

최 종
연구보고서

천연자원 유래물질의 제형화를 통한 새로운
딸기 잿빛곰팡이병 방제방법 개발
Development of environmental-friendly control
method on gray mold using substances from
natural resource

연구기관

충남대학교 농업생명과학대학

협동연구기관

(주) 바이오셀드

농림자료실



0012812

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “천연자원 유래물질의 제형화를 통한 새로운 딸기 잭빛곰팡이병 방제방법 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 07 월 14 일

주관연구기관명 : 충 남 대 학 교

총괄연구책임자 : 김 홍 기

세부연구책임자 : 김 홍 기

연 구 원 : 강 성 우

연 구 원 : 김 중 배

연 구 원 : 전 남 주

협동연구기관명 : (주)바이오셀드

협동연구책임자 : 유 성 준

연 구 원 : 곽 두 원

연 구 원 : 김 정 선

연 구 원 : 김 진 희

요 약 문

I. 제 목

천연자원 유래물질의 제형화를 통한 새로운 딸기 잭빛곰팡이병 방제방법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

딸기는 생식을 위주로 하는 신선식품이기 때문에 **화학농약의 사용이 상당히 문제시** 되고 있다. 잭빛곰팡이병은 고소득 작물 재배를 위한 시설재배에서 주로 많이 발생하여 **전 생육기간에 걸쳐 피해를** 입힌다. 현재 잭빛곰팡이병 방제를 위해서 다양한 방법이 시도되기는 했지만 현실적 방제는 살균제에 의존할 뿐이다. 계속되는 살균제의 다량살포로 약제저항성 균주와 변이균주들의 출현으로 방제의 어려움뿐만 아니라 농약의 오·남용에 의한 농산물 잔류문제가 제기되었다. 또한 화학농약의 경우 잔류안전성을 위하여 수확기의 일정기간 이전에는 사용을 금하고 있어 작물재배 후기에 발생하는 병에 대해서는 다른 대안이 없는 현실이다. 이에 **환경친화적 새로운 잭빛곰팡이병 방제제 개발의 필요성**이 강력하게 대두된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 이미 확보하여 충분히 병 방제 가능성을 확인한 **천연자원** 및 chitosan 등의 **어패류 추출물**, 미국자리공 등의 **환경유해식물** 그리고 꿀꺽질 등의 **농업부산물**들로부터 추출한 물질들을 다양한 형태로 혼합하여 식물체의 생육촉진과 병원균을 억제할 수 있는 **다기능 딸기 잭빛곰팡이병 방제용 천연물제제**를 개발하고자 한다. 아울러 이들 제제들의 잭빛곰팡이병원균에 대한 **활성검정, 생리활성물질의 분리 및 동정, 항균활성 증대 방안 모색, 유용물질대량 생산기술개발, 제제화 기술의 개발, 포장효과검정** 등을 통하여 미생물을 이용한 생물학적 방제와는 완전히 다른 인체에 무해하고 환경에 영향이 없는 값싸고

새로운 유형의 천연물질 유래 잿빛곰팡이병 방제제를 개발하고, 미국자리공 등 환경 유해 식물들을 유용자원화하며, 농가주변의 천연자원 및 농업부산물의 활용방안을 통해 환경정화와 자원재활용 효과를 거둠으로서 **농업환경보호**에도 앞장서고자 한다. 그리고 다른 인체 무해성분을 **보조제나 협력제**로 사용함으로써 **방제효과를 증대**시킬 뿐만 아니라 다른 병 방제에도 기여하는데 그 목적이 있다.

최근 화학농약의 오·남용으로 인한 생태계 파괴, 잔류 독성 문제, 각종 저항성 균주의 출현, 소비자의 안전 농산물 선호경향 등의 추세에 따라 작물의 병충해 방제 분야에서 화학농약의 입지는 점차 줄어들고 있다. 이에 천연물 농약에 관한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있으나 농약으로서의 체계적 연구가 미흡하고, 화학농약을 대체하기에는 그 효과가 미흡하다고 인식되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 그동안 뛰어난 항균활성을 인정받고도 농업분야에서 활용되지 못한 essential oil의 실질적 적용을 위하여 새로운 실험법을 도입하여 essential oil의 천연물 농약으로서의 가능성을 알아보았으며 여러 가지 방법을 통해 실용화를 시도하였다.

본 연구에 사용된 31 종류의 약용식물 중 세신 (*Asarum sieboldii*)의 ethanol 추출물이 *B. cinerea*에 대한 항균활성이 가장 뛰어났다. 세신의 항균활성 물질은 Methyl eugenol로 동정되었다. Methyl eugenol은 젤리의 향기, 빵의 첨가물, 비알콜성 (비발효) 맥주, 껌, 사탕, 푸딩, 아이스크림의 향료로써 사용되고 있는 essential oil로써 상온에서 묽은 노란색을 띠는 액체이며 끓는 점은 254.7°C, 어는 점은 -4°C이다. 장미, 피멘토, 바실, 하이신스, 시트로넬라, 아니스, 계피꽃, black berry essence, 바나나, 후추 등으로부터 얻어지며 0.02 ~ 0.3% (5 ~ 52ppm)의 농도로써 상업적으로 쓰이고 (NTP, 1998), 1일 섭취 권장량은 0.26mg/kg이다 (Stroffberg and Grungschober 1978, NAS 1989).

Methyl eugenol은 *in vitro* 검정에서 다른 종류의 essential oil인 carvacrol, Thymol, Eugenol보다 *B. cinerea*에 대한 항균활성이 낮았지만, 다른 3가지 essential oil 처리구와 마찬가지로 *B. cinerea* 균사 선단부 및 균사 곳곳에 큰 손상을 입혔으며 세포질도 유출시켰다. 이러한 세포질 유출 현상은 essential oil에 의해 *B. cinerea* 균사의 세포벽이나 세포막이 손상에 의한 것으로 보인다.

고농도의 essential oil을 단순히 물과 혼합해서 딸기 과실에 살포하였을 경우 무처리구에 비하여 잿빛곰팡이병이 더 많이 발생하였으며, 저농도 처리구 역시 고농도 처리구보다 감염률은 낮았지만 처리구간의 편차가 크고 *in vitro*에서와 같은 높은 항균활성을 보이지

않았다. 그러나 *in vivo*에서 Methyl eugenol 처리구들이 대체적으로 carvacrol, Thymol, Eugenol 처리구들에 비하여 방제가가 높게 나타나 *in vitro*와는 정반대의 결과를 보여주었다. *In vitro*에서 강력한 항균활성을 나타내었던 carvacrol, Thymol, Eugenol이 *in vivo*에서 항균활성이 약해지는 현상은 essential oil이 기름성분이기 때문에 물에 희석되지 않아 고농도의 essential oil 덩어리가 분무되었을 경우에 발생할 가능성이 있다. 또한 농도가 높을수록 병발생률이 증가된다는 점은 essential oil이 고농도에서 약해를 일으킬 수 있다는 것을 말해준다. 이에 발아하는 고추 종자 발아 실험을 통한 약해 검정으로 고농도의 essential oil이 뿌리털 형성을 억제한다는 것을 확인하였으며, 딸기 과실에 대한 약해 검정에서는 Methyl eugenol을 제외한 고농도의 essential oil이 연약한 딸기 과실 표피에 연화를 일으키는 약해를 일으켰다. 이러한 약해 문제는 essential oil의 농업적 적용에 관한 연구에서 대부분 언급되고 있지 않다. 단지 Arras and Usal (2001) 만이 essential oil에 의한 과실의 손상을 언급하였는데 이러한 약해 때문에 그 동안 essential oil의 농업적 적용이 이루어지지 않았던 이유가 아닐까 추정된다.

또한 essential oil이 물과 섞이지 않는 특성은 균일한 농도의 도포를 매우 어렵게 하기 때문에 essential oil의 약해를 더욱 심하게 만드는 것으로 보인다. 이 문제를 해결하기 위해 식용 계면활성제인 tween 20을 사용하여 essential oil을 유화시켰으며, 유화된 essential oil을 딸기 포장에 처리하였을 때 1,000ppm까지 약해가 발생하지 않았다. 유화된 essential oil 제제를 처리한 딸기 과실의 당도와 경도 또한 무처리구에 비해 큰 차이가 없었다. 이러한 유화는 tween 20의 농도를 적절히 조절함으로써 저농도에서 강력한 항균활성을 나타내는 essential oil의 특성을 최대한 활용할 수 있도록 essential oil의 입자크기를 조절할 수 있게 해 주었다. 추후 tween 20의 양을 조절함으로써 같은 양의 essential oil을 사용할 때 보다 높은 방제효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 tween 20을 이용한 유화는 essential oil의 약해 발생문제를 해결해주며, essential oil의 특성을 최대한 발휘하게 하여 그들의 농업적 적용을 가능케 해주는 핵심적인 요소라 할 수 있겠다.

유화제 형태의 essential oil을 딸기 포장에 처리하였을 때 저농도의 Methyl eugenol 처리구에서 가장 안전하고도 높은 방제가를 얻을 수 있었으나 Thymol이나 Eugenol 처리구에서는 *in vitro*에서와 같은 강력한 항균활성을 확인할 수 없었다. 또한 수확 하루 전에 essential oil 제제를 처리하였을 때 딸기의 저장성이 크게 향상되었고, 특히 Methyl eugenol 처리구에서 딸기 잿빛곰팡이병 억제율이 매우 높게 나타났다. *In vitro*와 상반된 이러한 결과들은 아직까지 밝혀지지 않은 Methyl eugenol의 항균활성 기작이 있거나 실험

에 선택된 Methyl eugenol의 농도가 딸기에는 약해를 주지 않지만 병원균에는 치명적인 항균활성을 나타내는 유효한 농도일 수 있다는 점을 시사한다. 또한 그간의 유효 항균활성 물질의 screening 과정에서 항균활성이 약했던 Methyl eugenol이 계속적으로 누락된 것이 아닌가 추정된다. 추후 다른 essential oil 제제들의 농도에 따른 병 방제 실험이 보다 체계적으로 이루어진다면 Methyl eugenol 뿐만이 아닌 Thymol, Eugenol도 유효한 항균 활성 농도를 찾을 수 있으리라 생각된다.

Essential oil의 항균활성을 높여주는 항균활성 보조제로 NaHCO_3 , neem oil, 분자량 30만 이상의 chitosan이 선발되었다. Neem oil은 세 가지 essential oil에 길항작용이 있는 것 같았으며, 분자량이 30만 이상의 chitosan은 세 가지 essential oil과 조합하였을 때 약간의 효과 증진은 있었으나 chitosan 자체의 처리 농도가 고농도이기 때문에 실제 농가에서 사용할 때 희석배수가 맞지 않는 문제점이 발생하였다. 그러나 NaHCO_3 는 그 자체만으로도 항균활성이 뛰어났으며 essential oil과 조합하였을 때도 방제효과가 증가했다. 특히 Methyl eugenol과 조합될 경우 두드러진 방제효과의 상승이 나타났다. NaHCO_3 는 ‘소다’로 불리는 식용 첨가물로써 빵을 부풀릴 때 특히 사용되고 있으며, 저장병해 및 각종 식물병 방제에 사용되고 있는 물질로 각광받고 있다. 하지만 NaHCO_3 는 속효성이며 지속기간이 짧고 NaHCO_3 를 과실에 처리하였을 경우 판매하기 전에 씻어야 하는 번거로움이 있다고 한다. 따라서 이러한 점을 고려하여 NaHCO_3 가 효과적이기는 하지만 그것의 단점을 보완할 수 있는 방법의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

Essential oil 제제의 안정성은 빛을 차단한 상태에서 60°C 항온기에서 4주 후까지도 항균활성이 나타나 매우 안정적인 것으로 판명되었다.

Methyl eugenol은 미국 식약청에서 인정한 먹을 수 있는 물질로 본 연구에서 개발된 방법에 의해 딸기의 잿빛곰팡이병을 매우 효과적으로 방제하면서도 수확 바로 직전에 사용할 수 있고, 딸기의 저장기간을 대폭 늘렸다. 또한, 딸기의 당도와 경도를 거의 변화시키지 않았고, 화학농약을 사용하지 않고도, Methyl eugenol 제형을 사용함으로써 친환경적인 생물농약으로 활용할 수 있는 기초 자료를 마련하였으며, 생물농약으로서의 활용가능성을 충분히 보여주었다. 이 제제는 앞으로 딸기 재배 농가에 보급되어 효과적인 병 방제 및 저장기간 연장을 통해 농민의 소득 창출과 무농약·웰빙을 선호하는 소비자의 기호까지 모두 만족시킬 것이다. 이와 관련된 특허 2개를 출원하였고, 딸기 재배와 관련된 대표 농민들에게 활용 방법을 교육한바 있으며, 앞으로 유관 회사를 통해 친환경적인 딸기 잿빛곰팡이병 방제제를 생산하여 농가에 보급할 예정이다.

위의 기법 등을 잘 활용한다면 딸기 잣빛곰팡이병만이 아니라 다른 작물의 각종 병해까지도 매우 효과적으로 방제할 수 있는 길이 열렸다고 할 수 있겠다.

Nostro 등 (2004)의 연구에 따르면 Carvacrol과 Thymol은 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*)의 약제 내성에 상관없이 강력한 항균활성을 나타낸다고 한다. 이것은 essential oil의 항균활성 기작이 포도상구균의 약제 내성과 관련 없는 세포막 손상 또는 ATP 합성저해 기작에 관여하기 때문이다. 이러한 관점에서 약제 저항성 잣빛곰팡이병의 방제도 essential oil을 통해서 가능하게 될 것으로 생각된다.

추후 각종 essential oil의 제형화를 통한 다양한 식물병원균의 유효 항균활성 농도 screening과 새로운 실험법을 통한 essential oil의 활용법이 개발된다면 천연물을 이용한 친환경적인 식물병 방제도 충분히 가능할 것으로 생각된다. 그리고 아직까지 천연물질을 이용한 생물농약 규정이 없으므로 규정이 제정되는 즉시 그에 맞게 생물농약 등록을 위한 조치를 취할 예정이다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

이 기법은 딸기 재배기간 중 발생하는 병뿐만 아니라, 저장병원균으로서 딸기 수확 후 유통과정 중 커다란 피해를 입혀 문제시 되고 있는 잣빛곰팡이병을 개발된 천연물질을 수확직전에 딸기에 처리함으로써 유통과정 중에 발생하는 주요 저장 병해를 획기적으로 방제할 수 있는 방법을 부수적으로 창출해 내었다. 이 또한 농민 소득 증대를 위한 현장 활용 면에서도 큰 가치가 있다고 판단된다.

개발된 이 기술을 딸기 재배 및 유통과정 중에서 보다 적극적으로 농업 현장에 활용하기 위해 앞으로 농림부, 농협, 농촌진흥청, 각 시군 농업기술센터 및 관련 농민단체 등에 관련 자료 및 업적을 홍보해 줄 것을 요청하며, 본 연구자들의 딸기 관련 세미나 참석 기회를 확대시켜 줄 것도 적극 요청하는 바이다.

SUMMARY

We take a growing interest on biological method instead of chemicals for plant diseases control at present. In addition, importance of substances extracted from natural resources including plants is also enhancing based on the demand of consumers and scientists who know well side-effects of agrochemicals in foods as well as crops.

This research was performed for environmental-friendly control of strawberry gray mold (*Botrytis cinerea* pers: fr.) using natural products. Antifungal substance was isolated and identified from *Asarum sieboldii* selected among 31 medicinal plants, and formulation and novel method were considered for agricultural application. Antifungal substance extracted from *Asarum sieboldii* was identified to be Methyl eugenol, a kind of essential oils. Carvacrol, Thymol and Eugenol were more effective than Methyl eugenol *in vitro* bioassay, while *in vivo* bioassay, control value of Methyl eugenol was the highest as 82% at 100ppm concentration. These results represented that two results *in vivo* and *in vitro* bioassay should be contrary. On the microscope, destroy of the hyphal tip and cytoplasmic outflow were observed, and it was confirmed the empty of hyphal cell throughout methylene blue-dyeing. All the essential oils tested, carvacrol, Thymol, Eugenol and Methyl eugenol caused phytotoxicity in germination of pepper seed and on strawberry fruit, but Methyl eugenol showed a little phytotoxic. Emulsification of essential oils at 300ppm concentration with tween 20 and 600ppm concentration with ethanol, enhanced the control effect even at low concentration and, in contrast, reduced phytotoxicity. Achieving 76.1% control value with 100ppm of Methyl eugenol, period of storage for the strawberry fruit was prolonged by to treatment one day before harvest. Volatility of Thymol and Eugenol was more effective than Methyl eugenol for postharvest disease caused by *B. cinerea* and especially, Thymol could control *Mucor* sp. Phytotoxicity caused by essential oils was resolved by air circulation using fan. It should be possible to control several plant diseases environmental-friendly, throughout formulation which enhancing control efficacy of essential oils for agricultural application based on determining available concentration, and developing various application

methods. Furthermore, this method developed should contribute very much to enhance income of farmers who cultivate strawberry plant in Korea from now.

CONTENTS

SUMMARY	3
Chapter 1. Comprehensive description of research	13
Section 1. Research significance	13
Section 2. Research purpose	16
Section 3. Research object and content	17
Chapter 2. Present condition of relative technique in the inside and outside of the country	20
Chapter 3. Contents and results of development of practice research	23
Section 1. Materials and method	23
Section 2. Results and discussion	38
Chapter 4. Objective achievement rate and contribution rate of relative branches ...	122
Chapter 5. Application scheme of results this study	123
Chapter 6. Abroad science technique information	124
Chapter 7. References	125

목 차

요 약 문	3
제 1 장 연구개발 과제의 개요	13
제 1 절 연구개발의 필요성	13
제 2 절 연구개발의 목표	16
제 3 절 연차별 연구개발 목표와 내용	17
제 2 장 국내·외 관련 기술의 현황	20
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	23
제 1 절 재료 및 방법	23
1. 딸기 잿빛곰팡이병 방제를 위한 환경 유해식물, 천연자원 및 농업 부산물의 수집 및 특성 분석	23
2. 딸기 잿빛곰팡이병 방제용 최적 재료 선발	24
3. 선발된 유용 천연물질의 항균 활성능 조사	24
4. 선발 물질 조합별 억제 효과 조사	24
5. 안전성 검사	25
6. 선발된 활용가능 물질의 기본 특성 조사	25
7. 항균활성 물질의 분리	26
8. 항균활성 물질의 정제 및 동정	27
9. 시제품 생산용 물질 대량 확보	28
10. 추출 물질 다량 획득 및 최적 분리 방법 모색	28
11. 천연물질의 약효 및 병 억제 기작 조사	29
12. 실내실험에서 기본제제의 활성 검정	30
13. 액제, 수화제, 분제, 서방형, 과립형 제형 검토 및 보완	31
14. 약효 증진 보조제 탐색	32
15. 다양한 조합을 통한 기본 제형 연구	34
16. 포장 실험을 통한 기본 제제의 활성 검정(상용농약과 비교 포함)	34
17. 전처리 효과검정과 처리횟수 및 치료효과조사	35
18. 잿빛곰팡이병에 대한 예방, 치료, 지속효과 등을 조사	36
19. 잿빛 곰팡이 다발생 포장에서의 활성 검정과 약효기간	36
20. 포장 활성 검정을 통한 최적 제형 선발 및 효과적인 사용방법 결정	37
21. 딸기의 저장 기간 조사	37

제 2 절 연구결과 및 고찰	38
1. 환경 유해식물, 천연자원 및 농업 부산물의 항균 특성분석	38
2. 잣빛곰팡이병 방제용 최적 재료 선발	38
3. 선발물질의 개별적 항균활성 조사	43
4. 선발 물질 조합별 억제 효과 조사	49
5. 천연물질의 안전성 실험	57
6. 선발된 활용가능 물질의 기본 특성 조사	63
7. 항균활성 물질의 분리	70
8. 항균활성 물질의 정제 및 동정	72
9. 시제품 생산용 물질 대량 확보	79
10. 기본제형 확립 및 가능제형 추가 검토	82
11. 천연물질의 약효 및 병 억제 기작 조사	83
12. 실내·외 실험에서 기본제제의 활성 검정	89
13. 소규모 포장 실험을 통한 기본 제제의 활성 검정(상용농약과 비교 포함)	98
14. 전처리 효과검정과 처리횟수 및 치료효과조사	103
15. 잣빛곰팡이병에 대한 예방, 치료, 지속효과 등을 조사	104
16. 잣빛 곰팡이 다발생 포장에서의 활성 검정과 약효기간 조사	105
17. 포장 활성 검정을 통한 최적 제형 선발 및 효과적인 사용방법 결정	118
18. 경시적 안정성 시험	120
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	122
제 5 장 연구개발결과의 활용방안	123
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	124
제 7 장 참 고 문 헌	125

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 딸기 잿빛곰팡이병(Gray mold disease)의 피해정도

- 1) 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)은 전세계적으로 **400여종 이상의 식물에 발병**하는 가장 대표적인 다범성 균으로 **딸기에 큰 피해**를 발생시킨다.
- 2) 국내 최고 고소득 작물중의 하나인 딸기는 잿빛곰팡이병, 흰가루병, 그리고 시들음병에 의해 전생육기간은 물론 수확 후까지도 잿빛곰팡이병균에 의해 커다란 피해를 입고 있다.
- 3) 2001년 전국의 전체 딸기농가에서 대략 20만톤의 딸기가 생산되며 8천억원의 시장이 형성되었다.
- 4) 잿빛곰팡이병은 전국 7,567ha중 반축성 재배 품종을 심고 수막재배를 실시하는 재배지에서 20~30%의 병 발생으로 해마다 464~670억원 정도의 피해를 입히고 있다 (논산 딸기 시험장 2000년 조사자료 참조).
- 5) 71%의 재배면적을 갖는 축성재배 품종을 재배하는 지역의 경우도 매년 350억~430억원 정도의 경제적 손실을 입고 있다 (한국식물병리학회지, 1998. 경북지역 시설원에 발생상황 참조).
- 6) 따라서 전국의 딸기 재배지에서 발생하는 잿빛곰팡이의 평균 발생률은 10~15%로 **경제적 피해액은 매년 총 814~1,100억원 정도로 예상**되며 최근 약제내성균 발생으로 인해 그 피해는 더 심해지고 있다.

나. 문제점

- 1) 딸기는 생식을 위주로 하는 신선식품이기 때문에 재배기간은 물론 특히 수확기에 **화학농약의 사용이 상당히 문제시** 되고 있다.
- 2) 잿빛곰팡이병은 발병특성상 고소득 작물 재배를 위한 시설재배에서 주로 많이 발생하여 **전 생육 기간에 걸쳐** 피해를 입힌다.
- 3) 잿빛곰팡이병 방제를 위해서 다양한 방법이 시도되기는 했지만 현실적 방제는 살균제에

의존할 뿐이다.

- 4) 계속되는 살균제의 다량살포로 약제저항성 균주와 변이균주들의 출현으로 방제의 어려움뿐만 아니라 농약의 오·남용에 의한 농산물 잔류문제가 제기되면서 **환경친화적인 새로운 잣빛곰팡이병 방제제 개발의 필요성**이 대두되고 있다.
- 5) 화학농약의 경우 잔류안전성을 위하여 딸기 수확기의 일정기간 이후에는 사용을 금하고 있어 작물재배 후기에 발생하는 병에 대해서는 다른 대안이 없는 현실이다.

다. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

- 가) 딸기 잣빛곰팡이병 방제는 주로 화학적 방제에 의존하고 있으나 농약 잔류, 내성균 출현 등의 문제가 있어 방제가 쉽지 않으며, 특히 딸기의 전생육기에 걸쳐 발생하는 잣빛곰팡이병 방제에는 많은 어려움이 있음.
- 나) 기존의 생물학적 방제 방법과는 완전히 다른 **천연자원 및 chitosan 등의 어패류 추출물, 미국자리공, 굴껍질 등의 환경유해식물과 농업부산물 등의 천연물질을 이용한 병해 방제제의 개발은 고부가 가치성 무공해 농산물 생산을 위해 필요함.**
- 다) 천연물질을 이용한 방제제의 상품화는 다른 생명공학기술에 비해 많이 발전되어 있지 않아 외국과 기술격차가 적음.
- 라) **간편한 제형으로 천연물질을 활용**하는 것은 본 연구팀에서 습득한 know-how이며 조합하는 물질의 구성요소에 따라 다양하게 경쟁력을 가질 수 있다고 판단됨.
- 마) 본 연구의 수행으로 얻어지는 유용천연물질로부터의 **물질추출기술, 유화기술, 제형화 기술**을 통해 안전한 먹거리를 생산하는 방법을 확립하고자 함.

2) 경제·산업적 측면

- 가) 딸기 잣빛곰팡이에 의해 매년 814~1,100억원의 경제적 손실이 발생하고 있음.
- 나) 농업부산물 및 천연물로 주변에서 흔히 볼 수 있는 미국자리공 등의 환경유해 식물이나 천연자원을 활용하는 것이므로 **개발비 투자가 상대적으로 적어 제품가격이 매우 저렴**할 것임.
- 다) 화학농약에서 비롯되는 독성잔류문제가 없어 시설재배 작물의 **수확기 및 저장시**에도 사용되므로 더 큰 **잠재시장을 확보**할 수 있음.
- 라) 딸기 잣빛곰팡이병의 방제를 위한 천연물질들의 제형화는 딸기에 발생하는 병들의 방제는 물론 **다른 병원균들에 대한 적용이 가능할 것으로 보여 넓은 경제적**인 수

익 창출 시장을 가지고 있음.

마) 딸기의 대일본 수출에도 잔류농약과 저장기간이 문제가 됨으로 이 문제를 동시에 해결하고자 함.

3) 사회·문화적 측면

가) 국가적으로 2008년까지 농약과 화학비료를 원제를 기준으로 30% 감축하고 **친환경 농산물 생산**량을 5% 이상 확대할 것을 추진하고 있어 이러한 정책과 농산물 생산에 일조할 것임.

나) 최근 환경에 대한 관심의 영향으로 사회적으로 환경오염과 인축독성이 거의 없는 농산물의 생산 요구가 점점 높아지고 있음.

다) 인체에 무해한 천연물질로 작업자의 농약중독 등을 막고 쾌적한 농약살포 작업조건을 조성할 수 있음.

라) 천연물질들을 이용한 병방제제의 개발은 **화학농약의 무분별한 오·남용**을 막아 **안전한 고품질 농산물생산에** 기여할 수 있음.

제 2 절 연구개발의 목표

1. 본 연구개발의 목표는 기존의 생물학적 방제와는 완전히 다른 천연자원으로부터 유래된 물질 중 항균활성을 나타내는 우수 재료들을 선발, 조합하여 경제성을 갖는 환경 친화적인 새로운 잣빛곰팡이병 방제용 천연물질 유래 병해 방제제를 개발하는데 있음.
2. 본 연구개발의 내용은 천연물질의 딸기잣빛곰팡이병균에 대한 항균활성검정, 항균 스펙트럼 조사, 생리활성물질의 분리 및 동정과 물질의 다양한 생물활성 검정 및 작용 특성조사, 효능증대방안 모색, 소포장실험, 유용물질 대량 생산법 확립, 제형개발, 농가 포장적용시험 등을 포함함.

제 3 절 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2003)	1. 항균성 보유 천연 자원 수집 및 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 수집된 활용 가능 자원들의 항균 특성 분석 ◆ 천연물질에 대한 안전성 검토
	2. 잣빛곰팡이병균에 대해 항균활성을 갖는 천연물질의 추출 및 활성검정	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 각종 식물자원 및 천연자원에 대한 천연물질의 항균활성 조사 및 유용재료 선별 ◆ 잣빛곰팡이병 항균활성물질 추출 및 활성검정 : 개별적인 선별 물질들에 대한 항균활성능 조사 ◆ 다양한 천연물질의 조합을 통한 병 발생억제 효과 모색
	3. 기본 제형 연구	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 활성 물질의 특성 조사 분석 ◆ 다양한 조합을 통한 기본 제형 연구 ◆ 경시적 안정성 시험
	4. 생물 활성 검정	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 포트 시험에서 기본 제제의 활성검정 ◆ 소포장 실험을 통한 기본 제제의 활성검정

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차년도 (2004)	1. 선발된 천연 물질의 조합을 통한 항균 활성 증대	<ul style="list-style-type: none"> ■ 천연물질의 약효 및 병 억제기작 조사 : 잣빛곰팡이병에 대한 예방효과, 치료효과, 지속효과 등을 조사 ■ 항균활성물질 추출물확보, 항균성 물질의 순화조건 확립 : 각종 chromatography, 용매추출법으로 순화 ■ 딸기 잣빛곰팡이병 다발생 온실 및 노지 포장에서의 활성검정
	2. 제형화를 위한 선발 천연 물질의 안정적 확보	<ul style="list-style-type: none"> ■ 천연자원 유래 추출물의 안정적 확보를 위한 다량 획득법 확립 ■ 최적 물질 생산 조건 확립 ■ 시제품 생산용 물질 확보
	3. 약효증진 방안 모색	<ul style="list-style-type: none"> ■ 약효 증진용 보조제 탐색 및 천연물질의 조합 ■ 포장 시험용 시제품 생산 ■ 경시적 안정성 시험
	4. 생물활성검정	<ul style="list-style-type: none"> ■ 상용농약과 천연물질의 방제효과 비교, 검정 ■ 포장 시험에서 제품의 활성 검정 : 처리량과 처리간격에 따른 전처리 효과검정과 최적처리횟수 조사와 치료효과 검정 ■ 제형별 병 발생 억제 효과 및 유효기간 조사

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차년도 (2005)	1. 방제기능 극대화 방안확립	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 딸기 잿빛곰팡이병 방제기능 극대화 체계 확립 : 천연물질간 혼합비율 등 복합처리기술 확립 ◆ 최적시기 처리 및 처리방법규명
	3. 산업화 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 기본제형처방 확립 및 가능제형 추가 검토 ◆ 효과 안정성 확보를 위한 제형 개발 ◆ 시제품 제조
	4. 생물 활성 검정	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 포장 시험에서 제품의 활성 검정 ◆ 딸기 저장기간 연장여부 조사 ◆ 제형별 병 발생 억제 효과 및 유효기간 조사 ◆ 기존 합성농약과의 혼용가능여부 조사 ◆ 시제품의 대규모 포장실험 ◆ 농가 적용 실험
	5. 제품가공 기술 및 관리 기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 유효성분 정량 실험 및 제품포장과 장기 보관 방법확립 ◆ 잿빛 곰팡이병 방제용 새로운 천연물농약 개발 ◆ 대농민 평가

제 2 장 국내 · 외 관련 기술의 현황

20세기 급격한 세계인구 증가로 인하여 지구상의 전 인류는 식량 확보라는 어려운 문제에 직면하게 되었고, 이를 해결하기 위한 방법으로 병충해, 잡초 방제기술 개발, 품종개량, 토양비옥도 증진 등을 이용하여 꾸준히 증산을 이루어 왔다. 그 중에서도 화학 합성농약을 이용한 병충해 및 잡초 방제는 농업생산 증대에 없어서는 안 될 중요한 요소로 인식되어 왔으며, 국내외 사용량은 계속 증가되고 있다. 그러나 지속적인 화학농약 사용과 과용, 오염 독성, 환경오염 및 자연생태계에 미치는 악영향, 인축에 대한 독성과 약제 저항성 병원균·해충의 발생으로 인한 방제효과 감소 등 여러 가지 문제점이 계속 제기되고 있다. 이러한 화학 농약 사용의 문제점을 줄이기 위하여 생물학적 방제법이 대안으로 제안되면서 환경친화적인 생물농약개발이 활발해지고 있다.

