

GOVP1200201096

632.954
L 2932

최 종
연구보고서

19

잡초류의 작용점에 특이적인 미생물 탐색을
통한 새로운 미생물 제초제의 개발
Development of Mechanism-Based New
Herbicides from Microorganisms

연구 기관
(주)그린바이오텍

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “잡초류의 작용점에 특이적인 미생물 탐색을 통한 새로운 미생물 제초제의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 일

주관연구기관명 : (주)그린바이오텍

주관연구책임자 : 최 기 현

책 임 연 구 원 : 최 성 원, 정 도 현

연 구 원 : 이 향 복, 김 지 태

신 택 수, 양 재 성

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

협동연구책임자 : 김 성 옥

연 구 원 : 황 의 일, 박 병 근

강 태 훈, 김 나 래

임 남 희

요 약 문

I. 제 목

잡초류의 작용점에 특이적인 미생물 탐색을 통한 새로운 미생물 제초제의 개발에 관한 연구.

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1950년대에 화학합성에 의한 제초제가 개발되어 노동 시간을 단축시키고 유용 작물의 생산성 증대에 많은 공헌을 해 왔으며, 현재 이용되고 있는 제초제의 대부분은 합성화합물이 주종을 이루고 있다. 화학합성 제초제의 반복적인 사용으로 인해 이들 약제에 대한 잡초의 저항성이 증대되어 새로운 제초제의 개발이 지속적으로 요구되고 있으나, 한편 환경오염으로 인해 그의 사용이 점차 제한되어질 전망이다.

이제까지 개발된 제초제들은 작용기작에 따라 ① 광합성전자전달 저해제 ② 광합성화에 필요한 diphenyl ether 형태의 제초제 ③ 식물 호르몬작용에 영향을 미치는 제초제 ④ 영양학적인 대사를 저해하는 제초제 ⑤ 세포분열을 저해하는 제초제 ⑥ 미생물 제초제 등으로 분류할 수 있으며, 최근에는 주로 작용기작을 이용하여 잡초에는 강력한 저해활성을 나타내면서도 독성이 적고 선택성이 있으며, 또한 환경오염을 유발하지 않는 제초제를 탐색하려는 시도가 이루어지고 있다.

환경오염을 유발하는 화학합성 제초제와는 달리, 미생물 또는 미생물이 생산하는 대사산물을 이용하는 미생물 제초제는 이용하는 미생물의 종류나 대사산물의 종류 및 구조가 다양하여 새로운 구조를 갖고 있는 선도물질탐색에 매우 유용하며, 특히 쉽게 분해되어 환경오염을 일으키지 않는다는 장점이 있어, 앞으로 화학합성제초제를 대체할 가능성이 많아서 미생물 제초제의 연구분야가 활성화될 것으로

사료된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 잡초류의 작용점에 특이적인 미생물 탐색을 통한 새로운 미생물 제초제의 개발로 내용은 다음과 같다.

- 1) 토양으로부터 유용 미생물의 분리 및 보존
- 2) 잡초류의 작용점을 이용한 제초활성 물질의 탐색체계 확립 .
- 3) 제초활성 물질을 생산하는 미생물의 탐색 및 *in vivo* 활성검정에 의한 미생물의 선발
- 4) 선발된 미생물의 균주 동정 및 제초활성 물질의 분리정제와 구조결정
- 5) 분리된 제초활성물질의 *in vitro* 및 *in vivo* 활성검정
- 6) 선발된 균주의 최적배양 조건확립 및 산업화를 위한 대량배양 조건확립
- 7) 선발된 균주를 이용한 미생물 제초제의 제형화 연구

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구과제의 결과는 다음과 같다.

1. 잡초류의 작용점을 이용한 제초활성 물질을 생산하는 미생물의 선발

토양으로부터 분리한 1,700여종의 미생물 배양액을 대상으로 한 잡초류(돌피)의 생합성 경로(glutamine 합성 및 cellulose 합성)를 저해하거나 이들 종자의 발아를 억제하는 기능을 이용한 미생물 제초제 탐색을 통하여 선발된 미생물 중, *in vitro* 및 *in vivo* 활성의 재현성을 보이면서 우수한 제초활성이 지속적으로 유지되는 방선균 A6497을 최종 선발하였다. 선발된 A6497 균주는 cellulose를 함유하고 있는 *Phytophthora parasitica* 균주에만 특

이적으로 우수한 항균활성을 나타내었으며, 또한 도꼬마리, 까마중, 자귀풀, 어저귀, 매꽃 등의 잡초에 대한 *in vivo* 제초활성이 우수하였다.

2. 제초활성 물질을 생산하는 균주의 동정

잡초류의 작용점을 이용한 미생물 제초제의 탐색을 통하여 선발된 미생물을 대상으로 하여 배양학적 특징과 생리·생화학적 특징 및 형태학적 특징을 조사하였다. 또한 균체 지방산 분석 및 세포벽 분석, 균체당 분석을 통하여, 최종 선발된 A6497은 *Streptomyces* 속으로 동정되었으며 이 균주를 *Streptomyces* sp. A6497 이라 명명하였다.

3. 제초활성 물질의 분리정제와 구조결정

선발된 *Streptomyces* sp. A6497의 배양액에 동량의 ethyl acetate를 첨가하여 2회 추출한 후 유기용매 층을 silica, ODS, Sephadex LH-20 column chromatography를 통하여 제초활성물질을 분리정제하였다. 활성검정은 cellulose를 함유하고 있다고 알려진 *P. parasitica* 균주를 이용하여 저해활성의 유무를 검정하였다.

화합물의 기기분석은 NMR spectrometer와 HREI-MS spectrometer를 이용하여 구조분석하였다. ESI-mass, ^1H NMR, ^{13}C NMR 및 DEPT 등을 비롯한 NMR spectrum 결과 이 화합물은 분자량 309이고, 분자식이 $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_5$ 인 nucleoside 계열의 화합물인 sangivamycin으로 동정되었다.

4. *Streptomyces* sp. A6497로부터 분리한 sangivamycin의 *in vitro* 및 *in vivo* 제초활성 검정

선발된 미생물로부터 분리한 sangivamycin은 세포벽 구성성분으로 cellulose를 함유하고 있는 *P. parasitica* 균주에 대해 선

택적으로 매우 강한 항균력 (MIC:3.125 μ g/ml)을 나타내었으며, 오이자엽을 이용한 bleaching 검정 시 처리구에서 조직이 먼저 물러진 다음 엽록소 탈색이 일어났다. 또한 greening 검정 시 대조약제인 oxyfluoren 보다 약간 강한 제초활성을 나타내었다.

한편 sangivamycin을 온실 내에서 수 종의 잡초를 대상으로 처리하였을때 경엽의 necrosis와 burning effect 등의 증상을 유발하기도 하고 고농도에서는 생육저해 현상을 나타내기도 하였으나 도꼬마리, 까마중, 자귀풀, 메꽃 등의 잡초에 강한 활성을 나타냈다. 이 화합물은 630g/ha에서 거의 모든 초종을 고사시켰으며, 200g/ha 이하에서는 활성이 낮아지는 경향을 나타내었다.

5. *Streptomyces* sp. A6497의 최적배양 및 대량배양 조건 확립

In vitro 및 *in vivo* 에서 강한 제초활성을 나타내는 *Streptomyces* sp. A6497 균주에 대한 발효조건을 검토하기 위하여 탄소원과 질소원 및 무기염류와 복합 혼합물의 영향을 검토하고 Plackett-Burman design(PBD)과 Box-Behnken experimental design(BBD)으로 통계처리하여 최적배지 및 각 조성의 최적점을 얻었다. 각각의 효과는 *P. parasitica* 균주에 대한 선택적인 항균활성으로 확인하였으며, 그 결과 최적배지를 2% glucose, 1.5% soluble starch, 0.4% pharma media, 1% yeast extract, 0.5% soybean meal, 0.4% CaCO₃, 0.3% K₂HPO₄로 결정하였다.

Sangivamycin은 5L jar fermenter를 이용한 부분적 연속 배양으로 pH 7.8, 28 $^{\circ}$ C에서 96시간 배양시 최대의 활성을 나타내어, 선별된 최적배지를 이용하여 2% seed, pH 7.8, aeration(초기) 300rpm, 1vvm, D.O. 40% control, 28 $^{\circ}$ C, 96시간을 최적배양 조건으로 결정하였다.

대량 발효 시 Reynolds number(Re#)를 이용한 rheological equilibrium 식으로 scale up factor 값을 유출할 수 있었다. 그러나 실제 5L jar fermenter와 tank fermenter 간의 내압의 유무와 구조적인 차이로 인한 Reynolds number를 이용한 factor의 계산상의 차이는 실제 측정된 D.O. 값으로 보정하여 scale up

factor 및 배양조건을 얻었다. 그 결과 500L까지 대규모화가 가능하였다.

6. *Streptomyces* sp. 46497의 제형화 연구

미생물 제초제의 제형화를 위해 여러종류의 증량제로부터 항균활성이 안정적으로 유지되는 celite, dextrin의 증량제를 선별하고, 이를 이용한 제형화시 분무건조 조건을 확립하기위한 열안정성 검정한 결과, 100℃까지 활성이 유지되었다.

또한 제초활성물질을 이용한 미생물 제초제의 산업적 이용 및 보관이 용이하도록 다양한 형태로 제형화하여 보존성을 검토한 결과 분무건조 방식을 이용한 분제 형태가 활성 유지에 가장 우수하여, 선별된 증량제 celite 5%(W/V), dextrin 5%(W/V)를 첨가한 후 inlet 120℃, outlet 85℃, 6L/hr(feeding rate) 조건으로 분무건조하여 분제 형태의 수화제로 제형화하였다.

여 백

SUMMARY

I. Subject

Development of mechanism-based new herbicides from microorganisms.

II. Objectives and Significance

Herbicides are important management tools in agriculture. The current trend in multiple crop rotations and conservation tillage practice allows to bring on increase of using variable herbicides for effective weed control. In addition, herbicides today are required to have both potent activity and safety to animals, humans and ecosystems.

Microbial metabolites attract attention as potential herbicides, because they are biodegradable, cause less pollution, and are diverse in structure and bioactivity. Recent research has led to development of new microbial herbicides and its functional mechanisms.

This work is initiated to isolate novel compounds having herbicidal activity from microbial secondary metabolite by the inhibition of seed germination and cellulose biosynthesis of weed.

III. Scope of the study

The research was performed with the scope as below:

1. Isolation and maintenance of microorganisms from various soil samples.
2. Mechanism-based screening of microorganisms producing

herbicidal activity.

3. Identification of the microorganism having herbicidal activity.
4. Purification and structure determination of the compound from *Streptomyces* sp. A6497.
5. *In vitro* and *in vivo* herbicidal activities of the compound isolated from *Streptomyces* sp. A6497.
6. Optimization of culture conditions for *Streptomyces* sp. A6497
7. Scale up of the fermentation process.
8. Formulation of the microbial herbicide.

IV. Results and prospects for application

1. Mechanism-based screening of herbicides from soil microorganisms

In order to search and develop novel herbicide from microorganisms, 1,700 strains isolated from soils were examined for the inhibitory activity on seed-germination and the biosynthesis of glutamine and cellulose.

One candidate which shows preferential inhibitory activity against cellulose containing *Phytophthora parasitica* and several weeds was finally selected, and the purification of bioactive compounds using filtrate of microorganisms was performed.

2. Identification of the isolated strain A6497.

Through the cultural, morphological, physiological characteristics and chemotaxonomy, it was found that this strain contained LL-diaminopimelic acid, long chain spore

connected as *retinaculum-flexibilis*. From these results, this strain was identified as the genus *Streptomyces* and designated as *Streptomyces* sp. A6497.

3. Purification and structure determination of bioactive compound from *Streptomyces* sp. A6497.

A secondary metabolite that exhibited preferential activity against *Phytophthora parasitica* was purified from *Streptomyces* sp. A6497 culture filtrate through several purification steps including solvent extraction, silica gel column chromatography, ODS column chromatography, and Sephadex LH-20 column chromatography.

Structure analyses of purified compound with HREI-MS spectrometry and NMR spectrometry revealed that the compound had molecular formular $C_{12}H_{15}N_5O_5$ (M.W. 309) and was identified as sangivamycin.

4. *In vitro* and *in vivo* herbicidal activities of sangivamycin isolated from *Streptomyces* sp. A6497.

The MIC of sangivamycin was examined by using several fungi. This compound showed strong inhibitory activity (MIC=3.125 μ g/ml) against *P. parasitica*.

In *in vitro* experiment of bleaching and greening, sangivamycin exhibited similar activity to that of oxyfluorfen. In addition, in green house experiment, sangivamycin showed strong herbicidal activities against various weeds.

5. Optimization for production of the active compound, sangivamycin, from *Streptomyces* sp. A6497

Production of sangivamycin having preferential activity against *Phytophthora parasitica* was optimized by statistically designed experiments and Box-Behnken design method. The optimal medium was determined as follows : 2% glucose, 1.5% soluble starch, 0.4% pharma media, 1% yeast extract, 0.5% soybean meal, 0.4% CaCO₃ and 0.3% K₂HPO₄.

Sangivamycin was effected by physical conditions such as pH, temperature and aeration as it was examined on 5L-jar fermenter by semi-continuous cultivation. The set point of pH and temperate were 7.8 and 28°C, respectively, and the optimal aeration conditions was 300rpm, 1vvm.

The mass production conditions were established in 5 to 500L fermenter. The tip speed and aeration rate were calculated and corrected by using rheological equilibrium constants such as Reynolds number and shear stress, and tuning error value.

6. Formulation of microbial herbicide.

Formulation was performed to stabilize the active compound during production and storage and aid application of the product. A wide variety of approaches was needed to achieve the appropriate formula.

After formulation of sangivamycin-producing *Streptomyces* sp. A6497, each formula was examined for their characteristics, heat stability, hardness and suspension, etc. Formulation process of sangivamycin-producing *Streptomyces* sp. A6497 was determined as following : Spray Drying (inlet 120°C, outlet 85°C, 6L/hr feeding rate), Carrier (5% of celite and 5% of dextrin in A6497 culture filtrate).

CONTENTS

| | |
|---|----|
| Development of mechanism-based new herbicides from microorganisms | |
| Chapter 1. Introduction ----- | 21 |
| Chapter 2. Contents and results of research ----- | 31 |
| Section 1. Method and contents of research ----- | 31 |
| 1. Isolation and maintenance of microorganisms ----- | 31 |
| 가. Isolation of useful microorganisms and culture media - | 31 |
| 나. Soil collection and isolation of microorganisms ----- | 31 |
| 2. Preparation and collection of culture broth ----- | 34 |
| 3. Screening system and selection of microorganisms ----- | 34 |
| 4. Identification of the selected microorganism ----- | 36 |
| 가. Cultural characteristics ----- | 36 |
| 나. Physiological and biochemical characteristics ----- | 36 |
| 다. Morphological characteristics ----- | 37 |
| 라. Chemotaxonomy ----- | 37 |
| 5. Purification and structure determination of bioactive compound from <i>Streptomyces</i> sp. A6497 ----- | 37 |
| 가. Culture of strain A6497 ----- | 37 |
| 나. Isolation and purification of bioactive compound ----- | 38 |
| 다. Structure determination of the isolated compound ----- | 38 |
| 라. <i>In vitro</i> herbicidal activity of the compound from <i>Streptomyces</i> sp. A6497 ----- | 38 |
| 마. <i>In vivo</i> herbicidal activity of the compound from <i>Streptomyces</i> sp. A6497----- | 40 |
| 6. Determination of minimal inhibitory concentration ----- | 40 |
| 가. Test organisms ----- | 40 |
| 나. Preparation of inoculum ----- | 40 |

| | |
|--|----|
| ㄷ. Determination of MIC ----- | 40 |
| 7. Optimization for production of sangivamycin from <i>Streptomyces</i> sp. A6497 ----- | 41 |
| 가. Optimal media ----- | 41 |
| 나. Optimal cultivation condition ----- | 42 |
| 8. Scale up of the fermentation process ----- | 42 |
| 9. Formulation of microbial herbicide ----- | 43 |
| Section 2. Results ----- | 45 |
| 1. Isolation and culture of useful microorganisms ----- | 45 |
| 2. Screening of microorganisms having herbicidal activity - | 45 |
| 가. Screening of inhibitors of the weed germination from microorganisms ----- | 45 |
| 나. <i>In vivo</i> assay of various culture broths having inhibitory activity against the seed germination of various weeds ----- | 45 |
| ㄷ. Screening for glutamine antagonists ----- | 47 |
| 라. Screening for inhibitors of cellulose biosynthesis --- | 47 |
| 마. <i>In vivo</i> assay of various culture broths having inhibitory activity against <i>Phytophthora parasitica</i> -- | 50 |
| 바. Selection of microorganism having herbicidal activity ----- | 52 |
| 3. Identification of selected microorganism ----- | 52 |
| 가. Cultural characteristics ----- | 52 |
| 나. Physiological characteristics ----- | 52 |
| ㄷ. Morphological characteristics ----- | 55 |
| 라. Analysis of the fatty acid ----- | 55 |
| 마. Analysis of the cell wall ----- | 55 |
| 바. Analysis of the saccharide ----- | 55 |
| 4. Isolation and purification of bioactive compound from <i>Streptomyces</i> sp. A6497 ----- | 58 |

| | |
|---|----|
| 5. Structure determination of the compound isolated from <i>Streptomyces</i> sp. A6497 ----- | 58 |
| 6. Determination of MIC of sangivamycin ----- | 62 |
| 7. <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> herbicidal activities of sangivamycin ----- | 67 |
| 가). <i>In vitro</i> bleaching assay ----- | 67 |
| 나). <i>In vitro</i> greening assay ----- | 67 |
| 다). <i>In vivo</i> herbicidal activity in greenhouse ----- | 69 |
| 8. Optimization for production of sangivamycin from <i>Streptomyces</i> sp. A6497 ----- | 71 |
| 가). Optimal media ----- | 71 |
| 1) Effect of carbon source ----- | 71 |
| 2) Effect of nitrogen source ----- | 71 |
| 3) Effect of mineral and complex media ----- | 71 |
| 4) Optimization of production media ----- | 74 |
| 나). Conditions of batch culture ----- | 74 |
| 9. Scale up of the fermentation process ----- | 83 |
| 10. Formulation of the microbial herbicide ----- | 83 |
| 가). Selection of additive ----- | 83 |
| 나). Test of heat-stability ----- | 87 |
| 다). Test of conservation ----- | 87 |
| 라). Formulation of microbial herbicide ----- | 87 |
| Chapter 3. Future applications ----- | 91 |
| Chapter 4. References ----- | 93 |

