

Rhamnolipid B에 의한 토마토 잿빛곰팡이병과 역병의 억제효과

안지예¹ · 박명수 · 김슬기² · 최경자 · 장경수 · 최용호 · 최재율¹ · 김인선² · 김진철*

한국화학연구원 산업바이오화학연구센터, ¹충남대학교 농학과, ²전남대학교 농화학과

Suppression Effect of Gray Mold and Late Blight on Tomato Plants by Rhamnolipid B

Jiye Ahn¹, Myung Soo Park, Seul Ki Kim², Gyung Ja Choi, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Jae Eul Choi¹, In Seon Kim² and Jin-Cheol Kim*

Chemical Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Yuseong-Gu, Daejeon 305-605, Korea

¹Department of Agronomy, Chungnam National University, Yuseong-Gu, Daejeon 305-764, Korea

²Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Buk-Gu, Gwangju 500-757, Korea

(Received on September 24, 2009; Accepted on November 24, 2009)

A *Pseudomonas* strain SG3 producing biosurfactant and showing antifungal and insecticidal activities was isolated from agricultural soil severely contaminated with machine oils. The antagonistic bacterium inhibited mycelial growth of all of the tested fungal pathogens. The fermentation broth of SG3 also effectively suppressed the development of various plant diseases including rice blast, tomato gray mold, tomato late blight, wheat leaf rust, barley powdery mildew and red pepper anthracnose. An antifungal substance was isolated from the fermentation broth of SG3 by ethyl acetate partitioning, silica gel column chromatography and preparative HPLC under the guide of bioassay. The chemical structure of the antifungal substance was determined to be rhamnolipid B by mass and NMR spectral analyses. The antifungal biosurfactant showed a potent *in vivo* antifungal activity against gray mold and late blight on tomato plants. In addition, rhamnolipid B inhibited mycelial growth of *B. cinerea* causing tomato gray mold and zoospore germination and mycelial growth of *P. infestans* causing tomato late blight. *Pseudomonas* sp. SG3 producing rhamnolipid B could be used as a new biocontrol agent for the control of plant diseases occurring on tomato plants.

Keywords : Biosurfactant, Gray mold, *Pseudomonas*, Rhamnolipid B, Tomato late blight

토마토(*Lycopersicon esculentum*)는 가지과 작물로 국내에서 가장 중요한 채소작물 중 하나이다. 국내 재배 면적은 해마다 증가하여 2007년에는 6,144 ha였으며, 토마토 총 재배 면적 중 생산량의 증대와 품질 향상을 위하여 시설재배 면적이 계속 증가하여 97.8%를 시설에서 생산하고 있다(농림부, 2008). 시설재배는 토마토를 연중 재배가 가능하게 했지만 동일 면적에서의 연작 재배에 따른 생리장해 및 각종 병해의 발생이 증가하고 있다. 우리나라에서 토마토의 주요 병으로 역병, 시들음병, 잿빛곰팡이

병, 풋마름병 및 잎곰팡이병 등이 심하게 발생한다(김 등, 2004). 이러한 토마토 병의 방제에는 살균제를 이용한 화학적 방제가 대부분이지만, 저항성균의 출현 및 환경 오염 등의 문제점이 있어 화학적 방제를 대체할 수단으로 생물적 방제가 시도되고 있다.

*Pseudomonas*속 균에 의한 생물적인 방제의 주요 기작은 항생물질(Chin 등, 1998), siderophore 생산(Handelsman과 Parke, 1989), 뿌리정착(Thomashow와 Weller, 1996) 및 유도저항성(induced systemic resistance; Kamilova 등, 2005) 등이 잘 알려져 있다. 특히 *Pseudomonas*속 균의 여러 종들로부터 다양한 항생물질들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 현재 이들 균이 생산하는 pyrrolnitrin(Pm), phenazine-1-carboxylic acid(PCA), 2,4-diacetyl-phloroglucinol

*Corresponding author

Phone) +82-42-860-7436, Fax) +82-42-861-4913

Email) kjinc@kriict.re.kr

(PhI), pyoluteorin(Plt) 등 많은 항생물질들이 주요 토양서식 식물병원균의 생물학적 방제에 이용하고 있다(Howell과 Stipanovic, 1979, 1980; Weller와 Thomashow, 1993; Thomashow 등, 1997).

세균, 효모, 곰팡이들은 glycolipid, lipopolysaccharides, lipopeptides, lipoproteins, lipoaminoacids, monoglycerides, diglycerides 등을 포함한 biosurfactants를 생산한다. 이들 중 탄소원으로써 glycerol을 첨가한 배지에서 자란 *Pseudomonas aeruginosa*이 생산하는 biosurfactant는 rhamnose와 β -hydroxydecanoic acid를 포함한 rhamnolipid로 특징되었다(Jarvis와 Johnson, 1949). Rhamnolipid는 *Pseudomonas* 속 균의 다양한 종들에 의해 복합 혼합물로써 생산되는 것이 잘 알려져 있고(Lang과 Wullbrandt, 1999), 뛰어난 장력활성 및 유화화의 특징 때문에 널리 주목받고 있다(Mulligan, 2005; Maier와 Soberón-Chávez, 2000). Stanghellini와 Miller(1997)는 rhamnolipid가 난균강인 *Phytophthora*와 *Pythium*에 대한 항균활성을 보고하였고, 최근 *P. aeruginosa* 균주 B5가 생산하는 rhamnolipid B는 다양한 식물병원균에 항균 활성을 나타낼 뿐만 아니라, *in vivo*에서 고추 역병과 오이 탄저병에 대하여 방제활성이 있음이 보고되었다(Kim 등, 2000).

