*Botrytis cinerea*와 *Colletotrichum acutatum*에 항균활성을 갖는 점액세균 *Sorangium cellulosum*에 대한 아종 분류 및 길항 특성 연구

Subspecies Classifying and Characterizing the Two Groups of Antagonistic *Sorangium cellulosum* against *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acutatum*

*Corresponding author

Tel: +82-41-530-2282
Fax: +82-41-530-2393
E-mail: scyun@sunmoon.ac.kr
ORCID
<https://orcid.org/0000-0001-6295-8642>

구태훈 · 윤성철

선문대학교 제약생명공학과

Tae-Hoon Koo and Sung-Chul Yun

Department of Pharmaceutical Engineering and Biotechnology, Sunmoon University, Asan 31460, Korea

We classified the previously reported antagonistic strains of *Sorangium cellulosum* into 5 subspecies (A–E). Four strains were antagonistic to *Botrytis cinerea* (AB group) and two strains were antagonistic to *Colletotrichum acutatum* (AC group). According to the genetic and sequential analyses with standard genes, *xynB1*, *bglA2*, *groEL1* for grouping, all strains of AB group were belonged to subspecies C and all strains of AC group were belonged to subspecies D. In addition, high pressure liquid chromatography with the culture filtrates confirmed the genetic results, because AB group had peaks with retention time at 20–22.5 minutes, whereas AC group had no peak. There was positive relationship ($R^2=0.9652$) between the control values of infecting *B. cinerea* on cherry tomatoes and the main peak areas of chromatograms among the four isolates of AB group. From the subspecies results of AB group, the main peak of KYC 3270 was expected to be epothilone D. However the retention times of the standard of commercial epothilone D and the main peak of KYC 3270 culture filtrate were different as 9.9 and 11.581 min., respectively. Finally, the antagonistic metabolite of AB group was inferred as 7-ketone epothilone D.

Keywords: 7-ketone epothilone D, Antagonistic metabolites, Chromatography, Myxobacteria, Phytopathogenic fungi

Received April 30, 2018

Revised May 9, 2018

Accepted May 9, 2018

서론

생물적 방제를 위한 후보 길항균 중 하나인 점액세균 *Sorangium cellulosum*은 독특하고 다양한 항진균 물질

을 분비하는 그람 음성 세균이다. Kim과 Yun (2011)은 *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Pyricularia grisea*, *Penicillium* sp. 등 네 가지 식물병원균들과 *S. cellulosum*의 배양 추출물을 대치배양하여 포자발아 및 균사생장 억제를 기준으로 점액세균 길항 균주를 선발하였다. 우리나라에서 분리한 *S. cellulosum* 318 균주 중 *C. acutatum* 길항 균주는 29개였는데 이들 중 23 균주는 *P. grisea*와 *Penicillium* sp.에도 동일하게 길항력을 보였다. 반면, *B. cinerea*에 길항력을 보인 *S. cellulosum*

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191
www.online-rpd.org

은 79 균주로서 탄저병 길항균주보다 2.7배 더 많았고, 이들 중 7개 균주만 *B. cinerea*와 *C. acutatum* 두 병원균 모두에 길항력을 보였다. 따라서 선발된 잣빛곰팡이 길항 점액세균인 AB 계열 (Antagoistic to *B. cinerea*; AB group) 79 균주와 탄저병 길항 점액세균인 AC 계열 (Antagoistic to *C. acutatum*; AC group) 29 균주는 7 균주를 제외하면 이 두 계열은 각기 다른 균주들로 구성되었다. 선발한 AB 계열 점액세균 79 균주 중 딸기 및 토마토 과실에 *B. cinerea*를 접종한 생물검정으로 KYC 3130, 3247, 3248, 3270 균주(Kim과 Yun, 2011)를 최종 선발하였고, AC 계열 점액세균 29 균주 중 고추 열매 및 묘 실험을 통해 KYC 3262, 3279를 선발했고 이 중 KYC 3262은 2011년부터 3년간 포장실험(Yun, 2014)을 실시하였다.

