. 이들 중 고체 및 액체배지하에서 항진균 활성 및 키틴분해효소의 활성을 모두 잃어버린 균주선별 과정 결과 KL1105 (8개), KLP21(3개) 및 KLP26(5개)에 대해서 2차 선별과정을 거쳤다. 항진균제 활성 및 키틴분해활성이 완전히 제거되었음에도 불구하고 정상 성장을 하는 균주를 선별한 결과, 최종적으로 KL1105에서는 7개, KLP21의 경우 1개, KLP26의 경우 3개의 돌연변이체를 분리하였다.

Strain #		항진균활성	키틴분해활성	성장 상태	비 고
KL1105	WT	+++	+++	Good	
	M-1	+	-	Good	이용 가능
	M-2	-	-	Good	이용 가능
	M-3	-	-	Good	이용 가능
	M-4	±	-	Bad	이용 불가능
	M-5	-	-	Good	이용 가능
	M-6	-	-	Good	이용 가능
	M-7	-	-	Good	이용 가능
	M-8	-	-	Good	이용 가능
	M-9	±	-	Bad	이용 불가능
KLP21	WT	+	+++	Good	
	M-1	-	-	Bad	이용 불가능
	M-2	-	-	Good	이용 가능
	M-3	-	-	Bad	이용 불가능
KLP26	WT	++	+	Good	
	M-1	-	-	Bad	이용 불가능
	M-2	-	-	Good	이용 가능
	M-3	-	-	Good	이용 가능
	M-4	-	-	Bad	이용 불가능
	M-5	-	-	Good	이용 가능

다. 항진균활성세균의 wild type과 mutant의 항진균활성물질 검색비교실험

KL1114와 KL1121을 대상으로 EMS에 의한 random mutagenesis를 통하여 제조된 항진균활성을 잃은 돌연변이체와 wild type의 Thin-layer chromatographic 특징을 비교한 결과, band 차이가 뚜렷하게 나타났는데 wild type에서 나타난 항진균활성이 있는 band가 돌연변이체에서는 나타나지 않았다.

Table 4-2-1 Wild type and mutant strains used in this experiment

Strains	Genotype	Pedigree	Construction
KL1114	wild type, AF ⁻ , Amp ^s , Cm ^s , Kan ^s , Str ^s , Tc ^s		AF ⁻ (antifungal activity +)
LKD004	KL1114 mutant, AF ⁻ , Amp ^s , Cm ^s , Kan ^s , Str ^s , Tc ^s	KL114	random mutagenesis w/EMS, AF ⁻
KL1121	wild type, AF ⁻ , Amp ^r , Cm ^r , Km ^r , Str ^r , Tc ^r		AF ⁻
LKD023	KL1121 mutant, AF ⁻ , Amp ^r , Tc ^r , Kan ^r	KL1121	random mutagenesis w/EMS, AF ⁻
LKD050	KL1121 mutant, AF ⁻ , Km ^r	KL1121	random mutagenesis w/EMS, AF ⁻

① 전개용매에 따른 wild type과 mutant의 향진균물질에 대한 Silica gel GF254 Thin-layer chromatography의 특징

전개용매 CHCl₃ : MeOH=15:1 (v/v)을 통하여 TLC를 수행한 결과, wild type인 KL1114의 향진균활성이 있는 Rf 0.28 band가 mutant인 LKD004에서는 나타나지 않았고 KL1121인 경우는 Rf 0.40과 0.55가 돌연변이체(LKD023)에서는 나타나지 않았고 EtoAC : MeoH=5:1전개용매에서는 KL1114의 Rf 0.63, KL1121의 Rf 0.33과 0.57이 각각 mutant에서는 나타나지 않았다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, mutant에서는 향생물질생성유전자가 확실히 결손된 것으로 사료된다(Fig 4-2-1, 4-2-4).

② KL1121(wild type)과 LKD023과 LKD050(mutant)의 향진균물질에 대한 reversed-phase C18 glass Thin-layer chromatography의 특징

wild type과 mutants를 대상으로 NB와 PP(pigment production)broth medium에서 3일간 배양한 후 상등액을 얻었다. 상등액을 ethyl acetate로 추출, 진공건조시킨 후 methanol에 녹여 reversed-phase C18 glass TLC를 수행한 결과, wild type과 mutants간에 서로다른 band양상을 나타내었으며 배지종류에 따라서도 차이를 보였다. 그리고 각각의 band들을 Bioassay를 수행한 결과, wild type에서 향진균활성 band가 나타났으나 mutant에서는 전혀 나타나지 않았다(Fig 4-2-2, 4-2-5).

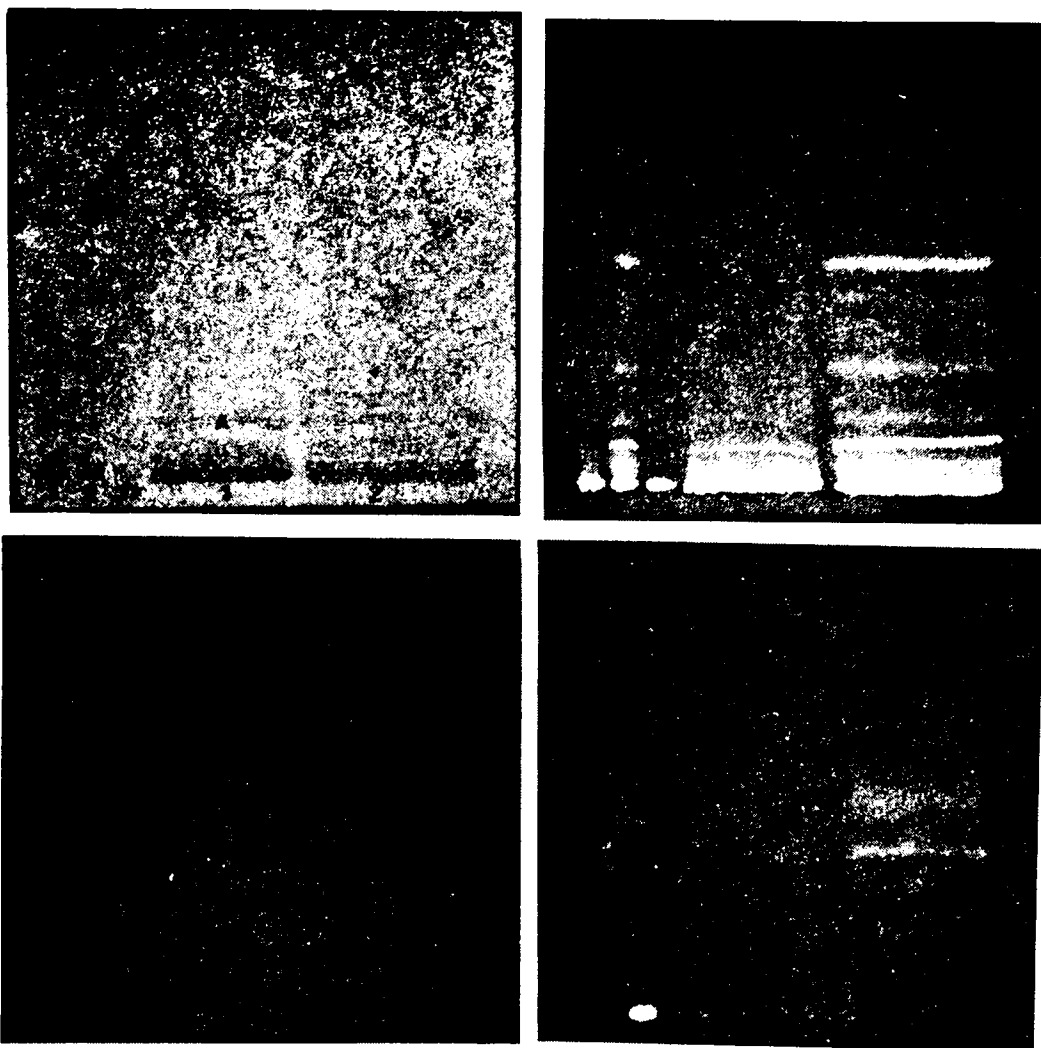


Fig. 4-2-1. TLC chromatogram of antifungal substrate from KL1114<1> and its mutants<LKD004(2)>

A: active antifungal band, 1★: KL1114(GluMOPS medium)

Solvent system: upper photographs/CHCl₃:MeOH(15:1, v/v), lower photographs / EtOAc:MeOH(5:1, v/v) .

Detection: UV 254nm(Left), UV 366nm(Right)

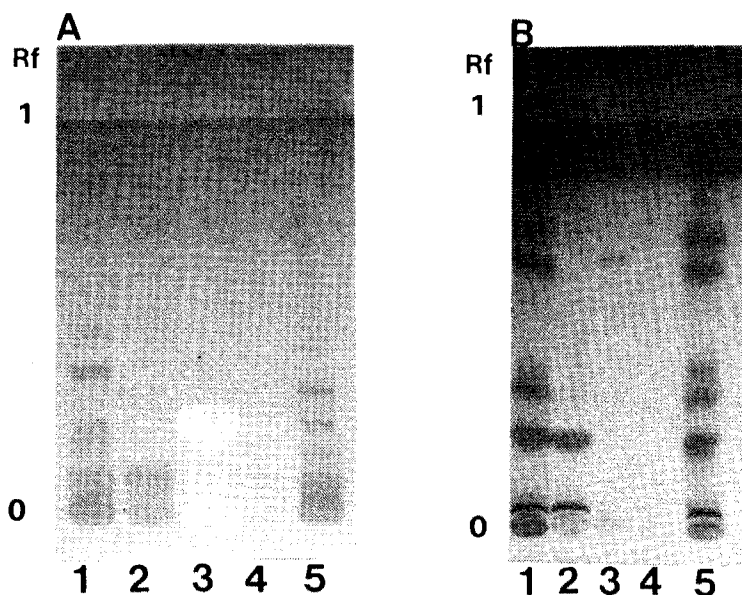


Fig. 4-2-2. Thin layer chromatogram of antifungal compounds from KL1114 and its mutants

A: Silica-gel(GF254), B: reverse phase plate

Lane 1: KL1114, 2: *Bacillus amyloliquefaciens* KCTC1660, 3: *Bacillus subtilis* 168, 4: LKD005(mutant treated with EMS, AF-), 5: R6(mutant radiated with γ -ray 20kGy, AF+),

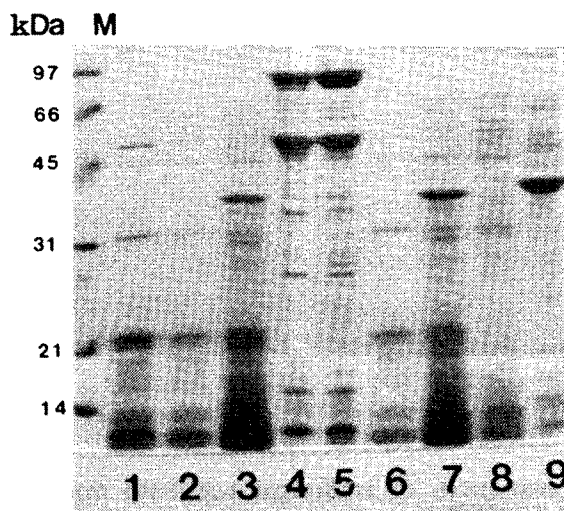


Fig. 4-2-3. Protein profiles of crude extracts from wild type and mutants by SDS-PAGE gel electrophoresis

Lane 1. KL1114 wild-type, 2. KLD002(mutant treated with EMS, AF+), 3. LKD003(mutant treated with EMS, AF+), 4. LKD005(mutant treated with EMS, AF-), 5. LKD013(mutant treated with EMS, AF-), 6. R5(mutant radiated with γ -ray 20kGy, AF+), 7. R6(mutant radiated with γ -ray 20kGy, AF+), 8. *Bacillus amyloliquefaciens* KCTC1660, 9. *Bacillus subtilis* 168

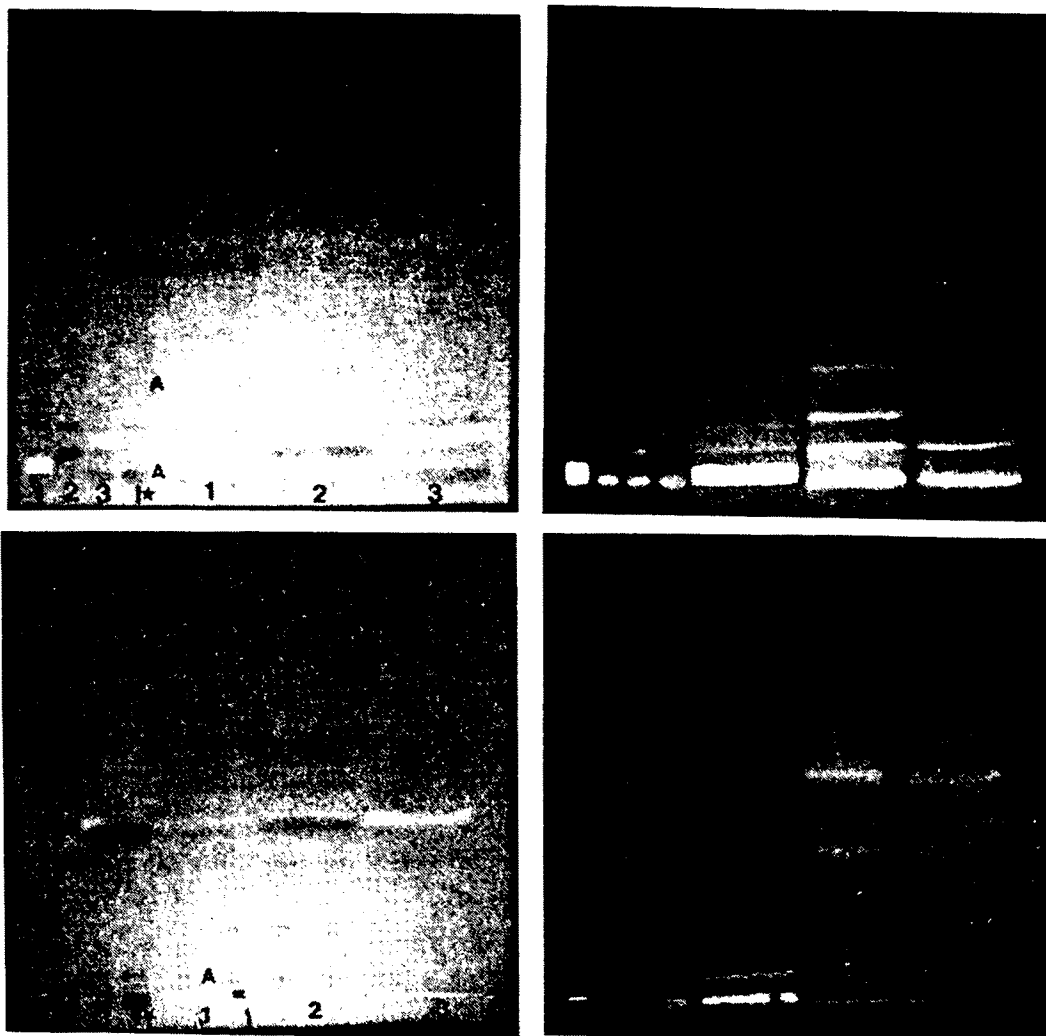


Fig. 4-2-4. TLC chromatogram of antifungal substrate from KL1121<1> and its mutants<LKD023(2), LKD050(3)>
 A: active antifungal band, 1★: KL1121(GluMOPS medium)
 Solvent system: upper photographs/CHCl₃:MeOH(15:1, v/v) , lower photographs/
 EtOAc:MeOH(5:1, v/v) .
 Detection: UV 254nm(Left), UV 366nm(Right)