본 연구에서는 기계유에 심하게 오염된 경작지의 토양에서 분리한 *Pseudomonas* sp. SG3 균주의 다양한 식물병에 대한 *Pseudomonas* sp. SG3의 *in vivo* 항균활성을 조사한 다음, 항진균활성 물질을 분리 동정하였다. 또한 동정한 항균물질 rhamnolipid B의 다양한 식물병에 대한 방제효과를 조사하여 *Pseudomonas* sp. SG3 균주의 미생물 살균제로서의 가능성을 타진하였다.

재료 및 방법

사용 균주. 기계유가 심하게 오염된 지역의 토양으로부터 분리한 *Pseudomonas* sp. SG3를 사용하였다. SG3 균주는 20% glycerol에 현탁하여 -80°C 에 보관하면서 실험에 이용하였다.

***Pseudomonas* sp. SG3 균주의 *in vitro* 항균활성.** 8개의 식물병원균에 대한 SG3균주의 균사생육 저해활성을 조사하였다(Table 1). Potato dextrose agar(PDA; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)를 기본배지로 사용하였고, 8mm 지름의 대상식물병원균의 균사를 포함하고 있는 agar plug를 PDA배지의 한쪽에 접종하였다. 3cm 정도 떨어진 곳에 Nutrient broth(NB; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 배지에서 30°C , 150 rpm으로 진탕배양한 배양체에 침지한 paper disc(8

Table 1. Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. SG3 against mycelial growth of various fungal pathogens in dual plate assays

Fungal phytopathogen	Diameter of inhibition zone (mm)
<i>Alternaria panax</i>	$4.4 \pm 0.92^*$
<i>Botrytis cinerea</i>	15 ± 2.5
<i>Collectotrichum coccodes</i>	7.8 ± 1.3
<i>Fusarium oxysporum</i>	7.5 ± 0.64
<i>Magnaporthe oryzae</i>	8.4 ± 0.07
<i>Phytophthora capsici</i>	13 ± 0.07
<i>Rhizoctonia solani</i>	8.5 ± 0.07
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	14 ± 3.7

*Data represents the mean \pm standard deviations of three replications.

mm 지름)를 침사하였다. 무처리구는 배지에만 침지한 paper disc를 사용하였다. 대상 식물병원균의 성장속도에 따라 3일 내지 7일간 배양한 다음 세균의 콜로니와 대상 식물병원균 사이의 저지대의 간격을 측정하였으며, 3반복으로 실시하였다.

***In vivo* 항균활성 검정.** SG3균주의 배양액과 분리한 항균 물질에 대하여 벼 도열병(RCB, *Magnaporthe oryzae*), 벼 잎집무늬마름병(RSB, *Rhizoctonia solani*), 토마토 잿빛곰팡이병(TGM, *Botrytis cinerea*), 토마토 역병(TLB, *Phytophthora infestans*), 보리 흰가루병(BPM, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*), 밀 붉은녹병(WLR, *Puccinia recondita*) 및 고추 탄저병(RPA, *Colletotrichum coccodes*)의 7가지 식물병에 대한 *in vivo* 항균활성을 조사하였다. SG3균주는 tryptic soy broth(TSB; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에서 3일간 30°C , 150 rpm으로 진탕배양 후 계면활성제 Tween 20을 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준으로 포함하는 배양 원액과 1/3희석액을 제조하였다. 대조구는 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준으로 포함하는 증류수를 사용하였다. 분리한 항균 물질은 acetone(최종농도, 10%)으로 용해한 후 계면활성제 Tween 20을 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준으로 포함하는 증류수에 희석하였다. 이때 대조구는 10% acetone과 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Tween 20을 함유하는 증류수를 사용하였다. 각 식물병당 2개의 포트를 이용하였고, 활성성분 시료를 엽면에 분무 살포한 후 24시간 동안 풍건한 다음 각각의 식물 병원균을 접종하였다.