생물농약은 농작물의 병해 또는 해충 및 잡초를 방제하기 위하여 자연 환경에서 채집 분리된 병원균, 기주 저항성 미생물, 천연식물 및 천적을 제품화한 것이다. 생물농약은 본래 자연계에 존재하고 있던 생물들을 농약으로 활용하기 때문에 환경 친화적이고 생태계에 미치는 영향이 거의 없다. 그러나 독성에 대한 안정성도 높으며, 병해충 및 잡초에 대한 방제를 실시할 때에 특이성을 나타내기 때문에 방제 표적 이외에는 전혀 피해를 주지 않는다. 이러한 생물제제로서는 미생물 (세균, 방선균, 진균, 바이러스, 원생동물 등), 효소, 항생 물질을 생성하는 방선균, 사상균, 세균과 성 교란용, 유살용 등의 페로몬 등이 있다. 그리고 천적 (포식성, 기생성 등), 식물성 물질 (Neem oil, 로테논, 해조액 등), 동물성 물질 (동물성 성 유지 등), 저항성 유전자 등이 생물제제로 사용되어지고 있다.

생물농약의 개발 역사를 보면, 고전적인 생물학적 제어는 1888년도에 시작되었는데 캘리포니아에서 솜방석각지진디 (cottony cushion scale)라는 감귤 해충을 퇴치하기 위해 호주산 베달리아 딱정벌레 (*Vedalia beetle*)를 수입방사하여 방제에 성공하였다. 이후, 영국에서는 1920년대 토마토 온실가루이 (*Trialeurodes vaporariorum*)를 온실가루이좀벌 (*Encarsia formosa*)을 수입하여 방제하였고, 1927년 미국에서는 감자 더듬이병 방제용으로 방선균을 이용하여 병원균 생장억제 효과를 얻었다.

Essential oil은 식물의 표피나 엽육 조직에서 분화된 세포의 특정 공간에 저장되어 있는 끓는 온도가 낮은 기름성 물질이며 공기 중에 쉽게 휘산되어 인간의 후각을 통해 인지될 수 있는 저분자량의 액상 혼합체로 (Evans, 1998; 송 등, 1998) 주로 냉침법 (maceration),

초임계 유체추출 (digestion), 냉흡수법 (enfleurage), 용매 추출 (solvent extraction), 초임계 유체추출 (supercritical fluid extraction : SFE), 플로라솔 (Florasols) 등의 방법으로 추출된다 (정 등, 2003). Essential oil은 고대로부터 음식의 부패를 막기 위한 향신료로 사용되었다는 기록이 많이 남아 있다. 이것은 오래 전부터 essential oil의 광범위한 항균활성효과가 인지되어 활용되었다는 것을 말해준다 (Kim et al., 1995; Packiyasothy and Kyle, 2002; Alzoreky and Nakahara, 2002). 1977년에 essential oil과 그 유도체들의 항균활성 실험을 통해 essential oil과 그 유도체 중 60% 정도는 균류를 억제하고, 30% 정도는 세균을 억제한다고 밝혀진 이후 (Chaurasia and Vyas, 1977) 각종 문헌에서 terpenes이나 terpenoids가 세균 (Taylor et al., 1996), 균류 (Suresh et al., 1997), 바이러스 (Xu et al., 1996), 원생동물에 강력한 항균활성을 갖으며 (Vishwakarma, 1990), 특정 해충 및 특정 식물병원균에 대해 살충, 항균활성을 갖는다는 사실도 알려졌다 (Isman, 2000). 한편 Ultee 등 (2002)은 식중독 병원균인 *Bacillus cereus*에 essential oil을 처리하여 항균활성 기작을 밝혀냈으며, Rasooli and Abyan 등 (2004)에 의해 Thymol 처리가 *Aspergillus parasiticus*의 aflatoxin 생성이 억제되어 보고되었다. 최근 essential oil의 폭넓은 항균작용과 관련하여 essential oil이 약제 내성의 유무에 상관없이 모든 포도상구균에 강력한 항균활성을 나타낸다고 밝혀냈다 (Nostro, 2004). 또한 부패하기 쉬운 식품의 보존성을 늘리기 위해 essential oil을 이용하고 (Holley and Pater, 2005), 적용범위를 넓히기 위한 시도가 여러 나라에서 이루어지고 있다 (Bunt, 2004).

이와 같이 뛰어난 항균활성을 인정받아 오래 전부터 식품 보조제로서 사용된 essential oil은 친환경 농산물을 선호하는 소비자의 요구와 친환경적인 농약의 개발이라는 시대적 소명아래 식물병 방제분야에서도 점진적으로 연구가 이루어지고 있다 (Wilson et al., 1997, Antonov et al., 1997, Daferera et al., 2003). 그러나 농업 현장에서 essential oil을 직접 적용한 사례는 거의 없었으며, 최근 Ji 등 (2005)이 토마토 세균성 시들음병을 방제하기 위하여 essential oil을 최초로 포장에 사용한 사례만이 있을 뿐이다. 이렇듯 essential oil의 실질적인 농업적 활용은 식품분야에 비하여 거의 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

또한 1992년 리우 세계환경회의에서 농약 사용량의 20%를 생물농약으로 대체하도록 결의함에 따라 각국은 정부차원에서 화학농약의 사용량을 제한하고 생물농약 개발을 촉진하는 정책을 추진하고 있다. 이처럼 화학농약의 사용을 줄이고 생물농약이 사용을 증대시키는 세계 농약산업의 추세와 함께 생물농약의 시장 규모도 매년 증가하고 있는데 현재는 세계 농약시장규모 (350억불)의 3%에 불과하나 2010년에는 전체 450억불의 10%를 차지할 것으로

예측되며, 국내에서도 현재는 전체 농약시장의 1% 내외 수준이나 2010년에는 10% (1,220억원)로 증가할 것으로 전망되고 있다.

이러한 국내외적인 농업생산 환경변화에 맞춰 정부 차원에서 1997년도 12월에 환경농업육성법이 공포되었다. 그 후에 실천이 진행되고 있는데, 농림부는 2001년 친환경농업육성 5개년 (2001~2005)계획 수립으로 친환경농업을 체계적으로 육성하기 위한 정책목표와 방향 설정하고 1999년 대비 2005년까지 화학비료, 농약 사용량 30% 감축하고 친환경 농산물 생산량을 5%까지 확대하여 전체 농산물의 0.2%인 유기농산물 비중을 2005년까지 0.5%, 2010년까지 선진국 수준인 2.0%로 확대해 나갈 목적으로 추진하고 있다. 이처럼 화학농약의 사용을 줄이고 천연물질을 포함한 생물농약의 사용을 증대시키는 것은 세계 농약산업의 새로운 추세가 되고 있다. 따라서 과도한 유기합성농약의 환경오염과 생태계 파괴와 같은 단점을 보완 또는 대체하는 것이 날이 갈수록 점점 더 중요한 문제로 대두되고 있는 현실에서 생물농약의 개발에 많은 투자와 관심이 모아진다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 재료 및 방법

1. 딸기 잿빛곰팡이병 방제를 위한 환경 유해식물, 천연자원 및 농업 부산물의 수집 및 특성 분석

가. 환경 유해식물의 항진균 특성 조사

환경유해 식물인 미국자리공을 이용한 딸기 잿빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*)에 대한 항진균 활성 검정을 위하여 미국자리공 생체중 100g을 100% MeOH 1,000ml에 넣고 homogenizer로 10분간 마쇄시킨 뒤 실온에서 1시간 진탕배양한 후 여과지로 여과시켰다. 걸러진 여액을 Rotary Evaporater를 이용하여 감압 증류한 후 농축된 미국자리공 MeOH 추출물을 멸균수를 이용해 녹이고 5mg/ml 농도의 PDA 배지를 만들어서 *Botrytis cinerea*에 대한 항진균 활성을 검정하였다.

나. 자원 식물의 항진균 특성 조사

선발된 약쑥, 차조기 씨, 할미꽃 뿌리, 마늘, 텍사, 세신, 천남성, 누로, 천초, 목단, 현호색, 위령선, 백작약, 백합, 초오, 정향, 소회향, 육계, 계지, 탕자, 가구자, 승마, 참비름, 민들레 등의 천연 자원 식물들을 선발하여 분쇄기를 이용하여 잘게 분쇄시킨 후 각각의 천연물 건물중 10g을 500ml의 70% EtOH에 넣어서 80℃에서 3시간 진탕배양 후 여과지로 여과시켰다. 걸러진 여액을 Rotary Evaporater를 이용하여 감압 증류하여 농축된 천연물 추출액을 5mg/ml 농도의 PDA 배지를 만들어서 *Botrytis cinerea*에 대한 항진균 활성을 검정하였다.

다. 농업 부산물들의 항진균 특성 조사

선발된 굴껍질, 밤껍질, 감껍질, 녹차찌꺼기 등의 농업부산물을 선발하여 생체중으로 100g을 1,000ml의 70% EtOH에 넣어서 60℃에서 3시간 진탕배양한 후 여과지로 여과시켰다. 걸러진 여액을 Rotary Evaporater를 이용하여 감압 증류시킨 농축된 추출물을 5mg/ml 농도의 PDA 배지를 만들어서 *Botrytis cinerea*에 대한 항진균 활성을 검정하였다.

2. 딸기 잿빛곰팡이병 방제용 최적 재료 선발

가. 농도별 항진균 활성능 조사

수집된 환경유해식물, 천연자원, 농업부산물의 MeOH 또는 EtOH로 추출한 추출물이 5 mg/ml의 농도로 함유된 PDA 배지에서 90% 이상의 생육저지를 나타내는 물질들을 선발하여 각각 5mg/ml, 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.1mg/ml 의 농도가 함유된 PDA 배지를 만들고, PDA에서 3일간 배양된 *Botrytis cinerea*의 선단부위를 4mm의 cork borer로 절단하여 접종원을 만들어 시험하고자 하는 항진균 배지에 접종하고 21℃에서 3일간 배양한 후 균사의 생장을 측정하여 유효 항진균 농도를 측정하였다.

나. 항진균 스펙트럼 조사

수집된 환경유해식물, 천연자원, 농업부산물 등의 추출물 5mg/ml의 농도가 함유된 PDA 배지에서 항진균 활성을 나타내는 재료들에 대해 주요 병원 진균인 *Botrytis cinerea* 외에 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, *Fulvia fulvum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pythium ultimum* 에 대한 항진균 활성을 검정하였다.

3. 선발된 유용 천연물질의 항진균 활성능 조사

선발된 유용 천연물질의 농도에 따른 *Botrytis cinerea*의 포자발아율을 측정하기 위하여 PDA에서 14일간 배양되어 포자가 유도된 *Botrytis cinerea*를 사용하였다. 포자가 유도된 *Botrytis cinerea* plate에 멸균수 10ml을 넣고 도말봉을 이용하여 포자를 회수한 뒤 dilution 법을 이용하여 2×10^2 /ml개의 농도로 희석하여 우수한 효과를 나타냈던 2mg/ml~0.1 mg/ml의 세신 추출물이 함유된 PDA 배지에 100 μ l를 접종하고 도말하고 20℃ 항온기에서 4일간 배양 후 발아된 개수를 확인하였다.

4. 선발 물질 조합별 억제 효과 조사

*Botrytis cinerea*에 대한 항진균 활성이 뛰어난 보조물질 chitosan, 환경유해식물, 천연자원식물 추출물들과의 조합에 따른 항진균 활성을 조사하였다. 보조물질 chitosan의 처리농도를 0.1 %로 고정하고 환경 유해식물과 천연자원 식물 추출물의 처리농도를 각각 0.1, 0.5, 1, 2mg/ml로

처리하여 잿빛곰팡이병원균에 대한 군사생육억제 정도를 분석하였다. 또한 환경유해식물과 천연자원식물 추출물의 농도를 각 1mg/ml로 고정하고 보조물질 chitosan의 농도를 0.005, 0.01, 0.05, 0.1%로 나누어 처리한 후 병원균에 대한 군사생육 억제율을 조사하였다.

5. 안전성 검사

가. 식물 발아실험

선발된 천연물들이 식물의 종자발아와 생육에 미치는 영향과 안전성을 구명하고자 파종 실험을 실시하였다. 실험은 Incubator와 온실을 이용하여 발아력과 생육을 동시에 조사하였다. 천연자원 추출물 1mg/ml의 농도에서도 약 80% 이상의 딸기잿빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*)의 생육 억제 효과가 있는 천연자원식물 추출물 세신, 소회향과 Sub-chitosan를 사용하였다. 희석농도는 천연자원식물 추출물 세신의 1,000ppm, 2,000ppm, 소회향의 1,000ppm, 2,000ppm, 보조물질 chitosan의 500배, 250배로 준비하였다. 포장상태의 발아와 생육을 조사하고자 생육배지를 Peatmoss + 부숙 퇴비 + Vermiculite를 7:2:1로 조제하였고, 종자는 신젠타코리아 노랑만집 배추종자를 파종하였다. Incubator에서는 Petri Dish에 90mm NO.2 여과지를 놓고 각각 2mL의 액을 떨어뜨리고 배추종자를 10립씩 파종한 후 발아율을 조사하였다. 온실에서는 72구멍 Plug Tray에 조제된 배양토를 충전한 후 종자를 파종하고 각각의 희석액을 저면관수 하였다. 무처리구는 증류수를 사용하여 7처리 5반복으로 하였다.

나. 선발된 천연물 추출물질의 식물의 생육에 미치는 효과 검증

선발된 천연물 추출물질의 효과를 검증하기 위하여 Petri Dish에 90mm NO.2 여과지를 놓고 각각 2mL의 액을 떨어뜨리고 배추종자를 10립씩 파종한 후 25℃에서 발아율을 조사하였다. 무처리구는 증류수를 사용하였고 5반복으로 실험하였다.

6. 선발된 활용가능 물질의 기본 특성 조사

가. 선발된 활용 가능 천연물의 용매별 분획 활성 및 딸기 잿빛곰팡이병원균 억제 활성 검증

딸기 잿빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*)의 군사생장저해에 효과적인 천연자원식물 세신과 소회향의 추출물 중 항균활성 분획을 검증하고자 용매별 분획 항균활성검정 시험을 하였다.

먼저 건조 마쇄된 천연자원식물 세신과 소회향을 각각 10g씩 70% EtOH에 넣고, 60°C shaking incubator에서 3시간 진탕배양 한 뒤, 거즈와 여과지를 사용하여 불순물을 걸러내고 획득된 추출액을 Rotary evaporator를 이용하여 감압 증류하여 추출물을 얻었다. 이어서 얻어진 추출물에 D.W 100ml을 넣고 resolution 시킨 뒤 분별깔때기를 이용하여 hexane 200ml과 혼합시켜서 hexane 분획을 얻고 남겨진 수층에 보다 극성의 용매인 Chloroform, Ethyl acetate, buthanol 순서로 hexane의 방법과 동일하게 실시하여 각각의 용매별 분획을 얻었다. 이어 용매들을 Rotary evaporator를 이용하여 감압 농축하여 최종 1ml의 추출물을 얻었다. 이와 같은 방법을 통해 얻어진 용매별 추출물을 무균상 안에서 여과지에 50 μ l씩 넣고 충분히 용매를 증발시킨 후 PDA 배지상에 *Botrytis cinerea*와 대치배양하여 항균활성을 검정하였다.

나. 선발된 활성물질의 항균 기작 조사

선발된 천연물 추출물질에 의한 군사생장 억제 기작을 조사하기 위해 활성분획의 추출물을 클린벤치 안에서 여과지에 50 μ l씩 넣고 충분히 용매를 증발시킨 후 PDA 배지상에 *Botrytis cinerea*와 대치배양하여 항균활성을 검정하였다. 25°C 에서 배양 후 병원균의 발아 및 군사생육억제 기작을 광학현미경 검경을 통하여 조사하였다.

7. 항균활성 물질의 분리

가. 항균활성 검정

1) 사용균주

딸기 잿빛곰팡이 병원균 *Botrytis cinerea*(CNU-BC 30, CNU-BC 40)을 사용하였다.

2) 항균활성 검정

항균활성 검정은 한천배지확산법(agar diffusion method)을 이용하였다. 시료용액을 멸균된 여과지(Toyo, 8mm, Japan)에 50 μ l 흡수시킨 뒤 상온에서 용매를 완전히 휘산시킨 후 *B. cinera*가 접종되어 활착된 PDA에 병원균과 2cm 간격을 두고 disc를 치상한 뒤 22°C 항온기에서 2일간 배양한 후 clear zone을 확인하였다.

8. 항균활성 물질의 정제 및 동정

가. 시약 및 기기

물질의 추출과 open column chromatography용 용매는 1급시약을 사용하였다. Open column chromatography용 silica gel은 Merck사의 Silica gel 60(70~230 mesh, column chromatography용, Germany)을, LH-20 column chromatography용 resin은 SephadexTM사의 LH-20(column chromatography용, Sweden)을, octadecyl silane(ODS)는 Merck사의 LiChroprep RP-18(40~63 μ m, column chromatography용, Germany)를 사용하였으며, TLC plate는 Silica gel 60 F₂₅₄(Merck, Germany), LCK18F Silica Gel 60Å(Whatman, U.K)를 사용하였다.

분자량 측정에는 LC-MS(Liquid chromatograph / mass spectrometer)를 이용하였으며 기기는 HP 1100 series LC/MSD(U.S.A)를 사용하였다.

1) Silica gel open column chromatography

100% EtOH로 추출한 시료 20g을 hexane, ethyl ether, chloroform, ethyl acetate, butanol, 증류수로 용매 분획한 것 중 항균활성을 나타내는 hexane층 extracts로 silica gel open column을 수행하였다. Silica gel 200g(70~230 mesh, column chromatography용, MERCK, Germany)을 hexane 100%로 slurry를 만들어 column(50×300 mm)에 충전시킨 후, 세신의 hexane extract 6.4g을 hexane : ethyl ether 20:0 ~ 0:20 으로 용출 분획하였다. 그 중 항균 활성이 가장 강한 18:2 분획을 2차 silica gel open column chromatography(50×60 mm)로 hexane : ethyl ether 190:10 ~ 188:12로 용출 분획하였다.

2) LH-20 column chromatography

SephadexTM사의 LH-20(column chromatography용, Sweden)을 MeOH 100%로 slurry를 만들어 column(20×700 mm)에 충전시킨 후 2차 silica gel open column chromatography를 통하여 얻어진 항균활성 분획을 100% MeOH로 용출 분획하였다.

3) ODS Thin layer chromatography

ODS Thin layer chromatography는 LCK18F Silica Gel 60Å(Whatman, U.K)를 사용하여 LH-20 column chromatography에 항균활성을 나타내는 분획을 검정하였다. MeOH 60%,

70%, 80%, 85%, 90%, 100%의 MeOH를 전개용매로 사용하여 항균활성 물질의 분리에 사용하였으며 anisaldehyde 시약으로 발색시켰으며 각 spot을 prep하여 100% MeOH에 용출시켜 agar diffusion method를 통하여 항균활성을 검정하였다.

4) ODS column chromatography

ODS Thin layer chromatography를 통하여 항균활성물질의 분리 조건을 확립한 뒤 ODS column chromatography를 수행하였다. Octadecylsilane(ODA) column chromatography는 Merck사의 LiChroprep RP-18(40~63 μ m, column chromatography용, Germany)을 column(50×300 mm)에 충전시킨 후 85% MeOH를 사용하여 항균활성 물질을 분리 정제하였다.

5) LC-MS(Liquid chromatograph / mass spectrometer)

나. 잣빛곰팡이에 대한 억제 효과가 뛰어난 물질의 동정

9. 시제품 생산용 물질 대량 확보

딸기 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*) 군사생장저해에 가장 효과적인 천연자원 식물로는 세신(*Asarum sieboldii*)을 선발하였다. 최종 선발된 세신을 이용하여 항균활성 물질을 대량 확보하여야만 앞으로의 연구수행이 원활할 뿐만 아니라 상품화가 가능하기 때문에 물질의 대량 확보가 매우 중요하다. 따라서 세신으로부터 천연자원 유래 항균물질을 다량으로 획득하기 위하여 세신의 종류 및 세신의 재배적 특성 등을 고려하여 시제품 생산용 물질의 대량 확보를 위한 방법을 모색하였다.

10. 추출 물질 다량 획득 및 최적 분리 방법 모색

딸기 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 군사생장저해에 효과적인 천연자원식물인 세신과 소회향에서 70% EtOH를 이용한 추출법을 사용하여 항균 활성능을 검정한 결과, 추출물 1 mg/ml의 농도에서 약 85% 이상의 딸기잣빛곰팡이병균의 군사생장을 저해하는 것을 알 수가 있었다. 하지만 추출 물질의 다량 획득 및 최적 분리 방법을 알아보기 위하여 MeOH를

이용한 저온 추출법과 열수추출을 실시하였다. 먼저 MeOH를 이용한 저온 추출방법은 천연자원식물 세신과 소회향 각각 10g씩을 100% MeOH 500ml에 넣고 shaking incubator를 이용하여 25℃에서 3시간 진탕배양 한 다음 거즈와 여과지를 이용하여 불순물(찌꺼기)을 걸러내고 수득된 MeOH 추출물을 Rotary evaporator를 이용하여 40℃의 온도에서 감압 농축시켜 활성을 검정하였다. 천연자원식물 세신과 소회향의 열수추출물은 각 10g을 DW 500ml에 넣고 중탕으로 약 15분간 가열하여 추출하고 거즈와 여과지를 이용하여 불순물(찌꺼기)을 걸러내고 수득된 열수추출물을 가지고 PDA를 제조하여 항균 활성능을 검정하였다.

11. 천연물질의 약효 및 병 억제 기작 조사

분리된 천연물질이 essential oil의 하나인 Methyl eugenol로 동정됨에 따라 보다 구체적인 항균활성 효과 및 병 억제 기작을 분석하였으며, 각종 논문에서 확인된 항균활성을 나타내는 essential oil인 carvacrol(98%, ALDRICH, U.S.A), Thymol(99.5% SIGMA, U.S.A), Eugenol(99%, ALDRICH, U.S.A) safrole(SIGMA, Switzerland), cymene(99%, ALDRICH, U.S.A)의 시약을 구입하여 세신에서 분리된 Methyl eugenol과 함께 동일하게 분석하였다.

가. Agar diffusion method

PDA 배지 상에 4cm 거리를 두고 한쪽에는 *B. cinerea*의 agar plug를 접종하고 다른 한쪽에는 Methyl eugenol, carvacrol, Thymol, Eugenol, safrole, cymene을 MeOH로 희석하여 50 μ g, 250 μ g, 500 μ g, 750 μ g, 1mg의 농도로 각각의 여과지에 흡수시킨 뒤 실온 상태에서 15분간 방치하여 MeOH를 모두 증발시킨 여과지를 배지 위에 치상한 뒤 22℃ 배양기에서 3일간 배양하였다. 접종 3일 후 균사 생장율을 측정하여 각종 essential oil의 농도별 항균활성 효과를 검정하였다.

나. Essential oil 함유 배지에서의 생육

Methyl eugenol, carvacrol, Thymol, Eugenol등의 essential oil을 50ppm, 100ppm, 200ppm의 농도별로 함유시킨 PDA 배지를 만들고 생육 저해율을 측정하여 항균활성 효과를 검정하였다. 이 때, essential oil류가 기름성분이기 때문에 배지와 잘 섞이지 않으므로 glycerol을 6:4(g/g) 비율로 첨가하여 essential oil이 배지와 섞이게 만들어 Autoclave 하여 essential oil 함유 PDA 배지(agar 1.8%)를 제조하였다. 보통 MeOH나 EtOH로써 essential oil을 희석하게 되는

데 MeOH나 EtOH 같은 경우 소량(0.5~5%)만 배지에 섞여 있어도 *B. cinerea*의 생육에 매우 큰 영향을 미치므로 glycerol을 사용하였다.

12. 실내실험에서 기본제제의 활성 검정

가. Essential oil 직접 분사

딸기(품종 : 장희)를 70% EtOH로 표면 소독한 후 멸균수로 3회 헹구내어 tray에 4개씩 넣어서 준비하고, *B. cinerea*의 포자를 6×10^4 20 μ l를 딸기 엽병에 접종하였다. 그 후 Methyl eugenol, carvacrol, Thymol, Eugenol을 5,000ppm, 10,000ppm의 농도로 멸균수에 섞고 분무하기 직전에 격렬히 흔들어서 분무기를 이용하여 딸기에 분무하였다. 또한 각 essential oil을 같은 방법으로 100ppm, 200ppm의 저농도로 만들어서 분무기를 이용하여 딸기에 분무하였다. 딸기에 essential oil을 분무 처리한 후 뚜껑을 덮고 22 $^{\circ}$ C의 incubator에서 4일간 배양한 후 딸기의 잿빛곰팡이병에 대한 이병률을 조사하였다.

나. 유화 제형

Essential oil은 기름 성분으로 물과 잘 섞이지 않는 성질 때문에 고농도를 처리하거나 저농도로 처리하더라도 물에 희석하여 뿌릴 경우 물만 분사되거나 오일만 분사될 경우가 있고, 오일만 분사되어 오일이 묻은 조직에서는 분명히 약해가 발생될 것으로 판단되었다. 따라서 essential oil의 제형화를 생각해 보았고, essential oil이 에탄올에 녹기 때문에 에탄올과 식용 가능한 계면활성제인 tween 20을 사용하여 농도별 유화 정도를 측정하여 유화 제형을 선택하였다.

다. Essential oil + glycerol

딸기(장희)를 70% EtOH로 표면 소독한 후 멸균수로 3회 헹구내어 tray에 넣어서 준비하고, *B. cinerea*의 포자를 6×10^4 20 μ l를 딸기 엽병에 접종하였다. 그 후 Methyl eugenol, Thymol, Eugenol, *Asarum sieboldi*의 항균활성분획을 tween 20 6:4(g/g)의 비율로 섞어서 100ppm, 200ppm의 농도로 만들어서 분무기를 이용하여 딸기에 분무하였다. 딸기에 essential oil을 분무 처리한 후 뚜껑을 덮고 22 $^{\circ}$ C의 incubator에서 4일간 배양한 후 딸기의 잿빛곰팡이병에 대한 이병률을 조사하였다.

라. 약해검정

Essential oil의 약해의 유무를 검정하기 위하여 딸기 잎, 배추 잎을 멸균수로 3회 헹궈낸 뒤 tray에 넣고 Methyl eugenol, carvacrol, Thymol, Eugenol을 tween 20 6:4(g/g)의 비율로 섞어 50ppm, 100ppm, 500ppm, 1,000ppm(essential oil 기준)의 농도로 만들고 분무기를 이용하여 딸기 잎과 배추 잎에 분무하고 3일 후에 약해 유무를 검정하였다.

13. 액제, 수화제, 분제, 서방형, 과립형 제형 검토 및 보완

여러 제형이 알려져 있으나 우리가 찾은 천연물질의 효능증대를 위해 알맞은 제형을 찾고자 노력하였다. 액제는 수용성원제, 물, 계면활성제의 3성분으로 된 액상제제로서 원제의 가수분해 우려가 없는 경우에 이용하며, 보조제는 5%정도의 비이온성 계면활성제, 동결방지제 등을 사용한다. 단점은 물에 쉽게 용해되는 원제로만 제조할 수 있는 제제이지만 제제 가능한 원제는 그리 많지 않다.

수화제는 고체원제와 증량제를 공기압축 분쇄기로 미분쇄한 후 계면활성제, 접착제, 습윤제, 분산제, 붕괴제 등을 첨가하여 만든 제제로 액상원제의 경우 증량제에 흡착시킨 후 분쇄한다. 액상수화제 (SC제, flowable제, sol제)에 대하여 입상수화제 (WDG제, WG제, dry flowable제)라고 하며, 계면활성제는 분산성 증진용으로 lignosulphonates, naphthalene sulphonate, formaldehyde condensates, ethoxylates, polycarboxylates 등이 사용된다. 원제 함량을 높일 수 있어 소포장이 가능하고 용량으로 계량이 가능하여 사용에 편리하나 시설비 투자 비용이 높다. 기술이 발달하여 미국에서 많이 보급되고 있고 수용성 팩제로 포장한 제품은 담수 논에서 살포시에도 생력화가 가능하다.

