

고추疫病菌(*Phytophthora capsici*)의 生物學的 防除
II. 抗菌物質의 分離 精製 및 抗菌活性

張胤喜* · 張相文* · 崔 炅* · 李東勳*

Biological Control of Phytophthora Blight of Red-pepper
Caused by *Phytophthora capsici*.

II. Isolation and Antifungal Activity of the Substances

Produced by *Pseudomonas* sp. A-183.

Yoon-Hee Chang*, Sang-Moon Chang*, Jyung Choi* and Dong-Hoon Lee*

Abstract

In the culture medium, the three antifungal fractions against *P. capsici* were separated by Sephadex G-25 column chromatography and Silica-gel chromatography.

The substance A in white powder and the substance B in sticky oil were isolated by ethyl acetate : acetone mixture(7 : 3), and the substance C in yellow powder was isolated by chloroform : ethyl acetate mixture(95 : 5).

The crude extract by ethyl acetate from the culture medium acidified to pH 2 was known to inhibit completely the growth of *P. capsici* at the level of 50mg kg⁻¹. The substance A and B were known to be effective above the level of 5mg kg⁻¹, and the substance C was effective above the level of 1mg kg⁻¹. However, at the level of 20mg kg⁻¹, the efficiency was in the order of A>C>B.

It is apparant on a pot-experiment scale that the three substances effectively control Phytophthora blight of the red-pepper plant grown in the soil inoculated with *P. capsici*.

*慶北大學校 農科大學 農化學科.

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea.

緒 論

고추疫病은 土壤傳染性으로 土壤서식 病原菌인 *Phytophthora capsici*에 의해 發生하는 病害로 고추 生産에 있어서 致命적인 病害 中の 하나이다. 그러나 기존의 化學的 防除나 저항성品種의 開發만으로는 疫病的을 完全히 防除할 수 없다¹⁾.

이러한 이유에서 最近 土壤傳染性 病害를 防除하기 위해 生物學的 防除를 권장하며 그에 관한 研究가 활발히 이루어지고 있다²⁾. 生物學的 防除의 研究는 주로 拮抗微生物에 의해 特定한 病原菌의 活動을 抑制시켜 防除效果를 얻고자 하는 것과³⁾ 有機物을 施用하여 土壤 中の 微生物相에 影響을 주어 病原菌의 繁殖을 抑制하는 것으로 大別할 수 있다⁴⁾. 國內에서도 生物學的 防除法에 관하여 관심이 고조되고 있는 實情이다⁵⁾. 外國의 경우 半세기 前부터 微生物을 利用한 農業用 抗生物質 및 拮抗菌에 대한

많은 研究를 해 오고 있다⁶⁾. 生物學的 防除에 利用되는 拮抗微生物로는 *Pseudomonas* sp., 포자를 形成하는 *Bacillus* sp., yeast, filamentous fungi 등이 있다⁷⁾. 이들 中 *Pseudomonas*屬 菌들이 生産하는 抗生物質로 pseudobactin^{8~11)}, 含窒素 heterocyclic化合物인 pyrolitrin, pyoluterin 및 phenazine化合物 등이 報告되어 있다^{12~18)}. 고추疫病菌에 대한 抗生物質의 生産에 관한 研究로는 李 등¹⁹⁾이 *Streptomyces parvullus*로 부터 polyoxin을, 金 등²⁰⁾이 *Streptomyces sneiyagawaensis*로 부터 concanamycin B를 分離하였으며, 李 등²¹⁾이 *Pseudomonas*屬菌株들로 부터 phyoluteorin, 2,4-diacetylphloroglucinol 및 1-hexadecanol 등을 分離하였다.

本 研究에서는 前報²²⁾에서 *P. capsici*에 대한 優秀한 抗菌力이 認定된 *Pseudomonas* sp. A-183 培養으로 生産된 抗生物質을 純粹分離하여 몇가지의 주요 植物病原菌에 대한 抗菌活性和 고추疫病에 대

