

GOVP1199904442

628.351

L293E

최 중
연구보고서

토착길항미생물의 유전공학적 육종에
의한 환경보전형 생물방제법 개발

Biological Control of Phytopathogenic Fungi by
The Genetic Breeding of Indigenous
Antagonistic Microorganisms

연구기관

영남대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “토착길항미생물의 유전공학적 육종에 의한 환경보전형 생물 방제법 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998 . 12. 15.

주관연구기관명 : 영남대학교
총괄연구책임자 : 김 상 달
책임 연구 원 : 김 종 국
책임 연구 원 : 이 창 은
연 구 원 : 임 호 성
연 구 원 : 이 은 탁
연 구 원 : 한 길 환
연 구 원 : 이 영 선
연 구 원 : 최 중 규
연 구 원 : 박 석 희

협동연구기관명 : 대구대학교
협동연구책임자 : 이 용 세
책임 연구 원 : 전 하 준

협동연구기관명 : 한국인삼연초연구원
협동연구책임자 : 도 재 호
선 임 연구 원 : 이 종 태
선 임 연구 원 : 이 성 계

협동연구기관명 : 경주아화농협
협동연구책임자 : 정 영 수
선 임 연구 원 : 하 성 수

여 백

요 약 문

I. 제 목

토착길항미생물의 유전공학적 육종에 의한 환경보전형 생물
방제법 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

농작물의 증산을 위해 무분별하게 사용되고 있는 맹독성 화학농약이 환경생태계의 보호나 인류건강의 담보를 위해 그 용도와 용량의 규제가 강력히 요구되고 있으므로, 향후 농작물의 병충해 방제를 위해서는 환경보전적인 생물학적 병해충 방제법이 크게 각광을 받을 것이다. 길항미생물을 이용하는 생물학적 방제, 특히 작물의 토양전염병의 방제는 토양생태계내에서 서로 다른 두 종류의 미생물간에 일어나는 경쟁현상(competition), 기생 또는 포식관계(parasitism, predation) 나 항생작용(antagonism) 등의 상호작용을 인위적으로 조절, 활용함으로써 가능하게 된다.

1970년대 저병해 경작지의 질병억제토양(suppressive soil)이 토양내 미생물들의 길항작용에 의한 것으로 보고된 이후 종합적 병해충 방제방법(IPM)의 일환으로 생물학적 방제법이 활발히 연구되어져 왔으며, 많은 종류의 토양세균, 방선균 및 진균류에 속하는 길항미생물들이 분리되어 생물학적 방제에 활용하기 위해 연구, 개발되어 왔다.

특히 토양전염성 식물병은 화학농약으로도 방제가 매우 어려우며, 병 발생이후에는 치료가 거의 불가능하기 때문에 각종 토양 전염성 식물병원균에 대한 생물학적 방제에 관한 연구가 화학적 방제법의 대안으로 활발히 연구, 개발되고 있다.

이와 같은 생물방제법이 병해방제에 도입될 경우 방제효과가 오랜 기간 동안 지속될 수 있으며, 화학농약 사용에 따른 생태계 파괴, 환경오염, 약해 및 잔류독성의 문제를 크게 줄일 수 있기 때문에 종합적 병해충 방제법의 근간이 되는 중요한 비중과 역할로서 매우 바람직한 환경보전형 방제법이라고 할 수 있다.

길항 미생물을 이용하는 생물학적 방제의 연구 목표로는 실제 경작지 토양에서의 방제력이 우수한 토착 길항미생물을 해당 지역의 재배지 토양에서 직접 선발, 육성하고 이들을 다시 해당지역 경작지에 되돌림(feedback) 처리하여 각종 작물 질병의 발생을 억제시키는 우점복원력이 강한 방제 방법의 확립이 무엇 보다 중요하다고 할 수 있다.

따라서 대상 각종 병원균에 대한 길항효과가 강력하면서도 해당지역의 토양내 정착, 우점화 능력이 우수한 토착 길항미생물의 분리, 선발, 육종과 효과적인 전달체계 연구가 생물방제에 열쇠가 되는 매우 중요한 목적이 되어야한다.

아울러 선발된 토착 길항미생물들의 길항기작을 조사하여 이들 길항기작을 증강시키거나, 기작별 길항미생물의 길항능을 유전공학적으로 통합, 부가하여 길항미생물의 토양내 되돌림 처리를 단순, 효율화하는 첨단 생물방제방법 또한 중요한 목적이 되어야 된다고 생각되어진다.

따라서 본 연구개발의 목적과 방향을 다음과 같이 나누어 볼 수 있다.

1. 우리나라 농촌지역, 특히 각 지방 해당지역의 기후, 풍토에 장기간 적응, 토착화되어 그지역의 토양환경에 복원 우점화되기 용이한 각종 토착 길항미생물들을 분리, 선발하고, 이들의 길항물질을 정제하여 그 길항기작들을 길항물질 수준으로 구명하여 각 기작별 우수 토착길항미생물을 육성하고, 해당지역의 경작지 토양에 되돌림 처리함으로써 실현성있는 생물방제법을 개발한다.
2. 선발된 토착 길항미생물들의 생물학적 방제기작의 유전자를 유전공학적으로 통합, 부가, 증강하여 다기능적 단일 생물방제균주로 유전 육종함으로써 여러 가지 복수 길항기작의 처리체계를 단순화하여 토양내 전달효과를 향상시키며, 부

수적으로 우리 고유의 길항기작 유전자원을 확보한다.

아울러 생물방제균의 토양내 생태학적 동태를 추적(**monitoring**)하기 위하여 **bio-report** 유전자인 **green fluorescence protein (GFP) gene**을 선발된 생물방제균주내 유전공학적으로 도입 발현시킴으로써 새로운 토양내 검증법을 개발하여 첨단적 생물방제법을 시도한다.

3. 길항기작별로 선발된 각종 토착 생물방제균이나, 육종된 생물방제균을 해당 지역 현지 토양내에서 신속히 우점화 되고 그 방제력이 유지될 수 있도록 하기 위해 길항미생물의 식물종자 피막화 등 새로운 전달체계를 구명, 확립함으로써 실용성 있고 경쟁력이 우수한 생물방제균 전달체계를 개발한다.

4. 선발된 생물방제균이나 육종균주의 실제 경작지내 방제력을 구명하기 위해 고추경작지에서 고추역병을 대상 질병으로 해서 지역별로 그 방제력을 확인, 조사함으로써 개발된 생물방제균주에 의한 생물방제법의 가능성을 보증하고, 아울러 공장수준의 시판용 생물방제제의 산업화 가능성과 유기, 자연농업 등의 환경농업에의 활용 가능성을 조사한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 맹독성 화학농약에 의한 식물병원균의 화학 방제법을 줄일수 있는 대안으로 새로운 환경보전적인 생물학적 식물병해 방제법을 개발하고자 한다. 경작지 토양내에서 생물학적 방제법의 그 재현 실현성을 향상시키기 위해, 우선 해당지역 토양에 적용, 토착화되어 있는 토착 길항미생물들을 분리, 선발하고 토양전염성 식물병원균에 대한 이들 길항미생물의 생물학적 방제기작들을 기작물 질 수준까지 규명하며, 이 들을 지역 토양에 되돌림(**feedback**) 처리함으로써, 우점력과 길항력이 우수한 새로운 생물방제법을 확립한다.

아울러 기작별 길항미생물들의 길항유전자를 우점 복원력이 우수한 단일균주의 생물방제균주에 부가, 합병하여 다기능 생물방제균으로 유전공학적 육종을 함으

로써 첨단적 생물방제방법을 개발하고, 또한 해당지역 토양에 우점력이 우수한 새로운 전달체제를 확립한다.

따라서 각 분야별 연구개발 내용과 범위는 다음과 같다.

1. 토착 길항미생물의 분리 및 선발

가. 지역토양내에서의 토착 길항미생물의 증균, 채취 및 분리.

지역의 특정 토양 및 저병해 경작지 토양으로부터 증미, 황토, 왕겨 등을 이용하는 자연농업 방식에 의해 우점력이 크고 생존 경쟁력이 큰 토착미생물들을 증균, 채취하고, 근부병균 등 식물병원성 진균에 대한 길항력있는 길항미생물을 분리한다.

나. 길항기작별 토착길항미생물의 선발

1) Chitinase 생산성 길항미생물의 선발

식물근부병균 등에 길항력을 가지는 길항미생물 중에서 chitin 분해력이 강한 길항미생물을 *Pseudomonas* 등 세균을 중심으로 선발한다.

2) 항생물질 생산성 길항미생물의 선발

식물병원균에 길항력이 있는 길항균주중에서 저분자 항생물질 생산성이 강한 길항미생물을 *Bacillus* 등 세균을 중심으로 선발한다.

3) Siderophore 생산성 길항균주의 선발.

분리된 길항균주중 CAS 배지 등 siderophore 검출배지를 통해 siderophore (철 특이 결합물질) 생산성이 강한 길항미생물을 선발한다.

4) 길항성 진균의 선발.

분리된 길항성 진균 중에서 고추역병균 등 식물병원균에 강력한 길항력을 가지는 길항성 진균을 선발한다.

2. 길항미생물의 길항기작 구명 및 길항물질의 정제, 동정

선발된 각종 길항미생물의 길항물질을 정제하고 그 구조 및 특성을 조사함으로써 길항 물질 수준의 길항기작을 구명한다.

가. 식물병원성 진균의 외막가수분해 효소의 정제 및 특성조사

식물병원성 진균의 외막을 구성하고 있는 chitin, glucan, cellulose 등 균사체 외막물질을 가수분해하는 효소 chitinase와 cellulase를 선발된 길항미생물로부터 분리, 정제와 그 효소학적 특성을 조사하고 이것들과 길항력과의 관계를 조사한다.

나. 항진균성 항생물질의 정제와 특성조사

포자발아 억제능 등 항생기작을 가지는 항진균성 항생물질을 선발 방제균주들의 배양물로부터 분리, 정제하고 그 구조적 특성을 조사하며, 이들의 구체적 길항기작을 조사한다. 아울러 이들 항생물질의 대량생산방법도 조사한다.

다. 길항성 siderophore의 정제 및 특성 조사

철이온 결합물질 siderophore를 생산하여 식물병원성 진균의 생육을 억제시키는 *Pseudomonas* 등의 생물방제균으로부터 siderophore를 분리 정제하고 그 구조적, 물질적 특성을 조사하여 길항력과의 관련기작을 규명하며, 이들의 최적 생산 조건도 조사한다.

라. 길항성 효소저해제의 정제 및 특성조사

항진균성 길항미생물의 길항물질 중 외막 가수분해효소나 항생물질 또는 siderophore 등에 의한 길항기작 이외의 길항기작 물질로 효소 저해제 특히 protease inhibitor가 존재함을 추정하고, 이를 정제하여 그 물질적 특성을 조사한다.

마. 기작조사의 범위

광학현미경, 전자현미경을 통한 식물병원균의 포자발아 억제 및 균사체 신장

억제현상을 관찰하고 각종 효소 활성도와 효소 저해력, 철(Fe)이온 결합능 등을 구명한다.

3. 토착 길항미생물의 분류학적 동정

가. 길항성 세균 및 방선균의 동정

생물방제균으로 선발된 길항성 세균의 분류학적 동정을 위해서는 세균 동정에 필요한 각종 생화학적 조사는 물론이고, 균체 지방산 분석, 형태학적 조사 등을 수행한다.

나. 길항성 진균의 동정

선발된 길항성 진균을 동정하기 위해서는 길항진균을 PDA에 접종배양한 후 그 진균류 동정에 필요한 배양적 특성과 광학현미경에 의한 형태적 특성에 의해 동정한다.

4. 다기능 생물방제균주의 유전공학적 육종

가. 돌연변이에 의한 방제력 증강균주의 육종

NTG 등 돌연변이 유발물질을 이용해 siderophore 생산능력 증강변이주, chitinase 생산능력 증강변이주, 항생물질 생산능 증강변이주를 유전적으로 육종한다.

나. 외부 길항유전자 도입 system 구축

- 1) 두종의 생물방제 기능을 가지는 길항성 진균을 서로 cell fusion (세포융합) 함으로서 생물방제능을 가지는 진균의 유전공학적 육종방법을 개발한다.
- 2) Protoplast transformation, competent cell transformation, electrophoration에 의해 방제력 증강된 길항미생물을 육종한다.

다. 외부 길항기작 유전자의 도입에 의한 유전공학적 육종

1) 항생물질 생산성 길항균주에 urease gene의 도입.

선발된 항생물질 생산성 (siderophore 소량생산) 길항균주 *Bacillus subtilis* SH14에 토양세균 *Bacillus pasteurii*의 urease gene을 도입, 발현한다.

2) Siderophore 생산성 길항균주에 urease gene의 도입.

선발된 siderophore 생산성 길항균주 *Pseudomonas fluorescens* GL7에 *Bacillus* 성 urease gene을 도입, 발현한다.

라. 길항 진균의 cell fusion에 의한 유전자 통합.

서로 다른 두 종의 길항성 진균 *Trichoderma* 간에 cell fusion (세포융합)을 통한 길항유전자의 통합을 수행한다.

마. 도입하는 외부유전자의 염색체 병합에 의한 길항유전자의 안정성 확보

1) Integration vector plasmid를 이용한 chitinase gene 및 urease gene의 chromosome integration에 의한 안정성 제고.

선발된 생물방제균 *Bacillus subtilis* SH14에 토양세균 *Bacillus pasteurii*의 urease gene과 생물방제균 *Pseudomonas* sp.3098의 chitinase gene을 integration vector pDL로 염색체내 삽입하여 길항능 소실없는 길항유전자의 안정성을 제고하는 방법을 개발한다.

바. 길항성 chitinase 유전자의 염기배열 결정 및 구조

다기능성 생물방제균 개발을 위해 gene cloning한 생물방제균 *Pseudomonas* sp. 3098의 chitinase gene의 염기배열 결정(DNA sequencing)을 행하여 nucleotide 염기 서열을 조사하고, 그 유전적 구조를 추정함으로써 우리 고유의 길항유전자를 유전자원화 한다.

5. 생물방제균내 Bio-report gene의 유전적 도입에 의한 생태학적 Monitoring 방법 개발

선발된 siderophore 생산성 생물방제균 *Pseudomonas fluorescence* GL7이나 *P. fluorescence* LS20에 토양내 동태 추적용 Bio-report gene인 green fluorescence protein (GFP) gene을 도입함으로써 새로운 생태학적 monitoring 방법을 개발한다.

6. 생물방제균의 토양내 방제력 및 전달 체계

가. 선발 생물방제균주 및 육종균주의 토양내 방제력 조사.

길항성 미생물의 토양내 방제력 유지능력과 동태 및 식물체에 미치는 영향을 고추역병균을 이용한 고추 식물실험으로 조사한다. 이때 생물 방제균주의 혼합처리에 따른 방제력 검증도 수행한다.

나. 생물방제균의 토양내 전달체계 조사.

생물방제균주의 효과적 토양내 전달체계를 조사하기 위해 생물방제균을 미리 배양한 배양토 이용방법, 방제균 배양균체의 관주 처리방법, 생물방제균의 종자 coating 처리방법 등의 각종 전달체계를 고추역병 방제력 실험을 통해 조사한다.

7. 경작지에서의 생물학적 방제법의 확립

각종 생물방제균이 실제 경작지에서 그 방제력이 발휘하는 지를 확인하기 위해 고추와 참깨를 대상작물로 해서 고추역병과 참깨 시들음병의 방제력 검증을 지역의 경작지 포장에서 수행한다. 방제력 검증과 더불어 체장, 경엽수, 중량 등 식물체 수확량에 미치는 영향도 조사한다.

8. 환경 농업에서의 생물방제법의 실용화

가. 환경 농업에의 활용 및 비교조사

전년도에 이미 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통해 선발된 토착 길항미생물의 환경농업에서의 활용과 실용화방법을 확립하기 위해, 기존 환경농업 방법을 이용하여 환경 농업에 사용되는 각종 유기질과 혼합 처리하여 처리구별로 비교 조사한다.

나. 생물 방제균의 산업화 방안

포장실험까지 확인된 생물방제균주를 실제 농가에 보급할 시판용 공장 수준의 산업화 가능성을 모색하기 위해 기술 이전할 기업과의 협의 및 시제품 생산을 시도한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 토착길항미생물의 분리, 선발 및 동정

1) 경북 경주, 영천, 경산지역의 해당지역 토양으로부터 증미, 황토, 왕겨를 이용한 새로운 토착 길항미생물의 채취, 분리법을 고안하여 우점력과 경쟁력이 큰 토착길항미생물을 분리 할 수 있었다.

2) 고추역병균 *Phytophthora capsici*, 근부병균 *Fusarium solani* 및 시들음병균 *F. oxysporum*의 생육을 억제하는 길항기작별 토착 길항미생물을 선발한 바, ①진균 외막 가수분해효소 생산성 길항균주 *Pseudomonas* sp. 3098, *Serratia* sp. 3095 및 ②항진균성 항생물질 생산성 길항균주 *Bacillus* sp. 4016, *Bacillus* sp. SH14, *Pseudomonas fluorescens* 2112, *Actinomyces* sp. KH28 및 ③siderophore 생산성 길항균주 *P. fluorescens* GL7, *P. fluorescens* LS20 및 ④protease

inhibitor 생산성 길항방선균 *Streptomyces* sp. KH1 및 [Ⓜ]길항성진균 *Trichoderma* sp. J1, J10, J13, J16, K5 및 *Penicillium* sp. 31K10 등의 토착 길항미생물들을 최종선발 하였고, 이들을 여러 가지 생리학적, 생화학적, 배양학적, 형태학적 방법으로 분류, 동정하였다.

나. 길항미생물의 길항기작 구명과 길항물질의 정제 및 특성

1) 시들음병균 *F. oxysporum*과 근부병균 *F. solani*의 생육을 억제하는 chitinase 생산성 생물방제균 *Pseudomonas* sp. 3098과 *Serratia* sp. 3095를 선발, 동정하고 그 길항기작물질인 chitinase를 정제한 결과 분자량이 각각 45,000 dalton 과 62,000 dalton 정도의 열에 안정한 pH 5.0과 pH 7.5의 최적작용pH와 각각 45℃의 최적반응온도를 가지는 단일 단백질의 chitinase들임을 각종정제방법을 동원하여 순수정제하여 그 효소학적 특성을 확인하였고, 이 chitinase가 길항력의 주 원인임을 구명하였다. 별도로 조사한 cellulase와 glucanase도 길항기작의 원인임을 알았다.

2) 고추역병균 *Phytophthora capsici*의 생육을 억제하는 생물방제균으로 선발된 토착길항세균 *Pseudomonas* sp. 2112가 생산하는 항진균성 항생물질을 정제하였으며, 이를 이용해 그의 저해기작을 고추역병균 *Phytophthora capsici*의 포자를 대상으로 radioisotope labelling precursor [³H] leucine, [³H] glucose, [³H] adenine 등으로 조사한 결과, 그 길항기작이 단백질 합성 및 RNA합성 저해기작임을 확인하였다.

3) 고추역병균 *Phytophthora capsici* 및 시들음병균 *Fusarium oxysporum*가 생육을 억제하는 항진균성 항생물질을 생산하는 생물방제력이 우수한 방선균 한 균주를 선발하여 *Actinomyces* sp. KH-28로 동정하고, 그 길항기작이 열에 불안정한 분자량이 250 dalton 정도의 황색을 띠는 quinoline 계 항생물질로 추정하였다.

4) 식물근부균 *Fusarium solani*의 생육을 억제하는 생물방제균 *Pseudomonas fluorescens* GL7을 선발, 동정하였고 이 길항균주가 생산하는 siderophore를 각종 정제방법으로 단일물질로 정제하여 그 구조적 특성을 조사한 결과 threonine, alanine, lysine (1:2:1)을 구성하는 분자량이 989 dalton인 pseudobactin 형태의 siderophore로 확인되었고 그 최대 흡광도는 400nm이었다.

5) 식물근부균 *Fusarium solai*의 생육을 억제하는 또 다른 생물방제균 *Pseudomonas fluorescens* LS20을 선발하여 분류학적으로, 동정하였고 이 길항균주가 생산하는 siderophore를 정제하여 그 물질적 특성을 조사한 결과 glycine, serine, threonine, glutamic acid, alanine, lysine (3:2:1:1:1:1)을 구성하는 분자량이

1,936 dalton 인 pyoverdin 형태의 siderophore로 확인하였으며, 최대 흡광도는 365nm이었다.

6) 탄저병 원인균인 *Colletotridum gloeosporides*와 점무늬 반점낙엽병균인 *Alternaria mali*에 대한 항진균성 길항능력이 우수한 방선균 *Streptomyces cyaneus* KH-1을 선발하여 수리학적 동정법 등 최신의 방법으로 동정하였고, 그 길항기작을 조사한 결과, 가수분해효소와 siderophore 등의 길항기작이 아닌 protease inhibitor에 기인됨을 확인하였으며, 그 길항물질을 정제한 결과 분자량이 283 dalton 정도의 polyhydroxyamine 인 것으로 확인하였다.

다. 다기능 생물방제균주의 유전공학적 육종

1) 선발된 생물방제균의 길항력보다 더 강력한 길항력을 가지는 증강변이균주를 유전적으로 육종함으로써 식물병원균을 보다 더 효율적으로 방제하기 위해, 생물방제균 *P. fluorescens* GL7을 NTG mutagen으로 돌연변이시켜 siderophore 생산능이 1.3 배 정도 증가된 증강변이주 강력한 생물방제균 *P. fluorescens* GL7-PM1을 육종하였다.

2) 토양내에서 또 다른 길항기작의 하나인 미생물성 ammonia 생성과 토양 알칼리화에 의한 siderophore의 길항능을 증가함으로써 생물방제력의 상승효과를 거둘 수 있는 다기능적 생물방제균의 개발을 위해, siderophore 생산성 길항균주 *P. fluorescens* GL7에 외부의 urease 유전자를 vector plasmid를 이용 도입하여 urease 생산능을 별도로 부가시켰으며, 이로인한식물근부균 *F. solani*에 대한 길항능의 증가도 확인하였다.

3) 다기능 생물방제균의 유전학적 육종과 길항 유전자원의 확보를 위해 chitinase 생산성 생물방제균 *Pseudomonase* sp. 3089로부터 3.2 Kb 정도의 chitinase gene을 cloning하였으며, 그 nucleotide 염기배열을 sequencing하였다. 아울러 chitinase 발현의 ORF 등 유전구조와 restriction map, 타 균주의 chitinase gene sequence와 homology 도 비교하여 유용한 길항성 유전자원을 확보하였고 다기능 방제균주의 육종재료로 사용하였다.

4) 식물근부균 *F. solani*에 강하게 생육을 억제하는 항진균성 항생물질을 생산하는 생물방제균 *Bacillus subtilis* SH 14에 또 다른 길항기작인 urease 유전자를 도입하여 복수기능의 생물방제균을 육종하였고 두기능의 상승작용에 의한 길항력의 증가도 확인 하였다.

5) 고추역병균 *Phytophthora capsici*의 생육을 강하게 억제하는 길항성진균 *Trichoderma*의 두종을 cell fusion하여 두 길항기능을 가지는 세포융합체를 육종하였다.

라. 도입유전자의 염색체 병합에 의한 길항유전자의 안정성 확보

1) 유전공학적으로 육종된 생물방제균의 도입유전자의 영구 발현 가능한 안정성을 확보하기 위해 항생물질 생산성 생물방제균 *B. subtilis* SH14의 염색체내에 integration vector PDL로 생물방제균 *Pseudomonas* sp. 3089의 3.2 Kb의 chitinase gene을 각각 병합함으로써 도입된 길항유전자의 소실 위험성이 없는 새로운 다기능 생물방제균주의 육종방법이 개발되었다.

2) 항생물질 생산성 생물방제균주 *B. subtilis* SH14의 chromosome내에 10.2 Kb의 *Bacillus pasteurii*의 urease gene을 병합하여 도입유전자의 안전성을 확보하였다.

마. 생물방제균내 Bio-report gene의 유전적 도입에 의한 생태학적 Monitoring 방법 개발

1) 생물방제균을 토양내에 투입하였을 때 그 증식 속도나 전파 양식 등 생태학적 동태를 추적하기 위해 siderophore 생산성 길항균주인 *P. fluorescens* LS20과 *P. fluorescens* GL7의 chromosomal DNA에 pUT mini Tn5 GFP를 이용하여 가장 우수한 bio-report인 green fluorescence protein(GFP)의 유전자를 integration시켜 새로운 생태학적 monitoring 방법을 개발하였다.

2) 강력한 Bio-report gene인 enhanced green fluorescence protein (EGFP)를 pHV 1432등 Bacillus 용 vector plasmid에 subcloning하여 Egfp의 발현을 가능하게 하였다.

바. 생물방제균의 토양내 방제력 및 전달 체계

1) 선발된 길항미생물을 혼합시킨 토양에 건전 고추묘를 이식 후 고추역병균 (*Phytophthora capsici*)을 접종(50 zoosporangia/g soil)하여 역병의 발생을 경시적으로 조사한 결과, 대조구에서는 5일 후부터 발병되기 시작하여 11일 후에는 전체 식물 100%가 이병되었으나, 선발된 길항미생물을 혼합시킨 토양에서는 40~66%의 이병률을 보여 생물방제균으로서의 이용 가능성이 충분하였으며, 처리농도

가 높을수록 이병률이 낮은 현상을 보여 길항미생물의 처리에 의해 병발생이 크게 억제되었다.

2) 길항진균간의 혼합처리에 따른 고추역병 발생 억제의 상승효과는 인정할 수 없었다. 길항진균 *Trichoderma*와 길항세균 *Bacillus*를 혼합하여 처리 하였을 때는 길항세균 단독으로 처리하였을 때보다 병발생률이 월등히 낮았으며, 길항진균을 단독으로 처리하였을 때 보다는 약간 낮은 경향을 보였다.

3) 길항성 *Trichoderma* sp.인 25J1과 36J13 및 36J13과 37J16균주간 protoplast fusion에 의해 얻은 colony중에서 안정성을 확인한 두 개의 fusant 균주(PFJ1+J13 및 PFJ13+J10)를 선발하여 동일한 방법으로 고추역병의 발생억제력을 조사한 결과 역병발생 억제효과의 상승적인 증진은 없었다.

4) 토양처리 후 생물방제균의 밀도는 처리 10일 후까지는 증가하였으나, 그 후부터는 감소하여 20일 후부터는 거의 평형을 유지하였으며, 50일 및 60일 후까지 갈수록 감소하는 경향을 보였다.

5) 이병토양에 길항미생물을 coating처리를 하지 않은 고추종자를 파종하였을 때 입묘율이 0% 이었으나, 길항미생물을 coating한 고추 종자는 조사 5주 후까지 40% 이상 건전묘로 생육하여 선발된 길항미생물의 종자 coating 효과가 크다는 것을 확인하였다.

6) 시판 화학농약 메타실엠 수화제를 관행농도(0.2g/l)로 처리한 토양내에서 생물방제균의 약제 저항성을 조사한 결과 *in vitro*에서와 같이 메타실엠 수화제는 생물방제균의 밀도에 영향을 미치지 않았다.

7) 줄기의 직경, 총 엽수, 초장, 엽면적, 화방수와 뿌리, 줄기, 잎의 건물중과 입묘율을 조사한 결과, 일반적으로 길항진균의 처리 배양토에 파종했을 때의 고추생육이 coating종자를 파종한 것 보다 좋은 경향을 보였으며, 길항세균의 처리에서는 차이가 뚜렷하게 나타나지 않았다.

8) 길항미생물의 종자 coating 처리가 고추나 참깨 종자의 발아에 영향을 미치지 않았고, 종자에 coating한 길항미생물의 활력은 1년까지 유지되었으며, perlite를 첨가제로 사용하였을 때 활력이 가장 좋았으며 발아율도 가장 높았다.

사. 경작지에서의 생물학적 방제법의 확립

1) 참깨종자에 coating처리한 길항미생물의 활력은 조사 60일까지 그대로 유지되고 있었으며 종자 coating처리가 발아에 영향을 미치지 않았고, 경작지내 토양병 억제효과 검증시험에서는 실험포장의 토양전염성병이 전혀 기후관계로 발생되지 않아 처리간 차이를 확인할 수 없었으며, 성장조사에서는 길항미생물의 처리와 무처리간에 유의성이 없었다.

2) 역병 방제력의 경작지 포장 시험에서는 무처리구에서 병 진전 속도가 매우 빨리 진행되어 2주 후에 이미 63.3%의 이병율을 보였으며, 4주 후에는 100% 이병되었다. 그러나 선발된 길항미생물 *Trichoderma* 등 균주의 처리구에서는 농약을 처리한 구와 유사하게 13.3% 정도의 이병률을 보여 길항미생물의 처리에 의해 병 발생이 억제됨을 뚜렷하게 보였다.

3) 고추 경작지내 길항미생물의 밀도변화와 토양에서의 생물방제균의 토양전달체계를 조사한 결과 이식 10일 후 조사한 생물방제균의 밀도는 최초 처리시 밀도보다 전체적으로 감소하는 경향을 보였으나 *Trichoderma* sp. K5 균주는 증가한 결과를 보였다. 처리 20일 후에는 처리 10일 후 보다 더 감소한 경향을 보였으며, 그 이후에는 밀도가 유지되거나 급격히 감소한 결과를 보였으며 균주간 차이가 있었다. 특히 병 발생억제 효과가 있었던 수종의 *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., 등의 길항성 균주는 감소되는 경향이 길항능이 적은 다른 균주에 비하여 완만하였다.

4) 관주처리에 의한 방법으로 길항미생물을 처리한 영천 청통면의 고추 포장에서 조사한 길항미생물의 밀도변화 조사에서는 처리한 다음 시간이 경과할수록 감소 경향을 보였으며, 길항미생물을 토양과 혼합하여 배양토를 만들어 처리한 방법과 비교하였을 때 보다 비교적 낮은 밀도를 나타내었다. 균주간 정착능력의 차이는

있었으며 *Trichoderma* sp. K5 균주와 *Bacillus* sp. 7079 균주의 균수가 가장 높았다.

5) 토양의 물리화학적 성질에 따른 길항미생물의 효과 및 동태시험에서 토양의 물리·화학적 성질의 차이는 생물방제균의 토양내 정착과 식물병 발생 억제효과에 큰 영향을 미치지 않았다.

아. 환경 농업에서의 생물방제법의 실용화

1) 환경농업이 행해져 왔던 경주 서면 지역의 경작지 토양에 고추를 이식한 후 경시적으로 역병의 발생을 조사한 결과 기후관계로 전체포장에서 역병이 발생되지 않아 길항미생물에 의한 병발생억제효과는 검증할 수 없었다.

2) 영천 및 경산지역의 경작지 포장시험에서 생물방제균이 식물체의 생장에 미치는 영향을 조사한 결과 2종의 *Trichoderma* 와 1종의 *Bacillus*, 1종의 *Pseudomonas*의 단독 처리 및 상이한 두균주의 혼합처리구에서 조사한 초장, 경 및 고추열매 수와 고추의 생체중이 대조구에 비하여 높은 경향을 보여 이들 균주에 의해 식물체의 생육이 촉진되었다.

3) 길항미생물을 처리한 다음 경시적으로 길항미생물의 정착력 동태를 조사한바 이식 10일 후에 생물방제균의 밀도는 처리농도에 비하여 감소된 경향을 보였다. 처리 20일 후 부터는 균주간 밀도에 차이를 보였는데 특히 *Trichoderma* sp. K5, *Pseudomonas* sp. 4059 및 *Bacillus* sp. 7079 균주의 밀도가 높게 나타나 이들 균주의 정착력이 다른 균주에 비하여 높은 것으로 나타났다.

4) 영천 청통면 및 경주 서면 포장에서 동일한 균주와 동일한 방법으로 실시한 실험결과를 비교할 때, 길항미생물의 정착력 및 식물체에 미치는 영향이 균주에 따라 유사하게 나타났으며, 고추 역병이 대량 발생하였던 경산 진량면 소재의 포장에서도 균주에 따라 유사한 특성을 나타내었으나 고추역병 방제력이 타지역보다 더욱 뚜렷하게 확인되었다.

5) 시험포장 토양의 물리, 화학적인 성질의 차이에 의한 길항미생물의 정착력 보다는 처리 시기의 기상조건에 따라서는 정착력에 차이가 있는 것으로 생각되었다.

2. 활용 방안

작물의 병해충을 방제하기 위해 사용되고 있는 화학농약의 폐해를 줄이기 위해 식물병원균의 생육을 억제하는 길항미생물들을 이용하는 생물학적방제법의 연구가 국내외에서 활발히 진행되어 왔으나 실제 경작지 토양에서의 길항력 소멸이나 효과적인 전달체계의 미흡으로 많은 문제점이 노출되고 있다.

본 연구에서는 이러한 문제점을 보완하기 위해 해당지역의 기후, 풍토에 장구히 적응되어 온 토착 길항미생물을 각종 길항기작별로 분리, 선발하고 유전공학적으로 육종하여 이를 다시 해당 지역의 토양에 되돌림(feedback) 처리함으로써 경작지 토양내 복원, 우점력이 큰 생물학적 방제법을 개발하고자 하였다.

이를 위해 경북의 경주, 영천, 경산 등지의 지역 토양에서 증미, 황토, 쌀겨 등을 이용하는 새로운 토착미생물 증균채취법을 고안하여 지역 토양에 장기간 우점화되어 있는 토착 길항미생물을 분리하고, 이들을 항생물질 생산성, 가수분해효소 생산성, siderophore 생산성 등 각종 길항기작별로 선발하여, 그 길항기작의 원인이 되는 길항물질을 정제하고 그 물질적 특성을 구명함으로써 조직적인 생물방제 균주의 개발을 가능하게 하였다.

각 길항기작별 토착 길항미생물로부터 각종 길항물질을 단일물질로 정제하여 그 특성을 규명하였고, 생산조건도 밝혔다. 따라서 길항미생물의 균체를 이용하는 생물방제방법 이외에 대량 생산되어 정제된 항진균성 항생물질을 이용하는 생물농약 산업에도 기여할 것으로 기대된다.

또한 선발된 토착 길항미생물들의 길항기능을 유전공학적으로 증강시키거나 부가, 통합하여 다기능적 생물방제균주로 육종함으로써, 복수의 길항균주들을 토양내 처리할 때 일어날 수 있는 길항균주간의 경쟁현상을 제거할 수 있는 새로운 첨단 생물학적 방제법을 개발할 수 있었다.

지역토양에서 선발된 항생물질 생산성 길항세균 *Bacillus subtilis*와 siderophore 생산성 길항세균 *Pseudomonas fluorescens*에 또 다른 길항기작인 urease의 유전자를 유전공학적으로 통합, 부가하여 길항능력을 증강시켰고, 항생물질생산성 길항세균 *Bacillus subtilis*에 chitinase 생산성 유전자를 부가, 병합함으로써 두가지 길항기능을 단일의 토착 길항미생물에서 발현시키는 유전공학적인 육종법을 개발하였으므로 생물방제균 육종의 새로운 장을 열었다고 할 수 있다.

한편 길항미생물들을 실제 경작지 토양내 투입하였을 때 길항균 밀도의 증감이나 근권에서의 우점화 등 토양내 생태학적 동태를 추적할 수 있는 적당한 방법이 없어서 생물학적 방제법 연구에 있어서 큰 문제점이었는데, 본 연구에서 지금까지 알려진 monitoring용 bio-reporter 중 가장 강하다고 알려진 green fluorescence protein (GFP) 유전자를 선발된 siderophore 생산성 생물방제균에 유전공학적으로 도입하여 발현시킴으로서 토양내 길항미생물의 동태 추적을 용이

하게 할 수 있는 새로운 monitoring 방법을 개발할 수 있었다. 따라서 개발된 이 방법을 이용하면 향후 농업용 토양미생물의 생태학 연구에 크게 활용될 것으로 기대된다.

아울러 선발된 길항미생물 *Pseudomonas*에서 길항성 chitinase 유전자를 cloning하여 그 염기배열이나 유전구조까지 밝혔으므로 유전공학적 다기능 생물방제균의 개발은 물론이고 우리 고유의 길항성 유전자원을 확보한 성과라고 생각한다.

또 plasmid vector에 의해 외부 길항유전자가 도입되었을 때 단기간은 별 영향이 없으나 생태계내에 장기간 계대되었을 때 일어날 수 있는 도입 길항유전자의 소실 위험성을 원천적으로 방지하기 위해, 생물방제균의 염색체내에 외부 길항유전자를 병합하여 영구히 안정하게 계승할 수 있는 방법을 integration vector를 이용하여 확립하였으므로 새로운 첨단 생물방제균 육종법을 개발했다고 할 수 있다.

*In vitro*에서 분리된 토착 길항미생물 중 *in vivo* 상태에서 병발생 억제능력이 확인된 균주를 이용하여 실제 경작지내에서 활용하기 위해서는 적절한 전달처리 방법의 확립이 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 최근 종자산업에서 활발히 응용되고 있는 종자의 프라이밍 처리방법과 연관지어 길항미생물을 종자에 coating하는 방법을 확립하였다. 길항미생물의 종자 coating처리시 가장 큰 문제점은 coating한 미생물의 활력 유지라 할 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 미생물의 활력유지에 가장 적절한 coating 재료와 binder를 선정하여 최적의 coating 방법을 개발하였다. 개발된 방법에 의해서 길항미생물을 고추종자와 참깨종자에 coating 처리시 길항미생물의 활력이 1년간 유지되었을 뿐만 아니라 종자의 발아에도 전혀 영향을 미치지 않았다. 또한 coating 처리한 종자를 고추역병이 이병된 토양에 과중하였을 때 병발생이 억제됨이 확인되어 길항미생물을 종자에 coating 처리하여 특히 유묘기 시기에 문제가 되는 토양전염성병을 방제할 수 있는 효과적 전달체계법을 개발하였고 할 수 있다.

길항미생물을 경작지에 직접 처리하였을 때 질병발생 억제력의 유지는 생물학 적방제에 있어서 가장 중요한 과제라 할 수 있다. 이를 위해 지금까지의 많은 연구는 길항미생물의 제제화와 처리시 각종 유기물의 혼합방법에 의해 정착능력과 질병발생 억제력을 향상시키고자하는 방향으로 진행되어 왔으나 실제 농가에서 활용하고자할 경우 많은 문제점이 있었다.

따라서 본 연구에서는 농가에서 가장 용이하게 사용할 수 있으며, 제품화시킬 경우 가장 저렴한 비용으로 생산할 수 있을 뿐만 아니라 활력이 장기간 유지될 수 있는 방법을 개발하고자 수돗물로 세척하여 가용성 물질이 전혀 함유되어 있지 않은 모래에 길항미생물을 배양하여, 이를 상토와 직접 혼합하여 사용할 수 있는 새로운 전달방법을 개발하였다. 실제 개발한 이 방법을 사용하여 선발된 길항미생물을 직접 경작지에 처리하였을 때 토양내 정착 능력이 우수하고 고추역병에 대한 억제효과가 매우 높은 결과를 얻을 수 있었다. 특히 고추역병에 대해

억제효과가 높았던 균주는 지역의 서로 다른 3곳의 실험포장에서 모두 높은 정착력을 보여 실제 농가에서 활용화할 수 있는 가능성을 제시하였다.

이러한 경작지 포장실험의 결과를 토대로 현재 식물영양제 및 비료 등을 주로 생산하고 있는 경북 경산시 소재의 주식회사 대유와 농가보급용 제품을 개발하기로 합의하였고, 현재 *Trichoderma* sp. K5 균주와 *Bacillus* sp. 7079는 제형화 단계에 있으며 대량 산업화할 수 있는 미생물제제를 개발하여 1999년 1년 동안 미생물제제의 등록 조건에 맞게 포장실험을 실시하여 역가를 재확인한 후 정식으로 등록하여 상업적 생산을 할 예정이다.

또한 항생물질 생산성 길항세균 *Bacillus* sp. 3034 균주도 경북 포항시 소재 주식회사 비왕산업에서 자체 포장실험을 통해 그 방제력을 인정하여 1998년 12월 1.5 ton 규모의 시제품 생산을 동의하였으며 시제품에 의한 농가 포장내 방제력 검증을 거쳐 향후 상업적으로 생산할 예정이다.

따라서 3년간 수행된 본 연구에서 개발된 토착 길항미생물에 의한 새로운 환경보존형 생물방제법은 향후 실제 농가에 활용, 보급될 수 있는 개연성이 충분하다고 생각되며, 선발된 각 기작별 생물방제균과 육종된 생물방제균들을 이용해 보다 진보된 첨단적 생물방제법의 실현이 가능하게 될 것으로 생각된다.

SUMMARY

In order to relieve the abuses of chemical pesticide, the researches of biological control with the antagonistic microorganisms which are applied for the reduction of phytopathogen have been carried out by many relative scientists. But the biological control strategies have met the several problems which are caused by rapid elimination of antagonistic ability and insufficient of useful delivery system in the soil.

In this study, we were going to try to solve these limitation of recent biological control researches by the selection of indigenous antagonistic microorganisms and the genetic breeding of multi-functional biocontrol agent.

The promising indigenous antagonistic microorganisms which can suppress several phytopathogenic fungi were selected by the unique selection method using steamed rice, rice bran and yellow soil in the areas of Kyongju, Youngcheun and Kyongsan.

The selected antagonistic microorganisms had been confirmed the several antagonistic mechanisms which include parasitism by hydrolizing enzymes, antagonism by antifungal antibiotics and competition by siderophore producing ability.

The antagonistic strain were identified as *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescense*, *Serratia proteamaculans*, *Actinomyces* sp. by their fatty acid analysis, physiological, cultural and morphological characteristics. Also, two strains of antagonistic fungi were identified as *Trichoderma* sp. and *Penicillium* sp. by their morphological characters.

We had purified the antagonistic substances from selected indigenous biological control agent, *Bacillus subtilis* 4016 and had confirmed MW 110~150 of polyhydroxymethyl like substance.

From the selected antagonistic *Serratia proteamaculans*, and *Pseudomonas* sp., we had purified the chitinases which were main factor

for antifungal degradation of phytopathogenic fungi *Fusarium solani* and *F. oxysporum*. The enzymatic characteristics of purified chitinases had the pH 5.0, 7.5 of optimal reaction pH, 45°C of optimal temperature and 45,000 dalton, 62,000 dalton of molecular weights, respectively.

Pseudobactin of siderophore had been purified from antagonistic *Pseudomonas fluorescence* GL7 as an antifungal substance which can suppress the growth of phytopathogenic fungi, *Fusarium solani*.

For the development of multi-functional antagonistic biocontrol agent, we had introduced the urease gene of *Bacillus pasteurii* and chitinase gene of *Serratia proteamaculans* into the other antagonistic *Bacillus subtilis* which can produce antibiotic with several genetic engineering techniques such as short-gun cloning, polymerase chain reaction, *in vitro* packaging, and chromosome integration vector system.

Thesedays, many soil microbiologist and microbial ecologist have studied about the monitoring techniques for the tracking the useful microorganisms in the field soil by bio-report gene such as green fluorescent protein(GFP) gene or bio- luminesces(*lux*) gene.

So, we were going to introduce the GFP gene into the chromosome of the siderophore producing antagonistic *Pseudomonas fluorescence* GL7 by transposon conjugation . Consequently, we were able to development the monitoring strain *P. fluorescens* GL7-GFP which can emit green fluorescent light in the fluorescent microscope by incorporation of GFP gene in the chromosome DNA of the selected antagonistic *P. fluorescens* GL7.

In the future, this monitoring technique of GFP introducing bacterium will be very useful method for the tracking of biocontrol agents in the field soil. From the one strain of the chitinase producing antagonistic *Pseudomonas* sp., 3098 the chitinase gene was cloned by short gun cloning and done sequencing their nucleotide sequences. And also, we were able to introduce the chitinase gene into chromosome DNA of the antagonistic *Bacillus subtilis* SH14 which can produce antifungal antibiotic

in using the integration plasmid vector. This result mean that the introduced foreign antagonistic gene can keep the synergic biocontrol ability with the existing antagonistic function without any disappearance of the acquired additional antifungal activity.

In the biological control of plant disease, delivery system of antagonistic microorganisms is a very important factor to keep their disease suppressive ability. To develop the excellent delivery system of antagonistic microbe to the field soil, the seed coating of selected antagonistic strain had been accomplished with several binders and carriers such as perlite, peat and CMC.

The coated antagonistic microorganisms on the seed were kept the their viable ability after one year storage. So, our formulation of seed coating was very useful delivery system for the biological control of soil-borne plant disease.

In order to confirm the biocontrol activity of the antagonistic microbes, we had measured the *in vivo* field test with selected antagonistic strain in the red-pepper field of Kyonsan, Yungchoen and Kyongju area. In this field test, we were aware of the good-efficacy for the reduction of red-pepper plague by the selected and mutated our antagonistic microorganisms.

Therefor we are able to insist upon that the biological control method by selected indigenous antagonistic microorganisms and genetically engineered strains is the very useful environmental phytopathogen control alternative strategy without harmful chemical fungicides.

CONTENTS

Chapter 1. General Introduction	37
Chapter 2. Selection and genetic breeding of indigenous antagonistic microorganisms	46
I. Introduction	46
II. Materials and Methods	49
1. Isolation and selection of indigenous antagonistic microorganisms	49
A. Enrichment, collection and isolation of indigenous antagonistic microorganism	49
1) Enrichment and collection of indigenous antagonistic microorganisms	49
2) Isolation and of indigenous antagonistic microorganisms	49
3) Confirmation of their biocontrol ability from indigenous antagonistic microorganisms	49
B. Selection of each indigenous antagonistic microorganisms by their antifungal mechanisms	49
1) Selection of chitinase-producing antagonistic bacteria	49
2) Selection of antibiotic-producing antagonistic bacteria	50
3) Selection of siderophore-producing antagonistic bacteria	50
4) Selection of antagonistic fungi	53
5) Selection of antibiotic producing antagonistic actinomycetes	54
6) Selection of protease inhibitor-producing antagonistic actinomycetes ..	55
2. Purification and characteristics of antagonistic substances	56
A. Purification and characteristics of extracellular lytic enzymes	56
1) Chitinase of <i>Pseudomonas</i> sp. 3098	56
2) Chitinase of <i>Serratia</i> sp. 3095	59
B. Purification and characteristics of antifungal antibiotics	62
1) Antibiotic of <i>Bacillus</i> sp. 4016	62
2) Antibiotic of <i>Pseudomonas</i> sp. 2112	65

C. Purification and characteristics of antifungal siderophore	68
D. Purification and characteristics of antifungal antibiotic from <i>Actinomyces</i> sp. KH-28	69
F. Purification and characteristics of protease inhibitor from <i>Streptomyces cyaneus</i> KH-1	70
3. Identification of indigenous antagonistic microorganisms	71
A. Identification of selected antagonistic bacteria	71
B. Identification of selected antagonistic actinomycetes	71
C. Identification of selected protease inhibitor-producing <i>Streptomyces</i> ...	71
4. Genetic development of antagonistic microorganisms as multi-functional biocontrol agents	75
A. Genetic breeding of antagonistic microorganism by NTG mutagenesis	75
1) Enhanced biocontrol efficacy of siderophore-overproducing mutant	75
B. Construction of foreign antagonistic gene introduction system	75
1) Genetic integration by fungal cell fusion	75
C. Introduction of foreign antifungal genes into antagonistic microorganism	76
1) Induction of a chitinase gene into antibiotic-producing microorganism	76
2) Induction of a urease gene into antibiotic-producing microorganism ...	79
3) Induction of a urease gene into siderophore-producing microorganism	80
5. Establishment of reliable stability of foreign antagonistic genes by chromosomal integration	81
A. Integration of a chitinase or urease gene into chromosomal DNA of antagonistic microorganisms	81
6. Monitoring of antagonistic microorganism by induction bio-reporter genes for the tracking after introduction of them into soil ecosystems	82
III. Results	84
1. Isolation and selection of indigenous antagonistic microorganisms	84
A. Enrichment, collection and isolation of indigenous antagonistic microorganism	84
B. Selection of each indigenous antagonistic microorganisms by their	

antifungal mechanisms	87
1) Selection of chitinase-producing antagonistic bacteria	87
2) Selection of antibiotic-producing antagonistic bacteria	90
3) Selection of siderophore-producing antagonistic bacteria	93
4) Selection of antagonistic fungi	103
5) Selection of antibiotic producing antagonistic actinomycetes	108
6) Selection of protease inhibitor-producing antagonistic actinomycetes	113
2. Purification and characteristics of antagonistic substances	116
A. Purification and characteristics of extracellular lytic enzymes	116
1) Chitinase of <i>Pseudomonas</i> sp. 3098	116
2) Chitinase of <i>Serratia</i> sp. 3095	129
B. Purification and characteristics of antifungal antibiotics	138
1) Antibiotic of <i>Bacillus</i> sp. 4016	138
2) Antibiotic of <i>Pseudomonas</i> sp. 2112	150
C. Purification and characteristics of antifungal siderophore	153
D. Purification and characteristics of antifungal antibiotic from <i>Actinomyces</i> sp. KH-28	171
E. Purification and characteristics of protease inhibitor from <i>Streptomyces cyaneus</i> KH-1	176
3. Identification of indigenous antagonistic microorganisms	194
A. Identification of antagonistic microorganisms	194
1) Identification of selected antagonistic Bacteria	194
2) Identification of selected antagonistic Actinomycetes	196
3) Identification of selected protease inhibitor-producing <i>Streptomyces</i>	201
4. Genetic development of antagonistic microorganisms as multi-functional biocontrol agents	213
A. Genetic breeding of antagonistic microorganism by NTG mutagenesis	213
1) Enhanced biocontrol efficacy of siderophore-overproducing mutant	213
B. Construction of foreign antagonistic gene introduction system	216
1) Genetic integration by fungal cell fusion	216

C. Introduction of foreign antifungal genes into antagonistic microorganism	216
1) Introduction of a chitinase gene into antibiotic-producing microorganism	216
2) Introduction of a urease gene into antibiotic-producing microorganism	223
3) Introduction of a urease gene into siderophore-producing microorganism	241
5. Establishment of reliable stability of foreign antagonistic genes by chromosomal integration	245
A. Integration of a chitinase or urease gene into chromosomal DNA of antagonistic microorganisms	245
6. Monitoring of antagonistic microorganism by induction bio-reporter genes for the tracking after introduction of them into soil ecosystems	249
A. Induction of a plasmid vector containing a GFP gene into <i>B. subtilis</i> SH14	249
B. Induction of a plasmid vector containing a GFP gene into <i>P. fluorescens</i> GL7	252
C. Integration of a GFP gene into chromosomal DNA of <i>P. fluorescens</i> GL7	258
D. Integration of a GFP gene into chromosomal DNA of <i>P. fluorescens</i> LS20	260

Chapter 3. Delivery system and application of indigenous antagonistic microorganisms in field soils

I. Introduction

II. Materials and Methods

1. Biocontrol ability and delivery system of antagonistic microorganisms in soils

A. Biocontrol ability of antagonistic microorganisms and genetically

developed microorganisms in soils	265
B. Activity and antibiotic resistance of antagonistic microorganisms	265
C. Effects of antagonistic microorganisms on plants	266
D. Delivery system of antagonistic microorganisms in soils	266
E. Seed Coating of antagonistic microorganisms	266
2. Establishment of biocontrol methods in field soils	269
A. Test plants	269
B. Antagonistic microorganisms	270
C. Culture and treatment of antagonistic microorganisms	270
D. Arrangement of test materials	271
E. Identification of biocontrol ability	271
F. Investigation of soil characteristics	271
G. Delivery system and density variation of antagonistic microorganisms	273
H. Effects of antagonistic microorganisms on plant growth	273
3. Practical use of biocontrol methods in environmental agriculture	273
A. Test plants	274
B. Antagonistic microorganisms	274
C. Culture and treatment of antagonistic microorganisms	274
D. Arrangement of test materials	275
E. Identification of biocontrol ability	275
F. Delivery system and density variation of antagonistic microorganisms	275
III. Results	276
1. Biocontrol ability and delivery system of antagonistic microorganisms in soils	276
A. Biocontrol ability of antagonistic microorganisms and genetically developed microorganisms in soils	276
B. Activity and antibiotic resistance of antagonistic microorganisms	280
C. Effects of antagonistic microorganisms on plants	284
D. Delivery system of antagonistic microorganisms in soils	288

2. Establishment of biocontrol methods in cultivated soils	290
A. Biocontrol ability of antagonistic microorganisms and genetically developed microorganisms in soils	290
B. Delivery system of antagonistic microorganisms in soils	301
3. Practical use of biocontrol methods in environmental agriculture	307
A. Physico chemical properties of tested field soil	307
B. Disease suppress of antagonistic microorganisms	308
C. Effects of antagonistic microorganisms on plant growth	309
D. Ecological dynamics of antagonistic microorganisms in the soil	310
Chapter 4. Results and Discussion	312
Chapter 5. Reference	321

목 차

제 1 장 서 론	37
제 2 장 토착길항미생물의 선발 및 유전공학적 육종	46
제 1 절 서 설	46
제 2 절 재료 및 방법	49
1. 토착길항미생물의 분리 및 선발	49
가 지역 토양내에서의 토착길항미생물의 증균, 채취 및 분리	49
1) 토착길항미생물의 증균, 채취	49
2) 토착길항미생물의 분리 배양	49
3) 토착길항미생물의 방제력 검증	49
나. 길항기작별 토착길항미생물의 선발	49
1) Chitinase 생산성 길항미생물의 선발	49
2) 항생물질 생산성 길항미생물의 선발	50
3) Siderophore 생산성 길항균주의 선발	50
4) 길항진균의 분리	53
5) 항진균성 길항 방선균의 선발	54
6) Protease inhibitor 생산성 길항방선균의 분리 및 선발	55
2. 길항미생물의 길항기작 구명, 정제 및 물질동정	56
가. 식물병원성 진균의 외막가수분해 효소의 정제 및 특성조사	56
1) <i>Pseudomonase</i> 유래 chitinase	56
2) <i>Serratia</i> 유래 chitinase	59
나. 항진균성 항생물질의 정제와 특성조사	62
1) <i>Bacillus</i> sp. 4016이 생성하는 항생물질	62
2) <i>Pseudomonase</i> sp. 2112가 생성하는 항생물질	65
다. 길항물질 siderophore의 정제 및 특성조사	68
라. 방선균이 생산하는 항진균성 항생물질의 정제 및 특성조사	69
마. 방선균이 생산하는 protease inhibitor의 정제 및 특성조사	70
3. 토착 길항미생물의 분류학적 동정	71

가. 길항성 세균 및 방선균의 동정	71
1) 길항성 세균의 동정	71
2) 항진균성 길항방선균의 동정	71
3) Protease inhibitor 생산 방선균의 동정	71
4. 다기능 생물방제균주의 유전공학적 개발	75
가. 돌연변이에 의한 방제력 증강균주의 육종	75
1) Siderophore 생산성 증강 변이주의 유전적 육종	75
나. 외부 길항유전자 도입 system 구축	75
1) Fungal cell fusion에 의한 길항유전자 통합	75
다. 외부 길항기작 유전자의 도입에 의한 유전공학적 육종	76
1) 항생물질 생산성 길항 균주에 Chitinase gene 도입	76
2) 항생물질 생산성 길항균주에 urease gene의 도입	79
3) Siderophore 생산성 길항균주에 urease 유전자 gene의 도입	80
5. 도입하는 외부유전자의 염색체 병합에 의한 길항유전자의 안정성 확보	81
가. Plasmid vector에 의한 chitinase gene 및 urease gene의 chromosome integration에 의한 안정성 제고	81
6. 생물방제균내 bio-report gene의 유전적 도입에 의한 생태학적 monitoring 방법 개발	82
제 3 절 실험 결과	84
1. 토착길항미생물의 분리 및 선발	84
가 지역 토양내에서의 토착길항미생물의 증균, 채취 및 분리	84
나. 길항기작별 토착길항미생물의 선발	87
1) Chitinase 생산성 길항미생물의 선발	87
2) 항생물질 생산성 길항미생물의 선발	90
3) Siderophore 생산성 길항균주의 선발	93
4) 길항진균의 분리	103
5) 항진균성 길항 방선균의 선발	108
6) Protease inhibitor 생산성 길항방선균의 분리 및 선발	113
2. 길항미생물의 길항기작 구명, 정제 및 물질동정	116
가. 식물병원성 진균의 외막가수분해 효소의 정제 및 특성조사	116
1) <i>Pseudomonase</i> 유래 chitinase	116

2) <i>Serratia</i> 유래 chitinase	129
나. 항진균성 항생물질의 정제와 특성조사	138
1) <i>Bacillus</i> sp. 4016이 생성하는 항생물질	138
2) <i>Pseudomonase</i> sp. 2112가 생성하는 항생물질	150
다. 길항물질 siderophore의 정제 및 특성조사	153
라. 방선균이 생산하는 항진균성 항생물질의 정제 및 특성조사	171
마. 방선균이 생산하는 protease inhibitor의 정제 및 특성조사	176
3. 토착 길항미생물의 분류학적 동정	194
가. 길항성 세균 및 방선균의 동정	194
1) 길항성 세균의 동정1)	194
2) 길항 방선균의 동정	196
3) Protease inhibitor 생산 방선균의 동정	201
4. 다기능 생물방제균주의 유전공학적 개발	213
가. 돌연변이에 의한 방제력 증강균주의 육종	213
1) Siderophore 생산성 증강 변이주의 유전적 육종	213
나. 외부 길항유전자 도입 system 구축	216
1) Fungal cell fusion에 의한 길항유전자 통합	216
다. 외부 길항기작 유전자의 도입에 의한 유전공학적 육종	216
1) 항생물질 생산성 길항 균주에 Chitinase gene 도입	216
2) 항생물질 생산성 길항균주에 urease gene의 도입	233
3) Siderophore 생산성 길항균주에 urease 유전자 gene의 도입	241
5. 도입하는 외부유전자의 염색체 병합에 의한 길항유전자의 안정성 확보	245
가. Plasmid vector에 의한 chitinase gene 및 urease gene의 chromosome integration에 의한 안정성 제고	245
6. 생물방제균내 bio-report gene의 유전적 도입에 의한 생태학적 monitoring 방법 개발	249
가. <i>B. subtilis</i> SH14에 GFP 유전자의 도입	249
나. <i>P. fluorescens</i> GL7 에 GFP의 유전자의 도입	252
다. <i>P. fluorescens</i> GL7 chromosome에 GFP gene integration	258
라. <i>P. fluorescens</i> LS20 chromosome에 GFP gene intergration	260

제 3 장 토착길항미생물의 토양내 전달체계 및 경작지 적용	262
제 1 절 서 설	262
제 2 절 재료 및 방법	265
1. 생물방제균의 토양내 방제력 및 전달체계	265
가. 선발 생물방제균주 및 육종균주의 토양내 방제력 조사	265
나. 길항미생물의 역가 및 약제저항성 조사	265
다. 길항미생물의 식물체에 미치는 영향 조사	266
라. 생물방제균의 토양내 전달체계 조사	266
마. 길항미생물의 coating처리	266
2. 경작지에서의 생물학적 방제법의 확립	269
가. 식물재료	269
나. 공시 길항미생물	270
다. 길항미생물의 배양 및 처리	270
라. 시험구 배치	271
마. 방제력 검증	271
바. 토양 특성의 조사	271
사. 길항미생물의 전달체계 및 밀도 변화	273
아. 길항미생물의 식물체 생장에 미치는 영향	273
3. 환경농업에서의 생물방제법의 실용화	273
가. 식물재료	274
나. 공시 길항미생물	274
다. 길항미생물의 배양 및 처리	274
라. 시험구 배치	275
마. 방제력 검증	275
바. 길항미생물의 전달체계 및 밀도 변화	275
제 3 절 실험 결과	276
1. 생물방제균의 토양내 방제력 및 전달체계	276
가. 선발 생물방제균주 및 육종균주의 토양내 방제력 조사	276
나. 길항미생물의 역가 및 약제저항성 조사	280
다. 길항미생물의 식물체에 미치는 영향 조사	284

라. 생물방제균의 토양내 전달체계 조사	288
2. 경작지에서의 생물학적 방제법의 확립	290
가. 선발 방제균주 및 육종균주의 토양내 방제력 조사	290
나. 토양에서 생물방제균의 토양전달체계	301
3. 환경농업에서의 생물방제법의 실용화	307
가. 실험포장의 물리·화학적 성질	307
나. 길항미생물의 병발생억제효과 검증	308
다. 길항미생물의 식물체 생장에 미치는 영향	309
라. 길항미생물의 동태 조사	310
제 4 장 결과 요약 및 고찰	312
제 5 장 참고 문헌	321

여 백

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 필요성

UR타결과 WTO 체제로 인한 국내 농업의 위축이 점차 현실화되고 있는 이 때 우리 농산물의 품질향상과 안전성을 제고하여 외국산 농산물과 차별화해야 될 필요성이 시급하며, 농작물 재배를 위해 무분별하게 사용되는 맹독성 화학농약에 의해 야기되는 심각한 농산물 오염과 자연생태계 파괴를 반드시 막아야 만 되는 절박한 시점에 와 있다. 1990년도 일년간 우리 나라의 화학농약 생산량을 보면 활성 성분량 기준으로 26,610톤으로 금액으로는 562종 3,682억원이나 되며, 수입량도 41,341톤으로 금액으로는 2,099억원이나 된다(1). 이 많은 맹독성 화학합성농약을 전국의 경작지에 매년 퍼부어 넣는다면 멀지 않은 장래에 우리의 식품과 우리의 생활환경과 우리의 상수원이 극도로 악화된다는 것은 자명한 일이다.

이러한 심각한 이유로 지금까지 무비판적으로 사용되어왔던 유해한 화학농약을 사용하지 않는 환경친화적인 유기·자연농업의 필요성이 자연스레 대두되었으며 일부에서는 이미 시험적으로 시행되고 있다. 심지어 선진국 독일이나 스위스 등지에서는 5 ha 이상의 농지를 유기농법 경작으로 전환할 때는 5,000 DM 또는 4,000 SF씩이나 지원도 하고 있다. 그러나 무화학농약의 유기농법은 일부 성공도 하고 있지만 수확량의 감소, 출하금액의 감소, 생산비 증가 등의 문제점(2)으로 인하여 화학농약 사용의 재배방법을 고수하는 관행농업에 의해 끈질기게 비판을 받고 있다.

따라서 무농약 농법의 취약점을 해결하기 위해 맹독성 화학농약 사용 대신에 미생물의 생산물질이나 미생물 그 자체를 이용하는 환경보전형 생물학적 방제법(Biological Control)의 필요성이 필연적으로 대두되었다(3-9). 우리 나라에서 생물학적 방제의 시작은 1970년 인삼의 근부병 원인균인 *Fusarium solani*에 대한 *Streptomyces* sp.의 길항효과를 조사한 연구에서 비롯된다. 그 후 1980년대에 들어서면서 몇몇 연구자들이 생물학적 방제연구에 참여하였으나 일부 시설원에 이외에는 실용화하기에 아직도 미흡한 점이 많다고 하겠다(10).

식물 병충해에 의한 각종 작물 생산의 손실은 세계적으로 전체 작물 생산량의 12%에 달하나 그 중에서 20% 정도만이 토양선충과 세균에 의한 손상이고 나머지 대부분은 식물병원성 진균에 의해 발병된다(11). 따라서 세균에 의한 식물병해의 방제 필요성보다는 진균성 식물병원균의 방제 필요성이 훨씬 시급하다고 할 수 있다. 지금까지는 정영륜등(11) 진균방제용 화학농약이 주로 사용되어 왔으나 위에서 소개한 여러 가지 폐해로 계속 사용에 한계점이 있다. 이러한 시점에서 환경 친화적인 진균병 방제용 생물학적방제 방법의 개발이 필연적이다.

식물근부균 등 식물병원성 진균에 대한 길항미생물의 생물방제기작은 아래 설명과 그림 1 과 같이 크게 3가지로 구분될 수 있다. 즉

1) *Streptomyces* sp.(12), *Arthrobacter* sp.(13), *Trichoderma harizianum*(14), *Trichoderma hamatum*(15), *Myrothecium verrucaria*(16), *Serratia marcescens*(17), *Pseudomonas stutzeri*(18), *Bacillus circulans*(19) 등이 분비하는 식물병원균 외막 가수분해효소인 chitinase, β -1,3-glucanase에 의해 식물병원균의 세포벽을 분해하는 parasitic 길항작용과,

2) *Streptomyces griseus*(20), *Streptomyces blastmyces*(21), *Streptomyces kasugaensis*(22), *Penicillium nigricans*(23), *Bacillus subtilis*(24) *Pseudomonas* sp.(25) 등이 생산하는 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해하는 항생작용(antibiosis)과,

3) Plant growth promoting rhizobacteria(PGPR)로 알려진 *Pseudomonas* sp.(26) 등이 분비하는 철(Fe^{3+}) 특이결합물질인 siderophore에 의해 식물병원균의 생육이 저해되는 경쟁적 길항작용(Competition)으로 나누어 볼 수 있다.

이러한 배경과 필요성에 따라서 본 연구진에서는 수년전부터 진균성 식물병원균의 방제를 위해 각 방제기능별 길항미생물 이용 생물방제법 연구를 수행해 왔다 (18,27-33,47-50).

그러나 특성이 상이한 여러 종류의 기능별 생물방제균이 동시에 동일 토양내에 전달되었을 경우 각각의 길항기능을 발휘하며 우점, 토착화되어 증식하기 위해서는 생육조건 불일치 등 여러가지 문제가 야기될 수 있다. 따라서 가능한 해당 환경에 쉽게 우점화될 수 있는 단일 내지 극소수의 토착 길항균주내에 여러가지 길항기능을 유전적으로 부가, 통합하는 유전공학적 육종에 의한 생물방제 기술개발이 필연적이라고 할 수 있다.

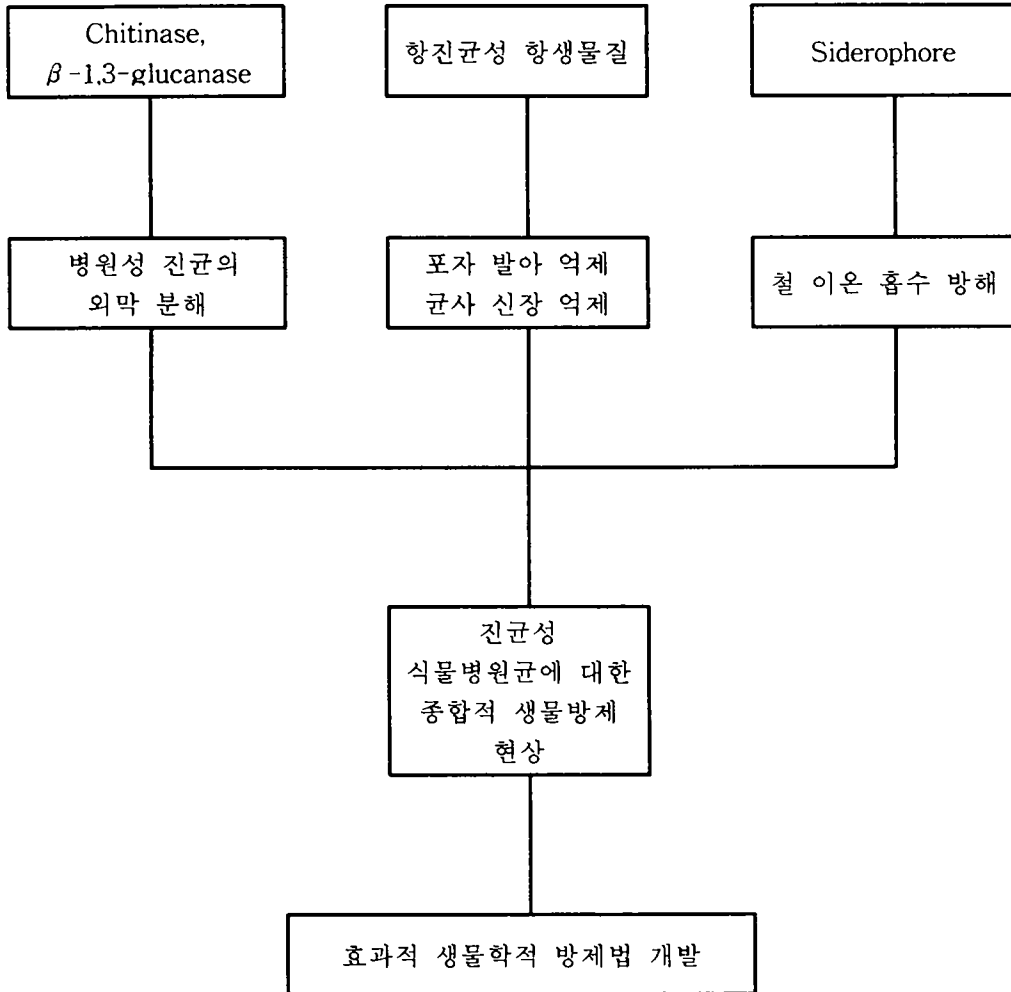


그림 1. 길항미생물에 의한 진균성 식물병해의 생물학적방제 기작

1. 기술적 측면

최근 농산물 시장개방에 따라 점차 늘어가는 수출입 농산물의 안전성을 보장하고 환경생태계 보호와 인류건강의 담보를 위해 화학농약 사용의 규제가 강력히 요구되고 있으므로 앞으로 농작물의 병충해 방제를 위해서는 생물농약이나 생물학적 방제법의 비중이 점차 높아질 전망이다. 따라서 안전하고 지속적인 생물학적 방제방법의 모색을 위해 최근에는 길항미생물을 이용하여 식물의 병충해를 방제하려는 환경보전형 생태학적 생물방제법의 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중에서 ① 항진균성 항생물질 ② 외막 가수분해효소(Chitinase, β -1,3-glucanase), ③ 철이온(Fe^{3+}) 특이 결합물질(Siderophore) 등을 생산하는 길항균주를 이용하는 생물학적 방제법이 중점적으로 연구되고 있다.

길항미생물을 이용하는 생물학적 방제법의 연구 추세는 ① 길항균주의 항균물질을 농업용 항생제로써 이용하는 방법과, ② 각 기능별 방제력이 강력하고 토양내 정착능력이 우수한 길항미생물을 선발, 배양하여 토양내에 직접 투입하는 방법으로 대별된다. 그러나 토양환경 변화를 보완하고 총체적인 길항력을 나타내어 효과적인 방제효과를 얻기 위해서는 방제기능이 다른 여러 종의 유용 길항미생물을 병용함으로써 식물병원균에 대한 완전한 방제효과를 높일 수 있다. 특히 생육 특성이 각기 다른 다수의 길항균주가 특정환경에서 투입되어 동시에 적응하여 우점화되기는 매우 힘든 실정이다.

따라서 동일공간에서 동시에 이러한 병용효과를 얻기 위한 또 다른 방법으로는 여러가지 길항 기능을 한 균주내에서 동시에 발휘하는 다기능성 생물방제균을 육종개발하여 특정 토양환경에 우점, 토착화되기 용이하도록 할 필요가 있으며, 그 목적을 달성하기 위하여 기능별로 선발된 방제균주간의 길항기능을 유전공학적 기법으로 부가, 통합하는 것이 필연적이다.

또한 현재 생물방제에 큰 문제가 되는 길항미생물의 근권 정착능력과 환경내 생존력을 안정화시키고 실제 현장 경작지내에서 실용화하기 위해서는 그 해당지역의 기후풍토와 토양조건에 토착화되어 있는 재래의 토착 길항균주를 대상으로 우선 선발, 육종해야 되고, 이들이 토양내에서 쉽게 우점화될 수 있는 새로운 전달체계방안을 연구해야 할 필요가 있다. 아울러 우리나라 토양에 알맞는 유용 길항유전자를 가지는 토착 미생물의 자원화를 도모할 필요성도 있다.

2. 경제와 산업적 필요성

경상북도는 곡류, 과일, 채소 등 각종 농작물의 최대 생산지(전국 경작지의 16.2%)이며 농민의 인구도 903,000명으로 전국 농민의 16.7%를 상회한다.

고추, 사과 등 주요 농산물의 재배면적과 수확량이 가장 큰 지역인 경상북도 지역에 1990년도 기준으로 살균제만 연간 4,000여 톤(활성 성분량 기준)이 각종 경작지에 투여되어 금액으로 환산하여도 600억원 넘게 소모되고 있는 실정이다(1). 특히 경상북도 주산물인 고추의 가장 치명적인 역병과 탄저병을 방제하기 위해 거의 모든 화학 살균제가 사용된다(표 2 참조).

표 1. 경상북도의 작물 수확량 및 경작면적 (전국 최대품목)
(1993년 기준)

		재 배 면 적		수 확 량	
		ha	전국비(%)	톤	전국비(%)
과 실	사 과	36,021	68.9	415,530	67.5
	복 승 아	4,784	45.4	60,326	48.9
	포 도	7,084	41.7	61,772	37.7
채 소	건 조 고 추	23,158	27.2	51,815	27.7
	참 외	5,007	54.2	148,232	64.0
특 용 작 물	참 개	10,221	22.0	3,066	18.8

표 2. 경상북도의 역병 및 탄저병 방제용 화학살균제 사용실태

	역병용 살균제	탄저병용 살균제	계
제품량 (kg)	1,082,365	6,994,080	8,076,445
유효성분량 (kg)	253,086	4,985,184	5,238,270
금액 (천원)	7,754,600	55,363,513	63,118,113

위의 예와 같은 화학농약 소비에 따른 경제적인 피해는 직접적으로 산출할 수 있지만 이들 화학농약에 오염된 농작물을 섭취함으로써 야기되는 국민건강상의 문제나 토양 악화, 자연생태계 파괴, 상수원 오염 등 간접적 피해까지 감안한다면 화학농약을 사용하는 관행농법의 부작용은 이루 말할 수 없다. 또한 농약 취급시 중독되는 농민건강의 위험성까지 따진다면 하루 빨리 생물방제법을 실용화하여 농민의 건강과 자연환경이 보전될 수 있는 환경보전형 농법의 개발이 시급하다.

물론 지금까지 사용하던 농약을 전혀 사용하지 않는다면 농작물 수확은 다소 감소하겠지만, 토착길항미생물을 이용하는 생물 방제법을 중심으로 하는 새로운 병충해 방제방법을 도입함으로써 해당 지역에 적합한 환경보전형, 환경친화형 생물학적 식물질병 방제법을 개발할 필요가 있다. 따라서 계수 가능한 경제적 수치로는 쉽게 계산될 수 없는, 농민과 소비자의 건강을 보호하고 후손에게 생산성이 유지되는 건강한 경작지와 자연환경을 물려주기 위해서도 전혀 새로운 첨단 기법을 도입한 환경조화형 생물방제농법의 개발이 필연적이다(35).

3. 국가 및 사회적 필요성

1992년 6월 「리우」 환경 회의를 계기로, 또 나아가 GR시대의 농산물 생산분야에도 맹독성 화학합성농약의 사용이 크게 규제되리라 추측된다. 그동안 녹색혁명이라는 깃발 아래 화학비료, 화학농약, 단작경영체계(Mono-culture system)를 토대로 한 관행농업기술의 혁신은 농작물 생산율은 비약적으로 향상시켰지만 이로 인해 자연생태계 파괴, 농작물 오염, 토양 황폐화 등 그 부작용은 심각한 상태에 와 있다.

이러한 위험을 해결하기 위해 십 여 년 전부터 화학농약, 화학비료 사용을 최소화하는 저투입 지속적 농업(LISA)방법이 강조되고 있으며 심지어 네덜란드에서는 2000년까지 화학농약과 화학비료의 양을 1990년 기준 50% 이하로 감축하는 국가적

계획을 세운 나라도 있다. 또한 환경보전적인 농작물 생산방법을 적극 권장하고 있는 독일 바이에른 주정부는 무농약 유기농법의 개발과 정착을 위해 주정부 예산의 20%를 투입하고도 있다(36).

국민의 건강을 위해 안전한 농산물 생산과 환경보전형 농법개발에 보다 더 큰 국가적 정책이 필요한 데도 불구하고 우리나라의 농업에 관련된 연구개발비의 증가율은 1976에서 1990년 사이에 연평균 5.9% 상승에 그쳐 공업 등 다른 분야 전체 연구개발비 상승율 22.4%에는 1/4정도에 불과한 실정이었으나 최근 농어촌 발전특별조치법에 의해 농업연구 확대 경향이 다소 완화되었다.

이제는 생산위주의 다른 농업연구도 중요하지만 지속적이고 안전한 농산물 생산을 위해 새로운 첨단기술의 생물방제법을 중심으로 하는 유기·자연농법의 연구와 환경보전형 생태보전형의 생물학적 병충해 방제법 개발 연구의 지원이 시급하다고 생각된다.

다행히 1994년 농림수산부의 농어촌발전대책과 1995년 첨단 농림수산물기술개발 중장기계획에서 환경조화형 농업기술개발의 필요성을 제시하며, 합리적이고 집중적인 실천계획을 세워서 우리농업의 특색을 살린 영농법을 발전시키고 환경농업육성을 위한 첨단기술개발을 지원하기에 이르렀다.

따라서 본 연구에서는 국가적 필요성이 인정되는 환경보전형 자연농업의 주요 핵심기술인 환경보전형 생물방제법의 첨단기법도입과 실용화 방안을 개발하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 목적 및 범위

농작물의 증산을 위해 무분별하게 사용되고 있는 맹독성 화학농약이 환경생태계의 보호나 인류건강의 담보를 위해 그 용도와 용량의 규제가 강력히 요구되고 있으므로, 향후 농작물의 병충해 방제를 위해서는 환경보전적인 생물학적 병해충 방제법이 크게 각광을 받을 것이다. 길항미생물을 이용하는 생물학적 방제, 특히 작물의 토양 전염병의 방제는 토양생태계내에서 서로 다른 두 종류의 미생물간에 일어나는 경쟁현상(competition), 기생 또는 포식관계(parasitism, predation) 나 항생작용(antagonism) 등의 상호작용을 인위적으로 조절, 활용함으로써 가능하게된다.

1970년대 저병해 경작지의 질병억제토양(suppressive soil)이 토양내 미생물들의 길항작용에 의한 것으로 보고된 이후 종합적 병해충 방제방법(IPM)의 일환으로 생물학적 방제법이 활발히 연구되어져 왔으며, 많은 종류의 토양세균, 방선균 및 진균류에 속하는 길항미생물들이 분리되어 생물학적 방제에 활용하기 위해 연구, 개발되어 왔다.

특히 토양전염성 식물병은 화학농약으로도 방제가 매우 어려우며, 병 발생이후에는 치료가 거의 불가능하기 때문에 각종 토양 전염성 식물병원균에 대한 생물학적 방제에 관한 연구가 화학적 방제법의 대안으로 활발히 연구, 개발되고 있다.

이와 같은 생물방제법이 병해방제에 도입될 경우 방제효과가 오랜 기간 동안 지속될 수 있으며, 화학농약 사용에 따른 생태계 파괴, 환경오염, 약해 및 잔류독성의 문제를 크게 줄일 수 있기 때문에 종합적 병해충 방제법의 근간이 되는 주요한 비중과 역할로서 매우 바람직한 환경보전형 방제법이라고 할 수 있다.

길항 미생물을 이용하는 생물학적 방제의 연구 목표로는 실제 경작지 토양에서의 방제력이 우수한 토착 길항미생물을 해당 지역의 재배지 토양에서 직접 선발, 육성하고 이들을 다시 해당지역 경작지에 되돌림(feedback) 처리하여 각종 작물질병의 발생을 억제시키는 우점복원력이 강한 방제 방법의 확립이 무엇 보다 중요하다고 할 수 있다.

따라서 대상 각종 병원균에 대한 길항효과가 강력하면서도 해당지역의 토양내 정착, 우점화 능력이 우수한 토착 길항미생물의 분리, 선발, 육종과 효과적인 전달체계 연구가 생물방제에 열쇠가 되는 매우 중요한 목적이 되어야한다.

아울러 선발된 토착 길항미생물들의 길항기작을 조사하여 이들 길항기작을 증강시키거나, 기작별 길항미생물의 길항능을 유전공학적으로 통합, 부가하여 길항미생물의 토양내 되돌림 처리를 단순, 효율화하는 첨단 생물방제방법 또한 중요한 목적이 되어야 된다고 생각되어진다.

따라서 본 연구개발의 목적과 방향을 다음과 같이 나누어 볼 수 있다.

1. 우리나라 농촌지역, 특히 각 지방 해당지역의 기후, 풍토에 장기간 적응, 토착화 되어 그지역의 토양환경에 복원 우점화되기 용이한 각종 토착 길항미생물들을 분

리, 선발하고, 이 들의 길항물질을 정제하여 그 길항기작들을 길항물질 수준으로 구명하여 각 기작별 우수 토착길항미생물을 육성하고, 해당지역의 경작지 토양에 되돌림 처리함으로써 실현성있는 생물방제법을 개발한다.

2. 선발된 토착 길항미생물들의 생물학적 방제기작의 유전자를 유전공학적으로 통합, 부가, 증강하여 다기능적 단일 생물방제균주로 유전 육종함으로써 여러가지 복수 길항기작의 처리체계를 단순화하여 토양내 전달효과를 향상시키며, 부수적으로 우리 고유의 길항기작 유전자원을 확보한다.

아울러 생물방제균의 토양내 생태학적 동태를 추적(**monitoring**)하기 위하여 **bio-report** 유전자인 **green fluorescence protein (GFP) gene**을 선발된 생물방제균주내 유전공학적으로 도입 발현시킴으로써 새로운 토양내 검증법을 개발하여 첨단적 생물방제법을 시도한다.

3. 길항기작별로 선발된 각 종 토착 생물방제균이나, 육종된 생물방제균을 해당지역 현지 토양내에서 신속히 우점화 되고 그 방제력이 유지될 수 있도록 하기 위해 길항미생물의 식물종자 피막화 등 새로운 전달체계를 구명, 확립함으로써 실용성 있고 경쟁력이 우수한 생물방제균 전달체계를 개발한다.

4. 선발된 생물방제균이나 육종균주의 실제 경작지내 방제력을 구명하기 위해 고추 경작지에서 고추역병을 대상 질병으로 해서 지역별로 그 방제력을 확인, 조사함으로써 개발된 생물방제균주에 의한 생물방제법의 가능성을 보증하고, 아울러 공장 수준의 시판용 생물방제제의 산업화 가능성과 유기, 자연농업 등의 환경농업에의 활용 가능성을 조사한다.

제 2 장 토착길항미생물의 선발 및 유전공학적 육종

제 1 절 서 설

농작물의 병충해 방지를 위해 무분별하게 사용되고 있는 화학농약은 환경생태계의 보호를 위해 그 용도와 용량 규제가 강력히 요구되고 있기 때문에, 향후 농작물의 병충해 방제를 위해서는 환경보전적인 생물학적 방제법이 필연적으로 되어 질 것이다. 길항미생물을 이용하는 생물학적 방제는 생태계내에서 서로 다른 두 종류의 미생물간에 일어나는 경쟁현상(competition), 기생 또는 포식관계(parasitism, predation)나 항생작용(antagonism) 등의 상호작용을 인위적으로 조절, 활용함으로써 가능하게 된다.

1970년대 저병해 경작지의 질병 억제토양(suppressive soil)이 토양내 미생물들의 길항작용에 의한 것으로 보고된(11) 이후 종합적 병해충 방제방법의 일환으로 생물학적 방제법이 활발히 연구되어져 왔으며, 생물방제법 개발을 위해 많은 종류의 토양세균, 방선균 및 진균류에 속하는 길항미생물들이 분리되어 각종 식물질병의 생물학적 방제에 활용하기 위해 연구, 개발되어 왔다.

식물근부병균 등 여러 가지 식물병원성 진균에 대한 길항미생물을 이용한 생태학적 생물방제방법에는 다음과 같이 크게 3가지 형태로 구분될 수 있다. 첫째는 *Streptomyces* sp.(12), *Arthrobacter* sp.(13), *Trichoderma harzianum*(14), *Trichoderma hamatum*(15), *Myrothecium verrucaria*(16), *Serratia marcescens*(17), *Pseudomonas stutzeri*(18), *Bacillus circulans*(19) 등이 분비하는 진균 외막가수분해효소인 chitinase, β -1,3-glucanase에 의해 식물병원균의 세포벽을 분해시키는 용균작용(degradative parasitism), 둘째로는 *Streptomyces griseus*(20), *Streptomyces blastmyces*(21), *Streptomyces kasugaensis*(22), *Penicillium nigricans*(23), *Bacillus subtilis*(24), *Pseudomonas* sp.(25) 등이 생산하는 항진균성 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해시키는 항생작용 (antibiosis), 셋째는 PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) 즉, 대부분 근권 *Pseudomonas* sp.가 분비하는 철(Fe^{3+}) 성분 특이 결합물질인 siderophore에 의해 식물병원균의 생육을 저해하는 경쟁적 길항작용 (competitive antagonism)을 이용한 방제방법이다(26).

Chitin은 N-acetyl-D-glucosamine(Glc NAc)이 β -1,4 결합으로 중합된 고분자물질로서, 게, 새우 등의 갑각류 및 연체류의 껍질과 근육, 그리고 곤충류, 버섯류의 표

피성분으로 유명하나 각종 식물병원성 진균 특히 근부균 *Fusarium* 속 사상균의 세포벽에 주성분으로 함유되어 있으며, 연간 100억톤 정도로 지구상에서 셀룰로오스 다음으로 많이 생산되고 있는 자원이다. 최근 chitin 및 chitin 유도체는 식품산업, 제약산업, 농업 및 환경분야 등 많은 분야에서 이용되고 있다(64-66).

생물방제균의 주요한 길항기작의 하나인 Chitinase(EC 3.2.1.14)는 chitin의 β -1,4-glucosidic 결합을 가수분해하는 효소이며, 작용기작에 따라 β -1,4-glucosidic 결합을 무작위로 절단하는 endo형 chitinase 그리고 chitin 사슬의 비환원성 말단으로부터 절단하는 exo형 chitinase 등이 있으며(67-68), Chitinase의 분리·정제 및 특성에 관한 연구는 국내외적으로 많이 보고되어 있다(68,69).

최근 곰팡이, 세균, 식물체에서의 chitinase의 역할이 규명되면서 이들 사이의 생태적 상호작용에 chitinase가 중요하게 관여하고 있다는 데에 큰 관심을 가지게 되었고, chitinase에 의한 식물병원성 진균이 함유된 chitin 성분의 효소적 분해는 작물의 병해를 막는 생물학적 방제에 효과적인 방법으로 알려져 있다(70,72). 따라서 이러한 목적에 적합한 생물방제력이 있는 길항미생물 유래의 chitinase가 분리·정제되고, 이의 효소적 특성이 조사되어져 오고 있다.

본 연구에서는 생물방제균의 개발에 필요한 길항기작 구명과 다기능 생물방제균의 육종에 필요한 chitinase 유전자원을 마련하고자 *Fusarium solani* 등의 식물병원성 진균의 생육을 억제하는 길항미생물로 선발, 동정된 *Pseudomonas* sp. 3098이 생산하는 chitinase를 분리·정제하였으며, 그 특성을 검토하였다.

또다른 길항기작인 Siderophore는 가용성인 저분자의 ferric iron-chelating 화합물이며 일반적으로 peptide 사슬로 연결된 황록색 (yellow-green)의 색소를 띠는 fluorescent chromophore이다(73-76). 이는 peptide 사슬의 구성과 크기에 따라 크게 2 가지의 구조적 형태로 나누어지는데(77,78), catechol (*o*-dihydroxybenzene)의 유도체로 catechol amides (phenolates, catecholates) 형태와 hydroxamic acid (RCONHOH)의 유도체로 hydroxamates 형태가 있다. Catechol 형태의 siderophore는 enterobactin, parabactin, agrobactin, anguibactin, vibriobactin, azotochelin 등이 있으며, hydroxamate 형태의 siderophore는 ferrichrome, ferrioxamine, coprogen, nocardamine 등이 있다. 또한 최근에 citrate-hydroxamate 형태의 siderophore로 arthrobactin, aerobactin, schizokinen 등이, 그리고 quinoline 형태의 siderophore로 pseudobactin이나 pyoverdin 등이 밝혀져 있다.

자연환경에서 미생물이 필요로 하는 철의 양은 Gram 양성균과 곰팡이의 경우 0.4~4.0 μM 정도, Gram 음성균의 경우 0.3~1.8 μM 정도이다(79). 이러한 대부분의 철은 호기적인 환경하에서 중성이나 알칼리 pH에서 용해상수 (solubility constant)가 $10^{-38.7}$ 정도로(80) 불용성의 ferric- oxyhydroxide polymer [$\text{Fe}(\text{OH})_3$]로 존재하며(81), 그 free ferric iron 농도는 일반적으로 pH 7에서 용해상수 10^{-18} 정도로 매우 낮다고 볼 수 있다(82).