유제는 난용성원제, 용제, 유화제의 3성분으로 된 액상 제제로서 물에 희석하면 유탁액이 되며, 인화성과 휘발성이 낮은 xylene, benzene, MFG, 알콜류 등의 단용 또는 혼용으로 사용된다. 보조제로는 유화제, 석출방지제, 분산제, 고착제 등을 사용하고, 유화제는 일반적으로 유화력이 강한 비이온성 계면활성제를 5-15%정도 사용한다.

분제는 원제를 talc, 점토광물, 쌀겨, 왕겨, 탈지강, 톱밥, 제올라이트, 질석, Cellulose, kaoline 등의 고체증량제와 소량의 보조제를 혼합하여 미분쇄한 분말 제제(입경 45 μ m(300메쉬 이하)로서 250메쉬에서 98%이상 통과해야한다. 액체원제의 제조는 화이트카본 등에 흡수시켜 농후분제를 만든 후 고체증량제와 혼합 분쇄한다. 보조제는 증량제, 滑劑(비산 증진효과), 고착제, 안정제(원제 안정 효과), 고화방지제 등을 사용한다. 생산비용이 저렴하나

살포 작업시 안전성 및 비산문제로 액상수화제, 과립수화제 등으로 대체되고 있다.

과립제(입제)는 용제에 녹인 원제를 입상 지오라이트 등의 담체에 흡착시키거나 (흡착법), 접착제를 사용하여 모래 등의 입자에 피복시키거나(피복법), 탈크, 벤토나이트 등의 광물질과 혼합 분쇄한 후 반죽하여 스크린을 사출시켜 만드는 방법(압출조립법) 등이 있다. 입경 300-1700 μ m, 48-10mesh이다. 보조제는 고결제, 안정제, 계면활성제 등이 있다.

그 밖에 캡슐제는 원제를 고분자물질로 피복하여 고체형태로 만들거나 캡슐 안에 원제를 넣어 만든 제형이다. 방출조절 기능을 갖고 있으며 특수 방제목적으로 사용한다.

오일제는 농약을 오일에 녹여 만들고 살포할 때는 유기용매에 희석하여 살포할 수 있도록 한 제형이다. 물로 희석할 수 없는 경우와 같이 특수목적으로 사용되며 원액을 직접 살포할 수도 있다.

종자처리수화제는 종자 부착성을 높인 수화제로 벼 직파용 종자, 벼 육묘상 파종 때 종자에 피복하여 사용할 수 있다. 병해충의 예방위주로 사용하기 때문에 적은 양으로 효과를 나타내며 살포시간을 기존 약제보다 월등히 절약할 수 있다. 약제 손실이 아주 적어 환경오염을 피할 수 있고 중독의 우려가 거의 없다. 마른 종자에 사용할 때는 적은 양의 물에 풀어 사용한다.

종자처리액상수화제는 액상수화제 형태로 종자처리수화제와 특성이 비슷하나 액상인 점이 다르다. 마른 종자에도 그대로 사용할 수 있으며 물에 희석하여 사용할 수도 있다.

분의제는 일반 수화제의 형태로 되어 있다. 가루상태 그대로 종자에 처리할 수 있고, 수화제와 같이 물에 희석하여 사용할 수도 있다.

본 제형의 특성상 지상부 식물병 방제를 실시하여야하므로 액제가 가장 우선시 되는 제형이며, 수화제도 약혼의 문제만 해결되면 사용하기 간편한 제형이라 생각된다.

14. 약효 증진 보조제 탐색

보조제란 원제의 활성이나 살포효과를 높이기 위해 제제 또는 살포액에 첨가하는 물질의 총칭으로서 주로 고분자물질이 이용되고 있는데 본 연구에 활용하기 좋도록 이들의 특성을 분석해 보았다. 최근에는 젤라틴, 전분(풀), 식물성오일, 동물성 oil, 물엿, 꿀, 조청, 알긴산, CMC, 보조물질 chitosan 등도 보조제로 많이 사용되고 있다. 그중에서도 효력증강제와 활성성분은 제제의 효력을 증진시키기 위해 첨가하는 물질로 활용가치가 매우 높다. 현재 농약이나 미생물제제에 많이 사용되는 보조제의 특성 및 종류를 살펴보면 다음과 같다.

전착제 (spreader)는 농약 살포액이 식물 또는 병해충의 표면에서 넓게 퍼지게 하기 위하여 첨가하는 물질로 폴리아미드수지, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌, 고급지방산에스테르 등이 있고, 고착제 (sticking agent)는 약제가 엽면에 강하게 부착하여 유실을 적게 하고 내우성을 증진시키기 위해 첨가하는 물질로 폴리아크릴산염, 폴리아크릴아미드산염, 폴리옥시에틸렌, 왁스, 전분의 인산에스테르, 폴리초산비닐 등이 있다.

증점제 (thickener)는 액상수화제, 캡슐현탁제 등 점도를 증가시키기 위해 첨가하는 물질이고 폴리아크릴산계 폴리머 등을 사용한다. 응집제 (coagulant, flocculant)는 분체의 미립자를 응집시켜 비산을 방지하기 위하여 첨가하는 물질로 글리세린옥시드 등을 사용한다.

방출조절제 (releasing controller)는 유효성분을 저장매체에 보존하여 방출속도를 조절하고, 공기 중의 휘산이나 광, 미생물 등에 의한 분해를 지연시켜 안정성을 증진시키기 위해 첨가하는 물질로 고분자화합물과 농약의 상호작용을 이용하는 것으로 천연 또는 합성 고분자물질 (폴리에스테르, 아크릴계 폴리머, 폴리우레아, 폴리염화비닐 등)을 사용하고 있다. 최근에는 자연 분해성 천연고분자물이 많이 이용되고 있다.

안정제 (stabilizer)는 농약을 보존할 때 그 상태 및 화학변화를 방지하기 위하여 첨가하는 물질로 분체, 수화제, 입제 등의 안정성 증진을 위해 폴리에틸렌 글라이콜, 폴리비닐알콜, 폴리염화비닐 등이 있다. 보습력 증강제는 수화제, 분체, 미분체 등에서 지속성, 보습력증진을 위해 첨가하는 물질로 수화제에서는 수용성고분자, 폴리에틸렌글라이콜 등, 분체에서는 폴리프로피렌글라이콜 등을 사용한다.

활성성분 (activator)은 고분자 자체만으로 생물활성을 나타내는 특성을 이용하여 유효성분 이외에 첨가하는 물질로 폴리에틸렌글라이콜 (후추의 발아촉진), 폴리아크릴산, 알긴산 (바이러스 감염 저지 효과), 양이온성 고분자 (살균작용), 젤라틴 (선충피해 방지효과), 카본산폴리머 (살응애 효과), 보조물질 chitosan (배혹반병 발생저지 효과) 등이고, 소포제 (antifoamer)는 물에 희석하는 제제에서 계면장력을 내림으로써 액체를 저울 때 거품발생을 방지하기 위해 첨가하는 물질이다. silica + polymethylsiloxane을 사용한다. 분산제 (dispersant)는 현탁액 내의 입자 (고체 또는 액체입자)를 분리 분산시키기 위해 첨가하는 물질이고, polyvinylpyrrolidone, alkylated vinylpyrrolidone polymer, calcium lignosulphonate, polyol, poloxamer 등을 사용한다. 특히, 농약입자의 표면에 강하게 흡착되어 입자간의 응집을 방지한다. 유화제 (emulsifier)는 한 액체를 혼합되지 않는 다른 액체 내에서 분산시키기 위해 첨가하는 물질로 종류는 amine ethoxylate, sodium dihexyl sulphosuccinate, phosphate ester of ethoxylated tristyrylphenol, ethoxylated polyoxypropylene 등이 있었다.

15. 다양한 조합을 통한 기본 제형 연구

제형(formulation)이란 균일살포, 약효증진, 부작용감소를 위해 원제에 부가재를 넣어 실제 사용되고 있는 제품을 의미하며, 제형 (formulation type)이란 입제, 유제, 수화제 등 제품형태를 의미한다. 현재 많이 사용되고 있는 제형에는 액제, 수화제, 분제, (과)립제, 완효성 (서방성), 등이 있다. 효과적으로 천연물제제를 실용화시키려면 최적의 제형화가 요구된다. 처리한 천연물이 식물의 표면에 부착될 수 있어야 하며, 천연물의 효능이 식물에서 효과적으로 발휘 될 수 있어야한다. 또한 제형에 함유된 성분들이 작물에 해로운 영향을 미치지 않아야 천연물을 제형화하여 병 방제에 이용하였을 때 효과를 얻을 수 있게 된다.

위와 같은 여러 가지 요인들을 고려하여 고정화 방법 (액제형, 수화제형, 분제형, 서방형, 과립형 등), 담체 선정 (쌀겨, 왕겨, 탈지강, 톱밥, 제올라이트, 질석, 전분, Cellulose, PVA, kaoline 등), 전착제 선정, 영양 보조제의 선정, 기타 미량원소의 첨가 등을 통해 딸기 잿빛곰팡이병을 효과적으로 방제할 수 있는 제형을 연구하였다.

충남대학교에서 추출한 천연물질 (세신, 소회향, 세신 + 소회향)에 전착제, 영양보조제, 식용오일, 계면활성제 등을 첨가하여 천연물질의 효능증진 및 딸기 표면의 집착성을 높이기 위하여 액제 제형을 개발하였다. 또한 액상제형은 딸기표면에 천연물의 흡착율을 높여줄 수 있는 흡착증강제와 물에 잘 녹는 분산제를 사용하였다. 영양원으로 질소원, 탄소원 및 미량요소 등을 사용하였는데 모두 물에 잘 녹는 성분으로 딸기에 스트레스는 적게 주고 비료효과도 줄 수 있는 성분을 선택하여 사용하였다.

수화제 타입 제형의 특징으로는 물에 현탁이 잘 되고 30분 이상 현탁이 지속되고, 또한 딸기 표면에 천연물의 흡착이 뛰어나며, 잎 표면에 약흔이 나타나지 않아야 한다. 수화제는 천연물 원제와 점토광물 증량제를 혼합하여 미분쇄한 후 코팅제, 습전제, 흡착증강제, 질소원, 탄소원, 분산제, 등을 첨가하여 만들었으며, 계면활성제는 음이온을 사용하여 부착력을 증진시켰다.

16. 포장 실험을 통한 기본 제제의 활성 검정(상용농약과 비교 포함)

가. Essential oil 농도별 항균활성

충남 공주의 딸기 시설포장 (200평)에서 장희 품종으로 포장에서의 기본제제 활성을 검정하였다. Methyl eugenol, Thymol, Eugenol을 essential oil : tween 20 : water 1g/0.66g/10ml

의 비율로 essential oil 제제 stock (유효 essential oil 농도 100,000ppm)을 만든 후 포장에서 살포하기 전에 500배 (200ppm), 1000배 (100ppm), 2000배 (50ppm) 희석하여 농약살포기를 통하여 분무하였다. 대조약제는 현재 상용되고 있는 약제인 깨끄탄을 1,000배 농도로 희석하여 사용하였다. Essential oil 제제는 3일 간격 2회 살포하였으며 깨끄탄은 7일 간격 1회 살포하였다. 딸기는 1처리구에 50포기씩 3반복으로 난괴법으로 배치하였다. 실험 전에 이병 잔재물을 제거하고 하엽을 모두 따주어 본 실험에 최적의 조건을 만들었다.

나. Essential oil + glycerol + 보조제

항균활성 보조제로서 NaH_2CO_3 1,000ppm과 neem oil (surfactant 5%) 1,000ppm, chitosan (MW 300 thousand upper) 10,000ppm을 선발하여 경남 진주의 딸기 시설포장 (200평)에서 장희 품종으로 포장에서의 항균활성 증진 효과를 검정하였다. Essential oil 처리구는 Thymol, Eugenol, Methyl eugenol 50ppm으로 정하였으며 대조구로써 tween 20 300ppm, EtOH 600ppm으로써 사용하였다. 딸기는 1처리구에 50포기씩 3반복으로 난괴법으로 배치하였다. 실험 전에 이병 잔재물을 제거하고 하엽을 모두 따주어 본 실험에 최적의 조건을 만들었다.

17. 전처리 효과검정과 처리횟수 및 치료효과조사

충남 공주의 딸기 시설포장(200평)에서 장희 품종으로 포장에서의 기본제형의 처리량과 전처리 효과검정, 처리횟수 및 치료효과를 조사하였다. *Asarum sieboldii*에서 추출한 항균활성 물질인 Methyl eugenol과 다른 essential oil의 한 종류인 Thymol, Eugenol을 essential oil : tween 20 : water 1g/0.66g/10ml의 비율로 essential oil 제제 stock (유효 essential oil 농도 100,000ppm)을 만든 후 포장에서 살포하기 전에 500배 (200ppm), 1000배 (100ppm), 2000배 (50ppm) 희석하여 농약살포기를 통하여 분무하였다. 대조약제는 현재 상용되고 있는 약제인 깨끄탄을 1,000배 농도로 희석하여 사용하였다. 딸기는 1처리구에 50포기씩 3반복으로 난괴법으로 배치하였다.

먼저 처리량에 따른 효과검정은 본 연구의 주관기관인 충남대학교에서 소규모 포장실험을 통해 선발된 처리량인 1,000배 (100ppm) 희석법을 사용하였으며, 전처리 효과검정은 본 연구의 주관기관인 충남대학교에서 실시하고 있는 실험 항목으로 같음한다. 처리횟수에 따른 치료효과의 검정은 2일 간격으로 essential oil 제형을 처리하여 횟수별 이병률을 조사하였

다. 실험 전에 이병 잔재물을 제거하고 하엽을 모두 따주어 본 실험에 최적의 조건을 만들었다.

18. 잣빛곰팡이병에 대한 예방, 치료, 지속효과 등을 조사

Essential oil 제형의 잣빛곰팡이병에 대한 예방, 치료, 지속효과 등을 조사하기 위하여 딸기(장희)에 먼저 essential oil을 처리하고 병원균을 접종하는 방법과 병원균을 먼저 접종하고 그 후에 essential oil을 처리하는 방법을 사용하였다. 이때 essential oil의 처리농도는 100ppm 이었으며 접종한 병원균은 2×10^4 20 μ l의 농도로 접종하였다. 또한 약효의 지속효과를 알아보기 위하여 먼저 essential oil 제형을 처리한 후 1, 3, 5일 간격으로 병원균을 각각 접종하여 효과를 검정하였다.

19. 잣빛 곰팡이 다발생 포장에서의 활성 검정과 약효지속기간

잣빛곰팡이 다발생 포장인 공주시 계룡면의 딸기 포장 (200평)에서 연차 실험을 통해 장희 품종으로 essential oil 제제의 활성과 그 약효지속기간을 분석하였다.

1차년도 실험 (2005년)에서는 *Asarum sieboldii*에서 추출한 향균활성 물질인 Methyl eugenol과 다른 essential oil의 한 종류인 Thymol, Eugenol을 essential oil : tween 20 : water 1g/0.66g/10ml의 비율로 essential oil 제제 stock (유효 essential oil 농도 100,000ppm)을 만든 후 포장에서 살포하기 전에 500배(200ppm), 1,000배 (100ppm), 2,000배 (50ppm) 희석하여 3일 간격 4회 농약살포기를 통하여 분무하였다. 대조약제는 현재 널리 사용되고 있는 약제인 깨뜨탄을 1,000배 농도로 희석하여 사용하였다. 딸기는 1처리구에 50포기씩 3반복으로 난괴법으로 배치하였다. 실험 전에 이병 잔재물을 제거하고 하엽을 모두 따주어 본 실험에 최적의 조건을 만들었다.

2차년도 실험 (2006년)에서는 *Asarum sieboldii*에서 추출한 향균활성 물질인 Methyl eugenol의 농도는 1,000배 (100ppm), 667배 (150ppm), 500배 (200ppm)로 보다 세분화하여 실험을 하였고, 또한 다른 essential oil과 혼합하여 7일 간격 4회 분무하여 약효를 조사하였다. 대조약제는 스미랙스, 깨뜨탄, 칸투스를 1,000배로 희석하여 사용하였다. 딸기는 1처리구에 50포기씩 3반복으로 난괴법으로 배치하였다. 실험 전에 이병 잔재물을 제거하고 하엽을 모두 따주어 본 실험에 최적의 조건을 만들었다.

20. 포장 활성 검정을 통한 최적 제형 선발 및 효과적인 사용방법 결정

최적제형을 선발하기 위한 조건을 설정하여 제형에 적합한 재료들을 선정하고 조사하였다. 주관기관인 충남대학교에서 추출한 천연물질 후보군들 중에 최종 선발된 것은 세신추출물로서 특히 추출물 중에 Methyl eugenol 분획이 가장 효과적으로 나타났다. 따라서 정유물질을 원제로서 두고 제품화 가능한 형태의 제형들을 조사하였다. 또한 사용방법도 간편하고 효과적인 방법들도 조사하였다.

세신 추출물 중에 Methyl eugenol을 원제로서 두고 제품화 가능한 형태의 제형들을 조사하였다. 사용방법이 간편하고 물질의 효과를 최대한 발휘할 수 있는 제형화 방법들을 조사하였고, 이 제형에 적합한 재료들을 모색해 보았다.

21. 딸기의 저장 기간 연장효과 분석

딸기 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 균사생장저해에 가장 효과적이었던 천연자원식물인 세신에서 추출한 Methyl eugenol을 제형화한 친환경제제를 처리하였을 때, 딸기의 저장성 연장효과 검정을 위해 저장기간을 조사하였다. 수확 전날 Methyl eugenol 제제 100ppm, 150ppm, 200ppm으로 희석하여 처리하고 하루 후에 딸기를 수확하였다. 딸기의 보관 온도는 20℃, 기간은 7일, 10일, 13일로 하였다.

제 2절 연구결과 및 고찰

1. 환경 유해식물, 천연자원 및 농업 부산물의 항균 특성분석

환경 유해식물, 천연자원 및 농업 부산물에서 딸기잰빛곰팡이병균이 *Botrytis cinerea*에 대한 항진균 활성을 screening 하기 위하여 균사생육 저해율을 측정하였다. 유용천연자원의 screening의 기준은 추출물 5mg/ml의 농도가 함유된 PDA 배지상에서 control 대비 80%이상 균사생육을 저해하는 것으로 선발하였다.

딸기 잰빛곰팡이병균의 균사생육을 70% 이상 저해를 나타내는 것들로 환경 유해식물인 미국자리공을 비롯하여 10가지의 천연자원 식물들이 조사되어졌다 (Fig. 1, 2, Table 1). 특히 7가지의 천연자원 식물의 추출물들에서는 잰빛곰팡이의 균사가 전혀 성장하지 않았으며, 마늘과 녹차 찌꺼기 추출물 등의 농업 부산물에서는 효과가 미미하거나 오히려 균사생육을 촉진하는 결과가 나타났다. 따라서 균사생육 억제효과가 뚜렷한 천연자원 식물에 대해 잰빛곰팡이병 방제를 위한 보다 세부적인 실험을 수행하였다.

2. 잰빛곰팡이병 방제용 최적 재료 선발

가. 농도별 항진균활성력

조사된 바와 같이 5mg/ml에서 90% 이상의 생육억제를 나타내었던 천연자원 유래물질들은 처리 농도가 낮아질수록 병원균에 대한 억제 효과도 낮아짐을 알 수 있었다 (Table 2). 이들 중 세신과 소회향의 천연자원 추출물만이 1mg/ml이 함유된 PDA배지에서 *Botrytis cinerea*의 균사생장이 약 80% 이상 억제되었는데 이는 현재 농업에 있어서 유용한 물질로 활용되고 있는 0.15%의 보조물질 chitosan이 함유된 PDA 배지에서 나타난 결과와 유사하게 나타났다. 따라서 이들 천연자원으로부터 추출한 물질들은 잰빛곰팡이병 방제에 있어서 활용가능성이 큰 것으로 판단되었다.

Tironin 등 (1951), Coler-Smith 등 (1969), Am-onker 등 (1971), Fliermans (1973), Appleton 등 (1975)은 마늘의 추출물이 곰팡이의 성장을 억제한다고 했고 Gilliver (1947)는 *Ranunculaceae*과 *Paeonia* 속의 식물이 *Venturia inaequalis*의 포자발아를 억제한다고 했으며 Powell 등 (1986)은 *Phytophthora palmivora*에 대하여 32과 57종의 식물에 6종의 식물이 포자발아에 강한 억제작용이 있다고 했다. 박 등 (1986)은 쇠비름즙액이 *Alternaria alternata*에

대하여 항균작용이 있다고 했으며 홍 등 (1988)은 국내자생 또는 재배식물 중 항균성물질이 인정되고 있는 13종의 식물을 대상으로 *Valsa ceralosperma*에 대하여 항균력을 검정한 결과 황백나무 박피로부터 얻은 조추출물이 가장 항균력이 높다고 했고 백 (1988)은 등배나무, 호장근의 추출물이 *Phytophthora* spp의 유주자낭 발아 및 균사생장을 억제한다고 했다. 또한 Sehgal (1961)은 식물 추출물의 항균능력이 그 식물의 분류학적 위치와는 상관이 없다고 하였다.

Table 1. Screening of antifungal activity of each herb plant analysed in this study

Scientific name	Activity (5mg/ml)	Scientific name	Activity (5mg/ml)
<i>Phytolacca americana</i>	++++	<i>Rhapontia uniflora</i>	++
<i>Amaranthus lividus</i> L.	+	<i>Senecio radicans</i>	++++
<i>Diospyros kaki</i>	+	<i>Paeonia suffruticosa</i>	+++++
<i>Citrus unshium</i>	-	<i>Corydalis turtschaninovii</i>	+++++
<i>Castanea crenata</i> var. <i>dulcis</i>	-	<i>Clematis florida</i>	+++
<i>Thea sinensis</i>	-	<i>Paeonia japonica</i>	+
<i>Taraxacum mongolicum</i>	+	<i>Meretrix lusoria</i>	+++
<i>Artemisia princeps</i> var. <i>orientalis</i>	-	<i>Aconitum ciliare</i>	+
<i>Perilla frutescens</i>	-	<i>Eugenia aromaticum</i>	+++++
<i>Pulsatilla koreana</i>	+	<i>Anethum graveolens</i>	+++++
<i>Allium scorodorpasum</i> var. <i>vivipar</i>	-	<i>Cinnamomum loureirii</i>	++++
<i>Alisma canaliculatum</i>	++	<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	++++
<i>Asarum sieboldii</i>	+++++	<i>Poncirus trifoliata</i>	+++
<i>Arisaema amurense</i> var. <i>serratum</i>	+	<i>Allium thunbergii</i> G. DON	+++++
<i>Aconitum pseudo-laeve</i> var. <i>erectum</i>	+++++	<i>Cimicifuga japonica</i>	+++

* (- : promotion, + : under 30%, ++ : 30~50% , +++ : 50~70% , ++++ : 70~90% , +++++ : 100% interference)

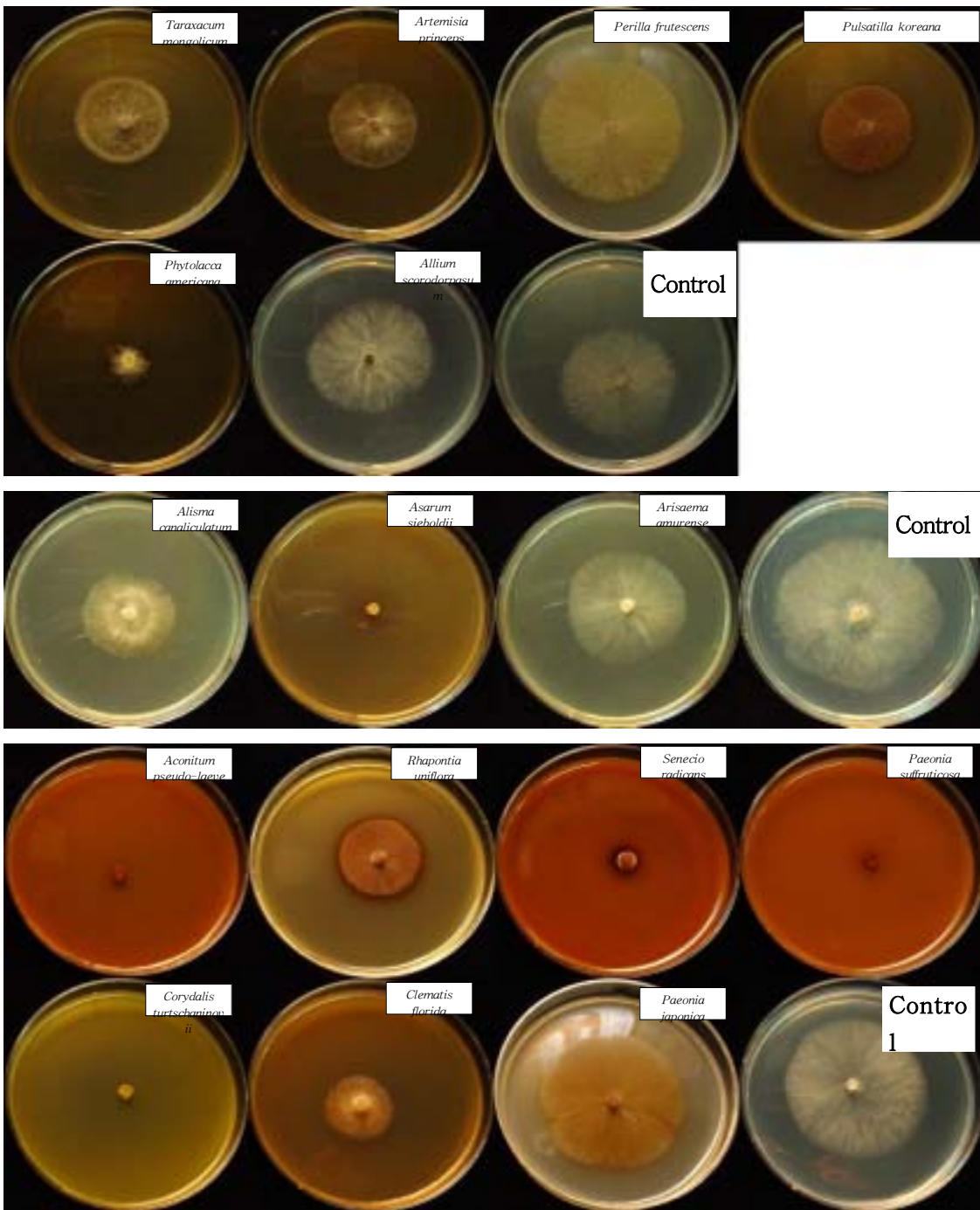


Fig. 1. Antifungal activity of the ethanol extracts of the wild plants against *B. cinerea*

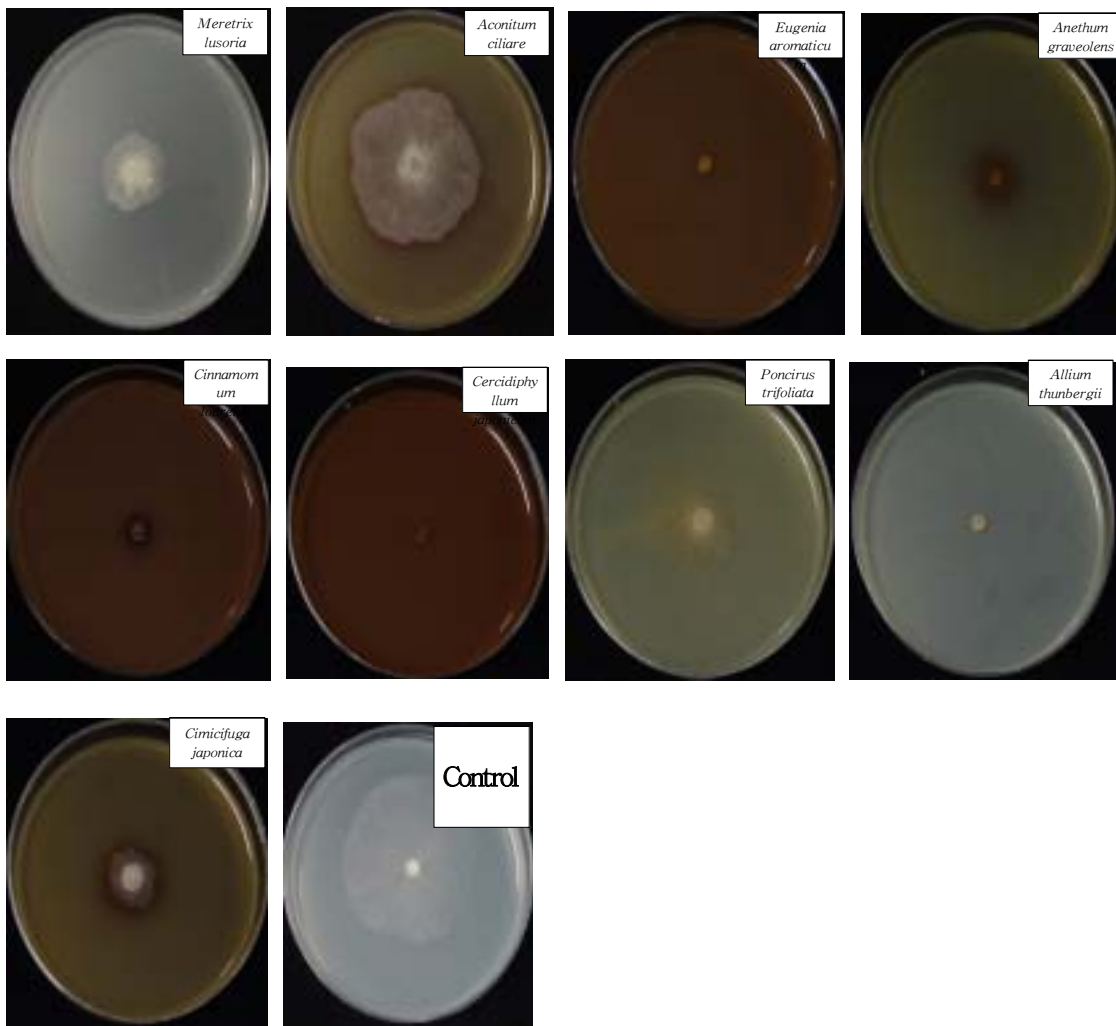


Fig. 2. Antifungal activity of the ethanol extracts of the wild plants against *B. cinerea*

Table 2. Antifungal activity of the ethanol extract from plants against *Botrytis cinerea*

Extract \ Conc.	5mg/ml	1mg/ml	0.5mg/ml	0.1mg/ml
<i>Phytolacca americana</i>	82.2 %	53.4 %	38.1 %	20.3 %
<i>Asarum sieboldii</i>	100 %	88.4 %	65.1 %	4.7 %
<i>Aconitum pseudo-laeve</i> var. <i>erectum</i>	100 %	76.3 %	33.6 %	16.8 %
<i>Senecio radicans</i>	100 %	53.1 %	-3.6 %	1.0 %
<i>Paeonia suffruticosa</i>	100 %	63.1 %	22.1 %	13.2 %
<i>Corydalis turtschaninovii</i>	100 %	60.0 %	17.8 %	18.9 %
<i>Eugenia aromaticum</i>	89.9 %	45.4 %	21.8 %	14.1 %
<i>Anethum graveolens</i>	100 %	87.7 %	62.9 %	7.1 %

Extract \ Conc.	0.3 %	0.15 %	0.1 %	0.05 %
sub Chitosan	100 %	86.6 %	76.8 %	66.7 %

나. 선발된 천연추출물들의 항진균 스펙트럼

1mg/ml의 농도에서 *Botrytis cinerea*의 균사생장이 약 80% 이상 저해를 보이는 세신과 소회향 그리고 보조물질 chitosan의 다양한 항진균 spectrum을 검정하기 위하여 시설하우스에서 발생하는 주요 병원균인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, *Fulvia fulvum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*을 접종하고 각 균의 생육에 적당한 온도에서 3일간 배양 후 항진균 활성을 조사하였다.