섬유소 분해성 점액세균은 유전적 특성에 따라 크게 5가지 아종(subspecies A-E)으로 분류한다(Lee 등, 2013). 아종 분류를 위한 세 가지 기준 유전자는 *groEL1*, *xynB1*, *bglA2* (Jiang 등, 2008)이며, 유전자 유무에 따라 *groEL1* 유전자만 결손된 것을 아종 A, *xynB1* 유전자만 결손된 것을 아종 E, 세 유전자가 모두 존재하면 아종 B, C, D 중 하나로 분류한다. 아종 B, C, D 분류는 *groEL1*, *xynB1* 염기서열 분석을 통해 전형적인 타입 균주들과의 유사성을 분석하여 최종 분류한다. 분류 기준인 세 유전자의 기능은 첫째 *xynB1* 유전자는 endo-1,4- β -glucanase를 활성화하여, cellulose, lichenin과 cereal- β -D-glucan 내 1,4- β -glucoside 결합을 가수분해하는 효소로 작용한다(Coughlan과 Hazlewood, 1993). 둘째로 *bglA2* 유전자는 β -glucosidase를 암호화하는 cellulase 관련 유전자이다. 마지막으로 *groEL1* 유전자는 점액세균의 생물막(biofilm) 형성 과정에서 지방산을 조절하여 mycolic acid 생합성에 관여한다(Ojha 등, 2005).

유전적 방법 외에도 고효능액체크로마토그래피(HPLC)를 이용한 분석화학적 방법으로 아종 분류할 수 있다. Lee 등(2013)은 사전에 유전적으로 분류된 5가지 아종 별로 독특한 크로마토그램 프로파일(profile)을 얻고, 이를 바탕으로 머무름시간(retention time, *rt*)이 유사한 특성 피크를 제시하였다. 즉, 아종 A는 하나의 특성 피크인 A, 아종 B는 세 개의 특성 피크인 B1/B2/B3, 아종 C는 특성 피크인 C, 그리고 아종 E는 두 특성 피크인 E1/E2를 갖으며, 독특하게도 아종 D는 특성 피크가 없었다(Lee 등, 2013). 또한, *S. cellulorum*가 분비하는 대표 생리활성 물질은 아종에 따라 독특한데, 아종 A는 disorazole을, 아종 C는 epothilone과 spirangien을, 아종 D는 ambruticin을, 아종 E는 soraphen을 대표적으로 생산한다(Lee 등, 2013). 이들 아종의 대표 생리활성 물질은 독특한 항균활성 기작을 갖으며, 5가지 아종과 2차 대사물질 간에는 뚜렷한 상관관계를 갖

는다(Lee 등, 2013). 크로마토그램의 정량적 특성 연구는 식물 병원균에 대한 길항력과 관련된 생리활성 물질 추정에 유용할 수 있는데, *S. cellulorum*의 아종 특성 피크의 면적(상대적 정량값)이 넓을수록 식물병원균의 발병 억제력(방제가)이 높은 양의 상관관계를 보인다면 특성 피크는 길항력이 있는 항균활성 물질로 추정할 수 있다. 또한 점액세균의 생리활성 물질 동정은 *S. cellulorum*들을 아종 분류한 후, 아종별 대표 생산물질 또는 그 유도체를 항균활성 물질로 1차 추론하고 이를 표준시료(standard)로 활용하여 생리활성 물질을 최종 동정할 수 있다.

본 연구는 선행 섬유소 분해 아종 분류 연구에서는 수행되지 않은 잣빛곰팡이 병원균에 길항력을 갖는 AB 계열 네 균주와 고추 탄저병에 길항력을 갖는 AC 계열 두 균주의 *S. cellulorum*을 유전학적 및 분석화학적 방법으로 아종 분류하여 두 계열의 차이를 구명하고자 한다. 또한 아종 분류를 위한 HPLC 크로마토그램의 특성 피크를 정량하여 식물 병원균에 대한 방제와 상관분석을 통해 피크에 나타나는 물질이 길항력과 관련되는지 확인하고자 한다. 마지막으로 AB 계열의 점액세균이 분비하는 *B. cinerea* 길항 물질 동정을 위해, 아종 분류를 위한 HPLC 크로마토그램의 특성 피크로부터 추론된 epothilone D를 표준시료로 활용하여 AB 계열의 길항 특성을 구명하고자 한다.

