



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0077357

(43) 공개일자 2007년07월26일

(21) 출원번호 10-2006-0006899

(22) 출원일자 2006년01월23일

심사청구일자 2006년01월23일

(71) 출원인 충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자 유승헌
충남 공주시 계룡면 하대리 328-2
김영숙
대전 동구 자양동 동아아파트 102동 1008호

(74) 대리인 김원준

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 신규 바실러스 아트로페어스 CNU05-1 및 이를 이용한식물병 방제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 각종 작물에 발생하는 잣빛곰팡이병에 탁월한 방제효과를 갖고 또한 다양한 식물병원균의 생육억제효과를 가지며 흰가루병에도 방제효과를 보이는 신규의 미생물 바실러스 아트로페어스(*Bacillus atrophaeus*) CNU05-1에 관한 것이다. 본 발명에 의한 CNU05-1균 펩타이드계 항균물질인 Iturin A-8을 생산하는 것으로 확인되었다.

본 발명의 바실러스 아트로페어스 CNU05-1와 그 배양물은 잣빛곰팡이병, 흰가루병 방제 활성과 기타 식물병원균의 생육을 효과적으로 억제하므로 종합 방제 개념의 다기능 생물 농약으로 사용될 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

그람 양성균의 간상형이며 내생포자를 형성하고, Iturin A-8을 생산하는 것을 특징으로 하는 바실러스 아트로페어스(*Bacillus atrophaeus*) CNU05-1균주 (기탁번호 : KCTC10901BP)

청구항 2.

제 1 항에 의한 균주의 발효물, 균주 현탁물 또는 발효여액을 유효성분으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 3.

제 2 항에 있어서,

상기 식물병은 잣빛곰팡이병 또는 흰가루병인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 4.

제 2 항에 있어서,

상기 식물병은 오이, 토마토, 딸기의 보트라이티스 시네리에(*Botrytis cinerea*)에 의한 잣빛곰팡이병, 오이, 호박, 참외의 스페로테카 후스카(*Sphaerotheca fusca*)에 의한 흰가루병, 담배의 골로비노마이세스 시코라세아룸(*Golovinomyces cichoracearum*)에 의한 흰가루병 또는 딸기의 스페로테카 아파니스(*Sphaerotheca aphanis*)에 의한 흰가루병인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 5.

제 1 항에 의한 균주의 발효물, 균주 현탁물 또는 발효여액을 유효성분으로 하는,

잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 흰가루병균, 토마토잎곰팡이병균(*Fulvia fulva*), 고추탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 인삼뿌리썩음병균(*Cylindrocarpon destructans*), 인삼모잘록병균(*Rhizoctonia solani*), 시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 파검은무늬병균(*Alternaria porri*), 사과점무늬낙엽병균(*Alternaria mali*), 인삼점무늬병균(*Alternaria panax*), 인삼잘록병균(*Pythium* sp.) 또는 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*)에 대한 항균활성을 가지는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 식물병의 생물학적 방제기술에 대한 것으로, 더욱 자세하게는 식물체 위에서 분리한 미생물인 바실러스 아트로페어스(*Bacillus atrophaeus*) CNU05-1를 배양하고 그 배양물을 이용하여 작물의 잣빛곰팡이병과 흰가루병을 방제하는 방법과 이 균이 생산하는 항진균물질에 관한 것이다.

잣빛곰팡이병은 지상부에 발생하는 병중에서 거의 모든 채소와 화훼, 과수에 발생하는 다범성 균으로 주로 과실에 발생하여 많은 피해를 가져오고 있다. 또한 이 균은 수확 후 이차적으로 저장, 운송, 판매 중의 과일류와 채소류에 부패병을 일으킨다. 특히 최근에는 기존의 화학농약에 대한 내성균이 빈번하게 출현하여 화학요법에 의한 방제가 효과가 떨어지고 있는 것이 현실이며, 일부 효과를 갖는 농약의 경우에도 잔류독성문제로 인하여 과일을 수확해야하는 딸기나 오이 등에 있어서는 그 사용이 엄격하게 제한되고 있는 실정이다. 따라서 화학농약을 대체할 수 있는 저독성의 환경친화성 생물농약개발에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다.

생물농약으로서 잣빛곰팡이병을 방제하고자하는 노력은 천연물, 미생물 등을 이용한 방법들이 제시되었으며 특히 바실러스속(*Bacillus* spp.), 트라이코더마속(*Trichoderma* spp.), 이스트(yeast) 등을 활용한 미생물농약들이 세계적으로 개발

되어 등록되고 있다. 외국의 경우 슈도모나스 시린지(*Pseudomonas syringae*)를 제제화한 상품명 바이오-세이프 텐(Bio-save 10)을 실용화하여 사용중이며, 일본의 경우 바실러스 속의 균(*Bacillus* sp.)을 2003년에 잣빛곰팡이병과 흰가루병 방제제로 상품화하였다. 국내의 경우에도 잣빛곰팡이병균의 군사생장 및 포자발아를 억제하는 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) N1균주를 이용한 잣빛곰팡이병 방제에 관한 연구가 보고되었다.

그러나 많은 연구 사례에도 불구하고 효과가 우수하고 저렴하며 안전한 잣빛곰팡이병 방제용 생물농약은 아직까지 정착되어 있지 않은 실정이다. 따라서 항균 활성이 우수하며 농약으로서의 특성이 안정한 신규 미생물의 탐색이 요구되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 각종 작물의 잣빛곰팡이병에 방제효과를 가지며 다양한 식물병원균에 항진균 활성이 우수하고 흰가루병에도 방제 효과를 보이는 신규의 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은 상기 신규 미생물을 함유하는 무독성의 환경친화적인 생물농약 재료를 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은 상기 신규 미생물이 생산하는 항진균물질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성

전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은, 그람 양성의 간상형이며 내생포자를 형성하고, Iturin A-8을 생산하는 것을 특징으로 하는 바실러스 아트로페어스(*Bacillus atrophaeus*) CNU05-1균주 (기탁번호 : KCTC10901BP)를 제공한다.

본 발명에 의한 상기 균주의 발효물, 균주 현탁물 또는 발효여액은 다양한 식물병 병원균에 대한 방제효과를 나타낸다. 예를들면, 본 발명에 의한 균주 및 그 발효액 등은 잣빛곰팡이병 또는 흰가루병 방제효과를 나타낸다.