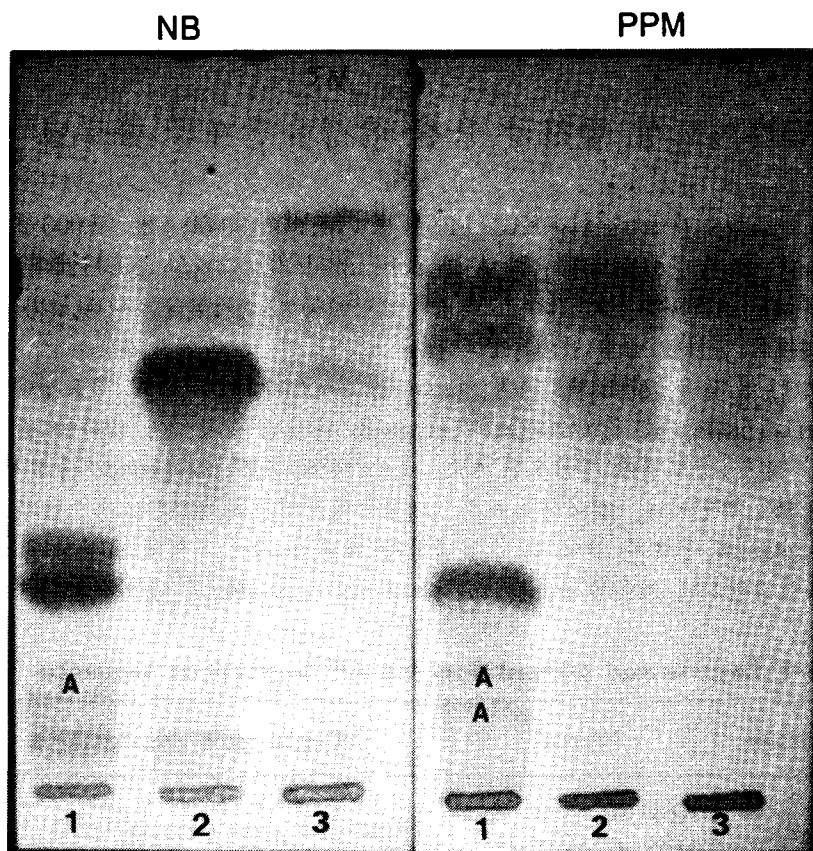


Fig. 4-2-5. Reverse phase TLC of antifungal compounds from KL1121<1> and its mutants<LKD023(2), LKD050(3)> cultivated in NB(left) and PPM(right) medium

•A: active antifungal bands

•Solvent system: acetonitrile /MeOH/water(1:1:1, v/v/v)

•Plate: TLC plate RP-18F254

③ 또한 방사선(Co^{60} γ -ray)선량을 2.5~25kGy로 조사한 후, AF⁻활성이 증진된 돌연변이체를 얻고자하였다. 그 결과 20kGy선량에서 약 1.5배 활성이 증진된 돌연변이체를 얻었다. 이들 돌연변이체들을 대상으로 항진균활성물질을 TLC로 분리하여 분석한 결과, AF⁻ (negative)돌연변이체들은 항진균활성물질의 생성이 완전히 억제되었다. 반대로 AF⁺⁺ 돌연변이체는 항진균활성물질의 합성이 약 50%이상 증가되었다.

제3절 펩타이드성 항진균 물질 합성유전자의 클로닝

앞에서 언급한 바와 같이 KL1114에서는 M.W. 3,000 및 5,000의 중분자성 polypeptide와 M.W. 41,000의 고분자성 polypeptide가, 그리고 KL1326에서는 M.W. 20,000의 polypeptide가 AF⁻(antifungal, 항진균활성) 기능을 나타내었다. 이들 polypeptide에서 분획된 일부 아미노산 서열에 근거하여 몇 종류의 degenerated primer를 제작하였으며, 이들을 probe로 하여 genomic Southern blot으로 클로닝을 시도하여 KL1114(3kDa, 5kDa), KL1326(20kDa)의 signal을 나타낸 클론들에 대하여 집중조사분석 중에 있다. 일단 클로닝이 성공되면 이는 세균기원의 AF⁻ polypeptide 유전자가 국제적으로 최초로 확인되는 것이며 특히 대장균에서의 과대발현 시스템의 도입이나 transgenic plant의 구축과 같이 그 응용범위가 대단히 크다. 현재 유전자가 클로닝되었을 때 식물형질전환에 적용할 transgenic plant vector system을 준비하고 있다.

Table 4-3-1. Degenerated primers from the AF⁻ polypeptide sequence

Primer Name	Source	Degenerated primer
P1114-1	KL1114 M.W. 5 kDa	T V W X A A N M 5'ACNGTNTGGNNNGCNGCNAATATG 3' C
P1114-2	KL1114 M.W. 5 kDa (Osmotin-like)	P Y T V W A A A 5'CCNTATACNGTNTGGGCGCNGC 3' C
P1326	KL1326 M.W. 20 kDa	I T G T K Q G 5'ATTACNGGNACNAAACAAGG 3' C G G A

*N means (T/C/A/G)

제4절 항진균활성단백질(KL1114로부터 유래된 분자량 41kDa)의 유전자클로닝, 과대발현 및 분리정제

KL1114로부터 분리된 41kDa 단백질의 N 말단의 peptide sequence를 분석하여 BLAST search를 수행한 결과, *Bacillus*의 flagellin과 높은 상동성을 보였다. 기발표된 flagellin유전자의 염기서열에 기초하여 primer를 제작하고 PCR로 KL1114 genomic DNA로부터 0.9kb의 DNA를 증폭시켜 클로닝하였으며 DNA 서열을 분석하여, flagellin 유전자임을 확인하였다. 또한 flagellin 합성유전자를 pET22b(+) vector를 이용하여 과대 발현시킨 다음, 항진균활성을 확인하였다. 한편 Sephadex G-100 column, Disc Prep. 전기영동장치, Rotofor system, Gel eluter 등을 이용하여 단백질을 순수분리정제하였다.

Table 4-4-1. Primers for PCR cloning of the gene encoding 41kDa AF+ protein from KL1114

Primer name	Oligonucleotides
P1114-3	5'CGAGCTCATATGAGAATTAAC3' (upstream)
P1114-4	5'CAAGCTTGGATCCTTAACGTAATAA3' (downstream)

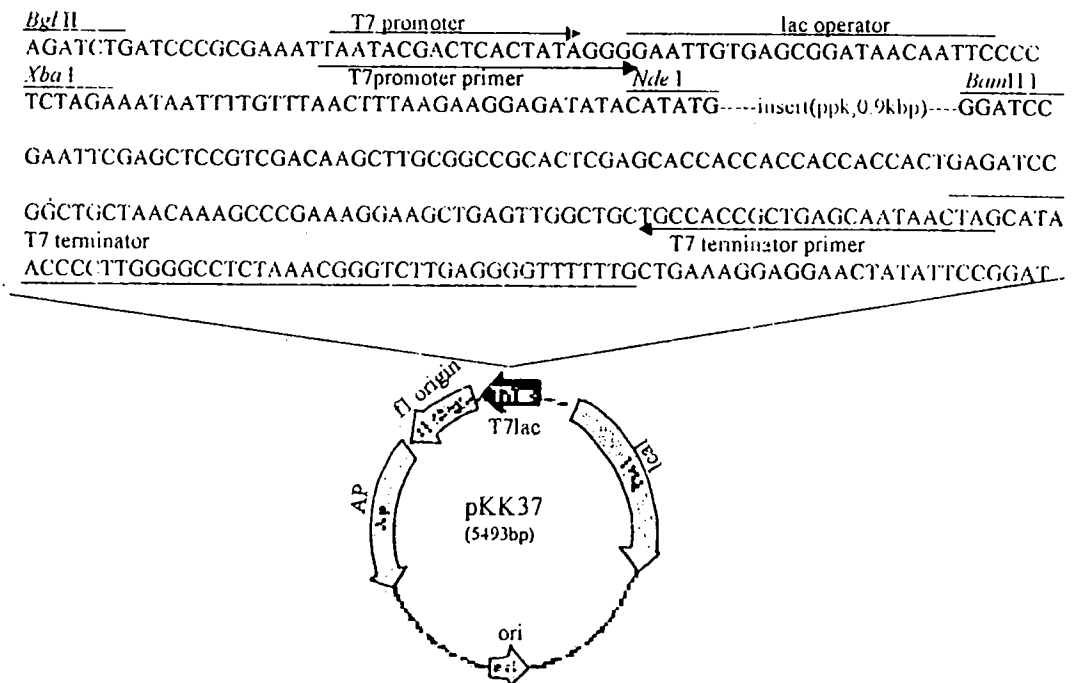


Fig. 4-4-1. Cloning and overexpression for 41 kDa gene. pKK37 was constructed. The *Nde* I and *Bam* HI fragment from the PCR products was subcloned into pET22b(+) vector.

Table 4-4-2. DNA sequence of the gene encoding 41kDa AF+ protein from KL1114

```

1   ATGAGAATTAACCACAATGTTGCAGCGCTTAACACACTGAACCGTTTGTCTTCAAAACAACAGTGCG
   M R I N H N V A A L N T L N C L Q T T V R A
67  AGCCAAAAGAACATGGAGAACTTTCTTCAGGCTTTCGCATCAACCGTGGGGAGATGACGCAGCA
   K R I W R N F L R S S H Q P C G R Z R S R S
133 GGTCTTGGATCTCTGAAAAATGAGAGGACAAATCAGAGGCTTTGAAATGGCTTCTAAAACTCT
   C D S E K M R G Q I R G L E M A S K L K T E
199 AAGACGGAATCTCTCTTATCCAACAGCTGAGGGTGCATTAAGTAACTCATGCGATCCTTCAAC
   S L L S K Q L R V H Z L N S C D P S T C S Z
265 GTGTCGTGAGCTAGTTGTTCAAGCTGGAACACTGGAACCTCAGGACAAAGCAACTGATTTGCAAT
   A S C S S W N T G T Q D K A T D L Q S I Q D
331 CTATTCAGATGAAATTTTCAGCTTAAACAGATGAAATCGATGGTATTTCAAATCGTACAGAATTCA
   F Q L Z Q M K S M V F Q I V Q N Q W Z E I A
397 ATGGTAAGAAATTGCTCGATGGCACTTACAAAGTTGACACAGCTACTCCTGCAAATCAAAGAACT
   R W H L Q S Z H S Y P A N Q K N L V F Q I G
463 TGGTATTCCAAATCGGAGCAAATGCTACACAGCAAATCTCTGTAAATATTGAGGATATGGGTGCTG
   A N A T K S L Z I L R I W V L T L L E L R S
529 ACGCTCTTGAATTAAGAAGCTGATGGTTCAATTGCAGCTCTTCATTAGTTAATGATCTTGACG
   Z W F N C S S S F S Z Z S Z V T K F A D N A
595 TAACAAAATTCGCAGATAATGCAGCAGATACTGCTGATATCGGTTTCGATGCTCAATTGAAAGTTG
   A D T A D I G F L N Z K L L M K R S T K F L
661 TTGATGAAGCGATCAACCAAGTTTCTTCTCAACGTGCTAAGCTTGGTGGGTACAAAATCGTCTAG
   L N C Z A W C G T K S S R A H N Z Q L S A S
727 AGCACACAATTAACAACCTTAAGCGCTTCTGGTGAAAACCTGACAGCTGCTGAGTCTCGTATCCGTG
   G E N L T A A E S R I R L I W L K R Z A N S
793 ACGTTGACATGGCTAAAGAGATGAGCGAATTCACAAAGAACAACATTCTTCTCAGGCTTCTCAAG
   Q R T T F F S G F S S Y A C S S K P T A A K
858 CTATGCTGCTCAAGCAAACCAACAGCCGCAAAACGTAAGTCAATTATTACGTTAAGGATCCAAGC
   V L Q L L R Z G S K L G S E F E . . . . .

```

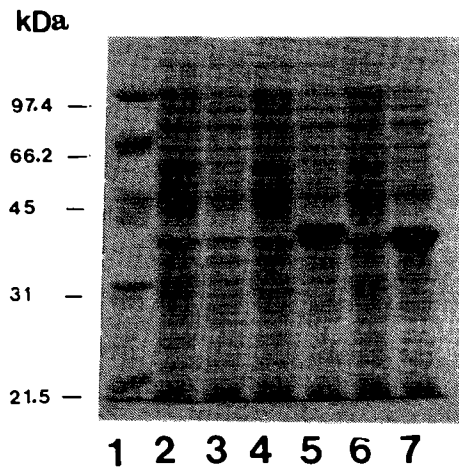


Fig. 4-4-2. SDS-PAGE showing overexpression of antifungal protein(M.W 41kDa) produced from KI1114
 Lane 1: Marker, 2: pET22b(+), IPTG⁻, 3: pET22b(+), IPTG(+), 4: pKK37, IPTG(-), 5: pKK37, IPTG(+), 6: pKK41, IPTG(-), 7: pKK41, IPTG(+)

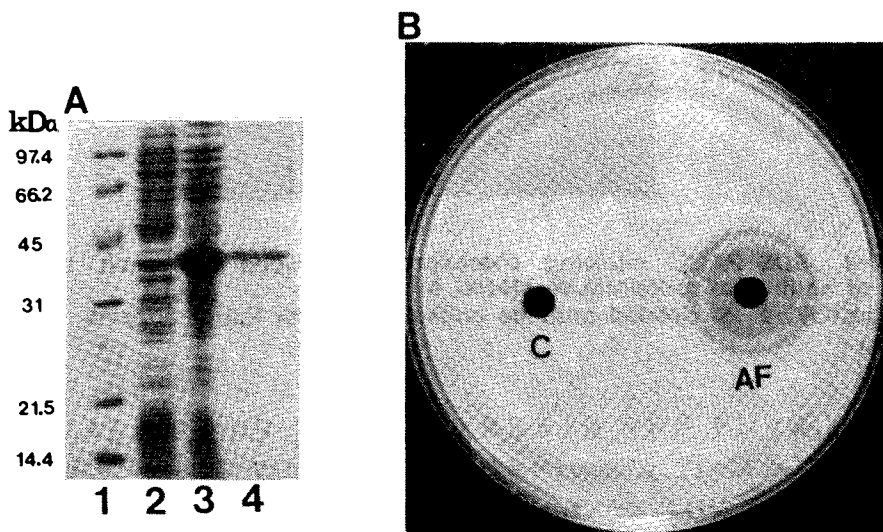


Fig. 4-4-3. Purification and antifungal activity of antifungal protein(M.W 41kDa) produced from KI1114
 A: purification of 41kDa protein
 Lane 1: Marker, 2: pET22b(+), 3: crude protein, 4: purified protein
 B: antifungal activity, C: control, AF: purified protein

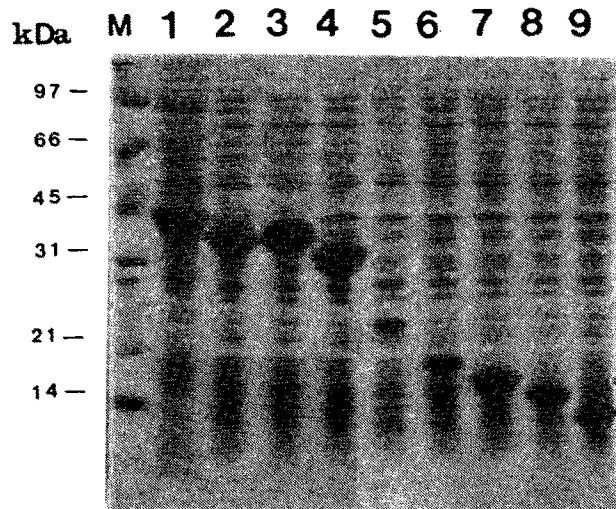


Fig. 4-4-4. SDS-PAGE showing overexpression mode for each of deleted mutants of antifungal protein(M.W 41kDa) in KI1114
Lane 1: pKK37, 2~9: deleted mutants constructed with ExoIII enzyme

또 flagellin 유전자에 있어서 항진균활성 domain을 찾기 위하여 C 말단으로부터 일련의 결실단편을 제조, T7 promoter하에서 과대발현을 시킨 후 순수 정제하였다(Fig. 4-4-4). 순수 정제된 각각의 deleted polypeptide들에 대하여 항진균활성을 측정하면서 최소크기의 항진균활성 polypeptide domain을 찾고 있다.

제5장 병원성 진균류의 MAPK family 유전자의 클로닝

제1절 서론

병원성진균류에 있어 신호전달체계를 연구조사하는 까닭은 첫째 복잡하고 급변하는 환경의 적응기작을 이해하는데 중요하며, 둘째 항진균제 개발과 요법을 위한 새로운 target site를 규명하는데 필수적이기 때문이다. 본 연구의 target site screening법에 적용할 model system으로 지금까지 방제가 가장 어려운 병원성진균류인 *Fusarium oxysporium*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinera*, *Alternaria mali* 등을 대상으로 한다.

