

최 종
연구보고서

고항균활성 키티나아제 활성균주를 이용한
토마토 잎곰팡이병 제어용 환경친화적
미생물제제 개발

Development of an Environmentally-Friendly Biopesticide with
Antifungal Bacteria Producing Chitinase to Control Tomato
Leaf Mold Disease

연구기관
동아대학교

농림자료실



0013323

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고항균활성 키티나아제 활성균주를 이용한 토마토 잎곰팡이병 제어용 환경친화적 미생물제제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 05월 21일

주관연구기관명 : 동아대학교

총괄연구책임자 : 문 병 주

세부연구책임자 : 정 순 재

세부연구책임자 : 이 영 병

연 구 원 : 김 현 주

연 구 원 : 이 광 열

연 구 원 : 백 정 우

연 구 원 : 전 옥 주

연 구 원 : 최 기 혁

연 구 원 : 공 현 기

요 약 문

I. 제 목

고항균활성 키티나아제 활성균주를 이용한 토마토 잎곰팡이병 제어용 환경친화적
미생물제제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1992년 UN 환경개발회의의 리우 선언 이후 지구 환경 보호를 위한 노력과 WTO가 창립되면서 환경과 무역을 연계시킨 그린라운드가 진행되면서 농업도 환경친화적 농업으로의 전환이 시급해졌다. 특히, 화학 농약 사용량의 제한 및 잔류허용량 강화로 저독성, 저약량 제품 또는 생물농약의 개발이 필요하게 되었는데, 국내에서도 최근 친환경농업 육성 5개년 계획의 수립으로 화학농약 사용량을 2005년도까지 원제 기준으로 30%를 감소시키고 저농약 재배로 친환경 농업 재배 면적을 확대시키는 친환경농업 구현을 계획하여 실행하고 있다(농림부, 2001). 따라서, 현재 국내에서는 미생물 농약에 대한 관심이 크게 일어나 많은 연구자와 벤처기업 등에서 연구가 진행되고 있으며, 생물 농약의 개발과 보급은 필수가 되어 이는 앞으로도 계속 가속화될 전망이다.

현재 전세계 미생물농약시장은 앞으로도 고속 성장할 것으로 예상되나, 국내에서 개발되어 등록, 시판되고 있는 미생물농약은 극히 미흡한 상태이고 이에 이용되는 균주의 특허문제 등 많은 문제가 산적해 있지만 우리나라 실정에 맞는 균주의 선발과 유전학적인 육종 그리고 이를 이용한 미생물농약 개발 및 이를 정확한 적용하는 방제 방법 확립으로 친환경농업을 일반화하는데 본 연구의 목적이 있다.

이에, 본 연구에서는 항균물질 활성 세균인 *Bacillus amyloliquefaciens* A-2, 항균물질활성과 chitinase 활성을 동시에 지니는 *Burkholderia capacia* CH-67 균주 및 chitinase 유전자가 삽입된 *B. amyloliquefaciens* A-2 형질전환체를 이용하여 토마토 잎곰팡이병 방제용 엽면살포제를 개발하여 환경친화적인 병 방제용 미생물농약을 개발하고 이를 실용화하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제 1 세부과제 : 고향균활성 키티나아제 활성 균주의 유전학적 육종

- 다양한 미생물로부터의 키티나아제 유전자 정보 확보
- 키티나아제 유전자의 분리 및 cloning
- 키티나아제 유전자의 항균물질 활성 미생물로의 도입 및 발현
- 고향균 활성 키티나아제 활성 재조합 미생물 최종 선발
- 키티나아제의 분리, 정제 및 특성 조사
- 선발 재조합 균주의 키티나아제 분비능, 활성능 부가에 의한 길항력 증강 조사
- 작물생육도(작물생육촉진) 조사
- 타작물의 잎곰팡이병에 대한 방제력 검정

제 2 세부과제 ; 고향균활성 키티나아제 활성 균주를 이용한 미생물제제 제조기술확립

- 키티나아제 활성 균주 및 항균활성 미생물의 지속적인 분리
- 선발 미생물의 배양적 생화학적 특성 검정과 동정
- 키티나아제 활성 미생물의 키티나아제 활성 검정
- 항균물질 활성 미생물의 항균활성 검정
- 고향균 활성 키티나아제 활성 모균주와 재조합 균주의 대량활성을 위한 최적조건 확립
- 고향균 활성 키티나아제 활성 모균주와 재조합 균주의 대량배양기술 개발
- 미생물제제 개발을 위한 Additives 선발
- 미생물제제의 제조기술확립 및 제형화
- 미생물제제의 최적화실험 및 우수제형선발
- 미생물제제의 경시적 유효도 및 안정성 조사
- 미생물제제의 타작물에 대한 약해시험 조사

제 3 세부과제 ; 개발 미생물제제의 방제효과 검정 및 포장 적용시험

- 선발 고향균 활성 키티나아제 활성 모균주와 재조합 균주의 생육실내 풋트상에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정
- 선발 고향균 활성 키티나아제 활성 모균주와 재조합 균주의 온실내의 풋트 및 토경재배에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정
- 미생물제제의 생육실내 풋트상에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정
- 미생물제제의 온실내의 풋트 및 토경재배에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정
- 미생물제제의 포장에서의 방제효과 실증시험
- 미생물제제의 실제자연병 발생 농가하우스에서의 방제효과 실증시험

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1 절 연구개발 결과

제 1 세부과제 : 고향균활성 키티나아제 활성 균주의 유전학적 육종

연구책임자 : 이 영 병

1. 연구의 목적

토마토 잎곰팡이병을 생물학적 방제법으로 효과적으로 제어하기 위해, 기존의 생물학적 방제제로 이용할 수 있는 향균물질 활성균을 분자육종 방법으로 개량하는 것을 목적으로 하였다. 길항미생물의 항생물질을 분비하는 기존의 능력에 향균활성 키티나아제 유전자를 도입하여 재조합 균주를 육종하는 목적으로 연구가 수행되었다.

2. 연구의 방법 및 결과

먼저 대상으로 하는 향균물질 활성균은 *Bacillus amyloliquefaciens* A-2를 이용하였고 이 A-2 균주는 향균물질의 활성은 있으나 chitinase 활성은 없었다. *Bacillus*속균에서 chitinase 형질 전환을 검정하기 위한 목적의 대조균주는 *B. subtilis* 168 균주를 이용하였다. A-2 균주에 도입한 chitinase 유전자는 *B. licheniformis* N1 유래의 chitinase 유전자와 *Cellulosimicrobium cellulans* CH-10 유래의 chitinase 유전자를 대상으로 하였다.

B. licheniformis N1 균주의 chitinase gene을 분리하고 염기서열을 분석한 결과, 다른 *B. licheniformis* 유래의 chitinase와 아미노산 서열에서 89-96%의 동일성을 보였으며 모든 conserved domain 이 확인되었다. *C. cellulans* CH-10에서 유래한 chitinase gene은 방선균에서 유래한 conserved 부위를 PCR로 증폭하여 염기서열을 분석하고 이 단편을 기초로 inverse PCR 하여 chitinase full sequences라고 예측되는 부위(1.2kb)를 클로닝하였다. 그러나 *C. cellulans* CH-10 균주의 배양여액의 chitinase 활성에 비해 클로닝한 유전자는 효소활성이 결여되어 재조합 균주 육종에 이용을 할 수 없었다. 반면, N1 유래 chitinase는 GST 융합단백질로 발현되고 효소활성이 colloidal chitin과 형광성 기질에 대해 우수하게 나타나 A-2 균주의 분자육종에 직접 이용하였다. 발현된 N1 chitinase 단백질을 함유하는 *E. coli*의 lysate와 형광기질을 이용한 chitinase 활성을 검정한 결과, 이효소는 endo-type의 chitinase인 것으로 판단되었다.

제조합 A-2 균주 육종을 위해 N-1 chitinase 유전자를 *Bacillus* 속 균 발현용인 pWH1520 벡터에 cloning하였다. 제조합된 플라스미드 pBex WH 1-4 는 *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 균주와 *B. subtilis* 168 에 성공적으로 형질전환되었고 형질전환 여부는 PCR과 Southern blot 방법으로 검정되었다. 형질전환체에서의 chitinase 유전자 발현은 RT-PCR 방법과 형질전환체의 배양상등액 또는 세포 추출액 그리고 형광기질을 이용한 활성검정 방법에 의해 확인되었다. 그 결과 제조합 플라스미드를 포함하는 형질전환체와 A-2 균주와 *B. subtilis* 168 균주 모두에서 예상되는 chitinase 발현물인 RT-PCR 산물이 검출되었다. 형광기질을 이용한 활성검정결과, *B. amyloliquefaciens* A-2 형질전환체와 *B. subtilis* 168 형질전환체에서 발현된 chitinase가 endo-type의 chitinase의 활성을 보였다.

마지막으로 획득된 chitinase 활성 유전자가 삽입된 *B. subtilis* 168/pBex WH-14 형질전환체의 *Fulvia fulva*에서 발현된 chitinase의 항균력 검정을 위해 *F. fulva* 포자발아에 대한 억제능을 조사하였다. *B. subtilis* 168/pBex WH-14 형질전환체에서 분비되는 N1 유래의 chitinase가 *F. fulva* 포자 발아율을 억제하는 활성이 있음을 확인하였다. 따라서 항균력이 인정된 N-1 chitinase를 발현하는 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주를 이용하여 생물학적 방제 제형을 제조하고 방제활성을 조사하였다.

제 2 세부과제 : 고향균활성 키티나아제 활성 균주를 이용한 미생물제제 제조기술확립

연구책임자 : 문 병 주

1. 연구의 목적

토마토 잎곰팡이병을 생물학적 방제법으로 효과적으로 제어하기 위해 우수한 항균물질 활성균을 선발하며 선발된 균주와 그 균주의 chitinase 활성 제조합 균주의 제형을 개발하여 키티나아제를 활성하는 고향균 활성 미생물 제제를 제조하는 기술을 확립하는 것을 목적으로 한다.

2. 연구의 방법과 결과

2005년 2월과 3월에 조사된 토마토 잎곰팡이병의 평균 이병엽율은 각각 28.8%와 16.7%로 조사되었으며, 대상 병원균으로 *Fulvia fulva* TF-13이 최종 분리 동정되었으며 이후의 병원성 및 방제효과 검정에 이용되었다. 분리한 TF-13 균주는 토마토에서 병원성이 일정하게 유지되었으

며 접종을 위한 분생포자 부유액은 여러배지를 검정한 결과 PDB 배지가 최종 선발되었다.

우수 항균물질 활성균은 토마토 근권과 엽권에서 다수의 균주를 분리하여 병원균과 대치 배양을 통해 1차 선발하고 병원균 *F. fulva* TF-13 균주가 접종된 토마토 식물에서 방제효과를 검정하여 A-2 균주를 최종 선발하였다. 선발된 길항균은 전자현미경 관찰, 16S rRNA 유전자 분석, *gyrA* 유전자 분석을 통해 최종 *Bacillus amyloliquefaciens* A-2로 동정하였다. A-2 균주 뿐 아니라 키티나아제 활성이 우수한 균주로 이 연구에서 *Paenibacillus pabuli* 로 동정된 CH-9 균주, *Cellulosimicrobium cellulans*로 동정된 CH-10 균주, 그리고 *Burkholderia cepacia*로 동정된 CH-67 균주도 분리되어 생물학적 방제효과가 함께 검정되었다. 분리된 균주들의 생물학적 방제효과는 플라스크내 항균효과 검정, 현미경을 통한 균사생육 억제능 검정, 그리고 생육실 포트상에서 길항균의 생물학적 방제력 검정 등을 통해 조사되었다. 그 결과 A-2 균주와 CH-67 균주가 우수한 길항균임이 증명되었다.

선발된 두 균주의 우수한 제형을 개발하기 위하여 각 균주의 배양에 적절한 기초배지 및 탄소원, 질소원, 제형을 위한 전달매체(carrier)를 포함한 첨가제를 선발하기 위한 실험과 적정 배양조건 및 제형화 조건을 탐색하기 위한 실험이 플라스크 배양과 발효기 배양을 통해 수행되었다. 그 결과 A-2 균주를 위해 기초배지(K_2HPO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.0005%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.0005%, $FeSO_4$ 0.0025%)에 현미유(Rice oil) 3.0%, yeast extract 0.5%를 첨가한 조성을 A-2 균주의 대량배양용 배지로 최종 선발하였으며, 이를 현미유배지로 명명하였다. 생육을 위한 적정 산도와 온도는 pH 6-7 그리고 35°C 이었다. *B. cepacia* CH-67 균주의 대량배양을 위해서는 기초배지(K_2HPO_4 0.125%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, KH_2PO_4 0.038%)에 현미유 3.0%와 $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%를 첨가한 배지를 최종 선발하였다. 두 균주의 수화제형과 액상수화제형의 제형을 다양한 전달매체를 이용하여 제조하였고 이들 각 제형의 효과를 제3세부과제에서 생육실 포트와 포장조건에서 검정하였다. 특히 A-2 균주를 위해 방제효과 검정을 통해 선발한 제형은 A-2 균주의 재조합 균주인 A-2/pBex WH 1-4 의 제형에도 그대로 적용하여 이용하였다.

제 3 세부과제 : 개발 미생물제제의 방제효과 검정 및 포장 적용시험

연구책임자 : 정 순 재

1. 연구의 목적

본 과제에 연구의 목적은 2세부과제에서 제조된 각종 길항미생물 제형들의 방제효과를 생육실내 포트와 하우스내 토경 재배 검정을 통해 분석하여 우수제형을 선발하고 재조합 균주의 제형과 기타 선발된 미생물 제제를 자연발병 포장에서 방제효과를 검정하여 우수한 미생물 제제를 제공하기 위한 것이다.

2. 연구의 방법과 결과

본 연구에 A-2 균주의 제제는 수화제형 A-2A, A-2B, A-2E, A-2F, A-2G, A-2H, A-2I, A-2J, A-2K, A-2L, A-2M, A2-MP, A2-O 그리고 액상수화제형 A-2C, A-2D 가 방제효과 검정에 이용되었다. 수화제형 제제 CH67-A, CH67-B, CH67-C, CH67-D, CH67-E, CH67-F 은 CH-67 균주를 이용하여 제조된 것으로 동일하게 방제효과 검정에 이용되었다. 각 제형의 생물학적 방제효과는 포트재배한 토마토에 병원균의 인공접종을 통한 생육실내 포트 검정이 수행되었다. 대조약제로는 화학농약인 트리후미졸이 이용되었다. 그 결과 선발된 A-2MP제제의 방제가는 100배 희석액 처리시 89.0%로 화학농약의 88.8% 수준과 유의차가 없었고 수화제형 CH-67C제제는 92.6% 방제가를 보여 화학농약의 89.5%와도 유의차가 없었다. A-2MP제제와 CH-67C제제의 혼합처리는 각 제제 단독처리와 큰 차이가 없어 권장되지 않았다. 또한, A2-MP와 CH67-C제제를 플라스틱 하우스내 토경재배한 토마토에서 방제효과를 검정한 결과, A2-MP와 CH67-C제제의 방제가는 100배 희석액 처리시 각각 79.4%, 76.6%로 화학농약의 79.6%와 유의차가 없었다.

한편, 항균물질활성과 키티나아제 활성을 동시에 가지도록 재조합된 A-2.5균주(A-2/pBex WH 1-4)를 이용하여 A2.5-MP 제제를 제조하고 잎곰팡이병 방제를 검정하였다. 그 결과 A2-MP 제제와 A2.5-MP제제는 각각, 78.4%와 80.1%로 유의차가 인정되지 않았다. 비록, 재조합균주에 의한 제제 A2.5-MP는 A2-MP제제와 유의차없이 우수하였지만 재조합균주에 의한 방제가의 증진은 크게 없었다. 따라서 도입된 chitinase의 *in vivo* 방제효과는 인정되지 않았다.

각 선발된 제형들, A-2MP, CH-67, A-2.5MP 들을 토마토 잎곰팡이 병이 자연발병하고 있는 경상남도 김해시 토마토 재배포장에서 2007년 2월 2일부터 3주 동안 매1주마다 100 배 희석후 처리하고 화학농약 트리후미졸은 3000배 희석하여 처리하여 방제효과를 비교 검정하였다. 그 결과, CH67-C의 경우 84.1% 의 방제가를 A2-MP제제의 경우는 60.0%의 방제가를 보였는데, 재조합균주를 이용한 A2.5-MP제제의 경우 79.1%의 방제가를 그리고 화학농약 트리후미졸 처리구는 81.6%의 방제가를 보여 처리간 유의차가 없었다. 각 제제와 화학농약의 교호처리의 결과 화학농약을 교호하여 살포하는 것이 제제만을 살포하는 경우보다 방제가가 다소 우수하게 나타났다.

A-2 균주의 토마토 엽권 정착력은 Rifampicin 저항성 *B. amyloliquifaciens* A-2R 균주를 이용하여 제조한 수화제형 A-2RMP 제제를 토마토 잎에 처리한 후 7일동안 생균수 조사를 통

해 확인한 결과 A-2균주의 엽권정착력이 5일까지 유지 되는 것으로 확인 되었다. 처리한 A-2 균주나 CH-67균주의 토마토 생육촉진효과를 플라스틱하우스내 포트재배에서 성체식물과 뿌리의 생중량 및 건중량을 측정하여 비교하였다. CH-67 균주 처리와 달리 A-2 균주 처리가 잎곰팡이병에 대한 항균활성 뿐만 아니라, 토마토의 생육촉진 효과가 있음이 확인되었다. 일부 토양병에 대한 이들 A-2MP제제와 CH67-C 제제의 방제효과가 인정되었다.

선발된 제형 A-2MP에서 방제원인 A-2 균주의 생균수는 11개월 동안 4℃와 실온에서 보관시 생균수가 5% 정도까지 감소하였다. CH-67C제제는 제조 시점부터 균주는 사멸되어 천연물 제형의 형태로 활성이 유지되는 것으로 나타났다. 각 장기간 보관한 A2-MP와 CH67-C제제는 4℃와 실온에서 보관시 활성이 일정기간 유지되었음이 확인되었다.

제 2 절 활용에 대한 건의

1. 본 연구로부터 탐색 분리된 항균물질활성균인 *B. amyloliquifaciens* A-2 균주는 토마토 잎곰팡이병 방제용 엽면살포제 미생물농약의 제제화에 최초로 이용되었으며, 균주 및 미생물농약 제조에 관련된 제형화 기술은 2005년 9월에 특허 출원되었다.