비록 토양에서 철 성분이 전체 무기이온의 1~6%로 풍부하다 할지라도 미생물들이 필요로 하는 철이온의 양은 자신의 생육유지에 충분하지 않으며 모든 토양미생물

들간의 경쟁적 요인이 될 수밖에 없다. 따라서 이러한 철이 부족된 환경 (low-iron stress)을 극복하기 위해 많은 호기성 및 통성혐기성 미생물들은 생육에 필요한 충분한 양의 철을 효과적으로 얻기 위해 특수한 IROMP (iron regulated outer membrane protein)에 의한 high affinity iron transport system (Fig. 1)을 가지고 있어, 철이온 (Fe^{3+})과 친화성이 높고 형광색을 나타내는 저분자량 (주로 400~2,000 daltons)의 가용성인 siderophore를 분비하여 철이온 (Fe^{3+})과 복합체를 형성한 다음, 외막에 있는 cognate-specific receptor에 결합되어 에너지 의존성 과정 (energy-dependent process)에 의해 순차적으로 세포질막을 통해 세포내로 받아들여지게 된다(83). 이러한 high affinity iron transport system과 관련된 siderophore의 생합성과 외막단백질 (outer membrane protein)은 철이온 (Fe^{3+})에 의해 조절되게 된다.

철은 일반적으로 식물병원균의 포자발아 (spore germination)와 발아관 신장 (germ tube elongation)에 필수적인 요인이며, 철이온 농도가 제한받지 않으면 그로 인해 식물 병원균의 생육이 활발하게 되어 식물뿌리 침투 및 감염에 원인이 된다 (43). 따라서 근권 (rhizosphere)에서의 PGPR은 식물뿌리 표면에 군집을 이루어 살며 철이온 흡수의 경쟁에서 우위를 점함으로써 식물병원균의 생육을 억제시키는데, 이는 대부분 fluorescent pseudomonads가 분비하는 siderophore에 의해 뿌리 주변의 철 (Fe^{3+})을 결합 (chelating)하여 식물병원균의 포자발아와 발아관 신장을 억제하는 것으로서 가능하게 된다. 이러한 경쟁적 길항작용은 토양전염병을 감소시키며, 기주식물의 근권 정착능력을 촉진함으로써 작물의 성장을 양호하게 하여 수확량을 증대할 수 있는 아주 효과적인 생물학적 방제방법이라 할 수 있으므로 이들 siderophore 생산성 생물방제균주를 심도있게 조사하였다.

그 외에도 길항미생물이 생산하는 항진균성 항생물질의 물질적 특성 구명과 구체적인 방제기작을 조사함으로써 강력한 생물방제균의 길항력 증강을 도모하였다. 또한 이상의 각종 길항기작을 지역 토양에 복원, 우점능력이 큰 토착길항미생물에 유전공학적으로 도입시켜 우수한 생물방제균으로 육종함으로써 토양내 전달체계가 간편한 다기능 소수균주의 유전공학적인 개발을 가능케 하였다.

이를 위해서는 돌연변이에 의한 전통적 유전 육종방법 이외에 cell fusion 이나 각종 recombinant DNA 기법을 동원하였다.

아울러 지금까지 취약부분으로 생각되어져 왔던 생물방제균주의 토양내 생화학적 추적, 동태연구를 의해 bio report로 유명한 green fluorescence protein (GFP) gene 을 선발된 생물방제균의 chromosomal DNA에 병합시킴으로써 재현성 있는 토양내 monitoring 방법을 개발하고자 하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 토착길항미생물의 분리 및 선발

가 지역 토양내에서의 토착길항미생물의 증균, 채취 및 분리

1) 토착길항미생물의 증균, 채취

지역토양내 우점능, 토착능, 복귀능이 강한 생물방제균을 선발하기위해 해당지역의 저병해 경작지나 인근 대나무밭 토양을 대상으로 증미(steamed rice)에 의한 포집법, 밀기울이나 왕겨, 황토 등에 의한 증균법을 고안하여 토착길항미생물을 채집하였다.

2) 토착길항미생물의 분리 배양

채집시료로부터 세균을 분리 배양하기위해서는 토양추출물을 첨가한 LB 평판배지를 사용하였다. *Bacillus* sp. 분리배양은 시료현탁액을 80℃에서 30~60분간 가열처리한후 희석하여 평판배양하였다. *Pseudomonas* sp. 분리배양은 *Pseudomonas* isolation agar(PIA)를 거쳐 King's medium B 를 사용하였다.

3) 토착길항미생물의 방제력 검증

채집된 각종 토착미생물을 대상으로 *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Phytophthora capsici* 등 식물병원균을 시험균주로 하여 발육저지대 측정법(pairing plate culture), 발육균체량 측정법 (cell mass test), 혼합배양법(dual culture method), Dendroid test등의 *in vitro* 시험을 통하여 길항미생물을 선발하였으며, *in vivo*에서 콩, 오이, 고추 등의 식물을 이용한 시험을 통하여 생물방제력을 확인하였다.

나. 길항기작별 토착길항미생물의 선발

1) Chitinase 생산성 길항미생물의 선발

선발된 길항미생물의 병원성 진균에 대한 길항기작이 chitinase 와 같은 식물병원균의 균체외막을 분해하는 고분자 효소단백물질인가를 조사하기 위해 길항미생물의 배양여액을 ammonium sulfate로 포화시켜 침전, 투석(cellulose dialysis sack, MW 12,000)한 후 그 효소활성도를 chitin, laminarin등을 기질로 조사하였으며, 아울러 시험균주를 이용한 *in vitro* 검증법으로 길항능도 조사하였다. 또한 Amicon centriprep

10 (MW 10,000)에 의해 얻은 고분자물질로도 효소활성도와 길항능을 조사하였다.

2) 항생물질 생산성 길항미생물의 선발

항생물질과 같은 저분자물질에 의한 길항기작을 조사하기 위해 Amicon centriprep 10 (MW 10,000)에 의해 수집한 저분자물질의 길항력을 *Fusarium solani* 등 시험균주를 이용해 pairing culture test, cell mass test, Dendroid test 등으로 조사하였다. 항생물질중 많은것이 내열성이므로 100℃에서 30분간 열처리한 후의 길항력도 조사하였으며, 아울러 대부분의 항생물질이 butanol 등 비극성 용매에 용출되는 지용성임을 감안하여 각종 유기용매로 추출한 후 그 길항력을 cell mass 법이나 Dendroid test, bioautography 등으로 조사하였다.

더불어 선발된 토착길항미생물들이 실제 토양내에서 식물 발병율을 저하시킬 수 있는가의 *in vivo* 실험을 하기 위하여, 고추(*Capsicum annum*), 오이(*Cucumis sativus*), 강남콩(*Phaseolus vulgaris*), 가지(*Solanum melongena*) 등의 식물 종자를 멸균 토양내에서 발아시킨 후 일정 크기의 묘를 pot에 옮겨 심고 *F. oxysporum*, *P. capsici* 등의 각종 시험 식물병원균의 포자 현탁액을 첨가하고, 습실에서 2일간 병원균 포자를 발아 확산시킨 후 선발된 길항균의 배양현탁액을 접종하고 25~30℃ 되는 식물 배양실에서 날짜별로 관찰하였다.

3) Siderophore 생산성 길항균주의 선발

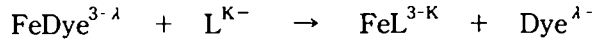
가) Siderophore 생산균주의 선발

본 연구에서는 저병해 경작지 토양, 특히 근권 (rhizosphere)에 서식하는 세균을 대상으로 siderophore 생산균을 분리함으로써 토착성 길항세균인 PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria)을 선발하고자 하였다.

이를 위해 근권토양의 현탁액을 siderophore 생산균주의 선발배지인 CAS (chrome azurol S) blue agar 평판배지에(88) 접종하여 28℃에서 배양시키면서 orange halo zone의 생성에 의한 siderophore 생산균을 일차적으로 분리하고, 이를 다시 CAS liquid assay(88)에 의해 siderophore 활성화에 따른 CAS의 탈색율과 Arnow phenolic assay(89)와 Csaky hydroxamate assay(90)에 의한 siderophore 활성화도 측정법을 이용하여 siderophore 생산능이 가장 우수한 균주를 선발하였다.

나) Siderophore의 검증 및 활성화도 측정

선발된 균주의 배양상등액에서 siderophore의 생산성을 확인하기 위해 Schwyn과 Neilands의 방법을(88) 이용한 CAS colorimetric assay를 이용하였다. 이 assay는 siderophore를 확인하는데 있어서 구조 및 종류와 상관없이 이용되는 universal chemical assay로서 iron(III) ion과의 친화력에 관계하며, 이 원리는 아래와 같은 방정식이 성립된다.



CAS의 복합체 [chrome azurol S/iron(III)/HDTMA (hexadecyltrimethyl ammonium bromide)] 즉, iron dye complex는 청색을 나타내며 흡광도 630 nm에서 최대의 흡광 spectrum을 가진다. 여기서 HDTMA는 cationic detergent로서 Fe-CAS와의 결합을 안정화시키는 역할을 한다. Siderophore와 같은 어떤 강한 ligand (L)가 매우 안정된 iron dye complex (blue-colored ferric complex)에 첨가되면 dye로부터 철이 제거되면서 탈색 (decolorization)되어 orange 색으로 변화된다.

이 CAS assay에서 standard로 DFOM (deferoxamine mesylate)를 사용하였으며, assay mixture는 CAS assay 용액의 0.5 ml와 배양상등액의 0.5 ml를 동량으로 사용하였다. 이때 assay mixture를 실온에서 3 시간 이상 평형화시킨 후 spectrophotometer (Hitachi U-2000)를 사용하여 630 nm에서 흡광도 (OD, optical density)의 감소율을 측정하였다.

신속한 siderophore 활성도 측정을 위해서는 CAS shuttle assay를 이용하였다. 이 assay 용액은 매우 안정한 CAS assay 용액에 4 mM 5-sulfosalicylic acid를 첨가시켜 Fe-CAS와의 결합을 다소 불안정하게 한 후, 37°C에서 20 분간 반응시키면서 siderophore에 의한 CAS의 탈색정도를 630 nm에서 2 초 간격으로 흡광도의 감소를 측정하였다. 이때 siderophore 활성도는 CAS의 탈색되는 양을 초기속도로 환산하여 초당 흡광도 630 nm에서 0.001에 해당되는 CAS의 탈색량을 1 unit로 표기하였다.

선발된 균주가 생산한 siderophore가 catechol-phenolate 형태인지를 확인하고 정량화하기 위해서는 Arnou의 phenolic assay를 이용하였다. 일반적으로 3,4-dihydroxyphenylalanine이나 2,3-DHBA (2,3-dihydroxybenzoic acid), 그리고 catechol의 경우에는 nitrous acid와 반응하여 노란색을 나타내며, 과잉의 sodium hydroxide가 첨가될 때 보통 진한 orange-red color를 띄고 catechol의 경우는 bright red color를 나타낸다. 이 때 assay mixture는 1 시간 이내에 510 nm에서 흡광도를 측정하였으며, standard로서 2,3-DHBA를 사용하였다.

또한 생산된 siderophore가 hydroxamate 형태인지를 정량화하기 위해서는 Csaky의 hydroxylamine/hydroxamic acid assay를 변형하여 이용하였다. 일반적으로 hydroxamate 형태 siderophore의 산 가수분해산물인 hydroxylamine의 경우 iodine에 의해 산화되며, 이때 HNO₂는 iodine 탈색단계와 coupling 단계를 거쳐 적색을 나타낸다. Assay mixture는 30 분 동안 처리한 후 543 nm에서 흡광도를 측정하였으며, standard로서 hydroxylamine hydrochloride를 사용하였다. Siderophore의 산 가수분해는 120°C에서 4 시간 동안 처리하였으며, iodine 탈색시약으로 2% sodium arsenite 용액대신 2.5% sodium thiosulfate 용액을 사용하였으며, coupling 시약으로서 0.3% α -naphthylamine 용액대신 0.05% N-(1-naphthyl) ethylenediamine 용액을 사용하였다.

다) Siderophore 생산균주에 의한 식물병원균의 생육억제능 조사

선발된 siderophore 생산균주에 의한 식물병원균의 생육억제능을 조사하기 위해 대표적 식물근부병균인 *Fusarium solani*를 대상으로 3% 8-hydroxyquinoline에 의해 탈철화시킨(91) siderophore 생산용 배지 KB (King's B) agar 평판배지의(92) 우측에 먼저 *F. solani*를 접종하여 28°C에서 24 시간 배양시킨 후, 좌측 2 cm의 간격에 분리된 길항균주를 획선 접종하여 대치배양시키면서 서로간의 증식선단까지의 거리를 측정, 조사하였다.

그리고 선발균이 생산하는 siderophore에 의해 식물병원균의 생육억제현상이 일어난다는 사실을 명확히 조사하기 위해, 상기의 KB agar 평판배지와 100 μ M FeCl₃가 첨가된 KB agar 평판배지의 중앙에 길항균을 각각 접종하여 28°C에서 24 시간 배양한 다음 *F. solani*의 포자체를 overspray한 후 4 일간 배양시키면서 생육저지환의 직경을 측정, 조사하였다.

더욱 정확한 억제능을 확인하기 위해서는 탈철화된 KB 액체배지와 100 μ M FeCl₃가 첨가된 KB 배지에 길항균을 각각 접종하여 28°C에서 24 시간 배양한 다음 *F. solani*의 포자체를 첨가하여 다시 4 일간 배양시킨 후, Toyo filter paper No. 2로 여과, 90°C에서 건조하여 그 균체중량 (cell mass)을 측정, 비교하였다.

또한 타 억제기작의 원인물질인 항생물질에 의한 식물병원균의 생육억제 가능성을 조사하기 위해 PDNA (potato dextrose-nutrient agar) 평판배지를(93) 사용하여 우측에 먼저 *F. solani*를 접종하여 28°C에서 24 시간 배양시킨 후 좌측 2 cm의 간격에 길항균을 획선 접종하여 대치배양시키면서 서로간의 증식선단까지의 거리를 측정하였다. 그리고 또 다른 억제기작인 외막가수분해효소 chitinase의 생산성은 유일 탄소원으로 colloidal chitin이 함유된 CMA (chitin minimal medium) 평판배지에(94) 길항균을 접종하여 28°C에서 배양한 후 colony 주위의 clear halo zone의 유무와 크기를 관찰하였다.

라) 식물병원균의 포자발아 및 균사생장 억제기작 조사

선발된 siderophore 생산성 길항균주가 어떻게 식물근부병균 *F. solani*의 포자발아 (spore germination)를 억제하는가를 조사하기 위해 우선 PDB (potato dextrose broth) 배지를 이용하여 *F. solani*를 28°C에서 5 일간 배양시키고, 그 원심침전물을 멸균수로 수회 씻어낸 후 10 겹의 멸균된 guaze로 여과하여 균사체로 부터 포자체를 회수하였다(95).

미리 마련된 KB 액체배지에 길항균을 접종하여 28°C에서 24 시간 배양한 다음 *F. solani*의 포자현탁액 (spore suspension)을 첨가하여 5 일간 배양시킨 후 Toyo filter paper No. 2로 여과, 90°C에서 건조하여 그 균체중량을 측정, 비교하였다. 또한 회수된 *F. solani*의 포자현탁액 50 μ l를 acid-washed depression slide 위에서 길항균주의 배양액 50 μ l와 함께 처리한 후 시간별로 포자발아율 및 발아관 (germ tube) 길이를 위상차 현미경 (phase-contrast microscope)으로 관찰하였다.

식물병원균의 균사신장 억제를 조사하기 위해서는 KB 액체배지에 *F. solani*의 포

자체를 첨가하여 3일간 배양한 다음 길항균을 접종하여 28℃에서 4일간 배양시킨 후 Toyo filter paper No. 2로 여과, 90℃에서 건조하여 그 균체중량을 측정, 비교하였다.

마) 타 균주 생산 siderophore의 이용능 조사

소수의 일부 미생물들은 생육환경내에서 자신이 생합성하지 않는 다른 미생물로부터 생산된 ferric siderophore 복합체를 이용할 수 있는 능력을 가진다(96-98).

Filter paper disc 방법을 이용하여 선발된 siderophore 생산성 길항균주가 성장이 어려운 한계농도의 EDDHA (ethylenediamine di-*o*-hydroxyphenyl acetic acid, 20 mM)가 첨가된 KB agar 평판배지의 전면에서 길항균을 접종 (10^6 cfu/ml)하여 28℃에서 24시간 배양한 다음, 미리 마련된 siderophore 생산성 길항균주들의 배양상등액 50 μ l를 Whatman No. 1 filter paper에 흡착시켜 배양시키면서 filter paper 주변의 성장상태를 조사하였다.

바) 식물실험을 통한 생물방제력 검증

선발된 siderophore 생산성 길항균주가 토양내에서 실제로 근부방제력이 있는가를 알아보기 위해 발병 기주식물로는 그 생육도가 빠른 강낭콩 종자 (*Phaseolus vulgaris* L.)를 사용하여 28℃ 항온실에서 발아시킨 후, 그 크기가 생육이 비슷한 종묘만 골라 식물근부병균 *F. solani*가 미리 접종된 플라스틱 pot의 멸균된 bermuculite와 경작지 토양을 섞은 혼합토양에 심고 방제균을 주입하여 식물성장 기간별로 그 잎수, 신장, 잎면적, 줄기상태 등 식물의 생육도를 15일간 단계별로 관측, 조사하였다.

선발된 길항균주가 *F. solani*에 의해 발병되는 식물뿌리의 근부현상을 어느 정도 방제할 수 있는가를 조사하기 위해 상기 식물생육도 시험에서 생육 기간별로 각 처리구의 식물을 뽑아 뿌리의 발육 및 부패상태 등 근부병 발생정도를 관찰하였다.

4) 길항진균의 분리

가) 공시토양 : 토착 길항진균을 선발하기 위해 경북 경주시 서면 지역의 일반 경작지 토양 및 대나무밭과 낙엽이 부식된 참나무가 주종을 이루고 있는 산 토양을 채집하였다. 토양표면 10~15cm 깊이에서 약 50g의 토양을 채집하였으며, 진균의 분리는 채집 즉시 또는 저온실(8℃)에 보관하면서 실시하였다.

나) 길항진균의 순수분리 : 채취한 토양시료 5.0g을 50ml의 멸균 생리식염수가 담긴 100ml 삼각 flask에 현탁한 다음 1ml를 취하여 9ml의 멸균수에 희석하고 계속 10배수로 10^{-4} 까지 희석하였다. 10^{-2} , 10^{-3} 및 10^{-4} 의 각 희석액에서 200 μ l씩을 취하여 tetracycline이 첨가된(25 μ g/ml) potato dextrose agar (PDA, Difco Co.) 15ml를 부어 균헌 petri dish에 분주한 다음 유리봉을 사용하여 도말 후 27℃에서 배양하였다. 2

4~48시간 배양 후 단일 colony를 순수분리하여 PDA에 3~5일간 배양하였다. 길항 효과가 우수한 균주의 선발은 대칭배양방법(dual culture)에 의해 실시하였다. 순수분리 후 배양한 각 균주의 균총(직경 5.0mm)을 PDA 및 V-8 평판배지의 한 쪽에 접종한 다음 다른 한 쪽에 4일간 PDA에 전배양한 *Phytophthora capsici*와 *Fusarium oxysporum*의 균총(5.0mm)을 각각 접종하여 27°C에서 4~5일간 배양 후 *F. oxysporum*과 *P. capsici*의 균사생장을 억제시키는 균주를 1차 길항진균으로 선발하였다.

다) 길항진균의 병원균 유주자낭 발아 억제효과 조사 : 각 길항진균의 배양여액은 50ml의 potato dextrose broth (PDB)가 담긴 100ml 삼각 flask에 길항진균을 접종하여 5~7일간 진탕액체배양(27°C, 120 rpm) 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취한 다음 membrane filter (0.45µm, Millipore)로 여과하여 만들었다. 배양여액 10ml를 100ml 삼각 플라스크에 넣고 고추 역병균의 현탁액(5×10^5 zoospore/ml)과 시들음병균의 분생포자 현탁액(5×10^5 spore/ml)을 각각 1.0ml를 접종하여 27°C에서 100 rpm으로 24시간 진탕 배양 후 광학현미경하(200×)에서 유주자의 발아율을 조사하였다. 공시 역병균은 경북대학교 김병수 박사가 밀양 고추 재배지의 이병주에서 분리한 균주를 분양 받아 사용하였으며, 역병균의 유주자낭 형성은 V-8 주스 한천 배지에서 하였다(지 등, 1988). 각 처리는 모두 3 반복하였다.

라) 길항진균의 고추 역병 억제효과 조사 : 선발한 길항진균의 고추 역병 발생 억제효과 조사는 pot 실험에 의해 실시하였다. 식물재료는 서울종묘에서 연구용으로 사용하고 있는 오룬고추를 분양 받아 사용하였다. 건전 고추묘의 육묘는 원예용 상토(Fisons, Canada)를 사용하여 자연광하의 온실에서 수행하였다. 길항진균의 배양토 100g을 900g의 상토(원예용상토:경작지토양:모래=1:1:1, V/V/V)와 혼합한 다음 비닐 포트(직경 17cm, 높이 16cm)에 담고 묘령이 30일된 고추묘를 포트당 5주씩 길항 균주당 3반복으로 이식하였다. 이식 후 포트당 50ml의 역병균 유주자현탁액(6×10^2 zoosporangia/ml)을 관주처리하였다. 관주처리 후 24시간 습실 처리한 다음 온실에서 계속 재배하면서 경시적으로 발병률을 조사하여 길항진균의 역병 억제효과를 조사하였다. 길항진균의 배양토는 원예용상토(Fisons, Canada), 경작지 토양 및 모래를 1:1:1(V/V/V)로 혼합한 후 corn meal을 0.3%(w/w) 첨가하고 1차 증류수와 혼합하여 1.0 l 삼각 플라스크에 600ml(Volume, 약 500g)를 담은 후 121°C에서 60분간 고압증기살균한 다음 4일간 PDA에 전 배양한 길항진균의 균총(직경, 1.0cm) 5개를 접종하여 27°C에서 14일간 배양하여 만들었다. 각 처리는 모두 3반복을 실시하였다.

5) 항진균성 길항 방선균의 선발

가) 항진균성 길항 방선균의 선발

환경친화성 생물학적 방제에 활용할 생물방제균을 선발하기 위해, 저 병해 경

작지토양을 대상으로 하여 기후풍토와 토양조건에 토착화되어 우점화 될 수 있는 균주를 대상으로 선발하기 위하여 토양에서의 생육이 강한 *actinomyces* sp. 를 대상으로 근권 (rhizosphere) 토양으로부터 길항균주를 선발하였다. 이를 위해 근권토양 시료 1g을 채취하여 멸균생리 식염수 10ml에 넣고 20분 동안 교반한 다음 멸균수로 10^{-3} 에서 10^{-5} 배로 희석하여 0.1ml를 분리용 배지 starch-nitrate agar 배지에 도말 한 후 28°C에서 2-4 주간 배양하여 나타난 사상균형태의 집락 (colony)을 분리하였다. 그 분리 배양한 균주를 이용하여 식물 병원균인 *Fusarium oxysporum* 를 대상으로 생육억제력을 확인하여 억제력이 강한 균주를 1차로 선발하였다(99-101).

나) 항진균성 항생물질의 생산

항진균성 항생물질 생산을 위한 배지는 glucose 10g, peptone 2g, yeast extract 1g, beef extract 1g 로 Bennett's 배지를 수정 조제하여 pH 7.0로 맞춘 배지에 배양시킨 후 그 배양 여액을 amicon을 이용 저분자와 고분자로 분리한 후 저분자용액 내에서 식물 근부균인 *Fusarium oxysporum*을 대상으로 paper disc 법에 의해 억제력을 확인하였다. 또한 cellulose membrane을 이용하여 투석 후 억제력을 확인하였다(102).

다) 항진균성 길항균주에 의한 여러 식물병원균의 억제 spectrum 확인

대표적인 식물병원균 *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *P. capsici*, *Alternaria mali*, *Penicillium expansum*, *Gaeumannomyces graminis* 등의 12종의 식물병원균을 potato dextrose broth 와 Bennett's 배지를 1:1로 섞은 후 agar 1.5%로 하여 만든 평판 배지의 우측에 식물병원균을 접종하고 좌측 2cm의 간격에 분리된 길항균주를 횡선 접종하여 대치배양 시키면서 서로간의 증식선단까지의 억제력을 조사하였다(103).

라) 식물실험을 통한 생물방제력 조사

선발된 항생물질 생산성 길항방선균주가 토양내에서 실제로 식물병원균에 저해력을 가지는지 확인하기 위해 고추, 가지를 발병 기주식물로하였으며 이를 위해 28°C 항온실에서 식물종자를 발아시킨 후, 그 크기와 생육이 비슷한 종묘만 골라 식물병원균인 *F. oxysporum* 과 *P. capsici* 가 접종된 플라스틱 pot의 멸균된 bermuculite, 유기퇴비 와 경작지 토양을 섞은 혼합토양에 심고 방제균을 관주방법으로 주입하여 식물생장의 생육도를 단계별로 관측, 조사하였다.

6) Protease inhibitor 생산성 길항방선균의 분리 및 선발

가) 길항균주의 선발 및 동정

저병해 경작지의 토양으로부터 채취하여 분리한 방선균으로부터 15 종의 식물병원

균에 대하여 길항 활성도가 있는 균주를 선발하기 위하여 1차로 채취한 시료를 80℃에서 30 분간 가열한 시료를 멸균 생리식염수에 혼탁하여 1×10^3 까지 희석한 후 방선균 분리 배지인 Starch-nitrate agar 배지를 사용하여 0.1ml 씩 접종한 후 28℃에서 2-3 주 일 간 배양하여 우선 500여종의 방선균을 분리 하였다. 이때 형성된 각기 다른 방선균 colony를 순수분리하여 사과반점 낙엽병의 원인이 되는 *Alternaria mali* 와 탄저병의 원인이되는 *Colletotridum gloeosporides* 의 생육을 억제하는 길항균주를 평판 배양법으로 선발하였다. 1차로 선발된 30 균주중에서 2차로 *Alternaria mali* 와 *Colletotridum gloeosporides* 에 보다 강한 억제력을 가지며 기존의 저해기작에 의한 저해와 저해영역이 다른 형태의 균을 선발하여 그 중 1균주의 방선균을 최종선발 하였다.

나) 항진균성 단백질분해효소 저해제의 생산

길항미생물 중에서 단백질 분해효소 등의 고분자물질 가수분해효소의 활성을 억제하는 효소저해제를 생산하는 길항성 방선균을 선발하여 그 효소저해제의 특성을 조사하고 물질의 동정을 하고자 하였다.

이를 위하여 우선 고분자 당인 starch 10g, 단백질인 soybean flour 25g, K_2HPO_4 0.05g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g, NaCl 2g, agar 15g (per 1 l) 에 pH 7.0 을 맞춘 고분자성 배지를 이용하여 최종 선발된 길항균주에 의한 식물병원균 생육억제력을 알아보기 위하여 사과반점낙엽병인 *Alternaria mali* 와 탄저병의 원인이되는 *Colletotridum gloeosporides*을 petri dish의 한쪽에 접종한 다음 50mm 간격을 두고 대칭인 지점에 선발방제 방선균주인 *Streptomyces cyaneus* KH-1을 접종하여 배양하였다. 또한 일반 항진균성 항생물질에 의한 길항기작인지를 확인하기 위해서 당류인 glucose 20g, 저분자단백질성인 casamino acid 4g, yeast extract 2g, K_2HPO_4 0.05g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g, NaCl 2g, agar 15g (per 1 l) 에 pH 7.0 을 맞춘 저분자 배지상에서의 억제력과 비교하였다. 그 결과 3 일 배양한 후 항균물질의 분비에 의하여 병원균의 생육을 억제하는 zone의 거리 차이를 확인하였다. 이러한 결과로서 병원균의 생육을 위한 고분자 영양물질을 흡수하기 위하여 분비한 분해효소를 저해함으로써 영양분의 부족에 의해 병원균 생육이 억제되는 것으로 확인 할 수 있었다.

2. 길항미생물의 길항기작 구명, 정제 및 물질동정

가. 식물병원성 진균의 외막가수분해 효소의 정제 및 특성조사

1) *Pseudomonase* 유래 chitinase

가) 길항세균의 계대배양 및 보관

선발된 길항세균 *Pseudomonas* sp. 3098의 계대 배양은 Luria broth에 agar 15g/

ℓ를 첨가한 plate에서 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

나) 사용배지 및 colloidal chitin의 제조

Pseudomonas sp. 3098로부터 효소를 생산하기 위한 배지조성은 glucose 5g/ℓ, peptone 2g/ℓ, colloidal chitin 2g/ℓ, K₂HPO₄ 1g/ℓ, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g/ℓ 그리고 NaCl 0.5g/ℓ가 되도록 만들었고, pH 7.0이 되도록 조정하였다. colloidal chitin은 Jeuniaux의 방법에(69) 따라 제조하였다.

다) Chitinase의 활성측정

효소활성은 colloidal chitin을 기질로 하여 DNS방법으로(104) 측정하였다. 0.2M acetate buffer(pH 5.0) 0.6ml, 0.55% colloidal chitin 0.2ml 및 효소용액 0.2ml를 가하여 50℃에서 2시간 동안 진탕하면서 반응시켰다. DNS용액 1ml를 첨가하여 효소반응을 정지시키고 100℃에서 5분간 가열한 후 냉각시켰다. 여기에 증류수 8ml를 가하고 혼합시킨 다음 540nm에서 흡광도를 측정하여 유리된 환원당을 정량하였다. Chitinase의 1 Unit는 1시간동안에 1μM의 glucose를 생산하는 효소량으로써 나타내었다.

라) 단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry법(105)으로 정량하였으며, 정제과정 중 용출분획의 단백질량은 280nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였다.

마) 조효소액의 조제

균주를 효소생산배지에 접종하여 30℃에서 200rpm으로 4일간 진탕배양한 후 10,000 x g에서 20분간 원심분리하여 상청액을 회수하였다. 여기에 황산암모늄을 90% 포화시켜 4℃에서 12시간 방치한 후 10,000 x g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 증류수로 투석하고 PEG로 농축시킨 것을 냉동보관하면서 조효소액으로 사용하였다.

바) 효소의 정제

조효소액을 5mM Tris-HCl buffer(pH 7.2)로 평형화시킨 DEAE-cellulose column(21 x 70 mm)에 흡착시킨 뒤 NaCl농도를 단계적으로 증가시키면서 18ml/hr의 유속으로 용출시킨 다음 효소활성이 있는 분획을 모아 농축하였다. 농축액을 증류수로 평형화시킨 BIO-GEL P-100 column(16 x 700mm)에 주입하고 8ml/hr의 유속으로 겔여과한 뒤 효소활성이 있는 분획을 모아 농축하였다. 농축액을 10mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 평형화시킨 hydroxyapatite column(50% celite함유, 22 x 70mm)에 흡착시킨 뒤 potassium phosphate buffer농도를 10mM에

서 200mM까지 농도구배시키면서 8ml/hr의 유속으로 용출시킨 다음 효소활성이 있는 분획을 모아 농축하였다. 농축액을 상기와 동일한 방법으로 2차 hydroxyapatite column chromatography를 실시하였다. 2차 hydroxyapatite column chromatography에는 buffer의 농도를 50mM에서 200mM까지 다르게 농도구배시켜 용출시킨 다음 효소활성이 있는 분획을 모았다.

효소정제의 전 과정은 4℃의 냉장실에서 행하였다. 효소정제과정 중의 활성분획의 농축에는 PEG를 사용하였고, 정제효소의 순도검증을 위한 농축에는 ultrafilter (Millipore Corp.)를 사용하였다.

사) 전기영동

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli의 방법에(105) 따라 7.5% gel를 사용하여 20mA에서 행하였다. 전기영동한 후 gel은 0.125% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 탈색용액(40% Methanol : 10% Acetic Acid)으로 탈색시켜 밴드를 확인하였다.

아) 정제효소의 특성

(1) pH의 영향

최적 pH는 pH 3.0~6.0은 0.1M citric acid-sodium citrate완충액으로 pH 6.0~8.0은 0.1M Clark and Lubs 완충액으로 pH를 각각 다르게 조정하여 다음 50℃에서 2시간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 반응 최적 pH를 검토하였고, 효소액 0.5ml에 Mallvaine 완충액(pH 3.0~8.0) 및 0.1M Clark and Lubs 완충액(pH 8.0~10.0) 0.5ml을 첨가하여 30℃에서 24시간 전처리한 다음 효소의 잔존활성도를 측정하여 효소의 pH 안정성을 검토하였다.

(2) 온도의 영향

0.8% colloidal chitin 용액 0.2ml, 0.2M acetate 완충액 0.6ml 및 정제효소액 0.2ml를 반응조성물로 하여 30~60℃ 범위에서 10℃ 간격으로 2시간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 반응최적온도를 검토하였고, 효소의 열안정성은 50℃, 60℃ 및 70℃에서 효소액을 보관하면서 경시적으로 효소의 잔존활성도를 측정하여 검토하였다.

(3) 금속이온 및 chemical의 영향

0.1M acetate 완충액(pH 5.0)에 용해시킨 MgSO₄, CoCl₂ 등의 금속염 및 각종 chemicals를 효소용액에 1mM 농도로 첨가하고 40℃에서 30분간 전처리 시킨 후 효소의 잔존활성도를 측정하여 금속이온 및 각종 chemicals가 효소활성에 미치는 영향을 검토하였다.

(4) 기질특이성

Chitin(crab shell, shrimp shell) 2종, chitosan(crab shell), glycol chitosan, α

-cellulose, soluble starch을 기질로 사용하였다. 0.8%의 각종 기질 0.2ml, 0.2M acetate 완충액(pH 5.0) 0.6ml 및 효소용액 0.2ml를 반응조성액으로 하여 50℃에서 2시간 반응시킨 후 상대활성을 측정하여 검토하였다.

(5) Michaelis 정수

최종농도 0.02~0.32%의 colloidal chitin을 기질로 사용하여 50℃에서 10분간 반응시킨 다음 Lineweaver-Burk법에 의하여 K_m 값을 구하였다.

(6) 분해율

0.2M acetate 완충액(pH 5.0) 0.2ml에 효소용액 0.4ml 및 0.8% colloidal chitin 용액 0.4ml를 첨가하고 50℃에서 24시간까지 일정시간별로 반응시킨 후 유리된 환원당의 양을 N-acetyl glucosamine으로 환산한 값과 기질(colloidal chitin)첨가량과 같은 양을 산분해하여 N-acetyl glucosamine으로 정량한 총량을 100으로 한 값을 비교하여 분해율을 구하였다.

2) *Serratia* 유래 chitinase

가) 길항세균의 계대배양 및 보관

길항세균 *Serratia* sp. 3095의 계대 배양은 King's B medium에 1.5% agar를 첨가한 배지에 접종하여 30℃에서 배양한 뒤 4℃에서 보관하면서 사용하였다.

나) Chitinase 생산

Serratia sp. 3095로부터 chitinase를 생산하기 위하여 chitin-minimal medium(C.M.M) 즉, 0.1% pepton, 0.7% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, 0.05% Sodium citrate, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.15% colloidal chitin, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% NaCl이 함유된 배지에 길항세균을 접종하여 30℃, 180rpm으로 3~4일간 진탕 배양하여 colloidal chitin이 완전히 가수분해될 때까지 배양하였다.

다) Chitinase activity 측정

Chitinase 활성은 colloidal chitin을 사용하여 DNS(3,5-dinitro salicylic acid) 방법으로(104) 측정하였다. 즉 1/15M phosphate buffer 용액(pH 7.5) 1ml, 0.5% colloidal chitin 용액 0.5ml 및 효소용액 0.1ml를 가하여 40℃에서 90분간 반응시킨 후 DNS방법을 사용하였다. chitinase 활성은 효소액 1ml가 colloidal chitin으로 부터 시간당 1 μM 에 해당하는 glucose를 유리시키는 효소의 양을 1unit로 나타내었다.

라) 단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry법으로(105) 정량하

였으며, 정제과정 중 용출분획의 단백질량은 280nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였다.

마) 조효소액의 조제

균주를 효소생산배지에 접종하여 30℃에서 180rpm으로 4일간 진탕배양한 후 10,000 x g에서 20분간 원심분리하여 상청액을 회수하였다. 여기에 황산암모늄을 75% 포화시켜 4℃에서 12시간 방치한 후 10,000 x g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 1/15M phosphate buffer 용액(pH 7.5)에 녹인 후 증류수로 투석하고 동결건조후 냉동보관하면서 조효소액으로 사용하였다.

바) 길항성 chitinase의 정제

조효소액을 colloidal chitin에 4℃에서 흡착시켜 10,000 x g에서 20분간 원심분리하여 침전된 흡착 chitinase를 1/15M phosphate buffer 용액(pH 7.5)으로 1회 세척 후 40℃에서 colloidal chitin을 완전히 분해 시킨후 이를 Amicon 10으로 원심분리하여 저분자 물질 제거 및 농축을 실시하였다. 이를 1/15M phosphate buffer 용액(pH 7.5)증류수로 평형화시킨 Sepadex G-100 column(15 x 500 mm)으로 겔 여과한 뒤 효소활성이 있는 분획을 모아 농축하고 다시 Sepadex G-75 column(15 x 700 mm)로 겔 여과하였다. 이를 1/15M phosphate buffer 용액(pH 7.5)로 평형화시킨 DEAE-sepadex A-50 column(15 x 300 mm)에 흡착시킨 뒤 NaCl농도를 단계적으로 증가시키면서 용출시켜 효소를 최종적으로 정제하였다. 이때 효소정제의 전 과정은 4℃에서 실시하였고, 효소정제과정 중의 활성분획의 농축은 동결건조를 실시하였다.

사) 전기영동

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli의 방법에(105) 따라 7.5% gel를 사용하여 20mA에서 행하였다. 전기영동한 후 gel은 0.125% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 탈색용액(40% Methanol : 10% Acetic Acid)으로 탈색시켜 밴드를 확인하였다.

아) 정제 chitinase의 효소학적 특성

(1) 최적작용 pH

최적작용 pH는 pH 2.0~5.0은 1M HCl-Sodium acetate으로 pH 5.0~8.0은 1/15M Phosphate(Na_2HPO_4 , KH_2PO_4)로, pH 8.0~12.0은 1/20M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-HCl}$ 을 이용하여 pH를 각각 다르게 조정한 다음(각 pH buffer가 변화할 때마다 pH를 겹치게 제조) 40℃에서 90분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 반응 최적 pH를 검토하였다.

(2) 최적작용 온도

0.5% colloidal chitin 용액 0.5ml, 1/15M phosphate 완충액 1ml 및 정제효소액 0.1ml를 반응조성물로 하여 35~55℃ 범위에서 5℃ 간격으로 90분 반응시킨 후 효소

활성을 측정하여 반응최적온도를 검토하였다.

(3) 최적반응시간

0.5% colloidal chitin 용액 0.5ml, 1/15M phosphate 완충액 1ml 및 정제효소액 0.1ml를 반응조성물로 하여 45℃에서 40분부터 130분까지 10분 간격으로 그 활성을 측정하여 반응시간을 검토하였다.

(4) pH 및 열안정성

효소액 0.2ml에 pH 2.0에서 pH 12까지 pH 0.5단위로 0.5ml를 첨가하여 4℃에서 12시간 전처리한 다음 효소의 잔존활성도를 측정하여 효소의 pH 안정성을 검토하였고, 효소의 열안정성은 40℃, 50℃, 60℃ 및 70℃에서 효소액을 20, 40, 60분 단위로 열처리를 해서 효소의 잔존활성도를 측정하여 검토하였다.

(5) 금속이온의 영향

$2 \times 10^{-3}M$ 로 용해시킨 $MgSO_4$, $CoCl_2$ 등 각종 금속염에 효소용액을 첨가하고 4℃에서 12시간 전처리 시킨 후 효소의 잔존활성도를 측정하여 금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 검토하였다.

(6) 저해제의 영향

$2 \times 10^{-3}M$ 농도로 용해시킨 각종 저해제에 효소용액을 첨가하고 4℃에서 12시간 전처리 시킨 후 효소의 잔존활성도를 측정하여 이를 금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 검토하였다.

(7) 기질특이성

Chitin(crab shell), chitosan(crab shell), glycol chitosan, α -cellulose, soluble starch을 기질로 사용하였다. 1/15M phosphate 완충액 2ml에 각종 기질을 0.5%가 되게 넣은후 효소용액 0.2ml를 반응조성액으로 하여 45℃에서 1시간 30분동안 반응시킨 후 상대활성을 측정하여 검토하였다.

(8) Michaelis 정수

최종농도 0.025~0.5%의 colloidal chitin을 기질로 사용하여 45℃에서 10분간 반응시킨 다음 Lineweaver-Burk법에 의하여 K_m 값을 구하였다.

나. 항진균성 항생물질의 정제와 특성조사

1) *Bacillus* sp. 4016이 생성하는 항생물질

가) 길항세균의 계대배양 및 보관

길항세균(*Bacillus* sp. 4016)의 계대배양은 nutrient agar배지에 접종하여 30℃에서 2~3일간 배양한 뒤 4℃에서 보관하면서 사용하였다.

나) 항균활성물질 생산

길항세균(*Bacillus* sp. 4016)으로부터 항진균성 항생물질을 얻기 위하여 2.0% maltose, 0.8% tryptone, 0.25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.15% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 및 0.08% $NaHCO_3$ 가 함유된 배지(pH 7.0으로 조정)에 균을 접종한 뒤 30℃에서 4일간 200rpm에서 진탕배양하였다.

다) 항균활성 조사

길항물질의 항균활성은 disc방법으로 조사하였다. 즉, potato dextrose agar(PDA) 평판 배지 중앙에 *Fusarium oxysporum*이 접종된 disc(직경 6mm)를 놓고 이 disc로부터 1cm 떨어진 곳에 100℃에서 10분간 살균한 항균활성분획을 침적시킨 disc를 놓은 후 30℃에서 2~4일간 배양하면서 *Fusarium oxysporum*의 균사생장속도를 조사하였다.

라) 항균활성 물질의 분리 및 정제

(1) n-Butanol추출

길항세균으로부터 생산된 항균활성물질을 대량으로 분리, 정제하기 위하여 배양액 4,000ml를 4℃, 8,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 상정액에 항균활성의 이행량이 많은 n-butanol을 1,000ml를 가하여 진탕한 뒤 n-butanol층을 분리하여 모우고 다시 물층에 1,000ml의 n-butanol을 가하여 상기와 같은 조작을 5회 반복하여 butanol층을 모은 뒤 이행된 항균활성물질을 50℃이하에서 감압농축하였다(106,107).

(2) Silica-gel chromatography

항균활성 물질을 분리, 정제하기 위하여 n-butanol 추출물을 silica-gel column(3.0 x 40cm)에 loading한 후 chloroform, chloroform : methanol = 9:1, 8 :2, 7 : 3, 6 : 4, 5 : 5비율의 용매로 각각 1 L씩 유출시켰다. 각 분획을 농축한 뒤 methanol에 녹여 항균활성을 조사한 결과 chloroform : methanol의 비율이 7:3, 6:4, 5:5인 분획에서 항균활성이 나타났기 때문에 이 분획을 모아 감압농축하였다(107,108).

(3) Silica-gel prep. TLC

Silica-gel column chromatography에 의해서 얻은 활성분획을 silica-gel prep. TLC 에 의해서 chloroform / methanol(60/40)의 전개용매로 전개시킨 뒤 단파장 자외선조사에 의해 9개의 분획으로 구분한 뒤 methanol로 추출하여 항균활성을 조사하였다. 이 때 항균활성은 Rf치가 약 0.05인 분획에서 나타났다(109).

(4) Silica-gel RP prep. TLC

Silica-gel prep. TLC에 의해서 얻은 활성분획을 RP prep. TLC에 의해 50% methanol로 전개시켜 항균활성이 있는 Rf치가 약 0.8부근인 band를 모아 HPLC를 이용한 분리용 시료로 사용하였다(110).

(5) HPLC

Silica-gel RP prep. TLC에 의해서 얻은 시료를 HPLC에 의해서 분리하였다(111,112). 이 때 HPLC분석조건은 다음과 같고 이를 요약하면 Fig. 2-1과 같다.

Capcell pak column(ODS)

40% aq. MeOH

10.7ml/min, 220nm

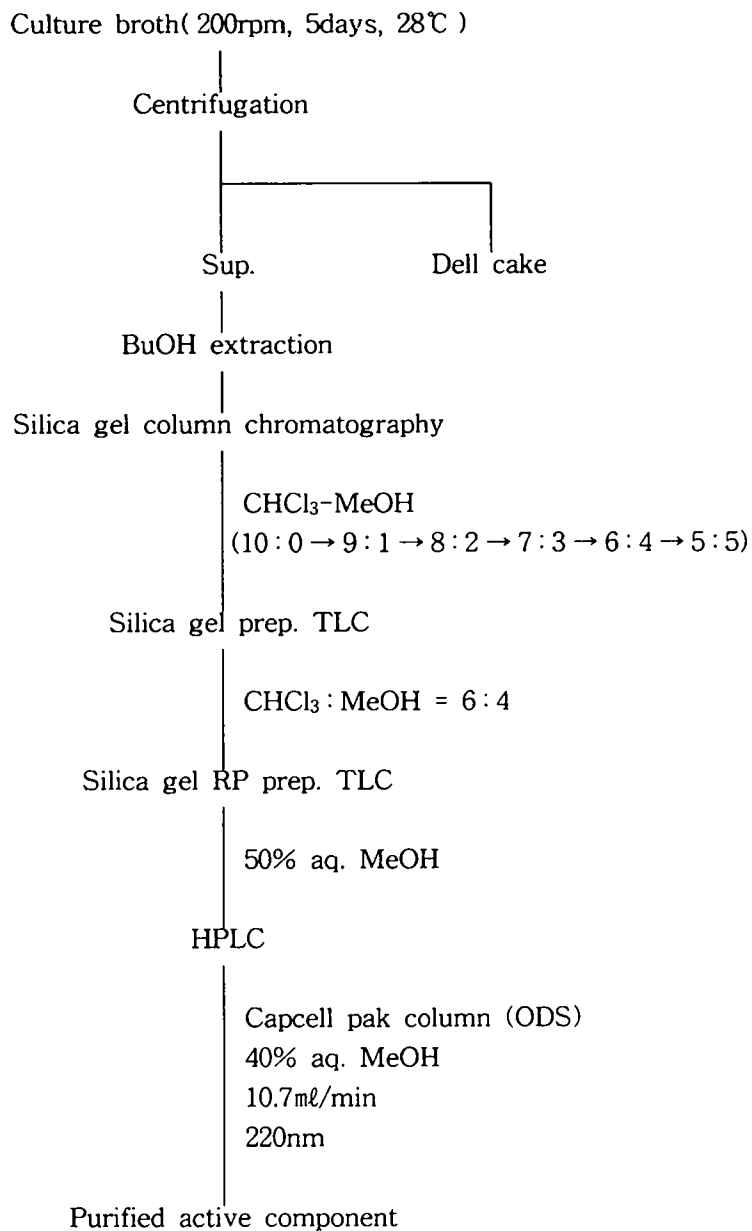


Fig. 2-1. Purification scheme of active principle produced by anti-fungal antibiotic from *Bacillus* sp. 4016

2) *Pseudomonase* sp. 2112가 생성하는 항생물질

가) 길항세균의 계대배양 및 보관

길항세균 *Pseudomonase* sp. 2112의 계대배양은 King's B medium(Proteose pepton No3 2%, K₂HPO₄ 0.15%, MgSO₄·7H₂O, Glycerol 1.5%)에 1.5% agar를 첨가한 배지에 접종하여 28℃에서 2일간 배양한 뒤 4℃에서 보관하면서 사용하였다.

나) 항균활성물질 생산

길항세균 *Pseudomonase* sp. 2112로부터 항진균성 항생물질을 얻기 위하여 King's B broth에 균을 접종한 뒤 28℃에서 4일간 180rpm에서 진탕배양하였다.

다) 항균활성 조사

길항물질의 항균활성은 disc방법으로 조사하였다. 즉, potato dextrose agar(PDA) 평판 배지에 *Phytophthora capsisi*의 포자를 도말한 후 직경 6mm disc에 100℃에서 10분간 살균한 항균활성분획을 침적시켜 28℃에서 2~4일간 배양하면서 *Phytophthora capsisi*의 균사생장을 억제하는 disc주위의 clear환의 유무로 조사하였다.

라) 항균활성 물질의 분리 및 정제

(1) n-Butanol 및 Ethyl acetate에 의한 추출

길항세균으로부터 생산된 항균활성물질을 대량으로 분리, 정제하기 위하여 배양액 9,000ml를 4℃, 8,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 상정액에 항균활성의 이행량이 많은 n-butan올 동량을 가하여 진탕한 뒤 n-butan올층을 분리하여 모으고 이를 glass microfibre filters(Whatman)로 거른후 이행된 항균활성물질을 50℃이하에서 감압농축하였다. 이를 100% methan올에 녹는 물질만 회수한후 감압 농축하고 이 물과 ethyl acetate를 이용 분획하여 ethyl acetate층에 녹아있는 항생물질을 회수할 수 있었다(106,107).

(2) Diaion HP-20 column chromatography

항균활성 물질을 분리, 정제하기 위하여 감압농축된 ethyl acetate 추출물을 methan올에 녹인후 Diaion HP-20 column(2.5 x 80cm)에 loading한 후 methan올을 0, 50, 100% 비율로 각각 1 L씩 유출시켰다. 각 분획을 농축한 뒤 methan올에 녹여 항균활성을 조사한 결과 50% methan올 분획에서 항균활성이 나타났기 때문에 이 분획을 모아 감압 농축하였다(107).

(3) Sephadex LH-20 column chromatography

Diaion HP-20 column chromatography에 의해서 얻은 활성분획을 LH-20

column(2.5×50cm)에 의해서 methanol로 튜브당 10ml씩 loading한 후 각 분획을 항균활성을 조사하여 항균활성이 나타나는 분획을 모아 감압 농축하였다(108). 이를 2차에 걸쳐 반복하였다

(4) Silica-gel TLC

Sephadex LH-20 column chromatography에 의해서 얻은 활성분획을 TLC에 의해 n-butanol : acetic acid : water를 5 : 1 : 4의 비율로 만든 전개액으로 전개시켜 항균활성이 있는 Rf치가 약 0.89 부근인 band를 모아 항균활성을 조사하고 HPLC를 이용하여 정제도를 확인하였다(110).

(5) HPLC

Silica-gel TLC에 의해서 얻은 시료를 HPLC에 의해서 분리하였다(111,112). 이때 HPLC분석조건은 다음과 같고 이를 요약하면 Fig. 2-2와 같다.

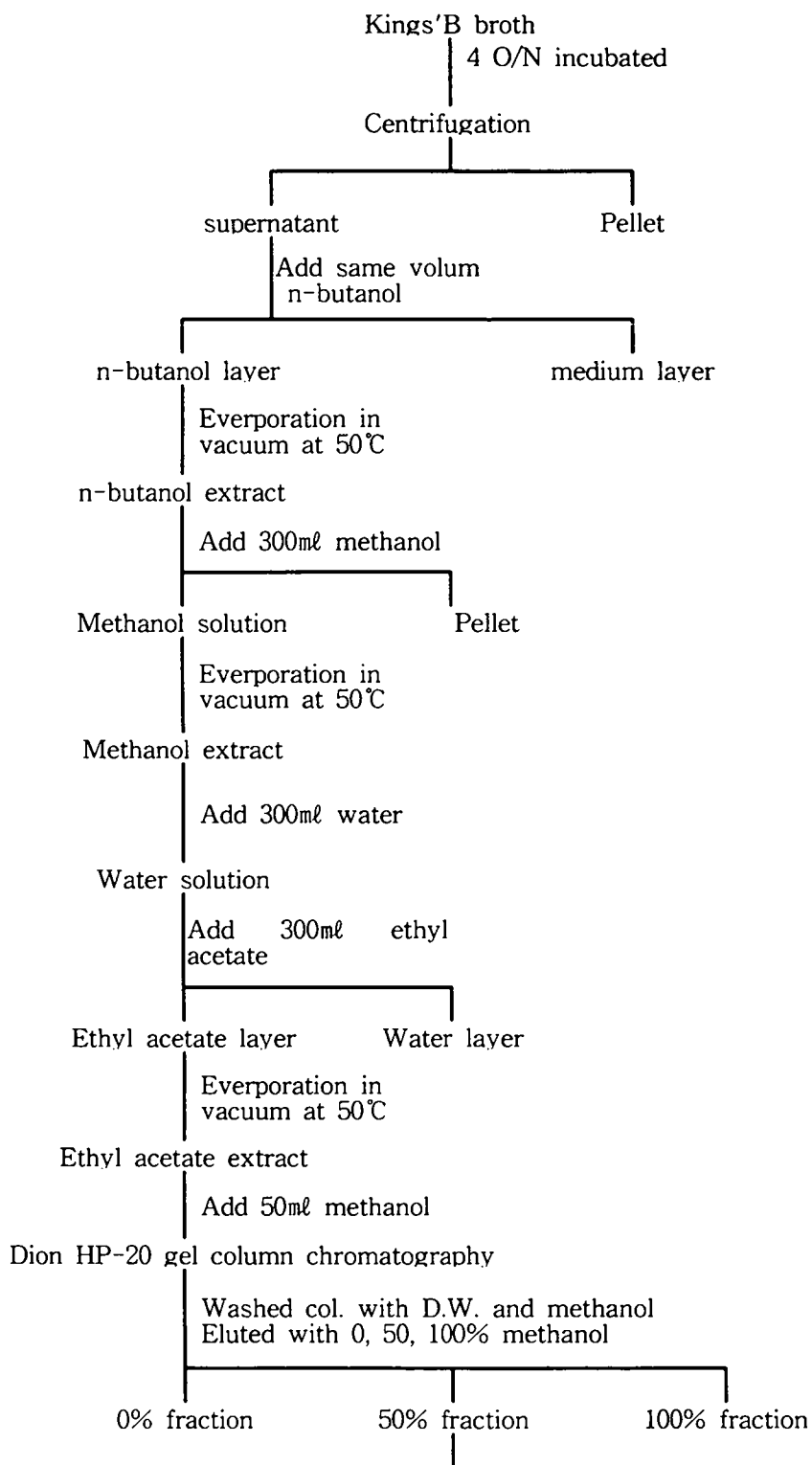
LC-NH2 column
75% Acetonitrile
11.0ml/min, 260nm

라) 길항기작 재확립 및 방제현상 해명

정제된 항생물질을 이용하여 식물 병원성 진균에 대한 antifungal 현상을 분자 생물학적으로 규명하기 위하여 단백질, 핵산, 세포벽 합성 전구체로 각각 [³H] Leucine, [³H] Adenine, [¹⁴C] Glucose를 이용하여 Hideyo Yamaguchi 등이 실시한 방법으로 실험하였다. 즉 0.85ml 20% 희석한 Potato Dextrose Broth(PDB)에 30 μ l antibiotic(control은 50% methanol을 첨가하였다)과 0.1ml *P. capsici*의 포자현탁액을 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 1시간 전배양을 하였으며, 여기에 각각의 labeled precursor를 20 μ l 첨가하여 1 O/N 시켰다.

Leucin Hot trichloroacetic acid(TCA)-insoluble material에 포함된 labeled leucin의 혼입량으로 결정하였다. 반응은 10% TCA 1 volume를 첨가하고 90 $^{\circ}$ C 15분간 가열하고 그 반응액에 포함된 insoluble material을 glassfiber filter(Whatman,GF/A)로 수거하고 2회 세척한후 air dry하였다. 이 filter에 포함된 radioactivity를 측정하였다.
Adenin Cold TCA-insoluble(RNA plus DNA) material에 포함된 labeled adenin의 혼입량으로 결정하였다. 반응은 10% cold TCA 1ml를 첨가한후 cold TCA-insoluble(RNA plus DNA)를 glassfiber filter로 수집하였다. 또 다른 sample에 1ml N KOH를 첨가하고 60 $^{\circ}$ C 2시간 처리후 1.8ml 20% cold TCA를 첨가 침전시킨후 0 $^{\circ}$ C에서 overnight 시킨후 glass fiber filter로 수거하였다.

Glucose 1N NaOH를 1ml 첨가한 후, boiling water에 20분간 분해한후 glass fiber filter로 수거하였다. 이를 멸균수로 2회 세척하였으며 air-dry시켜 측정하였다.



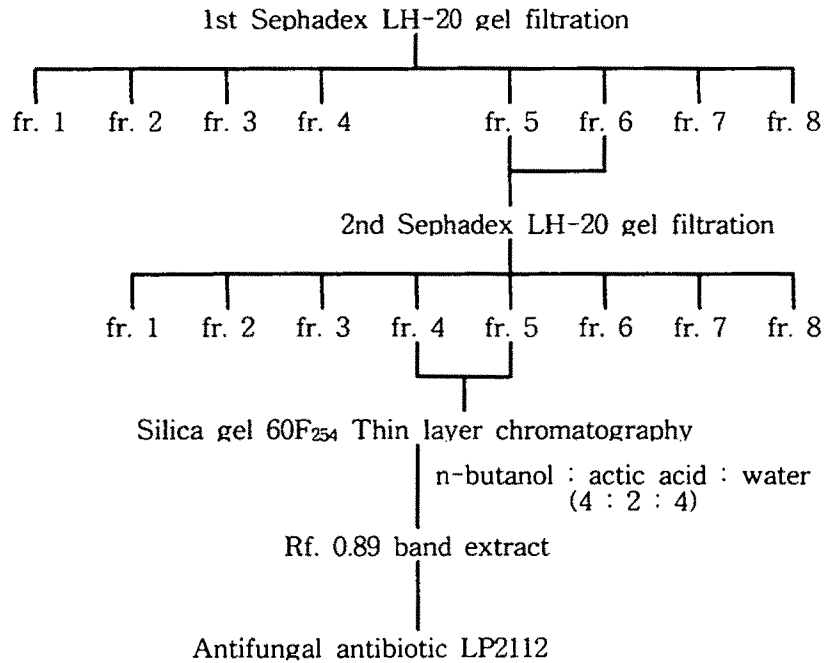


Fig. 2-2. Purification scheme of active principle produced by anti-fungal antibiotic from *Pseudomonas* sp. 2112

다. 길항물질 siderophore의 정제 및 특성조사

1) Siderophore 생합성의 최적 조건 조사

길항력 증강을 위한 siderophore 생산 최적조건을 알기 위하여, 또한 siderophore를 정제하기 위한 대량생산 목적으로 siderophore생산의 최적 조건을 조사하였다. pH 별 균체생산량과 siderophore 생산량을 비교 분석하여 최적 pH를 구하였고, Fe 이온의 농도 차이에 의한 siderophore 생산량을 조사하였고, 강한 금속 chelator EDDHA을 이용하여 siderophore uptake능을 조사하였다.

2) 길항물질 siderophore의 정제

먼저 구조적으로 안정한 ferric siderophore로 추출하고 CM-sephadex C-25을 이용하여 ion chromatography로 단일 ferric siderophore를 정제한 후 이를 EDTA를 사용하여 탈철화시켜 Sephadex G-25를 이용하여 순수한 siderophore를 정제하고 이를 TLC 상에서 확인하였다.

3) Siderophore 물질 동정

정제된 siderophore를 6N HCl과 47% HI로 가수분해시켜서 amino 산 분석기로

분석을 행하였고, 정제된 siderophore의 최대 흡수 파장을 기존 siderophore의 그것과 비교하여 그 구조를 규명하였다. 그리고 Fab+ Mass로 분자량을 확인하였다.

라. 방선균이 생산하는 항진균성 항생물질의 정제 및 특성조사

1) 길항물질 생합성의 최적조건조사

가) 증식곡선 및 최적 배양시간 조사

선발된 항진균성 길항균주의 항생물질 생산에 미치는 최적의 배양시간을 조사하기 위하여 각각의 항생물질 생산배지에 선발균을 접종하여 배양하면서 시간별로 균의 성장 및 배양 상등액에서의 저해기작을 각각의 분석 방법에 의해 조사하였다.

나) 배양온도 및 pH의 영향

선발된 항진균성 길항균주의 항생물질 생산에 미치는 최적의 배양온도 및 pH의 영향을 조사하기 위하여 항생물질 생산배지로써 glucose 10g, peptone 2g, yeast extract 1g, beef extract 1g 로 조제하여 pH 7.0으로 맞춘 다음 배양온도 별로 배양시키면서 균주의 성장과 항생물질의 생산을 비교분석하며, 항생물질 생산배지의 초기 pH를 2-11로 조절하며 균주의 성장 및 항생물질생산율을 비교 분석하였다.

2) 항진균성 항생물질의 정제 및 특성조사

가) 항생물질의 추출 및 정제

선발된 진균성 항생물질의 분리정제를 위해서는 몇가지의 점을 고려하여 수행하였다.

첫째, 100℃에서 15분 정도 끓임으로서 안정성을 조사하였다.

둘째, methanol, butanol, chloroform, ethanol등의 유기용매 분배성을 조사하였다.

셋째, 용매에 용출성을 조사하였다.

넷째, 음이온 및 양이온 교환수지 흡착성 조사를 통하여 활성물질의 물리, 화학적 특성 및 정제방법에 대한 정보를 수집하였다. 이를 토대로 대용량의 유기용매추출, 이온교환수지, silica gel, ODS column chromatography, cellulose column chromatography, preparative TLC, HPLC등을 이용하여 단일물질로 분리, 정제하였다.

나) 항생물질의 특성조사

선발된 길항균주의 배양액으로부터 항생물질을 분리, 정제한 후 용매별 용해도, 각종 전개용매의 TLC 의한 Rf 값 및 발색시약에 의한 반응성 그리고 UV 흡광 spectrum 조사등 각종 이화학적 특성을 조사하여 정제된 항생물질의 구체적인 물질 특성을 규명하며, 기존에 알려진 항생물질과 비교, 분석하였다.

다) 항생물질의 구조분석

단일물질로 정제 된 후 자외선 분광기(UV), thin layer chromatography (TLC), 적외선 흡수 분광 광도계(infra-red spectroscopy, IR), gas chromatography(GC), 질량분석기(mass spectrometry, MS), 핵자기 공명 분광기 (nuclear magnetic resonance, NMR) 등의 여러 분석기기를 이용하여 그 항생물질의 분자량, 성질 및 특성을 확인함으로써 자세한 분자구조를 구명하였다.

마. 방선균이 생산하는 protease inhibitor의 정제 및 특성조사

1) 단백질분해효소 저해제의 추출 및 정제

선발된 단백질분해효소 저해제의 분리정제를 위해서는 몇가지의 점을 고려하여 수행 하였다.

첫째, 100℃에서 15분 정도 끓임으로서 안정성을 조사하였다.

둘째, methanol, butanol, chloroform, ethanol등의 유기용매 분배성을 조사하였다.

셋째, 용매에 용출성을 조사하였다.

넷째, 음이온 및 양이온 교환수지 흡착성 조사를 통하여 활성물질의 물리, 화학적 특성 및 정제방법에 대한 정보를 수집하였다. 이를 토대로 대용량의 유기용매추출, 이온교환수지, silica gel, preparative TLC, HPLC등을 이용하여 단일물질로 분리, 정제하였다.

2)단백질분해효소 저해제의 특성조사

선발된 길항균주의 배양액으로부터 단백질분해효소 저해제를 분리, 정제한 후 용매별 용해도, 각종 전개용매의 TLC 의한 Rf 값 및 발색시약에 의한 반응성 그리고 UV 흡광 spectrum 조사등 각종 이화학적 특성을 조사하여 정제된 단백질분해효소 저해제의 구체적 물질 특성을 규명하며, 기존에 알려진 단백질분해효소 저해제와 비교, 분석하였다.

3) 단백질분해효소 저해제의 구조분석

단일물질로 정제 된 후 자외선 분광기(UV), thin layer chromatography (TLC), 적외선 흡수 분광 광도계(infra-red spectroscopy, IR), 질량분석기(mass spectrometry, MS), 핵자기 공명 분광기 (nuclear magnetic resonance, NMR) 등의 여러 분석기기를 이용하여 그 단백질분해효소 저해제의 분자량, 성질 및 특성을 확인 함으로써 자세한 분자구조를 구명하였다.

4) 단백질분해효소 저해제의 저해 기작 확인

식물성 진균에서 생산되는 단백질분해효소의 생산이 *S. cyaneus* KH-1에 의해서 생산되는 효소저해제에 의해 저해됨을 확인하고, 이 저해기작이 어떤 형태로써 저해되는지를 확인 하기 위하여 Lineweaver-Burk plots에 의해 확인한 결과 진균성 단백질분해효소에 대한 저해는 경쟁적인 저해인 것으로 확인 할 수 있었다

3. 토착 길항미생물의 분류학적 동정

가. 길항성 세균 및 방선균의 동정

1) 길항성 세균의 동정

선발된 토착길항미생물의 분류학적 동정을 위해 세균은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(113) 및 Laboratory Manual of General Bacteriology (114)의 방법에 따라 형태, 배양학적 특성과 생리, 영양학적 특성을 조사하여 동정하였으며, 곰팡이는 현미경 관찰등 형태학적 조사에 의해 동정하였다. 아울러 *Pseudomonas*와 *Bacillus*는 API system의 20NE analytical kit와 VITE[®] system의 BACILLUS[®] biochemical kit 그리고 Biolog[®]사의 동정 시스템으로 확인하였다.

2) 항진균성 길항방선균의 동정

선발된 길항방선균주의 분류학적 동정을 위해서는 Bergey's manual of systematic bacteriology 와 Manual of methods for general bacteriology에 준하여 동정하였다. 특히 방선균의 경우 International Streptomyces Project(ISP), Numerical Taxonomy 방법에 의해 동정하였다(115,116). 형태학적 특성조사에서는 ISP 배지를 사용하여 배양한 후 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰하며, 생리학적 특성에서는 세포벽내의 당분석, 세포벽내의 diaminopimelic acid 분석 그리고 지방산 분석 등으로 *Actinomyces* 속임을 확인하였으며, 종 단계의 확인은 탄소원의 이용성, 질소원의 이용성, 항균활성 시험등의 41가지 단위형질 실험결과를 computer program 인 TAXON program을 이용하여 종(species)단계로 수리동정하였다(117).

3) Protease inhibitor 생산 방선균의 동정

가) 균주의 동정을 위한 특성조사

Streptomyces sp. KH-1의 특성은 주로 Shirling 등의 방법 과 Bergey's manual of systematic bacteriology, Manual of methods for general bacteriology에 준하였으며, *Streptomyces* sp. KH-1 수리동정은 TAXON program을 이용하여 주군집(major cluster)의 수리동정에 이용된 단위형질(unit character)은 Williams 등의 방법을 따랐다.

나) 형태학적 특성

Inorganic salts starch agar (ISP 4) 배지에서 28℃로 배양하면서 육안 또는 광학 현미경으로 형태학적 변화를 관찰하였으며, 보다 자세한 형태를 알기 위해 주사형 전자현미경(SEM)으로 관찰하였다.

다) 배양학적 특성

최적생육온도 및 최적생육 pH는 Bennett's 배지로 조사하였으며, 균사체 형태의 관찰, 균사 및 포자의 색깔, 영양균사체 (substrate mycelium), 가용성 색소의 형성 등은 Bennett's 배지와 ISP 배지를 사용하여 조사하였다.

라) 생리적특성

(1) Melanin 생산

Melanin 색소의 생산은 peptone-yeast extract-iron agar (ISP6) 와 tyrosine agar (ISP7) plate 에서 28℃에서 14 일 배양한 후 관찰하였다.

(2) Diaminopimelic acid 분석

Starch-casein-nitrate 배지에서 3일간 배양한 균체를 7,100g으로 회수하여 French pressure(Sim aminco)로 균체를 파쇄한 뒤 16,000g에서 15 분 간 원심분리하여 동결건조 하였다. Diaminopimelic acid(DAP) 와 아미노산 분석을 위하여 동결 건조된 균사 20 mg을 6 N HCl 용액 5 ml 에 현탁하여 1ml를 Pyrex tube 에 넣고 밀봉한 후 100 ℃에서 18 시간 가수분해하였고, 이를 여과, 진공감압기에서 농축하여 탈염산시키고 이 농축액을 cellulose F TLC plate (20×20cm, merck Co.)를 이용하여 methanol-water-5N HCl-pyridine (80 : 15 : 5 : 10)으로 전개시킨 다음 acetic ninhydrine으로 발색시킨 후 나타난 spot의 위치를 비교하여 판단하였다.

(3) 세포내의 당분석

동결건조한 *Streptomyces* sp. KH-1 의 세포 50 mg을 2 N H₂SO₄ 1ml에 현탁하여 Pyrex tube 에 넣고 밀봉 한 후 2시간 가수분해시키고, Ba(OH)₂ 로 pH 5.0-5.2 로 중화시킨 다음 원심분리 (16,000g, 15 분) 하여 침전물을 제거하였다. 그 상등액을 감압농축 한 후 이를 0.3ml의 증류수에 녹여 TLC 시료로 사용하였다. Spotting 한 시료를 ethyl acetate-pyridine-water-acetic acid (100:35:25:5, v/v) 용매로 전개시킨 다음, aniline phtalate로 발색시켜 세포내의 당 조성을 표준당 band의 R_f 치와 비교 확인 하였다.

(4) 종(種) 수리동정을 위한 특성 분석

주군집(major cluster) 동정을 위한 41개의 단위형질(unit character)은 Williams 등의 방법에 따라 시험하였다. TAXON program은 단위형질의 특성을 + 혹은 -로 입력하고 입력된자료를 CLUSTAN으로 분석하여 수리분류를 하였으며, 수리분류 데이터를 기본자료로 입력하여 작성된 identification probability matrix의 특성과 동정하고자하는 균주의 특성을 비교, 분석함으로써 수리동정하였다.

(5) 질산환원능

KNO_3 0.1%와 agar 0.17%를 포함하는 nutrient broth에서 자란 배양액을 Knowles 등의 방법에 따라 실온에서 약 15 분간 방치한 후 관찰하였다. 이 때 붉은 색으로 변하면 positive 하고, 만약 색깔 변화가 없으면 zinc (5mg/ml)를 첨가하여 붉은 색으로 변하면 negative 로 판정 하였다.

(6) H_2S 생산능

Ferric ammonium citrate(0.025%)를 첨가한 nutrient agar slant 배지에 백금이로 배지에 깊이 찢어 고정하고자 하는 균주를 천자 접종하여 semi-anaerobic 상태로 배양하면서 검은색으로 변하면 positive로 간주하였다.

(7) Lecithinase 및 Lipase 생산능

Lecithinase와 lipase 생산능은 egg-yolk agar 배지를 이용하여 이 plate에 균을 접종하여 약 7 일간 배양하면서, lecithinase의 경우는 colony 주위에 turbid zone이 형성되면 positive 로 간주하였으며 이와 같은 zone이나 광택이 생기지 않으면 negative 로 간주 하였다.

(8) Urease 생산능

Urease는 Christensen urea agar plate에서 28℃에서 배양하여 red-violet 색깔의 형성으로 판정한다. 이 배지에 균을 접종하여 약 7 일간 배양하면서 red-violet 색깔을 형성하면 positive로 판단 하였다.

마) 탄소원 이용성

탄소원 이용성은 기본배지, 즉 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.64g, KH_2PO_4 2.38g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5.65g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0g을 물 1 l 에 녹인 배지에 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.64g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.11g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.79g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15g을 물 1 l 에 녹인 용액인 Pridhan & Gottlieb trace salts을 1ml 첨가하여 pH 를 6.7 로 조절한 다음 2%의 agar를 첨가한 후 살균하여 사용하였다. 각 탄소원은 10% stock solution을 여과 살균한 다음 1% 량이 되게 첨가 하였다. 탄소원 이용성 여부는 탄소원을 첨가하지 않은 배지를 negative control로 D-glucose 를 첨가한 배지를 positive control로 하여 각 탄소원에서의 생육도를 비교하여 판별 하였다.

바) 질소원 이용성

질소원 이용성은 기본배지로 D-glucose 1.0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, NaCl 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, K_2HPO_4 0.1%, agar 1.2% 에 각 질소원을 첨가하여 살균한 다음 28℃에서 14 일 간 배양한 후 생육도를 비교 관찰 하였다. 이때 기본배지를 negative control로 , L-asparagine이 든 배지를 positive control로 각각 정하였다.

사) 단일 및 고분자 화합물의 분해 활성

Tyrosine (0.5%), guanine (0.05%), casein (skim milk 1.0%), elastin (0.3%), chitin (0.5%), xanthine (0.4%) 및 xylan (0.4%) 등의 분해활성은 glucose 대신 glycerol이 든 변형된 Bennett 배지에서 colony 형성이나 또는 colony 주위의 clearing zone의 형성 여부로 판별하였다. Gelatin (0.4%) 과 starch (1.0%)의 분해능은 동일 배지의 agar plate에서 약 7일간 배양한 후 각각 acidified HgCl₂와 iodine solution을 첨가하여 colony 주위의 분해 zone의 형성 여부를 판별하였다.

아) 화학저해제에서의 생육

Bennett 배지에 phenol, crystal violet, sodium azide 등의 생육 저해제를 일정량 첨가하여 제조한 다음 균주를 도말접종하여 28℃에서 약 7일간 배양하면서 생육 여부를 관찰하였다.

자) 항균활성시험

Bennett 배지에서 약 3-4 일 간 자란 *Streptomyces* KH-1 균주를 항균 활성 시험을 위해 거꾸로 한 petri dish에 40 분 동안 chloroform에 노출시켜 균주를 사멸시킨후 chloroform 용매를 공기중에 증발시킨 후 0.7% agar가 든 Bennett 배지의 5ml를 부가하여 분주하고 시험균주를 접종하여 30℃에서 24 시간 배양한 후 저해환을 확인 하였다.

차) 항생제 내성 특성

각종 항생제는 stock solution을 만든 후 200, 100, 50, 25 및 10µg/ml 농도로 희석한 용액을 paper disc에 40µl 씩 soaking하여 충분히 풍건한 다음, 시험용 plate 배지에 적당한 간격으로 놓고 28℃에서 약 5 일 간 배양하여 저해활성 zone의 형성 여부를 조사하였다.

카) 건조 균체량 측정

배양액의 상등액을 원심분리하여 제거하고 생리식염수로 3회 이상 세척한 다음 105℃ dry oven에서 항량이 될 때까지 건조시킨 후 측정 하였다.

4. 다기능 생물방제균주의 유전공학적 개발

가. 돌연변이에 의한 방제력 증강균주의 육종

1) Siderophore 생산성 증강 변이주의 유전적 육종

가) 증강변이주의 선발

Siderophore 생산성 길항균주 *P. fluorescens* GL7을 돌연변이원 NTG (N-methyl-N'-nitrosoguanidine)로 mutation 시켜서(118) 탈철화된 King'B(KB) 배지와 CAS배지로 선별하여 Csaky 법을 이용하여 증강 생산된 hydroxamate type의 siderophore의량을 재확인하였다.

나) 증강변이주의 검증

모균주 *P. fluorescens* GL7 및 육종 선발된 siderophore 생산성 증강 돌연변이주 *P. fluorescens* GL7-PM1(sid⁺), *P. fluorescens* GL7-NM1(sid⁻), 그리고 충분한 Fe ion (100 μM)를 넣어준 배지에서 자란 *P. fluorescens* GL7의 외막단백질을 분리하여(119-121) SDS-PAGE에(122-124) 의해 iron-regulated outer membrane protein (IROMP)을 비교, 분석하였다. 아울러 모균주 및 돌연변이주의 식물근부균 *Fusarium solani*에 대한 길항능을 조사하였다.

나. 외부 길항유전자 도입 system 구축

1) Fungal cell fusion에 의한 길항유전자 통합

Cell fusion 에 의한 육종균주의 개발은 1차년도에서 생물방제균으로 선발한 *Trichoderma* 속에 속하는 25J 1균주와 36J13 및 37J10균주간 protoplast fusion을 Shin과 Cho(1993)의 방법에 준하여 실시하였다. Protoplast나출은 각 균주를 complete medium에 36시간~48시간 진탕액체 배양 후 원심분리에 의하여 취한 균사를 0.6M sorbitol을 함유한 10mM phosphate buffer(pH 6.5)로 2번 세척한 후 0.5g을 취하여 Novozyme 234(Sigma Co.) 용액(10mg/ml buffer) 10ml를 처리하여 하였다. 이때 사용한 삼투압안정제는 0.6M sorbitol을 함유한 10mM phosphate buffer(pH 6.5)였으며, 처리는 120rpm 으로 30℃에서 3~5시간 동안 하였다. 이렇게하여 형성된 원형질체를 glass filter(porosity 1)로 여과하여 회수한 후 삼투압안정제로 세척하여 순수분리하였다. Protoplast의 융합은 각각 회수한 protoplast를 취하여(5×10^8 protoplast/ml) PEG4000 용액(30%, containing 10mM of CaCl₂ in 0.1M Phosphate buffer)에 30℃에서 10~15분간 처리하여 하였다. 처리후 0.6M sorbitol로 세척한 다음 0.75% soft agar에 현탁하여 regeneration complete medium 및 regeneration

minimal medium에 도달접종하여 배양하여 형성된 colony를 취하였다.

다. 외부 길항기작 유전자의 도입에 의한 유전공학적 육종

1) 항생물질 생산성 길항 균주에 Chitinase gene 도입

선발된 생물방제 균주 *Pseudomonas* sp. 3098 의 길항성 Chitinase 유전자를 클로닝하기 위하여 다음의 5가지 gene cloning 방법이 사용되었다.

가) *B. circulans* 의 Chitinase 유전자의 특정부분을 이용한 *Pseudomonas* sp. 3098 균주로부터의 Chitinase 유전자 클로닝

B. circulans 균주에서(125) 보고된 chitinase 유전자의 아미노산 배열 및 open reading frame을 참고로 하여 기존의 data에 수록된 chitinase 유전자의 아미노산 배열과 비교하여 이들 염기배열중 보존이 잘되어 있는 부분의 염기서열 중 *B. circulans*의 541염기부터 시작하는 아미노산배열 SVGGW와 993염기부터 시작하는 아미노산배열 GVPANKL 사이에 상호상동성이 높은 배열이 비교적 많이 포함되므로 541염기부터 시작하는 primer(primer 1)와 993염기위치의 아미노산배열과 상보적인 primer(promer 2)를 합성하여 *Pseudomonas* sp. 3098의 염색체 DNA상에서 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction : PCR)을 위한 primer로 사용하였다. 합성된 PCR primer의 염기서열은 다음과 같다 (Fig. 4-1)

```
primer 1 : 541 S V G G W G A .
           5'- TCTGTTGGTGGCTGGGGAGCT-3'

primer 2 : 993 G V P A N K L
           GGTGTTCCCGCGAACAACTG3'
           CCACAAGGGCGCTTGTTTGAC5'

           5'- CAGTTTGTTCGCGGGAACACC-3' --
```

Fig. 4-1. Specific primers for the amplification of chitinase gene

나) 다양한 미생물 유래 chitinase 들의 ORF를 이용한 chitinase 유전자의 클로닝

다양한 미생물 균주에서 보고된 chitinase 유전자의 염기배열을 기초로하여 이들 염기 배열간의 상동성을 조사하여 보존이 잘된 부분에서 새로운 primer를 합성하여 PCR을 시행하였다.

합성한 primer의 염기배열은 다음과 같다 (Fig. 4-2).

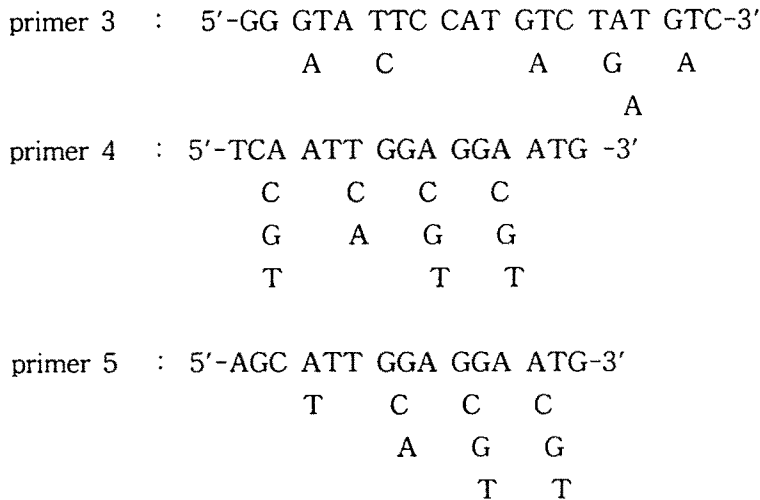


Fig. 4-2. Design of primers for the chitinase gene amplification by PCR

다) *Serratia marcescens*의 chitinase 유전자를 probe로 이용한 클로닝

Serratia marcescens 균주에서(126) 보고된 chitinase 유전자 염기배열을 기준으로 하여 *Pseudomonas* sp. 3098 균주(126) 부터 chitinase 유전자를 확인하기 위한 probe를 제작하였다. *Pseudomonas* sp. 3098 균주의 염색체 DNA를 여러 가지의 제한효소로 절단한 후 agarose gel 전기영동으로 분리한 후 filter paper로 transfer 하고, *Serratia marcescens*의 chitinase 유전자를 probe로 하여 Southern hybridization을 실시하였다.

라) *In vitro* packaging에 의한 클로닝

In vitro packaging에는 Promega의 Packagene® Lambda DNA Packaging System을 사용하였다. *Pseudomonas* sp. 3098 균주의 염색체 DNA를 제한효소 EcoRI을 사용하여 부분분해를 행한후, *EcoR* I으로 절단하여 Calf intestinal alkaline phosphatase를 처리한 cosmid vector pHC79(Fig. 4-3)의 EcoRI 절단부위에 삽입하였다.

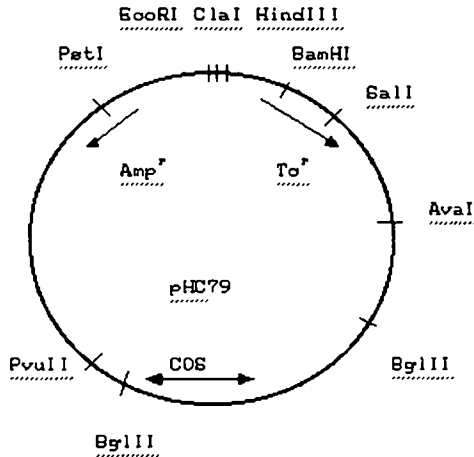


Fig. 4-3. Construction of cosmid pHC79 vector for *in vitro* packaging

E. coli LE392(F⁻, *hsdR*574(*r_k*⁻, *m_k*⁺), *supE*44, *supF*58, *lacY*1 or Δ (*lacZY*)6, *galK*2, *galT*22, *metB*1, *trpR*55)를 0.2%의 10mM MgSO₄와 0.2% maltose를 함유하는 LB 배지에서 약 5시간 배양후 OD가 0.6내지 0.8정도 될 때 까지 배양한후 4℃에 보존하며, competent cell 로 사용하였다. *In vitro* packaging을 위해서 5μl의 ligation mixture와 packaging extract 50μl를 혼합하여 실온에서 3시간 가량 방치하여 packaging 시킨 후, 445μl 의 phage buffer(20mM Tris-HCl, pH 7.4, 100mM NaCl, 10mM MgSO₄) 와 25μl의 chloroform을 첨가하고 가볍게 혼합한후 4℃에 보존하였다. 회석된 phage액 100μl와 대장균 배양액 100μl를 5ml의 시험관에 넣고 37℃에서 30분간 감염시켰다. 45℃로 보온한 3ml의 TB top agar(1% Bacto-trypton, 0.5% NaCl, 0.8% agar)와 혼합 후, chitin을 함유한 chitinase 선택배지에 중층한 후 37℃에 배양하면서 형질전환체의 선택을 시도하였다.

마) Plasmid pUC19를 이용한 shotgun 클로닝

Pseudomonas sp. 3098 균주의 염색체 DNA를 제한효소 *psfI*로 부분분해한 후 이 효소로 절단된 pUC18에 도입하여 *E.coli* JM109에 형질전환한 후 chitin이 함유된 배지에 도말하여 형질전환체의 획득을 시도였다(127).

2) 항생물질 생산성 길항균주에 urease gene의 도입

가) Urease gene 함유 recombinant plasmid의 조제 및 subcloning

Urease gene은 Kim 등이 cloning한 바 있는 10.7Kb 크기의 *B. pasteurii* urease gene library pBU11(128)를 사용하였으며, vector plasmid는 *E. coli* - *Bacillus* shuttle vector 인 pGB215-110, pGR71과 pEB203(129)를 이용하였다. 항생제는 plasmid pGR71의 경우 kanamycin(Km)과 chloramphenicol(Cm)를 50 μ g/ml와 20 μ g/ml, pGB215-110의 경우 ampicillin(Ap)과 Km을 50 μ g/ml와 5 μ g/ml, pEB203의 경우는 Ap와 Km을 50 μ g/ml와 10 μ g/ml를 각각 최종농도로 첨가하였다.

Alkali lysis방법에 따라 pBU11을 분리하였고, 단일의 urease gene단편을 얻기 위해서 *Bam*H I으로 partial digestion하고, 이것을 0.6% low melting agarose gel 상에서 60V로 전기영동을 실시한 후 urease gene fragment의 단일 band를 절단한 후 β -agrase를 이용하여 elution하였으며 ethanol 침전법으로 분리하였다.

Ligation을 위해 vector plasmid를 제한효소로 절단 후 calf intestinal alkaline phosphatase (CIP)로 탈인산화하고, ligation kit ver. II[®] (TaKaRa)를 이용하여 urease gene fragment 15 μ l 와 탈인산화된 pEB203 5 μ l(약 50ng)를 섞은 후 ligation kit. sol II 20 μ l를 첨가하여 16 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하였으며, urease gene library가 함유된 이 recombinant plasmid를 pGU366로 명명하였으며 이것을 형질전환에 이용하였다.

나) Urease gene에 의한 *E. coli*의 형질전환

*E. coli*의 형질전환은 Mandel과 Higa의 CaCl₂ 방법(130)을 따라 행하였다. Urease-positive 형질전환체의 선별은 항생제 내성 colony를 일차선발하고, 최종적으로 Christensen urea agar(CUA) 평판배지상에(131) tooth pick replica법으로 spot하여 붉은색으로의 변색여부로 urease-positive colony를 선발하였다.

다) 길항균주 *Bacillus subtilis* SH14의 형질전환

Bacillus subtilis SH14의 형질전환은 Chang과 Cohen의 방법(132)에 의거해서 PEG-incuced protoplast(PIP) 형질전환법을 이용하였고, protoplast regeneration medium은 mannitol regeneration agar를(133,134) 사용하였다.

항생제는 Km을 사용하였고, 최종농도가 400 μ g/ml되도록 첨가하였으며, transformant는 재생배지에서 일차선발을 한 후, CUA 평판배지에 tooth pick replica 법으로 spot하여 붉은색으로의 변색여부로서 최종선발하였다.

라) 형질전환체의 urease 생산성 측정

Recombinant plasmid로 형질전환시킨 생물방제균 *B. subtilis* SH14의 형질전환체가 암모니아 생성 유전자, 즉 urease gene를 정상적으로 발현시키는지 조사하기 위해 urea R broth(Km 10 μ g/ml)에서 4일간 30 $^{\circ}$ C에서 배양하면서 생성되는 적색도를 흡광도 550nm에서 측정하였다.

마) Urease gene에 의한 길항력 증강

Urease gene이 도입된 형질전환체 *B. subtilis* SH14(pGU366)의 식물근부균 *F. solani*의 생육억제능을 조사하기 위해서 0.5% urea가 함유된 PDN agar 평판배지에서 대치배양법으로 조사하였다.

한편 *B. subtilis* SH14(pGU366)의 배양물을 0.5% urea 함유 potato dextrose broth에 첨가한 후 식물병원균의 전 배양 균사체를 균등하게 접종하여 28 $^{\circ}$ C, 160rpm으로 7일간 배양하였으며 filter paper로 여과 건조하여 그 건조 균체량을 측정 비교하였다.

3) Siderophore 생산성 길항균주에 urease 유전자 gene의 도입

가) Urease gene 함유 recombinant plasmid 조제

선발된 siderophore 생산성 길항균주 *P. fluorescens* GL7에 urease 생산능을 유전적으로 부가하기 위하여 이미 cloning한 바 있는 호알카리성 세균 *Bacillus pasteurii* 유래 urease gene이 함유된 plasmid pBU11(10.7Kb)(134)을 분리하여 단일의 urease gene 단편을 얻기 위해 *Bam*HI으로 partial digestion하고 0.6% low melting agarose gel 상에서 전기영동을 실시하였다. Urease gene내의 또 하나의 *Bam*HI site가 절단되지 않은 10.7 kb 정도의 단편을 elution하여 urease gene library를 얻었다. Urease 유전자 도입의 최적 vector로 선정된 broad-host range plasmid pKT230에 *Bam*HI으로 절단한 후 alkaline phosphatase 처리 등을 거쳐 elution한 urease gene library와 T4 DNA ligase로 ligation하였다.

