

식물내생미생물(Endophyte)을 이용한 채소병 방제용 미생물 살균제 개발

김진철

한국화학연구원 생물기능연구팀

식물내생미생물(Endophyte)이란 식물체내에서 식물에는 아무런 해를 끼치지 않고 공생하는 미생물을 일컬으며, 식물체의 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 등 식물의 조직 대부분에 분포하며, 주로 세포간극 사이에서 서식한다. 일반적으로 식물내생미생물에는 세균(endophytic bacteria), 방선균(endophytic actinobacteria) 및 곰팡이(endophytic fungi) 등이 포함된다. 식물내생세균으로는 1997년 현재 54개 속에 129종의 세균들이 보고되어 있고, 이들 중에서 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* 및 *Agrobacterium* 등이 주요 세균들로 알려져 있다. 식물내생곰팡이로는 자낭균류(Ascomycotina), 담자균류(Basidiomycotina), 불완전균류(Deuteromycotina) 및 난균강균류(Oomycetes) 등에 속하는 균들이 보고 되고 있는데, 화분과 식물(grass endophyte)에는 특히 *Epichloe*속과 *Neotyphodium*속(*Epichloe*의 불완전세대)에 속하는 균들이 많은 빈도로 서식한다고 보고되고 있다. 식물내생방선균으로는 균근방선균으로서 알려진 *Frankia*속 외에 *Streptomyces*속, *Microbispora*속, *Streptosporangium*속, *Micromonospora*속 및 *Nocardiodes*속 등이 주로 알려져 있다.

이들 식물내생미생물들은 식물의 내병성 증진, 식물의 내충성 증진, 식물생장 촉진, 식물의 내한성 증진, 식물의 정착력 증진, 식물의 채식동물에 대한 방어능 증진 등의 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 다양한 구조와 약리활성을 가지고 있는 물질을 생산하고 있는 것으로 보고 되고 있다. 따라서 본 연구팀에서는 이와 같은 특징을 가지고 있는 식물내생미생물을 이용하여 채소에 발병하는 식물병, 특히 흰가루병, 잿빛곰팡이병, 토마토 역병 및 탄저병 등을 방제할 수 있는 미생물 살균제를 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

포장에서 자라고 있는 건전한 고추, 오이, 토마토, 호박, 배추 등의 식물체를 채취한 후 부위별로 나누어 표면살균을 실시한 다음 식물내생미생물을 분리하였다. 세균 260개 균주와 곰팡이 151개 균주 등 총 411개 균주를 분리한 후 액체배지에서 배양한 다음 토마토 역병, 오이 탄저병, 토마토 잿빛곰팡이병 및 보리 흰가루병 등 4개의 식물병에 대한 1일전 예방효과를 조사하였다. 그 결과 세균들 중에서 토마토 역병, 오이 탄저병 및 보리 흰가루병에 대하여 각각 7개, 29개 및 5개 균주가 높은 방제효과를 보였다. 식물내생곰팡이들 중에는 토마토 역병, 오이 탄저병, 보리 흰가루병에 대하여 각각 25개, 23개 및 1개 균주가 높은 활성을 보였다. 하지만 토마토 잿빛곰팡이병에 대해서는 높은 활성을 보이는 세균 및 곰팡이는 발견되지 않았다.

보리 흰가루병에 대하여 높은 활성을 보이는 5개의 세균들(EB064, EB070, EB072,

EB081 및 EB120)에 대하여 더 연구를 진행하였다. 이들 5개 균주의 배양액은 보리 흰가루병에 대하여 80%이상의 방제활성을 보였는데, 이 중에서 3개의 균주, 즉 EB072, EB081 및 EB120 균주는 배양액의 9배 희석액에서도 40%이상의 방제활성을 보였다. 선발한 3개의 균주들을 온실에서 재배하고 있는 오이를 이용하여 오이 흰가루병 (*Sphaerotheca fuliginea*)에 대한 방제효과를 조사한 결과 고추 잎으로부터 분리한 *Bacillus subtilis* EB120이 가장 높은 활성을 보였다. EB120균주의 배양여액은 25배 희석액과 50배 희석액 처리시 각각 84%와 76%의 높은 활성을 보였다. EB120균주가 생산하는 항균물질의 온도에 대한 안정성을 조사한 결과 항균물질들은 온도에 대하여 매우 안정한 것으로 나타났다. 항균물질을 분리하여 기기분석을 실시한 결과, EB120균주는 iturins(bacillomycin L 과 bacillomycin F), surfactins(licheysin B) 및 agrastatins 외에 신규 물질이라 생각되는 cyclolipopeptide계 항균물질을 생산하는 것으로 나타났다. 현재 이 균주는 (주)효살림에 기술이전되어 미생물제제로서 판매되고 있으며, 미생물살균제로서 등록을 추진하고 있다.