본 발명은 상기 균주의 발효물, 균주 현탁물 또는 발효여액을 유효성분으로 하는 각종 식물병 방제용 조성물을 제공한다. 보다 구체적으로 예를들면, 본 발명에 의한 상기 조성물은 오이, 토마토, 딸기의 보트라이티스 시네리에(*Botrytis cinerea*)에 의한 잣빛곰팡이병, 오이, 호박, 참외의 스페로테카 후스카(*Sphaerotheca fusca*)에 의한 흰가루병, 담배의 골로비노마이세스 시코라세아룸(*Golovinomyces cichoracearum*)에 의한 흰가루병 또는 딸기의 스페로테카 아파니스(*Sphaerotheca aphanis*)에 의한 흰가루병 방제용으로 사용될 수 있다.

또한 본 발명은, 상기 균주의 발효물, 균주 현탁물 또는 발효여액을 유효성분으로 하는, 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 흰가루병균, 토마토잎곰팡이병균(*Fulvia fulva*), 고추탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 인삼뿌리썩음병균(*Cylindrocarpon destructans*), 인삼모잘록병균(*Rhizoctonia solani*), 시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 과검은무늬병균(*Alternaria porri*), 사과점무늬낙엽병균(*Alternaria mali*), 인삼점무늬병균(*Alternaria panax*), 인삼잘록병균(*Pythium* sp.) 또는 그람 음성균인 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*)에 대한 항균활성을 가지는 조성물을 제공한다(실시예 3).

본 발명은 각종 작물의 잣빛곰팡이병과 흰가루병에 대한 방제효과가 뛰어나고 또한 식물병원성 균류에 광범위한 항균활성을 가지는 신규의 미생물 바실러스 아트로페어스(*Bacillus atrophaeus*) CNU05-1을 제공한다.

본 발명에 의한 상기 균주는 80℃ 이상의 고온에서 안정하며 UV나 pH의 변화에도 잣빛곰팡이병균에 대한 항균활성은 유지된다(도시 생략).

본 발명의 CNU05-1 균은 뮤엘라 흰톤 액체배지로 3~4일 배양 후 50배 희석한 배양물을 딸기, 토마토, 오이 등에 처리 시 잣빛곰팡이병의 발생에 대하여 탁월한 방제효과를 갖는다(시험예 I 및 II). 또한 배양액 50배 희석액 살포 시 딸기와 오이, 담배의 흰가루병에도 탁월한 방제효과를 갖는다(시험예 III 및 IV).

본 발명의 CNU05-1균이 배양액 중에 생산하는 항진균 활성물질은 지용성 레진으로 1차 분리되고 실리카 겔 크로마토그래피와 에이치피엘씨(HPLC)로 정제되어 흰색의 분말상인 물질로 제공되며 에칠아세테이트(EtOAc), 클로로포름(CHCl₃) 등의 비극성 용매에는 녹지 않았으며 물, 디엠에스오(DMSO), 메탄올, 에탄올(EtOH)에는 잘 녹았다.

본 발명의 CNU05-1균이 생산하는 항 진균 활성물질인 CNU05-1-M은 이에스아이-메스(ESI-mass) 분석 결과 분자량 1085인 물질로 수소핵자기공명 (^1H -NMR) 과 탄소핵자기공명(^{13}C -NMR) 스펙트럼을 갖으며 8개의 아미노산으로 구성된 iturin A-8로 동정되었다(실시예 5).

이하 본 발명을 다음의 실시예 및 시험예에 의하여 설명한다. 하기 실시예 및 시험예는 본 발명을 설명하고자하는 하나의 예일 뿐 이에 의해 본 발명의 기술적 사상의 범위가 변경되거나 축소되는 것은 아니다.

실시예 1 : CNU05-1 균의 분리 및 동정

본 발명의 균주는 대전광역시 유성구 소재 KT&G 중앙연구원과 충남대학교 인근의 야산에 자생하는 식물체 잎에서 분리하였다.

채집한 잎을 물로 씻고 풍건한 후 1% 차아염소산나트륨으로 표면살균하고 막자사발로 충분히 갈아 멸균 증류수로 희석하였다. 희석액을 뮤엘라 힌톤 한천배지(Mueller Hinton agar)에 중층법으로 처리하여 27℃ 배양기에서 2~3일 배양한 후 몇 번의 계대배양을 거쳐 순수하게 1종의 미생물을 분리하였다. 분리된 미생물을 CNU05-1라 명명하였다.

형태관찰과 생리·생화학적 특성 및 균체 지방산(fatty acid) 분석과 gyrase A gene 염기서열분석을 통해 상기 분리된 CNU05-1 균주를 동정하였다.

분리된 균주는 뉴트리언트 한천(nutrient agar) 배지, 포테이토 슈크로스 한천(potato sucrose agar) 배지 및 뮤엘라 힌톤 한천(Mueller Hinton agar) 배지에서 양호하게 생육하며 뮤엘라 힌톤 한천 배지에서 검정색 색소를 형성하였다. 생육 적온은 30??이었다. 균주는 그람 양성이며 크기가 $0.7\sim 1.0 \times 2.0\sim 3.0 \mu\text{m}$ 의 간상형 미생물(도 1)로, 운동성을 갖고 내생포자를 형성하며 카탈레이스(catalase) 효소를 분비하는 호기성 미생물이다.

한편 균체 지방산 분석 결과는 표 1과 같으며 gyrase A gene 염기서열분석에 기초한 계통도는 도 2이며 그 결과는 표 2와 같다.

[표 1]

지방산 조성	CNU 05-1
C _{14:0} ISO	1.33
C _{15:0} ISO	20.97
C _{15:0} ANTEISO	51.13
C _{16:1} w7c alcohol	0.53
C _{16:0} ISO	3.52
C _{16:0}	1.74
ISO C _{17:1} w10c	1.00
C _{17:1} ISO I/ANTEI B	1.13
C _{17:0} ISO	5.08
C _{17:0} ANTEISO	11.99

[표 2]

Type strain	Accession No.	Similarity (%)	nt differences /compared
<i>Bacillus atrophaeus</i> KCTC 3701 ^T	AF272016	98.7	11/870
<i>Bacillus mojavenis</i> NRRL B-14698 ^T	AF272019	95.9	32/780
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KCTC 1660 ^T	AF272015	83.3	156/939
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> NRRL B-23049 ^T	AF272020	83.3	135/810
<i>Bacillus vallismortis</i> NRRL B-14890 ^T	AF272025	81.5	166/900
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> KCTC 3135 ^T	AF272021	81.1	143/759
<i>Bacillus licheniformis</i> KCTC 1918 ^T	AF272017	77.1	195/855

T: type strain

이상의 균 동정 결과를 종합한 결과, 분리된 미생물 CNU05-1은 gyrase A gene 염기서열에서 가장 연관성이 높은 바실러스 아트로페어스(*Bacillus atrophaeus*)인 것으로 동정되었다. 그러나 완전 동일하지는 않았기 때문에 상기 중에 속하는 신규한 균주임을 확인할 수 있었다. 본 발명에 의한 상기 미생물을 공식 기탁기관에 기탁하여 기탁번호 KCTC10901BP를 부여받았다.