나) Siderophore 생산성 길항균주의 형질전환

Urease gene을 함유한 recombinant plasmid를 siderophore 생산성 길항균주 *P. fluorescens* GL7에 도입하기 위해 Bagdasarian의 alkaline competent transformation 방법과 high voltage puls electroporation (Easyject Tween Pulser, Equibio)에 의한 transformation 방법을 병행하여 최적의 조건으로 실시하였다. Urease gene의 발현은 selective marker 항생물질인 streptomycin (μ g/ml)을 함유한 KB 배지에 나타나는 colony를 일차 선별하였고, 최종적으로 항생물질 함유 Christensen urea agar(131) 평판배지상에서 붉은색으로 나타내는 urease-positive colony를 선별하였다.

다) Urease 유전자 도입 siderophore 생산균주의 길항력 증강 조사

Urease 생성능을 유전적으로 부가 받은 siderophore 생산성 길항균주 *P. fluorescens* GL7이 식물근부병균 식물근부균 *F. solani*의 생육억제력이 암모니아 생성능 부가 이전의 길항균주에 비해 증강되었는지를 조사하기 위해 생육억제거리측정법에 의해 그 길항력이 향상되었는가를 확인하였다.

5. 도입하는 외부유전자의 염색체 병합에 의한 길항유전자의 안정성 확보

가. Plasmid vector에 의한 chitinase gene 및 urease gene의 chromosome integration에 의한 안정성 제고

1) 생물방제균 *B. subtilis* 의 integration vector pDL내로 chitinase 유전자의 subcloning

생물방제균 *B. subtilis* SH14의 염색체내에 cloning된 *Pseudomonase* sp. 3089의 chitinase유전자를 integration시키기 위하여 *B. subtilis* 용 integration vector pDL의 *EcoR* I site에 cloned chitinase gene을 도입하기로 하였다. 이를 위하여 pUC18에 들어있는 chitinase 유전자의 좌우에서 annealing할 수 있는 primer를 이용하여 polymerase chain reaction을 시행하였다. 이때 사용한 *B. subtilis*용 integration vector pDL의 구조는 다음 Fig. 5-1 과 같다.

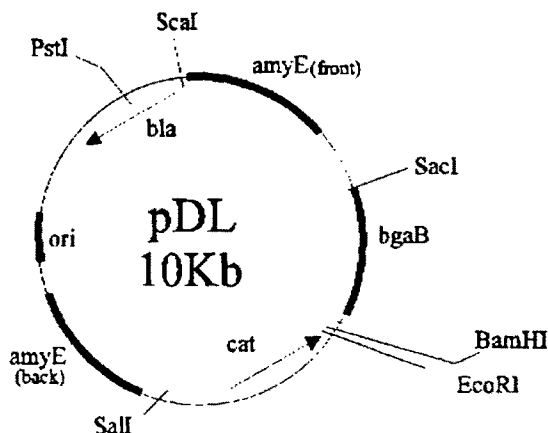


Fig. 5-1. Construction of *B. subtilis* integration vector pDL

2) *B. subtilis* 의 integration vector pDL내로 urease 유전자의 subcloning

Urease gene도 역시 pDL에 도입하였다. 김상달교수 연구실에서 클로닝되어 염기 배열이 결정된 *B. pasteurii*의 urease 유전자를 가지고 있는 pGU366을 제한효소 *Bam*H I으로 부분분해하고 agarose gel 전기영동한 후 urease의 전 배열을 가지고 있는 10.7kb의 단편을 Gene clean kit 을 이용하여 분리정제하였다.

6. 생물방제균내 bio-report gene의 유전적 도입에 의한 생태학적 monitoring 방법 개발

가. GFP 유전자 함유 recombinant plasmid의 조제 및 subcloning

GFP gene은 pYKB28에서 분리한 *lacZ*을 포함한 1Kb 크기의 GFP 유전자와 pEGFP에서 분리한 EGFP 유전자를 사용했으며, vector plasmid는 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector인 pHV1432와 *cdd* gene을 함유한 pSO51을 사용하였고, *E. coli*-*Pseudomonas* shuttle vector인 pKG230을 사용했으며 Gram negative용 vector인 pHSG396을 이용하였다.

Vector plasmid와 GFP 유전자의 ligation을 위해 vector plasmid를 제한효소로 절단한 후 calf intestinal alkaline phosphatase (CIP)로 탈인산화하였고, ligation kit ver. II[®] (TaKaRa)를 이용하여 GFP gene 5 μ l와 탈인산화된 vector plasmid 5 μ l (약 50ng)를 섞은 후 ligation kit. sol II 10 μ l를 첨가하여 16 $^{\circ}$ C에서 30분~2시간 처리하여 GFP gene이 함유된 recombinant plasmid를 조제하였다.

나. GFP gene에 의한 *E. coli*의 형질전환

*E. coli*의 형질전환은 Mandel과 Higa의 CaCl₂ 방법(130)과 electrophoration법을 따라 행하였다. GFP 발현 형질전환체의 선별은 항생제 내성 colony를 일차선발하고, 최종적으로 IPTG 4 μ mol을 첨가한 LB 배지를 사용하였다. 평판배지상에 tooth pick replica법으로 spot하여 UV상에서 형광색을 발하는 colony를 선발하였다.

다. 길항균주 *B. subtilis* SH14의 형질전환

B. subtilis SH14의 형질전환방법은 Cohen과 Chang 방법(132)에 의거한 PEG-induced protoplast (PIP) 방법을 이용하였다. 우선 Pennasay broth (PAB) 5 ml에 증점중하여 배양한 후 그 배양액을 50ml PAB에 1%되게 접종하여 OD₆₀₀에서

0.4가 될 때까지 배양하였다. 이 배양액을 5,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 균체를 SMMP 4ml로 현탁한 후에 lysozyme 20mg/ml를 포함하는 SMMP 1ml를 첨가하였다. 이것을 37℃에서 2시간 배양하여 protoplast를 제조하였고 SMMP로 세차해 씻은 후 형질전환에 이용하였다. Protoplast 현탁액 0.5ml에 재조합된 plasmid를 첨가한 후 바로 40% PEG 4000 1.5ml을 첨가하여 5분간 상온에 방치하였다. 여기에 5ml SMMP를 첨가하여 현탁한 후 3,000rpm으로 15분간 원심분리하여 1ml SMMP로 다시 현탁하였다. 현탁액은 30℃에서 2시간 배양 후 항생제를 함유하는 regeneration agar 배지 (DM3 medium)에(133) 도말하여 30℃에서 24시간 배양 후 항생제 내성 colony를 얻었다.

라. *P. fluorescens* GL7에 GFP 유전자의 형질전환

P. fluorescens GL7의 형질전환은 Mandel과 Higa의 CaCl₂ 방법(130)과 electrophoration법을 따라 행하였다. GFP 발현 형질전환체의 선별은 항생제 내성 colony를 일차선발하고, 최종적으로 IPTG 4μmol을 첨가한 LB 배지를 사용하였다. 평판배지상에 tooth pick replica법으로 spot하여 UV상에서 형광색을 발하는 colony를 선별하였다.

마. *P. fluorescens* GL7과 *P. fluorescens* LS20에 GFP 유전자의 integration

P. fluorescens GL7과 *P. fluorescens* LS20에 GFP를 도입하기 위해 사용된 plasmid는 pUT mini Tn5-GFP이며 그 host인 *E. coli* S-17을 이용하였다. 선발된 생물방제균과 *E. coli* S-17의 conjugation은 pUT mini Tn5-GFP를(135,136) 함유한 *E. coli* S-17을 ampicillin (50μg/ml)과 tetracycline (15μg/ml)을 넣어준 LB broth에 24시간 성장시킨 배양액 1ml와 siderophore를 생산하는 생물방제균 *P. fluorescens* GL7, *P. fluorescens* LS20을 각각 동일배지에 24시간 성장시킨 배양액 1ml를 혼합하여 원심분리한 후 균체만 회수하였다. 그 균체를 LB broth 1ml에 다시 현탁시킨 후 미리 멸균된 cellulose filter를 통과시켜 *E. coli* S-17과 생물방제균을 서로 접합되게 한 후 LB agar 배지에 균체가 위쪽으로 향하게 하여 얹은 후, 30℃ incubator에서 1시간에서 10시간 동안 배양시켰다. 시간별로 mating시킨 균체를 다시 LB broth에 현탁시킨 후 농도별로 희석하여 tetracycline (15μg/ml)이 함유된 M9 minimal agar에(137) 배양시킨 후 conjugation된 colony를 선별하였다.

pUT mini Tn5-GFP에 포함된 GFP는 promotor가 없으므로 intergration될 때 chromosome의 promoter 바로 뒤에 삽입이 되어야만 GFP가 발현되기 때문에 450~490nm의 형광 현미경으로 발현력이 좋은 균주를 선별하였다.

제 3 절 연구 결과

1. 토착길항미생물의 분리 및 선발

가. 지역토양내에서의 토착길항미생물의 증균, 채취 및 분리

생물방제 해당지역의 토양과 기후, 풍토에 장기간 적응, 우점화 되어서 실제 사용 시 토양환원, 복귀력과 성장경쟁력이 강한 토착길항미생물을 채취하기 위하여 그지역의 대나무 발 부식 토양과 저병해 경작지 토양을 채취원으로 해서 개발한 증미에 의한 포착방법, 흑설탕, 밀기울, 왕겨, 황토에 의한 숙성, 증균 방법을 고안(Fig. 1-1, 1-2)하여 토착길항미생물을 효율적으로 채집할 수 있었으며, 그 결과 240종의 토착길항세균과 2종의 토착방선균 그리고 10종의 토착사상균을 채취하여 분리 배양할 수 있었다. 이를 대상으로 방제력 강력한 토착길항미생물의 선발을 위해 지역토양에서 상기의 방법으로 채집, 분리 배양한 각종 토착미생물 중 *Fusarium solani*, *F. oxysporium*, *Phytophthora capsici* 등 식물병원균의 생물을 강력히 억제하는 생물방제력 강력한 토착길항미생물을 선발한 결과 8종의 *Basillus* sp.와 11종의 *Pseudomonas* sp. 2종의 *Trichoderma* sp.등을 선발할 수 있었다.(Table 1-1)

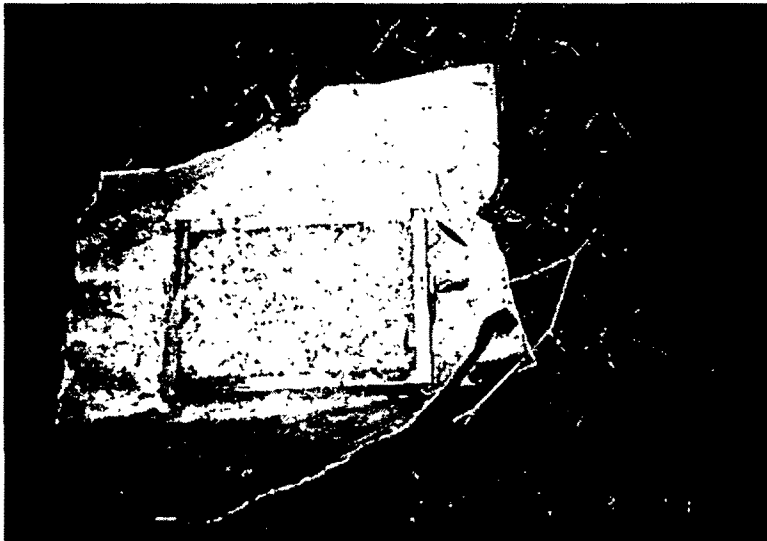


Fig. 1-1. Instrument for the collection of indigenous antagonistic microorganisms with steamed rice.



Fig. 1-2. Isolation and enrichment culture of indigenous antagonistic microorganisms from local soil



Fig. 1-3. Biocontrol effect by antagonistic microorganism *Serratia* sp. 3095.

A: Control

B: *Fusarium oxysporium* only

C: *Fusarium oxysporium* + *Serratia* sp. 3095

Table 1-1. Selected indigenous antagonistic microorganisms against phytopathogenic fungi

Strain	Genus	Antagonistic fungi		
		Pairing culture ^{*1}	Cell mass ^{*2}	Dual culture ^{*3}
4016	<i>Bacillus</i> sp.	<i>F.s., F.o., P.c</i>	←	←
7079	<i>Bacillus</i> sp.	<i>F.o., P.c.</i>	←	←
3034	<i>Bacillus</i> sp.	<i>F.o., P.c.</i>	<i>P.c.</i>	<i>F.o., P.c.</i>
LX5	<i>Bacillus</i> sp.	<i>F.o., P.c.</i>	<i>P.c.</i>	<i>F.o., P.c.</i>
4009	<i>Bacillus</i> sp.	<i>F.o., P.c.</i>	←	←
B23	<i>Bacillus</i> sp.	<i>P.c.</i>	←	←
5057	<i>Bacillus</i> sp.	<i>P.c.</i>	←	←
SH14	<i>Bacillus</i> sp.	<i>F.s.</i>	←	←
3098	<i>Pseudomonas</i> sp. 3098	-	<i>F.o., P.c.</i>	←
2071	<i>Pseudomonas</i> sp. 2071	<i>F.o., P.c.</i>	←	←
2112	<i>Pseudomonas</i> sp. 2112	<i>F.o., P.c.</i>	←	←
3095	<i>Serratia</i> sp. 3095	-	<i>F.o., P.c.</i>	←
4059	<i>Pseudomonas</i> sp. 4059	<i>F.o., P.c.</i>	←	←
5042	<i>Pseudomonas</i> sp. 5042	<i>P.c.</i>	<i>F.o., P.c.</i>	←
5046	<i>Pseudomonas</i> sp. 5046	<i>P.c.</i>	<i>F.o., P.c.</i>	←
6036	<i>Pseudomonas</i> sp. 6036	<i>F.o., P.c.</i>	←	←
GL7	<i>Pseudomonas</i> sp. GL7	<i>F.s.</i>	←	←
GL17	<i>Pseudomonas</i> sp. GL17	<i>F.s.</i>	←	←
LS20	<i>Pseudomonas</i> sp. LS20	<i>F.s.</i>	←	←
KH1	<i>Streptomyces</i> sp. KH1	-	<i>P.c.</i>	←
36J1	<i>Trichoderma</i> sp. 36J1	<i>P.c.</i>	←	←
36J13	<i>Trichoderma</i> sp. 36J13	<i>P.c.</i>	←	←
37J10	<i>Trichoderma</i> sp. 37J10	<i>P.c.</i>	←	←
37K5	<i>Trichoderma</i> sp. 37k5	<i>P.c.</i>	←	←
2715	<i>Fusarium</i> sp. 2715	<i>P.c.</i>	←	←
31K10	<i>Penicillium</i> sp. 31K10	<i>P.c.</i>	←	←

F.s. : *Fusarium solani* (근부균)

F.o. : *Fusarium oxysporium* (시들음병균)

P.c. : *Phytophthora capsici* (역병균)

*1 : LB media made with *F. sol* and *P.cap.* dry cell

*2 : 5ml of culture supernatant add to 45ml of fungal media(PDB)

*3 : 5ml of bacterial media with 45ml of fungal media(PDB)

나. 길항기작별 토착길항미생물의 선발

1) Chitinase 생산성 길항미생물의 선발

고추역병균 *P. capsici*의 균체 세포벽 주성분은 β -1,3 glucan와 cellulose이고 *F. solani*와 *F. oxysporium*의 그것은 chitin 과 β -1,3 glucan으로 되어 있으므로 이들 식물병원균의 균체외벽을 파괴할수 있는 외막가수분해효소를 강하게 생산하는 길항미생물을 선발하였다. Chitinase 생산성길항균주의 선발을 위해서는 chitin minimal medium(CMM)이나 chitin-perptone배지에서의 clear zone을 크게 형성하는 균주를 선발하였으며, 그 chitinase활성도는 colloid chitin을 기질로 반응시켜, DNS법으로 환원당 생성을 확인한 후 *in vitro* 길항력 검증을 통해 *Pseudomonas* 3098, *Serratia* 3095 와 *Baillus* 7079를 최종 선발하였다. 이들을 시드름병균을 대상으로 pot 실험으로 *in vivo* 방제력도 확인하였다(Fig. 1-3)

아울러 배양여액의 Amicon centriprep 10에 의해 얻은 고분자물질로 cell mass법에 의해서도 확인하였다. (Table 1-2)

외막가수분해효소 생산성 길항미생물로 선발한 균주중 대표적인 *Pseudomonas maltophilia* 3098를 대상으로 그 길항기작을 조사한 결과는 식물 병원성 곰팡이 *F.oxysporum* 이나 *F.solani* 등의 세포벽이 주로 chitin(47%)로 되어 있고 β -1,3-glucan(14%), mannan 등으로 구성되어 있기 때문에 chitinase등의 가수분해 효소에 의한 길항기작을 조사해 본 결과 이들 병원균 표피 피막을 붕괴할 수 있는 외막 가수분해 효소에 의해 병원균의 생육이 강하게 저해 받는다는 사실을 확인하였다.

선발된 *Pseudomonas maltophilia* 3098의 배양물로부터 얻은 고분자 단백질 물질에는 chitinase와 β -1,3-glucanase 활성이 매우 높았으며(Table 1-3) 이들 효소(MW10,000이상 고분자물질)에 의한 균체증식 억제율이 배양액 원액의 억제율에 비해 90%나 된다는 결과는 *Pseudomonas maltophilia* 3098의 길항기작을 항생물질과 같은 저분자 물질이라기보다는 chitinase와 같은 고분자 효소에 의한 길항기작임을 알 수 있었다.(Table 1-4) 아울러 냉 alcohol로 단백질물질을 제거한 후의 잔존 길항력과 열처리로 단백질을 불활성화 시킨 후의 잔존 길항력을 조사하여 본 결과 길항균배양원액의 길항능에 비해 8~10%정도의 길항능만 잔존한다는 것은 이 길항세균의 길항기작이 chitinase와 같은 고분자 단백질효소들에 기인된 것이라고 추정할 수 있었다.(Table 1-5)

Table 1-2. The antagonistic indigenous bacteria producing the hydrolytic enzymes for phytopathogenic fungal cell wall degradation

(1) Antagonistic activity against *Fusarium oxysporium*

Strain	Enzyme production			Antifungal activity(culture supernatant)		High MW substance (10K)
	Chitinase	β -1.3 glucanase	Cellulase	Cell mass inhibition	Dual culture inhibition	
<i>Bacillus</i> sp. 4009	1.0(U)	25.8(U)	28.8(U)	15.0(%)	15.9(%)	26.0(%)
<i>Bacillus</i> sp. 7079	9.5	0.0	12.8	1.0	12.2	10.4
<i>Pseudomonas</i> sp. 3095	32.7	27.7	8.4	1.0	54.5	36.4
<i>Pseudomonas</i> sp. 3098	13.9	22.4	22.9	1.0	36.5	35.2

* : Used induce medium(chitin-pepton medium)

(2) Antagonistic activity against *Phytophthora capsici*

Strain	Enzyme production			Antifungal activity(culture supernatant)		High MW(10K) substance*
	Chitinase	β -1.3 glucanase	Cellulase	Cell mass inhibition	Dual culture inhibition	
<i>Bacillus</i> sp. 4009	1.0(U)	25.8(U)	28.8(U)	43.7(%)	30.3(%)	38.4(%)
<i>Bacillus</i> sp. 7079	9.5	0.0	12.8	1.0	11.8	5.7
<i>Pseudomonas</i> sp. 3095	32.7	27.7	8.4	1.0	78.8	47.4
<i>Pseudomonas</i> sp. 3098	13.9	22.4	22.9	1.0	71.9	38.6

* : Used induce medium(chitin-pepton medium)

Table 1-3. Hydrolytic enzymes produced by antifungal bacterium *Pseudomonas* sp. 3098

Enzymes	Substrate	Activity(u)*
Chitinase	Colloidal chitin	13.9
β -1,3-glucanase	Laminarin	22.4
Cellulase	CMC	22.9

*1 μ g of produced reducing sugar for 1hrs reaction.
Determinate with Somogyi-Nelson method.

Table 1-4. Antifungal activity of high-molecular substances(enzymes) of *Pseudomonas* sp. 3098 against *Fusarium solani*.

Add in media	Cell mass(dry weight mycelium)		
	Cell mass(mg)	Inhibition(%)	Antifungal(%)
Culture filtrate	136	52.4*	100.0
Dialyzed sol.	153	46.5	88.7
Centriprep 10 sol.	151	47.2	90.1
H ₂ O	286	0	-

*100%-relative dry weights of *F. solani* to control(H₂O) culture

Table 1-5. Residual antifungal activity of heat-denaturated culture filtrate and alcohol treated non-protein substances.

	Cell mass(mg)	Inhibiting(%)	Relative antifungal(%)
Culture filtrate	13.5	51.8	100
Non-protein substance	265	5.4	10.4
Heat-denaturated	271	4.2	8.1
H ₂ O	280	0	-

*100%-relative dry weight of *F. solani* to control(H₂O)culture

2) 항진균성 물질 생산성 길항미생물의 선발

가) 항생물질 생산성 길항미생물의 선발

길항미생물의 많은 종들은 항진균성 항생물질을 생산하므로써 그 생물방제능을 발휘한다. 해당지역의 토양생태에 우점되어 있는 항생물질 생산성 토양길항미생물을 선발하기 위하여 pairing culture plate (agar 3%) 상의 생육저지대 거리측정방법과 배양여액의 Amion centriprep 10(MW 10.000) 으로 얻은 저분자 물질에 의해 cell mass법, Dendroid test 등을 이용해 *Bacillus* sp. SH14, 4016, *Pseudomonas* sp. 2112, 4059 등을 선발할 수 있었다.(Table 1-6)

항생물질 생산성 길항미생물중 *Bacillus* sp. 4016을 대상으로 그 길항기작이 항진균성 항생물질에 기인됨을 조사하였다.

Bacillus sp.4016의 배양액 원침상등액을 Sigma dialysis sack(cellulose, MW 12.000)을 사용하여 저분자 물질을 모두 제거하고 고분자 물질만으로 그 길항력을 조사해 본 결과 항진균성 활성도가 84~85%정도가 소실되었으며 배양상등액을 10 0℃에서 60분간 열처리하여 효소에 의한 길항가능성을 제거한 후 그 길항능을 측정하여 본 결과 88~90%정도의 활성이 잔존함을 알 수 있었다. 아울러 유기용매 butyl alcohol에 길항물질을 전용 분획시켜 길항력을 조사해 보니 배양원액에 비해 93%이상의 길항력이 butanol층으로 옮길 수 있었고, Amicon Centriprep 10(MW 10.000)로 분리한 저분자물질에 89%이상의 길항력을 얻을 수있었다. 따라서 *Bacillus* sp. 4016의 길항력은 chitinase와 같은 고분자물질이 아닌 항생물질과 같은 저분자물질로 확인되었다(Table 1-7)

한편 길항세균과 식물근부균 *F.solani*를 동시배양(dual culture)시키면서 형태적 길항기작을 현미경으로 조사해본결과 포자발아 자체를 억제하기도 하였으며 발아되어 성장하는 균사도 비정상적인 위축 변형된 균사로 변해짐을 알았다. 또한 이 길항물질의 포자 발아억제와 균사체 신장억제 현상을 포자발아율과 균사체 신장율로 조사해 본 결과 항생물질의 농도를 증가시킴에 따라 *F. solani*의 발아율과 균사신장율이 동시에 감소됨을 알았다.(Table 1-8)

Table 1-6. The antagonistic indigenous bacteria producing the antibiotic substances for phytopathogenic fungal growth inhibition.

(1) Antifungal activity against *Fusarium oxysporum* and *F. solani*

Strain	Antifungal activity			Low MW (10K ↓) inhibition	Residual activity of heat treat
	Pairing distance	Cell mass inhibition	Dual culture inhibition		
<i>Bacillus</i> sp. SH14	5(mm)	15.3(%)	15.9(%)	9.2(%)	11.6(%)
<i>Bacillus</i> sp. 4016*	6	50.2	53.2	51.2	50.0
<i>Pseudomonas</i> sp. 4059	5	47.9	50.3	45.2	32.5
<i>Pseudomonas</i> sp. 2112	3	56.6	47.1	41.5	36.5

* : *F. solani*

Heat treat for 60min at 80°C

(2) Antifungal activity against *Phytophthora capsici*

Strain	Antifungal activity			Low MW (10K ↓) inhibition	Residual activity of heat treat
	Pairing distance	Cell mass inhibition	Dual culture inhibition		
<i>Bacillus</i> sp. SH14	10(mm)	43.7(%)	30.3(%)	31.2(%)	29.0(%)
<i>Bacillus</i> sp. 4016	4.5	52.5	50.3	52.3	50.2
<i>Pseudomonas</i> sp. 4059	5	75.8	81.1	71.0	67.2
<i>Pseudomonas</i> sp. 2112	9	88.8	92.8	83.7	78.7

He

at treat for 60min at 80°C

Table 1-7. Antifungal activity of low-molecular substance(antibiotics) of *Bacillus fumilus* 4016 against *Fusarium solani*

	Dry mycelium		mycelial colony size	
	inhibition ratio	relative	inhibition ratio	relative
Culture filtrate	52.9(%)	100.0(%)	51.5	100.0
Dialyzed	8.4	15.9	8.5	16.5
Centriprep10(10.000 ↓)	48.8	92.2	46.0	89.3
Heat-treated filtrate	46.5	87.9	46.5	90.3
Butanol ext.sol.	49.5	93.6	48.5	94.2

Table 1-8. Effect of antifungal substance produced from *Bacillus* sp.4016 on the Fusarial spore germination and tube elongation

Antifungal substance conc.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Chlamydospore germination (%)	Germ tube length(μm)
500	42.1	< 9
250	9.0	< 15
100	68.2	< 20
50	71.9	< 338
10	78.0	< 40
Untreated	100.0	380 \pm 20

나) 길항물질의 시험 병원균에 대한 길항 spectrum조사

선발된 길항미생물이 생산한 길항물질의 각종 식물병원균에 대한 길항력을 조사하는 antifungal spectrum을 조사하기 위해 항생물질 생산성 길항 균주로 선발된 *Bacillus pumilis* 4016이 생산한 길항 물질을 대표적으로 선택하여 조사하여 본 결과 *Fusarium solani*, *Fusarium oxysfoium*이나 *Alternaria kikuchiana*, *Alternaria mali* 등에 강한 길항을 가지고 있었다.(Table 1-9)

Table 1-9. Antifungal spectrum of the substances from *Bacillus* sp. 4016 against plant pathogenic fungi.

Phytopathogenic fungi	Fungal wt. (mg) ^a	Inhibition(%) ^b
<i>Altenaria kikuchiana</i>	179.1	48.8
<i>Altenaria mali</i>	192.4	45.0
<i>Pyriculara oryzae</i>	254.1	27.4
<i>Fusarium solani</i>	172.5	56.4
<i>Fusarium oxysporum</i>	211.9	35.9
<i>Botryis cinerea</i>	294.3	15.9
<i>Collectrichium spp</i>	298.7	14.6
<i>Rizoctonia solani</i>	325.9	6.8
<i>Phytophthora capsici</i>	312.5	10.7
<i>Pythium ultimum</i>	335.2	4.2

a : Dry weight of phytopathogenic fungi with culture filterates from *Bacillus* sp. 4016 in potato dextrose broth(PDB) after incubation of 28°C for 5 days.

b : Completed incubation ratio(100%)-dry weight of plant pathgenic fungi with culture filterates from *Bacillus* sp. 4016 relative to those cultured with water.

The all data values are the means from three replication.

3) Siderophore 생산성 길항균주의 선발

가) Siderophore 생산성 길항미생물의 선발

식물의 생육을 촉진하고 식물병원균의 발병률을 감소시키는데는 근권(Rhizosphere)미생물인 plant growth promoting rhizobacteria(PGPR)의 역할이 크며 그 원인으로 철이온(Fe^{3+}) 특이 결합물질인 siderophore의 생산에 기인된다는 것은 이미 널리 알려진 사실이다.

지역토양에서 선발한 토착 길항미생물중 siderophore 생산성 길항 세균을 siderophore 생산균주의 선발배지인 CAS (chrome azurol S) blue agar 평판배지에서 황색변색대(orange halo zone)이 1 cm 이상의 균주를 일차적으로 우선 분리하였고, siderophore 활성에 따른 CAS liquid assay와 Csaky hydroxamate assay 그리고 Arnow phenolic assay에 의해 siderophore 생산능이 가장 우수한 3 개 균주 GL7, SH14, LS20을 최종 선발하였다 (Table 1-10).

선발된 siderophore 생산균주의 식물병원균에 대한 길항능을 8-hydroxyquinoline 으로 탈철화 한 King's B(KB) 액체배지와 $100\mu M$ $FeCl_3$ 가 첨가된 KB배지를 이용해 cell mass법으로 조사한 결과, 선발균 모두 siderophore 생산에 의해 식물근부균 *F. solani* 생육을 강하게 억제하였으며, 이를 *in vivo* pot 실험으로 그 방제력을 확인하였다.

나) Siderophore 생산균주에 의한 식물병원균의 생육억제능

Siderophore 생산성 토착 길항미생물로 선발된 균주에 의한 식물병원균의 생육억제능을 조사하기 위해 식물근부균 *F. solani*를 대상으로 3% 8-hydroxyquinoline에 의해 탈철화된 KB (King's B) 액체배지와 $100\mu M$ $FeCl_3$ 가 첨가된 KB 배지에 길항균과 *F. solani*의 포자체를 접종하여 $28^{\circ}C$ 에서 4일간 배양시킨 후 Toyo filter paper No. 2로 여과, $90^{\circ}C$ 에서 건조하여 그 균체 중량을 측정, 비교하였다. 그 결과 탈철화된 KB 액체배지에서 성장한 siderophore 생산균주의 경우 식물병원균 *F. solani*에 상당히 높은 생육억제능을 나타내었다. 또한 탈철화된 KB 액체배지에서 성장한 균주가 $100\mu M$ $FeCl_3$ 첨가 KB 액체배지에서 보다 근부균의 생육억제능이 GL7, GL17의 경우 약 29% 정도, LS20의 경우 약 25%, SH14의 경우 13% 정도로 높게 나타내었다. 이 결과로 미루어 보아 선발된 길항균주가 분비하는 철이온 특이 결합물질인 siderophore에 의해 *F. solani*의 생육이 Fe 이온이 결여된 환경에서 보다 더 강하게 억제된 것을 볼 수 있었다 (Fig. 1-4).

Table 1-10. Characterization of siderophores in iron-deficient medium.

Strain	d	CAS liquid assay ^a	Catechol assay ^b	d	Hydroxamate assay ^c
GL7		0.092	0		23.49
GL11		0.113	10.27		4.52
SH14		0.110	26.22		0
GL17		0.093	0		22.75
GL19		0.098	0		7.88
LS3		0.102	0		19.24
LS6		0.096	0		8.41
LS12		0.094	0		22.52
LS16		0.114	25.26		0
LS20		0.088	0		25.31
Reference		1.000	0		0

All strains were grown at 28°C for 40 hr in iron-deficient KB medium.

^a Siderophore production was determined by measuring the decrease in absorbance at 630 nm by the method of Schwyn and Neilands.

^b The presence of catechol-phenolic type siderophores was detected at 510 nm by the method of Arnow. The value is the concentration of 2,3-dihydroxybenzoic acid equivalents ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

^c The presence of hydroxamate type siderophores was detected at 543 nm by the method of Csaky. The value is the concentration of hydroxylamine equivalents ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

All values are means of three replicates.

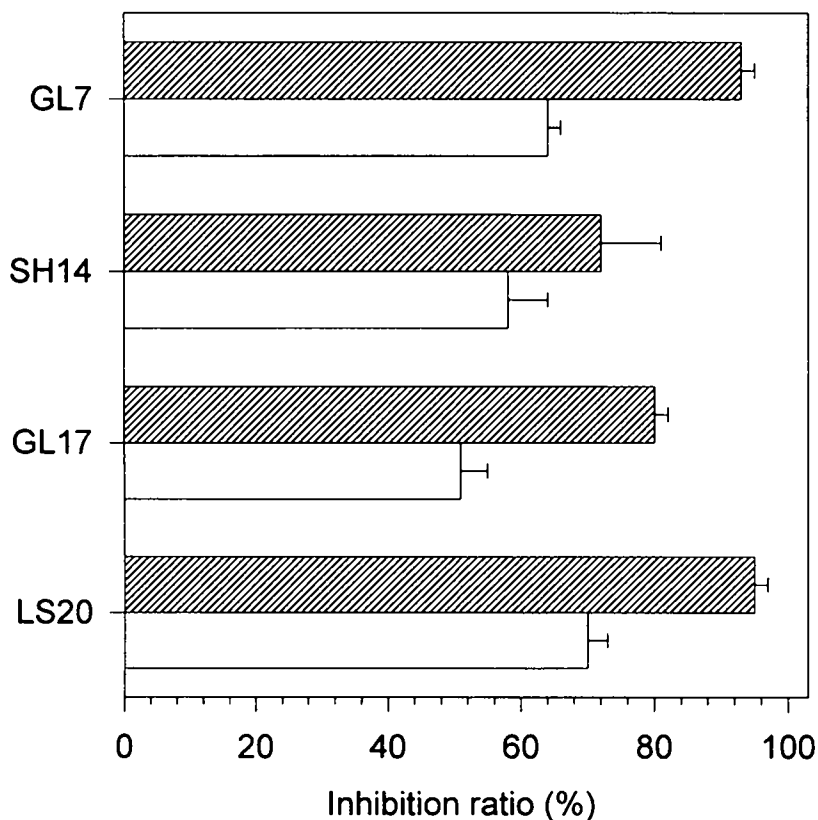


Fig. 1-4. Antifungal activity of siderophore- producing strains against *F. solani* in iron- deficient liquid cultures.

Bacterial strains were grown at 28°C for 40 hr in an iron-deficient KB broth(▨) or in a KB broth(□) amended with 100 μM FeCl₃, respectively. The bacterial cultures were inoculated with a suspension (10⁸ cfu/ml) of *F. solani* and dry weights of the cultures were determined after 4 days of incubation at 28°C. Each data point represents the mean of three replications; vertical bars represent standard deviations.

다) Siderophore 생산균주에 의한 타 억제물질 생산 가능성 조사

Siderophore 생산성 토착길항미생물로 선발된 균주를 대상으로 타 억제물질인 항생물질 및 외막가수분해효소에 의한 식물병원균의 생육억제 가능성을 조사하였다. 이를 위해 항생물질에 의한 억제 가능성은 PDNA(potato dextrose-nutrient agar) 평판배지의 좌측에 먼저 식물근부균 *F. solani*를 접종하여 28°C에서 2일간 배양시킨 후 우측 4 cm의 간격에 선발된 길항균을 희석 접종하여 배양시키면서 서로간의 증식선단까지의 거리를 측정, 비교하였다. 그리고 외막가수분해효소 chitinase의 생산성은 유일 탄소원으로 colloidal chitin이 함유된 CMM(chitin minimal medium)평판배지에 길항균을 접종하여 28°C에서 배양한 후 colony 주위의 clear halo zone의 크기를 비교, 관찰하였다. 그 결과 SH14 균주의 경우 타 균주에 비해 식물근부균 *F. solani*의 생육억제능은 비록 약하지만 Fe 이온이 풍부한 배지에서의 높은 억제력을 나타낸 결과는 항생물질 등에 의한 억제현상이 부가적으로 작용한 것으로 보이며, 그 외 siderophore 생산균주들은 타 억제물질인 항생물질 및 외막가수분해효소의 생육억제 가능성은 전혀 나타나지 않았다.

라) Siderophore 생산균주에 의한 식물병원균의 포자발아 및 균사신장 억제

선발된 siderophore 생산균주에 의한 식물근부균 *F. solani*의 명확한 억제기작을 규명하고자 포자발아 및 균사신장에 미치는 영향을 조사하였다. 포자발아 억제현상을 조사하기 위해 KB 액체배지에 길항균을 접종하여 28°C에서 24시간 배양한 다음 *F. solani*의 포자체를 첨가하여 5일간 배양시킨 후 Toyo filter paper No. 2로 여과, 90°C에서 건조하여 그 균체 중량을 측정, 비교하였다. 병원균의 균사신장 억제를 조사하기 위해서는 KB 액체배지에 *F. solani*의 포자체를 첨가하여 3일간 배양한 다음 길항균을 접종하여 28°C에서 4일간 배양시킨 후 그 균체중량을 측정, 비교하였다. 그 결과 선발된 siderophore 생산균주 모두 식물근부균 *F. solani*의 포자발아를 상당히 억제할 수 있었으며, 균사신장억제율도 60% 이상의 높은 억제능을 나타내었다. 그 중 GL7과 LS20 균주의 경우 포자발아율이 99% 정도, 균사신장억제율이 70% 이상으로 타 균주의 경우 보다 높게 나타내었다 (Fig.1-5, 1-6).

이상의 결과로 미루어 보아 선발된 siderophore 생산균주에 의한 식물병원균의 생육억제기작은 철이온 특이 결합물질인 siderophore의 분비에 따른 병원균의 chlamydospore 발아와 germ tube elongation에 필수적인 요인이 되는 철 (Fe^{3+}) 이온의 결핍으로 생육이 저해되는 경쟁적 길항작용이라 볼 수 있었다.

마) 타 siderophore 이용능 조사

토양내에서 자신이 생합성하지 않은 외부의 다른 미생물로 부터 생산된 ferric siderophore complex를 효과적으로 얻기 위한 목적으로 선발된 siderophore 생산성 길항균주로부터 생성된 siderophore 복합체를 서로간에 이용할 수 있는지 여부를 성장이 어려운 한계농도의 EDDHA (ethylenediamine di-*o*-hydroxyphenyl acetic acid, 20mM)가 첨가된 KB agar 평판배지에서 cross-feeding 실험에 따른 filter paper disc법을 이용하여 조사하였다. 그 결과 *P. fluorescens* LS20의 경우 모든 균주의 배양액이 침적된 filter paper disc 주변에 colony의 형성이 관찰되었으며, *P.*

fluorescens GL7, GL17 균주는 *B. subtilis* SH14의 배양액이 침적된 filter paper disc 주변에 colony의 형성을 관찰할 수 있었다. *B. subtilis* SH14 균주의 경우 타 균주의 배양액이 침적된 filter paper disc 주변에 colony를 전혀 형성하지 않았다 (Table 1-11). 따라서 *P. fluorescens* LS20, GL7, GL17 균주는 타 미생물체가 생산한 siderophore complex도 이용할수 있는 아주 강력한 siderophore생산성 길항세균으로 확인되었다.

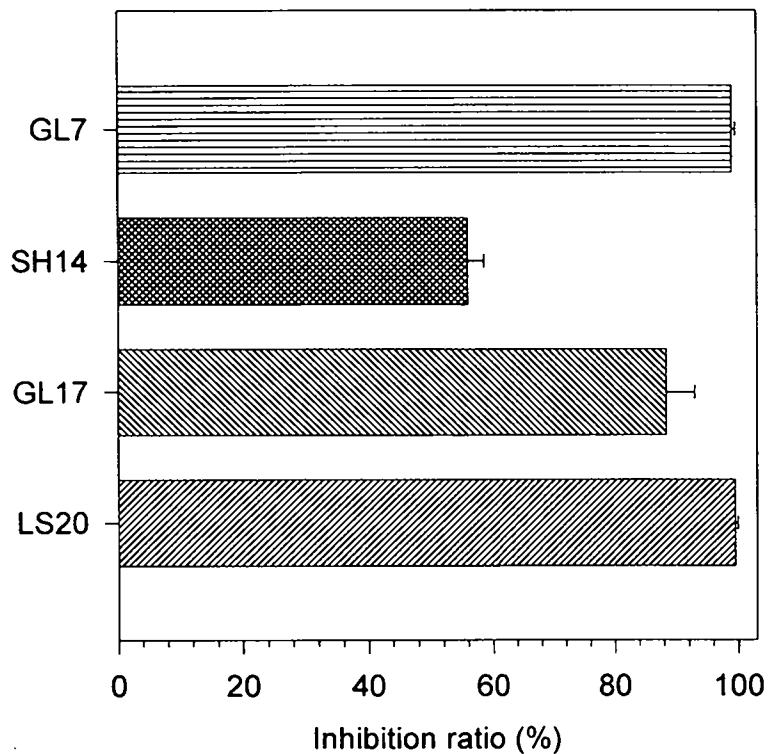


Fig. 1-5. Antifungal activity of siderophore- producing strains on spore germination of *F. solani* in liquid cultures.

Each of bacterial cell was grown in a KB liquid medium with spore suspension of *F. solani*. Dry weights of the cultures were determined after 5 days of incubation at 28°C.

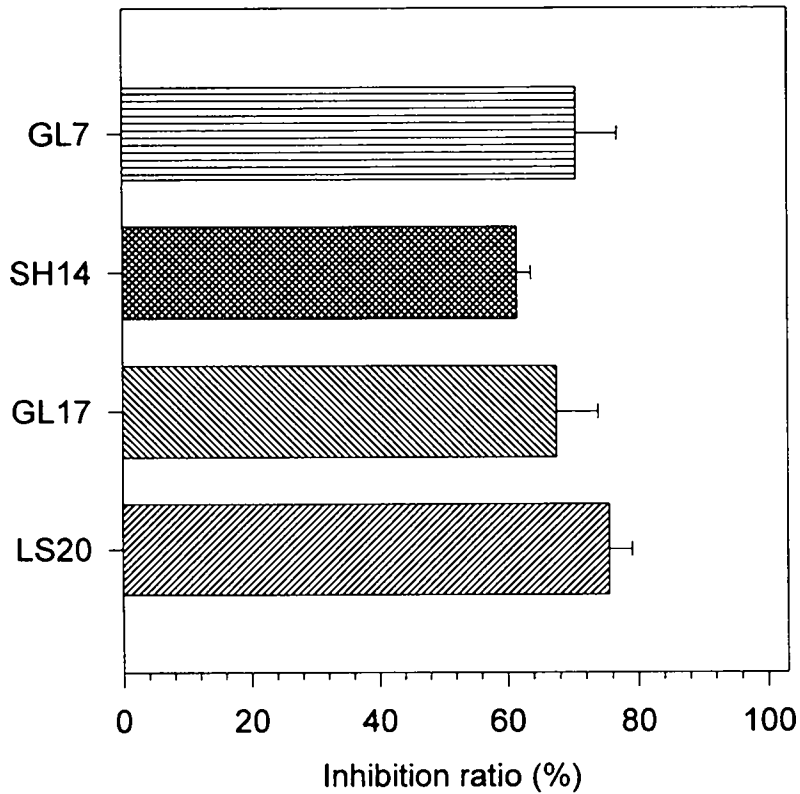


Fig. 1-6. Antifungal activity of siderophore-producing strains on mycelial growth of *F. solani* in liquid cultures.

Each of bacterial cell was added to a KB liquid medium preinoculated with *F. solani* for 3 days at 28°C. Dry weights of the cultures were determined after 4 days of incubation at 28°C.

Table 1-11. Ability of iron-restricted culture supernatants to cross-feed of siderophore producing bacteria using a siderophore assay.

Strain incorporated in agar	Growth stimulated by iron-restricted culture supernatant of strain			
	GL7	SH14	GL17	LS20
GL7	+	+	-	-
SH14	-	+	-	-
GL17	-	+	+	-
LS20	+	+	+	+

The bioassay involved measuring the zone of growth around 5mm diameter well containing 50 μ l sample on a plate containing KBA plus 20mM EDDHA seeded with 10⁶ cfu. of the bacteria.

사) 식물실험을 통한 생물 방제력 확인

선발된 siderophore 생산균주를 대상으로 토양내에서 실제로 근부방제력이 있는가를 알아보기 위해 발병 기주식물로 그 생육도가 빠른 강남콩 종자 (*Phaseolus vulgaris* L.)를 사용하여 28 $^{\circ}$ C 항온실에서 발아시킨 후 크기가 비슷한 종묘를 골라 이미 멸균된 Bermuculite와 경작지 토양이 들어 있는 plastic pot에 심은 다음, 식물 근부균 *F. solani*의 포자체 (2×10^8 cfu/g soil)와 생물방제균 *P. fluorescens*(2×10^8 cfu/g soil)를 pot 토양에 함께 처리한 후 22~25 $^{\circ}$ C 조명장치된 식물배양실에서 성장시키면서 식물성장 기간별로 그 잎수, 신장, 잎면적, 줄기상태 등 식물의 생육도 및 뿌리의 발육, 부패상태 등 근부병 발생정도를 15일간 단계별로 관찰, 조사하였다. 그 결과 Fig. 1-7과 1-8에서 보는 바와 같이 *F. solani*만을 처리한 경우는 28%의 생육을, 무처리구는 76%의 생육을 보인데 반해 선발된 생물방제균주와 *F. solani*와 함께 처리한 경우는 모두 80% 이상의 성장율을 보여 주었다. 그리고 방제균을 처리할 경우 무처리구 보다 식물의 생육도가 양호하였으며, 근부병 발생도 거의 볼 수 없었다. 이 결과로 미루어 보아 선발된 siderophore 생산균주는 식물근부균 *F. solani*에 의한 근부병을 효과적으로 방제할 수 있었으며, 또한 생산된 siderophore에 의해 철이온을 식물에 공급하여 PGPR로 작용함으로써 식물의 성장을 촉진시킬 수 있는 것으로 사료된다.

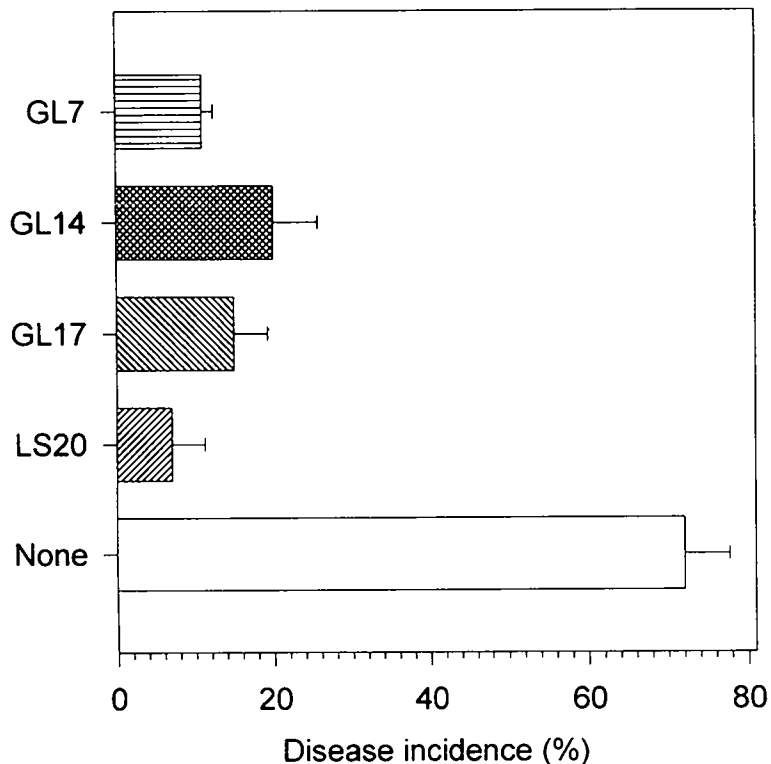


Fig. 1-7. Effect of siderophore-producing strains on the fusarium wilt of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.).

Polypropylene boxes (50×50×50mm) were two-third filled with a field soil, and 25 seeds of kidney bean were placed in each box. A seed cover layer (one-third of the pot's depth) was infested with 6×10^8 CFU of *F. solani* spore per gram of soil and mixed with 5×10^8 CFU of bacterial suspension. Each data point represents the mean of three replications of 25 seedlings each; vertical bars represent standard deviations.

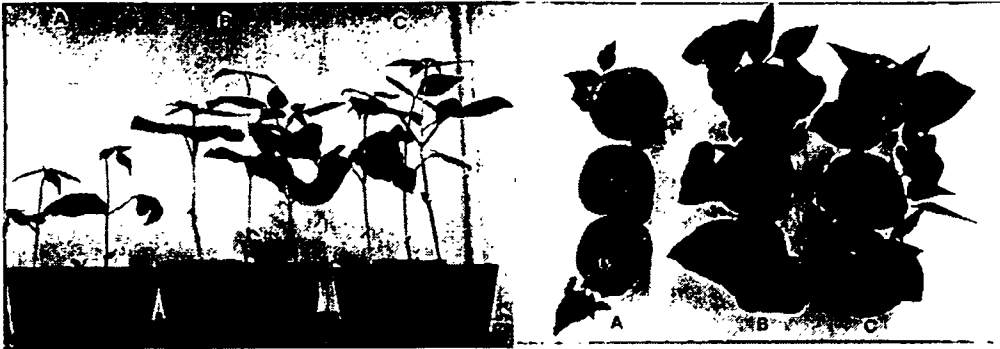


Fig. 1-8 *In vivo* suppressive effect of *P. fluorescens* GL7 against fusarium wilt of kidney bean (*phaseolus vulgaris* L.) caused by *F. solani*

A : *F. solani*

B : *F. solani* and *P. fluorescens* GL7

C : Control

4) 길항진균의 분리

가) 고추 역병균에 대한 길항진균의 선발

토착 길항진균을 선발하기 위해 경주시 서면 일대의 10개 지역에서 채취한 공시토양재료에서 단일 colony로 157개의 진균을 순수분리하였다. 157개 균주 중 고추 역병균(*Phytophthora capsici*) 및 시들음병균(*Fusarium oxysporum*)과 대칭배양하여 역병균과 시들음병균의 균사생장을 억제시켜 clear zone을 형성하거나, 균사 생장을 억제시키면서 중복생장(Fig. 1-9)을 하는 16개 균주를 1차 길항진균으로 선발하였다.

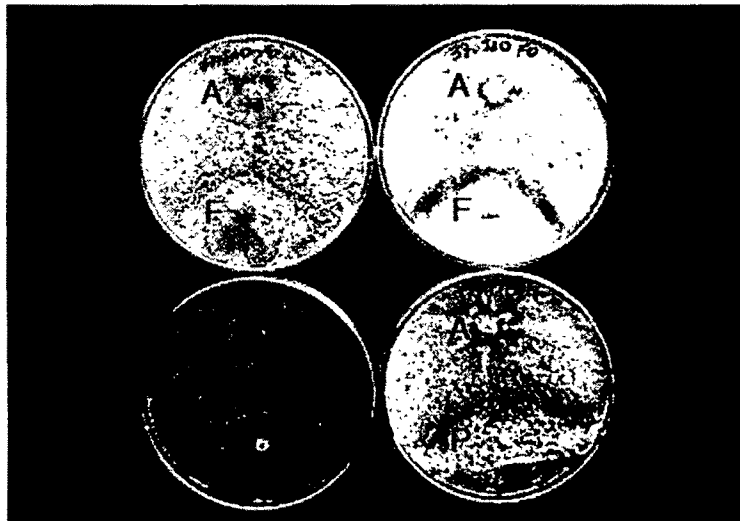
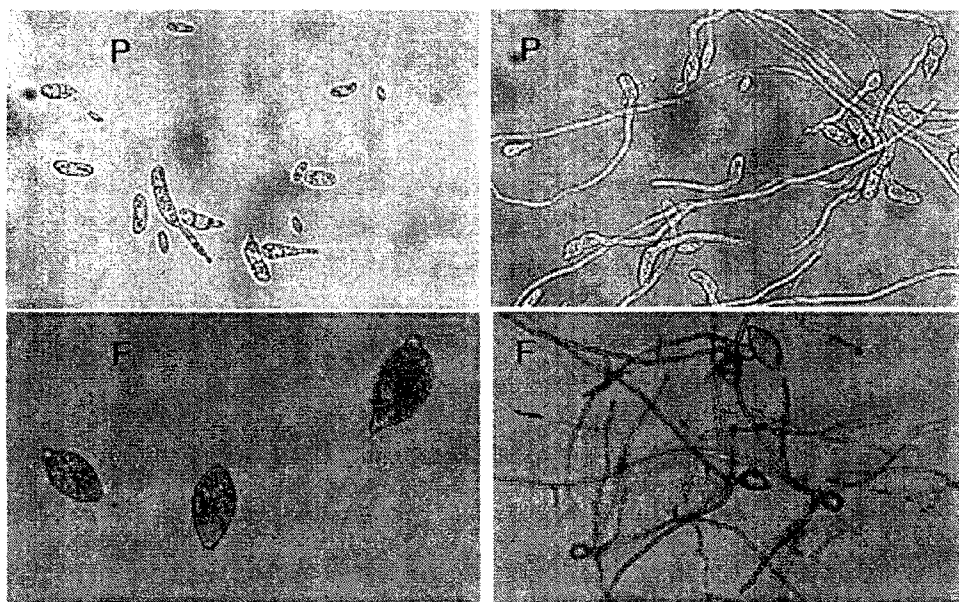


Fig. 1-9. Inhibition effect of antagonistic fungi 37 J10 (A) against *Phytophthora capsici* (P) and *Fusarium oxysporum* (F) on potato dextrose agar (left) and V-8 juice agar (right) plate for 5 days after incubation at 27°C.

나) 길항진균의 병원균 유주자낭 발아 억제효과 조사

1차 선발한 16개 길항진균의 배양여액에 역병균의 유주자와 시들음병균의 분생포자를 접종하여 24시간 후에 발아율을 조사한 결과 모든 균주의 배양여액에서 고추 역병균의 유주자낭의 발아는 완전히 억제되었으며 (Fig. 1-10), 시들음병균의 분생포자 발아도 현저히 억제되었

다(Table 1-12). 이러한 결과는 대칭배양에서 균사생장을 억제하여 clear zone을 형성하거나, 공시 병원균에 대해 중복생장을 하여 선발한 모든 길항진균이 항진균성 물질을 분비한다고 할 수 있었으며, 지 등(1988)이 분리한 *Trichoderma harzianum*의 배양여액의 효과와 유사하였다.



Culture filtrate

Water

Fig. 1-10. Antagonistic effect of cell-free culture filtrates of antagonistic fungi(36 J13) isolated from soils on germination of the zoosporangia of *Phytophthora capsici* (P) and the conidia of *Fusarium*

Table 1-12. Antagonistic effect of cell-free culture filtrates of antagonistic fungi isolated from soils on germination of the zoosporangia of *Phytophthora capsici* and the conidia of *Fusarium oxysporum*

Antagonistic fungi	Germination(%) ^a	
	Zoosporangia of <i>P. capsici</i>	Conidia of <i>F. oxysporum</i>
25 J1	0	0
27 J5	0	3.1
37 J10	0	0
36 J13	0	1.4
19 J15	0	2.5
35 J15	0	0
23 J16	0	0
28 J16	0	3.4
21 K2	0	4.2
24 K5	0	5.2
22 K7	0	3.7
20 K9	0	5.1
31 K10	0	1.9
38 K10	0	0
27 K12	0	1.4
PDB	91.5	94.2

The antagonistic fungi were grown in PDB for 3~5 days at 27°C and their cell-free filtrates were collected by centrifugation followed by aseptic 0.45 μ m-filtration.

a: Values are averages of 3-replications.

다) 길항진균의 고추 역병 억제효과

길항진균의 배양토에 건전 고추묘를 이식 후 고추 역병균의 유주자낭을 관주처리하여 접종한 결과 접종 4일 후부터 이병주를 관찰할 수 있었으며(Fig. 1-11), 14일까지 경시적으로 이병률을 조사한 결과는 Table 1-13과 같다. 접종 4일 후부터 이병주를 관찰 할 수 있었으며, 6일 후에는 멸균수를 처리한 대조구에서는 모든 식물이 발병되었으나, 길항진균을 처리한 구에서는 병의 발생이 억제되는 경향을 보였다. 접종 8일 후에는 길항진균의 처리구에서도 병이 발생되기 시작하여 27 J5, 37 J10, 36 J13 및 31 K10 균주의 처리에서는 각각 20.0%, 26.7%, 20.0% 및 33.3%의 이병률을 보였으며 35 J15와 21 K2 균주의 처리구에서는 100%의 이병률을 보여 균주간 차이가 현저하였다. 접종 14일 후에는 병든 식물이 완전히 고사하는 현상을 보였으며, 접종 8일 후에 낮은 이병률을 보였던 27 J5, 37 J10, 36 J13 및 31 K10 균주의 처리에서는 53.3~66.7%의 이병률을 보여 고추 역병발생에 대한 억제효과가 높음을 알 수 있었다.

고추 역병 발생의 최적조건에서 실험한 이상의 결과에서 모든 공시 길항진균의 배양토에서 역병의 발생이 대조구에 비하여 지연되었거나 억제됨을 알 수 있었다. 특히 접종 8일 후 까지 역병발생의 억제효과가 50%이상 되었던 균주들은 길항 미생물을 이용한 고추역병의 생물적 방제에 관한 다른 연구보고와 비교할 때 월등히 높은 병 발생 억제효과를 보이지는 않았지만 역병의 최적발생조건에서 비교적 높은 효과를 나타내었으므로 이들 균주의 생리, 생태적 특성을 구명하여 적정 처리 방법 등을 개발할 경우 고추역병을 생물학적으로 방제할 수 있는 가능성을 보였다.



Fig. 1-11. Effect of antagonistic fungi(36 J13) on disease development of Phytophthora blight of red-pepper plants in infested soil(3×10^4 zoosporangia/600g pot soil) in the green house. Six days after inoculation.

Table. 1-13. Effect of selected antagonistic fungi on incidence of Phytophthora blight of red pepper plants in infested soil(3×10^4 zoosporangia/600g pot soil) in the green house

Antagonistic fungi	Number of diseased plants(/15)					
	4days ^a	6	8	10	12	14
25 J1	0	0	7	8	15	15(100%)
27 J5	0	2	3	3	7	9(60.0%)
37 J10	2	4	4	5	8	8(53.3%)
36 J13	0	3	3	5	9	10(66.7%)
19 J15	0	6	9	14	15	-(100%)
35 J15	2	13	15	-	-	-(100%)
23 J16	2	5	10	14	15	-(100%)
28 J16	1	4	9	15	-	-(100%)
21 K2	3	12	15	-	-	-(100%)
24 K5	3	5	8	13	15	-(100%)
22 K7	2	3	8	10	13	13(86.6%)
20 K9	0	8	13	15	-	-(100%)
31 K10	0	3	5	6	8	8(53.3%)
38 K10	0	0	12	15	-	-(100%)
27 K12	0	4	9	13	14	14(87.5%)
Water	4	15	-	-	-	-(100%)

a: days after inoculation.

5) 항진균성 길항 방선균의 선발

가) 항진균성 길항 방선균의 선발

환경 보전적 생물학적 방제균을 선발하기 위해 우리 해당지역의 기후, 품종 및 토양적응되어 생육력이 강하고 또한 병원성진균에 강한 억제력을 가진 길항성 방선 균주를 500 여 주의 방선균을 분리하였다. 분리된 균주를 대상으로 시들음병의 원인균인 식물병원균 *Fusarium oxysporum*을 이용하여 생육억제력이 강한 균주를 선발하였다. 선발된 길항균주를 대상으로 agar piece 법, Dendroid test 법으로 Table 1-14에서 보는 바와 같이 항진균성 생산방선 균주로 보이는 균주 중 항균 활성이 가장 강한 한 균주를 최종 선발하였다.

나) 항진균성 길항기작

선발된 길항균주 *Actinomyces* sp. KH-28이 병원성 진균인 *F. oxysporum*에 강력한 저해력을 나타내므로 이 길항기작을 확인하기 위하여 몇 가지 방법을 이용하여 확인하였다. 기존의 길항기작은 진균세포외막 가수분해효소와 2차대사산물인 항생물질 그리고 경쟁적 영양물질흡수물질 siderophore에 의한 저해방법으로 나눌 수 있다. 본 저해물질의 저해기작을 확인하기 위하여 Bennett's 배지에 28℃에서 5일간 배양시킨 배양여액을 Sigma제 membrane sack 를 사용하여 저분자물질을 분리한 후 각각 억제력을 확인하였으며 또한 Amicon을 이용하여 분자량 별로 분리하여 억제력을 확인 한 결과 저분자 물질에서 저해력을 확인하였다. 이러한 결과로 본 *Actinomyces* sp. KH-28이 생산하는 물질이 항생물질인 것으로 판명하였다.

다) 항진균성 길항방선균의 식물병원균의 억제 spectrum 확인

선발된 길항방선균 *Actinomyces* sp. KH-28 균주를 12 종류의 식물병원성 진균에 plate 상에서 대치배양시킨 결과 Table 1-15에서와 같이 *F. solani*, *F. oxysporum*, *Alternaria mali*, *Phytophthora capsici* 등의 병원성 진균에 억제력을 나타내었으며, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium expansum*, *F. lini*, *Rizoctonia* sp.등의 병원성진균에는 저해력을 나타내지 않았다. 이와같은 저해력은 균체의 배양여액을 n-butanol층에 녹인 물질을 농축하여 확인하였다. 저해 zone은 Fig. 1-12의 *F. oxysporium*의 저해력을 paper disc로서 확인하였다.

라) 식물실험을 통한 생물방제력 측정

선발된 생물방제균 *Actinomyces* sp. KH-28이 실제 토양내에서도 그 길항력이 발휘하는 지를 확인 하여 본 바 Fig. 1-13, 1-14에서와 같이 실제토양 내에서도 그 길항력이 입증되어 항진균성 방선균주를 확보하였다. 본 연구에서 시들음병균인 *F. oxysporum*에 강하게 저해함을 확인 할 수 있었으며, 또한 고추 및 가지 역병균인 *Phytophthora capsici*에 대해서도 뛰어난 길항력을 발휘함을 확인 할 수 있었다 (Fig. 1-15, 1-16).

Table 1-14. Selection of antifungal antagonistic strain against *F. oxysporum* from rhizosphere in suppressive cultivated soil.

The results were a average value by test of 3 times.

Strains	Inhibition radius (mm) [±]
KH-4	1
KH-7	2
KH-12	3
KH-18	2
KH-19	5
KH-22	2
KH-23	4
KH-28	10
KH-34	7

* The isolates and *F. oxysporum* inoculated 20mm distance at first on the PDA and Bennett's medium of 50% each and incubated at 28°C for 5 days.

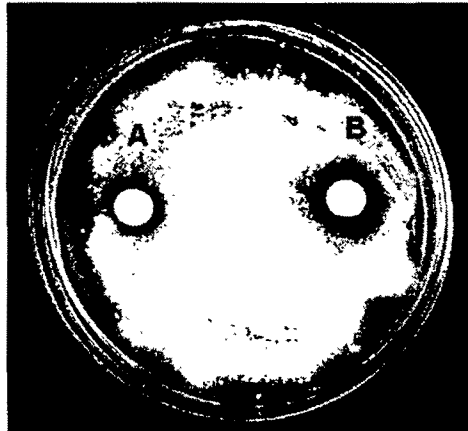


Fig. 1-12. Antifungal inhibition of *F. oxysporum* with paper disk method to cultures of *Actinomyces* sp. KH-28.

A: one piece of paper B: two piece of papers



Fig. 1-13. *In vitro* antagonistic effect of *Actinomyces* sp. KH-28 against phytopathogenic *Fusarium oxysporum*

A: *Actinomyces* sp. KH-28, B: *Fusarium oxysporum*

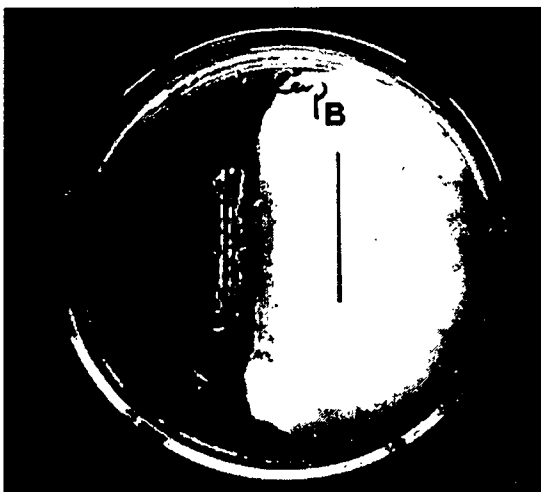


Fig. 1-14. *In vitro* antagonistic effect of *Actinomyces* sp. KH-28 against phytopathogenic *Phytophthora capsici*.

A: *Actinomyces* sp. KH-28, B: *Phytophthora capsici*

Table. 1-15. Antifungal spectrum of *Actinomyces* sp. KH-28 the plant pathogenic fungi.

+ : inhibited, - : uninhibited

Test fungi		Paring culture	Crude antibiotic*
<i>Pythium ultimum</i>	잘록병	-	-
<i>Fusarium solani</i>	뿌리 썩음병	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	시들음병	+	+
<i>Rhizoctonia</i> sp.	모잘록병	-	-
<i>Fusarium moniliforme</i>	시들음병	-	-
<i>Alternaria kikuchiana</i>	점무늬낙엽병	+	+
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	잎탄저병	-	-
<i>Penicillium expansum</i>	푸른곰팡이병	-	-
<i>Stemphylium</i> sp.	잎마름병	+	+
<i>Septoria solani</i>	둥근무늬병	-	-
<i>Puccinia adenophora</i>	녹병	-	-
<i>Phytophthora capsici</i>	역병	+	+

*The crude antibiotic extracted with n-BuOH from culture filtrates, concentrated 100 times and examined by paper disk method



Fig. 1-15. In vivo suppressive effect of *Actinomyces* sp. KH-28 against phytopathogenic *Fusarium oxysporum* on the red pepper
 A: *Fusarium oxysporum*. B: *Fusarium oxysporum* with *Actinomyces* sp. KH-28
 C: Control



Fig. 1-16. In vivo suppressive effect of *Actinomyces* sp. KH-28 against phytopathogenic *Phytophthora capsici* on an eggplant.
 A: *Phytophthora capsici*., B: *Phytophthora capsici* with *Actinomyces* sp. KH-28

6) Protease inhibitor 생산 방선균의 분리 및 선발

가) Protease inhibitor 생산 방선균의 분리 및 선발

식물병원성진균에 길항 미생물을 이용하여 생물학적 방제를 하고자하는 환경농업 연구가 활발히 연구되고 있다. 이와 같은 방제기작으로서 외막가수분해효소인 chitinase(138,139), glucanase(140), cellulase(141) 등 식물병원성진균의 외막을 분해함으로써 균생장을 억제하는 기작과 미생물 특유의 2차 대사산물인 항생물질에 의해 병원성 진균의 세포벽 합성이나 세포의 증식을 억제하는 기작등이 있다(142,143). 또한 균의 생육에 필수적인 철등과 같이 영양물질을 경쟁적으로 흡수함으로써 병원성 진균의 생육을 억제하는 방제기작등이 많이 연구되고 있다(144,145).

지금까지 알려진 이러한 방제기작 이외에 해충 및 병원성 진균이 분비하는 분해성 단백질 분해효소를 특이하게으로 저해함으로써 단백질의 섭취를 저해하여 균의 생육을 저해하는 기작도 있을 수 있다. 이러한 연구를 위하여 처병해 경작지의 토양으로부터 채취하여 분리한 방선균으로부터 15 종의 식물병원균에 대하여 길항 활성도가 있는 균주를 선발하기 위하여 1차로 채취한 시료를 80℃에서 30 분간 가열한 시료를 멸균 생리식염수에 혼탁하여 1×10^{-3} 까지 희석한 후 방선균 분리 배지인 Starch-nitrate agar 배지를 사용하여 0.1ml 씩 접종한 후 28℃에서 2-3 주 일 간 배양하여 우선 500여종의 방선균을 분리 하였다. 이때 형성된 각기 다른 방선균 colony를 순수분리하여 사과반점 낙엽병의 원인이 되는 *Alternaria mali* 와 탄저병의 원인이되는 *Colletotridum gloeosporides* 의 생육을 억제하는 길항균주를 평판 배양법으로 선발하였다. 1차로 선발된 30 균주중에서 2차로 *Alternaria mali* 와 *Colletotridum gloeosporides* 에 보다 강한 억제력을 가지며 기존의 저해기작에 의한 저해와 저해영역이 다른 형태의 균을 선발하여 그 중 1균주의 방선균을 최종선발 하였다.

나) 길항방선균의 항진균성 길항기작

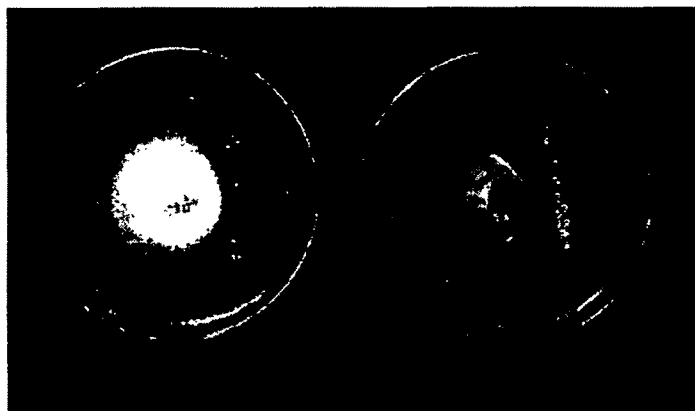
선발된 탄저병균 동식물병원균의 생육을 억제하는 생물방제균 *Streptomyces cyaneus* KH-1 길항방선균의 길항기작이 기존의 항진균성 항생물질(kasugamycin, fusidic acid, cycloheximide 등) 이나 세포외막 가수분해효소(chitinase, cellulase, glucanase 등)에 의해 병원성 진균을 억제하는 통상의 길항기작인가를 조사하기 위해 이미 설명한 바의 방법으로 그 가능성을 확인 하였으나 항생물질이나 가수분해효소, siderophore 생산 등에 의한 길항기작이 아님을 알았다.

따라서 기존의 억제기작 이외에 고분자 단백질 등의 영양물질을 분해하여 흡수하는데 필요한 분비성 세포외 효소를 저해함으로써 병원균의 생육을 억제하는 효소저해제에 의한 길항기작이 아닌가를 확인 해 볼 필요가 있다. 그러므로 생물방제균으로 선발된 *Streptomyces cyaneus* KH-1의 길항기작으로 효소저해제에 의한 원인이 아닐까 의심하여 protease 활성을 저해하는 protease inhibitor의 존재를 확인 하고자 하였다.

우선 최종 선발된 길항방선균 *Streptomyces cyaneus* KH-1 에 의한 식물병원균

생육억제력을 알아보기 위하여 고분자성 배지를 이용하여 사과반점낙엽병인 *Alternaria mali* 와 탄저병의 원인이되는 *Colletotridum gloeosporides*을 petri dish 의 한쪽에 접종한 다음 50mm 간격을 두고 대칭인 지점에 선발 방선균주인 *Streptomyces cyaneus* KH-1을 접종하여 배양하였다. 또한 일반 항진균성 항생물질에 의한 길항기작인지를 확인하기 위해서 단당류인 glucose 20g, 저분자단백질성인 casamino acid 4g, yeast extract 2g, K₂HPO₄ 0.05g, MgSO₄ · 7H₂O 0.05g, NaCl 2g, agar 15g (per 1 l) 에 pH 7.0 을 맞춘 저분자 배지상에서의 억제력과 비교하였다. 그 결과 3 일 배양한 후 항균물질의 분비에 의하여 식물병원균의 생육을 억제하는 zone의 거리 차이를 확인하였다.

이러한 결과로서 식물병원균의 생육을 위한 고분자 영양물질을 흡수하기 위하여 분비한 분해효소를 저해함으로써 영양분의 부족에 의해 병원균 생육이 억제되는 것으로 확인 할 수 있었다 (Fig. 1-17). 또한 *Streptomyces cyaneus* KH-1의 배양물질을 80℃에서 30 분 동안 가열한 후 그 저해성을 paper disc 법에 의하여 확인 한 결과 비슷한 억제력을 나타냄을 확인 할 수 있었다. 따라서 *S. cyaneus* KH-1 이 생산한 길항성 저해물질은 병원성진균의 외막을 붕괴하는 외막 가수분해효소도 아님을 확인 할 수 있었고 고분자성 protein의 분해를 저해하는 protease inhibitor에 그 길항기작이 있음을 추론 할 수 있었다.



A

B



C

D

Fig. 1-17. Inhibition of hyphal extension of *A. mali* and *C. gloeosporides* by antifungal agents produced by *S. cyaneus* KH-1.

A: *P. ultimum*, B: *A. mali*, C: *P. ultimum*, D: *C. gloeosporides*

A and C composed with medium of low molecular media(starch 10g, soy bean flour 25g)

B and D composed with medium of high molecular media(casamino acid 4g, yeast extract 2g)

2. 길항미생물의 길항기작 구명, 정제 및 물질동정

가. 식물병원성 진균의 외막가수분해 효소의 정제 및 특성조사

1) *Pseudomonas* 유래 chitinase의 기작구명 및 정제

가) Chitinase의 정제 및 분자량

Pseudomonas sp. 3098의 배양여액을 90%황산암모늄으로 침전시켜 조효소액을 얻고, 조효소액을 DEAE-cellulose column chromatography(Fig. 2-3), Bio-Gel P-100에 의한 겔여과(Fig. 2-4), 1차 및 2차 Hydroxyapatite column chromatography(Fig. 2-3, 2-4)과정을 거쳐 chitinase를 정제하였다. 정제과정을 요약한 결과는 Table 2-1과 같다. 정제효소의 정제도는 배양여액에 비해 15.7배 증가하였고, 회수율은 5.8%로 나타났다.

정제효소의 순도 및 분자량을 조사하기 위하여 SDS-PAGE로 확인한 결과는 Fig. 5와 같이 단일밴드를 나타내었으며, 분자량은 45kDa으로 추정되었다.

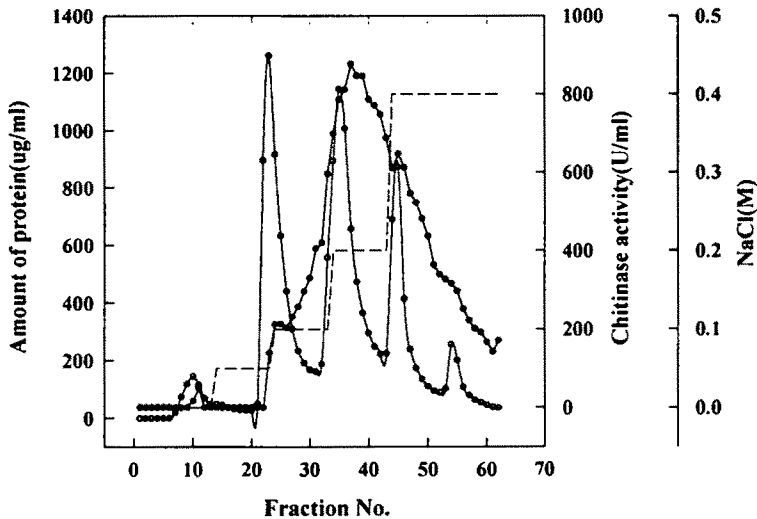


Fig. 2-3. Ion Exchange chromatography of chitinase from *Pseudomonas* sp. 3098 on DEAE-cellulose column.

The column(2.1x7cm) was equilibrated with 5mM Tris-HCl buffer(pH 7.2). The enzyme adsorbed was eluted by a stepwise elution of NaCl concentration in 5mM Tris-HCl buffer solution at the flow rate of 18ml/hr and 3ml fractions were collected.

—●—, Protein amount ; —●—, Chitinase activity ; - - - - , NaCl concentration.

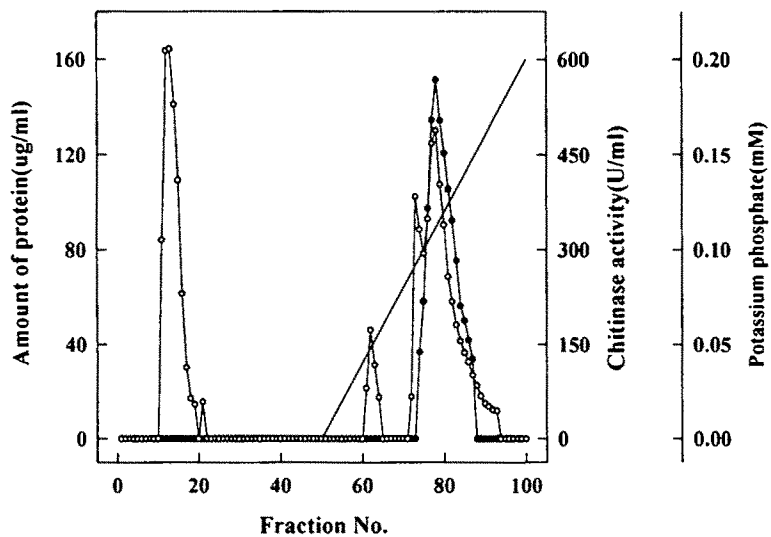


Fig. 2-5. 1st hydroxyapatite column chromatography of chitinase from *Pseudomonas* sp. 3098.

The column(2.2x7.0cm) was equilibrated with 10mM potassium phosphate buffer(pH 6.8). The enzyme absorbed eluted by a linear gradient of potassium phosphate concentration at the flow rate 8ml/hr and 2ml fractions were collected.

○—○ , Protein amount ; ●—● , Chitinase activity ;
 — , Concentration of potassium phosphate buffer(pH 6.8).

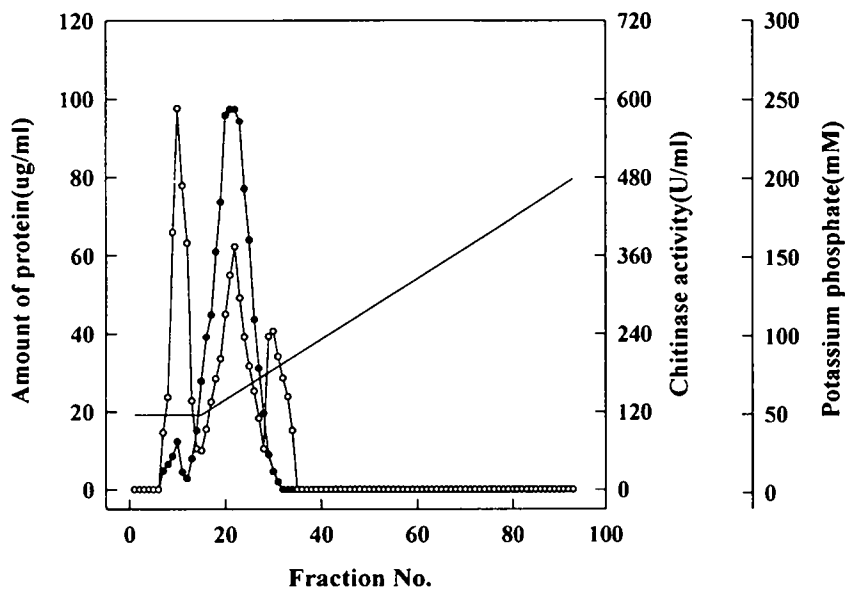


Fig. 2-6. 2nd Hydroxyapatite column chromatography of chitinase from *Pseudomonas* sp. 3098.

The column (2.2 x 4.0cm) was equilibrated with 10mM potassium phosphate buffer (pH 6.8). The enzyme adsorbed was eluted by a linear gradient of potassium phosphate concentration at the flow rate of 12ml/hr and 1.5ml fractions were collected.

○—, Protein amount ; ●—, Chitinase activity ;
 —, Concentration of potassium phosphate buffer (pH 6.8).

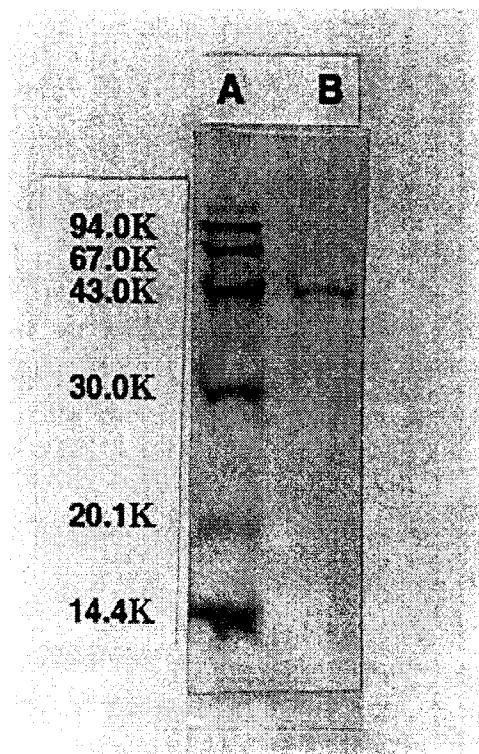


Fig. 2-7. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of purified chitinase.

The purified enzyme was electrophoresed on a 7.5% polyacrylamide slab gel with 0.1% SDS. Lane A, Molecular mass markers(in kilodaltons). Lane B, Purified chitinase.

Table 2-1. Summary of the purification of the chitinase produced from *Pseudomonas* sp. 3098

Purification step	Total Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Culture filtrate	1,963.4	12,095.4	6.2	-	100.0
Salting out and dialysis	861.3	9,917.5	11.5	1.85	82.0
DEAE-cellulose chromatography	196.2	4,626.3	23.6	3.81	38.2
BIO-GEL P-100 gel filtration	121.5	3,701.2	30.5	4.92	30.6
1st Hydroxyapatite chromatography	20.6	1,521.3	73.8	11.90	12.6
2nd Hydroxyapatite chromatography	7.2	702.5	97.6	15.74	5.8

나) 정제효소의 특성

(1) pH의 영향

Pseudomonas sp. 3098이 생산하는 chitinase의 활성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과는 Fig. 2-8과 같이 pH5.0에서 최대활성을 나타내었다. 이는 *Serratia marcescens*(17), *Streptomyces griceus*(150), *Bacillus licheniformis*(151) 등이 생산하는 대부분의 chitinase 최적 pH가 4.0~7.0으로 약산성인 것처럼 본 균주가 생산하는 chitinase의 최적 pH5.0도 약산성으로 거의 일치하였다.

Pseudomonas sp. 3098이 생산하는 chitinase의 pH 안정성을 검토한 결과는 Fig. 2-9에서 보는 바와 같이 pH5.0~9.0까지의 범위에서 80% 이상의 잔존활성도를 나타내었다. pH3.0에서는 약 50%, pH4.0에서는 약 75%의 잔존활성도를 나타내었으나, pH10.0에서는 급격히 실활되어 약 40%의 잔존활성도를 나타내었다.

(2) 온도의 영향

Pseudomonas sp. 3098이 생산하는 chitinase의 활성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 2-10과 같이 45℃에서 최대활성을 나타내었다. 이는 *B. licheniformis*(151), *Streptomyces thermoviolaceus*(152) 등이 생산하는 호열성 효소의 최적온도 70~80℃와는 상당한 차이를 보이나, *Aeromonas salmonicida* (153), *Aspergillus* sp.(68) 등이 생산하는 대부분의 chitinase 최적온도 40~50℃와 일치하였다.

Pseudomonas sp. 3098이 생산하는 chitinase의 열에 대한 안정성을 검토한 결과는

Fig. 2-11과 같다. 50℃에서 3시간 열처리로 약 80%이상의 잔존활성을 나타내었으며, 70℃에서 30분간 또는 60℃에서 1시간 열처리로 약 50%의 잔존활성을 나타내었다. 이는 *Streptomyces orientalis*(154)가 생산하는 chitinase의 경우 70℃에서 15분간, *Aeromonas salmonicida*(153)가 생산하는 chitinase의 경우 60℃ 이상의 열처리로 효소활성이 거의 실활되는 것에 비해 열에 대한 안정성이 비교적 크다는 것을 알 수 있었다.

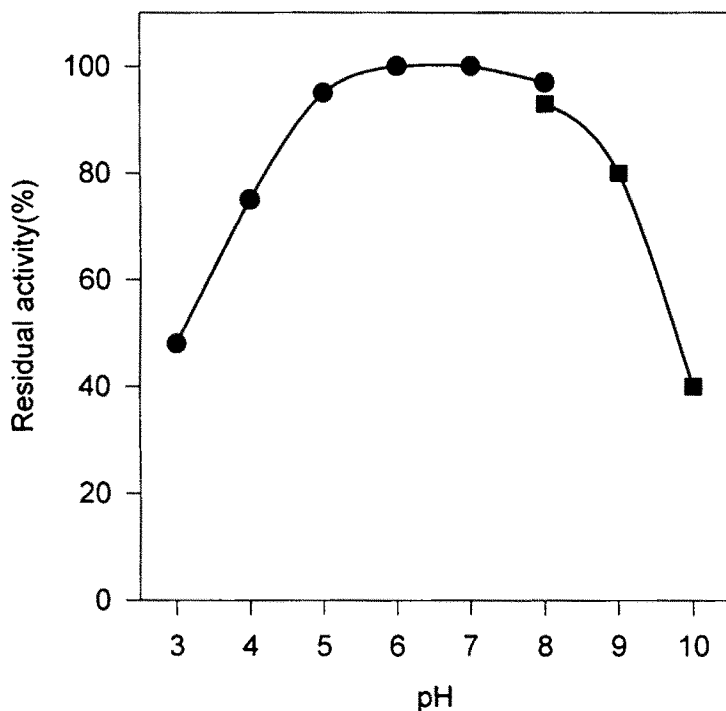


Fig. 2-9. pH stability of *Pseudomonas* sp. 3098 chitinase.

- : 0.1M citric acid-0.2M Na₂HPO₄ buffer,
- : 0.1M Clark and Lubs buffer.

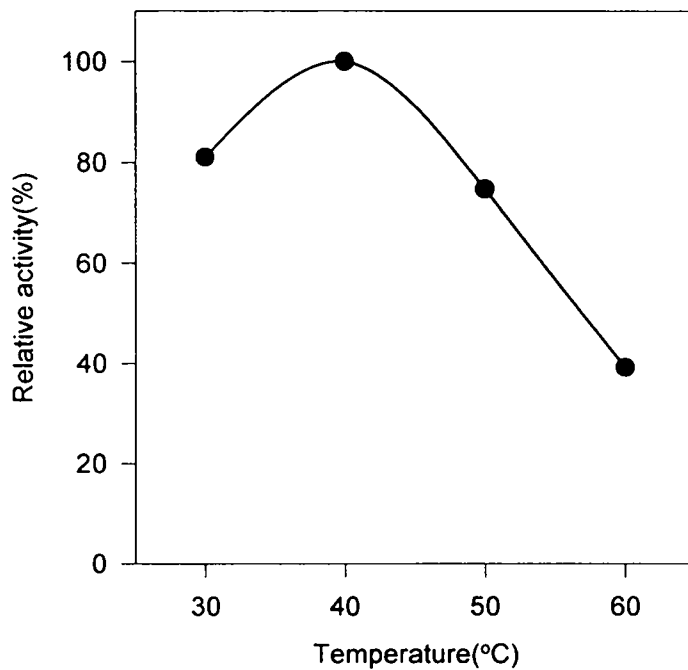


Fig. 2-10. Effect of temperature on the activity of *Pseudomonas* sp 3098 chitinase.

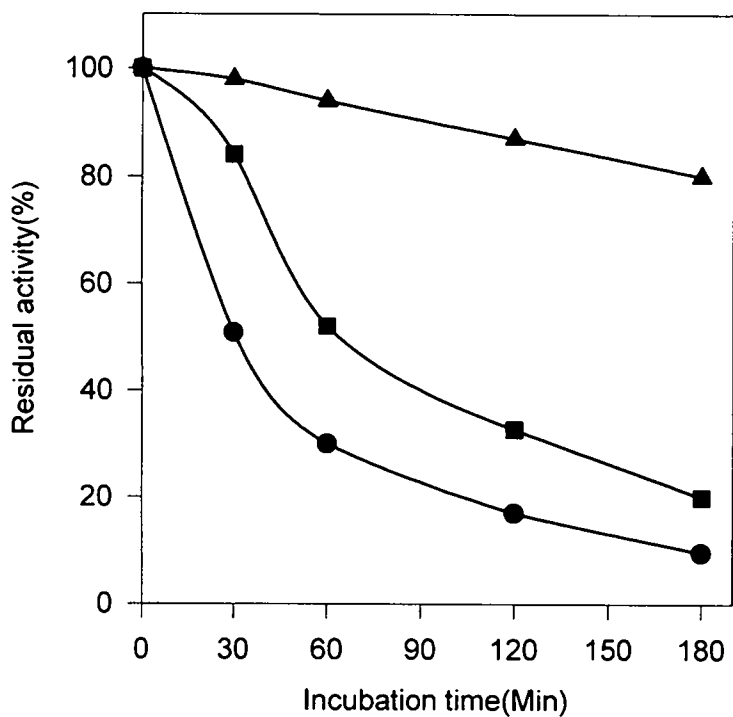


Fig. 2-11. Thermal stability of *Pseudomonas* sp. 3098 chitinase

● : 70°C, ■ : 60°C, ▲ : 50°C.

(3) 금속이온의 영향

효소활성에 미치는 각종 금속염의 영향을 검토한 결과는 Table 2-2와 같이 단백질 변성제인 Hg^{2+} 이온에 의해 약 72%가 실패되었고, Fe^{2+} 및 Ag^{1+} 이온에 의해 약 50%가 실패되었으나, 시험한 그외 이온들은 효소활성에 영향을 주지 않았다. *Pseudomonas stutzeri*(70) 생산하는 chitinase의 경우 효소활성이 Co^{2+} 이온 1mM 농도에서 약 40% 증가하였다고 보고하였으나, 본 효소에서는 Co^{2+} 이온이 activator로 작용하지 않음을 나타내었다.