여 백

목 차

잡초류의 작용점에 특이적인 미생물 탐색을 통한 새로운 미생물 제초제의 개발

| | |
|---|----|
| 제 1 장 서 론 ----- | 21 |
| 제 1 절 연구개발의 목적과 범위 ----- | 21 |
| 제 2 절 연구개발의 목표 ----- | 30 |
| 제 2 장 연구개발 수행내용 및 결과 ----- | 31 |
| 제 1 절 연구 수행방법 및 내용 ----- | 31 |
| 1. 유용 미생물의 분리 및 수집 ----- | 31 |
| 가. 유용 미생물의 분리와 배지 ----- | 31 |
| 나. 토양 채취 및 균주의 분리 ----- | 31 |
| 2. 유용 미생물 배양액의 전처리 및 수집 ----- | 34 |
| 3. 제초활성을 나타내는 미생물의 탐색 ----- | 34 |
| 가. 돌피 발아를 억제하는 미생물의 탐색체계 ----- | 34 |
| 나. Glutamine 합성을 저해하는 미생물의 탐색체계 ----- | 35 |
| 다. Cellulose 합성을 저해하는 미생물의 탐색체계 ----- | 35 |
| 라. 제초활성물질 생산균주의 선발 ----- | 36 |
| 4. 제초활성물질을 생산하는 균주의 동정 ----- | 36 |
| 가. 배양학적 특징 ----- | 36 |
| 나. 생리·생화학적 특징 ----- | 36 |
| 다. 형태학적 특징 ----- | 37 |
| 라. Chemotaxonomy ----- | 37 |
| 5. <i>Streptomyces</i> sp. A6497로부터 생산되는 제초활성 물질의 분리·정제 및 구조분석 ----- | 37 |
| 가. <i>Streptomyces</i> sp. A6497의 배양 ----- | 37 |
| 나. 제초활성물질의 분리정제 ----- | 38 |
| 다. 제초활성물질의 구조결정 ----- | 38 |
| 라. 제초활성물질의 <i>in vitro</i> 활성검정 ----- | 38 |

| | |
|---|----|
| 다. 제초활성물질의 <i>in vivo</i> 활성검정 ----- | 40 |
| 6. 제초활성물질의 최소 생육 저지농도 (MIC)의 측정 ----- | 40 |
| 가. 접종 균주 ----- | 40 |
| 나. 접종균액의 제조 ----- | 40 |
| 다. MIC 측정방법 ----- | 41 |
| 7. <i>Streptomyces</i> sp. A6497의 최적배양 조건 확립----- | 41 |
| 가. A6497의 최적배지 검토----- | 41 |
| 나. A6497의 최적배양 조건 검토----- | 42 |
| 8. <i>Streptomyces</i> sp. A6497의 대량배양 조건확립 ----- | 42 |
| 9. <i>Streptomyces</i> sp. A6497의 제형화 연구 ----- | 43 |
| 제 2절. 연구결과 ----- | 45 |
| 1. 유용 미생물의 분리 및 배양 ----- | 45 |
| 2. 미생물이 생산하는 제초활성 저해물질의 탐색 ----- | 45 |
| 가. 돌피발아를 억제하는 미생물의 탐색 ----- | 45 |
| 나. 돌피발아를 억제하는 미생물의 <i>in vivo</i> 제초활성검정 -- | 45 |
| 다. Glutamine 합성을 저해하는 생물의 탐색 ----- | 47 |
| 라. Cellulose 합성을 저해하는 미생물의 탐색 ----- | 47 |
| 마. Cellulose 합성을 저해하는 미생물의 <i>in vivo</i> | |
| 제초활성검정 ----- | 50 |
| 바. 제초활성물질을 생산하는 균주의 최종선발 ----- | 52 |
| 3. 제초활성물질을 생산하는 균주의 동정 ----- | 52 |
| 가. 배양학적 특징 ----- | 52 |
| 나. 생리적 특징 ----- | 52 |
| 다. 형태학적 특징 ----- | 55 |
| 라. 균체 지방산 분석 ----- | 55 |
| 마. 세포벽 분석 ----- | 55 |
| 바. 균체 당 분석 ----- | 55 |
| 4. <i>Streptomyces</i> sp. A6497 균주로부터 분리한 제초활성 | |
| 물질의 분리정제 ----- | 58 |
| 5. <i>Streptomyces</i> sp. A6497 균주로부터 분리한 제초활성 | |
| 물질의 구조결정 ----- | 58 |

| | |
|---|--------|
| 6. <i>Streptomyces</i> sp. A6497로부터 분리한 sangivamycin의 최소생육저지 농도 결정----- | 62 |
| 7. <i>Streptomyces</i> sp. A6497로부터 분리한 sangivamycin의 제초활성검정 ----- | 67 |
| 가. sangivamycin의 bleaching 검정 ----- | 67 |
| 나. sangivamycin의 greening 검정 ----- | 67 |
| 다. sangivamycin의 온실제초활성검정 ----- | 69 |
| 8. <i>Streptomyces</i> sp. A6497의 최적배양 조건 확립----- | 71 |
| 가. <i>Streptomyces</i> sp. A6497의 최적배지 ----- | 71 |
| 1) 탄소원의 영향 ----- | 71 |
| 2) 질소원의 영향 ----- | 71 |
| 3) 무기염류 및 복합 혼합물의 영향 ----- | 71 |
| 4) Plackett-Burman Design 및 Box-Behnken experimental Design을 이용한 배지의 최적화 ----- | 74 |
| 나. <i>Streptomyces</i> sp. A6497의 회분식 배양조건 ----- | 74 |
| 9. <i>Streptomyces</i> sp. A6497의 대량배양 조건 확립 ----- | 83 |
| 10. <i>Streptomyces</i> sp. A6497의 제형화 연구----- | 83 |
| 가. 증량제 선정 ----- | 83 |
| 나. 열안정성 실험 ----- | 87 |
| 다. 보존성 실험 ----- | 87 |
| 라. 분무건조에 의한 제형화 확립 ----- | 87 |
| 제 3 장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의----- | 91 |
| 제 4 장 참고문헌 ----- | 93 |

여 백

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

전 세계의 농경지는 약 1억 5억천만 헥타르이고, 육지 면적의 10%에 달하며 농작물 생산에 해를 끼치는 잡초의 종류가 200여종 이상이나 알려져 있는 데 유사종을 포함하면 6,000여종에 이른다고 알려져 있으며¹⁾ 그 일부 난방제 잡초 종을 표 1²⁾에 나타내었다. 농작물 생산 시에는 잡초 제거가 필수적으로 수반되어야 하는 데 이러한 잡초 제거는 주로 손과 농기계에 의해 이루어져 왔으나, 1950년대 초반 화학 합성된 제초제가 개발된 이래 노동력을 절감시키고, 농작물의 수확량 증대에 많은 기여를 해오고 있다.

세계 농약 시장은 약 300억불로 이 중 제초제 시장은 44%인 132억불을 점유하고 있고, 그 점유율은 매년 증가 추세에 있다. 현재 사용되고 있는 제초제는 그 작용 기작에 따라 ① 광합성 전자 전달 저해제 ② 광활성화에 필요한 diphenyl ether형 제초제 ③ 식물 호르몬에 작용하는 제초제 ④ 영양 대사를 저해하는 제초제 ⑤ 세포분열을 저해하는 제초제 ⑥ 미생물 제초제로 분류되고 있으나¹⁾ 가장 이상적인 제초제는 잡초에 강한 활성을 나타내면서 식물체 이외의 생물에서는 최저 독성을 나타내야 하고, 잡초와 작물간에도 높은 선택성을 나타내며, 환경에 대해서도 별다른 영향을 나타내지 않아야 한다.

이러한 점을 고려하여 최근 화학합성 연구자들도 특이적인 작용 기작을 지닌 선택성이 높은 제초제 즉 식물체에만 특이적으로 존재하는 효소나 생합성 과정만을 선택적으로 저해하는 제초제의 개발에 치중하고 있다. 현재 사용되고 있는 제초제들은 화학 합성된 화합물이 주종을 이루어 왔으나 그동안 반복적인 제초제의 사용으로 인해 토양의 산성화와 농산물의 잔류독성 및 환경오염 등으로 인해 많은 사회적인 문제가 최근 대두되고 있다. 또한 1992년 6월 브라질에서 개최된 유엔환경 보호 위원회 (UNCEO)의 세계 환경 보존 협약 회의에서 현재 사용되고 있는 유기 합성 농약의 25~75%를 절감시키기 위한 규제 움직임이 처음으로 시작되었으며, 국내에서도 2004년부터 현재 사

Table 1. Major weeds, which are difficult to control

| Scientific name | Korean name | English name |
|---|-------------|-----------------------|
| 밭 잡초 | | |
| <i>Agropyron smithii</i> RYDB | 개밀 | Cheatgrass |
| <i>Allium vineale</i> L. | | Wild garlic |
| <i>Ambrosia artemisiifolia</i> L. | 돼지풀 | Common ragweed |
| <i>Artemisia princeps</i> Pampan | 쑥 | Mugwort |
| <i>Brachiaria platyphylla</i> Nash | | Broadleaf signalgrass |
| <i>Calystegia japonica</i> CHOISY | 메꽃 | Bindweed |
| <i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop. | 엉겅퀴 | Thistle |
| <i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers. | 우산잔디 | Bermudagrass |
| <i>Cyperus rotundus</i> | 향부자 | Purple nutsedge |
| <i>Cuscuta japonica</i> Choisy | 새삼 | Dodder |
| <i>Equisetum arvense</i> L. | 쇠뜨기 | Field horsetail |
| <i>Euphorbia feterophylla</i> L. | | Wild poinsettia |
| <i>Humulus japonicus</i> Sieb. | 환삼덩굴 | Japanese hop |
| <i>Imperata cylindrica</i> P. Beauv. | 띠 | Vogongrass |
| <i>Polygonum convolvulus</i> L. | 나도닭의덩굴 | Wild buckwheat |
| <i>Rottboellia exaltata</i> (L.) L.F. | | Itchgrass |
| <i>Sesbania exaltata</i> Cory | 커피위드 | Hemp sesbania |
| <i>Sorghum halepense</i> | 존슨그라스 | Johnsongrass |
| 논 잡초 | | |
| <i>Elocharis Kuroguwai</i> OHWI | 올방개 | Water nutsedge |
| <i>Leersia japonica</i> Makino | 나도겨풀 | |
| <i>Oenanthe javanica</i> D. C. | 미나리 | |
| <i>Potamogeton distinctus</i> A. BENNET | 가래 | Pondweed |
| <i>Sagittaria triolia</i> L. | 벗풀 | Arrowhead |
| <i>Scirpus Planiculmus</i> Fr. Schm. | 새삼매자기 | |
| 비 농경지 및 산림 잡초 | | |
| <i>Miscanthus purpurascens</i> Rendle | 억새 | |
| <i>Phytolacca americana</i> L. | 미국자리공 | Common pokeweed |
| <i>Pteridium aquilinum</i> Kuhn var. <i>latiusculum</i> Underw | 고사리 | Eastern bracken fern |
| <i>Pueraria thunbergiana</i> Benth | 쑥 | Kudzu |
| <i>Phragmites communis</i> Tria | 갈대 | Common reed |
| <i>Robinia pseudo - acasia</i> | 아카시나무 | Acasia |
| 수생 잡초 | | |
| <i>Eichhornia crassipes</i> Solm | 부레옥잠 | Water hyacinth |
| <i>Hydrilla verticillata</i> | | Water thyme |
| <i>Trapa japonica</i> Flerov | 마름류 | Water chesnut |

용되고있는 유기 합성 농약의 30%를 감축할 예정으로 있어 화학합성 농약을 대체하고 농작물의 생산성을 유지하기 위한 대체기술의 개발이 시급한 실정이다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 미생물 균주 자체나 미생물이 생산하는 2차 대사산물을 이용하여 잡초를 방제하기 위한 미생물 제초제에 대한 연구가 많이 시도되고 있으며 이 중 일부는 산업화에 성공하였다.

미생물 유래의 제초 활성 물질로는 herbicidin A와 herbicidin B가 1976년에 처음으로 보고되었는데 이전에는 단백질 합성 저해제인 cycloheximide가 비 선택적으로 단자엽 및 쌍자엽 식물에 저해 활성을 나타내며, anisomycin과 toyocamycin이 식물 종자 발아 저해 활성을 나타낸다고 알려져 있었다¹⁾. 이 외에도 nucleoside 화합물 일부와 glufosinate³⁾, herbimycins⁴⁾, phosalacine⁵⁾, phthoramycin⁶⁾, bialaphos⁷⁾, oxetin⁸⁾, homoalanosine⁹⁾, phthoxazolin¹⁰⁾, hydantocidin 등¹¹⁾이 미생물 배양액으로부터 보고되었으며 이 중 anisomycin과 glufosinate는 산업화 되었다. Herbicidin은 식물 경영에 처리 하였을 때 벼에는 약해를 나타내지 않고 쌍자엽 잡초에 대해서 강한 활성을 나타내었는데 herbicidin A가 herbicidin B보다 선택성이 높았다.¹²⁾ Herbimycin¹³⁾의 경우에는 단자엽 및 쌍자엽 잡초 양쪽에 강하게 저해 활성을 나타내었으며 특히 사초과인 금방동사리에 효과적이었으며 후에 Rous sarcoma virus에서도 저해 활성이 보고되었다¹⁴⁾.

Bialaphos는 oligopeptide로서 처음에는 벼의 문고병 원인균인 *Pellicularia sasaki*에 저해 활성이 있다고 보고¹⁵⁾되었다가 후에 여러 잡초에 대한 저해활성이 강하다고 보고된 화합물도 토양 처리 후에는 용이하게 분해되어^{7,16)} 파종 전 처리용 제초제로서 일본에서 널리 사용되고 있다. 이 화합물의 작용 기작은 bialaphos가 phosphinothricin으로 대사된 후 glutamine 생합성을 저해¹⁷⁾하여 식물세포 내에 암모니아를 축적시켜 잡초를 고사시키는 것으로 알려졌다^{18,19)}. 또한 glutamine antagonist를 탐색하여 발견된 phosalacine 화합물도 구조적으로는 bialaphos와 동일한 phosphinothricin 구조를 갖고 있으며 이 화합물은 식물체 내에서 대사되어 bialaphos 처럼 glutamine synthetase 활성을 저해한다고 보고되었다⁵⁾. 이외에 bialaphos에 alanine이 하나 더 붙어 있는 trialaphos²⁰⁾도 glutamine 생합성을 저

해하며, oxetan ring을 지닌 최초의 천연물인 oxetin도 glutamine synthetase를 저해하는데 특히 이 화합물은 *B. subtilis*와 시금치 유래의 glutamine synthetase도 비 경쟁적으로 저해한다고 알려졌다¹¹.

Homoalanosine은 발 잡초종인 도꼬마리, 칼란코에, 여뀌 등에 특히 제초활성을 나타내며 논 잡초에 대해서도 광범위한 제초활성 스펙트럼을 나타내나 경엽처리하면 주로 뿌리나 새싹 부분에 활성을 나타낸다²¹). 또한 phthoxazolin은 cellulose를 세포벽 성분으로 함유하고 있는 *Phytophthora parasitica*를 사용하여 cellulose 생합성 저해제를 탐색하여 찾아낸 제초활성 물질이다²²).

최근에 알려진 hydantocidin은 항생물질 제초제^{11, 23})로서 단자엽, 쌍자엽, 일년생 및 다년생 잡초에 대하여 모두 강한 활성을 나타내며, 이 화합물은 제초효과를 나타내는 유일한 sugar-spiro-hydantoin 화합물로서 *Streptomyces hygroscopicus* SANK 13584 균주에 의해 생산된다. 이 화합물은 시험관 내에서 양배추 종자에 대한 발아력을 검정하는 방법으로 스크리닝 되었는데 단자엽, 쌍자엽의 일년생과 다년생 식물들의 성장을 비 선택적으로 억제하였으며, 실제 풋트 실험의 결과 500ppm 농도에서 hydantocidin 처리 효과는 같은 농도에서의 glyphosate와 대등하였으나 이미 상품화된 bialaphos 보다는 더 높았다. 이외에 *Streptomyces chromofuscus* 균주로부터 발견된 herboxidiene²⁴)은 평지, 야생메밀, 나팔꽃 등의 잡초에 대해서는 선택적인 반면에 벼, 강낭콩, 밀에서는 전혀 저해활성을 나타내지 않았으며 그 작용 기작은 아직까지 밝혀지지 않고 있다. 이외에도 미생물로부터 보고된 제초활성을 지닌 화합물로는 α -methylene- β -alanine²⁵), isoxazole-4-carboxylic acid²⁶), coaristeromucin²⁷), cis-2-amino-1-hydroxy-cyclo-butane-1-acetic acid²⁸), kaimonolide A와 B²⁹), altemicidin 등³⁰)이 보고되고 있다.

한편 식물 병원균에서는 많은 phytotoxin들이 보고되었음에도 불구하고 아직까지 실용화된 예는 별로 없으나 식물 병원균의 포자를 이용하여 미생물 제초제로 개발한 예는 몇가지 알려져 있으며 상품화되었거나 등록 시험 중인 미생물 제초제들을 표2에 나타내었다.

먼저 *Phytophthora palmivora*를 이용한 액체 제제인 DeVine^{31, 32})은

Table 2 . A list of the manufactural bioherbicides

| Products | Microorganism | Target weed | Company |
|-----------------|---------------------------------------|---|-------------------------------------|
| Devine | <i>Phytophthora palmivora</i> | Strangler vine in orange field | Abbott(1982) (USA) |
| Collego | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Northern Jointvetch | Ecogen(1982) (USA) |
| Persimmon wilt | | Persimmon trees | Nobel Foundation |
| Silver Leaf | <i>Chondrostereum prupureum</i> | Wild blackbery | Koppert (Netherlands) |
| Bur Anthracnose | <i>Colletotrichum orbiculare</i> | Spiny cocklevurr Xanthium, sinosum | Australia Licinensing to Sandoz co. |
| Biomal | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Round-leavea mallow in lentil flax, wheat field | Philom Bios (Canada) |
| Puccinia spore | <i>Puccinia canaliculata</i> | Yellow nutsedge in rice field | |

1981년 Abbott사에서 상품화한 것으로 미국 Florida 지방의 감귤 재배농장에서 자생하는 stangler vine(Milkweed vine, *Morrenia odorata*)를 방제하기 위하여 개발되었는데 Stangler vine은 남미 원산이지만 Florida 지방의 12만 ha에 이르는 농장에서 번식하는 문제 잡초이다. 또한 벼와 콩 경작지에 자생하는 자귀풀 방제용 미생물 제초제로써 미국 Arkansas 지방에서 주로 사용하고 있는 Collego^{33,34)}는 1982년 Ecogen 사에 의해 상품화된 것으로 *Colletotrichum gloesporioides* f. sp. *aeschynmen* 포자를 분제 형태로 제제화 한 포자분말과 수용성 포자분산 용액으로 구성되어 있다. 1972년부터 10년간에 걸쳐 포장 실험한 결과 90% 이상의 방제효과를 보였으며, 자귀풀 종류에 선택적인 활성을 낸다고 알려져 있다.

Colletotrichum gloesporioides f. sp. *malvae*의 포자를 분말화하여 제제로 만든 Biomal³⁵⁾은 미국, 캐나다의 아마, 밀 경작지 중의 원형 잎 mallow(*Malva pusilla*) 방제용으로서 병원균 포자 현탁액 살포 후 17-20일 이내에 잡초가 고사되며, 일반적으로 다른 미생물 제초제의 경우 습도 유지 등 기후 조건이 중요한 데 비해 Biomal은 건조한 지역에서도 잡초에 강하게 발병시킬 수 있어 상대적으로 유리한 장점을 가지고 있다. 또한 Bur Anthracnose³⁶⁾는 1951년 호주에서 많이 자생하는 문제 잡초인 spiny cocklebur(*Xanthium spinosum*)를 방제하기 위하여 개발된 것으로서, 1987-1988년에 걸쳐 포장에서 재 실험한 결과 문제 잡초를 50-100% 방제할 수 있는 것으로 조사되었다. 이 제초제는 처음에 *Colletotrichum xanthii*로 동정되었던 *Colletotrichum orbiculare*라는 식물 병원균을 이용하고 있는 데, 건조한 목초지에서도 98% 이상의 높은 방제 효과를 나타내었다. 이외에 현재 미생물 제초제를 개발하기 위하여 전 세계에서 연구중인 제초제들을 요약하여 표3에 나타내었다.

