

GOVP1200812060

최 종 보 고 서

최      중  
연구보고서

T0023754

차나무 탄저병 및 겹등근무늬병 방제전용  
미생물제제 개발 및 상품화에 관한 연구

**Development and Commercialization of  
Antagonistic Bacterial Biofungicide against  
Anthracnose (*Colletotrichum theae-sinensis*) and  
Gray blight (*Pestalotiopsis longiseta*) on tea  
plants**

연 구 기 관  
순 천 대 학 교

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “차나무 탄저병 및 겹등근무늬병 방제전용 미생물제제 개발 및 상품화에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 24일

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 고 영 진

세부연구책임자 : 허 재 선

협동연구기관명 : 코엔바이오

협동연구책임자 : 염 규 진

# 요 약 문

## I. 제 목

차나무 탄저병 및 겹등근무늬병 방제전용 미생물제제 개발 및 상품화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라의 차나무 재배면적은 1980년대까지는 500ha 이하였었지만 2000년 1,419ha, 2003년 2,360ha로 증가 추세를 보이면서 최근에 녹차산업이 급속도로 성장하고 있다. 차나무 재배면적의 증가와 집약적인 대단위 다원조성으로 차나무 병해 발생과 피해가 급증하고 있는데, 차나무에 발생하는 식물병 중에서 탄저병(anthracoise, 병원균 *Colletotrichum theae-sinensis*)과 겹등근무늬병(Gray blight, 병원균 *Pestalotiopsis longiseta*, *Pestalotiopsis theae*)이 가장 큰 피해를 주는 주요 병해로 밝혀졌다. 그러나 차나무 대단위 재배농가에서 농약의 지속적인 살포로 이미 copper hydroxide, thiophanate-methyl 등 일부 약제에 대한 저항성 균주의 출현과 식품 잔류독성 문제 등 화학적 방제의 한계가 드러나고 있다. 따라서 녹차산업의 지속적인 성장을 이끌어갈 성공적인 차나무 재배를 위해서는 화학 약제를 대체할 새로운 방제 약제의 개발을 통한 종합적 방제 체계 확립이 시급한 실정이다. 따라서 환경친화적이면서 지속적인 녹차산업을 선도할 수 있는 차나무 주요 병해에 대한 종합적 방제 체계 확립을 위한 출발점으로 차나무 재배에서 가장 큰 애로사항으로 대두되고 있는 탄저병과 겹등근무늬병을 동시에 방제할 수 있는 미생물제제를 개발하고 상품화하고자 본 연구를 수행하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

차나무 엽권 길항미생물을 이용한 차나무 탄저병 및 겹등근무늬병 방제전용 미생물제제 개발을 위하여 녹차 재배지역 서식 토착 우수 길항균주 수집 및 선발하여 선발균주의 대량 증식 및 내생 포자 다량 생성 조건 구명하고 엽권 정착 및 생존 기능을 강화한 제형화 연구를 실시하여 최종 제형을 선발하였다. 차나무 탄저병 및 겹등근무늬병 방제전용 미생물제제의 현장 적용 기술 개발을 위하여 미생물제제 최적살포 시기 추정을 위한 차나무 탄저병 및 겹등근무늬병 발생소장을 조사하고 선발된 길항미생물 균주의 실내 검증을 실시하였으며, 길항미생물의 현장 적용 monitoring

을 위한 항생제 저항성 돌연변이 균주를 개발하였다. 돌연변이 균주를 이용하여 개발된 시제품 미생물제제에 대한 현장 적용 평가를 실시하였으며, 최종 개발된 미생물제제의 현장 적용 평가를 통하여 차나무 탄저병 및 겹등근무늬병 방제 효과 검증 및 방제프로그램을 개발하였다. 연구개발된 미생물제제의 대량생산 프로세스 개발 및 상품화를 위하여 선발 길항미생물의 대량배양 시스템을 개발하였으며, 실험실 개발 제형의 대량 생산을 위한 프로세스를 개발하여 시제품 생산 및 시제품의 품질 평가를 실시하였고 마지막으로 개발된 미생물제제의 사업화를 위하여 제품 등록 및 상품화를 위한 제반 작업을 실시하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

차나무 엽권으로부터 차나무 탄저병과 겹등근무늬병에 우수한 길항력을 보이는 토종길항세균을 선발하여 형태적, 생리생화적, 분자생물학적 방법을 이용하여 최종적으로 *Bacillus subtilis*로 동정하고 선발 길항세균을 *B. subtilis* BD3010으로 명명하여 국제특허출원목적으로 균주기탁을 실시하였다. 길항세균 *B. subtilis* BD3010의 최적배양조건으로는 탄소원 maltose와 starch를, 질소원으로 yeast와 tryptone을 선발하고 최적 배양온도는 30°C, pH는 7인 것을 규명하였다.

대량배양을 통해 확보한 길항세균을 이용하여 사용편의성, 균주 안정성, 녹차 품질 등을 고려하여 미생물제제 제형화를 실시하여 최종적으로 액상수화제를 개발하였으며, 개발된 액상수화제의 완제품의 균밀도는  $1.5 \times 10^{10}$  CFU/ml로 나타났으며, 보존 유지제로 0.9% NaCl을 첨가하여 1년 이상 상온에서 길항균의 안정성이 유지되는 것을 확인하였다.

개발과정에서 미생물제제의 현장적용 fitness 추적을 위하여 항생제 Rifampicine에 저항성을 지니는 돌연변이 균주 유도에 성공하여, 선발 길항균의 적응성을 실내 실험을 통해 확인한 결과, 10일 간격으로 3회 이상 처리한 경우 처리한 길항균을 차나무 엽권에서 검출할 수 있었고 검출율은 살포 농도 대비 약 10%정도인 것으로 조사되었으며, 이러한 농도에서도 탄저병에는 약 71%, 겹등근무늬병에는 약 77%의 병방제 효과가 있는 것으로 나타났다.

개발된 시제품 미생물제제를 이용하여 2006년도에 차나무 재배 포장에서 현장적용평가를 실시한 결과, 전체적으로 발병엽률이 낮아서 방제가를 산출하여 미생물제제의 효과를 단순 비교하기에는 타당성이 낮아 보이지만 겹등근무늬병에 대한 방제가를 산출한 결과 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 처리구의 방제가는 52.4%, 미생물제제를 1주일 간격으로 6회 살포한 처리구에서는 66.7%, 미생물제제와 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구에서는 71.4%, 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 4회 살포구에서는 85.7%의 방제가를 나타내었다. 미생물제제를 여러 가지 살포횟수와 살포간격으로 처리하여 방제효과를 비교한 결과 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일

간격 4회 살포구의 85.7%의 방제가를 나타낸 반면에 미생물제제와 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구에서 70%이상의 방제가를 나타내었다. 따라서 미생물제제와 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포하는 것이 화학약제의 사용을 절감하고 방제효과를 높일 수 있는 친환경적 차나무 겹등근무늬병 방제 프로그램으로 개발하였다.

또한 탄저병에 대한 방제가를 산출한 결과 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 처리구의 방제가는 54%, 미생물제제를 1주일 간격으로 6회 살포한 처리구에서는 72%, 미생물제제와 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구에서는 76%, 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 4회 살포구에서는 88%의 방제가를 나타내었다. 미생물제제를 여러 가지 살포횟수와 살포간격으로 처리하여 방제효과를 비교한 결과 화학약제(트리후민 수화제) 1주일 간격 4회 살포구의 88%의 방제가를 나타낸 반면에 미생물제제와 화학약제(트리후민 수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구에서 76%이상의 방제가를 나타내는 것으로 보아 미생물제제와 화학약제(트리후민 수화제) 1주일 간격으로 2회 교대 살포하는 것이 화학약제의 사용을 절감시키면서 방제효과를 극대화시킬 수 있는 친환경적 차나무 탄저병 방제 프로그램으로 개발하였다.

미생물제제의 대량생산 및 사업화를 위하여 200L 규모의 대량배양 발효장치를 자체 개발하였으며, 미생물제제 대량 생산을 위한 표준 공정을 개발하였다. 실험실에서 도출된 연구결과를 기준으로 대량배양 및 생산을 위한 공정배지로 감자가루(4g/L)+Dextrose(20g/L)+탈지분유(5g/L)를 최종 결정하였으며 Wetting agent로 Tween-20을 선발하였고 계면활성제 및 slovent로는 Silicon oil을 선발하여 사용하여 제조한 액상수화제 미생물제제의 제조원가는 10ℓ 제품 기준으로 10,000원 내외로 책정되어 기존에 시판되고 있는 여타 미생물제제와 화학약제에 비하여 가격 경쟁력이 충분히 있을 것으로 판단되었다.

개발된 차나무 탄저병 및 겹등근무늬병 방제 전용 미생물제제는 제품등록(미생물제제 [10-(14)-나-12-2호])과 상표출원 ('차사랑' 상표출원(40-2007-0014580))을 완료한 상태이며 현재 완제품이 출시되어 시판 중이다. 앞으로 개발된 제품의 성능 향상을 위하여 핵심기술이 될 수 있는 Bacillus 속 세균의 내생포자 휴면타파 조절 기술 개발을 추진 중이며 이를 통하여 다균주 복합미생물제제 개발을 실시할 예정이다. 본 연구를 통하여 친환경농산물 인증을 희망하는 녹차재배 농가에게 실질적인 도움을 줄 수 있는 친환경 미생물제제와 방제프로그램이 개발되어 녹차재배 농가의 소득 증대와 개발된 미생물제제의 사업 촉진이 예상된다.

# SUMMARY

## (영문 요약문)

### I. Title

Development and Commercialization of Antagonistic Bacterial Biofungicide against Anthracnose (*Colletotrichum theae-sinensis*) and Gray blight (*Pestalotiopsis longiseta*) on tea plants

### II. Purpose and Background

Tea cultivation area covered less than 500 ha until the late 80's in Korea. However, the cultivation area rapidly increased upto 2,360ha during the last decades and tea industry is one of the fast growing business sectors in Korea. Along with the intensive cultivation of tea plants, anthracnose (*Colletotrichum theae-sinensis*) and gray blight (*Pestalotiopsis longiseta*) became the most serious problem in tea production. Control of these diseases is mainly dependent on chemical fungicides, which already caused the emergency of copper hydroxide and thiophanate-methyl resistant strains in the field. Thus there is a need for new solutions to substitute the current fungicides for successful tea cultivation with minimizing negative consequences for human health and environmental protection. For this purpose, development and commercialization of the biofungicide based on antagonistic bacteria isolated from tea leaves was attempted to achieve environment-friendly control of the disease on tea plants.

### III. Research scope and activity

Useful antagonistic bacteria were isolated from tea leaves to develop the biofungicide for environment-friendly control of anthracnose and gray blight on tea trees. Optimum cultural conditions of the selected antagonists were also determined for mass culture of the antagonists. Formulation of the biofungicide was tried with use of endospore forming-cell

culture. For the successful application of the biofungicide, disease progress of the pathogens were investigated in the field. Rifampicine-resistance mutant was induced to monitor ecological fitness of the antagonist. The fitness was also investigated with use of the mutant in the field conditions to evaluate their performance on tea leaves. In final year, the biofungicide were applied in the field to evaluate their colonization and control efficiency in tea plantation field. Based on the field investigation, biofungicide spray program was develop with use of chemical fungicide together. For industrialization of the biofungicide, mass production system of the antagonist and manufacturing processes of the biofungicide were designed and developed. To compromise the cost-benefit of the biofungicide production, modified cultural conditions were also established in a mass production scale. commercialization of the biofungicide were also tried by preparing registration of the antagonist and the product.

#### **IV. Results and future works**

*Bacillus subtilis* BD0310 isolated from tea leaves was used for the development of a biofungicide against *Pestitalotiopsis longiseta* and *Colletotrichum theae-sinensis* causing gray blight and anthracnose of tea plants. The isolate was deposited at Korean Type Culture Center (KTCC) for international patent right. The optimum growth conditions were investigated for the mass cultivation of the microbial agent. The optimum temperature were determined at 30oC and the optimum initial pH was pH 7.0 in nutrient broth. Among the tested carbon sources, maltose and starch were found to increase antifungal activity of the microbial agent. Yeast extract and tryptone apparently increased antifungal activity of the agent against the pathogens.

After mass culture of the antagonistic bacteria, formulation of the biofungicide were tried in a suspension concentrate. A final product of the formulated biofungicide showed bacterial cell density of  $1.5 \times 10^{10}$  CFU/ml of 0.9% NaCl with feasible cell stability and activity for 1 year at the ambient temperature. Refampicine-resistant mutants of the antagonist were successfully induced to monitor ecological fitness of the antagonist in the field. The mutants were detected on the tea leaves in the application of the biofungicide more than 3 times at 10 days interval with the maximum recovery rate of 10% of applied cell density. Even under the cell density,

gray blight and anthracnose on tea leaves were successfully suppressed with control efficiency of 71% and 77%, respectively.

In the field investigation under application of the biofungicide in 2006, control efficiencies were evaluated to be 52.4%, 66.7%, 71.4% and 85.7% against gray blight and 54%, 72%, 76% and 88% against anthracnose in 4 times spray of the biofungicide alone at 7 days interval, 6 times spray of the biofungicide alone at 7 days interval, 2 times alternate spray of biofungicide and chemical fungicide at 7 days interval and 4 times spray of chemical fungicide alone at 7 days, respectively. Therefore, the alternate application of the biofungicide and chemical fungicide at 7 days interval can increase the control efficiency with reduction of the amount of chemical fungicides for the control of gray blight and anhracnose in the field.

For industrialization of the biofungicide, mass production system of the antagonist and manufacturing processes of the biofungicide were designed and developed. at the scale of 200 L culture. Nutrient sources for mass production were modified to be the mixture of potato powder (4g/L), dextrose(20g/L) and powdered skim milk (5g/L). Tween-20 and silicon oil were also determined to be wetting agent and surfactant, respectively. The production cost of the biofungicide were estimated to be cheaper than 10,000 Korean won (approx. 10 USD) per 10 L of marketable volume. This price is fairly reasonable compare to other biofungicides and even to chemical fungicides. The biofungicide is now on sale in the market under the name of Cha Sa Rang with production permission from local authority. The biofungicide can contribute to higher income of the environment-friendly production farmers and protection of agricultural environment for tea production.



# CONTENTS

Chapter 1 General introduction -----	9
Part 1. Research purpose -----	9
Part 2. Research background -----	9
Chapter 2 Current status of Research and development -----	12
Part 1. Research and development in Korea -----	12
Part 2. Oversea Research and development -----	14
Chapter 3 Research activity and results -----	15
Part 1 Disease progress of anthracnose and gray blight on tea plants -----	15
Part 2 Isolation of antagonistic bacterial against anthracnose and gray blight -----	17
Part 3 Determination of cultural condition for mass production -----	22
Part 4. Formulation of biofungicide -----	29
Part 5. Indoor investigation of biofungicide -----	36
Part 6. Development of application technology of biofungicide in the field -----	44
Part 7. Evaluation of ecological fitness of biofungicide with use of mutant -----	48
Part 8. Disease control trial of biofungicide in the field -----	53
Part 9. Improvement of biofungicide with use of mixturs of antagonistic bacteria -----	58
Part 10. Development of mass cultural system and manufacturing process of biofungicide production -----	64
Chapter 4. Achievement and contribution of the results to other related research areas -----	70
Chapter 5. Application plan of the results -----	73
Chapter 6. Recent oversera information on the research areas -----	75
Chapter 7 References -----	76

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	9
제 1 절	연구개발의 목적 -----	9
제 2 절	연구개발의 필요성 -----	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	12
제 1 절	국내 기술 개발 동향 -----	12
제 2 절	국외 기술 개발 동향 -----	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	15
제 1 절	차나무 겹등근무늬병과 탄저병의 발생실태 -----	15
제 2 절	차나무 겹등근무늬병과 탄저병균에 대한 길항세균 선발 -----	17
제 3 절	길항세균의 대량 배양 조건 구명 -----	22
제 4 절	엽권 정착 및 생존 기능을 강화한 길항세균의 제형화 -----	29
제 5 절	미생물제제의 방제효과 실내 및 온실 검정 -----	36
제 6 절	미생물제제의 현장 적용 기술 개발 -----	44
제 7 절	형질전환균주를 이용한 미생물제제의 현장 적용 평가 -----	48
제 8 절	미생물제제를 이용한 차나무 겹등근무늬병 및 탄저병 방제 -----	53
제 9 절	제품 기능 향상을 위한 다균주 혼합 2세대 미생물제제 개발 선행 연구 -----	58
제 10 절	차나무 탄저병 및 겹등근무늬병 방제 전용 미생물제제의 대량생산 프로세스개발 및 상품화 -----	64
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	70
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 -----	73
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	75
제 7 장	참고문헌 -----	76

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

차나무(*Camellia sinensis* O. Kuntze)는 동백과에 속하는 아열대성 목본상록식물로 연평균 기온이 13℃ 이상인 지역에 광범위하게 분포하고 있으며, 아시아를 중심으로 아프리카, 남아메리카 등 30여개국 이상에서 재배되고 있다. 우리나라에서는 소수의 대규모 다원을 제외하고는 대부분의 농가가 소규모로 다원을 경영하고 있다. 그러나 우리나라의 차나무 재배면적은 1980년대까지는 500ha 이하였었지만 2000년 1,419ha, 2003년 2,360ha로 증가 추세를 보이면서 최근에 녹차산업이 급속도로 성장하고 있다.

차나무 재배면적의 증가와 집약적인 대단위 다원조성으로 차나무 병해 발생과 피해가 급증하고 있는데, 차나무에 발생하는 식물병 중에서 탄저병(anthracoise, 병원균 *Colletotrichum theae-sinensis*)과 겹등근무늬병(gray blight, 병원균 *Pestalotiopsis longiseta*, *Pestalotiopsis theae*)이 가장 큰 피해를 주는 주요 병해로 밝혀졌다.

차나무 병해 관리가 재배 기술적 측면에서 해결해야 할 시급한 문제로 대두됨에 따라 차나무에 피해를 주는 주요 병해인 탄저병과 겹등근무늬병의 발생 생태, 병발생 및 진전 조건 등 기초적인 병역학 연구 및 방제약제 선별, 등록 및 약제살포프로그램 개발 등 화학적 방제 연구가 수행되고 있다.

그러나 차나무 재배농가에서 농약의 무분별한 살포로 이미 copper hydroxide, thiophanate-methyl 등 일부 약제에 대한 저항성 균주의 출현과 식품 잔류독성 문제 등 화학적 방제의 한계가 드러나고 있다. 따라서 녹차산업의 지속적인 성장을 이끌어갈 성공적인 차나무 재배를 위해서는 화학 약제를 대체할 새로운 방제 약제의 개발을 통한 종합적 방제 체계 확립이 시급한 실정이다.

따라서 환경친화적이면서 지속적인 녹차산업을 선도할 수 있는 차나무 주요 병해에 대한 종합적 방제 체계 확립을 위한 출발점으로 차나무 재배에서 가장 큰 애로사항으로 대두되고 있는 탄저병과 겹등근무늬병을 동시에 방제할 수 있는 미생물제제를 개발하고 상품화하고자 본 연구를 수행하였다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

- 최근 20년 동안 우리나라 녹차 생산량 및 소비량이 비약적으로 성장함.
- 녹차 재배면적의 증가와 집약적인 대단위 다원조성으로 차나무 병해 발생과 피해가 급증하고 있어 차나무 병해 관리가 재배 기술적 측면에서 해결해야 할 시급한 문제로 대두됨.
- 영년생 작물인 차나무에 발생하는 식물병 중에서 탄저병 (anthracnose, 병원균 *Colletotrichum theae-sinensis*)과 겹둥근무늬병(gray blight, 병원균 *Pestalotiopsis longiseta*, *Pestalotiopsis theae*)이 가장 큰 피해를 주는 주요 병해로 밝혀짐.
- 차나무 탄저병과 겹둥근무늬병에 대한 기초적인 병역학 연구(병원균의 발생 생태, 병발생 및 진전 조건) 및 화학적 방제 연구(약제 선발, 등록 및 약제살포프로그램) 등이 수행됨.
- 그러나, 녹차 재배농가에서 농약의 무분별한 살포로 이미 일부 약제(copper hydroxide, thiophanate-methyl)에 대한 저항성 균주의 출현과 식품 잔류독성 문제 등 화학적 방제의 한계가 드러나고 있음.
- 따라서, 녹차산업의 지속적인 성장을 이끌어갈 성공적인 녹차 재배를 위해서는 화학 약제를 대체할 생물농약(미생물제제)의 개발을 비롯한 IPM 체계 확립이 시급함.
- 현재 국내에서 차나무 탄저병과 겹둥근무늬병 방제를 위한 전용 생물농약(미생물제제)은 전무한 상태이며, 본격적인 연구 개발이 시도되지 않음.
- 국내·외에서 개발된 생물농약들은 대부분 토양전염성 식물병을 대상으로 개발되어 엽권부에 발생하는 차나무 탄저병과 겹둥근무늬병 방제에는 부적합함.
- 따라서, 국내 녹차 재배지역의 차나무에서 분리한 토착 길항미생물을 주원료로 하는 차나무 전용 생물농약(미생물제제)의 개발이 시급함.
- 차나무 전용 생물농약(미생물제제)은 국내 생산 농가의 고소득 작물이며, 수출 유망품목으로 발전 가능한 고품질 생엽차 재배 및 생산 향상을 위하여 반드시 개발해야하는 핵심 농업용 신소재임.

### 2. 경제·산업적 측면

- 국내 녹차 산업은 최근 20년간 생산과 소비의 꾸준한 증대로 성장산업으로 발돋움하였음에

도 불구하고 아직 1인당 소비수준이 크게 낮은 편인데, 최근 건강식품으로 인식되면서 다양한 녹차가공품이 개발되고 이들 상품에 대한 소비 증대가 기대되어 산업규모의 확대 여지가 충분함.

- 녹차는 고부가가치의 경제작물이면서 다양한 가공품 개발과 관광 상품화를 통하여 지역 경제에 큰 영향을 주고 있어서 주요 녹차 재배지역인 남해안 일대와 제주도에서 지역 전략작목으로 재배를 확대시키고 있음 (주요 녹차산지인 보성군의 경우, 산업연관효과를 감안하면 녹차 및 녹차 관련 산업의 규모가 연간 1,189억원로 추정하고 있음).
- 그러나, 2004년부터 녹차시장 개방으로 무한경쟁시대가 도래하여 중국이나 일본에 비해 매우 취약한 구조를 지니고 있는 국내 녹차산업의 보호 및 육성을 위한 특화 전략이 필요함 (국내 녹차는 생산성 면에서 일본이나 중국에 비해 현저하게 경쟁력이 낮지만 차잎 자체가 가지고 있는 녹차의 기능성 성분은 외국종에 비하여 국내 재래종이 훨씬 우수함).
- 현재 차나무 병해 방제를 위하여 대다수 다원에서 시행하는 무분별한 약제 방제는 잔류농약에 의한 식품안전성과 인체위해성 문제를 대두시키기 때문에 수출 농산물로 부적격할 뿐만 아니라 저가의 수입 녹차와의 차별성을 통한 국내 녹차 산업 육성 및 보호에도 가장 큰 걸림돌로 작용함.
- 따라서, 농산물 수입 자유화에 대비하여 국내 녹차 생산농가의 경쟁력 확보와 수출 산업으로의 육성을 위해 친환경 재배가 유력한 대안으로 대두됨.
- 현재까지 친환경 재배를 위한 병해관리 기술로 탄저병 저항성 차품종 육성 및 무기염류 처리 기술이 일부 개발된 상태이지만 차나무 탄저병과 겹등근무늬병 방제를 위한 전용 생물농약(미생물제제)은 전무한 상태이므로 차나무에 발생하는 주요 병인 탄저병과 겹등근무늬병에 효과가 탁월한 생물농약(미생물제제) 개발이 절실함.
- 친환경농업을 위한 농업용 신소재 개발 사업으로서 생물농약(미생물제제) 개발은 국내 농업 관련 생물벤처산업 및 지역 실정에 필요한 특화산업 육성이라는 시대적 요청에 부합하고, 차별성을 갖춘 지역 특화산업 육성을 통한 지역사회 안정과 지역경제 활성화 도모에도 필요함.

### 3. 사회·문화적 측면

- OECD국 2004년까지 농약생산량 30% 감축(1999년 농약총생산량 기준), 수출입농산물 잔류검사, 살포총량 규제 강화로 특정 농약 생산 금지, 총생산량 규제 강화 추세임.

- 소비자의 소비행태 조사결과, 녹차에 대한 이미지는 건강식품(63.1%), 맛과 향으로 마시는 식품(20.9%)으로 인식하고 있어 일반인들의 소비 선호도가 매우 높기 때문에 식품 안정성 및 인체위해성에 대한 철저한 관리가 필요함.
- 건강식품으로서 식품안정성과 인체위해성 관리를 위해서는 농약잔류물 기준치 강화와 함께, 무 농약 유기재배기술의 보급을 통한 품질고급화가 절실함.
- 또한, 녹차 재배지역의 관광 상품화를 통한 지역경제 활성화뿐만 아니라, 도시인들에게 휴식 공간을 제공하고 있는 심미적 기능을 감안할 때, 환경친화적이며 지속가능한 녹차산업으로의 전환이 장기적 전략으로 필요하며, 이를 위해서도 무 농약 녹차 유기재배기술 보급이 절실하게 요청됨.
- 따라서, 무 농약 유기재배기술의 핵심인 병해충 방제를 위한 IPM 체계 확립이 시급하며, 이를 실현시키기 위한 전략으로 화학 약제를 대체할 생물농약 개발 시급함.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내 기술 개발 동향

- 국내에서 미생물농약과 생화학농약에 대한 연구는 1980년을 전후하여 기초적인 연구가 시작하여, 1987년에는 인삼 뿌리썩음병을 방제 약으로 바이코나의 개발을 시작으로, 1994년에는 역병 방제용 AC-1을 개발하는 등 여러 종류의 미생물농약이 개발돼 소개되었음.
- 생물농약 연구개발은 1990년대 후반부터 본격적으로 이루어졌으며, 한국화학연구원과 생명공학연구원 등의 정부출연연구소, 경상대학교, 순천대학교, 서울대학교 등의 대학교, 그리고 (주)동부농화학, (주)그린바이오텍, (주)비아이지 등의 기업체에서 연구를 진행해왔음.
- 국내에서는 미생물농약과 생화학농약 등록규정이 각각 2001년과 2005년에 정해짐에 따라 다양한 산/학/연 기관에서 본격적으로 연구를 추진하고 있음.
- 국내에는 살균제 5종과 살충제 14종 등 총 19개 품목의 미생물농약이 등록되어 있으나 (표 1) 이 중 12종은 수입 미생물임. 생화학농약의 경우 2005년에 등록 규정이 마련되어 현재까지 등록된 생화학농약은 없는 실정임.
- 현재 국내에서 시판중인 미생물농약들 중 살충제는 대부분 수입한 제품들인 반면에 살균제는 국내에서 자체 개발한 제품들 주종을 이룸.
- 이 밖에도 현재 국내에서는 살충, 살균 효과가 있다고 알려져 있는 미생물제제 및 생화학제제가 생물농약으로 등록되지 않고 전문적 기술력의 부족으로 개발 중에 제품화되어 유통되고 있는 제품들은 약 500 - 1,000여개, 생산업체만 해도 퇴비를 포함 200개가 넘는 것으로 추정되고 있으며, 현재 지속적으로 증가하는 추세에 있음.
- 우리나라 정부에서는 친환경농업정책의 효율적인 운영을 위하여 현재 친환경 농자재의 개발단계에 소요되는 경비의 일부를 업체에 지원할 예정이며, 또한 개발한 생물농약을 농민들이 구입할 때 보조하는 사업을 추진 중에 있기 때문에 효과가 우수한 생물농약의 개발이 촉진되고 또

한 생물농약의 시장은 급속도로 팽창할 것으로 추정됨.