이들 model system의 target site를 kinase cascade에 포함되어 있는 MAPKs, MEKK(MAPK kinase kinase), MEK(MAPK kinase), HOG1 등으로 확장하고자 한다. target site screening 방법은 기존의 탐색방법과 병행해서 이미 확보해 놓은 항진균 활성물질의 분획시료는 물론이고 앞으로 더 분리될 많은 세균으로부터 얻은 시료를 대상으로 시행한다. 이는 국내외적으로 처음 시도되는 경쟁력있는 연구가 되기 때문에 국제적으로도 항진균활성 선도물질을 탐색도출할 가능성이 매우 높기 때문이다.

제2절. genomic library로부터 MAPK family 유전자의 클로닝

가. MAPK 유전자 후보 선별

식물 병원성 진균류 *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporium cucumerrium*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*로부터 분리한 genomic DNA를 URA3 CEN shuttle vector pRS316에 삽입하여 genomic DNA library를 제조한 후 이를 MAP kinase가 결손된 yeast mutant (EY1095)에 형질전환을 수행하였다. 이들 형질전환체들은 α -mating factor가 도말된 배지에서 수행되는 cell growth inhibition test를 통해 선별한 결과 *Botrytis cinerea*의 경우는 2개, *Alternaria solani*의 경우는 43개, *Fusarium oxysporium cucumerrium*의 경우는 88개의 유전자 후보를 선별하였다. 이중에서 *A. solani*의 경우는 14개, *F. o. cucumerrium*의 경우는 21개의 유전자 후보가 drop assay를 통해서 2차 선별되었다. 이들에 대해서 mating test를 통해서 최종적인 유전자 후보를 선별한 후, 염기서열 결정 및 특성에 관한 연구를 수행하고 있다.

나. putative MAPK 유전자의 염기서열 결정

*Botrytis cinerea*에서 1차 선별된 두 개의 MAP kinase 유전자 후보들은 제한효소 지

도작성을 통해 동일한 유전자임이 확인되었다. 이 유전자 후보에 대한 염기서열 결정을 위해서 ExoIII nuclease 처리하여 250bp씩 결실된 클론들을 확보하여 이들의 염기서열을 결정한 결과, 총 2087bp의 크기를 지닌 유전자이었으며 인터넷을 통한 염기서열 상동성 검색 결과 효모의 uracil-DNA glycosylase와 아미노산 서열면에서 높은 상동성을 보이고 있음을 확인할 수 있었다.

(A)

ATCAATACTCTGGATGAAAGTTGGCTTGCTCATCTGAAAGACGAGGTCGTCACGGCGGAGTTTTGAATTTAAAG
 CGATTTCTGAAGAAAGAGAAAGATTCAAAGGCTAAGATCTTCTCCGGAGGAAGATGTTTACTCTTGGTCAGTT
 TTTCCCCAGTAACTCCTACCTGTGACACATTACGATGCACCAGCTAGAAGTATAATCATACTAACATGGGTCCA
 ATTCAGGTCCCCGACACACACCCTGCACAAGGTTAAAGTCGTTATCGTCGGCCAAGACCCATATCACAATGACAA
CCAAGCACACGGTCTCTGCTTCTCCGTCCGACCACCAACAAGAGCCCTCCATCCCTCGTAAACATCTACAAAGA
AATCAGCAAGGAGTACCCAGATTTCAAATCCCTCCTAATAATGGCGGATTACTGATTCCTGGGCTGAGCGTGG
CGTATTGATGTTAAATACCTGTTTAAACAGTCCGCGCCACCAAGCAAACAGCCACTCGAATAAAGGATGGGAACG
ATTTACGCAGCGATGTATAGATCTCGTTGCTCGTCCGGACGAATGGAGTTGTCTTTTTGGCTTGGGTAATCC
 AGCTGGGACGAGGGTTGCTAAGATCAATCGACAGAAGCATTGTGTTTTGCAGTCTAAGCATCCTAGTCCGTTAAG
 TGCTCACGGTGGATTTGTAAGTTTTTCTTAGCAGATCAAGAATTAGCAGGAACGGGTTTTGGGAAGAAAGG
 TTGCTAATTTGCATATTTAGTTTTGGAAATGGCCATTTTCATCAAATGCAATGAGTGGTTGGCTTCGGATATGGT
 GAGGATGGAATCATCGATTGGACTCTAGTACCGTCTAAGAAAGAGCCAACCTCCCATCAAACCTGATGCGGCGACT
 CTCTCGGATAAGGAAAATGCGTTGCCGTTGGCTGGTGTGTCGTGGAGAAGAAAGCGTCCGGTGGTGTGACT
 AAGTGTCTCTTGAGAAGGAGCCAAAATGCTATTGAGAAGATGAATTTGACGATGAGGATGCTTTGGAGGCTTT
 GGTGAGGCCGAGAAGAATTCGCCTGTTGGTAAGGCTTGATCTGCAGGATGTGGTTGTTTTGTCTTGATAGTGGT
 CTTGTTATAGGATGGTAGTCCGGCTTCATGGTGTGTGTTATATTATGTTTAGGATCTAAGTTAATTACTTGTCT
 TTCAAACCTGAGTGCATATAGACACCTCAATATAGTATTCTGCTAGTATTATGTGCAACATTCCTCAAATTTCT
 CTCGGCATTATACCTACGTGTAGTATACACTTGACGGATAGTTGCCAGCAGTGATGAATGGTCTGTCTTCATG
 AAGCTCATCTCATCGACTGGCACTTATAGAAGTATATTAATACTACTTACTATATTAGTACTACTAATAGTATTG
 ATGGTAGTCTGATGAGGGTTCCCGGAGTATATGACATATTTCAAGGTAGATCCTCCCAACATCATCCCAAATCAC
 TTAGCATTCAAACGAGACATAACCGGAGAAAGTAAAAGAATTTACGTAGATATATATGCATGGAATATCACAAT
 TAATCTTCAATATGTCCAATATGACAACGAACATTTAGTTGATTGACTACGAAAGATTTGGAAATTCAGATTCT
 CGCCGTGTGCGTGGTGGGCCGACTTATCGATAAACCTCAAGCTTCTTCATGAATTTGGGAATTCAGATCAACT
 CGTCTTCTATTCAGCGCTGCGCCCTTCACTCTCTACCAATCCAATGTAACCTGCCATGTGAACCAATGGAAC
 TACTTGGCTCCCTAATACTCCCCAGTCGCGGAGTCGAACCTCGAGCACCAGAGCATGTCCGCTGTGAGAGGGC
 AAAAGTACGTACAATAACCCATCTCTCTCGAACCAAGGTTGGAAGACTGAACGCTTCTTAGAACGATGTGCGACA
 CCTAGGCCTCAGTGTAGAGTCATTAGATGAGTCAATTCACCCGCACGAAAATCCAGAGCTACAGGATC

(B)

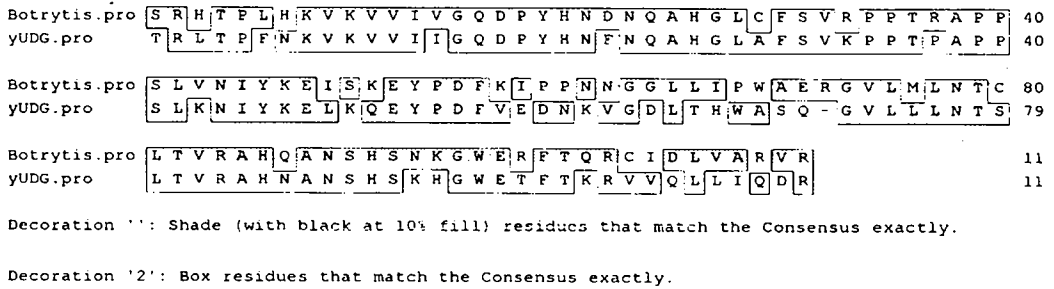


Fig. 5-2-1. Analysis of MAP kinase candidate clone (A) Nucleotide sequence (B) Amino acid comparison in the underlined region of (A) between MAP kinase candidate clone and uracil-DNA glycosylase.

다. PCR을 통한 MAPK family 유전자의 클로닝

1) Degenerate oligonucleotides 제작

효모의 MAP kinase인 *FUS3*, *KSS1*, *HOG1*, *SMK1*의 아미노산 서열 중 잘 보존되어 있는 아미노산 잔기로부터 degenerate oligonucleotide들을 다음과 같이 디자인하여 PCR primer로 사용하였다. GG(C/T)TT(A/C/G/T)A(A/C/G/T)(A/T)TC(A/C/G/T)C(G/T)(A/G)TG (MEK3), GT(A/C/G/T)GC(A/C/G/T)AT(A/G)AA(A/G)AA(A/G)AT (MAK2), TC(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)GC(A/C/G/T)C(G/T)(A/G)TA(A/C/G)(C/T)A (MAK4).

2) Genomic DNA cloning

병원성 진균류 (*Alternaria solani*, *Botryosphaeria dothides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporium cucumerium*, *Mycosphaerella melonia*, *Phyphthora capsici*, *Pyricularia oryzae*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*)에서 추출한 chromosomal DNA와 primer MAK2와 MAK4를 사용하여 PCR를 실행하였다 이때의 PCR 반응조건은 30 cycles(94°C, 1min; 52°C, 2min; 72°C, 2min)로 하였다. PCR산물은 0.8% agarose gel로 확인하여 500~700bp의 band를 2차PCR의 template로 사용하여 위와 같은 조건으로 2차 PCR를 실행하였다.

PCR product를 blunt ends로 만들어 pBluescript SK(+)의 EcoRV site에 삽입하여 *E. coli* DH5 α 균주에 transformation하였다. Ampicillin이 첨가된 TYE 고체배지에서 성장하는 clone을 선택하여 alkaine lysis방법으로 plasmid를 추출하였고, plasmid를 HindIII와 BamHI를 처리하여 insert의 크기를 확인하여 MAPK clone을 최종선별하였다.

그 결과, *A. solani*, *B. dothides*, *C. gloeosporioides*, *F. o. cucumerium*, *P. ultimum*, *R. solani*, *S. sclerotiorum*으로부터 후보 MAPK clone을 얻을 수 있었다.

균주명	insert 크기	균주명	insert 크기
<i>F. o. cucumerium</i>	500bp	<i>C. gloeosporioides</i>	500bp
<i>A. solani</i>	500bp		450bp
<i>R. solani</i>	700bp	<i>S. sclerotiorum</i>	600bp
<i>P. ultimum</i>	500bp		700bp
<i>B. dothides</i>	500bp		

3) MAP kinase 유전자의 염기서열 결정

① 방법

위에서 얻어진 MAP Kinase clone들을 Bioneer사의 Siverstar™ Staining Kit를 사용하여 염기서열을 분석하였다.

② 결과

Cg-2 (*Colletotrichum gloeosporioides*)

gttgcgataaagaagatcacaccttctgatcatcccatgttctgcttgcgaactctccgtgagatgaagcttctgagatact
 ttaaccacgagaacatcatctccatctctcgacattcagaagccccggagctacgagacctcaacgaggctacctcatcc
 aagtaggcaacctccatgcctacgctcacatctgggacattgctgacacctttgtccactaggagctcatggagacg
 gacatgcatcccggtcatcgaccaagactatcgacgacatgcatattatt

Cg-8 (*Colletotrichum gloeosporioides*)

gtcgtcgctatgaagaagattacgctttcgatcactccatgttatgtttgctgactttcgtgaaatgaagtactgcgctact
 ttaaccccgctttcatcttctgatcttgatgttcagagcctcgcaactgtgagattcacgagggtgattgaattcaagtac
 attcctcagacacgacacacacac

Pu-2 (*Pythium ultimum*)

tcagggtcctgttaccacggcaacttatctagctgaagaccacgtatcggccaagaccgcatcaccacgggcatacgtc
 agggatgtcctctagctcccacctcttctattttggcggctgatgtgctgtacgagttggctcagctcgcactacag

Pu-3 (*Pythium ultimum*)

tctggtgcgctgtaccacgtgtctggggcgagggtggcgcaagacaaaggaaacctttgatcggaatcaagtgtggtgtt
 gcacgagctaagaacgaggcgaccagacctctggtggatcttcaggggagaacctaaagtcaaatgaa

Pu-5 (*Pythium ultimum*)

tctggtgcgctatactacggtgatacaatgcggcaatgtattgcggctgaaccgccagtcacatgtgaaaagcactcagtt
 cgttctcagctcgtcaacacgtgaatgccttgcccatg

Pu-21 (*Pythium ultimum*)

gggctcgatactacagtgctcagcactctgtgggtgtagctacggatggggataccgaagctcgtgcgagacaaaatc
 cgcaagcttgagggtcccgtactggtcgtatgaggaggttctc

Pu-23 (*Pythium ultimum*)

ggggcgctgtaccaactgttcttaattgttctccgtggggctgccattgtcaggcagagtaccaactgggtcgaagatatt
atcgtaatggacagtcgacagggctgggtctcagtcag

Ss-6 (*Sclerotinia sclerotiorum*)

gtggctatgaagaagatggcagtgagcctgaatatttctgataatatgctgtcgtgttgatgtgcaatggtaaaaa
gggagtttccgacaagcccagtgaaacgacagataagcagcagcaatcaatgcaagaagaattagatcttctgcagtt
tgattctcgggagatctatccttatcattcctagagtcactacagc

Ss-7 (*Sclerotinia sclerotiorum*)

gttgccatgaagaagatgagcataggaagattaagagcattgctgtccctaataatgatgttaaaaaagattccatgggtat
atcctcgagtcacttacaagtcaattgcatagaatgcaatgctaataacataatccatttacggccaccaagatcact
gtaaatgttcagttatggttctcgtcaca

Ss-8 (*Sclerotinia sclerotiorum*)

gaggctatgaagaagatggcagtgagcctgaatatttctgataatatgctgtcgtgttgatgtgcaatggtaaaaa
gggagtttgcgacaagcccagtgaaacgacagataagcagcagcaatcaatgcaagagattagctctcgagtttgattctg
ggagat

Bd-5 (*Botryosphaeria dothides*)

ggtgctgttactagcatggttccttgcacaataatccttttgccttaagcgtatcattgctggcatttctttacagccatg
ggccttcattcccactcaactagacgggtctcaactggatctaggaggcaaggcttatcttactaataaactgtctgtgt
ctctgactgtctctacagagaactgatactactagacataa

Bd-9 (*Botryosphaeria dothides*)

ggtgctgttactagcatggttccttgcacaataatccgaggccttttgccttaagcgtatcattgctggcatttctttacagcc
atgggccttcattcccactcaactagacgggtctcaacttatctagttgctatctacataactgtcttctgctctgacttc

Rs-9 (*Rhizoctonia solani*) T3

gtcgcgatgaagaagatgagaccggcgggggtccggaagggtctgtgctgtagtggtcgagacgacatcacagtagt
tcgaaggggttcttgagttctgtgctggcaacgagaccgctctgtgtgctgattcagttatcgccatcgccatctcatcc
aaactttcttgaggcgggtctgactccat

이상의 DNA염기서열을 아미노산으로 번역하여 ORF를 조사한 결과, *C. gloeosporioides*(고추탄저병)는 벼도열병을 일으키는 *Magnapotha grisea*와 98%의 상동성을 보였으며, *Fusarium solani*와는 86%의 상동성을 보였다. 따라서 MAPK와의 가장 높은 Homology를 가진 *C. gloeosporioides*의 clone인 Cg-2의 480 bp를 Southern blotting을 하기 위한 probe로 사용하였다.

4) Southern blot analysis

① probe의 준비

MAP kinase의 유전자와 상동성을 나타낸 *C. gloeosporioides*로부터 PCR클로닝된 DNA단편을 nick translation 방법으로 probe를 제조하였다. 480 bp의 *BamH I*/*Xho I* 단편을 [α -³²P]-dCTP로 표식한 후, Sephadex G-50 column으로 정제하여 probe로 사용하였다.

② Southern blotting

여러 가지 병원성 진균류의 Genomic DNA를 *Bam*HI 으로 절단한 후 0.8% TBE agarose gel에서 전기영동하여 각 단편들을 분리시켰다. 이를 nylon membrane으로 transfer한 후 위에서 제조한 probe로 Southern blotting을 행하여 Fuji medical X-ray film에 노출시켜 autoradiography를 얻었다.

