

GOVP 12001062

632,96
L293b
1999

최 중
연구보고서

Bacteriocin 을 이용한 환경 친화성 식물 병원균 방제법 연구 개발
Studies on bacteriocin for biological control of plant pathogenic bacteria

GlycinecinA 를 이용한 생물학적 방제원의 가능성 연구
Studies on the possibility of bacteriocin, glycinecinA
as a biological control agent

서울대학교 농업생명과학대학

제주대학교 의과대학
농업과학기술원

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Bacteriocin을 이용한 환경 친화성 식물 병원균 방제법 연구 개발”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999 . 12 . 22 .

주관연구기관명 : 서울대학교 농생물학과

총괄연구책임자 : 조 용 섭

협동연구기관명 : 제주대학교 의과대학

협동연구책임자 : 조 문 제

협동연구기관명 : 농업과학기술원

협동연구책임자 : 김 충 회

요 약 문

I. 제 목

Bacteriocin을 이용한 환경 친화성 식물 병원균 방제법 연구 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

한국에서 주요 작물에 병을 일으키는 세균은 주로 *Xanthomonas* spp.에 속한다. 벼 흰빛잎마름 병을 일으키는 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 고추 세균성 반점병을 일으키는 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, 배추. 무우 세균성 검은 썩음병을 일으키는 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, 그리고 최근 들어 복숭아에서 크게 문제가 되고있는 복숭아 세균성 구멍병균인 *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* 등을 꼽을 수 있겠다. 이를 방제하는 대책으로는 지금까지 구리약제나 항생제에 의존하는 화학적 방제에 크게 의존해왔으나 사용자나 환경에 대한 오염문제나 비선택적인 살균으로 인한 유용미생물의 감소로 인한 작물의 경제적 손실과 생태계의 피해, 그리고 이들 약제에 대한 저항성 균들의 출현 및 확산은 보다 안전하고 효과적이며 병원균에 대해서만 효과를 발휘하는 선택적인 방제대책을 요구한다. *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*은 *Xanthomonas* spp.만을 특이적으로 억제, 살균하는 박테리오신을 분비하는데 이 물질은 앞서 언급한 바와 같은 기존약제의 환경피해, 비선택성 등의 약점을 극복할 수 있는 성질을 모두 갖추고 있다. 이 박테리오신을 이용하여 지금까지 비교적 방제하기가 어려운 *Xanthomonas* spp.에 의한 식물병 방제를 하기 위해 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*가 분비하는 박테리오신을 체계적으로 연구

하고 유전자공학 등의 연구 및 기술을 적용하여 이 박테리오신을 보다 생산, 저장하기 쉽고 경제적이면서 효과적인 환경 친화성의 식물세균병 방제원으로 이용할 수 있게 하는 것이 본 연구의 목적이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

Xanthomonas campestris pv. *glycines*가 분비하는 박테리오신, glycinecin을 체계적으로 연구하기 위하여 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra의 genomic library를 작성하고 여기서 박테리오신 생합성에 관계하는 유전자를 포함하는 clone을 선별하여 그 유전자의 염기서열분석, genetic organization, glycinecin 생합성 유전자의 promoter 분석 등을 수행해 glycinecin 생성 기작과 이후 유전자 조작에 필요한 정보를 얻고 이를 토대로 이 유전자에 여러 유전공학 기술을 적용하여 glycinecin이 생성 증가나 성질향상, 그리고 생존능력이 우수한 다른 부생균에 이 유전자를 도입하여 glycinecin을 생성할 수 있게끔 하는 조작 등을 통해 효과적인 환경 친화성의 식물세균병 방제원으로 개발하려하였고 또한 glycinecin을 순수 분리하여 glycinecin의 구조 및 구성, 생화학적 특성과 *Xanthomonas* spp.에 대한 살균효과의 메카니즘을 규명하려하였고 생화학적인 조작을 통해 glycinecin의 성질향상을 시도하였다. 실제적인 병 발생 억제효과와 식물세균병 방제원으로서의 가능성을 검정하기 위하여 그리고 이 박테리오신이 생태계와 환경에 미치는 영향을 조사하기 위해 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra나, 분리된 glycinecin을 이용하여 벼 흰빛잎마름 병을 일으키는 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 고추 세균성 반점병을 일으키는 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*에 대한 방제실험과 토양 내 균밀도 조사 등을 온실과 포장에서 수행하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

Xanthomonas campestris pv. *glycines* 8ra가 분비하는 glycinecin 생합성에 관계하는 유전자를 cloning하여 염기서열 분석 등의 분자생물학적 연구를 통해 glycinecin 생합성에는 2개의 open reading frame(ORF) 이 관여하며 이 유전자는 지금까지 보고

된 다른 유전자들과의 어떤 유의미한 상동성이 발견되지 않았다. glycinecin의 발현은 glycinecin의 생성균인 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*의 성장 단계에 의존적이며 특히 영양물의 고갈이나 생태적인 환경수용능력이 한계에 다다를 때 glycinecin의 생합성이 최대에 다다른 것으로 나타났다. 이러한 유전적, 분자생물학적 정보를 바탕으로 promoter의 조작이나 생존능력이 우수한 부생균에로의 glycinecin 유전자의 도입등으로 glycinecin의 생성을 증가시켰고 glycinecin을 분비할 수 있는 몇몇 부생균들을 제작했다. 그리고 glycinecin의 생화학적 연구에서 glycinecin의 분자량과 이 glycinecin은 2개의 서로다른 단량체가 결합한 이량체(heterodimer)임이 밝혀졌고 여러 실험을 통해 살균에 관여하는 작용 메커니즘을 추측해낼 수 있었다. 이후 생화학적 및 유전공학적인 조작으로 보다 열이나 pH등에 안정적인 glycinecin으로 성질개량을 해내었다. 포장 및 온실에서 방제 및 환경친화성 조사에서 glycinecin은 공시약제와 비슷하거나 더 우수한 병발생억제 효과를 나타내었으며 토양생태계나 환경등에 미치는 악영향은 없는 것으로 나타났다.

Glycinecin은 이상의 실험 등에서 포장 등의 환경 하에서도 비교적 안정하게 존재하며 병발생 억제효과를 나타냈으며 유전공학 및 생화학적으로 기능이 향상된 glycinecin은 보다 안정적이며 보관 등이 용이하며 그 유전자가 도입된 부생균들은 포장에서 오랫동안 잔존하며 우수한 병발생 억제효과를 보일 것으로 기대된다. 유전자 조작된 이들 균들의 환경 내에서의 위험성 등이 충분히 검정되어 위험하지 않다고 판단되면 이 glycinecin을 이용한 방제법은 우수한 방제효과를 기대할 수 있음과 동시에 환경 및 이용자에 무해한 환경 친화적인 방제법으로 산업적 이용도 가능할 것이다.

SUMMARY

Xanthomonas campestris pv. *glycines* 8ra produces bacteriocin, glycinecin, which inhibits the growth of bacteria specifically belong to *Xanthomonas* spp. *Xanthomonas* spp. includes many important plant pathogenic bacteria such as *X. c.* pv. *vesicatoria* which causes the bacterial leaf spot in pepper and tomato and *X. oryzae* pv. *oryzae* which causes bacterial leaf blight in rice. Glycinecin has many of good properties as a biological control agent. Since glycinecin inhibit the growth of phytopathogenic *Xanthomonas* sp, it can be used to control disease without any harm to beneficial bacteria for plant mostly belonged to *Pseudomonas* sp. In addition to that it is safe for user and environment. However, it needs some modification to develop glycinecin as a effective biological control agent. The cosmid clones involved in the production of glycinecin were isolated from the genomic library of *X. c.* pv. *glycines* 8ra The DNA region involved in bacteriocin production was localized and its DNA sequences were determined. Based on DNA sequence analysis, two different open reading frames(ORFs) were found and these 2 ORFs are relevant for *in vivo* activity of bacteriocin in *Escherichia. coli*. The 2 ORFs encode each 39kDa and 14kDa polypeptides and they were not significantly related to any other genes. To reveal regulation of bacteriocin synthetic genes and environmental signals involved in the bacteriocin production, a function of promoter was determined by using reporter genes encoding β -galactosidase and β -glucuronidase. The strain harboring plasmid contained transcriptional fusion of the promoter region of bacteriocin gene and β -glucuronidase gene shows the growth phase-dependent β -glucuronidase gene expression. This tendency of gene expression is often observed in the other bacteria producing bacteriocin. However, the application of glycinecin to the field became a obstacle to overcome for glycinecin as a effective biological control agent. The solutions of this purpose are the application of epiphytic bacteria carrying glycinecin gene from *X. c.* pv. *glycines* 8ra as effective biological control delivers and inhanement of glycinecin production. For this purpose, we modified the glycinecin gene. A broad host-range vector such as pGly034 carrying gene for the glycinecin production and

secretion was transferred by conjugation into epiphytic bacteria such as *Pseudomonas fluorescens* which was present widely in phylloplane. These epiphytic bacteria express glycinecin stably and the populations of These bacteria remained in aequate level. The activity of glycinecin was increased upto 200 times when the promoter of the glycinecin gene was under the strong *lac* promoter.

Biochemical characterization of glycinecinA has not been reported. Biochemical aspects of glycinecinA are an essential goal to study its mode of action on sensitive cells, with a view at evaluating its possible utilization as a biological control agent. Recently, about 1.7 kb DNA fragment responsible for production of glycinecinA has been cloned, and sequenced. Possible open reading frames were expressed in *Escherichia coli* DH5 α , and expressed proteins were purified with usual protocols of bacteriocin purification, consisting of ammonium sulfate precipitation and column chromatography. The molecular mass of glycinecinA was estimated to be approximately 54 kDa polypeptide, consisting of two subunits as analyzed by SDS-PAGE. The purified active glycinecinA was heterodimer of these two subunits deduced from cross-linking reaction and gel-filtration chromatography. The result of N-terminal protein sequencing indicated that these two subunits have signal peptides necessary to pass through the cytoplasmic membrane. GlycinecinA is very stable at wide range of pH (pH5-pH9) and temperature. Because of these properties, glycinecinA has a possibility as a good biological control agent. We have tested glycinecinA as a biological control agent of *X. campestris* pv. *vesicatoria* and *X. oryzae* pv. *oryzae* in the greenhouse and field for two years. The antibiotic activity is present in cell free culture supernatant of stationary phase culture of *X. campestris* pv. *glycines* 8ra. When the stability of glycinecinA was studied in room temperature and 4°C, it was found to remain constant for up to 2 months in room temperature, and in 4°C, remain constant about 10 months. The minimum activity of glycinecinA to control *X. campestris* pv. *vesicatoria* and *X. oryzae* pv. *oryzae* was 12800Au/ml in greenhouse, and activity of glycinecinA on pepper and rice leaves are each continue for 8 days and 7 days. We have tested the population changes of *X. campestris* pv. *vesicatoria* on pepper leaves and *X. oryzae* pv. *oryzae* on rice leaves. The populations of *X. campestris* pv. *vesicatoria* and *X. oryzae* pv. *oryzae* were monitored for 1 weeks. Compared with treatment with only *X. campestris* pv. *vesicatoria* and *X. oryzae* pv. *oryzae*, the pre-spraying of glycinecinA reduced the populations of *X. campestris* pv. *vesicatoria* and *X. oryzae* pv. *oryzae*. Based on these results, researches of disease control were carried out in greenhouse and field. The bacterial spot disease and bacterial leaf blight each monitored after 4 weeks and 5 weeks from spraying date of *X. campestris* pv. *vesicatoria* and *X.*

oryzae pv. *oryzae*. The treatment of spraying with glycinecinA showed significant effect as much as chemical treatment.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction

- 1.1 Historical background and motivation 11
- 1.2 The purpose of the study 17

Chapter 2 Studies on the possibility of bacteriocin, glycinecinA as a biological control agents

- 2.1 Molecular characterization of glycinecin genes and molecular biological modification for evaluating biological control agents . . . 18
- 2.2 Biochemical characterization of glycinecin for evaluating biological control agents 44
- 2.3 Biological control with glycinecin producing GMO (genetically modified microorganism) and glycinecin 54

목 차

제 1 장 서 론

제 1절 연구개발의 배경과 필요성 11

제 2절 연구개발의 목적 17

제 2 장 과제별 연구 수행내용 및 결과

제 1절 제 1 세부과제

Bacteriocin "glycinecin"의 유전자 분리 및 분자생물학적 조작 18

제 2절 제 1 협동과제

Bacteriocin "glycinecin" 의 작용기작 연구 및 효능 개량 44

제 3절 제 2 협동과제

조작된 유전자 가진 미생물 이용한 생물적 방제 및 glycinecin을 직접 이용한 방제 54

여 백

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 배경과 필요성

1. 연구의 배경

현재 인류는 식량자원의 확보에 큰 힘을 기울이고 있다. 급증하는 인구증가에 따라 2000년대까지 현재의 2배 이상의 식량 증산이 요구된다는 분석도 있다. 식량증산을 위해 품종개량, 경작 토양관리, 병충해 방제 등의 수단을 통해 농업생산성 향상을 위한 꾸준한 노력을 해오고 있다. 특히 식량 자원 확보에 있어서 큰 장애가 되는 것이 식물 병원균에 의한 병해라 할 수 있다. 균형 있던 자연 생태계가 식량 생산을 위하여 대면적에 균일한 품종을 재배함에 따라 단순화된 농업생태계로 전환되어 불균형화가 심화됨으로써 일어난 역작용이 식물병의 발생이라는 결과로 나타나게 된다. 즉 부생성 미생물과 병원성 미생물의 다양한 분포상황이 계속적인 작물재배로 인하여 병원성 미생물의 증식에 선택적으로 유리한 환경조건을 제공하게 된 결과, 한계수준 이상으로 증식하여 식물병이 대발생하게 된다.

지금까지 각종 식물병의 방제는 주로 저항성 품종의 개발과 농약사용에 의한 화학적 방제에 크게 의존하고 있다. 그러나 저항성 품종의 개발에는 많은 기술적, 경제적, 그리고 시간적 제약이 따르며, 또한 새로운 저항성 품종을 선발하여도 번식 속도가 빠른 세균이 바로 적용할 수 있는 능력을 키우게되어 능력을 상실하게 된다. 농약사용에 의한 화학적 방제는 방법이 용이하며, 경제적이고 효과 또한 매우 크다. 그러나 최근 같은 농약의 빈번한 반복사용으로 인하여 저항성 균들의 출현이 급증하였으며, 더욱이 많은 효과적인 살균제들이 우리의 생활환경을 오염시켜 세계 도처에서 그러한 효과적인 살균제의 사용을 금지시키고 있는 실정이다. 최근 들어서 생물학적 방제에 많은 사람들이 관심을 기울이고 있다. 생물학적 방제의 정의는 학자들 간에 차이는 있으나, 일반적으로 “미생물의 처리에 의한 식물병원균의 밀도 감소 또는 식물병의 억제”라는 의미의 축소된 정의가 받아들여지고 있다. 병원균에 대하여 길항 및

경합 미생물을 분리하여 배양한 후, 토양, 종자, 또는 식물체에 직접 처리하여 그들의 증식에 적합한 조건을 조성하여 줌으로써 병원균이 침입할 기회를 낮추거나, 살균 물질을 분비하여 병원균의 번식을 억제하게 하는 방법이다. 이와같은 생물학적방제의 장점은 그 효과가 오랫동안 지속될 수 있다는 것 이외에도 유기합성 농약이 가지는 환경오염, 약해 및 잔류 독성의 문제가 없다는 점에서 매우 바람직한 것으로 받아들여지고 있다. 생물적 방제 연구의 기본은 농업생태계의 생산성을 상당한 수준으로 유지하면서 생태계균형을 위한 각종 구성요소의 다양화를 도모하여 식물병의 발생을 억제하고자 하는 것이다. 이러한 생물적 방제의 연구는 외국에서 오래전부터 시작되어 왔으나, 그 실용성에 대하여는 회의 적이었다. 그러나 최근 10년간 유전자 조작 등의 기술개발로 생물적 방제와 화학적 방법이 겸비된 새로운 방제 방법이 시도되었으며 몇몇 분야에서는 상업적으로도 큰 효과를 거두고 있다. 특히 세균의 경우 박테리옌(Bacteriocin)이라는 살균물질을 생성, 분비하는 균들이 있다. Bacteriocin이란, 세균이 생성, 분비하는 살균능력을 가진 단백질로, 대부분의 경우 생성세균과 가까운 종류의 세균에만 특이적으로 작용한다. 식물 세균병균을 죽이는 물질은 그 죽이는 병균에 특이적으로 살균효과를 보여야하며, 주위의 작물에게 유익한 균들에게는 무해한 것이어야 한다. 이상적으로는, 그 살균 효과를 보이는 물질이 생산, 저장하기 쉽고, 경제적이어야 하며, 사용자나 환경에 안전 한 것이어야 한다. 이러한 이상적인 살균물질의 거의 모든 성질을 Bacteriocin은 가지고 있다. Bacteriocin생성 균주를 이용한 식물세균병 방제는 과수의 근두암종병(*Agrobacterium tumefaciens*)의 경우 큰 성공을 거두었으나, 다른 세균병에 대해서는 아직 실용적인 단계에 이르지 못하고 있다.

한국주요 작물에 병을 일으키는 세균은 주로 *Xanthomonas* ssp.에 속한다. 우리나라에서 가장 중요한 세균병균은, 벼 흰빛잎마름 병을 일으키는 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 고추 더탱이병을 일으키는 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, 배추.무우 세균성 검은 썩음병을 일으키는 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, 그리고 최근 들어 복숭아에서 크게 문제가 되고있는 복숭아 세균성 구멍병균인 *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* 등을 꼽을 수 있겠다. 우리나라에서 세균병균은 진균병균보다 덜 중요시 취급되어 온 결과 기초적인 연구조차 제대로 시행되

어 오지 못 하였다. 특히 장마 뒤에는 세균병이 역학적인 문제로까지 번지나 이러한 세균병균에 대한 어떠한 체계적인 연구가 전혀 없는 현실이다. 따라서 상기의 문제점을 효과적으로 해결할 수 있는 체계적인 연구와 기술의 개발이 무엇보다 선행되어야 한다는 사실을 본 연구의 배경으로 하고있다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

1) 엽권에서의 길항 미생물을 이용한 생물적 방제

생물학적 방제를 위한 다양한 시도가 있었으나 길항 미생물의 처리부위에서의 정착능력이 방제효과에 큰 영향을 미쳤으며 안정적으로 정착하더라도 항생물질을 생산하는 미생물의 경우 생산능력의 저하로 인해 효과적인 방제원으로서 이용할 수 없었다. 현재까지 식물병의 생물학적 방제는 엽권보다는 근권에서 방제가능성이 높은 것으로 알려져 있다. 엽권에서의 생물학적방제가 어려운 이유는 근권에 비해 다양한 엽권환경의 변화와 잎의 형태적 특징 때문이다. 다양한 엽맥, 모용과 돌출표, 표피세포, 기공과 수공, cuticle, wax등이 뿌리와 다른 잎의 형태적 특징이다. 또한 엽권은 순환과 비순환성 환경변수가 존재하며, 온도, 상대습도, 이슬, 강우, 바람, 일광등이 뿌리에 비해 매우 복잡하게 얽혀있기 때문에 뿌리에 비해 상대적으로 환경을 조절하기가 어렵다. 세균이 생존하기 위해서는 한낮동안 다습해야하며, 정착장소는 표피세포의 배사면위의 공동과 엽맥을 따라 분포한다. 길항 미생물의 농도한계는 식물체, 병원균의 접촉 잠재능력, 엽권의 영양상태, 전체미생물의 양, 엽권의 미기상및 포장의 환경에 따라 변화한다. 따라서 방제에 이용될 길항 미생물의 엽권에서의 생존이 생물학적 방제의 성패를 좌우하는 핵심요인이라 할 수 있다. 대부분의 경우 방제에 이용할 미생물을 비병원성 돌연변이체를 많이 사용하였으며 또한 많은 효과도 보았다. 그러나 비병원성 돌연변이체는 세포간극에서의 생존은 다른 부생균 보다 강하나 엽면에서의 생존은 부생균 보다 오래가지 못한다. 그러한 비병원성 돌연변이체의 문제점은 부

생균을 생물학적 방제의 매개체로 사용한다면 해결될 수 있다. *Pseudomonas fluorescens*는 식물체에 유용한 부생균으로서 엽권에서의 생존 능력도 뛰어나며 또한 다른 식물진균에도 길항작용을 가지고 있다. 그러한 부생균에 유전적으로 조작된 bacteriocin gene을 삽입, 복제 가능케 하면 비병원성 돌연변이 체를 이용하는 생물학적 방제의 한계를 타파할 수 있을 것이다. 또한 유전자 조작이 간편하며 어디에서나 생존이 우수한 *Escherichia coli*와 같은 비병원균을 이용하는 방법도 현재 생물학적 방제의 매체가 가지고 있는 한계를 극복하는데 일익을 담당 할 것이다. 엽권의 미생물상은 열린계로써 생물학적 방제원이 정착한 후에 발생하는 병원균의 성장을 억제할 수 있다.

2) bacteriocin을 이용한 방제

식물 세균병균을 죽이는 물질은 그 죽이는 병균에 특이적으로 살균효과를 보여야 하며, 주위의 작물에게 유익한 균들에게는 무해한 것이어야 한다. 이상적으로는, 그 살균 효과를 보이는 물질이 생산, 저장하기 쉽고, 경제적이어야 하며, 사용자나 환경에 안전한 것이어야 한다. 이러한 이상적인 살균물질의 거의 모든 성질을 Bacteriocin은 가지고 있다. 그러나 이러한 bacteriocin 에 대한 연구는 몇몇 세균을 제외하곤 극히 미약하다.

Bacteriocin을 이용한 방제방법은 크게 2가지로 나눌 수 있다. 우선 가장 많이 이용하는 방법이 bacteriocin을 생성하는 균을 이용하는 방법이다. 가장 성공적인 예가 *Agrobacterium radiobacter*가 분비하는 Agrocin 84의 경우이다. 이 경우 *Agrobacterium radiobacter*가 비병원균이기 때문에 적용이 용이하다. 거의 완벽한 방제효과를 보이는 이 경우에도 agrocin84를 생성하는 유전자가 다른 병원균으로의 전이가 가능한 plasmid에 존재하기 때문에 야기되는 문제가 크다. 또한 대부분의 경우 그 bacteriocin에 면역성을 주는 유전자가 bacteriocin을 생성하는 유전자와 같이 있다. 만일 bacteriocin을 생성하는 유전자가 면역성을 주는 유전자와 함께 다른 병원 세균으로 이동된다면 bacteriocin의 살균효과는 완전히 상실하게 된다. 이러한 문제점은 유전자 조작으로 plasmid의 전이에 관계되는 *tra* gene과 같은 유전자를

bacteriocin 생성 plasmid에서 없애 주면 간단하게 해결된다. *Agrobacterium radiobacter* 의 agrocin 84의 경우 plasmid pAgK84의 *tra* gene을 없애서 묘포장에서 근두암종병균을 거의 100% 방제하고있다. 그러나 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*가 생성하는 glycinecin 의 경우 glycinecin의 생성에 관계되는 유전자가 chromosome상에 있으므로 전이의 문제는 크게 우려되지 않는다. 또한 많은 bacteriocin생성 유전자의 경우 그 유전자의 발현이 UV나 mytomyacinC등에 의하여 유도되며, 평상시에는 극 미량의 bacteriocin이 생성된다. 이러한 경우 bacteriocin을 생성하는 세균의 포장에서 효과는 거의 없다고 할 수 있다. *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*의 경우 낮은 수준의 bacteriocin의 생성과 저 영양 상태시 현저히 감소되는 bacteriocin의 생성등의 문제점은 bacteriocin 유전자를 분리하여 항상 높은 수준으로 bacteriocin 유전자를 발현시킬 수 있는 *lac* promoter나 *tag* promoter 밑에 두어 발현시킨다면 항상 높은 정도의 bacteriocin을 생성할 수 있을 것이다. 두 번째로 bacteriocin을 이용하는 방법은 bacteriocin을 순수 분리하여 직접 살포하는 것이다. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 가 생성하는 syringacin의 경우 잎당 3 ng의 bacteriocin을 병원균, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 접종 전에 압력을 이용하여 처리한 결과 보통 250 개씩 발생하던 병반이 전혀 나타나지 않았다. 또한 병원균 접종 5 분 후 같은 양의 bacteriocin을 처리 시에는 평균 50 개의 병반이 보여, 정제된 bacteriocin의 탁월한 살균효과를 보여주었다. 그러나 이러한 정제된 bacteriocin의 처리에도 문제점은 따른다. 제일 먼저 완전히 정제되지 않은 bacteriocin을 사용할 경우 병원균에게 영양분을 공급할 우려가 있으며, 또한 식물체나 식물체에 유리한 미생물에게 독소로 작용할 가능성도 있다. 그러므로 고도로 정제된 bacteriocin의 처리가 중요하다. 또한 bacteriocin 의 상온에서의 안정성과 식물체에서의 정착성, 그리고 병원균 특이성을 연구하여 농민이 안전하게 살포할 수 있으며, 어떠한 온도에서도 안정되고 원하는 병원균에 특이적으로 작용 할 수 있는 bacteriocin의 개발이 필요하다. 이러한 문제점은 bacteriocin을 순수 분리하여 그 화학적 성질과 구조를 밝히게되면 해결이 가능하리라 본다. Bacteriocin 의 화학적 구조와 성질을 알게되면 작용 mechanism을 알게되고, 문제점이 발생 시 bacteriocin 자체의 화학 구조를 변화시키는 등의 방법으로 생태계와 인간에게 안전하며 병원균 특이적으로 작용

할 수 있는 bacteriocin을 이용한 효과적인 생물농약의 개발이 가능하리라 본다.

나. 경제적 측면

최근 대두되고 있는 농업 생산환경의 악화는 화학적 방제의 남용으로 인해 발생한 약제 저항성 균주의 출현 및 이에 기인한 방제능력의 감소, 막대한 개발비를 투자하는 신농약 개발, 농약 원제 도입 시 기술료(royalty)를 지불, 살포비용의 낭비 등이 주요 원인이다. 그러나 무엇보다도 화학적 방제에 의한 환경 오염을 고려할 때 생물학적 방제원의 이용은 환경 오염에 의한 직, 간접적 비용을 보상하며, 환경 보전을 통해 향후 농업의 지속적인 생산성 유지에 의해 화학적 방제보다도 우수한 경제성을 갖는다. 특히 xanthomonads는 우리나라 농업경제에 커다란 영향을 미친다. 장마의 피해가 심한 지역에서는 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*에 의한 쌀 생산량의 감소가 5% 까지도 가며, 미국의 경우 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*에 의한 고추의 피해는 장마에 관계없이 노지에서 약 10% 가량 된다. 우리나라의 경우 고추 피해 상황에 관한 정확한 통계자료는 구할 수 없으나 노지 재배가 대부분인 국내에서의 피해상황도 이에 상응하리라 본다. 최근들어 *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*에 의한 복숭아 구멍병에 대한 농민의 피해 보고가 급증하였으나 국내에서의 *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*의 연구가 전혀 되어있지 않아 어떠한 방제 대책도 세우지 못하는 실정이다. *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*가 분비하는 bacteriocin인 glycinecin은 우리나라에서 크게 문제되고있는 모든 xanthomonads 세균에 살균효과를 나타내므로 단 한번의 방제개발로 이러한 모든 문제점을 해결 할 수 있으므로 개발비용이 크게 감소 될 수 있다.

다. 사회적 측면

전세계적인 관심사인 환경 문제는 농업에 크게 영향을 미쳐 농약사용을 규제하기에 이르렀고 무공해 작물, 유기농법 등의 신조어를 만들어 내고 있다. 실제 농약 사용에서 가장 우려하고 있는 것이 농약의 잔류독성과 생태계의 파괴이다. 이에 따라

농약의 사용은 규제되는 추세이며 국제간 농산물의 교역에서도 농약의 잔류량은 주요 수입 규제 도구가 되고 있다. 그러나 농약을 사용하지 않으면 생산성이 크게 감소됨으로 현대 농업은 농업 생산성의 유지와 환경 보전이라는 딜레마에 빠져있다. 국민건강을 고려하면 보다 적게 농약을 사용하는 것이 유리하지만, 생산성을 유지하고 또한 국민의 생존을 위해서는 농약의 사용이 불가피하다. 또한 농약을 사용하지 않아 발생하는 생산성의 하락은 쌀, 고추 등의 가격인상과 이에 따른 수입량의 증가, 농가 및 국민 가계에 미치는 파장 등 사회적, 경제적 영향은 헤아릴 수 없을 것이다. 이러한 문제의 해결을 위해 생물학적 방제의 개념은 도입되어야 하며, 특히 생태계에 안정적이며 특이성이 높고 경제적인 bacteriocin을 이용한 생물학적 방제나 새로운 생물 농약의 개발은 필수적이다.