한편 국내에서도 *Epicoccosorus* 균주를 이용하여 논 잡초의 하나인 올방개를 방제할 수 있는 미생물 제초제³⁷⁾가 특허 출원된 바 있으며, 논 잡초 가운데 가장 문제가 되고 있는 피를 방제하기 위하여 *E. monoceras* 균주를 분리하고 이용하고자 하는 연구가 진행되고 있다³⁸⁾. 최근에는 한국생명공학연구원에서 크로버 등 밭 잡초를 효과적으로 방제할 수 있는 *Penicillium oxalicum* 균주를 선발하여 초지용 미

Table 3. A List of current projects on microbial herbicides

| Weed | Pathogen(Registered name) | Target crops | Country |
|--------------------------|--|------------------|----------------|
| Abutilon theophrasti | <i>Colletotrichum coccoides</i> | Soybean | Canada |
| Acacia mearnsii | <i>Ceratpcustos</i> sp. | Tree plantations | South Africa |
| | <i>Cylindrobasidium laeve</i> | Tree plantations | South Africa |
| A. saligna | <i>Uromycladium tepperianum</i> | Tree plantations | South Africa |
| Aeschynomene virginica | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . f. sp. <i>aeschynomene</i> (Collego) | Rice and soybean | USA,Arkansas |
| | <i>Phomopsis amaranthicola</i> | | |
| Amaranthus spp | <i>Dreschlera avenaceae</i> (Telcomorph <i>Pyrenolhora chaetomioides</i>) | Vegetables | USA, Florida |
| Avena fatua | <i>Chondrostereum purpureum</i> | Wheat | P.R.China |
| Broad -leaved trees | <i>Ascochyta caulina</i> | Tree platations | Holland:Canada |
| <i>Chenopodium album</i> | <i>Cercospora</i> sp. | Various | Holland |
| | An unidentified fungu | Various | Holland |
| <i>Cirsium arvense</i> | <i>Fusarium</i> sp. | Various | Canada |
| | <i>Puccinia punctiformis</i> | Pastures | Germany |
| | <i>Botrytis</i> sp. | Pastures | Holland |
| | <i>Phoma</i> sp. | Pastures | Germany |
| | <i>Fusarium tricinctum</i> & <i>Alternaria</i> sp. | Pastures | Germany |
| <i>Cuscuta</i> spp. | <i>Dactylaria higginsii</i> | Cranberries | USA, Florida |
| <i>Cyperus</i> spp. | <i>Puccinia canaliculata</i> (Dr. BioSedge) | Various | USA, Florida |
| <i>C. esculentus</i> | <i>Cercospora</i> sp. | Various | USA, Georgia |
| <i>C. rotundus</i> | <i>Puccinia romagnoliana</i> | Various | Brazil;Israel |
| | <i>Fusarium tumidum</i> | Various | India;Istael |
| <i>Cytisus scoparius</i> | | Tree plantations | New Zealand |
| <i>Erigeron annuus</i> | <i>Phomapataminum</i> | Pastures;Various | Italy |

| Weed | Pathogen(Registered name) | Target crops | Country |
|---------------------------------------|--|------------------|--|
| <i>Solanum viarm</i> | <i>Colletotrichum</i> sp. | Soybean and rice | UK Switzerland |
| | <i>Pseudomonas solanacearum</i> | Citrus and sod | Brazil, USA, |
| <i>Sphenoclea</i> <i>zeylanica</i> | <i>Colletotrichum</i> sp. | Rice | Mississippi |
| | <i>Alternaria</i> sp. | | USA, Florida |
| <i>Striga hermonthica</i> | | Rice | Brazil, USA, |
| | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Rice | Brazil, USA, |
| | <i>Fusarium nygamai</i> | Various | Florida |
| <i>Ulex europaeus</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | Cereals | Philippines |
| | | | Malaysia |
| various annual weeds | <i>Fusarium semitectum var.majus</i> | Sorghum | Sudan- Germany |
| | <i>Fusarium tumidum</i> | Plantation crops | West Africa |
| Various broad-leaf tree | <i>Myrothecium verrucaria</i> | Various | Canada |
| | <i>Chondrostereum purpureum</i> | Agroforstry | Sudan Germany New Zealand USA,Maryland Canda |
| Various composite weeds | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i> | Various | Holland |
| | | | USA,Florida |
| <i>Viola arvensis</i> | <i>Mycocentrospora acerina</i> | Not identified | USA,Canada |
| Weed seeds | <i>Pyrenophora semeniperda</i> | Various | |
| | <i>Chaetomium globosum</i> | Seed bank | UK-Australia |
| | <i>C. spirale</i> | Seed band | Australia |
| <i>Xanthium</i> spp. | <i>Alternaria zinniae</i> | Various | UK |
| | <i>Colletotrichum orbiculare</i> | Various | Australia |
| | <i>Puccinia xanthii</i> | | Australia |

| Weed | Pathogen(Registered name) | Target crops | Country |
|----------------------------|--|------------------|---------------|
| <i>Euphorbia</i> | <i>Helminthosporium</i> sp. | Various | Brazil |
| heterophylla | Not identified | Cereals | Vietnam |
| Grass weeds | | Citrus | -Australia |
| | <i>Drechslera</i> sp. and <i>Exserohilum</i> sp. | Various | USA, Florida |
| | <i>Pyrenophora semeniperda</i> | Tree Plantations | Australia |
| | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Pastures | South Africa |
| <i>Hakea sericea</i> | <i>Uromyces heliotropii</i> | Pastures | Australia |
| <i>Heliotropium</i> | | | |
| <i>europaeum</i> | <i>Cercospora</i> sp. | Various | Australia |
| | <i>Colletotrichum caudatum</i> | Various | Malaysia |
| <i>Imperata cylindrica</i> | <i>Ascochyta</i> sp. | Various | Malaysia |
| | <i>Puccinia rufipes</i> | Various | Malaysia |
| | <i>Colletotrichum graminicola</i> | Various | Malaysia |
| | <i>Didymaria</i> sp. | Various | Malaysia |
| | <i>Dinemasporium</i> sp. | Various | Malaysia |
| | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. | | |
| <i>Malva pusilla</i> | sp.malvae(Biomal) | Plantation crops | Canada |
| <i>Mikania micrantha</i> | <i>Cercospora mikaniicola</i> | Citrus | Malaysia |
| <i>Morrenia odorata</i> | <i>Phytophthora palmivora</i> (DeVine) | Turf grass | USA,Florida |
| <i>Poa annua</i> | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>poae</i> | Pastures | USA,Japan |
| <i>Pteridium</i> | | | |
| <i>aquilinum</i> | <i>Ascochyta pteridis</i> | | UK |
| <i>Rottboellia</i> | | | |
| <i>chochinchinensis</i> | <i>Sporisorium ophiuri</i> | Cereals | UK |
| | <i>Colletotrichum</i> sp. nov. nr. | | |
| | <i>graminicola</i> | Cereals | Thailand - UK |
| <i>Rumex</i> spp. | <i>Puccinia rottboelliae</i> | Cereals | Thailand-UK |
| | <i>Uromyces rumicis</i> | Pastures | Azores, |
| <i>Sagittaria</i> spp. | <i>Ramularia rubella</i> | Pastures | Portugal |
| <i>Senecio vulgaris</i> | <i>Rhynchosporium alismatis</i> | Rice | Azores, |
| <i>Senna obtusifoli</i> | <i>Puccinia lagenophorae</i> | Various | Portugal |
| <i>Sesbania exaltata</i> | <i>Alternaria cassiae</i> | Soybean | Australia |

생물 제초제^{39,40)}로서 개발하기 위하여 특허를 출원하는 등 밭 잡초 방제용 미생물 제초제로서의 활용 가능성을 시사하고 있다. 그러나 국내에서는 논밭의 몇 가지 주요 잡초에 대한 병원균을 분리하여 미생물 제초제로 활용하기 위한 연구가 일부 수행되고 있으나 아직까지도 국내에서 제품화되거나 산업화된 사례는 없는 실정이다.

이와같이 미생물 제초제에 대한 연구는 오래 전부터 지속적으로 이루어지고 있으나 화학합성 농약의 사용 규제로 인해 이를 대체할 수 있는 제초제에 대한 필요성이 나날이 증대되고 있다. 이러한 추세에 따라 미생물의 2차 대사산물로부터 새로운 제초제를 탐색하고 개발하기 위하여 cellulose와 glutamine 합성을 저해하는 활성 저해 물질을 탐색하고 활성 저해 물질의 이화학적 및 생물학적 특성을 조사하였다.

제 2 절 연구개발의 목표

지금까지 개발된 유기합성계 제초제들은 강력한 제초활성을 통해 그 동안 유용 작물의 생산성 향상에 많은 기여를 해왔으나 점차 약제에 대한 잡초의 저항성이 증가 추세에 있어 더욱 강력하고 새로운 제초제의 개발이 요구되고 있고, 또한 유기합성계 제초제로 인한 환경 오염으로 인하여 점차 그의 사용이 제한되어질 가능성이 높기 때문에 이러한 제초제들을 대체할 수 있는 새로운 제초제의 개발 필요성이 점차 대두되고 있다.

미생물 제초제는 미생물 자체를 직접 이용하거나 미생물이 생산하는 대사산물을 이용하여 잡초를 방제하기 때문에 환경 친화형이며 대사산물이나 구조가 다양하고 쉽게 분해되는 장점이 있으므로 이 분야에 대한 연구가 매우 활성화 될 것으로 기대되고 있다.

따라서 본 연구에서는 미생물의 다양성을 이용하여 안전성이 높고 선택성이 있으며 환경오염을 유발하지 않고 광범위한 제초활성을 나타내는 미생물 제초제를 개발하기 위하여 잡초류의 생합성 경로 (glutamine 합성 및 cellulose 합성)를 저해하거나 이들 종자의 발아를 억제하는 기능을 이용한 미생물 제초제를 탐색, 개발하고자 한다.

제 2 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법 및 내용

1. 유용 미생물의 분리 및 수집

가. 유용 미생물의 분리와 분리배지

자연계에 널리 분포되어 있는 흔한 일반 미생물보다는 특이적으로 분포되어 있는 미생물들이 새로운 화합물을 생산할 가능성이 높기 때문에 희귀 방선균과 특이적 곰팡이류와 버섯 곰팡이 등을 분리하였다.

분리 배지로는 방선균의 경우 humic acid agar⁴¹⁾(humic acid 1g, Na₂HPO₄ 0.5g, KCl 1.7g, MgSO₄·7H₂O 0.05g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, CaCO₃ 0.02g, B-vitamin mixture 0.5mg, cycloheximide 50mg, nystatin 50mg, agar 20g, D.W. 1 l, pH 7.3)를 이용하였으며, 곰팡이의 경우 potato dextrose agar와 yeast extract-malt extract agar(yeast extract 3g, malt extract 3g, peptone 5g, glucose 10g, agar 20g, D.W. 1 l, pH 5-6)을 이용하였다(표 4). 또한 미생물의 향생물질 생산성을 검토하기 위한 발효배지는 가용성 전분과 soytone을 주성분으로 하는 배지를 기본 배지로 이용하였으며 그 조성을 표 5에 나타내었다.

나. 토양 채취 및 균주 분리

지면으로부터 5~10cm 지점의 토양을 멸균된 vinyl bag에 채취하여 실험실까지 운반한 후 협잡물을 제거하고 가는 체를 이용하여 일정한 크기의 토양 입자만을 선별하였다.

선별된 토양 1g에 멸균액(6% yeast extract, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.02% Tween 80) 10ml를 첨가하여 현탁시킨 후 waring blender로

Table 4. Composition of isolation media.

| Media | Composition |
|---------------------|---|
| Starch-nitrate agar | Starch 10g, KNO ₃ 2g, NaCl 2g, K ₂ HPO ₄ 2g Casamino acid 0.3g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.05g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.01g, CaCO ₃ 0.02g Cycloheximide 50mg, nystatin 50mg, Agar 20g, D.W. 1 liter (pH 7.0) |
| HV agar | Humic acid 1g, Na ₂ HPO ₄ 0.5g, KCl 1.7g MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.05g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.01g CaCO ₃ 0.02g, B-vitamins* 0.5mg cycloheximide 50mg, Nystatin 50mg, Agar 20g, D.W. 1 liter (pH 7.2) |
| YM agar | Yeast extract 3g, Malt extract 3g Peptone 5g, Dextrose 10g, Agar 20g, D.W. 1 liter (pH 6.2) |

* 0.5mg each of thiamine HCl, riboflavin, niacin, pyridoxal-HCl, inositol, Ca-pantothenate, p-aminobenzoic acid, and 0.25mg of biotin.

Table 5. Composition of fermentation media for antibiotic production.

| Ingredients | Quantities/liter |
|---|--|
| 1. For Actinomyces Starch Soytone Pharmamedia Polypeptone Yeast extract K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O NaCl CaCO ₃ FeSO ₄ MnCl ₂ ZnSO ₄ CoCl ₂ | 20g 4g 3g 2g 1g 1g 0.5g 2g 3g 20mg 10mg 10mg 5mg |
| 2. For Fungi Starch Soytone Pharmamedia K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O CaCO ₃ NaCl Trace mineral(Fe, Mn) | 20g 4g 3g 1g 0.5g 3g 5g Trace |

수십초간 혼합하고 45℃에서 15분간 진탕 배양하였다. 다시 혼합액을 멸균된 증류수를 이용하여 일정 비율로 희석시킨 후 분리용 배지에 0.1ml씩 도말하여 27℃에서 4주간 배양하였다. 배양 후 평판에 나타난 집락을 다시 순수 분리하고 보존용 배지에 이식하여 27℃에서 생육이 왕성할 때까지 배양하고 20% glycerol 용액에 현탁시킨 후 -80℃ deep freezer에 보존하면서 실험에 이용하였다.

2. 유용 미생물 배양액의 전처리 및 수집

분리된 미생물을 방선균의 경우 2% starch, 0.4% soytone, 0.3% pharmamedia, 0.2% polypeptone, 0.1% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.2% NaCl, 0.3% CaCO₃, 2mg FeSO₄, 1mg MnCl₂, 1mg ZnSO₄, 0.5mg CoCl₂ 가 포함된 발효배지를 이용하고, 곰팡이류의 경우는 상기 배지에서 polypeptone과 yeast extract를 제외한 배지를 이용하여 28℃에서 4~5일 배양하고 배양 상등액을 동일량의 methanol을 이용하여 추출한 후, 추출물을 제초활성 물질 탐색에 이용하였다(표 5).

3. 제초활성을 나타내는 미생물의 탐색

가. 돌피발아(pre-emergence)를 억제하는 미생물의 탐색

먼저 24 multi-well plate에 멸균된 0.8% 한천용액을 2ml씩 분주하여 굳힌 다음, 상기 배양액 추출물을 100μl씩 분주하여 돌피발아를 억제하는 대사산물의 검색에 이용하였다. 돌피를 0.5% NaOCl 용액을 3분간 침지하여 표면 소독하고 멸균 증류수로 세척한 후, 멸균 증류수에 침지하여 4℃ 냉장고에서 1주일간 방치하였다. 방치 후 발아가 유도된 돌피종자를 멸균된 여과지를 이용하여 수분을 제거하고 상기 검색용 well에 5립씩 3반복으로 올려놓고 돌피의 발아를 조사하였으며, 일차적으로 80% 이상의 발아 억제능을 나타낸 대사산물을 1차적으로 선별하였다.

나. Glutamine 합성을 저해하는 미생물의 탐색⁵⁾

Glutamine 합성을 저해하는 미생물을 탐색하기 위하여 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 균주를 Davis minimal 배지(0.2% glucose, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.7% K₂HPO₄, 0.05% sodium citrate, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, pH7.0)에 접종하여 37℃에서 하룻밤 배양하였다. 배양 후 A_{550nm}에서 흡광도가 1.5되도록 조절하고 균액과 L-glutamine을 50℃로 유지된 멸균한 Davis minimal 배지에 1/100 되게 첨가하여 잘 교반한 다음 L-glutamine이 첨가한 평판과 L-glutamine이 첨가되지 않은 평판을 조제하여 탐색에 이용하였다. 이렇게 조제한 두 가지종류의 평판에 시료를 올려놓은 후 L-glutamine이 첨가되지 않은 평판에서는 저해활성을 나타내지만 L-glutamine이 첨가된 평판에서는 저해활성을 나타내지 않은 균주들을 선별하였다.

다. Cellulose 합성을 저해하는 미생물의 탐색¹⁰⁾

식물체는 세포벽이 cellulose로 구성되어 있어 cellulose 합성을 저해하는 저해제는 제초제로 이용될 수 있기 때문에 이런점에 착안하여 세포벽 구성성분으로 cellulose를 함유하고 있는 *Phytophthora parasitica* 균주와 cellulose를 함유하고 있지 않은 *Candida albicans* 균주를 이용한 탐색체계를 확립하였다.

Phytophthora parasitica 균주를 glucose-V8 배지(0.9% glucose, 14(v/v)% V8 supernatant, 0.2% agar, pH6.5)에 접종하여 27℃에서 2-3일 동안 진탕 배양하였다. 배양 후 Waring blender로 2-3회 분쇄하고 멸균하여 50℃로 유지된 배지에 1/5되게 첨가하고 잘 교반한 다음 평판에 분주하였다. Cellulose를 함유하고 있지 않은 *C. albicans* 균주는 Sabouraud's 배지에 하룻밤 배양한 후 A_{550nm}에서 흡광도가 1.5가 되도록 조절한 후 멸균하여 50℃로 유지된 배지에 1/10되게 첨가하고 잘 교반한 다음 평판에 분주하였다. 이렇게 조제한 두 종류의 평판을 이용하여 *C. albicans* 평판에서는 저해활성을 나타내지 않고 *P. parasitica* 평판에서만 저해활성을

나타내는 균주를 1차로 선별하였다.

라. 제초활성물질을 생산하는 미생물의 최종 선발

분리된 유용 미생물 발효액의 전처리된 시료를 대상으로 돌피발아 억제 대사산물과 glutamine 합성 저해제 및 cellulose 합성 저해제를 탐색하여 제초활성물질을 생산하는 균주를 선발하였다. 또한 1차 선발된 미생물의 발효액을 이용하여 온실내에서 제초활성검정을 행하였으며 *in vitro*와 *in vivo* 활성검정시 제초활성의 재현성을 나타내면서 제초활성이 안정적으로 유지되는 미생물을 최종 선발하였다.

4. 제초활성물질을 생산하는 미생물의 동정

가. 배양학적 특징

1) 접종용 균체의 조제

GLY(liver extract 100ml, yeast extract 5g, tryptone 10g, K₂HPO₄ 1.0g, glucose 5g, D.W 900ml) 배지에 A6497 균주를 한 백금이 접종하여 28℃에서 3일간 배양한 후 원심분리하고 생리식염수로 2-3차례 세척하여 접종용 균체를 조제하였다.

2) 배양학적 특성 조사

방선균은 배지의 종류에 따라 서로 다른 배양 특성을 나타내기 때문에 방선균의 배양학적 특성에 많이 이용되고 있는 ISP 배지와 Czapek 배지 및 Bennett 배지를 이용하여 배지 표면에 접종용 균체를 접종하고 28℃에서 7-21일간 배양한 후 기균사의 색상, 기생균사의 색상 및 용해성 색상에 대하여 관찰하였다.

나. 생리·생화학적 특징

방선균 A6497 균주의 여러 생리적인 특성을 조사하기 위하여 배

양 온도와 단백질 분해력, melanine 생합성 유무, 전분 가수분해력 및 12종의 당 이용성을 조사하였다.

다. 형태학적 특징

방선균 A6497 균주의 형태학적 특징 (포자의 연결상태, 포자의 표면, 포자의 크기 등)을 주사전자현미경 (scanning electron microscope)으로 조사하였다.

라. Chemotaxonomy

1) 균체 지방산 분석

배양한 A6497 균체를 saponification, methylation하여 메틸화된 균체 지방산을 gas chromatography로 분석하고 Microbial Identification System으로 동정하였다.

2) 세포벽 분석

방선균 A6497 균주의 균체를 동결건조하고 가수분해한 후 TLC로 diaminopimelic acid 성분을 분석하였다.

3) 균체당 분석

Tryptic soy agar에서 자란 균체를 동결건조하고 1N H₂SO₄로 가수분해한 후 HPLC로 균체의 당 성분을 분석하였다.

5. *Streptomyces* sp. A6497로부터 생산되는 제초활성 물질의 분리·정제

가. *Streptomyces* sp. A6497의 배양

냉동고에 보관 중인 방선균 A6497 균주를 yeast extract-malt extract 배지(0.4% yeast extract, 1.0% malt extract, 0.4% dextrose, D.W. 1ℓ, agar 2.0%, pH 7.3)에 배양한 후 50ml의 E배

지(2.0% soluble starch, 0.4% soytone, 0.3% pharmamedia, 0.2% polypeptone, 0.1% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.2% NaCl, 0.3% CaCO₃, 0.002% FeSO₄, 0.001% MnCl₂, 0.001% ZnSO₄, 0.0005% CoCl₂)가 함유되어 있는 500ml의 baffled flask에 접종하여 27℃에서 3일 동안 종배양하였다. 종 배양액을 1 l의 신선한 E-배지가 들어있는 5 l baffled flask에 2% 되게 접종하여 27℃에서 4일 동안 진탕배양하였다.

나. 제초활성물질의 분리정제

방선균 A6497의 배양액에 동량의 ethyl acetate를 첨가하여 2회 추출한 후 ethyl acetate 추출액을 silica, ODS, Sephadex LH-20 column chromatography를 하여 분리정제하였다.

다. 제초활성물질의 구조결정

방선균 A6497 균주로부터 분리한 제초활성물질의 구조를 결정하기 위하여 NMR spectrometer와 HREI-MS spectrometer를 이용하여 구조를 분석하였다.

라. 제초활성물질의 *in vitro* 활성검정

1) Cellulose를 함유하고 있는 *Phytophthora parasitica*를 이용한 활성검정

선발된 A6497 균주를 배양하고 분리정제하는 과정에서 용출된 분획들의 활성을 검정하기 위하여 *Phytophthora parasitica* 균주를 glucose-V8 배지(0.9% glucose, 14(v/v)% V8 supernatant, 0.2% agar, pH 6.5)에 접종하여 27℃에서 2-3일 동안 진탕배양하였다. 배양 후 Warning blender로 2-3회 분쇄하고 멸균하여 50℃로 유지된 배지에 1/5되게 첨가하고 잘 교반한 다음 균일하게 평판에 분주하였다. Cellulose를 함유하고 있지 않은 *C. albicans* 균주는 Sabouraud's 배지에 하룻밤 배양하여 A_{550nm}에

서 흡광도가 1.5되도록 조절한 후 멸균하여 50℃로 유지된 배지에 1/10되게 첨가하고 잘 교반한 다음 평판에 분주하였다.