보조물질 chitosan을 유사한 농도와 처리시 모든 공시 병원균들에 대해 고른 균사생육 억제력을 나타냈으나 세신과 소회향 추출물들은 *Botrytis cinerea*에만 특이적인 항균활성이 나타났으며 보조물질 chitosan 처리구보다 더 높은 균사생육 억제율을 나타냈다. 한편 세신 추출물의 경우는 강하진 않지만 *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*에 대한 항진균 활성도 나타났다.

3. 선발물질의 개별적 항균활성 조사

*Botrytis cinerea*에 대한 항진균 활성이 뛰어난 추출물 세신과 소회향에 대한 보다 세부적인 농도별 항진균 활성과 농도별 포자 발아 억제율을 검정하였다.

가. 선발된 천연자원 세신과 소회향의 추출물의 농도별 생육억제율 조사

추출물 세신의 농도별 *Botrytis cinerea*의 균사생육 억제는 0.9mg/ml 이상의 농도에서 85% 이상의 균사 생육억제효과가 있었으며, 0.5mg/ml의 농도에서 50% 이상의 균사 생육억제효과를 알 수가 있었다. 보다 자세한 농도별 생육 억제율을 비교 분석한 결과 1.5 ~ 0.9mg/ml 사이의 농도에서 항균 활성능의 감소는 비교적 적은 편이지만, 그보다 더 낮은 농도에서는 항균 활성능의 감소폭이 크기 때문에 최소한의 유효활성 농도는 0.9mg/ml이 되는 것을 알 수 있다 (Fig. 3). 한편 추출물 소회향의 농도별 *Botrytis cinerea*의 균사생육 억제는 1.0mg/ml 이상의 농도에서 85% 이상의 균사 생육억제효과가 있었으며, 0.5mg/ml의 농도에서 60% 이상의 균사 생육억제효과를 알 수가 있었다. 소회향은 세신과는 다르게 적은 농도에서도 항균활성농도의 감소폭이 그리 크지 않는다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4).

나. 선발된 천연자원 세신과 소회향 추출물의 농도별 포자 발아 억제율 조사

추출물 세신과 소회향의 1.5mg/ml의 농도에서 80% 이상의 포자 발아 억제가 일어나고,

0.6mg/ml의 농도에서 약 50% 정도의 포자 발아 억제가 일어남을 알 수 있었다 (Fig. 5, 6). 포자발아억제에 있어서 *Hedera helix* (금송악)의 추출물은 128배까지 희석하여도 효과가 있다고 했으며 홍 등 (1989)은 황백나무 박피의 추출물이 *Valsa cerasperma*에 대해 포자 발아 억제를 한다고 했다, 한편, 식물 중에서 박 등 (1986)은 지방산계통, 홍 등 (1988)은 Alkaloid성 화합물, Sehgal (1961)은 Lactones, Quinones, Ketones, Phenoltd 화합물, Acids 등의 항균성물질을 탐색 보고한 바 있다.

Table 3. Antifungal activity of *Asarum sieboldii*-extract against plant pathogens

Pathogen	Inhibition rate of mycelial growth (%)		
	2mg/ml	1mg/ml	0.5mg/ml
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	46.4	26.1	20.8
<i>Fulvia fulvum</i>	39.9	22.9	12.4
<i>Phytophthora capsici</i>	61.5	44.3	25.3
<i>Rhizoctonia solani</i>	68.8	75.7	9.0
<i>Botrytis cinerea</i>	100	91.7	71.3
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	63.1	63.0	50.7

Table 4. Antifungal activity of *Anethum graveolens* extract against plant pathogens

Pathogen	Rate of growth inhibition (%)		
	2mg/ml	1mg/ml	0.5mg/ml
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	9.9	13.1	-9.9
<i>Fulvia fulvum</i>	5.3	0	-3.5
<i>Phytophthora capsici</i>	23.6	3.3	0
<i>Rhizoctonia solani</i>	62.8	40.2	3.5
<i>Botrytis cinerea</i>	91.4	85.8	62.4
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	41.7	27.3	13.0

Table 5. Antifungal activity of Sub-chitosan against plant pathogens

Pathogen	Rate of growth inhibition (%)	
	0.3 %	0.15 %
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	100	91.3
<i>Fulvia fulvum</i>	100	100
<i>Phytophthora capsici</i>	100	68.2
<i>Rhizoctonia solani</i>	100	60.1
<i>Botrytis cinerea</i>	100	71.4
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100	73.1

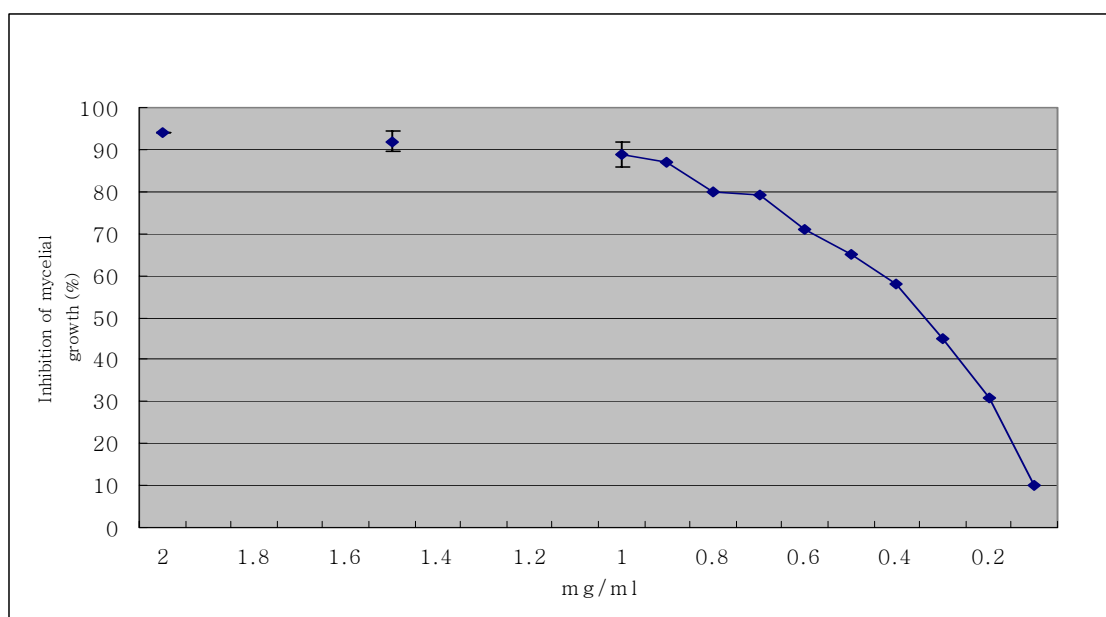


Fig. 3. Inhibition of mycelial growth of *Botrytis cinerea* by concentration of *Asarum sieboldii*-extract.

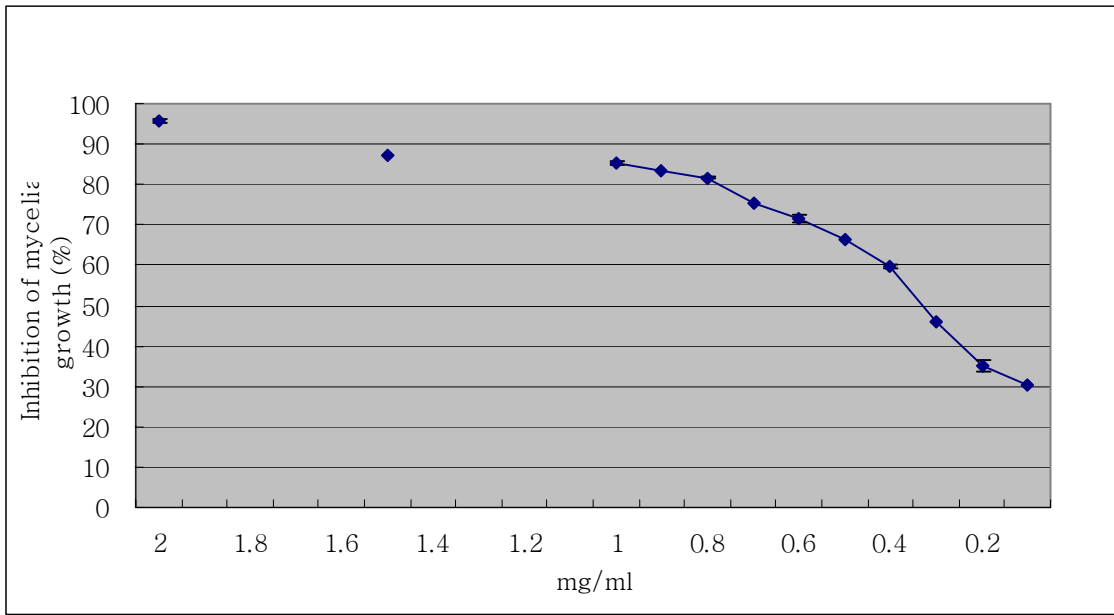


Fig. 4. Inhibition of mycelial growth of *Botrytis cinerea* by concentration of *Anethum graveolens*-extract.

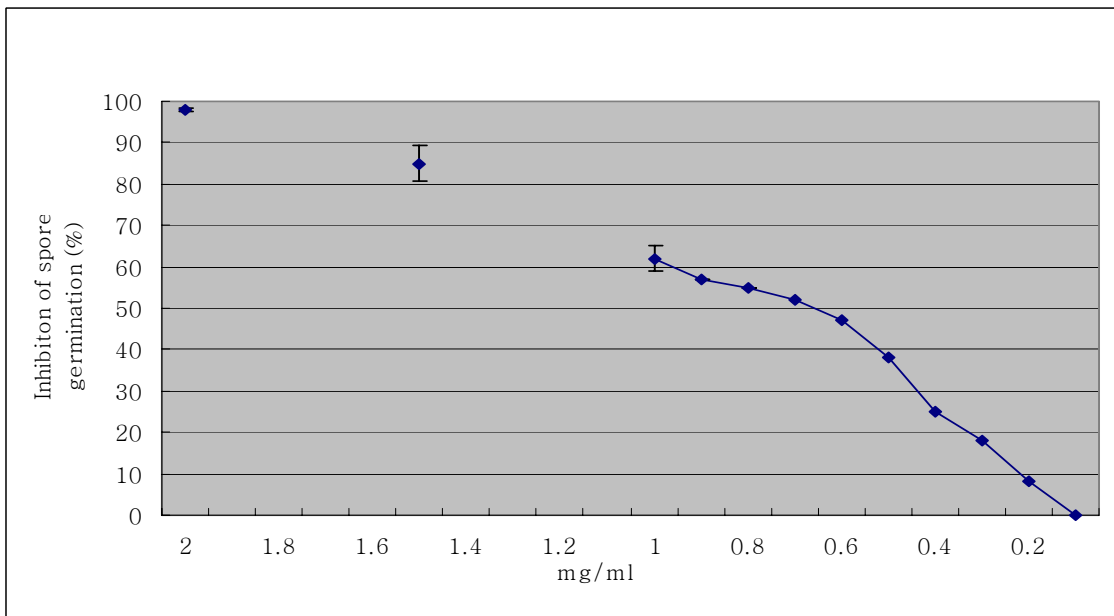


Fig. 5. Inhibition of spore germination of *Botrytis cinerea* by concentration of *Asarum sieboldii*-extract.

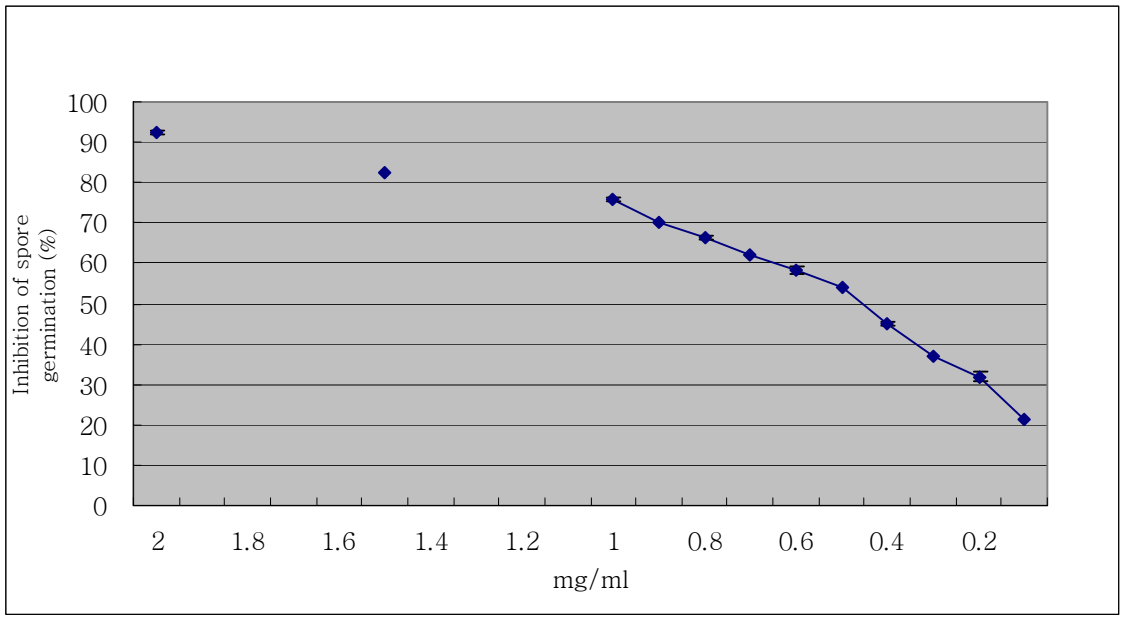


Fig. 6. Inhibition of spore germination of *Botrytis cinerea* by concentration of *Anethum graveolens*-extract.

4. 선발 물질 조합별 억제 효과 조사

가. 천연 물질과 chitosan 조합

각 균별로 *Botrytis cinerea*에 대하여 높은 항진균 활성을 나타내는 물질들과 시설 하우스 내에서 발생하는 주요한 병원균에서 폭넓은 항진균 활성을 나타내는 보조물질 chitosan을 조합하여 병원균의 균사생육 억제효과를 검정하였다.

보조물질 chitosan 처리농도를 고정시킨 후 환경유해식물, 그리고 추출한 천연물질 세신과 소회향을 대상으로 0.1, 0.5, 1, 2mg/ml의 농도별로 잣빛곰팡이 병원균에 대한 균사생육억제 정도를 조사한 결과 억제율이 뚜렷이 증가하지는 않았지만, 보조물질 chitosan만 단독 처리한 것보다 식물 추출물의 농도를 높이며 처리한 각 처리구에서 잣빛곰팡이 병원균에 대한 균사생육 억제율이 높게 나타났다(Table 6, 8). 또한 추출한 천연물질의 처리농도를 고정시키고 보조물질 chitosan 처리농도를 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 %로 각각 나누어 농도별로 처리한 결과에서도 보조물질 chitosan의 처리농도를 높일수록 균사생육 억제율은 높아졌지만, 혼합처리에 의한 잣빛곰팡이 병원균의 균사생육 억제 상승효과는 나타나지 않았다 (Table 7, 9).

Table 6. Inhibition of mycelial growth of *Botrytis cinerea* by Sub chitosan and extracts of *Phytolacca americana*

Treatment of extracts of <i>Phytolacca americana</i>	Inhibition rate
Sub chitosan (0.1%) + 0.1mg/ml	68.7
" + 0.5mg/ml	77.4
" + 1mg/ml	81.3
" + 2mg/ml	82.4
Sub chitosan 0.1%	67.8

Table 7. Inhibition of mycelial growth of *Botrytis cinerea* by extracts of *Phytolacca americana* and Sub chitosan

Treatment of Sub chitosan	Inhibition rate
Plant extract (1mg/ml) + 0.005%	67.8
" + 0.01%	60.0
" + 0.05%	70.6
" + 0.1%	81.3
Plant extract (1mg/ml)	67.8

Table 8. Inhibition of mycelial growth of *Botrytis cinerea* by extracts of *Asarum* and Sub chitosan

Treatment of <i>Asarum sieboldii</i> -extracts	Inhibition rate (%)
Sub chitosan (0.1%) + 0.1mg/ml	73.1
" + 0.5mg/ml	86.3
" + 1mg/ml	94.7
" + 2mg/ml	100
Sub chitosan (0.1%)	66.7

Table 9. Inhibition of mycelial growth of *Botrytis cinerea* by Sub chitosan and extracts of *Asarum sieboldii*

Treatment of Sub chitosan	Inhibition rate (%)
<i>A. sieboldii</i> -extract (1mg/ml)+ 0.005%	85.2
" + 0.01%	88.4
" + 0.05%	92.4
" + 0.1%	100
<i>Asarum sieboldii</i> -extract (1mg/ml)	86.7

나. 천연 물질의 기초 실험을 통한 활성 검증

1) *in vitro* 검증

젯빛곰팡이 병원균의 군사생육억제에 효과가 있는 천연물질의 포트 및 포장 실험에 적용하기 앞서 소규모 *in vivo* 실험을 통하여 상기 물질들의 포장 적용 유무를 검증하였다. 딸기에 병원균을 접종하기 전에 천연물 추출물을 처리한 결과에 있어서는 세신추출물의 방제효과가 78.9%로 가장 높았으며 소회향추출물은 32.2%로 매우 낮았다. 하지만 병원균을 접종한 후 천연물 추출물을 처리한 결과에 있어서 세신추출물은 병원균의 접종 전에 처리한 결과와 유사하게 나타났으나, 소회향추출물과 Sub-chitosan의 결과에 있어서는 병원균 접종 전에 천연물 추출물을 처리한 결과에 비하여 매우 높아졌음을 알 수 있었다. (Table 10, Fig. 7).

Table 10. Effect of disease control for each natural extract on strawberry.

Treatment	Before inoculation(%)	After inoculation(%)
<i>Asarum sieboldii</i> -extract	78.9	76.7
<i>Anethum graveolens</i> -extract	32.2	87.8
Sub-chitosan	55.6	88.9
<i>Asarum sieboldii</i> -, <i>Anethum graveolens</i> -extract and Sub-chitosan	55.6	44.4



Fig. 7. Antifungal effects of natural extract in bioassay. left : treatment, right : control.

2) *in vivo*

제형화하지 않은 세신, 소회향, Sub chitosan을 7일 간격 3회 처리한 결과 세신 추출물의 방제가는 55.1 %로써 상용중인 약제인 깨끄탄의 방제가인 61.1 % 보다는 낮았지만 천연물 처리구 중에서는 가장 좋았다. 소회향 추출물의 방제가가 29.3 %로써 가장 낮은 방제효과를 보였으며, 보조물질인 chitosan 0.2 %도 방제가가 39.0 %로써 비교적 방제효과가 낮았다. 무처리구의 발병률은 39.4%로 천연물의 항균활성을 검정하는데 적합한 수준이었다 (Table 11).

제형화한 세신과 소회향, 세신 + 소회향을 7일 간격 3회 처리한 결과 H 제형의 경우 방제가가 58.6 %로써 상용중인 약제인 깨끄탄의 방제가인 56.6%와 근접한 방제효과가 나타남을 알 수 있었다. 한편 소회향 제형은 제형화하지 않고 처리하였을 때와 마찬가지로 방제효과가 낮았으며, 세신 + 소회향 제형의 방제가도 5.1%로써 상당히 방제효과가 낮았다. 무처리구의 발병률은 40.8%로 제형화한 천연물의 항균활성을 검정하는데 적합하였다 (Table 12, Fig. 8).

in vitro 상에서 항진균 효과가 우수하였던 세신 추출물은 포장에서도 상용중인 약제인 깨끄탄과 비슷한 병 방제효과를 확인 할 수 있었다. 한편 *in vitro* 항진균 효과가 우수하였던 소회향 추출물은 제형화하지 않은 포장실험과 제형화한 포장실험 결과 상당히 방제효과가 낮은 것으로 확인되었으며 이에 따라 혼합제형 역시 저조한 방제효과가 나타남을 확인하였다. 이에 따라 소회향은 추출물의 특성에 따른 다른 제형화 방안의 모색이 필요할 것으로 보인다.

Table 11. Control effect of *Asarum sieboldii*-, *Anethum graveolens*- extract and Sub chitosan to *Botrytis cinerea*

Treatment	diseased rate			Average (%)	Control value (%)
	1	2	3		
<i>Asarum sieboldii</i> (1mg/ml)	10.2	33.3	9.5	17.7	55.1
<i>Anethum graveolens</i> (1mg/ml)	20.0	42.9	20.6	27.8	29.3
Sub chitosan (0.2%)	21.0	26.1	25.0	24.0	39.0
깨끄탄(1,000배)	15.6	18.2	12.1	15.3	61.1
Control	42.3	40.1	35.7	39.4	

Table 12. Control effect of '*Asarum sieboldii*' formulation and '*Anethum graveolens*' formulation to *Botrytis cinerea*

Treatment	Diseased rate			Average (%)	Control value (%)
	1	2	3		
<i>Asarum sieboldii</i> formulation	30.8	7.7	12.1	16.9	58.6
<i>Anethum graveolens</i> formulation	40.6	36.0	20.6	32.4	20.5
<i>Asarum sieboldii</i> + <i>Anethum graveolens</i> formulation	47.1	53.6	15.4	38.7	5.1
깨끄탄(1,000배)	16.2	20.8	16.1	17.7	56.6
Control	40.0	40.0	42.3	40.8	



Fig. 8. Field test for bioassay of natural extract. left ; treatment, right ; control

5. 천연물질의 안전성 실험

가. 작물 종자발아 실험

딸기 잿빛곰팡이 병원균 (*Botrytis cinerea*)에 대해 생육억제효과가 있었던 공시된 천연 물질들에 대해 배추 종자를 과중한 후 약해존재 여부를 조사하였다 (Table 13, 14). 배추 종자는 공시된 천연물질에서 Incubator 내에서는 과중 후 3일째 모두 발아되어 농도별 발아율에는 차이가 없었으며 6일 후 생육에도 큰 차이를 보이지 않았다. 온실 내 과중실험에서도 모두 발아하여 처리된 천연물의 배추 종자 발아에 억제작용은 없었으며, 농도별 발아율에도 차이가 없었다 (Fig. 9, 10). 따라서 선발된 천연물질들은 식물체에 처리시 발아에 전혀 영향을 주지 않으며 안전할 것으로 판단되어 추후 동물 독성 시험에 안전성이 확보될 경우 상용화시 전혀 문제가 없을 것으로 판단된다.

Table 13. Germination rate of Chinese cabbage seed treated by Sub chitosan, *Anethum graveolens* and *Asarum sieboldii* extract

Extract	Concentration	Number of germinated seeds (EA)	Germination rate (%)
<i>Asarum sieboldii</i>	1,000 ppm	71	98.6
	2,000 ppm	72	100
<i>Anethum graveolens</i>	1,000 ppm	70	97.2
	2,000 ppm	71	98.6
Sub chitosan	2,000 ppm	72	100
	1,000 pm	69	95.8
Control		70	97.2

Table 14. Germination rate of Chinese cabbage seed treated by Sub chitosan, *Anethum graveolens* and *Asarum sieboldii* extract

Extract	Concentration	Number of germinated seeds (EA)	Germination rate (%)
<i>Asarum sieboldii</i>	1,000 ppm	10	100
	2,000 ppm	10	100
<i>Anethum graveolens</i>	1,000 ppm	10	100
	2,000 ppm	10	100
Sub chitosan	2,000 ppm	9.7	96.7
	1,000 pm	9.7	96.7
Control		9.7	96.7



Fig. 9. Effect of Sub chitosan, *Anethum graveolens* and *Asarum sieboldii*-extract treated on germination of Chinese cabbage seeds *in vivo*.

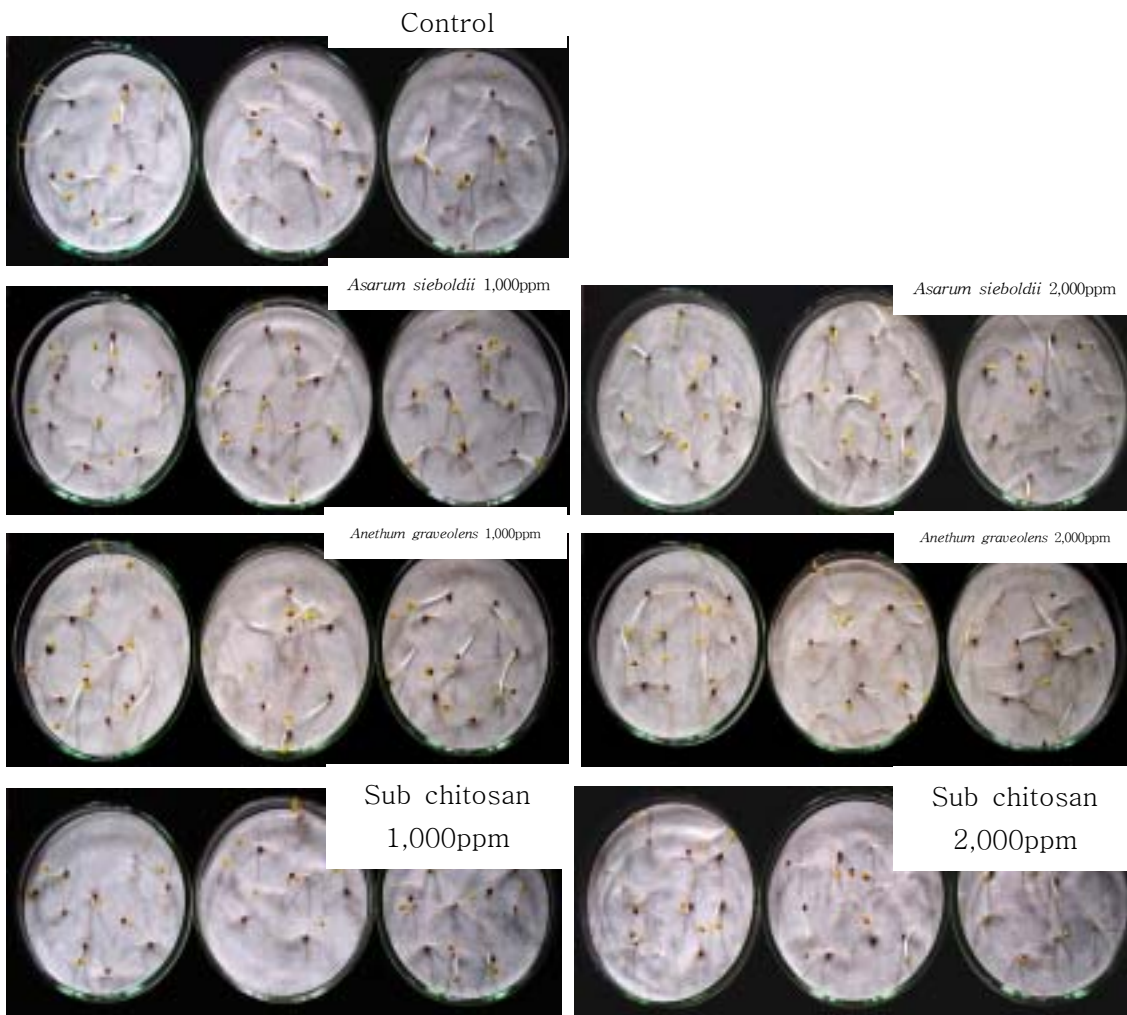


Fig. 10. Effect of Sub chitosan, *Anethum graveolens* and *Asarum sieboldii*-extract treated on germination of Chinese cabbage seeds *in vitro*.

