

최 중
연구보고서

흰가루병 방제용 환경친화적 미생물
농약의 개발

Development of Biofungicide for Control of
Powdery mildews

연구기관

충남대학교
농업생명과학대학

농림부

최 중
연구보고서

흰가루병 방제용 환경친화적 미생물
농약의 개발

Development of Biofungicide for Control of
Powdery mildews

연구기관

충남대학교
농업생명과학대학

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “흰가루병 방제용 환경친화적 미생물 농약의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 일

주관연구기관명 : 충남대학교
총괄연구책임자 : 유 승 헌
세부연구책임자 : 유 승 헌
연 구 원 : 김 영 숙
연 구 원 : 조 혜 선
연 구 원 : 고 미 선
연 구 원 : 이 남 영
연 구 원 : 이 혜 민
연 구 원 : 조 명 길
협동연구기관명 : (주) 경 농
협동연구책임자 : 장 철

요 약 문

I. 제 목

흰가루병 방제용 환경친화적 미생물 농약의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

흰가루병은 전 세계적으로 11,800여종의 식물에서 발생하는 것으로 보고 (Broun, 1987)되고 있으며 국내에서는 400여종의 식물에 발생하는 것으로 알려졌다(Shin, 1994). 그중에서 보리, 밀 등의 곡물류와 오이, 딸기, 토마토 등의 채소류, 사과, 포도, 배등의 과수류, 그리고 장미, 거베라 등의 화훼류에서 흰가루병의 피해가 크다(Shin, 1994; Spencer, 1978).

흰가루병 방제를 위해서 다양한 방법이 시도되기는 했지만 현실적 방제는 살균제에 의존하고 있으며 국내에서 흰가루병 방제에 사용된 금액은 전체 살균제의 약 10%에 달하고 있다(농약공업협회, 2000). 하지만 계속되는 살균제 사용으로 흰가루병의 약제저항성이 유발되는 등 약효저하에 대한 보고 (Asari et al., 1994; Erikson et al., 1998)가 계속되고 있으며 농약의 오·남용에 의한 농산물 잔류문제가 제기 되면서 환경친화적 새로운 흰가루병 방제제 개발의 필요성이 대두 되고 있다. 또한 화학농약의 경우 잔류안전성을 위하여 수확기의 일전기간 이전에는 사용을 금하고 있어 작물재배 후기에 발생하는 병에 대해서는 다른 대안이 없는 현실이다.

본 연구의 목적은 환경친화적인 흰가루병의 방제를 위하여 본 연구팀이

확보하고 있는 국내 토착미생물중에서 흰가루병 방제효과가 우수한 균주의 분류학적 특성을 밝히고 각종 흰가루병 및 식물병원균류에 대한 활성검정, 항균활성물질의 분리 및 동정, 대량배양기술개발, 제제화기술의 개발, 독성평가, 포장시험 등을 통하여 경제성을 갖는 환경친화적인 새로운 흰가루병 방제용 생물 농약을 개발하는데 있다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 흰가루병 방제는 주로 화학적 방제에 의존하고 있으나 농약 잔류, 내성균 출현 등의 문제가 있으며 방제가 쉽지 않음. 특히 딸기, 오이, 참외 등 과채류의 방제에는 많은 어려움이 있음.
- 우리나라 토착미생물을 이용한 생물농약의 개발은 안정적이며 지속적인 병방제에 효과적일 것이며 고부가 가치의 무공해 농산물 생산에도 필요함.
- 미생물농약의 상품화는 세계적으로 성장 초기 단계로 기타 다른 생명공학기술에 비해 기술격차가 적음.
- 생물 screening method는 연구자의 노하우와 관련된 부분으로 기술적 우위를 평가하기 어렵고 선발된 균주자체의 효과에 따라 경쟁력을 가질 수 있음.
- 선발된 균주의 우수한 효과에도 불구하고 경제성을 갖는 생산방법을 개발하지 못한 것이 생물농약개발의 가장 큰 문제점임.
- 본 연구의 수행으로 미생물의 대량배양기술, 물질회수기술, 제제화기술을 통해 상품으로서 가치를 갖는 생산방법을 확립하고자 함.

나. 경제·산업적 측면

- 생물농약의 개발비는 화학농약에서 개발비의 대부분을 차지하는 독성, 잔류 관련 시험이 대폭 완화될 가능성이 높아 개발비 투자가 상대적으로 경제적일 수 있음.
- 잔류문제가 거의 없으므로 시설재배의 수확기 미 저장 중에 사용되는 잠재시장을 화학농약과는 차별되게 확보할 수 있음.

- 생물농약 제품생산 process가 확립될 경우 기존에 사장될 수 있는 많은 유용미생물의 상품화에 응용되어 국내에서 경쟁력 있는 다양한 생물농약 원제 및 제품을 확보할 수 있는 기반이 될 수 있음.

다. 사회·문화적 측면

- 최근 환경에 대한 관심의 영향으로 사회적으로 환경오염과 인축독성이 거의 없는 생물농약의 요구가 점점 높아지고 있는 실정임.
- 인체에 무해한 생물농약으로 작성자의 농약중독 등을 막고 쾌적한 농약 살포 작업조건을 조성할 수 있음.
- 화학농약을 효과적으로 대처할 수 있는 생물농약의 개발은 화학농약의 무분별한 오·남용을 막아 안전한 고품질 농산물생산에 기여할 수 있음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발의 내용은 흰가루병 생물검정법 확립, 활성균주의 동정, 각종흰가루병에 대한 항균 스펙트럼 조사, 항균활성물질의 분리 및 동정, 활성균주 및 물질의 다양한 생물활성검정 및 작용특성 조사, 소포장실험, 대량배양법 확립, 제형개발, 독성 및 안정성 평가시험, 농가포장적용시험 등을 포함하며 구체적인 연구내용과 범위는 다음과 같다.

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2002)	1. 흰가루병 생물검정법 확립 및 각종 흰가루병에 대한 항균 활성 스크리닝	<ul style="list-style-type: none"> ○ 공시균주 : 본 연구팀이 선발한 SH-05, SH-09균주 ○ 흰가루병 생물검정법 확립 : 오이, 담배 잎을 공시하여 흰가루병 방제효과를 효과적으로 검정할 수 있는 생물검정법 확립 ○ 미생물의 기본 배양법 확립 및 소량 배양 : 배지종류, 배양온도, 배양기간 등의 비교 ○ 선발균주의 항균스펙트럼 검정: 딸기, 오이, 담배, 토마토, 구기자 흰가루병을 대

	<p>2. 기본 제형 연구</p> <p>3. 독성 연구</p> <p>4. 생물 활성 검정</p>	<p>상으로 항균스펙트럼을 조사</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 선발균주의 분류학적 특징 조사 : 공시균주의 세균학적, 분자생물학적 특징조사 ○ 배양여액 추출물의 항균활성검정 : 배양여액 및 추출물의 흰가루병 억제효과 조사 ○ 활성 물질의 특성 조사 분석 ○ 기본 제형 연구 ○ 경시 안정성 시험 ○ 원제의 포유 동물 독성 시험 ○ <i>in vivo</i> 시험에서 기본 제제의 활성검정 ○ 소포장 실험을 통한 기본 제제의 활성검정
<p>2차년도 (2003)</p>	<p>1. 선발 균주의 다양한 활성검정 및 활성물질의 순화</p> <p>2. 선발균주 배양법 최적화</p> <p>3. 처방 개선 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선발균주 및 물질의 다양한 약효 및 병억제 작용 조사 : 균체 및 배양여액의 흰가루병 예방효과, 치료효과, 지속효과등을 조사 ○ 상용농약과 길항미생물의 병방제효과 비교 ○ 흰가루병이외의 주요 병원균에 대한 활성검정 : 탄저병균, 잿빛곰팡이병균, 역병균에 대한 활성검정 ○ 항균활성물질 조추출물확보, 항균성 물질의 순화조건 확립 : 각종 chromatography, 용매추출법으로 순화 ○ 소포장실험을 통한 활성검정 ○ 기본 배양조건 확립 ○ Scale up 과정에서 최적 배양조건 확립 ○ 시제품 생산용 물질 배양 ○ 약효 증진용 부자재 탐색

	<p>4. 독성 연구</p> <p>5. 생물 활성 검정</p>	<p>○ 포장 시험용 시제품 생산</p> <p>○ 경시 안정성 시험</p> <p>○ 제품 : 포유 동물 독성 시험</p> <p>○ 제형에 따른 활성검정 : <i>in vivo</i> 시험</p> <p>○ 포장 시험에서 제제품의 활성 검정</p>
<p>3차년도 (2004)</p>	<p>1. 항균활성물질의 구조 분석 및 포장 실험</p> <p>2. 선발균주 대량배양</p> <p>3. 산업화 공정 확립</p> <p>4. 독성 연구</p> <p>5. 생물 활성 검정</p>	<p>○ 항균활성물질의 유기분광학적 방법을 이용한 특성조사 및 항균활성물질의 화학구조 분석</p> <p>○ 시제품의 포장실험 (오이, 딸기 파프리카)</p> <p>○ Pilot scale 생산 : 대형 발효조(300 ℓ)를 이용한 대량배양</p> <p>○ 포장 시험 및 제조 허가용 시제품 제조</p> <p>○ 생태계 생물에 대한 영향 시험</p> <p>○ 국가 등록에 필요한 시험 검토 및 수행</p> <p>○ 포장시험에서 시제품의 활성 검정</p> <p>○ 농가 적용 실험</p>

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

I 연구개발 결과

세부과제: 흰가루병 방제용 유용미생물의 생물활성검정 및 활성물질의 탐색

1. 길항미생물의 배양 및 활성검정

가. 흰가루병 생물검정법 확립

흰가루병균은 절대기생균(obligate parasite)으로서 인공배양이 불가능하여 *in vitro* 활성검정을 할 수 없다. 따라서 *in vivo* 생물검정법의 확립이 필요하다. 담배 유묘잎과 오이 유묘잎을 공시하여 분리한 미생물들의 흰가루병 방제효과를 효과적으로 검정할 수 있는 생물검정법을 확립하였다.

나. 길항미생물(SH-05, SH-09)의 기본 배양법 확립

분리균주들의 항균활성물질 생산 최적조건을 찾기 위한 기본배양법을 확립하기 위하여 배지, 온도, 기간, 회전속도의 영향을 조사하였다.

- SH-05균주는 세균배지인 Müller Hinton Broth 배지를 사용하였으며 25~30℃에서 100~150rpm으로 3일간 배양하였다.
- SH-09균주는 방선균배지인 GSS배지를 이용하였으며 27℃에서 250rpm으로 5~7일간 배양하였다.

다. 길항미생물(SH-05, SH-09)의 각종 흰가루병에 대한 활성 검정 및 우수균주 선발

활성균주의 배양물을 이용하여 담배 흰가루병(*Golovinomyces cichoracearum*), 오이 흰가루병(*Sphaerotheca fusca*), 딸기 흰가루병(*Sphaerotheca aphansis*), 토마토 흰가루병(*Golovinomyces cichoracearum*), 구기자 흰가루병(*Arthrocladiella mougeotii*), 보리 흰가루병(*Blumeria graminis*)에 대한 방제효과를 *in vivo* 온실시험 및 소포장 시험으로 검정하였다. 길항세균인 SH-05균주는 배양여액에서 각종 흰가루병에 대한 방제효과가 인정되었고 균체현탁액에서는 방제효과가 없었다. 그러나, 길항

방선균인 SH-09균주는 배양여액 및 균체 현탁액에서 모두 6종 흰가루병에 대한 방제효과가 우수하였으며 대조농약보다도 방제효과가 우수함으로 SH-09균주를 공시균주로 선발하였다.

라. 선발균주(SH-09)의 다양한 항균활성 및 작용특성 검정

- SH-09균주는 6종의 흰가루병 외에도 벼도열병균(*Magnaporthe grisea*), 토마토 잎곰팡이병균(*Cladosporium fulvum*), 오이 탄저병균(*Collectotrchum lagenarium*), 오이 덩굴쪼김병균(*Fusarium oxysporum*), 사과 점무늬낙엽병균(*Alternaria mali*), 벼 깨씨무늬병균(*Cochliobolus miyabeanus*), 포도탄저병균(*Glomerella cingulata*)등의 균사 생육 억제효과를 보였으나 토마토 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 감자 역병균(*Phytophthora infestans*)에는 매우 약한 활성을 보였고 세균에는 활성을 보이지 않았다.
- SH-09균주의 배양여액 및 균체는 오이 흰가루병과 담배 흰가루병의 예방효과와 치료효과가 우수하였으며 특히 예방효과가 더욱 우수하였다. SH-09균주의 오이 흰가루병 방제효과의 지속성을 조사하였던바 배양액 살포 후 6일째까지는 90%이상의 방제가를 보였으나 8일째부터는 흰가루병이 다시 발생하였다.

2. 길항미생물의 분류학적 특징 및 동정

가. SH-05균주의 동정을 위하여 전자현미경 사진을 통한 형태적 특성조사와 16S rDNA염기서열 분석을 하였던 바 SH-05균주는 *Burkholderia* sp.로 동정하였다.

나. SH-09균주의 동정을 위하여 배양적, 생리적 특성을 조사하였고 세포벽 구성성분을 분석하였으며 주사전자현미경을 통한 형태적 특성을 조사하였고 16S rDNA 염기서열분석을 실시하였던 바 SH-09균주는 *Streptomyces thermocoprophilus* 및 *S. thermoviolaceus*와 유사하지만 이들과 구별되는 신종으로 판명되었으며 따라서 이 균주를 *Streptomyces* sp.로 동정하였다.

3. SH-09균주가 생산하는 항균활성물질의 순화, 정제 및 동정

SH-09균주가 생산하는 항진균활성물질의 분리, 정제를 위하여 물질의 용매추출

성과 레진 흡착성을 조사하였으며 각종 column chromatography 분석을 실시하여 3개의 peak를 확인하였다. 물질의 구조동정을 위하여 ^1H -, ^{13}C -NMR, LRESIM, MALDI/TOF/MS 및 HPLC 분석을 실시하였던 바 이 물질이 cyclic lipopeptide로서 분자량이 각각 1176, 1190, 1162이며 구조식이 $\text{C}_{53}\text{H}_{81}\text{N}_{11}\text{O}_9$ 와 $\text{C}_{53}\text{H}_{83}\text{N}_{11}\text{O}_{19}$ 및 $\text{C}_{52}\text{H}_{79}\text{N}_{11}\text{O}_{19}$ 인 neopeptin A, B, C로 동정되었다.

4. 미생물 원제(SH-09균주)의 물리, 화학적 특성

SH-09 균주의 온도에 대한 안정성을 조사하였던바 $-10\sim 30^\circ\text{C}$ 의 온도범위에서 보존기간에 관계없이 항균활성을 유지하였으며 MBA배지에서 10회 계대를 하여도 안정성을 유지하였다. 열에 대한 안정성은 pH 2, 7에서는 열(120°C)에 안정하였으나 pH 10에서는 열처리 시 항균활성이 소실되었다.

5. 포장시험

가. SH-09균주 배양물의 포장시험

SH-09균주의 배양물을 5~20배로 희석하여 시설하우스에서 재배중인 오이(품종: 은성백다다기)에 3회 경엽 살포한 후 흰가루병 발병도를 조사하였던 바 대조약제(훤나리)보다 우수한 79~92%의 방제가를 나타내었다.

나. SH-09균주 시제품의 포장시험

협동연구기관(주. 경농)에서 제조한 SH-09 30% 수화제(WP)의 500배 희석액으로 시설하우스 내에서 재배중인 오이, 딸기 및 파푸리카 흰가루병 방제효과를 조사하였던바 각각 82~84%, 85%, 80~90%의 방제가를 나타내었으며 모두 대조약제보다 우수한 방제효과를 보여주었다.

협동과제: 환경친화형 제형화 기술개발 및 독성 검정

6. 제형연구

가. 활성 물질의 특성 조사 분석

SH-09균주의 활성을 나타내는 물질을 포함하는 원제를 수급하여 제형 검토에 필요한 기본적인 이화학적 특성을 조사, 분석하였다.

나. 기본 제형 연구

상기연구에서 확보된 원제의 이화학적 특성을 고려하여 가능한 제형을 검토한 다음, 액상 및 고상제형 중에서 가장 적절한 제형을 선발하고 다양한 보조제를 이용하여 처방연구를 수행하였다. 시험된 처방은 농약관리법상의 검사 및 검토항목을 검토하여 우수한 물성을 가지는 처방을 선발하였다.

다. 약효증진용 부자재 탐색

활성물질의 이화학적 특성과 작용상의 특징을 고려하여 약효증진 효과가 기대되는 부자재를 선발하여 부제재별 적절한 처방을 검토하여 처방 5가지를 선발하였으며, 처방별 활성시험을 통하여 효과가 가장 우수한 처방한가지를 선발하였다.

라. 포장시험용 시제품 생산

포장시험용 시제품을 생산하기 위하여 상기연구에서 확립된 최적의 처방을 이용하여 동결건조된 형태의 원제를 주성분으로 하는 30% WP(수화제)의 포장시험용 시제품제작에 성공하였으며 이화학적 검토결과, 물성이 우수하여 생물시험용 시료로 제공하였다.

마. 경시 안정성 시험

처방연구를 통하여 확립된 제품을 대상으로 약효보증기간내의 제품의 안정성을 확보하고자 경시안정성 시험을 수행하였으며, 그 결과 실온에서 2년 정도의 보관이 가능한 것으로 확인되었다.

7. 독성 연구

제품의 대한 독성 시험을 위하여 처방검토 및 활성검토를 통하여 선발된 시료를 분양받아 농촌진흥청에서 고시한 독성시험 기준과 방법에 준하여 제품의 포유동물 독성시험인 급성경구독성시험, 급성경피독성시험, 급성어독성시험을 기간 내에 수행하여 정상적으로 완료하였다. 즉, 배양물을 원제로 하는 원제독성 시험과 시제품으로 확립된 30% WP에 대한 제품독성 시험결과 모두 저독성으로 판명되었다. 이 결과는 생물농약 등록 시 필요한 단계별 시험(Tier system)에서 모두 1단계 시험만을 필요로 하는 것을 암시하였다.

8. 배양법 최적화 연구

가. 기본배양조건 확립

유효미생물(SH-09)의 산소요구도, 활성측정용 in vitro 검정법, 대량배양 형태인 액체배양에서 포자생성 및 균사 생존성, 계대배양에서 안정적인 활성물질을 생산하는 산업용 균주로서의 안정성, 2차 대사가 이루어지기까지의 기간에 대한 기본배양 정보를 계획된 추진일정에 따라 수행완료하였다.

나. Scale up 과정에서 최적배양조건 확립

기본배양조건이 기존에 설정된 GSS배지를 중심으로 진행과 동시에 8가지 이상의 새로운 배지조성에 대한 검토를 수행하여 GSS배지 단점을 극복할 수 있는 새로운 배지조성을 찾아내고 산업화 배지로 대체할 수 있는 연구를 완료하여 대량배양용 배지로 적용시험을 수행하여 scale up 가능성을 확보하였다.

다. 시제품 생산용 물질배양

시제품생산용 물질배양은 포장시험이 시작되기 이전에 제제검토가 이루어져야 하는 관계로 기본배양조건 확립에 활용된 GSS배지를 이용한 물질배양을 수행하였다. Scale up 연구에서 발효기에서 배양할 수 있는 배양물성이 확보된 배지성분으로 대체하기 이전의 조성으로 약효 발현에만 초점을 두었다. 이 때문에 발효기 배양을 수행하지 못하고 flask를 이용한 실험실 배양으로 물질배양을 완료하여 제제검토 및 시제품생산용 원제로 제제 연구에 분양완료하였다.

라. Pilot scale 생산

SH-09의 생물학적 특성을 바탕으로 배양조건을 확립하였으며 이를 바탕으로 대형발효조(300ℓ)를 이용한 대량생산을 할 수 있는 pilot scale의 배양을 성공적으로 수행하였다.

9. 생물 활성 검정 및 포장시험

가. 제형에 따른 활성검정 : in vivo 실험

예비실험을 통해 제형검토를 수행한 5가지의 처방에 대한 in vitro 검정법 및 온실 pot 실험을 수행하여 가장 활성이 우수한 처방5를 선발하였다. 이를 이용하여 주요 식물병원균에 대한 약효스펙트럼을 확인하고 오이 흰

가루병에 대한 예방 및 치료효과 검정 수행을 완료하였다.

나. 포장 시험 수행

오이를 재배하는 유기농 하우스에서 7일 간격 3회 처리를 하는 일반적인 살균제 등록 시험법에 따라 포장시험을 수행 완료하였다. 그 결과 현재 화학농약으로 사용되는 대조약제와 비교하여도 우수한 약효를 확인 할 수 있어 생물농약으로 개발 가능성을 확인 하였다.

II 활용에 대한 건의

본 과제의 연구는 산업화에 초점을 맞추어 진행되었기 때문에 산업화를 전제로 연구가 수행되었다. 먼저 제형화연구를 통해 향후 개발될 유사한 생물농약의 제형화 정보를 확보할 수 있었으므로 이 결과를 바탕으로 좀 더 효율적인 제품개발에 활용하고자 한다. 독성시험의 경우 생화학농약에 대해서는 원제 및 제품의 처리농도 등을 설정하는데 지표성분 등의 활용 등이 제시되고 있지만 아직은 명확한 기준이 없기 때문에 이 부분에 대해서는 좀 더 등록기관과의 조율이 필요할 것이라고 판단된다. 발효공정에 대해서는 균주 각각의 특성의 조사가 중요한데 본 과제의 주관기관 및 협동기관의 연구를 통해 필요한 기초정보를 확보하였다. 기초배양연구를 바탕으로 pilot scale의 배양을 수행하였으므로 이 결과를 대량생산에 활용할 수 있을 것으로 판단된다. 생물활성의 경우는 기존의 화학농약과 비교하여 우수한 장점을 확보하였기 때문에 제품이 등록되어 판매시점에서 홍보자료로도 활용할 수 있을 것이다.

Summary

(영문 요약문)

Development of biofungicide for control of powdery mildews

Powdery mildews are one of the most common, conspicuous and widespread plant diseases. They seldom kill their hosts but utilize their nutrients, reduce photosynthesis, impair growth, and reduce yields, sometimes by as much as 20 to 40 percent. Among the plants most severely affected by powdery mildew are various cereals, such as barley and wheat, other crops that suffer common and severe losses from powdery mildew are the cucurbits, especially cucumber and melon; pepper; strawberries; many ornamentals such as rose; grape; and many trees such as apple.

Currently, powdery mildews are primarily controlled by application of systemic fungicides such as triforine, triadimenol and fenarimol. However, fungicide treatment is often not satisfactory and generates undesirable effects to the environments. Alternative methods are needed because of concerns about environmental contamination and fungicide residues and because of the widespread use of the chemicals in the field has led to the emergence of resistant isolates to fungicides. Using antifungal microorganisms and/or antifungal substances from the microorganisms for control of plant diseases is considered to be one of the alternative methods.

The objective of this study is to develop a new and environmentally safe

biofungicide for control of powdery mildews.

For this purpose, an isolate of actinomycetes(SH-09) was selected as a potential biofungicide against powdery mildews, and identified based on morphological, physiological and molecular characteristics. Also, antifungal activity of the isolate against powdery mildews and other plant pathogenic fungi was investigated, antifungal compounds produced by the isolate were purified and identified, mass culture method and formulation method of the isolate were developed, toxicity test of the isolate and the formulation product was carried out, and the formulation product was evaluated for control of powdery mildews of strawberry, cucumber and paprika in field condition.

The results obtained are summarized as follows.

1. For testing the control value of microorganisms against powdery mildews effectively, *in vivo* bioassay methods using seedling leaves of tobacco and cucumber were developed.
2. As a basic culture method of a antifungal bacterium(SH-05), the SH-05 isolate was cultured on Müller hinton broth medium at 25~30°C in a shaking incubator(100~150rpm) for 3 days; while that of an antifungal actinomycetes(SH-09) was cultured on GSS medium at 27°C(250rpm) for 5 ~ 7days.
3. The culture filtrates of the SH-05 isolate showed control effect against powdery mildews of tobacco, cucumber, strawberry, tomato, Chinese matrimony vine and barley, but the bacterial cells of the isolate did not show control effect against them. However, not only the culture filtrates but also the cells of the isolate of actinomyces(SH-09) showed high level of control effect against the powdery mildews. From the result of this bioassay test, the SH-09 isolate was

selected as an excellent potential biofugicide.

4. The SH-09 showed broad spectrum of antifungal activity. Besides the antifungal activity against powdery mildews, it also strongly inhibited mycelial growth of *Magnaporthe grisea*, *Cladosporium fulvum*, *Collectotrichum lagenarium*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria mali*, *Cochliobolus miyabeanus* and *Glomerella cingula*, but weakly inhibited *Botrytis cinerea* and *Phytophthora infestans*.

Although the culture filtrates and cells of the SH-09 isolate showed not only preventive but also curative effect against powdery mildews of cucumber and tobacco, the preventive effect was more strong.

5. The SH-05 isolate was identified as *Burkholderia* sp. based on morphological and 16S rDNA sequence analysis, The SH-09 isolate was identified as *Streptomyces* sp. on the basis of cultural, physiological, and morphological study, and cell wall composition and 16S rDNA sequence analysis.

6. From the culture filtrate of the SH-09 isolate, three antifungal substances were isolated and purified through the separation of various solvents and column chromatography. The structural identification was determined through ^1H - and ^{13}C -NMR, LRSIM, MALDI/TOF/MS and HPLC analyses. The molecular weights of the substances were 1176, 1190 and 116, and molecular formulas were $\text{C}_{53}\text{H}_{81}\text{N}_{11}\text{O}_{19}$, $\text{C}_{54}\text{H}_{83}\text{N}_{11}\text{O}_{19}$ and $\text{C}_{54}\text{H}_{79}\text{N}_{11}\text{O}_{19}$, respectively. They were identified as neopeptin A, B and C.

7. Control value of diluted(5 \times , 20 \times) culture broth of the SH-09 isolate against powdery mildew of cucumber in vinylhouse field was 79~92%, when sprayed three times on cucumber plants at 7days intervals.

Control value of the formulation product of the culture broth against powdery mildew of cucumber, strawberry, and paprika in farmer's field was 82~84%, 85% and 80~90%, respectively. The control value of the formulation product against

powdery mildews was superior than that of the fungicide(fenarimol).

8. After a through study of the inert ingredients for improvement of control effect of the technical microorganism(SH-09) and the storage stability of the active ingredient, the formulation of the biofungicide composed of the 30% WP was produced successfully.

9. In toxicity test, both the culture broth of the isolate SH-09 and the formulation product(30% WP) of the culture were found to be non- or low-toxic to mammalia and fishes.

10. In mass culture experiments, pilot scale culture of the isolate SH-09 was sucessfully carried out using large scale fermentor(300 ℓ).

11. The application of the fromulation product(30% WP) of the culture broth of the isolate SH-09 in farmer's field was proved sucessfully to control the powdery mildew of cucumber.