이렇게 조제한 두 종류의 평판을 이용하여 *C. albicans* 평판에서는 저해활성을 나타내지 않고 *P. parasitica* 평판에서만 저해활성을 나타내는 분획을 우선적으로 분리 정제하였다.

2) 오이자엽을 이용한 bleaching 활성검정

평강 삼척 내병성 오이의 종자를 vermiculite에 파종하여 온실에 두고 10일 동안 배양하고, 증류수에 용해시킨 시험용액(DMSO 1%, Acetone 1%, Tween 20 0.01%)을 5.5cm Petri-dish에 1.2 ml씩 분주한 후 petri-dish당 직경 6mm의 녹화된 오이자엽 disk 6개를 치상하였다. 오이자엽이 들어있는 petri-dish를 28℃에서 14시간 동안 광주기($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 내외)의 배양기에 놓아둔 다음 일정시간이 경과하면 메탄올을 첨가하고 homogenizer로 마쇄하여 색소를 추출하고 원심분리한 후 분광광도계로 흡광도를 조사하여 색소형성 저해 정도를 대조구에 대한 억제정도로서 표시하였다.

3) 오이자엽을 이용한 greening 활성검정

평강 삼척 내병성 오이의 종자를 vermiculite에 파종하여 25℃ 향온 압조건에 6일 간 배양하고, 증류수에 용해시킨 시험용액(DMSO 1%, Acetone 1%, Tween 20 0.01%)을 5.5cm Petri-dish에 1.2 ml씩 분주한 후 petri-dish당 직경 6mm의 녹화된 오이자엽 6쌍을 띄웠다. 오이자엽이 들어있는 petri-dish를 5℃ 향온 압조건에서 24시간동안 보관한 후 28℃에서 14시간 동안 광주기($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 내외)의 배양기에 놓아둔 다음 생체중을 측정하고 메탄올 내에서 homogenizer로 마쇄하여 색소를 추출하고 원심분리한 후 분광광도계로 흡광도를 조사하여 색소형성 저해 정도를 대조구에 대한 억제정도로서 표시하였다.

마. 제초활성물질의 *in vivo* 활성검정

멸균되지 않은 양질 사토에 적당량의 비료를 혼합시킨 다음 시험용 포트(350 cm²)에 담고 파종구를 만들어 잡초 또는 작물종자를 (수수, 피, 개밀, 바랭이, 미국개기장, 메꽃, 도꼬마리, 어저귀, 자귀풀, 까마중) 파종한 후 곱게 친 흙으로 복토하여 온실에 둔 다음 10일간 키웠다.

처리할 배양액을 잘 흔들어 14ml 분취한 후 Tween 20 용액을 한 방울씩 넣고 hand sprayer로 처리한 후, 온실에서 2주간 키우면서 제초효과를 형태, 생리학적 관찰근거에 의해 달관 조사하였다. 즉 무방제의 경우를 0, 완전방제의 경우를 100으로 하여 각각의 제초활성 정도를 평가하는 데 70 이상의 등급을 나타내면 그 식물에 대하여 제초효과가 있는 것으로 간주하였다.

6. 진균류에 대한 최소 생육 저지 농도(MIC) 측정

가. 접종 균주

최소 생육 저지 농도(MIC)를 측정하기 위하여 사용한 식물 병원진균 *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria kikuchiana*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum lagenarium*은 농업진흥청과 화학연구소 농약 Screening Center에서 분양받아 실험에 이용하였다.

나. 접종 균액의 제조

진균류는 25℃에서 potato dextrose agar(Difco) 배지에서 7-14일 동안 충분히 배양한 후 접종원으로 사용하였다.

다. 측정 방법

시험하고자 하는 시료 용액을 멸균된 증류수를 이용하여 2배 희석 계열을 만든 후 멸균하여 50℃로 유지시킨 potato dextrose agar(Difco) 배지를 시료 용액과 9:1의 비율로 혼합하여 최종 농

도가 1000-1.95 μ g/ml이 되도록 5cm 크기의 평판에 분주하였다. 배지가 고형화되면 위에서 제조한 접종 균액을 각 평판마다 일정씩 접종하여 25 $^{\circ}$ C에서 1-5일 동안 배양한 후 육안으로 관찰하여 균의 생육이 억제된 농도를 최소 생육 저지 농도(MIC)로 정하였다.

7. *Streptomyces* sp. A6497의 최적배양 조건 확립

가. 방선균 A6497 균주의 최적배지 검토

1) 탄소원의 영향

기본 배지(탄소원 2%(w/v), 질소원(Yeast extract) 1%, NaCl 0.05 %, K₂HPO₄ 0.1%, CaCO₃ 0.1%, pH 7.0)에 각종 탄소원을 2%(w/v) 첨가한 다음 종균 배양액을 2%(v/v)되게 접종하여 28 $^{\circ}$ C에서 4일간 배양하면서 *Phytophthora parasitica*에 대한 항균활성을 검토하였다.

2) 질소원의 영향

Glucose를 2%(w/v) 첨가한 기본 배지(pH 7.0)에 각종 질소원을 1%(w/v)되게 첨가한 다음 종균 배양액을 2%(w/v) 접종하고 28 $^{\circ}$ C에서 4일간 배양한 후 항균활성을 검토하였다.

3) 무기염류 및 복합 혼합물의 영향

탄소원으로 2% glucose 와 질소원으로 1.0% yeast extract 를 첨가한 기본 배지(pH 7.0)에 pharma media, NaCl, K₂HPO₄, CaCO₃, MgSO₄·7H₂O, (NH₄)₂SO₄의 농도를 달리하여 첨가한 후 종균 배양액을 2%(w/v)되게 접종하여 28 $^{\circ}$ C에서 4일간 배양한 후 항균활성을 검토하였다.

4) PBD와 BBD를 통한 배지의 최적화

통계적 배지 개선 실험인 PBD (Plackett-Burman Design)와 BBD(Box-Behnken experimental Design)의 통계처리를 이용하여

미리 선별된 탄소원, 질소원 및 무기 염류 등을 종합하여 최적화 배지를 선별하였다. PBD는 excel (MS)를 이용하여 +run (200%의 선별된 medium component), -run (20%의 선별된 medium component)을 각각 6개씩 12개의 실험군과 3개의 기준군(0의 center 값)을 사용하여 실행하였고, 각 군에 대한 항균활성 결과로 배지 성분 중 항균활성을 나타내는 주성분(main effect)을 선별하였다. 또한 BBD는 PBD의 결과에서 얻어진 main effect 값이 높은 원소를 선별하여 나머지 배지의 조성을 고정시킨 후 변이가 큰 원소의 농도를 달리하여 최적농도를 조사하였다. +run, 0(center), -run의 변이를 원소별로 4개씩 무작위로 배치하고 +run 값은 PBD에서 표준편차 값이 클수록 0(center)값과 편차가 커지도록 설정하였다.

나. *Streptomyces* sp. A6497의 최적 배양 조건 검토

최적배지를 이용하여 최적 발효 시간과 발효시의 물리적 변화 및 활성을 높이는 인자를 조사하기 위해 batch culture를 하였으며, 이로부터 간접 배양 monitoring factor를 구하였으며, 부분적인 연속배양을 통하여 배양 시의 최적 물리적 조건(온도, pH, DO: dissolved oxygen)도 조사하였다.

배양 조건은 initial pH 7.6, initial aeration (rpm 300, 1vvm), 28°C(control)로 하여, 12시간 간격으로 sampling하여 항균활성을 측정하였다.

부분식 연속배양은 회분식 배양에서 얻어진 비성장계수를 이용하여 inlet의 배지 투입 속도를 결정하고 steady state 시간을 3일간 유지한 후 2일 동안 회분식 배양하여 활성물질 생산량을 각각의 물리적 조건 (pH, 온도)에서 비교 검토하였다.

8. *Streptomyces* sp. A6497의 대량배양 조건 확립

위의 배양 최적화 실험을 통해 얻어진 control factor를 이용하여 대량배양 적용 여부를 검토하였다. Scale up은 5L jar fermenter에서

50L fermenter, 500L tank 형태의 fermenter까지 점차적으로 하였으며, control factor는 온도, pH, D.O.(Dissolved Oxygen)로 온도와 pH는 고정하였고 D.O. 값은 40% saturation을 유지하였다.

D.O. 값은 rheological equilibrium을 확인하기 위한 좋은 수단이 되기 때문에 scale up을 실시할 경우 D.O. 값과 Reynolds number를 이용한 예측이 가능하였으며, impeller와 tip speed는 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\frac{D \nu \delta}{\mu} = \frac{D' \nu' \delta'}{\mu'}$$

μ = viscosity δ = density
 N = tip speed D = diameter of impeller
 $\nu = ND$
 같은 배지를 사용하므로 $\mu = \mu'$, $\delta = \delta'$

그러나 jar fermenter와 tank fermenter와의 내압 차이로 인한 rheological equilibrium 차이는 실제 D.O. 값을 보정하여 해결하였으며, 그에 따른 생산 profile을 측정하여 small scale의 측정값과 비교하였다.

9. *Streptomyces* sp. A6497의 제형화 연구

가. 증량제 선정

제조활성물질의 안정성 및 산업적 이용을 위하여 활성물질의 보관 및 사용이 용이하도록 생산된 배양액을 여러 가지 증량제로 제형화하여 보존성, 수화성, 경도, 분말도, 수분함량 등의 특성을 확인하고, 증량제를 이용하여 제형화한 후에 *P. parasitica*에 대한 항균활성을 조사하면서 안정성 및 보존성을 검토하였다.

나. 열 안정성 실험

Streptomyces sp. A6497의 배양 중에 생성되는 제조활성 물질의 제형화시 분무건조 조건을 확립하기 위해 열 안정성을 조사하였다.

같은 batch에서 생산된 배양액을 4℃에서 7,000rpm으로 15분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 각각 25, 40, 55, 70, 85, 100, 121, 150℃의 온도에서 1시간 동안 방치한 후 *P. parsitica*에 대한 항균활성으로 열 안정성을 확인하였다.

다. 제형의 선별

제조활성물질을 생산하는 *Streptomyces* sp. A6497을 미생물 제조제로 이용하기 위하여 여러 가지 형태로 제형화하고 각 제형별 제제의 보존성을 확인하였다. 제형화의 방법으로 액상 수화제는 배양액을 4℃에서 7,000rpm으로 15분간 원심분리한 후 미세여과기 (pellicon system)를 이용하여 균체를 제거하고 제형화하였으며, 분제 형태의 수화제는 크게 분무건조식, 동결건조식, 송풍건조식의 3가지 방법으로 제조하였다. 분무건조식은 미리 만들어진 액상형태의 수화제를 일반적으로 많이 사용되는 부재인 5% white carbon(W/V)과 5% dextrin(W/V)을 첨가하여 inlet 120℃, outlet 85℃, 6L/hr로 분무 건조한 후 90℃의 증량제를 첨가하여 제조하였다. 또한 동결건조식은 미리 만들어진 액상형태의 수화제를 5% (W/V) celite와 5% dextrin을 첨가한 후 -70℃에서 동결하여 freeze dryer로 건조한 후 나머지 90%의 증량제를 첨가하여 제형화하였다. 마지막으로 송풍건조식은 증량제에 동량의 액상수화제를 혼합하여 40℃에서 송풍건조하였다.

이러한 방법으로 만들어진 액상 수화제 및 분제 형태의 수화제들을 각각 소량 포장한 후에 40℃에서 8주간 보존하면서 *P. parsitica*에 대한 항균활성을 검정하면서 시간에 따른 보존성 및 안정성을 확인하여 가장 적합한 제형화 방법을 선별하였다.

제 2 절 연구 결과

1. 유용 미생물의 분리 및 배양

전국 각지에서 수집한 40여개 (토양, 버섯류)의 시료를 대상으로 방선균과 곰팡이 분리를 시도하여 1,748여종 (방선균 1,030, 곰팡이 718)의 각종 미생물들을 분리하였다. 분리된 미생물들을 적절한 발효 배지 (방선균 : 2% starch, 0.4% soytone, 0.3% pharmamedia, 0.2% polypeptone, 0.1% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ 7H₂O, 0.2% NaCl, 0.3% CaCO₃, 2mg FeSO₄, 1mg MnCl₂, 1mg ZnSO₄, 0.5mg CoCl₂, 곰팡이 : 2% starch, 0.4% soytone, 0.3% pharmamedia, 0.2%, K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ 7H₂O, 0.2% NaCl, 0.3% CaCO₃, 2mg FeSO₄, 1mg MnCl₂, 1mg ZnSO₄, 0.5mg CoCl₂)를 이용하여 27℃에서 4-5일 배양하고 methanol로 1:1 추출한 후 돌피 발아 억제 활성물질과 glutamine 합성 저해제 및 cellulose 합성 저해제 탐색에 이용하였다.

2. 미생물이 생산하는 제초활성 저해물질의 탐색

가. 돌피의 발아(pre-emergence)를 억제하는 대사산물의 탐색

돌피의 발아를 억제하는 미생물을 검색하기 위하여 1,748여종(방선균 1,030, 곰팡이718)의 미생물 발효액을 대상으로, 우선 24 multi-well plate에 멸균된 0.8% 한천용액을 2ml씩 분주하여 굳힌 다음, 상기 배양추출물을 100 μ l씩 분주하여 돌피발아를 억제하는 대사산물을 검색하였다. 1차적으로 돌피발아에 억제활성이 있는 46종을 선별하였으며, 처리농도를 달리하여 발아억제활성을 조사한 결과 발아억제활성이 높고 재현성이 있는 것은 5종이었다(표 6).

나. 돌피의 발아를 억제하는 대사산물의 *in vivo* 제초활성 검증

돌피, 명아주, 질경이, 물달개비, 바랭이, 방동사니, 미국가막

Table 6. Screening results of the inhibitor on the weeds germination.

| Microorganism | Inhibition | Microorganism | Inhibition |
|---------------|------------|---------------|------------|
| A5611 | ++ | A6072 | + |
| A5639 | ++ | A6073 | + |
| A5658 | + | A6077 | + |
| A5717 | ++ | A6083 | ++ |
| A5779 | + | A6084 | ++ |
| A5858 | + | A6146 | ++ |
| A5883 | + | A6148 | + |
| A5885 | ++ | A6163 | + |
| A5957 | ++ | A6164 | +++ |
| A5973 | ++ | A6182 | +++ |
| A5997 | ++ | A6183 | + |
| A6018 | + | A6186 | + |
| A6025 | ++ | A6188 | + |
| A6027 | ++ | A6195 | ++ |
| A6029 | + | A6230 | +++ |
| A6030 | + | A6232 | + |
| A6034 | ++ | A6252 | ++ |
| A6035 | ++ | A6261 | +++ |
| A6047 | + | A6706 | ++ |
| A6048 | + | F2458 | ++ |
| A6052 | +++ | F2865 | + |
| A6067 | + | F2875 | + |
| A6068 | ++ | F2892 | + |

*+ : Inhibition % > 25, ++: Inhibition % > 50,

+++ : Inhibition % > 75

사리, 미국개기장, 독새풀, 여뀌 등의 잡초 또는 작물종자를 파종한 후 선발된 5종의 미생물 배양액을 처리하여 제초효과를 형태, 생리학적 관찰근거에 의해 달관 조사하였다. 즉 무방제의 경우를 0, 완전방제의 경우를 100으로 하여 각각의 제초활성 정도를 평가하는 데 70이상의 등급을 가지면 그 식물에 대하여 제초효과가 있는 것으로 간주하였다. 5종의 미생물 배양액 중 A6182와 A6261 균주는 돌피, 바랭이 등에 강한 발아억제 활성을 나타내었다(표 7).

다. Glutamine 합성을 저해하는 활성저해물질의 탐색

1,748여종(방선균 1,030, 곰팡이 718)의 미생물 발효액을 대상으로 L-glutamine을 첨가하지 않은 배지에서는 저해활성을 나타내고 L-glutamine을 첨가한 배지에서는 저해활성을 나타내지 않는 glutamine 합성 저해제를 탐색하여 3종의 미생물(곰팡이 3, 방선균 1주)을 선발하였다. L-glutamine을 첨가하거나 L-glutamine을 첨가하지 않은 배지 모두에서 저해활성을 나타낸 균주는 73 균주(방선균 54, 곰팡이 19주)였으며, 이 균주들 대부분은 양쪽 평판 모두에서 생육 저지환이 15mm 이상의 강한 저해활성을 나타내었다. 그러나 선별한 3균주 모두 L-glutamine이 함유된 배지에서는 생육 저지환을 나타내지 않았으나 L-glutamine이 없는 *B. subtilis* 배지에서는 10mm 전후의 미약한 생육 저지환을 나타냈으며(표 8), 이들은 *in vivo* 제초활성 검정시 유효한 활성을 나타내지는 못했다.

라. Cellulose 합성을 저해하는 활성저해물질의 탐색

세포벽 성분으로 cellulose를 함유하고 있는 *P. parasitica* 균주와 cellulose를 함유하고 있지 않은 *C. albicans* 균주를 이용하여 cellulose 합성 저해제를 탐색하기 위하여 분리한 1,748(방선균 1,030, 곰팡이 718) 균주를 대상으로 활성 저해물질을 탐색하여 35 균주(방선균 29, 곰팡이 5)를 선별하였다(표 9). 선별한 35

Table 7. *In vivo* herbicidal activities of various culture broth from microorganisms.

| Herbs | A6052 | A6164 | A6182 | A6230 | A6261 |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 돌피 <i>Echinochloa crusgalli</i> | 52 | 0 | 76 | 0 | 92 |
| 명아주 <i>Atriplex gmelini</i> | 0 | 0 | 20 | 0 | 52 |
| 질경이 <i>Plantago alata</i> | 26 | 50 | 0 | 0 | 24 |
| 물달개비 <i>Monochoria vaginalis</i> | 36 | 24 | 12 | 0 | 0 |
| 바랭이 <i>Digitaria ciliaris</i> | 0 | 32 | 96 | 0 | 80 |
| 방동사니 <i>Cyperus microiria</i> | 0 | 46 | 50 | 0 | 68 |
| 미국가막사리 <i>Bidenes tripartita</i> | 0 | 0 | 0 | 34 | 30 |
| 미국개기장 <i>Panicum acroanthum</i> | 56 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 뚝새풀 | 0 | 12 | 24 | 0 | 0 |
| 여뀌 <i>Persicaria blumei</i> | 34 | 24 | 0 | 0 | 34 |

Table 8. Screening for glutamine antagonist

(Unit : mm)

| Microorganisms | <i>B. subtilis</i> | |
|----------------|---------------------|------------------|
| | without L-glutamine | with L-glutamine |
| F2629 | 10 | 0 |
| F2712 | 11 | 0 |
| F2866 | 10 | 0 |

Table 9. Screening for inhibitors of cellulose synthesis. (Unit :mm)

| Microorganisms | Inhibition zone of assay plate | |
|----------------|--------------------------------|--------------------|
| | <i>P. parasitica</i> | <i>C. albicans</i> |
| A5826 | 17 | 0 |
| A5828 | 30 | 0 |
| A5829 | 31 | 0 |
| A5830 | 21 | 0 |
| A5832 | 30 | 0 |
| A5833 | 20 | 0 |
| A5872 | 19 | 0 |
| A5896 | 21 | 0 |
| A5943 | 17 | 0 |
| A6012 | 11 | 0 |
| A6013 | 23 | 0 |
| A6015 | 11 | 0 |
| A6017 | 12 | 0 |
| A6018 | 15 | 0 |
| A6058 | 11 | 0 |
| A6080 | 15 | 0 |
| A6081 | 11 | 0 |
| A6141 | 15 | 0 |
| A6169 | 14 | 0 |
| A6171 | 15 | 0 |
| A6180 | 11 | 0 |
| A6181 | 19 | 0 |
| A6196 | 21 | 0 |
| A6252 | 21 | 0 |
| A6266 | 24 | 0 |
| A6497 | 40 | 0 |
| A6674 | 40 | 0 |
| A6767 | 31 | 0 |
| A6789 | 13 | 0 |
| F2391 | 23 | 0 |
| F2767 | 40 | 0 |
| F2777 | 35 | 0 |
| F3022 | 25 | 0 |
| F3121 | 20 | trace |

주의 균주들 절반은 20mm 이하의 생육저지환을 나타내었으나 20~40mm의 생육저지환을 나타낸 균주들도 절반이나 되어 이 중에서 재현성이 있고 강한 생육 저지환을 나타내는 6 균주들을 우선적으로 선발하여 *in vivo* 실험에 이용하였다.