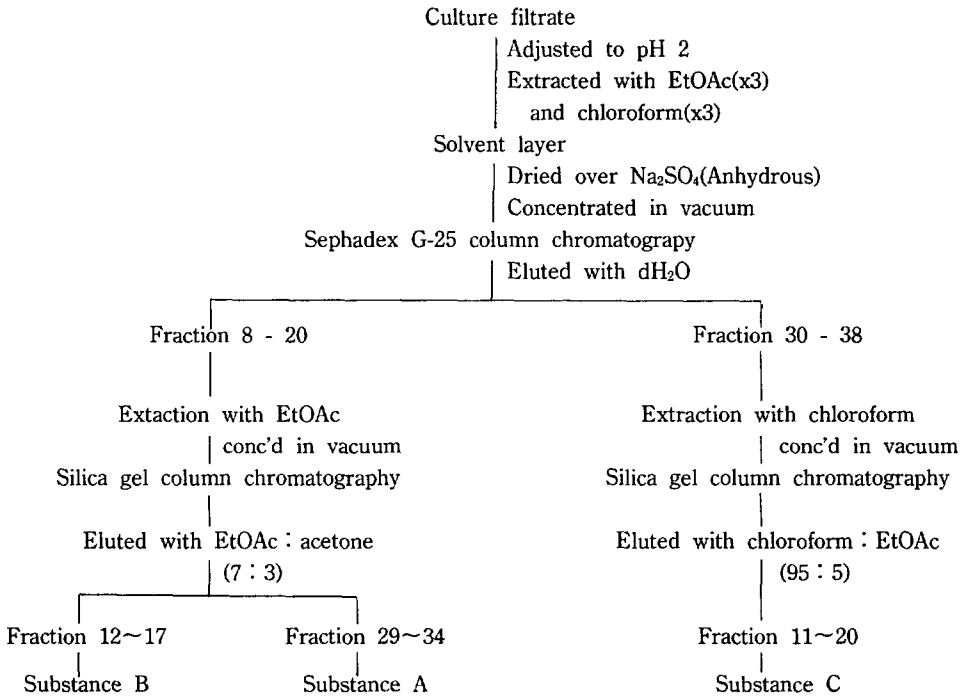


Fig. 1. Isolation procedures of antifungal substances.

한 防除效果를 檢定하였다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

고추疫病菌(*P.capsici*) 및 抗菌物質 生産菌株 (*Pseudomonas* sp. A-183)의 보관과 培養은 前報²²⁾와 同一한 方法으로 遂行하였으며, 抗菌活性 測定에 使用한 植物病原菌 *Phythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Mycosphaerella melonis*, *Fusarium oxysporum*, *Collectotrichum* sp., *Ceratosporma* sp. 등은 慶北大學校 農化學科 微生物學 研究室에서 分讓받았다.

2. 抗菌物質의 分離, 精製

Pseudomonas sp. A-183의 培養液 中에 生産된 抗菌物質을 Fig. 1과 같은 절차에 따라 純粹分離하였다.

3. 抗菌物質의 抗菌活性 調査

고추疫病菌에 대한 抗菌物質의 抗菌活性 調査方法은 前報²²⁾와 同一한 方法으로 實施하였다.

4. 고추疫病的 防除試驗.

PDA平板培地에서 10日 동안 培養한 *P.capsici*의 菌叢에 殺菌증류수를 넣고 끓어 내어 菌絲懸濁液을 만든 後 10ml씩 120°C에서 1시간 殺菌한 土壤 50g을 넣은 紗畚(직경 9cm)에 混合하였다. 여기에 20일 고추묘(청홍고추)를 10株씩 移植하고 分離된 抗菌物質의 stock solution(10mg/ml)을 25µg/ml의 濃도로 稀釋한 後 土壤 1g當 0.2ml씩 加하였으며 30°C로 조정된 生長室에서 生育시켰다. 10일 後 고추의 地表面部位의 줄기가 잘록해진 것을 疫病이 發生한 것으로 判定하였다.

結果 및 考察

1. 抗菌物質의 有機溶媒에 의한 抽出

Pseudomonas sp. A-183을 PD培地에서 5日 동안 培養 後 培養液을 遠心分離하였다.

이 培養遠心上澄液 20ml에 各各 ethanol 및 acetone을 80ml를 넣고 재차 遠心分離後 上澄液을 濃縮하였으며 다른 有機溶媒는 培養液과 同量이 되게 添加하여 抽出 濃縮하였다. 濃縮된 syrup를 0.01N-NaOH로 中和시키고 PDA培地에 添加하여 抗菌活性을 調査한 結果는 Table 1과 같았다.

Table 1. Extraction of crude antifungal substances with organic solvents.

| Solvents | Inhibition(%) of <i>P. capsici</i> growth* |
|-----------------|--|
| 80% Methanol | 50.0 |
| 80% Acetone | 42.9 |
| Butanol | 46.4 |
| Ethyl acetate | 46.4 |
| Chloroform | 35.7 |
| Petroleum ether | 7.1 |
| Diethyl ether | 7.1 |
| Dichloromethane | 3.6 |

*Culture solutions(20ml) were extracted with various solvents and concentrated, and mixed with PDA medium(100ml).

