

토양으로부터 분리한 항진균 활성을 나타내는 세균의 동정과 그 생물활성

김성욱 · 이지우 · 이상한 · 복성해*

한국화학연구소 생물공학실

Identification of Bacteria Having Antifungal Activity Isolated from Soils and Its Biological Activity

Kim, Sung-Uk, Jee-Woo Lee, Sang-Han Lee and Song-Hae Bok*

Biotechnology Lab., Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-606, Korea

Abstract — A bacterium producing the antifungal compound KRF-001 isolated from soil was selected and identified as *Bacillus subtilis*. The antibiotic KRF-001 was active against various fungi. Efficacy of KRF-001 at various concentration for controlling leaf blast of rice in the paddy field was evaluated and compared with recommended rates of kasugamycin, blastocidin-s and tricyclazole. KRF-001 caused no irritation on the skin of rabbits and LD50 for mice was deduced more than 5000 mg/kg which indicates the possibility of low toxicity or no toxicity.

항진균 항생물질인 griseofulvin(1), nystatin(2), amphotericin B(3)가 방선균으로부터 발견되어 진균증에 대한 화학요법이 확립된 이래 이제까지 많은 항진균항생물질이 발견되었으나 외용제나 내장(內臟)진균증 치료제로 이용되고 있는 화합물은 매우 적은 실정이다.

세균 감염증의 화학요법이 상당히 많은 발전을 해 온 것에 비하여 진균증의 화학요법은 아직도 그 발전속도가 완만한 실정이나 특히 주목해야할 점은 내장진균증 환자가 매년 증가하고 있고(4) 피부 진균증의 잠재 환자도 상당수에 달하고 있다는 점이다. 최근에는 광범위 항세균 항생물질, 스테로이드 호르몬, 면역억제제 또는 항암제 등의 사용에 따른 기회 감염에 의해 내장 진균증이 더욱더 증가하고 있는 추세이다(5).

한편 농업용 항생물질의 개발은 이미 오래전부터 시작되어 그동안 kasugamycin(6), polyoxin(7), validamycin(8), 등이 실용화되어 독성이 강한 일부 유기합성계 농약을 대체하고 식량증산에 이바지해 왔다.

그러나 지금까지의 유기합성계 농약개발은 적은 양으로도 효과가 좋고 가격이 저렴한 제품의 개발에 주력해 왔으나 최근 환경오염문제와 더불어 농작물의 잔류 독성문제가 커다란 사회문제로 부각되고 있고, 기존의 많은 유기합성계 농약들도 암유발 가능성 또는 잔류독성 규제방침에 따라 그 사용이 점차 제한되어질 전망이다.

이와 같은 관점에서 본 연구에서는 각종 진균증에 광범위한 항균력을 나타내고 독성이 적은 항진균 항생물질을 개발하고자 국내의 각종 토양으로부터 항진균 활성을 나타내는 미생물을 분리하고 그 생물활성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선별

토양으로부터 균주를 분리하기 위한 분리용 배지로는 starch-nitrate agar(9)와 humic acid agar(10)를 기본배지로 이용하여 5,000여 균주의 세균과 방선균을 분리한 후 agar piece(11)법을 이용하여 항진균 활성을 나타내는 균주를 선별하였다. 선별된 미생물의 항생물질 생산성을 검토하기 위한 발효 배

Key words: Antifungal agent, fungicide, *Bacillus subtilis*

*Corresponding author

지는 soluble starch 20 g, soybean meal 25 g, glucose 0.5 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, polypeptone 1 g, $CaCl_2$ 1 g, NaCl 3 g, D.W. 1 l (pH 7.2)를 이용하였으며 *In vitro*와 *In vivo*에서 강력한 활성을 나타내는 균주를 선별하여 실험에 사용하였다.

선별된 균주의 동정

분리된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(12)와 The Genus Bacillus(13) 및 기타 동정서(14)의 실험방법에 따라 형태학적 및 생리학적 여러 특성을 조사하여 동정하였다.

포장에서의 벼도열병방제

벼도열병 포장실험은 서울대학교 농과대학 농업기술연구소에 의뢰하여 실험을 진행하였다.

