

Isolation of antifungal compounds from *Helicosporium nizamabadense* KCTC 0635BP

Ki Wook Kim¹, Yun Ui Bae¹, Ju Soon Yoo¹, Su Dong Cho³, Ja Young Moon^{1,4},
Dong-Wan Kim⁵, Yong Kee Jeong⁶ and Woo Hong Joo^{1,2*}

¹Institute of Genetic Engineering, ²Department of Biology, ³Institute for Basic Science,
⁴Department of Biochemistry and Health Sciences, ⁵Department of Microbiology, Changwon
National University, Changwon, Korea

⁶Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan, Korea
TEL; +82-55-279-7443, FAX; +82-55-279-7449

Abstract

One strain was isolated from wilted chestnut tree and identified as *Helicosporium nizamabadense*. Also, the strain was evaluated for biocontrol potentials against phytopathogens. Autoclaved fraction of the isolate also showed complete growth inhibition of the turfgrass large patch pathogen, *Rhizoctonia solani* AG2-2 and plant pathogen, *Botrytis cinerea*. Culture extracts of *Helicosporium nizamabadense* were purified by Thin Layer Chromatography. The several fractions were analyzed by GC-MS, and NMR etc. Antifungal activities were presumably showed more than 5 fractions against the pathogens. Among them, the most effective antifungal fraction was identified as 2-Methylresocinol using GC-MS, and NMR. These results suggest that the 2-Methylresocinol may be useful for biochemicals.

서론

식물병원균에 의해 발생하는 각종 병을 예방 및 방제하기 위해서 정기적으로 농약을 살포할 경우 심각한 독성문제와 환경오염을 야기시킬뿐만 아니라 non target disease를 유발시키기도 한다.¹⁾ 따라서 농약의 과다사용에 따른 문제점을 줄여 나가고, 자연생태계를 보존하며, 장기적으로 식물병원균을 효과적으로 방제할 수 있는 생물학적 방제법이 요구된다. 병원균에 대한 길항미생물을 이용하는 생물학적방제에 관한 연구는 지난 반세기 동안 현저하게 증가되었으며, 일반적으로 *Bacillus subtilis*, *Gliocladium virens*, *Trichoderma* sp., *Pseudomonas* sp. 등과 같은 종

이 연구, 개발되어져 오고 있다. 하지만 인위적으로 조절된 환경에서 선발된 길항 미생물을 매우 다양한 환경요인이 작용하는 포장에 처리해야 하기 때문에 현재 실용화되고 있는 예는 극히 일부에 지나지 않는다.^{2), 3)} 이러한 문제점은 길항미생물의 선발방법과 처리방법을 효과적으로 개선할 경우 해결될 수 있을 것이다. 본 연구는 *Helicosporium* sp. KCTC 0635BP 균주로부터 여러 가지 항균 물질을 분리, 정제하여, 식물병원균을 target으로 저해활성을 검정 한 후, 구조를 규명하고, 그 물질의 응용성과 이용가능한 분야를 타진해 보고자 한다.

재료 및 방법

1) 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 밤나무 고사목으로부터 분리한 *Helicosporium* sp. KCTC 0635BP이며, 항진균 활성 테스트를 위한 실험균주로 *Rhizoctonia solani* AG2-2, *Botrytis cinerea*를 사용하였다.

2) 배지

본 실험에서 균주의 배양과 식물병원균에 대한 항균활성 테스트에 Potato Dextrose Agar(PDA)와 Potato Dextrose Broth(PDB) 배지를 사용하였다.

3) 사용 시약 및 기기

생리활성 물질의 추출용매로 사용된 Ethylacetate와 Methanol은 일반 공업용(Ducsan Pure Chemical Co., Ltd.)을, 물질의 정제 및 구조분석에 이용된 Methanol과 n-hexane은 특급시약(Junsei Chemical Co., Ltd)을 사용하였다. 또한 GC-MS와 NMR을 통해 물질의 구조를 분석하였다.