표 1. 국내 미생물농약의 등록현황

개발	상 표	미생물	적용병해충	개발회사
국내 개발	솔빛채	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i>	배추좀나방	그린바이오텍
	탑시드	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	흰가루병	"
	썰러스	<i>Bacillus subtilis</i>	잣빛곰팡이병	"
	큐팩트	<i>Ampelomyces quisqualis</i>	흰가루병	"
	쎄이프그로	<i>Streptomyces colombiensis</i>	잎집무늬마름병	KIBC
	마이코싸이드	<i>S. goshikiensis</i>	잣빛곰팡이병	"
	토박이	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i>	배추좀나방	동부한농
해외 개발	슈리사이드	<i>B. thuringiensis</i>	복숭아심식나방	수입
	영일비티	<i>B. thuringiensis</i>	나방류	
	스콜피온	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i>	나방류	
	비오칸	<i>B. thuringiensis</i>	배추좀나방	
	바이오비트	<i>B. thuringiensis</i>	나방류	
	툰업	<i>B. thuringiensis</i>	배추좀나방	
	그물망	<i>B. thuringiensis</i>	배추좀나방	
	엠페릴	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i>	배추좀나방	
	비겔	<i>B. thuringiensis</i>	파좀나방	
	삼공비티	<i>B. thuringiensis</i>	나방류	
	바이충	<i>B. thuringiensis</i>	나방류	
	미성살충탄	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i>	나방류	

- 정부에서는 농산물의 시장 개방이 앞으로 가속화됨에 따라 농업에서의 경쟁력 확보차원에서도 친환경농산물의 생산을 더욱 확대하기 위한 정책을 펴고 있음.
- 현재 국내에서 판매되고 있는 제품들 중에서 사용 방법 및 경제적 가치의 부지로 품목당 매출액이 5억 원 이상이 되는 제품은 없으나 시장이 팽창하고 또한 미생물농약 및 생화학농약으로 등록이 활발하게 진행된다면 2010년도에는 품목당 30억 원의 제품이 등장할 것으로 기대됨.
- 생물농약 개발 과정에는 고도의 기술 및 전문성이 필요한 부분과 생산성이 떨어지는 발효기



등이 필요한데 이러한 종류는 미생물의 분리, 동정, 생리활성 물질의 분리, 동정, 대량생산 공정 개발, 제제, 안전성 평가, 포장시험 등이 필요하고, 기술적 자료를 근거로 국가별로 상당한 비용 및 많은 시간이 소요되는 등록자료 생산 및 심의절차가 필요함.

- 우리나라의 경우에는 아직까지 생물농약 개발 분야에 대한 연구는 성장 초기 단계로서 대부분의 기술들은 한국화학연구원, (주)그린바이오텍, (주)동부한농화학, (주)비아이지, (주)LG생명과학 등의 연구기관과 기업체를 중심으로 선진국 대비 70%정도 갖추고 있는 실정이나, 대량 발효 공정 기술 및 제형화 기술은 선진국 수준에 비하여 크게 부족한 실정임.
  
- 그러므로 세계적으로 급성장하고 있는 세계 생물농약 시장에 국내 제품이 진입하기 위해서는 정부의 체계적인 지원 하에 산/학/연이 상호 협력하는 종합적인 연구를 진행해야 하는 것이 절실히 필요함. 이렇게 함에 따라 국내 생물농약개발 기술이 선진국 수준으로 발전하고 또한 수출 가능한 생물농약 제품이 개발될 것으로 기대됨.
  
- 차나무의 친환경 병방제를 위한 생물농약은 아직 등록되어 있지 않은 상태이며, 친환경재배 농가에서는 다른 병방제를 목적으로 개발된 생물농약(미생물제제 및 천연물농약)을 이용하고 있어 빠른 시일 내에 차나무 진균성 병해 방제 전용 미생물농약이 개발되기를 기대하고 있음. 따라서 본 연구를 통하여 국내 최초로 차나무 겹등무늬병 및 탄저병 방제 전용 미생물제제를 최초로 상품화하여 농가에 보급할 수 있게 되며, 친환경농산물인증을 희망하는 차나무재배 농가에 곧 바로 활용되어 신규 시장을 개척할 수 있는 가능성이 높음.

## 제 2 절 국외 기술 개발 동향

- 생물농약의 최초연구는 1927년 감자 더듬이병 방제용으로 방선균을 이용한 것으로 시작.
- 생물농약의 경우에는 대기업보다는 주로 벤처기업이나 중소기업들이 주도적으로 시장을 선도하고 있음. 이들 중에서 연간 500억원 이상의 매출의 비교적 큰 규모의 회사로는 Valent BioSciences사, Certis USA사, Koppert사 등이 있으며, 작지만 성공적인 회사로 평가받고 있는 회사로는 AgraQuest사, BioWorks사 및 E-nema사 등이 있음. 그리고 혁신적인 기술로서 이제 막 시작하는 회사로는 Pasteuria BioSciences사, Exosect사 등이 있음.
- 이들 회사들은 각국 정부의 친환경농업정책의 일환으로 정부로부터 정책적 후원을 받으면서, 독자적으로 미생물과 천연물을 선발하거나 대학 및 연구소로부터 아웃소싱을 통하여 우수한 후보물을 확보하여 생물농약을 개발하고 있음.
- 2002년 현재 미국 EPA에는 76개의 미생물농약과 113개의 생화학농약(Biochemical pesticides)이 등록되어 있음 (표 2).

표 2. 주요 국가의 생물농약 제품 등록 현황

국가	미생물농약	생화학농약	천적	계	비고
미국	76	113	-	189	2002. 04
영국	96	51	54	201	2001. 12
일본	35	-	25	60	2002. 07
한국	9	-	-	9	
계	216	164	79	459	
비율	47%	36%	17%	100%	

- 유럽의 경우에는 미국과 그 정의가 조금 다르지만 BCPC(British Crop Protection Council)에서 출판한 “The Manual of Biocontrol Agents, 3rd edition”에 따르면 미생물농약이 112개가 등록되어 시판되고 있으며, 천연물농약은 58개가 등록되어 있고, Semiochemicals, 즉 반합성화합물 농약이 56개가 등록되어 있음.

- 미국의 경우에는 천적이 생물농약에 포함되어 있지 않음. 이들 선진 3개국(미국, 영국, 일본)의 생물농약 중에서 미생물농약과 생화학농약의 비율은 각각 46%와 36%로서 전체의 82%를 차지하고 있음. 따라서 본 사업에서는 이들 두 가지 생물농약, 즉 미생물농약과 생화학농약 개발에 대한 연구를 하고자 함.
  
- 국외에서도 차나무 진균성 병해 방제 전용 생물농약(미생물제제 및 천연물 농약)은 아직 상품화 되지 않은 상태. 따라서 본 연구를 통하여 차나무 탄저병과 곱둥근무늬병 방제 전용 미생물제제를 최초로 개발하여 일본, 중국, 대만 등 동아시아 주요 차재배 국가를 상대로 수출 가능성이 매우 높은 상태.

### 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

#### 제 1 절 차나무 꺾등근무늬병과 탄저병의 발생실태

##### 1. 차나무 꺾등근무늬병의 발생소장

우리나라 차 생산의 50%이상을 차지하고 있는 주요 차나무 재배지인 전남 보성군에서 2004년 6월 30일부터 10월 30일까지 약 10일 간격으로 14회에 걸쳐 차나무 꺾등근무늬병 발생실태를 조사하였다. 전남농업기술원 차연구시험장에서 재배되고 있는 야부기다 품종에서 차나무 꺾등근무늬병의 발생소장을 조사하였다. 조사방법은 식재되어 있는 차나무 3 line(1×35 m<sup>2</sup>/ line)을 임의선정하고 1 line당 6구획씩 나누어 시험구내에서 20×20 cm의 정사각형의 철망을 이용하여, 철망내의 차나무 총엽수에 대한 발병엽을 처리당 3반복으로 조사하여 발병엽률로 환산하였다 (그림 1).

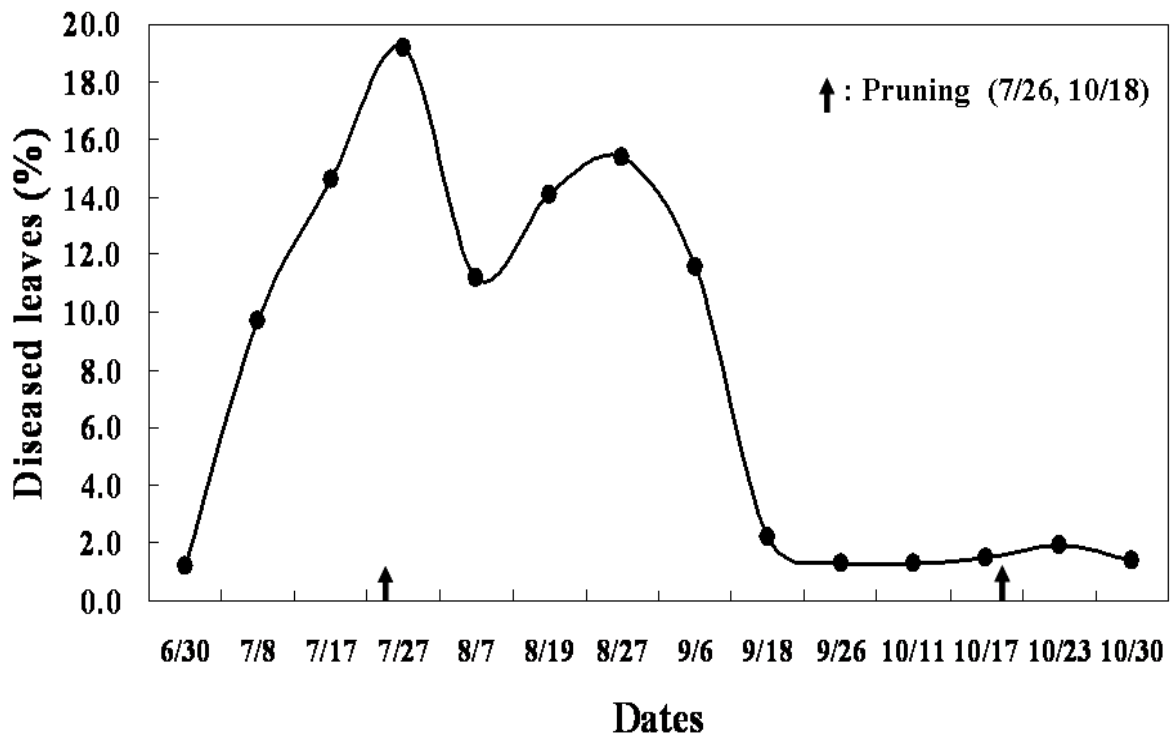


그림 1. 전남농업기술원 차연구시험장의 2004년도 차나무 생육기의 꺾등근무늬병 발생소장.

2004년 6월 30일 이전엔 차나무 잎에서 겹등근무늬병반을 거의 찾아 볼 수 없었으나, 6월 30일 이후엔 계속해서 증가하기 시작하여 7월 27일에 19.2%로 가장 높은 발병엽률을 나타냈다. 그러나 7월 26일 정지 후 8월 7일에는 11.2%로 발병엽률이 갑작스럽게 감소하였으며, 8월 18일부터 태풍 메기로 인한 장마로 8월 27일까지는 발병엽률이 계속해서 증가하였고, 9월 이후 새순이 3~5엽 이상 전개되었을 때에는 발병엽률이 불과 2% 내외를 나타내었으며, 10월 19일 정지 때도 발병엽률이 1.6%로 더 이상 발병엽률이 증가하지 않았다.

## 2. 차나무 탄저병의 발생소장

2004년 6월 30일부터 10월 30일까지 약 10일 간격으로 14회에 걸쳐 10년 이상 유기농법을 이용해 온 몽중산다원의 재래종에서 차나무 탄저병의 발생소장을 조사하였다. 조사방법은 식재되어 있는 차나무 3 line(1×35 m<sup>2</sup>/ line)을 임의선정하고 1 line당 6구획씩 나누어 시험구내에서 20×20 cm의 정사각형의 철망을 이용하여, 철망내의 차나무 총엽수에 대한 발병엽을 처리당 3반복으로 조사하여 발병엽률로 환산하였다 (그림 2).

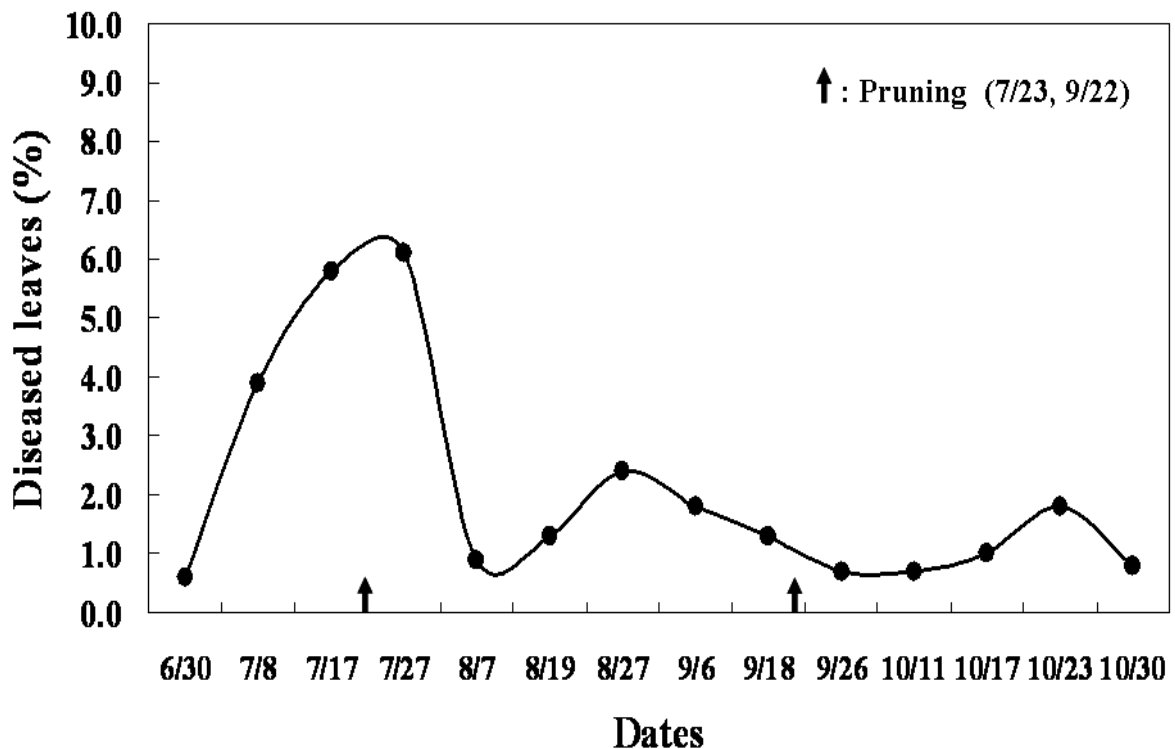


그림 2. 전남농업기술원 차연구시험장의 2004년도 차나무 생육기의 탄저병 발생소장.

차나무 탄저병의 발병엽률 또한 2004년 6월 30일 이전에 거의 찾아볼 수 없었고, 7월 27일 6.1%로 가장 높은 발병엽률을 나타내었으며 7월 23일 정지 이후엔 1% 내외의 발병엽률을 보였다. 8월 18일 태풍에 의한 장마로 갑자기 발병엽률이 증가하였고, 8월 27일 차나무 신엽이 3엽 이상 증가하여 발병엽률이 점점 감소하다 9월 22일 정지를 기점으로 발병엽률이 1~2%의 내외로 증가하지 않는 경향을 보였다.

### 3. 차나무 겹등근무늬병과 탄저병의 방제적기

차나무 겹등근무늬병과 탄저병은 6월말에 발생하기 시작해서 7월말에 최고 발병기에 도달하는 것으로 조사되었다. 차나무 겹등근무늬병과 탄저병이 8월까지도 계속해서 증가하리라 예상했었지만 7월말(7월 26일 차연구시험장/ 7월 23일 몽중산다원)에 정지에 의해 병든 잎들이 제거됨으로써 8월초에는 발병엽률이 급격한 하락을 나타내었다.

결국 전남 보성지역 차나무 재배지에서는 6월말부터 겹등근무늬병과 탄저병이 발생하기 시작하므로 미생물제제를 사용할 경우에는 겹등근무늬병과 탄저병이 발생하기 시작하는 6월말 전에 미생물제제를 살포해야 한다는 사실을 유추할 수 있었다.

## 제 2 절 차나무 겹등근무늬병과 탄저병균에 대한 길항세균 선발

### 1. 차나무 엽권으로부터 토착 길항세균의 분리 및 선발

전남 보성의 대한다엽과 몽중산다원에서 건전한 차나무 잎을 채취하여, 멸균수 300 ml에 채집한 잎 10개를 넣고 진탕배양기에서 1시간 동안 진탕배양 시켰다. 진탕배양한 멸균수를 항온수조에서 80°C, 15~20분 동안 멸균시킨 후 영양배지(Nutrient agar; NA)에 100  $\mu$ l를 분산 도말평판법으로 도말하여 24시간 후 단일균총을 순수분리하였다. 순수분리한 세균을 백금이로 PDA와 NA를 1 : 1로 혼합한 포도당 영양배지 정 가운데에 일직선으로 4.5 cm 길이로 접종하고 양 옆에 1.5 cm 간격을 두고 10일 동안 배양한 차나무 겹등근무늬병균 *Pestalotiopsis longiseta*의 균총과 차나무 탄저병균 *Colletotrichum theae-sinensis*의 균총 disc를 cork borer(9 mm)로 잘라 block을 올려놓은 후 25°C 항온기에서 7일간 배양하여 길항효과가 있는 세균을 분리하였다. 그 중 가장 높은 군사생장 억제효과를 보이는 균주를 선발하여 영양배지 (Nutrient broth; NB)에 단일균총을 넣고 24시간 배양하여 4,000rpm으로 20분간 원심분리하고 배양액 1 ml을 15% glycerol에 넣어 -80°C에 보관하였다.

한편 차나무 겹등근무늬병균과 탄저병균에 대하여 우수한 길항 효과를 나타내는 세균으로 선발된 BD0310균주 등 3개 균주를 NB에서 12시간 배양한 현탁액을 흡광도(Optical density) 560nm,  $1.43 \times 10^{12}$  cells/ml로 조정하여 접종원을 만들었다. 차나무 잎 표면을 수돗물로 깨끗이 행구고 9.57 mM, pH 7.5인 살균수(Phosphate Buffered Sulfate; PBS)에 다시 씻어 낸 후 filter paper에서 수분을 완전히 제거한 차나무 잎을 멸균된 가위로 상처를 내어 습실처리된 petri dish에 넣고, 25°C, 90% 이상의 습도에서 3일간 배양하여 길항세균을 접종하지 않은 대조구와 비교하여 길항세균에 의한 병발생 유무를 조사하였다.

차나무 잎에서 *B. subtilis* BD0310을 포함한 50여개의 균주를 분리하여 PDA와 NA를 1 : 1로 혼합한 포도당 영양배지상에 분리된 50여개의 세균과 차나무 겹등근무늬병균과 탄저병균을 대치 배양하여 25°C에서 7일간 배양하여 군사생장 억제효과를 확인한 결과 BD0310과 2개 균주가 군사생장 억제효과를 보였다.

그러나 분리된 3개 균주들은 모두 차나무 겹등근무늬병균과 탄저병균 군사생장 억제효과가 높았으나, BD0310만이 차나무에 병원성이 없었고 나머지 2개 균주는 차나무 잎을 갈변시키는 병적 증상을 일으켰다. 따라서 차나무에 병원성이 전혀 없는 것으로 확인되고 차나무 겹등근무늬병균과 탄저병균에 대해 군사생장 억제효과가 가장 뛰어난 BD0310을 차나무 겹등근무늬병균과 탄저병균에 대한 토착 길항세균으로 최종 선발하였다 (그림 3, 4).

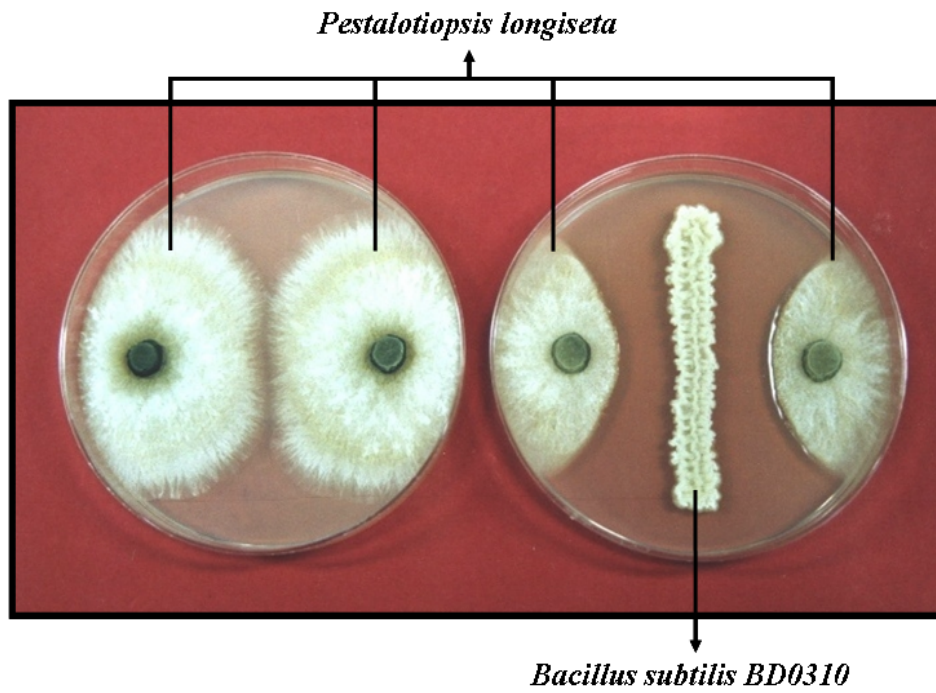


그림 3. 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주에 의한 차나무 겹등근무늬병균 *Pestalotiopsis longiseta*의 균사생장 억제.

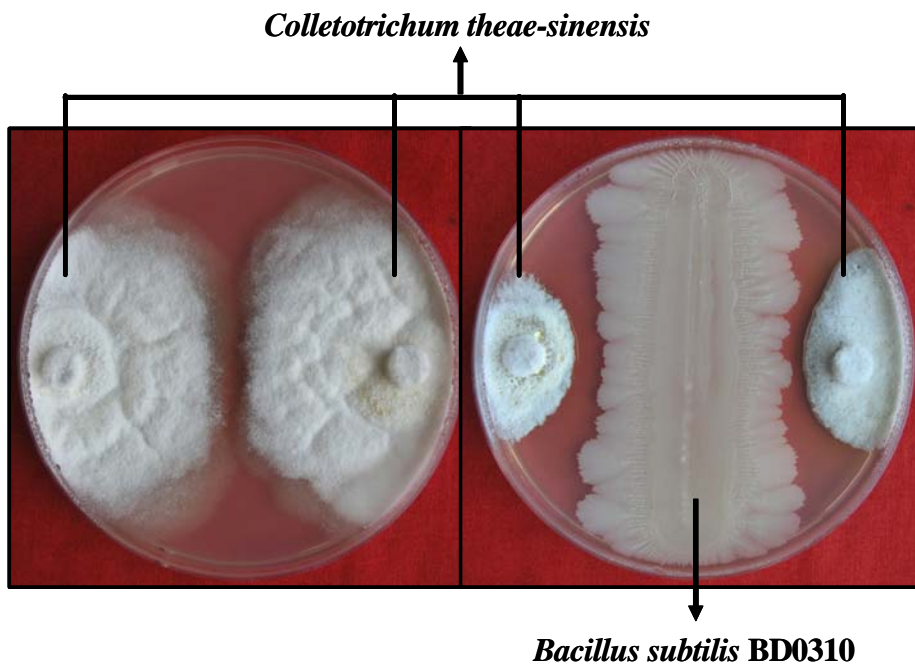


그림 4. 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주에 의한 차나무 탄저병균 *Colletotrichum theae-sinensis*의 균사생장 억제.



## 2. 차나무 엽권 길항세균의 동정

배지에서 길항 효과가 높은 길항세균을 동정하기 위해 Claus와 Berkeley(1986), Gullino(1992), Lee와 Choi(1985), Park, Lee, Kim과 Lee(1994), Park, Lee와 Lee(1995), Wilson과 Chalutz(1989)의 방법에 의한 미생물의 형태적 특성 및 생리·생화학적 특성 조사와 *AccuPrep* PCR Purification Kit를 이용한 분자생물학적인 방법에 의한 분석을 병행하였다. 형태적 특성으로는 Doetch법(Park 등, 1995)에 의해서 그람염색 및 형태를 관찰하였고, 세균의 크기와 형태는 광학현미경( $\times 1,000$ )과 1% PTA Negative염색하여 전자현미경(SEM)하에서 관찰하였다.

내생포자 형성유무 및 포자의 위치는 NB에서 24시간 진탕배양한 후배양액을 살균된 falcon tube에 2 ml씩 넣고, 80°C 에서 15분간 열처리하여 methylene blue로 염색하여 광학현미경( $\times 1,000$ )을 이용하여 관찰하였다. 생리·생화학적 특성으로는 혐기적 성장, 온도 45°C, pH 5, 7, NaCl 1~7%에서의 성장 유무, arabinose, mannitol, xylose에서 산 생성 유무, citrate의 이용 유무, starch 분해 및 Voges-Proskaur test를 조사하였다(강, 2000; 김, 1995; 이 등, 1999; Yoshida, 2001).

분자생물학적인 방법에 의한 분석으로는 길항세균의 세포를 분해하고 DNA를 extraction 한 후 PCR하여 전기영동하였다. 전기영동 후 band를 확인하고 RNA band를 잘라냈다. 잘라 낸 gel을 gel extraction kit를 이용해 extraction하고 PCR purification kit를 사용해 gene cleaning한 후 염기서열을 분석하여 NCBI에 입력된 염기서열과 상동성을 비교하여 종을 동정하였다.

차나무 겹등근무늬병균과 탄저병균에 길항력이 높은 BD0310 균주를 동정하기 위해 먼저 그람 염색법과 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰한 결과 그람양성의 간균이고 열처리시 내생포자를 형성하였다(그림 5, 6).

또한 차나무 겹등근무늬병균과 탄저병균에 길항력이 높은 BD0310 균주의 종을 동정하기 위하여 생리·생화학적 특성을 조사하고 Claus와 Berkeley(1986)의 *Bergey's manual*과 비교한 결과, 세균의 직경은 1.0  $\mu\text{m}$  이하였고, 혐기적 성장을 하였으며, 1~7% NaCl과 고온인 65°C에서도 생존하였다. 카세인, 젤라틴, 전분의 가수분해, 질산염 환원, Citrate 이용 그리고 V-P test에서 모두 양성반응을 보여 *Bacillus subtilis*로 1차 확인되었다 (표 3).

한편 BD0310 균주의 생리·생화학적 특성에 의해 *B. subtilis*로 동정된 결과의 신빙성을 재확인하기 위한 분자생물학적 동정 수단으로 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과, BD0310 균주의 염기서열이 Gene bank data내의 *B. subtilis*와 99.9%의 상동성을 보여 최종적으로 *B. subtilis*로 동정하였다 (그림 7).



그림 5. 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주의 그람 염색 사진.

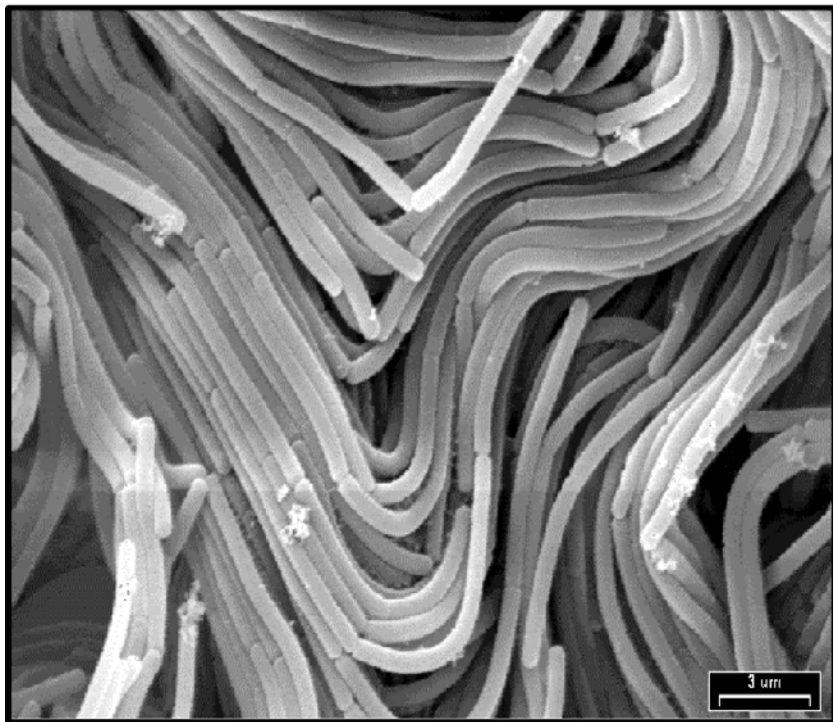


그림 6. 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주의 주사현미경 사진.