抗菌活性이 methanol, acetone, butanol, ethyl acetate 및 chloroform으로 抽出했을 때 높게 나타났다. 그러나 petroleum ether, diethyl ether 및 dichloromethane에는 抽出되지 않았다.

培養液 200ml를 취하여 methanol, acetone 및 ethyl acetate로 추출 농축하여 粗抗菌性 物質을 얻었으며, 이를 50~100mg kg⁻¹ 濃도로 稀釋하여 抗菌活性을 調査한 結果는 Table 2와 같았다.

培養濾液을 減壓 濃縮하여 얻은 粗抗菌性 物質의 量은 1.35g이었으며 ethylacetate(pH 2)로 抽出하였을 때는 0.18g의 粗物質을 얻었다. 抽出되는 粗抗菌

物質의 量은 methanol을 사용했을 때 가장 많았으나 相對的인 活性은 낮았다. ethylacetate(pH 2)로 抽出했을 때 粗抗菌物質의 抗菌活性이 가장 높았으며 이 粗抗菌物質은 50mg kg⁻¹에서도 *P. capsici*의 生育을 완전히 抑制시키는 것으로 나타났다.

Table 2. Inhibition rate of *P. capsici* grown on antifungal substances produced by *Pseudomonas* sp. A-183.

| Extraction* | Yield of crude antifungal sub. (g/200ml) | Inhibition(%) of <i>P. capsici</i> growth | | | |
|----------------------|--|---|-------|-------|-------|
| | | Conc. (ppm) | | | |
| | | 1000 | 500 | 100 | 50 |
| 80% methanol | 0.72 | 100.0 | 100.0 | 48.4 | 38.7 |
| 80% acetone | 0.42 | 100.0 | 77.4 | 43.4 | 38.0 |
| Ethyl acetate(pH 10) | 0.18 | 100.0 | 80.0 | 33.3 | 22.6 |
| Ethyl acetate(pH 2) | 0.40 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Culture filtrate | 1.35 | 100.0 | 61.3 | 58.1 | 35.5 |

*Soluble fractions in 80% methanol, 80% acetone and culture filtrate were concentrated to dryness on vacuum.

이상의 結果로 보아 ethyl acetate(pH 2)에 목적하는 抗菌性物質의 抽出收率이 높음으로 ethyl acetate(pH 2)에 轉用된 物質은 親油性 化合物로 추정되었다²³⁾.

2. 抗菌物質의 分離 精製 및 性質

Pseudomonas sp. A-183이 生産하는 抗菌物質을 Fig. 1과 같은 過程에 따라 分離 精製하여 培養液으로 부터 最終的으로 白色 粉末狀의 A물질(29~34 fraction)과sticky oil狀의 B物質(12~17 fraction)을 얻었으며, UV 吸收分割에서는 노란색 粉末狀의 C物質(11~20 fraction)等 3種類의 物質을 純粹分離하였다. 純粹分離된 物質이 單一物質로 精製되었는지를 알기 위하여 TLC를 實施한 結果는 Table 3과 같았다.

여러種類의 展開溶媒에서도 모두 單一band의 R_f

값을 나타내어 세種類의 物質 모두 單一 物質로 確認되었다. 分離된 세種類의 抗菌物質을 各各 1mg을 秤量하여 2ml의 溶媒에서의 溶解性を 調査한 結果, 세가지 物質 모두 알칼리 溶液에서는 溶解되었으나, 酸性溶液에서는 C物質 만이 다소 溶解되고 A와 B物質은 溶解되지 않아서 脂肪酸을 포함하는 物質로 추정되었다.

Table 3. R_f values of the antifungal substances on the thin layer chromatography.

| Solvent system | R _f value | | |
|--|----------------------|------|------|
| | A | B | C |
| Benzene : acetone(1 : 1) | 0.05 | 0.43 | 0.94 |
| Chloroform : acetone(3 : 7) | 0.10 | 0.67 | 0.85 |
| Chloroform : methanol : acetic acid(7 : 1 : 0.5) | 0.25 | 0.65 | 0.93 |
| Chloroform : methanol : acetic acid(6 : 1 : 0.5) | 0.31 | 0.62 | 0.82 |
| Chloroform : methanol : acetic acid(5 : 1 : 0.5) | 0.36 | 0.48 | 0.68 |
| Chloroform : methanol(75 : 15) | 0.48 | 0.68 | 0.87 |

*Color development for the spot was carried out with conc.-H₂SO₄

分離된 세가지 物質의 溫度 및 pH에 대한 安定性を 調査한 結果는 Table 4와 같았다.

