

초음파 파쇄에 의한 항진균 폴리엔 생성 방선균의 포자형성 최적화

¹김 병 균 · ²한 규 범 · † ¹김 응 수
¹인하대학교 생물공학과, ²한슨바이오(주)
(접수 : 2007. 1. 17., 게재승인 : 2007. 5. 8.)

Optimization of Spore Production *via* Sonication of Antifungal Polyene-producing Actinomycetes

Byung-Kyun Kim¹, Kyubeom Han², and Eung-Soo Kim†¹

¹Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

²Hanson Biotech Co., Ltd., Daejeon 306-791, Korea

(Received : 2007. 1. 17., Accepted : 2007. 5. 8.)

The polyene antifungal antibiotics, mostly produced by Gram-positive soil actinomycetes, are a family of type I polyketide macrolide ring compounds with 20~40 carbon backbone contain 3~8 conjugated double bonds. Using polyene-specific genomic screening strategy, we previously isolated three novel polyene-producing actinomycetes strains from soil, implying the potential application of these strains' spores as microbial pesticides. Here, we report that the sonication is a very efficient method for actinomycetes spore generation with a sonicator power-dependent manner. In addition, these sonication-driven actinomycetes spores retained significant portion of their cell viabilities as well as antifungal activities after freeze-drying procedure, implying the potential application of these strains' spores as microbial pesticides.

Key Words : Spore production, polyene, actinomycetes, sonication

서 론

사람, 가축, 및 작물에는 해가 없으면서 대상 병해충을 효과적으로 방제할 수 있는 미생물 유래 생물농약은 화학농약의 과다한 사용으로 인한 환경오염을 최소화할 수 있다는 장점으로(1, 2), 현재 Avermectin계 농업용 항생제, BT 및 Baculovirus 등을 포함한 다양한 천연 화합물들이 개발 활용되고 있으며, 최근에는 재조합 유전자 기술을 이용한 신규 생물농약의 발굴 및 효과적 생산을 위한 실용화 연구도 매우 활발하게 진행되고 있다(3-5). 특히 *Streptomyces lydicus*의 포자를 이용한 생물농약 상업화의 성공사례가 최근 보고됨을 계기로 다양한 생리활성을 지닌 방선균의 발굴 및 실용화연구의 필요성이 제기되고 있다 (6). 포자형성 능력을 갖는 방선균은 발아하면 식물이 뿌리를 내리듯이 토양 혹은 배지 밑으로 자라는 substrate mycelia를 형성하고, 이후 일정 시간이 지나 영양분의 고갈과 같은 외부로부터의 자극이 주어지면 substrate mycelia를 바탕으로 위로

자라는 aerial mycelia 형태를 띠면서 다시 포자를 형성하는 독특한 생활사를 가진다(7, 8). 영양물질의 결핍이나 건조한 환경에서의 포자형성 능력은 방선균 유래 생물농약 제제화에 있어 가장 큰 장점이며, 건조, 열, 및 기타 화학물질에도 안정성을 보임으로써 장기보관시의 활성유지와 다른 화학제제와의 혼합 적용에도 유리함을 가지게 한다(6). 이러한 장점으로 인해 방선균은 식물의 성장과 질병으로부터의 방제를 위한 중요한 자원으로 오랫동안 연구되어 왔지만, 토양 진균방제에 대한 방선균의 생태학적 이해 부족 및 제제화의 어려움 등으로 앞서 언급한 *Streptomyces lydicus*를 제외하고는 대부분 상업화에 실패하였다(9, 10).

