

최 종
연구보고서

초지와 밭에서 광역 제초활성을 갖는
친환경형의 새로운 미생물 개발 실용화

Development of New Microbial
Herbicides having Broad Spectra

연구기관
한국생명공학연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “초지와 밭에서 광역 제초활성을 갖는 친환경형의 새로운 미생물 개발 실용화” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 4일

주관연구기관명: 한국생명공학연구원

총괄연구책임자: 김 창 진

연 구 원: 이 향 범

연 구 원: 박 동 진

연 구 원: 전 은 수

연 구 원: 권 오 성

연 구 원: 박 상 호

연 구 원: 홍 영 덕

위탁연구기관명: 충남대학교

위탁연구책임자: 윤 효 인

요 약 문

I. 제 목

초지와 밭에서 광역 제초활성을 갖는 친환경형의 새로운 미생물 개발 실용화

II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 과제는 오늘날 유기합성 제초제의 다량 사용에 따른 환경오염 및 독성 문제를 극복할 수 있는 저독성이며 환경에 친화적인 새로운 미생물제초제의 개발을 목적으로 하였다. 이를 위해 1차 선발된 제초활성을 지닌 곰팡이와 방선균류를 중심으로 미생물 자체를 생물제제 (biocontrol agent, BCA)로 이용하는 연구와 미생물로부터 유래한 제초활성물질을 이용하는 연구분야로 나누어 실시하였다. 잡초 및 작물에 대한 제초활성검정을 통해 최종 선발된 균주는 제제화를 위한 균생태생리적인 기초연구 및 활성물질의 구조 구명을 통해 미생물제제 실용화 및 그 기술개발을 목표로 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 제초활성 곰팡이 균주 *Penicillium oxalicum* F40362의 클로버를 비롯한 주요 초종에 대한 제초활성 검정
2. 제초활성 미생물 균주의 안정적인 제초 활성 유지를 위한 장기 보존, 포장 조건에서의 활성 유지, 포자농도와 제초활성 상관 관계 등과 관련한 제제화 연구
3. 제초활성 균주의 최적 균사 성장 및 대량 포자생산조건 등 균류의 생태·생리적 특성 조사

4. 제초활성균주의 잡초 종합방제 시스템의 확립을 위한 기존 약제와의 병용 실험
5. 곰팡이 *Myrothecium roridum* F000252 균주를 이용한 제초활성 검정 및 생태생리적 특성 조사
6. 방선균 *Streptomyces* sp. KA79가 생산하는 제초활성물질의 분리정제와 화학구조 구명
7. *Bipolaris* spp.가 생산하는 제초활성 물질의 분리정제와 화학구조 구명
8. 생물농약 등록기준에 근거한 활성 균주의 실험동물에 대한 급성 및 아급성 독성시험

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제초활성 검정 결과 선발된 *Penicillium oxalicum* F40362 및 *Myrothecium roridum* F000252 균주의 미생물 제초제로서의 이용가능성을 검토한 결과 실용화 가능성이 매우 높은 것으로 판단되었다. 따라서 *Penicillium oxalicum* F40362 균주의 경우 제초 활성의 안정성, 장기 보존, 포자농도와 제초활성과의 상관성 등과 관련한 균류의 제제화 연구를 통해 제제화 조건 등이 확립되었다. *Penicillium oxalicum* F40362 균주의 최적 군사 생장 및 포자생산을 위한 환경 (수분 및 온도) 연구, 환경 스트레스에 대한 적응력과 관련한 균류 생태·생리적 특성이 조사되었다. 한편, *Penicillium oxalicum* F40362 균주의 잡초종합방제 시스템의 확립을 위한 기존 약제와의 병용 실험결과 Dicamba 등의 약제가 본 균주의 생존에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 상기 균주 등은 생물농약 등록기준에 근거한 활성 균주의 동물에 대한 급성 및 아급성 독성시험 결과 전혀 독성에 의한 증상이 관찰되지 않았다.

미생물이 생산하는 대사산물을 이용한 연구에서 방선균 *Streptomyces* sp. KA79로부터 신규 methoxyhygromycin 유도체가 분리되었으며 *Bipolaris sorokiniana* 균주로부터 3-hydroxy benzoic acid methyl ester 및 3-methoxy

benzoic acid 물질이 처음 분리되었으며, *Bipolaris zeicola* 균주로부터 신규 cochlioquinone 유도체가 분리되었다.

미생물을 이용하는 생물제초제의 연구개발 수준은 아직 시작단계이나 앞으로 생물농약산업 분야에서 적극적으로 활용될 수 있는 계기가 마련되어야 할 것으로 생각된다. 환경친화형 미생물제초제는 앞으로 유기합성농약의 대안으로 그 수요를 늘릴 필요가 있으며 이에 따라 지속적인 연구개발 및 포장에서의 적용과 이용을 위한 지원이 필요하다고 생각된다.

여 백

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Development of new microbial herbicides having broad spectra

II. Objectives and importance of the study

Biocontrol of weeds has not been recognized only as a replacement for chemical pesticides, but also as a viable part of well designed, integrated weed management systems to control or reduce the population of undesirable weed species. This study was performed for developing biocontrol agent (BCA) for control of problematic weeds and searching for bioherbicidal materials, and for developing technology for practical use.

III. Contents and scope of the study

1. Use of *Penicillium oxalicum* F40362 as a biocontrol agent.
2. Formulation of BCA for improved field efficacy and shelflife
3. Ecophysiology of BCA relevant to environmental stress, especially water and temperature stress
4. Effect of mixed application of chemical and BCA on weed control
5. Use of *Myrothecium roridum* F000252 as a bioherbicidal agent

6. Purification and isolation of bioactive compounds produced by *Streptomyces* sp. KA79 and *Bipolaris* spp. and determination of the chemical structures
7. Toxicity and safety test

IV. Results and their application

A fungal agent *Penicillium oxalicum* F40362 and *Myrothecium roridum* F000252 have shown potential as BCA for control of problematic weeds in Korea. The BCA formulated as wheat bran-corn starch showed high herbicidal effect. In the ecophysiological study, *Penicillium oxalicum* F40362 has shown its ability to survive or grow under water and temperature stress condition. The fungal agent mixed with chemical pesticide may be effectively applied to integrated weed management for control of weeds. In another study, several bioherbicidal materials were isolated, purified from cultures of an actinomycete isolate, *Streptomyces* sp. KA79, and two fungal isolates, *Bipolaris sorokiniana* and *B. zeicola*, respectively, using solvent partition, open column chromatography and HPLC. Their chemical structures were determined to be a new methoxyhygromycin derivative, 3-hydroxy benzoic acid methyl ester, 3-methoxy benzoic acid, and two new cochlioquinone compounds such as cochlioquinone A and B by Mass and NMR analyses.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction

1. Background and importance of the study
2. Objectives of the study

Chapter 2. Materials and methods

1. Use of living microorganisms as BCA
 - A. Isolation and identification
 - B. Herbicidal activity
 - C. Formulation
 - D. Mixed application
 - E. Ecophysiology
 - F. Toxicity and safety
2. Study of bioherbicidal material
 - A. *Streptomyces* sp. KA79
 - a. Isolation and purification of bioactive compound
 - b. Chemical structure determination
 - B. *Bipolaris* spp.
 - a. Isolation and purification of bioactive compound

- b. Chemical structure determination

Chapter 3. Result and discussion

1. Use of living microorganisms as BCA
 - A. Isolation and identification
 - B. Herbicidal activity
 - C. Formulation
 - D. Mixed application
 - E. Ecophysiology
 - F. Toxicity and safety

2. Study of bioherbicidal material
 - A. *Streptomyces* sp. KA79
 - a. Isolation and purification of bioactive compound
 - b. Chemical structure determination
 - B. *Bipolaris* spp.
 - a. Isolation and purification of bioactive compound
 - b. Chemical structure determination

Chapter 4. Conclusion

Chapter 5. References

목 차

제1장 서 론	17
제1절 연구배경 및 필요성	19
제2절 본 과제 의 연구 목표	20
1. 연구개발의 최종 목표	20
2. 연구 목표	20
3. 연구개발 내용 및 범위	21
제2장 연구추진 방법	23
제1절 생균의 제초활성 연구	25
1. 균주분리 및 스크리닝	25
2. 균주 동정	25
3. 제초활성 검정	26
가. 균배양	
나. <i>in vitro</i> 활성검정	
1) <i>Chlorella</i> 를 이용한 검정	

2) <i>Lemna</i> 를 이용한 검정	
3) Greening plant를 이용한 검정	
4) 닭의장풀을 이용한 검정	
다. <i>in vivo</i> 활성검정	
1) Pot 시험	
2) 온실시험	
4. 활성균주의 제제화	30
가. 제제화	
나. 안정성 및 보존성	
5. 약제혼용 실험	32
6. 균생태·생리	32
가. 생물제제의 군사생장에 대한 환경요인의 영향	
나. 분생포자발아에 대한 환경요인의 영향	
다. 탄소원 이용성	
7. 안전성 (독성) 스크리닝	34
가. 시험재료 및 동물	
나. 사육환경	
다. 투여약량 및 약제조제	
1) 급성 경구독성	
2) 급성 경피독성	
3) 피부 자극성	
4) 안점막 자극성	

라. 시험물질의 투여	
1) 급성 경구독성	
2) 급성 경피독성	
3) 피부 자극성	
4) 안점막 자극성	
제2절 대사산물을 이용한 연구	39
1. <i>Streptomyces</i> sp. KA79 균주가 생산하는 제초 활성물질의 분획	39
가. 활성물질의 분리 및 정제	
나. 구조결정	
2. <i>Bipolaris</i> spp. 균주가 생산하는 제초 활성물질의 분획	41
가. 활성물질의 분리 및 정제	
나. 구조결정	
제3장 연구결과	43
제1절 생균의 제초활성 연구	45
1. 균주 분리 및 동정	45
2. 제초활성 검정	47
가. <i>in vitro</i> 활성검정	

1) *Chlorella*를 이용한 검정

2) *Lemna*를 이용한 검정

나. *in vivo* 활성검정

1) 식물 유묘 검정법

2) Pot 실험

3) 온실 실험

4) 약제 검용 시험

제2절 제제화 및 안정성 60

1. 제제화 연구 60

2. 안전성 및 보존성 62

3. 균생태·생리..... 62

가. 생물제제의 균사생장에 대한 환경요인의 영향

나. 분생포자 발아에 대한 환경요인의 영향

다. *P. oxalicum* 균주의 포자생성에 대한 환경요인의 영향

라. 탄소원 이용성

제3절 안전성 (독성) 스크리닝 69

1. *P. oxalicum* F40362 제제 69

가. 급성 경구독성

나. 급성 경피독성

다. 피부 자극성

라. 안점막 자극성

마. 독성 시험 (번식독성)

2. *Myrothecium roridium* F000252 74

가. 제초활성

나. 제제화된 제초제의 제초 효과	
다. 배양적 특성	
라. 안전성 (급성독성)	
제4절 대사산물을 이용한 연구	80
1. <i>Streptomyces</i> sp. KA79 균주가 생산하는 제초 활성물질	80
가. 배양적, 균학적 특성	
나. 활성물질의 분리 및 정제	
다. 제초 활성	
라. 구조 결정	
2. <i>Bipolaris</i> spp. 균주가 생산하는 제초 활성물질	91
가. <i>Bipolaris sorokiniana</i> 균주	
1) 활성물질의 분리 및 정제	
2) 화학구조 결정	
나. <i>Bipolaris zeicola</i> 균주	
1) 활성물질의 분리 및 정제	
2) 화학구조 결정	
제4장 종합 결론	103
제5장 참고 문헌	111
본 연구와 관련 발표한 논문 및 특허	117

여 백

제 1 장 서 론

여 백

제 1 장 서 론

제 1 절 연구의 필요성

잡초는 작물의 생장에 필수적인 수분, 영양분, 그리고 태양광선을 작물과 경쟁함으로써 작물의 질과 수량을 저하시키는 중요한 제한 요인이다. 현재 잡초방제를 위하여 여러 종류의 유기합성 제초제가 사용되고 있음에도 불구하고 잡초에 의한 작물의 생산 손실은 여전히 많은데 이는 제초제의 지속적 사용에 따른 잡초군락의 생태학적 변화, 제초제 저항성 유발, 그리고 현재 사용되고 있는 제초제로써는 방제가 어려운 새로운 잡초의 발생 등에 기인하고 있기 때문이다. 오늘날 유기합성 제초제의 다량 사용에 따른 환경오염 및 독성 문제가 매우 심각하여 저독성이고 제 환경에 친화적인 새로운 미생물제초제의 개발이 절실히 요구되어왔다.

미생물제초제는 미생물 포자와 그 대사산물을 이용하는 것으로 구분되며 대략 100여 종 이상이 보고되었으며 주로 선진국에서 실용화가 이루어져왔으나 국내에서는 아직까지 개발 실용화된 예가 거의 없다. 따라서 농업생태계를 고려한 환경친화형 미생물의 전문기능을 이용한 제초성 미생물의 개발 및 실용화가 절실히 요구되고 있다. 잡초를 미생물학적인 방법으로 방제하는 것은 환경적으로 안전하며, 효율성이 높기 때문에 많은 연구가 활발히 진행되고 있으며 세계적으로 수십종의 잡초가 미생물제초제에 의해 방제될 수 있을 것으로 예측되어 왔다. 현재 사용중인 제초제는 제초활성 범위에 있어서 선택성을 가진 것이 대부분이고 광역성을 가진 것이 적기 때문에 광역성의 기능을 보유한 제초제의 개발이 요구되고 있다.

그러나 국내에서 초지와 밭에 자생하는 문제잡초 종에 대한 생물학적 방제에

대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않다. 우수한 미생물제제를 개발하기 위하여는 우선 국내 문제잡초에 대해 강력한 병원성을 가진 미생물 균주를 확보하고 이들의 대량생산 방법을 확립하며, 대량생산된 미생물이 실제 포장에서 안정적이며 지속적으로 제초활성을 나타내게 하는 제제화 기술개발이 요구되어왔다.

제 2 절 본 과제의 연구 목표

1. 연구개발의 최종목표

초지와 밭에서 광역 제초활성을 갖는 친환경형의 새로운 미생물 개발 실용화

2. 연구개발의 목표

본 과제는 오늘날 유기합성 제초제의 다량 사용에 따른 환경오염 및 독성 문제를 극복할 수 있는 저독성이며 환경에 친화적인 새로운 미생물제초제의 개발을 위한 것이다. 이를 위해 1차적으로 선발된 제초활성을 지닌 곰팡이와 방선균류를 중심으로 미생물 자체를 이용하는 잡초방제 연구와 제초활성물질을 분리, 구조를 구명하는 연구분야로 나누어 실시한다. 잡초 및 작물에 대한 제초활성검정을 통해 최종 선발된 균주는 제제화를 위한 균생태·생리적인 기초연구 및 활성물질의 구조구명을 통해 미생물제제 실용화 및 그 기술개발을 목표로 한다.

3. 연구개발 내용 및 범위

- 가. BCA (Biocontrol agent) 제로서 *Penicillium oxalicum* F40362 균주 및 *Myrothecium roridum* F000252 균주의 이용
- 나. 제초활성 미생물 균주의 제초 활성의 안정성, 장기 보존, 포자농도와 제초 활성과의 상관성 등과 관련한 균류의 제제화 연구
- 다. 제초활성 균주의 최적 균사 생장 및 포자생산환경 (수분 및 온도) 연구, 환경 스트레스에 대한 제제의 적응력과 관련한 균류 생태·생리적 특성
- 라. 제제화 조건 검토와 작용 기작 등에 관한 특성
- 마. 잡초종합방제 시스템의 확립을 위한 기존 약제와의 병용 실험
- 바. 방선균 *Streptomyces* sp. KA79가 생산하는 제초활성 대사물질 분리 및 화학구조 구명
- 사. *Bipolaris sorokiniana* 및 *B. zeicola*가 생산하는 제초활성 대사물질 분리 및 화학구조 구명
- 아. 생물농약 등록기준에 근거한 활성균주의 동물에 대한 급성 및 아급성 독성시험

여 백

제 2 장 연구추진방법

여 백

제 2 장 연구추진 방법

제1절 생균의 제조활성 연구

1. 균주 분리

전국 각지로부터 200여 점의 토양 및 이병식물체 시료를 수집하여 균분리원으로 이용하였다. 방선균의 경우 희석평판법 (dilution plating method)으로, 곰팡이의 경우는 희석평판법 및 표준습지법 (standard blotter method)으로 실시하였다. 균분리용 배지는 방선균의 경우 humic acid-vitamin agar 배지 (HA 배지, humic acid 1g, Na_2HPO_4 0.5g, KCl 1.7g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, CaCO_3 0.01g, vitamin B complex 미량, cycloheximide 50mg/l, pH7.2)를 그리고 곰팡이의 경우는 PDA (potato dextrose agar) 및 Littman oxgall 배지를 사용하였다. 한편, 이병식물체로부터의 병원균의 분리는 Plant Pathology (Agrios 저)의 방법에 따라 분리하였다.

2. 균주 동정

방선균 동정의 경우 방선균 동정 실험법 및 International Streptomyces Project (ISP) 방법에 준하여 실시하였으며 곰팡이 동정의 경우 Compendium of Soil Fungi (D. M. Anderson), Soil and Seed Fungi (Watanabe 저), Dematiaceous Hyphomycetes (Ellis 저), Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification (Samson & Pitt 저) 등을 참조하였으며 특히, 분생포자좌 (sporodochia), 분생포자병 (conidiophore), 소병자 (phialide), 소병자포자

(phialoconidia) 및 균사 (mycelia) 등의 형태적 특징을 광학현미경 또는 전자현미경으로 관찰한 후 동정하였다.

3. 제조활성 검정

가. 균주 배양

선발된 균주 배양체의 제조활성의 특성을 조사하기 위하여 두 종류의 방선균 배양용 배지를 사용하였는데 즉, glucose-soybean meal-soluble starch (GSS 배지, soluble starch 10g, glucose 20g, soybean meal 25g, beef extract 1g, yeast extract 4g, NaCl 2g, K₂HPO₄ 0.5g/L, pH 7.3)배지와 glucose-soluble starch-molasses (GSM 배지, soluble starch 10g, glucose 20g, molasses 5ml, yeast extract 5g, peptone 5g, CaCO₃ 2g/L, pH 7.2)배지에 5일간 배양된 균배양액 및 이들의 추출물을 이용하였다.

한편 곰팡이 균주의 경우 *in vitro* 및 *in vivo* 제조활성 검정에 사용할 액체 배양은 감자-덱스트로스즙액 (potato dextrose broth) 및 이스트-펩톤-설탕용액 [yeast-peptone-sucrose solution (YpSs)] 배지를 사용하여 25℃에서 7일간 배양한 것을 사용하였다. 첫째, 액체 배양체는 감자 20%, 가용성 녹말 10%를 함유한 감자즙액 (potato dextrose broth) 배지 (pH 7.2)와 거친 콩가루 25%, 육즙 1%, 효모추출액 4%, NaCl 2%, K₂HPO₄ 0.25%, CaCO₃ 2%를 함유한 YpSs 배지 (pH 7.2)를 사용하였다. 배양체의 준비는 500ml의 삼각플라스크 (baffled flask) 2개에 각각 50ml씩 분주한 액체배지를 121℃에서 20분간 살균하고, 이것에 균주의 환천 조각 (agar plug)을 접종하고 28℃, 150rpm에서 2일간 진탕 배양하여 사용하였다. 둘째, 고체 배양체는 밀기울 (rice bran) 200g에 멸균수 120-200ml을 부어 밀기울에 수분이 완전히 스며들도록 한 다음 삼각플라스크 (1 l)에 넣어 121℃에서 30분간 멸균하고, 충분히 식힌 다음 균을 접종하였다. 그 후 25℃에서 10-14일간 배양하여 포자가 충분히 형성되도록 하였다. 밀기울 배지에 첨가할

젤라틴체는 500ml의 멸균수에 옥수수전분 (corn starch) 20g, 한천 (agar) 7g을 넣고, 121℃에서 30분간 멸균하여 젤라틴화 시킨 다음 약 40℃로 식혀 얻었다. 이를 포자가 충분히 형성된 밀기울 배지에 부어서 섞은 후 이 혼합액을 굳혔다. 완전히 굳으면 작은 조각으로 분쇄하고, 배기소 (fume hood)에서 12시간 이상 건조 제제화 하여 본 실험에 사용하였다.

나. *In vitro* 활성 검정

1) *Chlorella*를 이용한 검정

단세포의 녹조류로서 엽록체를 갖고 광합성을 하는 *Chlorella regularis*에 대한 활성을 통해 광합성 저해를 검정하는 방법으로서, 균체, 균배양액 및 추출물을 위와 동일한 방법으로 준비하여 미리 *Chlorella* 균주를 Arnon's A5 배지 (Arnon's 용액 1ml, KH_2PO_4 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005g, Yeast extract 20g, agar 12g/L, pH 6.5)에 배양한 후 paper disc법으로 시료에 대한 저해 정도를 조사하였다.

2) *Lemna*를 이용한 검정

렘나검정법은 좁개구리밥의 일종이며 미니플랜트인 렘나 파우시코스스타타 (*Lemna paucicostata*)를 이용한 검정 방법으로 균주 배양액 또는 추출액을 농도 별로 희석하여 렘나가 자라는 24웰의 플레이트에 치상한 후 렘나의 생육저해 여부를 조사하는 방법이다. 제조활성 조사는 무균의 허트너 영양배지 (Hutner's nutrient medium)에서 검정한다. 배양되는 좁개구리밥의 일종인 렘나를 일정한 농도로 배양하여 검정 화합물의 농도를 달리하여 영양용액에 첨가한 후 일정한 밀도로 치상한 후 성장조절실에서 배양하여 배양 15-20일 제 성장량 및 엽록소 함량을 측정하고 무처리군과 비교하였다. 제조활성 지수는 *Lemna*의 생육 저해율에 따라 0-5의 수리점수를 두었다. 즉 활성지수는 생육 저해율이 <10 (%) 0, 11-30 (%) 1, 31-50 (%) 2, 51-70 (%) 3, 71-90 (%) 4, 91-100 (%) 5로 하였다.