Table 2-2. Effect of metal ions on the chitinase activity from *Pseudomonas* sp. 3098

Metal ions	Residual activity(%)
None	100.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	83.4
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	80.8
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	97.3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	87.0
$FeCl_2 \cdot 6H_2O$	48.1
$HgCl_2$	28.1
$CaCl_2$	94.4
KCl	100.0
$MnSO_4 \cdot x H_2O$	95.8
$AgNO_3$	43.6
$Pb-(CH_3COO)_2$	91.1

(4) Chelate제, 효소저해제 등 화학물질의 영향

효소활성에 미치는 각종 화학물질의 영향을 검토한 결과는 Table 2-3과 같이 organic mercurial이고 단백질 구조내에 -SH group에 고도의 친화성을 가지고 있으며 -SH group enzyme inhibitor로 알려진 *p*-CMB는 일반적으로 $10^{-5}M$ 에서 효소활성을 저해하는 것으로 알려져 있는데(155), 본 실험에서는 $10^{-3}M$ 에서 약 27% 효소활성을 저해하였다. 또한 halogenated alkylating agent인 iodoacetic acid는 일반적으로 $10^{-3}M$ 에서 효소활성을 저해하는 것으로 알려져 있는데(155), 본 실험에서도 $10^{-3}M$ 에

서 26%정도 효소활성을 저해하였다. 또한 urea, 2,4-DNP 및 금속염 chelate제인 EDTA는 약 20%내외의 효소활성을 저해하였다. 시험한 그외 화학물질들, 즉 anionic detergent인 SDS 및 각종 효소저해제등은 효소활성에 거의 영향을 미치지 않았다.

Table 2-3. Effect of chemicals on the chitinase activity from *Pseudomonas* sp. 3098

Chemicals	Residual activity(%)
None	100.0
NaF	91.9
<i>p</i> -DMBA	101.5
SDS	102.0
Urea	78.4
Na ₂ HAsO ₄	91.1
<i>p</i> -CMB	72.9
2,4-DNP	79.0
<i>o</i> -Phenantholine	89.5
Iodoacetic acid	73.7
EDTA-2Na	83.4

* *p*-DMBA; *p*-Dimethylaminobenzaldehyde, SDS; Sodium Dodecyl Sulfate, *p*-CMB; *p*-Chloromercuribenzoate, 2,4-DNP; 2,4-Dinitrophenol, EDTA; Ethylene Diamine Tetra Acetate.

(5) 기질특이성

각종 기질을 선정하여 기질특이성을 조사한 결과는 Table 2-4 와 같다. 본 효소는 colloidal chitin 및 shrimp shell 유래의 chitin은 분해하였으나, crab shell 유래의 chitin과 chitosan, glycol chitosan, α -cellulose 및 soluble starch는 분해하지 못하였다.

Table 2-4. Substrate specificity of the chitinase from *Pseudomonas* sp. 3098

Substrates	Relative activity
Colloidal chitin	100
Cchitin(shrimp shell)	43.3
Chitin(crab shell)	0
Chitosan(crab shell)	2.0
Glycol chitosan	0
α -Cellulose	4.0
Soluble starch	2.6

(6) Michaelis 정수

Lineweaver-Burk 방법으로 본 효소의 colloidal chitin에 대한 K_m 값을 측정한 결과는 Fig. 2-12와 같이 본 효소의 K_m 값은 0.11%로 계산되었다.

이는 *Aeromonas salmonicida*가(153) 생산하는 chitinase의 colloidal chitin에 대한 K_m 값이 0.13%라고 보고하였는데, 본 효소도 이와 유사한 K_m 값을 나타내었다.

(7) 분해율

본 효소의 colloidal chitin에 대한 분해율을 측정한 결과는 Fig. 2-13과 같이 10분 반응시 약 18%, 1시간 반응시 약 25%의 분해율을 보였으며, 24시간 반응시 최대분해율이 34%였다.

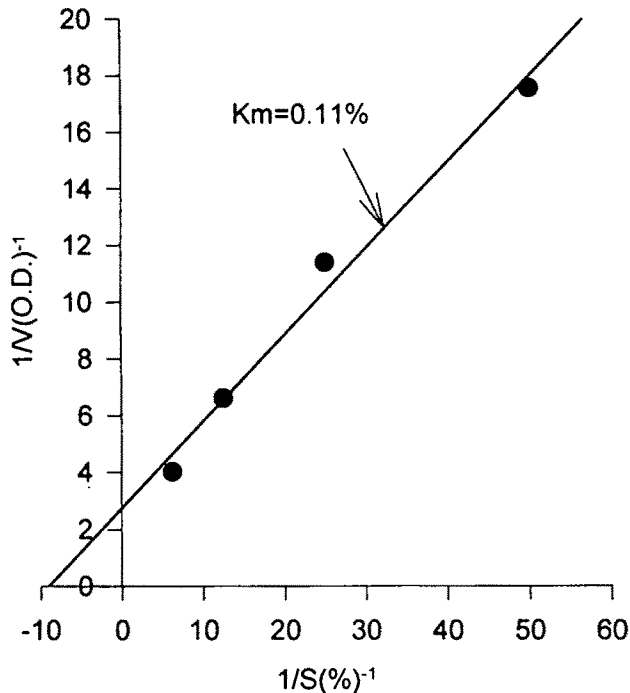


Fig. 2-12. Lineweaver-Burk plot of colloidal chitin hydrolysis by *Pseudomonas* sp. 3098 chitinase.

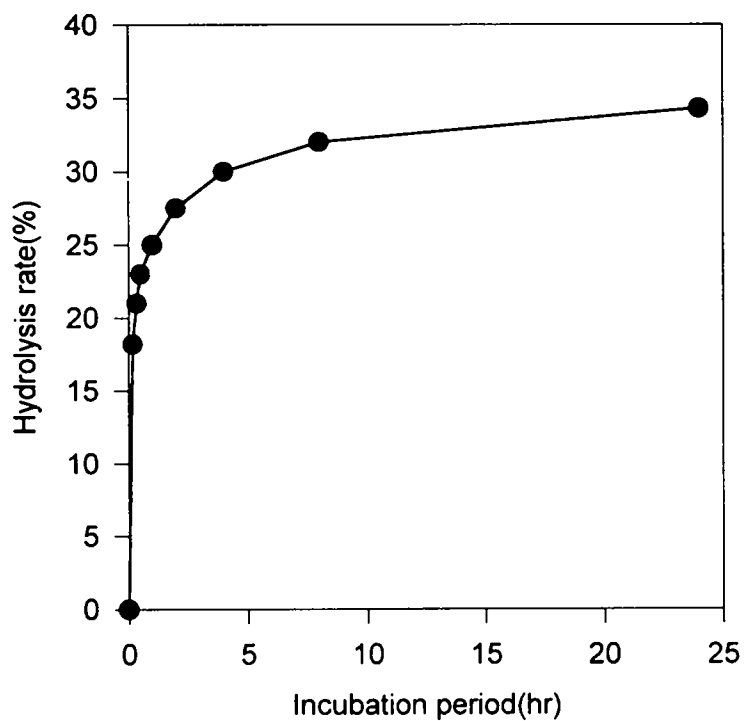


Fig. 2-13. Progressive curve of colloidal chitin hydrolysis by *Pseudomonas* sp. 3098 chitinase.

2) *Serratia* 유래 chitinase의 기작구명 및 정제

가) 길항성 Chitinase의 정제 및 분자량

고추역병균 *Phytophthora capsici*의 생육을 억제하는 길항세균 *Serratia* sp. 3095의 배양여액을 황산암모늄으로 75% 침전시켜 조효소액을 얻고, 조효소액을 Affinity adsorption 과정을 거쳐 Sepadex G-100 column(15 x 500 mm), Sepadex G-75 column(15 x 700 mm) gel 여과와 DEAE-sepadex A-50 column(15 x 300 mm) ion exchange chromatography 과정을 거쳐 chitinase를 정제하였다(Fig. 2-14, 2-15, 2-16). 정제과정을 요약한 결과는 Table 2-4와 같다. 정제효소의 정제도는 배양여액에 비해 14.23배 증가하였고, 회수율은 19.93%로 나타났다.

정제효소의 순도 및 분자량을 조사하기 위하여 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였으며 확인된 분자량은 62,000Da으로 추정되었다(Fig. 2-17).

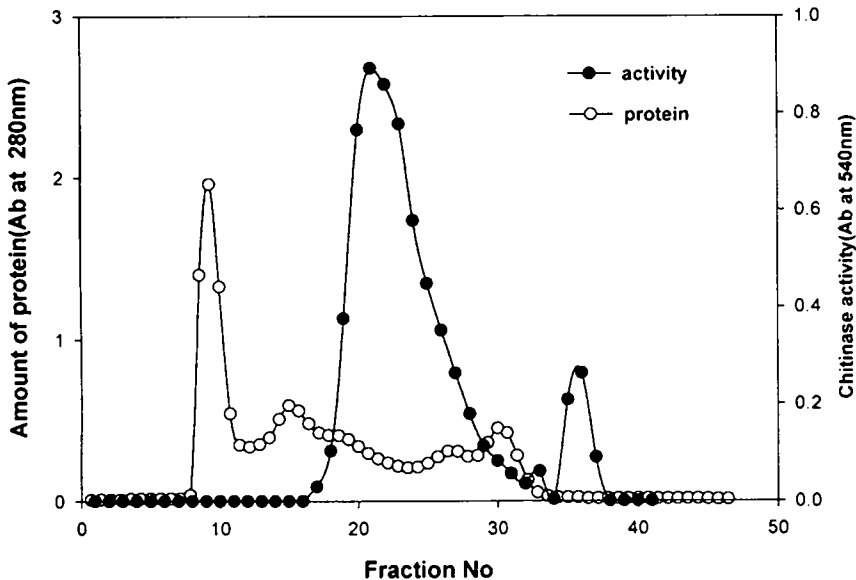


Fig. 2-14. Sephadex G-100 gel filtration of chitinase from *Serratia* sp. 3095.

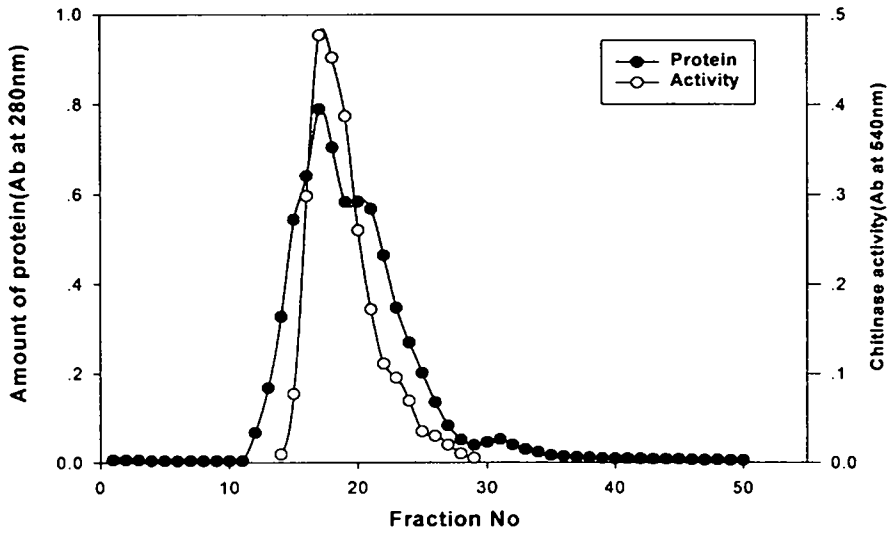


Fig. 2-15. Sephadex G-75 gel filtration of chitinase from *Serratia* sp. 3095.

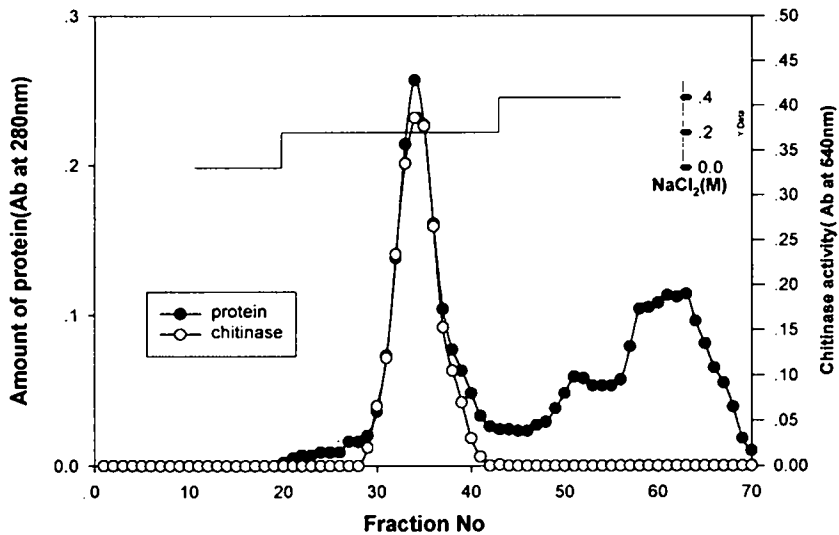


Fig. 2-16. DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography of chitinase from *Serratia* sp. 3095.

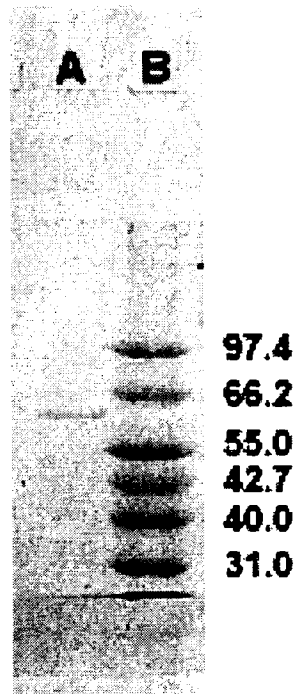


Fig. 2-17. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of purified chitinase.

The purified enzyme was electrophoresed on a 10% polyacrylamide slab gel with 0.1% SDS. Lane A, Purified chitinase. Lane B, Molecular mass markers(in kilodaltons).

Table 2-4. Summary of the purification of the chitinase from *Serratia* sp. 3095

Purification step	Total Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Culture filtrate	1,600.1	6,386.0	3.99	-	100.00
Salting out and dialysis	752.9	5,186.4	6.89	1.72	81.21
Affinity adsorption	366.6	3,638.2	9.92	2.49	56.97
Sephadex G-100 gel filtration	84.7	1,768.2	20.9	5.24	27.69
Sephadex G-75 gel filtration	64.2	1,534.2	24.0	6.02	24.02
DEAE-sephadex A-50 chromatography	22.4	1,272.8	56.8	14.23	19.93

나) Chitinas의 최적 pH

길항세균 *Serratia* sp. 3095가 생산하는 chitinase의 활성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과는 Fig. 2-18과 같이 pH 7.5에서 최대활성을 나타내었다. 이는 *Serratia marcescens*, *Streptomyces griseus*, *Bacillus licheniformis*가 생산하는 chitinase의 최적 pH가 4.9~6.4로 약산성인 것에 비해 본 균주가 생산하는 chitinase의 최적 작용 pH는 7.5정도의 중성으로 다소 차이를 보였다.

다) Chitinas의 최적온도

길항세균 *Serratia* sp. 3095가 생산하는 chitinase의 활성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 2-19과 같이 45°C에서 최대활성을 나타내었다. 이는 *S. marcescens*가 생산하는 chitinase의 최적온도 50°C와 거의 유사하나, *B. licheniformis*가 생산하는 chitinase의 최적온도 80°C와는 상당한 차이를 보였다.

라) 최적반응시간

길항세균 *Serratia* sp. 3095가 생산하는 chitinase의 활성에 미치는 반응시간의 양상을 검토하여 본 결과는 Fig. 2-20와 같이 100분이 경과한후 약 90%가량 반응이 진행되었으며 120을 경과후로 chitinase 활성도가 감소되었다.

마) pH 안정성

길항세균 *Serratia* sp. 3095가 생산하는 chitinase의 pH 안정성을 검토한 결과는 Fig. 2-21에서 보는 바와 같이 pH 5.5~10.5까지의 범위에서 80% 이상의 잔존활성도를 나타내었다. pH 5.0에서는 약 60%의 잔존활성도를 나타내었으나, pH 11.5에서는 급격히 실활되어 10% 미만의 잔존활성도를 나타내었다.

바) 열안정성

길항세균 *Serratia* sp. 3095가 생산하는 chitinase의 열에 대한 안정성을 검토한 결과는 Fig. 2-22과 같다. 70℃에서 20분간 열처리로 90%, 60℃에는 80%가 실활되었다. 반면 50℃에서는 60분간 열처리로 80%이상 잔존활성을 보였다. 이는 *Streptomyces orientalis*의 경우 70℃에서 15분간의 열처리로 효소활성이 거의 실활되는 것과 거의 유사함을 알 수 있었다.

사) Michaelis 정수

Lineweaver-Burk 방법으로 본 효소의 colloidal chitin에 대한 K_m 값을 측정한 결과 본 효소의 K_m 값은 0.37%로 계산되었다.

이는 *Pseudomonas* sp. 3098와 *Aeromonas salmonicida*(153)가 생산하는 chitinase의 colloidal chitin에 대한 K_m 값이 각각 0.11%와 0.13%라고 보고하였는데, 본 효소와는 상당한 차이를 나타내었다.

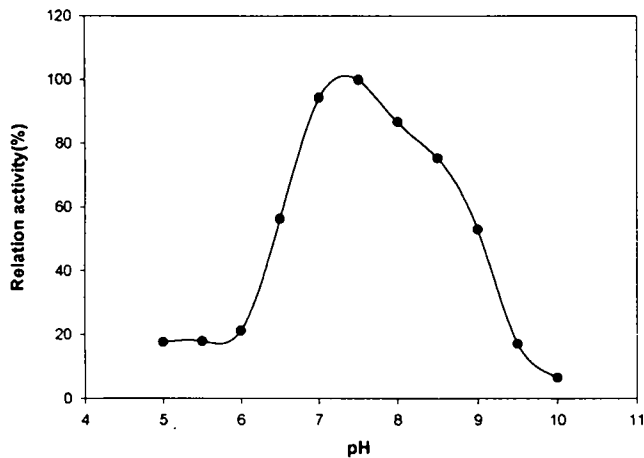


Fig. 2-18. Effect of pH on the activity of *Serratia* sp. 3095 chitinase.

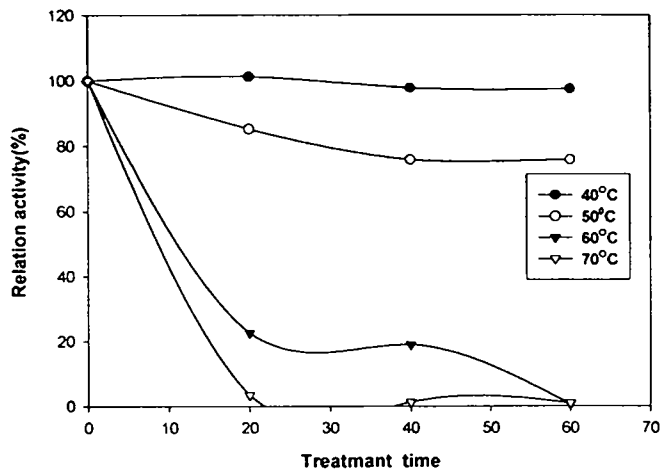


Fig. 2-19. Thermal stability of *Serratia* sp. 3095 chitinase.

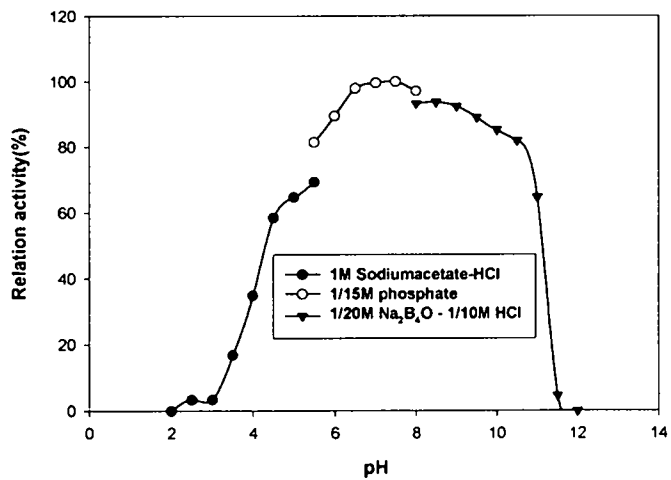


Fig. 2-20. pH stability of *Serratia* sp. 3095 chitinase.

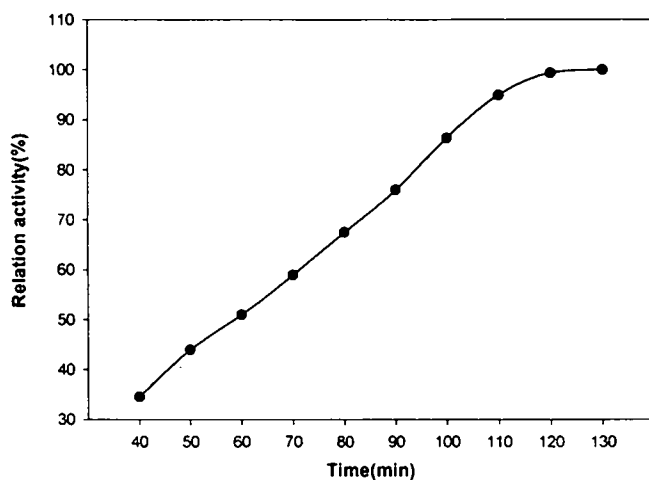


Fig. 2-21. Time course of colloidal chitin hydrolysis by *Serratia* sp. 3095 chitinase.

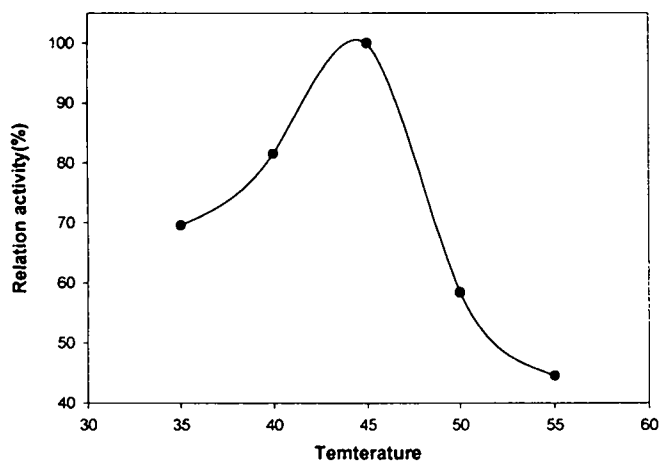


Fig. 2-22. Effect of temperature on the activity of *Serratia* sp. 3095 chitinase.

사) 금속이온의 영향

효소활성에 미치는 각종 금속염의 영향을 검토한 결과는 Table 2-5와 같이 Sn²⁺에 의해 약 60% 이상 실패 되었고, Hg²⁺, Ag¹⁺ ion 에 의해서는 40% 이상 실패이 되었다.

아) 저해제의 영향

효소활성에 미치는 각종저해제의 영향을 검토한 결과 AHB의 경우 약 70% Iodoacetate는 40%, Thiourea, P-CMB 경우에 약 35% 정도 저해를 보였으며, SDS 에서는 안정하였다(Table 2-6).

Table 2-5. Effect of metal ions on the chitinase activity from *Serratia* sp. 3095

Metal ions	Residual activity(%)
None	100
MgSO ₄ · 7H ₂ O	65.5
CuSO ₄ · 5H ₂ O	69.1
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	93.6
FeCl ₂ · 6H ₂ O	79.2
HgCl ₂	58.0
CaCl ₂	87.8
MnSO ₄ · x H ₂ O	92.8
AgNO ₃	59.2
Pb-(CH ₃ COO) ₂	63.1
NiCl ₂	71.2
BaCl ₂	87.1
SnCl ₂	40.2

final conc. 10⁻³M

Table 2-6. Effect of enzyme inhibitors on the chitinase activity from and *Serratia* sp. 3095

Chemicals	Residual activity(%)
None	100.0
SDS	92.0
<i>p</i> -CMB	68.2
Idoacetic acid	60.2
EDTA-2Na	70.8
CDTA	72.7
L-cystein	78.0
Hydroxyurea	65.9
AHB	31.8
Sodiumazide	75.0

*SDS; Sodium Dodecyl Sulfate, *p*-CMB; *p*-Chloromercuribenzoate, final conc. 10^{-3} M
 EDTA; Ethylene Diamine Tetra Acetate, AHB; Acetohydroxamicacid.

나. 향진균성 항생물질의 정제와 특성조사

1) *Bacillus* sp. 4016이 생성하는 항생물질

가) *Bacillus* sp. 4016이 생산하는 항균물질의 구조분석

(1) NMR 에 의한 구조분석

본 물질의 완전한 구조는 적어도 mass data 로부터의 분자량이 결정됨으로서 그 정확한 구조를 추정할 수 있으리라 사려되며, 아래 구조는 지금까지의 NMR data (Table 2-7, Fig. 2-23 ~ 2-30)만을 가지고 추정한 것으로서 정확한 구조로 단정할 수는 없다.

1) 1.13 ppm의 triplet methyl은 H-H COSY cross peak로부터 3.52 ppm의 methylene과 coupling하고 있음을 알 수 있다. 또한 그 methylene의 ^{13}C chemical shift(56.78)는 이 탄소가 산소와 결합하고 있음을 말해준다. 따라서 $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 기의 존재가 확인된다.

2) 한편 8.25 ppm의 peak는 DEPT 90으로부터 Methine 수소임을 추정할 수 있었으며 HMQC로부터 이 탄소의 chemical shift value가 79.45임을 알 수 있었다. 마찬가지로 이 탄소도 산소 혹은 질소와 같은 형태로 원소와 결합하고 있음을 시사해준다.

3) 또한 3.25 ppm의 peak의 면적비는 11.405로서 메틸기 2개(면적비 6) 내지는 3개(면적비 9)로 추정할 수 있으며, ^{13}C chemical shift value로부터 $\text{OCH}_3 \times 3$ 의 singlet로 추정된다.

따라서 본 물질은 ^{13}C NMR상에서 언급한 위의 4개 탄소 이상의 탄소를 갖지 않기 때문에 가능한 subunit는 아래와 같다.

OCH_2CH_3

$\text{OCH}_2 \times 2$ (or $\text{OCH}_3 \times 3$)

CH

이상의 3개 부분 구조를 연결해 볼 때, OCH_3 는 3개일 수는 없다. 따라서 다음의 구조로 잠정 결론을 내린다.

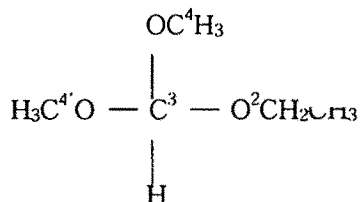


Table 2-7. ^1H and ^{13}C NMR data for anti-fungal antibiotic from *Bacillus* sp. 4016 in DMSO-d6

position	dc	dH(multiplicity, J Hz)
1	18.82	1.13(3H, t, 7.1)
2	56.78	3.52(2H, q, 7.1)
3	79.45	8.26(H, s)
4, 4'	49.19	3.25(6H, s)

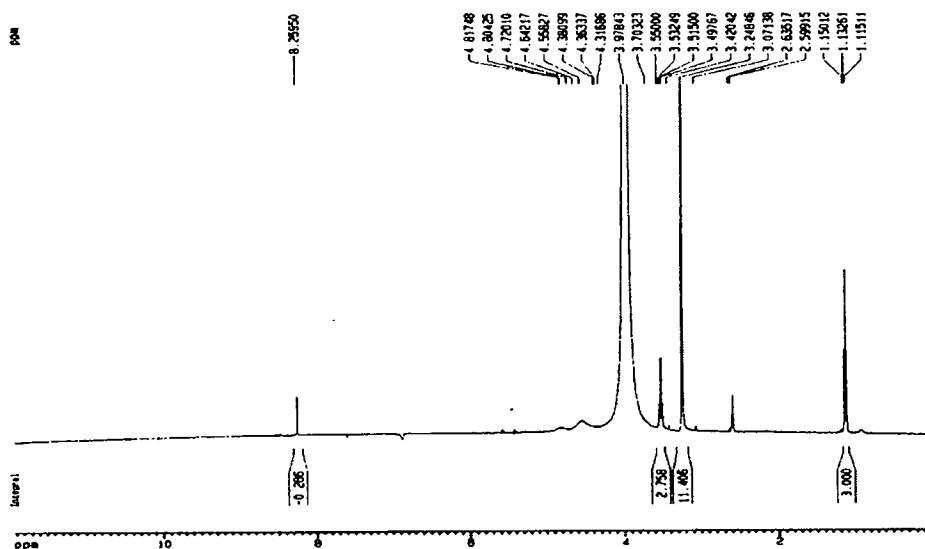


Fig. 2-23. ^1H -NMR(400 MHz) spectrum of anti-fungal antibiotic from *Bacillus* sp. 4016 in DMSO-d6

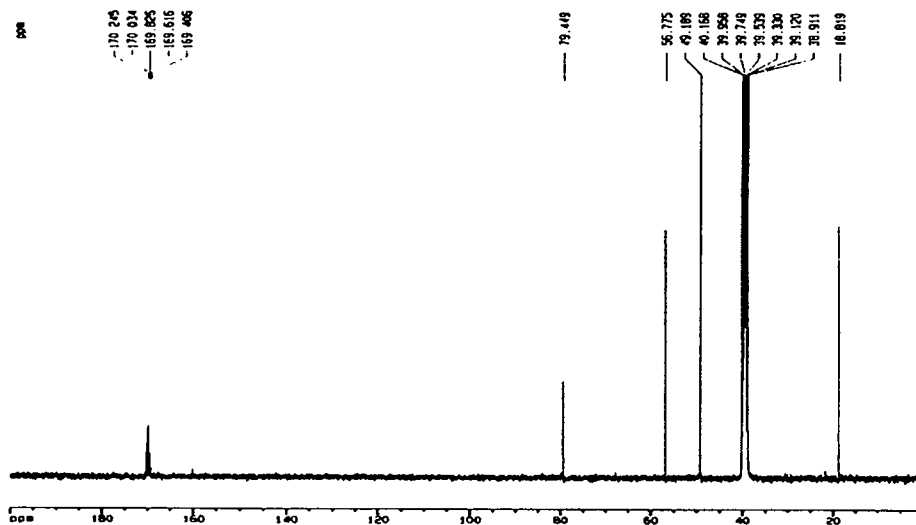


Fig. 2-24. ^{13}C -NMR(100 MHz) spectrum of anti-fungal antibiotic from *Bacillus* sp. 4016 in DMSO-d₆

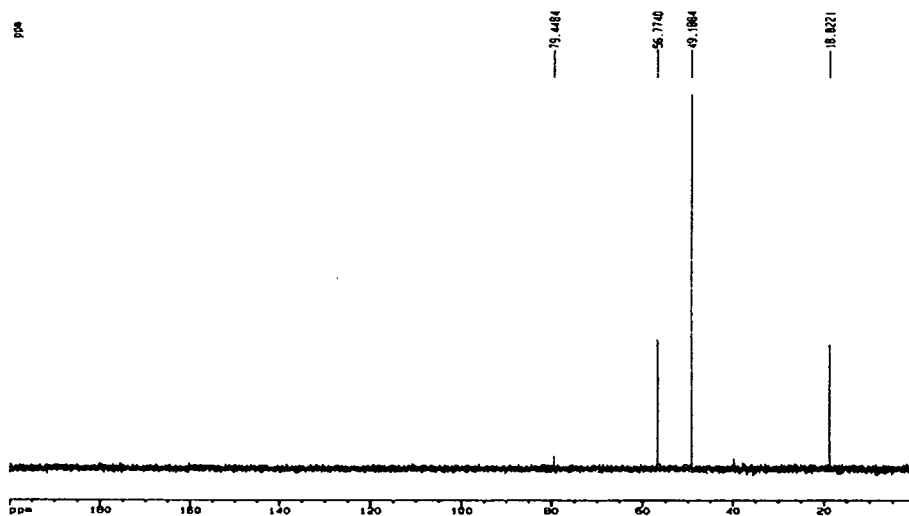


Fig. 2-25. ^{13}C -NMR(DEPT 135° , 100 MHz) spectrum of anti-fungal antibiotic from *Bacillus* sp. 4016 in DMSO-d₆

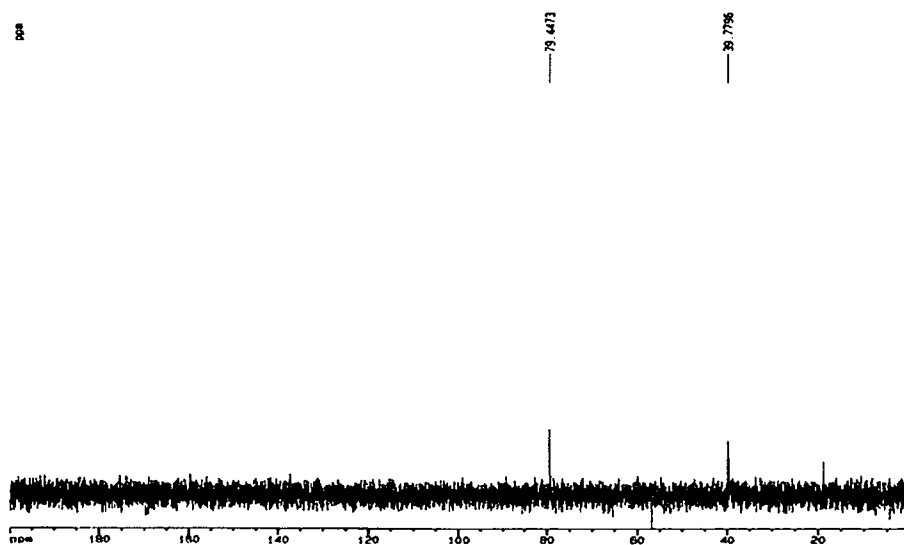


Fig. 2-26. ^{13}C -NMR(DEPT 90° , 100 MHz) spectrum of anti-fungal antibiotic from *Bacillus* sp. 4016 in DMSO-d₆

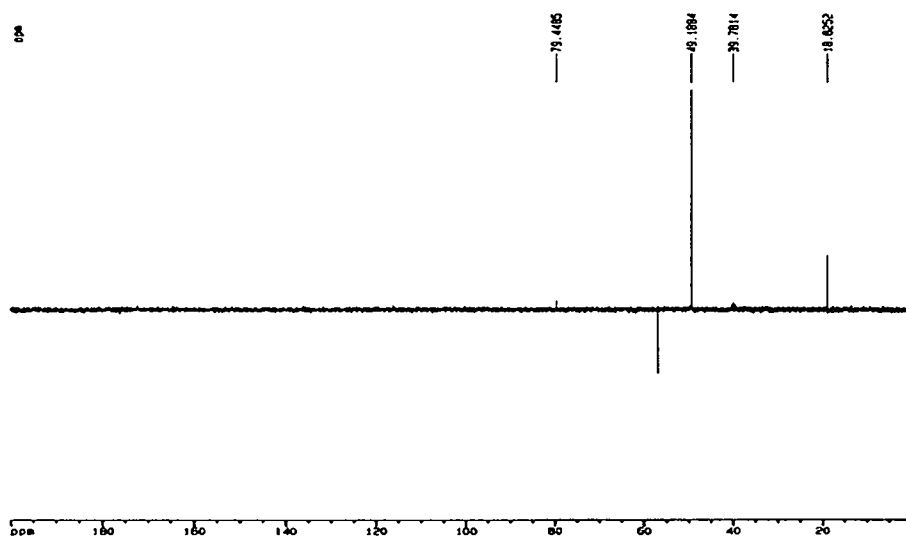


Fig. 2-27. ¹³C-NMR(DEPT 45° , 100 MHz) spectrum of anti-fungal antibiotic from *Bacillus* sp. 4016 in DMSO-d6

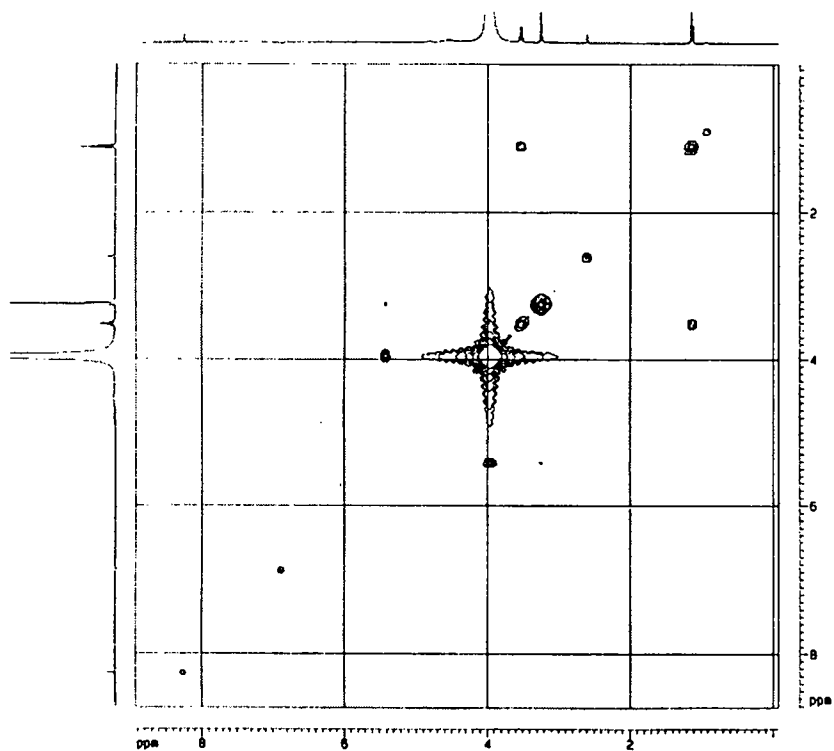


Fig. 2-28. $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY NMR spectrum of anti-fungal antibiotic from *Bacillus* sp. 4016 in DMSO- d_6

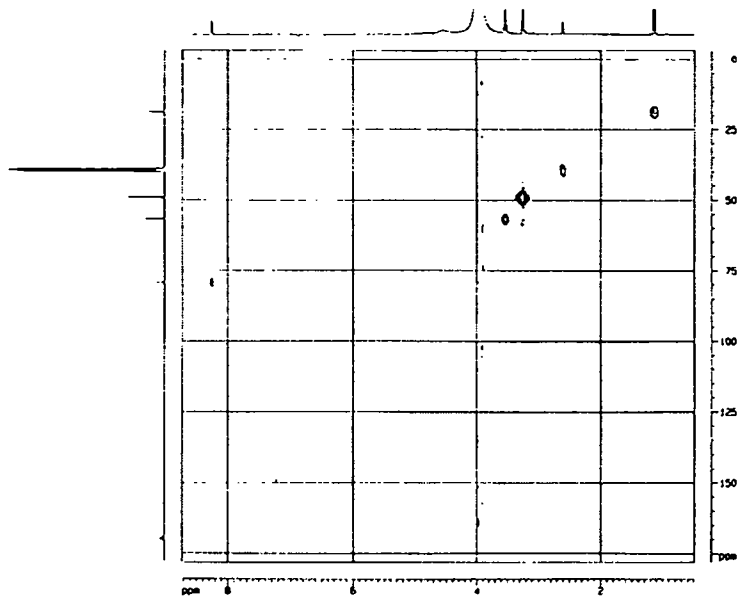


Fig. 2-29. HMQC NMR spectrum of anti-fungal antibiotic from *Bacillus* sp. 4016 in DMSO-d6

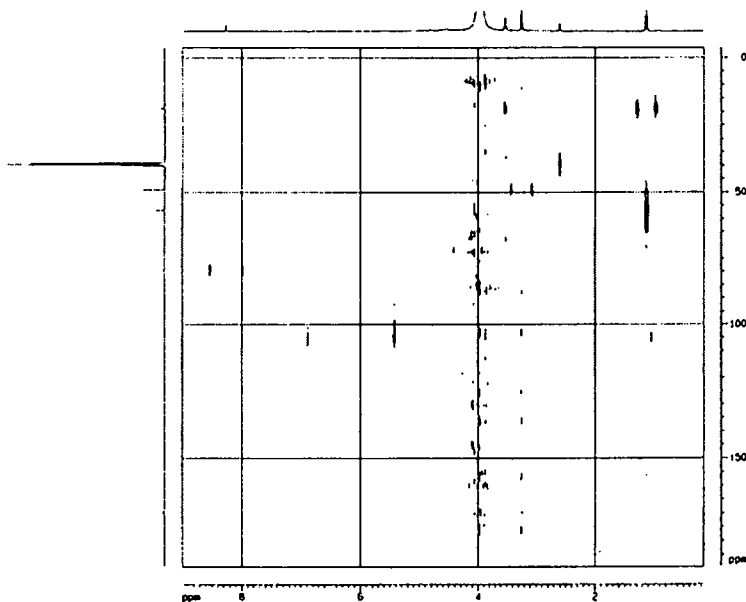


Fig. 2-30. HMBC NMR spectrum of anti-fungal antibiotic from *Bacillus* sp. 4016 in DMSO-d6

가) *Bacillus* sp. 4016이 생산하는 항진균성항생물질의 특성

(1) 저해물질의 작용양상

시들음병균 *Fusarium oxysporum* 포자현탁액을 potato dextrose agar(PDA) 배지에 도말한 후 부분정제된 항생물질을 침적한 disc paper를 놓았을 때에는 *Fusarium oxysporum*의 생육저해활성을 나타내지 않았다. 그러나 PDA 평판배지 중앙에 *Fusarium oxysporum* 포자가 묻혀진 disc paper를 놓고 이 disc paper와 1cm정도 떨어진 곳에 저해물질을 침적시킨 disc paper를 놓고 28~30℃에서 배양했을 때에는 생육이 저해되었다. 따라서 *Bacillus* sp. 4016이 생산하는 항진균성 항생물질은 포자 생육 또는 발아과정에서는 저해력이 없으나 균사생장을 저해하는 물질로 판단된다 (Table 2-8).

Table 2-8. Effect on antifungal activity for spores and mycelia growth of *Fusarium oxysporum* by antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. 4016

Kinds	Antifungal activity
Spores	-
Mycelia	+

(2) 항생물질의 농도에 따른 생육저해 활성

항생물질을 5~0.15mg/ml의 농도로 조제하여 *Fusarium oxysporum*에 대한 생육저해활성을 조사한 결과 Table 2-9와 같이 0.3mg/ml의 농도까지 생육저해활성이 나타났다. 따라서 *Bacillus* sp. 4016이 생산하는 항생물질의 *Fusarium oxysporum*에 대한 최소생육저해농도는 300µg/ml 부근이라고 판단된다.

Table 2-9. Minimal inhibition concentration(MIC) of the antibiotic produced by *Bacillus* sp. 4016 against *Fusarium oxysporum*

Concentration(mg/ml)	Antifungal activity
5.0	+++
2.5	+++
1.25	++
0.625	+
0.3125	+
0.1563	±
0.0782	-

(3) 항생물질의 열에 대한 안정성

항생물질의 농도를 2.5mg/ml로 조정하여 100℃에서 1~5시간 동안 열처리한 후 *Fusarium oxysporum*에 대한 antifungal activity를 조사한 결과는 Table 2-10과 같이 열에 대단히 안정하여 100℃에서 5시간 동안 열처리하여도 항균활성을 그대로 유지하였다. 따라서 본 항생물질은 열에 아주 안정한 성질이 있음을 확인하였다.

Table 2-10. Heat stability of antifungal antibiotics from *Bacillus* sp. 4016

Time at 100℃(hrs)	Antifungal activity
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+

(4) 항생물질의 pH에 대한 안정성

Bacillus sp. 4016의 항생물질을 0.2N-HCl과 NaOH 용액을 사용하여 pH 2~11로 조정하고 100℃에서 1시간 동안 열처리한 후 동량의 0.1M-potassium phosphate buffer용액(pH6.2)을 가하여 중화한 뒤 잔존한 antifungal activity를 조사한 결과는 Table 2-11와 같다. 본 항생물질은 산성에서는 매우 안정하였으나 중성, 알칼리성 용액에서는 불안정한 물질로 판단된다. 한편 pH 2, 3, 4에서 100℃에서 1~5시간 동안 열처리한 후 잔존활성을 조사한 결과 Table 2-12에 나타난 바와 같이 pH2, 10 0℃에서 5시간 동안 열처리하여도 활성을 그대로 유지하고 있어 산과 열에 매우 안정한 물질로 판단된다.

Table 2-11. pH stability of antifungal antibiotics from *Bacillus* sp. 4016

pH	Antifungal activity
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+
6	+
7	±
8	-
9	-
10	-
11	-

Table 2-12. pH and heat stability of antifungal antibiotics from *Bacillus* sp. 4016

pH	Time at 100°C(hrs)	antifungal activity
2	1	+
	2	+
	3	+
	5	+
3	1	+
	2	+
	3	+
	5	+
4	1	+
	2	+
	3	+
	5	+

(5) 여러 가지 곰팡이류에 대한 항균활성

본 항생물질은 *Fusarium oxysporum*에 강한 항균효과를 나타내지만 사과 갈색점 무늬병을 일으키는 *Alternaria mali*의 11종에 대한 항균활성 유무를 조사한 결과는 Table 2-13과 같다. *Alternaria mali* (wild type), *Alternaria mali* IFO 8984, *Alternaria mali* KCTC 6972, *Alternaria alternata* KCTC 6005, *Glomerella cingulata* IFO 9767, *Pyricularia oryzae* IFO 5994 등의 균주에 대해서는 강한 생육 저해활성을 나타내었다. *Colletotrichum lagenarium* IFO 7513, *Fusarium oxysporum*에 대해서는 약한 활성을 보였고, *Botrytis cinerea* IFO 5365, *Cochliobolus miyabeanus* IFO 5277, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* IFO 9761에 대해서는 중간정도의 생육저해활성을 나타내었다. 따라서 생물방제균 *Bacillus* sp. 4016이 생산하는 항진균성 항생물질은 그 항균범위(spectrum)가 매우 넓은 광범위 항진균성 항생물질임을 확인하였다.

Tabel 2-13. Antifungal effect on the various fungi strains of antifungal antibiotics from *Bacillus* sp. 4016

Strains		Antifungal activity
<i>Alternaria mali</i> IFO 8984	사과갈색점무늬병	+++
<i>Alternaria mali</i> wild type		+++
<i>Alternaria mali</i> KCTC 6972		+++
<i>Alternaria alternata</i> KCTC 6005	고추검은곰팡이병	+++
<i>Glomerella cingulata</i> IFO 9767	사과탄저병	+++
<i>Pyricularia oryzae</i> IFO 5365	도열병	+++
<i>Botrytis cinerea</i> IFO 5365	야채젓빛 곰팡이병	+++
<i>Cochloibolus miyabeanus</i> IFO 5277	깨씨무늬병	++
<i>Fusarium oxysporum</i> IFO 9761	채소시들음병	++
<i>Fusarium solani</i>		++
<i>Colletotrichum lagenariu</i> IFO 7513	오이 등의 탄저병	+
<i>Fusarium oxysporum</i>		+

+++ : strong inhibition, + : weak inhibition

(6) 여러 가지 효소처리가 항균활성에 미치는 영향

Bacillus sp. 4016의 항균물질의 분자구조내에 glucosidic linkage 또는 peptide bond 등이 존재하는지 그리고 항균력과 어떤 관계가 있는지를 조사하기 위하여 amylases, cellulase 및 proteases를 mg/ml의 농도가 되게 첨가하였다. 이들을 40℃에서 30분간 incubation시킨 뒤 100℃에서 10분간 열처리하고나서 항균활성을 조사한 결과는 Table 2-14과 같이 amylases, cellulase, protease 등을 처리하여도 본 항생물질은 그 활성을 잃지 않았다. 따라서 본 항생물질은 peptide bond나 glycosidic bond로 형성되어 있지 않음을 알았다.

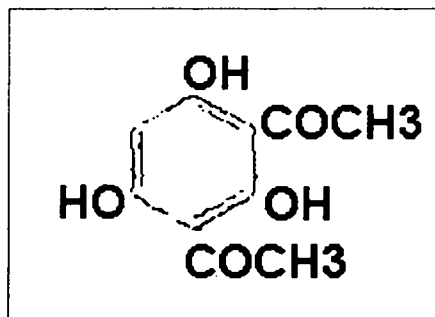
Table 2-14. Effect on the antifungal activity by the treatment of the various enzymes for antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. 4016

Enzymes	Antifungal activity
α -Amylase	+
β -Amylase	+
Amyloglucosidase	+
Cellulase	+
Trypsin	+
Protease K	+

2) *Pseudomonase* sp. 2112 가 생산하는 항생물질

가) *Pseudomonas* 성 항생물질의 분리 및 정제와 NMR 에 의한 구조분석

Pseudomonase 속의 생물방제균 *Pseudomonase* sp. 2112가 생산하는 항 진균성 항생물질(LP-2112)을 정제하고, 본 물질의 구조를 mass data와 지금까지의 NMR data (Fig. 2-31 ~ 2-33)를 가지고 추정 한 것으로서 분자량 210을 가지는 *Pseudomonase* 유래성 항 진균물질인 2,4-diacetylphloroglucinol($C_{10}O_5H_{10}$)으로 분석이 되었고 그 추정 구조는 다음과 같다.



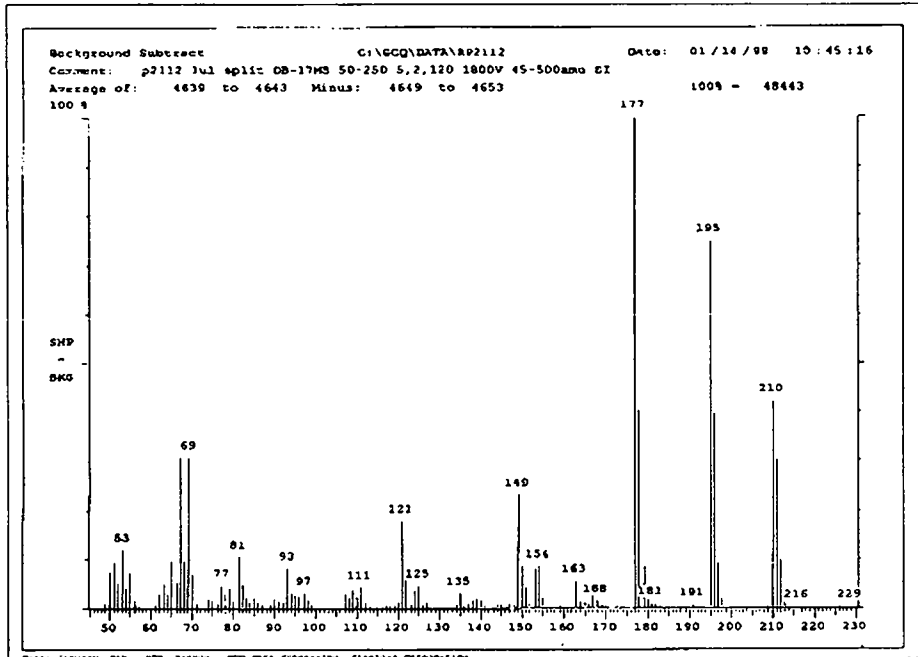


Fig. 31. Fab-mass spectrum of anti-fungal antibiotic from *Pseudomonase* sp. 2112.

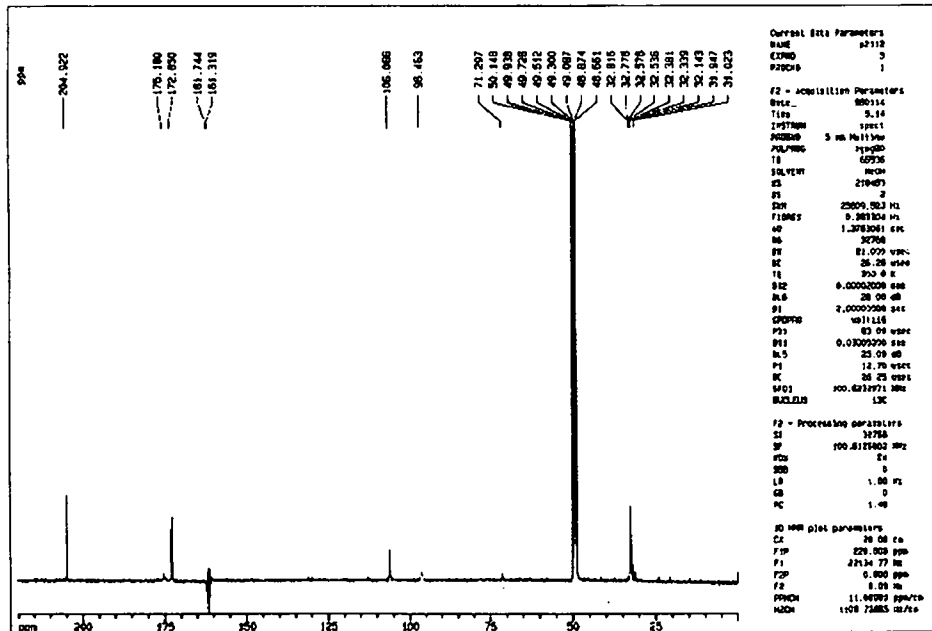


Fig. 2-32. ^{13}C -NMR spectrum of anti-fungal antibiotic from *Pseudomonase* sp. 2112.

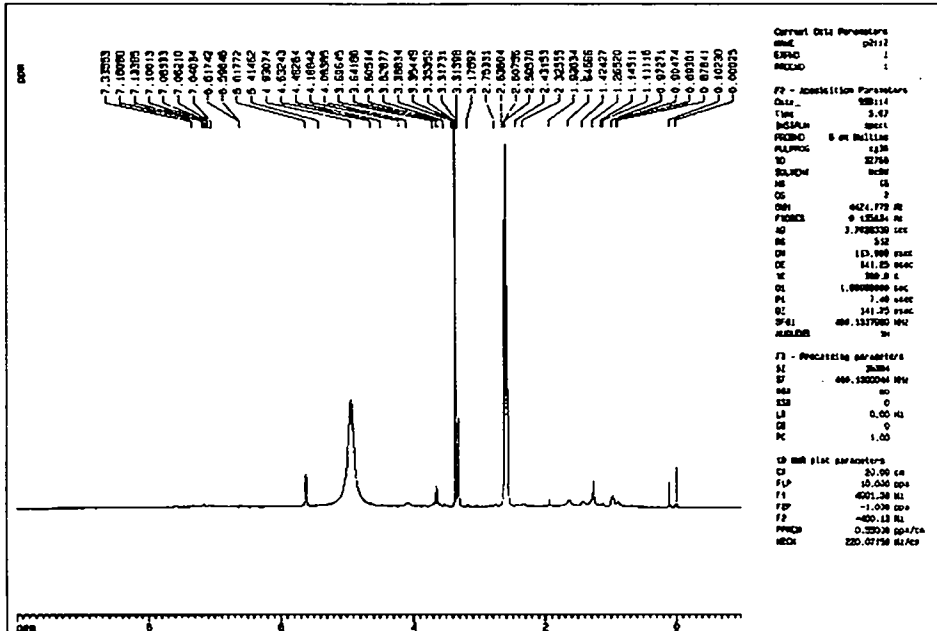


Fig. 2-33. ^1H -NMR spectrum of anti-fungal antibiotic from *Pseudomonase* sp. 2112.

나) *Pseudomonas* 성 항생물질의 작용기작

고추역병균 *Phytophthora capsici*에 대한 길항 기작 확인을 위해 radioisotope labelling precursor를 이용한 실험을 실시한, 결과 Table 2-15에서 볼 수 있는 것과 같이 병원성진균의 단백질 합성 및 RNA합성 저해기작임을 확인하였다.

Table 2-15. Antifungal mechanism of LP-2112 by labelling precursor.

		Data(CPM)	
Cellular constituents	Labeled precursor	Control	Treated with LP-2112
DNA and RNA	^3H Adenine	991781.8	324348.4
DNA		61284.6	57435.4
Protein	^3H Leucine	2644208.0	335252.2
Cell wall	^{14}C Glucose	35804.6	37438.8

다. 길항물질 siderophore의 정제 및 특성조사

1) Siderophore 생합성의 최적 조건 조사

가) 배양 pH의 영향

토양에서 미생물의 생육 경쟁은 토양의 pH가 많이 좌우한다. 그중 Fe의 획득 경쟁에 있어서의 pH는 가장 영향이 큰 요소이다. 산성토양에서의 철은 Fe^{3+} 인 이온화 형태로 존재하므로 미생물이 철을 이용하기에 충분하여 식물병원균에 의한 식물의 감염이 증가하나 알칼리성토양에서의 철은 불용성의 ferric-oxyhydroxide polymer로 존재함으로 식물병원균이 이를 이용하지 못하므로 미생물의 경쟁적 요인이 될 수 있다. 그러므로 선발된 길항균주 *P. fluorescens* GL7과 *P. fluorescens* LS20의 siderophore 생합성에 미치는 pH의 영향을 조사하여 식물병원균의 균사 성장 (hyphal growth) 및 포자발아 (chlamyospore germination) 억제에 최적조건을 찾고자 하였다. 그 결과 *P. fluorescens* GL7과 *P. fluorescens* LS20은 pH 6.5~9.0까지 50% 이상의 다소 높은 siderophore 생산성을 보였으며, pH 7.0일 때 최대의 생산능을 나타내었다 (Fig. 2-34, 2-35).

이 결과로 미루어 보아 선발된 *P. fluorescens* GL7과 *P. fluorescens* LS20은 산성 pH에서 보다 중성 pH 또는 약알칼리성 pH에서 대부분 siderophore를 생산하였다. 이는 식물병원균과 경쟁적 요인이 될 수 있는 중성 및 알칼리성 토양에서 siderophore를 분비한다는 이론에 부합되어 생물방제균으로서의 역할에 좋은 특성을 가지는 결과라 할 수 있다.

나) Fe ion의 영향

$Fe(III)$ 는 일반적으로 식물병원균의 포자(chlamyospore) 발아와 그에 의한 germ tube elongation에 필수적으로 이용됨으로, $Fe(III)$ 이 토양내에 다량으로 존재하면 식물병원균이 그것을 이용하고, 식물병원균의 성장으로 인하여 식물 뿌리의 침투 및 감염의 요인이 된다. 그러므로 선발된 길항균주 *P. fluorescens* GL7과 *P. fluorescens* LS20의 성장 및 siderophore 생합성에 미치는 Fe ion의 영향 및 최적 농도를 조사함으로써 식물근부균 *F. solani*의 chlamyospore 발아 및 germ tube elongation의 최대의 억제효과를 추정하고자 하였다. 그 결과 선발된 *P. fluorescens* GL7과 *P. fluorescens* LS20 균주는 Fe가 20 $\mu g/ml$ 까지 첨가된 배지에서 siderophore를 생산하였으며, 각각 0.1 $\mu g/ml$ 과 0.2 $\mu g/ml$ 일 때 최대의 siderophore 생산능을 나타내었다 (Fig. 2-36, 2-37).

이 결과로 미루어 보아 선발된 *P. fluorescens* GL7과 *P. fluorescens* LS20은 Fe

ion이 거의 결핍된 환경에서 siderophore를 분비하는 것을 볼 수 있다. 이는 Fe ion이 부족한 토양에서 선발된 미생물들은 Fe ion이 풍부한 토양의 미생물보다 siderophore 생산성이 우수한 것으로 확인되었으며, 이들 미생물들에 의한 siderophore의 분비는 식물병원균의 성장을 억제시키고 작물의 수확을 양호하게 하여 수확량을 증대할 수 있는 가장 효과적인 생물방제를 가능케 할 수 있을 것이다.

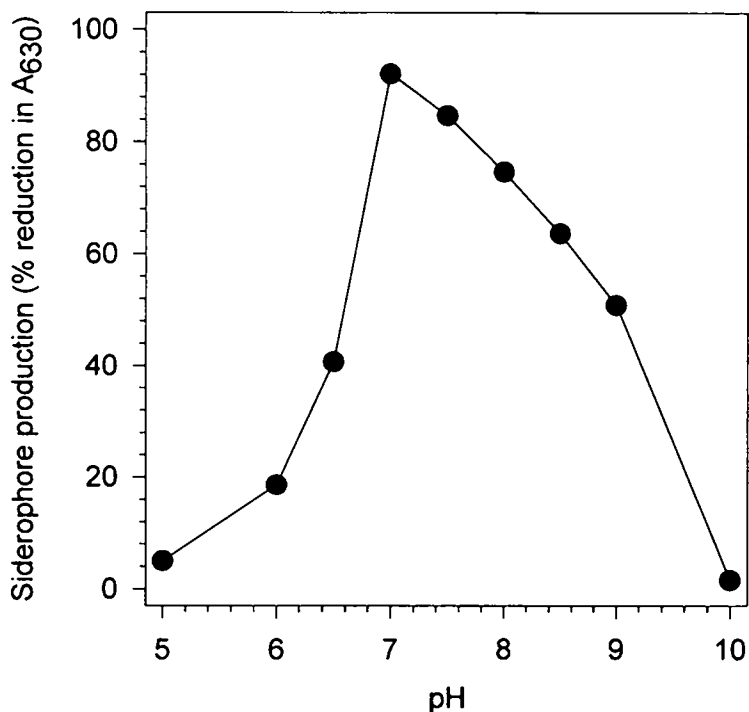


Fig. 2-34. Effect of pH on the siderophore production of *P. fluorescens* GL7.

Bacteria was grown in a KB medium with various initial pHs. Culture supernatants were assayed for siderophores using the universal chemical assay of Schwyn and Neilands.

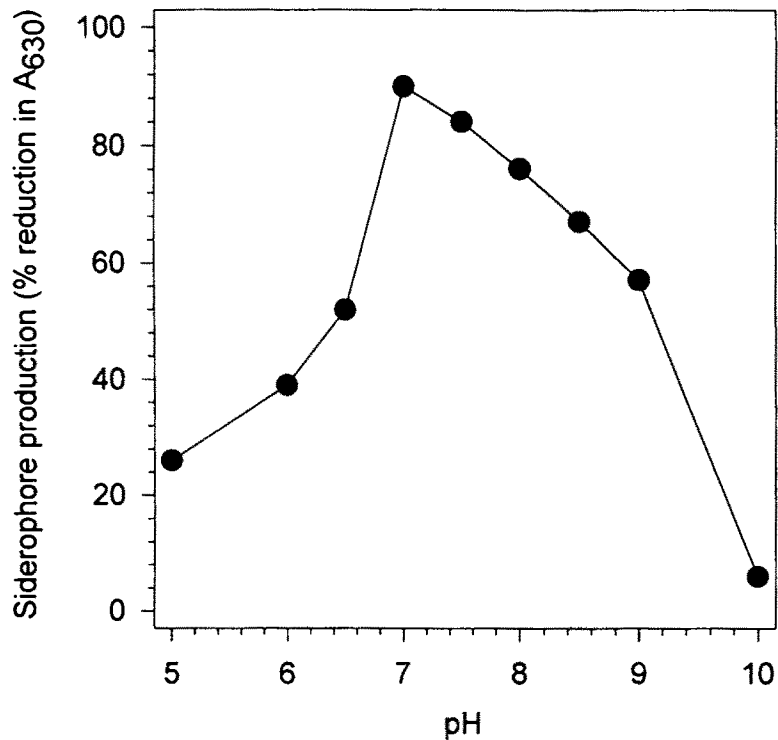


Fig. 2-35. Effect of pH on the siderophore production of *P. fluorescens* LS20.

P. fluorescens LS20 was grown in an iron-deficient KB medium with various initial pHs. Culture supernatants were assayed for siderophores using the universal chemical assay of Schwyn and Neilands.

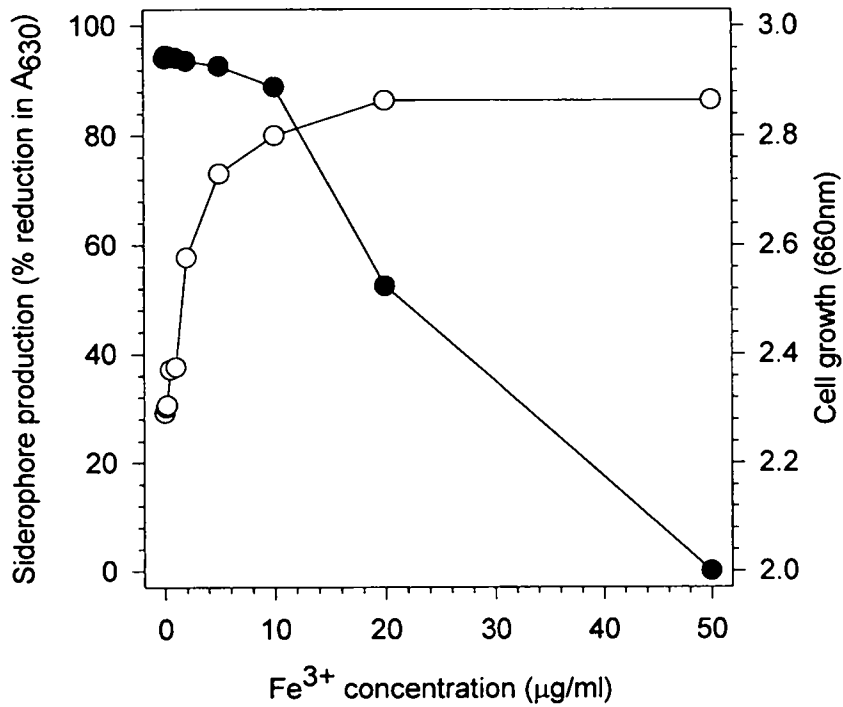


Fig. 2-36. Effect of iron concentration on the siderophore production and growth of *P. fluorescens* GL7.

Bacteria was grown in a KB medium containing different concentrations of iron. Culture supernatants were assayed for siderophores using the universal chemical assay of Schwyn and Neilands.

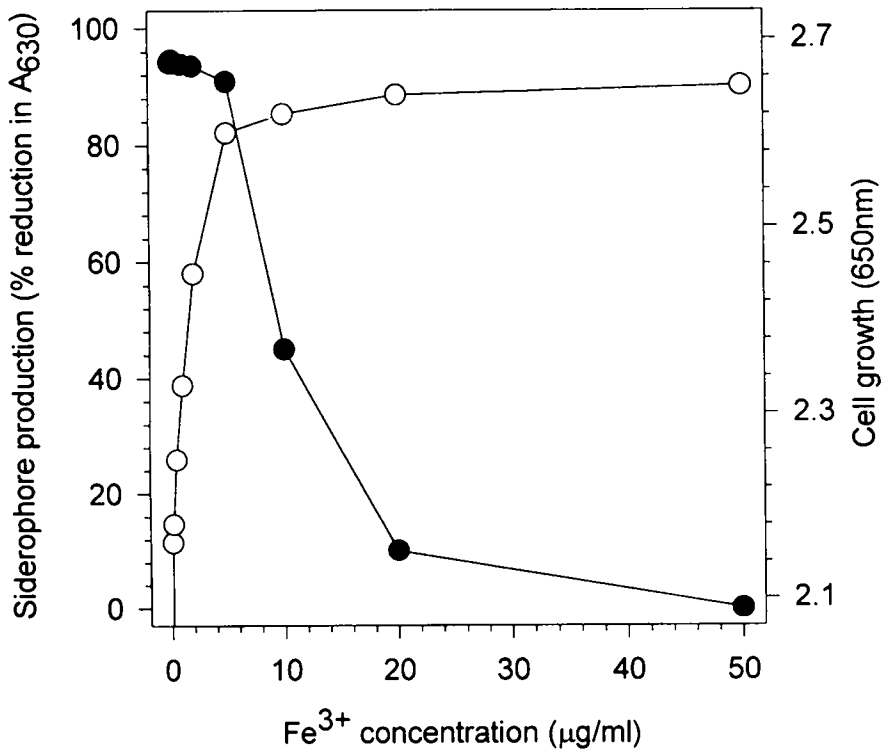


Fig. 2-37. Effect of iron concentration on the siderophore production and growth of *P. fluorescens* LS20.

P. fluorescens LS20 was grown in an iron-deficient KB medium containing different concentrations of iron. Culture supernatants were assayed for siderophores using the universal chemical assay of Schwyn and Neilands. ○, cell growth; ●, siderophore production

다) Synthetic iron chelator, EDDHA의 영향

Fe ion과의 결합능력이 우수한 synthetic iron chelator인 EDDHA (ethylenediamine di-*o*- hydroxyphenyl acetic acid, $\log K_{Fe}=33.9$)를 이용하여 선발된 길항균주 *P. fluorescens* GL7과 *P. fluorescens* LS20의 성장 및 siderophore 생합성에 미치는 영향을 조사하였다. 이는 이들 균주들이 분비하는 siderophore의 Fe ion uptake 능력을 알 수 있게 해준다. 그 결과 선발된 *P. fluorescens* GL7과 *P. fluorescens* LS20은 5 mM의 EDDHA가 첨가된 농도에서도 성장하였으며, 0.5 mM일 때 최대의 siderophore 생산능을 보여주었다 (Fig. 2-38, 2-39).

이 결과로 미루어 보아 선발된 *P. fluorescens* GL7은 synthetic iron chelator인 EDDHA의 높은 농도에서도 Fe ion을 이용하여 성장을 가능케 하였으며, 이는 철 이온 결합능력이 강한 것으로 보아 실제 토양에서 식물병원균과 경쟁적 요인이 될 수 있어 강력한 생물방제균으로서의 능력을 충분히 짐작할 수 있었다.

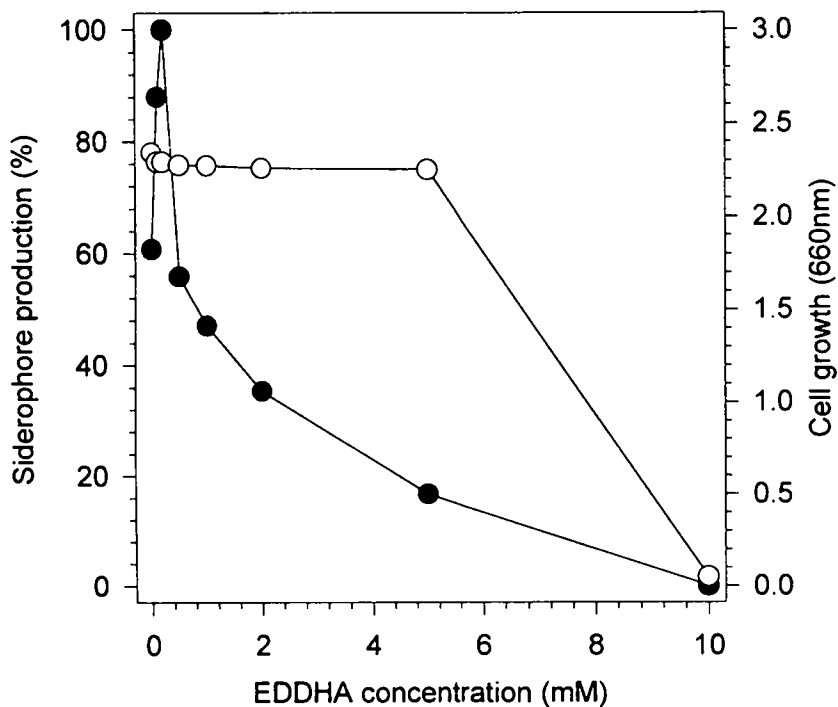


Fig. 2-38. Effect of EDDHA concentration on the siderophore production and growth of *P. fluorescens* GL7.

Bacteria was grown in a KB medium containing different concentrations of iron. Culture supernatants were assayed for hydroxamates using a Csaky assay solution.

EDDHA, Ethylenediaminedi-*o*-hydroxyphenylacetic acid

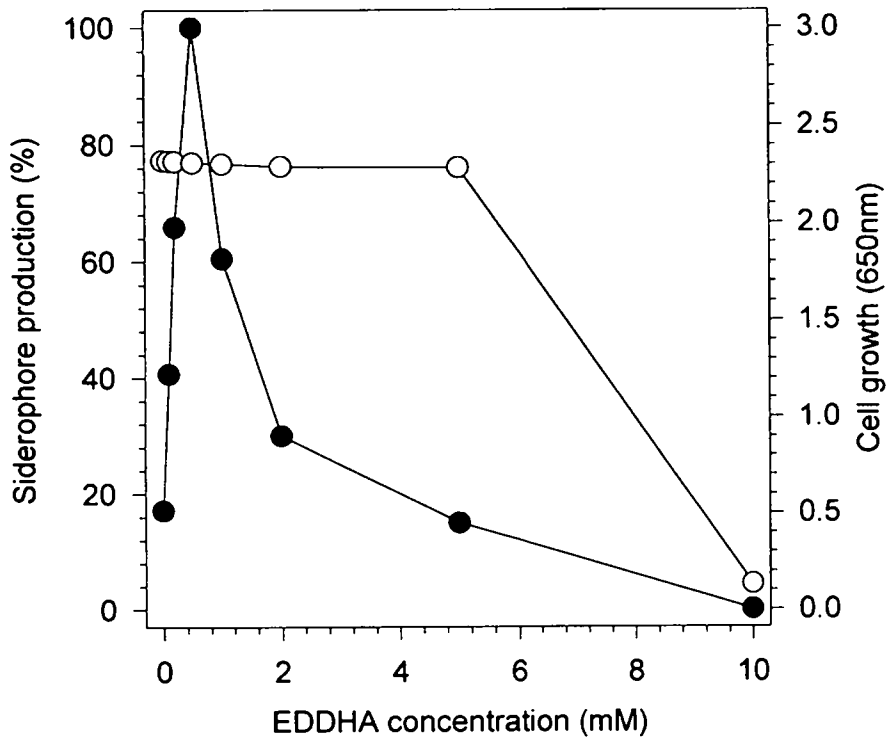


Fig. 2-39. Effect of EDDHA concentration on the siderophore production and growth of *P. fluorescens* LS20. *P. fluorescens* LS20 was grown in an iron-deficient KB medium containing different concentrations of EDDHA. Culture supernatants were assayed for hydroxamates using a Csaky assay solution. EDDHA, Ethylenediaminedi-*o*-hydroxyphenylacetic acid; ○, cell growth; ●, siderophore production

2) 생물방제균으로부터 정제된 siderophore의 특성조사 및 구조 동정

가) 생물방제균 배양액으로부터 siderophore의 정제

선발된 길항균주 *P. fluorescens* GL7과 *P. fluorescens* LS20이 생산한 siderophore는 구조적으로 ferric siderophore보다 불안정하고 정제 효율이 떨어지므로 ferric siderophore의 정제를 먼저 행한후 탈철화를 시켜 siderophore를 정제하였다 (Fig. 2-40, 2-41).

선정된 철이온이 제한된 siderophore 생산용 배지인 Alexander 배지를 이용하여 48 시간 진탕배양된 원침상등액에 FeCl_3 (100mg/ℓ)를 첨가한 다음 진한 적갈색 (reddish-brown)을 나타내는 것을 확인하고, CHCl_3 /phenol (1:1, v/w)을 이용하여 추출을 행한 후 ethyl ether로 phenol을 제거하였다. 이때 crude Fe(III)-siderophore complex는 철이 결합되지 않은 crude siderophore 보다 추출효율이 증대하였다. 이는 Fe(III)-siderophore complex의 CHCl_3 /phenol에 대한 용해도를 증가시킴을 알 수 있었다. 상기의 추출물은 CM Sephadex C-25 cation exchange column에 loading(buffer: sodium acetate-pH 6.5, 0.05M)하여 chromatography 하였는데 그 결과 *P. fluorescens* GL7의 경우 1 개의 high peak와 1 개의 low peak가 나타났으며, 그 중 fraction 첫번째 peak는 reddish-brown의 ferric siderophore complex이었으며, 두 번째 peak는 같은 색을 가졌으나 첫번째 peak의 분해산물로서 비활성 부분으로 확인되었다. *P. fluorescens* LS20의 경우 1 개의 high peak와 2 개의 low peak가 나타났으며, 그 중 fraction 첫번째 peak는 reddish-brown의 ferric siderophore complex이었으며, 두 번째 peak는 첫번째 peak의 분해산물로서 비활성 부분이며 세번째 peak는 철이 결합되지 않은 siderophore로 확인되었다. *P. fluorescens* GL7과 *P. fluorescens* LS20으로부터 각각의 첫번째 peak를 2 차례의 CM Sephadex C-25 cation exchange column chromatography를 수행하여 진한 reddish-brown band 확인할 수 있었으며, 용출된 단일 peak를 얻은 다음, 각 시료를 silica gel G-60에 10 μl 씩 spotting하여 ethanol: water (7:3) 용매계로 분리하여 iodine vapor, ninhydrin solution으로 단일 spot를 확인하고, 동결건조하여 -20°C 에서 저장하였다.

동결건조된 crude Fe(III)-siderophore complex를 5% 8-hydroxyquinoline 으로 pH 4.0에서 탈철화 시켰다. 탈철화 후 다시 형광색을 띄는 것을 확인하고 두차례의 Sephadex G-25 gel filtration column chromatography를 행하여 단일 peak를 얻은 다음 (Fig. 2-42), 각 시료를 silica gel G-60에 10 μl 씩 spotting하여 chloroform: acetic acid: ethanol (95:5:2.5) 용매계로 분리하여 UV irradiation, ferric chloride solution, iodine vapor, ninhydrin solution 으로 단일 spot를 확인하고, 동결건조하여 -20°C 에서 저장하였다.

따라서 본 정제과정을 통하여 *P. fluorescens* GL7과 *P. fluorescens* LS20이 생산하는 siderophore는 거의 단일 물질로 정제되었다.

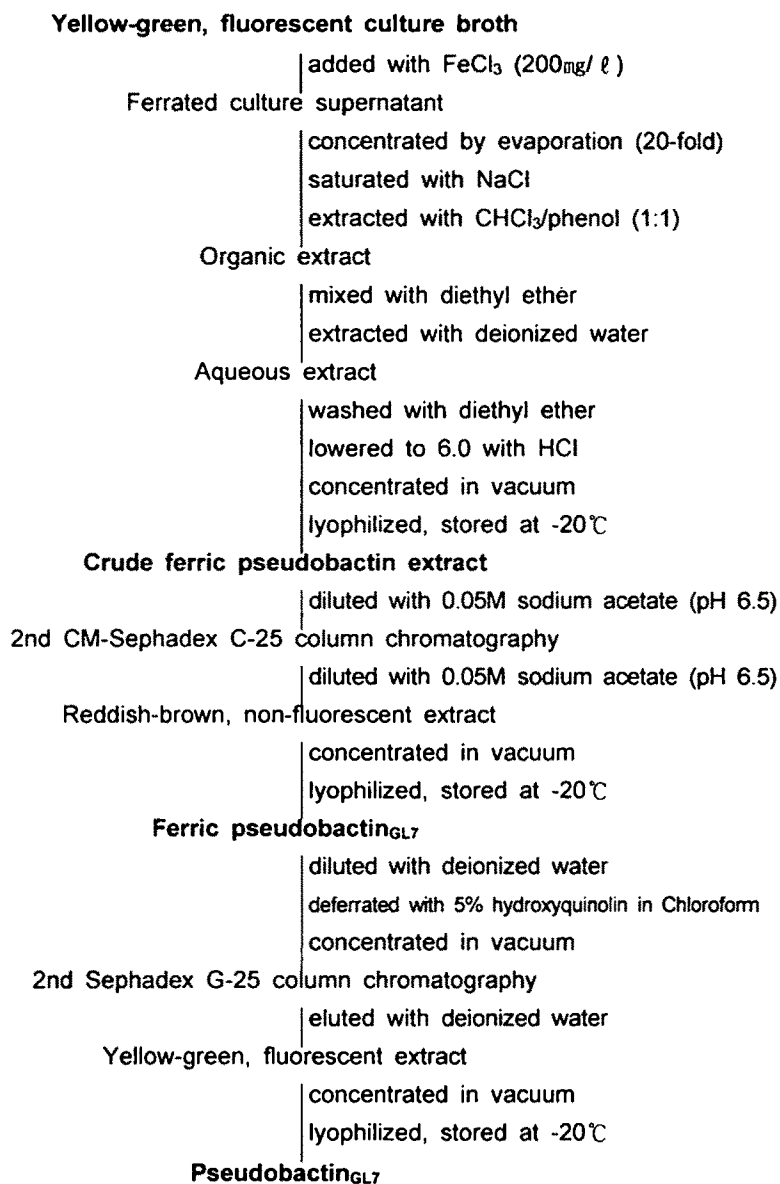


Fig. 2-40. Purification procedure of pyoverdin from *P. fluorescens* GL7

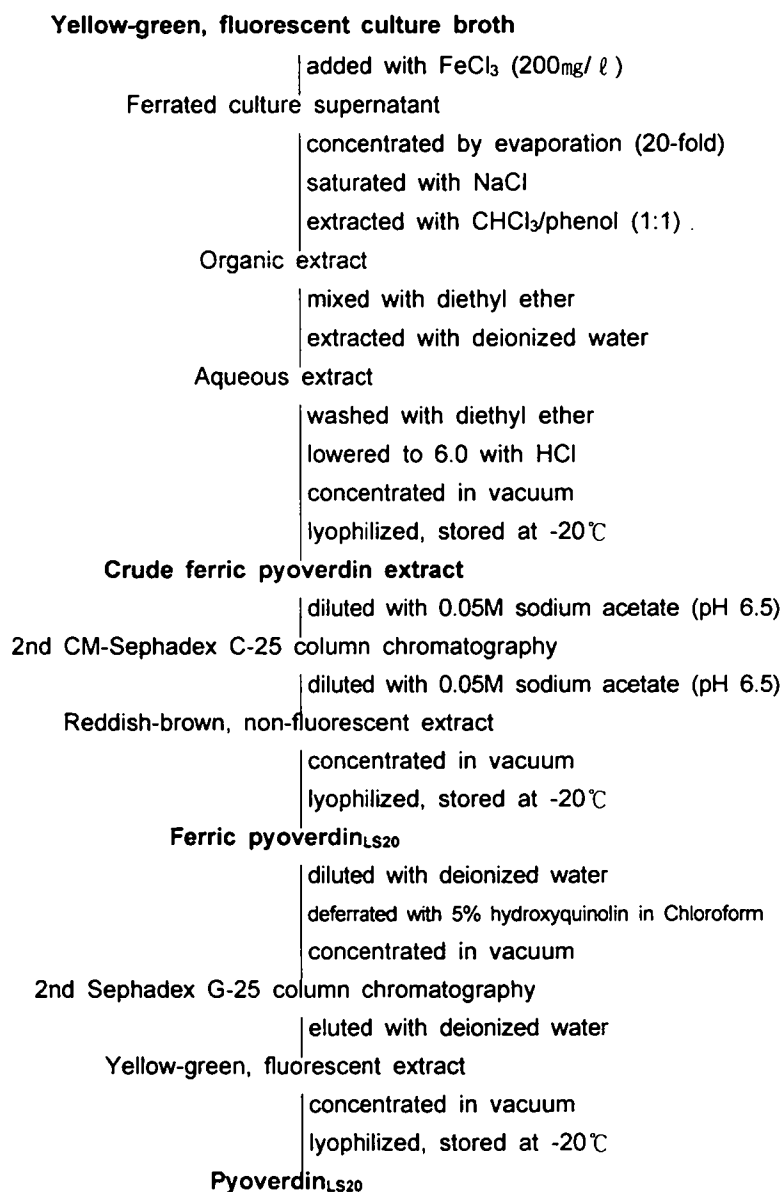


Fig. 2-41. Purification procedure of pyoverdinin from *P. fluorescens* LS20

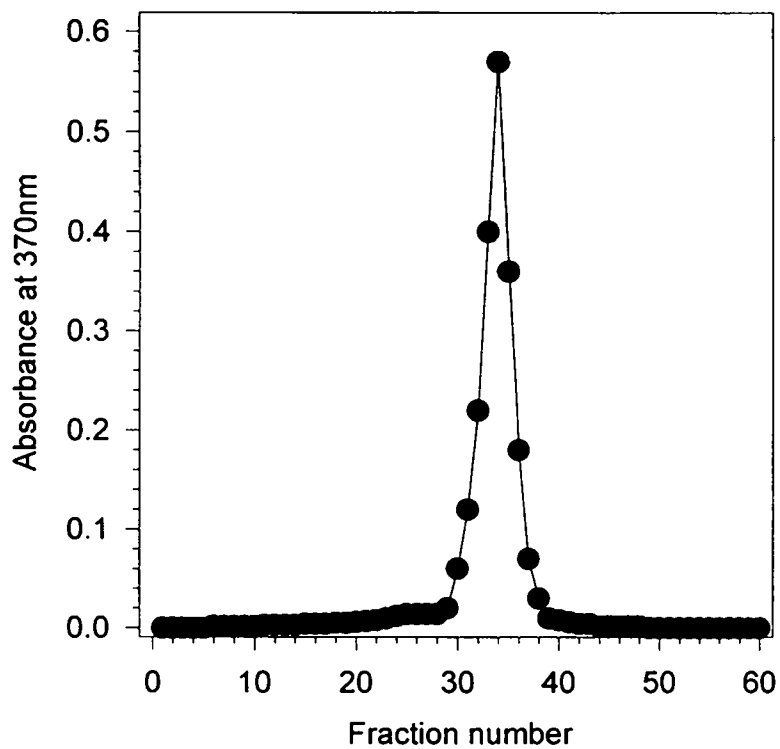


Fig. 2-42. Elution profile of Sephadex G-25 column loaded with purified pyoverdinin_{LS20} from *P. fluorescens* LS20.

나) 정제된 siderophore의 물질 동정

본 정제과정을 통하여 *P. fluorescens* GL7과 *P. fluorescens* LS20이 생산하는 siderophore는 거의 단일물질로 정제된 것으로 사료되며, 따라서 이 물질을 하기의 동정결과에 따라 각각 pseudobactin_{GL7}과 pyoverdin_{LS20}으로 명명하였다 (Fig. 24, 25).

P. fluorescens GL7이 생산하는 pseudobactin_{GL7}은 395~405 nm에서 최대의 흡수 spectrum (pH 7.0)을 나타내었으며 (Fig. 2-42), 정제된 ferric siderophore complex는 siderophore와 비슷한 399.8~401.2nm에서 최대의 흡수 spectrum을 나타내었다 (Fig. 2-42). 그리고 *P. fluorescens* LS20이 생산하는 pyoverdin_{LS20}은 pH 6.5에서 365~381 nm에서 최대의 UV 흡광 spectrum을 나타내었으며, ferric-pyoverdin_{LS20}은 400~401 nm에서 최대의 흡광 spectrum을 나타내었다 (Fig. 2-43). 이들 결과는 지금까지 알려진 대부분 *Pseudomonas* spp.들이 생산하는 siderophore들과 거의 일치하는 흡수 파장을 보여주었다.

정제된 pseudobactin_{GL7}을 6N HCl로 가수분해하여 구성 아미노산을 분석한 결과 threonine, alanine, lysine이 확인되었으며, 이들의 구성비는 1:2:1로 나타났다 (Fig. 2-44, Table 2-16). 이들의 아미노산은 *P. fluorescens* B10이 생산하는 pseudobactin과 동일하였다. 그리고 상기의 분석에서 모르는 2개의 아미노산이 검출되었다. 그 중 aspartic acid 이전의 peak는 Teintze의 보고에서와 같이 β -threo-hydroxyaspartic acid로 추정할 수 있었으며, standard로 DL-threo- β -hydroxyaspartic acid와 동일 retention time을 얻을 수 있었다. 또 다른 peak는 standard로서 rodotoruric acid ([cyclo N^δ-acetyl-N^δ-hydroxyl-L-ornitine]₂)를 사용하여 47 % HI hydrolysate로 분석한 결과 pseudobactin의 구조상 필수인 1 mole의 N^δ-hydroxyornitine으로 확인되었다.

Pseudobactin은 분자량이 989 Da으로 2,3-diamino-6,7-dihydroxy quinoline 형태의 yellow-green fluorescent chromophore로 구성되며, 그 N-terminal의 6개의 아미노산이 직쇄상의 oligopeptide로 연결되어 있다. 또한 N^δ-hydroxyornitine으로 유도된 hydroxamate group과 β -hydroxyaspartic acid로 유도된 σ -dihydroxy aromatic group을 포함한다. 이들 두 개의 group과 chromophore catechol unit의 6개의 oxygen 원자와 ferric ion과 결합하고 있다.

Ferric-siderophore의 Fab+ Mass를 측정된 결과 분자량이 1050으로 밝혀졌다 (Fig. 2-45).

이 결과에서 지금까지 알려진 *Pseudomonas* spp.가 생산하는 siderophore 가운데 pyochelin이나 ferribactin과는 달리 pseudobactin과 동일한 최대흡수 spectrum을 나타내었으며, 아미노산 분석에서 pseudobactin은 1 mole의 N^δ-hydroxyornitine과 hexapeptide로 구성한다는 점을 고려해 볼 때, 선발된 *P. fluorescens* GL7이 생산하는 siderophore는 기존에 밝혀진 pseudobactin형태의 물질로 확인되었으며, 아미노산 구성면에서 동일하다고 확인되었다.