항진균 및 항바이러스 활성을 지닌 폴리엔 항생제는, 일반적으로 20~40개의 탄소로 이루어진 macrolactone ring 구조를 지니며, 분자 내에 약 3~8개의 conjugated double bond를 갖는 전형적인 type I 폴리케타이드 매크로라이드 (polyketide macrolide) 화합물이다(Fig. 1). 현재까지 보고된 대부분의 폴리엔 계열의 항생물질들은 그램 양성 토양미생물인 방선균 (actinomycetes)에 의해 생합성된다고 알려져 있으며, 진균류의 세포막에 존재하는 sterol과 결합하고 channel을 형성하여 K⁺, Mg²⁺ 등의 세포내 성분을 세포외로 누출시키는 대사장애를 일으킴으로써, 곰팡이 및 효모와 같은 진균류에 대한 우수한 항진균 활성을 갖는다고

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-32-860-8318, Fax : +82-32-872-4046

E-mail : eungsoo@inha.ac.kr

알려져 있다(11, 12). 본 연구진은 선행연구를 통하여, 폴리엔 생합성에만 특이적으로 관여하는 Cytochrome P450 hydroxylase 유전자를 PCR primer로 사용하는 '방선균 유전체 스크리닝 전략'을 성공적으로 개발하였고, 이 유전체 스크리닝 방법을 이용하여 기존에 밝혀지지 않은 3종류의 신규 폴리엔 생산 방선균주 (*Pseudonocardia autotrophica*, *Streptomyces* sp. MMBL001, MMBL003)를 확보하였다(13) (Fig. 2). 또한 이들 방선균주들이 흑색썩음균핵 병원균과 역병균 등의 식물병원성 진균을 대상으로 강력한 항진균 활성을 갖고 있음을 확인함으로써, 이들 방선균주들의 미생물농약으로의 활용 가능성을 제시하였다(Kim et al, unpublished data).