2. *Burkholderia cepacia* 균주는 그동안 유전적으로 면역력이 약한 호흡기질환 환자에 치명적인 인체 병원균으로 보고되어 있어 본 균주의 사용에 매우 제한적이었다. 그러나 본 연구에서의 *B. cepacia* CH-67 균주는 항균물질활성 및 키티나아제 활성을 동시에 지녀 국내의 다양한 작물 병원균에 광범위한 스펙트럼을 지닐뿐만 아니라, 그 활성이 매우 높아 활용도가 매우 기대된다. 또한 본 연구실에서 개발한 제제 제형화 완성 후 존재하는 생균수 조사에서 세균은 사멸하고 활성물질만이 남아 장기간의 보관에도 토마토 잎곰팡이병에 대한 방제효과가 여전히 우수하여 미생물제제보다는 천연물제제로 개발되는 것이 더 경제적면에서 더 효율적일 것이다. 또한, 어독성 및 동물 독성검사를 의뢰한 결과에서도 특별한 독성 문제가 제기되지 않아 미생물제제로 개발되어도 무방할 것으로 판단되었다. 그러나 독성에 대한 안전성 문제는 매우 민감한 사안이므로 추후에 여러 차례의 토의가 이루어질 것이다.

3. *B. amyloliquifaciens* A-2 균주 및 *B. cepacia* CH-67 균주에 의해 생성되는 물질 연구는 본 세균에 의한 항균 화합물의 보고가 지금까지 알려진 바가 적어 신규화합물일 가능성이 있고, 물질 분리 후 물질특허 출원과 동시에 유기 합성 및 유도체합성을 시도하여 다양한 약제개발 및 활성에 활용될 것이다.

4. *B. cepacia* CH-67 가 분비할 것으로 예상되는 항균활성물질 중 고분자량 폴리펩타이드는 농약용 또는 의약용 항균제로의 개발에 이용될 것이다.
5. 지금까지 보고된 연구 또는 국내외 등록된 특허와 전혀 다른 formulation의 구성성분으로 미생물제제가 완성되어 국내특허에 출원되었다.
6. 미생물제제 및 천연물 제제의 제형화 개발은 기술이전에 활용될 수 있다.

SUMMARY

Title: Development of an Environmentally-Friendly Biopesticide with Antifungal Bacteria Producing Chitinase to Control Tomato Leaf Mold Disease

Project I. Molecular Breeding of Chitinase Producing Biocontrol Bacteria.

1. Aim

The specific aim of Project I was to produce biocontrol bacteria with improved biocontrol activity by introducing the chitinase gene. The resultant recombinant biocontrol strain may effectively control the tomato leaf mold. This study was conducted to generate a chitinase producing recombinant biocontrol strain, which already expresses antifungal activity, but not chitinase activity.

2. Methodology and Results

The target biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 produces antifungal compounds but not chitinase. The control strain to confirm the transformation and expression of chitinase gene in *Bacillus* sp was *B. subtilis* 168. The subject chitinase genes were originated from other biocontrol strains *B. licheniformis* N1 and *Cellulosimicrobium cellulans* CH-10. Deduced amino acids sequence analysis of clone chitinase gene from N1 strain revealed an 89-96% consistency with those from other *B. licheniformis* strains. All the conserved domains of chitinases were identified. The chitinase genes from the CH-10 strain were cloned by internal PCR and inverted PCR to isolate full length genes. However, compared to the chitinase activity from culture supernatant of the CH-10 strain, the isolated clone did not exhibit chitinase activity. Thus, the gene was not fit to be transformed into the A-2 strain. In contrast, the N1 chitinase gene was expressed in *Escherichia coli* as a fusion protein and the enzyme

showed the expected activity against colloidal chitin and fluorescent substrates. The N1 chitinase was subsequently used for generating chitinase producing recombinant biocontrol strain A-2. The expressed protein in *E. coli* showed that the enzyme was endo-type chitinase. A recombinant plasmid pBex WH 1-4 was generated by cloning the N1 chitinase gene into pWH1520. The recombinant plasmid was successfully transformed into *B. amyloliquefaciens* A-2 and *B. subtilis* 168. The transformation was confirmed by PCR and Southern blot. Expression of the chitinase gene in the transformants was confirmed by RT-PCR and analysis of chitinase activity using fluorescent substrates. The expressed enzyme in *Bacillus* spp. showed the same endo-type chitinase activity.

Finally, the antifungal effect of N1 chitinase expressed in *B. subtilis* 168 was examined by investigating the spore germination inhibition of *Fulvia fulva* by the transformant *B. subtilis* 168/pBex WH 1-4. The chitinase proved to have the activity to inhibit the spore germination of *F. fulva*. Therefore, biocontrol activity of recombinant *B. amyloliquefaciens* A-2 strain was investigated by generating effective formulations.

Project II. Formulation of Chitinase Producing Biocontrol Bacteria to Control

Tomato Leaf Mold

1. Aim

The specific aims of Project II were to select effective biocontrol strains suppressing tomato leaf mold and to generate effective formulations of the selected biocontrol strains. The selected formulations would be applied to generate effective formulations of the recombinant biocontrol strain of *B. amyloliquefaciens* A-2, producing active chitinase.

2. Methodology and Results.

The frequency of tomato leaf mold occurrence in Busan between February and March of 2005 was between 28.8% and 16.7%. The causative fungi *Fulvia fulva* TF-13 was isolated from the diseased plants and identified to be used as the pathogen inoculum to investigate disease control value. The strain TF-13 maintained good virulence on tomato plants and produced the large amounts of conidia as inoculum. The PDB (Potato dextrose broth) was finally selected as the optimum media to prepare fungal inoculum. Antagonistic bacteria against *F. fulva* were isolated from tomato rhizosphere and phyllosphere and tested for biocontrol activity both *in vitro* and *in vivo*. Through electron microscopy, 16S rRNA gene analysis and *gyrA* comparison, the antagonistic bacteria A-2, CH-9, CH-10 and CH-67 were identified as *Bacillus amyloliquefaciens*, *Paenibacillus pabuli*, *Cellulosimicrobium cellulans*, and *Burkholderia cepacia*, respectively. Biocontrol activity of the four candidates was investigated by the antifungal activity *in vitro* and *in vivo* again.

Finally, A-2 and CH-67 were selected for further studies. In order to identify effective formulations of the two strains, basal medium, carbon source, nitrogen source and carriers for mass cultivation and formulations were selected through small scale flask cultivation and mass cultivation of antagonistic individual bacteria.

The mass cultivation medium for A-2 was rice oil, containing 3% rice oil and 0.5% yeast extract in the basal medium (K_2HPO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.0005%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.0005%, $FeSO_4$ 0.0025%). The mass cultivation medium for CH-67 contained 3% rice oil and 0.5% $(NH_4)_2SO_4$ in the basal medium (K_2HPO_4 0.125%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, KH_2PO_4 0.038%). Various types of wettable powder type formulations and emulsified liquid formulations for both strains were generated by using various carriers. The respective formulations were selected to examine the disease control activity in project III along with the formulation of recombinant biocontrol strain A-2/pBex WH 1-4.

Project III. Biocontrol Activity of Formulation Products against Tomato Leaf Mold and Its Field Test

1. Aim

The specific aims of Project III include the investigation of biocontrol activity of various formulations against tomato leaf mold using antagonistic bacteria A-2, CH-67, and recombinant A-2 strain in growth chamber rooms, greenhouses and commercial production conditions of tomatoes. This study identified effective formulations to control tomato leaf mold in the field.

2. Methodology and Results

Formulations tested in this study include wettable powder type and emulsified liquid type. The A2-A, A2-B, A2-E, A2-F, A2-G, A2-H, A2-I, A2-J, A2-K, A2-L, A2-M, A2-MP, A2-O, CH67-A, CH67-B, CH67-C, CH67-D, CH67-E, CH67-F were wettable powder types and A2-C, A2-D were emulsified liquid type. Chemical fungicide Triflumizole was used as a control. The biocontrol activity of the formulations were investigated both in growth chamber rooms and in greenhouses on tomato plants inoculated with *F. fulva*. The most effective formulations from A-2 and CH-67 strain were A2-MP and CH67-C, respectively. Disease control value of A2-MP by 100-fold dilution treatment showed 89% which is not significantly different from that of chemical fungicide with 88.8%. Similarly, disease control value of CH67-C with 100-fold dilution treatment exhibited 92.6% which is also not significantly different from that of chemical fungicide with 89.5%. The mixed application of A2-MP and CH67-C was not recommended.

On the other hand, the recombinant biocontrol strain A-2.5 (A-2/pBex WH 1-4) was subjected to generate formulation A2.5-MP and investigated biocontrol activity. A2-MP and A2.5-MP showed a disease control value of 78.4% and 80.1% at 100-fold dilution,

respectively, which are not significantly different from each other. The *in vivo* biocontrol activity of introduced chitinase in the recombinant strain was not recognized in a growth chamber experiment.

In a similar manner to the greenhouse experiments, the biocontrol activity of the formulations A2-MP, CH67-C, A2.5-MP was compared in tomato production conditions in Kimhae from January through March, 2007. Disease control values of 100 fold diluted CH67-C, A2-MP, A2.5-MP and 3,000 fold diluted chemical fungicide exhibited 84.1%, 60%, 79.1%, and 81.6%, respectively. Treatments showed no significant differences in disease control values. Alternative treatment of chemical fungicide with different formulations showed enhanced disease control activity compared to the single treatment of biocontrol formulations. The viability of the A-2 strain, both on tomato leaf surfaces and during storage, maintained for 5 days, and 11 months, respectively. While the plant growth promotion activity was not recognized from CH-67 treatment, the activity was apparent from A-2 treatment by comparing both the fresh weight and dry weight of roots and adult plants. The biocontrol activity of some soil-borne disease was recognized from both formulations. The CH67-C formulations were prepared as natural product-based formulations since the bacteria *Burkholderia cepacia* CH-67 were all lethal during formulation process. In all cases, both A2-MP and CH67-C retained biocontrol activity for a certain time period when they were stored at 4°C.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	27
Section 1. Purpose and significance of the research	27
1. Background of the research	27
2. Importance of the research	32
Section 2. Contents and scope of the research	37
1. Final goal of the research	37
2. Contents and scope of the research	38
Chapter 2. Research trend and problems in Korea and foreign country	39
1. Research trend in foreign country	39
2. Research trend in Korea	42
3. Patents of biopesticides in Korea	46
4. Problems of technology	48
5. Future prospect	49
6. Validity of technology transfer	50
Chapter 3. Research contents and results	51
<Project I> Molecular Breeding of Chitinase Producing Biocontrol Bacteria.	
Section 1. Introduction	51
Section 2. Isolation of chitinase gene from chitinase producing bacteria	
1. Material and methods	53
2. Results	55
가. Zymogram of <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> CH-10	55
나. Cloning of chitinase gene	56
1) Cloning of chitinase gene from <i>Bacillus licheniformis</i> N1	56
2) Cloning of chitinase gene from <i>Bacillus licheniformis</i> CH-1	58

3) Cloning of chitinase gene from <i>C. cellulans</i> CH-10	60
Section 3. Cloning, expression and activity assay of chitinase genes	65
1. Material and methods	65
2. Results	66
가. Expression of chitinase gene from N1 and CH-1 in pET system	66
1) Expression chitinase gene from <i>B. licheniformis</i> N1 in pET system	
2) Expression chitinase gene from <i>C. cellulans</i> CH-10 in pET system	
나. Chitinase assay using Fluorogenic N-acetylglucosamine substrates ...	70
1) Enzyme activity of N1 chitinase	70
2) Enzyme activity of CH-10 chitinase	71
Section 4. Construction of expression vector system in <i>Bacillus</i> sp.	73
1. Material and methods	73
2. Results	74
가. Cloning to expression vector pWH1520	74
나. Transformation of recombinant plasmid into <i>Bacillus</i> sp.	75
다. Expression analysis of chitinase gene by RT-PCR	76
라. Chitinase activity from recombinant <i>Bacillus</i> strains 168 and A-2 ...	77
Section 5. Inhibition of spore germination by chitinase from transformants	79
1. Material and methods	79
2. Results	79
<Project II> Formulation of Chitinase Producing Biocontrol Bacteria to Control Tomato Leaf Mold	
Section 1. Introduction	81
Section 2. Isolation and identification of microorganism	82
1. Material and methods	82
2. Results	89
가. Isolation, identification of tomato leaf mold pathogen	89

1) Symptoms of tomato leaf mold and its occurrence	89
2) Fungal pathogen and conidia production	91
3) Pathogenicity analysis	93
나. Isolation and characterization of antagonistic bacteria	95
1) Isolation of antagonistic bacteria	95
(가) Primary selection	95
(나) Disease control effect by antagonistic bacteria	96
(다) Antifungal activity by antagonist A-2 strain	97
2) Identification of antagonist A-2 strain	98
다. Isolation and identification of chitinase active strains	102
1) Isolation of chitinase active strain CH-9 and CH-10	102
2) Isolation of CH-67	103
3) Identification of chitinase active strain	104
(가) Strain CH-9	104
(나) Strain CH-10	105
(다) Strain CH-67	108
라. Growth inhibition effects of pathogen by antifungal and chitinase active strain	110
1) flask cultivation	110
2) Suppression of pathgen mycelia	110
3) Growth inhibition effects by A-2 and CH-10 strain	112
마. Control effects of antifungal and chitinase active strain at pot assay	114
1) Single and/or mixture treatment of A-2, CH-9, CH-10 strain ..	114
2) Single treatment of CH-67 strain	114
Section 3. Mass cultivation to develop biopesticides	117
1. Material and methods	117
2. Results	119
가. Optimal culture conditions of <i>B. amyloliquefaciens</i> A-2 strain	119
1) Cultural characteristics of A-2 strain	119

(가) Flask cultivation	119
(1) Culture time, Temperature, Initial pH	120
(2) Carbon sources	122
(3) Nitrogen sources	123
(나) 7L Jar fermentation	124
나. Optimal culture conditions of <i>C. celluans</i> CH-10 strain	124
1) Culture time, Temperature, Initial pH	124
2) Carbon sources	126
다. Optimal culture conditions of <i>B. cepacia</i> CH-67	128
1) Flask cultivation	128
(가) Carbon sources	128
(나) Nitrogen sources	129
2) 7L Jar fermentation	130
Section 4. Development of biopesticide for tomato leaf mold	133
1. Material and methods	133
2. Results	135
가. Formulation of A-2 strain	135
1) Selection of carriers	135
2) Formulations	135
(가) wettable powder formulation A2-A~A2-L	135
(나) wettable powder formulation A2-M, A2-MP, A2-O	135
나. Formulation of CH-10 strain	136
다. Formulation of CH-67 strain	137
1) wettable powder formulation CH67-A, CH67-B, CH67-C	137
2) wettable powder formulation CH67-D, CH67-F	137

<Project III> : Control effects of developed biofungicides and Field applications

Section 1. Introduction	139
Section 2. Control effects of biopesticides and selection of suitable formulation at pot assay	141

1. Material and methods	141
2. Results	145
가. Control effects of biopesticides of A-2 strain	145
1) Wettable powder formulations A2-A, A2-B, A2-E, A2-F and soluble concentrate A2-C, A2-D	145
2) Wettable powder formulations A2-G~A2-L	146
3) Wettable powder formulations A2-H, A2-M	150
4) Wettable powder formulations A2-MP, A2-O	152
5) Control effects of Selected formulation A2-MP	154
나. Control effects of biopesticides of CH-10 strain	156
1) Wettable powder formulations CH-10G	156
다. Control effects of biopesticide of CH-67 strain	158
1) Control effects of flask culture of CH-67 strain	158
2) Control effects of fermenter culture of CH-67 strain	158
3) Pot assay	158
(가) Wettable powder formulations CH67-A, CH67-B, CH67-C	159
(나) Wettable powder formulations CH67-D, CH67-F	161
4) Control effects of CH-67C formulations according to different spraying concentration	164
라. Synergy effects of antifungal active formulation (A2-MP) and chitinase active formulation CH67-C	165
마. Control effects of formulation of recombinant A-2.5 strain	167
 Section 3. Application of selected biofungicides in plastic house	170
1. Material and methods	170
2. Results	170
가. Tomato leaf mold	170
 Section 4. Application of selected biofungicides in a field experiment	173
1. Material and methods	173
2. Results	174

가. Control effects of biopescides by spraying times	174
나. Control effects of biopescides by crossed or mixed treatments	177
Section 5. Survival ability and stability of developed biofungisides	180
1. Material and methods	180
2. Results	182
가. Assessment of survival cells of A-2 formulation	182
나. Plant growth promoting effects by biofungicides	182
다. Application to the soil disease	184
라. Storage stability	187
마. Control effects of biopescides after long-term storage	187
Chapter 4. Accomplishment and contribution to the related field	189
Section 1. Achievement of research goal	189
Section 2. Contribution to the related field and expected impacts	191
Chapter 5. Future Application of the research	193
Chapter 6. Overseas scientific information	196
Chapter 7. References	204

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	27
제 1 절 연구개발의 목적과 필요성	27
1. 연구의 배경	27
2. 연구개발의 필요성	32
제 2 절 연구개발 내용 및 범위	37
1. 최종연구목표	37
2. 연구개발의 내용 및 범위	38
제 2 장 국내외 기술개발 현황	39
제 1 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점	39
1. 외국에서의 개발현황	39
2. 국내에서의 개발 현황	42
3. 국내의 특허관련 동향	46
4. 관련기술 문제점	48
5. 앞으로의 전망	49
6. 기술도입의 타당성	50
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	51
<제 1 연구 목표> 고향균활성 키틴나아제 활성 균주의 유전학적 육종	
제 1 절 서 론	51
제 2 절 다양한 Chitinase 활성 균주에서 chitinase 유전자 분리	
1. 연구수행 방법	53
2. 연구 결과	55
가. <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> CH-10 chitinase의 활성 zymogram	55
나. Chitinase 유전자 cloning	56
1) <i>Bacillus licheniformis</i> N1으로부터의 chitinase gene의 cloning	56
2) <i>Bacillus licheniformis</i> CH-1으로부터 chitinase gene의 cloning	

3) *Cellulosimicrobium cellulans* CH-10으로부터 chitinase gene의 cloning

제 3 절 Chitinase 유전자의 cloning, expression 및 활성 검정	
1. 연구수행 방법	65
2. 연구결과	66
가. N1 및 CH-10 chitinase의 pET system에서의 발현	66
1) <i>B. licheniformis</i> N1 chitinase의 pET system에서의 발현	66
2) <i>C. cellulans</i> CH-10 유래의 chitinase 유전자의 pET-42a(+) system에서의 발현	68
나. Fluorogenic N-acetylglucosamine을 이용한 chitinase 기질 특이성 조사	70
1) N1 chitinase의 기질 특이성 조사	70
2) CH-10 chitinase의 기질 특이성 조사	71
제 4 절 <i>Bacillus</i> sp.에서의 발현용 Vector system 구축	73
1. 연구수행 방법	73
2. 연구결과	74
가. <i>Bacillus</i> sp.에서 발현용 vector cloning	74
나. <i>Bacillus</i> sp. 의 형질전환	75
다. RT-PCR 을 이용한 발현확인	76
라. <i>Bacillus</i> strain (168, A-2) 에서의 N1 chitinase assay	77
제 5절 형질전환 균주(<i>Bacillus subtilis</i> 168)의 길항능 조사	79
1. 연구수행 방법	79
2. 연구결과	79
<제 2 연구목표> 고향균활성 키틴나아제 활성 균주를 이용한 미생물제제 제조기술확립	
제 1 절 서 론	81
제 2 절 유용미생물의 탐색 및 동정	82
1. 연구수행 방법	82
2. 연구 결과	89