CONTENTS

(영문목차)

Chapter 1. Overview of the research project	21
Chapter 2. Current status of the technique development	24
Chapter 3. Research contents and results	25
I. Bioassay of useful microorganisms for control of powdery mildews and investigation of antifungal substances produced by the microorganisms	
1. Culture and bioassay of the antifungal microorganisms	32
(1) Establishment of bioassay method	32
(2) Establishment of basic culture method	36
(3) Bioassay test of the microorganism against powdery mildews	37
(4) Antifungal activity of the SH-09 isolate	47
2. Taxonomy and identification of the isolate used	51
3. Purification and identification of the antifungal substance produced by the SH-09 isolate	65
4. Physical and chemical properties of the technical microorganism SH-09	75
5. Field experiment	77
(1) Field experiment of the culture broth of the SH-09	77
(2) Field experiment of the formulation product	77
II. Development of formulation technique and toxicity test	
6. Formulation study	79

(1) Analysis of properties of the active substances	79
(2) Basic formulation study	80
(3) Investigation of inert ingredients	80
(4) Storage stability test	82
(5) Production of experimental product	83
7. Toxicity test	83
(1) Toxicity test of the SH-09 culture broth	83
(2) Toxicity test of the formulation product(SH-09 30% WP)	85
(3) Toxicity test for registration of biofungicide	94
8. Development of mass culture system	94
(1) Optimization of culture method of the selected isolate	94
(2) Establishment of <i>in vitro</i> bioassay for measuring the activity of bioactive substances	96
(3) Liquid culture for industrial use	98
(4) Establishment of the optimum conditions in the scale up process	100
(5) Production of bioactive substances using industrial culture media	102
(6) Mass culture for experimental product	103
9. Bioassay test and field experiment	104
(1) Bioassay for selection of the isolate(1st year)	104
(2) Bioassay of different formulation products of the SH-09 isolate	105
(3) Field experiment using the formulation product	108
Chapter 4. Degree of accomplishment of the object	111
Chapter 5. Application plan of the results	119
Chapter 6. Reference	120

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	21
제2장 국내외 기술개발 현황	24
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	25
세부과제 : 흰가루병 방제용 유용미생물의 생물활성 검정 및 활성물질의 탐색	
1. 길항미생물의 배양 및 활성 검정	32
가. 흰가루병 생물검정법 확립	32
나. 길항미생물 균주의 기본배양법 확립	36
다. 분리균주의 흰가루병에 대한 활성검정 및 우수균주 선발	37
라. 선발균주(SH-09)의 다양한 항균활성 검정 및 작용특성 검정	47
2. 분리균주의 분류학적 특징 및 동정	51
3. SH-09균주가 생산하는 항균활성물질의 분리 및 동정	65
4. 미생물 원제(SH-09)의 물리, 화학적 특성	75
5. 포장시험	77
가. SH-09 배양물의 포장시험	77
나. SH-09 시제품의 포장시험	77
협동과제 : 환경친화형 제형화 기술개발 및 독성검정	
6. 제형연구	79
가. 활성물질의 특성 분석	79
나. 기본제형 연구	80
다. 부자재 탐색	80
라. 경시 안정성	82
마. 시제품 생산	83

7. 독성 연구	83
가. SH-09 배양액의 독성연구	83
나. SH-09 30% 수화제의 독성연구	85
다. 생물농약 등록을 위한 독성연구	94
8. 선발균주의 배양법 연구	94
가. 선발균주 배양법 최적화	94
나. 활성물질 측정용 <i>in vitro</i> 검정법 확립	96
다. 산업용 액체배양에서 포자생성여부 및 균사생존	98
라. Scale up 과정에서 최적배양조건 확립	100
마. 산업용 배지를 이용한 활성물질생산	102
바. 시제품 생산용 물질배양	102
사. Pilot scale 생산	103
9. 생물활성검정 및 포장시험	104
가. 1차년도 균주선발 활성검정	104
나. 선발된 SH-09의 제형에 따른 활성검정 : <i>in vivo</i>	105
다. 포장 시험 수행	108
제4장 목표달성도 및 관련분야에서의 기여도	111
제5장 연구개발결과의 활용계획	119
제6장 참고문헌	120

제1장 연구개발과제의 개요

흰가루병은 전 세계적으로 11,800여종의 식물에서 발생하는 것으로 보고(Broun, 1987)되고 있으며, 국내에서는 400여종의 식물에 발생하는 것으로 알려졌다(Shin, 1994). 그중에서 보리, 밀 등의 곡물류와 오이, 딸기, 토마토 등의 채소류, 사과, 포도, 배 등의 과수류, 그리고 장미, 거베라 등의 화훼류에서 흰가루병의 피해가 크다(Shin, 1994; Spencer, 1978).

특히, 국내에서 시설재배의 딸기, 오이, 가지, 및 장미 등 거의 모든 작물에서 흰가루병의 피해가 큰데 그 원인은 일조량 부족, 활기불량, 밀식재배, 질소비료 과용 등 국내 시설재배 특성상 흰가루병 발병을 극복하기 어려운 재배환경 때문이다. 시설재배 포장에서 흰가루병균은 분생포자상태로 생존이 가능하며 분생포자가 식물에 부착한 후 5~6일 후에 한 세대가 경과하여 다시 분생포자가 형성되므로 매우 빠른 시간에 병이 진전되는 병이다(Endo 1989). 흰가루병이 발생하면 식물의 광합성과 호흡이 저해되어 동화작용과 증산작용을 감소시키고 수량 감소를 초래하는데, 오이의 경우 흰가루병의 만연에 의해 20~50%의 수량 감소가 보고되었다(Bélanger et al., 1998; Verhaar et al., 1993).

흰가루병 방제를 위해서 다양한 방법이 시도되기는 했지만 현실적 방제는 살균제에 의존하고 있으며 국내에서 흰가루병 방제에 사용된 금액은 전체 살균제의 약 10%에 달하고 있다(농약공업협회, 1999). 하지만 계속되는 살균제 사용으로 흰가루병의 약제저항성이 유발되는 등 약효저하에 대한 보고(Asari et al., 1994; Erikson et al., 1998)가 계속되고 있으며 농약의 오·남용에 의한 농산물 잔류문제가 제기 되면서 환경친화적 새로운 흰가루병 방제제 개발의 필요성이 대두 되고 있다. 또한 화학농약의 경우 잔류안전성을 위하여 수확기의 일전기간 이전에는 사용을 금하고 있어 작물재배 후기에 발생하는 병에 대해서는 다른 대안이 없는 현실이다.

본 연구의 목적은 환경친화적인 흰가루병의 방제를 위하여 본 연구팀이 확보하고 있는 국내 토착미생물 중에서 흰가루병 방제효과가 우수한 균주의 분류학적 특성을 밝히고 각종 흰가루병에 대한 활성검정, 항균활성물질의 분리 및 동정, 대량배양기술개발, 제제화 기술의 개발, 독성평가, 포장시험 등을 통하여 경제성을 갖는 환경친화적인 새로운 흰가루병 방제용 생물 농약을 개발하는데 있다.

본 연구개발과제의 연구범위는 다음과 같다.

세부과제 : 흰가루병 방제용 유용미생물의 생물활성 검정 및 활성물질의 탐색

1. 길항미생물의 배양 및 활성 검정

가. 흰가루병 생물검정법 확립

나. 길항미생물 균주의 기본배양법 확립

다. 분리균주의 흰가루병에 대한 활성검정 및 우수균주 선발

라. 선발균주(SH-09)의 다양한 항균활성 검정 및 작용특성 검정

2. 분리균주의 분류학적 특징 및 동정

3. SH-09균주가 생산하는 항균활성물질의 분리 및 동정

4. 미생물 원제(SH-09)의 물리, 화학적 특성

5. 포장시험

가. SH-09 배양물의 포장시험

나. SH-09 시제품의 포장시험

협동과제 : 환경친화형 제형화 기술개발 및 독성검정

6. 제형연구

가. 활성물질의 특성 분석

- 나. 기본제형 연구
- 다. 부자재 탐색
- 라. 경시 안정성
- 마. 시제품 생산

7. 독성 연구

- 가. SH-09 배양액의 독성연구
- 나. SH-09 30% 수화제의 독성연구
- 다. 생물농약 등록을 위한 독성연구

8. 선발균주의 배양법 연구

- 가. 선발균주 배양법 최적화
- 나. 활성물질 측정용 *in vitro* 검정법 확립
- 다. 산업용 액체배양에서 포자생성여부 및 균사생존
- 라. Scale up 과정에서 최적배양조건 확립
- 마. 산업용 배지를 이용한 활성물질생산
- 바. 시제품 생산용 물질배양
- 사. Pilot scale 생산

9. 생물활성검정 및 포장시험

- 가. 1차년도 균주선발 활성검정
- 나. 선발된 SH-09의 제형에 따른 활성검정 : *in vivo*
- 다. 포장 시험 수행

제2장 국내외 기술개발 현황

흰가루병 병원균은 활물기생균으로 인공배지에서 배양이 불가능하여 배양이 가능한 주요식물병원균에 비해 스크리닝이 어려운 실정이다. 흰가루병 미생물농약으로 ECOGEN(USA)에서 중복기생균인 *Ampelomyces quisqualis*을 이용한 AQ10 제품이 개발되어 상품화되었으며 국내에서도 AQ 미생물 농약이 개발되어 실용화 단계에 있으나 중복기생균의 특성상 예방적 효과가 없으며 흰가루병균 발생과 중복기생균 발아를 위한 습도 조건이 일치하지 않는 등 안정적 효과를 기대하기 어려운 문제점이 제기되고 있다. 퇴비추출물, 식물추출물, 수용성 실리콘, 염, 세제, baking soda, 점토, 기름, 증발억제제를 이용한 흰가루병 방제가 연구되었지만 현재까지 상업화가치는 미미한 상태이다.

항생물질을 생산하여 흰가루병을 방제할 수 있다고 알려진 미생물인 *Bacillus* spp., *Tilletiopsis albescens*, *T. albescens*, *Sporothrix flocculosa*, *S. rugulosa*을 소재로 연구가 진행되고 있으며 특히 *Bacillus*를 이용한 생물농약은 상품화를 앞두고 있는 것들이 여러 건 있으나 그 방제효과에 대하여는 충분한 검토가 요구된다. 또한 국내토착균주를 이용한 생물농약의 개발이 아니고 외국도입균을 이용할 경우 국내 생태계에 미치는 영향을 고려하여야 할 것이다.

세계적으로 친환경농산물의 생산, 소비가 계속적으로 증가하는 추세이고 최근에는 중국에서도 Green food 생산을 적극 추진하고 수출산업화하고 있는 실정이다. 국내에서도 우리 농산물의 품질 경쟁력을 높이고 농가소득증대에 기여하기 위하여 정부에서는 2013년까지 화학농약 및 비료 사용량의 40% 절감을 목표로 하고 있다. 따라서 환경친화적인 생물농약의 개발에 관한 관심이 점차 높아지고 있으나 방제효과가 우수한 생물농약은 드물며 대량배양기술, 물질회수기술, 제제화기술이 개발되지 못한 상태에서 경제적인 생산이 어려운 상황이다. 최근에 *Bacillus* 및 *Ampelomyces*등을 이용한 흰가루병 방제용 생물농약의 개발에 관한 연구가 많이 시도되고 있으나 대조약제인 유기합성농약에 비하여 방제효과가 떨어지는 경우가 대부분이다. 그러나 본 연구진이 추진하고 있는 생물농약은 환경친화적이면서 유기합성농약보다 방제효과가 우수한 생물농약제품을 개발하고자 하며 이는 국내외적으로 생물농약의 개발에 획기적인 전기가 될 것으로 기대된다.

제3장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1절. 연구개발 수행 내용

세부과제 : 흰가루병 방제용 유용미생물의 생물활성검정 및 활성물질의 탐색

1. 흰가루병 생물검정법 확립

- 담배와 오이를 육묘한 후 그 잎을 공시하여 길항 미생물의 흰가루병 방제 효과를 검정할 수 있는 생물검정법을 확립하였다.
- 담배흰가루병 검정은 담배 유묘잎의 원관 검정법으로 조사하였고 오이 흰가루병 검정은 오이 떡잎 검정법으로 조사하였다.

2. 길항미생물의 기본 배양법 확립

- 공시 미생물인 SH-05균주와 SH-09균주의 높은 항균활성을 나타내는 기본 배양법을 확립하기 위하여 배지, 배양온도, 배양기간, 배양회전속도(rpm)의 영향을 조사하였다.
- SH-09균주가 생산하는 항균활성물질의 최적 생산조건을 알기 위하여 GSS 배지(soluble starch 10g, glucose 20g, soybean meal 25g, beef extract 1g, yeast extract 4g, NaCl 2g, K₂PO₄ 0.25g, CaCO₃ 2g, H₂O 1000ml, pH 7.2)를 기본 배지로 하여 배양시간별로 항생물질의 생산변화를 조사하였다. 배양 조건은 27°C, 250rpm 이었고, 균주 접종 후 매일 1ml씩 취하여 배양액의 항균활성을 오이 탄저병균에 대한 항균력으로 조사하였다. 한편 GSS배지와 유사한 항균활성을 나타내는 배지를 선별하기 위하여 modified GSS 배지(soybean meal 대신에 두유 5% 및 10% 첨가)와 MB broth 배지(starch 5g, malt ext. 1g, yeast ext. 1g, glucose 5g, N-Z-amine A 1g, H₂O 1000ml, pH 7.3)를 사용하였다.

3. 길항미생물의 각종 흰가루병에 대한 활성검정 및 우수 균주 선발

- 본 연구팀이 선발한 길항미생물인 SH-05균주와 SH-09균주를 사용하여 주요 흰가루병인 딸기 흰가루병(*Sphaerotheca aphansis*), 오이 흰가루병(*Sphaerotheca fusca*), 담배 흰가루병(*Golovinomyces cichoracearum*), 토마토 흰가루병(*Golovinomyces cichoracearum*), 구기자 흰가루병(*Arthrocladiella mougeotii*), 보리 흰가루병(*Blumeria graminis*)에 대한 항균 스펙트럼을 온실검정과 소포장 시험으로 조사하였다.
- 온실검정: 오이, 담배, 보리는 온실에서 육묘하여 흰가루병이 발생하기 시작하는 유묘를 대상으로 미생물 배양액(배양여액 및 배양균체 현탁액)의 방제 효과를 조사하였다.
- 소포장 시험: 오이, 딸기, 토마토, 구기자의 시설재배포장을 이용하여 농약 관리법상의 시험방법에 따라 흰가루병 발생 초에 공시 미생물 배양액을 경엽 살포하여 방제효과를 조사하였다.

4. 선발균주(SH-09)의 다양한 항균활성 및 작용특성조사

- 제 1년차 연구에서 오이 흰가루병, 딸기 흰가루병, 담배 흰가루병, 토마토 흰가루병, 구기자 흰가루병에 대한 우수한 방제효과를 확인 하였으며, 2년차에는 보리 흰가루병(*Blumeria graminis*)에 대한 항균활성을 in vivo 온실검정으로 조사하였다. 흰가루병균 이외에 벼 도열병균(*Magnaporthe grisea*), 사과 점무늬낙엽병(*Alternaria mali*), 토마토 잎곰팡이병균(*Cladosporium fulvum*), 오이탄저병균(*Colletotrichum lagenarium*), 포도 탄저병균(*Glomerella cingulata*), 벼 깨씨무늬병균(*Cochliobolus miyabeanus*), 오이 덩굴쪼김병균(*Fusarium oxysporum*), 토마토 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 감자 역병균(*Phytophthora infestans*) 등 9종의 식물병원진균에 대한 항균활성을 in vitro paper disk법으로 조사하였다.
- 작용특성은 SH-09 균주 배양물의 흰가루병에 대한 예방효과, 치료효과 및 약효지속효과를 조사하였다. 예방효과를 보기 위하여는 pot 재배의 오이(2~3엽기) 및 담배(4~5엽기) 식물체에 배양물을 5배 및 10배 희석하여 경엽 처리한 후 흰가루병이 발생한 온실로 옮겨서 병발생을 조사하였다. 치료효과는 흰가루병이 발생하기 시작한 2~3엽기의 오이 및 4~5엽의 담배 식물체

에 SH-09 배양물을 경엽처리하고 1주일 후에 발병도를 측정하였다. 오이 흰가루병 방제 효과의 지속성을 보기 위하여는 위의 예방 효과 검정과 같은 방법으로 처리한 후 오이 식물체를 2, 4, 6, 8, 10, 12일 간격으로 흰가루병 발병도를 조사하였다.

5. 분리균주의 분류학적 특징 및 동정

- 미생물균주의 16S rDNA 염기서열분석, 배양적 특성, 전자현미경(SEM)관찰, 생리생화학적 분석 등을 통하여 분류학적 특성을 조사하고 동정하였다.
- 방선균 SH-09 균주의 동정을 위해서는 MBA 배지(starch 5g, malt ext. 1g, yeast ext. 1g, glucose 5g, N-Z-amine A 1g, agar 15g, H₂O 1000ml, pH 7.3)에서 배양하였다. SH-09 균주의 배양적, 생리적 특성을 조사하였고, 주사전자현미경을 통한 형태적 특성을 조사하였으며, 방선균의 세포벽 구성 성분 중의 하나인 diaminopimelic acid(DAP) 이성질체를 확인하기 위하여 SH-09 균주의 세포벽 구성 성분을 분석하였다. 또한 Yeast extract-malt extract agar를 비롯한 11종의 배지에서 배양적 성질을 조사하였고, 세균 및 효모에 대한 항균활성, 효소활성, 항생제 저항성, 유기물 분해 및 질소원, 탄소원 이용성 등을 조사하였다.

SH-09 균주의 16S rDNA 염기서열분석을 통한 동정을 위하여 genomic DNA로부터 16S rDNA를 증폭하여 그 염기서열을 분석하였다. 분석된 16S rDNA의 염기서열을 NCBI GenBank의 data base와 비교하여 SH-09균주를 동정하였다.

6. 항균활성물질의 순화, 정제 및 동정

- 항균활성물질의 특성을 알아보기 위하여 물질의 용매추출성과 레진 흡착성을 조사하였다. 활성물질의 분리, 정제를 위하여 GSS 배지에서 배양한 배양여액을 Diaion HP-20 column chromatography, silica gel column chromatography, silica gel(ODS) column chromatography, TLC분석, HPLC 분석을 통하여 항균 물질을 분리하였다. 분리한 물질의 분자량을 확인하고 구조를 동정하기 위하여 MALDI/TOF/MS 분석과 ¹H-, ¹³C NMR분석을 하였다.

7. SH-09균주의 물리, 화학적 특성조사

○ SH-09균주의 온도 대한 안정성과 균주계대에 대한 안정성을 조사하였으며 활성물질의 열, pH 안정성을 조사하였다. 균주의 온도에 대한 안정성을 조사하기 위해서는 MBA 배지에서 배양한 colony를 -10, -5, 0, 10, 20, 30℃에 보관한 후 5일 간격으로 GSS배지에 접종하여 배양여부 및 항균활성을 조사하였다. 균주계대에 대한 안정성을 보기 위해서는 SH-09 균을 MBA 배지에서 1주일 간격으로 10회까지 계대를 한 후 colony를 GSS배지에 접종하여 항균활성을 조사하였다.

한편 항균활성 물질의 열, pH 안정성을 조사하기 위해서는 GSS배지에서 배양한 배양액의 pH를 2, 7, 10으로 조절한 후 100℃로 15분간 열처리하고 항균활성을 조사하였다.

8. 포장시험

○ SH-09균주 배양물의 흰가루병 방제효과를 오이 비닐하우스 포장(논산시 벌곡면 소재)을 이용하여 농약관리법상의 시험방법에 따라 수행하였다. SH-09 균주를 GSS배지에서 배양한 후 배양물을 5, 10, 20배 희석하여 흰가루병 발생 초기에 1주일 간격으로 3회 경엽살포하고 최종살포일 7일 후에 흰가루병 발병도를 조사하여 방제효과를 조사하였다.

○ 협동연구기관(경농)에서 제형화한 시제품(SH-09 30% WP)의 약효평가를 위하여 오이, 딸기, 파푸리카의 흰가루병 방제시험을 각각 농가의 비닐하우스 포장에서 실시하였다. 오이(품종: 백다다기), 딸기(품종: 장희), 파푸리카(품종: 스페셜)을 일반농가 관행재배법에 따라 재배하였고, 발병 초 7일 간격으로 3회 경엽 처리하였으며 시험구 배치는 임의 배치법 3반복으로 하였다.

협동과제 : 환경친화형 제형화 기술 개발 및 독성 검정(협동)

9. 제형화 기술 개발

가. 활성 물질의 특성 조사 분석

활성을 나타내는 물질의 기본적인 특성을 조사하고, 분석하여 제제 시 유의 점들에 대한 내용을 확인한다.

나. 기본 제형 연구

활성이 있는 물질에 대하여 가능한 제형을 검토한 후, 가장 적절한 배형으로 처방을 확립하고자 한다. 제형 검토 방법에는 액상 제형과 고상 제형에 대해 검토할 수 있다.

다. 약효증진용 부자재 탐색

먼저 약효증진이 가능한 다양한 보조제를 수배한 다음, 활성물질의 이화학적 특성과 작용상의 특징을 고려하여 적절한 부자재를 선별하였다. 선별된 부자재는 각각의 이화학적 특성을 고려하여 제조 처방을 검토하였으며 가장 물질성이 우수한 처방을 선별하여 처방 5가지를 선별하였다. 이렇게 하여 선별된 5가지 처방은 생물활성 시험을 실시하여 가장 우수한 활성을 보이는 한 가지 처방을 선별하였다.

라. 경시 안정성 시험

수화제의 저장안정성은 제품의 상품화 과정에서 필수적인 검토항목으로 실온에서 보관하여 경시적인 이화학성의 변화를 관찰하여야 하나 시간적으로 제약이 따르므로 통상은 고온에서의 단기적인 학대시험으로 대체하게 된다. 고온 학대시험은 제형화된 시료를 고온에 보관한 다음, 일정기간마다 꺼내어 물성의 변화를 관찰하여 제품의 유통조건과 유통기간을 정하게 된다.

마. 포장시험용 시제품 생산

상기시험을 통하여 선별된 처방을 이용하여 포장시험용 수화제를 생산하였다. 제조과정은 먼저 원제와 계면활성제 그리고 보조제를 혼합한 다음, 건식 분쇄기인 air mill로 분쇄하여 제조하였다. 이때 air mill의 분쇄압은 5-8 kgf/cm³이며 분쇄입도는 10 μ m이하를 기준으로 한다. 이렇게 하여 제조된 수화제는 농약관리법상의 검사항목인 수화성과 분말도를 측정하여 시험용 시료로 제공하였다.

10. 독성연구

제품에 대한 포유동물 독성시험을 위하여 급성경구독성시험, 급성경피독성시험, 급성어독성시험을 수행하였다. 시험방법은 농촌진흥청에서 고시한 독성시험 기준과 방법에 준한 시험동물에 대하여 일정기간의 순화 및 검역기간을 거쳐 준비한 다음, 시험물질을 처리하고 일정시간후 치사수, 일반중독

증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하여 독성을 평가하였다.

11. 배양기술 확립

가. 기본배양조건 확립

활성물질 생성용 배지조성으로 GSS배지 [souble starch 10g, glucose 20g, soybean meal 25g, beef extract 1, yeast extract 4g, NaCl 2g, K₂PO₄ 0.25g, CaCO 2g, H₂O 1000ml (pH7.2)]를 기본으로 배양하였다. 산소요구도 측정을 위해 shaking incubator에서 flask의 배지량 조절 및 baffle flask를 이용하여 통기량 조절을 수행했고 rpm을 조절하여 균체가 flask 안쪽표면에 붙는 현상 및 균체가 pellet으로 멎는 현상을 조절하였다.

활성물질 측정용 검정균으로 한국유전자은행에서 분양받은 탄저병균(KCTC6169)과 도열병균(KCTC6974)을 공시하였고 이 검정균들을 사용하여 고체 배지상에서 배지배양 과 seed배지를 이용한 검정을 수행하였다. 대치배양은 PDA(potato dextrose agar)에 한쪽에 검정균을 접종하고 반대쪽에 배양액, 균체 및 배양액을 처리하여 inhibition zone을 측정하였다. seed 배지는 탄저병균(KCTC6169)을 이용하여 PDA배지에서 7일간 배양하여 포자를 충분히 생성시킨 후 PDA배지에 100ml당 5ml로 희석한 1 plate(10¹²cfu/ml)의 검정균 포자액을 넣어 seed 배지를 만들었고, paper disc법을 사용하여 inhibition zone을 측정하였다. seed배지를 이용한 inhibition zone의 결과는 오이 흰가루병균의 pot 시험결과와 상관관계를 조사하여 in vitro 검정법을 확립하였다.

포자생성여부는 고체배지 plate 상에서 9~14일간 배양 후 기중균사에 형성되는 포자와 액체배양 시 형성되는 포자를 각각 광학현미경을 이용하여 x400, x1,000 배율에서 관찰하였다. 균사체 생존기간 측정은 배양액 상태로 실온에서 측정하고 배양액에서 균사체만을 회수한 후 동결건조 하여 약 3개월 후에 ISP2배지에서 cfu를 측정하여 활성을 검정하였다.

산업화 균주용 안정성 테스트는 10회 이상의 계대 배양을 수행하면서 각각의 배양에서 in vitro 검정법에 의한 활성물질 생성량을 비교하여 검정하였다.

나. Scale up 과정에서 최적배양조건 확립

Scale up 과정에 필요한 8가지 방선균 배양용 배지조성 중에 활성이 GSS와 유사한 활성을 나타내는 2가지 배지조성 GSY배지(glycerol 10g, starch 5g, yeast extract 5g in water 1L)와 GUPB배지(glucose 10g, peptone 10g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄ 0.1g in water 1L)을 이용하여 7일간 배양 후 활성물질량과 균체생성량을 측정하였다. 활성물질량의 검정은 in vitro 검정법을 사용하였고 균체생성량은 원심분리를 통해 배양액에서 균체를 분리 건조시킨 균체무게를 측정하였다. GSY배지성분을 기본으로 하여 glucoes, soytone 등 대체가 가능성이 높은 물질의 첨가량에 따른 영향을 조사하였고 산업용 원료인 CSL[*corn steep liquor*(sugar 40brix, protein 40%)], whey(protein 11%, lactose 60~65%), molasses(sugar 50%), fish meal을 사용하여 산업용 배지 사용가능성 여부를 검정하였다.

다. 시제품 생산용 물질배양

시제품 생산을 위한 시료생산은 200ml의 GSS배지를 담은 1L flask에 3일간 배양한 접종원 10ml을 접종하여 7일간 배양한 후 원심분리를 통해 불용성물질을 제거한 배양여액을 동결건조를 통해 이루어졌고 필요한 원제는 flask 배양을 반복하여 확보하였다.

12. 생물활성 검정

가. 제형에 따른 활성검정 : in vivo 시험

제형에 따른 활성검정에 사용된 시료는 처방개선 연구에서 제제검토가 된 5개의 처방 시료에 대하여 이루어졌다. 활성물질량의 측정은 in vitro 검정법에 의해 수행되었고 생물활성 시험의 오이 흰가루병에 대한 pot 시험으로 수행하여 SH-09 30%WP를 선발하였다. pot 시험의 방법으로 병원균을 접종하기 위해 3엽기의 오이(품종:백다다기)를 실험에 사용하였다. 흰가루병균은, 온실에서 오이를 성체까지 재배하며 흰가루병의 발생을 유도하며 오이잎에 형성된 흰가루병균의 분생포자를 실험에 사용하였다. 병 발생을 위해서는 분생포자가 공기전반하여 자연감염될 수 있도록 흰가루병이 발생한 오이 사이에 실험에 사용하는 오이를 배치하여 재배하였다. 약제의 처리는 예방효과를 검정하기 위해 3엽기의 오이에 SH-09 30%WP를 250, 500, 1000, 2000배로

회석하여 충분히 경엽 분무처리하였다. 처리한 오이는 1일간 온실에서 풍건한 후, 흰가루병이 발생한 오이 사이로 옮겨서 배치하고 병 발생을 조사하였다. 치료효과를 측정하기 위해서는 3엽기의 오이를 SH-09 30%WP를 처리하기 전에 흰가루병이 발생한 오이 사이에 배치하여 2일간 보관한 다음, 예방처리와 동일한 농도로 오이잎에 흐르기 직전까지 충분히 처리하였다. 병조사는 약제 처리 2주 후에 잎에 형성된 병반의 발병도를 아래와 같은 기준으로 발병 계수를 조사하였다.

$$\text{발병도} = \frac{\sum(\text{발병수} \times \text{계수})}{4N} \times 100$$

- 0 : 발병무
- 1 : 발병면적율 1-5%
- 2 : 발병면적율 5.1-20%
- 3 : 발병면적율 20.1-40%
- 4 : 발병면적율 40.1 이상%
- N : 조사엽수

나. 포장 시험 수행

실험포장은 충북 청원군의 유기농 오이하우스에서 수행 하였고 약제처리는 SH-09 30%WP를 500배로 희석하여 흰가루병의 발생 직후에 처리하였다. 이때 포장에서의 흰가루병의 발생율은 0.1%이었다. 처리한 약제는 500배로 희석한 SH-09 30%WP와 기존 시판되고 있는 미생물 제제를 동일하게 희석하여 처리하였다. 시험구 배치는 난괴법 3반복으로 설계하여 배치하였고 병조사는 온실에서와 동일한 방법으로 발병도를 조사하여 병 방제 효과를 구하였다.