③ MAP Kinase 클론 확보

*C. gloeosporioides*의 intact MAP Kinase PCR 클론을 probe로 하였을 때 Southern blotting 결과 hybridization한 각 병원성 진균류의; MAP Kinase 클론(*Bam*HI 단편)의 크기는 다음과 같다. *C. gloeosporioides*(고추탄저병균)는 2kb, *M. melonia*(수박덩굴마름병균)는 2kb, *P. capsici*(고추역병균)의 경우 12kb, *F. oxysporum cucumerium*(근부병균)의 경우는 7kb 정도의 genomic MAP Kinase DNA 단편을 얻었다. 현재 이들 4종류의 MAPK 클론확보는 확실하게 되었다.

다. cDNA cloning

Alternaria solani, *Fusarium oxysporium cucumerium* 및 *Rhizoctonia solani*로부터 분리된 total RNA에 대한 역전사과정을 통해서 cDNA library를 제작하였으며 이를 대상으로 현재 위에 언급된 primer를 사용하여 PCR 클로닝 및 colony hybridization을 수행하고 있다. 클론을 얻게 되면 yeast mutant에 형질전환시키고 cell growth inhibition test와 mating test 등을 통해 후보유전자를 선별하여 염기서열 및 특성을 규명한 다음, MAPK 표적탐색체계인 재조합체를 구축할 것이다.

제6장 환경친화형 · 다기능적 미생물 농약(제제)개발

제1절 서론

이미 확보해 놓은 병원성 진균류에 강한 길항능력 및 항진균활성능력을 지닌 후보세균(120여종 중 16개를 대상)을 대상으로 세균선별 및 조합, 고정화방법(고체상, 반고체, 액상), 세균 흡착제 선정(단일흡착제 응용: 질석, 제오라이트, 쌀겨, 전분, 셀룰로오즈, 규석 등등), 보조제 선정(flavonoid 등), 세균흡착증강제 선정(단일 또는 복합적 계면활성제 등 선정 및 음이온, 양이온, 중성 선택), 영양염류 조성, 토양 및 환경내 생존률 측정, 환경에서의 항진균활성능, 활성세균과 병원성 진균류 그리고 기주간의 상호작용, 풋트 및 온실 실험 등 등의 실험결과를 고려하여 20여가지 이상의 시제품을 만든 후 1차적으로 대형 온실 및 야외실험을 시행한다.

1차 대형 온실실험 및 야외실험 결과, 보완된 2차 시제품으로 2차 온실 및 야외실험을 시행하는 등 2~3차례 더 반복실험하여 최종적으로 미생물제제의 최적 formulation을 완성한다. 이 후 이들 항진균활성세균 및 항진균물질 그리고 미생물농약(제제)의 제조과정 및 제법등은 특허출원 하였다

제2절 세균선별

16개균주 중 항진균활성이 우수하면서 현재까지 국내외적으로 보고되지 않았던 6균주(KL1114, KL1121, KL1326, KL1179, KL1143, KLP21)를 대상으로 우선적으로 미생물 농약제제 제조실험(시제품제조 실험)에 적용하였다.

제3절 항진균활성물질 생성의 최적조건확립

1-3차년도에 분리한 항진균활성물 생성 세균으로부터 항진균활성물질의 최적 생성조건을 확립하기 위해 탄소원, 질소원, 인원 등의 조성이 다른 NB(리터당 beef extract 3g, peptone 5g, NaCl 8g)와 Glucose M63(리터당 40% glucose 5ml, five X 20ml, 1M MgSO₄ 0.1ml, thiamin(B1) 0.1ml)배지 및 GM63+0.05%YE, CZ, Glu-MOPS, TSB, SMB, PDB, TYEB, LB등과 같은 배지에서 배양된 배양액을 농축, 여과하여 *C. albicans*가 접종된 NA배지와 식물병원균이 접종된 PDA배지에 농축액 100 μ l를 각각 접종, 30 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양 후 억제환을 측정한 결과 NB에서 항진균 활성이 강하게 나타났다.

그리고 기존의 1차년도에 분리한 항진균 세균중에서 항진균활성이 가장 우수한 KL1136, KL1137, KL1179, KL1187, KL1188를 정제과정 및 구조분석을 원활히 수행하기 위하여 여러종류의 최소배지에서 생육 및 활성물질 생성여부를 분석한 결과, malate minimal 63 medium이 가장 우수하였다.

또한 항진균 활성물질 생성미생물(KL1114, KL1143, KL1326, KL1179, KL1121 및 KLP21)과 KL1121를 제외한 5종의 미생물 혼합물을 대상으로 배지 조성중 탄소원, 질소

원 및 인산원에 대한 성장 적정효과 실험을 수행하였다. 미생물의 성장곡선은 48시간동안 620 또는 630nm(탄소원의 경우)에서 측정하였다.

Table 6-3-1. Antifungal activity of antifungal compounds produced from various media

항진균 세균	배양액 농축물	배양된 배지	항진균 활성도 (억제환: mm)					
			<i>C. albicans</i>	<i>R. solani</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>P. oryzae</i>	<i>F.o. cucumerium</i>	<i>C. gloesporioides</i>
KL1114	20	GM63	2	+	+	+	+	+
		NB	3	+++	+++	+++	+++	+++
KL1121	20	GM63	5	+	+	+	+	+
		NB	7	+	+	+	+	+
KL1143	20	GM63	2.5	+	+	+	++	+
		NB	2.5	+++	++	++	+++	+++
KL1314	20	GM63	1.5	+	+	+	+	+
		NB	1	+	++	+	+	+
KL1321	20	GM63	1	+	+	+	+	+
		NB	2	++	++	++	++	+++
KL1326	20	GM63	0	+	+	+	+	+
		NB	1	+	+	++	++	++
KL1330	20	GM63	2	+	+	+	+	+
		NB	3	++	+++	+++	++	+++
KL1367	20	GM63	0	+	+	+	+	+
		NB	2.5	+++	+++	+++	+++	+++

+: 성장억제대 1~2 mm, ++: 성장억제대 3~4 mm, +++: 성장억제대 5 mm 이상

Table 6-3-2. Growth patterns of antifungal bacteria according to various minimal media

media \ strains	KL1136	KL1137	KL1179	KL1187	KL1188
Glucose-M63 broth/agar	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Glycerol-M63 broth/agar	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
0.2%MeOH-M63	-	-	-	-	-
Malate-M63 broth/agar	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

G: growth, NG: no growth

Table 6-3-3. Antifungal activity of antifungal compound produced from various minimal media

항진균세균	배양액 농축률	배양된 배지	억제환(mm)			
			complete inhibition	delayed growth	patial inhibition	전체 억제환(mm)
KL1136	20	Malate M63	1.5	5.0	0	6.5
		NB	1.0	2.0	0	3.0
KL1137	20	Malate M63	1.5	5.0	0	6.5
		NB	1.0	2.0	0	3.0
KL1179	20	Malate M63	0	5.0	0	5.0
		NB	0	2.0	0	2.0
KL1187	20	Malate M63	1.5	5	0	6.5
		NB	1.0	2.0	0	3.0
KL1188	20	Malate M63	1	0	0	1
		NB	0	0	0	0

실험대상 병원균: *Candida albicans*

complete inhibition zone(완전성장억제대), ^c delayed growth zone(지체성장억제대), ^d partial inhibition zone(부분성장억제대)

Table 6-3-4. Composition of medium

배지	종류
Glu-MOPS의 phosphate 농도(mM)	0.01 0.05 0.1 0.5 1.0 2.0
질소원	beef extract, casamino acid, malt extract, peptone, tryptone, urea, yeast extract
탄소원	fructose, galactose, glycerol, lactose maltose, mannitol, sucrose
아미노산	alanine, arginine, lysine, proline
비타민	B1, B2, B12

가. 탄소원 종류에 따른 성장량

탄소원은 GM63배지에 질소원으로 peptone(0.5%)을 고정양으로 넣어주고 각각의 탄소원을 0.5%씩 첨가하여 이용하였다. glucose를 제외한 7가지 탄소원 중 KL1114는 lactose와 mannitol이 KL1326의 경우 fructose, galactose, glycerol이 성장을 위한 탄소원으로 매우 효과적이었다.

Table 6-3-5. Growth rate of antifungal bacteria according to various carbon sources

strains source	KL1114	KL1143	KL1326	KL1179	KLP21	KL1121
D-fructose	○	△	◎	○	○	◎
D-galactose	○	○	◎	○	△	○
D-glycerol	△	×	◎	○	◎	◎
D-lactose	◎	△	△	○	△	△
D-maltose	△	×	△	○	○	△
D-mannitol	◎	○	○	○	○	○
D-sucrose	△	○	○	○	○	△

◎ : very good ○ : good △ : poor × : very poor

나. 질소원 종류에 따른 성장량

GM63배지에 각각의 질소원을 0.5%로 첨가한 것을 이용하여 측정하였다. Glu-MOPS 배지에서보다 비교적 성장률과 성장량이 좋았다. 대체적으로 6종의 항진균세균의 성장을 위한 질소원으로 peptone과 yeast extract가 가장 좋았으며, urea를 사용할 경우 성장률이 가장 낮았다. KL1114의 경우에는 특이하게 tryptone이 가장 좋았다.

Table 6-3-6. Growth rate of antifungal bacteria according to various nitrogen sources

strains source	KL1114	KL1143	KL1326	KL1179	KLP21	Mixed strains	KL1121
Beef extract	△	△	◎	△	○	○	○
Casamino acid	△	△	◎	◎	◎	◎	○
Malt extract	△	△	△	△	△	△	×
Bacto peptone	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎
Bacto tryptone	◎	△	◎	△	◎	◎	◎
Urea	×	×	○	×	△	△	△
Yeast extract	△	◎	◎	◎	◎	◎	◎

◎ : very good ○ : good △ : poor × : very poor

다. 인산원 농도에 따른 성장량

인산원은 Glu-MOPS 배지의 phosphate 농도를 달리하여 항진균 활성세균들의 성장을 측정하였다. 농도에 따라 성장률은 정확히 비례하였다. 0.5mM 이상의 농도에서는 세균성장량의 최대 yield에서 차이가 없었다.

Table 6-3-7. Growth rate of antifungal bacteria according to various phosphate concentrations

strains condition	KL1114	KL1143	KL1326	KL1179	KLP21	mixed strains	KL1121
optimal conc.(mM)	≥0.5	≥0.5	≥0.5	NG	≥0.5	≥0.5	≥0.5
stationary phase	12hr	12hr	12hr	NG	12hr	18hr	12hr

NG: no growth (KL1179 : growth in the malic acid)

라. 탄소원, 질소원 종류 및 인산원 농도에 따른 항진균활성도

KL1179와 KLP21를 제외한 항진균활성세균들(혼합균 포함)은 배양시간(6, 12, 24시간)에 따라 배양액을 취해 원심분리하여 미생물을 제거하고 상등액에서 동량의 butanol을 이용하여 항진균 활성물질을 추출하였다. 이 중 1ml만을 농축, *C. albicans*(KLP21의 경우 *Fusarium*)에 대하여 항진균 활성도를 측정하였고 1179와 KLP21은 미생물을 취해 disk를 이용하여 활성도를 측정하였다.

활성도는 *C. albicans* 또는 *Fusarium*이 성장하지 못하는 inhibition zone의 직경(cm 단위)을 측정하였다. KL1114와 KL1143의 경우 배지 조성에 영향을 받지 않고 높은 활성도를 보였으며 나머지 미생물들은 Glu-MOPS 배지보다는 질소원 배지에서, 질소원보다는 탄소원 배지에서 높은 활성도를 나타내었다. 즉 본 연구에서 탐색된 항진균활성세균에 대한 최적성장조건 및 항진균물질 최적생성조건이 확립되었다.

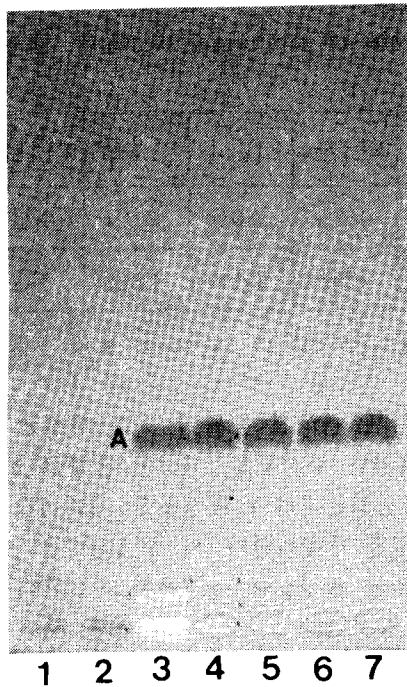


Fig. 6-3-1. TLC band patterns of KL1121 samples extracted from GluMOPS 2.0mM Pi medium according to time course. *A: band with antifungal activity
*1: 6hr, 2: 12hr, 3: 24hr, 4: 48hr, 5: 72hr, 6: 96hr, 7: 120hr

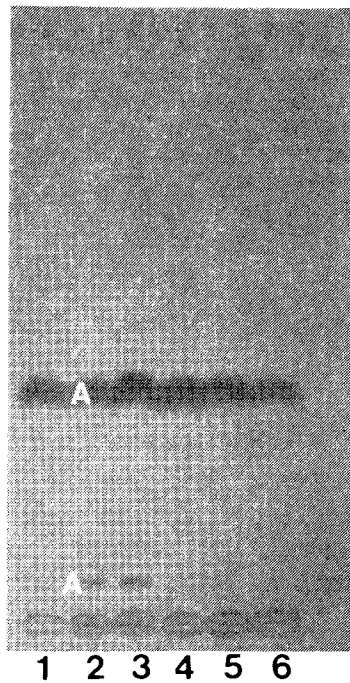


Fig. 6-3-2. TLC band patterns of KL1121 samples according to various phosphate concentration and pH. *A: band with antifungal activity
*1: 2.0mM(pH4.0), 2: 0.01mM(pH7.0), 3: 0.1mM(pH7.0), 4: 1.0mM(pH7.0), 5: 2.0mM(pH7.0), 6: 2.0mM(pH7.0)

Table 6-3-8. Antifungal activity of antifungal bacteria according to various carbon sources

source \ strains		KL1114	KL1143	KL1326	KL1179	KLP21	KL1121
D-fructose	6 hr	+++	++	-	+	+	+
	12 hr	+++	++	+++	+	+	+++
	24 hr	+++	++	+++	+	+	+++
D-galactose	6 hr	++	++	-	+	+	+
	12 hr	+++	+++	+++	++	+	++
	24 hr	+++	+++	+++	++	+	++
D-glycerol	6 hr	+++	++	-	++	-	+
	12 hr	+++	++	+++	++	+	+++
	24 hr	+++	++	+++	+	+	+++
D-lactose	6 hr	+++	+++	+	+	+	+
	12 hr	+++	+++	+++	+	+	+++
	24 hr	+++	+++	+++	+	+	+++
D-maltose	6 hr	+++	+++	+	+	-	+
	12 hr	+++	+++	+++	+	+	++
	24 hr	++	+++	+++	+	+	++
D-mannitol	6 hr	+++	++	++	+	+	+
	12 hr	+++	+++	+++	+	+	++
	24 hr	++	+++	+++	++	+	++
D-sucrose	6 hr	+++	++	-	+	+	+
	12 hr	+++	++	+++	++	+	+++
	24 hr	+++	++	+++	++	+	+++

