

최 중
연구보고서

목질자원으로부터 농업용 항곰팡이 방제제
제조기술 개발
Development of antifungal agents for agriculture
from wood biomass

주관연구기관
(주)유림하이텍

협동연구기관
경상대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “목질자원으로부터 농업용 항공판이 방제제 제조기술 개발에 관한 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 4월 25일

주관연구기관명 : (주)유림하이텍

총괄연구책임자 : 임 부 국

세부연구책임자 : 임 부 국

연 구 원 : 홍 성 철

최 준 식

정 규 진

협동연구기관명 : 경 상 대 학 교

협동연구책임자 : 양 재 경

연 구 원 : 박 지 현

여 희 동

요 약 문

I. 제 목

목질자원으로부터 농업용 항곰팡이 방제제 제조기술 개발

II. 연구개발의목적 및 필요성

최근 농산물에서 잔류성 농약 사용에 있어서 그 독성에 대한 위험이 일반인의 관심이 되고 있고, 무분별한 농약 사용은 병원균의 약제에 대한 저항성이 커져서 약효를 잃고 그 사용량이 점점 많아지는 결과까지 발생하게 되었다. 이러한 상황 속에서 소비자들은 점점 더 건강에 대한 관심이 높아지면서 무농약과 유기농 등의 인체에 해로운 것을 최소한으로 사용하기를 원하고 있다. 그리하여 소비자들은 친환경적 먹을거리 생산이 농업의 주된 관심사로 부각되었다. 이에 따라 화학비료 및 농약의 사용을 제한하는 친환경 농업이 다각도로 연구 개발되고 있지만, 그 적용 범위가 매우 제한적인 문제점을 가지고 있다. 특히 농산물 재배 시 발생하는 곰팡이성 질병은 농약으로도 그 질병을 통제하기 어려운 문제점이 있다. 따라서 농가에서는 곰팡이성 질병방제를 위해 미생물제재 및 화학 농약을 과다하게 사용하여 농산물의 품질 저하를 초래하는 경향이 있다.

흰가루병은 일반적으로 저온성 균주로 하우스 작물의 대표적인 피해 질병으로 알려져 있으며, 환경적 조건에 따라 약 25종의 균주가 백반(흰가루병)을 발생시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 흰가루병은 전 세계적으로 11,800여종의 식물에서 발생하는 것으로 보고(Broun 등, 1987; Koji, 1986; Spencer, 1978)되고 있으며 국내에서는 400여종의 식물에 발생하는 것으로 알려졌다. 그중에서 보리, 밀 등의 곡물류와 오이, 딸기, 토마토 등의 채소류, 사과, 포도, 배 등의 과수류, 그리고 장미, 거베라 등의 화훼류에서 흰가루병의 피해가 크다. 흰가루병은 시설재배뿐만 아니라 노리 재배에서도 많이 발생하여 큰 피해를 주고 있는 식물 병이다. 흰가루병이 발생하면 식물의 광합성과 호흡이 저해되어 동화작용과 증산작용을 감소시킨다. 흰가루병은 하위엽에서부터 시작하여 흰가루 모양의 곰팡이가 발생하여 상위엽으로 진전되며, 병이 진전됨에 따라 병반조직이 괴사하면서 급속히 노화되어 잎이 떨어지게 된다.

피해는 주로 잎에서 형성되는 병반과 낙엽에 의한 초세약화, 이에 따른 수량 감소로 나타난다. 오이의 경우 흰가루병 만연에 의해 20~50%의 수량감소가 보고되었다.

흰가루병 방제를 위해서 다양한 방법이 시도되기는 했지만 현실적인 방제에 있어서는 화학농약에 의존하고 있으며 국내에서 흰가루병 방제에 사용된 금액은 전체 살균제의 약 10%에 달하고 있다. 그러나 계속되는 살균제 사용으로 흰가루병의 약제 저항성이 유발되는 등 약효저하에 대한 보고가 계속 되고 있으며 농약의 오·남용에 의한 농산물 잔류 문제가 제기되면서 환경 친화적인 새로운 흰가루병 방제제 개발의 필요성이 대두되고 있다.

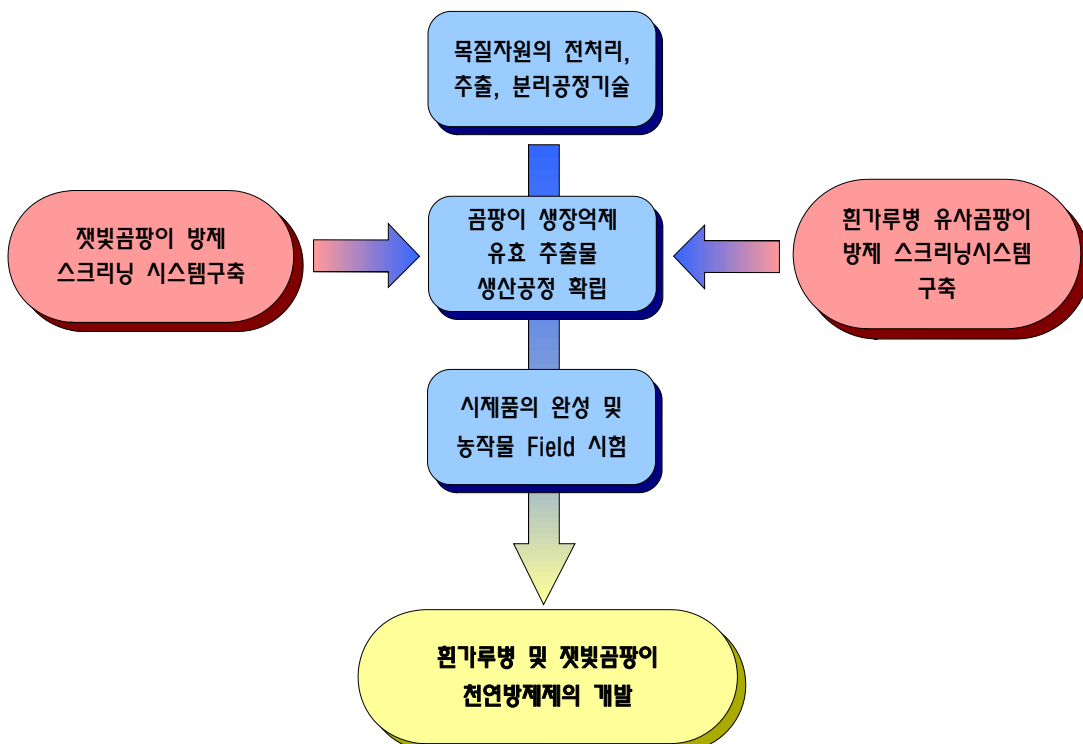
최종적으로 본 연구에서는 목재에 각종 물리 화학적 처리법을 적용하여 항균력이 강한 천연성분을 단리하여 농가에서 흰가루병이라고 오인되고 있는 곰팡이병 군사 생장억제제로서의 기능을 검증하고, 그 효능을 최적화하여 생산 농산물의 품질향상 및 친환경 농산물 생산 기술의 초석을 마련하는데 그 연구 목적이 있다.

본 연구에서 추진하고자 하는 천연물로부터 유래되는 흰가루병과 유사한 곰팡이병 방제기술은 최근 친환경 농업의 큰 초석이 될 것으로 확신하며, 향후 그 시장의 확대도 매우 유리하게 될 것으로 판단된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 과제는 임산자원 (간벌재 등)으로부터 전처리, 추출, 분리공정을 통한 식물 병원성 유해 곰팡이 방제 약품의 공정개발과 생산에 관한 연구로써 물질을 생산 기술을 확립하는 2개의 세부과제와 제제의 성능을 검사하고 개선하는 협동과제로 구성되어 수행하였다.

본 연구에서 수행한 주요 연구내용 및 범위는 다음과 같다.



| 연구 개발 목표 | 주요개발 내용 및 범위 |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">(제 1세부과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 목질원료로부터 흰가루병 유사 곰팡이 방제 유효 추출물의 분리 공정 확립 | <ul style="list-style-type: none"> · 목질자원으로부터 항곰팡이 추출물의 획득을 위한 전처리 공정 개발 · 곰팡이 생육억제 추출물 대량생산을 위한 목질 원료의 선별 및 현실적 공급형태 결정 · 목질자원으로부터 항곰팡이 원료물질을 생산 하기 위한 분리 및 정제 공정 개발 · 흰가루병 유사 곰팡이의 생육을 저해하는 목질 추출물을 위탁과제와 연계하여 선별 · 흰가루병 유사 곰팡이 생육억제제 원료 생산을 위한 공정의 확립 및 최적화 |
| <p style="text-align: center;">(협동과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 흰가루병 유사 곰팡이의 생장억제 원료물질의 선별 및 확보 | <ul style="list-style-type: none"> · 흰가루병 유사 곰팡이 균주를 확보하고 지속적인 계대배양 및 곰팡이 생장환경인자 탐색 · 제 1세부 과제로부터 생산된 목질 추출물의 곰팡이의 생육억제 성능시험 · 곰팡이 생육을 억제하는 목질 추출물 원료의 선별 및 최소저해농도 결정 · Field로부터 채취, 배양된 흰가루병 유사 곰팡이 균주에 대한 목질 추출액의 생장억제 시험 |
| <p style="text-align: center;">(제 1세부과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 흰가루병 유사곰팡이 생장억제를 위한 천연방제제 생산 기술 확립 | <ul style="list-style-type: none"> · 목질원료로부터 곰팡이병 생장억제 base 물질의 대량생산을 위한 공정 개선 연구 · 위탁과제와 연계하여 대량생산된 원료물질의 곰팡이 생장저해성능의 재확인 · 곰팡이 방제제의 시제품 생산 · 농작물 직접 방제를 통한 시제품의 현장 시험 · 화합물 첨가에 따른 시제품의 성능개선 및 농작물을 대상으로 한 현장 시험 |
| <p style="text-align: center;">(협동과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 천연 목질 항곰팡이 제제의 성능 개선 | <ul style="list-style-type: none"> · 잣빛곰팡이(<i>Botrytis cinerea</i>) 균주를 확보하고, 생육환경인자를 분석 · 공급된 목질 추출원료의 잣빛곰팡이 생육억제 성능 시험 · 잣빛곰팡이 생육을 억제하는 목질 추출물 원료의 최소저해농도 결정 · 천연 항곰팡이 방제제 성능 개선을 위한 부가 화합물의 선별 및 성능개선 방법 확보 |

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구는 목질 자원으로부터 식물 성장에 적용하는 항곰팡이 방제제 제조 기술 개발에 대한 것으로 시제품의 개발과 현장 적용 시험을 통하여 항곰팡이 제제의 이용에 대한 경제적 효과를 기대하게 되었다. 그 내용은 본문에서 자세하게 설명되어 질 것이며, 그 결과에 대한 요약문은 다음과 같다.

1. 목질원료로부터 흰가루병 방제 유효 추출물의 분리 공정 확립

(1) 목질자원으로부터 항곰팡이 추출물의 획득을 위한 전처리공정 개발 : 원료의 전처리 조건을 선정하기 위해 장비의 최적 전처리 조건을 검토한 결과 목질원료를 고온 · 고압 처리하여 파쇄 된 목질 원료를 물과 혼합하여 교반장치에서 페놀성 성분을 포함한 추출물로 추출하였다. 기건 시킨 목질원료에 증류수를 일정량 첨가, 혼합한 다음 30분 동안 120℃에서 반응시킨 후 반응 잔사와 반응 액을 분리하는 공정을 확립하였다.

(2) 곰팡이 생육억제 추출물 대량생산을 위한 목질 원료의 선별 및 현실적 공급형태 결정 : 각 통계자료를 바탕으로 참나무를 목질 원료로 선택하였다.

(3) 목질자원으로부터 항곰팡이 원료물질을 생산하기 위한 분리 및 정제 공정 개발 : 전처리 공정을 거친 목재 추출물을 정제장치에 투입하여 항곰팡이 추출 원료를 생산하기 위한 공정을 확립하였다.

(4) 흰가루병 유사 곰팡이의 생육을 저해하는 목질 추출물을 위탁과제와 연계하여 선별 : 목질 추출물 중에서 곰팡이의 생육을 저해하는 추출물을 실험을 통하여 선별하였다.

(5) 흰가루병 유사 곰팡이 생육억제제 원료 생산을 위한 공정의 확립 및 최적화 : 목재 추출물 대량 원료 생산 공정을 확립하고 공정에 따라서 제품화를 이루었다.

2. 흰가루병 유사 곰팡이 생장억제를 위한 천연방제제 생산기술 확립

(1) 목질원료로부터 곰팡이 생장억제 base 물질의 대량생산을 위한 공정 개선 연구 : 전처리 과정과 제품 생산의 최적화를 위한 공정을 확립하고 base 물질의 대량 생산을 위한 공정을 체계화하였다.

(2) 위탁과제와 연계하여 대량생산된 원료물질의 곰팡이 생장 저해성능의 재확인 : base 물질의 화학적 조성 분석을 통하여서 생산된 원료 물질이 곰팡이병에 저해 능력을 가지는 물질들의 함유를 확인하였다.

(3) 흰가루병 유사 곰팡이 방제제의 시제품 생산 : 앞선 연구 활동을 통하여서 시제품 생산을 위한 공정을 확립하고, 시스템의 최적화를 위한 보충적인 실험을 통해 시제품의 생산을 확립하였다.

(4) 농작물 직접 방제를 통한 시제품의 현장 시험 : 농작물에 직접 적용하여 시제품의 항곰팡이 효과가 상당함을 확인하였다.

(5) 화합물 첨가에 따른 시제품의 성능개선 및 농작물을 대상으로 한 현장 시험 : 시제품의 base물질에 방제제 역할을 할 수 있는 화합물을 첨가하고 이에 따라서 개선됨을 현장의 농작물에 직접 적용하여 성능을 확인하였다.

3. 병원성 곰팡이의 생장억제 원료물질의 선별 및 확보

(1) 흰가루병 유사 곰팡이 균주를 확보하고 지속적인 계대배양 및 곰팡이 생장환경인자 탐색 : 곰팡이의 생장에 적합하다고 알려진 고체배지 중에서 5종을 선택하여 *Cladosporium*을 배양한 결과, SDA배지에서의 균사생장량이 가장 높게 나타났으며, 다른 고체배지의 균사 생장량과는 5% 수준에서 유의성이 나타났다. *Cladosporium*의 최적 생장 온도는 15℃ - 25℃의 범위로 나타났으며, 40℃에서 *Cladosporium* 균사는 거의 생장이 되질 않았다. *Cladosporium*의 균사생장에 가장 적합한 pH는 7.0 - 9.0라고 판단되었다. 결과적으로 *Cladosporium*을 배양하기 위한 최적 배지는 SDA 배지였으며, 최적 온도는 25℃, pH는 7.0으로 나타났다.

(2) 목질추출물의 병원성 곰팡이 생육억제 성능 : 목질 추출물의 곰팡이 균사생장 억제율은 12%-40% 수준이었으며, 시판 곰팡이 방제제의 균사생장 억제율은 70-100%로, 목질 추출물보다 높은 억제 효능을 나타내었으며, 이결과로 곰팡이 방제제 성능을 향상시키기 위한 첨가물의 부가가 필요하다고 인식되었다.

(3) 병원성 곰팡이 생육을 억제하는 목질 추출물 원료의 선발 및 최소저해농도 결정 : 메탄올 추출물의 균사생장 최소 저해 농도는 250ppm이라 판단되며 메탄올 추출물 농도 1000ppm에서는 균사생장 저해율이 약 32%로 나타났는데 이러한 수치는 열수추출물 저해율 보다는 낮은 결과로 메탄올 추출물보다는 열수추출물에 곰팡이 생장을 저해하는 물질이 더 많이 함유되어 있다는 사실을 추측할 수 있었다.

(4) 주관연구기관이 생산한 목질추출물에 대한 작물의 안정성 시험 : 제조한 목질 추출물 원료는 작물의 성장저해를 일으키지 않음으로서 성장 저해 및 약해 현상은 일어나지 않아 방제제 원료로서의 사용이 가능함을 판단하였다.

4. 천연 목질 항곰팡이 제제의 성능 개선

(1) 잿빛곰팡이 (*Botrytis cinerea*) 균주를 확보하고, 생육환경인자 분석 : *Botrytis cinerea*는 균사생장 최적온도는 25℃이며 최적생장배지는 PSA배지 및 PDA배지라고 판단되었다. *Botrytis spp. from Kumsan*의 최적생장온도는 20℃ 및 25℃이며, 최적배지는 PSA배지, MA배지 및 PDA배지로 판단되었다.

*Botrytis spp. from Munsan*의 최적 생장온도는 20℃ 및 25℃이며, 최적배지는 PSA배지, MA배지 및 PDA배지로 판단되었다. *Botrytis cinerea*의 생육을 위한 PDA배지에 있어서 최적 pH는 pH 5.0과 pH 7.0이었다. *Botrytis spp. from Kumsan*의 생육을 위한 PDA배지에 있어서 최적 pH는 pH 5.0과 pH 7.0이었다.

*Botrytis spp. from Munsan*의 생육을 위한 PDA배지에 있어서 최적 pH는 pH 5.0과 pH 7.0이었다.

(2) 제1세부과제로부터 제공받은 목질 원료로부터 잿빛 곰팡이 생육 억제 물질의 추출을 위한 추출법 도출 : 3종의 잿빛 곰팡이에 대하여 목질원료로부터 추출된 열수추출물, 메탄올 및 에탄올추출물의 항균활성을 측정함으로써 목질원료로부터 효과적으로 잿빛 곰팡이 방제원료를 추출하는 방법을 탐색하고자 시도되었다. *Botrytis cinerea*, *Botrytis spp. from Munsan* 및 *Botrytis spp. from Munsan*에 대하여 항균활성이 가장 높은 추출물은 열수추출물이었으며, 그다음으로 메탄올 추출물이었다. 그러므로 목질원료로부터 잿빛곰팡이 방제제 원료 추출법은 열수추출법이 가장 유리하다고 판단되었다. 목질원료로부터 획득된 열수추출물의 항균활성은 균종에 따라 다르게 나타났지만, 1000 ppm 추출물농도에서 *Botrytis cinerea* 37%, *Botrytis spp. from Munsan* 24% 및 *Botrytis spp. from Munsan* 27%로 나타났으며, 이러한 항균활성은 천연물 방제제 원료로서의 가능성이 매우 높다고 판단되었다.

(3) 원료추출물의 생리활성 탐색 및 물질의 분리 : 열수 추출물의 물질분리를 위한 developing solution은 n-hexane : chloroform : ethyl acetate의 비율이 12 : 18 : 8이 가장 좋았고, 이 developing solution에 formic acid의 비율을 0.2 첨가시킨 developing solution이 물질을 가장 잘 분리시키는 것으로 판단된다. 컬럼크로마토그래피와 UV 스펙트럼 결과를 종합해보면 열수추출물은 6개의 fraction group으로 분리 할 수 있었다.

Fraction I 과 II group은 *Botrytis* spp. 3종 대하여 높은 항균활성을 나타내었다.

Fraction group I에는 9개의 페놀성 물질이 혼합되어 있는 것을 알 수 있었으며, fraction group II에는 16개의 페놀성 물질이 혼합되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 특히 fraction group 그룹 I과 II에서 7.68 분 retention time에 나타나는 물질 6번과 물질 5번은 거의 동일한 물질로 판단되며, 이 물질이 항균활성이 영향을 미친다고 추측된다.

(4) Lab. 수준에서 시제품 및 시판제품의 곰팡이 성능 평가 : 시중에 판매되고 있는 2종의 시판품과 본 연구에서 제조된 시제품 2종의 잣빛 곰팡이 3종에 대한 항균활성 능력 비교한 결과 다음과 같은 결과를 획득하였다. 본 연구진이 제조한 시제품 A는 *Botrytis* spp. from *Kumsan*에 대한 항균활성이 약 14.8%로서 시판품 D와 거의 비슷한 수준이었다.

시제품 B는 *Botrytis cinerea* 및 *Botrytis* spp. from *Munsan* 에 대한 항균활성이 13%, 19%로서 시판품 D의 항균활성 13%, 23% 수준과 거의 비슷하게 나타났다. 본 연구에서 제조된 시제품 A와 B는 현재 수준으로서는 시장 경쟁력이 약하지만, 향후, 천연물로 유래된 항균물질을 추가한다면, 시장 진입가능성은 충분히 있다고 판단된다. 본 연구의 결과물인 시제품들은 농약제조업체나 화학약품업체로부터 제조된 곰팡이방제제와는 차원이 다른 제품으로 특히 무독성으로 인체에 무해한 천연물로 구성되었다는 것이 최대의 장점이다.

SUMMARY

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.

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 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 fungicides residues and because of the widespread use of the chemicals in the field has led to the emergence of resistant isolates to fungicides.

The objective of this study is to develop of antifungal for agriculture from wood biomass.

For this purpose, it applies a various physics and a chemical method in the wood and extracts the natural ingredient where the antifungal power is strong.

verifies a function of antifungal and effect the optimization to improves the quality of agricultural products.

The result obtained are summarized as follows.

- Separation process of control extract powdery mildew from wood resource

1. **Technique development of pretreatment process on raw material** : the optimal pretreatment method was chose as high temperature and high pressure method lignocellulose material.
2. **Sorting the wood materials and supply form decision for products the anti-mold materials material** : Statistical data with character oak with wood materials selection

3. Separation and purification process for products the anti-mold materials

material : It committed the wood extract which is rough a pretreatment process to refiner and established the process for a clause mold extraction materials production.

4. Selection of wood extract which growth control of powdery mildew : sorted the material which control the growth market of the powdery mildew from in the wood extract.

5. Production for growth control of powdery mildew materials of process establishment and optimization : establishment wood extract massive materials production process and produced consequently in process.

- Natural controller product technology establishment for growth control of powdery mildew materials

1. Establishment of process system of optimum pretreatment for mass

production : The process for the optimization of pretreatment process and product production establishment and for the mass production of the material process system anger.

2. The materials material mass production of growth control of powdery

mildew efficiency confirmation : Chemical creation analysis of the base material it leads, suppression ability confirmation of the produced materials control powdery mildew.

3. Production of control powdery mildew : establishment of the process for a product production and The supplement test for the optimization of system it led and production it established.

4. Improvements product of application : applied in the crops and it confirmed the effect of the product.

5. Improvements product of application case and efficiency improvement by chemical compound addition : added the chemical compound and directness it applied it confirmed in the crops and an efficiency.

- Selection and security of growth control materialof powdery mildew

1. subculture and make certain strain of powdery mildew and growth

environment element analysis of powdery mildew : The optimum growth medium is SDA growth medium , the optimum temperature is 25°C and pH is 7.0.

2. Powdery mildew growth control performance of the wood extract : The growth suppression ratio was 12-40% . Improves an efficiency the additive for is necessary with the result.

3. Decide of concentration powdery mildew growth control of extract : That the material which suppresses the lifestyle market from the hydrothermal extract the methanol extract compared to is more it guessed.

4. Safety evaluation on wood extract : Does not get up the lifestyle market suppression of the crops as the control materials the use is possible.

- **Performance improvement of natural anti-mold subject matter**

1. Analysis of growth environment elementals make certain strain of *Botrytis cinerea* : The optimum growth medium is PSA or PDA growth medium , the optimum temperature is 20-25°C and pH is 7.0 and 5.0.

2. From the wood materials sampling process deduction for the *Botrytis cinerea* growth control matter : Test it led and the hydrothermal extraction method most was effective.

3. Demulsification and physiology activity search of extract : From result of column chromatography hydrothermal extracts separated at six fraction group.

4. Fungi performance appraisal of test production and marketing product from Lab. level : Was composed of the natural water which with nonpoisonous characteristic is harmless in the human body confirmed the thing.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of research and development

Section 1. Objective of research development

1. Effect of engineering development

Section 2. Necessity of research development

1. Definition of powdery mildew
2. Control engineering of powdery mildew
3. Ability and character of control engineering powdery mildew making from wood resource

Chapter 2. Status technique development home and abroad

1. making technology of control engineering powdery mildew from wood
2. Used the sterilizer of existing prevent powdery mildew
3. Existing control engineering of powdery mildew
4. Status technique development home and oversea of control engineering powdery mildew

Chapter 3. Contents and Results achieved in this research and development

Section 1. Separation process of control extract powdery mildew from wood resource

1. Technique development of pretreatment process on raw material
2. Sorting the wood materials and Supply form decision for products the anti-mold materials material
 - a. exports and imports of wood resources
 - b. The status of agricultural and forest waste resources
 - c. Oak materials purchase course
3. Separation and purification process for products the anti-mold materials material
 - a. wood extract production process
4. Selection of wood extract which growth control of powdery mildew
5. Production for growth control of powdery mildew materials of process establishment and optimization

Section 2. Natural controller product technology establishment for growth control of powdery mildew materials

1. Establishment of process system of optimum pretreatment for mass production
2. The materials material mass production of growth control of powdery mildew efficiency confirmation
 - a. Analysis of chemical component of base material
 - b. pH measurement
 - c. Inorganic matter content analysis by ICP analysis
 - d. Carbohydrate analysis
 - e. Volatile ingredient analysis
3. Production of control powdery mildew
4. Improvements of product for application
5. Improvements of product for application case and efficiency improvement by chemical compound addition

Section 3. Selection and security of growth control material of powdery mildew

1. Subculture and make certain strain of powdery mildew and growth environment element analysis of powdery mildew
 - a. Introduction
 - b. Material and experimental
 - 1) Subculture and make certain strain of powdery mildew
 - 2) Growth environment element analysis of powdery mildew
 - c. Results and consideration
 - 1) Strain secure and cultivation
 - 2) Growth environment of fungi
 - d. Summary
2. Powdery mildew growth control performance of the wood extract
 - a. Introduction
 - b. Material and methods
 - c. Results and discussion
 - d. Summary
3. Concentration decision of extracts for powdery mildew growth control
 - a. Introduction
 - b. Material and methods

- 1) Processing of wood extract materials
- 2) Picking and cultivation of mold from the field
- 3) Decision of extracts concentration for mold growth control
- c. Results and consideration
4. Safety evaluation on wood extract
 - a. Introduction
 - b. Material and methods
 - c. Results and consideration

Section 4. Performance improvement of natural anti-mold subject matter

1. Analysis of growth environment element and make certain strain of *Botrytis cinerea*
 - a. Introduction
 - 1) Cucumber and *Botrytis cinerea*
 - 2) Strawberry and *Botrytis cinerea*
 - 3) Tomato and *Botrytis cinerea*
 - 4) Pepper and *Botrytis cinerea*
 - 5) Pumpkin and *Botrytis cinerea*
 - 6) Watermelon and *Botrytis cinerea*
 - 7) Pear and *Botrytis cinerea*
 - b. Material and experimental
 - 1) Subculture and make certain strain of *Botrytis cinerea*
 - 2) Analysis of growth environment element
 - 3) Growth of the mycelium
 - c. Results and consideration
 - 1) Optimum medium and temperature of *Botrytis cinerea*
 - 2) Optimum medium and temperature of *Botrytis* spp. from Kumsan
 - 3) Optimum medium and temperature of *Botrytis* spp. from Munsan
 - 4) Optimum pH of medium for growth *Botrytis cinerea*
 - 5) Optimum pH of medium for growth *Botrytis* spp. from Kumsan
 - 6) Optimum pH of medium for growth *Botrytis* spp. from Munsan
 - d. Results
2. From the wood materials sampling process deduction for the *Botrytis cinerea* growth control matter

- a. Introduction
 - b. Material and experimental
 - c. Results and consideration
 - 1) Yield of extract powder
 - 2) Antibiosis activity of wood extract
 - d. Results
3. Demulsification and physiology activity search of extract
- a. Introduction
 - b. Material and methods
 - c. Results and discussion
 - 1) Demulsification under favor of the column chromatography
 - 2) Activity test of disjunct fraction group
 - 3) HPLC analysis
 - d. Results
4. Fungi performance appraisal of test production and marketing product from
Lab. level
- Chapter 4. Achievement and contribution
- Chapter 5. Results and application of research and development
- Chapter 6. Oversea technique information collected during the research and
development
- Chapter 7. References

목 차

| | |
|---|----|
| 제 출 문 | 1 |
| 요 약 문 | 2 |
| SUMMARY | 9 |
| CONTENTS | 12 |
| 목 차 | 16 |
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 | 21 |
| 제 1 절 연구개발의 목적 | 21 |
| 1. 기술개발의 효과 | 21 |
| 제 2 절 연구 개발의 필요성 | 21 |
| 1. 흰가루병의 정의 | 23 |
| 2. 흰가루병의 방제 기술 | 24 |
| 3. 목질 자원으로부터 제조된 유사 흰가루병 방제제의 기능 및 성격 | 25 |
| 제 2 장 국내의 기술개발 현황 | 27 |
| 1. 목재로부터 흰가루병 방제 제품의 제조 기술 | 27 |
| 2. 기존의 살균제를 이용한 흰가루병 방제 | 27 |
| 3. 기존의 흰가루병 방제 기술(특허) | 28 |
| 4. 국내외 회사의 흰가루병 방제 기술 보유 현황 | 40 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 | 41 |
| 제 1 절 목질원료로부터 유사 흰가루병 방제 유효 추출물의 분리 공정 확립 | 41 |
| 1. 목질자원으로부터 항공팡이 추출물의 획득을 위한 전처리공정 개발 | 41 |
| 가. 목질자원의 물리적 파괴를 위한 전처리법 조건 연구 | 41 |
| 나. 전처리 원료로부터 목재 추출물의 추출방법 연구 | 45 |

| | |
|--|----|
| 다. 원료의 최적 전처리 기술 연구 | 46 |
| 라. 원료의 전처리 공정 기술개발 | 47 |
| 2. 곰팡이 생육억제 추출물 대량생산을 위한 목질 원료의 선별 및 현실적 공급형태 결정 | 48 |
| 가. 목질 원료의 수출입 현황 | 48 |
| 나. 농산 및 임지 폐잔재의 발생현황 | 53 |
| 다. 참나무 원료 구입 경로 | 56 |
| 3. 목질자원으로부터 항곰팡이 원료물질을 생산하기 위한 분리 및 정제 공정 개발 | 58 |
| 가. 목재 추출물 생산 공정도 | 58 |
| 4. 병원성 곰팡이의 생육을 저해하는 목질 추출물을 위탁과제와 연계하여 선별 | 60 |
| 가. 목질추출물 생산을 위한 전처리 기술 연구 | 60 |
| 나. 폴리페놀류(phenolic compound) 생산을 위한 목질 원료의 전처리 연구 | 61 |
| 5. 병원성 곰팡이 생육억제제 원료 생산을 위한 공정의 확립 및 최적화 | 71 |
| | |
| 제 2 절 농작물 병원성 곰팡이 생장억제를 위한 천연방제제 생산기술 확립 | 72 |
| 1. 목질원료로부터 곰팡이병병 생장억제 base 물질의 대량생산을 위한 공정 개선 연구 | 72 |
| 2. 위탁과제와 연계하여 대량생산된 원료물질의 곰팡이 생장 저해성능의 재확인 | 74 |
| 가. Base 화합물의 화학적 조성 분석 | 74 |
| 나. pH 측정 | 75 |
| 다. ICP 분석에 의한 무기물 함량 분석 | 75 |
| 라. 탄수화물 분석 | 75 |
| 마. 휘발성 성분 분석 | 76 |
| 3. 흰가루병 유사 곰팡이 방제제의 시제품 생산 | 79 |
| 4. 농작물 직접 방제를 통한 시제품의 현장 시험 | 80 |
| 가. 시금치 농가 적용 사례 | 80 |
| 나. 토마토 농가 적용 사례 | 80 |
| 다. 딸기 하우스 농가 | 81 |
| 라. 파리 고추 하우스 농가 | 82 |
| 마. 파리 고추 양액재배하우스 농가 | 83 |
| 5. 화합물 첨가에 따른 시제품의 성능개선 및 농작물을 대상으로 한 현장 시험 | 85 |
| 가. 복합 비료 및 항곰팡이 제제의 복합화 및 성능 평가 | 85 |
| 나. 무기물과의 복합처리에 따른 공시종자의 발아 및 생장 시험 | 92 |
| 제 3 절 흰가루병 유사 곰팡이의 생장억제 원료물질의 선별 및 확보 | 94 |

| | |
|---|-----|
| 1. 곰팡이 균주를 확보하고 지속적인 계대배양 및 곰팡이 생장환경인자 탐색 | 94 |
| 가. 서 설 | 94 |
| 나. 재료 및 방법 | 99 |
| 1) 곰팡이 균주 확보 및 계대배양 | 99 |
| 2) 곰팡이의 생육환경 인자 탐색 | 101 |
| 다. 결과 및 고찰 | 103 |
| 1) 균주확보 및 배양 | 103 |
| 2) 곰팡이의 생육 환경 | 103 |
| 라. 요약 | 110 |
| 2. 목질추출물의 곰팡이 생육억제 성능 | 111 |
| 가. 서 설 | 111 |
| 나. 재료 및 방법 | 112 |
| 다. 결과 및 고찰 | 115 |
| 1) 공시재료의 이화학적 특성 | 115 |
| 2) 곰팡이의 생육저해성능 | 115 |
| 라. 요약 | 120 |
| 3. 곰팡이 생육을 억제하는 목질 추출물 원료의 선발 및 최소저해농도 결정 | 121 |
| 가. 서 설 | 121 |
| 나. 재료 및 방법 | 121 |
| 1) 목질 추출물 원료의 조제 | 121 |
| 2) Field로부터 곰팡이 균주의 채취 및 배양 | 122 |
| 3) 추출물의 곰팡이 생장 최소 억제 농도 결정 | 123 |
| 다. 결과 및 고찰 | 123 |
| 4. 주관연구기관이 생산한 목질추출물에 대한 작물의 안정성 시험 | 128 |
| 가. 서 설 | 128 |
| 나. 재료 및 방법 | 128 |
| 다. 결과 및 고찰 | 129 |
| | |
| 제 4 절 천연 목질 항곰팡이 제제의 성능 개선 | 131 |
| 1. 잣빛곰팡이(<i>Botrytis cinerea</i>) 균주를 확보하고, 생육환경인자 분석 | 131 |
| 가. 서 설 | 131 |
| 1) 오이 잣빛 곰팡이병 | 131 |
| 2) 딸기 잣빛 곰팡이병 | 132 |

| | |
|--|-----|
| 3) 토마토 잣빛 곰팡이병 | 132 |
| 4) 상추 잣빛 곰팡이병 | 132 |
| 5) 고추 잣빛 곰팡이병 | 132 |
| 6) 호박 잣빛 곰팡이병 | 132 |
| 7) 사과 잣빛 곰팡이병 | 133 |
| 8) 수박 잣빛 곰팡이병 | 133 |
| 9) 배 잣빛 곰팡이병 | 133 |
| 나. 재료 및 방법 | 135 |
| 1) 잣빛 곰팡이 병의 곰팡이 균주 확보 및 계대배양 | 135 |
| 2) 생육환경인자 분석 | 142 |
| 3) 균사 성장량 측정 | 143 |
| 다. 결과 및 고찰 | 144 |
| 1) <i>Botrytis cinerea</i> 의 최적배지 및 최적온도 | 144 |
| 2) <i>Botrytis</i> spp. from Kumsan의 최적배지 및 최적 온도 | 151 |
| 3) <i>Botrytis</i> spp. from Munsan의 최적배지 및 최적 온도 | 156 |
| 4) <i>Botrytis cinerea</i> 의 생육을 위한 배지의 최적 pH. | 166 |
| 5) <i>Botrytis</i> spp. from Kumsan 생육을 위한 배지의 최적 pH | 167 |
| 6) <i>Botrytis</i> spp. from Munsan 생육을 위한 배지의 최적 pH | 167 |
| 라. 결 론 | 171 |
| 2. 제1세부과제로부터 제공받은 목질 원료로부터 잣빛 곰팡이 생육억제 물질의 추출을 위 한 추출법 도출 | 171 |
| 가. 서 설 | 171 |
| 나. 재료 및 방법 | 172 |
| 다. 결과 및 고찰 | 174 |
| 1) 추출물 분말의 수율 | 174 |
| 2) 목질 추출물의 항균활성 | 175 |
| 라. 결 론 | 197 |
| 3. 원료추출물의 생리활성 탐색 및 물질의 분리 | 197 |
| 가. 서 설 | 197 |
| 나. 재료 및 방법 | 198 |
| 다. 결과 및 고찰 | 201 |
| 1) Column chromatography를 이용한 물질 분리 | 201 |
| 2) 분획된 fraction group의 활성시험 | 211 |

| | |
|--|-----|
| 3) HPLC 분석 | 216 |
| 라. 결 론 | 217 |
| 4. Lab. 수준에서 시제품 및 시판제품의 곰팡이 성능 평가 | 217 |
| 가. 서 설 | 217 |
| 나. 재료 및 방법 | 219 |
| 다. 결과 및 고찰 | 222 |
| 1) 시제품 및 시판품의 특성 | 222 |
| 2) 시제품 및 시판품의 항균활성 | 222 |
| 라. 결 론 | 249 |
| | |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 250 |
| | |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 | 253 |
| | |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 255 |
| | |
| 제 7 장 참고문헌 | 261 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

1. 기술개발의 효과

간벌제 및 임산자원의 효율적인 이용방안이 연구대상이 되고 있는 현실적인 측면에서 임산자원의 구성성분을 개질하여 새로운 고부가가치의 시장을 개척함으로써 목질자원의 이용에 있어서 새로운 분야를 창출하리라 기대된다. 또한 흰가루병과 유사한 곰팡이 방제 약제를 임산자원으로부터 생산함으로써 자연 친화적 효과를 부가적으로 얻을 수 있다.

- 천연물에 의한 친환경적 방제는 국민들의 안전한 먹거리(친환경농산물 인증) 요구를 수용할 수 있음
- 곰팡이병에 의한 농작물의 품질 저하 및 20-30% 수율 감소를 방지함으로써 농민 소득 증대와 농작물의 가격 안정화
- 화학적 방제를 대신한 천연약제 방제는 생태계의 혼란 및 중의 돌연변이 발생을 억제할 수 있음
- 농민들의 과도한 화학약제에 의한 방제 대신에 천연약제를 사용함으로써 최종 소비자들에게 신뢰성 회복 구현
- 단위면적당 생산 수율 증가로 인한 농작물의 생산단가 저하 유도
- 최적의 시기에 분무방제 해야 만 효과를 나타내는 화학약제와는 달리 사용 시기에 대한 제약을 최소화 할 수 있음
- 다른 약제와 혼합하여 사용할 수 있는 수용성제제이고, 천연물로 구성되어 있기 때문에 다른 약제의 약효를 저하 하지 않기 때문에 혼합방제가 가능함

제 2 절 연구개발의 필요성

최근 농산물에서의 잔류성 농약 사용에 있어서 그 독성에 대한 위험이 일반인의 관심이 되고 있고, 수출입시의 검역에서 농약의 농산물 잔류로 인해 문제가 되어 보건 당국에서도 그에 대한 규정을 강화시키고 있다. 특히 과채류는 생식하기 때문에 더욱 문제가 되어, 농약을 사용하지 않거나, 최소한으로 사용한 친환경농산물에 대한 소비자들의 요구가 점차 커지고 있다. 게다가 무분별한 농약사용의 증가로 인해 병원균의 약제 저항성 발생으로 약효를

않고 그 사용에 제한이 따르게 되어 대안으로 생물적방제가 관심을 되고 있다. 미생물에 의한 생물적방제의 성공 가능성은 Wilson 등에 의해 언급되어졌으며, 환경친화적 병, 해충 및 잡초방제 기술로의 인식전환이 촉구되고 있다.

시설재배를 통한 과채류 재배에 있어서도 환경정화와 환경친화적 농법으로 전환이 크게 요구되고 있으며, 유용미생물의 이용은 대부분 식물의 생장을 촉진시키고 뿌리 전염성 병해에 대하여 생물적 방제력을 높이는데 사용되고 있다. 식물의 생육을 촉진하는 미생물로서 콩과에 공생하는 뿌리혹박테리아, 여러 식물에 공생하는 VA균근류, 버섯류 같은 공생미생물과 PGPR(Plant Growth Promoting Rhizobacteria)이나 PGPF(Plant Growth Promoting Fungi)와 같은 근권 미생물이 알려져 있다.

Caron은 균근균이 식물뿌리에 침입하여 식물과 상호작용으로 주로 식물성장에 관련하며 토양전염성 병원균을 억제한다고 보고했으며, 균근균이 토양 내 축적된 염류 및 독성물질에 대한 저항성 그리고 한발과 근부손상에 따른 피해경감 등에 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.

흰가루병은 전세계적으로 11,800여종의 식물에서 발생하는 것으로 보고되고 있으며 국내에서는 400여종의 식물에 발생하는 것으로 알려졌다.

그 중에서 보리, 밀 등의 곡물류와 오이, 딸기, 토마토 등의 채소류, 사과, 포도, 배, 등의 과수류, 그리고 장미, 거베라 등의 화훼류에서 흰가루병의 피해가 크다.

흰가루병은 시설재배뿐만 아니라 노지 재배에서도 많이 발생하여 큰 피해를 주고 있는 식물병이다. 흰가루병이 발생하면 식물의 광합성과 호흡이 저해되며, 병이 진전됨에 따라 병반 조직이 괴사하면서 급속히 노화되어 잎이 떨어지게 된다. 피해는 주로 잎에 형성되는 병반과 낙엽에 의한 초세약화 이에 따른 수량감소로 나타난다.

국내에서 시설재배의 딸기, 오이, 가지 및 장미 등 거의 모든 작물에서 흰가루병의 피해가 큰데, 그 원인은 일조량 부족, 환기 불량, 밀식재배, 질소 비료 과용 등 국내 시설재배 특성상 흰가루병 발병을 극복하기 어려운 재배환경 때문이다. 시설재배 포장에서 흰가루병균은 분생포자 상태로 생존이 가능하며 분생포자가 식물에 부착한 후 5~6일후에 세대가 경과하여 다시 분생포자가 형성되므로 매우 빠른 시간에 병이 진전되는 병이다. 흰가루병은 약제의 살포로 방제가 가능하나 병원균은 순환물 기생성이며 내생균사를 형성하기 때문에 약제를 살포하지 않으면 내생균사에서 곧 다시 발생하므로 농가에서는 주기적으로 방제약제를 살포하고 있다. 방제에 노력과 경비가 많이 들고, 방제에 실패할 경우 세력이 떨어지면서 과실의 착색과 비대가 불량해져 수량이 크게 감소하게 된다.

최근 들어 국민건강 생활에 관심이 많아지면서 친환경적 먹거리 생산이 농업의 주된 관심사로 부각되고 있다. 이에 따라 화학비료 및 농약의 사용을 제한하는 친환경 농법이 다각도로 연구 개발되고 있지만, 그 적용 범위가 매우 제한적인 문제점을 가지고 있다. 특히

농산물 재배시 발생하는 곰팡이성 질병은 농약으로도 그 질병을 통제하기 어려운 문제점이 있다. 따라서 농가에서는 곰팡이성 질병방제를 위해 미생물제제 및 화학 농약을 과다하게 사용하여 농산물의 품질 저하를 초래하는 경향이 있다.

본 연구에서 추진하고자 하는 천연물로부터 유래되는 곰팡이병 방제기술은 최근 친환경 농업의 큰 초석이 될 것으로 확신하며, 향후 그 시장의 확대도 매우 유리하게 될 것으로 판단된다.

흰가루병은 일반적으로 저온성 균주로 하우스 작물의 대표적인 피해 질병으로 알려져 있으며, 환경적 조건에 따라 약 25종의 균주가 백반(흰가루병)을 발생시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 흰가루병의 발병 대상 작물은 거의 전 작물에 발생하며, 흰가루병과 유사한 곰팡이성 질병이 많이 발생하고 있다. 최근 흰가루병의 약론을 간단히 언급하자면 다음과 같이 정의할 수 있다.

1. 흰가루병의 정의

- 흰가루병은 식물의 잎이나 줄기에 흰가루 형태의 반점이 생기는 식물병의 일종으로 백분병(powdery mildew)이라고도 함
- 병원균은 약 25여종으로 알려져 연구보고 되어 있으며, *Sphaerotheca*속, *Erysiphe*속, *Microsphaera*속, *Podosphaera*속, *Phyllactinia*속, *Uncinula*속에 속하는 곰팡이의 변종으로부터 유래
- 병에 감염되면 곰팡이 균사류가 엉키기 때문에 식물체가 회백색을 띠게 되며, 병에 걸린 부위는 뒤틀리면서 잎이나 줄기를 시들게 하여 농작물 및 과일의 품질을 급격히 저하시켜 상품성을 상실을 초래함과 동시에 20 - 40% 정도의 수량을 감소
- 딸기, 고추, 토마토, 오이, 수박, 참외, 메론, 당근, 사과나무, 배나무 등에 주로 피해를 입히며, 일단 감염되면 잎, 줄기, 과일의 표면위에 포자를 방출, 발아하고 식물조직내의 양분을 흡수하여 균체가 생활



Fig 1-1-1. 흰가루병에 감염된 잎

2. 흰가루병의 방제기술

- 가. 병든 잎은 일찍 제거하여 초기 전염원을 없앤다.
 - 나. 질소 과용을 피하고 인산 및 칼리질 비료를 충분히 준다.
 - 다. 다소 건조하고 서늘한 조건에서 많이 발생하므로, 다른 병의 발생을 조장하지 않는 한 온도와 습도를 높여 준다.
 - 라. 내부기생성 병원균이므로 침투이행성 약제를 살포하거나, 미생물 제제를 사용한다.
 - 마. 발병초 예방적으로 약제를 살포하는 것이 효과적이다.
 - 바. 현재 등록된 약제는 없으나 웨나리유제, 지오관수화제, 베노밀수화제, 지오관·리프를수화제, 지오관·유황액상수화제 등의 농약을 사용한다.
 - 사. 생물적 방제에 관한 연구도 1980년대 이후에 중요성이 알려지면서 많은 연구자들에 의해 활발히 진행되어지고 있다.
- 농가에서 흰가루병의 발병 초기나 발병을 방지하기 위해 각종 시판 약제를 일주일 간격으로 3-4회 뿌려 주는 것이 최선의 방제 방법으로 알려져 있으나, 그 효능이 미비하다.

- 흰가루병 방제 약제는 환경농산물 인증기준을 초과하는 경우가 대부분이어서 생산된 농작물은 유기농산물 인증을 받을 수 없으며, 대형 유통 매장이나 백화점 판매가 거의 불가능 하다.
- 현재 대부분의 농민들은 최종 수확물이 환경농산물 인증기준을 초과하지 않는 범위 내에서 흰가루병을 억제할 수 있는 천연물 친환경 천연 방제 약품을 요구하고 있다.

3. 목질자원으로부터 제조된 유사 흰가루병 방제제의 기능 및 성격

- 흰가루를 유발하는 곰팡이의 포자형성 및 균사생장을 저해할 수 있는 억제제의 주원료를 목재로부터 단리·생산하고자함

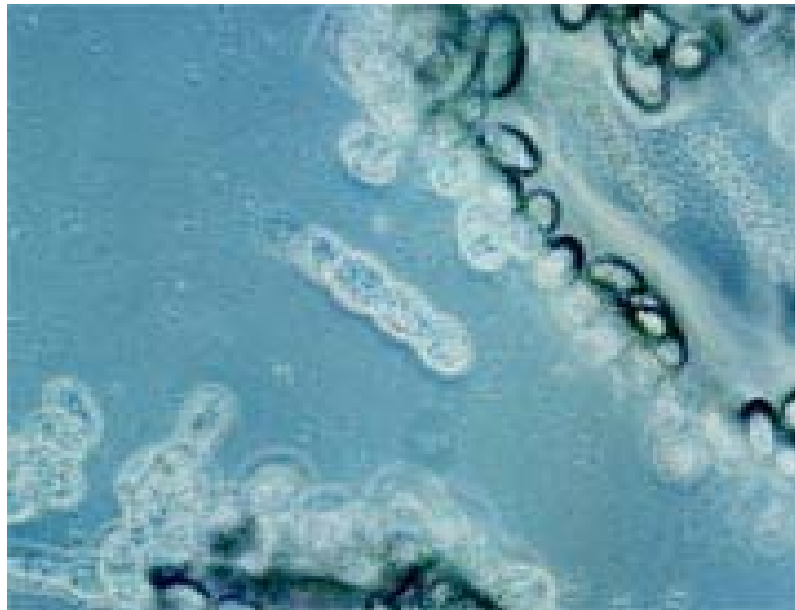


Fig 1-1-2. 흰가루 병원균의 현미경사진

- 천연상태에서 목재를 구성하고 있는 주성분인 cellulose, hemicellulose, lignin 및 다양한 종류 추출성분들은 천연 상태에서 곰팡이 포자 형성이나 균사생장 억제 역할을 기대하기가 힘들
- 목재를 원료로 하여 전처리공정, 추출공정, 물질분리공정으로부터 얻어진 천연물질을 주성분으로하는 흰가루병 발생 곰팡이 균사생장 억제제 개발 및 제품화

- 목재로부터 얻어진 천연 추출물 이외에 흰가루병 유사 곰팡이의 균사체 세포벽을 파괴하여 운동성을 상실하게 하는 인체 유해 천연물질을 추가 첨가하여 균사의 생장을 제어할 수 있는 제품 개발
- 흰가루 유사 병원균 이외에 딸기, 오이, 토마토, 고추, 상추 등 각종 작물의 지상부 조직을 침해하여 어린과일에 치명적인 손상을 초래하는 잿빛곰팡이(*Botrytis cinerea*)에 대해서도 방제능력을 가지는 목질자원 유래 천연방제약품을 개발하고자 함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 목재로부터 흰가루병 방제 제품의 제조 기술

- 작물에 발생하는 흰가루병을 유발하는 대표적인 곰팡이병의 약 25%는 흰가루병원균에 의해 발병
- 흰가루병은 작물의 생산성을 저하시키는 주요 식물병 중의 하나임
- 지금까지 흰가루병을 방제하기 위해 많은 합성 살균제를 사용하여 왔음
- 합성 살균제의 오·남용으로 인한 환경오염, 저항 돌연변이 개체의 발생, 잔류독성 등의 문제가 발생
- 최종 소비자들의 저농약, 무농약, 농산물의 수요가 계속적으로 증가
- 합성 살균제의 대안으로서 독성이 거의 없으면서 환경에 노출시 잘 분해되는 환경친화적인 천연 살균제를 원하는 농민들의 요구가 증대
- 작물 피해를 초래하는 곰팡이 생장억제 제품을 합성살균제가 아닌 천연 목재로부터 전처리, 분리, 정제된 화합물로부터 획득하는 것은 친환경 농산물 생산에 있어서 필수적인 요건임
- 현재 목재로부터 병원성 곰팡이제제를 개발 또는 시판하고 있는 국내기업은 없음
- 무한한 biomass 자원인 목질자원은 고부가가치화 및 사용범위확대가 절실히 요구됨

2. 기존의 살균제를 이용한 흰가루병 방제

- 흰가루병은 방제약제의 효과적인 선택에 의해 방제효율을 증진시킬 수 있으며, 동일계통의 약제를 연용 할 경우 약제 내성균이 출현하기 쉬워 방제효율이 현저히 저하되는 병해
- 현재 흰가루병 방제제로 등록된 10계통 20여종의 살균제는 계통별로 구분되어 있음
- 사용약제들의 대부분이 트리아졸계, 유기염소계, 피리미딘계, 카바메이트계에 속하며, 이런 계통에는 속하는 약제에 대해서는 일반적으로 미생물의 약제 저항성이 많이 생김
- 따라서 새로운 계통의 약제로서 퀴나졸린트리아졸계, 아닐리노피리미딘계, 스트로빌루린계 등이 개발되어 있음
- 흰가루병 방제를 위해서는 효과적인 약제를 선택하고 계통이 다른 약제를 번갈아 가며 살포해야만 방제 효과를 얻을 수 있음

3. 기존의 흰가루병 방제 기술(특허)

흰가루병 방제 기술과 관련된 특허의 대부분은 화학약제와 관련된 내용이 대부분이며, 그 대부분은 현재 출원 심사중에 있으며, 천연계 목재를 전처리하여 단리, 제조한 흰가루병 제제는 현재 출원 되어 있지 않다.(2004년 12월)

- 흰가루병 방제용 화학제제 특허

○ 특허등록 10-2000-0005928

- : 오이와 딸기의 흰가루병 방제용 조성물 및 이를 함유하는 농약 제제
- : 라우릴 알콜에톡실레이트 및 C10/C12 알콜 에톡실레이트로 이루어진 제제

○ 특허등록 10-2002-0008105

- : 크리소파놀 또는 파리에틴을 유효성분으로 함유하는 식물 흰가루병 방제
- : 크리소파놀(chrysophanol) 및 파리에틴(parietin)이 유효성분

○ 특허취소 10-1990-0019243

- : 피리딜카바메이트화합물, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 유해 유기체 방제용 살균 조성물
- : 식물의 균핵병을 억제하는 효과가 탁월한 피리딜카바메이트 화합물의 제조

○ [특허실용] 오이와 딸기의 흰가루병 방제용 조성물 및 이를 함유하는 농약 제제

10-2000-0005928 (2000.02.09) 한국화학연구원 등록

- 본 발명은 오이와 딸기의 흰가루병 방제에 효과가 우수한 조성물 및 이를 포함하는 농약 제제에 관한 것으로, 본 발명에 따르는 라우릴 알콜 에톡실레이트 및 C10/C12 알콜 에톡실레이트로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상의 계면활성제를 포함하는 조성물을 흰가루병에 걸린 오이나 딸기에 적용하면 흰가루병에 대하여 우수한 치료 효과를 얻을 수 있으며, 또한 인체 또는 가축에 대한 독성이나 환경오염에 대한 위험이 거의 없고, 다른 흰가루병 예방용 농약과 함께 사용함으로써 농약의 사용량 또한 현저하게 줄일 수 있음
- 본 발명은 오이와 딸기의 흰가루병 방제에 효과가 우수한 조성물 및 이를 포함하는 농약 제제에 관한 것으로, 본 발명에 따르는 라우릴 알콜 에톡실레이트 및 C10/C12 알콜 에톡실레이트로 이루어진 균에서 유래

○ [특허실용] 크리소파놀 또는 파리에틴을 유효성분으로 함유하는 식물흰가루병 방제 조성물 10-2002-0008105 (2002.02.15) 한국화학연구원등록

- 본 발명은 화학식 1 및 2의 크리소파놀(chrysophanol) 및 파리에틴(parietin)을 유효성분으로 함유하는 식물 흰가루병 방제 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 크리소파놀 또는 파리에틴 함유 조성물은 보리 흰가루병 및 오이흰가루병 등과 같은 식물병의 방제에 효과적으로 사용될 수 있다. 본 발명은 화학식 1 및 2의 크리소파놀(chrysophanol) 및 파리에틴(parietin)을 유효성분으로 함유하는 식물 흰가루병 방제 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 크리소파놀 또는 파리에틴 함유 조성물은 보리 흰가루병 및 오이흰가루병 등과 같은 식물병의 방제에 효과적으로 사용될 수 있음

○ [특허실용] 선충과 식물 흰가루병의 방제용 조성물 및 그 제조 방법

10-2003-0003868 (2003.01.21) 이형철 공개

- 본 발명은 탄닌계 식물 추출물의 1종 또는 2종 이상의 혼합물을 사용한 살선충 방제제, 흰가루병 방제제 및 식물 내병성 조성물에 관한 것
- 본 발명에 사용된 식물은 울피, 감, 호프, 솔잎, 아선약, 암마록, 커피, 가자, 소목, 지유, 호장, 대황, 조등으로하고, 이들 추출물의 1종 또는 2종 이상의 혼합물은 식물기생성 선충 및 작물의 흰가루병(POWDERY MILDEW)에 대하여 탁월한 방제효과를 얻을 수 있음
- 또한 이들 조성물은 작물의 내병성 증진과 세균발달을 촉진시키는 효과가 있어 작물 생육 및 열매의 성장을 촉진시키며, 인축독성 및 환경오염에 대한 위험이 거의 없어 안전하게 사용할 수 있는 식물 병해 방지용 조성물

○ [특허실용] 치환티오피펜유도체 및 이것을 유효성분으로 하는 농원예용살균제

10-1996-0010708 (1996.04.10) 미쓰이가가쿠 등록

- 본 발명의, 일반식(1)로 표현된 치환티오피펜유도체는, 각종 작물의 병원성균류에 대해 넓은 질병스펙트럼을 지니고 있어, 특히, 잣빛곰팡이병, 흰가루병 및 녹병 등의 질병에 대해 제어효과가 우수하며, 또한, 심각한 문제점으로 되고 있는, 종래 살균제에 대한 내성에도 유효하여, 농원예용 살균제에 유용
- 본 발명의, 일반식(1)로 표시된 치환티오피펜유도체는, 각종 작물의 병원성균류에 대해 넓은 질병스펙트럼을 지니고 있어, 특히, 잣빛곰팡이 병, 흰가루병 및 녹병 등의 질병에 대해 방제효과가 우수하며, 또한, 심각한 문제점으로 되고 있는, 종래 살균제에 대한 내성에도 유효하여, 농원예용 살균제로서 유용

○ [특허실용] 항균성 미생물제제와 그의 용도

10-2000-0050963 (2000.08.31) 서형원 등록

- 본 발명은 식물의 곰팡이 병원균을 제어함으로써 식물의 생장을 증진시킬 수 있는 항균성 미생물 제제, 제조방법, 처리방법 및 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 항균성 미생물 제제는 스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* spp.) WYE 20 (KCTC 0341BP)과 WYE 324 (KCTC 0342BP) 중의 적어도 하나의 신규한 항균성 미생물 균주를 포함하고 있으며, 이들 균주의 생존성 및 활성을 안정한 상태로 유지시킬 수 있는 미생물 전달 매체를 포함
- 본 발명의 항균성 미생물 제제는 다양한 식물체에 병을 일으키는 라이족토니아, 피토프소라, 스크러로티니아, 피쿨레리아, 콜레토티리컴, 보트리티스, 스페로세카 등을 포함하는 곰팡이 병원균의 제어 활성이 뛰어난

○ [특허실용] 식물 병원성 진균에 대한 생물제제 조성물 및 이를함유하는 생물제제

10-2003-0003872 (2003.01.21) 이형철 공개

- 본 발명은 오이와 딸기 등의 작물에 식물 병원성 진균(흰가루병, 잿빛곰팡이병, 노균병, 역병)의 방제효과가 탁월한 조성물 및 이를 포함하는 생물제제에 관한 것으로, 본 발명에서 소목, 황금, 정향, 도두, 옛기름(보리, 쌀보리, 밀) 중에서 1종 혹은 2종 이상 포함하는 조성물을 식물 병원성 진균(흰가루병, 잿빛곰팡이병, 노균병, 역병)에 걸린 오이나 딸기에 적용하면 식물 병원성 진균에 대하여 우수한 치료효과를 얻을 수 있으며, 또한 인축에 대한 독성이나 환경오염에 대한 위험이 거의 없고, 다른 진균 예방제제 및 담체, 부형제, 희석제와 함께 사용함으로써 농약의 사용량을 현저히 줄일 수 있음

○ [특허실용] 식물 흰가루병의 방제용 조성물 및 그 제조 방법

10-2002-0082596 (2002.12.23) 오비티 공개

- 본 발명은 생약재를 추출 여과하여 제조하는 흰가루 방제 및 식물 내병성 추출물에 관한 것으로서, 생약재는 오배자(GALLNUT)로하고, 오배자의 물 추출물, 메탄올 추출물 및 열수 추출물을 흰가루에 걸린 작물에 적용하면 흰가루병(POWDERY MILDEW)에 대하여 우수한 치료효과를 얻을 수 있음
- 또한 이들 조성물은 작물의 내병성과 발근촉진 효과가 있어 작물생육 및 열매의 성장을 촉진시키며, 인축독성 및 환경오염에 대한 위험이 거의 없어 안전하게 사용할 수 있는 흰가루 예방 및 치료 조성물

- [특허실용] 신규한 바실러스속 (*Bacillus* sp.) CMB26균, 이를 이용한 리포펩티드의 제조방법, 상기 바실러스속 CMB26균 및/또는 리포펩티드를 유효성분으로 함유하는 식물곰팡이균의살균제.

10-2002-0049338 (2002.08.20) 가이아비티 공개

- 본원 발명은 종래의 문제점을 해결하기 위하여 상이한 농약 과다 사용때문에 내성이 생기는 고질적인 곰팡이균인 역명, 탄저병, 흰가루병 등의 항곰팡이성 미생물농약 및 그의 제조방법, 신규한 바실러스속 (*Bacillus* sp.) 및 그의 제조방법을 제공하고 더욱이 화성비료에서 나타날 수 있는 토양잔류와 축적, 먹이사슬에 의한 가축과 인체에 이행, 합성농약의 과다사용으로 인한 생태계 파괴를 막을 수 있는 농약을 제공
- 곰팡이의 포자 및 균사체 파괴능이 높은 리포펩티드(lipopeptide)를 생산하는 것을 특징으로 하는 신규한 미생물인, 바실러스속 (*Bacillus* sp.) CMB26균

- [특허실용] 살선충, 흰가루병 방제, 식물 생육 촉진용 조성물 및 그 제조방법

10-2003-0003876 (2003.01.21) 이형철 공개

- 본 발명은 탄닌계열 화합물을 사용한 살선충 방제제, 흰가루병 방제제 및 식물 내병성 조성물에 관한 것
- 본 발명에 사용된 탄닌계열 화합물은 탄닌산, 카테킨, 갈릭산, 에피카테킨, 메틸갈레이트, 탄닌 유도체로 하고, 이들 물질의 단일 혹은 2종 이상의 혼합물은 식물기생성 선충 및 작물의 흰가루병에 대하여 탁월한 방제효과를 얻을 수 있음
- 또한 이들 조성물은 작물의 내병성 증진과 세균발달을 촉진시키는 효과가 있어 작물 생육 및 열매의 성장을 촉진시키며, 인축독성 및 환경오염에 대한 위험이 거의 없어 안전하게 사용할 수 있는 식물 병해 방지용 조성물

- [특허실용] 소리쟁이 추출물 함유 식물 흰가루병 방제 조성물

10-2002-0007950 (2002.02.14) 한국화학연구원 공개

- 본 발명은 흰가루병에 대해 방제활성을 갖는 소리쟁이(*Rumex crispus*) 또는 참소리쟁이(*Rumex japonicus*)의 추출물 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 소리쟁이 또는 참소리쟁이를 메탄올로 추출하고 감압 농축한 후에 이를 여러 가지의 유기용매로 순차적으로 추출함으로써 얻어진 각 추출물을 식물 흰가루병에 처리하면 효과적으로 방제할 수 있다.

- [특허실용] 피리딜카바메이트화합물, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 유해 유기체 방제용 살균 조성물 10-1990-0019243 (1990.11.27) 이시하라산교 취하
 - [목적] 오이 탄저병, 오이 흰가루병, 감귤류 보통녹색곰팡이병, 사과 및 배 붉은곰팡이병 및 회색곰팡이병 및 여러가지 식물의 균핵병을 억제하는 효과가 탁월한 피리딜카바메이트 화합물의 제조방법을 제공
 - [구성] 방향족 탄화수소, 사이클릭 또는 아사이클릭 지방족 탄화수소, 에테르, 케톤, 니트릴 및 비양성자성 극성용매 중에서 금속산화물, 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 탄산염, 알칼리 금속 수소화물 및 트리에틸아민 등의 염기의 존재하에 일반식(II)의 화합물을 Y-COOR₃로 표시되는 화합물과 섭씨 0도 내지 60도의 온도에서 1 내지 5 시간 동안 반응시켜 일반식(I)의 화합물을 제조

- [특허실용] 살진균성 벤조디옥산아민 유도체 10-1990-7000770 (1990.04.14) 이.아이.듀우판드네모아앤드컴파니 취하
 - [목적] 식물에 있어 곰팡이병, 특히 흰가루병 방제제인 살진균성 벤조디옥산 아민 유도체에 관한 것
 - [구성] 일반식[I]의 벤조디옥산 아민 유도체 및 이의 농업적으로 적합한 염을 식물 서식지에 적용시켜 식물의 곰팡이병을 억제
 - 바람직한 화합물로는 1~2-[6,7-[1,1~디메틸에틸]~2,3~디히드로~1,4벤조디옥산~2~일]에틸~트랜스~3,5~디메틸 피페리딘 등이 있음
 - 일반식[II]의 화합물 및 이를 함유하는 농업적으로 적합한 조성물 및 염을 제공하며 일반식[II]의 이탈그룹 L은 [L은 할라이드 또는 설포네이트] HNR₆R₇의 아민 화합물로 치환시키거나, 통상적 용매중에서 리튬 알루미늄 히드라이드 같은 환원제를 사용하여 상용 아미드[일반식[XIII]를 환원시켜 일반식[I]의 벤조디옥산 아민 유도체를 제조.