정제된 pyoverdin_{LS20}을 6 N HCl로 가수분해하여 구성 아미노산을 분석한 결과 glycine, serine, threonine, glutamic acid, alanine, lysine이 확인되었으며, 이들의 구

성비는 3:2:1:1:1로 나타났다 (Table 2-17)

그리고 질량분석기 (mass spectroscopy)를 이용하여 정제된 siderophore의 분자량을 확인한 결과 positive Fab-Mass spectrum에서 1936 daltons로 나타났다.

일반적으로 pyoverdinin은 분자량이 1,000~2,000 daltons 정도로 2,3-diamino-6,7-dihydroxy quinoline 형태의 yellow-green fluorescent chromophore로 구성되며 (Fig. 35), 그 N-terminal에는 6~12 개의 아미노산이 직쇄상 oligopeptide로 연결되어 있다. 또한 N^δ-hydroxyornitine으로 유도된 hydroxamate group과 β-hydroxyaspartic acid로 유도된 σ-dihydroxy aromatic group을 구성한다. 이들 두 개의 group과 chromophore catechol unit의 6 개의 산소원자가 Fe(III) ion과 결합하고 있다.

이 결과에서 정제된 pyoverdinin_{LS20}은 지금까지 알려진 *Pseudomonas* spp.가 생산하는 siderophore 가운데 pyochelin이나 ferribactin과는 달리 pseudobactin이나 pyoverdinin과 동일한 UV 최대흡광 spectrum을 나타내었으며, 일반적으로 pseudobactinin은 1 mole의 N^δ-hydroxyornitine과 hexapeptide로 구성되는데 반해, pyoverdinin의 경우 2 mole의 N^δ-hydroxyornitine과 6~12개 정도의 peptide로 구성한다는 점 그리고 positive Fab-mass spectrum에서 1,936 daltons로 분자량이 크다는 점 등을 고려해 볼 때, 선 발된 길항균주 *P. fluorescens* LS20이 생산하는 siderophore는 기존에 밝혀진 pyoverdinin 형태의 물질로 확인되었으며, 아미노산 구성면에서 조금 상이한 것으로 밝혀졌다.

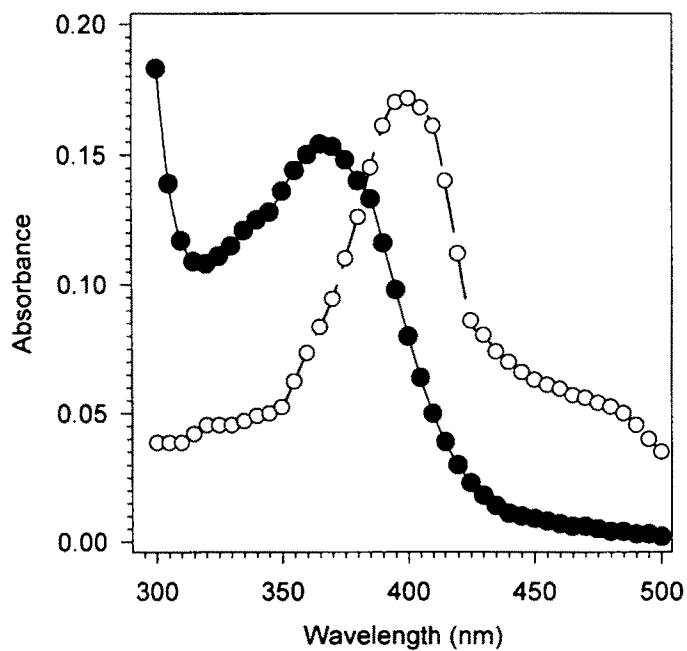


Fig. 2-43. Absorption spectra of pyoverdine_{LS20} and its ferric complex from *P. fluorescens* LS20 in aqueous solution, pH 6.5.

●, pyoverdine_{LS20}; ○, ferric pyoverdine_{LS20}

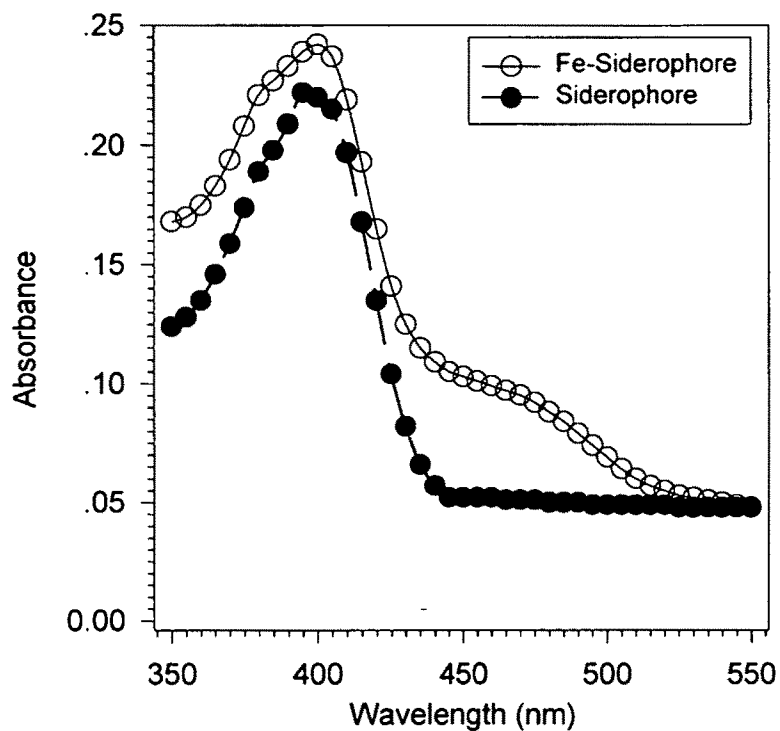


Fig. 2-42. Absorption spectra of pseudobactin and its ferric complex from *P. fluorescens* GL7 in aqueous solution, pH 6.5.

Table 2-17. The components of amino acids from the hydrolysates of the pyoverdinin_{GL20} from *P. fluorescens* LS20.

Amino acid	Mole %	Component ratio (%)
Glycine	42.17	3
Serine	25.20	2
Threonine	12.43	1
Glutamic acid	88	1
Alanine	14.32	1
Lysine	13.29	1

The pyoverdinin_{LS20} sample was hydrolyzed in vacuo for 24 hr at 110°C in 6 N HCl

Table 2-16. The components of amino acids from the hydrolysates of the pseudobactinin_{GL7} from *P. fluorescens* GL7.

Amino acid	Mole %	Component ratio (%)
Threonine	4.96	1
Alanine	11.97	2
Lysine	5.20	1

The pseudobactinin_{GL7} sample was hydrolyzed in vacuo for 24 hr at 110°C in 6 N HCl

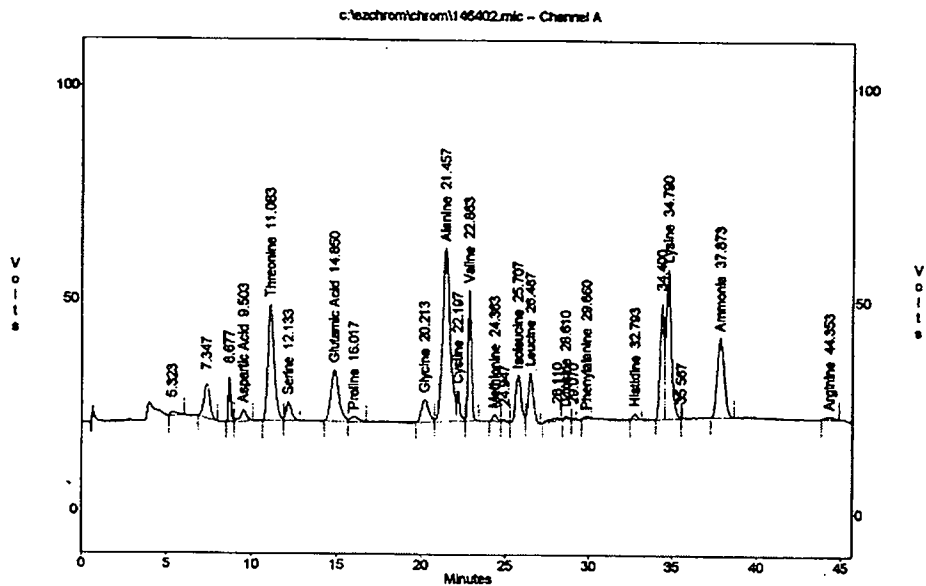


Fig. 2-44. Chromatogram of amino acids from pseudobactin_{GL7} hydrolysates

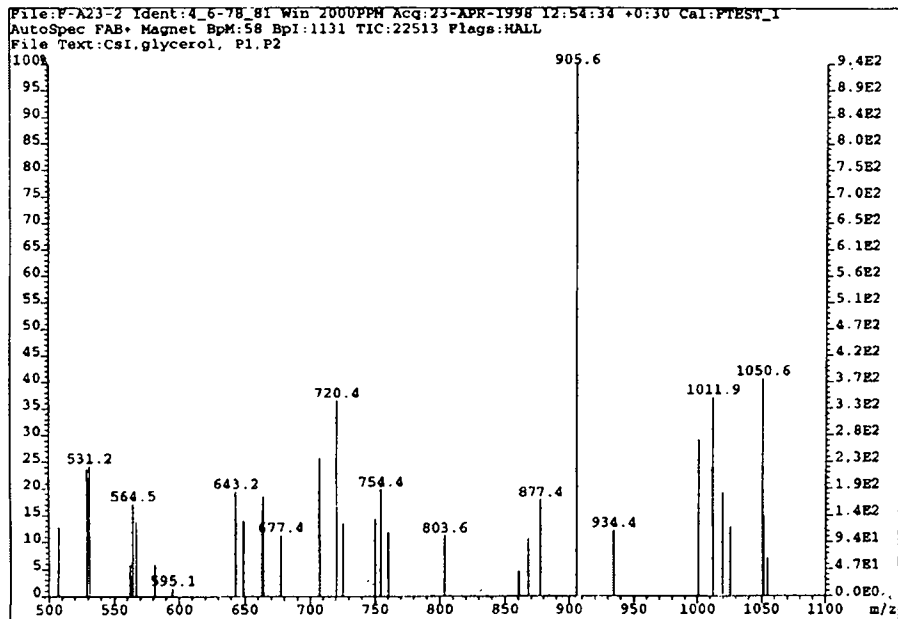


Fig. 2-45. Molecular Weights of Ferric Pseudobactin_{GL7}

라. 방선균이 생산하는 항진균성 항생물질의 정제 및 특성조사

1) 항진균성 길항방선균의 항생물질 생합성의 최적조건 조사

선발된 항진균성 길항균주인 *Actinomyces* sp. KH-28이 항생물질 생산에 미치는 최적의 배양온도, pH 및 배양시간의 영향 (Fig. 2-46, 2-47, 2-48)을 조사하기 위하여 Bennett's 배지에 배양 시켰다. 그 결과 pH 7 과 30℃의 배양온도에서 생육력 및 항생물질 생산성이 가장 좋았으며, 배양시간 별로는 시간이 지날수록 항생물질 생산성이 증가 함을 확인 할 수 있었다.

2) 항생물질의 특성조사

정제된 항생물질의 특성을 확인 한 결과 용매별 용해도는 n-butanol, methanol, ethanol, toluene, n-hexan등에 용해성을 확인 할 수 있었으며 (Table 18), 여러 가지 생화학적 반응 검사에서 2:4-Dinitrohydrazine에 양성반응을 나타내며 UV 조사결과 형광색을 나타내었다. 그러나 ninhydrin 반응 등 amine 확인 반응에서는 확인되지 않았다.

전개용매를 ethanol:ammonia: water=8:1:1로 하여 silicagel TLC 상에서 전개하여 Rf 치를 확인 한 결과 0.87로 나타났다 (Table 19).

그리고 UV흡광 spectrum은 260 과 440 nm에서 흡광을 나타내었다.

기기 분석에 의한 분석방법은 H-NMR 과 Fab mass를 이용하여 확인하였다. 그 결과 분자량이 250 정도이였으며, 이러한 생화학적 분석 및 기기분석 방법에 의하여 quinoline 계 항생물질임을 추정할 수 있었다.

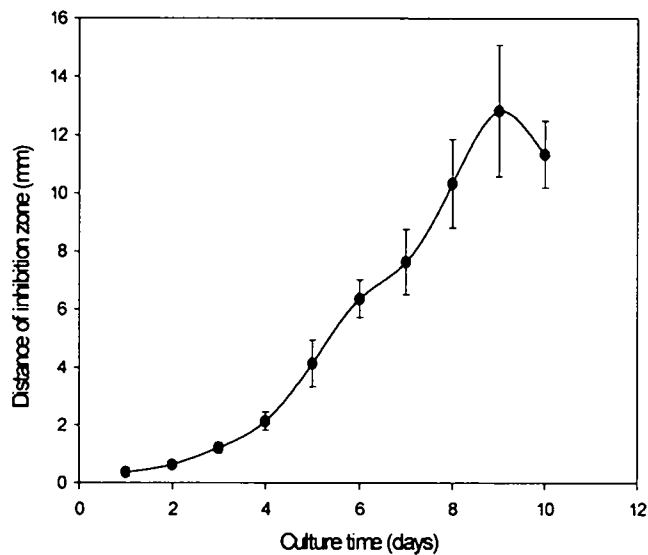


Fig. 2-46. Inhibitory effects of culture filterates of *Actinomyces* sp. KH-28 against *Fusarium oxysporum* by culture time.

The *Actinomyces* sp. KH-28 incubated on the Bennett's medium for 8 days. The culture filterates was extracted with n-BuOH. The extracts confirmed inhibition zone with repeated test of 3 times on the PDA by paper disk method.

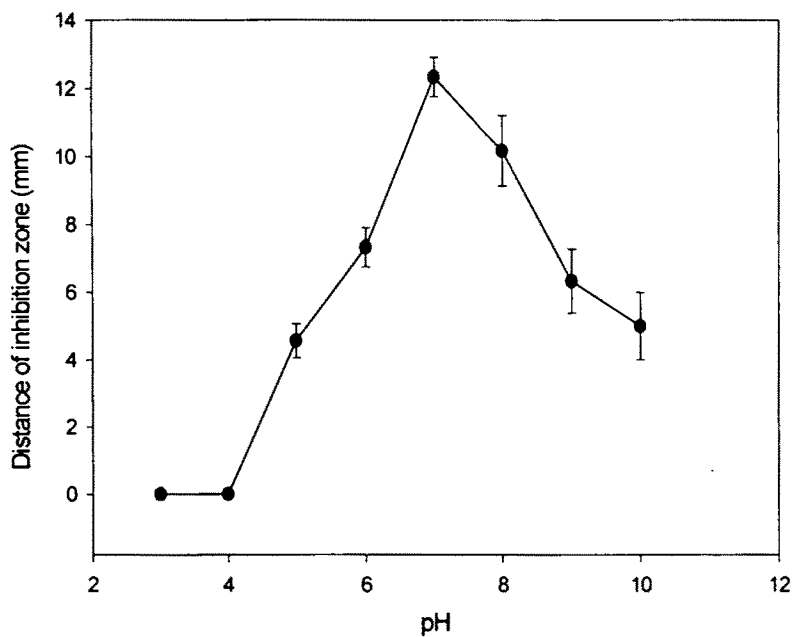


Fig. 2-47. Inhibitory effects of culture filterates of *Actinomyces* sp. KH-28 against *Fusarium oxysporum* by pH.

The *Actinomyces* sp. KH-28 incubated on the Bennett's medium for 8 days. The culture filterates was extracted with n-BuOH. The extracts confirmed inhibition zone with repeated test of 3 times on the PDA by paper disk method.

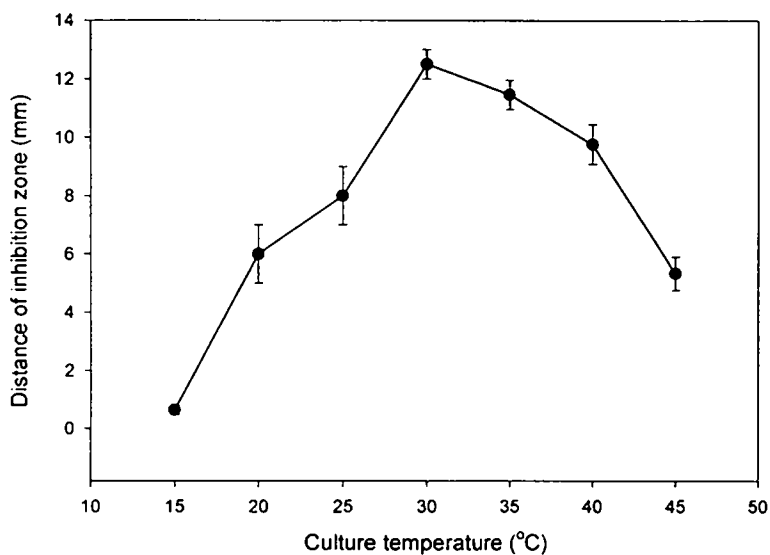


Fig. 2-48. Inhibitory effects of culture filterates of *Actinomyces* sp. KH-28 against *Fusarium oxysporum* by culture temperatures.

The *Actinomyces* sp. KH-28 incubated on the Bennett's medium for 8 days. The culture filterates was extracted with n-BuOH. The extracts confirmed inhibition zone with repeated test of 3 times on the PDA by paper disk method.

Table 2-18. Solubility of the antifungal antibiotic *Actinomyces* sp. KH-28.

Souble in ethanol, methanol, Toluene, n-hexane, n-butanol
Insoluble in chloroform, ethylacetate, acetone, water, ethylether

Table 2-19. Comparision of KH-28 antibiotic and *p*-Benzoquinone by TLC^a.

a: Silica gel GF254 plate

b: Petrolether : ethylether=7 : 3

	KH-28	<i>p</i> -Benzoquinone
2:4-Dinitrohydrazine	orange-brown	orange-brown
<i>R_f</i> ^b	0.6	0.48
Visible	yellow	yellow
λ max(nm)EtOH	240	240

마. 방선균이 생산하는 protease inhibitor의 정제 및 특성조사

1) Protease inhibitor의 최적 생산조건 조사

식물병원성 진균의 단백질분해효소를 저해하는 protease inhibitor를 생산하는 *Streptomyces cyaneus* KH-1 균주로 부터 protease inhibitor를 정제하여 그 구조를 구명하고자 하였다. 이를 위하여 방선균 배양배지인 Bennett (glucose 1g, yeast extract 1g, peptone 2g, beef extract 1g, pH 7.0 per 1 l) 배지상에 접종하여 5일간 배양시킨 종 배양액을 starch 10g, soybean flour 25g, K₂HPO₄ 0.05g, MgSO₄ 7H₂O 0.05g, NaCl 2g, agar 15g, per 1 l 에 pH 7.0을 맞춘 고분자성 배지에 1% 접종한 후 200 rpm으로 shaking incubator 상에서 28℃ 에서 5 일 간 15 l 을 대량 배양 시켰다. 그 배양액을 Whatman No. 2 filter paper를 이용하여 균체를 분리하였으며 그 분리한 배양 여액을 80 ℃에서 10 분 간 열처리 한 후 Fig. 2-49에서와 같은 방법으로 저해물질을 정제하였다.

먼저 배양여액을 *n*-butanol을 이용하여 3회 추출 후 그 *n*-butanol 층을 40℃에서 감압농축 시켰다. 감압농축한 *n*-butanol 층 저해물질을 DEAE-sephadex A-25 column chromatography (∅2.5X50cm)를 이용 0.05 M Tris HCl buffer (pH 8.0) 로 용출 시켰으며, 그 fraction을 spectrophotometer 를 이용 210nm에서 OD 값을 측정 한 결과 Fig. 2-50에서와 같이 나타났다. 이 fraction 상에 저해제 활성을 확인하여 본 결과 24에서 35 사이에서 활성을 확인 할 수 있었다. 또한 저해제내의 buffer 제거 및 불순물을 제거하기 위하여 Sephadex G-25 column chromatography (∅ 2.5X50cm)를 이용하여 물로 용출시켜 저해제 활성부위를 assay 함으로써 확인하였다 (Fig. 2-51).

분리된 저해물질을 분자량이 적은 resin을 이용하여 gel filtration 하기 위하여 Sephadex G-15 column chromatography (∅1.5X30cm)를 이용하여 물로 용출시켜 활성 부위를 분리하였다 (Fig. 2-52).

여기에서 얻은 분획을 TLC 로 정제 여부를 확인 한 결과 불순물이 있음을 확인 하고 각종 용매 ethyl ether, chloroform, toluene, methanol, 그리고 acetone을 이용하여 추출하였다.

추출단계를 거친 저해물질을 분취용 HPLC를 이용하여 Fig. 2-53에서와 같은 활성 부위를 분취하여 모아 정제하였다 (Fig. 54). 이 물질을 여러 가지 용매를 이용하여 용해성을 확인 하였으며 (Table 21) 이 용매를 이용하여 TLC 상에서 *R_f* 치를 구하였으며 (Table 20) 아울러 단일물질로의 정제를 확인 할 수 있다.

항생물질의 물질동정

정제된 항생물질의 특성을 확인 한 결과 용매별 용해도는 n-butanol, methanol, ethanol, toluene, n-hexan등에 용해성을 확인 할 수 있었으며, 여러 가지 생화학적 반응 검사에서 2:4-Dinitrohydrazine에 양성반응을 나타내며 UV 조사결과 형광색을 나타내었다. 그러나 ninhydrin 반응등 단백질구성 확인 반응에서는 negative로 나타났다.

전개용매를 ethanol:ammonia: water=8:1:1로 하여 silicagel TLC 상에서 전개하여 *R_f* 치를 확인 한 결과 0.87로 나타났다.

그리고 UV흡광 spectrum은 260 과 440 nm에서 흡광을 나타내었다.

기기 분석에 의한 분석방법으로는 Fig. 55, 56 에서 나타난 것과 같이 H-NMR 과 Fab mass를 이용하여 확인하였다. 그 결과 분자량이 503 dalton 이었으며, 이러한 생화학적 분석 및 기기분석 방법에 의하여 quinoline 계 항생물질임을 추정 할 수 있었다.

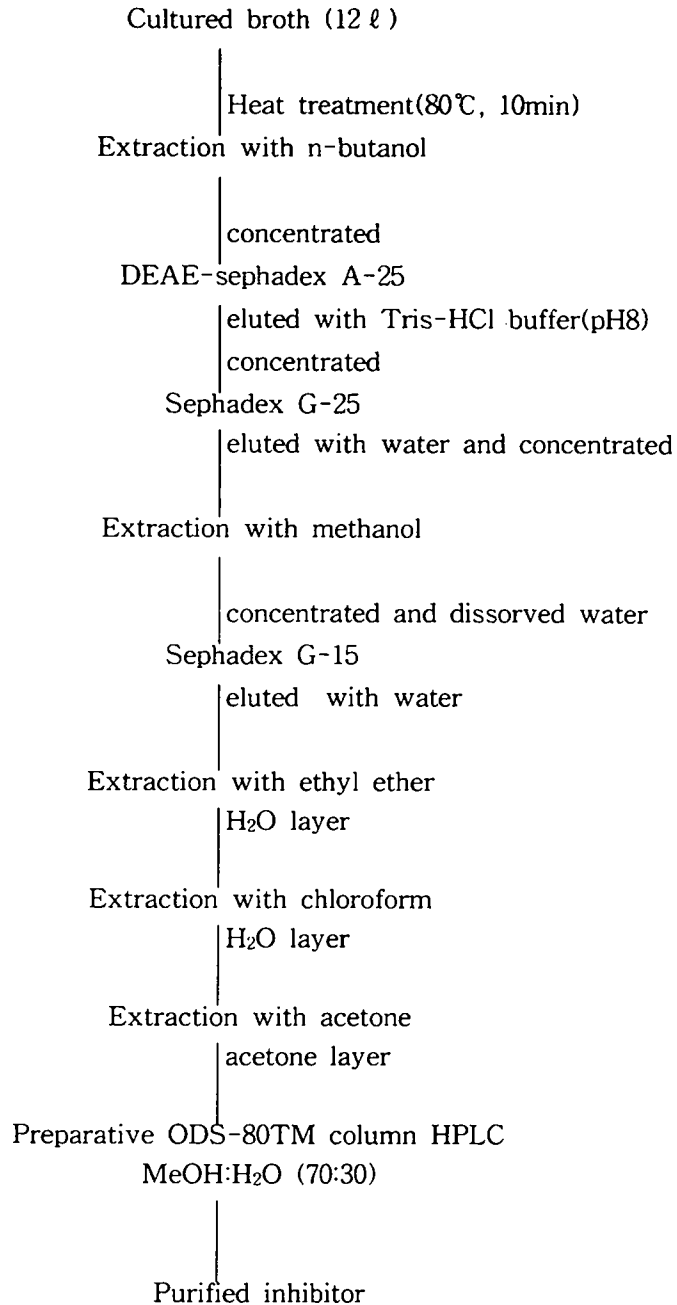


Fig. 2-49. Isolation procedure of the protease inhibitor from the culture of *Streptomyces cyaneus* KH-1.

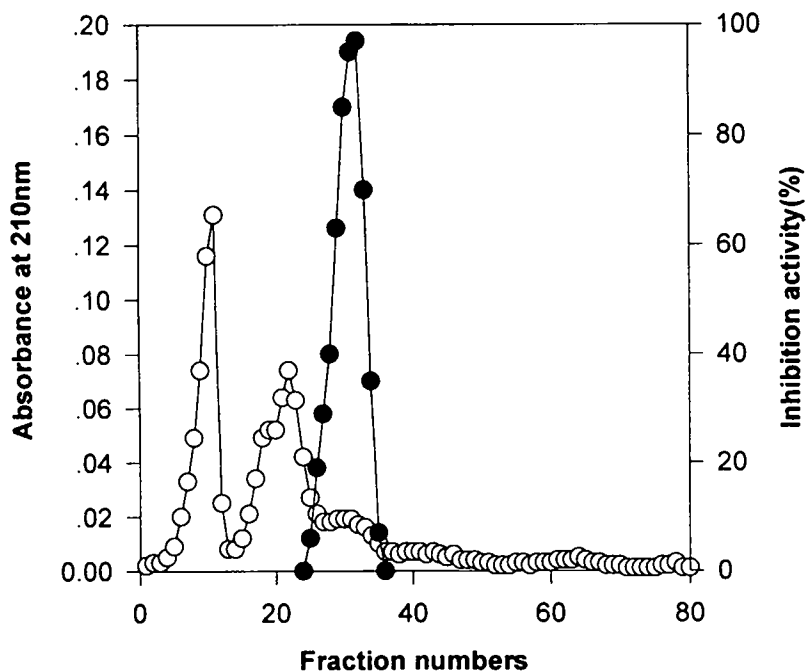


Fig. 2-50. DEAE-sephadex A-25 column chromatography of protease inhibitor.

○ : absorbance at 210nm, ● : protease inhibitor activity(%)

The sample solution was applied to the column ($\varnothing 2.5 \times 50$ cm) equilibrated with water and then eluted with the same solution.

Fraction of 4ml were collected at a flow rate of 19 ml/hr and aliquots were taken for determination of protease inhibitor activity.

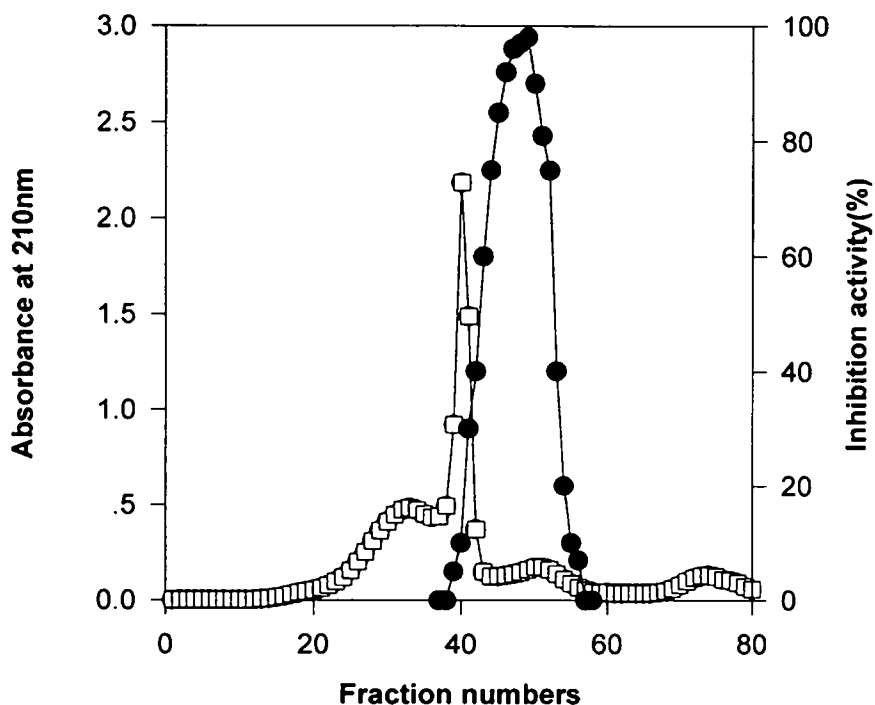


Fig. 2-51. Sephadex G-25 column chromatography of protease inhibitor.

□: absorbance at 210nm, ●: protease inhibitor activity (%)

The sample solution was applied to the column ($\varnothing 2.5 \times 50$ cm) equilibrated with distilled water and then eluted with the same solution. Fraction of 4ml were collected at a flow rate of 19 ml/hr and aliquots were taken for determination of protease inhibitor activity.

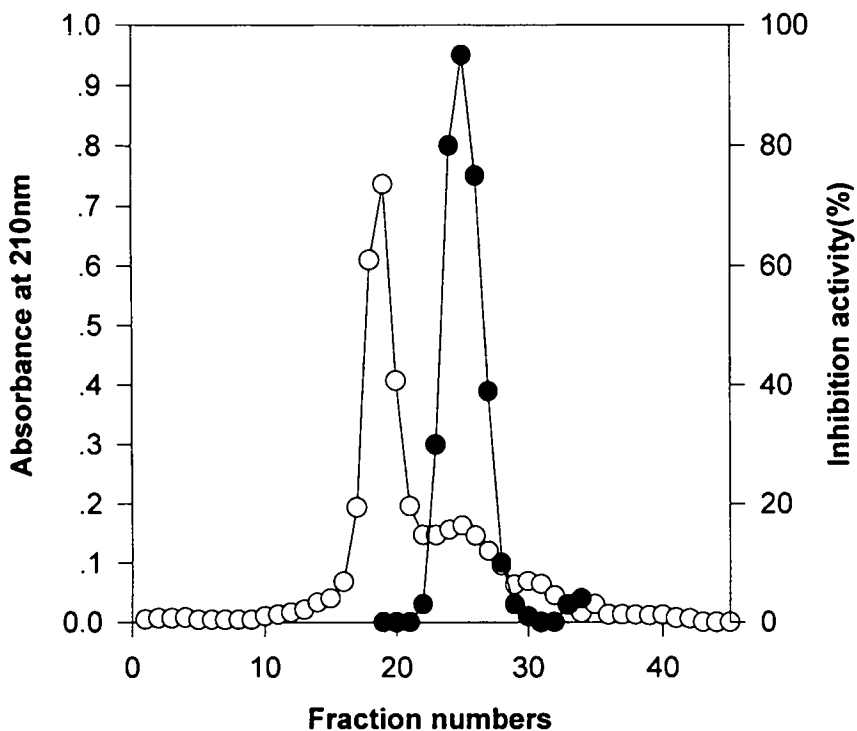


Fig. 2-52. Sephadex G-15 column chromatography of protease inhibitor.

○: absorbance at 210nm, ●: protease inhibitor activity (%)

The sample solution was applied to the column ($\phi 1.5 \times 30$ cm) equilibrated with distilled water and then eluted with the same solution. Fraction of 3ml were collected at a flow rate of 14.3 ml/hr and aliquots were taken for determination of protease inhibitor.

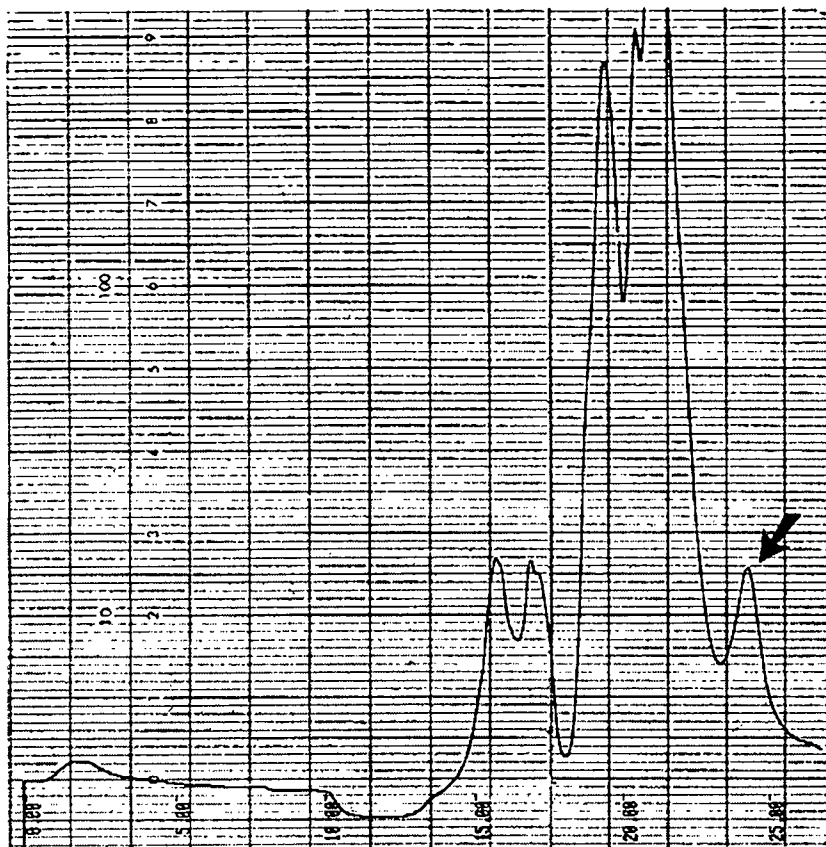


Fig. 2-53. Preparative HPLC patterns of active fractions of protease inhibitor.

Protease inhibitor dissolved in methanol was injected into TSK gel ODS-80 Tm column (ϕ 21.5mmX30cm) and eluted with 70% methanol at a flow of 4ml/min. Optical density at 210nm was measured.

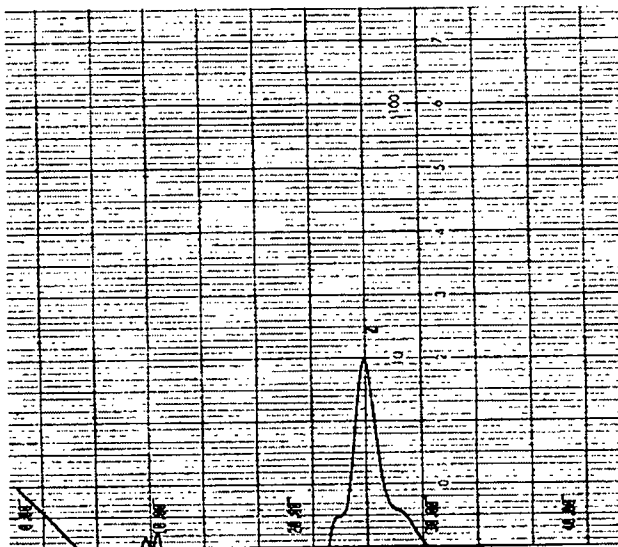


Fig. 2-54. Analytical HPLC of the purified protease inhibitor.

Protease inhibitor dissolved in methanol water was injected into TSK gel ODS-80 Tm column (Φ 21.5mmX30cm) and eluted with 70% methanol at a flow of 4ml/min. Optical density at 210nm was measured.

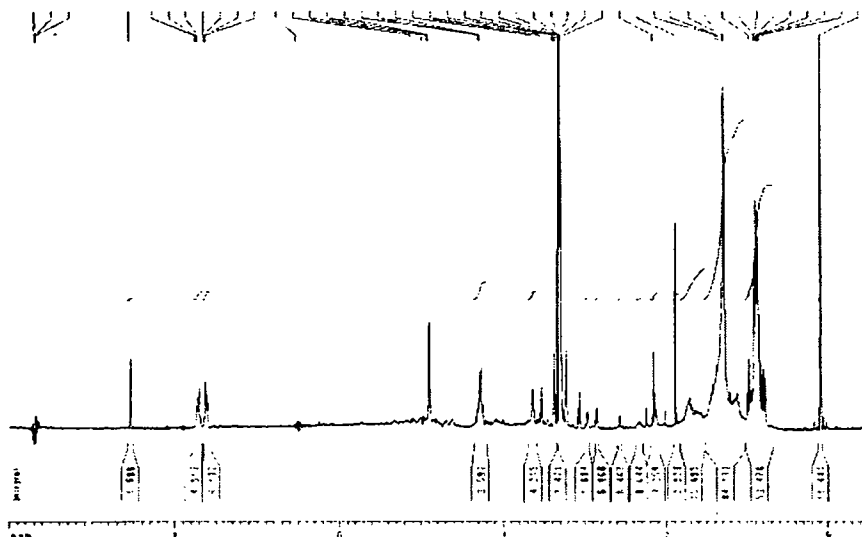


Fig.55. $^1\text{H-NMR}$ (30MHz) spectrum of antifungal antibiotic from *Actinomyces* sp. KH-28 in MeOH

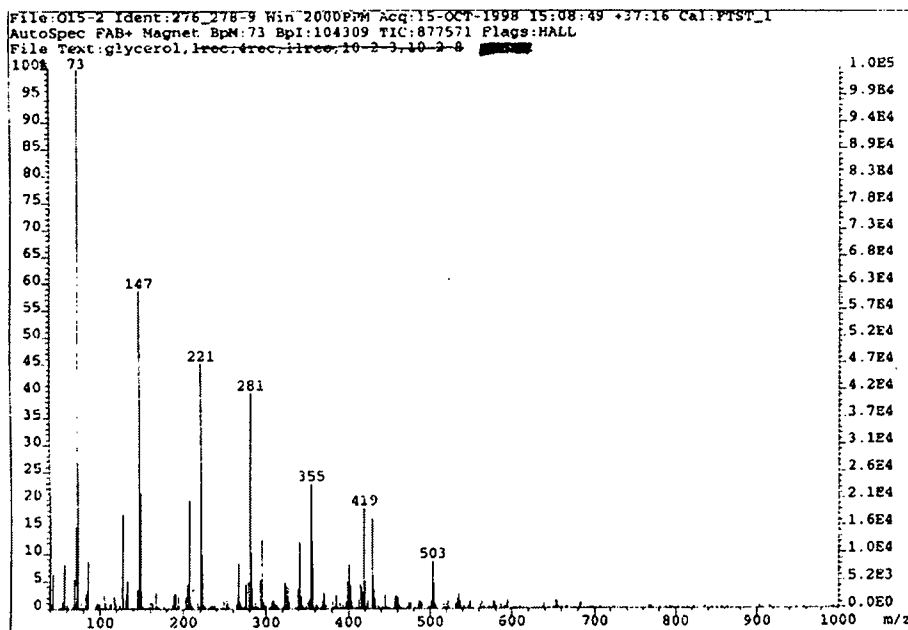


Fig.56. EI mass spectrum of antifungal antibiotic from *Actinomyces* sp. KH-28 in MeOH

2) 효소저해제 (protease inhibitor)의 활성 특성

식물병원성 진균인 *Alternaria mali* 와 *Colletotridum gloeosporides*에 의해 분비하는 단백질등 영양물질의 분해효소를 억제하는 효소저해제 활성을 측정하기 위하여 진균성 단백질분해 효소의 저해활성을 조사하고자 하였으며 Greenberg 방법 (149)에 의하여 protease의 활성도를 측정하였다.

가) 저해제의 전처리 시간에 의한 영향

단백질 분해효소의 반응에 있어서 효소, 저해제 그리고 기질과의 반응에 앞서 효소와 저해제간의 전처리를 시간별로 시켰을 경우 저해율의 영향을 확인한 결과 Fig. 2-57과 같이 5 분 이상의 전 처리를 시켰을 경우 가장 높은 저해율을 보였다. 이 실험 결과로는 0에서 1 분 사이의 전처리 결과 저해율이 점점 떨어짐을 알 수 있었으며, 2 분 이후 저해율이 증가했으며 5 분 이후부터 최고의 저해율을 나타냄을 확인하였다.

나) 저해제 농도별 저해활성을

식물병원성 진균의 단백질 분해효소에 대한 저해제 농도별 저해율을 확인 한 결과 Fig. 2-58에서 나타난 것 처럼 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 50% 이상의 저해율을 나타냄을 알 수 있었으며 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 거의 100%에 가까운 저해율을 나타내었다.

다) 반응시간별 저해율

식물병원성 진균의 단백질 분해효소에 대한 저해제 처리의 반응시간에 의한 저해율을 확인하기 위하여 기질로는 casein 1%, 진균성 protease 그리고 1 μM 의 저해제를 60 분 간 각 시간별로 반응시켜 본 결과 20 분 반응 시켰을 경우 80% 이상의 저해율을 확인 할 수 있었으며, 30 분의 경우 90% 이상의 저해율을 나타내었다(Fig 2-59).

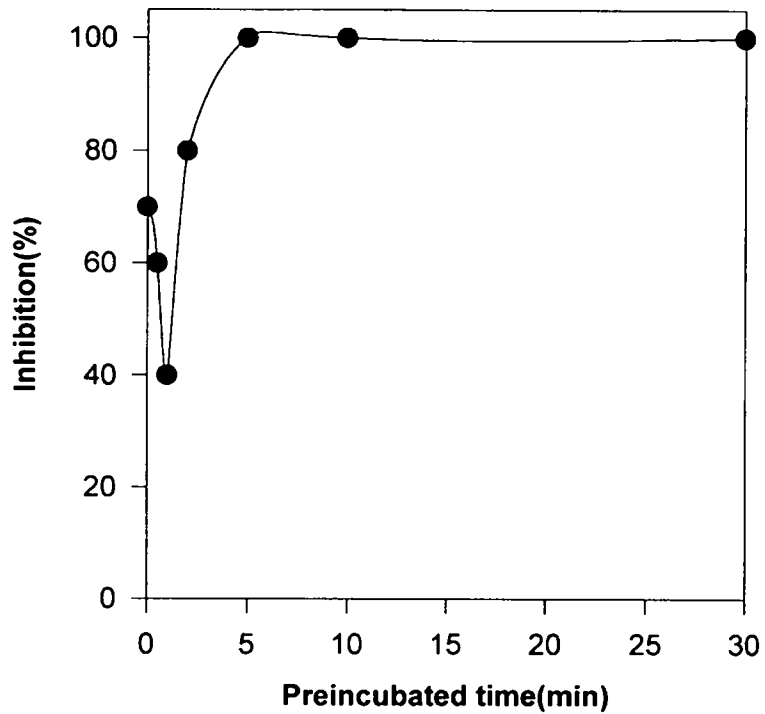


Fig. 2-57. Effect of preincubating time on the inhibitory activity of the protease.

1 μ M of inhibitor was allowed to react with protease at absence of casein(1%) for various time at 37°C and pH 7.0 prior to determination of inhibition activity.

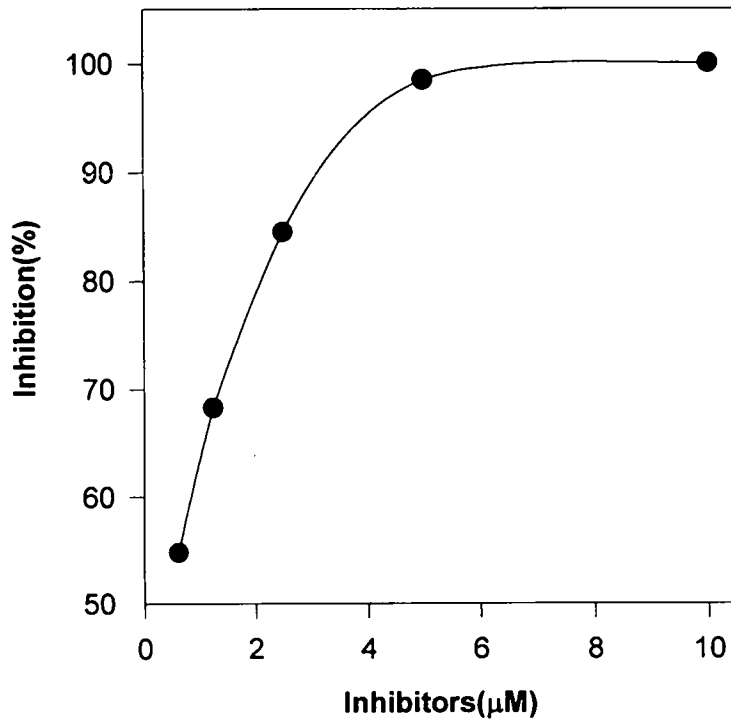


Fig. 2-58. Inhibitory effect of the protease activity for casein by the inhibitor KH-1 concentration .

The enzyme was preincubated with the inhibitor for 5min at 25°C, then the casein of 1% was added, and the enzymatic activity was measured. The best inhibition was setted with 100.

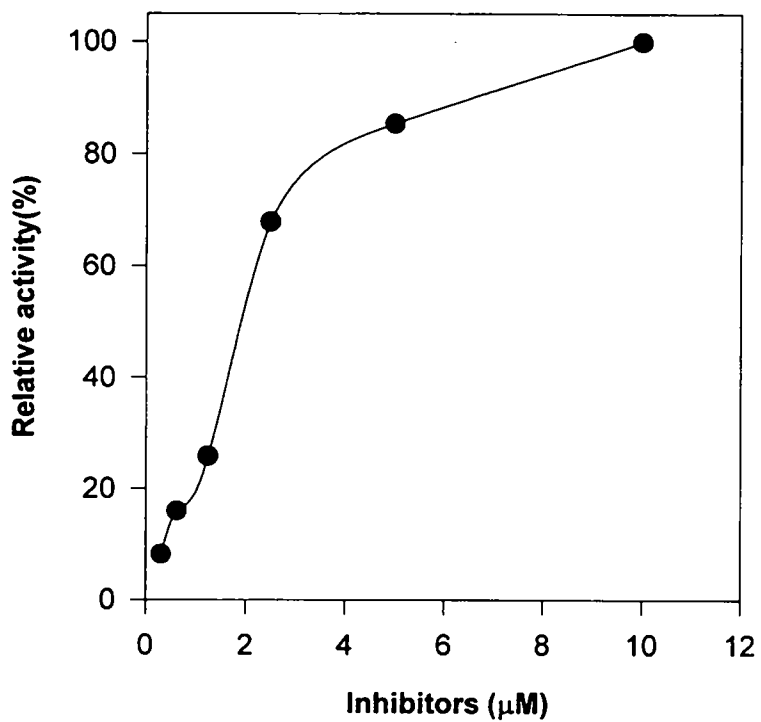


Fig. 2-59. Effect of reaction time in inhibition activities of protease.

The reaction was used with casein of 1% and $1\mu\text{M}$ of inhibitor after preincubated for 5min.

3) *Streptomyces cyaneus* KH-1의 protease inhibitor의 물질 구조

단백질 분해효소를 저해하는 protease inhibitor를 *Streptomyces cyaneus* KH-1의 배양여액으로부터 상기의 방법으로 단일물질로 정제한 후 그 구조를 밝히기 위하여 여러 가지 생화학적방법에 의하여 구성물질을 확인하였으며(Table 2-22), 이 저해물질을 IR spectrum, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, EI mass 그리고 IR spectrum 등의 여러 가지 기기를 사용하여 저해물질의 구조를 밝혔다(Fig. 2-60 ~ 2-63). 이와같은 물질구조를 분석한 결과 생물방제 방선균 *S. cyaneus* KH-1 이 생산한 길항성 protease inhibitor를 polyhydroxylamine으로 구성된 분자량 283 정도의 물질로 구명되었다.

Table 2-20. Solubility in various solvent of the Protease inhibitor

-
- ^aSoluble in water, methanol, ethanol, *n*-butanol, acetone
 - ^bInsoluble in ethyl ether, chloroform, *n*-hexane, toluene, benzen
-

The extracted cultures measured after concentrated with evaporator.

^aThe soluble inhibitor was appeared above 50% of inhibition activity.

^bThe insoluble inhibitor was appeared less than 50% of inhibition activity.

Table 2-21. *Rf* value of the protease inhibitor in various solvent systems.

Solvents	<i>Rf</i>
<i>n</i> -butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 1)	0.64
methanol : water (7 : 3)	0.90
ethanol : ammonia : water (8 : 1 : 1)	0.63
<i>n</i> -butanol : ethanol : water (4 : 1 : 2.2)	0.76
methanol : water : pyridine (20 : 5 : 1)	0.73
isopropanol : water (4 : 1)	0.56
ethyl acetate : pyridine : water (12 : 5 : 4)	0.30
<i>n</i> -propanol : ethylacetate : water (7 : 1 : 2)	0.52
phenol : ethanol : water (15 : 4 : 1)	0.51
<i>n</i> -butanol : pyridine : water (1 : 1 : 1)	0.75

Estimation of *Rf* value was carried out with silica gel thin layer chromatography and coloration of the spot was performed with iodine.

Table 2-22. Biochemical reaction of the protease inhibitor.

Reaction	Result
ninhydrine	+
Ehrlich ' s reagent	-
Pauly reagent	-
Sakaguchi	-
alkaline potassium permanganate	+
α -naphthylamine	+
phthalic acid	-
DNS	-
Aniline	-
5% H ₂ SO ₄	+
Iodine	+
phosphomolybdic acid	+

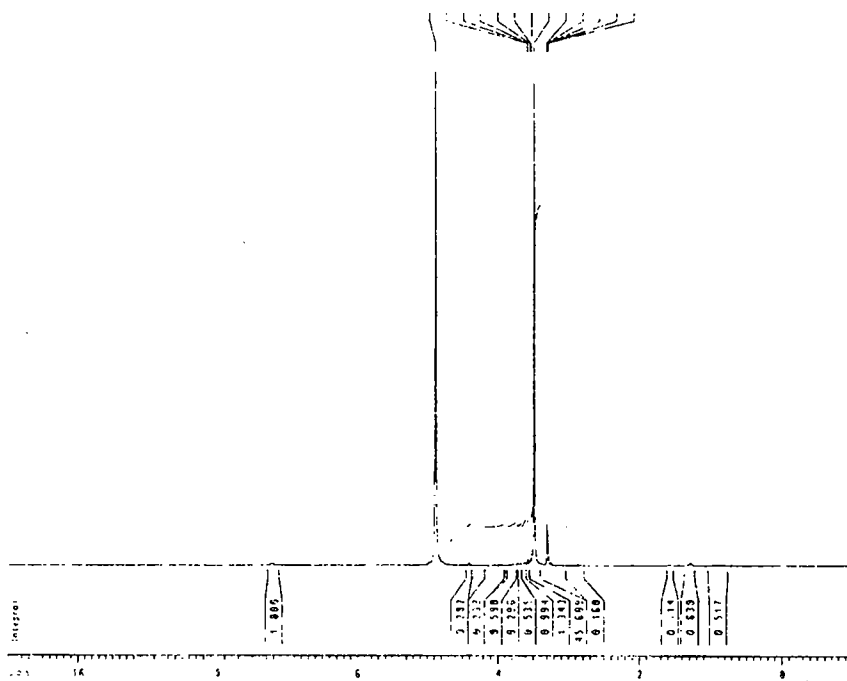


Fig. 2-60. H-NMR spectrum of protease inhibitor in MeOH (300 MHz)

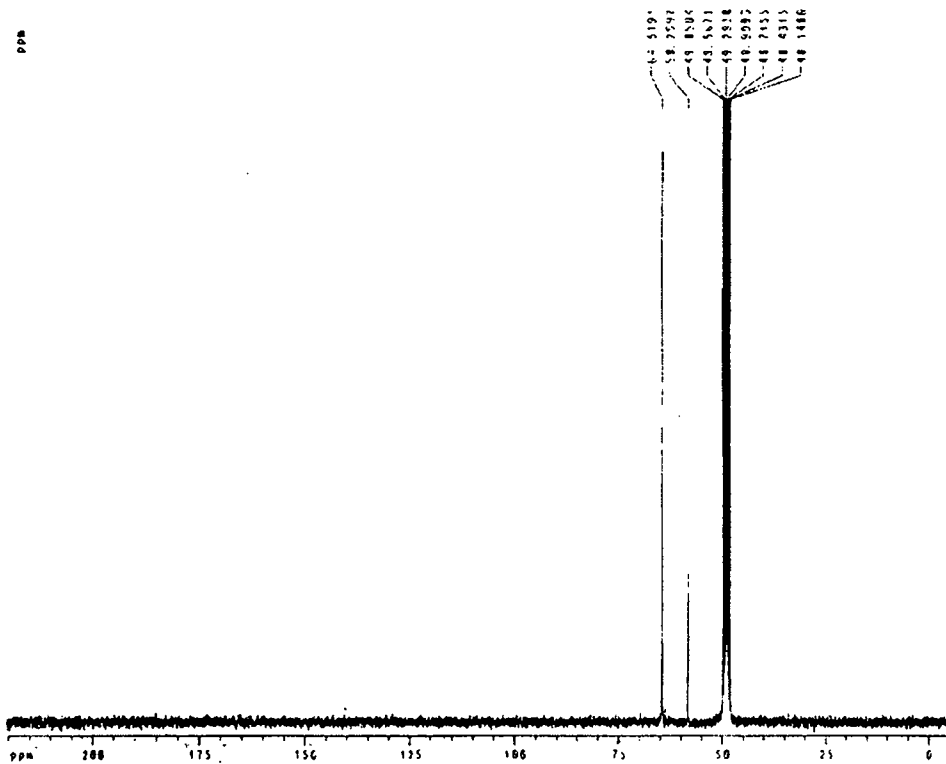


Fig. 2-61. ^{13}C -NMR spectrum of protease inhibitor in MeOH (75 MHz)

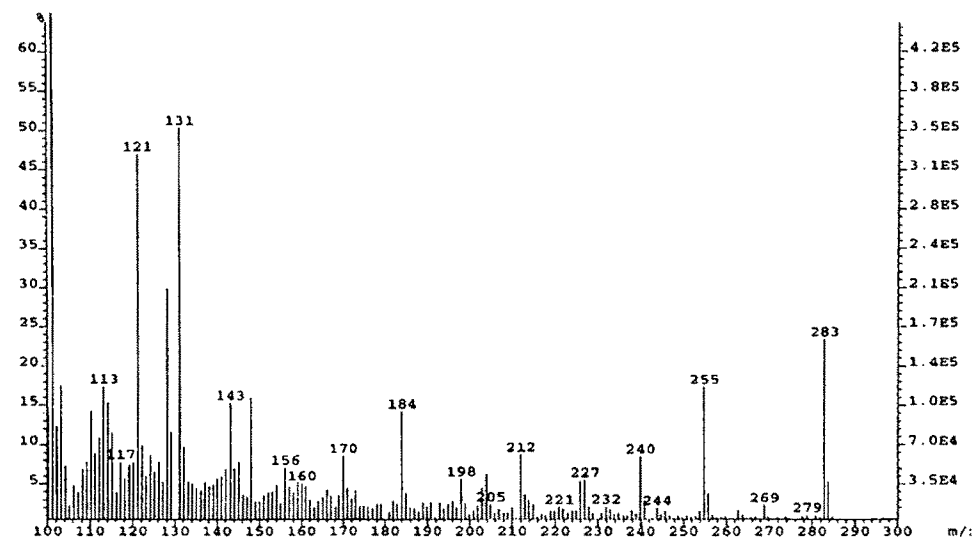


Fig. 2-62. Mass spectrum of the protease inhibitor.

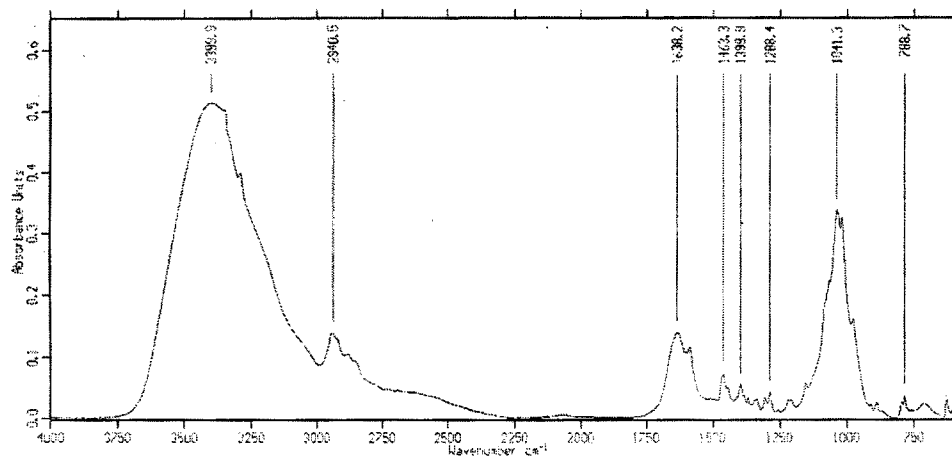


Fig. 2-63. IR spectrum of protease inhibitor in KBr.

3. 토착 길항미생물의 분류학적 동정

가. 길항성 세균 및 방선균의 동정

1) 길항성 세균의 동정

항생물질 생산성 길항미생물중 4016, 2112 등의 균주를 그 형태적, 배양적, 생리적, 생화학특성을 조사해본 결과 3034, 4016, SH14 균주는 Gram염색성 양성이고 포자염색법으로 포자가 확인된 간균으로 catalase test 양성, oxidase test 양성, V-P test 양성이었으므로 *Bacillus* 속으로 동정되었다.

2112 균주는 Gram염색성 음성이고 극모성 편모를 가지고 포자를 형성하지 못하는 초기성 간균으로 oxidase test 양성, catalase test 양성인 것으로 미루어보아 *Pseudomonas* 속으로 동정되었다. 또한 3098균주는 API 20 NE test 결과 *Pseudomonas maltophilia*로 추정되고 3095균주는 Biolog[®]사 동정시스템을 이용하여 *Serratia proteamaculans* 근연종으로 동정되었다.

이중 *Bacillus* sp. 4016는 *Bacillus pumilus* 근연종으로, *Bacillus* sp. SH14는 *Bacillus subtilis* 근연종으로 추정되었으며(Table 3-1) *Pseudomonas* sp. GL7, GL17, LS20는 *Pseudomonas fluorescens*로 추정되었다.

Table 3-1. Identificatinon of the antagonistic strain on their morphrological physiological nutritional characteristics.

Characteristics	Selected <i>Bacillus</i> 4016	Standard <i>Bacillus</i> <i>pumilus</i>	Selected <i>Bacillus</i> GL14*	Standard <i>Bacillus subtilis</i>
Cell form	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram stain	+	+	+	+
Endospore production	+	+	+	+
Spore round	-	-	-	-
Anaerobic growth	-	-	-	-
Voges-Proskauer				
broth (pH>6)	+	+	+	d
(pH<7)	+	-	-	-
Growth at pH 6.8	+	+	+	+
5.7	+	+	+	+
Growth at NaCl 2~7%	+	+	+	+
10%	-	ND	-	ND
Growth at 5°C	-	-	-	-
10~50°C	+	+	-	d
55°C	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+
Oxidase test	+	+	+	+
Voges-Proskauer test	+	+	+	+
Acid from D-glucose	-	+	+	+
L-Arabinose	d	+	+	+
D-Xylose	-	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-
Hydrolysis of Casein	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+
Starch	+	-	+	+
Utilization of Citrate	+	+	+	+
Propionate	+	-	-	-
Nitrate reduced				
to nitrite	-	-	+	+
Degradation of tyrosin	-	-	-	-
Deamination of				
phenylalanine	-	-	-	-
Formation of Indole	-	-	-	-
Dihydroxyaceton	+	ND	+	ND
Identification	<i>Bacillus</i> <i>pumilus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	

+ : Positive, - : Negative, d : 11-89% of strains are positive,
**Bacillus SH14* was also identified with VIEK[®] · BACILLUS Kit

2) 길항 방선균의 동정

식물병원성 진균인 *F. oxysporum*의 생육을 강하게 억제하는 균주로 선발된 길항성 방선균주 KH-28의 동정을 하였다. 본 균주의 배양상의 특징은 International Streptomyces Project (ISP)배지로 배양하여 균주의 생육양상을 관찰하였다(Table 3-2). 균주의 생육형태는 대체로 좋은 편이었으며 약간의 yellow의 색소를 생산함을 확인 할 수 있었다. ISP 4 배지에서 성장한 colony를 이용하여 전자현미경(SEM)상에서 형태를 관찰한 결과 Fig. 3-1에서와 같이 spore 형태는 rugose하고, spore chain은 spirales하게 나타났다. 또한 방선균내의 세포벽구성물질인 diaminopimelic acid를 확인함으로써 미생물을 분류한 결과 Fig. 3-2에서와 같이 *Streptomyces* 속의 특징인 L,L-diaminopimelic acid를 함유하고 있지 않음을 확인하였으며, 또한 세포벽의 총당은 특징적인 당을 확인할 수 없어 *Streptomyces* 속의 특징과 일치함을 확인하였다(Fig. 3-3). 또한 본 균주의 배양학적, 생리학적 및 생리학적특징등을 확인한 결과 Table 3-4, 3-5 와 같은 결과를 얻었다. 이와같은 결과를 이용 *Streptomyces* 속의 동정을 위해 computer program을 이용한 분석방법 결과 *Streptomyces* 속에 속하지 않음을 확인하였다. 그러므로 본 균주는 *Actinomyces* sp. KH-28로 잠정 명명하였다.



Fig. 3-1. Scanning electron micrography of isolate KH-28 cultured on ISP 4 media for 14 days



Fig. 3-2. Cellulose thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid(DAP) isomers and amino acids of isolate KH-28.
 1. Cell wall hydrolysate, 2. DAP isomers (a; LL-DAP, b; meso-DAP, c; 3-OH DAP)

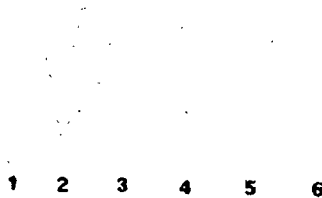


Fig. 3-3. Cellulose thin layer chromatogram of whole cell sugar extract of isolate KH-28.
 1. Whole cell wall extract, 2. Glucose, 3. Arabinose, 4. Rhamnose, 5. Galactose, 6. Mannose

Table. 3-2. Cultural characteristics of the isolate KH-28 strain.

Medium	Growth	Aerial mycelum	Soluble pigment
trypton yeast extract broth (ISP1)	M	pale yellow	pale yellow
yeast malt extract agar (ISP2)	G	grey	brown
oatmeal agar (ISP3)	G	grey	brown
inorganic salts starch agar(ISP4)	G	grey	pale brown
glycerol asparagine agar(ISP5)	G	greyish white	yellow
peptone-yeast extract iron agar(ISP6)	P	pale yellow	pale brown
tyrosine agar(ISP7)	P	grey	none
starch agar	G	grey	yellowish pale brown
nutrient agar	M	white	pale brown
potato dextrose agar	G	grey	brown
gluse peptone agar	M	yellowsh white	pale brown
czapeck agar	G	grey	pinkish brown

G: good, M: moderate, P: poor

Table. 3-3. Morphological characteristics of the isolate KH-28 strain.

Formation	Morphological characteristics
colony surface	powdery
spore chain	spirales
spore surface ornamentation	rugose
colony size	—
other soluble pigment	none
reverse side color	pale yellow-brown
aerial mass color	grey
melanoid pigment	none

Table. 3-4. Physiological, biochemical and antimicrobial properties of the isolate KH-28 strain.

Properties	Results
optimal growth temp. range	28-35 °C
at 10 °C	no growth
at 45 °C	growth
optimal pH range	6.8-7.0
at pH 4.3	no growth
at pH 10	growth
lecitinase	negative
lipolytic enzyme	negative
chitin lysis	positive
pectin lysis	positive
neomycin(50µg/ml)	no growth
rifampicin(50µg/ml)	no growth
NaCl(7% w/v)	no growth
sodium azide (0.01% w/v)	no growth
phenol(0.1% w/v)	no growth
nitrate reduction	negative
hydrogen sulfide production	positive
xanthine	positive
allantoin	negative
arbutin	negative
<i>Bacillus subtilis</i>	inhibited
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	inhibited
<i>Aspergillus niger</i>	uninhibited

Table. 3-5. Cultural characteristics of carbohydrate and nitrogen sources utilization by isolate KH-28 strain.

a: Results were determined after 7, 14 and 21 days by comparing growth with

Carbohydrate sources	Results ^a	Nitrogen sources	Results ^b
D-xylose	+	DL- α -aminobutyric acid	+
meso-inositol	+	L-histidine	-
mannitol	+	L-hydroxyproline	+
L-rhamnose	+		
raffinose	+		
D-fructose	-		
inulin	+		
adonitol	-		
cellobiose	-		

that on unsupplemented basal medium and on a positive control containing D-glucose.

b: Results were determined after 15 days by comparing the growth on each source with that on the unsupplemented basal medium and on a positive control containing L-asparagine.

3) Protease inhibitor 생산 방선균의 동정

최종 선발된 방선균주를 분류학적으로 동정하기 위하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 와 Actinomycetes Taxonomy 의 방법에 따라 International *Streptomyces* Project (ISP) 의하여 재료 및 방법에 기술한 방법에 의하여 수행하였으며 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성 등을 조사하였다.

그 결과 Fig. 3-4에서와 같이 전자현미경(SEM)관찰로 형태학적인 관찰을 보았으며 생화학적인 분류방법인 세포벽내에 함유한 Diaminopimelic acid (DAP)의 구성성분의 확인으로 LL-DAP임을 확인할 수 있었으며(Fig. 3-5) 총 당분석으로는 세포벽내에 특징적인 당을 확인 할 수 없었으므로 *Streptomyces* 에 속하는 방선균임을 확인하였다(Fig.3-6)(146,147). 본 분리균주의 배양학적특징으로 방선균의 전형적인 생육방법을 갖추고 있으며 이러한 여러 가지 생화학적 분해 및 배양조건을 바탕으로 종 단위의 균주확인을 위해 연구를 수행하였다 (Table 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11, 3-12). 이 방대한 방선균을 종(species) 수준으로 동정하기 위하여 Ward에 의하여 개발된 TAXON program을 이용 수리 분류 data로부터 확률동정하여 균주동정에 더 가깝게 접근하였다. 그 결과 분리된 길항균주는 *Streptomyces cyaneus*에 속하는 방선균인 것으로 확인하였다 (Table 3-13, 3-14, 3-15, 3-16)(148).

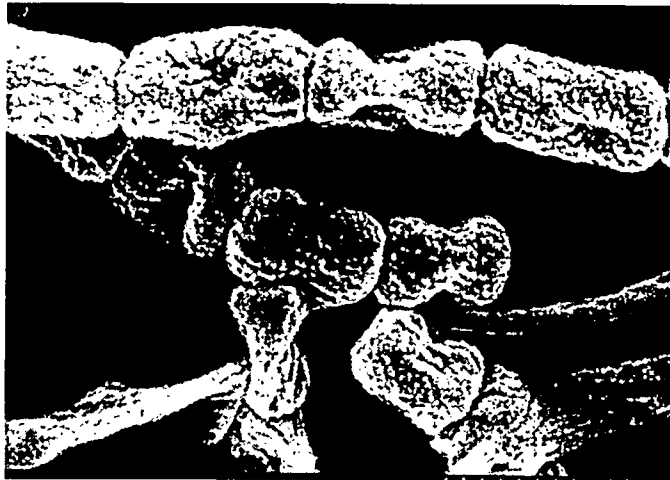


Fig. 3-4. Scanning electron micrograph of isolate *Streptomyces cyaneus* KH-1 culture on ISP4 media for 14 days.

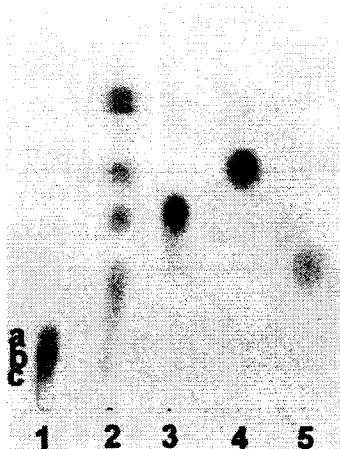


Fig. 3-5. Cellulose thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid (DAP) isomers and amino acids of isolate *S. cyaneus* KH-1.

1. cell wall hydrolysate, 2. DAP isomers (a; LL-DAP, b; meso-DAP, c; 3-OH DAP)

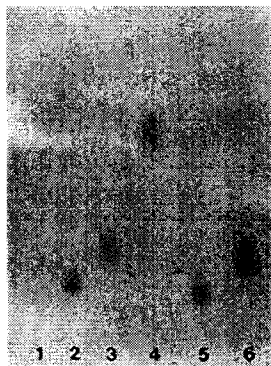


Fig. 3-6. Cellulose thin layer chromatogram of whole cell sugar extract of isolate *S. cyaneus* KH-1

1. whole cell extract, 2. glucose, 3. arabinose, 4. rhamnose, 5. galactose, 6. mannose

Table 3-6. Cultural properties of the *Streptomyces* sp. KH-1.

Medium	Growth	Aerial mycelium	Soluble pigment
Inorganic salts starch agar (ISP 4)	M	grey	none
Glycerol asparagine agar (ISP 5)	M	dark brown	brown
Peptone-yeast extract iron agar (ISP 6)	P	black	black
Trypton yeast extract broth (ISP 1)	M	brown	brown
Yeast malt extract agar (ISP 2)	G	dark brown	brown
Oatmeal agar (ISP 3)	G	white	pinkish pale brown
Tyrosine agar (ISP 7)	P	black	black
Starch agar	M	pinkish grey	brown
Nutrient agar	M	brownish grey	brown
Potato dextrose agar	M	greyish brown	brown
Glucose peptone agar	M	brown	brown
Czapeck agar	G	dark brown	pinkish brown

G, good : M, moderate : P, poor

* Media were employed by International *Streptomyces* Project.

The strain was cultured in various kinds of media at 28°C for 14 days.

Table 3-7. Morphological properties of the *Streptomyces* sp. KH-1.

Formation	Morphological Properties
Spore chain	rectiflexibles
Spore surface ornamentation	smooth
Colony surface	powdery
Colony size	discrete
Other soluble pigment	—
Reverse side color	brown
Melanoid pigment	product
Aerial mass color	brown

Table 3-8. Cultural, physiological and biochemical properties of the *Streptomyces* sp. KH-1.

Properties	Results
Optimal pH range	6.5-7.0
at 4.3	No growth
at 10	Growth
Optimal growth temp, range	23-25°C
at 10°C	No growth
at 45°C	No growth
Lecitinase	-
Lipolytic enzyme	-
Chitin lysis	+
Pectin lysis	+
Urease	-
Gelatin lysis	+
Casein lysis	+
Starch lysis	+
Tween hydrolysis	+
Catalase	+
Hydrogen sulfide production	+
Nitrate reduction	-
Indole production	-

+: Positive, -: Negative

Table 3-9. Utilization of carbohydrate the *Streptomyces* sp. KH-1.

Carbohydrates	Results	Carbohydrates	Results
L-Arabinose	-	Adonitol	+
D-Galactose	+	Cellobiose	+
Salicin	±	D-Fructose	-
Sucrose	±	meso-Inositol	+
D-Melezitose	+	Mannitol	+
D-Melibiose	+	Raffinose	+
Inulin	+	Dextran	+
D-Xylose	-	L-Rhamnose	+
Glycerol	+	Glucose	+

Results: +, Positive ; ±, Doubtful ; -, Negative

Table 3-10. Utilization of nitrogen the *Streptomyces* sp. KH-1.

Nitrogen sources	Results
L-Methionine	+
L-Phenylalanine	-
L-Serine	+
L-Threonine	+
DL- α -Amino-n-butyric acid	-
L-Arginine	+
L-Cysteine	+
L-Histidine	-
L-Valine	+
Potassium nitrate	+
L-Asparagine	+

Result: +, utilized ; -, not utilized

Table 3-11. Antimicrobial spectrum of the *Streptomyces* sp. KH-1 strain.

Strain	Antimicrobial activity
<i>E. coli</i>	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>Streptomyces murinus</i>	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
<i>Aspergillus niger</i>	+

+: Positive, -: Negative

Table 3-12. Growth of the *Streptomyces* sp. KH-1 in the presence of chemical inhibitor and antibiotic

Reagents	Results
Sodium chloride, 7%	—
Phenol, 0.1%	—
Potassium tellurite, 0.001%	—
Sodium azide, 0.01%	—
Crystal violet, 0.0001%	—
Neomycin, 50 μ g/ml	—
Rifamycin, 50 μ g/ml	—

—; No growth

The strains were incubated at 28°C for 7 days in the modified Bennett medium.

Table 3-13. Taxonomic unit characters for the identification of the *Streptomyces* sp. KH-1.

-
1. Antimicrobial activity
Bacillus subtilis (SUB) -, *Streptomyces murinus* (MUR) +
Aspergillus niger (NIG) +
 2. Biochemical tests
lectinase (LEC) -, pectin hydrolysis (PEC) -
Nitrate Reduction (NO₃) -, H₂S Production (H₂S) +
 3. Degradation tests.
Xanthine (XAN) +, Allantoin (ALL) -
Arbutin (ARB) -
 4. Antibiotic resistance
Neomycin (50μg/ml) (NEO) -, Rifampicin (50μg/ml) (RIF)-
 5. Growth test
45°C(45C) -, NaCl(7%,w/v)(7NA) -
Sodium azide (0.01%, w/v)(01Z) -, Phenol(0.1%,w/v)(PHN) -
 6. Compound as sole source of nitrogen (0.1%),w/v)
DL- α -Aminobutyric acid(BUT) -, L-Histidine(HIS) -
L-Hydroxyproline(HYD) +
 7. Organic compounds as sole source of carbon
D-Xylose (XYL) -, *meso*-Inositol (IND) +, Mannitol (MAN) +
L-Rhamnose (RMA) +, Raffinose (RAF) +, D-Fructose (FRU) -
Inulin(INN) +, Adonitol(ADO) +
Cellobiose (CEL) +
 8. Morphology and pigmentation
Spore chain morphology: rectiflexible (RFS) +, retinaculiaperti -, spirales -
 verticillati (BIV) -
Spore chain ornamentation: smooth (SMO) +, rugose (RUG) -
Colour of aerial spore mass: red (RED) -, grey (GRY) +, green (GRN) -
Diffusible pigment: reverse red/ orange (ROP) -
 reverse yellow/ brown(YBP) +
Melanin production on PI agar (MPI) +
Fragmentation of mycelium (FRG) -
-

Characters in parenthesis is the code name for computer program.

Table 3-14. Identification of the *Streptomyces* sp. KH-1 to the major cluster of *Streptomyces* by TAXON program.

TAXON Major cluster (centrotype number)	Taxonomic distance ^a	95% TAXON radius ^b	% Prob of strain further away ^c	Willcox probability ^d
18 (<i>S. cyaneus</i>)	0.4688	0.4166	0.1765	0.998490
29 (<i>S. lydicus</i>)	0.4879	0.3615	0.0000	0.000001
33 (<i>S. chromogenus</i>)	0.5166	0.3932	0.0001	0.000109

a: This expresses the distance of an unknown strain from the centroid of the group with which it is being compared.

b: This represents the radius of taxonomic groups including 95% groups of Taxon *J*.

c: This indicates what percent of all the cluster groups in represented by strains in cluster groups outside the identified strain.

d: This is the likelihood of unknown strain(*u*) against Taxon *J* divided by the sum of the likelihood of *u* against all *q* taxa.

Table 3-15. Comparison of taxonomic scores among hypothetical median organism (HMO), centrotype, outer-most member strain (OMS), best matched organism (BMO) and the selected strain.

Member of cluster 18	TAXON distance	95% TAXON radius	Probability of further away(%)	Willcox probability
HMO ^a	0.2445	0.4166	99.8221	0.999842
Centrotype ^b 592PE (<i>S. peruviansis</i>)	0.2718	0.4166	98.7261	0.999875
OMS ^c 042HA (<i>S. hawaiiensis</i>)	0.4454	0.4166	1.8417	0.962592
BMO ^d 483LT (<i>S. luteogriseus</i>)	0.4125	0.4166	10.2368.	0.999388
selected strain KH-1	0.4788	0.4166	0.1765	0.998490

a: This calculates the best identification scores achievable by entirely example of each group in a matrix.

b: This designated to determine overlap between groups in a matrix constructed using percentage positive values for character states.

c: This calculates the lowest identification scores achievable by entirely typical example of each group in a matrix.

d: This designated to the best matched identification scores at example of group in a matrix by the isolate strain

Table 3-16. Comparison of taxonomic unit characters among organisms in cluster 18 of *Streptomyces* and the S_{SM} value calculated by TAXON program.

Taxonomic unit characters (TAXON code)*	Positive characters state(%)	KH-1 strain	HMO in cluster 18	Best matched strain <i>S.luteoigriseus</i>	Centrotype <i>S. peruviansis</i>
RFS	5	+	-	-	-
RAS	31	-	-	-	-
SPI	28	-	+	+	+
BIV	1	-	-	-	-
SMO	93	+	-	+	-
RUG	1	-	-	-	-
RED	23	-	-	-	-
GRY	92	+	-	+	-
GRN	1	-	-	-	-
ROP	61	-	-	-	-
YBP	31	+	-	-	-
MPI	79	+	+	+	+
FRG	1	-	-	-	-
BUT	23	-	-	-	-
HIS	48	-	+	+	+
HYD	29	+	-	-	-
LEC	1	-	-	-	-
PEC	55	-	+	+	-
NO3	73	-	-	+	-
H2S	98	+	+	-	+
SUB	54	-	-	-	-
MUR	36	+	+	+	+
NIG	11	+	-	+	-
XAN	28	+	+	+	+
ALL	55	-	+	-	-
ARB	55	-	+	-	-
NEO	1	-	-	-	-
RIF	54	-	-	-	-
45C	24	-	-	-	-
7NA	81	-	-	-	-
01Z	61	-	-	-	-
PHN	36	-	+	-	-
XYL	98	-	+	-	+
INO	59	+	+	+	+
MAN	79	+	+	+	+
FRU	98	-	+	-	+
RHA	29	+	+	+	+
RAF	99	+	+	+	+
INU	28	+	+	+	+
ADO	48	+	+	+	+
CEL	59	+	+	+	+
Matching to KH-1		41	27	33	31
Mismatching to KH-1		0	14	8	10
S_{SM} value		100	65.85	80.48	75.61
Willcox Probability		0.99849 0	0.999842	0.999388	0.999875

HMO: Hypothetical Median Organism, S_{SM} : Simple match coefficient

* Code name for computer program of Table 12

나. 길항성 진균의 동정

1차 선발한 길항진균 중 배양토를 사용하였을 때 고추 역병에 대해 억제효과가 높은 37 J10과 36 J13 균주는 PDA에서 투명(hyaline)한 균사의 성장속도가 매우 빠르고 배양시간이 경과함에 따라 녹색(green)을 띄며, branched 상태의 conidiophore가 관찰되고 플라스크모양의 phialides와 구형의 phialides spore가 관찰되어 *Trichoderma* sp.로 동정하였다. 27 J5 균주는 균사가 밀집된 상태에서 자라며 배양시간이 경과함에 따라 노란(yellow)색을 띄고, conidiophore에서 conidia가 생성되며, macroconidia와 microconidia가 관찰되어 *Fusarium* sp.로 동정하였다. 31 K10 균주는 conidiophore의 형태와 conidia의 형태에 의해 *Penicillium* sp.로 동정하였다 (Fig. 3-7).

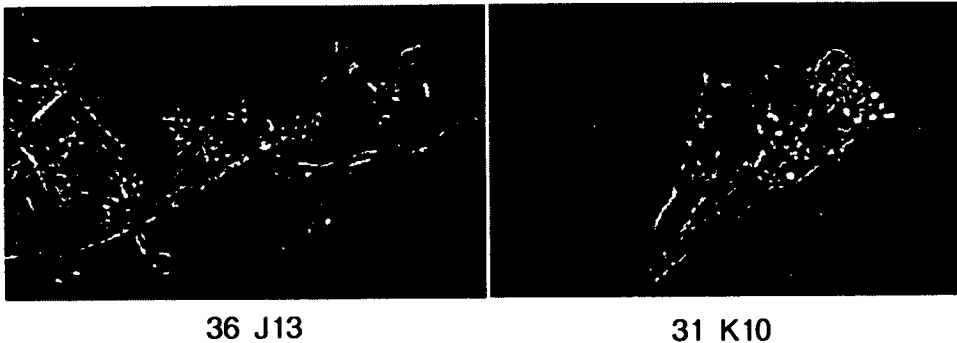


Fig 3-7. Conidiophore of antagonistic fungi (36 J13 and 31 K10) isolated from soil.

4. 다기능 생물방제균주의 유전공학적 개발

가. 돌연변이에 의한 방제력 증강균주의 육종

1) Siderophore 생산성 증강 변이주의 유전적 육종

가) 증강 변이주(Sid')의 선발

보다 강력한 생물방제균을 유전적으로 육종함으로써 같은 노력으로 식물병원균에 의한 농작물의 손실을 보다 더 효율적으로 방지할 수 있을 것으로 기대하여 선발된 길항균주 *P. fluorescens* GL7이 분비하는 siderophore의 생산능력을 1-Methyl 3-nitro 1-nitrosoguanidin (NTG) 로 돌연변이시켰다. Siderophore 생산성 증강변이주를 선발하기 위하여 철이 결핍된 KB (King's B) 배지에서 모균주보다 형광이 많이 보이는 30여 돌연변이주를 1차 선발하였다. 선발된 균주들을 대상으로 siderophore 선별배지인 CAS (Chrome Azurol S)배지를 이용하여 halo zone이 가장 큰 돌연변이주 1종을 최종 선발하였다.

NTG mutagen에 의해 돌연변이주를 얻은 후 siderophore의 생산성 및 식물근부균 *F. solani*에 대한 길항능을 모균주와 비교, 확인하였다. 그 결과 Table 4-1에서 보는 바와 같이 siderophore 생산성 증강변이주 *P. fluorescens* GL7-PM1(Sid')은 모균주에 비해 1.3 배 가량의 siderophore 생산능이 증강되었고(Fig. 4-4), 형광색 색소 (fluorescent pigment) 또한 모균주에 비해 많이 관찰되었다 (Table 4-1). 그리고 siderophore deficient mutant (*P. fluorescens* GL7-NM1)를 상기와 같은 방법으로 NTG mutagen에 의해 선발하여 siderophore 생산 증강변이주와의 비교를 용이하게 하였다.

Table 4-1 Characterization of siderophore-negative/positive mutant strains

Strain	Cell protein ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CAS	Hydroxamate	
		% reduction in A_{630} ^a	A_{543} ^b	$[\mu\text{g}(\text{mg cell})^{-1}]$ ^c
GL7	661	95.2	1.150	18.77
GL7-SN1*	626	5.7	0.065	1.36
GL7-SP1*	663	97.3	1.453	25.82

a) Percent values of 1-absorbancy/absorbancy reference at 630 nm.

b) Values of absorbancy in supernatant fluids per mg cell protein present per ml.

c) The values are μg hydroxylamine equivalents per ml.

* induced NTG mutagenesis

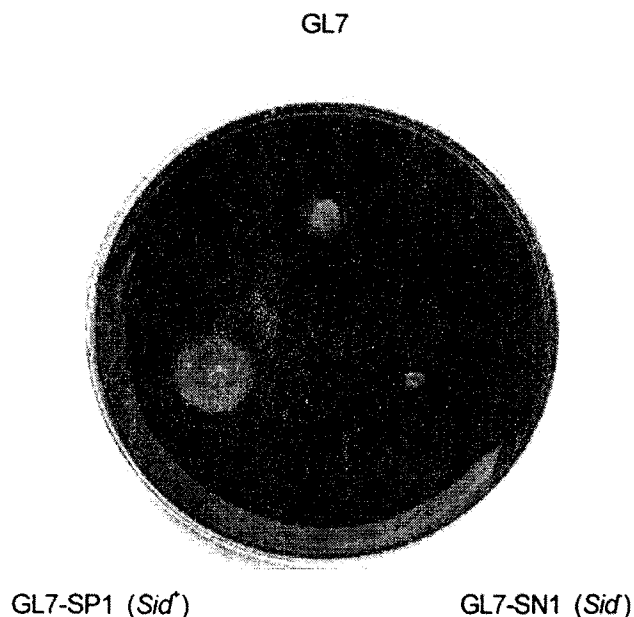


Fig. 4-4. Halo formation of *P. fluorescens* GL7 and its mutants on a CAS agar

나) 증강변이주의 검증

모균주 *P. fluorescens* GL7 및 선발된 siderophore 생산성 증강 돌연변이주 *P. fluorescens* GL7-PM1, *P. fluorescens* GL7-NM1(sid⁻), 그리고 충분한 Fe ion (100 μ M)를 넣어준 배지에서 자란 *P. fluorescens* GL7의 외막단백질을 분리하여 SDS-PAGE에 의해 iron-regulated outer membrane protein (IROMP)을 비교, 분석하였다. 그 결과 모균주 *P. fluorescens* GL7에서 나타나는 90,000 dalton 부근의 outer membrane protein band가 철이 풍부한 배지에서 성장한 모균주에서는 나타나지 않았다. 이 결과로 미루어 보아 siderophore의 생합성 및 수송에 관여하는 90,000 dalton 부근의 IROMP를 확인 할 수 있었다. 그리고 siderophore 생산성 증강 돌연변이주 *P. fluorescens* GL7-PM1의 경우 IROMP가 모균주 *P. fluorescens* GL7에서 보다 더 많이 생산되었으며, siderophore 생산 결핍변이주 *P. fluorescens* GL7-NM1에서는 전혀 생산하지 않았다.

또한 siderophore 생산성 증강 돌연변이주 *P. fluorescens* GL7-PM1의 식물근부균 *F. solani*에 대한 길항능을 조사한 결과 모균주에 비해 생육 저해 능력이 증강되었음을 확인할 수 있었다. 이들 결과에서 NTG mutation에 의해 육종된 *P. fluorescens* GL7-PM1은 siderophore 생산능과 더불어 식물근부균에 대한 생육억제 능력이 모균주에서 보다 더 증강되었다는 것을 입증할 수 있었다.

나. 외부 길항유전자 도입 system 구축

1) Fungal cell fusion에 의한 길항유전자 통합

25J1과 36J13 및 36J13과 37J10균주간 protoplast fusion에 의해 얻은 colony중에서 안정성을 확인한 두 개의 균주(PFJ1+J13 및 PFJ13+J10)를 선발하여 동일한방법으로 고추역병의 발생억제력을 조사한 결과 병발생억제효과의 증진이 없었다.

다. 외부 길항기작 유전자의 도입에 의한 유전공학적 육종

1) 항생물질 생산성 길항 균주에 Chitinase gene 도입

생물방제균 *Pseudomonas* sp. 3098 Chitinase 유전자를 클로닝하기 위하여 이용된 5가지 실험의 결과 중합효소 연쇄반응에서 증폭된 단편을 전기영동상에서 분리한후 T-vector (Promega)에 클로닝하였다. 그리고, 클로닝된 유전자의 염기배열을 확인한 결과 chitinase와의 유사한 배열이 발견되지 않았다. 그리고, *Serratia marcescens* 균주의 chitinase 유전자를 probe로 Southern hybridization에서도 band를 확인하지 못하였다. 이러한 결과로 볼 때, *Pseudomonas* sp. 3098 균주의 chitinase 유전자는 *Serratia marcescens* 균주의 chitinase와는 상동성이 없거나 매우 낮은 것으로 추정된다. 또한 *In vitro* packaging 법으로도 형질전환체가 획득되지 않았다.

그러나, plasmid pUC19를 이용한 shotgun 클로닝에서 유일하게 chitinase활성이 확인된 colony를 획득하였다. 그리하여 pUC18에 들어있는 insert DNA의 길이를 측정해본 결과 3.2 kb 임이 확인되었다. 우선 insert DNA를 *Pst* I으로 절단했을 때 3개의 단편으로 분해(Fig. 4-5)가 되었다.