제2절 연구 개발의 목적

식물 세균 병원균을 죽이는 물질은 그 죽이는 병균에 특이적으로 살균효과를 보여야 하며, 작물에게 유익한 균들에게는 무해한 것이어야 한다. 대부분의 작물이 생육하는 환경에서는 유용미생물이 존재해 식물의 생육을 돕고 진균, 세균등에 의한 식물병의 발병을 억제하는데 비 특이적인 살균은 이러한 유용미생물들을 죽임으로써 유용미생물에 의한 유리한 효과를 기대할 수 없으며 결과적으로 작물에 불이익을 가하게 되기 때문이다. 그리고 이상적으로는, 그 살균효과를 보이는 물질이 생산, 저장하기 쉽고, 경제적이어야 하며, 사용자나 환경에 안전한 것이어야 한다. 이러한 이상적인 식물병원세균 살균물질의 거의 모든 성질을 bacteriocin은 가지고 있다. 본 과제의 최종 목표는 국내의 주요 병원세균인 벼 흰빛 잎마름병균 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), 고추 반점병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)등을 방제하기 위하여 bacteriocin을 분비하는 미생물을 이용한 생물학적 방제 법을 개발하고 또한 bacteriocin을 생물 농약으로 개발시키는 데 있다.

제 2장 과제별 연구수행 내용 및 결과

제1절 제 1 세부과제 : Bacteriocin "glycinecin"의 유전자 분리 및 분자생물학적 조작

1. 연구내용

가. glycinecin 생성 유전자 분리 및 분석

1) glycinecin 생성에 관계된 유전자의 분리

bacteriocin 생성에 관계하는 유전자들의 분리는 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra의 genomic library의 bacteriocin "glycinecin"의 생성유무로 하였다. *E. coli*는 bacteriocin "glycinecin"에 resistant하기 때문에 clone들이 bacteriocin gene을 가지고 있어 생성, 분비가 가능하다면 bacteriocin에 sensitive한 *Xanthomonas* spp. 에 대해 inhibitory zone을 형성하기 때문에 쉽게 선발이 가능하게 된다. bacteriocin에 sensitive한 *Xanthomonas* strain으로는 고추세균성 반점병을 일으키는 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strain YK93-4를 이용하였다. 이러한 방법으로 pG08, pG11, pG13, pG33, pG35 5개의 clone들을 선발하였고 southern blotting 방법으로 2개의 group으로 나뉘어짐을 알게되었다. 그중 bacteriocin activity가 가장 강하게 나타난 pG08을 택해 계속적인 분석을 실시하였다. pG08은 21kb의 큰 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra의 DNA를 가지고 있어 이를 좁혀나가는 방법으로 먼저 restriction enzyme mapping을 시도하였다. restriction enzyme mapping이 끝난 뒤, partial digestion과 subcloning의 방법을 이용하여 pG08의 bacteriocin 생성에 필요한 최소한의 크기인 1.9kb의 DNA region을 포함한 subclone pSGEB1을 얻게되었다. (Fig 1)

2) 생성유전자의 DNA sequencing

bacteriocin 생성에 필요한 최소한의 크기인 1.9kb의 DNA region을 포함한 subclone pSGEB1의 DNA sequencing을 시작하여 먼저 가능한 많은 pSGEB1의 subclone들을 확보하여 양방향에서 sequence하여 들어갔다. sequence방법은 auto sequence를 사용하였으며 auto sequence를 사용하여 매울 수 없는 gap은 PCR을 이용한 manual sequence를 이용하여 1.9kb의 DNA sequence를 모두 마쳤다. (Fig 2)

3) DNA sequence analysis

subclone pSGEB1의 1.9kb DNA sequence를 DNASIS, PROSIS, CLUSTAL V, BLAST N, BLAST P, BLAST X 등의 program을 사용하여 DNA sequence analysis를 하였다. 그 결과 glycinecin을 encoding할수 있는 open reading frame이라고 판단 할 수 있는 DNA region이 2곳정도 발견되었으며 (Fig 2) blast search로 이미 알려진 다른 DNA등과 homology를 조사하였으나 뚜렷하게 homology를 보이는 DNA는 없으나 , Clostridium 균의 toxin gene과 약간의 homology를 보였다.

나. glycinecin 유전자의 발현 메카니즘과 조작

1) 유전자의 발현 메카니즘의 연구

DNA sequence상에서는 glycinecin을 생성하는 open reading frame(ORF)가 2곳정도 존재 함을 알 수 있었다. 이중 어떤 곳이 glycinecin을 생성하는 ORF 인지를 알아내기 위해 deletion analysis를 수행한 결과 2개의 ORF중 어느 한곳이라도 손실되면 glycinecin을 생성하지 못하는 것으로 나타났다. 이중 앞쪽 약 39kDa의 polypeptide를 encoding하는 ORF를 ORF1, 뒤쪽의 약 14kDa의 polypeptide를 encoding하는 ORF를 ORF2로 명명하였고 이중 ORF1을 포함하고 있는 plasmid를 가진 *E. coli*에 ORF2를 포함하는 DNA를 조금씩 deletion하여 이를 각각 plasmid에 ligation시킨 뒤 하나씩

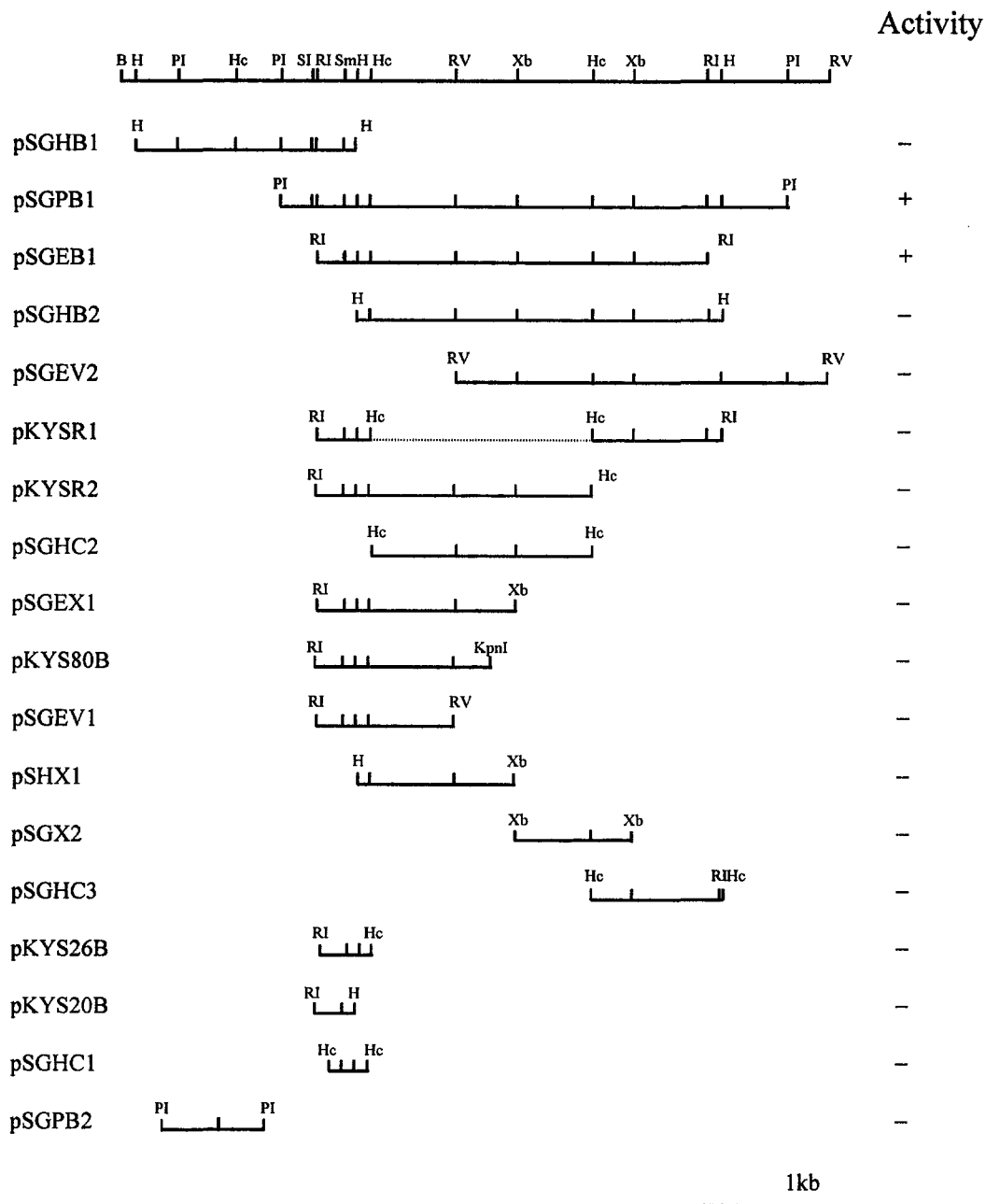


Fig. 1. The restriction enzyme maps of pBL5 and subclones.

Enzyme abbreviation: E, *EcoRI*; B, *BamHI*; H, *HindIII*; PI, *PstI*; Hc, *HincII*; S1, *Sall*; Sm, *SmaI*; RV, *EcoRV*; Xb, *XbaI*.

CGCTCCTTGAGGTAGAGATTGCTAGGGGCGTGCTGGGGTGTCAACTGCTGTGGTGGCACA 60
CCGAGAGTGCAACCCTGCCGATGAGATACGCGCAAGATTTCTCTGAGTCCCAGCCTGCCA 120
ATCTATCTCAACAAACAAGCTTGCCACCCTTTCACAGTGAATGTCCGCCGAGCCCTGGC 180
CGTCTCGCCGCCGTACGAATTCAATGTAATATCATGGGAGCTGGGTTCGCAAATAAGGCT 240
EcoRI
AGAGGCTCTCGCACAATAGCTGGCCGTACATCAATGGGGATTCCCGAACCAATTGCA 300
GGCTTACACAACATGCAAGACGCTTTTTCTTCCAATTCGGTGAGGGATGTTCTTACAGCA 360

ATTTTCATGTTTCATAGGATTGTCAGTCGCCGACCAAGCCGTCGCGCAGAATCCAAAACAA 420
M P I G L S V A N Q A V A Q N P K Q
AACCTTCAGTACTTTGCCGTTTGCCAGTCGGGTCCGTGCGACATTTACAATGGCCGATCA 480
N L Q Y F A V C Q S G P C D I T N G G S
CGTGATCCATTTGGGTATCGGACCGAAATGTATTCTTGGGAAAGTGAGGCAGCGTCTAGA 540
R D P F G Y R T E M Y S W E S E A A S R
GCCATCGCGGATTATCTCGAAATTGATGGTTGGGATGTCCTGAGATTCAATCGGTATGG 600
A I A D Y L E I D G W D V P E I Q S V W
CGGCGTAAATGCGAAAGGGCTGAGGTGGCAACATTCCCCGTTGTCTATTACTTGTTCCCA 660
R R K C E R A E V A T F P V V Y Y L F P
CAGCAGTGGATGGGCGTGTGACTTCACTCATCAATGCTACACCTATCGGCCTGACGGT 720
Q Q W M G R V D F T H Q C Y T Y R P D G
CTGTACCCCCATCCAGTCCAGCTCCATACGTACGAAGCATAATTGTAAGTGCAAGCTGT 780
L S P P S S P A P Y V R S I I V S A S C
AGGCCAGGATTCGTCGTGAAGGACTACGACACAGGCGAGTGTGGCGTGTTCCTGGCGCC 840
R P G F V V K D Y D T G E C W R V P G A
TGTCCAGGCTATCCAGAAAATAGTACTTTTCGGATGCGGAGAAAAGCGTGGCGGAACTTCAA 900
C P G Y P E N S T F G C G E S V A E L Q
GCAACTCGAAAGAGCCAGATTGATCCCCGTCGTCTTTCCATAACCAGCAAGAGTGCATC 960
A T R K S Q I D P R R L F H N Q Q E C I
GCCAGAAAATCATGTGAATTGCCGTGCCAAATGGATAATTGCCAATGGATGGATTGGTG 1020
A R K S C E L R C Q M D N C Q W M D L V
ATCCCTGCGTTACACCAGGCCTTATCTAGACGGGGATGGCATCTGGCCAATAGTGGAGACT 1080
I P A F T R P Y L D G D G I W P I V E T
AACTGTGGCGCAATGCAGAGCCTGTTGAGCGTGGTACCTGGTGGCAAGTGGATCGCGGAT 1140
N C G A M Q S L L S V V P G G K W I A D
AGAGAGTGTTCCTCGACTATGGGCTGGAATCACGTTCAAATAGACCTCAAGGCTGCGCTT 1200
R E C F S T M G W N H V Q I D L K A A L

continued from previous page

```
GAAGCACATGGATGTGGAACGCAGAAAGACTGGGACTTGGTCGGAGACCAAATTGCACCG 1260
  E A H G C G T Q K D W D L V G D Q I A P
TGCCTACTTAAAACGGACCCTGGATATCCTAACCAGTACTACGAATTTGGCGGCGTCTTC 1320
  C L L K T D P G Y P N Q Y Y E F G G V F
GTTCCGTTGGCTCGTGAGAGAGTGAGATCGCAGTGCCTTGCTAGTCGCAATGCGCGTGGC 1380
  V R L A R E R V R S Q C L A S R N A R G
TTACCCATTGATATTAATTCTGGATTTGGAGGAAAGGTATGCCGAGCCGAGCCCTAATTT 1440
  L P I D I N S G F G G K V C R A E P *

              ────────────────────────────────────────────────────────────────────────────────────▶
TTTTGCTTCTCGCCGCTAGCTCAATGGGCGCCCCGTGCACAGAACGACGCTCCACCTACTT 1500
      M G A R A Q N D A P P T
GGACCATCCGTGCAGCGATTTCCGAAACCAGTTAGTAGGAGAATGGGAGCTATCGAAGA 1560
  W T I R A A I S G N Q L V G Q W Q L S K
TAACTTCTCAGGATGAACTGCTCCAGAAAGCAGCATCTGCTCAGATTGGCATCGCCCGTG 1620
  I T S Q D Q L L Q K A A S A Q I G I A R
GAGCCTCATTCCAGATTCAAGTCACGCTAGTTAACCCCGAGGTGCCGAGGTGGACGTTA 1680
  G A S F Q I Q V T L V N P A G A Q V D V
CTGGATCATCAAATGATTTATCGGCCAAAAGCTTGCTTGAATGTAACGTCTAGTGGCA 1740
  T G S S K L I Y R P K A C L N V T S S G
TGGCCACTCTGCCGAGCATCCCGAGTAGCCCGGGCACCTGTCAGCCTGGCGACCCACTAC 1800
  M A T L P S I P S S P G T C Q P G D P L
CAATCACCATCATATATTTGACAAGACCGCTGGAGTGGCAGCAGCAAACATGTATGCCA 1860
  P I T I I Y K D K T A G V A A A N M Y A
TGAAAATCAACTAGCCTATTGGCGCTAGATCTATTGCACTAAAGTTTCAGGAATTC 1916
  M K I N *                               EcoRI
```

Fig. 2. Nucleotide sequence of 1.9kb DNA fragment.

1.7kb *EcoRI-EcoRI* DNA fragment is insertional DNA of pSGEB1; deduced amino acid sequence is indicated underneath. arrows indicate the putative open reading frames (ORFs).

도입시킨 결과 sequence상의 ORF2를 완전히 포함하는 plasmid가 도입된 경우에만 glycinecin activity가 회복되는 것을 확인하였다. (Fig 3) 이 결과로 glycinecin은 약 39kDa의 polypeptide와 약 14kDa의 polypeptide가 함께 합성되어야만 glycinecin activity가 나타나는 것으로 확인되었고 glycinecin은 이 두 peptide가 sub-unit로 구성되어 있을 가능성이 높다고 결론내릴 수 있다. (Fig 4)

glycinecin 생성에 관계하는 환경적인 조건과 signal을 알아내 glycinecin 발현 mechanism을 알아내기 위하여 Glycinecin 생성에 관계하는 유전자의 DNA fragment의 promoter 뒤에 β -galactosidase의 structural gene을 붙여 발현양상을 조사하는 reporter gene assay를 시작하였다. β -galactosidase의 structural gene이 포함되어 있는 pMLB1034 plasmid vector에 의 promoter region을 cloning하는데 이 때 총 3개의 DNA translation frame이 생기므로 이를 모두 확인해보기 위하여 PCR을 사용하여 promoter region에 특정한 restriction enzyme site를 붙여 translation frame에 맞추어 cloning하였다. (Fig 5) 이 cloning된 plasmid를 가진 *E. coli*를 LB와 M9 minimal media에 각각 incubation시켜 ONPG(*o*-nitrophenylgalactopyranoside)를 이용하여 β -galactosidase의 발현정도를 정량하였고 (Table 1) 그결과 DNA sequence에서 예상한 frame에서 β -galactosidase activity를 확인 할 수 있었으나 ONPG를 이용한 정량은 그 sensitivity가 만족스럽지 못하며 glycinecin을 생성하는 모균주인 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 가 β -galactosidase activity를 가지고 있기 때문에 β -glucuronidase를 encoding 하는 gene을 reporter로 하는 GUS assay를 하기로 결정하였다. 이를 위해 promoter region 뒤에 promoter가 없는 β -glucuronidase를 encoding 하는 gene을 transcription fusion시킨 plasmid를 제작하여 (Fig 6, 7) 이를 gene transfer를 통해 각각 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra에 도입시켰다 이 균주를 72시간까지 LB broth에서 배양하면서 600nm에서 optical density를 측정하고 동시에 4-MUG(4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide)를 기질로 β -glucuronidase activity를 측정하였다. 그 결과 β -glucuronidase activity가 bacterial growth phase에 의해 영향을 받는데 특이적으로 bacterial growth가 stationary phase에 진입할 때 β -glucuronidase activity가 급격히 증가함을 알 수 있었다. (Fig 8) 이는 *Xanthomonas*

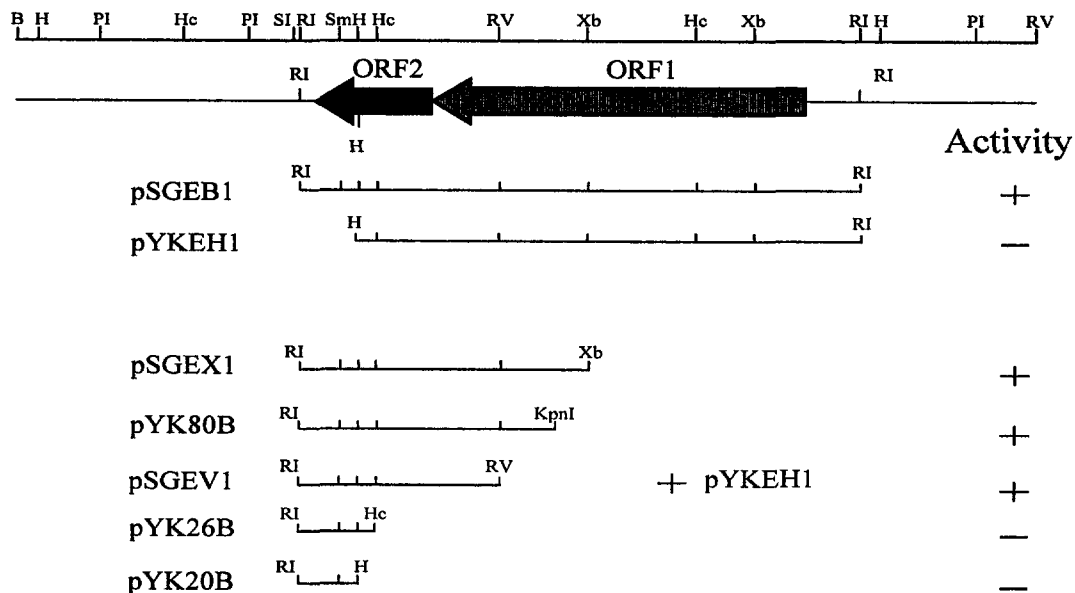


Fig. 3. Cotransformation of *E. coli* cells with pYKEH1 and recombinant plasmids. Enzyme abbreviation: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; RV, *Eco*RV; Hc, *Hinc*II; H, *Hind*III; PI, *Pst*I; S1, *Sal*I; Sm, *Sma*I; Xb, *Xba*I.

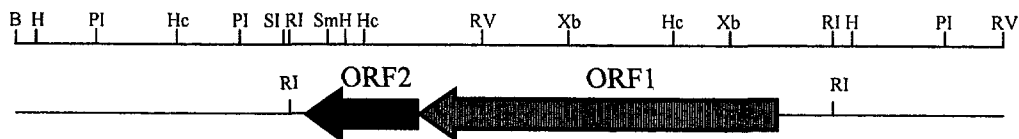


Fig. 4. Genetic organization of the ORF1 and ORF2 regions of glycinecin gene isolated from *X. c. pv. glycinis* 8ra. Enzyme abbreviation: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; RV, *Eco*RV; Hc, *Hinc*II; H, *Hind*III; PI, *Pst*I; S1, *Sal*I; Sm, *Sma*I; Xb, *Xba*I.

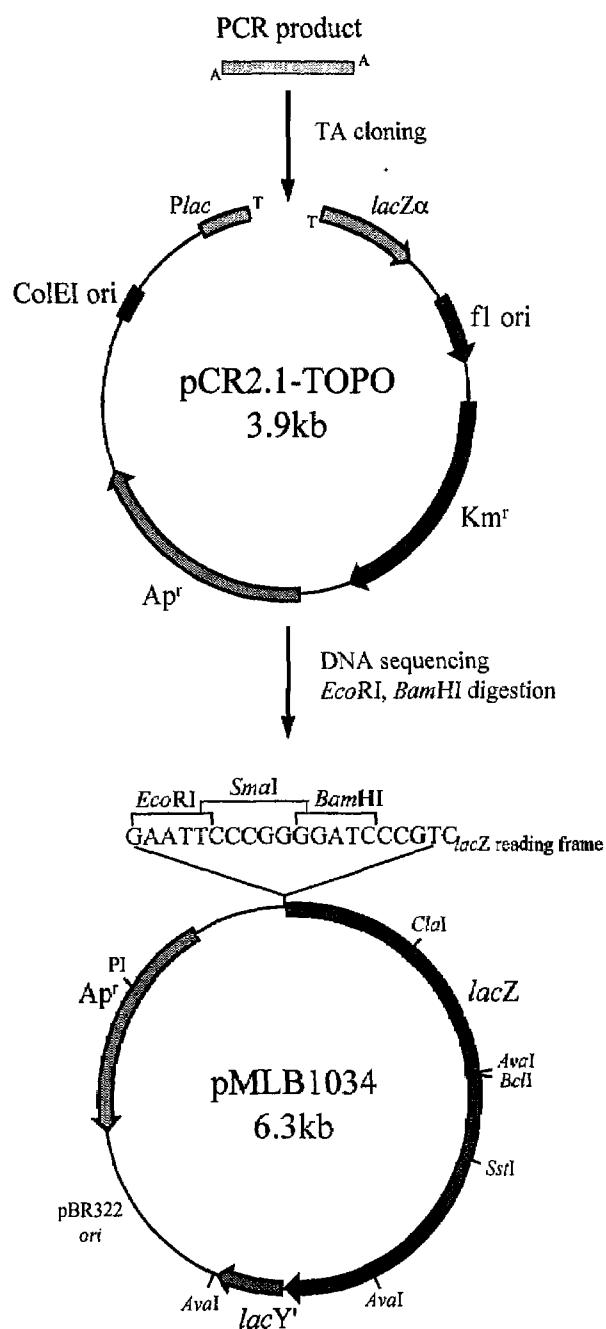
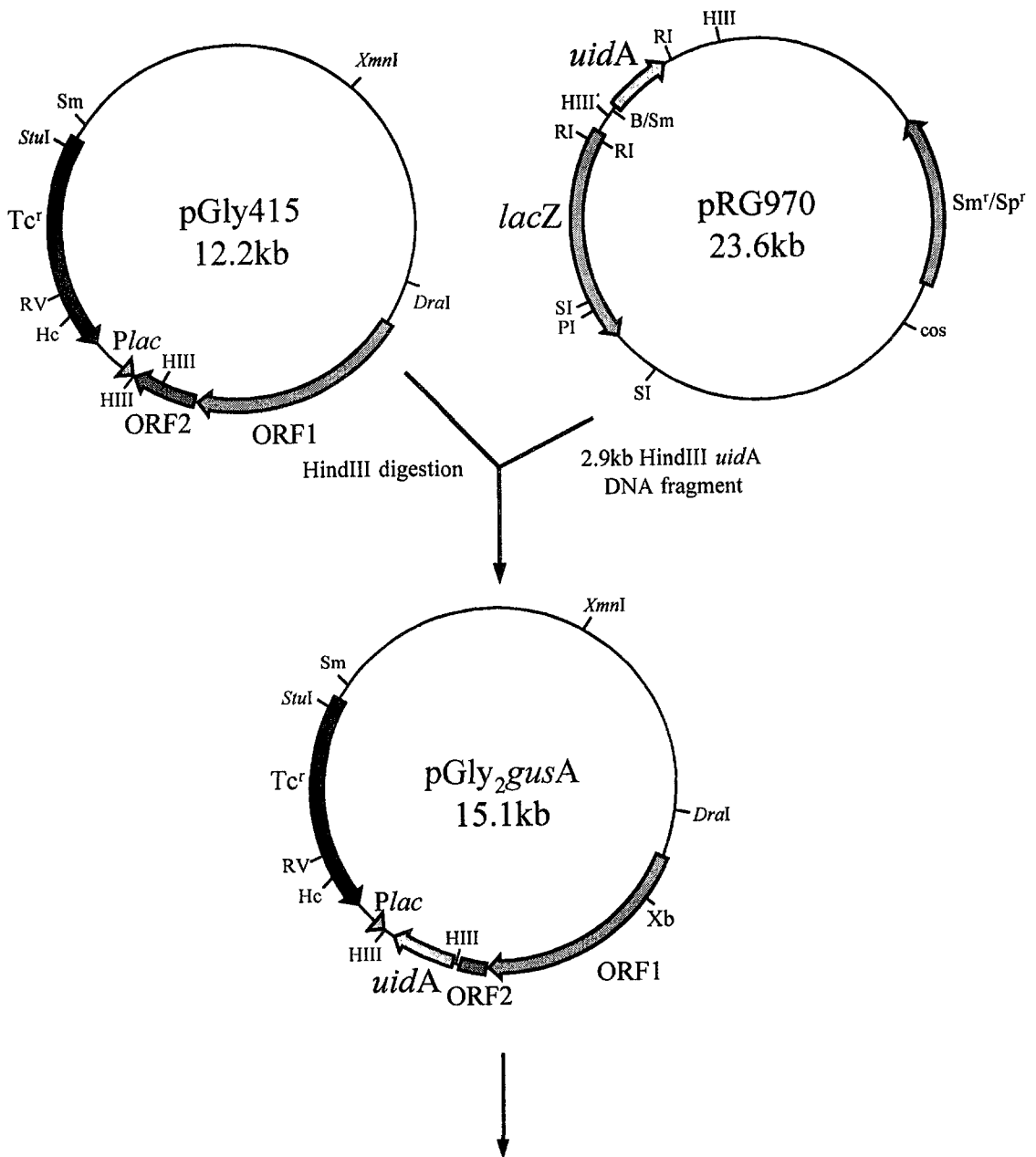


Fig. 5. Schematic diagram of TA cloning and construction of plasmids for reporter gene assay with *lacZ* fusion.