마. Cellulose 합성을 저해하는 활성저해물질의 *in vivo* 제초활성 검증

Cellulose 합성을 강하게 저해하는 6 균주를 우선적으로 선별하여 1 liter 삼각 플라스크에 배양하여 재현성 있게 강한 제초활성을 나타내는지의 여부를 조사한 결과 4균주가 1차 실험에서의 결과와 대등한 제초활성을 나타내었고 나머지 2 균주들은 1차 실험보다 미약한 결과를 나타내었다. 따라서 이 화합물들이 *in vivo*에서도 저해활성을 나타내는지의 여부를 확인하기 위하여 한국화학연구소 농약활성 연구실에 의뢰하여 *in vivo*에서의 제초활성을 조사한 결과 방선균과 곰팡이로부터 강한 제초활성을 나타내는 후보물질을 3종류 얻을 수 있었다(표 10). 이러한 후보물질들은 방선균(A6497) 1종과 곰팡이(F2767, F2777) 2종이었으며 주요 제초증상은 처리 후 초기에(1주 이내) 경엽의 necrosis와 burning effect를 나타내었다. 특히 이들 중 처리당시의 경엽은 고사되더라도 기타 조직은 비교적 빠르게 재생되는 경향을 나타내는 약제로는 F2767, F2777이었다. 반면에 A6497은 광엽 식물에서의 제초활성이 초기에는 강한 저해활성을 나타내지 않았으나, 후기(14일 경과하여 판독 시)에는 초기와는 달리 지속적으로 강한 제초활성을 나타내어(표 10) 이 화합물은 광합성 과정을 저해하는 것으로 추정되었으나 자세한 것은 더욱 더 조사하여야 할 것으로 사료되었다.

한편 어저귀, 도꼬마리의 경우 epinasty, 잎이 작아지며 엽면이 요철모양으로 굴곡되는 증상들이 동반되어 호르몬성 제초효과도 어느 정도 포함되어 있는 것으로 판단되었다.

Table 10. *In vivo* herbicidal activities of various culture broth from microorganisms.

| Microorg. | Days | SORBI | ECHCG | AGRSM | DIGSA | PANDI | SOLNI | AESIN | ABUTH | XANSI | CAGEH |
|-----------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A6497 | 2 | 10 | 40 | 10 | 30 | × | 30 | 70 | x | 40 | 0 |
| | 14 | 30 | 20 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 80 | 100 |
| A6674 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| A6767 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F2767 | 2 | 90 | 70 | 30 | 100 | × | 90 | 70 | 65 | 70 | 30 |
| | 14 | 30 | 0 | 35 | 70 | 70 | 40 | 30 | 50 | 40 | 0 |
| F2777 | 2 | 50 | 70 | 10 | 95 | × | 70 | 70 | 50 | 15 | 20 |
| | 14 | 35 | 35 | 40 | 40 | 40 | 100 | 40 | 0 | 35 | 0 |
| F3022 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| Classification | Abbr. ¹⁾ | Scientific name | English name | Korean name |
|----------------|-----------------------------------|---|-------------------|-------------|
| Grasses | SORBI | <i>Sorghum bicolor</i> Moench | Common sorghum | 수수 |
| | ECHCG | <i>Echinochloa crus-galli</i> P. Beauv | Barnyardgrass | 돌피 |
| Broadleaves | AGRSM | <i>Agropyron smithii</i> Rydb. | Quackgrass | 개밀 |
| | DIGSA | <i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop. | Large crabgrass | 바랭이 |
| | PANDI | <i>Panicum dichotomiflorum</i> Michx. | Fall panicum | 미국개기장 |
| | SOLNI | <i>Solanum nigrum</i> L. | Black nightshade | 까마중 |
| | AESIN | <i>Aeschynomene indica</i> L. | Indian jointvetch | 자귀풀 |
| | ABUTH | <i>Abutilon avicennae</i> Gaertn | Velvetleaf | 이저귀 |
| | XANSI | <i>Xanthium strumarium</i> L. | Cocklebur | 도꼬마리 |
| CAGEH | <i>Calystegia japonica</i> Choisy | Bindweed | 메꽃 | |

¹⁾ Bayer code

바. 제초활성물질을 생산하는 미생물의 최종선발

분리된 유용미생물 발효액의 전처리된 시료를 대상으로하여 돌피발아 억제 대사산물 및 glutamin 합성 저해제와 cellulose 합성 저해제 탐색체계를 이용, 위의 결과에서 선발된 수종의 미생물의 발효액을 이용한 온실내 제초활성 검정 결과를 토대로 *in vitro* 및 *in vivo* 활성검정시 활성의 재현성을 보이면서 제초활성이 안정적으로 유지되는 A6497을 최종 선발하여 이를 대상으로 균주의 동정 및 제초활성 물질의 분리 정제를 수행하였다.

3. 제초 활성물질을 생산하는 균주의 동정

가. 배양학적 특징

선별한 방선균 A6497 균주를 ISP 배지 6종과 Bennet 배지 및 Czapek 배지 등 10여 종의 배지를 이용하여 28℃에서 3주 동안 배양하면서 증식, 기균사 색깔, 배면의 색깔, 수용성 색소 생성 등 배양학적 특징을 관찰한 결과 ISP 6(peptone-yeast extract iron agar)배지를 제외한 나머지 배지에서는 생육이 왕성하고 기균사를 형성하였다(표 11). 기균사의 색깔은 배지에 따라 다양한 색상을 나타내었고, 대부분의 배지에서는 생성되지 않았다. 또한 배면 색상은 배지의 종류에 따라 다소 차이를 나타내었으나 전반적으로 옅은 갈색계열이었다.

나. 생리적인 특징

방선균 A6497 균주의 생리적인 특성을 조사한 결과 이 균주의 생육온도는 25-30℃이었고 최적온도는 28℃이었으며, 전분가수분해와 casein 분해 반응에서 양성 반응을 나타내었으나, xanthin과 L-tyrosin 반응에서는 음성을 나타내었다(표 12).

한편 당 이용성은 시험에 이용한 10여종의 당류 중 arabinose를 제외한 나머지 9종에서 양성 반응을 나타내었다(표 13).

Table 11. Cultural Characteristics of the isolated strain A6497.

| Media | Characteristics | A6497 |
|---|-----------------|----------------------------|
| Yeast extract-Malt extract agar(ISP-2) | G | Abundant |
| | AM | White(263) |
| | R | s. Y(84)+m. Y(87) |
| | Sp | Absent |
| Oatmeal agar (ISP-3) | G | Abundant |
| | AM | gy · YG(122) |
| | R | d. Y(88) |
| | Sp | Absent |
| Inorganic salts-Starch agar (ISP-4) | G | Abundant |
| | AM | gy. gY(105)+l. gy. ol(109) |
| | R | m. Y(87) |
| | Sp | Absent |
| Glycerol-Asparagine agar (ISP-5) | G | Abundant |
| | AM | gy. gY(105) |
| | R | p. Y(89) |
| | Sp | Absent |
| Peptone-Yeast extract Iron agar (ISP-6) | G | Poor |
| | AM | 형성안됨 |
| | R | m. Y(87) |
| | Sp | Absent |
| Tyrosine agar (ISP-7) | G | Abundant |
| | AM | gy. gY(105) |
| | R | p. Y(89) |
| | Sp | Absent |
| Bennett agar | G | Abundant |
| | AM | White(263) |
| | R | m. Y(87)+gy. Y(90) |
| | Sp | Absent |
| Nutrient agar | G | Moderate |
| | AM | 형성안됨 |
| | R | gy. Y(90) |
| | Sp | Absent |
| Czapek agar | G | Abundant |
| | AM | gy. gY(105) |
| | R | p. Y(89) |
| | Sp | Absent |
| Modified Tyrosine agar | G | Moderate |
| | AM | 형성안됨 |
| | R | p. Y(89)+l. Y(86) |
| | Sp | Absent |

* G:Growth, AM :Aerial mycelium, R :Reverse color , Sp :Soluble pigment

Table 12. Physiological characteristics of the isolated strain A6497

| Test | A6497 |
|--------------------|---------|
| Starch hydrolysis | + |
| Melanine formation | - |
| Temp range(°C) | 25-30°C |
| Optimum | 28°C |
| Decomposition | |
| Casein | + |
| Xanthin | - |

Table 13. Utilization of carbon sources by the isolated strain A6497

| Sugars | A6497 |
|-----------|-------|
| Arabinose | ± |
| Dextrin | ++ |
| Fructose | ++ |
| Galactose | + |
| inositol | + |
| Inulin | + |
| Mannitol | + |
| Raffinose | + |
| Salicin | + |
| Sucrose | + |
| Xylose | ++ |

다. 형태학적 특징

방선균 A6497 균주의 형태학적 특징을 주사전자현미경으로 조사한 결과 긴 사슬의 포자가 retinaculum-apertum의 형태로 연결되었고, 포자의 표면은 smooth 형태이었으며, 크기는 0.8-1.0 x 1.0-1.6 μm 이었다(그림 1).

라. 균체 지방산 분석

Tryptic soy broth에서 배양한 집락을 모아 saponification, methylation하여 메틸화된 지방산을 gas chromatography로 분석하고 Microbial Identification System으로 동정한 결과 A6497 균주는 anteiso-C_{15:0} (28.36%), iso-C_{16:0} (19.78%), iso-C_{15:0} (16.62%), anteiso-C_{17:0} (11.74%)가 주요 성분으로 검출되었다.

마. 세포벽 분석

세포벽 내의 diaminopimelic acid를 분석한 결과 이 균주는 LL-diaminopimelic acid를 함유하였다(그림 2).

바. 균체당 분석

Tryptic soy agar에서 생육한 균체를 모아 동결건조시킨 후 황산으로 가수분해하고 HPLC로 분석한 결과 표준물질로 사용한 8개 당(rhamnose, ribose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose, meso-inositol)모두 A6497 균주에서는 검출되지 않았다.

이상의 모든 결과들을 종합해 볼 때 A6497 균주는 *Streptomyces* 속으로 동정되어 이 균주를 *Streptomyces* sp. A6497 균주라고 명명하였다.

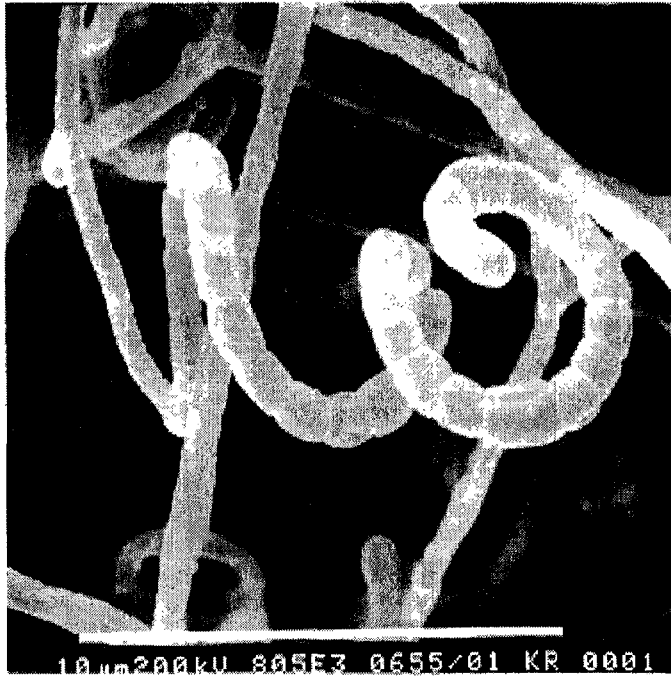


Fig. 1. Scanning Electron Microphotogram of the isolated strain A6497.

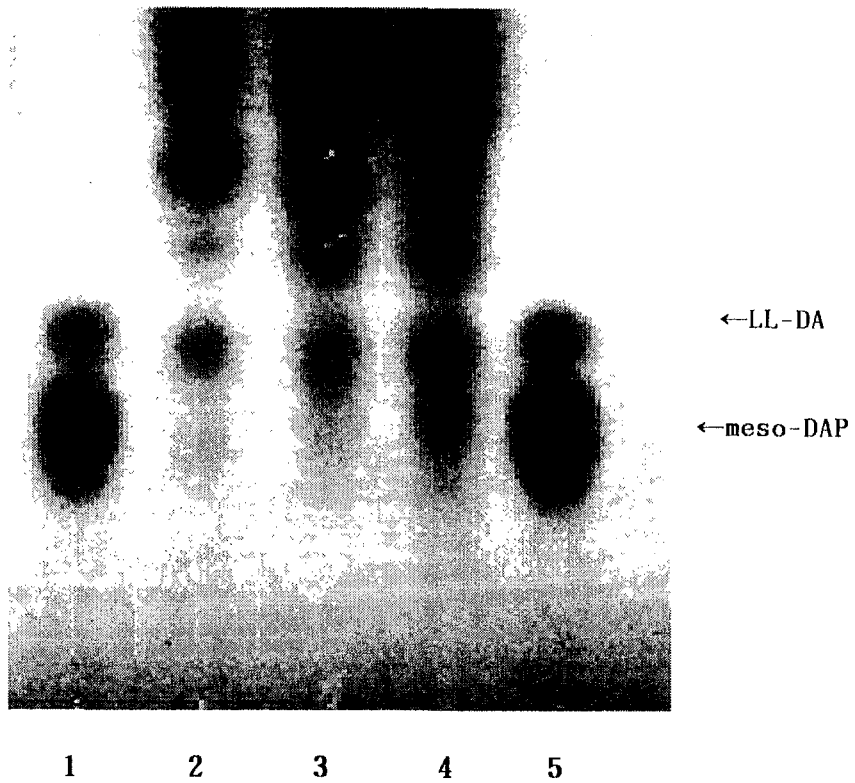


Fig.2. Thin layer chromatograms of diaminopimelic acid (DAP) isomer.

* 1, 5 : Standard, 2, 3, 4 : The strain A6497

4. *Streptomyces* sp. A6497로부터 제초활성물질의 분리정제

Streptomyces sp. A6497이 생산하는 cellulose 합성 저해물질을 분리정제하기 위하여 A6497 균주를 E 배지에 접종하여 27°C에서 4 일 동안 진탕배양하여 이를 분리정제에 이용하였다. A6497 발효액에 동량의 ethyl acetate를 첨가하여 2회 추출하고 ethyl acetate 추출액을 silica column chromatography(chloroform : methanol)를 실시하여 활성 분획을 얻은 후 ODS column chromatography (methanol : water)를 2회 실시하여 2개의 활성분획으로 나누었다. 다시 50-60% methanol에 용출된 활성분획을 ODS sep-pak column chromatography와 Sephadex LH-20 column chromatography를 하여 5개의 활성분획으로 나누고 이 중에서 분획 3을 더욱 더 분리정제하기 위하여 ODS sep-pak column chromatography(10% CH₃CN → CH₃CN → MeOH)를 행한 후 10% CH₃CN에 용해된 부분을 다시 50% MeOH로 용출시켜 화합물 1을 분리정제하고 구조분석을 행하였다(그림 3). 또한 Sephadex LH-20 column chromatography를 하여 얻은 분획 4와 5를 합하고 ODS preparative TLC를 행하여 세포벽 내에 cellulose를 함유하고 있는 *Phytophthora parasitica* 평판에서만 40mm 이상의 저해활성을 나타내는 분획(R_f : 0.46)을 분리정제하였다(그림 3).

5. *Streptomyces* sp. A6497로부터 분리한 제초활성물질의 구조 결정

Streptomyces sp. A6497가 생산하는 화합물의 화학구조를 규명하기 위하여 ESI-mass 분석 및 ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT를 비롯한 각종 NMR spectrum을 측정 및 해석하였다. 먼저 분자량을 알아보기 위하여 ESI-mass spectrum(그림 4)을 측정한 결과 m/z 309.8에서 [M+H]⁺에 기인하는 peak가 관찰되어 본 화합물의 분자량이 309인 것을 알았다. 또한 ¹H NMR spectrum(그림 5)을 측정한 결과 8.06 및 8.03 ppm에서 방향족성 methine proton signal이 관찰되었고, 5.99, 4.62, 4.28, 4.13 ppm에서 산소와 결합한 methine proton

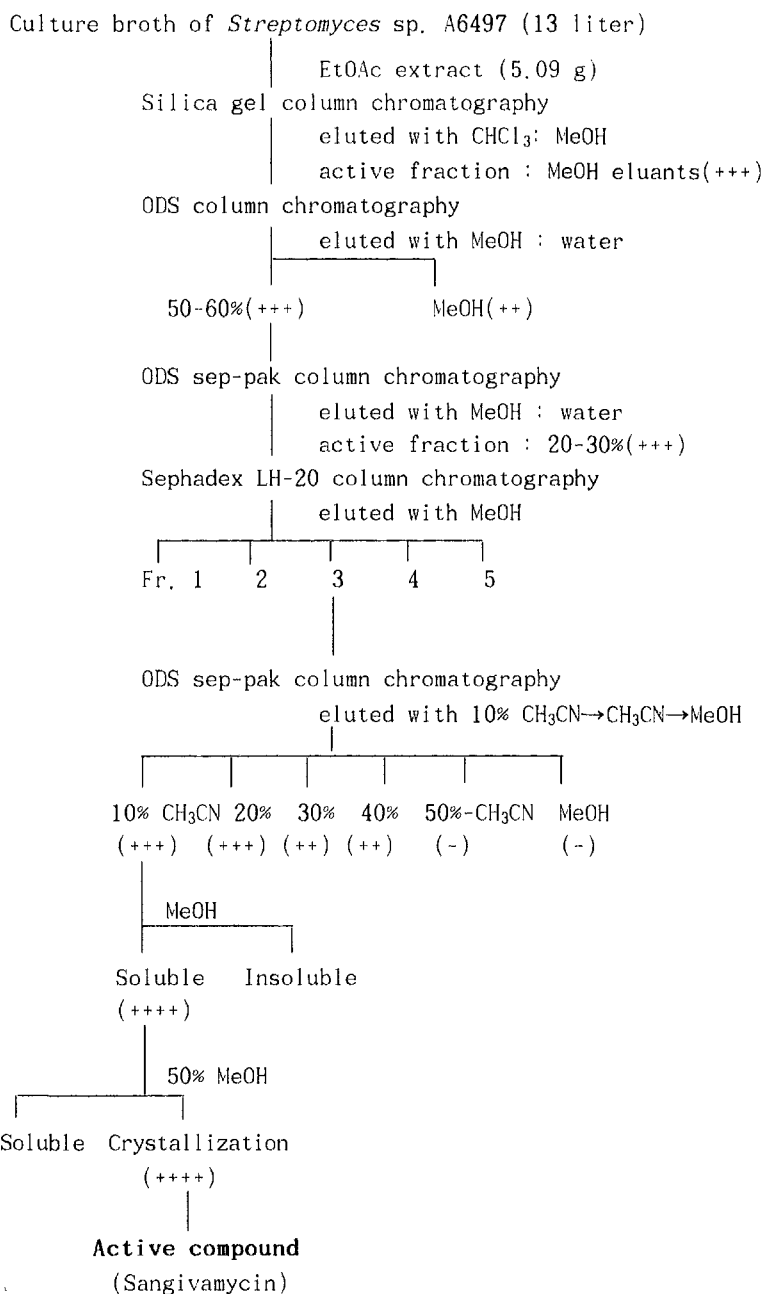


Fig. 3. Purification steps of bioactive compound from *Streptomyces* sp. A6497.

*Inhibition zone(100 μ gloading): ++++:>40mm, +++:40-20mm, ++:15-20, +:<15mm.

KRIBB : HYL_A97COM1 80% ACN(0.1% FA)
072114Y1189 (1.618) Cm (88.92-74.78)

Scan 35 -
2.90µl

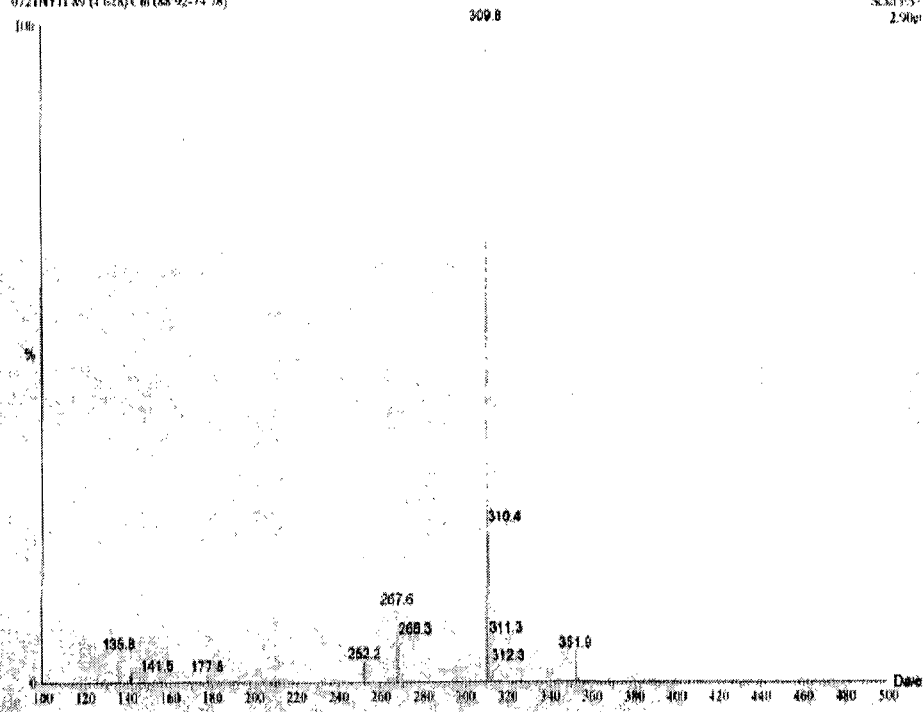


Fig. 4. HREI Mass spectrum of bioactive compound produced from *Streptomyces* sp. A6497.