가) 클로닝된 길항성 chitinase유전자의 염기배열 결정

3개의 *Pst*I단편으로 이루어진 chitinase유전자의 염기배열을 Sanger의 dideoxy chain termination법에 따라 결정하였으며 사용기기는 ABI의 DNA sequencing system을 이용하였다. 생물방제균으로 선발된 *Pseudomonas* sp. 3098의 chitinase gene 염기배열 결정의 결과는 다음과 같다(Fig. 4-5)

Pst I
 CTGCAGTCGACCACGCCGACGCCGACGCCAACACCTACACCGACGCCATACCCCAACACCTACGCCACGCCGTACACCAAC⁸⁰
 CCCGACGCCACCCCGACGCCAACGCCAACGCCGACGCCGTCCGGTGTGCCCTGCCGCCCGATGCCCTGACCTCGGCC¹⁶⁰

Pst I
 TGACGAACGTGCCGTACTGCTCGGTGTACGACGCCAACGCCCGGAGAAAGCTGGCCAACGCCCTGCAGCGCCGATCGTC²⁴⁰
 GGCTACTTCACCAGCTGGCGCACCGGTGCCGGGGCACGCCACCTACCTGGTCAACAACATCCCGTGGGACAAGGTCAC³²⁰
 CCACATCAACTACGCCCTTTGCCACCGTGGACAGCGCCAACAAGGTGCCATCGGCAGCGCGCGGAACAATCCGGACACGG⁴⁰⁰
 GCCTGACCTGCGCGAACAATCCCGGGCGCGGCATGGATCCGTCCGTGCCGTACAAGGGCACTTCAACCTGCTGGCGCAG⁴⁸⁰
 TACAAGAAAAAGTATCCGGCAGTGAAGGTGATGCTGTCCGTGGCGGGCTGGGCCGGCAGCGCGGGCTTCTACACCGCAAC⁵⁶⁰
 GACGAATGCCGACGGCAGCCTGAACGCCGGCGGCATCAACACCGTGGCCGACTCGATGGTGGGTTCCGTCACCAGTACC⁶⁴⁰
 CGTTCTTCGACGGCATCGACATCGACTACGAGCACCCGACCACCAACAACGAGGCCGGCAACCCCGTCGATTTCCGCATC⁷²⁰
 TCCAAGCCCCGCTGGCGGGCTGATGAAGAGCTACAACGAGCTGCTGCCGGTGGTGGCCAGAAGCTGGACACGGCCGC⁸⁰⁰
 CGTCCGCACAAGAAGTACTACCTGCTGACGATCGCCGGCTCGCCCTCGGGCTGGTGGTGGTGGCGGGGAGGAAAACATGT⁸⁸⁰
 CCGGCCTGAATACCTGGACTATCCCTTCGCTCATGTCTGATGACCTGCACGGCGGGTGAACCAATACGTCGGTCCGAAAC⁹⁶⁰
 GCGGCACGTGTTCCAGCATGGCAACGACGGCAACTGGCGCCGGTAACGCCTACTCGTACGGCGGCATGGGCTACCTGAA¹⁰⁴⁰
 CGTGGACTGGGCTATCCGCTTCTACCGCGCGCATTTGCAGGCCGGCCGATCAACAATCGGGCTGCCATATTACACGGCGC¹¹²⁰
 GCTGGAAGGACGTTACCGCGGCACCAATGGCTGTGGGGCACAGCCCGACCGTCAACGACCCGGTGGCTGCGCCGGC¹²⁰⁰
 ATCAAGACCTGGCGTCCGGCGCCACCGGCATCGACAACGCTGGCACGACCTGGACCCGAACGCCAAGCCGATCCCGG¹²⁸⁰

Pst I
 CGCGGGCAACCCGTTGTGGCACGGCTGAACCTGCAGAACGCCATCGTGCCGGACTACCTGGACGCCTACGGCATCACGG¹³⁶⁰
 AGAAGACGCTGACGGGCACCTACACGGCCAACCTACAGCGCCACCCCTGGCGGGCCATGGCTGTGGAACGCCACCCGAAG¹⁴⁴⁰
 GTGTTCCTGTCGACGGAAACGGCGCAGTCGATCCGGCCAAAGACGAGTACGTGATCGACAACGGTATCGCGCGCATCAT¹⁵²⁰
 GATCTGGGAGCTGGCCGGGACTATCGGTGGGACGCGCGCAAGAATGGCGGCAAGGGTGAAGTACTTCAATGGGCTACACCC¹⁶⁰⁰
 TGACGACCAATATCCCAACCGGTTCAAGCGCCCTCCTCCCTATGGTGGACCCGGTGGACACGGCCATGCCGGCCACC¹⁶⁸⁰
 AGCCCAAGGTGTCGATCGAACTGGGAGTTGGAAGCTGGGGACAGCAACTACCCGATCAACCCGGTCAATGACGCTGA¹⁷⁶⁰
 CGAACCCGACGACGGTGACGATCCCGGGCGGCTCGGTGGTGGAGTTCGACTATCCGGTGTCCGGCCCGGCCAATATGAGC¹⁸⁴⁰
 GACCAGTCGGGCTACGGGCTGACGGTCAACAAGGCCGCTACACGGGACCGAACAATAACGGCGGCTTCAAGGCCAACTT¹⁹²⁰
 CAACCGGGCCCGCTTACAGTTCGGCGTGGCAGTCGCTGGCCCCGGCGCCTCGGTGTCCGCTGACCTTGAAGTACCAGGT²⁰⁰⁰
 TGCCGATCAAGTGGCCGTCGGNCTACAGATCACCGTAAAACGGCGTGAAGTATGCCCTGAGCCGACAGTTTTCCGAACC²⁰⁸⁰
 TGCCGTGGGGCTGAAATAAGTTGACCTTCCGGNCGGCTTTTGGCAAGTCCCGGATGCCCGTAACCGGGATTTTTTCNA²¹⁶⁰
 AGGGTTGGTTCCAAAAAAC²¹⁸⁰ - 400bp - ²²⁰⁰CCCAANNCTGAGCANCCNGTCAATNGCAAGCAAAACCC²⁶⁴⁰

GGCGTACCCTCCACGCCCTCCAGGGTTGGGGTCTGTCCCTTCGGGACTTGACCCGGTTTTTA TCGCGCCGGCAGCGTACC²⁷²⁰
 CCCCTGCAAGCAAGCAGCCGTGATATCGGACATCATGCAAAAAGCATACCAGCTGAACCTAGCGAGAAGATCACCAAACCT²⁸⁰⁰
 TCCGCAAGGAATCTCACTGTCTACTTCCAGATTATTCGATCCACGAATACCAGACATCGAAAACCTGTCATTTGGACGAATA²⁸⁸⁰
 ACTCAGGCCAGCGTAAGCTACAACATTTGCCAGAGGTATATATTTCCAGGAGTCGCCATGTCCGCCACCCCATTCGCGGT²⁹⁶⁰
 TGAAGATGCACCCGGATTCGTCATTTGCCGACGCTTACCGCCGCTACATGCCGCTGTTGAAGGCACCGCTGCCGCCCTGT³⁰⁴⁰
 TCGAAGCGCTGGGGCGCGCGTACGTCGACGGCCGCTTCCCGCGGCTGAGCATCAACGTATCGCCATCGATCGAGGCGG³¹²⁰
 CCGCGTGCCGCCCTTTTTTGTGTCCTACGCCCGCCGAATTAGCACGAGTTTCAATATCTGCAG³¹⁸⁷

Fig.. 4-5. Nucleotide sequence of cloned chitinase gene of antagonistic *Pseudomonas* sp. 3098

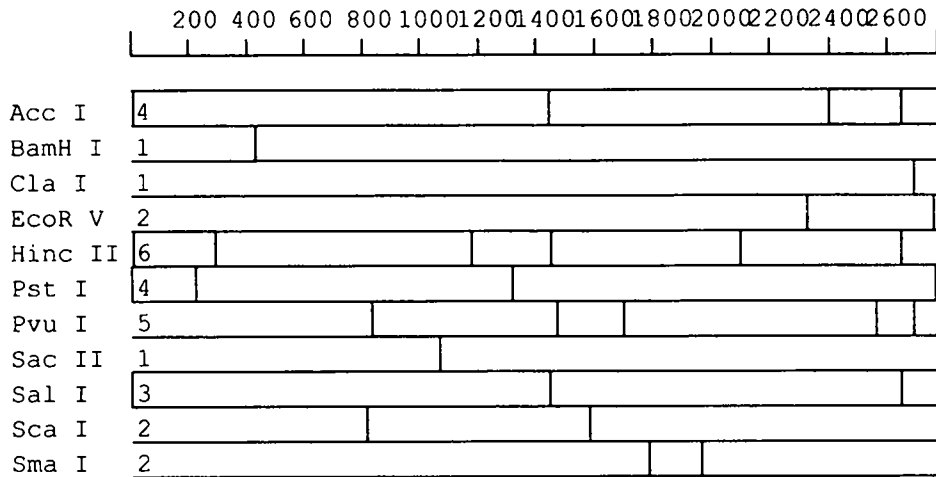


Fig. 4-7. Restriction site of chitinase gene of antagonistic *Pseudomonas* sp. 3098

제한 효소 mapping을 수행하였을 때 위와 같은 결과를 얻었으며 클론된 단편 내에는 *Bam*HI site가 1개부위, *Pst*I site가 2개부위에서 존재함을 알았다.

라) 염기배열로부터 추정된 open reading frame(ORF)

(1) ORF의 amino acid 배열

Pseudomonas sp. 3098 의 길항성 chitinase유전자는 538개의 아미노산을 코드하는 것을 알았으며 최초의 아미노산은 methionine이었으며 마지막의 아미노산은 alanine 이었다 (Fig. 4-8).

```

MDPSLPYKGFNLLAQYKKKYPVKVMSLVGGWAGSGGFYTATTNADGSLNAAGINTLADSMVAFLHQYPPFDGIDIDYE50
HPTTNNEAGNPLDFAISKPRLAGLMKSYNELLRVVRQKLDTAADVADKKYLLTIAGSASGWVLRGEENMSGLN.TWTMPSL100
MSYDLHGGWNQYVGPNAALFDDGNDGELRAGNAYSYGGMGYLNVDWAYRFYRGALQAGRINQVPPYYTRGWKDV TGGTNG150
LWGTSPVNDPVACAGIKTCGSGATGIDNVWHDLDPNGKPIPGGGNPLWHALNLQNAIVPDYLDAYGITEKTLTGTYTAN200
YSATLAAPWLWNA TRKVFLSTETAQSIAAKTQYVIDNGIGGIMIWELAGDYAWDAAKNGGKGEYFMCYTLTTNIAAFKA250
ASPYGATRSDTAMPATSAKVSIELGRLEAGRQQLPDQPGHDADEPQQRDDPGRLLGGVRLSGVGAGQYERPVGLRADGHQ300
GRLHGTEQYRRLQGGQLQPGPI.HDSAWQSLAPGASVSLTLNYQVADQVAVGLIHDHRKTA total 538 a.a

```

Fig. 4-8. Deduced open reading frame(ORF) from chitinase gene

이 ORF를 보면 PCR primer 제작을 이용한 클로닝법의 경우 성공하지 못한 이유를 알 수 있을 것 같다. 왜냐하면 PCR primer 제작에 이용한 배열 SVGGWA의 경우에는 클로닝된 것을 보면 SVGGAG였으며 GVPANKL의 배열과는 유사한 부위가 발견되지 않았다. 또한 그 후에 DIDWEYP배열 기초로 제작한 primer를 사용한 경우는 이와 유사한 배열이 ORF에서는 발견되지 않았으므로 chitinase 유전자의 클로닝은 PCR을 이용한 방법으로는 성공하기가 매우 어렵다는 것을 알 수 있었다.

(2) ORF의 nucleotide sequence

Pseudomonas sp. 3098의 길항성 chitinase의 ORF에 해당하는 염기배열은 다음과 같으며, 1617bp로 구성되어 있다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4-9).

```

ATGGATCCGTCGCTGCCGTACAAGGGCCACTTCAACCTGCTGGCGCAGTACAAGAAAAAGTATCCGGCAGTGAAGGTGA1-80
GCTGTCGGTGGGCGGCTGGGCCGGCAGCGGGCTTCTACACCGCAACGACGAATGCCGACGGCAGCCTGAACCGGGCCG160
GCATCAACACGCTGGCCGACTCGATGGTGGGTTTCTGCACCGTACCCGTTCTTCGACGGCATCGACATCGACTACGAG240
CACCCGACCACCAACAACAGGGCCGGCAACCCGCTCGATTTCCGCCATCTCCAAGCCCCGCTGGCGGGCCTGATGAAGAG320
CTACAACGAGCTGCTGGGGTGGTGGCCAGAAGCTGGACACGGCCCGCTCGCCGACAAGAAGTACTACCTGCTGACGA400
TCGCCGGCTCGGCCTCGGGCTGGGTGCTGCCGGCGAGGAAAACATGTCCGGCCTGAATACCTGGACTATGCCTTCGCTC480
ATGTCGTATGACCTGCACGGCGGCTGGAACCAATACGTCCGTCCGAACCGGGCAGTGTTCGACGATGGCAACGACGGGA560
ACTGCGCGCCGGTAACGCCTACTCGTACGGCGGCATGGGCTACCTGAACGTGGACTGGGCCTATCGCTTCTACCCGGGG640
CATTGCAGGCCCGCCGATCAACATCGGCGTGCCATATTACACGCGCGGCTGGAAGGACGTTACCCGGCGCACCAATGGC720
CTGTGGGGCACCAGCCGACCGTCAACGACCCGGTGGCCTGCCCGGCA TCAAGACCTGGGTTCGGGGCCACCGGCAT800
CGACAACGCTCTGGCAGCACTGGACCCGAACGGCAAGCCGATCCCCGGCGGGCAACCCGTTGTGGCACGGCTGAACC880
TGCAGAACGCCATCGTGCCGACTACCTGGACGCCTACGGCATCACGGAGAAGACGCTGACGGGCACCTACACGGCCAAC960
TACAGCCACCCCTGGCGGCCATGGCTGTGGAACGCCACCCGCAAGGTGTTCTGTGACGGAACGGCGCAGTCGAT1040
CGCGGCAAGACGCAGTACGTGATCGACAACGGTATCGGGCGCATCATGATCTGGGAGCTGGCCGGGACTATGCGTGGG1120
ACGCGGGAAGAATGGCGGCAAGGGTGAGTACTTTCATGGGCTACACCTGACGACCAATA TCGCCAACCCGTTCAAGGC1200
GCCTCTCCCTATGGTGGACCCGGTCCGACACGGCCATGCCGGCCACCAGCCCAAGGTGTCGATCGAACTGGGCAGGT1280
GGAAGCTGGGGACAGCAACTACCCGATCAACCCGGTCAATGACGCTGACGAACCGCAGCAGGTGACGATCCCGGGCGGC1360
TCGTTGGTGGAGTTCGACTATCCGGTGTCCGGCCGGCCAATATGAGCGACCAAGTCGGGCTACGGGCTGACGGTCAACAA1440
GGCCGGCTACACGGGACCGAACAATATCGGGCGCTTCAAGGCCAACTTCAACCCGGGCCGCTTACGATTCGGCGTGGCA1520
GTCGCTGGCCCCGGCGCCTCGGTGTCCGTGACCTTGAACCTACAGGTTGCCGATCAAGTGGCCGTCGGNCTACACGATC1600
ACCGTAAAACGGCGTGA total 1617 nucleotide sequence

```

Fig. 4-9. Nucleotide sequence of chitinase encoded by ORF

마) 결정된 염기배열과 상동성이 높은 배열의 검색

위에서 결정된 염기배열을 Blastx program으로 검색시 나타나는 상동성 영역은 다음과 같으며 60여종의 chitinase유전자 배열과 상동성이 상당히 존재하는 것으로 보아 본연구에서 염기배열이 결정된 유전자는 chitinase gene임을 알 수 있었다 (Fig. 4-10)

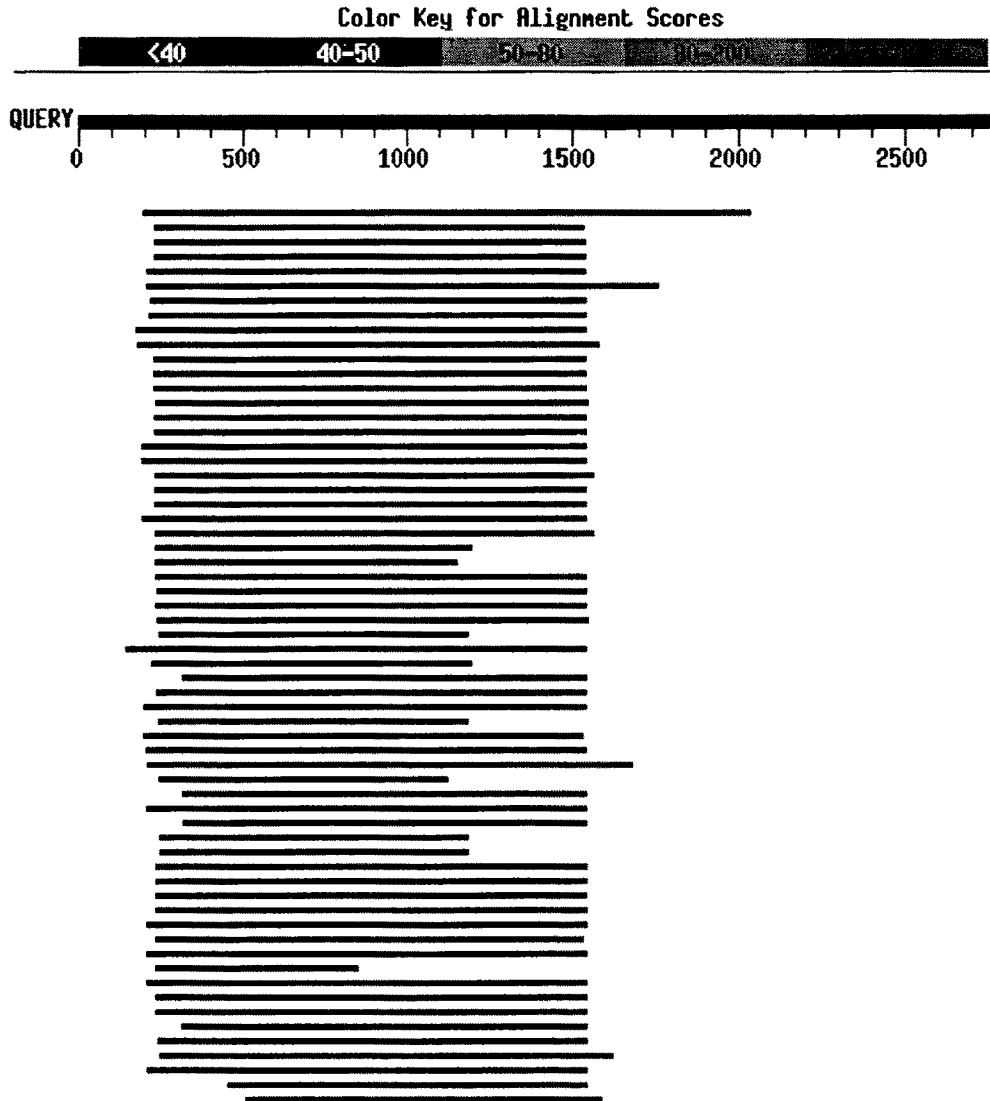


Fig. 4-10. Similarity of chitinase gene between *Pseudomonas* sp. 3098 and the other chitinases.

Sequences producing significant alignments:

gi|1698444 (U41418) chitodextrinase [Vibrio furnissii]

Length = 1046

Score = 509 bits (1297), Expect = e-143
Identities = 264/517 (51%), Positives = 338/517 (65%), Gaps = 39/517 (7%)

Query: 196
NGREKLANGLQRRIVGYFTSWRTGAGGTPTYLVNIPWDKVTTHINYAFATVDSANKVAIG 375
+GREK+ RR++GYFTSWR G YLV +IPW+++THINYAF ++ S KV +G

Sbjct: 309
DGREKMGADHPRRVIGYFTSWRAGDDDQTAYLVKDIPWEQLTHINYAFVDSIGSDGKVNVG 368

Query: 376
--SGANNPDTGLTWPNIPGAAMDPSLPYKGFHLLAQYKKKYPVAVKVMLSVGGWA----- 534
+ ANN G W G +DP+L +KGFH LA YK+KY VK ++S+GGWA

Sbjct: 369
DVNDANNAAVGKEWD---GVEIDPTLGFKGFHFGALATYKQKY-GVKTLISIGGWAETGGH 424

Query: 535 -----GSGGFYTATTNADGSLNAAGINTLADSMVAFLHQYPPFDGIDIDYEHPTTNN
690

Sbjct: 425 FDNDGNRVADGGFYTM'TTNADGSINQQGIETFADSAVEMMRKYRF-DGLDIDLRISNIDG
483
GGFYT TTNADGS+N GI T ADS V + +Y F DG+DID +

Query: 691
EAGNPLDFAISKPRLAGLMKSYNELLRVVRQKLDAAVADKYYLLTIAGSASGWVLRGE 870
GNP D A S+ R A LM SY+EL+RV+R+KLD A+ D +Y+LTIA +S ++LRG

Sbjct: 484
GTGNPDDTAFSESRRAYLMNSYHELMRVLREKLDVASAQDGVHYMLTIAAPSSAYLLRGM 543

Query: 871
ENMSGLNTWTMPSLMSYDLHGGWNQYVGPNAALFDDGNDGELRAGNAY---SYGGMGYLN 1041
E M+ ++MSYDLHG WN +VG NAAL+D G D EL N Y YGG+GYLN

Sbjct: 544
ETMAVTQYLDYVNIMS YDLHGAWNDHVGHNAAALYDTGKDELAQWNVYGT AQYGGIGYLN 603

Query: 1042
VDWAYRFYRGALQAGRINIGVPPYYTRGWKDV'TGGTNGLWGT----SPTVNDPVACAGIKT 1209
DWA+ ++RG++ AGRINIGVPPYYTRGW+ VTGG NGLWG S V++

Sbjct: 604
TDWAFHYFRGSMPAGRINIGVPPYYTRGWQGV'TGGDNGLWGARLAKSKRVS NRYGEGEKNN 663

Query: 1210
CGSGATGIDNVWHDLDXXXXXXXXXXXXXXXXLWHALNLQNAIVPDYLDAYGI--TEKTLTGTY 1383
CG GATG+DN+WHD++ +WHA NL++ I YL YG+ T L GTY

Sbjct: 664
CGYGATGLDNMWHVDVNAAGDEMGAGSNPMWHAKNLEHGIWGSYLAVYGLDPTTAPLVGTY 723

Query: 1384 TANYSATLAAPWLWNATRKFVFLSTETAQSI AAKTQYVIDNGIGGIMI WELAGDY-----
1545

Sbjct: 724
ARNYDSVAIAPWLWNAEKKVFLSTEDKQSIDVKADYVIDKEIGGIMFWELAGDYNCYVLD 783
NY + APWLWNA +KVFLSTE QSI K YVID IGGIM WELAGDY

Query: 1546
-----AWDAAKNGGKGEYFMGYTLT'NIANAFKAASPYGATRSDTAMPATS AKVSI 1698
+ + A G+GEY MG T+T I + FKA A+PYG T + A+P+ + +++

Sbjct: 784
ANGQRTSIDSTEQACESGQGEYHMGNTMTKAIYDKFKAATPYGNTVATGAVPSETVDIAV 843

Query: 1699 ELGRLEAGRQQLPDQP 1746
+G + G Q P P

Sbjct: 844 SIGGFKVGDQNYPINP 859

Score = 97.9 bits (240), Expect = 2e-19
Identities = 46/110 (41%), Positives = 63/110 (56%)

Query: GWKLGDSNYPINPVMTLNRSVVTIPGGSVVEFDYPVSAPANMSDQSGYGLTVIKAGYTG 1709
G+K+GD NYPINP +T TN + V IPGG+ +FD PVSAP N DQSG GL+VI +G+T
Sbjct: 847 GFKVGDQNYPINPKVTFNNTGVDIPGGTAFQFDIPVSAPDNAKDQSGGGLSVIASGHTR
906

Query: 1889 PNNIGGFKANFNRRARFTIPRGSXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXIKWPSXYTITV 2038
+NIGG +R F++P I P+ Y++ +
Sbjct: 907 ADNIGGLDGMTMHRVAFSLPAWKTLPAGDTYELDMVYYLPISGPANYSVNI 956

gnl|PID|e220269 (Z68924) Chitinase [Clostridium thermocellum]
Length = 482

Score = 198 bits (497), Expect = 2e-49
Identities = 143/437 (32%), Positives = 197/437 (44%), Gaps = 4/437 (0%)

Query: RRIVGYFTSWRTGAGGTPTYLNNIPWDKVTTHINYAFATVDSANKVAIGSGANNPDTGLT 408
+RIVGYF W Y V++IPWD VTHINYAFA ++ I
Sbjct: 33 KRIVGYFAEWNIYLENN-YYEVS DIPWDMVTHINYAFAKIEIGRIIIDK----- 81

Query: WPNIP---GAAMDPSLPYKGFHFLAQQKYPYKAVKVMLSVGGWAGSGGFYTATTNADGS 579
W I A +D P +GHF L +YK++YP VK ++SVGGW S F +D +
Sbjct: 82 WAAIQKPFDAILD--PIRGHFGQLIKYKEQYPHVKTLISVGGWTESKYF-----SDVA 133

Query: 580 LNAAGINTLADSMVAFLHQYPPFDGIDIDYEHPTTNNEAGNPLDFAISKPRLAGLMKSYN
759
L NT ADS V F+ Y F DG+DID+E+P + N I +P +++
Sbjct: 134 LTESRNTFADSCVEFIRTYRF-DGVDIDWEYPVSGGMPEN-----IRRPEDK---QNFT 184

Query: ELLRVVRQKLDAAVADKKYLLTIAGSASGWVLRGEENMSGLNTWTMPSLMSYDLHGGW 939
LL+ +R+KLD A D K+YLLTIA A + ++ E ++M+YD G W
Sbjct: 185 LLLKCLREKLDAAAGAEDGKHLYLLTIAAPAGSFNIKNTPEPIYHQYLDFINIMTYDYSGSW
244

Query: NQYVGPNAALFDDGNDGELRAGNAYSYGGMGYLNVWDWAYRFY-RGALQAGRINIGVPPYYT 1116
A L+ + ND NVDW + Y R + A +IN+GVPPY
Sbjct: 245 ENVANHLAPLYMNPNDPSYPERKEK-----FNVDWTVKEYLRLGVPAEKINVGVPYYA
297

Query: RGWKDVTGGTNGLWGTSPVNDPVACAGIKTCGSGATGIDNVWHDLXXXXXXXXXXXXXXL 1296
GW++V GG NGL+GTS + P++ +H ++
Sbjct: 298 AGWQEVNGGINGLFGTS---SKPLS-----STQFHYINSLLKSPDLGFTRY 340

Query: WHALNLQNAIVPDYLDAYGITEKTLTGTYTANYSATLAAPWLWNATRKFVFLSTETAQSLA 1476
W D Y + P+LWN S E S+
Sbjct: 341 W-----DEYAM-----VPYLWNPESATVYSYEDEISLK 368

Query: 1477 AKTQYVIDNGIGGIMIWELAG 1539
K YVI+N +GGIMIWEL+G
Sbjct: 369 NKCDYVIENNLGGIMIWELSG 389

gnl|PID|d1010477 (D63702) chitinase [Kurthia zopfii]
Length = 699

Score = 173 bits (433), Expect = 5e-42

Identities = 142/437 (32%), Positives = 211/437 (47%), Gaps = 31/437 (7%)

Query: RIVGYFTSWRTGAGGTPTYLVNNIPWDKVTTHINYAFATVDSANKVAIGSGANNPDTGLTW 411 232
+IVGY+ SW AG Y V +I KVTHINYAFA + N V + P+ +TW
Sbjct: 45 KIVGYPSW---AGYGRNYNVTDIDPTKVTHINYAFADI-CWNGVHGPNPDPSPGNP-VTW
99

Query: 412 P-----NIPGAAM---DPSL-----PYKGFHFLLAQYKKKYPVAVKVML 516
N+P + DP + P G+ N L + K+ P +K ++
Sbjct: 100 TCQNEKSQTINVPNGTIVLGDWPWIDTGTGTFAGDTWDQPIAGNINQLNKLKQINPNLKTII
159

Query: SVGGWAGSGGFYTATTNADGSLNAAGINTLADSMVAFLHQYPPFDGIDIDYEHPTTNEA 696 517
SVGGW S F +D + AA A+S V FL +Y F DG+D+D+E+P +
Sbjct: SVGGWTWSNRF-----SDVAATAATREVFANSAVDFLRKYNF-DGVDLDWEYPPVSGGLD 212 160

Query: GNPLDFAISKPRLAGLMKSYNELLRVVRQKLDAAVADKKYLLTIAGSASGWVLRGEE- 873 697
GN + +G ++Y LL +R+KLD A D K YLLTIA AS E
Sbjct: 213 GNS-----KMSGDKQNYTLLLSKIREKLDAAAGAVDGKKYLLTIASGASTTYAANTEL
264

Query: -NMSGLNTWTMPSLMSYDLHGGWNQYVGPNAALFDDGNDGELRAGNAYSY----GGMGYL 1038 874
N++ + W ++M+YD +G W + NA L D +A ++ G G+L
Sbjct: ANIASIVDWI--NIMTYDFNGAWQKVSahnallnydpaasaagvpdantfnvaagaqghl 322 265

Query: NVDWAYRFYRGALQAGRINIGVPIYTRGWKDVTTGGTNGLWGTSPVNDPVACAGIKTCGS 1218 1039
N + A ++ +GVP+Y RGW NG + T C G + G+
Sbjct: 323 N-----AGVPAAKLVLVGVPFYGRGWDGCAQAGNGQYQT-----CTGGSSVGT
364

Query: GATGIDNVWHDLDXXXXXXXXXXXXXLWHALNLQNAIVPDYLDAYGITEKTLTGTYTANYS 1398 1219
G + ++DL+ +Y++ G YT ++
Sbjct: 365 WEAGSFD-FYDLET-----NYINKNG-----YTRYWN 390

Query: 1399 ATLAAPWLWNATRKFVFLSTETAQSIAAKTQYVIDNGIGGIMIWELAGD 1542
T P+L+NA+ K F+S + A+SI KT Y+ G+GG M WEL+GD
Sbjct: 391 DTAKVPYLYNASNKRfisyddaesigyktayikskglggamfwelsgd 438

sp|P20533|CHII_BACCI CHITINASE A1 PRECURSOR >gi|98111|pir||A38368 chitinase (EC 3.2.1.14)

precursor - Bacillus circulans >gi|142688 (M57601)
chitinase A1 [Bacillus circulans]
Length = 699

Score = 162 bits (407), Expect = 5e-39
Identities = 137/437 (31%), Positives = 208/437 (47%), Gaps = 31/437 (7%)

Query: RIVGYFTSWRTGAGGTPTYLVNNIPWDKVTTHINYAFATVDSANKVAIGSGANNPDTGLTW 411 232
+IVGY+ SW A Y V +I KVTHINYAFA + N + + P+ +TW
Sbjct: 45 KIVGYPSW---AAYGRNYNVADIDPTKVTHINYAFADI-CWNGIHGNPDPSPGNP-VTW
99

Query: 412 P-----NIPGAAM---DPSL-----PYKGFHFLLAQYKKKYPVAVKVML 516
N+P + DP + P G+ N L + K+ P +K ++
Sbjct: 100 TCQNEKSQTINVPNGTIVLGDWPWIDTGTGTFAGDTWDQPIAGNINQLNKLKQTNPNLKTII
159

Query: 517
SVGGWAGSGGFYTATTNADGSLNAAGINTLADSMVAFLHQYPPFDGIDIDYEHPTTNEA 696
SVGGW S F +D + AA A+S V FL +Y F DG+D+D+E+P +

Sbjct: 160
SVGGWTWSNRF-----SDVAATAATREVFANSAVDFLRKYNF-DGVLLDWEYPPVSGGLD 212

Query: 697
GNPLDFAISKPRLAGLMKSYNELLRVVRQKLDAAVADKKYYLLTIAGSASGWVLRGEE- 873
GN +P ++Y LL +R+KLD A D K YLLTIA AS E

Sbjct: 213 264
GNS-----KRPEDK---QNYTLLLSKIREKLEDAAGAVDGGKYLLTIASGASATYAANTEL

Query: 874
-NMSGLNTWTMPSLMSYDLHGGWNQYVGPNAALFDDGNDGELRAGNAYSY----GGMGYL 1038
++ + W ++M+YD +G W + NA L D +A ++ G G+L

Sbjct: 265
AKIAAIVDWI--NIMTYDFNGAWQKISAHNAPLNYDPAASAAGVPDANTFNVAAGAQQHL 322

Query: 1039
NVDWAYRFYRGALQAGRINIGVPPYTRGWKDVTTGGTNGLWGTSPVNDPVACAGIKTCGS 1218
+ + A ++ +GVP+Y RGW NG + T C G + G+

Sbjct: 323 364
D-----AGVPAAKLVLPVYFGRGWGCAQAGNGQYQT-----CTGGSSVGT

Query: 1219
GATGIDNVHDLDXXXXXXXXXXXXXLWHALNLQNAIVPDYLDAYGITEKTLTGTYTANYS 1398
G + ++DL+ +Y++ G YT ++

Sbjct: 365 390
WEAGSFD-FYDLEA-----NYINKNG-----YTRYWN

Query: 1399 1542
ATLAAPWLWNATRKFVFLSTETAQSIAAKTQYVIDNGIGGIMIWELAGD
T P+L+NA+ K F+S + A+S+ KT Y+ G+GG M WEL+GD

Sbjct: 391 438
DTAKVPYLYNASNKRIFISYDDAESVGYKTAYIKSKGLGGAMFWELSGD

gi|3193265 (AF069131) chitinase [Bacillus subtilis]
Length = 596

Score = 145 bits (363), Expect = 8e-34
Identities = 130/445 (29%), Positives = 207/445 (46%), Gaps = 29/445 (6%)

Query: 208
KLANGLQRRIVGYFTSWRTGAGGTPTYLVNIPWDKVTHINYAFATVDSANKVAIGSGAN 387
K ++ +I+GY+ SW GA G + V ++ KV+HINYAFA + +

Sbjct: 32 82
KASSDKSYKIIGYYPSW--GAYGRD-FQVWDMASKVSHINYAFADICWEGR-----HG

Query: 388 483
NPD-TG---LTWP-----NIPGAAM---DPSL-----PYKGFHNLQAQY
NPD TG TW ++P ++ DP + P +G+F L +

Sbjct: 83 142
NPDPTGPNPQTWSCQDENGVIDVPNGSIVMGDPWIDVQKSNAGDTWDEPIRGNFKQLLKL

Query: 484
KKKYPVAVKVMLSVGGWAGSGGFYTATTNADGSLNAAGINTLADSMVAFLHQYPPFDGIDI 663
KK +P +K +SVGGW+ S F +D + + A A S V FL +Y FDG+D+

Sbjct: 143 195
KKNHPLKTFISVGGWSWSNRF-----SDVAADPAARENFAASAVNFLRKYG-FDGVDL

Query: 664
DYEHPPTTNEAGNPLDFAISKPRLAGLMKSYNELLRVVRQKLDAAVADKKYYLLTIAGS 843
D+E+P + GN ++P ++Y LL+ VR+KLD A D K YLLT

Sbjct: 196 247
DWEYPPVSGGLPGNS-----TRPE---DKRNYTLLLQDVREKLEDAAEAKDGKYYLLTTVSG

Query: 844
ASGWVLRGEENMSGLNTWTMPSLMSYDLHGGWNQYVGPNAALFDDGNDGELRAGNAYSYG 1023
AS + E T ++M+YD +GGW NA LF D E NA ++

Sbjct: 248 306
ASPEYVSNTELD KIAETVDWINIMTYDFNGGWQSSISAHNAPLFYDPKAKEAGVPNAETF-

Query: 1024
GMGYLNVWDWAYRFYRGA-LQAGRINIGVPYYTRGWKDVDTGGTNGLWGTSPVNDPVACAG 1200
N++ + Y+ A ++A ++ +G P+Y RGW + NG +
Sbjct: 307 -----NIESTVKRYKEAGVKADKLVLTGTFYGRGWSNCEPADNGEY----- 347

Query: 1201
IKTCGSGATGIDNVWHDLDDXXXXXXXXXXXXLWHALNLQNAIVPDYLDAYGITEKTLTGT 1380
+ CG G W ++ +L+ +Y++ G
Sbjct: 348 -QKCGPAKEG---TWE-----KGVFDFSDLEK----NYINKNG----- 377

Query: 1381 YTANYSATLAAPWLWNATRKFVFLSTETAQSIAAKTQYVIDNGIGGIMIWELAGD 1542
Y ++ P+L+NA F++ + +S KT + NG+ G M W+ +GD
Sbjct: 378 YKRYWNDRAKVPFLYNAENGNFITYDDEESYGKTDLIQSNGLSGAMFWDFSGD 431

gil1845337 (U71214) chitinase [Bacillus licheniformis]
Length = 604

Score = 142 bits (355), Expect = 7e-33
Identities = 154/518 (29%), Positives = 232/518 (44%), Gaps = 55/518 (10%)

Query: 208
KLANGLQRRIVGYFTSWRTGAGGTPTYLVNIPWDKVTTHINYAFATVDSANKVAIGSGAN 387
K +G +I+GY+ SW GA G + V ++ KV+HINYAFA + +
Sbjct: 34 KADSGKNYKIIGYPSW--GAYGR-NFQVWDMDSKVSHTINYAFADICWEGR-----HG
84

Query: 388 NPD-TG---LTW-----PNIPGAAMDPSL-----PYKGFHLLAQY 483
NPD TG TW PN DP + P +G+F L +
Sbjct: 85 NPDPTGPNPQTWSCQDENGVIDAPNGTIVMGDPWIDAQKSNPGDVWDEPIRGNFKQLLKL
144

Query: 484
KKKYPAVKVMLS VGGWAGSGGFYTATTNADGSLNAAGINTLADSMVAFLHQYPPFDGIDI 663
KK +P +K +SVGGW S F +D + + A S V FL +Y F DG+D+
Sbjct: 145 KKSHPHLKTFISVGGWTWSNRF-----SDVAADPVARGNFAASAVEFLRKYGF-DGVDL
197

Query: 664
DYEHPPTNNEAGNPLDFAISKPRLAGLMKSYNELLRVRQKLDTAAVADKKYLLTIAGS 843
D+E+P + GN ++P ++Y LL+ VR+KLD A D K YLLTIA
Sbjct: 198 DWEYPVSGGLPGNS-----TRPEDK---RNYTLLLQEVRRKLDAAEAKDGKEYLLTIASG
249

Query: 844
ASGWVLRGEENMSGLNTWTMPSLMSYDLHGGWNQYVGPNAALFDDGNDGELRAGNAYSYG 1023
AS + E T ++M+YD +GGW NAALF D E NA +Y
Sbjct: 250
ASDRYVSNTELDKIAQTVDWINIMTYDFNGGWQSSISAHNAALFYDPKAKEAGVPNAETY- 308

Query: 1024
GMGYLNVWDWAYRFYRGA-LQAGRINIGVPYYTRGWKDVDTGGTNGLWGTSPVNDPVACAG 1200
N++ + Y+ A ++ ++ +G P+Y G VN P A
Sbjct: 309 -----NIENTVKRYKEAGVKGDKLVLTGTFPFE-----GAGAVVN-PAATEN 348

Query: 1201
IKTCGSGATGIDNVWHDLDDXXXXXXXXXXXXLWHALNLQNAIVPDYLDAYGITEKTLTGT 1380
I++ G ++ + I ++T
Sbjct: 349 IRSADRRKKGRGKMEY-----STFQILKRTYVNVQ 377

Query: 1381 --YTANYSATLAAPWLWNATRKFVFLSTETAQSIAAKTQYVIDNGIGGIMIWELAGD----
1542
Y ++ P+L+NA F++ + QS KT ++ NG+ G M W+ +GD
Sbjct: 378
NGYKRYWNDQAKVPFLYNAENGNFITYDDEEQSFGHKTFIKANGLSGAMFWDFSGDSNRT 437

Query: 1543 -----YAWDAAKNGGKGE-----YFMGYTLTTNANAFKAASPYGATRSDTAMPA
1677
 D A +GG E G T T+++ A+ AAS G ++ *
 Sbjct: 438 LLNKLAADLDFAPDGGNPEPPSSAPVNVVVTGKT-ATSVSLAWDAASS-GTNITEYVVVSF
495
 Query: 1678 TSAKVSI----ELGRLEAGRQQLPDQPGHDAD 1761
 S +S+ E+G L G DAD
 Sbjct: 496 ERSISVKETSAEIGNLNRGTAYSFTVSAKDAD 528

gi|2429326 (AF014950) chitinase A [Stenotrophomonas maltophilia]
 Length = 700

Score = 142 bits (354), Expect = 9e-33
 Identities = 134/441 (30%), Positives = 193/441 (43%), Gaps = 27/441 (6%)

Query: 220 GLQRRIVGYFTSWRTGAGGTPTYLVNNIPWD----KVTHINYAFATVDSANKVAIG-SGA
384
 G +R++GYFT W G G Y V NI K+THINYAF V +N+ +G + A
 Sbjct: 295 GGTKRVIGYFTQW--GIYGR-NYRVKNIDTSGSAAKLTHINYAFGNVRN-NRCEVGVTQA
350
 Query: 385 NNPDTGL-----TWPNIPGAAMDPSLPYKGFHLLAQYKKKKYPAVKVMLSVG
525
 ++P+TG+ ++ G+A P +G++N L Q K K+P VKV++S+G 351
 Sbjct: SDPNTGVGGDAFADYTKAFGAGESVSGSADTWDQPLRGNWNQLKQLKAKHPNVKVLISLG 410
 Query: 526 GWAGSGGFYATTNADGSLNAA-----GINTLADSMVAFLHQYPPFDGIDIDIEHPT
681
 GW S GF +A A+ A G + D FDGIDID+E+P 411
 Sbjct: GWTWSRGFSSAAQPANRQAFVASCVDAYIKGNLPVTDGAGGVGAAAGVFDGIDIDWEYPV 470
 Query: T-NNEAGNPLDFAISKPRLAGLMKSYNELLRVVRQKLDAAVADKKEYLLTIAGSASGWV 858
 G P D A +Y LL R++LD A + LLT+A A
 Sbjct: 471 ACGLSCGTPADNA-----NYTALLAEFRRQLD---AVRPGLLLTVAVGAGIDK 515
 Query: LRGEENMSGLNTWTMPSLMSYDLHGGWNQYVGPNAALFDDGNDGELRAGNAYSYGGMGYL 1038
 +R + + ++M+YD HG W+ ++ALFD D Y+
 Sbjct: 516 IRVTDPAAYHPYLDLFINVMTYDFHGAWDPQTNHHSALFDSPADPSTGDQKLYN-----
568
 Query: NVDWAYRFYRGALQAGRINIGVPIYTRGWKDVTTGGTNGLWGTSPVNDPVACAGIKTCGS 1039
 + D F + A ++N+G+ YY RGW V G NGL+ + AG G+
 Sbjct: 569 SNDAMEAFLSRGVPASKLNLGIGYYGRGWTGVASGNNGLYKS-----AGGAAPGT
618
 Query: GATGIDNVWHDLDXXXXXXXXXXXXLWHALNLQNAIVPDYLDAYGITEKTLTGTYTANYS 1219
 GI++ W L+N P Y D
 Sbjct: 619 YEAGIED-----WKV--LKNLNWPVYTD----- 639
 Query: 1399 ATLAAPWLWNATRKFVFLSTETAQSIAAKTQYVIDNGIGGIMIWELAGD 1542
 A W+ N T F S +T + K YV G+GG WE +GD
 Sbjct: 640 TVAKATWISNGT--TFWSVDTPAMVTEKMGYVKAQCLGGGAFFWEFSGD 685

gn|PID|d1014672 (D89568) chitinase C [Bacillus circulans]
 Length = 491

Score = 132 bits (328), Expect = 1e-29

Identities = 119/443 (26%), Positives = 186/443 (41%), Gaps = 3/443 (0%)

Query: ANGLQRRIVGYFTSWRTGAGGTPTYLVNNIPWDKVTTHINYAFATVDSANKVAIGSGANNP 393 214
A+ L ++I+ Y W * N+I ++++HINY+FA + + S
Sbjct: 41 ADPLPKKIIAYVAGWAN-----WTANDIKVEQLSHINYSFALISNGKATITNSDRTK- 92

Query: DTGLTWPNIPIGAAMDPSLPYKGFHLLAQYKKKYPVAVKVMLSVGGWAGSGGFYTATTNAD 573 394
++ K + P +KV+LSVGGW G+ GF +D
Sbjct: 93 -----LQMMVGLKSRNPDLKVLSSVGGW-GANGF-----SD 122

Query: 574 GSLNAAGINTLADSMVAFLHQYPPFDGIDIDIEHPTTNEAGNPLDFAISKPRLAGLMKS 753
+L A T ADS+V + DG+D+D+E+PT NP ++P+ ++
Sbjct: 123 AALTDASRTTFADSIVQLVTSNNL-DGVDDLWEYPT-----NPAAGTTARPDQK---QN 172

Query: YNELLRVVRQKLDTAAVADKYYLLTIAGSASGWVLRGEE--NMSGNTWTMPSLMSYDL 927 754
+ +LL VR+KL+ + K YLLTIA AS L G E N++ L W +LM+YD
Sbjct: 173 FTQLLSKVREKLNAGQGQINGKQYLLTIAAGASSYLNGVEINNITPLLDWI--NLMTYDF 230

Query: HGGWNQYVGPNAALFDDGNDGELRAGNAYSYGGMGYLNVDWAYRFYRGA-LQAGRINIGV 1104 928
HG W+ G + L G D ++V A +R + + A ++ IG
Sbjct: 231 HGTWDATTGHHTNL--SGRD-----ISVTSAVNLFNRNSGVPANKLVIGG 272

Query: PYYTRGWKDVTTGGTNGLWGTSPVNDPVACAGIKTCGSGATGIDNVVHDLXXXXXXXXXX 1284 1105
+Y R W V NGL D A G +
Sbjct: 273 AFYGRAWTGVQNSNGL-----DRPASGGFEPD----- 300

Query: XXXLWHALNLQNAIVPDYLDAYGITEKTLTGTYTANYSATLAAPWLWNATRKFVFLSTETA 1464 1285
N IV +L+ G YT + ++ AP+L+N F+S +
Sbjct: 301 -----YNTIVSQFLNKNG-----YTRYWDSSAQAPYLFNG--NTFISYDDP 339

Query: 1465 QSIAAKTQYVIDNGIGGIMIWE LAGD 1542
QS++ K QYV ++ +GGIM WE + D
Sbjct: 340 QSLSLKVQYVKNSNLGGIMFWEYSND 365

gi|1044849 (Z66524) similar to chitinase-like repeats; cDNA EST yk353g7.3 comes from this gene [Caenorhabditis elegans]
Length = 633

Score = 130 bits (323), Expect = 4e-29
Identities = 125/455 (27%), Positives = 188/455 (40%), Gaps = 10/455 (2%)

Query: CSVYDANGREKLANGLQRRIVGYFTSWRTGAGGTPTYLVNNIPWDKVTTHINYAFATVDSA 357 178
C Y +NG L RR VGY TSW G P + +K+TH+ +AF VDS
Sbjct: 23 CVDYLSNGGI-LDRSCGRRRVGYITSW----GKHP---FRDDQAEKLTHLVFAFFVVDSD 74

Query: NKVAIGSGANNPDTGLTWPNIPIGAAMDPSLPYKGFHLLAQYKKKYPVAVKVMLSVGGWAG 537 358
V + A K + + ++P +K++ +VGGW
Sbjct: 75 GSVKLEGDAA-----KARLEHVKEVASRHPDLKLLYAVGGWEN 112

Query: 538 SGGFYTATTNADGSLNAAGINTLADSMVAFLHQYPPFDGIDIDIEHPTTNEA-GNPLDF 714
S F T ADS + L + V + +Y F DG+DID+E+P T G P D
Sbjct: 113 SQYFSVLT--ADHSRRSI----LISNFVKVIKEYGF-DGVDDIDWEYPTVGGAVEGTPAD- 164

Query: 715

AISKPRLAGLMKSYNELLRVVRQKLDTAADVADKKYLLTIAGSASGWVLRGEENMSGLNT 894
 ++Y L+R +R +L K YL++ AG+A WV L+ ++ L
 Sbjct: 165 -----RRNYVNL MREL RNL RDLESETGKSYLISFAGAAGHWV LKPGYDLQQLMK
 214

Query: 895
 W-TMPSLMSYDLHGG----WNQYVGPNAALFDDGNDGELRAGNAYSYGGMGYLNV DWAYR 1059
 + ++MSYD G W Y GP A L + +S G +NV +

Sbjct: 215
 YCDFVNVMSYDYFGAWASKWGAYTGPPAPL-----QFAMPKKFS----GRMNVHATMK 263

Query: 1060
 FYRGALQA-GRINIGVPPYYTRGWK---DVTGGTNGLWGTSP TVNDPVACAGIKTCGSGAT 1227
 Y ++A +IN+GVP+Y R WK D T+ +W T+ N G+

Sbjct: 264 DYSCQIKATDKINMGVPFYGRFWKNVGD AVDSTDDMWRTATATNSE-----GTKFE
 314

Query: 1228
 GIDNVWHDL DXXXXXXXXXXXXLWHALNLQNAIVPDYLDAYGITEKTLTGTYTANYSATL 1407
 G D W DL T KT + +

Sbjct: 315 GGDVQWRDLHEKFD-----TTKT-----KFHSGS 338

Query: 1408 AAPWLWNATR KVFLSTETAQSI AAKTQYVIDNGIGGIMI WELAGD 1542
 P++W + +K F+ E A+S+ K Y++N IGG+MIW + D

Sbjct: 339 KTPFIWLSEKTFVGYENAESLKHKVDYIVENNIGGVMIWAIDFD 383

gi|2291167 (AF016419) contains similarity to the class II chitinases
 [Caenorhabditis elegans]
 Length = 2025

Score = 117 bits (291), Expect = 2e-25
 Identities = 124/466 (26%), Positives = 198/466 (41%), Gaps = 21/466 (4%)

Query: 184
 VYDANGREKL-ANGLQR RIVGYFTSWRTGAGGTPTYLVN NIPWDKVTHINYAFATVDSAN 360
 V + G+ L A +RIVGY+T W G N + K+TH+ +AF +

Sbjct: 1477 VEEPTGKSSLPAASCGKRIVGYTTGW----GDREITENQLK--KLTHVIFAFVAMYEDG
 1529

Query: 361
 KVAIGSGANNPDTGLTWP NIPGAAMDPSLPYKGFHLLAQYKKKYP AVKVMLSVGGWAGS 540
 V G+ + D+G P AA + N+ ++ V+V+ +VGGW S

Sbjct: 1530 SVKF GA-VSEDDSG-----PQA AKKAERRF---LNMKKKARAANS GVRVLF AVGGWDNS
 1579

Query: 541 GGFYTATTNADGSLNAAGINTLADSMVAFLHQY PFFDGIDIDYEHPTT NNEAGNPLDFAI
 720

Sbjct: 1580 Y ++ AD DS+ +F+ DG+D+D+E+P +N +
 Q--YFSSVAADSGKR----KKFVDSIASFVEDQKI-DGV DLDWEYPDSNGKDA-----
 1625

Query: 721
 SKPRLAGLMKSYNELLRVVRQKLDTAADVADKKY--YLLTIAGSASGWVLRGEENMSGLNT 894
 K++ +L++ +R+K A K+ Y++T+A +A W LR ++ G+

Sbjct: 1626 -----KNHVQLIKEIREKPFSEMAKKKKR KDPYVITLASAAGEWNL RKG YDLK GILK
 1676

Query: 895
 WT-MPSLMSYDLHGGWNQ----YVGPNAALFDDGNDGELRAGNAYSYGGMGYLNV DWAYR 1059
 + ++M+YD +G W Y G A L+ G L+ G G L N D++ +

Sbjct: 1677 YADFINVMTYDYYGAWESKWGAYTGT P AP LYF----GSLK-----GFSGKLNADFSMK
 1725

Query: 1060
 FYRGALQA-GRINIGVPPYYTRGWKDV TG---GTNGLWGTSP TVNDPVACAGIKTCGSGAT 1227

Sbjct: FY + ++N+GVP+Y R WK+V G ++ +W T+ N G 1726
FYACKTEKPSQLNMGVPFYGRYWKNVLGPIDKSDNMWRTAAPQNGKYE-----GGYV 1777

Query: 1228
GIDNVWHDLXXXXXXXXXXXXLWHALNLQNAIVPDYLDAYGITEKTLTGTYTANYSATL 1407
G W +L WH EKT T
Sbjct: 1778 G----WRNL---AKEGWNKGSASWH-----EKTKT----- 1800

Query: 1408
AAPWLWNATRKFVFLSTETAQSIAAKTQYVIDNGIGGIMIWELAGDYAWDAAKN----- 1566
P++ N K FL E +S+ K +Y D +GG+MIW L D D N
Sbjct: 1801
--PYIMNNGAKKFLGFENERSLKEKMKYATDRNLGGLMIWALDLDLDDADTLLNLVSSAGL 1858

Query: 1567 --GGKGE 1581
GGKG+
Sbjct: 1859 CSGGKGD 1865

gnl|PID|d1032528 (AB015996) chitinase A precursor [Serratia marcescens]
Length = 563

Score = 111 bits (274), Expect = 2e-23
Identities = 115/437 (26%), Positives = 180/437 (40%), Gaps = 25/437 (5%)

Query: 232 RIVG-YFTSWRTGAGGTPTYLVNNIPWDKVTTHINYAFATVDSANKV-----AI 372

++VG YF W G G + V+ IP +TH+ Y F + N + A+
Sbjct: 158 KVVGSYFVEW--GVYGR-NFTVDKIPAQNLTHLLYGFIPICGGNGINDSLKEIEGSFQAL 214

Query: 373
GSGANNPDTGLTWPNIPGAAMDPSL-----PYKGFHLLAQYKKKYPVAVKVMLSVGG 528
+ P AA+ + PYKG+F L K+ +P +K++ S+GG
Sbjct: 215 QRSCQGREDFKVSIIHDPFAALQKAQKGVTAWDDPYKGNFGLMALKQAHPDLKILPSIGG 274

Query: 529
WAGSGGFYTATTNADGSLNAAGINTLADSMVAFLHQYFFFDGIDIDYEHP---TTNNEAG 699
W S F+ + S+ FL + FFDG+DID+E P N G
Sbjct: 275 WTLSDPFFFMGDKVKR-----DRFVGSVKEFLQTWKFFDGVVIDWEFPGGKGANPNLG 327

Query: 700
NPLDFAISKPRLAGLMKSYNELLRVRQKLDTAADVADKKYLLTIAGSASGWVLRGEENM 879
+P D ++Y L++ +R LD +V + Y LT A SA +
Sbjct: 328 SPQD-----GETYVLLMKELRAMLDQLSVETGRKYELTSAISAGKDKIDKVAYN 376

Query: 880
SGLNTWTMPSLMSYDLHGGWNQYVGPNAALFDDGNDGELRAGNAYSY-GGMGYLNVDDWAY 1056
N+ LMSYD +G FD NG A NA ++ Y V+
Sbjct: 377 VAQNSMDHIFLMSYDFYGA-----FDLKNLGHQTALNAPAWKPD'TAYT'VNGVN 425

Query: 1057
RFYRGALQAGRINIGVPPYYTRGWKDV TGGTNGLWGTSPTVNDPVACAGIKTCGSGATGID 1236
++ G+I +G Y RGW V G N I G+ +
Sbjct: 426 ALLAQGVKPKGI VVG TAMYGRGWTVNGYQN-----NIPFTGTAT'GPVK 469

Query: 1237
NVWHDLXXXXXXXXXXXXLWHALNLQNAIVPDYLDAYGITEKTLTGTYTANYSATLAAP 1416
W +N IV DY G + ++G + Y AT AP
Sbjct: 470 GTW-----ENRIV-DYRQIAG---QFMSGEWQYTYDATAEAP 502

Query: 1417 WLWNA⁺TRK⁺VFL⁺STETAQ⁺SIAAK⁺TQY⁺VIDNG⁺I⁺G⁺G⁺IMI⁺WELAGD 1542
 +++ + ++ + A+S+ AK +YV+D +GG+ WE+ D
 Sbjct: 503 YVFKPSTGDLITFDDARSVQAKGKYVLDKQLGGLFSWEIDAD 544

pir||S60651 chitinase precursor - *Serratia marcescens* >gi|908885 (Z36294)
 pid:e115394 [*Serratia marcescens*]
 Length = 563

Score = 109 bits (271), Expect = 5e-23
 Identities = 114/437 (26%), Positives = 179/437 (40%), Gaps = 25/437 (5%)

Query: 232 RIVG-YFTSWRTGAGGTPTYLVNNIPWDKVT⁺HINYAFATVDSANKV-----AI
 372

++VG YF W G G + V+ IP +TH+ Y F + N + A+
 Sbjct: 158 KVVGSYFVEW--GVYGR-NFTVDKIP⁺AQNLTHLLYGFIPICGGNGINDSLKEIEG⁺SFQAL
 214

Query: GSGANNPDTGLTWPNI⁺PGAAMDPSL-----PYKGFH⁺NLLAQYKKKYP⁺AVKVM⁺LSVGG 528
 + P AA+ + PYKG+F L K+ +P +K++ S+GG

Sbjct: 215 QRSCQGREDFK⁺VS⁺I⁺HDPFAALQKAQK⁺GVTA⁺WDDPYKGN⁺F⁺Q⁺LMALKQAHPDLKILPSIG⁺G
 274

Query: WAGSGGFY⁺TATTNADGSL⁺NAAGINTLADSMVAFLHQY⁺PPFDGIDIDYEHP---TTNNEAG 699
 W S F+ + S+ FL + FFDG+DID+E P N G

Sbjct: 275 WTLSDPFFFMGDKV⁺KR-----DRFVGS⁺VKEFLQ⁺TWKFFDGDV⁺DIDWEPGGKGANPNL⁺G
 327

Query: NPLDFAISK⁺PRLAGLMKSYNELL⁺R⁺VVRQKLD⁺TA⁺AVADK⁺KYYLL⁺TIAGSASG⁺WVLRGEENM 879
 +P D ++Y L++ +R LD + + Y LT A SA +

Sbjct: 328 SPQD-----GETYVLLMKELRAM⁺L⁺D⁺QLSAETGRKYEL⁺TSAISAGKDKIDK⁺VAYN
 376

Query: SGLNTWTMP⁺SLMSYDLHGGWNQYVGP⁺NAALFDDGNDGELRAG⁺NAYSY-GGMGYLNVDWAY 1056
 N+ LMSYD +G FD N G A NA ++ Y V+

Sbjct: 377 VAQNSMDHIFLMSYDFYGA-----FDLKNLGHQTALNAPAWK⁺PD⁺AYTTVNGV⁺N
 425

Query: RFYRGALQAGRINIG⁺VPY⁺YTRGWKDV⁺TGGT⁺NGLWGTSP⁺TVNDPVACAGIKTCGSGATGID 1236
 ++ G+I +G Y RGW V G N I G+ +

Sbjct: 426 ALLAQGVKPGKIVVGTAMYGR⁺GT⁺VNGYQN-----NIPFTGTATGPV⁺K
 469

Query: NVVHDLXXXXXXXXXXXXLW⁺HALNLQNAIV⁺PDYLDAYGITEK⁺TLTGTYTANYSATLAAP 1416
 W +N IV DY G + +G + Y AT AP

Sbjct: 470 GTW-----ENGIV-DYRQIAG---QFMSGEWQYTYDATAEAP 502

Query: 1417 WLWNA⁺TRK⁺VFL⁺STETAQ⁺SIAAK⁺TQY⁺VIDNG⁺I⁺G⁺IMI⁺WELAGD 1542
 +++ + ++ + A+S+ AK +YV+D +GG+ WE+ D

Sbjct: 503 YVFKPSTGDLITFDDARSVQAKGKYVLDKQLGGLFSWEIDAD 544

Fig. 4-11. Amino acid sequence comparison of chitinase gene of *Pseudomonas* sp. 3098 with the other chitinases.

Query : Sequence of chitinase gene from *Pseudomonase* sp. 3089
 Sbjct : Published chitinase gene sequence of 60 strains

구체적으로는(Fig. 4-11) 상동성이 *Vibrio furnissi*의 chitodextrinase와 51%, *Clostridium thermocellum*의 chitinase와 32%, *Kurthia zopfii*의 chitinase와 32%, *Bacillus circulans*의 chitinase A1과 31%, *B. subtilis*의 chitinase와 29%, *B. licheniformis*의 chitinase와 29%, *Stenotropomonas maltophila*의 chitinase와 30%, *B. circulans*의 chitinase C와 26%, *Caenorhabditis elegans*의 chitinase-like repeats와 27%, *Serratia marcescens*의 chitinase와 26%로 나타났다. 그러나 여러 가지의 chitinase들과의 상동성의 비율이 대부분 30% 전후인 것으로 미루어 볼 때 기존의 chitinase 유전자의 full sequence를 이용하더라도 Southern hybridization이나 colony hybridization으로 chitinase 유전자를 검색한다는 것이 대단히 어려운 시도임을 알 수 있었다.

2) 항생물질 생산성 길항균주에 urease gene의 도입

가) Vector plasmid의 선정

E. coli - *Bacillus* shuttle vector인 pBU110, pGB215-110, pGR71, 그리고 pEB203를 대상으로 PEG-induced protoplast transformation (PIP) 방법에 의해 선발된 길항균주 SH14에 도입하여 형질전환율을 조사해 본 결과 Table 4와 같이 plasmid pEB203이 가장 우수한 형질전환율을 나타내었다 (Table 4-2).

Table 4-2. Transformation frequency of *B. subtilis* SH14 with the PEG-induced protoplast transformation

Plasmid	Size (Kb)	Transformation frequency / μg of plasmid DNA
pGB215-110	10.6	3.4×10^4
pGR71	8.4	7.5×10^3
pEB203	6.4	8.9×10^4

나) Urease gene library의 subcloning

Kim 등이 이미 cloning한 바 있는 pBU11을 *Bam*H I으로 부분절단하고 0.6% low melting agarose gel상에서 전기영동을 하여 urease gene fragment부분만을 elution 하였으며, *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector인 pEB203의 *Bam*H I site에 삽입하여 *E. coli* JM109를 형질전환함으로써 Fig. 4-12에서 보는 바와 같은 recombinant plasmid를 작제하였다.

LB 평판배지(Am 50 μ g/ml)에서 항생제 내성 colony를 선발한 후 CUA에서 12개의 urease-positive colony를 획득하였다. Birnboim 등의 Alkali lysis 방법에 따라 형질 전환된 *E. coli* JM109(pGU366)으로부터 recombinant plasmid를 small scale로 얻었으며, 0.8% agarose gel상에서 전기영동으로 확인하였다. 재조합 plasmid의 size는 약 17Kb정도이며, *Bam*H I으로 절단해 본 결과 pBU11의 urease gene fragment의 band와 vector plasmid pEB203의 band를 확인할 수 있었다.

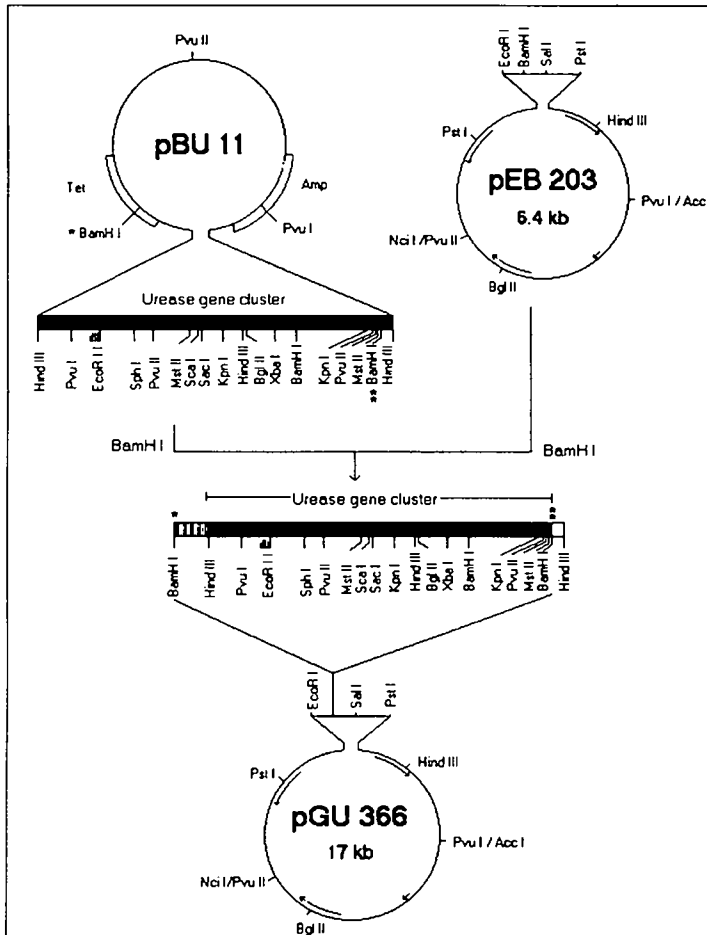


Fig. 4-12. Construction scheme of the recombinant plasmid pGU366 containing the urease gene of *B. pasteurii*.

★ - ★★ : Inserted sites

다) Urease gene library pGU366를 이용한 길항균주의 형질전환

B. subtilis SH14에 또다른 길항기작으로 암모니아 생성능을 부가하기 위해서 PIP 방법으로 *B. subtilis* SH14에 pGU366를 형질전환 하였다. Transformant의 선발은 일차로 항생제 내성 colony를 선발한 후 CUA 평판배지에 tooth pick replica법으로 spot하여 붉은색으로 발색되는 urease-positive colony를 선발하였다. *B. subtilis* SH14(pGU366)로부터 plasmid의 분리는 Alkali lysis법에 따라 행하였으며, 이때 lysozyme 처리는 37°C에서 20분간 행하였다. pGU366은 Fig. 4-13에서 보는 바와 같이 0.8% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 확인하였다.

B. subtilis SH14(pGU366)에서 urease 유전자를 정상적으로 발현시키는가를 조사하기 위해 urea R broth(Km 10 μ g/ml)에서 30°C에서 4일간 배양하면서 생성되는 적색도를 흡광도 550nm에서 측정된 결과 urease 유전자를 함유한 pGU366으로 형질전환된 *B. subtilis* SH14(pGU366)에서도 urease가 정상적으로 발현됨을 알 수 있었는데 *E. coli* JM109 (pGU366)와는 달리 발현에 있어 다소의 시간이 걸렸으나 2일이 경과된 후로는 *E. coli*와 거의 유사한 발현력을 나타내었다.

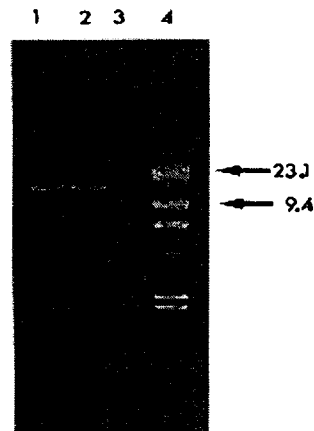


Fig. 4-13. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA isolated from transformant of *B. subtilis* SH14

Lane 1; Purified pGU366

Lane 2; pGU366 from *B. subtilis*
SH14(pGU366)

Lane 3; *B. subtilis* SH14

Lane 4; λ -DNA digested with HindIII

라) 도입된 recombinant plasmid pGU366의 안정성

B. subtilis SH14내에서 pGU366의 안정성을 조사하기 위해서 항생제가 첨가되지 않은 nutrient broth에서 계대배양시키면서 2일 간격으로 10 μ g/ml의 Km을 함유한 선택배지와 함유하지 않은 비선택배지에서 일정비율로 희석, 도말배양하여 비선택배지에서 나타난 colony를 백분율로 조사한 결과 Fig. 4-14에서와 같이 10일이 경과후에도 65%이상의 안정성을 나타내어 *B. subtilis* SH14에 도입된 pGU366은 비교적 안정하다고 추정할 수 있다.

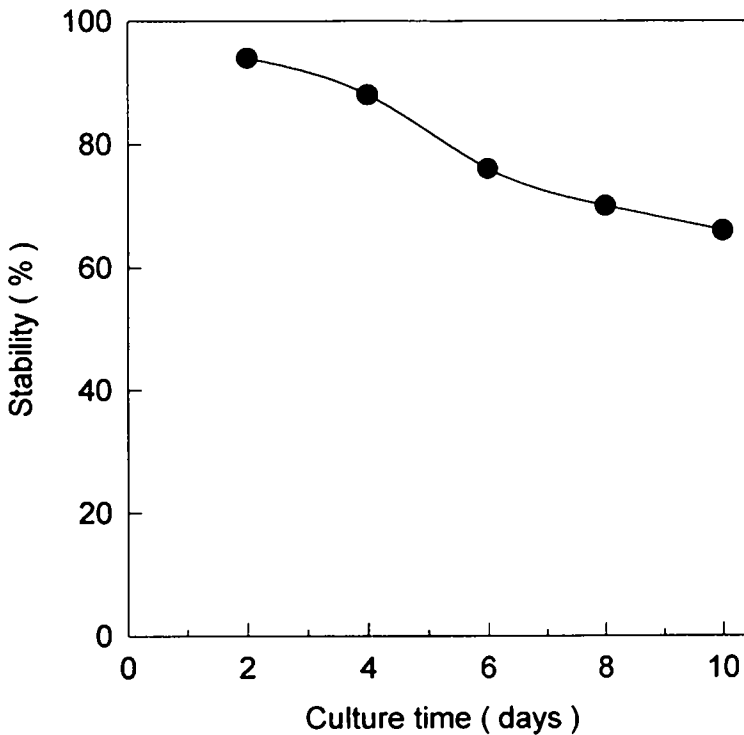


Fig. 4-14. Stability of plasmid pGU366 in *B. subtilis* SH14 (pGU366) .

B. subtilis SH14 carrying pGU366 was subculture on NB without kanamycin. The subculture was plated of NA plate with and without Km (10 μ g/ml) per two days.

마) 형질전환의 최적조건

B. subtilis SH14에 pGU366을 최적으로 형질전환시킬 수 있는 최적조건을 조사하기 위해 protoplast 제조시 사용되는 lysozyme의 처리조건을 조사하였다. *B. subtilis* SH14의 증기 대수기가 될 때까지 배양한 균체를 200 μ g/ml의 lysozyme를 함유한 SMMP에 42 $^{\circ}$ C에서 80rpm으로 시간별로 처리한 다음 그 형질전환율을 조사한 결과 90분에서 가장 높은 형질전환율을 나타내었다. 이는 각 lysozyme 처리시간에 대한 형질전환율은 완전한 원형질체 형성이 형질전환효율에 필수적이라는 Akamatsu의 보고와 자극성이 적은 lysozyme 처리과정으로 처리시간을 연장한 경우보다는 재생율은 높으나 PEG-induce fusion의 빈도가 낮다는 Akamatsu의 결과와 비슷하게 *B. subtilis* SH14의 원형질체 형질전환율도 30분 이후 증가하다가 90분에서 최고치를 나타냈으며 이후 처리시간의 연장은 오히려 감소하는 것을 보여 주었다.

형질전환과정에서 PEG (MW4000)의 농도가 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위해 최종농도가 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60%되게 첨가한 후 형질전환율을 조사한 결과 40%되게 첨가하였을 때 최고의 형질전환율을 나타내어 *Bacillus* sp.의 형질전환시 최적 PEG 농도가 30%이라는 Hopwood의 보고와는 상이한 결과로 *B. subtilis* SH14의 형질전환에 필요한 PEG의 농도는 다소 높은 농도를 요구하였다.

Plasmid DNA의 농도가 미치는 영향을 조사하기 위해 정제된 pGU366을 각 농도별로 첨가하여 형질전환시켜 본 결과 1.5 μ g 이하의 농도에서는 형질전환율이 plasmid 첨가량과 비례하여 증가하였으나 그 이상을 첨가하였을 때는 형질전환율은 일정하였다. 이것은 1 μ g 이하의 농도에서 plasmid DNA 첨가량과 비례적으로 형질전환율이 증가하였다는 Chang 등의 보고와 1.0 μ g 이상의 농도에서는 형질전환빈도가 그 이하의 농도에 비해 증가율이 감소하였다는 Vorobjeva 등의 보고와 상이한 결과로서 비교적 많은 양의 plasmid가 요구된다는 것을 알 수 있었다(Table 4-3).

Table 4-3. Optimal conditions on the transformation of *B. subtilis* SH14 with pGU366.

Conditions	Optima
Time of lysozyme treat	90min
PEG concentration	40%
Amount of pGU366	1.5 μ g

바) 형질전환체의 urease에 의한 길항력 증강조사

Urease gene이 도입된 *B. subtilis* SH14(pGU366)의 식물근부균 *F. solani*의 생육 억제능을 조사하기 위해서 0.5% urea가 함유된 PDNA 평판배지에서 개체균간의 증식선단까지의 거리를 측정한 결과 Table 4-4에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* SH14(pGU366)이 숙주균주인 *B. subtilis* SH14보다 우수한 길항력을 나타내었으며, 숙주균주와는 달리 식물근부균 *F. solani*를 전체적으로 저해하는 것으로 나타났다. 또한 0.5% urea가 함유된 PDNB 액체배지에 *F. solani*와 *B. subtilis* SH14(pGU366)를 *F. solani*와 *B. subtilis* SH14을 혼합배양하여 균체중량법으로 측정한 결과 Fig. 15와 Table 4-5에서 보는 바와 같이 각각 38.0%, 44.0% 정도의 억제력을 보였다. 이러한 결과로 미루어 외부의 urease gene를 도입함으로써 항진균성 항생물질 생산성 생물방제균 *B. subtilis* SH14에 ammonia 생성능을 별도로 부가하게되어 다기능적인 생물방제균의 육종이 가능할 수 있다고 생각되어진다.

Table 4-4. *In vitro* antifungal activity of *B. subtilis* SH14 containing urease gene (pGU366) against *F. solani*.

Days	Antifungal activity ^a		
	<i>B. subtilis</i> SH14	<i>B. subtilis</i> SH14(pGU366)	None
1	5.8 (mm)	3 (mm)	6 (mm)
2	17	12	19
3	21	16	23
4	24	18	27
5	24	19	30

a ; An agar disk (8mm in diameter) of *F. solani* inoculum placed at a 3 cm distant from the edges of the bacterial colonies on potato dextrose-nutrient agar (PDNA) medium containing 0.5% urea. The plates were incubated at 30°C and the antifungal activity was determined by measuring the diameter (mm) of fungal mycelium.

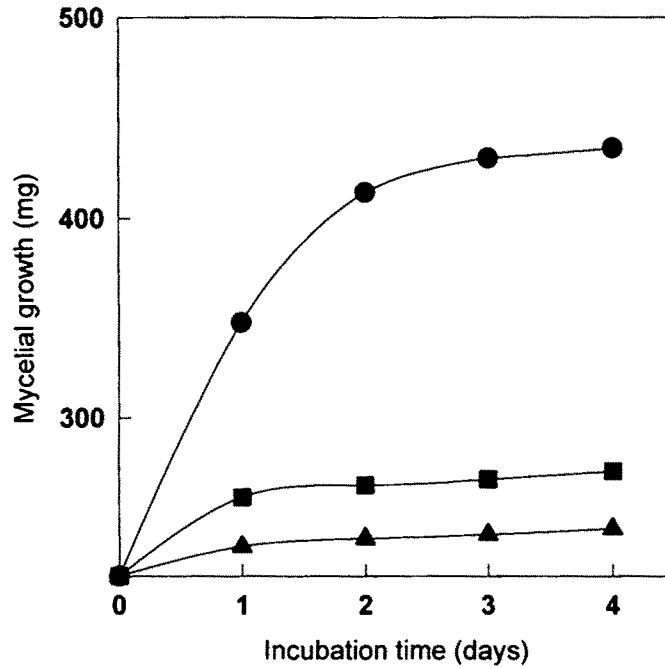


Fig. 4-15. Antifungal activities of *B. subtilis* SH14 and its transformant on the mycelial growth of *F. solani*

Three days old *F. solani* culture were treated with culture of *B. subtilis* SH14 and *B. subtilis* SH14 (pGU366) grown in NB with 0.5% urea at 30°C for 3 days.

- ; *F. solani* with of *B. subtilis* SH14,
- ▲- ; *F. solani* with of *B. subtilis* SH14 (pGU366),
- ; *F. solani* only,

Table. 4-5. Antifungal activity of transformant *B. subtilis* SH14 (pGU366)

Strains	Antifungal activity	
	Fungal dry weight	Inhibition ratio ^a
None	435 (mg)	0 (%)
<i>B. subtilis</i> SH14	270	38.0
<i>B. subtilis</i> SH14(pGU366)	244	44.0

Three days old *F. solani* culture were treated with culture of *B. subtilis* SH14 and *B. subtilis* SH14 (pGU366) grown in NB with 0.5% urea at 30°C for 3 days. After 5 days of incubation, the antifungal activity was determined

a ; Completed inhibition ratio(100%) - dry weight of *F. solani* cultured with solution relative to those cultured with water

3) Siderophore 생산성 길항균주에 urease 유전자 gene의 도입

가) siderophore 생산성 길항균주에 urease 유전자 도입과 발현

일반적으로 알칼리성 토양 (suppressive soil)에서의 철 성분은 불용성의 ferric-oxyhydroxide polymer로 존재함으로 미생물의 경쟁적 요인이 될 수 있다. 따라서 이들 siderophore들이 환경내 철 성분의 용해성이 저하되는 알칼리 pH 영역에서 그 길항능력을 크게 발휘할 수 있다는 점을 감안해 볼 때, siderophore를 생산하는 길항 미생물이 주위 환경을 알칼리화시키는 능력을 동시에 가진다면 보다 증강된 생물방제균으로 활약할 수 있을 것이다.

따라서 선발된 siderophore 생산성 길항균주 *P. fluorescens* GL7에 urease 생산능을 유전적으로 부가하여 토양내에서 미생물성 ammonia 생성과 토양 알칼리화에 의한 siderophore 생성능의 증가는 가장 효율적인 토양 전염성 식물병원균의 생물학적 방제방법이라 할 수 있다.

이미 cloning한 바 있는 호알카리성 세균 *Bacillus pasteurii* 유래 urease gene이 함유된 plasmid pBU11을 분리하여 *Bam*HI 으로 partial digestion한 후 urease gene을 elution하였다. Urease 유전자 도입의 최적 *Pseudomonas* vector로 선정된 broad-host range plasmid pKT230을 동일 restriction endonuclease로 digestion한 후 alkaline phosphatase 처리 등을 거쳐 elution한 urease gene과 DNA T4 ligase로 ligation하였다.

Ligation된 hybrid plasmid를 recipient host인 *P. fluorescens* GL7에 alkaline competent 방법에 의해 transformation을 행한 후, selective marker 항생물질 (Sm 150 μ g/ml)을 함유한 KB medium에 나타나는 colony를 Christensen urea plate 상에서 붉은색의 환을 생성하는 urease positive colony를 선발하였다 (Fig. 4-16).

형질전환된 urease gene 함유 recombinant plasmid를 agarose gel 상에서 전기영동으로 확인한 결과 Fig. 4-17에서 보는 바와 같이 recombinant plasmid의 크기는 약 22Kb정도이며, 제한효소 *Bam*HI 으로 절단시 urease gene fragment의 잘린 두 band와 vector plasmid pKT230의 band를 확인할 수 있었으며, 이로써 urease gene이 삽입되었음을 확인 할 수 있었다.

따라서 작제된 recombinant plasmid를 pKU311로 명명하였다.

나) Urease 유전자 도입 siderophore 생산균주의 길항력 증강 조사

Urease 유전자가 도입된 형질전환체 *P. fluorescens* GL7 (pKU311)에 의한 식물근부 병원 *F. solani*의 생육억제능이 숙주균주인 *P. fluorescens* GL7에 비해 보다 더 증강되었는지 여부를 확인하기 위해 생육억제거리 측정법에 의해 그 결과를 비교해 보았다.

Table 4-6에서 보는 바와 같이 urease gene이 발현된 *P. fluorescens* GL7 (pKU311)은 *E. coli* JM109(pBU11)에 비해 urease 생산능은 다소 떨어졌지만, 그 길항능은 siderophore 생산능에 부합되어 *P. fluorescens* GL7에 비해 1.2 배 정도 증강

된 억제력을 나타내었다.

이상의 결과를 미루어 보아 선발된 siderophore 생산성 길항균주 *P. fluorescens* GL7에 외부의 urease 유전자를 도입하여 urease 생산능을 별도로 부가시킴으로써 *F. solani*에 대한 길항능을 증가시킬 수 있었다. 따라서 차후 토양에서 미생물성 ammonia 생성과 토양 알칼리화에 의한 siderophore 생성능의 증가로 인한 생물방제력의 상승효과를 거둘 수 있는 새로운 다기능적 생물방제균이 개발되었다고 본다.

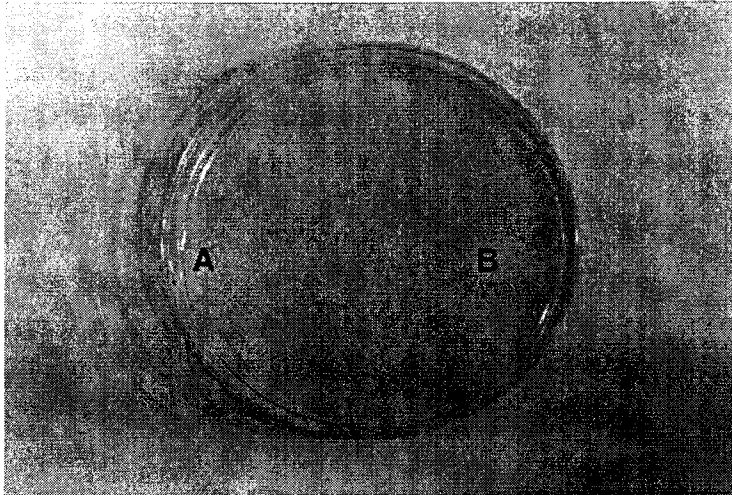


Fig. 4-16. Urease expression of *P. fluorescens* GL7 (pKU311) on Christensen's urea plate.

The strains were grown on Christensen's urea agar containing streptomycin (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and incubated at 28°C for 1 days.

A, *P. fluorescens* GL7 (pBR322)

B, *P. fluorescens* GL7 (pKU311)

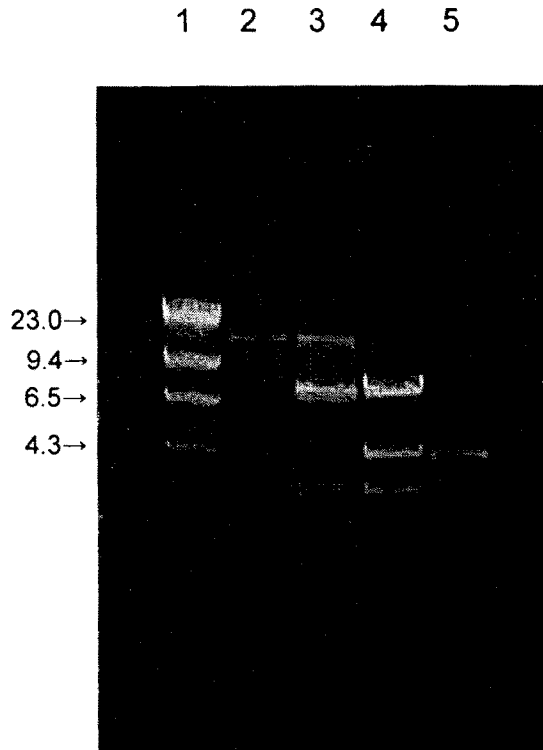


Fig. 4-17. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid pKU311.

Lane 1, λ -DNA digested with *Hind*III

Lane 2, pKT230 digested with *Bam*H I

Lane 3, pKU311 digested with *Bam*H I

Lane 4, pBU11 digested with *Bam*H I

Lane 5, pBR322 digested with *Bam*H I

Table 4-6. Antifungal activity of *P. fluorescens* GL7 containing urease gene against *F. solani*.

Strain	Urease activity ^a	Antifungal activity(mm) ^b
<i>E. coli</i> JM109 (pBU11)	1.30	6
<i>P. fluorescens</i> GL7	-	10
<i>P. fluorescens</i> GL7 (pKU311)	0.82	12

^a All strains were grown in urea R broth containing 2% urea for 3 days. Urease activity was estimated at 550 nm.

^b All strains were grown at 28°C on KBA plates containing 2% urea. Inhibition zone of *F. solani* was measured the distance between the edge of the bacterial colony and fungal mycelium after 4 days of incubation. All values are means of three replicates.

5. 도입하는 외부유전자의 염색체 병합에 의한 길항 유전자의 안정성 확보

가. Plasmid vector에 의한 chitinase gene 및 urease gene의 chromosom integration에 의한 안정성 제고

1) *B. subtilis* SH14의 염색체내 chitinase gene 병합을 위한 integration vector pDL내로 subcloning

생물방제균 *B. subtilis* SH14의 염색체내 길항성 *Pseudomonas* sp. 3098의 chitinase gene을 integration 함으로 chitinase gene의 안전성을 확보하고자 하였다. pUC18 vector의 multicloning site의 *Pst* I에 들어있는 chitinase 유전자(Fig. 5-3)의 PCR 산물은 아래 Fig. 5-2 2번 lane의 화살표 위치에서 보는바와 같이 3.2 kb 위치에서 증폭이 된 것을 확인한 후, 이 단편을 T-vector에 도입한후 제한효소 *EcoR* I으로 절단하여 양쪽에 *EcoR* I 인식부위를 가진 chitinase유전자 단편을, *EcoR* I으로 절단된 pDL과 연결하였다(Fig 5-4). pDL에 삽입된 길항성chitinase 유전자를 생물방제균 *B. subtilis* SH-14의 염색체 DNA에 integration 시켜 발현을 관찰 하였다.

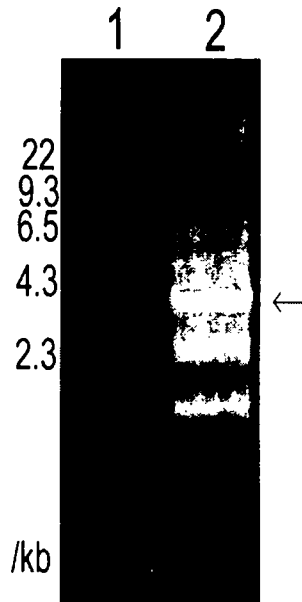


Fig. 5-2. Amplification of chitinase gene of *Pseudomonas* sp. 3089 by PCR
Lane 2 : PCR product amplified from pUC18 vector containig chitinase gene

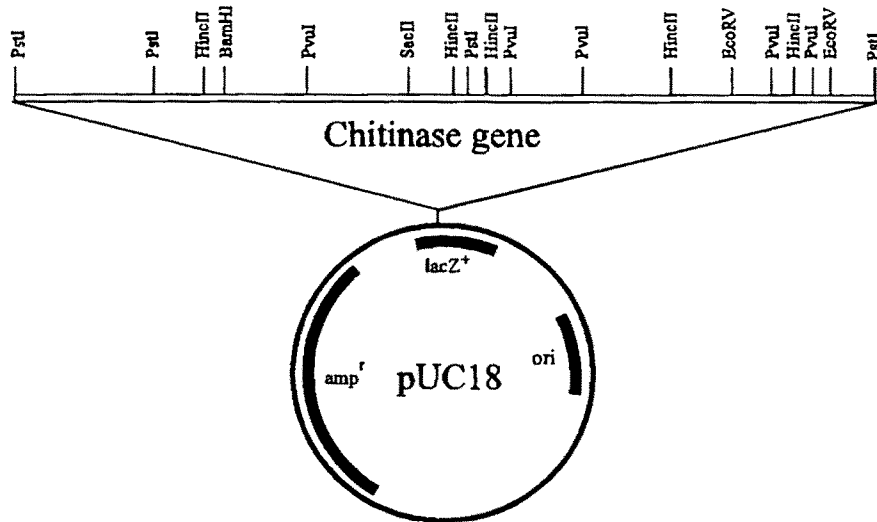


Fig. 5-3. Scheme of pUC18 vector containing chitinase gene of *Pseudomonas* sp 3089

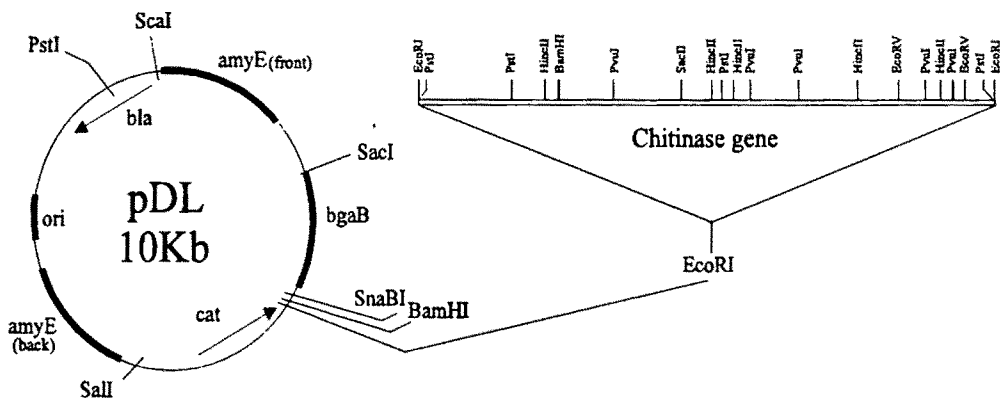


Fig. 5-4. Scheme of pDL vector containing chitinase gene of *Pseudomonas* sp. 3089

2) 생물방제균 *B. subtilis* SH14의 염색체내 urease gene 병합을 위한 integration vector pDL내로 subcloning

생물방제균 *B. subtilis* SH14의 염색체내 도다른 방제기작인 urease gene을 병합하여 도입 유전자의 안전성을 확인하고자 하였다.