실험에 사용한 벼, 토마토, 보리 및 밀은 지름 4.5 cm의 플라스틱 포트에 수도용 상토 또는 원예용 상토를 70% 정도 채운 후, 종자를 파종하여 $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 의 온실에서 1주 내지 4주간 재배하였다. 벼 도열병은 3~4엽기의 유묘에 도열병의 원인균인 *M. oryzae*의 포자 현탁액(5×10^5 spores/ml)을 분무 접종하고, 25°C 의 습실상에서 하루 동안 습실

처리한 후, 25°C의 항온실에서 5일간 배양하여 발병을 유도하였다. 벼 잎집무늬마름병은 잎집무늬마름병의 원인균인 *R. solani*를 배지(밀기울 90 g, 왕겨 15 g 및 증류수 100 ml)에서 7일간 배양하여 얻은 배양물을 5엽기 유묘에 접종하고 25의 습실상에서 4일간 습실처리한 후, 25°C의 항온실에서 4일간 배양하여 발병을 유도하였다. 토마토 역병은 3~4엽기 토마토 유묘에 역병의 원인균인 *P. infestans*의 유주자낭(10^5 zoosporangia/ml)에서 나출된 유주자 현탁액을 분무 접종한 후 25°C의 습실상에서 2일간 습실처리하고 25°C의 항온습실에서 1일간 배양하여 발병을 유도하였다. 토마토 잿빛곰팡이병은 토마토 3~4엽기 유묘에 잿빛곰팡이병의 원인균인 *B. cinerea*의 포자 현탁액(10^6 spores/ml)을 처리한 후, 20°C의 습실상에서 3일간 배양하여 발병을 유도하였다. 밀 붉은녹병은 1엽기 유묘에 활물기생균으로 알려진 녹병의 원인균인 *P. recondita*의 포자를 250 µg/ml의 Tween 20 용액에 0.67 g spores/의 양으로 현탁하여 분무 처리하고 20°C의 습실상에서 하루 동안 습실처리한 후 20°C의 항온실로 옮겨 6일간 배양하여 발병을 유도하였다. 보리 흰가루병은 보리의 1엽기 유묘에 숙주 식물에서 계대배양된 흰가루병의 원인균인 *E. graminis* f. sp. *hordei*의 포자를 털어서 접종하고 20°C의 항온실에서 7일간 배양하여 발병을 유도하였다. 벼 도열병, 밀 붉은녹병, 보리 흰가루병은 접종 7일 후, 벼 잎집무늬마름병은 접종 8일 후, 그리고 토마토 잿빛곰팡이병과 토마토 역병은 접종 3일 후에 병반면적율을 조사하였다(James, 1971).

한편, 고추 탄저병에 대한 방제활성 실험을 위해서는, 지름 7.0 cm의 플라스틱 포트에 원예용 상토를 70% 정도 채운 후 최아된 고추 종자를 파종하고, 이를 온실에서 3~4엽기까지 키운 다음 상기에서 준비된 SG3균주의 배양액과 분리한 항균 물질 시료를 엽면 살포하였다. 시료 살포 후 24시간 동안 상온에서 건조시킨 다음 고추 탄저병원균인 *C. coccodes*의 포자 현탁액(4×10^5 spores/ml)을 분무 접종하였다. 습실상에서 2일간 발병시킨 후 25°C의 항온실에 1일간 방치하였고, 접종 3일 후에 병반면적율을 조사하였다(James, 1971).

각각의 실험은 2반복으로 실시하였고, 이로부터 얻은 병반면적율을 이용하여 다음과 같은 식에 따라 방제가를 계산하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \frac{[\text{무처리구 발병도} - \text{처리구 발병도}]}{\text{무처리구 발병도}} \times 100$$

항균물질의 분리. 식물병원균에 대해 항균활성을 가진 *Pseudomonas* sp. SG3 균주로부터 항균물질의 분리를 실

시하였다. *Pseudomonas* sp. SG3 균주를 TSB 배지에서 3일간 30°C, 150 rpm으로 5 l를 배양하였다. 배양액(5 l)을 8000 rpm, 10 min, 4°C로 원심분리하여 균체와 상정액을 분리하였다. 분리된 상정액을 ethyl acetate, *n*-butanol 순서로 각각 2회 추출 및 분획하여 ethyl acetate 추출물과 *n*-butanol 추출물을 얻었고, 이를 methanol로 25 mg/ml 농도로 용해한 다음 벼 도열병균에 대하여 생물검정을 실시하였다. 벼 도열병균에 대한 생물검정은 7일간 25°C, 150 rpm으로 PDB 배지에서 배양한 도열병균을 blender를 이용하여 10초간 마쇄한 다음, 마쇄액을 PDA 배지에 1% 접종하고 잘 흔들어준 다음 petri dish에 부었다. 배지를 잘 굳히고 지름 8 mm의 paper disc에 각각의 분획 용액을 35 µl씩 점적하고 건조시킨 후 도열병균이 접종된 배지 위에 치상하였다. 이 때 무처리구는 용매만 35 µl 처리한 것을 이용하였다. 25°C에서 3일간 배양한 다음 inhibition zone을 조사하였다.