나. 선발된 천연물 추출물질의 식물의 생육에 미치는 효과 검증

Petri Dish에 멸균된 90mm NO.2 Filter Paper를 놓고 각각 2mL의 액을 떨어뜨리고 배추종자를 10립씩 과중한 후 25℃에서 6일간 배양하여 발아율을 조사하였다. 무처리구는 증류수를 사용하였고 5반복으로 실험하였다. 추출물 세신을 처리했을 경우 1000ppm에서는 식물체의 생육에 영향을 미치지 못했지만 2000ppm을 처리시에는 20%의 생육촉진효과가 나타났다. 한편 추출물 소회향을 처리했을 경우는 1000ppm에서는 물론 2000ppm에서도 높은 생육촉진효과를 나타냈다. 따라서 추출물 소회향의 경우는 딸기 잭빛곰팡이 병원균에 대한 억제 효과 및 식물체의 생육 촉진 효과를 나타내는 것으로 미루어 추후 유용하게 활용 되어질 것으로 판단된다.

Table 15. Growth rates of concentration of extraction *Asarum sieboldii* plant, *Anethum graveolens* plant, Sub chitosan. After 6 days sowing Chinese cabbage seed *in vitro* (each 10 seed sowing, five replicated).

Extract	Concentration	Growth (cm)	Growth promoting rate (%)
<i>Asarum sieboldii</i>	1,000 ppm	4.9	-12.5
	2,000ppm	6.8	21.4
<i>Anethum graveolens</i>	1,000 ppm	7.9	41.1
	2,000ppm	9.8	75.0
Sub chitosan	2,000ppm	5.3	-5.3
	4,000ppm	5.2	-7.1
Control		5.6	-



Fig. 11. Photographs of comparison of plant growth treated with extracts of *Asarum sieboldii* plant, *Anethum graveolens* plant, Sub chitosan and distilled water. 1; distilled water, 2; *Asarum sieboldii* plant, 1,000ppm, 3; *Asarum sieboldii* plant, 2,000ppm, 4; *Anethum graveolens* plant 1,000ppm, 5; *Anethum graveolens* plant 2,000ppm, 6; Sub chitosan 2,000ppm, 7; Sub chitosan 4,000ppm.

6. 선발된 활용가능 물질의 기본 특성 조사

가. 선발된 활용 가능 천연물의 용매별 분획 활성 및 딸기잰빛곰팡이병균 억제 활성 검증

딸기잰빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 균사생장저해에 효과적인 천연자원 식물추출물 세신과 소회향 중 항균활성 분획을 검정하고자 용매별 분획 항균활성검정 시험을 수행하였다.

Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, ethanol에 순차적으로 추출하였을 때 Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, ethanol, 수층 중에서 hexane 과 Chloroform분획에서만 활성이 나타났는데 hexane 분획에서 가장 큰 활성을 보였다(Fig. 12, 13, 14).

나. 선발된 활성물질의 항균 기작 조사

선발된 천연추출물에 의한 균사생장 억제 기작을 조사하기 위해 활성분획의 추출물을 무균상 안에서 paper disc에 50 μ l씩 넣고 충분히 용매를 증발시킨 후 PDA 배지상에 *Botrytis cinerea*와 대치배양하여 항균활성을 검정하였다 (Fig. 15, 16, 17). 25 $^{\circ}$ C에서 15일간 배양 후 병원균의 발아 및 균사생육억제 기작을 광학현미경하에서 400배로 검경을 통하여 조사하였다. 배지상에서는 억제 영역이 나타났으며 현미경으로 그 영역을 검경시 균사생장 저해 및 용해되는 것이 관찰되었다.

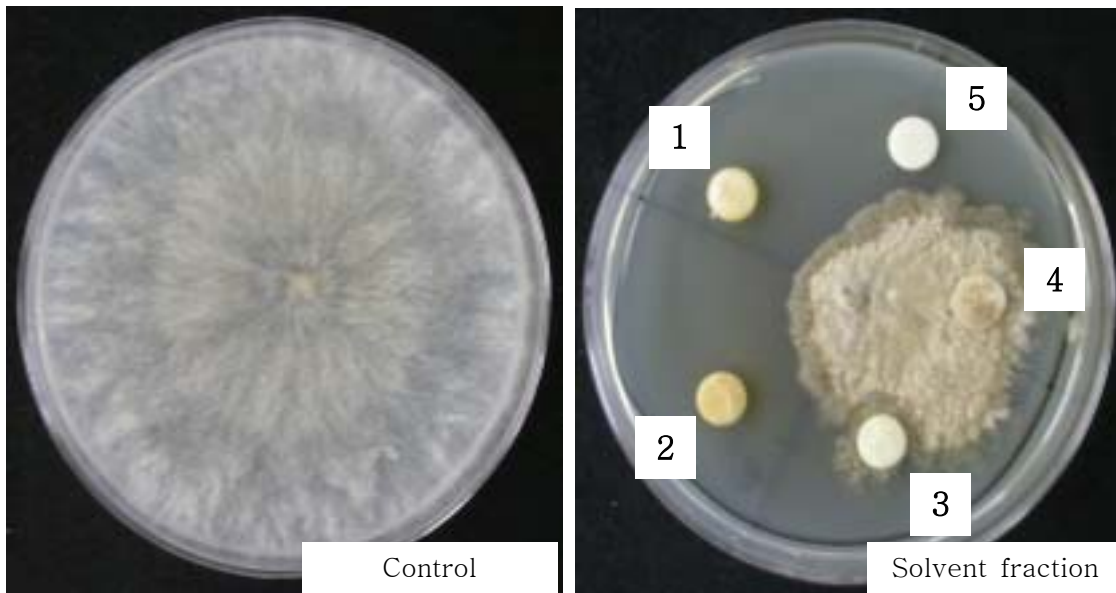


Fig. 12. Antifungal activities of *Botrytis cinerea* against with fraction of hexane and Chloroform with *Asarum sieboldii* plant extract.

Control; after 5 days of culturing *Botrytis cinerea* , solvent fraction; after 60 days of culturing *Botrytis cinerea*,

1; hexane fraction, 2; chloroform fraction, 3; ethylacetate fraction, 4; butanol fraction, 5; H₂O fraction.

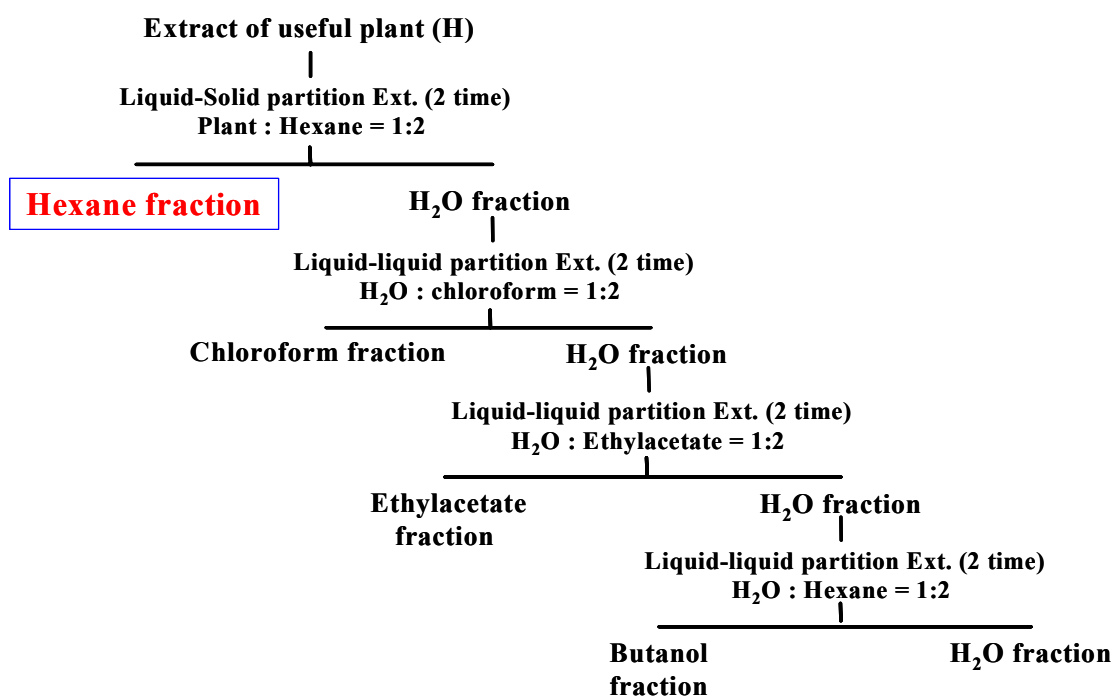


Fig. 13. Initial separation procedures of antifungal compounds from *Asarum sieboldii* plant extract.



Fig. 14. Inhibition zone of *Botrytis cinerea* of hexane fraction of *Asarum sieboldii* plant and *Anethum graveolens* plant.

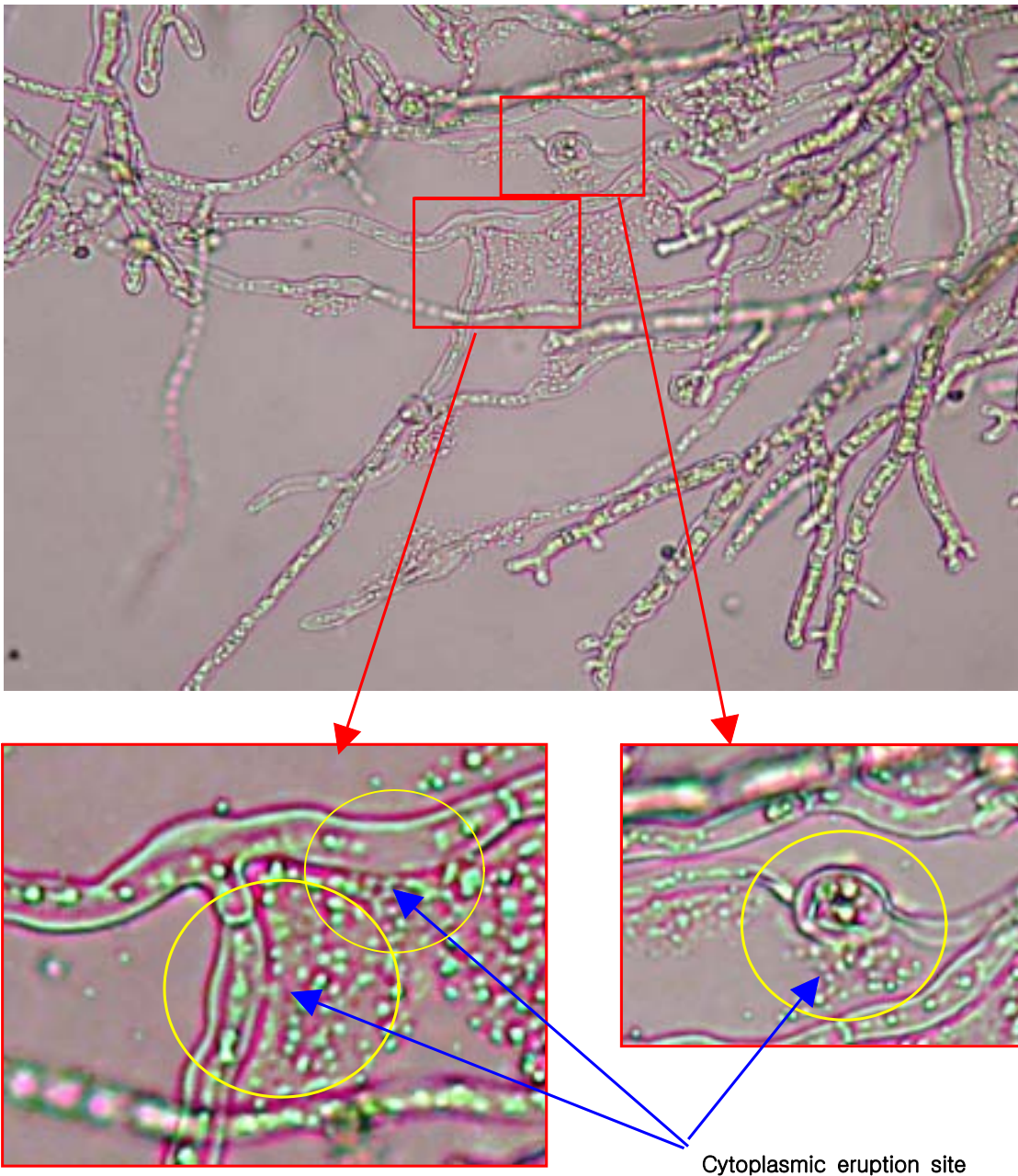


Fig. 15. Antifungal mechanisms of *Anethum graveolens* extract; Cell lysis of *Botrytis cinerea* (upper), Cytoplasmic eruption of damaged wall (under left), Cytoplasmic eruption of fungal swelling (under right).

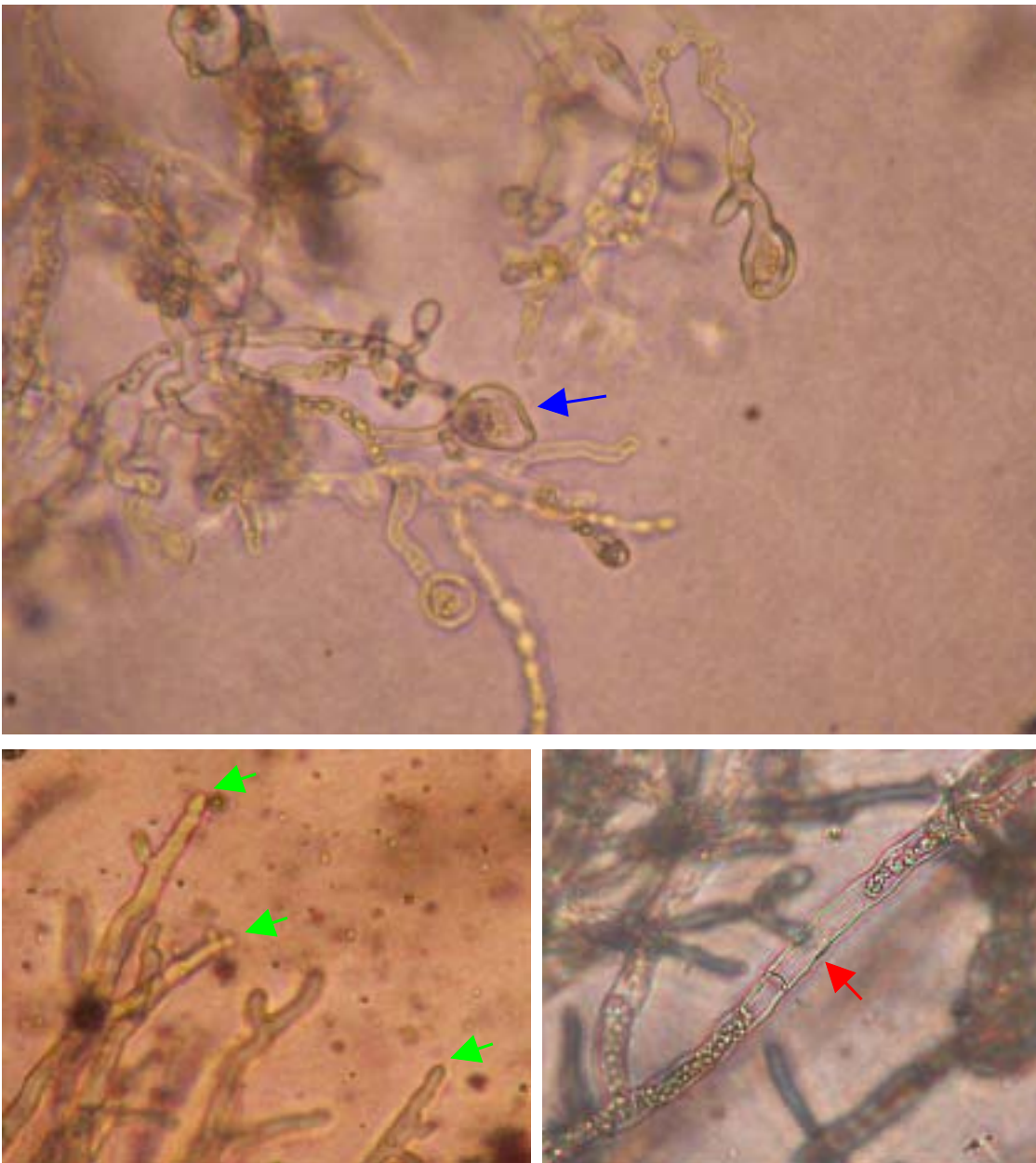


Fig. 16. Antifungal mechanisms of extract *Asarum sieboldii* plant; lysis of cell membrane and fungal damaged of swelling (upper, blue arrow), Inhibition of apical growth (under left, green arrow). Cytoplasmic digestion of lysis of cell membrane (under right, red arrow).



Fig. 17. Antifungal activities of (0.2%) Sub chitosan suppression on spore formation (left, red circle), cytoplasmic eruption of lysis of cell membrane (right, blue arrow).

7. 항균활성 물질의 분리

가. 물질의 분리

1차년도에 선발된 *B. cinerea*에 항균활성을 나타내는 *Asarum sieboldi*의 hexane fraction을 silica gel open column(70 ~ 230 mesh, column chromatography용, MERCK, Germany)을 통하여 hexane : ethyl ether 용매계통으로 분획하였는데 hexane : ethyl ether 18:2(v/v)에서 항균활성이 강한 분획을 590mg 얻었다. 항균활성의 검정은 수득된 분획을 멸균된 paper disc에 50 μ l 점적시킨 뒤 용매를 완전히 휘산 시킨 후 *B. cinerea*와 PDA 배지상에서 대치배양하는 agar diffusion method를 이용하였다. 수득된 분획을 hexane : ethyl ether 190:10 ~ 188:12 (v/v)의 용매로 silica gel column chromatography를 수행하여 항균활성을 나타내는 분획을 320mg 얻었다. 이들 분획을 더욱 정제하기 위하여 LH-20 column chromatography를 실시하였다. 100% MeOH의 용매를 매우 천천히 흘려 내리면서 소량씩 분획한 뒤 항균활성을 나타내는 분획을 다시 모아서 항균활성 물질을 분리했다. 분리된 항균활성 물질을 ODS TLC plate를 이용하여 2 μ l씩 점적한 후 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 100%의 함수 MeOH를 전개용매로 사용하여 chromatography 한 뒤 anisaldehyde 시약으로 발색시켰다. 85%의 함수 MeOH에서 물질의 분리가 가장 잘 이루어졌으며 나타난 spot을 prep하여 100% MeOH에 용출시켜 항균활성물질을 수거하여 agar diffusion method로 항균활성을 검정한 결과 Rf. 의 spot에서 항균활성을 나타냄을 알았다. ODS TLC에서 항균활성물질의 분리조건이 확립되어 (85% MeOH) ODS column chromatography도 85% MeOH의 용매계를 사용하여 항균활성 물질을 분리 정제하였다 (Fig. 18).

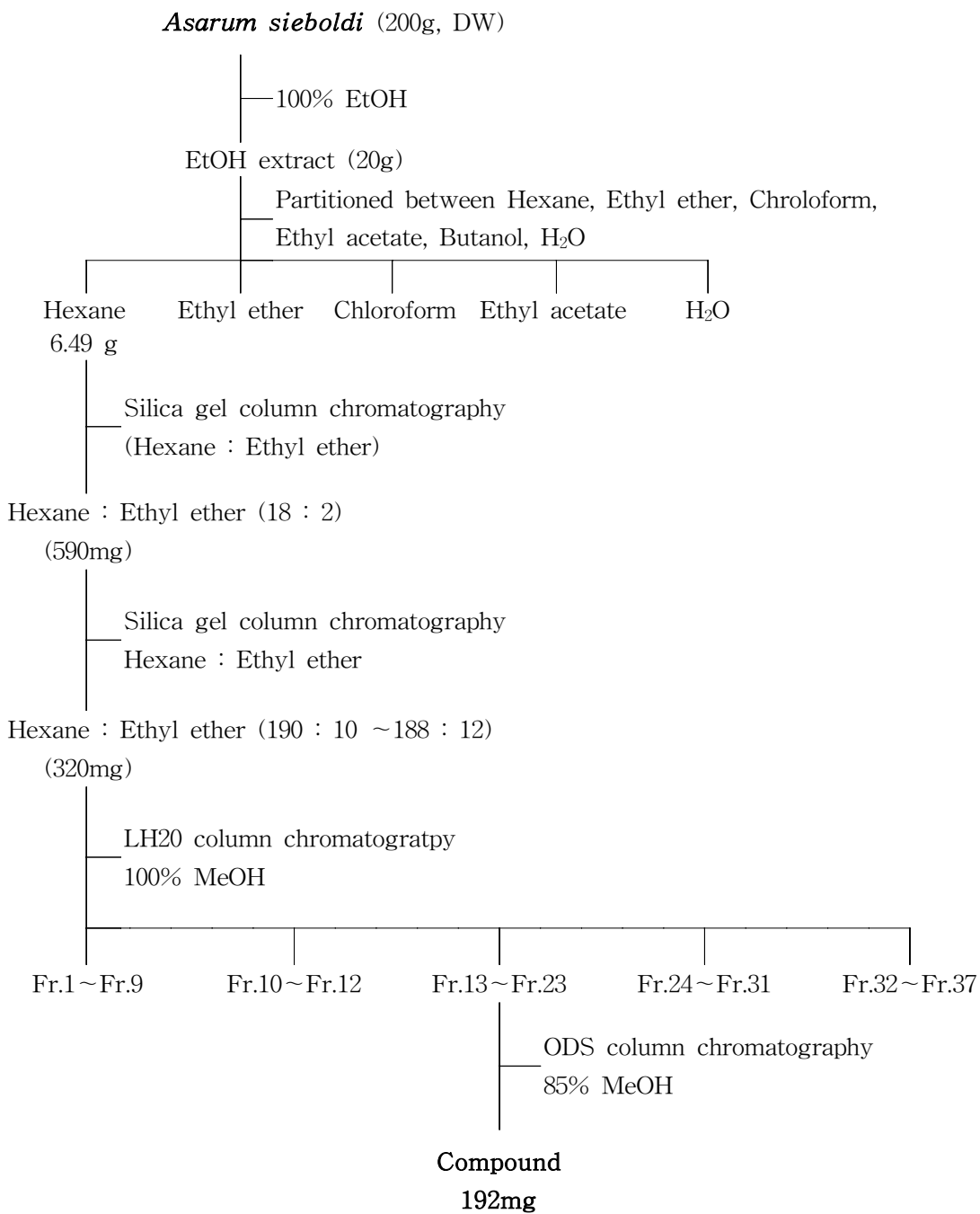


Fig. 18. Scheme for the isolation of antifungal compound from *Asarum sieboldi* extracts

나. 추출방법에 따른 효과 검증

1) 열수추출

천연자원식물 세신의 열수 추출 결과 기존의 70% EtOH 추출법에 보다 1.5mg/ml의 농도에서는 약 8.3 %, 1mg/ml의 농도에서는 약 5.9 %, 0.5mg/ml의 농도에서는 약 26.4 %의 항균 활성능의 향상이 발견되었다. 하지만 열수추출에서는 추출 후 감압농축의 과정이 없었고, 가열의 세기 및 시간에 따른 항균 활성능의 검증이 아직 이루어지지 않은 상태로서 보다 많은 실험을 요한다.

Table 16. Comparison of antifungal activities between materials extracted by hot water and 70% EtOH

	1.5mg/ml		1mg/ml		0.5mg/ml	
	A	B	A	B	A	B
Inhibite rate	91.7 %	100 %	89.4 %	95.3 %	56.2 %	82.6 %

A; 70% EtOH extract B; hot water extracts

2) pH 안정성 test

딸기 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)에 대한 항균 활성능을 나타내는 천연 자원식물 세신의 항균활성물질이 pH에 따른 안정성을 검증하고자 1g/100ml의 농도로 현탁된 세신 수용액에 pH를 측정하고, 산성 쪽으로 pH 0.38과 염기 쪽으로 pH 12.35까지 보정한 뒤 1시간 경과 후 다시 원래 pH인 4.75로 보정하고 1mg/ml의 농도로 PDA 배지를 만들어 항진균 활성을 검증하였다. 그 결과 pH 0.38 ~ 12.35 모든 범위에서 항진균 활성을 유지하는 것을 확인할 수 있었다.

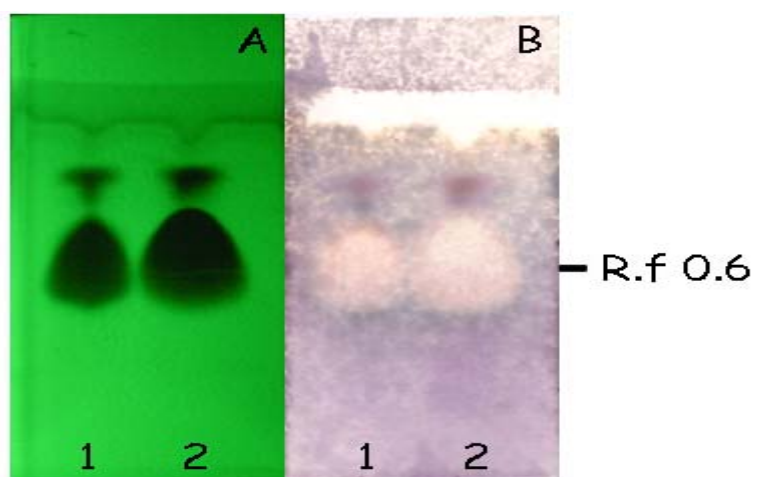
8. 항균활성 물질의 정제 및 동정

식물의 향기물질은 정유라 불려지는데 이러한 일종의 oil은 isoprene 구조의 물질이 풍부한 식물의 2차 대사산물이다. 이러한 oil은 terpenes이라 불리며 일반적인 구조는 C₁₀H₁₆이나 C₂₀

는 diterpenes, C₃₀는 tetraterpenes, C₄₀은 teraterpenes, C₅는 hemiterpenes, C₁₅는 sesquiterpenes 이라 불린다. 이러한 물질에 산소와 같은 원자가 추가되면 terpenoid라 불린다. Terpenoid는 acetate로부터 합성되어지는데 그들의 기원은 지방산과 공유된다. 일반적으로 hexane 층에서 얻어지는 물질은 지질이라 할 수 있다. 식물체가 갖고 있는 항균활성 물질 중 지질에 속하는 것으로 essential oil이 있다. 따라서 세신에 함유되어 있는 essential oil이 Methyl eugenol, xanthoxylol, safrole 등이 있는 것으로 김 등 (1999)이 보고하였다. 따라서 Methyl eugenol (ALDRICH, U.S.A), safrole (SIGMA, Switzerland)을 구입하여 agar diffusion method로 항균활성효과 유무를 검정하였다. 항균활성검정 결과 Methyl eugenol이 항균활성이 있으며 safrole은 항균활성 효과가 없음이 확인되었다 (Fig. 19). 따라서 항균활성 효과가 있는 Methyl eugenol을 *Asarum sieboldi*에서 추출한 항균활성물질과 같이 ODS TLC에 점적한 후 85% MeOH로 전개시킨 뒤 anis-aldehyde로 발색하여 동일한 Rf. 0.6의 spot을 확인하였다 (Fig. 20). ODS TLC R.f 0.6의 spot을 100% MeOH로 용출시킨 것(Fig. 21)과 ODS open column의 유효항균활성 분획 (Fig. 22.)과 Methyl eugenol (ALDRICH, U.S.A) (Fig. 23)을 LC-MS를 이용하여 MW를 측정된 결과 Methyl eugenol의 MW과 ODS TLC R.f 0.6의 spot과 ODS open column의 유효항균활성 분획의 MW이 178로 같음이 밝혀졌다. 따라서 *Asarum sieboldi*에서 추출한 항균활성물질은 Methyl eugenol임이 확인되었다 (Fig. 24).