토양 세균 *B. pasteurii* 균주의 urease 유전자를 가지고 있는 pGU366을 제한효소 *BamH* I으로 부분분해하고 agarose gel 전기영동한 후 urease의 전 배열을 가지고 있는 10.7kb의 단편 확인할 수 있었다. 아가로즈 전기영동상의 3번 lane에서는 *BamH* I으로 절단된 pDL을 나타내고 있다(Fig. 5-5). 이와 같이 조제된 urease와 pDL의 연결된 모양은 Fig. 5-6 과 같다. pDL에 삽입된 urease 유전자를 *B. subtilis*의 염색체 DNA에 integration 시켜 발현을 관찰 하였다.

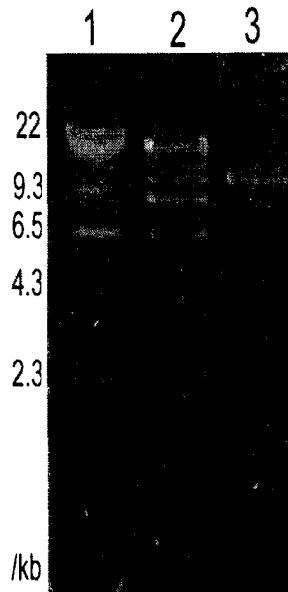


Fig. 5-5. Agarose gelelectrophoresis of pDL vector containing urease gene

Lane 2 : pGU366 restricted with *BamH* I

Lane 3 : pDL vector restricted with *BamH* I

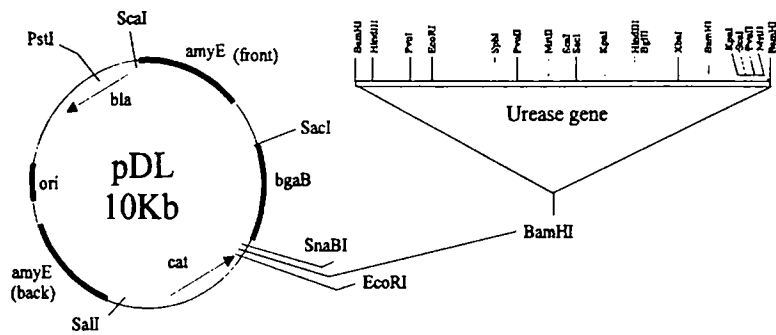


Fig. 5-6. Scheme of pDL vector containing urease gene

6. 생물방제균내 bioreport gene의 유전적 도입에 의한 생태학적 monitoring 방법 개발

선발된 생물방제균주 및 유전공학적으로 육종된 생물방제균을 토양내에 투입하였을 때 그 증식정도나 전과양식을 추적 (monitoring)함으로써 생물방제균의 토양내 실제 방제력을 확인하기 위한 방법의 일환으로 생물방제균에 추적용 report gene을 도입하고자 하였다. 따라서 본 연구에서는 항생물질에 의한 길항력이 우수한 *B. subtilis* SH14와 siderophore를 강력히 생산하는 *P. fluorescens* GL7에 bioreport gene인 GFP (green fluorescence protein) gene을 도입하기로 하였다. 이들 GFP gene과 같은 report gene의 도입은 선발된 생물방제균은 물론 유전적으로 다른 방제 능이 부가된 육종균주가 차후 실제 토양내에 투입되었을 때 그들의 토양내 동태조사와 추적에 매우 용이할 것으로 기대된다.

가. *B. subtilis* SH14에 GFP 유전자의 도입

1) *Bacillus-E. coli* shuttle vector pHV1432에 GFP 유전자의 도입 및 형질전환

선발된 생물방제균 *B. subtilis* SH14에 GFP gene을 도입하기 위하여 먼저 최적의 vector plasmid로 선정된 *Bacillus-E. coli* shuttle vector인 pHV1432에 plasmid pYKB28에 삽입되어 있는 GFP gene을 subcloning한 후 *E. coli* JM109에 alkaline competent transformation방법에 의해 형질전환하였다. GFP 유전자가 삽입된 *E. coli* JM109는 UV 395nm에서 형광을 띠를 확인하였고 또한 recombinant plasmid를 분리하여 전기영동을 실시한 결과 1.0Kb의 GFP gene band를 확인할 수 있었다. 작제된 recombinant plasmid를 pJK2160-GFP로 명명하였다 (Fig. 6-1, 6-2, Table 6-2).

Recombinant plasmid pJK2160-GFP를 선발된 길항균주 *B. subtilis* SH14에 도입하기 위하여 현재 여러 세균의 형질전환에 널리 사용되고 있는 electroporation 방법을 이용하였으나 형질전환균주를 획득하지 못하여 Chang 방법에 의거한 PEG-induced protoplast (PIP)방법을 이용하였다. 그 결과 24개의 항생제 내성 colony를 얻었으며 그 선발된 균을 대상으로 plasmid를 분리하여 전기영동을 실시한 결과 pJK2160-GFP band를 확인할 수 있었다. 그리고 spectrophotometer를 이용하여 UV 395nm에서 그 활성을 측정된 결과 *E. coli* JM109-GFP에 비해 발현이 다소 미약하여 다음 실험을 진행하였다.

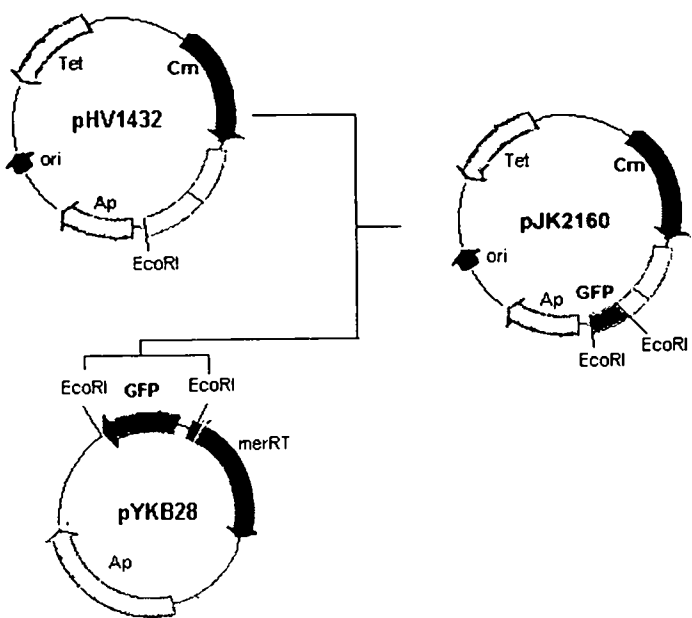


Fig. 6-1. Construction scheme of the recombinant plasmid pJK2160 containing the GFP gene

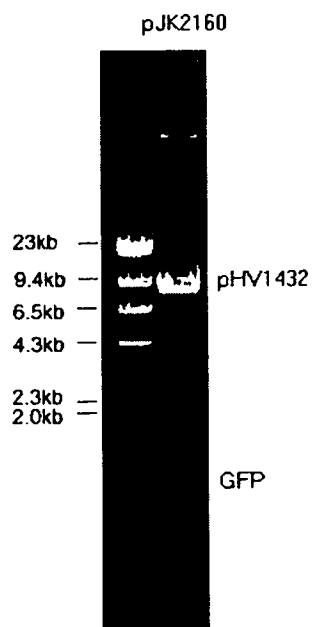


Fig. 6-2. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA pJK2160

2) Cdd gene이 함유된 pSO51에 GFP 도입 및 형질전환

Bacillus sp.의 chromosome에서 분리한 promotor인 cdd gene이 함유된 pSO51을 vector를 사용하여 *EcoRI*으로 절단한 부분에 plasmid pYKB28의 GFP gene을 subcloning하여 *E. coli* JM109에 alkaline competent transformation방법에 의해 형질전환시켰다. 그 결과 UV에서 강하게 형광색을 발하는 transformant를 3×10^2 개를 획득하였으며(Table 6-1), 작제된 recombinant plasmid를 pSG51로 명명하였다.

그 중 발현이 가장 좋은 것을 선택하여 plasmid를 분리해 전기영동으로 그 사이즈를 확인한 결과 1.0Kb의 GFP gene band를 확인할 수 있었다 (Fig. 6-3, Table 6-2).

Recombinant plasmid pSG51을 선발된 길항균주 *B. subtilis* SH14에 PEG-induced protoplast (PIP)방법을 이용하여 형질전환하였다. 그 결과 42개의 colony를 얻을 수 있었고 전기영동으로 pSG51이 형질전환되었음을 확인할 수 있었다. 그리고 UV 395nm에서 그 활성을 측정한 결과 *E. coli* JM109-GFP에 비해 발현이 미약하였다.

따라서 생물방제균의 토양내 실제 방제력을 확인하기 위한 방법의 일환으로 생물방제균에 추적용 report gene을 도입하고자 하는 의미에서 pSG51을 이용한 GFP의 도입은 부적합한 것으로 사료된다.

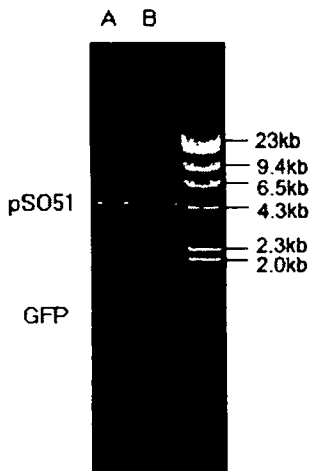


Fig. 6-3. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA pSG51

Line A : pSO51

Line B : pSG51 (pSO51 + GFP)

나. *P. fluorescens* GL7 에 GFP의 유전자의 도입

1) *E. coli*-*Pseudomonas* shuttle vector인 pKT230에 GFP gene의 도입 및 형질전환

Siderophore 생산균주인 *P. fluorescens* GL7에 bioreport gene을 도입을 위한 최적의 vector plasmid로 선정된 *E. coli*-*Pseudomonas* shuttle vector인 pKT230에 plasmid pYKB28의 GFP gene을 삽입하기 위하여 pKT230을 *Eco*RI으로 절단하여 CIP를 처리하여 탈인산화시킨 vector와 GFP gene에 T4 nucleotide kinase를 처리하여 인산화시킨 후 DNA ligation kit(Takara)를 이용하여 16°C에서 30분~2시간 동안 ligation시켰다 (Fig).

Ligation시킨 Recombinant plasmid를 *E. coli* JM109에 electroporation방법에 의해 형질전환시켰으며, 이 때 electroporation 조건은 Table 와 같다. 그 결과 UV에서 강하게 형광색을 발하는 21개의 형질전환체를 얻을 수 있었으며, 이 recombinant plasmid를 pKG230으로 명명하였다(Fig. 6-4, Table 6-2).

그 중 발현이 가장 좋은 것을 선택하여 plasmid를 분리해 전기영동으로 그 사이즈를 확인한 다음(Fig. 6-5), *P. fluorescens* GL7에 transformation을 수행하였다. 그 결과 5개의 형질전환체를 획득하였고 전기영동으로 pKG230을 확인할 수 있었다. 그리고 UV 395nm에서 그 활성을 측정한 결과 *E. coli* JM109-GFP에 비해 발현이 미약하여 GFP 유전자 도입을 위한 pKG230은 부적합하다고 본다.

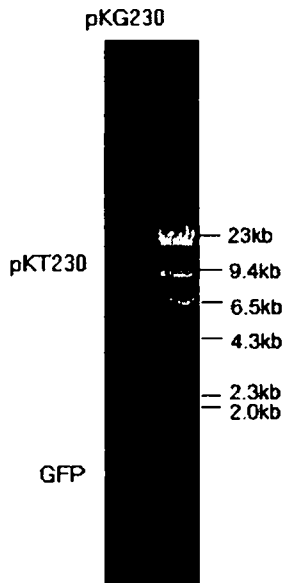


Fig. 6-5. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA pKG230

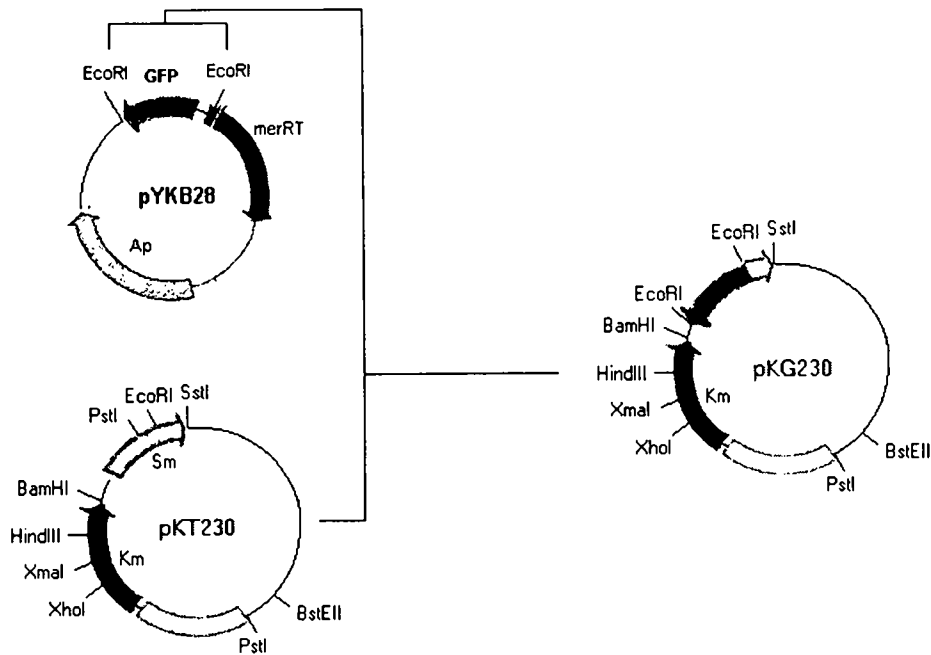


Fig. 6-4. Construction scheme of the recombinant plasmid pKG230 containing the GFP gene

2) 발현력이 우수한 pEGFP의 형질전환

Siderophore 생산균주인 *P. fluorescens* GL7에 bioreport gene을 도입하기 위하여 pGFP를 세균에서 더욱 뛰어난 발현력을 가지도록 변형시킨 pEGFP(Fig. 6-6)를 *P. fluorescens* GL7에 competent-transformation 방법과 electroporation 방법을 병행하여 형질전환시켰다.

그 결과 4×10^3 개의 형질전환체를 획득하였고 전기영동으로 pEGFP를 확인할 수 있었다(Fig. 6-7). 그리고 UV 395nm에서 그 활성을 측정한 결과 *E. coli*

JM109-GFP에 비해 발현이 미약하여 GFP 유전자 도입을 위한 pEGFP은 부적합하다고 본다.

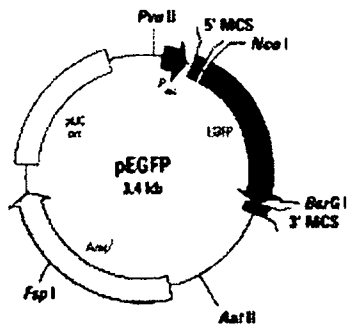
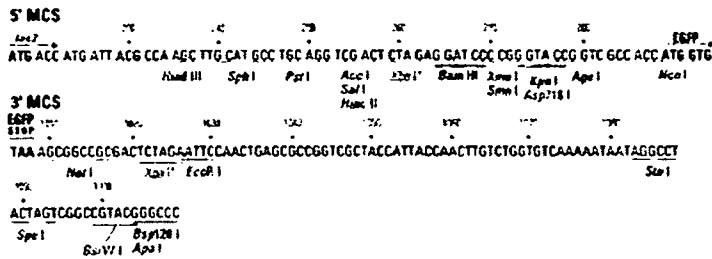


Fig. 6-6. Construction scheme of the plasmid pEGFP

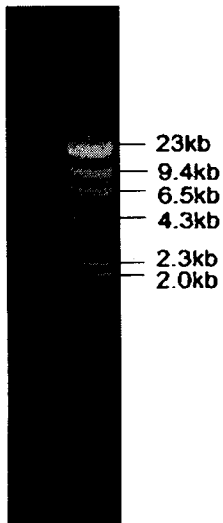


Fig. 6-7. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA pEGFP

3) Gram negative 전용 vector 인 pHSG396에 GFP gene 삽입

Gram negative 세균에서 발현력이 우수한 vector인 pHSG396에 GFP gene을 삽입하였다(Fig. 6-8, Table 6-2). pHSG396을 *EcoRI*과 *HindIII*로 절단하여 CIP를 처리하여 탈인산화시킨 vector와 GFP gene에 T4 nucleotide kinase를 처리하여 인산화시킨 후 DNA ligation kit (Takara)를 이용하여 16°C에서 30분~2시간 동안 ligation시켰다.

Ligation시킨 Recombinant plasmid를 *E. coli* JM109에 의해 형질전환시켰으며, 그 중 발현이 가장 좋은 것을 선택하여 plasmid를 분리해 전기영동으로 그 크기를 확인하였다 (Fig. 6-9). 그 결과 UV에서 강하게 형광색을 발하는 4×10^3 정도의 형질전환체를 얻을 수 있었으며, 이 recombinant plasmid를 pHEG396으로 명명하였다.

선발된 transformant에서 분리한 recombinant plasmid를 *P. fluorescens* GL7에 transformation을 수행하였다. 그 결과 4×10^3 개의 형질전환체를 획득하였고 전기영동으로 pHEG396을 확인할 수 있었다. 그리고 UV 395nm에서 그 활성을 측정한 결과 *E. coli* JM109-EGFP에 비해 발현이 미약하여 GFP 유전자 도입을 위한 pHEG396은 부적합하다고 본다.

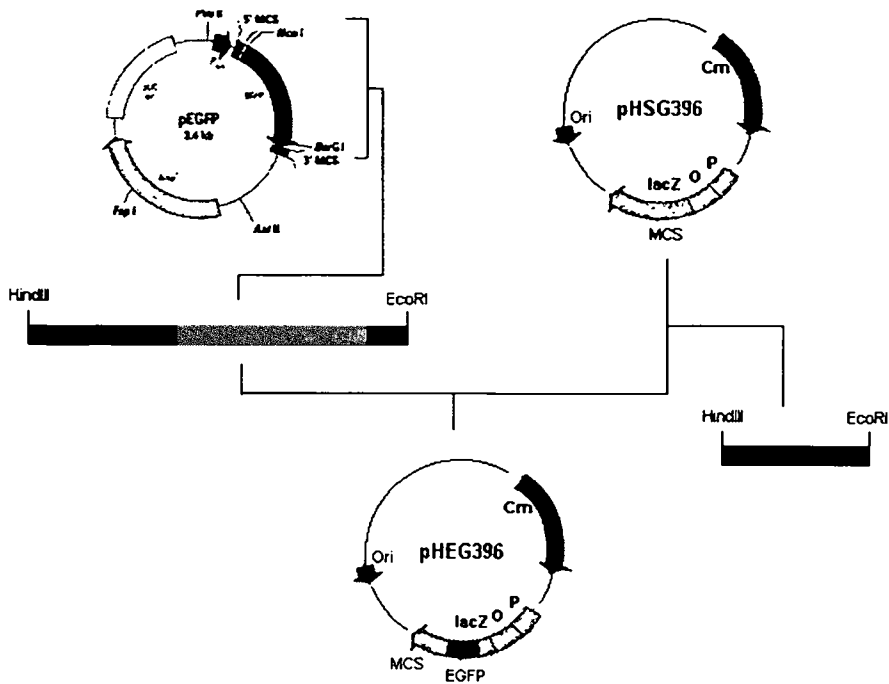


Fig. 6-8. Construction scheme of the recombinant plasmid pHEG396 containing the EGFP gene

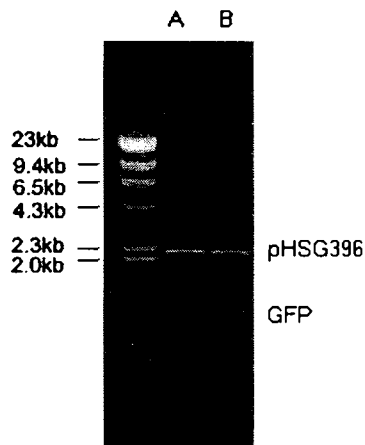


Fig. 6-9. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA pHEG396

Line A : pHSG396

Line B : pHEG396 (pHSG396+EGFP)

Table 6-1. Electrophoration of plasmids into *E. coli* JM109

Voltage	pJK2160	pSG51	pEGFP	pKG230	pHEG396
1000V	0	0	0	0	0
1500V	1	5	3×10	0	1.5×10
2000V	5	3.2×10	4.3×10^5	5	4.1×10^2
2500V	6×10	3×10^2	2×10^4	21	4×10^5
3000V	9	8	4.2×10	0	2.1×10

(Capacity : $0.5 \mu\text{F}$, Shunt(OHM) : 201Ω , Pulse : 0.100 msec)

Table 6-2. GFP-Recombinant DNA

Recombinant DNA	Antibiotic resistance	restriction enzyme	Vector	Inserter	Expression in <i>E. coli</i>
pJK2160	Cm, Am	EcoRI	pHV1432	GFP+lacZ	+
pSG51	Am	EcoRI	pSO51	GFP+lacZ	+++
pKG230	Km	EcoRI	pKT230	GFP+lacZ	++
pHEG396	Cm, Am	EcoRI, HindIII	pHSG396	EGFP	++++

다. *P. fluorescens* GL7 chromosome에 GFP gene integration

토양내에서 GFP 유전자의 안정성을 유지하기 위한 유전자 도입 방법으로 선발된 *P. fluorescens* GL7의 chromosomal DNA에 GFP 유전자의 intergration을 행하였다. pUT mini Tn5-GFP(Fig. 6-10)를 함유하는 *E. coli* S-17과 *P. fluorescens* GL7을 시간별로 mating시킨 균체를 다시 LB broth에 현탁시킨 후 농도별로 희석하여 tetracycline (15µg/ml)이 함유된 M9 minimal agar에 배양시킨 후 3.1×10^3 개의 conjugation된 colony를 획득하였다 (Table 6-3).

pUT mini Tn5-GFP에 포함된 GFP는 자체 promotor가 없으므로 integration 될 때 chromosome의 promoter 바로 뒤에 삽입이 되어야만 이 GFP가 발현되기 때문에 450~490nm의 형광 현미경으로 발현력이 좋은 *P. fluorescens* GL7을 선별하였다 (Fig. 6-11).

그 후 GFP가 chromosomal DNA에 삽입이 되었기 때문에 세균의 영양요구가 변하거나 siderophore 생산능이 감퇴되었는 지를 확인한 결과 원균과 다른없는 안정성을 가지고 있다는 것이 확인되었다.

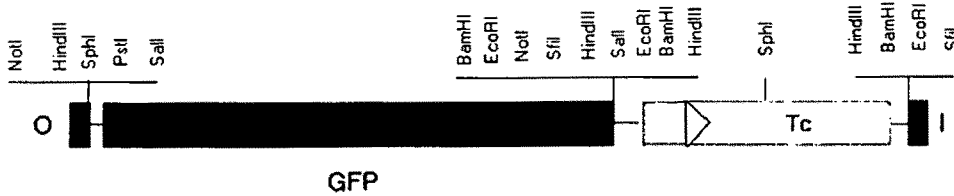


Fig. 6-10. Construction scheme of the Mini Tn5 containing the GFP gene

Table 6-3. Cojugation frequency and GFP expression of *Pseudomonas fluorescens* GL7

Time(h)	conjugant	Expression Colony (%)
1	2.0×10	15
2	2.3×10	15
3	2.2×10	10
4	5.7×10	25
5	9.8×10	30
6	1.1×10^2	25
7	5.8×10^2	20
8	9.3×10^2	45
9	3.1×10^3	70
10	2.0×10^4	50

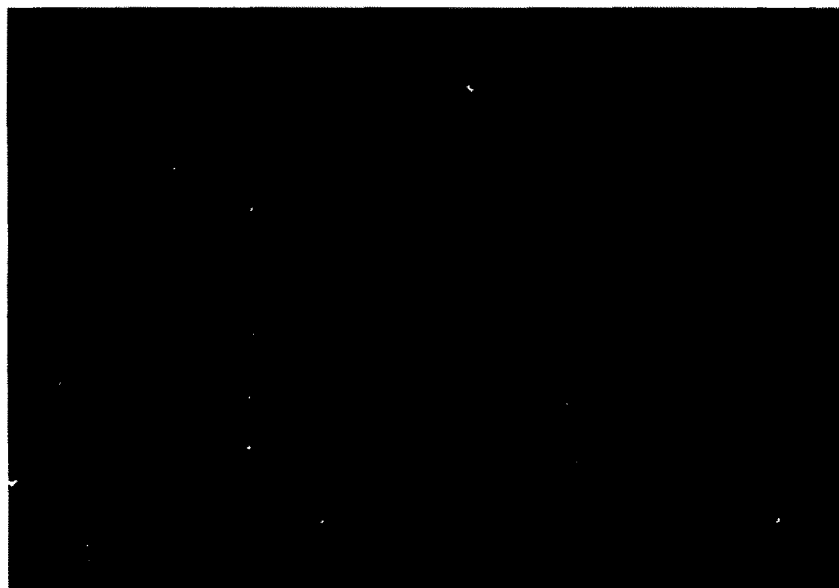


Fig. 6-11. Fluorescent microscope photograph of GFP expression by *P. fluorescens* GL7

라. *P. fluorescens* LS20 chromosome에 GFP gene intergration

토양내에서 GFP 유전자의 안정성을 유지하기 위한 유전자 도입 방법으로 선발된 *P. fluorescens* LS20의 chromosomal DNA에 GFP 유전자의 intergration을 행하였다. pUT mini Tn5-GFP를 함유하는 *E. coli* S-17과 *P. fluorescens* LS20을 시간별로 mating시킨 균체를 다시 LB broth에 현탁시킨 후 농도별로 희석하여 tetracycline (15 μ g/ml)이 함유된 M9 minimal agar에 배양시킨 후 5.1 \times 10³ 개의 conjugation된 colony를 획득하였다 (Table 6-4).

pUT mini Tn5-GFP에 포함된 GFP는 자체 promotor가 없으므로 integration 될 때 chromosome의 promoter 바로 뒤에 삽입이 되어야만 이 GFP가 발현되기 때문에 450~490nm의 형광 현미경으로 발현력이 좋은 *P. fluorescens* LS20을 선별하였다 (Fig. 6-12).

그 후 GFP가 chromosomal DNA에 삽입이 되었기 때문에 세균의 영양요구가 변하거나 siderophore 생산능이 감퇴되었는지를 확인한 결과 원균과 다름없는 안정성을 가지고 있다는 것이 확인되었다.

Table 6-4. Cojugation frequency and GFP expression of *Pseudomonas fluorescens* LS20

Time(h)	conjugant	Expression Colony (%)
1	2.6 \times 10	5
2	2.7 \times 10	20
3	2.7 \times 10	20
4	8.7 \times 10	15
5	1.8 \times 10 ²	25
6	1.2 \times 10 ²	30
7	7.4 \times 10 ²	45
8	5.1 \times 10 ³	75
9	4.6 \times 10 ³	55
10	2.0 \times 10 ³	45



Fig. 6-12. Fluorescent microscope photograph of GFP expression by *P. fluorescens* LS20

제 3 장 토착길항미생물의 토양내 전달체계 및 경작지 적용

제 1 절 서 설

토양전염성 병원균은 식물체의 종자를 통하거나 이병식물체와 함께 토양표면이나 토양 속에 잔재해 있다가 병해를 일으키기 때문에 우리나라와 같이 특정작물을 연작하는 재배환경에서는 토양전염성병에 의한 농작물의 피해가 매우 심각하다. 이들 병원균에 의한 병으로는 *Phytophthora capsici*에 의한 역병(156,157), *Fusarium oxysporum*에 의한 시들음병(158-162), *Rhizoctonia solani*에 의한 갈록병 및 뿌리썩음병, *Pythium* spp.에 의한 갈록병(163) 등이 있다. 대부분의 토양전염성병원균에 의한 병은 발병부위가 주로 뿌리 혹은 지체부 줄기로서, 이들의 대부분이 토양속에 묻혀 있으므로 초기 병징을 발견하기가 매우 어려우며 병징이 나타나기 시작한 이후에는 엽권(phyllplane)에 발생하는 병과는 달리 일반 유기합성농약을 사용하여 방제하기가 매우 어렵다(164-167). 따라서 토양전염성병을 효과적으로 방제하기 위해서는 작물을 재배하기 전에 methyl bromide 또는 chloropicrin과 같은 농약을 사용하여 토양을 훈증처리하여야 한다. 그러나 이들 농약은 잔류독성으로 인한 환경오염 및 생태계파괴 등의 문제가 나타날 수 있을 뿐만 아니라 처리비용이 많이 들기 때문에 사용이 제한된다(168,169). 이러한 단점을 해결하기 위해서는 병원균을 억제시킬 수 있는 길항미생물을 이용하는 생물학적 방제방법을 이용하는 것이 효과적이라 할 수 있다(170).

이에 대한 연구는 1921년 Hartley가 시도한 이래 많은 연구자에 의해 연구되고 있으며(165,166,171-175), 국내에서도 활발히 연구가 진행되어지고 있다(158,176-183). Merriman 등은 실용적인 생물학적 방제의 방편으로 높은 가능성을 가진 분야가 엽권보다는 토양에 서식하는 토양전염성 병원균에 대한 길항미생물의 이용이라고 하였고, 이러한 예로서 *Trichoderma* spp.를 이용한 *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*

와 *Phytophthora capsici*의 방제(173,184), *Pseudomonas fluorescens*를 이용한 *Gaeumannomyces graminis*와 *Pythium*에 의한 사탕무우 damping off의 방제(163,185)를 들 수 있다. 토양을 포함한 생태계내에서 서로 다른 종에 속하는 미생물들의 길항작용에 의해 자연적으로 병의 만연이 억제될 수 있는 현상들이 오래 전부터 잘 알려져 왔으며(186), 특히 suppressive soil에서 잘 알려져 있다(187). 이러한 현상을 이용하는 생물학적방제는 병원균에 대한 길항효과가 높은 미생물을 실험실에서 분리하여 실제로 이용하는 방향으로 행해져 왔으나, 그 성공율은 낮았다(186). 따라서 생물학적방제 효율을 높이기 위해서는 길항효과가 높은 길항미생물의 분리와 길항미생물의 직접처리시 자연생태계내에서 정착·증식할 수 있는 처리방법이 개발되어야 한다. 길항미생물을 이용하는 생물학적 방제의 연구는 정착능력이 우수한 길항미생물을 재배지 토양에 직접 처리하여 병의 발생을 억제시키는 방법의 확립이라 할 수 있다. 따라서 대상 병원균에 대한 길항효과가 우수하면서 정착능력이 있는 균주를 선발하는 것이 매우 중요하다. 이러한 목적을 달성하기 위해서 *in vitro*에서 target 병원균에 대한 길항효과 검정에 의해 선발한 길항미생물과 유전육종 균주의 *in vivo* 즉 토양내에서의 방제력을 조사 비교하여 우수한 균주를 확보하는 것이 선행되어야 한다.

*In vitro*에서 선발 또는 육종된 생물방제균을 이용하여 특히 작물에 막대한 피해를 일으키는 토양전염성병원균을 방제하기 위해서 토양 내에서의 방제력조사가 선행되어야 하며 적절한 처리방법의 개발이 매우 중요하다. 또한 처리방법에 따른 전달체계와 방제력을 검정하여 생물방제균의 효과를 극대화시킴으로서 실제 포장에 적용할 수 있는 방법을 개발하여야 한다.

본 연구는 *Phytophthora capsici*를 비롯한 주요 작물의 토양전염성 병원균에 대한 길항효과에 의해 선발된 길항미생물 및 유전공학적으로 육종된 길항미생물의 *in vivo*상태에서 병의 방제효과 및 전달체계와 방제효과를 극대화시킬 수 있는 생물방제균의 처리방법을 개발하기 위하여 온실에서 고추 역병을 중심으로 pot 실험에 의해 그 결과를 조사하였을 뿐만 아니라, 실제 재배포장에서 이들 균주를 효과적으로 적용할 수 있는 방법을 확립하고자 수행되었다. 이를 위해 생물방제 균주의 실제 역

가 및 약제 저항성을 조사하고 적절한 처리 방법과 시기 및 농도의 확립과 생물방제 균이 식물체에 미치는 영향 등을 종합적으로 평가 분석하였다.

일반적으로 환경농업은 식물병의 방제에 있어서 종합적 방제법의 일환으로 모든 이용 가능한 유기질비료의 시용에 의해 작물을 건강하게 생육시킴으로서 각종 병원균에 대한 자연적인 저항성을 증대시킬 뿐만 아니라, 토양미생물들의 생태적인 다양성을 증대시키고, 특히 각종 작물의 토양전염성 병원균에 대해 길항미생물로 작용할 수 있는 방선균, *Pseudomonas*속 균 및 *Bacillus*속에 속하는 균들의 밀도를 증가시켜 병원균의 밀도를 감소시킴으로서 병의 발생을 억제시켜 농약 사용을 최소화시킬 수 있는 환경친화적인 영농방법이라 할 수 있다. 환경농업에서의 생물방제법의 실용화에 관한 연구에서는 본 연구과제의 1년차 연구에서 분리, 선발한 토착길항미생물 중에서 *in vitro* 및 *in vivo*에서 특히 고추의 역병균에 대한 효과가 2년차 온실 pot 실험에서 확인된 길항미생물을 실제 환경농업에서 이용되고 있는 각종 유기질과 혼합 처리하여 그 효과를 검증하여 포장에서의 실용화 방안을 확립하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 생물방제균의 토양내 방제력 및 전달체계

가. 선발 생물방제균주 및 육종균주의 토양내 방제력 조사

1) 토양내 방제력 유지 능력 조사

토양내에서 길항진균의 식물병 방제력 유지능력을 조사하기 위해서 potato dextrose agar (PDA)에서 2~4일간 전배양한 길항진균의 절편(5.0 mm) 6개 썩을 취하여, 흙 : 모래 : TKS2 = 1:1:1(V/V/V)로 혼합한 후 0.03%(w/w)의 corn meal(Sigma, C-6304)을 첨가한 다음 수분함량을 60%로 조절하여 1.0 l 삼각 플라스크에 300ml를 담은 후 1시간동안 121℃에서 고압증기살균하여 만든 배양토에 각각 접종한 후 27℃항온실에 3~7일간 배양하여 길항진균의 배양토를 만들었다. 길항진균의 배양토 1.0g을 흙 : 모래 : TKS2 = 1:1:1(V/V/V)로 혼합한 상토 99.0g의 비율로 혼합한 후, TKS2 원예용상토를 사용하여 온실에서 육묘한 고추 건전묘(오륜고추, 서울종묘)를 5엽기에 이식한 다음, 고추역병균을 접종하여 이병률을 조사하여 방제력 유지 능력을 조사하였다. 이때 고추역병균의 접종밀도는 pot 토양 1.0g 당 50 유주자낭의 농도로 접종하였다.

길항세균의 방제력을 조사하기 위하여 길항세균을 tryptic soy broth (TSA, 2.0%, pH6.5)에 접종하여 27℃에서 120rpm으로 2~3일간 진탕배양한 후, 고속냉장원심분리기에서 10분간 원심분리(12,000×g) 하여 얻은 균체를 멸균수에 희석하여 상토 1.0g 당 10^5 - 10^9 cell의 농도로 혼합하여 만든 상토에 고추 건전묘를 이식 후 역병균을 접종한 다음 이병율을 조사하였다. 이병식물의 조사는 접종 5일 후부터 2일 간격으로 13일 까지 실시하였다.

2) 길항미생물의 토양내 동태 조사

생물방제균을 처리한 상토에서 처리 후 60일 까지 10일 간격으로 상토 5.0g 씩 표본을 취하여 현탁액을 만든 다음, 평판희석법으로 밀도를 측정하였다.

나. 길항미생물의 역가 및 억제저항성 조사

길항미생물의 역가조사는 길항미생물의 처리 농도별 고추역병 억제효과를 조사하여 실시하였다. TKS2 원예용상토를 사용하여 온실에서 육묘한 고추 건전묘(오륜고

추, 서울종묘)를 공시하였다. 처리당 3주 5반복으로 하였으며, coating 종자는 5주 5반복으로 실시하였다. 길항진균의 처리는 길항진균의 배양토 10g, 1.0g, 0.1g을 각각 상토 90g, 99.0g, 99.9g 과 혼합하여 실시하였으며, 길항세균은 상토 1.0g당 10^6 및 10^8 cell이 되게 처리하였다.

고추종자에 길항미생물을 피막처리한 coating종자를 사용한 역가검사는 10^4 ~ 10^8 cell or spore/ml로 종자에 피막시킨 후 이병토양에 파종하여 실시하였다.

생물방제균의 약제 저항성은 potato dextrose broth (Difco. Co. PDB) 와 nutrient broth (Difco. Co. NB, 1/10 diluted)에 methanol에 녹인 technical form의 metalaxyl, metalaxyl-copper를 $1\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$, $100\mu\text{g/ml}$ 로 첨가한 다음 생물방제균을 접종하여 배양한 후 건물중과 cfu를 조사하여 검정하였다. 이때 길항진균은 PDA에 72시간 전배양한 균총(5mm)을 접종하였으며, 길항세균은 NB에 24시간 전배양한 배양체 1.0ml (5×10^5)를 접종하였다. 토양내에서 생물방제균의 약제저항성을 조사하기 위해서 상토 40g을 test tube(직경 2.5cm, 길이 15cm)에 채우고 121°C 에서 60분간 고압증기 살균 후, 관행농도로 희석한(0.2g/l) 메타실엠수화제 10ml를 첨가한 후 각 생물방제균을 coating한 종자를 파종하여 배양실에서 재배하면서 1주일 간격으로 토양현탁액을 만들어 생물방제균의 활력을 평판희석법으로 조사하여 실시하였다.

다. 길항미생물의 식물체에 미치는 영향 조사

길항미생물의 식물체에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생물방제균을 coating처리한 종자를 plastic pot에 파종하여 온실에서 재배하여 조사하였다. 관수는 양액을 조절하여 1일2회 5분간 자동 system에 의해 mist형태로 실시하였으며, 식물체에 미치는 영향은 발아율 및 초기 생육조사에 의해 실시하였다.

라. 생물방제균의 토양내 전달체계 조사

생물방제균의 토양내 전달체계를 조사하기위하여 생물방제균을 coating한 종자를 사용하여 실험실에서는 약제내성 조사와 동일한 방법으로 실험을 수행하였으며, 식물체에 미치는 영향을 조사할 때와 같은 방법으로 재배하면서 뿌리 부위별 방제균의 밀도 및 토양중 방제균의 밀도를 선택배지 등을 사용하여 조사하였다.

마. 길항미생물의 coating처리

길항미생물의 역가, 약제저항성, 길항미생물의 식물체에 미치는 영향 및 생물방제균의 토양내 전달체계를 효과적으로 조사하기 위하여 본 실험실에서 생물방제균을 종자에 직접처리할 수 있는 방법으로 사용한 coating처리는 다음과 같이 실시 하였다.

1) 길항미생물

1차년도에서 생물방제균으로 선발한 고추역병균에 길항효과가 있는 것으로 확인된 bacteria 5균주(B23, B7079, B4005, P2112, P4059), fungi 5균주(24K5, 25J1, 35J15, 36J13, 37J10)를 공시하였다.

2) 길항미생물의 배양 및 회수

가) Bacteria : Bacteria는 TSB에 접종 후 27℃에서 120rpm으로 진탕액체배양한 다음 12,000×g로 15분간 원심분리하여 cell을 수확하였다. 0.85% NaCl용액에 cell을 현탁하여 OD_{660nm}에서 실험에 따라 농도를 조절하면서 실험에 사용하였다.

나) Fungi : Fungi는 PDA에 접종 후 27℃에서 4~5일간 배양 한 다음 본 실험에서 coating시 사용한 binder를 1/10로 희석한 용액 10ml를 petri dish에 부어 포자를 수확한 다음 4겹의 살균된 거즈로 여과하여 사용하였다.

3) 접착제 및 첨가제

Coating시 접착제로는 arabic gum을 사용하였으며, 첨가물로는 perlite, sodium alginate, kaoline, xanthem, corn meal, tryptic soy broth, potato dextrose broth를 사용하였다.

4) Coating

가) Bacteria : Bacteria의 coating은 두가지 방법을 사용하였다. 고추종자를 cell 현탁액(OD_{660nm}=1.0) 15ml에 0.89g의 고추종자(150립)를 24시간 동안 실온에서 침지처리한 후 4~5시간 실온에서 풍건시킨 종자와 침지처리를 하지 않은 종자를 각각 사용하여 coating하였다. Coating은 coating기에서 종자 150립에 3ml의 cell 현탁액(10^7 - 10^9 cell/ml)을 균일하게 분사한 후 첨가제 및 binder를 사용하여 실시하였다.

나) Fungi : 고추종자 150립에 3ml의 포자현탁액(10^8 spore/ml)을 균일하게 분사한 후 상기 방법에 의해서 실시하였다.

이 때 대조구로는 동일한 방법으로 생물방제균의 현탁액 대신 멸균수를 처리하면서 coating하였다.

5) 보관 : Coating처리한 종자의 보관은 8℃ 냉장실에 하였다.

6) 발아율조사

Coating처리한 고추 종자 및 coating방법에 따른 발아에 미치는 영향을 coating처리한 종자를 보관하면서 경시적으로 조사하였다. 발아율은 발아상(11×11×4cm, 그림 3)에 40ml의 멸균수를 사용하여 습기를 유지할 수 있도록한 다음 30개(6×5)의 종자를 놓은 후 25℃, 18 시간 광조건하의 growth chamber에 옮겨 놓고 3~5일 후부터 3일 간격으로 조사하였다.

7) 활력조사

고추 종자에 coating처리한 길항미생물의 활력은 coating처리한 고추종자를 직접 PDA 또는 TSA에 접종 후, 27℃ 배양기에 배양한 다음 24~48시간 후 길항미생물의 생장을 조사하여 하였다. 길항 fungi를 coating한 종자는 PDA에 각각 5립씩 접종하였으며, 길항 bacteria를 coating한 종자는 TSA상에 종자를 5개씩 희석으로 그어 접종한 다음 배양하였다.

2. 경작지에서의 생물학적 방제법의 확립

경작지내에서 길항미생물의 전달체계 및 방제력 검증, 지역별 및 작물별 방제력 검증과 선발 길항균주 및 유전육종 길항균주의 환경 적응 및 토착능력 등을 조사하기 위하여 고추와 참깨를 식물재료로 선정하여 경북 경산시 진량면, 영천시 청통면 및 경주시 서면에 실험포장을 선정하여 실험을 실시하였다.

가. 식물재료

1) 고추

식물재료는 서울종묘에서 연구용으로 사용하고 있는 오륜고추를 분양 받아 사용하였다. 건전 고추묘의 육묘는 원예용 상토(Fisons, Canada)를 사용하여 자연광하의 온실에서 수행하였다(Fig. 8-1).



Fig. 8-1. Seedling of red-pepper.

2) 참깨

농촌진흥청에서 분양 받은 단백질 품종을 사용하였다.

나. 공시 길항미생물

In vitro 와 온실 pot 실험에서 식물병 발생 억제효과가 있는 것으로 확인된 길항진균 8균주 (J1, J10, J13, J15, J16, K5, K9, K10), 길항세균 5균주 (P2112, P4059, B7079, LX5, B23) 및 protoplast fusion에 의해 얻어진 두 균주 (PFJ1+J13, PFJ13+J16)를 사용하였다.

다 길항미생물의 배양 및 처리

3) 길항진균

가) 배양토를 이용한 처리 : 모래를 2mm체로 친 후 수돗물로 완전히 세척하여 70℃로 조절한 건조기에서 건조시킨 다음 corn meal (Sigma) 과 97:3 (W/W)으로 혼합하여 500ml의 삼각 플라스크에 300g을 넣은 후, 1차 증류수 45ml를 첨가하여 잘 혼합하여 121℃에서 60분간 멸균하여 길항진균의 배양토를 만들었다. 플라스크에 4~5일간 potato dextrose agar에 전배양한 길항진균의 균종(직경 1.0cm) 5개씩을 접종하여 28℃ 항온기에서 21일 동안 배양하였다. 길항진균의 토양내 처리는 길항진균의 배양토와 모래와 발효를 1:1(V/V)로 혼합하여 만든 상토를 1:99(W/W)로 혼합하여 물과 혼합(100:15)한 다음 고추는 이식할 때 1주당 500g씩 처리하였으며, 참깨는 파종시 1구당 100g씩 복토하여 처리 하였다.

나) 침지처리 : 고추를 이식할 때 고추묘를 4시간 동안 길항진균의 포자 현탁액 (10^7 spore/ml)에 4시간 동안 침지 후 이식하였다. 길항진균의 포자현탁액은 potato dextrose agar에 길항진균을 4~7일 간 배양한 후 멸균수로 포자를 수확하여 만들었다.

다) 관주처리 : 고추를 이식한 후 1주당 포자현탁액을 500ml 씩 관주처리 하였다.

2) 길항세균

가) 배양 : 공시 길항세균을 tryptic soy broth 300ml에 72시간 진탕 액체 배양하였다.

나) 배양토를 이용한 처리 : 배양액 300ml를 2.7kg의 상토(흙:모래=1:1, V/V)와 혼합하여 상기와 같이 처리하였다.

다) 침지처리 : 길항세균을 배양 후 원심분리하여 cell을 수확한 다음 1차증류수에 현탁하여 현탁액(10^7 cell/ml)을 만들어 상기와 같이 처리하였다.

라) 관주처리 : 고추를 이식한 후 1주당 세균현탁액을 300ml씩 관주처리하였다.

3) 혼합처리

길항세균(B7079)과 길항진균(J13)의 배양토를 각각 1:1로 혼합하여 상기와 같은 방법으로 고추이식시 처리하였다.

4) 참깨종자의 coating처리

길항진균, 길항세균 및 유전육종균주를 배양 후 각각 포자현탁액(10^8 spore/ml)과 cell 현탁액($OD_{660nm}=1.5$)을 만든 다음 1ml를 9ml의 binder용액과 혼합하여 coating 기계에서 2.0g의 종자에 골고루 분사하면서 첨가제 (perlite)를 사용하여 실시하였다.

라. 시험구 배치

시험구배치는 난괴법 3반복을 실시하였다.

마. 방제력 검증

1) 참깨

파종 후 입묘율을 조사하였으며, 10일 간격으로 토양병해에 의한 결손주를 조사하였다.

2) 고추

정식 후 경시적으로 각 처리에 따른 이병률을 조사하였다.

바. 토양 특성의 조사

시험포장의 흙을 3곳에서 임의로 채집하여 토양의 물리성 및 화학적 성질을 다음과 같이 조사하였다.

1) 토양시료

시험포장 토양의 물리·화학적 특성을 조사하기 위하여 근권토양을 약 500g 채취하여 그늘에서 풍건시킨 후 2mm 체로 sieve하여 분석하였다.

2) 토양 pH

풍건토 5.0g을 beaker에 넣은 다음 증류수 25ml를 첨가하고 유리봉으로 저어 주면서 1시간 동안 치환 시킨 후 pH를 측정하였다.

3) 양이온 치환용량(Cation exchange capacity, CEC)

풍건토 5.0g을 1.0N - ammonium acetate (pH 7.0) 용액으로 12시간 동안 치환 침출 시킨 후 80% ethyl alcohol로 12시간 동안 세척한 다음 직접증류법으로 증류한 후 0.1N - H₂SO₄ 용액으로 적정하여 CEC를 측정하였다.

4) 치환성 양이온

양이온 치환용량 분석시의 1N - ammonium acetate (pH 7.0) 침출액을 ICP (Varian, Liberty Series II)로 분석하였다.

5) 유효인산

Bray No. 1 방법으로 분석하였다. 풍건 세트 1.0g을 시험관에 넣은 다음 Bray No. 1 침출액 10ml를 첨가한 후 정확히 1분간 혼든 다음 여과하여 그 여액을 ICP (Varian, Liberty Series II)로 분석하였다.

6) 전질소

0.5mm 체로 친 풍건세트 1.0g을 Kjeldahl flask에 넣고 황산염혼합분말 5.0g과 농황산 25ml를 가하여 분해한 다음 직접증류법으로 증류한 후 0.1N - H₂SO₄로 적정하였다.

7) 토양유기물

Walkley - Black 방법으로 분석하였다. 80 mesh 체로 친 풍건세트 1.0g을 250ml 삼각플라스크에 넣은 다음 1N - 중크롬산칼리용액 10ml를 첨가하고 농황산 20ml를 넣은 다음 1분간 흔들어서 주고 약 30분간 방치 후 증류수 200ml를 가하고 85% 인산 10ml와 NH₄F 분말 0.2g을 가하여 섞은 다음 0.5N ferrous ammonium sulfate로 적정하였다.

8) 토성

토성은 비중계법으로 분석하였다. 풍건토 50g을 250ml beaker에 넣고 분산제(5.0% sodium hexa meta phosphate, 0.9% sodium carbonate anhydrous 혼합용액) 100ml를 첨가하여 잘 섞은 후 24시간 방치한 다음 1.0 l mess cylinder에 옮겨서 증류수를 첨가하여 1.0 l로 만든 다음 Hand Stir로 1분간 상하로 20회 진탕 후 151H Hydrometer로 10, 13시간에 비중을 측정하여 점토함량을 구하고, 53 μ m 체로 sieve하여 모래함량을 구하였으며, 미사의 함량은 100 - (점토함량+모래함량)으로 결정하였다.

9) 보수력

풍건토를 pressure plate 위에서 16시간 포화시킨 후 Pressure plate apparatus에 설치하여 각각의 압력 (0.1, 1.0, 15bar)에서 평형시킨 후 건조하여 수분함량을 측정하였다.

사. 길항미생물의 전달체계 및 밀도 변화

경시적으로 근권토양을 약 20g씩 채취하여 냉장실에 보관하면서 처리한 미생물의 종류에 따라 선택배지를 사용하여 CFU에 의해 처리한 길항미생물의 밀도변화를 조사하였다.

아. 길항미생물의 식물체 생장에 미치는 영향

길항미생물의 처리가 식물체의 생장에 미치는 영향은 식물체의 초장, 경경, 열매 수 및 무게 등을 측정하여 조사하였다.

3. 환경농업에서의 생물방제법의 실용화

길항미생물을 환경농업에 직접적용 실용화방법을 구명하기 위하여 실제 환경농업이 행해지고 있는 경북 경주시 서면에 시험포장을 설정하여 고추를 재배하면서 병발생정도, 길항미생물의 밀도 및 생육상태 등을 조사하였다.

가. 식물재료

고추 : 식물재료는 서울종묘에서 연구용으로 사용하고 있는 오륜고추를 분양 받아 사용하였다. 건전 고추묘의 육묘는 원예용 상토(Fisons, Canada)를 사용하여 자연광 하의 온실에서 수행하였다.

나. 공시 길항미생물

In vitro 와 온실 pot 실험에서 식물병 발생 억제효과가 있는 것으로 확인된 길항진균 8균주 (J1, J10, J13, J15, J16, K5, K9, K10), 길항세균 5균주 (P2112, P4059, B7079, LX5, B23) 및 protoplast fusion에 의해 얻어진 두균주 (PFJ1+J13, PFJ13+J16)를 사용하였다.

다. 길항미생물의 배양 및 처리

1) 길항진균

가) 침지처리 : 고추를 이식할 때 고추묘를 4시간 동안 길항진균의 포자 현탁액 (10^7 spore/ml)에 침지 후 이식하였다. 길항진균의 포자현탁액은 potato dextrose agar에 길항진균을 4~7일 간 배양한 후 멸균수로 포자를 수확하여 만들었다.

나) 관주처리 : 고추를 이식한 후 1주당 포자현탁액을 500ml 씩 관주처리 하였다.

2) 길항세균

가) 배양 : 공시 길항세균을 tryptic soy broth 300ml에 72시간 진탕 액체 배양하였다.

나) 침지처리 : 길항세균을 배양 후 원심분리하여 cell을 수확한 다음 1차증류수에 현탁하여 현탁액(10^7 cell/ml)을 만들어 상기와 같이 처리하였다.

다) 관주처리 : 고추를 이식한 후 1주당 500ml의 세균현탁액을 관주처리하였다.

3) 혼합처리

길항세균(B7079)과 길항진균(J1)의 현탁액을 각각 1:1로 혼합하여 상기와 같은 방법으로 고추이식시 처리하였다.

라. 시험구 배치

시험구 배치는 난괴법 3반복으로 하였으며 반복당 10주씩 정식하였다.

마. 방제력 검증

정식(5월 21일) 후 경시적으로 각 처리에 따른 이병률을 조사하였다.

바. 길항미생물의 전달체계 및 밀도 변화

정식 후 경시적(10일)으로 근권토양을 약 20g씩 채취하여 냉장실에 보관하면서 처리한 미생물의 종류에 따라 CFU에 의해 조사를 하였다.

제 3 절 실험 결과

1. 생물방제균의 토양내 방제력 및 전달체계

가. 선발 생물방제균주 및 육종균주의 토양내 방제력 조사

1) 토양내 방제력 유지 능력 조사

고추의 건전묘를 생물방제진균의 배양토에 이식 후 역병균을 접종한 다음 역병발 생정도를 온실에서 조사한 결과 Table 7-1과 같다. 길항진균의 배양토를 10% 및 1.0%로 첨가한 상토에서는 이병식물의 수가 0.1% 첨가한 상토에서 보다 훨씬 낮은 경향을 보여 처리 농도에 따른 효과를 인정할 수 있었다(Fig. 7-1). 길항세균은 10^5 , 10^7 및 10^9 cell/g soil로 처리한 농도간 차이가 길항진균과 같이 뚜렷하게 나타나지는 않았으나 10^9 cell/g soil 농도로 처리하였을 때가 비교적 이병주의 수가 적었다.

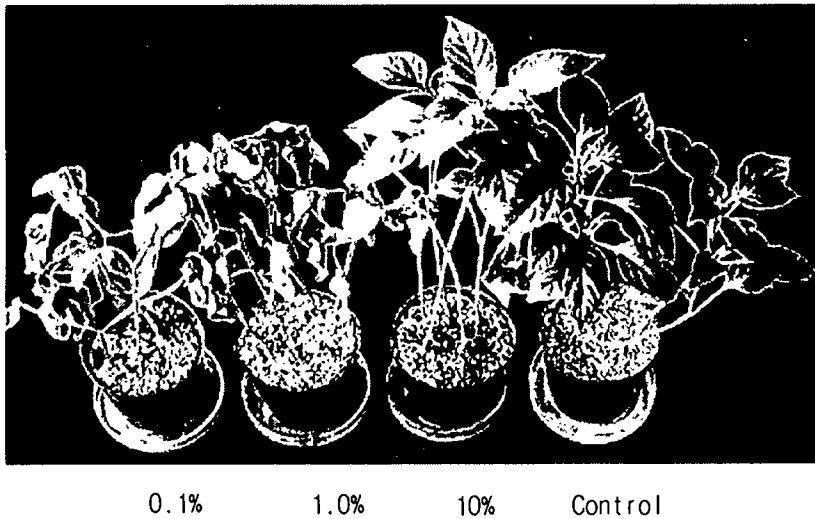


Fig. 7-1. Effects of application concentration of antagonistic fungi(36 J13) on disease development of *Phytophthora* blight of red-pepper plants in infected soil in the greenhouse. Six days after inoculation.

생물방제균의 혼합처리에 따른 병방제효과를 조사하기 위하여 25J1과 36J13, 36J13과 37J10, 36J13과 B7079, 36J13과 P4049를 혼합하여 상토를 만든 후 건전묘를 이식한 다음 동일한 방법으로 역병의 발생정도를 조사한 결과는 Table 2에서 볼 수 있다. 이때 길항진균의 배양토와 길항세균의 처리농도는 각각 1.0% 및 10^7 cell/g soil로 취하여 혼합하였다.

길항진균간의 혼합처리에 따른 병발생억제효과의 상승은 인정할 수 없었으며, 길항진균(36J13)과 길항세균을 혼합하여 처리 하였을 때는 길항세균 단독으로 처리하였을 때보다 병발생률이 월등히 낮았으며, 길항진균을 단독으로 처리하였을 때 보다는 약간 낮은 경향을 보였으나 병발생정도가 유사하여, 혼합처리에 따른 병발생억제효과의 증진은 인정할 수 없었다. 또한 25J1과 36J13 및 36J13과 37J10균주간 protoplast fusion에 의해 얻은 colony중에서 안정성을 확인한 두 개의 균주 (PFJ1+J13 및 PFJ13+J10)를 선발하여 동일한방법으로 고추역병의 발생억제력을 조사한 결과에서도 Table 7-2에서 보는 바와 같이 병발생억제효과의 증진이 없었다.

Table 7-1. Effects of selected antagonists on incidence of Phytophthora blight of red pepper plants in the green house

Antagonists	Application	no. of diseased plants(/15) after				
		5days	7	9	11	13
24K5(<i>Trichoderma</i> sp.)	10%	0	1	3	6	10(66.7%)
	1%	0	2	7	9	11(73.3%)
	0.1%	1	4	9	12	14(93.3%)
25J1(<i>Trichoderma</i> sp.)	10%	0	0	1	3	6(40.0%)
	1%	0	0	3	5	8(53.3%)
	0.1%	0	0	2	5	9(60.0%)
35J15(<i>Trichoderma</i> sp.)	10%	0	0	5	6	9(60.0%)
	1%	0	1	3	5	9(60.0%)
	0.1%	0	1	2	7	12(80.0%)
36J13(<i>Trichoderma</i> sp.)	10%	0	0	4	3	6(40.0%)
	1%	0	1	1	5	7(46.7%)
	0.1%	0	0	2	7	11(73.3%)
37J10(<i>Trichoderma</i> sp.)	10%	0	0	2	3	7(46.7%)
	1%	0	1	1	6	10(66.7%)
	0.1%	1	1	3	9	12(80.0%)
B23(<i>Bacillus</i> sp.)	109 cell/g soil	0	0	4	5	11(73.3%)
	107	1	1	2	6	11(73.3%)
	105	1	1	3	9	15(100%)
	109	0	0	5	6	9(60.0%)
B7079(<i>Bacillus</i> sp.)	107	0	1	2	8	10(66.7%)
	105	1	2	4	11	13(86.7%)
	109	0	0	5	6	11(73.3%)
LX5(<i>Bacillus</i> sp.)	107	1	1	3	9	11(73.3%)
	105	1	2	6	11	13(86.7%)
	109	1	1	5	7	11(73.3%)
P2112(<i>Pseudomonas</i> sp.)	107	0	1	4	7	12(80.0%)
	105	1	2	4	9	14(93.3%)
	109	1	1	4	7	10(66.7%)
P4049(<i>Pseudomonas</i> sp.)	107	1	2	5	9	11(73.3%)
	105	1	2	6	10	13(86.7%)
	Water	3	9	1	15	15(100%)

Values are number of diseased plants in 3 replications planted of 5 plants in each pot

나) 길항미생물의 토양내 동태 조사

온실에서 생물방제균을 처리한 상토에 고추를 육묘하면서 60일 까지 10일 간격으로 상토 5.0g 씩 표본을 취하여 현탁액을 만든 다음, 선택배지를 사용하여 평판희석법(10 fold dilution plating method)으로 시료 1.0g당 처리한 생물방제균의 밀도를 측정 한 결과는 Table 7-3과 같다. 생물방제균의 밀도는 처리 10일 후까지는 증가하였으나, 그 후 부터는 감소하여 20일 후 부터는 거의 평형을 유지하였으며, 50일 및 60일 후 까지 갈수록 약간씩 감소하는 경향을 보였다.

Table 7-2. Effects of selected antagonists on incidence of Phytophthora blight of red pepper plants in the green house

Antagoniss	Application	No. of diseased plants(/15) after				
		5days	7	9	11	13
25J1+36J13	1%+1%	0	1	3	6	9(53.3%)
PFJ1+J13	1.0%	1	1	4	7	10(66.7%)
36J13+37J10	1%+1%	0	1	2	5	7(46.7%)
PFJ13+J10	1.0%	0	0	1	4	8(53.3%)
36J13+B7079	1%+10 ⁷ cell/g soil	0	1	2	4	6(40.0%)
36J13+P4049	1%+10 ⁷ cell/g soil	0	1	3	5	7(46.7%)
Water		2	8	10	15	15(100%)

Values are number of diseased plants in 3 replications planted of 5 plants in each pot.

PF : Protoplast fusion.

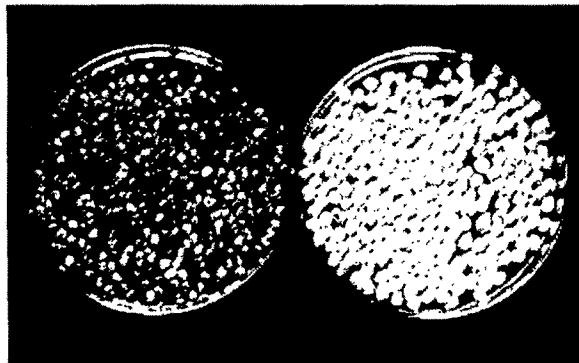


Fig. 7-3. Red-pepper plants which sowing with pelleted seeds in artificially infected soils.

나. 길항미생물의 역가 및 약제저항성 조사

고추종자에 길항미생물을 $10^4 \sim 10^8$ cell or spore/ml로 현탁액을 만든 다음 접착제를 사용하여 종자에 피막시킨 후 피막처리한 종자(Fig. 7-2)를 이병토양에 파종한 다음 취아 1주일 후부터 5주일 까지 1주일 간격으로 이병주를 조사하였다(Fig. 7-3). Table 7-4에서 보는 바와 같이 길항미생물의 배양토 및 토양관주처리에 의해 조사한 병방제효과(Table 7-3)와 비교 할 때 길항진균은 역가가 비교적 낮은 경향을 보였으나, 길항세균은 유사한 경향을 보였다. 경시적인 차이는 조사한 5주 까지 전체적으로 1주 후 보다는 증가한 경향을 보였으나, 급격한 병발생의 증가는 관찰되지 않았다.



Naked seeds

Pelleted seeds

Fig 7-2. Pelleted red-pepper seeds with spores of antagonistic fungi (36 J13).

생물방제균의 억제저항성을 조사하기 위해서 metalaxyl, metalaxyl-copper를 첨가한 배양기에 생물방제균을 접종 후 길항진균은 6일, 길항세균은 3일간 27℃에서 120rpm으로 진탕배양 후 건물중과 cfu를 조사한 결과는 Table 7-5 및 Table 7-6과 같다. 공시 길항진균은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 억제처리 농도에서는 생장이 약 50%정도 억제되었으나, 1 μg 및 10 μg 농도에서는 큰 영향을 받지 않았다. 길항세균은 metalaxyl에 대해서는 길항진균과 유사한 경향을 보였으나, metalaxyl-copper에는 현저히 생장이 억제되어 1 μg 농도에서도 약 60%에서 80%까지 생장이 억제되었다.

메타실엠수화제를 관행농도(0.2g/l)로 처리한 토양내에서 생물방제균의 억제저항성을 조사하기 위하여 생물방제균을 coating처리한 종자를 파종 후 경시적으로 생물방제균의 밀도를 조사한 결과 *in vitro*에서와 같이 메타실엠수화제는 생물방제균의 밀도에 영향을 미치지 않았다.

Table 7-3. Colony forming unit (CFU) of antagonistic microorganisms in rhizosphere soil of red pepper after inoculation in the greenhouse pot experiment

Antagonists	Application	Log no. of cfu/g soil after					
		10days	20	30	40	50	60
25J1	10 ⁵ /g soil	5.23	4.75	4.64	4.52	4.16	4.32
36J13	10 ⁵	5.34	4.54	4.35	4.32	3.97	4.70
37J10	10 ⁵	5.42	4.34	4.62	4.21	3.84	3.92
B23	10 ⁷	7.68	6.32	6.20	5.87	4.89	4.95
B7079	10 ⁷	7.74	6.21	6.31	4.13	4.72	4.46
P4049	10 ⁷	7.67	6.32	6.18	6.21	5.32	4.76

Table 7-4. Effects of seed coating with selected antagonistics on incidence of Phytophthora blight of red pepper plants in artificially infected soil in the green house

Antagonists	Application	No. of diseased plants(/15) after				
		1 week	2	3	4	5
24K5(<i>Trichoderma</i> sp.)	10 ⁸ spore/ml	9	10	12	12	12(80.0%)
	10 ⁶	10	10	12	12	13(86.6%)
	10 ⁴	13	14	14	15	15(100%)
25J1(<i>Trichoderma</i> sp.)	10 ⁸	6	6	8	8	9(60.0%)
	10 ⁶	9	10	11	11	12(80.0%)
	10 ⁴	10	11	12	12	12(80.0%)
35J15(<i>Trichoderma</i> sp.)	10 ⁸	9	10	10	10	10(66.7%)
	10 ⁶	10	10	10	10	10(66.7%)
	10 ⁴	13	13	13	14	14(93.3%)
36J13(<i>Trichoderma</i> sp.)	10 ⁸	10	10	10	10	11(73.3%)
	10 ⁶	11	12	12	12	12(80.0%)
	10 ⁴	12	14	14	14	14(93.3%)
37J10(<i>Trichoderma</i> sp.)	10 ⁸	9	9	10	10	10(66.7%)
	10 ⁶	10	11	11	11	11(73.3%)
	10 ⁴	11	11	11	11	11(73.3%)
B23(<i>Bacillus</i> sp.)	10 ⁸ cell/ml	7	8	9	9	9(60.0%)
	10 ⁶	8	9	9	10	10(66.7%)
	10 ⁴	11	11	12	12	12(80.0%)
B7079(<i>Bacillus</i> sp.)	10 ⁸	8	9	9	9	9(60.0%)
	10 ⁶	10	10	11	11	11(73.3%)
	10 ⁴	12	13	13	13	13(86.7%)
LX5(<i>Bacillus</i> sp.)	10 ⁸	6	6	8	8	8(53.3%)
	10 ⁶	8	10	10	10	10(66.7%)
	10 ⁴	9	9	10	10	10(66.7%)
P2112(<i>Pseudomonas</i> sp.)	10 ⁸	6	6	7	7	7(46.7%)
	10 ⁶	7	7	7	7	7(46.7%)
	10 ⁴	10	10	11	11	11(73.3%)
P4049(<i>Pseudomonas</i> sp.)	10 ⁸	8	10	10	10	10(66.7%)
	10 ⁶	9	11	11	11	11(73.3%)
	10 ⁴	11	12	13	13	13(86.6%)
Water		15	15	15	15	15(100%)
Control coated seed		3	3	3	4	4(26.6%)
no coated seed		2	2	3	3	3(20.0%)

control : in no infected soil

Values are number of diseased plants in 3 replications planted of 5 plants in

Table 7-5. Growth of antagonistic fungi at 27°C for 6 days in potatodextrose broth containing various concentrations of each of the two fungicides

Antagonistic microorganisms	0	metalaxyl			metalaxyl-copper		
		1 ¹⁾	10	100	1	10	100
25J1	413 ²⁾	379	407	228	398	372	186
36J13	427	403	431	256	408	379	214
37J10	389	405	376	268	378	352	169

1) $\mu\text{g/ml}$ in potato dextrose broth.

2) dry weight of mycelium : mg.

Table 7-6. Growth of antagonistic bacteria at 27°C for 3 days in nutrient broth containing various concentrations of each of the two fungicides

Antagonistic microorganisms	0	metalaxyl			metalaxyl-copper		
		1 ¹⁾	10	100	1	10	100
B23	5.6 ²⁾	5.4	4.8	2.8	2.3	1.4	1.2
B7079	5.9	5.8	4.9	3.1	2.1	1.7	1.4
P4049	6.2	6.3	5.3	3.4	1.1	1.1	1.2

1) $\mu\text{g/ml}$ in 1/10 diluted nutrient broth.

2) number of cfu/ml ($\times 10^8$)

다. 길항미생물의 식물체에 미치는 영향 조사

길항미생물의 식물체에 미치는 영향을 알아보기 위하여 발아율 및 초기 생장을 조사하였다. 발아율은 *in vitro*와 온실에서 coating 처리한 종자를 사용하여 조사하였다. 즉, 생물방제균을 coating 처리한 종자의 발아율을 *in vitro*에서 발아상(27℃, 5,000lux, 16h.)을 사용하여 조사하였다. 발아 실험 상자(11×11×4cm)에 대조 coating 종자 및 생물방제균을 처리하여 coating한 종자를 각각 30개씩 파종 후 발아력을 조사한 결과 종자의 coating 처리가 발아에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(Fig. 7-4).



Fig. 7-4. Germination of pelleted red-pepper seeds. Five days after planting.

Table 7-7. Effect of seed coating with selected antagonistics on germination of red pepper plants in soil in the green house

	coated seed in no treated soil(C)	non coated seed in treated with antagonistics soil(T)
24K5(<i>Trichoderma</i> sp.)	21 ¹⁾	21
25J1(<i>Trichoderma</i> sp.)	23	24
35J15(<i>Trichoderma</i> sp.)	24	22
36J13(<i>Trichoderma</i> sp.)	23	22
37J10(<i>Trichoderma</i> sp.)	24	21
B23(<i>Bacillus</i> sp.)	21	22
B7079(<i>Bacillus</i> sp.)	24	22
LX5(<i>Bacillus</i> sp.)	23	21
P2112(<i>Pseudomonas</i> sp.)	23	22
P4049(<i>Pseudomonas</i> sp.)	22	22
Water control	24	23

1) Number of plants was examined 14 days after planting. Total of 25 seeds were planted.

생물방제균을 피막시킨 종자를 상토에 파종한 처리와 생물방제균의 배양토를 혼합하여 만든 상토(배양토:상토=1:99, w/w)에 피막처리를 하지 않은 종자를 각각 파종한 다음 온실에서 2주일 후 조사한 발아율은 모두 84%이상 되었으며, 처리간 및 생물방제균간 차이가 없어 생물방제균의 처리가 종자의 발아에 미치는 영향이 없음을 알 수 있었다(Table 7-7).

길항미생물의 식물체에 미치는 영향을 조사하기 위하여 4엽기의 건전묘를 생물방제균의 배양토를 혼합하여 만든 상토(배양토:상토=1:99, w/w)에 이식 후 양액을 균일하게 점적관수(Fig. 7-5)하면서 온실에서 90일간 재배 후(Fig. 7-6) 조사한 경경, 초장, 엽수, 엽면적, 화방수 및 뿌리의 생육을 조사한 결과는 Table 7-8과 Table 7-9에서 볼 수 있다.



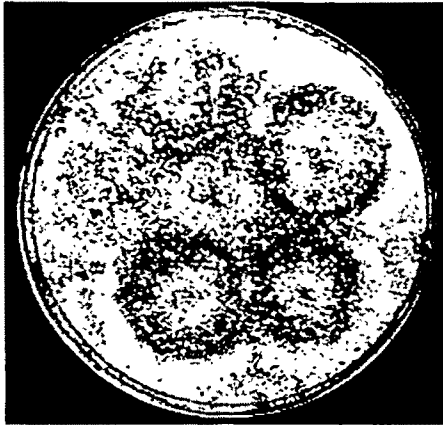
Fig. 7-5. Red-pepper plants of growing in green house.



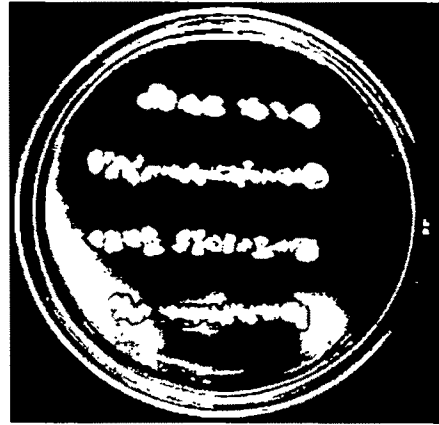
Fig. 7-6. Red-pepper plants. Ninety days after transplanting in soils mixed with antagonistic microorganisms.

Table 7-8. Effect of antagonists on growth of red pepper plants in the greenhouse in pot test

	diameter of stem (mm)		no. of leaves		height of plant (cm)		total leaf area (cm ²)		no. of flower	
	C ¹⁾	T ²⁾	C	T	C	T	C	T	C	T
24K5	2.88	3.66	14.8	18.8	18.6	22.8	51.32	82.52	4.8	6.4
25J1	3.22	3.46	15.8	17.6	20.4	22.8	70.06	82.26	4.6	5.6
35J15	2.96	3.62	13.8	19.4	19.6	23.8	54.14	88.26	3.6	8.4
36J13	3.78	3.52	18.8	18.2	22.8	21.6	78.30	93.04	6.6	6.4
37J10	3.42	3.44	15.8	16.8	20.6	23.0	62.10	72.16	5.4	6.2
B23	3.56	3.60	20.2	18.0	27.0	22.8	91.50	91.12	8.0	7.0
B7079	3.14	3.66	16.0	20.0	23.4	25.0	79.59	104.66	5.4	9.0
LX5	3.94	3.24	22.4	16.6	29.6	22.0	107.34	64.54	8.0	5.8
P2112	3.34	3.64	17.8	20.2	24.8	23.2	88.54	102.10	6.2	8.2
P4049	3.34	3.62	18.2	17.4	23.6	24.4	91.60	91.86	6.4	6.2
Water	3.30		15.6		23.0		69.12		5.0	
control	3.54		16.8		22.6		90.56		7.2	



36 J13



B 23

Fig. 7-7. Viability of pelleted antagonistic microorganisms on red-pepper seeds.

줄기의 직경, 총 엽수, 초장, 엽면적, 화방수와 뿌리, 줄기, 잎의 건물중과 입묘율을 조사한 결과 일관성 있는 결과는 얻을 수는 없었으나, 일반적으로 길항진균의 처리에서는 배양토에 파종했을 때의 생육이 coating종자를 파종한 것 보다 좋은 경향을 보였으며, 길항세균의 처리에서는 차이가 뚜렷하게 나타나지 않았다.

라. 생물방제균의 토양내 전달체계 조사

배양토 및 관주처리에 의한 생물방제균의 토양내 경시적인 밀도조사결과는 Table 7-3에서 보는 바와 같다. 생물방제균의 coating처리에 따른 생물방제균의 활력을 coating한 종자를 8℃ 냉장실에 보관하면서 1달 간격으로 꺼내어 배양기에 접종하여 조사한 결과 perlite를 첨가물로 사용하였을 때 1년까지 활력이 있는 것(Fig. 7-7)으로 확인되었으며(Table 7-9,10), 발아력도 유지되고 있음을 확인하였다.

Table 7-9. Effect of antagonists on growth of red pepper plants in the greenhouse in pot test

	dry weight of root (mg)		dry weight of stem (mg)		dry weight of leaves (mg)		total number no. of plants	
	C ¹⁾	T ²⁾	C	T	C	T	C	T
24K5	0.27	0.34	0.26	0.43	0.28	0.34	19	21
25J1	0.30	0.33	0.34	0.37	0.31	0.30	20	22
35J15	0.24	0.38	0.38	0.54	0.29	0.46	24	22
36J13	0.31	0.41	0.47	0.45	0.36	0.44	22	18
37J10	0.29	0.34	0.40	0.42	0.33	0.34	22	21
B23	0.34	0.35	0.44	0.44	0.47	0.44	19	19
B7079	0.30	0.41	0.40	0.45	0.35	0.47	24	19
LX5	0.34	0.30	0.37	0.34	0.47	0.34	22	21
P2112	0.32	0.35	0.45	0.47	0.43	0.45	22	20
P4049	0.29	0.34	0.22	0.42	0.35	0.45	21	20
Water control	0.29	0.36	0.40	0.49	0.39	0.47	23	22

1) C : coated with antagonists seed.

2) T : non coated seed planted in antagonists treated soil.

Values are averages of 5 replications planted of 5 seeds each.

Table 7-10. Activity of seed coated antagonistic microorganisms

Antagonist		Viability of pelleted microorganisms						
		1 ¹	2	3	4	5	6	12
25J1	Dipped seed	+	+	+	+	+	-	-
	Dry seed	+	+	+	+	+	+	+
36J13	Dipped seed	+	+	+	+	+	+	+
	Dry seed	+	+	+	+	+	+	+
37J10	Dipped seed	+	+	+	+	+	-	-
	Dry seed	+	+	+	+	+	+	-
B23	Dipped seed	+	+	+	+	+	+	+
	Dry seed	+	+	+	+	+	+	+
B7079	Dipped seed	+	+	+	+	+	+	-
	Dry seed	+	+	+	+	+	+	+
B4049	Dipped seed	+	+	+	+	+	+	-
	Dry seed	+	+	+	+	+	+	+

¹Month after seed coating with antagonistic microorganisms.

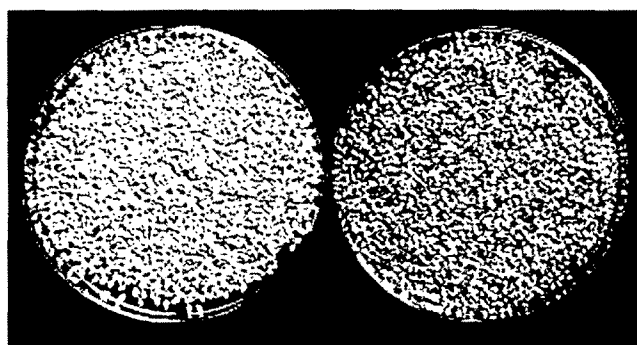
2. 경작지에서의 생물학적 방제법의 확립

가. 선발 방제균주 및 육종균주의 토양내 방제력 조사

1) 참깨

가) 종자의 coating처리

길항미생물을 참깨종자에 coating처리(Fig. 8-2)한 후 경시적(15일)으로 종자를 배양기에 접종(Fig. 8-3)하여 길항미생물의 활력을 조사한 결과 Table 8-1과 같으며 조사한 60일까지 길항미생물의 활력은 그대로 유지되고 있었다.



Pelleted seeds

Naked seeds

Fig. 8-2. Pelleted sesame seeds with spores of antagonistic fungi (36 J13).

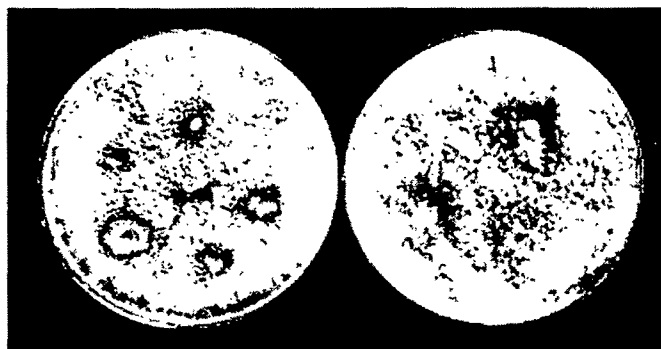


Fig. 8-3. Viability of pelleted antagonistic microorganisms on sesame seeds.

Table 8-1. Viability of seed coated antagonistic microorganisms

Antagonistic microorganisms	Colony formation			
	15 ^a	30	45	60
J1	+	+	+	+
J10	+	+	+	+
J13	+	+	+	+
J15	+	+	+	+
J16	+	+	+	+
J36	+	+	+	+
K5	+	+	+	+
K10	+	+	+	+
P2112	+	+	+	+
P4059	+	+	+	+
B7079	+	+	+	+
LX5	+	+	+	+
B23	+	+	+	+

a: Days after seed coating with antagonistic microorganisms.

종자에 coating 처리한 길항미생물의 활력을 확인한 후 발아시험상을 사용하여 발아에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 8-2와 같다. Coating 처리를 하지 않은 종자는 87.0%의 발아율을 보였으나 길항미생물을 첨가하지 않은 대조구와 길항미생물을 첨가하여 coating 한 종자에서는 이보다 낮은 74.1, 79.6 및 81.5%의 발아율을 보였다.

나) 방제력 검증시험

길항미생물을 coating한 종자를 실험포장에 파종하여 입묘율을 조사하고 경시적으로 토양전염성병의 발생상황을 조사하여 길항미생물에 의한 병발생억제효과를 조사하기 위하여 5월 18일에 파종하였으나, 대조구를 비롯한 전체 처리구에서 입묘율이 극히 불량하여 결과를 얻지 못하였다. 따라서 실험포장을 정리한 다음 7월 6일에 2차로 다시 파종하여 실험을 실시하였다. 그러나 토양전염성병이 전혀 발생되지 않아 처리간 차이를 확인할 수 없었다.

Table 8-2. Effect of seed coating of sesame on germination

Antagonistic microorganisms	No. seeds planted	Number of germination	Germination (%)
J1	54	43	79.6
J10	54	44	81.5
control	54	40	74.1
non coated seed	54	47	87.0

a: Days after seed coating with antagonistic microorganisms.

1) 고추

가) 병발생 억제력 검증시험 (1차)

고추의 역병발생은 이병토양을 집중한 경산시 진량면 대구대학교 포장에서만 관찰이 되었다. 건전묘를 5월 9일에 이식한 다음 7월 20일 까지 재배하면서 1차 포장실험을 수행하였다. 이식 후 60일경에는 전체 처리구에서 80% 이상 역병이 발생(Fig. 8-4)하여 생육조사를 실시하고 포장을 정리한 다음 2차 포장실험을 실시하였다.



Fig. 8-4. Diseased plants of red-pepper. 56 days after planting.

이식 후 1주일 간격으로 역병의 발생정도를 조사한 결과는 Table 8-3, 8-4와 같다. 진량면의 포장에서는 무처리의 경우 정식 28일 후에는 40%의 이병율을 보였으나 길항미생물의 처리구에서는 18~27%의 이병율을 보이고 있어 병발생억제효과가 있음을 나타내었다. 또한 경시적인 차이에서 보면 병의 발생도 지연되고 있음을 나타내었다. 7주 후에는 P2112균주와 B7079균주처리에서 무처리의 81.5% 보다 낮은 66.7%와 64.8%의 이병율을 보였으며, 8주 후에는 전처리구에서 80%이상의 이병율을 보여 길항미생에 의한 방제효과가 인정되지 않았다. 동일한 기간 동안 청통면의 농가포장에서는 역병이 전혀 발생하지 않아 길항미생물의 처리에 의한 역병의 방제효과를 관행재배구와 비교할 수 없었다.

이식 70일 후에 각 처리구에서 역병에 이병되지 않은 건전식물(Fig. 8-5)의 초장과 경경, 지상부 식물체의 생체중, 고추열매 수 및 무게 등을 조사하여 길항미생물이 식물체의 성장에 미치는 영향을 평가하였다.

진량면 대구대학교 포장의 경우 정식할 때 농약을 관주처리한 구의 초장이 다른 처리구에 비해서 큰 경향을 보였으나, 처리간 조사한 경경, 고추열매 수 및 무게에는 차이가 없는 경향을 보여 길항미생물의 처리가 식물의 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었다. 그러나 청통면의 포장에서는 길항세균인 P2112균주를 처리한 구의 식물체가 다른 처리구에 비하여 생육이 좋은 경향을 보였다.

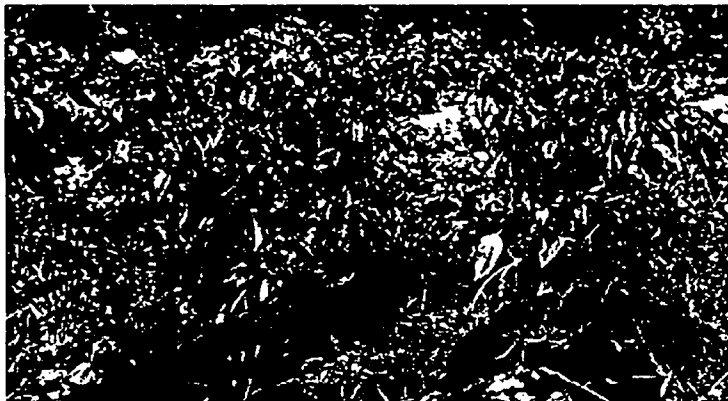


Fig. 8-5. Health plants of red-pepper (Jinryang-myun).

Table 8-3. Effect of antagonistic microorganisms on disease incidence Phytophthora blight in red pepper plants (Jinryang-myun)

Antagonistic microorganisms	Number of plant	Number of disease plants							
		7 ^a	28	21	28	35	42	49	56
J 1	54	0	0	4	15	18	31	39	46(85.2%)
J15	54	0	2	8	14	17	33	40	45(83.3%)
P2112	54	0	1	6	15	23	30	36	45(83.3%)
LX5	54	0	0	3	12	21	35	43	50(92.6%)
B7049	54	0	0	5	10	17	32	35	48(88.9%)
Fungicide	54	0	0	4	14	21	35	41	47(87.0%)
Control	54	05	5	12	22	27	41	44	48(88.9%)

a: Days after planting.

Table 8-4. Effect of antagonistic microorganisms on disease incidence
Phytophthora blight in red pepper plants (Chungtong-myun)

Antagonistic microorganisms	Number of plant	Number of diseased plants							
		7 ^a	14	21	28	35	42	49	56
J 1	30	0	0	0	0	0	0	0	0
J10	30	0	0	0	0	0	0	0	0
J13	30	0	0	0	0	0	0	0	0
J15	30	0	0	0	0	0	0	0	0
J16	30	0	0	0	0	0	0	0	0
J36	30	0	0	0	0	0	0	0	0
K 5	30	0	0	0	0	0	0	0	0
K10	30	0	0	0	0	0	0	0	0
P2112	30	0	0	0	0	0	0	0	0
P4059	30	0	0	0	0	0	0	0	0
B7079	30	0	0	0	0	0	0	0	0
LX5	30	0	0	0	0	0	0	0	0
B 23	30	0	0	0	0	0	0	0	0
J1+B7079	30	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungicide	30	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	30	0	0	0	0	0	0	0	0

a: Days after planting.

Table 8-5. Effect of antagonistic microorganisms on growth of red pepper in field test
(Jinryang-myun)

Antagonistic microorganisms	height of plant (cm)	diameter of stem (mm)	fruit	
			total number	total fresh weight (g)
J 1	77.8 ± 7.3	16.8 ± 3.0	44.5 ± 11.0	264.5 ± 66.2
J15	80.3 ± 12.1	15.6 ± 1.4	40.7 ± 12.5	166.8 ± 21.9
P2112	82.5 ± 7.1	16.0 ± 2.2	33.8 ± 19.6	136.1 ± 54.8
LX5	81.3 ± 10.3	16.5 ± 3.5	34.7 ± 13.1	176.0 ± 26.7
B7049	82.4 ± 2.2	15.0 ± 1.6	33.3 ± 4.5	182.5 ± 70.9
Fungicide	86.8 ± 5.9	18.5 ± 3.6	44.7 ± 12.4	232.3 ± 51.1
Control	82.8 ± 3.0	16.1 ± 2.1	38.5 ± 14.9	191.7 ± 41.7

Seventy days after planting.

Table 8-6. Effect of antagonistic microorganisms on growth of red pepper in field test

(Chungtong-myun)

Antagonistic microorganisms	height of plant (cm)	diameter of stem(mm)	fruit	
			total number	total fresh weight (g)
J 1	78.3± 2.9	14.3±1.5	33.7± 7.2	301.9±101.4
J10	81.0± 6.1	16.0±4.4	50.7± 6.5	454.1±111.7
J13	80.7±10.1	17.0±2.0	40.3± 8.7	373.4± 81.7
J15	86.0± 3.0	17.5±2.1	41.0± 1.7	447.9± 2.9
J16	78.3± 5.5	13.3±1.2	31.7± 9.3	367.0±125.7
J36	75.3± 6.8	15.4±3.7	40.0± 8.0	381.6± 94.1
K 5	82.7± 6.1	16.8±2.4	44.0± 7.0	457.0± 66.7
K10	75.3± 4.0	15.9±2.2	43.3±11.2	359.1±105.9
P2112	88.8± 9.3	19.0±2.6	51.0±10.0	582.3± 50.0
P4059	82.7± 7.5	17.3±2.3	37.0±10.5	372.9± 40.0
B7079	89.0± 5.0	15.2±1.1	50.7±24.0	471.8±138.6
LX5	85.7± 9.5	15.8±2.0	29.3± 3.8	416.4± 38.5
B23	75.7± 6.7	13.7±0.8	25.7± 5.5	303.4± 51.9
J1+B7079	80.7± 3.0	13.1±2.3	25.0± 9.6	297.2± 73.5
Fungicide	78.0± 2.0	12.9±0.1	24.9± 3.8	261.6± 24.7
Control	80.7± 6.8	15.1±2.3	45.0± 9.6	397.2± 73.5

Seventy days after planting.