재료 및 방법

병원균 및 점액 세균 배양. 잣빛곰팡이 병원균인 *B. cinerea* (No. 43528)는 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection: KACC)로부터 분양받았고, 고추 탄저병원균인 *C. acutatum* SWS은 수원 고추포장에서 2000년 초에 분리하였다. 두 병원균은 감자한천배지에서 25°C로 7일간 배양한 후 얻은 포자를 1×10^5 conidia/ml 농도의 현탁액으로 만들어 실험에 사용하였다. 기존 연구에서 길항력을 확인한 *S. cellulorum* (KYC 3130, 3247, 3248, 3270 이상 AB 계열, KYC 3262, 3279 이상 AC 계열) 여섯 균주를 점액세균 은행(Myxobank)에서 분양받아 -70°C에 보관하였다. 동결건조된 길항균의 활성을 증진시키기 위하여 ST21 배지에 멸균된 거름종이 조각(0.5 cm $\times$ 2 cm) 위에 균주를 치상하여 7일간 배양하였다. 고체 배지에서 배양된 균주들은 과실에 접종하는 생물검정을 위해 CSG 액체 배지(Casitone, Soluble starch, Glucose 첨가 배지) 100 ml에 접종하여 생리활성 물질 생산을 유도하였다(Kim과 Yun, 2011). 또한 HPLC 분석을 위하여 ST21배지에 배양된 균주들을 CYS 액체 배지(Casitone, Yeast extract, Soluble starch 첨가 배지) 100 ml에 접종하여 배양하였다(Lee 등, 2013).

S. cellulosum의 아종 분류를 위한 PCR과 염기서열 분석. 6가지 길항 균주들의 아종 분류를 위한 DNA 추출, 프라이머 제작과 PCR 조건은 Lee 등(2013)의 아종 분류 실험방법에 따라 수행하였다. 염기서열 분석은 MacroGen®에 의뢰하였다. 길항균주와 아종별 대표균주의 염기서열 유사성 검증을 위해 필요한 각 아종별 대표균주들은 아종 A는 KYC 3064, 아종 B는 KYC 3234, 아종 C는 KYC 3013, 아종 D는 KYC 3156, 아종 E는 KYC 3076이었다. 염기서열 자료들 간에 유전적 유사성 비교는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 실시하였다. 최종적으로 Mega6 program을 사용하여 계통수를 작성하였다.

HPLC 분석을 위한 점액세균 배양 농축 추출물 제조. 각 길항 균주들을 100 ml의 CYS 액체 배지에서 180 rpm, 32°C 조건으로 5일간 진탕 배양한 후, 멸균 거즈로 걸러내어 배양 여액을 준비하였다. 배양 여액은 회전농축기로 수분을 모두 제거한 후, 메탄올 1-2 ml를 첨가하였다. 최종적으로 pore size 0.2 µm 크기의 주사기 필터로 여과하여 불순물을 제거한 최종 100배 농축 추출물을 준비하였다.

아종 분류를 위한 HPLC 분석. 선발한 길항균 배양 추출물 1 ml를 사용하여 아종 분류의 특성 피크를 얻기 위한 크로마토그램 분석은 Lee 등(2013)이 실시한 *S. cellulosum* 아종 분류를 위한 용매체계(solvent system)를 사용하였다. 고효능액체크로마토그래피 기기(Shimadzu HPLC 2300, Japan)와 컬럼 Agilent zorbax C-18 (Agilent, USA)을 이용하여 배양 추출물 1개 당 50 분 동안 분석하였다. 유사한 머무름시간에 나타난 특성 피크들은 크로마토그래피 상에서 면적값을 측정하여, 배양 추출물 1 ml 당 상대적 함유량으로 정량하였다.

생물검정 및 회귀분석. 길항균 배양 여액들을 이용하여 *B. cinerea*에 대한 방제가를 얻기 위한 생물검정 실험은 Kim과 Yun (2011)에서 KYC 3270을 선발했던 방법과 같은 방법을 사용했다. 방울토마토와 딸기 과실을 접종 24시간 전 70% 에탄올과 멸균수로 표면 살균한 후, 각 처리 당 배양 여액 10 ml를 분무하여 준비하였으며, positive control은 시판농약인 fludioxonil(사파이어, Syngenta, China, a.i. 20%)를 사용하였다. 24시간 후 각 처리별로 준비된 과실에 잿빛곰팡이 포자현탁액을 접종하여 과실의 발병유도를 위해 밀폐용기 안에 멸균수를 첨가하여 습도를 조절하였다. 발병률은 25°C의 배양 조건에서 24시간 간격으로 관찰하면서 접종 후 5-7일 후 발병각 대조구에서 과실의 병징이 충분히 나타났을 때 처리한 과실 중 발병과실의 백분율

로 발병률(Incidence)을 측정하여 방제가를 계산하였다. 각 처리 당 방울토마토 4개, 딸기 10개의 과실을 사용하였으며, 실험은 총 4회 반복하였다. 각 균주별 방제가(control value)와 특징 피크 상대 면적값을 이변량 변수(x, y)로 만들어 점도표를 작성한 후, 이를 선형 회귀분석하였다.