그 결과 ethyl acetate 추출물(950 mg)이 활성을 나타내는 것을 확인하였고, 이로부터 활성물질을 분리하기 위하여 chloroform:MeOH(95:5~1:1, v/v)을 전개용매로 하는 silica gel column chromatography(2.4×40 cm, Kiesel gel 60, 230~400 mesh, 100 g; Merck)를 실시하였다. 이로부터 얻은 용출액을 TLC 패턴에 따라 8개로 분획하고 농축하여 벼 도열병균에 대한 생물검정을 실시하였다.

그 결과 활성을 나타내는 F7과 F8 분획을 합하여(593 mg, yellow), 순수하게 정제하기 위하여 preparative HPLC를 이용하였다. 이 때 preparative HPLC 조건은 다음과 같다; column: Capcell Pak C₁₈(20 mm×250 mm), 용출용매: water:MeOH gradient solvent system, 유속: 8 ml/min, 검출과장: 210 nm. 이 과정을 통하여 95 mg의 순수한 물질 compound A를 분리하였다.

분리한 물질 compound A의 순도를 조사하기 위하여 다음과 같은 조건으로 HPLC 분석을 실시하였다; column: Cosmosil C₁₈(150 mm×4.6 mm), 용출용매: water:acetonitrile+0.1% trifluoroacetic acid gradient solvent system, 유속: 1 ml/min, 주입량: 10 µl, 검출과장: 210 nm.

기기분석. 분리한 물질의 구조를 동정하기 위하여 질량분석 및 핵자기공명분석을 실시하였다. 질량분석은 Agilent/HP1100 Series(G1946D) liquid chromatograph/mass selective detector(Agilent, USA)를 이용하여 음이온 electrospray ionization mode로 분석하였다. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT 135°, ¹H-¹H COSY 및 ¹H-¹³C COSY 스펙트럼은 Bruker AMX-500 핵자기공명분석기(500 MHz; Rheinstetten, Germany)를 이용하여 분석하였다.

Rhamnolipid B의 in vitro 항진균활성. Rhamnolipid B

는 *in vivo* 생물검정에서 7가지 식물병 중 *B. cinerea*에 의한 토마토 잿빛곰팡이병과 *P. infestans*에 의한 토마토 역병에 높은 방제효과를 보였다. 따라서 이들 두 가지 식물병에 대한 효과가 병원균의 포자발아 억제에 의한 것인지 아니면 균사생육 저해에 의한 것인지를 규명하기 위하여 두 식물병원균의 포자발아와 균사생육 저해 효과를 조사하였다.

Rhamnolipid B의 포자 발아 억제 효과를 조사하기 위하여 토마토 잿빛 곰팡이병인 *B. cinerea*와 토마토 역병 균인 *P. infestans*를 사용하였다. Rhamnolipid B는 메탄올에 0.27, 0.74, 2.23, 6.67, 20 mg/ml 수준으로 용해하였다. *B. cinerea*는 PDA에 접종한 후 20°C 항온기에서 7일간 배양하여 형성된 분생포자를 멸균수로 수확 후 10^5 spore/ml으로 조정된 다음 1.5 μ l를 150 μ l의 PDB 배지와 혼합하였다. *P. infestans*는 oat meal agar(OMA; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 배지에 접종 후 20°C 항온기에서 7일간 배양한 후 유주자낭을 수확하여 5×10^5 zoosporangia/ml으로 맞추어 4시간 동안 냉장보관 후 유주자를 PDB 배지와 혼합하였다. Rhamnolipid B는 최종 농도가 각각 2.7, 7.4, 22.3, 66.7, 200 μ g/ml이 되도록 병원균이 포함된 배지에 첨가한 다음 hole slide glass에 80 μ l씩 분주하였다. Hole slide glass를 습식처리된 플라스틱 상자에 넣은 다음 20°C에서 24시간 동안 배양한 후 현미경하에서 포자 발아율을 조사하였다. 대조약제는 토마토 잿빛곰팡이병 방제에 사용되고 있는 fludioxonil와 토마토 역병 방제에 사용되는 streptomycin sulfate를 동일한 농도로 처리하였다. 실험은 각각의 농도 당 3반복으로 실시하였다. 발아관이 포자 길이의 2배 이상이 될 때 발안된 것으로 하였다.

Rhamnolipid B의 균사 성장 억제 효과를 조사하기 위하여 PDA 배지에 메탄올에 용해한 rhamnolipid B를 최종 농도가 각각 2.7, 7.4, 22.3, 66.7, 200 μ g/ml이 되도록 첨가하여 혼합 배지를 만들었다. PDA 배지에서 5일간 자란 *B. cinerea*와 *P. infestans* 균총의 선단부위를 직경 5 mm의 균사 절편을 떼어내어 물질이 혼합된 배지의 중앙에

접종하였다. 대조약제는 토마토 잿빛곰팡이병 방제에 사용되고 있는 fludioxonil와 토마토 역병 방제에 사용되는 streptomycin sulfate를 앞에서와 같은 농도로 처리하였다. 병원균은 20°C에서 배양한 후 균사의 직경을 측정하였다. 실험은 각각의 농도 당 3반복으로 실시하였다.