Table 4. Temperature and pH stability of antifungal substances.

| Treatment* | Inhibition(%) of <i>P. capsici</i> growth | | | | |
|------------------|---|------------|------|------|------|
| | | | A | B | C |
| Temp. | 80°C | 30-60 min. | 41.9 | 29.0 | 61.3 |
| | 110°C | 30-60 min. | 41.9 | 29.0 | 61.3 |
| pH** | 2 | | 25.8 | 16.2 | 61.3 |
| | 4, 6, 8, 10 | | 41.9 | 29.0 | 61.3 |
| Non treatment*** | | | 41.9 | 29.0 | 61.3 |

*Antibiotic solution (A and B : 10µg/ml, C : 5 µg/ml) were treated.

**The pH was adjusted back to 6.5 after the antibiotic solution was treated at room temperature for 48 hrs.

***The Non-treatment was adjusted to pH 6.5.

세가지 抗菌性物質 모두 80℃ 및 110℃에서 60分 동안 熱處理하여도 抗菌活性에 影響을 주지 못하여 熱에 대한 安定性이 높은 것으로 思料된다. 또한 C 物質은 pH 2~10 사이에서 安定하였으며 A와 B 物質은 pH 2에서 不安定하여 抗菌活性이 減少되었으나 pH 4 이상에서는 安定한 것으로 나타났다.

3. 抗菌物質의 抗菌活性.

*P. capsici*에 대한 抗菌活性

分離된 3가지 物質을 0.5~20mg/kg의 濃度로 PDA培地에 添加하여 Dendroid法²⁴⁾에 의하여 抗菌活性을 調査한 結果 Table 5와 같았다.

Table 3. Inhibition of *P. capsici* by antifungal substances produced by *Pseudomonas* sp. A-183.

| Conc.(mg/kg) | Inhibition(%) of <i>P. capsici</i> growth | | |
|--------------|---|----------|----------|
| | A | B | C |
| 0.5 | 0.0 (R) | 0.0 (R) | 0.0 (R) |
| 1.0 | 0.0 (R) | 0.0 (R) | 21.7 (R) |
| 2.5 | 0.0 (R) | 0.0 (R) | 39.2 (T) |
| 5.0 | 25.0 (R) | 17.9 (R) | 59.6 (S) |
| 10.0 | 39.2 (R) | 30.2 (T) | 71.4 (S) |
| 20.0 | 85.7 (T) | 35.6 (T) | 78.6 (S) |

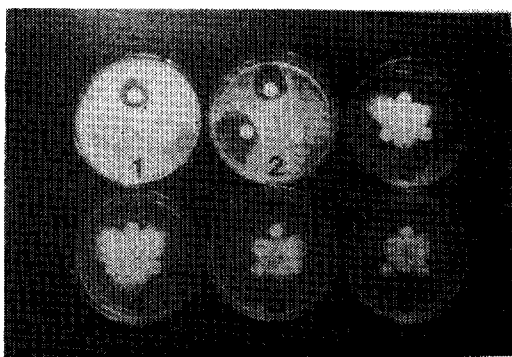
Growth type of *P. capsici* : R : regular, T : thin, S : scanty

C 物質은 1.0mg/kg에서 부터 抗菌活性을 나타내며 5.0mg/kg 처리로 50% 이상의 活性을 나타내었다. 그러나 A와 B 物質은 5mg/kg에서 活性을 나타내기 시작하며 B 物質은 A와 B 物質에 비해 抗菌活性이 상대적으로 낮았다. 各各 20mg/kg씩 處理하였을 경우에는 抗菌活性이 A>C>B의 順이었다. 이러한 現象은 各 物質의 分子의 크기 및 물에 대한 溶解度의 差異에 따른 擴散速度 및 初期活性濃度의 差異때문으로 추정된다.

10mg/kg로 處理한 培地上에서 菌絲의 發育狀態를

比較해 보면 A 物質에서는 無處理의 경우 보다는 적지만 *P. capsici*의 氣中菌絲가 發育하였으나 B와 C 物質의 경우에는 전혀 氣中菌絲의 發育이 보이지 않았다.