2차 대사산물인 epothilone 확인을 위한 HPLC 분석. 아종 분석 결과 대표 생리활성물질로 추정된 epothilone D (PMID 268909, Sigma-Aldrich, USA)를 시중에서 구하고 표준시료로 정해 메탄올 1 ml에 1,000배 희석 후 zorbax C-18 컬럼을 사용하여 HPLC 크로마토그램에서 특성 피크를 얻었다. 2차 대사산물을 동정하기 위한 용매 체계는 아종분류를 위한 용매 체계를 약간 변형하여 분석시간을 15분으로 단축하고 용매 A와 B의 비율을 변경하여 진행하였다(Kern 등, 2015). 용매 A는 acetonitrile과 물을 8대 2 비율로 혼합하였으며, 용매 B는 acetonitrile만을 사용하였다. 0-8분까지 용매 B 농도를 20%부터 90%까지 점차 증가시켰으며, 8-15분에는 90%를 유지하였다. 이 실험은 AB, AC 계열 대표 균주인 KYC 3270과 KYC 3262만을 분석하였다.

결 과

유전적 아종분류. PCR을 통해 길항 점액세균의 *xynB1*, *bglA2*, *groEL1* 유전자 존재 유무를 확인한 결과, AB 계열과 AC 계열 6 균주 모두 분류 기준인 세 유전자를 다 갖고 있었다(Fig. 1). 따라서 AB 계열과 AC 계열은 아종 B, C, D 중 하나였다. 명확

Fig. 1. Electrophoresis of *Sorengium cellulosum* PCR products of *xynB1* gene (lane 1, 4, 7, 10, 13, 16), *bglA2* gene (lane 2, 5, 8, 11, 14, 17) and *groEL1* gene (lane 3, 6, 9, 12, 15, 18). The three genes are for subspecies *S. cellulosum*. KYC 3130, 3247, 3248, and 3270 were AB (Antagonistic to *Botrytis cinerea*) strains and KYC 3262, and 3279 were AC (Antagonistic to *Colletotrichum acutatum*) strains of *S. cellulosum*. Lane M1 and M2 were 1 kb ladder maker.

Fig. 2. Phylogenetic tree of the eight strains of *Sorengium cellulorum* PCR products of *xynB1* (A) and *groEL1* (B) genes. The underlined KYC 3064, 3234, 3013, 3156, and 3076 were the type strains of sub-species A, B, C, D, and E, respectively.

한 아종 분류를 위하여 염기서열 분석을 실시하여 NCBI에 등록된 각 아종 내 대표 균주들의 *xynB1*, *groEL1* 유전자의 유사성을 비교한 결과, AB 계열인 KYC 3130, KYC 3247, KYC 3248, KYC 3270 균주들은 아종 C의 대표 균주인 KYC 3013과 유사한 반면, AC 계열인 KYC 3262와 KYC 3279는 아종 D의 대표 균주인 KYC 3156과 유사하였다(Fig. 2). PCR과 염기서열 분석 결과, AB 계열은 아종 C로, AC 계열은 아종 D로 분류하였다.

분석화학적 아종 분류. 아종 분류를 위해 HPLC 크로마토그램을 분석한 결과, AB 계열인 KYC 3130, 3247, 3248, 3270은 머무름시간 20–22.5분 사이에 반복적인 특성 피크가 존재하였다(Fig. 3). 이 피크는 UV 254 nm에서 나타나 epothilone로 추론하였다. 그런데, 같은 방법으로 Lee 등(2013)이 분석한 아종 분류를 위한 HPLC 크로마토그래피 결과 아종 C의 특성 피크 머무름시간은 28–29분이어서 본 연구결과인 AB 계열 특성 피크의 머무름시간 20–22.5분과 5분 이상의 머무름시간 차이를 보이는데, 이는 기계적 차이로 볼 수 없으므로 AB 계열의 특성 피크는 epothilone라기보다는 유도체 중 하나인 epothilone D로 판단하고, 이를 동정하기 위한 2차 HPLC 실험을 준비하였다. 한편, AC 계열인 KYC 3262와 3279는 20–22.5분에 피크가 간혹 있었지만, 반복된 실험에서 지속적으로 검출되지 않

Fig. 3. Chromatograph of *Sorengium cellulorum* extracts of AB (Antagonistic to *Botrytis cinerea*) group isolates (KYC 3130, 3247, 3248, and 3270) with HPLC solvent system I for subspecies grouping. The arrows were main peaks at 20–22.5 min. retention time.