가. 토마토 잎 곰팡이병 발생과 분리, 동정 및 병원성 검정	89
1) 토마토 잎곰팡이병의 발병율 및 병징 조사	89
2) 공시병원균 및 포자부유액 선발	91
3) 병원성 검정	93
나. 향균물질활성 균주 선발 및 동정	95
1) 우수 향균물질활성균 분리	95
가) 향균물질활성균의 1차 선발	95
나) 생육실내 방제효과 검정 및 최종 선발	96
다) 향균물질활성균 A-2 균주의 향균물질에 의한 포자발아억제	97
2) 우수 향균물질활성균 A-2균주의 동정	98
다. 키티나아제 활성균주의 분리 및 동정	102
1) 키티나아제 활성균주 CH-9 와 CH-10의 분리	102
2) 키티나아제 활성 균주 CH-67의 분리	103
3) 키티나아제 활성 균주의 동정	104
가) CH-9 균주	104
나) CH-10 균주	105
다) CH-67 균주	108
라. 선발 향균물질 활성 및 키티나아제 활성 균주에 의한 병원균 생육억제효과 검정	
1) 플라스크 내 검정	110
2) 현미경내 균사억제능 관찰	110
3) A-2 균주와 CH-10균주의 동시배양에 의한 병원균의 생육억제효과	112
마. 생육실내 포트상에서의 방제효과	114
1) A-2 CH-9, CH-10 균주의 단독 및 혼합처리에 의한 방제효과	114
2) CH-67 균주 단독처리에 의한 방제효과	114
제 3 절 향균물질활성 세균의 대량배양기술확립	117
1. 연구수행 방법	117
2. 연구 결과	119
가. <i>B. amyloliquefaciens</i> A-2 균주의 최적배양 조건 확립	119
1) 향균물질활성균 A-2 균주 배양적 특성 조사	119
가) 삼각플라스크배양	119

(1) 배양시간, 생육온도 및 초기 pH의 영향	120
(2) 탄소원	122
(3) 질소원	123
나) 발효기(Jar fermenter)에서의 배양	124
나. 키티나아제 활성균주 CH-10의 대량배양용 배지선발	124
1) 생육온도, 초기 pH 조건	124
2) 탄소원	126
다. <i>B. cepacia</i> CH-67 균주의 최적배양조건 확립	128
1) 삼각플라스크배양	128
가) 탄소원	128
나) 질소원	129
2) 발효기 배양	130
제 4 절 잎곰팡이병 방제용 엽면살포제 미생물농약 제조기술확립	133
1. 연구수행 방법	133
2. 연구결과	135
가. A-2 균주를 이용한 수화제형 및 액상수화제형의 제형화	135
1) 전달매체 선발	135
2) 제형화	135
가) A2-A~A2-L 수화제형	135
나) A2-M, A2-MP, A2-O 수화제형	136
나. CH-10 균주를 이용한 수화제형 미생물농약의 제형화	136
다. CH-67 균주를 이용한 수화제형 미생물농약의 제형화	137
1) CH67-A, CH67-B, CH67-C 수화제형	137
2) CH67-D, CH67-F 수화제형	137

<제 3 연구목표> : 개발 미생물제제의 방제효과 검정 및 포장 적용시험

제 1 절 서 론	139
제 2 절 개발 미생물제제의 방제효과 검정 및 우수제형 선발	141
1. 연구수행 방법	141

2. 연구결과	145
가. 향균물질 활성균 <i>B. amyloliquefaciens</i> A-2균주를 이용한 미생물제제의 생육실 포트에서의 방제효과	145
1) 1차 제제 (수화제형 A2-A, A2-B, A2-E, A2-F / 액상수화제형 A2-C, A2-D)	145
2) 2차 제제 (수화제형 A2-G~A2-L)	146
3) 3차 제제 (수화제형 A2-H, A2-M)	150
4) 4차 제제 (수화제형 A2-MP, A2-O)	152
5) 최종 선발된 미생물제제 A2-MP제제의 희석배수별 방제효과 검정	154
나. 키티나아제 활성균주 CH-10를 이용한 방제효과검정	156
1) CH-10균주를 이용한 미생물제제	158
다. 키티나아제 활성균주 CH-67의 최종 선발과 방제효과 검정	158
1) CH-67 균주 배양액의 방제효과 검정	158
2) CH-67 균주의 발효기 배양액의 방제효과 검정	159
3) CH-67 균주를 이용한 엽면살포제의 생육실내 포트검정	159
가) 1차 제제(CH67-A, CH67-B, CH67-C)	161
나) 2차 제제(CH67-D, CH67-F)	161
4) 최종 선발된 CH67-C제제의 희석배수별 방제효과	164
라. 향균물질활성 제제(A2-MP)와 키티나아제 활성 제제(CH67-C)의 혼합방제효과 검정	165
마. 재조합 A-2.5 균주를 이용한 미생물제제의 방제효과	167
 제 3 절 플라스틱 하우스내 토경재배에서의 방제효과 검정	170
1. 연구수행 방법	170
2. 연구결과	170
가. 개발 미생물농약의 포장에서의 방제효과 검정	170
 제 4 절 미생물농약의 자연발생 농가실증시험	173
1. 연구수행 방법	173
2. 연구결과	174
가. 개발 미생물제제의 처리횟수별 방제효과	174

나. 개발 미생물제제의 혼합 및 교호처리에 의한 방제효과	177
제 5 절 선발 미생물농약의 작물에서의 엽권정착력 및 저장안정성 검정	180
1. 연구수행 방법	180
2. 연구결과	182
가. 플라스틱하우스내 포트재배한 토마토에서의 A-2제제의 엽권정착력검정 ·	182
나. 개발 미생물제제의 작물에서 생육촉진 효과 검정	182
다. 타작물의 토양병에 대한 방제력 검정	184
라. 개발 미생물제제의 저장안정성 검정	187
마. 개발 미생물제제의 장기간 보관후 방제효과 검정	187
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	189
제 1 절 연구개발목표의 달성도	189
제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 및 기대효과	191
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	193
제 6 장 해외과학기술정보	196
제 7 장 참고문헌	204

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적과 필요성

1. 연구의 배경

가. 토마토 잎곰팡이병 연구

○ 토마토 잎곰팡이병 (Leaf mold)을 일으키는 병원균은 *Fulvia fulva*이며, 균사덩이의 형태로 종자의 표면에 부착 또는 기생하여 월동하며 온실내에서는 병든 잎에서 포자덩이, 균사 및 분생포자의 형태로 생존하며 수시로 기공을 통해서 침입한다. 이외에도 가지에 발생하는 잎곰팡이병균 *Mycovellosiella natrassii* Deight가 알려져 있다.

○ 병징은 잎의 표면에 담황색의 윤곽이 희미한 무늬가 생기며 잎맥에 싸이고 그 뒷면에는 회갈색 곰팡이의 분생포자가 생긴다. 열매에는 꼭지를 둘러싸는 검은 무늬가 생기며 단단해지고 약간 움푹해진다.

○ 발생환경은 노지에서도 발생하나 시설재배에서 상대습도 80%이상 다습시 환기가 나쁘고 온도가 22℃정도일 때 심하게 발병하며, 10~15℃에서는 현저히 발병이 억제된다. 조밀하게 심어 통풍이 나쁘면 포기내의 습도가 높아져 발생이 심화된다. 생육후기에 비료기가 떨어져 식물이 쇠약할 때 발생이 많다.

○ 주로 공기 전염을 하며 병원균은 온실, 하우스의 각종 자재, 피해를 받은 잎 및 종자에 붙어있는 균사로 겨울을 지낸다. 병반이 형성된 후에는 병반 위에 많은 분생포자가 생기고 이것이 비, 바람에 의해서 날려 퍼지게 된다. 분생포자는 저녁부터 이튿날 아침에 걸쳐 엽면에 생긴 이슬에 의하여 쉽게 발아하여 기공으로 침입하므로 잎 뒷면이 감염되기 쉽다. 잎곰팡이병의 발생은 온도와 습도에 크게 영향 받는다. 즉 기온은 20~25℃ 에서 발병되거나 퍼지기 쉽고 10~15℃에서는 거의 퍼지지 않는다. 습도는 90% 이상의 다습조건에서 발생되기 쉽다. 노지재배에서는 비가 많은 6~7월에 발생하고 밤낮의 온도교차가 크고 비오는 날이 많은 지역에서 발생하기 쉽다.

○ 하우스재배에서는 봄에 비가 많이 오고 환기가 곤란할 때 많이 발생 한다. 또 관수량이 많다든지 흙이 지나치게 습한 하우스에서 많이 발생하고 비료가 부족하여 초세가 약한 것이나 밀식해서 지나치게 무성한 경우에도 많이 발생한다.

○ 경종적 방제방법은 우선 종자소독과 온실의 환기 및 배수에 유의하고, 저항성 품종을 재배하며, 충분한 시비로서 영양부족 현상이 나타나지 않도록 하며 병든 식물체는 발견 즉시 제거하고 수확 후 병든 식물체가 남지 않도록 해야 한다.

○ 화학적 방제방법으로는 토마토 잎곰팡이병 등록 약제인 가벤다가스신수화제 (고추탄), 리프졸훈연제 (트리후민), 사프롤유제지오판수화제 (툽신엠), 지오판·유황액상수화제 (아싸), 이프로·치람수화제 (로브티), 지오판·리프졸수화제 (굳타임) 등이 있다. 하지만 최근 화학농약에 의한 방제효과가 매우 낮아져 새로운 약제 개발이 시급한 실정이다.

나. 키티나아제의 병 방제 기작 연구

○ Chitin은 N-acetyl-D-glucosamine이 β -1,4 결합으로 중합된 고분자물질로서 게, 새우 등의 갑각류 및 연체류의 껍질과 근육, 곤충류, 버섯류의 표피 성분으로 알려져 있으며 특히, 식물병원성 진균의 세포벽을 이루는 주성분이다.

○ 생물학적 방제 기작 중의 하나인 키티나아제 (EC 3.2.1.14)는 chitin의 β -1,4-glucosidic 결합을 가수분해하는 효소이며, 작용기작에 따라 β -1,4-glucosidic 결합을 무작위로 절단하는 endo형과 chitin 사슬의 비환원성 말단으로부터 절단하는 exo형 키티나아제 등이 있으며, 키티나아제분리 및 정제 그리고 특성에 대한 연구는 많이 보고되어 있다.

○ 최근 곰팡이, 세균, 식물체에서의 역할이 규명되어지면서 이들 사이의 생태적 상호관계에 키티나아제가 중요하게 관여하고 있는데 관심을 가지게 되었고, 키티나아제에 의한 식물병원성 진균이 함유한 chitin성분의 효소적 분해는 작물의 병해를 막는 생물학적 방제에 효과적인 방법으로 알려져 있다(Chet, I 등, 1990; Harman, G 등, 1989; Ordentlich, A 등, 1987, 1988; Sitrit, Y 등, 1995; Sneh, B 등, 1981, Tweddell, R 등, 1994).

○ 키티나아제 gene을 이용한 생물학적 방제 연구

- Kobayashi, D. Y. 등(2001) *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1의 키티나아제 gene의 특성과 생물학적 방제.
- Lutz, Matthias P. 등(2001) 생물학적 방제제로 이용된 *Trichoderma atroviride* P1내에서의 키티나아제 gene의 발현

다. 키티나아제 gene 연구의 해외도입기술정보

○ 1999년의 연구에 따르면, 키티나아제 gene의 cloning은 gene regulation과 catalytic activity와 직접적인 관련이 있으며, 키티나아제 gene은 inducer로서의 chitin과 repressor/inducer system에 의해 통제되어진다고 보고되고 있다.

○ 2000년 이후의 연구 경향에 따르면, 농업적, 미생물 산업적, 환경적인 면에서의 키티나아제 연구의 중요성은 gene expression의 발전을 이루게 하며, 효소의 대량활성을 위해서 키티나아제 gene의 regulation과 cloning을 이해하는 데 많은 업적들이 기대된다.

○ 미생물로부터의 키티나아제 gene의 Cloning과 sequence에 관한 연구

균 주 명	키티나아제 유전자	저 자
<i>Serratia liquefaciens</i> .	chiB	Woytowich, A.등
<i>Bacillus circulans</i> WL-12	키티나아제 A1	Tanaka, H
<i>Aeromonas hydrophila</i> JP101	Chi92	Mei Li Wu
<i>Pseudomonas</i> sp. YHS-A2.	키티나아제	Lee, H. S.;
<i>Bacillus cereus</i>	exo키티나아제 Chi36	Shu-Yi Wang
<i>Bacillus</i> sp. BG-11	thermostable 키티나아제	Bhushan, B.
<i>Vibrio alginolyticus</i> H-8.	키티나아제 genes	Ohishi, K.
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> OPC-520	thermostable 키티나아제	Tsujibo, H.
<i>Chlorella virus</i> PBCV-1	2 키티나아제 genes 1 chitosanase gene	Liangwu Sun
proteobacteria	키티나아제 genes	Cottrell, M. T
<i>Serratia marcescens</i> 2170	chiC	Suzuki, K
marine microorganism	키티나아제s	Cottrell, M. T
<i>Aeromonas</i> sp. No. 10S-24.	pCA8 ORF	Ueda, M.
<i>Xanthomonas</i> sp. AK	ChiA	Sakka, K
<i>Bacillus licheniformis</i> TP-1	키티나아제 gene	Srisurang, T.
<i>Candida albicans</i>	CHT1	McCreath, K. J
<i>Bacillus circulans</i> WL-12	chiC	Mustafa Alam
<i>Aeromonas caviae</i>	chiA gene	Sitrit, Y.
<i>Rhizopus oligosporus</i>	two 키티나아제s	Yanai, K.
<i>Streptomyces lividans</i> 66	키티나아제 genes	Miyashita, K.
<i>Vibrio alginolyticus</i> H-8	키티나아제 gene	Ohishi, Kazuo

라. 키티나아제 유전자의 발현 시스템 기술 개발

생물공학분야에서 유용유전자를 클로닝하는 이유 중의 하나는 특정미생물에서 유용유전자를 과잉발현하여 유용단백질 및 효소를 대량활성하는데 있다. 이를 위해선 다양한 유전자 조작을 통해 전사, 번역, 분비, 단백질의 안정성 등을 증진시키고자 발현 벡터의 개발은 매우 중요하다. 선진 각 국에서는 다양한 미생물을 이용하여 재조합 단백질을 저렴한 비용으로 대량활성하기 위한 연구가 경쟁적으로 진행되고 있으며, 유용효소의 산업화를 위한 다양한 숙주 및 발현계의 개발을 특허화하고 많은 기술을 독점 보고하고 있는 실정이다. 국내에서도 유전자발현기술 역시 진행되고는 있으나 외국의 기술을 모방하거나 전수받고 있는 실정이므로 유전자 재조합 발현기술은 날로 그 중요성이 증대되고 있다.

(국외의 연구동향)

○ Harris 등(1993)은 *Serratia marcescens*의 키티나아제 유전자를 35S constitutive promoter에 구축하여 *T. harzianum*에 도입 발현하였다.

○ Zeilinger 등(In submit)은 *T. harzianum*의 키티나아제 유전자로부터 외래유전자를 발현할 수 있는 promoter를 개발하였다.

○ Sitrit 등(1995)은 알팔파 뿌리혹세균인 *Rhizobium melioli*에 도입 발현시켜 *Rhizoctonia solani*를 억제하는 형질전환 균주를 얻었다.

○ 키티나아제 유전자의 미생물내에서의 발현 연구

균 주 명	숙 주 명	키티나아제 유전자	저 자
<i>Aeromonas</i> sp. No. 10S-24	<i>E. coli</i>	pCA 8 ORF	Sutrisno, A.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Aspergillus awamori</i> .	endo키티나아제	Murphy, R. A.
<i>Streptomyces olivaceoviridis</i> ATCC 11238	Heterologous expression	chi92	Haiming Li
-	<i>Bacillus thuringiensis</i> .	키티나아제 gene	Lertcana. M.
<i>Xanthomonas</i> sp.	<i>E. coli</i>	키티나아제 gene	Hwang C. W.
<i>Janthinobacterium lividum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	키티나아제 gene	Molloy, C
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>E. coli</i>		Chernin, L. S
<i>Aeromonas</i> sp. No. 10S-24	<i>E. coli</i>	키티나아제 III gene	Ueda, M
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	endo키티나아제	Margolles-Clark
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> OPC-520	<i>E. coli</i>	키티나아제 gene	Tsujibo, H
<i>Alteromonas</i> sp. strain 0-7.	<i>E. coli</i>	키티나아제 gene	Tsujibo, H
<i>Streptomyces plicatus</i>	<i>E. coli</i>	키티나아제 gene	Robbins, P. W.
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>E. coli</i>	키티나아제 gene	Chen, J. P
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>E. coli</i>	chiA74	Barboza-Corona , J. Eleazar

(국내의 연구동향)

- 김상달(1997, 1998, 연구보고서) 은 *Xanthomonas malthophilia*의 키티나아제 유전자를 siderophore 활성성 균주인 *P. fluorescens* GL20에 broad-host range plasmid를 대상으로 도입 발현하여 식물근부균 *Fusarium oxysporium*을 억제하였다.
- 강선철 등(1998, 연구보고서) 등은 곤충기생성 병원균인 *Metarhizium anisopliae*와 *Beauveria brassiana*로 부터 살충성 활성을 나타내는 키티나아제와 protease를 분리하여 살충성 곰팡이내에서 도입 발현하였다.
- 정영륜(2002, 연구보고서)은 *T. harzianum*과 *Pseudomonas putida*에 키티나아제 유전자를 도입 발현하였다. 그러나, 유전적으로 안정하지 못하여 실용화연구는 고려되지 않았다.
- 국내의 키티나아제 유전자를 이용한 대부분의 국내 연구보고서에 의하면 분리한 키티나아제 유전자를 유용세균이나 사상균에 성공적으로 형질전환하여 고효율로 발현되는 발현효과만을 확인하였을 뿐, 이들의 상업화를 위한 대량배양기술 및 제형화 기술개발에 관한 연구결과는 국내에서는 전무하다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

○ 토마토는 현재 가공용에서 생식용에 이르기까지 다양한 종류가 개발되어 세계에서 가장 많이 재배되고 있는 채소류로 성장하였고 우리나라에서는 주로 생식용으로 재배되고 있으나 최근에는 당도가 높고 먹기에 편한 방울토마토의 수요증가와 채소류 수출의 급격한 증대로 재배면적이 크게 늘어나고 있는 추세이다. 토마토는 주요 과채류와 비교했을 때 단가는 약간 낮은 편이지만 단경기나 홍수출하기에 관계없이 연중 가격이 안정되어 있으며, 농가 표준소득 또한 노지재배에서는 고추, 오이에 비해 높고, 시설재배에서는 고추보다는 낮지만 오이와는 비슷한 것으로 나타났다. 이를 미루어 보아 토마토는 단수증대와 품질향상 기술만 갖출 수 있다면 안정 소득작목으로 손꼽힐 수 있을 것 같다.