+++ : 3cm, ++ : 2-3cm, + : 1-2cm, - : 1cm

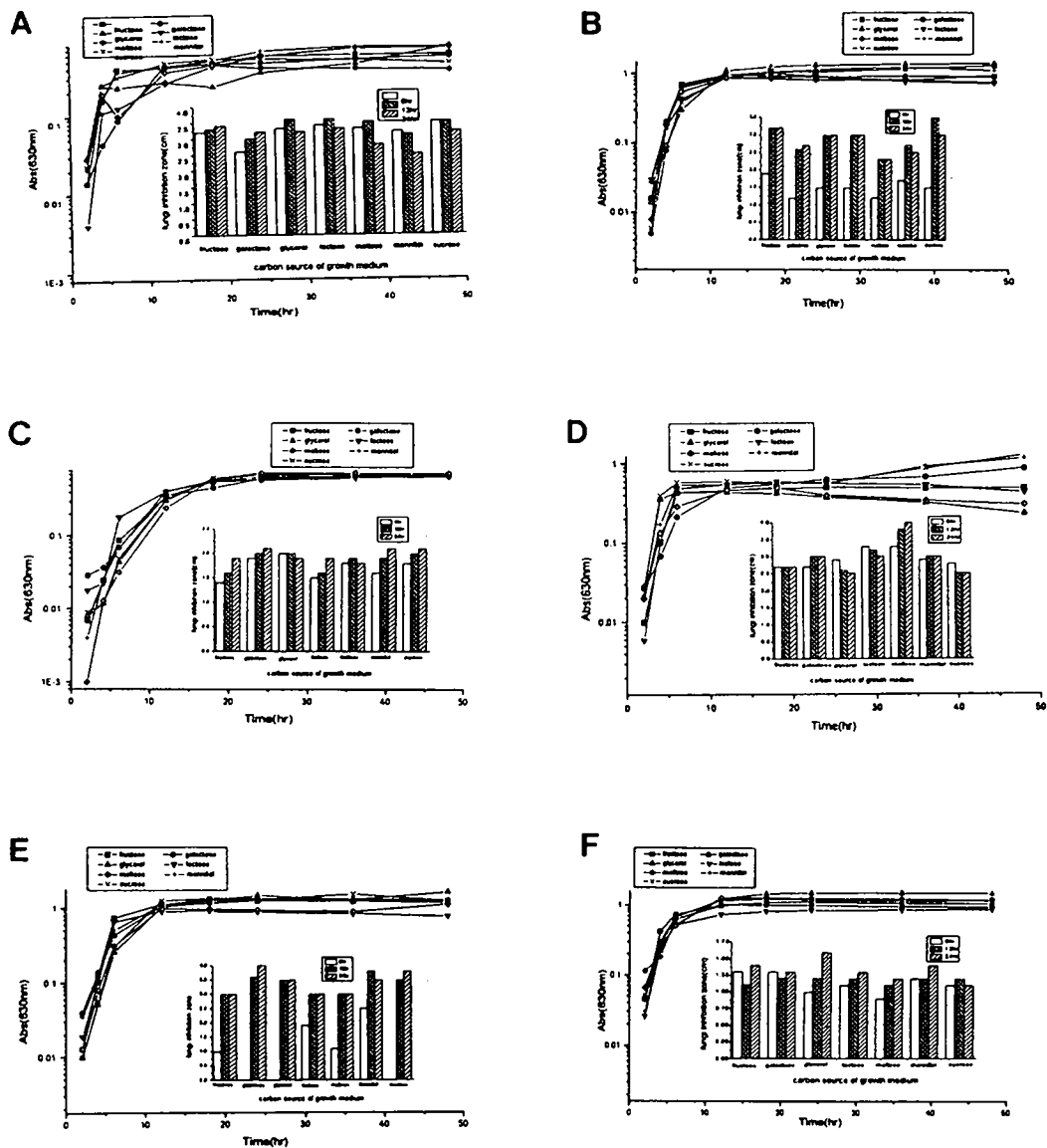


Fig. 6-3-3. Growth rate and antifungal activity of antifungal bacteria according to various carbon source

A: KL1114, B: KL1121, C: KL1179, D: KL1143, E: KL1326, F: KLP21

Table 6-3-9. Antifungal activity of antifungal bacteria according to various carbon sources

source \ strains		KL1114	KL1143	KL1326	KL1179	KL1121	mixed strains	KLP21
Beef extract	6 hr	+++	++	+	+	-	-	+
	12 hr	++	++	++	+	++	-	+
	24 hr	++	++	++	+	++	-	+
Casamino acid	6 hr	++	++	-	+	+	-	+
	12 hr	++	++	+	+	+++	-	+
	24 hr	++	++	+	+	+++	-	+
Malt extract	6 hr	+++	+++	+	-	-	-	-
	12 hr	+++	+++	+	-	-	-	-
	24 hr	+++	+++	+	-	-	-	-
Bacto peptone	6 hr	+++	++	-	+	-	-	+
	12 hr	+++	+++	++	+	+++	-	+
	24 hr	+++	++	++	+	+++	-	+
Bacto tryptone	6 hr	+++	++	-	+	-	-	+
	12 hr	+++	++	++	+	+++	-	+
	24 hr	+++	++	++	+	+++	-	+
Urea	6 hr	++	++	-	-	-	-	+
	12 hr	++	++	+	-	++	-	+
	24 hr	++	+++	+	-	+++	-	+
Yeast extract	6 hr	++	-	-	+	-	-	+
	12 hr	++	+	++	+	++	-	+
	24 hr	++	++	++	+	+++	-	+

Table 6-3-10. Antifungal activity of antifungal bacteria according to various phosphate concentrations

Concentration \ strains		KL1114	KL1143	KL1326	KL1179	KL1121	mixed strains	KLP21
0.01mM	6 hr	++	++	+	-	-	-	-
	12 hr	++	++	+	-	+	-	-
	24 hr	++	++	+	-	++	-	-
0.05mM	6 hr	++	++	-	-	-	-	-
	12 hr	++	++	+	-	++	-	-
	24 hr	++	++	+	-	+	-	-
0.1mM	6 hr	++	++	+	-	-	-	-
	12 hr	++	++	+	-	++	-	-
	24 hr	++	++	+	-	++	-	-
0.5mM	6 hr	++	++	-	-	-	-	-
	12 hr	+++	++	-	-	+	-	-
	24 hr	++	++	-	-	+	-	-
1.0mM	6 hr	++	+++	-	-	-	-	-
	12 hr	+++	+++	-	-	+	-	-
	24 hr	++	++	-	-	+	-	-
2.0mM	6 hr	++	++	+	-	-	-	-
	12 hr	+++	+++	+	-	+	-	-
	24 hr	++	++	+	-	+	-	-

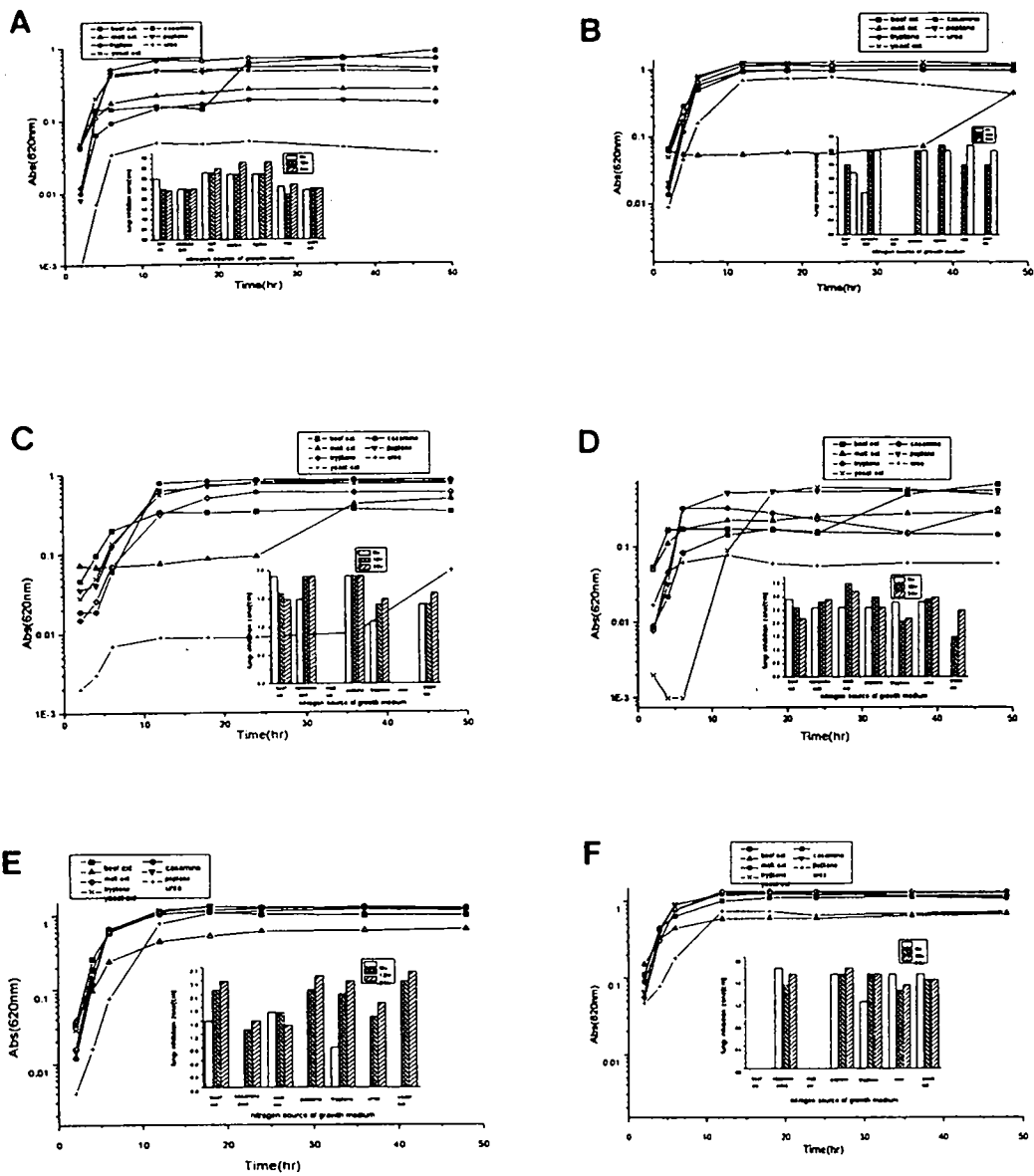


Fig. 6-3-4. Antifungal activity of antifungal bacteria according to various nitrogen sources

A: KL1114, B: KL1121, C: KL1179, D: KL1143, E: KL1326, F: KLP21

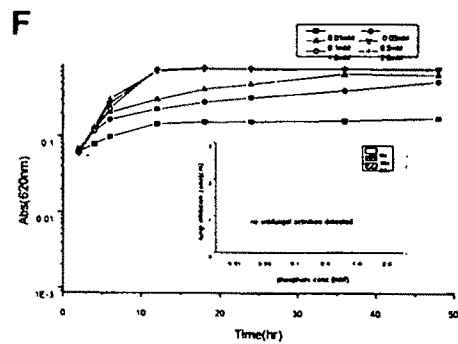
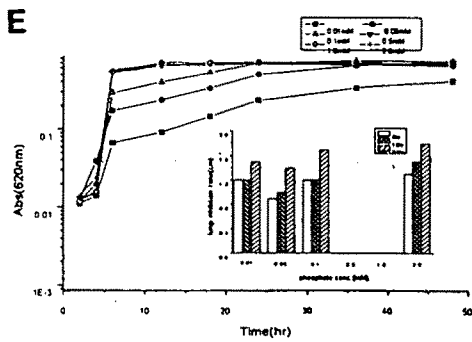
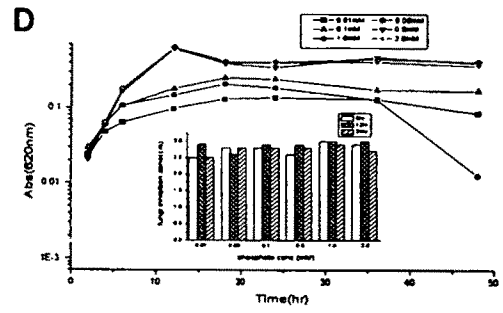
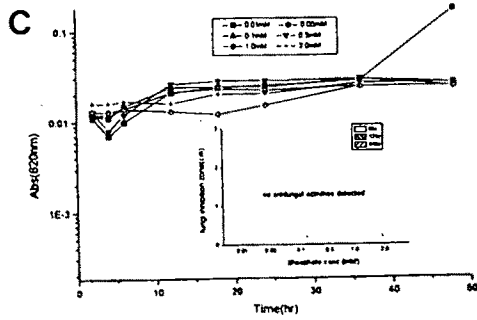
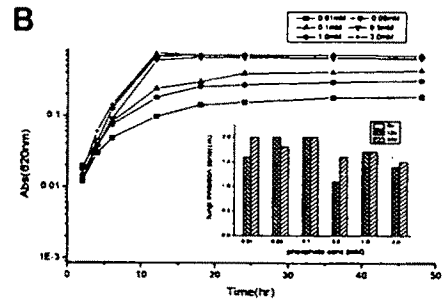
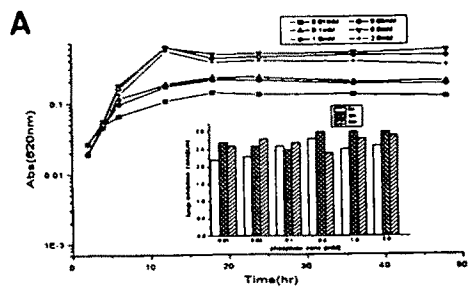


Fig. 6-3-5. Antifungal activity of antifungal bacteria according to various phosphate concentrations

A: KL1114, B: KL1121, C: KL1179, D: KL1143, E: KL1326, F: KLP21

Table 6-3-11. Optimal conditions for growth rate and antifungal activity of antifungal bacteria

strains \ condition	optimal condition	antifungal activity(cm)
KL1114	Bacto peptone	3.8
KL1143	maltose	4.0
KL1326	galactose	4.0
KL1179	galactose, mannitol, sucrose	2.1
KLP 21	Bacto peptone	1.8
KL1121	sucrose	3.5

마. 아미노산, 비타민 첨가 및 pH 변화에 따른 및 항진균활성도 조사

3차년도에 새롭게 선정된 항진균활성물질 생성세균(KL1114, 1121, 1143, 1179, 1326, KLP21)을 대상으로 환경요인에 따른 항진균활성물질의 생성능을 비교하기 위해 온도, pH, 비타민(B1, B2, B12) 및 아미노산 등을 달리하여 배양하였다. 각 구간에서 배양된 배양액의 상등액을 동량의 butanol로 추출하여 감압농축 한 후, 농축액으로부터 항진균활성물질의 생성능을 측정된 결과, 항진균활성세균의 성장률 및 배지내 pH변화는 균주간 거의 유사한 양상을 보였다. 그러나 항진균활성물질 생성능에 있어서는 균주간 차이를 보여 KL1114, 1179, 1326는 비타민 B1, KL1121는 비타민 B2, KL1143는 비타민 B12가 첨가될 때 최대 항진균활성물질 생성능을 보였다. 아미노산은 aginine, lysine 처리구에서 항진균활성물질생성능이 높았다.

바. 온도에 따른 항진균활성물질 생성률

배양온도를 15, 25, 30, 37℃구간에서 3일간 배양한 후, 항진균활성도를 측정된 결과, 균주간 다소 차이는 있지만 전체적으로 30~37℃온도구간에서 항진균물질 생성능이 우수하였다.

Table 6-3-11. Antifungal activity according to supplementation with vitamins

Vitamin	antifungal activity(mm)					
	KL1114	KL1121	KL1143	KL1179	KL1326	KLP21
B1	4	2.5	2	5	6	-
B2	-	7	2	4	5	-
B12	1	5	2.5	3	5	-

사. 식물종자 발아율

항진균활성세균이 아무리 우수한 항진균활성을 가지고 있더라도 식물체의 성장을 저해한다면 항진균활성세균으로서 가치가 없을 것이다. 따라서 항진균활성세균을 대상으로 종자발아율을 측정하는 것이 매우 중요하다.

불암조생 풋호박 종자의 발아율은 KL1179를 제외한 모든 균주에서 control과 같은 100%의 발아율을 나타내었다. 오리엔탈피망글로리의 경우, 모든 균주가 control과 유사한 발아율을 보였다.

이처럼 본 연구에서 선정된 항진균활성세균들은 식물종자발아율을 저해시키지 않으므로 포장에서 쓰이는 미생물농약제제로 뿐만아니라, 종자수준에서 피막화시킬 경우 종자 저장 및 보존에도 대단히 유용할 것이다.