공시품종 및 경종법 : 벼 품종 "락동 벼"를 서울대학교 농과대학 부속농장(수원시)의 보온절충식 못자리에서 상법으로 육묘하여 6월 9일 수답에 98주/평을 손으로 이양하였다. 기비로서 질소, 인산, 칼륨을 10 a당 각각 18 kg, 18 kg, 18 kg 사용하였다. 그리고 발병을 유발하기 위하여 6월 26일부터 7월 28일까지 3~4일 간격으로 9회에 걸쳐 퇴비로 류안 72 kg/10 a를 분포하였다.

공시 살균제 처리 : KRF-001의 3농도 750, 1500, 3000 ppm(각 a.i., 115, 230, 460 ppm)의 효과를 대조약제로 가스가마이신(가스민) 20 ppm, 브라스티시딘(부라딘) 207 ppm, 트리싸이클라졸(트리졸, 빔) 400 ppm의 상용양(100 l/10 a)를 7월 10일과 18일에 살포하여 방제치를 비교하였다.

각 공시 살포제에 전착제 트라이톤(alkyl polyethoxylate and sodium salt of alkylsulfonate alkylate 60%) 0.17 ml/300 ml을 섞어서 뿌렸다.

발병조사 및 실험결과 : 병반면적율을 농촌진흥청 기준에 따라 7월 26일과 7월 31일에 조사하였다(Table 1). 전체 포장면적은 10 a(20 m×50 m), 7개 처리구를 난괴법으로 4반복하였으며, 구당 면적은 6.9 m²(약 2.1평)으로 하였다. 각 구마다 150주에서 30주, 4반복 병반면적율을 평균하였다.

국소 자극성 및 급성경구독성시험

피부 자극성 시험 : 4개월된 Newzeland white rabbit(2~3 kg, ♂) 2마리를 이용하여 전처리한 KRF-

Table 1. Investigation of degree of diseased area of rice plant

병반면적율	이병상태
0.0%	잎 전체에 병반이 전혀 없을 때
0.2%	아랫잎에만 소형병반이 드물게 발생하였 때
0.5%	소형병반이 드물게 발생하였으나 새잎에도 발병이 인정될 수 있을 때
1.0%	병반이 상당히 눈에 띄고 평균 2~3잎당 병반이 하나 정도씩 있을 때
2.0%	병반이 전반적으로 상당히 눈에 띄고 잎당 평균 1개 정도의 병반이 있을 때
5.0%	발병이 많고 잎당 평균 2~3개의 병반이 눈에 띄거나 전반적으로 병반이 분포되어 있을 때
11.0%	발병이 심하고 각경 새잎에 위축현상이 있을 때
25.0%	발병이 심하고 식물체의 위축현상이 극심할 때
55.0%	발병이 심하고 식물체가 크게 위축되거나 잎의 피해가 현저하며 고사주가 생길 때
100.0%	포기가 완전고사 상태일 때

001을 0.5 g/0.5 ml되게 용해하게 2.5×2.5 cm 크기의 4개소에 찰과와 비찰과로 24시간 적용하였다. 관찰은 1, 2, 3, 7일 후 각각 반응을 관찰하였다.

급성경구독성 시험 : 7~8주령된 ICR mouse 수컷 7마리(35±5 g)와 암컷 7마리(25±5 g)을 1군당 2~3마리씩 분할하여 전처리한 KRF-001을 500, 1000, 5000 mg/kg을 경구투여 하고 2주 후에 일반상태와 체중 변화 및 부검관찰을 행하였다.

결과 및 고찰

선별된 균주의 동정

전국 162개 지역의 토양으로부터 분리한 항진균 활성을 나타내는 KRF-001 생산균주를 동정하기 위하여 여러 특성을 조사한 결과 Gram 양성이고, catalase 양성의 간균으로, 운동성이 있으며, 내생포자를 형성하는 전형적인 *Bacillus* 속의 특징을 나타내었다. 이러한 사실은 참고로하여 더욱 더 형태학적, 배양학적 특성과 생리적인 특성을 조사한 결과(Table 2, 3) Voges-Proskauer 반응, citrate 이용성, 질산염환원 반응, 전분과 casein 가수분해 반응에서는 양성을 나타내었다. 반면에 oxidase 반응, propionate 이용성, tyrosine 분해와 phenylalanine의 탈아미노 반응에서 음성을 나타내었으며 glucose, xylose, mannitol, ara-

Table 2. Morphological and cultural characteristics of bacterial strain producing the antifungal compound KRF-001

1. Morphological characteristics	
Cell form	Rods
Size (μm)	0.8~1.0×2~6
Gram stain	Positive
Spore shape	Ellipsoidal
Spore position	Subterminal
Sporangium swollen	Negative
Motility	Positive
Colony shape	Irregular, opaque
Colony color	Creamy
2. Cultural characteristics	
Nutrient agar (pH 6.8)	++
Potato dextrose agar (pH 5.6)	++
Growth in 7% NaCl	+
Temperature for growth	15~50°C
Growth pH	5~10.5
Growth in lysozyme (0.001%)	negative

++: Abundant growth, +: Normal growth, -: no growth

nbiose로부터 산을 모두 생성하였다.