제 2절. 연구개발 결과

세부과제 : 흰가루병 방제용 유용미생물의 생물활성검정 및 활성물질의 탐색

1. 길항미생물의 배양 및 활성검정

가. 흰가루병 생물검정법 확립

흰가루병균은 절대기생균(obligate parasite)으로서 인공배양이 불가능하여 in vitro활성검정을 할 수 없다. 따라서 in vivo, 생물검정법을 이용할 수밖에 없으며 흰가루병의 활성억제를 간편히 조사할 수 있는 생물검정법의 확립이 필요하다.

1) 담배 유묘 검정법

공시미생물 배양액의 농도별 흰가루병 활성을 온실에서 육묘한 담배유묘를 이용한 담배 잎 원판검정법으로 조사하였다. 즉 흰가루병이 발생한 2~4엽기의 담배(품종NC82)잎을 직경 4~5cm 원판으로 잘라 검정시료(배양액)를 살포한 후 1~2시간 풍건하여 water agar plate에 치상하고 22℃ (12시간 광조건)의 항온기에서 2~3일 배양하면서 검정시료의 항균활성(흰가루병균 사멸 여부)을 조사하였다. 검정시료인 SH-05균주는 Mueller Hinton Broth(MHB)배지에서 25℃/125rpm으로 3일간 배양하였으며 SH-09균주는 GSS배지에서 27℃/250rpm으로 5일간 배양하였다.

표1. 공시균주 배양액의 담배 흰가루병 방제효과(담배 잎 원판검정법)

균주 번호	배양액 농도 (희석비율)	병반수 ^a		방제효과(%) ^b
		처리전	처리후	
SH-05	5배 희석	75	13	83
	10배 희석	82	18	78
SH-06	5배 희석	65	31	52
	10배 희석	72	47	35
SH-09	5배 희석	86	7	92
	10배 희석	90	12	87
SH-13	5배 희석	95	53	44
	10배 희석	80	58	28
무처리		74	88	-

a 20개 담배 잎 원판의 평균병반수

b 방제효과 = $[1 - (\text{처리 후의 병반수} / \text{처리 전의 병반수})] \times 100$

담배 유묘(원판)검정의 결과 공시한 균주 중 SH-05균주와 SH-09균주의 흰가루병 방제효과가 높았다. 이 검정법은 흰가루병 활성균주의 선발 및 미생물제제의 흰가루병 방제효과 검정에 활용된 것이다.

2) 오이 유묘 검정법

온실에서 육묘한 오이 유묘의 떡잎을 이용한 검정법을 확립하였다. 즉 흰가루병이 자연발생한 오이의 떡잎을 잘라 검정시료(배양액)를 살포한 후 1~2시간 풍건하여 water agar plate에 치상하고 20℃(12시간 광)의 항온기에서 2~3일 배양하면서 검정시료의 항균 활성을 조사하였다.

한편, 검정시료의 흰가루병 예방효과를 조사하기 위하여는 건전하게 생육시킨 무병 유묘의 떡잎을 잘라 검정시료를 살포한 후 1~2시간 풍건하고 그 위에 오이 흰가루병균의 분생포자를 붓으로 도말하여 접종하고 water agar plate에 치상한 후 3~4일 후에 발병정도를 조사하였다.

표2. 공시균주 배양액의 오이 흰가루병 방제효과(오이 떡잎검정법)

균주번호	배양액 농도 (희석비율)	병반수 ^a		방제효과(%) ^b
		처리전	처리후	
SH-05	5배 희석	19	3	84
	10배 희석	20	6	70
SH-06	5배 희석	22	12	45
	10배 희석	21	13	38
SH-09	5배 희석	22	0	100
	10배 희석	24	2	92
SH-13	5배 희석	20	10	50
	10배 희석	18	12	33
무처리		22	24	-

a 떡잎 20개의 평균 병반수

b 방제효과=[1-(처리 후의 병반수/처리 전의 병반수)]×100

표3. 공시균주 배양액의 오이 흰가루병 예방효과(오이 떡잎검정법)

균주번호	배양액 농도 (희석비율)	병반수 ^a		예방효과(%) ^b
		처리전	처리후	
SH-05	5배 희석	0	4	79
	10배 희석	0	8	58
SH-09	5배 희석	0	0	100
	10배 희석	0	0	100
SH-13	5배 희석	0	16	16
	10배 희석	0	17	11
무처리		10	19	-

a 떡잎 20개의 평균 병반수

b 예방효과=[1-(처리의 병반수/처리전의 병반수)]×100



그림1. 오이 유묘 검정법

나. 길항미생물의 기본 배양법 확립

공시 균주등의 항균활성 물질 생산 최적 조건을 찾기 위한 기본배양법을 확립하기 위하여 배지, 배양온도, 배양기간, 배양회전속도(rpm)의 영향을 조사하였다.

1) 배지

SH-05균주는 세균배양배지인 Mueller Hinton Broth(Difco)배지를, SH-09균주는 방선균 배양배지인 GSS 배지를 사용하였다. GSS 조성은 soluble starch 10g, glucose 20g, soybean meal 25g, beef extract 1, yeast extract 4g, NaCl 2g, K₂PO₄ 0.25g, CaCO₃ 2g, H₂O 1000ml (pH7.2)이다.

2) 배양온도

길항세균 SH-05균주와 길항방선균 SH-09균주는 모두 25~30℃에서 배양할 경우 높은 활성을 나타내었다.

3) 배양기간

길항세균 SH-05 균주와 길항방선균 SH-09 균주는 각각 3일 이상, 5~7일간 액체 배양을 하였을 때 높은 항균활성을 나타내었다.

4) 회전속도(rpm)

길항세균 SH-05 균주와 길항방선균 SH-09 균주는 각각 100~150rpm, 250rpm으로 액체 배양을 하였을 때 높은 항균 활성을 나타내었다.

5) SH-09균주의 기본 배양법 확립 및 두유첨가의 효과

SH-09 균주가 생산하는 항균활성물질의 최적생산조건을 알아보기 위하여 500ml의 삼각플라스크에 100ml의 GSS배지를 넣고 27℃ 항온기에서 250rpm으로 shaking culture 한 후 배양시간별로 항균활성물질의 생산성의 변화를 조사하였고, 균사의 균체량(생체중)과 배지의 pH를 조사하였다 (Fig. 4).

접종 후 2일부터 매일 배양액 1ml 씩을 회수하여 배양여액과 균체를 분리한 후 배양여액의 항균활성, pH 및 균체량을 측정하였다.

그 결과 GSS 배지에서 배양시간이 지날수록 항생물질의 생산이 증가하였는데 특히 5~6일 배양한 경우 가장 높은 항균력을 나타내었다.

균체량은 배양 7일까지 계속적으로 증가하였으며 배지상의 pH도 배양 7

일까지 점차적으로 증가하였다.

항균활성물질 생산을 위한 기본배지인 GSS 배지와 유사한 활성을 나타내는 배지를 찾기 위하여 MB broth 배지와 GSS 배지 중 soybean meal 을 시판중인 두유 5%, 10%로 대체한 modified GSS 배지의 활성을 비교하였다. 그 결과 MB broth 배지는 GSS 배지에 비교하여 활성물질 생산량이 낮았으며 두유 5%~10%를 첨가한 modified GSS 배지는 GSS 배지와 유사한 활성을 나타내었다.

Modified GSS 배지는 soybean meal 대신에 두유를 첨가하기 때문에 콩가루가 없어 배양물을 균체와 배양여액으로 분리하기가 용이하며 균체의 활성을 조사하기에 용이한 배지이다.

다. 길항미생물의 각종 흰가루병에 대한 활성검정 및 우수균주 선발

1) 담배 흰가루병(*Golovinomyces cichoracearum*) 방제효과

가) SH-05균주 및 SH-09균주의 담배흰가루병 방제효과

SH-05균주 및 SH-09균주의 배양여액(culture filtrate)과 균체(Cell)현탁액을 7일 간격으로 3회 4~5엽기의 담배 잎에 살포하고 살포최종 7일 후에 방제효과를 조사하였다(온실검정). SH-05균주는 MHB 배지에서 25°C/125rpm으로 3일 배양한 후 배양액을 7000rpm으로 20 분간 원심분리하여 배양여액과 균체를 분리하였으며, SH-09균주는 GSS배지에서 27°C/250rpm으로 5일 배양한 후 배양액을 7000rpm으로 20분간 원심분리하여 배양여액과 균체를 분리하였다. SH-05균주의 경우 배양여액에서 76~82%의 방제효과를 보인 것에 비해 세균 균체만을 처리 시 방제효과가 떨어졌다. 그러나 SH-09균주의 경우 배양여액에서 89~95%, 방선균 균체만 처리 시 85~87%의 방제효과를 보여 주었다.

표4. SH-05균주, SH-09균주의 담배흰가루병 방제효과(온실검정)

균주	처리내용	발병도(%) ^a	방제가(%)
SH-05	배양여액 5배 희석액	14.5	82.3
	배양여액 10배 희석액	20.0	75.6
	배양균체 5배 희석액	57.0	30.5
	배양균체 10배 희석액	58.5	28.7
SH-09	배양여액 5배 희석액	4.5	94.5
	배양여액 10배 희석액	9.0	98.0
	배양균체 5배 희석액	10.5	87.2
	배양균체 10배 희석액	12.5	84.8
무처리		82.0	-

a 발병도 = $\frac{\sum(\text{발병수} \times \text{계수})}{4N} \times 100$

0: 발병무, 1: 병반면적율 0.1~5%, 2: 병반면적율 5.1~10%,

3: 병반면적율 10.1~20%, 4: 병반면적율 20.1%이상, N: 조사 주 수



그림2. SH-05균주의 담배흰가루병 방제효과

나) SH-05군주 및 SH-09군주의 담배흰가루병 치료 및 예방효과

SH-05군주, SH-09군주의 담배흰가루병 치료효과를 조사하기 위하여 이미 병이 발생한 담배 잎에 배양여액 및 균체 액을 살포하여 병의 사멸 및 진전을 조사하였고, 예방효과를 조사하기 위해서는 병이 발생하지 않은 담배 잎에 배양여액 및 균체액을 살포한 후 신규 병 발생여부를 조사하였다(온실검정).

SH-05군주의 경우 배양여액에서만 치료와 예방효과가 각각 82%, 88%로 높았으며 균체 현탁액의 효과는 매우 낮았다. SH-09군주의 경우 배양여액 및 균체 현탁액에서 모두 우수한 치료 및 예방효과가 있었다.

표5. SH-05군주, SH-09군주의 담배흰가루병 예방 및 치료효과

군주	처리내용 ^a	병반 수 ^b		치료효과 (%) ^c	병반 수 ^b		예방효과 (%) ^d
		처리 전	처리 후		처리 전	처리 후	
SH-05	배양여액	365	66	82	0	34	88
	배양균체	395	269	32	0	229	20
SH-09	배양여액	380	27	93	0	14	95
	배양균체	325	52	84	0	36	87
무처리		375	388	-	0	287	-

a 배양원액의 5배 희석

b 20개의 잎의 평균 병반수, 일주일 간격으로 2회 처리 7일 후 조사

c 치료효과(%)= 1-[처리 전 병반수/처리 후 병반수]×100

d 예방효과(%)= 1-[처리 일 병반수/무처리 병반수]×100

다) SH-09군주 배양여액의 농도별 담배 흰가루병 방제효과

배양여액의 농도별 흰가루병 방제효과조사는 배양여액을 건조시킨 후 물에 녹여 1000~10ppm으로 조절한 후 담배 잎에 살포하였다. 그 결과 1000ppm~500ppm에서는 100%의 높은 방제효과를 보였고 10ppm농도에서도 78%의 방제효과를 나타내었다.

표6. SH-09균 배양여액의 농도별 담배흰가루병 방제효과

농도(ppm) ^a	발병도(%) ^b	방제가(%) ^c
1000	0.0	100
500	0.0	100
100	1.7	97.2
50	3.8	93.9
10	13.7	78.0
무처리	62.3	-

a배양여액 동결건조 후 농도별로 물에 녹임

b흰가루병 발병초기의 온실 담배 잎에 농도별 시료를 7일 간격으로 3회 살포 7일 후 병반면적율을 조사하여 발병도를 산출함

c처리구와 무처리구의 발병도를 조사하여 방제가 산출

라) SH-09균주의 담배흰가루병 방제효과의 지속성

SH-09균주의 담배흰가루병 방제효과의 지속성을 조사하기 위하여 배양여액과 배양균체를 3일 간격으로 2회 담배 잎에 살포하고 3일 후, 6일 후, 9일 후에 방제효과(방제가)를 조사하였다. 배양여액 및 균체 현탁액 모두에서 처리 7일째까지 98%의 높은 방제효과를 보였고 10일째 까지도 70%, 65%의 방제효과를 보였다.

표7. SH-09균주의 담배흰가루병 방제효과의 지속성

처리 내용 ^a	발병도(방제가, %) ^b		
	3일 후	6일 후	9일 후
배양여액	0(100)	2.0(98.0)	30.0(70.0)
배양균체	0(100)	2.0(98.0)	35.0(65.0)
무처리	90(-)	100(-)	100(-)

a GSS액체배지/27°C/250rpm/5일 배양 배양여액, 균 현탁액 모두 배양원액의 5배 희석 농도

b 3일 간격으로 2회 NC82 담배 잎 표면 살포 후 발병도 조사

2) 오이흰가루병(*Sphaerotheca fusca*)방제효과

가) SH-05균주 및 SH-09균주의 오이흰가루병 방제효과

공시균주의 배양여액 및 균체 현탁액을 7일 간격으로 3회, 4엽기의 오이(품종: 은성 백다다기) 잎에 살포하고, 살포 7일 후에 방제효과를 조사하였다(온실검정).

표8. SH-05균주, SH-09균주의 오이 흰가루병 방제효과(온실검정)

균주	처리 ^a	발병도(%) ^b	방제가(%)
SH-05	배양여액 5배 희석액	15.5	80.3
	배양여액 10배 희석액	22.7	71.1
	배양균체 5배 희석액	52.6	33.0
	배양균체 10배 희석액	60.5	22.9
SH-09	배양여액 5배 희석액	5.5	93.0
	배양여액 10배 희석액	8.0	89.8
	배양여액 20배 희석액	14.0	82.2
	배양여액 30배 희석액	17.5	77.7
	배양균체 5배 희석액	6.5	91.7
	배양균체 10배 희석액	12.4	84.2
	배양균체 20배 희석액	17.0	78.3
	배양균체 30배 희석액	20.2	74.3
무처리		78.5	-

a 7일간격으로 3회 살포, 7일 후 조사

b 발병도= $\frac{\sum(\text{발병수} \times \text{계수})}{4N} \times 100$

0: 발병무, 1: 병반면적율 1~5%, 2: 병반면적율 5.1~20%,

3: 병반면적율 20.1~40%, 4: 병반면적율 40.1%이상, N: 조사 엽 수

SH-05균주의 배양여액의 경우 5배 희석액에서 80%의 방제가를 보인 반면 배양균체 처리시 방제효과가 없었다. 그러나 SH-09균주의 경우 배양여액 및 배양균체에서 모두 방제효과가 높았으며(5배 희석구에서 90%이상) 배양여액의 경우 30배 희석액에서도 78%의 방제가를 나타내었다.

나) SH-05균주 및 SH-09균주의 오이흰가루병 방제효과의 지속성

공시균주의 오이흰가루병 방제효과의 지속성을 보기 위하여 배양여액과 배양균체현탁액을 3일 간격으로 2회 오이 잎에 살포하고 3일 후, 6일 후, 9일 후에 방제효과를 조사하였다. SH-05균주의 경우 6일 후까지는 78~84%의 방제효과가 있었으나 9일 후에는 방제효과가 낮아졌다. SH-09균주의 경우 5~10배 희석액에서는 9일 후까지도 90% 이상의 높은 방제효과가 있었으나 30배 희석액에서는 9일 후의 방제 효과가 낮아졌다.

표9. SH-05균주, SH-09균주의 오이흰가루병 방제효과의 지속성

균주	처리내용 ^a	발병도(방제가%)		
		3일 후	6일 후	9일 후
SH-05 ^b	배양여액 5배 희석	12.0(84.0)	16.0(79.5)	56.0(30.0)
	배양균체 5배 희석	39.0(48.0)	50.5(35.3)	65.2(18.5)
SH-09 ^c	배양여액 5배 희석	2.0(97.3)	4.0(94.9)	4.0(95.0)
	10배 희석	3.5(95.3)	7.0(91.0)	7.5(90.6)
	20배 희석	5.5(92.7)	14.0(82.1)	24.5(69.4)
	30배 희석	8.0(89.3)	17.0(78.2)	36.0(55.0)
	배양균체 5배 희석	3.2(95.7)	7.0(91.0)	9.0(88.8)
	10배 희석	3.5(95.3)	13.0(83.3)	15.5(80.6)
	20배 희석	6.5(91.3)	17.5(77.6)	20.4(62.0)
	30배 희석	8.0(89.3)	21.0(73.1)	45.0(43.8)
무처리		75.0	78.0	80.0

a 3일간격으로 2회 살포

b MHB 배지/25℃/125rpm/3일배양

c GSS 배지/27℃/250rpm/5일배양

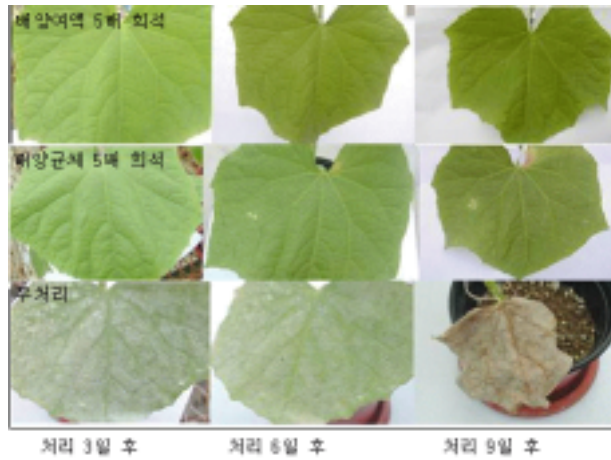


그림3. SH-09균주의 오이 흰가루병 방제효과의 지속성 실험

다) SH-05균주 및 SH-09균주의 오이흰가루병 방제효과 소포장검정

오이흰가루병이 발생하는 비닐하우스 오이포장을 이용하여 4월 9일부터 7일 간격으로 3회 미생물공시균주를 경엽살포하고 최종 약제처리 7일 후에 발병도를 조사하였다. 그 결과 SH-05균주 배양여액의 방제가 61%였고, SH-09균주는 배양여액 및 균체현탁액 모두 방제가가 80%이상으로서 대조약제인 웨나리(방제가 69%)보다 우수한 방제효과를 보여 주었다.

표10. SH-05균주, SH-09균주의 오이흰가루병 방제효과(소포장시험)

처리 ^a	발병도(%) ^b	방제가(%)
SH-05균주		
배양여액 5배 희석	26.6	61.2
배양균체 5배 희석	53.5	22.0
SH-09균주		
배양여액 5배 희석	7.6	88.9
배양균체 5배 희석	12.0	82.5
웨나리 유제 4000배	21.4	68.8
무처리	68.6	-

^a 7일 간격으로 3회처리

^b 발병도(%) = $\frac{\sum(\text{발병수} \times \text{계수})}{4N} \times 100$



그림 4. SH-05균주, SH-09균주의 오이 흰가루병 방제효과(소포장실험)

3) 딸기 흰가루병(*Sphaerotheca aphansis*) 방제효과

가) SH-05균주의 딸기 흰가루병 방제효과

배양액 5배 희석액을 온실에서 생육 중인 딸기(품종: 장희) 잎표면과 뒷면에 7일 간격으로 3회 살포하고 최종 살포 7일 후 발병율을 조사한 결과 잎 표면과 뒷면 모두에서 각각 82.6%, 83.2%의 높은 방제 효과를 보였다.

표 11. SH-05균의 딸기 흰가루병 방제 효과

처리내용 ^a	잎 표면		잎 이면	
	발병도(%)	방제가(%)	발병도(%)	방제가(%)
배양여액	7.5	82.6	10.5	83.2
무처리	43.0	-	62.5	-

^a배양액(배양여액 + 균체) 5배 희석액, 7일 간격 3회 살포

나) SH-09균주의 딸기 흰가루병 방제효과(소포장실험)

배양여액 5배 희석액과 배양균체액 5배 희석액을 농가 비닐하우스에서 생육 중인 딸기(품종: 장희)에 7일 간격으로 3회 경엽 살포하고 최종 살포 7일 후에 이병과율을 조사하였다. 그 결과 대조약제보다 높은 85%이상의 높은 방제가를 나타내었다.

표12. SH-09균주의 딸기 흰가루병 방제효과(비닐 하우스 실험)

처리 ^a	이병과율(%)	방제가(%)
배양여액	4.0	88.8
배양균체	5.5	84.7
훤나리	9.5	73.6
무처리	36.0	-

^a 7일 간격 3회 살포



그림5. Sh-09균주의 딸기 흰가루병 방제효과(소포장 실험)

4) 토마토흰가루병(*Golocinomyces cichoracearum*) 방제효과

가) SH-05균주, SH-09균주의 토마토흰가루병 방제효과

SH-05균주의 배양여액(5배 희석)과 SH-09균주의 배양여액 및 배양균체액(각각 5배 희석)을 비닐하우스에서 생육중인 토마토(품종: 꼬꼬)에 7일 간격으로 3회 경엽 살포하고 최종살포 7일 후에 발병도를 조사하였던바 SH-05균주는 75%, SH-09균주는 78~81%의 방제가를 나타내었다.

표13. SH-05균주, SH-09균주의 토마토흰가루병 방제효과(비닐하우스실험)

처리	발병도(%)	방제가(%)
SH-05 배양여액	12.5	75.0
SH-09 배양여액	9.0	81.3
배양균체	10.5	78.1
무처리	48.0	-



그림6. SH-05균주, SH-09균주의 토마토흰가루병 방제효과(소포장 실험)

5) 구기자흰가루병(*Arthrocladiella mougeotii*) 방제효과

가) SH-05균주, SH-09균주의 구기자흰가루병 방제효과(소포장 실험)

공시균주 중 SH-05균주는 배양액(배양여액 + 균체)을 3배 희석하였고 SH-09균주는 배양액을 5배, 10배로 희석하여 비닐하우스에서 재배 중인 구기자(품종: 청양 재래종)에 7일 간격으로 3회 경엽살포하였고 최종 살포 7일 후에 방제효과를 조사하였다. SH-05균주 처리구의 방제가는 74%였고, SH-09 균주의 방제가는 80%이상으로 우수하였다.

표14. SH-05균주, Sh-09균주의 구기자흰가루병 방제효과(소포장실험)

처리 ^a	발병도(%)	방제가(%)
SH-05균주		
배양액 3배 희석액	16.8	74.4
SH-09균주		
배양액 5배 희석액	10.8	83.5
배양액 10배 희석액	12.8	80.5
무처리	65.5	-

^a 7일 간격으로 3회 처리



그림7. SH-05, SH-09균주의 구기자 흰가루병 방제효과(소포장 실험)

라. 선발균주(SH-09)의 다양한 항균활성 및 작용특성 조사

1) 보리 흰가루병(*Blumeria garminis*) 방제효과

SH-09 균주를 modified GSS(1) 배지에서 배양한 후 배양여액과 배양균체를 각각 5배, 10배 희석하여 흰가루병이 발생하는 온실에서 보리(품종:올보리)에 7일간격으로 3회 경엽살포하고 최종살포 7일 후에 발병도를 조사하였다. 그 결과 배양여액의 경우 대조 약제(77%)보다 우수한 82~87%의 방제가를 나타내었으며 균체도 78~85%의 방제가를 나타내었다.

SH-09 균주는 지난해 제 1차년도 실험 결과 오이, 담배, 토마토, 딸기, 구기자 흰가루병에 대한 우수한 방제효과를 확인한 바 있고 본 연구 결과 보리 흰가루병에 대하여도 우수한 방제효과를 보임으로서 공시한 모든 흰가루병의 방제제로 개발할 수 있음을 확인하였다.

표15. SH-09 균주의 보리흰가루병 방제효과

처 리		발병도(%) ^a	방제가(%)
배양여액	5배 희석	7.5	86.7
	10배 희석	10.2	81.9
배양균체	5배 희석	8.5	85.0
	10배 희석	12.5	77.8
대조약제 (훼나리)		13.2	76.7
무처리		56.5	

^a 발병도 = $\frac{\sum(\text{발병수} \times \text{개체수})}{4N} \times 100$

0: 발병무, 1: 병반면적율 0.1~5%, 2: 병반면적율 5.1~10%

3: 병반면적율 10.1~20%, 4: 병반면적율 20.1% 이상 N: 조사주수

2) 흰가루병균 이외의 식물병원성 진균에 대한 항균활성 검증

SH-09균주의 흰가루병균 이외의 식물병원성 진균에 대한 항균활성을 paper disk 법으로 조사하였다. 즉 배양여액을 5~20배까지 희석한 후 멸균된 paper disk(직경 8mm)에 흡수시켜 풍건하고 검정용 plate에 치상하여 배양하면서 저지환 유무 및 저지환의 크기를 측정하였다. 검정균용 plate는 중층법으로 제작하였다. 즉 검정용 진균류는 PDA에 전 배양한 후 세포마쇄기로 갈아 PDA plate에 증충하여 검정용 plate를 만들었다. 참고로 세균에 대한 항균활성을 조사하였는데 공시 세균을 MH broth에 전배양한 후 전배양액을 MHA와 혼합하여 MH plate에 증충한 후 검정용 plate로 사용하였다.

본 연구결과 SH-09는 벼도열병균, 토마토잎곰팡이병균, 오이탄저병균, 오이덩굴쫄김병균, 사과점무늬낙엽병균, 벼깨씨무늬병균, 포도탄저병균등에 균사생육억제 효과를 보였으나 Gram 양성, 음성 세균에는 활성을 보이지 않았고 토마토갯빛곰팡이병균, 감자역병균에는 매우 약한 활성을 보였다(표16.). 또한 저지환내의 검정균을 현미경으로 관찰시 균사 팽윤현상(swelling)이 관찰되어(그림8.) 본 균의 항균활성이 세포벽 합성 저해임을 나타내었다.

표16. SH-09 균주의 항균활성 스펙트럼

검정균	항균 활성 (배양여액, mm) ^a			
	원액	5배희석	10배희석	20배희석
벼도열병균 (<i>Marnaporthe grisea</i>)	15	18	15	10
토마토잎곰팡이병균 (<i>Cladosporium fulvum</i>)	18	10	0	0
오이탄저병균 (<i>Colletotrichum lagenarium</i>)	27	20	17	14
오이덩굴썩김병균 (<i>Fusarium oxysporum</i>)	22	17	13	9
사과점무늬낙엽병 (<i>Alternaria mali</i>)	15	9	0	0
벼깨씨무늬병균 (<i>Cochliobolus miyabeanus</i>)	24	18	14	9
포도탄저병균 (<i>Glomerella cingulata</i>)	23	15	9	0
토마토갯빛곰팡이병균 (<i>Botrytis cinerea</i>)	12	0	0	0
감자역병균 (<i>Phytophthora infestans</i>)	15	0	0	0
그람양성균 (<i>Bacillus subtilis</i>)	0	0	0	0
그람음성균 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	0	0	0	0

^a paper disk 법



그림8. SH-09 균주의 배양여액에 의한 오이 탄저병균의 균사 팽윤현상

3) SH-09 균주의 작용특성(예방효과, 치료효과, 약효지속효과)

오이 및 담배를 이용한 온실 실험으로 SH-09균주의 흰가루병 예방효과와 치료효과 및 약효지속성을 조사하였다.