Fig. 4. Chromatograph of *Sorengium cellulorum* extracts of AC (Antagonistic to *Colletotrichum acutatum*) group isolates (KYC 3248 and 3279) by HPLC solvent system I for subspecies grouping. The main peak was not detected on both isolates.

아(Fig. 4), 특성 피크가 없는 아종 D의 특징(Lee 등, 2013)을 보였다. 따라서 HPLC 분석화학적 아종 분류 결과와 유전학적 아종 분류 결과들 모두 AB 계열은 아종 C, AC 계열은 아종 D로 일치하였다.

특징 피크 면적값과 방제가의 상관관계. AB 계열에 속하는 4가지 균주들의 배양 여액을 방울토마토(Fig. 5)와 딸기(Fig.

Fig. 5. Control values of AB group (KYC 3130, 3247, 3248 and 3270) of *Sorengium cellulosum* with infection *Botrytis cinerea* on cherry tomato (A). Control values were calculated the occurrence of gray molds among 4 fruits of cherry tomato. Correlation between control values of AB strains of *S. cellulosum* and relative area (%) of the main peak on HPLC chromatograph by solvent system I. The four strains of AB group are KYC 3130 (-), 3247 (▲), 3248 (◆) and 3270 (×). Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$). Data were the average of four replications.

Fig. 6. Control values of AB group (KYC 3130, 3247, 3248 and 3270) of *Sorengium cellulosum* with infection *Botrytis cinerea* on strawberry (A). Control values were calculated the occurrence of gray molds among 10 fruits of strawberry. Correlation between control values of AB strains of *S. cellulosum* and relative area (%) of the main peak on HPLC chromatograph by solvent system I. The four strains of AB group are KYC 3130 (-), 3247 (▲), 3248 (◆) and 3270 (×). Means with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$). Data were the average of four replications.

6) 과실에 접종하여 얻은 방제가와 특징 피크의 상대 면적값은 균주 별로 달랐다. AB 계열에 속하는 각 점액세균의 방제가는 방울토마토에 접종한 KYC 3247, 3248, 3270 균주에서 각각 75.0%, 75.0%, 100%였으며, positive control인 fludioxonil의 50%보다 높았다. 한편 KYC 3130의 방제가는 12.5%였다(Fig. 5A). 한편, 딸기에 접종한 fludioxonil의 방제가가 87.5%로 가장 높았으며, KYC 3130, 3247, 3248은 각각 4.2%, 16.7%, 16.7%로 방울토마토에 비해 방제가가 낮았다. KYC 3270만이 79.2%로서

대조 약제인 fludioxonil에 버금가는 길항력을 보였다(Fig. 6A). AB 계열 균주들의 특징 피크 상대 면적값은 각각 3.631 (KYC 3130), 8.432 (KYC 3247), 7.264 (KYC 3248), 9.926 (KYC 3270)이었다. 상대 면적값과 생물검정 실험의 방제가들을 상관분석한 결과, 상대 면적값이 증가함에 따라 방제가도 증가하는 양의 상관관계는 방울토마토에서는 $R^2=0.9652$ 로 뚜렷한 반면(Fig. 5B), 딸기에서는 $R^2=0.5891$ 로 명확하지 않았는데(Fig. 6B), KYC 3247과 KYC 3248 두 균주는 크로마토그램 상 중간 수준의 상대 피

Fig. 7. Chromatographs of epothilone D standard (A), KYC 3270 (B), and KYC 3262 (C) extracts by HPLC solvent system II. The arrows had main peak at 11.582 min. retention time.

크 면적을 갖는 반면 방제가는 생산된 물질량에 비해 낮았기 때문이었다.