各種 植物病原菌에 대한 抗菌活性 : 分離된 抗菌物質의 各種 植物病原菌에 대한 抗菌活性을 Paper disk法²⁵⁾으로 調査한 結果는 Fig. 2와 같았다.



Paper disks (8mm in diameter) were treated 20μl of antibiotic solutions (A and B : 1mg/ml, C : 0.5mg/ml) and treated on agar medium after drying (1 : *P. ultimum*, 2 : *R. solani*, 3 : *M. melonis*, 4 : *F. oxysporum*, 5 : *Collectotrichum* sp., 6 : *Ceratosporma* sp.)

Fig. 2. Antifungal activities on phytopathogenic fungi.

A 物質은 6種의 病原性 眞菌에 대해서 모두 抗菌活性을 보였다. 특히 *R.solani*와 *P. ultimum*에 강한 抗菌活性을 보였으며 B 物質도 *R.solani*, *P.ultimum*, *M.melonis*, *Collectotrichum* sp.에 대해 A 物質과 비슷한 活性을 보였다. 그러나 C 物質은 *P. ultimum*에 대해서만 약간의 抗菌活性을 보일 뿐 다른 病原菌에는 *P. capsici*에서와 比較해 볼 때 대조적으로 抗菌活性이 거의 없는 것으로 나타났다.

고추疫病에 대한 效果

고추疫病的 防除效果를 알아보기 위하여 세가지 抗菌物質을 25μg/ml로 調劑하여 0.2ml/g (soil)의 濃度로 고추苗를 移植한 pot에 處理한 後고추疫病菌을

接種하였다. 10日 동안 生育시킨 後, 疫病防除效果를 調査한 結果는 Fig. 3과 같았다.

고추疫病菌(*P.capsici*)만을 處理한 區에서는 疫病이 심하게 發生하여(10株 中 7株에서 病發生) 植物體가 枯死되고 있으나 分離한 세가지 抗菌物質을 處理한 區에서는 疫病的 發生이 없이 對照區와 동일한 정상적인 生育을 나타내었다. 그러므로 *Pseudomonas* sp. A-183 菌株 및 生産된 抗生物質들은 *Phytophthora capsici*에 의한 고추疫病에 效果的인 微生物農藥으로 使用 可能한 것으로 思料된다.



1, 2 : *P. capsici* only, 3 : control, 4 : *P. capsici* + A, 5 : *P. capsici* + B, 6 : *P. capsici* + C. Pepper seedlings¹⁰⁾ were transplanted in either untreated soil or soil mixed with mycelium of *P. capsici* and thereafter, the solution of antifungal agents (25μg/ml) was drenched at the rate of 0.2ml/g (soil). Diseased plants were examined 10 days after transplanting.

Fig. 3. Control of sheath blight caused by *P. capsici* on red pepper plants by antifungal substances.

要 約

고추疫病菌인 *Phytophthora capsici*에 대한 生物學的 防除를 위하여 *Pseudomonas* sp. A-183菌株의 培養液으로 부터 3가지 化合物을 分離 精製한 後 抗菌活性을 調査하여 微生物農藥의 開發에 대한 可能性을 檢定하였다.

培養濾液을 pH 2로 조정하여 ethyl acetate로 抽出한 場合に 抗菌活性이 가장 높았으며, 粗抽出物 50mgkg⁻¹의 濃度에서도 *P. capsici*의 生育을 완전히 抑制시켰다. 培養濾液으로 부터 白色粉末狀의 A物質, sticky oil狀의 B物質 및 黃色 粉末狀의 C物質을 分離 精製하였다. A, B 및 C物質의 *P. capsici*에 대한 抗菌力의 最小汨害濃度는 各各 1mgkg⁻¹, 5mgkg⁻¹ 및 5mgkg⁻¹으로 나타났다. 세가지 物質 모두 pot試驗에서 *P. capsici*에 의한 고추疫病을 效果的으로 防除하였다.