표 3. 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주의 생리·생화학적 특성

Characteristics	BD0310 isolate	<i>Bacillus subtilis</i> <sup>a</sup>
Cell diameter > 1.0 $\mu$ m	-	-
Spores round	-	-
Gram reaction	+	+
Form	rod	rod
Sporangium swollen	-	-
Parasporal crystals	-	-
Anaerobic growth	-	-
Voges-Proskauer test	+	+
Acid from :		
D-Glucose	+	+
L-Arabinose	+	+
D-Mannitol	+	+
D-Xylose	+	+
Gas from glucose	-	-
Hydrolysis of starch	+	+
Utilization of citrate	+	+
Growth at pH 5.7	+	+
Growth in NaCl		
2%	+	+
5%	+	+
7%	+	+
Growth at		
30	+	+
40	+	+
55	-	-
65	-	-

<sup>a</sup>Data from Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986).

Symbol: +, more than 90% of the strains are positive; -, more than 90% of the strains are negative.

AACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTOGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTG	60
ATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACT	120
CCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGNTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGG	180
TGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG	240
GCTCACCAAGGCNACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA	300
GACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT	360
CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG	420
GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC	480
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAT	540
TGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACC	600
GGGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAAGTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGT	660
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAAGGCGACTCTCTGGT	720
CTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG	780
TCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCOCTTAGTGCTGCAGC	840
TAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTG	900
ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTT	960
ACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCAGAGT	1020
GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA	1080
CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCG	1140
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCOCTTATGACCTGGGC	1200
TACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCC	1260
CACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCG	1320
CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGOCTTGACACACCGCC	1380
CGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGC	1440
CGCTGAAGGTGGACAGAG	1458

그림 7. 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주의 16S rDNA 염기서열.

### 제 3 절 길항세균의 대량 배양 조건 구명

#### 1. 길항세균의 길항력을 증가시키는 탄소원

길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주의 대량배양을 위한 기초실험으로 플라스크배양에서의 영양원, 온도 및 pH가 길항세균 생장에 미치는 영향을 조사하였다 (이, 2001; 문, 2002; Nguyen, 2004; Son 등, 2002) 모든 실험은 250 ml 플라스크에 배지량은 100 ml로 하였고, 121 , 1.2psi에서 20분간 살균한 후 길항세균을 NB에서 24시간 배양 (30°C , 160rpm)한 배양액 1 ml을 접종하여 수행하였다.

길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주의 차나무 겹등근무늬병균과 탄저병균의 균사생장 억제효과를 증진시키는 탄소원을 선별하기 위해, NB 배지에 0.05%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.005%  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 와 탄소원으로서 포도당(glucose), 과당(fructose), 유당(lactose), 맥아당(maltose), 갈락토스(galactose), 전분(starch), 소비톨(sorbitol), 이노시톨(inositol), 글리세롤(glycerol)을 각각 1.0%씩 첨가한 후 길항세균을 접종하고 30°C, 160rpm에서 진탕배양하였다. 5일간 배양 후, 4,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 필터(Milipore filter, 0.22  $\mu\text{m}$ )를 사용하여 여과시킨 후 PDA plate(두께 5 mm)에 cork borer(직경 9 mm)를 이용하여, 중앙에 hole(직경 9 mm)을 만들고 그 속에 paper disc(직경 9 mm)를 치상하여 길항세균배양액 300  $\mu\text{l}$ 를 넣어 무균상내에서 음건시키면서 흡수시켰다. 10일동안 PDA에서 배양한 차나무 겹등근무늬병균과 탄저병균 균총을 동일한 직경의 cork borer로 떼어낸 후 치상된 paper disc와 균총표면이 접촉하게 hole속에 넣어 25 °C 에서 7일간 배양시킨 후 균총의 성장 크기를 비교하여 길항세균 disc와 접촉하지 않은 무처리구와 병원균의 균총생장 크기와 상대적인 성장 등을 비교하여 조사하였다.

*B. subtilis* BD0310 균주의 길항력을 증가시키는 탄소원으로서 공시한 포도당(glucose), 과당(fructose), 유당(lactose), 맥아당(maltose), 갈락토스(galactose), 전분(starch), 소비톨(sorbitol), 이노시톨(inositol), 글리세롤(glycerol) 등 9개의 탄소원 중 차나무 겹등근무늬병균에 대해서는 maltose, 탄저병균에 대해서는 starch가 가장 효과적이었다 (그림 8, 9).

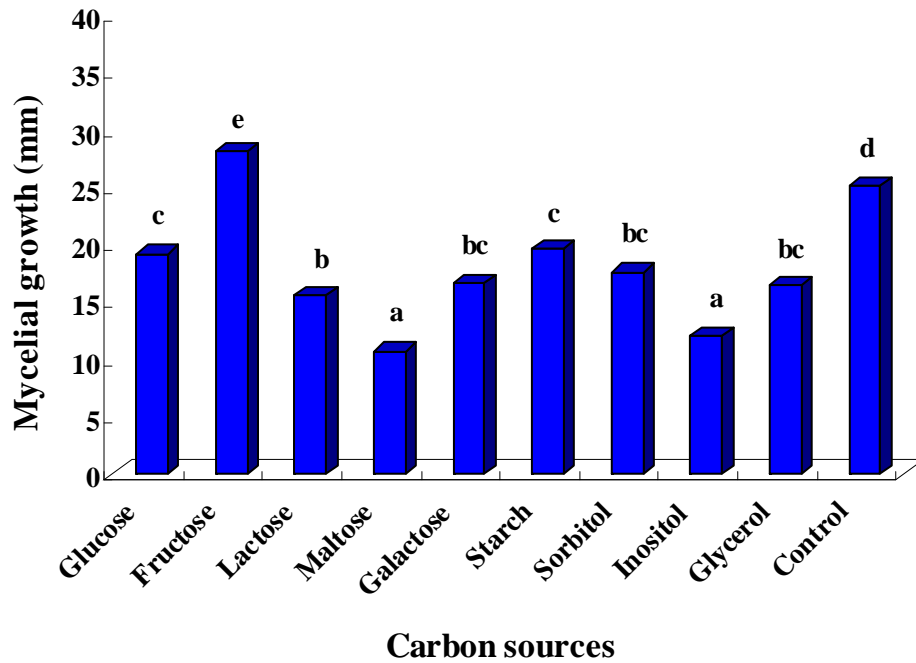


그림 8. 감자한천배지에서 차나무 검둥근무늬병균 *Pestalotiopsis longisetata*에 대한 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주의 항균활성을 증대시키는 탄소원 (DMRT.at  $P=0.05$ ).

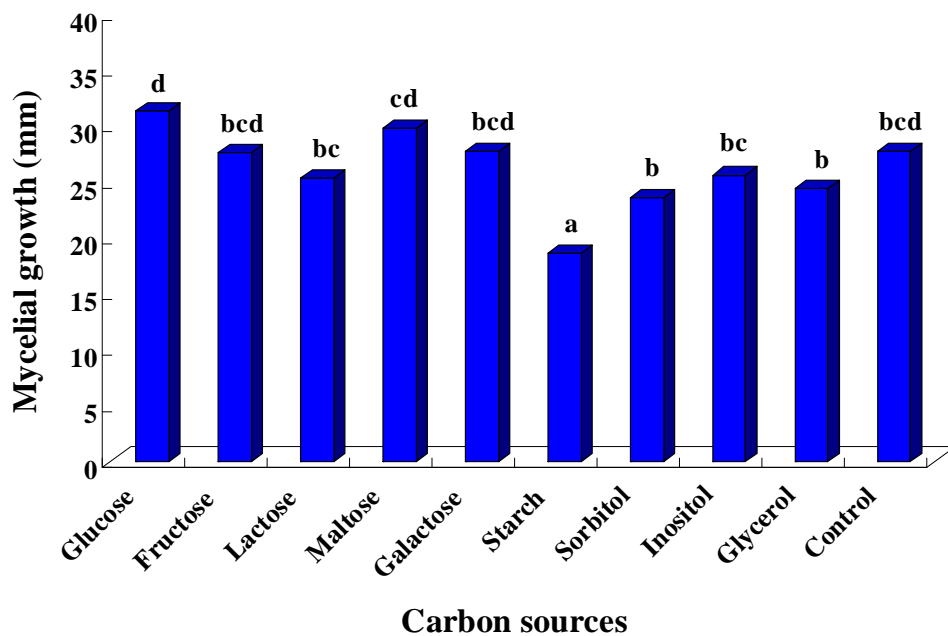


그림 9. 감자한천배지에서 차나무 탄저병균 *Pestalotiopsis longisetata*에 대한 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주의 항균활성을 증대시키는 탄소원 (DMRT.at  $P=0.05$ ).

## 2. 길항세균의 길항력을 증가시키는 질소원

길항세균 배양에 적합한 탄소원을 선발한 후, 길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주의 차나무 겹등근무늬병균과 탄저병균의 균사생장 억제효과를 증진시키는 질소원을 선발하기 위해, NB에 적합한 탄소원을 첨가한 후, 0.05%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.005%  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 와 공시 질소원으로서 casein, tryptone, malt extract, yeast extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 을 각각 1.0%씩 첨가한 배지에 길항세균을 접종하고 30°C, 160rpm에서 진탕배양하였다. 5일간 배양 후, 4,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 필터(Milipore filter, 0.22  $\mu\text{m}$ )를 사용하여 여과시킨 후 PDA plate(두께 5 mm)에 cork borer(직경 9 mm)를 이용하여, 중앙에 hole(직경 9 mm)을 만들고 그 속에 paper disc(직경 9 mm)를 치상하여 길항세균배양여액 300  $\mu\text{l}$ 를 넣어 무균상내에서 음건시키면서 흡수시켰다. 10일동안 PDA에서 배양한 차나무 겹등근무늬병균과 탄저병균 균종을 동일한 직경의 cork borer로 떼어낸 후 치상된 paper disc와 균종표면이 접촉하게 hole속에 넣어 25 °C 에서 7일간 배양시킨 후 균종의 성장 크기를 비교하여 길항세균 disc와 접촉하지 않은 무처리구와 병원균의 균종생장 크기와 상대적인 성장 등을 비교하여 조사하였다.

*B. subtilis* BD0310 균주의 길항력을 증가시키는 질소원으로서 공시한 casein, tryptone, malt extract, yeast extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  등 5개의 질소원 중 차나무 겹등근무늬병균에 대해서는 yeast extract, 탄저병균에 대해서는 tryptone이 가장 효과적이었다 (그림 10, 11).

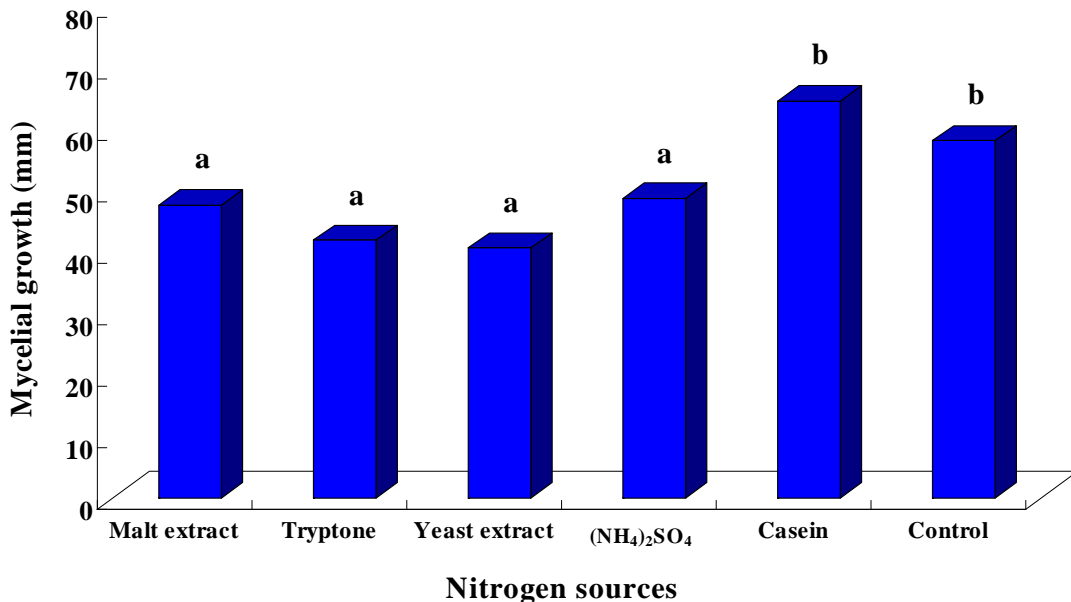


그림 10. 감자한천배지에서 차나무 겹등근무늬병균 *Pestalotiopsis longiseta*에 대한 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주의 항균활성을 증대시키는 질소원 (DMRT.at  $P=0.05$ ).

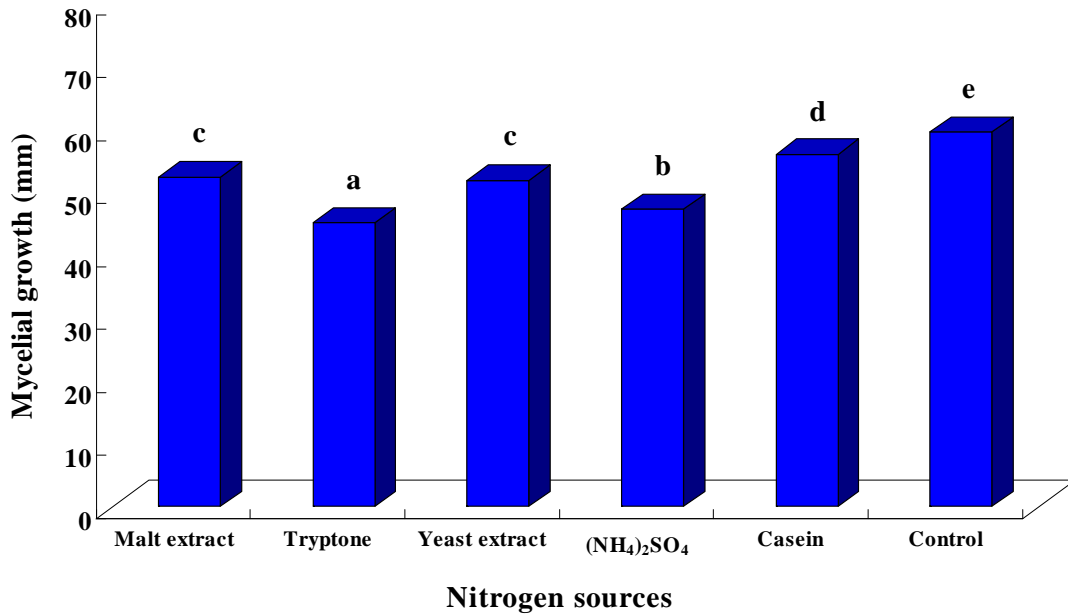


그림 11. 감자한천배지에서 차나무 탄저병균 *Pestalotiopsis longiseta*에 대한 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주의 항균활성을 증대시키는 질소원 (DMRT.at  $P=0.05$ ).

### 3. 길항세균의 배양 적정 온도

길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주의 배양 적온을 조사하기 위해 NA에 24시간 동안 길항세균을 배양한 후, NB에 단일균총을 접종하여 30°C, 160rpm으로 48시간 배양한 배양액 1 ml을 NB배지에 접종하고 20°C에서 45°C까지 5°C 간격으로 조정된 진탕배양기(160rpm)에서 배양하면서 12시간 간격으로 배양액 1 ml을 채취하여 9 ml의 멸균수에 넣어 분광광도계에서 세균밀도의 변화를 흡광도 560nm에서 조사하였다.

*B. subtilis* BD0310 균주의 배양 적정 온도구명을 위해 20°C~45°C까지 5°C 간격으로 실험을 한 결과, 30°C에서 24시간 동안 배양했을 때, 560 nm에서 흡광도(abs)는 0.37로 가장 높게 나타났으며, 시간이 경과함에 따라 점차 낮아졌다 (그림 12). 따라서 *B. subtilis* BD0310 균주의 대량배양을 위한 적정 온도는 30°C, 적정 시간은 14시간임을 알 수 있었다.



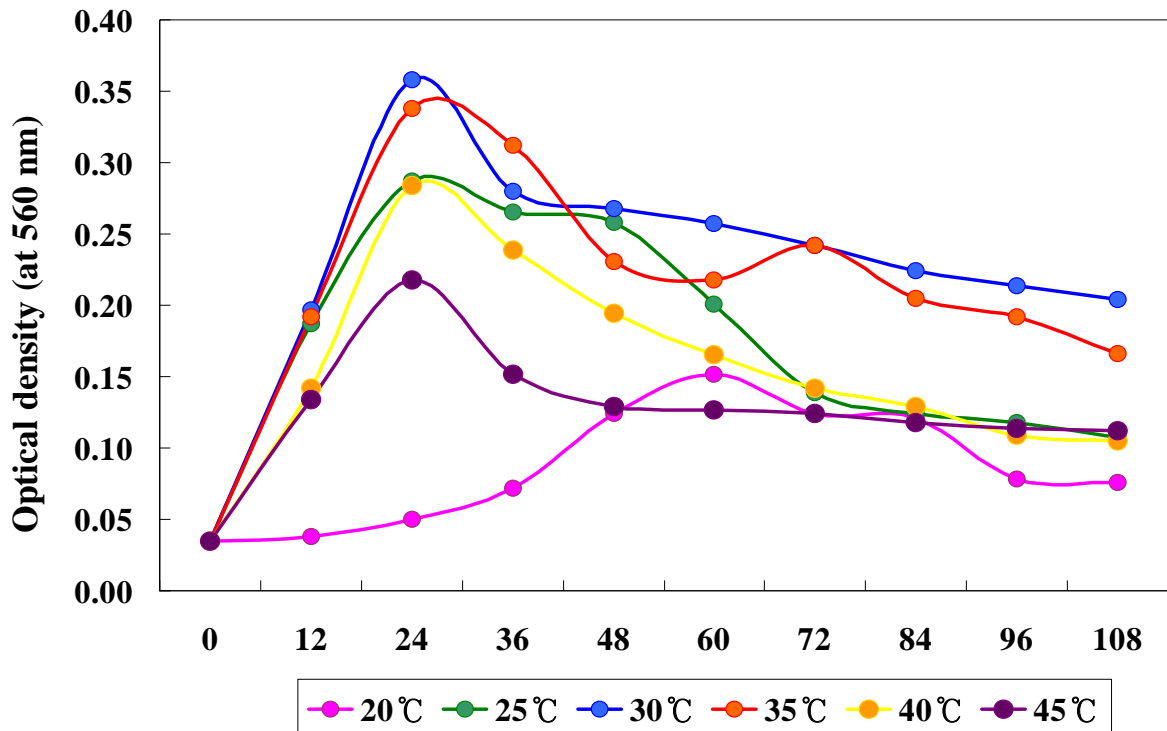


그림 12. 초기 배양 온도에 따른 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주의 성장 곡선.

#### 4. 길항세균의 배양 적정 pH

길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주 배양에 적합한 pH를 알아보기 위하여, NB에서 24시간 배양하고 고압증기멸균된 NB를 pH 3, 5, 7, 9, 11, 대조구는 pH 7로 맞추어 0.22  $\mu$ l milipore filter로 filtering 한 후 배양세균액을 1 ml 접종하고 진탕배양기에서 3~4일 배양한다. 3~4일 배양된 세균 배양액을 멸균수에 10배 희석하여 분광광도계에서 흡광도 560nm으로 하여 세균밀도를 비교 조사하였다.

NB에서 24시간과 48시간 배양 후 길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주의 생장에 미치는 초기 pH의 영향을 조사한 결과, pH 7에서 24시간과 48시간 배양에서 모두 가장 높은 흡광도(abs) 수치를 보였다 (그림. 13). 따라서 *B. subtilis* BD0310 균주의 대량배양을 위한 초기 적정 pH는 7임을 알 수 있었다.

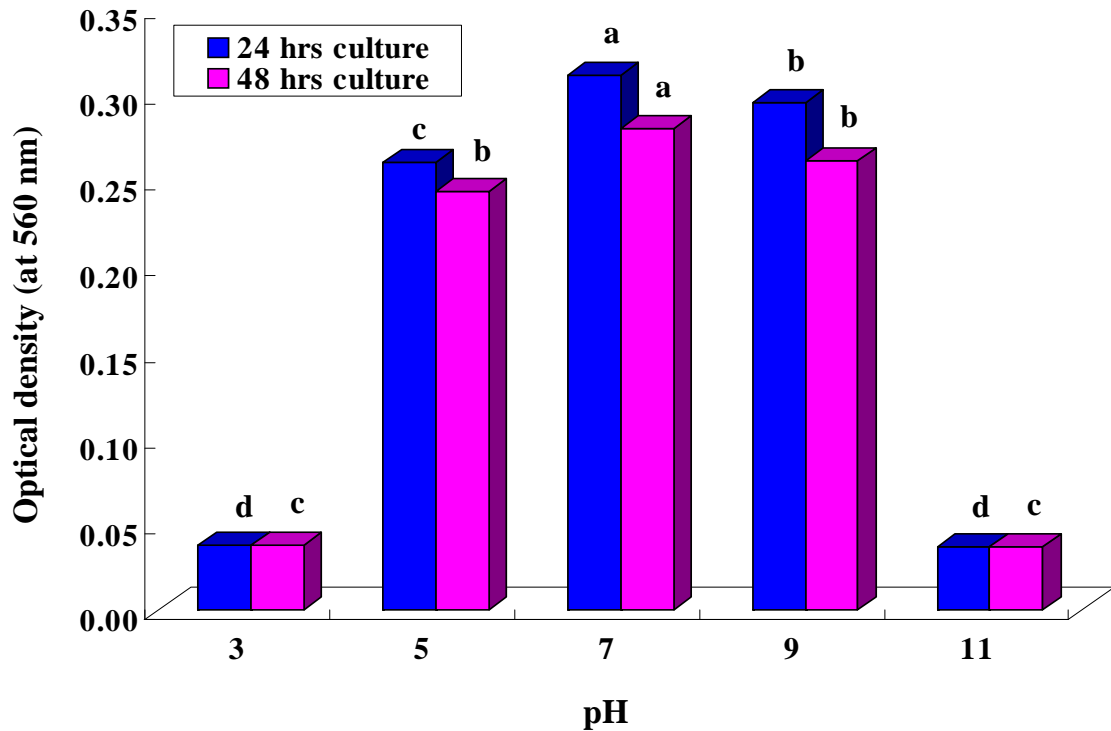


그림 13. 초기 배양 pH에 따른 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주의 성장 그래프.

### 5. 농약에 대한 길항세균의 감수성

차나무 엽권에서 분리한 길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주가 차나무에 살포되는 살균제와 살충제에 대한 반응을 조사하기 위하여 계통이 다른 12개의 대표적인 약제에 대한 감수성 정도를 조사하였다(KACIA,1995; Ware, 1993). 실제 관행농가에서 사용하는 약량을 증류수에 녹여 100  $\mu$ l를 paper disc에 흡수시키고 건조시킨 다음 NA plate에 길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주 배양액 100  $\mu$ l를 도말한 후 치상하여 25 °C 항온기에서 배양시켜 paper disc의 주변에 형성된 저지대의 크기를 조사하였다.

NA에서 길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주를 차나무에 살포되는 살균제와 살충제를 관행농가에서 사용하는 약량으로 희석하여 paper disc에 묻혀 대치배양하여 clear zone 형성유무를 관찰한 결과 계통이 무기동제인 Copper sulfate를 제외하고는 다른 계통의 약제에서는 성장저지대가 생성되지 않은 것으로 보아 무기동제에만 감수성을 가지고 있고 그 외 약제에서는 감수성을 띄지 않았다 (표 4). 따라서 길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주를 제형화하여 차나무 겹등근무늬병과 탄저병 방제용 미생물제제로 실용화할 경우에 Copper sulfate를 비롯한 무기동제는 혼용할 수 없음을

시사한다.

표 4. 영양배지에서 여러 가지 차나무 약제에 대한 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주의 감수성 조사

Pesticides	Target pests	Formulation (%) <sup>a</sup>	Applied concentration (ppm)	Sensitivity
Azoxystrobin	gray blight	SC 20	100	-
Triflumizole	anthracnose	WP 30	750	-
Thiophanate-methyl	anthracnose	WP 70	150	-
Copper sulfate	anthracnose	WP 58	20	+
Lambda cyhalothrin	leaf miner	EC 1	10	-
Flufenoxuron	spider mite	DC 5	50	-
Methidathion	wax scale	EC 50	400	-
Chlorfluazuron	smaller tea tortrix	EC 5	25	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	smaller tea tortrix	WG 35,000 DBMU/mg	-	-
Chlorfenapyr	tea red spider mite	SC 10	33.5	-
Fenpyroximate	tea red spider mite	SC 5	25	-
Tebufenpyrad	tea red spider mite	WP 10	50	-

<sup>a</sup>SC: Suspension concentrate, WP: Wettable powder, EC: Emulsifiable concentrate, DC: Dispersible concentrate, WG: water dispersible granule.

- : Insensitive, + : Sensitive.

## 제 4 절 엽권 정착 및 생존 기능을 강화한 길항세균의 제제화

### 1. 길항세균의 제제화 요건

농약의 제형은 크게 수화제, 분제, 입제, 유제, 액제 등으로 분류가 되는데, 제제처리 대상이 녹차라는 특수성 때문에 처리시 미관과 제제처리부위가 엽상이라는 것을 고려하고 분제와 입제는 부적합한 것으로 판단하였다. 또한 미생물제제의 주제가 살아있는 미생물이라는 것을 고려하여 유제와 액제는 농약제조사 주제를 녹이게 되므로 부적합한 것으로 판단하였다.

따라서 본 연구에서는 수화제를 만드는 것을 목적으로 하였으며, 제형 개발연구는 표 5의 제제화의 요건에 준하여 실시하였다.

표 5. 길항미생물 제제화의 요건(고기능, 고안정, 고농축(안정성, 장기보존성, 사용편의성))

단계	세부사항	조사방법
제제화	제품개발비	제품완성에 필요한 비용산출비교
	제제화의 용의성	소요시간, 제제화 단계, 제품독성유무비교
	제제화전·후의 균수율 변화	균수율 조사비교
처 리	병원균의 억제효과	기주처리시 발병 유무
	제제처리의 용의성	제제 준비·처리소요시간, 처리시 난점
	제제처리 후 미관	이물질 유무
	제제처리 후 균수율 변화	균수율 조사비교
보 관	보관의 용의성	보관방법
	보관 방법에 따른 균수율 변화	4℃, 25℃, 상온 보관 후 균수율 비교
	균수율 변화	균수율 조사

### 2. 길항세균 제제화 단계

#### 1) 액상수화제

##### ① 각 혼합재료에 대한 독성

7% Sodium Chloride(NaCl) 45 ml, 4% Sodium Chloride(NaCl) 45 ml, 10배 희석된 UV차단제 5

ml(10%), 5 g보습제(콜라겐)(10%) 각각을 탄소원(Maltose monohydrate) 1%, 질소원(Yeast extract) 0.5%를 넣은 Nutrient Broth에 넣어 총 50 ml로 만든 배지에 길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주를 12시간 액체배양하여 100  $\mu$ l 접종하고 150 RPM, 30°C에서 48hr 액체배양하고 각 배양액을 10배 희석하고 560nm의 spectrophotometer를 이용하여 흡광도(ABS)를 측정하여 결과를 보았다. 대조구는 혼합재료가 제외된 배지에 길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주를 접종 배양한 것으로 하였다.

그 결과 표 6에서 보는 것과 같이 대조구와 비교하여 각각의 혼합재료들로 만든 배지에서 문제 없이 성장하는 것으로 보아 각각의 혼합재료들은 길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주에 독성을 나타내지 않는 것으로 판단하였다.

표 6. 각 혼합재료로 만든 배지에서 성장한 길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주의 흡광도 (ABS)

반복	대조구	①	②	③	④
1	0.452	*	0.399	0.438	0.689
2	0.473	*	0.429	0.483	0.692
3	0.459	*	0.420	0.554	0.753

대조구 : 혼합 재료를 제외한 배지 조성(nutrient broth)

① : 7% Sodium Chloride(NaCl)

② : 4% Sodium Chloride(NaCl)

③ : 5 g콜라겐-보습제(10%)

④ : 10배 희석된 UV차단제 5 ml(10%)

\* : 균이 뭉쳐서 자라 측정불가능.

## ② 각 혼합재료의 혼합조성별 제제

500 ml nutrient broth배양액에 길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주를 12시간 액체배양하여 100  $\mu$ l 접종하고 150 RPM, 30°C에서 5일동안 액체배양하여 4000RPM, 5분동안 원심분리하여 모아진 균체만을 모아서 표 5에서 보는 것과 같은 조성으로 7종류에 해당하는 액상수화제를 만들었다. 그리고 7종의 액상수화에의 안정성을 검토하기 위해 4°C에 보관하며 7일 간격으로 14일까지 균 수율변화를 조사하였다 (표 7).