- [특허실용] N-페닐알킬벤즈아미드 살진균제 10-1988-0013849 (1988.10.24) 일라이릴리앤드컴파니 취하
 - [목적] 본 발명은 식물의 진균성 병해, 특히 농작물의 흰가루병 퇴치에 유용한 살진균제 화합물, 혼합물, 조성물 및 살진균방법에 관한 것
 - [구성] 본 화합물은 일반식[I]로서 혼합물은 [I]의 1중량% 이상의 양과 제2의 살진균성 화합물과 혼합하고, [I]에 식물학상 허용하는 담체를 혼합하여 조성물을 만들고 본 화합물 중 2,6~디클로~N~[[4~[트리플루오로메틸]페닐]메틸]벤즈아미드인 화합물이 우수하며 본 화합물은 아르알킬아민과 벤조일클로라이드와 반응시켜 얻거나, N~하이드록시벤즈이미도일클로라이드와 반응시켜 얻을 수 있음

○ [특허실용] 아크릴레이트살진균제

10-1988-0008571 (1988.07.11) 웨링애그로케미칼스리미티드 등록

- [목적] 살진균, 살충, 외부기생충 박멸 또는 제초작용을 갖고 있으며, 특히 곡물 흰가루병, 포도나무노균병, 도열병, 벼 앞집무늬 마름병, 감자 역병 및 사과 검은별 무늬병에 대해 살진균제로 유용한 아크릴산 유도체의 제조방법을 제공
- [구성] 일반식(II)의 화합물을 $R_1(CH_2)_m-Xp-H$ 의 화합물과 반응시키거나, W가 CH인 경우 일반식(IV)의 화합물을 염기 조건하에서 $HCOOR_2$ 의 포르메이트 에스테르와 반응시켜 일반식(I)의 화합물을 제조
- W는 CH 또는 N이고, n은 0-1이고, m은 0-18이고, R1은 비치환이거나, 또는 치환된 헤테로시클릭 비치환이거나 또는 치환된 헤테로시클릭(티오)카르보닐, 아미노메틸렌, 치환된 헤테로시클릭리텐메틸이고, Z는 할로젠화 같은 치환기임

○ [특허실용] 살진균제

10-1988-0002979 (1988.03.21) 웨링애그로케미칼스리미티드 거절

- 식물의 진균병(포도나무 노균병 플라스모파라 비티콜라(Plasmopara viticola), 토마토 역병 및 감자 역병 피토포토라 인페스탄스(Phytophthora infestans)), 보리 흰가루병 또는 도열병 및 사과 검은 별무늬병에 대한 살진균제를 제공
- 일반식(I)의 화합물. 상기식에서, X는 CR_4 또는 N이고, R1은 $-SO_2R_5$ 또는 $-COR_8$ 이고, R2는 CN, $-CH=N-OR_{10}$ 이고, R3 및 R4는 동일하거나 상이한 것

○ [특허실용] 디할로겐치환티오시아노피리미딘유도체, 그의 제조방법 및 농원예용살균제

10-1987-0011324 (1987.10.13) 미쓰이가가쿠 등록

- [목적] 농원예용 살균제로 쓸수 있는 디할로게노티오시아노피리미딘 유도체를 제공
- [구성] 일반식(I)로 표시됨을 특징으로 하는 디할로게노티오시아노피리미딘 유도체. (X 및 Y는 할로겐 원자를 나타낸다.) [효과] 역병, 노균병, 흰가루병, 회색 곰팡이병 및 각종 작물의 유사환 병들을 비롯한 광범위한 식물병들에 대하여 강력한 방제효과를 나타내며 종자소독, 경엽살포, 토양처리 등 각종의 방법들에 의해 사용할 수가 있음

○ [특허실용] 1,2,6-트리페닐-4-(1H)-피리디논유도체, 그의 제법 및 용도

10-1987-0006932 (1987.07.01) 구미아이가가쿠고교이하라케미칼고교 등록

- [목적] 1,2,6-트리페닐-4-(1H)-피리디논 유도체, 그의 제법 및 용도를 제공한다

- [구성]다음 일반식의 4(1H)-피리디논 유도체 및 그의 염 상기식에서, X,Y 및 Z는 동일하거나 상이하고, 독립적으로 할로젠원자, 니트로기, 시아노기, 히드록시기, 알데히드기(-CHO), 알킬기, 할로겐치환 알킬기, 시아노알킬기, 히드록시알킬기, 알콕시알킬기, 알콕시기, 할로겐치환 알콕시기, 알콕시알콕시기, 알케닐기, 알케닐옥시기, 알킬닐기, 알킬닐옥시기, 알카노일기, 알카노일옥시기, 페닐기, 페녹시기, 카르바모일기, 알킬 카르바모일옥시기, 카르복실 또는 카르복실레이트기, 또는 아미노기임

○ [특허실용] 벤조티아졸린살진균제

10-1987-0004607 (1987.05.12) 웨링애그로케미칼스리미티드 취하

- [목적]본 발명은 살진균 작용을 갖는 벤조티아졸린[티온] 화합물의 벤조 고리에서 이치환되거나 3위치에 아미노기를 갖는 살진균 특성의 벤조티아졸린[티온]은 화합물에 관한 것
- [구성]발명된 일반식[I]은 R1이 알킬, 알케닐, 알킬닐기일 경우 R1이 H인 화합물을 염기성 조건에서 R1Q[Q는 할로젠]와 반응시켜 얻고, X가 아미노기인 일반식[I]은 [III]에서 W가 아미노기인 것으로부터 R1Q와 반응시켜 얻음
- R1이 치환된 아미노기인 경우에는 일반식[IV]의 아미노기를 치환시켜 공지된 방법으로 얻을 수 있고, X가 황인 일반식[I]의 화합물은 X가 산소인 것으로부터 황화제, 예로 라웨순 시약 처리로 얻을 수 있음

○ [특허실용] 피리다지논유도체

10-1987-0000996 (1987.02.07) 닛산가가쿠고교가부시키가이샤 등록

- [목적] 3(2H)-피리다지논 유도체 및 그의 제조방법, 살충,살비,살선충 및 살곤충성 효력이 있는 농업용 원예용 약제조성물을 제공
- [구성]식(II)의 화합물과 일반식(III)의 화합물을 반응시켜 식(I)의 3(2H)-피리다지논 유도체를 제조하는 방법 위의 일반식에서 R은 탄소수 2내지 6의 직쇄 또는 측쇄의 알킬기이고 A는 할로젠원자, 탄소수 1 내지 4의 알콕시 또는 탄소수 1내지 4의 알킬티오이고, X는 산소원자 또는 유황원자이고 B는 - CR1R2-, -CR1R2-CR3R4-, -CR1-R2-CR3R4-CR5R6- 또는 -CR1R2-CO-이고 Y는 산소원자, 유황원자, -NR7-, -CR3R4-,CVR1R2-이고, V는 산소원자 또는 유황원자

○ [특허실용] 피라졸옥심유도체의 제조방법

10-1986-0011396 (1986.12.27) 니혼노야쿠 등록

- [목적]하기 일반식(I)로 나타내어지는 피라졸 옥심 유도체의 제조방법을 제공하는 것

- [구성]하기 일반식(II)의 화합물을 하기 일반식(III)의 화합물과 반응시킴을 특징으로 하는 하기 일반식(I)로 나타내어지는 피라졸 옥심 유도체의 제조방법.식중, R1은 C1-C4 알킬 또는 페닐이고; R2는 수소, C1-C5 알킬, C1-C3 할로알킬 또는 페닐이며; R3는 수소, C1-C4 알킬 또는 페닐이고; R4는 수소, C2-C4 알킬카르보닐, 벤조일, 나프틸 또는 일반식 -C6H4-X4 의 치환체

○ [특허실용] (2-시아노-2-아릴에틸)피리딘화합물 및 그 유도체의 제조방법

10-1986-0006911 (1986.08.21) 롬앤드하스컴파니 등록

- [목적](2-시아노-2-아릴에틸)피리딘 화합물 및 그의 유도체의 제조방법을 제공하는 것임
- [구성]하기 일반식(I)의 화합물, 및 그의 산염, 유리 염기 및 금속염 착화물 [효과]본 발명의 화합물은 식물 병원성 진균의 예방 및 치료에 유용하며 즉, 식물을 진균에 노출시키기 전 또는 후에 적용하기에 유용
- 이들은 피코미세테스, 아스코미세테스, 바시디오미세테스 및 듀테로이세테스류들을 포함하는 넓은 영역의 진균에 유효하고 그들은 특히 흰가루병, 녹병균, 리족토니아 솔라니(벼문고병) 및 벼도열병에 유효하고 결과적으로, 본 발명의 여러 화합물은 곡물, 과실 및 채소 수확에 영향을 미치는 진균퇴치에 유용할 것임

○ [특허실용] 구아니딘계화합물의제조방법

10-1985-0001149 (1985.02.23) 다이닛뽀잉크앤드케미칼즈인코포레이티드 등록

- [목적]살균성 구아니딘 화합물을 알킬벤젠술폰산과 같은 총 탄소원자가 9이상인 친유성기(oleophilic group)를 갖는 산과 반응시킴으로써 수득된 살균성 구아니딘 화합물의 수-불용성 산부가염을 활성성분으로 함유하는 식물 독성이 감소된 농원예용 구아니딘계 살균제의 제조방법을 제공하는 것
- [구성]구아니딘 화합물 또는 그의 산부가염을 총 탄소원자수가 9 이상인 친유성기를 갖는 산 또는 그의 염과 반응시킴을 특징으로 하는 구아니딘 화합물의 제조방법

○ [특허실용] 2-(3-피리딜)-2-페닐아미노아세트산의신규유도체의제조방법

10-1984-0007333 (1984.11.22) 아벤티스크롭사이언스 취하

- [목적] 뿌리썩음병, 세프트리오세스, 흰가루병, 녹병등의 곡물의 세균성 질병, 과수의 질병에 유용한 2-(3-피리딜)-2-페닐아미노아세트산을 제공
- [구성] 일반식(III)의 피리딘 유도체를 일반식(IV)의 아닐린 유도체와 반응시키고,

자체적으로 생성된 히드로시안산과 반응시켜 일반식(I)의 화합물을 제조하며 반응은 섭씨 0도-100도의 온도에서 톨루엔, 크실렌, 클로로벤젠, 디클로로벤젠등의 할로젠화 되는 방향족, 지방족 또는 지환족 탄화수소류 용매중에서 염산과 같은 무기산 또는 아세트산과 같은 유기산을 알칼리금속 시안화물과 반응시켜 히드로시안산이 자체적으로 생성되도록 함

○ [특허실용] 아졸릴메틸-티에닐-카빈올유도체의제조방법

10-1984-0003254 (1984.06.09) 바이엘악티엔게젤샤프트 취하

- [목적] 프라스모디오포로미세테스, 난균류, 키트리디오미세테스등을 구제하는데 유용하고, 특히 벼의 질병 예를들어, 피리쿨라리아 오리자에 곡류의 질병, 흰가루병, 녹병 등을 방제할 수 있으며, 활성 화합물을 토양 및 뿌리를 통하거나 종자를 통하여 식물의 지상부에 주었을 때 진균 감염으로부터 식물을 보호할 수 있는 살진균제로 유용한 일반식(I)의 아졸릴메탈-티에닐-카빈올 유도체 및 그의 산부가염 및 금속염 복합체를 제조
- [구성] 2-(2-브로모티엔-5-일)-2(4-클로로펜옥시메틸)-옥시란 및 1,2,4-트리아졸을 출발물질로 함

○ [특허실용] 아실화트리아졸일-알-플루오로피나콜일유도체의 제조방법

10-1984-0002462 (1984.05.04) 바이엘악티엔게젤샤프트 등록

- [목적]살진균제로서 유효한 일반식(I)의 신규 아실화트리아졸일-감 마-플루오로피나콜일 유도체 및 그의 염 및 금속착염의 제조 방법의 제공을 목적으로 함
- [구성]일반식(II)의 1-트리아졸일-2-하이드록시-부탄 유도체를 용매 존재하에 일반식(VI)의 이소시아네이트와 반응시켜 일반식(I)의 화합물 및 그의 염과 금속착염을 제조하는 것으로 구성되며,일반식에서, Az는 1,2,4-트리아졸-1-일 또는 1,2,4-트리아졸-4-일이고, R은 알킬, 알케닐 등이며,X는 수소 또는 불소이고, Z는 할로젠, 임의로 치환된 페닐이고 각각의 Z는 독립적으로 선택되며,n은 0 또는 1 내지 2의 정수이고,R''는 알킬,할로게노알킬 등

○ [특허실용] N,N-치환된아졸카복스아미드유도체의제조방법

10-1983-0000865 (1983.03.03) 님뽕가야꾸 취하

- [목적]신규 N,N-치환된 아졸 카복스 아미드 유도체의 제조방법 및 상기 유도체를 활성성분으로 함유하는 농업용 또는 원예용 살진균제 조성물 또는 살선충제 조성물을 제공하기 위한 것

- [구성]일반식(II)의 화합물을 일반식(III)의 화합물과 반응시켜 일반식(I)의 N,N-치환된 아졸 카복스 아마이드 유도체 화합물을 제조하고 일반식(IV)의 화합물을 일반식(V)의 화합물과 반응시켜 상기 일반식(I)의 화합물을 제조하고 상기 화합물의 유도체 중 하나를 이용하여 농업용 또는 원예용 살진균제 조성물을 제조할 수 있음
- [효과]농작물 질병의 탁월한 제거효과를 나타내며 특히 농작물 재배 토양에 사용하면 흰가루병, 검은 무늬병, 회색곰팡이병과 같은 식물의 지상부위 질병에 대해 탁월한 효과를 나타냄

○ [특허실용] 알파-아릴-1H-1,2,4-트리아졸-1-에탄올의제조방법

10-1980-0004333 (1980.11.12) 산도즈리미티드 등록

- [목적]살진균제로서 유용한 일반식(I)의 화합물의 제조방법의 제공을 목적
- [구성]일반식(II)의 화합물을 불활성 유기용매 내에서 일반식(III)의 화합물과 반응시킴을 특징으로 하여, 일반식(I)의 화합물을 제조하는 방법으로 구성되고 일반식에서, R0는 C1-12알킬, C3-6 시클로알킬 또는 (C3-6시클로알킬)-C1-3알킬이고, R은 H, F, Cl, Br 등이고, R'는 H, C1-4알킬, 할로젠 등이며, R''는 H이고, X는 알칼리금속이다. [효과]일반식(I)의 화합물은 흰가루병 또는 녹병균을 포함한 식물병 원성 진균을 박멸하는데 유용한 살진균제이다.

○ [특허실용] 아실화트리아졸일-R-폴루오로피나콜일유도체의제조방법

10-1980-0003596 (1980.09.12) 바이엘악티엔게젤샤프트 등록

- [목적]살진균제로 유용한 일반식(I)의 신규 아실화 트리아졸일-r-폴 루오로피나콜일 유도체 및 그의 생리적으로 무독한 염 및 금속착염의 제조방법의 제공을 목적으로 한다. [구성]일반식(II)의 1-트리아졸일-2-하이드록시-부탄 유도체를 용매 존재하에 일반식(IV)의 산무수물과 반응시킴을 특징으로 하여 일반식(I)의 아실화 트리아졸일-감마-폴루오로피나콜일 유도체 및 그의 생리학적으로 무독한 산부가염 및 금속착염을 제조하는 방법으로 구성되며, 일반식에서, Az는 1,2,4-트리아졸-1-일 또는 1,2,4-트리아졸-4-일이고, R은 알킬, 알케닐, 알키닐 등이고, X는 수소 또는 불소이고, Z는 할로젠, 임의로 치환된 페닐등이며, n은 0, 1 또는 2이다. [효과]일반식(I)의 화합물은 아실화 트리아졸일-2-하이드록시-부탄유...

○ [특허실용] 1,2,4-트리아릴-르에놀에테르의제조방법 10-1980-0003002 (1980.07.28)

바이엘악티엔게젤샤프트 포기

- [목적]곡류의 흰가루병과 사과의 흰가루병, 오이의 흰가루병을 사멸시키는데 탁월한

효과를 지닌 식물보호제로 유용한 1,2,4-트리아졸릴-에놀-에테르의 제조방법을 제공한다. [구성]할로게노 케톤을 희석제인 존재하에서와 산결합제의 존재하에서 1,2,4-트리아졸과 반응시켜 제조된 구조식(II)의 1,2,4-트리아졸릴 케톤을 방향족 탄화수소류, 할로젠화 탄화수소류, 아세테르류, 포름아미드류, 및 디메틸설폭사이드 등의 불활성 유기용제 중에서 수산화나트륨과 수산화칼륨 등의 무기염기의 존재하에, 섭씨 20 내지 80도의 온도에서 1,2,4-트리아졸릴 케톤 1몰당 알킬 설페이트 또는 할라이드 1 내지 2몰을 사용하여 반응시켜 구조식(I)의 화합물을 제조한다.

○ [특허실용] N-치환된페닐카바산유도체,이의제조방법,농업및원예용살균제,유도체의중간체및이의제조방법 10-1995-0032619 (1995.09.29) 니혼노야쿠 등
 록

- 본 발명은 흰가루병 병균, 반점병, 잎마름병 및 회색 곰팡이를 방제하는데 매우 효과적인 일반식 (I)의 N-치환된 페닐카바산 유도체; 당해 유도체의 제조방법; 당해 유도체를 활성 성분으로서 함유하는 농업 및 원예용 살균제; 당해 유도체의 중간체; 및 중간체의 제조방법에 관한 것이다. 상기 식에서, R1은, (C1-6)알킬 그룹, 할로(C1-6)알킬 그룹, (C1-6)알콕시(C1-6)알킬 그룹, (C1-6)알케닐 그룹, (C2-6)알케닐 그룹 또는 할로(C1-6)알콕시(C1-6)알킬 그룹이고, R2는 H, (C1-6)알킬 그룹, 할로(C1-6)알킬 그룹, (C1-6)알콕시(C1-6)알킬 그룹, (C2-6)알케닐 그룹 (C2-6)알키닐 그룹, 할로(C1-6)알콕시(C1-6)그룹 또는 시아노(C1-6)알킬 그룹임.

○ [특허실용] 농업및원예용살진균제 10-1993-0000526 (1993.01.16) 이.아이,듀우
 판드네모아앤드컴파니 포기

○ 본 발명은 신규의 농업 및 원예용 살진균제에 관한 것이다. 본 발명의 농업 및 원예용 살진균제는 감염성 농작물 병해, 특히 채소, 화초 및 관상수 및 유실슈의 역병, 노균병 및 흰가루병 등의 방제에 유효하다.

○ [특허실용] 2-메톡시이미노카르복실산 에스테르 10-1991-0009825 (1991.06.14)
 바이엘악티엔게젤샤프트 거절

- [목적] 보리 또는 밀의 흰가루병, 갈색 무늬병, 또는 곡류에 대한 눈곰팡이병과 벼 도열병에유용하며, 과수 및 재배 채소의 질병을 퇴치하는데 유용한 살충제인 2-메톡시이미노카르복실산 에스테르의 제조방법을 제공한다. [구성] 메탄올, 에탄올 또는 프로판올과 같은 알코올류, 이들과 물의 혼합물 또는 순수한 물등의 용매중에서 염산, 브롬화수소산 또는 황산과 같은 강한 무기산을 반응 보조제의 존재하에 일반

식(II)의 아크릴산 에스테르 유도체 몰당 1.0 내지 1.5몰의 O-메틸하이드록실아민 하이드로클로라이드와 적합하다면 1.0 내지 1.5몰의 반응 보조제를 섞서 20-60도에서 반응시켜 일반식(I)의 화합물을 제조한다. A는 라디칼 $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3\text{CH}-$ 및 $-\text{CH}_2\text{N}$ 중의 하나이며, Y는 라디칼 $-\text{CO}-\text{O}-$, ...

○ [특허실용] 사황화 소다를 함유한 미량요소 복합비료의 제조방법

10-1997-0058108 (1997.11.05) 한국삼협화성 등록

- 본 발명은 토양과 작물에 꼭 필요한 동물성 종합 아미노산 액과 사황화 소다(Na_2S_4)가 함유된 고급 미량요소 복합비료의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.본 발명의 복합비료에서, 동물성 종합 아미노산 액은 연작으로 인한 지력(地力)과 영양분의 감소를 회복시켜 주고, 사황화 소다(Na_2S_4)는 대개의 농약 중에 고농도로 함유되어 각종 병충해 방제역할을 하는 황(S) 성분을 공급하여 과다한 농약의 살포대신 소량으로도 모든 작물에 오는 흰가루병 및 세균성 바이러스 균의 예방 및 퇴치에 효과를 볼 수 있다.

○ [특허실용] 과실동봉장치 20-1999-0013036 (1999.07.05) 윤석길 등록

- 본 고안은, 과실의 검은무늬병, 겹무늬병, 흰가루병, 점무늬낙엽병 및 겹무늬썩음병 등을 방제함과 더불어, 까마귀와 같은 조류로부터의 피해를 예방하기 위한 과실동봉장치에 관한 것으로서, 일측에 개구부를 가지는 본체와, 상기 개구부를 폐쇄 가능한 크기로 형성된 덮개체를 구비하고, 상기 본체에 덮개체를 결합하여 과실을 동봉하도록 구성되며, 상기 본체와 덮개체 중 적어도 하나에 과실의 꼭지를 수용하도록 절개부가 형성된 것을 특징으로 한다.

○ [특허실용] NaOH와 목초액, 규산, 길경 및 키토산을 이용한 흰가루병및 곰팡이 억제에 관한 조성물 및 제조방법

10-2004-0028820 (2004.04.26) 이상호 공개

- 본 발명은 식물의 흰가루병 과 곰팡이병 예방 및 억제, 나아가서는 치료에 관한 조성물로서, 더욱 상세하게는 각종 식물의 곰팡이병에 적용시 곰팡이균의 포자를 분해하고 세포막을 파괴하여 식물의 정상적인 성장을 도와 주며, 비료성분으로서 조성된 물질이므로 식물에게 영양을 주며 곰팡이 균을 사멸시킴으로 사람과 식물과 토양이 농약으로부터 벗어날 수 있는 친환경적인 조성물 및 그 제조법에 관한 것으로 농약 사용절감과 환경오염방지는 물론 농가소득을 증대시키고자 함

4. 국내·외 회사의 흰가루병 방제 기술 보유 현황

- 국내에서 제조되는 흰가루병 화학방제 약제는 흰가루병 방제에만 직접적으로 사용되는 약품은 없으며, 거의 대부분의 약품은 다른 병해 방제를 위해 개발된 약제를 응용하여 사용하고 있음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 목질원료로부터 유사 흰가루병 방제 유효 추출물의 분리공정 확립

1. 목질자원으로부터 항곰팡이 추출물의 획득을 위한 전처리공정 개발

가. 목질자원의 물리적 파괴를 위한 전처리법 조건연구

1) 재료 및 방법

본 연구에 사용된 공시재료는 목분, 수증기전처리 목분, 목분 및 수증기처리 목분으로부터 조제한 홀로셀룰로오스를 이용하였으며, 각기 물리적인 전처리 용이성을 판단하기 위해 각 공시재료의 비표면적을 포화염 수용액에 의한 조습법과 흡습법에 의해 측정하였다. 각 상대습도 조건에서의 평형함수율은 다음 식에 의해 산출하였다.

$$EMC(\%) = \frac{W - W_0}{W_0} \times 100 \text{-----}(1)$$

EMC : 평형함수율 (Equilibrium moisture content)

W : 각 상대습도에 있어서 평형에 도달한 시료질량(g)

W₀ : 시료의 건건질량 (g)

한편 내부표면적을 계산하기 위해서 상대수증기압 $x(=P/P_0)$ 와 수분흡착량 $V(\text{g-water/g-wood})$ 를 실험으로부터 측정하고, 이 x 와 V 로부터 BET plot에 필요한 $x/V(1-x)$ 를 계산하였다.

$$\frac{x}{V(1-V)} = \frac{C-1}{V_m \cdot C} \cdot x + \frac{1}{V_m \cdot C} \text{-----}(2)$$

이 기울기와 절편으로부터 V_m 과 C 를 구할 수가 있다. 이 V_m 으로부터 내부표면적 S 는 다음 식으로 구할 수 있다.

$$S = \frac{a \cdot N \cdot Vm}{M} \times 10^{-4} (m^2/g) \text{-----(3)}$$

단, S : 내부표면적 (m²/g), x : 상대수증기압

V : 흡착량 (g/g), a : 물분자 한 개가 점유하는 면적 (=14.8×10⁻⁶cm²)

N : 아보가드로 수 (=6.02×10²³), Vm : 단분자층 흡착량 (g)

M : 물분자량 (=18) 이다.

2) 결과 및 고찰

가) 평형함수율의 변화

Table 3-1-1은 목분과 각각 다른 조건으로 수증기 처리한 목분의 평형함수율 결과를 나타낸 것이다. 이 표에서 보는 바와 같이 동일한 상대습도 하에서는 무 처리 목분의 EMC가 가장 높게 나타났다. 이와 같은 현상들은 수증기처리시의 고온·고압에 의하여 헤미셀룰로오스가 분해 및 변질이 심하게 되었고, 고온에 의해 분해된 리그닌이 비교적 수분과 결합력이 높은 헤미셀룰로오스와 셀룰로오스를 둘러싸고 있기 때문이라고 추정되

Table 3-1-1. Equilibrium moisture contents(%) of control wood meal and steam exploded wood meal were treated under various condition(25°C) for poplar wood.

| Steam explosion conditions (kgf/cm ² · min) | Equilibrium moisture contents(%) | | | | | | | | |
|--|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| | Relative humidity(%) | | | | | | | | |
| | 11 | 22 | 33 | 43 | 54 | 66 | 75 | 85 | 95 |
| wood meal | 2.5 | 4.2 | 5.3 | 6.6 | 8.0 | 9.4 | 12.0 | 13.6 | 15.5 |
| 25 - 3 | 1.2 | 2.0 | 2.6 | 3.4 | 4.7 | 5.5 | 7.7 | 9.6 | 11.3 |
| 6 | 1.6 | 2.2 | 2.6 | 3.3 | 4.0 | 5.0 | 6.9 | 8.4 | 9.8 |
| 9 | 1.1 | 1.7 | 2.3 | 3.0 | 3.9 | 5.0 | 6.9 | 8.5 | 10.2 |
| 30 - 3 | 1.5 | 2.0 | 2.1 | 2.4 | 2.9 | 4.0 | 5.8 | 7.5 | 9.3 |
| 6 | 1.4 | 2.6 | 2.2 | 2.9 | 3.6 | 4.7 | 6.3 | 7.9 | 9.4 |
| 9 | 1.3 | 1.9 | 2.4 | 3.1 | 3.6 | 4.9 | 6.5 | 8.0 | 9.5 |

Table 3-1-2는 탈리그닌처리한 목분 및 수증기처리 목분의 평형함수율 결과를 나타낸 것이다. 또한, 목분과 수증기처리재 목분을 탈리그닌 처리하여 실험한 결과, 탈리그닌처리

전보다 비교적 더 높은 평형습수율을 나타냈는데 이것은 탈리그닌처리에 의해서 목재중의 리그닌이 제거됨으로써 시료중의 수분흡착면적이 증가되었기 때문으로 추정된다.

Table 3-1-2. Equilibrium moisture contents(%) of delignified control wood meal and steam exploded wood meal were treated under various conditions(25°C) for poplar wood.

| Steam explosion conditions (Kgf/cm ² · min.) | Equilibrium moisture contents(%) | | | | | | | | |
|--|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| | Relative humidity(%) | | | | | | | | |
| | 11 | 22 | 33 | 43 | 54 | 66 | 75 | 85 | 95 |
| wood meal | 3.8 | 4.9 | 6.2 | 7.0 | 7.7 | 8.5 | 10.4 | 14.5 | 17.9 |
| 25-3 | 4.0 | 4.1 | 4.7 | 5.4 | 6.4 | 7.5 | 9.5 | 10.9 | 13.2 |
| 6 | 2.4 | 3.4 | 4.4 | 5.1 | 6.2 | 7.0 | 8.9 | 10.5 | 11.6 |
| 9 | 2.4 | 3.6 | 4.7 | 5.2 | 6.5 | 7.3 | 8.8 | 10.3 | 11.2 |
| 30-3 | 3.0 | 3.5 | 4.9 | 5.8 | 6.6 | 7.1 | 8.8 | 10.2 | 12.1 |
| 6 | 2.2 | 3.0 | 3.0 | 4.3 | 5.6 | 6.6 | 8.1 | 9.3 | 11.8 |
| 9 | 2.7 | 3.9 | 4.5 | 5.6 | 6.8 | 7.8 | 10.0 | 10.8 | 12.9 |

나) 비표면적의 변화

Table 3-1-3은 목분과 각기 다른 수증기처리조건으로 수증기처리한 목분의 비표면적 변화를 나타내었다. 수증기처리한 목분은 대조구인 목분에 비해 비표면적이 상당량 감소하였다. 먼저 동일처리시간에 있어서 수증기처리압력에 대한 비표면적의 변화를 보면 처리시간이 3, 6분의 경우는 수증기처리압력이 강해질수록 비표면적은 점차 감소하였다. 반면에 처리시간 9분의 경우는 수증기처리압력이 강해져도 비표면적의 큰 차이는 보이지 않았다.

Table 3-1-3. Specific surface areas(S), amount of monomolecular vapor adsorption(V_m) of wood meal and steam exploded wood meal for the various conditions of poplar wood

| Steam explosion condition (Kgf/cm ² · min.) | $\frac{C-1}{V_m \cdot C}$ | $\frac{1}{V_m \cdot C}$ | r | V_m (g/g) | S(m ² /g) |
|---|---------------------------|-------------------------|-------|-------------|----------------------|
| wood meal | 20.579 | 2.488 | 0.997 | 0.043 | 215 |
| 25-3 | 37.883 | 6.060 | 0.998 | 0.023 | 113 |
| 6 | 48.213 | 2.449 | 0.998 | 0.020 | 98 |
| 9 | 43.561 | 6.727 | 0.998 | 0.020 | 98 |
| 30-3 | 73.679 | -0.770 | 0.995 | 0.014 | 68 |
| 6 | 59.019 | 0.937 | 0.964 | 0.017 | 83 |
| 9 | 46.94 | 4.511 | 0.998 | 0.020 | 96 |

r : Regression coefficients.

Table 3-1-4는 탈리그닌 처리한 목분 및 탈리그닌 처리한 수증기 처리 목분의 비표면적 변화를 나타내었다. 대조구인 목분의 비표면적은 탈리그닌전의 결과와 동일하게 수증기 처리 목분에 비해 상당히 높게 나타났으며, 수증기처리시간 및 처리압력에 대한 비표면적 변화는 탈리그닌전의 경우와는 큰 차이를 보였다. 먼저 동일처리시간에 있어서 수증기처리압력에 대한 비표면적의 변화를 보면, 수증기처리압력이 강해져도 비표면적은 거의 같거나 큰 변화를 보이지 않았다.

Table 3-1-4. Specific surface areas(S), amount of monomolecular vapor adsorption(V_m) of wood meal and steam exploded wood meal for the various conditions of poplar wood

| Steam explosion condition (Kgf/cm ² · min.) | $\frac{C-1}{V_m \cdot C}$ | $\frac{1}{V_m \cdot C}$ | r | V_m (g/g) | S(m ² /g) |
|---|---------------------------|-------------------------|-------|-------------|----------------------|
| wood meal | 23.107 | 0.636 | 0.998 | 0.042 | 209 |
| 25-3 | 33.865 | -0.623 | 0.999 | 0.030 | 149 |
| 6 | 29.700 | 1.765 | 0.998 | 0.032 | 157 |
| 9 | 28.622 | 1.693 | 0.991 | 0.033 | 163 |
| 30-3 | 26.783 | 1.511 | 0.992 | 0.035 | 175 |
| 6 | 40.169 | 1.299 | 0.974 | 0.024 | 120 |
| 9 | 28.416 | 1.313 | 0.998 | 0.034 | 167 |

r : Regression coefficients.

나. 전처리 원료로부터 목재 추출물의 추출방법연구

1) 재료 및 방법

전처리 원료로부터 목재 추출물의 추출을 위해 냉수추출, 수산화나트륨용액 처리(실온 처리, 비등처리)를 행하였다.

2) 결과 및 고찰

가) 공시재료의 목재 조성분

본 실험에서 사용된 공시재료인 신갈나무와 이테리포플러의 화학적 조성분 비교 결과를 Table 3-1-5에 표시하였다. 냉수, 온수, 유기용제, 알칼리 추출물과 같은 추출성분은 신갈

나무가 이태리포플러 보다 약간 많았으며, 리그닌함량을 나타내는 Klason lignin 함량은 20% 전후로 거의 비슷하였다. 알칼리추출물 함량이 다른 추출물에 비해 양이 많은 이유는 알칼리 가열처리에 의해 냉수, 온수 추출물 및 유지, 수지, 밀납, 정유, 리그닌 및 헤미셀룰로오스의 일부가 동시에 추출되기 때문이다.

Table 3-1-5. Chemical compositions of wood (%)

| Characters | <i>Quercus mongolica</i> | <i>Populus euramericana</i> |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Cold water extractives | 2.0 | 1.7 |
| hot water extractives | 4.8 | 3.4 |
| Ethanol-benzene extractives | 2.6 | 1.1 |
| Alkali(1% NaOH) extractives | 24.2 | 22.4 |
| Klason lignin | 20.8 | 21.7 |
| Ash | 0.6 | 0.8 |

다. 원료의 최적 전처리 기술 연구

본 연구에서 목질자원의 전처리방법으로 고온·고압 처리방법을 선택하였으며, 이 방법은 리그노셀룰로스계 물질(목질자원)의 전처리에 있어 가장 효율적인 방법 중의 하나라고 알려져 있다. 일반적인 리그노셀룰로스계 물질(목질자원)의 전처리에는 화학적인 방법, 물리적인 방법, 생물학적인 방법이 있으며, 이러한 전처리 방법은 그 방법에 따라 장단점이 있다. 그러나 에너지 측면 및 환경적 측면을 고려 할 때 고온·고압 처리방법이 가장 효율적인 방법으로 사료된다. 본 연구에서 사용된 고온·고압 처리장치는 현재 주관기관에서 보유중인 장치를 사용하였으며, 그 장치의 사진을 Fig 3-1-1에 나타냈다.

원료의 최적 처리조건에서 우선시 검토 되어야 할 사항은 1회 처리량이며, 처리 조건에 따른 처리 수율 및 파쇄상태를 육안적으로 검토해야 할 필요성이 있다. 본 연구에서 사용

된 고온고압 처리장비의 최대 1회 처리량은 15kg으로 규명되었고, 이때 처리 수율은 약 97%로 나타났다. 약 3%의 손실은 처리시 시료를 완전하게 회수하기가 불가능하였으며, 일부는 처리과정 동안 휘발성분 등이 열에 의해 휘발되기 때문으로 생각되어진다.



Fig 3-1-1. 본 연구에 사용된 시료 전처리 장치

라. 원료의 전처리공정 기술개발

원료의 전처리 조건을 선정하기 위해 장비의 최적 전처리 조건을 검토하였으며, 검토조건은 시료의 투입량, 처리 후 수율, 파쇄상태의 육안적 검토를 행하여 결정하였다. 전처리된 목질원료(리그노셀룰로스)는 충분히 기건시켜 공시재료로 사용하였다.

본 연구에서 있어서 원료의 최적 전처리공정은 목질원료를 고온·고압 처리하여 파쇄되어진 목질원료(리그노셀룰로스)는 일정 비율로 일정시간동안 물과 혼합하여 교반장치에서 페놀성 성분을 포함한 목재 추출물을 온수추출 하였다. 기건 시킨 목질원료에 증류수를 일정량 첨가 (액비 20/1), 혼합한 다음, 30분 동안 120℃에서 반응시킨 후 반응 잔사(고온·고압 처리된 원료)와 반응 액(목재 추출물)을 분리하였다. 원료의 최적 전처리 공정은 Fig 3-1-2와 같다.



리그노 셀룰로오스원료



고온·고압 처리



고온·고압된 원료 회수과정



온수추출

Fig 3-1-2. 원료 최적 전처리 공정

2. 곰팡이 생육억제 추출물 대량생산을 위한 목질 원료의 선별 및 현실적 공급형태 결정

가. 목질 원료의 수출입 현황

Table 3-1-6은 목재의 대륙권별 수입과 수출의 현황을 나타낸 것이며, Table 3-1-7과 Table 3-1-8은 목재 중에서도 본 연구에 원료로 사용되는 참나무 수출현황과 수입현황을 나타낸 것이다. Table 3-1-9와 Table 3-1-10은 우리나라 관세청에서 부여한 코드분류(HSK; Harmonized System Korea; 관세·통계 통합품목분류표) 10단위별 국가별 참나무 수출현황과 수입현황을 나타낸 것이며, Table 3-1-11은 참나무의 계절별 수입 제재목 및 종자와 수출 원목 및 제재목 현황을 나타낸 것이다.

Table 3-1-6. 목재의 대륙권별 수, 출입 현황

| 지 역 | 목 재 류 | 비 중 |
|------|--------|-------|
| 아시아 | 16,364 | 78.1 |
| 유럽 | 2,147 | 10.3 |
| 북미 | 1,731 | 8.3 |
| 대양주 | 94 | 0.4 |
| 아프리카 | 126 | 0.6 |
| 중남미 | 58 | 0.3 |
| 중동 | 422 | 2.0 |
| 합 계 | 40,942 | 100.0 |

Table 3-1-7. 참나무 수출현황

| 국 명 | 2004. 04 | | | | 2005. 04 | | | |
|-------|------------|----------------------------|-----------|------------|------------|----------------------------|-----------|------------|
| | 중량 (kg) | 물량 (t,천m ³) | 금액 (불) | 금액 (천불) | 중량 (kg) | 물량 (t,천m ³) | 금액 (불) | 금액 (천불) |
| 홍 콩 | - | - | - | - | 9,514 | 0.02 | 11,838 | 11.84 |
| 인도네시아 | - | - | - | - | 4,020 | 0 | 4,900 | 4.9 |
| 기 타 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 합 계 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13,537 | 0 | 16,738 | 17 |

Table 3-1-8. 참나무 수입현황

| 국 명 | 2004. 04 | | | | 2005. 04 | | | |
|-----------|------------|----------------------------|-----------|------------|------------|----------------------------|-----------|------------|
| | 중량 (kg) | 물량 (t,천m ³) | 금액 (불) | 금액 (천불) | 중량 (kg) | 물량 (t,천m ³) | 금액 (불) | 금액 (천불) |
| 미 국 | 3,595,300 | 5.30 | 3,344,693 | 3,344.69 | 3,442,761 | 4.93 | 3,375,757 | 3,375.76 |
| 러시아 | 762,417 | 0.89 | 285,130 | 285.13 | 819,021 | 0.96 | 318,158 | 318.16 |
| 캐나다 | 98,951 | 0.17 | 115,287 | 115.29 | 93,056 | 0.14 | 102,682 | 102.68 |
| 인도 네시아 | 23,687 | 0.04 | 14,719 | 14.72 | 104,550 | 0.17 | 87,220 | 87.22 |
| 일 본 | 13,230 | 0.02 | 34,557 | 34.56 | 12,850 | 0.2 | 31,180 | 31.18 |
| 중 국 | 25,000 | 0.04 | 9,920 | 9.92 | 11,960 | 0.2 | 15,565 | 15.57 |
| 대 만 | - | - | - | - | 21,745 | 0.04 | 14,648 | 14.65 |
| 필리핀 | - | - | - | - | 22,000 | 0.04 | 2,969 | 2.97 |
| 기 타 | 23,000 | 0 | 5,816 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 합 계 | 4,541,585 | 6 | 3,810,122 | 3,810 | 4,527,943 | 6 | 3,948,172 | 3,948 |

Table 3-1-9. HSK 10단위별 국가별 참나무 수출현황

| HSK | 품목명 | 국기호 | 국가명 | 중량 (kg) | 물량 (t,천m ³) | 금액 (불) | 금액 (천불) |
|------------|-------------|-----|-------|------------|----------------------------|-------------|------------|
| 4403910000 | 원목 | ID | 인도네시아 | 4,020 | 0 | 4,900 | 5 |
| 4407910000 | 제재목 | HK | 홍콩 | 9,517 | 0.02 | 11,838 | 12 |
| 전체합계 | 2005년도 | - | - | - | - | 793,791,051 | 793,791 |
| 소 계 | 2005년 4월 | - | - | - | - | 16,738 | 17 |

Table 3-1-10. HSK 10단위별 국가별 참나무 수입현황

| HSK | 품목명 | 국기호 | 국가명 | 중량 (kg) | 물량 (t,천m ³) | 금액 (불) | 금액 (천불) |
|------------|----------|-----|-------|------------|----------------------------|-------------|------------|
| 1209991010 | 참나무 종자 | CN | 중국 | 2,426 | 2.43 | 6.130 | 6 |
| 4403910000 | 원목 | RU | 러시아 | 819,021 | 0.96 | 318.518 | 318 |
| 4403910000 | 원목 | US | 미국 | 1,627,626 | 1.9 | 1,390.617 | 1,391 |
| 4403910000 | 원목 | CA | 캐나다 | 28,655 | 0.03 | 26.626 | 27 |
| 4407910000 | 제재목 | TW | 대만 | 21,745 | 0.4 | 14.648 | 15 |
| 4407910000 | 제재목 | US | 미국 | 1,815,135 | 3.03 | 1,985.086 | 1,985 |
| 4407910000 | 제재목 | ID | 인도네시아 | 104,550 | 0.17 | 87.220 | 87 |
| 4407910000 | 제재목 | JP | 일본 | 12,850 | 0.02 | 3.180 | 31 |
| 4407910000 | 제재목 | CN | 중국 | 11,960 | 0.02 | 15.565 | 16 |
| 4407910000 | 제재목 | CA | 캐나다 | 64,401 | 0.11 | 76.056 | 76 |
| 4407910000 | 제재목 | PH | 필리핀 | 22,000 | 0.04 | 2.969 | 3 |
| 전체합계 | 2005년도 | - | - | - | - | 793.791.051 | 793.791 |
| 소 계 | 2005년 4월 | - | - | - | - | 3.954.302 | 3.954 |

Table 3-1-11. 참나무의 계절별 수, 출입

| 시 기 | HSK | 품목명 | 중량 (kg) | 물량 (t, 천m ³) | 금액 (불) | 단가 | |
|----------|-----|------------|------------|-----------------------------|-----------|-----------|--------|
| 2004. 04 | 수출 | 4407910000 | 제재목 | 15,300 | 0.03 | 11,012 | 367 |
| | | 1209901010 | 종자 | 800 | 0.8 | 17,226 | 21.45 |
| | 수입 | 4003190000 | 원목 | 3,252,537 | 3.81 | 236,468 | 620.65 |
| | | 4407910000 | 제재목 | 2,143,537 | 3.57 | 219,249 | 614.14 |
| 2004. 07 | 수출 | 4407910000 | 제재목 | 70,900 | 0.12 | 52,862 | 440.5 |
| | | 1209901010 | 종자 | 800 | 0.8 | 17,226 | 21.54 |
| | 수입 | 4003190000 | 원목 | 3,722,632 | 4.36 | 2,735,615 | 627.44 |
| | | 4407910000 | 제재목 | 2,848,145 | 4.74 | 3,006,016 | 634.21 |
| 2004. 10 | 수출 | 4407910000 | 제재목 | 133,589 | 0.22 | 101,514 | 461.41 |
| | | 1209901010 | 종자 | 801 | 0.8 | 34,753 | 43.44 |
| | 수입 | 4003190000 | 원목 | 4,539,772 | 5.31 | 3,154,620 | 594.09 |
| | | 4407910000 | 제재목 | 3,937,181 | 6.56 | 4,271,177 | 651.09 |
| 2004. 01 | 수출 | - | - | - | - | - | - |
| | | 1209901010 | 종자 | 2,426 | 2.43 | 6,130 | 2.52 |
| | 수입 | 4003190000 | 원목 | 664,925 | 0.78 | 409,292 | 524.73 |
| | | 4407910000 | 제재목 | 465,403 | 0.78 | 493,791 | 633.06 |

나. 농산 및 임지 폐잔재의 발생현황

Table 3-1-12는 생활폐기물의 지역별 및 성상별 발생량을 나타낸 것이다. 본 주관기관을 중심으로 전국 통계자료를 조사하였으며, 생활폐기물 중 농산폐자원의 발생량은 포함되지 않았다.

Table 3-1-12. 생활폐기물 지역 및 성상별 발생량 (2002)

(단위: 톤/일)

| 구 분 | 종 이 류 | 연 탄 재 | 금속·유리 | 음 식 물 류 | 기 타 |
|--------------|------------|-----------|------------|------------|-------------|
| 계 | 12171 | 535 | 6621 | 11397 | 19178 |
| 서울특별시 | 3265 | 10 | 1701 | 2523 | 4553 |
| 부산광역시 | 1246 | 11 | 552 | 970 | 1252 |
| 대구광역시 | 680 | 20 | 377 | 550 | 1015 |
| 인천광역시 | 509 | 8 | 300 | 679 | 817 |
| 광주광역시 | 347 | 16 | 146 | 345 | 640 |
| 대전광역시 | 329 | 9 | 217 | 438 | 647 |
| 울산광역시 | 318 | 4 | 185 | 270 | 605 |
| 경기도 | 2282 | 70 | 1308 | 2307 | 3102 |
| 강원도 | 389 | 137 | 194 | 351 | 1068 |
| 충청북도 | 379 | 50 | 200 | 264 | 711 |
| 충청남도 | 433 | 65 | 314 | 454 | 781 |
| 전라북도 | 372 | 13 | 177 | 430 | 635 |
| 전라남도 | 257 | 33 | 247 | 386 | 1057 |
| 경상북도 | 453 | 62 | 217 | 604 | 896 |
| 경상남도 | 677 | 25 | 398 | 692 | 1210 |
| 제주도 | 235 | 2 | 88 | 134 | 189 |

Table 3-1-13은 시도별 사업장 폐기물의 발생현황을 나타낸 것이다. Table 3-1-15는 현재 발생되고 있는 임지 폐목재 발생량을 나타낸 것이다. 1998년을 기준으로 한 국내바이오매스 부존자원은 연간 약 1,200만 ton에 이르며, 현재의 기술로 이용가능한 자원은 그 양의 약 20%에 해당하는 230만 ton에 이른다. 또한 농업부산물의 부존자원은 400만 ton/년에 달하며, 보급 잠재량은 105만 ton/년에 이르며 이를 현금으로 환산하면 3,675억원에 이르고 있다.

2002년도 말 현재 우리나라의 임산자원은 461,635,000톤으로 나타났으며, 산림에서 이루어지고 있는 숲 가꾸기 사업 또는 간벌, 지장목 벌채 등으로 생산되는 폐잔목과 용재로서 이용이 불가능한 폐자원에 대하여 이용방안이 절실히 필요하다.

산림청에서는 2004년부터 5개년간 1,000,000 ha 산림에 대한 숲 가꾸기를 실시할 예정으로 있으며, 이들 사업장의 전체 산림축적은 약 83,700 m³으로 추정되며, 30%를 간벌한다고 가정할 때, 수집이 예상되는 임목축적은 25, 100 m³이다.

이를 2002년도 말 우리나라 전체 영급별 임목축적 구성비를 적용시켜보면, 즉 용재로서 가치가 떨어지는 3영급이하와 용재로서의 쓰임새가 많은 4영급이상의 비율인 『48:52』를 축적에 각각 적용시키면, 3영급이하가 12,500 m³, 4영급이상이 13,100m³의 임목축적이 수집될 것으로 예상된다.

수집되는 임목에 있어, 3영급이하는 축적의 20% 정도가 용재로 이용되며, 80%가 폐자원으로 단순 연료용으로 사용된다고 가정하고, 4영급이상은 축적의 80%가 용재로, 20%가 폐자원으로 발생된다는 것으로 가정하면, 전체 임산폐자원(연료로 이용가능)은 숲 가꾸기 5년간 12,300 m³이 되리라 예상된다.

현재 우리나라는 간벌, 피해목 벌채, 지장목 벌채 등을 통해 발생하는 폐잔재를 그대로 산에 방치시키는 경우가 대부분이며, 이들은 산불이나 산사태 발생시 더 많은 피해를 촉진시킬 수 있는 요인이 되므로 이를 수집하여 적극 이용하는 방안을 강구하여야 할 것이다.

Table 3-1-13. 시도별 사업장 가연성 일반 폐기물 발생현황

(단위: 톤/일)

| 시 도 | 소 계 | 종 이 류 | 나 무 류 | 합성수지류 | 기 타 |
|-------|------|-------|-------|-------|------|
| 합계 | 6053 | 506 | 2632 | 1800 | 1115 |
| 서울특별시 | 2116 | 198 | 869 | 511 | 538 |
| 부산광역시 | 121 | 2 | 41 | 59 | 19 |
| 대구광역시 | 57 | 13 | 27 | 13 | 4 |
| 인천광역시 | 49 | 4 | 15 | 26 | 4 |
| 광주광역시 | 103 | 6 | 65 | 17 | 15 |
| 대전광역시 | 80 | - | 37 | 36 | 7 |
| 울산광역시 | 30 | - | 14 | 11 | 5 |
| 경기도 | 1981 | 180 | 817 | 686 | 298 |
| 강원도 | 347 | 6 | 151 | 102 | 88 |
| 충청북도 | 103 | 6 | 27 | 31 | 39 |
| 충청남도 | 367 | 68 | 141 | 139 | 19 |
| 전라북도 | 66 | 8 | 23 | 20 | 15 |
| 전라남도 | 326 | 1 | 248 | 62 | 15 |
| 경상북도 | 145 | 3 | 68 | 54 | 20 |
| 경상남도 | 87 | 7 | 39 | 31 | 10 |
| 제주도 | 75 | 4 | 50 | 2 | 19 |

Table 3-1-14. 임지 폐목재 발생량 (2002)

| (단위: ha, m ³) | | | | | |
|---------------------------|---------|--------|---------|--------|-------|
| 구 분 | 합 계 | 주 별 | 수 종 개 신 | 간 별 | 기 타 |
| 벌채재적 | 1230578 | 474079 | 296806 | 273237 | 90363 |
| 발생량 | 48918 | 8263 | 6106 | 26312 | 4875 |

다. 참나무 원료 구입 경로

- 참나무 원료 공급 회사 : 대진산업(주)·펄프원료, 경남 함안군 소재, 055-587-0845
- 원목가격 : 1 ton 당 7만원
- 골목가격 :
 - 표고골목 : 개당 2,300 ~ 2,500원
 - 영지, 상황골목 : 1 ton 당 10만원
- 톱밥 : 80ℓ 당 15,000원, 작은포대(20 kg) 4,000원
- 목재칩 : 1 kg 당 160 ~ 200원
- 원료공급은 하물배달(운송비 별도부가) 함

Table 3-1-15은 2005년도에 대진산업(주)·펄프원료회사로부터 참나무 칩을 (주)유림하이텍이 공급받아 분기별 목재칩 원료 사용량을 나타낸 것이며, Table 3-1-16은 2005년도 참나무류의 규격별 시세를 나타낸 것이다.

Table 3-1-15. (주)유림하이텍 분기별 목재칩 원료의 주문물량 (2005년)

| 분 기 | 물 량 (kg) | 단 가 (원) | 금 액 (원) | 운송비 (원) |
|------|----------|---------|-----------|---------|
| 1 분기 | 2,360 | 160 | 377,600 | 45,000 |
| 2 분기 | 3,450 | 160 | 552,000 | 45,000 |
| 3 분기 | 5,600 | 180 | 1,008,000 | 45,000 |
| 4 분기 | 4,270 | 170 | 725,900 | 45,000 |

Tabel 3-1-16. 참나무류 시세 (2005년 기준, H: 수고(m), R: 근원직경(cm))

| 수종명 | 규격 | 조달청가격 (원) | 협회가격 (원) | 식재비 (원) |
|----------|----------|-----------|----------|---------|
| 졸참나무 | H2.0×R4 | 32,100 | 35,000 | 11,870 |
| | H2.5×R5 | 41,900 | 56,000 | 17,910 |
| | H2.5×R6 | 63,200 | 78,000 | 24,480 |
| | H3.0×R8 | 99,200 | 109,000 | 39,100 |
| | H3.5×R10 | 166,000 | 178,000 | 53,720 |
| | H3.5×R12 | 225,000 | 253,000 | 68,870 |
| | H3.5×R15 | 296,000 | 332,000 | 92,080 |
| 갈참나무 | H2.0×R4 | | 35,000 | 11,870 |
| | H2.5×R5 | | 50,000 | 17,910 |
| | H2.5×R6 | | 70,000 | 24,480 |
| | H3.0×R8 | | 100,000 | 39,100 |
| | H3.5×R10 | | 155,000 | 53,720 |
| | H3.5×R12 | | 245,000 | 68,870 |
| | H3.5×R15 | | 385,000 | 92,080 |
| 상수리나무 | H3.5×R20 | | 730,000 | 132,970 |
| | H2.0×R4 | 25,100 | 31,000 | 11,870 |
| | H2.5×R5 | 39,500 | 55,500 | 17,910 |
| | H3.0×R6 | 61,000 | 74,000 | 24,480 |
| | H3.5×R8 | 109,000 | 131,000 | 39,100 |
| | H3.5×R10 | 151,000 | 188,000 | 53,720 |
| | H4.0×R12 | 211,000 | 240,000 | 68,870 |
| | H4.0×R15 | 262,000 | 290,000 | 92,080 |
| | H4.5×R18 | 343,000 | 450,000 | 115,810 |
| H4.5×R20 | 450,000 | 640,000 | 132,970 | |
| 꿀참나무 | H2.0×R4 | | 33,000 | 11,870 |
| | H2.5×R5 | | 48,000 | 17,910 |
| | H2.5×R6 | | 69,000 | 24,480 |
| | H3.0×R8 | | 99,000 | 39,100 |
| | H3.5×R10 | | 150,000 | 53,720 |
| | H3.5×R12 | | 240,000 | 68,870 |
| | H3.5×R15 | | 370,000 | 92,080 |
| 신갈나무 | H3.5×R20 | | 680,000 | 132,970 |
| | H2.0×R4 | | 35,000 | 11,870 |
| | H2.5×R5 | | 50,000 | 17,910 |
| | H2.5×R6 | | 70,000 | 24,480 |
| | H3.0×R8 | | 100,000 | 39,100 |
| | H3.5×R10 | | 155,000 | 53,720 |
| | H3.5×R12 | | 250,000 | 68,870 |
| 떡갈나무 | H3.5×R15 | | 360,000 | 92,080 |
| | H3.5×R20 | | 640,000 | 132,970 |
| | H2.0×R4 | | 35,000 | 11,870 |
| | H2.5×R5 | | 60,000 | 17,910 |
| | H2.5×R6 | | 70,000 | 24,480 |
| | H3.0×R8 | | 100,000 | 39,100 |
| | H3.5×R10 | | 155,000 | 53,720 |
| 떡갈나무 | H3.5×R12 | | 250,000 | 68,870 |
| | H3.5×R15 | | 360,000 | 92,080 |
| | H3.5×R20 | | 640,000 | 132,970 |

3. 목질자원으로부터 항공광이 원료물질을 생산하기 위한 분리 및 정제 공정 개발

가. 목재추출물 생산 공정도

본 연구에서 있어서 목질자원(참나무 칩)으로부터 항공광이 원료물질인 목재추출물을 생산하기 위한 분리 및 정제공정 개발은 1차적인 처리로 목재칩(리그노셀룰로오스)을 고온·고압처리 하였다. 참나무 chip 원료는 전처리 공정으로 고온 (200℃ 이상), 고압 (20~40 kg/cm²) 포화수증기하에서 단시간 (6~10분) 처리한 후 대기 중에 노즐을 통하여 순간적으로 방출하여 팽창과 마찰력에 의하여 목재 조직의 파쇄와 해섬화를 도모하였으며, 이 고온·고압처리된 목재의 폐놀성 성분을 포함한 목재 추출물을 추출하기 위하여 물을 일정량 첨가 (액비 20:1), 혼합한 다음, 30~60분 동안 120℃에서 반응시킨 후 반응 잔사 (고온·고압 처리된 시료)와 반응액(목재 추출물)을 탈수와 여과에 의하여 분리하였다. 이렇게 분리된 목재 추출물은 다시 정제장치에 투입 (100ℓ)하고, 정제장치 내부온도 60℃에서 진공상태가 되며, 압력 540~580 kg/cm² setting 으로 정제공정을 회수된 목재 추출물을 본 연구에 적용할 항공광이 추출 원료로 사용하였다. 목재추출물 생산 공정은 Fig 3-1-3과 같다.



리그노 셀룰로오스원료



고온·고압 처리



고온·고압된 원료 회수공정



온수추출공정



탈수·1차 여과



2차 여과액 회수공정



목재 추출물 정제공정



정제된 목재 추출물 회수

Fig 3-1-3. 목재 추출물 생산 공정도

4. 흰가루병 유사 곰팡이의 생육을 저해하는 목질 추출물을 위탁과제와 연계하여 선별

가. 목질추출물 생산을 위한 전처리 기술 연구

본 연구에서는 시료의 전처리 및 고온·고압 전처리 공정을 거친 시료로부터 저분자 페놀류의 분리를 위해서 공시재료의 화학적 전처리 및 성분 분석을 하였다. 공시재료 5 g을 500 ml 삼각플라스크에 넣고 1% 수산화나트륨 용액 250 ml를 첨가하여 실온에서 2시간 교반한 후 glass filter (1G3)로 여과한 다음, 그 잔사를 증류수, 10% 초산용액으로 순차 세척하였다. 한편 화학적 전처리제는 alditol-acetate법에 의해 구성당 분석을 하고 Klason lignin 법에 의해 lignin함량을 정량하였다.

Table 3-1-17. Yield, lignin content and delignification rate of steam exploded wood treated with 1% sodium hydroxide solution

| Materials No. | Yield of residue (%) | Lignin content (%) | Delignification rate (%) |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------|--------------------------|
| EQ ¹⁾ 25-3 ²⁾ | 78.0 | 13.5 | 62.8 |
| EQ 25-3 ³⁾ | 59.2 | 7.6 | 86.6 |
| EQ 25-3 ⁴⁾ | 58.0 | 7.3 | 88.9 |

1) EQ: Steam explosion of *Quercus monglica*

2) EQ: 25-3: Steam explosion of *Quercus monglica* (25 kg/cm², 3 min)

3) EQ: 25-6: Steam explosion of *Quercus monglica* (25 kg/cm², 6 min)

4) EQ: 25-9: Steam explosion of *Quercus monglica* (25 kg/cm², 9 min)

공시재료의 화학적 전처리 (탈리그닌 처리)에 따른 수율 및 잔존 리그닌 함량 측정은 Table 3-1-17과 같다. 고온·고압 중의 리그닌 함량은 Table 3-1-17에서 보는 바와 같이 동일압력에서 처리시간이 길어질수록 함량이 증가하며, 또한 동일처리 시간에서 압력이 높아질수록 리그닌 함량이 증가하였다. 이는 고온·고압 처리 조건이 강해질수록 목재 중의 헤미셀룰로오스 가수분해 및 탈수소화 반응이 진행되고, 또한 가수분해 및 탈수소화 반응이 진행된 헤미셀룰로오스가 2차적으로 변화를 일으켜 furfural 등으로 변질되어 유실됨으로써 고온·고압재의 리그닌 함량이 상대적으로 높아졌다고 생각되며, 또한 그 이외의 원인으로서는 첫째, 고온·고압 처리 동안에 목재 중의 헤미셀룰로오스의 glucoside 결합이 가수분해되어 저분자화되었기 때문으로 판단되며, 둘째, 고온·고압재 중의 리그닌에 당류가 결합하여 산가수분해에 대한 저항성 증가 및 용출된 리그닌의 탄수화물 코팅으로 인하여 리그닌 정량시 영향을 미친 것으로 판단된다.

나. 폴리페놀류(phenolic compound) 생산을 위한 목질 원료의 전처리 연구

1) 원료 및 공시재료

주관연구기관(Y사, 대구시 소재)로부터 제공받은 수증기 처리된 목재원료(참나무)를 실온에서 기건 시킨 다음, Willey mill로 분쇄하여 40 mesh on - 80 mesh pass 부분을 분리하여 공시재료로 사용하였다.

2) 추출물 수율 및 페놀산 수율

가) 시료 2g (건건중량, oven dry weight)을 250 mL 삼각플라스크에 투입하고 증류수 50mL을 첨가하여 실온에서 1.5시간, 3시간, 6시간 각각 shaking하였다.

나) 반응종료 후, 2G3 glass filter로 여과한 다음, 증류수로 충분히 세척, 건조하여 추출물 수율을 측정하였다.

다) 페놀산 수율을 측정하기 위하여 여과액 총량을 100 mL로 조정한 다음, UV spectrophotometer (U-3000, Hitachi Ltd. Tokyo, Japan)를 사용하여 208nm에서 흡광도를 측정하였다.

라) 미리 작성된 liginosulfonic acid (Sigma co.)검량선 (Fig. 3-1-4, Fig. 3-1-5)을 이용하여 반응 전 투입된 시료의 건건중량을 기준으로 하여 페놀산 수율을 계산하였다.

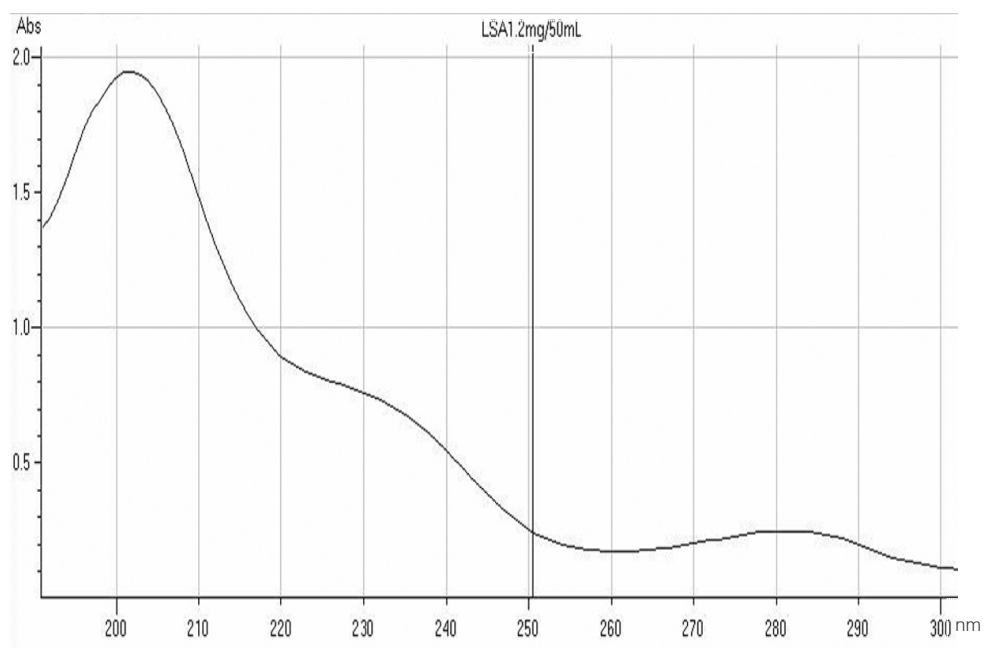


Fig. 3-1-4. Ultraviolet (UV) spectra of lignosulfonic acid (LSA).

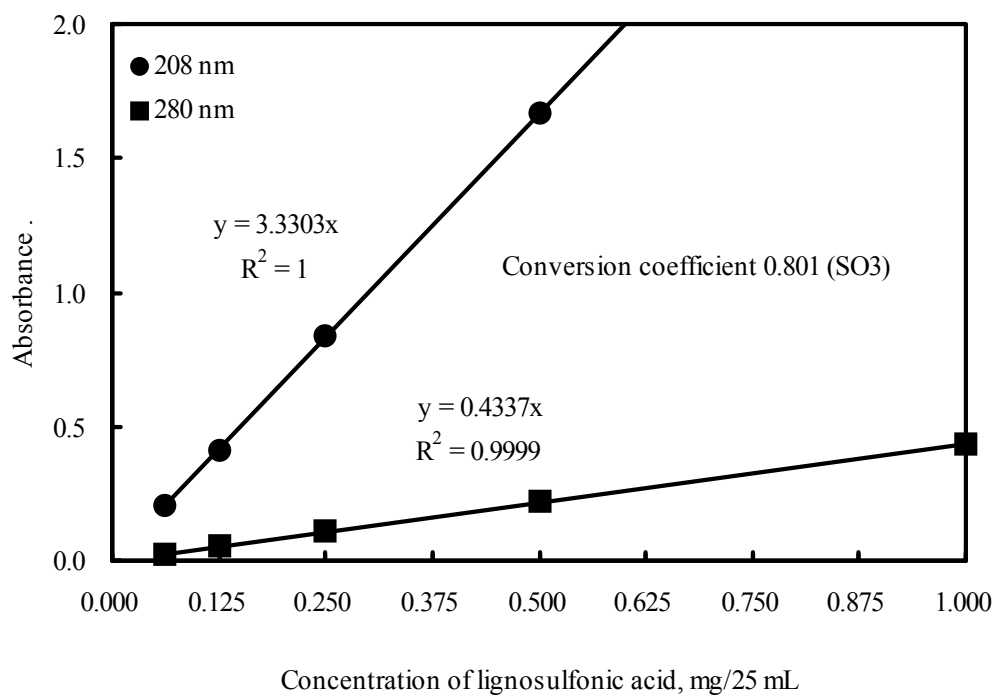


Fig. 3-1-5. Calibration curves of lignosulfonic acid (LSA).

3) 추출물에 함유된 페놀산 조성 분석

가) 추출물의 일부를 채취하여 pH 6.5 - 7.5 로 조정 한 다음, 4배양의 에탄올을 첨가하여 교반한 다음, 5000 RPM, 10분의 조건으로 원심 분리하였다.

나) 원심분리 후, 상층부 액을 따로 분리하여 HPLC를 사용하여 페놀산 조성 및 페롤산 함량을 분석하였다.

다) 분석조건은 TSK gel ODS-80(4.6mm × 25cm, Tosho) column을 사용하였고, UV detector 280nm에서 분석하였으며 이동상으로는 solvent A는 5% glacial acetic acid, solvent B는 methanol을 사용하였다.

라) 표준검량물질로는 vanillin, vanillic acid, ferulic acid와 cinnamic acid를 사용하였으며, 이들 화합물은 Sigma co.로부터 구입하여 사용

4) 목재원료의 전처리 효능 평가

주관연구기관(Y사, 대구시 소재)으로부터 제공받은 목재 원료에 증류수만을 투입하여 실온에서 1.5시간, 3시간, 6시간 반응했을 때 추출물 수율을 측정하였고, 추출물로부터 페놀산 수율과 페놀산 조성 및 페롤산의 수율을 측정하였다.

(1) 페놀산 수율 측정을 위한 검량선

추출물에 함유된 페놀산 조성 분석을 위해 사용된 각 표준물질의 검량곡선은 Fig 3-1-6에, 표준물질의 HPLC chromatogram은 Fig 3-1-7에 나타내었다. 표준검량물질로는 vanillin, vanillic acid, ferulic acid와 cinnamic acid를 사용하였으며, 이들 화합물은 Sigma co.로부터 구입하여 사용하였다.

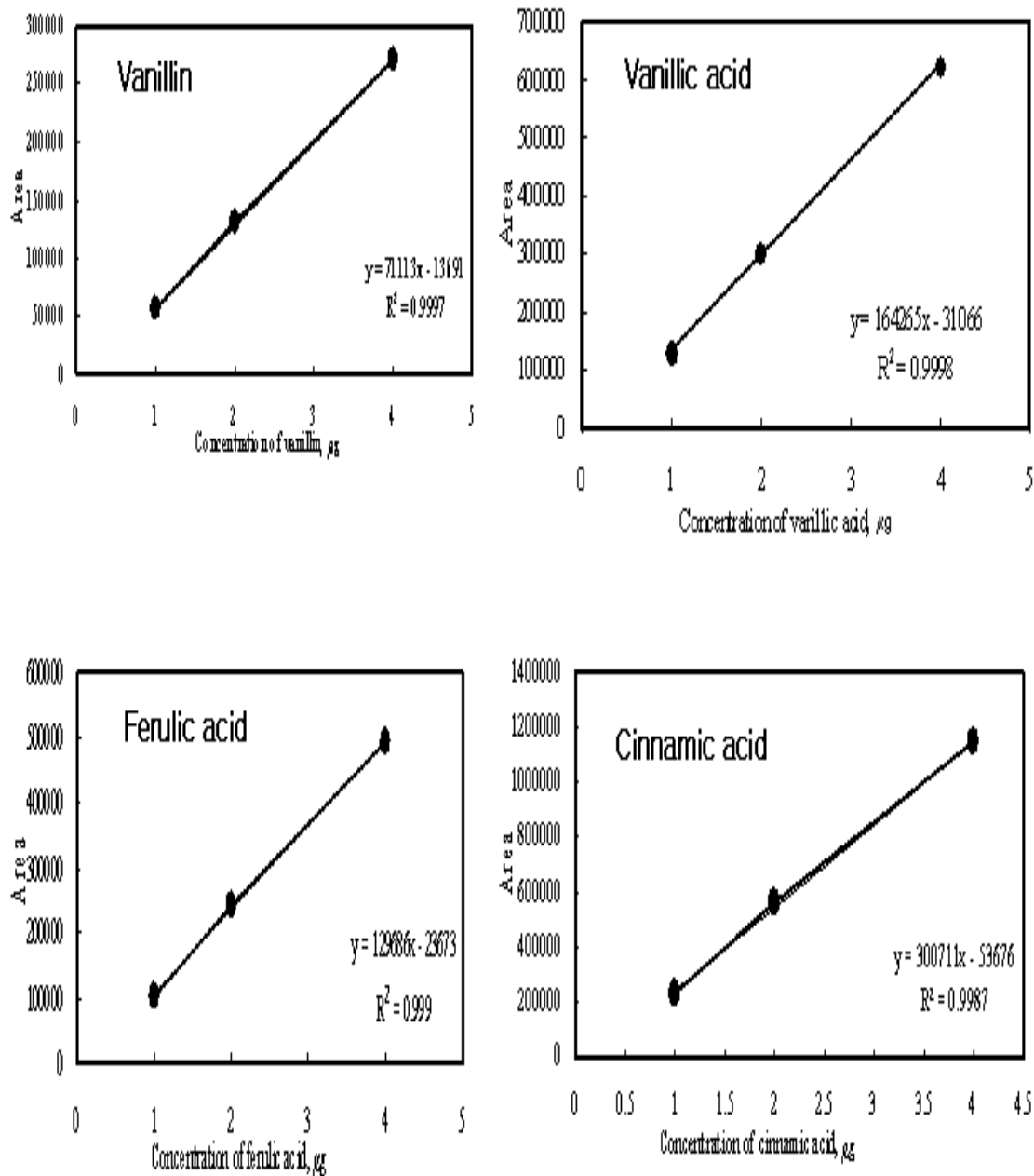


Fig 3-1-6. Calibration of phenolic compounds contents by HPLC analysis

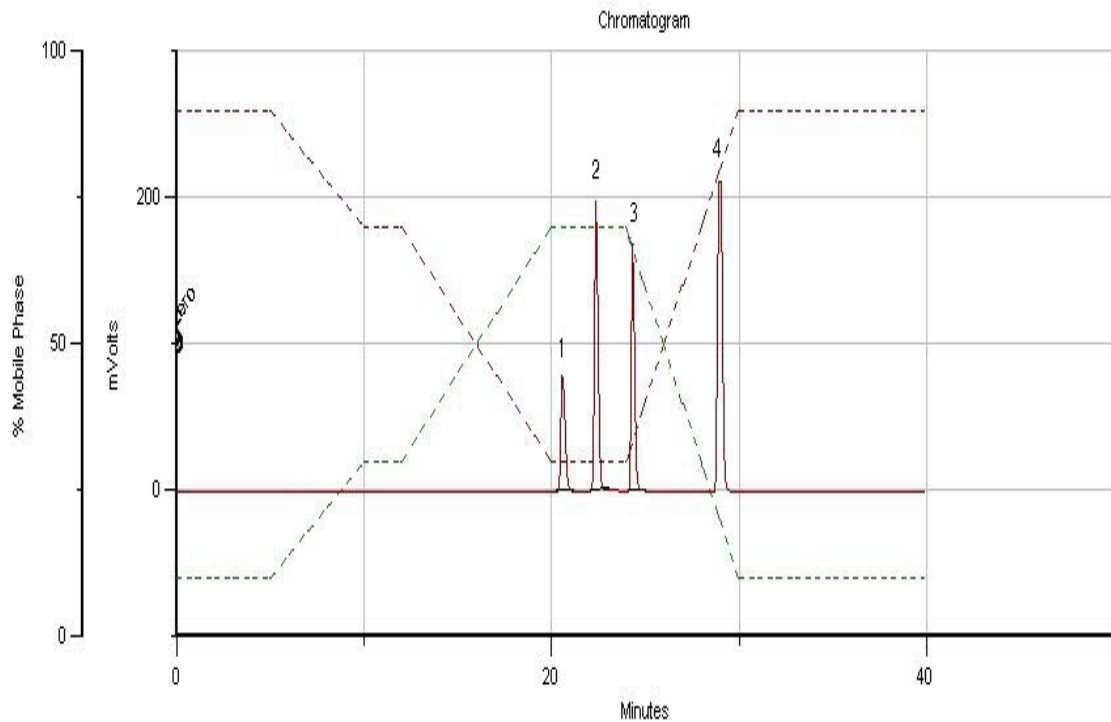


Fig 3-1-7. Standard curves of vanillin, vanillic acid, ferulic acid and cinnamic acid by HPLC

1; vanillin, 20.59 min., 2; vanillic acid, 22.37 min.,

3; ferulic acid, 24.32 min., 4; cinnamic acid, 28.93 min.