한편, 오이 탄저병 및 보리 흰가루병에 대하여 90%이상의 높은 항균활성을 보이는 F0010균주를 선발하여 이 균주로부터 항균물질을 분리하고, 구조를 동정하였다. 이 균주는 ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 염기서열과 분생포자 및 자실체 형태 등에 근거하여 *Xylaria* 속 균으로 동정되었다. 이 균주의 액체 배양 여액으로부터 ethyl acetate 분획, silica gel column chromatography 및 *in vivo* assay를 통하여 두 개의 항균물질을 분리하였다. 질량분석과 핵자기공명분석을 통하여 두 물질은 griseofulvin과 dechlorogriseofulvin으로 동정되었다. Dechlorogriseofulvin과 비교할 때 griseofulvin은 더 높은 *in vitro* 및 *in vivo* 항균활성을 보였다. Griseofulvin은 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 밀 붉은녹병 및 보리 흰가루병에 대하여 50 µg/ml - 150 µg/ml 수준에서 높은 방제효과를 보였다. *Xylaria*속 균주에 의한 griseofulvin의 생성은 처음으로 보고하는 바이다.

토마토 역병에 대하여 우수한 항균활성을 보이는 식물내생곰팡이에 대하여 더 연구를 진행하였다. 23개의 균주가 배양여액을 살포하였을 경우 90%이상의 높은 방제활성을 보였는데, 이들은 ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 염기 서열에 의해 10개 균주는 *Fusarium oxysporum*, 5개 균주는 *Fusarium*속, 2개 균주는 *Chaetomium*속, 2개 균주는 *Penicillium*속, 1개 균주는 *Coniochaeta ligniaria*, 1개 균주는 *Colletotrichum*속 그리고 1개 균주는 *Talomyces*속으로 분류되었다. 한 균주는 분류할 수 없었다. 이들 중에서 *Fusarium oxysporum* EF119균주가 가장 높은 활성을 보였으며, 10배, 50배 및 100배 희석액에서 각각 95, 90 및 57%의 활성을 보였다. EF119 균주의 배양액을 상등액과 균체로 나눈 후 50배로 희석하여 토마토 역병에 대한 활성을 조사한 결과 배양액, 배양여액, 그리고 균체는 각각 91%, 45% 및 55%의 활성을 보여 항균물질이 균체나 배양여액에 거의 동량으로 존재하는 것으로 나타났다. 배양여액으로부터 ethyl acetate분획, silica gel column chromatography, Sephadex-LH20 column chromatography 및 *in vivo* assay를 통하여 붉은색의 활성물질을 분리하였다. 질량분석과 핵자기공명 분석 결과 분자량이 328인 bikaverin으로 동정되었다. 분리한 bikaverin을 벼 도열병, 벼 문고병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병, 보리 흰가루병, 밀 붉은녹병, 고추

탄저병의 7가지 식물 병에 대한 활성검정을 실시한 결과 토마토 역병에 대해서만 특이적으로 33.3 $\mu\text{g/ml}$ 의 낮은 농도에서도 87%의 높은 항균활성을 보였다.

현재 *Xylaria*속 균주 및 *F. oxysporum* EF119균주를 이용한 미생물살균제를 개발하기 위하여 최적 발효 공정에 대한 연구를 실시하고 있다. 또한 분리한 식물내생 미생물을 이용한 고추 역병 등의 토양전염병 방제용 미생물 살균제를 개발하기 위하여 스크리닝을 실시하고 있다.