표 7. 각 혼합 재료들의 혼합조성

	①	②	③	④	⑤
I	◆	◆		◆	◆
II	◆		◆	◆	◆
III	◆			◆	◆
IV	◆	◆			
V	◆		◆		
VI	◆	◆		◆	
VII	◆		◆	◆	

◆ : 혼합된 재료

①500 ml nutrient broth배양액의 균체

②7% Sodium Chloride(NaCl) 45 ml

③4% Sodium Chloride(NaCl) 45 ml

④10배 희석된 UV차단제 5 ml(10%)

⑤5 g보습제-콜라겐(10%).

표 8의 다양한 혼합 조성에서 I ~ III종의 균수율이 급격히 떨어지는 것을 볼 수 있었으며, 이것은 보습제인 콜라겐의 혼합에 의한 것으로 보이며, IV종과 V종 또한 균 수율 변화가 있는 것을 볼 수 있는데, 이것은 UV차단제의 혼합 유무에 따른 것으로 판단된다. 그러나 VI종과 VII종 혼합제는 균수율의 변화가 다른 혼합 조합에 비해 안정적인 것으로 보여 NaCl의 함량이 적은 VII종 혼합제로서 Nutrient broth정량 4ℓ, Yeast extract 0.5%, Maltose 1% 배지에 150 RPM, 30℃에서 5 일 동안 균 배양하고 4000 RPM, 10분 원심분리하여 길항세균 BD0310의 cell만을 따로 모으고 50 ml 멸균수에 씻어서 모으고, 10% UV차단제 NaCl 4%의 혼합 멸균수 50 ml를 첨가하여 제조한 것을 액상수화제로 결정하였다.

표 8. 보관 경과일 수에 따른 BD0310 균 수율 변화(4℃보관)

보관일수	(×10 <sup>3</sup> CFU)						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
0	3,900	4,200	3,000	3,500	4,000	3,900	4,200
7	2	3	5	450	1,100	1,300	1,300
14	37	14	17	90	60	4,400	130

## 2) 수화제

수화제는 본 연구팀에 의해 기존에 개발된 미생물제제의 제조법을 변형하여 제조하였다. Nutrient broth 4ℓ, Yeast extract 0.5%, Maltose 1% 배지에 150 RPM, 30℃에서 5일 동안 균 배양하고 4000 RPM, 10분 원심분리하여 길항세균 BD0310의 cell만을 따로 모으고 50 ml 배양여액에 혼합시키고 여기에 Glucose 0.1%, 쌀가루 20%, 콩가루 20%를 섞어서 건조시킨 후 쿼터기로 빻아서 425 μm 체로 고운 제제만을 모아서 수화제를 완성하였다.

## 3) 제제화 비용산출

액상수화제는 100 ml, 수화제는 45~50 g의 제제를 만드는 것을 기준으로 제제화 비용을 산출하였다. 제제화 비용은 표 9와 표 10에서 보는 것과 같이 액상수화제는 34,775원, 수화제는 14,885원이며, 같은 양과 농도의 미생물제제를 만드는데 액상수화제가 수화제보다 2.3배정도 더 많이 산출되었다.

표 9. 액상수화제 제제화 비용산출

Chemical	(100ml 기준)		
	재료 가격 (원/500g)	단위가격 (원/g)	사용량 가격 (원/100ml)
Nutrient Broth	94,000	188	12,032
Yeast extract	83,000	166	1,328
Maltose	38,600	77	1,235
NaCl	22,500	45	180
UV차단제	10,000,000	2,000	20,000
Total			34,775

표 10. 수화제 제제화 비용산출

Chemical	(50g 기준)		
	재료 가격 (원/500g)	단위가격 (원/g)	사용량 가격 (원/50g)
Nutrient Broth	94000(500)	188	12,032
Yeast extract	83000(500)	166	1,328
Maltose	38600(500)	77.2	1,235.2
Glucose	13200(500)	26.4	10.56
쌀가루	2000(300)	7	140
콩가루	2000(300)	7	140
Total			14,885.76

### 3. 제제처리 단계

제제처리 대상이 녹차라는 특수성 때문에 처리 시 엽상의 미관을 고려할 필요가 있다. 만들어진 제제를 녹차에 1~7회까지 처리함으로써 엽상에 남는 입자에 관하여 그림 14를 기준으로 표 11과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

표 11. 제제처리 후 미립자의 착색정도(Class No.)

제제	처리횟수				
	1회	3회	5회	7회	2주 경과
액상수화제	1	1	1	1	1
수화제	2	3	4	5	1

액상수화제는 7회까지 처리하더라도 입자가 전혀 남지 않았으며, 수화제는 1회 처리만으로도 Class No. 2에 해당되었으며, 7회 처리 시에는 Class No. 5에까지 해당할 많은 양의 미립자가 남아있었다. 이 결과로 볼 때 수화제는 미관상의 문제가 있는 것으로 보였다. 그러나 7회까지 모두 처리하고 2주가 경과한 후에는 액상수화제와 같이 Class No. 1에 해당할 만큼 입자가 남지 않았다. 이것으로 보아 처리 후 일정기간이 경과한 다음에는 액상수화제와 수화제 모두 제제처리 시에 미관상의 문제는 없을 것으로 판단된다. 또한 제제처리 시 노즐이 막히거나, 처리하기 위한 전 처



리의 복잡성의 문제가 없어서 제제처리 단계에서는 문제가 없었다.

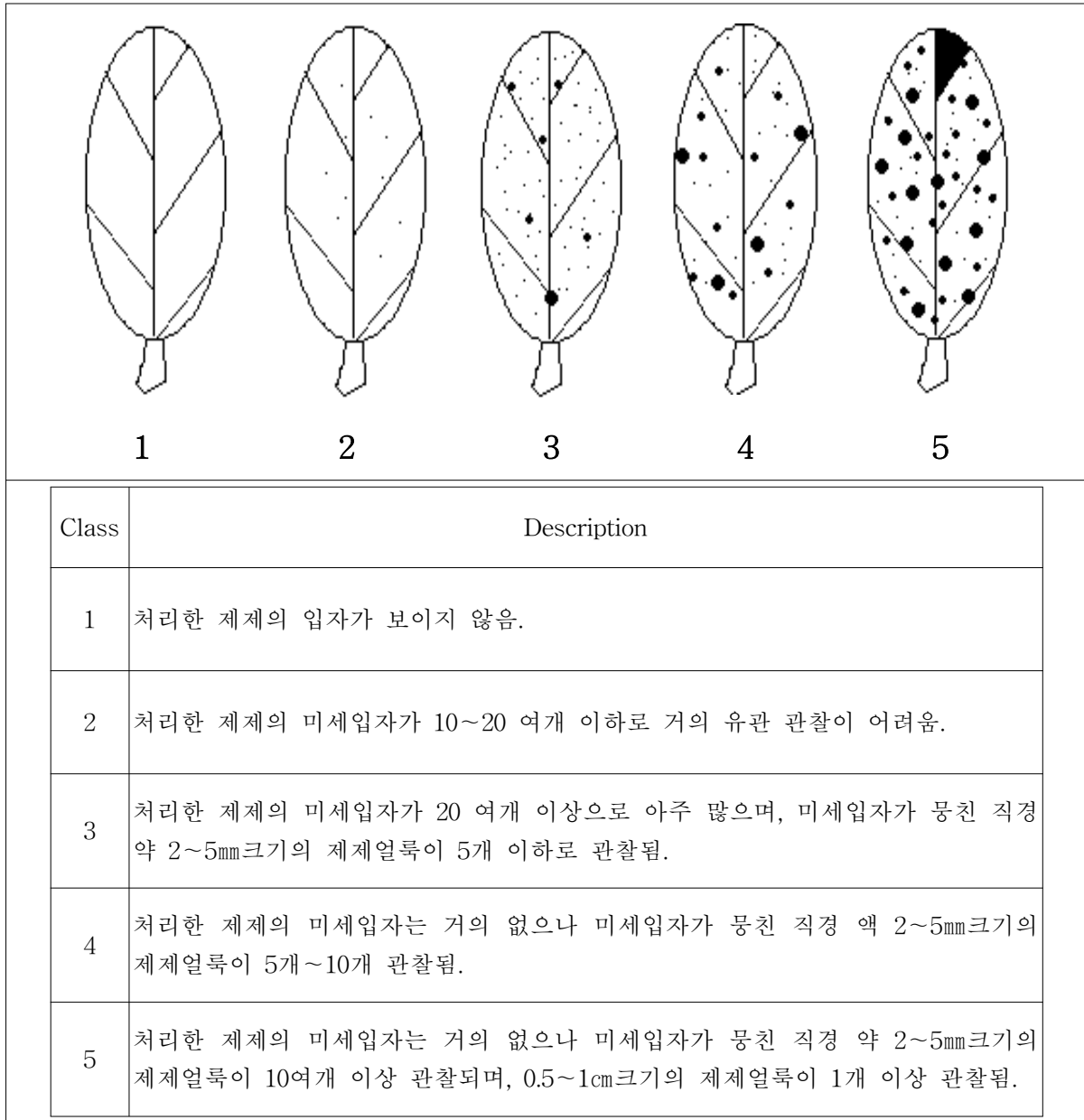


그림 14. 제제처리시 미립자 착색정도의 기준.

#### 4. 제제보관 단계

액상·수화제를 만들고 보관온도와 기간에 따른 균 밀도 변화를 보기 위해 4℃, 25℃, 상온에서

장기보관하며 일정 간격으로 균밀도 변화를 관찰하였다. 표 12에서 보는 것과 같이 액상수화제는 1개월이 경과한 후에는 균밀도가 급격하게 감소하여 10개월 경과일에는 거의 균이 살아남지 않았다. 보관온도에 따른 균밀도 차이는 거의 없었으나 그 중 상온보관 시 균밀도가 높았다. 이에 반해 수화제는 6개월까지의 균밀도 변화는 거의 없었으며, 10개월째부터는 균밀도가 떨어지기 시작하였다. 그리고 보관온도에 따른 균밀도 변화는 6개월까지는 보관상의 차이가 없었으나 10개월째에는 상온에서만 균밀도를 유지하고 이 외의 온도에서는 균밀도가 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 따라서 액상수화제는 어떠한 온도에서든 1개월 동안 보관이 가능하지만 보관상 불안정한 것으로 보이며, 수화제는 어떠한 온도에서든 6개월까지는 보관이 가능하며, 상온보관 시에는 10개월까지도 보관이 가능하여 보관상 안정적인 수화제로 보인다. 본 연구의 결과 액상수화제는 보관상문제로 보완이 필요하며, 반면 수화제는 보관상 용이한 것으로 나타났다.

표 12. 수화제 보관온도와 경과 일수에 따른 균밀도 변화

보관일수	액상수화제 (CFU/2ml)			수화제 (CFU/ml)		
	4℃	25℃	상온	4℃	25℃	상온
0일		$70 \times 10^8$			$62 \times 10^8$	
7일	$5 \times 10^8$	$30 \times 10^8$	$24 \times 10^8$	$10 \times 10^7$	$45 \times 10^7$	$29 \times 10^8$
14일	$20 \times 10^8$	$50 \times 10^8$	$55 \times 10^8$	$56 \times 10^8$	$67 \times 10^8$	$25 \times 10^7$
1개월	$10 \times 10^6$	$8 \times 10^6$	$15 \times 10^6$	$30 \times 10^7$	$37 \times 10^7$	$45 \times 10^7$
6개월	$13 \times 10$	$5 \times 10^2$	$26 \times 10^3$	$89 \times 10^7$	$65 \times 10^7$	$56 \times 10^7$
10개월	0	$2 \times 10$	$34 \times 10^2$	$6 \times 10^5$	$70 \times 10^6$	$88 \times 10^7$

### 5. 엽권 정착 및 생존 기능을 강화한 제형 최종 선발

제형의 결정은 제제처리 대상이 녹차라는 특수성과 주제가 살아있는 미생물이라는 것을 고려하여 수화제를 만드는 것을 목표로 액상수화제와 수화제를 만들었다. 제제화시 길항미생물에 대한 혼합재료의 독성검사를 통해 혼합재료를 결정하였으며, 제제처리 대상이 녹차라는 특수성 때문에 처리 시 엽상의 미관을 고려할 필요가 있어 만들어진 제제를 녹차에 처리한 후 미립자의 유무를 본 결과 액상수화제는 입자가 전혀 남지 않았으며, 수화제는 미립자가 남아있었으나 처리하고 2주가 경과한 후에는 액상수화제와 같이 입자가 남지 않았다. 이것으로 액상수화제와 수화제 모두 제

제처리 시에 미관상의 문제는 없을 것으로 판단된다. 또한 제제처리 시 노즐이 막히거나, 처리하기 위한 전 처리의 복잡성의 문제가 없어서 제제처리 단계에서는 문제가 없었다. 그리고 액상수화제와 수화제를 만들고 보관온도와 기간에 따른 균 밀도 변화를 보기 위해 4℃, 25℃, 상온에서 장기보관하며 일정 간격으로 균밀도 변화를 관찰하였다. 그 결과 액상수화제는 어떠한 온도에서든 1개월 동안 보관이 가능하며 보관상 불안정한 것으로 보이며, 수화제는 어떠한 온도에서든 6개월까지는 보관이 가능하며, 상온 보관 시에는 10개월까지도 보관이 가능하여 보관상 안정적인 수화제로 보인다. 본 연구의 결과 액상수화제와 수화제 모두 제제화의 요건에 합당하지만 액상수화제는 보관상문제로 보완이 필요하며, 반면 수화제는 보관상 용이한 것으로 판단된다.

## 제 5 절 미생물제제의 방제효과 실내 및 온실 검정

### 1. 차나무 겹등근무늬병에 대한 미생물제제의 방제효과 실내 및 온실 검정

#### 1) 차나무 겹등근무늬병에 대한 미생물제제의 방제효과 실내 검정

*B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제에 의한 차나무 겹등근무늬병균의 방제효과를 실내에서 검정하였다. PDA와 NA를 1 : 1로 혼합한 포도당 영양배지를 절반으로 나누고, 한쪽엔 겹등근무늬병균에 대한 수화제형 미생물제제를 다른 한쪽엔 10일 배양한 겹등근무늬병균을 대치배양한 후 25 °C에서 7일간 배양시켰다. 겹등근무늬병균들끼리만 배양한 대조구와 미생물제제와 대치배양한 겹등근무늬병균 균총생장 크기를 비교하여 조사하였다 (그림 15).

차나무 겹등근무늬병 방제용 수화제를 차나무 겹등근무늬병균의 발병 억제 효과를 PDA와 NA를 1 : 1로 혼합한 포도당 영양배지에서 검증해 본 결과 대조구의 균사생장은 24.0 mm, 제제와 대치배양된 균사의 생장은 6.0 mm로 3/4정도 균사생장을 저해했다 (그림 15).

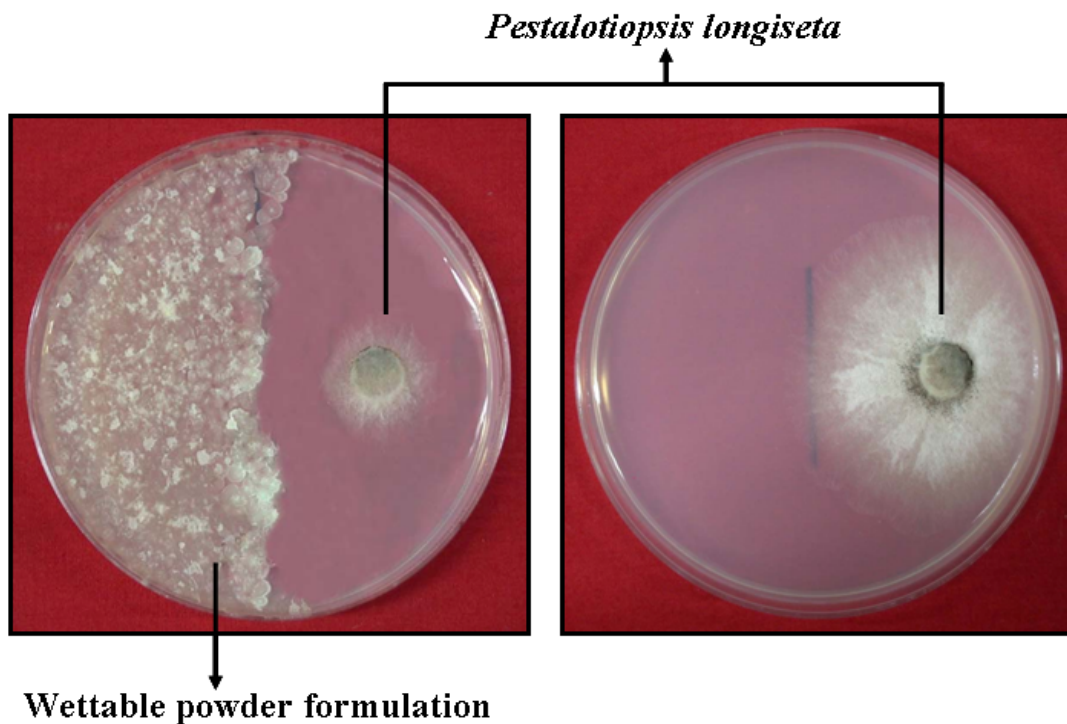


그림 15. 감자한천배지+영양배지에서 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주를 이용한 수화제형 미생물제제의 차나무 겹등근무늬병균 *Pestalotiopsis longiseta* 균사생장 억제.

2) 차나무 겹등근무늬병에 대한 미생물제제의 방제효과 온실 검증

*B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제에 의한 차나무 겹등근무늬병 방제효과를 유리 온실에서 표 13처럼 처리하여 검증하였다.

표 13. 포트에서 차나무 겹등근무늬병과 탄저병 방제 실험 처리 방법

Treatments	Application methods
Untreated control (U. CK.)	Sterilized water was sprayed after wound on tea leaves
Pathogen (P.)	Conidial suspension of <i>P. longiseta</i> and <i>C. theae-sinensis</i> was sprayed after wounding on tea leaves
Formulation (For.)	Wettable powder formulation of <i>B. subtilis</i> BD0310 was sprayed afterwounding on tea leaves
Formulation without antagonist (For. W.A.)	Carrier of formulation without <i>B. subtilis</i> BD0310 was sprayed after wounding on tea leaves
Formulation+Pathogen (For. + P.)	Conidial suspension of <i>P. longiseta</i> and <i>C. theae-sinensis</i> was inoculated 2 days after spray of wettable powder formulation on wounded tea leaves
Pathogen+Formulation (P. + For.)	Wettable powder formulation of <i>B. subtilis</i> BD0310 was sprayed 2 days after inoculation of <i>P. longiseta</i> and <i>C. theae-sinensis</i> on wounded tea leaves
Formulation without antagonist+Pathogen (For. W. A. + P.)	Conidial suspension of <i>P. longiseta</i> and <i>C. theae-sinensis</i> was inoculated 2 days after spray of carrier of formulation without <i>B. subtilis</i> BD0310 on wounded tea leaves
Pathogen+Formulation without antagonist (P. + For. W. A.)	Carrier of formulation without of <i>B. subtilis</i> BD0310 was sprayed 2 days after inoculation of <i>P. longiseta</i> and <i>C. theae-sinensis</i> on wounded tea leaves
Fungicide+Pathogen (Fun. + P.)	Conidial suspension of <i>P. longiseta</i> and <i>C. theae-sinensis</i> was inoculated 2 days after spray of azoxystrobin sc and tebuconazole wp on wounded tea leaves
Pathogen+Fungicide (P. + Fun.)	Azoxystrobin sc and tebuconazole wp were sprayed 2 days after inoculation of <i>P. longiseta</i> and <i>C. theae-sinensis</i> on wounded tea leaves

각 처리구는 모두 10가지 처리구로 무처리구, *B. subtilis* BD0310을 제외한 수화제형 제제 처리구, *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제 처리구, 겹등근무늬병균을 2일 전 접종한 후 *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제를 살포한 처리구, *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제를 2일 전 살포한 후 겹등근무늬병균을 접종한 처리구, 겹등근무늬병균을 2일 전 접종한 후 *B. subtilis* BD0310을 제외한 수화제형 제제를 살포한 처리구, *B. subtilis* BD0310을 제외한 수화제형 제제를 2일 전 살포한 후 겹등근무늬병균을 접종한 처리구, 겹등근무늬병균을 2일 전 먼저 접종하고 화학약제를 살포한 처리구, 화학약제를 2일 전 살포한 후 겹등근무늬병균을 접종한 처리구, 겹등근무늬병균만 접종한 처리구로 실험을 수행하였다.

단독처리를 제외한 P.+For., For.+P., P.+For. W. A., For.W. A.+P., P.+Fun., Fun.+P.의 6개 처리구의 사용량은 살균수에 현탁한 겹등근무늬병균 포자현탁액( $3.6 \times 10^5$  spores/ml), *B. subtilis* BD0310을 제외한 수화제형 제제 100배액, 차나무 겹등근무늬병 방제 약제로 등록된 3가지 약제 중 오티바 액상수화제(azoxystrobin sc) 500배(농약공업협회, 2004) 및 *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제 100배액을 화분에 재식한 차나무 신초에 달린 2~3엽을 멸균된 가위로 상처를 낸 후 잎의 앞·뒷면에 충분히 살포하고, 상대습도 98%이상,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 유리 온실에서 보관하면서 접종 7일 후에 발병엽률과 방제가를 조사하였다 (표 14, 그림 16).

표 14. 포트에서 차나무 겹등근무늬병에 대한 수화제형 미생물제제의 예방 및 치료 효과

Treatments	Diseased leaves (%)	Control value (%)
Untreated control.	0.0 a	100
Formulation without antagonist	29.6 cd	66.7
Formulation	18.5 bc	79.2
Pathogen + Formulation	44.4 d	50.1
Formulation + Pathogen	25.9 c	70.9
Pathogen + Formulation without antagonist	96.3 f	0.0
Formulation without antagonist + Pathogen	74.1 e	16.6
Pathogen + Fungicide	25.9 c	70.9
Fungicide + Pathogen	7.4 ab	91.7
Pathogen	88.9 ef	-

DMRT at  $P=0.05$ .

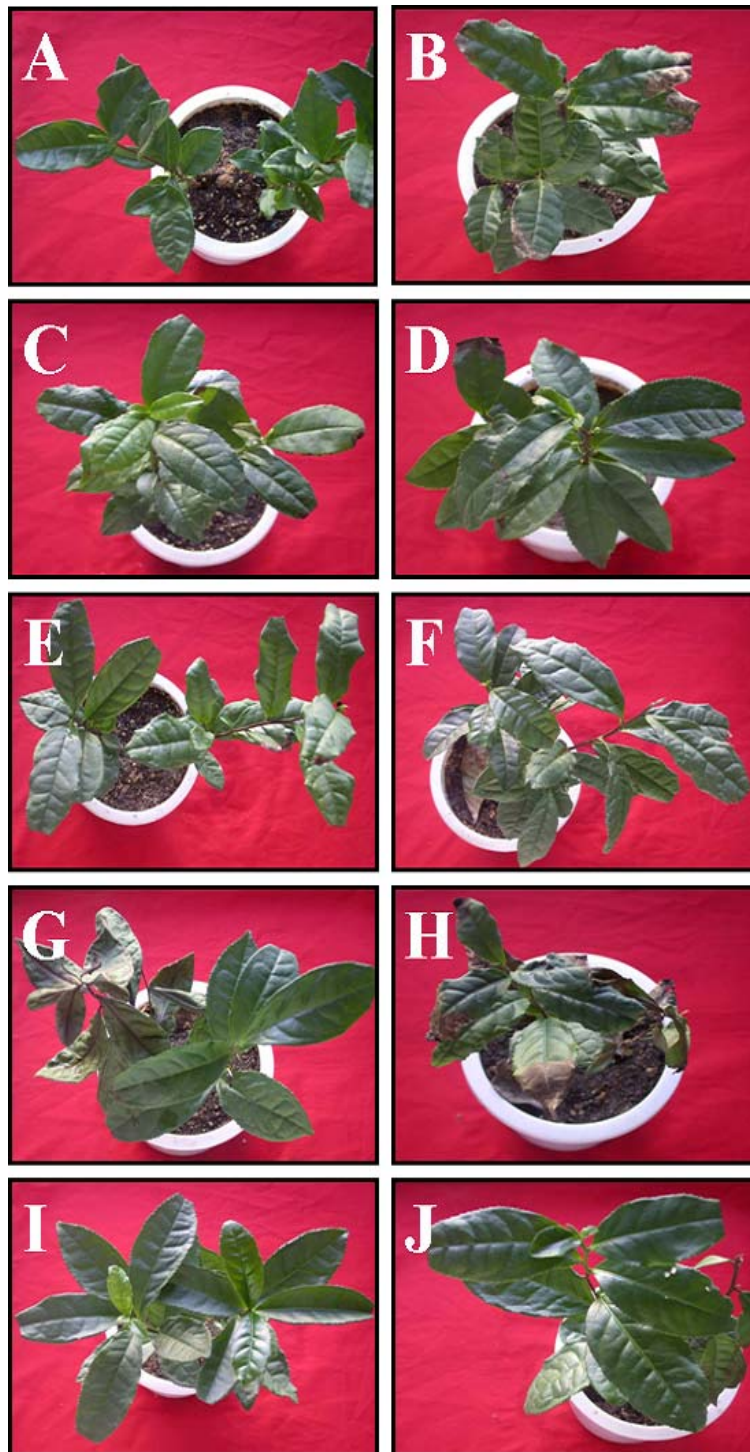


그림 16. 포트에서 차나무 겹등근무늬병에 대한 수화제형 미생물제제의 예방 및 치료 효과 (A) Untreated control, (B) Pathogen, (C) Formulation, (D) Formulation without antagonist, (E) Formulation+Pathogen, (F) Pathogen+Formulation, (G) Formulation without antagonist+Pathogen, (H) Pathogen+Formulation without antagonist, (I) Fungicide+Pathogen, (J) Pathogen+Fungicide.

차나무 잎에 겹등근무늬병균을 2일 전 접종한 후 *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제를 살포한 처리구에서 차나무 겹등근무늬병 방제가는 50.1%였지만, *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제를 2일 전 살포한 후 겹등근무늬병균을 접종한 처리구에서 차나무 겹등근무늬병 방제가는 70.9%였다. 이러한 결과는 *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제를 겹등근무늬병균에 감염된 잎에 처리했을 경우 나타내는 치료효과보다는 겹등근무늬병균에 감염되기 전에 차나무 잎에 처리했을 경우에 나타내는 예방효과가 우수함을 보여준다.

따라서 차나무 겹등근무늬병 방제 약제로 등록된 오티바 액상수화제(azoxystrobin sc)의 예방효과 91.7%에는 못 미치지만 치료효과 70.9%와는 대등하므로 *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제는 환경친화적 차나무 겹등근무늬병 예방약제로 개발 및 실용화 가능성을 충분히 시사해준다.

## 2. 차나무 탄저병에 대한 미생물제제의 방제효과 실내 및 온실 검정

### 1) 차나무 탄저병에 대한 미생물제제의 방제효과 실내 검정

*B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제에 의한 차나무 탄저병균의 방제효과를 실내에서 검정하였다. PDA와 NA를 1 : 1로 혼합한 포도당 영양배지를 절반으로 나누고, 한쪽엔 탄저병균에 대한 수화제형 미생물제제를 다른 한쪽엔 10일 배양한 탄저병균을 대치배양한 후 25°C에서 7일간 배양시켰다. 탄저병균들끼리만 배양한 대조구와 미생물제제와 대치배양한 탄저병균 균총생장 크기를 비교하여 조사한 결과 대조구의 균사생장은 14.0 mm, 제제와 대치배양된 균사의 생장은 4.52 mm로 2/3정도 균사생장을 저해하였다 (그림 17).

### 2) 차나무 탄저병에 대한 미생물제제의 방제효과 온실 검정

앞에서 기술한 차나무 겹등근무늬병에 대한 방제효과 검증 방법과 동일하게 수행하였다(Table 11). 각 처리구는 모두 10가지 처리구로 무처리구, *B. subtilis* BD0310을 제외한 수화제형 제제 처리구, *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제 처리구, 겹등근무늬병균을 2일 전 접종한 후 *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제를 살포한 처리구, *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제를 2일 전 살포한 후 겹등근무늬병균을 접종한 처리구, 겹등근무늬병균을 2일 전 접종한 후 *B. subtilis* BD0310을 제외한 수화제형 제제를 살포한 처리구, *B. subtilis* BD0310을 제외한 수화제형 제제를 2일 전 살포한 후 겹등근무늬병균을 접종한 처리구, 겹등근무늬병균을 2



일전 먼저 접종하고 화학약제를 살포한 처리구, 화학약제를 2일 전 살포한 후 겹둥근무늬병균을 접종한 처리구, 겹둥근무늬병균만 접종한 처리구로 실험을 수행하였다.