실시예 2 : CNU05-1 균주의 배양

실시예 1에서 확인된 바와 같이, 균주 CNU05-1는 감자한천액체배지, 뉴트리언트액체배지, 뮤엘라 힌톤 액체배지, 엘비 액체배지 모두에서 충분히 생장·배양이 가능하다. 이하에서는 주로 뮤엘라 힌톤 액체배지를 사용하였는데, 여러 가지 목적에 따른 상기 균주의 배양은 다양한 배지에서 가능함은 당연할 것이다.

상기 균주의 배양을 위해, 뮤엘라 힌톤 배지 21g 을 1 리터 증류수에 넣어 잘 녹인 후 500ml 삼각플라스에 200ml씩 분주하고 1.5기압 121℃로 20분간 고압 살균하여 제조하였다. 제조된 배지에 플레이트 상태의 CNU05-1 균을 백금으로 취하여 접종한 후 30℃에서 150rpm으로 흔들어주면서 4일간 배양하였다.

배양액은 검은 갈색을 띠고 점성을 보이며 pH는 8.5 이었다.

실시예 3 : CNU05-1 균의 항균 활성 분석

본 발명에 의한 CNU05-1균을 뮤엘라 힌톤 액체배지에서 4일간 배양 후 원심분리하여 균체와 배양여액으로 나누고, 균체를 멸균수에 현탁한 후 각각을 페이퍼 디스크(paper disk)에 50 μ l씩 점적하고 풍건하였다. 이 페이퍼 디스크를 미리 제작한 병원균 검정용 플레이트에 치상하여 2~3일 배양한 후 생성된 저지환의 크기를 조사하였다(표 3; CNU05-1균의 항균 활성 스펙트럼).

[표 3]

병 원 균	항균 활성 ^a (mm)	
	배양여액	균 현탁액
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	16
<i>Candida albicans</i>	+ ^b	0
<i>Botrytis cinerea</i>	14	32
<i>Magnaporthe grisea</i>	16	23
<i>Fusarium oxysporum</i>	11	17
<i>Fulvia fulva</i>	+	8
<i>Aspergillus niger</i>	0	+
<i>Alternaria porri</i>	10	18
<i>Alternaria mali</i>	9	14
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	10	12
<i>Alternaria panax</i>	11	22
<i>Pythium sp.</i>	8	30
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	13	21
<i>Rhizoctonia solani</i>	12	16
<i>Trichoderma sp.</i>	0	12

^aPaper disk method, ^bSlightly inhibited

본 실시예에서 확인할 수 있듯이, 본 발명에 의한 균주의 발효물, 균주 현탁물 또는 발효여액은, 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 흰가루병균, 토마토잎곰팡이병균(*Fulvia fulva*), 고추탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 인삼뿌리썩음병균(*Cylindrocarpon destructans*), 인삼모잘록병균(*Rhizoctonia solani*), 시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 파검은무늬병균(*Alternaria porri*), 사과점무늬낙엽병균(*Alternaria mali*), 인삼점무늬병균(*Alternaria panax*), 인삼잘록병균(*Pythium sp.*) 또는 그람 음성균인 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*)에 대한 항균활성을 가지고 있다.

시험예 I. 토마토 및 오이에 대한 잣빛곰팡이병 방제효과 시험

온실조건에서 재배중인 토마토와 오이 유묘를 이용하여 각종 병원균에 대한 방제효과를 시험하였다. 토마토는 초장 길이가 10~15cm인 유묘를 사용하였으며 오이는 본엽 1~2엽기의 유묘를 이용하였다.

특별한 언급이 없는 경우, 실험은 20℃, 12시간:12시간 명/암 조건의 상대습도 90%의 항온기에서 수행하였다.

처리액은 상기 실시예 2와 같이 배양한 다음, 전체 배양액을 소정의 농도로 희석한 "배양액", 배양액을 원심분리하여 균체와 배양여액으로 나누고 각각 소정의 농도로 희석한 "균현탁액" 및 "배양여액"등 3종으로 하였다.

소정의 농도로 희석된 처리액을 유묘 25주당 50ml씩 통상의 방법으로 분무살포하고 풍건 한 후, 병원균 포자현탁액을 분무 접종하여 20℃ 항온기에서 7일간 배양한 후에 발병율을 조사하는 방식으로 방제효과를 확인하였다.

잣빛곰팡이병균 포자는 0.1몰의 포타슘포스페이트(0.1M KH₂PO₄)가 첨가된 20% 브이팔(V8)쥬우스에 1×10⁶ spore/ml 농도로 현탁한 후 유묘 25주당 30ml씩 통상의 방법으로 분무살포하여 접종하였다.

시험예 I-1 : 처리액의 처리시점에 따른 방제효과

온실에서 생육 중인 토마토와 오이 유묘에, 병원균 접종 24시간 전(전처리) 및 24시간 후(후처리) 및 동시(동시처리)에 본 발명에 의한 CNU05-1 균 배양물을 처리하여 병 발생과 방제효과를 조사하였다.

그 결과, 오이와 토마토 유묘 모두에서 배양액을 처리한 경우 전처리, 동시처리 시 95% 이상의 방제효과를 보였으며 배양여액을 처리한 경우에도 90% 이상의 높은 방제효과를 보였다(표 4; CNU05-1균 배양물의 처리시간에 따른 잣빛곰팡이병 방제효과).

[표 4]

식물	처리시간	발병도(%) ^a			방제가(%)		
		배양액	균현탁액	배양여액	배양액	균현탁액	배양여액
오이	전처리	0	1.2±0.7	3.72±0.4	100	98.8	96.28
	동시처리	0	15.8±1.7	2.8±0.8	100	84.2	97.2
	후처리	42.5±0.5	62.3±1.5	71.2±1.3	55.7	37.7	28.7
	대조구	96±3.2	100	100			
토마토	전처리	0	13.8±0.7	1.9±0.41	100	86.2	98.1
	동시처리	0	31.5±1.7	3.75±0.8	100	68.5	96.2
	후처리	14.6±0.5	58.6±1.5	24.9±1.3	84.7	41.4	75.1
	대조구	96±2.3	100	100			

^a균배양액 및 배양여액 20배 희석액과 균 현탁액(10⁷cfu/ml)을 살포하고 7일 후 결과 조사

시험예 I-2 : 배양여액의 희석배수에 따른 방제효과

배양여액을 멸균증류수로 20, 50, 100, 150배 희석하여 희석배수에 따른 잣빛곰팡이병 방제효과를 조사하였다. 병원균은 배양여액을 분무살포하고 풍건한 후에 분무접종 하였다.