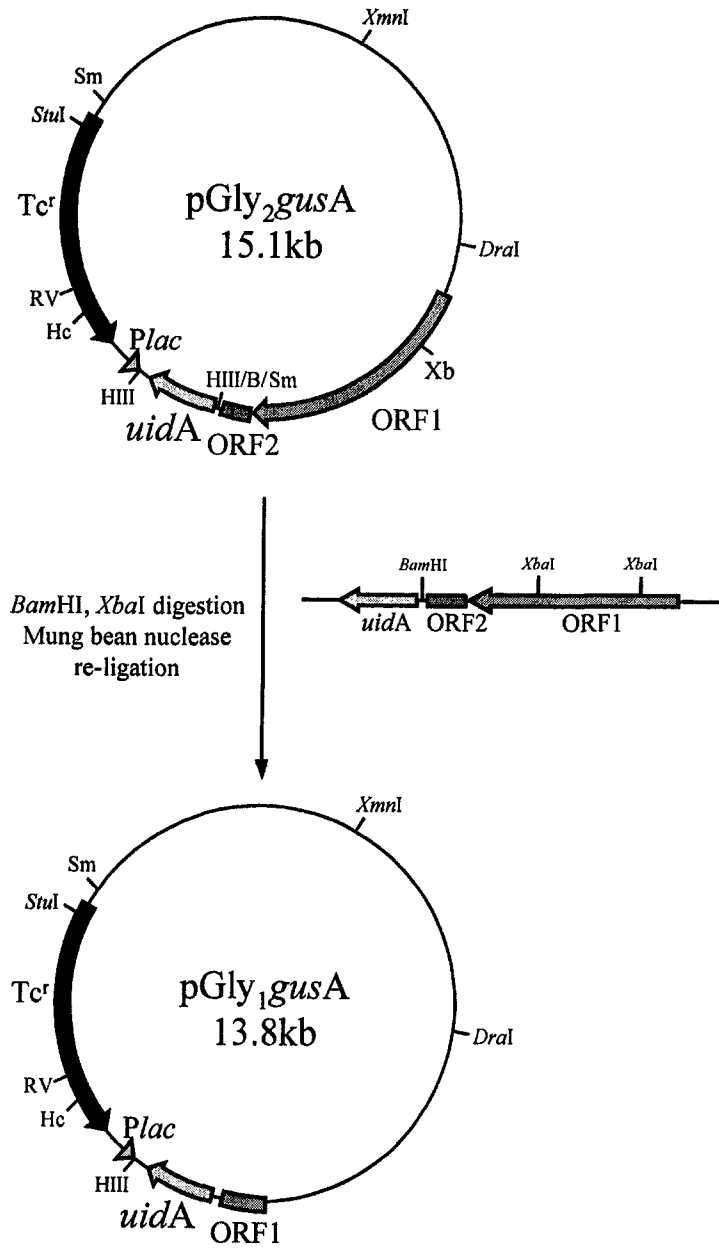
Strain	β -Galactosidase activity	
	LB medium	M9 minimal medium (0.4% glycerol)
<i>E. coli</i> DH5 α		
pMLB1034 (control)	ND ^a	ND
pGly ₁ lacZ	42 \pm 8	<2

ND^a not determined

Table 1. β -galactosidase reporter gene assay of *E. coli* clone expressed β -galactosidase under the control of the promoter of ORF1. The bacteria were grown to early stationary phase (OD =1.0) in media with appropriate antibiotics prior to assay. The activity of β -galactosidase was measured as described previously (Miller, J. H. 1992)



continued



continued

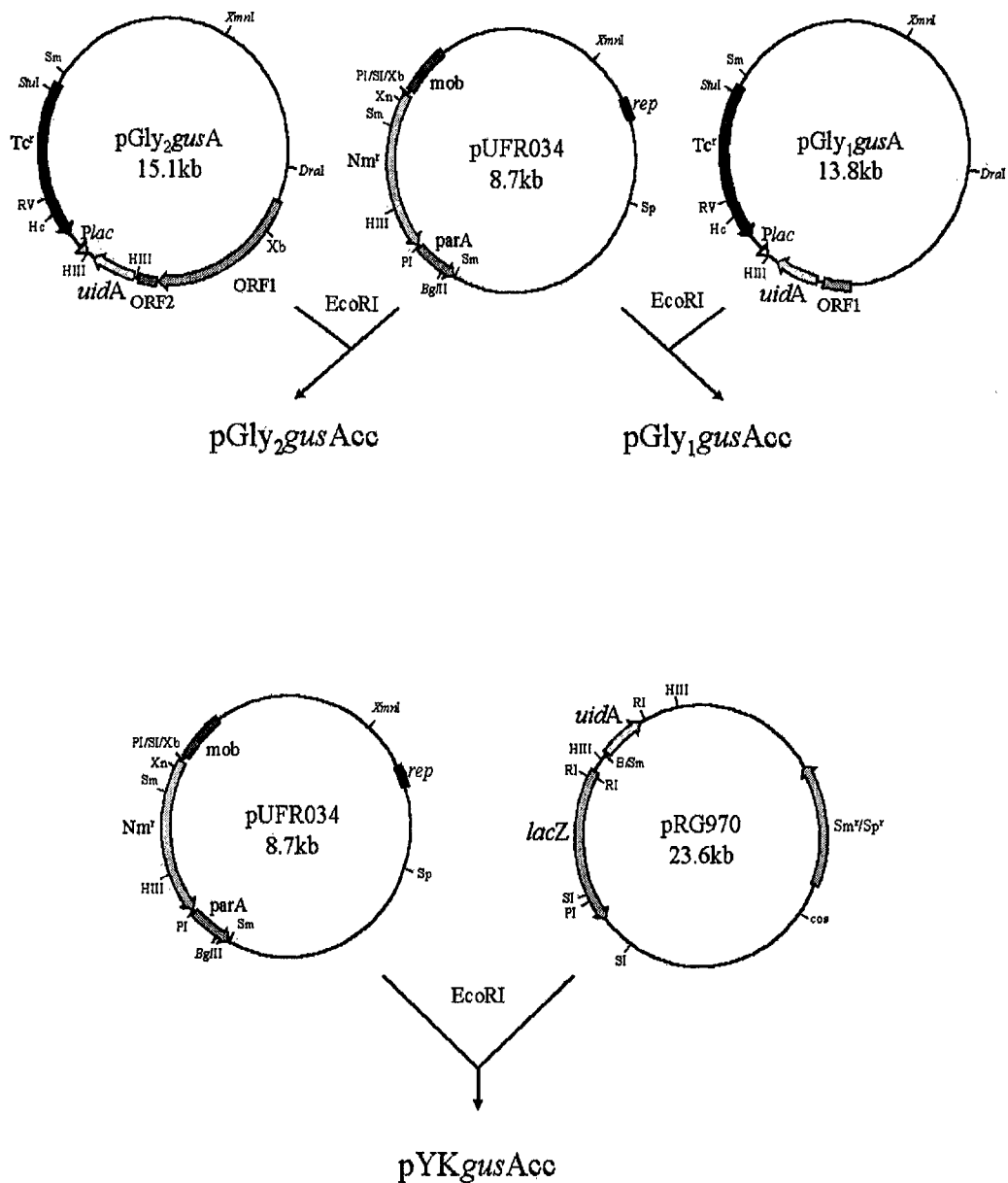


Fig. 6. schematic diagrams of construction of plasmids for reporter gene assay with GUS fusion.

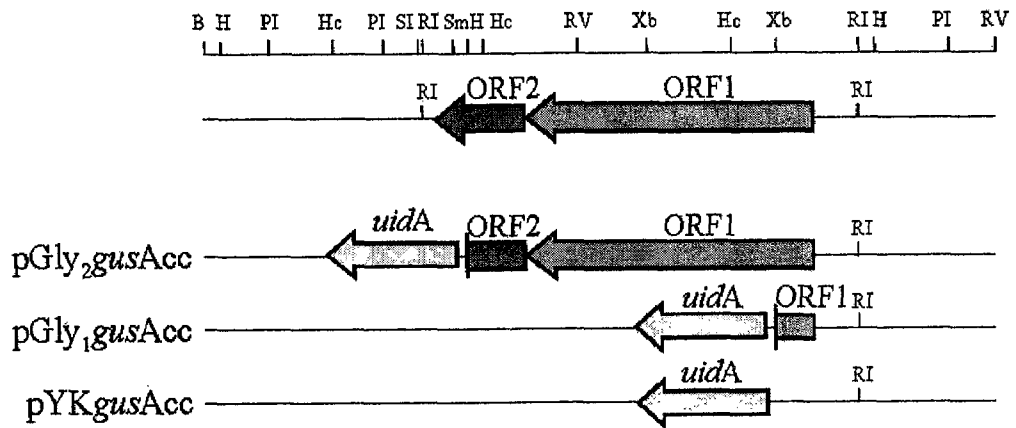


Fig. 7. schematic diagrams of plasmids for reporter gene assay with GUS fusion.
 Enzyme abbreviation: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; RV, *Eco*RV; Hc, *Hinc*II; H, *Hind*III; PI, *Pst*I;
 S1, *Sal*I; Sm, *Sma*I; Xb, *Xba*I.

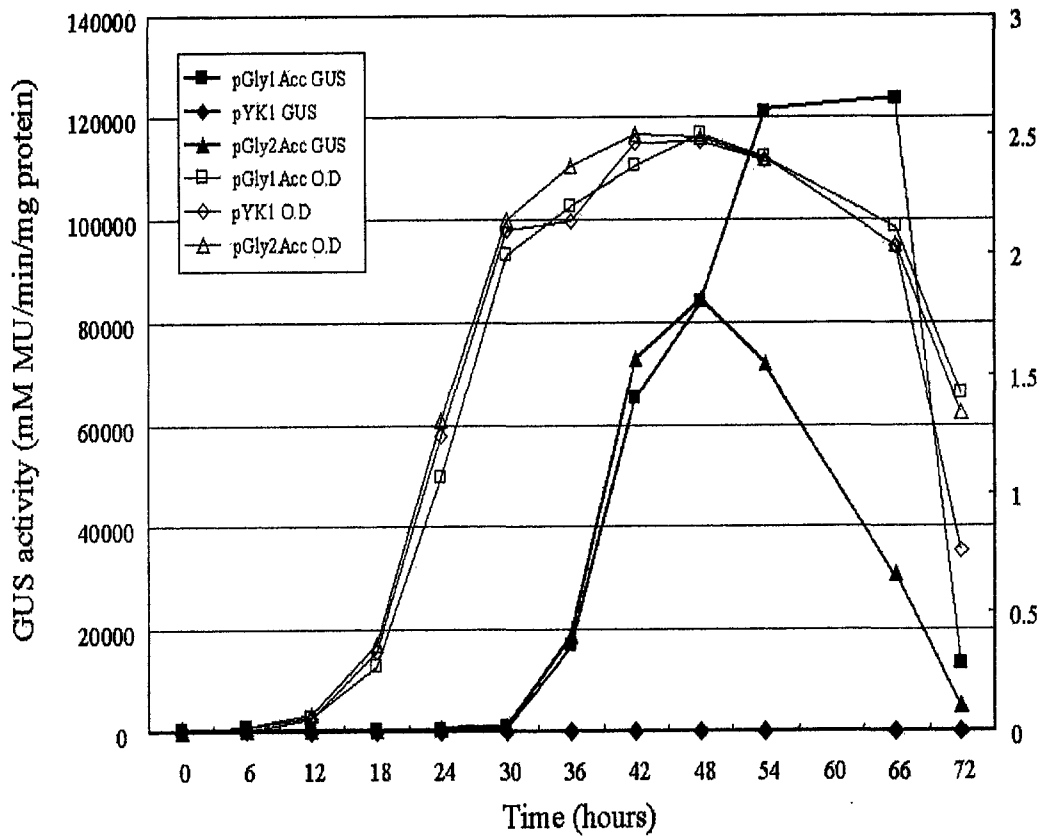


Fig. 8. The growth phase-dependent expression of ORF1 and ORF2. The expression of the plasmid-borne transcriptional GUS fusion was determined in *X. c. pv. glycines 8ra* and GUS activity of *X. c. pv. glycines 8ra* carrying pYK_{gus}Acc was also measured as a control. The strains were grown in LB medium with tetracycline and rifampicin. The growth of the bacterial cultures was monitored by measuring the absorbance (OD₆₀₀) and is indicated by open symbols. GUS activities of strains are displayed by filled symbol.

campestris pv. *glycines* 8ra가 stationary phase인 조건에서 bacteriocin을 급격히 생성하기 시작한다는 것을 알려준다.

2) 유전자의 promoter 분석 및 조작

glycinecin 생성에 관계하는 유전자의 DNA의 sequence를 PROMOTER SCAN, PROMOTER ANALYSIS등의 program을 이용하여 promoter region을 탐색하였고 (Fig 9) 이를 정확히 확인하기 위하여 β -galactosidase gene을 reporter gene으로 하는 reporter gene assay로 확인할 수 있었다. 그리고 제 1 협동과정의 N-terminal amino acid sequence결과로 glycinecin 생성에 관계하는 유전자의 open reading frame을 정확히 확인할 수 있었다. glycinecin의 생성을 보다 강하고 항상적으로 발현시켜 보다 효과적인 생물학적 방제원으로 이용하기 위하여 glycinecin 생성에 관계하는 유전자의 promoter를 pRK415 plasmid의 *lac* promoter와 pDSK600 plasmid의 *lacUV5* promoter로 치환시키는 실험을 하여 *lac* promoter로 치환시킨 pGly415Plac과 *lacUV5* promoter로 치환시킨 pGly600PlacUV5를 제작하였고 (Fig 10) glycinecin 생성에 관계하는 유전자의 원래 promoter를 가진 pGly415를 제작하여 glycinecin의 생성 정도를 함께 여러 조건에서 비교하면서 조사하였다. 그 결과 원래의 promoter를 가진 pGly415에 비교하여 약 150-200배의 glycinecin activity의 증가를 확인하였다. (Fig11)

3) 각 유전자들의 배합위한 유전자의 조작 및 다른 배합시 bacteriocin activity 측정

박테리오신 생성에 관계하는 유전자의 2개의 group인 pG08과 pG13의 subclone들을 한 박테리아 내에서 서로 독립적으로 발현될 수 있는 plasmid를 각각 한 박테리아 (*E. coli* DH5 α) 내에 도입시켜 이를 통해 2개의 bacteriocin gene에 의한 bacteriocin activity의 변화를 관찰하였다. glycinecin 생성 유전자의 모균주인 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra와 glycinecin 생성에 관계하는 유전자의 최소 단위인 1.9kb의 DNA fragment가 있는 subclone pSGEB1, pBL5 그리고 pG13의 subclone

Start	End	Score	Promoter Sequence
404	449	0.81	GGATGTTCTTACAGCAATTTTCATGTTTCATAGGATTGTCA G TCGCCGACC
436	481	0.88	GATTGTCAGTCGCCGACCAAGCCGTCGCGCAGAATCCAAA A CAAAACCTT
496	541	0.91	CCGTTTGCCAGTCGGGTCCGTGCGACATTTACAATGGCCG A TACCGTGAT
617	662	0.86	CGAAATTGATGGTTGGGATGTCCTTGAGATTCAATCGGTA T GGCGGCCTA
1206	1251	0.96	TGTTTCTCGACTATGGGCTGGAATCACGTTCAAATAGACC T CAAGGCTGC
1463	1508	0.85	ATTTGGAGGAAAGGTATGCCGAGCCGAGCCCTAATTTTT T GCTTCTCGC
1749	1794	0.84	CAAAATTGATTTATCGGCCAAAAGCTTGCTTGAATGTAAC G TCTAGTGGC
1892	1937	0.85	GGAGTGGCAGCAGCAAACATGTATGCGATGAAAATCAACT A GCCTATTGC

Fig 9. Promoter predictions by Promoter analysis program (<http://www-hgc.lbl.gov/projects/promoter.html>) with score cut off 0.80 (transcriptional start site shown in larger font):

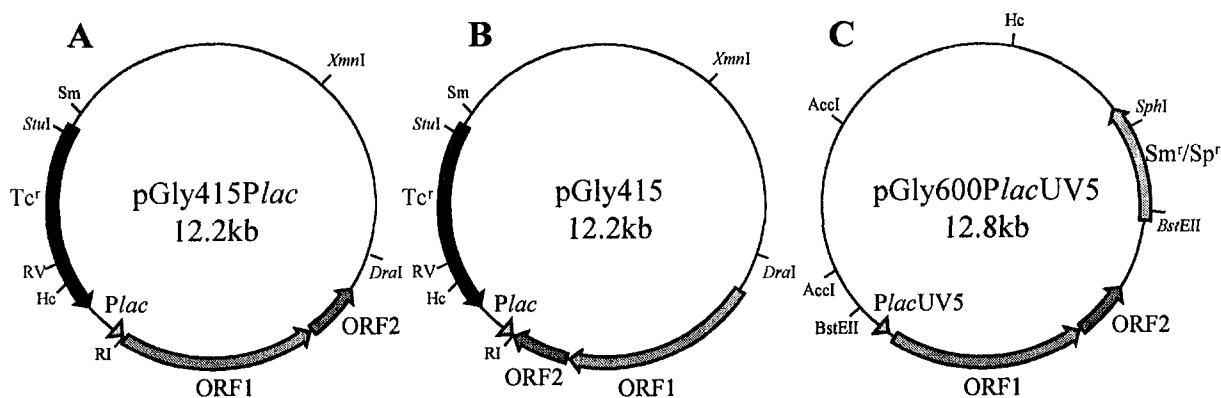


Fig 10. Maps of plasmids carrying glycinecin gene under control of a strong promoter. (A) pGly415Plac and (B) pGly415 are derivatives of pRK415 containing *lac* promoter. (C) pGly600PlacUV5 is a derivative of pDSK600 carrying *lacUV5* promoter. abbreviation: RI, *EcoRI*; RV, *EcoRV*; Hc, *HincII*; Sm, *SmaI*; Sm^r, streptomycin resistance; Sp^r, spectinomycin resistance; Tc^r, tetracycline resistance.

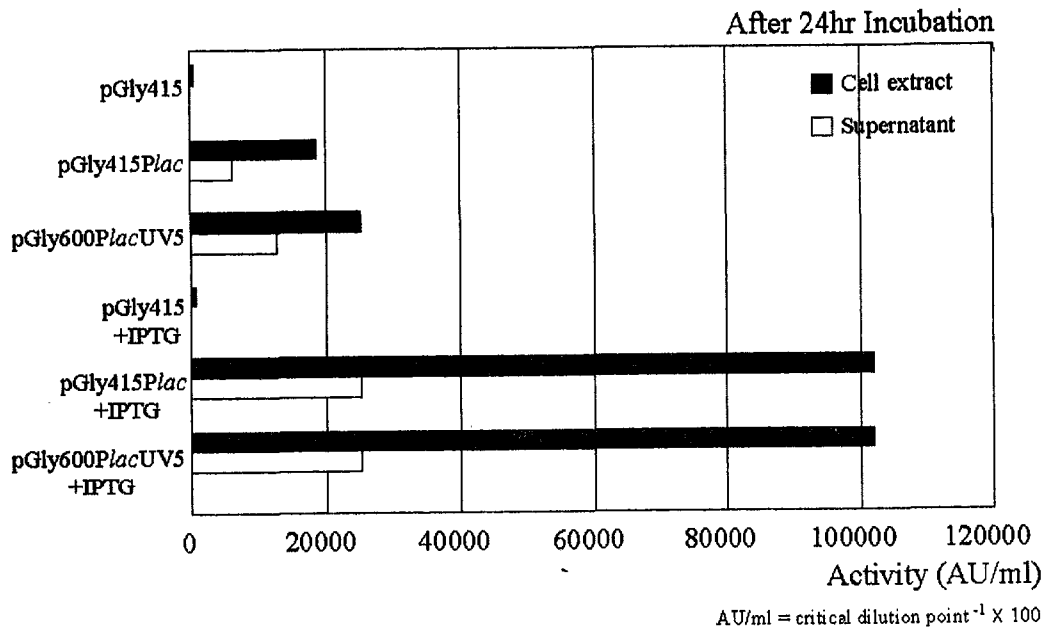


Fig 11. Bacteriocin activities of pGly415Plac and pGly600PlacUV5 substituted with lac and lacUV5 promoter The cells were grown in LB medium without antibiotics for 24 hours. *X. c. pv. vesicatoria* YK93-4 strain was used for measuring glycinecin activities.

pKYS109L, vector plasmid인 pLAFR3, pBluescriptII SK+를 각각 조합으로 *E. coli* 에 도입시킨 *E. coli* DH5 α (pSGEB1), *E. coli* DH5 α (pBL5), *E. coli* DH5 α (pBL5+pKYS109L), *E. coli* DH5 α (pBL5+pLAFR3), *E. coli* DH5 α (pSGEB1+pKYS109L), *E. coli* DH5 α (pKYS109L+pBluescriptII SK+), *E. coli* DH5 α (pKYS109L)를 각각 LB broth 에 168시간동안 배양하면서 적정시간대에 2-fold dilution으로 bacteriocin activity를 측정하였다. 그 결과 예상한 synergistic effect와는 반대로 오히려 bacteriocin activity가 격감하는 것을 관찰하였다. 이는 bacteriocin을 생성하는 세균이 자신이 생성하는 bacteriocin에 의해 자기 자신의 생장이 억제되는 것을 막기위해 세균내에서 bacteriocin의 activity를 일시적으로 억제하는 immunity response에 의한 것으로 예상하며 이 실험결과를 토대로 하면 plasmid pKYS109L에 immunity response에 관계하는 유전자가 존재할 가능성이 높다 (Fig 12)

다. 조작된 유전자를 다양한 매체로 전이

1) 각각의 유전자들의 각각 다른 매체에서의 활성측정

생물학적 방제라는 소기의 목적을 달성하기 위해 bacteriocin을 생성하는 유전자를 작물에 정착능력이 우수한 세균 등, 여러 우수한 성질을 가진 미생물에 도입시킬 필요가 있으므로 여러 미생물에 도입시켜 glycinecin을 발현시킬 plasmid vector로 broad host-range vector인 pUFR034, pRK415에 glycinecin 유전자를 삽입하여 각각 pGly034, pGly415를 제작하였다. (Fig 13) 두 plasmid 모두 비교적 작은 크기여서 여러 세균에 도입이 용이하며 신뢰할수 있는 항생제 maker를 가지고 있어 도입여부나 추적등의 이후 실험이 용이하다. 특히 pGly034는 plasmid내에 *parA*라는 독특한 유전자 영역이 존재하는데 이는 *Agrobacterium tumefaciens*의 Ti plasmid에서 유래한 것으로 plasmid 복제시 그 plasmid를 안정화시킴으로서 세균이 증식할 때 새로 증식된 일부세균이 plasmid를 보유하지못해 도입된 형질을 상실하는 것을 막아준다고 알려져 있고 실제 몇몇 세균에 이 plasmid를 도입시켜본 결과 72세대까지 총세균의 95%이상 이 이 plasmid를 갖고있음이 확인되었다. broad host-range vector인 pRK415의 *lac*

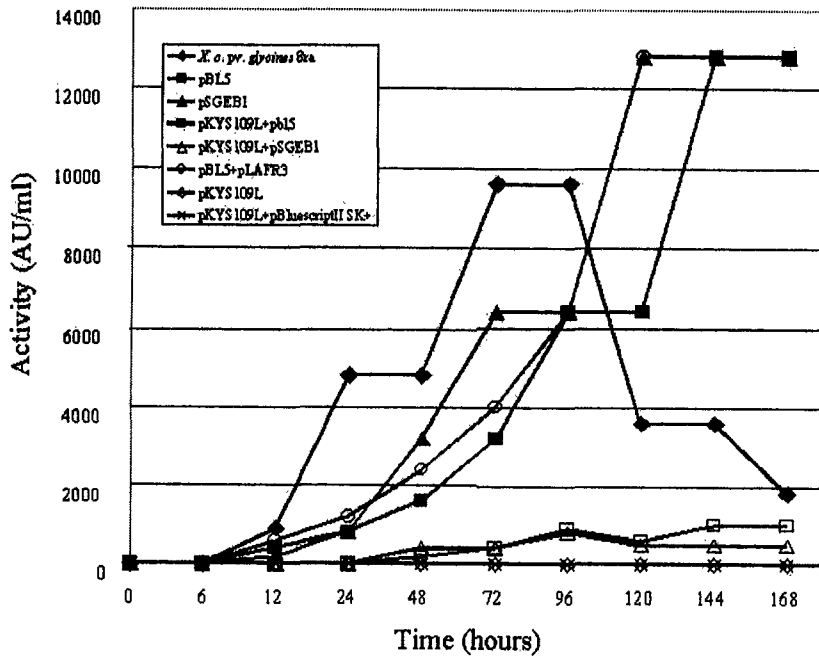


Fig 12. Comparison of bacteriocin activities with various combinations of bacteriocin synthetic genes. The cells were grown in LB medium without antibiotics for 168 hours. *X. c. pv. vesicatoria* YK93-4 strain was used for measuring glycinecin activities.

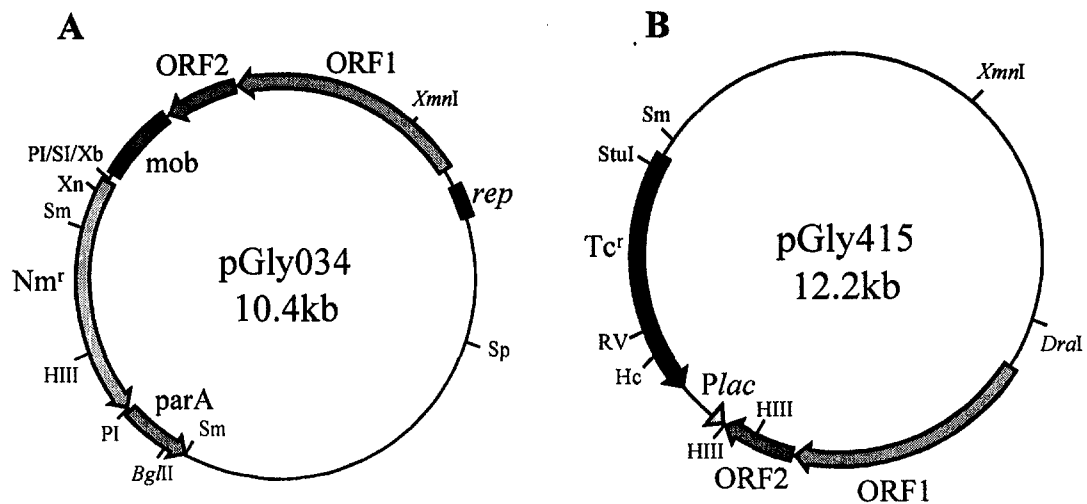


Fig 13. The broad-host-range plasmids carrying glycinecin gene. (A) map of plasmid, pGly034 (B) map of plasmid, pGly415. abbreviation: RV, *EcoRV*; Hc, *HincII*; H, *HindIII*; Sm, *SmaI*; Sp, *SphI*; Xb, *XbaI*; Xh, *XhoI*; Nm^r, neomycin resistance; Tc^r, tetracycline resistance; *rep*, replication region; *mob*, conferring plasmid mobilization ability; *parA*, partition locus from pTAR.

promoter와 pDSK600의 *lacUV5* promoter를 이용하여 보다 많은 glycinecin을 발현시킬 plasmid로 pGly415Plac과 pGly600PlacUV5를 제작하였고 이것은 *E. coli*에서 IPTG로 유도하였을 때 원래보다 200배가량 bacteriocin activity가 증강된 바를 확인한 바 있다 이 plasmid를 *E. coli*에 도입시키면 강력하게 glycinecin을 발현시켜 충분한 glycinecin을 얻을 수 있다. 가혹한 환경조건에서 생존률이 좋고 정착능력이 매우 우수한 *Bacillus*속 세균들에 적용할 수 있게끔 pHY300PLK를 vector로 glycinecin을 발현시킬 수 있는 plasmid pGly300PLK를 제작하였다.