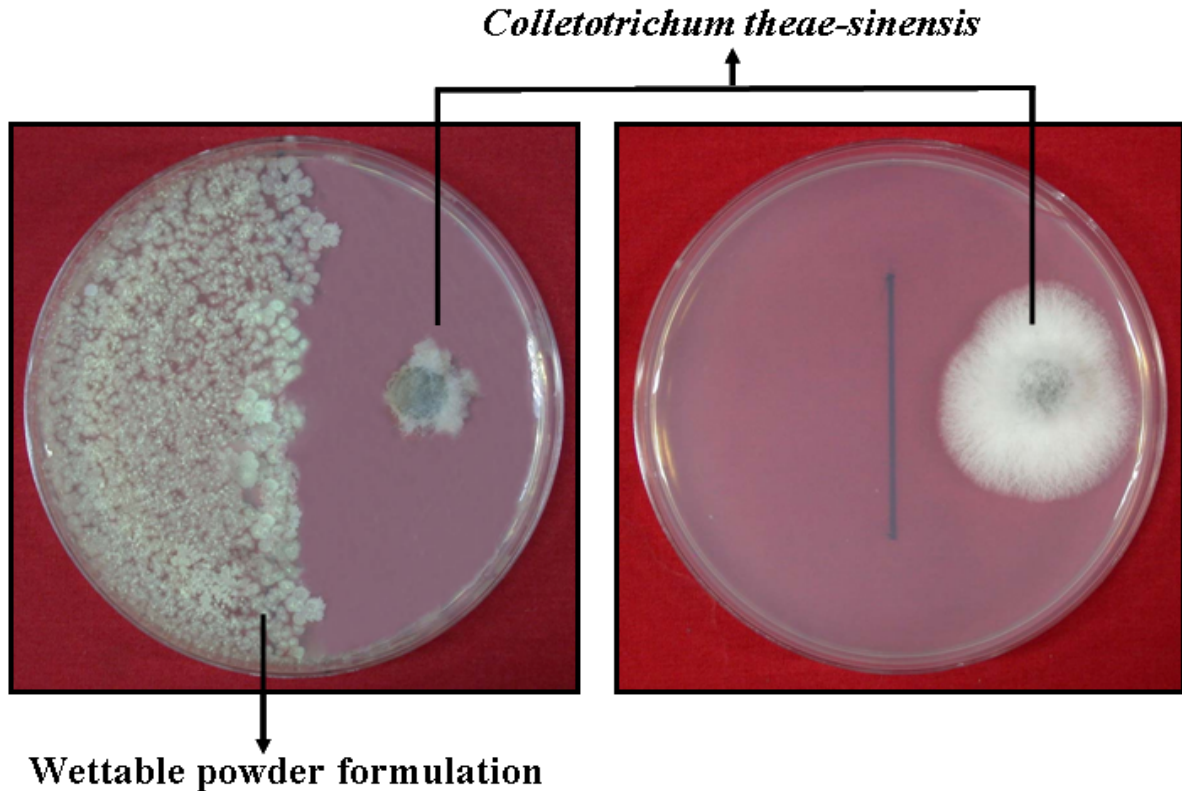


그림 17. 감자한천배지+영양배지에서 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310 균주를 이용한 수화제형 미생물제제의 차나무 탄저병균 *Colletotrichum theae-sinensis* 균사생장 억제.

사용된 처리구의 사용량은 살균수에 현탁한 탄저병균 포자현탁액( $3.6 \times 10^5$  spores/ml), *B. subtilis* BD0310을 제외한 수화제형 제제 100배액, 차나무 탄저병 방제 약제로 등록된 3가지 약제 중 실바코 수화제(tebuconazole wp) 1000배(농약공업협회, 2004) 및 *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제 100배액을 화분에 재식한 차나무 신초의 2~3엽에 멸균된 가위로 상처를 낸 후 잎의 앞·뒷면에 충분히 살포하고, 상대습도 98%이상,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 유리 온실내에서 보관하면서 접종 7일 후에 발병엽률과 방제가를 조사하였다 (표 15, 그림 18).

차나무 잎에 탄저병균을 2일 전 접종한 후 *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제를 살포한 처리구에서 차나무 탄저병 방제가는 59.1%였지만, *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제를 2일 전 살포한 후 탄저병균을 접종한 처리구에서 차나무 탄저병 방제가는 77.3%였다. 이러한 결과는 *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제를 탄저병균에 감염된 잎에 처리했

을 경우 나타내는 치료효과보다는 탄저병균에 감염되기 전에 차나무 잎에 처리했을 경우에 나타내는 예방효과가 우수하였다.

이러한 *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제의 예방효과는 차나무 탄저병 방제 약제로 등록된 실바코 수화제(tebuconazole wp)의 예방효과 90.9%에는 못 미치지만 치료효과 72.8%보다는 우수한 것이 입증되었으므로 *B. subtilis* BD0310 균주의 수화제형 미생물제제는 환경친화적 차나무 겹등근무늬병과 탄저병을 동시에 예방할 수 있는 약제로 개발하여 실용화할 수 있을 것으로 판단되었다.

표 15. 포트에서 차나무 탄저병에 대한 수화제형 미생물제제의 예방 및 치료 효과

Treatments	Diseased leaves (%)	Control value (%)
Untreated control.	0.0 a	100
Formulation without antagonist	7.4 a	90.9
Formulation	3.7 a	95.5
Pathogen + Formulation	33.3 bc	59.1
Formulation + Pathogen	18.5 ab	77.3
Pathogen + Formulation without antagonist	70.4 d	13.6
Formulation without antagonist + Pathogen	40.7 c	50.1
Pathogen + Fungicide	22.2 abc	72.8
Fungicide + Pathogen	7.4 a	90.9
Pathogen	81.5 d	-

DMRT at  $P=0.05$ .

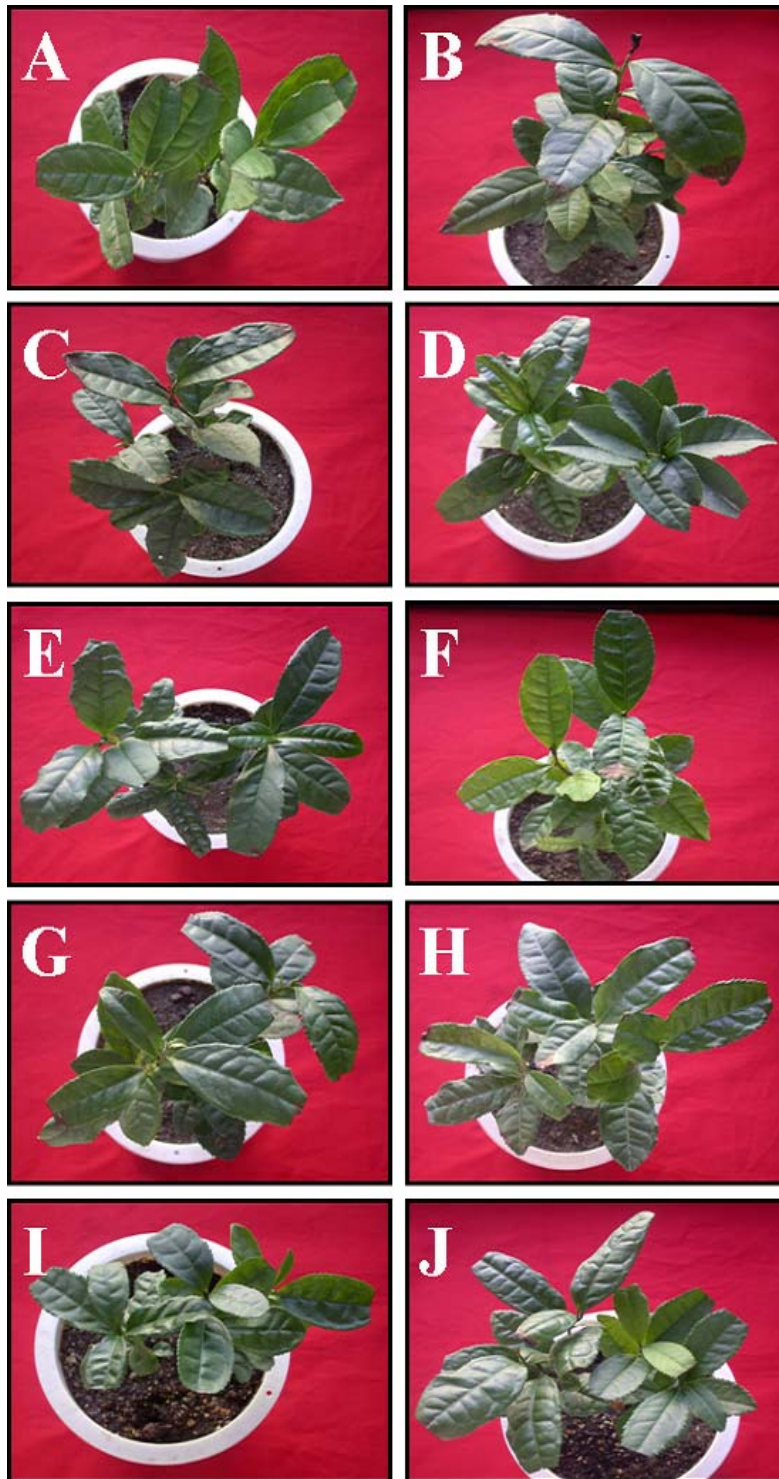


그림 18. 포트에서 차나무 탄저병에 대한 수화제형 미생물제제의 예방 및 치료 효과 (A) Untreated control, (B) Pathogen, (C) Formulation, (D) Formulation without antagonist, (E) Formulation+Pathogen, (F) Pathogen+Formulation, (G) Formulation without antagonist+Pathogen, (H) Pathogen+Formulation without antagonist, (I) Fungicide+Pathogen, (J)Pathogen+Fungicide.

## 제 6 절 미생물제제의 현장 적용 기술 개발

### 1. 길항균주 현장적용 monitoring을 위한 추적 marker 도입 형질전환 균주 개발

1차년도에 Spectinomycin 항생제 저항성 유전자를 지닌 plasmid를 삽입하여 형질전환을 시도하여, 길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주의 transformant를 전기영동한 결과 형질전환체 내에 plasmid가 존재하는 것을 확인함으로써 추적 marker를 도입한 형질전환 균주를 개발하였으나, 심사자들의 GMO에 대한 부정적 의견 때문에 돌연변이 균주 개발로 연구 방향을 전환하였다.

길항세균 *B. subtilis* BD0310 균주의 현장에서 엽권 정착 유무와 생존 능력을 monitoring하기 위하여 그림 19처럼 시험과정을 거쳐 Rifampicin 항생제 저항성균주를 만들었다.

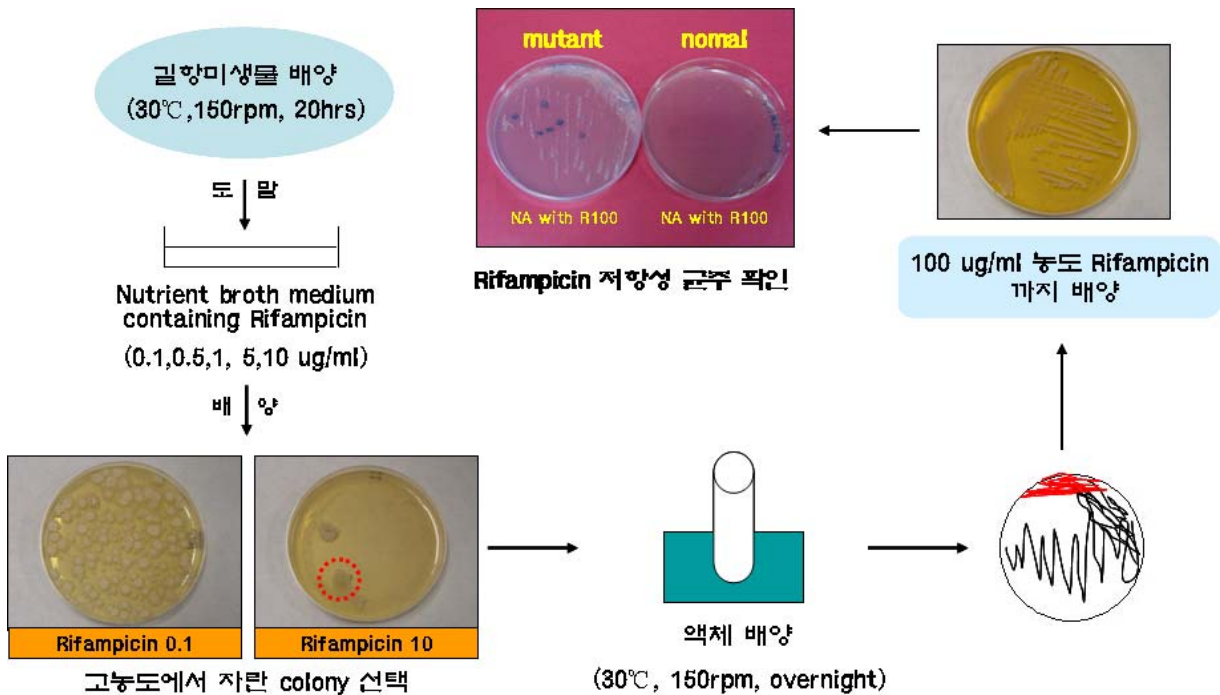


그림 19. Rifampicin 저항성 돌연변이 길항균주 제조 과정.

즉 *B. subtilis* BD0310 균주를 3 ml LB에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 Rifampicin 농도가 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml 순으로 낮은 농도부터 높은 농도까지 들어있는 LB 배지를 만들어 seed culture를 200 µl씩 도말하여 37°C에서 하룻밤씩 배양하였다. 저농도 조정 LB 배지에서부터 성장한 *B. subtilis* BD0310 균주 colony를 고농도 조정 LB 배지로 점차 옮겨 배양하여 최종 Rifampicin 100 µg/ml 조정 LB 배지에서 성장하는 *B. subtilis* BD0310 균주를 확보함으로써

써 Rifampicin 저항성균주를 확보하였다. 이렇게 확보된 돌연변이 균주의 항균활성 검증을 실시한 결과 wild type와 차이가 없는 항균활성을 보이는 것을 확인하였다.

## 2. 형질전환 균주를 이용한 현장 fitness 검증을 위한 생태학적 연구

### 1) 미생물제제의 엽권정착

액상수화제는 100배 희석액에 계면활성제 tween #20 1~2방울을 넣어 접종준비를 하고, 수화제는 200배 희석하고 계면활성제 tween #20 1~2방울을 넣어 접종준비를 하였다. 접종은 1시간동안 상온에 두었다가 분무접종하였다. 1회 처리당 전체 차나무에 100 ml의 수화제를 처리하며, 1, 3, 5, 7회까지 처리하였다. 액상수화제의 대조구는 세균이 없는 액상수화제의 희석액, 수화제는 세균이 없는 수화제의 희석액을 처리하였다. 미생물제제 처리 후 관찰환경은 12시간 광 처리, 28°C, 80% 상대습도의 Growth Chamber에서 이루어 졌으며, 접종일부터 24시간동안은 비닐덮개를 이용하여 100% 상대습도를 유지시켰다.

Rifampicin 저항성 길항균주를 이용한 미생물제제는 1회 처리마다  $10^5$  CFU/ml 정도의 세균밀도로 처리별 차나무(평균 100엽 내외)에 10일 간격으로 처리한 것으로, 처리 후 40일까지 조사를 실시하였다. 밀도조사는 길항미생물이 Rifamycin 저항성균주이며 *Bacillus*이기 때문에 Rifamycin NA배지에 80°C 열처리를 하고 세균 수율을 조사하였다.

미생물제제를 1회~7회까지 처리한 결과 표 16과 같은 결과를 얻었으며, 표 16의 결과는 1엽에서 수율된 균밀도이다. 5회 이상 처리시 초기 확인된 세균 밀도는 액상수화제와 수화제 모두 처리 세균밀도의 약 10% 내외의 균만이 휴면을 타파하여 정착한 것으로 판단된다. 액상수화제와 수화제 처리 모두 같은 경향을 보이며 1회 처리 시에는 40일이 경과할 때까지 세균 수율이 확인되지 않았으며, 3회 처리 시 30일째에 세균 수율이 가능했으며, 5회와 7회 처리 시 20일째부터 세균 수율이 가능했다. 정상적으로 처리된 횃수에 비례하여 균 밀도가 증가할 것으로 예상하였지만 실험 결과 3회 이상 처리 시에는 그 횃수에 관계없이 세균밀도는 뚜렷하게 증가하지 않았으며, 20일 이후부터는 균 수율이 가능함을 알 수 있었다. 또한 그림 20에서 볼 수 있는 바와 같이 미생물제제 처리 후에 육안으로 식별 가능한 뚜렷한 제제 처리 흔적은 관찰되지 않았을 뿐만 아니라, 제형화 첨가원료에 의한 독성 가시피해가 나타나지 않았다. 따라서 본 실험의 결과 3회 이상 처리된 균체가 있어야 엽권에서 BD0310이 정착하여 살 수 있고 세균밀도는 처리 횃수와 정비례하여 증가하지 않았지만, 최종 처리 후 20일이 경과한 후에 내생포자를 타파하고 생균으로서 살아 갈 수 있는 것으로 판단된다.

표 16. 미생물제제 처리 횟수에 따른 균 수율변화 (CFU/leaf)

	처리횟수	10일	20일	30일	40일
액상 수화제 (con.)	1	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
액상 수화제	1	0	0	0	0
	3	0	0	18	30
	5	0	6	30	18
	7	0	12	72	54
수화제 (con.)	1	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
수화제	1	0	0	0	0
	3	0	0	30	6
	5	0	6	66	6
	7	0	18	90	36

- 접종하여 처리한 배양액의 균 농도:  $10^5$  CFU/ml

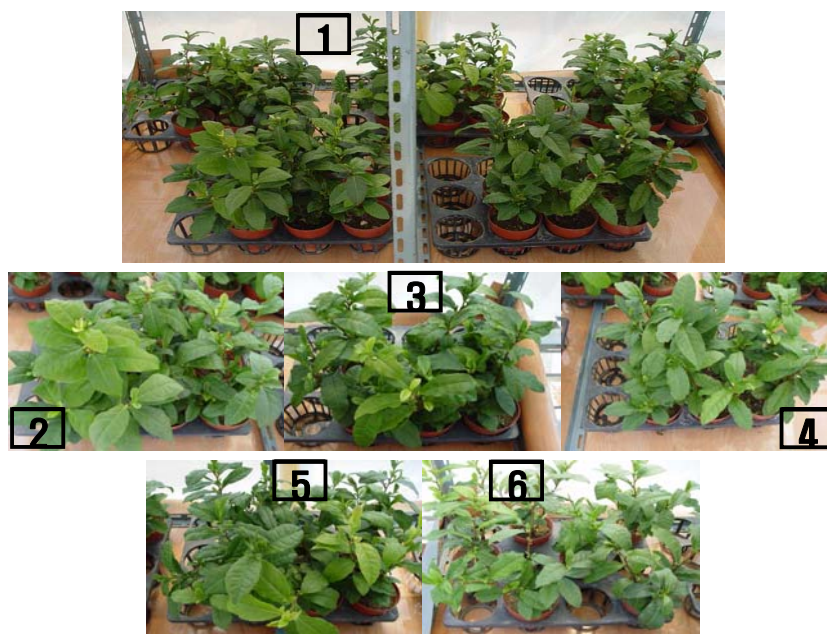


그림 20. 미생물제제 5회 처리 후 차나무 모습 (1;실험구 전체, 2;액상수화제, 3;액상수화제 대조구, 4;수화제, 5;수화제 대조구, 6;무처리구).

## 2) 미생물제제의 차나무 겹등근무늬병 방제 효과 평가

액상수화제는 50배 희석액에 계면활성제 tween #20 1~2방울을 넣어 접종준비를 하고, 수화제는 100배 희석하고 계면활성제 tween #20 1~2방울을 넣어 접종준비를 하였다. 접종은 1시간동안 상온에 두었다가 분무접종하였다. 처리구는 액상수화제, 수화제, 각 수화제별 대조구, 무처리 대조구이며, 각 처리구는 3주 차나무/1 pot/6 pot이며, 액상수화제의 대조구는 세균이 없는 액상수화제의 희석액, 수화제는 세균이 없는 수화제의 희석액을 처리하였다. 접종 세균 밀도는  $10^5$  CFU/ml 정도로, 1회 처리마다 각 pot당 20 ml의 미생물제제 희석액을 3일 간격으로 5회까지 처리하였다. 차 겹등근무늬병원균 *Pestalotiopsis logiseta* 처리는  $10^6$  conidia/ml 농도로 제제 5회 처리 3일 후 분무접종하였다. 실외 비닐 온실에서 실험은 실시하며, 통상 20~25℃ 온도, 30~60% 상대습도를 유지하며 제제처리일부터 24시간 동안에는 100% 상대습도를 유지시킨다. 병원균 처리 후에는 3일 동안 100% 상대습도를 유지하였다 (그림 21). 병원균 접종 30일 후에 발병엽률을 조사하여 미생물제제의 병방제효과를 평가하였다.

액상수화제 처리구의 발병엽률은 8.8%, 수화제 처리구의 발병엽률은 9.0%로 무처리구에 비하여 각각 65.9%와 65.1%의 방제가를 나타냈다 (표 17)(그림 22). 액상수화제와 수화제 모두 차나무 겹등근무늬병균 *P. logiseta*에 길항력을 갖는 미생물제제이며, 두 가지 형태의 미생물제제의 방제 효과는 비슷한 수준이었으며, 비교적 높은 방제가를 나타내었다.

표 17. 차나무 겹등근무늬병균 접종 30일 후 발병엽률과 방제가

	액상수화제 처리구	수화제 처리구	무처리구
발병엽률(%)	8.8	9.0	25.6
방제가(%)	65.9	65.1	



그림 22. 차나무 겹등근무늬병균 접종 후 병 발생(병원균 접종 30일째, 1;병원균 접종 후 전체 처리구, 2;병원균 상처접종, 3;무처리구, 4;액상수화제, 5;액상수화제 대조구, 6;수화제, 7;수화제 대조구).



## 제 7 절 형질전환균주를 이용한 미생물제제의 현장 적용 평가

### 1. 미생물제제의 살포 일정

형질전환 균주를 이용하여 대량생산방법으로 제조된 미생물제제의 차나무 겹등근무늬병 및 탄저병 방제효과를 검증하기 위한 현장살포 시험은 전남 보성에 위치한 전남농업기술원 차연구시험장의 야부키타 포장과 몽중산다원 재래품종 포장에서 2005년 6월 10일부터 14회에 걸쳐 수행하였고(표 18), 발병조사는 미생물제제 첫 살포일자인 6월 10일부터 83일이 경과한 9월 2일과 90일이 경과한 9월 9일에 각각 실시하였다.

표 18. 차나무 겹등근무늬병 및 탄저병 방제전용 미생물제제 살포 일정

처리구	미생물제제 살포횟수 및 살포일자											
	6월				7월				8월			9월
	2주 (6/10)	3주 (6/18)	4주 (6/25)	1주 (7/4)	2주 (7/11)	3주 (7/18)	4주 (7/23)	1주 (8/1)	2주 (8/11)	3주 (8/17)	4주 (8/26)	1주 (9/2)
①	○	○	○	○								
②	○	○	○	○		○						
③	○	○	○	○		○		○				
④	○	○	○	○		○		○		○		
⑤	○	○	○	○		○		○		○		○
⑥	○	○	○	○				○				
⑦	○	○	○	○				○				○
⑧		○				○				○		
⑨		○		○		○		○		○		○
CK												

- ① 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구
- ② 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 후 1회 추가 살포
- ③ 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 2회 추가 살포
- ④ 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 3회 추가 살포
- ⑤ 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 4회 추가 살포
- ⑥ 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구 + 한 달 후 1회 추가 살포
- ⑦ 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구 + 한 달 간격 2회 추가 살포
- ⑧ 화학약제 한 달 간격 3회 살포
- ⑨ 화학약제 2주일 간격 6회 살포

CK 무처리구

\* 1~7 : 미생물제제 처리구, 8~9 : 화학약제(아족시스트로빈 액상수화제) 처리구

\* 처리구 면적 : 1×1.5 m<sup>2</sup>, 시험구 배치 : 난괴법 3반복

## 2. 미생물제제의 차나무 겹등근무늬병 방제효과

2005년 미생물제제의 차나무 겹등근무늬병 방제 현장 살포 검증을 수행한 전남농업기술원 차연구시험장 시험포장의 전경은 그림 23과 같다.



그림 23. 차나무 겹등근무늬병 방제 시험포장 (전남농업기술원 차연구시험장의 차나무 야부기타품종 재식 포장)

차나무 겹등근무늬병의 발생이 예년에 비해 낮아서 무처리구의 발병엽률은 4.4%인데 반하여 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 처리구의 발병엽률은 3.7%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 후 1회 추가 살포한 처리구에서는 1.3%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 간격으로 2회 추가 살포한 처리구에서는 1.0%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 간격으로 3회 추가 살포한 처리구에서는 0.7%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 간격으로 4회 추가 살포한 처리구에서는 0.5%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 한 달 후 1회 추가 살포한 처리구에서는 2.3%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후

에 한 달 간격으로 2회 추가 살포한 처리구에서는 1.0%의 발병엽률을 나타내었다. 반면에 차나무 겹등근무늬병 방제약제인 아족시스트로빈 액상수화제를 한 달 간격으로 3회 살포한 처리구의 발병엽률은 0.6%였고 아족시스트로빈 액상수화제를 2주일 간격으로 6회 살포한 처리구의 발병엽률은 0.2%였다 (그림 24).

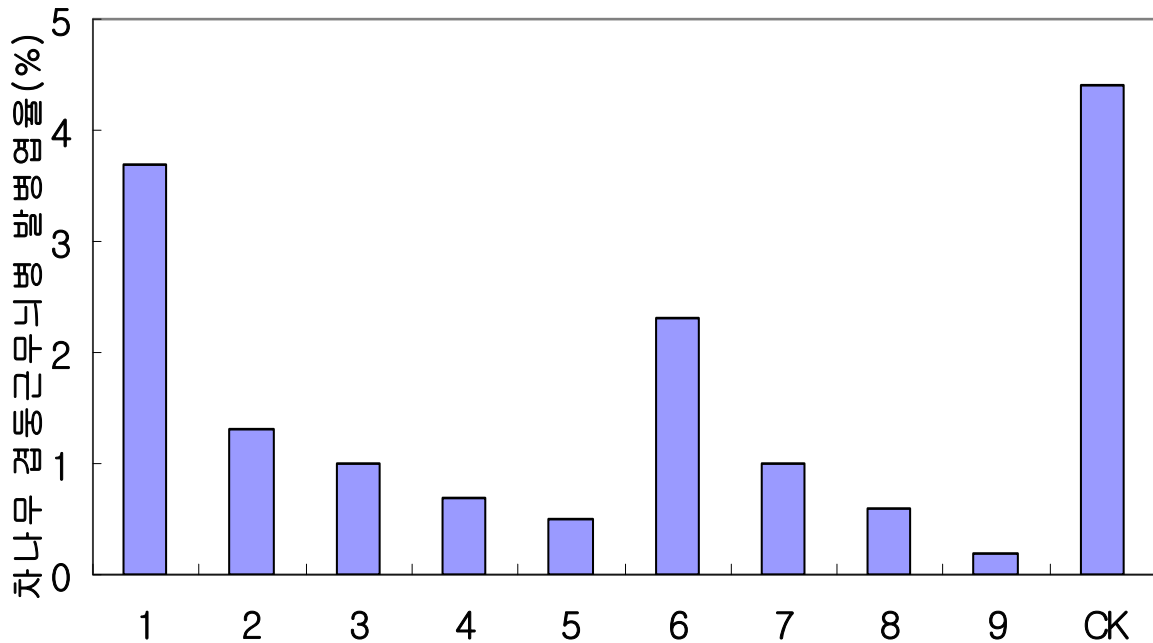


그림 24. 미생물제제 살포횟수에 따른 차나무 겹등근무늬병 발병엽률. ① 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구, ② 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 후 1회 추가 살포, ③ 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 2회 추가 살포, ④ 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 3회 추가 살포, ⑤ 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 4회 추가 살포, ⑥ 1주일 간격 4회 살포구 + 한 달 후 1회 추가 살포, ⑦ 1주일 간격 4회 살포구 + 한 달 간격 2회 추가 살포, ⑧ 화학약제 한 달 간격 3회 살포, ⑨ 화학약제 2주일 간격 6회 살포, CK: 무처리.