그 결과 100배 희석 시 토마토에서는 80.7%, 오이에서는 69%의 방제효과를 보였으며 20배 희석액 처리 시 토마토와 오이 모두에서 97%이상의 높은 방제효과를 보였다(표 5; CNU05-1균 배양여액의 희석농도별 잣빛곰팡이병 방제효과).

[표 5]

처리내용		발병도 (%)		방제가 (%)	
		토마토	오이	토마토	오이
배양여액	20배액	1.9±1.0	2.5±0.1	98.1	97.3
	50배액	5.1±1.7	23.1±3.7	94.6	75.6
	100배액	18.3±1.5	29.3±4.9	80.7	69
	150배액	62.3±1.3	68.2±3.3	34.4	27.9
디크론 수화제	500배액	0	4.7±0.3	100	95.0
	대조구	95.1±3.7	94.7±1.3		

- 분무 살포 후 풍건하고 접종 7일 후 조사

시험예 I-3 : CNU05-1균의 균체 현탁농도에 따른 방제효과

CNU05-1균 배양액을 원심분리한 후 균체만을 회수하고 멸균증류수로 2~3회 세척하여 항균물질을 완전히 제거한 균체를 멸균증류수로 소정 정도 희석하여 오이와 토마토 유묘에 경엽 살포하였다.

처리 24시간 경과 후 잿빛곰팡이병원균을 분무 접종하여 배양하면서 병 발생 정도를 조사하였다. 표 6(CNU05-1 균의 균체농도에 따른 잿빛곰팡이병 방제효과)에서 보는 바와 같이 오이 및 토마토 유묘에 처리 시 10^6 cfu/ml 농도에서도 약 50% 정도의 방제 효과를 보였다.

[표 6]

균 농도 (cfu/ml)	발병도 (%)		방제율 (%)	
	토마토	오이	토마토	오이
10^8	15.5	8.7	77.6	85.6
10^7	26.8	18.3	61.3	69.7
10^6	38.0	27.6	45.2	54.3
10^5	59.8	43.7	13.8	27.7
0^b	69.4	60.5		

시험예 I-4 : CNU05-1균 배양물의 포장조건에서 방제효과

CNU05-1균 배양물의 포장조건에서의 잿빛곰팡이병 방제효과를 조사하기 위하여, 유묘를 하우스 정식하여 3~4주간 재배한 토마토와 오이에 배양물을 살포하고 잎과 줄기, 꽃과 열매에서의 병 발생 여부를 조사하였다. 포장시험은 2005년 9월 10일~ 11월 25일에 이루어졌고, 이때 하우스내 온도는 15~25℃였다.

배양물은 7일 간격으로 3회 살포하였고, 최종 살포 7일 후 자연적으로 발생한 잿빛곰팡이병의 발병 여부를 조사하였다.

그 결과 배양물 50배 희석액 처리 시 오이에서 78.5%, 토마토에서 97.5%의 방제효과를 보였으며 잿빛곰팡이병 방제제로 사용 중인 디크론 수화제와 거의 대등한 효과를 보였다(표 7; CNU05-1균 배양물의 포장조건에서 잿빛곰팡이병 방제효과).

[표 7]

처리내용		발병율(%)		방제율(%)	
		토마토	오이	토마토	오이
배양물	20배희석액	0	4	100	92.8
	50배희석액	2	12	97.5	78.5
디크론 수화제		0	6	100	89.2
	500배희석액				
대조구		80	56		

시험예 II. 딸기에 대한 잿빛곰팡이병 방제효과 시험

CNU05-1균 배양물의 딸기 잿빛곰팡이병 방제효과를 알아보기 위해 충남 논산에 위치한 논산딸기시험장에서 재배중인 대향 품종에 배양물을 처리하고 이병과율을 조사하였다. 세부적인 시험은 상기 시험예 I 및 다음의 시험예에 기재된 바와 같이 이루어졌다.

시험예 II-1 : CNU05-1균 배양물의 처리시점에 따른 방제효과

본 발명에 의한 CNU05-1 균 배양물에 딸기를 30초간 침지 처리하여 풍건 한 전후 및 동시에 전술한 시험예 I에서와 같은 방식으로 병원균포자현탁액을 분무 집중하고 7일 경과 후에 이병과율과 방제효과를 조사하였다.

그 결과는 표 8(CNU05-1균 배양물의 처리시간에 따른 딸기 잿빛곰팡이병 방제효과)과 같이 동시나 24시간 전처리 시 방제 효과가 우수하였다.

[표 8]

처리시간	이병과율 (%)			방제가 (%)		
	배양액	균현탁액	배양여액	배양액	균현탁액	배양여액
전처리	16.6	25	25	83.4	73.5	72.7
동시처리	2.7	22.2	5.5	97.3	76.4	93.9
후처리	25	66.6	41.6	75	29.4	54.5
대조구	100	94.4	91.6			

시험예 II-2 : CNU05-1균의 균체농도에 따른 방제효과

CNU05-1균 배양액을 원심분리한 후 균체만을 회수하고 멸균증류수로 2~3회 세척하여 항균물질을 완전히 제거한 균체를 멸균증류수로 현탁하여 딸기를 침지 처리하였다. 24시간 경과 후 잿빛곰팡이병원균을 분무 집중하여 7일간 배양한 후 병 발생 정도를 조사하였다.

표 9(CNU05-1균의 균체농도에 따른 딸기 잿빛곰팡이병 방제효과)에서 보는 바와 같이 배양액의 100배 희석농도인 10^6 cfu/ml의 균 농도에서도 59.4%정도의 방제 효과를 나타내었다.

[표 9]

균체농도 (cfu/ml)	이병과율 (%)	방제가 (%)
10^8	15.5	77.5
10^7	21.8	68.4
10^6	28.0	59.4
10^5	36.3	47.3
0	69.0	

시험예 II-3 : CNU05-1균 배양물의 포장조건에서 방제효과

CNU05-1균 배양물의 포장조건에서 딸기 잿빛곰팡이병 방제효과를 조사하기 위하여, 충남 논산에 위치한 논산딸기시험장에서 재배중인 매향 품종에 소정 농도로 희석된 배양물을 7일 간격으로 3회 살포하고, 최종 살포 7일 후 딸기의 이병과수를 조사하였다.