(2) 목재원료의 전처리 효능 평가

(가) 전처리 조건에 따른 추출물 수율

주관연구기간(Y사, 대구소재)로부터 제공받은 목재 원료에 증류수만을 투입하여 실온에서 1.5시간, 3시간, 6시간 반응했을 때 추출물 수율을 Fig 3-1-8에 나타내었다. 그 결과, 전처리 조건과 추출물 수율 간에는 유의성이 나타났으며, 목재원료의 전처리 시간이 10분 보다는 5분 처리가 추출물 수율 측면에서 높게 나타났으며, 가장 높은 추출물 수율은 전처리 조건 5분, 반응시간 6시간에서 나타났으며, 이때 추출물 수율은 193mg이었다.

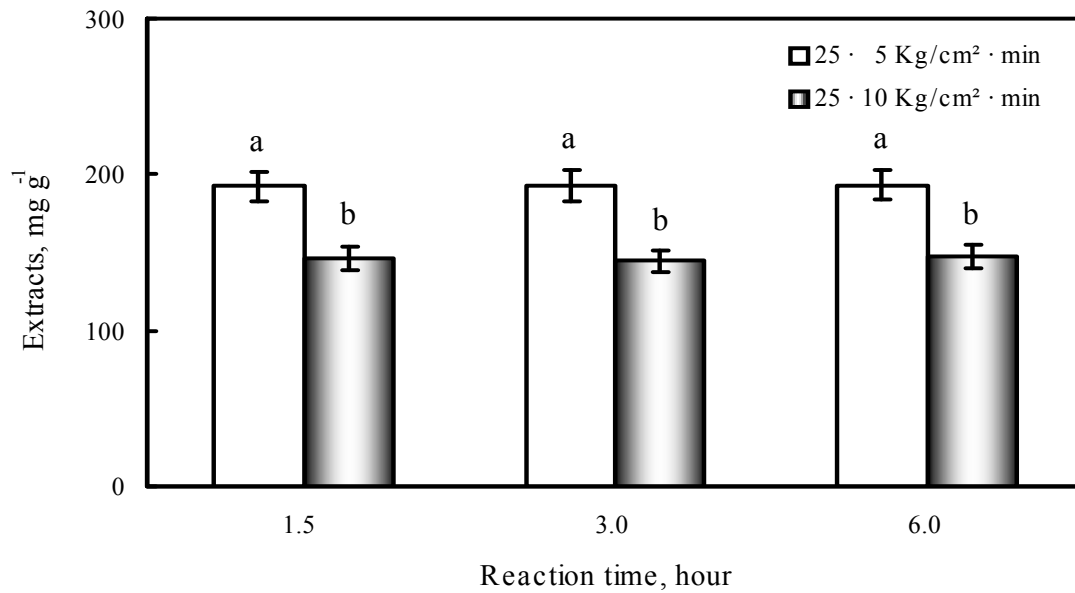


Fig 3-1-8. Yield of extracts with water from pretreated wood at room temperature

- Notes: 1) Based on the oven dry weight of the pretreated wood.
 2) The vertical bars the standard errors of individual means.
 3) Bars followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

(나) 페놀산 수율

Fig 3-1-9에 전처리된 목재원료를 실온에서 처리했을 때, 페놀산 수율을 나타내었다. 그 결과 전처리된 목재원료의 증류수 투입에 의한 페놀산 수율은 전처리 조건 (5분과 10분)과 페놀산 수율 간에는 유의성이 나타나지 않았으며, 반응시간에 따른 페놀산 수율의 변화도 일정한 경향이 나타나지 않았으며, 페놀산은 전처리 시간 10분, 반응시간 3시간의 반응조건에서 25 mg을 얻을 수 있었다.

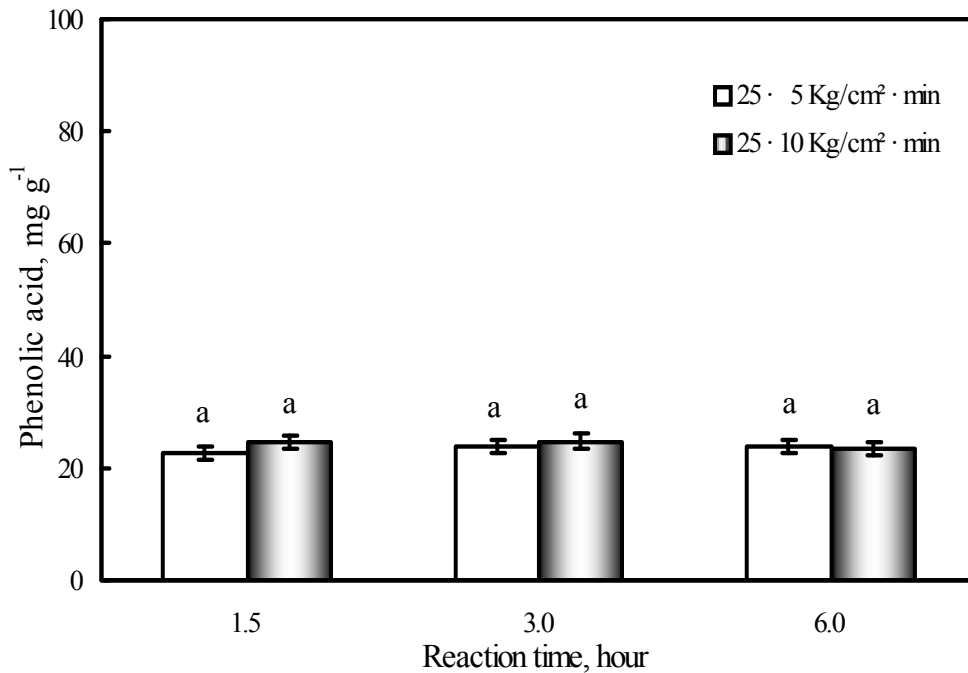


Fig 3-1-9. Yield of phenolic acid with water from pretreated wood at room temperature

- Notes: 1) Based on the oven dry weight of the pretreated wood.
 2) The vertical bars the standard errors of individual means.
 3) Bars followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

다) 페놀산 조성 및 페룰산의 수율

전처리 목재원료를 실온에서 처리했을 때, 생산된 페놀산 조성(vanillin, vanillic acid, ferulic acid, cinnamic acid) 및 페룰산의 수율을 Fig 3-1-10, Fig 3-1-11, Fig 3-1-12에 나타냈었다. 그 결과, 전처리 조건과 페룰산 수율 사이에는 유의성이 나타났으며, 전처리 시간이 짧을수록 페룰산 수율은 높았다. 또한, 전처리 조건 5분, 반응시간 6시간의 조건에서 0.16 mg의 페룰산을 획득하였다.

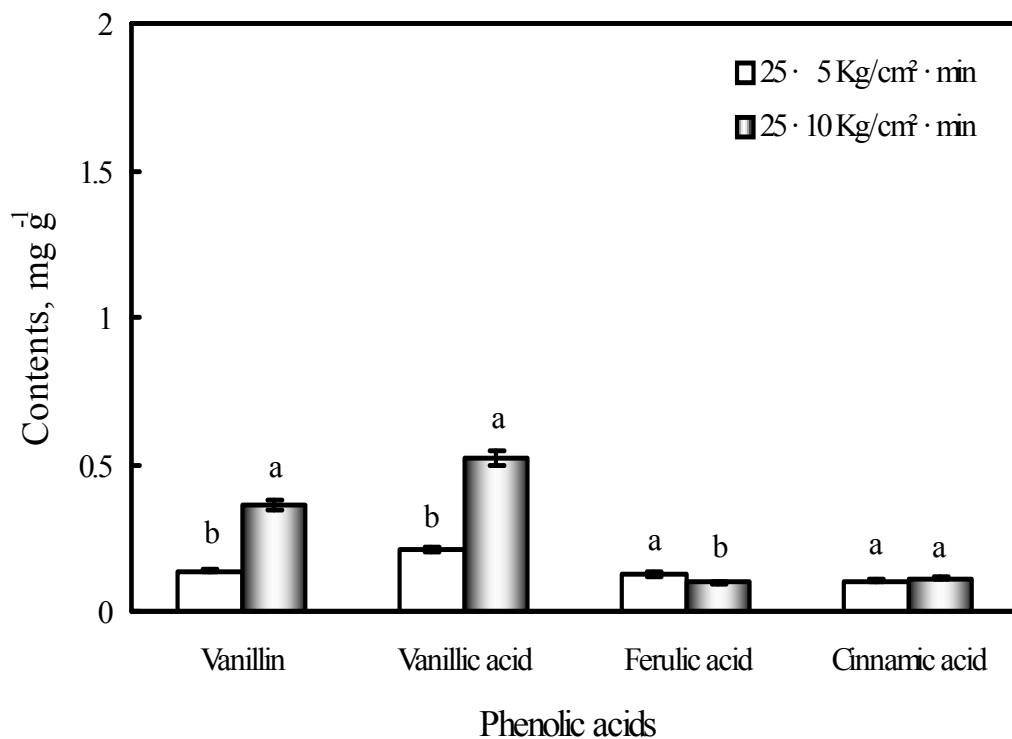


Fig 3-1-10. Yield of vanillin, vanillic acid, ferulic acid and cinnamic acid with water from pretreated wood at room temperature for 1.5 hour

Notes: 1) Based on the oven dry weight of the pretreated wood.

2) The vertical bars the standard errors of individual means.

3) Bars followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

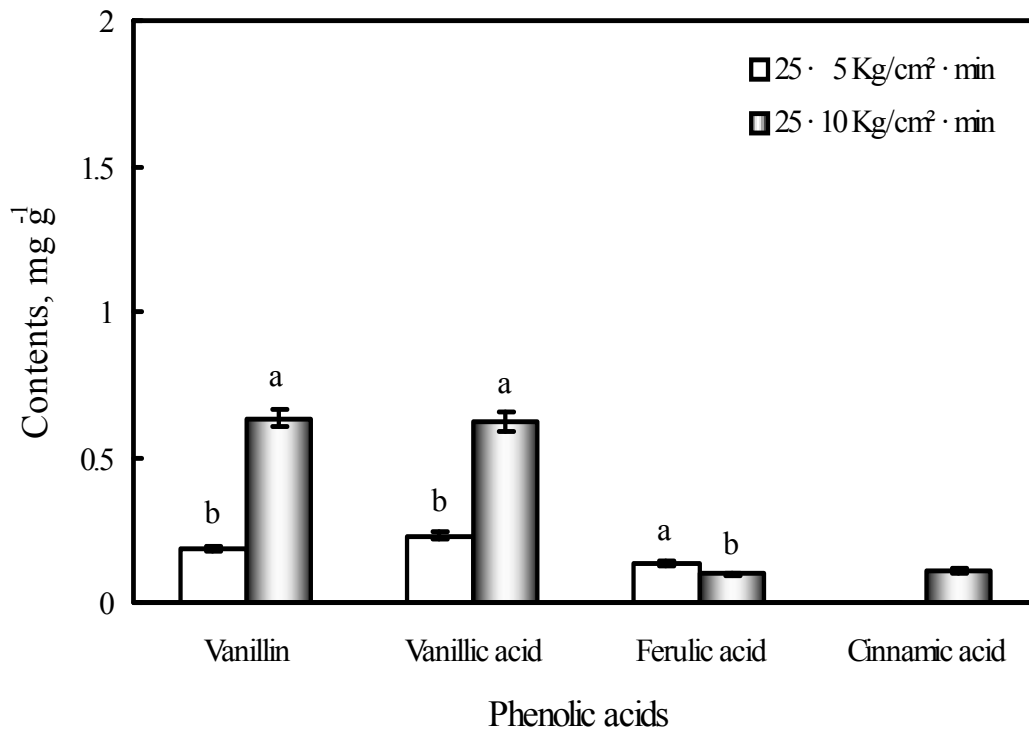


Fig 3-1-11. Yield of vanillin, vanillic acid, ferulic acid and cinnamic acid with water from pretreated wood at room temperature for 3.0 hour

- Notes: 1) Based on the oven dry weight of the pretreated wood.
 2) The vertical bars the standard errors of individual means.
 3) Bars followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

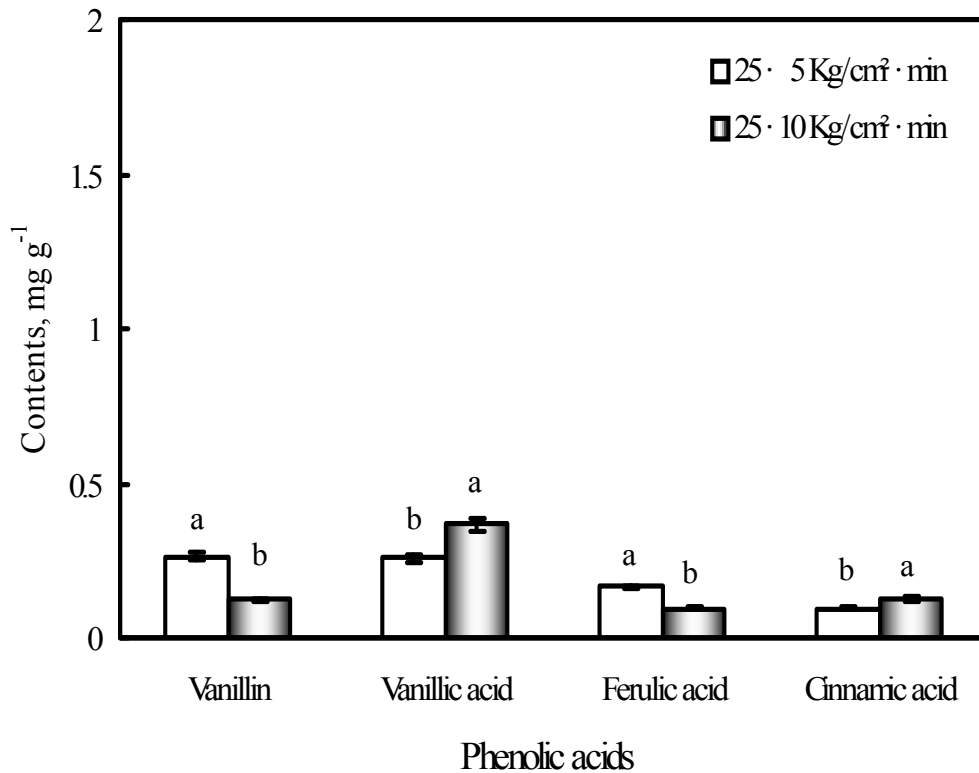


Fig 3-1-12. Yield of vanillin, vanillic acid, ferulic acid and cinnamic acid with water from pretreated wood at room temperature for 6.0 hour

- Notes: 1) Based on the oven dry weight of the pretreated wood.
 2) The vertical bars the standard errors of individual means.
 3) Bars followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to the Duncan's New Multiple-Range Test.

5. 흰가루병 유사 곰팡이 생육억제제 원료 생산을 위한 공정의 확립 및 최적화



리그노 셀룰로오스원료

→



고온·고압 처리

→



고온·고압된 원료 회수공정

→



온수추출공정

→



탈수·1차 여과

→



2차 여과액 회수공정

→



목재 추출물 정제공정

→



미량요소성분 보증

→



목재 추출물 교반

→



목재 추출물 제품화

Fig 3-1-13. 목재 추출물 대량 원료 생산 공정

제 2 절 농작물 병원성 곰팡이 생장억제를 위한 천연방제제 생산기술 확립

1. 목질원료로부터 곰팡이병 생장억제 base 물질의 대량생산을 위한 공정 개선 연구

본 연구에서 흰가루병 유사 곰팡이의 생장억제제의 생산을 위한 시제품 공정을 최적화 하였다. 검토조건은 시료의 투입량, 목재 유효성분 온수추출과 탈수 및 여과에 의한 1차적인 수율, 회수액 증발처리에 따른 수율을 평가하여 결정하였다. 또한 대량 생산을 위한 최적 공정시스템 도출하였다.

신공정법에 의한 병원성 곰팡이의 생장억제 base 물질의 대량 생산을 위한 제조 공정은 Fig. 3-2-1과 같다. 원료(참나무 칩)의 1회 고온·고압 처리 조건에 따른 처리 수율 및 파쇄상태를 육안적으로 검토 한 결과, 본 연구에서 사용된 고온·고압 처리 장비의 최대 1회 처리량은 15 kg으로 규명되었고, 이때 처리 수율은 약 97%(고온·고압된 원료)로 나타났다.

공시재료로 사용된 참나무 Chip 원료는 전처리 공정으로 고온·고압 포화수증기 하에서 단시간 처리하였으며, 이 고온·고압 처리된 목재의 페놀성 화합물 성분을 포함한 목재 추출물을 추출하기 위하여 물을 일정량 첨가, 혼합한 다음 30~60분 동안 120℃에서 반응시킨 후 반응 잔사와 반응액을 탈수와 여과에 의하여 분리하였다.

이렇게 분리된 목재 추출물은 다시 혼화 장치에 목재 추출물과 무기 성분을 보충하여 일정 시간 동안 혼화 처리하여 공정을 개선하였다.



리그노 셀룰로오스원료

→



고온·고압 처리

→



고온·고압된 원료 회수공정

→



온수추출공정

→



탈수· 1차 여과

→



2차 여과액 회수공정

→



미량요소성분 보증

→



시험제품 교반 공정

→



시험제품 제품화

Fig. 3-2-1. 흰가루병 곰팡이 억제물질 대량 생산 공정

2. 위탁과제와 연계하여 대량생산된 원료물질의 곰팡이 생장 저해성능의 재확인

가. Base 화합물의 화학적 조성 분석

Table 3-2-1에 고온·고압 전처리된 Base 화합물의 화학적 조성을 나타내었다. 냉수 추출물을 비롯한 대부분의 추출물 함량은 일반 목분에 비해서 대단히 높은 수준을 나타내었다. 전처리된 원료 목재의 추출물 함량을 일반 목분(참나무)과 비교해보면 냉수 추출물은 약 2-3배, 열수 추출물은 약 3-4배, 알카리 추출물은 약 2배, 유기용제 추출물은 약 12-13배 증가되는 경향을 나타내었다. 이러한 경향은 고온·고압 하에서 원료 목재(참나무)를 구성하고 있는 목재 세포벽이 파괴됨과 동시에 목재를 구성하고 있는 주요성분인 cellulose, hemicellulose, lignin의 화학적 변화로 인하여 각종 추출물 함량이 증가 된 것으로 생각된다. 즉, 목재의 주요 구성성분이 고온·고압 하에서 일부 열적 변환 및 분해로 인한 저분자 화로의 전환 때문에 각종 추출약품에 의한 추출물량이 증가된 것으로 판단된다.

Table 3-2-1. Chemical compositions of steam explosion treated *Quercus mongolica* wood.

| Characters | Contents, % |
|-----------------------------|-------------|
| Cold water extractives | 5.3 |
| Hot water extractives | 18.5 |
| Alkali(1% NaOH) extractives | 44.2 |
| Ethanol-benzene extractives | 33.2 |
| Klason lignin | 19.3 |
| Holocellulose | 78.4 |
| Ash | 0.6 |

한편, 전처리된 수증기 처리재를 알콜·벤젠으로 탈지 처리한 다음, 이를 시료로하여 lignin 함량 및 holocellulose 함량을 측정 한 결과, 일반 목분(참나무)에서 나타나는 결과와 큰 차이가 없었다. 이것은 목재를 고온·고압 처리하면, 각종의 유기용제 추출가능 성분이 증가되지만, 원료 목재를 구성하고 있는 cellulose, hemicellulose 및 lignin의 함유 비율에는 큰 영향을 미치지 못한다고 생각된다.

나. pH 측정

참나무 칩으로부터 25기압에서 6분간 처리된 수증기 처리재 추출물의 pH와 비중 결과는 5반복에 의하여 측정하였다. 그 결과는 추출물의 pH는 3.0-3.5 범위를 나타내었고, 비중은 1.0046이었다.

다. ICP 분석에 의한 무기물 함량분석

참나무 칩으로부터 25기압에서 6분간 처리된 수증기 처리재 추출물에 함유하고 있는 무기물 함량을 ICP(유도결합플라즈마분광계)에 의하여 측정 한 결과를 Table 3-2-2에 나타내었다.

Table 3-2-2. Inorganic compound of extracts from steam exploded wood by ICP.
(unit : ppm)

| Element | Ca | Mg | Cu | Zn | Fe | Mn |
|---------------------|----|----|-------|-------|------|-----|
| Steam exploded wood | 31 | 18 | 0.564 | 0.623 | 0.14 | 2.3 |

※ 0.05ppm 이하는 측정불가

라. 탄수화물 분석

참나무 칩으로부터 25기압에서 6분간 처리된 수증기 처리재 추출물에 함유하고 있는 탄수화물의 조성은 HPLC에 의하여 fructose 검량 기준에 의해 분석하여 그 결과를 나타내었고, 탄수화물의 함량 분석은 DNS법으로 측정되었다. 이들 결과는 Table 3-2-3에 나타내었다.

Table 3-2-3. Sugar composition of extracts from steam exploded wood.

| Sugar form | Sugar composition(%) | | | | |
|------------|----------------------|------|------|------|------|
| | Ara. | Xyl. | Man. | Gal. | Glu. |
| Oligomer | - | 95.3 | - | - | 4.7 |
| Monomer | 10.8 | 52.7 | 22.8 | 10.2 | 3.5 |

마. 휘발성 성분 분석

참나무 칩으로부터 25기압에서 6분간 처리된 수증기 처리재 추출물의 휘발성 성분 분석 결과를 Table 3-2-4에 나타내었다.

대부분 화합물의 동정은 MS library data를 이용하였으며 또한 기존의 목재의 추출물 성분으로 이미 알려져 있는 화합물에 근거를 두었다. 목재의 추출물은 성분 자체가 매우 다양하여(특히 이성질체가 다량 존재) 이들 화합물을 모두 동정하는 것은 거의 불가능하다. 따라서 대부분 MS data와 시판품과의 비교를 통해 동정을 하고 있는 실정이다. 본 실험에서는 자체 보유하고 있는 시판품과 MS data를 이용하여 동정하였지만 MS data를 이용한 경우 확실한 동정을 위해 시판품을 이용한 확인이 반드시 필요하다.

Table 3-2-4. Volatile components of extracts from steam exploded wood.

| Peak No. | RT(min) | Compounds | A |
|----------|---------|--|-------|
| 1 | 20.13 | Acetic acid | 2.67 |
| 2 | 20.69 | Furfural | 0.90 |
| 3 | 22.95 | Tetrahydrofurfuryl alcohol | 0.88 |
| 4 | 24.35 | 2,3-Dimethyl cyclopenten-1-one | 1.31 |
| 5 | 26.50 | 5-Methyl-2-furfural | 0.83 |
| 6 | 28.77 | Unknown | 0.81 |
| 7 | 30.64 | Unknown | 0.70 |
| 8 | 39.68 | 3,4-Dimethoxy toluene | 1.10 |
| 9 | 42.62 | Guaiacol | 5.87 |
| 10 | 43.19 | 3(or 6)-Methyl guaiacol | 1.03 |
| 11 | 47.04 | 6(or 3)-Methyl guaiacol | 0.81 |
| 12 | 47.60 | cis-5-Butyldihydro-4-methyl-2(3H)-furanone | 1.82 |
| 13 | 47.85 | 4-Methyl guaiacol | 9.45 |
| 14 | 48.17 | Trimethyl phenols | 0.71 |
| 15 | 48.38 | 3(or 6)-Ethyl guaiacol | 1.05 |
| 16 | 50.32 | 1-Indanone | 1.48 |
| 17 | 50.60 | <i>o</i> -Cresol | 1.97 |
| 18 | 50.67 | Phenol | 1.69 |
| 19 | 50.98 | - | 0.73 |
| 20 | 51.97 | Phenols | 1.27 |
| 21 | 52.84 | 3-Ethyl syringol | 1.87 |
| 22 | 53.05 | Acetoguaiacone | 0.66 |
| 23 | 53.43 | Octanoic acid | 1.16 |
| 24 | 54.17 | 2-Ethyl phenol | 0.73 |
| 25 | 54.42 | 2,5(or 4)-Xylenol | 1.72 |
| 26 | 54.64 | 2,4(or 5)-Xylenol | 2.74 |
| 27 | 55.04 | <i>p</i> -Cresol + <i>m</i> -Cresol | 2.66 |
| 28 | 55.67 | Acetosyringone | 1.02 |
| 29 | 55.85 | 4-Propyl guaiacol | 6.86 |
| 30 | 58.02 | 2,3-Xylenol | 0.77 |
| 31 | 58.64 | 2-Phenyl-2-butenal | 0.64 |
| 32 | 58.79 | Eugenol | 1.24 |
| 33 | 58.91 | Ethylmethylphenols | 1.41 |
| 34 | 59.09 | Ethylmethylphenols | 0.73 |
| 35 | 59.34 | 3,5-Xylenol | 2.87 |
| 36 | 59.70 | 3-Ethyl phenol | 0.78 |
| 37 | 61.01 | Trimethyl phenols | 0.83 |
| 38 | 61.58 | 3,4-Xylenol | 1.29 |
| 39 | 61.74 | Trimethyl phenols | 1.10 |
| 40 | 63.16 | trans-Isoeugenol | 0.98 |
| 41 | 63.53 | Ethylmethyl phenols | 0.74 |
| 42 | 63.68 | Syringol | 6.88 |
| 43 | 67.74 | 4-Methyl syringol | 8.12 |
| 44 | 70.43 | 4-Ethyl syringol | 10.11 |
| 45 | 73.58 | 4-Propyl syringol | 5.03 |

Note: Percentages(0.5% >) based on the area of the peaks on GC chromatogram.

-: Peaks not detected on total ion chromatogram(TIC) obtained from mass results.

참나무 칩으로부터 25기압에서 6분간 처리된 수증기 처리재 추출물을 GC-MS와 HPLC 등을 이용하여 유기산 분석, 탄수화물 분석, 페놀성 화합물(폴리페놀) 분석, 휘발성 성분 분석한 결과를 단리된 원료가 식물에 미치는 영향과 그 분석 결과를 Table 3-2-5에 나타내었다.

Table 3-2-5. Application effect & component analysis of base compound.

| 구 성 성 분 | | (%) | 적 용 효 과 |
|-----------------|----------------|-------|---|
| 저분자탄수화물 (%) | Arabinose | 0.82 | ① 토착미생물의 활성화 ② 저온기 지온 향상 ③ 영양 흡비율 증가 ④ 미완숙퇴비 발효 촉진 |
| | Xylose | 5.40 | |
| | Mannose | 0.66 | |
| | Galactose | 0.42 | |
| | Glucose | 12.70 | |
| Polyphenol류 (%) | Lignin류 | 2.60 | ① 항산화기능(노화방지) ② 작물의 스트레스(냉해, 낙화, 낙과 등) 방지 ③ 에틸렌 생합성 억제 ④ 도복방지 ⑤ 병·충해 방지 |
| | Tannin류 | 0.40 | |
| | Flavonoid류 | 1.20 | |
| 유기산(%) | Acetic acid | 1.46 | ① 뿌리 발근 촉진 ② 작물 생육 촉진 ③ 영양 흡비율 촉진 |
| | Uronic acid | 0.51 | |
| | Levulinic acid | 0.54 | |
| | Ferulic acid | 0.21 | |
| | Cinnamic acid | 0.10 | |
| | Vanillic acid | 0.16 | |
| 휘발성분 | Furfural | 미량 | ① 내병성 강화 ② 살균력 향상 ③ 탄저병 예방 ④ 노균병 예방 |
| | Fugenol | 미량 | |
| | Propanone | 미량 | |
| | Isoeugenol | 미량 | |

3. 곰팡이 방제제의 시제품 생산



리그노 셀룰로오스원료

→



고온·고압 처리

→



고온·고압된 원료 회수공정

→



온수추출공정

→



탈수· 1차 여과

→



2차 여과액 회수공정

→



미량요소성분 보충

→



시험제품 교반 공정

→



시험제품 제품화

→



시판용 제품

Fig. 3-2-2 흰가루병 곰팡이 억제물질 시제품 생산 공정

4. 농작물 직접 방제를 통한 시제품의 현장 시험

가. 시금치 농가 적용 사례

시제품을 시금치 재배 농가에 500배 희석 처리한 후에 적용하였다.



Fig. 3-2-3. 시금치 농가에서 시제품 적용 시험

시금치 재배농가에 적용한 결과 시제품을 희석 처리한 하우스의 작물은 수확할 때까지 곱팡이성 질병의 감염 없이 건강하게 생육하였지만, 농장주가 기존에 사용하는 제품을 처리한 대조구에서는 생육 중간 단계에서 Fig. 3-2-3 에서 보는 것처럼 곱팡이성 질병에 감염되었으며, 시제품을 처리한 시금치 보다 생육이 불량하고, 상품성도 좋지 못 하였다. 시금치 농장주는 식물생장 영양제를 처리한 하우스의 시금치의 수확량과 상품성이 30%이상 향상되었다고 평가하였다.

나. 토마토 농가 적용 사례

Fig. 3-2-4는 토마토 농가에 시제품을 500배 희석하여 엽면살포 2회 처리하였다. 대조구는 농장주의 농법으로 처리하였다. 이 결과, 대조구에서는 잎곰팡이 발생율이 높아 토마토의 생육이 매우 불량해졌으며, 시제품을 처리한 토마토 군에서는 잎곰팡이 발생율이 낮았으며, 그 전염율도 현저하게 낮은 것으로 평가되었다. 이 농장주는 시제품의 처리가 건강한 생육상태를 유지시켜 주었으며, 그 결과 잎곰팡이 병에 대한 내성이 좀 더 강한 것으로 평가된다고 하였다.



| | |
|---|--|
|  |  |
| <p style="text-align: center;">대조구</p> | <p style="text-align: center;">시제품 적용</p> |

Fig. 3-2-4. 토마토 농가에서 시제품 적용 시험

다. 딸기 하우스 농가

- 1) 농가 소재지 : 경남 진주시 문산읍 속사리
- 2) 적용 하우스 면적 : 흰가루 감염된 250평 하우스
- 3) 목재추출물의 시비량은 물 400ℓ(물 20말)당 1ℓ를 혼합(400배 희석)하여 엽면살포하였다.
- 4) 목재추출물의 시비횟수는 5일 주기로 3회 엽면살포 하였다.
- 5) 목재추출물을 흰가루 감염상태에서 첫 엽면살포로 딸기 잎과 줄기에 감염된 흰가루병의 생육이 저해되어 더 이상 확산되지 않았으며, 2회째 엽면살포로 잎에 보이는 흰가루 포자가 현저하게 줄어들었고, 3회째 엽면살포로 딸기의 잎과 줄기가 생기가 있어지고 광택이 나기 시작하면서 전반적인 생육이 좋아졌다. 딸기의 흰가루 감염으로 생육이 저조한 사진과 목재 추출물 적용으로 생육이 좋아진 사진을 Fig.3-2-5에 나타내었다.



| | |
|---|--|
|  |  |
| <p>전 하우스에 흰가루 감염으로 생육불량</p> | <p>목재추출물 살포 후 건강해진 딸기 작물</p> |

Fig 3-2-5. 흰가루 감염 딸기에 적용한 목재추출물의 효과

라. 파리고추 하우스 농가

- 1) 농가 소재지 : 경남 진주시 대곡면
- 2) 적용 하우스 면적 : 흰가루병에 감염된 900평 하우스
- 3) 목재추출물의 시비량은 물 300~400ℓ (물 15~20말)당 1ℓ 를 혼합(300~400배 희석)하여 엽면살포하였다.
- 4) 목재추출물의 시비횟수는 파리고추 하우스농가의 흰가루 감염 정도가 심각한 상태였기 때문에 5~6일 주기로 4회 엽면살포하였다.
- 5) 이 파리고추 농가는 파리고추 잎에 흰가루병 감염상태가 심각하여 목재추출물을 첫 시비로 물 300ℓ 당 1ℓ 를 혼합(300배 희석)하여 엽면살포하였다. 그 결과, 흰가루 병의 생육이 멈추었으며, 2차~4차 엽면살포는 400배 희석하였다. 2차 엽면살포로 파리고추 잎의 흰가루병은 개체수가 줄어들기 시작하였으며, 3차 엽면살포로 전반적으로 확산되어 있던 흰가루병 감염 잎이 많이 줄어들기 시작하면서 새로운 잎과 꽃이 피기 시작 하였다. 4차 엽면살포로 흰가루병 감염 잎은 거의 없었으며 새로 나온 줄기와 잎의 개체수가 많아지면서 Fig 3-1-6에서 보는 바와 같이 어두웠던 잎의 상태는 녹색을 띄며 광택을 나타내었다.

| | |
|---|--|
|  |  |
| <p>전 하우스에 흰가루 감염</p> | <p>목재추출물 살포 후 건강해진 파리고추 작물</p> |

Fig 3-2-6. 흰가루 감염 파리고추에 적용한 목재추출물의 효과

마. 파리고추 양액재배하우스 농가

- 1) 농가 소재지 : 경남 함양군 함양읍 용평리
- 2) 적용 하우스 면적 : 흰가루 감염된 400평 하우스
- 3) 목재추출물의 시비량은 물 400ℓ(물 20말)당 1ℓ를 혼합(400배 희석)하여 엽면살포하였다.
- 4) 목재추출물의 시비횟수는 파리고추 양액재배 하우스농가의 흰가루 감염 상태에서 5~6일 주기로 3회 엽면살포 하였다.
- 5) 양액시스템으로 파리고추를 재배하는 하우스 농가에 흰가루병이 감염되어 목재추출물을 400배 희석하여 엽면살포를 실시하였다. 첫 엽면살포로 흰가루병 감염된 잎의 곰팡이의 생육이 정지되는 현상을 보였으며, 2회째 엽면살포로 건조되고 광택이 없던 잎은 다시 밝은 녹색을 나타내고 광택이 나면서 잎의 생육이 좋아지는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 3회째 엽면살포로 흰가루병은 거의 소강상태를 보였으며 새순과 새잎 나오고 꽃도 피기 시작하였다. 목재추출물 적용 전과 후를 Fig 3-2-7에 나타내었다.

| | |
|---|--|
|  |  |
| <p>전 하우스에 흰가루 감염으로 잎이 마른상태</p> | <p>목재추출물 살포 후 건강해진 파리고추 작물</p> |

Fig 3-2-7. 흰가루 감염 파리고추 양액재배 하우스에 적용한 목재추출물의 효과

5. 화합물 첨가에 따른 시제품의 성능개선 및 농작물을 대상으로 한 현장 시험

가. 복합 비료 및 항공팽이 제제의 복합화 및 성능 평가

1) 복합비료의 정의

비료의 3요소인 질소, 인산, 가리성분 중 최소한 2성분 이상을 보증하고 비중에 따라 미량 요소를 함유하고 있는 다성분 비료의 총칭으로 현재 가장 많이 사용되고 있는 비료이다.

비료공정규격에서는 제조방법, 주용도, 보증 성분 등에 따라 제1종, 제2종, 제3종, 제4종 및 완효성 복합비료로 구분하고 있다.

특징은 ① 속효성 비료와 완효성 비료를 적당히 배합함으로써 비료용출 속도를 조절하고, ② 비료 3요소가 함유되어 있어 시비에 소요되는 노력절감, ③ 토양, 작물 및 기상조건 등에 적합하게 배합할 수 있는 등 이점이 많다.

2) 복합비료의 종류

가) 제1종 복합비료

- 비료 3요소 중 2성분이상을 보증하며 그 합계량이 20%이상으로 화학적 공정을 거쳐 제조된 비료이다.
- D.A.P (Diammonum phosphate : 18-46-0)가 생산되고 있으나 거의 2, 3종 복합 비료의 원료로 사용되고 있다.

나) 제2종 복합비료

- 비료 3요소 및 제1종 복합비료 중 2종 이상을 배합하여 그 성분의 합계량이 20% 이상임, 여기에 미량요소인 고토, 붕소, 망간 등을 보증하는 비중도 있다.
- 현재 생산 공급되고 있는 복합비료 중 유기물이 함유되지 않은 비료는 모두 이 비중에 속한다.
- 유통되고 있는 복합비료의 대부분을 차지하고 있다.

예) 19-11-5, 17-0-15, 10-10-14 등

다) 제3종 복합비료

- 제2종 복합비료의 원료에 유기물을 배합한 것으로써 비료 3요소 중에서 2성분 이상을 12%이상, 유기물 10%이상을 보증한 비료이다.

- 유기물은 수용성은 제외되며, 유기물의 주원료는 깻묵, 채종유박, 증제 피혁분 등 유기 질비료를 사용하여 제조하고 있다. 예) 15-10-10-10, 8-0-8-30 등

라) 제4종 복합비료

식물의 뿌리로 부터 양분흡수가 곤란하거나 과수, 채소류 등의 맛, 색 및 상품성 을 높이고자 식물의 잎에 시용하는 엽면시비용과 수정재배 시 작물에 영양을 공급하는 양액재비용, 비료를 물에 타서 토양에 관주하는 관주용 및 화초용으로 분류되며 사용되는 원료는 모두 수용성이라야 한다.

- 엽면시비용

질소, 인산, 가리 중 2성분 이상의 합계량이 10%이상이고 고토, 망간, 붕, 철, 몰리브덴, 아연, 구리, 칼슘 중 2종 이상을 수용성으로 규격이상 보증 하여야 한다.

비료제조업체가 시험근거를 토대로 작성한 농약혼용 가부표에 의거 농약과 혼합하여 살포하면 비용이 절감된다.

토양시비 시 불가급태로 되어 흡수가 어려운 망간, 아연, 구리 등의 성분을 보충하는데 필요한 비료이다.

- 양액재비용 또는 관주용

질소, 인산, 가리는 엽면시비용과 같고 미량요소는 5종 이상을 규격 이상 보증 하여야 한다.

비료성분이 서로 결합하여 침전, 결정 또는 불용화 될 우려가 있는 것은 구분포장(1호, 2호 또는 A액, B액)을 허용하나 사용할 때는 전부 시용해야 효과가 나타난다.

- 화초용

질소, 인산, 가리 중 2성분 이상의 합계량이 0.2%이상 이고 미량요소는 2종 이상을 규격 이상 보증하여야 한다.

화분, 관상용나무 등에 시용편리성을 도모하기위해 별도 희석하지 않고 바로 사용하는 액체비료이다.

마) 완효성복합비료

완효성 질소비료인 피복요소, 씨·디·유, 아이·비·디·유비료에 인산, 가리 성분 중 1 성분 이상을 배합한 피복요소복합비료, 씨디유 복합비료, 아이비디유 복합비료와 비료 3요소 중 2성분 이상을 피복한 피복복합비료, 발작물용 완효성 비료인 포름요소 복합비료가 있다.

3) 전처리 시료의 안정성

고온·고압처리 시료가 식물의 발아와 생장에 영향을 미치는 지를 알아보기 위해 0.5g, 1g, 5g 씩 원 시험용 포트에 넣고 배추종자의 발아와 생장을 조사하였다(Fig 3-2-8, Fig 3-2-9). 배추종자는 약 2일 후부터 발아가 되기 시작하여 4일 후에는 완전히 발아되었다. 고온·고압처리 목재의 처리는 식물의 발아에 그다지 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 오히려 고온·고압처리 목재의 처리는 무처리구 보다 10일 전에는 발아를 촉진하는 것으로 나타났다. 또한 고온·고압처리 목재의 양은 발아율에 다소의 영향을 미치나 우려할만한 수준은 아닌 것으로 나타났다.

Fig 3-2-10은 고온·고압처리 목재가 상추의 발아에 미치는 영향을 조사한 결과이다. 상추는 고온·고압처리 목재 처리 농도에 따라 약간의 발아억제 현상이 관찰되었다. 특히 5g의 고온·고압처리 목재 처리는 발아를 매우 억제하는 것으로 나타났다. 그러나 시간에 경과하면서 발아율이 점차 증가되어 10일 이후에는 발아가 무처리구에 비해 큰 차이가 없었다(Fig 3-2-11).

Fig 3-2-12는 고온·고압처리 목재처리 농도에 따른 고추의 발아율을 조사한 결과이다. 고추는 고온·고압처리 목재의 처리농도에 그다지 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 오히려 6일 전까지는 무처리구 보다 발아를 촉진하는 것으로 나타났다.

Fig 3-2-13는 고온·고압처리 목재와 시판되고 있는 수경재배용 액비인 하이포넥스(hyponex)를 일정비율 혼합한 후 배추의 종자 발아율을 조사한 것이다. 그 결과 하이포넥스(hyponex)가 첨가된 고온·고압처리 목재는 무처리구 보다 발아율을 촉진시키는 것으로 나타났으며, 발아율 또한 높았다.

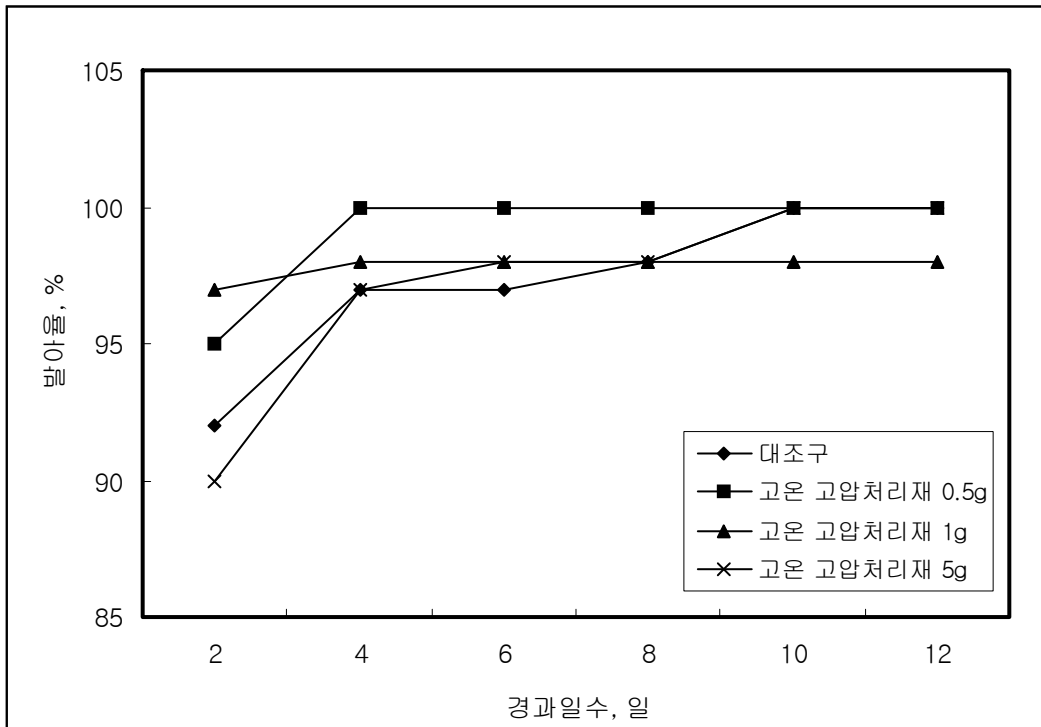


Fig 3-2-8. 고온·고압처리 목재의 중량별 처리에 따른 배추 종자발아



Fig 3-2-9. 전처리 시료가 배추종자의 발아에 미치는 영향

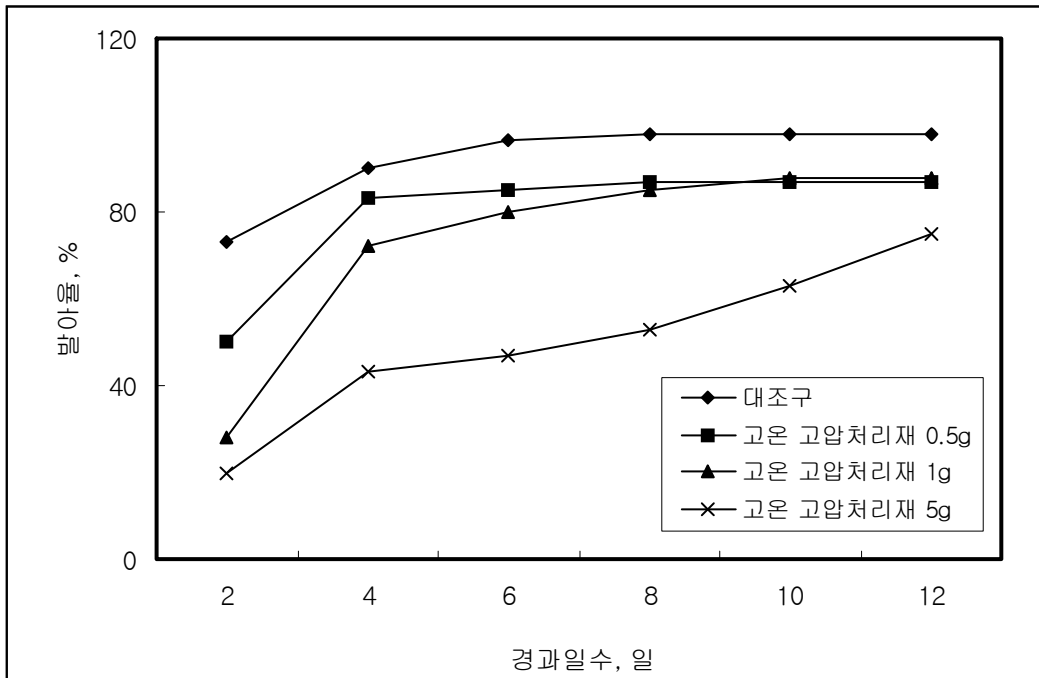


Fig 3-2-10. 고온 · 고압처리 목재 처리에 따른 상추의 종자발아

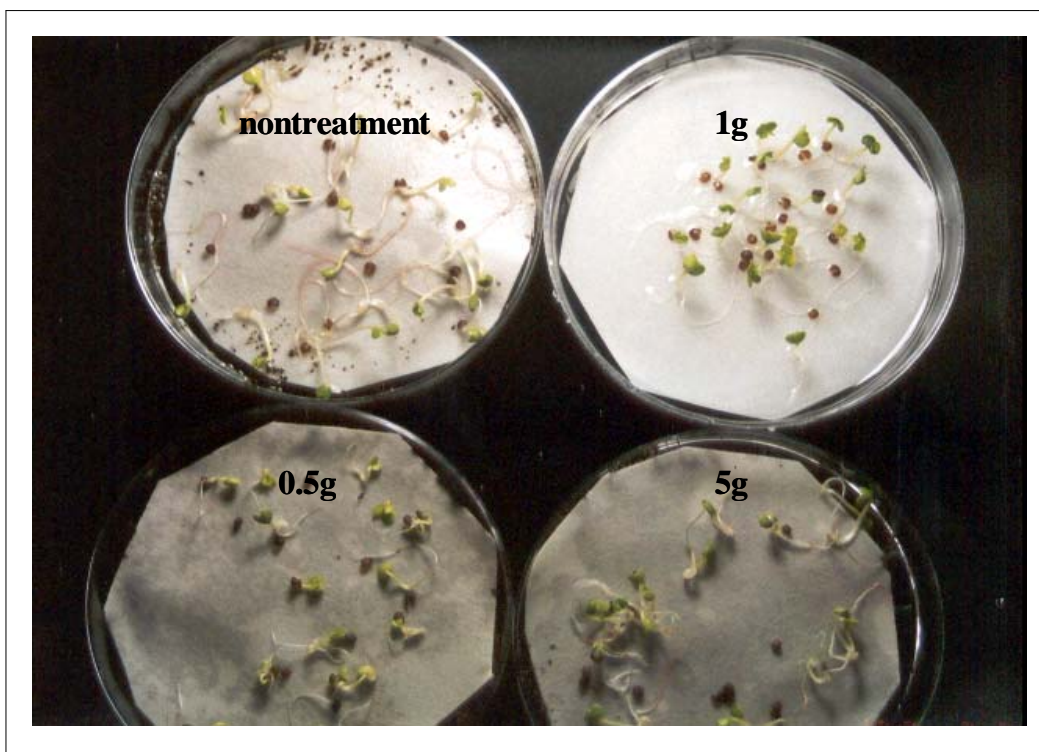


Fig 3-2-11. 전처리 시료가 상추 종자의 발아에 미치는 영향

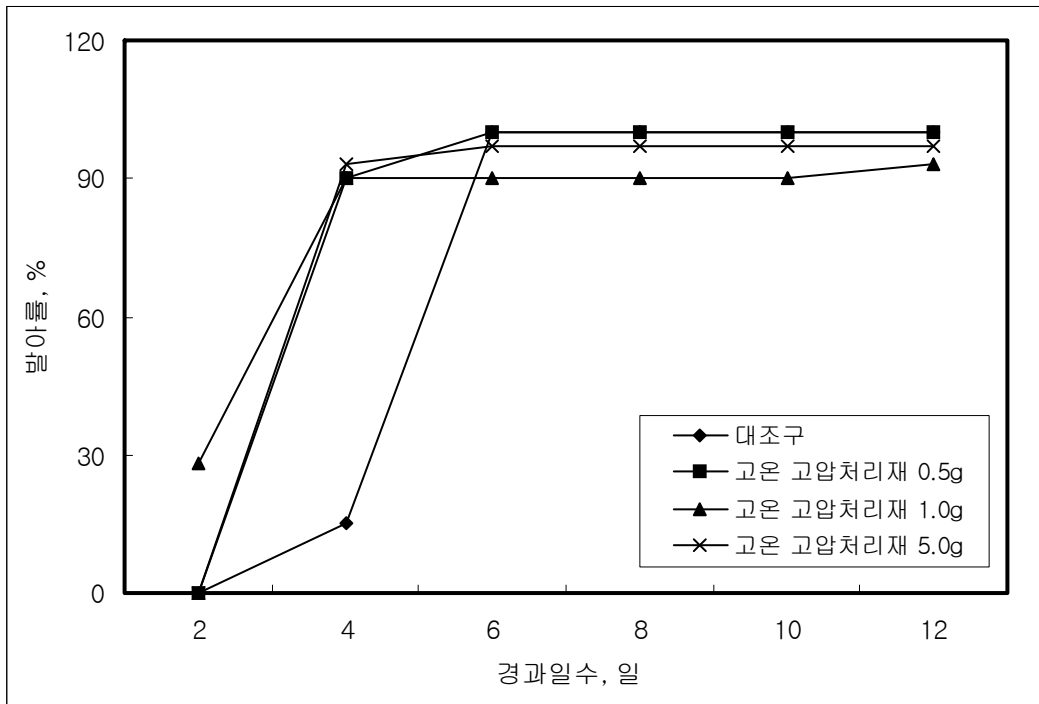


Fig 3-2-12. 전처리 시료의 투입중량이 고추 종자 발아에 미치는 영향

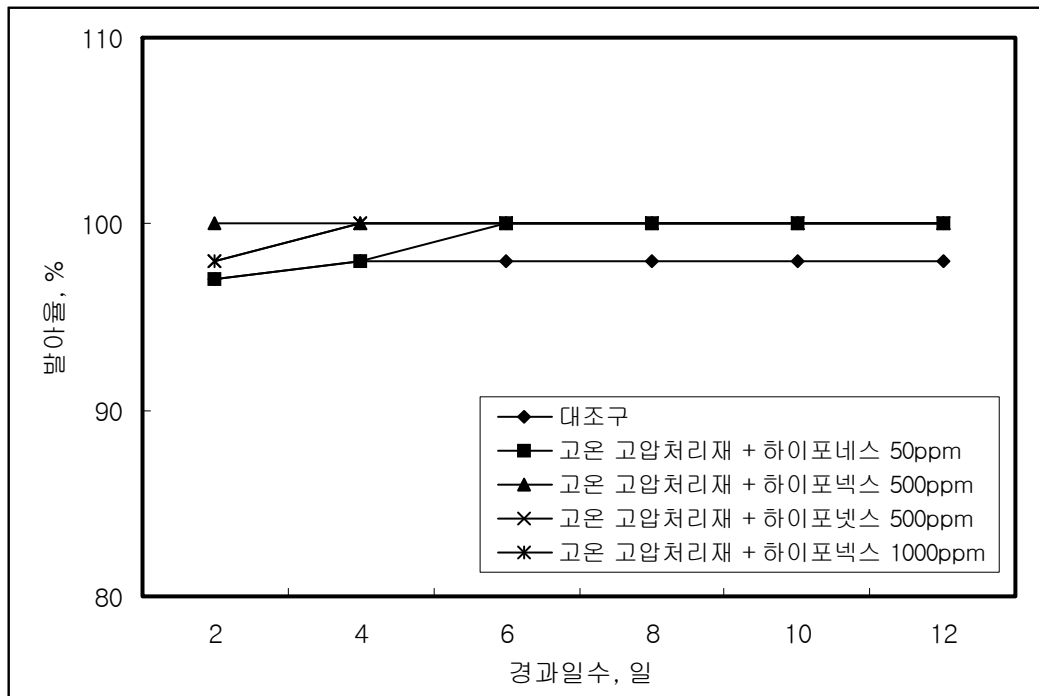


Fig 3-2-13. 하이포넥스(hyponex) 처리에 따른 배추 종자발아율

Fig. 3-2-14는 고온·고압처리 목재와 시판되고 있는 수경재배용 액비인 하이포넥스(hyponex)를 일정비율 혼합한 후 상추 종자 발아율을 조사한 것이다. 그 결과 하이포넥스(hyponex)가 첨가된 고온·고압처리 목재는 무처리구 보다 발아율을 촉진시키는 것으로 나타났으며, 발아율 또한 높았다.

Fig. 3-2-15는 고온·고압처리 목재와 시판되고 있는 수경재배용 액비인 하이포넥스(hyponex)를 일정비율 혼합한 후 고추 종자 발아율을 조사한 것이다. 그 결과 하이포넥스(hyponex)가 첨가된 고온·고압처리재는 무처리구 보다 발아율을 촉진시키는 것으로 나타났으며, 발아율 또한 높았다.

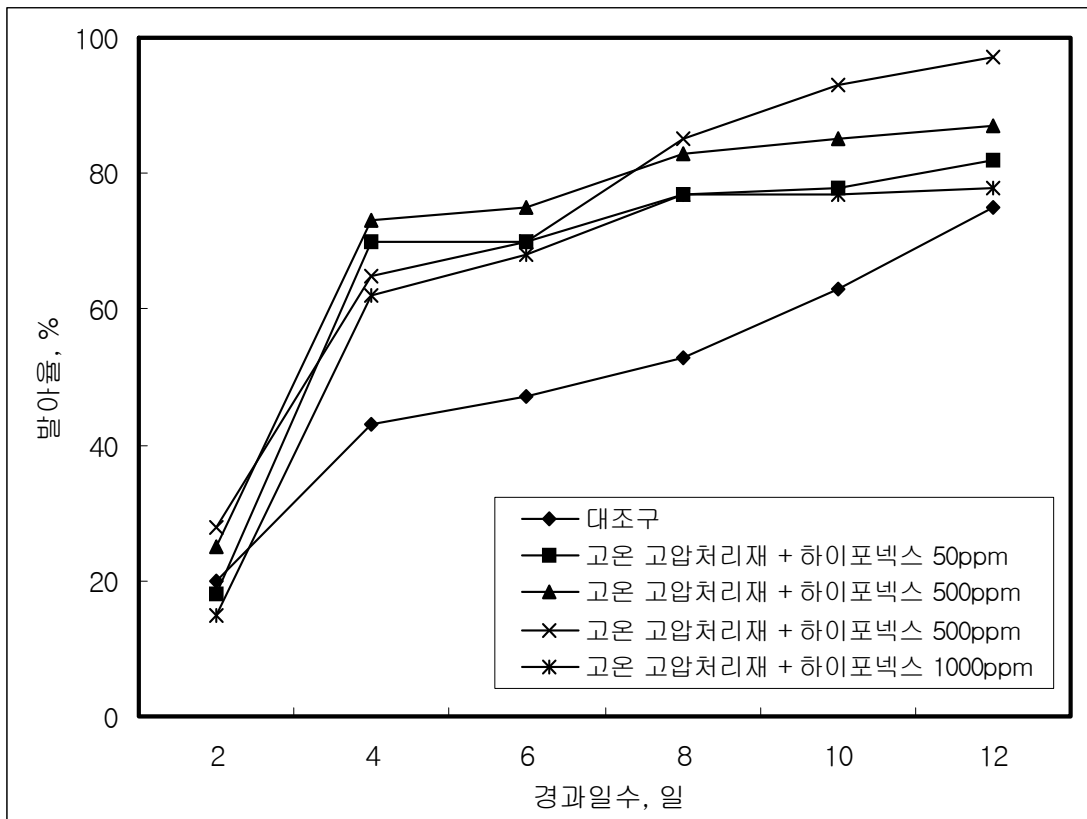


Fig. 3-2-14. 하이포넥스(hyponex) 처리에 따른 상추 종자발아율

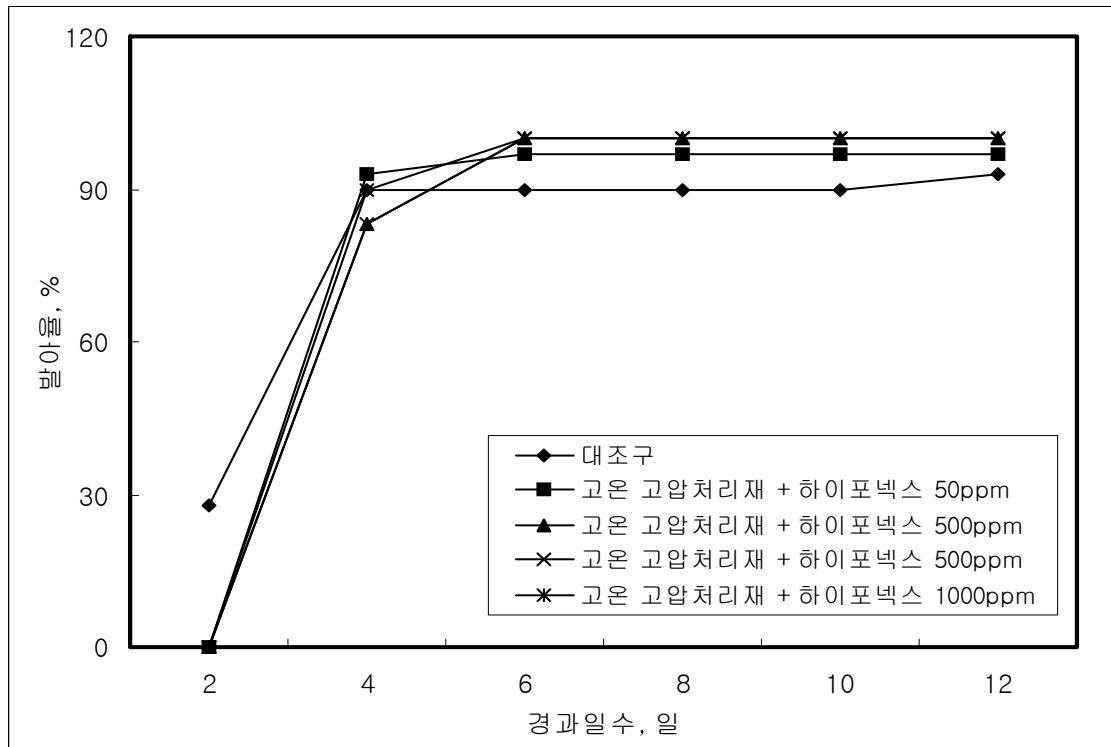


Fig 3-2-15. 하이포넥스(hyponex) 처리에 따른 고추 종자발아율

나. 무기물과의 복합처리에 따른 공시종자의 발아 및 성장 시험

제3종 복합비료 개발을 위해 Table 3-2-6과 같이 NH_4NO_3 300g, KH_2PO_2 210g, H_3BO_3 58g, $MnSO_4$ 250g을 조성하였다. 고온·고압처리된 목재원료와 적정 농도의 무기염 혼용처리는 무처리구에 비해 식물의 성장을 촉진시켰다.

Table 3-2-6. 제3종 복합 비료 개발을 위한 무기물 조성표

(고온·고압 처리된 목재원료 1 kg 중)

| 무기물종 | 1% | 10% | 30% | 60% | 100% |
|------------|-------|------|------|------|------|
| NH_4NO_3 | 3g | 30g | 90g | 180g | 300g |
| KH_2PO_4 | 2.1g | 21g | 63g | 126g | 210g |
| H_3BO_3 | 0.05g | 0.5g | 1.5g | 3g | 58g |
| $MnSO_4$ | 0.25g | 2.5g | 75g | 15g | 25g |

(라) 제3종 복합비료의 유효농도 시험

본 연구에서 개발된 제 3종 복합비료는 1% 처리시 식물의 생육을 무처리구에 비해 약 30% 이상 촉진시켜 친환경적 이면서 효율적인 비료로서 가능성을 제시해 주었다 (Table 3-2-7).

Table 3-2-7. 리그노셀룰로오스 복합비료를 농도별로 처리하였을 때 상추의 성장

| 처리농도(%) | 성장 (cm) |
|---------|---------|
| 0 | 5.8 |
| 1 | 8.2 |
| 5 | 5.3 |
| 10 | 5.6 |
| 15 | 4.1 |
| 20 | 4.0 |
| 50 | 3.5 |

제 3 절 흰가루병 유사 곰팡이의 생장억제 원료물질의 선별 및 확보

1. 흰가루병 유사 곰팡이 균주를 확보하고 지속적인 계대배양 및 곰팡이 생장환경인자 탐색

가. 서 설

흰가루병(powdery mildew)은 백분병이라고도 하며, 세계 곳곳에서 나타나는 식물의 병중의 하나이다. 병원균은 약 20여 종으로 알려져 있고 에리시페속(*Erysiphe*), 마이크로스피라속(*Microsphaera*), 포도스피라속(*Podosphaera*), 필라크티니아속(*Phyllactinia*), 스파이로테카속(*Sphaerotheca*), 옹키놀라속(*Uncinula*)에 속하는 곰팡이 종들의 특수한 변종에 의하여 형성된다.

흰가루병은 고추, 토마토, 오이, 수박등 많은 종류의 작물에 피해를 주며, 증상 및 병의 발생 환경의 경우 농작물뿐만 아니라 나무 등에도 잘 발생하며, 잡초에서도 흔히 나타난다.(Table 3-3-1 참조) 흰가루병에 걸리면 곰팡이 균사류가 엉키기 때문에 식물체가 회백색을 띠게 되고 병에 걸린 부위는 흉한 모양으로 뒤틀리면서 잎이나 줄기를 시들게 하고 열매의 질이 떨어진다. 잎 뒷면에 처음 갈색의 오돌도돌한 돌기가 생기면서 잎의 앞면은 황갈색으로 퇴색하며 시간이 지남에 따라 잎 뒷면에서 부터 흰가루같은 곰팡이가 덮이기 시작하여 심한 경우는 잎 앞면에도 흰가루가 형성된다. 잎 앞면에 엽맥을 따라 갈색의 괴사가 나타나기도 하며 심한 경우 낙엽이 지며 밤과 낮의 온도차가 심한 지역이나 25℃ 전후의 온도를 좋아하고 공기습도가 낮은 때에 발생이 심하다. 통풍이 잘되지 않는 곳에서 흔히 발생하며 분생포자의 형태로 공기를 통해 전염되고 균사의 형태로 월동 또는 월하하여 이듬해 전염원으로 존재한다.

특히, 고추 흰가루병의 경우 노지에서 발생하나 시설하우스내의 발생이 훨씬 심하며, 특히 온도가 비교적 낮고 건조한 조건에서의 발병이 많다. 흰가루병의 발병 초기에는 잎 뒷면의 엽맥을 따라 몇 개의 각이진 흰색의 서리가 낀 듯한 포자가 발생하기 시작하며 점차 증가하여 잎의 표면에 밀가루를 뿌려 놓은 것처럼 분생포자가 퍼지며 시간이 경과됨에 따라 흑색소립의 자낭각이 생긴 다음, 더욱 진전되어 초기에 발생한 잎은 누렇게 변색되며 떨어진다. 흰가루병은 잎의 전후 면에 발생하며 잎 뒷면에만 나타나는 경우도 많으며 내부기생성으로 식물의 내부에 흡기를 박고 영양원을 취하므로 균사가 잎 표면에 나타나지 않는 특성을 가진다.

Table 3-3-1. The host plant and pathogenic bacteria of powdery mildew

| Host plant | Pathogenic bacteria (Scientific name) |
|----------------|---|
| Hot pepper | <i>Leveilluia taurica</i> |
| Tomato | <i>Erysiphe cichoracearum, leveillula taurica</i> |
| Cucumber | <i>Sphaerotheca fuliginea</i> |
| Watermelon | <i>Sphaerotheca fuliginea</i> |
| Melon | <i>Sphaerotheca fuliginea</i> |
| Carrot | <i>Erysiphe heraclei</i> |
| Strawberry | <i>Sphaerotheca humuli</i> |
| Apple tree | <i>Podospaera leucotricha</i> |
| Pear tree | <i>Phyllactinia pyri</i> |
| Pumpkin | <i>Sphaer otheca fuliginea</i> |
| Rose | <i>Sphaerotheca pannosa</i> |
| Grapevine | <i>Uncinula necator</i> |
| Persimmon tree | <i>Phyllactinia kagicola</i> |
| Sesame | <i>Oidium sesami</i> |
| Eggplant | <i>Erysiphe cichoracearum</i> |
| Gypsophila | <i>Oidium sp.</i> |
| Gerbera | <i>Sphaerotheca fuliginea</i> (Schlecht) Poll |

흰가루병의 종류에 따라 변색 정도가 다르며 사상균의 일종으로 자낭균류에 속하며 실제 포장에서는 불완전 세대의 분생포자가 발생하여 2차전염원이 된다. 분생포자는 연쇄상으로 형성되며 분생자경의 최선단부의 포자가 가장 먼저 만들어진 포자로 이 포자의 모양은 장타원형이며 발아적온은 15-30℃ 이며 고추, 피망에 주로 발생한다.

분생포자가 비산 시 전염되며 건조 조건하에서 분생포자는 80일간 전염력을 유지하며, 발병적온은 15-28℃이고 최적온도는 25℃로 주로 시설 재배하우스내의 건조조건에서 많이 발생한다. 흰가루병의 전염 경로는 이병 잔사에서 월동한 자낭각이 발아하여 자낭포자를 형성하고 공기 중에 비산하여 식물체에 침입하고, 2차 전염은 식물체에서 형성된 분생포자가 식물체로 침입하는데 분생포자의 비산은 낮에 많고 밤에는 적다. 공기습도의 변화 시 건조 상태로 이행되는 시간에 공기의 흐름에 따라 포자가 이동되며 심하게 발생한다.

호박 흰가루병은 주로 잎에 발생하며, 잎자루와 줄기에도 발생하고 잎에 처음 흰색의 분생포자가 점점이 나타나고 진전되면 잎 전체에 밀가루를 뿌려 놓은 것 같은 증상으로 변하고 기온이 서늘해지면 병반상에 흑색소립집이 형성되며, 잎이 고사되는 일은 잘 없으나 발병이 심하면 잎이 노화되며 수확기간이 단축된다.

Fig. 3-3-1은 흰가루병에 감염된 여러 가지 작물들의 잎을 나타낸 것이다. 병원체는 *Spharotheca fuliginea* 진균계의 자낭균문에 속하며, 순 활물 기생균으로서 인공배양이 불가능하며 병원균은 무색 단세포, 막원형으로 10개미만의 포자가 분생자경위에 체인모양으로 형성되어 있고 병원균은 25℃ 내외에서 잘 번식하며, 황에 대해서는 비교적 약하다고 알려져 있다. 흰가루병은 15~28℃ 에서 많이 발생되며, 37℃ 이상의 고온에서는 병 발생이 억제되고 노지포장에서는 억제재배 오이에 심하게 발생하며 일조가 부족하고 밤낮의 온도차가 심하며, 다비재배를 할 때 병 발생이 많아진다. 병원균은 이병 잔재물에서 월동하여 1차 전염원이 되며, 병반상에 형성된 분생포자가 비산하여 2차 전염이 시작된다.