3) 오이 자엽 (greening plant)을 이용한 검정

오이 자엽을 이용한 제초활성 검정법은 다음과 같다. 시료를 0.1ml DMSO에 녹이고 여기에 0.3ml acetone을 추가한다. 이후 9.6ml (0.01% Tween 20 함유)의 증류수로 희석하였다 (DMSO의 최종농도는 1%, acetone은 3%임). 이를 초기농도로 하여 4배씩 희석하여 시험용액을 조제하였다. 치상 및 배양은 24 well plate에 0.2ml의 시험용액을 분주한 후, 25°C 암조건에 6일간 키운 오이 자엽 1쌍씩을 치상하고 이를 25°C 암조건에 overnight 시킨 후 연속 명조건에 2일간 배양하였다. 활성조사는 녹화정도를 0-5 grade system에 준하여 달관 평가하였다.

다. *In vivo* 활성 검정

1) Pot 시험

잡초에 병원성 및 제초 활성이 있는 균주를 선별하기 위하여 1차 스크리닝은 발아 전 (pre-emergence) 및 발아 후 (post-emergence) 시험으로 나누어 14종의 대상잡초 (수수, 돌피, 개밀, 바랭이, 미국개기장, 까마중, 자귀풀, 어저귀, 도꼬마리, 메꽃, 바랭이, 돌피, 명아주, 토끼풀 등)의 잎에 균배양액 및 포자 현탁액을 직접 pot에 처리하여 검정하였다. 즉, 균 배양액을 균질기 (homogenizer)를 이용하여 분무기를 통과할 정도로 미세하게 갈아서 사용하며 약제 처리 전까지 냉장고에 보관하면서 스크리닝에 이용하였다. *In vivo* 제초활성 검정을 위한 식물체는 멸균되지 않은 사질토양에 적당량의 비료를 혼합시킨 다음, 시험용 포트 (350cm²)에 담고 파종구를 만들어 잡초 또는 작물종자를 파종한 후 곱게 친 흙으로 복토한 후 온실에서 자란 것을 공시하였다. 처리할 배양액 (0.1%의 Tween 20 용액) 14ml을 손분무기 (hand sprayer)로 처리하며 경엽 처리하였다. 배양액을 처리한 후 온실에서 2주일간 생육시키면서 처리 4일 및 14일 후에 나타나는 제초활성 효능을 형태학적, 생리학적 관찰근거에 의해 달관 조사하였다. 즉, 무

방제의 경우를 0, 완전방제의 경우를 100%으로 하여 각각의 제초활성 정도를 평가하는데 70% 이상의 등급을 가지면 실제적으로 그 식물에 대하여 제초효과가 있는 것으로 간주하며 80% 이상의 제초효과를 보인 초종을 방제가능 초종으로 간주하였다. 1차 스크리닝은 이러한 탐색 방법 이외에도 수수, 무, 바랭이, 피 종자를 이용한 종자발아 저해 활성 및 공시 작물로서 수수, 옥수수, 콩, 밀, 벼에 대한 약해 및 안전성 검정을 동시에 실시하였다.

2) 온실 시험

미생물제초제의 제초활성 및 약효를 조사하기 위하여 온실조건 하에서 실시하였다. 시험방법은 온실조건 (300cm³)하 완전임의배치로 3반복 실시하였다. 처리약량은 추천량 (5.3g/300cm²)과 추천량의 1/10량 (0.53g/300cm²) 이었으며 처리방법은 각각 토양처리 및 경엽 처리하였다. 즉, pot당 약량을 물 100ml에 희석하거나, 또한 토양처리는 약제처리 전 pot당 물을 200ml 씩 관주한 후 약제를 pot내 토양에 직접 살포하는 방법을 취하였다.

라. 기타 검정법

1) 라디노클로버 유묘검정법

라디노클로버 (ladino clover) 종자를 여과지를 이용하여 습실 처리된 플레이트 상에 깔고 그 위에 균을 접종 처리한 후 종자발아 및 유묘 신장 정도를 조사하는 방법과, 3-4일간 미리 종자발아를 유도시킨 후 어린 유묘체 상에 직접 균 또는 배양액을 접종 처리하는 방법이다. 균을 접종하는 경우 여과지 3장을 멸균수에 분쇄 플레이트에 깔 후 이 위에 병원균 포자 (포자현탁액은 0.1% Tween 20이 포함된 살균수 용액에서 희석됨)를 ml당 10⁵-10⁸ 농도로 균포자를 일정농도로 처리하고 광이 쪼이는 습실 배양기에서 치상하는 방법이다.

2) 바랭이, 매듭풀, 닭의장풀 및 토끼풀 잎 검정법

In vitro 및 *in vivo* pot상에서의 제초활성의 조사는 물론 본 연구실에서 확립한 바랭이 등의 식물체 잎을 이용하는 leaf bioassay법을 사용하여 제초활성을 검정하였다. 국내 주요 밭잡초인 바랭이 (*Digitaria sanguinalis*), 매듭풀 (*Kummerowia striata*), 닭의장풀 (*Commelinia communis*), 토끼풀 (*Trifolium repens*) 잎에 대한 제초활성을 조사하였다. 조사방법은 국내 밭이나 들에서 자라는 바랭이 등의 잎을 취해 1% NaOCl로 표면소독한 후 상처 (또는 무상처)를 내고 잎 뒷면 (또는 앞면)에 균배양액이나, 균 plate로부터 포자 또는 agar plug를 취하여 올려놓은 후 처리시간별로 제초활성을 조사하는 것으로 포화습도가 유지되는 조건 하에 두고 1주일 이상 증상을 달관 조사하였다.

4. 활성균주의 제제화

가. 제제화

본 연구에서는 미생물제초제로서 개발하고자 많은 잡초 병반으로부터 분리한 식물병원균을 대상으로 제초활성을 스크리닝하였으며 그 결과 기 선발된 우수 균주인 *Penicillium oxalicum* F40362 (국내특허번호 제 16630)를 제제화 하기 위한 최적 조건을 검토하였다.

기 선발된 *P. oxalicum* 균주는 pot 실험을 통하여 방제 대상 잡초인 토끼풀, 바랭이, 까마중, 자귀풀 및 대조식물인 한국형 들잔디와 한지형 잔디에 대한 제초활성을 조사한바 토끼풀에 대해 강한 선택적 활성을 보인 바 있다. 본 연구에서는 이 균주를 이용하여 미생물제초제로서 활성의 안정성을 유지, 산업적으로 제제화 개발할 수 있는지 검토하고자 하였다. 즉, wheat bran-corn starch를 이용하여 제제화 시에 균 처리 농도에 따른 제초활성과 저장기간에 따른 생균수를 측정하고 제제 농도에 따른 제초활성도 조사하였다. 한편, wheat bran-corn starch 제제 방법은 우선 wheat bran 200g에 물 300ml이 스며들도록 하여 121℃

에서 살균한다. 다음으로 배지에 25℃에서 10일 이상 배양하여 포자가 충분히 형성 되도록 하였다. 포자가 충분히 형성된 배지와 500ml 멸균수에 corn starch 20g, agar 7g을 120℃에서 30분간 멸균하여 젤라틴화 시킨 후 약 40℃로 식힌다. 이것을 bran배지에서 잘 자란 병원균의 다량의 포자가 형성되어 있는 flask에 부어 혼합하였다. 이 혼합액을 완전 건조하고 homogenizer로 균질화 하여 사용하였다. Agar가 굳기 전에 1ml을 취해 희석하여 cell 수를 확인하고 건조시킨다. 완전히 굳으면 작은 조각으로 부수어 blender로 갈아 분말로 만든다. 분말 1그램 씩을 취해 희석하여 cell 수를 확인하고 sampling용 비닐봉투에 담아 4℃ 및 상온에서 각각 보관하며 본 실험을 실시하였다. 저장방법은 다음 8 종류의 처리구로 나누어 실시하였다.

A: 균주+옥수수전분->freeze dry, B: 균주+옥수수전분->1% glycerol->풍건, C: 균주+옥수수전분 + 2% glycerol->풍건, D: 균주+옥수수전분+풍건+perlite (1:1, w/w), E: 균주+옥수수전분+풍건+vermiculite (1:1,v/v), F1: 균주+옥수수전분+풍건+chitosan (1:1, v/v), F: 균주+옥수수전분+풍건+chitin (1:1, v/v), F3: 균주+옥수수전분+풍건+pectin (1:1, v/v).

나. 안정성 및 보존성

미생물제조제로서 잠재성 및 실용화 가능성을 미리 검토하기 위하여 저장기간에 따른 제제 중의 활성 균주 수를 조사하였다. 저장기간에 따른 제제 중의 활성균주 수를 조사하기 위하여 wheat bran-corn starch와 이 제제에 1% glycerol 및 2% glycerol, perlite, vermiculite, chitosan, chitin, pectin을 각각 같은 부피로 섞은 후 4℃ 및 상온에 8개월 간 보관하면서 경시적으로 생균수와 제조활성을 조사하였다. 본 연구에서는 선발된 균주중 한 *P. oxalicum* 균주를 이용하여 pot 실험 및 제제화의 최적화를 위한 기초실험을 실시하고 있다. 특히 잔디밭에 문제가 되고 있는 토끼풀에만 선택적인 제조활성을 보인 *P. oxalicum* 균주를 이용하여 처리 농도에 따른 제조활성 및 제제의 장기보관시의 안정성에 관한 기초실험을 실시하였다.

5. 약제 혼용 실험

P. oxalicum F40362 균주의 기존 약제와의 혼용가능성을 알아보기 위하여 본 실험을 실시하였다. 대상잡초는 클로버를 선정하였으며 대상약제로는 클로버 등의 제초제로 사용중인 파란들 (FLAZASULFURON) 수화제를 공시약제로 선정하였다. 처리방법은 *P. oxalicum* F40362 (0.1g/10ml)+파란들 기준량 (7.5g/20L) 및 배양 (15g/20L) 및 대조구 (무처리)로 나누어 실시하였다. 생물 제제와 약제를 1시간 동안 진탕 배양한 후 일정량을 PDA 배지에 도말한 후 플레이트에 형성된 콜로니 수를 세어 균생존율 및 균주 활성 수준을 조사하였다.

6. 균생태·생리

가. 생물 제제의 균사생장에 대한 환경요인의 영향

균배양을 위한 기본배지는 2% MEA (malt extract agar, pH 5.5)를 사용하였다. 기본배지의 수분활성도 (water activity, a_w)는 0.995였으며 여기에 용질인 glycerol을 첨가하여 0.94, 0.97 a_w 배지를 조제하였다. 조제된 배지의 수분활성도는 Novasina IC II (Novasina AG, Zurich, Switzerland)로 측정하여 확인하였다.

균사생장에 미치는 환경요인에 대한 영향을 알아보기 위하여 *Myrothecium roridum* 및 *P. oxalicum* 균주를 미리 PDA배지에서 배양한 후 분생포자를 모아 각 a_w 로 조절된 살균된 용액에 현탁시켜 분생포자 현탁액 (1×10^7 ml⁻¹)을 만들어 이를 접종원으로 사용하였다. 균생장을 조사하기 위하여 공시 균주의 포자현탁액을 a_w 가 0.94, 0.97, 0.995로 조정된 MEA배지의 중앙에 후크를 이용하여 한 방울씩 접종하였다. 접종 후에는 동일한 a_w 의 처리구별로 polyethylene bag으로 밀봉하여 18, 20, 25, 30℃에서 배양하면서 2일 간격으로 균사의 성장직경을 조사하였다. 균사의 성장 직경은 균총의 반경을 4 방향에서 측정하여 평균값으로 하였으며 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

나. 분생포자 발아 및 포자생성에 대한 환경요인의 영향

포자발아율 및 발아관 신장조사는 *P. oxalicum* 균주에 대하여 PDA배지에서 배양한 후 얻은 포자를 각 0.94, 0.97, 0.995 a_w 로 조정된 용액에 균포자를 현탁시켜 분생포자 현탁액 ($1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$)을 만들어 동일 a_w 로 조정된 MEA배지에 도말하여 온도별로 배양한 후 배양 시간대별로 배양기에서 꺼내어 광학현미경하에서 측정하였다. 한편, 여러 수분활성 및 온도조건 하에서의 포자 생성능을 조사하기 위해서는 상기 방법과 동일하게 처리하였으며 MEA배지에 2-8 주까지 배양한 후 각 plate에 살균수 (0.1% Tween)를 첨가하여 포자 현탁액을 만들어 haemocytometer를 사용하여 포자 수를 측정하였다.

다. 탄소원 이용성

본 실험은 BIOLOG plates (GN MicroPlates, BIOLOG, Inc. CA)를 이용하여 Lee 등 (1999)의 방법에 따라 다양한 수분활성 및 온도 조건 하에서 *P. oxalicum* 균주가 이용할 수 있는 탄소원 (기질) 이용성 (여기서는 생태적 niche 값으로 정의)을 구하였다. 각 BIOLOG plate에는 carbohydrates, carboxylic acid, aminoacid, amines, amide, 기타 탄소화합물을 비롯한 95개의 탄소원 (기질)이 함유되어있다. PDA배지에서 배양하여 얻은 균주의 분생포자를 살균수에 현탁하여 원심분리하는 과정을 3번 반복한 후 MES 완충액 (Sigma Chemical Co.)으로 씻고 다시 원심분리하였다. MES용액에 NaCl의 양을 달리하여 0.90, 0.955 및 0.995 a_w 용액을 만든 후 이 용액으로 포자현탁액 (포자농도 $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$)을 만들어 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 떨어뜨렸다. 처리된 Biolog Plate는 18, 25, 30°C에서 15일 이상 배양한 후 탄소원의 이용유무를 육안 및 광학 입체현미경 하에서 조사하였다.

7. 안전성 (독성) 스크리닝 (위탁시험기관: 충남대학교 수의과대학)

미생물 제초제가 개발되어 실용화되기 위해서는 인축 및 농업환경에 대한 안전성이 요구되고 있으므로 제제 개발 전에 이러한 연구가 선행되어야 함으로 1차년도에는 급성독성시험을, 2차 년도에는 아급성 독성을 실시하여 인축 및 환경에 미칠 수 있는 영향을 조사하였다. 또한 선발된 나머지 균주들에 대하여도 우선 경구 독성시험을 실시 중에 있다. 특히, 제제화 균주로 선발된바 있는 *P. oxalicum* F40362 균주에 한하여 우선 ICR 마우스를 이용하며 미생물제제의 급성 경피독성 (랫트), 피부자극 (토끼), 안자극 (토끼)시험을 실시하였다.

가. 급성 경구독성 (위탁연구)

1) 동물 및 주령

시험계는 농촌진흥청 고시 농약의 독성시험기준과 방법에 따라 급성경구독성에는 마우스를 사용하였다. 본 ICR계 마우스는 농약 독성시험에 널리 사용되고 있으며 본 실험에서도 이를 사용하였다. 주령 및 체중 범위는 다음 표1에서 보는 바와 같다.

표 1. 주령 및 체중 범위

구분	마우스	
	♂	♀
구입시 주령	4주령	4주령
구입시 체중	21.3±1.3	20.5±0.7
투여시 주령	6주령	6주령
투여시 체중	27.1±1.7	23.3±1.0

본 실험에 사용한 동물은 순화를 위하여 동물을 구입한 후 14일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후 건강한 개체를 무작위로 선별하여 시험에 공시하였다.

2) 사육환경

본 독성실험은 항온 ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), 항습 (상대습도 $55\pm 3\%$)이 유지되며, 무진, 무균의 청정공기가 공급되는 동물환경제어사육장치 (GOG Environmental Control Unit, 명진기계상사, 서울)에서 시험군에 따라 마우스는 암수 각각 5마리씩 배치된 카보네이트 사육상자 (420x260x190mm)에서 이루어졌으며 2주간의 순화기간을 거친 후 건강하고 피모 상태가 양호한 동물을 선별하여 시험에 사용하였다. 깔짚은 버드나무 다공질 깔짚 (삼육 실험동물연구소, 오산)을 사용하였으며, 주 2회씩 교환하였다. 마우스 사료는 마우스용 실험동물 고형사료 (삼양 유지사료, 원주)를 이용하였으며, 음수는 상수도를 이용하였다.

3) 투여 약량 수준 설정 및 약제 조제

기초시험 투여시 약량 ($2,500\text{mg/kg}$)을 암수 각각 5마리씩 10마리를 공시하였으며, 개체별 식별은 피모에 색소로 일련번호를 표시하였다. 대조군은 공시 시험물질이 고상으로 투여 약제 조제시 콘오일을 사용하여 용매 대조군으로 설정하였다. 공시약제 조제시 용매의 선택은 공시 시험물질이 증류수에 용해되지 않으므로, 콘오일을 용매로 선정하여 현탁액 상태로 공시하였다. 투여 액량은 10ml/kg (체중)에 해당되도록 하였다.

4) 시험 물질의 투여

투여 개시 3-4시간 전부터 시험물질 투여 후 3-4시간 동안은 사료를 급여하지 않았다. 투여는 마우스용 경구투여 주사침을 이용하여 체중 측정치를 기준으로 시험물질 조제 액량 및 용매를 산출 경구투여 경로를 이용하여 위 내에 1회 강제 투여하였다.

5) 관찰 및 검사항목

투여 당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간 익일부터는 매일 1회씩 일반중독증상 및 치사된 동물 수를 14일간 관찰 조사하였다. 부검은 관찰기간 종료 후 에테르 마취시켜 실시하였으며 내부장기의 육안적 이상유무를 관찰하였다. 투여당일은 투여후 1시간에서 4시간까지 매시간 익일부터는 매일 1회씩 일반중독증상 및 치사된 동물 수를 14일간 관찰 조사하였다. 공시된 모든 마우스에 대하여 투여 당일 및 7일, 14일째 개체별 체중을 측정하였다.

나. 급성 경피독성

투여 약량 (2,000mg/kg)을 암수 각각 5마리씩 10마리를 공시하였으며, 개체별 식별은 피모에 색소로 일련번호를 표시하였다. 대조구 및 공시약제 조제시 용매의 선택은 앞의 방법과 동일하게 실시하였다. 시험개시 전에 약제처리를 위해서 랫트 등 부위의 체모를 clipper를 이용하여 체표면적의 10% 정도 (4x5cm)를 삭발하였다. 투여는 현탁액 상태로 조제한 약제 또는 용매 (콘오일)를 균일하게 도포한 다음 공시약물의 유실을 방지하기 위하여 비자극성 테이프로 24시간 동안 고정시켰다. 약제 처리 24시간 후 테이프를 제거하고 피부에 남아있는 약제를 제거하였다. 일반중독증상 및 치사된 동물수의 관찰은 앞의 방법과 동일하게 실시하였다.

다. 피부 자극성

투여 약량 및 실험동물 수는 농약의 시험 기준과 방법에 규정된 약량인 0.5g을 찰과 및 비찰과 부위에 각각 적용하였으며, 사용 실험동물 수는 암수 각각 3마리씩 6마리를 공시하였고 개체별 식별은 피모에 색소로 일련번호를 표시하였다. 대조구의 준비, 용매의 선택과 시험물질 조제는 앞의 방법과 동일하게 실시하였다.

체모의 제거 : 시험개시 전에 약제처리를 위해서 토끼 등부위의 체모를 동물용 전기 clipper를 이용하여 12x12cm 넓이로 체모 시켰다. 체모 시킨 토끼의 등부위를 처치부와 대조부로 나누고, 여기에 각각 비찰과 부위와 찰과 부위를 두어 모두 4 구획을 설정하여 시험을 실시하였다. 찰과 부위는 주사기 바늘 끝을 이용하여 井자 모양으로 표피에 출혈을 일으키지 않을 정도로 손상을 주어 찰과 상태로 만들었다. 시험물질을 처치하기 위해 외과용 테이프로 사용되는 microfoam (3M, U.S.A.)을 5x5cm로 만든 후 여기에 2.5x2.5cm 크기의 사각형을 잘라내어 만들어진 창틀모양을 피부에 접촉시키고, 중앙 부위에 형성된 창틀모양에 거어즈 3점을 고정시켰다. 시험물질 0.5g이 포함된 현탁액 그리고 대조용매 (콘오일) 0.5ml을 상기 4구획 중 지정된 곳의 거어즈에 적하한 다음 비자극성 테이프로 4시간 동안 고정시켰다. 약제 처리 4시간 후 테이프를 제거하고 피부에 남아있는 약제를 제거하였다.

순화기간, 시험물질 투여 후 피검 피부가 정상으로 회복될 때까지의 외관 및 일반증상에 대하여 관찰하고, 사망여부를 확인하였다. 시험에 사용된 모든 토끼에 대하여 시험물질 적용 전, 24, 48, 72시간에 체중을 측정하였다. 시험물질을 투여하고 난 뒤 4시간째에 미온수로 시험물질을 잘 제거한 후 투여부위에 대해 홍반과 가피 형성, 부종형성 등의 피부자극반응을 관찰하였다. 노출 종료 후 24시간, 48시간, 72시간째에 투여부위에 대해 같은 요령으로 피부자극반응을 관찰하였다. 자극성의 평가는 Draize의 제안에 따라 24시간 및 72시간만의 성적을 이용하여 1차 자극지수 (P.I.I.)를 구하였다. 물질의 자극도의 구분은 다음 표 2에 표시한 기준에 따라 평가하였다.

표 2. Irritation rating for primary dermal reaction

Rating	Range of primary irritation index
Mild irritant	< 2
Moderate irritant	2 - 5
Severe irritant	>5

라. 안점막 자극성

농약의 시험 기준과 방법에 규정된 약량인 0.1g을 한쪽 눈에 적용하였으며, 총 사용동물 수는 암수 각각 3마리씩 6마리이었으며 개체별 식별은 피모에 색소로 일련번호를 표시하였다. 대조구의 준비, 용매의 선택과 시험물질 조제는 앞의 방법과 동일하게 실시하였다. 시험개시 24시간 전 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 토끼를 사용하였다. 한쪽 눈의 결막낭 내에 시험물질 0.1g이 포함되어 있는 현탁액을 적용시켰다. 다른 한쪽 눈은 대조군으로서 콘오일 0.1ml을 결막낭 내에 주입하였다. 순화기간, 시험물질 투여후 1, 24, 48, 72시간 후에 일반증상에 대하여 관찰하고, 사망여부를 확인하였다. 시험에 사용된 모든 토끼에 대하여 시험물질 적용 전, 적용 후 24시간, 48시간, 72시간에 체중을 측정하였다. 시험물질을 투여하고, 1시간 후 각막의 혼탁, 홍채 이상, 결막 발적, 결막부종, 배출물정도 등의 안반응을 관찰하였다. 투여 후 24시간, 48시간, 72시간에도 같은 방법으로 안반응을 관찰하였다.