전체적으로 발병엽률이 낮아서 방제가를 산출하여 미생물제제의 효과를 단순 비교하기에는 타당성이 낮아 보이지만 방제가를 산출한 결과 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 처리구의 방제가는 15.9%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 후 1회 추가 살포한 처리구에서는 70.5%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 간격으로 2회 추가 살포한 처리구에서는 77.3%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 간격으로 3회 추가 살포한 처리구에서는 84.1%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 간격으로 4회 추가 살포한 처리구에서는 88.6%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 한 달 후 1회 추가 살포한 처리구에서는 47.7%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 한 달 간격으로 2회 추가 살포한 처리구에서는

77.3%의 방제가를 나타내었다(그림 25).

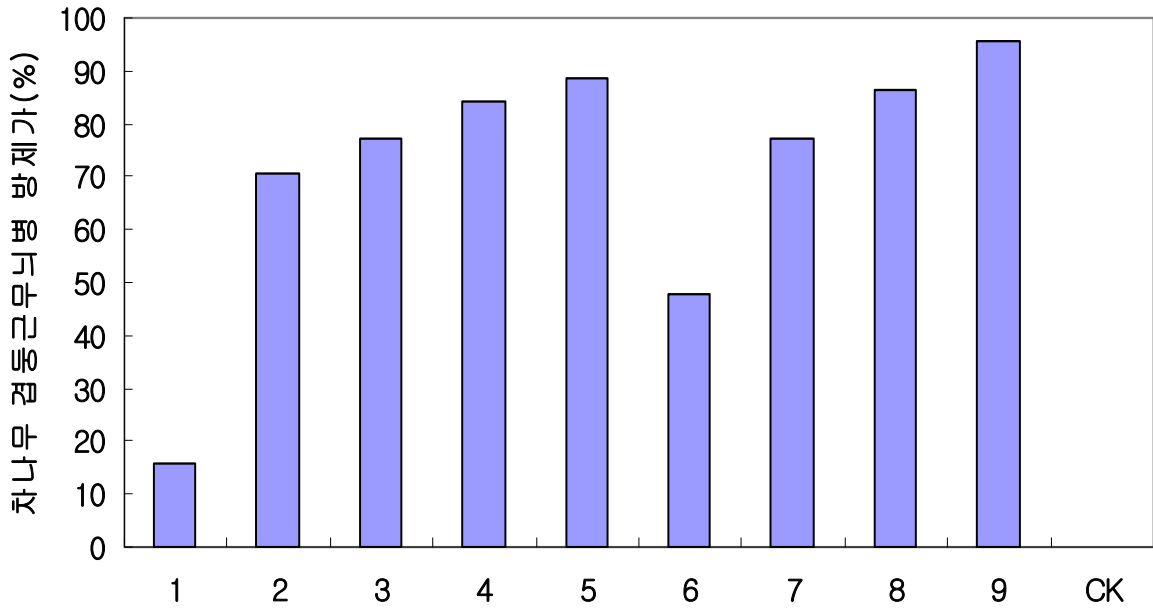


그림 25. 미생물제제 살포횟수에 따른 차나무 겹동근무늬병 방제가. ① 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구, ② 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 후 1회 추가 살포, ③ 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 2회 추가 살포, ④ 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 3회 추가 살포, ⑤ 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 4회 추가 살포, ⑥ 1주일 간격 4회 살포구 + 한 달 후 1회 추가 살포, ⑦ 1주일 간격 4회 살포구 + 한 달 간격 2회 추가 살포, ⑧ 화학약제 한 달 간격 3회 살포, ⑨ 화학약제 2주일 간격 6회 살포. CK: 무처리.

### 3. 미생물제제의 차나무 탄저병 방제효과

2005년 미생물제제의 차나무 탄저병 방제 현장 살포 검증을 수행한 보성 몽중산다원 시험포장의 전경은 그림 23과 같다.

차나무 탄저병의 발생은 예년에 비해 극히 낮아서 무처리구의 발병엽률은 4.5%인데 반하여 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 처리구의 발병엽률은 3.9%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 후 1회 추가 살포한 처리구에서는 2.1%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 간격으로 2회 추가 살포한 처리구에서는 1.6%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 간격으로 3회 추가 살포한 처리구에서는 0.7%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 간격으로 4회 추가 살포한 처리구에서는 0.6%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 한 달 후 1회 추가 살포한 처리구에서는 2.4%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 한 달 간격으로 2회 추가 살포한 처리구에서는 0.8%의 발병엽률을 나타내었다(그림 27).



그림 26. 차나무 탄저병 방제 시험포장(보성 몽중산다원의 차나무 재래품종 재식 포장)

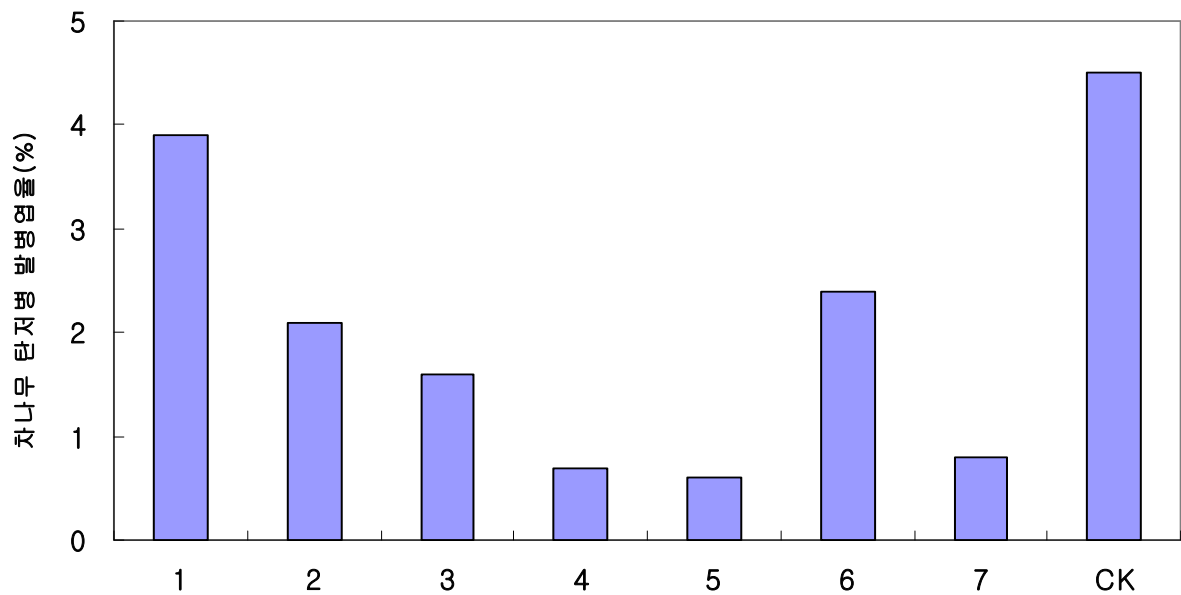


그림 27. 미생물제제 살포횟수에 따른 차나무 탄저병 발병영률. ① 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구, ② 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 후 1회 추가 살포, ③ 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 2회 추가 살포, ④ 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 3회 추가 살포, ⑤ 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 4회 추가 살포, ⑥ 1주일 간격 4회 살포구 + 한 달 후 1회 추가 살포, ⑦ 1주일 간격 4회 살포구 + 한 달 간격 2회 추가 살포, CK: 무처리.

전체적으로 발병염률이 낮아서 방제가를 산출하여 미생물제제의 효과를 단순 비교하기에는 타당성이 낮아 보이지만 방제가를 산출한 결과 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 처리구의 방제가는 13.3%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 후 1회 추가 살포한 처리구에서는 53.3%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 간격으로 2회 추가 살포한 처리구에서는 64.4%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 간격으로 3회 추가 살포한 처리구에서는 84.4%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 간격으로 4회 추가 살포한 처리구에서는 86.7%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 한 달 후 1회 추가 살포한 처리구에서는 46.7%, 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 한 달 간격으로 2회 추가 살포한 처리구에서는 82.2%의 방제가를 나타내었다(그림 28).

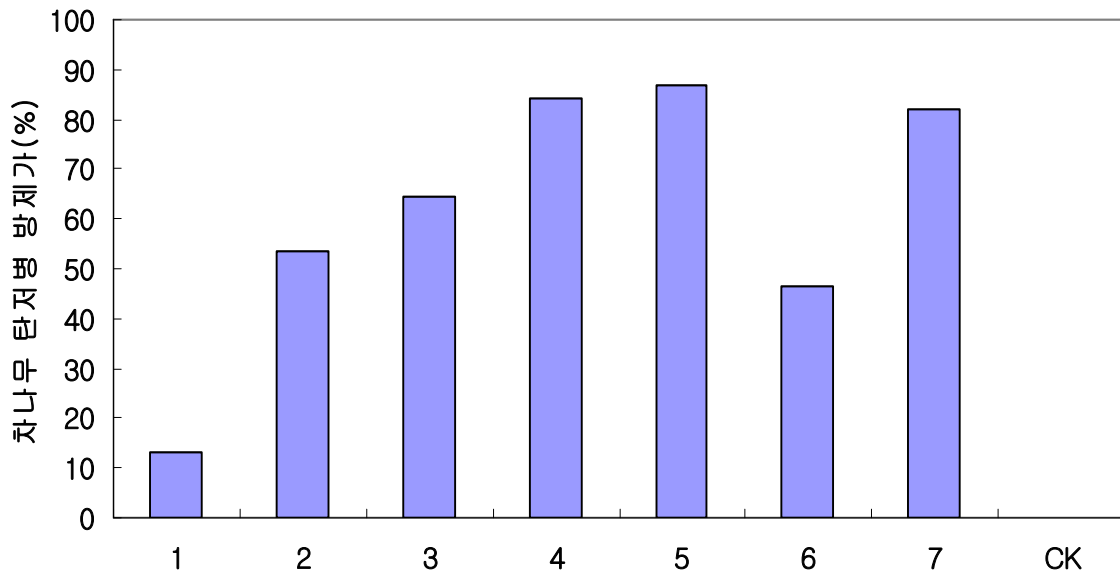


그림 28. 미생물제제 살포횟수에 따른 차나무 탄저병 방제율. ① 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구, ② 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 후 1회 추가 살포, ③ 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 2회 추가 살포, ④ 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 3회 추가 살포, ⑤ 1주일 간격 4회 살포구 + 2주일 간격 4회 추가 살포, ⑥ 1주일 간격 4회 살포구 + 한 달 후 1회 추가 살포, ⑦ 1주일 간격 4회 살포구 + 한 달 간격 2회 추가 살포, CK: 무처리.

따라서 미생물제제를 여러 가지 살포횟수와 살포간격으로 처리하여 방제효과를 비교한 결과 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 후에 2주일 간격으로 2회 이상 추가 살포하는 경우에 65% 이상의 방제율을 나타내어 차나무 탄저병 방제를 위한 미생물제제의 현장살포 시 적합한 처리일정으로 판단된다.

## 제 8 절 미생물제제를 이용한 차나무 겹등근무늬병 및 탄저병 방제

### 1. 미생물제제의 살포 일정

형질전환된 균주 *Bacillus subtilis* BD0310을 이용하여 대량배양한 액상수화제형 미생물제제를 차나무 겹등근무늬병과 탄저병 방제효과 시험을 검증하기 위해 전남 보성에 위치한 전남농업기술원 차연구시험장과 전남 강진에 위치한 장원산업의 야부키타 포장에서 2006년 6월 26일부터 6회에 걸쳐 수행하였다. 각 처리구는 모두 5가지 처리구로 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구, 미생물제제 1주일 간격 6회 살포구, 미생물제제와 화학약제(오티바 액상수화제, 트리후민 수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구, 화학약제(오티바 액상수화제, 트리후민 수화제) 1주일 간격 4회 살포구, 무처리구로 실험을 수행하였다 (표 19).

모든 처리구의 면적은 1.5 m<sup>2</sup>씩 3반복으로 수행하였으며 살포된 액상수화제형 미생물제제는 10<sup>8</sup> CFL/ml의 농도로 화학약제 오티바 액상수화제는 500배액으로 차나무에 살포하여 미생물제제 첫 살포일자인 6월 26일부터 30일이 경과한 7월 26일과 44일이 경과한 8월 9일에 각각 발병엽률을 조사하였다.

표 19. 차나무 겹등근무늬병 및 탄저병 방제전용 미생물제제 살포 일정

처리구	미생물제제 살포횟수 및 살포일자					
	6월 26일	7월 3일	7월 12일	8월 19일	7월 26일	8월 2일
①	○	○	○	○		
②	○	○	○	○	○	○
③	○	△	○	△		
④	△	△	△	△		
⑤						

① 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구

② 미생물제제 1주일 간격 6회 살포구

③ 미생물제제와 화학약제(오티바 액상수화제, 트리후민 수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구

④ 화학약제(오티바 액상수화제, 트리후민 수화제) 1주일 간격 4회 살포구

⑤ 무처리구

\* ○ : 미생물제제 처리구, △ : 화학약제(오티바 액상수화제, 트리후민 수화제) 처리구

\* 처리구 면적 : 1×1.5 m<sup>2</sup>, 시험구 배치 : 난괴법 3반복

## 2. 미생물제제를 이용한 차나무 겹등근무늬병 방제

2006년 미생물제제의 차나무 겹등근무늬병 방제 현장 살포 검증을 수행한 전남농업기술원 차연구시험장 시험포장의 전경은 그림 29와 같다.



그림 29. 차나무 겹등근무늬병 방제 시험포장(전남농업기술원 차연구시험장)

2006년 차나무 겹등근무늬병의 포장 발병엽률이 2005년 겹등근무늬병의 포장 발생에 비해 0.6% 증가한 상태에서 미생물제제 현장 살포 검증 결과(그림 29), 무처리구의 발병엽률은 5.0%인데 반하여 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 처리구의 발병엽률은 2.4%, 미생물제제를 1주일 간격으로 6회 살포한 처리구에서는 1.4%, 미생물제제와 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구에서는 1.2%, 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 4회 살포구에서는 0.6%의 발병엽률을 나타내었다(그림 30).



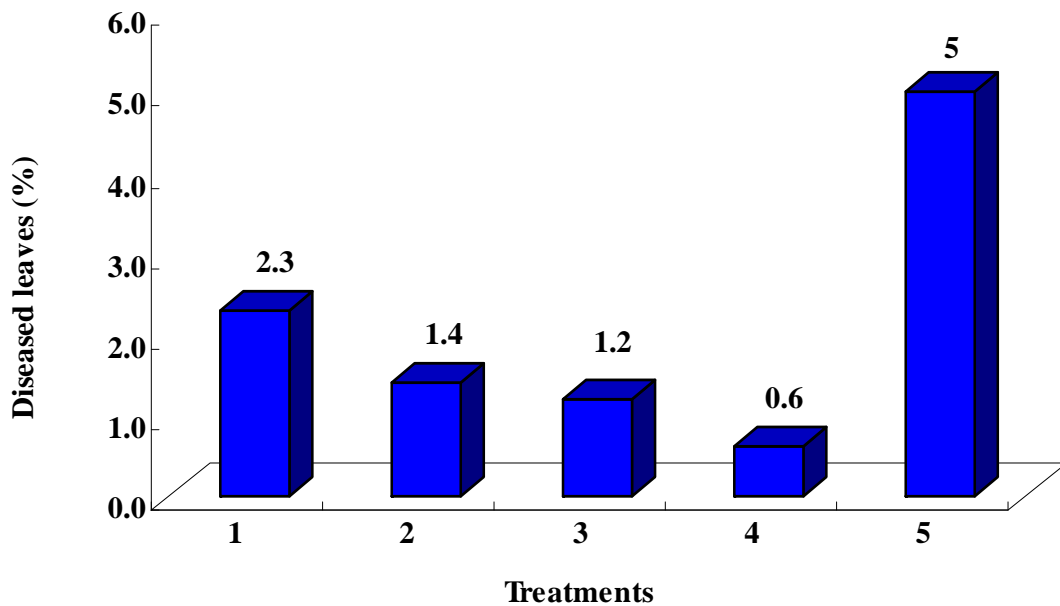


그림 30. 미생물제제 살포횟수에 따른 차나무 겹등근무늬병 발병엽률. ① 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구, ② 미생물제제 1주일 간격 6회 살포구, ③ 미생물제제와 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구, ④ 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 4회 살포구, ⑤ 무처리구.

전체적으로 발병엽률이 낮아서 방제가를 산출하여 미생물제제의 효과를 단순 비교하기에는 타당성이 낮아 보이지만 방제가를 산출한 결과 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 처리구의 방제가는 52.4%, 미생물제제를 1주일 간격으로 6회 살포한 처리구에서는 66.7%, 미생물제제와 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구에서는 71.4%, 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 4회 살포구에서는 85.7%의 방제가를 나타내었다 (그림 31).

미생물제제를 여러 가지 살포횟수와 살포간격으로 처리하여 방제효과를 비교한 결과 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 4회 살포구의 85.7%의 방제가를 나타낸 반면에 미생물제제와 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구에서 70%이상의 방제가를 나타내었다. 따라서 미생물제제와 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포하는 것이 화학약제의 사용을 절감하고 차나무 겹등근무늬병에 대한 방제효과를 높이는 친환경적 차나무 겹등근무늬병 방제 프로그램으로 판단된다.

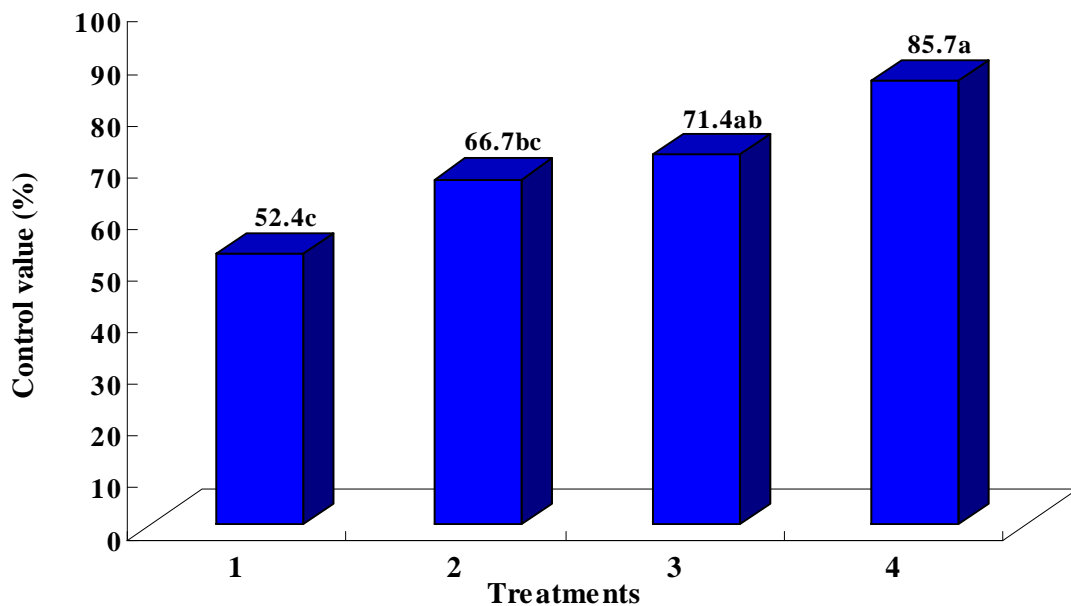


그림 31. 미생물제제 살포횟수에 따른 차나무 곁등근무늬병 방제가. ① 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구, ② 미생물제제 1주일 간격 6회 살포구, ③ 미생물제제와 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구, ④ 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 4회 살포구.

### 3. 미생물제제를 이용한 차나무 탄저병 방제

2005년에는 미생물제제의 차나무 탄저병 방제 현장 살포 검증을 보성 몽중산다원에서 수행하였다. 그러나 몽중산다원은 철저하게 유기농재배를 실천하는 다원이어서 약제처리구를 대조구로 둘 수가 없었기 때문에 부득이 2006년 미생물제제의 차나무 탄저병 방제 현장 살포 검증은 전남 강진 장원산업에서 수행하였는데 시험포장의 전경은 그림 32와 같다.

2006년 차나무 탄저병 방제 현장 살포 검증 시험을 수행한 장원산업 시험포장에서는 2005년 시험을 수행했던 몽중산다원에 비하여 탄저병 발생이 2% 정도 증가하여 무처리구의 발병엽률은 6.3%인데 반하여 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 처리구의 발병엽률은 3.0%, 미생물제제를 1주일 간격으로 6회 살포한 처리구에서는 2.1%, 미생물제제와 화학약제(트리후민 수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구에서는 1.8%, 화학약제(트리후민 수화제) 1주일 간격 4회 살포구에서는 0.9%의 발병엽률을 나타내었다 (그림 33).



그림 32. 차나무 탄저병 방제 시험포장 (장원산업의 차 야부기타품종 재식 포장)

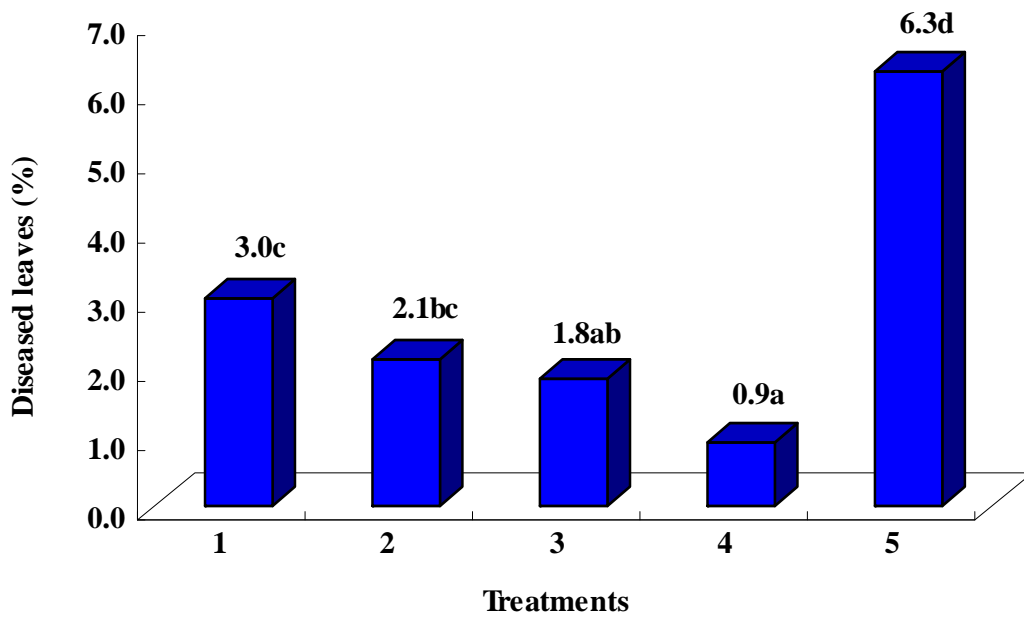


그림 33. 미생물제제 살포횟수에 따른 차나무 탄저병 발병엽률. ① 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구, ② 미생물제제 1주일 간격 6회 살포구, ③ 미생물제제와 화학약제(트리후민 수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구, ④ 화학약제(트리후민 수화제) 1주일 간격 4회 살포구, ⑤ 무처리구.

전체적으로 발병염률이 낮아서 방제가를 산출하여 미생물제제의 효과를 단순 비교하기에는 타당성이 낮아보이지만 방제가를 산출한 결과 미생물제제를 1주일 간격으로 4회 살포한 처리구의 방제가는 54%, 미생물제제를 1주일 간격으로 6회 살포한 처리구에서는 72%, 미생물제제와 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구에서는 76%, 화학약제(오티바 액상수화제) 1주일 간격 4회 살포구에서는 88%의 방제가를 나타내었다 (그림 34).

미생물제제를 여러 가지 살포횟수와 살포간격으로 처리하여 방제효과를 비교한 결과 화학약제(트리후민 수화제) 1주일 간격 4회 살포구의 88%의 방제가를 나타낸 반면에 미생물제제와 화학약제(트리후민 수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구에서 76%이상의 방제가를 나타내는 것으로 보아 미생물제제와 화학약제(트리후민 수화제) 1주일 간격으로 2회 교대 살포하는 것이 화학약제의 사용을 절감시키면서 방제효과를 극대화시킬 수 있는 친환경적 차나무 탄저병 방제법으로 판단된다.

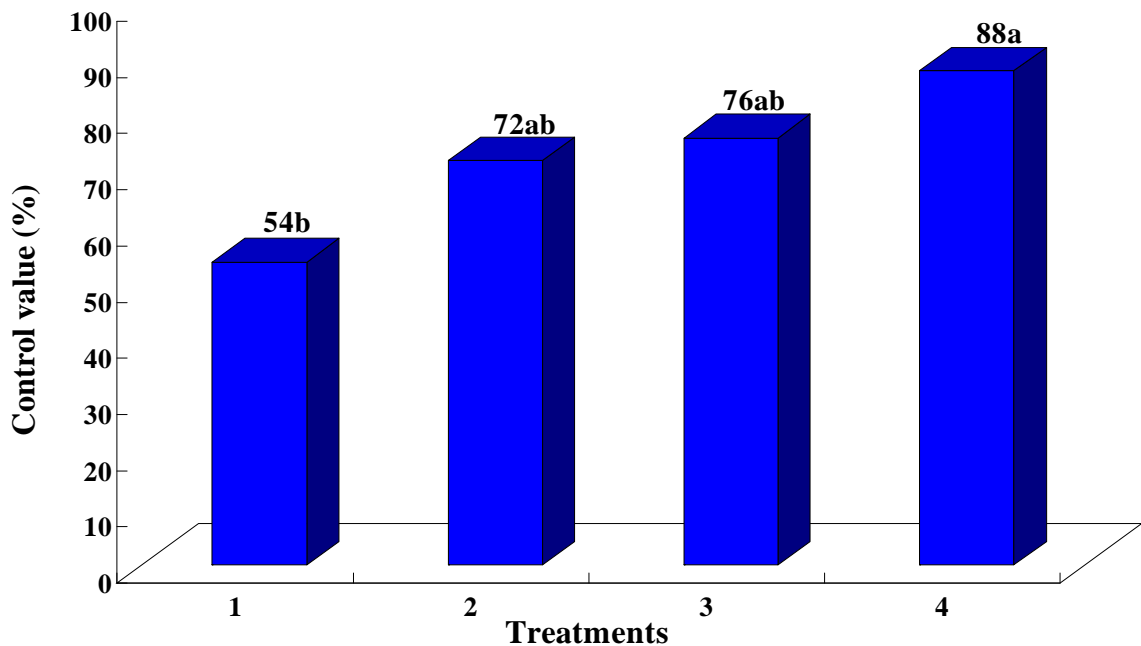


그림 34. 미생물제제 살포횟수에 따른 차나무 탄저병 방제가. ① 미생물제제 1주일 간격 4회 살포구, ② 미생물제제 1주일 간격 6회 살포구, ③ 미생물제제와 화학약제(트리후민 수화제) 1주일 간격 2회 교대 살포구, ④ 화학약제(트리후민 수화제) 1주일 간격 4회 살포구, ⑤ 무처리구.

## 제 9 절 제품기능 향상을 위한 다균주 혼합 2세대 미생물제제 개발 선행 연구

### 1. 다균주 미생물제제 개발을 위한 추가 균주 선발 및 균주특성 규명

기존에 개발된 미생물제제의 제품 기능 향상을 위한 다균주 복합제제 개발을 위하여 차나무 (*Camellia sinensis*)와 같은 속에 속하는 동백나무 (*Camellia japonica*) 엽권으로부터 길항균주 선발을 실시하였다. 이를 위하여 남해 도서지방인 여수, 순천, 보성, 장흥, 완도, 거금도, 거문도, 진도에 서식하고 있는 동백나무로부터 *Bacillus* 속에 속하는 균주를 선발하고 차나무 겹등근무늬병 원균에 대한 길항력을 기준으로 7 isolate의 후보 균주를 선발하였다. 그 중에서 NA 평판배지에서 격자식 대치배양을 통하여 기존에 개발된 제품의 길항균주인 BD3010 균주에 가장 영향이 적은 균주로 완도지역에서 채집한 동백나무 잎으로부터 분리한 우수 길항균주 CJ06003를 선발하였다 (그림 35).