본 연구에서는 흰가루병 곰팡이와 유사한 *Cladosporium* 균주를 농가로부터 수집하고, 이를 지속적인 계대배양하여 곰팡이의 생육 환경인자를 탐색하기 위하여 실시하였다.



Melon



Strawberry



Pear tree



Watermelon



Pumpkin



Grapevine



Tomato



Hot pepper



Persimmon tree



Cucumber



Eggplant



Gypsophila

Fig. 3-3-1. Close-up of powdery mildew mycelia on leaves

나. 재료 및 방법

1) 곰팡이 균주 확보 및 계대배양

가) *Cladosporium* spp. 곰팡이 균주 확보

곰팡이 균주는 곰팡이병이 발병된 농가의 비닐하우스를 방문하여 토마토 및 고추의 잎으로부터 직접 채취하였다. Fig. 3-3-2는 본 연구진이 *Cladosporium* spp.을 채취 (경남 의령군 의령읍 동동리 1539-6번지)한 토마토 잎의 사진으로 이미 잎의 전면에 흰색의 균사가 형성되어 있었다. Fig. 3-3-3은 본 연구진이 병원균의 채취원 (경남 진주시 옥봉동) 으로 사용한 고추 잎의 사진으로 이미 잎의 전면에 흰색의 곰팡이 균사가 형성되어 있었다(Fig. 3-3-2 참조).

나) 현미경 관찰

고추 및 토마토 잎에 생육하고 있는 곰팡이는 백금이를 사용하여 잎에 붙어있는 병원균을 슬라이드글라스에 옮긴 다음, Lactophenyl cotton blue 염색약을 점적한 다음, 백금이를 얇게 펼쳐 커버글라스를 덮어 병원균 표본을 만들었으며, 병원균의 관찰 및 사진 촬영은 광학현미경(Olympus BX51, Japan)에서 400배율(접안 $\times 10$, 대물 $\times 40$)로 관찰하였으며, 현미경에 장착된 디지털 이미지 기록장치(TDI Digicam HQ, Techsan international)를 사용하여 400배율에서 병원균의 사진을 촬영하였다.

다) 균주의 배양

곰팡이병에 감염된 토마토와 고추의 잎은 곰팡이 균사가 있는 부분을 2cm(가로) \times 2 cm(세로)의 크기로 자른 후, malt agar (MA, Difco.), potato dextrose agar (PDA, Difco)에 접종하여 24°C의 인큐베이터에서 생장, 보관하였다. 또한 감염된 토마토 잎과 고추 잎 각각을 멸균된 증류수 100 ml에 3-5장을 투입한 다음, 충분히 교반 후 이를 분무기에 투입하여 시중에서 구입한 호박종묘 (진주육묘장, 경남 진주시 초전동)에 매일 10 ml씩 2일간 분무하였으며, 이들 호박종묘는 상대습도 80%, 28°C의 생장실에서 보관하면서 지속적으로 균주를 확보하였다.



Fig. 3-3-2. Powdery mildew on hot pepper leaves

2) 곰팡이의 생육환경 인자 탐색

가) 최적배지 탐색

공시균주인 *Cladosporium*속 곰팡이는 경남지역의 비닐하우스 농가로부터 제공받은 고추의 잎으로부터 채취(2005년 6월) 배양하였으며, 순수분리를 위하여 malt agar배지 및 potato dextrose agar배지를 사용하여 28℃ 배양기에서 배양하였다. 곰팡이의 최적생장배지 탐색을 위하여 Potato dextrose agar (PDA배지), Sabourds dextrose agar (SDA배지), Malt extract agar (MEA배지), Yeast extract agar (YEA배지) 및 Yeast extract-malt extract agar (YMA배지)에 공시균주를 접종하여 28℃의 인큐베이터에서 성장시켰다. Table 3-3-2에 *Cladosporium*의 최적배지 탐색을 위해서 사용된 배지의 조성을 나타냈다.

Table 3-3-2. Composition of agar medium for growing of *Cladosporium*

| Composition of medium, g/ 1L of distilled water | | | | |
|---|-----------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| Potato dextrose agar, PDA | Sabourds dextrose agar, SDA | Malt extract agar, MEA | Yeast extract agar, YEA | Yeast extract-malt extract agar, YMA |
| Potato 300g | Peptone 10g | Malt extract 20g | Yeast extract 4g | Yeast extract 3g |
| Glucose 20g | glucose 40g | Peptone 1g | Malt extract 10g | Malt extract 3g |
| Agar 20g | Agar 20g | Glucose 20g | Glucose 4g | Peptone 5g |
| | | Agar 20g | Agar 15g | Glucose 10g |
| | | | | Agar 20g |

나) 곰팡이의 최적 pH 및 최적 생장온도

*Cladosporium*의 최적생장을 위한 pH를 탐색하기 위하여 0.1M 초산과 0.1M의 수산화나트륨용액을 사용하여 배지중의 pH를 pH 4.5, pH 7.0, pH 9.0으로 조정한 다음 균주를 접종하여 15℃, 25℃, 40℃의 인큐베이터에서 각각 성장시켜 균사 생장량을 측정하여 최적 pH 및 최적 생장온도를 결정하였다.

다) 균사생장량 측정

균주의 균사생장량은 Fig. 3-3-3과 같이 petri-dish상의 가로, 세로로 설정된 x, y 축을 기준으로 균사의 생장 길이를 버니어캘리퍼스로 측정한 후 x, y축 평균값을 사용하였으며, 5반복 실험 결과의 평균값으로 계산하였다.

라) 통계분석

데이터는 최소 3반복 이상의 평균값으로 계산하였고, 유의성 검정은 Duncan's multiple range test (SAS 8.01)에 의해서 5% 수준에서 평가하였다.

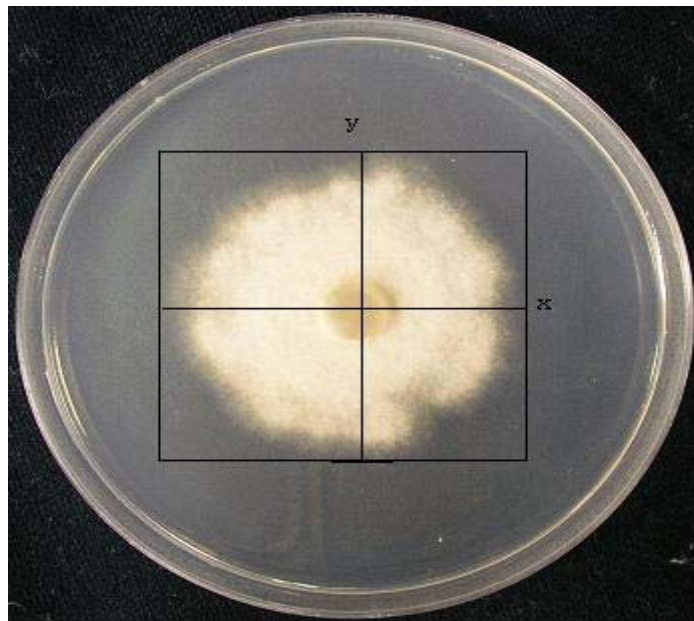


Fig. 3-3-3. Measurement method of mycelial growth for *Cladosporium* on the potato dextrose agar (PDA).

Note: Measurement of mycelial growth length of horizontal direction on the basis of inoculation surface (mm).

다. 결과 및 고찰

1) 균주확보 및 배양

Fig. 3-3-4는 병에 감염된 토마토 잎과 고추 잎의 세척액을 건전한 호박모종의 잎에 분무하였을 때, 병의 감염 단계를 5일단위로 관찰한 사진이다. 토마토 잎과 고추 잎의 세척액을 호박종묘에 분무한 결과 토마토 잎의 세척액에 의한 호박모종은 5일 만에 잎의 앞면에 흰색 반점이 관찰되었으며, 10일 경과 후에는 흰색반점이 약 1 cm - 2 cm의 크기로 전개되었으며, 15일 경과 후에는 잎의 전면부 면적 약 30%를 흰가루병 병징이 나타남과 동시에 (Fig. 3-3-4 참조) 잎이 말라가기 시작하였다.

Fig. 3-3-5는 토마토 잎으로부터 분리한 곰팡이의 균사와 포자를 광학 현미경을 이용하여 400배율로 관찰한 사진이고, Fig. 3-3-6은 고추 잎으로부터 곰팡이의 균사와 포자를 광학 현미경을 이용하여 400배율로 관찰한 사진이다. Fig. 3-3-6의 고추 잎에서 분리한 곰팡이의 현미경 사진은 곰팡이 전문가 (Special technician, Glen Alm, University of Guelph, Canada)의 동정에 따르면 *Cladosporium*속의 곰팡이로 판정된다. 그러나 실제로 거의 대부분의 농가에서는 흰가루병과 같은 흰색의 곰팡이만 작물에 발병되면 흰가루병 이라 부르고 있으며, 또한 *Cladosporium* 곰팡이를 흰가루병 원인균으로 오인하고 있었고, 실제로 흰가루병 곰팡이와 *Cladosporium* 곰팡이는 거의 동시에 작물을 감염시켜 작물을 고사시키는 것으로 알려져 있다. 대부분의 고추 재배농가에서는 *Cladosporium* 곰팡이의 피해가 심각함으로서 이에 대한 항 곰팡이제제를 업체에게 요구하고 있다.

2) 곰팡이의 생육 환경

Fig. 3-3-7에 *Cladosporium*균주를 각각의 다른 고체배지에서 7일간 배양하였을 때, 균사생장량을 나타낸 것이다. 곰팡이의 생장에 적합하다고 알려진 고체배지 중에서 5종을 선택하여 곰팡이를 배양한 결과, SDA배지에서의 균사생장량이 가장 높게 나타났으며, 다른 고체배지에 있어서 균사 생장량과는 유의성이 나타났으며, 가장 균사생장율은 SDA배지, PDA배지, MEA배지, YEA배지 및 YMA배지 순으로 낮게 나타났으며, 각 배지의 균사생장량 간에는 5% 수준에서 유의성이 나타났다. 결과적으로 *Cladosporium*의 균사생장을 위한 최적배지는 SDA배지라고 판단되었다.



After 5 days



After 10 days



After 15 days

Fig. 3-3-4. Development of powdery mildew on pumpkin leaves

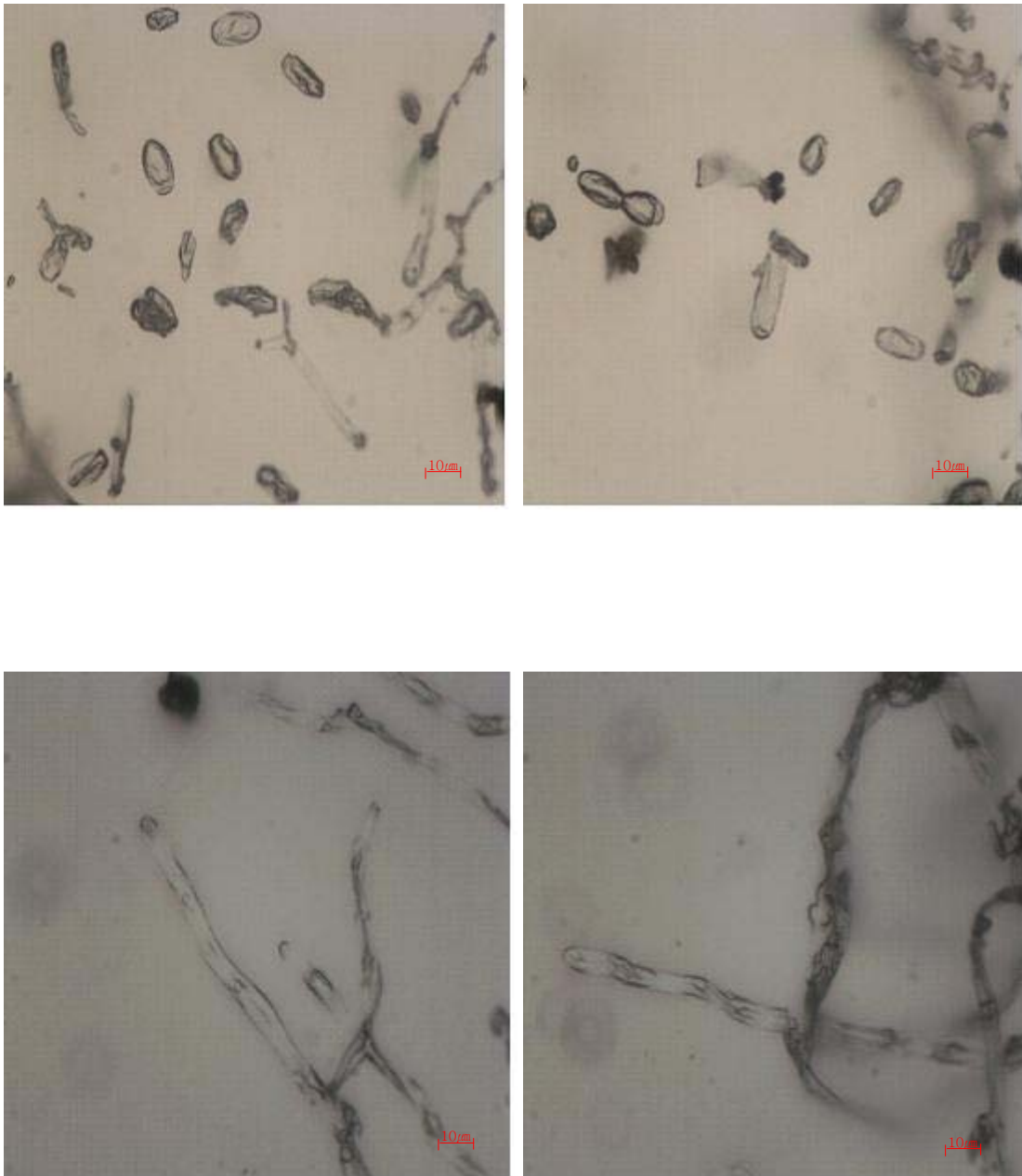


Fig. 3-3-5. Powdery mildew, *Leveillula taurica*, grows through the stomates and produces white colonies of abundant spores (conidia) borne singly on stalks (conidiophores) on the underside of tomato leaves ($\times 400$).

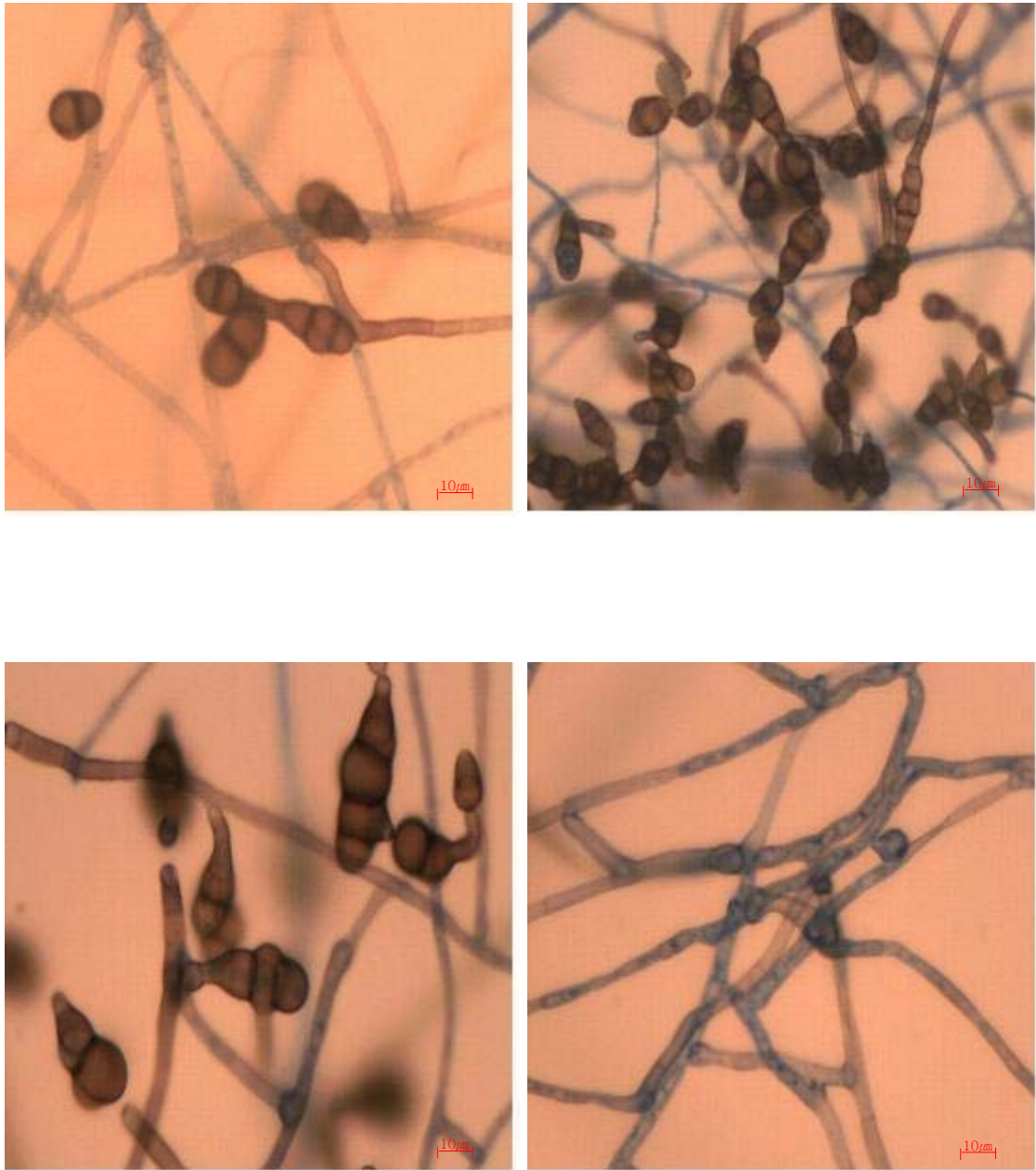


Fig. 3-3-6. Powdery mildew, *Leveillula taurica*, grows through the stomates and produces white colonies of abundant spores (conidia) borne singly on stalks (conidiophores) on the underside of hot pepper leaves ($\times 400$).

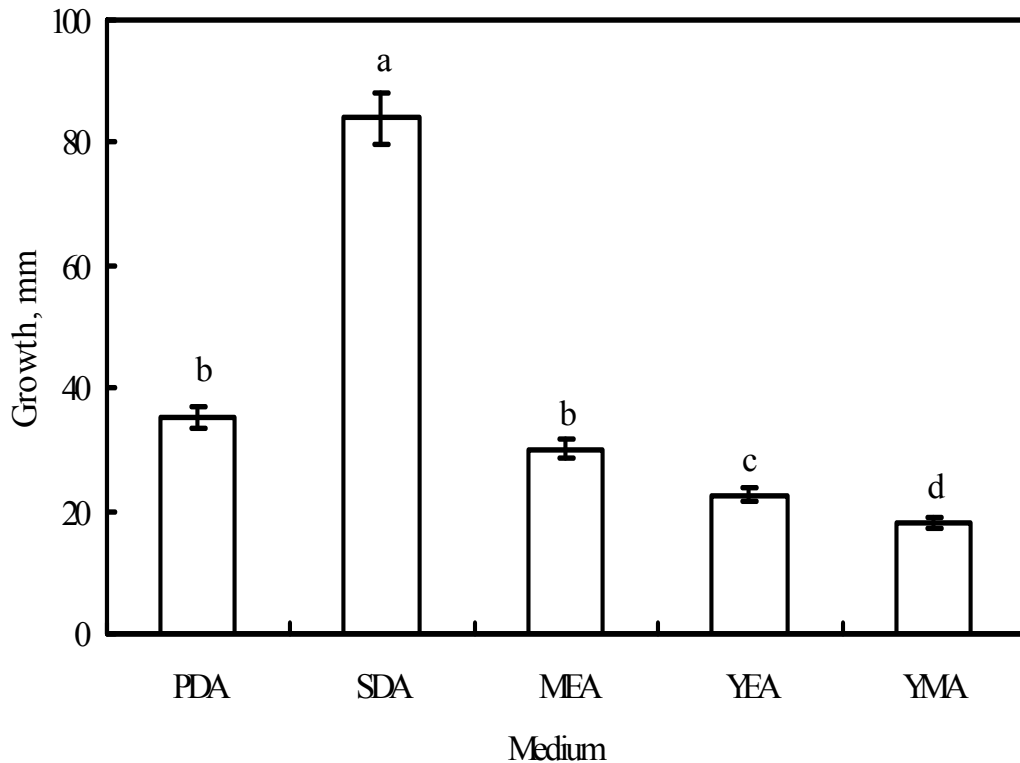


Fig. 3-3-7. Mycelial growth of *Cladosporium* at different agar medium at 25°C

PDA : Potato dextrose agar

SDA : Sabourds dextrose agar

MEA : Malt extract agar

YEA : Yeast extract agar

YMA : Yeast malt agar

Fig. 3-3-8은 *Cladosporium*을 pH 4.5, pH 7.0, pH 9.0의 SDA배지에 접종한 다음, 15°C의 배양기에서 성장시킨 다음 균사생장량을 나타낸 결과이다. 15°C의 온도에서 *Cladosporium*의 균사생장에 적합한 pH를 알아보기 위해 SDA배지의 pH를 조절한 다음 배양한 결과, pH 7.0 및 pH 9.0 에서 균사생장량이 가장 높게 나타났으며, pH 4.5 배지에서의 균사생장량은 5% 수준에서 유의성이 나타났다. 즉 *Cladosporium* 은 pH 중성 및 약 알칼리 조건에서 가장 잘 생육하였고, 15°C의 생육온도에서는 *Cladosporium* 균사생장을 위한 최적 pH는 pH 7.0 및 pH 9.0이라고 판단되었다.

Fig. 3-3-9는 *Cladosporium*을 pH 4.5, pH 7.0, pH 9.0의 SDA배지에 접종한 다음 25°C

의 배양기에서 성장시킨 다음 균사생장량을 나타낸 결과이다. 균사생장량은 pH 7.0 및 pH 9.0의 배지에서 가장 높은 균사생장량을 나타냈으며, pH 4.5배지와는 5% 수준에서 균사생장량이 유의성이 나타났다. pH에 따른 균사의 성장량 변화 경향은 15℃와 차이가 없었으며 결과적으로 25℃의 온도에서 *Cladosporium*의 균사생장을 위한 최적pH는 pH 7.0 및 pH 9.0 이라고 판단되었다.

Fig. 3-3-10은 *Cladosporium*을 pH 7.0의 SDA배지에 접종한 다음 15℃, 25℃, 40℃의 배양기에서 성장시킨 다음 균사생장량을 나타낸 결과로 균사 성장량은 25℃에서 가장 높게 나타났으며, 15℃의 성장량과는 유의성이 없었다. 6일동안에 약 83mm의 균사생장량을 나타냈고, 40℃에서는 균사생장은 약 20 mm 수준으로 생장이 거의 되질 않았다. 결과적으로 *Cladosporium*을 배양하기 위한 최적온도는 25℃라고 판단되었다.

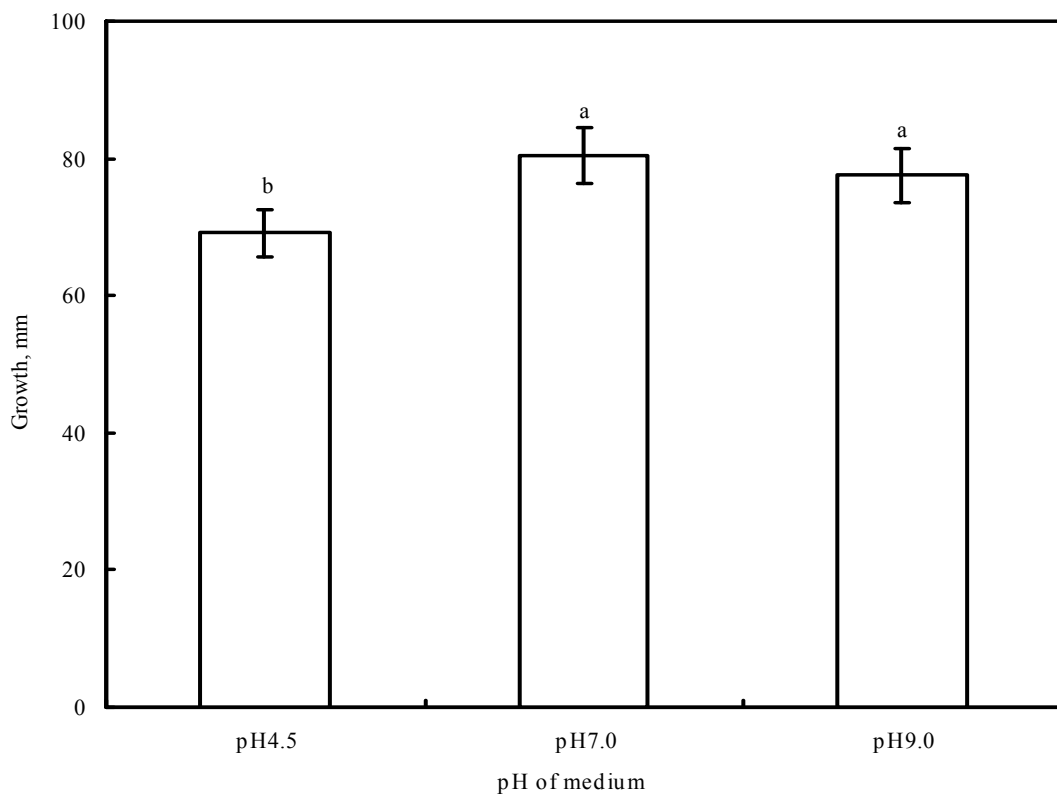


Fig. 3-3-8. Effect of pH on mycelial growth of *Cladosporium* in the SDA medium at 15℃

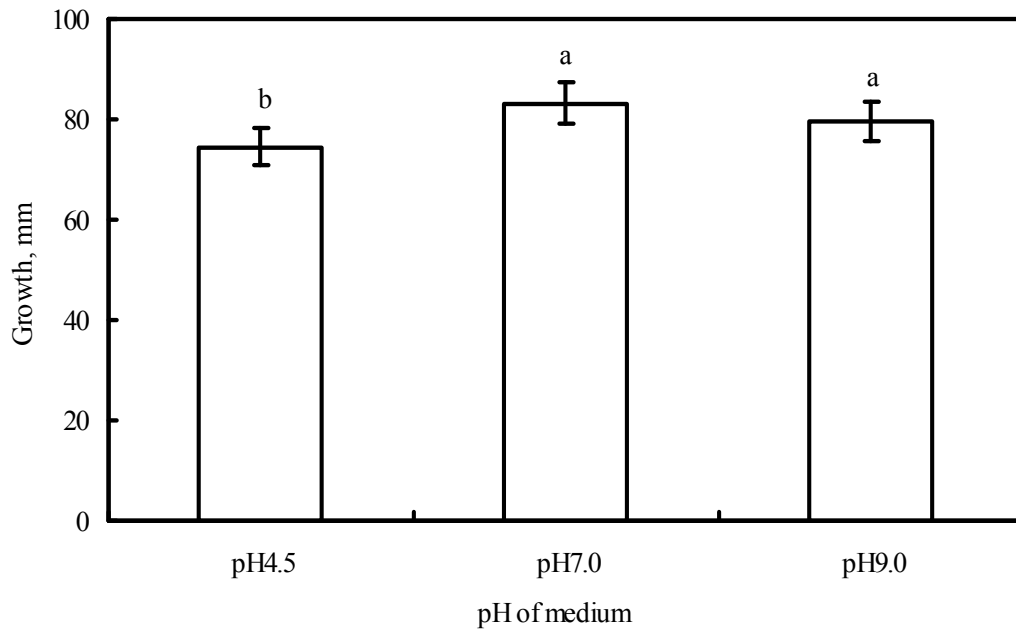


Fig. 3-3-9. Effect of different pH on mycelial growth of *Cladosporium* in the SDA medium at 25°C

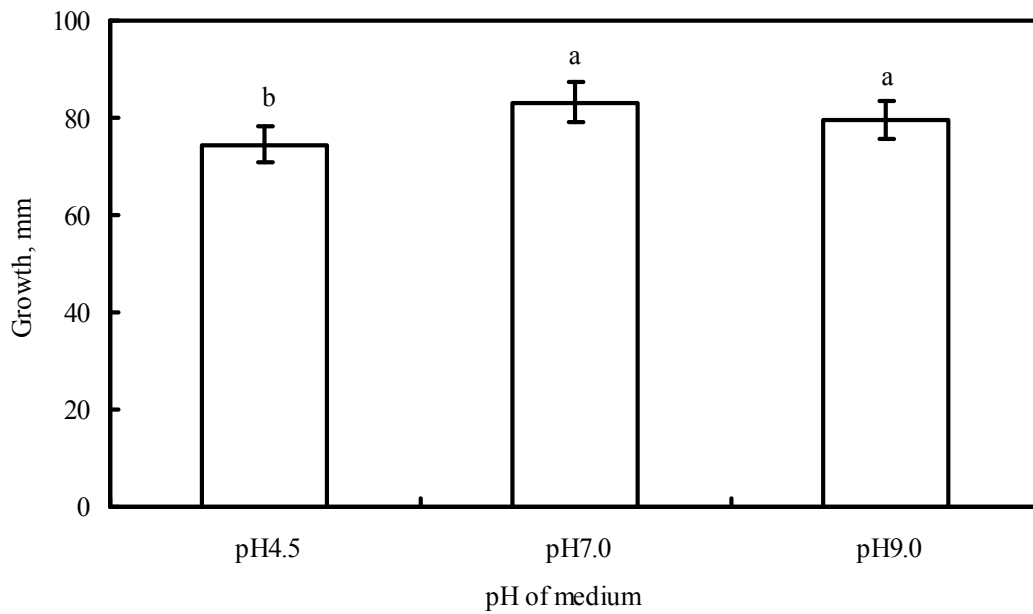


Fig. 3-3-10. Effect of different temperature on mycelial growth of *Cladosporium* in the SDA medium at pH 7.0

라. 요약

곰팡이의 생장에 적합하다고 알려진 고체배지 중에서 5종을 선택하여 *Cladosporium*을 배양한 결과, SDA배지에서의 균사생장량이 가장 높게 나타났으며, 다른 고체배지의 균사생장량과는 5% 수준에서 유의성이 나타났다.

*Cladosporium*의 최적 생장온도는 15℃ - 25℃의 범위로 나타났으며, 40℃에서 *Cladosporium* 균사는 거의 생장이 되질 않았다. *Cladosporium*의 균사생장에 가장 적합한 pH는 pH 7.0 - pH 9.0라고 판단되었다.

결과적으로 *Cladosporium*을 배양하기 위한 최적 배지는 SDA 배지였으며, 최적 온도는 25℃, pH는 7.0으로 나타났다.

2. 제 1세부 과제로부터 생산된 목질 추출물의 곰팡이의 생육억제 성능시험

가. 서 설

우리나라에서 재배되고 있는 대부분의 채소류 등의 농작물은 상당한 이병성을 나타내며 작물에 따라 새로운 품종들중 일부는 저항성을 나타내지만, 이들 품종들은 시간이 경과됨에 따라 감수성과 저항성을 나타내므로 안정적이지 못하다. 따라서 온실 내에서 주로 재배되는 작물들은 대부분 이병성을 나타내기 때문에, 추가적인 약제 방제가 필수적이라 할 수 있다.

노지에서 인위적인 환경조절이 곤란하지만 시설재배에서는 저녁 때 관수나 약제살포를 피해 주·야간의 온도차가 심하지 않도록 관리해야 하며, 또한 천장이 열린 상태로 개방하여 습한 공기를 환기시킨 후 천장을 닫아 야간의 습도를 낮추어야 하고 낮 동안에는 최대한 실내의 습도를 낮추는 환경조절이 최선의 방법이다.

화학적인 방제로서는 흰가루병은 유황훈증, 분무등 온실에서는 훈증제 및 유기화학 농약을 이용하여 방제하는 방법이 있다. 대부분의 환경에서 매주 살포는 적당한 수준의 방제 효과를 나타내지만, 작물의 급속한 성장기간이나 온도 변화 및 상대습도가 자주 변하는 환경에서는 더 자주 약제를 살포해주어야 한다. 살균제인 fenarimol, triadimefon과 etaconazole등은 정상적인 온도 또는 가온 후 휘발에 의해 온실의 흰가루병을 방제하는데 효과적이었다고 보고되고 있다. 따라서 약제방제를 위해서는 이병엽과 이병지를 제거하고 등록된 약제로 발병 전에 예방적으로 약하게 희석하여 주기적으로 약액이 충분히 묻도록 살포하는 것이 이상적이라 판단된다.

흰가루병의 경우 잎 뒷면부터 발생하기 때문에 초기발생은 잎의 윗면만 관찰해서는 지나치기 쉽다. 잎 뒷면을 잘 관찰하여, 잎이 말려 올라갈 때까지 방치하지 않도록 해야 하며 유기화학농약의 경우 육묘기 부터 여러 종류의 농약을 체계적, 정기적으로 사용하여야 하며 흰가루병원균이 소량 발생하였을 때 철저히 방제하여 만연을 방지해야한다. 특히, 과일에는 약제가 잘 묻지 않기 때문에 수확기까지 방제를 철저히 한다.

본 연구진은 흰가루병의 발병 및 생육억제를 위하여 시판되는 유기화학 농약인 M사의 제품(균자바) 2가지와 주관연구기관으로부터 제공받은 목질추출물을 이용하여 흰가루병 방제효과를 시험함으로써, 목질추출물을 원료로 하는 곰팡이병 방제제 제조가능성을 진단하고자 시도되었다.

나. 재료 및 방법

1) 공시균주

고추모종의 잎으로 채취된 *Cladosporium* 균주는 pH 7.0 SDA배지에 접종한 다음, 25℃에서 8일간 계대배양 하였다. Petri-dish 상에서 계대배양된 곰팡이로부터 cork baller를 사용하여 직경 10mm의 균사 pellet을 분리하여 곰팡이 균사의 접종원으로 하였다.

2) 공시재료

목질추출물의 곰팡이 방제 성능을 평가하기 위하여 주관연구기관인 (주) 유림하이텍으로부터 제공받은 목질추출물(가칭, 유림슈퍼, sample A)과 시중에서 흰가루병 곰팡이 억제제로 판매되고 있는 M사의 제품(균자바, sample B)을 시료로 하였다 (Fig. 3-3-11).

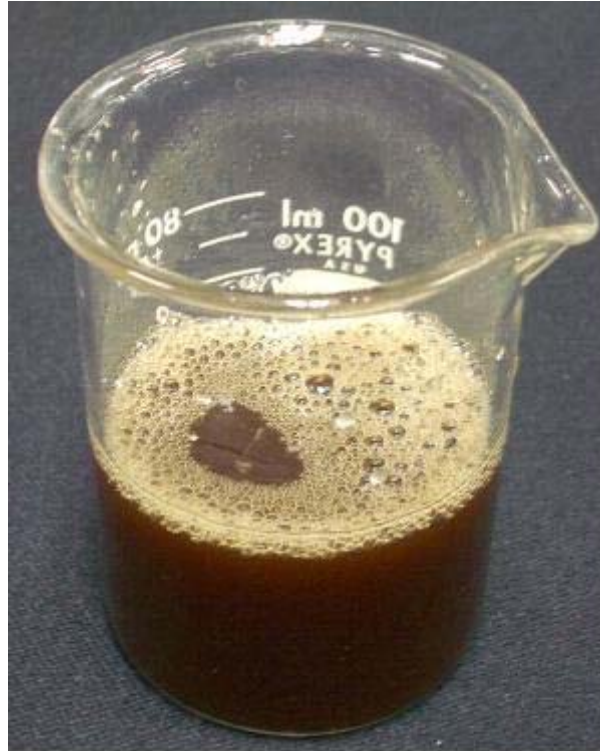
시중에서 시판되고 있는 sample B는 현재 작물의 흰가루병 곰팡이 억제제로서의 성능이 우수하다고 농민 및 농약자재상들에게 알려져 있으며, 판매량도 상당한 수준에 이르고 있는 제품이다.

3) 공시재료의 고형분 함량 및 pH 측정

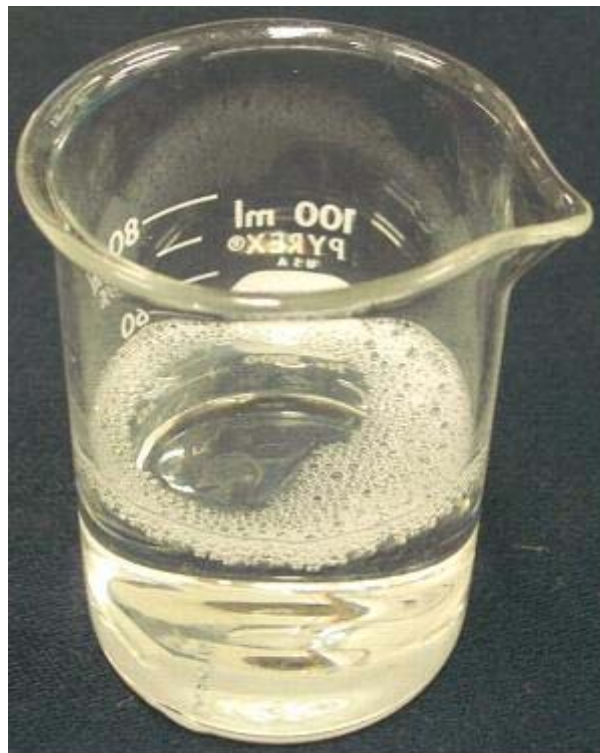
시료의 고형분 함량 측정을 위하여 각각의 시료 100 ml를 채취하여 50℃의 수조에서 감압하여 건조 시킨 다음, 105℃의 건조기에서 항량에 달할 때 까지 건조시킨 다음, 고형분 함량을 측정하였으며, 시료(sample A, B)의 pH는 pH meter (Hanna HI-8418, USA)를 사용하여 측정하였다.

4) 곰팡이 생육억제 성능 평가

주관기관으로부터 제공받은 목질추출물 (액체상, sample A) 및 현재 시판되고 있는 흰가루병 방제제(액체상, sample B)를 SDA배지와 혼합하여 125배, 250배, 500배, 1000배 농도의 고체배지를 조제하였으며, 이때, sample의 첨가는 배지 멸균 후, 실시하였으며 sample A, B가 각기 다른 농도로 첨가된 SDA배지에 계대배양된 *Cladosporium* 곰팡이 pellet (10mm)을 접종한 다음 25℃에서 7일간 생장시켰다.



Sample A



Sample B

Fig. 3-3-11. Sample A prepared from wood extracts and sample B sold on the market

균사생장길이는 Fig. 3-3-12와 같이 petri-dish상의 가로, 세로로 설정된 x, y 축을 기준으로 균사의 생장 길이를 버니어캘리퍼스로 측정된 후 x, y축 평균값을 사용하였으며, 5반복 평균값으로 평가하였다. 균사 저해율은 식 (1)에 의하여 계산하였으며, 이때 대조구는 sample 첨가되지 않은 SDA배지에서 균사생장을 기준으로 하였고, 5반복 평균값으로 평가하였다.

$$\text{균사생장저해율 (\%)} = \left\{ 1 - \frac{\text{시험구의 균사생장길이(mm)}}{\text{대조구의 균사생장길이(mm)}} \right\} \times 100 \dots\dots \text{식 (1)}$$

5) 통계분석

데이터는 최소 3반복 이상의 평균값으로 계산하였고, 유의성 검정은 Duncan's multiple range test (SAS 8.01)에 의해서 5% 수준에서 평가하였다.

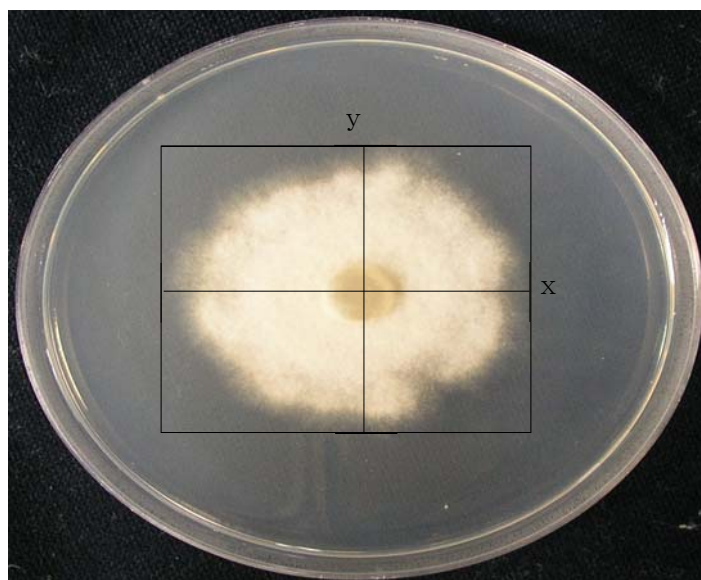


Fig. 3-3-12. Measurement method of mycelial growth for *Cladosporium* on the SDA medium.

Note: Measurement of mycelial growth length of horizontal direction on the basis of inoculation surface (mm). Antifungal activity,% = [1-(a mycelial growth diameter of the test petri dish, mm/ a mycelial growth diameter of the control petri dish, mm) × 100].

다. 결과 및 고찰

1) 공시재료의 이화학적 특성

Table 3-3-3은 공시재료로 사용된 목질추출물과 시판 방제제의 이화학적 특성을 나타냈다. Sample A (목질추출물)는 고형분 함량이 6.48 g/ml로서, sample B (시판방제제)에 비해 약 50%수준이었으며, 이러한 결과로부터 추측해 볼 때 sample B는 다량의 수용성 화학약품이 첨가되어 있음이 예측된다.

Table 3-3-3. Solid content and pH of the sample A and Sample B

| Sample | Characteristics | |
|--------|-------------------------|------------|
| | Solid content, g/100 ml | pH |
| A | 6.48 ± 0.12 | 6.8 ± 0.1 |
| B | 16.18 ± 0.32 | 11.8 ± 0.1 |

Sample B의 pH는 강한 알칼리성이었으며, 이는 첨가된 약품이 물에 용해되었을 때 강한 알칼리성을 나타냄으로서 알칼리성 약품을 첨가한 것으로 추측되며, 이와는 달리 sample A는 거의 중성에 가까운 수치를 나타냄으로서 목재로부터 추출되어진 화합물에는 pH를 변화시킬 수 있는 화합물이 거의 없음을 알 수 있었다.

2) 곰팡이의 생육저해성능

Fig. 3-3-13과 Fig. 3-3-14는 *Cladosporium* 곰팡이에 대한 sample A(목질추출물)의 생육억제성능을 표시한 것으로 대조구에 비해서는 모든 조건의 희석농도에서 균사생장 억제성능이 발휘되었고, 1000배 희석이 된 경우에도 목질추출물의 균사 생장 저해력은 나타났으며, 희석농도가 낮아질수록 곰팡이 균사생장 억제성능은 높아졌고, 각 희석농도에 따른 균사생장 억제력은 5% 수준에서 유의성이 나타났으며, 125배 희석농도 배지에서는 약 40%의 균사생장억제력이 발휘되었다.

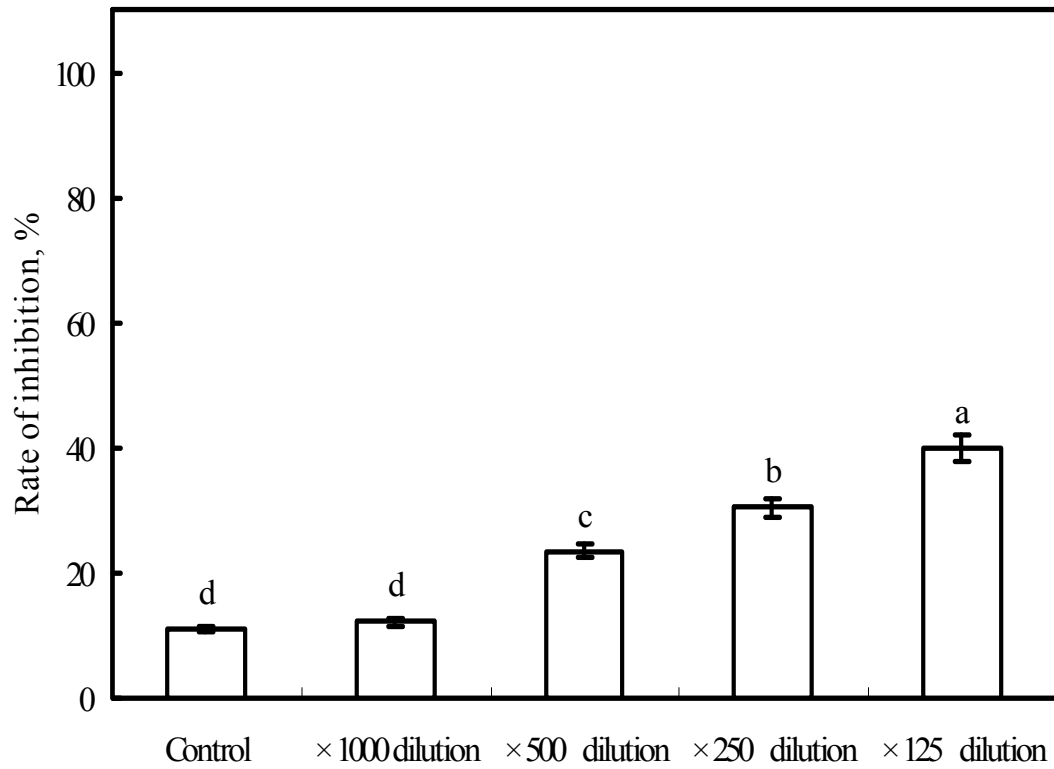
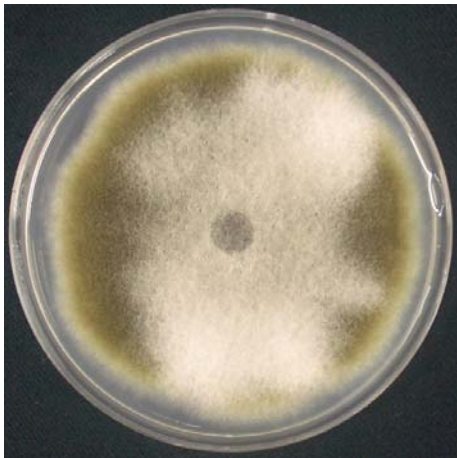


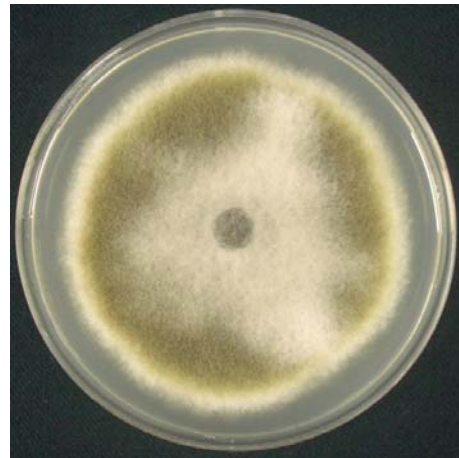
Fig. 3-3-13. Antifungal activity of wood extracts against *Cladosporium* on the SDA medium at 25°C for 7 days



Control



× 1000 dilution



× 500 dilution



× 250 dilution



× 125 dilution

Fig. 3-3-14. Growth inhibition of wood extracts (sample A) against *Cladosporium* .

Fig. 3-3-15와 Fig. 3-3-16은 시중에 판매되고 있는 흰가루병 곰팡이 생장 억제제인 sample B의 균사 생장 억제를 나타낸 결과로, 대조구와 비교했을 때 모든 조건의 희석농도에서 곰팡이 균사 생장 억제력이 나타났으며, 특히 250배, 125배 희석의 경우 거의 곰팡이 균사 생장억제력이 100%에 도달하였고, 500배 및 1000배 희석된 경우에도 균사생장 저해능력이 70%에 근접하였다.

Sample A와 sample B의 균사생장억제력을 비교했을 때, 목질 추출물인 sample A는 시판제품으로서 판매되어 성능을 인정받기 위해서는 곰팡이 균사 생장 억제력 부분에서 개선할 점이 있다고 판단되며, 단순히 목질 추출물만으로는 흰가루병 곰팡이 생장억제제로서의 역할이 어렵다는 사실을 인식할 수 있었다.

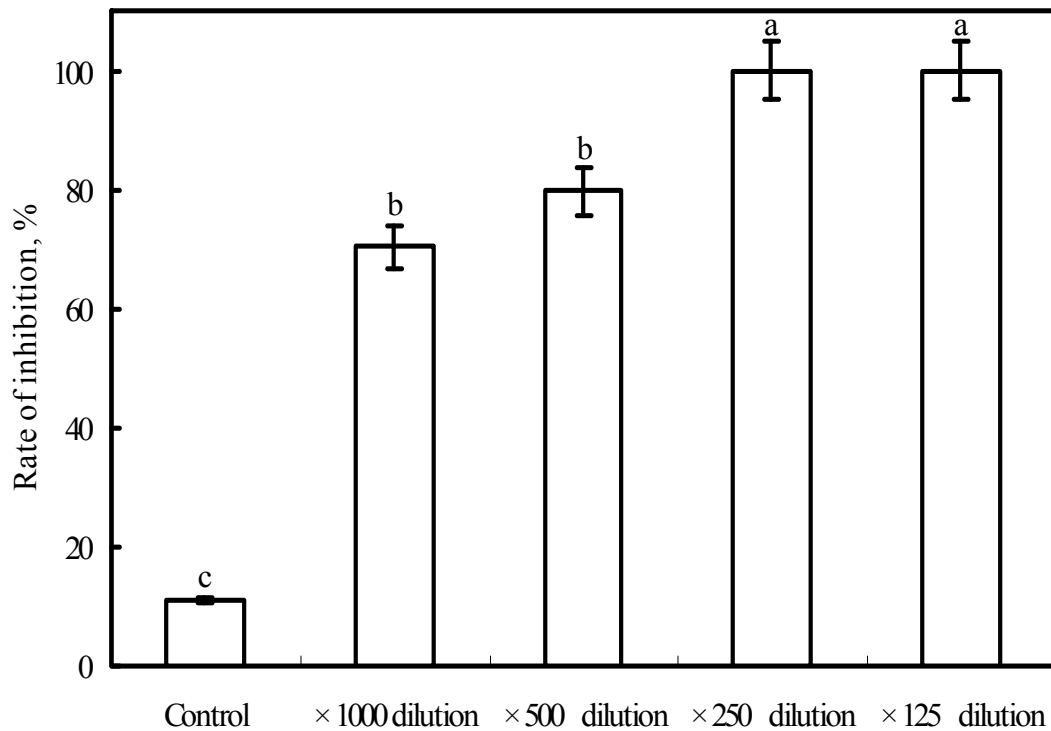


Fig. 3-3-15. Antifungal activity of anti fungal agents (sample B) against *Cladosporium* on the SDA medium at 25°C for 7 days(%)



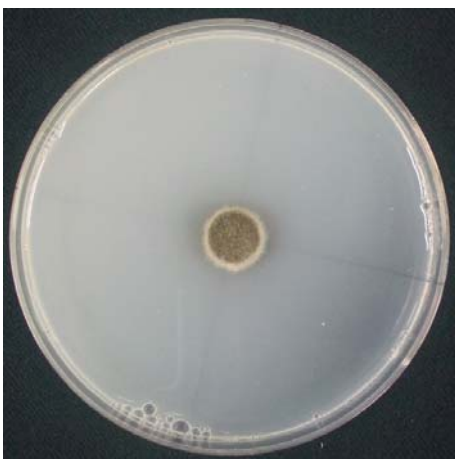
Control



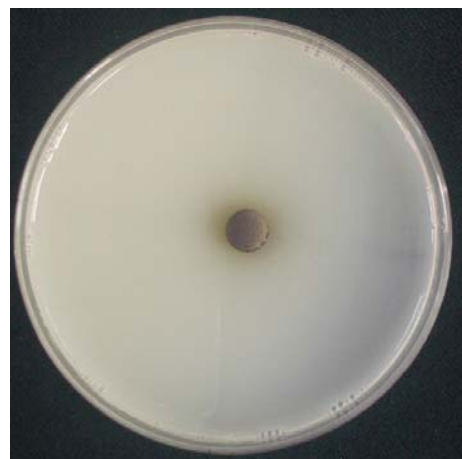
× 1000 dilution



× 500 dilution



× 250 dilution



× 125 dilution

Fig. 3-3-16. Growth inhibition of anti fungal agents (sample B) against *Cladosporium* .

라. 요약

주관기관으로부터 제공받은 목질 추출물의 곰팡이 균사생장 억제율은 12% - 40% 수준이었으며, 시판 곰팡이 방제제의 균사생장 억제율은 70 - 100%로, 목질 추출물보다 높은 억제 효능을 나타냈다.

목질추출물을 원료로하여 흰가루병 곰팡이 방제제를 제조하기 위해서는 방제 성능을 향상시키기 위한 첨가물의 부가가 반드시 필요하다고 인식되었다.

3. 곰팡이 생육을 억제하는 목질 추출물 원료의 선발 및 최소저해농도 결정

가. 서 설

곰팡이류에 의한 작물의 피해는 현실적으로 비닐하우스 재배에서는 빈번하게 일어나는 상황이 되었다. 이들의 방제나 예방을 위하여 다종다양한 화학 농약 및 기능성 농약이 널리 이용되고 있으나, 작물의 최종 소비자들은 안전한 천연물의 사용을 희망하고 있다. 이러한 이유로 본 연구에서는 곰팡이의 생육억제를 위하여 천연물인 목재원료로부터 추출한 추출물이 곰팡이의 군사생장 저해를 능력을 가지는 것이 확인되었기 때문에 이를 다시 세분화하여 추출하여 여러 균의 화합물을 분리할 필요성을 가지게 되었다. 특히 유사 흰가루병에 효능을 발휘하는 목질원료의 최적 추출조건과 추출조건에 따른 곰팡이의 최소저해농도를 결정하기 위하여 곰팡이병의 생육억제 시험의 필요성이 확인되어졌다. 이미 제2절에서 주관연구기관인 (주) 유림하이텍이 목재원료로부터 추출한 목질추출물(가칭, 유림슈퍼, sample A)이 시판제품으로서 판매되어 성능을 인정받기 위해서는 곰팡이 군사 생장 억제력 부분에서 개선할 점이 있다고 판단되어졌으며 목질 추출물만으로는 곰팡이 생장억제제로서의 역할이 어렵다는 사실을 인식하였다.

본 연구진은 이에 대한 구체적인 연구가 필요할 것으로 판단되어 *Cladosporium* 곰팡이를 대상으로 항균효능을 발휘하는 원료를 선발하기 위하여 본 연구는 시도 되었다.

나. 재료 및 방법

1) 목질추출물 원료의 조제

목질추출물 원료의 선발을 위하여 주관기관인 유림하이텍으로 고압 전처리된 목재시료 (Fig. 3-3-17.)를 제공받아 이로부터 곰팡이 생육을 저해하는 원료를 선발하기 위하여 열수추출과 메탄올 추출을 실시하여 열수추출물과 메탄올 추출물을 획득하였다.

열수추출은 반응용기에 주관기관으로부터 제공받은 목질원료 5 g(전건중량기준)과 증류수 500 ml를 첨가하여 충분히 교반 한 다음, 121℃에서 30분 반응시킨 다음, glass filter G3로 여과하여 추출 여과액을 획득하였다

메탄올 추출은 반응용기에 주관기관으로부터 제공받은 목질원료 5 g(전건중량기준)과 메탄올 500 ml를 첨가하여 실온에서 24시간 동안 100 rpm의 속도로 교반 한 다음, glass filter G3로 여과하여 추출 여과액을 획득하였으며 이때 추출물의 수율은 최초 투입된 전처

리 목재의 전건중량을 기준으로 하여 추출 물 중량을 백분율로 표시하였는데, 열수추출물의 수율은 32.4 %였으며, 메탄올 추출물의 수율은 26.8%였다.

획득된 추출물들은 50℃의 온도에서 일정수분까지 감압, 농축한 다음, 냉동건조기를 이용하여 동결건조 후, 분말 상태로 조제하였다.

2) Field로부터 곰팡이 균주의 채취 및 배양

주관기관과 함께 합동으로 대구지역 및 경남지역의 비닐하우스 작목반을 중심으로 곰팡이 병 균주를 확보하기 위해 병이 발병된 고추의 잎을 채취하였다 (경남 진주시 옥봉동 소재).

곰팡이병에 감염된 잎은 곰팡이 균사가 있는 부분을 2cm(가로) × 2 cm (세로)의 크기로 자른 후, SDA배지에 접종하여 24℃의 인큐베이터에서 3일간 성장시켰다.



Wood chip before pretreatment

Pretreated wood

Fig. 3-3-17. Pretreated wood supported from Yulim high tech co.

3) 추출물의 곰팡이생장 최소 억제 농도 결정

분말상의 열수추출물 및 메탄올 추출물을 멸균된 증류수에 용해한 다음, SDA배지와 혼합하여 125 ppm, 250ppm, 500 ppm, 1000 ppm 추출물 농도를 가지는 고체배지를 조제하였다. 열수추출물 및 메탄올 추출물이 각기 다른 농도로 첨가된 SDA배지에 고추 잎으로부터 채취, 배양된 *Cladosporium* 균주 pellet (10mm)을 접종한 다음 25℃에서 7일간 성장시켰다.

균사 성장 저해율은 식 1에 의거하여 계산하였으며, 이때 대조구는 sample이 첨가되지 않은 SDA배지를 기준으로 하였다.

$$\text{균사성장저해율 (\%)} = \left\{ 1 - \frac{\text{시험구의 균사생장길이(mm)}}{\text{대조구의 균사생장길이(mm)}} \right\} \times 100 \dots\dots \text{식 (1)}$$

다. 결과 및 고찰

Fig. 3-3-18와 Fig. 3-3-19 은 열수추출물의 농도별 첨가에 따른 *Cladosporium* 균사생장저해를 나타낸 것으로 추출물 투입농도에 따른 균사생장저해정도는 5% 수준에서 유의성을 나타냈으며, 대조구와 비교하여 125 ppm 이상의 농도에서 약 10%이상의 곰팡이 균사생장 저해를 나타냈으며, 곰팡이 균사생장 최소저해농도는 125 ppm 이라고 판단되었고, 1000 ppm에서 약 40%의 균사생장 저해 효과를 나타냈다.

Fig. 3-3-20과 Fig. 3-3-21은 메탄올 추출물에 의한 곰팡이 균사생장 저해율을 나타낸 결과로서 대조구와 비교하여 250 ppm이상에서 균사생장저해 효과가 나타났으며, 250 ppm 이후의 농도에서는 5% 수준에서 유의성이 인정되었고, 메탄올 추출물의 균사생장 최소 저해농도는 250 ppm이라 판단되었다. 메탄올 추출물 농도 1000 ppm 에서는 균사생장 저해율이 약 32%로 나타났는데 이러한 수치는 열수추출물 저해율 (42%)보다는 낮은 결과로 메탄올 추출물보다는 열수추출물에 흰가루 곰팡이 생장을 저해 하는 물질이 더 많이 함유되어 있다는 사실을 추측할 수 있었다.

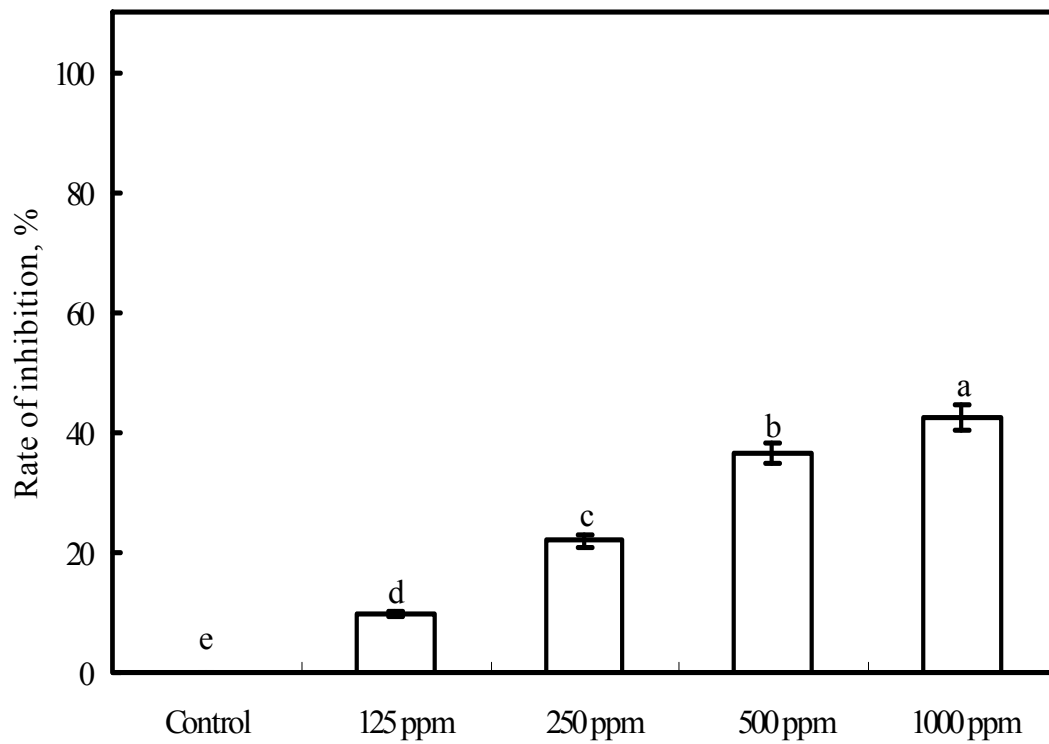
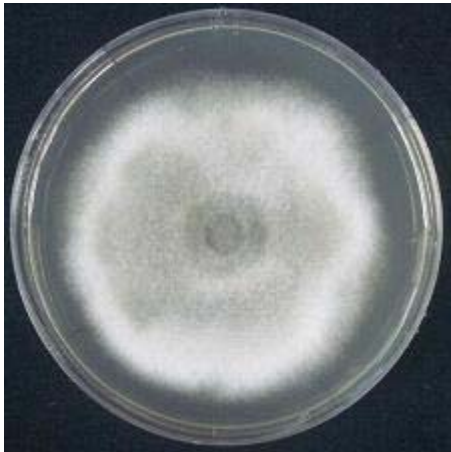


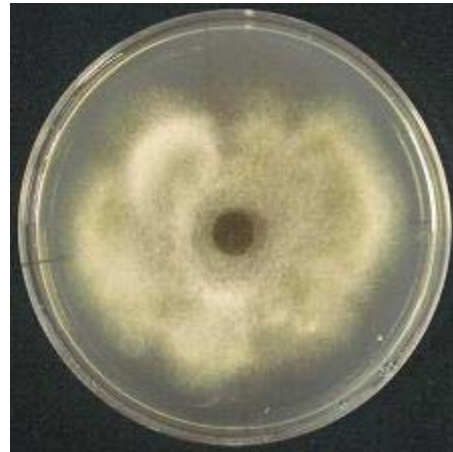
Fig. 3-3-18.. Antifungal activity of hot water extracts from pretreated wood against *Cladosporium* in the SDA medium at 25°C for 7 days.



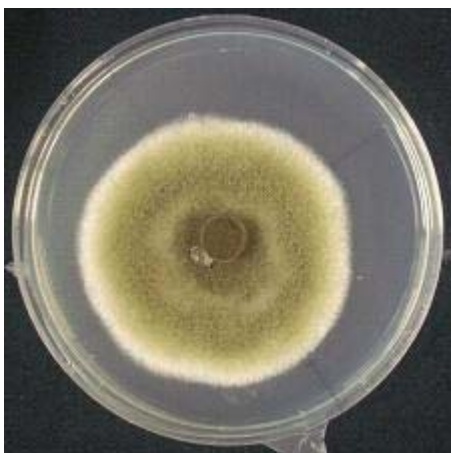
Control



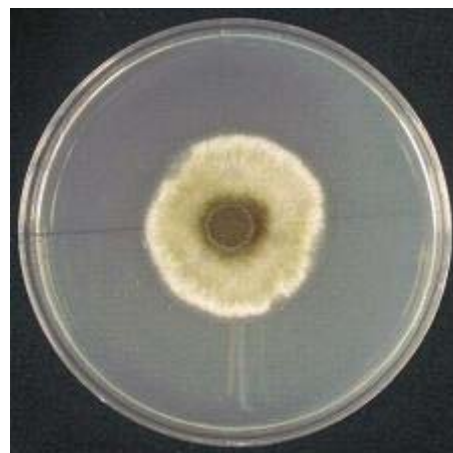
125 ppm



250 ppm



500 ppm



1000 ppm

Fig. 3-3-19. Growth inhibition of hot water extracts prepared from wood against *Cladosporium*.

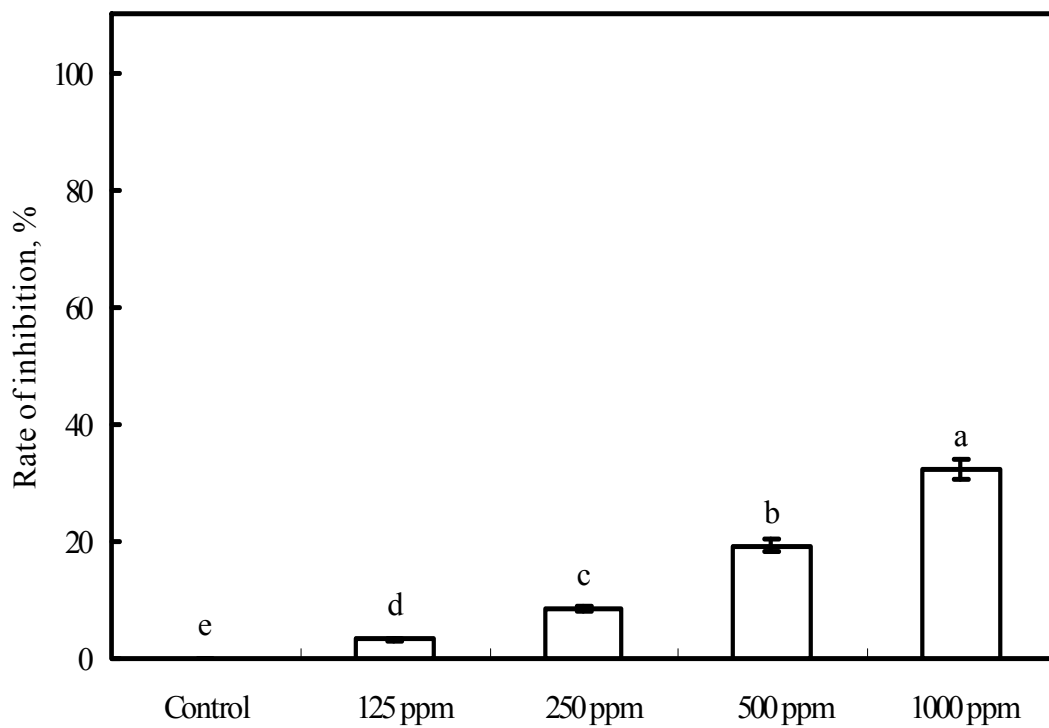
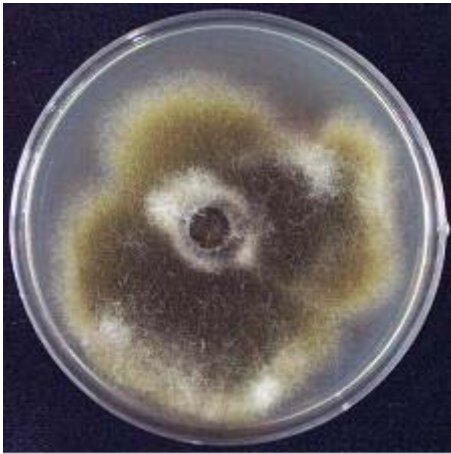


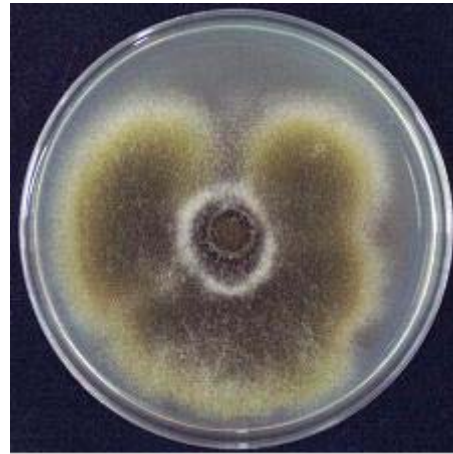
Fig. 3-3-20. Antifungal activity of methanol extracts from pretreated wood against *Cladosporium* in the SDA medium at 25°C for 7days



Control



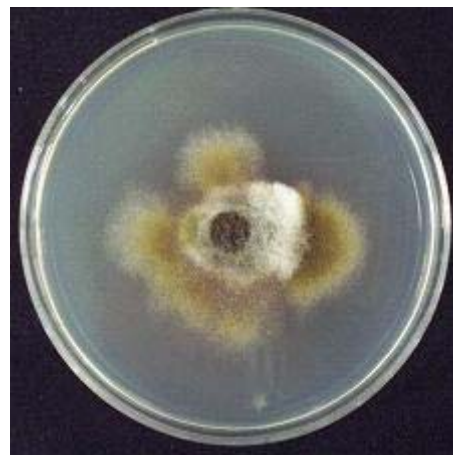
125 ppm



250 ppm



500 ppm



1000 ppm

Fig. 3-3-21. Growth inhibition of methanol extracts prepared from pretreated wood against *Cladosporium*.