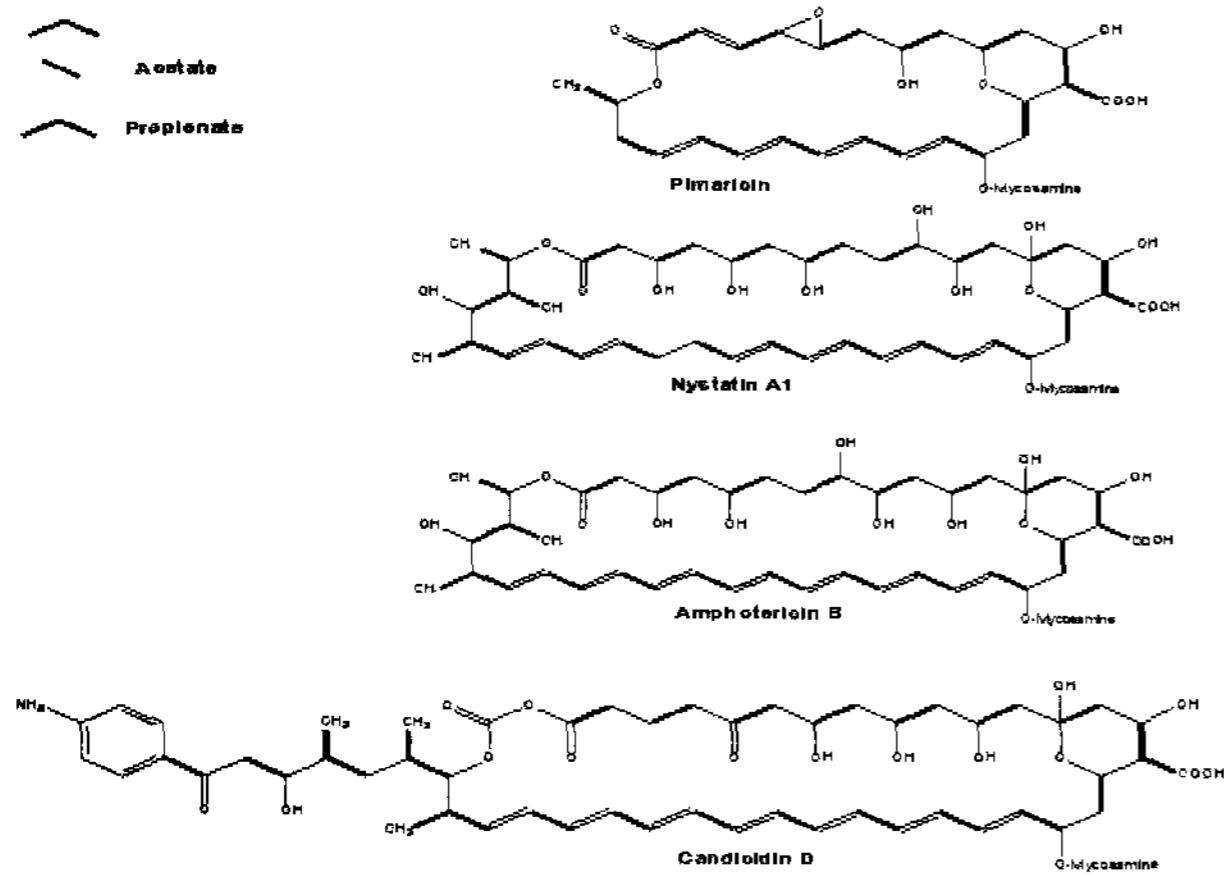


Figure 1. Structures of most commonly-used polyene macrolides. Polyene-specific structural moiety was highlighted by dotted boxes.

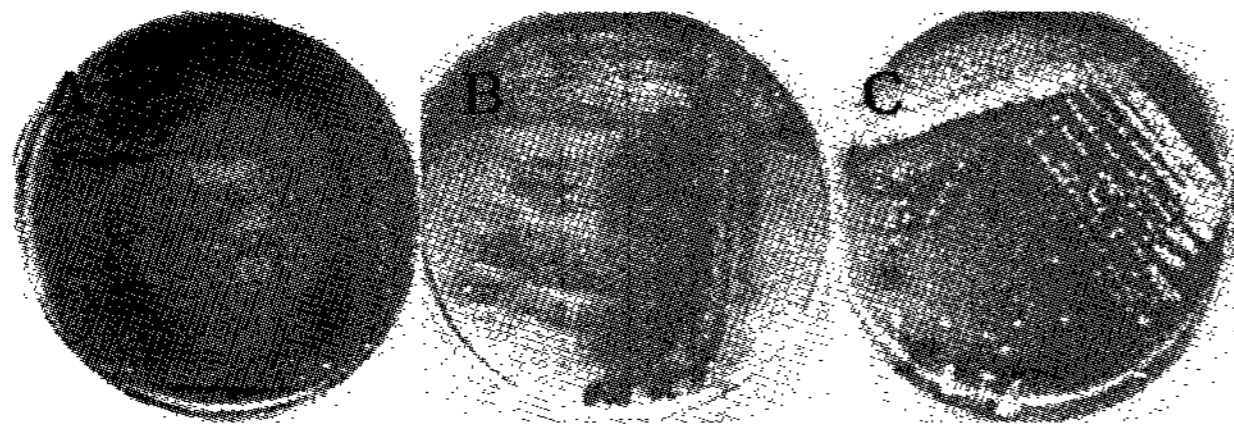


Figure 2. Plates of three polyene-producing actinomycetes strains. A, MMBL001 B, MMBL003 C, *P. autotrophica*.

따라서 본 연구에서는, 이들 3종의 신규 폴리엔 생산 균주들을 액체 배양한 후, 초음파 파쇄기로 물리적 충격을 주어 배양액 상에 존재하는 pellet 형태의 균사체를 단세포 형태의 포자형태로 전환시키고, 장기보관을 위한 포자의 동결건조 및 항진균 활성 등을 검증함으로써 항진균 폴리엔 방선균주를 이용한 미생물농약 제제화 가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양방법

본 연구에서는 선행연구에서 폴리엔 생산균주로 확인한 *Streptomyces* sp. MMBL001, MMBL003을 이용하였다. 단기 보관을 위하여, R2YE 고체배지 (103 g sucrose, 0.25 g

K_2SO_4 , 10.12 g $MgCl_{2 \cdot 6H_2O}$, 10 g glucose, 0.1 g Difco casamino acids, 2 ml trace element solution, 5 g yeast extract, 5.73 g TES buffer, 22 g agar를 증류수 1 L에 녹여 멸균 후 1 ml KH_2PO_4 (0.5%), 0.4 ml $CaCl_{2 \cdot H_2O}$ (5 M), 1.5 ml L-proline (20%), 0.7 ml NaOH (1 N) 첨가)에서 포자상 태로 4°C에서 보관하였으며, 중기 장기 보관으로는 20% glycerol의 spore suspension으로 -70°C에 보관하였다. 또한 동결건조 상태에서는 상온에 보관하였으며, 배양시 R2YE 25 ml을 baffled flask에 접종하여 30°C, 200 rpm으로 15일간 배양하였다.