HPLC를 활용한 활성 물질 추정. epothilone D로 추정된 AB 계열 대표 균주 KYC 3270과 AC 계열 대표 균주 KYC 3262의 생리활성 물질 동정을 위해 HPLC 크로마토그래피를 통해 특성 피크를 찾았다. 우선 epothilone D 표준곡선(Fig. 7A) 피크의 머무름시간은 9.310분(Fig. 7A)이었는데, 이는 Kern 등(2015)이 보고한 epothilone D 피크 머무름시간인 약 9분과 차이가 없어 머무름시간 9.310분을 우리가 얻은 크로마토그램에서 표준 물질인 epothilone D의 특성 피크 머무름시간으로 정하고, 점액세균의 크로마토그램에서 유사한 특성 피크를 확인하여 물질동정을 시도하였다. Fig. 7B의 크로마토그램에서 가장 특징적으로 보이는 피크의 머무름시간은 AB 계열인 KYC 3270

이 11.582분이었고, Fig. 7C의 크로마토그램에서는 AC 계열인 KYC 3262에서는 8-10분 사이에 피크가 없어, 두 대표 균주 모두에는 epothilone D가 없음을 확정하였다(Fig. 7B, C). Fig. 7B의 KYC 3270의 특성 피크 머무름시간 11.582분은 Kern 등(2015)이 보고한 머무름시간 10.9분의 7-ketone epothilone과 유사하여 AB 계열의 대표균주인 KYC 3270의 생리활성 물질로 추정하였다.

토 의

결론적으로, 잣빛곰팡이를 길항하는 AB 계열의 4가지 대표 균주들은 *S. cellulorum* 아종 C로, 탄저병을 길항하는 AC 계열 2가지 대표 균주들은 *S. cellulorum* 아종 D로 분류되었으므로 두 계열은 각각 다른 아종이었고, 길항 기작의 차이는 다른 종류의 생리활성 물질을 분비하기 때문인 것으로 추정된다. 유전자 분석 결과 AB, AC 계열 *S. cellulorum* 균주 모두는 분류 기준 유전자 *xynB1*, *bglA2*, *groEL1* 들을 모두 갖고 있어 전형적인 타입 균주와 유사성을 통해 아종을 확정하였다. HPLC 크로마토그램에서 나타난 AB 계열 20-22.5분 특성 피크와, 특성 피크가 뚜렷하지 않은 AC 계열 두 균주의 아종 분류 결과는 분석화학 및 유전자 분석 결과들은 일치하였다. 또한 AB 계열의 특성 피크 면적과 방울토마토에서 나타난 잣빛곰팡이 방제가 사이의 높은 상관관계($R^2=0.9652$)는 특성 피크의 물질이 항균활성 물질과 관련될 것으로 추정된다. 따라서 길항력이 확인된 섬유소 분해 점액세균을 활용하여 생물방제를 하려면 대상 병원균이 잣빛곰팡이냐 탄저병균이냐에 따라 AB, AC 계열을 각각 구별하여 적용하여야 한다.

아종 C는 spirangien과 epothilone 두 가지 생리활성물질을 생산하며, 이들은 epothilone을 생산하는 *epoA* 유전자와 spirangien을 생산하는 *spiG* 유전자를 갖는다(Lee 등, 2013). 두 대표 생리활성 물질은 정성적 차이에 의하여 각각 spirangien A-G, epothilone A-K 유도체를 갖는데 머무름시간은 물질마다 각각 다르다(Frank 등, 2007; Kern 등, 2015). Frank 등(2007)과 Niggemann 등(2005)에 따르면 spirangien A는 머무름시간이 23.6분이며, UV maxima가 303, 318, 333, 351 nm라고 하였다. 하지만 우리는 UV 254 nm에서 분석하였기 때문에 epothilone 계열 중 머무름시간이 가장 유사한 epothilone D로 1차 추정하였다. Epothilone은 UV 254 nm에서 피크가 나타났는데, epothilone B는 6.9분, 14-OH epothilone D는 5.5분, 그리고 epothilone D는 약 9분의 머무름시간을 갖는다고 보고되었다(Kern 등, 2015). Rogalska 등(2013)과 Wang 등(2009)은 epothilone A-D로부터 다양한 파생물들이 존재하며, 각

물질들의 항암활성 연구를 실시하였다. 그 결과, 저해농도 (Inhibition Concentration, IC)가 각각 1.57 $\mu\text{g/ml}$ (epothilone A로부터의 파생물), 0.00249 $\mu\text{g/ml}$ (epothilone B), 0.846 $\mu\text{g/ml}$ (epothilone B로부터의 파생물)였으며, epothilone C와 D의 파생물들은 활성이 없었다. 본 연구에서 AB 계열의 생리활성물질로 추정된 7-ketone epothilone D도 epothilone D의 파생물 중 하나이다(Kern 등, 2015).