배양액 5배 및 10배 희석액을 처리한 경우 오이 및 담배에서 예방효과와 치료효과가 우수하였다. 오이흰가루병(*Sphaerotheca fusca*)의 경우 예방효과는 88~94%, 치료효과는 82~89%를 보여 주었고, 담배흰가루병(*Golovinomyces cichoracearum*)의 경우 예방처리는 89~96%의 방제효과, 치료 처리는 86~93%의 방제효과가 있었다.(표17.)

표17. SH-09 균주 배양액의 오이 및 담배 흰가루병 예방 및 치료효과

기주	처리내용	예방 효과		치료 효과	
		발병도(%)	방제가(%)	발병도(%)	방제가(%)
오이	배양액 5배 희석액	4.2	94.0	9.0	89.4
	배양액 10배 희석액	6.5	90.0	11.2	84.4
	무처리	70.5		72.0	
담배	배양액 5배 희석액	2.5	96.2	4.5	93.3
	배양액 10배 희석액	5.0	92.3	7.2	89.3
	무처리	65		67.0	

^a 발병도 = $\frac{\sum(\text{발병수} \times \text{계체수})}{4N} \times 100$

0: 발병무, 1: 병반면적율 0.1~5%, 2: 병반면적율 5.1~10%

3: 병반면적율 10.1~20%, 4: 병반면적율 20.1% 이상, N: 조사주수

SH-09 균주의 오이 흰가루병 방제효과의 지속성을 조사기 위하여 배양여액을 2~3엽기의 오이에 경엽처리하고 흰가루병이 발생한 오이 온실로 옮겨 2일 간격으로 병 발생상을 조사하였다. 그 결과 배양액 실패 후 6일까지는 병 발생이 거의 없었으나 8일째부터 흰가루병이 발생하였으며, 점차 증가하였다(표 18). 따라서 SH-09균주의 배양액의 살포간격은 일반농약과 같이 1주일 간격의 살포로 병발생을 충분히 방제 할 수 있으며 합리적인 제형화의 개발로 지속성을 늘린다면 살포간격을 늘릴 수도 있을 것이다.

표18. SH-09 균주의 오이 흰가루병 방제효과의 지속성

처리내용	발병도(방제가 %)					
	2일 후	4일 후	6일 후	8일 후	10일 후	12일 후
배양여액 5배 희석	-	0 (100)	2.2 (96.7)	12.0 (82.9)	38.0 (50.3)	60.5 (24.6)
10배 희석	-	0.8 (97.7)	6.4 (90.3)	20.5 (70.7)	47.5 (37.9)	72.0 (10.2)
무처리	-	35.0	66.5	70.0	76.5	80.2

^a 발병도 = $\frac{\sum(\text{발병수} \times \text{계체수})}{4N} \times 100$

0: 발병무, 1: 병반면적율 0.1~5%, 2: 병반면적율 5.1~10%

3: 병반면적율 10.1~20%, 4: 병반면적율 20.1% 이상, N: 조사주수

2. 분리균주의 분류학적 특징 및 동정

가. 길항세균(SH-05균주)의 동정

자생 식물체 잎으로부터 순수 분리한 SH-05 균은 16S rDNA 유전자의 Sequence를 rRNA 이차구조를 참고하여 alignment 하여 얻은 Similarity 값을 토대로 균 동정한 결과 16S rDNA partial sequence 분석 결과 수준에서 SH-05 균은 *Burkholderia* 속에 속하는 세균으로 판명되었다. 정확한 종의 동정은 similarity 값이 97%이상되는 10종의 strain과 DNA-DNA hybridization을 시행하고 similarity 값을 구한 후 결정될 것이다.

○ 결정된 염기서열의 개수: 725 bp.

○ 결정된 염기서열:

```
CGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTT
GCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCC
TGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGATCT
ACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGAT
GGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGT
AGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCT
GATCCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACT
TTTGTCGGAAAGAAATCCTGAGGGCTAATATCCTTCGGGGATGACGGTA
CCGGAAGAATAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACG
TAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCG
GTTTGTAAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATT
GGTGACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCCACGTGTA
GCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCC
CCTGGGCCAATACTGACGCTCATGC
```

표19. Similarity 분석결과

<i>Burkholderia gladioli</i> ATCC 10248T	X67038	100.00	0/722
<i>Burkholderia plantarii</i> LMG 9035TT	U96933	99.44	4/708
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196T	U96931	99.43	4/707
<i>Burkholderia stabilis</i> LMG 14294T	AF148554	98.34	12/723
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> LMG 14191T	U96930	98.28	12/696
<i>Burkholderia ubonensis</i> GTC-P3-415T	AB030584	98.27	12/695
<i>Burkholderia ambifaria</i> LMG 19182T	AF043302	98.19	13/719
<i>Burkholderia multivorans</i> LMG 13010T	Y18703	98.07	14/725
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG 10929T	AF097534	97.93	15/725
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416T	M22518	97.32	19/710
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1026bT	U91839	96.68	24/723
<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344T	AF110188	96.54	25/723

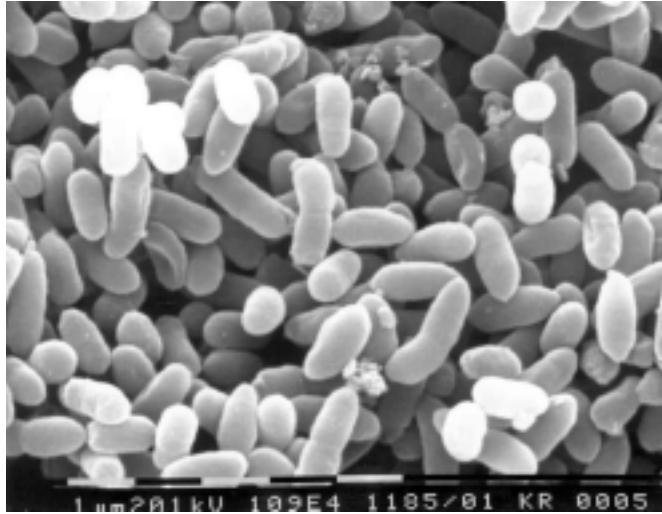


그림9. *Burkholderia* sp. SH-05균주의 SEM 사진

나. 길항방선균(SH-09균주)의 동정

선발균주 SH-09의 동정을 위하여 배양적, 생리적 특성을 조사하였고, 세포벽 구성 성분을 분석하였으며 주사전자현미경을 통한 형태적 특성을 조사하였고 16S rDNA의 염기서열을 분석하였다.

SH-09 균주를 MBA 배지에서 배양 시 기중균사 및 기질균사를 생성하는 방선균의 특징을 갖고 있으며 Gram 양성을 나타내었다. 기질균사는 특별한 색을 보이지 않았고 포자를 형성하였다. 포자는 회색이었고 포자 사슬은 나선형(spirales)으로 연결되었으며(표20.) Pepton/yeast/iron agar 배지와 tyrosine agar 배지에서 melanin을 형성하였다.(표21.) 전자현미경으로 관찰한 포자포면의 형태는 그림1과 같이 돌기가 있었다.

세포벽 성분중의 하나인 diaminopimelic acid(DAP) 이성질체를 확인하기 위하여 SH-09 균주의 세포벽 구성성분을 분석한 결과 LL-DAP를 함유하였으며 Trypton yeast extract broth에서 melanoid 색소를 형성하였다. (표 22)

Æ20. Morphological characteristics of *Streptomyces* sp. SH09

Characteristics	<i>Streptomyces</i> sp. SH09
Presence of spores (aerial mycelium)	+
Spore chain morphology :	
<i>Rectiflexibiles</i>	-
<i>Retinaculiaperti</i>	-
<i>Spirales</i>	+
<i>Verticillati</i>	-
Spore chain ornamentation :	
Smooth	-
Warty	-
Spiny	+
Hairy	-
Rugose	-
Production of aerial spore mass	+

Æ21. Cultural and physiological characteristics of *Streptomyces* sp. SH09

Characteristics	<i>Streptomyces</i> sp. SH09
Color of spore mass :	
Red	–
Yellow	–
Gray	+
Green	–
Blue	–
Violet	–
White	–
No distinctive substrate mycelial pigments	+
Pigmentation of substrate mycelium :	
Red/orange	–
Green	–
Blue	–
Violet	–
Production of diffusible pigments	–
Pigmentation of diffusible pigments :	
Red/orange	–
Yellow/brown	–
Green	–
Blue	–
Violet	–
Sensitivity of substrate pigment to pH	–
Sensitivity of diffusible pigment to pH	–
Melanin production on peptone/yeast/iron agar	+
Melanin production on tyrosine agar	+
Fragmentation of mycelium	–
Sclerotia formation	–
Sporulation on substrate mycelium	–



그림10. SH-90균 포자의 전자현미경 사진

생장 최적 온도는 27-35°C였으며 10°C 이하 또는 50°C 이상에서는 생장하지 못하였다(표23). Yeast extract-malt extract agar를 비롯한 11종의 배지에서 SH-09 균주의 배양적 특성을 조사한 결과는 표24에서 보는 바와 같다

표22. Other physiological characteristics of *Streptomyces* sp. SH09

Characteristics	<i>Streptomyces</i> sp. SH09
Cell wall composition	LL-DAP
Gram staining	+
Sporangium and motile spore	-
Melanoid pigment production in Trypton-yeast ext. broth(ISP No.1)	+
Gelatin liquefaction	
Glucose-peptone gelatin(27°C)	+
Gelatin(27°C)	+
Skim milk(27°C & 37°C)	
Coagulation	-
Peptonization	-
Cellulose decomposition	-
Optimum temperature for growth	27~35°C

㉔23. Growth of *Streptomyces* sp. SH09 at different temperatures and pH 4.3

Characteristics	<i>Streptomyces</i> sp. SH09
4°C	–
10°C	–
37°C	+
45°C	+
pH 4.3	+

㉔24. Cultural characteristics of *Streptomyces* sp. SH09

Medium	Growth	Spore mass color*	R. S.**	S. P.***
Yeast ext.–malt ext. agar (ISP No. 2)	good	I.gray(264)	d.y.Br(78)	I.y.Br(76)
Oat meal agar (ISP No. 3)	good	I.gray(264)	I.y.Br(76)	I.y.Br(76)
Inorganic salts–starch agar (ISP No.4)	moderate	I.gray(264)	m.Y(87)	none
Glycerol–asparagine agar (ISP No.5)	moderate	I.br.gy(63)	I.gy.Br(60)	none
Peptone–yeast ext. iron agar (ISP No.6)	poor	none	I.br.gy(63)	m.y.Br(77)
Tyrosine agar (ISP No.7)	good	I.br.gy(63)	d.gy.Br(62)	m.y.Br(77)
Sucrose–nitrate agar	moderate	I.y.Br(76)	y.white(92)	none
Glucose–asparagine agar	moderate	none	y.white(92)	none
Nutrient agar	poor	none	I.y.Br(76)	none
Bennett's agar	good	I.gray(264)	d.y.Br(78)	I.y.Br(76)
Starch agar	moderate	y.white(92)	y.white(92)	none

*Color name was assigned according to ISCC–NBS Centroid Color Charts

Reverse side color, *Soluble pigment

SH-09 균주는 *Bacillus subtilis*를 비롯한 4종의 세균, *Candida albicans*를 비롯한 2종의 효모균에 대해 항균활성을 보이지 않았으며(표25), 효소활성 측정결과 pectin과 hippurate를 가수분해하였고 β -lactamase를 생성하였다. (표26).

표25. Antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. SH09

Test microorganism	<i>Streptomyces</i> sp. SH09
<i>Bacillus subtilis</i> IAM 1069	—
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IAM 1201	—
<i>Escherichia coli</i> AB 1157	—
<i>Micrococcus luteus</i> JCM 1464	—
<i>Candida albicans</i> IFO 6258	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 1008	—
<i>Streptomyces murinus</i> JCM 4333	—
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	—

표26. Enzyme activity of *Streptomyces* sp. SH09

Enzyme	<i>Streptomyces</i> sp. SH09
Lecithinase	—
Proteolysis	—
Lypolysis	—
Pectin hydrolysis	+
Chitin hydrolysis	—
H ₂ S production	+
Hippurate hydrolysis	+
β -Lactamase production on YPG agar	+
β -Lactamase production on Beecham's FS agar	+
Production of <i>Klebsiella</i> β -Lactamase inhibitor	—

한편 SH-09균주의 유기물 분해(표27), 항생제 저항성(표28), 화학억제제 (chemical inhibitors) 존재하에서의 생육억제 여부(표29), 질소원 및 탄소원 이용성 여부(표30, 표31)를 조사하였다.

표27. Degradation of organic compounds by *Streptomyces* sp. SH09

Organic compound	<i>Streptomyces</i> sp. SH09
Hypoxanthine	+
Guanine	-
Elastin	-
L-Tyrosine	-
Adenine	+
Xanthine	-
DNA	+
RNA	+
Tween-80	+
Starch	+
Xylan	-
Casein	-
Testosterone	-
Urea	+
Allantoin	-
Gelatin	+
Aesculin	+
Arbutin	+

표28. Resistance of *Streptomyces* sp. SH09 to antibiotics

Antibiotic($\mu\text{g}/\text{ml}$)	<i>Streptomyces</i> sp. SH09
Gentamicin (100)	-
Neomycin (50)	+
Streptomycin (100)	-
Tobramycin (50)	+
Rifampicin (50)	-
Cephaloridin (100)	+
Vancomycin (50)	-
Demethylchlorotetracycline (500)	+
Oleandomycin (100)	-
Lincomycin (100)	+
penicillin G (10 i. u.)	+

Æ29. Growth of *Streptomyces* sp. SH09 in the presence of chemical inhibitors

Chemical inhibitor (% w/v)	<i>Streptomyces</i> sp. SH09
Sodium chloride (4)	+
Sodium chloride (7)	+
Sodium chloride (10)	–
Sodium chloride (13)	–
Sodium azide (0.01)	+
Sodium azide (0.02)	–
Phenylethanol (0.1)	+
Phenylethanol (0.3)	–
Phenol (0.1)	+
Potassium tellurite (0.001)	+
Potassium tellurite (0.01)	+
Thallos acetate (0.001)	–
Thallos acetate (0.01)	–
Crystal violet (0.0001)	+

Æ30. Growth of *Streptomyces* sp. SH09 on sole nitrogen source

Nitrogen source (0.1 % w/v)	<i>Streptomyces</i> sp. SH09
DL- α -Amino-n-butyric acid	+
Potassium nitrate	+
L-Cysteine	+
L-Valine	+
L-Threonine	+
L-Serine	+
L-Phenylalanine	+
L-Methionine	+
L-Histidine	+
L-Arginine	+
L-Hydroxyproline	+

표31. Growth of *Streptomyces* sp. SH09 on sole carbon source.

Carbon source (1.0 % w/v)	<i>Streptomyces</i> sp. SH09
L-Arabinose	+
Sucrose	+
D-Xylose	+
meso-Inositol	+
mannitol	+
D-Fructose	+
L-Rhamnose	+
Raffinose	+
D-Melezitose	-
D-Mannose	+
D-Lactose	+
Inulin	+
Adonitol	-
Salicin	-
Trehalose	+
D-Melibiose	+
Dextran	-
D-Galactose	+
Cellobiose	+
Xylitol	-
Sodium acetate (0.1% w/v)	+
Sodium citrate (0.1% w/v)	-
Sodium malonate (0.1% w/v)	-
Sodium propionate (0.1% w/v)	+
Sodium pyruvate (0.1% w/v)	+

이상이 균 특성을 분석한 결과 SH-09균주는 방선균 *Streptomyces* sp. 임
이 확인되었으며 종의 동정을 위하여 16s rDNA 염기서열 분석을 실시하였
다.

SH-09 균주의 16S rDNA 염기서열분석을 통한 종의 동정을 위하여
genomic DNA로부터 16S rDNA를 증폭하여 그 염기서열을 분석하였고(그

림 11) 분석된 염기서열을 NCBI GenBank의 database와 비교하였다. Clustal 방법에 의하여 결정된 계통수(Phylogenetic tree)는 SH-09 균주가 *Stretomyces thermoviolaceus* 및 *S. thermocoprophilus*와 유사한 군임을 보여주고 있다(그림 12).

SH-09 균주의 16S rDNA 염기서열 693개중 676개가 *S. thermoviolaceus* subsp. *apinges* DSM 41312T(EMBL/ GenBank accession number: Z68095)와 일치하여 두 균주간의 염기서열 유사도가 97.55%였으며, *S. thermoviolaceus* subsp. *thermoviolaceus* DSM 40443(EMBL/ GenBank accession number: Z68096)와는 669개가 일치하여 염기서열 유사도가 96.54%였고, *S. thermocoprophilus* DSM41700T와는 672개가 일치하여 염기서열 유사도가 96.97%인 것으로 나타났다(표32.).

```
AAGTTTCTTGGGGGGGATTAGTGGCGAAGCGGTGAGTAACACATGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACA
AGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACTCAGGACCGCATGGTCTCTGGGTGGAAAGCTCCGGCGGTG
CAGGATGAGCCCGGGCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGAGGGTAGCCGGCCTG
AGAGGGCGACCGGGCACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA
CAATGGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGAAGCGCGGTGAGGGATGACGGCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAG
GGAAGAAGCGAAAGTGAACGGTACCTGCAGAAAGAAGCGCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGT
AGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTCCGGTGGGTTGTGAAAGC
CCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTGGATAACGGGCGAGGCTAAATTTGGGTAGGGGAAATCGGAATTCCTGGT
GTACDDGTGAAATGCCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTTTGGGGCGGATACTGACCCCT
GAAGAGCCAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATT
```

그림11. SH09균의 16S rDNA 유전자분석에 의한 염기서열

SH-09 균주의 16S rDNA 염기서열 693개중 676개가 *S. thermoviolaceus* subsp. *apinges* DSM 41312T(EMBL/ GenBank accession number: Z68095)와 일치하여 두 균주간의 염기서열 유사도가 97.55%였으며, *S. thermoviolaceus* subsp. *thermoviolaceus* DSM 40443(EMBL/ GenBank accession number: Z68096)와는 669개가 일치하여 염기서열 유사도가 96.54%였고, *S. thermocoprophilus* DSM41700T와는 672개가 일치하여 염기서열 유사도가 96.97%인 것으로 나타났다(표32.).

이상의 균특성과 16S rDNA 염기서열분석을 결과로 SH-09 균주는 *S.*

thermoviolaceus 및 *S. thermocrophilus* 와 매우 유사하지만 이들과 구별되는 다른 종으로서 신종으로 판단되었으며 이 균주를 *Streptomyces* sp. SH-09로 잠정적으로 명명하였고, 신종의 명명작업은 진행 중이다.

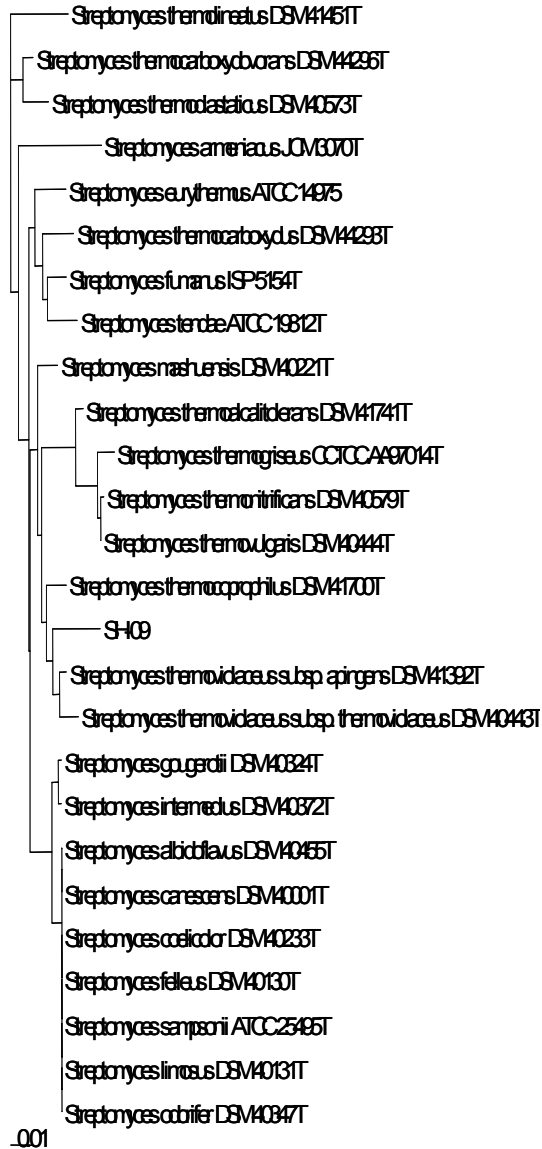


그림12. Phylogenetic position of SH-09 isolate within the genus *Streptomyces*.

32. Levels of 16S rDNA sequence similarity between SH-09 isolate and other species of the genus *Streptomyces*.

organism	% Similarity with																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1 Stm. armen	100																										
2 Stm. thmli	93.91	100																									
3 Stm. thcdv	95.09	96.52	100																								
4 Stm. thmdi	93.78	95.79	98.41	100																							
5 Stm. eury	93.76	95.49	97.10	96.67	100																						
6 Stm. thcds	93.62	95.94	96.96	95.80	96.51	100																					
7 Stm. mashu	94.66	95.07	96.39	95.80	97.10	96.67	100																				
8 Stm. thakt	93.64	94.62	96.53	95.80	95.65	95.65	96.96	100																			
9 Stm. thgri	92.73	92.85	95.24	94.44	64.27	93.95	95.72	97.78	100																		
10 Stm. thmni	93.08	93.33	95.51	94.78	94.63	94.78	96.10	98.55	99.05	100																	
11 Stm. thmvu	93.23	93.48	95.66	94.93	94.78	94.92	96.24	98.70	99.05	99.86	100																
12 Stm. thmco ^a	94.80	94.78	96.67	96.09	96.66	95.79	98.12	96.96	95.40	96.09	96.24	100															
13 Stm. thmva ^b	94.66	95.94	97.83	97.11	96.66	96.67	97.55	97.54	95.72	96.53	96.68	98.27	100														
14 SH-09	93.07	93.77	95.66	94.93	95.36	95.07	96.39	95.80	93.98	95.09	95.23	96.97	97.55	100													
15 Stm. thmvt ^c	94.23	95.08	98.41	97.68	96.81	96.81	96.97	96.96	94.93	95.95	96.10	97.11	98.85	96.54	100												
16 Stm. gouge	94.93	95.65	97.10	96.37	96.95	96.81	97.10	96.08	94.91	95.7	95.22	96.66	97.39	95.51	96.38	100											
17 Stm. inter	95.22	95.51	96.95	96.23	95.80	96.95	97.25	95.78	94.75	95.07	95.22	96.66	97.39	95.80	96.38	99.71	100										
18 Stm. albid	94.51	95.07	96.38	95.94	96.95	96.52	97.40	96.23	95.25	95.52	95.66	97.11	96.68	95.52	95.81	99.13	99.13	100									
19 Stm. canes	94.51	95.07	96.38	95.94	96.95	96.52	97.40	96.23	95.25	95.52	95.66	97.11	96.68	95.52	95.81	99.13	99.13	100	100								
20 Stm. coeli	94.51	95.07	96.38	95.94	96.95	96.52	97.40	96.23	95.25	95.52	95.66	97.11	96.68	95.52	95.81	99.13	99.13	100	100	100							
21 Stm. felle	94.51	95.07	96.38	95.94	96.95	96.52	97.40	96.23	95.25	95.52	95.66	97.11	96.68	95.52	95.81	99.13	99.13	100	100	100	100						
22 Stm. samps	94.51	95.07	96.38	95.94	96.95	96.52	97.40	96.23	95.25	95.52	95.66	97.11	96.68	95.52	95.81	99.13	99.13	100	100	100	100	100					
23 Stm. limosu	94.51	95.07	96.38	95.94	96.95	96.52	97.40	96.23	95.25	95.52	95.66	97.11	96.68	95.52	95.81	99.13	99.13	100	100	100	100	100	100				
24 Stm. odori	94.51	95.07	96.38	95.94	96.95	96.52	97.40	96.23	95.25	95.52	95.66	97.11	96.68	95.52	95.81	99.13	99.13	100	100	100	100	100	100	100			
25 Stm. fuman	93.91	95.22	97.24	96.52	97.53	97.53	97.25	96.08	94.91	94.93	95.07	96.52	96.52	95.36	96.81	96.38	96.52	96.96	96.96	96.96	96.96	96.96	96.96	96.96	96.96	100	
26 Stm. tned	93.03	94.91	96.66	95.65	97.23	97.10	96.66	95.64	94.1	94.33	94.48	95.93	96.08	94.63	96.66	96.22	96.08	96.51	96.51	96.51	96.51	96.51	96.51	96.51	96.51	97.82	100

^a *Streptomyces thermocoprophilus*, ^b *S. thermoviolaceus* subsp. *apinges*, ^c *S. thermoviolaceus* subsp. *thermoviolaceus*

3. 길항미생물이 생산하는 항균활성물질의 순화, 정제 및 동정

가. SH-05균주가 생산하는 활성물질

SH-05균이 생산하는 활성물질의 정제를 위한 기초실험으로 HP-20 레진에 대한 흡착성을 조사하였다. 각각의 크로마토그래피 분획으로 흰가루병 방제 효과를 조사한 결과 양 활성 모두 pass, wash 분획에서 확인되어 수용성의 물질로 추정되었다. 또한 배양여액을 에탄올 처리하여 침전물의 활성을 확인하였다. 항 바이러스 활성이 흰가루병 활성 분획과 일치하여 활성물질 정제 시 지표활성으로 활용이 가능 할 것으로 추정되었으며(표 33) 에탄올에 침전되지 않는 것으로 보아 고분자 화합물이 아닐 것으로 추정되었다(표 34).

표33. SH-05균 배양여액의 HP-20 컬럼 크로마토그래피 분획 활성

처리 내용 ^a	TMV감염억제 효과(%) ^b	흰가루병 방제효과(%) ^c
Pass	80↑	89.5
Wash	95↑	27.2
30%Me	0	0
50%Me	0	0
70%An	0	0
대조구(tap water)	0	0

^a각 분획 농축하여 용매 제거 후 배양액 2배 희석 농도로 처리

^bX-nc 담배 잎에 반엽법으로 처리

^c7일 간격으로 3회 살포, 최종 살포 7일 후 발병율과 방제효과 조사

표34. SH-05균 배양여액 에탄올 침전물의 흰가루병 방제효과

분 획 ^a	발병 율(%)	방제효과(%) ^b
에탄올 침전 시 상징액	3.57	95.8
에탄올 침전물(수용성)	55.3	35.4
에탄올 침전물(난용성)	82.1	0.04
수돗물	85.7	-

^a모든 처리 분획은 감압농축하여 용매 제거 후 원 배양액의 5배 희석 농도로 처리

^b흰가루병의 발병도를 조사하여 발병율과 방제효과 산출

제제화 시험에 필요한 조정제물을 확보하기 위한 활성성분의 정제는 그림 13의 방법으로 수행하였다. 각 단계별 활성 분획은 흰가루병 방제효과로 확

인하였으며 배양액 5배 희석농도에서 조사하였다. 정제물의 농도별 흰가루병 활성은 담배 잎 원판 검정법으로 조사하였다. 즉 흰가루병이 발생한 담배 잎을 직경 5-6cm 원판으로 만들어 검정시료를 살포한 후 풍건하여 water agar plate에 치상하고 22°C/12시간 광 조건의 배양기에 배양하면서 활성을 확인하였다.