이와 같은 모든 특성을 종합해 볼 때 KRF-001 생산균주는 보고된 *B. subtilis*의 균주보다 세포의 크기와 포자의 위치 및 oxidase 반응에서 다소 차이가 있는 것을 제외하고는 대부분의 성질이 모두 일치하여 KRF-001 생산균주는 *B. subtilis*로 동정하였다.

항진균 항생물질 KRF-001의 항균작용

부분적으로 정제된 조시료를 이용하여 도열병균의 포자와 균사의 형태 변화를 조사하고 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 KRF-001은 포자의 발아 억제와 균사의 생육을 다같이 억제하며 특히 균사의 심한 swelling 현상은 polyoxin에서 관찰되는 양상과 매우 흡사하고 기존의 kasugamycin이나 blasticidin-S와는 그 저해 양상이 다르다는 것을 알 수 있었다. 이러한 형태학적인 관찰과 세포벽 합성을 저해하는 polyoxin의 저해 양상으로부터 KRF-001의 작용부위는 세포벽 합성 저해일 것으로 추정되나 자세한 것은 더욱 더 조사하여만 할 것으로 사려된다.

항진균 항생물질 KRF-001의 MIC 측정

Table 3. Physiological characteristics of bacterial strain producing the antifungal compound KRF-001

Characteristics	Record
Catalase	+
Oxidase	-
Voges-proskauer test	+
Acid from	
D-Glucose	+
L-Arabinose	+
D-xylose	+
D-Mannitol	+
Hydrolysis of	
Casein	+
Gelatin	+
Starch	+
Utilization of	
Citrate	+
Propionate	-
Degradation of tyrosine	-
Deamination of phenylalanine	-
Nitrate reduced to nitrite	+
Formation of indole	-
Arginine dehydrogenase	-

+: Positive; -: Negative

거의 단일물질로 생각될 정도로 분리정제된 KRF-001을 시료로 사용하여 17종의 식물 병원균과 11종의 인체병원균에 대한 MIC를 측정하였다. MIC 측정결과 KRF-001은 6종류의 균주를 제외하고는 *in vitro*상에서 100 μg/ml 이하의 농도에서 활성을 나타내었으며, 특히 도열병 원인균인 *P. oryzae*에 대한 MIC는 3.25 μg/ml이었고 몇몇 균주를 제외하고는 대부분이 6.25~25 μg/ml의 농도에서 MIC를 나타내었다. 또한 인체 병원균에 대한 생육억제 효과에서 *C. albicans*와 *T. mentagrophytes* 모두 12.5 μg/ml의 농도에서 생육억제 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

따라서 KRF-001은 광범위 항진균제로써 식물병원균 및 인체 질병 유발균들을 모두 사멸할 수 있는 잠재력을 나타내었다(Table 4, 5). 한편 세균에 대한 활성은 시험대상으로 삼은 균주 중 식물병원균인 *Xanthomonas*를 제외하고는 100 μg/ml의 농도에서 전혀 생육 저해를 나타내지 않은 결과로부터 일반적으로 세균에 대한 활성은 낮은 것으로 생각되었다(Table 6).