결과 및 고찰

In vitro 항균활성 검정. *Pseudomonas* sp. SG3 균주의 8가지 식물병원균에 대한 *in vitro* 항균활성을 대치배양 방법으로 조사한 결과, Table 1과 같이 나타났다. SG3 균주는 시험한 모든 식물병원균에 대하여 균사생육저해활성을 보였으나, 대상 식물병원균에 따라 활성에는 차이를 보였다. *B. cinerea*, *Phytophthora capsici* 및 *Sclerotinia sclerotiorum*에는 비교적 강한 항균활성을 보였고, *R. solani*, *Fusarium oxysporum*, *C. coccodes* 및 *M. oryzae*에 대해서는 중간정도의 활성을 보였다. *Alternaria panax*에 대해서는 가장 약한 활성을 보였다. 이와 같이 SG3균주는 매우 광범위한 항균스펙트럼을 보였다.

In vivo 항균활성 검정. SG3 균주의 배양액을 원액과 1/3로 희석하여 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 역병, 토마토 잿빛곰팡이병, 밀 붉은녹병, 보리 흰가루병 및 고추 탄저병의 7가지 식물병에 대하여 *in vivo* 항균활성 검정을 실시하였다. 그 결과 SG3 균주 배양액의 원액은 시험한 7가지 식물병중에 벼 잎집무늬마름병을 제외한 모든 식물병에 대하여 70% 이상의 높은 방제활성을 보였다(Table 2). 특히 토마토 역병과 보리 흰가루병에는 90% 이상의 높은 방제활성을 보이는 것으로 나타났다. 배양액을 1/3로 희석하여 살포한 경우에는 벼 도열병, 토마토 역병 및 보리 흰가루병에 대해서만 80% 이상의 높은 활성을 보였고, 다른 식물병에 대해서는 40% 이상의 낮은 방제활성을 보였다.

항균 물질의 분리 및 구조 동정. *Pseudomonas* sp. SG3 균주의 에틸아세테이트 추출물로부터 분리한 compound A의 구조를 동정하기 위하여 LC-MS 분석을 실시한 결

Table 2. Disease control value of the fermentation broth of *Pseudomonas* sp. SG3 against 7 plant diseases

Sample	Dilution factor	Control value (%) ^a						
		RCB	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM	RPA
SG3	1-fold	87 ± 7.0 ^b	17 ± 7.8	75 ± 0.0	97 ± 0.0	80 ± 0.0	90 ± 0.0	70 ± 7.0
	3-fold	83 ± 3.5	28 ± 7.8	8 ± 11.8	93 ± 2.3	20 ± 0.0	80 ± 4.7	38 ± 17.6

^aRCB, rice blast (*Magnaporthe oryzae*); RSB, rice sheath blight (*Rhizoctonia solani*); TGM, tomato gray mold (*Botrytis cinerea*), TLB, tomato late blight (*Phytophthora infestans*); WLR, wheat leaf rust (*Puccinia recondita*); BPM, barley powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*); RPA, red pepper anthracnose (*Colletotrichum coccodes*).

^bData represents the mean ± standard deviations of two replications.

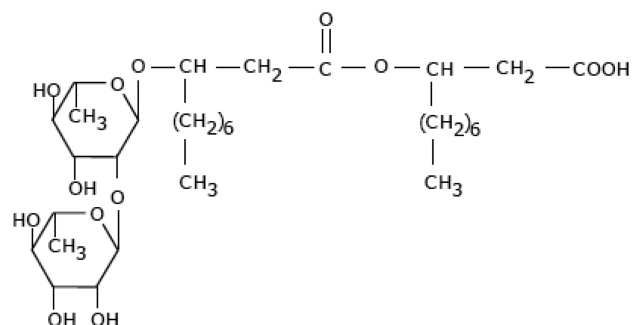
Table 3. NMR data of rhamnolipid B

Carbon	δ_C	Proton	δ_H
C-1	104.40	H-1	4.94
C-2	80.71	H-2	3.79
C-3	- ^a	H-3	- ^a
C-4	- ^a	H-4	- ^a
C-5	70.42	H-5	3.74
C-6	18.23	H-6	1.29
C-7	99.13	H-7	4.97
C-8	72.00	H-8	3.79
C-9	- ^a	H-9	- ^a
C-10	- ^a	H-10	- ^a
C-11	70.30	H-11	3.70
C-12	18.19	H-12	1.29
C-13	75.30	H-13	4.12
C-14	41.40	H-14	2.60
C-15	172.72	No proton	
C-16	25.97	H-16	1.60
C-16'(CH ₂)	34.24	H-16'(CH ₂)	1.36
C-16''(CH ₃)	14.60	H-16''(CH ₃)	0.95
C-17	72.80	H-17	5.32
C-18	40.71	H-18	2.51
C-19	175.32	No proton	
C-20	26.39	H-20	1.67
C-20'(CH ₂)	34.24	H-20'(CH ₂)	1.36
C-20''(CH ₃)	14.60	H-20''(CH ₃)	0.95

^aNot identified due to the complicated peaks.