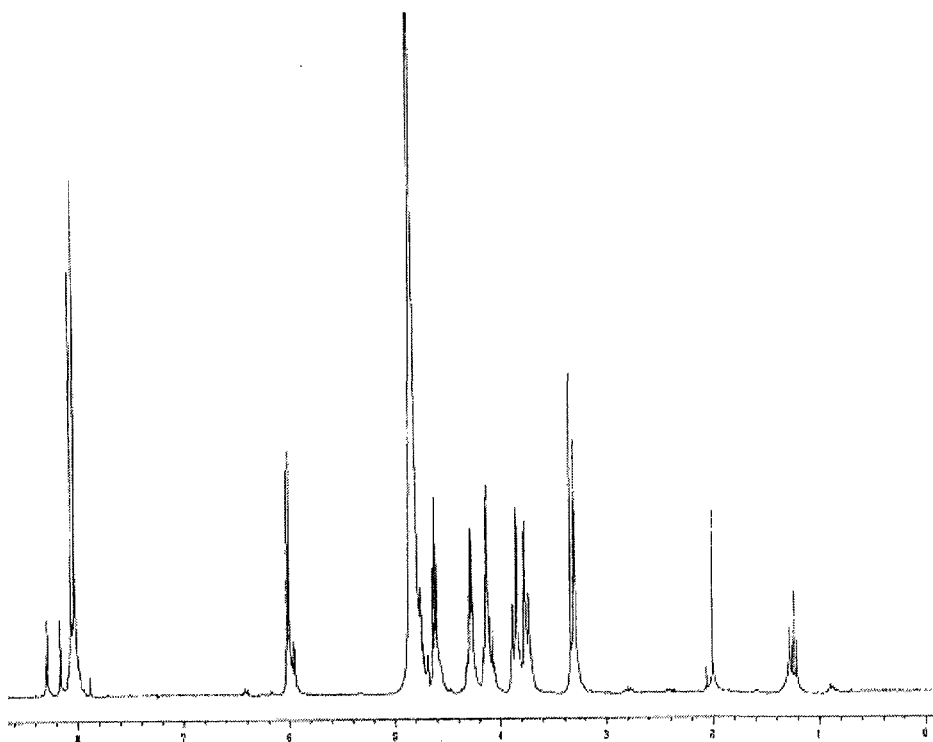


Fig. 5. ¹H-NMR spectrum of bioactive compound produced from *Streptomyces* sp. A6497(300MHz, CD₃OD).

signal 및 3.86, 3.75 ppm에서 methylene proton signal이 관찰되었다. 이 같은 ^1H NMR spectrum은 nucleoside 계열 화합물의 전형적인 특징으로 특히 5탄당의 ribose의 peak들은 문헌치의 ribose signal과 매우 잘 일치하였다. 따라서 nucleoside 계열의 화합물과 spectrum을 비교 분석한 결과 adenosine과 본 화합물이 매우 유사함을 알 수 있었다. 그러나 상술한 분자량 및 ^{13}C NMR spectrum은 adenosine과 일치하지 않아 ^{13}C NMR spectrum (그림 6) 및 DEPT spectrum(그림 7)을 측정된 결과 168.89 ppm에서 carbonyl 탄소, 153.43 및 128.07 ppm에서 aromatic methine 탄소, 159.80, 151.05, 112.17, 103.52 ppm에서 4개의 사급 탄소가 관찰되었다. 또한 91.64, 87.52, 75.58, 72.45 ppm에서 산소와 결합한 methine 탄소, 63.44 ppm에서 methylene 탄소가 관찰되었으며 이는 문헌과의 비교에 의하여 5탄당의 ribose 유래의 peak들로 규명되었으며, 본 화합물의 ^1H NMR, ^{13}C NMR data를 표 14에 나타내었다. 이상의 mass 및 NMR 분석으로부터 *Streptomyces* sp. A6497이 생산하는 화합물은 분자량 309이고 분자식이 $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_5$ 인 nucleoside계의 화합물로 규명되었으며 이를 토대로 database를 이용하여 검색한 결과 본 화합물은 항진균 활성물질과 항바이러스 물질 및 protein kinase C 저해제로 보고된 sangivamycin⁴²⁾으로 동정하여 그 구조를 그림 8에 나타내었으며 이 화합물이 제초활성을 나타낸다는 사실을 처음으로 발견하였다.

6. 방선균 *Streptomyces* sp. A6497 균주로부터 분리한 sangivamycin의 최소 생육저지 농도(MIC)의 결정

Cellulose 합성을 저해하는 sangivamycin을 이용하여 식물 병원성 진균류 8종에 대한 항균력을 조사하였다(표 15). 그 결과 벼의 도열병을 일으키는 *Pyricularia oryzae*, 오이 잣빛 곰팡이병을 일으키는 *Botrytis cinerea*, 오이 탄저병을 일으키는 *Colletotrichum lagenarium* 및 배나무 흑반병을 일으키는 *Alternaria kikuchiana*에 대한 MIC 값은 $100\ \mu\text{g/ml}$ 를 나타내어 매우 미약한 항균력을 나타내었다. 또한 이 화합물은 벼의 문고병을 나타내는 *Rhizoctonia solani*와

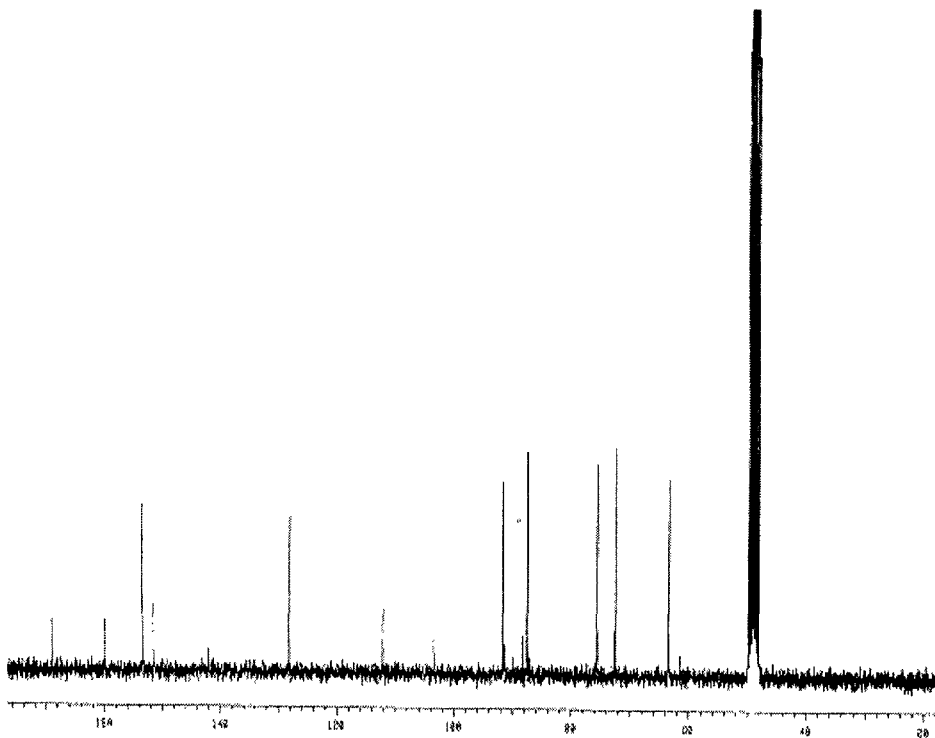


Fig. 6. ^{13}C NMR spectrum of bioactive compound produced from *Streptomyces* sp. A6497 (75MHz, CD_3OD).

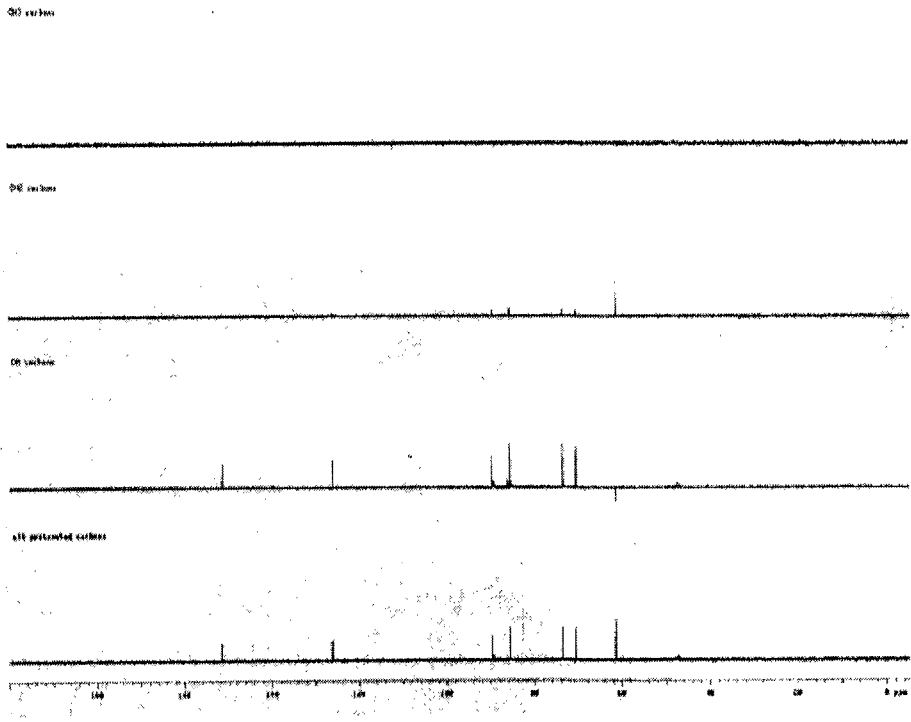


Fig. 7. DEPT spectrum of bioactive compound produced from *Streptomyces* sp. A6497.

Table 14. ¹H NMR and ¹³C NMR spectral data for bioactive compound produced by *streptomyces* sp. A6497(CD₃OD).

| No | ¹³ C chemical shifts | ¹ H chemical shifts |
|-------------------|---------------------------------|--|
| 2 | 153.43 (CH) | 8.03 (1H, s) ^a |
| 4 | 159.80 (C) | |
| 4a | 103.52 (C) | |
| 5 | 112.17 (C) | |
| 6 | 128.07 (CH) | 8.06 (1H, s) |
| 7a | 151.05 (C) | |
| 1' | 91.64 (CH) | 5.99 (1H, d, <i>J</i> =6.3) |
| 2' | 75.58 (CH) | 4.62 (1H, t, <i>J</i> =6.3) |
| 3' | 72.45 (CH) | 4.28 (1H, dd, <i>J</i> =5.1, 3.0) |
| 4' | 87.52 (CH) | 4.13 (1H, m) |
| 5' | 63.44 (CH ₂) | 3.86 (1H, dd, <i>J</i> =12.3, 2.6) 3.75 (1H, dd, <i>J</i> =12.3, 3.2) |
| CONH ₂ | 168.89 (C) | |

^aProton resonance integration, multiplicity and coupling constants(*J*=Hz) in parenthesis

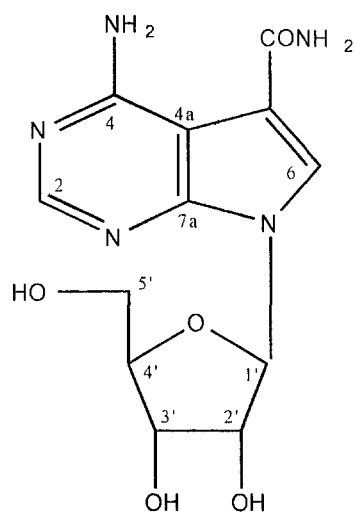


Fig. 8. Structure of sangivamycin produced from *Streptomyces* sp. A6497.

Table 15. The antifungal activities of sangivamycin against various plant pathogens.

(MIC : $\mu\text{g/ml}$)

| Plant Pathogens | Sangivamycin |
|----------------------------------|--------------|
| <i>Pyricularia oryzae</i> | > 100 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 50 |
| <i>Phytophthora parasitica</i> | 3,125 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | > 100 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 100 |
| <i>Colletotrichum lagenarium</i> | 100 |
| <i>Alternaria kikuchiana</i> | 100 |
| <i>Phytophthora capsici</i> | 50 |

고추의 역병을 일으키는 *Phytophthora capsici*에 대해서도 미약한 저해활성을 나타내었으나($50 \mu\text{g/ml}$) 세포벽에 cellulose를 함유하고 있다고 알려진 *Phytophthora parasitica* 균주에 대해서는 선택적으로 매우 강한 항균력을 나타내었다($3.125 \mu\text{g/ml}$).

7. *Streptomyces* sp. A6497로부터 분리한 sangivamycin의 제조 활성 검정

가. 오이자엽을 이용한 bleaching 검정

평강 삼척 내병성 오이의 오이자엽을 petri dish에 넣고 28°C 의 광주기($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 내외)의 배양기에서 14시간 동안 방치한 후 메탄올 내에서 homogenizer로 마쇄한 다음 색소를 추출하고 원심 분리한 후 분광광도계를 이용하여 흡광도를 조사한 다음 색소형성 정도를 조사한 결과 sangivamycin은 대조약제로 사용한 oxyfluoren과 비슷한 제조활성을 나타내었으나(표 16) 작용발현 특성에는 차이를 나타내었다. Oxyfluorfen 처리구에서는 처리 후 2일만에 엽록소 소실로 인한 심한 탈색 증상이 나타났으나 sangivamycin 처리구에서는 조직이 먼저 물러진 다음 엽록소의 탈색이 일어나는 경향을 나타내었다.

나. 오이자엽을 이용한 greening 검정

평강 삼척 내병성 오이의 오이자엽을 petri dish에 넣고 5°C 항온 암조건에서 24시간 보존한 후 28°C 에서 14시간 동안 광주기($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 내외)의 배양기에서 24시간 동안 방치한 후 생체중을 측정하고 메탄올 내에서 homogenizer로 마쇄한 다음 색소를 추출하고 원심분리한 후 분광광도계를 이용하여 흡광도를 조사한 다음 색소형성 저해정도를 대조구와 비교한 결과 sangivamycin은 대조약제로 사용한 oxyfluoren 보다는 약간 강한 제조활성을 나타내었다(표 17). 그러나 sangivamycin 처리구에서는 엽록소 생합성 과정을 저해하는 oxyfluorfen과는 달리 암조건 하에서도 조직이

Table 16. Effect of sangivamycin and oxyfluorfen on the bleaching of greened cucumber cotyledon.

| Conc. (ppm) | Total chlorophyll (% of control) | |
|----------------|----------------------------------|-------------|
| | A6497 | Oxyfluorfen |
| 0.1 | 89.6±3.3 | 91.7±8.3 |
| 1 | 69.1±5.3 | 46.2±7.9 |
| 10 | 28.7±8.0 | 0±0 |
| 100 | 0±0 | 0±0 |

Table 17. Effect of sangivamycin and oxyfluorfen on the bleaching of greened cucumber cotyledon.

| Conc. (ppm) | Total chlorophyll (% of control) | |
|----------------|----------------------------------|-------------|
| | A6497 | Oxyfluorfen |
| 0.1 | 89.6±3.3 | 91.7±8.3 |
| 1 | 69.1±5.3 | 46.2±7.9 |
| 10 | 28.7±8.0 | 0±0 |
| 100 | 0±0 | 0±0 |

손상되기 때문에 색소 생합성 과정을 저해하는 화합물은 아니라고 판단되었다.

다. 온실 제초활성 검정

온실 내에서 10여종의 잡초에 대해 sangivamycin이 제초활성을 나타내는지의 여부를 조사하기 위하여 멸균되지 않은 사질양토에 적당량의 비료를 혼합시킨 다음, 시험용 포트 (350 cm²)에 담고 파종구를 만들어 잡초 또는 작물종자를 파종한 후(수수, 피, 개밀, 바랭이, 미국개기장, 메꽃, 도꼬마리, 어저귀, 자귀풀, 까마중) 곱게 친 흙으로 복토하여 온실에 둔 다음 10일간 생육시켰다. 이때 초종별 엽기 또는 신장상태는 개밀 2엽, 피, 2엽, 수수 3엽, 바랭이 3엽초기, 미국개기장 2엽, 까마중 제1본엽 전개, 자귀풀 2복엽 전개, 어저귀 제 2본엽 출현, 도꼬마리 2복엽 출현, 메꽃 5-10cm 정도로 포트당 10 ml의 시험용액을 hand sprayer로 처리한 후, 온실에서 키우면서 제초효과를 형태, 생리학적 관찰근거에 의해 달관조사하였다.

그 결과(표 18) sangivamycin은 처리 후 초기에 (1주 이내) 경엽의 necrosis와 burning effect를 나타내는 증상을 유기시켰다. 특히 광엽식물에서의 활성이 후기에도 지속적으로 나타났는데, 도꼬마리의 경우 잎이 작아지며 엽면이 요철모양으로 굴곡되는 증상들이 동반되었고, 어저귀의 경우는 상대적인 내성이 있으나 고농도에서 생육저해 현상이 동반되었으며, 까마중의 경우에는 신엽의 chlorosis도 관찰되었다.

이러한 결과들을 종합해 볼 때 sangivamycin은 막파괴 기능과 함께 세포분열과정의 교란을 야기하는 것으로 추정되었다.

Sangivamycin의 제초활성은 630g/ha 에서 거의 모든 초종을 고사시켰으며, 200g/ha이하에서는 활성이 낮아지는 경향을 나타내어 비슷한 증상의 기존 합성 제초제보다는 활성이 약하지만 천연물이라는 입장에서 생각해 볼 때 어느 정도 실용화가 가능한 제초활성능력을 나타내는 화합물로 사료되었다.

Table 18. Effect of sangivamycin on the herbicidal activity of several weeds at foliar treatment.

Post-emergence, Treatment at 10Days

| DAT | Rate (g/ha) | SORBI | ECHCG | AGRSM | DIGSA | PANDI | SOLNI | AESIN | ABUTH | XANSI | CAGEH |
|-----|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2 | 23.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 70 | 10 C | 0 | 0 | 20 C | 20 C | 0 | 20C | 0 | 20 E | 15 C |
| | 210 | 40 C | 70 C | 15 | 70 C | 60 C | 30 CI | 100 C | 10 B | 60 BE | 30 AC |
| | 630 | 70 C | 80 C | 60 C | 90 C | 60 C | 60 CI | 100 C | 10 B | 60 BE | 90 C |
| 6 | 23.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 70 | 20 IA | 20C | 0 | 20 C | 30CB | 0 | 20 C | 0 | 10 E | 0 |
| | 210 | 80CBI | 100 | 25 C | 85CBI | 60CB | 85BCI | 100 | 20 B | 90 | 60 CB |
| | 630 | 100 | 100 | 90 | 100 | 90 | 100 | 100 | 70 B | 100 | 100 |
| 11 | 23.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 70 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | 210 | 60 | 100 | 20 | 70 | 50 CB | 65 | 100 | 20 | 90 | 60 |
| | 630 | 100 | 100 | 60 BC | 100 | 90 | 100 | 100 | 80 B | 100 | 100 |

* Test plants used in this experiment

| Classification | Abbr. ¹⁾ | Scientific name | English name | Korean name |
|----------------|-----------------------------------|---|-------------------|-------------|
| Grasses | SORBI | <i>Sorghum bicolor</i> Moench | Common sorghum | 수수 |
| | ECHCG | <i>Echinochloa crus-galli</i> P. Beauv | Barnyardgrass | 돌피 |
| Broadleaves | AGRSM | <i>Agropyron smithii</i> Rydb. | Quackgrass | 개밀 |
| | DIGSA | <i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop. | Large crabgrass | 바랭이 |
| | PANDI | <i>Panicum dichotomiflorum</i> Michx. | Fall panicum | 미국개기장 |
| | SOLNI | <i>Solanum nigrum</i> L. | Black nightshade | 까마중 |
| | AESIN | <i>Aeschynomene indica</i> L. | Indian jointvetch | 자귀풀 |
| | ABUTH | <i>Abutilon avicennae</i> Gaertn | Velvetleaf | 어저귀 |
| | XANSI | <i>Xanthium strumarium</i> L. | Cocklebur | 도꼬마리 |
| CAGEH | <i>Calystegia japonica</i> Choisy | Bindweed | 메꽃 | |

¹⁾ Bayer code

8. *Streptomyces* sp. A6497의 최적배양 조건 확립

가. *Streptomyces* sp. A6497의 최적배지 검토

1) 탄소원의 영향

기본배지에 각종 탄소원을 2%(w/v) 첨가한 다음 종균 배양액을 2%(v/v)되게 접종하여 28℃에서 4일간 배양하면서 항균활성을 검토한 결과, 대부분의 탄소원에서 저해물질의 생산이 높았으며 그 중에서도 특히 glucose와 soluble starch를 첨가했을 때 대조구에 비하여 항균활성이 높았다(표 19).