제2절 대사산물을 이용한 연구

균배양액에 존재하는 제초활성 물질의 확인을 위해 방선균 *Streptomyces* sp. KA79의 경우 GSS 배지에서 5일간 28°C에서, 곰팡이 *B. sorokiniana* 균주의 경우 PDA 고체배지에 접종하여 30°C에서 2주일간 암 배양하였다. 방선균 배양체의 경우 배양액을 원심 분리한 후 70% acetone 및 ethylacetate 등으로 추출하였으며 이를 *Lemna* 등에 대한 일차 제초활성검정에 이용하였다. 곰팡이 배양체의 경우 acetone에 96시간씩 2회 침지한 후 감압 여과하고 이를 진공농축 하였다. 농축된 추출물을 극성에 따라 용매 분획하고 피와 버의 유근(幼根) 신장 저해활성검정을 통하여 활성층을 선별하였다. 즉, *Bipolaris* spp. 균주를 PDA 고체배지 (petri plate 540매)에 접종하여 배양하고 배양체를 용매로 추출하여 여과된 침지액을 진공 농축하여 acetone을 증발시킨 후 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol로 분획하였다. 피와 버의 유근(幼根)신장 저해활성검정을 통하여 활성 분획을 선별하고 TLC, open column (silica gel, ODS) 및 HPLC를 이용하여 5종의 활성 물질을 정제 분리하였다. 이들의 화학구조는 MS, IR, UV, NMR (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C COSY 및 HIMBC 등) 등의 기기분석을 통하여 화학구조를 결정하였다. 또한 활성균의 배양액 및 추출물을 직접 잡초에 농도별로 처리하여 광역잡초 및 단일 잡초에 대한 선택성, 활성범위 및 제초활성 수준을 조사하였다.

1. *Streptomyces* sp. KA79 균주가 생산하는 제초활성 물질의 분획

가. 활성물질의 분리 및 정제

제초활성이 확인된 *Streptomyces* sp. KA79 배양체에 존재하는 제초활성 물질을 분리하고자 하였다. 활성물질의 확인을 위해 방선균의 경우 GSS 배지에 5일간 그리고 곰팡이의 경우 PD broth에 1주일 이상 배양한 후 배양된 균 배양액을 원심분리한 후 70% acetone으로 용매 추출하였으며 제초활성물질을 확인하

기 위하여 각종 column chromatography, TLC 및 HPLC를 실시하였다. TLC는 silica gel plate (Merk F254)를 이용하여 CHCl₃-MeOH (4:1, v/v)을 용매조건으로 하여 조사하였다. 강한 제조활성을 보인 균주에 대해서는 활성이 균주 때문인지, 균주가 생산하는 제조활성물질에서 연유한 것인지를 확인하는 과정을 거친 후 활성물질의 존재가 확인되면 활성물질의 본체를 규명하기 위하여 활성물질을 분리·정제하였다.

제조활성 검정결과 백화현상을 보인바 있는 *Streptomyces* sp. KA79 균주가 생산하는 제조활성물질의 분리정제 과정을 구체적으로 보면 배양 상등액을 활성탄 column (2.5L)에 통과시켜 흡착시키고 30% acetone으로 씻어내고 80% acetone으로 활성 분획을 용출시켜 감압 농축하였다. 감압 농축액을 butanol로 3회 추출하였으며 활성 분획인 BuOH층을 감압 농축하여 CHCl₃-MeOH (4:1, v/v)을 용매로하는 silica gel column (300cc)상에서 전개시켜 활성 분획을 얻고 다시 감압 농축한 후 MeOH을 용매로하는 sephadex LH-20 column (700cc)상에서 전개시켜 활성 분획을 얻고 최종적으로 sephadex G-10 column (700cc)상에서 분리하여 HPLC상에서 분석하여 순수한 제조활성물질을 얻었다. 이때 HPLC 분석조건으로는 reverse phase인 ODS column과 normal phase인 aquasil column을 사용하여 20% MeOH (citrate buffer, pH 3)과 CHCl₃-MeOH-H₂O (81:17:8, v/v/v)의 용매조건 및 UV₂₅₄에서 측정하였다.

나. 화학구조 결정

Streptomyces sp. KA79가 생산하는 활성물질의 물리화화적인 특성을 구명하기 위해 methanol을 용매로 UV 흡수스펙트럼을 조사하였고, 활성물질 구명을 위해 Mass, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 스펙트럼을 실시하였으며 추출 정제된 물질에 대한 물리화학적 특성을 조사하여 화학구조를 결정하였다.

2. *Bipolaris* spp. 균주가 생산하는 제초활성 물질의 분획

가. 활성물질의 분리 및 정제

제초활성검정결과 제초활성을 보인 *Bipolaris sorokiniana* 및 *B. zeicola* 배양체의 EtOAc 추출액 및 강한 제초활성을 나타낸 기타 분획을 취하였다. 이 중에서 피 뿌리생육에 대한 저해활성이 높게 나타낸 EtOAc층 (3.125g)을 silica gel (150g) column (4 i.d.×45cm)에 packing하였다. 그리고 silica gel column chromatography (chloroform, chloroform:MeOH=9:1-1:1, MeOH, v/v)를 실시하여 13개의 조분획 층 (F-F13)을 얻었다. 이들 중에서 활성이 높은 F-2 (0.355g)층과 F-3 (0.375)을 Sep-pak C18 (MeOH, CHCl₃)로 분리하였다. 활성물질을 분리하기 위해 사용한 감압 농축기는 EYELA A-3s (EYELA Tokyo Rikaikai Co. Ltd., 일본)이었으며, HPLC는 JASCO 모델 (일본)의 LC900 시리즈를 사용하였다. 이 F-2, F-3의 MeOH층을 HPLC로 분리하여 compound 1 (1.1mg)과 compound 2 (13mg)를 얻었다.

나. 화학구조 결정

활성물질의 화학구조 분석을 위해 사용한 NMR spectrometer는 Bruker DMX 600 (600MHz)을 사용하였고, 이때, 내부표준물질은 TMS를 사용하였으며, chemical shift는 ppm (δ)으로 나타내었다. EI-MS spectrometer는 Micro mass autospec spectrometer를 사용하여 70eV에서 측정하였다.

여 백

제 3 장 연구 결과

여 백

제 3 장 연구 결과

제1절 생균의 제조활성

1. 균주 분리 및 동정

수집된 200여 점의 토양시료로부터 약 2,000여 균주 (방선균 1,400주, 곰팡이 600주)를 분리, 확보하였다. 분리된 균주는 적절히 배양한 후에 그 배양액을 대상으로 *in vitro* 또는 *in vivo* 활성 검정을 실시하였다. 제조활성은 *Chlorella*에 대한 여지법, *Lemna* assay 및 토마토 잎에 대한 bioassay법 등 여러 가지 방법으로 검정하였다. 한편, 토마토 잎 bioassay법에 의한 식물독성 (phytotoxicity)이 강하게 나타날 경우 이에 대한 해석은 제조활성 여부는 물론 간접적으로 토마토 작물에 약해 가능성도 있는 것으로 간주하였다.

제조활성을 나타낸 균주 중 방선균의 경우 일부 희소방선균에 속하는 균주도 있었으나 대부분이 *Streptomyces*속에 속하는 균주이었으며, 곰팡이의 경우에는 *Aspergillus*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Trichoderma* 속에 속하는 균주가 많았으며 이는 대체로 분리빈도와 상관이 있는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 이중에서 광역 제조활성을 보이는 *Penicillium*, *Myrothecium*속 균주등이 선발되었다(그림 1). 활성 균주의 균동정을 위하여 균의 분생포자병 (conidiophore), 분생포자좌 (sporodochia), 소병자 (phialide) 및 소병자포자 (phialoconidia) 등의 형태적 특징을 광학현미경 (50-400배율) 및 전자현미경 (SEM)으로 조사하였다.

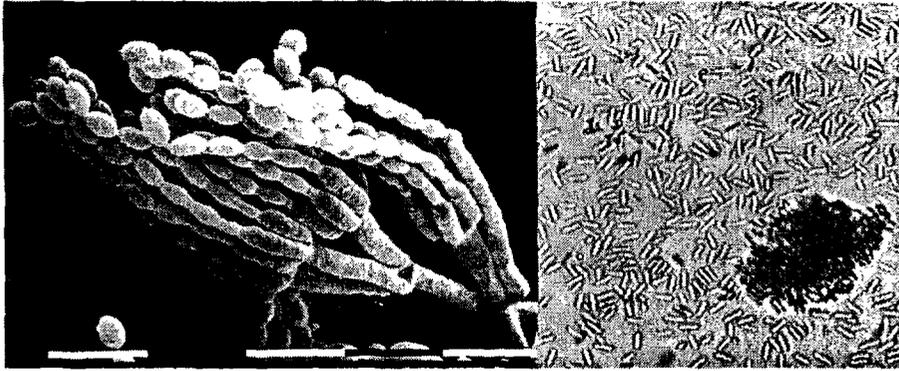


그림 1. *Penicillium oxalicum* F40362의 분생포자 및 분생자병 (x2,000) (왼쪽) 및 *Myrothecium roridum* F000252의 분생포자 (x400) (오른쪽).

*Penicillium*속 균은 무성적으로 포자를 생성하는 불완전 세대의 명칭으로 완전세대는 *Talaromyces*로 자낭각을 형성하는 균이다. 본 균은 Czapak, MEA배지 상에서 앞면은 암녹색을, 배면은 황녹색을 띠었다. 분생자병의 형태는 one stage 분지를 하고 있으며 fasciculate 형이었으며 분생포자는 columnar형태의 conidial head상을 이루었으며 소병자 위에 연쇄상으로 착생하였으며 크기는 직경 2-2.7 μm 를 나타냈으며 ellipsoidal형이었으며 소병자의 형태는 flask형이었다. 본 균주는 한국생명공학연구원 유전자은행에 이미 오래 전에 기탁하여 수탁번호 KCTC 0263BP를 부여받았다.

한편, *Myrothecium*속 균은 격막이 있는 균사가 잘 발달하여 하이포마이세테강에 속하는 불완전균류인 미로세스시움 로리둠이었다. 본 발명에 따른 균주는 배양기간이 지나면서 배지가 함유된 plate 상에 최고 1.5mm 이상의 분생포자좌 (sporodochia)를 형성하는 특징을 나타냈다. 분생포자좌는 쿠션모양이었으며 균사상에서 처음에 진한 녹색을 띠다가 차차 검은색을 띠었으며 종종 분생포자좌끼리 합쳐지기도 하였다. 특히, 건조한 상태에서 딱딱하고 검은 분생포자좌를 잘 형성하였다. 분생포자병은 반투명내지 유색이며 조밀한 분지와 빗자루모양의 분생포자병을 형성하였다. 포자덩어리는 점성을 띠었으며 처음에 녹색을 띠다가

차차 견고해지면서 검은색을 띠었다. 분생포자는 분생포자병위에 위치한 소병자 끝에 착생하였으며 소병자의 크기는 8.5-15.3x1-2 μ m이었으며 소병자포자의 크기는 6-8x1.5-2.5 μ m 이었다. 소병자포자의 색깔은 반투명 내지 검은색을 띠며 단일 세포이고 난형 (ovoid)내지 간형 (elongate)이었다. 본 발명에 따른 신균주 미로세스시움 로리둠 F000252는 한국생명공학연구원 유전자은행에 2001년 3월 3일자로 기탁하여 수탁번호 KCTC 0980BP를 부여받았다.

2. 제조활성 검정

가. *In vitro* 제조활성 검정

1) *Chlorella*를 이용한 검정

분리된 방선균 중 400주에 대해서는 소형 pot를 사용하여 공시 10종의 잡초종에 대한 *in vivo* 활성검정을 실시하였고, 방선균 479주와 곰팡이 99주에 대해서는 *in vitro* 활성 검정을 실시하였다 (그림 1).

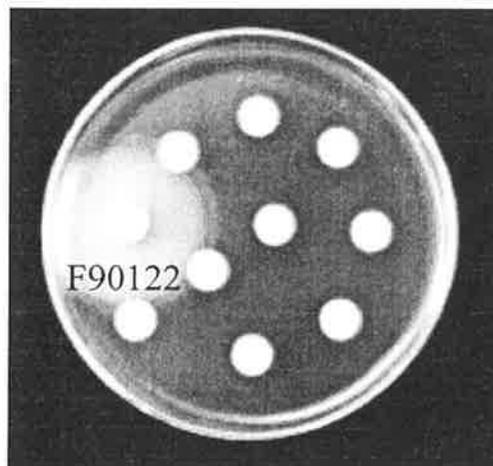


그림 1. 곰팡이배양액의 *Chlorella regularis*에 대한 활성

그 결과 방선균 33 균주와 곰팡이 6 균주가 *Chlorella*에 대해 강한 제초활성을 나타내었다 (표 1).

표 1. *Chlorella regularis*에 대한 스크리닝 결과

균주번호	저해활성	균주번호	저해활성
A80079 ^s	+++ ^b	A90306	++
A80088 ^s	+	A90311	+
A80505 ^s	++	A90321	+
A80549 ^s	+++	A90342	+
A80561 ^s	++	A90352	++
A80568 ^s	++	A90358	++
A80571 ^s	++	A90498	++
A80578 ^s	++	A90523	++
A80588 ^s	++	A90582	++
A80601 ^s	+	A90642	++
A80605 ^s	++	A90607	+
A80610 ^s	++	A90615	++
A90114 ^s	++	A90652	++++
A90120	+	A90716	++
A90176	++	F90020 ^f	++
A90195	++	F90121 ^f	+
A90257	+	F90148 ^f	+
A90256	++	F90153 ^f	+++
A90284	+	F90167^f	+++
A90287	+	F90122 ^f	++++

^s 방선균 균주, ^f 곰팡이 균주, ^b +: <10mm, ++: 11-20mm, +++: 21-30mm, ++++: >31mm (저지환)

2) *Lemna*를 이용한 검정

Miniplant인 *Lemna*를 이용한 제초활성 검정은 균 배양액을 희석 배율을 달리 처리하여 *Lemna*의 생육 저해율로 조사하였는 바 11 균주가 6,250ppm 이하에서

9 균주는 12,500ppm 이하에서 그리고 3 균주는 25,000ppm 이하에서 91% 이상의 생육 저해율 (지수 5)을 나타냈다. 또한 9 균주는 3,200ppm에서, 6 균주가 25,000ppm에서 70-90%의 생육 저해율 (지수 4)를 나타냈다. 특히, MS80769 균주는 1,563ppm에서도 저해지수 5로서 가장 강력한 제초활성을 보였다. 한편, 2차 *Lemna* assay 결과는 표 2에서와 같다. 2.5% 처리시 제초활성을 보인 시료는 총 60시료 (곰팡이 7균주, 방선균 53균주)이었으며 3,125ppm이하의 저농도에서 제초지수 3이상을 나타낸 균주는 21개 균주 (곰팡이 2균주, 방선균 19균주)이었으며 195ppm이하에서도 제초활성을 보인 균주는 M232 균주를 비롯하여 7개 균주이었다. 한편, GSS 및 GSM 배지상에서 제초활성을 보인 균주 수는 각각 19, 34 균주를 나타냄으로써 GSM 배지가 제초활성이 더 높게 나타났다.

표 2. *Lemna*에 대해 활성을 나타낸 곰팡이 및 방선균

균주번호 (000-)	F/A*	제조활성지수		제조지수*** 5의 농도
		25,000ppm	3,125ppm	
F167	F	5	5	
F225	F	4	2	
F243	F	4	ND**	
F245	F	4	ND	
F252	F	4	4	
F257	F	5	4	확인중
F294	F	4	0	
F297	F	5	2	
G220	A	4	ND	
M232	A	5	5	1,563
G232	A	5	5	
M235	A	5	5	1,563
G235	A	5	5	
M239	A	5	5	391
G239	A	5	ND	
M247	A	5	ND	
G247	A	4	ND	
M252	A	5	4	
M253	A	5	4	
M262	A	4	ND	
M265	A	5	ND	
M271	A	5	5	391
G271	A	5	ND	
M278	A	5	ND	
G278	A	5	ND	
M281	A	5	ND	
M284	A	4	ND	
M285	A	5	5	391
G285	A	5	5	
M312	A	4	ND	
M325	A	5	ND	
G325	A	5	3	12,500
M326	A	5	ND	
G326	A	5	ND	12,500
M328	A	5	ND	
M335	A	4	4	
G336	A	4	1	
M337	A	4	ND	
M345	A	5	3	
G345	A	4	ND	
M353	A	5	5	3,125
M366	A	5	ND	
G370	A	4	1	
M371	A	5	1	
G371	A	5	ND	
G373	A	4	3	

계속

균주번호 (000-)	F/A	25,000ppm	3,125ppm	제초지수 5의 농도
M374	A	5	5	
M389	A	4	2	
G397	A	5	5	
M397	A	5	5	확인중
G402	A	5	NE	
M402	A	5	4	
M407	A	5	0	
G410	A	5	2	
G411	A	3	0	
M413	A	5	3	
M421	A	5	4	
M441	A	5	5	
M443	A	5	1	
M447	A	4	3	
M453	A	4	2	

*F/A: fungus and actinomycetes, **ND: not determined. *** 제초지수 1 - 5 (1: 매우 약; 2: 약; 3: 중; 4: 강; 5: 매우 강).

나. *In vivo* 활성검정

1) 식물잎 및 유묘 검정법

① 토마토 잎을 이용한 검정

토마토 잎에 대한 1차 제초활성 조사는 그림 2에서와 같은 방법으로 토마토 잎 상에 균배양체나 배양추출물을 점적하는 방법으로 활성을 나타낸 시료는 *in vivo*에서 제초활성을 나타내거나 제초활성이 대상잡초에 특이한 균주에 대하여 제제화 가능성이 높을 것으로 평가하였다.

본 bioassay 검정 결과 *Myrothecium roridum* F000252, *Penicillium oxalicum* F40362 및 A80079 (= *Streptomyces* sp. KA79) 등의 균주에서 각각 중도의 제초 활성을 보였다. 또한 시험한 5종류의 *Myrothecium*속 균주 중 2 균주에서 중도 독성을 나타내 1차 선발되었다.

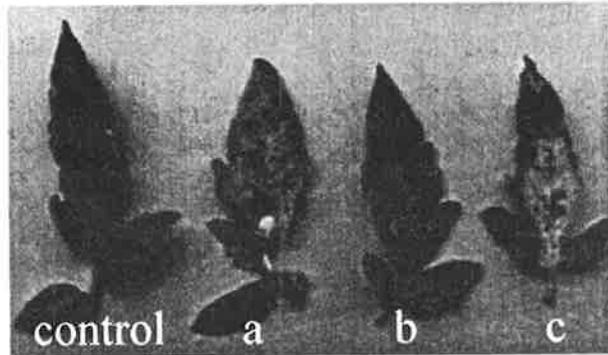


그림 2. 균 배양체의 토마토 잎에 대한 식물독성 검정

② 오이 자엽을 이용한 검정

오이 자엽에 대한 제초활성 조사는 기 선발된 *in vitro* 및 *in vivo*에서 제초활성이 우수하거나 제초활성이 대상잡초에 특이한 균주에 대하여 제제화 가능성을 알아보고자 실시하였다. 활성이 우수한 균주들에 대해 제초활성에 대한 재현성 실험을 실시하였는바 대부분의 균주가 높은 재현성을 보였다. A80605 및 A90323 균주의 오이 자엽에 대한 제초활성을 조사한 결과 A80605 균주의 경우는 용매 분획층은 물론 배양액 자체에서도 제초활성이 있었으며 ethylacetate 추출물은 클로렐라에 대하여 30ppm에서도 활성을 보였다. 그러나 A90323 균주는 액체 배양체에서만 제초활성을 강하게 보였으나 용매층에서는 매우 미약하여 수용성물질로 판단되었으며 활성물질 분리는 본 연구에서는 보류하였다.

③ 바랭이 및 닭의장풀 잎을 이용한 검정법

그림 3에서와 같은 방법으로 바랭이 잎을 이용하는 leaf bioassay법을 이용한 바랭이 (*Digitaria sanguinalis*)에 대한 제초활성 조사한 결과 바랭이에 대한 선택적인 제초활성을 보이는 균주가 다수 선발되었으며 이 bioassay법이 바랭이에

대한 제조활성 균주의 스크리닝에 효과적인 방법으로 확인되었고 이를 이용하여
기 선발된 활성 균주들에 대한 제조활성 및 그 특성을 조사하였다.

한편, *Aspergillus niger*의 제조활성에 대한 상승효과를 조사중에 있으며 닭의
장풀에 대한 *Aspergillus niger*의 추출물의 제조활성물질을 분리하기 위한 연구
를 수행 중에 있다. *A. niger* HBL011의 배양추출물은 매듭풀, 토끼풀 및 닭의장
풀에 대하여 대체로 높은 제조활성을 나타냈다 (그림 3).

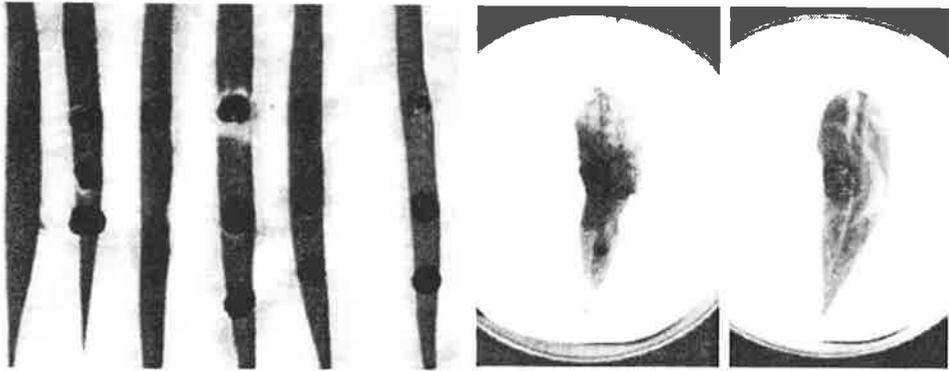


그림 3. 바랭이 (왼쪽) 및 닭의장풀 (가운데, 오른쪽)에 대한 독성검정

그림 4는 *A. niger*의 추출물이 닭의장풀에 대한 식물독성이 있음을 나타내 주
는 것이다. 본 추출물은 닭의장풀 이외에도 매듭풀 및 토끼풀에 대한 제조활성
을 보여주었다.