과 [M+H]⁻ 이온이 m/z 649.5에서 나타나 분자량이 650으로 추정되었다.

Compound A의 정확한 구조를 확인하기 위하여 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 및 다양한 모드의 NMR을 분석할 결과, Table 3과 같이 정리되었다. NMR data를 문헌과 비교한 결과, 이전에 Yamaguchi 등(1976)이 보고한 rhamnolipid B와 일치하는 것으로 나타났다. 따라서 compound A는 분자식이 C₃₂H₅₈O₁₃이고, 분자량이 650인 rhamnolipid B로 동정

**Fig. 1.** Chemical structure of rhamnolipid B isolated from *Pseudomonas* sp. SG3.

되었다(Fig. 1).

Rhamnolipid에는 rhamnose 하나인 monorhamnolipid (rhamnolipid 1)와 rhamnose가 두 개인 dirhamnolipid (rhamnolipid 2)가 있다. Monorhamnolipid이든 dirhamnolipid이든 보통 두 개의 지방산을 가지고 있는데, 두 개의 지방산 중 하나는 보통 β -hydroxydecanoic acid이며, 다른 하나는 β -hydroxydecanoic acid이거나 β -hydroxy group을 가진 12:0, 12:1, 12:2 또는 8:2인 지방산이기도 하다. Rhamnolipid B의 경우 dirhamnolipid이며, 두 개의 지방산이 모두 동일한 β -hydroxydecanoic acid로 구성되어 있다(Fig. 1).

Rhamnolipid B의 *in vivo* 항균활성 검정. *Pseudomonas* sp. SG3로 부터 분리한 rhamnolipid B의 *in vivo* 항균활성을 조사하기 위하여 앞에서 서술한 7가지 식물병에 대하여 방제활성 실험을 수행하였다. Rhamnolipid B는 토마토 잿빛곰팡이병과 역병에 대해 500 μ g/ml 수준에서 각각 86%와 93%의 방제활성을 보였고, 250 μ g/ml 수준에서도 각각 83%와 92%의 높은 방제활성을 보였다(Table 4). SG3 배양액의 *in vivo* 항균스펙트럼과 비교할 때 많은 차이가 보였다. 즉 배양액의 경우에는 벼 도열병과 토마토 역병 및 보리 흰가루병에 대하여 높은 방제효과를 보였고, 토마토 잿빛곰팡이병과 고추 탄저병 및 밀 붉은 녹병에 대해서는 중간 정도의 활성을 보였는데 비하여 rhamnolipid B는 토마토 역병과 토마토 잿빛곰팡이병에

Table 4. *In vivo* antifungal activity of rhamnolipid B isolated from *Pseudomonas* sp. SG3 against 7 plant diseases

Sample	Conc. (μ g/ml)	Control value (%) ^a						
		RCB	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM	RPA
Rhamnolipid B	500	0 \pm 0.0 ^b	25 \pm 7.0	86 \pm 3.5	93 \pm 2.3	3 \pm 4.7	0 \pm 0.0	11 \pm 17.6
	250	13 \pm 17.6	20 \pm 0.0	83 \pm 0.0	92 \pm 4.6	3 \pm 4.7	0 \pm 0.0	11 \pm 14.1

^aRCB, rice blast (*Magnaporthe oryzae*); RSB, rice sheath blight (*Rhizoctonia solani*); TGM, tomato gray mold (*Botrytis cinerea*), TLB, tomato late blight (*Phytophthora infestans*); WLR, wheat leaf rust (*Puccinia recondita*); BPM, barley powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*); RPA, red pepper anthracnose (*Colletotrichum coccodes*).

^bData represents the mean \pm standard deviations of two replications.

대해서만 높은 활성을 보였다. 이는 *Pseudomonas* sp. SG3 균주가 rhamnolipid B 외에 다른 항균물질을 생산할 가능성이 있든가 배양액에 rhamnolipid B의 항균활성에 영향을 미치는 다른 물질이 있는 것으로 추정된다.

한편, 김 등(2000)은 *P. aeruginosa* B5균주로부터 분리한 rhamnolipid B가 고추 역병과 오이 탄저병에 대하여 높은 방제효과를 보인다고 하였다. 하지만 본 연구에서는 *C. coccodes*에 의한 고추 탄저병에는 낮은 방제효과를 보였다. 이러한 차이는 접종원의 농도, 발병환경, 약제 처리 및 접종 방법 등의 차이 등의 여러 가지 원인에 의하여 차이가 발생하는 것으로 생각된다. 고추 역병균인 *P. capsici*와 동일한 난균강균에 속하는 *P. infestans*에 의해 발병하는 토마토 역병에는 높은 방제효과를 보였다.