결과 및 고찰

Helicosporium sp. KCTC 0635BP는 분생포자의 형상이 길고 가늘며, 격막이 존재하는 물론, 가지의 끝이나 측면에 분생자기를 포함하고 균사의 끝이 감겨져 있는 형태학적 특성이 주사현미경을 통해 관찰됨에 따라 *Helicosporium nizamabadense*로 동정되었다. 동정된 KCTC 0635BP를 대량배양하여 항균물질을 추출, 정제하고 GC-MS, NMR을 이용하여 구조를 규명하는 과정에서 KCTC 0635BP가 생산하는 물질이 잔디라지패취병 및 식물병원성을 유발하는 *Rhizoctonia solani* AG2-2와 *Botrytis cinerea*에 대한 항진균 활성이 있음을 검정할 수 있었다. 그 결과 정제된 5종의 fraction 중 F-2, F-3, F-4의 물질에서 항균 활성이 우수함을 확인하였으며, *Rhizoctonia solani* AG2-2의 경우 각각 5.5mm, 9mm, 8mm의 저해환을, *Botrytis*

*cinerea*는 6.5mm, 14mm, 13mm의 높은 저해율을 나타내었다. 다음으로 항균효과 등 생리활성을 나타내는 물질을 분리, 정제하여 구조를 분석한 결과 세가지 fractions이 2-Methylresocinol임을 밝혀 내었다. 이상과 같은 결과에서 정상적인 미생물 균주에서 2-Methylresocinol이 생산, 분비됨이 확인된 것은 최초의 보고로서 분비기작, 내성 기작 그리고 2-Methylresocinol의 유용성과 생산공정 규명은 추후 연구되어야 할 과제로 판단된다.

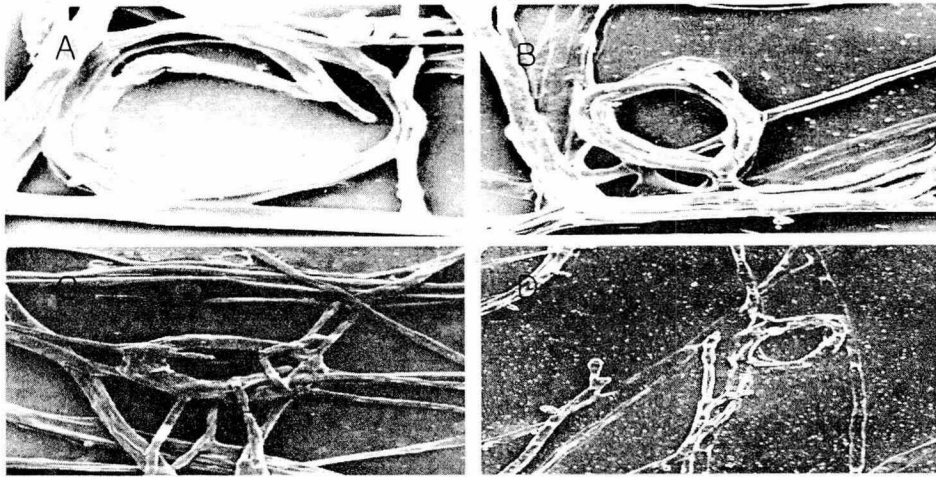


Fig. 1. scanning electron microscopy of *Helicosporium* sp. KCTC 0635BP.

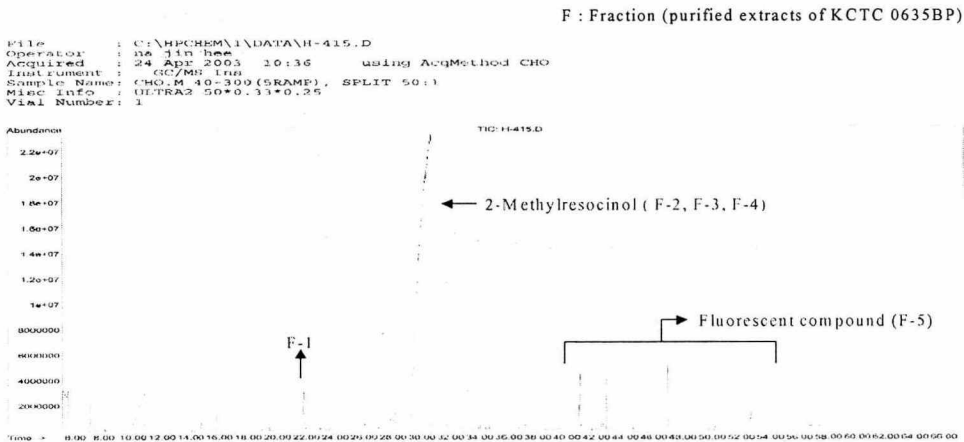


Fig. 2. GC-Mass chromatogram of total extracts of *Helicosporium nizamabadense* KCTC 0635BP.