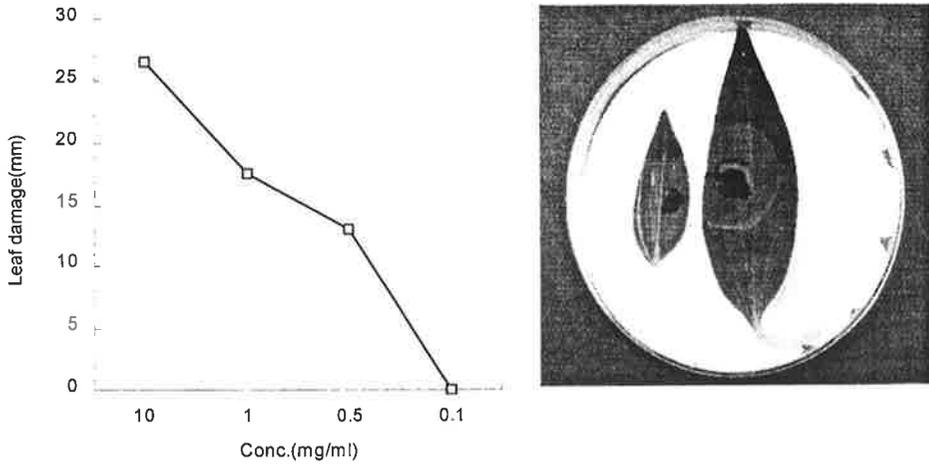


그림 4. *A. niger* HBL001 ethyl acetate 추출물의 *Commelinia communis*에 대한 독성검정

닭의장풀에 대한 *A. niger* HBL001 배양체의 ethyl acetate추출물은 닭의장풀에 대해서는 처리 수 시간 후에도 연화적 갈변 병징이 나타나기 시작하여 500 및 1,000ppm에서 24시간 내에 각각 직경 13 및 17.5mm의 갈변증상을 나타냈다. 10,000ppm에서는 수 시간 내에 갈변이 이루어지기 시작하여 24시간 후에 약 세로 직경 27mm가 고사되었다.

또한 매듭풀에 대하여는 500ppm 처리구에서는 24 시간내에 추출물의 점적 부위만큼 고사되었으나 1,000ppm에서는 24시간 내에 전체 잎이 완전히 고사되었다. 그리고 토끼풀에 대하여는 1,000ppm에서는 처리 수 시간부터 갈변이 되기 시작하여 3일 후에는 직경 20mm가 갈변되었다 (그림 5).

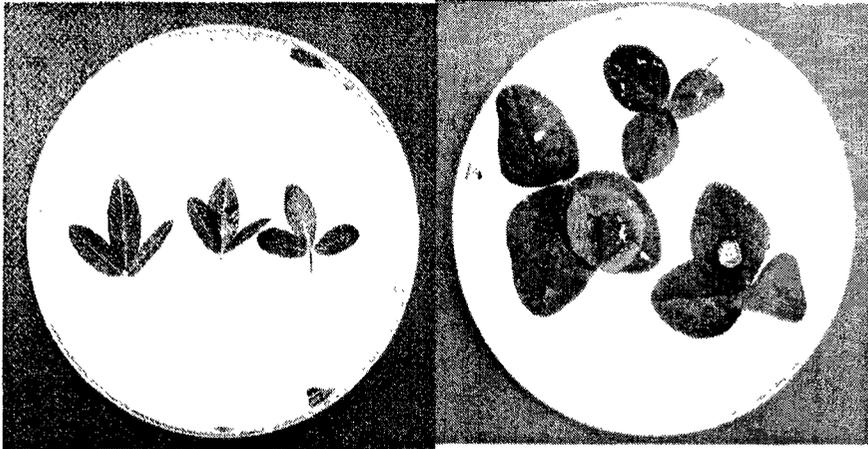


그림 5. *A. niger* HBL001 ethyl acetate 추출물의 *Kummerowia striata* (왼쪽) 및 *Trifolium repens* (오른쪽)에 대한 독성검정.

④ 클로버 종자 및 유묘를 이용한 검정

본 발명에 따른 균주의 소병자포자 현탁액 (ml당 1×10^7 소병자포자 농도)을 라디노클로버 종자가 습실 처리된 플레이트에 발아전 집중 처리한 후 라디노클로버 종자발아저해 및 떡잎 생육 저해 정도를 조사한 결과, 처리 3-4일 후에도 종자발아가 현저히 억제되었으며, 또한 발아된 유묘에 처리할 경우에도 라디노클로버 유묘의 생육이 매우 억제되었다. 미로세시움균의 침입과정을 육안 및 현미경 하에서 조사한 결과 종자표피 및 떡잎 상에 2일 후부터 균의 감염이 이루어지는 것이 관찰되었고, 4-5일 후부터는 특히 종자 및 떡잎 상에 진한 녹색-검정색의 분생포자좌 (sporodochia) 및 균사가 잘 형성되어 가는 것이 관찰되었으며 종피 및 떡잎 이외에도 줄기 및 뿌리의 감염으로 진전되면서 클로버의 생육이 매우 억제되는 것이 관찰되었다.

2) Pot 시험

In vivo 시험에서 활성을 보인 균주들의 pot상에서 공시잡초에 대한 제초활성

이 발아전 및 발아후에 있는지를 확인하고 대상잡초에서 분리한 균주를 이용한 기주범위, 처리방법에 따른 효과, 제초활성의 특성 등을 조사하였다. 특히 바랭이에 대해 활성이 높았던 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* 곰팡이 균주와 방선균 A80633 및 A80079 (*Streptomyces* sp. KA79) 방선균 균주의 경우는 세부적인 특성을 조사한 바 미생물제조제 균주로 특허출원 준비중에 있다.

검정결과 방선균 20여 균주와 곰팡이 3균주가 높은 제초활성을 보였고 3등급 이상의 활성을 나타낸 균주는 17개 균주를 대상으로 제초특성을 조사하고 있다 (표 3 및 3-1). 특히 A80633 균주는 바랭이에 대해 발아전 (pre-emergence test) 시험에서 선택적으로 높은 제초활성과 백화현상을 나타냈으며 이외에도 A80067, A80650, A80659, A80673 균주는 강한 제초활성을 나타냈다. 한편, A80495, A80528, A80561, A80568 균주는 제초활성 스펙트럼이 매우 좁은 활성을 나타냈다. 대체로 여러 초종에 제초활성을 보이는 균주는 *Lemna*에 대체로 낮은 활성을 나타냈다. 또한 강력한 제초활성 특히 백화현상을 나타냈던 KA79균주의 경우 세부적인 제초활성을 조사하였으며 활성물질 구명을 위한 연구를 실시하였다.

표 3-1. 일차 스크리닝 (발조건, pre-emergence test)

번호	수수	돌피	개밀	바랭이	미국개 기장	까마 중	자귀 풀	어저 귀	도꼬 마리	메꽃	종 합	
A80633	0	0	0	90(NB)	0	0	0	0	0	0	바랭이 (백화)	
A80659	0	40	70(B)	95	80(B)	80(B)	95	60(B)	20	100		5*
A80673	0	70(B)	100	100	100	60(B)	100	30	80	100		5
A80067	20(B)	20(B)	40(B)	50(BI)	80(B)	0	0	0	0	0		4-5

표 3-2. 일차 스크리닝 (발조건, post-imergence test)

번호	수수	틀피	개밀	바랭이	미국개 기장	까마 중	자귀 풀	어저 귀	도꼬마 리	메꽃	총 합	
A80013	35(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80024	35(C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80067	35(I)	30 (BC)	04-5	90	70 (BC)	0	100	95	80 (BEI)	100		
A80146	35(C)	80 (BC)	20(C)	100	X	0	0	0	0	0		4
A80210	30(I)	0	30(C)	30(C)	X	30(I)	0	0	80 (BIC)	0		3-4
A80484	0	40(B)	0	50 (BC)	20	0	0	0	70 (BE)	0		3
A80491	20	70 (BC)	0	90	30	0	40 (BI)	20	80	100		5
A80495	0	0	0	0	0	0	0	70 (BI)	70 (B)	0		4
A80501	20	0	0	20	0	0	0	0	60 (BI)	0		3
A80504	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80511	40(BI)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80512	30(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80519	20	0	0	50(C)	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80601	35(I)	0	0	0	0	0	0	0	20	0		1
A80602	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80603	40(I)	0	0	0	0	0	0	0	40 (BI)	0		2
A80605	40(C)	20	0	35 (BC)	0	0	0	0	40 (BEC)	0		3-4
A80607	35(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80611	40(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80612	40(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80619	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80620	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80623	35(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1

계속

A80745	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80771	30(IC)	20	35(B)	0	0	0	0	0	0	0		3
A80772	10	20	0	40(B)	0	0	0	0	0	0		2-3
A80773	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0		1
A80774	30(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80778	30(IC)	0	0	0	0	0	0	0	70 (BE)	0		3
A80791	10	0	0	0	0	0	0	0	40 (E)	0		2-3
A80792	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80805	20	0	0	0	0	0	0	0	20	0		2-3
A80807	35(C)	0	0	20	0	0	0	0	0	0		2
A80811	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80814	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80817	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80847	30(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80852	30(IC)	20	20	40(C)	0	0	0	0	0	0		1-2
KA79	70	90	0	90	20	0	80	20	0	0		4
F000252	40	40	30	70	30	95	95	20	100	100		5

계속

A80624	35(I)	80 (BC)	20(C)	100	X	0	0	0	40 (BEC)	0	약해	1
A80633	20	0	0	80(N)	20	0	0	0	0	0	약해	1
A80639	35(I)	0	0	0	0	0	0	0	20	0	약해	1
A80644	20	70 (BC)	0	90	30	0	40 (BI)	20	80	100		5
A80650	90(CI)	60 (BC)	40 (BC)	70(B)	95	0	95	90	100	70		5
A80654	40(I)	60(BI)	0	70(BI)	95	0	50 (BI)	20	80	80		4-5
A80659	90	70 (BC)	40 (BC)	100	100	100	100	95	100	100		5
A80660	20	0	0	0	0	0	0	0	20	0	약해	2
A80662	20	0	0	0	0	0	0	0	20	0	약해	1
A80663	20(I)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80665	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	약해	1
A80666	30(I)	0	0	0	0	0	0	0	20	0	약해	1
A80670	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0		1
A80673	95	70(C)	40(C)	100	100	100	100	100	100	100		5
A80674	30	35	0	70(BI)	0	0	0	0	80	50		4
A80675	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0		1
A80678	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0		1
A80684	60(I)	70(B)	0	95	20	0	40 (BI)	0	90	100		4
A80686	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0		1
A80701	40(I)	0	0	20	0	0	0	0	40 (BI)	0		2

B: stunting(작아짐), C: dessication, E: 뒤틀림, 기형, I: chlorosis, N: bleaching,
X: not determined. *제조지수 1-5 (1: 매우 약, 2: 약, 3: 중, 4: 강, 5: 매우 강).

3) 온실시험

*P. oxalicum*의 크로버에 대한 약효를 확인하고 생물농약으로서 개발 가능성을

파악하고자 실시한 결과 약제처리후 1주일 경부터 경엽처리한 구간에서 약제가 처리된 일부 잎이 적화되는 증상을 보이기 시작하였으며 약제처리 후 30일 경부터는 적화된 잎은 말라죽고 새로운 신엽은 세엽화 되거나 황화되는 생육억제 증상을 보였으나 완전히 고사시키지는 못하였다. Pot당 5.3g 처리시에는 경엽처리에서 60% 정도의 약효를 보여 타 약제와의 혼용처리가 효과를 보일 것으로 사료되었다.

4) 약제 겸용 시험

토끼풀에 대한 *P. oxalicum* 균주와 기존 약제를 겸용 약제 처리하였을 경우 토양처리에 비하여 경엽처리가 제초효과가 더 높았으나 Dicamba 약제를 경엽처리할 경우 98.3%에 비하여 60-70%의 제초효과를 나타내었는데 이러한 제초효과는 보통의 미생물 제초제의 활성범위에 해당되는 것으로 판단되며 차후 제초제 혼용시험 및 미생물 혼합제제 기술 (또는 mixed organism 이용기술)과 같은 방법 등을 적용한다면 매우 높은 제초효과를 거둘 수 있을 것으로 판단되었다.

제2절 제제화 및 안정성

1. 제제화 연구

본 연구에서는 토끼풀에 대한 병원성 검정결과 기 선발된 우수 균주 *Penicillium oxalicum* F40362를 제제화 하기 위한 기초실험의 일환으로 제제화 최적 조건을 검토하였다. 활성검정은 방제대상 식물로는 3종류의 토끼풀 (ladino, red, white clover)을 사용하였고 제초활성 평가는 pot에서 발병된 것을 달관 조사하여 다음과 같이 나타내었다. 즉, 0: no effect, 10-30: slight effect, 40-60:

moderate effect, 70-90:severe effect, 100: complete death으로 나타냈다. 제조활성이 우수하게 나타난 균주는 다음 표 4에서와 같이, ①제조활성은 wheat bran-corn starch 제제에서 약 10^8 spore/gr 농도에서 90% 이상의 강한 제조활성을 보였다. ②8개월 동안 보관된 이 제제들은 상온보다 4 °C에서 생균수가 더 일정하게 유지되었다. 모두 10^8 spores/gr 이상의 농도와 저장 2주까지 30% 이상의 생균수를 유지하였다. 이 제제들 중 wheat bran-corn starch와 1% glycerol을 혼합한 제제에서 저장 중 안정성이 높았다. ③장기 보관된 제제들을 온실에서 pot 실험한 결과 wheat bran-corn starch와 perlite 제제에서 제조활성이 90% 이상으로 우수하게 나타났다 (표 6).

이상의 결과로 볼 때 제제화가 잘 이루어진다면 *P. oxalicum* 균주가 미생물제 초제로 개발될 수 있음을 보여주었다.

표 4. 제제화 종류에 따른 시간별 활성 균주의 밀도 (CFU/g)

저장 기간 처리구	0	0(건조후)	1주	2주	4주	8주	16주	32주
A	23 ^a	23	22	19	9	9	9	8
B	100	95	60	60	45	37	37	37
C	100	100	70	55	15	15	15	10
D	70	65	60	15	15	14	14	12
E	150	70	60	30	20	20	20	20
F1	40	25	15	9	9	8	8	8
F2	40	30	17	10	9	9	9	9
F3	40	20	10	5	2	2	2	2

a x 10^8 /g (CFU), A: 균주+옥수수전분->냉건, B: 균주+옥수수전분->1% glycerol->풍건, C: 균주+옥수수전분+2% glycerol->풍건, D: 균주+옥수수전분+dry+perlite (1:1, w/w), E: 균주+옥수수전분+풍건+vermiculite (1:1,v/v), F1: 균주+옥수수전분+풍건+chitosan (1:1, v/v), F2: 균주+옥수수전분+풍건+chitin (1:1, v/v), F3: 균주+옥수수전분+풍건+pectin (1:1, v/v).

2. 안정성 및 보존성

미생물제조제로서의 활용 가능성을 검토하기 위하여 저장기간에 따른 제제 중의 생존 균주 수를 조사하였다. 저장기간에 따른 제제 생존 균주 수를 조사한 결과는 다음 (표 5)과 같이, wheat bran-corn starch 제제에서 약 10^8 spore/g 농도에서 90%의 이상의 제초활성을 보였다. 한편, 8개월 동안 보관된 이 제제들은 상온 보관보다 4°C 보관시 생존수가 더 일정하게 유지되었다. 제제의 안정성은 앞의 기본배지에 1% glycerol을 혼합한 제제에서 가장 높았다. 그리고 온실 pot 실험한 결과 기본배지 (A)와 perlite 첨가 제제 (D)에서 제초활성이 거의 90%로 우수하게 나타났다.

결과적으로 몇가지 제제에서는 8개월 후에도 상당히 생존율이 높은 것으로 확인되어 실용화 가능성이 매우 높은 것으로 판단되었다.

표 5. 제제화 저장 32주후 제형별 제초활성

Clover	Mycoherbicidal activity (%)							
	A	B	C	D	E	F1	F2	F3
Ladino	85	10	20	90	5	5	0	85
Red	100	80	90	95	10	30	5	15
White	95	25	45	80	5	5	0	15

Treatment conc. was 0.5g/pot. 0: no effect, 10-30: slight effect, 40-60: moderate effect, 70-90: severe effect, 100: complete death.

3. 균생태·생리

토끼풀에 강력한 선택적 제초활성을 갖는 *Penicillium oxalicum* F40362 균주의 제제화 잠재성을 평가하고자 생태·생리학적 특성을 조사하였다.

가. 생물 제제의 균사 성장에 대한 환경 요인의 영향

*Penicillium oxalicum*의 균사 성장에 대한 수분 활성, solute 및 온도 효과를 조사하였다. 그 결과 본 *Penicillium oxalicum* F40362 균주는 glycerol과 설탕을 기질로 사용하였을 때 높은 수분활성 조건 (0.98 a_w), 고온 (30°C)에서 균사 성장이 제일 좋았으나 KCl을 기질로 사용하였을 때 25-30°C 조건 하에서 0.995 a_w 와 0.98 a_w 조건 간의 균사생장에 있어서의 차이는 거의 없었다 (그림 6).

0.98-0.995 a_w 에 비해 0.97 a_w 이하 조건 하에서는 균사 성장율이 낮아지기 시작하였으며 0.94 a_w 에서는 균사 성장율이 현저히 낮아지는 경향을 보였다. *P. oxalicum* 균주는 0.95 a_w 에서 최대생육을 보이는 *Aspergillus*속 균과 같은 전형적인 xerophilic (=xerotolerant, osmophilic)한 균류에 비해서는 좀더 수분 stress에 대한 높은 저항성을 나타내지만 다른 일반적인 포장 균류 (field storage)의 최적 a_w 에 비해서는 더 낮은 a_w 를 가지며 수분 및 온도 stress에 대한 저항성은 이들에 비해 더 큰 것으로 나타나 생물 제제로서의 잠재성은 매우 높은 것으로 평가되었다.

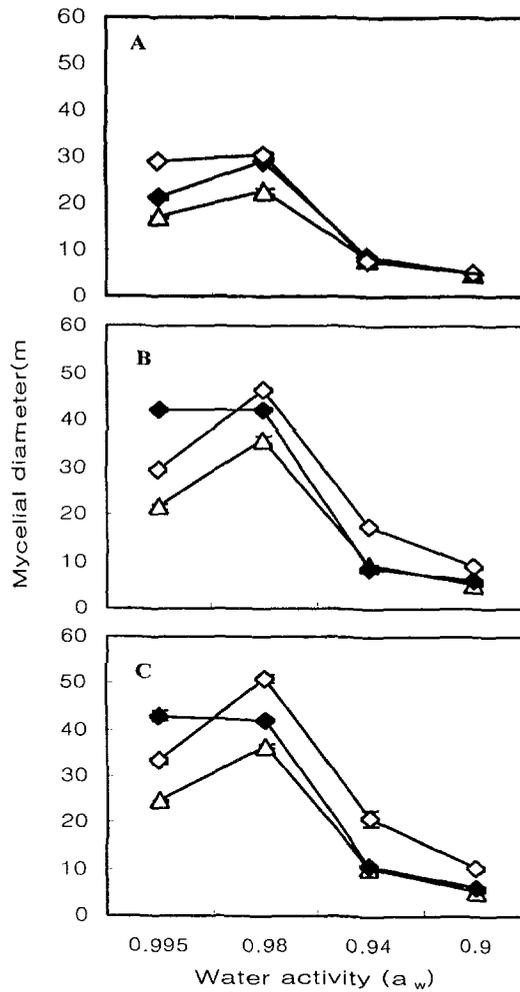


그림 6. 수분활성, 기질 및 온도조건에 따른 *P. oxalicum* F40362균주의 균사생장에 관한 효과 (수분활성조건: 0.90, 0.94, 0.98 및 0.995 a_w , 온도조건: 20 (A), 25 (B) and 30°C (C); KCl: ◆, 글리세롤: △, 설탕: ◇).

나. 분생포자 발아에 대한 환경요인의 영향

Penicillium 균주의 MEA 배지상에서의 분생포자 발아율은 균사 생육조건에서와 마찬가지로 a_w 와 온도에 따라서 많은 차이가 있었다 (그림 7). *Penicillium*

균주는 0.995 a_w /30℃에서 발아율이 제일 좋아 12시간 후에 약 90%의 발아율을 나타냈으나 0.97 a_w 에서는 발아율이 72.4%로 다소 떨어지는 경향을 보였다. 이러한 발아율은 일반 포장균류에 비해서 매우 높은 발아율이며 발아전 요구되는 정체시간 (lag phase time)도 a_w 및 온도에 따라 차이가 있기는 하지만 대체로 짧은 것으로 나타났다. 낮은 수분활성 (0.94 a_w)에서는 36시간 후에는 18, 25, 30℃에서 각각 12, 72, 79%의 발아율을 나타내 온도가 낮아질수록 발아전 정체시간 (lag phase time)이 길어지지만 대체로 발아율은 높은 것으로 나타났다. 한편, 발아관의 신장은 발아율이 높더라도 a_w 와 온도에 따라 큰 차이를 보였다. 높은 수분활성 (0.995 a_w)에서 18시간 후 발아관의 크기는 20℃에서 54.5 μm , 30℃에서 168 μm 로 그 차이는 약 3배이었다. 0.97 a_w 의 조건에서는 20℃에서 12시간 이후에 발아가 시작되며 25℃와 30℃에서도 12시간 후 발아관의 크기는 각각 5.1, 8.98 μm 이었다.

다. *Penicillium oxalicum* 균주의 포자 생성에 대한 환경 요인의 영향

1) 분생포자 발아

A_w 를 달리하여 *Penicillium* 균주의 포자형성정도를 조사한 결과 glycerol을 기질로 사용한 PDA 및 MEA 배지상에서 0.97 a_w 조건이 0.995 a_w 조건에서보다 더 높았으며 glucose를 기질로 사용할 경우 0.995 a_w 는 물론 0.94 a_w 에서도 높은 포자생성을 나타내었다 (그림 7, 8). 포자생성은 대한 환경조건에 따라 그리고 기질의 종류에 따라 포자생산의 유도 (stimulation) 패턴이 달라지는 것을 알 수 있었다. 또한 0.94 a_w 의 낮은 수분 조건에서도 배양시간이 길어짐에 따라 약간의 포자생성이 이루어 졌다.