HPLC 크로마토그램에서 추정된 7-ketone epothilone D를 확인하고자 액체크로마토그래피 질량(liquid chromatography with mass spectrometry, LC-MS) 분석을 실시하였으나 기대했던 특성 피크를 LC-MS 크로마토그램으로부터 직접적으로 얻지 못하였다(supplementary data). 그 이유는 7-ketone epothilone D가 연속적인 화학 반응으로 인해 변성되었기 때문이다(Kern 등, 2015). 즉, H_2O 가 발생할 경우, m/z 가 472로 감소하고, CO_2 가 생성되었을 때는 m/z 가 402로 감소되며, 7번 탄소와 이중 결합된 산소에 삼중결합이 발생하였을 때에는 162까지 감소한다. 또한 epothilone D 수준에서 에폭시화가 진행되어 물이 발생함과 동시에 epothilone B로 전환되어 7-ketone epothilone D가 생성되지 않기도 한다(Kern 등, 2015).

AC 계열인 KYC 3262는 2011–2013년에 걸쳐 330.6 m^2 면적에서 3년간 포장 실험을 수행하였다(Yun, 2014). KYC 3262 배양여액 처리구의 방제가는 3년간 각각 31%, 89%, 82%였으며, 화학농약인 dithianon 방제가는 각각 19%, 97%, 91%여서 배양여액의 방제가는 화학농약 대비 10%에 버금가는 차이를 보여 생물농약의 가능성을 보여주었다(Yun, 2014). 비록, 본 연구에서는 HPLC 화학분석 방법으로 AC 계열의 특성 피크를 얻지 못하였지만, 아종 D의 대표 생리활성 물질은 ambruticin일 가능성이 높으므로(Lee 등, 2013), 향후 연구에서는 AC 계열 균주가 분비하는 ambruticin의 정량분석 연구를 통해 생리활성 물질을 규명하는 연구를 수행하는 것이 합리적이다.

본 연구결과 AB 계열 *S. cellulorum* 4 균주 KYC 3130, 3247, 3248, 3270 네 균주 모두는 아종 C의 특성 피크를 갖으며 7-ketone epothilone D로 추정되는 생리활성물질을 분비하였다. 따라서 우리가 스크리닝한 318균주의 섬유소 분해 점액세균으로부터 잿빛곰팡이에 길항력을 보인 79균주 중 탄저병 및 다른 식물병원균에 길항력이 없고 오직 잿빛곰팡이에만 길항력을 보이는 72균주의 대부분은 아종 C로 추정된다. 한편, Ringel 등(1997)은 아종 D의 대표 생리활성 물질인 ambruticin이 0.78 mcg/ml 의 농도에서 *B. cinerea*에 길항력이 있다고 보고하였다. 이러한 결과는 *B. cinerea*에 대한 길항 점액세균은 한 가지 *S. cellulorum* 아종에만 국한되지는 않는다고 할 수 있다.

Kim과 Yun 등(2011)이 보고한 전체 318개의 *S. cellulorum* 균주 중 *B. cinerea*-*C. actatum*에 모두 길항력을 보였던 7균주의 *S. cellulorum*는 ambruticin을 분비하는 균주라고 추정된다. 단, 앞서 언급한 epothilone들과 같이 ambruticin도 다양한 유도체와 파생물들이 존재하기 때문에, 공통 길항균 7균주는 *C. acutatum* 길항균 22균주와는 다른 파생물일 것으로 추정된다.