그 결과 배양물 50배 희석액 처리 시 72.4%의 방제효과를 보였다(표 10; CNU05-1균 배양물의 포장조건에서 딸기 잿빛곰팡이병 방제효과).

[표 10]

처리내용	처리과수		이병과율(%)	방제가(%)
	전체과수	이병과수		
배양물 50배 희석액	338	20	5.9	72.4
타 미생물제제 500배 희석액	491	35	7.12	66.7
수돗물	505	108	21.39	

시험예 III. CNU05-1균 배양물의 오이 흰가루병 방제효과

온실조건의 포트에서 재배 중인 오이 잎에 흰가루병(*Sphaerotheca fusca*)이 10%정도 발생시기에 본 발명에 의한 균 배양물을 일주일 간격으로 3회 살포하고, 최종 살포 7일 후 잎에서의 발병율을 조사하였다.

배양물 20배 희석 농도에서는 대조약제인 웨나리와 유사한 효과를 보였다(표 11; CNU05-1 균의 오이 흰가루병 방제효과).

[표 11]

처리내용	발병율(%)	방제가(%)
배양물 20배 희석액	10.5	89.3
배양물 50배 희석액	30.3	69.3
웨나리 4000배 희석액	2.4	97.6
수돗물(대조구)	98.6	

- 웨나리: 농가 권장 사용농도인 4000배 희석액

시험예 IV. CNU05-1균 배양물의 딸기 흰가루병 방제효과

CNU05-1균 배양물의 딸기 흰가루병(*Sphaerotheca aphanis*) 방제효과를 알아보기 위해 충남 논산에 위치한 논산딸기시험장에서 재배중인 매향 품종에 본 발명에 의한 균 배양물을 일주일 간격으로 3회 살포한 다음 최종 살포 7일 후 이병과율을 조사하였다.

배양물 50배 희석농도에서 83.7%의 방제효과를 보여 대조약제인 트리후민 보다 우수함을 확인하였다(표 12; CNU05-1 균의 딸기 흰가루병 방제효과).

[표 12]

Treatment	처리과수		이병과율(%)	방제가(%)
	전체과수	이병과수		
배양물 20배 희석액	732	60	8.19	88.1
배양물 50배 희석액	338	38	11.2	83.7
트리후민 4000배 희석액	613	142	23.1	66.4
수돗물(대조구)	781	538	68.9	

-트리후민: 농가 권장 사용농도인 4000배 희석액

시험예 V. CNU05-1균 배양물의 담배 흰가루병 방제효과

온실조건의 포트에서 재배 중인 담배잎에 흰가루병(*Golovinomyces cichoracearum*)이 20~30%정도 발생시기에 균 배양 물을 일주일 간격으로 3회 살포하고 최종 살포 7일 후 병 방제효과를 조사하였다.

배양물 20배 희석 농도에서는 무처리 대비 86.0%의 방제효과를 보였다(표 13; CNU05-1 균의 담배 흰가루병 방제효과(담배 NC82)).

[표 13]

처리내용	발병율(%)	방제가(%)
배양물 20배 희석액	13.8	86.0
배양물 50배 희석액	26.4	73.2
수돗물(대조구)	98.6	

실시예 4 : CNU05-1균의 배양적 특성

본 발명에 의한 균주의 최적 배양조건을 확립하기 위하여 배지의 조성이 균주의 생육과 항균 물질 생산에 미치는 영향을 알아보고 탄소원과 질소원의 조성을 변화시켜 이들의 관계를 조사하였다. 균주는 실시예 2와 같은 방법을 기본으로 하여 배양하였다.

실시예 4-1 : 배양시간에 따른 균 생육 및 항균활성의 변화

배양시간별로 배양액을 취하여 생균수, pH 및 항균활성의 변화를 조사하였다.

배양액의 pH는 배양시간이 경과함에 따라 서서히 증가하여 배양 4일째 8.5 이상이었고 생균수는 배양 24시간째 최대가 되었다가 이후 점차 감소하였다. 한편 항균활성은 배양 24시간째 급격히 증가하여 4일째 최대가 된 후 서서히 감소하였다.

실시예 4-2 : 배양 pH에 따른 균 생육 및 항균활성의 변화

배지의 pH에 따른 균 생육과 활성의 변화를 알아본 결과 pH 2, 11에서는 균이 거의 생육하지 못하였고 pH 3~4에서는 미약하게 생육하였다. 한편 pH 5부터 균 생육과 항균물질생산이 본격적으로 시작되어 pH 10까지 균 생육과 항균물질 생산이 양호하였으며 가장 적합한 pH는 6~10이었다. 한편 균 생육이 가능했던 pH 범위내의 최종 pH는 8.8~9.1로 알칼리성을 띄는 것으로 조사되었다.

실시예 4-3 : 배양 온도에 따른 균 생육 및 항균활성의 변화

균 배양 시 최적 온도를 알아보기 위하여 10~50℃까지 10℃간격으로 구분하여 24시간 배양 후 배양액 중의 균체량을 측정(OD값, 660nm)하여 균 생육정도를 조사하였으며 4일 배양액의 항균활성을 조사하였다.

그 결과 CNU05-1균주는 20~30℃의 온도 범위에서 생육이 왕성하였으며 항균활성도 최대가 되었다.

실시예 4-4 : 항균성 항생물질 생산 및 균 생육에 미치는 탄소원의 영향

최소영양배지(K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, Sodium citrate 0.05%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01% w/v, pH 7.0) 25ml에 각종의 탄소원을 1.0% (w/v)가 되도록 첨가한 후 27℃, 150rpm으로 3일간 배양하여 각 배양액의 OD값(660 nm)을 측정하였으며 균을 완전히 제거한 배양여액을 이용하여 항균활성을 조사하였다.

그 결과 표 14(항균성 항생물질 생산 및 균 생육에 미치는 탄소원의 영향)에서 보는 바와 같이 만노즈(mannose)와 슈크로즈(sucrose) 첨가 시 항균활성이 우수하였으며 슈크로즈가 균 생육에 가장 좋은 효과를 나타냄을 확인하였다.