4. 주관연구기관이 생산한 목질추출물에 대한 작물의 안정성 시험

가. 서 설

병해충이나 잡초 등의 방제를 위하여 살포하는 농약은 그 대상으로 하는 농작물에 부착될 뿐만 아니라 토양표면에 떨어지기도 하고 대기 속으로 흩날려 다니다. 또한 농약을 작물에 분무하는 작업자에게도 피해를 줄 수 있고, 그 부근을 지나가는 통행인이 호흡 중 농약을 들이쉴 가능성도 생각할 수 있다. 토양에 처리된 농약은 작물의 뿌리와 잎을 통해 흡수될 뿐만 아니라 빗물을 따라 토양 속을 이동하여 지하수에까지 도달할 가능성도 생각해야 한다. 이처럼 처리된 농약은 여러 가지 다양한 동태(행동)를 나타낸다.

이런 관점에서 농약의 안전성을 생각할 때는 여러 가지 측면에서의 영향을 평가해야 한다. 이를 크게 나누면 다음과 같이 정리할 수 있다. 1) 사용자에게 대한 안전성 2) 농작물을 먹는 소비자에게 대한 안전성 3) 환경에 대한 안전성 4) 작물에 대한 안정성. 이 중에서 작물에 대한 안정성은 효과가 매우 뛰어난 방제제라 할지라도, 작물의 생장이나 수확에 영향을 미친다면 사용을 고려해야 할 것이다.

곰팡이 방제제 제조업체들은 이를 약해라고 부르고 있으며, 방제제의 효능이 뛰어나더라도, 작물에 약해가 발생된다면 그 방제제는 판매가 될 수 없으며, 경우에 따라서는 작물의 피해액을 보상하는 경우도 흔히 발생한다. 제제의 개발에서 등록까지는 긴 세월과 방대한 시험 성적을 필요로 한다고 하였는데 그 대부분이 이러한 안전성을 확인하는데 쓰이는 것이다. 소재가 되는 화합물이 병해충 등에 대하여 약효 면에서 아무리 우수하더라도 안전성에 결함이 발견되면 개발은 중지된다.

주관기관으로부터 제공받은 목질원료 추출물의 작물 안정성 시험을 목적으로 고추모종을 사용하여 직접 이를 분무함으로써 그 약해를 관찰하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

1) 공시재료

주관연구기관으로부터 제공받은 목질추출물 원료의 안정성 검정을 위하여 고추모종을 구입하여 약해 실험을 실시하였으며 고추모종은 발아로부터 65-70일 경과된 고추모종을 사용하였다. 이 모종은 한양원예바이오(경남 진주시 소재)로부터 구입하였으며, 주관기관으로부터 제공받은 목질추출물 원료는 2종(가칭 슈퍼 1, 슈퍼 2)이었으며, 이들 원료의 고형분

함량은 슈퍼 1은 7.5 g / 100 ml 였고, 슈퍼 2는 0.3 g / 100 ml 였다.

2) 약해시험

고추모종을 대상 작물로 한 약해 시험은 25℃, 상대습도 30%의 항온, 항습실에서 실시하였으며, 3반복 실험하였다. 목질추출물 원료는 125배, 250배, 500배로 희석하여 분무기에 투입한 다음, 고추모종 1 개체 당 지상부위에 각각 17 ml의 목질추출물을 매일 분무하였으며, 약해관찰기간은 6일로 설정하였고, 이때 대조구는 증류수로 하였으며, 분무양 및 방법은 시험구와 동일하게 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

Fig. 3-3-22는 주관기관으로부터 제공받은 목질 추출물원료의 약해 시험을 위하여 고추 모종에 직접 분무한 다음, 작물의 잎과 전체적인 상태를 비교한 사진이다. 제공받은 슈퍼 1 과 슈퍼 2는 사진에서 보는 바와 같이 대조구(증류수)와 비교해 볼 때, 고추 모종의 잎과 줄기부분은 목질 추출물의 농도에 따라서 차이가 발생하지 않았고, 정상적인 성장을 하였다.

이러한 결과는 본 연구에서 제조한 목질 추출물 원료는 작물의 성장저해를 일으키지 않음으로서 성장 저해 및 약해 현상은 일어나지 않을 것으로 판단되며, 방제제 원료로서의 사용이 가능하다고 판단되었다.

오히려 경우에 따라서는 목질원료가 분무된 모종에서는 잎의 색상이 대조구에 비해 더 선명하고 영양상태가 좋은 것으로 나타났다. 이러한 경향은 모든 희석농도에서 관찰되었으며, 향후 식물생장 영양제나 기타 제제로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

국내의 곰팡이 생장억제제 시장에서는 약 30%의 제품이 작물에 존재하는 곰팡이 생장을 억제 하지만, 경우에 따라서 작물자체의 잎이나 열매의 이상 성장 및 고사를 초래하는 경우가 많으며, 이러한 결과는 곰팡이 생장억제제에 과다하게 투입된 화학약품 때문인 것으로 알려져 있다.

이러한 측면에서 목질추출물 원료는 천연물 제제로서 원료 사용 잠재력이 크다고 판단되었다.



Control, water



Super 1, $\times 125$ dilution



Super 1, $\times 250$ dilution



Super 1, $\times 500$ dilution



Super 2, $\times 125$ dilution



Super 2, $\times 250$ dilution



Super 2, $\times 500$ dilution

Fig. 3-3-22. Photos of seedlings of red pepper sprayed with the wood extracts (6 days).

제 4 절 천연 목질 항곰팡이 제제의 성능 개선

1. 잣빛곰팡이(*Botrytis cinerea*) 균주를 확보하고, 생육환경인자를 분석

가. 서 설

잣빛곰팡이병은 보트리티스(*Botrytis* spp.)속 곰팡이에 의해 발생하는 병해로 거의 모든 채소와 작물에 발생되며 특히 잎을 생체로 이용하는 시설하우스 잎 들깨에 있어서는 경제적 손실을 초래하는 매우 중요한 병이다. 잣빛곰팡이병은 불완전균에 속하는 곰팡이로서, 공기 중에 쉽게 분산되는 다량의 분생포자를 형성하는데 병든 조직의 표면에 작은 검은 균핵을 형성하여 불량한 환경에서도 오랫동안 생존할 수 있다. 병원균은 2~30℃ 사이에서 성장하지만 10℃이하의 저온에서도 활동이 왕성하므로 저온(0~10℃)에서 저장중인 식물체에도 많은 피해를 입히며 병원균의 최적 성장과 포자형성 및 방출 그리고 발아와 감염온도는 18~23℃ 정도이며 이때 식물체 표면에 수분이 필수적으로 요구된다. 채소와 작물의 포장에서 병원균은 저온(24℃이하)과 포화습도 상태가 6~9시간이상 지속되면 주로 상처부위나 노화된 세포의 각피를 침입한다.

잣빛곰팡이병은 병든 조직위에 특징적인 잣빛의 곰팡이 분생포자를 형성하는데 저온 다습한 하우스 재배 작물에서 특히 피해가 많다. 하우스내의 적당한 습도 조건하에서 분생포자의 발아에 의해 잎 표면에서 침입하여 갈색의 수침상의 병반이 형성되고 시간이 지나면서 병반의 크기가 잎 전체로 진전되고 특히 신초 부위에 이병이 되면 신초가 검은색으로 변하면서 분생포자가 형성되고, 또한 줄기, 엽병 등 식물체 전체에 이병이 되는 병원력이 매우 강한 병으로서 방제를 소홀히 하면 폐농의 경우까지 생기는 매우 까다로운 병이다(Fig. 3-4-1참조).

1) 오이 잣빛곰팡이병

개화 후 암꽃의 화관에서 발생 어린 과일로 침해하여 과일을 담갈색으로 연부 시키며 습도가 높을 때에는 피해부에 회색 내지 담갈색의 곰팡이가 밀생한다.

오이의 끝부분에 꽃이 붙어있는 곳부터 발병하게 되는데 그곳의 병반부는 회갈색의 곰팡이가 무수히 밀생한다. 잎에 발생하는 경우는 병원균이 침입한 꽃잎이나 어린과실 등이 잎에 떨어져 부착한 부분을 중심으로 회갈색의 원형 병반이 형성된다.

2) 딸기 잿빛곰팡이병

주로 과실에 발병하나 꽃, 잎 등에도 침입하여 과실에는 수확기에 발병이 많고 처음에는 유침상 담갈색의 적은 반점이 나타나다가 급속히 확대되어 과실전면에 회색 곰팡이가 밀생하며 미숙과는 담갈색의 건조한 병반을 만든다.

3) 토마토 잿빛곰팡이병

잎, 줄기, 과일에 주로 발병하며 특히 어린 과일에 큰 피해를 입히고, 어린식물에서는 잎, 줄기에 발생하고 잎에는 갈색의 큰 원형병반이 생기고, 줄기와 잎자루에는 암갈색의 수침상의 원형병반이 생긴다.

4) 상추 잿빛곰팡이병

시설재배에서 겨울부터 봄에 걸쳐 발생이 많고, 지면에 접한 잎에 수침상의 병반이 나타나는데 다습 조건에서 병반이 더욱 빨리 확대 된다.

5) 고추 잿빛곰팡이병

과일과 작은 가지를 주로 침해하며, 과일은 병든 꽃으로부터 전염되며 어린과일일 때 발병해서 담갈색으로 썩어 낙과하며 크게 자란 과일에는 비교적 적으며 파리형 고추는 시장에 출하한 후에도 발병되는 경우가 있고, 병징 최초의 증상으로는 잎의 뒷면에 서리와 같은 각이진 담백색 곰팡이가 아주 작게 생기고 잎의 표면에는 곰팡이가 거의 나타나지 않으며 담황색의 작은 반점무늬가 보인다.

이 병은 조직 중에 균사가 침입해서 내부에 기생함으로써 오이 등의 흰가루병과 같이 잎에 밀가루를 두껍게 바른 것 같은 증상을 나타내고, 증세가 진행되면 잎은 점차 황색으로 변하고 포기 밑 부분의 일찍 발병한 잎부터 떨어진다.

6) 호박 잿빛곰팡이병

병징은 잎이나 줄기 표면에 밀가루 같은 곰팡이가 생기고 나중에는 회색을 띠며 중앙에 흑색소립이 발생하고, 병이 더욱 진전되면 병든 잎은 누렇게 말라 죽는다.

7) 사과 잿빛곰팡이

병징은 과실, 잎, 과경, 잎자루 등 지상부 모든 부위에 발생하나 특히, 잎과 과실에서의 발생이 심고, 잎의 끝부분부터 병반이 시작되는 일이 많으며, 초기에는 갈색의 소형반점으로 나타나고, 진전되면 대형병반으로 확대되고, 심하면 잎 전체가 고사한다.

8) 수박 잿빛곰팡이병

다습할 때 발생하는 병해로서 반축성 재배에 특히 많고, 처음에는 꽃잎에 침해하고 차차 수술이나 암술, 꽃받침, 과피에 만연해 간다.

수확기의 과일은 1-2일 사이에 썩어문드러지고 회색가루 모양의 곰팡이가 밀생하고, 과일 꼭지와 잎자루의 아랫부분도 침해되기 쉬우며 개화 후 곧 발병한 것은 어린과일이 미이라 형상으로 갈변하나 어린과일이 조금 크게 되면 자갈색의 반점이 되어 비대하지 않고 수확량도 크게 줄어든다. 논과 저습지의 시설재배에서는 통로에 물이 들어 질퍽한 상태일 때 줄기와 잎, 과일에 부착되면 그 부분에 발생한다.

9) 배 잿빛곰팡이병

병징 잎에는 처음 수침상의 작은 반점이 형성되고 점차 진전되면서 갈색의 대형 병반으로 확대되고, 주로 잎 끝부분에서부터 발병되는 일이 많으며, 습하면 병반상에 잿빛의 분생포자가 밀생한다. 과실에는 주로 저장 중에 나타나며, 처음에는 과육이 변색되고, 심하면 과실전체가 부패한다.

목질원료 추출물의 잿빛곰팡이 균사생장 억제 능력 확인을 위한 기초실험으로서 잿빛곰팡이 균주를 확보하고 곰팡이의 생육인자를 분석하였다.



Hot pepper



Chrysanthemum



Pear leaf



Watermelon vine



Pumpkin



Grape



Tomato



Apple leaf



Strawberry



Cucumber



Lettuce



Gypsophila

Fig. 3-4-1. *Botrytis* spp. signs on various fruits and leaves

나. 재료 및 방법

1) 잿빛곰팡이 병의 곰팡이 균주 확보 및 계대배양

가) 균주확보 및 배양

공시균주는 생명공학연구소 유전자은행(KCTC)에서 분양받은 *Botrytis cinerea* (NO. 6973)와 경남 진주시 문산읍 산곡리 584-8번지 고추농가로부터 직접 채취한 *Botrytis* spp. 그리고 경남 진주시 금산면 가방리 1035번지 고추농가로부터 직접 채취한 *Botrytis* spp. 3종을 사용하였다. 각 농가에서 채취한 *Botrytis* spp.를 각각 *Botrytis* spp. from *Kumsan* 과 *Botrytis* spp. from *Munsan* 이라고 명명하였고, 잿빛곰팡이가 형성된 고추의 품종은 녹각이었다.

Fig. 3-4-2, Fig. 3-4-3, Fig. 3-4-4 및 Fig. 3-4-5는 *Botrytis* spp. from *Kumsan* 과 *Botrytis* spp. from *Munsan*이 수집된 각각의 현지 재배농가의 사진으로, Fig. 3-4-6은 본 연구진이 잿빛곰팡이병원균의 채취원으로 사용한 고추의 잎과 줄기의 사진이다.

Botrytis cinerea (KCTC : NO.6973), *Botrytis* spp. from *Kumsan* 및 *Botrytis* spp. from *Munsan*은 Potato dextrose agar (PDA, Difco), Potato sucrose agar (PSA, Difco)에 접종하여 25℃ 배양기 내에서 지속적으로 계대배양하여 실험에 사용하였다.(Fig. 3-4-7 참조) 곰팡이균의 보존은 25℃에서 4-7일간 배양된 *Botrytis* spp. 3종을 미네랄 오일로 채워진 각각의 튜브에 10mm pellet 3개씩 넣어 -75℃에서 냉동 보관하였으며 보존균주는 15일에 한번씩 계대 배양하였다.



Fig. 3-4-2. Pepper farm house (*Botrytis* spp. from *Kumsan*)



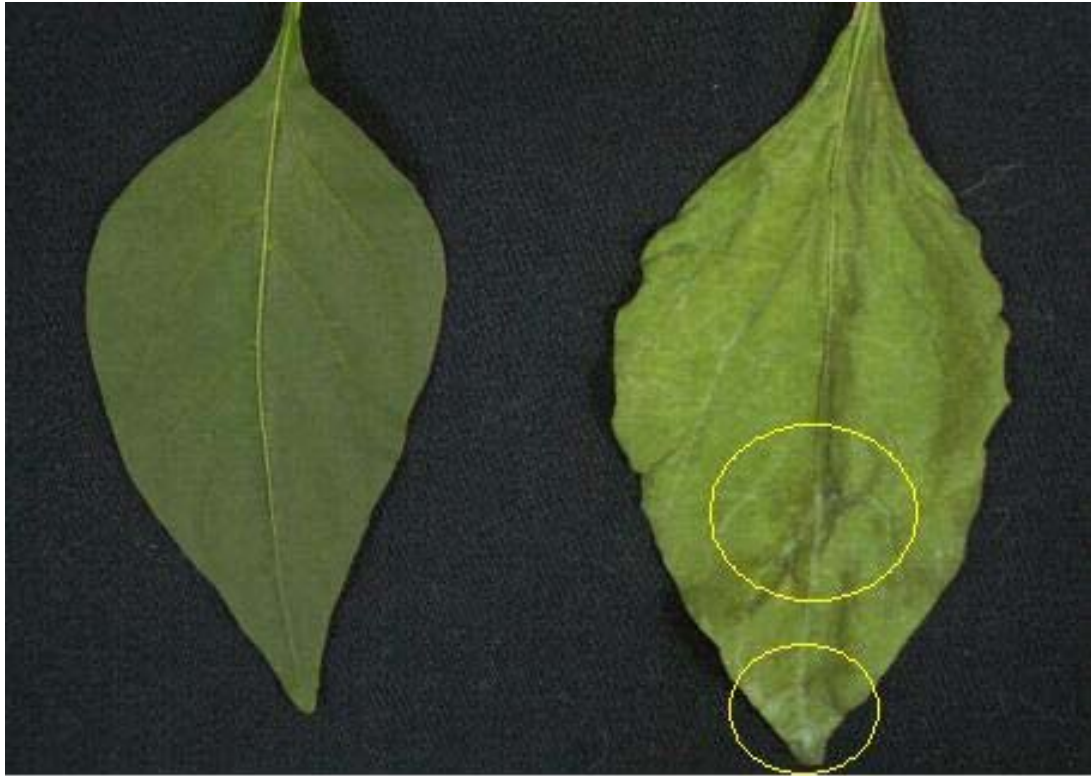
Fig. 3-4-3. Pepper farm house (*Botrytis* spp. from *Kumsan*)



Fig. 3-4-4. Pepper farm house (*Botrytis* spp. from *Munsan*)



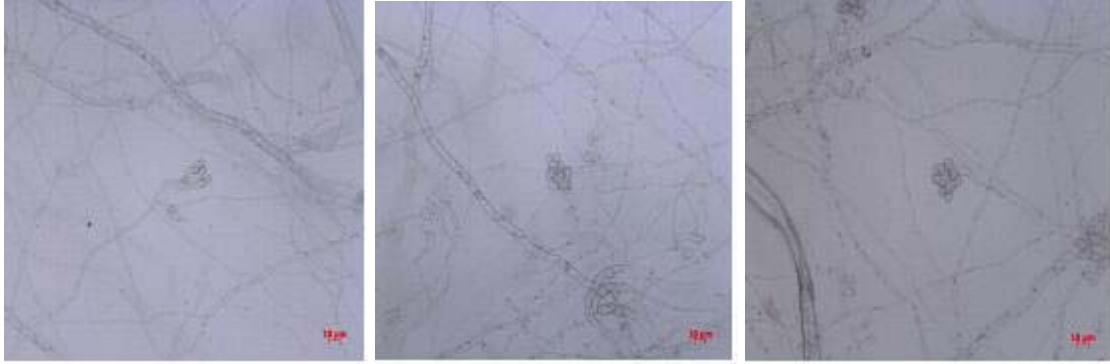
Fig. 3-4-5. Pepper farm house (*Botrytis* spp. from *Munsan*)



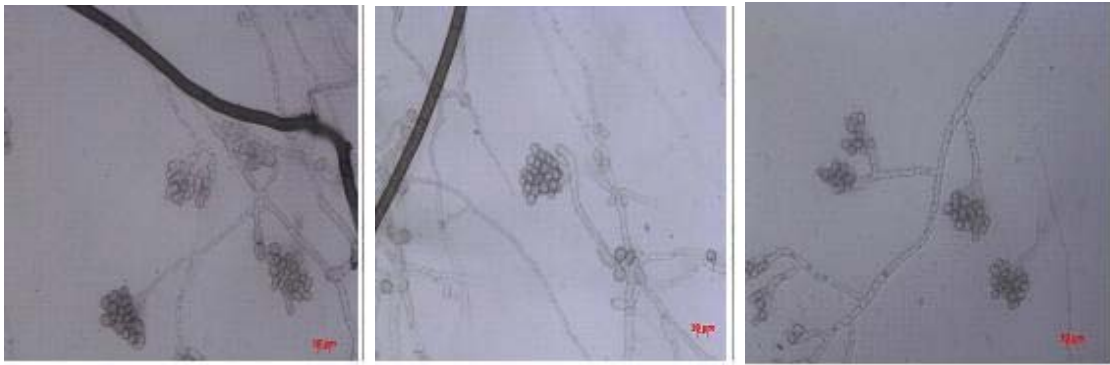
Sound leaf

Infected leaf

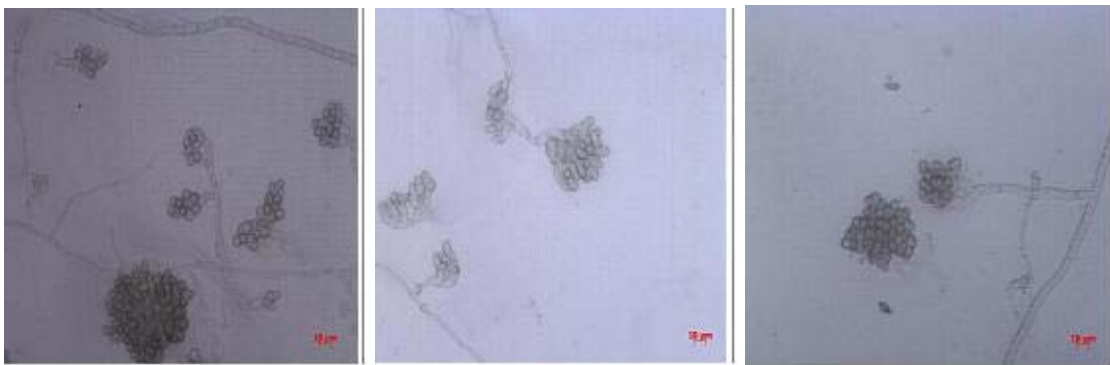
Fig. 3-4-6. *Botrytis* signs on hot pepper leaves.



Botrytis cinerea ($\times 200$)



Botrytis spp. from *Kumsan* ($\times 200$)



Botrytis spp. from *Munsan* ($\times 200$)

Fig. 3-4-7. *Botrytis* spp. spore and mycelium by microscope

2) 생육환경인자 분석

가) 최적배지탐색

최적생장배지 탐색에 사용된 배지 및 배지의 조성은 Table 3-4-1과 같다.

Table 3-4-1. Composition of various agar medium for growing of *Botrytis* spp.

| PDA (Potato Dextrose Agar) | PSA (Potato Sucrose Agar) | MA (Malt Agar) |
|-------------------------------|------------------------------|--------------------|
| Potato 300g | Potato 200g | Malt extract 30g |
| Glucose 20g | Sucrose 20g | Agar 20g |
| Agar 15g | Agar 20g | Distilled Water 1L |
| Distilled Water 1L | Distilled Water 1L | |

나) 최적온도 탐색

갯빛곰팡이 최적생장온도 탐색을 위한 생장온도 선택은 20℃, 25℃, 30℃로 하였으며, 항온항습기(제이오텍(주), BI-1000M)를 사용하였다.

다) 최적pH 탐색

갯빛곰팡이 최적 pH 탐색을 위하여 0.1N HCl과 0.1N NaOH를 사용하여 각각의 배지를 pH 3.0, pH 5.0, pH 7.0, pH 9.0으로 조절한 다음, 균주를 접종하였다.

3) 균사 성장량 측정

공시균주의 균사성장량은 Fig. 3-4-8과 같이 petri-dish상의 가로, 세로로 설정된 x, y 축을 기준으로 균사의 성장 길이를 버니어캘리퍼스로 측정한 후 x, y축 평균값을 사용하였으며, 5반복 평균값으로 평가하였다.

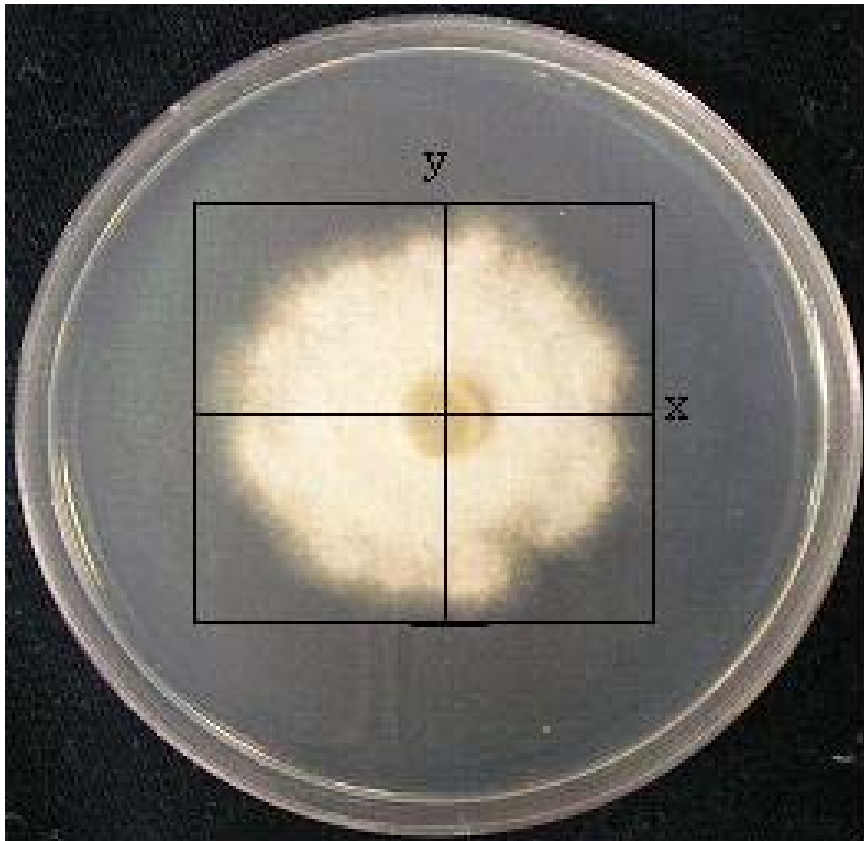


Fig. 3-4-8. Measurement method of mycelial growth for *Botrytis* on the medium.

Note: Measurement of mycelial growth length of horizontal direction on the basis of inoculation surface (mm).

다. 결과 및 고찰

1) *Botrytis cinerea*의 최적배지 및 최적온도.

가) 생장온도 20℃에서 최적배지.

Fig. 3-4-9는 *Botrytis cinerea*를 PSA배지, MA배지, PDA배지생장에 접종한 다음 20℃의 배양기에서 3 - 7일 성장시킨 다음 균사생장량을 비교한 결과이다. 20℃의 온도에서 7일 경과 되었을 때 균사생장량은 PDA배지에서 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로 PSA배지가 우수하였다. 하지만 성장초기의 균사생장량은 PSA배지가 PDA배지보다 5% 수준에서 유의성이 높게 나타났다.

Fig. 3-4-10은 20℃의 생장온도에서 *Botrytis cinerea*를 고체배지에 따른 균사 성장시킨 결과로, 배양 초기 3일에서는 세 가지 배지모두 비슷한 균사생장량을 나타내었지만, 5일 이후부터 PDA배지에서의 균사생장량이 높았다. 7일 경과 후 PDA배지와 PSA배지에서의 균사 생장량은 현저하게 MA배지보다 높게 나타났다.

나) 생장온도 25℃에서 최적배지.

Fig. 3-4-11은 25℃의 생장온도에서 고체배지종류를 달리하여 균사생장시킨 결과로, 균사생장량은 3일경과 후 PSA배지와 PDA배지에서 가장 높은 균사생장량을 나타내었다. 또한 7일 경과 후에서도 PSA배지 및 PDA배지가 가장 높은 균사생장량을 나타내었다.

Fig. 3-4-12는 25℃에서 *Botrytis cinerea*의 균사를 성장시킨 결과로, 3일 경과 후에는 3종의 배지 모두 균사생장량이 비슷하였다. 최종적으로 7일 경과 후에는 PSA배지 및 PDA배지에서의 균사생장량이 MA배지보다 높았다.

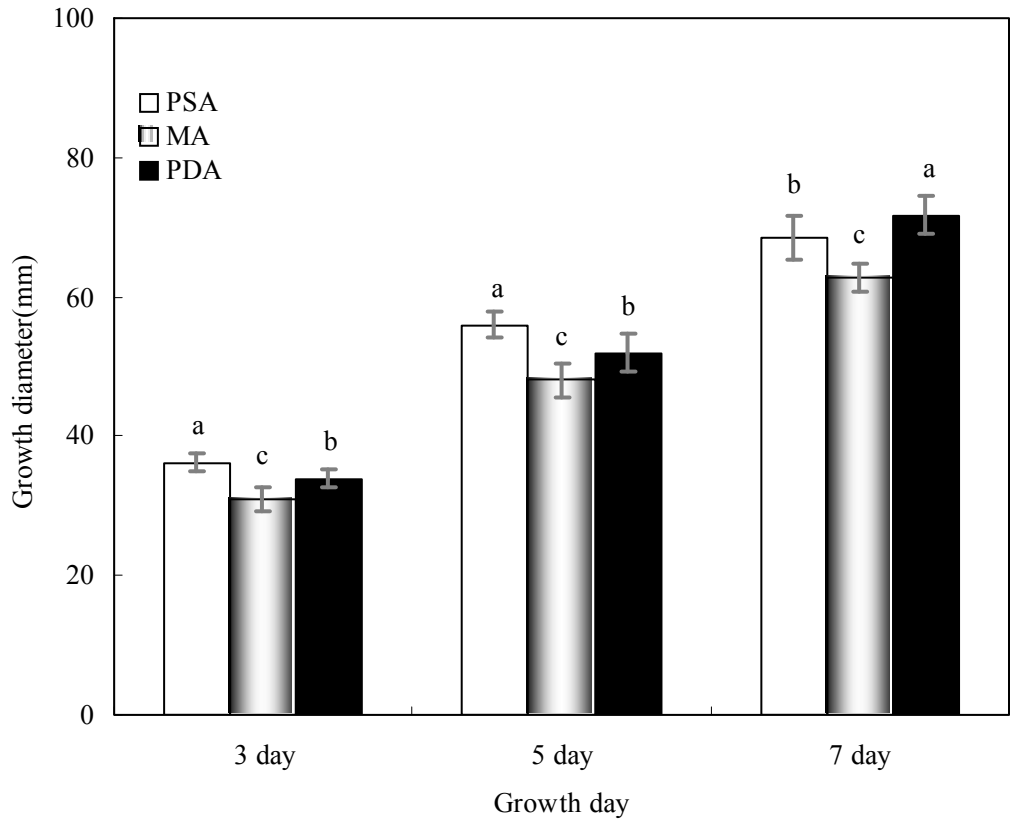


Fig. 3-4-9. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis cinerea* at 20°C.



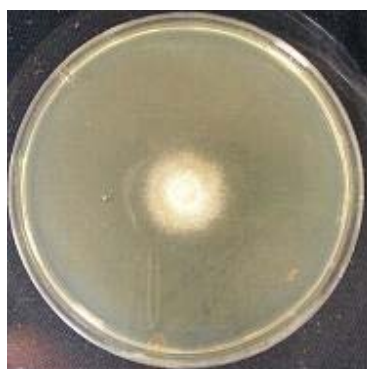
PSA medium, 3 days



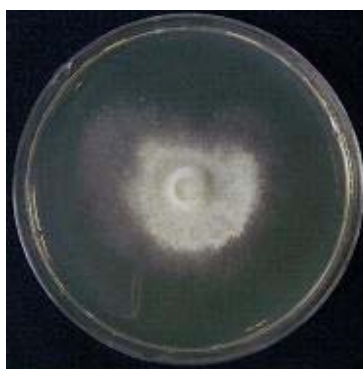
PSA medium, 5 days



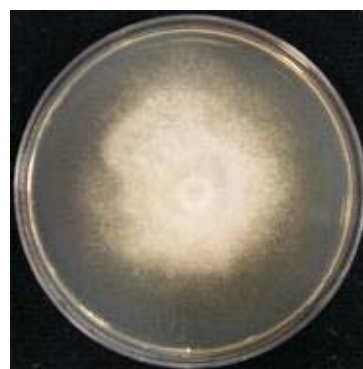
PSA medium, 7 days



MA medium, 3 days



MA medium, 5 days



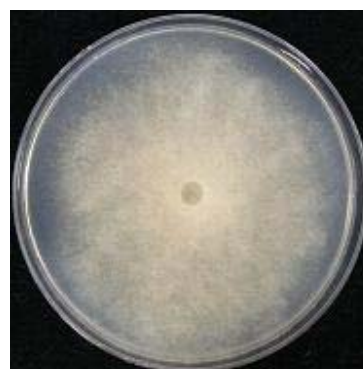
MA medium, 7days



PDA medium, 3 days



PDA medium, 5 days



PDA medium, 7days

Fig. 3-4-10. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis cinerea* at 20°C

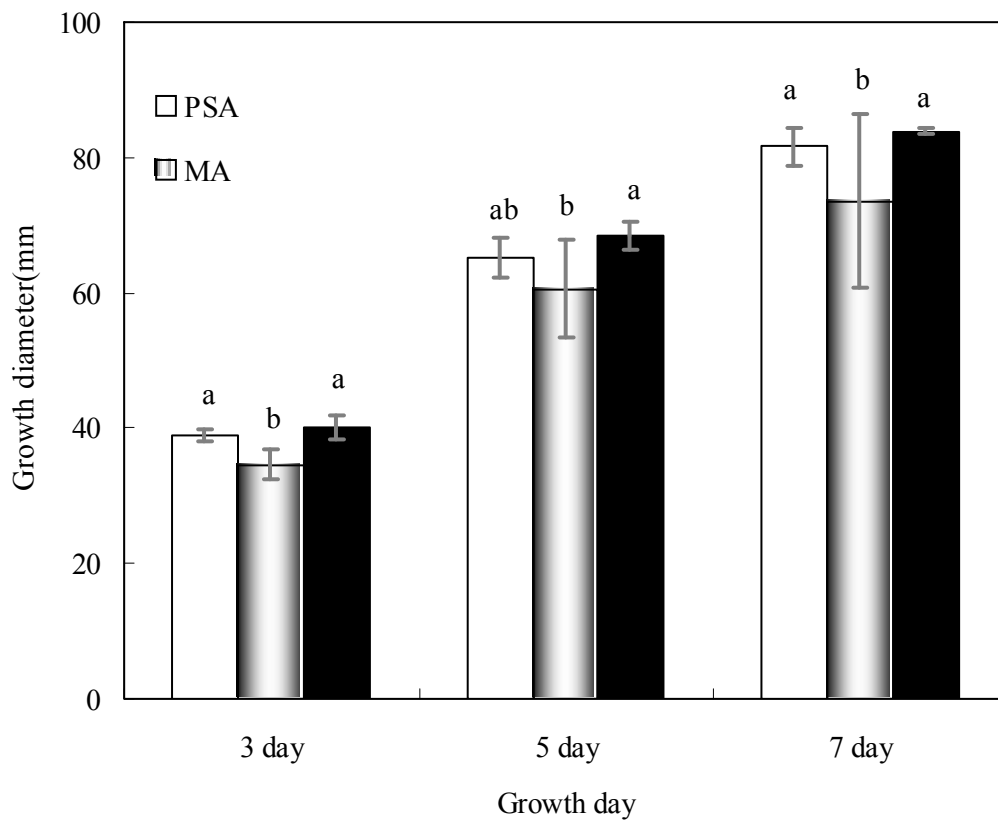
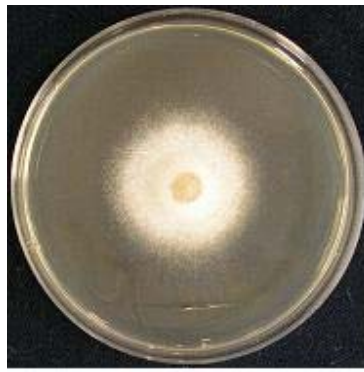


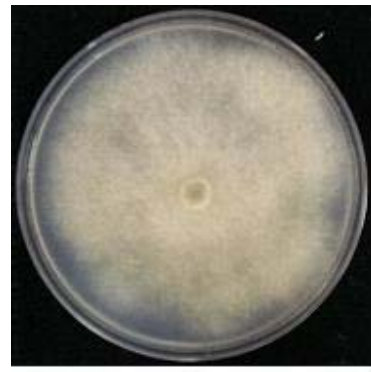
Fig. 3-4-11. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis cinerea* at 25°C.



PSA medium, 3 days



PSA medium, 5 days



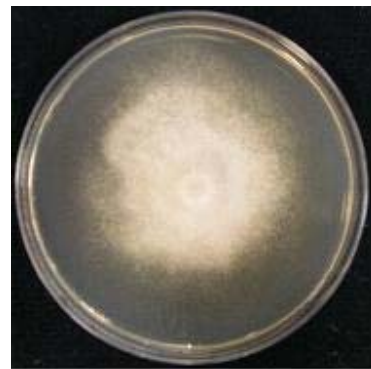
PSA medium, 7 days



MA medium, 3 days



MA medium, 5 days



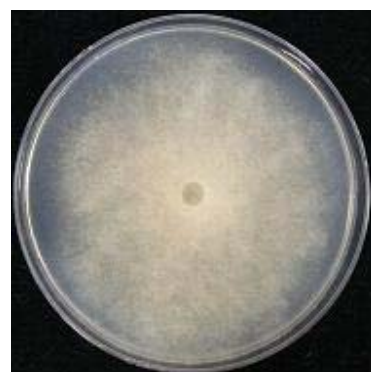
MA medium, 7 days



PDA medium, 3 days



PDA medium, 5 days



PDA medium, 7 days

Fig. 3-4-12. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis cinerea* at 25°C

다) 생장온도 30℃에서 최적배지.

Fig. 3-4-13은 30℃의 생장온도에서 *Botrytis cinerea*의 균사를 성장 시킨 결과로서 균사생장량은 7일 경과 후에도 40mm를 초과하지 못했다. 그러나 7일 경과 후 최적 균사생장량은 PSA배지에서 나타났다.

Fig. 3-4-14는 30℃에서 *Botrytis cinerea*의 균사생장량을 나타낸 사진으로 7일 경과 후에도 균사는 3종배지 전체표면의 50%를 차지하지 못했다.

라) 생장온도와 최적배지.

Fig. 3-4-15는 *Botrytis cinerea*를 각각의 온도에 배양 시켰을 때 배지에 따른 균사생장량을 나타낸 결과이다. 20℃의 생육온도에서는 PDA배지가 가장 성장량이 높았으며, 25℃에서는 PSA배지 및 PDA배지가 성장량이 높게 나타났고, 30℃에서는 PDA배지가 가장 높은 성장량을 나타내었다.

*Botrytis cinerea*의 최저 생육온도는 25℃라고 판단되며, 이때 최적의 배지는 PSA배지 및 PDA배지라고 판단되었다.

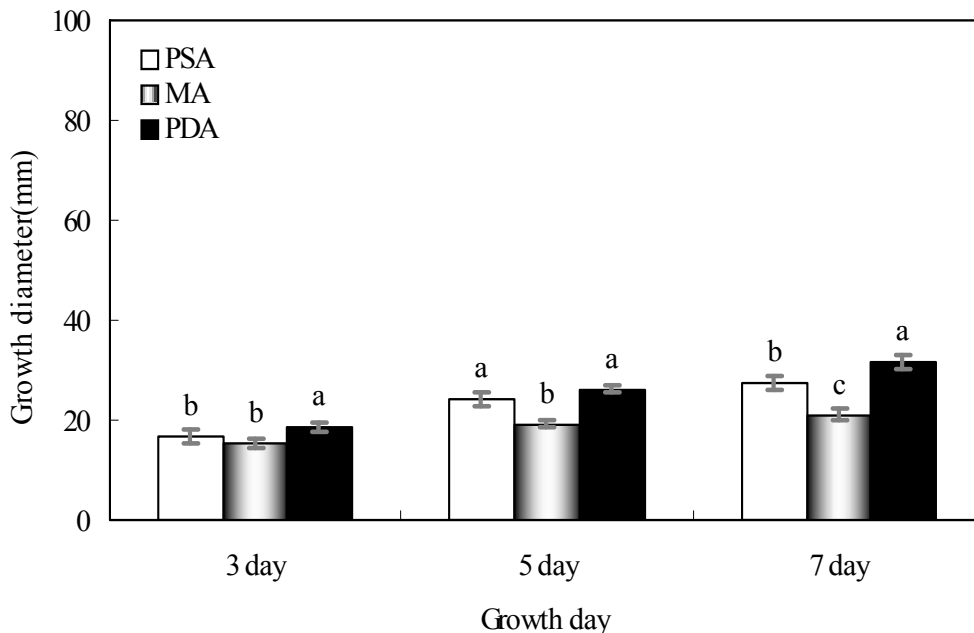


Fig. 3-4-13. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis cinerea* at 30℃.



PSA medium, 3 days



PSA medium, 5 days



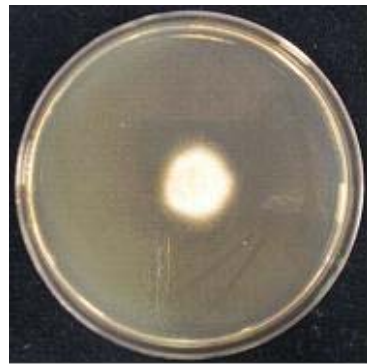
PSA medium, 7 days



MA medium, 3 days



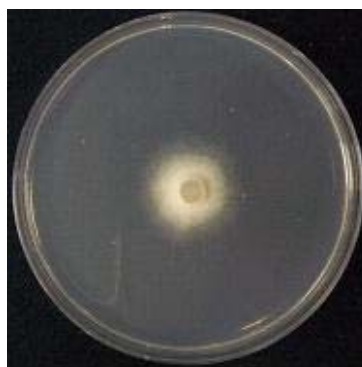
MA medium, 5 days



MA medium, 7 days



PDA medium, 3 days



PDA medium, 5 days



PDA medium, 7 days

Fig. 3-4-14. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis cinerea* at 30°C

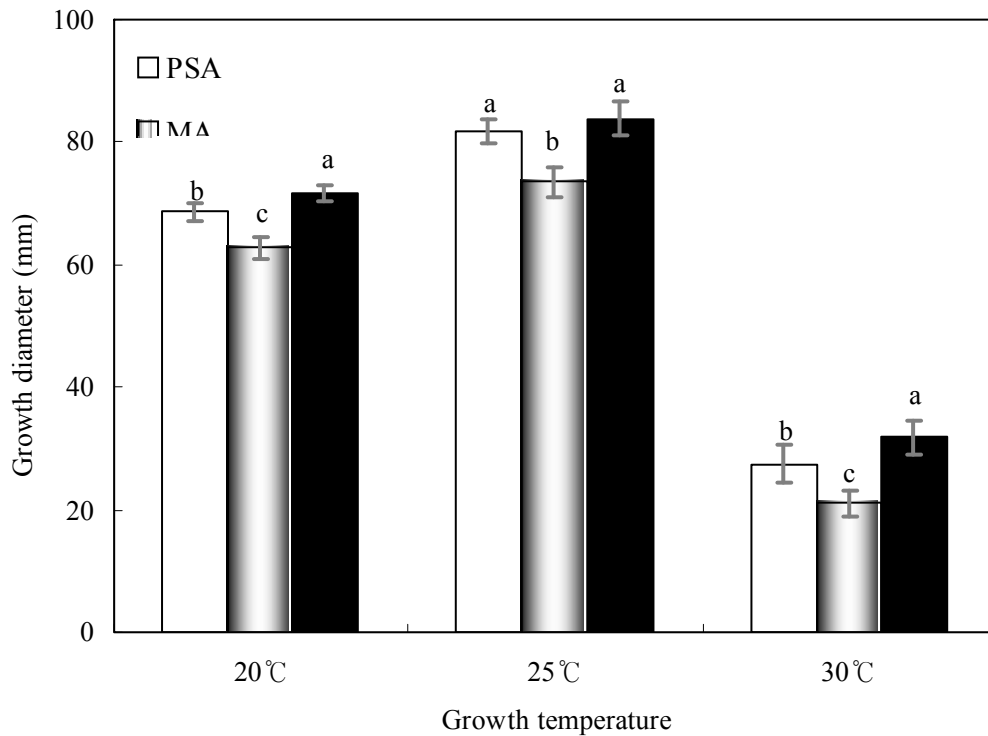


Fig. 3-4-15. Effect of medium on the mycelial growth of *Botrytis cinerea* in the various growth temperature

2) *Botrytis* spp. from *Kumsan*의 최적배지 및 최적 온도.

가) 생장온도 20°C에서 최적배지

Fig. 3-4-16은 *Botrytis* spp. from *Kumsan*을 PSA배지, MA배지 및 PDA배지에 접종한 다음 20°C의 배양기에서 성장시켰을 때 균사생장량을 나타낸 결과이다. 20°C에서 균사생장량은 5일 및 7일 경과 후에도 배지종류에 따른 균사생장량의 차이가 5% 수준에서 유의성이 나타나지 않았다. 그러므로 20°C의 *Botrytis* spp. from *Kumsan*에 적합한 배지는 3종 모두 가능하였다.

Fig. 3-4-17은 20°C의 생장온도에서 *Botrytis* spp. from *Kumsan*을 각각의 고체배지에서 균사를 성장시킨 결과로, 5일 및 7일 경과 후에도 배지에 따른 균사생장량 차이는 나타나지 않았다.

나) 성장온도 25℃에서 최적배지

Fig. 3-4-18은 25℃에서 배지에 따른 *Botrytis* spp. from *Kumsan*의 균사생장 결과로서, 5일 경과 후 균사의 생장은 최대에 다다랐고 7일 경과 후와 균사생장량은 차이가 없었다. 또한 배지의 종류에 따른 균사생장량 차이는 나타나지 않았다.

Fig. 3-4-19는 25℃의 온도에서 각각의 고체배지에 *Botrytis* spp. from *Kumsan*의 균사를 접종했을 때 성장된 모습을 나타낸 사진으로 5일 경과 후 3종의 배지에서 최대의 균사생장량을 나타내었으며, 배지의 종류에 따른 균사생장량 차이는 거의 육안으로 구분하기 힘든 수준이었다.

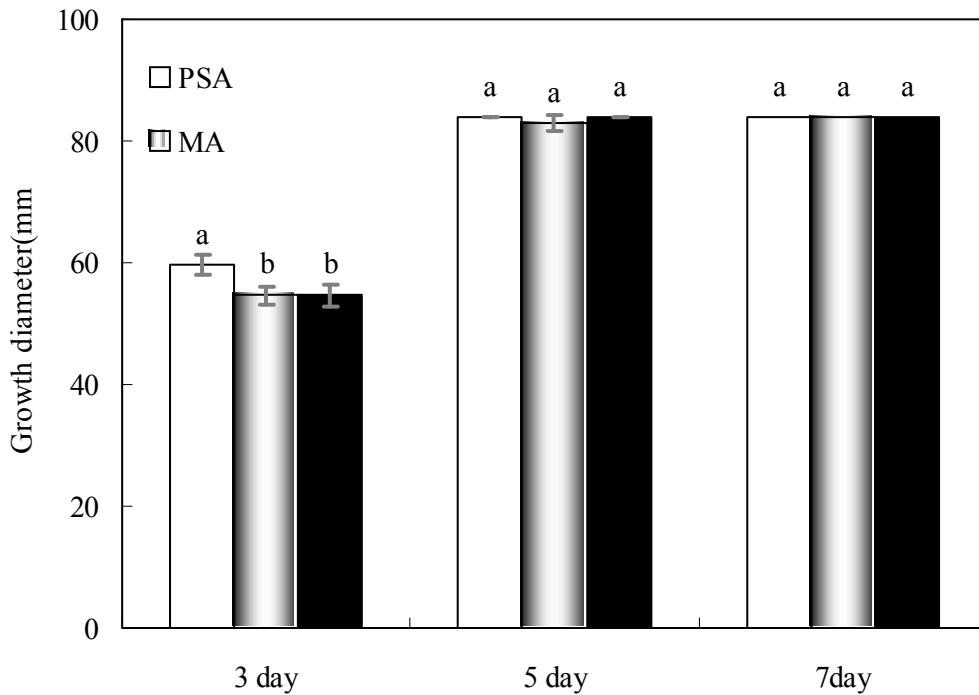


Fig. 3-4-16. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan* at 20℃



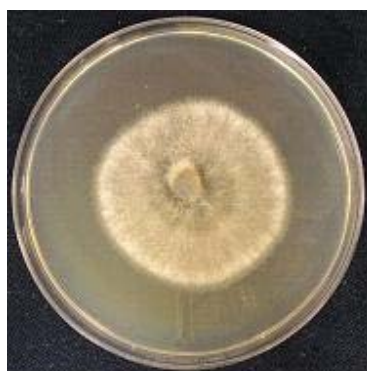
PSA medium, 3 days



PSA medium, 5 days



PSA medium, 7 days



MA medium, 3 days



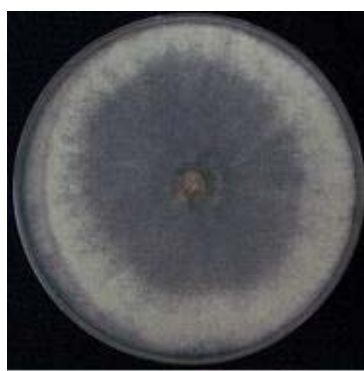
MA medium, 5 days



MA medium, 7 days



PDA medium, 3 days



PDA medium, 5 days



PDA medium, 7 days

Fig. 3-4-17. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan* at 20°C

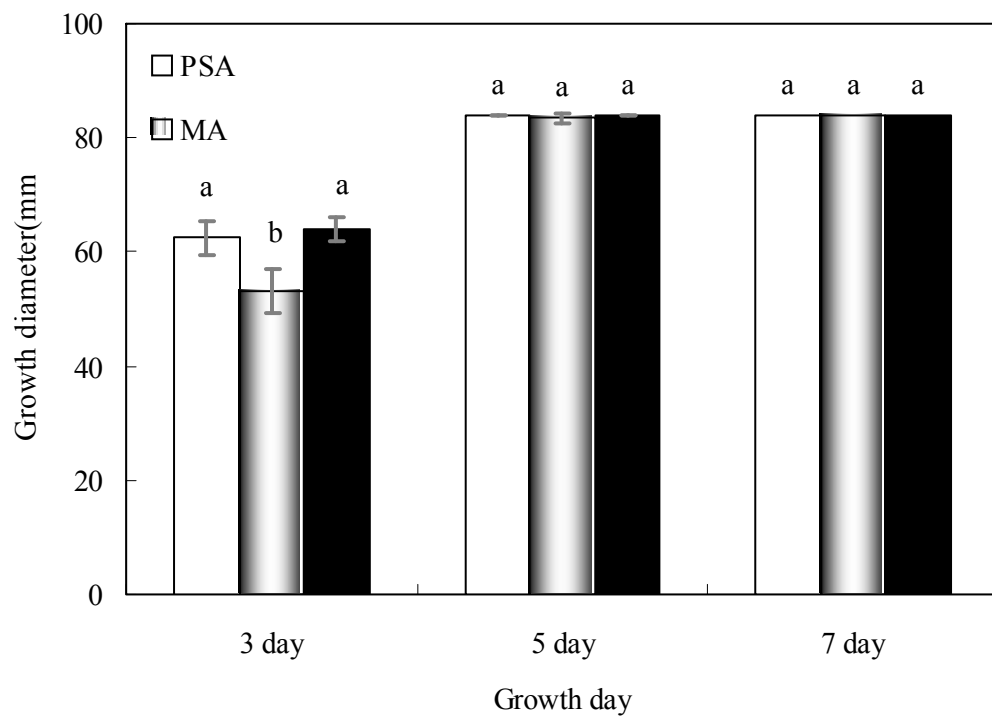


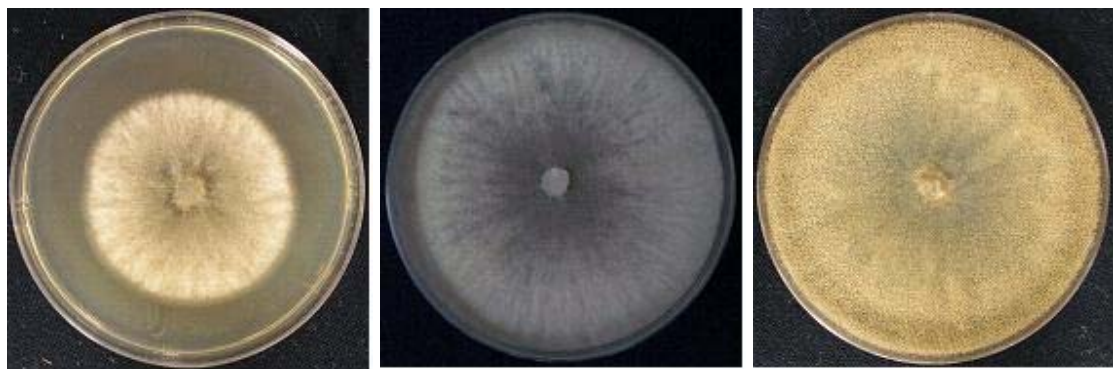
Fig. 3-4-18. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan* at 25°C



PSA medium, 3 days

PSA medium, 5 days

PSA medium, 7 days



MA medium, 3 days

MA medium, 5 days

MA medium, 7 days



PDA medium, 3 days

PDA medium, 5 days

PDA medium, 7 days

Fig. 3-4-19. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan* at 25°C

다) 생장온도 30℃에서 최적배지

Fig. 3-4-20은 30℃에서 PSA배지, MA배지 및 PDA배지를 각각 달리하여 *Botrytis* spp. from *Kumsan*의 균사를 성장시켰을 때 나타난 결과이다. 경과일 수에 관계없이 MA배지에서 가장 높은 균사생장량을 나타내었으며, 나머지 2가지 배지는 거의 동일한 균사생장량을 나타내었다.

Fig. 3-4-21은 30℃의 생육조건에서 배지를 달리하여 균사를 성장시켰을 때 경과일 수에 따라서 촬영된 사진으로 5일과 7일이 경과되어도 균사생장량은 전체배지 표면적의 50%를 초과하지 못했다.

라) 생장온도와 최적배지.

Fig. 3-4-22는 *Botrytis* spp. from *Kumsan*을 각각의 온도에서 배양하였을 때 배지에 따른 균사생장량을 나타낸 것이다. 20℃ 및 25℃에서의 경우 배지의 종류와 상관없이 잘 자랐지만, 30℃에서는 MA배지가 가장 높은 생장량을 나타내었다. 그러므로 *Botrytis* spp. from *Kumsan*의 균사생장 최적온도는 20℃와 25℃라고 판단되었으며, 이때 최적배지는 PSA배지 및 MA배지라고 판단된다.

3) *Botrytis* spp. from *Munsan*의 최적배지 및 최적온도.

가) 생장온도 20℃에서 최적배지

Fig. 3-4-23은 *Botrytis* spp. from *Munsan*을 PSA배지, MA배지 및 PDA배지에 접종한 다음 20℃의 배양기에서 성장시킨 후 균사생장량을 나타낸 결과이다. 20℃의 온도에서 균사생장량은 5일 및 7일 경과 후 모든 배지에서 균사생장량이 동일하게 나타났고, 이 결과는 5% 수준에서 유의성이 나타나지 않았다.

Fig. 3-4-24는 20℃의 생장온도에서 *Botrytis* spp. from *Munsan*을 각각의 고체배지에 접종하여 균사생장시킨 사진으로, 균사생장량은 3종의 배지에서 큰 차이가 없었다.

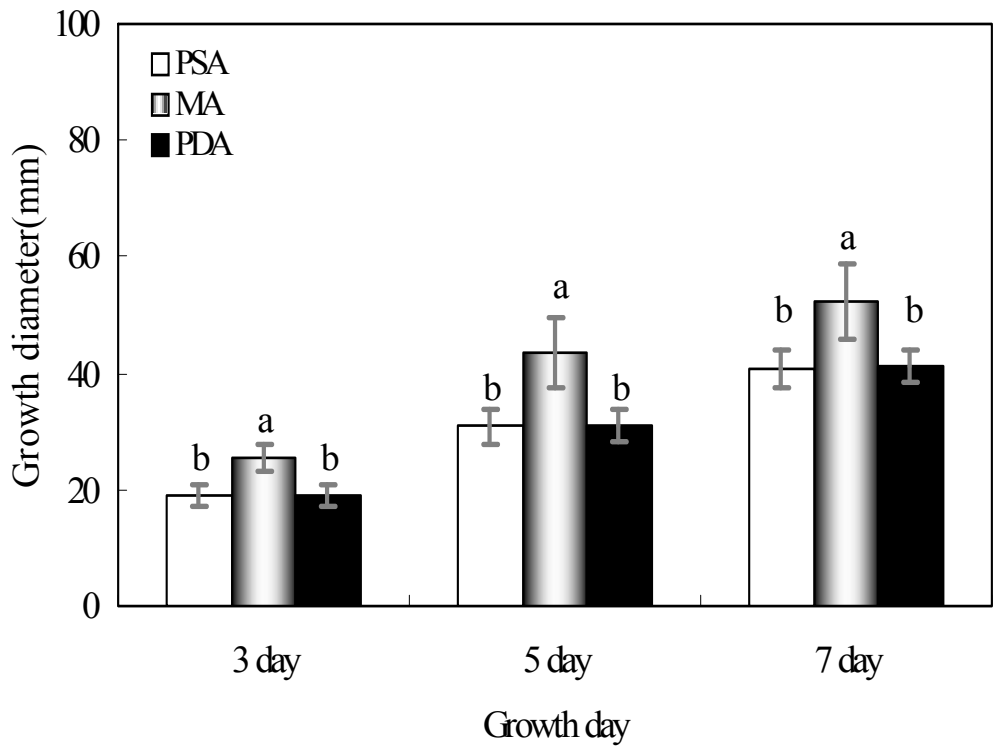
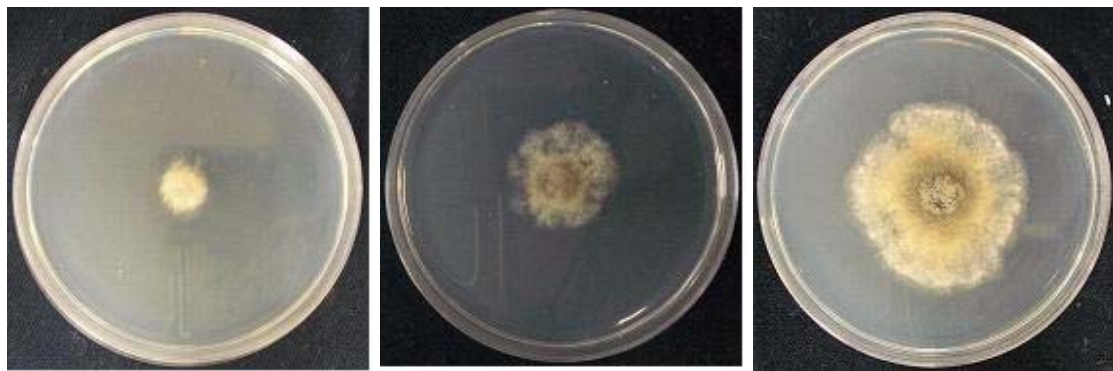


Fig. 3-4-20. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan* at 30°C



PSA medium, 3 days

PSA medium, 5 days

PSA medium, 7 days



MA medium, 3 days

MA medium, 5 days

MA medium, 7 days



PDA medium, 3 days

PDA medium, 5 days

PDA medium, 7 days

Fig. 3-4-21. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan* at 30°C

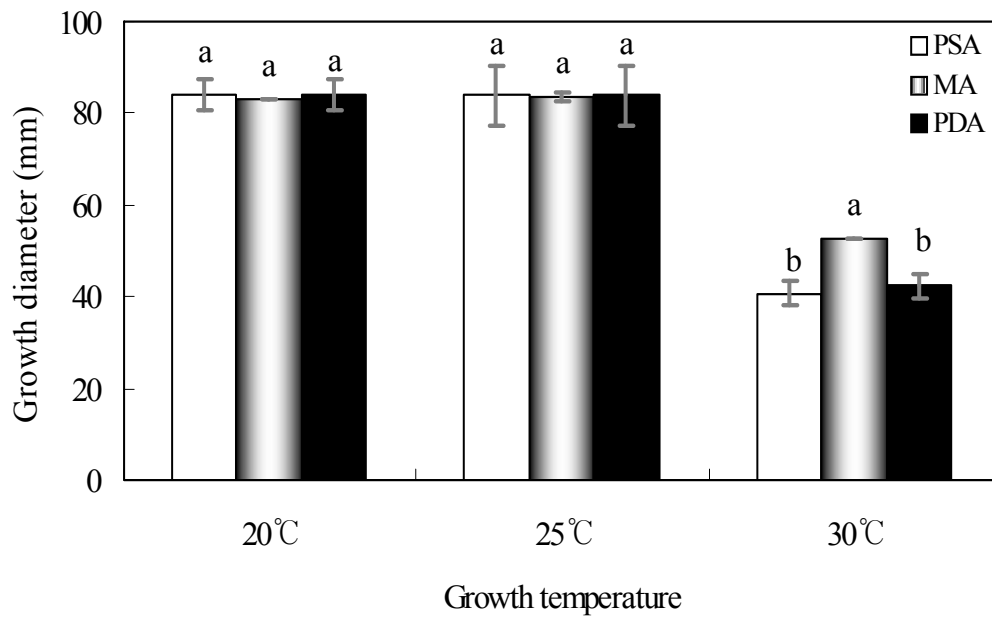


Fig. 3-4-22. Effect of medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan* in the various growth temperature

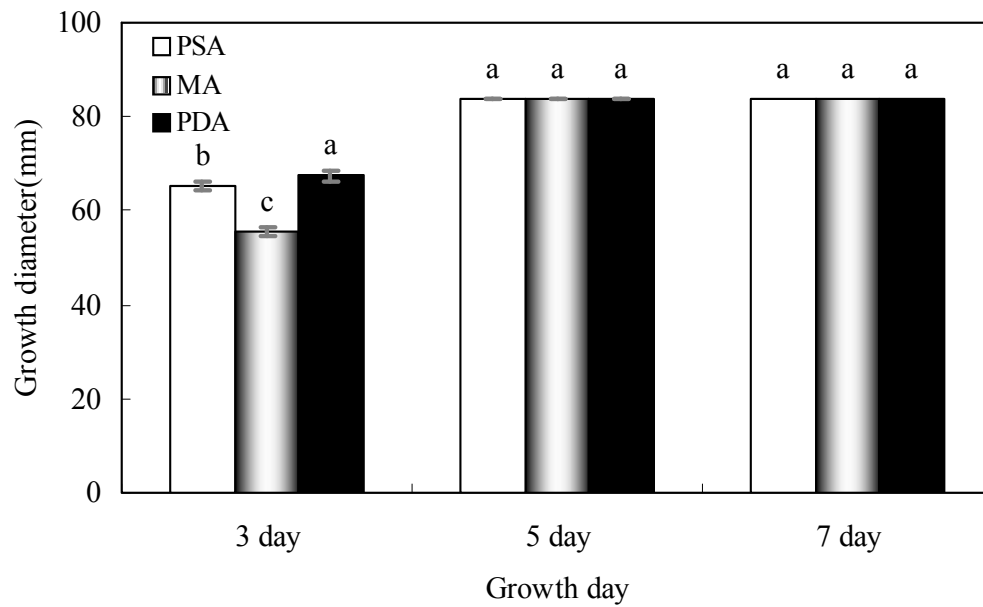
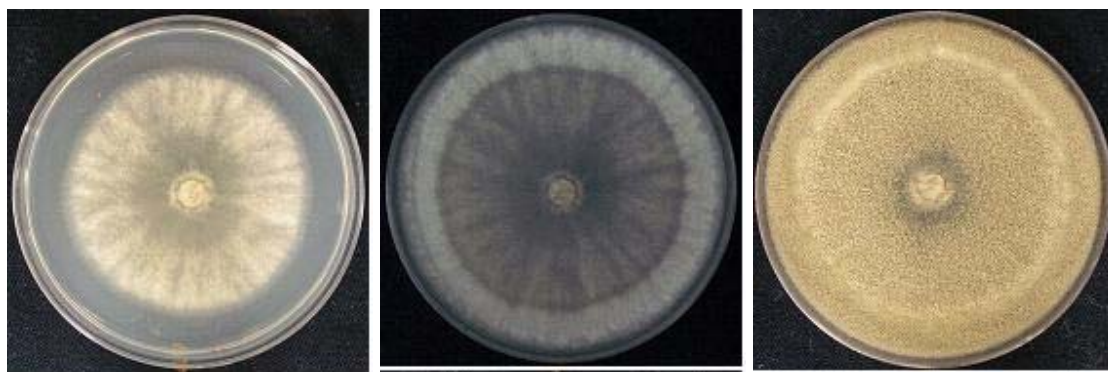


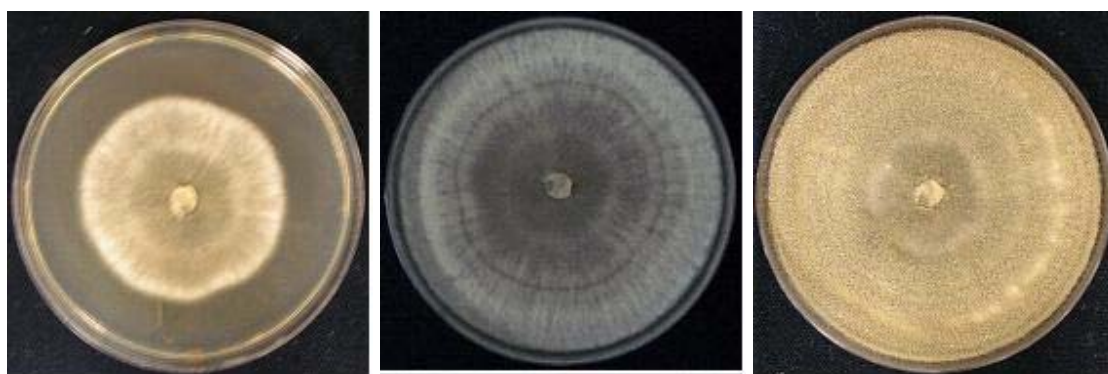
Fig. 3-4-23. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan* at 20°C



PSA medium, 3 days

PSA medium, 5 days

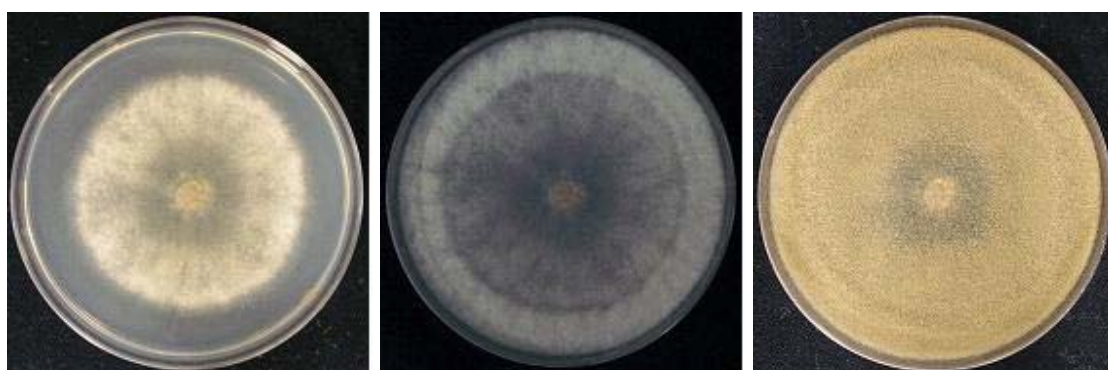
PSA medium, 7 days



MA medium, 3 days

MA medium, 5 days

MA medium, 7 days



PDA medium, 3 days

PDA medium, 5 days

PDA medium, 7 days

Fig. 3-4-24. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan* at 20°C

나) 생장온도 25℃에서 최적배지

Fig. 3-4-25는 25℃의 생장온도에서 고체배지 종류를 달리하여 군사생장시킨 결과로, 군사생장량은 20℃와 비교하였을 때 약간 높은 군사생장량을 나타냈다. 5일 및 7일 경과 후 3종의 배지에 따른 군사생장량 차이는 5% 수준에서 유의성이 나타나지 않았다. 그러므로 25℃에서 최적 배지는 3종 모두 가능하다고 판단되었다.