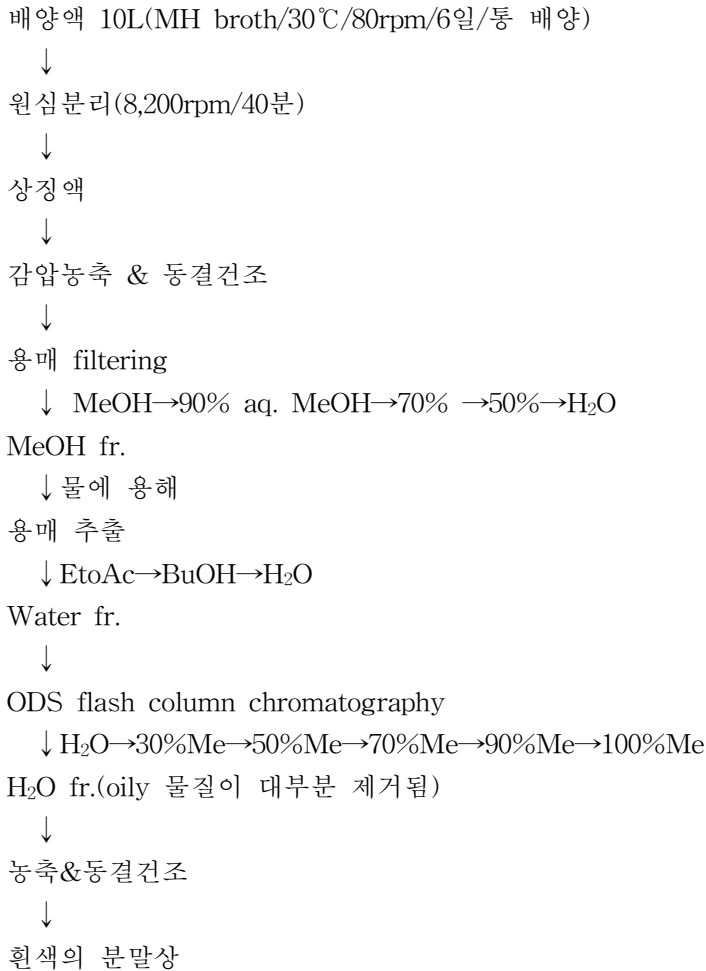


그림13. SH-05 균 흰가루병 활성 물질의 분리·정제

나. SH-09균주가 생산하는 항균활성물질의 분리 및 동정

SH-09 균주가 생산하는 항진균물질의 분리, 정제를 위하여 우선 물질의 용매 추출성과 레진흡착성을 조사하였다. 그 결과 항균물질은 buthanol과 같은

극성이 강한 용매에 추출되었고, 양이온교환수지에 흡착되었다(표35).

표35. SH-09 균이 생산하는 항균물질의 용매 추출성과 레진 흡착성

처리내용	항균활성 (저지환, mm) ^a	흰가루병 방제활성 ^b
용매추출성		
Ethyl acetate	0	-
butanol	27	+
레진 흡착성		
양이온교환수지	27	+
음이온교환수지	0	-

^a paper disk 법 (벼 도열병균)

^b 담배잎 원판검정법

따라서 이 물질은 극성이 비교적 강한 지용성화합물로 흡착성 레진을 사용하여 정제가 가능하였다(Fig 14). 즉 GSS배지로 5일간 배양(27°C/220rpm)한 배양액을 8,000rpm으로 30분간 원심분리하여 배양여액과 균체로 분리하였다. 균체 내의 항균물질은 70% 함수 아세톤을 24시간 처리하여 추출하고 이를 농축하여 유리 컬럼에 통과시키고 레진에 흡착된 항균물질을 70% 함수아세톤으로 용출하였다. 용출액은 감압 농축하여 용매를 제거한 후 동결건조 하였으며 건조물을 클로로포름-메탄올(10:1)에 현탁시킨 후 silica gel column chromatography 하였다. 전개용매로는 클로로포름-메탄올-물을 10:1:0~1:1:0.3까지 용매계의 극성을 점차 높이면서 사용하였으며, 도열병균에 대한 항균활성조사 결과 활성물질은 클로로포름-메탄올-물(10:1:0.1~0.2)에서 대부분 용출되었다. 활성분획은 농축하여 소량의 메탄올에 녹인 후 메탄올-물(65:35~0:100)을 전개용매로 역상 silica gel(ODS) column chromatography 하였다. 활성분획은 HPLC(ODS, Capcell pak, 10×250mm, 20~80%의 함수 아세토니트릴, 1.5ml/min, 220nm)하여 최종 정제하였다. HPLC 정제시 항균활성을 갖는 3개의 main peak M-1(18분대), M-2(19분대), M-3(20분대)를 확인(Fig 15)하였으며 각각의 활성 peak를 분취하여 NMR, MS spectrum조사용

시료로 사용하였다.

M-1, M-2, M-3의 분자량을 확인하기 위하여 MALDI/TOF/MS 분석을 하였다(Fig 16~18), M-1은 m/z 1162(M+H)⁺, m/z 1184(M+Na)⁺, M-2는 m/z 1176(M+H)⁺, m/z 1196(M+Na)⁺, M-3는 m/z 1190(M+H)⁺, m/z 1212(M+Na)⁺였다. 이 물질들은 ¹H 및 ¹³C NMR분석을 통해 lipopeptide 계열 물질임을 알 수 있었으며 M-1은 구조식이 C₅₂H₇₉N₁₁O₁₉이고 분자량(M)이 1161인 neopeptin C, M-2는 구조식이 C₅₃H₈₁N₁₁O₁₉이고 분자량(M)이 1175인 neopeptin A, M-3는 구조식이 C₅₄H₈₃N₁₁O₁₉이고 분자량이 1190인 neopeptin B로 동정하였다.

Culture broth of Sh09

↓ centrifuged and combined with cel extract

Culture filtrate

↓

Diaion HP-20 column chromatography

↓ washed with water & 50% aq. MeOH eluted
with 70% aq. acetone

Silica gel column chromatography

↓ eluted with CHCl₃-MeOH-Water(10:1:0~1:1:0.3)

Silica gel(ODS) colum chromatography

↓ eluted with MeOH-Water(65:35~100:0)

HPLC(ODS)

↓ Capcell pak, 10×250mm, 1.5ml/min, 220 nm
eluted with MeCN-Water(20:80~80:20)

SH09-M1, M2, M3

그림14. The purification procedure of antifungal materials from *Streptomyces* sp. SH-09

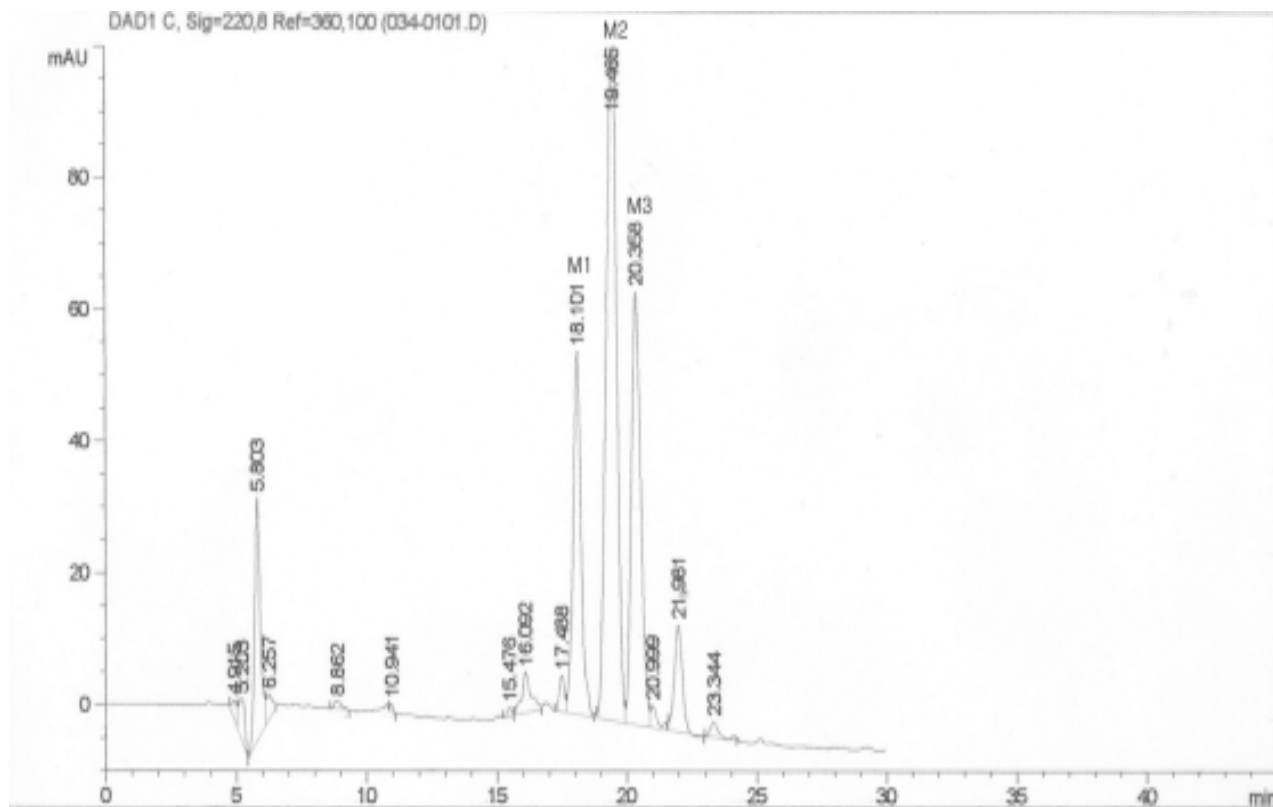


그림15. HPLC chromatogram of antifungal compounds from *Streptomyces* sp. SH-09

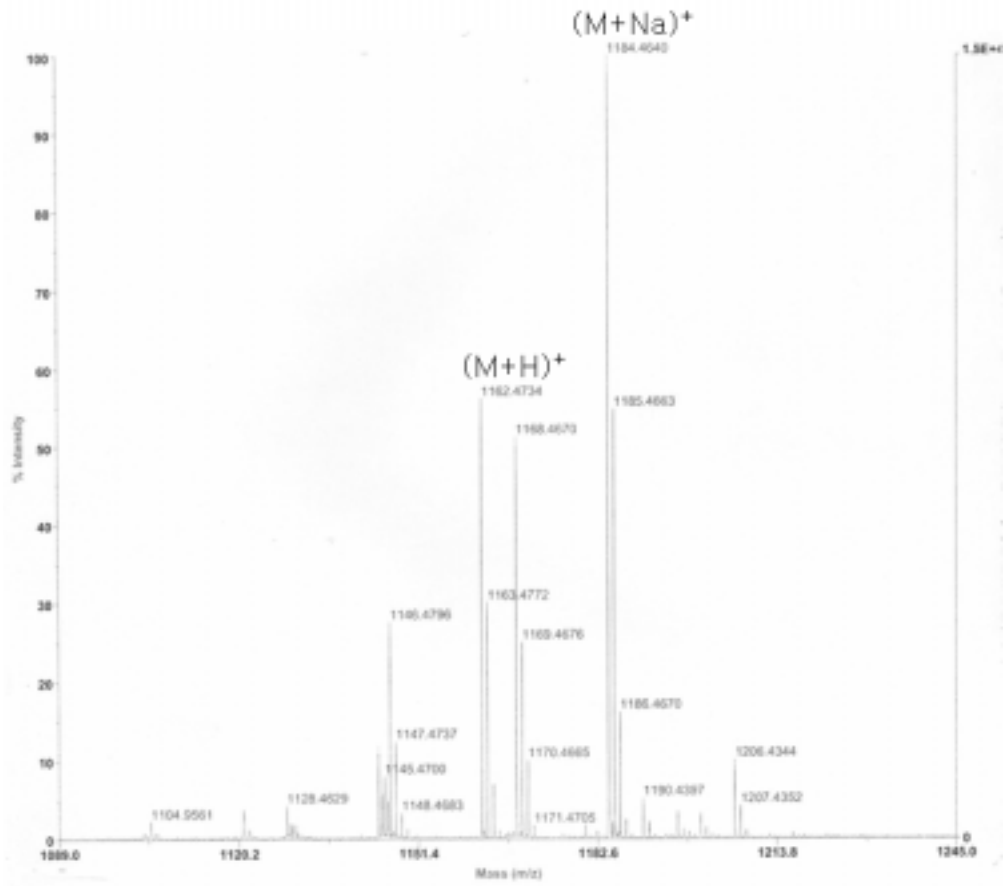


그림16. SH-09 균주가 생산하는 항균활성물질(M1) 분자량 확인을 위한 MALDI/TOF/MS 분석

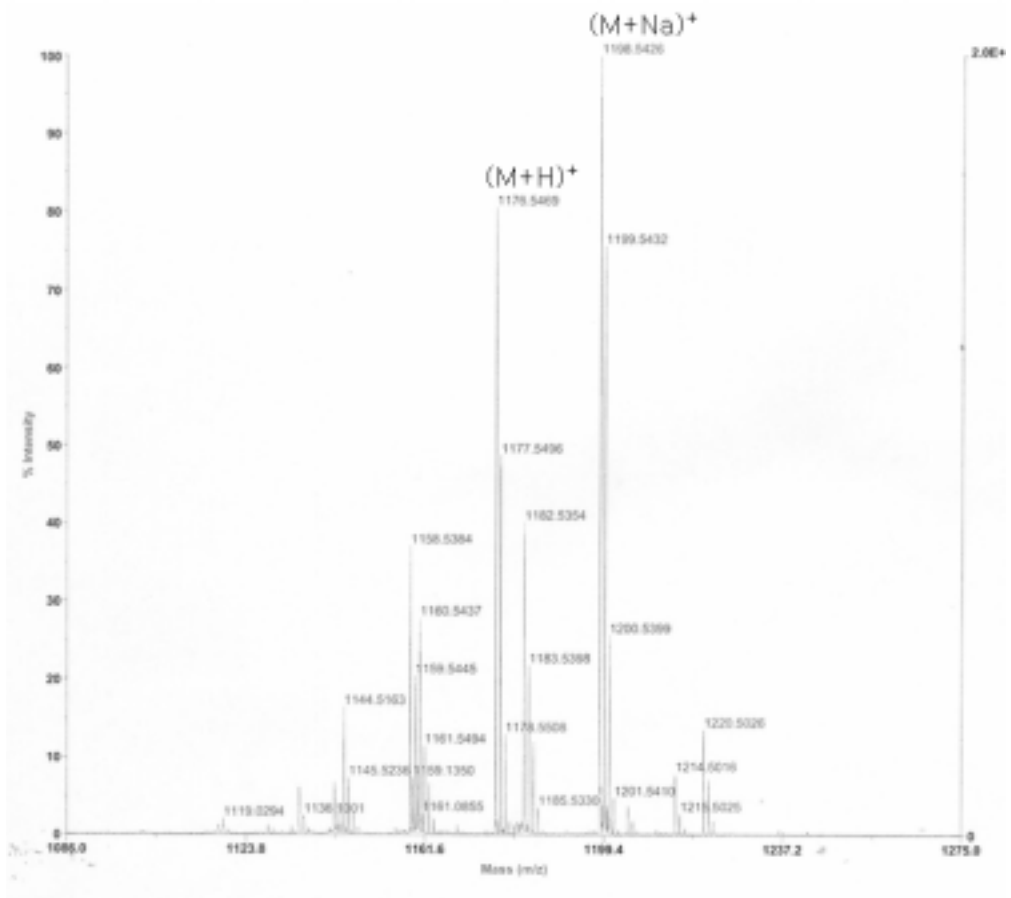


그림17. SH-09 균주가 생산하는 항균활성물질(M2) 분자량 확인을 위한 MALDI/TOF/MS 분석

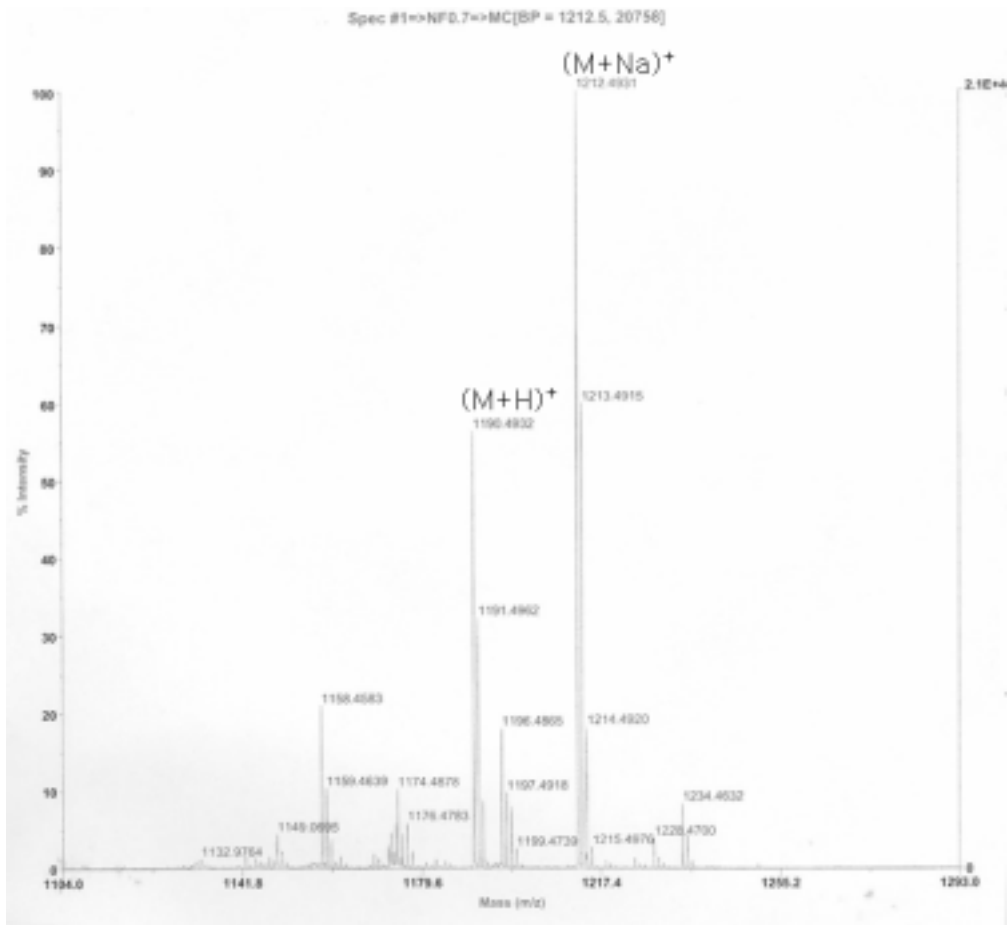


그림18. SH-09 균주가 생산하는 항균활성물질(M3) 분자량 확인을 위한 MALDI/TOF/MS 분석

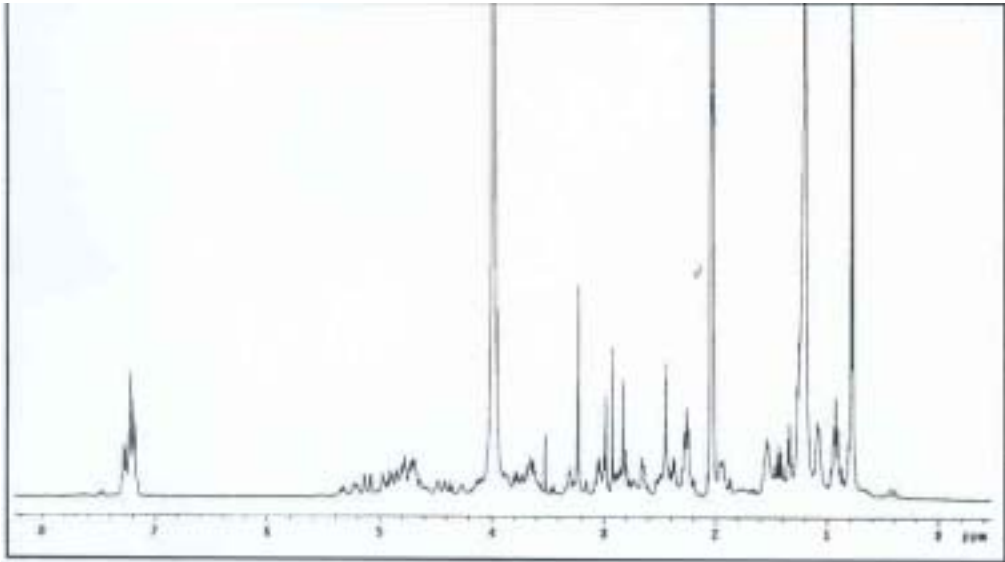


그림19. ^1H NMR spectrum of neopeptin A

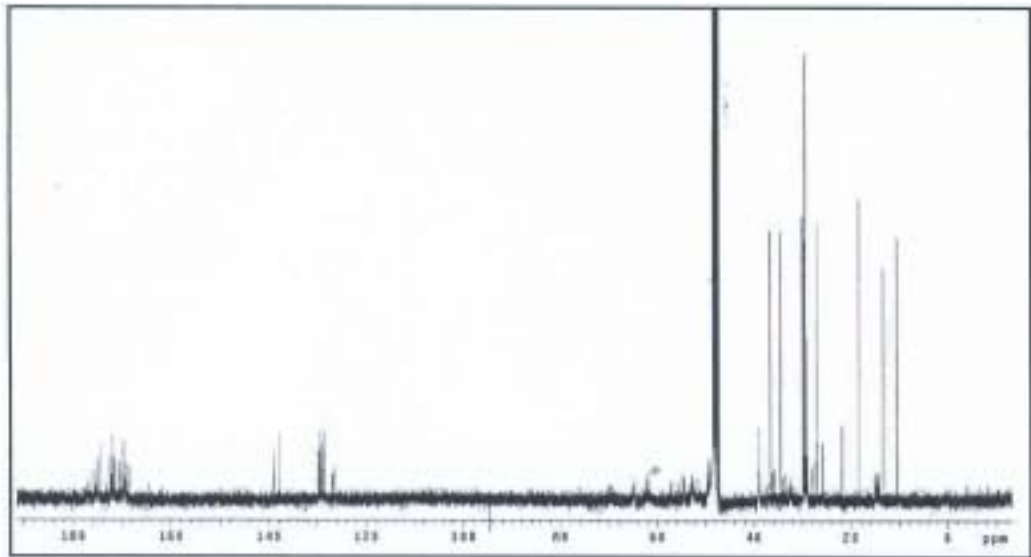


그림20. ^{13}C NMR spectrum of neopeptin A

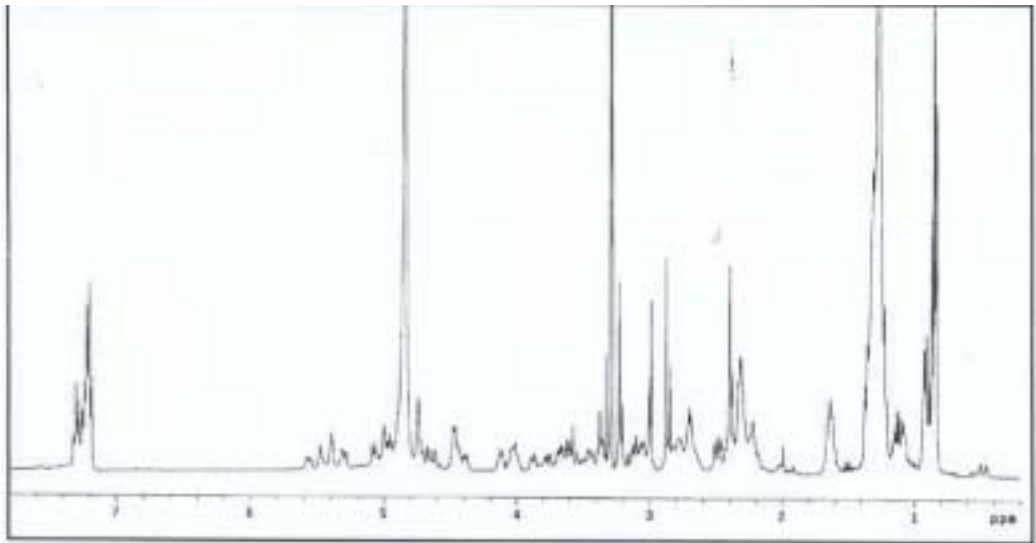


그림21. ^1H NMR spectrum of neopeptin B

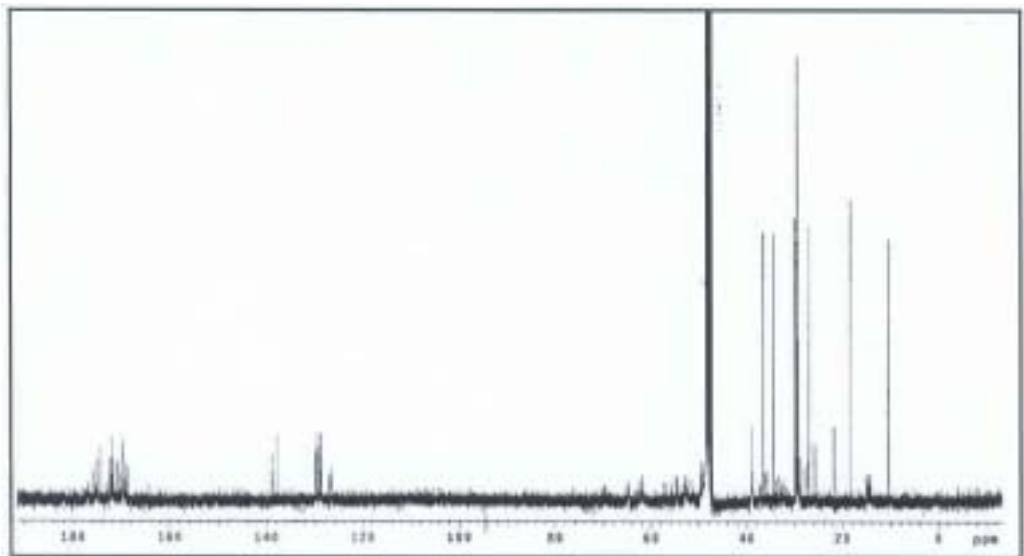
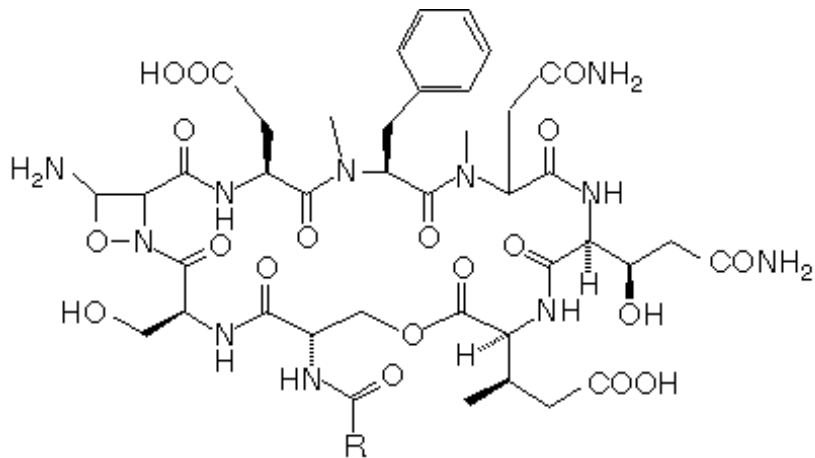


그림22. ^{13}C NMR spectrum of neopeptin B



- A** : R = $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
B : R = $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$
C : R = $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

그림23. Neopeptin A, B, C의 구조식

4. 미생물원제(SH-09균주)의 물리, 화학적 특성

SH-09 균주의 온도에 대한 안정성을 조사하기 위하여 MBA 고체 배지에서 15일간 배양한 colony를 $-10^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 까지 온도별로 일정기간 보관한 후 GSS배지로 옮겨 배양한 후 고추탄저병균(*Collectotrichum lagenarium*)에 대한 항균활성을 paper disk 법으로 조사하였다. 그 결과는 표 36에서 보는 바와 같이 보존 온도 및 보존기간에 관계없이 항균활성을 유지하고 있었다.

광(자외선)에 대한 안정성을 조사하기 위하여는 MBA배지에서 배양한 colony를 자외선이 조사되는 chamber에 24~48시간 둔 후 single colony를 GSS 배지에 접종하여 배양활성 및 항균 활성을 검정 중에 있으며 그 결과는 곧 얻을 수 있을 것이다.