○ 미국 등 선진국에서 최근에 발표한 연구 결과에 의하면 토마토의 리코핀 색소가 세포의 산화를 방지하여 항암 효과를 나타낸다고 하였는데, 이 결과에 의하면 금후 토마토 소비가 늘어날 것으로 기대된다. 토마토의 품종은 숙기와 과형에 따라 최근에 각광을 받고 있는 완숙형을 비롯하여 미숙형, 송이토마토, 방울토마토, 등 4가지로 대별할 수 있는데 판매처와 소비자의 기호를 고려하여 선택하면 된다.

○ 토마토는 생육기간동안 착과의 안전성 측면에서 두 가지 유형의 품종군으로 분류되는데, 하나는 유한생장군으로 4~6단 이상에서 착과가 불안정하여 재배기간도 6개월 이하인 단기재배성 품종들로 기존에 국내에서 재배되고 있는 토마토 품종은 대부분 유한생장군에 속한다. 또다른 하나는 무한생장군으로 6개월이상 재배가 가능하며 연간 35~40단 수확할 수 있는 장기재배형 품종 군이고 유럽이나 중동, 미주지역에서 재배되는 토마토 품종은 대부분 이 품종군에 속한다.

○ 토마토에 발생하는 병해는 수십여종이 알려져 있으나, 우리 나라의 시설, 노지재배에서 중요한 병해는 잿빛곰팡이병, 잎곰팡이병, 겹등근무늬병, 점무늬병, 시들음병, 역병, 풋마름병, 배꼽썩음병, 모자이크병 등이며 이외에 흰가루병, 균핵병, 궤양병, 반점세균병은 지역이나 해에 따라 국부적으로 발생하여 간혹 피해를 가져온다. 이중 *Botrytis cinerea*에 의한 잿빛곰팡이병과 *Fulvia fulva*에 의한 잎곰팡이병이 가장 중요하고 다음으로는 앞서 언급한 역병과 *Alternaria* spp. 균에 의한 겹무늬병, *Stemphium* spp. 균에 의한 점무늬병이 흔히 발생한다. *Leveillula* spp.에 의한 흰가루병과 *Sclerotinia* spp.에 의한 균핵병은 지역적으로 간혹 발생하여 피해를 주고 있다.

○ 잎곰팡이병의 방제는 주로 화학농약에 의존하여 왔지만 이는 환경오염에 의한 생태계 파괴 및 인축에 대한 독성 그리고 약제저항성 균주의 출현으로 전 세계적으로 심각한 문제점들이 대두되고 있다. 이를 위해 최근에는 길항미생물에 의한 생물학적 방제에 관한 연구결과들이 보고되어 지면서 실용화 연구에 의해 제품들이 시판되고 있으나 그들의 방제효과의 변이와 토양내의 길항균 밀도 불유지 등으로 인해 실용화 측면에서는 다소 부정적이다.

○ 이를 극복하고자 여러 가지 병발생 기작 중 식물병원균의 세포벽 구성성분인 chitin을 분해하는 식물병 억제효소, 즉 키티나아제를 이용한 생물학적 방제 연구가 진행되면서 최근에는 유전공학적으로 키티나아제를 분비하는 미생물의 병 억제능력을 증가시키고자 노력하고 있다. 특히, 항생물질을 활성화하는 균주들보다 병원균에 대한 억제능력이 낮은 chitin 분해 미생물의 병 억제 능력

을 증가시키기 위해 항생물질 활성 능력이 높은 균주를 선발하고 여기에 키티나아제 유전자를 도입, 발현시켜 키티나아제 분비와 항생물질에 의한 병 억제력을 동시에 지닌 다기능성 균주로 형질 전환하여 지금까지 알려진 균주들보다 병방제 능력이 뛰어난 균주로 개발하는 것이 미생물제제 개발에 있어서 가장 필요한 기술 분야로 대두되고 있다. 그러나, 국외 뿐만 아니라 국내의 실험실내 실험에서는 키티나아제 분해능이 증가되었음을 확인하였으나, 이를 이용하여 미생물농약으로 개발한 예는 외국의 사례(살충제 개발)를 제외하고는 전무하며, 국내 역시 실제로 미생물농약을 개발하여 실제 포장에서 그 방제 능력을 확인하여 실용화한 예는 현재까지 보고된 바가 없다.

나. 경제 산업적 측면

○ 세계적으로 더욱 높아지는 자국의 환경생태계 보호 열기에 따라 기존 화학농약의 피해사례가 주목받고 있고, 이로 인한 토양, 수질오염, 인축에 대한 독성 및 환경호르몬 피해, 저항성 해충 출현, 유용천적 감소 등이 보고되고 있다. 지구환경생태계와 인류 건강에 대한 심각한 수준의 위협을 주는 이러한 문제점을 최소화하기 위해 선진국을 중심으로 환경친화적 생물농약의 필요성을 중요하게 인식하고 관련 기술 및 제품개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 현재 전 세계적으로 2백여종의 생물농약이 연구되고 있는 것으로 알려져 있으며 약 60여종 (병해충 방제용 17종, 해충 방제용 37종, 선충 방제용 2종, 잡초 방제용 8종)의 생물농약 관련 상품이 실용화되어 있다(농약정보 99년 7.8호).

○ UNCED는 99년까지 화학농약 사용량의 25%를 줄이거나 대체하도록 각국에 권고하고 있으며, 우리나라도 2004년까지 현재 사용되고 있는 화학농약의 50%를 대체하거나 줄이겠다는 추진 계획을 수립, 발표하였다(97. 농림부). 최근 (주)경농 등 기존 대기업들이 생물농약 개발에 참여하였고, 생물농약전문 벤처기업의 창업 움직임도 활발히 진행되고 있는 등 관련 연구 개발의 움직임이 활발하며 그 필요성이 해를 거듭할수록 절실히 요구되고 있는 실정이다.

○ 현재 전 세계 생물농약의 시장규모는 약 8,000억 원 정도이며, 미생물농약은 약 2,000억 원 정도이다. 약 20조원의 전체 농약 시장에서 생물농약이 차지하는 비중은 아직 미약하지만, 전체 농약시장 성장률에 비해 생물농약은 중요성이 급속히 증대되어 연 20%이상의 성장을 하고 있으며, 2000년대 초까지 약 5,000억 원의 시장 형성이 예측된다.

○ 미국 시장조사에 의하면 2000년 현재 생물농약의 판매는 5억불에서 11억불로 농약전체의

11%를 차지하고 있으며 전 세계적으로는 70억불정도로 예상하고 있다. 국내시장 역시 매년 증가 추세에 있으므로 본 연구의 다기능성 균주는 새로운 미생물농약으로 개발될 수 있고, chitin 유전자들은 병저항성 품종 육종에 이용될 수도 있으며, 시설재배 작물의 토양전염성병 방제를 위한 토양 첨가제로도 활용될 수 있을 것이다.

○ 현재 우리나라에서는 (주)케이이비씨에서 활성화하고 있는 약제 중 항곰팡이 미생물 제제인 프라미쓰, 바이오 콘트롤, 마이코싸이드는 모두 잿빛곰팡이병과 흰가루병을 방제하는 미생물농약이며 현재 개발된 잎곰팡이용 미생물농약은 등록된 바가 없다.

다. 사회문화적 측면

○ 선진국에서는 생물농약의 보급 확대를 위하여 미생물농약의 저독성 인정 등록기간 단축 및 비용감면, 등록우선권 부여 등의 국가차원의 지원정책을 시행하고 있다. 미국은 생물농약의 개발 및 관리 면에서는 선진화가 이루어졌으며 미국의 생물농약의 관리 체계는 OECD국가 및 타 국가의 모델이 되고 있다. 세계적인 화학 및 농약회사인 미국 몬산토사의 화학분야 포기 및 생물분야 집중 선언, 듀폰사의 미생물살충제 시장진출 전략 강화 등의 움직임과 함께 우리나라 기업 및 정부도 환경생태계보호를 위한 관련부처의 국가행동계획 수립에 이와 같은 상황에 대처하기 위한 적극적인 노력을 시도하고 있다. 일본은 미국의 생물농약의 관리 체계를 근간으로 하여 1997년에 「미생물농약가이드라인」을 제정하여 화학농약과는 별도로 관리하고 있으며 그 범주에는 바이러스, 세균, 진균 원생동물 및 선충이 포함이 되며 천적 항생물질 유전자 조작 미생물은 제외하고 있다.

○ 국내의 경우, 관련 연구자들을 중심으로 일부 BT.등 일부 곤충병원미생물을 이용한 미생물살충제 개발 시도 노력이 수년 전부터 계속되어 오고 있으나, 우수 균주의 확보 부족, 미생물농약시장 규모의 협소, 관련 전문가의 부족, 관련업계의 개발 의지 부족, 정부 및 민간의 인식 부족 등의 이유로 말미암아 효과적인 방제기술 및 관련제품개발에 성공하지 못한 실정이다. 그러나, 「미생물농약의 등록시험방법 및 등록신청 서류 검토 기준」이 고시됨에 따라 미생물농약 개발연구가 한층 활성화되고 가속화될 것으로 전망하고 있다.

○ 현재까지 몇몇 길항미생물에 의해 개발된 생물농약이 시판되고 있지만 화학농약보다 방제효과가 낮고, 대상병원균의 범위가 좁으며, 방제효과에 대한 확신과 농민들에 의한 불신으로 많이 이용되지 못하고 있는 실정이다. 이를 극복하기 위해서 병원균의 억제효과가 더 우수하고 대상 병원

균의 범위가 넓은 유용미생물의 확보와 첨단 유전공학 기술에 의한 활성물질 또는 효소 활성 증대 및 대량활성 기술 개발과 최종적으로 포장 응용기술 개발에 주력하여야 한다.

이는 국내토양과 우리고유의 작물 보호에 적합한 무공해 생물방제법을 확립할 수 있으며, 유기화학농약의 사용을 최소화할 수 있고, 국내농산물의 질적 수준과 안전성을 높여 환경보존과 농산물시장 개방 압력에 도움이 될 것이다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

1. 최종연구목표

항균활성이 뛰어난 길항세균인 *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 균주 및 항균활성과 키티나아제 활성을 동시에 지녀 탁월한 방제균으로 확인된 *Burkholderia cepacia* CH-67균주를 이용하여 잎곰팡이병 방제용(*Fulvia fulva*) 엽면살포제를 개발하고자 하였다. 또한 *B. licheniformis* N1 균주 및 다양한 균주로부터 식물병원성 진균의 세포벽가수분해에 관여하는 키티나아제 유전자의 유전정보를 획득하여 그람양성균인 *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 균주에 도입함으로써 유전학적 육종을 통해 고효율 키티나아제 및 고향균물질 활성 균주로 개발하고 이를 새로운 미생물 농약 개발에 이용하므로서 환경친화적인 생물학적 방제법을 개발하고자 하였다.

2. 연구개발의 내용 및 범위

제 1 세부과제 : 고향균활성 키티나아제 활성 균주의 유전학적 육종

- 다양한 미생물로부터의 키티나아제 유전자 정보 확보
- 키티나아제 유전자의 분리 및 cloning
- 키티나아제 유전자의 항균물질 생산 미생물로의 도입 및 발현
- 고향균 활성 키티나아제 활성 재조합 미생물 최종 선발
- 키티나아제의 분리, 정제 및 특성 조사
- 선발 재조합 균주의 키티나아제 분비능, 활성능 부가에 의한 길항력 증강 조사
- 작물생육도(작물생육촉진) 조사
- 타작물의 잎곰팡이병에 대한 방제력 검정

제 2 세부과제 ; 고향균활성 키티나아제 활성 균주를 이용한 미생물제제 제조기술확립

- 키티나아제 활성 균주 및 항균활성 미생물의 지속적인 분리
- 선발 미생물의 배양적 생화학적 특성 검정과 동정
- 키티나아제 생산 미생물의 키티나아제 활성 검정
- 항균물질 생산 미생물의 항균활성 검정
- 고향균 활성 키티나아제 활성 모균주와 재조합 균주의 대량활성을 위한 최적조건 확립
- 고향균 활성 키티나아제 활성 모균주와 재조합 균주의 대량배양기술 개발
- 미생물제제 개발을 위한 Additives 선발
- 미생물제제의 제조기술확립 및 제형화
- 미생물제제의 최적화실험 및 우수제형선발
- 미생물제제의 경시적 유효도 및 안정성 조사
- 미생물제제의 타작물에 대한 약해시험 조사

제 3 세부과제 ; 개발 미생물제제의 방제효과 검정 및 포장 적용시험

- 선발 고향균 활성 키티나아제 활성 모균주와 재조합 균주의 생육실내 포트상에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정
- 선발 고향균 활성 키티나아제 활성 모균주와 재조합 균주의 온실내의 포트 및 토경재배에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정
- 미생물제제의 생육실내 포트상에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정
- 미생물제제의 온실내의 포트 및 토경재배에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정
- 미생물제제의 포장에서의 방제효과 실증시험
- 미생물제제의 실제자연병 발생 농가하우스에서의 방제효과 실증시험

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점

1. 외국에서의 개발현황

가. 미생물 자체를 이용한 생물농약

각종 식물병원균에 대해 그들의 증식을 억제시키거나, 기생하거나, 항생작용 및 포식작용을 나타내는 미생물을 이용하여 병방제에 활용하는 생물학적 방제법이나 이들 미생물을 농약화시킨 미생물 농약은 현재 실용화 된 것이 16종, 실용화로 추진 중인 것이 29종이 알려져 있으며 실제로는 그 이상의 건들이 추진되고 있다. 2005년 현재 미생물농약으로 등록된 유용미생물로서 살균성세균은 10종, 곰팡이 11종, 살충성 세균은 9종, 곰팡이 6종, 선충 7종, 원생동물 1종, 바이러스 11종 등이다. 살선충곰팡이는 1종, 선충 1종, 제조성 세균 1종, 곰팡이는 2종으로 총 80여종의 미생물이 등록된 상태다.

미생물을 이용한 병해 방제시도 연구는 1927년 미국에서 감자 더덩이병 방제용으로 방선균을 이용한 것이 최초이며, 1960년 이후부터 농약의 형태로 실용화되기 시작하였고, 일본에서는 1962년에 담배 허리마름병에 *Trichoderma* 생균 제제를 시초로 이후에 많은 제품이 미국에서 개발되었으며 대부분의 실용화 제품이 옥묘중 발생하는 묘잘록병 방제용으로 개발되었음이 주목되었다(표 1). 2000년 현재까지 미국에서는 약 44 종 이상의 미생물농약이 등록되었고 지속적으로 발표되고 있다(표 2).

병해 방제용 생물농약중 가장 획기적인 성공 제품으로는 각종 작물 중에서도 특히 다년생 목본류의 뿌리에 발생되고 있는 뿌리혹 세균병(Crown gall)에 길항미생물인 *Agrobacterium radiacter* strain 84 및 K1026균주를 이용한 Galltrol, Dygall, Nogall, Bakuterozu 제품이 있다. 현재의 유기합성농약이 모든 세균병에 효과가 저조하나 특히 뿌리혹 세균병은 유기합성농약 효과를 전혀 볼 수 없는데 비해, 이 생물농약은 확실한 효과를 나타내어 우수한 방제제로 이용되고 있다. 이 생물농약의 방제기작으로는 *A. radiobacter*세균이 활성화하는 아그로신(Agrocin)이라는 항균성 물질이 병원균의 세포벽 합성을 저해하는 것이 기작이다.

표 1. 병해방제용 미생물살균제 실용화 생물농약

(농과원 최용철)

미생물	이 용 균 주	대 상 병 해	상 품 명	등록국(년)
세 균	<i>Agrobacterium radiobacter</i> strain 84	Crown gall	Galltrol Bakuterozu Dygall	USA('79) Japan('89) Canada
	<i>A. radiobacter</i> K1026	Crown gall	Nogall	Australia
	<i>Bacillus subtilis</i>	Seedling root diseases Infection seed-born	Quantum 4000 GUS 2000	USA USA
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Seedling root	Blue circle	USA
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> EG-1053	Damping-off	Dagger G	USA('88)
	<i>Streptomyces griseovirides</i>	Damping-off(Fusarium, Alternaria etc.)	Mycostop	USA
곰팡이	<i>Gliocladium virens</i> GL-21	Dampint-off (Rhizoctonia, Pythium)	WRC-GL-21-W RC-AP-1	USA('90)
	<i>Pythium ligandam</i>	Sugar beet disease	Polygandron	Czechoslovakia
	<i>T.harzianum Rifaistrain</i> KRL-AG 2	Damping-off (Pythium)	F-Stop	USA
	<i>T. harzianum /polysporum</i>	Wood-decaying fungus	BinabTM T	USA
	<i>T. lignorum</i>	Southern blight Sore shin(Tobacco)	Trichoderma (spore)	Japan('62)
	<i>T. viridae</i>	Verticillium in mushroom Plum silver leaf disease	BINAB T SEPPIC BINAB	France UK

표 2. 미국에서 상업적으로 이용되고 있는 주요 미생물 농약

(USDA,2000)

방제미생물	상품명	대상병원균
세균		
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Galltrol-A외 3종	뿌리혹병
<i>Bacillus subtilis</i>	Kodiak외 4종	뿌리썩음병, 시들음병
<i>Burkholderia cepacia</i>	Intercept	각종 토양병
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BlightBAN A506외 3종	사과·배나무 화상병
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Conquer외 2종	양송이세균성갈색무늬병
<i>Pseudomonas syringae</i>	Bio-save 100외 1종	젓빛곰팡이병, 푸른곰팡이병
<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Mycostop	각종 토양병
곰팡이		
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	AQ10	각종 흰가루병
<i>Candida oleophila</i>	Aspire	젓빛곰팡이병, 푸른곰팡이병
<i>Coniothyrium minitans</i>	Contans 외1종	균핵병
<i>Fusarium oxysporum</i>	Biofox C외 1종	시들음병
<i>Gliocladium virens</i>	SoilGard	모잘록병, 뿌리썩음병, 팻취병
<i>Gliocladium catenulatum</i>	PreStop외 1종	모잘록병, 뿌리썩음병, 팻취병
<i>Pythium oligandrum</i>	Polygandron	모잘록병, 뿌리썩음병
<i>Talaromyces flavus</i>	Protus	뿌리썩음병, 시들음병
<i>Trichoderma harzianum</i>	Binab T외 12종	균핵병,역병,뿌리썩음병,시들음병

나. 항생물질을 이용한 생물농약

미생물을 인공적으로 배양할 때 배양액에 미생물이 활성하는 대사물질을 배출하게 되는데 이러한 대사 활성물질을 분리 정제하여 의약품 및 농업용 항생물질로 활용하고 있다. 이러한 항생물질은 약 8,000종 이상이 알려져 있으며 이중 실용화 추진 중인 것은 약 600여종이며 농업용으로 활용되는 것은 20여종, 그중 병해방제용으로 많이 사용되고 있는 것은 6종이 실용화되고 있다(표 3). 농업용 항생물질 활성균은 토양내에 많이 분포하고 있는 방선균(Actinomycetes)중 *Streptomyces*속 균주로부터 많은 물질이 알려져 있다. 세계 최초의 농업용 항생물질은 1958년 도열병 방제용 항생물질로 알려져 있는 Blasticidin S를 선두로 Kasugamycin, Polyoxin,

Validamycin 등이 사용되고 있다. 이들 농업용 항생물질은 미생물 자체가 아닌 활성물질인 물질을 이용하게 되므로 농약으로서의 안전성 평가는 유기합성물질인 화학농약과 동일한 수준에서 평가되고 있으며 화학농약에 비해 매우 저독성인 것으로 알려져 있다.