Table 6-3-12. Effect of Antifungal bacteria upon seed germination

균주 # / 식물종자	불암조생 풋호박			오리엔탈피망글로리		
	처리 1 ^c	처리 2	평균	처리 1	처리 2	평균
control ^a	100 %	100 %	100 %	78 %	70 %	74 %
1114 ^b	100 %	100 %	100 %	73 %	50 %	62 %
1143	100 %	100 %	100 %	55 %	70 %	63 %
1179	50 %	75 %	63 %	70 %	73 %	72 %
1326	100 %	100 %	100 %	70 %	80 %	75 %
KLP21	100 %	100 %	100 %	60 %	80 %	70 %

a : 멸균수

b : 48 시간 NB 배지에 배양후 원심분리하여 얻은 침전세포를 증류수로 희석 (OD =1)

c 20 개 종자/ 처리

제4절 항진균세균의 항진균활성 유지체계용 Bio- matrix개발

항진균활성세균이 자연 환경생태계 또는 식물체에서 생존을 유지하면서 항진균생리활성물질유지를 유지하기 위해서는 영양분공급(단기적, 중장기간 이용가능한 영양분), 항진균세균의 보호, 발아율 증진, 장단기적 성장 등이 필요하다. 이러한 제반요인을 만족시키기 위해 Bio-matrix 체계를 구축 개발 하고자 하였다.

가. Bio-matrix 구성재료

- ㉑ 식물자원 고분자재료(biogel) : 시금치가루, 양배추가루, 생현미, 도토리묵가루, 알파곤, 미역가루, 신선초가루, 쑥가루, 생울무가루, 다시마가루, 녹두가루, 마가루, 팥가루, 밤가루, 미숫가루, 솔잎검정콩가루, 당근가루
- ㉒ 미생물기원 생체고분자(microgel) : ● Microgel (Cyanobacteria 등)
● PHB (poly-β-hydroxybutyrate)
- ㉓ Matrix로 활용될 생체고분자 합성미생물의 intact cell 자체
- ㉔ 기타 : 질석, 진흙, 알긴산, 키틴, 굴조개껍질, 과일껍질건조분말, 옥수수대/왕겨/툽밥 태운 가루 등, 각종 extract, peptone, tryptone, 당류, 무기염류, 비타민, 아미노산, flavonoid 등
- ㉑, ㉒, ㉓, ㉔ matrix 구성재료를 적절히 혼합하여 20여종 biomatrix를 구성하였다.

나. Bio-matrix 조제

미생물을 피막화하는 고분자재료인 단백질, 탄수화물 기타 등을 혼합하여 제조한 20여종 biomatrix중 8가지를 예를들어 소개하면 다음과 같다.

Table 6-4-1. Composition of bio-matrix macromolecule materials

성분	첨가량(g/ℓ)
솔잎콩가루 + 감자가루	280 + 120
전분	400
전분 + 당근가루	280 + 120
콩가루 + 양배추가루	280 + 120
콩가루 + 미역가루	280 + 120
시금치가루	400
당근가루	400
미역가루	400

Table 6-4-2. Composition of contained biogel in bio-matrix

성분	첨가량
고분자재료	400g (표 6-3-1)
glucose	2g
peptone	2g
MgCl ₂	0.04g
CaCO ₃	2g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	120mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	20mg
KH ₂ PO ₄	0.1g
질석	40g
H ₂ O	1ℓ

“Biomatrix를 영양원으로 주었을 때 항진균활성세균의 생존유지기간, 생존발아율, 항진균활성유지, 항진균물질생성능력을 측정한 결과, 본 연구진이 제안하여 제조한 Biomatrix는 모든 항진균활성세균에 적용할 수 있었으며, 미생물농약 및 미생물제제의 피막화와 미생물담체로서 역할이 매우 탁월하였다.

다. 세균 흡착 증강제로서 생분해성 Coating 응집물질의 개발

식물병원성 진균류를 방제하기 위한 살균제로서 상품화하기 위해서는 길항균을 coating 응집물질을 처리하여 장기간 실온에서도 길항활성을 유지할 수 있도록 해야하고 또한 식물잎에 잘 부착하고 토양에 처리 시 잘 분해할 수 있는 응집물질의 개발을 위해 본 연구진에 의해 탐색한 항진균활성세균은 물론 남조류 (cyanobacteria)가 수생환경으로 방출하는 응집물질 (biofloculants)을 추출하여 특성을 분석하였다. 여러 종의 남조류 균주중 kaolin clay를 이용한 assay 와 Alcian blue binding assay를 통해 선발한 *Anabaena* sp. PC-1 과 *Anabaena* sp. N-1444가 응집활성이 강한 extracellular 응집물질을 풍부하게 분비하는 것으로 측정되었다.

이 응집물질의 특성을 이해하기 위해 *Anabaena* sp. PC-1을 6주간 배양하면서 각주별로 성장곡선과 kolin 응집활성을 조사한 결과 성장이 정체기에 이르는 4주경에 응집활성이 가장 강하게 나타났으며, 4주간 배양한 균주로부터 hot phenol을 이용하여 응집물질을 추출하고 CTAB 및 ethanol 침전법을 이용하여 부분정제한 후 Sephacryl S 200 column chromatography를 이용하여 순수정제하였다. 이 응집물질은 고분자성 다당류 (macromolecular polysaccharides)로서 분석결과 전체 분자량의 63 %는 neutral sugars, 5 %는 uronic acids, 12 %는 proteins으로 구성되어 있으나, keto acids, hexosamines, fatty acids는 거의 존재하지 않았고 나머지 구성요소는 분석중이다.

분리정제된 응집물질은 cationic dye인 Alcian blue에 강한 affinity를 갖기 때문에 polyanionic/sulfated 다당류로 사료된다. 이물질의 응집활성은 강한 산도조건에서 더 강하게 나타났으며 (acid-dependent), 100°C에서 7분간 가열해도 응집활성이 40% 증가하는 것으로 보아 thermal stability가 강한 것으로 사료되었다. 또한 NaCl, NaNO₃, MgSO₄, ZnSO₄와 같은 염이나 metal을 첨가하였을 때 그 활성이 증가되는 것으로 판명되었고 용액상에서 active carbon, silica, aluminum oxide, bentonite, chitin, chitosan, powdered agar, cellulose, DEAE, Dowex-50W, phosphate cellulose, Sephadex와 같은 유기/무기물질과도 정도의 차이는 있었지만 응집하였다.

또한 항진균활성세균 중 KL1321, 1143, 1330, 1367은 응집활성이 서서히 증가하는 다른 여러 균주와 달리 배양 후 1일부터 pH2~4사이의 조건에서 강한 응집활성을 나타내었다. 따라서 세균흡착증강제로서 환경친화형응집제는 본 연구진의 항진균활성세균으로부터 합성되는 것을 직접 이용할 수 있는 장점이 있다.

마. 항진균활성물질의 활성증진 보조제응용

미생물 source 보다는 식물에 다량분포하는 천연산물인 flavonoid계통의 화합물을 배지에 첨가할 경우 항진균활성의 상승효과 가능성이 있는가를 타진하기 위해서, 또한 항진

균 활성이 뛰어나지만 세포독성이 있는 metal성분과 같은 물질이 flavonoid와의 상호작용을 통해서 진균의 성장에 어떤 효과를 미치는가를 검증하기 위해 Zinc 와 Quercetin 및 Copper와 Quercetin의 상호작용에 의한 진균성장의 억제효과를 관찰하였다.

Flavonoid를 항진균활성증진보조제로서의 적용가능성에 대한 연구는 이미 완결하여 국제저명학술지에 게재한 바 있다(Letters in Applied Microbiology. 26:363-366, 1998).

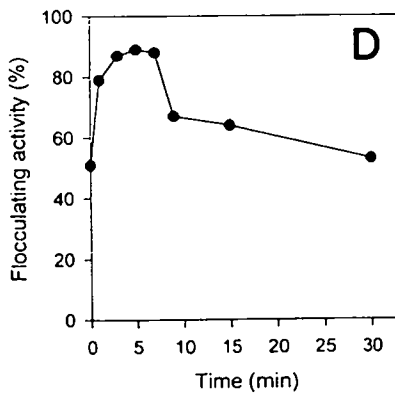
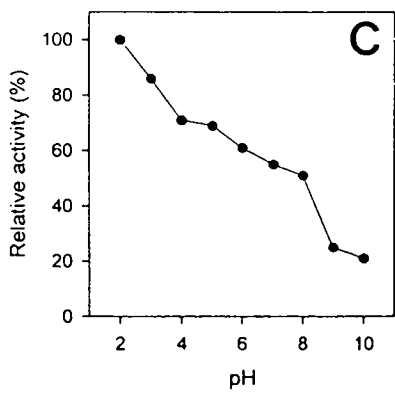
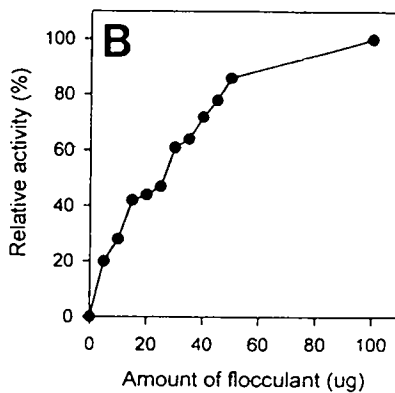
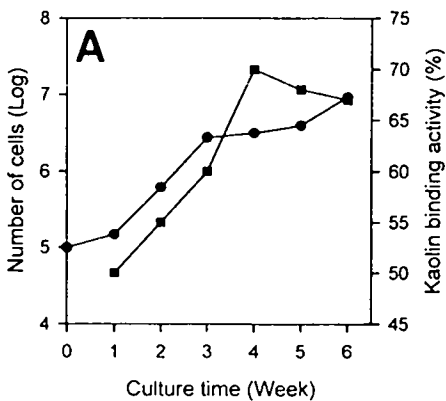


Fig. 6-4-1. Development of biodegradable bioflocculants

제5절 항진균활성(AF) 세균-Biomatrix(BM) Complex 미생물 농약개발

가. 제조과정

1차적으로 조제된 8종의 Biomatrix를 멸균한 후, 50℃ 정도에서 냉각하였다. 농축된 항진균활성세포를 먼저 Microgel 등으로 1차 피막화를 한 후, 상기 Bio-matrix와 잘 섞어서 고분자재료 gm 당 세포수가 $10^8 \sim 10^{10}$ 정도되게한 후 homogenizer속에서 균일하게 섞어 미생물들이 골고루 막속에 2차적으로 고정되도록 하였다. 이렇게 고정된 미생물-Microgel-고분자Bio-matrix복합체는 건조한 후 분쇄하여 적당한 크기의 분말이나 조각으로 제조한 후 크기별 시료를 이용하여 이들의 강도, 점착성, 세포 발아능력, 미생물들의 항진균활성등을 수행하였다.

나. AF-BM Complex 미생물농약 시제품의 개요도

현재 제조된 시제품의 미생물농약은 다음과 같은 5가지(㉠~㉡)형태로 피막화한 것들이다(생략, 대외비결과, 3차년도 최종보고서 요약서에 보고했슴). 이러한 형태의 미생물농약 제조기법, 구성, 피막화 기술은 국내외적으로 최초의 일이다. 현재 동부한농(주)과 국내외 특허출원에 합의되었으며 현재 변리사와 내용 수정 협의중에 있으며 12월말경에는 특허출원될 것이다.

제6절 미생물농약 시제품의 안정성 측정

가. 시간에 따른 항진균세균의 생존발아율

미생물 농약은 약효 수명은 최소한 1~2년정도 유지되는 것이 중요하기 때문에 제조한 미생물농약(AF-BM KL I ~ V)을 0개월, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월을 방치하였을 때 회생될 수 있는 살아있는 미생물 수를 조사하였다.

농축된 항진균활성 세균을 다음과 같이 실험구간을 설정하여 각각의 시료를 NA평판배지 상에 도말한 후 30℃에서 24시간 배양하고, 처음에 넣어준 미생물 수와 회생된 미생물 수를 비교하여 안정성을 측정하였다.

실험구간	시 료
Control	농축된 항진균 세균자체
Liquid	액체상태의 Microgel/sol. + 항진균활성세균
Dry	Microgel과 항진균활성세균을 혼합한 후 건조시킴

그 결과 대조군에 비하여 Microgel로 피막화되어 건조된 시료가 균주에 따라 다소 차이는 있지만 12개월 저장기간 동안 아무런 변화없이 안정하였다.

나. 회생된 항진균세균의 항진균활성도

회생된 AF⁻ 세균을 임의로 50개씩 선별하여 AF test한 결과, 모두 AF⁻, 길항성을 보유하고 있어, 회생된 균주들 모두 생물학적으로 항진균활성을 그대로 유지하고 있었다.

제7절 미생물농약 AF-BM KL I ~ V 시제품의 포장활성실험

이미 (98. 6. 13~현재) 각종 채소, 야채류 작물에 대한 포장활성실험이 동부한농(주)의 대형온실(4곳)에서 시행하였다.

오이, 딸기, 고추 등의 잎, 열매, 뿌리 그리고 근권토양에서의 생존발아율, 항진균활성 등을 조사하고 발병억제를 등을 조사하였다. 그 결과(너무 많음) 중 하나를 예로 들면, 오이잣빛곰팡이에 대한 방제효과를 조사하였을 때 유기화학농약(Fluazianam)과 비등하였다<첨부도면 참고>.

가. 피막화된 미생물농약시제품 내 항진균활성세균의 엽면, 토양생존률

KL1114, 1121, 1179, KLP21 등 4가지 균주에 대하여 오이엽면, 오이근권토양, 일반토양에서 1주후, 2주후의 생존률을 조사한 결과 KLP21(½정도감소)를 제외한 모든 균주들이 초기의 생존수에 비하여 오히려 2~20배까지 증가하였다.

나. 미생물농약 시제품 살포활성 실험 결과

KL1114, 1121, 1143, 1326, 1179, KLP21 활성세균을 피막화시킨 시제품을 살포하였을 때, KL1114(Tech)시제품(5,000ppm, 10⁷cfu/ml)은 대조약제 Fluazianam(200ppm)에 비하여 오이잣빛곰팡이에 대한 방제효과가 오히려 높았다(KL1114(Tech): 83%, Fluazianam: 74%). 벼문고병에 대해서는 KL1114(Tech)는 53%, 대조약제 74%로 나타났다. 다른 시제품들의 경우도 방제효과가 뚜렷이 나타났다.

다. 미생물농약 코팅종자 발아율 실험 결과

6가지 미생물농약시제품(KL1114, 1121, 1179, KLP21, 1143, 1326을 각각 피막화시킨) 원체를 오이, 토마토, 고추의 종자들 100개씩을 대상으로 코팅하였을 때, 코팅종자의 발아율은 무처리구와 차이가 벗어나 오히려 증가하는 효과가 나타났다.

라. 미생물농약제제의 UV 및 γ -ray 저항성 실험

햇빛에 5시간 노출시켰을 때 KL1114 균주는 단순히 증량제만 배합하였어도 생존률은 감소되지 않았다. 그러나 KL1114 균주는 증량제, Microgel, UV차단제, 미역가루, 야채가루, 영양분 등을 적절히 배합하여 제제화 하였을 때 생존균체수가 약간 증가하였다. 또한 방사선(Co⁶⁰ γ -ray)선량을 2.5~25kGy로 조사한 후, 감수성을 조사한 결과, 20kGy선량에 γ -ray 저항성을 나타내었다.

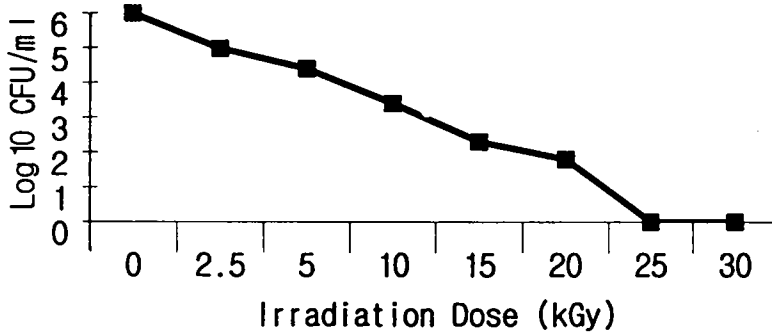


Fig. 6-7-1. Survival curve of *Bacillus* sp. KL1114 population according to a variety of gamma irradiation dose

마. 항진균활성세균의 독성조사

현재 항진균활성세균 및 정제된 항진균물질(저분자량 항진균활성물질 KL1114의 M.W. 3, 5, 41kDa 항진균 폴리 펩타이드, KL1326의 20kDa 폴리펩타이드, 항진균활성 세포벽분해 효소) 그리고 시제품화한 미생물농약제제를 대상으로 세포독성실험, 피부자극 실험 및 급성독성실험을 시행하였다. 현재까지 수행된 독성실험 결과를 검토해본 결과, 매우 만족할 수 있었다. KL1114, 1121, 1179, KLP21, KL1143, 1326 등의 항진균세균들과 미생물농약시제품에 대해서 모두 mouse를 대상으로 경구투입에 의한 급성독성실험을 시행하였다. 2,000mg/kg(일반농약투입기준보다 매우 높음) 투여하였을 때 전혀 독성효과를 나타내지 않았을 뿐만 아니라 오히려 대조구에 비하여 체중이 증가하는 효과가 있었다.