표36. 배양이 완료된 SH-09 균주의 저장 온도에 대한 안정성

배양후 보존온도(℃)	보존기간별 항균활성 ^a					
	5일	10일	15일	20일	20일	30일
-10	+	+	+	+	+	+
-5	+	+	+	+	+	+
0	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+

^a MBA배지에서 배양이 완료된 colony를 일정 기간 보관 후 GSS 배지에 접종하여 paper disk 법으로 탄저병균에 대한 항균활성을 검정

SH-09 균주의 계대에 대한 안정성을 조사하기 위하여 고체 배지인 MBA 배지에서 배양한 colony를 10일 간격으로 계대를 하고 single colony를 GSS 배지로 접종하여 항균활성을 in vitro paper disk법으로 조사하였다. 그 결과 10회에 걸쳐 계대를 한 colony에서도 항균활성을 일정하게 유지하고 있었다.

한편 항균활성물질의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 배양여액의 pH를 2, 7, 10으로 조절 후 100℃로 15분간 열처리하고 각각의 pH를 7로 중화한 후 사과 점무늬낙엽병균(*Alternaria mali*)에 대한 항균활성 및 담배흰가루병(*Golovinomyces cichoracearum*) 방제효과를 조사하였다. 그 결과 pH2, 7에서는 열에 안정하였으나 알카리 조건(pH10)에서는 항균활성이 대부분 소실되었다(표37.).

표37. SH-09 항균활성물질의 열 안정성

처 리 내 용	열 안정성 ^a	
	항균활성(mm) ^b	흰가루병 방제활성 ^c
pH 2	23	+
pH 7	26	+
pH 10	0	-

^a 100℃/ 15분 ^b paper disk ^c 담배잎 원판검정법

5. 포장시험

가. SH-09균주의 배양물의 포장시험

SH-09 균주의 GSS 배양액을 5~20배로 희석하여(Adjuvant로 200mg/ℓ의 tween 20첨가) 시설하우스에서 재배중인 오이(품종: 은성백다다기)에 5월 2일부터 1주일 간격으로 3회 경엽살포하고 마지막 처리 1주일 후에 발병도를 조사하였다(표 38). 그 결과 SH-09 배양액 처리구는 79~92%의 방제가를 나타내어 대조약제인 훼나리에 비하여 방제효과가 우수함을 확인하였다.

표38. SH-09 균주 배양액의 오이 흰가루병 방제효과(논산군 벌곡면 시설하우스)

처리 ^a	발병도(%) ^b	방제가(%) ^c
배양액 5배 희석	3.9	92.0
” 10배 희석	6.2	87.3
” 20배 희석	1.5	78.6
대조약제 (훼나리 유제 4000배)	12.5	74.5
무처리	49.0	

^a 7일간격으로 3회 경엽처리

^b 발병도(%) = $\frac{\text{표}(발병수 \times \text{계체수})}{4N} \times 100$

^c 방제가(%) = $(1 - \text{처리구의 발병도} / \text{무처리구의 발병도}) \times 100$

나. SH-09균주 시제품의 포장시험

1) SH-09 시제품의 딸기 흰가루병 방제시험

SH-09 30% WP의 500배액을 시설하우스에서 재배중인 딸기(품종: 장희)에 2005년 4월 26일부터 1주일 간격으로 3회 경엽살포하고 최종 살포 7일후에 흰가루병 이병과율을 조사하였다(표39). 그 결과 SH-09 30% WP 처리구는 85% 방제가를 나타내어 대조약제인 Trifumizole(61%)에 비하여 우수한 방제효과를 보여주었다.

표39. SH-09 30% WP(시제품)의 딸기 흰가루병 방제효과(충남, 논산)

처리	이병과율(%)			평균	방제가(%)
	1	2	3		
SH-09 30% WP	0	13.1	17.0	10.0	84.7
대조약제(Triflumizole)	10.8	14.0	51.9	25.6	60.9
무처리	86.3	35.4	74.5	65.4	

2) SH-09 시제품의 오이 흰가루병 방제시험

SH-09 30% WP의 500배액을 시설하우스의 오이(품종: 백다다기)에 3회 살포하고(2005년 9월 15일, 9월 22일, 9월 29일), 최종살포 5일후, 7일후, 9일후에 흰가루병 발병도를 조사하였다(표40). 표40에서 보는 바와 같이 시제품 1, 2 모두 대조약제보다 우수한 방제효과를 나타내었으며 1차 조사일(5일후)에는 89~91%의 방제가를 2차 조사일(7일후)에는 82~84%의 방제가를 나타내었다.

표40. SH-09 30% WP(시제품)의 오이 흰가루병 방제효과(대전)

처리	5일 후		7일 후		9일 후	
	발병도 (%)	방제가 (%)	발병도 (%)	방제가 (%)	발병도 (%)	방제가 (%)
SH-09 30% WP-A	10	88.8	16	82.4	38	60
SH-09 30% WP-B	8	91.0	15	83.5	35	63.2
대조약제(Fenarimol)	16	82.0	20	78	41	56.8
무처리	89		91		95	

3) SH-09 시제품의 파푸리카 흰가루병 방제시험

SH-09 30% WP 500배액을 시설하우스에서 재배중인 파푸리카(품종: 스펀셜)에 9월 16일부터 1주일 간격으로 3회 살포하고 마지막 살포 5일후, 7일후에 흰가루병 이병엽율을 조사하였다.

표41에서 보는 바와 같이 SH-09시제품의 흰가루병 방제효과는 대조약제인 Azoxystrobin보다 우수하여 5일 후 88~92%의 방제가를 7일후에는 80~8

9%의 방제가를 나타내었다.

표41. SH-09 30% WP(시제품)의 과푸리카 흰가루병 방제시험

처리	5일 후		7일 후	
	이병엽율(%)	방제가(%)	이병엽율(%)	방제가(%)
SH-09 30% WP-A	9.9	88.0	18.2	80.0
SH-09 30% WP-B	6.8	91.8	9.5	89.5
대조약제(Azoxystrobin)	15.5	81.2	21.5	76.4
무처리	82.5		91.1	

이상의 포장시험 결과 SH-09의 시제품으로 생산한 생물농약 SH-09 30% WP의 딸기, 오이, 과푸리카 흰가루병 방제효과는 모두 대조약제인 화학농약보다 우수하여 실용화, 기업화가 충분히 가능함을 나타내었다.

협동과제 : 환경친화형 제형화기술개발 및 독성연구

6. 제형화 기술 개발

가. 활성 물질의 특성 분석

3년간 수행한 연구 중 1년차에서는 몇 가지 후보 미생물에 대한 제형검토가 있었다. 이들 후보 미생물에 의해 생산되는 배양물은 각각 서로 다른 특성을 보였으며 포장시험 결과 약효가 가장 우수한 SH-09균주가 최종 선발되었다. 이를 바탕으로 제형화 연구가 수행되었다.

제형검토에 필요한 항목으로 활성물질을 포함하는 원제의 약효활성, 처리방법, 물리화학적 등이 있다. 본 제형연구에서 공급받는 SH-09 배양물의 경우 흰가루병에 우수한 활성을 보이는 물질로 사용방법은 희석하여 사용하는 것이므로 결국 원제의 물리화학적에 대한 특성조사가 제형연구에 필수적인 요소가 된다. 원제의 물리화학적에는 다양한 항목이 있으나 제형연구에 있어서는 원제의 성상과 용해도 그리고 안정성 등이 가장 중요한 특성들이다. 먼저 용해도는 농약제형을 결정하는 1차적 요소이므로 우선적으로 조사를 실

시하였다. 그 결과, 활성성분은 수용성이 매우 낮았고 일반적인 유기용제에 잘 녹았는데 특히, 메탄올이나 에탄올에 잘 녹았다. 공급받은 시료의 성상은 연한 갈색의 동결 건조물의 형태였고 물에 희석 시 불용성 성분이 관찰되었다. 활성성분은 열에 안전하며 pH 5-9 조건에서도 활성의 변화가 없음을 따라 기본적인 농약용 부재의 사용에 큰 무리가 없을 것으로 판단되었다.

나. 기본 제형 연구

1차년도에는 제형화할 시료가 액상으로 공급됨에 따라 액상수화제로 검토하였다. 액상수화제의 경우에는 활성에는 문제가 없었으나 원제 제조과정 중에 포함된 이물질 등으로 장기간 보존시에 층분리 문제와 함께 제품이 변질되는 문제점이 발견되었다.

2차년도부터는 최종 선발된 SH-09균주를 사용한 동결건조된 분상 원분을 대상으로 처방검토를 실시하였다. 고상제형의 경우, 1차적인 검토제형으로는 수화제가 일반적이지만 세계적인 추세는 환경친화적이고 생력적인 제형을 선호함에 따라 기존의 수화제를 개선한 입상수화제가 일반화되어 있다. 그러나 생물농약에 있어서 입상수화제 제형은 제조과정중의 건조공정에 의한 활성성분의 변화 등에 대한 세밀한 검토가 필요하고 제조단가가 높기 때문에 본 시험에서 수화제를 대상으로 처방검토를 실시하였다. 이러한 수화제에 대한 검토결과는 향후 제형화 다양성에 대한 검토시에 활용할 수 있는 자료로 활용할 수 있다.

수화제는 농약관리법상 분상으로서 물에 희석하였을 때 수화되는 농약을 말하는 것으로 유효성분, 수화성 그리고 분말도를 이화학적 검사항목으로 하고 있다. 그러므로 제제검토시 계면활성제의 선발과 입도관리 그리고 저장안정성의 확보가 중요하다. 먼저 제형화를 위한 유효성분의 함량은 원제의 유효성분 함량과 생물시험의 편리성을 고려하여 30%로 정하여 처방검토를 실시하였고 증량제는 원가 및 제제상의 선호도 등을 고려하여 카오린으로 선발하였다.

다. 약효증진용 부자재 탐색

계면활성제의 경우는 다양한 종류가 사용되고 있지만 저장 안정성 및 혼화성 등을 고려하여 습윤제와 분산제를 복합적으로 선발하여 이용하였고, 입도는 기본적인 수화제의 자체 관리규격에 준하여 검토하였다. 통상적으로 수화

제에 사용되는 계면활성제로는 비이온 계면활성제인 polyoxyethylene alkylaryl ether / polyoxyethylene alkyl ether를 음이온화시킨 것과 이온성 계면활성제인 alkyl sulfate, lignosulfonate, naphthalene sulphonate formaldehyde condensates 등의 두 가지 계통이 검토 가능하였으므로 선별을 위하여 우선적으로 검토를 실시한 결과, polyoxyethylene alkylaryl ether / polyoxyethylene alkyl ether를 음이온화시킨 것이 우수한 물성과 활성을 보임에 따라 이후의 시험에는 상기의 계면활성제를 기초로 하여 처방검토를 실시하였다.

기본 계면활성제가 선발됨에 따라 약효증진을 위한 보조제의 선발을 위한 시험을 실시하였다. 생물농약에 있어서 적절한 보조제의 선발은 유효성분의 안정성 및 활성에 미치는 영향이 크므로 처방검토에 필수적인 과정이라고 할 수 있다. 다양한 문헌과 시험자료를 바탕으로 다양한 부자재가 약효증진 효과를 보일 수 있음을 확인하였으며 실제로 효과가 확인되거나 제제검토에 이용된 경우도 있었다. 이에 따라 본 활성성분에 적합한 부자재를 선발하여 처방검토에 이용하였다. 식물에서 유래한 고분자 물질인 TP의 경우, 습윤/분산 능력도 우수하고 자체적인 살균활성도 보임에 따라 선발되었고 광물질인 SD의 경우는 광차단 효과에 의한 활성성분의 안정화에 기여할 것으로 기대되어 선발하였다. 각각의 보조제는 효과 확인을 위하여 단일 또는 혼용하여 처방에 이용되었으며 이렇게 하여 확립된 처방은 건식 분쇄기인 air mill을 이용하여 수화제로 제조하였다. 처방별 제품은 제조후 농약관리법에서 규정한 검사항목인 분말도와 수화성을 측정한 결과, 양호한 물성을 보임에 따라 생물활성 시험용 시료로 사용하였다.

처방별 활성시험 결과, 음이온성 base 계면활성제 보다는 비이온성 base 계면활성제가 효과적이었으며, 보조제의 경우는 식물에서 유래한 고분자 물질인 TP와 광물질인 SD를 모두 포함하는 처방 5번이 가장 우수한 활성을 보였다. 이는 선발된 두가지 보조제가 자체적인 활성증진효과와 함께, 동시에 사용될 경우에는 약효상승 효과를 보이는 것으로 판단되었다. 이에 따라 이후의 시험에서는 처방5번으로 제조한 시료를 사용하였다.

표42. SH-09 30% 수화제의 처방검토 결과

1. 처방검토결과						
원부재명	처방1	처방2	처방3	처방4	처방5	비고
SH-09 원제	30	30	30	30	30	
습윤/분산제 1	5	-	-	-	-	LS
습윤/분산제 2	-	5	5	5	5	APS
보조제	-	-	3	-	3	TP
보조제	-	-	-	2	2	SD
증량제	Rest	Rest	Rest	Rest	Rest	Kaolin
Total	100	100	100	100	100	
2. 물리성 검토결과						
검토사항	처방1	처방2	처방3	처방4	처방5	검토기준
제제형태	수화제	수화제	수화제	수화제	수화제	
외 관	갈색분말	갈색분말	갈색분말	갈색분말	갈색분말	
수화성	양 호	양 호	양 호	양 호	양 호	2분 내외
분말도	양 호	양 호	양 호	양 호	양 호	44 μ m, 98%up
저장안정성	양 호	양 호	양 호	양 호	양 호	50 $^{\circ}$ C, 4주

라. 경시 안정성 시험

제품의 약효보증기간을 정하고자 처방연구를 통하여 선발된 제품을 대상으로 실온 및 고온에서의 경시적인 안정성 시험을 수행하였다. 상온에서의 안정성 시험의 경우, 검토기간이 너무 많이 소요되는 관계로 농약관리법상의 시험방법에 따라 고온에서의 경시안정성 시험을 수행하였다. 그 결과, 확립된 처방의 제품은 경시적으로도 안정하였다.

표43. SH-09 30% 수화제의 경시안정성 시험결과

검토사항	보관조건					검토기준
	실온	2주	4주	60일	90일	
외 관	갈색분말	갈색분말	갈색분말	갈색분말	갈색분말	
수화성	양 호	양 호	양 호	양 호	양 호	2분 내외
분말도	양 호	양 호	양 호	양 호	양 호	44 μ m, 98%up

마. 포장시험용 시제품 생산

상기시험을 통하여 선발된 처방을 이용하여 시험용 시료를 제조하였다. 수화제의 제조과정은 먼저 원제와 계면활성제 그리고 보조제를 혼합한 다음, 건식 분쇄기인 air mill로 분쇄하여 제조하였다. 이렇게 하여 제조된 수화제는 농약관리법상의 검사항목인 수화성과 분말도를 측정 한 결과, 수화성은 2분 이내였으며, 분말도의 경우도 325mesh에서 98% 이상이 통과됨에 따라 수화제로 사용하는데 적합한 것으로 판단되었다. 이에 따라 제조된 수화제를 시험용 시료로 제공하였다.

10. 독성연구

가. SH-09배양액에 대한 독성시험

1) 급성경구 독성시험

SH-09에 대하여 급성경구독성을 조사하기 위하여 ICR 계통의 S.P.F 마우스에 원제를 5,000mg/kg의 용량으로 암수 각각 5마리씩 단회 경구 투여하여 14일 동안 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. 그 결과 암수 마우스에 대한 원제의 단회 경구투여는 투여기간동안 특이한 사항이 관찰되지 않았으며, LD50값은 5,000mg/kg로 산출되었다.

표44. Acute oral toxicity of test material in S.P.F mice

Test material	a.i ¹ (%)	FT ²	LD ₅₀ (mg/kg)
Technical		Solid ³	> 2,500

¹ active ingredient, ² formulation type

2) 급성경피 독성시험

SH-09에 대하여 급성경피독성을 조사하기 위하여 ICR 계통의 S.P.F 랫드에 4,000mg/kg의 용량으로 암수 각각 5마리씩 단회 경피 투여하여 14일 동안 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. 그 결과 암수 랫드에 대한 원제의 단회 경피투여는 투여기간동안 특이한 사항이 관찰되지 않았으며, LD50값은 4,000mg/kg로 산출되었다.

표45. Acute dermal toxicity of test material in S.P.F rats

Test material	a.i ¹ (%)	FT ²	LD ₅₀ (mg/kg)
Technical		Solid ³	> 2,000

¹ active ingredient, ² formulation type

3) 피부자극성시험

SH-09에 대한 피부자극성시험을 암수 각각 3마리의 New Zealand White계 토끼를 이용하여 투여 후 72시간까지 농촌진흥청 고시 제 2003-7호 ‘독성시험 기준과 방법’에 따라 실시하였다. 시험한 결과, New Zealand White계 토끼에 있어서 원제의 피부자극의 국소독성은 없는 것으로 판단된다.

4) 안점막자극성시험

SH-09에 대한 안점막자극성시험을 암수 각각 3마리의 New Zealand White계 토끼를 이용하여 투여 후 72시간까지 농촌진흥청 고시 제 2003-7호 ‘독성시험 기준과 방법’에 따라 실시하였다. 시험한 결과, New Zealand White계 토끼에 있어서 원제의 안점막자극의 국소독성은 없는 것으로 판단된다.

5) 피부감작성시험

SH-09에 대한 피부감작성시험을 암수 각각 15마리의 Hertley계 기니픽을 이용하여 감작야기 후 72시간까지 농촌진흥청 고시 제 2003-7호 ‘독성시험 기준과 방법’ 중 Buehler test에 따라 실시하였다. 시험한 결과, Hertley계 기니픽에 있어서 원제의 피부감작성은 없는 것으로 판단된다.

나. SH-09 30% 수화제에 대한 독성시험

1) 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험

가) 요약

SH-09 30% 수화제에 대한 급성경구독성을 SPF 마우스(ICR계통)를 이용하여 1회 경구 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- (1) 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 2,500mg/kg를 투여하여 관찰한 결과 시험기간(14일)중 치사개체가 발견되지 않았다.
- (2) 일반중독증상은 전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.
- (3) 체중변화의 통계처리에 있어 체중측정 전 기간에 걸쳐 유의차가 인정되지 않았다.
- (4) 약제투여와 관련한 내부장기에 대한 영향은 없었다.

이상의 결과, 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 2,500mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

나) 재료 및 방법

(1) 시험계

(가) 동물종(계통) : SPF Mouse(ICR계)

(나) 공급원

명 칭 : 삼육실험동물연구소

주 소 : 경기도 오산시 서랑동 77-1번지

☎ 031 - 372 - 3636

대표이사 : 배 치 남

(다) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2004-4호 농약의 독성시험기준과 방법에 마우스를 사용하도록 되어 있으며 ICR계통은 농약의 경구독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

(라) 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동

물실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

(2) 사육환경

(가) 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 5\%$, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 실험조건에서 사료와 음수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

(나) 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자($270\times 220\times 130\text{mm}$)에 대패밥 깔집(삼육실험동물, 한국)을 깔아 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균, 건조한 후 암·수 각각 5마리씩 사육 유지하였다.

(다) 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료(주), 한국)를, 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유섭식 및 섭수 시켰다.

(3) 투여약량 수준설정 및 약제조제

(가) 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 $2,500\text{mg/kg}$ 에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

(나) 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2004-4호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 등부에 Picric acid를 이용하여 일련번호로 표시하였다.

(다) 대조구의 설정

시험물질이 고상으로 투여약제 조제 시 증류수에 잘 현탁되므로 용매 대조군을 제외한 증류수 대조군만을 두었다.

(라) 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되는 관계로 용매는 증류수로 하였으며, 시험물질의 조제는 20ml의 Teflon Cap Vial을 이용하여 칭량한 후 증류수를 가하여 용해 및 현탁시켜 조제하였다.

(마) 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 마우스의 체중과 약액 투여량을 고려하여
투여액량 수준별 공히 10ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(4) 시험물질의 투여

(가) 사료의 절식

투여개시 3 - 4시간 전부터 절식을 시킨 후 투여 3 - 4시간 후 사료급
이를 재개하였다.

(나) 투여경로 및 투여방법

마우스용 경구 주사침(Zonde)을 이용하여 체중측정치를 기준으로
10mg/kg 용량을 경구로 위내에 삽입, 1회에 한하여 강제투여 하였다.

(5) 관찰 및 조사항목

(가) 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회
(오전 9시)씩 일반중독증상을 관찰하였고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼
내서 부검을 실시하였다.

(나) 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10,
D14일째 개체별 체중을 측정하고 그 결과를 통계 처리하여 분석하였다.

(다) 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 이산화탄소(CO₂) 가스로 마취시킨
후 내부장기의 육안적 이상유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록
용지에 기록하였다.

다) 결과 및 고찰

(1) 치사동물 및 LD50값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 SH-09 30% 수화제는 기초
시험 약량인 2,500mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수 모두 치사개체가
발견되지 않았다.

따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 2,500mg/kg으로 독성
분류상 저독성을 나타내었다.

(2) 일반중독증상

전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

(3) 체중변화

시험에 이용된 동물의 시험개시 D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록결과로 보아 약제투여군은 무처리 대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

(4) 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

2) 마우스를 이용한 단회 투여 경피독성시험

가) 요약

SH-09 30% 수화제에 대한 급성경피독성을 SPF 랫드(SD계통)를 이용하여 1회 경피 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- (1) 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 2,000mg/kg를 투여하여 관찰한 결과 시험기간(14일)중 치사개체가 발견되지 않았다.
- (2) 일반중독증상은 전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.
- (3) 체중변화의 통계처리에 있어 체중측정 전 기간에 걸쳐 유의차가 인정되지 않았다.
- (4) 약제투여와 관련한 내부장기에 대한 영향은 없었다.

이상의 결과 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 2,000mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

나) 재료 및 방법

(1) 시험계

(가) 동물종(계통) : SPF Rat(SD계)

(나) 공급원

명 칭 : 삼육실험동물연구소

주 소 : 경기도 오산시 서량동 77-1번지

☎ 031 - 372 - 3636

대표이사 : 배 치 남

(다) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2004-4호 농약의 독성시험기준과 방법에 랫드를 사용하도록 되어 있으며 SD계통은 농약의 경피독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

(라) 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

(2) 사육환경

(가) 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 5\%$, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 실험조건에서 사료와 음수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리사육하였다.

(나) 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자($420\times 260\times 180\text{mm}$)에 대패밥 깔집(삼육실험동물, 한국)을 깔아 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균, 건조한 후 암·수 각각 5마리씩 사육 유지하였다.

(다) 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료(주), 한국)를, 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유섭식 및 섭취 시켰다.

(3) 투여약량 수준설정 및 약제조제

(가) 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 $2,000\text{mg/kg}$ 에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

(나) 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2004-4호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 미부에 유성매직을 이용하여 일련번호로 표시하였다.

(다) 대조구의 설정

시험물질이 액상으로 투여약제 조제시 증류수에 잘 현탁되므로 용매

대조군을 제외한 증류수 대조군만을 두었다.

(라) 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되는 관계로 용매는 증류수로 하였으며, 시험물질의 조제는 20ml의 Teflon Cap Vial을 이용하여 칭량한 후 증류수를 가하여 용해 및 현탁시켜 조제하였다.

(마) 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 랫드의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여액량 수준별 공히 5ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(4) 시험물질의 투여

(가) 사료의 절식

경피독성시험의 투여경로상 절식시간은 따로 두지 않았다

(나) 투여경로 및 투여방법

시험개시 전 약제처리를 위한 공시동물의 등부위를 동물용 제모기를 이용하여 체표면적의 약 10%를 제모하고, 조제된 공시약제를 체표에 골고루 바른 후 약제 유실을 방지하기 위하여 임상용 거어즈로 고르게 감고 비자극성 테이프로 고정시켜 주었다. 약제처리 24시간이경과한 후 도포물을 제거하고, 한편 피부에 남아 있는 공시약제를 증류수를 이용하여 잘 닦아주었다.

(5) 관찰 및 조사항목

(가) 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회(오전 9시)씩 일반중독증상을 관찰하고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

(나) 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 개체별 체중을 측정하고 그 결과를 통계 처리하여 분석하였다.

(다) 부검시험기간 종료 후 살아있는 개체를 이산화탄소(CO₂) 가스로 마취시킨 후 내부장기의 육안적 이상유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록용지에 기록하였다.

다) 결과 및 고찰

(1) 치사동물 및 LD50값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 SH-09 30% 수화제는 기초 시험 약량인 2,000mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수 모두 치사개체가 발견되지 않았다.

따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 2,000mg/kg으로 독성 분류상 저독성을 나타내었다.

(2) 일반중독증상

전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

(3) 체중변화

시험에 이용된 동물의 시험개시 D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록결과로 보아 약제투여군은 무처리대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

(4) 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

3) 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험

가) 요약

SH-09 30% 수화제에 대한 급성어독성을 잉어를 이용하여 96시간 동안 생사수, 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 일반중독증상은 시험 전기간동안 관찰되지 않았다.

(2) 체중은 평균 $0.91 \pm 0.293g$, 전장은 평균 $4.50 \pm 0.230cm$ 이었다.

(3) pH는 평균 7.12(최저 6.88 - 최고 7.32)이었고, DO는 평균 6.45(최저 6.01 - 최고 8.24)였다.

(4) 시험기간의 평균수온은 $22.5^{\circ}C$ (최저 $22.0^{\circ}C$ - 최고 $23.0^{\circ}C$)였다.

(5) Total Hardness는 84.3(Moderately Hard), Alkalinity는 72.0(Moderately Hard)였다.

이상의 결과 본 시험물질의 LC50(48hrs)은 > 10ppm이었으며, 독성분류상 어독성Ⅲ급으로 확인되었다.

나) 재료 및 방법

(1) 시험계

(가) 공시어 : 잉어(Cyprinus carpio)

(나) 공급원

명 칭 : 국립수산진흥원 경북내수면개발시험장

주 소 : 경북 울진군 근남면 행곡리 228번지

☎ 054 - 783 - 9413

장 장 : 이 석 희

(다) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2004 - 4호 농약의 독성시험기준과 방법에 급성어독성시험의 경우 시험어류는 잉어를 사용하도록 되어 있으며, 농약의 어독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

(라) 순화 및 사육

시험어류는 분양 후 약 2주간 실험실내 환경 하에서 순화 사육시켰다.

(2) 사육환경

(가) 사육환경

본 시험의 환경은 실내에서 물의 순화, 여과를 시킬 수 있는 유리수조 장치를 이용, 시험용수는 지하수를 이용하여 수온은 22 ~ 24℃, 조도는 200 ~ 300Lux의 범위 내에서 사육, 순화시켰다.

(나) 사료 급여

사료는 잉어용 부상성 고품사료(부산관상어용식품, 한국)를 1일 1회 급여하였다.

(3) 시험농도 수준설정 및 약제조제

(가) 시험농도 설정

기초시험 투여농도인 10ppm에서 시험을 수행하였다.

(나) 시험용 수조

원통형의 유리제품 10ℓ (Φ24×30cm)용기를 사용하였다.

(다) 시험어류의 크기 및 시험어류 수

잉어의 크기는 전장 5cm정도의 것으로 선별하였으며, 수조당 시험어류

수는 5마리를 수용하고, 시험농도 수준당 2개의 수조를 사용하였다.

(라) 시험용수 및 수온

시험용수는 지하수를 72시간 이상 정체시켰다가 사용하였으며, 수온의 조절은 항온수조내에 시험용 유리수조를 담귀서 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 시험기간동안 유지시켰다.

(마) 산소공급

시험기간중 시험중인 수조 내에 인위적인 산소공급은 시키지 않았다.

(바) 사료 급여

시험개시 48시간 전부터 시험종료시까지 사료 급여를 중단하였다.

(사) 대조구 설정

시험물질 무처리를 음성대조구로 하고, PCP-Na염(90%, Aldrich, USA)을 양성대조구로 하였다.

(아) 약제 조제

시험물질이 고상이므로 칭량 후 증류수를 이용하여 현탁 후 처리하였다.

(4) 관찰 및 검사항목

(가) 일반중독증상 및 생사율

처리당일은 1시간에서 4시간까지는 매시간, 그 이후에는 24, 48, 72, 96시간 간격으로 일반중독증상 및 생사수를 관찰 조사하였다.