[표 14]

탄소원	균(세포) 수 (×10 ⁷ cfu/ml)	항균활성 (mm)	
		<i>M. grisea</i>	<i>B. cinerea</i>
아랍지노즈 (Arabinose)	0.6±0.03	10.5	16
글루코즈 (Glucose)	35±0.2	11	14
프럭토즈 (Fructose)	4±0.1	12	0
갈락토즈 (Galactose)	11±1.4	0	0
만노즈 (Mannose)	39±2.7	14	30
자일로즈 (Xylose)	15±1.46	0	0
락토오즈 (Lactose)	4.6±0.3	0	0
말토오즈 (Maltose)	4.6±0.6	11	16
글리세롤 (Glycerol)	25±0.8	0	0
슈크로즈 (Sucrose)	130±12	14	27
라피노즈 (Raffinose)	33±1.7	9	0
사카로즈 (Saccharose)	13±0.4	10	15
전분 (Starch)	65±1.4	13	19
최소 배지	1±0.6	0	0

- 항균 활성은 페이퍼 디스크법으로 조사

실시예 4-5 : 항균성 항생물질 생산 및 균 생육에 미치는 질소원의 영향

질소원 이용성은 1% 슈크로즈(sucrose)를 탄소원으로 하는 최소배지(K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, Sodium citrate 0.05%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01% w/v, pH 7.0)에 유기태와 무기태질소원(0.5%, w/v)을 첨가하여 탄소원과 동일한 방법으로 균 생육과 항균활성을 조사하였다.

그 결과 소고기(Beef ext.)와 효모(Yeast ext.) 추출물을 첨가한 배지에서 균 생육과 항균 활성이 모두 우수하였다(표 15; 항균성 항생물질 생산 및 균 생육에 미치는 질소원의 영향).

[표 15]

질소원	균(세포) 수 ($\times 10^7$ cfu/ml)	항균 활성 (mm)	
		<i>M. grisea</i>	<i>B. cinerea</i>
카사미노에시드(Casamino acid)	20 $\pm$ 1.2	10	12
카제인 (Casein)	2.7 $\pm$ 0.4	15	19
소고기 추출물 (Beef ext.)	50 $\pm$ 3.7	19	30
효모 추출물 (Bacto yeast ext.)	63 $\pm$ 4.5	23	31
박토 펩톤 (Bacto peptone)	10 $\pm$ 0.67	13	0
프로테오즈 펩톤(Proteose peptone)	34 $\pm$ 1.3	15	0
맥아 추출물 (Malt ext.)	8.7 $\pm$ 0.72	11	0
우레아 (Urea)	0.013	0	0
암모니움 시트레이트 (Ammonium citrate)	6.9 $\pm$ 0.5	16	0
암모니움 포스페이트 (Ammonium phosphate)	12 $\pm$ 0.78	11	0
포타슘 니트레이트 (Potassium nitrate)	0.023	0	0
소듐 니트레이트 (Sodium nitrate)	10 $\pm$ 0.9	11	11
최소 배지	1.6 $\pm$ 0.3	9	0

실시예 4-6 : 대량 배양용 탄소원, 질소원 선발

대량 배양 시 가격이 저렴하고 균 생육과 항균 물질생산능이 우수한 질소원과 탄소원을 선발하기 위하여 산업용으로 많이 사용되는 여러 가지 질소원에 대한 CNU05-1균의 이용성을 조사하였으며, 탄소원으로 슈크로스 또는 밀에서 추출한 전분(starch)을 1(w/v)% 사용하였다. 질소원은 0.5(w/v)% 첨가하였다.

그 결과는 표 16(항균 활성 및 균 생육과 포자형성에 미치는 질소원의 영향)에서 보는 바와 같이 콩가루(soybean meal)를 첨가한 경우, 경제성 측면에서 볼 때, 균 생육도 비교적 빠르고 항균 활성도 우수함을 확인하였다.

[표 16]

Nutrient source	균(세포) 수 (cfu/ml)		항균 활성(mm)	
	생균수($\times 10^8$)	내생포자($\times 10^5$)	<i>M. grisea</i>	<i>B. cinerea</i>
슈크로즈(Sucrose, 1%) +				
콩가루(Soybean meal)	22 $\pm$ 0.1	5.12 $\pm$ 0.28	16.5	19
유청(Whey)	7 $\pm$ 0.1	2.88 $\pm$ 0.23	12	0
씨메스엘(C. S. L)	2.01 $\pm$ 0.07	13.7 $\pm$ 0.58	16	10
린시드오일(Linseed oil)	1.9 $\pm$ 0.2	5.5 $\pm$ 0.79	10	0
맥아추출물(Malt ext.)	2.86 $\pm$ 0.25	21.2 $\pm$ 4.3	12	0
물고기추출물(Fish meal)	2.8 $\pm$ 0.43	225 $\pm$ 3.8	18	22
소미톤(Soytone)	7.2 $\pm$ 0.1	271 $\pm$ 4.3	17	0
소고기추출물(Beef ext.)	3.3 $\pm$ 0.41	3.08 $\pm$ 0.16	13	0
효모추출물 (Yeast ext., technical)	5.1 $\pm$ 0.4	177 $\pm$ 2.0	21	28
박토 효모추출물 (Bacto yeast ext.)	10.2 $\pm$ 0.12	133 $\pm$ 6.02	16	21
밀 전분(Starch, wheat) +				
효모추출물 (Yeast ext., technical)	7.53 $\pm$ 0.11	272 $\pm$ 4.14	18	10
박토 효모추출물 (Bacto yeast ext.)	11 $\pm$ 0.7	124 $\pm$ 3.46	16	+
기본 배지(MH broth)	22.8 $\pm$ 0.4	56 $\pm$ 2.44	16	10

- 내생포자는 80℃로 30분간 가열한 후 조사

실시예 5 : CNU05-1균이 생산하는 항균물질의 분리와 정제

본 발명에 의한 균주의 배양물에서 실제 항균효과를 나타내는 물질을 분리하여 정제하였다.

전술한 실시예 2의 방법으로 배양한 균 배양물을 먼저 Diaion HP20 레진이 충전되어있는 유리 컬럼을 통과시켰다. 흡착되어 있는 물질을 70% 함수 아세톤으로 추출하고 농축하였다. 농축물을 소량의 클로로포름(CHCl_3)과 메탄올(MeOH) 혼합 용매에 녹여 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시하였다. 상기 용매계를 7:3~0:10로 극성을 점점 높여가며 물질을 전개하여 가장 항균활성이 강한 분획의 물질을 분리정제하였다.

정제물을 감압농축한 후 메탄올과 물을 용매계로 오디에스(ODS) 컬럼크로마토그래피를 수행하고 에이치피엘씨(HPLC)를 통하여 최종 정제하였다. 최종 정제물을 CNU05-1-M라 명하였다.