2) 각각의 조작된 유전자를 각각의 매체로 conjugation이나 transformation을 이용하여 전이

E. coli S17-1은 그 염색체내에 plasmid mobilization에 관계하는 유전자가 삽입된 균주로 여기에 plasmid를 transformation하여 그 plasmid를 도입시킬 목적세균을 접합시키면 대단히 높은 효율로 plasmid는 *E. coli* S17-1에서 목적세균으로 옮겨지게 된다. (Fig 14) 이 방법을 통해 *Pseudomonas fluorescence*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Erwinia herbicola*에 pGly034등을 도입시켰다. 그 외 실제 온실과 포장의 고추엽면에서 분리하여 정착능력이 우수할 것으로 기대되는, (biolog system으로 동정한 결과 *Pseudomonas putida*로 밝혀진) 세균에 대해서도 같은 실험을 수행하였고 모두 비교적 높은 수준의 glycinecin의 발현이 관찰되었다. (Fig 15) 그리고 *Bacillus*속 세균들에 적용할 수 있는 plasmid인 pGly300PLK를 electroporation을 통해 도입시켰으나 activity를 관찰할 수 없었다. 그 이유로 생각되어진 것은 그램양성균인 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra의 glycinecin gene이 그램양성균인 *Bacillus*속 세균내에서는 제대로 발현되지 않기 때문이라고 생각되어진다. 이를 극복하기 위해서는 *Bacillus*속 세균내에서도 발현이 가능한 *Bacillus* 특유의 promoter를 이용하여야 발현이 가능할 것으로 보이나 본 연구에서는 *Bacillus*에 glycinecin을 도입시키는 것은 포기하고 이미 발현이 가능한 여러 부생세균들을 가지고 이후의 실험을 계속하였다.

3) 각각의 유전자들의 각각 다른 매체에서의 활성 측정

여러 세균들에 적용할 수 있는 plasmid로 pGly034와 pGly415를 제작했으나 활성, 도입 효율등에 있어 pGly034가 훨씬 우수하였고 오랫동안 plasmid가 안정하게 존재하여 안정적인 bacteriocin 발현이 가능하다는 점으로 이후 모든 실험은 pGly034로 실시하였다. pGly034를 각각 *E. coli* S17-1, *Pseudomonas fluorescence*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61, *Erwinia herbicola*에 도입한 결과 bacteriocin activity를 확인할 수 있었고, 특징적인 것은 bacteriocin activity가 도입된 세균들에 따라 그 정도의 차이를 보였으며 *Pseudomonas*속 균주들이 비교적 강하게 나타났다. (Fig 15) pGly034가 도입된 *Pseudomonas fluorescence*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61, *Erwinia herbicola*를 72시간동안 배양하면서 총세균수, 배양액의 bacteriocin activity, 세균마쇄액의 bacteriocin activity를 측정한 결과 (Fig 16, Fig 17, Fig 18) 이들 세균은 총세균수에 있어서는 모두 비슷한 수준을 보이나 bacteriocin activity에서는 분명한 차이를 보이고 있으며 *Pseudomonas fluorescence*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61은 세균배양액의 bacteriocin activity가 점차적으로 높은수준으로 나타나고 있는 것으로 보아 glycinecin의 분비가 제대로 되고있음을 시사하며 이는 생물학적 방제원으로 이용하고자할 때 좋은특성으로 작용할 것이다. 이들 균주들의 작물 엽면에서의 정착능력을 온실내 고추에 각각 균을 spray하여 일간격으로 엽면에서의 목적세균 population의 경시적 변화를 관찰하였다. (Fig 19, Fig 20) 그 결과 glycinecin을 도입한 균주들도 wild type의 부생균과 비슷한 수준의 정착능력을 나타냈으며 오랫동안 비교적 충분한 수준으로 population이 유지되고 있어 우수한 병발생 억제효과가 기대된다.

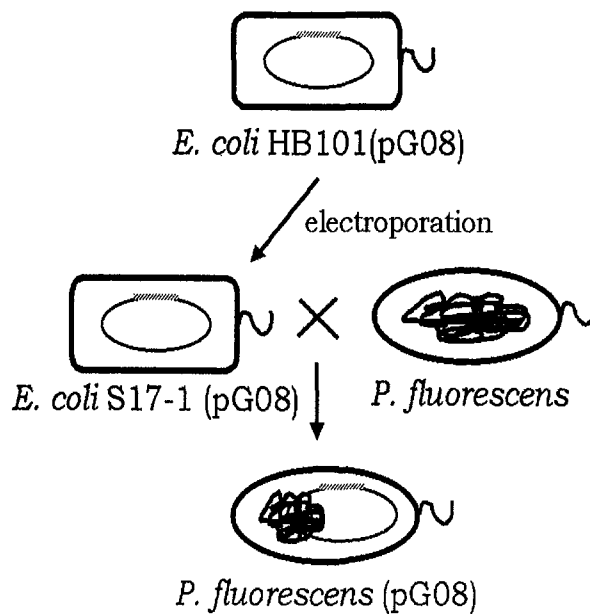


Fig 14. Schematic diagram of biparental mating between *E.coli* S17-1 and *P. fluorescens*

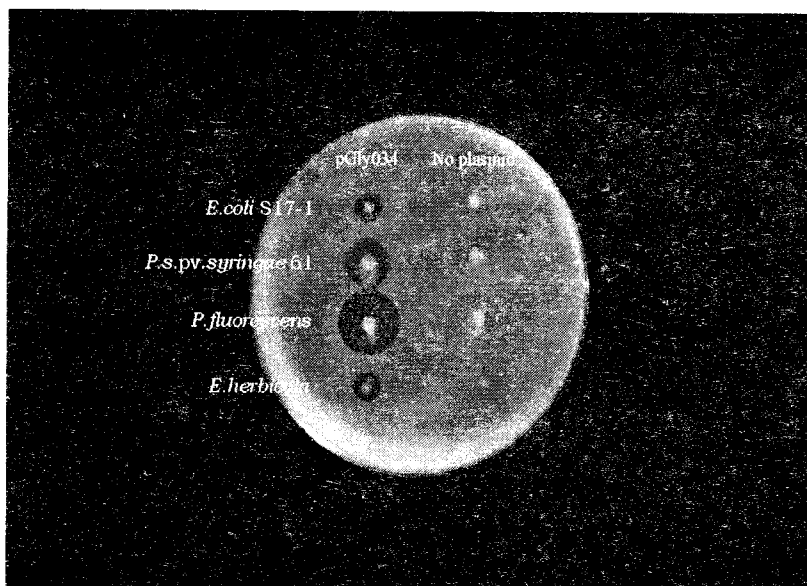


Fig 15. The glycinic acid activities of various bacterial species carrying plasmid, pGly034

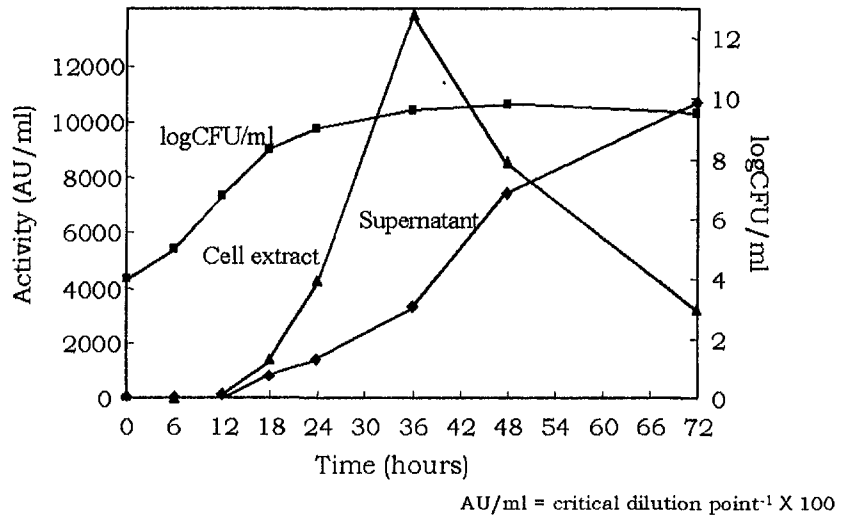


Fig 16. The glycinecin activities of *P. fluorescens* (pGly034)

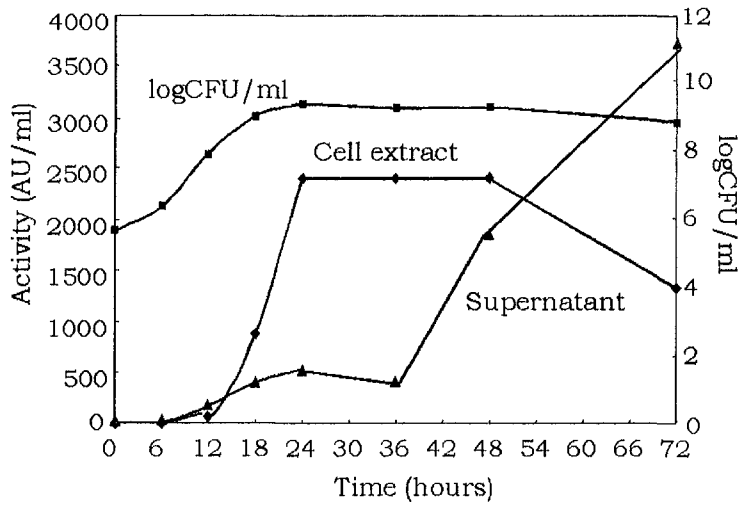


Fig 17. The glycinecin activities of *P. syringae* pv. *syringae* 61 (pGly034)

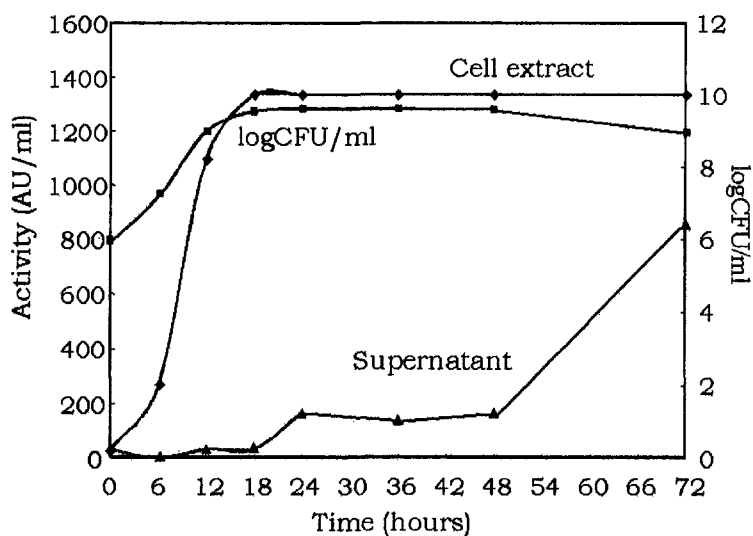


Fig 18. The glycinecin activities of *E. herbicola* (pGly034)

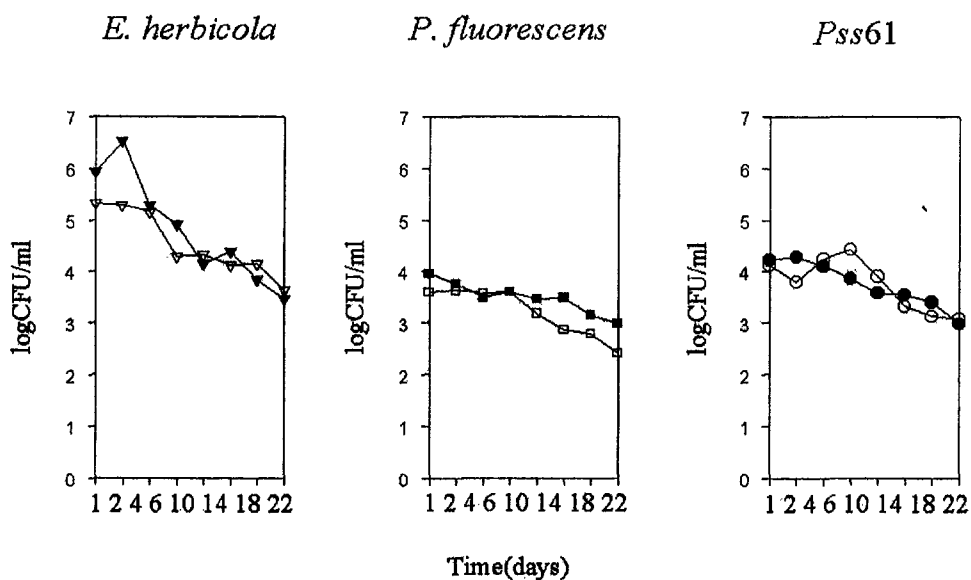


Fig 19. Population changes of epiphytic bacteria (*E. herbicola*, *P. fluorescens*, *P. syringae* pv. *syringae* 61(*Pss61*)) carrying plasmid, pGly034 on pepper leaves

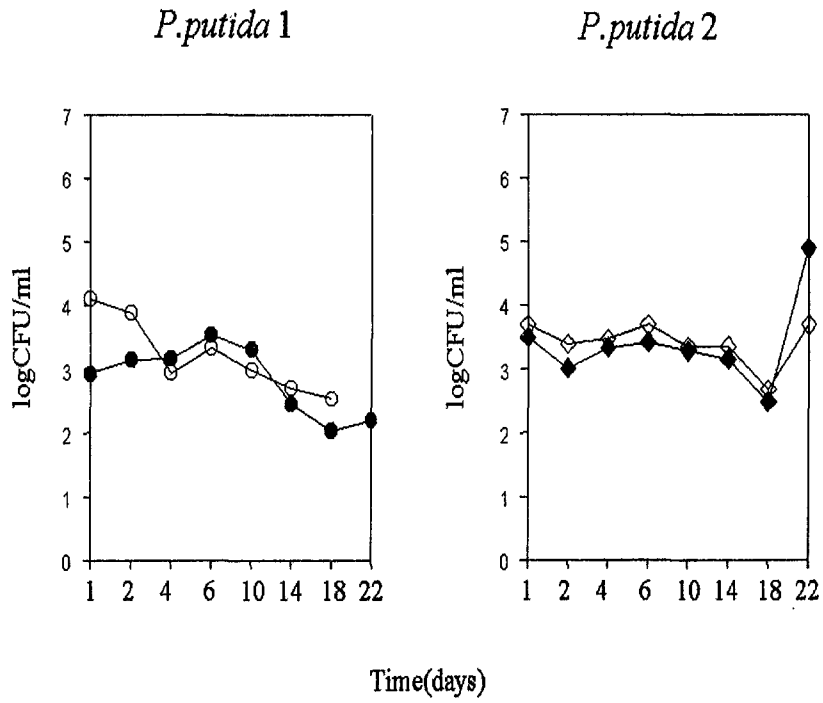


Fig 20. Population changes of epyphytic bacteria (*P. putida 1* and *2*) carrying plasmid, pGly034 on pepper leaves

제2절 제1협동과제 : Bacteriocin "glycinecin" 의 작용기작 연구 및 효능 개량

1. 연구내용 및 결과

가. glycinecin의 최적생산 조건 및 순수분리 분석

1) 균의 bacteriocin 분비의 최적조건 선별

초기의 실험수행에서 추측하였던 것은 glycinecin이 cell 밖으로 배출되는 것으로 판단을 하였기 때문에, 순수분석을 하기 위해서 bacteriocin 생성 균주의 최적의 배양시간과 생성을 설정할 필요가 있었다. glycinecin 분비의 최적조건을 구하기 위해서 bacterial growth에 따른 bacteriocin activity를 측정하였고, 측정 시 producer strain인 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra외에 glycinecin 생성관련유전자를 클로닝한 pBL5를 참고로 사용하였다. glycinecin의 생성과 온도와의 관계를 알아보았다. 온도는 20℃와 30℃를 비교하고 pH 6, 7, 8, 9에는 균을 키우면서 glycinecin의 생성을 알아보았다. 또한 NB, LB, PSB 등의 media의 효과도 시험하였다. glycinecin의 생성은 producer bacterial cell 수가 10^7 CFU/ml정도가 되어야 bacteriocin detection이 가능하였고 pH는 7과 8, LB media에서 배양조건이 최적이었다. cell을 키우는 동안 배지에서는 축적이 됨을 알 수 있었다. *E.coli* DH5 α 의 경우 시간이 경과할수록 계속 배지에 축적이 되며, 2일 배양시의 bacteriocin activity보다 약 10 배의 더 많은 activity를 보였다. 여기에서 얻은 배양액을 이용하여 정제과정으로 들어갔다. 하지만 정제하기에는 낮은 농도의 glycinecin이 얻어졌기 때문에 대량 배양이 필요하게 되었다. 생화학적인 특징 연구수행에서 *E.coli* subclone에서는 glycinecin이 cell 밖으로 배출되는 것이 아니고 cell내에 존재함을 cell을 ultra-sonication으로 cell을 파괴시키면서 알 수 있었다. *E.coli* (pBL5)인 경우 cell extract와 supernatant를 비교하였을 때 cell extract가 최고 15배 정도 activity가 높게 나옴을 볼 수 있었다. 이 결과로 배양액이 아닌 정제를 위한 대량배양의 문제점을 해결할 수 있었고, 정제과정 초기단계를 어느 정도 간단히 줄일 수 있었다. 또한 cell에서 crude glycinecin을 얻은 후 안정화

시킬 수 있는 buffer의 pH의 선정이 우선 조건이었기 때문에 pH를 바꾸면서 5, 15, 25, 35℃에서 일정시간 incubation한 후 glycinecin activity변화를 연구하였다. glycinecin은 pH 7-9에서 35℃에서도 전반적으로 안정된 activity를 보였지만, 특히 pH 8-9 에서 안정성을 보였다.

2) glycinecin의 순수분리 및 생화학적 특성분석

배양조건 선정과 glycinecin의 안정성 유지를 위한 buffer pH의 선정이 이루어졌기 때문에 정제방법의 선택이 필요하였다. 정제방법은 일반적인 단백질 정제 방법을 이용하기로 하였고, 전체적인 과정은 ammonium sulfate precipitation 그리고 column chromatography과정이 주된 과정이었다 (그림 1).

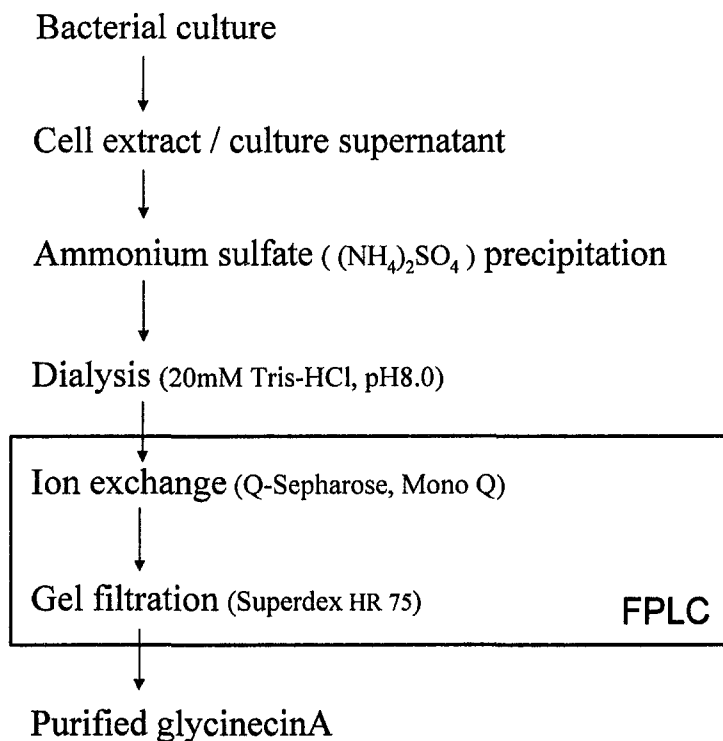


그림 1. GlycinecinA의 정제과정

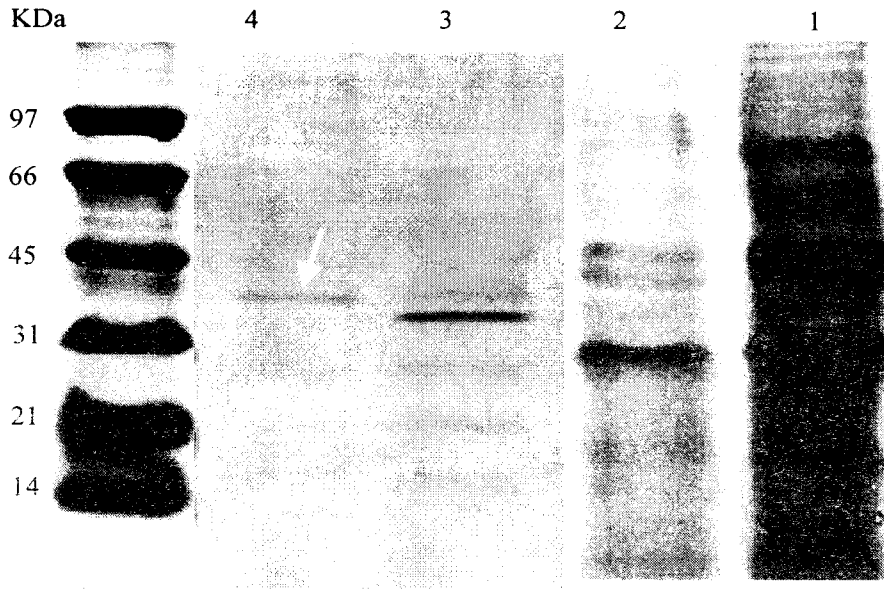


Fig. SDS-PAGE analysis of fractions from GlycinecinA purification steps. Lane 1, culture supernatant; lane 2, ammonium sulfate precipitation 30 -60%; lane 3 and lane 4, active fraction after FPLC anion exchange chromatography; lane M, molecular mass standards (phosphorylase, 97.4kDa; bovine serum albumin, 14.2kDa; ovalbumin, 45kDa; carbonic anhydrase, 31kDa; soybean trypsin inhibitor, 21.5kDa; lysozyme, 14.4kDa). The arrow indicates the protein band of GlycinecinA .

glycinecin 유전자의 subclone인 pBL5 혹은 pSGEB1을 producer cell로 사용을 하였고, cell 배양후 cell만을 모아서 sonication을 하였다. 이 cell extract를 20-40 %의 ammonium sulfate로 precipiteion시켰다. 가장 활성이 높은 fraction을 선택하여, 20mM Tris-HCl, pH8.0로 투석시키고 desalting하였다. desalting한 단백질을 anion-exchange column(Q-sepharose, mono Q)와 gel-filtration column(Superdex 75)를 사용하여 정제를 하였다 (표 1). SDS-PAGE의 단백질 profile로 보아 거의 순수한 glyciencin을 볼 수 있었다 (그림 2). 약 38kDa 크기의 glycinecin을 GlycinecinA로 명명하였다. 과연 이 band가 activity와 일치하는 지 확인하기 위해서 native gel(pH8.8)에서 activity band를 잘라내어 electroelution하고 SDS-PAGE에서 관찰한 결과 동일한 38kDa의 band를 확인하였다 (그림 3, 4).

Sample	Total Protein (mg)	Total Activity (AU)	Specific Activity (AU/mg)	Activity Recovered (%)	Fold Purification
Cell extract	300	7,680,000	25,600	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation 20 - 40%	18.575	3,840,000	206,729	50	8.1
Q-sepharose	4.2	112,000	304,762	1.7	12
Mono Q	0.14	3,200	400,000	0.4	16
Gel-filtration	5.3 µg/ml	2,400	452,830	0.3	18

표 1. GlycinecinA의 정제 table.

그림 2. 정제 단계에 따른 SDS-PAGE 단백질 profile.

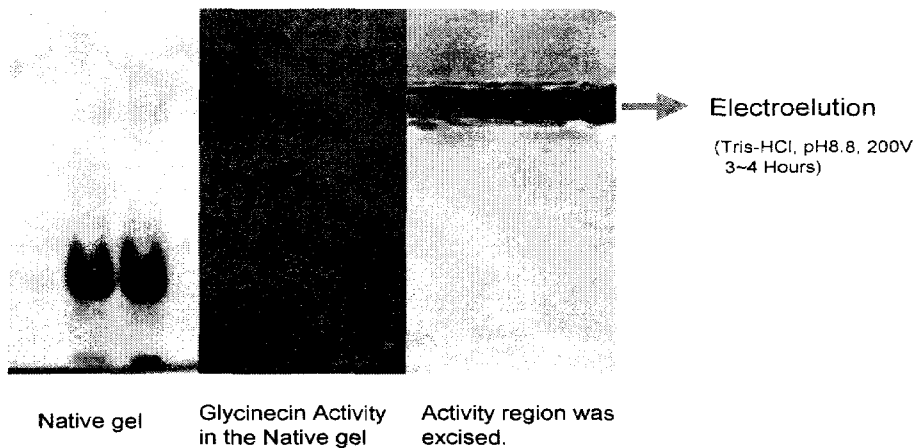


그림 3. Native gel상에서 GlycinecinA의 active region을 잘라내는 과정

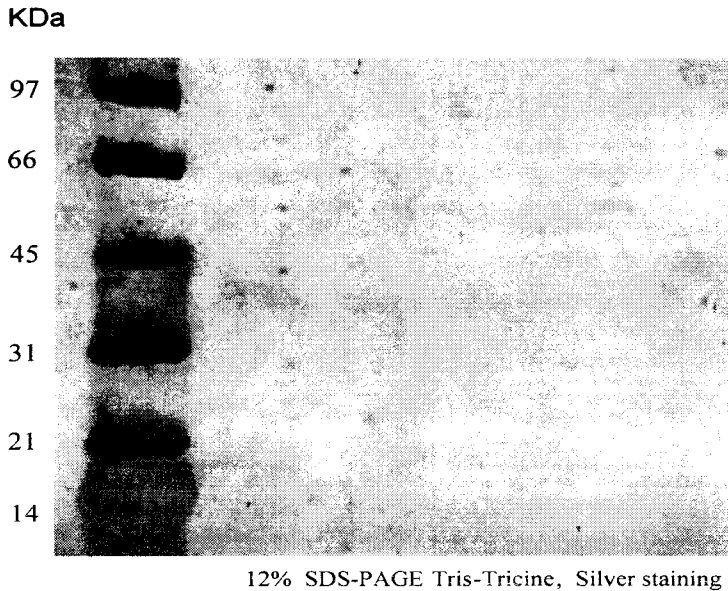


그림 4. GlycinecinA의 활성을 가진 gel조각을 electroelution후 SDS-PAGE에서 관찰, 동일한 38kDa의 band를 확인하였다.

이미 GlycinecinA의 생성관련 유전자의 부위의 DNA의 서열은 확인이 되어 있는 상태이지만, ORF의 위치는 모호한 상태였다. 이러한 이유에서 정제된 단백질의 N-terminal sequencing 연구가 필요하게 되었다. 기본적인 정제방법의 설정이 이루어졌기 때문에 정제 후 SDS-PAGE로 단백질 profile을 보아 거의 순수한 GlycinecinA을 얻을 수 있었으며, 이전에 정제가 되었던 39kDa의 band와 같이 존재하는 14 kDa 정도의 band를 확인할 수 있었다. 14kDa의 단백질을 확인하기 위하여, N-terminal amino acid sequencing을 10mM CAPS (3-cyclohexylamino-1-propane-sulfonic acid) buffer로 electroblotting을 하였다. 그 결과 GlycinecinA의 39kDa의 ORF 뒤에 또 다른 ORF가 overlapping되면서 존재하는 것을 확인하였다. 이것은 14kDa 단백질이 GlycinecinA의 활성에 관여하는 subunit이라는 것을 보여주는 결과였다 (그림 5). 흥미로운 점은 이 39kDa과 14kDa의 2개의 단백질이 모두 N-terminal에서 각각 13개, 20

개의 signal peptide를 가진다는 것이다. 이 sequence는 GlycinecinA가 cytoplasmic membrane을 통과할 때 중요한 기능을 하고 있을 것이라 보고 있다. 활성을 가지고 있는 GlycinecinA은 signal peptide가 잘려나간 상태가 될 것이며, 실제 N-terminal sequencing 결과도 잘려나간 부위 이후에서 아미노산을 읽을 수 있었다. 현재 GlycinecinA는 periplasmic space에 존재하는 것으로 보고 있다. 그리고 *E.coli*에서는 GlycinecinA가 periplasmic space에 주로 존재하는 것을 볼 수 있었다. 모균주인 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra에서는 생합성된 GlycinecinA가 대부분 cell밖으로 분비되는 것으로 보아 모균주에만 존재하는 어떠한 분비기작이 존재하는 것으로 보인다 (표 2).

Strains (Plasmid)	Fractions(AU/ μ g)			
	supernatant	periplasmic extract	cytoplasmic extract (soluble protein)	cytoplasmic extract (insoluble protein)
<i>E. coli</i> DH5 α (pSGEB1)	18.42	263.24	63.08	29.17
<i>X. campestris</i> pv. <i>glycines</i> 8ra	182.03	14.47	1.07	0.53

표 2. GlycinecinA의 cell에서의 존재경향.