參考文獻

1. Baker, K. F. and R. J. Cook (1983) : The nature and practice of biological control of plant pathogen, Soc., St. Paul., p. 539.
2. Cook, R. J. (1988) : Biological control of plant pathogen : Theory to application, Phytopathol., 75 : 25.
3. Omura, S., Y. Tanaka, K. Hisatome, S. Miura, Y. Takahashi and A. Nakagawa (1988) : Phthoramycin, a new antibiotic, active against a plant pathogen, *Phytophthora* sp., J. Antibiotics, 41 : 1910~1912.
4. 尹世永, 甲裴秀昭 (1994) : 고추疫病菌에 대한 有機物 施用土壤의 溶菌作用, 韓土肥誌, 27(4) : 303~308.
5. 엄재열 (1993) : 미국의 식물검역 기준에 적합한 사과 병해방제의 체계 수립, 경상북도 용역연구 보고서, p. 3~43.
6. Fry, E. W. (1982) : Principle of plant disease management, Academic Press, New York, p. 176~180.
7. Mukerji, K. G. and K. L. Garg (1988) : Bioccontrol of plant disease, Vol.1, CRC Press, p. 167~170.
8. Teintze, M., M. B. Hossain, C. L. Barnes, J. Leong and D. van der Helm (1981) : Structure

- of ferric pseudobactin, siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*, Biochemistry, **20** : 6446~6457.
9. Misaghi, I. J., L. J. Stowell, R. G. Grogan and L. C. Spearman (1982) : Fungistatic activity of water-soluble fluorescent pigments of fluorescent *Pseudomonads*, Phytopathol., **72**(1) : 33~36.
 10. Scher, F. M. and R. Baker (1982) : Effect of *Pseudomonas putida* and asynthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *fusarium* wilt pathogens, Phytopathol., **72** : 1567~1573.
 11. Taraz, K., D. Seinsche and H. Budzikiewicz (1991) : Variants of pseudobactin and pseudobactin A : new pyoverdin type peptide siderophores from *Pseudomonas fluorescens* E2, Z. Naturforsch., C : Biosci.(Ger), **46** : 522~566.
 12. Arima, K., H. Imanaka, A. Fukuta, M. Mukaizaka and G. Tamura (1964) : Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*, Agric. Biol. Chem., **28** : 575~576.
 13. Howell, C.R. and R.D. Stipanovic (1979) : Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium, Phytopathol., **69** : 480~482.
 14. 本間善久 (1990) : 타이콘 苗立枯病을 抑制する *Pseudomonas cepacia* の 拮抗 機構, 植物防疫, **44**(10) : 442~445.
 15. Homma, Y., Z. Sato, F. Hirayama, K. Konno, H. Shirahama and T. Suzui (1989) : Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens, Soil Biol. Biochem., **21** : 723~728.
 16. Howell, C. R. and R. D. Stipanovic (1980) : Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin, Phytopathol., **70** : 712~715.
 17. Gurussiddaiah, S., M. Weller, A. Sarkar and R. J. Cook (1986) : Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis var. tici* and *Pythium* spp., Antim. Ag. Chemt., **29** : 488~495.
 18. Brisbane, P. G., L. J. Janik, M. E. Tate and R. F. O. Warren (1987) : Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2~79(NRRLB-15132), Antimicrob. Agents Chemother., **31** : 1967~1971.
 19. 이인경, 김창진, 김신덕, 유익동 (1990) : *Streptomyces* 屬 菌株가 生産하는 抗고추 疫病性 抗生物質, 韓國應用微生物學會誌, **18** : 142~147.
 20. 김창진, 이인경, 윤봉식, 유익동 (1993) : *Streptomyces neyagawaensis* 38D10 菌株가 生産하는 concanamycin B의 抗고추 疫病活性, 韓國應用微生物學會誌, **21** : 322~328.
 21. 李仁遠, 金龍局 (1990) : 拮抗微生物로 부터 抗菌性物質의 分離 및 精製에 관한 研究 : *Pseudomonas* 屬 菌이 生成하는 拮抗物質의 分離 및 同定, 農試論文集, **33** : 355~364.
 22. 張胤熹, 張相文, 李東勳, 崔 烜 (1996) : 고추 疫病菌의 生物學的 防除, I. 抗菌物質 生産을 위한 菌株의 選拔, 韓國環境農學會誌, **15**(3) : 289~295.
 23. Dische, Z. and E. Borenfreund (1951) : A new spectrophotometric method for the detection and determination of sugars and trioses, J. Biol. Chem., **192** : 583~587.
 24. 裒 武, 高永熹 (1982) : *Streptomyces* sp.가 生産하는 抗眞菌性 抗生物質에 관한 研究, (第1報) 生産菌株의 選別과 抗眞菌性 抗生物質의 分離 精製, 韓國應用微生物學會誌, **10** : 33~37.
 25. Victor Lorian, M. D. (1991) : Antibiotics in laboratory medicine(3rd ed.), William and Wilkins, Baltimore.