항진균 항생물질 KRF-001의 잎도열병 방제효과

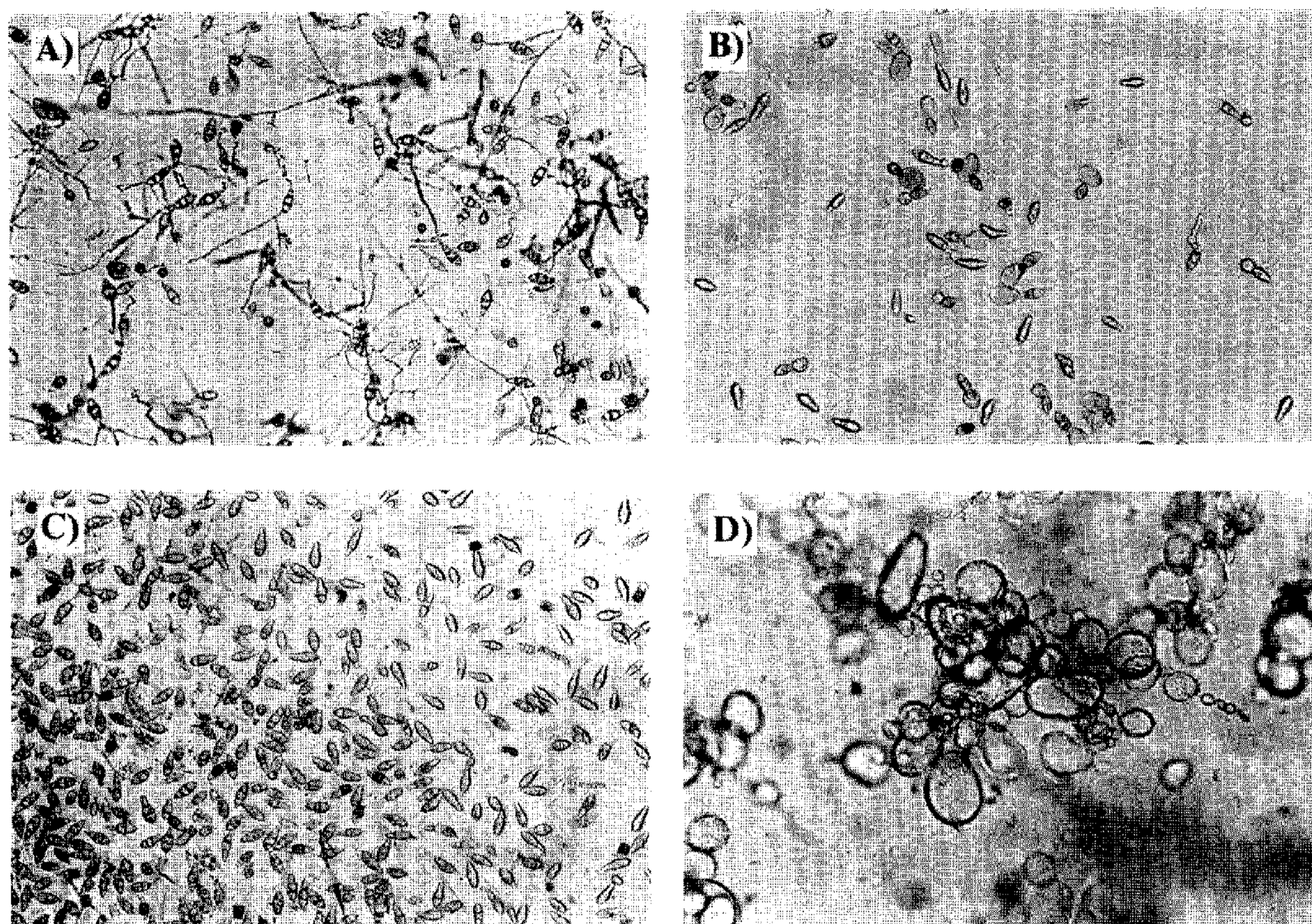


Fig. 1. A) Normal mycelial growth of *P. oryzae*; B) Inhibition of spore germination of *P. oryzae* by KRF-001 (250 µg/ml); C) Inhibition of spore germination of *P. oryzae* by KRF-001 (1 mg/ml); D) The abnormal mycelial growth of *P. oryzae* caused by KRF-001.

Table 4. Antifungal activity of KRF-001 against various plant pathogenic fungi

Classification	Microorganisms	MIC (µg/ml)	Media ¹⁾
Pathogenic Fungi (For plant)	<i>Alternaria alternata</i>	100	PDA
	<i>Alternaria citri</i>	100	PDA
	<i>Alternaria panax</i>	25	V-8 juice
	<i>Botrytis cinerea</i>	12.5	PDA
	<i>Cercospora kikuchi</i>	25	PDA
	<i>Fusarium oxysporum</i>	25	PDA
	<i>Fusarium roseum</i>	12.5	PDA
	<i>Fusarium solani</i>	25	PDA
	<i>Glomerella cingulata</i>	12.5	PDA
	<i>Glomerella glycines</i>	25	PDA
	<i>Phytophthora cactorum</i>	100	V-8 juice
	<i>Phytophthora capsici</i>	100	PDA
	<i>Phytophthora parasitica</i>	100	PDA
	<i>Pythium irregulare</i>	100	PDA
	<i>Pythium ultimum</i>	100	PDA
	<i>Piricularia oryzae</i>	3.25	PDA
<i>Rhizoctonia solani</i>	25	PDA	