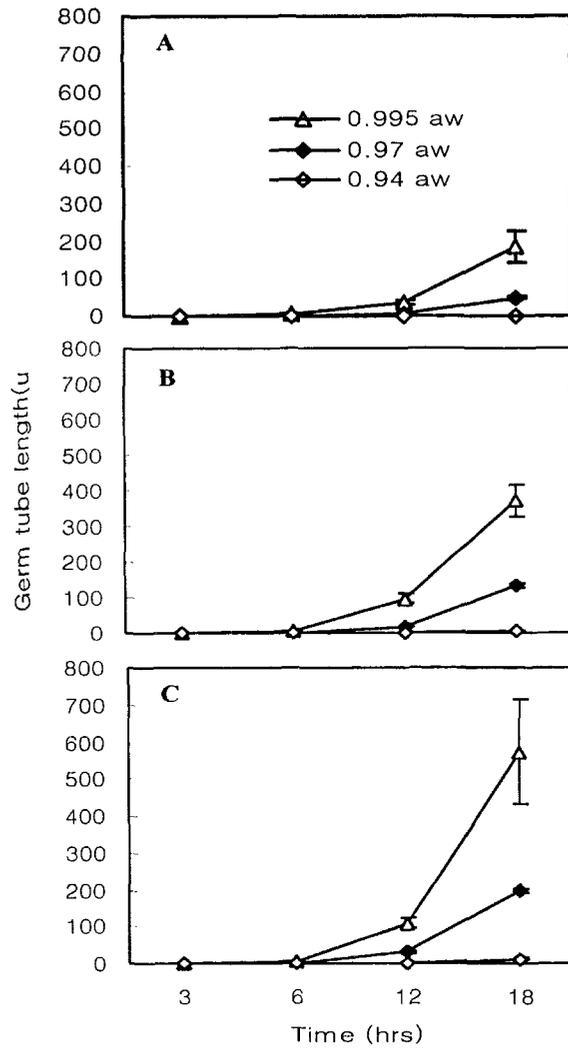


그림 7. *Penicillium oxalicum*의 분생포자 발아에 대한 수분활성 및 온도의 효과 (0.995: △, 0.97: ◆, 0.94: ◇): 18: A, 25: B and 30°C: C).

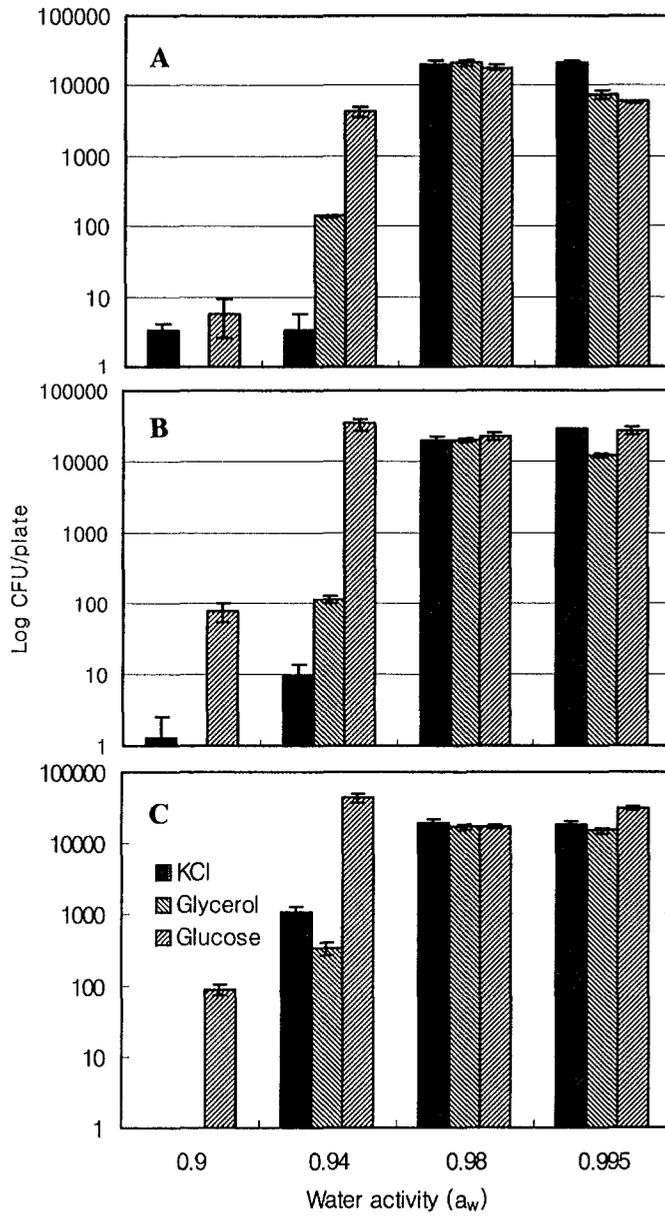


그림 8. *Myrothecium* 균주의 포자형성에 대한 수분활성 및 solute의 효과 (A: 20°C, B: 25°C, and C: 30°C).

라. 탄소원 이용성

A_w 와 온도를 달리하여 *Penicillium* 균주의 탄소원 이용 능력을 조사한 결과 a_w 및 온도에 따라 큰 차이를 나타냈다 (그림 9). *Penicillium* 균주의 탄소원 이용성은 0.95-0.90 a_w 에서보다 수분활성이 높은 0.995 a_w 에서 탄소원 이용성이 훨씬 높았으며 온도에 따른 큰 차이 없이 비슷한 경향을 나타냈다.

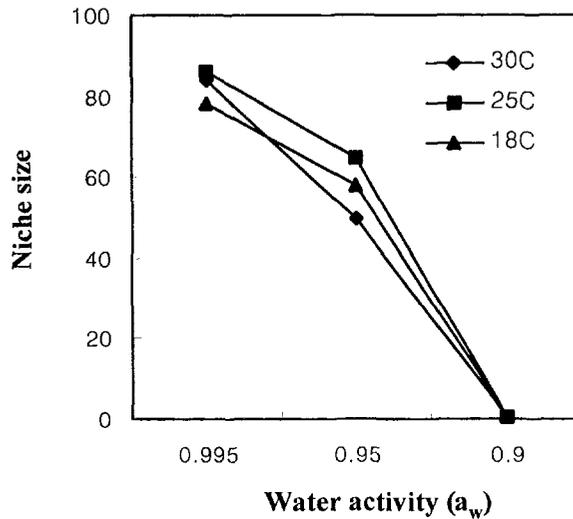


그림 9. *P. oxalicum* F40362 균주의 온도 및 수분활성조건별 별 생식역 크기 (niche size) (GN Biolog MicroPlate, 처리조건은 NaCl in 0.25M MES완충액).

25°C에서 탄소원 이용성 (niche size)은 0.995 a_w 및 0.95 a_w 에서 각각 86 및 65를 나타냈다. 수분활성이 0.95 a_w 에서는 0.995 a_w 에서보다 탄소원 이용성이 매우 낮아지는 경향을 나타냈으며 온도에 의한 차이도 더 컸다. 0*Penicillium* 균주의 탄소원 이용성은 0.95-0.90 a_w 에서보다 수분활성이 높은 0.995 a_w 에서 탄소원 이용성이 훨씬 높았으며 온도에 따른 큰 차이 없이 비슷한 경향을 나타냈다. 수

분활성이 비교적 낮고 온도가 높은 0.95 a_w/30℃ 조건에서의 탄소원 이용성은 0.995 a_w, 25℃와 비교하였을 경우 약 41% 덜 이용하는 것으로 나타났다. 한편 0.90 a_w의 매우 낮은 수분 조건에서는 어느 온도 조건 하에서도 어떤 탄소원도 이용하지 않았다.

균류의 탄소원 이용성은 실제 포장에서 기주체 정착, 침입, 분해에 이르는 전 과정에 영향을 주기 때문에 균류 활성화와 직접 관련되므로 식물 균병학적 및 식물병원학적으로 매우 중요하다. 특히 제초 대상식물을 기질로 한 이용성이 높아야 다른 우점균류와의 경쟁력을 가질 수 있기 때문이다.

제3절 안전성 (독성) 스크리닝 (위탁과제)

1. *Penicillium oxalicum* F40362

가. 급성 경구독성

P. oxalicum F40362의 시험물질에 대한 급성 경구독성을 마우스 (ICR 계통)를 공시하여 1회 경구 투여한 후 2주간 치사수, 일반 중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다. 암컷과 수컷 모든 동물은 기초시험 투여 약량 (2,500mg/kg)에서 치사한 개체가 없었다. 일반 중독증상으로 관찰된 것이 없었다. 체중변화는 투여량에 관계없이 증가추세를 보였다. 부검소견은 모든 장기에 특별한 소견이 없었다. 이상의 결과, 본 시험에서 관찰된 임상증상 및 부검소견만으로 표적장기를 추적하기는 어려웠으며, LD₅₀값은 암컷과 수컷 모두 2,500mg/kg 이상이었다.

한편, 기타 제초활성 균주의 독성시험 결과 상기 균주 이외에도 본 연구를 통하여 선발된 30여 제초활성 우수 균주에 대하여도 동일한 급성 독성시험을 실시하였다. 그 결과는 암컷과 수컷 모든 동물은 기초시험 투여 약량 (2,500mg/kg)에 의해서 치사한 개체가 없었으며, LD₅₀는 2,500mg/kg 이상이었다. 시험기간

중 1일 1회 마우스의 건강상태, 중독증상 및 사망의 유무를 관찰 기록하였으며 일반증상을 보다 객관화시키기 위해 침울, 유연, 축동, 비경의 건조, 입모 등을 주요 관찰사항으로 관찰한 결과 대부분의 균주가 급성독성을 나타내지는 않았으며 시험물질에 의해 치사한 동물은 한 마리도 없었다. 전 시험동물을 대상으로 부검을 실시하였으나 이상소견을 나타낸 장기는 발견할 수 없었다.

1차 년도의 급성경구시험에 이어 2차 년도에는 급성경피독성, 피부자극성, 안점막 자극성을 보기 위하여 마우스, 랫트, 백색토끼를 이용하여, 독성시험의 기준과 방법'에 준하여 독성을 평가하였으며 현재 제조활성이 우수한 균주들에 대하여 급성독성이외의 독성을 스크리닝한 결과 *P. oxalicum* F40362 균주의 스크리닝결과 일반 임상증상은 관찰할 수 없었으며, 체중에 미치는 유의성 있는 변화도 없었다. 다만, 안점막 자극성 시험에서 육안적으로 결막에 있어서 시험물질을 적용한 후 1시간 후에 발적이 관찰되었으나 현탁액으로 조제한 시험약제를 결막낭내에 적용하였기 때문에 기계적인 자극으로 인한 것으로 판단되었다.

나. 급성 정피독성

암컷과 수컷 모든 동물은 기초시험 투여약량 (2,000mg/kg)에서 치사한 개체가 없었으며, LD₅₀는 2,000mg/kg 이상이였다. 본 시험물질에 기인한 특기할 만한 일반증상의 변화는 없었으며, 특히 본 시험물질에 의해 치사한 동물은 한 마리도 없었다. 체중의 변화 실험에 사용된 랫트의 체중은 시험물질 섭취전, 섭취후 1일, 7일, 14일에 측정하였으며 결과는 표 6에 표시하였다. 시험군 전체에서 시간이 경과함에 따라 체중이 증가함을 알 수 있었으며, 시험물질에 의한 체중변화는 나타나지 않았다. 전 시험동물을 대상으로 부검을 실시하였으나 이상소견을 나타낸 장기는 발견할 수 없었다.

표 6. *P. oxalicum* F40362 균주의 경피 투여 후 체중의 변화

구분	대조군		시험군	
	♂	♀	♂	♀
투여전	194.3±10	164.4±5.8	196.1±6.2	166.2±7.5
투여후 1일	197.5±8.3	169.8±6.7	198.3±8.3	172.5±12.3
투여후 7일	245.2±14.8	190.7±9.9	268.9±16.3	195.1±6.0
투여후 14일	308.6±24.3	229.3±7.8	323.1±13.1	242.6±6.0

다. 피부 자극성

시험물질이 투여된 모든 토끼에서 본 시험물질에 기인한 일반증상의 변화는 관찰되지 않았으며, 사망한 동물은 없었다. 시험물질에 기인한 체중의 변화는 인정되지 않았다 (표 7).

표 7. *P. oxalicum* F40362 균주의 피부 자극 후 체중의 변화

	♂	♀
적용전	2162.8±47.6	2081.6±36.4
적용후 24시간	2162.5±57.3	2081.4±28.4
적용후 48시간	2163.2±75.2	2082.1±43.2
적용후 72시간	2163.3±36.4	2082.4±63.4

시험물질을 토끼의 피부에 투여한 후, 홍반 및 가피 형성에 미치는 영향을 관찰한 결과, 시험물질을 도포한 후 24시간째의 경우 대조군과 시험군 모두에서 홍반 및 가피, 부종 형성이 거의 관찰되지 않았다. 한편, P.I.I. (일차자극지수)가 0.25로 나타났는데, 1미만의 수치는 정상(0)과 가벼운 자극 (1) 사이의 값으로 본

시험물질은 거의 피부 자극성을 나타내지 않는다고 평가하였다 (표 8).

표 8. 토끼의 피부 자극 시험 결과

Site		Control site								Test site							
Change		Erythema & Eschar				Edema				Erythema & Eschar				Edema			
Phase		Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded	
After treatment (hrs)		24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72
No.	Sex																
1	♂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	♂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
3	♂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
4	♀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	♀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	♀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Mean score		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4/6	0	0	0	2/6	0
Sum of mean		0		0		0		0		0		0.67		0		0.33	
Total		0								1.0							
P.I.I.		0								0.25							

- P.I.I. : primary irritation index = total/4

라. 안점막 자극성

시험물질이 투여된 모든 토끼에서 본 시험물질에 기인한 일반증상의 변화는 관찰되지 않았으며, 사망한 동물은 없었다. 시험물질에 기인한 체중의 변화는 인정되지 않았다 (표 9).

표 9. *P. oxalicum* F40362 균주의 안점막 자극 후 체중의 변화

	♂	♀
적용전	2119.8±71.1	2097.4±37.6
적용후 24시간	2118.1±98.4	2096.5±63.4
적용후 48시간	2118.8±76.3	2097.1±72.3
적용후 72시간	2119.5±88.4	2097.3±54.3

시험물질을 결막낭내에 적용한 후 각막의 혼탁, 홍채이상, 결막의 발적, 부종, 분비물의 생성 등의 안점막 자극반응을 관찰한바 시험물질 적용후 1시간 후에 결막의 일부혈관의 충혈, 정상보다 약간의 종창, 약간의 배출물 등의 안점막 자극반응이 관찰되었으나, 24시간 후에는 결막의 충혈이 관찰되지 않았다 (표 10).

표 10. 토끼에서의 안점막 자극성의 평가

Side		Control side						Test side					
After treatment		1 hr			24 hr			1 hr			24 hr		
Ocular regions		각막	홍채	결막	각막	홍채	결막	각막	홍채	결막	각막	홍채	결막
No.	Sex												
1	♂	0	0	0	0	0	0	5	0	4	0	0	0
2	♂	0	0	0	0	0	0	5	0	6	0	0	0
3	♂	0	0	0	0	0	0	5	0	6	0	0	0
4	♀	0	0	0	0	0	0	5	0	4	0	0	0
5	♀	0	0	0	0	0	0	5	0	6	0	0	0
6	♀	0	0	0	0	0	0	5	0	4	0	0	0
Mean region		0	0	0	0	0	0	5	0	5	0	0	0
Mean score		0			0			10			0		
MAS		0						10					

- MAS (maximum average score): the highest mean score from total observation time-points.

마. 독성시험 (번식독성 시험)

F40362 (1g당 2.6×10^8 균수)의 번식독성시험 자료를 얻기 위하여 랫트 (SD 계통)에 1회 경구 투여한 후 치사수, 일반중독증상, 체중변화, 부검소견, 미생물수 및 임신지수를 관찰 조사한 결과 약물 투여 후 시험기간 중 일반적인 중독증상 및 치사한 동물은 없었다. 약물 투여 후 시험기간 중 암컷 및 수컷에서 약제에 기인한 체중 감소는 관찰되지 않았다. 조직을 채취하여 미생물 검출여부를 조사한 바 미생물이 검출되지 않았다. 임신지수 (교미율, 임신율, 출산율)는 교미율이 시험기간 중 교미율은 대조군은 15/40 (37.5%)이며, 실험군은 12/40 (30%)의 결과를 나타내었다. 처리 후 랫트의 발정주기가 4-5일임을 고려한다면 교미기간을 8-10일의 기간을 두고 약 2주간의 질전확인을 충분하게 실시할 수 있다. 대조군이나 실험군의 교미율이 낮은 이유는 교미 후 2-3시간이 지나면 질전이 탈락하기 때문이라 사료되었다.

2. *Myrothecium roridum* F000252

본 균주는 제초활성검정결과 1차 선발된 후 *in vivo* pot 실험 등을 통하여 미생물 제제 개발 잠재성 후보 균주로 최종 선발하고자 하였다.

가. 제초활성 검정

1) *In vitro* 활성 검정

특히, *Myrothecium roridum* F000252 균주는 *Lemna paucicostata* (렘나 파우시코스스타타)에 대하여 배양액 및 배양추출물 모두 높은 활성을 보였다. 렘나 파우시코스스타타에 대하여 *in vitro* 상에서 배양액을 50,000-0.8ppm범위로 조정하여 제초활성을 조사한 결과, *Lemna*에 대하여 배양원액을 16배 희석한 6,250ppm에

서 저해지수 4, 또한 1250ppm에서도 제초지수 2로 매우 높은 활성을 나타냈으며, 배양액의 에틸아세테이트 추출물의 경우 1.6ppm에서도 매우 높은 제초활성(제초지수 3)을 나타냈다(그림 10).

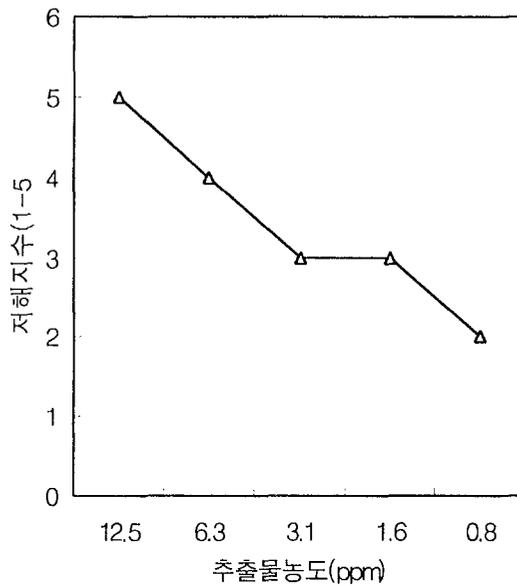


그림 10. *Myrothecium* 배양체의 *Lemna paucicostata*에 대한 농도별 저해활성

한편, 본 배양체의 아세톤 추출물은 여러 종류의 그람음성 및 양성세균 및 아스퍼질러스 (*Aspergillus*), 캔디더스 (*Candidus*)균 등에는 거의 활성을 나타내지 않았으나 클로렐라 (*Chlorella*)에 대하여는 높은 활성을 나타냈다. 한편, *Myrothecium roridum* 균주의 *in vivo* 상에서 여러 잡초종에 대하여 제초효과가 있는지를 식물에 직접 처리하여 그 활성을 검증하였고, 그 결과 까마중, 자귀풀, 어저귀, 도꼬마리, 메꽃, 토끼풀 등의 발잡초와 물달개비 등의 논잡초에 대하여 95%이상의 매우 높은 제초효과를 나타냈으며 바랭이와 올미에는 각각 70 및 80%의 대체로 높은 제초활성을 나타냈다.

제초활성은 처리 수일 후부터 급격히 나타나며 4일과 14일 후 제초활성 수준

은 큰 차이가 없었다. 한편, 작물의 일종인 수수에 대한 제초활성은 성숙체 식물에 대하여 매우 미약하였으며 종자에 처리한 경우는 그 효과가 극히 미약하였다. 또한, 작물에 대한 약해는 토마토, 오이 등의 채소류와 밀보리 식물체에 대하여 배양원액에 대해서 미약하였다. 따라서, 본 미생물 제제는 물달개비 등의 논에서 발생하는 잡초종, 채소류 재배시에 발생하는 잡초종 및 잔디밭의 토끼풀의 방제에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다. 한편, *Myrothecium roridum* 제제를 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 및 1×10^8 포자/g의 농도별로 멸균수에 현탁하여 토끼풀을 비롯한 잡초종에 처리하고 그 제초작용을 1-2주일 후에 관찰하였다. 균주의 제초작용을 상기 실험에 1에서와 유사한 기준에 의해서 평가하였다. 그 결과는 다음 표 11에서 나타낸 바와 같다.

표 11. 작물과 잡초종에 대한 미로세스움 F000252 균주의 *in vivo* 제초활성

학명	일반명	방제가*(%)
<i>Abutilon avicennae</i>	Velvetleaf(어저귀)	±
<i>Aeschynomene indica</i>	Indian jointvetch(자귀풀)	++++
<i>Agropyron smithii</i>	Cheatgrass(개밀)	±
<i>Calystegia japonica</i>	Bindweed(베꽃)	++++
<i>Digitaria sanguinalis</i>	Large crabgrass(바랭이)	++
<i>Echinochloa crus-galli</i>	Barnyardgrass(돌피)	±
<i>Monochoria vaginalis</i>	Monochoria(물달개비)	++++
<i>Oryzae sativa</i>	Rice(벼)	±
<i>Panicum dichotomiflorum</i>	Fall panicum(미국개기장)	+
<i>Sagittaria pygmaea</i>	Arrow head(올미)	+
<i>Scirpus juncooides</i>	Bulrush(올챙이고랭이)	-
<i>Solanum nigrum</i>	Black nightshade(까마중)	++++
<i>Sorghum bicolor</i>	Sorghum(수수)	+
<i>Trifolium repens</i>	Clover(토끼풀)	++++
<i>Xanthium strumarium</i>	Cocklebur(도꼬마리)	++++

*방제가는 접종 2주후의 결과임 -: 방제효과 <30%, ±: <40%, +: <70%, ++: <80%, +++: <90%, ++++: >91%.