(나) 체중측정 및 크기측정

시험 중 치사된 개체는 발견 즉시 꺼내어 체중 및 전장을 측정하였으며, 시험종료 후 살아 남은 개체는 시험종료시 체중과 전장을 측정하였다.

다) 결과 및 고찰

(1) 생사어류 및 LC50값(48h, 96h)

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 SH-09 30% 수화제는 기초 시험 투여농도인 10ppm으로 10마리의 잉어에 투여한 결과 시험기간(96h) 중 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서, 본 약제의 반수치사약량(LC50)은 48시간에서 $> 10\text{ppm}$, 96시간에서 $> 0\text{ppm}$ 으로 판명되었으며, 독성분류상 어독성 III급으로 사료된다.

(2) 일반중독증상

처리군에서 시험물질 투여 후 96시간동안 관찰되지 않았다.

다. 생물농약 등록을 위한 독성검토

1) 생물농약등록법

2005년 4월 농진청 고시(제2005-3호)에 따르면 생물농약의 범주에 생화학농약이 포함되어 최초 과제를 수행할 당시에 불확실했던 독성시험 방법이 확립되었다. 본 과제에서 1~2년차에 수행된 원제(SH-09배양액)등록을 위한 시험과 제품에 대한 기초시험을 수행하였다. 3차 년도에서는 안전성평가분야로 인·축 독성분야 및 환경생태 독성 분야의 시험을 등록법에 준해서 수행하였다. 인·축 독성분야는 SH-09 30% 수화제의 급성경구독성시험, 급성경피독성시험을 수행하였으며, 환경생태독성분야는 SH-09 30% 수화제의 잉어를 이용한 급성어독성시험, 물벼룩류 급성유영저해시험을 수행하였다. 그 결과 모든 시험에서 저독성이 인정되어 등록을 위한 최소한의 1단계만의 수행으로 등록이 가능할 것으로 사료되었다.

8. 선발균주 배양연구

가. 선발균주 배양법 최적화

1). 기본배양조건 검토 및 시험내용 확립

1차 년도에는 몇 가지 후보 미생물들의 생물활성시험결과 담배, 오이, 딸기 등의 다양한 작물의 흰가루병에 활성이 인정된 SH-09 균주를 선발하였다. SH-09를 선발하기까지 스크리닝에 사용한 시료를 만들기 위한 배양은 미생물의 종류에 따라 세균의 경우 nutrient broth 나 Mueller-Hinton배지처럼 일반적으로 세균배양에 사용되는 조성을 사용했고 방선균의 경우에는 GSS배지처럼 다양한 대사물질을 잘 만들 수 있는 조성을 사용하였다. 2차년도부터는 SH-09 대해서 산업화가 가능한 최적배양법을 확립하기 위한 연구가 수행되었다. 먼저, 활성균주의 분류학상 특성을 조사하여 이 균주의 최적 배양법을 확립하기 위해 선행되어야 할 연구주제를 설정하고 이에 따라 연구를 수행하였다.

SH-09 균주는 미생물 분류상 Streptomyces 속에 속하는 방선균으로

밝혀졌기 때문에 방선균의 배양 특성을 중심으로 본 균주를 산업화하기 위한 배양방법의 예비정보를 조사하고 이에 따른 연구를 수행하였다.

- 가) 방선균은 편성호기성(obligate aerobe)로 기본적으로 배양 중에 산소공급이 매우 중요한 요소로 작용하기 때문에 산소요구도 확인을 위한 실험을 수행하였다. 방선균을 현미경상으로 관찰할 때 균체는 그람양성균의 균사체로 존재한다. 이들의 genome은 10⁴kb 정도의 single circular chromosome으로 구성되고 대사적인 특징으로 protease, cellulase, amylase, lipase등의 여러 세포외 효소, 항생물질 및 색소들과 같은 2차 대사산물을 생산하는 것으로 알려져 있다. 지구상에 알려진 천연 항생물질의 약 64%정도가 방선균이 생산하는 것으로 알려져 있을 정도이다.
- 나) SH-09균주가 흰가루병에 활성을 보이는 유효활성물질도 항생물질일 가능성이 높았다. 추후 연구결과 SH-09가 갖는 다양한 활성물질 중 화학구조가 규명되어 neopeptins을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 흰가루병원균 특성상 절대활물 기생체이므로 이 항생물질을 in vitro 상에서 직접 확인할 수 없기 때문에 활성물질의 양을 측정할 수 있는 간접적인 검정법 확립이 필수적이다. 이를 위해 검정법을 확립하고 이 검정법이 실제 흰가루병에 활성과 상관관계가 있는 지 확인실험을 수행하였다.
- 다) 방선균의 배양상 특징은 세균이면서 균사를 형성하여 곰팡이와 같은 형태로 자라고 포자를 형성하는 등 형태학적인 특이성이 현저하며 포자의 경우 고체 배지상에서 균사체가 colony 형태로 증식 후 영양분이 고갈되면 기중균사(aerial mycellium)이 형성되고 여기에 포자가 형성이 된다.
- 라) 일반적으로 산업화 배양에서 선택되어지는 액체배양에서는 포자생성이 매우 적거나 전혀 생성되지 않기 때문에 본 균주를 순수 미생물농약 형태로 만들기 위해서는 액체배양완료 시에 포자형성 유무 및 균사의 생존성 확인을 수행하였다.
- 마) 방성균의 특성상 유전적 성질의 불안정성이 다른 균에 비해 뚜렷하게 높기 때문에 본 균주가 산업화 균주로서 사용되기 위해서는 활성물질 생산이 안정적인가를 확인할 필요가 있으며 이를 위해 연속적인 계대배양

을 통해 안정성을 확인하였다.

- 바) SH-09의 활성물질이 2차 대사산물로 예상되기 때문에 활성물질의 효과적인 생산을 위해서는 1차대사에 필요한 시간과 2차대사가 이루어지는 idiophase로 전환되는 시간을 측정하여 배양조건에 따른 차이를 확인하였다.

2) SH-09의 산소요구도 측정

기본 배양조건 확립에 사용된 배양용 배지 성분은 1차년도 배양에서 활성이 인정된 GSS 배지[souble starch 10g, glucose 20g, soybean meal 25g, beaf extract 1, yeast extract 4g, NaCl 2g, K2PO4 0.25g, CaCO 2g, H2O 1000ml (pH7.2)] 를 기본으로 연구가 수행되었다. 산소요구도 확인을 위한 조건은 동일한 크기의 flask에 배지량을 달리하거나 배지량은 고정시키고 배양기의 교반횟수(rpm)를 변화 시켜 균체의 양을 비교했다. 배지량이 적을수록 산소공급이 용이하여 단위 배양액에서의 균체량은 증가했지만 일정수준 이하의 배지량에서는 더 이상 균체량이 증가하지 않아 대량배양 시 일정 수준의 통기조건이 갖추어 진다면(일반적인 발효기 조건) 산소요구량에 의한 제한요소는 크지 않을 것으로 보였다. 하지만 배양기의 교반횟수의 변화에 따른 배양에서는 rpm이 120 미만일 경우 균사가 분산되지 않고 뭉치는 현상이 일어나서 pellet이 생겨 균체배양이 불량해 지는 것을 관찰할 수 있었고 균사체가 flask 안쪽 표면에 붙는 현상이 심하였다. 이 경우 rpm이 180 이상이 될 경우 균사가 분산되면서 뭉치는 현상이 급격히 줄어드는 현상을 관찰할 수 있어 배양 시 교반 속도에 따른 균사의 응집현상이 많이 좌우될 수 있음을 예측할 수 있었다.

나. 활성물질 측정용 in vitro 검정법 확립

SH-09는 흰가루병원균에 활성을 확인했지만 흰가루병원균은 인공배양이 불가능하므로 흰가루병원균에 활성과 상관관계를 갖는 인공배양이 가능한 다른 식물병원균 선발이 필요했다. 이전까지 식물병원균 스크리닝 결과 이 균주는 탄저병균과 도열병균 활성이 있는 것으로 나타났고

범용적인 공시균을 한국유전자은행에서 분양받아 in vitro 검정법에 활용하였다. 분양받은 탄저병균(KCTC6169)와 도열병균(KCTC6974)의 접종원을 만들어 고체 agar배지 상에서 대치배양을 실시한 결과 두 균 모두 약한 inhibition zone을 형성하였고 특히, 탄저병균의 경우에는 활성물질에 의한 검게 색깔이 변하는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 대치배양은 검정균이 자라는 시간이 7일 이상 걸리는 문제점과 정량화하는데 어려움이 활성물질에 더 잘 반응하는 탄저병균을 이용하여 PDA(potato dextrose agar)배지에서 7일간 배양하여 포자를 충분히 생성시킨 후 PDA배지에 100ml당 5ml로 희석한 1 plate(10¹²cfu/ml)의 검정균 포자액을 넣어 seed 배지를 만들었다. 이 seed 배지에 배양액, 배양여액 및 균체를 paper disc법으로 접종한 후 inhibition zone을 측정하면 접종 후 1일 후에 결과를 확인할 수 있으며 정량화도 가능하였다. 탄저병균을 이용한 in vitro 검정법을 확립한 후 inhibition zone과 실제 흰가루병에 활성과의 상관관계를 확인하고자 흰가루병이 자연 발생된 온실에서 pot에 심겨져 있는 3~4엽기 오이에서 농도별로 활성시험을 실시한 결과 상관관계가 있는 것을 확인하였다. 이것을 이용해서 서로 다른 배양조건에서 배양된 배양체의 inhibition zone은 흰가루병의 발병도(disease severity)와 상관관계가 있는 것을 확인하였다(그림24).

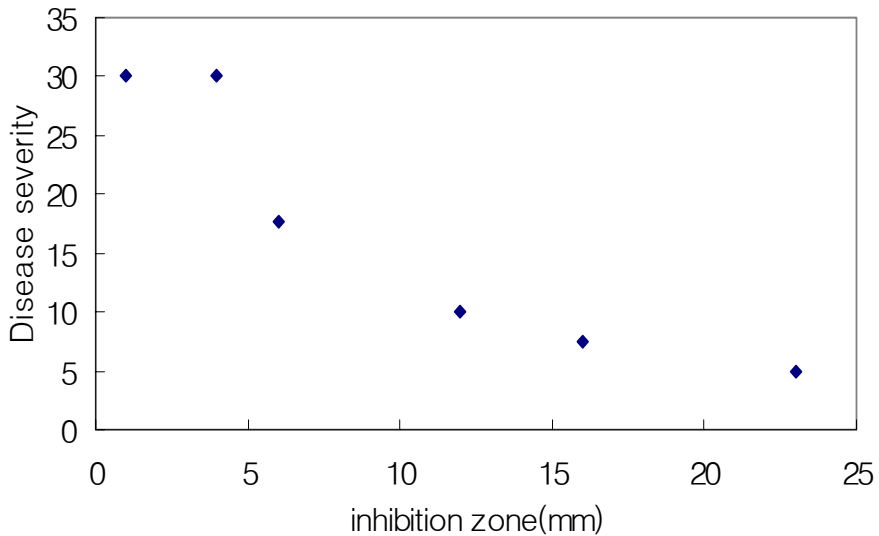


그림24. 방선균(SH-09)의 서로 다른 배양조건에 따른 검정균(KCTC6169)의 inhibition zone과 오이 흰가루병균의 pot 실험에서의 상관관계 그래프

특히, 배양액 및 균체 추출물에 포함되어 있는 활성물질을 유기용매인 MeOH의 농도별로 추출했을 때 활성을 나타내는 pattern이 정확하게 MeOH가 90%를 정점으로 극성과 비극성으로 갈수록 inhibition zone과 오이흰가루병에 대한 활성이 감소하는 것으로 보아 활성물질은 단일물질일 가능성이 높으며 배지 등의 배양조건에 따라 활성물질의 양이 변화하지만 활성물질의 종류는 변화하지 않는 것으로 예측되었다. 이 후 배양과정의 활성물질량은 위에서 확립한 검정법으로 측정하였다.

실제로 3차년도 연구에서 다양한 활성물질 중 neopeptins의 화학구조를 규명할 수 있었고 이 때 neopeptins은 HPLC기기로 검출할 수 있기 때문에 최종적으로 배양체의 neopeptins 함량은 기기정량 분석이 가능하였다.

다. 산업용 액체배양에서 포자생성여부 및 균사생존 기간

SH-09는 고체배양에서도 기중균사 끝에 생성되는 포자량이 매우 적은 균주이다. 특히, 액체배양에서 사용된 GSS배지에서는 거의 포자를 만

들지 않는다. 그래서 배양액의 cfu를 측정할 때 propagule로 작용하는 것은 대부분 군사체이다. 군사체의 생존기간은 배양액 상태로 배양이 끝난 후 실온에서 급격히 활성이 감소하여 4주 후에는 활성을 완전히 잃게 된다. 하지만 군사체를 동결건조해서 보관하면 훨씬 활성보존기간을 늘릴 수 있는데 현재 약 3개월이상 활성이 변화없이 유지하는 것을 관찰할 수 있었다.

1) 산업화 균주용 안정성 테스트

방선균은 유전적 성질이 복잡하고 불안정적인 표현형을 갖는 것이 많으므로 SH-09균주도 산업화용 균주로 사용되기 위해서는 가장 중요한 활성물질 생산의 안정성을 확보해야만 한다. 계대 배양 시 SH-09의 보관균주용 배지로 사용하는 ISP2 고체배지(glucose 4g, malt extract 10g, yeast extract 4g, agar 17g in 1L water)에서 계대를 하여 single colony를 GSS배지에 접종하여 배양양상 및 활성을 검정하였다. 배양 시 균체 pellet 형성양상과 배양액 색소의 진한 정도가 약간씩 차이가 났지만 in vitro 검정법에서 나타난 활성물질 생성량은 거의 일정하게 유지하고 있어서 wild type의 균주로도 산업화를 수행할 수 있을 것으로 판단되었다.

2) 활성물질 생산시간

SH-09가 활성물질 생산을 위한 본 배양에서 먼저 1차대사를 균체의 증식이 먼저 이루어져야 하는데 균체의 증식은 접종원의 양에 따라 최대성장까지 시간의 차이를 보이는데 대략 4일이 걸린다. 이때까지는 활성물질생산이 거의 없어 seed 배지상에 inhibition zone을 전혀 만들지 못하다가 배양 5일 후부터 활성물질이 생성되고 이것은 약 7일 이후부터는 더 이상 늘어나지 않는 양상을 보인다(그림25).

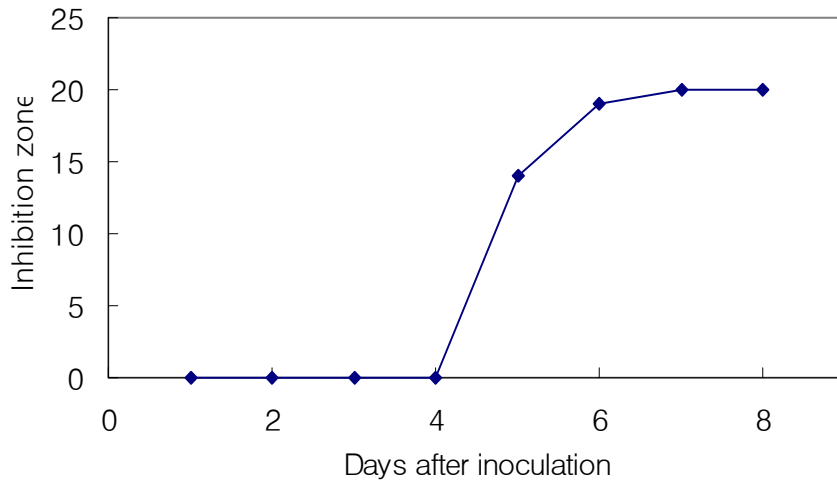


그림25. 방선균(SH-09)의 배양시간에 따른 검정균(KCTC6169)의 inhibition zone의 변화

이 결과는 SH-09의 배양에서 1차 생장에 약 4일이 걸리며 활성물질을 생산하는 idiophase는 5일째부터 시작하여 약 7일까지 완료되는 것으로 판단되며 향후 배양 scale up 시 물질생성 pattern을 예측해 볼 수 있다.

라. Scale up 과정에서 최적배양조건 확립

기본배양조건을 기초로 하여 활성물질생산 최적화를 위한 scale up 과정으로 배지조건 최적화를 수행하였다. 1년차 연구에서 제시된 GSS배지의 경우 다른 배지에 비해 활성성분 생산량이 많은 장점이 있지만 미생물체제를 만들 때 여러 가지 공정상에 문제를 일으키는 불용성 soybean meal이 물 1L 기준으로 25g 이나 들어가 배양액의 물성이 매우 불량할 소지를 가지고 있다. 이를 해결하기 위해 다양한 GSS배지의 조성을 조정하면서 활성물질 생성량을 비교한 결과 soybean meal이 활성물질 생성과 매우 밀접한 관계를 가지며 이 성분에 비례하여 활성물질량이 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 그래서 1차 목표는 모두 수용성인 배지 성분을 찾아 제형상의 물성을 확보문제를 해결하는 정성적인 것이고 2

차 목표는 1차 목표에서 확보된 배지성분의 량을 조절하여 활성물질 key factor를 찾아내는 것이며 3차 목표는 최종적으로 배양의 scale up에서 사용될 산업용 배지를 사용하여 경제성을 확보하는 대량생산 체제의 생산원료를 탐색 확립하는 것이다.

1). 미생물제제 제형상 우수한 수용성 배지성분 탐색

일반적인 방선균 배양에서 사용되는 8가지의 각각의 배지를 이용하여 SH-09를 배양한 후 검정균을 이용한 in vitro test를 통해 GSS와 유사한 활성을 나타내는 2가지 배지 조성 GSY배지(glycerol 10g, starch 5g, yeast extract 5g in water 1L)와 GUPB배지(glucose 10g, peptone 10g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄ 0.1g in water 1L)을 선발하였다. 이 중 GSY배지는 기존의 GSS배지와 활성물질 생성량이 거의 같으면서도 배양액의 물성은 제형화에 훨씬 우수한 배지성분이며 그 조성물도 매우 단순하여 scale up 산업화에도 매우 유용한 특성을 갖는다. 특히, C/N ration를 비교해 보면 GSS가 1: 1인 반면 GSY는 2:1로 탄소의 비율이 높지만 1L에 포함된 절대량은 GSY가 탄소원(C)은 1/3, 질소원(N)은 1/6로 균체의 1차 성장보다는 2차 대사산물을 만드는데 유리한 조성이며 훨씬 배지를 효과적으로 사용하는 조성이라 할 수 있다. 실제로 균체의 배양에서 균사 pellet의 형성이 줄어들고 배양상태도 양호한 것으로 나타나 GSY배지를 scale up을 위한 기본배지성분으로 설정하였다.

2). GSY배지의 변형을 통한 항생물질의 생산

GSY배지에서 glycerol을 2배로 증가시켰을 때는 활성물질생성은 유사했으나 균체생장은 감소하는 경향을 보여 지방산을 이용한 탄소원 증가가 배양에 유리하지 않았으며 glycerol을 glucose로 바꾸고 그 양을 2배로 증가시켰을 때는 활성물질이 생산되는 기간이 약간 빨라졌으나 배양 후 7일 이후의 절대량은 동일했고 균체 생장은 오히려 감소시키는 경향을 보였다. 위 결과를 바탕으로 대량배양에서는 고가의 원료로 사용이 어려운 yeast extract를 대체할 수 있는 soytone 25g을 사용했을 때 활성물질 생산기간도 단축되고 양도 충분히 확보할 수 있었다. 하지만 활

성물질 생산량의 최적조건은 yeast extract가 포함된 조성이었으며 starch 5g, soytone 25g, yeast extract 5g 조성인 배지성분에 glycerol 10g이 glucose 10g 보다 균체성장에는 유리했지만 활성물질생산에는 불리한 것으로 나타났다.

마. 산업용 배지를 이용한 활성물질생산

GSY배지의 변형을 통해 얻은 결과를 바탕으로 실제 생산현장에서 사용되는 배지성분을 이용한 배양을 수행하였다. 배양에 사용된 원료로는 CSL[corn steep liquor(sugar 40brix, protein 40%)], whey(protein 11%, lactose 60~65%), molasses(sugar 50%), fish meal이 사용되어 각각의 조합에서 활성을 검정한 결과 CSL 20g과 Molasses 5g 조합이 균체 성장 및 생산속도 생산량 모두 가장 우수한 것으로 나타났다. 이 결과는 산업용 배양에 직접 적용할 수 있을 것으로 판단되며 향후 표면반응분석법(SAS, MiniTab)을 이용한 최적화를 통한 배지 성분농도 조정 및 물질구조분석에서 나오는 물질 생성기작 확인을 통한 metabolic activator 나 precursor를 이용한 항생물질생산 최적화 이전의 1단계 산업용 최적화를 달성했다고 할 수 있다.

바. 시제품 생산용 물질배양

생물시험, 특히 포장시험의 특성상 시험이 가능한 기간이 정해져 있으므로 주어진 기간에 시험을 수행하기 위해서는 연구기간 초반에 시제품을 제작할 수 있도록 제제연구에 생산용 원제를 제공하여 하기 때문에 실제 시제품 생산용 배양물질은 1차년도 시험결과 활성이 인정된 GSS 배지로 배양한 시료를 사용하였다. 하지만 이 시료의 경우 표준화된 in vitro 검정법에 의해 활성지수를 예측할 수 있으므로 후에 산업용 배지를 이용한 scale up 후의 배양액에 대한 약효를 예측할 수 있는 자료로 활용할 수 있으며 특히 물질구조동정이 완료되어 분석법이 확립된 후에는 더욱 정밀한 자료를 확보할 수 있을 것이다. GSS배지의 경우 대량으로 배양기에서 배양하기에는 배지의 물성이 불량한 관계로 배양기 배양을 수행하지 않고 위에서 서술했듯이 배지 개량연구를 진행하여 산업용

배양이 가능하도록 개선하였다. 그래서 2차년도에 생물활성 검정용 시료는 산업용으로 만들어지기 이전의 lab scale에서 생산된 시료로 생산표준화 이전의 시료이지만 생물활성은 예측할 수 있는 시료이다. 시제품 생산을 위한 시료생산은 200ml의 GSS배지를 담은 1L flask에 3일간 배양한 집중원 10ml을 접종하여 7일간 배양한 후 원심분리를 통해 불용성 물질을 제거한 배양여액을 동결건조를 통해 이루어졌고 필요한 원제는 flask 배양을 반복하여 확보하였다.

사. Pilot scale 생산

3년차에는 최종적으로 이전까지 연구된 배양관련 연구결과를 바탕으로 Pilot scale의 배양을 수행하였다. 대형발효조(300L : working volume 150L)에서 배양을 실시하였고 그 구체적인 방법은 다음과 같다.

- 1) SH-09균주를 고체배지로 만든 GSM배지[starch 10g, glucose 20g, molasses 5ml, yeast extract 5g, peptone 5g, calcium carbonate 2g, pH7.0(with KOH)] 접종하고 3일간 배양함
- 2) 4개의 1L flask,에 300ml 씩 GSM배지액을 넣고 살균 후 종배양체 30ml 씩 접종하고 2일간 배양
- 3) 전배양 : GSCB배지(glucose 15g, corn steep liquor 20g, starch 10g, yeast extract 4g) or GSS modified(glucose 20g, starch 10g, corn steep liquor 5g(adjusted pH6.9 with KOH) soybean powder 25g, beef extract 1g, yeast extract 4g, NaCl 2g, KH₂PO₄ 0.5g) 20L에 접종하고 2일간 배양(50L jar fermenter)
- 4) 본배양 : GSCS배지 or GSSmodified 150L에 접종하고 5일간 배양(300L jar fermenter)
- 5) 원심분리 및 농축 후 동결건조

* 120rpm에서 1v/vm(150L air/min) - 1분간 배지 1L에 1L air 공급
 본 pilot scale 배양에서 GSCB배지의 경우는 활성뿐만 아니라 균체 생장에 우수한 조건을 제공하였고 GSSmodified배지는 균체량은 적었지만 활성은 더 뛰어났다. 기본적인 활성은 검정균을 이용한 in vitro test와 지표물질인 neopeptins의 HPLC 검정으로 확인하였다.

9. 생물활성검정 및 포장시험

가. 1차년도 균주선발 활성검정

최종적으로 SH-09가 선발되기 전 1차년도에는 SH-05에 대한 시험을 수행하였다.

오이를 본엽 1~2엽까지 육묘하였는데, 떡잎에는 흰가루병이 발생하였다. 이러한 오이 유묘에 1회 약제를 처리하고 2일 후에 흰가루병을 분무 집중하여 약효를 조사한 결과, 희석배수에 상관 없이 50% 이상의 방제가를 나타내어 실용성이 있다고(표46) 판단되었지만 미흡한 수준이었다.

표46. 오이 흰가루병에 대한 in vivo 시험 결과

공시약제	희석배수	병반 면적율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		A	B	C	평균		
SH-05 20% SC	1,000	22.5	15.0	10.0	15.8	b	54.9
SH-05 20% SC	500	15.0	12.5	15.0	14.2	b	59.4
SH-05 20% SC	100	10.0	20.0	15.0	15.0	b	57.1
훼나리 유제(대조)	4,000	5.0	2.5	5.0	4.2	a	88.0
무처리	-	30.0	40.0	35.0	35.0	c	·-

C.V(%)----- (27.9)

오이 흰가루병 시험 : 오이 흰가루병이 발생하기 시작하는 농가의 오이 포장을 임대하여 7월 9일부터 7일 간격으로 3회 약제를 경엽 처리하고, 최종 약제처리 7일 후 병반면적율을 조사하여 발병도로 환산하여 약효를 평가하였다. 그 결과, 희석배수 100배에서는 33.5%의 낮은 방제가를 보인 반면, 희석배수 50배에서는 대조약제와 유의차가 없이 66.0%의 우수한 방제가를 나타내어 개발가능성이 있음을 확인하였다.

표47. 오이 흰가루병에 대한 소포장 시험 결과

공시약제	희석배수	발병도(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		A	B	C	평균		
SH-05 20% SC	100	32.0	20.4	27.5	26.6	b	33.5
SH-05 20% SC	50	10.0	8.7	22.2	13.6	a	66.0
훼나리 유제(대조)	4,000	13.2	10.3	21.4	15.0	a	62.5
무처리	-	41.2	40.0	38.8	40.0	c	-

C.V(%)----- (19.7)

딸기 흰가루병 시험 : 딸기 흰가루병이 발생하기 시작하는 농가의 딸기 포장을 임대하여 5월 16일부터 7일 간격으로 3회 약제를 경엽 처리하고, 최종 약제처리 7일 후 병반면적율을 조사하여 발병도로 환산하여 약효를 평가하였다. 그 결과, 대조구인 웨나리 유제가 55.7%의 방제가를 보인 반면, 활성물질은 희석배수 100배에서 68.4%의 방제가를 보임에 따라 개발 가능성이 있음이 판단되었다.

표48. 딸기 흰가루병에 대한 소포장 시험 결과

공시약제	희석배수	이병과율(%)				방제가 (%)
		A	B	C	평균	
SH-05 20% SC	100	9.0	5.0	8.0	7.5	68.4
웨나리 유제(대조)	3,000	14.0	11.0	6.5	10.5	55.7
무처리	-	26.5	19.5	25.0	23.7	-

1차년도에는 SH-05 시험을 수행하면서 동시에 다른 후보군주에서 약효가 우수한 SH-09를 선발하였다. SH-09에 대한 시험은 2차 년도부터 대량생산연구를 수행하면서 제작되는 시료를 가지고 온실 및 포장시험을 수행하였다.