최종 정제물 CNU05-1-M은 에칠아세테이트(EtoAc), 클로로포름(CHCl_3) 등의 비극성 용매에는 녹지 않았으며 물, 디엠에스오(DMSO), 메탄올, 에탄올(EtOH)에는 잘 녹았다. CNU05-1-M을 메탄올에 녹여 유브이(UV) 흡수 스펙트럼을 조사한 결과 275nm에서 최대 흡수피크를 보였으며 클로로포름과 메탄올 4:1 용매계로 알에프(R_f)값을 조사한 결과 0.5이었다. 그 결과는 표 17(항균물질 CNU05-1-M의 물리 화학적 특성)과 같다.

활성물질 CNU05-1-M은 이에스아이 메스(ESI-mass) 스펙트럼 측정(도 3) 시 m/z 1108.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 및 1084 $[\text{M} - \text{H}]^+$ 피크가 관찰되어 분자량이 1085임을 알 수 있었으며, 도 4의 수소핵자기공명파와 도 5의 탄소핵자기공명 스펙트럼은 결과 분자식이 $\text{C}_{51}\text{H}_{80}\text{N}_{12}\text{O}_{14}$ 인 iturin A-8로 동정되었다. 본 활성물질 CNU05-1-M의 구조는 도6과 같다.

[표 17]

특 성	CNU05-1-M
성 상	흰색 분말
UV ($\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$)	275 nm
분자량	1085
Elemental analysis	
Carbon	56.44%
Hydrogen	7.43%
Nitrogen	15.49%
Oxygen	20.64%
Molecular formula	$\text{C}_{51}\text{H}_{90}\text{N}_{12}\text{O}_{14}$
TLC($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$, 4:1)	$R_f = 0.5$
Solubility	
Soluble	Water, DMSO, Methanol
Insoluble	EtoAC, Chloroform

iturin A-8은 2002년 Hiradata 등에 의해 처음 보고된 iturin계 항생물질로 7개의 알파-아미노산(α -amino acid)과 하나의 베타-아미노산(β -amino acid)으로 구성된 펩타이드계 항생물질이다. Iturin계 항생물질은 8개의 isomer가 mixture로 생산되며, 아스퍼질러스 피버스(*Aspergillus feavus*), 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 콜레토티리컴 글로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*) 등을 포함하는 다양한 식물병원균에 대한 항균 및 항진균 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.

본 실시예에 의해 본 발명에 의한 신규 균주가 펩타이드계 항생물질인 iturin A-8을 경제적으로 생산할 수 있음을 확인하였다.

발명의 효과

본 발명의 바실러스 아트로페우스(*Bacillus atrophaeus*) CNU05-1 균주는 각종 작물에 발생하는 잣빛곰팡이병과 흰가루병 방제효과가 뛰어나며 기타 식물병원균에 광범위한 항균 활성 스펙트럼을 낸다. 또한 항균활성의 지속성이 뛰어나며 균 특성 역시 물리화학적으로 안정하므로 우수한 다기능의 생물농약 재료로 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

도 1은 CNU05-1균주의 전자현미경 사진.

도 2는 CNU05-1균주의 gyrase A gene 염기서열분석에 의한 계통도.

도 3은 CNU05-1균주가 생산하는 항진균물질의 ESI-mass 스펙트럼 결과도.

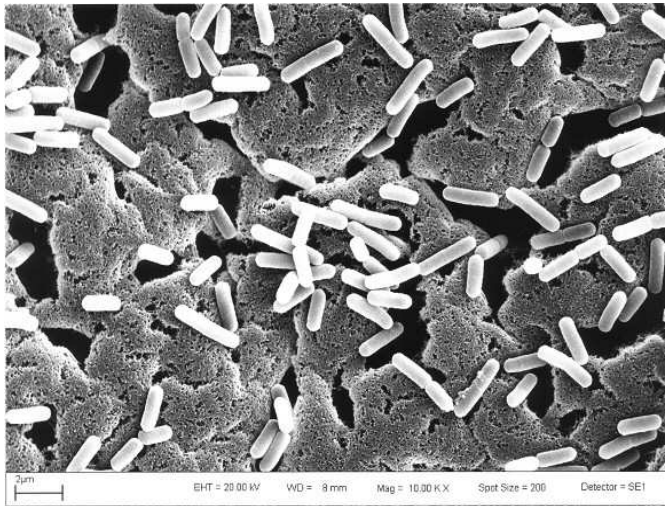
도 4는 CNU05-1균주가 생산하는 항진균물질의 수소핵자기공명 (^1H -NMR) 스펙트럼 결과도.

도 5는 CNU05-1균주가 생산하는 항진균물질의 수소핵자기공명 (^{13}C -NMR) 스펙트럼 결과도.

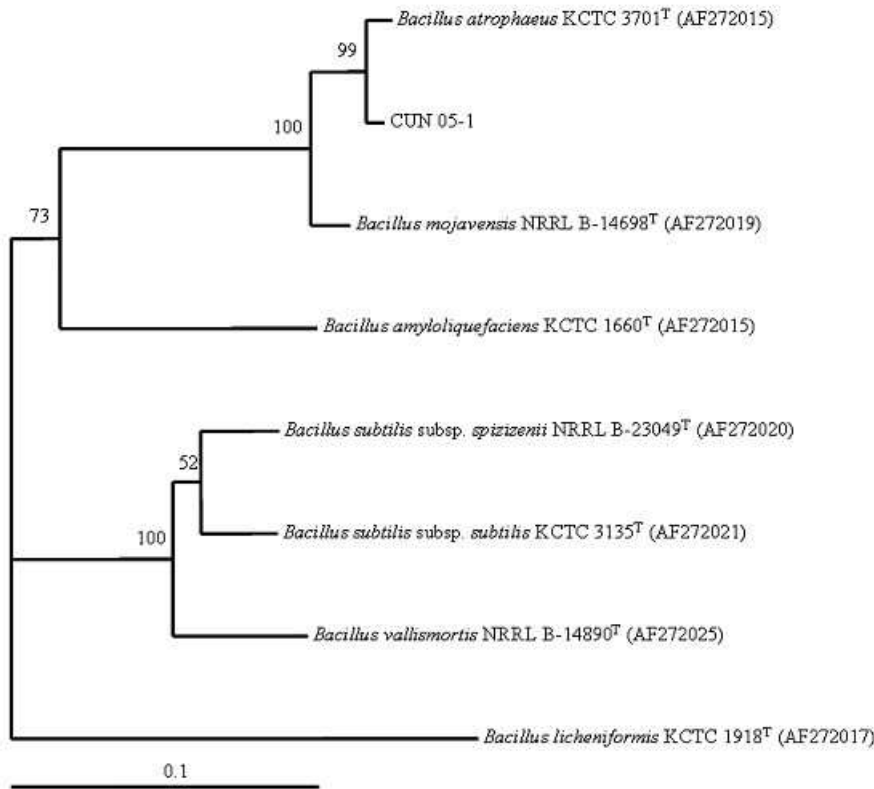
도 6은 CNU05-1균주가 생산하는 항진균물질 CNU05-1-M의 구조도.