나. 제제화 된 제초제의 제초 효과

상기 실시예에서와 같은 방법으로 제제화 된 미생물 제초제를 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 및 1×10^8 포자/g의 농도별로 멸균수에 현탁하여 토끼풀을 비롯한 잡초종에 처리하고 그 제초작용을 1-2주일 후에 관찰하였다. 균주의 제초작용을 상기 실험예에서와 유사한 기준에 의해서 평가하였다. 그 결과는 다음 표 11에서 나타낸 바와 같다.

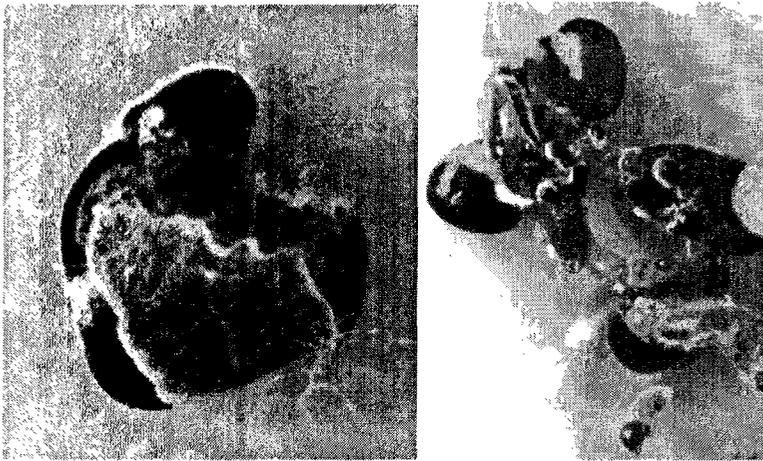


그림 11. *Myrothecium roridum* F000252 (KCTC 0980BP) 균주에 의해 심하게 종피 감염된 라디노클로버 종자 및 그의 확대 사진.

상기 표 11의 결과로부터 신균주는 여러 발 잡초종과 몇몇 논 잡초종에 대하여 높은 제초활성을 가지며, 특히 까마중, 자귀풀, 도꼬마리, 메꽃, 토끼풀 등의 발 잡초종과 물달개비 등의 논 잡초종에 대하여 높은 선택적 제초효과를 보여 주었다. 본 균주의 활성은 그림 11에서와 같이 발아 전부터 발아 후에 모두 활성을 나타내는 특징을 나타내 발아 전 및 발아 후처리제로 개발 가능성이 매우

높을 것으로 사료된다.

다. 배양적 특성

1) 생물제제의 균사생장에 대한 환경요인의 영향

분리균의 MEA 배지 상에서 온도 및 수분 활성조건을 달리하여 균사 생육정도를 조사하였다. 그 결과, 본 균주의 생육은 25℃에서 가장 좋았으며 비교적 고온 (30℃)에서도 대체로 양호하였으며, 낮은 온도 (18℃)에서도 균사생육은 잘 이루어져 최적온도인 25℃에서와 큰 차이를 나타내지 않았다. 또한, 수분 활성조건을 달리하여 MEA 배지 상에서 배양 10일 후 균사생육을 조사한 결과 수분활성이 높은 0.995 a_w 에서 가장 양호하였으며 0.964 a_w 의 대체로 낮은 수분조건에서도 균사생장이 대체로 잘 이루어지지만 이보다 더 낮은 0.95 a_w 에서는 거의 균사생장이 이루어지지 않았다 (그림 12).

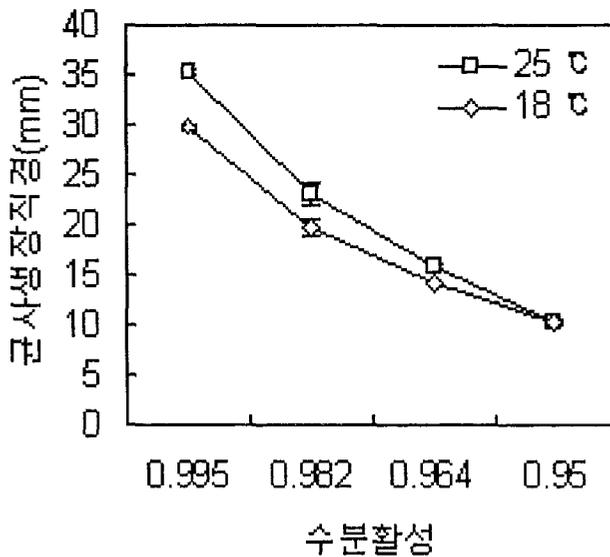


그림 12. *Myrothecium roridum* F000252 균주의 균사생장에 대한 수분 활성 및 온도효과

2) 기타 특성

분생포자좌의 형성은 고온에서보다는 20-25℃ 부근에서 잘 형성되었으며 배양 기간 중에 온도변화 (고온보다는 저온 조건하)가 있을 경우 더 잘 형성되는 것으로 관찰되었다. 배양초기에는 배지 상에 흰색 내지 연한 살색의 기균사를 잘 형성하였으며 색소는 거의 분비하지 않았으며 플레이트 배면의 색은 살색을 띠었으며 플레이트 상에서 형성된 기균사를 긁어주거나 아가플러그로 찍어줄 경우 다량의 액체성의 분생포자층을 포함하는 분생포자좌의 형성이 급격히 유도되는 것으로 나타났다. 한편, 액체배양의 경우 감자한천 배지에 진탕 배양할 경우 약한 적색을 띠었으며 배양체의 점성이 몰트액체 배지에 비해 더 높은 점성을 나타냈다.

라. 안전성 (급성독성)

Myrothecium roridum 배양체의 급성독성 결과 본 실험에서의 처리 농도에서는 급성독성의 증상은 전혀 관찰되지 않았으며 상기 *Penicillium oxalicum* 균주에서와 동일한 실험결과를 나타냈다. 그러나 자연계에서 분리되는 일부 *Myrothecium*속 균종에는 verrucarín, roridin, trichothecene계 독소 등의 진균독소를 생산하는 균이 있어 동일 속군에서 활성 균주를 선별하거나 생물농약 개발시 생산되는 독성물질의 양과 독성물질의 종류에 대한 분석도 요구된다고 하겠다.

제4절 대사산물을 이용한 연구

1. *Streptomyces* sp. KA79 균주가 생산하는 제초활성 물질

가. 배양적 균학적 특징

제초활성물질을 생산하는 균주로서 선발된 방선균 *Streptomyces* sp. KA79 균주의 배양적 특성을 조사한 결과 표 12에서와 같다. 본 균주의 생육정도는 yeast-malt extract agar배지와 tyrosine배지에서는 보통의 생육을 나타냈으나 기타배지에서는 생육정도도 좋지 않았고 기균사 (aerial mycelium)도 아주 빈약하였다. 또한, 기질균사 (substrate mycelium)의 형성정도는 oatmeal agar배지, inorganic salt atarch agar배지, glycerol-asparagine agar배지 및 tyrosine agar 배지 등에서는 보통의 생육을 나타내었으나 yeast-malt extract agar배지에서는 생육이 아주 빈약하였고 배지색은 raw umber를 나타냈다.

표 12. Streptomycete strain KA79의 배양적 균학적 특징

배지	생장 (배지색)	기균사 (색)	배면색	색소
Yeast malt extract agar(ISP No. 2)	빈약 (raw umber)	중 (white)	흑백	raw umber
Oatmeal agar (ISP No. 3)	중 (white)	빈약 (white)	burnt umber	raw umber
Inorganic salt-starch agar(ISP No. 4)	중 (raw umber)	빈약 (grey)	burnt umber	raw umber
Glycerol-asparagine agar (ISP No. 5)	중 (raw umber)	빈약 (white)	흑백	raw umber
Tyrosine agar (ISP No. 7)	중 (raw umber)	중 (grey)	burnt umber	멜라닌색소

그러나 포자층 (spore mass)은 대부분 회색 또는 whitish grey를 나타냈고 수

용색소로 대부분 raw umber를 나타냈다. 현재 당이용성 및 생리적 특성을 세부적으로 조사한 결과 *Streptomyces*속에 속하는 균주로 동정되었다.

Streptomyces sp. KA79 균주의 경우 ISP 균정에 따라 배양한 후 전자현미경 및 관촬현미경으로 형태적 특징을 조사한 결과 (그림 13) spore chain의 형태는 rectiflexibilis하였으며 spore는 smooth, oblong하였고 크기는 $1.4-1.6 \times 0.9-1 \mu\text{m}$ 이었다.

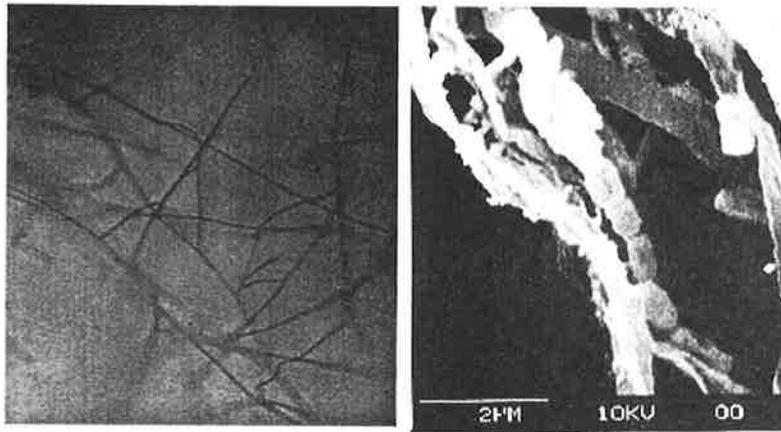


그림 13. *Streptomyces* sp. KA79의 포자 및 균사의 광학사진 (왼쪽) 및 전자현미경사진 (오른쪽)

나. 활성물질의 분리 및 정제

Streptomyces sp. KA79 균주로부터 활성물질의 분리는 그림 14에서와 같은 과정에 의해 실시되었다. 제초 활성 물질은 carbon column에 흡착시켰으며 BuOH층으로 이행시킨 후 silicagel open column, Sephadex LH-20 column 및 Sephadex G-10 column chromatography를 실시하여 분리하였다. 표 14는 A80605 균주의 활성물질 분리정제하는 과정을 보여주는 그림으로 A80605 균주에 대해 용매분획을 비롯한 HP20 및 silica gel column, HPLC 등을 실시하여 물질을 단리하였다.

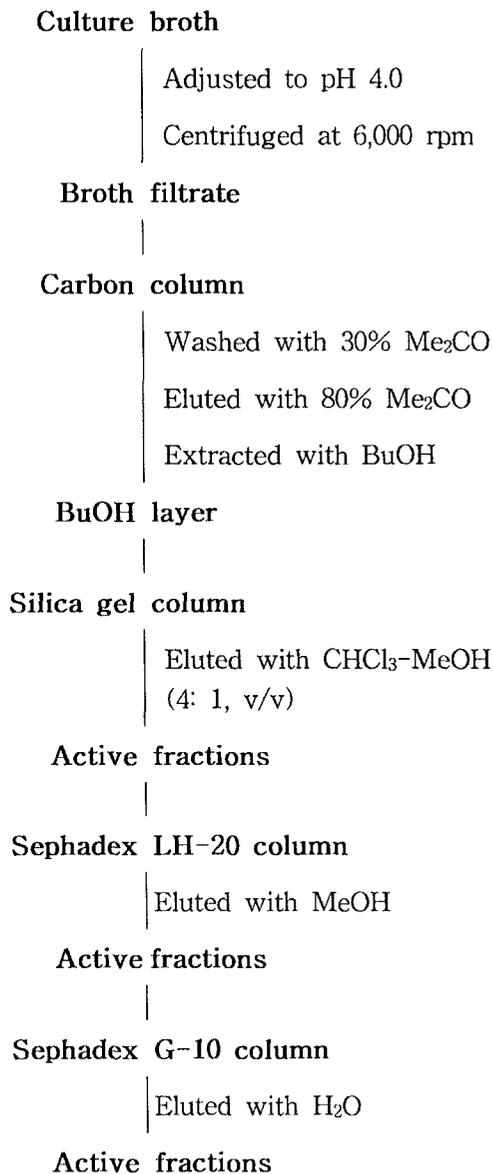


그림 14. *Streptomyces* sp. KA79 균주 배양액으로부터 제초활성물질의 분획

분리과정을 보면 HP20 column을 사용하여 70% MeOH로 용출시키고 이를 evaporator를 이용하여 감압 증류하며 다시 물층을 ethylacetate로 재 추출하여 감압 증류하였다. 이를 다시 methanol:chloroform (70:1, v/v)조건으로 silicagel column을 통과시킨 분획을 제조활성 검정에 이용하였다. 현재 HPLC를 통해 활성피크를 확인하여, prep HPLC를 통해 분리정제 하였으며, 분리 후에 구조를 구명하였다.

또한 A80605 방선균주의 경우 균배양체를 직접 사용하였을 경우와 용매추출 물에서도 높은 제조활성을 보였다. 표 14에서 처럼 활성 균주 A80605 배양체를 ethylacetate로 추출할 경우 억제물질이 가장 많이 추출되었고 핵산층에는 매우 적은 양의 물질이 존재하는 것으로 확인되었다.

표 14. 용매 분획 및 균제별 greening plant에 대한 활성

Code	Extraction condition	Greening grade	
		30ppm	10ppm
	Silicagel column		
S1	CHCl ₃ only	0	0
S2	CM 99 : 1	0	0
S3	CM 70 : 1	5	3.8
S4	CM 40 : 1	4.3	1.8
S5	CM 10 : 1	4.8	2
S6	CM 5 : 1	2	0.3
S7	CM 1 : 1	0	0
S8	CM 3 : 7	0	0
S9	Methanol only	0	0
	HP column		
H30	30% MeOH	0	0
H70	70% MeOH	5	2.3
H100	100% MeOH	0	0
HA	Acetone elution	4	1.3
ME	균사추출 EtOAc	5	5
CE	Culture broth	5	4.5

한편, A80605 균배양체를 butanol로 추출하였을 경우 오이 자엽의 녹화를 오히려 촉진시키는 경향을 보였다. 한편, 오이 자엽을 이용하여 제조활성을 확인한 결과 보인 몇몇 시료의 추출과정은 특성을 보면, A90323 균주는 용매 분획에서는 활성을 거의 나타내지 않았다. 따라서 A90323 균주는 수용성 물질에 의한 활성을 보이는 것으로 간주되었다.

그리고 A80605 균배양체를 ethylacetate와 hexane으로 추출하여 오이 자엽에 대한 제조활성을 검정하였으며 특히, ethylacetate 층은 12ppm까지 활성을 보였으며 hexane층의 것은 133ppm까지 활성이 있어 전 실험 결과와 같은 경향을 보였다. 그러나 본 제조활성물질은 기기분석결과 기지의 cycloheximide 물질로 동정되었다. 이 물질은 본 균주를 비롯한 많은 방선균 균주에서 높은 빈도로 검출되었으며 1차 제조활성 스크리닝에서 본 물질을 배제할 수 있는 시스템 개발이 요구되었다.

다. 제조 활성

한편, 제조활성 균주로 기 선발된 *Streptomyces* sp. KA79 균주의 경우 1차 *in vivo* post-emergence 시험에서 명아주, 비름 등의 잡초에 제조활성을 강하게 나타냈으며 바랭이 등에 대하여는 pre-emergence 등에서 백화현상을 유발시켜 고사시키는 선택적이며 특이한 제조활성을 보였다. 특히, 쌍자엽 잡초보다는 단자엽 잡초에서 post-emergence보다는 pre-emergence에서 강한 활성을 나타내며 피, 바랭이에 대해서 0.25kg/ha 농도에서 완전히 고사시키거나 벼에는 무해하여 피와 벼에 강한 선택성을 나타내 제제화 가능성이 매우 높은 균주로 평가되었다. 표 15는 10여 개 잡초에 대한 pot 실험결과를 나타낸 것이다.

표 15. *Streptomyces* sp. KA79 화합물의 제초활성 (pre-emergence)

Cotyledon	Weed	Compound(kg/ha)				
		4	2	1	0.5	0.25
Monocotyledon	<i>Sorghum bicolor</i>	100*	90	80	70	45
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	100	100	100	90	90
	<i>Agropyron smithii</i>	65	50	40	0	0
	<i>Digitaria sanguinalis</i>	100	100	100	80	90
	<i>Panicum dichotomiflorum</i>	100	100	60	10	20
Dicotyledon	<i>Solanum nigrum</i>	90	50	50	0	0
	<i>Aeschynomene indica</i>	90	90	90	80	50
	<i>Abutilon avicennae</i>	50	40	60	20	0
	<i>Xanthium strumarium</i>	30	20	0	0	0
	<i>Calystegia japonica</i>	65	60	20	0	0

*Herbicidal activity was evaluated by the following score of mortality (0-100%) after 14 days (0: no activity, 10-30: slight activity, 40-60: moderate activity, 70-90: strong activity, 100: complete death).

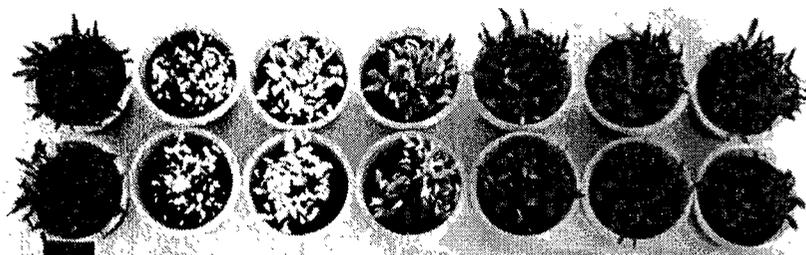


그림 15. 바랭이에 대한 *Streptomyces* sp. KA79의 제초활성 (왼쪽부터 대조구, 16mg, 4mg, 2mg, 1mg, 0.25mg, 0.12mg/포트 처리구임)

라. 구조결정

1) UV 스펙트럼

UV 스펙트럼은 시료를 MeOH에 녹여서 측정하였다. Silica gel TLC plate상에는 CHCl₃-MeOH(4:1, v/v)을 용매로 하였을 때는 Rf치 0.22, BuOH-MeOH-H₂O (4:1:1, v/v)를 용매로 하였을 때는 Rf치 0.70을 나타내었다. UV 스펙트럼의 특성은 그림 16에서와 같다. *Streptomyces* sp. KA79 균주 배양체로부터 분리정제된 제조활성물질의 특성을 조사한 결과 (표 16) 수용성 물질로서 물과 methanol에 잘 녹으나 ethylacetate, chloroform 및 benzene 등의 유기용매에는 잘 녹지 않았다. *Streptomyces* sp. KA79 균주가 생산하는 제조활성물질의 UV 흡수특성은 중성에서는 λ_{max}가 214,270,300 (s)nm이었고 산성에서도 shift가 일어나지 않았지만 알칼리성에는 250, 280 (S), 322nm를 나타냈다.

표 16. *Streptomyces* sp. KA79 화합물의 물리화학적 성상

Appearance	White powder
SI-MS (m/z)	517 (M+H) ⁺
UV λ _{max} (MeOH) nm	214 270 300 (s)
UV λ _{max} (MeOH-HCl) nm	214 270 300 (s)
UV λ _{max} (MeOH -NaOH) nm	250 280 (s) 322
Solubility	Soluble in H ₂ O, MeOH, insoluble in EtOAc, CHCl ₃ , Benzene
TLC (R _f) on silica gel	0.22 in CHCl ₃ -MeOH (4:1, v/v)

2) MS (SIMS) 스펙트럼

분자량을 조사하기 위해 selective ion mass spectroscopy (SIMS)를 보면 K^+ 이온을 혼합하여 조사한 spectrum상에서 $(M+K)^+$ ion peak가 555에서, Na^+ 을 혼합하여 조사한 spectrum상에서 $(M+Na)^+$ ion peak가 539에서 나타나 분자량이 516을 나타냈다. 한편 본 활성물질의 물리화학적 특징을 보면 본 물질은 흰색 파우더로서 메탄올용매에서 214, 270 및 300nm에서 최대 흡수량을 나타냈다 (그림 16).

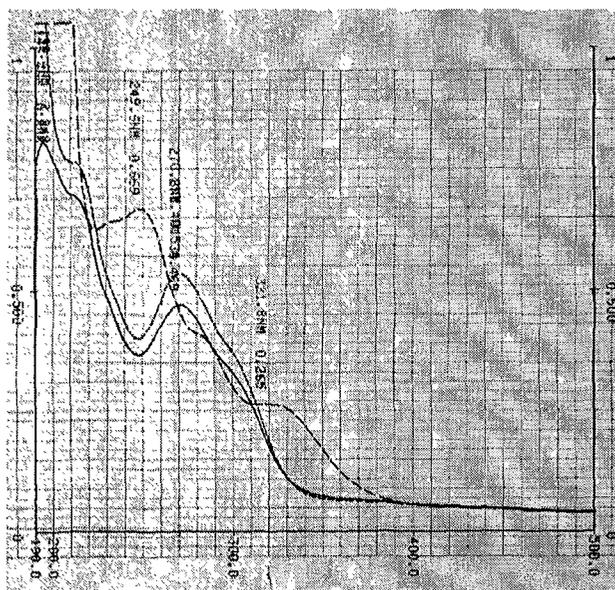


그림 16. UV spectrum of *Streptomyces* sp. KA79 compound in methanol

79A4 (GLY)
SAMPLE NO. : 171 SCAN NO. : 1x11 RT(MIN.): 0.0

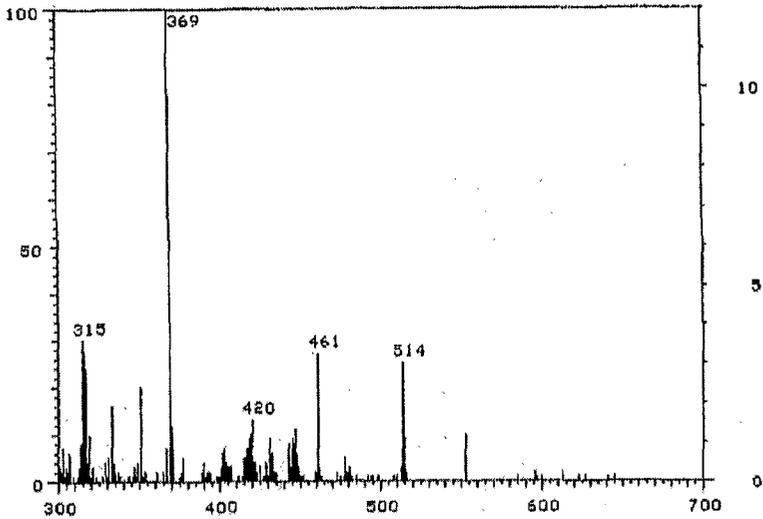


그림 17. *Streptomyces* sp. KA79 유래 화합물의 SIMS MS 스펙트럼

3) NMR (^1H -NMR) 스펙트럼

구조확인을 위하여 조사한 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 조사하였으며 standard로는 TMS를, 용매는 CD_3OD 를 사용하였다. 그림 18에서처럼 ^1H -NMR 스펙트럼을 보면 σ 3.51ppm에서 OCH_3 signal이 있지만 σ 2.12ppm에서 $2'\text{-CH}_3$ signal은 있으나 $5''\text{-CH}_3$ signal이 나타나지 않고 있다.