14kDa의 단백질은 작은 크기로 존재하였기 때문에 쉽게 발견을 못하였다. 특히 GlycinecinA의 활성이 어느 정도 이상이 되어야 관찰할 수 있었다. Gel-filtration(Superdex 75)을 통하여 변성이 되지 않은 조건의 GlycinecinA의 분자량을 조사한 결과 SDS-PAGE에서 관찰되었던 약 39kDa의 크기보다 큰 약 50kDa의 부분에서 elution되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 7). 이것은 native GlycinecinA가 linear form을 형성할 수 있다는 가능성과 39kDa외에 또 다른 subunit이 존재할 수 있다는 가능성을 보여주었다. 이러한 의문점을 해결할 수 있는 실험을 수행을 하였는

데, 하나는 N-terminal sequencing을 통하여 GlycinecinA의 DNA sequence와 비교하는 것이었다. 두 단백질의 N-terminal sequencing 결과, 모두 signal sequence를 가지고 있음을 알았다. 39 kDa를 coding하는 ORF1에서는 Gln, Asn, Lys, Gln, Asn, Leu, Xaa, Tyr의 순서로 N-terminal sequencing 결과를 볼 수 있었고, 14 kDa을 coding하는 ORF2에서는 Gln, Asn, Asp, Ala, Pro의 순서로 결과를 확인할 수 있었다. 2개의 ORF 모두 Met부터 시작을 하지 않는 것으로 보아서 signal sequence를 가지고 있는 것으로 예상되었고, 하나의 GlycinecinA에는 2개의 ORF에서 나오는 2개의 단백질이 subunit을 이루고 있음을 알았다. 또한 DNA sequence에서 추측한 단백질 분자량도 SDS-PAGE에서 관찰한 크기와 거의 일치함을 보였다 (그림 6). Chemical cross linker를 사용하여 두 개의 subunit이 어떻게 GlycinecinA를 형성하고 있는지 알아보았다. DSS(Disuccinimidyl substrate) chemical cross linker를 정제된 GlycinecinA 과 반응시켜서 SDS-PAGE에서 관찰한 결과 약 55kDa의 single band를 볼 수 있었다 (그림 8). 이것은 두 molecule이 하나의 GlycinecinA의 활성을 보이는 것으로 설명할 수 있으며, gel-filtration chromatography에서 관찰된 GlycinecinA의 분자량을 설명할 수 있다. 활성을 가진 약 55kDa의 3차 구조분석은 본 실험 목적에는 꼭 필요한 전제 조건이 아니기 때문에 GlycinecinA의 생화학분석의 목표달성은 완료되었다.

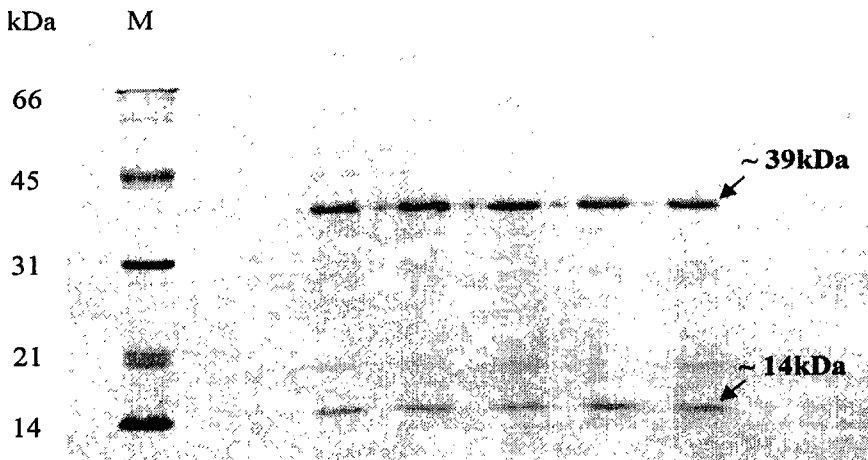


그림 5. PVDF membrane에 electroblotting된 정제된 glycinecinA.

CGCTCTTGGAGTAGAGATTGCTAGGGCGTGCTGGGGTCAACTGCTGTGGTGGCACA 60
 CCGAGAGTCAACCCCTGCGGATGAGATACGGCAAGATTCTCTGAGTCCAGCCTGGCA 120
 ATCTATCTCAACAACAGCTTGCCACCCCTTTCACAGTGAATGTCGGCGGAGCCCTGGC 180
EcoRI
 CGCTCGCCCGCTACGAATTCATGTAATATCATGGGAGCTGGGTTCGCAATAAGGCT 240
 AGAGGCTCTCGCAAAATAGCTGGCCGTACATCAATGGGATTTCCGAAACCAATTCGA 300
 GGCTTACACAACATGCAAGCGCTTTTCTTCCAATTCGGTGGAGGATGTTCTTACAGCA 360
 M Q D A F S S N S V R D V L T A
 ATTTTCATGTTTCATAGGATTGTGAGTCGCCGACCAAGCCGTGCGCGAGAATCCAAACAA 420
 I F M P I G L S V A N Q A V A Q N P K Q
 AACCTCAGTACTTTGCCGTTTCCAGTCGGTCCGTGCGACATTTACAATGGCGGATCA 480
 N L Q Y F A V C Q S G P C D I T N G G S
 CGTGATCCATTTGGGTATCGGACCGAAATGTATTCTTGGGAAAGTGGCGAGCGTCTAGA 540
 R D P F G Y R T E M Y S W E S E A A S R
 GCCATCGCGGATTTCTCGAAATGATGGTGGGATGTCCTGAGATTCAATCGGTATGG 600
 A I A D Y L E I D G W D V P E I Q S V W
 CGCGTAAATGCGAAAGGGCTGAGGTGGCAACATCCCCCTGTCTATTACTTGTCCCA 660
 R R K C E R A E V A T F P V V Y Y L F P
 CAGCAGTGGATGGGGCGTGTGACTTCACTCATCAATGTACACCTATCGGCCGTGACGGT 720
 Q Q W M G R V D F T H Q C Y T Y R P D G
 CTGTACCCCCATCCAGTCCAGTCCATACGTACGAAGCATAATTTAAAGTCAAGCTGT 780
 L S P P S S P A P Y V R S I I V S A S C
 AGGCCAGGATTCGTGTAAGGACTACGACACAGGCGAGTGTGGCGTGTCTCGGGCC 840
 R P G F V V K D Y D T G E C W R V P G A
 TGTCCAGGCTTCCAGAAAATAGTACTTTCCGATGCGGAGAAAGCTGGCGGAACCTCAA 900
 C P G Y P E N S T F G C G E S V A E L Q
 GCACTCGAAAGAGCGAGATTGATCCCGTCTGCTTTTCGATAACCGAGCAAGAGTGCATC 960
 A T R K S Q I D P R R L F H N Q Q E C I
 GCCAGAAAATCATGTGAATTCGCGTGCCTGCAAAATGGATAATTCGCAATGGATTTGGTG 1020
 A R K S C E L R C Q M D N C Q W M D L V
 ATCCCTGGCTTACCAGGCCCTTATCTAGACGGGATGGCATCTGGCCAAATAGTGGAGACT 1080
 I P A F T R P Y L D G D G I W P I V E T
 AACTGTGGCGCAATGCAGAGCCTGTTGAGCGTGGTACCTGGTGGCAAGTGGATCGCGGAT 1140
 N C G A M Q S L L S V V P G G K W I A D
 AGAGAGTGTCTTCGACTATGGGCTGGAATCACGTTCAAATAGACCTCAAGGCTGCGCTT 1200
 R E C F S T M G W N H V Q I D L K A A L
 GAAGCACATGGATGTGGAACGACAGAAAGACTGGGACTTGGTCGGAGACCAAAATGCACCG 1260
 E A H G C G T Q K D W D L V G D Q I A P
 TGCCTACTTAAAACGGACCCTGGATATCCTAACAGTACTACGAATTTGGCGCGCTCTTC 1320
 C L L K T D P G Y P N Q Y Y E F G G V F
 GTTCGTTGGCTCGTAGAGAGTGAATCGCAGTGCCTTGCCTAGTCGCAATGCGCGTGGC 1380
 V R L A R E R V R S Q C L A S R N A R G
 TTACCATTGATATTAATCTCGGATTGGAGAAAGGATATCCGAGCCGAGCCCTAATTT 1440
 L P I D I N S G F G G K V C R A E P *
 M P S R A L I
 TTTTGTCTCGCCGCTAGCTCAATGGGCGCCGTGCACAGAACGAGCTCCACCTACTT 1500
 F L L L A A S S M G A R A Q N D A P P T
 GGACCATCCGTCAGCGGATTTCCGGAACCAAGTGTAGGAGAATGGAGCTATCGAAGA 1560
 W T I R A A I S G N Q L V G E W E L S K
 TAACTTCTCAGGATGAATGCTCCGAAAGCAGCATCTGCTCAGATTGGCATCGCCCGTG 1620
 I T S Q D E L L Q K A A S A Q U G I A R
 GAGCCCTATCCAGATTCAAGTCAGCTAGTTAACCCCGCAGGTGCCGAGTGGACGTTA 1680
 G A S F Q I Q V T L V N P A G A E V D V
 CTGGATCATAAAATGATTATCGGCCAAAAGCTTGTGAAATGTAACGCTAGTGGCA 1740
 T G S S K L I Y R P K A C L N V T S S G
 TGGCCACTGCGCAGCATCCCGAGTAGCCCGGGCACCTGTGAGCTGGCGACCCACTAC 1800
 M A T L P S I P S S P G T C Q P G D P L
 CAATCACCATCATATATTTCGACAGCCGCTGGAGTGGCAGCAGCAACATGTATGCGA 1860
 P I T I I Y F D K T A G V A A A N M Y A
EcoRI
 TGAATAACCACTATTCGGCTAGATCTATTGCACTAAAGTTTCAGGAATTC 1916
 M K I N *

ORF 1
(39kDa)

ORF 2
(14kDa)

그림 6. GlycinecinA의 ORF1과 ORF2. 굵게 표시된 아미노산은 N-terminal sequencing과 일치하는 부분.

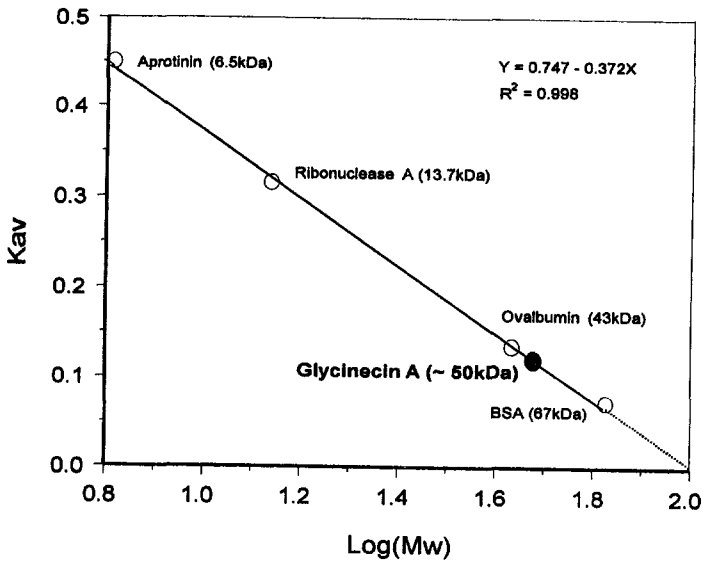


Fig. Standards and Glycinecin A (Superdex 75 HR 10/30),
20mM Tris-HCl, pH 8.0 with 0.15M NaCl, Flow rate : 0.4ml/min, 280nm.

그림 7. gel-filtration chromatography(superdex 75)를 통한 GlycinecinA의 분자량 측정.

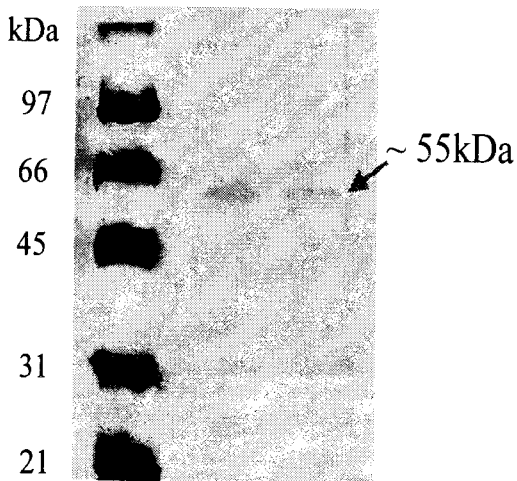


그림 8. 정제된 GlycinecinA를 cross-linking reaction하여 SDS-PAGE로 분석, 38kDa 과 14kDa의 heterodimer로 구성되어 약 55kDa근처의 단백질 single band를 관찰되었다.

나. glycinecin의 효능 극대화를 위한 작용기작연구

1) GlycinecinA의 기본적인 작용기작연구

GlycinecinA의 작용 기작을 밝히기 위하여 GlycinecinA 처리 후 ATP level 변화, transmembrane electrical potential ($\Delta\psi$), intracellular Δ pH 등을 연구하였다. ATP level의 측정에는 bacteria를 2.5 mM sodium phosphate buffer (pH7.0)에 resuspend하고, 5분 후 10 mM glucose를 가한 후, 15분 후에 100,000 AU/ml glycinecin을 가하고, 5분 간격으로 20 μ l sample을 취하였다. Sample 20 μ l와 dimethyl sulfoxide 80 μ l를 혼합하여 2분 동안 centrifuge 한 후, supernatant 20 μ l와 dimethyl sulfoxide 80 μ l를 혼합한 후 distilled water 5 ml로 희석하였다. 이 sample 내의 ATP 농도는 luciferin-luciferase enzyme assay를 이용하여 측정하였다. 그리고 $\Delta\psi$ 를 측정하기 위하여 potential-sensitive fluorescent probe인 3,3'-dipropylthiacarbocyanine [diSC₃(5); Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg., USA]를 이용하였다. Excitation 파장은 643 nm, emission 파장은 666 nm 이었고, cell은 50 mM potassium HEPES buffer (pH 7.0)에 resuspend하고, control로 nigericin을 이용하였다. intracellular Δ pH를 측정에는 pH-sensitive fluorescent probe인 5 (and 6-)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (cFDASE; Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg., USA)를 이용하였다. cell과 1 μ M cFDASE를 혼합하여 30°C에서 10분 배양하고 wash 한 후 fluorescence 변화를 측정하여 intracellular pH 변화를 측정하였다. ATP level의 변화를 측정한 결과 Fig. 에서 보는 바와 같이, GlycinecinA 처리 후 intracellular ATP 농도는 급격히 줄어들었지만 extracellular ATP 농도는 큰 변화가 없었다. 이와 같은 결과는 glycinecin이 bacteria 내의 cellular function을 저해하여 에너지 대사를 방해하지만, membrane에 pore를 형성하여 cell 내의 ATP를 cell 바깥으로 유실되게 만들지는 않는다는 것을 보여주는 결과이다. Glycinecin이 bacteria를 lysis 하는지 620 nm에서 시간에 따른 흡광도 변화를 측정하였으나 5,000, 10,000, 15,000, 20,000 AU의 glycinecin을 처리하여도 2시간 동안 아무 변화가 없었다. $\Delta\psi$ 와 intracellular Δ pH를 측정하기 위한 시도는 실패하였다. $\Delta\psi$ 를 측정하기 위하여 potential-sensitive fluorescent probe인

3,3'-dipropylthiacarbocyanine [diSC₃(5)]를 이용하고, Δ pH를 측정하기 위하여 pH-sensitive fluorescent probe인 5 (and 6-)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (cFDASE)를 이용하였으나, 두 가지 probe이 모두 cell 내로 잘 들어가지 않아서 $\Delta\psi$ 와 intracellular Δ pH를 측정하는데 실패한 것 같다. *Xanthomonas*가 xanthan gum을 분비하여 probe이 cell 내로 들어가기 힘든 것 같은데, 이의 해결 방안을 강구하고 있다. 하지만, glycinecin 처리 후 O.D 변화가 없었고 ATP가 cell 외로 유출되지 않는 것으로 보아 glycinecin이 membrane에 pore를 형성하지 않는다는 결론을 내릴 수 있다 (그림 9).

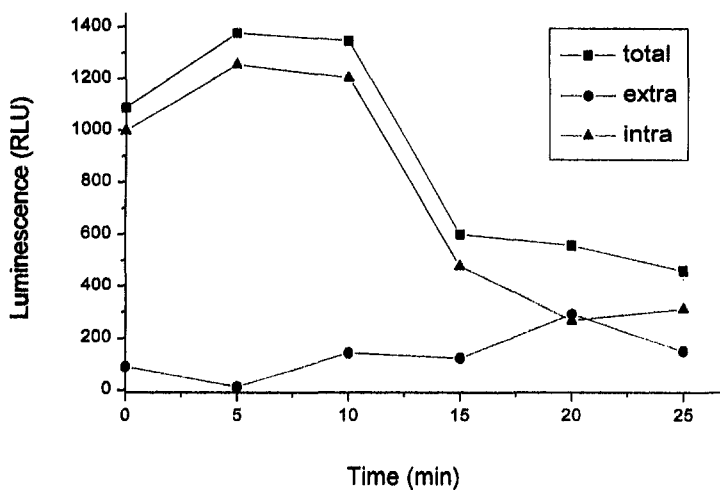


Fig. 5. Measurement of ATP level. The ATP level was measured using luciferin-luciferase enzyme system. One mM glucose was added at time 0 and 102,400 AU of glycinecin was added at 10 min.

그림 9. GlyciencinA가 감수성균주(*X.c.pv. vesicatoria* YK93-4)의 cell 내의 ATP 수준의 변화를 유도함을 보여준다.

2) Host specificity 기작 연구

GlycinecinA가 host specificity를 갖는 기작을 밝히기 위하여, glycinecin이 target bacteria에 결합하는 특성을 연구하였다. (그림 10) 에서 보는 바와 같이 pH 4-5에서 glycinecin binding이 최고를 보였으며, pH8 이상과 pH3 이하에서는 낮은 binding을 보였다.

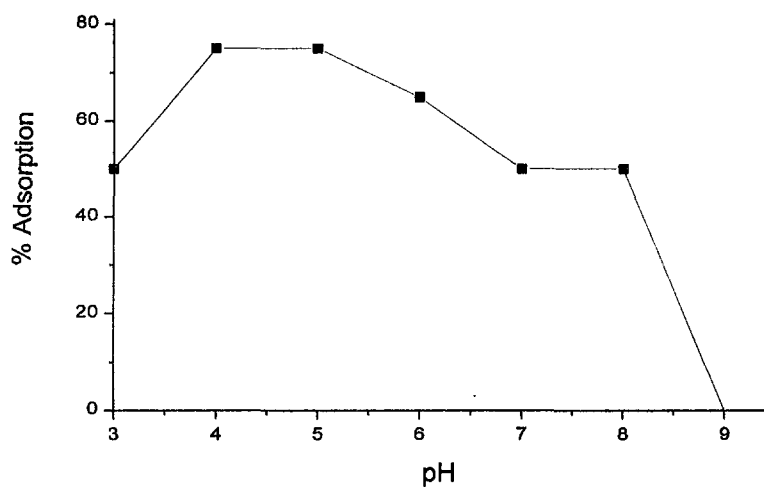


Fig. 6. Influence of pH on the adsorption of glycinecin to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* cells

그림 10. GlycinecinA가 pH에 따라 감수성 균주 (*X.c. pv. vesicatoria* YK93-4)에 붙는 정도가 달라짐을 보여준다.

다. glycinecin의 효능개량

1) GlycinecinA의 안정성 유지에 대한 연구

Subunit이 존재한다는 것은 그만큼 안정성을 잃어버리기 쉬운 조건이라고 볼 수 있다. 앞에서 실험한 cross-linker 실험에서 보았듯이 SDS-PAGE의 reducing condition에서 안정하게 subunit의 결합을 유지시킬 수 있음을 보았다. 그렇다면 활성자체도 어느정도 안정화될 수 있는 가능성이 높았다. 그래서 45, 60, 75, 90℃에서 15분간 처리해본 결과 GlycinecinA의 열안정성 범위보다 넓은 75, 90℃에서도 활성이 남아 있는 것을 관찰하였다 (그림 11). 이 결과는 GlycinecinA가 포장에 응용될 때 받을 수 있는 여러 가지 요인들 중에 열에 대한 영향을 해결해 줄 수 있는 단서가 될 수 있을 것이다.

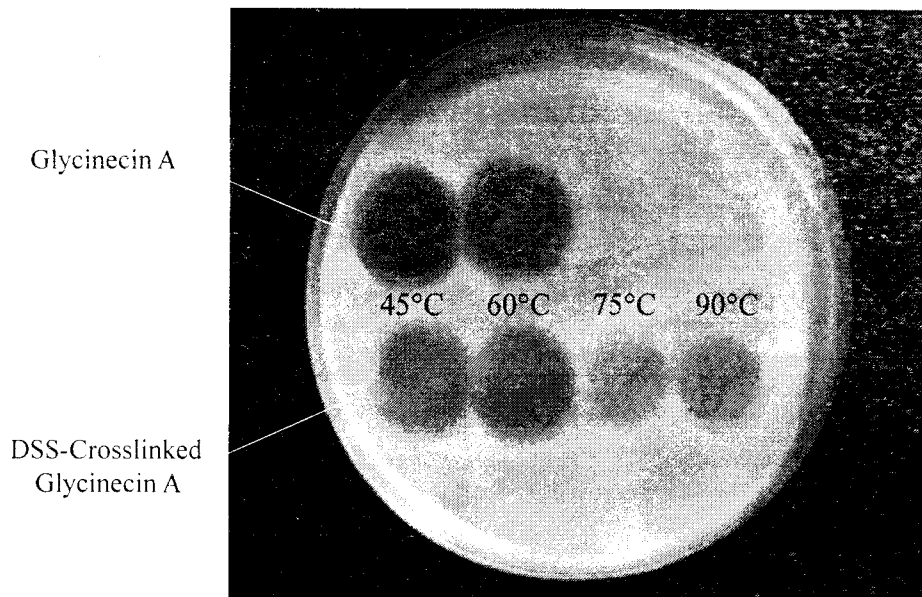


Fig . Heat stability of crosslinked GlycinecinA

그림 11. Crosslinked GlycinecinA의 열안정성

유전자 수준에서의 조작에서 안정성을 증가시키기 위하여, ORF1와 ORF2 사이의 termination codon을 제거하여 이 두 개의 ORF를 연결시켰다(translational fusion, 그림 12). translational fusion된 glycinecinA인 glycinecinA'는 활성을 보였고, periplasmic space에 존재하였다 (표 3). 마찬가지로 단백질 활성이 온도와, pH에 안정성이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다 (그림 13, 14).

Strains (Plasmid)	Protein	Fractions(AU/ μ g)			
		supernatant	periplasmic extract	cytoplasmic extract (soluble protein)	cytoplasmic extract (insoluble protein)
<i>E. coli</i> DH5 α (pGly415Plac)	GlycinecinA	864.86	2459.17	423.35	624.69
<i>E. coli</i> DH5 α (pGlyA'B0)	GlycinecinA'	204.08	1262.32	320.48	69.66

표 3. translation fusion된 glycinecinA'의 활성비교.

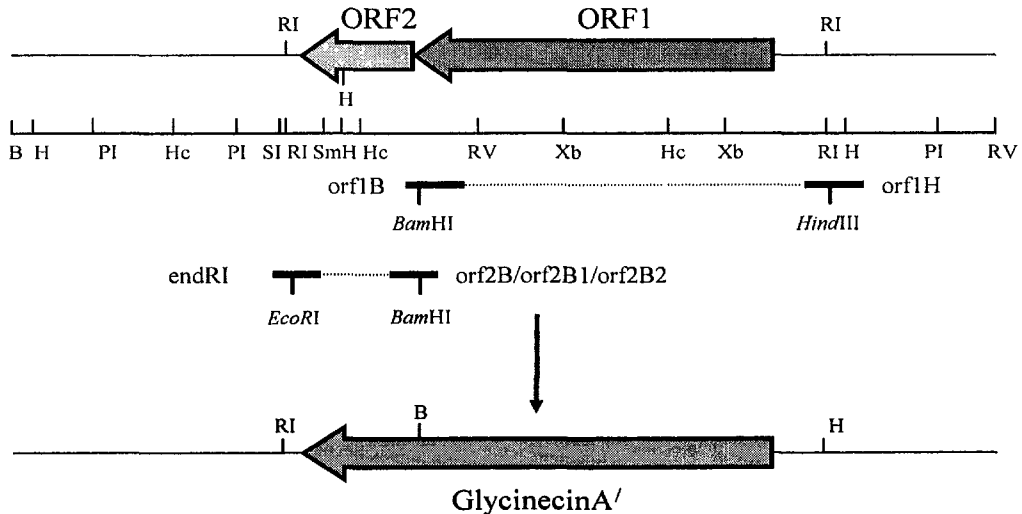


그림 12. ORF1 와 ORF2의 translational fusion.

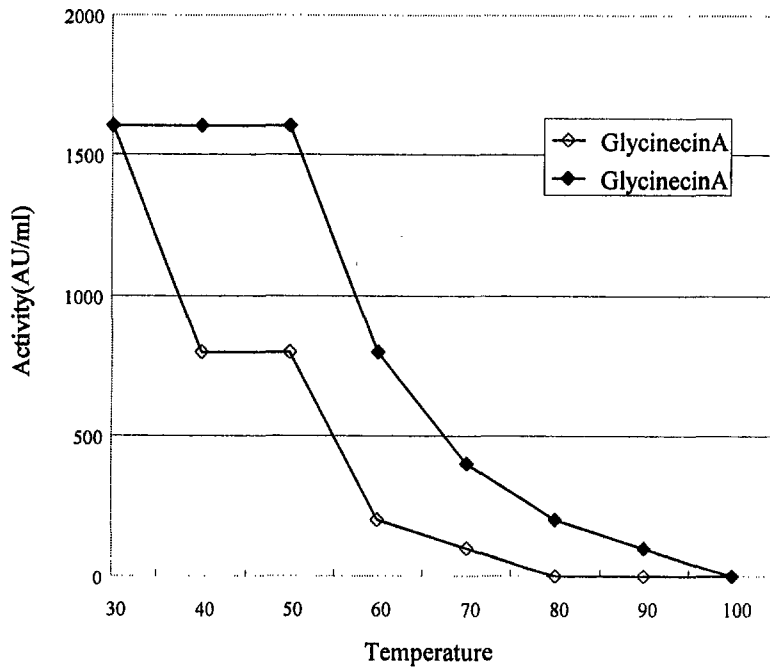


그림 13. glycinecinA'의 열에 대한 안정성.

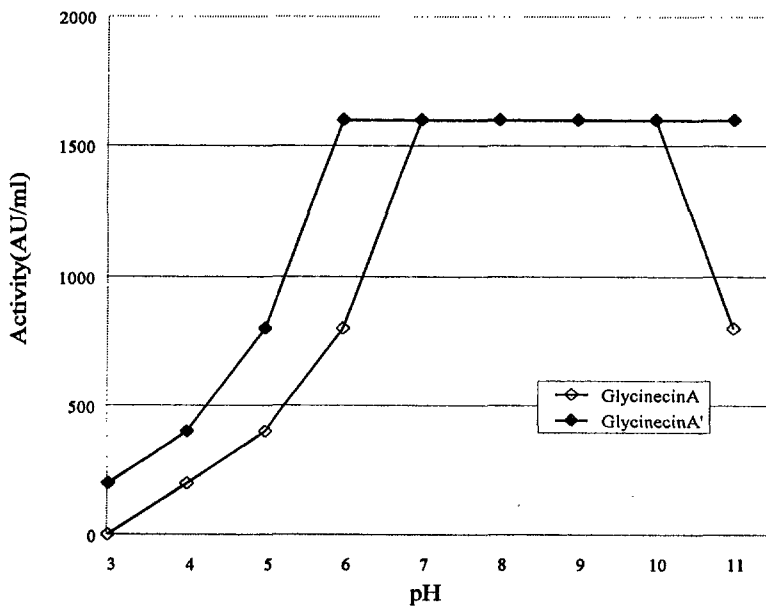


그림 14. glycinecinA'의 pH에 대한 안정성.