그림 35. 완도지역 서식 동백나무 엽권에서 분리한 길항균주 CJ06003 isolate의 항균력.

선발된 CJ06003 균주의 동정을 실시한 결과, 형태적 특성으로 그람염색과 생리·생화학적 특성으로 온도 45°C, pH 5, 7, Motility, 전분 분해력을 조사 한 결과 모두 양성반응을 보였고, GF5030은 전분 분해력에서 음성 반응을 보였다. 분자생물학적인 방법에 의한 분석으로 길항세균의 세포를 분해하고 DNA를 extraction 한 후 PCR하여 전기영동하였다. 전기영동 후 band를 확인하고 RNA band를 잘라냈다. 잘라 낸 gel cleaning한 후 염기서열을 분석하여 NCBI에 입력된 염기서열과 비교한 결과 *Bacillus subtilis*와 99% 상동성을 보여 최종적으로 *B. subtilis*로 동정하였다.

추가 길항균주인 CJ06003 균주의 배양 특성 및 미생물제제 개발을 위하여 절대적으로 필요한 선발 균주의 내생포자 생성 확인을 위하여 NB배지를 이용하여 30°C, 150rpm으로 진탕배양하면서 시간대별로 위상차 현미경 관찰을 실시한 결과, 배양 3일부터 내생포자가 영양세포와 확연히 구별되기 시작하여 5일째부터는 거의 모든 세균들이 내생포자로 존재하는 것을 확인하여, 배양기간을 5일로 결정하게 되었다 (그림 36).

제형화 이후 포장 처리시 길항균의 내생포자 생존을 또는 영양세포로의 전환율은 *Bacillus* 속 길항세균을 미생물제제로 이용하는데 성공 여부를 결정하는 매우 중요한 요인이기 때문에 이에 대한 조사를 실시하였다. NB배지를 이용하여 30°C, 150rpm으로 진탕배양한 후 길항균을 수거하여 냉장보관 상태에서 시간 경과 별로 NA 평판배지에서 생성된 길항균주의 CFU를 조사한 결과, 배양직후에 비하여 1주까지는 매우 안정된 경향을 보였지만 이후 시간 경과에 따라 내생포자의 회수율이 급격히 감소하여 4주 후에는 초기 균농도가 10,000배 이하로 감소하는 것을 확인하였다 (표 20).

표 20. 시간경과에 따른 추가 길항세균 CJ06003 균주의 내생포자 회수율

경과 시간	배양직후	1주 후	2주 후	4주 후
균농도 (CFU/ml)	$8.1 \times 10^7$	$8.0 \times 10^7$	$4.8 \times 10^6$	$3.5 \times 10^3$

시간 경과에 따른 내생포자의 회수율 감소에 대한 원인 분석하기 위하여 배양여액의 고압멸균 처리, 단백질 분해 효소처리, 배양여액 내 균주 보관 등을 조사한 결과, 배양여액 내의 물질이 내생포자의 영양세포로의 전환(휴면타과)에 관계가 없음을 추측할 수 있었다. 일반적으로 알려진 내생포자 생성 및 휴면타과와 관련된 열처리를 실시한 결과에서도 변화를 찾아 볼 수 없었다. 따라서 현재 문헌 조사를 통해 알려진 L-alanine과 같은 화학물질을 이용한 내생포자 휴면타과 실험을 진행 중에 있다. 만약 길항균주의 내생포자 휴면타과를 조절할 수 있는 방법을 찾아내게 된다면, 복합균주 처리 후 병발생상태나 환경조건에 따라 서로 다른 시기에 서로 다른 균주를 순차적

으로 활성화 시킬 수 있기 때문에 다균주 복합 미생물제제 개발 및 실용화를 위한 기반기술이 개발될 것으로 기대된다.

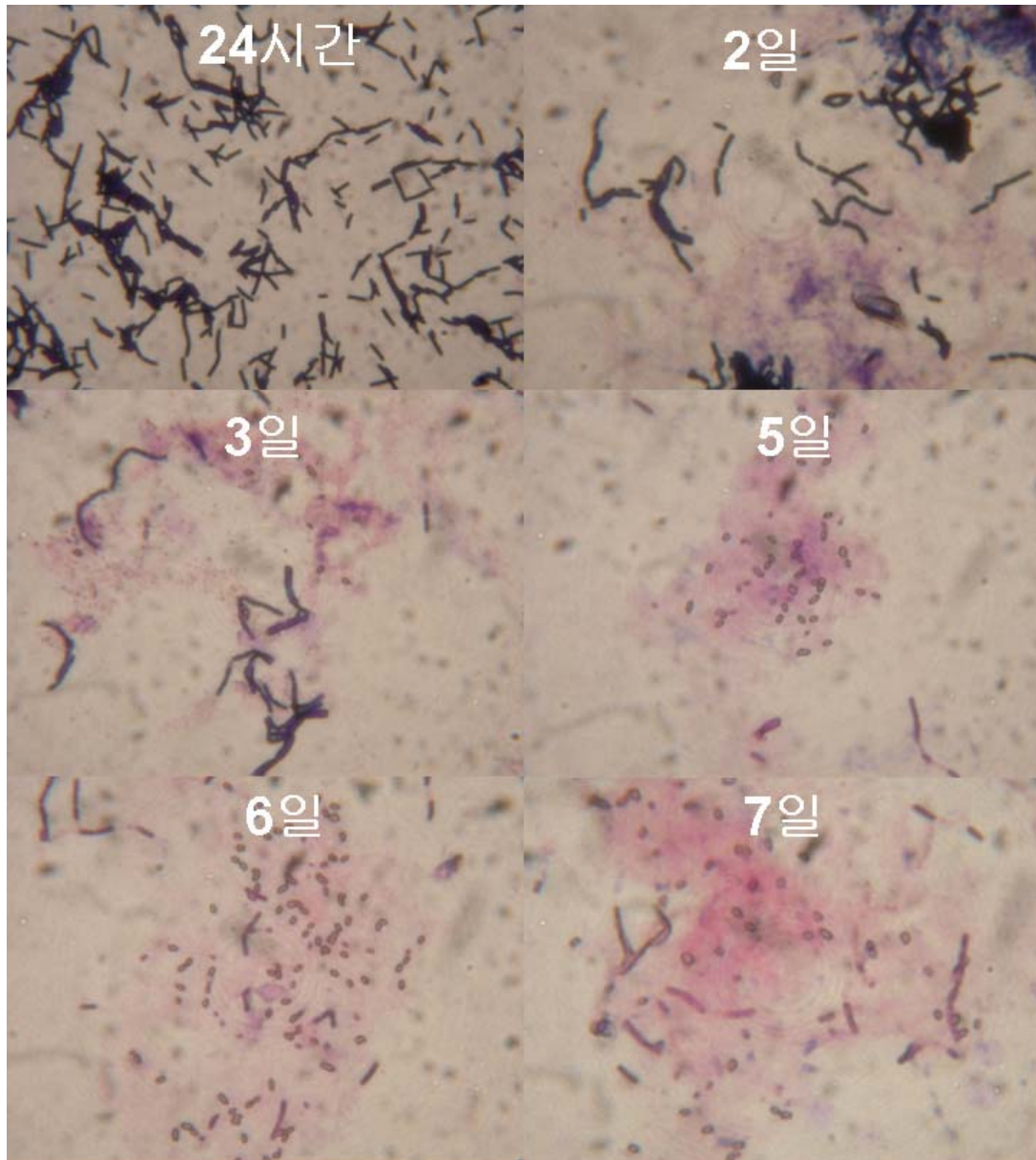


그림 36. 추가 길항균주 CJ06003의 배양기간에 따른 내생포자 생성 정도

## 2. 추가 길항세균 CJ06003 균주의 배양조건 규명

*B. subtilis* CJ06003 길항세균의 차나무 겹등근무늬병균의 균사생장 억제효과를 증가시키는 탄소

원으로는 maltose와 starch가 효과적이었으며 (그림 37), 질소원으로 peptone, tryptone, malt extract가 효과적이었다 (Fig. 37). 길항세균의 배양 적정 온도으로 30℃~35℃로 조사되었으며 (그림 38), 배양 적정 pH는 pH 7에서 가장 높은 세균밀도를 보였다 (그림 39).

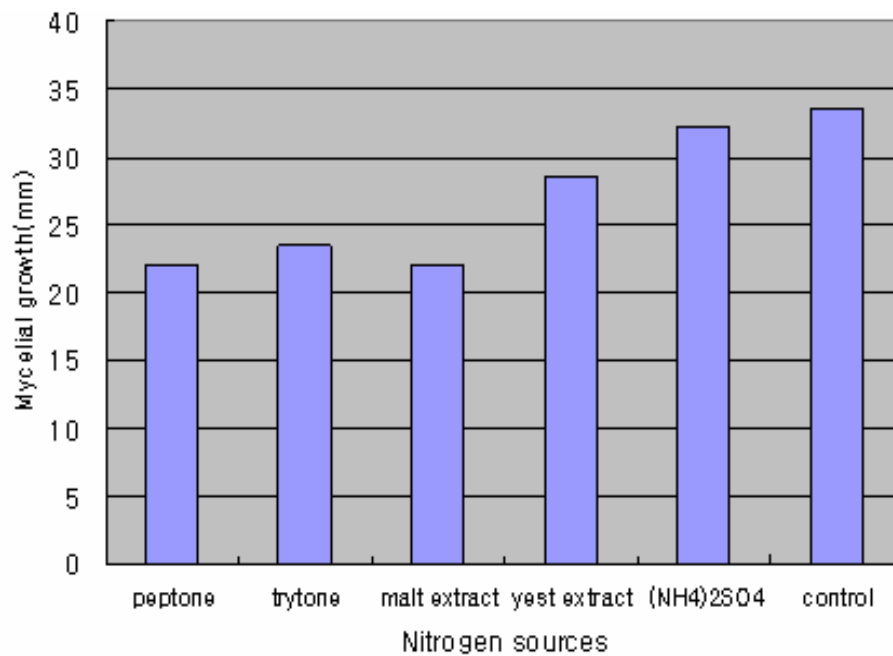
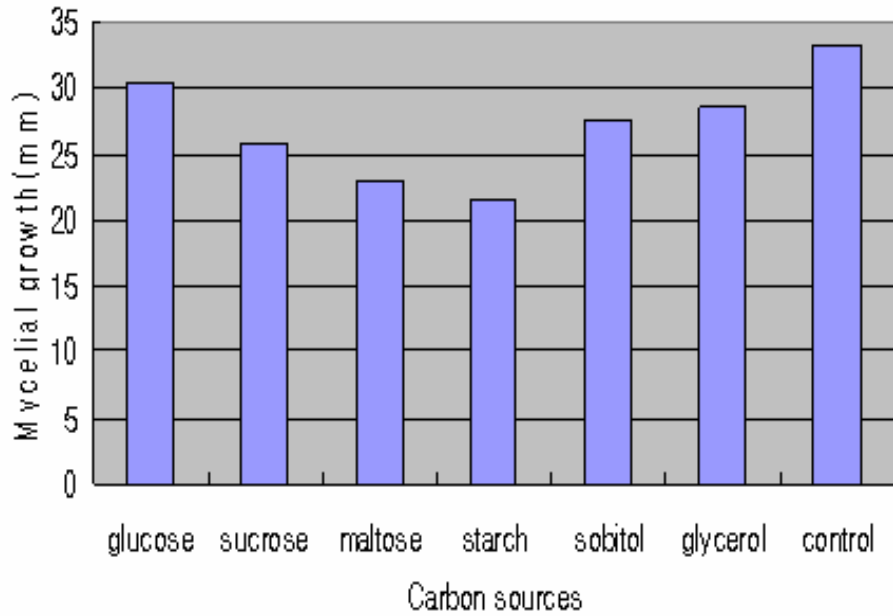


그림 37. 감자한천배지에서 차나무 겹등근무늬병균 *Pestalotiopsis longiseta*에 대한 길항세균 *Bacillus subtilis*CJ06003 균주의 항균활성을 증대시키는 탄소원과 질소원.



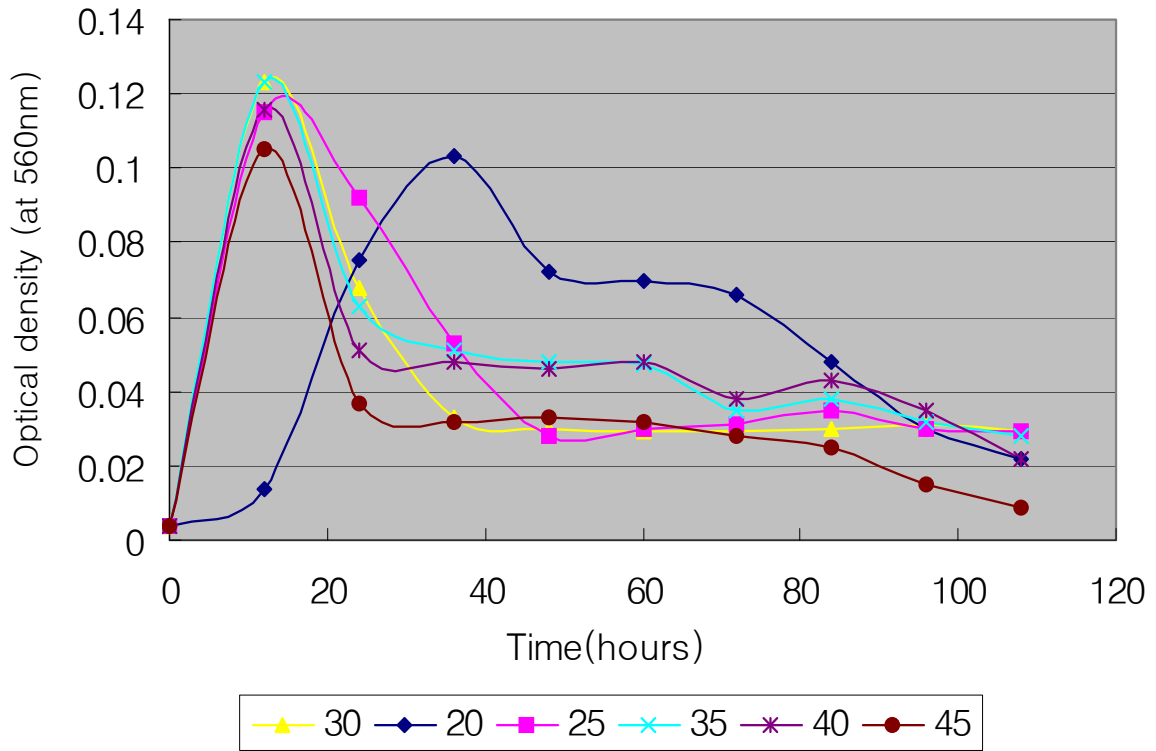


그림 38. 영양배지에서 초기 배양온도에 따른 길항세균 *Bacillus subtilis* CJ06003 균주의 성장곡선.

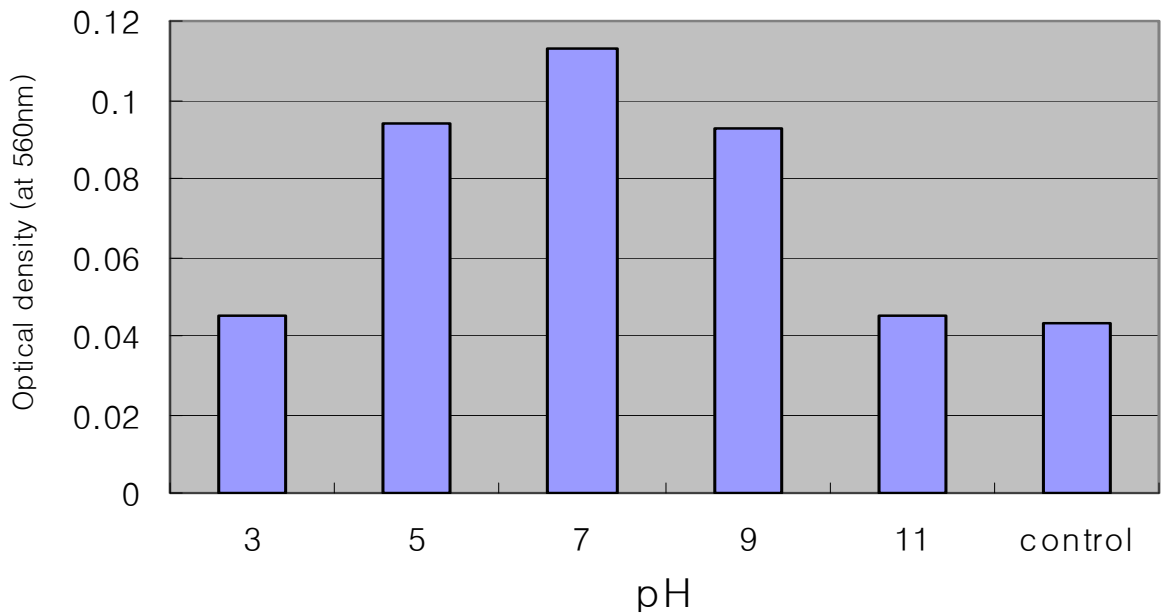


그림 39. 영양배지에서 초기 배양 pH에 따른 길항세균 *Bacillus subtilis* CJ06003 균주의 성장그래프.

## 제 10 절 차나무 탄저병 및 겹등근무늬병 방제전용 미생물제제의 대량생산 프로세스 개발 및 상품화

### 1. 실험실 구멍 최적 배양 조건의 대형화 배양 시스템 개발

주관연구기관에서 1차년도에 구명한 최적 조건을 만족할 수 있도록 개발한 대형 배양시스템 (그림 40)과 3차년도에 액상수화제를 제품으로 대량 생산하기 위하여 배양온도, 공기공급율, 배양기간 등이 자동으로 운전될 수 있는 설비를 완성하였다 (그림 41).



그림 40. 길항세균 대량배양을 위하여 자체 제작한 발효기(200 L)



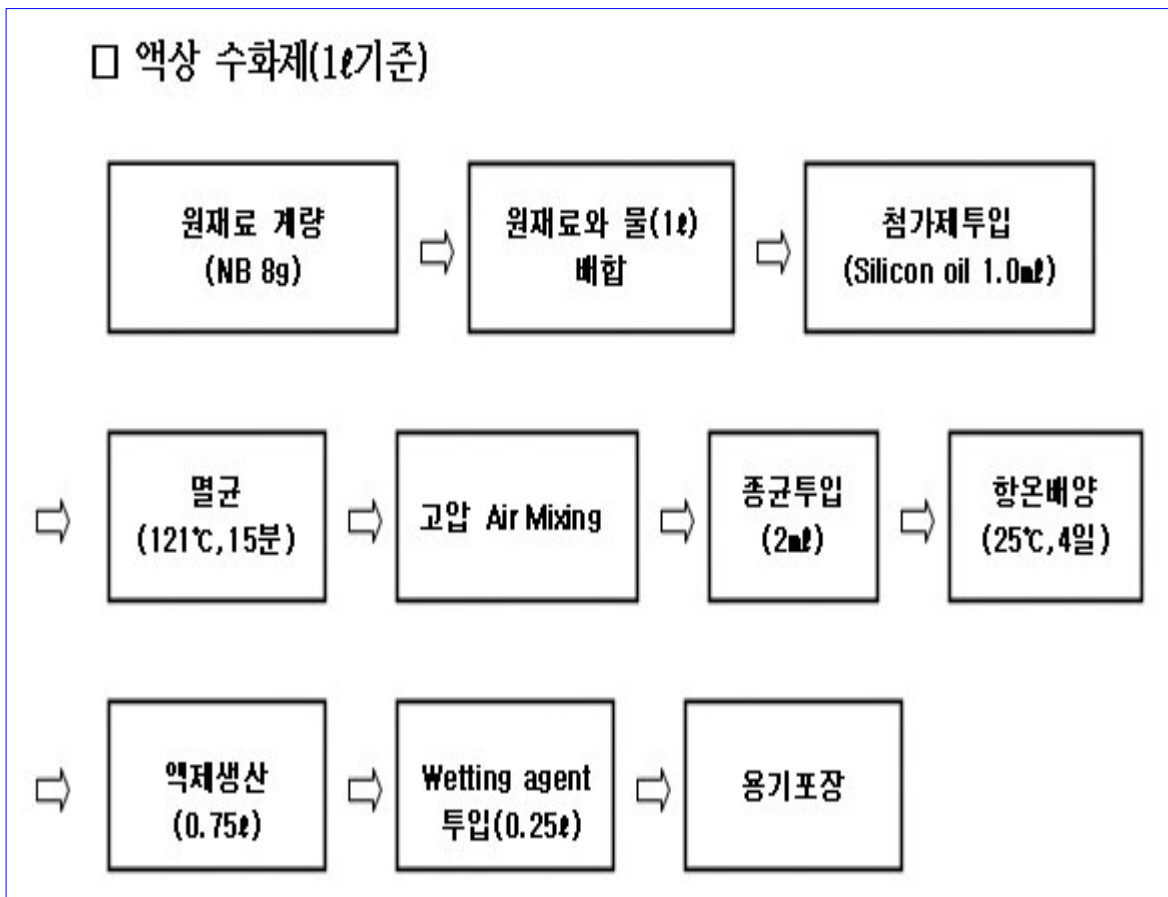
그림 41. 최종연도에 개발 완료된 액상수화제 제조용 길항균주 대량 배양시스템

## 2. 최종 선발 제형 대량생산을 위한 제형화 프로세스 개발

실내 연구개발과 아래와 같은 현장실험결과를 통하여 액상수화제 미생물제제를 최종 제형으로 선발하였다.

- ① 7회 살포 시에도 녹차잎에 미관상 문제가 없음 : 착색정도 1이하
- ② 높은 방제가(77.3%)를 보임.
- ③ 높은 희석비율(500배)로 사용 가능하여 운반 및 보관이 용이함.
- ④ 포장에서 희석 후 분무기로 쉽게 살포 가능함 : 노즐 막힘 현상 등이 없음.

액상수화제 제형의 미생물제제를 대량 생산하기 위하여 아래와 같은 제형화 프로세스를 개발하였다.



### 3. 액상수화제의 경제성을 높이기 위한 새로운 원료물질 및 배합비율 선정

대량 생산시 액상수화제의 생산단가를 낮추기 위하여 Nutrient broth 대비 원재료비를 약 85% 이상 줄일 수 있는 [감자가루+Dextrose+탈지분유] 조합을 C, N, P, 무기질 공급원으로 도출하였다. 최종 선발된 배합비율은 액상수화제 1ℓ 당 감자가루는 4g, Dextrose는 20g, 탈지분유는 5g로 결정하였다. 위와 같이 선발된 원료물질을 사용하여 25℃에서 4일 간 균을 배양한 결과는 표 21과 같다.

표 21. 영양원 변화에 따른 배양시 균농도 비교

원재료 배양 횟수	감자가루+탈지분유+Dextrose 사용시 균 농 도(cfu/ml)	Nutrient broth 사용시 균 농 도(cfu/ml)
1차 배양	1.7×10 <sup>10</sup>	2.2×10 <sup>10</sup>
2차 배양	1.2×10 <sup>10</sup>	2.1×10 <sup>10</sup>
3차 배양	1.5×10 <sup>10</sup>	1.9×10 <sup>10</sup>
평균	1.5×10 <sup>10</sup>	2.1×10 <sup>10</sup>

위의 배양 결과를 볼 때 영양원을 경제성이 매우 높은 [감자가루+Dextrose+탈지분유] 조합으로 바꾸어도 균농도에 큰 영향은 없는 것으로 보아 최종제품 대량 생산시 NB 대신 [감자가루+Dextrose+탈지분유] 조합을 이용하기로 최종 결정하였다.

### 4. 최종 제품의 보관성을 높이기 위한 첨가물질 및 적정 배합비 선발

제품의 보관성을 12개월 이상으로 높이기 위해서는 내생포자 형성을 촉진시킬 수 있는 stress성 물질을 투입하여야 하기 때문에, 이를 위하여 일반적으로 많이 쓰이며 쉽게 구할 수 있는 재료인 NaCl을 이용하였으며 적정 첨가비율을 결정하기 위하여 NaCl 첨가비율별로 형성된 내생포자 농도를 측정한 결과, NaCl은 0.9%를 투입하는 것이 보관성을 높이기 위한 적정 비율임을 알 수 있었다 (표 22).

표 22. NaCl 처리비율별 균농도 비교

NaCl 처리비율	균 농도(cfu/ml)	비 고
0.3 %	$7.1 \times 10^7$	3반복 실험
0.6 %	$5.4 \times 10^8$	
0.9 %	$7.3 \times 10^9$	
1.2 %	$2.3 \times 10^8$	
1.5 %	$4.1 \times 10^7$	

5. 최종 제품(액상수화제) 대량 생산시 경제성 분석

Wetting agent로 Tween-20을 선발하였고 계면활성제 및 solvent로는 Silicon oil을 선발하여 사용하였다. 이 때 위 두가지 재료의 물질안전보건자료(MSDS) 의하면 아래와 같은 첨가 농도에서는 독성이 없으며 인·축에 무독성을 나타내는 것으로 알려지고 있다. 표 23에 제시된 것과 같이 액상수화제 1ℓ 생산시 순재료비는 약 110원정도 소요되며, 월별로 원액 4,200ℓ 생산 기준시 여기에 용기구입비(190원/ℓ), 등유비(360원/ℓ), 인건비(340원/ℓ)를 포함하면 제품 1ℓ당 약 1,000원이 정도 소요되어 10ℓ 제품 기준 생산비는 10,000원 내외로 책정될 수 있어 기존에 시판되고 있는 여타 미생물제제에 비하여 가격 경쟁력이 충분히 있을 것으로 판단되었다.

표 23. 최종제품의 원료성분 및 배합비율

원료명	투입량	단 가	비 고
감자가루	4 g	5 원	탄소/무기물
탈지분유	5 g	2 원	질소/인
Dextrose	20 g	10 원	탄소
NaCl	0.9 %	20 원	내생포자 생성 촉진
Tween-20	1.0 %	60 원	Wetting agent
Silicon oil	0.1 %	10 원	계면활성/solvent
Ascorbic acid	0.01 %	3 원	미량원소
최종제품	1 ℓ	110 원	

## 5. 미생물제제 보관 안정성 및 항균활성 검증

위의 최종제품의 상온 보관시 안정성을 확인하기 위하여 제품에서 재분리하여 균농도를 확인한 결과 그늘진 장소에서 상온으로 12개월 이상 보관된 경우  $1.3 \times 10^9$  cfu/ml 이상의 균농도를 확인에 장기간 보관에도 제품의 안정성을 확인할 수 있었다 (표 24). 또한 8개월 경과 후에 미생물제제로부터 분리한 길항균과 녹차 병원균과의 대치 배양을 통하여 항균활성 유지되고 있는 것을 확인할 수 있었다 (그림 42).

표 24. 액상수화제 보관일수에 따른 균밀도 변화

보관일수	액상 수화제(cfu/ml)	비 고
0 개월	$1.6 \times 10^{10}$	
2 개월	$1.1 \times 10^{10}$	
4 개월	$9.3 \times 10^9$	
6 개월	$7.4 \times 10^9$	상온 그늘진 곳 보관시
8 개월	$4.5 \times 10^9$	
10 개월	$2.1 \times 10^9$	
12 개월	$1.3 \times 10^9$	

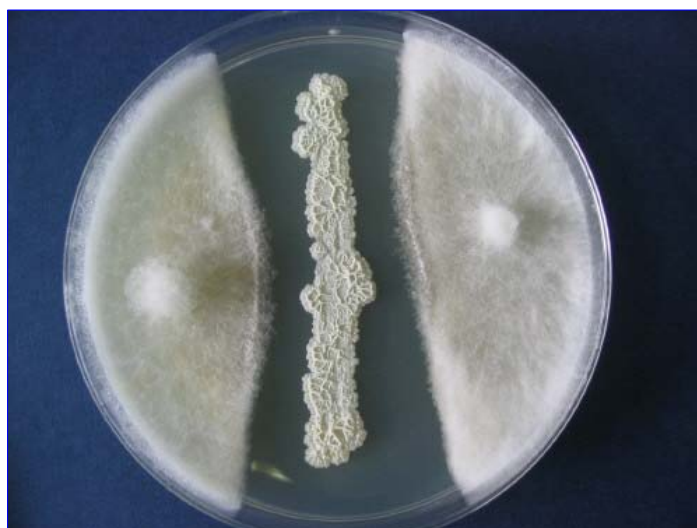


그림 42. 8개월 경과 후 미생물제제로부터 분리한 길항세균 대치배양을 통한 항균활성 유지 평가

## 6. 미생물제제 최종제품생산

대량배양장치와 제형화장치를 이용하여 개발 공정에 따라 미생물제제 생산을 실시하여 그림 43과 같은 액상수화제 최종제품을 생산하였다.