Fig. 3-4-26은 25℃에서 배지의 종류를 달리하여 군사를 생육시켰을 때 경과일 수에 따라서 성장된 모습이다. 5일 이후에서의 군사생장량은 큰 차이가 없었으며, 배지의 종류에 따른 군사생장량 차이는 관찰되지 않았다.

다) 생장온도 30℃에서 최적배지

Fig. 3-4-27은 30℃에서 *Botrytis* spp. from *Munsan*을 PSA배지, MA배지 및 PDA배지 각각에 접종한 다음 경과일 수에 따른 군사생장량을 나타낸 결과로, 모든 시험구에서 군사생장량은 최대 40mm로 나타남으로서 군사생장량은 매우 저조하였다. 하지만 PDA배지가 다른 2가지 배지보다 높은 생장량을 나타내었으며, 이때 5% 수준에서 유의성이 나타났다.

Fig. 3-4-28은 30℃에서 배지의 종류를 달리하여 *Botrytis* spp. from *Munsan*의 군사를 생육시켰을 때, 경과일 수에 따라서 성장된 모습이다. 5일 경과 후에도 군사의 생장은 매우 저조하였으며, 7일 경과 후에도 군사생장은 20℃ 및 25℃와 비교해볼 때 매우 낮은 수준이다. 7일 경과 후 최적 배지로는 PDA배지가 유리하다고 판단되었지만, 결론적으로 *Botrytis* spp. from *Munsan*은 30℃의 생육온도에서 낮은 군사생장을 나타내었다.

라) 생장온도와 최적배지

Fig. 3-4-29는 *Botrytis* spp. from *Munsan*을 각각의 온도에서 배양하였을 때 배지에 따른 군사생장량을 나타낸 것이다. 20℃ 및 25℃의 생육온도에서 *Botrytis* spp. from *Munsan*의 경우 *Botrytis* spp. from *Kunsan*과 동일하게 배지에 상관없이 빠른 군사생장을 보였지만 30℃의 생육온도에서는 PDA배지에서 군사생장량이 가장 높게 나타났다.

결과적으로 *Botrytis* spp. from *Munsan*의 군사생장 최적온도는 20℃와 25℃라고 판단되었으며, 이때 최적배지는 PSA배지, MA배지 및 PDA배지라고 판단된다.

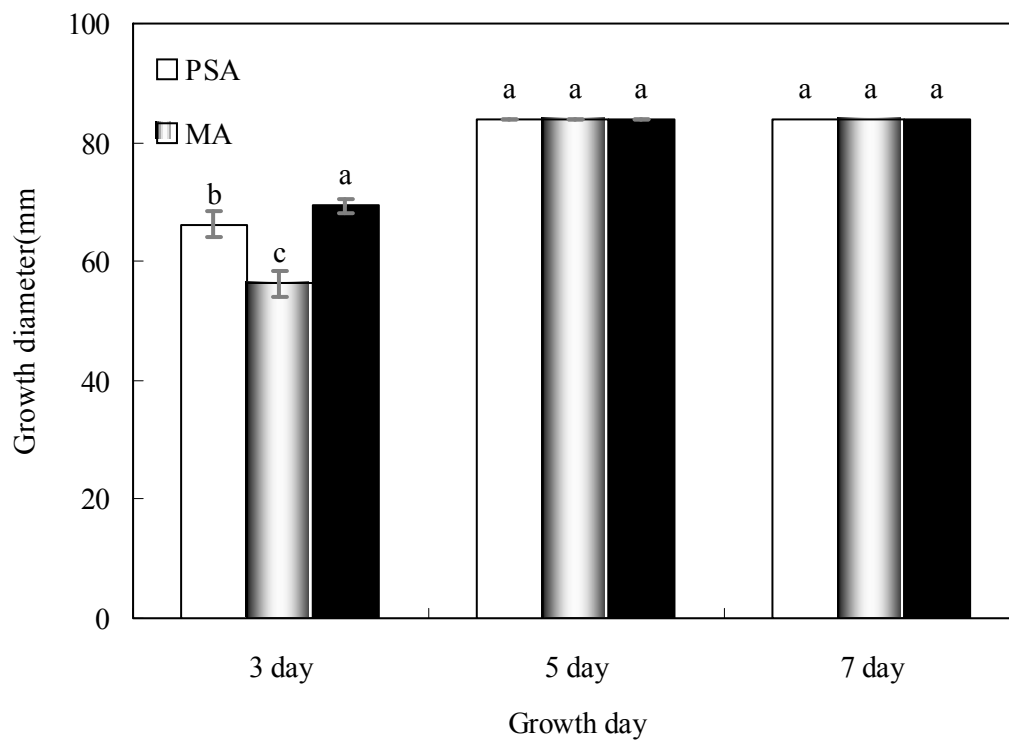
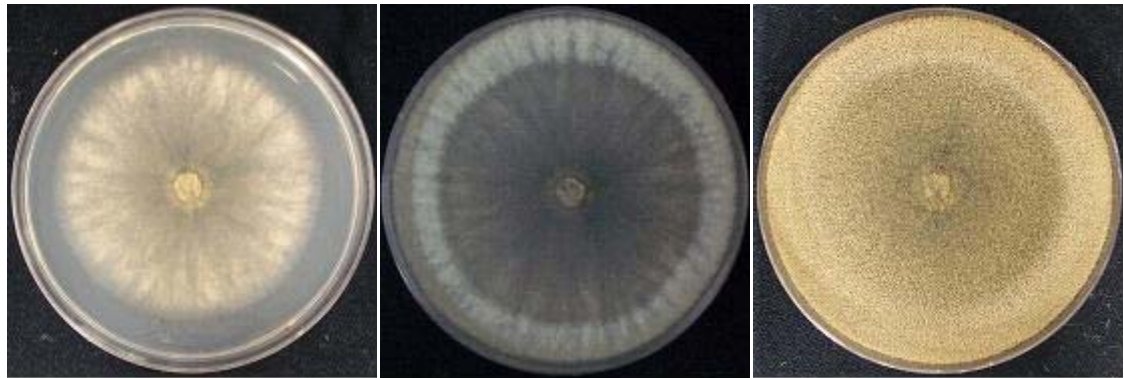


Fig. 3-4-25. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan* at 25°C



PSA medium, 3 days

PSA medium, 5 days

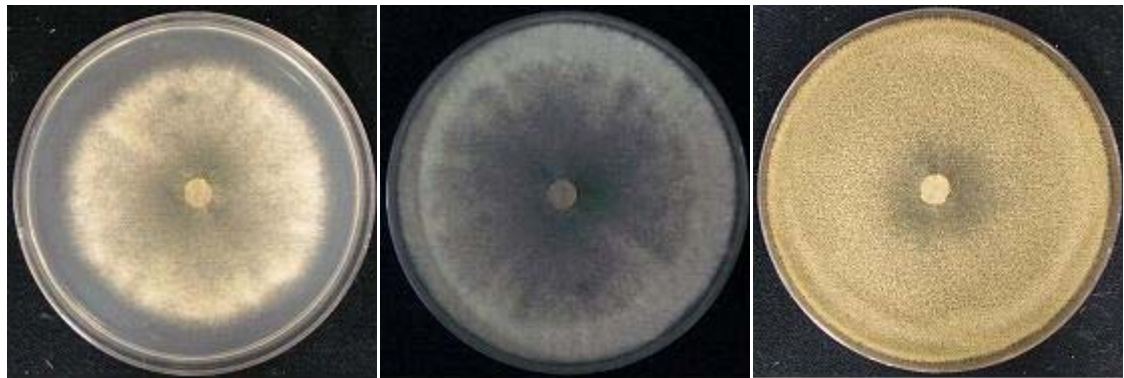
PSA medium, 7 days



MA medium, 3 days

MA medium, 5 days

MA medium, 7 days



PDA medium, 3 days

PDA medium, 5 days

PDA medium, 7 days

Fig. 3-4-26. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan* at 25°C

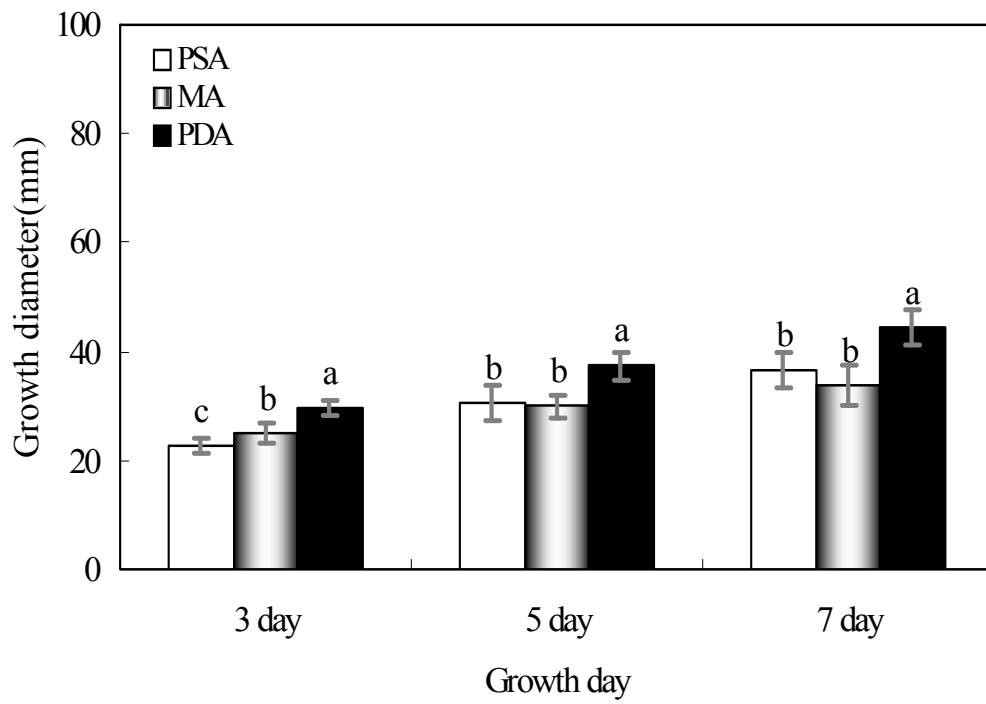


Fig. 3-4-27. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan* at 30°C



PSA medium, 3 days

PSA medium, 5 days

PSA medium, 7 days



MA medium, 3 days

MA medium, 5 days

MA medium, 7 days



PDA medium, 3 days

PDA medium, 5 days

PDA medium, 7 days

Fig. 3-4-28. Effect of various agar medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan* at 30°C

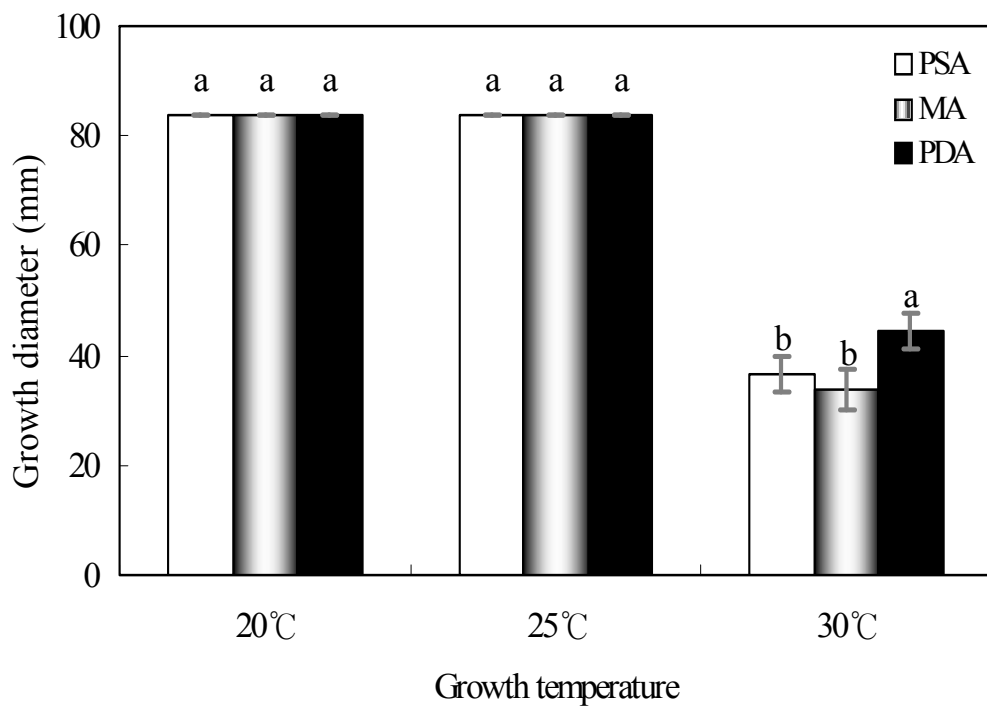


Fig. 3-4-29. Effect of medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan* in the various growth temperature

4) *Botrytis cinerea* 생육을 위한 배지의 최적 pH.

Fig. 3-4-30은 25°C에서 PDA배지의 pH를 각기 달리하여 *Botrytis cinerea* 균사를 생장시킨 결과로서, 생장일 수에 상관없이 pH 5.0과 pH 7.0에서 높은 생장량을 나타내었다. 특히 pH 5.0의 생장량은 pH 7.0 보다 생장량이 높았다. 이때 pH 5.0과 pH 7.0간의 균사생장량 차이에 있어서 유의성은 인정되지 않았다.

Fig. 3-4-31은 각기 다른 pH를 나타내는 PDA배지에서 *Botrytis cinerea*의 균사생장을 단계적으로 나타낸 사진이다. 배양 후 3일이 경과 되었을 때 pH에 따른 균사생장량은 큰 차이가 없었지만 5일 이후부터 pH 5.0과 pH 7.0의 배지에서 균사생장량이 육안적으로 높게 나타났다.

5) *Botrytis* spp. from *Kumsan* 생육을 위한 배지의 최적 pH.

Fig. 3-4-32는 25°C에서 PDA배지의 pH를 각기 달리하여 *Botrytis* spp. from *Kumsan* 균사를 생장시킨 결과로서, 생장일 수에 상관없이 pH 5.0과 pH 7.0에서 높은 생장량을 나타내었다. 특히 pH 5.0과 pH 7.0 배지간의 균사생장 차이는 거의 나타나지 않았다. pH 9.0 배지는 pH 3.0 배지보다는 균사생장량이 높게 나타났다.

결과적으로 *Botrytis* spp. from *Kumsan* 의 생육을 위한 PDA 배지의 최적 pH는 pH 5.0과 pH 7.0이었다.

6) *Botrytis* spp. from *Munsan* 생육을 위한 배지의 최적 pH.

Fig. 3-4-33은 25°C에서 PDA배지의 pH를 각기 달리하여 *Botrytis* spp. from *Munsan* 균사를 생장시킨 결과로서, 생장일 수에 상관없이 pH 5.0과 pH 7.0에서 높은 생장량을 나타내었다. 배양기간 3일에서는 pH 7.0배지가 pH 5.0 배지보다 균사생장량이 높았지만 5일 및 7일 경과 후에는 pH 5.0과 pH 7.0 배지사이에서 균사생장량 차이는 5% 수준에서 유의성이 나타나지 않았다.

결과적으로 *Botrytis* spp. from *Munsan* 의 생육을 위한 PDA 배지의 최적 pH는 pH 5.0과 pH 7.0이었다.

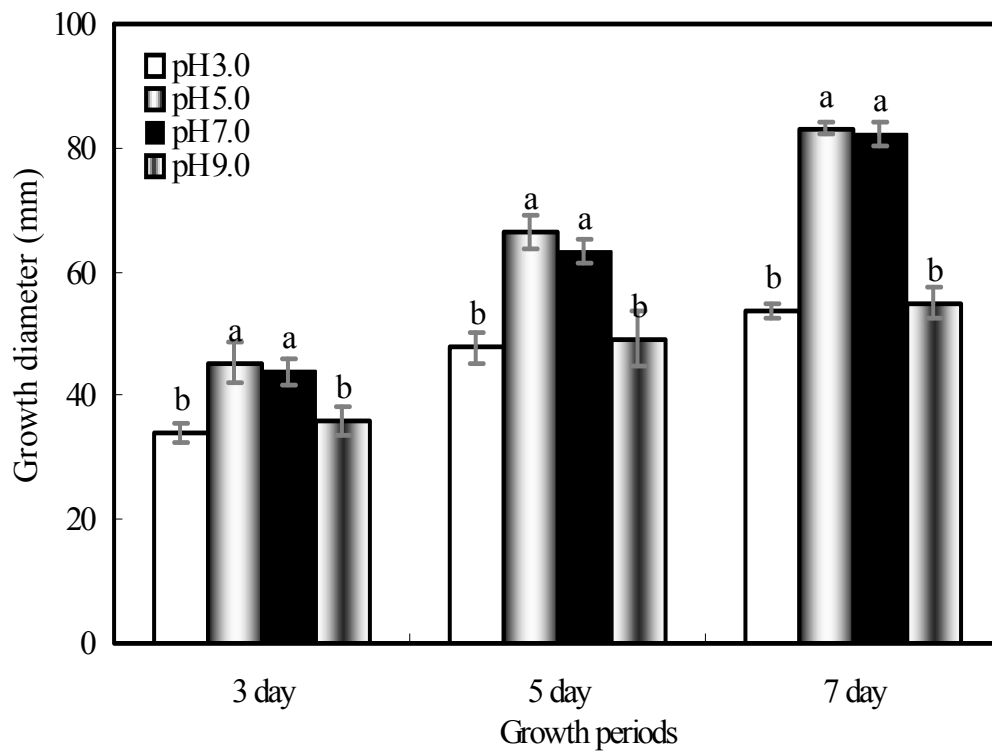


Fig. 3-4-30. Effect of pH of PDA medium on the mycelial growth of *Botrytis cinerea* at 25°C

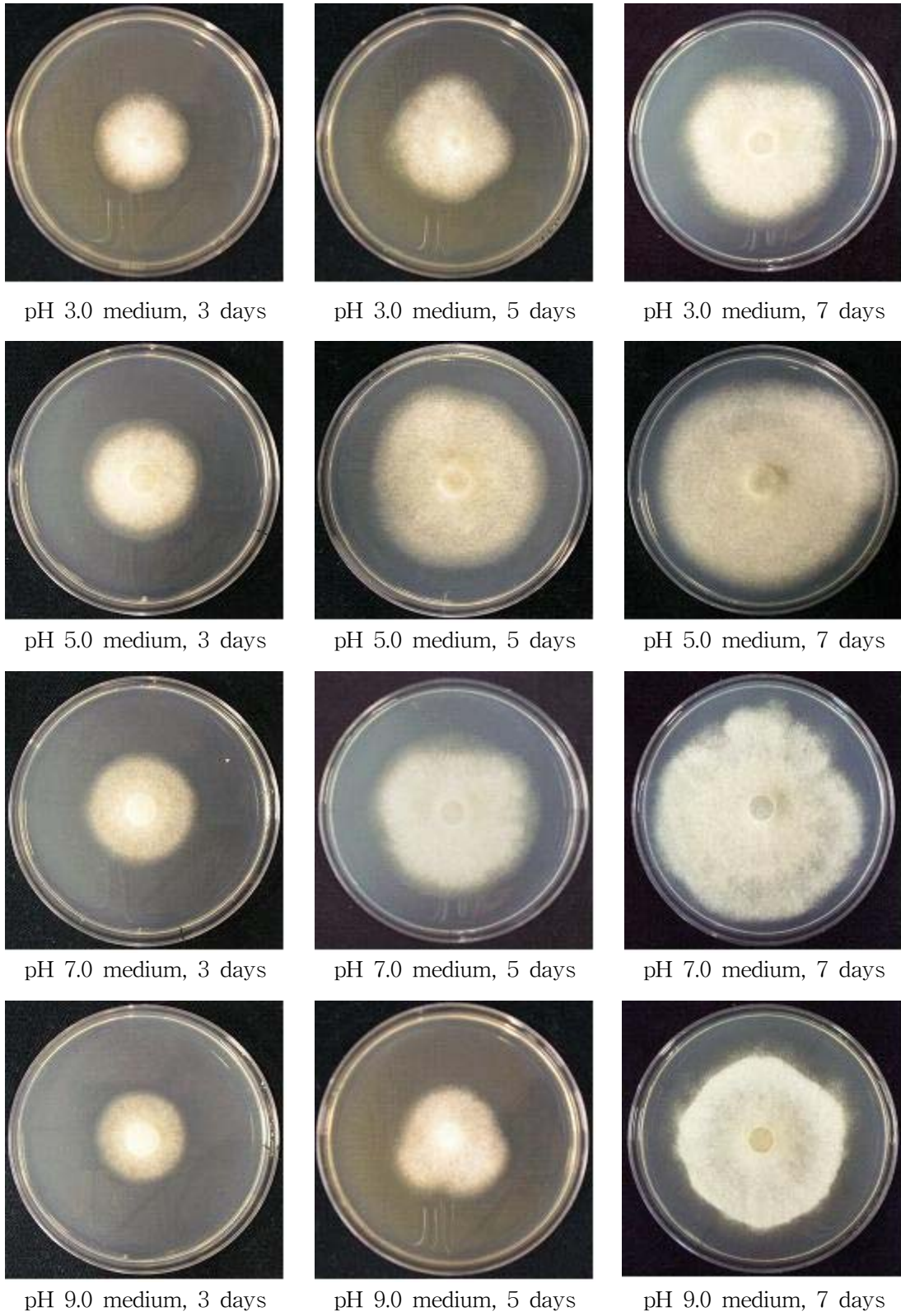


Fig. 3-4-31. Effect of pH of PDA medium on the mycelial growth of *Botrytis cinerea* at 25°C

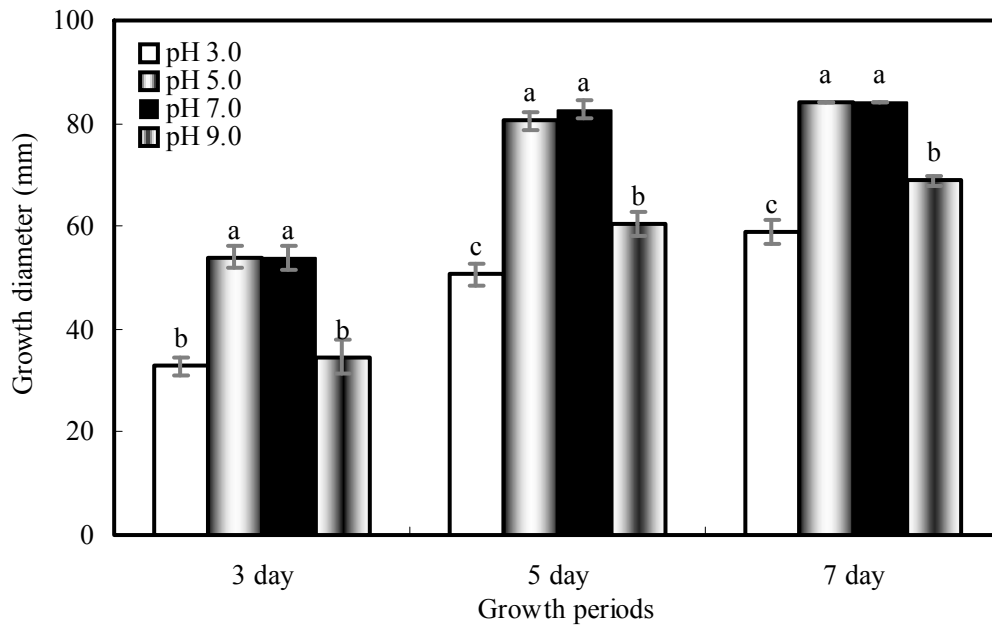


Fig. 3-4-32. Effect of pH of PDA medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan* at 25°C

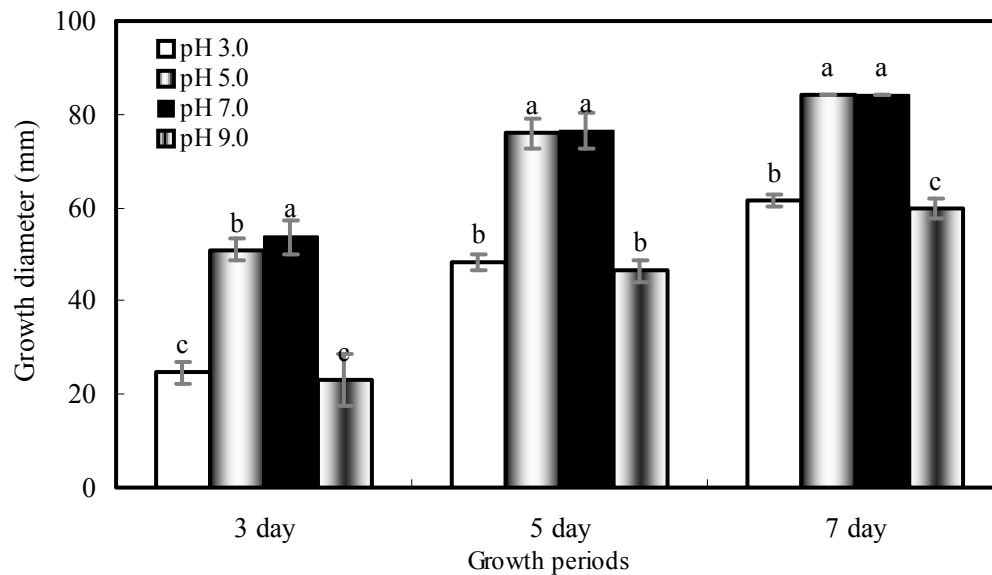


Fig. 3-4-33. Effect of pH of PDA medium on the mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan* at 25°C

라. 결 론

*Botrytis cinerea*는 균사생장 최적온도는 25℃이며 최적생장배지는 PSA배지 및 PDA배지라고 판단되었다. *Botrytis spp. from Kumsan*의 최적생장온도는 20℃ 및 25℃이며, 최적배지는 PSA배지, MA배지 및 PDA배지로 판단되었다.

*Botrytis spp. from Munsan*의 최적 생장온도는 20℃ 및 25℃이며, 최적배지는 PSA배지, MA배지 및 PDA배지로 판단되었다. *Botrytis cinerea*의 생육을 위한 PDA배지에 있어서 최적 pH는 pH 5.0과 pH 7.0이었다. *Botrytis spp. from Kumsan*의 생육을 위한 PDA배지에 있어서 최적 pH는 pH 5.0과 pH 7.0이었다.

*Botrytis spp. from Munsan*의 생육을 위한 PDA배지에 있어서 최적 pH는 pH 5.0과 pH 7.0이었다.

2. 제1과제로부터 제공받은 목질 원료로부터 잣빛 곰팡이 생육억제 물질의 추출을 위한 추출법 도출

가. 서 설

잣빛곰팡이병은 우리나라의 시설재배 시 가장 큰 문제가 되고 있는 지상부 병해로 채소뿐만 아니라 화훼재배에서도 큰 피해를 가져오고 있다. 일반 노지재배에서는 비가 계속적으로 오게 되는 장마철을 제외하고는 거의 발생하지 않는다. 하우스재배에서만 국한하여 발생하는 가장 큰 이유는 병원균의 생태적 특성에서 오는 것으로 병원균이 온도가 낮고 포화습도에 가까운 조건에서 포자형성, 발아 및 기주체 침입이 이루어지기 때문에 억제재배 이후의 축성, 반축성 재배시의 겨울 봄까지의 저온기 하우스 재배환경이 이러한 조건에 합치되기 때문이다. 과채류의 경우는 개화 후 꽃 부분에서 발병하여 열매로 번지므로 과실의 피해에 의한 직접적인 수량감수를 초래하고 운송중이나 시장의 판매 시에도 과실을 하는 가장 중요한 원인 이 되고 있다. 우리나라에서 피해가 큰 채소 작목을 보면 오이, 호박, 토마토, 고추, 가지, 상치, 시금치, 딸기, 파, 양파, 부추 등이고 이외에 튕립, 카네이션, 국화, 장미, 제라늄 등의 화훼에도 발생 하여 적지 않은 피해를 가져오고 있다.

현재 약제방제는 병원균의 발병진전이 급격히 이루어지므로 발병초기에 예방적으로 수행되어야 한다. 현재까지 이병의 방제에 침투이행성 전문약제 및 광범위 보호 살균제가 상당수 고시되어 있다. 이들 약제 중 베노밀, 푸로파, 빈졸, 지오판, 이프로 등 전문약제들은 연용시 내성균이 생기므로 광범위 약제와 혼용하여 사용하거나 교호 살포해야 한다.

잣빛 곰팡이병의 발병 및 생육억제 제품개발을 위하여 주관연구기관인 (주) 유림하이텍이 제공한 목재원료로부터 유효한 화합물 추출을 시도 하였다.

나. 재료 및 방법

1) 공시균주

가) *Botrytis cinerea* (KCTC : NO.6973)

시판품의 항균활성 성능평가에 사용되는 공시균주인 *Botrytis cinerea*(NO.6973)는 한국 유전자은행(KCTC)으로부터 분양받아 PDA 및 PSA배지를 사용하여 25℃ 배양기 내에서 배양하여 실험에 사용하였다.

나) *Botrytis* spp. from *Kumsan*

경남 진주시에 위치한 고추농가 (경남진주시 금산면 가방리 1035번지)에서 잿빛곰팡이 병에 감염된 고추 잎을 채취한 다음, PSA배지 및 PDA배지를 사용하여 균주를 분리, 25℃에서 배양하여 실험에 적용하였다. 고추농가에서 채취한 잿빛곰팡이를 *Botrytis* spp. from *Kumsan*이라 명명하였다.

다) *Botrytis* spp. from *Munsan*

경남 진주시에 위치한 고추농가 (경남진주시 문산읍 산곡리 584-8번지)에서 잿빛곰팡이 병에 감염된 고추 잎을 채취한 다음, PSA배지 및 PDA배지를 사용하여 균주를 분리, 25℃에서 배양하여 실험에 적용하였다. 고추농가에서 채취한 잿빛곰팡이를 *Botrytis* spp. from *Munsan*이라 명명하였다.

2) 목질원료의 추출

가) 목질원료 추출물의 조제

주관기관인 유림하이텍으로 목질원료를 제공받아 이로부터 잿빛곰팡이의 생육을 저해하는 원료를 선별하기 위하여 열수추출, 메탄올 추출과 에탄올 추출을 실시하여 열수추출물, 메탄올 추출물, 에탄올 추출물을 획득하였다. 추출물 분말의 수율은 투입된 목질원료의 전건중량을 기준으로 하여 획득된 추출물 분말 중량의 백분율로 표시하였다.

나) 열수추출물의 조제 및 배지조제

반응용기에 목질원료 20 g(전건중량기준)과 증류수 500 ml를 첨가하여 충분히 교반 한 다음, 121℃에서 30분 반응시킨 다음, 여과하여 추출액을 획득하였다.

추출액은 50℃의 감압건조기에서 일정 수준까지 건조시킨 다음, 냉동건조기를 이용하여 동결건조 후, 추출물 분말을 획득하고 이를 1000ppm, 500ppm, 250ppm 및 125ppm 농도로 PDA배지에 첨가하였다. 추출물 분말은 배지 멸균 후 첨가하였다.

다) 메탄올추출물 및 에탄올추출물의 조제 및 배지조제

반응용기에 목질원료 20 g(전건중량기준)과 메탄올 (또는 에탄올) 500 ml를 첨가하여 실온에서 24시간 교반 한 다음, 여과하여 추출액을 획득하였다.

추출액은 50℃의 감압건조기에서 일정 수준까지 건조시킨 다음, 냉동건조기를 이용하여 동결건조 후, 추출물 분말을 획득하고 이를 1000ppm, 500ppm, 250ppm 및 125ppm 농도로 PDA배지에 첨가하였다. 추출물 분말은 배지 멸균 후 첨가하였다.

3) 항균활성 측정 및 통계처리

가) 항균활성 측정

추출물의 일정한 농도로 함유된 배지에 계대배양된 *Botrytis* spp. 균주 3종으로부터 10 mm의 균사 pellet을 분리하여 접종한 다음 25℃에서 배양하였다. 이때 대조구는 추출물이 첨가되지 않은 배지를 사용하였다. 항균활성은 식 1에 의거하여 계산하였으며, 균사생장량은 5반복 평균값을 사용하였다.

$$\text{항균활성, \%} = \left\{ 1 - \frac{\text{시험구의 균사생장길이(mm)}}{\text{대조구의 균사생장길이(mm)}} \right\} \times 100 \dots\dots \text{식 (1)}$$

나) 통계처리

Botrytis spp. 3종의 항균활성에 대한 통계분석을 위하여 각 계통의 5개체 5반복 값을

Micro office EXCEL을 이용하여 표준편차를 나타내었으며 각 실험구 사이의 유의성은 SAS Corporate Statistics GLM의 Release 8.01을 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan의 multiple range test로 분석하였다.

다. 결과 및 고찰

1) 추출물 분말의 수율

열수, 메탄올 및 에탄올 추출에 의한 추출물 분말의 사진은 Fig. 3-4-34 에 나타내었다.

열수 추출물의 수율은 32%로 가장 높게 나타났고, 그 다음이 메탄올 추출물 26%, 에탄올 추출물 18% 였다.

추출물의 색상은 열수추출물이 가장 밝은 색상을 나타냈으며, 메탄올 및 에탄올 추출물은 약간 짙은 갈색을 나타냈다.

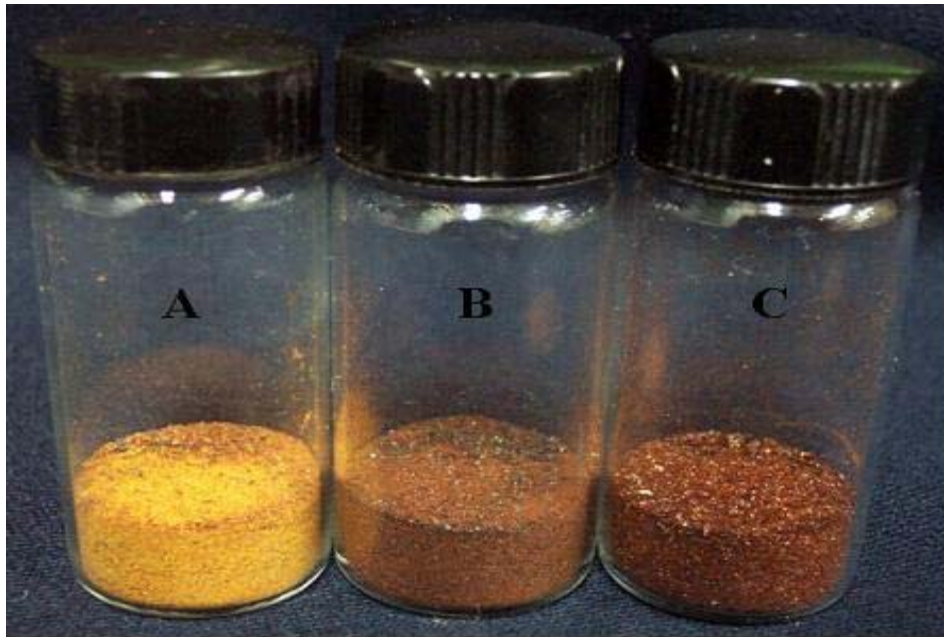


Fig. 3-4-34. Water, methanol and ethanol extracts from wood materials
A : Water extract, B : Methanol extract, C : Ethanol extract

2) 목질추출물의 항균활성

가) *Botrytis cinerea*에 대한 추출물의 항균활성

(1) 열수추출물

Fig. 3-4-35와 Fig. 3-4-36은 *Botrytis cinerea*에 대한 열수추출물의 항균활성을 나타낸 결과 및 사진으로서, 125 ppm 이상의 열수추출물 농도에서 잿빛곰팡이 항균 활성이 나타났으며, 추출물 농도의 증가에 따라 약간 높은 항균활성을 나타냈지만, 추출물 농도에 따른 유의성은 없었다. 1000 ppm의 농도에서는 30% 이상의 항균활성을 나타냈다.

Fig 3-4-36의 사진에서 보는 바와 같이 대조구에 비해 열수추출물은 *Botrytis cinerea*에 대하여 항균활성이 나타나며, 125 ppm이하에서도 항균활성의 가능성이 있다고 판단되었다.

(2) 메탄올 추출물

Fig. 3-4-37과 Fig. 3-4-38은 *Botrytis cinerea*에 대한 메탄올 추출물의 항균활성을 나타낸 결과로, 열수 추출물과 마찬가지로 125 ppm 이상의 농도에서 항균활성이 나타났고, 이때의 항균활성은 약 25% 수준이었다. 500 ppm이상의 농도에서 250 ppm과 유의성이 나타났으며, 500 ppm의 농도와 1000 ppm 농도사이에 있어서 항균활성에 대한 유의성은 나타나지 않았다.

Fig. 3-4-38에서 보는 바와 같이 500 ppm 이상에서 분명한 저해 경계가 나타났으며, 저농도에서의 항균활성도 확인 되었다.

(3) 에탄올 추출물

Fig. 3-4-39와 Fig. 3-4-40은 *Botrytis cinerea*에 대한 에탄올 추출물의 항균활성을 나타낸 결과로서 125 ppm의 저농도에서도 항균활성은 나타났으며, 추출물 농도가 1000 ppm까지 증가되더라도 5% 수준에서 유의성은 나타났지만, 급격한 항균활성 증가는 나타나지 않았다. Fig. 3-4-40에서 보는 바와 같이 항균활성은 육안으로도 확인 할 수 있었으며, 메탄올 추출처럼 분명한 저해 경계는 나타나지 않았다.

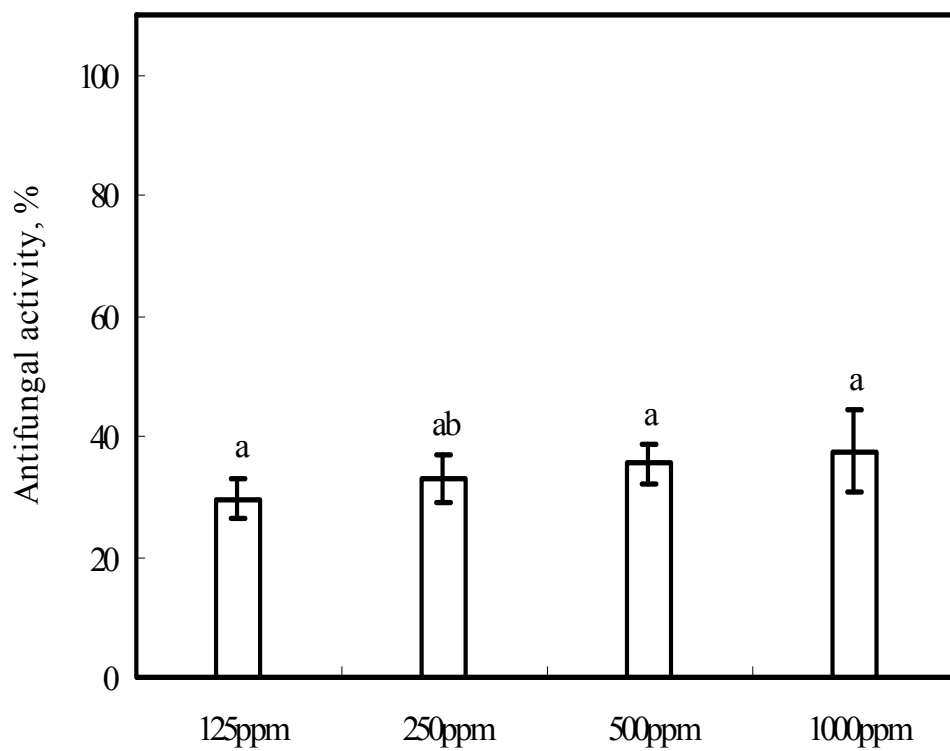
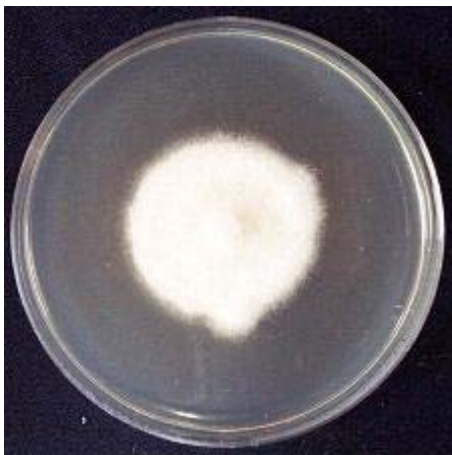


Fig. 3-4-35. Antifungal activity of water extract against *Botrytis cinerea* for 7days.



Control



1000ppm



500ppm



250ppm



125ppm

Fig. 3-4-36. Effect of concentration of water extract with each parts per million to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis cinerea* for 7days.

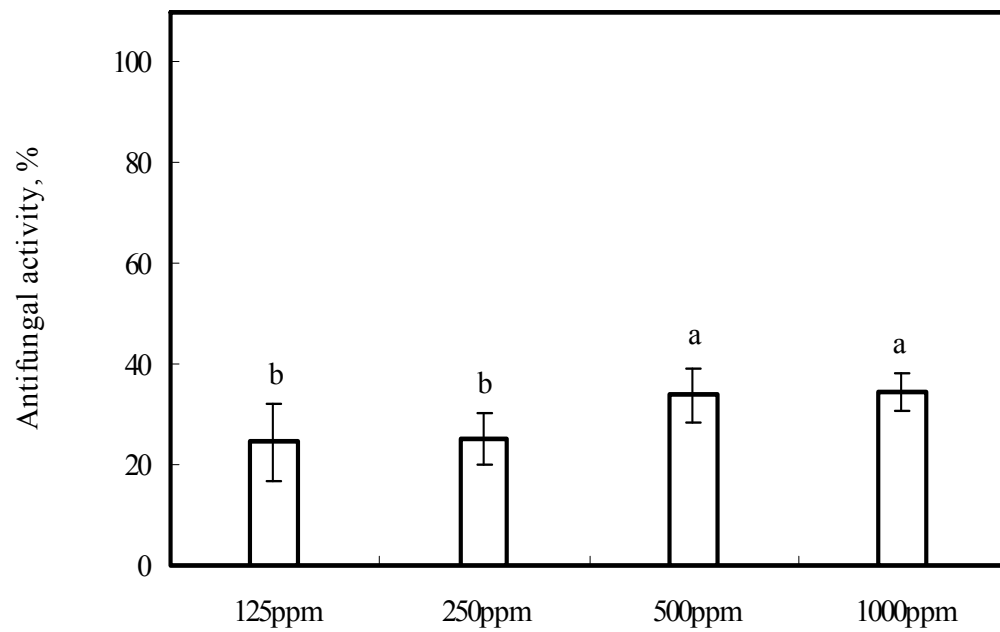


Fig. 3-4-37. Antifungal activity of methanol extract against *Botrytis cinerea* for 7days.



Control



1000ppm



500ppm



250ppm



125ppm

Fig. 3-4-38. Effect of concentration of methanol extract with each parts per million to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis cinerea* for 7days.

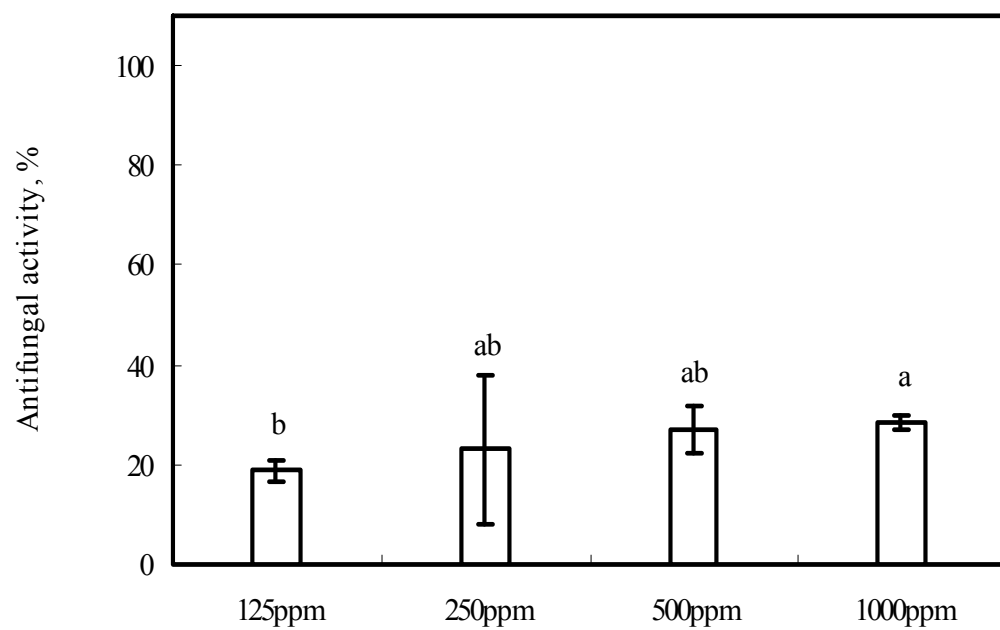


Fig. 3-4-39. Antifungal activity of ethanol extract against *Botrytis cinerea* 7days.



Control



1000ppm



500ppm



250ppm



125ppm

Fig. 3-4-40. Effect of concentration of ethanol extract with each parts per million to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis cinerea* 7days.

나) *Botrytis* spp. from *Munsan* 에 대한 추출물의 항균활성

(1) 열수추출물

Fig. 3-4-41과 Fig. 3-4-42는 *Botrytis* spp. from *Munsan* 에 대한 열수추출물의 항균활성을 나타낸 결과로 125 ppm의 농도에서 약 12%의 항균활성을 나타냈으며, 추출물의 농도에 따른 유의성 차이는 1000 ppm 수준에서 나타났다. Fig. 6-9에서보는 바와 같이 분명한 균사생장 억제 면은 1000 ppm의 배지에서 관찰될 수 있었다.

(2) 메탄올 추출물

Fig. 3-4-43과 Fig. 3-4-44는 *Botrytis* spp. from *Munsan* 에 대한 메탄올 추출물의 항균활성을 나타낸 것으로 125 ppm 에서는 13% 수준, 1000 ppm에서는 23% 수준의 항균활성이 나타났다. 125 ppm의 저농도에서도 항균활성은 나타났지만, 1000 ppm 수준에서 유의성이 나타났다. 실제의 사진에서는 125 ppm 및 250 ppm의 농도에서는 항균활성이 약하게 관찰되었다.

(3) 에탄올 추출물

Fig. 3-4-45 및 Fig. 3-4-46은 *Botrytis* spp. from *Munsan* 에 대한 에탄올 추출물의 항균활성을 나타낸 것으로 125 ppm에서는 약 6%, 250 ppm 에서는 약 11% 수준의 항균활성이 나타났으며, 농도에 따른 유의성은 있었다. 하지만 전체적으로 낮은 항균활성을 나타냈다.

Fig. 3-4-46의 사진에서는 500 ppm 이상의 농도에서 항균활성이 육안으로 관찰될 수 있었으며, 125 ppm과 250 ppm에서는 항균활성이 분명하게 나타나지 않았다.

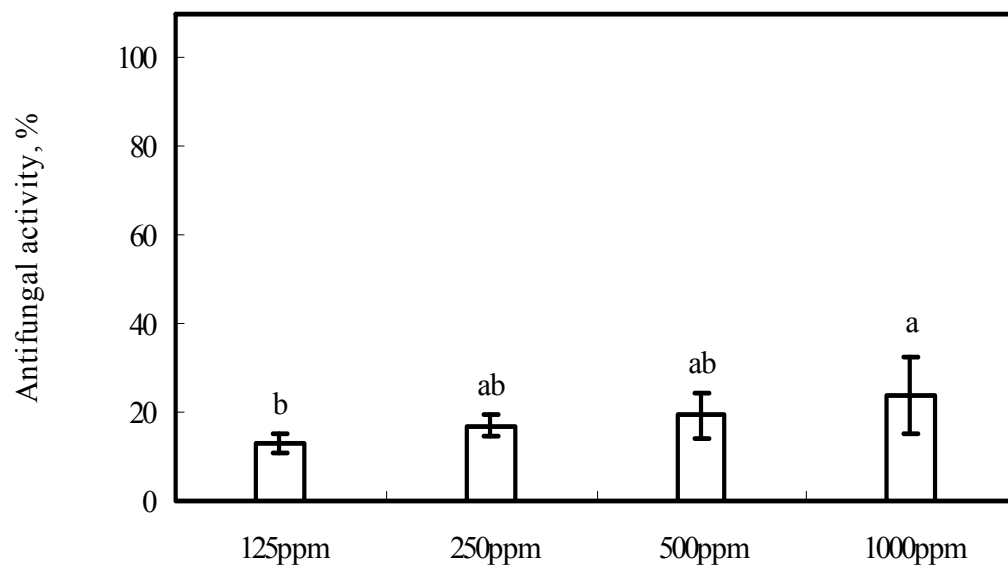
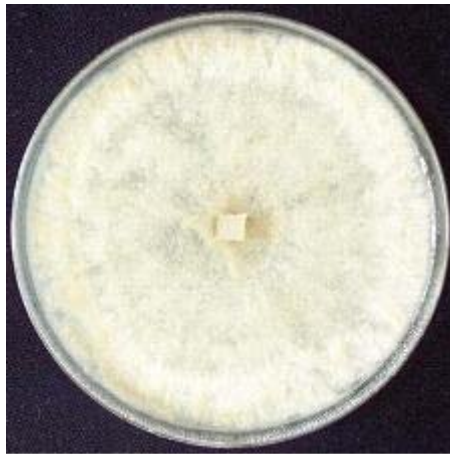


Fig. 3-4-41. Antifungal activity of water extract against *Botrytis* spp. from *Munsan* for 5 days.



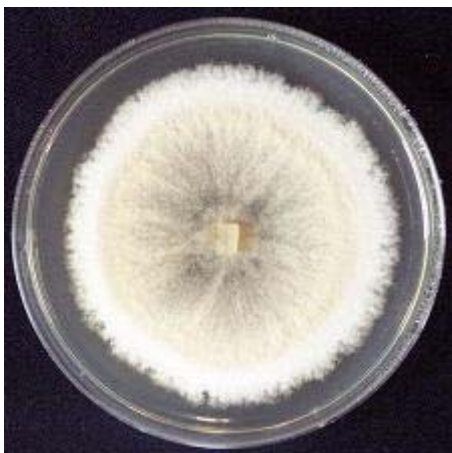
Control



1000ppm



500ppm



250ppm



125ppm

Fig. 3-4-42. Effect of concentration of water extract with each parts per million to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan* for 5 days.

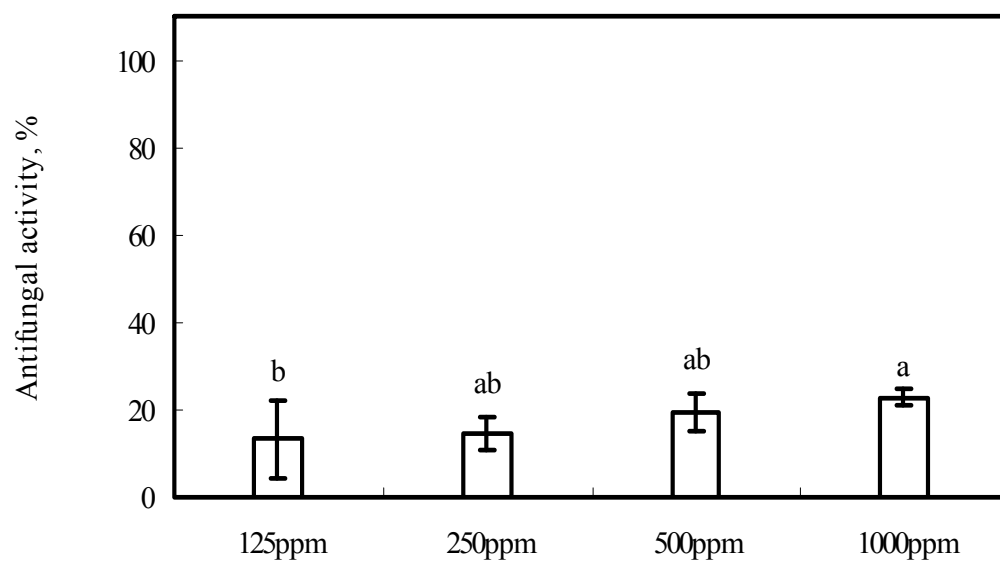
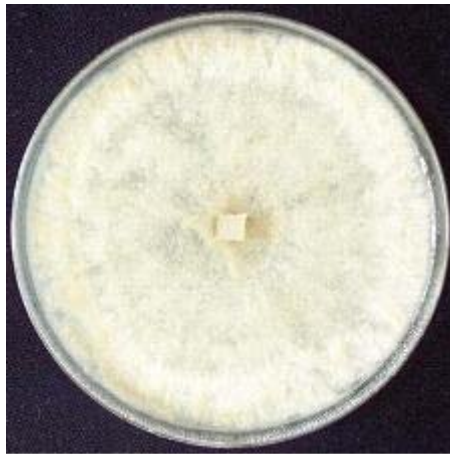
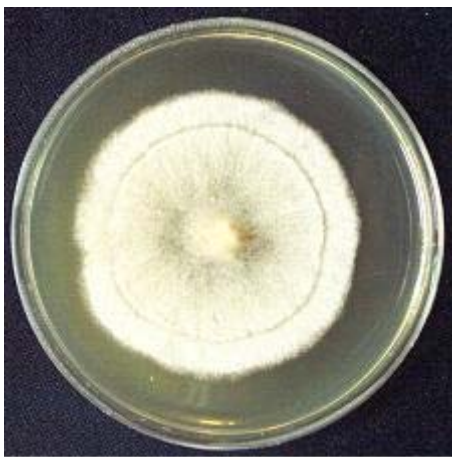


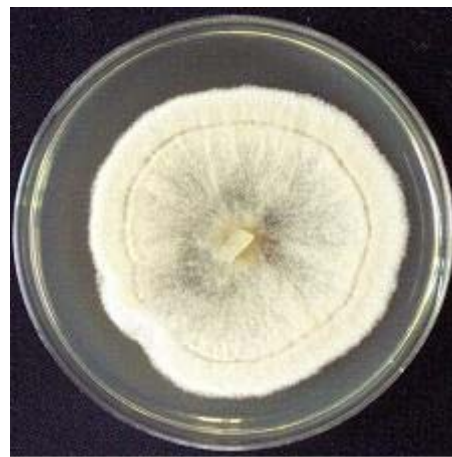
Fig. 3-4-43. Antifungal activity of methanol extract against *Botrytis* spp. from *Munsan* for 5 days.



Control



1000ppm



500ppm



250ppm



125ppm

Fig. 3-4-44. Effect of concentration of methanol extract with each parts per million to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan* for 5 days.

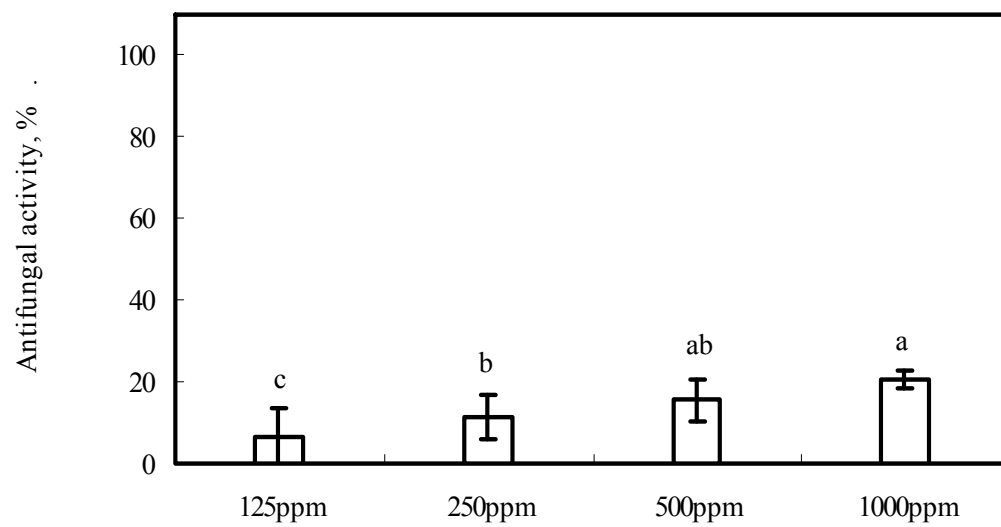
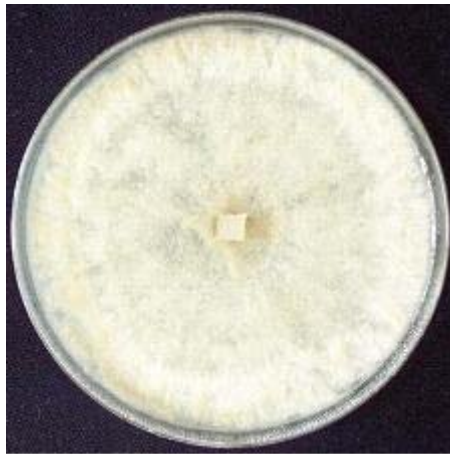
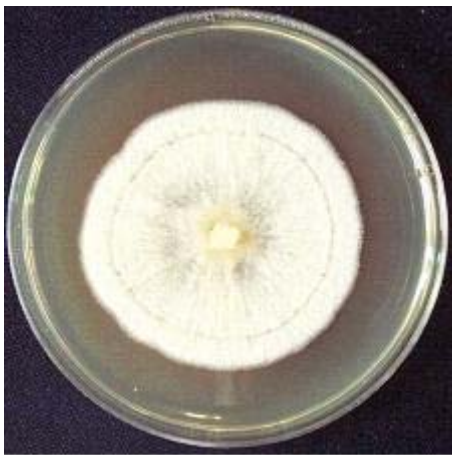


Fig. 3-4-45. Antifungal activity of ethanol extract against *Botrytis* spp. from *Munsan* for 5 days.



Control



1000ppm



500ppm



250ppm



125ppm

Fig. 3-4-46. Effect of concentration of ethanol extract with each parts per million to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan* for 5 days.

다) *Botrytis* spp. from *Kumsan* 에 대한 추출물의 항균활성

(1) 열수추출물

Fig. 3-4-47 및 Fig. 3-4-48은 *Botrytis* spp. from *Kumsan* 에 대한 열수추출물의 항균활성을 나타낸 결과로 125 ppm 에서는 13% 수준, 1000 ppm 에서는 27% 수준의 항균활성을 나타냈으며, 추출물 농도에 따른 항균활성은 5% 수준에서 유의성이 나타났다.

(2) 메탄올 추출물

Fig. 3-4-49 및 Fig. 3-4-50은 *Botrytis* spp. from *Kumsan* 에 대한 메탄올 추출물의 항균활성을 나타낸 결과로 125 ppm 에서는 13% 수준, 1000 ppm 에서는 25% 수준의 항균활성을 나타냈으며, 육안적인 항균활성의 수준도 열수 추출물과 거의 비슷하게 나타났다.

(3) 에탄올 추출물

Fig. 3-4-51과 Fig. 3-4-52는 *Botrytis* spp. from *Kumsan* 에 대한 에탄올 추출물의 항균활성을 나타낸 결과로서 control과 생장을 비교하였을 때 1000 ppm 의 농도에서 약 20% 정도의 항균활성을 나타냈으며 열수 추출물, 메탄올 추출물에 비해 낮은 항균활성을 나타냈다.

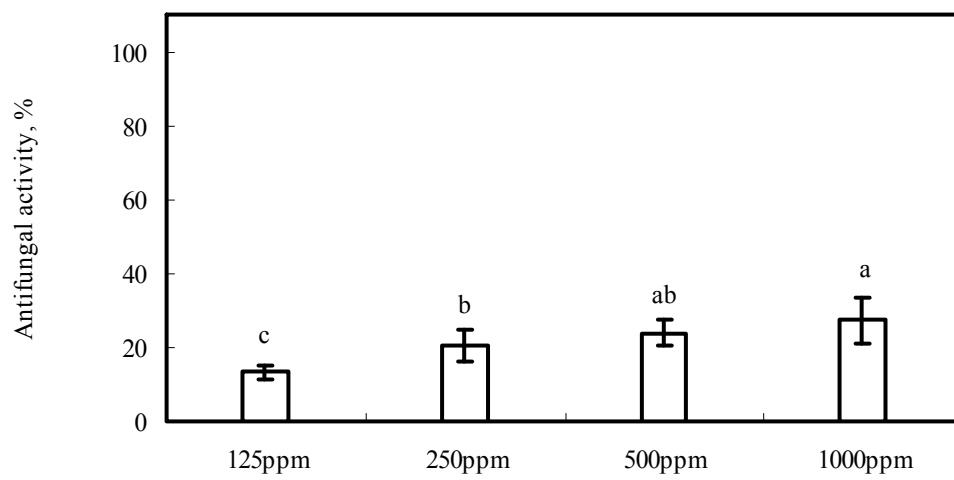
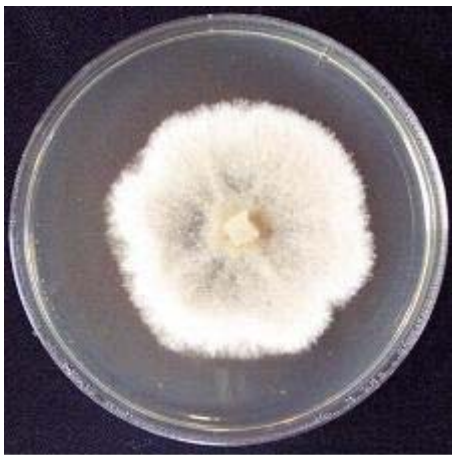


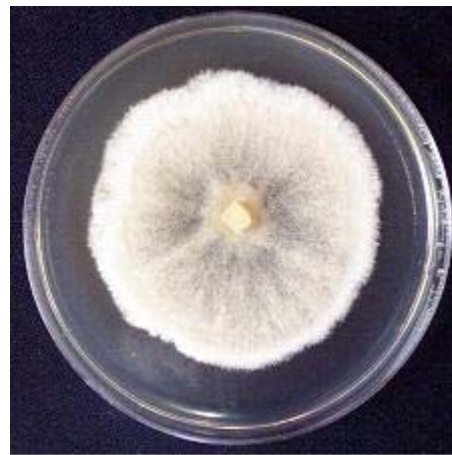
Fig. 3-4-47. Antifungal activity of water extract against *Botrytis* spp. from *Kumsan* for 5 days.



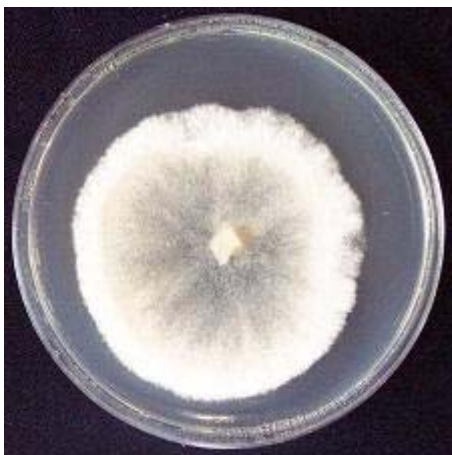
Control



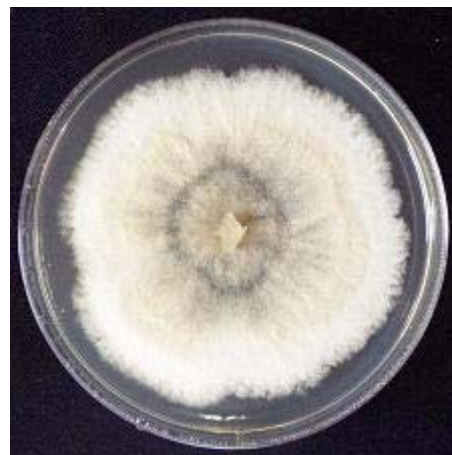
1000ppm



500ppm



250ppm



125ppm

Fig. 3-4-48. Effect of concentration of water extract with each parts per million to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan* for 5 days.

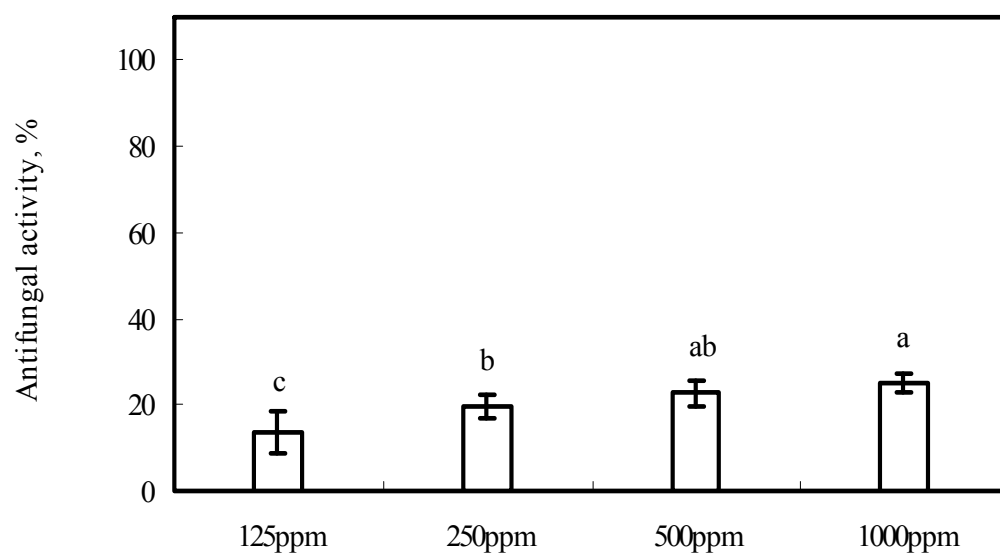
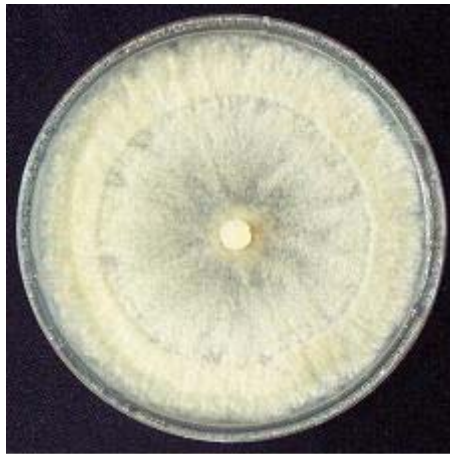
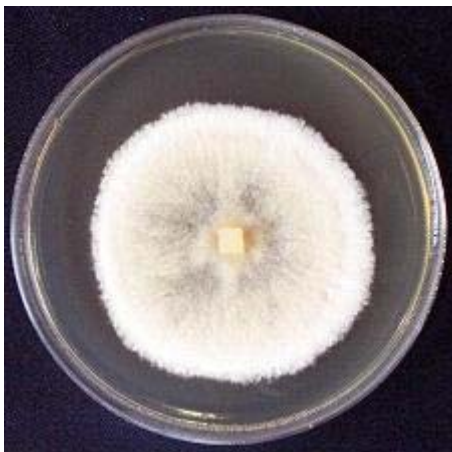


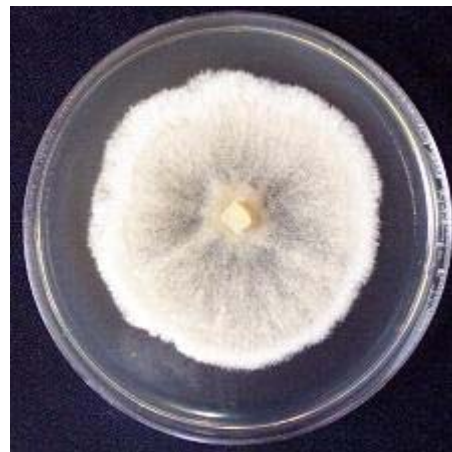
Fig. 3-4-49. Antifungal activity from methanol extract against *Botrytis* spp. from *Kumsan* for 5 days.



Control



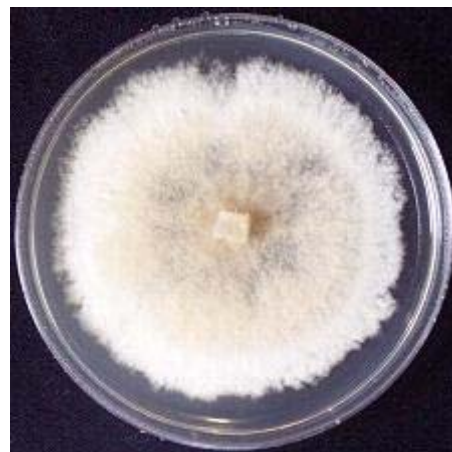
1000ppm



500ppm



250ppm



125ppm

Fig. 3-4-50. Effect of concentration of methanol extract with each parts per million to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan* for 5 days.