¹⁾PDA: potato dextrose agar

Table 5. Antifungal activity of KRF-001 against various human pathogenic fungi

Classification	Microorganisms	MIC (µg/ml)	Media ¹⁾
Pathogenic fungi (for human)	<i>Alternaria fumigatus</i> ATCC 16424	50	Sab.
	<i>Blastomyces dermatitidis</i> ATCC 26198	6.25	Sab.
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	12.5	Sab.
	<i>Cladosporium carrionii</i> ATCC 16264	50	Sab.
	<i>Coccidioides immitis</i> ATCC 34020	6.25	Sab.
	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 36556	6.25	YM
	<i>Epidermophyton floccosum</i> ATCC 38486	6.25	Sab.
	<i>Histoplasma capsulatum</i> ATCC 28179	12.5	Sab.
	<i>Microsporum canis</i> ATCC 11622	12.5	PDA
	<i>Sporothrix schenkii</i> ATCC 10212	25	Sab.
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC	12.5	Sab.	
Non pathogenic fungi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NRRL Y-139	6.25	YM

¹⁾Sab: Saboaraud agar; YM: Yeast malt extract agar; PDA: Patato dextrose agar

Table 6. Antibacterial spectrum of KRF-001

Strains	KRF-001 (µg/ml)
<i>Streptococcus pyogenes</i> A308	>100
<i>Streptococcus pyogenes</i> A77	>100
<i>Streptococcus faecium</i> MD8b	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> SG511	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> 285	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> 503	>100
<i>Escherichia coli</i> O 55	>100
<i>Escherichia coli</i> DC 0	>100
<i>Escherichia coli</i> DC 2	>100
<i>Escherichia coli</i> TEM	>100
<i>Escherichia coli</i> 1507 E	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1592E	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1771	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1771M	>100
<i>Salmonella typhimurium</i>	>100
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1082E	>100
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1522E	>100
<i>Enterobacter cloacae</i> P99	>100
<i>Enterobacter cloacae</i>	>100
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	>100

Substance: KRF-001; Method: Agar Dilution (Hoechst 345), Medium: Mueller Hinton Agar; Inoculum size: 10⁷ Colony Forming Unit/ml, Incubation time; 18 hrs

온상에서의 *in vitro* 실험에서 벼도열병과 오이갯빛 곰팡이병에 활성을 나타낸 항진균 물질 KRF-001의

Table 7. Efficacy of KRF-001 and other fungicides for controlling leaf blast of rice in the paddy field

Treatment	Diseased leaf area ^a (%) with protective value ^b	
	26 July	31 July
KRF-001 750 ppm (a.i. 115 ppm)	0.56(69)	0.59(74)
KRF-001 1500 ppm (a.i. 223 ppm)	0.51(72)	0.54(76)
KRF-001 3000 ppm (a.i. 460 ppm)	0.48(73)	0.52(77)
Blasticidin-S (a.i. 20 ppm)	0.76(58)	0.78(65)
Kasugamycin (a.i. 20 ppm)	0.51(72)	0.56(75)
Tricyclazole (a.i. 400 ppm)	0.30(83)	0.41(82)
Control (no treatment)	1.79(0)	2.25(0)

^aThe rating was done 47 and 52 days after transplanting; ^bBased in each of 30 hills/plot with 4 replicates in randomized blocks

$$\text{Protective value} = 100 \times \frac{\text{Diseased leaf area}(\%) \text{ of control} - \text{Diseased leaf area}(\%) \text{ of fungicide}}{\text{Diseased leaf area}(\%) \text{ of control}}$$

포장에서의 약효를 검정하기 위하여 전처리한 발효액을 식물체에 살포하고 일정기간이 지난 후 발병율을 조사하여 그 결과를 Table 7에 나타내었다. Table 7에 나타낸 바와 같이 KRF-001의 3가지 농도 처리구의 방제효과는 대조약제인 blasticidin-S보다는 다소 높고

tricyclazole 보다는 다소 낮았으며 kasugamycin과는 거의 대등한 방제효과를 나타내었다.