표 3. 병해방제용 농업용 항생물질 (농과원 최용철)

항 생 물 질	생 산 균 주	대 상 병(작물)	등록년도 (한국)
Blasticidin-S	<i>Streptomyces griseochsomogenes</i>	Blast(Rice)	'58('66)
Kasugamycin	<i>St. kasugaensis</i> <i>St. kasugapinus</i>	Blast(Rice)	'64('69)
Validamycin	<i>St. hygrosopicus</i> <i>var.limoneus</i>	Sheath blight(Rice)	'70('76)
Polyoxin	<i>St. cacaoi</i> var. <i>asoensis</i>	Sheath blight(Rice) Alternaria leaf spot(Apple) Powdery mildew (Apple, Pear, Cucumber) Black rot(Pear) Brown spot(Tobacco) Gray mold(Red pepper) Scab(Pump) Canker(Apple)	'64('71)
Streptomycin	<i>St. griseus</i>	Canker(Citrus) Bacteria shot hole(Peach) Late blight(Potato)	'44('81)

2. 국내에서의 개발 현황

미생물 자체를 이용하거나, 미생물이 활성하는 생리활성물질에 대한 국내의 연구 및 개발은 외국에 비해 30~50년 뒤늦은 1980년대에 기초적 연구가 수행되어 왔으며, 전문가가 부족한 실정과 체계가 갖춰져 있지 않은 상황에 의해 실용화되고 있는 제품은 개발되어 있지 않다. 그러나, 최근에 체계적인 연구실과 전문가들에 의해 꾸준한 노력에 따라 연구역사에 비해 연구수준은 많이 향상되어 좋은 결과가 이루어지고 있다. 미생물자체를 이용하여 병해방제용으로 연구된 것으로는 1985년부터 국가연구기관 및 대학의 병리학자를 주축으로 담배의 모자이크병 (TMV), 세균성마름병(Bacterial wilt), 오이 시들음병(*Fusarium wilt*), 고추 역병(*Phytophthora blight*), 딸기 시들음병, 눈마름병(*Rhizoctonia bud rot*), 사탕무우 잘록병(Damping-off), 벼 도열병, 잎집무늬마름병 방

제 등에 관한 연구가 보고되어 있다(표 3). 특히, 보고된 연구결과 중 현재 활용 가능성이 높아 일부 균주에 특허를 취득 또는 특허중인 것은 고추역병 방제를 위한 길항미생물균주인 AC-1, 오이 덩굴쪄짐병 방제용인 비병원성 균주와 각종 작물에 발생하고 있는 흰가루병균에 기생하는 기생균에 의한 방제방법은 곧 실용화가 가능한 것으로 생각된다.

표 4. 국내에서의 미생물에 의한 각종 작물병해 방제 연구

작 물	대 상 병	미생물 종류	보고 년도
Tobacco	TMV	Virulence virus	'85
	Bacterial wilt	Non pathogenic <i>P. solanacearum</i>	'85
Cucumber	Fusarium wilt	<i>Rhizosphere antagonists</i>	'87
		<i>P. gladioli</i>	'92
		Non pathogenic strain of <i>Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum</i>	'93
		<i>Gliocladium virens</i> <i>P. putida</i>	'95
Red pepper	Phytophthora blight	<i>Bacillus sp.(AC-1)</i>	'86
		<i>P. cepacia</i>	'88
		<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Enterobacter agglomerans</i>	'89
		Non pathogenic strain of <i>Phytophthora capsici</i>	'92
Strawberry	Fusarium wilt	<i>Trichoderma sp.</i>	'88
		<i>T. harzianum</i>	'95
		<i>P. gladioli</i>	'90
	Rhizoctonia bud rot	<i>Antagonistic microorganisms</i>	'94
Sugar beet	Damping-off	<i>Pseudomonas sp.</i>	'88
Rice	Blast, sheath blight	<i>Pseudomonas sp.</i>	'90

한편, 미생물 활성 활성물질인 농업용 항생물질 연구 역시 외국에 비해 20~30년 후에 추진되었으며 현재도 신물질 탐색에 힘쓰고 있다. 지금까지 결과로는 벼 흰잎마름병 방제용으로 cychloheximide를 분리 동정한바 있으며, 방선균 streptomycetes균에 의한 Maculocin을 분리한 바 있으나, 신물질 분리나 유망한 물질의 활용까지는 이르지 못하고 있다. 이제까지 국내에서 미생물 자체를 이용한 병해방제용 생물적 방제중 가장 많은 연구가 이루어진 고추역병균 방제용 AC-1 균주를 생물농약으로 등록하기 위한 제반시험을 완료한 단계이며, 실용화를 추진중이다.

*Botrytis cinerea*의 생물학적 방제 중 수확 후 발생하는 각종 저장성 병해도 보고되고 있는

데, 예를 들면 장미(pyrrrolnitrin), avocado(*Bacillus subtilis*), 포도(*Trichoderma* spp.), 사과(*Pseudomonas cepacia*, 배(*P. cepacia*, *Bacillus pumilus*, *B. amyloliquefaciens*), citrus(*Candida olephila*), cyclamen(*Ulocladium atrum*)가 보고되고 있다. 전세계적으로 약 40종의 생물농약 제품이 식물병의 방제용으로 시판되고 있는데, *Trichoderma*속 균을 이용한 제제인 Trichodex (Deborah 등, 년도불명)와 *Pseudomonas syringae*를 이용한 Bio-save 110 등이 국외에서 시판되고 있으나 작물 살포용 뿐만 아니라 길항세균을 이용한 미생물농약은 전혀 개발되지 않고 있다.

국내에서 복성해 등(생명공학연구소, 1992)에 의해 *B. subtilis*를 길항균으로한 딸기 잭빛곰팡이병 방제용 미생물농약의 개발을 성공적으로 수행하였으나 수년이 지난 현재까지 그 실용화 여부가 불분명한데 최근 미생물농약 등록 기준이 마련되어 품목고시가 될 것으로 기대하고 있다. 최근 BT계 미생물농약의 약효를 10배이상 오래 지속시키고 싼 제조공정에 성공했다고 밝혔다.

최근 경상대학교 정영륜 교수 연구팀에 의해 2000년도에 개발된 토리(상품명)는 *T. harzianum*을 이용한 미생물농약으로 잭빛곰팡이병에 매우 탁월한 효과가 있는 것으로 보고(정영륜 등, 1993)되고 있으며 현재 시판 중에 있다(표 5).

2002년 3월 국내 처음으로 그린바이오텍이 고추 역병 살충제와 잭빛곰팡이용 살균제 등 3종을 등록을 하였으며 2003년도에 완제품을 출시하였다.

2003년 전남대 지연태와 정순주 교수팀이 NIN(대표 김희경)와 공동연구한 결과 천연무독성 농약 개발에 성공하였다. 이는 미국 등의 학자들이 2010년 개발을 목표로 앞지른 것으로서 이 무독성 농약은 천연물을 이용해 만든 생물전환체제로 단백질원과 식물성 지방산을 원료로한 물질을 추출해 이를 나노 입자를 제조하였다. 이는 벼문고병, 벼도열병, 잔디 패치병, 고추탄저병, 장미역병, 오이 흰가루병과 잭빛곰팡이병 등을 완전 구제한다고 발표하였다.

2005년 동부한농화학은 비티제인 '*B. thuringiensis* 살충제' 등 10 여종 이상의 미생물농약을 개발 중에 있으며 현재 5개 종이 등록절차를 진행중에 있다. 또한, 환경친화적 제초제인 DBH-129, 원예용 살충제 DBI-3204, 미생물살균제 AC-1, 나방류 방제에 주로 활용되는 "바이오박"을 상품화하였다.

배재대 바이오의약센터 소장 이기성 교수는 동부한농화학과의 산학협력으로 KL1114MBF 세

균을 이용한 무공해 무독성 농약을 개발하고 곧 상품으로 출시된다. 이 농약은 입제, 수화제, 종자 코팅제 등의 다양한 상품으로 개발되었는데, 특히 배추무사마귀병 방제용 종자코팅제는 작물의 뿌리에 미생물이 정착, 각종 병해를 일으키는 병원균의 침입을 억제하는 것으로 환경에 전혀 영향이 없다고 밝혔다.

본 연구실에서는 1999년 *B. licheniformis* N1 균주로 제조한 Soy제제의 들깨 잿빛곰팡이병 예방효과와 치료효과를 입증하였고, 이를 이용하여 1999년에서 2002년까지는 수화제형 N1E제제를 딸기, 토마토, 결구상추의 잿빛곰팡이병을 약 90% 이상 방제하였음을 증명하였다. 게다가 수화제형 N1K제제 역시 상기의 작물에서 잿빛곰팡이병에 대한 높은 방제효과를 보여 새로운 미생물 농약의 방제 가능성을 보였다. 2004년에서 2005년도에는 결구상추 밀둥썩음병 방제용으로 수화제형 BW-13A제제의 방제효과를 실제 포장에서 검증하였고, 결구상추 균핵병 방제용으로 액상수화제 A7-2제제와 수화제 A7-I 제제 역시 방제효과가 자연병발생 포장에서 방제효과가 뛰어나 특허 출원되었다.

표 5. 국내에서 살균제로 개발 중인 미생물 균주와 개발된 미생물 제품

대상 식물병	균 주	연구팀	제품명
인삼뿌리썩음병	<i>Bacillus, Arthrobacter, Pseudomonas</i> 등 복합균주	한국인삼연초연구소 투엠바이아연구소	바이코나 1, 2 (1987)
고추역병	<i>Bacillus</i> AC-1	농업과학기술원	흰나라 등 (1994)
모잘록병 등	<i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	경상대	3년차 포장실험 (1995)
채소시들음병	<i>Paenibacillus koreensis</i>	경상대	3년차 포장실험 (1998)
배추무사마귀병	<i>Bacillus</i> sp.	배재대, 동부한농	(2000)
잣빛곰팡이병 잎곰팡이병 겹둥근무늬병	<i>Trichoderma harzianum</i>	경상대 제일그린	토리 (2000)
흰가루병, 고추역병	<i>Paenibacillus polymyxa</i> AC-1	그린바이오텍	탑씨드 (2003)
잣빛곰팡이병, 모잘록병	<i>Bacillus subtilis</i> GB413	그린바이오텍	썰러스 (2004)
흰가루병	<i>Ampelomyces quisqualis</i> AQ94013	그린바이오텍	큐펙트 (2004)

3. 국내의 특허관련 동향

1) 국내 생물농약에 관한 기술 개발은 외국에 비해 3-4년도의 기술 격차가 있으나 생물농약에 관한 특허는 87년 BT 균의 대량제조방법으로 첫 출원이 이루어졌다가 94년에 항바이러스 단백질을 함유하는 바이러스 방제제의 특허가 출원되었다. 2002년 5월까지의 총 19건으로 매년 점점 늘어나고 있는 추세이다.

2) 국내 미생물농약은 총 8개 품목이 등록되었는데, 이중 국내 선두업체인 그린바이오텍이 2002년 3월 국내 처음으로 고추 역병 살충제와 잣빛곰팡이용 살균제 등 3종의 원제 등록과 더불어 2004년도에 2종의 미생물농약(썰러스, 큐펙트)를 추가하여 총 5개 품목을 등록하였다. 이어 2005년에는 잔디용미생물농약을 1건 추가하여 총 6개 품목을 등록한 것으로 밝혔다.

3) 2003년 전남대 지연태와 정순주 교수팀이 NIN(대표 김희경)와 공동개발한 천연무독성 농약 개발로 세계 29개국에 특허 출원하였다. 현재 이 연구팀은 작물안전성 검사를 마친 것으로 알려졌다.

4) 동부한농화학은 BT제인 '*B. thuringiensis* 살충제' 등 10 여종 이상의 미생물농약을 개발 중에 있으며 현재 5개 종이 등록 절차를 진행 중에 있다. 환경친화적 제초제인 DBH-129, 원예용 살충제 DBI-3204, 미생물살균제 AC-1, 나방류 방제에 주로 활용되는 “바이오박”을 상품화하였다.

5) 복성해(생명공학연구소) 박사팀은 최근 BT계 미생물농약의 약효를 10배 이상 오래 지속시키는 신흠 제조공정의 개발로 26개국에 특허 출원하였고, 삼성물산과 캐나다의 2개 회사와 산업화를 추진 중에 있다.

6) 고려바이오연구소, 엔바이오시스, 한국바이오세라믹, 한국녹생환경, 비아이지 등의 바이오벤처기업과 경농, 한국화학연구원, 한국과학기술원 등도 연구개발을 활발히 진행하고 있다.

7) 본 연구실의 경우, 2005년 현재 과리목 해충에 대해 방제효과를 가지는 바실러스 슈린지에스 균주를 이용한 미생물 살충제(제 0458765 호)와 바실러스 리케니포미스 N1 및 이를 포함하는 식물병원성 진균 방제용 미생물 제제(제 0506721 호) 등의 2건이 미생물농약의 제형화로 특허 등록되었다.

4. 관련기술 문제점

가. 국내 개발의 문제점

- 1) 국내 개발기술은 연구역사가 짧고 기술수준이 낮고 연구인원이 수적으로 부족하며 연구가 산발적이며 중심체제가 없어 활성화가 지연되고 있다.
- 2) 방제대상의 선택성이 좁고, 제한적이다.
- 3) 농약 제조 판매측면에서 수익보장이 어렵고, 개발여력이 없다.
- 4) 사용자 측면으로는 속효성인 화학농약을 선호한다.
- 5) 농약 등록시 국내여건상 제출서류 작성 해결 부족 및 시일이 많이 걸린다.
- 6) 국내 미생물농약 등록을 위한 GLP 인정 독성시험기관이 미흡하며 이를 뒷받침할 국가차원의 적극적 지원이 필요하다.
- 7) 산학협력 체제의 미성숙으로 기술을 습득한 연구원들의 취업난때문에 기술 연계가 이루어지지 않는다.

나. 생물농약의 등록 요건

미국, 캐나다, 영국, 유럽 등의 외국에서는 화학농약과 생물농약의 등록 평가기준이 상세히 정해져 있으며, 안전성 평가부분에서도 요건별로 차이를 두고 있으나, 국내의 경우에는 농약관리법에 생물농약 등록규정이 있기는 하나 그 내용이 현재로서는 명확하지 않아 그 기준이 매우 모호한 실정이다. 일본의 경우에도 최근 생물농약의 실용화품목이 증가됨에 따라 새로운 규정에 의해 생물농약이 등록되고 있으며 등록규정이 정립되어 실용화를 간단히 추진되도록 하고 있다. 따라서, 국내에서도 새로운 생물농약 등록기준이 세부적으로 나뉘어 명료하게 설정되어 저독성이면서 안전한 생물농약이 활용될 수 있는 방법이 제시되어야 할 것으로 생각된다. 금후, 생물농약으로 실용화하기 위한 검토기준 중 연구자가 생각하여야 할 참고 사항으로는

- 1) 화학농약의 규격, 성상과 같은 수준으로 이용생물의 분류상의 위치와 특성을 명확히 파악한다.
- 2) 인간이나 가축에 대한 감염성의 유무, 병원성의 유무를 밝혀야 하며
- 3) 농약으로서의 실용적인 효과를 확인한다.
- 4) 표적작물에 대한 약해 및 이상증상 등에 영향이 없어야 하며

- 5) 환경이나 표적 외 생물(누에, 꿀벌, 지렁이 등 유용곤충)에 영향이 없고
- 6) 농약으로서의 제품관리(수송, 보관, 유효기간 등)가 되어야 한다.

다. 이용상의 문제점

- 1) 화학농약과는 달리, 그 효과가 서서히 나타나는 경우가 많다.
- 2) 주위 환경에 의해 효과가 영향을 받는 경우가 많다.
- 3) 재연성이 떨어지는 경향이 있다.
- 4) 화학농약 보다 낮은 방제가를 목표로 한다.
- 5) 화학농약에 비해 고가인 경우가 많다.
- 6) 사용상의 주의점이나 효과를 발휘하기 위한 조건이 있다.
- 7) 화학 농약과의 동시사용 영향 평가가 어렵다.
- 8) 화학농약에 비해 가격이 비싸나 활성물의 가격반영이 어렵다.

5. 앞으로의 전망

환경 친화적 미생물농약은 농약의 잔류독성 및 축적과 환경 오염 등 문제를 야기하는 화학농약의 대체 품목으로 시장이 확대될 것이다. 미생물농약 제조는 다른 분야에 비해서 비교적 외국과의 기술 격차가 적고, 미래 산업으로서 전망이 밝다. 하지만 개발 소요기간, 기술, 자금 등 많은 문제로 민간 기업이 이를 전부 해결해 나가기 어려운 실정이다. 이에 정부차원에서의 지원이 시급하다.

생물농약이 세계적으로 차지하는 매출액은 전체 농약 300억불 중 1%에 해당하는 3억불에 지나지 않으며, 개발 실용화된 70여종 중 각국에서 많이 사용되고 있는 미생물 살충제인 Bt제를 제외하면 대부분의 생물농약 사용량은 많지 않다. 이외에 사용중인 생물농약은 화학농약보다 효과가 우수하거나, 화학농약에 의한 문제점으로 도출된 약제저항성 문제해결 또는 방제가 어려운 뿌리혹 세균병의 방제제로 이용되고 있다. 그러나, 이제까지 사용되고 있는 화학농약이 과학기술의 발달에 의해 밝혀지지 않았던 독성의 문제점이 점차 밝혀짐에 따라 저독 안전한 생물농약의 개발 및 실용화는 더욱 촉진될 것으로 생각된다. 특히, 생물농약은 환경생태계에 안전하며, 약제저항성 출현이 없고, 농산물의 안전성 및 부존자원을 이용한 저렴한 개발비 등으로 볼 때 개발은 꼭 필요하다.