초음파 파쇄기를 이용한 방선균 포자 생성

Pellet 형태의 균사체를 포자 형태로 전환시키기 위하여 초음파 파쇄기 (Ulssco Hitech. Co. Korea)를 이용하여 최적 조건을 알아보았다. 15일간 배양 후 최대 700 W를 100%로 하여 0, 6, 12, 18, 24, 30%의 출력으로 pellet 형태의 균사체를 초음파 파쇄하였다. 초음파 파쇄조건은 상온에서 2초간 2회 파쇄하였고 펄스의 OFF 시간은 3초간 하였다. 파쇄 후 탈지면이 들어간 멸균된 유리 주사기 필터를 이용하여 포자만을 회수하였고(14), 이를 다시 R2YE 고체배지에 도말하여 활성을 갖는 포자의 수를 측정하였다.

동결건조 및 항진균 활성

필터를 거쳐 회수된 포자를 같은 부피의 10% skim milk를 동결보호제로 사용하여 장기보존을 위한 동결건조 (Ilshin Lab Co., Ltd. Korea)를 수행하였다. 시료를 -70°C 냉장고에서 24시간 냉동시킨 후 freeze dryer의 cell에 넣고 실온 (20~25°C)에서 응축기 온도 -70°C, 압력 10 mm Torr의 조건하에서 24시간 동결 건조하였다. 동결건조된 포자들의 생존도를 측정하기 위하여, 이들 포자를 다시 도말하여 생균 수를 측정하였으며, R2YE 25 mL에 colony를 접종하여 5일간 배양하였다. 배양 후 같은 부피의 buthanol으로 extraction 후 evaporation하였고, 1 mL의 methanol에 녹여 *Candida albicans*를 대상으로 항진균 활성을 알아보았다. 단, *P. autotrophica*의 경우에는 R2YE agar 배지에 도말 후 1 volume의 buthanol을 사용해 extraction하였다. Bioassay에 사용된 배지는 YM 고체배지 (3 g yeast extract, 3 g malt extract, 5 g peptone, 10 g glucose, 15 g agar를 증류수 1 L에 녹여 멸균)를 사용하였다. *C. albicans*가 접종된 YM 고체배지에 6 mm methanol extract disc를 이용해 저해환을 확인하였다.

결과 및 고찰

방선균 균주별 초음파 파쇄 후 포자 수 비교

방선균의 발생학적 최종주기인 포자 형태를 가능한 많이 수확하기 위하여 15일 정도 장기간 액체 배양을 한 *Streptomyces* sp. MMBL001, MMBL003 및 *Pseudonocardia autotrophica*를 각각 0, 6, 12, 18, 24, 30%의 출력으로 초음파 파쇄 후 포자수를 측정하였다. MMBL001은 12% 출력의 초음파 파쇄를 하였을 때 가장 효율적인 포자로의 전환이 이

루어졌으며, 이는 초음파 파쇄 없이 포자를 회수했을 경우에 대비하여 약 389%에 해당하는 회수율로 측정되었다(Fig. 3). MMBL003과 *P. autotrophica*의 경우에도, 각각 18%, 12% 출력에서 가장 효율적으로 전환되었으며, 초음파 파쇄 없이 포자를 회수했을 경우에 대비하여 각각 298%, 186%에 해당하는 회수율로 측정되었다(Fig. 3). 최대 전환 출력 이상으로 초음파 파쇄를 하였을 경우, 포자 회수 효율은 오히려 감소하였고, 이는 아마도 과도한 초음파에 의한 세포들의 사멸에 기인한다고 판단된다. 배양부피 및 배양시간의 변화에서도 각 균주들의 최적의 포자 회수율은 유사하게 측정되었다(data not shown). 따라서 포자 수확을 위한 최적의 조건은 배양조건보다는 각각의 방선균주의 특성에 따라서 다르게 결정됨을 확인할 수 있었다.