제 3절 제 2 협동과제: 조작된 유전자를 가진 미생물을 이용한 물적 방제 및 glycinecin을 직접 이용한 방제

I. Bacteriocin 분비균의 생육특성 및 실내활성검정

1. 서 론

세균이 분비하는 bacteriocin은 항생물질의 한 종류로서 다른 항생물질과는 달리 그 활성범위가 그 물질을 분비하는 균과 아주 가까운 근연종에 국한한다는 특징을 갖는다. 이러한 특징은 실제 농업적 이용시 목표로 삼고 있는 병원균을 제외한 생태계의 유익한 타 미생물에게는 실제적인 영향이 없다는 것을 뜻하므로 실용적으로 개발하면 이런 면에서 환경부담이 없는 좋은 방제방법의 하나라고 생각되고 있다.

세균이 분비하는 항균물질 중의 일종이므로 세균의 성장정도나 영양원의 가용정도에 따라 박테리오신의 분비여부 및 분비량에 큰 영향을 받게 되는데 박테리오신 분비량을 최적화하기 위한 배양환경시험은 효과적인 방제매체를 조제한다는 측면에서 꼭 필요한 시험이 된다.

방제균의 실내 배양시 여러 환경중에서도 온도, 배양시간, pH 그리고 영양원의 효과는 핵심적인 요소가 되므로 이들을 배합한 조건에서 박테리오신 량의 경시적 변화가 조사되어야 한다.

생성된 박테리오신의 여러 가지 식물병원세균에 대한 항균활성은 그 좁은 활성범위에도 불구하고 병원균에 대한 특이성을 검정하기 위해서 꼭 필요하다고 생각된다. *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*와 근연종인 고추반점세균병균(*X. c.* pv. *vesicatoria*)과 벼흰잎마름병균(*X. c.* pv. *oryzae*)에 대한 활성은 무엇보다도 먼저 검정되어야 할 사항으로 생각된다. 만일 활성이 있는 것으로 확인되면 박테리오신 분비균의 고추잎이나 벼엽면에서의 친화성이 검정되어야 하며 더 나아가 병원세균의 존재시 그 밀도가 어떻게 서로 영향하며 변화하는지에 대한 정보가 확보되어야만 성공적인 이용기술의 개발이 가능하리라 생각된다.

2. 재료 및 방법

가. 박테리오신 분비 최적조건 구명

공시 박테리오신 분비균 H80(*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*)을 Nutrient broth(NB)배지(yeast extract 3, beef extract 5, Difco)에 배양하면서 배양후 84시간까지 일정간격으로 생육상황을 조사하였다. 배양온도는 20℃와 30℃의 두 그룹으로 나누었으며 배양액내 균체농도는 흡광도로 표기하였다.

공시 H80균주의 생장에 미치는 영양원의 효과를 조사하기 위하여 배지를 Luria-Bertani(LB) broth(bacto-tryptone 10, yeast extract 5, NaCl10), NB 그리고 Peptone sucrose broth(PSB)(bacto-peptone 10, sucrose 10, sodium glutamate 1)로 하고 30℃에 배양하면서 배양후 48시간까지 일정간격으로 밀도를 측정하였다.

박테리오신 분비균의 분비활성에 미치는 온도, pH, 영양원의 효과를 조사하기 위하여 온도는 20, 30℃, 영양원은 NB, LB, PSB 그리고 pH는 6-9까지 1간격으로 조정후 항균활성 보유 최대 희석농도를 1,600배로 고정하여 최소배양시간을 측정하였다.

나. 박테리오신의 항균활성조사

H80균이 분비하는 박테리오신 glycinecin의 주요 병원세균 및 진균에 대한 항균활성을 실내에서 조사하였다. 대상병원세균은 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*의 5종, *Pseudomonas*속 병원세균 5종, *Erwinia*속 병원세균 2종, 그리고 병원진균은 *Phytophthora capsici* 등 11종을 공시하였다. 시험방법은 NA배지에 박테리오신 조추출액을 혼합하여 굳힌 후 그 위에 병원균의 현탁액을 도말하여 생육상황을 무처리와 비교하였다.

다. 고추반점세균병에 대한 활성조사

고추반점세균병(병원균 : *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 박테리오신 분비균 H80의 발병억제효과를 온실에서 조사하였다. H80을 NB배지에 배양하여 그 농도를 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹cfu/ml로 조절하여 공시균의 현탁액을 만들었다. 병원세균은 동일한 방법으로 10⁵cfu/ml의 접종원을 조제하였으며 고추는 한별고추를 공시하여 2차

분지기에 달한 묘를 사용하였다. 병원균의 접종시기를 H80균 접종시기에 따라 동시접종(0), 접종후 1, 3, 5일, 접종전 1, 3, 5일로 나누어 치료효과와 예방효과를 조사하였다.

공시균 H80을 접종농도별로 고추잎에 분무살포하고 접종후 120시간까지 12시간 간격으로 고추잎에서의 밀도변화를 경시적으로 조사하였다. 또한 병원균 접종 1일후, 3일후, 5일후 H80을 접종한 구에서 병원균과 H80균의 고추잎에서의 밀도변화를 처리 6일부터 15일까지 1일 간격으로 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 박테리오신 분비균의 생육특성

박테리오신 분비균 H80은 20℃보다 30℃의 고온에서 생장이 좋았다. 20℃ 경우는 생장의 정점이 배양후 60시간 전후였으며 30℃의 경우는 배양 정점이 36-48시간 사이에 존재하여 20℃보다 12-24간 더 빨랐다. 따라서 H80의 배양시 30℃에서는 36시간 전후로 접종원을 수확하는 것이 가장 좋다고 생각된다.

3가지 영양원별로 H80균의 생육상황을 조사한 결과 배양 16시간까지는 3가지 영양원 사이에 생육상에 큰 차이가 없었으나 그 이후 PSB에서의 생장이 다소 둔화되는 경향이였다. LB배지와 NB배지에서의 생육상의 차이는 거의 없었다. 따라서 H80균의 배양시 PSB배지보다는 LB배지를 이용하는 것이 보다 유리하다고 생각된다.

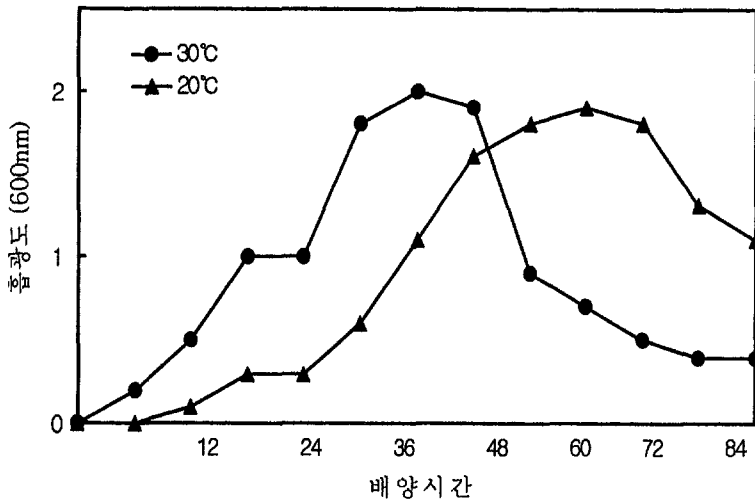


그림 1-1. Bacteriocin 분비균 *X. c. pv. glycines* H80 균주의 온도별 성장곡선

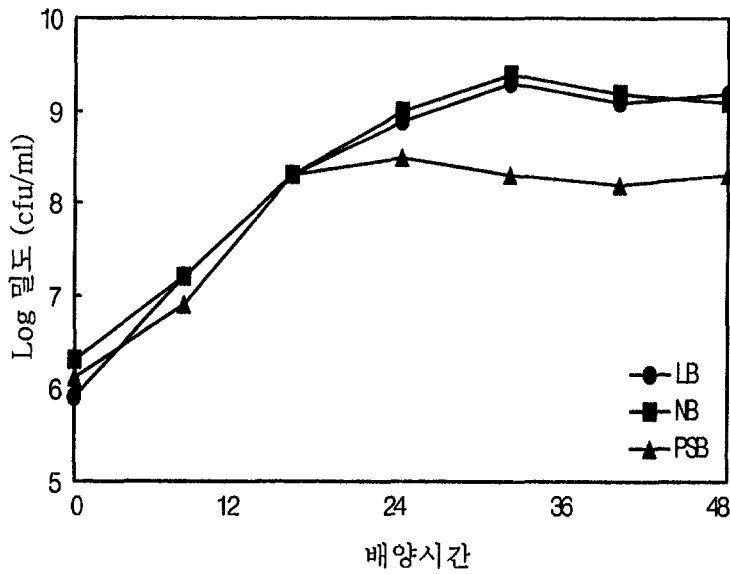


그림 1-2. 박테리오신 분비균 *X. c. pv. glycines* H80 균주의 생장에 미치는 영양원의 영향

나. 항균활성보유 최적환경

H80균이 박테리오신을 분비하여 항균활성을 보이는 최적환경을 온도, 영양원, pH의 각 수준에서 조사하였을 때 20℃ 보다는 30℃에서 배양하는 것이 최소 배양시간 18시간으로 저온에 비해 12시간 더 빨랐으며 영양원은 PSB보다는 NB나 LB배지에서 배양하는 것이 4시간정도 최소배양시간이 단축되었다. pH별 생육을 보면 pH 7, 8에서 가장 왕성한 생육을 보였고 그 이전 이후에서는 최소배양시간이 길어지는 경향이있다. 따라서 H80균의 Bacteriocin 분비 최대활성을 얻기 위해서는 LB 혹은 NB배지에서 pH를 7-8로 조정후 30℃에서 배양하는 것이 가장 양호하다고 생각된다.

표 1-1. *X. c. pv. glycines* H80균의 bacteriocin 분비에 미치는 온도, pH, 영양원의 효과

배양조건	항균활성 보유 최대희석농도	최소 배양시간
온도 20℃	1,600배	30
30℃	"	18
배양액 NB	"	18
LB	"	18
PSB	"	24
pH 6	"	24
7	"	18
8	"	18
9	"	30

다. 박테리오신의 병원균에 대한 활성

H80균이 분비하는 bacteriocin의 각종 병원세균 및 진균에 대한 항균활성을 보면 주로 H80균이 속하는 *Xanthomonas*속 병원세균에 높은 항균활성을 보였다. 그러나 같은 *Xanthomonas*속 병원세균중에서도 H80균이 속해있는 *X. c. pv. glycines*와 *X. maltophilia*에는 활성이 없었고 고추반점세균병균, 십자화과 검은썩음병균, 벼흰잎마름병균, 감귤 궂양병균에는 항균활성이 높게 나타났다. *Xanthomonas*속 이외의 세균에서는 유일하게 꽃마름병균(*Pseudomonas solanacearum*)에 항균활성을 보였으며 그 외의 병원진균에는 전혀 항균활성을 보이지 않았다. 이러한 결과를 보면 박테리오신은 그 정의에서처럼 박테리오신 분비균과 동일한 속에 속하는 병원세균에 주로 활성을 보이고 있기 때문에 실제 응용시 비목표 미생물에 대한 영향이 없어 환경적으로 매우 안전한 방제제로 사용될 수 있다고 생각된다.

표 1-2. *X. c. pv. glycines* H80 균주 및 박테리오신 glycinecin 조추출액의 주요 병원균에 대한 항균활성

대 상 균 주	항 균 활 성	
	세 균	박테리오신
<i>X. c. pv. vesicatoria</i>	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	+	+
<i>X. c. pv. oryzae</i>	+	+
<i>X. c. pv. citri</i>	+	+
<i>X. c. pv. glycines</i>	-	-
<i>X. maltophilia</i>	-	-
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	+	+
<i>P. tabaci</i>	-	-
<i>P. syringae pv. glycinea</i>	-	-
<i>P. fluorescens</i>	-	-
<i>P. putida</i>	-	-
<i>E. coli</i>	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	-	-
<i>Pythium myriotylum</i>	-	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-	-
<i>Alternaria sesami</i>	-	-
<i>Didimella melonis</i>	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-
<i>Cladosporium fulvum</i>	-	-

라. 고추반점세균병에 대한 활성

1) 고추엽면에서의 생존소장

H80균의 농도별 고추잎에서의 경시적 밀도변화를 보면 대개 접종후 24시간까지 밀도가 증가한 후 그 이후부터 서서히 감소하는 경향을 보이고 있다. 그러나 어느 경

우든 밀도가 급격히 감소하는 추세가 없어 H80균의 고추잎에서의 생장은 접종후 지속적으로 감소하긴 하지만 대체로 안정적이고 처리 120시간이후에도 10^6 cfu 이상의 고밀도를 유지하고 있어 항균활성 유지에는 큰 문제가 없다고 생각된다 농도별로 보면 10^6 , 10^7 , 10^8 cfu 접종구는 접종 120시간후 10^7 cfu 전후로 그 밀도가 나타나고 있으나 10^9 cfu의 고농도 접종시에는 120시간후에도 10^8 cfu의 고밀도가 유지되고 있어 실제 응용시 고농도 접종이 보다 유리할 것으로 생각된다. 그러나 이러한 고농도 접종원을 준비하기 위해서는 그만큼의 노력과 비용이 많이 들기 때문에 실용상에서는 10^8 cfu/ml 이상이면 충분한 방제활성을 나타낼 수 있으리라 생각된다.

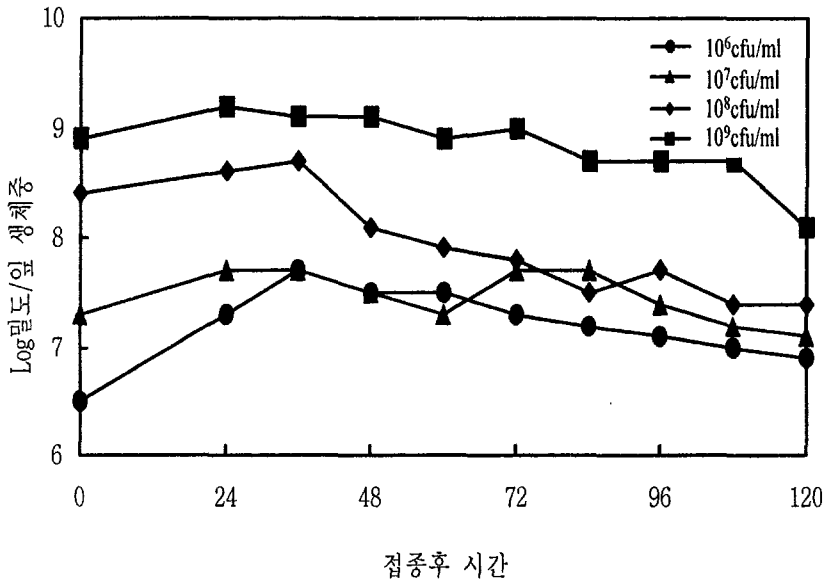


그림 1-3. 박테리옌 분비균의 접종농도별 고추잎 표면에서의 밀도변화

2) 박테리옌 분비균의 처리시기별 방제활성

박테리옌 분비균 H80균을 직접 고추잎에 살포한 후 고추반점세균병에 대한 예방 및 치료효과를 보면 치료효과보다는 예방효과가 훨씬 우수하게 나타나고 있다. 예방효과의 면에서는 H80 살포후 5일까지도 그 효과가 1일후 살포와 동등한 방제효과를 보였으며 치료효과는 병원균의 살포후 H80 처리일이 길어질수록 방제효과가 떨어

지는 경향을 보였다. 따라서 H80을 실제포장에서 이용할 때는 병의 발생전에 예방적으로 살포하는 것이 필요하다고 생각된다.

표 1-3. 박테리오신 분비균 *X. c. pv. glycines* H80 균주의 처리시기별 고추반점 세균병 발병정도

처 리 균 주	처리일자	병반수/잎
병 원 균	0	5.5
Bacteriocin신 분비균	+1	1.4
"	+3	1.7
"	+5	1.6
"	-1	2.7
"	-3	3.8
"	-5	3.5

3) 병원균과 H80균의 고추 엽면에서의 상호작용

병원균과 Bacteriocin 분비균의 동시 존재시 고추엽면에서의 밀도변화를 보면 병원균은 H80균의 접종시기와 상관없이 10^7 - 10^9 cfu/g 생체중의 높은 밀도를 유지하였으며 이와 같은 경향은 H80균을 늦게 접종할수록 두드러지게 나타났다.

H80균의 경우에 있어서도 대체로 접종시기와 상관없이 10^7 cfu/g 생체중의 밀도가 병원균 접종후 15일까지 유지되었으나 병원균 접종후 H80균의 접종일수가 빠를수록 그 밀도가 높은 경향이였다. 이와 같은 경향을 보면 일단 병원균이 고추엽면에 존재하면 접종시기와 상관없이 H80의 존재가 병원균에 큰 영향을 주지 못하기 때문에 결국 방제효과가 H80이 병원균에 앞서 존재할 때보다 떨어지는 것으로 생각되어진다.

표 1-4. 접종시기별 고추반점세균병균 및 Bacteriocin 분비균 *X. c. pv. glycines* H80균의 고추잎에서의 경시적 밀도변화

병원균 접종후 경과일수	Log 밀도 / 잎 생체중					
	병원균접종 1일후 H80 접종		병원균접종 3일후 H80 접종		병원균접종 5일후 H80 접종	
	병원 균	H80 균	병원균	H80 균	병원균	H80 균
6일	7.2	8.0	-	-	-	-
7일	8.6	8.8	-	-	-	-
8일	7.7	8.0	7.7	7.2	-	-
9일	7.4	8.2	6.8	7.5	-	-
10일	8.3	7.7	7.6	7.9	8.0	8.5
11일	8.3	7.5	7.8	7.6	8.4	7.5
12일	8.7	7.4	8.4	7.3	8.3	7.6
13일	8.5	7.0	8.5	7.2	8.2	7.5
14일	-	-	7.7	7.3	8.2	7.1
15일	-	-	8.5	7.3	8.3	7.6

II. Bacteriocin 분비균 및 그 대사산물의 생물활성

1. 서 론

Bacteriocin과 일반 항균물질과의 차이점을 보면 그 활성범위가 박테리오신을 분비하는 세균과 아주 가까운 근연종에 국한한다는 매우 특이적인 작용범위를 갖는 데에 있다고 할 수 있다. 그 활성도 Bacteriocin을 분비하는 세균을 시용할 때 세균이 생존하면서 지속적으로 항균물질을 분비하여 방제효과를 나타내는 경우도 있을 수 있고 세균의 생존이 환경에 따라 지대한 영향을 받아 세균의 밀도가 급격히 감소하거나 사멸할 경우에는 방제효과가 나타나지 않는 경우도 있을 수 있을 것이다. 따라서 세균 자체를 그대로 시용할 경우에는 대상작물의 시용부위에서 세균의 생장이 어떤지 또한 기상환경 등 주위환경에 대해 어떠한 영향을 받는지가 면밀히 검토되어야 할 것이다. 이 중에서 가장 중요한 사항은 박테리오신을 분비하는 세균이 대상작물의 시용부위에 이미 존재하고 있는 유익한 미생물에 대한 어떠한 영향을 끼치는지가 될 것이다. 만일 이미 존재하는 엽면 미생물에 대해 부정적인 영향을 미친다면 대상으로 하는 목표

병해는 감소할 지 모르나 유익한 엽면 미생물의 사멸에 의해 타 병원균이 침해할 수 있는 여지가 있기 때문이다.

둘째로 살아 있는 세균의 생존이 대상작물의 시용부위에서 여의치 못할 경우 박테리오신을 분비하는 세균의 대사산물이나 조추출액을 직접 사용하는 방법이 있을 수 있을 것이다. 만일 그 효과가 세균자체의 시용보다 더 높게 나타난다면 이 경우 환경에 대한 영향을 덜 받는다는 면에서 시기적, 지역적 변이가 적어지고 따라서 보다 안정적인 시용효과를 갖게 될 것이다. 박테리오신 분비균의 대사산물이나 조추출액을 사용할 경우는 실용상 정제과정에서 경비가 많이 들고 노력이 많이 든다는 불리성이 있기 때문에 이 경우 먼저 경제성이 검토되어야 할 것이며 종합적인 측면에서 공정개발의 실용성이 조사되어야만 한다. 물론 분비된 박테리오신의 활성부위를 찾아내어 순화하고 정제하여 그 화학구조식을 밝혀 합성하여 대량생산하는 방법이 있으나 지금까지 알려진 바에 의하면 대개의 박테리오신의 화학구조가 너무 복잡하여 그 동정에 많은 어려움이 수반하며 동정이 끝난 활성부위도 그 구조가 대단히 복잡하여 합성시 경제성이 없는 경우가 대부분이었다.

본 시험에서는 이러한 점을 고려하여 먼저 박테리오신 분비균 H80의 대상작물 엽면에서의 밀도변화를 면밀히 검토하였으며 특히 시용부위에 이미 존재하는 미생물에 대해 어떠한 영향을 끼치는지를 상세히 조사하였다. 또한 박테리오신 분비균 H80균과 함께 H80균의 마쇄액, 조추출액을 함께 공시하여 그 활성이 어떻게 다른지가 검토되었으며 H80균이 활성이 보이고 있는 고추반점세균병뿐만 아니라 벼흰잎마름병을 대상으로 온실과 포장에서 그 방제효과가 검토되었다.

2. 재료 및 방법

가. 박테리오신 분비균의 엽면 동태조사

대상작물인 고추묘는 한별품종을 공시하여 2차 분지기에 달한 묘를 사용하였으며 벼는 흰잎마름병에 감수성 품종인 밀양 23호를 공시하여 분얼초기의 묘를 사용하였다. 병원균은 NB배지에 배양하여 접종원은 10^6 cfu/ml의 밀도로 사용하였다. 공시병원균은 Rifampicin과 Kanamycin의 내성으로 표지하여 선택배지상에도 검출될 수 있도록 조정하였다. Bacteriocin 분비균 H80의 접종농도도 10^6 cfu/ml로 조정하여 사용하였다.

병원균과 H80균은 서로 동시에 존재할 때 혹은 단독으로 존재할때의 경시적인 밀도를 조사하였으며 접종후 4, 6, 8, 11, 16, 20, 30일 후에 시용잎에서 일정 표본을 채취하여 주발에서 마쇄한 후 생체중당 병원균이나 H80균의 밀도를 산출하여 graph로 표시하였다. 벼 엽면에서의 밀도는 접종후 13, 20, 27, 40일에 조사하였다.

나. 박테리오신 분비균의 타미생물에 대한 영향조사

H80균을 Kanamycin 50ug/ml, Rifampicin 100ug/ml이 첨가된 PSA배지에 24시간 30℃에서 배양하여 접종원 농도를 10^8 cfu/ml로 조정하여 Tween 20을 0.01% 농도로 첨가한 후 2차 분지기에 달한 고추묘에 접종하였다. 접종한 고추는 30℃의 습실상에서 24시간 둔 후 꺼내어 온실에 옮겨 두었다.

고추엽면에서의 미생물의 밀도변화를 조사하기 위해 접종후 4, 6, 11, 20일후에 각각 고추잎을 채취하여 주발에 마쇄한 후 g 생체중당 총세균, 사상균 형광성 *Pseudomonas*, 비형광성 *Pseudomonas*, *Bacillus*, 방선균의 밀도를 각각의 선택배지를 이용하여 조사하였으며 미생물의 Log 밀도를 경시적으로 표시하였다.

다. 박테리오신 분비균의 매체별 생물활성 검증

H80균과 H80의 배양여액, 그리고 H80의 마쇄액의 고추반점세균병과 벼흰잎마름병에 대한 방제효과를 온실에서 조사하였다. H80의 배양여액은 Tryptic soy broth에서 3일간 배양한 후에 이를 10,000g, 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 filter 멸균한 것을 사용하였다. H80균의 마쇄액은 H80균의 배양액을 원심분리하여 침전펄렛을 살균수로 여러번 씻은후 VWR Sonifier 450을 이용하여 10분간 마쇄하여 사용하였다. 이때 마쇄전의 H80균의 밀도는 10^8 cfu/ml로 조정하였다.

H80균의 접종원 농도는 10^8 cfu/ml로 하였으며 온실에서 육묘하여 2차 분지기에 달한 다조아 고추묘와 분얼초기의 밀양 23호 벼에 분무접종한 후 30℃의 습실상에 24시간 두고 꺼내어 온실에 두었다. H80균의 마쇄액과 배양여액도 동일한 방법으로 고추와 벼에 접종하였다. 고추반점세균병과 벼흰잎마름병균은 NB배지에서 배양여 세균세포를 원심분리한 후 살균수로 씻어 사용하였으며 접종원 농도는 10^6 cfu/ml로 고정하여 H80의 각 매체 접종후 5, 10, 20, 30일후에 고추와 벼 엽면에 분무접종하였다.

병원균 접종후 식물은 30℃의 습실상에 24시간 두어 발병을 유도하였으며 그 후 꺼

내어 온실에 두어 발병을 관찰하여 고추반점세균병의 경우 발병엽수와 엽당 병반수, 그리고 병반형을 조사하였고 벼흰잎마름병은 발병엽수, 병반면적을 그리고 병반형을 조사하였다.

라. 생물적 방제 매체의 포장활성 예비검정

H80, H80의 마쇄액, 배양여액을 공시하여 고추반점세균병은 수원의 탐동포장에서 그리고 벼흰잎마름병은 이천시험지에서 포장시험을 수행하였다. 고추는 난괴법 3반복으로 시험구를 설정하였으며 시험구의 크기는 $7 \times 5m = 35m^2$ 으로 구당주수는 85주로 하였다. 고추품종중 다조아 고추를 육묘하여 5월 7일 포장에 정식하였고 6월 20일부터 10일 간격으로 3종의 생물적 방제 매체를 사용하여 병원균은 6월 21일에 접종하였다. 대조약제는 동수화제를 공시하였으며 7월 18일 발병상황을 조사하였다. 고추엽면에서의 H80균의 생존사항을 알기 위하여 고추잎 표본을 채취하여 g 생체중당 H80균 밀도를 조사하였다. 각 처리구당 생육상황을 조사하기 위하여 7/18일 발병조사시 초장을 조사하였으며 반점세균병의 발병정도는 0(무발병)~5(잎 완전고사)까지의 발병지수로 표기하였다.

벼흰잎마름병에 대한 포장시험은 밀양 23호를 5월 22일 이앙하였으며 방제균 처리는 8월 3일, 8월 11일, 8월 18일에 그리고 발병조사는 8월 25일에 수행하였다. 시험구는 난괴법 3반복으로 설정하였으며 시험구의 크기는 $3 \times 3m = 9m^2$ 이었다. 병원균의 접종은 각 시험구의 증상에 이병묘 9주를 재식하여 접종하였다. 대조약제는 시라젠을 공시하였다. 벼 엽면에서의 H80의 밀도는 H80균 접종후 1, 3, 6일후 조사하였다. 흰잎마름병의 발병정도는 0(무발병)~5(잎 완전고사)의 발병지수로 표기하였으며 9월 28일 각 구당의 수량을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 박테리오신 분비균의 엽면동태

1) 고추엽면에서의 밀도변화

반점세균병균이 존재하지 않을 때 박테리오신 분비균 H80의 밀도는 g 생체중당

10-100cfu/g 생체중을 유지하여 큰 변화는 없었다. H80 방제균이 존재하지 않을 때 고추반점세균병균의 엽면밀도는 시간이 갈수록 큰 폭으로 증가하여 엽면 생존력이 우수하게 나타나고 있으나 병원균의 존재시 H80의 밀도는 비존재시보다 큰 폭으로 증가하여 10^2 - 10^3 cfu/g 생체중이었고 시간이 경과할수록 점차 증가하는 양상을 보여 병원균과 H80간에 상호작용이 일어나는 것으로 생각된다.

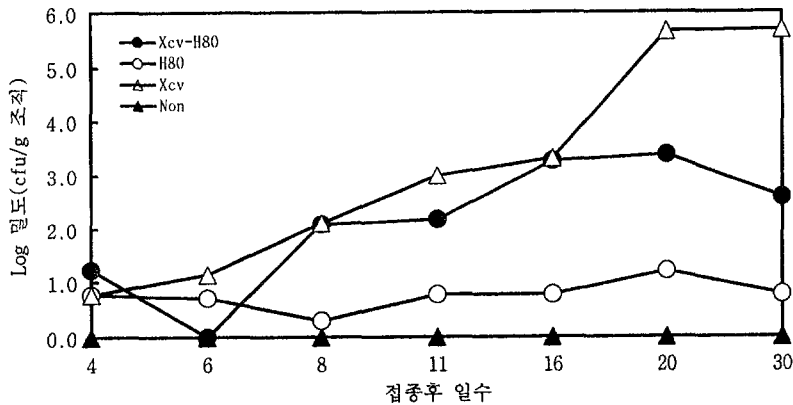


그림 2-1. Bacteriocin 분비균 H80을 단독 혹은 고추 반점세균병균(Xcv)과 동시 접종하였을 때 고추 엽면에서의 경시적인 밀도변동 추이

2) 벼엽면에서의 밀도변화

벼흰잎마름병균의 존재시 박테리옌 분비균 H80의 밀도는 단독 접종시에 비해 밀도가 1/10 정도로 낮아서 병원균에 의해 상당한 영향을 받는 것으로 나타났다. 그러나 H80균 단독 혹은 병원균과의 동시 존재시 H80의 밀도는 점차 감소하는 양상을 보여 벼 엽면에서의 생존력이 시간이 갈수록 떨어지는 것으로 나타났다.