2) 질소원의 영향

Glucose를 2%(w/v) 첨가한 기본 배지(pH 7.0)에 각종 질소원을 1%(w/v) 되도록 첨가하고 종균 배양액을 2% (w/v)되게 접종하여 28℃에서 4일간 배양한 후 항균활성을 검토한 결과, yeast extract, soybean meal 등을 첨가했을 때 항균활성이 가장 높게 나타났다(표 19).

3) 무기염류 및 복합 혼합물의 영향

탄소원으로 2%의 glucose 와 질소원으로 1.0%의 yeast extract 를 첨가한 기본배지(pH 7.0)에 pharma media, NaCl, K₂HPO₄, CaCO₃, MgSO₄·7H₂O의 농도를 달리하여 첨가한 후 종균 배양액을 2%(w/v)되게 접종하여 28℃에서 7일간 배양한 후 항균활성을 검토하였다. 그 결과 0.6% pharma media, 0.4% CaCO₃, 0.3% K₂HPO₄ 를 첨가했을 때 *P. parasitica*에 대한 항균활성이 가장 높게 나타났으나, NaCl, MgSO₄·7H₂O의 영향은 거의 없는 것으로 나타났다(표 20).

Table 19. Effect of carbon and nitrogen sources on the production of antifungal agent from *Streptomyces* sp. A6497.

| Sources(2%) | Antifungal activity (mm) |
|------------------|--------------------------|
| Carbon sources | |
| None | 8 |
| Corn starch | 34 |
| Fructose | 21 |
| Galactose | 32 |
| Glucose | 48 |
| Lactose | 22 |
| Maltose | 25 |
| Mannitol | 34 |
| Mannose | 26 |
| Soluble starch | 47 |
| Sorbitol | 30 |
| Sucrose | 25 |
| Nitrogen sources | |
| None | 9 |
| Beef extract | 32 |
| Casamino acid | 28 |
| Casitone | 41 |
| Malt extract | 42 |
| Peptone | 27 |
| Polypeptone | 28 |
| Skim milk | 36 |
| Soybean meal | 45 |
| Soytone | 30 |
| Tryptone | 18 |
| Yeast extract | 49 |

Table 20. Effect of pharma media, CaCO₃ and K₂HPO₄ on the production of antifungal agent from *Streptomyces* sp. A6497

| Concentration(%) | Antifungal activity (mm) |
|---------------------------------|--------------------------|
| Pharma media | |
| 0 | 34 |
| 0.2 | 45 |
| 0.4 | 46 |
| 0.6 | 49 |
| 0.8 | 35 |
| 1.0 | 30 |
| CaCO ₃ | |
| 0 | 35 |
| 0.1 | 37 |
| 0.2 | 45 |
| 0.3 | 46 |
| 0.4 | 48 |
| 0.5 | 40 |
| K ₂ HPO ₄ | |
| 0 | 35 |
| 0.1 | 37 |
| 0.2 | 38 |
| 0.3 | 48 |
| 0.4 | 40 |
| 0.5 | 40 |

4) Plackett-Burman Design(PBD)과 Box-Behnken experimental design(BBD)을 통한 배지의 최적화

Streptomyces sp. A6497이 생산하는 제초활성물질의 생산을 최대화하기 위하여 PBD를 이용하여(그림 9) 기본 배지의 최적화를 실시한 결과, 그림 10에서와 같이 탄소원인 glucose가 제초활성물질 생산에 가장 중요한 요소로 나타났으며 질소원 또한 주된 인자 중의 하나라고 사료되었다. 따라서 이러한 PBD 결과로부터 glucose, soluble starch, pharma media, yeast extract를 배지 성분으로 정하고 각각 성분의 농도를 정하기위해 이들 각각의 최적점을 얻어내고(그림 11), 실험적으로 얻어낸 최적점을 BBD 통계 처리하였다(표 21).

Glucose(20g/L), soluble starch(20g/L), pharma media(6g/L) 및 yeast extract는 8g/L가 BBD의 통해 얻은 최적 활성물질 생산에 적합한 배지 조성이었다. BBD 결과를 요약하여 표 21에 나타내었는데 12번 조성이 제초활성물질 생산에 최적인 배지 조성으로 사료되었다.

따라서 제초활성물질을 생산하는 *Streptomyces* sp. A6497의 최적배지 조성은 glucose 2%, soluble starch 1.5%, pharma media 0.4%, yeast extract 1%, CaCO₃ 0.4%, Soybean meal 0.5%, K₂HPO₄ 0.3%로 결정하였다.

나. 회분식 배양 조건

Streptomyces sp. A6497균주를 5L jar fermenter에서 working volum 2.5L의 최적 배지를 넣고 2% seed(v/v), 초기 pH7.0, aeration(300rpm, 1vvm), 28℃에서 배양하면서 시간에 따른 pH, DO 및 배지의 항균활성 변화를 확인한 결과(그림 12), pH는 초기에 조금씩 상승하다가 2차 대사산물이 생성되는 시기인 48시간에서 급격히 떨어지는 것으로 확인되었으며 상대적으로 DO값은 48시간까지 균체 성장기에 급격히 떨어지다가 2차 대사 산물이 생산되는 시점을 기해 상대적으로 많이 상승하는 것으로 보인다. DO와 pH를 이용하여 간접적으로 정지기와 2차 대사산물이 생성되는 시

| Streptomyces spp | | | | | | | | | |
|------------------|----------|----------------|------------|------------|----------|---------|--------|----------|--------------|
| After 96hr | | | | | | | | | |
| Run | Glucose | soluble starch | gamma hama | medi/yeast | extracoy | bean Me | K2HPO4 | CaCO3 | Activity(mm) |
| 1 | + | - | + | - | - | - | - | + | 59 |
| 2 | + | + | - | + | - | - | - | - | 51 |
| 3 | - | + | + | - | + | - | - | - | 19 |
| 4 | + | - | + | + | - | + | + | - | 49 |
| 5 | + | + | - | + | + | - | - | + | 60 |
| 6 | + | + | + | - | + | + | + | - | 61 |
| 7 | - | + | + | + | - | + | + | + | 29 |
| 8 | - | - | + | + | + | - | - | + | 23 |
| 9 | - | - | - | + | + | + | + | - | 22 |
| 10 | + | - | - | - | + | + | + | + | 25 |
| 11 | - | + | - | - | - | + | + | + | 21 |
| 12 | - | - | - | - | - | - | - | - | 16 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 47 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 51 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 55 |
| 1 | 30g/L | 2 | 6 | 1 | 1 | 0.6 | 8 | | |
| 2 | 30 | 20 | 0.6 | 10 | 1 | 0.6 | 0.8 | | |
| 3 | 3 | 20 | 6 | 1 | 10 | 0.6 | 0.8 | | |
| 4 | 30 | 2 | 6 | 10 | 1 | 6 | 0.8 | | |
| 5 | 30 | 20 | 0.6 | 10 | 10 | 0.6 | 8 | | |
| 6 | 30 | 20 | 6 | 1 | 10 | 6 | 0.8 | | |
| 7 | 3 | 20 | 6 | 10 | 1 | 6 | 8 | | |
| 8 | 3 | 2 | 6 | 10 | 10 | 0.6 | 8 | | |
| 9 | 3 | 2 | 0.6 | 10 | 10 | 6 | 0.8 | | |
| 10 | 30 | 2 | 0.6 | 1 | 10 | 6 | 8 | | |
| 11 | 3 | 20 | 0.6 | 1 | 1 | 6 | 8 | | |
| 12 | 3 | 2 | 0.6 | 1 | 1 | 0.6 | 0.8 | | |
| 13 | 16.5 | 11 | 3.3 | 5.5 | 5.5 | 3.3 | 4.4 | | |
| 14 | 16.5 | 11 | 3.3 | 5.5 | 5.5 | 3.3 | 4.4 | | |
| 15 | 16.5 | 11 | 3.3 | 5.5 | 5.5 | 3.3 | 4.4 | | |
| main effect | 29.16667 | 7.833333 | | 7.5 | 5.5 | -2.5 | -3.5 | -0.16667 | |

Fig 9. Run of plackett-burman design (PBD) on Excel

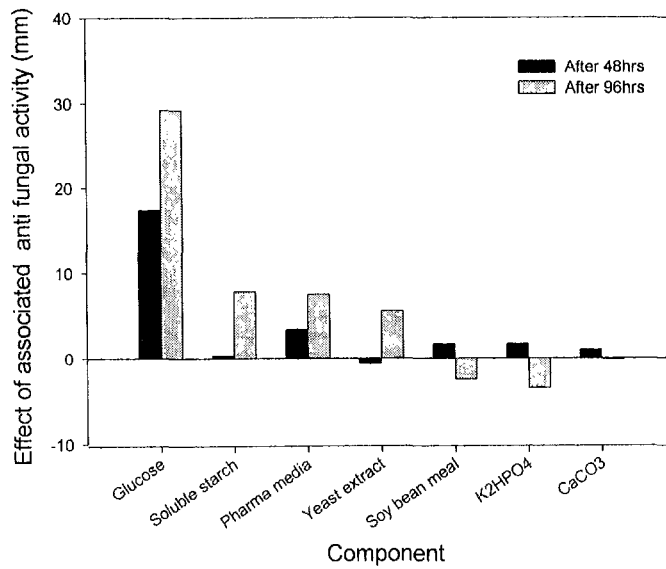


Fig 10. Results of Plackett-Burman Design (antifungal effect of each components and its mutuality on producing of antifungal agent)

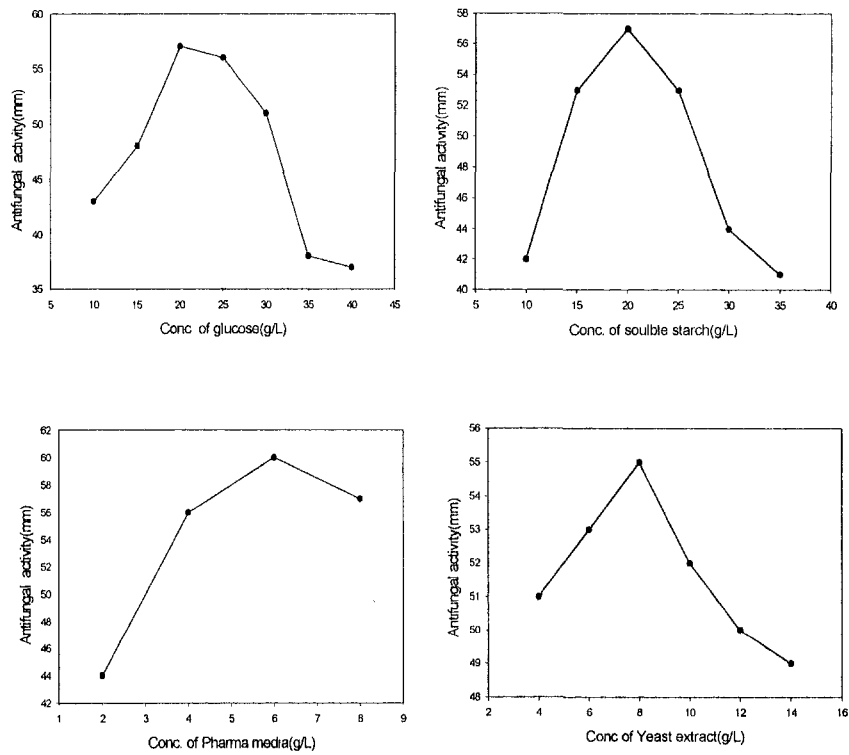


Fig 11. Optimal concentration of main components (glucose souble starch, pharma media and yeast extract)

Table 21. Result of Box-Behnken experimental Design

| Run | Glucose | Soluble starch | Pharma media | Yeast extract | Soybean meal | K ₂ HPO ₄ | CaCO ₃ | Antifungal Activity (mm) |
|-----|---------|----------------|--------------|---------------|--------------|---------------------------------|-------------------|--------------------------|
| 1 | + | 0 | 0 | 0 | S | S | S | 54 |
| 2 | 0 | + | 0 | + | S | S | S | 53 |
| 3 | + | - | 0 | - | S | S | S | 60 |
| 4 | - | - | 0 | + | S | S | S | 58 |
| 5 | - | + | + | 0 | S | S | S | 50 |
| 6 | - | 0 | - | + | S | S | S | 49 |
| 7 | 0 | 0 | + | - | S | S | S | 53 |
| 8 | 0 | + | - | 0 | S | S | S | 59 |
| 9 | - | - | - | 0 | S | S | S | 55 |
| 10 | + | + | + | - | S | S | S | 46 |
| 11 | + | 0 | + | - | S | S | S | 55 |
| 12 | 0 | - | - | + | S | S | S | 61 |
| 13 | S | S | S | S | S | S | S | 54 |
| 14 | S | S | S | S | S | S | S | 60 |
| 15 | S | S | S | S | S | S | S | 55 |

| | glucose (g/L) | soluble starch (g/L) | pharma media (g/L) | yeast extract (g/L) | soybean meal (g/L) | K ₂ HPO ₄ (g/L) | CaCO ₃ (g/L) |
|---|---------------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| + | 30 | 25 | 8 | 10 | | | |
| 0 | 20 | 20 | 6 | 8 | | | |
| - | 10 | 15 | 4 | 6 | | | |
| S | 20 | 20 | 6 | 8 | 5 | 3 | 4 |

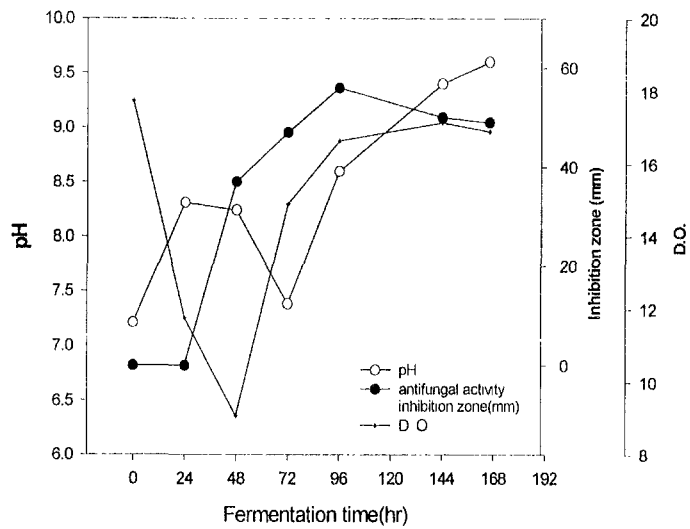


Fig. 12. Fermentation profile of *Streptomyces* sp. A6497

기를 알 수 있었으며, 또한 제초활성물질이 최대 생성되는 시기는 96 시간으로 나타나 이를 근거로 하여 발효 종료시점을 정하였으며, 연속배양의 기준 dilution rate은 pH가 조금씩 상승하는 부분부터 DO값이 떨어지다가 다시 상승하는 부분까지의 시간을 기준으로 0.86ml/min으로 하였다.

부분적 연속배양은 배양이 stationary phase에 들어갔을 때 일정 dilution rate을 주고 물리적 인자(pH, 온도 등)를 고정시킨 후 chemo stat이 유지되도록 3 time batch만큼 더 배양한 후 2일 동안 inlet, outlet없이 배양하여 그 고정인자에서의 항균활성을 확인하였다. 이 후 다시 물리적 인자를 바꾸어 같은 방법으로 연속적으로 각 인자에 따른 항균활성을 구할 수 있었다. 그 결과 부분적 연속배양에서 최적 pH와 온도는 각각 표 22에서처럼 pH 7.8과 28℃에서 4일 배양하였을 때 최대 활성을 나타내었다.

그림 13은 방선균 A6497 균주를 5L jar fermenter에서 working volume 2.5L의 최적배지를 넣고 2% seed, pH 7.8, aeration(초기: 300rpm, 1vvm), DO 40% control, 28℃에서 배양하였을 때, 시간에 따른 pH, DO 및 배지의 항균활성의 변화를 도식화 한 것으로, pH를 조절하지 않았을 때보다 항균활성이 4mm정도 향상되어 그림 12의 배양조건에 비해 하루 정도 앞당겨 짐을 알 수 있었다. 또한 DO 값을 통하여 배양시기를 확인할 수 있었으며, 산소의 충분한 공급으로 균체의 배양기간과 제초활성 물질의 생성기간이 단축됨을 알 수 있었다.

Table 22. Optimization of temperature and pH in continuous culture

| Temp. pH | Antifungal activity (mm) | | | |
|-------------|--------------------------|------|------|------|
| | 23°C | 25°C | 28°C | 31°C |
| 5.4 | 38 | 40 | 41 | 29 |
| 6.2 | 44 | 46 | 51 | 38 |
| 7.0 | 42 | 54 | 54 | 50 |
| 7.8 | 42 | 53 | 61 | 51 |
| 8.6 | 46 | 51 | 56 | 56 |
| 9.4 | 41 | 42 | 51 | 49 |

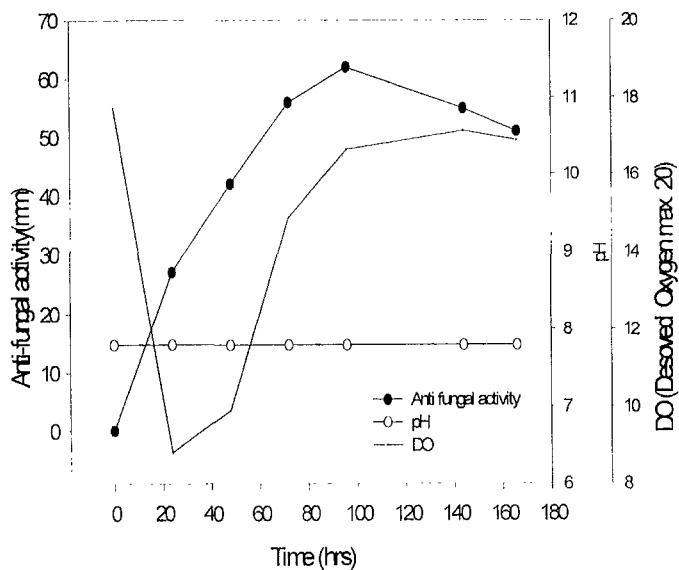


Fig.13. Time course of bioactive compound production by *Streptomyces* sp. A6497 fermentation (adjusted pH 7.8, 40% saturated D.O., 28°C)

9. *Streptomyces* sp. A6497의 대량배양 조건확립

배양 최적화 실험을 통해 얻어진 조절 인자(pH, D.O.)를 이용하여 대량배양 적용 여부를 검토한 결과 pH는 최적 pH에 고정시키고 D.O. 값을 40% 이상으로 control하여 D.O.를 control하지 않고 배양했을 때보다 같은 활성을 나타내는 시기를 24시간 앞당길 수 있었다. 그러나 대량화에서 D.O.를 small scale과 동일하게 하기 어려우므로 Reynolds number(Re#)를 이용한 rheological equilibrium 식과 D.O. 값을 기준으로 하여 어느 정도 500L scale까지 대규모화할 수 있었다.

그림 14는 500L에서의 배양 profile을 도식화한 것으로 5L jar fermentation결과와 비교하였을 때 생산 시기가 조금 늦어졌을 뿐 배양액의 항균활성 최대 값은 거의 유사한 수준을 나타내었다. 제반되는 과정은 표 23에서와 같이 생산부피와 발효기 내에서의 역학을 동일한 Re#로 scale up 했음을 알 수 있으며, 계산치와 실측치가 다른 것은 발효기 내부 형태와 내압의 차이에서 오는 것으로 사료된다. 또한 실제 growth rate와 항균활성과의 관계를 유추해볼 때 500L까지의 대규모화가 잘 이루어졌음을 알 수 있었다.