Fig. 19. Comparison of antifungal activity between Methyl eugenol (left) and safrole (right)



Development : 85% MeOH

1 : ODS TLC prep

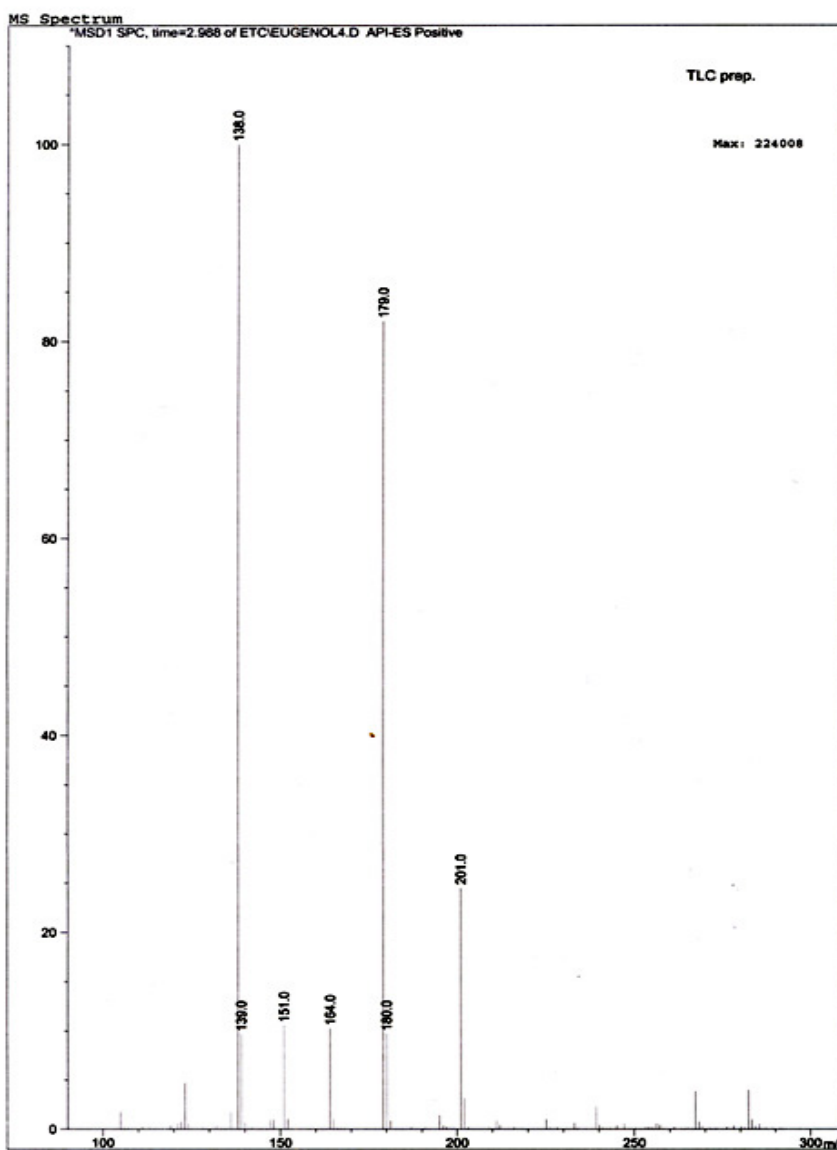
2 : methyl eugenol (purchased)

A : 245nm UV

B : anisaldehyde

Fig. 20. TLC development

Print of window 80: MS Spectrum

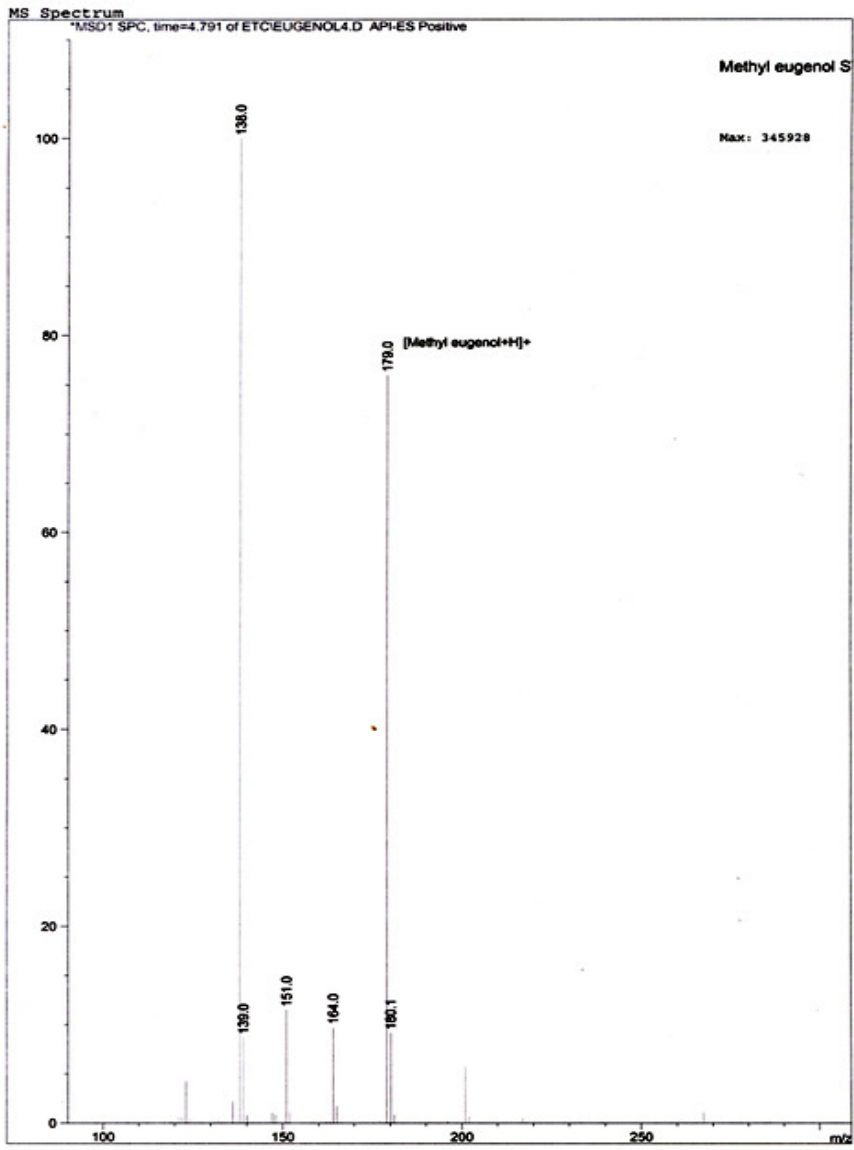


Instrument 1 12/16/04 11:06:46 AM jhlim99

Page 1 of 1

Fig. 21. LC-MS chromatogram of ODS TLC prep (Rf. 0.6)

Print of window 80: MS Spectrum

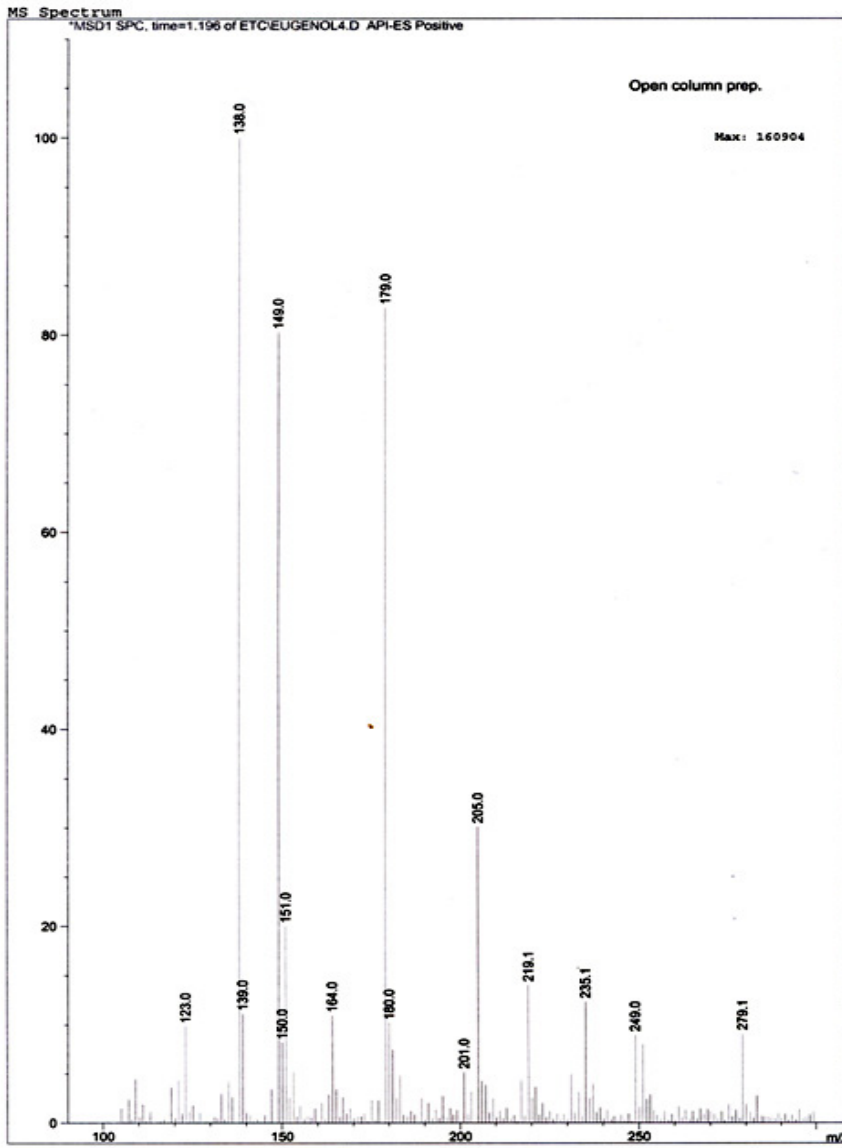


Instrument 1 12/16/04 11:02:51 AM jhlim99

Page 1 of 1

Fig. 22. LC-MS chromatogram of Methyl eugenol

Print of window 80: MS Spectrum



Instrument 1 12/16/04 11:05:14 AM jhlim99

Page 1 of 1

Fig. 23. LC-MS chromatogram of open column prep

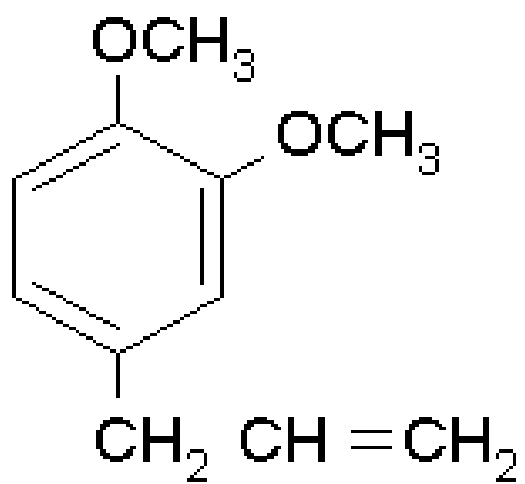


Fig. 24. Chemical structure of Methyl eugenol

9. 시제품 생산용 물질 대량 확보

가. 식물체의 다량획득방법

천연자원식물을 이용한 천연물 신약이나 천연물 농약을 개발하는데 있어서 대다수의 연구자들이 천연자원식물들로부터 신약후보물질이나 천연물농약 후보물질로서 가치 있는 식물을 찾아 우수한 많은 연구결과를 내고 많은 우수한 논문과 업적들을 발표하고 있다. 그럼에도 불구하고 대다수의 연구자들에게 그 자원식물로부터 안정적 원료물질 확보방안에 대해 문의해보면 정확한 답을 하지 못하고 있다. 대부분 원료물질을 중국으로부터 싼값에 구입하거나 중국 현지재배 등을 말하고 있었고 국산은 값이 비싸 생산가격을 맞출 수 없다는 내용으로 일관하고 있는 실정이다. 이와 같은 문제점을 극복할 수 있는 물질 확보 방안을 찾기 위해 1차년도 연구를 통해 최종 선발된 세신의 안정적 확보를 위해 세신에 대한 다양한 각도로 조사한 결과 국내에서 세신의 재배방법과 재배특성 등을 확인할 수 있었고 그 결과는 다음과 같다.

1차년도 screening 과정에서 실험에 공시한 약제는 대전의 한약 약전상가에서 구입하여 실험을 공시하였지만 구입할 때마다 재료의 모습이나 형태가 다르고 특히 뿌리에서 나는 향기나 맛에 차이가 있었다. 현재 국내에 유통되고 있는 한약 재료는 대다수가 중국산이며 간혹 국산의 경우 매우 고가였다. 향균활성 실험에서 우수한 결과를 나타낸 세신은 국산세신이었고(Fig. 25) 안정적으로 활성이 있는 물질을 얻어 낼 수 있었으나 중국산 세신을 이용하였을 때는 그 결과가 일정하지 않았다. 시중에 유통되는 세신은 중국산 북경세신과 한국산 서울세신이라는 통용 명으로 유통되고 있었다. 따라서 국내 자생하는 세신의 특성과 재배농가 등을 조사한 결과 국내에서 세신의 대량 재배 가능성을 확인할 수 있었다. 세신의 인공 재배방법은 좀 더 구체적인 연구결과가 필요하지만 1년간 조사한 결과들을 토대로 분석한 결과 인삼재배방법과 매우 흡사하다고 판단된다. 3년 근부터 약제로서 사용가능하며 4~6년까지 재배해야만 약제로서 효과가 뛰어나다고 알려져 있다. 세신은 반음지성 식물로서 해가림 시설이 있어야 가능하다 (Fig. 26). 재배는 소규모 산간지방에서 이루어지고 있으며 병에 의한 피해도 거의 없고 앞으로 인삼재배와 비슷하게 농가의 고소득 작물로서 가치가 있을 것으로 예상되며 세신의 재배방법 개선을 통해 다수확을 할 수 있다고 생각된다. 결론적으로 국내 토양에서 인위적으로 대량 재배를 통해 국산 자생 세신을 안정적으로 확보할 수 있다고 판단된다.

세신의 학명은 *Asarum sieboldii*이며 족두리풀의 뿌리를 건조한 약제. 향명으로는 세심(洗心)이라

하였으며, 시(繒)·소신(少辛)·세초(細草)라고도 하였다. 세신이란, 뿌리가 가늘고 몹시 매운 맛을 띠고 있어서 붙여진 명칭이다. 죽두리풀은 쥐방울과에 속하는 여러해살이 초본식물인데, 5~7월에 뿌리를 채취하여 그늘에서 말린다. 효능은 감기로 코가 막히거나 콧물이 흐를 때 분비물을 배출시키고 발한작용을 한다. 또 열이 심하고 두통이 있을 때 쓰인다. 만성기관지염이나 기관지 확장증에 진해제로서 쓰이고 구내염에도 효과가 있고 특히 뿌리의 정유 함량은 2~3%이다. 정유의 주성분은 Methyl eugenol과 safrole로 알려져 있다. 쥐방울과에 속하는 여러해살이 초본식물이며 죽두리풀인 세신은 꽃에 열매가 8~10개 있으며 종자 발아는 시기가 무척 중요하다고 판단되었다. Fig. 27은 충남대학교 농과대학 비닐하우스에서 본 연구진들에 의해 종자발아에 성공한 세신 식물의 사진이다.



Fig. 25. Photograph of *Asarum sieboldii*.



Fig. 26. Photograph of 4 -year old *Asarum sieboldii* cultivated in the field



Fig. 27. Photograph of 1 -year old *Asarum sieboldii* germinated from *Asarum sieboldii* seed.

10. 기본제형 확립 및 가능제형 추가 검토

최적제형을 선별하기 위한 조건을 설정하여 이 제형에 적합한 재료들을 선정하고 조사하였다. 유제는 난용성 원제, 용제, 유화제의 3성분으로 된 액상 제제로서 물에 희석하면 유탁액이 되며, 인화성과 휘발성이 낮은 xylene, benzene, MFG, 알콜류 등이 일반적으로 단용 또는 혼용으로 사용된다. 보조제로는 유화제, 석출방지제, 분산제, 고착제 등을 사용하고, 유화제는 일반적으로 유화력이 강한 비이온성 계면활성제를 5-15%정도 사용하고 있었다. 오일제는 농약을 오일에 녹여 만들고 살포할 때는 유기용매에 희석하여 살포할 수 있도록 한 제형이다. 물로 희석할 수 없는 경우와 같이 특수목적으로 사용되며 원액을 직접 살포할 수도 있다. 종자처리 액상수화제는 액상수화제 형태로 종자처리 수화제와 특성이 비슷하나 액상인 점이 다르다. 마른 종자에도 그대로 사용할 수 있으며 물에 희석하여 사용할 수도 있다. 종자처리 수화제는 종자 부착성을 높인 수화제로 벼 직파용 종자, 벼 육묘상 파종 때 종자에 피복하여 사용할 수 있다. 병해충의 예방위주로 사용하기 때문에 적은 양으로 효과를 나타내며 살포시간을 기존 약제보다 월등히 절약할 수 있다. 약제 손실이 아주 적어 환경오염을 피할 수 있고 중독의 우려가 거의 없다. 마른 종자에 사용할 때는 적은 양의 물에 풀어 사용한다.

본 제형의 특성상 지상부 식물병 방제를 실시하여야 함으로 유화제가 가장 우선시 되는 제형이며, 오일제와 액상수화제의 혼합제가 가능한 제형으로 판단되었다.

11. 천연물질의 약효 및 병 억제 기작 조사

가. Agar diffusion method

*B. cinerea*에 대한 Methyl eugenol, carvacrol, Thymol, Eugenol, safrole, cymene의 agar diffusion method에 의한 항균활성 검증에서 carvacrol과 Thymol은 750 μ g/disc의 농도에서 60%이상의 균사생육억제 효과가 나타났으며 Methyl eugenol과 Eugenol은 50% 이상의 균사생육억제 효과가 나타났으며 농도가 높아질수록 항균활성정도 따라서 높아짐을 알 수 있었다. Safrole은 농도가 높아질수록 항균활성이 높아지는 경향이 있지만 carvacrol과 Thymol에 비하여 상대적으로 낮았다. Cymene은 농도가 높아질수록 항균활성효과가 낮아졌다(Fig. 28). 따라서 동일농도일 때 항균활성효과가 뛰어난 carvacrol, Thymol, Eugenol, Methyl eugenol이 딸기 잿빛곰팡이병 방제제로써 이용 가능성을 확인하였다.

또한 각종 essential oil의 시간에 따른 농도별 균사 생육억제율을 조사한 결과 carvacrol, Thymol, Eugenol, Methyl eugenol은 균사 생육억제율이 조금씩 감소되는 반면 cymene과 safrole은 균사 생육억제율이 현저하게 감소되는 것으로 밝혀졌다(Fig. 30).

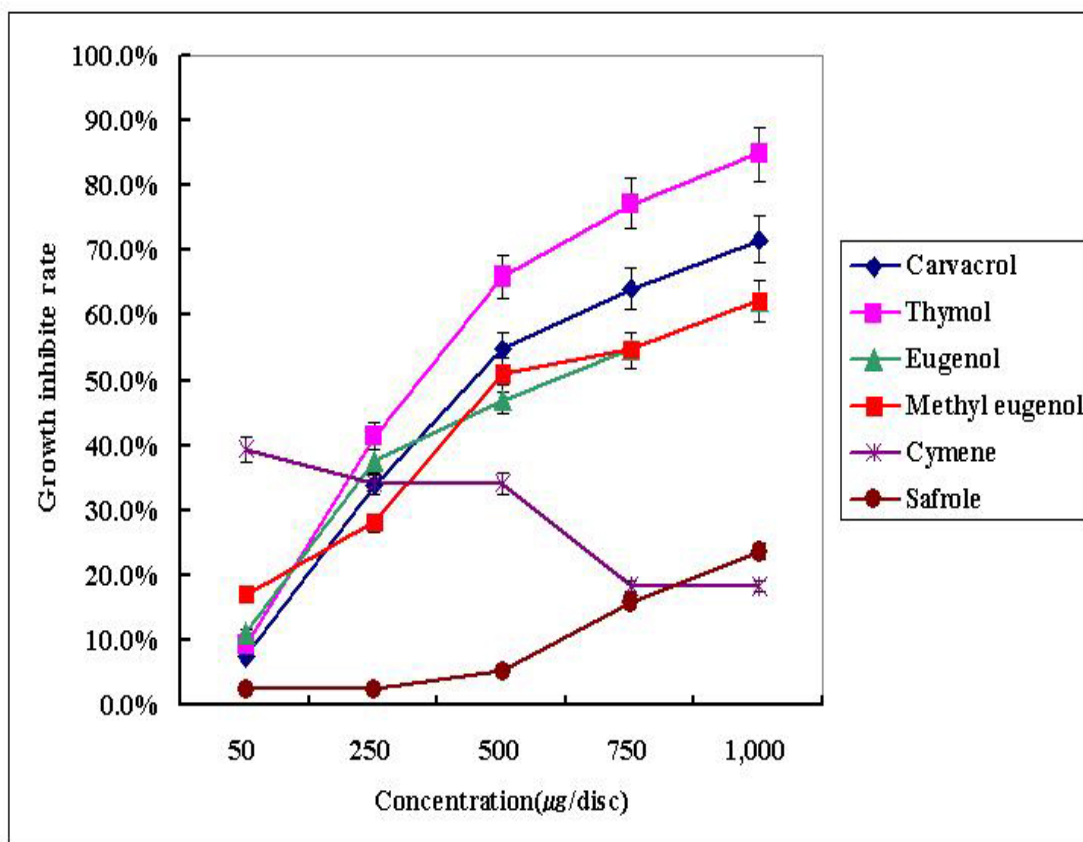
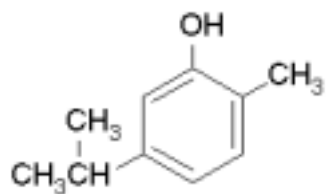
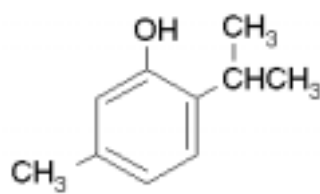


Fig. 28. Comparison of mycelial growth inhibition rate according to the concentration of various essential oils by agar diffusion method.

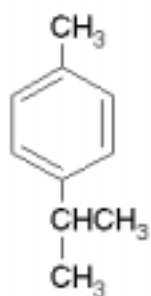
A



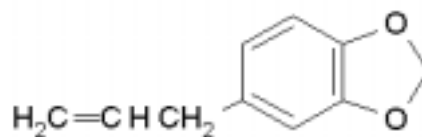
B



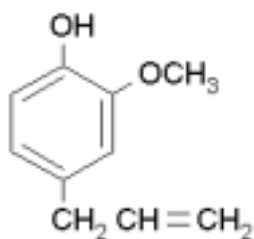
C



D



E



F

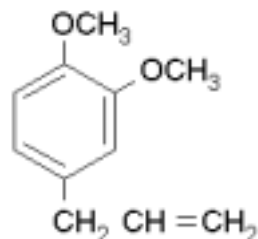


Fig. 29. Chemical structure of compounds that used in this study

A; Carvacrol, **B;** Thymol, **C;** Thymol, **D;** Safrole, **E;** Eugenol, **F;** Methyl eugenol

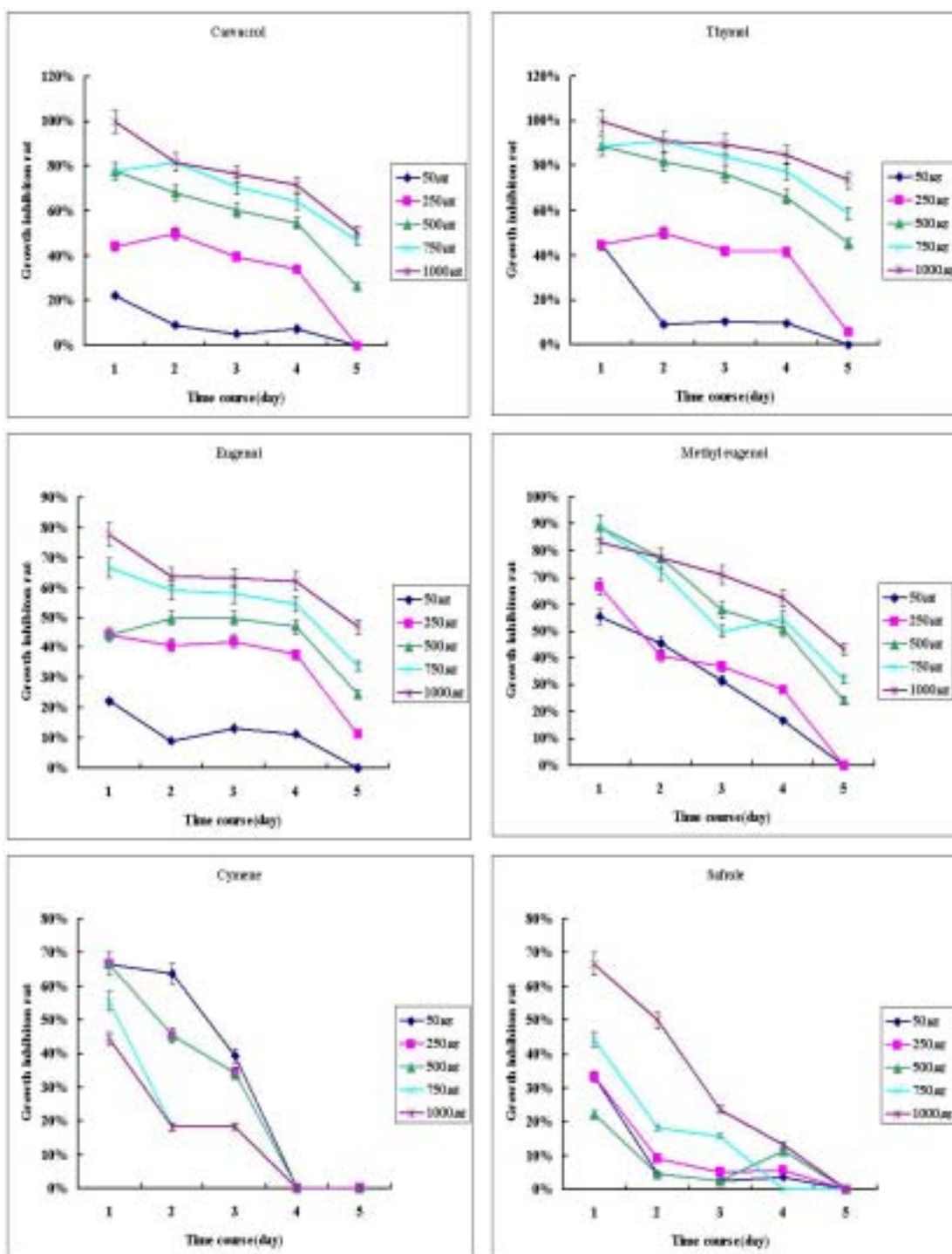


Fig. 30. The inhibition rate of mycelial growth with various essential oils by time course.

나. Essential oil의 작용기작

Essential oil의 항균활성 기작은 oil의 소수성인 성질에 의한 세포질 막에 영향을 주어 세포질 막을 확장시키고, 그에 따르는 막 포텐셜 저해하여 세포질을 유출시킨다. 그리고 pH 농도 구배 변화, ATP 합성저해로 인한 항균활성이 나타난다.

양성자 구동력 저해에 의한 ATP 합성저해 기작을 나타낸 것이다 (Fig. 31). oil이 세포질 안으로 들어가면 수산기의 H⁺이온이 떨어지고 K⁺이온 oil에 붙어 세포질 밖으로 나온다. 이처럼 세포질 안의 K⁺이온이 세포질 밖으로 나오면서 세포질 막의 막 포텐셜을 저해하게 된다.

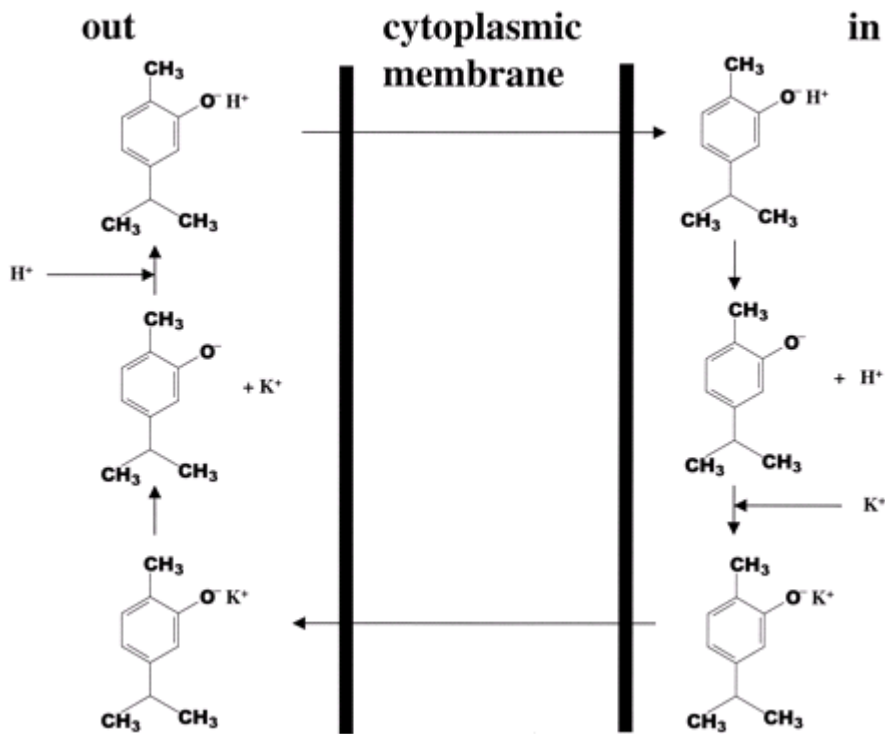


Fig. 31. Proton motive force.

나. Essential 함유 배지

Agar diffusion method에서 균사 생육 억제율이 높았던 각각의 carvacrol, Thymol, Eugenol, Methyl eugenol과 유화제로써 glycerol을 섞어서 만든 PDA 배지 상에서 *B. cinerea* 생육억제율을 조사한 결과 carvacrol, Thymol, Eugenol은 10ppm에서도 31% 이상의 균사생장억제를 일으켰으며 50ppm 이상의 농도에서 carvacrol과 Thymol은 81% 이상, Eugenol은 65% 이상의 생육억제가 나타남을 확인하였다. Methyl eugenol은 10ppm의 농도에서 16% 정도의 억제효과가 일어났으며 100ppm에서는 43% 정도의 생육억제 효과나 나타나 carvacrol, Thymol, Eugenol에 비하여 그 효과가 비교적 낮음을 알 수 있었다 (Fig. 32).