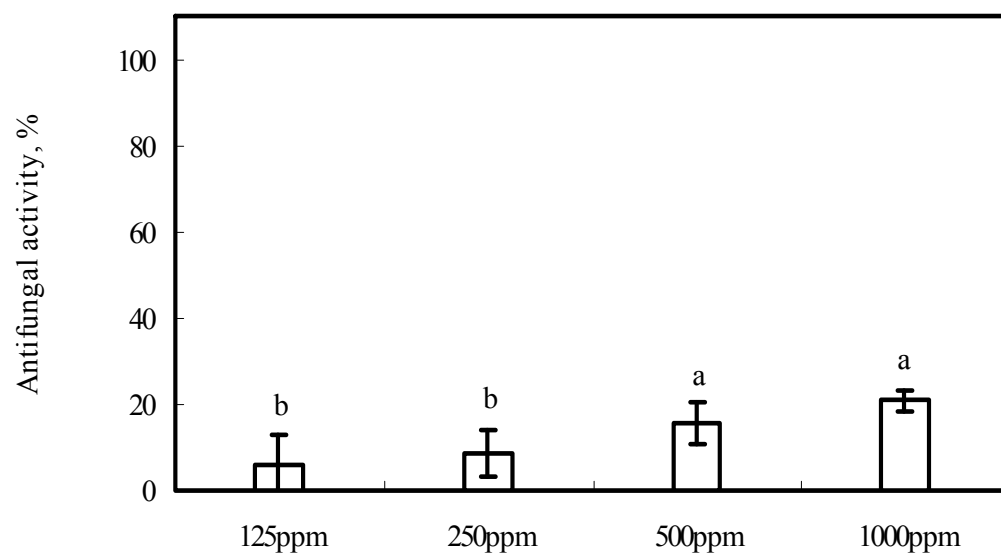
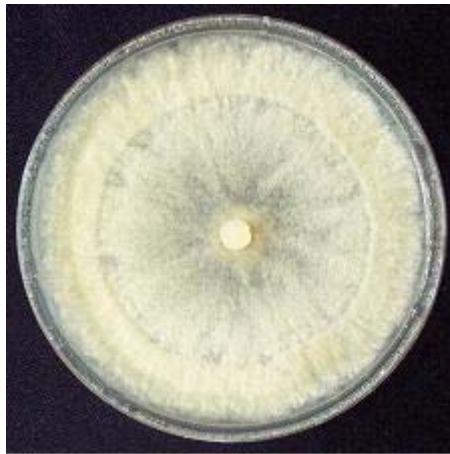
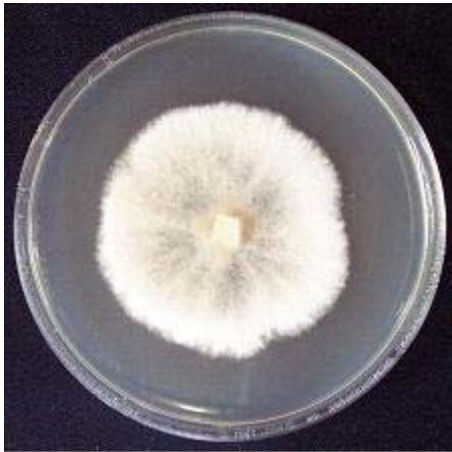


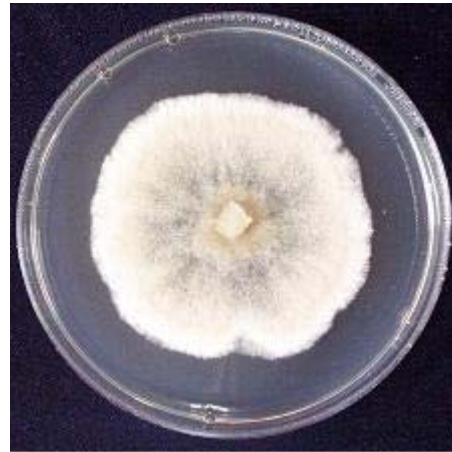
Fig. 3-4-51. Antifungal activity of ethanol extract against *Botrytis* spp. from *Kumsan* for 5 days.



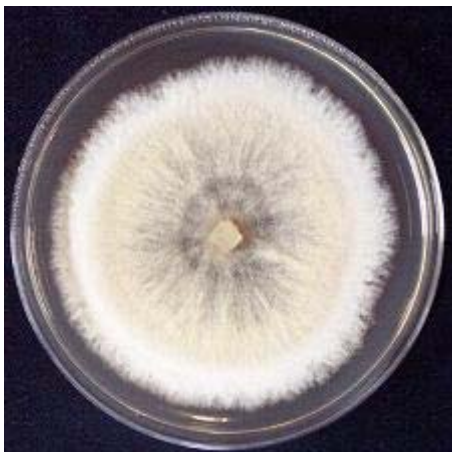
Control



1000ppm



500ppm



250ppm



125ppm

Fig. 3-4-52. Effect of ethanol concentration of extract with each parts per million to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan* for 5 days.

라) *Botrytis* 에 대한 추출물의 항균활성

Table 3-4-2는 *Botrytis* spp. 3종에 대하여 목질원료로부터 추출된 열수, 메탄올, 에탄올 추출물을 125, 250, 500, 1000ppm의 농도로 PDA배지에 첨가하여 5~7일 동안 25°C에서 배양시켰을 때 항균활성을 나타낸 결과이다.

Table 3-4-2. Antifungal activity of extracts against *Botrytis* spp.

| | Antifungal activity, % | | |
|------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | <i>B. cinerea</i> | <i>B. spp.</i> from <i>Munsan</i> | <i>B. spp.</i> from <i>Kumsan</i> |
| Water extract | | | |
| 125 ppm | 29.6 ± 6.9b | 13.1 ± 2.3c | 13.4 ± 2.0c |
| 250 ppm | 32.9 ± 3.3ab | 16.9 ± 2.4b | 20.4 ± 4.1b |
| 500 ppm | 35.6 ± 4.0a | 19.4 ± 5.2ab | 23.9 ± 3.7ab |
| 1000 ppm | 37.6 ± 3.4a | 23.9 ± 8.8a | 27.4 ± 6.3a |
| Methanol extract | | | |
| 125 ppm | 25.5 ± 3.7b | 13.3 ± 8.8c | 13.5 ± 4.9c |
| 250 ppm | 25.1 ± 5.2b | 14.6 ± 3.7b | 19.4 ± 2.7b |
| 500 ppm | 33.8 ± 5.0a | 19.4 ± 4.1ab | 22.7 ± 2.9ab |
| 1000 ppm | 34.5 ± 7.8a | 22.8 ± 1.9a | 25.2 ± 2.3a |
| Ethanol extract | | | |
| 125 ppm | 18.8 ± 2.8b | 6.5 ± 6.9c | 5.7 ± 7.0b |
| 250 ppm | 23.0 ± 14.8ab | 11.2 ± 5.5b | 8.7 ± 5.4b |
| 500 ppm | 27.0 ± 4.8ab | 15.5 ± 5.1ab | 15.7 ± 4.7a |
| 1000 ppm | 28.5 ± 1.4a | 20.6 ± 2.2a | 20.8 ± 2.2a |

Botrytis cinerea, *Botrytis* spp. from *Munsan* 및 *Botrytis* spp. from *Kumsan*에 대하여 항균활성이 가장 높은 추출물은 열수추출물이었으며, 그 다음으로 메탄올 추출물이었다. 그러므로 목질원료로부터 잿빛곰팡이 방제제 원료 추출법은 열수추출법이 가장 유리하다고 판단되었다.

라. 결론

3종의 잿빛 곰팡이에 대하여 목질원료로부터 추출된 열수추출물, 메탄올추출물 및 에탄올추출물의 항균활성을 측정함으로써 목질원료로부터 효과적으로 잿빛 곰팡이 방제원료를 추출하는 방법을 탐색하고자 시도되었다.

Botrytis cinerea, *Botrytis* spp. from *Munsan* 및 *Botrytis* spp. from *Munsan*에 대하여 항균활성이 가장 높은 추출물은 열수추출물이었으며, 그다음으로 메탄올 추출물이었다. 그러므로 목질원료로부터 잿빛곰팡이 방제제 원료 추출법은 열수추출법이 가장 유리하다고 판단되었다.

목질원료로부터 획득된 열수추출물의 항균활성은 균종에 따라 다르게 나타났지만, 1000 ppm 추출물농도에서 *Botrytis cinerea* 37%, *Botrytis* spp. from *Munsan* 24% 및 *Botrytis* spp. from *Munsan* 27%로 나타났으며, 이러한 수준의 항균활성은 천연물 방제제 원료로서의 가능성이 매우 높다고 판단되었다.

3. 원료추출물의 생리활성 탐색 및 물질의 분리

가. 서 설

잿빛곰팡이병균의 학명은 불완전균류에 속하는 *Botrytis cinerea*이며, 일부 병원균에서는 자낭반(apothecium)을 형성하기도 하는데, 자낭균 세대의 학명은 *Botryotinia fuck eliana*으로, 이 병원균의 최적 균사생장, 포자형성, 포자방출, 포자발아 및 발병 적온은 15- 23℃이며 최저 2℃, 최고 31℃이다.

본 병원균의 감염에는 습도가 가장 중요한데 이 병원균은 공기 중의 상대습도가 90% 이상이어야 발아할 수 있고 병원균은 광에 의하여 포자형성이 유기되는 것으로 알려져 있으며, 병든 조직에는 분생포자를 가진 많은 분생자병이 묻혀있고, 바람에 의해 먼 거리까지 포자를 전파 시킨다.

포도의 경우 잿빛곰팡이병균은 개화기 끝 무렵부터 침입하여 veraison(과실의 성숙 초기)까지 잠복상태로 있다가 그 이후부터 발병한다. 이 시기까지 발병하지 않는 이유는

glycolic acid, tannins, phytoalexins와 같은 여러 가지 천연 항균 물질 때문에 균의 생장이 억제되는 것이다. Veraison이후 이러한 물질은 감소되고 병원균의 생장은 가능하게 된다. 따라서 포도, 딸기 등은 성숙기가 특히 감염되기 쉽다.

최근의 연구에 따르면 과산화수소를 활용해 잿빛곰팡이를 방제하는 기술이 개발되었는데, 이 방제법은 잔류독성 문제가 없는 게 특징이다. 잿빛곰팡이병은 20℃ 전후에서 습도가 높고 질소질 비료를 너무 많이 살포했을 때 발병돼 피해를 준다. 따라서 수확에 앞서 잿빛곰팡이병을 방제하려면 30% 과산화수소 23ml 또는 3%의 과산화수소 230ml를 20ℓ의 물에 혼합해 수확 전 1주일 간격으로 2회 살포하는 것이 추천할 수 있는 방제법이라고 알려져 있다.

목재로터 유래된 천연화합물을 잿빛 곰팡이 방제에 사용할 수 있는 새로운 바이오농약 원료를 개발하기 위하여 시도되었으며, 직접적으로 잿빛 곰팡이 균에 효력을 발휘하는 유효 화합물 그룹을 탐색하는 것이 주목적이다.

나. 재료 및 방법

1) 목질원료 및 열수추출물 조제

주관기관인 유림하이텍(주)으로부터 제공받은 목질원료는 윌리밀에 의하여 분쇄하고, 스크린 80과 스크린 20 으로 스크린 작업하여 20 mesh pass, 80 mesh on 시료를 분리하였다.

분리된 시료는 열수추출을 위하여 반응용기에 시료 20 g(전건중량기준)과 증류수 500 ml를 첨가하여 충분히 교반 한 다음, 121℃에서 30분 반응시킨 다음, 여과 깔때기로 여과하여 추출, 여과액을 획득하였다. 획득된 추출물들은 50℃의 수조에서 감압건조기를 사용하여 일정수분까지 건조시킨 다음, 냉동건조기를 이용하여 동결건조 후, 분말 상 열수추출물을 획득하였다.

2) Column chromatography를 이용한 물질분리 및 최적용제 확인

가) 물질분리를 위한 최적용매 결정

열수추출물 분말 0.1 g 을 증류수 1ml에 녹여 5분간 초음파 처리하여 충분히 용해한 다음, silica gel 60 plates (Merck, Germany)를 2.5cm × 3.5cm cutting하여 적정한 비율로 혼합시킨 developing solution (n-Hexane : chloroform : Ethyl acetate) 을 이용하여 2분 동안 전개시켜 mobile phases를 확인하였고 여기에 이용된 8개의 mobile phases와 TLC plate에

나타난 fraction의 Rf 값의 범위를 측정하였다. 또한 n-Hexane : chloroform : Ethyl acetate의 각각의 비율에 따른 8개의 mobile phases중 물질의 분리가 가장 좋다고 판단되는 developing solution 을 선택하여 그 solution에 formic acid를 비율별로 첨가하여 mobile phases을 확인하고 역시 TLC plate에 나타난 fraction의 Rf 값의 범위를 측정하였다.

나) Silica-gel column chromatography에 의한 물질 분획

열수추출물 분말 용액과 실리카겔 혼합한 후 aspirator (SIBATA WJ-15) 를 이용하여 감압 농축시켜 열수추출물이 실리카겔에 잘 흡착되게 하였고, silica gel (particle size 0.063 - 0.2 mm, Merck, Germany) 과 developing solution (n-Hexane : chloroform : Ethyl acetate : Formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.2, v/v/v/v)이 채워진 유리 column (2.3cm × 40cm) 에 1g 을 적용시켰다. Fraction은 test tube에 각각 10 ml씩 수집하였으며, 본 fraction의 분획은 4반복을 1 set로 하였고, 1 set의 시료는 열수추출물 1g이 투입되도록 하였다.

다) 분획된 fraction의 물질 확인 및 group별 분리

수집된 각각의 fraction은 TLC와 UV Spectrophotometer (U-3000, Hitachi, Japan)를 사용하여 물질을 확인하고 각각의 group별로 분획되었다.

TLC는 n-Hexane : chloroform : Ethyl acetate : Formic acid (v/v/v/v) 12 : 17 : 8 : 0.2의 mixtures를 developing solution한 형태로 TLC plate는 silica-gel column chromatography에 의한 열수 추출물 fraction (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 and 90, fraction number) 의 chromatography를 위해 사용되었다.

TLC에 의해 Rf 값의 범위를 측정하고 UV Spectrophotometer는 280과 325nm에서 흡광도 값을 측정하였으며 각각의 fraction의 그룹의 UV흡광도가 최대인 fraction을 TLC plate를 이용하여 확인하였다.

UV Spectrophotometer를 이용한 흡광도 값과 TLC plate를 이용한 각각의 fraction의 Rf 값의 범위를 서로 비교하여 동일한 물질이라고 판단되는 fraction끼리 group을 형성하였다.

라) Fraction group 수율

분획된 각각의 fraction을 group으로 구분하여 이를 합한 다음, aspirator (SIBATA WJ-15) 를 이용하여 완전히 감압 농축시킨 후 methanol을 일정량 넣어 용해시켜 5분간 초

음과 처리 후 다시 aspirator (SIBATA WJ-15) 를 이용하여 완전히 감압 농축시켰다.

Methanol을 이용하여 총 3반복 농축시킨 후 증류수를 일정량 투입하여 용해시킨 후 5분 간 초음파 처리하여 동결건조 시켜 각각의 fraction group의 전건중량을 측정하였다.

3) Fraction 그룹의 항균활성

가) 공시균주

(1) *Botrytis cinerea* (KCTC : NO.6973)

시판품의 항균활성 성능평가에 사용되는 공시균주인 *Botrytis cinerea*(NO.6973)는 한국 유전자은행(KCTC)으로부터 분양받아 PDA 및 PSA배지를 사용하여 25℃ 배양기 내에서 배양하여 실험에 사용하였다.

(2) *Botrytis* spp. from *Kumsan*

경남 진주시에 위치한 고추농가 (경남진주시 금산면 가방리 1035번지)에서 잣빛곰팡이병에 감염된 고추 잎을 채취한 다음, PSA배지 및 PDA배지를 사용하여 균주를 분리, 25℃에서 배양하여 실험에 적용하였다. 고추농가에서 채취한 잣빛곰팡이를 *Botrytis* spp. from *Kumsan*이라 명명하였다.

(3) *Botrytis* spp. from *Munsan*

경남 진주시에 위치한 고추농가 (경남진주시 문산읍 산곡리 584-8번지)에서 잣빛곰팡이병에 감염된 고추 잎을 채취한 다음, PSA배지 및 PDA배지를 사용하여 균주를 분리, 25℃에서 배양하여 실험에 적용하였다. 고추농가에서 채취한 잣빛곰팡이를 *Botrytis* spp. from *Munsan*이라 명명하였다.

나) 항균활성 측정

Fraction group을 1000 ppm 농도로 PDA배지에 혼합된 배지에 계대배양된 *Botrytis* spp. 균주 3종으로부터 10 mm의 균사 pellet을 분리하여 접종한 다음 25℃에서 배양하였다. 이때 대조구는 추출물이 첨가되지 않은 배지를 사용하였다. 항균활성은 식 1에 의거하여 계

산하였으며, 균사생장량은 5반복 평균값을 사용하였다.

$$\text{항균활성, \%} = \left\{ 1 - \frac{\text{시험구의 균사생장길이(mm)}}{\text{대조구의 균사생장길이(mm)}} \right\} \times 100 \dots\dots\dots \text{식 (1)}$$

4) 통계분석

Botrytis spp. 3종의 항균활성에 대한 통계변화분석을 위하여 각 계통의 5개체의 5반복 값을 Micro office EXCEL을 이용하여 표준편차를 나타내었으며 각 실험구사이의 유의성은 SAS Corporate Statistics GLM의 Release 8.01을 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan의 multiple range test로 분석하였다.

5) HPLC Analysis

분획된 fraction의 6개 (I, II, III, ... VI) group 중 *Botrytis* spp. 3종에 대한 antifungal activity가 가장 좋다고 판단되는 fraction group에 대하여 HPLC 분석을 하였다.

HPLC 분석은 Kang et al 의 방법을 따랐고, Antifungal activity가 가장 높게 나타난 fraction group은 Me-OH를 이용하여 용해시켜, memberain filter (0.2 μ m, Germany) 를 이용하여 여과하였다. 여과액 20 μ l를 TSK gel ODS-80Ts column (4.6mm \times 25cm, 5 μ m, Tosoh) 이 장착된 HPLC system (Gilson, France)에 loading시켰다. UV 는 280nm에서 detector하였고, Mobile phases는 H₂O : CH₃CN : H₃PO₄가 600 : 400 : 5 의 비율로 혼합된 solvent를 사용하였다. Injection후 solvent는 0.6ml/min의 비율로 loading 하였다.

다. 결과 및 고찰

1) Column chromatography를 이용한 물질분리

가) 최적용매 결정

열수추출물의 fraction분리를 위한 최적용매 결정에 n-hexane, chloroform and ethyl acetate 의 비율을 달리한 최초 8개의 mobile phases 가 사용되었다.

Table 3-4-3은 8개의 mobile phases과 Rf값의 범위를 나타낸 것이고, Fig. 3-4-53은 n-hexane, chloroform and ethyl acetate의 비율별 mobile phases의 사진을 나타낸 것이다.

Table 3-4-3. The mobile phases studied

| No. | Solvents | Fraction number | Range of Rf of compound |
|-----|---|-----------------|-------------------------|
| 1 | n-hexane : chloroform : ethyl acetate = 1 : 1 : 1 (v/v/v) | 4 | 0.16-0.56 |
| 2 | n-hexane : chloroform : ethyl acetate = 2 : 1 : 18 (v/v/v) | 2 | 0.68-0.84 |
| 3 | n-hexane : chloroform : ethyl acetate = 4 : 3 : 16 (v/v/v) | 4 | 0.28-0.76 |
| 4 | n-hexane : chloroform : ethyl acetate = 8 : 7 : 12 (v/v/v) | 3 | 0.16-0.56 |
| 5 | n-hexane : chloroform : ethyl acetate = 10 : 12 : 10 (v/v/v) | 2 | 0.12-0.2 |
| 6 | n-hexane : chloroform : ethyl acetate = 12 : 17 : 8 (v/v/v) | 6 | 0.08-0.52 |
| 7 | n-hexane : chloroform : ethyl acetate = 16 : 22 : 4 (v/v/v) | 2 | 0.08-0.2 |
| 8 | n-hexane : chloroform : ethyl acetate = 18 : 28 : 2 (v/v/v) | 3 | 0.08-0.16 |

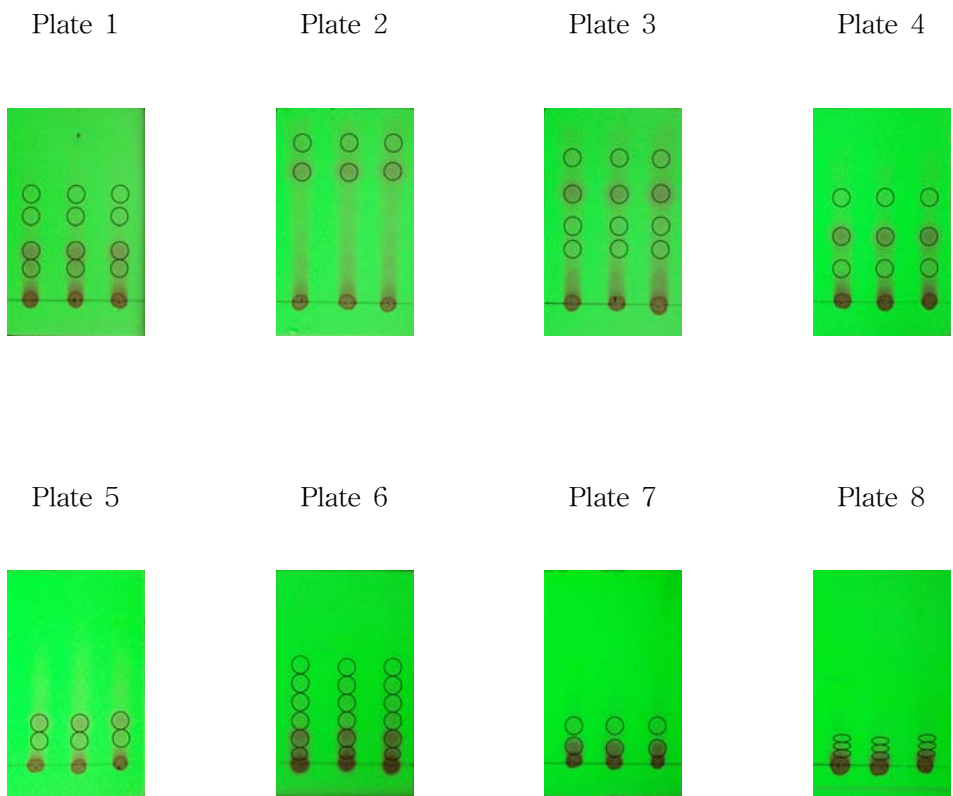
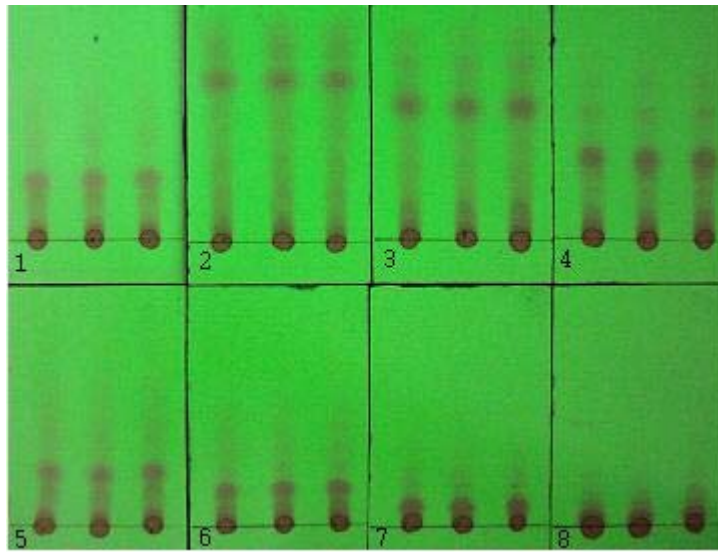


Fig. 3-4-53. TLC screening of mobile phases studied. The plate number correspond to the number in Table 3-4-3.

Fig. 3-4-53에서 n-hexane 와 chloroform의 비율이 ethyl acetate와 비교하여 높을수록 mobile phase는 아래에 있고, n-hexane 와 chloroform의 비율이 ethyl acetate와 비교하여 낮을수록 mobile phases이 아래쪽에 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 반대로 말하면 ethyl acetate의 비율이 n-hexane 와 chloroform과 비교하여 높을수록 mobile phases가 높게 나타나고, 낮을수록 낮게 나타났다. 그 이유는 n-hexane 과 chloroform은 비극성 용매에 가깝고, ethyl acetate는 극성용매에 가깝고 TLC plate의 고정상에 해당하는 silica-gel은 비극성에 속하기 때문이라고 판단된다. 극성은 극성과 친화력을 가지고 비극성은 비극성과 친화력을 가지므로 비극성에 속하는 n-hexane 과 chloroform의 비율이 높을수록 고정상인 silica-gel 과 친화성이 커지므로 이동하는 속도가 감소하여 물질이 아래쪽에 나타나게 된다.

n-hexane : chloroform : ethyl acetate 의 비율이 2 : 1 : 18, 10 : 12 : 10 그리고 16 : 22 : 4 (v/v/v)인 2, 5, 7번 용매의 경우 2개의 fraction이 나타났고 그 Rf의 범위는 각각 0.68~0.84, 0.12~0.20, 0.08~0.20 이였고, n-hexane : chloroform : ethyl acetate 의 비율이 8 : 7 : 12 와 18 : 28 : 2 (v/v/v)인 4, 8번 용매의 경우는 3개의 fraction과 각각 0.16~0.56과 0.08~0.16 범위의 Rf값을 나타냈다.

4개의 fraction이 나타난 용매 1번 (n-hexane : chloroform : ethyl acetate = 1 : 1 : 1, v/v/v) 과 3번 (n-hexane : chloroform : ethyl acetate = 4 : 3 : 16 v/v/v)은 각각 0.16~0.56 과 0.28~0.76의 Rf값을 나타냈다. 가장 많은 fraction(6개)이 나타난 용매 6번 (n-hexane : chloroform : ethyl acetate = 12 : 17 : 8, v/v/v) 의 Rf값은 0.08~0.52으로 가장 많은 fraction을 나타낸 6번 용매가 가장 잘 분리시키는 것으로 판단된다. 조금 아쉬운 점이 있다면 fraction이 밑 부분에서 나타나는 것이다. 그리고 물질 분리가 가장 잘된다고 판단되는 6번 용매에 (n-hexane : chloroform : ethyl acetate = 12 : 17 : 8, v/v/v)에 Formic acid를 일정한 비율로 첨가하여 그 mobile phases를 연구하였다. 첨가된 formic acid의 비율은 Table 3-4-4와 Fig. 3-4-54에 나타내었다.

Fig 3-4-54에서는 formic acid의 첨가비율이 0.2인 6-4번이 가장 분리가 잘되었지만 formic acid 첨가 비율이 0.5, 0.4, 0.3, 0.1은 별다른 차이(Rf값)를 나타내지 않았다. 결과적으로 열수 추출물의 물질분리는 developing solution인 n-hexane : chloroform : ethyl acetate 의 비율이 12 : 18 : 8이 가장 좋았고, 이 developing solution에 formic acid의 비율을 0.2 첨가시킨 developing solution이 물질을 가장 잘 분리시키는 것으로 판단된다.

Table 3-4-4. The mobile phases studied of developing solvent by addition formic acid

| No. | Solvents | Fraction number | Range of Rf of compound |
|-----|--|-----------------|-------------------------|
| 6-1 | n-hexane : Chloroform : ethyl acetate : Formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.5 (v/v/v/v) | 5 | 0.16-0.56 |
| 6-2 | n-hexane : chloroform : ethyl acetate : Formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.4 (v/v/v/v) | 5 | 0.12-0.52 |
| 6-3 | n-hexane : chloroform : ethyl acetate : Formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.3 (v/v/v/v) | 5 | 0.14-0.54 |
| 6-4 | n-hexane : chloroform : ethyl acetate : Formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.2 (v/v/v/v) | 6 | 0.06-0.52 |
| 6-5 | n-hexane : chloroform : ethyl acetate : Formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.1 (v/v/v/v) | 5 | 0.14-0.52 |

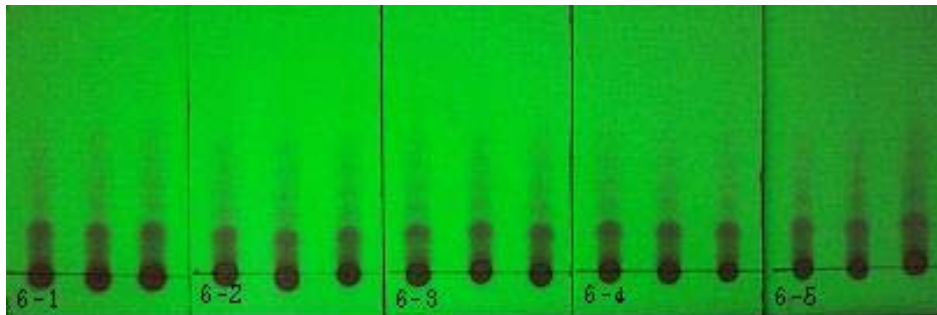


Plate 6-1

Plate 6-2

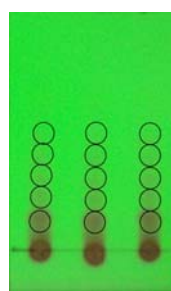
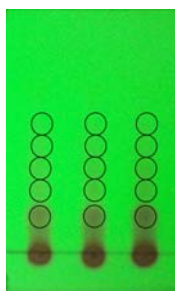


Plate 6-3

Plate 6-4

Plate 6-5

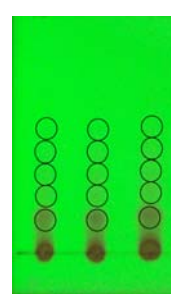
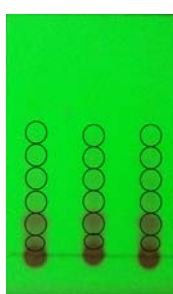
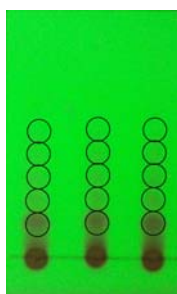


Fig. 3-4-54. TLC screening of mobile phases studied of developing solvent by addition formic acid. The plate number correspond to the number in Table 7-2.

나) Column chromatography를 이용한 물질의 분리

2.3 × 40 cm column에 의해 10ml씩 130개의 fraction이 수집되었으며 수집된 fraction은 각각 TLC와 280, 325nm의 UV Spectrophotometer에 의해 물질이 확인되었다.

Fig. 3-4-55는 2.3 × 40cm column에 의해 수집된 각각의 fraction을 TLC에 적용시켜 developing solution (n-hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid = 12 : 17 : 8 : 0.2, v/v/v/v) 에 의한 mobile phases을 나타낸 것이고, Fig. 3-4-56은 UV Spectrophotometer에 의한 325nm에서의 흡광도 값을 그래프로 나타냈다.

Fig. 3-4-55를 보면 fraction 1~10까지는 물질이 나타나지 않다가 15번에서 세 개의 물질이 나타났고, 10~15번 사이에도 물질이 존재할 수 있을 것으로 추측된다. 그 이유는 fraction number 10을 넘어서면서 흡광도가 증가하는 것을 볼 수 있기 때문이라고 판단된다 (Fig. 3-4-56). 그리고 15~95번은 TLC plate상에서 물질이 확실히 분리되는 것을 확인할 수 있었다. 극성이 높은 물질부터 빠져 나오고 극성이 낮은 물질이 늦게 빠져 나오는 것을 알 수 있었지만 100번 이후부터는 물질이 나타나지 않아 없다고 판단할 수 있지만 100번 이후에도 계속 흡광도가 나타나는 것(Fig. 3-4-56)으로 보아 미량이지만 아직 물질이 존재하는 것으로 보여진다.

결론적으로 Fig. 3-4-56과 Fig. 3-4-57을 비교해 보면 6개의 그룹으로 분리가 되는 것으로 판단된다.

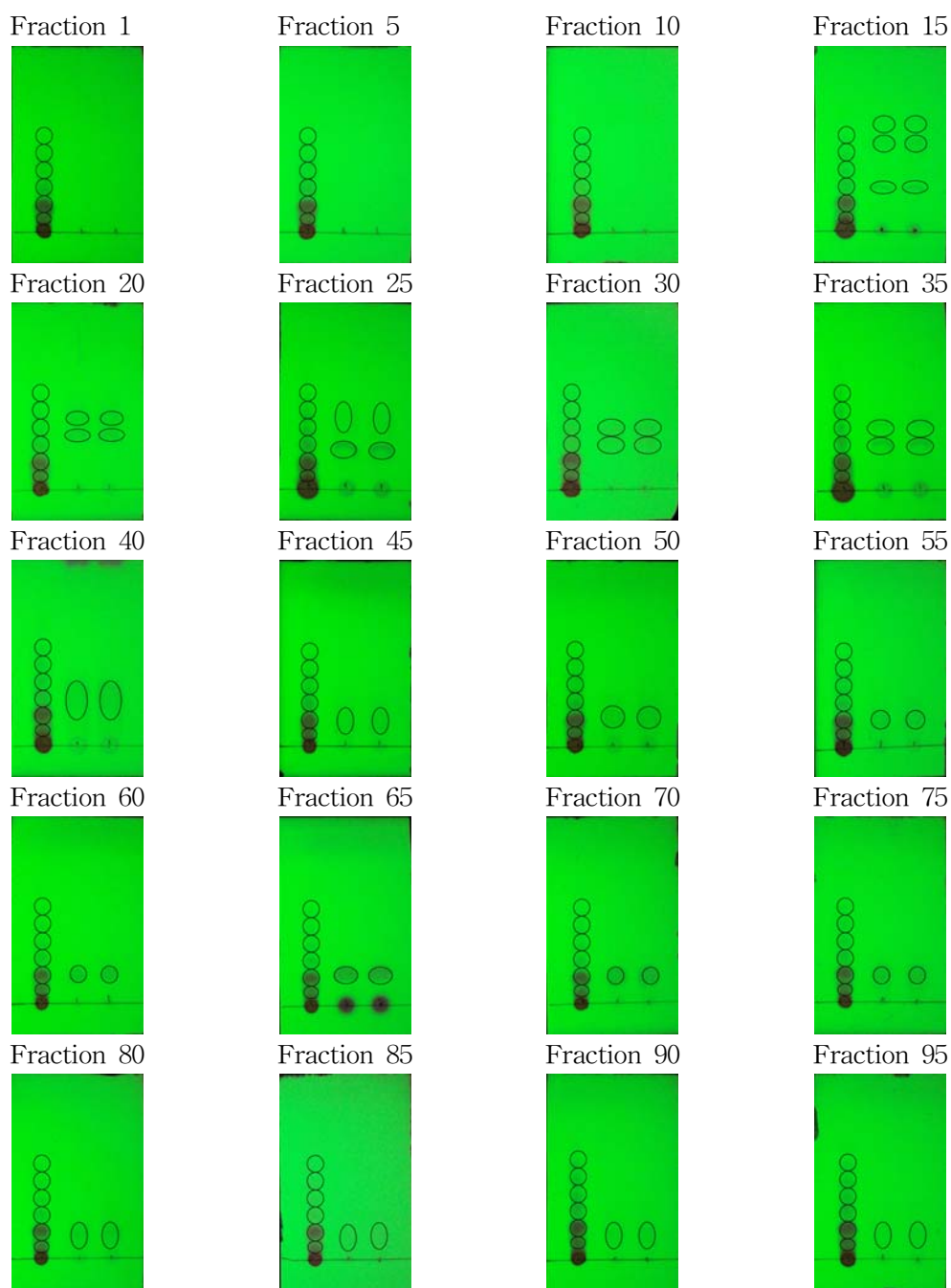


Fig. 3-4-55. Separation of compounds from water solvent-soluble fraction by column chromatography (column: $2.3 \times 40\text{cm}$, silica-gel 60: 45g) and thin layer chromatography (TLC plate: silica-gel 60 F₂₅₄, 0.5mm, MERCK).

The elution solvents for column of the water soluble fraction was used as 12 : 17 : 8 : 0.2 of used n-hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid. The TLC was performed using mixture of n-hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid (v/v/v) in 12 : 17 : 8 : 0.2.

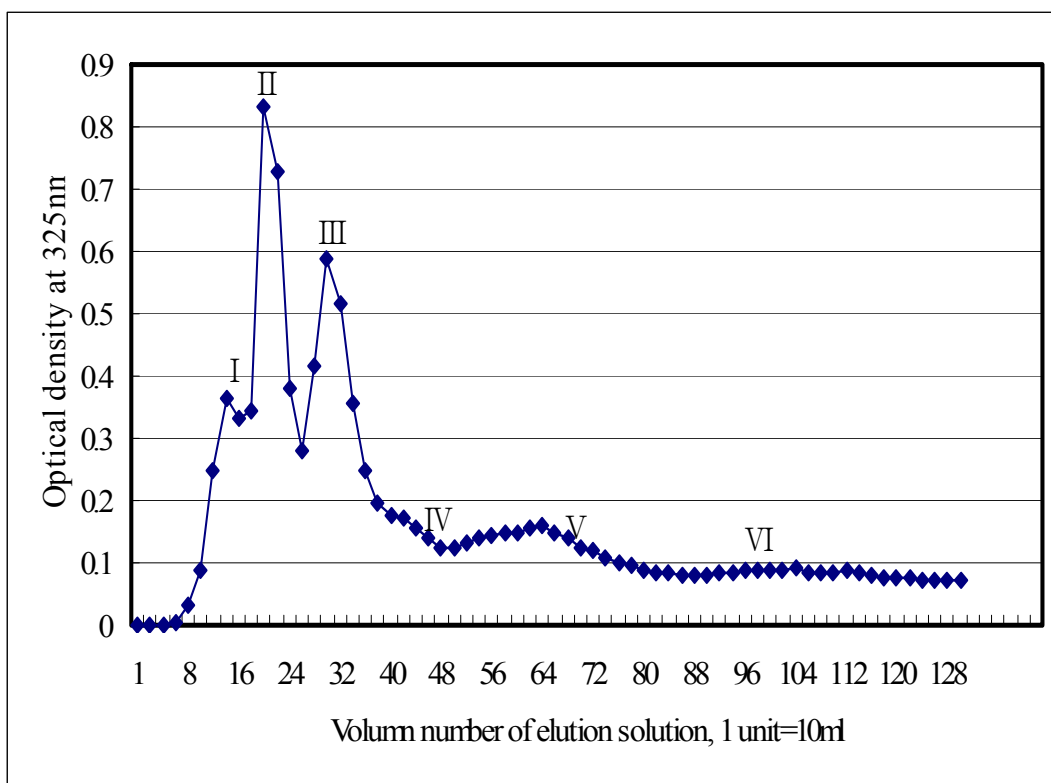


Fig. 3-4-56. The chromatography of a sample separated by silica gel column (2.3 × 40cm, silica-gel 60: 45g).

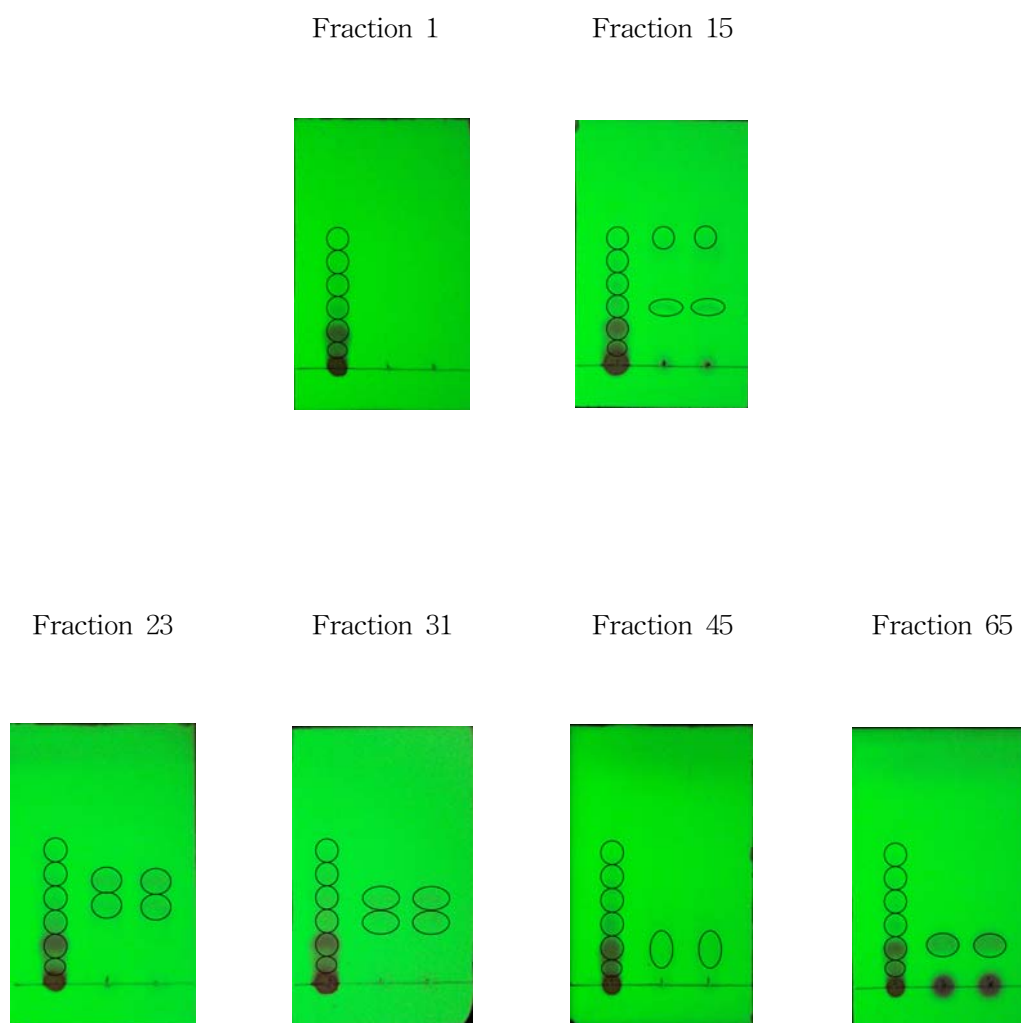


Fig. 3-4-57 Separation of compounds from water solvent-soluble fraction by column chromatography (column: 2.3 × 40cm, silica-gel 60: 60g) and thin layer chromatography (TLC plate: silica-gel 60 F₂₅₄, 0.5mm, MERCK).

The elution solvents for column of the water soluble fraction was used as 12 : 17 : 8 : 0.2 of used n-hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid. The TLC was performed using mixture of n-hexane : chloroform : ethyl acetate : formic acid (v/v/v) in 12 : 17 : 8 : 0.2.

2) 분획된 fraction group의 활성시험

Silica-gel column chromatography에 의해 10 ml 단위로 분획된 130개의 fraction에 대한 325nm에서의 UV Spectrophotometer (U-3000, Hitachi, Japan)의 흡광도(Fig. 7-4) 흡광도 값을 기준으로 6개의 fraction group으로 분획하였다.

Table 3-4-5는 컬럼크로마토그래피에 의해 분리된 6개 fraction group의 수율을 나타냈다.

Table 3-4-5. The yield of fraction group from 1 g of hot water extract by column chromatography

| Fraction group | Yield, mg* |
|----------------|---------------|
| I | 8.03± 3.48b** |
| II | 10.40± 2.50b |
| III | 9.73± 3.77b |
| IV | 8.20± 1.15b |
| V | 32.47±10.02a |
| VI | 11.70± 4.67b |

* Yield was based on the 1g of dried hot water extracts

** Mean followed by the same letter within the column are not significantly different at <0.05 according to Duncan's new multiple-range test.

Table 3-4-5에서 fraction V group 이 열수추출물 1g에 대하여 32.47mg이 추출되어 가장 높은 수율을 나타내었으며, fraction VI group이 11.70mg으로 두 번째로 높은 수율을 나타냈지만 fraction I group의 경우 8.03mg 으로 가장 낮은 수율을 나타냈다.

Table 3-4-6, Fig. 3-4-58, Fig. 3-4-59 및 Fig. 3-4-60에 *Botrytis* spp. 3종에 대한 각각의 fraction group의 항균활성을 나타냈다.

Table 3-4-6에서 fraction II, III, IV group이 *Botrytis cinerea* 에 대하여 약 50%의 항균 활성을 나타내었고, fraction VI group이 *Botrytis cinerea* 에 대하여 가장 낮은 항균활성을 나타냈다. *Botrytis (Munsan)*, *Botrytis (Kumsan)* 에 대해서 fraction I group이 각각 42.33%, 35.38%로 다른 fraction group보다 높은 항균활성을 나타내었고 fraction II group이 각각 36.63%와 33.22%로 두 번째로 높은 항균활성을 나타냈다.

Fraction I 과 II group의 경우 *Botrytis* spp. 3종 대하여 높은 항균활성을 나타내어 Fraction I 과 II group이 *Botrytis* spp. 3종에 대하여 항균활성이 가장 좋은 것으로 판단된다. 하지만 fraction III과 IV group은 *Botrytis cinerea* 에 대항하여서 50%가 넘는 높은 항균활성을 나타내었지만 *Botrytis munsan*, *Botrytis kumsan* 에 대하여 비교적 낮은 활성을 나타냈다.

Table 3-4-6. Antifungal activity of each fraction group (1000ppm) against *Botrytis* spp. for 7 days.

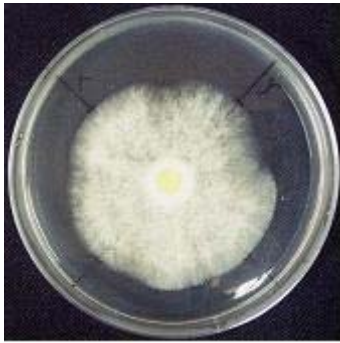
| Fraction group | Antifungal activity, %* | | |
|----------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | <i>Botrytis cinerea</i> | <i>Botrytis</i> from <i>Munsan</i> | <i>Botrytis</i> from <i>Kumsan</i> |
| Control | - | - | - |
| I | 32.50±4.29b*** | 35.38±3.14a | 42.33±0.52a |
| II | 50.89±0.75a | 33.22±1.59a | 36.63±1.54b |
| III | 50.56±0.94a | 14.30±0.68d | 4.03±1.94e |
| IV | 51.60±3.78a | 19.78±2.20c | 11.85±1.38d |
| V | 26.50±7.15bc | 24.44±3.15b | 25.28±1.51c |
| VI | 21.56±3.92c | 21.58±1.26bc | 14.63±2.62d |

* Antifungal activity represents percentage of control and each values represents mean ± standard deviation (n=5)

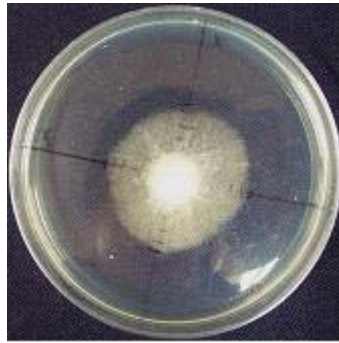
** Mean followed by the same letter within the column are not significantly different at <0.05 according to Duncan's new multiple-range test.



Control



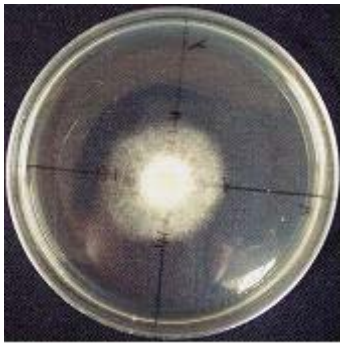
Fraction group I



Fraction group II



Fraction group III



Fraction group IV

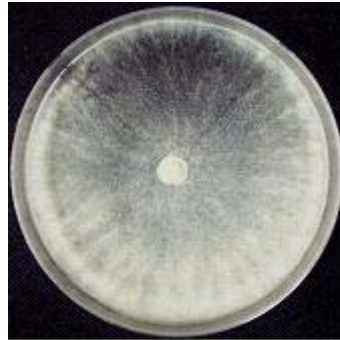


Fraction group V



Fraction group VI

Fig. 3-4-58. Effect of each fraction group to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis cinerea* for 7days.



Control



Fraction group I



Fraction group II



Fraction group III



Fraction group IV

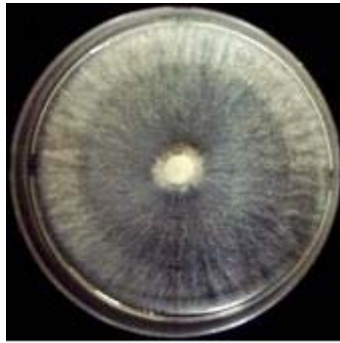


Fraction group V

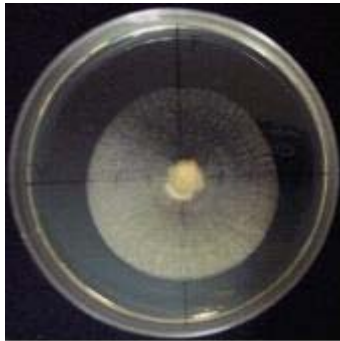


Fraction group VI

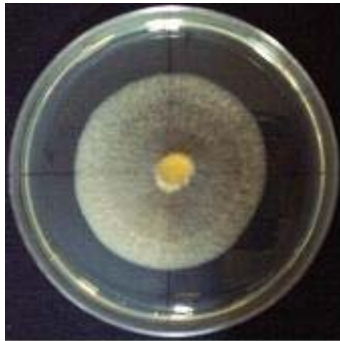
Fig. 3-4-59. Effect of each fraction group to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* from *Munsan* for 4days.



Control



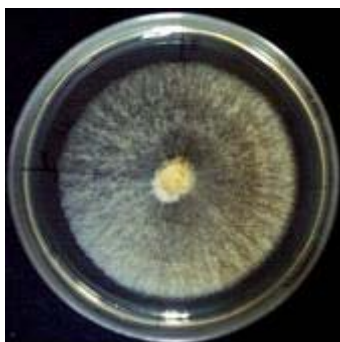
Fraction group I



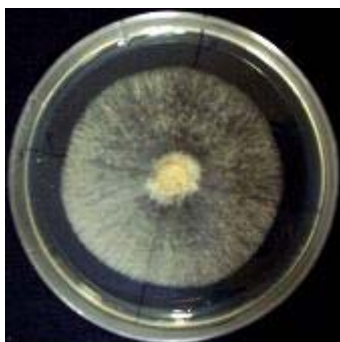
Fraction group II



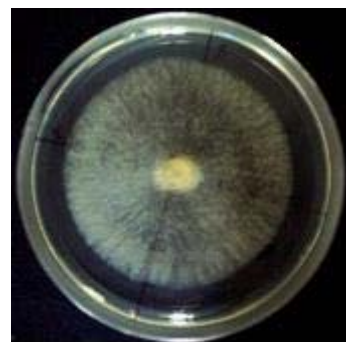
Fraction group III



Fraction group IV



Fraction group V



Fraction group VI

Fig. 3-4-60. Effect of each fraction group to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* from *Kumsan* for 3days.

3) HPLC 분석

Botrytis spp. 3종 대하여 가장 높은 항균활성을 나타낸 fraction group I, II를 HPLC system을 사용하여 분석하였다. Fig. 3-4-61은 HPLC system을 사용하여 분석한 fraction group I, II의 HPLC chromatogram 이다.

Fraction group I에는 9개의 페놀성 물질이 혼합되어 있는 것을 알 수 있었으며, fraction group II에는 16개의 페놀성 물질이 혼합되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 특히 fraction group 그룹 I과 II에서 7.68 분 retention time에 나타나는 물질 6번과 물질 5번은 거의 동일한 물질로 판단되며, 이 물질이 항균활성이 영향을 미친다고 추측된다.

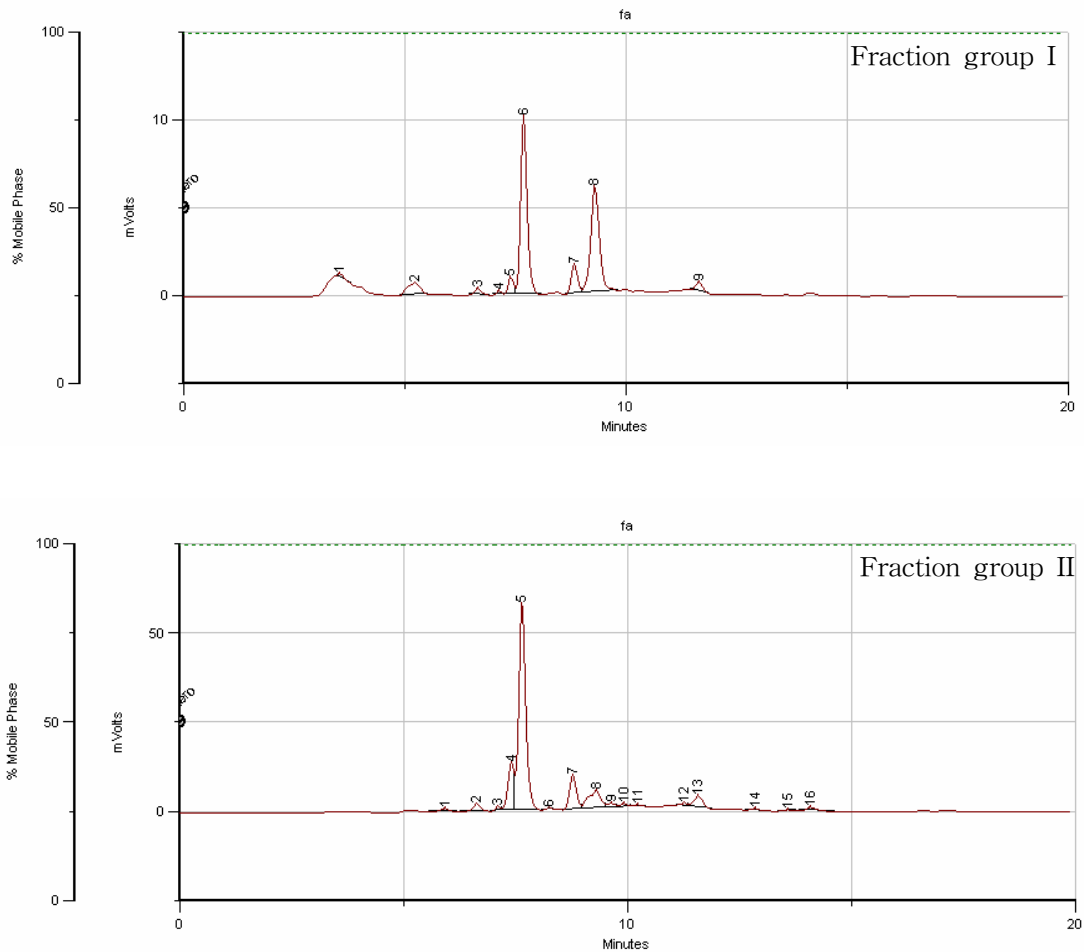


Fig. 3-4-61. HPLC chromatograms of fraction group I and II

라. 결 론

열수 추출물의 물질분리를 위한 developing solution은 n-hexane : chloroform : ethyl acetate의 비율이 12 : 18 : 8이 가장 좋았고, 이 developing solution에 formic acid의 비율을 0.2 첨가시킨 developing solution이 물질을 가장 잘 분리시키는 것으로 판단된다.

Column 크로마토그래피와 UV 스펙트럼 결과를 종합해보면 열수추출물은 6개의 fraction group으로 분리 할 수 있었다.

Fraction I 과 II group은 *Botrytis* spp. 3종 대하여 높은 항균활성을 나타내었다.

Fraction group I에는 9개의 페놀성 물질이 혼합되어 있는 것을 알 수 있었으며, fraction group II에는 16개의 페놀성 물질이 혼합되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 특히 fraction group 그룹 I과 II에서 7.68 분 retention time에 나타나는 물질 6번과 물질 5번은 거의 동일한 물질로 판단되며, 이 물질이 항균활성이 영향을 미친다고 추측된다.

4. Lab. 수준에서 시제품 및 시판제품의 곰팡이 성능평가

가. 서 설

잣빛곰팡이 병원균의 감염에는 습도가 가장 중요한데 이 병원균은 공기 중의 상대습도가 90% 이상이어야 발아할 수 있고 병원균은 광에 의하여 포자형성이 유기되는 것으로 알려져 있으며, 병든 조직에는 분생포자를 가진 많은 분생자병이 뭉쳐있고, 바람에 의해 먼 거리까지 포자를 전파 시킨다.

포도의 경우 잣빛곰팡이병원균은 개화기 끝무렵부터 침입하여 veraison(과실의 성숙 초기)까지 잠복상태로 있다가 그 이후부터 발병한다. 이 시기까지 발병하지 않는 이유는 glycolic acid, tannins, phytoalexins와 같은 여러 가지 천연 항균 물질 때문에 균의 생장이 억제되는 것이다. Veraison이후 이러한 물질은 감소되고 병원균의 생장은 가능하게 된다. 따라서 포도, 딸기 등은 성숙기가 특히 감염되기 쉽다.

본 병원균의 방제는 물리적 방제 수단으로 재배 시설내의 환기 및 온풍 장치를 이용 저온 다습의 발병환경을 개선하거나 발병 식물을 제거하여 2차 전염원을 제거하는 방법, 밀식을 피하고 과번성을 막기 위하여 질소 비료의 사용을 제한하는 방법이 있다. 그러나 가장 널리 사용되는 방법은 살균제를 사용하는 방법이다.

약제 방제는 발생 초기에 중점을 두고 7- 10일 간격으로 실시한다. 다발생 포장에서 균핵형성 균주의 분포가 많은 경우 토양 소독을 실시한다. 사실상 잣빛곰팡이병 발생 위험도를

예상할 수 있는 효과적인 방법이 거의 없는 실정이므로 예방적 차원의 주기적인 살균제 살포가 일반적으로 추천되고 있다

잣빛곰팡이병 방제 약제로는 여러 계열의 약제가 사용되고 있는데 그 특성을 살펴보면 다음과 같다.

1) 호흡 저해제

Dithiocarbamate계의 thiram과 chloromethylmercaptan derivatives로 folpet, dichlofluanid 등은 곰팡이의 포자 발아를 주로 저해한다.

2) Tubulin 생합성 저해제

Benzimidazole계 살균제로 carbendazim, benomyl, thiophanate methyl 등이 널리 사용되고 있다. 이 계열의 살균제는 곰팡이의 포자 발아보다는 균사의 성장을 억제하는 작용을 지닌 살균제로 곰팡이의 β - tubulin에 결합하여 곰팡이의 tubulin 생합성을 저해한다. 작용 범위가 넓고, 침투 이행성이 높고 낮은 농도에서도 좋은 약효를 보이므로 잣빛곰팡이병 방제뿐만 아니라 다른 병에도 널리 사용되어 왔다.

3) Dicarboximides 와 Phenylpyrroles

Benzimidazole계 살균제의 저항성 문제를 극복하기 위하여 새로운 대체 살균제로 dicarboximide계 살균제인 procymidone, vinclozolin, iprodione 등이 개발되어 지금까지 널리 사용되고 있다. 이 두 계열의 살균제는 tocopherol에 의하여 살균 활성이 소멸되는 것으로 볼 때 활성 산소 발생으로 지질 과산화(lipid peroxidation)에 의하여 살균 활성을 나타낸다고 한다.

4) Anilinopyrimidines

국내에는 아직 등록된 약제는 없으나 이 계열의 살균제는 작용범위가 넓은 dimethanil, cyprodinil, mepanipyrin이 최근에 유럽에서 등록되어 사용되고 있다. 이 살균제들은 병원균이 기주 식물을 침입할 때 protease, cellulase, lipase와 같은 가수분해 효소의 분비를 저해하므로 기주 식물의 침입을 저해하는 작용 메커니즘을 지닌 것으로 알려져 있다

일반적으로 국내에 보급되고 있는 대표적인 잣빛곰팡이병 방제 약제로는 benzimidazole계 살균제인 benomyl, carbendazim, thiophanate methyl과 dicarboximide계로 procymidone, vinclozolin, iprodione 등이 있다. Benomyl은 살균 작용 범위가 넓고, 침투성이며 낮은 농도에서도 좋은 약효를 보이므로 잣빛곰팡이병 방제뿐만 아니라 다른 병에도 널리 사용되어 왔다.

최근 친환경적 농업의 바람을 타고 농약에 의한 병해충 방제보다는 농약이외의 물질을 이용한 병해충 방제에 대하여 많은 농업인들이 관심을 가지고 있는 가운데 생물학적 방제기술이 새로운 방제법으로 대두되고 있다.

생물적소재(예를 들면 유용 미생물, 천적 및 식물추출물 등)를 이용하여 병해충 및 잡초를 방제하는 기술인 생물학적 방제제는 “생물적·화학적 방제제(biological and biologically derived pest control agent)”라고 하며 그 효과가 공식적인 시험을 통해 인정되는 농약으로 등록을 마친 것을 ‘바이오농약(biopesticide)’이라고 한다. 생물학적 방제는 현재까지 획일적으로 이루어져 오던 합성농약에 의한 화학적 방제법에서 탈피하여 좀 더 친환경적인 방제 전략을 도입하고자 하는 사회적 인식과 노력 속에서 최근 들어 범세계적으로 많은 주목을 받고 있다. 이러한 생물학적 방제에 근간을 이루는 바이오농약은 넓은 의미로 ‘병, 해충, 잡초를 방제하기 위하여 이용되는 미생물, 생물 또는 천연물로부터 유래된 물질’을 모두 포함하는 것으로 우리의 건강과 국내의 살균성 바이오농약에 대한 연구는 1980년을 전후로 기초적인 연구가 시작되어 80년대 중반부터 실질적인 식물병 방제기술이 도입되었다.

인삼뿌리썩음병 방제연구를 시작으로 주요 작물의 모잘록병, 역병, 잣빛곰팡이병, 무배추 무사마귀병 등의 방제를 위한 연구가 대학교, 국가 연구기관 및 기업체 등에서 수행되어 왔으며, 그 결과 몇 가지 제품이 개발되어 미생물 비료로 등록·판매되었다.

본 절에서는 잣빛곰팡이병의 방제 약제로 시판되고 있는 시판품과 본 연구진이 제조한 시제품을 이용하여 잣빛곰팡이의 균사생장 저해효과 (항균활성)을 비교, 확인함으로써 제품화 가능성을 진단하고자 실시하였다.

나. 재료 및 방법

1) 공시균주

가) *Botrytis cinerea* (KCTC : NO.6973)

시판품의 항균활성 성능평가에 사용되는 공시균주인 *Botrytis cinerea*(NO.6973)는 한국 유전자은행(KCTC)으로부터 분양받아 PDA 및 PSA배지를 사용하여 25℃ 배양기 내에서 배

양하여 실험에 사용하였다.

나) *Botrytis* spp. from *Kumsan*

경남 진주시에 위치한 고추농가 (경남진주시 금산면 가방리 1035번지)에서 잣빛곰팡이병에 감염된 고추 잎을 채취한 다음, PSA배지 및 PDA배지를 사용하여 균주를 분리, 25°C에서 배양하여 실험에 적용하였다. 고추농가에서 채취한 잣빛곰팡이를 *Botrytis* spp. from *Kumsan*이라 명명하였다.

다) *Botrytis* spp. from *Munsan*

경남 진주시에 위치한 고추농가 (경남진주시 문산읍 산곡리 584-8번지)에서 잣빛곰팡이병에 감염된 고추 잎을 채취한 다음, PSA배지 및 PDA배지를 사용하여 균주를 분리, 25°C에서 배양하여 실험에 적용하였다. 고추농가에서 채취한 잣빛곰팡이를 *Botrytis* spp. from *Munsan*이라 명명하였다.

2) 공시재료

본 연구에서 제조된 시제품(시제품 A, 시제품 B) 2종과 현재 시판되고 있는 잣빛곰팡이 방제품 2종(시판품 D, 시판품 N)을 잣빛곰팡이에 대한 항균활성 비교하기 위하여 사용하였다.

3) 항균활성

가) 배지조제

공시재료인 시제품 A, B 및 시판품 D, N을 멸균된 증류수에 투입하여 일정농도로 용해한 다음, 이를 PDA배지에 혼합하여 배지를 조제하였다. 시제품 및 시판품은 배지 멸균 후 첨가하였다 (Fig 3-4-62. 참조).

나) 항균활성 측정

시제품 및 시판품이 일정한 농도로 함유된 배지에 계대배양된 *Botrytis* spp. 균주 3종으로부터 10 mm의 군사 pellet을 분리하여 접종한 다음 25°C에서 배양하였다. 이때 대조구는

추출물이 첨가되지 않은 배지를 사용하였다. 항균활성은 식 1에 의거하여 계산하였으며, 균사생장량은 5반복 평균값을 사용하였다.

$$\text{항균활성, \%} = \left\{ 1 - \frac{\text{시험구의 균사생장길이(mm)}}{\text{대조구의 균사생장길이(mm)}} \right\} \times 100 \dots\dots\dots \text{식 (1)}$$

다) 통계처리

Botrytis spp. 3종의 항균활성에 대한 통계분석을 위하여 각 계통의 5개체 5반복 값을 Micro office EXCEL을 이용하여 표준편차를 나타내었으며 각 실험구 사이의 유의성은 SAS Corporate Statistics GLM의 Release 8.01을 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan의 multiple range test로 분석하였다.



Fig. 3-4-62. Prototype and product for test of antifungal activity against *Botrytis* spp.

다. 결과 및 고찰

1) 시제품 및 시판품의 특성

본 연구진이 제조한 시제품 A와 B의 pH는 6.9 - 8.1 범위에 있었으며, 희석농도에 따라 약간의 편차가 나타났다. 시판품 D는 분말형 제품으로 희석 후 pH 6.2 -7.2 범위였고, 시판품 N은 pH 4.2 - 4.9의 범위였다.

Fig. 3-4-63은 시제품과 시판품을 각각 증류수에 희석한 시료 사진으로 시제품 A, B 및 시판품 D는 액체시료의 색상이 투명한데 비하여 시판품 N은 저농도에서 황색을 나타냈다.

2) 시제품 및 시판품의 항균활성

가) *Botrytis cinerea* 에 대한 항균활성

Fig 3-4-64와 Fig 3-4-65는 *Botrytis cinerea* 에 대한 시제품 A의 항균활성시험 결과로, 희석농도에 따른 항균활성 차이는 유의성이 없었으며, 약 8-12%의 항균활성을 나타냈다. 이러한 수준의 항균활성은 시제품으로서 효능이 낮다고 판단되며, 효능을 증가시키기 위한 천연물 첨가제가 더 필요할 것으로 판단되었다.

Fig 3-4-66과 Fig 3-4-67은 *Botrytis cinerea* 에 대한 시제품 A의 항균활성시험 결과로, 시제품 B는 약 125% 희석되었을 때 약 14%의 항균활성을 나타냈으며, 이러한 수준의 항균활성은 제품으로서 효능이 낮음으로서 추가적인 천연물 방제제가 필요할 것으로 판단되었다.

Fig 3-4-68 및 Fig 3-4-69는 *Botrytis cinerea* 에 대한 시판품 D의 항균활성시험 결과로, 25℃의 생장온도에서 PDA배지에 시판품 D를 희석농도별로 조절하였을 때 각각의 *Botrytis cinerea* 균사생장 저해율은 control과 생장을 비교하였을 때 0.8g/L, 0.4g/L배 희석된 Medium에서 13%정도의 균사생장 저해가 나타났으며 유의성이 인정되었다. 이러한 수치는 본 연구진이 제조한 시제품의 성능과 거의 유사한 수준이었다.