나) 병발생 억제력 검증시험 (2차)

7월 20일에 1차 실험포장에서 역병의 발생정도와 건전식물의 생육을 조사한 다음 포장을 정리하고 2차 실험을 실시하였다. 2차 실험에서는 고추 이식시 길항균의 배양토를 벼 육묘용 상토와 99:1(W/W)로 혼합하여 한 주당 500g씩 사용하여 정식하였다. 이때 길항진균의 농도는 약 10^5 spore/g soil 였으며, 길항세균의 농도는 10^7 cell/g soil로 조절하여 처리하였다(Fig 8-6).

이식 후 1주일 간격으로 역병의 발생정도를 조사한 결과는 Table 7과 같다. 무처리에서는 이식 1주일 후에 50.3% 역병이 발생하였으나, 길항미생물의 처리 구에서는 PFJ13+J16균주의 처리에서 16.7% 이병되었고 다른 균주의 처리구에서는 거의 이병되지 않았다(Fig. 8-7).

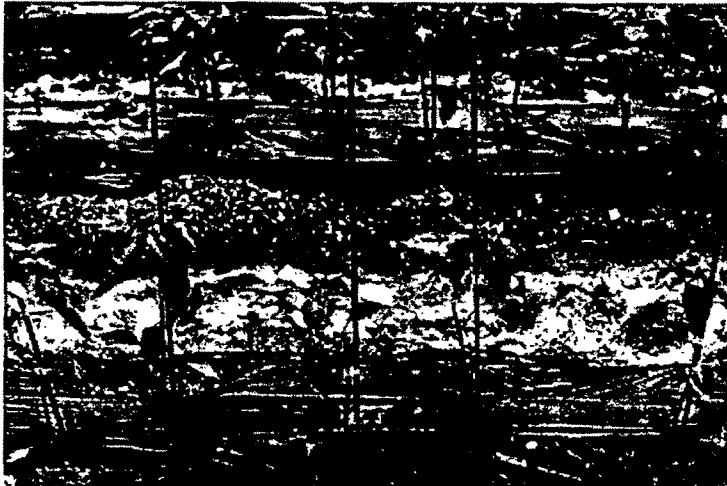


Fig. 8-6. Plants of red pepper. Five days after planting.

Table 8-7. Effect of antagonistic microorganisms on disease incidence
Phytophthora blight in red pepper plants (Jinryang-myun)

Antagonistic microorganisms	Number of plant	Number of disease plants					
		7 ^a	14	21	28	35	42
J 1	30	0	1	2	4	9(30%)	30(100%)
J10	30	2	4	5	19	28(93.3%)	30(100%)
J13	30	0	1	3	8	12(40%)	29(96.7%)
J15	30	0	0	1	10	11(36.7%)	30(100%)
J16	30	0	0	0	3	7(23.3%)	30(100%)
PFJ1 + J13	30	0	0	0	4	6(20%)	27(90%)
PFJ13 + J16	30	5	8	13	21	25(83.3%)	30(100%)
K 5	30	0	0	0	2	3(10%)	22(73.3%)
K 9	30	2	3	4	11	15(50%)	30(100%)
K10	30	1	1	2	10	12(40%)	26(86.7%)
B23	30	0	1	3	14	26(86.7%)	30(100%)
B7079	30	0	0	0	2	8(26.7%)	25(83.3%)
BLX5	30	1	4	5	16	23(76.7%)	30(100%)
P4059	30	0	0	0	0	11(36.7%)	22(73.3%)
P2112	30	0	0	2	18	22(73.3%)	24(80%)
Fungicide	30	0	0	0	4	9(30%)	30(100%)
Control	30	16	19	21	30	30(100%)	30(100%)

a: Days after planting.

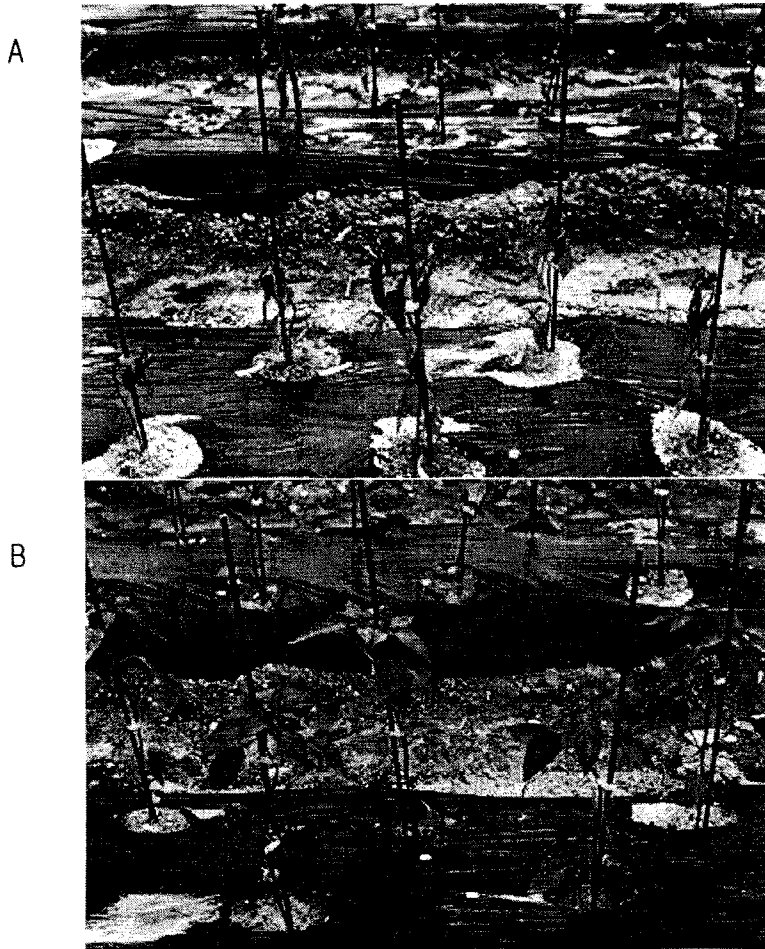
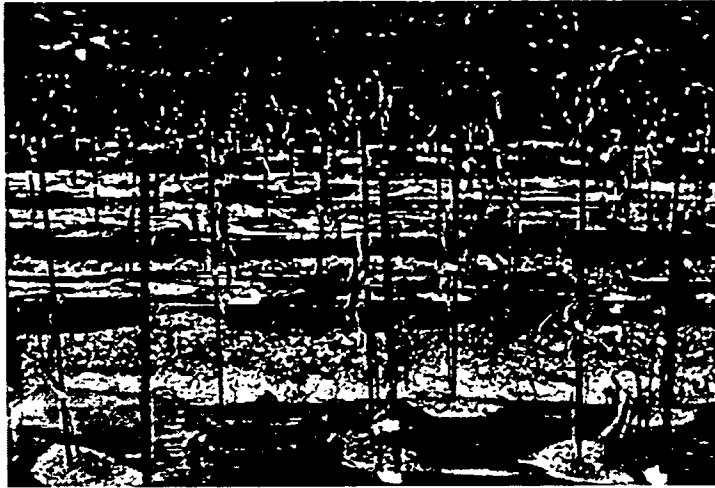


Fig. 8-7. Diseased (A) and health (B) plants of red-pepper. Seven days after planting. A; Control. B : Treated with antagonistic fungi (K5).

무처리구에서는 병 진전 속도가 매우 빨리 진행되어 2주 후에 이미 63.3%의 이병율을 보였으며, 4주 후에는 100% 이병되었다. 그러나 J1, J16, PFJ1+J13, K5, B7079, P4059균주의 처리구에서는 농약을 처리한 구와 유사하게 13.3% 정도의 이병률을 보여 길항미생물의 처리에 의해 병발생이 억제됨을 뚜렷하게 보였다(Fig. 8-8). 특히 잦은 비와 많은 강수량에 의해 역병의 발생이 급격히 진전된 후에 조사한 5주 후에도 이들 균주들의 처리구에서는 비교적 낮은 이병율을 보여 효과가 지속되고 있음을 알 수 있었다. 그러나 그 이후에는 실험포장 전체가 급격히 이병되어 6주 후에는 K5 균주와 P7079균주의 처리구에서도 73.3%의 이병율을 보였고, 다른 처리구에서는 80%~100% 이병율을 보여 더 이상 길항진균에 의한 효과가 지속되지 않는 것으로 판단되었다.

A



B



Fig. 8-8. Diseased (A) and health (B) plants of red-pepper. 14 days after planting. A; Control. B : Treated with antagonistic fungi (K5).

정식 6주 후에 각 처리구에서 역병에 이병되지 않은 건전식물이 3개 이상 남아있는 식물체만 대상으로 하여 초장과 경경, 지상부 식물체의 생체중, 고추열매 수 및 무게 등을 조사하여 길항미생물이 식물체의 생장에 미치는 영향을 1차 실험에서와 같이 조사한 결과는 Table 8-8과 같다. 처리구간에 뚜렷한 차이는 인정할 수 없었으나 2차실험에서도 P2112균주의 처리구 식물의 초장이 다른 처리구에 비해서 약간 큰 경향을 보였다. 1차 실험과 비교하였을 때 경경과 고추 열매의 수 및 무게가 매우 낮은 현상은 재배시기와 재배기간에 기인한 것으로 사료된다.

Table 8-8. Effect of antagonistic microorganisms on growth of red pepper in field test

(Jinryang-myun)

Antagonistic microorganisms	height of plant (cm)	diameter of stem(mm)	dry weight (g)		fruit	
			top	root	total number	total fresh weight (g)
PFJ1 + J13	88.8±2.1	10.4±0.4	26.9±2.8	2.2±0.2	30.0±3.1	74.3±16.0
K 5	83.0±9.2	10.0±0.4	25.3±3.6	2.0±0.4	23.3±1.2	82.1± 7.3
K10	93.7±1.5	11.0±0.2	33.8±3.2	2.4±0.1	23.8±3.1	117.3±31.0
B7079	93.0±3.6	9.2±1.8	28.1±1.1	2.5±0.5	25.0±5.1	105.2±24.8
P4059	91.0±3.0	10.9±0.5	29.1±3.9	2.9±0.2	29.7±2.1	101.0±14.0
P2112	96.7±7.8	11.1±1.5	39.5±6.7	2.6±0.4	29.0±6.6	108.4±26.4

42 days after planting.

나. 토양에서 생물방제균의 토양전달체계

토양에서 생물방제균의 토양전달체계를 조사하기 위하여 경시적으로 근권토양을 채취하여 10.0g을 취한 40ml의 멸균수에 희석하여 현탁액을 만든 다음 선택배지를 사용하여 평판희석법(10 fold dilution plating method)으로 시료 1.0g당 처리한 생물방제균의 밀도를 측정된 결과는 Table 8-9와 같다. 이식 10일 후 조사한 생물방제균의 밀도는 최초 처리시 밀도보다 전체적으로 감소하는 경향을 보였으나 *Trichoderma* sp.인 K5 균주는 증가한 결과를 보였다. 처리 20일 후에는 처리 10일 후 보다 더 감소한 경향을 보였으며, 그 이후에는 밀도가 유지되거나 급격히 감소한 결과를 보였으며 균주간 차이가 있었다. 특히 병발생억제 효과가 있었던 J1 균주를 비롯한 J13, J16, PFJ1+J13, K5, B7079, P4059 및 P2112 균주 등은 감소되는 경향이 다른 균주에 비하여 완만하였다.

관주처리에 의한 방법으로 길항미생물을 처리한 청통면의 포장에서 조사한 길항미생물의 밀도변화조사는 Table 8-10에서 볼 수 있다. 처리한 다음 시간이 경과할수록 감소하는 경향을 보였으며, 실험포장의 조건은 다르지만 길항미생물을 토양과 혼합하여 배양토를 만들어 처리한 방법과 비교하였을 때 보다 비교적 낮은 CFU를 나타내었다. 균주간 정착능력의 차이는 있었으며 *Trichoderma* sp.인 K5 균주와 *Bacillus* sp.인 B7079 균주의 CFU가 가장 높았다.

토양의 물리·화학적 성질에 따라 생물방제균의 토양내 정착과 식물병발생 억제효과에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 조사한 실험포장 토양의 물리·화학적 특성은 Table 8-11 및 8-12와 같다. 두 실험포장 모두 양토로 분석되었으며, 토양의

pH는 일반적인 우리나라 토양에 비하여 높은 경향을 보였다. Ca이 진량면 토양에서 청통면의 포장보다 높았으나 다른 물리·화학적 성질에 특이한 차이는 없었다. 이와같이 토양의 성질에 차이가 없으면서 역병의 발생에 차이가 있었던 것은 진량면의 대구대학교 포장은 인위적으로 이병토를 만들었기 때문인 것으로 판단할 수 있으며, 청통면의 포장은 고추를 처음 재배하는 포장이기 때문에 발병이 되지 않은 것으로 사료된다.

Table 8-9. Colony forming unit (CFU) of antagonistic microorganisms in rhizosphere soil of red pepper (Jinryang-myun)

Antagonistic fungi	application	Log no. of cfu/g soil after			
		10days*	20	30	40
J 1	5.0	5.2±0.91	4.2±0.32	3.6±0.48	2.6±0.12
J10	5.0	4.0±0.64	3.2±0.28	1.2±0.12	1.2±0.31
J13	5.0	4.4±0.72	4.4±2.40	3.6±0.20	3.3±0.15
J15	5.0	4.2±0.47	4.3±0.48	0.8±0.10	0.6±0.02
J16	5.0	5.2±0.55	3.7±0.16	2.8±0.12	2.8±0.33
PFJ 1+J13	5.0	4.6±0.67	3.9±0.64	2.8±0.16	2.3±0.24
PFJ13+J16	5.0	4.2±0.23	4.2±0.18	3.2±0.13	1.4±0.21
K 5	5.0	5.6±0.12	4.0±1.32	4.0±0.52	4.1±0.64
K 9	5.0	3.2±0.26	3.4±0.41	1.2±0.15	1.0±0.13
K10	5.0	4.3±0.11	3.7±0.12	3.0±0.25	2.9±0.46
Fungicide	-	0.4±0.27	0.2±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
Control	-	0.4±0.04	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01

Antagonistic bacteria	application	Log no. of cfu/g soil after			
		10days	20	30	40
B23	7.0	6.0±0.53	2.8±0.30	2.2±0.62	1.5±0.31
B7079	7.0	5.5±1.06	4.3±0.25	3.6±1.34	2.8±0.67
BLX5	7.0	3.5±0.55	1.0±0.15	2.4±0.86	1.6±0.43
P4059	7.0	6.7±1.57	4.0±0.18	3.7±0.11	2.4±0.55
P2112	7.0	5.0±0.56	3.4±0.46	3.3±1.63	2.0±0.80
Fungicide	-	0.5±0.02	0.5±0.20	0.4±0.17	0.5±0.01
Control	-	0.5±0.03	0.6±0.26	0.5±0.36	0.5±0.06

* days after planting

Table 8-10. Colony forming unit (CFU) of antagonistic microorganisms in rhizosphere soil of red pepper (Chungtong-myun)

Antagonistic fungi	applicatio n	Log no. of cfu/g soil after			
		10days*	20	30	40
J 1	5.0, 500ml	3.7±0.92	2.7±1.28	2.6±0.42	2.1±0.27
J10	5.0, 500ml	4.2±0.76	3.4±0.69	1.3±0.51	0.4±0.11
J13	5.0, 500ml	3.2±0.82	2.1±0.47	2.0±0.26	1.7±0.53
J15	5.0, 500ml	3.7±0.93	2.5±0.98	1.6±0.38	1.3±0.31
J16	5.0, 500ml	3.1±0.78	2.7±0.72	1.7±0.15	1.5±0.69
J36	5.0, 500ml	4.6±1.02	2.1±1.85	1.9±0.67	1.9±0.82
K 5	5.0, 500ml	4.3±0.92	3.6±0.62	3.3±0.42	3.4±1.01
K10	5.0, 500ml	4.6±1.13	2.8±0.94	2.9±0.87	3.1±0.93
J1+B7079	5.0, 500ml	3.4±0.95	2.7±0.52	1.9±0.34	2.1±0.30
Fungicide	-	0.3±0.02	0.2±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
Control	-	0.2±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01

Antagonistic bacteria	applicatio n	Log no. of cfu/g soil after			
		10days	20	30	40
P2112	7.0, 300ml	4.7±1.03	3.1±1.02	3.0±0.94	2.5±0.91
P4059	7.0, 300ml	5.6±1.32	3.3±0.94	2.1±0.87	0.8±0.72
B7079	7.0, 300ml	5.7±1.67	4.1±1.56	3.6±1.05	3.6±1.05
LX5	7.0, 300ml	3.8±1.45	2.9±1.04	1.9±0.94	1.2±0.77
B23	7.0, 300ml	4.1±0.94	2.8±0.97	1.7±0.82	0.9±0.63
J1+B7079	7.0, 300ml	5.7±1.42	3.9±0.83	3.6±1.05	3.3±0.92
Fungicide	-	0.4±0.01	0.4±0.19	0.4±0.13	0.5±0.11
Control	-	0.4±0.02	0.4±0.31	0.5±0.25	0.5±0.46

* days after planting

Table 8-11. Physical property of soil

Field	soil texture	clay(%)	silt(%)	sand(%)	capacity to retain water (Bar, %)		
					0.1	0.33	15
Jinryang-myun	양토	16.69±1.73	42.4±0.77	40.9±1.14	24.33±1.28	24.09±1.20	14.7±0.81
Chungdong-myun	양토	15.75±0.32	38.2±7.52	46.0±7.83	23.64±4.10	22.99±3.53	14.13±3.24

Table 8-12. Chemical property of soil

Field	pH (1:5 H ₂ O)	organic matter (%)	total nitrogen (%)	cmol(+)/kg					BS (%)	P (ppm)
				CEC	Ca	Mg	K	Na		
Jinryang-myun	7.2±0.2	3.0±0.5	0.1±0.0	17.8 ±0.4	17.1 ±2.7	3.8 ±0.2	0.8 ±0.3	0.1 ±0.0	124.7 ±17.7	212.64 ±186.62
Chungdong-myun	6.5±0.6	2.8±1.3	0.1±0.1	15.3 ±6.1	11.0 ±7.4	3.5 ±1.2	1.0 ±0.2	0.2 ±0.0	96.5 ±24.6	355.09 ±137.1

CEC; cation exchange capacity,

BS; base saturation,

P; available phosphate,

기후조건에 따른 역병의 발생상태를 비교검토하기 위하여 참고로 기상조건을 검토하였다. 고추 이식일인 5월 10일부터 8월 31일 까지의 기상 자료(Table 8-13)를 토대로하여 분석할 경우, 특히 진랑면 포장에서 강우가 집중적이었던 8월 8일 이후 역병이 급격히 발생하여 강수량과 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. 그러나 길항미생물의 밀도변화와 실험한 올해 한 해의 data만으로는 정확한 분석이 불가능하였다.

Table 8-13. Meteorological data on Taegu area

Date	Mean temperature(°C)	Humidity(%)	Rainfall amount(0.1mm)
5. 10	16.6	68	13
11	12.1	87	385
12	14.7	75	117
13	18.0	56	
14	19.0	52	
15	18.4	52	
16	17.6	84	246
17	20.0	61	
18	20.8	59	
19	22.5	52	
20	22.8	50	
21	23.0	46	
22	23.4	46	
23	24.1	51	
24	21.9	64	
25	19.0	59	
26	21.2	46	
27	22.2	46	
28	20.3	60	
29	22.3	56	
30	22.1	35	
31	21.1	37	
6. 1	19.8	57	5
2	16.9	82	208
3	19.5	64	2
4	16.3	73	0
5	15.5	79	8
6	16.7	62	
7	18.6	55	
8	20.8	58	
9	19.6	79	54
10	20.5	73	25
11	21.6	65	
12	20.9	66	0
13	19.1	81	151
14	18.7	77	140
15	22.3	67	
16	23.0	72	18
17	22.6	67	
18	21.6	68	
19	20.8	80	69
20	22.9	70	
21	21.8	69	
22	20.9	60	
23	20.3	61	
24	20.3	77	172
25	22.7	87	368
26	24.3	81	165
27	23.6	83	446
28	23.9	80	54
29	27.5	67	
30	25.5	78	105

Date	Mean Temperature(℃)	Humidity(%)	Rainfall amount(0.1mm)
7. 1	26.1	67	32
2	25.5	77	22
3	27.1	71	176
4	24.2	73	157
5	26.7	69	38
6	28.3	66	
7	29.3	61	
8	30.1	59	
9	30.5	58	
10	29.0	70	0
11	25.7	81	32
12	23.5	72	
13	22.5	64	
14	23.0	70	13
15	22.2	82	190
16	23.2	79	22
17	21.8	67	
18	22.0	72	90
19	25.1	68	150
20	26.1	66	0
21	23.6	82	204
22	23.2	75	95
23	24.4	69	
24	24.3	66	
25	23.4	81	141
26	23.5	87	36
27	25.2	77	176
28	25.3	78	3
29	25.6	74	0
30	25.0	74	0
31	24.7	77	32
8. 1	27.2	76	680
2	25.9	83	68
3	28.3	74	9
4	28.6	71	1
5	29.9	65	
6	29.3	72	2
7	28.8	69	
8	27.5	77	221
9	27.2	79	12
10	27.1	79	5
11	28.0	74	48
12	26.1	81	91
13	25.2	84	562
14	26.6	79	22
15	27.2	82	153
16	23.3	88	999
17	23.8	79	10
18	23.2	88	498
19	26.0	67	
20	26.2	68	0
21	25.7	72	39
22	25.8	75	54
23	25.7	75	5
24	26.2	62	
25	25.6	59	
26	24.8	64	
27	23.5	74	
28	23.9	68	
29	24.0	67	
30	23.7	58	
31	23.8	66	0

3. 환경농업에서의 생물방제법의 실용화

가. 실험포장의 물리·화학적 성질

환경농업이 행해져 왔던 경작지에서 생물방제균의 정착능력과 병발생억제력 등을 조사하기 위해 선정한 시험포장 토양의 물리·화학적 성질은 Table 9-1, 9-2와 같다. 토성은 양토로 분석되었으며, 기타 분석한 토양의 물리적성질은 다른 두곳의 시험포장과 유사하였다. 토양의 pH는 6.4로 진량면의 포장에 비해서는 낮았으나 우리나라의 일반토양 보다는 높았다. 유기물함량은 토양을 채집한 3곳 중에서 한곳의 토양이 6.11%로 현저히 높았으며 두 곳의 토양에서도 2.59%와 2.54%를 나타내어 다른 포장과 유사하였으나 일반토양보다는 매우 높았다. 전질소함량도 높은 경향을 보였으며, Ca, Mg, K, Na 및 B는 1곳을 제외한 다른 2장소에서 채취한 토양은 일반적인 평균 경향을 나타내었다. 그러나 유효인산의 함량이 일반토양에 비하여 현저히 높았다.

Table 9-1. Physical property of soil

Field	soil texture	clay(%)	silt(%)	sand(%)	capacity to retain water (Bar, %)			
					0.1	0.33	15	
Seo-myun	1	양토	16.30	41.02	42.68	34.76	30.45	13.28
	2	양토	15.87	43.78	40.35	24.00	23.12	9.72
	3	양토	16.78	44.95	38.27	27.58	24.98	9.54
	mean	양토	16.32±0.46	43.3±2.01	40.4±2.21	28.82±5.51	26.23±3.81	10.93±2.11
Jinryang-myun		양토	16.69±1.73	42.4±0.77	40.9±1.14	24.33±1.28	24.09±1.20	14.70±0.81
Chungdong-myun		양토	15.75±0.32	38.2±7.52	46.0±7.83	23.64±4.10	22.99±3.53	14.13±3.24

Table 9-2. Chemical property of soil

Field	pH (1:5 H ₂ O)	organic matter (%)	total nitrogen (%)	cmol(+)/kg					BS (%)	P (ppm)	
				CEC	Ca	Mg	K	Na			
Seo- myun	1	6.25	6.11	0.27	19.55	12.83	8.22	0.89	0.78	116.41	917.09
	2	6.32	2.59	0.14	14.77	7.39	2.86	0.66	0.06	74.31	327.57
	2	6.59	2.54	0.16	14.53	8.46	2.57	0.51	0.07	80.06	528.15
	mean	6.4±0.2	3.3±2.0	0.2±0.1	16.3 ±2.8	9.6 ±2.9	4.6 ±3.2	0.7 ±0.2	0.3 ±0.4	90.3 ±22.8	590.94 ±99.70
Jinryang- myun	7.2±0.2	3.0±0.5	0.1±0.0	17.8 ±0.4	17.1 ±2.7	3.8 ±0.2	0.8 ±0.3	0.1 ±0.0	124.7 ±17.7	212.64 ±186.62	
Chungdong- myun	6.5±0.6	2.8±1.3	0.1±0.1	15.3 ±6.1	11.0 ±7.4	3.5 ±1.2	1.0 ±0.2	0.2 ±0.0	96.5 ±24.6	355.09 ±137.1	

CEC; cation exchange capacity,

BS; base saturation,

P; available phosphate,

나. 길항미생물의 병발생억제효과 검증

이식 후 경시적으로 역병의 발생을 조사한 결과는 Table 9-3과 같다. 이식 후 70 일 까지 조사한 결과 전체포장에서 역병이 발생되지 않아 길항미생물에 의한 병발생 억제효과를 검증할 수 없었다. 이러한 결과는 90일 후의 조사에서도 동일하게 나타났다.

Table 9-3. Effect of antagonistic microorganisms on disease incidence
Phytophthora blight in red pepper plants (Seo-myun)

Antagonistic microorganisms	Number of plant	Number of diseased plants						
		10 ^a	20	30	40	50	60	70
J 1	30	0	0	0	0	0	0	0
J10	30	0	0	0	0	0	0	0
J13	30	0	0	0	0	0	0	0
J15	30	0	0	0	0	0	0	0
J16	30	0	0	0	0	0	0	0
J36	30	0	0	0	0	0	0	0
K 5	30	0	0	0	0	0	0	0
K10	30	0	0	0	0	0	0	0
P2112	30	0	0	0	0	0	0	0
P4059	30	0	0	0	0	0	0	0
B7079	30	0	0	0	0	0	0	0
LX5	30	0	0	0	0	0	0	0
B 23	30	0	0	0	0	0	0	0
J1+B7079	30	0	0	0	0	0	0	0
PFJ1 + J13	30	0	0	0	0	0	0	0
PFJ13 + J16	30	0	0	0	0	0	0	0
Fungicide	30	0	0	0	0	0	0	0
Control	30	0	0	0	0	0	0	0

a: Days after planting.

다. 길항미생물의 식물체 생장에 미치는 영향

역병이 발생되지 않았기 때문에 처리한 길항미생물의 식물병발생 억제력을 검정할 수 없었지만 생물방제균이 식물체의 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 청통면의 포장과 비교하기 위하여 각 처리별 난괴법 3반복으로 배치한 실험구에서 임의로 3주씩 이식 70일 후에 식물을 채취하여 식물체의 생육상태를 조사한 결과는 Table 9-4와 같다. 조사한 초장 및 경형은 처리간 유의성이 없었으나, 고추의 열매 수는 25개에서 48개 까지 조사되었다. 또한 전체 고추열매의 생체중은 280g에서 411g까지 조사되었다. 이와같은 차이가 처리한 길항미생물에 기인한 것으로 판단할 수는 없었다. 그러나 대조구와만 비교할 때 K5, K10, P4059, B7079 및 B7079와 J1 균주의 혼합처리구에서 조사한 초장 및 고추열매 수 및 고추의 생체중이 더 높은 경향을 보였다.

Table 9-4. Effect of antagonistic microorganisms on growth of red pepper in field test
(Seo-myun)

Antagonistic microorganisms	height of plant (cm)	diameter of stem(mm)	fruit	
			total number	total fresh weight (g)
J 1	76.0± 3.61	13.5±2.78	29.7± 12.01	313.4± 34.84
J10	80.3± 7.23	16.9±1.37	37.7± 11.37	369.2± 37.61
J13	76.7± 11.55	16.5±2.16	34.3± 3.21	359.7± 23.26
J15	82.7± 6.51	15.5±1.24	39.0± 1.73	374.6± 24.01
J16	78.7± 8.08	13.4±0.64	34.3± 4.93	331.3± 10.99
J36	75.7± 5.69	14.5±3.56	39.7± 6.66	353.2± 70.46
K 5	82.0± 9.00	15.4±3.33	43.7± 5.50	411.1± 6.83
K10	83.0± 7.00	17.9±1.95	44.0± 6.55	378.4± 33.52
P2112	74.0± 8.54	13.4±1.22	32.3± 3.51	291.4± 12.78
P4059	84.7± 8.14	14.0±1.05	49.0± 10.00	398.5± 25.74
B7079	85.3± 8.74	18.9±3.05	40.3± 8.02	370.9± 67.82
LX5	82.3± 2.08	17.5±3.12	38.0± 9.08	382.6± 21.36
B 23	78.7± 4.62	14.2±1.21	33.0± 10.00	291.2± 58.03
J1+B7079	87.0± 10.10	15.9±1.93	43.0± 10.10	385.6± 53.76
PFJ 1+J13	83.7± 7.77	16.3±1.37	26.3± 4.50	280.8± 22.26
PFJ13+J16	80.0± 10.00	14.1±2.10	28.0± 3.00	277.4± 33.66
Fungicide	82.7± 4.51	13.9±1.06	25.7± 5.51	299.3± 28.70
Control	78.0± 4.58	14.7±2.16	37.3± 8.33	335.2± 39.85

Seventy days after planting.

라. 길항미생물의 동태 조사

이식시 길항미생물을 처리한 다음 경시적으로 길항미생물의 정착력을 선택배지를 사용하여 CFU에 의해 조사한 결과는 Table 9-5와 같다. 청통면의 포장과 동일한 방법으로 고추 이식시 진균은 처음 10^5 spore/ml의 현탁액을 300ml씩 관주처리하였으며, 길항세균은 10^7 cell/ml의 현탁액을 300ml씩 관주처리 하였다. 이식 10일 후에 조사한 생물방제균의 밀도는 처리농도에 비하여 현저히 감소된 경향을 보여 정착력이 낮은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 서면포장에 이식 후 12일 동안 평균 온도가 20℃ 이상 유지되고 비가오지 않은 건조한 기상조건을 보였기 때문이라 사료된다. 처리 20일 후 부터는 균주간 밀도에 차이를 보였는데 특히 K5, P4059 및 B7079 균주의 밀도가 높게 나타나 이들 균주의 정착력이 다른 균주에 비하여 높은 것으로 나타났다.

이와 같은 결과를 청통면 및 진랑면의 포장에서 조사된 결과와 비교할 때 포장간 정착력에 큰 차이를 나타내지 않았으나, 균주간 정착력에는 유사한 경향을 나타내어 생물방제균의 정착력은 균주의 특성에 의해 차이가 있는 것으로 사료되었다.

Table 9-5. Colony forming unit (CFU) of antagonistic microorganisms in rhizosphere soil of red pepper (Seo-myun)

Antagonistic fungi	application	Log no. of cfu/g soil after			
		10days ^a	20	30	40
J 1	5.0, 500ml	3.7±0.72	2.1±0.61	1.8±0.31	2.0±0.16
J10	5.0, 500ml	3.1±1.01	2.2±0.34	2.0±0.42	1.4±0.22
J13	5.0, 500ml	3.5±0.62	2.9±0.51	2.6±0.63	1.8±0.55
J15	5.0, 500ml	3.2±0.55	2.9±0.43	2.4±0.35	1.9±0.63
J16	5.0, 500ml	3.4±0.93	2.8±0.24	2.1±0.24	1.8±0.27
J36	5.0, 500ml	4.0±0.76	3.1±1.00	2.4±0.36	1.9±0.43
K 5	5.0, 500ml	4.1±0.82	3.8±0.63	3.6±0.28	3.6±1.25
K10	5.0, 500ml	3.6±0.93	3.0±0.79	2.4±0.76	2.3±0.49
J1+B7079	5.0, 500ml	3.4±0.72	3.1±0.24	2.1±0.62	2.1±0.74
Fungicide	-	0.5±0.04	0.6±0.03	0.5±0.04	0.6±0.05
Control	-	0.6±0.04	0.7±0.05	0.6±0.05	0.6±0.06

Antagonistic bacteria	application	Log no. of cfu/g soil after			
		10days	20	30	40
P2112	7.0, 500ml	4.0±1.03	3.2±1.02	2.7±0.63	2.3±0.91
P4059	7.0, 500ml	4.2±1.32	3.9±0.94	3.6±0.72	3.1±0.72
B7079	7.0, 500ml	4.8±1.67	4.3±1.56	3.7±1.00	3.7±1.05
LX5	7.0, 500ml	3.1±1.45	2.6±1.04	1.7±0.46	1.4±0.77
B23	7.0, 500ml	2.0±0.94	1.5±0.97	1.4±0.48	0.9±0.63
J1+B7079	7.0, 500ml	2.7±1.42	2.4±0.83	2.2±0.62	2.1±0.52
Fungicide	-	0.5±0.13	0.5±0.19	0.6±0.11	0.5±0.25
Control	-	0.5±0.11	0.7±0.31	0.5±0.25	0.5±0.34

a, days after planting

제 4 장 결과 요약 및 고찰

제 1 절 결과 요약

가. 토착길항미생물의 분리, 선발 및 동정

1) 경북 경주, 영천, 경상지역의 해당지역 토양으로부터 증미, 황토, 왕겨를 이용한 새로운 토착 길항미생물의 채취, 분리법을 고안하여 우점력과 경쟁력이 큰 토착길항미생물을 분리 할 수 있었다.

2) 고추역병균 *Phytophthora capsici*, 근부병균 *Fusarium solani* 및 시들음병균 *F. oxysporum*의 생육을 억제하는 길항기작별 토착 길항미생물을 선발한 바, 진균 외막 가수분해효소 생산성 길항균주 *Pseudomonas* sp. 3098, *Serratia* sp. 3095 및 항진균성 항생물질 생산성 길항균주 *Bacillus* sp. 4016, *Bacillus* sp. SH14, *Pseudomonas fluorescens* 2112, *Actinomyces* sp. KH28 및 siderophore 생산성 길항균주 *P. fluorescens* GL7, *P. fluorescens* LS20 및 protease inhibitor 생산성 길항방선균 *Streptomyces* sp. KH1 및 길항성진균 *Trichoderma* sp. J1, J10, J13, J16, K5 및 *Penicillium* sp. 31K10 등의 토착 길항미생물들을 최종선발 하였고, 이들을 여러 가지 생리학적, 생화학적, 배양학적, 형태학적 방법으로 분류, 동정하였다.

나. 길항미생물의 길항기작 구명과 길항물질의 정제 및 특성

1) 시들음병균 *F. oxysporum*과 근부병균 *F. solani*의 생육을 억제하는 chitinase 생산성 생물방제균 *Pseudomonas* sp. 3098과 *Serratia* sp. 3095를 선발, 동정하고 그 길항기작물질인 chitinase를 정제한 결과 분자량이 각각 45,000 dalton 과 62,000 dalton 정도의 열에 안정한 pH 5.0과 pH 7.5의 최적작용pH와 각각 45°C의 최적반응 온도를 가지는 단일 단백질의 chitinase들임을 각종정제방법을 동원하여 순수정제하여 그 효소학적 특성을 확인하였고, 이 chitinase가 길항력의 주 원인임을 구명하였다. 별도로 조사한 cellulase와 glucanase도 길항기작의 원인임을 알았다.

2) 고추역병균 *Phytophthora capsici*의 생육을 억제하는 생물방제균으로 선발된 토착 길항세균 *Pseudomonas* sp. 2112가 생산하는 항진균성 항생물질을 정제하였으며, 이를 이용해 그의 저해기작을 고추역병균 *Phytophthora capsici*의 포자를 대상으로 radioisotope labelling precursor [³H] leucine, [³H] glucose, [³H] adenine 등으로 조사한 결과, 그 길항기작이 단백질 합성 및 RNA합성 저해기작임을 확인하였다.

3) 고추역병균 *Phytophthora capsici* 및 시들음병균 *Fusarium oxysporum*가 생육을 억제하는 항진균성 항생물질을 생산하는 생물방제력이 우수한 방선균 한 균주를 선발하여 *Actinomyces* sp. KH-28로 동정하고, 그 길항기작이 열에 불안정한 분자량이 250 dalton 정도의 황색을 띠는 quinoline 계 항생물질로 추정하였다.

4) 식물근부균 *Fusarium solani*의 생육을 억제하는 생물방제균 *Pseudomonas fluorescens* GL7을 선발, 동정하였고 이 길항균주가 생산하는 siderophore를 각종 정제방법으로 단일물질로 정제하여 그 구조적 특성을 조사한 결과 threonine, alanine, lysine (1:2:1)을 구성하는 분자량이 989 dalton인 pseudobactin 형태의 siderophore로 확인되었고 그 최대 흡광도는 400nm이었다.

5) 식물근부균 *Fusarium solai*의 생육을 억제하는 또 다른 생물방제균 *Pseudomonas fluorescens* LS20을 선발하여 분류학적으로, 동정하였고 이 길항균주가 생산하는 siderophore를 정제하여 그 물질적 특성을 조사한 결과 glycine, serine, threonine, glutamic acid, alanine, lysine (3:2:1:1:1)을 구성하는 분자량이 1,936 dalton 인 pyoverdin 형태의 siderophore로 확인하였으며, 최대 흡광도는 365nm이었다.

6) 탄저병 원인균인 *Colletotridum gloeosporides*와 점무늬 반점낙엽병균인 *Alternaria mali*에 대한 항진균성 길항능력이 우수한 방선균 *Streptomyces cyaneus* KH-1을 선발하여 수리학적 동정법 등 최신의 방법으로 동정하였고, 그 길항기작을 조사한 결과, 가수분해효소와 siderophore 등의 길항기작이 아닌 protease inhibitor에 기인됨을 확인하였으며, 그 길항물질을 정제한 결과 분자량이 283 dalton 정도의 polyhydroxyamine 인 것으로 확인하였다.

다. 다기능 생물방제균주의 유전공학적 육종

1) 선발된 생물방제균의 길항력보다 더 강력한 길항력을 가지는 증강변이균주를 유전적으로 육종함으로써 식물병원균을 보다 더 효율적으로 방제하기 위해, 생물방제균 *P. fluorescens* GL7을 NTG mutagen으로 돌연변이시켜 siderophore 생산능이 1.3 배 정도 증가된 증강변이주 강력한 생물방제균 *P. fluorescens* GL7-PM1을 육종하였다.

2) 토양내에서 또 다른 길항기작의 하나인 미생물성 ammonia 생성과 토양 알카리화에 의한 siderophore의 길항능을 증가함으로써 생물방제력의 상승효과를 거둘 수 있는 다기능적 생물방제균의 개발을 위해, siderophore 생산성 길항균주 *P. fluorescens* GL7에 외부의 urease 유전자를 vector plasmid를 이용 도입하여 urease 생산능을 별도로 부가시켰으며, 이로 인한 식물근부균 *F. solani*에 대한 길항능의 증가도 확인하였다.

3) 다기능 생물방제균의 유전학적 육종과 길항 유전자원의 확보를 위해 chitinase 생산성 생물방제균 *Pseudomonas* sp. 3089로부터 3.2 Kb 정도의 chitinase gene을 cloning하였으며, 그 nucleotide 염기배열을 sequencing하였다. 아울러 chitinase 발현의 ORF 등 유전구조와 restriction map, 타 균주의 chitinase gene sequence와 homology 도 비교하여 유용한 길항성 유전자원을 확보하였고 다기능 방제균주의 육종재료로 사용하였다.

4) 식물근부균 *F. solani*에 강하게 생육을 억제하는 항진균성 항생물질을 생산하는 생물방제균 *Bacillus subtilis* SH 14에 또 다른 길항기작인 urease 유전자를 도입하여 복수기능의 생물방제균을 육종하였고 두기능의 상승작용에 의한 길항력의 증가도 확인 하였다.

5) 고추역병균 *Phytophthora capsici*의 생육을 강하게 억제하는 길항성진균 *Trichoderma*의 두종을 cell fusion하여 두 길항기능을 가지는 세포융합체를 육종하였다.

라. 도입유전자의 염색체 병합에 의한 길항유전자의 안정성 확보

1) 유전공학적으로 육종된 생물방제균의 도입유전자의 영구 발현 가능한 안정성을 확보하기 위해 항생물질 생산성 생물방제균 *B. subtilis* SH14의 염색체내에 integration vectorPDL로 생물방제균 *Pseudomonas* sp. 3089의 3.2 Kb의 chitinase gene을 각각 병합함으로써 도입된 길항유전자의 소실 위험성이 없는 새로운 다기능 생물방제균주의 육종방법이 개발되었다.

2) 항생물질 생산성 생물방제균주 *B. subtilis* SH14의 chromosome내에 10.2 Kb의 *Bacillus pasteurii*의 urease gene을 병합하여 도입유전자의 안전성을 확보하였다.

마. 생물방제균내 Bio-report gene의 유전적 도입에 의한 생태학적 Monitoring 방법 개발

1) 생물방제균을 토양내에 투입하였을 때 그 증식 속도나 전파 양식 등 생태학적 동태를 추적하기 위해 siderophore 생산성 길항균주인 *P. fluorescens* LS20과 *P. fluorescens* GL7의 chromosomal DNA에 pUT mini Tn5 GFP를 이용하여 가장 우수한 bio-report인 green fluorescence protein(GFP)의 유전자를 integration시켜 새로운 생태학적 monitoring 방법을 개발하였다.

2) 강력한 Bio-report gene인 enhanced green fluorescence protein (EGFP)를 pHV

1432등 *Bacillus* 용 vector plasmid에 subcloning하여 EGFP의 발현을 가능하게 하였다.

바. 생물방제균의 토양내 방제력 및 전달 체계

1) 선발된 길항미생물이 혼합된 토양에 건전 고추묘를 이식 후 고추 역병균을 접종 (50 zoospore/g soil)하여 역병의 발생을 경시적으로 조사한 결과 대조구에서는 5 일 후부터 발병되기 시작하여 11일 후에는 전체 식물(100%)이 이병되었으나, 25J1, 36J13, B7079 및 P4059이 혼합된 토양에서는 각각 40%, 40% 60% 및 66.7%의 이병률을 보여 생물방제균으로서의 이용 가능성을 보였다.

2) 길항 미생물의 처리농도가 높을수록 이병률이 낮은 현상을 보여 길항미생물의 처리에 의해 병발생이 억제됨을 알 수 있었으며 이러한 경향은 *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus polymyxa* 및 *Trichoderma harzianum* 등의 길항미생물을 이용한 고추의 생물학적 방제에 관한 보고들(26,33-36)과 일치하는 경향을 보였다.

3) 서로 다른 종의 길항미생물들의 혼합처리에 의해 병발생 억제효과가 증진된다는 보고(Park and Kim, 1989)가 있으나, 본 실험에서는 길항진균간의 혼합처리에 따른 병발생억제효과의 상승은 인정할 수 없었으며, 길항진균(36J13)과 길항세균을 혼합하여 처리 하였을 때는 길항세균 단독으로 처리하였을 때보다 병발생률이 월등히 낮았으며, 길항진균을 단독으로 처리하였을 때 보다는 약간 낮은 경향을 보였으나 병발생정도가 유사하여, 혼합처리에 따른 병발생억제효과의 증진은 인정할 수 없었다.

4) 25J1과 36J13 및 36J13과 37J10균주간 protoplast fusion에 의해 얻은 colony중에서 안정성을 확인한 두 개의 균주(PFJ1+J13 및 PFJ13+J10)를 선발하여 동일한 방법으로 고추역병의 발생억제력을 조사한 결과 병발생억제효과의 증진이 없어 protoplast fusion에 의해 병발생 억제효과가 높은 균주를 얻지는 못하였다.

5) 토양처리 후 생물방제균의 밀도는 처리 10일 후까지는 증가하였으나, 그 후 부터는 감소하여 20일 후 부터는 거의 평형을 유지하였으며, 50일 및 60일 후 까지 갈수록 감소하는 경향을 보였다. 이와 같은 경향은 Lee(181) 의 보고와 유사하였다.

6) 이병토양에 coating처리를 하지 않은 종자를 파종하였을 때 입묘율이 0% 였으나, 길항미생물을 coating한 고추 종자는 조사한 5주 후 까지 40% 이상 건전묘로 생육하여 였다. 특히 종자의 coating 처리가 종자의 발아에 영향을 미치지 않았으며, 종자에 coating한 길항미생물의 활력이 1년까지 유지되어 길항미생물을 작물의 종자에 coating처리하여 파종할 경우 특히 유포기에 발생하여 큰 피해를 주는 각종 병을 방제할 수 있는 가능성을 제시하였다.

7) 메타실엠수화제를 관행농도(0.2g/l)로 처리한 토양내에서 생물방제균의 억제 저항성을 조사한 결과 *in vitro*에서와 같이 메타실엠수화제는 생물방제균의 밀도에 영향을 미치지 않았다.

8) 줄기의 직경, 총 엽수, 초장, 엽면적, 화방수와 뿌리, 줄기, 잎의 건물중과 입묘율을 조사한 결과 일관성 있는 결과는 얻을 수는 없었으나, 일반적으로 길항진균의 처리에서는 배양토에 파종했을 때의 생육이 coating종자를 파종한 것 보다 좋은 경향을 보였으며, 길항세균의 처리에서는 차이가 뚜렷하게 나타나지 않았다.

사. 경작지에서의 생물학적 방제법의 확립

1) 참깨종자에 coating처리한 길항미생물의 활력은 조사 60일까지 그대로 유지되고 있었으며 종자 coating처리가 발아에 영향을 미치지 않았고, 경작지내 토양병 억제효과 검증시험에서는 실험포장의 토양전염성병이 전혀 기후관계로 발생되지 않아 처리간 차이를 확인할 수 없었으며, 성장조사에서는 길항미생물의 처리와 무처리간에 유의성이 없었다.

2) 역병 방제력의 경작지 포장 시험에서는 무처리구에서 병 진전 속도가 매우 빨리 진행되어 2주 후에 이미 63.3%의 이병율을 보였으며, 4주 후에는 100% 이병되었다. 그러나 선발된 길항미생물 *Trichoderma* 등 균주의 처리구에서는 농약을 처리한 구와 유사하게 13.3% 정도의 이병률을 보여 길항미생물의 처리에 의해 병 발생이 억제됨을 뚜렷하게 보였다.

3) 고추 경작지내 길항미생물의 밀도변화와 토양에서의 생물방제균의 토양전달체계를 조사한 결과 이식 10일 후 조사한 생물방제균의 밀도는 최초 처리시 밀도보다 전체적으로 감소하는 경향을 보였으나 *Trichoderma* sp. K5 균주는 증가한 결과를 보였다. 처리 20일 후에는 처리 10일 후 보다 더 감소한 경향을 보였으며, 그 이후에는 밀도가 유지되거나 급격히 감소한 결과를 보였으며 균주간 차이가 있었다. 특히 병 발생억제 효과가 있었던 수종의 *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., 등의 길항성 균주는 감소되는 경향이 길항능이 적은 다른 균주에 비하여 완만하였다.

4) 관주처리에 의한 방법으로 길항미생물을 처리한 영천 청통면의 고추 포장에서 조사한 길항미생물의 밀도변화 조사에서는 처리한 다음 시간이 경과할수록 감소 경향을 보였으며, 길항미생물을 토양과 혼합하여 배양토를 만들어 처리한 방법과 비교하였을 때 보다 비교적 낮은 밀도를 나타내었다. 균주간 정착능력의 차이는 있었으며 *Trichoderma* sp. K5 균주와 *Bacillus* sp. 7079 균주의 균수가 가장 높았다.

5) 토양의 물리화학적 성질에 따른 길항미생물의 효과 및 동태시험에서 토양의 물리·화학적 성질의 차이는 생물방제균의 토양내 정착과 식물병 발생 억제효과에 큰 영향을 미치지 않았다.

아. 환경 농업에서의 생물방제법의 실용화

1) 환경농업이 행해져 왔던 경주 서면 지역의 경작지 토양에 고추를 이식한 후 경시적으로 역병의 발생을 조사한 결과 기후관계로 전체포장에서 역병이 발생되지 않아 길항미생물에 의한 병발생억제효과는 검증할 수 없었다.

2) 영천 및 경산지역의 경작지 포장시험에서 생물방제균이 식물체의 생장에 미치는 영향을 조사한 결과 2종의 *Trichoderma* 와 1종의 *Bacillus*, 1종의 *Pseudomonas*의 단독 처리 및 상이한 두균주의 혼합처리구에서 조사한 초장, 경 및 고추열매 수와 고추의 생체중이 대조구에 비하여 높은 경향을 보여 이들 균주에 의해 식물체의 생육이 촉진되었다.

3) 길항미생물을 처리한 다음 경시적으로 길항미생물의 정착력 동태를 조사한바 이식 10일 후에 생물방제균의 밀도는 처리농도에 비하여 감소된 경향을 보였다. 처리 20일 후 부터는 균주간 밀도에 차이를 보였는데 특히 *Trichoderma* sp. K5, *Pseudomonas* sp. 4059 및 *Bacillus* sp. 7079 균주의 밀도가 높게 나타나 이들 균주의 정착력이 다른 균주에 비하여 높은 것으로 나타났다.

4) 영천 청통면 및 경주 서면 포장에서 동일한 균주와 동일한 방법으로 실시한 실험 결과를 비교할 때, 길항미생물의 정착력 및 식물체에 미치는 영향이 균주에 따라 유사하게 나타났으며, 고추 역병이 대량 발생하였던 경산 진량면 소재의 포장에서도 균주에 따라 유사한 특성을 나타내었으나 고추역병 방제력이 타지역보다 더욱 뚜렷하게 확인되었다.

5) 시험포장 토양의 물리, 화학적인 성질의 차이에 의한 길항미생물의 정착력 보다는 처리 시기의 기상조건에 따라서는 정착력에 차이가 있는 것으로 생각되었다.

제 2 절 종합 고찰 및 활용 방안

작물의 병해충을 방제하기 위해 사용되고 있는 화학농약의 폐해를 줄이기 위해 식물병원균의 생육을 억제하는 길항미생물들을 이용하는 생물학적방제법의 연구가 국내외에서 활발히 진행되어 왔으나 실제 경작지 토양에서의 길항력 소멸이나 효과적인 전달체계의 미흡으로 많은 문제점이 노출되고 있다.

본 연구에서는 이러한 문제점을 보완하기 위해 해당지역의 기후, 풍토에 장구히 적응되어 온 토착 길항미생물을 각종 길항기작별로 분리, 선발하고 유전공학적으로 육종하여 이를 다시 해당 지역의 토양에 되돌림(feedback) 처리함으로써 경작지 토양내 복원, 우점력이 큰 생물학적 방제법을 개발하고자 하였다.

이를 위해 경북의 경주, 영천, 경산 등지의 지역 토양에서 증미, 황토, 쌀겨 등을 이용하는 새로운 토착미생물 증균채취법을 고안하여 지역 토양에 장기간 우점화되어 있는 토착 길항미생물을 분리하고, 이들을 항생물질 생산성, 가수분해효소 생산성, siderophore 생산성 등 각종 길항기작별로 선발하여, 그 길항기작의 원인이 되는 길항물질을 정제하고 그 물질적 특성을 구명함으로써 조직적인 생물방제균주의 개발을 가능하게 하였다.

각 길항기작별 토착 길항미생물로부터 각종 길항물질을 단일물질로 정제하여 그 특성을 규명하였고, 생산조건도 밝혔다. 따라서 길항미생물의 균체를 이용하는 생물방제방법 이외에 대량 생산되어 정제된 항진균성 항생물질을 이용하는 생물농약 산업에도 기여할 것으로 기대된다.

또한 선발된 토착 길항미생물들의 길항기능을 유전공학적으로 증강시키거나 부가, 통합하여 다기능적 생물방제균주로 육종함으로써, 복수의 길항균주들을 토양내 처리할 때 일어날 수 있는 길항균주간의 경쟁현상을 제거할 수 있는 새로운 첨단 생물학적 방제법을 개발할 수 있었다.

지역토양에서 선발된 항생물질 생산성 길항세균 *Bacillus subtilis*와 siderophore 생산성 길항세균 *Pseudomonas fluorescens*에 또 다른 길항기작인 urease의 유전자를 유전공학적으로 통합, 부가하여 길항능력을 증강시켰고, 항생물질생산성 길항세균 *Bacillus subtilis*에 chitinase 생산성 유전자를 부가, 병합함으로써 두가지 길항기능을 단일의 토착 길항미생물에서 발현시키는 유전공학적 육종법을 개발하였으므로 생물방제균 육종의 새로운 장을 열었다고 할 수 있다.

한편 길항미생물들을 실제 경작지 토양내 투입하였을 때 길항균 밀도의 증감이나 근권에서의 우점화 등 토양내 생태학적 동태를 추적할 수 있는 적당한 방법이 없어서 생물학적 방제법 연구에 있어서 큰 문제점이었는데, 본 연구에서 지금까지 알려진 monitoring용 bio-reporter 중 가장 강하다고 알려진 green fluorescence protein (GFP) 유전자를 선발된 siderophore 생산성 생물방제균에 유전공학적으로 도입하여 발현시킴으로서 토양내 길항미생물의 동태 추적을 용이하게 할 수 있는 새로운

monitoring 방법을 개발할 수 있었다. 따라서 개발된 이 방법을 이용하면 향후 농업용 토양미생물의 생태학 연구에 크게 활용될 것으로 기대된다.

아울러 선발된 길항미생물 *Pseudomonas*에서 길항성 chitinase 유전자를 cloning하여 그 염기배열이나 유전구조까지 밝혔으므로 유전공학적 다기능 생물방제균의 개발은 물론이고 우리 고유의 길항성 유전자원을 확보한 성과라고 생각한다.

또 plasmid vector에 의해 외부 길항유전자가 도입되었을 때 단기간은 별 영향이 없으나 생태계내에 장기간 계대되었을 때 일어날 수 있는 도입 길항유전자의 소실 위험성을 원천적으로 방지하기 위해, 생물방제균의 염색체내에 외부 길항유전자를 병합하여 영구히 안정하게 계승할 수 있는 방법을 integration vector를 이용하여 확립하였으므로 새로운 첨단 생물방제균 육종법을 개발했다고 할 수 있다.

*In vitro*에서 분리된 토착 길항미생물 중 *in vivo* 상태에서 병발생 억제능력이 확인된 균주를 이용하여 실제 경작지내에서 활용하기 위해서는 적절한 전달처리방법의 확립이 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 최근 종자산업에서 활발히 응용되고 있는 종자의 프라이밍 처리방법과 연관지어 길항미생물을 종자에 coating하는 방법을 확립하였다. 길항미생물의 종자 coating처리시 가장 큰 문제점은 coating한 미생물의 활력 유지라 할 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 미생물의 활력유지에 가장 적절한 coating 재료와 binder를 선정하여 최적의 coating 방법을 개발하였다. 개발된 방법에 의해서 길항미생물을 고추종자와 참깨종자에 coating 처리시 길항미생물의 활력이 1년간 유지되었을 뿐만 아니라 종자의 발아에도 전혀 영향을 미치지 않았다. 또한 coating 처리한 종자를 고추역병이 이병된 토양에 파종하였을 때 병발생이 억제됨이 확인되어 길항미생물을 종자에 coating 처리하여 특히 유묘기 시기에 문제가 되는 토양전염성병을 방제할 수 있는 효과적 전달체계법을 개발하였고 할 수 있다.

길항미생물을 경작지에 직접 처리하였을 때 질병발생 억제력의 유지는 생물학적방제에 있어서 가장 중요한 과제라 할 수 있다. 이를 위해 지금까지의 많은 연구는 길항미생물의 체제화와 처리시 각종 유기물의 혼합방법에 의해 정착능력과 질병발생 억제력을 향상시키고자하는 방향으로 진행되어 왔으나 실제 농가에서 활용하고자할 경우 많은 문제점이 있었다.

따라서 본 연구에서는 농가에서 가장 용이하게 사용할 수 있으며, 제품화시킬 경우 가장 저렴한 비용으로 생산할 수 있을 뿐만 아니라 활력이 장기간 유지될 수 있는 방법을 개발하고자 수돗물로 세척하여 가용성 물질이 전혀 함유되어 있지 않은 모래에 길항미생물을 배양하여, 이를 상토와 직접 혼합하여 사용할 수 있는 새로운 전달방법을 개발하였다. 실제 개발한 이 방법을 사용하여 선발된 길항미생물을 직접 경작지에 처리하였을 때 토양내 정착 능력이 우수하고 고추역병에 대한 억제효과가 매우 높은 결과를 얻을 수 있었다. 특히 고추역병에 대해 억제효과가 높았던 균주는 지역의 서로 다른 3곳의 실험포장에서 모두 높은 정착력을 보여 실제 농가에서 활용화할 수 있는 가능성을 제시하였다.

이러한 경작지 포장실험의 결과를 토대로 현재 식물영양제 및 비료 등을 주로 생

산하고 있는 경북 경산시 소재의 주식회사 대유와 농가보급용 제품을 개발하기로 합의하였고, 현재 *Trichoderma* sp. K5 균주와 *Bacillus* sp. 7079는 제형화 단계에 있으며 대량 산업화할 수 있는 미생물제제를 개발하여 1999년 1년 동안 미생물제제의 등록 조건에 맞게 포장실험을 실시하여 역가를 재확인한 후 정식으로 등록하여 상업적 생산을 할 예정이다.

또한 항생물질 생산성 길항세균 *Bacillus* sp. 3034 균주도 경북 포항시 소재 주식회사 비왕산업에서 자체 포장실험을 통해 그 방제력을 인정하여 1998년 12월 1.5 ton 규모의 시제품 생산을 동의하였으며 시제품에 의한 농가 포장내 방제력 검증을 거쳐 향후 상업적으로 생산할 예정이다.

따라서 3년간 수행된 본 연구에서 개발된 토착 길항미생물에 의한 새로운 환경보존형 생물방제법은 향후 실제 농가에 활용, 보급될 수 있는 개연성이 충분하다고 생각되며, 선발된 각 기작별 생물방제균과 육종된 생물방제균들을 이용해 보다 진보된 첨단적 생물방제법의 실현이 가능하게 될 것으로 생각된다.

제 5장 참고 문헌

1. 농림수산부. 1991. 농약생산, 출하, 수입. *농림 수산 통계 연보(1991)*. p:68-71.
2. 농약 공업 협회. 1993. 무농약 재배시 병충해 피해 실태. *농약정보 14권*. 6: 13-15.
3. 과학기술처. 1990. Expansion and improvement of a screening system for development of new pesticides. p: 1-5.
4. Schroth, M.N., and J.G. Hancock. 1981. Selected topics in biological control. *Ann. Rev. Microbiol.* 35: 453-476.
5. Papavizas, G.C., and R.D. Lumsden. 1980. Biological control of soilborne fungal propagules. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 389-413.
6. Baker, K.F., and R.J. Cook. 1974. Biological control of plant pathogens, W.H. Freeman and Co., Sanfrancisco. p: 433.
7. Cook, R.J. and K.F. Baker. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. *Am. Phytopathol. Soc., St. Paul.* p:539.
8. Papavizas, G.C., and R.D. Lumsden. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 389.
9. Henis, Y., and I. Chet. 1975. Microbial control of plant pathogens. *Adv. Appl. Microbiol.* 19: 85-111.
10. 김홍진, 박규진, 이순구, 정영륜, 이종화. 1984. 인삼연작장애의 생물학적 방제연구, 한국인삼연초연구소.
11. 정영륜. 1991. 식물체를 이용한 살균할성 검정방법. *한국 생화학회 주최 생리활성물질 심포지움*. p: 371-381.
12. Tominaga, Y., and Y. Tsujisaka. 1976. Purifications and some properties of two chitinase from *Streptomyces orientalis* which lyse *Rhizopus* cell

- wall. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 2325-2333.
13. Morrissey, R.F., E.P. Dugan, and J.S. Koths. 1976. Chitinase production by an *Anthrobacter* sp. lysing cells of *Fusarium roseum*. *Soil Biol. Biochem.* **8**: 23-28.
 14. Hadar, Y., I. Chet, and Y. Heins. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harizianum*. *Phytopathol.* **69**: 64-68.
 15. Harman, G.E., I. Chet, and R. Baker. 1980. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Phythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.* **70**: 1167-1172.
 16. Vyas, P., and M.V. Deshpauche. 1989. Chitinase production by *Myrothecium verrucaria* and its significance for fungal mycelia degradation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **35**: 343-350.
 17. Ordentlich, A., Y. Elad, and I. Chet. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol.* **78**: 84-88.
 18. Lirn, H.S., Y.S. Kim, and S.D. Kim. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 510-516.
 19. Watanabe, T., W. Oyanagi, K. Suzuki, and H. Tanaka. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* **172**: 4017-4022.
 20. Gregory, K.F., O.N. Allen, A.J. Riker, and W.H. Peterson. 1952. Antibiotics as agents for the control of certain damping-off fungi. *Am. J. Botany.* **9**: 405-415.
 21. Takeuchi, S., K. Hirayama, K. Ueda, H. Sasaki, and H. Yonehara. 1958. Blastocidin S, a new antibiotic. *J. Antibiot.* **11**: 1-5.
 22. 米原弘. 1979. 일본における農薬用抗生物質の研究. *Nippon Nogeikagaku*

Kaishi. 53: 71-76.

23. Brian, P.W., J.M. Wright, J. Stubbs, and A.M. Way. 1951. Uptake of antibiotic metabolites of soil microorganisms by plant. *Nature* 167: 347-349.
24. Leoffler, W., J.S.M. Tschen, N. Vanittanakom, M. Kugler, E. Knorpp, T.F. Hsieh, and T.G. Wu. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3 : a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* 115: 204-213.
25. Arima, K., H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuta, and G. Tamura. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* 28: 575-576.
26. Paulitz, T.C., and J.E. Loper. 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Phythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathol.* 81:930-935.
27. 김광태, 임호성, 김상달. 1990. 생물방제균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1이 가지는 약제내성 plasmid curing. *영남대 자원문제연구논문집*. 9: 71-76.
28. Lim, H.S., and S.D. Kim. 1990. Antifungal mechanism of *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 for biocontrol of *Fusarium solani* causing plant root rot. *Korean J. Microbiol. Biotech.* 18: 81-88.
29. Lim, H.S., and S.D. Kim. 1990 The role of chitinase of *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 in biocontrol of *Fusarium solani*. *Korean J. Microbiol. Biotech.* 18:188-194.
30. 임호성, 김상달. 1990. 식물근부균 *Fusarium solani*에 길항하는 생물방제균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1의 유전공학적 개발. *한국산업미생물학회지* 18: 437-441.
31. 김용수, 김상달. 1990. 생물방제균 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1의 형질전환 조건. *한국산업미생물학회지* 18: 454-459.
32. Lim, H.S., and S.D. Kim. 1994. The production and enzymatic properties of extracellular chitinase from *Pseudomonas stutzeri* YPL-1, as a biocontrol

- agent. *J. Microbiol. Biotech* 4: 134-140.
33. Kim, Y.S., and S.D. Kim. 1994. Antifungal mechanism and properties of antibiotic substances produced by *Bacillus subtilis* YB-70 as a biocontrol agent. *J. Microbiol. Biotech* 4:296-304.
 34. 농림수산부. 1993. 1993년산 작물통계, 연도별 채소 및 과실 생산량. p: 130-167.
 35. 농협중앙회. 1994. 아시아에 있어서의 지속적 농업의 가능성. 농협조사월보 (1994년 5월호). p: 40-48.
 36. 정후섭. 1992. 일본, 화란, 독일의 지속형농업을 위한 유기농업. 선진 해외 농업기술현황 고동연구(서울대). p: 209-210.
 37. Waksman, S.A., B. Elizabeth, and R.H. Christine. 1944. Bacteriostatic and bacteriocidal properties of antibiotic substances with special reference to plant pathogenic bacteria. *Bull. Torrey Botan. Club.* 71: 107-121.
 38. 배무, 고평희. 1982. *Streptomyces* sp.가 생산하는 항진균성 항생물질에 관한 연구(제1보) 생산균주의 선별과 항진균성 항생물질의 분리 정제. *Korean J. Appl. Microbiol Bioeng.* 10: 33-37
 39. Wiffen, A.A. 1941. The production, assay, and antibiotic activity of actidione, an antibiotic from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 56: 283-291.
 40. Isono, K., and S. Suzuki. 1979. The polyoxin, pyrimidine nucleoside peptide antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis. *Heterocycles* 13:333-351.
 41. Hamamoto, T., S. Gunji, H. Tsuji, and T. Beppu. 1983. Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics.(1) *J. Antibiot.* 36: 639-645.
 42. Ubukata, M., M. Uramoto, J. Uzawa, and K. Isono. 1986. Structure and biological activity of neopeptins A, B and C, inhibitors of fungal cell wall glycan synthesis. *Agric. Biol. Chem.* 50: 357-365.

43. Uramoto, M. 1989. Search for new antifungal antibiotics : Isolation and structure of phosmidosine. 한국 산업 미생물학회, 한국중균협회 주최 새로운 산업미생물과 신물질 탐색. p: 184-194.
44. Johnson, E.A., and K.L. Burdon. 1946. Eumycin-A new antibiotic active against pathogenic fungi and higher bacteria, including Bacilli of tuberculosis and diphtheria. *J. Bacteriol.* 51: 591.
45. Howell, C.R., and R.D. Stipanovic. 1980. Suppression of Pythium-induced damping-off of cotton seedings by *Pseudomonas vluorescens* and its antibiotic, pyoloterin. *Phytopathol.* 70: 712-715.
46. Mcloughin, T.J., J.P. Quinn, A. Bettermann, and R. Bookland. 1992. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1760-1765.
47. 장종원, 김상달. 1995. "항진균성 길항세균 *Bacillus subtilis* YBL-7의 종자피막용 포자체의 생산과 발아조건. 한국산업미생물학회지. 23: 236-242.
48. 장종원, 김상달. 1995. "길항세균 *Bacillus subtilis* YBL-7의 건조포자체의 종자피막화에 의한 생물학적 방제. 한국산업미생물학회지. 23: 243-248.
49. You, J.H., B.H. Song, J.G. kim, M.H. Lee, and S.D. Kim. 1995. Genetic organization and nucleotide sequencing of the *ure* gene cluster in *Bacillus pasteurii*. *Mol. cell.* 5: 359-369.
50. Lim, H.S., S.D. Kim. 1995. The Role and Characterization of β -1,3-Glucanase in Biocontrol of *Fusarium solani* by *Pseudomonas stutzeri* YPL-1. *Korean J. Microbiol. in press.*
51. Francis, J., J. Madinaveitia, H.M. Macturk, and G.A. Snow. 1949. *Nature* 163: 365.
52. Hesseltine, C.W., C. Pidacks, A.R. Whitehill, N. Bohonos, B.L. Hutchings, and J.H. Williams. 1952. *J. Am. Chem. Soc.* 74: 1362.
53. Neilnds, J.B. 1952. *J. Am. Chem. Soc.* 74: 4846-4847.

54. 전홍기, 강호영, 고철중, 백형석. 1991. *Pseudomonas synxantha* A3가 생성하는 siderophore A3에 관한 연구. *Kor. J. Microbiol.* 29: 307-313.
55. Park Y., H.H. Kim, M.G. Yeo, Y.W. Seo, H.C. Koh, Y.G. Yang, H.S. Cheong and S.J. Kim. 1992. Identification of fluorescent pseudomonads producing siderophore and construction of siderophore biosynthesis defective mutant. *Kor. J. Microbiol.* 30: 286-290.
56. Buyer, J.S., J.M. Wright, and J. Leong. 1986. Structure of pseudobactin A124, a siderophore from a bean-deleterious *Pseudomonas*. *Biochemistry* 25: 5492-5499.
57. Philson, S.B., and M. Llinas. 1982. Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens*. II. Structural homology as revealed by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 257: 8086-8090.
58. Teintze, M., M.B. Hossain, C.L. Barnes, J. Leong, and D.V. Helm. 1981. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochemistry* 20: 6446-6457.
59. Yang, C., and J. Leong. 1984. Structure of pseudobactin 7SR1, a siderophore from a plantdeleterious *Pseudomonas*. *Biochemistry* 23: 3534-3540.
60. Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 715-731.
61. Neilands, J.B. 1984. Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiol. Sci.* 1: 9-14.
62. Weinberg, E.D. 1974. Iron and susceptibility to infectious disease. *Science* 184: 952-956.
63. Biedermann, G., and P. Schindler. 1957. On the solubility of precipitated iron (III) hydroxide. *Acta Chem. Scand.* 11: 731-740.
64. 전유진, 이용호, 김세권. 1996. 키틴·키토산의 생리기능성(1). *한국키틴·키토산연구회지.* 1(1): 4~13.

65. 김세권. 1996. 키틴·키토산 유도체의 합성기술과 그 분석법. *한국키틴·키토산연구회지*. 1(1): 20~47.
66. Lee, H. S., H. J. Lee, S. W. Choi, S. Her and D. H. Oh. 1997. Purification and Characterization of Antifungal Chitinase from *Pseudomonas* sp. YHS-A2. *J. Microbiol. Biotechnol.* 7(2): 107~113.
67. Thomas, E. B. 1969. *Enzyme Handbook*, Vol II, Pp 570~571. Springer-Verlag. Berlin.
68. 정의준, 이용현. 1995. Chitooligosaccharides 생산에 적합한 chitinase를 분비하는 균주의 선별, chitinase의 분리정제 및 반응특성. *한국산업미생물학회지*. 23(2): 187~196.
69. Jeuniaux, C. 1966. *Methods in Enzymology* 8, Pp644-650, Academic Press, New York.
70. Lim, H. S. and S. D. Kim. 1994. The Production and Enzymatic Properties of Extracellular Chitinase from *Pseudomonas stutzeri* YPL-1, as a Biocontrol Agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* 4(2): 134~140.
71. Ohta, M., T. Yamagami and G. Funatsu. 1995. Purification and Characterization of Two Chitinase from the Leaves of Pokeweed (*Phytolacca americana*). *Biosci, Biotech. Biochem.* 59(4): 656~661.
72. St Leger, R. J., R. M. Cooper and A. K. Charnley. 1986. Cuticle-degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Regulation of Production of Chitinolytic Enzymes. *Journal of General Microbiology.* 132: 1509~1517.
73. Buyer, J.S., J.M. Wright, and J. Leong. 1986. Structure of pseudobactin A124, a siderophore from a bean-deleterious *Pseudomonas*. *Biochemistry* 25: 5492-5499.
74. Philson, S.B., and M. Llinas. 1982. Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens*. II. Structural homology as revealed by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 257: 8086-8090.

75. Teintze, M., M.B. Hossain, C.L. Barnes, J. Leong, and D.V. Helm. 1981. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochemistry* 20: 6446-6457.
76. Yang, C., and J. Leong. 1984. Structure of pseudobactin 7SR1, a siderophore from a plant-deleterious *Pseudomonas*. *Biochemistry* 23: 3534-3540.
77. Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 715-731.
78. Neilands, J.B. 1984. Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiol. Sci.* 1: 9-14.
79. Weinberg, E.D. 1974. Iron and susceptibility to infectious disease. *Science* 184: 952-956.
80. Biedermann, G., and P. Schindler. 1957. On the solubility of precipitated iron (III) hydroxide. *Acta Chem. Scand.* 11: 731-740.
81. Lindsay, W. L. 1979. Chemical equilibria in soils. John Wiley, New York.
82. Spiro, T.G. 1977. Chemistry and biochemistry of iron. In E. B. Brown, P. Aisen, J. Fielding, and R. R. Crichton (ed.), Proteins of iron metabolism. Grune and Stratton, New York. p: 23-32.
83. Neilands, J.B. 1982. Microbial envelope proteins related to iron. *Ann. Rev. Microbiol.* 36: 285-309.
84. Elad, Y., and R. Baker. 1985. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathol.* 75: 1047-1052.

85. Monreal, J., and E.P. Reefer. 1968 The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 15: 689-696.
86. Bemiller, J.N. 1965. Polysaccharide preparations: Chitin. *Methods Carbohydr. Chem.* 5: 103.
87. Lee E.J., K.S. Kim, S.H. Hong and J.H. Ha. 1995. The mechanism of biological control of *Pseudomonas* spp. Against *Fusarium solani* causing plant root-rot disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23 : 91.
88. Schwyn, B., and J.B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 47-56.
89. Arnow, L.E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* 118: 531-537.
90. Csaky, T. 1948. On the estimation of bound hydroxylamine. *Acta Chem. Scand.* 2: 450-454.
91. Waring, W.S. and C.H. Werkman. 1942. Growth of bacteria in an iron-free medium. *Arch. Biochem.* 1: 303-310.
92. King, J.V., J.J.R. Campbell, and B.A. Eagles. 1948. Mineral requirements for fluorescein production by *Pseudomonas*. *Can. J. Research.* 26C: 514-519.
93. Yigal, E., and C. Ilan. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathol.* 77: 190-195.
94. Monreal, J., and E.P. Reefer. 1968 The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 15: 689-696.
95. Elad, Y., and R. Baker. 1985. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathol.* 75: 1047-1052.
96. Jurkevitch, E., Y. Hadar, and Y. Chen. 1992. Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 119-124.

97. **Crowley, D.E., Y.C. Wang, C.P.P. Reid, and P.J. Szaniszló.** 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil* **130**: 179-198.
98. **Höfte, M., K.Y. Seong, E. Jurkevitch, and W. Verstraete.** 1991. Pyoverdinin production by the plant growth beneficial pseudomonas strain 7NSK₂ : ecological significance in soil. *Plant and Soil* **130**: 249-257.
99. **Hayakawa, M.** 1990. Selective isolation methods and distribution of soil actinomycetes. *J. Actinomycetol.* **4**: 103-112.
100. **Lechevalier, M.P.** 1981. *Actinomycetes*, 159-166. *Gustav Fischer.* Springer-Verlag, New York.
101. **Kim, C.J., K.H. Lee, A. Shimazu, I.D. Yoo.** 1994. Reisolation frequency of soil actinomycetes on multiple isolation media. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 329-331.
102. **Victor Lorian, M.D.** 1991. Antibiotics in laboratory medicine, Willams and Wilkins, Batimore, 3rd ed.
103. **Yigal, E., and C. Ilan.** 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathol.* **77**: 190-195.
104. **Miller, G. L.** 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry.* **31**(3): 426~428.
105. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265~275.
106. **Kim S.U., S.Y. Lee, S.K. Kim, K.H. Son, Y.K. Kim, S.S. Moon and S.H. Bok.** 1996. Isolation and characterizaion of antifungal compound

- produced by *Aspergillus candidus* F1484. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24 : 574.
107. **Lim D.S., S.K Yoon, M.S. Lee, W.H. Yoon and C.H. Kim.** 1996. Isolation and identification of *Streptovercillium* sp. NA-4803 producing antifungal substance. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24 : 664.
 108. **Chang J.W. and S.D. Kim.** 1995. Seed coating for the application of biocontrol *Bacillus subtilis* YBL-7 against phytopathogens. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23 : 243.
 109. **Yeo W.H., B.S. Yun, K.S. Whang, C.O. Lee and S.H. Yu.** 1996. An isochromanequinone compound produced by *Micromonosproa* sp. SA-246. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24 : 321.
 110. **Suh W.N., J.H. Park, J.Y. Lee, I.S. Kim, K.J. Lee and M. Bae.** 1996. Isolation and numerical identification of *Streptomyces* strains producing inhibitors of fungal cell wall synthesis. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24 : 27.
 111. **Yoon W.H., D.S. Lim, M.S. Lee and C.H. Kim.** 1997. Isolation and identification of *Streptomyces* sp. NA-52 producing growth inhibitor against *Pyricularia oryzae*. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25 : 537.
 112. **Y.S. Kim, J.K. Son, D.C. Moon and S.D. Kim.** 1997. Isolation and structure determination of antifungal antibiotics from *Bacillus subtilis* YB-70, a powerful biocontrol agent. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25 : 60
 113. **Krieg, N.R., and J.G. Holt.** 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, 9th ed. Vol.1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
 114. **Gerhardt, P.G, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips,** 1981. Manual of methods for general bacteriology. American Society For Microbiology, Washington.

115. Shirling, E.B. and D. Gottlieb, 1966. Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.
116. Williams, S.T., M. Goodfellow, E.M.H. Wellington, J.C. Vickers, G. Alderson, P.H.A. Sneath, M. Sackin, and A. M. Motimer, 1983 A probability matrix for the identification of some *Streptomyces*, *J. Gen. Microbiol.* 129: 1815-1830.
117. Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M.H. Wellington, P.H.A. Sneath and M. Sackin, 1983 Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1743-1813.
118. **Miller, J. H.** Nitrosoguanidine Mutagenesis. *Experiments in Molecular Genetics* 14: 125-129.
119. **Visca, P., G. Colotti, L. Serino, D. Verzili, N. Orsi, and E. Chiancone.** 1992. Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore- metal complexes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2886-2893.
120. **Osborn, M.J., and R. Munson.** 1974. Separation of the inner (cytoplasmic) and outer membranes of gram negative bacteria. *Methods Enzymol.* 31A: 642-653.
121. **Filip, C., G. Fletcher, J.L. Wulff, and C.F. Earhart.** 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *J. Bacteriol.* 115: 717-722.
122. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
123. **Morrissey, J.H.** 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117: 307-310.

124. **Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
125. **Zeng H, Wang Y, Zhang Y** ; Molecular cloning of a chitinase gene from *Bacillus circulans* C-2 ; *Chin J Biotechnol* 1998;14(1):25-9
126. **Gal SW, Choi JY, Kim CY, Cheong YH, Choi YJ, Lee SY, Bahk JD, Cho MJ,** Cloning of the 52-kDa chitinase gene from *Serratia marcescens* KCTC2172 and its proteolytic cleavage into an active 35-kDa enzyme. ; *FEMS Microbiol Lett* 1998 Mar 1;160(1):151-8
127. **Sanger F., Nicken, S., Coulson, A. R.,** 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
128. **Park, C.S., T. Paulitz, and R. Baker.** 1988. Attributes Associated with increased biocontrol activity of fluorescent *Pseudomonas*. *Koren J. Plant Pathol.* **4**(3): 218-225.
129. **Park, S.H., B.T.Koo, B.S.Shin, and J.I.Kim.** 1991. Construction of shuttle promoter-probe and expression vectors for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, and expression of *B. thurigiensis* subsp. *Kurstaki* HD-73 crystal protein gene in the two species. *J. Microbiol. Biotech.* **1**: 37-44.
130. **Mandel, M. and A. Higa.** 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 109-118.
131. **Kim, S. D. and R. P. Hausinger.** 1994. Genetic Organization of the Recombinant *Bacillus pasteurii* Urease Genes Expressed in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 108-112
132. **Kim, S.D., and J.Spizizen.** 1985. Transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by recombinant plasmid DNA. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **13**: 345-348.
133. **Chang, S. and S.N. Cohen.** 1977. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**: 111-115.

134. **Kim, S.D., and J. Spizizen.** 1985. Molecular cloning and expression of *Bacillus pasteurii* urease gene in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 13: 297-302.
135. **Cormack, B. P., R. H. Valdivia, S. Falkow,** 1996. FACS- optimized mutants of the Green Fluorescent protein (GFP). *GENE*
136. **Matthysse, A. G., S. Stretton.** 1996. Construction of GFP vectors for use in Gram-negative bacteria other than *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters.* 145: 87-94
137. **Simon, R.** 1984. high frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by in vitro constructed Tn5-Mod transposon. *Mol. Gen. Genet.* 196: 413-420
138. **Berger, L.R. and Reynolds, D.M.** 1985 The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochem. Biophys. Acta.* 29: 522-533.
139. **Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U. and Boller, T.** 1986 Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324: 365-367.
140. **Takeuchi, Y., Yoshikaura, M., Takeba, G., Tanaka, K., Shibata, D. and Horino, O.** 1990 Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase in soybean. *Plant. Physiol.* 93: 673-682.
141. **Berg, B. and Petterson, G.** 1977 Location and formation of cellulases in *Trichoderma viride*. *Journal of Applied Bacteriology* 42: 65-75.
142. **Rytter, J.L., Lukezie, F.L., Craig, R., and G.W. Moorman.** 1989. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. *Phytopathol.* 79: 367-370.
143. **김성욱, 이지우, 이상한, 복성해.** 1991. 토양으로 부터 분리한 항진균성 활성을 나타내는 세균의 동정과 그 생물활성. *한국산업미생물학회지* 19: 337-342.
144. **Yeun, G.Y., and M.N. Schroth.** 1986. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f.

- sp. *dianthi* by iron competition with an *Alcaligenes* sp. *Phytopathol.* 75: 171-176.
145. **Vandenbergh, P.A., C.F. Gonzales, A.M. Wright, and B.S. Kunka.** 1983. Iron-chelating compounds produced by soil *Pseudomonas*: correlation with fungal growth inhibition. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 128-132.
146. **Shirling, E.B. and D. Gottlieb,** 1966. Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.
147. **Williams, S.T., M. Goodfellow, E.M.H. Wellington, J.C. Vickers, G. Alderson, P.H.A. Sneath, M. Sackin, and A. M. Motimer,** 1983 A probability matrix for the identification of some *Streptomyces*, *J. Gen. Microbiol.* 129: 1815-1830.
148. **Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M.H. Wellington, P.H.A. Sneath and M. Sackin,** 1983 Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1743-1813.
149. **Greenberg, D.H.** 1955 Plant proteolytic enzymes. *Method Enzymol.* 19: 839-906.
150. **Beger, L. R. and D. H. Reynolds.** 1958. The Chitinase system of a strain of *streptomyces griseus*. *Biochem. Biophys. Acta.* 29: 522~534.
151. **Tsutomu, T., A. Katsumi, T. Yasuyuki and S. Kenzo.** 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. *Biochemica et Biophysica Acta.* 1078: 404~410.
152. **Tsujibo, H., K. Minoura, K. Miyamoto, H. Endo, M. Moriwaki and Y. Inamori.** 1993. Purification and Properties of a Thermostable Chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(2): 620~622.

153. 이강표, 김창남, 유주현. 1990. *Aeromonas salmonicida* YA7-625에 의한 chitinase의 생산 및 정제. *한국산업미생물학회지*. 18(6): 599~606.
154. Tominaga, Y. and Y. Tsujisaka. 1976. Purifications and some properties of two chitinase from *Streptomyces orientalis* which lyse *Rhizopus* cell wall. *Agric. Biol. Chem.* 40: 2325~2333.
155. Dawson, Rex M. C., D. C. Elliott, W. H. Elliott and K. M. Jones. 1986. *Data for Biochemical Research*. 3rd ed. Pp 316~335, Oxford Science Publications. Oxford.
156. Hwang, B. K. and Kim, E. S. 1992. Protection of pepper plants against Phytophthora blight by an avirulent isolate of *Phytophthora capsici*, *Korean J. Plant Pathol.*, 8(1) : 1-7.
157. Kim, C. H. 1989. Disease occurrence in red-pepper by continuous mono-cropping and its control in Kores. pp9.1-9.20 *In: Proc. International seminal on 'Yield losses due to continuous cultivation on major economic crops' held in August 13-19,1989 at RDA/FFTC/ASPAC, Suwan Korea.'*
158. Cho, C. T. and B. J. Moon. 1984. Studies on the wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae* in Korea. *Korean J. Plant Prot.* 23:74-81.
159. Fisher, N. L., L. W. Burgess, T. A. Toussoun and P. E. Nelson. 1982. Canation leaves as a substrate and for prosering cultures of *Fusarium* specise. *Phytopathology* 72:151-153.
160. Moon, B. J., S. H. Rho, and C. T. Cho. 1990. Biological control of *Fusarium* wilt of strawberry by antagonistic Bacterium, *Pseudomonas gladioli*, in greenhouse. *Korea J. Plant Pathol.* 6: 461-466.
161. Puhalla, J. E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 63:179-183.
162. Snyder, W. C. and H. N. Hansen. 1940. The species concept in *Fusarium*. *Amer.*

163. **Howell, C. R.** and Stipanovic, R. D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyolufurin, *Phytopathology*. 70:712-715
164. **Baker, R.** 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 6:263-294.
165. **Hoy M. A. and D. C. Herzog.** 1985. Biological control in agriculture IPM system. *Acad. Press. Orlando, U.S.A.*
166. **Merriman, P. and K. Russell.** 1990. Screening strategies for biological control. *In: Biological Control of soil-borne Plant Pathogens.* edited by D. Hornby. C·A·B International Wallingford, UK. pp427-435.
167. 김홍진, 정영륜, 이순구, 오승환, 김경태. 1982. 인삼토양병해의 생물학적 방제 연구. 한국 인삼연초연구소. 연구보고서(인삼재배):46-63.
168. **Burpee, L. L. and Goulty, L. G.** 1984. Evaluations of fungicides for control of pink and gray snow mold on creeping bentgrass. pp.6-7 *In : Turfgrass Research Annual Report. R. W. Sheard(ed.). Univ. of Guelph, Ontario.38p*
169. 김충희 · 조원대 · 김승철, 1982. 고추역병의 방제에 관한 연구, 농사보고(토비 · 작보 · 균이 · 농가), 46-50.
170. **Cook, R. J. and K. F. Baker.** 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogen. *Phytopathol. Soc, st., Paul. Min.*
171. **Chet, I.** 1990. Biological control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatment. *In: Biological Control of soil-borne Plant Pathogens.* edited by D. Hornby. C·A·B International Wallingford, UK. pp15-25.
172. **Handelsman J., and Stabb, E. V.** 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens, *Plant Cell*, 8 : 1855-1869.
173. **Kim, C. H., Cho, W. D. and Kim, S. C.** 1982. An investigation of the control of red-pepper fruit rot caused by *Phytophthora capsici* Leonian. *Res.*

174. Merriman, P. R., Price, R. D., Kollmorgen, J. F., Piggott, T. and Ridge, E. H. 1974. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. Aust. J. Agric. Res 25:219-226.
175. Powell, K. A., Faull, J. L. and Renwick, A. 1990. The commercial and regulatory challenge. pp445-464 In : *Biological control of soil-borne Plant Pathogens. edited by D. Hornby. C.A.B International Wallingford, Oxon, UK.*
176. Chung, H. S. and W. B. Choi. 1990. Biological control of sesame damping-off in the field by coating seed with antagonistic *Trichoderma viride*. Seed Sci. & Technol. 18:451-459.
177. Chung, H. S., W. B. Choi, and Y. J. Koh. 1986. Biological control of sesame seedling diseases by coating seed with antagonistic *Trchoderma viride*. Research report, rural development administration, Agri. Institutional cooperation, 141-150.
178. Hong S. S., K. S. Park, C. H. Kim and E. J. Lee. 1990. Granule formulation of *Pseudomonas cepacia* antagonistic to *Phytopathora capsici* and its viability on red-pepper. Korean J. Plant Pathol. 6:434-439.
179. Jee, H. J., C. G. Nam and C. H. Kim. 1988. Studies on biological control of *Phytophthora* blight of red-pepper I. Isolation of antagonists and evaluation of antagonistic activity in vitro and in greenhouse. Korean J. Plant Pathol. 4:305-312.
180. Kim, D. S., Cook, R. J., and Weller, D. M. 1997. Bacillus sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage, Phytopathology 87 : 551-558.
181. Lee, E. J., H. J. Jee, K. S. Park, and C. H. Kim. 1990. Studies on biological control of *Phytophthora* blight of red-pepper IV. Performance agents in field under polyethylene filmhouse. Korean J. Plant Pathol. 6:58-64.

182. Shin, G. C., J. J. Im, S. H. Yu, and J. S. Park. 1987. Biological control of sesame soil-borne disease by antifungal microorganisms. Korean J. Plant Prot. 26:229-237.
183. 김충희, 서효덕, 조원대, 김성봉. 1982. *Fusarium oxysporum*에 의한 양말기 시들음병의 약제방제 및 품종저항성에 관한 연구. 한국식물보호학회지 21:61-67.
184. Hardar, Y., I. Chet and Y. Henis. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69:64-68.
185. Weller, D. M. and R. J. Cook, 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. Phytophthology 73:463-469
186. Cook, R. J. 1990. Twenty-five years of progress towards biological control. In: *Biological Control of soil-borne Plant Pathogens*. edited by D. Hornby. C·A·B International Wallingford, UK. ppl-14.
187. Hornby D. 1983. Suppressive soils. Ann. Rev. Phytopathol. 21:65-85.
188. 남윤구 · 지형진 · 김충희, 1988. 고추역병에 대한 생물학적 방제연구 II. 유기물 토양첨가에 의한 길항균 활성증대 효과, 한국식물병리학회지, 4(4) : 313-318.
189. 박경석 · 장성완 · 김충희 · 이은중, 1989. 고추역병에 대한 생물학적 방제연구 III. *Phytophthora capsici*의 길항균 *Trichoderma harzianum*과 *Pseudomonas cepaci*의 제형 및 그 보존, 한국식물병리학회지, 5(2) : 131-138.
190. 지형진 · 남윤구 · 김충희, 1988. 고추역병에 대한 생물학적 방제연구 I. 길항균 분리 및 실내와 온실에서 역가검정, 한국식물병리학회지, 4(4) : 305-312.
191. 홍순성 · 박경석 · 김충희 · 이은중, 1990. 고추역병균 길항균 *Pseudomonas cepacia*의 입제제형 및 활성, 한국식물병리학회지, 6(4) : 434-439.