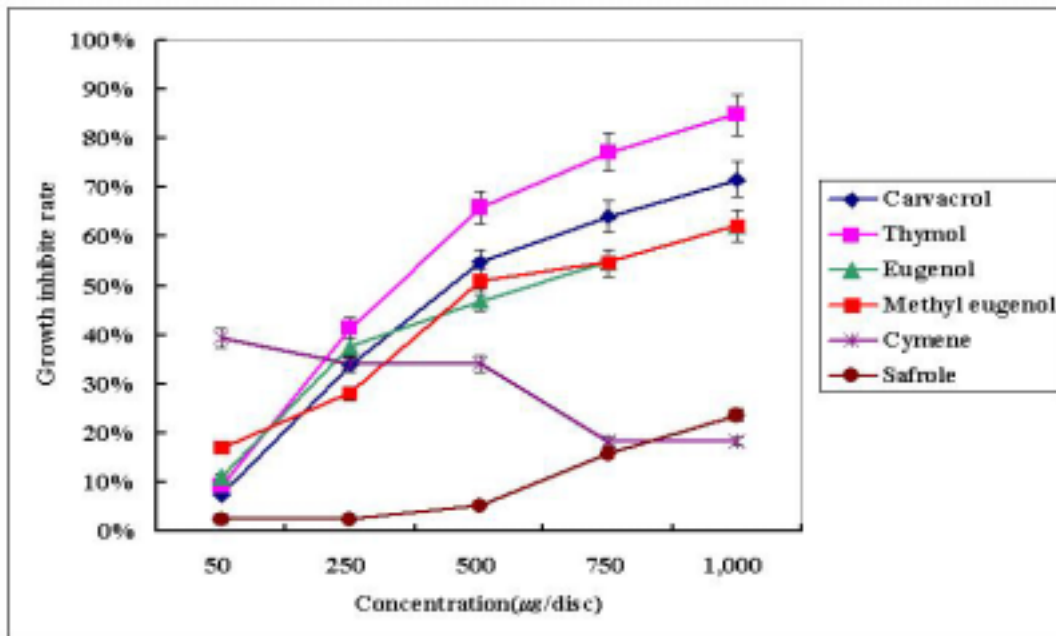


Fig. 32. Comparison with inhibition rate of mycelial growth in PDA media containing various essential oils.

12. 실내 · 외 실험에서 기본제제의 활성 검증

가. Essential oil 직접 분사

Essential oil을 증류수에 농도별로 섞고 분무하기 전에 심하게 흔들어서 분사한 결과 carvacrol 5,000ppm과 10,000ppm에서는 오히려 병이 더 심하게 발생하였으며 다른 essential oil의 처리구에서도 오히려 병이 더 조장되었음을 알 수 있었다. 하지만 Methyl eugenol 5,000ppm에서 92.3%의 방제가가 나왔으나 10,000ppm에서는 오히려 242.3% 병이 더 발생하였다(Table 17).

Table 17. Control effects of the high concentration of non-emulsified essential oils on strawberry cv. *Akihime*

Treatment	Concentration (ppm)	Diseased rate (%)	Control value (%)
Carvacrol	5,000	37.5 a^z	- 476.9
	10,000	14.3 a	- 119.2
Thymol	5,000	14.3 a	- 119.2
	10,000	4.5 a	30.8
Eugenol	5,000	20.0 a	4.5
	10,000	17.5 a	20.0
Methyl eugenol	5,000	0.5 a	92.3
	10,000	22.3 a	- 242.3
Control		6.5 a	

^zMean separation with columns by Duncan's multiple range test, *P* : 0.05.

Essential oil의 처리량이 높을 경우 병 방제 효과보다는 병 조장 효과가 있는 것으로 판단되어 100ppm, 200ppm으로 처리하였을 경우 carvacrol -21.4%, 75%, Thymol은 28.6%, 30.7%, Eugenol은 -96.4%, -36.2%, Methyl eugenol은 52.1%, 81.4%의 병 방제효과가 나타나는 것을 확인하였다. Essential oil과 물을 직접 섞어서 분사할 경우 고농도에서는 오히려 병을 조장하는 효과가 나타나며 저농도에서는 효과가 좋은 경우도 나쁜 경우도 발생하였다 (Table 18).

Table 18. Control effects of the low concentration of non-emulsified essential oils on strawberry cv. *Akihime*

Treatment	Concentration (ppm)	Diseased rate (%)	Control value(%)
Carvacrol	100	42.5 ab^z	- 21.4
	200	8.8 b	75.0
Thymol	100	25.0 ab	28.6
	200	24.3 ab	30.7
Eugenol	100	68.8 a	- 96.4
	200	46.3 ab	- 32.1
Methyl eugenol	100	16.8 b	52.1
	200	6.5 b	81.4
Control		35.0 ab	

^zMean separation with columns by Duncan's multiple range test, *P* : 0.05.

나. Essential oil + 유화제

1) 유화제를 첨가한 essential oil의 유화(Fig. 33, 34, 35)

Essential oil과 물을 직접 섞어 분무하였을 때 약해가 나기 때문에, essential oil을 희석하여 유용하게 살포할 수 있도록 tween 20을 이용하여 essential oil의 유화정도를 측정하였고, 제형에 필요한 tween 20의 농도를 산출하였다.

가) Eugenol

Tween 20에 유화를 시켜 물에 희석하였을 때, oil과 물로 분리되지 않는 tween 20의 농도는 2ml이상/10ml의 농도 (final concentration 200ppm)가 된다.

Final concentration of Tween 20

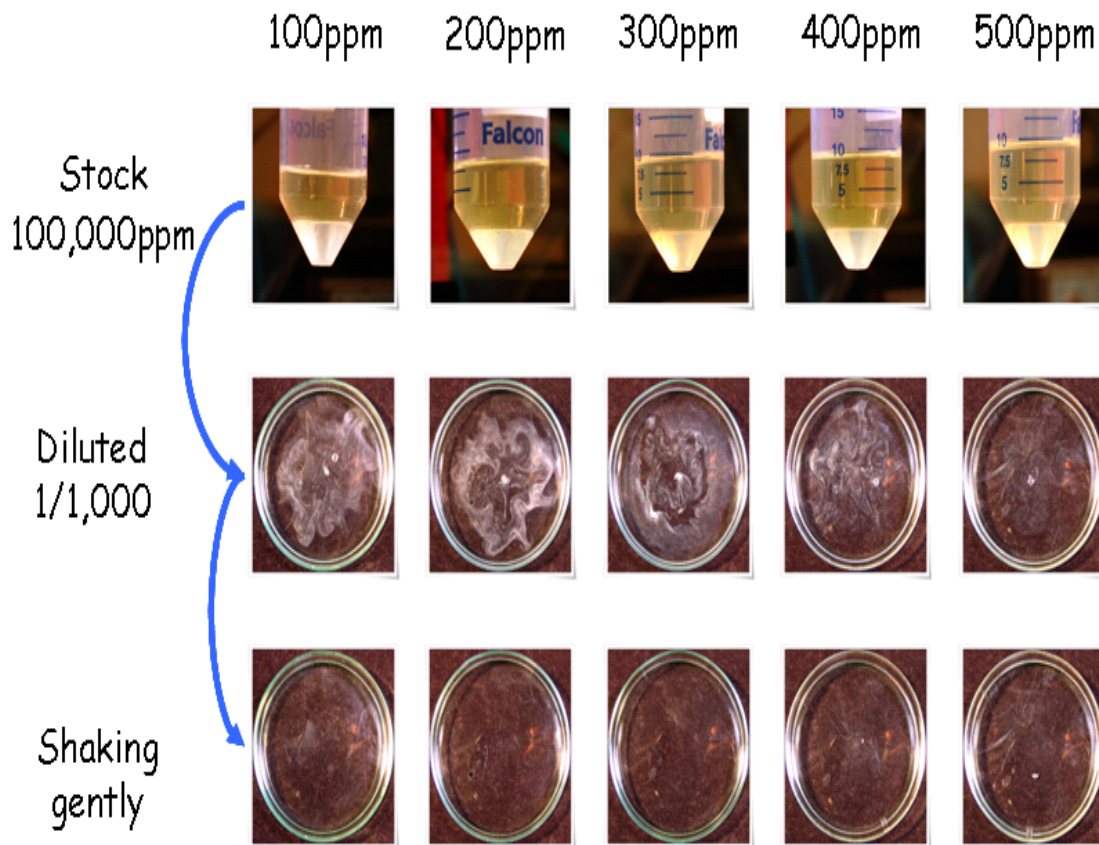


Fig. 33. Mixture of Eugenol and tween 20

나) Methyl eugenol

Tween 20에 유화를 시켜 물에 희석하였을 때, oil과 물로 분리되지 않는 tween 20의 농도는 2ml이상/10ml의 농도 (final concentration 200ppm)가 된다.

Final concentration of Tween 20

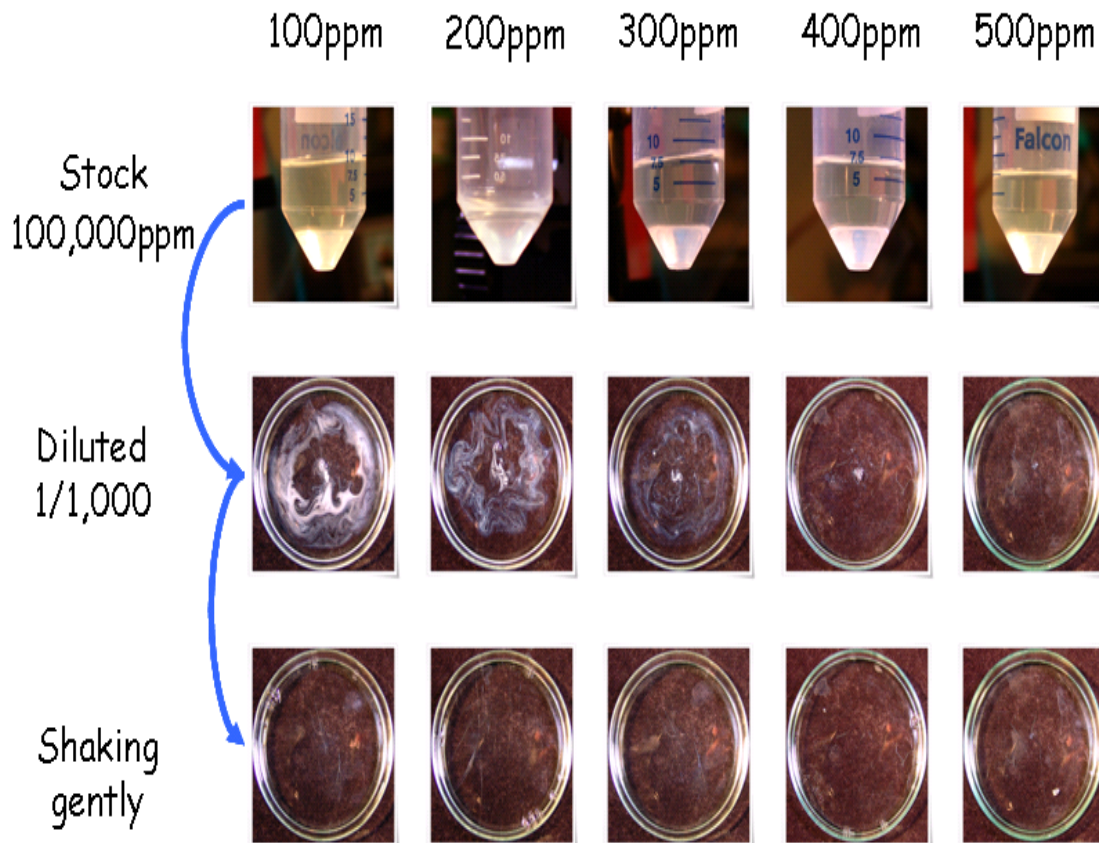


Fig. 34. Mixture of Methyl eugenol and tween 20

다) Thymol

Tween 20에 유화를 시켜 물에 희석하였을 때, oil과 물로 분리되지 않는 tween 20의 농도는 3ml이상/10ml의 농도 (final concentration 300ppm)가 된다.

Final concentration of Tween 20

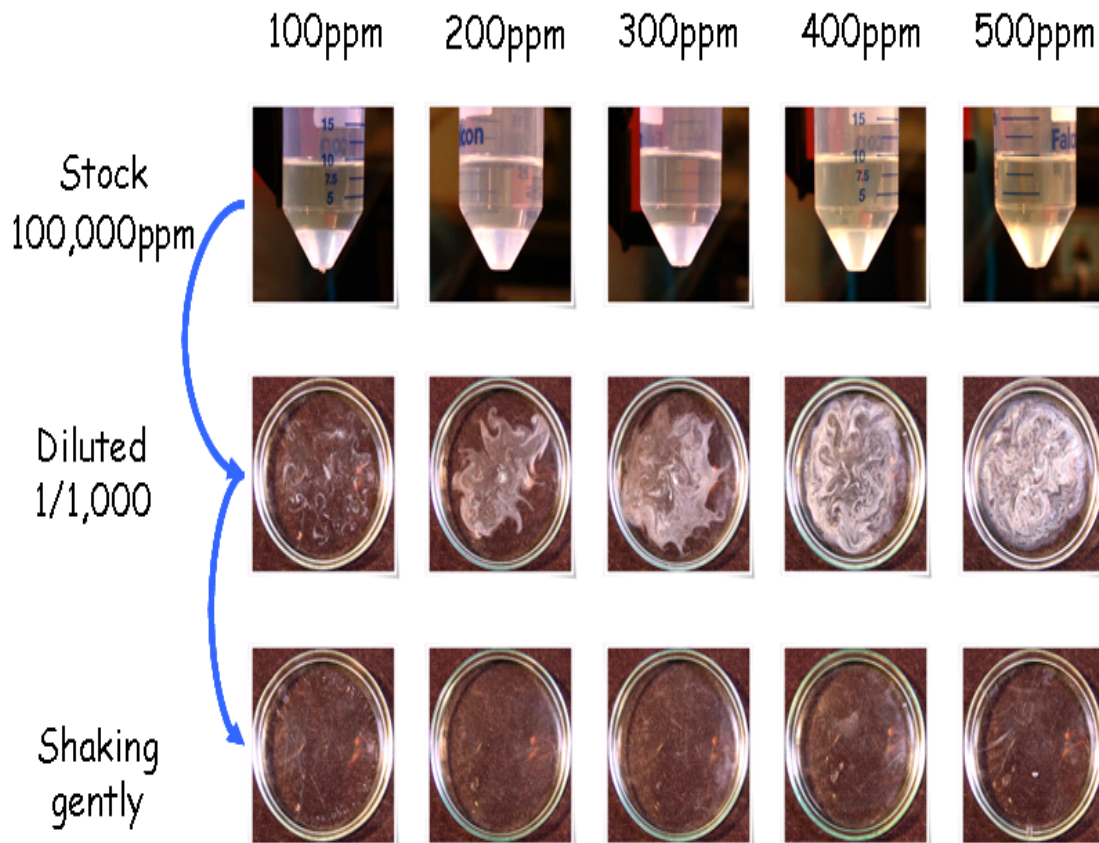


Fig. 35. Mixture of Thymol and tween 20

따라서 essential oil의 제형화를 위한 기본 제형의 최적 조합은 essential oil : tween 20 : water 1:3:6의 비율로 정하였다.

2) 유화제를 첨가한 essential oil의 방제효과

Essential oil과 glycerol을 섞어서 만든 제형으로 100ppm과 1,000ppm으로 처리하였을 경우 Thymol은 22.7%, 22.4%, Eugenol은 24.5%, 25.9%, Methyl eugenol은 62.7%, 12.0%의 방제효과가 나타남을 확인하였다 (Table 19, Fig. 36).

Table 19. Control effects of various emulsified essential oils on strawberry cv. *Akihime*

Treatment	Concentration (ppm)	Diseased rate (%)	Control value (%)
Thymol	100	55.6 ab^z	22.7
	1,000	55.8 ab	22.4
Eugenol	100	54.3 ab	24.5
	1,000	44.4 ab	25.9
Methyl eugenol	100	26.8 b	62.7
	1,000	63.2 ab	12.0
Control		71.9 a	

^zMean separation with columns by Duncan's multiple range test, *P* : 0.05.

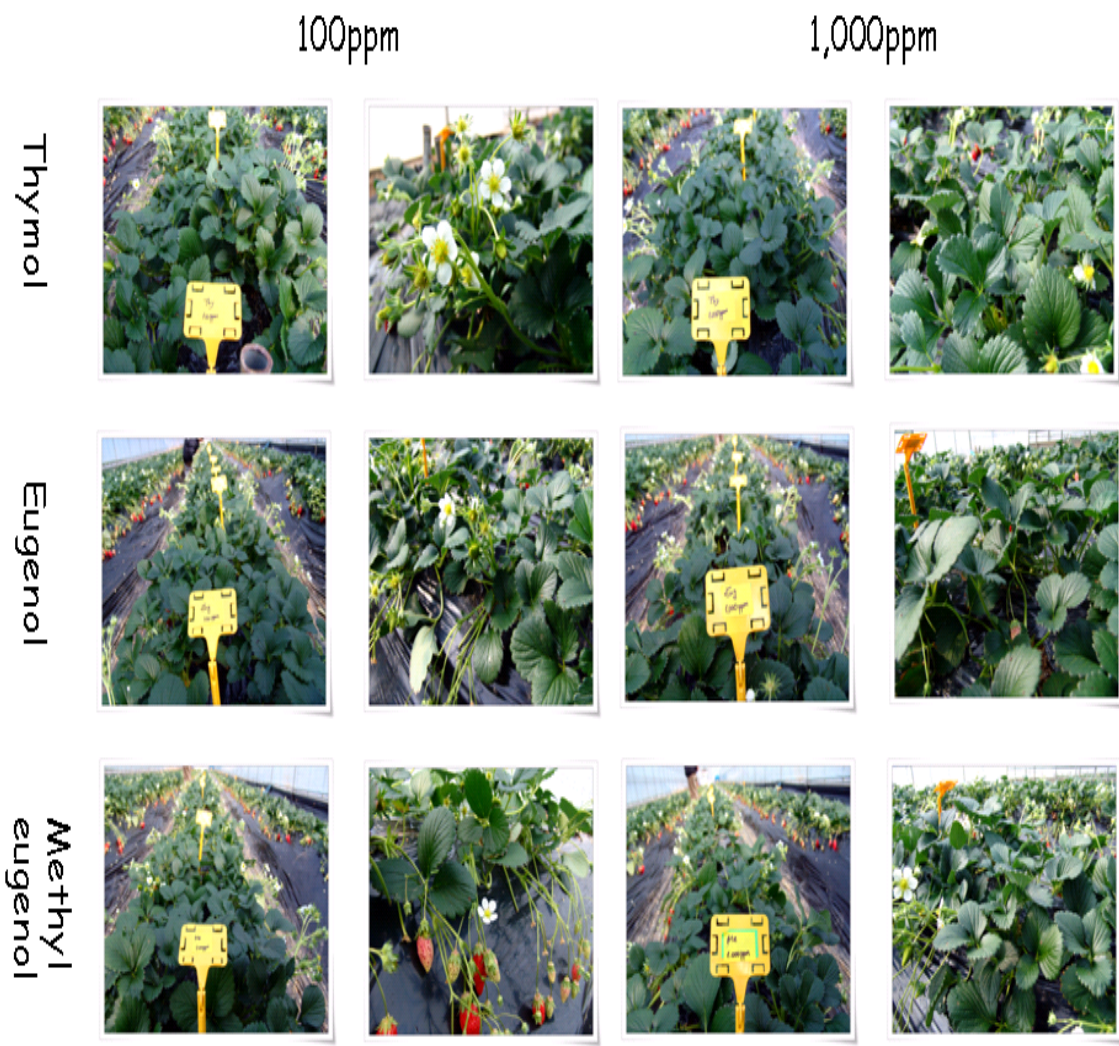


Fig. 36. Treatment of mixture of Essential oil and tween 20

다. 약해검정

Methyl eugenol, carvacrol, Thymol, Eugenol을 glycerol 6:4(g/g)의 비율로 섞어 배추에는 50ppm, 100ppm, 500ppm, 1,000ppm의 농도로 딸기에는 500ppm, 1,000ppm의 농도로 분무기를 이용하여 분무하고, 3일 후에 약해 유무를 검정한 결과 전혀 약해가 나타나지 않았음을 확인할 수 있었다 (Fig. 37).

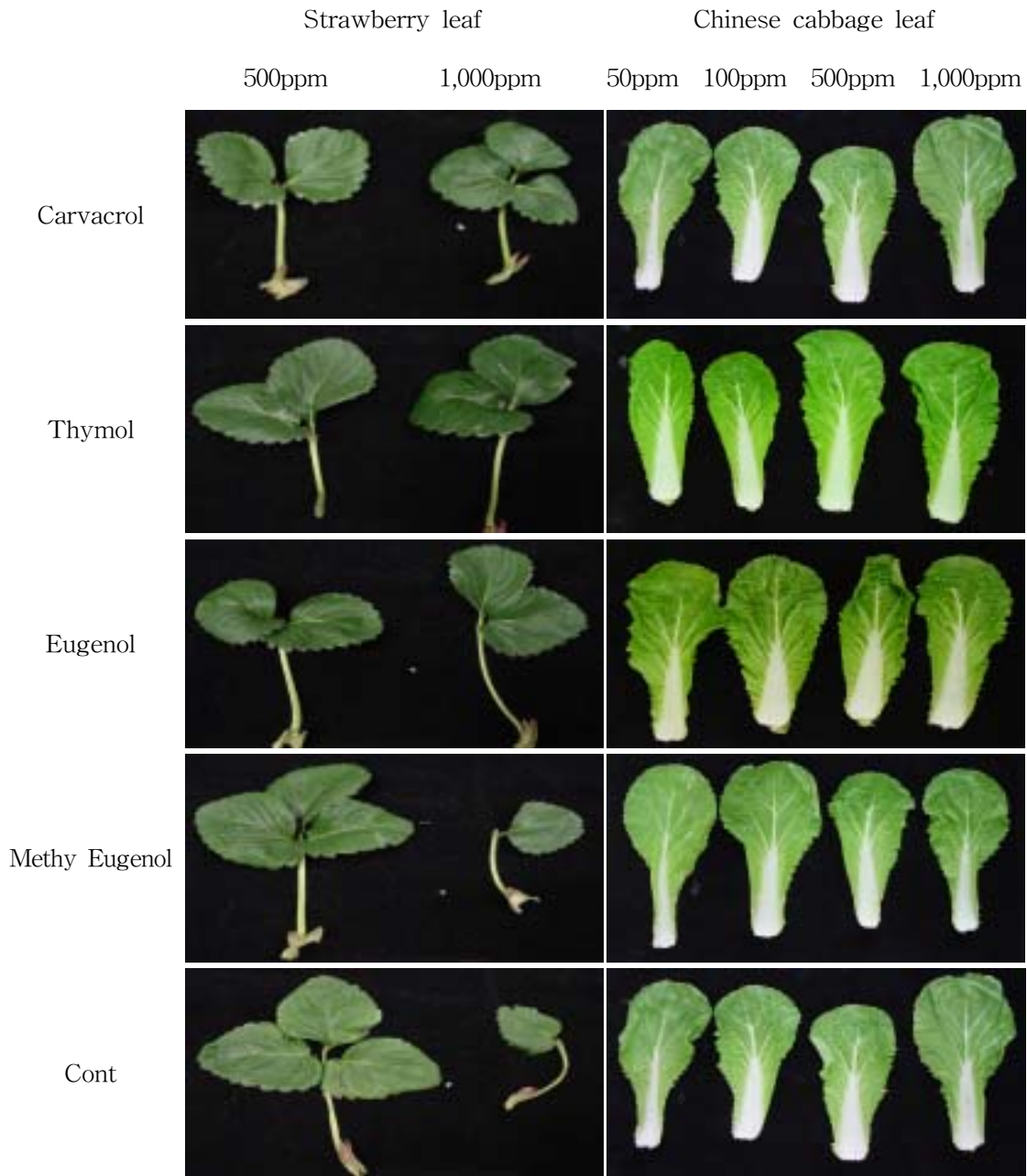


Fig. 37. Examination damage of essential oil

13. 소규모 포장 실험을 통한 기본 제제의 활성 검증(상용농약과 비교 포함)

가. Essential oil 농도별 항균활성

소규모 포장에서 essential oil 제형의 농도별 활성을 검증한 결과 Thymol의 처리구는 농도가 높아질수록 방제효율이 높아지는 경향을 보였으며, Eugenol의 처리구에서는 농도가 높아질수록 방제효율이 낮아지는 경향이 나타났다. Methyl eugenol을 처리하였을 때 100ppm에서 82.5%의 방제효율이 나타나는 것으로 밝혀졌으며 한편 상용농약인 깨끄탄을 1000배 (1,000ppm) 농도로 처리하였을 때는 90.9%의 방제효율이 나타났다 (Table 20). 이 정도수준의 방제가 일반적으로 시중에 시판중인 농약의 방제가와 비슷한 수준으로 약해와 기타의 아무런 부작용이 없는 점을 고려하면 아주 우수한 결과라 할 수 있다.

Table 20. Control effects of emulsified essential oils on strawberry cv. *Akihime* in green house

Treatment	Concentration (ppm)	Diseased rate (%)	Control value (%)
Thymol	50	12.8 ab ²	38.1
	100	6.5 ab	68.6
	200	3.8 ab	81.5
Eugenol	50	7.0 ab	63.8
	100	8.6 ab	55.7
	200	12.6 ab	26.2
Methyl eugenol	50	6.3 ab	67.0
	100	3.3 ab	82.5
	200	13.9 ab	23.8
Diethofencarb + carbendazim	1,000	1.7 b	90.9
Control		20.7 a	

²Mean separation with columns by Duncan's multiple range test, *P* : 0.05.

나. 소규모 포장에서의 기본제형 활성 검증

소규모 포장에서의 기본제형 활성은 Thymol 100ppm에서 36.7%, Eugenol 100ppm에서 40.1%, Methyl eugenol 100ppm에서 60.2%의 방제효율이 나타나 본 연구과제의 주관기관인 충남대학교에서 실시한 충남 공주에서의 실험 방제가와 유사한 경향을 나타냈으며, 상용농약인 깨끄탄을 1000배 (1,000ppm) 농도로 처리하였을 때는 91.1%의 방제효율이 나타남을 알 수 있었다(Table 21).

Table 21. Control effects of emulsified essential oils on strawberry cv. *Akihime* in green house

Treatment	Concentration (ppm)	Diseased rate (%)	Control value (%)
Thymol	100	20.6	36.7
Eugenol	100	19.4	40.1
Methyl eugenol	100	12.9	60.2
Diethofencarb+ carbendazim	1,000	2.9	91.1
Control		32.5	

다. Essential oil + 보조제

Essential oil 제제와 보조제를 섞어서 딸기에 처리하였을 때 Eugenol의 경우 세 가지 보조제를 모두에서 방제효율이 저하되는 양상이 나타났으며, Methyl eugenol의 경우만이 그 효과가 상승하는 경향이 나타났다 (Table 22).

Table 22. Control effects of emulsified essential oils mixed with co-agents on strawberry cv. *Akihime* in green house

Treatment		Concentration (50ppm)	Diseased rate (%)	Control value (%)
NaHCO ₃	+	Thymol	15.9 bcd ^z	47.8
		Eugenol	19.2 a-d	36.8
		Methyl eugenol	8.7 d	71.4
Neem oil	+	Thymol	21.1 a-d	30.7
		Eugenol	22.6 a-d	25.8
		Methyl eugenol	17.0 a-d	44.2
Chitosan	+	Thymol	15.2 cd	50.1
		Eugenol	22.4 a-d	26.5
		Methyl eugenol	10.6 cd	65.2
NaHCO ₃			21.7 a-d	28.9
Neem oil			24.1 abc	20.9
Chitosan			20.3 bc	33.3
Tween 20			30.8 a	-1.1
EtOH			30.4 ab	0.3
Control			30.5 ab	

NaHCO₃; 1,000ppm, Neem oil (surfactant 5%); 1,000ppm, Chitosan (MW 300 thousand upper) ; 10,000ppm, Tween 20 (polyoxyethylene sorbitanmonolaurate): 300ppm, EtOH : 600ppm

^zMean separation with columns by Duncan's multiple range test, *P* : 0.05.

라. 다른 essential oil을 혼합한 Methyl eugenol 제형의 잣빛곰팡이병 억제율 조사

Thymol, Eugenol 등의 essential oil은 *in vitro* 실험에서 각 각 잣빛곰팡이병에 억제 효과가 뛰어났다. 이러한 다른 essential oil을 첨가하면 Methyl eugenol 제형의 상승효과를 확인할 것이라 생각하고 실험에 착수하였다. 하지만 각 각의 essential oil을 처리하였을 때보다 낮은 균사억제를 보여 essential oil 제형은 단독으로 제형을 만들어 처리하는 것이 보다 효과적이라 할 수 판단되었다(Table 23). 이때에도 Methyl eugenol의 방제가는 무려 87.7%나 되어 그 가능성을 확인 할 수 있었다.