제7장 환경보전 및 정화 능력

제1절 서론

항진균활성세균이 생물폐자원을 이용하여 고부가가치의 미생물농약제제 및 항진균제 생산은 물론이고, 환경정화능력이 있는지 여부를 가리기 위해 유기물분해와 독성유기화학농약분해 및 저항성에 관련된 세포내외효소의 활성을 액체상태와 고체배지상태로 나누어 조사하였으며, 액체상태의 효소활성도를 측정하기 위하여 사용된 각 효소의 기질은 표 7-1-1에 나타낸 바와 같다.

제2절 유기물 분해능

고체배지상에서는 전분, glucan, 지질, 단백질, 셀룰로오즈, 펙틴, 리그닌분해활성을 조사하였는데 대부분 분해여부는 배지상에서 독특한 발색실험을 통하여 투명대 혹은 발색대로 확인하였다. 그 결과 16종의 항진균활성세균 모두 유기물분해능력이 뛰어났다. 특히 미생물농약제제 항진균제 생산에 이용된 KL1114 균주는 glucan, 전분, 단백질, 셀룰로오즈, 리그닌 분해능력이 다른 균주에 비하여 3배 이상 높아 매우 탁월하였으며, KL1105, 1326 균주는 키틴분해능과 지질분해능이 매우 강하였다.

Table. 7-2-1. Exoenzyme and substrates used in this study

Tested exoenzymes	Substrates
β -Glucosidase	4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside(Sigma)
Amylase	4-methylumbelliferyl- α -D-glucoside(Sigma)
Phosphatase	4-methylumbelliferyl-phosphate(Sigma)
Exo-chitinase	4-methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide(Sigma)
Endo-chitinase	4-methylumbelliferyl-N,N'-diacetyl chitobioside(Sigma)
Exo-cellulase	4-methylumbelliferyl- β -D-cellobioside(Sigma)
Endo-cellulase	4-methylumbelliferyl- β -D-celotrioside(Sigma)

Table 7-2-2. Exoenzyme activity of antifungal bacteria

Strains	Exoenzyme activity(CPS/ml)						
	β -glucosidase	amylase	phosphatase	exo-chitinase	endo-chitinase	exo-cellulase	endo-cellulase
KL1112	1273	4251	13496	1322	13128	1488	1246
KL1114	1479	1059	14200	1258	1049	1307	11336
KL1121	1271	1244	11412	1322	1352	1271	1222
KL1136	1218	1207	1262	1295	1314	1183	1184
KL1137	1206	1202	1236	1263	1479	1222	1195
KL1143	1146	1047	12680	1253	1179	1157	1578
KL1178	1234	1217	1281	1280	1281	1222	1233
KL1179	1195	1280	1233	1256	1312	1207	1190
KL1188	1241	1212	1249	1274	1285	1200	1202
KL1105	1413	1433	11520	1905	11286	1284	1317
KL1314	1265	1253	1531	1332	1994	1326	1254
KL1321	1678	33804	17550	9185	1414	1196	11574
KL1326	1193	1124	1187	1139	1895	1261	1097
KL1330	17230	11360	15048	5034	1610	1496	9264
KL1367	1108	1039	11250	1100	1080	1297	12296
KLP21	4749	1424	18271	7328	23484	1463	1393

CPS: counting per second

Table 7-2-3. Enzyme activity of antifungal bacteria upon solid medium

Strains	Enzyme activity					
	β -Glucosidase	SA	LA	PA	CA	Ligninase
KL1112		+++	++	+++		
KL1114	++	+++		+++	+++	++
KL1121		+	+	+++	++	
KL1136				+		
KL1137		+		+		
KL1143	++	+++		+++	+++	+
KL1178		+				
KL1179						
KL1188				+		
KL1105		+	+++	+++		
KL1314			+++	+++		
KL1321	+++	+++	++	+++	+++	
KL1326			+++	++		
KL1330	+++	+++	+	+++	+++	+
KL1367	++	+++		+++	+++	+
KLP21		+	+++	++		

SA: amylase, LA: lipolytic enzyme(fatty acid esterase), PA: proteolytic enzyme (protease), CA: cellulolytic enzyme(cellulase)

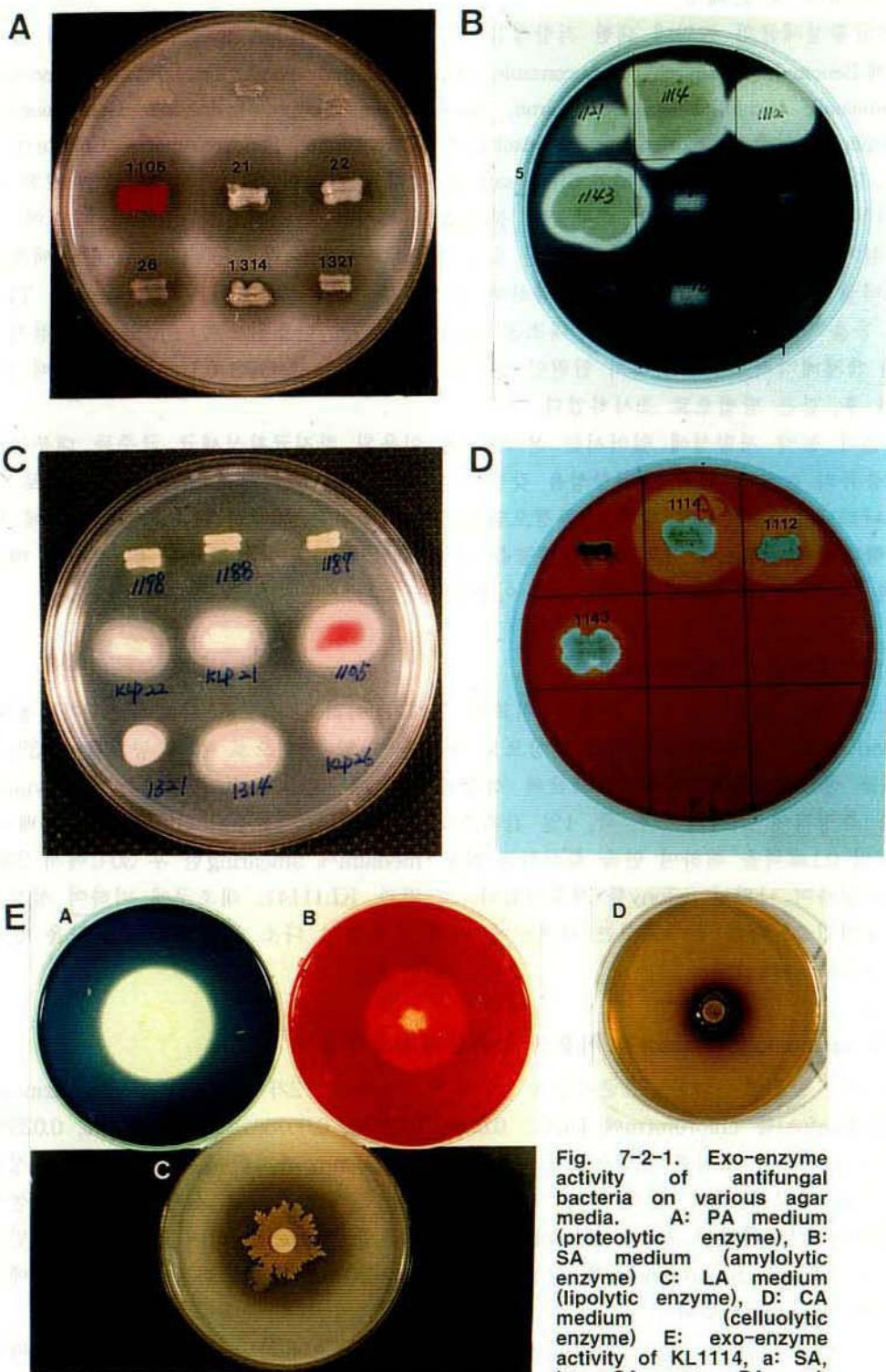


Fig. 7-2-1. Exo-enzyme activity of antifungal bacteria on various agar media. A: PA medium (proteolytic enzyme), B: SA medium (amylolytic enzyme) C: LA medium (lipolytic enzyme), D: CA medium (celluolytic enzyme) E: exo-enzyme activity of KL1114, a: SA, b: CA, c: PA, d: glucosidase

나. 농약내성 및 분해능

항진균활성세균의 농약에 대한 저항성을 분석하기 위하여 NA medium에 23종의 농약 (살균제; Benomyl, Flusilazole, Tebuconazole, Oxadixyl, Edifenphos, Tricyclazole, Mancozeb, Chlorothalonil, Dichlofluanide, Pencycuron, Azoxystrobin, Copper hydroxide, Isoprothiorane, Iprobenphos, 살충제; Chlorfenapyr, Imidacloprid, Carbofuran, Fenpyroximate, Chlorpyrifos, BPMC, Diazinon, 제초제; Butachlor, Glyphosate)을 각각 첨가하여 30°C에서 2일간 배양한 후 성장여부를 관찰하였다. 농약 분해능의 분석을 위해서는 탄소원으로 glucose 대신에 농약을 첨가한 GM63 액체배지와, 유일한 인(P)원으로 농약을 첨가한 Glu-MOPS 액체배지에 배양한 후, 30°C에서 3일간 배양하여 성장여부 및 분해능을 UV spectrum과 TLC 방법 등을 통하여 조사하였다. 대조군(control)으로는 탄소원으로 glucose가 첨가된 GM63 액체배지와, 역시 원래의 인원인 인산을 첨가한 Glu-MOPS 0.1mM Pi 액체배지에 배양한 후, 같은 방법으로 조사하였다.

그 결과 농약 저항성에 있어서는 본 연구에 이용된 항진균활성세균 균주들 대부분이 여러 종류의 농약에 대하여 저항성을 갖는 반면 분해능에 있어서는 균주별, 농약별로 차이를 나타내었다. 독성이 강하고 환경오염물질로 작용하는 대부분의 유기화학농약에 대하여 항진균활성세균이 저항성과 분해능을 가지고 있기 때문에 환경보전 및 정화에 매우 유용한 다기능적 미생물제제(농약)으로 이용할 수 있다.

1) 농약분해세균의 growth curve

순수분리된 농약분해세균 중에서, 비교적 분해가 어려울 것으로 사료되는 3가지농약, diazinon(DIA), iprobenfos(IPR)를 대상으로 농약을 단일 인원으로 각각 농도를 0.03%과 0.05%를 공급하였을때 농약분해세균의 성장곡선을 1일 간격으로 증식된 생균수(viable cell)를 측정하여 조사하였다. 즉, 1일 간격으로 배양액(균이 접종된 GluMOPS액체배지)으로부터 0.1ml씩을 취하여 연속 희석하고 NA medium에 smearing한 후 30°C에서 24hr 동안 배양하여 나타난 colony를 계수하였다. 그 결과, KL1114는 대조구에 비하여 성장률이 우수하였고, 다른 균주에서는 대조구에 비해 성장률이 다소 둔화되면서 농약을 분해하는 것으로 나타났다.

2) U.V spectrophotometer를 이용한 농약분해속도측정

농약의 농도에 대한 표준곡선을 구하기 위하여, 2가지 농약, DIA(diazinon), IPR(iprobenfos)를 chloroform에 DIA는 0.03%, 0.015%, 0.0075%, IPR는 0.05%, 0.025%, 0.0125%가 되도록 조정된 표준농도에 따라 190nm~500nm까지의 흡광도 변화를 측정하였다. 이를 참고로 하여, 실제 농약분해세균에 의한 분해능 측정을 시행하였다. 즉, 농약분해세균의 진탕배양액 3ml와 chloroform 3ml를 혼합, vortexing하여 chloroform층만을 취하고 U.V. spectrophotometer를 이용하여 190nm~500nm까지의 파장(wavelength)에서 흡광도를 scanning하였다.

이 후, 3, 5, 7일 시기에 상기와 동일한 방법을 반복, 이용하여 시간이 경과함에 따라 농약이 분해되는 양(속도)을 조사한 결과, 7일 경과후에는 균주에 따라 약간 차이는 있지

만 전체적으로 70%이상 농약이 분해되는 양상을 나타내었다.

3) TLC(Thin layer chromatography)에 의한 분해율 측정

농약분해세균에 의한 농약분해양상 및 분해율을 직접 육안으로 조사하기 위하여 thin layer chromatography를 사용하여 배지내 잔존하는 농약을 분리, 측정하였다. 3, 5, 7일 배양액으로부터 1ml을 취한 후, 1ml의 chloroform을 첨가한 다음, 즉시 혼합하였고 chloroform layer를 취하여 N₂ gas로 건조시킨 다음, 다시 chloroform 1방울을 가하여 TLC하였다. 전개용매로는 Me-OH : H₂O = 80 : 20을, TLC plate는 silicagel GF 254(Sigma, Co)를 사용하였으며, 45분간 전개시킨 다음, U.V. light를 조사하여 발색시켜 본 결과, UV spectrum결과와 일치하였다.

Table 7-2-4. Pesticides used in this study

구분	품목명	상표명	A.I.(%)	사용농도 (ppm)	용해도	적용대상
살균제	Benomyl	Benlate	95.0	250	acetone	광범위
	Flusilazole	누스타	98.6	20	methanol	과수, 곡류
	Tebuconazole	실바코	98.0	250	isopropanol	과수
	Oxadixyl	산도판	98.0	250	methanol	원예
	Edifenphos	히노산	95.0	300	methanol	벼
	Tricyclazole	빔	96.0	375	methanol	벼
	Mancozeb	다이센엠45	83.0	1,000	물	광범위
	Chlorothalonil	다코닐	98.5	1,000	acetone	광범위
	Dichlofluanide	유파렌	90.0	1,000	methanol	채소갯빛
	Pencycuron	몬세렌	97.0	250	isopropanol	벼, 잔디
	Azoxystrobin	아마스타	98.4	100	acetone	광범위
	Copper hydroxide	코사이드	89.0	800	ammonia water	Bactericide
	Isoprothiorane	후치왕	96.0	400	methanol	벼, 채소
	Iprobenphos	키타진	97.0	50	acetone	벼
살충제	Chlorfenapyr	섹큐어	93.2	50	acetone	응애
	Imidacloprid	코니도	95.0	50	isopropanol	진딧물
	Carbofuran	큐라텔	75.0	300	isopropanol	나방, 멸구
	Fenpyroximate	살바왕	98.0	25	methanol	응애
	Chlorpyrifos	더스반	93.0	200	methanol	나방
	BPMC	멸사리	93.0	500	acetone	벼멸구, 매미충
	Diazinon	다이아톤	95.0	30	acetone	나방
제초제	Butachlor	마세트	87.0	50	acetone	1년생 잡초
	Glyphosate	GPS	98.0	50	물	과원잡초

Table 7-2-5: Resistant patterns of antifungal bacteria upon agrochemicals

구분	품 목 명	KL 1112	KL 1114	KL 1121	KL 1136	KL 1137	KL 1143	KL 1178	KL 1179	KL 1188	KL 1105	KLP 21	KL 1314	KL 1321	KL 1326	KL 1330	KL 1367
살 균 제	Benomyl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Flusilazole	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
	Tebuconazole	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
	Oxadixyl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Edifenphos	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Tricyclazole	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	Mancozeb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Chlorothalonil	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	Dichlofluanide	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
	Pencycuron	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Azoxystrobin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Copper hydroxide	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Isoprothiorane	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Iprobenphos	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
살 충 제	Chlorfenapyr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Imidacloprid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Carbofuran	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Fenpyroximate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Chlorpyrifos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BPMC	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
	Diazinon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
제 초 제	Butachlor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Glyphosate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Table 7-2-6. Degradable pattern of antifungal bacteria upon agrochemicals

구분	품목명	KL 1112	KL 1114	KL 1121	KL 1136	KL 1137	KL 1143	KL 1178	KL 1179	KL 1188	KL 1105	KLP 21	KL 1314	KL 1321	KL 1326	KL 1330	KL 1367	비고
살균제	Benomyl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Flusilazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Tebuconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Oxadixyl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Edifenphos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GluMOPS
	Tricyclazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Mancozeb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Chlorothalonil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Dichlofluanide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Pencycuron	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Azoxystrobin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Copper hydroxide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Isoprothiorane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Iprobenphos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GluMOPS
살충제	Chlorfenapyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Imidacloprid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Carbofuran	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Fenpyroximate	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
	Chlorpyrifos	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	GluMOPS
	BPMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Diazinon	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	GluMOPS
제초제	Butachlor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Glyphosate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	GluMOPS
대조구	GM63	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	GluMOPS	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	

제8장 활용에 대한 건의

제1절 기대효과

본 과제의 연구결과를 잘 활용할 경우 다음과 같은 기대효과를 충족시킬 수 있다.