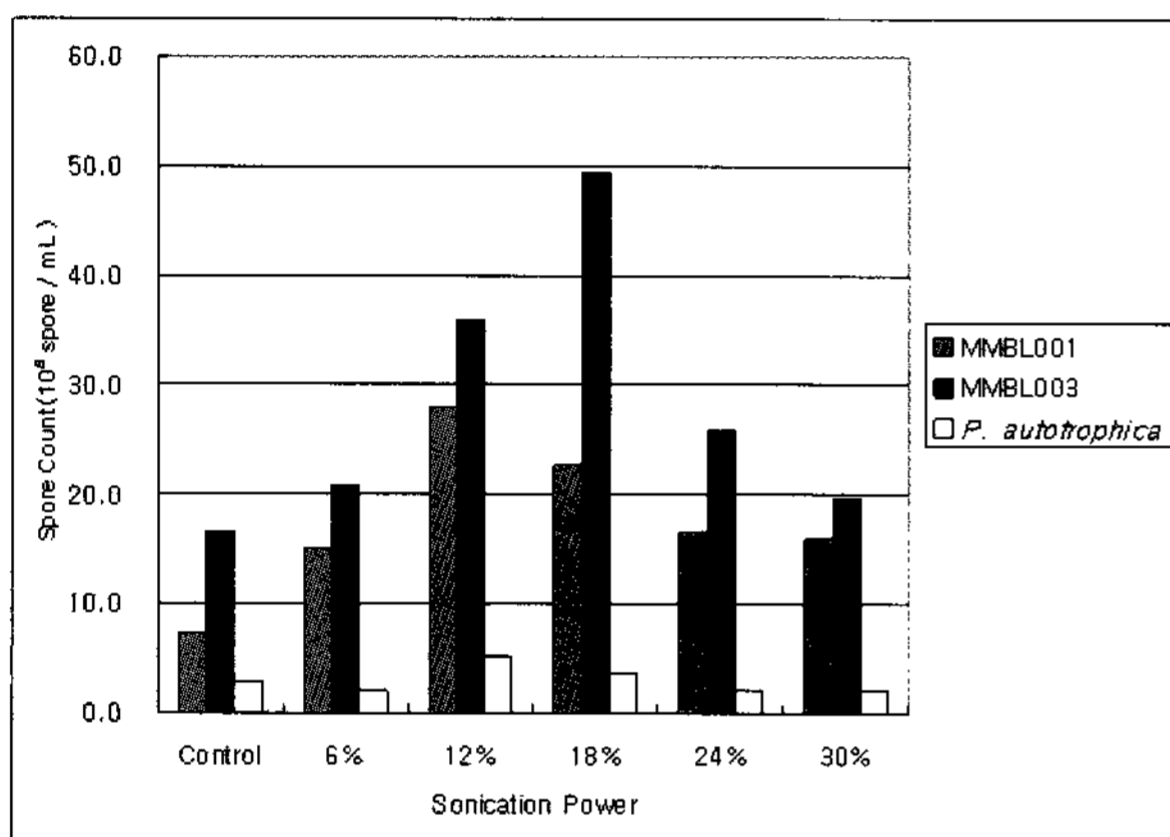


Figure 3. Spore cell recovery after sonication at various sonication powers.