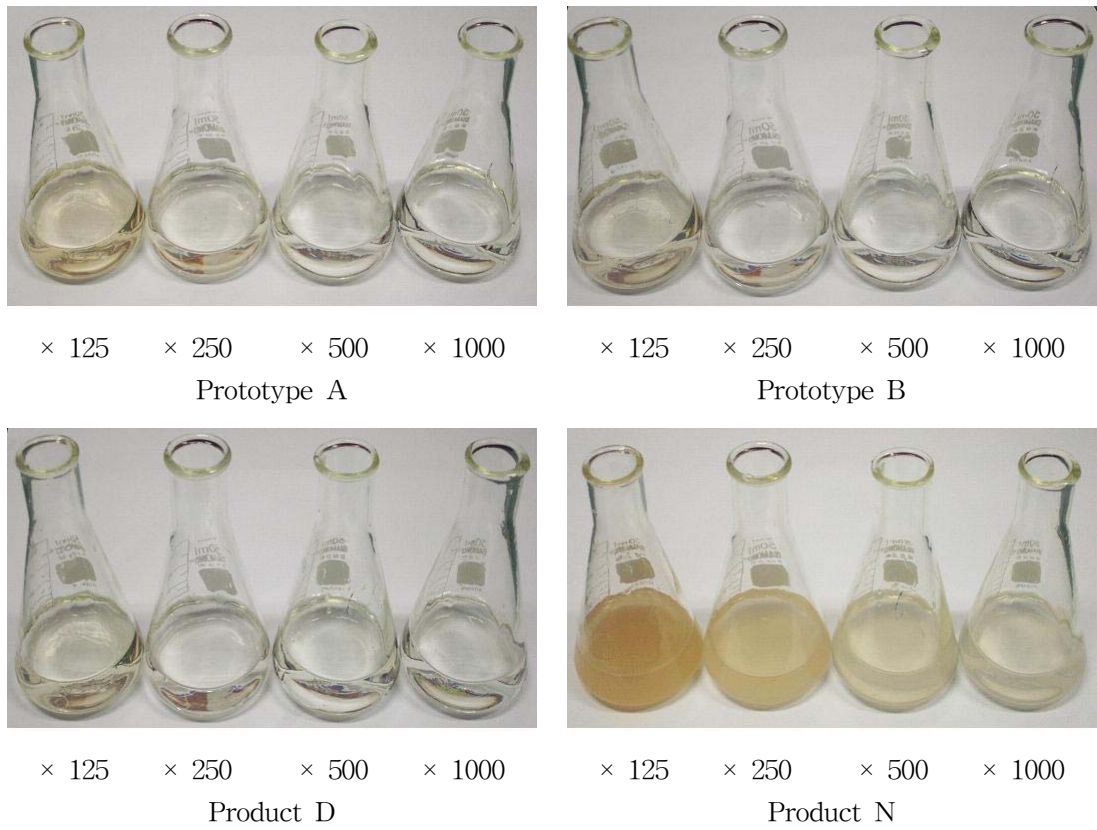


Fig. 3-4-63. Diluted solutions of prototypes and products

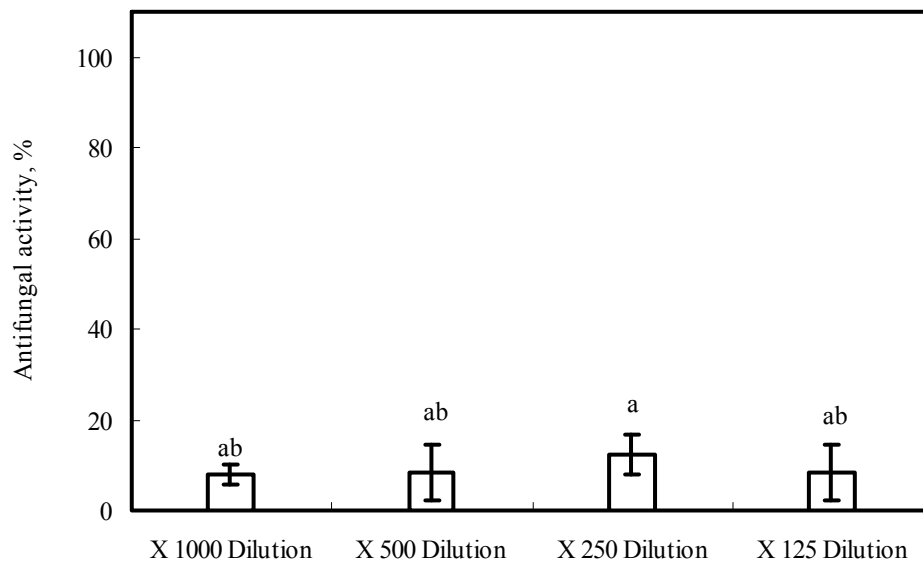


Fig. 3-4-64. Antifungal activity of prototype A against *Botrytis cinerea*.



Control



× 1000 dilution



× 500 dilution



× 250 dilution



× 125 dilution

Fig. 3-4-65. Effect of prototype A to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis cinerea*

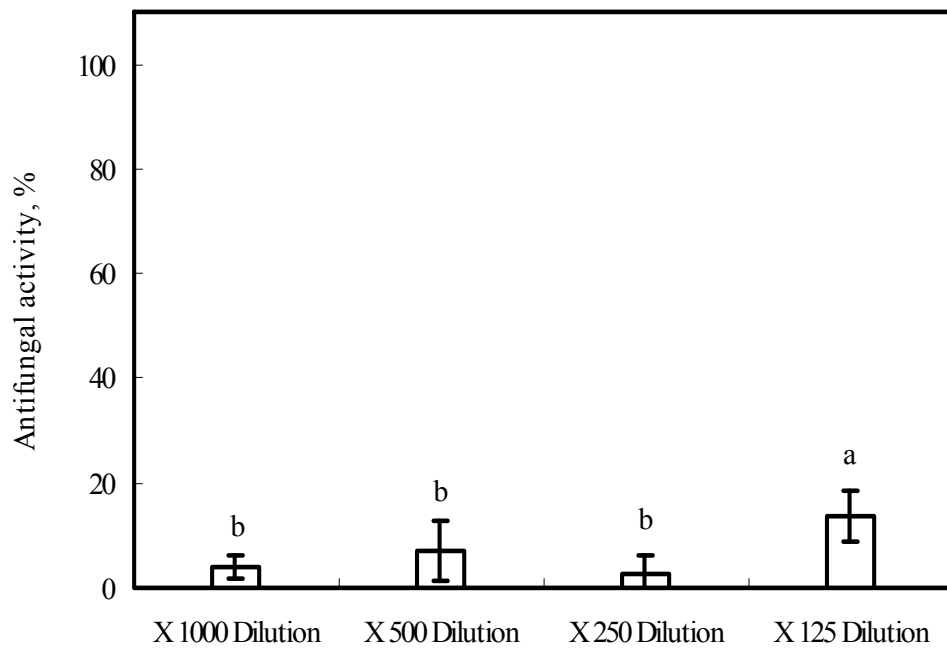


Fig. 3-4-66. Antifungal activity of prototype B against *Botrytis cinerea*.



Control



× 1000 dilution



× 500 dilution



× 250 dilution



× 125 dilution

Fig. 3-4-67. Effect of prototype B to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis cinerea*

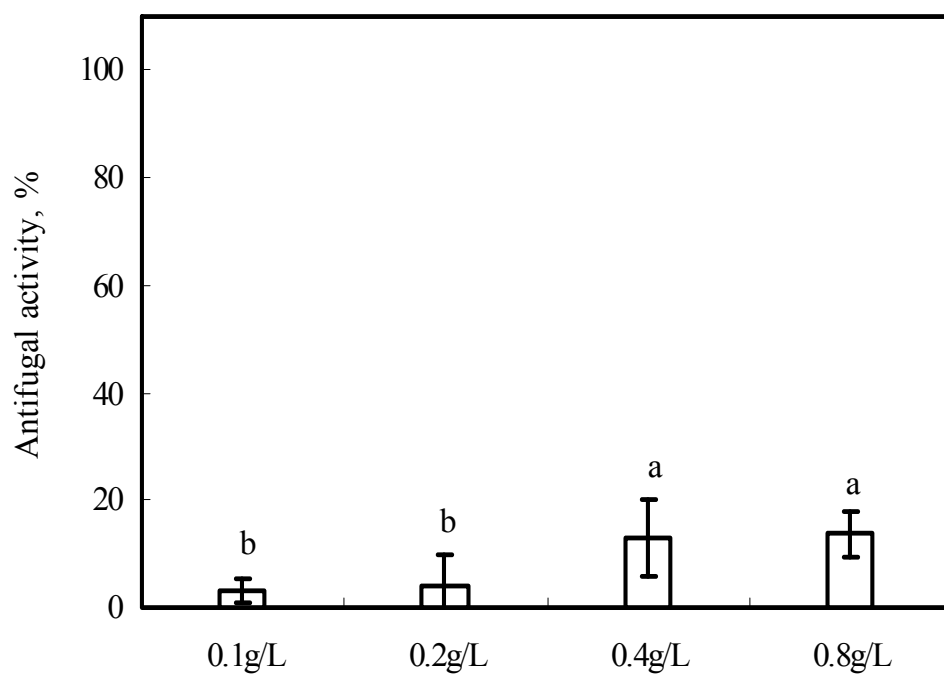


Fig. 3-4-68. Antifungal activity of product D against *Botrytis cinerea*.



Control



0.1g/L



0.2g/L



0.4g/L



0.8g/L

Fig. 3-4-69. Effect of product D to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis cinerea*

Fig 3-4-70과 Fig 3-4-71은 25℃에서 *Botrytis cinerea*에 하여 시판품 N을 각각의 희석 배율로 적용시킨 PDA 배지상에서 7일 동안 배양시킨 후, 항균활성을 나타냈다. PDA배지에 시판품 N을 희석 농도별로 조절하였을 때, 각각의 *Botrytis cinerea* 균사생장 저해율을 나타낸 결과로서 시판품을 희석배율로 첨가한 모든 배지에서 균사가 성장하지 않았다. 즉 거의 100%에 근접한 항균활성을 나타냈다. 배지에 투입된 시판품 N의 양은 업체에서 권장하는 수준의 양이었지만, 그 항균활성은 대단히 높은 수준이었다. 오히려 작물에 대한 약해가 우려되는 수준이었다.

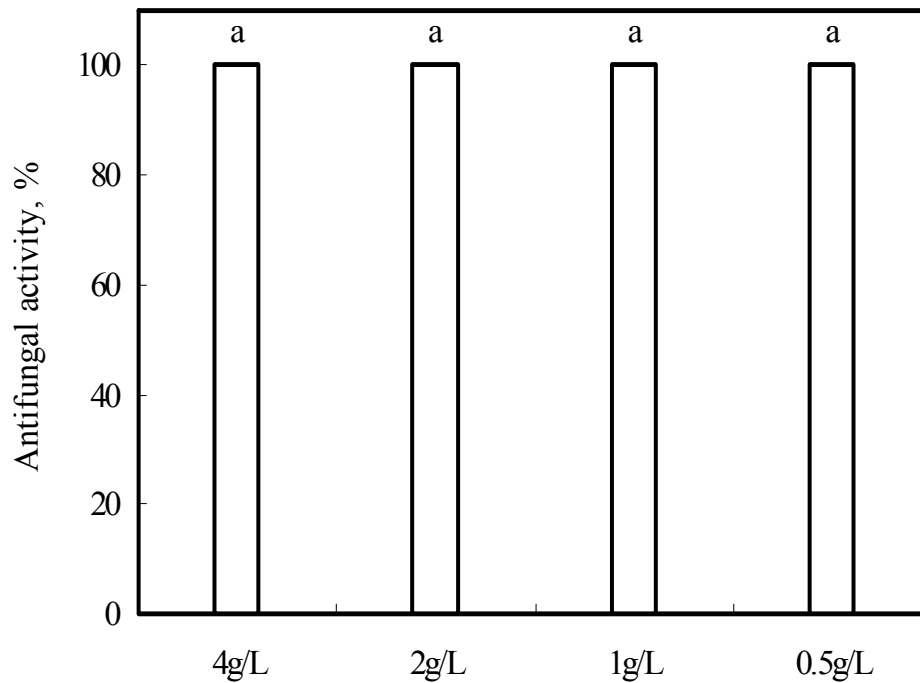


Fig. 3-4-70. Antifungal activity of product N against *Botrytis cinerea*.



Control



0.5g/L



1.0g/L



2.0g/L



4.0g/L

Fig. 3-4-71. Effect of product N to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis cinerea*

나) *Botrytis* spp. from *Munsan* 에 대한 항균활성

Fig. 3-4-72와 Fig. 3-4-73은 *Botrytis* spp. from *Munsan*에 대한 시제품 A을 각각의 희석배율로 적용시킨 PDA배지에 25°C에서 5일 동안 배양시킨 후 항균활성을 나타낸 결과이다.

희석농도에 따른 *Botrytis* spp. from *Munsan*의 항균활성은 125배 및 250배에서 약 7% - 15% 수준으로 나타났다. 이러한 수준은 방제제의 효력 측면에서 시장성이 뒤떨어진다고 판단되었다.

Fig. 3-4-74와 Fig. 3-4-75는 *Botrytis* spp. from *Munsan*에 대한 시제품 B을 각각의 희석배율로 적용시킨 PDA배지 상에서 5일 동안 배양시킨 후, 항균활성을 나타낸 결과이다. 5일 성장에서 125배, 250배 희석된 배지에서 항균활성이 각각 20%, 10%로 나타났으며, 농도에 따른 유의성이 나타났다. 이러한 항균활성의 수준은 방제제로서의 가능성을 보여주는 부분이라고 판단된다.

Fig. 3-4-76과 Fig. 3-4-77은 *Botrytis* spp. from *Munsan*에 대한 시판품 D를 각각의 희석배율로 적용시킨 PDA배지에서 5일 동안 배양시킨 후, 항균활성을 나타낸 결과이다. 투입중량이 0.1 g/L부터 0.8 g/L까지 항균활성은 유의성이 나타났으며, 그 값은 8% - 23% 수준이었다. 시판품 D는 잣빛곰팡이, *Botrytis* spp. from *Munsan*에 대하여 항균활성이 있는 것으로 판단되었다. 이 수치는 시제품 B와 거의 비슷한 항균활성 수준이었다.

Fig. 3-4-78과 Fig. 3-4-79는 *Botrytis* spp. from *Munsan*에 대한 시판품 D를 각각의 희석배율로 적용시킨 PDA 배지에서 5일 동안 배양시킨 후, 항균활성을 나타낸 결과이다. PDA배지에 시판품 N을 희석농도별로 첨가하였을 때, 모든 배지에서 균사가 성장하지 못하여 거의 100% 에 근접하는 항균활성을 나타냈다. 이러한 수치는 항곰팡이 제제로서는 우수하다고 판단되지만, 작물의 성장이나 수확에 나쁜 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 배제할 수 없다.

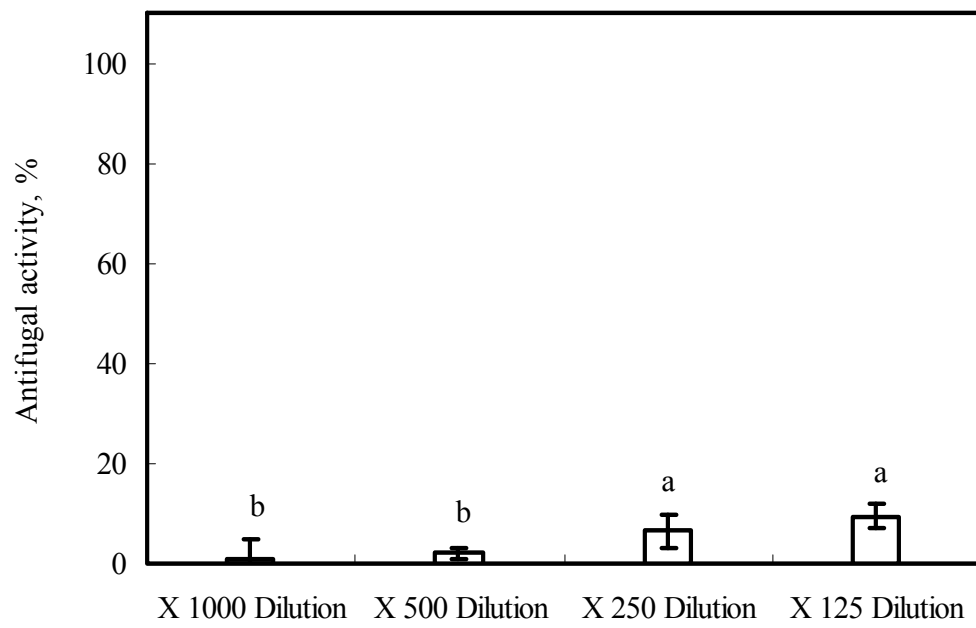


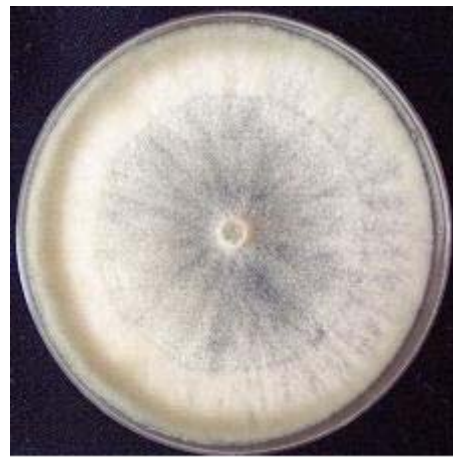
Fig. 3-4-72. Antifungal activity of prototype A against *Botrytis* spp. from *Munsan*



Control



× 1000 dilution



× 500 dilution



× 250 dilution



× 125 dilution

Fig. 3-4-73. Effect of prototype A to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan*.

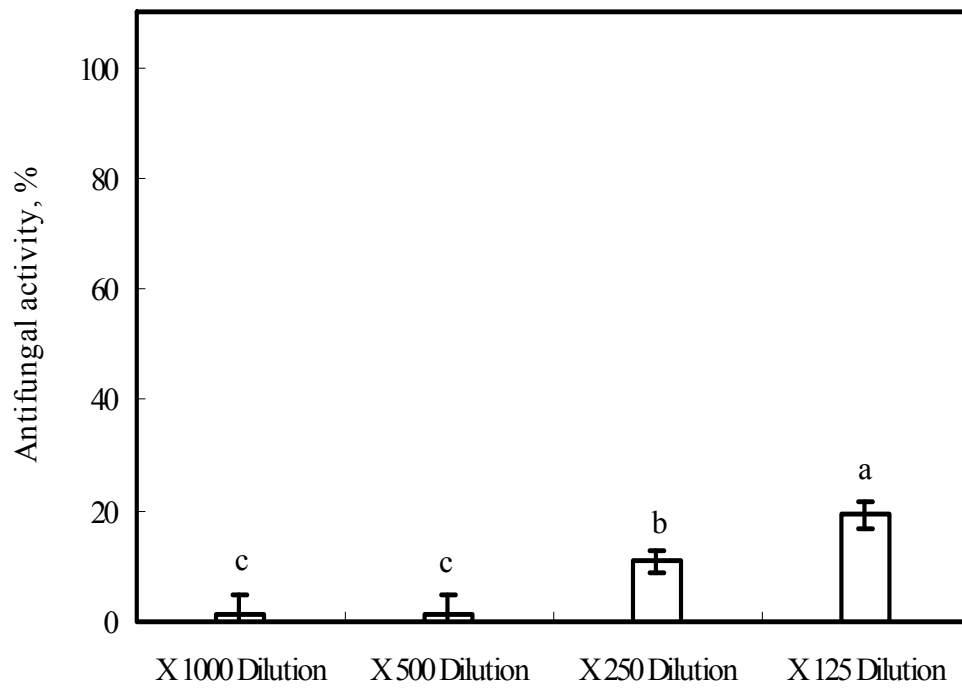


Fig. 3-4-74. Antifungal activity of prototype B against *Botrytis* spp. from *Munsan*



Control



× 1000 dilution



× 500 dilution



× 250 dilution



× 125 dilution

Fig. 3-4-75. Effect of prototype B to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* sp. from *Munsan*.

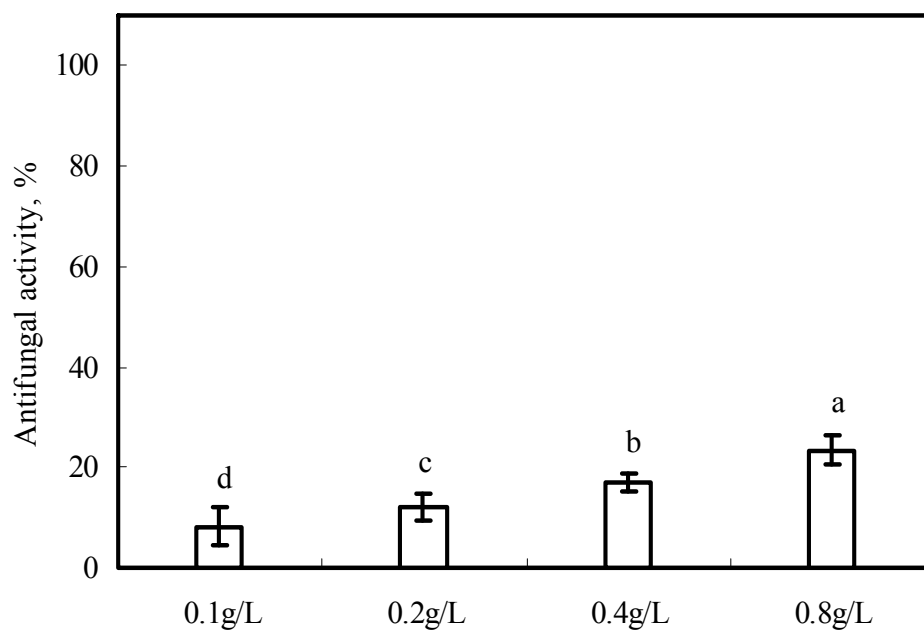


Fig. 3-4-76. Antifungal activity of product D against *Botrytis* spp. from *Munsan*



Control



0.5g/L



1.0g/L



2.0g/L



4.0g/L

Fig. 3-4-77. Effect of product D to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan*.

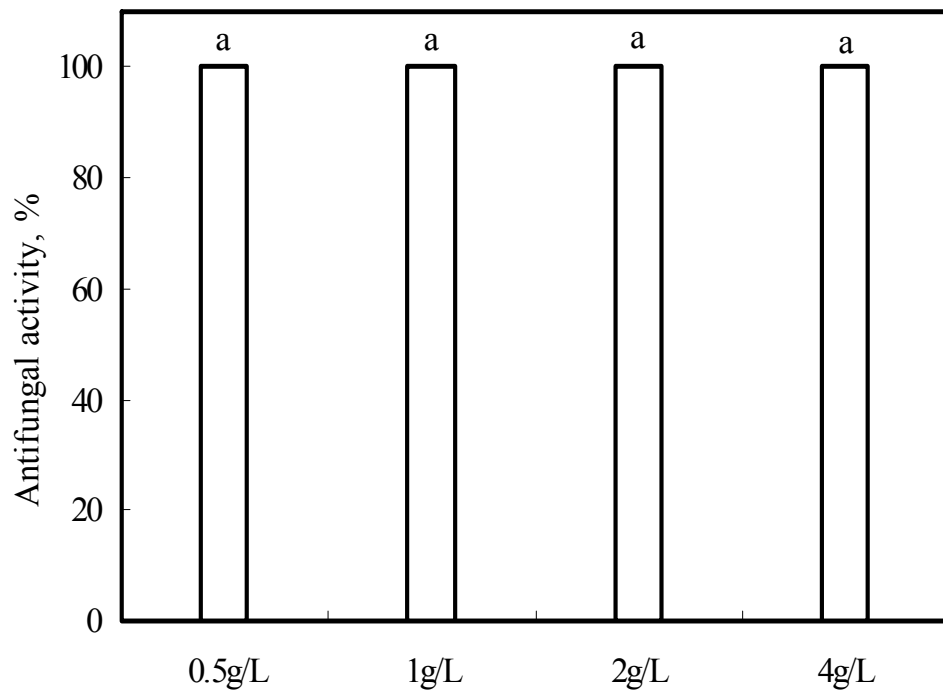


Fig. 3-4-78. Antifungal activity of product N against *Botrytis* spp. from Munsan



Control



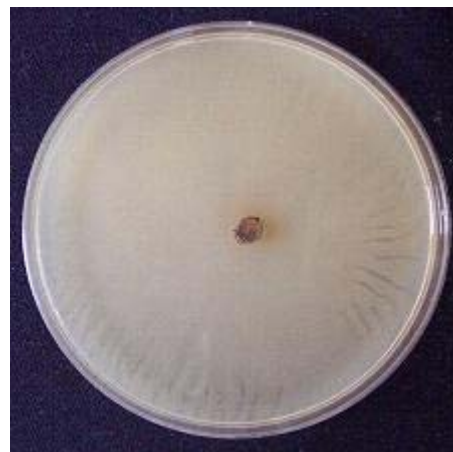
0.5g/L



1.0g/L



2.0g/L



4.0g/L

Fig. 3-4-79. Effect of product N to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Munsan*.

다) *Botrytis* spp. from *Kumsan* 에 대한 항균활성

Fig. 3-4-80과 Fig. 3-4-81은 *Botrytis* spp. from *Kumsan*에 대한 시제품 A의 항균활성을 나타낸 결과로 각각의 희석배율이 적용된 PDA 배지에서 7일 동안 배양시켰을 때 희석농도 125배, 250배는 500배와 1000배에 비교하여 유의성이 나타났으며, 항균활성은 약 14% 수준이었다. 이러한 결과는 항곰팡이 방제제로서 방제성능은 약간 낮지만, 천연물 유래 제품으로서는 우수하다고 판단되었다.

Fig. 3-4-82와 Fig. 3-4-83은 *Botrytis* spp. from *Kumsan*에 대한 시제품 B의 항균활성을 나타낸 결과로 각각의 희석배율이 적용된 PDA 배지에서 7일 동안 배양 시켰을 때, 모든 농도에서 항균활성은 3% 이하로 나타났다. 이러한 결과는 시제품 A와는 매우 다른 결과를 나타냈다. 시제품 B는 *Botrytis* spp. from *Kumsan*대하여 항균활성이 거의 없는 수준이었다. 시제품 A와 시제품 B는 같은 잣빛곰팡이 속의 범위에서도 그 효능이 다르다는 사실은 매우 흥미로운 사실이었다.

Fig. 3-4-84와 Fig. 3-4-85는 *Botrytis* spp. from *Kumsan*에 대한 시판품 D의 항균활성 결과로 0.1 g/L - 0.8 g/L 농도에서 약 13% - 20%의 항균활성을 나타냈다. 또한 0.8 g/L은 다른 농도와의 유의성이 나타났으며, 항균활성은 시판제품으로서 신뢰할 만한 수준이었다.

Fig. 3-4-86과 Fig. 3-4-87은 *Botrytis* spp. from *Kumsan*에 대한 시판품 N의 항균활성을 나타낸 결과, 각각의 희석배율로 적용시킨 PDA배지에서 5일 동안 배양시켰을 때, 균사생장은 전혀 없었다. 이때의 항균활성은 거의 100% 수준이었으며, 본 연구에서 실험된 시제품 및 시판품중에서 가장 우수한 결과를 나타냈다.

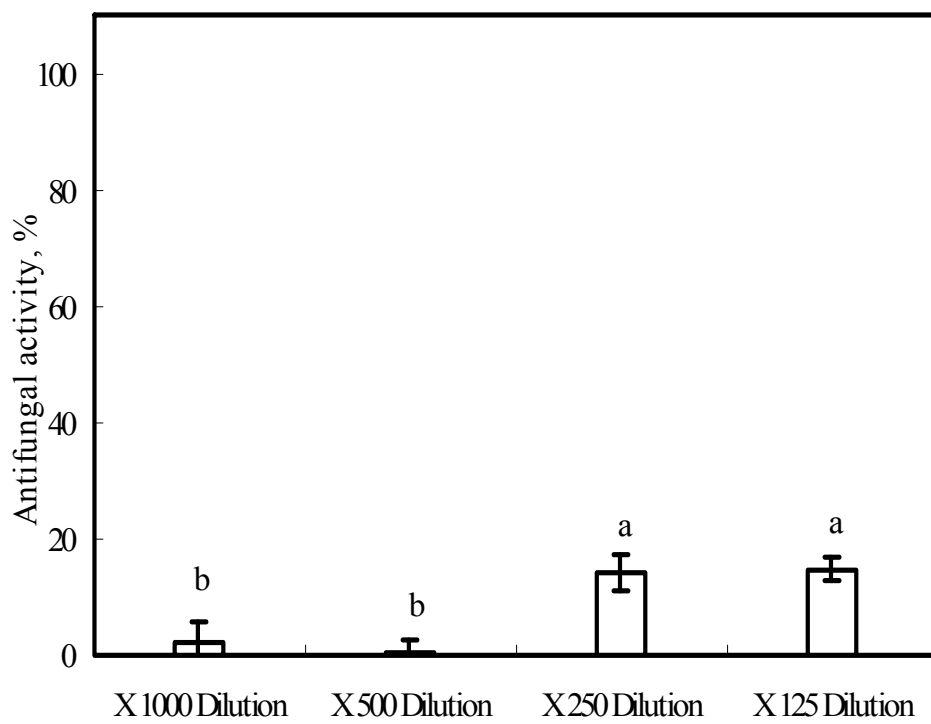


Fig. 3-4-80. Antifungal activity of prototype A against *Botrytis* spp. from *Kumsan*



Control



× 1000 dilution



× 500 dilution



× 250 dilution



× 125 dilution

Fig. 3-4-80. Effect of prototype A to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* sp. from *Kumsan*

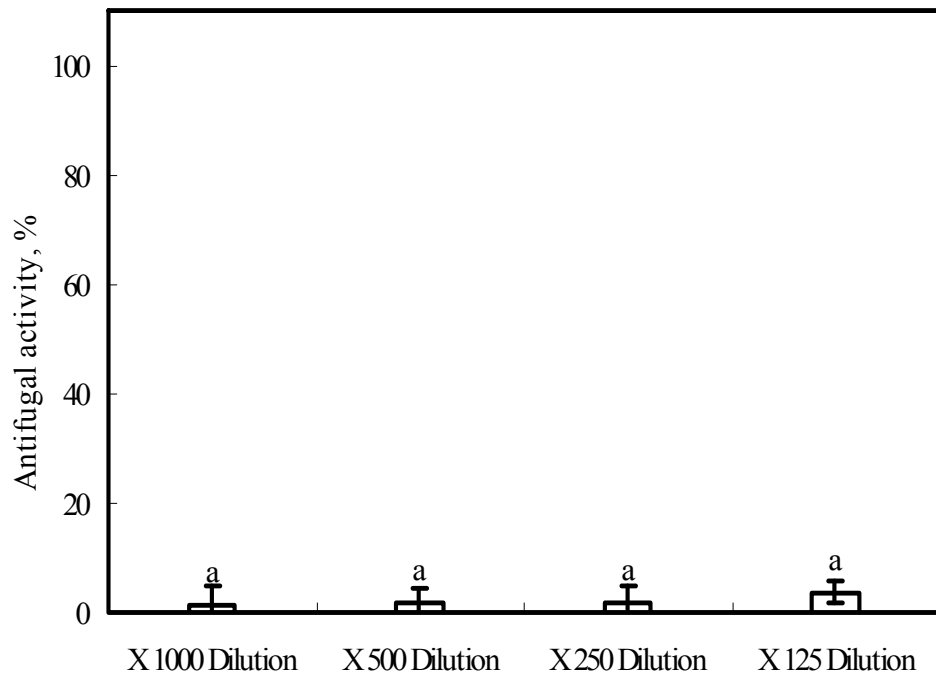
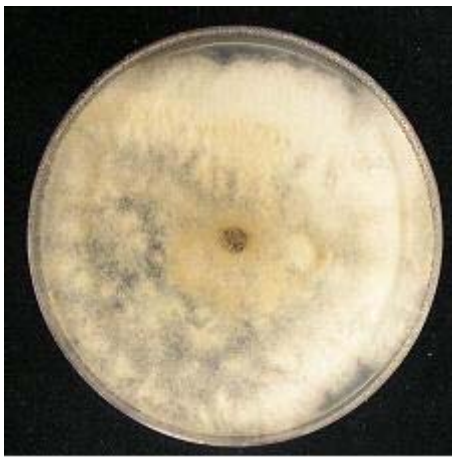


Fig. 3-4-82. Antifungal activity of prototype B against *Botrytis* spp. from *Kumsan*



Control



× 1000 dilution



× 500 dilution



× 250 dilution



× 125 dilution

Fig. 3-4-83. Effect of prototype B to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan*

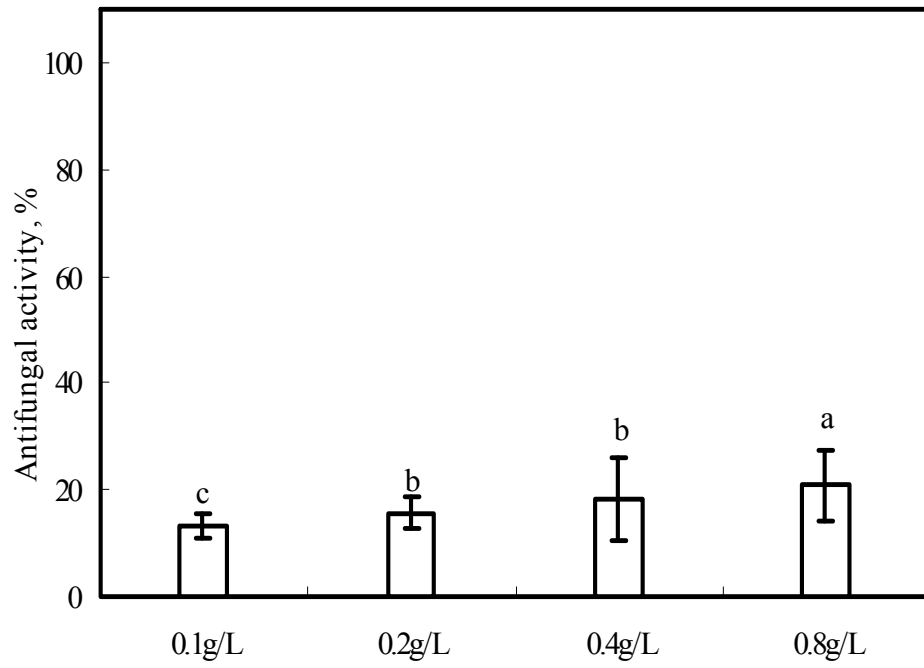


Fig. 3-4-84. Antifungal activity of product D against *Botrytis* spp. from *Kumsan*



Control



0.1g/L



0.2g/L



0.4g/L



0.8g/L

Fig. 3-4-85. Effect of product D to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan*

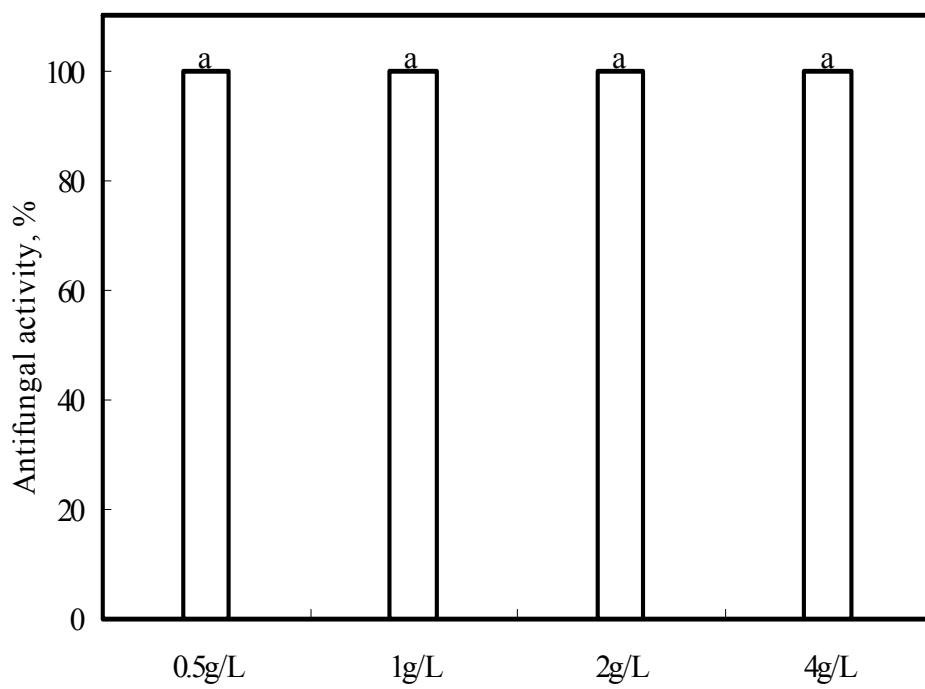


Fig. 3-4-86. Antifungal activity of product N against *Botrytis* spp. from *Kumsan*



Control



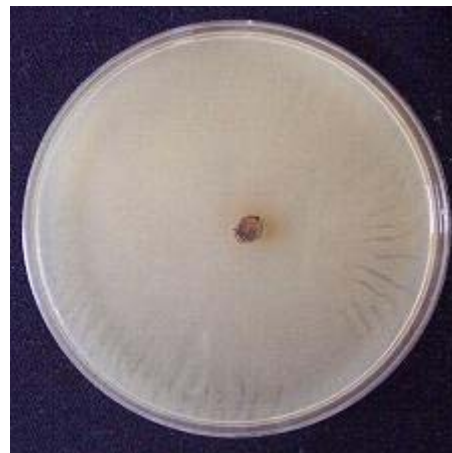
0.5g/L



1.0g/L



2.0g/L



4.0g/L

Fig. 3-4-87. Effect of product N to PDA medium at 25°C for mycelial growth of *Botrytis* spp. from *Kumsan*.

라. 결 론

시중에 판매되고 있는 2종의 시판품과 본 연구에서 제조된 시제품 2종의 잣빛 곰팡이 3종에 대한 항균활성 능력 비교한 결과 다음과 같은 결과를 획득하였다.

본 연구진이 제조한 시제품 A는 *Botrytis spp. from Kumsan*에 대한 항균활성이 약 14.8%로서 시판품 D와 거의 비슷한 수준이었다.

시제품 B는 *Botrytis cinerea* 및 *Botrytis spp. from Munsan*에 대한 항균활성이 13%, 19%로서 시판품 D의 항균활성 13%, 23% 수준과 거의 비슷하게 나타났다.

본 연구에서 제조된 시제품 A와 B는 현재 수준으로서는 시장 경쟁력이 약하지만, 향후, 천연물로 유래된 항균물질을 추가한다면, 시장 진입가능성은 충분히 있다고 판단된다.

본 연구의 결과물인 시제품들은 농약제조업체나 화학약품업체로부터 제조된 곰팡이방제제와는 차원이 다른 제품으로 특히 무독성으로 인체에 무해한 천연물로 구성되었다는 것이 최대의 장점이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구목표 달성도

본 연구과제의 최종 목표는 첫째 임산자원(간벌재 등)으로부터 전처리, 추출, 분리공정을 개발하고, 이 공정에서 항균력이 강한 천연 제품 생산을 위한 최적화 공정을 개발하여 시제품을 생산한다. 둘째 개발된 제품을 식물 병원성 유해 곰팡이에 적용하여 군사 생장억제제로서의 기능을 검증하고, 그 효능을 최적화하여 생산 농산물의 품질향상 및 친환경 농산물 생산 기술의 초석을 마련하는데 있다.

본 연구의 구체적인 연구개발 목표를 연차별로 나타내면 다음과 같다.

| 구 분 | 연구 개발 목표 | 주요개발 내용 및 범위 |
|------------------------|---|--|
| 1단계 기초연구 (2005년) | <p>(제 1세부과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 목질원료로부터 흰가루병 유사 곰팡이 방제 유효추출물의 분리 공정 확립 <p>(협동과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 흰가루병 유사 곰팡이의 생장억제 원료물질의 선발 및 확보 | <ul style="list-style-type: none"> · 목질자원으로부터 항곰팡이 추출물의 획득을 위한 전처리공정 개발 · 곰팡이 생육억제 추출물 대량생산을 위한 목질 원료의 선별 및 현실적 공급형태 결정 · 목질자원으로부터 항곰팡이 원료물질을 생산하기 위한 분리 및 정제 공정 개발 · 흰가루병 유사 곰팡이의 생육을 저해하는 목질 추출물을 위탁과제와 연계하여 선별 · 흰가루병 유사 곰팡이 생육억제제 원료 생산을 위한 공정의 확립 및 최적화 · 흰가루병 유사 곰팡이 균주를 확보하고 지속적인 계대배양 및 곰팡이 생장환경인자 탐색 · 제 1세부 과제로부터 생산된 목질 추출물의 흰가루병 곰팡이의 생육억제 성능시험 · 곰팡이 생육을 억제하는 목질 추출물 원료의 선발 및 최소저해농도 결정 · Field로부터 채취, 배양된 흰가루병 곰팡이 균주에 대한 목질 추출액의 생장억제 시험 |

| 구 분 | 연구 개발 목표 | 주요개발 내용 및 범위 |
|---------------------------------------|---|---|
| 2단계 응용연구 및 시제품 제작 (2006년) | <p style="text-align: center;">(제 1세부과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 흰가루병 유사 곰팡이 생장억제를 위한 천연 방제제 생산기술 확립 <p style="text-align: center;">(협동과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 천연 목질 항곰팡이 제제의 성능 개선 | <ul style="list-style-type: none"> · 목질원료로부터 곰팡이병 생장억제 base 물질의 대량생산을 위한 공정 개선 연구 · 위탁과제와 연계하여 대량생산된 원료물질의 곰팡이 생장 저해성능의 재확인 · 곰팡이 방제제의 시제품 생산 · 농작물 직접 방제를 통한 시제품의 현장 시험 · 화합물 첨가에 따른 시제품의 성능개선 및 농작물 을 대상으로 한 현장 시험 · 잣빛곰팡이(<i>Botrytis cinerea</i>) 균주를 확보하고, 생육 환경인자를 분석 · 공급된 목질 추출원료의 잣빛곰팡이 생육억제 성능 시험 · 잣빛곰팡이 생육을 억제하는 목질 추출물 원료의 최소저해농도 결정 · 천연 항곰팡이 방제제 성능 개선을 위한 부가 화합 물의 선별 및 성능개선 방법 확보 |

2. 관련분야 기여도

본 연구가 성공적으로 수행됨에 따라서 이용도가 낮은 임산자원(간벌재 등)을 이용하여 고부가 가치를 창출하고, 농산물 재배 시 발생하는 곰팡이성 질병 방제의 어려움을 해결하는 기여할 뿐만 아니라 본 기술에 관련된 산업 발전에도 큰 기여가 가능할 것이라 여겨진다.

또한 현재 경제성장으로 인한 삶의 가치가 높아지면서 안전한 먹거리에 대한 국민의 관심이 높아지고, 이에 대한 규정도 바뀌어 가는 실정에서 농업경영자들도 환경 친화적인 농법으로 관심을 돌리고 있는 시점이다. 화학농약의 오·남용으로 인한 농약의 잔류 문제와 미생물 제제의 과다 사용은 농산물의 품질을 저하시킬 뿐 아니라 저항성으로 인하여 방제효과

가 계속해서 떨어진다는 점은 새로운 기술을 요구하고 있다고 볼 수 있다

. 본 연구에서 중점을 둔 곰팡이성 세균에 대한 현재 농가에서의 방제 기술은 환경농산물 인증기준을 초과하는 방제 약제를 사용하고 있는 실정이다. 이에 따라 유기농산물 인증을 받을 수 없으며 대형 유통 매장이나 백화점의 판매가 거의 불가능한 상황에서 농가는 환경농산물 인증기준을 초과하지 않는 범위 내에서 흰가루병을 억제할 수 있는 천연물 친환경 천연 방제 약품을 요구하고 있다. 연구에서 개발된 제품은 다른 약제와 혼합하여 사용할 수 있는 수용성 제제이고, 천연물로 구성되어 있기 때문에 다른 약제의 약효를 저하 하지 않는 것으로 혼합방제가 가능하며 최적의 시기에 분무 방제 해야만 효과를 나타내는 화학약제와는 달리 사용 시기에 대한 제약을 최소화 하였다.

이러한 가운데 본 연구 개발은 천연물에서부터 곰팡이성 세균 방제 기술을 개발하는 것으로 친환경 농업의 큰 초석이 될 것으로 확신하며, 향후 그 시장의 확대도 매우 유리하게 될 것으로 판단된다.

본 연구에서 개발된 제품은 현재 (주)유림하이텍에서 항곰팡이성 세균 방제를 위한 제품으로 시판되고 있으며, 농가의 실질적인 적용으로 그 효과를 거두어 농민 소득의 증대와 농작물의 가격 안정화를 이루고 있으며 또한 소비자에게도 안전한 먹거리를 제공하여 신뢰성을 구현하고 있는 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제의 최종목표는 목재에 각종 물리 화학적 처리법을 적용하여 항균력이 강한 천연성분을 단리하여 흰가루병 균사 생장억제제로서의 기능을 검증하고, 그 효능을 최적화하여 생산 농산물의 품질 향상 및 친환경 농산물 생산 기술을 마련하는데 있다.

이에 따라서 임산자원 (간벌재 등)으로부터 전처리, 추출, 분리공정을 통한 식물 병원성 유해 곰팡이 방제 약품의 공정개발과 생산에 관한 연구로써 물질의 생산 기술을 확립하는 세부과제와 제제의 성능을 검사하고 개선하는 협동과제로 구성되어 수행하였다. 수행결과 임산자원으로부터 항곰팡이 추출물을 획득하는 전처리 공정을 개발하고, 대량생산을 위한 공정의 최적화를 확립하였으며, 이 공정으로부터 생산한 흰가루병 방제 약제의 Field 실험을 통하여 제품의 안정성 및 성능을 확인하였다. 곰팡이 방제 제품의 생산은 농작물 생산에 있어서 자연 친화적 효과를 얻을 수 있었다. 본 연구의 수행 결과의 활용계획과 이에 따르는 기술 효과는 다음에 나타내었다.

- 천연물에 의한 친환경적 방제는 국민들의 안전한 먹거리 (친환경 농산물 인증) 요구 수용에 활용
- 흰가루병에 의한 농작물의 품질 저하 및 20~30% 수율 감소를 방지함으로써 농민 소득 증대와 농작물의 가격 안정화
- 화학적 방제를 대신한 천연약제 방제로 생태계의 혼란 및 종의 돌연변이 발생을 억제
- 농민들의 과도한 화학약제에 의한 방제 대신 연구 개발 제품을 사용함으로써 최종소비자들에게 신뢰성 회복 구현
- 단위면적당 생산 수율 증가로 인한 농작물의 생산 단가 저하 유도
- 최적의 시기에 분무 방제해야만 효과를 나타내는 화학약제와 달리 사용시기에 대한 제약을 최소화
- 다른 약제와 혼합하여 사용할 수 있는 수용성 제제이며, 천연물로 구성되어 있기 때문에 다른 약제의 약효를 저하하지 않는 혼합 방제제로서 사용 가능

이러한 기술 활용효과를 바탕으로 본 연구에서 개발된 제품을 농가에 직접 적용한 결과 항곰팡이 방제제로서의 역할을 하였으며, 이로 인하여 연구 목표의 기대치에 달성하였다.

시제품은 (주)유림하이텍의 각 지사 및 지점 그리고 대리점을 통해 판매되어 최종적으로 농민들이 구매를 하고 있다. 아래의 표는 제품의 판매 실적을 나타낸 것이다.

| 판매제품명 | 판매금액 (백만원) | 판매일 | 각 지사 및 지점 | 판매국가 |
|-------|---------------|---------------------------|-----------|------|
| 유립슈퍼 | 80 | 2006.04.01~ 2007.04.01 | 각 지사 및 지점 | 한국 |

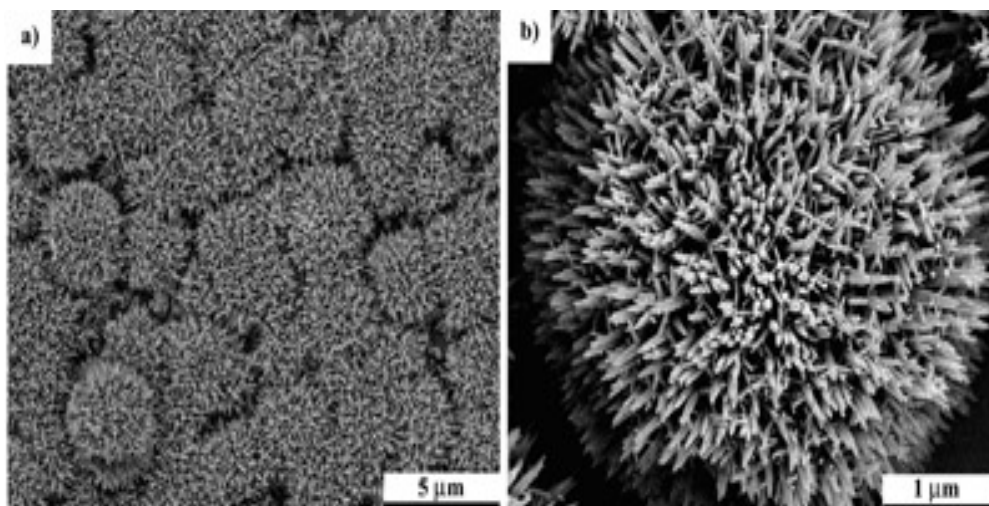
< 제품 판매 실적 >

2년에 걸친 연구로 실용화 단계에 도달하여 상용화되는 연구성과물이 개발되었다. 이것은 항곰팡이제로서 판매실적을 올리고 있으며, 본 기술 개발이 성공적으로 수행됨에 따라 가치가 낮은 간벌재 등에서 부가가치를 창조하여 기업의 소득 증대 및 수익 증진에 기여하고, 또한 친환경적인 제품의 개발로 농업 기술의 향상 뿐 아니라 항곰팡이 제제로 수입되고 있는 제품을 대체하는 국내 자체 기술을 확보하였으며, 안전한 먹거리로 인한 국민 건강에도 기여한 것으로 판단된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 오이 흰가루병 저항성 연관 양적형질유전자좌 분석 :

일본 국립채소 및 차 연구소와 교토 대학 농업대학원 등의 공동 연구팀은 오이(cucumber)의 흰가루병(powdery mildew) 저항성에 연관된 양적형질유전자좌를 분석한 내용을 TAG지 1월호에 게재했다. 오이(*Cucumis sativus* L.) 흰가루병은 *Podosphaera xanthii* 나 *Golovinomyces cichoracearum*이라는 곰팡이 병원균에 의해 감염되는 병으로서, 오이에 게는 가장 심각한 병 중 하나이다. 이들 곰팡이 병원균들은 모두 *Erysiphaceae* 속에 속하는 것으로 이들을 구분하기는 매우 어려운 것으로 알려져 있다.



흰가루병에 저항성을 보이는 오이 품종은 주로 여름철 포장 재배에서 이용되는 시판 품종으로 이들의 저항성은 오로지 고온 환경에서만 나타나는 것으로 보고된 바 있다. 이렇게 온도에 의존적인 저항성 기작에 관하여는 아직까지 알려진 바가 거의 없으며, 겨울철 온실 재배용으로 시판되는 저항성 품종은 개발된 바 없는 것으로 알려져 있다.

연구팀은 오이 흰가루병 저항성에 대한 연구를 수행하기 위해서 흰가루병 저항성 계통인 Santou와 이병성 계통인 PI197088-1을 교배하여 내혼계인 F7 집단을 육성하였다.

조사 결과, F7 개체들의 흰가루병에 대한 저항성 정도는 연속적 분포를 보였고, 이는 흰가루병 저항성이 양적형질유전자좌(quantitative trait loci, QTLs)에 의해 조절된다는 사실을 알려준다. 26°C와 20°C의 조건에서 각각 흰가루병 저항성 QTL을 분석해 본 결과, 각각의 조건에서 2개와 3개의 유전자좌가 확인되었다. 이들 중 한 개의 QTL은 두 조건의 환경 모

두에서 동일한 위치에서 발견되었고, 이로써 서로 다른 조건의 환경에서 한 개의 주동 QTL이 작용을 하거나 두 온도 조건에서 다른 QTL들이 특이적으로 작용하는 것으로 유추해 볼 수가 있다. 이러한 결과들은 네 개의 QTL이 다른 온도 조건의 양상으로 조절되며, 이들의 조합이 조사된 오이 집단의 고수위 흰가루병 저항성에 대해서 중요한 역할을 하는 것으로 제시한다. 연구팀은 “본 연구를 통해서 오이 흰가루병 저항성과 연관된 각 QTL들에 대한 STS(Sequence-tagged site) 마커들이 개발되었고, 이들은 앞으로 강력한 흰가루병 저항성을 갖는 오이 육종을 위한 연구사업에 있어서 대단히 유용하게 활용될 것”이라고 기대한다.

2. 감염 중인 잎에서 흰가루병균 단포자의 동정과 유전자 발현 검출 :

일본 킨키대학 (Kinki Univ.) 농학부의 H. Toyoda (toyoda@nara.kindai.ac.jp) 연구팀은 디지털현미경으로 관찰하면서 식물의 잎에서 발아 중인 포자를 하나씩 피펫으로 떼어내어 동정하고 유전자 발현을 검출

하였다. 흰가루병균의 분생포자는 바람에 의해서 퍼진다. 분생포자는 기주 식물과 비기주 식물 잎 모두에서 발아하여 부착기를 형성하여 침입을 시도하여 감염과 병을 일으키려고 한다. 식물은 흰가루병균이 있으면 화학적, 세포적으로 반응한다. 비기주 식물은 침입을 당한 잎의 표피 세포에서 과민성반응을 일으켜



서 흡기 형성을 억제함으로써 이어지는 균사 발달과 포자 형성을 차단한다. 이런 잎들은 육안으로 보면 잎 표면에 곰팡이 흔적이 없이 건강해 보인다. 흰가루병균에 대한 식물의 반응을 연구하면서 비병원성 흰가루병균의 공격으로 발생한 세포반응이 있을 경우 연구자들은 어려움을 겪을 수밖에 없었다. 비병원성 흰가루병균이 연구 대상 흰가루병균과 형태적으로 구별이 가지 않기 때문이었다. 이 일본 연구팀은 실제로 예비실험에서 온실에서 토마토를 키우면서 원하지 않는 흰가루병균에 의한 자연감염을 완전히 배제할 수 없었다. 잎에서 형성되는 그 유사균들의 부착기는 토마토 흰가루병의 병원균인 *Oidium neolycopersici*의 그것과 아주 비슷했다.

이 때문에 부착기 형성 이전의 흰가루병 감염 단계에서 식물과 곰팡이 간의 상호작용의 초기현상 분석에 어려움이 많았다. 사실상 어떤 분생포자는 이미 표피세포에서 일어난 과민성 세포 죽음 때문에 흡기 형성을 하지 못했다. 하지만 과민성 반응을 일으킨 포자가 *O. neolycopersici*의 것인지를 확인하는데 기존의 형태적, 분자적 방법으로는 적당하지 못하다.

이런 문제를 해결하기 위해서 일본 연구진은 잎에서 개개의 곰팡이 증식체를 효과적으로 동정할 수 있는 방법 개발에 노력을 기울이게 된 것이었다. 그들이 개발한 방법은 현실도가 높은 디지털현미경으로 유리 피펫을 조정하여 발아하고 있는 하나의 분생포자를 떼어내는 것이었다. 이 현미경은 잎을 탈색하거나 곰팡이를 염색할 필요 없이 곰팡이를 살아 있는 그대로 관찰할 수 있었다. 염색약을 쓰게 되면 효소를 불활성화시켜서 이후 단계에서 유전자 분석이 어려워지게 된다.

연구진은 분리한 분생포자를 가지고 목표 뉴클레오티드 서열 증폭에 충분할 정도로 높은 감도를 얻어내기 위하여 5.8S rDNA와 인접한 내부전사간격 (ITS) 서열의 PCR과 포개어진 (nested) PCR을 거쳐 증폭하였다 (PCR/nested PCR).

그 분생포자의 목표 서열은 병원균 *O. neolycopersici* 나 *Erysiphe trifolii* (syn. *Microsphaera trifolii*)의 그것과 완전히 일치하였다.

연구자들은 RT-PCR/nested PCR 이나 다중 RT-PCR/nested PCR을 이용하여 단일 분생포자에서 발현되는 전사체를 증폭하는 것이 가능하였다. 연구자들은 발아전 및 발아후 단계에서 분생포자를 토마토 잎에서 개별적으로 제거하여 두 가지 흰가루병균 유전자를 감시하였다. 그 결과 베타-튜불린 상당 TUB2-ol은 발아전 및 발아후 단계에서 발현되었고 큐티나제 상당 CUT1-ol은 발아후에만 발현되었다. 연구자들은 디지털현미경 미세조작과 2단계 PCR 증폭의 결합은 식물 잎 표면에서 개개 곰팡이 번식체를 조사하는데 유용한 방법이라고 쓰고 있다.

3. 사과에서 흰가루병 저항성 유전자의 지속성 연구 :

프랑스 ' UMR PaVé; and UMR GenHort' 연구소의 ' V. Caffier '와 동료 연구원들은 사과 품종 'PI2'에서의 흰가루병 저항성 유전자의 지속성 여부에 관한 연구 결과를 ' Plant Pathology'지 온라인 논문으로 발표했다. 'INRA'그룹에서 개발된 ' M. zumi' 품종의 저항성은 사과 육종에 주요하게 이용되어 왔다. 이 저항성은 연구 초기에는 한 개의 우성 유전자에 의해 발현되는 것으로 인식되어져 왔지만, 연구가 진행되면서 두 개 이상의 유전자가 관련되거나 그 이상으로 복잡하게 작용할지도 모른다는 인식이 지배적이었다. 그리고, 최근 연구 결과 'M. zumi'의 저항성에는 'PI2'라는 최소한 한 개의 주동 유전자가 관련한다는 사

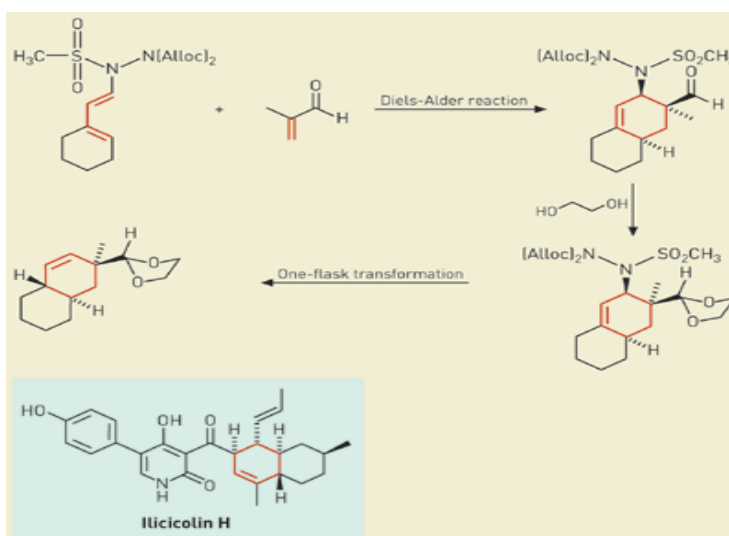
실이 밝혀졌다. 그러나 'PI2' 유전자로 선발된 유전자형에서도 흰가루병 감염 사례가 증가했는데, 이 현상을 설명하기 위해 4가지 가설이 제시되고 있다. 첫째, 선발 효율이 낮아서 'PI2' 유전자를 보유하지 않은 유전자형이 선발되었을 가능성을 생각해 볼 수 있고, 둘째, 유묘기와 성숙기의 저항성 발현 차이의 가능성, 셋째, 집중원 강도에 따른 저항성 수준의 차이, 넷째, 새로운 병원성 분리종의 진화에 의한 저항성 극복의 가능성을 생각해 볼 수 있었다.

연구진은 'PI2' 유전자로 선발된 후대들의 이병성 진화 수준을 비교하고, 자연 환경과 조절된 인공 환경에서의 상기 네 가지 가설 검증 을 위해서, 그리고 새로운 병원성 변종의 발전으로 인한 'PI2' 저항성의 파괴 가능성을 진단하고자 본 연구를 수행하게 되었다.

'PI2' 유전자는 'Malus zumi' 품종에서 유래된 흰

가루병 저항성 유전자로서 사과 육종 프로그램에 주요하게 활용되고 있는데, 최근 프랑스의 과수 시험장에서 PI2 유전자를 보유하는 사과에서 흰가루병에 대한 이병성이 증가하는 현상이 관찰되었다. 이 현상은 사과나무의 수령이나 저항성 유전자 PI2의 발현 유도를 위한 병원성 접종량으로도 설명이 불가능한 것이었다. 병원성 검증 결과 시험 과수원에서 분리된 'Podosphaera leucotricha' 분리종은 PI2에 대해서 감염성인 것으로 확인되었다. PI2 유전자 보유 개체의 선발로 이뤄진 사과 식수 후 6년 이내에 나타나는 병원성 분리종으로 인하여 저항성이 파괴되는 것이 확인되었고, 식수 10년 후 후대에서 여전히 흰가루병 저항성을 보이는 유전자형은 2-56%의 비율로 남아 있는 것이 확인되었다.

연구진은 '이러한 결과들로 보아 PI2 저항성의 지속성은 추가적인 양적 유전자에 의해 영향을 받는 것 같다'고 얘기한다.



4. 춘파형 보리의 흰가루병, 점녹병, 구름무늬병 저항성 선발을 위한 AB-QTL 분석 :

독일 본대학 작물육종과학부의 'M.von Korff'를 비롯한 연구팀은 춘파형 보리에서 야생종

으로부터 도입된 흰가루병(powdery mildew), 점녹병(leaf rust), 구름무늬병(scald) 저항성 유전자좌를 확인하기 위하여 AB-QTL(advanced backcross-quantitative trait loci) 분석을 수행한 결과를 'TAG'지 최신호에 게재했다. 연구팀은 흰가루병(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei* L.)과 점녹병(*Puccinia hordei* L.), 구름무늬병(*Rhynchosporium secalis* (Oud.) J. Davis)에 대한 새로운 저항성 유전자를 유전자 지도상에 위치시키기 위한 목적으로 춘과형 보리 재배종 'Scarlett'과 야생형 보리 'ISR42-8' 계통을 교배하여 복반수체(doubled haploid, DH)를 여교잡으로 육성한 BC2DH(advanced backcross doubled haploid) 집단을 재료로 QTL 분석을 수행했다. 8 지역의 다른 환경에서 자연 감염에 의한 포장 병 검정 결과를 98개 SSR 유전자좌의 유전자형 결과와 함께 분석해본 결과, 흰가루병 저항성 QTL이 9개, 점녹병 저항성 QTL이 6개, 그리고 구름무늬병 저항성 QTL이 3개가 확인되었다.

실험결과 외래의 저항성 QTL 대립형질이 도입된 경우 흰가루병과 점녹병, 구름무늬병에 대한 병징이 각각 최대 51.5, 37.6, 16.5% 감소되었음이 확인되었고, 조사된 어떤 QTL은 기존 보고된 바 있던 질적 저항성 유전자나 양적 저항성 유전자들과 부합하는 것일지도 모른다. 그리고, 나머지 유전자들은 새롭게 발견된 유전자들일 가능성이 높다고 연구팀은 얘기한다.

5. 토마토의 흰가루병 저항성 유전자에 연관된 마커 개발 :

최근 이탈리아의 Bari 대학과 Foggia 대학의 연구원으로 구성된 식물 병리 연구팀은 토마토 흰가루병 저항성 유전자에 연관된 PCR 마커를 개발했다.

토마토는 세계적으로 매우 중요한 작물 중의 한가지로서 열매 자체로서 뿐만 아니라 가공 식품으로서도 다양하게 활용되는 유용한 작물이다. 그러나, 흰가루병에 의한 피해가 심각해지면서 생산성 감소와 살균제에 의한 비용 손실이 증가해왔다.

현재 대부분의 토마토 재배종은 흰가루병에 감수성인 것으로 확인되었고, 이제 새로운 저항성 재배종의 육종이 가장 바람직한 환경 친화적인 대책으로 인식되고 있다. 이미 밝혀진 흰가루병 저항성 유전자들로는 ol-1, ol-2, ol-3 의 세가지가 있는데, 이 유전자들은 모두 역 교배 육종과 마커 보조 선별법을 활용한 계획의 시작에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 그리고, 이미 ol-1과 ol-3 유전자에 연관된 PCR 마커 개발이 진행 중이다. 연구팀은 ol-2에 연관된 마커를 개발하기 위해서 흰가루병 저항성인 야생종과 이병성인 재배종을 교배하여 F2 집단을 육성했고, 이 집단을 가지고 BSA(bulked segregant analysis)를 수행했다.

그 결과 한 개의 RAPD(random amplified polymorphic DNA) 마커가 이병성 집단에서 확인되었고, 공우성 유전 양식을 보기 위해서 이것을 다시 CAPS(cleaved amplified

polymorphic sequence) 마커로 전환시켰다. 그리고, 26개의 프라이머 조합을 조사해 본 결과 2개의 AFLP(amplified fragment length polymorphism) 마커가 확인되었다.

연구팀에 따르면, '토마토 염색체 지도에 신뢰성있게 위치한 CAPS 마커와 2개의 AFLP 마커는 앞으로 ol-2 육종 프로그램에 있어서 매우 유용하게 사용되어질 수 있다'고 한다.

제 7 장 참 고 문 헌

1. Aharoni, Y. and R. Barkai-Golan. 1987. Pre-harvest fungicide sprays and polyvinyl wraps to control *Botrytis* rot and prolong the postharvest storage life of strawberries. J.Hort Sci. 62:177-181
2. Agrios, G.N. 1988. Plant pathology (3rd edition). Academic Press, Inc., New York, 803p.
3. Akutsu, K., Tsukamoto, T., Irino, T. and Okuyama, S. 1988. Transfer of benconyl-resistance by hyphal fusion of *Botrytis cinerea*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 54:290-295
4. Baker, C.J. and E.W. Orlandi. 1995 Active oxygen in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 33:299-321
5. Blancard, D., Lecoq, H. and Prtrat, M. 1994. A Color Atlas of Cucurbit Diseases. Manson Publishing. pp.212-213.
6. Byun, H-J and S.J. Choi. 2003 Activation of disease resistance related enzymes by treatment of hydrogen peroxide and benzoic acid in cucumber(*Cucumis sativus*). J.Kor.Soc. Hort. Sci. 44:287-291
7. Davidse, L. C. 1973. Antimitotic activity of methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. Pesticide Biochem. Physiol. 3:317-325
8. Davis, R. P. and Dennis, C. 1981. Properties of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea*. Pestic. Sci. 12:521-535.
9. Dennis, C. and R.P. Davis. 1979. Tolerance of *Botrytis cinerea* to inprodione and vinclozolin Plant pathol. 28:131-133

10. Ellis, M. B. and Waller, J. M. 1972. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria, No. 431
11. Farr, D.F., Bill, G.F., Chamuris, G.P. and Rossman, A. Y. 1995. Fungi on Plants and Plant products in the United States. APS press, USA. 443-444pp.
12. Holmes, G. J. and Eckert, J. W. 1995. Relative fitness of imazalil-resistant and -sensitive and -sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Dis.* 79:1068-1073.
13. Hunter, T., K.J. Brent, G.A. Carter, and J.A. Hutcheon. 1987 Effects of fungicide spray regimes on resistance in grey mold (*Botrytis cinerea*) on strawberry plants. *Ann. Appl. Biol.* 50:569-575.
14. Legard, D.E., C.L. Xiao, J.C. mertely, and C.K. Chandler. 2000. Effects of plant spacing and cultivar on incidence of *Botrytis* fruit rot in annual strawberry. *Plant Dis.* 84:531-538.
15. Leroux, P. and Fritz, R. 1984 Antifungal activity of dicarboximides and aromatic hydrocarbons and resistance to these fungicides. In: *Mode of action of antifungal agents*, Trinci, A. P. J. and Pyley, J. F., ed. pp. 207-237. Cambridge Press, Cambridge.
16. Lower, R.L. and Edwards, M.D. 1986. *Breeding Vegetable Crops*. AVI Publishing Co. pp.173-204.
17. Moorman, G. W. and Lease, R. T. 1992. Benzimidazole- and dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* from pennsylvania greenhouses. *Plant Dis.* 76:477-480.
18. Norio, O., kazuhiko, S., Tesuo, A. and Yoshiaki, Y. 1988. Decreased sensitivity of cucumber powdery mildew to ergosterol biosynthesis inhibitors. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54:629-632.
19. Peever, T.L. and Milgroom, M. G. 1994. Lack of correlation between fitness and resistance to sterol biosynthesis-inhibiting fungicides in *Pyrenophora teres*.

Phytopathology 84:515-519.

20. Staub, T. and Sozzi, D. 1984. Fungicide resistance: A continuing challenge. *Plant Dis.* 68:1026-1031

21. Sherf, A. F. and Macnab, A.A. 1986. *Vegetable Diseases and Their Control* (2nd edition), John Wiley and Sons, Inc., New York, 728p.

22. Szkolnik, M. 1981. Physical modes of action of sterol-inhibiting fungicides against apple diseases. *Plant Dis.* 65:981-985.

23. Takeuchi, T. and Nagai, Y. 1982. Occurrence of strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide fungicides in tomatoes and cucumbers in greenhouses. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 48:210-216

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림 기술개발 사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술 개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개 하여서는 아니됩니다.