

## *Helicosporium* sp.의 항균활성 및 항균물질의 분석

주우홍, 배기정, 이상명\*, 최승태\*\*, 정영기\*\*\*

창원대학교 생물학과, 임업연구원 남부임업시험장\*, 창원대학교 유전공학연구소\*\*,

동의대학교 미생물학과\*\*\*

전화 (055) 279-7443, FAX (055) 279-7449

### Abstract

To confirm the antifungal activity to plant pathogenic fungi, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia solani* AG2-2, *Fusarium oxysporium*, *Phytophthora dreschler*, *Alternaria* sp. were selected. *Helicosporium* has the antifungal activity to *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia solani* AG2-2, while *Fusarium oxysporium*, *Phytophthora dreschler* did not affected even though *Alternaria* made a feeble response to that antifungal compounds. From <sup>1</sup>H-NMR spectrum of antifungal compound, this compound was guessed to be a structure corresponding to cholesterol.

### 서론

식물병의 약 70~80%는 병원성 진균에 의하여 발생하는 것으로 밝혀졌으며, 이로 인한 경제적인 손실은 막대한 것으로 알려지고 있다. 이러한 병원성 진균을 방제하기 위하여 합성 살균제를 이용한 화학적 방제법이 널리 보편화되어 있으나, 기주식물에 대한 약해와 토양잔류 독성문제, 내성균주의 출현 문제 등의 부가적인 문제가 발생하고 있다. 진균의 방제법으로는 토양에 존재하는 진균을 훈증하여 살균하는 방법, 종자 감염을 방지하기 위한 종자 소독법, 길항 미생물을 이용하는 생물학적 방제법, 식물에 직접 살균제를 살포하여 감염을 예방하거나 치료하는 방법 등이 있지만, 살균제의 살포가 가장 보편화되어 있다. Benzimidazole계와 dicarboximide계 등의 대부분의 살균제는 유기합성에 의해 제조되며, 인축에 대하여도 약해가 심하고, 또한 방제 후에도 분해가 잘 되지 않고 토양에 오래 잔류하기 때문에 환경오염과 토양오염의 주 원인이 되고 있다. 이러한 농약의 남용으로 심각하게 파괴된 생태계를 복원하기 위해서는 자연계에 존재하는 식물에 대한 비병원성 진균, 기생성 선충 등 유익한 생물 농약 인자를 탐색, 선발 및 개발하여 환경 친화형 식물병해충 방제 시스템 기술을 정립하는 것이 시급하다. 따라서 본 연구에서는 *Helicosporium* 을 대량 배양하여 항균활성을 가지는 물질을 분리, 정제하고, 이를 이용하여 몇 종의 진균류를 대상으로 항균활성을 검증함과 동시에 이 물질을 분석하였다.

### 재료 및 방법

## 공시균주

본 실험에 사용한 균주는 밤나무 고사목에서 분리한 *Helicosporium* sp. KCTC 0653BP이며, 그 외 실험균주로는 *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia solani* AG2-2, *Fusarium oxysporium*, *Phytophthora dreschler*, *Alternaria* sp.이었다.

## 배지

본 실험에서 사용한 배지는 Potato dextrose agar, Yeast extract agar 및 Corn meal agar였다.

## 사용 시약 및 기기

본 실험에서 사용한 시약은 Sigma사 제품이며, 흡광도 측정에는 Spectrophotometer (UV1601, Shimadzu), HPLC column (AGILENT 1100)은 C18을 사용하였다.

## 균주의 성장 특성 조사

UV-spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 측정하여 성장률을 조사하고, 최적 온도, 최적 pH를 결정하였다. 본 배양은 PDB 배지에 초기 흡광도가 0.002가 되도록 접종한 후 150rpm, 25°C에서 진탕 배양하면서 경시적으로 흡광도를 측정하여 균주의 성장을 측정하였다.

## 항균물질 조사

KCTC 0653BP 균주를 PD broth 배지 250 ml를 25°C, 5일간 배양한 후 filtration시킨 배양여액을 6,000rpm으로 상온에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 상등액에 석유에테르를 동량 혼합하여 150rpm으로 상온에서 72시간 진탕한 후 석유에테르층으로 이동한 KCTC 0653BP의 항균물질을 분별갈때기를 이용해서 분리하였고, 수층은 따로 분리 후 실험에 사용하였다. 분리된 석유에테르층은 다시 6,000rpm으로 상온에서 10분간 원심분리하고 침전물질을 제거한 상등액을 25°C에서 농축시켰다. 농축물질을 methyl alcohol에 녹인 후 0.45µm syringe filter로 여과시켰다. 여과된 추출물을 UV-VIS spectrophotometer로 spectrum을 확인하였고, TLC, HPLC 및 NMR로 분석, 확인하였다. TLC plate(Merck)에 추출된 항균물질을 methanol에 녹인 샘플을 점적하여 chloroform / methanol / acetic acid가 85 : 15 : 2의 비율로 섞인 용매로 이동시켰다. 전개 후 plate를 50% 황산으로 분무한 후 가열하여 생긴 spot을 확인하였다. HPLC는 Hypersil BDS C18로 역상액체 크로마토그래피 시스템(Water HPLC)으로 실온에서 분석하였으며, 용매는 acetonitrile / water (60 : 40)을 사용하여 분당 0.5ml의 유속으로 분석하였다. 또한 <sup>1</sup>H-NMR을 이용하여 항균물질의 예상되는 구조를 밝혔다.