국내의 입장으로 볼 때 농약을 필수적으로 사용하지 않으면 안될 상황에서는 자체개발 생물농약은 필요한 자재이다. 현재, 개발하고 있는 국내의 연구결과를 확대발전 시킨다면 단기간내에

실용화가 가능할 것이며, 외국에서 개발된 것보다는 국내 자원을 이용한 생물농약이 국내환경에 잘 적응할 뿐만 아니라 기술축적 측면에서 육성시켜야 할 분야로 보며, 21세기에 화학농약 대체로 생물농약 사용이 바람직할 것으로 볼 때 실용화 축진은 필수적인 과제라 생각된다.

6. 기술도입의 타당성

가. 외국에서 상품화된 것은 특정 작물의 특정 병을 대상으로 하는 미생물농약이 주종을 이루고 있으나, 국내에서 많이 발생하는 병과는 양상이 다르므로 이에 대한 방제효과가 의문시된다. 선행 기술을 도입하더라도 기술의 종속, 기술료 등 아직까지 작은 우리나라 미생물농약 시장에서 경제성을 맞추기가 쉽지 않을 것이다.

나. 미생물농약의 개발은 장기간에 걸친 기술, 정보, 경험의 축적으로 이루어지며, 한번의 기술도입으로 그러한 능력을 갖출 수 없으므로 기술도입에 의한 기술의 정립은 불가능하다. 국제적인 기술 보호 여건이나 이를 극복해야 하는 국내 여건으로 볼 때 국내의 우수 연구진과 국내 기업이 효과적인 연구 공조체계를 이루어 연구를 진행해야 한다.

다. 미생물을 이용한 미생물 제제는 그 환경에 적응하는 능력이 중요하므로 국내에서 분리한 균주를 이용하는 것이 가장 바람직하다고 보여 진다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 세부과제 : 고향균활성 키티나아제 활성 균주의 유전학적 육종

연구책임자 : 이 영 병

제 1 절 서 론

Chitin은 각종 식물병원성 진균 특히 사상균의 세포벽 주성분으로 알려져 있으며 연간 100 억톤 정도로 지구상에서 셀룰로오스 다음으로 많이 생산되고 있는 자원이다. 최근 chitin 및 chitin 유도체는 식품산업, 제약산업, 농업 및 환경분야 등의 다양한 산업분야에서 이용되고 있다. 생물방제균의 주요기작중의 하나인 chitinase는 chitin의 β -1,4-glucosidic 결합을 가수분해하는 효소이며, 작용기작에 따라 chitin의 β -1,4-glucosidic을 무작위로 절단하는 endo-형과 chitin 사슬의 비환원성 말단으로부터 절단하는 exo-형 등이 있다.

오래전부터 곰팡이, 세균, 식물체에서의 chitinase 역할에 관한 연구들이 규명되면서 이들 사이의 생태적 작용 상호작용에 chitinase가 중요하게 관여하고 있다는 데에 큰 관심을 가지게 되었고 식물병원성 진균이 함유한 chitin 성분의 효소적 분해는 작물의 병해를 방지하는 적극적인 방제 기작 중의 하나이다. 병발생 기작 중 식물병원균의 세포벽 구성성분인 chitin을 분해하는 식물병 억제효소, 즉 키티나아제를 이용한 생물학적 방제 연구가 진행되면서 최근에는 유전공학적으로 키티나아제를 분비하는 미생물의 병 억제능력을 증강시키고자 노력하고 있다. 특히, 항생물질을 활성하는 균주들보다 병원균에 대한 억제능력이 낮은 chitin 분해 미생물의 병억제 능력을 증강시키기 위해서 항생물질 활성 능력이 높은 균주를 선발하고 여기에 키티나아제 유전자를 도입, 발현시켜 키티나아제 분비와 항생물질에 의한 병 억제력을 동시에 지닌 다기능성 균주로 형질전환하여 지금까지 알려진 균주들보다 병방제 능력이 뛰어난 균주로 개발하는 것이 미생물제제 개발에 있어서 필요한 기술분야로 대두되었다.

그러나, 국외 뿐만 아니라 국내의 실험실내 실험에서는 키티나아제 분해능이 증가되었음을 확인하였으나, 이를 이용하여 미생물농약으로 개발한 예는 외국의 사례(살충제 개발)를 제외하고는 전무하며, 국내 역시 실제로 미생물농약을 개발하여 실제 포장에서 그 방제 능력을 확인하여 실용

화한 예는 현재까지 보고된 바가 없다. 따라서, 본 연구에서는 다기능성 방제균의 육종에 필요한 chitinase이 유전자원을 마련하고 항균활성은 있으나, chitinase 활성은 없었던 *Bacillus amyloliquefacines* A-2 균주에 chitinase 유전자를 삽입하여 이들의 증가된 방제력을 검정하고자 하였다.

제 2 절 다양한 Chitinase 활성 균주에서 chitinase 유전자 분리

1. 연구수행방법

가. Colloidal chitin 제조

Chitin은 비수용성이며 분자내 수소결합으로 인하여 매우 단단한 구조를 가지고 있기 때문에 산이나 효소에 의해서 쉽게 분해되지 않으므로, chitin의 미립자를 물에 분산시켜 chitinase가 작용할 수 있는 colloidal chitin을 제조하여 사용하였다. 먼저 Crude chitin (Practical grade from Crab shells, Sigma) 100 g에 강염산(HCl) 2,000 ml를 가하여 4℃에서 24시간동안 교반시키고 glass wool로 여과하였다. 여액은 4℃의 에탄올로 가하여 교반시키면서 흰색의 colloidal chitin이 생성되면 상온에서 colloidal chitin이 가라앉을 때까지 방치하고 상등액은 버린다. 이를 7,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 침전물은 다시 증류수에 분산시킨 후 10 N NaOH로 중화시키고, 앞선 과정에서 생성된 NaCl의 제거를 위해 3~4회 증류수로 세척한 후 원심분리하고 침전물을 회수, colloidal chitin을 제조하였다.

나. 유전자 조작에 사용된 균주 및 plasmids

본 연구에 plasmid 구축 및 증폭을 위한 숙주세포로는 *E. coli* DH5α (*supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1*)와 Top10'(F⁻, *mcrA*, D(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), *f80lacZDM15 DlacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139 D(ara-leu)7697*, *galK*, *rpsL(StrR)*, *endA1*, *nupG*)를 사용하였으며, 발현 숙주세포로는 BL21(DE3) (F⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS(r_B⁻m_B⁻)*, *gal(DE3)*)를 사용하였다. PCR product의 cloning을 위한 vector로는 pGEM-T vector (promega)를, 발현용 plasmid vector는 pET22b (Novagen)를 사용하였다. *Bacillus* 발현용 vector로는 *E. coli-Bacillus* shuttle vector인 pWH1520 (MoBiTec)을 사용하였으며, 발현용 *Bacillus* 숙주로는 *Bacillus subtilis* 168를 사용하였다.

항진균활성 세균인 *B. licheniformis* N1과 chitinase 활성균주인 *B. licheniformis* CH-1의 Chromosomal DNA를 분리하여 template로 사용하였다. *B. licheniformis*에서 chitinase gene의 염기서열이 밝혀진 *B. licheniformis* TP-1유래의 TP-chitinase 염기서열을 기초로 primer를 디자인하여 Chi-F,R이라고 명명하였다(Table 1). 중합효소는 *Taq* DNA polymerase로 Ex *taq* (Takara, Korea)을 구입하여 사용하였다. 한편, PCR 증폭반응은 Mygenie 32 thermal block (Bioneer, Korea)을 사용하고, 증폭 조건은 94℃(5분), 94℃(1분), 51℃(1분), 72℃(1분 30초)로 30회 반복하고, 마지막 단계로 72℃에서 5분간 실시하였다. 이 조건으로 증폭된 산물을 QIA

quick PCR purification kit (Qiagen Inc., Germany)를 이용하여 정제한 후, pGEM-T vector 에 ligation 한 후 *E. coli* top 10' 에 transformation 한 후 LB X-gal 배지에서 white colony 를 선별하였다. 선별된 형질전환체 가 포함된 5 ml의 LB broth (ampicilline 50ug/ml) 접종하여 밤새 배양 후 plasmid 추출 후 CH-1과 N1 균주의 chitinase gene 을 포함할 것으로 예상되는 적절한 재조합plasmid를 확보하였다. 재조합 플라스미드의 제한효소 절단 양상에 기초하여 올바른 재조합 clone을 선별하여 시료의 염기 서열 분석을 Genotech corp. (Daejeon, Korea) 에 의뢰하였다. 삽입된DNA의 양가닥의 염기서열을 완전히 분석한 이 후, 이 DNA 염기서열을 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 에서 BLASTN을 통하여 분석하였다.

다. 재조합 plasmid 제작 및 형질전환

*E. coli*에 있는 plasmid DNA는 plasmid purification kit (Nucleogen)을 사용하여 추출하였으며, 유전자 및 제한효소단편 DNA의 cloning과 *E. coli* 형질전환은 Maniatis 등의 방법으로 수행하였다.

라. Chitinase 활성측정

1) Plate agar assay

0.5% colloidal chitin이 포함된 LB agar plate배지에서 분리균 및 형질전환체를 배양하여 colloidal chitin의 분해에 의한 투명환을 관찰하여 활성을 결정하였다. 투명환이 나타난 plate는 증류수로 bacteria colony를 씻어낸 다음 0.5% congo red solution으로 37°C에서 30분간 염색한 후 1M NaCl 로 씻어내어 반응을 정지시켰다.

2) SDS-PAGE와 Zymogram

SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법으로 행하였으며, 1 mm 두께의 12%(w/v) polyacrylamide gel 에 0.7 mg CM-chitin-RBV/ml를 첨가하여 사용하였다. 120V의 일정한 전압으로 상온에서 행하였으며, 단백질 band는 0.25% Coomassie blue R-250으로 염색하여 확인하였다. In situ zymogram technique을 이용하여 chitinase 활성을 분석하기 위하여 polyacrylamide gel 제조시 . 단백질 sample은 sample buffer (2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 1.25% (w/v) β -mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8)를 첨가한 후 5분간 끓여 상온에서 식혔다. 전기영동이 끝난 후 gel을 증류수에서 15분정도 방치하였으며, 0.1% Triton X-100이 포함된 50 mM sodium acetate buffer에서 24시간 방치하였다. Chitinase 활성을 가지는 band에서 투명환을

관찰하였다.

2. 연구수행결과

가. *Cellulosimicrobium cellulans* CH-10의 chitinase 활성 zymogram

C. cellulans CH-10 균주로부터 활성화되어지는 chitinase의 분자량 및 효소활성검정을 위해 SDS-PAGE상에서 pN-NAG₂를 기질로 하여 colloidal chitin이 포함된 배지에서 chitinase 활성을 조사하였다. 그 결과, 배양상층액 뿐만 아니라 잔존의 chitin에서도 활성이 나타나 chitinase는 chitin에 binding되어 있을 것으로 판단되었으며, 이후 chitin에 binding되어 있는 chitinase를 쉽게 분리정제하기 위하여 배양액에서 colloidal chitin을 분리한 다음 guanidine chloride를 사용하여 상온에서 약 2시간동안 단백질을 용출시켰는데, 그 결과, *C. cellulans* CH-10의 배양상층액, 농축액, 그리고 기질 첨가 시에 모두 총 3개의 chitinase band가 관찰되었다(Fig. 1).

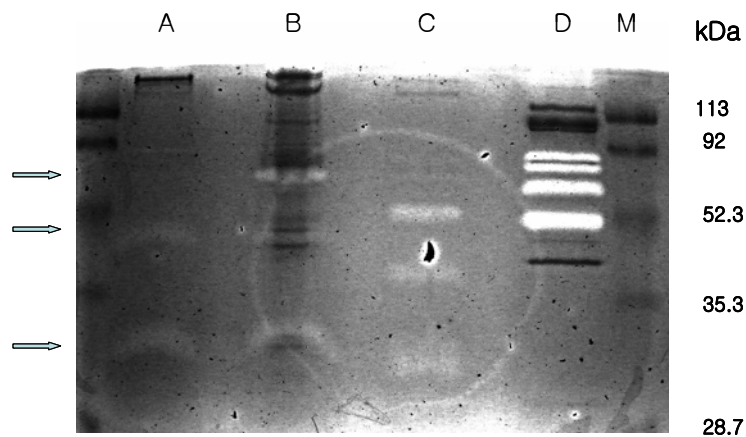


Fig. 1. Chitinase activity determination on SDS-PAGE of *Cellulosimicrobium cellulans* CH-10 and *Paenibacillus pabuli* CH-9 culture supernatant. A 12% acrylamide gel was supplemented with 0.25 mg/ml CM-chitin-RBV for the in-gel chitinase assay: Lane A, the culture supernatant (CH-10 strain); lane B, 70% ammonium sulfate precipitate of the supernatant (CH-10); lane C, protein eluted from colloidal chitin remained in the CH-10 culture (elution by 2M guanidine chloride); lane D, 10-fold concentrate of the *Paenibacillus pabuli* CH-9 supernatant. Lane M indicates molecular weight standards.

나. Chitinase 유전자 cloning

1) *Bacillus licheniformis* N1으로부터의 chitinase gene의 cloning

본 연구과제의 선행연구에서 *B. licheniformis* N1 균주의 chitinase의 유전자를 모균주인 N1 균주 또는 항균물질 활성이 높은 유용미생물에 효율적으로 chitinase 활성을 증강시켜 방제 기작이 향상된 다기능적 균주의 확보와 함께 이들을 이용한 새로운 미생물 농약 개발에 이용하고자 하였다. N1 균주의 chitinase gene 염기서열 분석 결과, 지금까지 그 특성이 알려져 있지 않은 *B. licheniformis* DSM13 chitinase와 96%의 protein sequence identity를 가지고 있었으며, 곤충의 세포벽 성분인 chitin에 효율적으로 작용하여 insecticidal activity를 가지는 것으로 알려진 *B. licheniformis* TP-1 chitinase와도 89%의 protein sequence identity를 나타내었다. 또한, DNA 염기서열에서도 98%의 아주 높은 sequence identity를 나타내었다(Fig .6). 이는 DNA 염기 서열 상에서 3개의 domain중에서 catalytic domain(44-435 amino acid)에서 부분적으로 하나의 염기가 deletion과 insertion에 의한 단백질 서열의 변화가 유도되었으며 chitin binding domain에서도 deletion이 생김으로서 전체 단백질 서열에서 DNA 염기서열과는 달리 낮은 homology를 보인 것으로 사료되었다(Fig. 2).

```

1  CATGGTTTGTCAAAAAAATTGGATGAAAAGGAGATGAAACATCGTGTGGTCAACAAAAGC
1  RBS M N I V L V N K S
61  AAAAAAGTTTTTCGTTTTTTC TTTCATTTTTGTTCATGTTGCTGAGCTTGTCAITTTGTAAT
10  K K F F V F S F I F V M L L S L S F V N
121 GGGGAAGTTGCAAAAGGCCGATTCCGGAAAAAAC TATAAAATCATCGGCTACTATCCATCA
30  G E V A K A D S G K N Y K I I G Y Y P S
181 TGGGGTGC TTACGGAAGGAATTTTCAAGTTTGGGATATGGACGTTTCAAAAAGTCAAGCCAC
50  W G A Y G R N F Q V W D M D V S K V S H
. . . . .
. . . . .
1681 GACGAATGAAAAGAGACGAACGCATACCGGGCGGAGAGCGGGTTGCATTTAATGAAAA
550  D E W K E T N A Y T G G E R V A F N G K
1741 GTGTATGAAGCGAAATGGTGGACGAAAAGCGGACCGGCCGGATCAATCCGGTGAATGGGGC
570  V Y E A K W W T K G D R P D Q S G E W G
1801 GATGGCCGCTGGTGGAGGCTGCGAATAA
590  V W R L V G G C E *

```

Fig. 2. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the chitinase from the N1. The start codon of ATG is boxed, the termination codon is asterisked, the chitin-binding domain is *highlighted* and SD sequences is underlined.