항진균 항생물질 KRF-001의 국소자극성 시험과 급성경구 독성시험

전처리한 항진균 항생물질 KRF-001의 예비 독성 실험을 행하기 위하여 토끼를 대상으로 한 피부자극 시험과 급성경구 독성시험을 행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

피부자극성 시험 : 일반상태 및 적용부에 특이한 자극성 반응은 관찰되지 않았으나 찰고부(투여 구획)의 찰과선을 따라 시험물질의 색으로 보이는 얼은 갈색의 가피가 형성되었다.

급성경구 독성시험 : 1) 일반상태 관찰 ; 5000 mg/kg 투여군의 수컷군에서만 3마리 중 1마리가 투여후 3일째 사망하였으며 사망전의 임상증상은 옹크림, 폐안, ruffled fur 등의 소견이 관찰되었으나 생존 동물에서는 특이내용이 관찰되지 않았다.

2) 체중변화 ; 각군 모두(500, 1000, 5000 mg/kg 투여군)에서 특이적인 체중감소 또는 억제경향은 관찰되지 않았다.

3) 부검소견 ; 사망동물(5,000 mg/kg의 수컷 1마리)에서 장관내 흑갈색 내용물이 관찰되었으나 그 밖의 특이소견은 관찰되지 않았다.

요 약

전국 162개 지역에서 수집한 토양에서 분리한 5,000여종의 토양 미생물 탐색을 통해서 항진균 활성이 우수한 한개의 생산균주를 선별하고 형태학적 배양학적, 생리화학적 균주 특성을 조사하고 *Bacillus subtilis*로 동정하였다. 이 균주가 생산하는 항진균물질은 벼도열병균, 회색곰팡이병균, 무좀균, 캔디다균 등에 효과가 있었으며 벼의 도열병에 대한 포장에서의 활성은 tricyclazole 보다는 낮지만 kasugamycin과 대등한 방제효과를 나타내었다.

한편 국소 자극성 시험에서는 자극성이 없는 것으로

나타났으며, 급성경구 독성은 5,000 mg/kg 군에서 1마리가 사망하여 LD₅₀ 값은 5,000 mg/kg 이상으로 추정되어 KRF-001은 저독성내지 무독성 항진균물질로 유추된다.

참고문헌

1. Oxford, A.E., H. Raistric and P. Simonart: *J. Biochem.*, **33**, 240 (1939)
2. Hazen, E.L. and R. Brown: *Science*, **112**, 423 (1950)
3. Gold, W., H.A. Stout, J.F. Pagano and R. Donovan: *Antibiot. Annu.*, **1956**, 579 (1955)
4. 伊藤草: 眞菌と眞菌病, **26**, 193 (1985)
5. 大野阿三と 大村智編: 抗生物質研究の最先端, 東京化學同人, 東京, 16 (1987)
6. Umezawa, H., Y. Okami, T. Hashimoto, Y. Suhara, M. Hamada and T. Takeuchi: *J. Antibiot.*, **18**, 101 (1965)
7. Isono, K., J. Nagatsu, Y. Kawahima and S. Suzuki: *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 848 (1970)
8. Iwasa, T., H. Yamamoto and M. Shibata: *J. Antibiot.*, **23**, 595 (1970)
9. Kuster, E. and S.T. Williams: *Nature*, **202**, 928 (1964)
10. Hayakawa, M. and H. Nonomura: *J. Ferment. Technol.*, **65**, 501 (1987)
11. 米原弘編: 抗生物質, 地球社, 東京, 63 (1981)
12. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Willams and Wilkins Co., Baltimore, 1104 (1986)
13. Gordon, R.E., W.C. Haynes and C.H. Pany: *The Genus Bacillus, Agriculture Handbook No. 427*, Agriculture Research Service, U.S. Department of Agriculture, Washington D.C. (1973)
14. 長容川武治編: 未生物の分類と同定 學會出版 Center, 東京, 203 (1981)
15. Drouhet, E., B. Dupont, L. Improvisi, M. Viaiani and A.M. Tortorano: *In vitro and In vivo evaluation of antifungal agents*, Elsevier, 31 (1986)
16. 지옥표 외: 신규 의약품 스크리닝 기술개발에 관한 연구(II) 과학기술처 연구보고서, 7 (1988)

(Recived June 25, 1991)