Table 23. Control effects of emulsified essential oils mixed with another essential oil on strawberry cv. *Akihime* in green house

Treatment	Concentration (50ppm)	Diseased rate (%)	Control value (%)
Methyl eugenol		4.2	87.7
Thymol		8.6	74.9
Eugenol		7.5	78.1
Safrole		12	64.9
Methyl eugenol	Thymol	11.3	67.0
Methyl eugenol	Eugenol	12.4	63.7
Methyl eugenol	cymene	22.4	34.5
Control		34.2	

Treatment; Methyl eugenol 150ppm, Thymol 150ppm, Eugenol 150ppm, safrole 150ppm

마. Essential oil을 처리한 후 딸기의 당도와 경도 변화

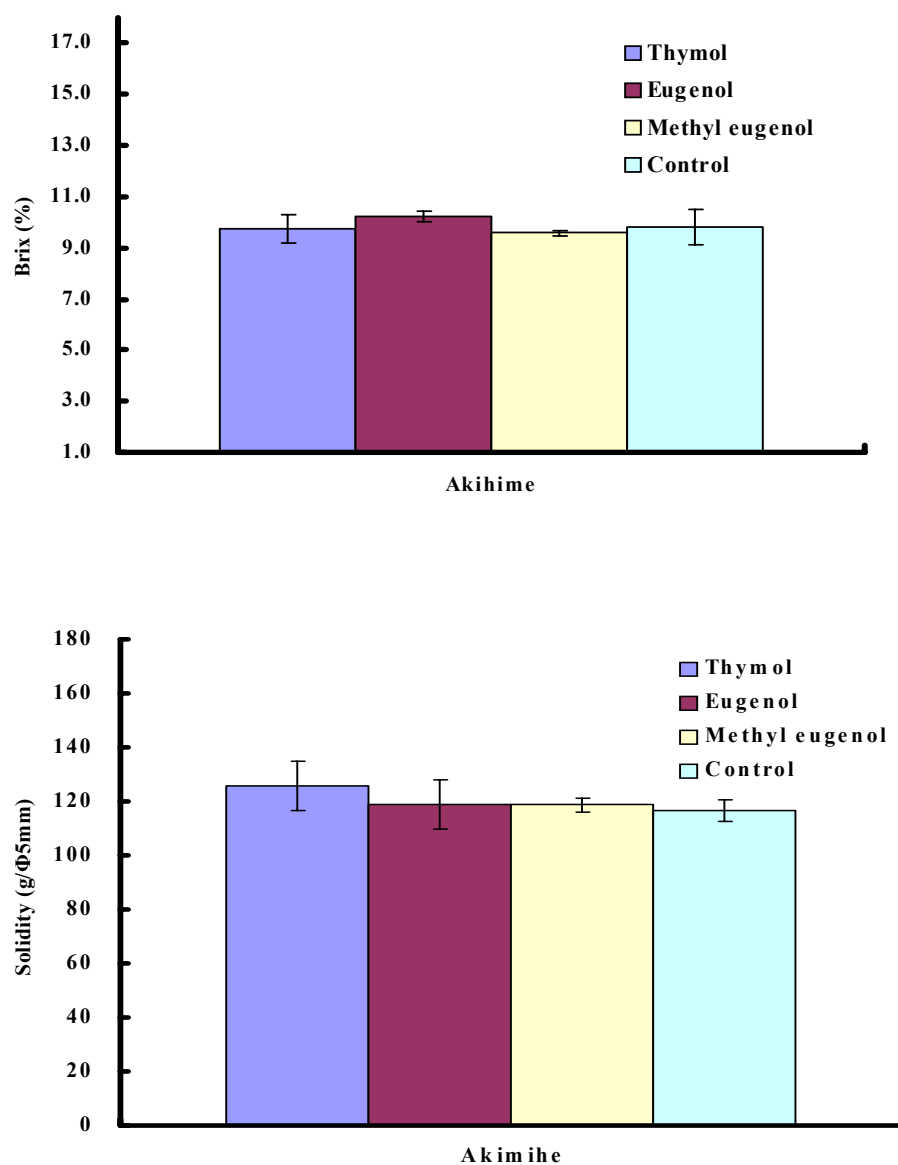


Fig. 38. Comparison of Brix and solidity after treatments of essential oils.

Fig. 36과 같이 각종 essential oil이 처리된 딸기 과실의 경도와 당도에서도 무처리구와 유사한 수준을 보여 이들 essential oil을 처리해도 품질에 아무런 영향을 주지 않는다는 사실이 밝혀져 이들의 효과적인 사용 가능성을 높였다.

14. 전처리 효과검정과 처리횟수 및 치료효과조사

병원균을 접종한 후 2일 간격으로 각 essential oil을 1회, 2회, 3회 처리하였을 때의 방제효율은 다음과 같다(Table 24). essential oil 제제는 처리 빈도가 높아질수록 그 방제효율이 높아졌으나, 이미 발병한 처리구에 essential oil 제제를 반복 처리하였을 때 치료효과는 확인할 수 없었다.

Table 24. Control effect according to the frequency to treat essential oils after inoculation

Treatment	Concentration (ppm)	The frequency to treat essential oils after inoculation					
		1		2		3	
		Diseased rate (%)	Control value (%)	Diseased rate (%)	Control value (%)	Diseased rate (%)	Control value (%)
Thymol	100	17.8	37.3	23.9	42.7	45.6	48.8
Eugenol	100	15.0	47.1	21.1	49.3	37.2	58.1
Methyl eugenol	100	12.2	56.9	15.0	64.0	21.1	76.3
Control		28.3		41.7		88.9	

15. 잣빛곰팡이병에 대한 예방, 치료, 지속효과 등을 조사

Essential oil 제제는 Table 25에서의 data와 같이 잣빛곰팡이병에 대한 치료효과보다는 예방효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 Table 26에서 각각의 essential oil들을 처리 당일, 3일 후, 그리고 5일 후에 병원균을 접종하여 essential oil 제제의 약효 지속기간을 알아본 결과 약효 지속기간은 1~2일 정도이며 시간이 지날수록 효과가 현저하게 저하되는 경향을 나타냈다.

Table 25. Control effects of each essential oil in treatment after inoculation and before

Treatment	Concentration (ppm)	Treatment after inoculation		Treatment before inoculation	
		Diseased rate (%)	Control value (%)	Diseased rate (%)	Control value (%)
Thymol	100	35.0	41.7	26.7	55.6
Eugenol	100	44.4	25.9	40.0	33.3
Methyl eugenol	100	50.0	16.7	5.6	90.7
Control		60.0		60.0	

Table 26. Control effects by time course of inoculate after essential oil treatments

Treatment	Concentration (ppm)	Inoculated after treatment(day)					
		1		3		5	
		Diseased rate (%)	Control value (%)	Diseased rate (%)	Control value (%)	Diseased rate (%)	Control value (%)
Thymol	100	13.3	42.9	45.6	21.2	82.2	1.3
Eugenol	100	10.6	54.8	42.8	26.0	85.6	-2.7
Methyl eugenol	100	5.6	76.2	26.7	53.8	73.3	12.0
Control		23.3		57.8		83.3	

16. 잣빛곰팡이 다발생 포장에서의 활성 검정과 약효기간 조사 (상용농약과 비교)

가. 다발생한 공주시 계룡면 포장에서의 essential oil의 활성 조사 (1차년도)

3일 간격 4회 처리한 잣빛곰팡이 다발생 포장에서의 이병률은 83.3%였고, Thymol, Eugenol, Methyl eugenol의 활성을 검증해 본 결과 상용농약인 깨끄탄의 경우 78.7%의 비교적 안정적인 방제가를 보인 반면 Thymol 20%, Eugenol 26.7%, Methyl eugenol 43.3%의 방제가를 보임으로써 다발생 포장에서는 효과가 많이 감소하는 경향을 보였다 (Table 27). 따라서 본 물질들을 상용화할 경우 잣빛곰팡이병이 다발생하기 이전에 예방차원에서 처리하는 것이 가장 효과적일 것으로 판단된다.

Table 27. Control effects of essential oil in largely infested strawberry field.

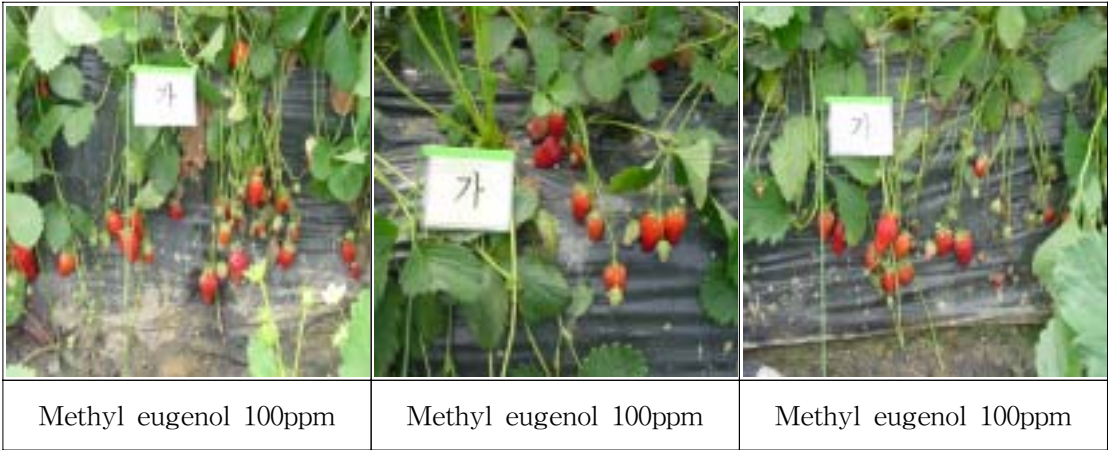
Treatment	Concentration(ppm)	Diseased rate(%)	Control value(%)
Thymol	100	66.7	20.0
Eugenol	100	66.1	26.7
Methyl eugenol	100	47.2	43.3
Diethofencarb+ carbendazim	1,000	17.8	78.7
Control		83.3	

나. 다발생한 공주시 계룡면 포장에서의 Methyl eugenol의 활성 조사 (2차년도)

7일 간격 4회 처리한 다발생 포장에서의 이병률은 30.6%였고, Methyl eugenol 제형의 활성을 검증해 본 결과 상용농약인 Procymidone WP(Standard)의 경우 74.6%, Diethofencarb + Carbendazim WP(Standard)은 70.3%, Boscalid WG(Standard)은 78.6%의 방제가를 보였고, Methyl eugenol 제형의 100ppm, 150ppm, 200ppm의 방제가는 45.3%, 59.0%, 30.7%를 보임으로써 다발생 포장에서 150ppm의 방제 효과가 비교적 뛰어남을 볼 수 있었다 (Table 28, Fig. 39). 그리고 Methyl eugenol 제형에 다른 essential oil을 첨가하였을 때의 data를 볼 때, Methyl eugenol 100ppm, Thymol 50ppm을 혼합 처리한 것에서 54.6%의 방제가를 보임으로써 비교적 효과가 좋았고, 앞으로 essential oil 제형에 다른 essential oil이나 보조제를 첨가하여 더욱 큰 상승효과를 기대할 수 있겠다.

Table 28. Control effects of essential oil in largely infested strawberry field.

Treatment	Concentration (ppm)	Diseased rate (%)	Control value (%)
Methyl eugenol	100	16.7	45.3
Methyl eugenol	150	12.6	59.0
Methyl eugenol	200	21.2	30.7
Methyl eugenol(100ppm)	+ Thymol 50	15.5	49.3
Methyl eugenol(100ppm)	+ Eugenol 50	17.2	43.9
Methyl eugenol(100ppm)	+ cymene 50	17.7	42.1
Methyl eugenol(150ppm)	+ Thymol 50	17.1	44.1
Methyl eugenol(150ppm)	+ Eugenol 50	16.6	45.9
Methyl eugenol(150ppm)	+ cymene 50	17.6	42.4
Methyl eugenol(200ppm)	+ Thymol 50	13.9	54.6
Methyl eugenol(200ppm)	+ Eugenol 50	17.0	44.4
Methyl eugenol(200ppm)	+ cymene 50	17.7	42.2
Procymidone WP(Standard)		7.8	74.6
Diethofencarb + Carben- dazim WP(Standard)		9.1	70.3
Boscalid WG(Standard)		6.6	78.6
Thymol 50		58.4	- 90.8
Eugenol 50		61.1	- 99.7
cymene 50		70.6	- 130.7
Control		30.6	





Methyl eugenol 200ppm



Methyl eugenol 200ppm



Methyl eugenol 200ppm



Methyl eugenol 100ppm +
Thymol 50ppm



Methyl eugenol 100ppm +
Thymol 50ppm



Methyl eugenol 100ppm +
Thymol 50ppm



Methyl eugenol 100ppm +
Eugenol 50ppm



Methyl eugenol 100ppm +
Eugenol 50ppm



Methyl eugenol 100ppm +
Eugenol 50ppm



Methyl eugenol 100ppm +
cymene 50ppm



Methyl eugenol 100ppm +
cymene 50ppm



Methyl eugenol 100ppm +
cymene 50ppm



Methyl eugenol 150ppm +
Thymol 50ppm



Methyl eugenol 150ppm +
Thymol 50ppm



Methyl eugenol 150ppm +
Thymol 50ppm



Methyl eugenol 150ppm +
Eugenol 50ppm



Methyl eugenol 150ppm +
Eugenol 50ppm



Methyl eugenol 150ppm +
Eugenol 50ppm



Methyl eugenol 150ppm +
cymene 50ppm

Methyl eugenol 150ppm +
cymene 50ppm

Methyl eugenol 150ppm +
cymene 50ppm



Methyl eugenol 200ppm +
Thymol 50ppm

Methyl eugenol 200ppm +
Thymol 50ppm

Methyl eugenol 200ppm +
Thymol 50ppm



Methyl eugenol 200ppm +
Eugenol 50ppm

Methyl eugenol 200ppm +
Eugenol 50ppm

Methyl eugenol 200ppm +
Eugenol 50ppm



Methyl eugenol 200ppm +
cymene 50ppm

Methyl eugenol 200ppm +
cymene 50ppm

Methyl eugenol 200ppm +
cymene 50ppm



Procymidone
WP(Standard)(x1,000)



Procymidone
WP(Standard)(x1,000)



Procymidone
WP(Standard)(x1,000)



Diethofencarb + Carbendazim
WP(Standard)(x1,000)



Diethofencarb + Carbendazim
WP(Standard)(x1,000)



Diethofencarb + Carbendazim
WP(Standard)(x1,000)





Eugenol 50ppm



Eugenol 50ppm



Eugenol 50ppm



cymene 50ppm



cymene 50ppm



cymene 50ppm



Fig. 39. Control effects of essential oil in largely infested strawberry field.

17. 포장 활성 검정을 통한 최적 제형 선발 및 효과적인 사용방법 결정

최종 선발된 물질의 동정을 위하여 세신에서 분리된 물질과 standard Methyl eugenol을 LC-메스를 통하여 분자량 분석을 수행한 결과 open column prep과 ODS TLC prep과 standard Methyl eugenol에서 모두 분자량 178의 pick가 확인되어 세신에서 분리된 향균활성물질이 Methyl eugenol임을 확인하였다. Methyl eugenol은 정유 또는 essential oil로서 식물의 향기를 말하며 이러한 이소프렌을 기본 구조로 하는 물질이 많이 함유된 2차 대사산물을 말한다. Essential oil은 식용, 약용, 허브 식물에서 추출되며 향균활성능이 잘 알려져 고대로부터 식품에 향료로써 널리 사용되었던 기록이 있다. Methyl eugenol은 물에 잘 녹지 않고 휘발성이 있는 정유로서 제제 (formulation)를 만들기 매우 까다로운 원료 중에 해당된다. 단지 물에 녹지 않는다는 문제점은 전착제로서 폴리아미드수지, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌, 고급지방산에스테르 등에서 선택하여 첨가함으로써 물에 잘 녹게 할 수도 있지만 원료가 휘발성이 있으므로 이들 전착제가 잎 표면을 황변 시킬 가능성이 있어 배제시켰다. 제형 (formulation type) 중에서도 입제, 수화제 등은 세신 추출물의 경우는 가능하지만 유효성분이 Methyl eugenol이므로 과립, 입제, 수화제 제형은 배제시킬 수 밖에 없었다. 이들 제형에 휘발성 물질을 가두어 두는 것은 매우 어렵기 때문이다. 특히 제품화 후에 보존 기간 및 유효약효 성분의 감소 변화로 인해 QC (Quality Control)가 불가능하기 때문에 커다란 문제를 야기시킬 수 있다. 만약 이 Methyl eugenol로 과립, 입제, 수화제 제형으로 꼭 만들려고 한다면 고분자물질로 피복하여 고체형태로 만들거나 캡슐 안에 원제를 넣어 만든 제형인 캡슐제를 사용할 수는 있다. 방출조절 기능을 갖고 있으며 특수 방제목적으로 사용하지만 생산시설의 투자비와 분산성에도 문제가 있어서 여러 문제점을 야기시킬 수도 있다. 따라서 Methyl eugenol의 경우는 최종적으로 유화제, 오일제, 오일제 + 액상수화제, 액상수화제 순으로 만들 수밖에 없다고 판단되었다.

효과적으로 휘발성 천연물제제를 실용화시키려면 최적의 제형화가 요구된다. 처리한 천연물이 식물의 표면에 부착될 수 있어야 하며, 휘발성 천연물의 약효성분이 잎 표면에 가능한 오래 체류하며 휘발되어 약효가 식물체에서 효과적으로 발휘될 수 있어야 한다. 또한 제형에 함유된 성분들이 작물에 해로운 영향을 미치지 않아야 천연물을 제형화하여 병 방제에 이용하였을 때 효과를 얻을 수 있게 된다. 더욱이 딸기 잣빛곰팡이병 방제에 사용하기 위해서는 딸기의 특성상 과육을 세척할 수 없고 바로 섭취할 수 있는 제형으로 만들어야 하는 또 다른 문제가 대두됨으로 어려움이 가중된다. 위와 같은 여러 가지 요인들을 고려하여

고정화 방법 (유화형, 액상수화제형), 오일제, 담체 선정 (Xantan Gum, Starch, Methyl Cellulose, PVA, Kaoline 등), 기타 미량원소의 첨가 등을 통해 딸기 잿빛곰팡이병을 효과적으로 방제할 수 있는 제형을 연구하였으며 최종 제형화는 산업화를 위한 특허화한 후에 공개하기로 한다. 최종 보고서 역시 특허 출원이 종료된 후에 배포하겠다. 단지 제품화 이전에 원제의 효능을 평가하고 간편하게 실험에 공시하기 위해 Methyl eugenol에 기초실험을 수행한 결과 최종적으로 tween 20을 첨가하여 천연물질의 효능증진 및 딸기 표면의 접착성을 높이기 위하여 액제 제형을 개발하였다. 또한 액상제형은 딸기표면에 천연물의 흡착률을 높여 줄 수 있는 흡착증강제와 물에 잘 녹는 분산제를 사용하였다. 영양원으로 질소원, 탄소원 및 미량요소 등을 사용하였는데 모두 물에 잘 녹는 성분으로 딸기에 스트레스는 적게 주고 비료효과도 줄 수 있는 성분을 선택하여 사용하였다. Essential oil은 광(光)에 민감하므로 제품 포장 용기로는 갈색 시약병이 적합하다고 생각된다.

결과적으로 딸기 과실 및 잎에 약흔이 나타나지 않으며 방제효과가 우수한 최종 제형으로는 액상수화제가 가장 바람직하다고 판단되었다. 따라서 딸기 잿빛곰팡이병 방제제의 최적 형태는 Methyl eugenol 15%, 계면활성제인 tween 20 30%, 동결방지제 15%, 산화방지제 2%, UV 차단제 0.5%, 보습제 0.5%, rest 물 37%이다. 이 제형은 물에 1,000배로 희석하여 사용하고, 7일 간격으로 3회 이상 처리하는 것이 잿빛곰팡이병 방제에 큰 도움을 줄 수 있다 (Fig. 40).



Fig. 40. Photograph of final formulation of Methyl eugenol

18. 딸기의 저장 기간연장 효과 조사

딸기 수확전 본 연구에서 개발된 Methyl eugenol 제제 100ppm, 150ppm, 200ppm으로 희석하여 처리하고 하루 후에 딸기를 수확하여, 보관 온도는 20℃, 그리고 7일, 10일, 그리고 13일간 처리하였을 때, 10일후의 저장병 방제효과를 조사하였다. 잣빛곰팡이병 억제율은 100ppm에서 87.6%, 150ppm에서는 89.9%, 200ppm에서는 80.3%로 발병률이 75.4%였던 무처리구와 대비할 때, 병 발생을 기대 이상으로 억제하였으며 저장기간도 훨씬 더 연장한다는 사실이 밝혀졌다(Table 29, Fig. 41).

이는 언제나 딸기과실의 저장기간이 너무 짧아 판매가 불가능하기가 일수이며 따라서 판매나 유통단계에서 농민과 상인의 소득증대에 커다란 문제점이었던 점을 고려한다면 앞으로 본 연구에서 개발된 제제를 활용할 경우 이러한 중대한 문제점을 해결하고 나아가 농가의 소득증대에도 반드시 크게 기여할 것으로 확신한다. 또한 저장기간이 연장됨으로써 그동안 잣빛곰팡이균에 의한 저장병이 발생하여 저장기간이 문제가 되어왔던 딸기의 일본 등 해외 수출에도 커다란 도움을 줄 것이 틀림없다.

Table 29. Control effects of essential oils in storage condition. The strawberry was harvested one day after treatments with essential oil, Methyl eugenol and it was stored at room temperature (20℃)

Treatment	Concentration (ppm)	Diseased rate (%)	Control value (%)
Methyl eugenol	100	12.4	83.6
Methyl eugenol	150	10.1	86.6
Methyl eugenol	200	19.7	73.9
Control		75.4	



Fig. 41. Control efficacy of Methyl eugenol formulation with each concentration under different storage period. The strawberry was harvested one day after treatments with essential oil, Methyl eugenol, and stored at room temperature (20°C).

A: after 7 day, **B:** after 10 day, **C:** after 13 day

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 과제는 1년차에서 각종 환경유해식물, 천연자원 및 농업부산물을 수집한 후, 잣빛곰팡이병에 대한 항균활성을 조사하였고, 2년차에 활성을 나타내는 식물체를 획득하여 잣빛곰팡이병균에 특이적으로 작용하는 물질의 분리 정제와 구조 분석 및 기본 제형 실험을 실행하였으며, 3년차에 활성물질의 제형화와 포장 검정 등을 목표로 수행되었다.

세신, 즉 *Asarum sieboldii*의 항균활성은 본문에서 제시한 바와 같이 실험에 사용된 잣빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*)에 효과적인 활성을 보였으며, 병원균의 군사 세포벽을 파괴하여 병원균의 생육을 억제하였고 병 방제효과도 우수하였으나, 다른 식물 병원균에 대해서는 월등한 효과를 보이지 않았다.

*Asarum sieboldii*에서 추출한 물질은 Methyl eugenol로 동정되었다. Methyl eugenol은 미국 식약청에서 인정한 먹을 수 있는 물질로 딸기의 잣빛곰팡이병을 매우 효과적으로 방제하면서도 **수확 바로 직전에 사용할 수 있고, 딸기의 저장기간을 대폭 늘렸다.** 또한, 딸기의 당도와 경도를 거의 변화시키지 않았고, 농약을 사용하지 않고, Methyl eugenol 제형을 사용함으로써 친환경적인 생물농약으로 활용할 수 있는 기초 자료를 마련하였으며, 생물농약으로서의 가능성을 충분히 보여주었다.

이 기법을 잘 활용한다면 딸기 잣빛곰팡이병만이 아니라 다른 작물의 각종 병해까지도 매우 효과적으로 방제할 수 있는 길이 열렸다 하겠다.

제 5 장 연구개발결과의 활용방안

본 연구를 통하여 확인된 Methyl eugenol은 젤리의 향기, 빵의 첨가물, 비알콜성 (비발효) 맥주, 껌, 사탕, 푸딩, 아이스크림의 향료로써 사용되고 있는 essential oil로써 식품으로의 이용뿐만 아니라 새로운 분야인 농업에의 응용에 기초자료를 제공하였으며, 잣빛곰팡이병균에 매우 뛰어난 활성을 지닌 생물농약으로서의 가능성을 제시하였다.

본 연구의 결과로 “**메틸 유제놀을 함유하는 잣빛곰팡이병 방제용 조성물**”, “**취산된 에센셜 오일의 처리에 의한 딸기 저장병해 방제 방법**” 등의 특허를 출원 중에 있으며, 재배농민을 위해 농업현장에 직접 사용하고자 (주) 바이오셀드나 기타 관련회사에 기술이전을 한 후, Methyl eugenol 제형을 상품화하여 시중에 공급할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

Essential oil이 특정 해충 및 특정 식물병원균에 대해 살충, 항균활성을 갖는다는 사실이 알려졌고 (Isman, 2000), Ultee 등 (2002)은 식중독 병원균인 *Bacillus cereus*에 essential oil을 처리하여 항균활성 기작을 밝혀냈으며, Rasooli and Abyan등 (2004)에 의해 Thymol 처리가 *Aspergillus parasiticus*의 aflatoxin 생성이 억제됨이 보고되었다.

최근 essential oil의 폭넓은 항균작용과 관련하여 essential oil이 약제 내성의 유무에 상관 없이 모든 포도상구균에 강력한 항균활성을 나타낸다고 밝혀냈고 (Nostro, 2004), 또한 부패하기 쉬운 식품의 보존성을 늘리기 위해 essential oil을 이용하였다 (Holley and Pater, 2005).

본 연구에서는 *Asarum sieboldii* 추출물이 딸기 잿빛곰팡이병에 대한 뛰어난 방제효과를 제시하였으며 또한 *Asarum sieboldii* 추출물의 주성분인 methyl Eugenol이라는 것이 확인되었는바 친환경 생물농약으로서의 가능성을 충분히 시사하고 있다.

제 7 장 참 고 문 헌

- Alzoreky, N. S., Nakahara, K. 2002. Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 223-230
- Arras, G., Usai, M. 2001. Fungitoxic Activity of 12 Essential oils against Four postharvest Citrus Pathogens: Chemical Analysis of *Thymus capitatus* Oil and its Effect in Subatmospheri Pressure Conditions. *Journal of Food Protection* 64,1025-1029.
- Bunt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.
- Chaurasia, S. C., and K. K. Vyas. 1977. In vitro effect of some volatile oil aganst *Phytophthora parasitica* var. *piperina*. *J. Res. India Med. Yoga Homeopath.* 1977, 24-26.
- Cowan, M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4), 564-582.
- Daferera, D. j., Ziogas, B. L., Polissiou, M. G. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection* 22, 39-44.
- Evans, W. C. 1998. *Pharmacognogy* 14th Edition. WB Saunders company Ltd.
- Holley, R. A., Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22, 273-292.
- Huang, Y., Ho, S. H., Lee, H. C., Yap, Y. L. 2002. Inceticidal properties of Eugenol, isoEugenol and methylEugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptea: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research* 38, 403-412.
- Isman, B. M. 2000. Plant essential oils for pest and disease management *Crop Protection* 19, 603-608.
- Ji, P., Momol, M. T., Olson, S. M., Pradhanang, P. M., Jones, J. B. 2005. Evaluation of Thymol as biofumigant for Control Bacterial Wilt of Tomato Under Field Conditions. *Plant Disease* 89, 497-500.

- Kim, J., Marshall, M. R., Wei, C. 1995. Antimicrobial activity of some essential oil components against five food borne pathogens, *J. Agric. Food Chem.* 43, 2839-2845.
- Lee, H. S., Lee, S. W., Cho, K. Y., Kim, M. K. and Ahn, Y. J. 2001. Fungal activities of 51 fruit-derived extracts in vivo against six phytopathogenic fungi. *Agric. Chem. Biotechnol.* 44: 147-153.
- Nostro, A., Blanco, A. R., Cannatelli, M. A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Roccaro, A. S., Alonzo, V. 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and Thymol. *FEMS microbiology letters* 230, 191-195.
- NTP. National Toxicology Program. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Methyl eugenol (CAS No. 93-15-12) in F344.N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). Technical Report Series TR-491. Research Triangle Park. NC: NTP
- Packiyasothy, E. V., Kyle, S. 2002. Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Microbiol.* 62, 139-148.
- Rasooli, I., Abyaneh, M. R. 2004. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parastiticus*. *Food Control.* 15, 479-483.
- Reddy, M. V. B., Angers, P., Gosselin, A., Arul, J. 1997. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry* 47(8), 1515-1520.
- Stroffberg, J., and F. Grundschober. 1988. Consumption ratio and food predominance of flavoring materials. *Perfum Flavor.* 12, 27.
- Suresh, B., S. Sriram, S. A. Dhanaraj, K. Elango, and K. Chinnaswamy. 1997. Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *J. Ethnopharmacol.* 55, 151-159.
- Taylor, R. S. L., F. Edel, N. P. Manandhar, and G. H. N. Towers. 1996. Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 50, 97-102.
- Ultee, A., Bennink, M. H. J., Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4), 1561-1568.

- Vishwakarma, R. A. 1990. Stereoselective synthesis of α -arteether from artemisinin. J. Nat. Prod. 53, 216-217.
- Winson, C. L., Solar, J. M., Ghaouth, A. El., Wisniewski, M. E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 81, 204-210.
- Xu, H. X., F. Q. Zeng, M. Wan, and K. Y. Sim. 1996. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. J. Nat. Prod. 59, 643-645.
- 고영진, 이동현, 김정호, 신은주, 배은영. 1997. 남부지방 야생식물들로부터 항균성 물질의 탐색. 순천대학교 논문집 16: 91-99.
- 김금숙, 백남인, 성재덕, 광용호. 1999. 세신(*Asiasarum sieboldii*)으로부터 Propiophenone의 분리. 한국농화학회지 42(4), 369-370.
- 김기은, 조문구. 1994. 천연자원으로부터 추출한 키틴함량과 키토산 항균활성. 한국미생물 응용생물과학회 22: 643-645.
- 김동원, 송영주, 최영근. 1999. 세신의 재배 년차에 따른 근수량 및 정유 성분 함량변화. 한국자원식물학회지 12, 27-30.
- 백수봉. 1989. 화채류 잣빛곰팡이병 방제를 위한 항생물질의 탐색과 활용기술 개발. 농시논문집 32: 205-210
- 송지숙, 류수노, 김관수, 방진기, 이봉호, 채영암. 1998. 식물성 정유의 분석기술과 농업분야 이용. 한국국제농업개발학회지 11(1), 107-125.
- 임요섭, 박영민, 박문수, 김길요, 김명조, 최용화. 2000. 국내자생식물의 항산화 및 항미생물 활성 탐색. 약용작물학회지 8: 342-350.
- 정해근, 방진기, 성낙술, 김성민. 2003. 자원식물의 기능성 정유 성분 이용고찰. 한국작물학회지 48(S), 41-48.
- 한상미, 배기환, 최관삼. 1998. 미국자리공(*Phytolacca americana*)에서 추출한 생물활성 물질의 동정 및 생물검정에 관하여. 한국생태학회지 21: 35-45.