벼흰잎마름병균의 경우는 H80균의 존재유무와 상관없이 그 밀도에 큰 차이가 없어 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타나고 있으나 병원균 역시 접종후 시간이 경과할수록 생존력이 떨어져 접종 40일 이후에는 거의 검출이 없었다.

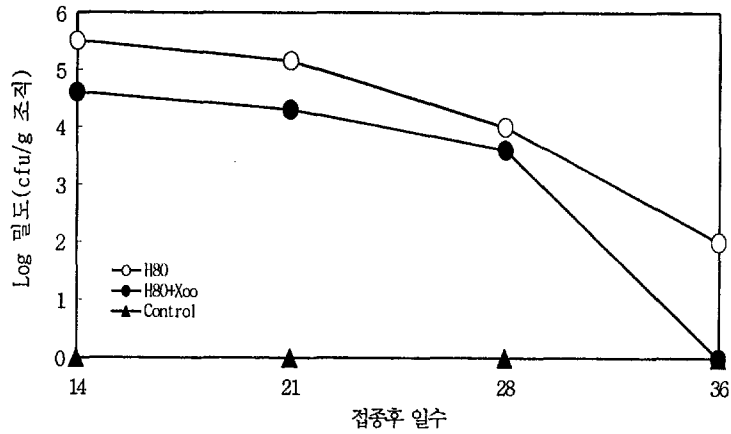


그림 2-2. Bacteriocin 분비균 H80을 단독 혹은 버 흰잎마름병균(Xoo)과 동시 접종했을 때 엽면에서의 H80의 경시적인 밀도변동 추이

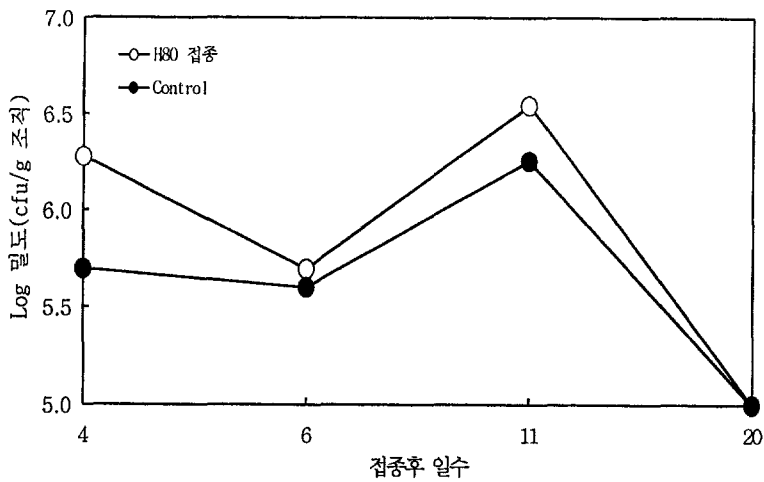


그림 2-3. Bacteriocin 분비균 H80을 단독 혹은 접종했을 때 버 엽면에서의 H80의 경시적인 밀도변동 추이

나. 박테리오신 분비균의 엽권내 타미생물에 대한 영향

1) 총세균 및 사상균의 밀도변화

고추 엽면에서의 총세균의 밀도는 H80균의 존재시 비슷하거나 약간 증가하는 경향이어서 H80균이 엽면존재 세균에 대한 영향은 거의 없는 것으로 판단된다. 또한 사상균의 경우를 보면 H80균이 존재하지 않을 때 초기에는 그 밀도가 높게 나타났으나 점차 감소하기 시작하여 나중에는 비존재시보다 낮아지는 경향이였다.

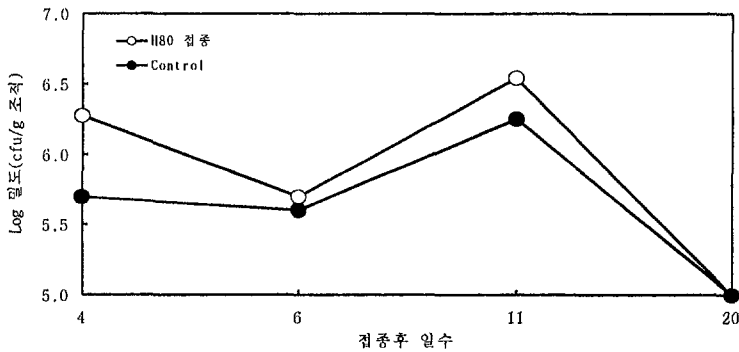


그림 2-4. Bacteriocin 분비균 H80의 접종후 고추 엽면에서의 총 세균의 경시적인 밀도변화 추이

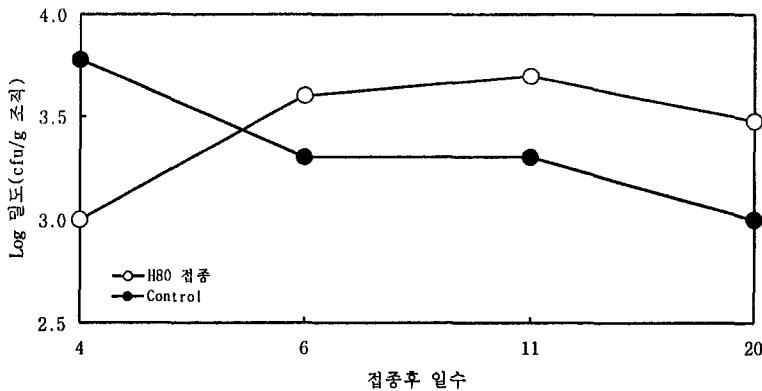


그림 2-5. Bacteriocin 분비균 H80 접종후 고추 엽면에서의 총사상균의 경시적 밀도변화 추이

2) *Pseudomonas*의 밀도변화

형광성 *Pseudomonas*의 엽면밀도는 H80균의 존재와 상관없이 접종후 시일이 경과할수록 감소하는 경향이였다. 비형광성 *Pseudomonas*의 경우도 초기에는 H80균이 존재할 때 그 밀도가 높았으나 시일이 경과할수록 밀도가 증가하여 접종 6일후에는 비슷한 수준이 되었다. 이 결과에서 판단하여 보면 H80균은 고추 엽면내 *Pseudomonas*의 생존증식에 큰 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

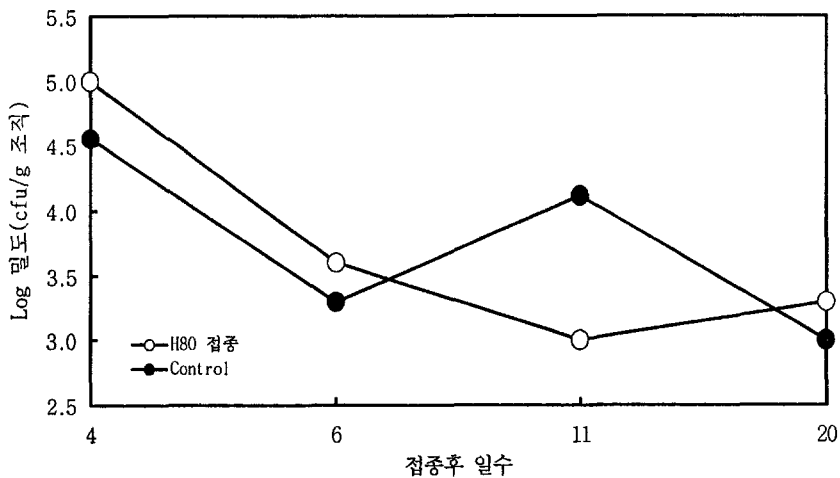


그림 2-6. Bacteriocin 분비균 H80 접종후 고추 엽면에서의 형광성 *Pseudomonas*의 경시적인 밀도변화 추이

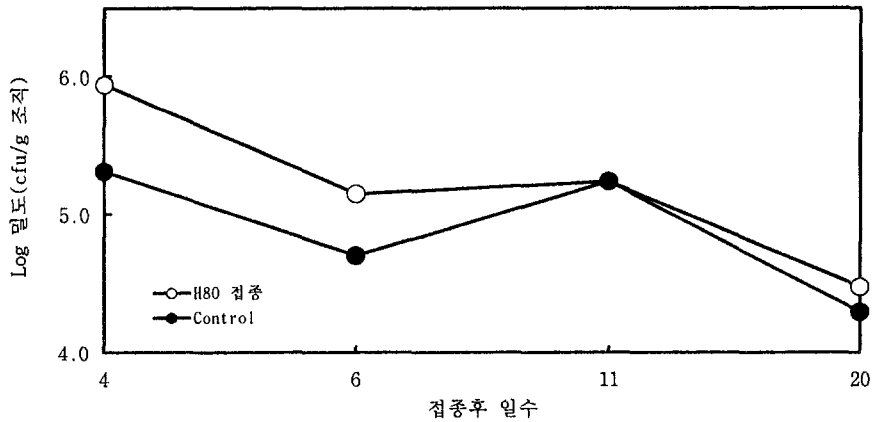


그림 2-7. Bacteriocin 분비균 H80 접종후 고추 열면에서의 비형광성 *Pseudomonas*의 경시적인 밀도변화 추이

3) *Bacillus*의 밀도변화

H80균이 존재시 *Bacillus*의 고추 열면내 밀도는 큰 폭으로 감소하여 H80균에 대한 영향을 받는 것으로 나타났으나 시간이 경과할수록 밀도가 떨어지는 경향은 뚜렷하였다.

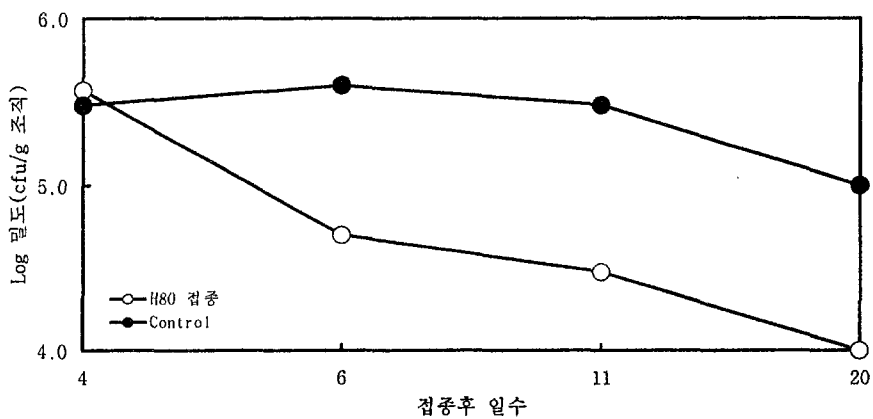


그림 2-8. Bacteriocin 분비균 H80 접종후 고추 엽면에서의 *Bacillus*의
경시적 밀도변화 추이

4) 방선균의 밀도변화

방선균의 밀도는 H80균이 존재할 때 접종초기에는 비존재시보다 현저하게 낮았으나 시일이 경과하면 급속히 그 밀도가 증가하여 H80균의 비존재시의 밀도와 동일한 수준으로 회복하였다. H80균이 존재할때도 방선균의 활동에는 큰 영향이 없는 것으로 생각된다.

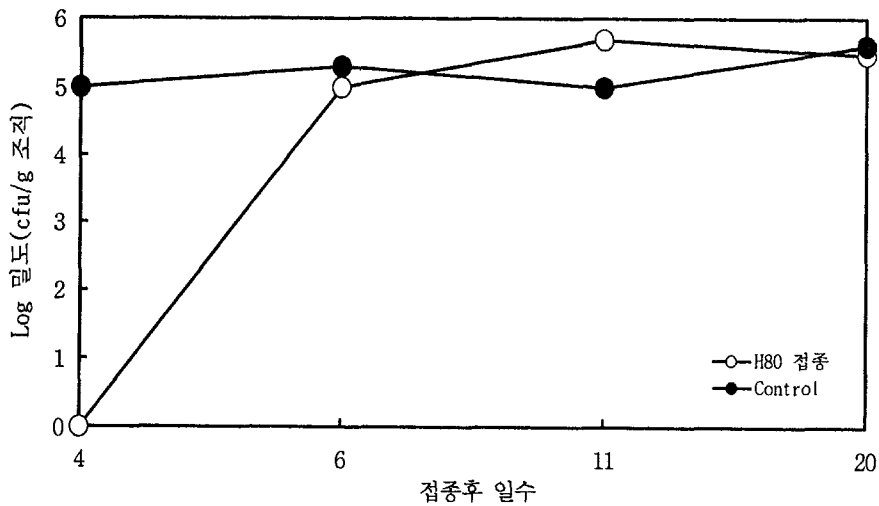


그림 2-9. Bacteriocin 분비균 H80 접종후 고추 엽면에서의 방선균의
경시적인 밀도변화 추이

다. 박테리옌 분비균의 경시적 생물활성

1) 고추반점세균병에 대한 생물활성

가) 방제균 처리 5일후 병원균 접종시 예방효과

방제매체중 H80 마쇄액의 효과가 가장 우수하게 나타나 대조약제인 동수화제인 방제효과와 동등한 수준이거나 월등한 방제효과를 보였다. H80 마쇄액의 처리시 발병

엽율도 급격히 감소하였으며 이병엽에서의 병반수도 타처리에 비해 현저히 적었으나 병반형은 동수화제의 처리구와 비슷하였다. H80 배양 마쇄액과 H80균 자체의 경우는 무처리에 비해 엽당 병반수가 적었으나 병반형에서는 차이가 없었다.

표 2-1. H80 처리 5일후 병원균 접종시 H80의 정제단계별 고추반점세균병 방제효과

처 리	엽수/주	발병엽수	엽당 병반수	병반형(0-5)
H80 균	14.0	3.0	12.0	4.7
H80 마 쇄 액	13.7	1.7	7.0	2.3
H80 배양여액	14.7	3.2	12.0	4.3
대조약제(동수화제)	13.7	3.7	19.7	2.3
무처리 접 종	14.3	3.0	23.3	4.3
무처리 무접종	13.0	0	0	0

* 수치는 3반복의 평균

나) 방제균 처리 10일후 병원균 접종시 예방효과

처리 5일후와 마찬가지로 H80 마쇄액의 방제효과가 대단히 우수하게 나타나 대조약제인 동수화제와 거의 동일한 수준이었다. H80균은 발병엽수나 엽당병반수에 있어서는 무처리와 별차이가 없었으나 병반형은 다소 낮게 나타나고 있다. H80의 배양여액은 발병엽수에 있어서 무처리와 비슷하였으나 엽당 병반수와 병반형은 무처리에 비해 현저히 낮아서 그 방제효과가 인정되었다.

표 2-2. H80 처리 10일후 병원균 접종시 H80 정제단계별 고추반점세균병 방제효과

처 리	엽수/주	발병엽수	엽당 병반수	병반형(0-5)
H80 균	16.0	6.0	23.7	3.0
H80 마 쇠 액	18.3	1.0	0.3	1.0
H80 배양여액	19.7	6.3	10.6	2.0
대조약제(동수화제)	21.3	1.3	2.0	0.3
무처리 접 종	22.0	7.9	25.1	4.1
무처리 무접종	19.1	0	0	0

다) 방제균 처리 20일후 병원균 접종시 예방효과

H80균 처리후 20일에 병원균을 접종하면 방제효과가 상당폭 감소하여 대조약제보다 방제효과가 떨어지는 것으로 나타나고 있다. 방제매체중에서는 H80 마쇄액의 효과가 가장 좋았으나 이 효과는 주로 발병엽수가 다소 적어지고 엽당 병반수가 적어지는데 있었다. H80균과 H80 배양여액의 처리는 무처리구에 비해 엽당 병반수가 다소 적어지는 것으로 나타나고 있으나 두 방제매체의 발병억제효과는 큰 차이가 없었다.

표 2-3. H80 처리 20일후 병원균 접종시 H80 정제단계별 고추반점세균병 방제효과

처 리	엽수/주	발병엽수	엽당 병반수	병반형(0-5)
H80 균	50.0	32.7	11.0	3.0
H80 마 쇠 액	41.7	24.7	5.0	2.7
H80 배양여액	43.3	35.7	10.0	2.7
대조약제(동수화제)	45.0	17.3	5.0	2.3
무처리 접 종	48.3	41.0	16.7	3.3
무처리 무접종	52.5	0	0	0

라) 방제균 처리 30일후 병원균 접종시 예방효과

H80 마쇄액의 처리효과가 엽당 병반수나 병반형에서 나타나고 있으나 발

병엽율은 대조약제에 비해 다소 높았다. H80균이나 그 배양여액도 무처리에 비해 엽당 병반수나 병반형에서 다소 낮아 예방효과가 다소간 지속되는 것으로 나타났다.

표 2-4. H80 처리 30일후 병원균 접종시 H80 정제 단계별 고추반점세균병 방제효과

처 리	엽수/주	발병엽수	엽당병반수	병반형
H80 균	16.7	16.3	4.3	2.7
H80 마 쇠 액	24.7	20.3	3.0	2.1
H80 배양여액	24.7	24.0	8.0	3.3
대조약제(동수화제)	19.3	14.3	5.0	2.3
무처리 접 종	16.3	15.7	14.0	4.0
무처리 무접종	20.0	0	0	0

2) 벼흰잎마름병에 대한 생물활성

가) 방제균 처리 5일후 병원균 접종시 예방효과

3가지 방제매체 모두 대조약제인 시라겐에 비해 방제효과가 현저히 낮아서 발병엽수나 병반면적, 병반형이 월등히 높게 나타나고 있으나 무처리에 비해서는 방제효과가 인정되었다. 방제매체별로 보면 H80마쇄액 > H80배양여액 > H80균의 순으로 효과가 좋았다.

표 2-5. H80처리 5일후 병원균(XOO)접종시 H80 정제단계별 벼흰잎마름병 방제효과

처 리	엽수/주	발병엽수	병반면적(%)	병반형
H80 균	15.0	6.0	40.0	4.3
H80 마 쇠 액	15.7	5.3	26.7	3.7
H80 배양여액	14.0	5.3	36.7	5.0
대조약제(시라젠)	17.3	1.3	3.3	1.7
무처리 접 종	19.5	10.0	65.0	5.0
무처리 무접종	21.0	0	0	0

* 수치는 3반복의 평균

나) 방제균 처리 10일후 병원균 접종시 예방효과

3가지 방제매체 모두 대조약제와 동등하거나 보다 우수한 방제효과를 보여 그 효과가 인정되었다. 그러나 발병정도가 처리와 상관없이 낮아서 무처리와 큰 차이를 보이지 않았으나 3가지 발병상황중 병반면적에서 그 효과가 두드러지는 경향이였다. 방제매체중에서는 H80 마쇄액의 효과가 타 매체에 비해 약간 우수한 경향이였다.

표 2-6. H80처리 10일후 병원균(XOO)접종시 H80 정제단계별 벼흰잎마름병 방제효과

처 리	엽수/주	발병엽수	병반면적(%)	병반형
H80 균	14.5	3.5	7.5	2.0
H80 마 쇠 액	21.3	2.0	6.7	2.0
H80 배양여액	19.3	3.0	11.7	2.0
대조약제(시라젠)	16.3	4.0	10.0	2.0
무처리 접 종	22.7	5.0	18.3	2.7
무처리 무접종	16.0	0	0	0

다) 방제균 처리 20일후 병원균 접종시 예방효과

방제매체의 처리효과는 대조약제에 비해 현저히 낮았으나 H80 마쇄액만이 무처

리에 비해 방제효과가 인정되어 방제균 처리후 경과일수가 길어지면 효과가 떨어지는 것으로 나타났다.

표 2-7. H80처리 20일후 병원균(XOO)접종시 H80 정제단계별 벼흰잎마름병 방제효과

처 리	엽수/주	발병엽수	병반면적(%)	병반형
H80 균	37.5	13.0	17.5	4.5
H80 마 쇠 액	43.0	12.0	7.5	3.5
H80 배양여액	39.0	15.5	25.0	5.0
대조약제(시라젠)	34.0	3.5	3.0	2.0
무처리 접 종	28.5	10.5	32.5	5.0
무처리 무접종	31.3	0	0	0

라. 생물활성 포장검정 예비시험

1) 고추 반점세균병에 대한 포장시험

가) 고추 엽면에서의 방제균 밀도변화

고추 엽면에서의 H80의 밀도는 처리 9일후 처음 관찰되었으며 그 이후 급격히 밀도가 감소하였고 처리 26일후에는 검출되지 않아서 H80의 포장에서의 생존력이 온실에서의 경우와는 달리 매우 약한 것으로 생각된다. 이것은 포장에서의 여러 환경조건이 온실에서처럼 지속적인 것이 아니어서 온도, 습도 등의 물리적인 요인과 엽면에 존재하는 미생물들에 의해 상당한 영향을 받고 있기 때문으로 풀이된다.

표 2-8. 시험포장 고추엽면에서의 박테리옌 분비균 H80의 경시적 밀도변화 양상

처 리 구	H80 밀도 (cfu×10 ⁴ / g 조직)			
	2 일후	9 일후	16 일후	26 일후
H80 균	0	7.8	0.5	0
무 처 리	0	0	0	0

* 수치는 3반복의 평균

나) 고추 생육상황 및 병방제효과

처리구별 고추초장은 H80 마쇄액이나 H80의 배양여액에서 다소 높은 경향이나 처리구간 유의적인 차이는 없었다. 고추 반점세균병의 처리구별 발병정도를 보면 전체적으로 발병이 낮아서 무처리의 경우 발병도 2-3의 지수를 보이고 있으나 대조약제나 3가지 방제매체의 경우 발병이 극히 낮아 구에 따라 0-1의 발병도를 나타내었다. 무처리를 제외한 나머지 4처리의 방제효과간에는 차이가 없었다. 이 경우처럼 전반적으로 발병이 낮을 경우 H80 방제매체의 방제효과는 보다 뚜렷이 나타나는 경향을 보였다.

표 2-9. 처리별 고추 초장 및 방제효과

처 리	생육정도 (초장 cm)				발 병 도 (0~5)			
	I	II	III	평균	I	II	III	평균
H80 균	37.9	40.4	43.9	40.7	0	0	1	0.3
H80 마쇄액	46.4	40.8	41.8	43.0	0	0	0	0
H80 배양여액	43.1	44.0	44.1	43.8	0	1	0	0.3
대조약제(동수화제)	41.2	38.3	42.8	40.8	0	0	1	0.3
무 처 리	41.5	42.1	43.7	42.4	0	2	3	2.3

2) 벼 흰잎마름병에 대한 방제효과

가) 벼 엽면에서의 방제균 밀도변화

처리후 H80균의 밀도는 처리후 6일까지 큰 폭의 감소없이 g 생체중당 10^3 - 10^4 cfu의 밀도를 유지하여 고추 엽면에서와는 달리 H80균이 잘 생존하고 있는 것으로 생각된다.

표 2-10. 시험구 처리별 벼 엽면에서의 H80의 정착력

처 리 구	H 80 밀도 (Log cfu / g 조직)		
	1 일 후	3 일 후	6 일 후
H80 균	3.6	3.9	3.6
무 처 리	0	0	0

나) 병방제효과

4가지 처리중 대조약제인 시라젠의 방제효과가 가장 높게 나타나 수량도 가장 많았다. 방제매체중에서는 H80 마쇄액의 효과가 가장 우수하였으며 H80균이나 배양여액에 비해 높은 방제효과를 나타내었고 수량도 높았다. H80균이나 H80 배양여액은 무처리에 비해 발병도가 비슷하였으나 수량은 다소 낮은 경향이였다.

표 2-11. 시험구 처리별 벼흰잎마름병 발병정도

처 리	발 병 정 도 (0 ~ 5)				수 량 (kg/9m ²)			
	I	II	III	평균	I	II	III	평균
H80 균	2.8	2.8	2.6	2.6	8.2	8.4	8.2	8.27
H80 마 쇠 액	2.2	1.8	1.4	1.4	9.2	8.2	8.6	8.67
H80 배양여액	2.8	3.0	2.5	2.5	8.5	8.6	8.0	8.37
대조약제(시라젠)	0.4	0.2	0.3	0.3	9.0	8.8	9.44	9.07
무 처 리	3.0	3.0	2.9	2.9	8.5	8.4	8.4	8.43

III. Bacteriocin 분비균 및 그 대사산물의 포장활성

1. 서 론

'98년의 예비시험에서 박테리오신 분비균 H80균의 포장에서의 고추 엽면 생존은 온실시험의 경우와 비교해 매우 열악한 것으로 나타나고 있다. 벼 잎에서의 생존은 고추의 경우에 비해 훨씬 양호한 것으로 평가되었지만 온실의 경우처럼 제어된 환경에서 보다 포장의 자연환경에서 생존력이 떨어지는 것은 너무나 당연한 현상으로 받아들여 진다. 벼 잎에서는 고추의 경우와는 달리 잎털(까락)이 존재하므로 H80균이 이들을 중심으로 군총을 형성하여 생존력이 좋아진 것으로 생각할 수 있다. 박테리오신을 분비하여 목표로 하는 병원균을 억제하기 위해서는 먼저 시용처에서 살아남아야만 하는데 H80균의 입장에서 보면 엽면에서의 생존에 필요한 영양원의 확보가 무엇보다도 시급하며 이렇게 하기 위해서는 엽면서식 미생물과의 경쟁에서 이길 수 있는 능력이 있어야 한다. 따라서 향후 연구에서 H80균의 근연종중에서 엽면 생존력이 뛰어난 균주를 찾는다면 박테리오신 분비균의 생물활성을 훨씬 양호하게 할 수 있을 것이다.

박테리오신 분비균의 대사산물을 이용한다면 엽면에서의 생존력이 큰 제한요인이 되지 않으므로 효과면에서는 경우에 따라 박테리오신 분비균 자체를 사용하는 것보다 억제효과가 크게 나타날 수 있다. 그러나 배양매체를 조제하는데 그만큼 시간과 노력이 많이 들고 또한 농축할 필요가 있거나 화학식 구조를 밝힌 후 합성할 필요가 있는 경우는 훨씬 세균자체 시용보다는 개발에 경비가 많이 소요되는 단점이 있을 것이다. 이와 같은 경우는 거의 다른 유기합성농약과 대동하게 되므로 잔류독성 등의 문제도 면밀히 검토해야 할 필요성이 생기게 된다.

'99년(3년차)의 시험에서는 '98년의 포장예비시험을 거쳐 어느 정도 그 효과가 검증된 균의 배양매체를 공시하여 포장에서 고추반점세균병과 벼흰잎마름병을 대상으로 예방효과와 치료효과를 검정하였다.

2. 재료 및 방법

가. 고추 반점세균병에 대한 효과검정

1) 온실에서의 H80균의 예방효과검정

고추품종은 다조아를 공시하였다. 엽면에서의 H80균의 밀도조사를 위하여 Rifampicin과 Kanamycin 내성균주를 사용하여 10^8 cfu/ml 농도로 접종원을 조제하였고 고추반점세균병과 벼흰잎마름병은 Rifampicin 내성균주를 사용하여 병원균 접종원 농도를 10^8 cfu/ml로 조정하여 사용하였다. 고추묘는 2차 분지기에 달한 묘를 사용하였다. 시험은 처리당 3-5반복하여 22-30℃의 온실에서 수행하였다. H80균이나 병원균의 접종 후 포트는 28℃의 습실상에 24시간 정치한 후 꺼내어 온실에 두었다.

처리는 H80균과 병원균을 동시 접종한 처리와 병원균의 접종시기를 H80 접종후 1, 3, 5, 10, 20, 30일후 시용한 처리를 두었으며 대조구로 H80 무접종, 병원균 무접종 그리고 H80/병원균 동시 무접종 처리를 두었다. 발병조사는 병원균 접종 26일후와 44일 후에 0(무발병)~5(잎 완전고사)까지의 발병지수를 사용하였다.