2) *Bacillus licheniformis* CH-1으로부터 chitinase gene의 cloning

B. licheniformis N1 이외에 chitin 분해능이 뛰어난 *B. licheniformis* CH-1 균주로부터도 chitinase gene을 확보하기 위해 *B. licheniformis* TP-1 chitinase gene과 N1 chitinase gene의 DNA 염기서열을 토대로 primer를 제작한 후, PCR을 실시하였다. 그 결과 약 1.8 Kb의 PCR product를 확보하였고, CH-1 chitinase gene의 DNA 염기서열 분석은 pGEM-T vector에 ligation하고, *E. coli* Top10F' 에 transformation 한 후 plasmid 를 추출하여 DNA sequencing 을 행하였다. 그 결과, CH-1 chitinase 의 염기서열은 N1 chitinase와 같이 TP-1과 높은 유사성을 보였으며, 단백질서열은 N1 chitinase와 96%의 매우 높은 identity 을 나타내었다. 또한, TP-1 chitinase와의 비교에서는 86%의 identity 을 보였다(Fig. 3, 4). 이와 같이 본 연구실에서 확보한 2종류의 *B. licheniformis*에서 cloning된 chitinase gene은 단백질 서열상 서로 높은 상동성을 보였으며, TP-1 strain는 catalytic domain과 chitin binding domain에서 homology가 낮은 것으로 나타나 효소의 활성 특성에 있어서 차이점이 있을 것으로 판단되었다(Fig. 4).

```

1  GTTT CATAGCTT GCCAAAAAATT GCTTGTAAAGGA GATGAAAAT CGTGTGAT CAACAAA
1                                     M K I V L I N K
61  AGCAAAAAGTTTTT CGTTTTTTT CTTT CATT TTTT GTTAT GAT GCT GAGCCT CCCATTT GTG
9   S K K F F V F S F I F V M M L S L P F V
121 AAT GGGGAAGTTGCAAAAAGCCGATT CCGGAAAAAACTATAAAAT CAT CGGCTACTAT CCA
29  N G E V A K A D S G K N Y K I I G Y Y P
181 T CAT GGGGT GCTTAT GGAAGGGATTTT CAA GTTTGGGATATGGACGTTT CGAAA GT CAGC
49  S W G A Y G R D F Q V W D M D V S K V S
-----
-----
1681 TAT GACGAAT GCAAAGAGACGA GCGCATA CACAGCGGAGAGCGGCTTGCAATTAACGGA
549 Y D E W K E T S A Y T G G E R V A F N G
1741 AAAGT GTATGAAGCGAAAT GGT GGACGAAAGGCGACCGGCCTGAT CAATCCGGTGAAT GG
569 K V Y E A K W W T K G D R P D Q S G E W
1801 GCGGTATGGCGGCT GATCGGAGGCTGCCAA TAA
589  G V W R L I G G C E -

```

Fig. 3. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the chitinase from the CH-1. The start codon of ATG is boxed, the termination codon is asterisked and the chitin-binding domain is *highlighted*.


```

U71214. : 1- MNIIVLVNKSKKFFVFSFI FVMLLSL FVNGEVAKADSGKNYKI IGYPPSWGAYGRNFQVWMDVSKVSHINYAFADICWEGRHG -84.
N-1 CHI : 1- MNIIVLVNKSKKFFVFSFI FVMLLSL FVNGEVAKADSGKNYKI IGYPPSWGAYGRNFQVWMDVSKVSHINYAFADICWEGRHG -84.
CH-1 CHI : 1- MNIIVLVNKSKKFFVFSFI FVMLLSL FVNGEVAKADSGKNYKI IGYPPSWGAYGRNFQVWMDVSKVSHINYAFADICWEGRHG -84.

U71214. : 85- NPDPGTGPNPQTWSCQDENGVIDAPNGT IVMGDPWIDAQKSNPGDVWDEP IRGNFKQLLKLKKSHPHLKTF ISVGGTWSNRFSD -168.
N-1 CHI : 85- NPDPGTGPNPQTWSCQDENGVIDAPNGT IVMGDPWIDAQKSNPGDVWDEP IRGNFKQLLKLKKSHPHLKTF ISVGGTWSNRFSD -168.
CH-1 CHI : 85- NPDPGTGPNPQTWSCQDENGVIDAPNGT IVMGDPWIDAQKSNPGDVWDEP IRGNFKQLLKLKKSHPHLKTF ISVGGTWSNRFSD -168.

U71214. : 169- VAADPVARCNFAASAVEFLRKYGFDGVDLDWEYEVSGGLPGNSTRPEDKRNITLLIQEVRKKLDAAEAKDGKEYLLITIASGASD -252.
N-1 CHI : 169- VAADPVARCNFAASAVEFLRKYGFDGVDLDWEYEVSGGLPGNSTRPEDKRNITLLIQEVRKKLDAAEAKDGKEYLLITIASGASD -252.
CH-1 CHI : 169- VAADPVARCNFAASAVEFLRKYGFDGVDLDWEYEVSGGLPGNSTRPEDKRNITLLIQEVRKKLDAAEAKDGKEYLLITIASGASD -252.

U71214. : 253- EYVSNTELDKTAQTVDWINIMTYDFNGGWQSI SAHNAELFYDPKAKEAGVPNAETYNIENTVKRYKEAGVKGDKVLGT PFYGR -336.
N-1 CHI : 253- EYVSNTELDKTAQTVDWINIMTYDFNGGWQSI SAHNAELFYDPKAKEAGVPNAETYNIENTVKRYKEAGVKGDKVLGT PFYGR -336.
CH-1 CHI : 253- EYVSNTELDKTAQTVDWINIMTYDFNGGWQSI SAHNAELFYDPKAKEAGVPNAETYNIENTVKRYKEAGVKGDKVLGT PFYGR -336.

U71214. : 337- AGAVVNPAAATENIRSADRRKRGKMEYSTQIDPKRIVYVNONGYKRYWNDQAKVPFLYNAENGNFI TYDDEQSFHGKTD FIKAN -420.
N-1 CHI : 337- GWSGCEPGGHGEYQKCGPAKCEIWEKGVFDESDLEKRYVNONGYKRYWNDQAKVPFLYNAENGNFI TYDDEQSFHGKTD FIKAN -420.
CH-1 CHI : 337- GWSGCEPGGHGEYQKCGPAKCEIWEKGVFDESDLEKRYVNONGYKRYWNDQAKVPFLYNAENGNFI TYDDEQSFHGKTD FIKAN -420.

U71214. : 421- GLSGAMFDFSGDSNRTLLNKLAAADLD FAPDGGNPEPPSSAPVNVRTGKTATSVSLAWDAESSVANIAYVVSFESRS ISVKE -504.
N-1 CHI : 421- GLSGAMFDFSGDSNRTLLNKLAAADLD FAPDGGNPEPPSSAPVNVRTGKTATSVSLAWDAESSVANIAYVVSFESRS ISVKE -504.
CH-1 CHI : 421- GLSGAMFDFSGDSNRTLLNKLAAADLD FAPDGGNPEPPSSAPVNVRTGKTATSVSLAWDAESSVANIAYVVSFESRS ISVKE -504.

U71214. : 505- TSAEIGLNRGTAYSFTVSAKDADGELHGTGPTVVTINSQACS YDEWKETNAYTGGERVAFNGKVYEAQWWTKGDRINPVG -586.
N-1 CHI : 505- TSAEIGLNRGTAYSFTVSAKDADGELHGTGPTVVTINSQACS YDEWKETNAYTGGERVAFNGKVYEAQWWTKGDRINPVG -586.
CH-1 CHI : 505- TSAEIGLNRGTAYSFTVSAKDADGELHGTGPTVVTINSQACS YDEWKETNAYTGGERVAFNGKVYEAQWWTKGDRINPVG -586.

U71214. : 587- AYGWSEANNRKNSG
N-1 CHI : 587- EWGVRRLVGGCE----
CH-1 CHI : 587- EWGVRRLVGGCE----

```

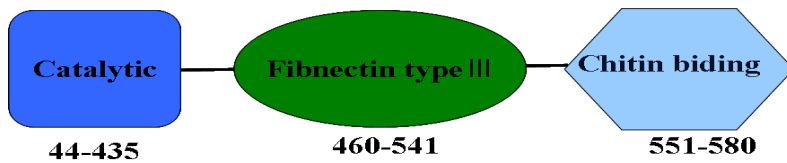


Fig. 4. Amino acid alignments for chitinases from *Bacillus licheniformis* N1, CH-1, TP-1 and structure of functional domains

3) *Cellulosimicrobium celluans* CH-10으로부터 chitinase gene의 cloning

C. celluans 에서 유래한 chitinase gene sequences를 기초로 primer를 design 하여 conserved 한 부위를 PCR로 증폭하여 염기서열 결과를 분석한 결과 342bp 단편을 얻었다(Table. 1). 이 단편을 기초로 inverse PCR 하여 *C. celluans* CH-10에서 chitinase full sequences라고 예측되는 부위 1.2kb 클로닝하였다(Fig. 5-7)

Table 1. Primers used in this study

Primer Name	sequences	비고
Chi F	5'-TCAATCTCATTTATGTAAGCGTTT-3'	
Chi R	5'-AAATCTCTCTTTATCGTTTTCTA-3'	
Hind chi F	5'-AAAGCTTTGGATGAAAAGGAG-3'	
Chi F2	5'-CGGAGTGATCGACGCGCAAATG-3'	
Chi F3	5'-GCGCCATAATGCGCTGTT-3'	
RTR1	5'-TGTATGCGTTCGTCTCTTTCCATTCG-3'	N1 chi
RTR2	5'-TATGGAGTTCTCCATCGGCGATCCTT-3'	
Bex F1	5'-GGACTAGTTCCTTGTGACTTCTGTGC- 3'	
Bex F2	5'-AAAGACTAGTAACATCGTGTTGG-3'	
Bex F3	5'-GGACTAGTATGAACATCGTGTTGG-3'	
Bex R1	5'-CCGGATCCCTATTTCGAGCCTCCGACCAG- 3'	
CH10-F2	5'-GCAGGTGAGCCACGAGAC-3'	partial chi
CH10-R2	5'-GGACCGGATGGTCTCGGCGAAGCC-3'	
iF-1	5'-GCGGGCCGCGGCCGTAGTAGGCGTCCTG-3'	
iR-1	5'-AGCAGGACCCGACCGTCGCGTGGCAGACCG-3'	
iF-2	5'-GTTACCTCGACCACGTGCACCAGCCCGTG-3'	
iR-2	5'-CCGGTACCGCGTCGATGACGTGCCACGACG-3'	inverse
iF-3	5'-GACCACGTGCACCAGCCCGTTCGCTCTCGTG-3'	PCR
iR-3	5'-GTCGGCGAGCACGGCTTCGCCGAGACCATC-3'	
RAGE-R	5'-GGTCCTCCATGGGGACAAGGATTCCCCAGG-3'	
RAGE-F2	5'-CTACGTCGCCGGGTACACGAGCGGCGCCGT-3'	
UF-1	5'-CGGCAACGCCTCGTTTCGACCAGT-3'	full length
UR-1	5'-GGAAGCTTGCAGGTGAGGTGGTCGCCCGT-3'	chi

```

1 TGCAGGTGAG CCACGAGACG CACGGGCTGG TGCACGTGGT CGAGGTGAAC
ACGTCCACTC GGTGCTCTGC GTGCCCGACC ACGTGCACCA GCTCCACTTG
iF-3 ← iF-2
51 ACCGCCAACT ACCCCACTA CTGCGACCCG GCCCAGCCGT TGGGGTGCC
TGGCGTTGA TGGGGTGAT GACGCTGGGG CGGGTCGGCA AGCCACCGG

101 CGCCGGGCGAG GACGCTACT ACGGCCGCGG CCCGCTCAG CTCTCCTGGA
GCGGCCGTC CTGCGGATGA TGCCGGCGCC GGGCGAGGTC GAGAGGAOCT
iF-1
151 ACGTCAACTA CCGGGCGGCC GGGGAGGCGC TGGGGATCGA CCTCCTACC
TGACGTTGAT GGCOCGCGG CCGCTCCGG ACCCCTAGCT GGAGGAGTGG

201 GACCCGTGGC TCGTGGAGCA GGACCGACC GTCGCGTGGC AGACCGCCT
CTGGGCACCG AGCAGCTCGT CCTGGGCTGG CAGCGCACCG TCTGGCGGA
iR-1
251 CTGGTACTGG AACACGCAGC CCGGTACCGG GTCGATGACG TGCCAGGAGG
GACCATGACC TTGTGGTGG GGCATGGCG CAGCTACTGC ACGGTGCTGC
iR-2

301 CGATCGTCGG CGAGCACGGC TTCGCGAGA CCATCCGGTC C
iR-3 → GCTAGCAGCC GCTCGTGCCG AAGCGGCTCT GGTAGGCAG G

```

Fig. 5. Pairwise alignment of partial chitinase gene from *C. cellulans* CH-10 with chitinase gene from *C. uda*. iF-1,2,3 primer is underlined and iR-1,2,3 primer is uplined

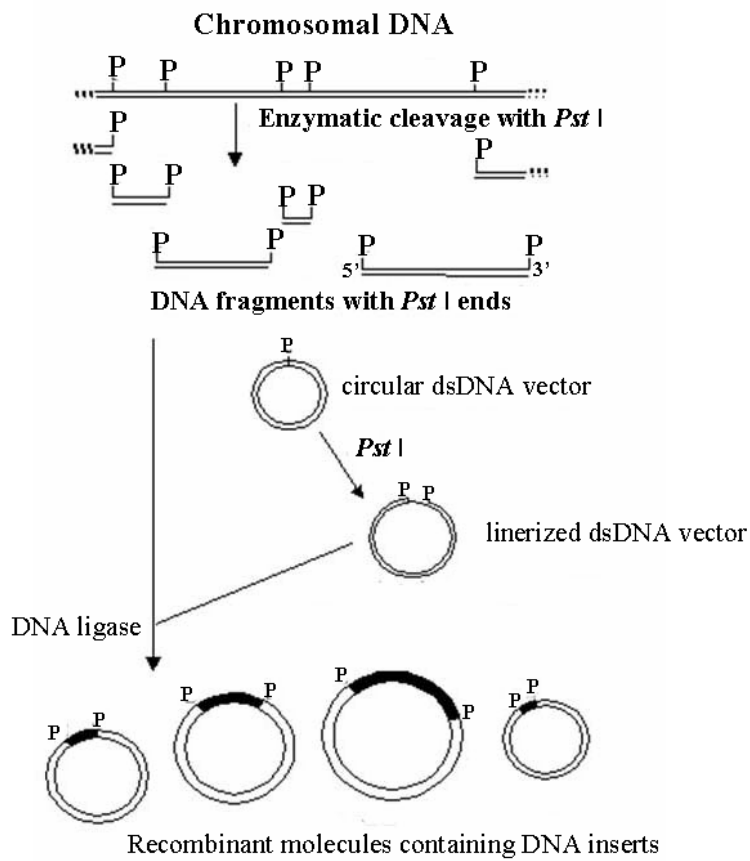


Fig. 6. Schematic diagram of genomic DNA library construction of *C. cellulans* CH-10

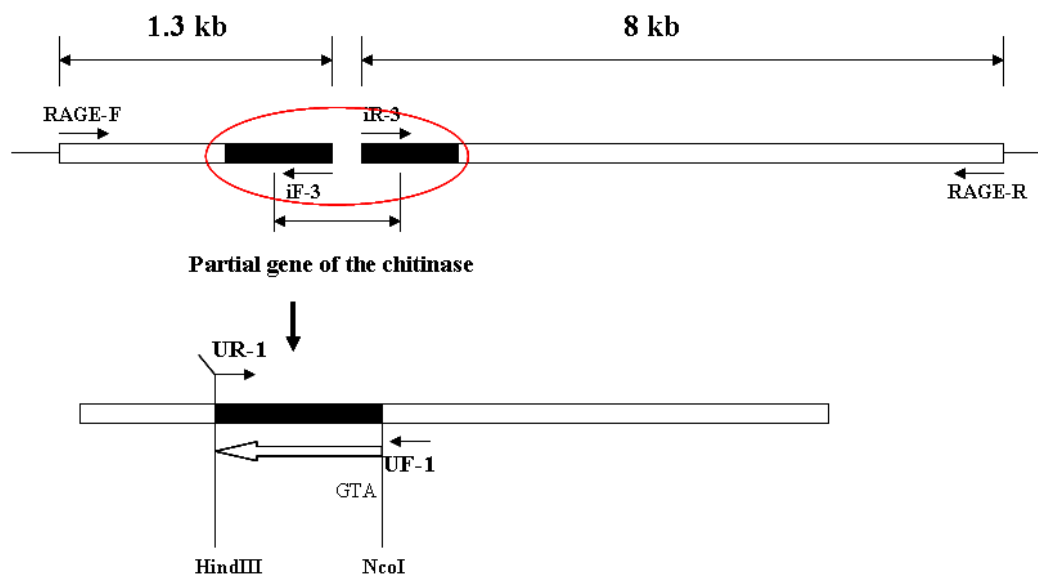


Fig. 7. The strategy to obtain full-length chitinase gene by inverse PCR. The UF-1 and UR-1 primers were used to amplify the full-length chitinase gene from *C. cellulans* CH-10 chromosome.

제 3 절 Chitinase 유전자의 cloning, expression 및 활성 검정

1. 연구수행방법

가. pET-42a vector를 이용한 Cloning

앞서 제 2 절의 N1과 CH-10 균주로부터 분리된 chitinase 유전자를 pET-42a vector에 cloning 하였는데, 이를 위해 start codon 앞 -25 ~ -15 부위 사이에 PCR 증폭으로 point mutation을 일으켜 제한효소 부위를 형성시켰다. 이 때 PCR 증폭을 위해 *Taq* DNA polymerase 는 *Ex taq* (Takara, Korea)를 구입하여 사용하였고, PCR 증폭반응은 Mygenie 32 thermal block (Bioneer, Korea)에서 94 °C pre-denature 5분, 94°C denaturation 1분, 52 °C annealing 1분, 72°C elongation 1분 30초로 하여 이를 30회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 5분간 증폭하였다. 이 조건으로 증폭된 PCR 산물은 QIA quick PCR purification kit (Qiagen Inc., Germany)를 이용하여 정제한 후, pGEM-T vector에 ligation하고 *E.coli* top 10'에 transformation 한 후 LB X-gal 배지에서 white colony를 선별하였다. 선별된 형질전환체들은 5 ml의 LB broth (ampicilline 50ug/ml)에 접종하여 밤새 배양한 후 재조합 plasmid를 확보하였다. 재조합 플라스미드의 제한효소 절단 양상에 기초하여 올바른 재조합 clone을 선별하여 염기서열 분석을 Genotech corp. (Daejeon, Korea)에 의뢰하였다. 이 후, 확인된 insert를 pET-42a vector에 ligation 한 후, *E. coli* top 10'에 transformation하고 LB X-gal 배지에서 white colony를 선별하였다. 선별된 형질전환체는 5 ml의 LB broth(kanamycin 50ug/ml)에 접종하여 밤새 배양 후 plasmid 추출하였다. 재조합 플라스미드의 제한효소 절단 양상에 기초하여 올바른 재조합 clone을 선별하여 재조합 DNA 를 pET-42-chi 로 명명하고, *E. coli* BL21(DE3) 에 transformation 하였다.

나. Expression of chitinase gene in pET system

앞서 형질전환된 *E. coli* BL21 (DE3)을 5 ml LB broth(kanamycin 50ug/ul) 에 배양한 뒤 여기서 3 ml의 배양액을 500-ml flask의 100 ml LB broth(kanamycin 50ug/ul)에 접종하고, 세균밀도(O.D₆₀₀)가 0.4-0.5 될 때까지 배양(37°C, 200 rpm)하였다. 그 후 isopropyl thiogalactoside (IPTG)를 1 mM 되도록 첨가하여 pET-42-chi에 들어 있는 N1 유래의 chitinase gene이 over-expression 되도록 유도하였다. 이를 4시간 동안 30 °C에서 배양시킨 다음 4 °C 에서 10,000g 로 10분간 원심분리하고, 집균한 뒤 배양상층과 집균을 따로 분리하여 4 °C에 보관하였다. 집균시료는 protein sample buffer와 혼합하여 5분간 끓이고, 총단백질은 12% SDS-PAGE에

전기영동하고 0.1% Coomassie brilliant blue R-250에 염색하였다

다. Fluorogenic 4-methylumbelliferone 을 이용한 chitinase assay

chitinase 활성검정을 위하여 기질로서, 4-Methylumbelliferyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide, 4-methylumbelliferyl- β -D-*N,N*-diacetylchitobioside, 4-methylumbelliferyl- β -D-*N,N,N'*-triacetylchitotrioside을 각각 DMSO에 녹여서 최종농도를 1 mM로 준비하였다. Chitinase 활성은 96 well micro plate에 200 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)을 150 μ l로 채운 뒤, 20 μ l의 기질을 넣고 혼합한 뒤 37 °C 에서 15분간 전반응 시키고 chitinase 시료를 30 μ l 넣어 37 °C 에서 15분간 효소반응을 하였다. 이 후, 3 M sodium carbonate를 50 μ l 첨가하여 효소 반응을 중지시키고, 390 nm에서 485 nm사이의 파장에서 4-methylumbelliferone의 증가로 생성된 형광물질을 측정하였다.