동결건조 및 항진균 활성 측정

수확된 방선균 포자들을 10% skim milk로 동결보호 처리 후, 동결건조 전, 후의 생균수를 측정하였다. 비록 세 균주 모두 동결건조로 인한 세포 생존률의 감소가 관찰되었으나, MMBL003은 MMBL001, *P. autotrophica*보다 약 3배의 상대적으로 높은 동결건조 후 생존률을 보였다 (Table 1). 이와 같은 결과로부터, MMBL003이 생물농약 제제화로의 가능성이 가장 우수하다고 판단되며, MMBL003에 특성화된 동결 보호제를 선별한다면 추가적인 생존률 증가도 기대할 수 있을 것으로 사료된다(15).

동결건조 후의 각 균주들의 항진균 활성 유지 여부를 규명하기 위하여, *Candida albicans*를 대상으로 한 동결건조 전, 후의 항진균 활성을 측정하였다. MMBL001과 MMBL003은 R2YE 액체배지에 5일간 배양 후 추출하였고, *P. autotrophica*는 R2YE 고체배지에서만 폴리엔 화합물이 측정되었기에 R2YE 고체배지에서 도말 후 agar 추출을 하였다. 세 균주 모두 동결건조 전, 후의 배양액으로부터 *C. albicans*에 대한 명확한 항진균 활성이 관찰되었다(Fig. 4).

이와 같은 결과는, 초음파 파쇄와 동결건조의 처리 후에도 MMBL001, MMBL003, *P. autotrophica* 유래 항진균 활성이 변함없이 유지됨을 증명하는 것이며, 궁극적으로는 이들 폴리엔 생산 방선균을 이용한 미생물농약 제제화 가능성을 제시하고 있다.

Table 1. Spore cell viability before and after freeze-drying

Strain	Before (10 ⁷ spore/mL)	After (10 ⁷ spore/mL)	Survival ratio (After/Before)
MMBL001	154	29.4	0.19
MMBL003	272	179	0.66
<i>P. autotrophica</i>	5.13	1.19	0.23

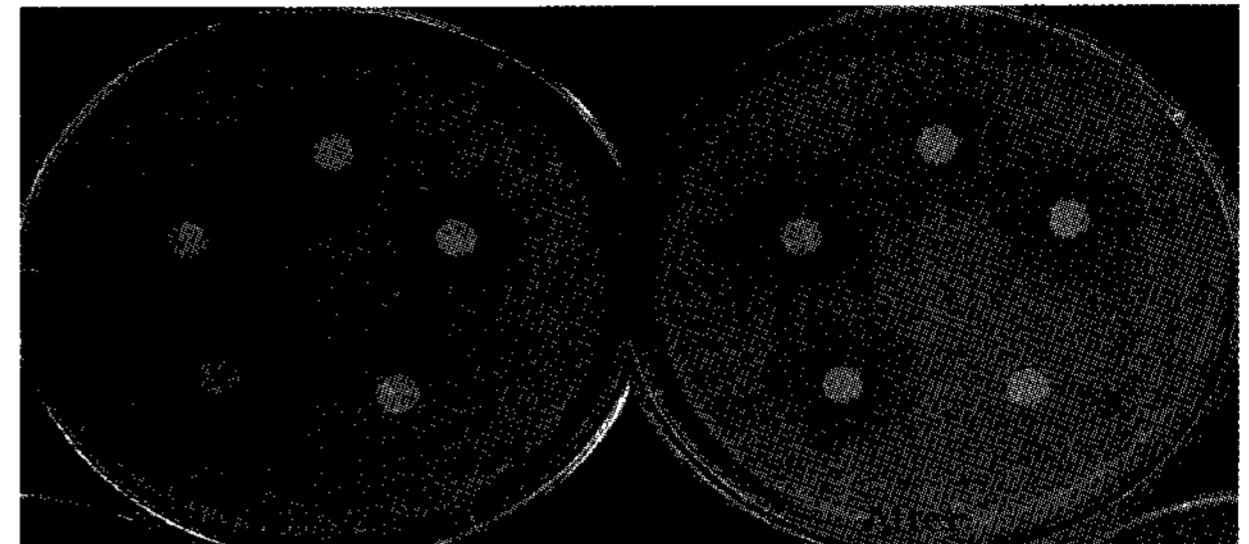


Figure 4. Antifungal bioassay against *C. albicans* before (left) and after (right) freeze-drying. NC, negative control; PC, positive control (nystatin 1 mM); A, MMBL001 B, MMBL003 C, *P. autotrophica*.