2) 온실에서의 H80균의 치료효과검정

품종 및 H80 접종원, 병원균의 접종원 농도는 예방효과검정의 경우와 동일하며 시험구 반복, 발병조사도 앞의 경우와 유사하게 수행하였다. 시험구 처리는 H80균의 접종일을 병원균 접종후로부터 1, 3, 5, 10, 20일 구로 나누었으며 대조구로 병원균 무접종/H80균 1일후 접종, 병원균접종/H80균 무접종, 그리고 병원균/H80균 동시 무접종 처리를 두었다.

3) H80균 및 병원균의 고추 엽면에서의 밀도변화 조사

H80균의 선접종구(예방효과구)와 병원균 선접종구(치료효과구)에서 병원균 접종후 1, 3, 5, 10, 20일후에 고추잎에서 표본을 채취하여 '98년 온실시험의 경우와 동일하게 고추 단위 조직당 H80균, 병원균의 밀도를 조사하였다. 시험은 각각 3반복하였다.

4) H80균의 시용 농도별 예방효과검정

H80균의 접종원 농도를 10^8 , 10^6 , 10^4 cfu/ml의 3처리를 두어 접종농도효과를 조사하였다. 병원균은 10^8 cfu/ml의 농도로 H80균 시용 1일후 접종하였으며 기타의 시험방법은 앞 항의 경우와 유사하였다. 발병은 0-5까지의 발병지수를 사용하여 접종 7, 11, 22일후에 조사하였고 각 처리별로 표준편차를 구하여 변이폭을 표시하였다. 각 처리별로 3반복하였다.

나. 벼흰잎마름병에 대한 효과검정

1) 온실에서의 H80균의 예방효과검정

벼품종은 밀양 23호를 공시하여 4각 포트($5 \times 15 \times 5$ cm)에 육묘하여 분얼초기에 달한 묘를 시험에 사용하였다. 벼흰잎마름병균과 H80균의 접종원 농도는 모두 10^8 cfu/ml로 고정하였으며 시험구는 처리별로 3-5반복하였다. 시험은 고추반점세균병과 동일한 온실에서 수행하였으며 접종후 식물은 28°C 습실상에서 24시간 정치후 꺼내어 온실에 두었다. 발병은 0(무발병)~5(잎 완전고사)까지의 발병지수를 이용해 병원균 접종 15, 26일후에 2회 조사하였다.

시험구 처리는 고추 반점세균병의 경우와 동일하게 하였으며 H80균의 동시접종구, H80균 접종후 1, 3, 5, 10, 20, 30일 처리를 두었고 H80 무접종/병원균 1일후 접종구, H80균 접종/병원균 무접종구, H80균/병원균 동시 무접종의 대조구를 두었다.

2) 온실에서의 H80균의 치료효과검정

시험방법은 예방효과의 경우와 동일하였다. 다만 시험구 처리에 H80균의 처리시기를 병원균 접종후 1, 3, 5, 10, 20일로 하였으며 대조구로 병원균 무접종/H80균 1일후 접종, 병원균 접종/H80균 무접종, 병원균/H80균 동시 무접종구를 두었다.

3) H80균 및 병원균의 벼 엽면에서의 밀도변화조사

H80균의 예방효과 검정시험과 치료효과 검정시험에서 예방효과시험의 경우 병원균 접종후 1, 3, 5, 10, 20일에 벼잎 표본을 채취하였고 치료효과시험의 경우 H80 접

종후 1, 3, 5, 10, 20일에 표본을 채취하여 단위 g 생체중당 병원균과 H80균의 밀도를 조사하였다.

4) H80균의 시용농도별 예방효과 검정

H80균 접종원 농도를 10^8 , 10^6 , 10^4 cfu/ml로 나누어 그 효과를 조사하였다. 시험방법은 예방효과 시험의 경우와 동일하였으며 병원균 접종 15, 26일후에 0-5의 발병도를 사용하여 발병상황을 조사하였다. 처리별로 3반복하였다.

다. 고추 반점세균병에 대한 포장시험 검정

다조아 품종을 공시하여 경기도 수원시 소재 농업과학기술원 시험포장에서 포장시험을 수행하였다. 고추묘는 5월 7일 포장에 정식하였으며 시험구는 크게 둘로 나누어 예방효과 시험구와 치료효과 시험구로 구분하였으며 각각 난괴법 3반복으로 5개의 처리를 배치하였다. 단위 시험구의 크기는 $3 \times 7m = 21m^2$ 이었으며 구당 묘수는 34주로 하였다. 처리는 H80균 10^8 cfu/ml, H80 10^8 cfu/ml 마쇄액, H80 10^6 cfu/ml 마쇄액, 쿠퍼수 화제 500배액, 무처리를 두었으며 6월 8일부터 10일 간격으로 3회 시용하였다. 병원균은 H80 시용 1일후(예방효과시험)와 1일전(치료효과시험) 10^8 cfu/ml 농도로 포장에 전면 살포하였다. 발병조사는 병원균 접종 39일후와 57일후에 발병주율을 조사하였다.

라. 흰잎마름병에 대한 포장시험 검정

흰잎마름병에 이병성인 밀양 23호를 공시하여 5월 21일 포장에 이앙하였다. 시험구는 난괴법 3반복으로 고추 반점세균병의 경우와 동일한 처리를 두었으며 대조약제는 시라젠 1,000배액을 공시하였다. 구당 면적은 $3 \times 3m = 9m^2$ 이었으며 각 구당 증앙의 9주에 대해 이앙시 흰잎마름병균 10^8 cfu/ml의 접종원을 분무 살포하여 접종하였다. 처리는 7월 28일부터 10일 간격으로 3회 시용하였으며 발병조사는 0-5의 발병지수를 이용하여 조사하였고 10월 7일 구당 수량을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 고추 반점세균병에 대한 온실검정

1) H80의 예방효과

H80균의 예방효과를 보면 접종 26일후 발병도가 H80균 접종후 1일후에 병원균을 접종한 처리가 가장 낮아 효과가 가장 좋은 것으로 나타난 반면에 H80 접종후 병원균의 접종일이 길어질수록 억제효과가 낮아지는 경향이였다. H80균과 병원균을 같이 접종할 때는 억제효과가 거의 없었다. H80 접종후 20일째에 발병이 낮아지는 것은 병원균의 접종후 일수가 6일째이므로 발병이 충분히 이루어지지 않았기 때문으로 생각된다. H80 접종후 44일째 조사한 결과를 보면 H80의 억제효과가 전혀 없어 H80 시용후 효과지속시간은 최소 44일 이내로 생각되며 H80의 억제효과가 낮아지는 것은 앞서의 엽면 밀도시험에서 보았듯이 H80의 고추 엽면내 생존력이 점점 떨어지는 현상 때문으로 해석된다.

표 3-1. 고추반점세균병에 대한 H80균(*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*)의 선접종후 병원균의 접종일에 따른 예방효과(온실시험)

병원균 접종일	접종 26일후 발병도(0-5)		접종 44일후 발병도(0-5)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
H80균과 동시 접종	3.7	0.47	5.0	0
H80균 접종후 1일	1.3	0.47	5.0	0
3일	2.7	1.25	5.0	0
5일	4.0	0	5.0	0
10일	4.7	0.47	5.0	0
20일	1.3	0.47	5.0	0
30일	0	0	4.3	0.47
H80균 무접종 / 병원균 1일후 접종	5.0	0	5.0	0
H80균 접종 / 병원균 무접종	0	0	0	0
H80균 / 병원균 동시 무접종	0	0	0	0

* 품종 : 다조아, H80균 처리일 : '99. 4. 22

2) H80의 치료효과

H80의 접종에 앞서 병원균을 먼저 접종하여 H80의 치료효과를 조사해보면 아래 표에서 보는 것처럼 예방효과의 경우와는 달리 병원균 접종후 일수와 상관없이 억제 효과는 거의 없는 것으로 나타나고 있다. 이와 같은 결과는 과거의 몇 번의 시험에서도 유사하게 나타나고 있어 일단 병원균이 고추 엽면에 존재하고 있을 때는 H80이 분비하는 Bacteriocin의 영향을 거의 받지 못하고 있는 것으로 생각된다. 이 결과를 보면 H80은 그 효과를 나타내기 위해서는 실용적으로 고추에 반점세균병이 발생하기 전에 예방적으로 살포할 필요가 있고 생각된다.

표 3-2. 고추 반점세균병의 병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) 선접종후 H80균의 접종일에 따른 치료효과(온실시험)

H80균 접종일	접종 26일후 발병도(0-5)		접종 44일후 발병도(0-5)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
병원균 접종후 1일	5.0	0	5.0	0
3일	5.0	0	5.0	0
5일	5.0	0	5.0	0
10일	5.0	0	5.0	0
20일	5.0	0	5.0	0
병원균 무접종 / H80균 1일후 접종	0	0	0.2	0.19
병원균 접종 / H80균 무접종	5.0	0	5.0	0
병원균 / H80균 동시 무접종	0	0	0.03	0.05

3) H80 및 병원균의 고추엽면에서의 밀도변화

고추잎에서의 H80균 및 병원균의 밀도를 보면 두 균 모두 비슷한 밀도변화의 경향을 보이고 있다. 병원균 접종후 1일후 2×10^4 cfu/g 조직의 밀도에서 3일후에는 급격히 감소하는데 이 기간은 접종후 고추 엽면에서의 적응때문으로 풀이된다. 그 이후 밀도는 급격히 증가하여 접종 5일후 최대치에 달하고 그 후 점점 감소하기 시작해서 접종후 20일후에는 거의 검출되지 않을 정도로까지 감소하였다. 따라서 이러한 엽면

밀도의 급격한 감소는 H80의 효과가 접종후 20일후에는 거의 나타나지 않는 주요 이유로 생각된다.

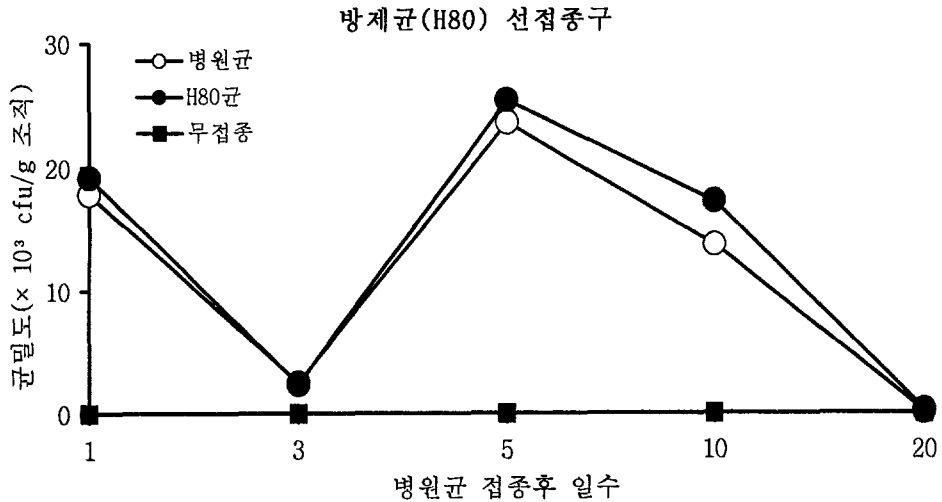


그림 3-1. 방제균(H80) 접종 1일후 병원균 접종시 고추엽면에서의 밀도변화

병원균을 H80에 앞서 먼저 접종한 경우도 대체적인 엽면 밀도의 변화는 앞의 예방 효과 검정구와 비슷한 경향을 보이고 있다. 병원균의 경우 접종 3일후에 밀도가 감소하였다가 5일후에 최대치에 달하며 접종 10일후에 급격히 감소하고 있다. H80의 경우는 접종 10일까지 완만히 그 밀도가 증가하여 그 이후 급격히 감소하고 있으며 병원균이 선점하고 있을 때는 그 밀도가 병원균에 비하여 대체로 낮아지고 있어 이러한 경향이 H80의 치료효과가 낮아지는 한 원인으로 생각되어 진다.

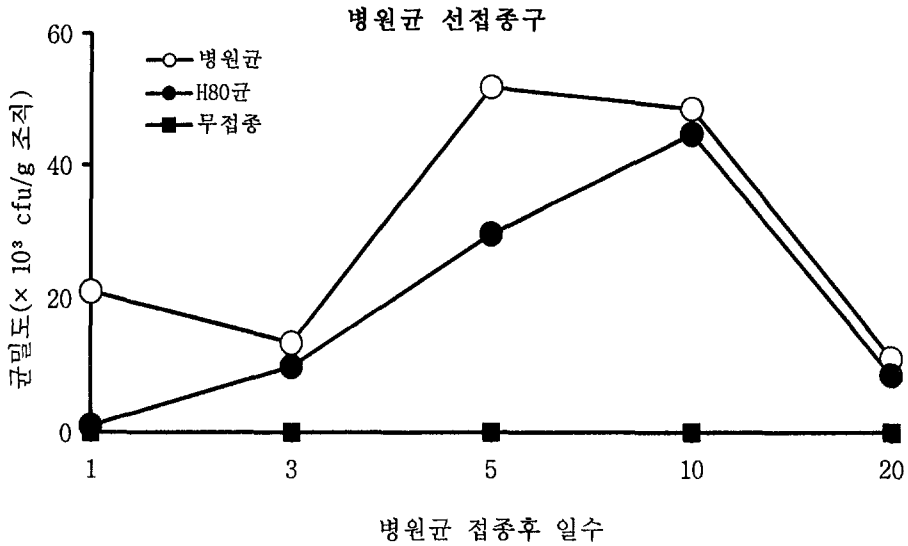


그림 3-2. 병원균 접종 1일후 방제균(H80) 접종시 고추엽면에서의 밀도변화

4) H80균의 접종농도별 예방효과

H80균의 접종농도가 높을수록 발병억제효과가 높아서 접종 7일후에는 10^8 cfu/ml의 경우 완벽한 방제효과를 보였으며 그 억제효과는 접종 11일후까지 계속되었으나 접종 22일후에는 발병억제효과가 나타나지 않아 무처리와 동등한 발병수준을 보였다. 10^6 cfu/ml의 경우도 10^8 cfu/ml 접종구에 비하여 그 억제효과는 떨어지나 지속효과는 10^8 cfu/ml의 경우와 유사하였다. 그러나 10^4 cfu/ml의 저농도로 접종하였을 때는 방제효과가 전혀 없었다.

표 3-3. 고추반점세균병에 대한 H80균의 접종 농도별 예방효과(온실시험)

H80균 시용농도 (cfu/ml)	접종7일후 발병도(0-5)		접종11일후 발병도(0-5)		접종22일후 발병도(0-5)	
	평 균	표준편차	평 균	표준편차	평 균	표준편차
10 ⁸	0	0	0.7	0.895	5.0	0
10 ⁶	0.3	0.47	2.0	0.82	5.0	0
10 ⁴	0.7	0.41	3.7	0.47	5.0	0
무 처 리	0.7	0.41	3.3	0.47	5.0	0

* H80균 시용 1일후 병원균 접종

나. 벼흰잎마름병에 대한 온실검정

1) H80균의 예방효과

H80균을 선접종하고 병원균을 나중에 접종하여 병원균의 접종일수별로 발병억제 효과를 조사한 결과 H80 접종후 병원균 접종일수가 빠를수록 그 효과가 좋은 것으로 나타났다. H80 접종후 3일 이내에 병원균을 접종하였을 때는 그 방제효과가 월등하게 좋았으나 5일 이후에는 그 억제효과가 대폭 감소하였다. 고추 반점세균병의 경우와 마찬가지로 H80균과 병원균을 동시에 접종하였을 때는 방제효과가 전연 나타나지 않았다. 접종 26일후 발병도를 조사하였을 때도 그 효과가 접종 15일후 조사결과와 유사하게 나타나 H80의 예방효과가 접종 26일때에도 지속되었다.

표 3-4. 벼흰잎마름병에 대한 H80균의 선접종후 병원균의 접종일에 따른 예방효과 (온실시험)

병원균 접종일	접종 15일후 발병주율(%)		접종 26일후 발병도(0-5)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
H80균과 동시 접종	43.0	19.97	2.7	0.47
H80균 접종후 1일	1.9	2.40	0.1	0.21
3일	2.1	2.92	0.7	0.47
5일	22.2	7.09	3.3	0.47
10일	20.4	9.08	3.7	0.47
20일	0	0	1.3	0.47
30일	0	0	0	0
H80균 무접종 / 병원균 1일후 접종	39.5	19.97	4.0	0
H80균 접종 / 병원균 무접종	0	0	0	0
H80균 / 병원균 동시 무접종	0	0	0	0

2) H80균의 치료효과

병원균의 선접종후 H80을 경과일수별로 접종하고 그 치료효과를 조사한 결과 병원균 접종후 5일이내에 H80을 접종할 경우 억제효과가 있어 무치리에 비해 발병을 1/4~1/2 수준으로 억제하였다. 그러나 10일 이후 접종하였을 때는 그 억제효과가 전혀 나타나지 않았다. 접종 26일에 조사한 결과를 보면 발병억제효과가 극히 미미하게 나타나거나 전혀 없어 H80의 효과지속기간은 접종 26일 이내로 생각되어 진다.

표 3-5. 벼흰잎마름병에 대한 병원균(*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*)의 선접종후 H80균의 접종일에 따른 치료효과(온실시험)

H80균 접종일	접종 15일후 발병주율(%)		접종 26일후 발병도(0-5)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
병원균 접종후 1일	22.7	9.32	4.8	0.40
3일	21.3	18.67	4.0	0
5일	43.0	20.56	5.0	0
10일	84.2	22.34	5.0	0
20일	79.1	17.02	5.0	0
병원균 무접종 / H80균 1일후 접종	0	0	0	0
병원균 접종 / H80균 무접종	82.5	1.08	5.0	0
병원균 / H80균 동시 무접종	0	0	0	0

3) H80균의 접종농도별 예방효과

H80균의 접종농도가 높을수록 그 방제효과도 높게 나타났다. 특히 10^8 cfu/ml의 고농도로 접종하였을 때는 무처리에 비하여 발병을 1/4 수준으로 낮추어 그 효과가 탁월하였다. 그러나 접종 26일후 조사에서는 그 효과가 상당폭 감소하는 것으로 나타나고 있다. 10^6 cfu/ml의 경우는 10^8 의 경우에 비해 그 효과는 떨어지나 무처리에 비해 발병정도가 낮았으나 10^4 cfu/ml의 접종농도에서는 발병억제효과가 전혀 없었다. 이러한 결과를 살펴보면 실제 응용시 H80의 접종농도는 최소한 10^6 cfu/ml 이상이 되어야 할 것으로 생각된다.

표 3-6. 벼흰잎마름병에 대한 H80균의 접종농도별 예방효과(온실시험)

H80균 시용농도 (cfu/ml)	접종 15일후 발병주율(%)		접종 26일후 발병도(0-5)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
10^8	5.1	0.58	3.3	0.47
10^6	14.0	18.39	3.7	0.47
10^4	38.2	10.71	5.0	0
무 처리	22.6	6.07	5.0	0

* H80균 시용 1일후 병원균 접종

4) H80 및 병원균의 벼 엽면에서의 밀도변화

H80균을 병원균에 먼저 접종하였을 때는 H80균의 선점효과가 있어 병원균에 비하여 그 밀도가 약간 높게 나타나고 있으나 이러한 경향은 병원균 접종후 20일 뒤에는 역전되고 있다. 그러나 고추반점세균병의 경우와는 달리 접종후 일수가 경과할수록 밀도의 변화가 급격하지 않고 지속적으로 밀도가 증가하는 경향을 보여 벼 앞에서는 두균의 생존이 고추잎보다 양호한 것으로 생각되었다.

병원균을 H80보다 먼저 접종하였을 때는 병원균의 밀도가 H80균보다 다소 높게 나타나고 있으며 접종후 시일이 경과할수록 완만하게 밀도가 상승하고 있어 접종 20일 후에 밀도가 최대치에 달하였다.

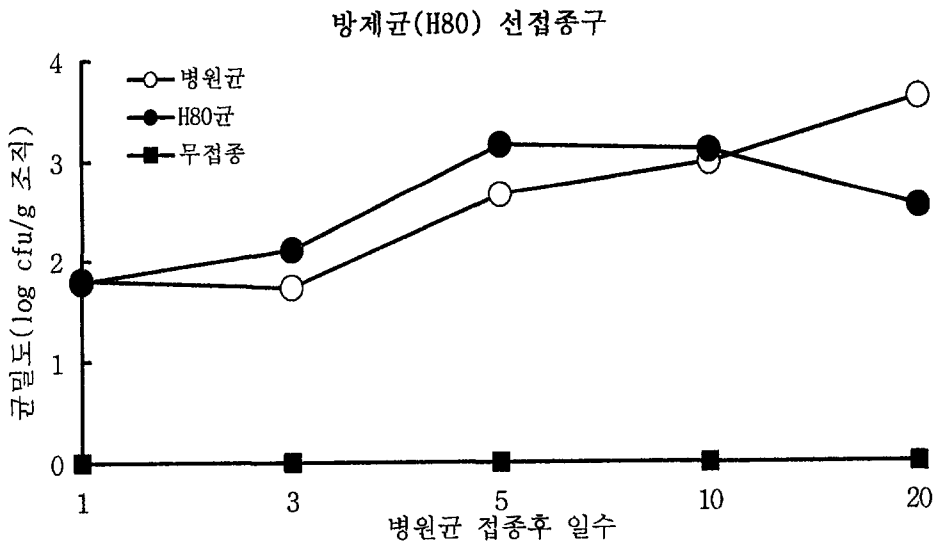


그림 3-3. 방제균(H80) 접종 1일후 병원균 접종시 벼 엽면에서의 밀도변화

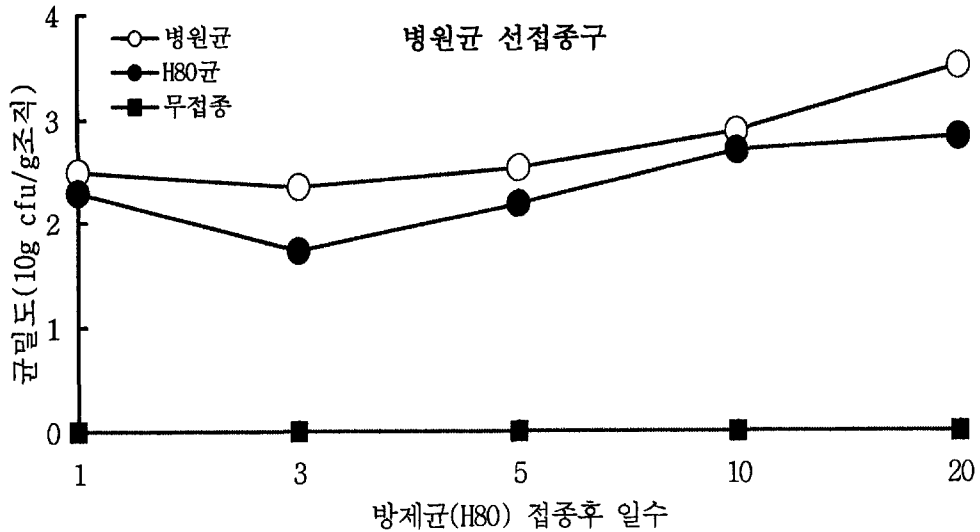


그림 3-4. 병원균 접종 1일후 방제군(H80) 접종시 벼 엽면에서의 밀도변화

다. 고추 반점세균병에 대한 포장검정

1) H80균 및 그 매체들의 예방효과

H80 10^8 cfu/ml 현탁액의 마쇄액, 10^6 cfu/ml 마쇄액, H80균 10^8 cfu/ml 현탁액의 효과를 포장에서 비교하여 보았을 때 병원균 접종 39일후에는 H80 10^8 cfu/ml 마쇄액의 효과가 대조약제인 동수화제의 효과와 비슷하게 나타나 발병을 효과적으로 억제하였다. 그러나 나머지 두처리는 대조약제에 비하여 효과가 떨어졌으나 무처리에 비해서는 발병이 낮아 억제효과가 인정되었다. 병원균 접종 57일후의 조사결과를 보면 대조약제를 포함한 모든 처리가 서로 비슷하여 무처리에 비해 발병이 약간 낮으나 방제효과는 39일의 조사결과에 비하여 대폭 감소한 것으로 나타났다.

표 3-7. 고추반점세균병에 대한 H80균의 예방효과(수원포장시험)

처 리	병원균접종 39일후 발병주율(%)		병원균접종 57일후 발병도(0-5)	
	평 균	표준편차	평 균	표준편차
H80 마쇄액 10 ⁸ cfu/ml	1.9	1.37	3.0	0
H80 마쇄액 10 ⁶ cfu/ml	6.9	3.70	3.7	0.47
H80 균 10 ⁸ cfu/ml	7.8	6.93	3.3	0.47
동수화제 500배액	1.9	1.37	3.0	0
무 처 리	22.5	6.04	4.0	0.82

* H80 처리 2일후 병원균 접종, H80 : 10일간격 3회 시용

2) H80균 및 그 매체들의 치료효과

온실시험과는 달리 H80 방제매체들의 치료효과가 인정되었으며 H80 마쇄액보다는 H80균 자체의 시용효과가 다소 높게 나타나고 있다. 특히 H80 고농도의 마쇄액과 H80균 자체의 시용효과는 병원균 접종 39일후 조사시 동수화제보다 우수하게 나타나고 있으며 이러한 효과는 시일이 경과해도 접종 57일까지도 지속되었다.

표 3-8. 고추반점세균병에 대한 H80균의 치료효과(수원포장시험)

처 리	병원균접종 39일후 발병주율(%)		병원균접종 57일후 발병도(0-5)	
	평 균	표준편차	평 균	표준편차
H80 마쇄액 10 ⁸ cfu/ml	7.8	5.01	2.0	0.82
H80 마쇄액 10 ⁶ cfu/ml	15.7	7.73	3.3	0.47
H80 균 10 ⁸ cfu/ml	5.9	2.41	1.7	0.47
동수화제 500배액	11.7	6.36	1.3	0.47
무 처 리	25.5	9.09	3.0	0

* 병원균 접종 2일후 H80 처리, H80 : 10일 간격 3회 시용

라. 벼 흰잎마름병에 대한 포장활성

벼 흰잎마름병에 대한 H80 방제매체들의 발병 억제효과는 고추 반점세균병의 경우와는 달리 방제매체의 종류와 상관없이 발병억제효과를 보이지 않았다. 수량조사 결과도 처리간에 차이가 없었다.

표 3-9. 벼흰잎마름병에 대한 H80균의 방제효과 및 수량(이천시시험지 포장시험)

처 리	발 병 도 (0-5)		수 량 (kg/평)	
	평 균	표준편차	평 균	표준편차
H80 마쇄액 10 ⁸ cfu/ml	1.6	0.49	2.17	0.09
H80 마쇄액 10 ⁶ cfu/ml	1.5	0.19	2.00	0.16
H80 균 10 ⁸ cfu/ml	2.2	0.88	2.07	0.09
시라젠 1000배액	0.2	0.11	1.67	0.25
무 처 리	1.0	0.38	2.03	0.12

* 난괴법 3반복의 평균

이상의 결과를 종합해 보면 박테리옌 분비균 H80균의 열권 생태계에 미치는 영향은 극히 미미한 것으로 판단되며 방제활성의 측면에서는 H80균 자체의 경우 그 접종농도가 10⁸cfu/ml 이상이 되어야 그 방제활성이 실용적인 수준에 달하는 것으로 생각된다. 또한 고추 반점세균병의 경우에 H80균 자체보다는 H80 고농도의 마쇄액이 보다 효과적인 것으로 생각된다. 온실조건에서 H80균의 방제효과는 주로 예방효과의 측면에서 나타나 그 지속효과는 매우 짧아서 살포후 3-5일에 극한하였다. 포장시용효과를 보면 H80균 혹은 H80균 고농도 마쇄액의 발병억제효과는 고추 반점세균병의 경우 현재 농가에서 사용중인 약제에 비해 대동하거나 약간 낮게 나타나고 있으나 벼흰잎마름병의 경우 거의 방제효과가 없었다. 향후 H80이 분비하는 bacteriocin을 실용화하기 위해서는 박테리옌을 추출 농축하여 고농도로 사용하거나 화학구조식의 구명후 인공합성하여 살균제 형태로 이용하는 방법이 연구되어야 할 것으로 생각된다.