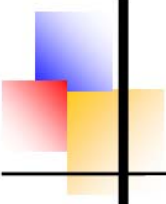


그림 43. 개발 완료된 액상수화제형 차나무 탄저병 및 겹등근무늬병 방제전용 미생물제제 제품

## 7. 개발 미생물제제의 실용화 및 상품화 준비

- 1) 국제특허출원용 균주기탁 완료 : 차나무 잎에서 분리한 균주인 *Bacillus subtilis* CEB 153 (*B. subtilis* BD3001)을 국제특허출원용으로 균주기탁(기탁번호 : KCCM-10640)을 2004년 12월 28일에 완료하였다.
- 2) 제품등록 완료 : 경기도 화성시에 2005년 1월 29일자로 미생물제제 [10-(14)-나-12-2호]로 등록 완료하였다.


- 3) 상표출원 완료 : 2007년 3월 19일에 제품명을 '차사랑'으로 상표출원(40-2007-0014580)하였다.
- 4) 용기 Design 및 현장 Manual 작성 : 3, 4, 5, 20ℓ 용량의 용기 측면에 labeling할 스티커를 제작하기 위하여 아래와 같이 도안하였으며 여기에 현장에서 쉽게 사용할 수 있도록 설명서도 첨부하여 제작하였다.
- 5) 연구 종료시점 현재 제품 개발 완료 및 시장 출시 (그림 44, 45).




# 차 사랑®

차나무용 미생물제제

- 차나무 탄저병 방제
- 차나무 겹등근무늬병 방제
- 광합성 촉진
- 차나무 잎 성장 촉진



<p><b>차사랑® 이란?</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▣ 차사랑은 미생물살균제로서 내생포자를 형성하는 길항균주를 국내재배 중인 차나무 잎에서 분리하여 제품에 이용하였음.</li> <li>▣ 이용된 균주는 차나무 탄저병 및 겹등근무늬병에 탁월한 방제효과를 나타냄.</li> <li>▣ 실제 차나무 재배농가에서 분리한 세균을 이용하므로 차나무 잎에서 안정적인 활성 및 생존력을 보여 병발생 예방효과가 큼.</li> <li>▣ 제품에 첨가된 영양소와 무기영류 등에 의하여 차나무 잎의 성장과 광합성을 촉진하여 최종 제품인 녹차의 질을 향상시킴.</li> <li>▣ 현재 많이 사용하고 있는 차나무 방제용 화학농약에 대하여 강한 내성을 가지고 있어서 화학농약과 혼용 혹은 교차사용 시에도 활성저하 등의 문제가 없음.</li> </ul>	<p><b>보증농도 :</b>  <i>Bacillus subtilis</i> KCCM 10640  (not less than <math>1 \times 10^8</math> CFU/Liter)</p> <p><b>살포시기 :</b>  5월초부터 6월말 사이에 4주 동안 1주 간격으로 4회 그 후 2주 간격으로 2회 총 6회 살포함.</p> <p><b>처리 방법 :</b>  제품을 500배 희석 후 <math>m^2</math>당 1.0ℓ 처리함.</p> <p><b>사용자 안전사항 :</b>  제품을 직접 마시지 말 것. 눈이나 피부에 과량 접촉 시 반드시 과량의 흐르는 물로 씻을 것.</p> <p><b>제품 보관 :</b>  제품은 직사광선을 피하여 암·냉소(4℃)에서 보관을 추천함. 제품 개봉 시 전량을 바로 사용함.</p> <p><b>제품등록번호 : 10-(14)-나-12-2</b></p>
---	--



경기 성남 중원 상대원동 SK테크노파크 메가동 613호

전화 : 031)776-2632~3; FAX : 031)776-2631

www.coenbio.com

그림 44. 차나무 탄저병 및 겹등근무늬병 방제전용 미생물제제 “차사랑”의 label.





그림 45. 개발 완료되어 출시된 차나무 탄저병 및 겹등근무늬병 방제전용 미생물제제 “차사랑”.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연구계획서 상의 평가의 착안점 및 기준

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 연도	2004	○차나무 엽권에서 분리한 우수 길항균주 선발	20 %	길항균주 확보 여부
		○후보 길항 균주의 대량 배양조건 구명	20 %	배양 조건 도출 여부
		○차나무 탄저병 및 겹동근무늬병 발생 소장 조사	10 %	병 발생 소장 data 확보 여부
		○선발 길항미생물 균주의 실내 검증	10 %	길항력 및 적응력 정도
		○후보 길항 균주에 추적 marker 유전자를 도입하여 형질전환 균주로 개발	20 %	형질전환균주 개발 여부
		○제품화를 위한 길항 균주 대량배양 시스템 설계 및 제작	20	배양시스템 시제품 제작 여부
2차 연도	2005	○차나무 엽권에서 길항균주의 정착과 생존 능력이 강화된 제형화 연구 및 실험실 수준 시제품 개발	30 %	제형화 성공 및 시제품 제조 여부
		○제품화를 위한 미생물제제 최종 product 시제품 생산 및 제품 성능 검증	10 %	안정성, 보관성, 항균활성 정도 판정
		○형질전환 길항 균주의 현장 fitness 검증을 위한 생태학적 연구 조사	15 %	길항 균주의 정착력 및 길항력 정도
		○형질전환 균주를 이용한 현장 적용 평가	15 %	포장 실험을 통한 항균활성 및 정착 성공 여부 확인
		○제품화를 위한 미생물제제 대량생산 시스템 및 프로세스 설계 및 개발	30 %	대량생산 설비 개발 및 시제품 제조 성공 여부
3차 연도	2006	○후보 길항 균주 추가 선발 및 복합 미생물제제 실험실 수준 시제품 개발	20 %	차세대 미생물제제 시제품 개발 여부
		○개발완료 미생물제제의 현장 적용 평가 및 시험성적서 작성	20 %	포장 실험을 통한 미생물제제 효과 검증
		○미생물제제 상품화 준비	20 %	특허출원, 제품 디자인 개발 완료
		○차나무 탄저병과 겹동근무늬병 방제 전용 미생물제제 개발 완료 및 제품 등록	40 %	완제품 생산 여부
최종 평가	2007	○차나무 엽권에서 분리한 우수 길항균주 선발	10 %	균주 등록
		○후보 길항 균주에 추적 marker 유전자를 도입하여 형질전환 균주 개발 및 현장 적용 평가	20 %	균주 개발 및 monitoring 실시 여부
		○제품화를 위한 미생물제제 대량생산 시스템 및 프로세스 설계 및 개발	20 %	대량생산을 통한 완제품 생산
		○차나무 탄저병과 겹동근무늬병 방제 전용 미생물제제 개발 완료 및 제품 등록	50 %	특허 출원 및 등록

2. 계획 대비 연구개발목표 달성도

구분	연도	평가의 착안점 및 기준	가중치	연구개발 달성 내용	달성도(%)
1차 연도	2004	길항균주 확보 여부	20 %	길항우수균주 <i>Bacillus subtilis</i> BD3010 선발	100
		배양 조건 도출 여부	20 %	최적 탄소원, 질소원, 온도, pH 규명	100
		병발생 소장 data 확보	10 %	현장 조사를 통한 자료 확보	100
		길항력 및 적응력 정도	10 %	실내검증을 통한 특성 확인	100
		형질전환균주 개발 여부	20 %	Rifampicine 100ppm 내성 자 연돌연변이 유도 성공	100
		배양시스템 시제품 제작 여부	20	200L 대량배양시스템 개발 및 제작	100
2차 연도	2005	제형화 성공 및 시제품 제조 여부	30 %	액상수화제형 시제품 개발	100
		안정성, 보관성, 항균활성 정도 판정	10 %	장기보관성 및 항균활성 검증	100
		길항 균주의 정착력 및 길항력 정도	15 %	돌연변이 균주를 이용한 실내 실험 검증을 통한 fitness 확인	100
		포장 실험을 통한 항균활성 및 정착 성공 여부 확인	15 %	돌연변이 균주를 이용한 포장 실험 검증을 통한 방제효과 확인	100
		대량생산 설비 개발 및 시제품 제조 성공 여부	30 %	대량생산 프로세스에 입각한 공정 개발 및 시제품 개발	100
3차 연도	2006	차세대 미생물제제 시제품 개발 여부	20 %	추가 균주 확보 및 배양특성 규명, 현재 내생포자 휴면타파의 기술적 문제 해결 중	80
		포장 실험을 통한 미생물제제 효과 검증	20 %	시제품을 이용한 포장실험 검증을 통한 방제효과 확인 및 살포 프로그램 개발	100
		특허출원, 제품 디자인 개발 완료	20 %	균주특허, 제품등록, 상표 등록 완료, 제품 특허는 준비 중	80
		완제품 생산 여부	40 %	완제품 개발 완료 및 시장출시	100
최종 평가	2007	균주 등록	10 %	국제특허출원용으로 기탁 완료 (기탁번호 : KCCM-10640)	100
		균주 개발 및 monitoring 실시 여부	20 %	GMO 대신 항생제 저항성 돌연변이 균주 개발 및 이를 이용한 포장 monitoring 검증 완료	100
		대량생산을 통한 완제품 생산	20 %	대량생산 시스템 및 프로세스 개발 완료 후 최종 완제품 출시	100
		특허 출원 및 등록	50 %	화성시에 미생물제제 [10-(14)-나-12-2호]로 제품 등록 완료 차사랑'으로 상표출원 (40-2007-0014580) 완료 제품 특허는 출원 준비 중	80

### 3. 연구개발 미비점 완보 진행 상황 및 관련분야의 기술발전예의 기여도

계획대비 연구개발목표는 거의 대부분 달성된 상태이며, 완제품이 출시되어 실제 친환경농산물 인증을 원하는 차나무재배 농가를 대상으로 제품 홍보 및 관측 활동을 진행 중에 있다. 목표 대비 달성이 미비한 부분은 차세대 미생물제제 개발을 위한 선행 연구부분으로 균주선발, 대량배양조건 규명 등과 같은 시제품 개발을 위한 대부분의 연구개발은 완료된 상태이나 개발 예정인 다균주 미생물제제에 이용된 복합균주들이 시기 별로 각기 다른 활성을 유발할 수 있도록 유도할 수 있는 내생포자 휴면타과 핵심 기술 개발은 여전히 진행 중에 있다. 올해 안에 이에 대한 기술개발이 완료된다면, 향후 추가 균주와 내생포자 휴면타과 기술을 접목한 미생물제제 개발이 가능하여 제품 기능이 한층 향상된 제품으로 발전할 수 있을 것으로 기대된다. 제품 특히 출원 부분은 본 연구개발이 완료된 상태이기 때문에 포장 성적 시험서를 바탕으로 현재 변리사와 협의 중이며 조만간에 출원을 실시할 예정이다.

본 연구개발이 관련분야의 기술발전예에 기여한 부분은 다음과 같이 정리할 수 있다.

#### 1) 엽권으로 분리한 토종 길항균주를 이용한 엽권 진균성 병해 방제용 미생물제제 개발

; 지금까지의 개발된 미생물제제의 상당수는 비교적 안정된 생태환경인 토양으로부터 분리한 길항균주를 이용하여 개발되었기 때문에 엽권에 발생하는 식물병을 방제하는데 많은 문제점이 있었다. 하지만 본 연구에서는 길항균주 선발부터 최종 적용대상 환경을 고려하여 차나무 엽권에서 균주 선발을 실시하였고, 개발된 미생물제제의 길항균들이 실제로 성공적으로 엽권에 정착하여 방제효과를 발휘할 수 있는 여부를 국내 최초로 돌연변이 균주를 유도하여 지속적으로 monitoring 함으로서 실질적인 정착 및 성공 여부를 과학적으로 확인한 것은 미생물제제 개발 및 관리를 한 차원 향상시킨 기술적 발전이라고 하겠다.

#### 2) 차나무 친환경 재배 기술보급 기반 마련

; 단순한 미생물제제의 제품 개발에서 그친 것이 아니라 화학약제와 교호 사용을 할 수 있는 방제 프로그램을 개발함으로써 미생물제제의 현장 활용성과 차나무 저농약 재배 기술 보급을 할 수 있는 기반을 마련하게 됨으로서 차나무 친환경재배 기술 보급에 기여할 것으로 기대한다.

### 3) 국내 개발 미생물제제의 수출 기반 마련을 통한 관련 산업 촉진

; 기술 및 제품 개발에 성공할 경우 차나무 재배 면적이나 수요 면에서 국내보다는 주변 일본, 중국, 대만 등 국외에서 차나무 전용 미생물제제의 수요가 높을 것을 염두에 두고 개발 단계부터 국제특허출원을 목표로 선발 균주를 국제특허용으로 기탁하였으며, singapore에 거점을 두고 있는 농약 중계상을 대상으로 지난 2년간 기술개발 과정과 제품 성능에 대한 홍보를 지속적으로 진행시켜 현재 제품 수출 상담이 진행 중에 있다. 실제로 수출이 이루어진다면 이러한 business model 은 농업 부분일지라도 연구개발 기획 단계에서부터 target oriented R & D의 성공적 사례가 될 수 있으며, 국내 친환경농자재 생산 벤처기업에서 좋은 사례와 자극제가 될 것으로 판단한다.

## 4. 학술발표를 통한 기여

### 1) 국내학술지 게재 실적 2편

- ① 오순옥, 김경희, 임광미, 허재선, 고영진. 2005. 차나무 겹등근무늬병의 발생소장 및 엽권 길항 미생물 선발. 식물병연구 11(2):162-166.
- ② 김경희, 오순옥, 허재선, 염규진, 고영진. 2006. 차나무 겹등근무늬병 방제용 미생물제제 개발을 위한 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310의 대량배양 최적조건. 식물병연구 12(2):85-90.

### 2) 국내학·협회 발표 실적 5건

- ① Soon-Ok Oh, Jae-Seoun Hur and Young Jin Koh. Development of a biocontrol agent against gray blight of tea plants. 한국균학회 춘계학술대회 및 임시총회. 2004. 5. 22. 한국균학회.
- ② Gyoung Hee Kim, Soon-Ok Oh, Jong Kyu Park, Jae-Seoun Hur and Young Jin Koh. Screen and development of a biocontrol agent against gray blight and anthracnose on tea plants. 2005년도 한국농약과학회 춘계학술발표회. 2005. 4. 7-8. 한국농약과학회.
- ③ Gyoung Hee Kim, Soon-Ok Oh, Jae-Seoun Hur and Young Jin Koh. *Bacillus subtilis* BD0310 as a potent biocontrol agent against brown blight of tea plants. 2005년도 한국식물병리학회 추계학술발표회. 2005. 10. 20-21. 한국식물병리학회.
- ④ Gyoung Hee Kim, Soon-Ok Oh, Hong Chul Kim, Jae Hyun Park, Mi Ra Park, Myoung

Taek Lim, Min Lee, In Ho Jeong, Jae-Seoun Hur and Young Jin Koh. Biocontrol of gray blight of tea plants by an antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* BD0310. 2006년도 한국식물병리학회 춘계학술발표회. 2006. 4. 21. 한국식물병리학회.

- ⑤ Gyoung Hee Kim, In Ho Jeong, Mi Ra Park, Myoung Taek Lim, Kyu San Lee, Sung Je Cho, Jong Young Yoon, Dong Heon Lee, Jae-Seoun Hur, Kyu Jin Yum and Young Jin Koh. Biological Control of Gray blight and Anthracnose on Tea Plants Using an Antagonistic Bacterium *Bacillus subtilis* BD0310. 2007년도 한국균학회 춘계학술발표회. 2007. 5. 4. 한국균학회.

3) 국내심포지움 발표 실적 2건

- ① 고영진. 근권/엽권토착세균 *Bacillus subtilis*를 이용한 친환경 미생물살균제 개발. 제 1회 순천대학교 · 농촌진흥청 · 친환경바이오사업단 공동심포지움. 2006. 4. 27. 순천대학교 · 농촌진흥청.
- ② 고영진, 신길호, 김경희. 차나무 병해의 종합적 방제. 차나무 친환경재배 기술에 관한 심포지움. 2006. 12. 21. 보성녹차 특성화사업단.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1. 개발된 핵심기술 및 활용계획

#### 1). 미생물제제 개발을 위한 후보 길항 균주 선발

- 활용분야 : 미생물제제 및 제품 개발을 위한 후보 균주 선발
- 활용유형 : 특허 출원, 산업체 균주 특허 전용권 이전
- 활용계획 : 국제특허출원을 염두에 두고 선발된 길항균주를 국제특허용 균주로 기탁한 상태이며 협동연구기관인 코엔바이오에 균주 특허 전용권 계약을 실시하여 현재 진행되고 있는 해외 바이어와의 제품 수출에 유리한 조건을 제공.

#### 2) 미생물제제 개발에 필요한 제형화 기술

- 활용분야 : 차나무 진균 방제 전용 미생물제제 개발
- 활용유형 : 특허 출원, 산업체 기술이전
- 활용방안 : 기술특허를 통하여 협동연구기관인 코엔바이오에 기술이전 및 제형화 기술특허 전용권 계약을 통한 사업화 추진

#### 3) 미생물제제 현장 적용 평가를 위한 추적 monitoring 기술

- 활용분야 : 미생물제제 개발 및 농가 사후 서비스 (after service) 제공
- 활용유형 : 산업체 기술 자문
- 활용방안 : 현장적용 monitoring을 위한 돌연변이 길항 균주를 협동연구기관인 코엔바이오에 공급하여 농가에서 제품에 대한 claim 발생시 사후서비스 및 고객 관리를 위한 현장 적용 평가에 활용. 또한 유사한 목적으로 기타 산업체나 기관의 요청 시, 주문 균주와 사용처에 맞도록 제작 공급함으로써 새로운 B2B (business to business) 사업 모델 개발

#### 4) 차나무 탄저병과 겹동근무늬병균 방제 전용 미생물제제

- 활용분야 : 미생물제제 개발 및 판매, 미생물제제 활용 산업
- 활용유형 : 특허 출원, 산업체 기술이전
- 활용방안 : 제품 특허를 통하여 협동연구기관인 코엔바이오에 기술이전 및 제형화 기술특허 전용권 계약을 실시하여 친환경농산물 인증을 희망하는 차나무 재배 농가나

## 2. 사업화 일정 및 계획

연구 종료 시점에 이미 완제품이 출시되어 친환경재배 농가를 대상으로 제품 홍보 중에 있으며 일부는 소규모로 시범 사용 중에 있다. 빠른 시일 내에 제품 특허 출원과 등록을 완료하여 내년 하반기부터는 본격적으로 국내외 시장 개척을 통한 사업화가 진행될 수 이루어질 수 있는 제반 여건을 마련할 예정이다. 또한 본 제품의 시장 개척 및 소비 확대를 위해서 순천대학교의 친환경농산물 인증센터에 개발과정 및 개발된 제품 성능에 대한 설명 자료 배포를 실시하고 포장 재배 실험과 생산농산물의 품질 조사 용역을 의뢰하여 안정성과 성능 면에서 공신력이 있는 기관의 인증을 획득하여 친환경인증을 희망하는 농가에 적극적으로 보급하는 방안을 참여기관과 협의 중에 있다. 따라서 가급적 빠른 시간 내에 농가 보급이 이루어질 수 있도록 대학 연구자들이 기업의 애로점을 해결할 것이며, 특히 제품 사용 과정에서 발생할 수 있는 문제점을 기술적으로 지원할 수 있는 내용을 기술이전협약에 첨부하여 체결함으로써 사업화를 촉진시킬 수 있는 바탕을 마련할 예정이다.

## 3. 추가 기술 개발 방안

개발 제품의 성능 향상을 위하여 다균주 복합미생물제제 제품 개발에 핵심기술인 내생포자 휴면타과 기술 개발을 올해 안에 완료하여 복합 균주들이 시기별로 활성을 갖도록 함으로서 어떤 상황에서도 100% 실패가 없는 한 차원 높은 미생물제제 개발을 추진할 예정이다.

## 4. 친환경 녹차재배 기술 현장 보급 방안

연구개발 과정 중에 보성군 소재 녹차생산자 조합 및 친환경녹차 생산자들과 공동으로 포장시험을 실시해 왔기 때문에 이미 소비자 중심적 시장 친화 제품으로 자리잡은 상태이다. 따라서 친환경농산물인증을 원하는 재배농가를 중점적으로 관리하여 개발된 제품의 활용 가능성을 높이도록 유도할 예정이다. 또한 순천대학교의 영농교육원과 녹차지원사업단의 대농민 교육 및 기술지도와 전남농업기술원의 대농민 교육 및 기술지도를 통하여 아직 친환경재배를 실시할 수 없는 일반



관행 농가들을 대상으로 본 연구개발에서 도출한 화학약제와 혼용하여 사용할 수 있는 병방제 프로그램을 적극 홍보하여 점차적으로 친환경재배 농가로의 전환을 유도함으로써 국내 녹차산업의 경쟁력 증진에 기여할 수 있도록 노력할 예정이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

2006년 11월 23일(목요일) 일본 시즈오카현 차업시험장 후지분장장 나카무라 요리유키(中村順行)박사로부터 “일본 차의 유기재배에 대하여”라는 제목의 세미나와 좌담회를 통하여 일본 차 유기재배에서 문제가 되는 병해충 발생실태와 방제대책에 관한 과학기술정보를 입수하였고, 11월 24일(금요일)에는 보성 몽중산다원을 실험실 연구원들과 함께 방문하여 친환경재배에서 문제되는 병해에 대한 현장진단법 등에 대한 기술을 입수하였다.

## 제 7 장 참고문헌

- Andrews, J. H. and Harris, R. F. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:145-180.
- Beattie, G. A. and Lindow, S. E. 1999. Bacterial colonization of leaves: spectrum of strategies. *Phytopathology* 89:353-359.
- Claus, D. and Berkeley, R. C. W. 1986. Genus *Bacillus*. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. by H. A. S. Peter, N. S. Mair, and E. Sharp. 1,105-1,139. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Exuka, A. and Ando, Y. 1994. *Tea Diseases in Japan*. Japan Plant Protection Association, Tokyo, Japan. 213pp.
- Horikawa, T. 1982. Effective fungicides and application time for control of tea gray blight caused by *Pestalothia longiseta*. *Tea Reserach Report* 56:45-56.
- Horikawa, T. 1985. Influence of spray methods on control of tea gray blight caused by *Pestalothia longiseta*. *Tea Reserach Report* 62:52-54.
- Horikawa, T. 1986. Occurrence of resistance of tea gray blight pathogen, *Pestalotiopsis longiseta* Spegazzini to benzimidazole fungicides. *Bull. Shizuoka Tea Ezpt. Stn.* 12:9-14.
- Horikawa, T. 1987. Effective fungicides and application time for control of tea gray blight caused by *Pestalotiopsis longiseta* Speg. *Tea Research J.* 62:45-56.
- Koh, Y. J., Shin, G. H., and Hur, J. S. 2001. Seasonal occurrence and development of gray blight of tea plants in Korea. *Plant Pathol. J.* 17:40-44.
- Nagano, M. M., Marahiel, M. A. and Zuber, P. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 170:5662-5668.
- Nguyen, T. T. H., Oh, S-O, Kim, G. H., Hur, J.-S., Koh, Y. J. 2005. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea* in Strawberries. *Plant Pathol. J.* 21(1):59-63.
- Oniki, M., Hamaya, E., Ando, Y. 1985. The actual nate of resistant strains of the tea anthracnose fungus *Gloeosporium theae-sinensis* against benzimidazole fungicides in Japan. *Tea Reserach Report* 61:7-11.
- Oniki, M., Narisawa, N., and Ando, Y. 1986. Incidence of strains of tea gray blight fungi

- Pestalotiopsis longiseta* and *Pestalotiopsis theae* resistant to benzimidazole fungicides in Japan. *Tea Research J.* 64:29-33.
- Rural Development Administration. 2000. International Symposium on Biological Control for Crop Protection. Suwon, Korea.
- Shin, G. H., Choi, H. K. Hur, J. S., Koh, Y. J. 1999. First report on gray blight of tea plant caused by *Pestalotiopsis theae* in Korea. *Plant Pathology Journal* 15(5):308-310.
- Shin, G. H., Hur, J. S, Koh, Y. J. 2000. Chemical Control of Gray Blight of Tea in Korea. *Plant Pathol. J.* 16:162-165.
- Silo-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He., H., Clardy, J. and Handelsman, J. 1994. Biological activities of two fungistatics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2023-2030.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U. and Jung, G. 1986. Fengycin - a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiotics* 39:888-900.
- 강길진. 정지현. 조정일. 2000. *Bacillus subtilis*가 생산하는 길항물질에 의한 아플라톡신 생성균의 억제. *한국식품위생안전성학회지* 15(2):122-127.
- 김경희, 오순옥, 허재선, 염규진, 고영진. 2006. 차나무 겹등근무늬병 방제용 미생물제제 개발을 위한 길항세균 *Bacillus subtilis* BD0310의 대량배양 최적조건. *식물병연구* 12(2):85-90.
- 김주희, 신길호, 김정운, 고영진. 2000. 무기화합물을 이용한 차나무 병해 방제시험. *전남농업기술원 시험연구보고서* 99-104.
- 박서기, 박기범, 차광홍. 1996. 차나무의 병해 III. *Pestalotiopsis longiseta*에 의한 차 겹등근무늬병. *한국식물병리학회지* 12(4):463-465.
- 박서기. 1995. *Colletotrichum theae-sinensis*에 의한 차 탄저병. *식물병과 농업* 1(2):26-28.
- 박종영, 김한우, 김현주, 진옥주, 정순재, 최우봉, 이선우, 문병주. 2005. 길항세균 *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13의 대량배양을 위한 최적 배양조건. *식물병연구* 11(2):158-161.
- 순천대학교 영농교육원. 2003. 녹차 - 2003년도 제 11기 최고농업경영자과정. 순천대학교. 순천, 한국.
- 신길호, 김정운, 김주희, 고영진. 1998. 차나무 겹등근무늬병 방제에 관한 연구. *전남농업기술원 시험연구보고서* 809-815.

신길호, 김정운, 김주희. 1997. 차나무 병해충 방제에 관한 연구. 전남농업기술원 시험연구보고서 711-716.

신길호. 차나무 겹등근무늬병 발생생태, 병원학 및 방제. 순천대학교 대학원 석사학위논문. 46p.

오순옥, 김경희, 임광미, 허재선, 고영진. 2005. 차나무 겹등근무늬병의 발생소장 및 엽권 길항미생물 선발. 식물병연구 11(2):162-166.

전남진흥원 보성차시험장. 1997. 차 재배와 가공기술. 나주, 전남.

최형국, 최정, 박장현, 신길호, 김주희. 2000. 차 안전생산을 위한 유기 자연 농자재 처리효과 시험. 전남농업기술원 시험연구보고서 93-98.

한국식물병리학회. 2004. 한국식물병명목록. 제4판. 한국식물병리학회. 779pp.

## 본문 작성 요령

1. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, 1), 가), (1), (가), ①, ㉠ 등으로 하고,
  - 장은 16포인트 중고딕체
  - 절은 14포인트 신명조체
  - 항은 10포인트 신명조체
  - 본문은 10포인트 신명조체로 한다.  
단, 본문의 내용중 중요부분은 중고딕체(진하게)로 사용할 수 있다.
2. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작한다.
3. 본문은 10포인트 횡으로 작성한다.
4. 1행은 42자, 1단은 30행으로 한다.
5. 페이지 번호는 하단 중앙 끝에 10포인트 활자로 한다.
6. 각 주(註)는 해당 페이지 하단에 8포인트 활자로 표기하여 본문과 구분토록 한다.
7. 페이지수는 편집순서 2의 제출문부터 시작한다.  
단, 삽입물이 있을 때는 그 삽입물의 크기에 불문하고 1면을 한 페이지로하여 일련번호를 붙인다.
8. 한글, 한문, 영문을 혼용한다.
9. 뒷면지에는 주의문을 넣는다.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

## 주 의

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

[부 표]

## 인 쇄 내 용

### I. 인쇄규격

1. 크 기 : 4×6배판(가로 188mm×세로 259mm)
2. 제 본 : 좌철
3. 용 지 : ○ 표지 200 g/m. 양면 아트지  
○ 내용 80 g/m. 모조지
4. 인쇄방식 :
  - 1) 표지 : 바탕 백색, 활자 흑색
  - 2) 내용 : 흑색 지정활자로 인쇄한다
  - 3) 양면인쇄

### II. 편집순서

1. 표 지
2. 제출문
3. 요약문
4. Summary
5. Contents
6. 목 차
7. 본 문
8. 뒷면지

### III. 참고사항

- 공판인쇄시에는 이 요령에 준한다.