Rhamnolipid B의 in vitro 항진균활성. *In vivo* 생물검정에서 rhamnolipid B는 토마토 잿빛곰팡이병과 토마토 역병에 대하여 높은 방제효과를 보였다. 따라서 이들 두 가지 식물병원균인 *B. cinerea*와 *P. infestans*의 포자 발아와 균사생육에 대한 rhamnolipid B의 효과를 조사하였다. 그

결과, rhamnolipid B는 *P. infestans*의 포자발아를 대조약제인 streptomycin sulfate과 유사한 정도로 억제하였다(Fig. 2). 이외는 달리 *B. cinerea*의 포자발아에는 거의 활성을 보이지 않았다.

두 식물병원균의 균사생육에 대한 rhamnolipid B의 효과를 조사한 결과, Fig. 3와 같이 나타났다. 그 결과 rhamnolipid B는 포자발아와는 달리 *B. cinerea* 균사생육에 대해서는 활성을 보였다. 22.2 µg/m에서는 40%, 66.6 µg/m에서는 83%, 그리고 200 µg/m에서는 100% 수준으로 균사생육을 억제하였다. 이와 같이 나타남에 따라 rhamnolipid B는 토마토 잿빛곰팡이병 방제에 있어서 포자발아가 아닌 균사생육을 저해함으로써 방제효과를 나타낼 수 있었다. 한편, rhamnolipid B는 *P. infestans*에 대해서는 균사생육도 대조약제로 사용한 streptomycin sulfate와 유사한 정도로 저해하는 것으로 나타났다. 따라서 rhamnolipid B는 토마토 역병의 방제시 병원균의 포자발아와 균사생육을 동시에 억제함으로써 우수한 방제효과를 나타낼 수 있었다.

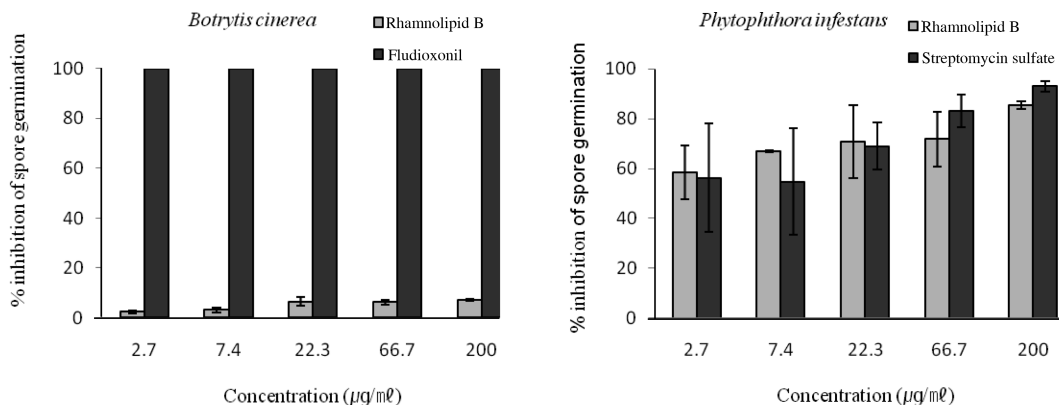


Fig. 2. Inhibitory activity of rhamnolipid B against spore germination of *Botrytis cinerea* and *Phytophthora infestans*.

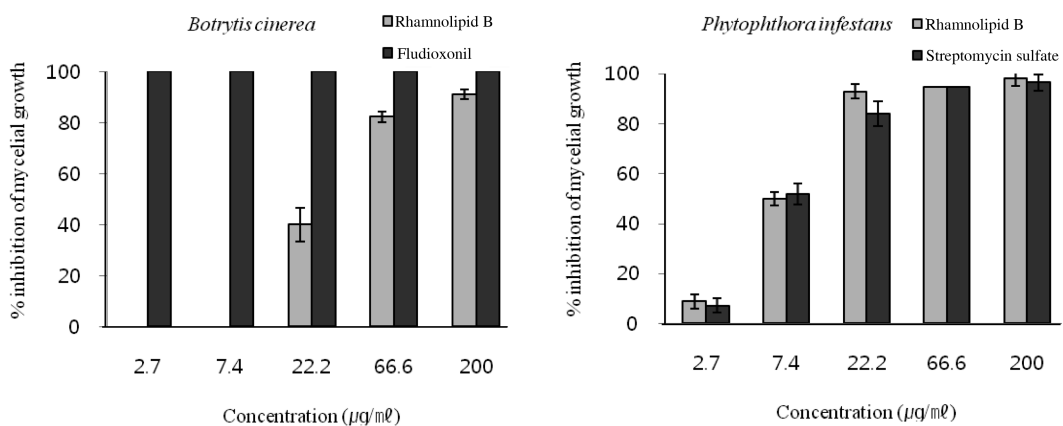


Fig. 3. Inhibitory activity of rhamnolipid B against mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phytophthora infestans*.

Stanghellini와 Miller(1997)는 *Phytophthora*와 *Pythium*에 대한 rhamnolipid의 항균 활성 및 수경 재배시 rhamnolipid를 생산하는 세균을 이용하여 생물학적 방제 효과를 보고하였다. 김 등(2000)은 *P. aeruginosa* 균주 B5가 생산하는 rhamnolipid B가 *Cercospora kikuchii*, *Cladosporium cucumerinum*, *Collectotrichum orbiculare*, *Cylindrocarpon destructans*, *M. oryzae*, *P. capsici*에 항균 활성을 나타낸다고 보고하였다.