## 결과 및 고찰

### KCTC 0653BP의 최적 온도 및 pH

PDB 배지에 접종하여 20, 25, 30, 35, 40°C의 온도에서 진탕 배양하여 경시적으로 540nm에서 흡광도를 측정한 결과 최적 배양온도는 25°C인 것으로 확인되었으며, 최적 pH는 8로 나타났다.

### 항균활성

*Helicosporium*의 항균활성을 확인하기 위하여는 PDB와 YM배지를 사용하였다. 대상 진균류로는 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Pytophthora* 등이며, *Rhizoctonia solani*에 대해서는 항균활성을 강하게 가지며, *Alternaria*에는 미약하게 항균작용을 나타내며, *Fusarium*과 *Pytophthora*에는 항균활성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 한편 식물병원균인 *Fusarium*은 *Alternaria*에 대해 길항작용을 하는 것으로 확인되었다.

### 항균물질

항균물질의 분리를 위하여 *Helicosporium* sp. KCTC 0635BP 균주를 PD broth 배지 3 l 에 25℃, 5일간 배양한 후, 6,000rpm으로 상온에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 상등액에 petroleum ether를 가하여 150rpm으로 25℃에서 72시간 shaking 후, petroleum ether 층으로 이동한 *Helicosporium* sp. KCTC 0635BP의 항균물질을 분별깔대기를 이용하여 분리시켰다. 분리된 petroleum ether층을 다시 6,000rpm으로 상온에서 10분간 원심분리하고 침전물을 제거한 상등액을 25℃에서 3시간동안 농축시키고, 농축물질을 methyl alcohol에 녹인 후, 0.45 $\mu$ m syringe filter로 여과되어진 추출물을 UV-VIS spectrophotometer를 사용하여 spectrum 분석하였고, acetonitrile과 증류수를 60:40으로 혼합한 용액을 전개용액으로 사용하여 HPLC로 분석하였다. HPLC column은 C<sub>18</sub>을 사용하여 220nm에서 탐지하였고, flow rate는 1ml/min로 하였다.

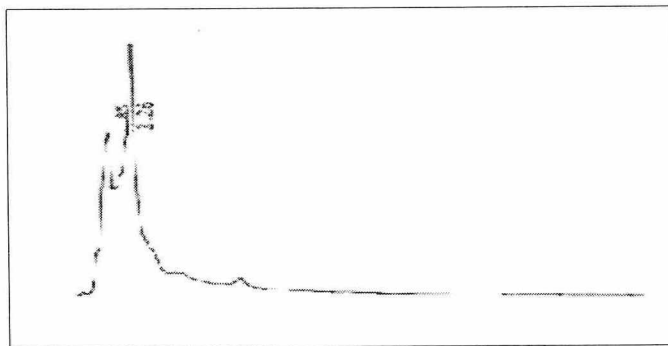


Fig. 1. HPLC chromatogram of antifungal compounds produced by *Helicosporium* sp. KCTC 0635BP

또한 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼을 통해서도 정확한 구조를 확인할 수 없었으나, 성분의 구조에 대한 예상되는 peak를 나타내는 program에 의해서 이 물질은 콜레스테롤에 해당하는 구조로 예상된다.

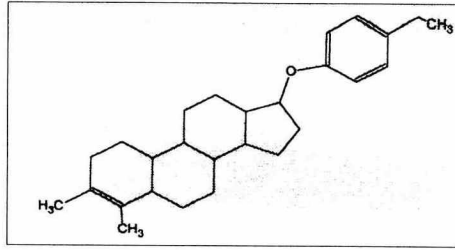


Fig. 2. The expected structure of the antifungal compound of *Helicosporium* KCTC 0653BP.

### 요약

식물병원균에 대한 *Helicosporium*의 항균작용을 확인하기 위하여 식물병원균인 *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia solani* AG2-2, *Fusarium oxysporium*, *Phytophthora dreschler*, *Alternaria*속을 선정하였고, 이에 대한 항균작용을 검토한 결과, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia solani* AG2-2에는 강한 항균활성을 나타내었으며, *Alternaria*에는 미약한 항균활성을 가졌으며, *Fusarium oxysporium*, *Phytophthora dreschler*에 대해서는 항균활성을 하지 않는 것으로 확인되었다. 이 항균물질의 구조를  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼을 통해서 분석한 결과 이 물질은 콜레스테롤에 해당하는 구조를 가진 것으로 추정된다.

### 참고문헌

1. Burpee, L.L., and Goult, L.G. 1984. Evaluations of fungicides for control of gray mold on creeping bentgrass. In: Turfgrass Research Annual Report, ed. by R.W. Sheard, pp. 6-7. Univ. of Guelph, Ontario. 38pp.
2. Elade, Y., Kohl, J. & Fokkema, N.J. 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. *Phytopathol.* 83: 308-313.
3. Feng, M.G, and J.B. Johnson. 1990. Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* 9(3): 785-790.
4. Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: Antibiosis. *Phytopathol.* 85: 469-472.
5. Paulitz, T.C., Park, S. and Baker, R. 1987. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Microbiol.* 33: 349-353.