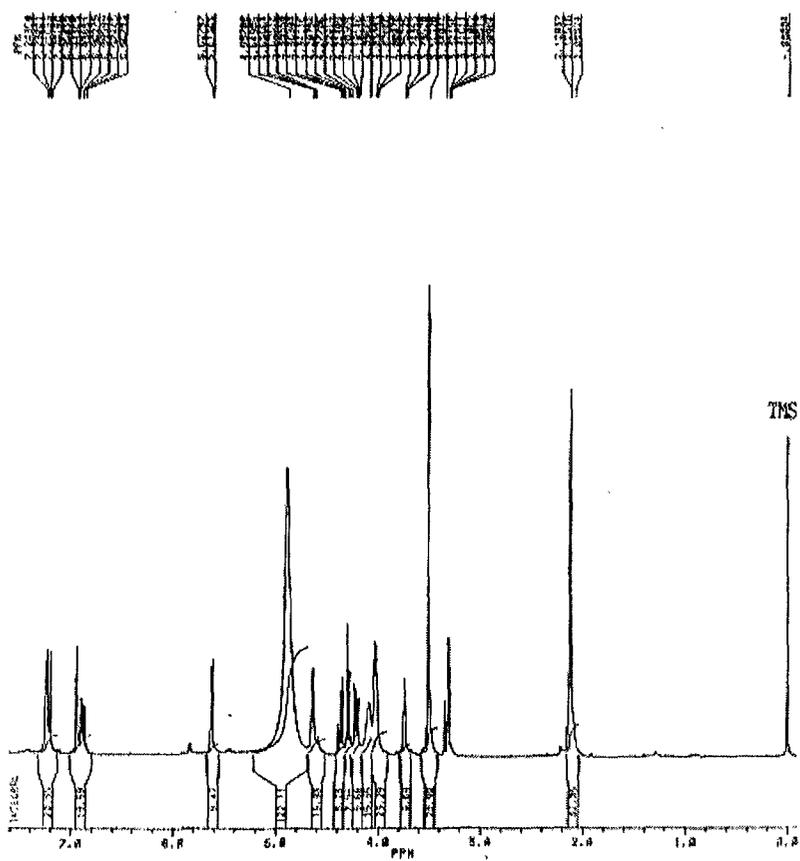


그림 18. *Streptomyces* sp. KA79화합물의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 (CD_3OD)

2. *Bipolaris* spp. 균주가 생산하는 제초활성 물질

본 연구는 벼 (*Oryza sativa*) 종자로부터 분리한 *Bipolaris sorokiniana* 균주의 배양체 추출물이 피 (*Echinochloa crus-galli*) 등의 잡초에 대하여 선택적 제초활성이 있음을 확인하고 본 균으로부터 식물 독소물질을 분리·정제하여 구조를 구명하였다. 이중 가장 강한 활성을 보이는 ethyl acetate 분획에서 2종의 화합물을 분리·정제하고 MS, UV, IR 및 NMR 등의 구조분석을 통하여 화합물의 구조를 구명하였다.

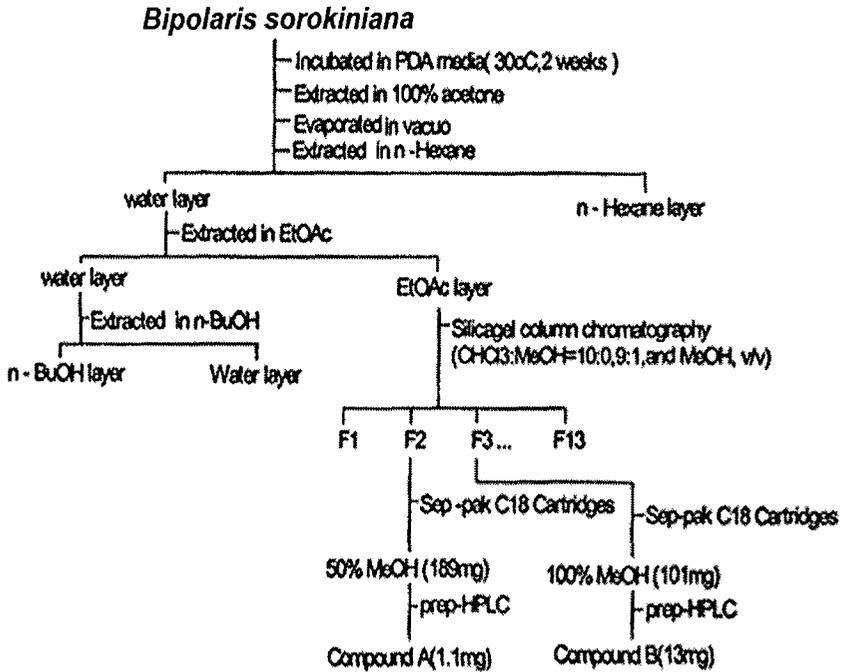


그림 20. *Bipolaris sorokiniana*로부터 제초활성 물질의 분리과정

가. *Bipolaris sorokiniana* 균주

1) 활성물질의 분리 및 정제

제조활성물질의 분리를 위한 절차는 그림 20에서와 같다.

2) 화학 구조 결정

① 화합물 I

EI-MS spectrum으로부터 본 화합물 I의 분자량은 152임을 알 수 있었다. ^1H NMR spectrum (600MHz, CDCl_3 , Table1)을 측정한 결과 7.62, 7.52, 7.32, 7.05ppm에서 각각 1H분의 aromatic doublet proton이 관찰되었고 결합상수로부터 이들 proton은 1,3-disubstituted benzene에 기인하는 것임을 알았다.

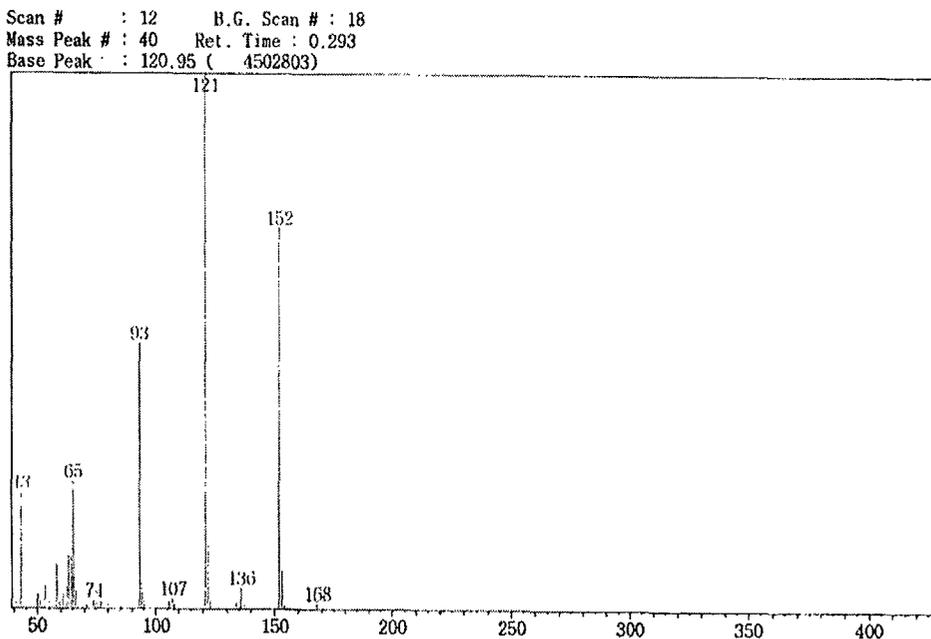


그림 21. *Bipolaris* compound I의 EI Mass 스펙트럼

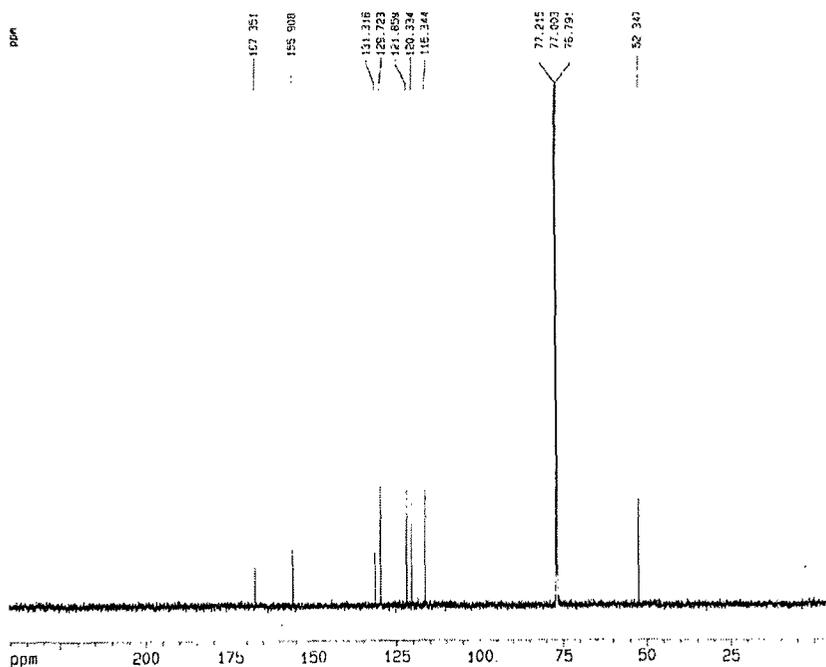
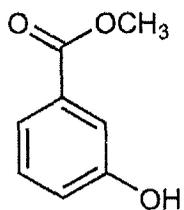


그림 23. *Bipolaris* compound 유래 활성물질 I의 ^{13}C -NMR 스펙트럼



3-hydroxy benzoic acid methyl ester

그림 24. *Bipolaris* compound I의 화학구조

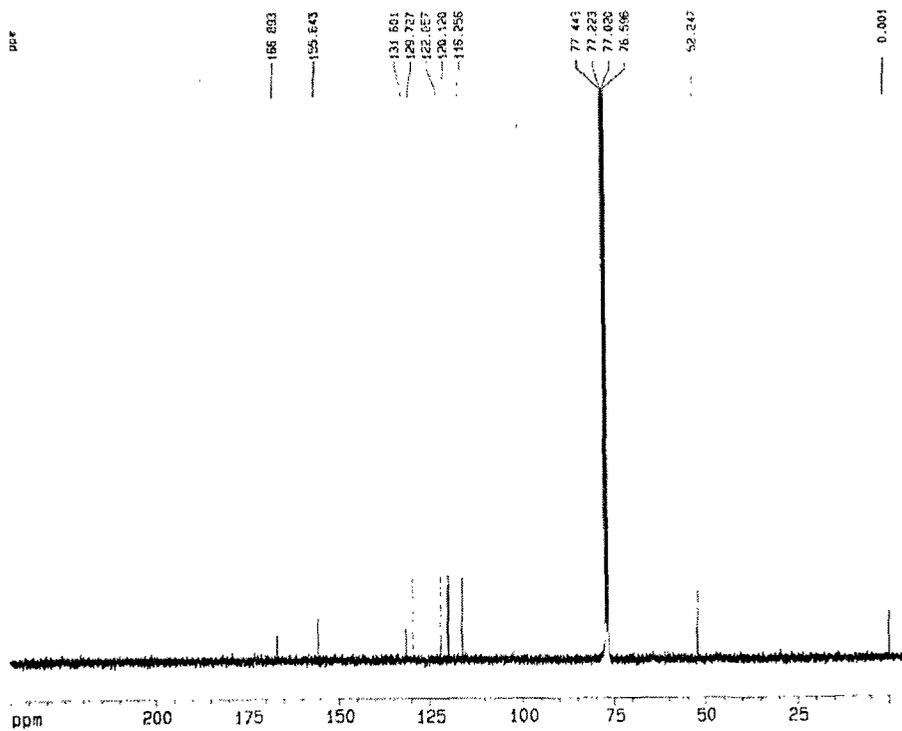
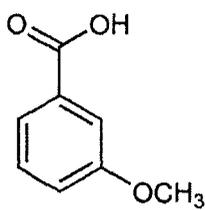


그림 26. *Bipolaris* compound II의 ^{13}C NMR 스펙트럼



3-methoxy benzoic acid

그림 27. *Bipolaris sorokiniana*로부터 제초활성물질 II의 분리

나. *Bipolaris zeicola* 균주

본 연구는 옥수수 (*Zea mays*) 종자에서 분리한 *Bipolaris zeicola*균의 배양액 추출물이 피에 대하여 높은 선택적 제초활성이 있음을 확인하고 활성 물질을 분리·정제하여 그 화학구조를 구명하였다.

1) 활성 물질의 분리 및 정제

활성검정 결과 EtOAc 층과 *n*-BuOH 층에서 강한 제초활성을 나타내었다. 높은 활성을 나타낸 EtOAc 분획을 이용하여 활성물질의 분리를 시도하였다. EtOAc (8.352g)을 silica gel (400g) column (4i.d.x45cm)에 packing 하였다. 그런 후 silica gel column chromatography (CHCl₃, CHCl₃ : MeOH=9:1-1:1, MeOH, v/v)를 실시하여 8개의 조분획 층 (F1-8)을 얻었다. 이들 중에서 활성이 높은 F-2 (0.565g)층을 Sep-pak silica gel cartridges (H₂O, MeOH, CHCl₃)를 이용하여 12개의 조분획 층 (F₂₋₁₋₁₂)을 분리하였다. 이 중에서 활성이 높은 F-2₁에서 Compound A (24.2mg), Compound B (28.8mg)를 분리하였다.

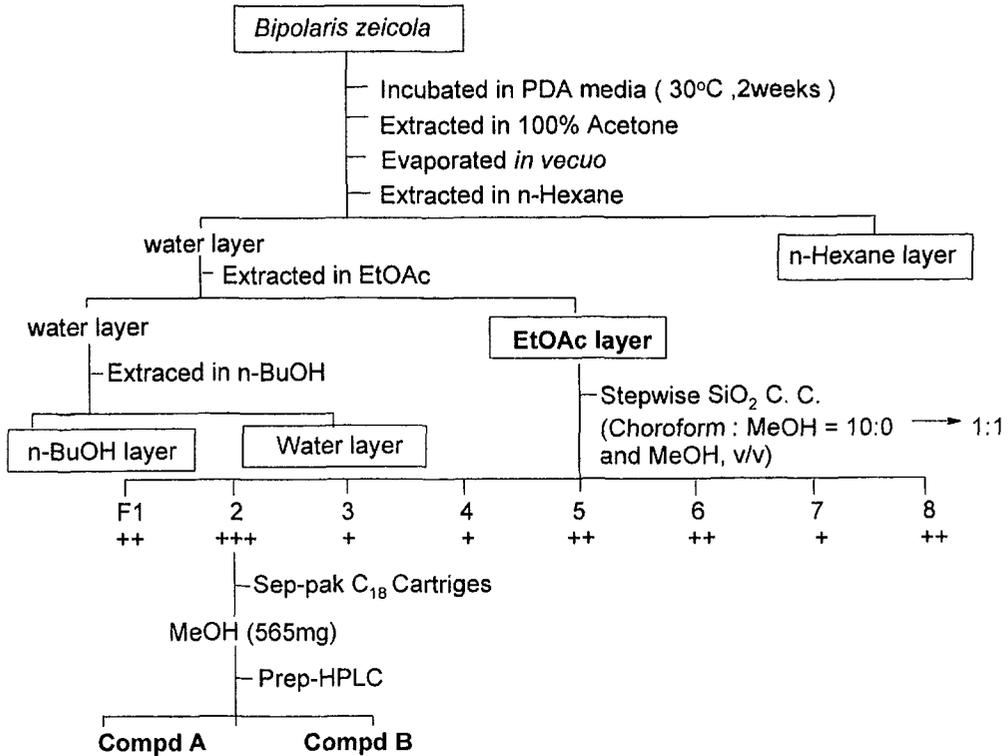


그림 27. *Bipolaris zeicola*로부터 신규 제초활성물질 A, B의 분리

2) 화학구조 결정

① 화합물 A

본 화합물들의 화학구조를 결정하기 위하여 EI-MS, ¹H, ¹³C-NMR 및 ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC를 포함한 2차원 NMR spectrum을 측정하였다. 이상의 spectrum을 종합적으로 해석한 결과 *Bipolaris cynodontis*에서 분리된바 있는 Cochlioquinone A 및 Cochlioquinol과 유사한 화학구조로 구명되었으며 화합물 B의 구조는 Cochlioquinone A의 7번 탄소의 ketone이 개열되어 -CH₂-CO-CH₃,

OCH₃기가 부가된 신규 화합물로 결정되었다.

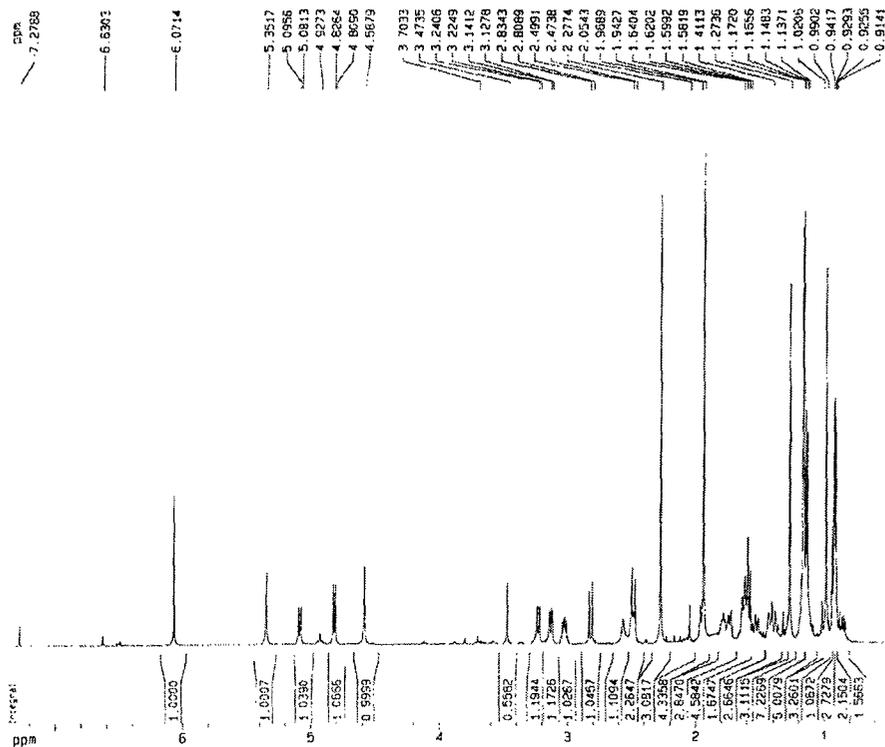


그림 28. *Bipolaris zeicola* 제초활성물질 A의 ¹H NMR 스펙트럼

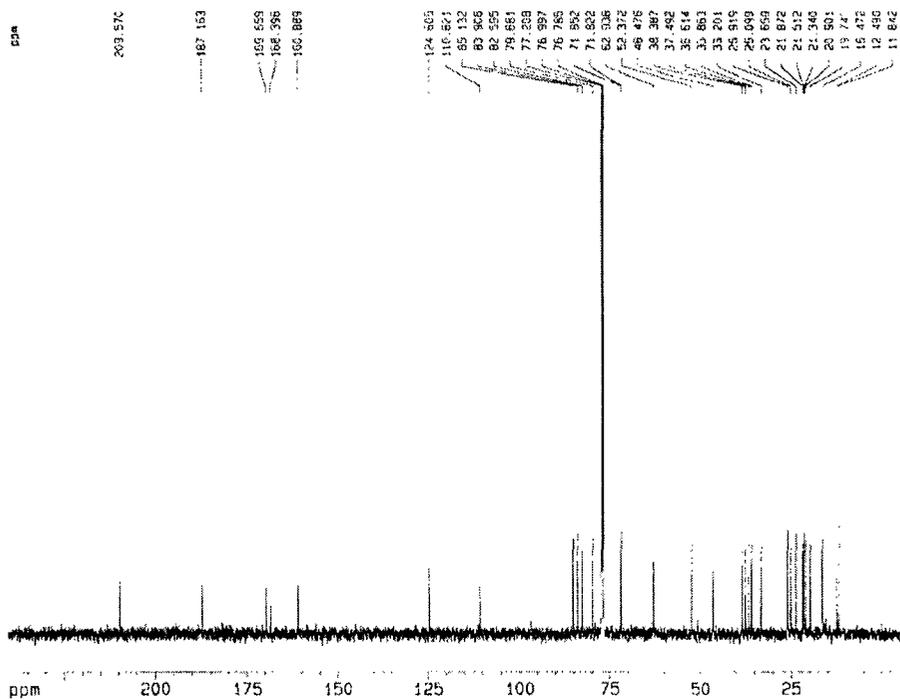


그림 29. *Bipolaris zeicola* 제조활성물질 A의 ^{13}C NMR 스펙트럼

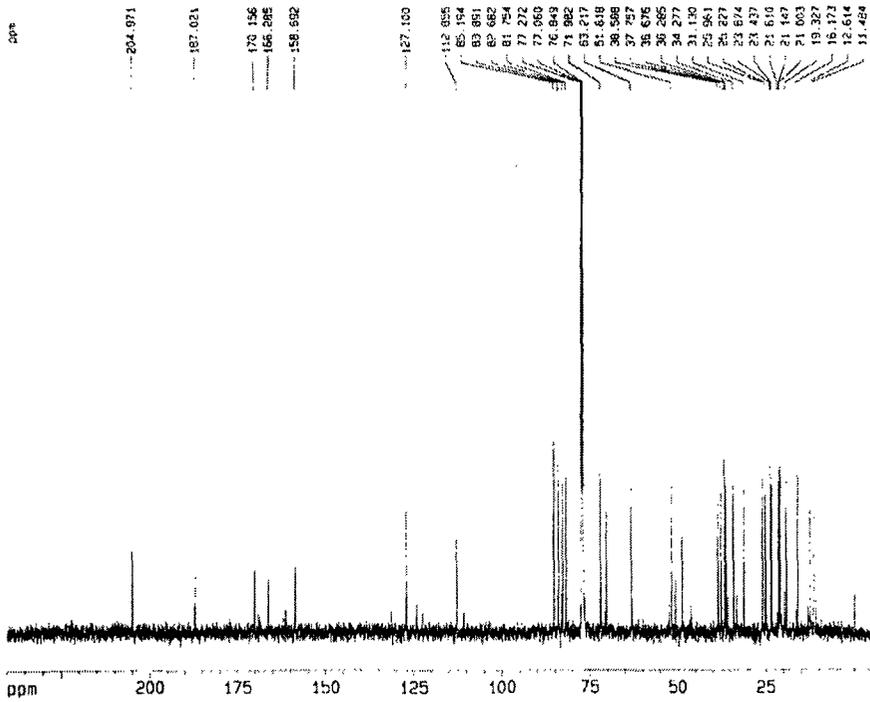


그림 29. *Bipolaris zeicola*로부터 신규제조활성 물질 B의 ^{13}C NMR 스펙트럼

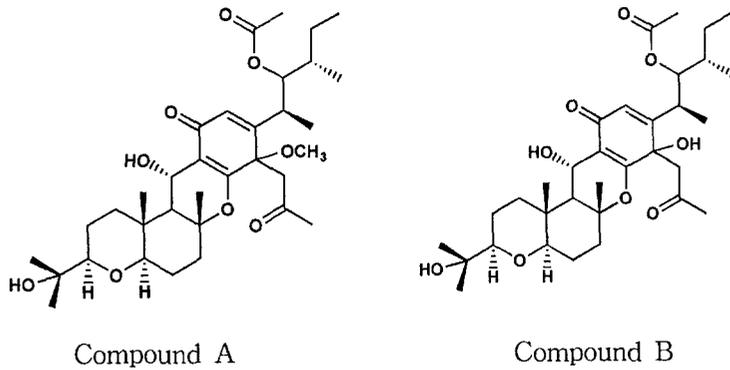


그림 30. *Bipolaris zeicola* 유래 신규 제조활성 물질 A, B의 화학 구조

제 4 장 종합 결론

여 백

제 4 장 종합 결론

본 연구는 선발된 제초활성을 지닌 곰팡이와 방선균류를 중심으로 미생물 자체를 생물제제 (biocontrol agent, BCA)로 이용하는 연구와 미생물로부터 유래한 제초활성물질을 이용하는 연구분야로 나누어 실시하였다.