Rhamnolipid는 자연계에서 쉽게 분해가 되고, 환경에 대하여 거의 영향을 주지 않을 뿐만 아니라 인축에 대한 독성도 낮다는 장점이 있다. 그리고 계면활성제로서 역할 뿐만 아니라 그 자체가 항균활성을 가지고 있어 친환경 농업을 하는데 있어 여러 가지로 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 본 실험과 Kim 등(2000)의 결과에 의하면 rhamnolipid B는 난균강균의 생육을 억제할 뿐만 아니라 다양한 진균의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 특히 본 실험에서는 rhamnolipid B가 *B. cinerea*에 의한 토마토 잿빛곰팡이병도 효과적으로 방제한다는 사실을 처음으로 발견하였다. 이러한 결과들을 종합할 때 rhamnolipid B를 생산하는 *Pseudomonas* sp. SG3는 토마토에 발생하는 잿빛곰팡이병과 역병을 포함한 다양한 식물병을 방제하는 미생물농약으로 이용 가능할 것으로 기대된다.

요 약

기체유가 심하게 오염된 토양으로부터 생물계면활성제를 생산하고 항균활성과 살충활성을 보이는 *Pseudomonas* sp. SG3 균주를 분리하였다. 이 길항세균은 시험한 8개의 식물병원균이 모두에 대하여 균사생육저해활성을 보였다. 또한 *in vivo* assay에서는 SG3 액체 배양액 처리시 벼도열병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병, 밀 붉은녹병, 보리 흰가루병 및 고추 탄저병에 강한 항균 효과를 보였다. 액체배양액으로부터 ethyl acetate 추출, silica gel column chromatography 및 preparative HPLC 등을 통하여 한 개의 항균물질을 분리하였다. 질량분석과 핵자기공명분석을 통해 분리한 물질의 구조를 동정한 결과 rhamnolipid B로 동정되었다. Rhamnolipid B는 토마토 잿빛곰팡이병과 토마토 역병에 높은 방제활성을 보였다. 그리고 토마토 잿빛곰팡이병균인 *B. cinerea*의 균사 성장과 토마토 역병균인 *P. infestans*의 유주자 발아 및 균사 성장을 효과적으로 억제하였다. Rhamnolipid B를 생산하는 *Pseudomonas* sp. SG3는 토마토에서 발생하는 식물병을 방제하는 새로운 생물방제제로서 이용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 2007031034004)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

- Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V., van der Bij, A. J., van der Drift, K. M. G. M., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R. J., Keel, C., Bakker, P. A. H. M., Tichy, H.-V., de Bruijn, F. J., Thomas-Oates, J. E. and Lugtenberg, B. J. J. 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 1069-1077.
- Handelsman, J. and Parke, J. L. 1989. Mechanisms in biocontrol of soilborne plant pathogens, In: Plant-microbe interactions, Vol. 3, ed. By T. Kosuge and E. W. Nebster, pp. 27-61. McGraw-Hill Publishing Co., New York.
- Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69: 480-482.
- Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* 70: 712-715.
- James, C. 1971. A Manual of Assessment Keys for Plant Disease. Canadian Department of Agriculture Publishing.
- Jarvis, F. G and John, M. J. 1949. A glycol-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* 71: 4124-4126.
- Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I. and Lugtenberg, B. 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* 7: 1809-1817.
- Kim, B. S., Lee, J. Y. and Hwang, B. K. 2000. *In vivo* and *in vitro* antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. *Pest Manag. Sci.* 56: 1029-1035.
- 김충희. 2004. 2003년 농작물 병해 발생개황. *식물병연구* 10: 1-7.
- Lang, S. and Wullbrandt, D. 1999. Rhamnose lipids - biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 22-32.
- Maier, R. M. and Soberón-Chávez, G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 625-633.
- Mulligan, C. N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133: 183-198.
- 농림부. 2007. 농림통계연보. 농림수산식품부.
- Stanghellini, M. E. and Miller, R. M. 1997. Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of

- zoosporic plant pathogens. *Plant Dis.* 81: 4-12.
- Thomashow, L. S. and Weller, D. M. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites., pp. 236-271. In: G. Stacey and N. T. Keen (eds.), *Plant-Microbe interactions*. Chapman and Hall, New York.
- Thomashow, L. S., Bonsall, R. F. and Weller, D. M. 1997. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ, pp. 493-500. In C. J. Hurst (ed.), *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington, D.C.
- Weller, D. M. and Thomashow, L. S. 1993. Use of rhizobacteria for biocontrol. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 306-311.
- Yamaguchi, M., Sato, A. and Yukuyama, A. 1976. Microbial production of sugar-lipids. *Chem. Ind.* 4: 741-742.