도면

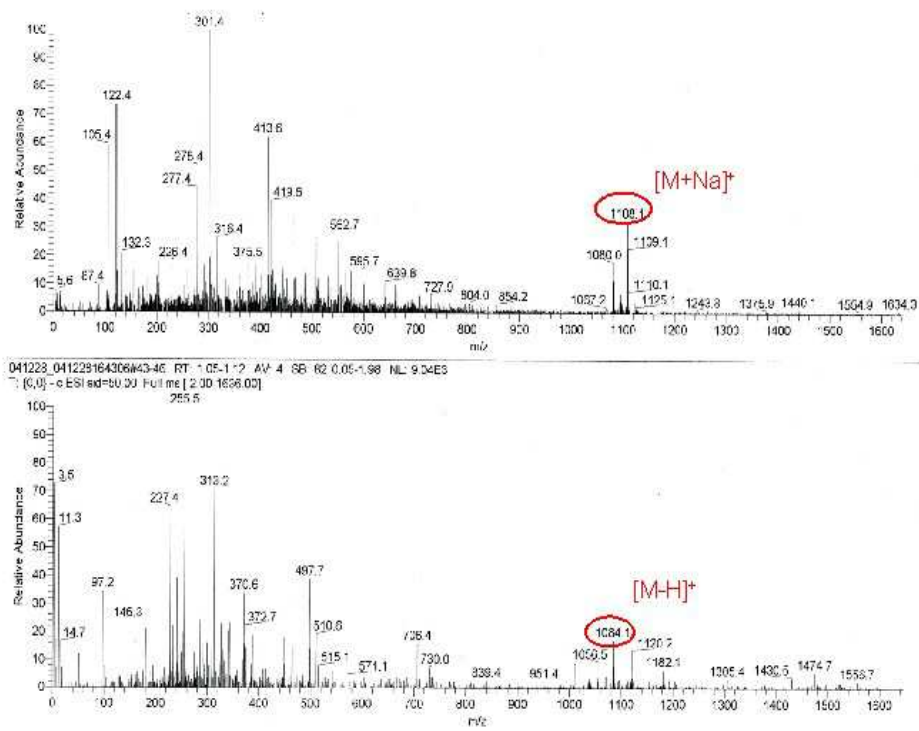
도면1



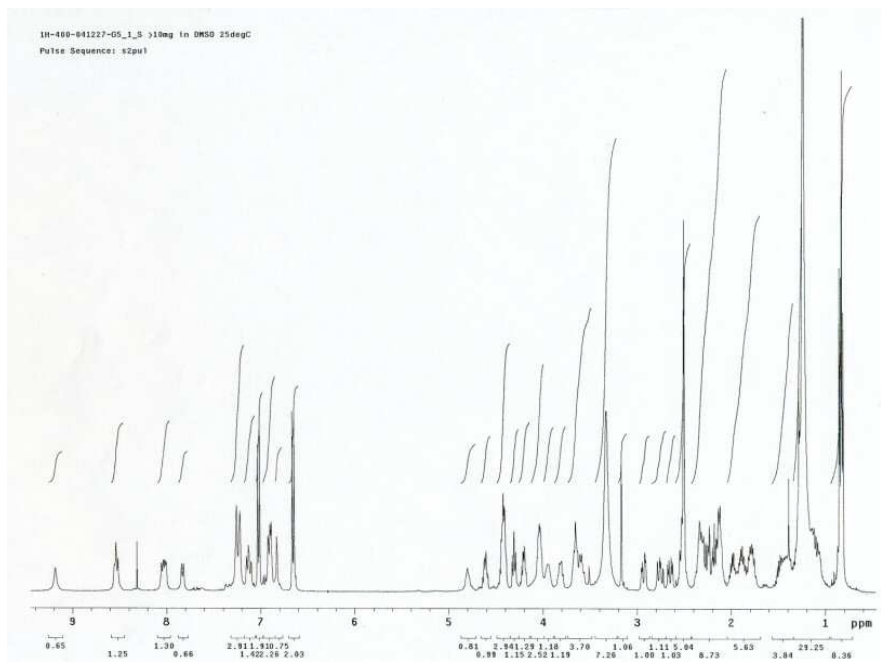
도면2



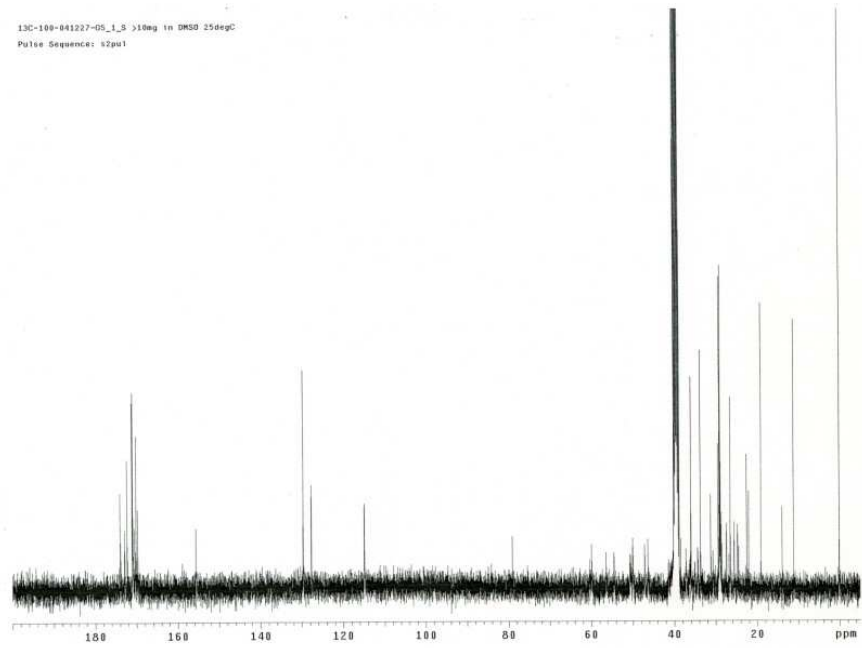
도면3



도면4



도면5



도면6