요 약

섬유소 분해 점액세균인 *Sorangium cellulosum* 균주들 중 *Botrytis cinerea*에 길항력을 갖는다고 보고한 4균주(Antagonistic to *Botrytis*, AB 계열)와 *Colletotrichum acutatum*에 길항력을 갖는다고 보고한 2균주(Antagonistic to *Colletotrichum*, AC 계열)를 5가지(A–E)의 *S. cellulorum* 아종(subspecies)으로 분류하였다. 분류 기준 유전자인 *xynB1*, *bglA2*, *groEL1* 세 유전자의 유전자 유무 및 염기서열 분석을 통해 AB 계열은 아종 C, AC 계열은 아종 D로 분류하였다. 또한, 배양추출물을 고효율 액체크로마토그래피(HPLC)로 분석한 아종 분류 결과 AB 계열 4균주는 머무름시간 20–22.5분에 유사한 특징 피크가 나타난 반면, AC 계열인 2균주는 특징 피크가 없으므로 AB 계열은 아종 C, AC 계열은 아종 D임을 재확인하였다. AB 계열 4균주들의 배양여액을 사용하여 방울토마토에 전처리 후 *B. cinerea*를 접종한 생물검정으로 방제가와 크로마토그램 특징 피크의 상대 면적값과의 상관분석 결과, 피크 면적이 큰 균주일수록 방제가도 높은 양의 상관관계($R^2=0.9652$)를 확인하였다. 아종 분류 결과 AB 계열은 아종 C의 대표 생리활성 물질의 파생물인 epothilone D로 추정되어, 이를 표준시료로 HPLC 분석한 결과 epothilone D의 머무름시간은 9.9분이었던 반면, KYC 3270 특성 피크의 머무름시간은 11.581분으로 달랐다. 따라서 우리는 AB 계열이 분비하는 생리활성 물질은 epothilone의 파생물인 7-ketone epothilone D로 추정하였다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgments

This work was supported by Sun Moon University Research Grant of 2018.

References

- Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P. 1993. Beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17: 259-289.
- Frank, B., Knauber, J., Steinmetz, H., Scharfe, M., Blöcker, H., Beyer, S. et al. 2007. Spiroketal polyketide formation in *Sorangium*: identification and analysis of the biosynthetic gene cluster for the highly cytotoxic spirangienes. *Chem. Biol.* 14: 221-233.
- Jiang, D. M., Zhao, L., Zhang, C. Y., Li, J., Xia, Z. J., Wang, J. et al. 2008. Taxonomic analysis of *Sorangium* strains based on HSP60 and 16SrRNA gene sequences and morphology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:2654-2659.
- Kern, F., Dier, T. K. F., Khatri, Y., Ewen, K. M., Jacquot, J. P., Volmer, D. A. et al. 2015. Highly efficient CYP167A1(EpoK) dependent epothilone B formation and production of 7-ketone-epothilone D as a new epothilone derivative. *Sci. Rep.* 5: 14881.
- Kim, S. T. and Yun, S. C. 2011. Selection of KYC 3270, a cellulolytic myxobacteria of *Sorangium cellulosum*, against several phytopathogens and a potential biocontrol agent against gray mold in stored fruit. *Plant Pathol. J.* 27: 257-265.
- Lee, C. Y., An, D. J., Lee, H. B. and Cho, K. Y. 2013. Correlation between *Sorangium cellulosum* subgroups and their potential for secondary metabolite production. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 297-303.
- Niggemann, J., Bedorf, N., Flörke, U., Steinmetz, H., Gerth, K., Reichenbach, H. et al. 2005. Spirangien A and B, highly cytotoxic and antifungal spiroketals from the myxobacterium *Sorangium cellulosum* : isolation, structure elucidation and chemical modifications. *Eur. J. Org. Chem.* 2005: 5013-5018.
- Ojha, A., Anand, M., Bhatt, A., Kremer, L., Jacobs, W. R. Jr. and Hatfull, G. F. 2005. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell* 123: 861-873.
- Ringel, S. M., Greenough, R. C., Roemer, S., Connor, D., Gutt, A. L., Blair, B. et al. 1997. Ambruticin(W7783), a New antifungal antibiotic. *J. Antibiot.* 30: 371-375.
- Rogalska, A., Marczak, A., Gajek, A., Szwed, M., Śliwińska, A., Drzewoski, J. et al. 2013. Induction of apoptosis in human ovarian cancer cells by new anticancer compounds, epothilone A and B. *Toxicol. In Vitro* 27: 239-249.
- Wang, J., Zhang, H., Ying, L., Wang, C., Jiang, N., Zhou, Y. et al. 2009. Five new epothilone metabolites from *Sorangium cellulosum* strain So0157-2. *J. Antibiot.* 62: 483-487.
- Yun, S. C. 2014. Selection and a 3-year field trial of *Sorangium cellulosum* KYC 3262 against anthracnose in hot pepper. *Plant Pathol. J.* 30: 279-287.