나. 선발된 SH-09의 제형에 따른 활성검정 : in vivo 시험

1년차 SH-05에 이어 2차 년도부터 선발된 SH-09는 주관기관 활성검정결과 SH-05에 비해 뛰어난 약효를 가지고 있음이 확인되어 2차년부터는 SH-09를 가지고 본격적인 활성검정을 수행하였다. 생물검정에 사용할 제형을 선발하기 위하여 처방검토를 수행한 처방1에서 처방5까지의 시료에 대해서 in vitro 검정법과 오이 흰가루병의 pot 시험을 수행하였다. in vitro 검정법을 통해 활성물질량을 비례적으로 정량할 수 있었고 모든 처방에 동일한 유효성분(30%)가 들어있기 때문에 처방 간에

inhibition zone의 차이는 인정되지 않았다. in vitro 검정법으로 활성농도를 예측하여 오이 흰가루병 pot 시험을 수행한 결과 모든 처방이 500배 희석액에서도 80%이상의 방제가을 보였으며 그 중 방제가 95%이상의 가장 약효가 우수한 처방5을 선발하게 되었다.

선발된 처방5를 이용하여 보리 흰가루병을 포함한 다른 계통의 주요 식물병에 대한 스펙트럼 조사를 실시하여 주요 작용 대상은 역시 흰가루병이고 도열병에도 약효가 있는 것으로 판단되었지만 수도용 개발은 경제성 검토를 통해 제외하였다.

선발된 제제를 이용하여 약제의 작용특성을 조사하기 위하여 오이식물에 흰가루병 유도를 약제처리 전과 후에 실시하여 약제의 예방 및 치료효과를 검정한 결과 예방효과뿐만 아니라 치료효과도 우수한 것으로 나타났다.

1) 선발된 제제의 작용 스펙트럼 조사

중요한 6 가지 식물병에 대하여 실제 제품형태의 제형으로 제조된 SH-09 30%WP(처방5)의 방제 효과를 식물체의 유묘를 사용하여 온실에서 검정하였다.

검정대상인 식물병과 그에 따른 기주식물 및 병원균은 다음과 같다.

식물병	기주식물	병원균
도열병	벼	<i>Magnaporthe grisea</i>
잎집마름병	벼	<i>Rhizoctonia solani</i>
잣빛곰팡이병	토마토	<i>Botrytis cinerea</i>
역병	토마토	<i>Phytophthora infestans</i>
녹병	밀	<i>Puccinia recondita</i>
흰가루병	보리	<i>Blumeria graminis</i>

SH-09 30%WP 제제는 250배의 희석액에서 벼 도열병과 보리 흰가루병에 대하여 85와 83%의 병방제 효과를 보였다. 그러나 나머지 병에 대한 방제 효과는 약 40% 이하로 매우 낮았다. 벼 도열병과 보리 흰가루병에 대한 효과도 미생물 제제에 대한 희석 배수가 높아짐에 따라 감소하여 500배 희석액의 경우, 65와 58%의 효과를 나타냈다.

표49. SH-0의 중요한 식물병에 대한 방제 효과

희석배수	RCB	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM
2000	10 ^a	5	7	0	33	42
1000	60	25	0	14	33	42
500	65	30	0	7	33	58
250	85	40	7	21	43	83

^a 모든 숫자는 방제가를 나타냄. 방제가는 아래의 식에 의해서 계산하였음.

$$\text{방제가(\%)} = \left(1 - \frac{\text{처리구에서의 발병율}}{\text{무처리구에서의 발병율}} \right) \times 100$$

RCB; 벼도열병, RSB; 벼 잎집얼룩병, TGM; 토마토 잿빛곰팡이병
TLB; 토마토 역병, WLR; 밀 붉은녹병, BPM; 보리 흰가루병

2) 선발된 제제의 작용특성 조사 (예방 및 치료효과 조사)

오이 성체를 이용한 온실실험 결과 SH-09 30%WP는 예방효과뿐만 아니라 치료효과도 우수한 것으로 나타났다. 500배로 희석하여 처리한 경우 예방 및 치료 처리에 의한 방제 효과는 89.5와 68.4%로, 치료 효과 보다는 예방 효과가 크게 나타났다.

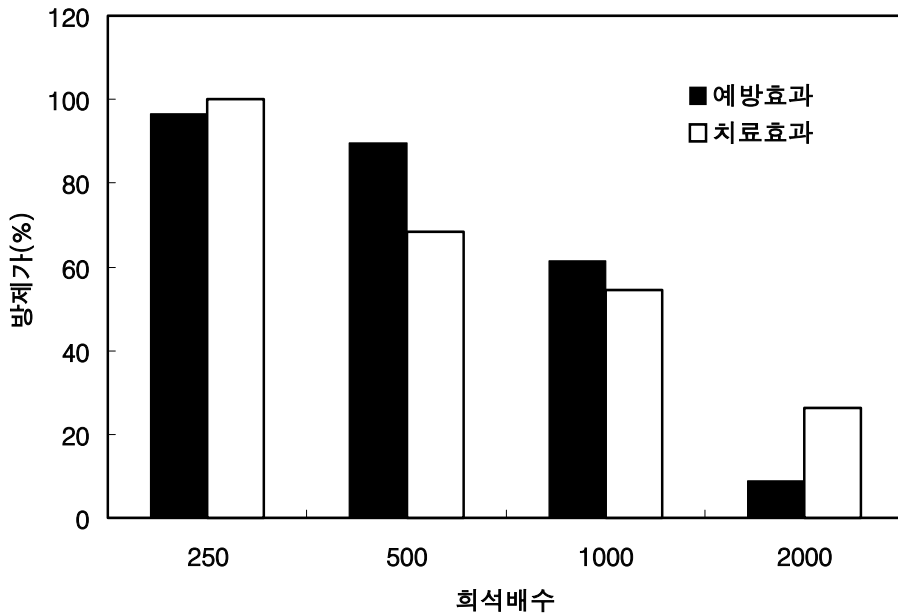


그림26. 오이 흰가루병에 대한 SH-09 30%WP의 예방 및 치료효과

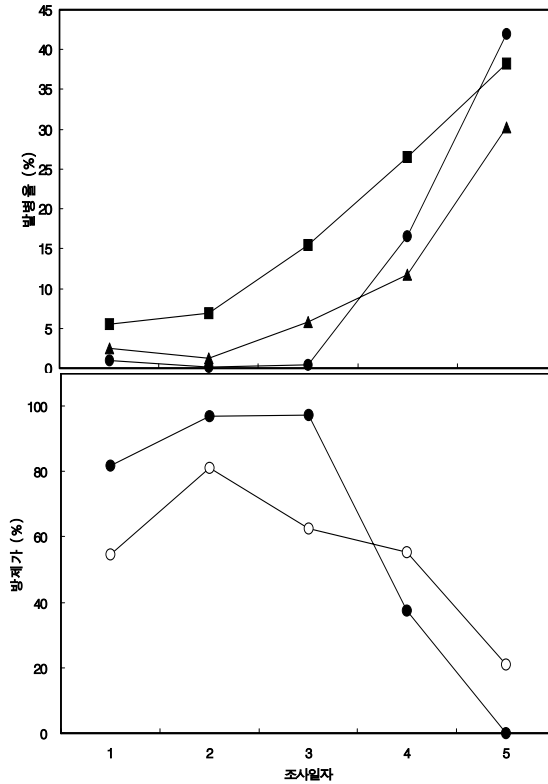
다. 시제품의 포장 시험

포장 시험은 이전의 *in vivo* 시험결과를 바탕으로 제형화된 제제 (SH-09 30%WP)의 약효검정에 초점을 맞추어 수행되었다. 스펙트럼 검토를 통해 흰가루병원균에 대한 시험으로 포장시험이 설계되었고 1차년도 약효평가를 통해 가장 좋은 시험대상인 오이 흰가루병에 대한 포장 (하우스) 시험을 수행하였다. 특히 본 연구가 상업화될 경우 화학농약 사용이 불가능한 유기농 하우스에서도 사용이 가능한 만큼 유기농을 하고 있는 농가에서 시험을 수행하였고 그런 관계로 화학농약을 대조약제로 사용 못한 아쉬움이 있지만 대신 현재 시판되고 있는 미생물제제를 대조 약제로 하여 시험을 수행하였다.

1) 포장에서 SH-09 제제의 방제효과

SH-09 30%WP의 500배의 희석액으로 오이 시설하우스에서 재배한 오이 성체에 처리한 결과, 1주일 간격으로 약제를 3회 처리하고 마지막 처

리 후 1주까지 약 97%의 방제 효과가 계속적으로 유지되었다. 그러나 4주 후부터는 37.6%로 방제효과가 급격히 감소하였고, 5주후에는 방제 효과가 전혀 나타나지 않으며, 무처리구와 동등한 발병율을 보였다.



- SH-09 30%WP ▲ 시판중인 미생물제제 ■ 무처리
- SH-09 30%WP ○ 시판중인 미생물제제

그림27. 오이 하우스재배에서 SH-09 30%WP에서 흰가루병에 대한 방제효과

위 결과로 상업화 제형에 준하는 제품(SH-09 30%WP)의 형태로 포장에서 화학농약처럼 사용할 수 있을 가능성을 확인했다. 기존에 시판중인 미생물제제보다 전체적인 약효면에서는 우수했지만 지속성은 약간 떨어지는 경향을 보였다. 예방뿐만 아니라 치료효과를 갖는 속효적인 특성은 화학농약 사용이 불가능한 수확직전에 사용할 수 있는 특화된 제품의 개발가능성이 매우 높았다.

2) Pilot scale 배양시료를 이용한 SH-09 30%WP의 약효확인 포장시험

오이 흰가루병(*Sphaerotheca fusca*)에 대한 약효평가를 위하여 오이(품종;백다다기)를 일반 농가관행 재배법에 준하여 재배하였고 시험구는 임의배치법에 따른 3반복으로 발병초 7일 간격으로 3회 경엽처리 후 구당 20주, 100엽 이상의 발병도를 조사하였다. 마지막 처리 7일 후 약효에 대한 시험결과는 다음과 같았다.

약제명	희석 배수	발병도 ^a				유의차 (DMRT)	방제가(%)
		1반복	2반복	3반복	평균		
SH-09 30%WP	500	3.5	4.0	4.2	3.9	a	92.1
SH-09 30%WP	1,000	5.9	6.1	6.5	6.2	a	87.6
대조약제 (훼나리 12.5%EC)	4,000	13.1	11.5	12.8	12.5	b	74.8
무처리	-	52.2	50.1	46.5	49.5	c	-

C.V(%)------(8.75)

발병도 = $\frac{\sum(\text{발병수} \times \text{개체수})}{4N} \times 100$

위 포장시험 결과로 대량배양을 통해 생산된 배양물을 가지고 제조된 SH-09 30%WP의 활성을 확인함으로써 본 과제가 추구하였던 산업화 시 실용성을 확보하는 제품을 확보할 수 있었다.

제4장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

1. 1차년도 연구개발의 목표 달성도

세부과제 : 흰가루병 방제용 유용미생물의 생물활성 특성 검정 및 활성물질의 탐색

가. 흰가루병 생물검정법 확립

담배 잎과 오이 잎을 공시하여 길항 세균과 방선균의 흰가루병 방제 효과를 효과적으로 검정할수 있는 생물 검정법을 확립하였다.

나. 활성균주의 항균 스펙트럼 검정

항균활성균주의 딸기, 오이, 담배, 토마토, 구기자 흰가루병에 대한 방제 효과를 in vivo 온실 시험 및 소포장 시험으로 검정하였다. 보리흰가루병에 대한 효과는 현재 수행 중이다. 길항세균인 SH-05균주와 방선균인 SH-09균주 모두 각종 흰가루병에 대한 방제효과가 우수하였고 특히 SH-09균주는 화학농약인 대조약제보다 방제효과가 좋았다.

다. 기본 배양법 확립

항균활성균주(SH-05, SH-09)의 배지, 배양 온도, 배양 기간 및 회전 속도(rpm) 등의 균들의 특성을 조사하여 높은 항균활성을 나타내는 기본배양법을 확립하였고 대량배양을 위한 기초자료로 활용할 수 있게 되었다.

라. 항균활성물질 생성능 조사

제제화 시험에 필요한 조정제물을 확보하기 위한 활성 성분의 정제 방법을 확립하였다. SH-05균주가 생산하는 항균활성물질 조추출물 확보를 위하여 에타놀, 메타놀, 침전물의 방제효과를 조사하였고 크로마티그래피를 통하여 활성물질의 순화를 시도하였다. SH-09균주가 생산하는 활

성물질의 순화, 정제를 수행하였다.

마. 활성균주의 분류학적 특성 조사, 동정

세균과 방선균 동정에 널리 사용하는 분자생물학적 방법인 16S rDNA의 염기서열 분석과 배양적 특성, 주사전자현미경(SEM)관찰을 통하여 동정을 실시하였다. SH-05균주는 *Burkholderia* sp., SH-09균주는 *Streptomyces* sp.으로 동정되었으며 정확한 종의 동정을 위하여 생리, 생화학적인 분석을 비롯한 추가 실험이 진행 중이다.

협동과제 : 환경친화형 제형화 기술개발

가. 기본 제형 연구

1) 활성 물질의 특성 조사 분석

제형화 기술개발을 위하여 SH-05균주의 활성을 나타내는 물질을 포함하는 원제의 기본적인 이화학적 특성을 조사, 분석하여 기본 제형 연구에 활용하였다.

2) 기본 제형 연구

활성물질의 이화학적 특성과 작용상의 특징을 고려하여 액상 및 고상 제형에 대하여 가능한 제형을 검토한 다음, 가장 적절한 제형을 선발하여 처방연구를 수행하였고 다양한 보조제를 이용하여 우수한 물성을 가지는 처방을 확립하였다.

3) 경시 안정성 시험

생물농약의 경우, 화학농약과는 달리 경시적으로 안정성이 악화될 수 있으므로 처방연구를 통하여 확립된 제품을 대상으로 약효보증기간내의 제품의 안정성을 확보하고자 경시안정성 시험을 수행하였다.

나. 독성 연구

SH-05균주의 활성 물질에 대한 독성을 판단하기 위하여 원제의 포유동물 독성 시험인 급성경구독성시험, 급성경피독성시험, 안점막자극성시

험, 피부자극성시험, 피부감작성시험을 수행하여 모두 저독성 또는 자극성이 없는 것으로 나타났다.

다. 생물 활성 검정

1) in vivo 시험 수행

유리 온실 및 실내에서 in vivo 시험 기준과 방법에 따라 주관연구기관으로부터 받은 SH-05균주 농축액의 기본 제제에 대한 오이 흰가루병 실내 시험을 수행 하여 생물 활성을 확인하였다.

2) 소포장 시험 수행

오이 시설재배 포장 및 딸기 시설재배 포장을 임대하여 SH-05균주의 기본 제제에 대한 흰가루병 소포장 시험을 수행하여 생물 활성을 확인하였다.

2. 2차년도 연구개발 목표의 달성도

세부과제: 흰가루병 방제용 유용미생물의 생물 활성 특성 검정 및 활성물질의 탐색

가. 선발균주의 동정 및 활성검정

흰가루병균에 항균활성이 우수한 SH-09 균주를 동정하기 위하여 배양적, 형태적, 생리적 특성을 조사하였으며, 16S rDNA의 염기서열을 분석하였고 NCBI GenBank의 data base와 비교하였다. 그 결과 *Streptomyces* sp.로 동정하였으며 기존에 보고된 *Streptomyces*와는 다른 신종으로 판단하였다.

- 1) 항균활성균주(SH-09)가 생성하는 항균활성물질의 최적 생성 조건을 알아보기 위하여 GSS 배지를 사용하여 배양시간별로 항생물질의 생산변화를 조사하였고 GSS배지외에 modified GSS 배지와 MB broth 배지의 항생물질 생산성을 조사하였다.

2) 활성검정 및 작용 특성 조사

1차 년도에는 SH-09 균주의 각종 흰가루병(오이 흰가루병을 비롯한 5종의 흰가루병)에 대한 우수한 방제효과를 보고하였고, 금년에는 보리 흰가루병에 대한 방제효과를 in vivo 온실 실험으로 검증하였으며 흰가루병균 이외에 벼도열병균(*Magnaporthe grisea*)을 비롯한 9종의 식물병원균에 대한 항균활성을 in vitro paper disk법으로 검증하였다.

SH-09 균주의 오이 및 담배 흰가루병에 대한 예방 및 치료효과를 조사하여 SH-09 균주가 흰가루병에 대하여 예방효과 및 치료효과가 있음을 확인하였으며 약효지속기간을 조사하였다.

나. 활성물질의 순화 및 정제

- 1) SH-09 균주가 생산하는 항진균활성 물질의 분리, 정제를 위하여 물질의 용매 추출성과 레진 흡착성을 조사하였으며 silica gel column chromatography 및 TLC분석과 HPLC 분석을 통하여 3개의 main peak를 확인하였고 이들의 분자량을 조사하였으며 NMR spectrum 분석을 진행 중에 있다

다. 미생물 원제의 물리 화학적 특성

- 1) SH-09 균주의 온도 및 광(자외선)에 대한 안정성과 균주 계대에 대한 안정성을 조사하였으며 활성물질의 열, pH 안정성을 조사하였다.

라. 소포장실험

- 1) SH-09 균주의 배양물을 이용하여 오이 재배하우스에서 흰가루병에 대한 방제 효과 시험을 수행하여 병방제 효과를 확인하였다.

협동과제: 환경친화형 제형화 기술 개발

가. 선발균주 배양법 최적화

1) 기본배양조건 확립

1차년도 생물활성시험결과 담배, 오이, 딸기 등의 다양한 작물의 흰가루병에 높은 방제 활성을 나타낸 SH-09균주에 대해서 미생물 동정결과

를 바탕으로 배양을 위해 점검해야 할 기본 사항들에 대하여 연구를 수행하였다. 그 결과 방선균인 유효미생물(SH-09)의 산소요구도, 활성측정용 in vitro 검정법, 대량배양 형태인 액체배양에서 포자생성 및 균사 생존성, 계대배양에서 안정적인 활성물질을 생산하는 산업용 균주로서의 안정성, 2차 대사가 이루어지기까지의 기간이 연구되어 기본배양조건을 확립할 수 있었다.

2) Scale up 과정에서 최적배양조건 확립

기본 배양조건을 기초로 활성물질생산 최적화를 위한 scale up 과정으로 배지조건 최적화를 수행하였다. 기존에 제시된 GSS배지의 단점을 극복한 새로운 배지조성을 찾아내어 활성물질생산의 주요 인자를 확인했으며 산업용 배지성분 적용을 위한 기초 자료를 확보하였다. 그 결과 시약용 고가 배지조성을 경제성을 확보할 수 있는 대량배양용 산업화 배지로 대체할 수 있었다.

3) 시제품 생산용 물질배양

시제품 생산은 생물시험의 특성상 특정 기간이전에 시료가 공급되어야 하기 때문에 기존에 제시된 GSS배지를 이용하여 생산을 하였다. 생산된 원제의 활성 정도를 in vitro 검정법에 의해 정량화 하였기 때문에 추후에 계속되는 배양최적화 이후의 시료에 대해서 시제품의 포장시험 결과를 활용할 수 있을 것이다.

나. 처방 개선 연구

1) 약효증진용 부자재 탐색

활성물질의 이화학적 특성과 작용상의 특징을 고려하여 가능한 부자재를 선별하고 처방별로 시료를 제조한 다음, 처방별 이화학적 및 생물활성을 비교하여 최적의 부자재 조합을 가지는 처방을 선별하였다.

2) 포장시험용 시제품 생산

상기연구에서 확립된 최적의 처방을 이용하여 포장시험용 시제품을 생산하여 생물시험용 시료로 제공하였다.

3) 경시 안정성 시험

생물농약의 경우, 화학농약과는 달리 경시적으로 안정성이 악화될 수

있으므로 처방연구를 통하여 확립된 제품을 대상으로 약효보증기간내의 제품의 안정성을 확보하고자 경시안정성 시험을 수행하였으며, 그 결과 경시적으로도 안정적인 물성을 보이는 것으로 확인되었다.

다. 독성 연구

제품의 독성을 판단하기 위하여 계획된 포유 동물 독성 시험인 급성경구독성시험, 급성경피독성시험, 급성어독성시험을 정상적으로 수행하여 급성경구독성과 급성경피독성은 독성분류상 저독성으로 급성어독성은 독성분류상 어독성 3급으로 확인되어 제품화하는데 문제가 없을 것으로 판단되었다.

라. 생물 활성 검정

1) 제형에 따른 활성검정 : in vivo 시험

제형화 검토가 된 5가지 처방에 대해서 in vivo검정법 및 오이 흰가루병에 대한 pot 시험결과 가장 활성이 우수한 처방5번을 선발하고 실제 제형화된 SH-09 30%WP의 주요 식물병에 대한 스펙트럼 검토를 한 결과 벼 도열병과 보리 흰가루병에 활성이 높은 것을 확인했다. 이 중 오이 흰가루병에 대한 예방 및 치료 효과검증을 한 결과 본 약제는 예방뿐만 아니라 치료효과도 동시에 가지며 매우 속효적인 효과는 나타냄을 확인하였다.

2) 포장 시험 수행

오이를 재배하는 유기농 하우스에서 흰가루병에 대한 포장시험을 1주간격 3회 처리로 수행한 결과 마지막 처리 후 1주일까지 97%의 방제가를 보였으며 기존에 개발되어 있는 흰가루병에 등록된 화학농약에서 관찰되었던 것처럼 1주일 후부터는 약효가 급격히 감소하는 것으로 나타났다.

3. 3차년도 연구개발 목표의 달성도

세부과제 : 흰가루병 방제용 유용미생물의 생물활성특성검정 및 활성물질의 탐색

가. 항균활성물질의 구조분석

SH-09의 배양여액으로부터 용매추출과 각종 column chromatography를 통하여 3개의 항균활성물질을 분리하였고 ^1H -, ^{13}C -NMR, LRESIM, MALDI/TOF/MS, HPLC분석을 통하여 항균활성물질의 분자량과 구조를 확인하였다. 그 결과 항균활성물질은 분자량이 각각 1175, 1190 및 1161이며 구조식이 $\text{C}_{53}\text{H}_{81}\text{N}_{11}\text{O}_{19}$, $\text{C}_{54}\text{H}_{83}\text{N}_{11}\text{O}_{19}$, $\text{C}_{52}\text{H}_{79}\text{N}_{11}\text{O}_{19}$ 인 neopeptin A, B 및 C인 것으로 밝혀졌다.

나. 시제품의 포장시험

시제품으로 생산한 SH-09 30% WP를 이용하여 오이, 딸기, 파푸리카가 재배되는 농가의 비닐하우스 포장에서 흰가루병 방제효과시험을 농약관리법상의 시험방법에 준하여 실시하였다.

협동과제 : 환경친화형 제형화 기술개발 및 독성연구

가. 시제품 생산용 물질 배양

시제품 생산을 위하여 SH-09균주를 대형발효조(300ℓ)를 이용하여 Pilot scale의 배양을 실시하였다.

나. 포장시험용 시제품 생산

SH-09 배양물의 시제품을 30% 수화제(WP)형태로 생산하였다.

다. 생물농약 등록을 위한 독성 검토

안정성 평가분야로 인·축 독성분야 및 환경생태독성분야의 시험을 생물농약 등록법에 준하여 실시하였다. 인·축 독성분야는 SH-09 30% 수

화제의 급성경구독성시험, 급성 경피독성 시험을 수행하였으며, 환경생태 독성분야는 SH-09 수화제의 잉어를 이용한 급성어독성시험, 물벼룩류 급성유영저해시험을 수행하였고 그 결과 모든 시험에서 저독성이 인정되었다.

라. 시제품을 이용한 포장시험

Pilot scale 배양시료를 제조한 시제품 SH-09 30% WP의 약효 확인시험을 오이 흰가루병을 대상으로 포장시험으로 실시하였다.

4. 최종평가의 착안점 및 관련 분야에의 기여도

본 연구에서 최종평가의 착안점 및 척도는 가) 제품의 약효 및 약해(50), 나) 제품의 제제 안정성(30), 다) 제품의 생산 가능성(20)에 두었다. 본 연구를 통하여 얻은 시제품의 약효(흰가루병 방제효과)는 대조농약보다 모두 우수하였고 약해는 없었으며 시제품의 제제 안정성도 확인되었고 대량배양을 통한 시제품 생산이 성공적으로 수행되었다.

본 연구를 통하여 우수한 흰가루병 방제용 생물농약을 개발하였으며 현재 협동연구기관(경농)을 통한 상품화가 추진 중이다.

본 연구를 통하여 생물농약 제제화의 기술이 축적되었고 생물농약의 산업화 공정체계가 확립되었으며 생산된 제품을 통하여 각종 흰가루병이 효율적으로 제어될 것이다.

제5장 연구개발결과의 활용계획

본 연구결과를 바탕으로 사업화를 실시하고자 한다. 이를 위해 본 연구를 통해 개발된 생물농약은 2005년 동작물 등록시험에 진입하였다. 또한 본 연구의 결과는 주관기관에서 기 출원한 SH-09의 특허(2004년 출원) 외에 협동기관에서도 생물농약(생화학농약) 등록 시 독점적 권리를 행사할 수 있는 특허를 출원(2005년 11월 출원예정)하고자 한다. 이 특허를 바탕으로 추가연구가 필요한 대량생산공정 개발을 협동연구기관에서 추진할 예정이며 생산의 경제성 확보를 위하여 주관연구기관과의 협의 하에 SH-09의 좀 더 세밀한 연구를 진행할 예정이다. 그리하여 본 과제 연구는 향후에 개발될 생화학농약 개발에 좋은 모델로 활용할 수 있을 것이다.

결론적으로 본 과제를 통해 개발된 SH-09는 협동기관에서 생물농약으로 개발하여 등록 후 생산 및 판매를 진행하는 일련의 과정을 통해 산업화를 수행할 예정이다.

제6장 참고문헌

1. 농약공업협회. 2004. 농약연보. 선문기획. 서울
2. 농업과학기술원, 농약공업협회(2003) 농약등록시험 담당자 교육 교재
3. 농업과학기술원(1996), 농약의 검사방법, 농약과학기술원고시 제1996-2호.
4. 농촌진흥청(2004), 농촌진흥청고시 제2004-4호, 농약의 등록시험 기준과 방법
5. Asari, S., Horie, H and Nakazawa, Y. 1994. Current status in sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* to DMI in Kanto_Tosan district, Japan. Proc. Kanto-Tosan Plant protec. Soc. 41: 69-75.
6. Bélanger, R. R., Dik, A. J. and Menzies. J. M. 1998. Powdery mildews recent advances toward integrated control. In : Plant-microbe interactions and biological control. Ed. Boland, G. J. and Kuykendall, D. L. Marcel dekker, New York.
7. Braun, U. 1987. A monograph of the *Erysiphales* (powdery mildews). Stuttgart, Borntraeger publisher. 700pp.

8. Burges, H. D. (1998), Formulation of Microbial Biopesticides – beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments, Kluwer Academic Publishers, UK.
9. Endo, T. 1989. Studies on the life-cycle of cucurbit powdery mildew fungus *Sphaerotheca fuliginea*(sclecht) Poll. Spec. Bull. Fukushima Pref. Agr. Exp. Stn. 5: 1-106.
10. Erickson, E. O. and Wilcox, W. F. 1997. Distribution of sensitivities to three sterol demethylation inhibitor fungicides among populations of *Uncinula necator*. Phytopathology 92: 1119(Abstr).
11. Kharchenko, G. L. and Ryabchinskaya, T. A. 2000. Planriz to control American powdery mildew on black currant. Zashchita-i-Karantin-Rastenii. 9: 38-39
12. Knowles, D. A. (1998), Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations, Kluwer Academic Publishers, UK.
13. OECD. 1996. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 203, Fish, Acute Toxicity Test
14. OECD. 1996. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 401, Acute Oral Toxicity Test.

15. Shin, H. D. 1994. Powdery mildew fungi and their host plants from Kangwon province. *The Korean J. Mycol.* 22: 229-246.
16. SHin, H. D. 2000. *Erysiphaceae* of Korea. 농업과학기술원
17. Spencer, D. M. 1978. *The powdery mildew*. London. Academic press.
18. Sudhakar, P., Gangwar, S. K. Sahu, P.K. 2000. Evaluation of some nitrogen fixing bacteria for control of foliar disease of mulberry. *Indian J. of Sericulture.* 39:9-11.
19. Verhaar, M. a., and T. Hijwegen. 1993. Efficient production of phialoconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew *Sphaerotheca fuliginea*. *Neth. J. Path.* 99: 101-103.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.