요 약

본 연구에서는 초음파 파쇄기를 이용하여 폴리엔 항진균 활성을 갖는 방선균 배양액으로부터 pellet을 회수하여 미생물농약으로 사용이 용이한 포자를 확보하기 위한 최적화 연구를 수행하였다. 그 결과, *Streptomyces* sp. MMBL001, MMBL003 그리고 *Pseudonocardia autotrophica*는 각각 12%, 18%, 12% 출력 (100%, 700 W)에서 최적의 포자 전환율을 보임을 확인하였다. 이렇게 확보한 포자를 10% skim milk 보호제를 사용하여 동결건조한 후 각각의 생균수를 측정 한 결과, MMBL003이 MMBL001과 *P. autotrophica*에 비해 3배 이상의 생균수가 유지됨이 측정되었다. *C. albicans*를 대상으로 항진균 효과를 확인한 결과, 동결건조된 3종의 방선균주 모두 우수한 항진균 활성을 유지함으로써 신규 폴리엔 생산 방선균을 이용한 미생물농약으로서의 활용 가능성을 제시하였다.

감 사

The authors are very grateful to the technical supports provided by the ERC in Inha University. This work was financially supported by a 21C Frontier R&D program MG 3-1 grants from the Korean Ministry of Science and Technology.

REFERENCES

- Lee, J. H., B. K. Kang, H. K. Kwon, J. O. Jung, and Y. K. Nam (2005), Isolation and Identification of Activated Microorganisms for Biocide Development, *Kor. J. Env. Hlth.* **31**, 31-38.
- Sudakin, D. L. (2003), Biopesticides, *Toxicol Rev.* **22**, 83-90.
- Yoon, Y. J., E. S. Kim, Y. S. Hwang, and C. Y. Choi (2004),

- Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 626-634.
4. Lee, J., Y. Hwang, E. Kim, and C. Choi (2000), Effect of a global regulatory gene, *afsR2*, from *Streptomyces lividans* on avermectin production in *Streptomyces avermitilis*, *J. Biosci. Bioeng.* **89**, 606-608.
 5. Yang, X. M. (1998), Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**, 95-98.
 6. Crawford, D. L., M. Kowalski, M. A. Roberts, G. Merrell, and L. A. Deobald (2005), Discovery, development and commercialization of a microbial antifungal biocontrol agent, *Streptomyces lidicus* WYEC108: History of a decade-long endeavor, *SIM NEWS* **55**, 88-95.
 7. Bibb, M. J. (1996), The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Microbiology* **142**, 1335-1344.
 8. Ohinishi, Y., J. W. Seo, and S. Horinouchi (2002), Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*, *FEMS Microbiol. Lett.* **216**, 1-7.
 9. Doumbou, C. L., M. K. Hamby-Salove, D. L. Crawford, and C. Beaulieu (2002), Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth, *Phytoprotection* **82**, 85-102.
 10. Whipps, J. M. (1997), Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens, *Adv. Bot. Res.* **26**, 1-134.
 11. Aparicio, J. F., P. Caffrey, J. A. Gil, and S. B. Zotchev (2003), Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 179-188.
 12. Zotchev, S. B. (2003), Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy, *Curr. Med. Chem.* **10**, 211-223.
 13. Lee, M. Y., J. S. Myeong, H. J. Park, and E. S. Kim (2006), Isolation and partial characterization of a cryptic polyene gene cluster in *Pseudonocardia autotrophica*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 84-87.
 14. Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood (2000), *Practical Streptomyces Genetics*, The John Innes Foundation.
 15. Kuznetsov, V. D., S. N. Filippova, S. A. Murav'eva, and V. M. Fishman (1977), Prognosing the viability of lyophilized *Actinomycetes parvulus* spores based on the "accelerated storage" method, *Mikrobiologiya* **46**, 318-323.