10. *Streptomyces* sp. A6497의 제형화 연구

가. 중량제의 선정

제초활성물질의 안정성 및 산업적 이용을 위하여 활성물질의 보관 및 사용이 용이하도록 생산된 배양액을 여러 가지 중량제로 제형화하여 활성을 비교하고 또한 농과원 고시 제 1999-1호에 준하여 보존성, 수화성, 경도, 분말도, 수분함량을 실험하여 그 결과를 표 24에 나타내었다.

제형화 후 항균활성을 측정한 결과 dextrin, gelatin, clay, perlite, white carbon, celite 등을 사용하였을 때 생육 저지환이 50mm 이상으로 저해활성이 가장 많이 보존되었으며, 수화성은 white carbon 및 vermiculite가 항균활성 안정성에 가장 우수한 것으로 나

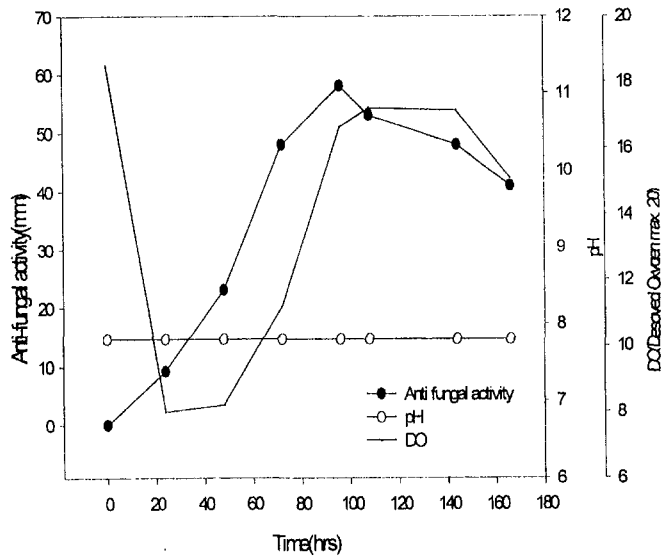


Fig 14. Fermentation profile of *Streptomyces* sp. A6497 in 500 liter fermenter (working vol. 300L)

Table 23 . Scale up factors of fermentation by *Streptomyces* sp. A6497

| Scale | Working Vol. | Max. Antifungal activity(mm) | Fluid Dynamics | | | | Specific growth rate (1/hr) | |
|-------|--------------|------------------------------|----------------|---------------------------|-----------------|-----|-----------------------------|--------|
| | | | DO control | | Re# | | | |
| | | | rpm | Aeration | | | | |
| 5L | 2.5L | 61 | 300~700 | 1vvm, pure O ₂ | ND ^z | 1.7 | 300 | 0.0208 |
| 50L | 30L | 58 | 120~280 | 0.5~1vvm | | 3.7 | 140 | 0.0199 |
| 500L | 300L | 58 | 40~100 | 0.3~0.7vvm | | 17 | 35 | 0.0197 |

Table 24. Effect of various additives in formulation.

| Additives | 항목 | | | | |
|-------------------|------------------|----------------------|-----------------|-------------------------------------|----------------------------|
| | Activity (mm) | Wettability (min) | Hardness (%) | A degree of particle size (%) | Moisture content (%) |
| Alginate | 45 | 4 | 80 | 10 | 3 |
| Celite | 57 | 6 | 10 | 80 | 2 |
| Clay | 53 | 12 | 15 | 70 | 2 |
| Dextrin | 58 | 6 | 90 | 5 | 10 |
| Gelatin | 54 | 3 | 85 | 5 | 8 |
| Glucose | 48 | 7 | 95 | 10 | 9 |
| Lactose | 49 | 7 | 20 | 65 | 6 |
| Perlite | 54 | 9 | 10 | 75 | 6 |
| Soluble Starch | 49 | 8 | 45 | 45 | 8 |
| Vermiculite | 41 | 30 | 20 | 60 | 4 |
| White Carbon | 54 | 30 | 50 | 40 | 5 |
| Zeolite | 51 | 15 | 25 | 50 | 3 |

타났다. 항균활성 보존 및 기타 항목들을 평가하여 가장 안정적이고 제형화가 용이한 dextrin 및 celite를 최종 선발하였다.

나. 열안정성 실험

Streptomyces sp, A6497 배양액을 분무건조 방식을 이용하여 분제 형태의 제형화에 앞서 분무건조시 열안정성을 검토하고자 같은 batch에서 생산된 배양액을 4℃에서 7,000rpm으로 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 각각 25, 40, 55, 70, 85, 100, 121, 150℃의 상태에 1시간 동안 방치한 후 항균활성을 확인한 결과 100℃까지 활성이 유지되어 열에 안정함을 알 수 있었다(표 25).

다. 보존성 실험

제조활성물질의 산업적 이용을 위하여 보관 및 사용이 용이하도록 생산된 배양액을 액상 수화제 및 분제 형태의 수화제로 각각 제형화하여 40℃에서 8주간 보관하면서 일주일 단위로 *P. parasitica*에 대한 항균활성을 확인한 결과(표 26), 액상 수화제의 형태보다는 분제 형태의 제형화 시료에서 항균활성이 우수하였으며, 특히 분제 형태의 제형화 중 분무건조 방식의 제형화 시료는 다른 제제에 비해 8주간의 시간이 지난 후에도 안정성이 다소 유지되는 것으로 보존성이 가장 우수함을 알 수 있었다. 따라서 분무건조 방식을 이용한 분제 형태의 수화제로 개발하였다.

라. *Streptomyces* sp. A6497의 제형화

Streptomyces sp. A6497의 최적배지를 이용하여 최적배양 조건으로 생산된 배양액을 4℃에서 7,000rpm으로 5분간 원심분리하여 상등액을 회수하고, 여기에 5% celite(W/V)와 5% dextrin(W/V)을 첨가하여 inlet 120℃, outlet 85℃, 6L/hr (feeding rate) 조건으로 분무건조한 결과, 시간당 첨가물 양만큼(600g) 정도의 항균활성물질을 얻을 수 있었으며, 분무건조 후 수분 함량은 2% 내외였고, 80mesh sieve에서 80% 이상 통과하였다.

Table 25. Heat stability of *Streptomyces* sp. A6497 broth.

| Heat-treatment | Inhibition zone (mm) | Heat-treatment | Inhibition zone (mm) |
|----------------|-------------------------|----------------|-------------------------|
| 25°C (control) | 57 | 85°C | 56 |
| 40°C | 57 | 100°C | 55 |
| 55°C | 56 | 121°C | 49 |
| 70°C | 56 | 150°C | 44 |

Table 26. Inhibitory activities against *P. parasitica* of formulated samples prepared by various process methods during the storage period from 0 to 8 weeks.

(Inhibition zone : mm)

| Formula | | Weeks | | | | | | | | |
|-----------------|---------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Suspension | | 61mm | 53mm | 48mm | 31mm | 27mm | 25mm | 21mm | 20mm | 18mm |
| Wettable powder | Spray drying | 60mm | 60mm | 58mm | 57mm | 55mm | 53mm | 52mm | 46mm | 40mm |
| | Freeze drying | 62mm | 59mm | 58mm | 56mm | 55mm | 54mm | 50mm | 44mm | 36mm |
| | Convectional drying | 57mm | 55mm | 46mm | 36mm | 30mm | 26mm | 22mm | 22mm | 19mm |

여 백

제 3 장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구는 잡초류의 작용점에 특이적인 미생물 탐색을 통한 새로운 미생물 제초제의 개발로서 본 과제로 얻어진 제초활성을 갖는 sangivamycin과 이러한 물질을 생산하는 *Streptomyces* sp. A6497균주를 이용하여 미생물 제초제의 개발에 활용하였으며, 연구개발 결과 및 활용방안은 다음과 같다.

1. 잡초류의 작용점에 특이적으로 작용하는 제초활성물질을 생산하는 유용 미생물의 확보

토양으로부터 분리한 1,700여종의 미생물을 분리하여 이들 배양액을 대상으로 잡초류의 생합성 경로(glutamine 합성 및 cellulose 합성)를 저해하거나, 이들 종자의 발아를 억제하는 물질을 생산하는 미생물을 탐색하여, 활성이 가장 우수한 후보 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 *Streptomyces* sp. A6497로 명명되었다.

2. 강한 제초활성 물질의 분리 기술 및 활성물질의 확보

선발된 미생물로부터 잡초류의 작용점(cellulose biosynthesis)에 특이적으로 활성을 나타내는 활성물질을 분리하여 sangivamycin으로 구조결정하였고, 분리된 sangivamycin은 cellulose를 함유하는 것으로 알려진 *Phytophthora parasitica*에 특이적 활성을 나타내며, 오이자엽을 이용한 bleaching 검정 및 greening 검정 결과 우수한 제초활성을 지닌 것으로 확인되었다. 분리된 활성물질은 염색소 탈색을 가져오나, 색소의 생합성에는 관여하지 않는 것으로 사료되었다.

3. 최적배양 및 대량생산과 제형화 기술의 확보

In vitro 및 *in vivo*에서 강한 제초활성을 나타내는 활성물질을 생산하는 *Streptomyces* sp. A6497의 최적배양 및 대량화를 실시한 결과, 통계적 배지 개선 실험인 PBD와 BBD 처리를 통해 균주의 탄소원, 질소원 및 무기염류 등의 배지 성분들을 선별하고 또한 각각의 최적 농도를 얻어내어 최적 배지 조성을 선별하였다.

또한 선별된 배지를 이용하여 배양 중 제초활성을 최대화하도록 최적 배양조건을 얻어내고, 배양 최적화 실험을 통해 얻어진 조절인자 (pH, D.O. Temp.)를 대량 배양에 적용하여 500L 용량의 fermenter 까지 대규모화 시켰다.

한편 산업적 이용이 용이하도록 여러 가지 형태로 제형화하여 소포장한 후 제초활성의 보존성 및 안정성을 검증하고, 상품화에 가장 용이한 중량제를 선별하여 분무건조 방식을 이용한 분제 형태의 수화제로 개발하였다.

4. 활용방안

Streptomyces sp. A6497로부터 생산되는 제초활성물질 sangivamycin은 항진균 효과, 항바이러스 효과 및 protein kinase C 저해제로 알려져 있으나, 제초활성에 대한 보고가 없어 현재 특허출원 중 에 있다.

또한 사업화 및 실용화에 있어서는 주관기관인 (주)그린바이오텍은 바이오벤처 기업으로서 현재 농업용 미생물제제(농약)을 생산, 판매하고 있는 회사로서 연간 1,000톤 규모의 대량배양 설비와 판매망을 확보하고 있어 1-2년간의 현장적용과 pre-marketting을 통하여 상품화 하고자 한다.

제 4 장 참고문헌

1. Okuda, S. 1992. Herbicides, P.224-236. In Omura, S. (Ed), The search for bioactive compounds from microorganisms, Springer-Verlag, New York.
2. 김시관, 여운형. 1996. 농업용 항생물질 탐색. P.97, In 신물질 탐색 연구회편, 농업용 항생물질 탐색 자유 아카데미, 서울.
3. 吉岡俊人 1987. 除草劑・植物成長調整劑の開発動向, p. 122-171, In 新農藥の開発と市場展望. CMC. 東京
4. Haneishi, T., A. Terahara, H. Kayamori, J. Yabe, and Y. Kondo. 1978. Herbicidins A and B, Two new antibiotics with herbicidal activity. II. Fermentation, isolation and biological activities J. Antibiot., 29: 870-875.
5. Omura, S., M. Murata, H. Hanaki, K. Hinotozawa, R. Oiwa and H. Tanaka. 1984a. Phosalacine, a new herbicidal antibiotic containing phoshinothricin. J. Antibiot., 37 : 829-835.
6. Omura, S., Y. Tanaka, K. Hisatome, S. Miura, Y. Takhashi, A. Nakagawa, H. Imai and H. B. Woodruff. 1988. Phthoramycin, a new antibiotic active against a Plant pathogen. *Phytophthora* sp. J. Antibiot., 41 : 1910-1912.
7. Tachibana, K. and Kaneko, K. 1986. Development of a new herbicide, Bialaphos Journal of Pesticide Science, 11 : 297-304.
8. Omura, S., M. Murata, N. Imamura, Y. Iwai and H. Tanaka. 1984b. Oxetin, a new antimetabolite from actinomycete. Fermentation, isolation, structure and biological activity. J. Antibiot., 37 : 1234-1332.
9. Fushimi, S., S. Nishikawa, N. Mito, M. Ikemoto, Sasaki, and H. Seto. 1988. Studies on a new herbicidal antibiotic, homoalanosine. J. Antibiot., 32: 1370-1378.
10. Omura, S., Y. Tanaka, K. Kanaya, M. Shinose and Y.

- Takahashi. 1990. Phthoxaxolin, a specific inhibitor of cellulose biosynthesis, produced by a strain of *Streptomyces* sp. J. Antibiot., 43 : 738-741.
11. Nakajima, M., K. Itoi, Y. Takamatsu, T. Kinoshita, T. Okazaki, K. Kawakubo, K. Shindo, M. Shindo, T. Honma, M. Tohjigamori and T. Haneishi. 1991. Hydantocidin: a new compound with gerbicial activity from *Streptomyces hygroscopicus*. J. Antibiot., 44: 293-300.
 12. Arai, M., T. Naneishi, N. Kitahara, R. Enokita, K. Kawakubo and Y. Kondo, 1976. Herbicidins A and B, two new antibiotics with herbicidal activity. J. Antibiot., 30 : 863-869.
 13. Omura, S., A. Nakagawa and N. Sadakane. 1979. Structure of herbimycin, a new ansamycin antibiotic, Tetrahedron Letters, 44 : 4323-4326.
 14. Uehara, Y., M. Hori, T. Takeuchi and H. Umezawa. 1985. Screening of agents which convert 'Transformed Morphology' of rous sarcoma virus infected rat kidney cells to 'Normal Morphology'. Identification of an active agent as herbimycin and its inhibition of intracellular src kinase. Japan Cancer Reserch(Gann) 76 : 672-675.
 15. Totsukawa, K., T. Suzuki, Y. Ogawa, T. Tsuruoka, H. Watanabe, K. Totsukawa, T. Suzuki, C. Moriyama, J. Yoshida, S. Inouye and T. Niida. 1973. Studies on a new antibiotic SF-1293. I. Isolation and physico-chemical and biological characterization of SF-1293 substance Scientific Reports of Meiji Seika Kaisha 13:34-41.
 16. Rupp, W., M. Finke, H. Bieringer and F. Langelueddeke, P. 1977. Ger. Offen. 2,717,440. 1978. Herbicidal composition. Chemical Abstracts, 88 : 70494e.
 17. Bayer, E., K. H. Gugel, K. Hagele, H. Hagenmaier, S. Jessipow, W. A. Konig and Zahner, H. 1972. Stoffwechsel product von Mikroorganismen 98. Mitteilung [1]

Phosphinothricin und phosphinothrithyl-Alanyl-Alanin.
Helvetica. Chimica Acta, 55 : 224-239.

18. Kreg, L. C., M. A. Walker, T. Senaratna and B. D. Mckersie. 1990. Growth, ammonia accumulation and glutamine synthetase activity alfalfa (*Medicago sativa* L.) shoots and cell cultures treated with phosphinothricin. *Plant Cell Reports*, 9 : 80-83.
19. Tachibana, K., T. Watanabe, Y. Sekizawa and T. Takematsu. 1986. Accumulation of ammonia in plant treated with bialaphos. *Journal of Pesticide Science*, 11 : 33-37.
20. Kato, H., K. Nagayama, H. Abe, R. Kobayashi and E. Ishihara. 1991. Isolation, structure and viological activity of trialaphos. *Agr. Biol. Chem.*, 55 : 1133-1134.
21. Fushimi, S., S. Nishikawa, N. Mito, M. Ikemoto, M. Sasaki and H. Seto. 1989. Studies on a new herbicidal antibiotic, homoalanosine. *J. Antibiot.*, 42 : 1370-1378.
22. Omura, S., Y. Tanaka, I. Kanaya, M. Shinose and Y. Takahashi. 1990. Phthoxaxolin, a specific inhibitor of cellulose biosynthesis, produced by a strain of *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, 43 : 1034-1036.
23. Mio, S., H. Sano, M. Shindou, T. Honma, S. Sugai. 1991. Synthesis and herbicidal activity of deoxy derivatives of (+)-hydantocidin. *Agr. Biol. Chem.*, 55 : 1105-1109.
24. Miller-Wideman, M., N. Makkar, M. Tran, B. Isaac, N. Biest. 1992. Herboxidiene, a new herbicidal substance from *Streptomyces chromofuscus* A7847. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.*, 45 : 914-921.
25. Issac, B. G., S. W. Ayer and R. J. Stonard. 1991. The isolation of α -methylene- β -alanine, a herbicidal microbial metabolite. *J. Antibiot.*, 44 : 795-796.
26. Uramoto, M., H. Ubukata, H. Osada, I. Yamaguchi and K.

- Isono, 1991. Isoxazole-4-carboxylic acid as a metabolite of *Streptomyces* sp. and its herbicidal activity. *Agr. Biol. Chem.*, 55 : 1415-1416.
27. Issac, B., S. Ayer, L. Letendre and R. J. Stonard, 1991. Herbicidal nucleosides from microbial sources. *J. Antibiot.*, 44 : 729-732.
28. Ayer, S., B. Issac, K. Luchsinger, N. Makkar, M. Tran, and R. J. Stonard, 1991. *cis*-2-amino-1-hydroxycyclobutane-1-acetic acid, a herbicidal antime-tabolite produced by *Streptomyces rochei* A13018. *J. Antibiot.*, 44 : 1460-1462.
29. Hirota, A., H. Okada, T. Kanza, A. Iogai and Hirota, 1990. Structure elucidation of kaimonolide B, a new plant growth inhibitor macrolide from *Streptomyces*. *Agr. Biol. Chem.*, 54 : 2489-2490.
30. Takahashi, A., S. Kurasawa, D. Ikeda, Y. Okami and T. Takeuchi, 1989. Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance. *J. Antibiot.*, 42: 1556-1566.
31. Kenney, D. S. 1986. Devine-The way it was developed- an industrialist's views. *Weed Sci.*, 34 : 15-16(suppl.1).
32. Watson, A.K. 1992. Biological and other alternative control measures. In: *Proceedings of the First International Weed Control Congress*, ed. by J. H. Combellack, K. J. Levick, J. Parsons and R. G. Richardson, Pp.64-73. *Weed Sci. Soc. Victoria Inc.*, Melbourne.
33. Te Beest, D. O., Yang, X. B. and Cisar, C. R. 1992. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Ann Rev. Phythopathol.*, 30 : 637-57.
34. Templeton, G.E., D. O. Te Beest and R. J. Jr. Smith, 1984. Biological weed control in rice with a strain of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. used as a mycoherbicide. *Crop Prot.*, 3 : 409-422.
35. Mortensen, K. 1988. The potential of an endemic fungus

- Colletotrichum gloeorioides*, for biological control of round-leaved mallow (*Malva pusilla*) and velvetleaf (*Avutilon theophrasti*). *Weed Sci.*, 36 : 473-478.
36. Auld, B. A., M. M. Say, H. I. Ridings and J. Andrews. 1990. Field applications of *Colletotrichum orbiculare* to control *Xanthium spinosum*. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 32 : 315-323.
37. 이수관, 김재철, 홍연규. 1994. 논 잡초 올방개 방제용 에피코코소라스(*Epiccosorus*)YCSJ-112 균주와 이 균주의 포자 대량 생산 방법 및 올방개의 방제 방법. Korea patent No.94-24055.
38. 정영륜, 김병섭, 김홍태, 조광연. 1990. 논피 (*Echinochloa crusgalli*) 잎 마름병을 일으키는 병원균 *Exserohilum* sp.의 분리 및 동정. *Korean J. Plant Pathol.*, 6 : 429-433.
39. 김판경, 박동진, 최순용, 김창진. 1996. 토끼풀 (*Trifolium repens* L.)에 제초활성을 나타내는 *Penicillium* sp.의 탐색. *한국농화학회지*, 39 : 455-459.
40. 김판경, 박동진, 최정섭, 황인택, 홍경식, 김창진. 1997. *Penicillium* sp.를 이용한 토끼풀의 생물학적 방제. *한국농화학회지*, 40 : 65-70.
41. Hayakawa, M. and H. Noromura. 1987. Humic acid- vitamine agar, a new medium for the selective isolation of soil Actinomcetes. *J. Ferment. Technol.*, 65 : 501-509.
42. Osada, H., T. Sonoda, K. Tsunodalsono, K. Isono. 1989. A new biological role of sangivamycin ; Inhibition of protein kinases. *J. Antibiot.*, 42 : 102-106.