최종 선발된 곰팡이 균주 *Penicillium oxalicum* F40362 및 *Myrothecium roridum* F000252의 미생물 제초제로서의 이용가능성을 검토한 결과 실용화 가능성이 매우 높은 것으로 판단되었다. 특히, *Penicillium oxalicum* F40362 균주의 경우 제초 활성의 안정성, 장기 보존, 포자농도와 제초활성과의 상관성 등과 관련한 균류의 제제화 연구를 통해 제제화 조건 등이 확립되었으며 최적 균사생장 및 포자생산을 위한 환경 (수분 및 온도) 연구, 환경 스트레스 등에 대한 적응력과 관련한 균류 생태 생리적 특성이 구명되었다. 한편, *Penicillium oxalicum* F40362 균주의 잡초 종합방제 시스템의 확립을 위한 Dicamba 등의 약제와의 병용 실험결과 농약에 대한 안정성 (생존율)이 매우 높게 나타났다. 상기 균주 등은 생물농약 등록기준에 근거한 활성균주의 동물에 대한 급성 및 아급성 독성시험 결과 전혀 독성에 의한 증상이 관찰되지 않았다.

한편, 미생물이 생산하는 대사산물을 이용한 연구에서 방선균 *Streptomyces* sp. KA79 균주로부터 신규 methoxyhygromycin 유도체가 분리되었으며 *Bipolaris sorokiniana* 균주로부터 3-hydroxy benzoic acid methyl ester 및 3-methoxy benzoic acid 물질이 처음 분리되었으며, *Bipolaris zeicola* 균주로부터 신규 cochlioquinone 유도체가 분리되었다. 이들 화합물질들은 물질 자체를 이용하는 것 뿐만 아니라 본 물질 생산 균주를 직접 생물제제로 이용하는 방안도 가능할 수 있을 것이다.

지금까지의 연구경험을 통해 볼 때, 미생물을 이용하는 생물제초제의 연구개발 수준은 아직 시작단계이나 앞으로 생물농약산업 분야에서 적극적으로 활용되어야 할 것으로 생각된다. 환경친화형 미생물제초제는 활성면에서는 기존의 유

기합성 농약의 제초활성에 비해 상당히 떨어지지만 앞으로 유기합성농약의 대안으로 그 수요를 늘릴 필요가 있으며 잡초의 종합방제 차원에서 다른 약제와의 혼용이나 균주 혼합제제 등의 방법이 제초활성 극대화를 위해 필요한 것으로 생각된다. 앞으로 생물제제의 지속적인 연구개발 및 포장에서의 적용과 이용을 위한 연구와 지원이 필요하다고 판단되었다.

이상의 본 연구의 구체적인 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 토양 및 식물시료 등에서 분리한 제초활성 균주는 *Bipolaris sorokiniana*, *B. zeicola*, *Penicillium oxalicum*, *Myrothecium roridum*, *Streptomyces* sp. 등으로 동정되었다.
2. 선발된 균주들의 제초활성을 보면 *Bipolaris* sp.는 피에 대하여, *Penicillium oxalicum* F40362 균주는 토끼풀에 대하여, *Myrothecium roridum*은 자귀풀, 물달개비, 까마중, 토끼풀 등에 대하여, 방선균 *Streptomyces* sp. KA79 균주는 바랭이에 대해 매우 높은 제초활성을 나타냈다.
3. *In vivo* 실험에서 광역 제초활성이 확인된 *Penicillium oxalicum* F40362의 크로버에 대한 약효를 경엽처리 및 토양처리로 나누어 실시한 결과 토양처리에 비하여 경엽처리가 제초효과가 더 높았으나 Dicamba약제를 경엽처리할 경우 98.3%에 비하여 60-70%의 제초효과를 나타내었는데 이러한 제초효과는 보통의 미생물 제초제의 활성범위에 해당되는 것으로 판단되며 차후 제초제 혼용 시험 및 미생물 혼합제제 기술 (mixed organism 이용기술)과 같은 방법 등을 적용한다면 매우 높은 제초효과를 거둘 수 있을 것으로 사료되며 제제화 연구를 통하여 실용화 가능성이 있음이 확인되었다.

4. 미생물제조제로서의 활용 가능성을 검토하기 제제별 제조활성을 조사한 결과 wheat bran-corn starch 제제에서 약 10^8 spores/g농도에서 90%의 이상의 높은 제조활성을 보였다. 장기 보관된 제제들을 온실에서 pot 실험한 결과 wheat bran-corn starch와 perlite 제제에서 제조활성이 90% 이상으로 우수하게 나타났다.

5. *Penicillium oxalicum* 균주와 과란들 제조제와의 혼용시험결과 과란들 기준량 (7.5g/20L), 배량 (15g/20L) 및 대조구 (무처리구)에서의 재검출 CFU를 측정 한 결과 각각 8.3×10^7 , 8.98×10^7 및 8.8×10^7 의 CFU를 나타내 화학약제 처리농도범위에서 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

6. *Penicillium oxalicum* 균주의 균사생장에 대한 수분활성, solute 및 온도효과 등을 조사한 결과 glycerol과 설탕을 기질로 사용하였을 때 0.98 a_w , 고온 (30°C) 조건 하에서 균사생장이 제일 좋았으나, KCl을 기질로 사용하였을 때는 25-30°C 조건 하에서 0.98 a_w 과 0.995 a_w 조건간에 비슷하였다. 배지조성을 glucose를 기질로 사용하였을 경우 낮은 수분활성조건인 0.94 a_w 에서 다른 기질을 사용하였을 때 보다 수분 stress조건에서도 높은 저항성을 갖는 것으로 나타났으며, KCl을 기질로 사용할 경우 0.98 a_w 및 0.995 a_w 에서 매우 높은 균사 성장율을 나타냈으며, 제제화를 위한 대량 포자형성 유도시 어느 정도의 수분 stress가 요구되었다.

7. 위탁과제로 의뢰한 미생물제제의 시험물질 *P. oxalicum* F40362, *M. roridum* F000252 균주 등을 비롯한 본 연구과제를 통하여 선발된 30여 제조활성 우수 균주에 대한 급성 경구독성을 조사하기 위하여 마우스, 랫트, 백색토끼를 이용하여, 농촌진흥청 고시 '독성시험의 기준과 방법'에 준하여 독성을 평가한 결과 시험물질에 기인한 일반 임상증상은 관찰할 수 없었으며, 체중에 미치는 유의성 있는 변화도 없었다.

8. *Streptomyces* sp. KA79 균주로부터 분리정제된 제조활성물질의 배양이 잡초 종에 대한 활성을 보면, 처리 초기에는 어느 정도의 발아억제 또는 잎의 백화현상이 관찰되며 시료처리 약 2-3 주일 내 배양이 초종이 고사되었으며, 쌍자엽 식물인 자귀풀에 대하여는 배양이 초종에 비하여 약간 낮은 제조활성을 나타냈다. 특히, 본 균주의 경우 피와 배양이에 대하여 선택성을 나타내 잡초방제시 균주를 직접 이용하거나 활성 대사산물이 함유된 배양체 자체를 이용할 수도 있을 것으로 사료되었다.
9. *Streptomyces* sp. KA79 균주의 최적 생육조건을 조사한 결과 균의 생육은 배양 1일째부터 크게 증가하기 시작하여 3-4일경에 최고에 달하였으며 제조활성 물질의 생산은 배양 3일경부터 크게 증가하여 4일경에 최고에 달하였다.
10. *Streptomyces* sp. KA79의 활성물질은 본 물질의 UV λ_{max} 는 중성과 산성에서는 214, 270, 305(S)nm, 알칼리성에서는 250, 283(S), 322nm에서 최대 흡수 peak를 나타냈으며, MS (SIMS) 스펙트럼 분석결과, 555 (M+K⁺), 539 (M+Na⁺)의 피크가 관찰되어 분자량은 516으로 추정되었다. 또한 ¹H-NMR 분석결과 본 물질은 carbon 23개, proton 32-34개, oxygen 12개, nitrogen 1개로 구성된 물질로 추정되었고, ¹³CNMR 스펙트럼분석을 통해 화학구조가 methoxyhygromycin 유도체의 신물질인 것으로 판단되었다.
11. *Bipolaris sorokiniana*로부터 화합물 I, II가 최초로 분리되었으며 EI-MS 스펙트럼, ¹H NMR, ¹³C-NMR spectrum을 조사한 결과 화합물 I, II의 분자량이 같은 3-hydroxybenzoic acid methyl ester 및 3-methoxybenzoic acid로 각각 결정되었다.

12. *Bipolaris zeicola* 균주로부터 화합물 A, B가 분리되었으며 본 화합물들의 화학구조를 결정하기 위하여 EI-MS, ^1H , ^{13}C -NMR 및 ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC를 포함한 2차원 NMR spectrum을 측정한 결과 *Bipolaris cynodontis*에서 분리되는 Cochlioquinone A 및 Cochlioquinol과 유사한 구조의 신규 화합물로 추정되었다.

여 백

제 5 장 참 고 문 헌

여 백

제 5 장 참고문헌

1. Agrios, G. N. 1997. Preparing for isolation. *Plant Pathology* (4th ed.), pp. 255-258.
2. Bruton, B. D. 1982. *Myrothecium roridum*, a probable devastating pathogen of muskmelon in south Texas. *Phytopath.* 72: 355.
3. Charudattan, R. 1985. The use of natural and genetically altered strains of pathogens for weed control. In: *Biological Control in Agricultural IPM*.
4. Charudattan, R. 1999. Current status of biological control of weeds. In: *Proceedings International Conference on Emerging Technologies in IPM*, St Paul, MN, USA.
5. Charudattan, R., and Walker, H. L. 1982. Biological control of weeds with plant pathogen. John Willey & Sons, Inc., New York, 293pp
6. Chase, A. R. & Poole, R. T. 1984. Development of *Myrothecium* leaf spot of *Diefenbachia maculata* perfection at various temperatures. *Plant Disease* 68: 488-490
7. Cullen, J. M. 1996. Integrated control and management. In: *Proceedings IXth International Symposium on the Biological Control of Weeds*, Stellenbosch, South Africa, 483-486.
8. Cutler, H. G. 1988. Perspectives on discovery of microbial phytotoxins with herbicidal activity. *Weed Technol.* 2: 525-532.
9. Domsch, K. H. & Gams, W. 1980. Compendium of soil fungi. I: 483-484.
10. Drake, G. N. 1980. Effect of *Myrothecium roridum* on the germination of cotton seeds. *Indian Phytopath.* 33: 591-593.

11. Ellis, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. pp. 552-556. CMI, KEW, England.
12. Gressel, J. & Amsellem, Z., Warshawsky, A., Kampel, V. & Michaeli, D. 1996. Biocontrol of weeds: overcoming evolution for efficacy. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 31: 399-404.
13. Harper, S. H. & Lynch, J. M. 1981. Effects of fungi on barley seed germination. *J. Gen. Microbiol.* 122: 55-60.
14. Kenfield, D., Bunkers, G., Strobel, G. A. and Sugarwara, F. 1988. Potential of new herbicides-phytotoxins from plant pathogens. *Weed Technol.* 2: 519-524.
15. Kim, P. -K., Park, D. -J. Choi, S. -Y. and Kim, C. -J. 1996. Screening of *Penicillium* sp. showing herbicidal activity on *Trifolium repens* L. *Agric. Chem. and Biotech.* 39: 455-459.
16. Kim, P.-K., Park, D. -J., Choi, J. -S., Hwang, I. T. Hong, K. S. , and Kim, C. -J. 1997. Biological control of clover by *Penicillium* sp. *Agric. Chem. and Biotech.* 40: 65-70.
17. Kroschel, J. Muller-Stover, D., Elzein, A. & Sauerborn, J. 1999. The development of mycoherbicides for the management of parasitic weeds of the genus *Striga* and *Orobanche*-a review and recent results. In: *Proceedings Xth International Symposium on Biological Control of Weeds*, Bozeman, Montana, USA.
18. Kuti, J. O., NG, T. J. & Bean, G. A. 1989. Possible involvement of a pathogen-produced trichothecene metabolite in *Myrothecium* leaf spot of muskmelon. *Physiol. & Mol. Plant Pathol.* 34: 41-54.
19. Muller-Scharer H., Scheepens, P. C. & Greaves, M. P. 2000. Biological

- control of weeds in European crops: recent achievements and future work. *Weed Research* 40: 83-98.
20. Okuda, S. 1992. Herbicide. In: The search for bioactive compounds from microorganisms ed. by S. Omura, pp. 224-236. Springer-Verlag, New York.
 21. Preston, N. G. 1961. Observations on the genus *Myrothecium*, III The cylindrical-spored species of *Myrothecium* known in Britain. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 44: 31-41.
 22. Strobel, G. A., Kenfield, D., Bunkers, G., Sugawara, F. & Clardy, J. 1991. Phytotoxins as potential herbicides. *Experientia* 47: 819-826.
 23. Sugawara, F. 1989. Plant pathogens and microbial products for weed control. *Nippon Nogorikagaku Kaishi* 63 (10): 1625-1629.
 24. Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa and Takematsu, T., 1986. Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *J. Pesticide Sci.* 11: 33-37.
 25. Te Beest, D. O., Yang, X. B. and Smith, R. 1992. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 637-657.
 26. Templeton, G. E. and Heiny, D. K. 1990. Mycoherbicides In: *New directions in Biological control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*, pp. 279-286. Alan R. Liss, Inc.
 27. Tinney, G. W., Theuring C., Paul, N. D. & Hartmann, T. 1998. Effects of rust interaction with *Puccinia lagenophorae* on pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris*. *Phytochemistry* 49: 1589-1592.
 28. UNCFD. 1992. Promoting sustainable agriculture and rural development:

- integrated pest management and control in Agriculture. In: *Proceedings United Nations Conference on Environment and Development*, Rio de Janeiro, Brazil.
29. Vurro, M., Zonno, M. V., Evidente, A., Andolfi, A. & Montemurro, P. 2001. Enhancement of efficacy of *Ascochyta caulina* to control *Chenopodium album* by use of phytotoxins and reduced rates of herbicides. *Biological Control* 21: 182-190.
 30. Vurro, M & Ellis, B. E. 1997. Effect of fungal toxins on induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in elicited cultures of hybrid poplar. *Plant Sci.* 126: 29-38.
 31. Yang, S.-M. & Brenner, D. 1997. Virulence and host range of three species of *Myrothecium* on *Amaranthus* spp. ARS USDA, TEKTRAN.
 32. Yang S-M & Schaad, N. W. 1996. Combined non-or low-virulent pathogens and special formulated carries as broad-spectrum bioherbicides. In: *Proceedings IXth International Symposium on Biological Control of Weeds*, Stellenbosch, South Africa, 482.
 33. 김창진. 1998. 미생물제초제. Pp. 433-453. 산업과 미생물. 도서출판 한림원.
 34. 유익동, 김창진, 김신덕. 1987. 미생물 대사산물을 이용한 제초제 개발현황과 전망. *농약과 식물보호*, 8 (6): 17-27.
 35. 유익동, 김창진, 김신덕. 1988. 미생물 대사산물을 이용한 신규 제초활성물질의 screening. *농약과 식물보호*, 9 (2): 39-47.
 36. 유익동, 김신덕, 김창진외. 1988. 방선균에 의한 식물생육조절물질 (I,II,III,IV,V), 과학기술처 연구보고서. N702 2 (2)-67-3 (1988)
 37. 정영륜. 1995. 식물병원진균을 이용한 잡초의 생물학적 방제. *식물균병학연구*. 355-372. 한림원.

본 연구와 관련 발표한 논문 및 특허

1. 논문발표

- 1) H. B. Lee, S. H. Yu, N. Magan and C. -J. Kim. 2001. Bioherbicidal potential of *Myrothecium roridum* for control of weeds in Korea. *Mycological Research* (accepted).
- 2) H. B. Lee, N. Magan and C. -J. Kim. 2001. Effect of environmental factors on growth, germination, sporulation and patterns of carbon source utilization in the bioherbicidal fungus *Penicillium oxalicum*. *Biological Control* (accepted).
- 3) H. B. Lee and C. J. Kim. 2001. A bleaching herbicidal activity by an Actinomycete strain KA79. *J. Microbiology and Biotechnology* (in preparation).
- 4) 이향범, 김창진. 2000. 토끼풀 (*Trifolium repens*) 방제용 생물제제 (Biocontrol agent), *Penicillium oxalicum* (PENOX)의 생장, 발아, 포자생성 및 탄소원 이용에 미치는 수분활성 및 온도의 영향. *농약과학회지*. 43 (6): 68-73.
- 5) 이향범, 김창진. 2000. 미생물제초제의 개발현황과 전망. *농약과학* 4: 5-9.

2. 학술발표

- 1) H. B. Lee and C. -J. Kim. 2001. 잡초방제를 위한 미로쉴시움 로리둠의 이용 (한국균학회 한중 국제학술심포지움 발표 예정 (제주대학교, 2001. 11. 1. 4).
- 2) H. B. Lee, S. H. Yu, N. Magan and C. -J. Kim. 2001. Bioherbicidal potential of *Myrothecium roridum* for control of weeds in Korea. *영국균*

- 학회 (BMS) 국제심포지움 (영국 Wales 대학, 2001. 04. 22-27).
- 3) 김진우, 임치환, 이항범, 김창진. 2001. 식물병원균 *Bipolaris sorokiniana*로부터 식물독소의 분리 및 구조결정 (한국농화학회 춘계학술대회, 2001. 05. 17-18).
 - 4) 이명호, 임치환, 이항범, 김창진. 2001. 식물병원균 *Bipolaris zeicola*로부터 제조활성 물질의 분리 및 구조결정 (한국농화학회 춘계학술대회, 2001. 05. 17-18).
 - 5) H. B. Lee, S H. Yu and C. -J. Kim. 2000. Effect of environmental factors on growth, germination, sporulation and carbon source availability in a bioherbicidal fungus *Penicillium oxalicum* isolated from clover. *Abstracts of Presentations of 2000 Spring Meeting of Korean Society of Plant Pathology*. p. 173.
 - 6) H. B. Lee, J. S. Kim, K. S. Hong, K. Y. Cho and C. -J. Kim. 2000. *In vivo* screening of biocontrol agents showing bioherbicidal activity against large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). *Abstracts of Presentations of 2000 Spring Meeting of Korean Society of Plant Pathology*. p. 179.
 - 7) 이항범, 권오성, 전은수, 박동진, 박상호, 김창진. 2000. Solute effects on growth and conidiation in a bioherbicidal fungus *Penicillium oxalicum* isolated from clover. 농약과학회 춘계학술대회 (충무, 2000. 04. 06-07).
 - 8) H. B. Lee, D. J. Park, S. H. Park, E. S. Jeon and C. -J. Kim. 1999. Influence of Environmental factors on a bioherbicidal agent, *Penicillium oxalicum* F40362. 농약과학회 추계학술대회 (홍천, 1999. 10. 08-09).

3. 특허

- 1) 신균주 페니실리움 속 F40362와 이를 이용한 미생물 제초제 (특허등록 제 16630호 1999년).
- 2) 신균주 미로세시움 로리둠 (*Myrothecium roridum* Tode ex Fries) KF000252 (KCTC 0980BP) 및 이의 용도 (특허출원 2001년 05월).

- 3) *Aspergillus niger* 배양추출물을 이용한 잡초방제 (준비중).
- 4) Solute의 조절을 통한 곰팡이의 sporulation 유도 (준비중).

4. 기타

- 1) 이향범, 김창진. 2000. 미생물을 이용한 미생물제초제 (bioherbicide)의 개발
생물농약연구회 (동부한농, 2000년 3월 16일)