Table 1. Mycelial growth inhibition of plant pathogenic fungi by compounds produced from *Helicosporium nizamabadense* KCTC 0635BP

Test compounds	Inhibition zone (mm)	
	<i>Rhizoctonia solani</i> AG2-2	<i>Botrytis cinerea</i>
Orcinol (0.5g/0.5ml)	15	22
Extracts of KCTC 0653BP.	5	10
Sterilized Extracts of KCTC 0653BP	7	8.5
Concentrated Extracts of KCTC 0653BP	9	5
F-1	-	-
F-2	5.5	6.5
F-3	9	14
F-4	8	13
F-5	6	3

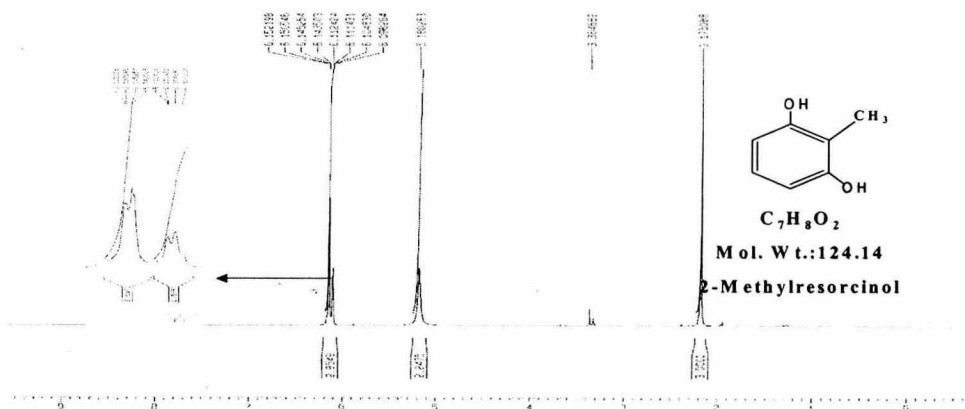


Fig. 3. ¹H-NMR spectrum of F-2, F-3, F-4 fractions.

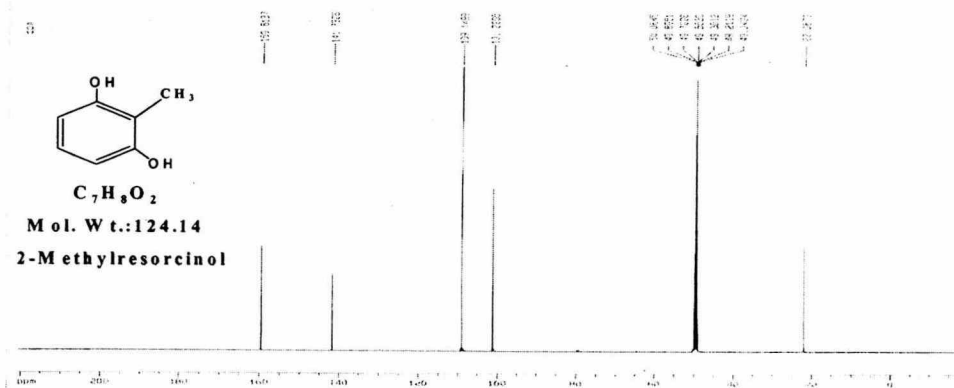


Fig. 4. ^{13}C -NMR spectrum of F-2, F-3, F-4 fraction.

참고문헌

1. Couch, H. B. and Smith, B. D. (1991), Increase in incidence and severity of target turfgrass diseases by certain fungicides, *Plant Disease* **75**, 1064-1067.
2. Chet, I. (1990), Biological control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatment. in: *Biological Control of soil-borne Plant Pathogens*, 15-25.
3. Burpee, L. L. and L. G. Goilty (1984), Suppression of brown patch disease of creeping mold on creeping bentgrass by isolates of nonpathogenic *Rhizoctonia* spp., *Phytopathology* **74**, 692-694.