1) 기술적 측면

- 균주탐색, 활성검색, 제제기술, 화합물의 환경 평가 기술, 독성 평가 기술, 공정화 기술 등이 선진국 수준으로 올라간다.
- 미생물농약 (제제), 다기능적 bio-controller에 대한 독창적인 formulation이 구축된다.
- 특히, target site screening technology (MAPK system 이용)가 확립되어 국제적으로도 창의적이며 절대적 우위를 점할 수 있는 전혀 새로운 기술력을 보유하게 된다. 진균류에 있어서 MAPK(mitogen activated protein kinase) system의 분자생물학적 연구는 다양한 환경 stress에 대한 신호전달체계를 규명 할 수 있기 때문에, 진균류 환경 내 성장과 생존에 대한 귀중한 요소들을 파악할 수 있으며, 또한 기초생명과학의 독창적인 학문적 기틀을 제공할 수 있다.
- 외국의 기술 의존도 및 선진국에서의 기술 종속 관계에서 탈피한다.
- 국내의 기술 개발로 인한 신농약 개발의 기술이 축적되었기 때문에 지속적인 신농약 살균제 및 미생물농약(제제)의 제품이 탄생된다.

2) 경제 산업적 측면

- 경제적 측면에서는 국내에서 사용하는 농약을 자체 조달로 외화를 절약하게 되며 신농약의 수출로 외화 획득의 효과가 있다. 신농약은 그 특허가 종료되는 20여년간 세계 시장에서 독점적으로 판매되기 때문에 경제적으로 고부가가치 상품을 창출하는 것이다. 사회적으로는 UR 및 WTO 체제하에서 농산물 시장의 개방에 대비하고, 주로 하우스 시설 내에서 채소, 원예작물 같은 특수 작물을 재배하는 우리 농민들에게 선택성 저공해 농약을 공급함으로써 그들의 건강을 보호해 주는 측면과 저공해 내지는 무공해 농약의 개발은 환경보전의 의미가 크다 하겠다.
- 특히, 환경친화형, 다기능적, 무공해, 무독성 길항미생물제제 및 미생물농약이 개발됨으로서 환경보전에 필수적인 Biocontroller로서 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 유기농법에 접목될 수 있기 때문에 시장성이 넓고, 고부가가치를 나타낼 수 있고 경제 산업적으로도 매우 중요하다.
- 세계 2대 농약회사인 Monsanto사가 작년도부터 화학농약의 생산을 중단키로 한 사실은, 미생물제제 (미생물농약, 미생물살균제)의 개발에 대한 중요성을 시사한다. 이러한 시대적 배경 하에서 본 과제가 추구하는 궁극적 목표가 3차년도 연구종료시점에 이룩되었기 때문에 경제, 산업적인 영향은 지대할 것으로 예측된다(현재 상업화 준비 완료, 시제품 완성, 등록준비 진행 중).

제2절 활용방안

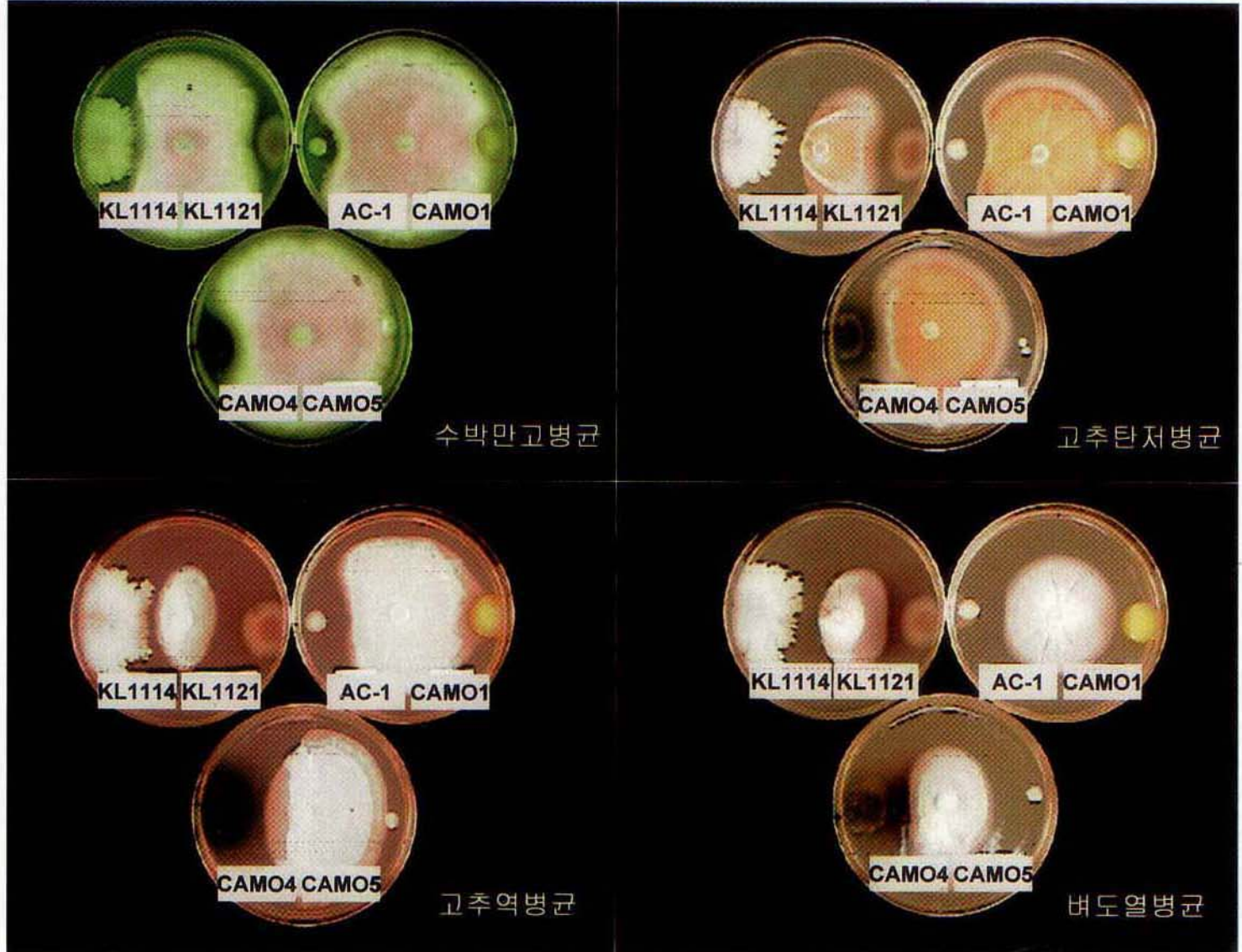
본 연구로부터 얻어진 결과들에 대하여 구체화된 활용계획을 요약하면 다음과 같다.

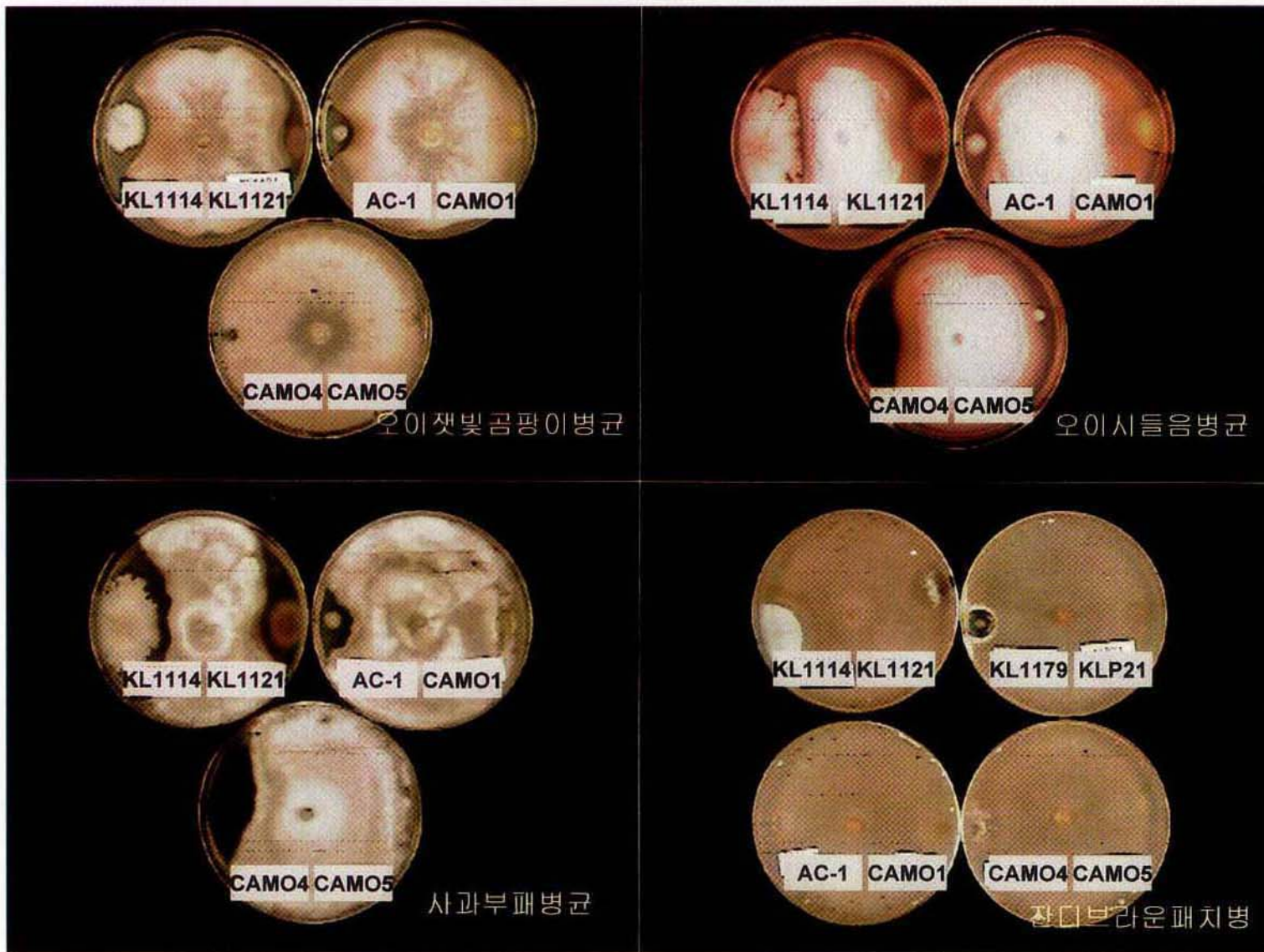
- ① 본 연구로부터 탐색분리된 16종의 항진균활성세균은 미생물농약, 미생물제제 그리고 항진균제 생산개발에 이용될 것이다(미생물농약, 미생물제제는 99년 6월경에 생산시판될 예정이다).
- ② 항진균활성세균 KL1114로부터 생성되는 분자량 530인 물질(KLMBF-①)은 신규선도 화합물일 가능성이 높다. 분자구조식이 밝혀지면 곧바로 물질특허출원과 동시에 유기합성 및 유도체합성을 시도하여 다양한 약제개발 및 생산에 이용될 것이다. 항진균물질 KLMBF-②~④ (분자량 1045, 1058, 1074)도 역시 같은 목적으로 활용될 것이다.
- ③ 항진균활성물질 중 분자량 3kDa과 5kDa의 폴리펩타이드는 농약용으로는 물론이고 의약품 항진균제로의 개발에 이용될 것이다.
- ④ 분자량 3kDa, 5kDa, 41kDa, 20kDa의 항진균 폴리펩타이드 합성유전자를 식물체에 재조합시켜 항진균활성 형질전환식물체를 제조하는데 이용될 것이다.
- ⑤ 세균 유래의 항진균활성 폴리펩타이드에 관한 연구는 국내외적으로 초유의 일로서, 3kDa, 5kDa, 41kDa, 20kDa의 폴리펩타이드는 N-말단의 아미노산서열이 이미 결정되었고, 특히 41kDa의 경우 완전한 유전자의 클로닝은 물론이고 과대발현까지 성공하였으므로 항진균활성이 증진된 변형폴리펩타이드를 제조할 수 있다.
- ⑥ 항진균활성효소를 분리, 정제한 결과 분자량이 45 KDa, 55 KDa, 59 KDa, 100 KDa 이상인 chitinolytic enzyme (Chit 45, Chit 55, Chit 59, Chit 100↑)으로 판명되었다. Chit 45, -55, -59는 exo-chitinase로, Chit 100↑는 endo-chitinase (chitobiosidase)로 밝혀졌다. 이들 세균 유래 항진균 효소 연구결과는 항진균활성 형질전환 식물체 구축에 필요한 기초자료로 이용될 수 있다.
- ⑦ 현재까지 개발보고된 것과는 구성성분이 전혀 다르게 미생물농약 및 제제의 formulation이 완성되었다.
- ⑧ 원제 제조 및 공정과정이 새롭게 확립되어 제조방법과 생산기술이 국내기업에 이전될 뿐만아니라 그 기술은 외국에 수출할 수도 있다.
- ⑨ 본 연구로부터 개발된 미생물제제 (및 농약)은 병원성진균류를 방제하는 biocontroller로서 이용될 뿐만아니라, 독성유기화학 농약분해능과 유기물 분해능력이 뛰어나기 때문에 다기능적 환경친화형 토양개량제, 퇴비부숙제, 환경정화제 등으로 이용될 수 있다.
- ⑩ 본 연구에서 클로닝된 MAPK(mitogen activated protein kinase)유전자는 표적부위탐색체계를 구축하는데 이용할 것이다(표적부위탐색체계를 이용하면 강력한 신규항진균 물질을 쉽게 선별 도출할 가능성이 높다). MAPK 표적부위 탐색체계구축기술은 국내 외기업에 기술이전하는데 높은 royalty를 받을 수 있는 신규기술력이기 때문이다.
- ⑪ 본 연구에서 항진균활성을 잃은 (AF⁻) 돌연변이체는 AF⁻ 합성유전자의 특성 및 조절 연구에 관한 기초 및 응용연구에 폭 넓게 활용할 수 있다.
- ⑫ 저비등점의 휘발성 항진균활성물질을 생성하는 KL1179 등의 균주는 잔디브라운패치

병 방제에 탁월한 효능을 보여 잔디보호용 미생물농약(제제)에 활용할 것이다.

- ⑬ 요컨대, 본 연구로부터 저공해, 선택성 항진균제 및 미생물농약과 제제가 개발되었기 때문에 기술이 국내기업에 이양되고 제품이 생산되어 국내작물의 보호는 물론, 농업 생산성을 제고시킬 뿐만 아니라 세계시장에 수출되어 외화획득에 기여하여 국가 경제에 이바지하게 될 것이다. 또한 기반기술과 경험의 축적은 본 항진균제 및 미생물농약 제제에 국한되지 않고 농약전반 및 지속적인 신물질 개발에 이용됨으로써 신제품(신농약, 신의약)의 지속적인 창출이 가능하다.

식물병원균에 대한 길항세균의 생육억제 효과





오이젯빛곰팡이병 방제 효과