2. 연구결과

가. N1 및 CH-10 chitinase의 pET system에서의 발현

1) *B. licheniformis* N1 chitinase의 pET system에서의 발현

B. licheniformis N1 균주의 chitinase의 단백질 특성 및 항원물질 활성 검정을 위해 pET42a expression vector system을 도입하여 chitinase의 효소단백질을 발현시켰다(Fig. 8). 그 결과, 98kDa 정도 되는 band에서 over-expression되는 것을 관찰하였는데, 이는 약 36 kDa되는 GST fusion protein이 N1 chitinase와 결합하여 발현되었다.(Fig. 9).

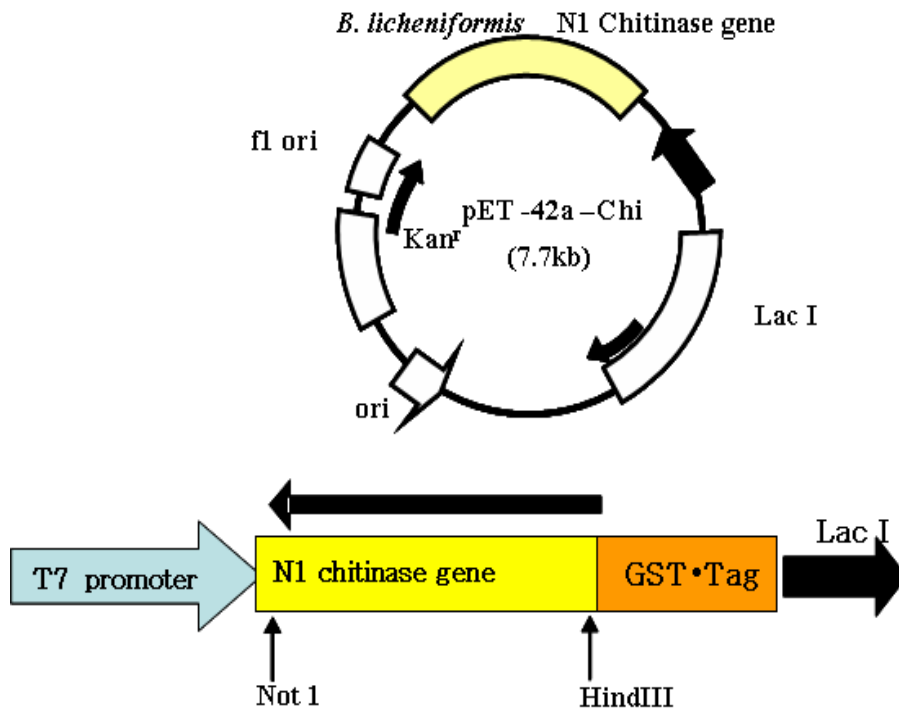


Fig. 8. Schematic diagram of the constructed recombinant plasmids, pET-42a-Chi, for overexpression of chitinase from *B. licheniformis* N1

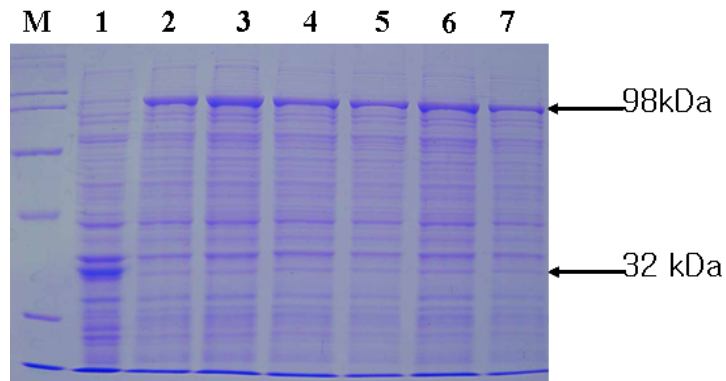


Fig. 9. SDS-PAGE analysis of the over-expressed chitinase gene from *B. licheniformis* N1 in *E. coli* cells.

Lane M, Molecular weight marker; lane 1, 4 hrs induction of BL21(DE3)/ pET-42a lysate; lane 2, 1 hr induction of BL21(DE3)/ pET-42-Chi lysate; lane 3, 1 hr 30 min induction of BL21(DE3)/ pET-42-Chi lysate; lane 4, 2 hr induction of BL21(DE3)/ pET-42-Chi lysate; lane 5, 2 hrs 30 min induction of BL21(DE3)/ pET-42-Chi lysate; lane 6, 3 hr induction of BL21(DE3)/ pET-42-Chi lysate; lane 7, 4 hr induction of BL21(DE3)/ pET-42-Chi lysate.

2) *C. cellulans* CH-10 유래의 chitinase 유전자의 pET-42a(+) system에서의 발현

UF-1/UR-1으로 PCR하여 얻은 product를 pGEM-T easy vector에 cloning하고 이의 recombinant DNA를 pUFR라고 명명하였다. 이 재조합 DNA를 *Nco* I 과 *Hind* III로 처리된 pET-42a(+) vector에 cloning하였다. 발현 vector에 cloning된 CH-10 유래의 chitinase 유전자의 과발현은 다양한 induction 조건별로 12% SDS-PAGE에서 조사되었는데, 그 결과 37°C의 조건에서 57.5kDa 수준의 과발현되는 밴드를 관찰 할 수 있었다(Fig. 10).

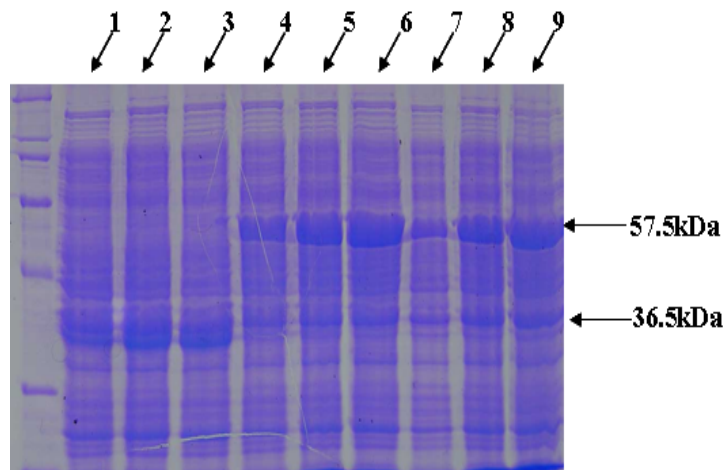


Fig. 10. SDS-PAGE analysis of the expressed CH-10 chitinase in *E. coli*.

Lane M, broad range marker; lane 1,2,3, represents 1 hr, 2 hr, 3 hr induction of BL21(DE3)/ pET-42a(control), respectively.

lane 4,5,6 represents 1 hr, 2 hr, 3 hr induction of pET-42-4-1, respectively. lane 7,8,9 represents 1 hr, 2 hr, 3 hr induction of pET-42-4-4, respectively.

나. Fluorogenic N-acetylglucosamine을 이용한 chitinase 기질 특이성 조사

1) N1 chitinase의 기질 특이성 조사

과발현된 N1 chitinase-GST fusion 단백질을 포함하는 *E. coli*의 lysate와 형광기질을 이용한 chitinase 활성을 검정하였다. 그 결과, 4MDG(4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide)기질에서는 chitinase 활성이 나타나지 않았는데, 이는 exo-chitinase (β -1,4-hexosaminidase) 활성 결여인 것으로 판단되었다. 반면 나머지 4MDD (4-methylumbelliferyl- β -D-N,N'-diacetylchitobioside)와 4MDT(4-methylumbelliferyl- β -D-N,N',N''-triacetylchitotrioside)에서는 활성이 관찰되었는데, 이는 N1 chitinase가 이들 기질에 존재하는 두 개 또는 그 이상의 과당을 Endo-splitting하여 활성을 나타내는 것으로 판단되었다. 가장 높은 활성은 4MDD에서 나타났는데, 이는 N1 유래의 chitinase 에서 가장 주요한 기능인 chitin에서 diacetylchitobiose을 인식하고 분해하는 것이기 때문이라고 사료된다. 한편 대조구로 chitinase를 발현하지 않는 *E. coli*의 lysate의 형광기질에 대한 활성 결과, 형광 활성이 전혀 없었다. 따라서, 앞서의 3가지의 기질을 이용하여 기질 특이성을 조사한 결과, N1 유래 chitinase는 endo-type의 chitinase 인 것으로 조사되었다(Fig. 11).

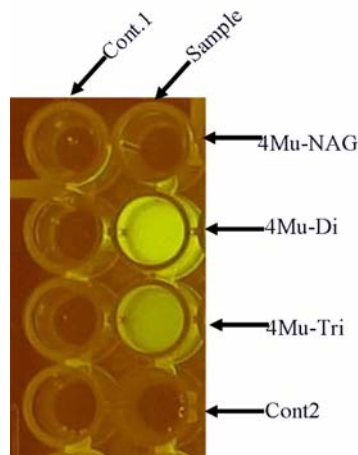


Fig. 11. Chitinase activity and substrate specificity of *E. coli* cells carrying the chitinase gene from *B. licheniformis* N1 using fluorogenic β -methylumbelliferine linked N-acetylglucosamine and its oligomers.

Cont 1 is *E. coli* BL21(DE3)/pET-42a lysate, Sample is *E. coli*

BL21(DE3)/pET-42-Chi lysate and Cont 2 is reaction with H₂O.

2) CH-10 chitinase의 기질 특이성 조사

CH-10 chitinase의 기질 특이성은 앞서의 N1 chitinase의 기질 특이성 조사와 동일한 방법으로 실시한 결과, 효소활성이 전혀 관찰되지 않았기에 시료를 soluble과 insoluble type으로 분리한 다음, soluble type인 경우는 Fluorogenic N-acetylglucosamine 기질과 반응시켜 효소활성을 검정하였으나 전혀 반응이 없었다.

CH-10 chitinase sequence의 결과가 family 19에 속하여 이들이 항균물질활성을 지니는 chitinase와 관련이 있다는 보고에 따라 *Streptomyces* sp. 유래의 chitinase amino acid sequences의 clustal과 비교해 보았다. 이때, start codon에서 약 100 개의 amino acid sequences가 family 19에 관련된 chitinase sequence에 대하여 아미노산 서열이 다른 것으로 확인되어 발현이 되지 않았던 원인을 예측할 수 있었다(Fig. 12).

```

BAC57931 : -----MIRRMG : 7
AAT27430 : -----MYRRVMS : 7
BAC59074 : -----MIRRMG : 7
AAQ24634 : -----MFRKRLS : 7
BAA23739 : -----MYRRVMS : 7
BAC45252 : -----MIRRLLS : 7
BAA88834 : -----MIAITIQ : 8
BAA88833 : -----MVG : 3
CAD55444 : ----- : 1
BAA75646 : ----- : 1
BAA75646 : -----VSRRIA : 8
CAB42954 : -----MSRRRIA : 8
CAB37321 : -----MFRRTA : 8
AAD32750 : -----MTRRRPTG : 8
BAA92252 : -----MKRRLKATVC : 12
CH-10 : -----SSRRFPH : 9
BAD92016 : MKVFLLIIVVIGTVLPLVSLTAFGALATPTLVNSVASGMCNLSWNGISGATGYDIYRNGNWRWVSTTSTADTGLSNGTAYTY : 83

BAC57931 : LLAALGAVVAMVAVLEA-----TTAAADCAAFWNS-----SVVTGGGTASNGHGHNTAKWM : 60
AAT27430 : LLAALGAVVAMVAVLEASASASAF-----TTAAADCAAFWNS-----SVVTGGGTASNGHGHNTAKWM : 67
BAC59074 : LLAALGAVVAVGLVLEA-----TTAAADCAAFWNS-----SVVTGGGTASNGHGHNTAKWM : 60
AAQ24634 : LLAALGAVVAAVLEA-----TAQAT-CFSAWNS-----SVVTGGGTASNGHGHNTAKWM : 60
BAA23739 : LLAALGAVVAAVLEA-----TAQAT-CATWNS-----SVVTGGGTASNGHGHNTAKWM : 60
BAC45252 : QAAAGALAAVAVLEA-----AAQATACATWNS-----SVVTGGGTASNGHGHNTAKWM : 61
BAA88834 : RNSARRLG-----LRATLG-----VATAGLVAAMTAA-----AQATG-----PVAGS : 49
BAA88833 : HSPHRST-----LVKSLA-----ATVLAALMIAAP-----AQATGSGITGLDGKCLDVAGA : 52
CAD55444 : --VQHR-----KALLA-----ATGAAALCTITM-----SAVAEK : 31
BAA75646 : VVTAALAGAVPELLMEANE-----ASASCSVHAWSD-----ANNTGDIVRMTDQKAVIAEH : 63
CAB42954 : VVTAALAGAVPELLMEANE-----ASASCSVHAWSD-----ANNTGDIVRMTDQKAVIAEH : 63
CAB37321 : LLAALVISTAAPVLEA-----AAAACSSVPSVAV-----RSVAGDIVRMTDQKAVIAEH : 63
AAD32750 : PIHRRRA-----ETLSP-----TGRMRRNRIALLP-----AALALVGSVIAF--ATTASA : 55
BAA92252 : IASAGVCLIAQAAVGAPE-----LKAACNFKVNSG-----VYKQGDVLEQANQVYLV : 72
CH-10 : AEHDMRVVVEPIATMCS-----RAGVGVERRWGA-----PVGEELRRVPEFRVSAAT : 63
BAD92016 : TVAAQNAVSPIDTBEQASRTCTPSSGGGGSLAAPTINVASSSATCSLWNAVSGATGYDIYRNGNWRWVSTTSTADTGLSNGTAYTY : 166

BAC57931 : -----DWWADQSGCGGGG-EDDPNPS--CFVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 133
AAT27430 : -----DWWADQAGCGGGTDDDPNPS--CFVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 141
BAC59074 : -----DWWADQACGGG-EDDPDPS-SFVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 136
AAQ24634 : -----DWTINDGACGTGGG-EDDPGSSN--CFVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 134
BAA23739 : -----DWWADQACGG-GEFGSSN--CFVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 134
BAC45252 : -----DWWADQCGDGGGQPG-PN--DFVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 134
BAA88834 : -----ASAAGSDTIQAN-----CFVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 107
BAA88833 : RNSANGTRVQITWCTGGSNQKWNATGGSTFASG-----FVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 82
CAD55444 : -----SDRTAAAE-----FVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 82
BAA75646 : -----SDRTAAAE-----FVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 82
BAA75646 : -----STWYNDPYACDGGGQTPVGN-----FVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 134
CAB42954 : -----STWYNDPYACDGGGQTPVGN-----FVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 134
CAB37321 : -----STWYNDPYACDGGGQTPVGT-----FVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 134
AAD32750 : -----HGGT-SQAA-----FVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 109
BAA92252 : -----TDPITSTWYAPTCDGGSPGNGT--DFVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 149
CH-10 : -----PMADPTPSLDPTSLAFT--DFVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 132
BAD92016 : -----STPVTSPQSAKNCPTPSSSNPNPS--CFVSEAFQCFMFEFRTYFVYGLIAA-SAFPA-SNGSDIV : 252

BAC57931 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 216
AAT27430 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 224
BAC59074 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 218
AAQ24634 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 217
BAA23739 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCITQSGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 215
BAC45252 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 217
BAA88834 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 215
BAA88833 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCWAGSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 298
CAD55444 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 165
BAA75646 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 165
BAA75646 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCWNPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 217
CAB42954 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 217
CAB37321 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 217
AAD32750 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 192
BAA92252 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 227
CH-10 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 218
BAD92016 : RREAAFLNVETGGGLVVEENSNMVCSSOPVGGCGAAYVGRGPIQLWNNNYAAGHALGILLGFDVVD : 334

BAC57931 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 295
AAT27430 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 295
BAC59074 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 298
AAQ24634 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 296
BAA23739 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 294
BAC45252 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 296
BAA88834 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 269
BAA88833 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 277
CAD55444 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 244
BAA75646 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 244
BAA75646 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 296
CAB42954 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 296
CAB37321 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 296
AAD32750 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 271
BAA92252 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 207
CH-10 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 297
BAD92016 : RASVWTDLWYVFCGADMTAAMVGGGFEETRIRINGLECGKFAWVRVDRPAPVAIVGIVGYS : 413

```

Fig. 12. Alignment of chitinase amino acid sequences of *C. cellulans* and other *Streptomyces* sp. BAC5793:chitinase IS [*Streptomyces* sp. AJ9463], AAT2743:chitinase IS [*Streptomyces* sp. MG3], BAC9907:chitinase [*Streptomyces* sp. J-13-3], AAQ2463:chitinase [*Streptomyces* griseobrunneus], BAA23739: chitinase C [*Streptomyces griseus*], BAC4525:family19 chitinase [*Nocardiaopsis prasina*], BAA88834:chi25 [*Streptomyces thermoviolaceus*], BAA88833:chi35 [*Streptomyces thermoviolaceus*], CAD5544:secreted chitinase [*Streptomyces coelicolor* A3(2)], BAA7564:ChiG [*Streptomyces coelicolor*], BAA7564:ChiF [*Streptomyces coelicolor*], CAB4295:chitinase [*Streptomyces coelicolor* A3(2)], CAB3732:30 kDa chitinase [*Streptomyces olivaceoviridis*], AAD3275:MmcY [*Streptomyces lavendulae*], BAA9225:chitinase B [*Burkholderia gladioli*] BAD9201:chitinase I [*Bacillus circulans*]

제 4 절 *Bacillus* sp.에서의 발현용 Vector system 구축

1. 연구수행방법

가. pWH1520 vector를 이용한 cloning

Bacillus sp.에서 발현 유도를 위해서 *Bacillus-E.coli* shuttle vector인 pWH1520(Mobitec, USA)을 구입하여 사용하였다. 이때, N1 chitinase gene을 pWH1520 vector에 cloning 하기 위해 start codon 앞 -25 ~ -15 부위 사이에 PCR 증폭으로 point mutation 을 일으켜서 제한 효소 *Spe* I 과 *Bam* HI 부위를 형성시키고(Table 1), PCR 증폭은 *Taq* DNA polymerase로 *Ex taq* (Takara, Korea)을 사용하였다. PCR 증폭반응은 Mygenie 32 thermal block (Bioneer, Korea)을 이용하여 94 °C pre-denature 5분, 94 °C denaturation 1분, 52 °C annealing 1분, 72 °C elongation 1분 30초로 30회 반복하고 마지막 단계에서 72 °C 5분간 증폭하였다

이 조건으로 증폭된 산물을 QIA quick PCR purification kit (Qiagen Inc., Germany)를 이용하여 정제한 후, pGEM-T vector 에 ligation하고 *E.coli* DH 5 α 에 transformation 한 후 LB X-gal배지에서 white colony를 선별하였다. 선별 형질전환체들은 5 ml의 LB broth (ampicilline 50ug/ml)에 접종하여 밤새 배양하고 재조합 plasmid를 확보하였다. 재조합 플라스미드의 제한효소 절단 양상에 기초하여 올바른 재조합 clone을 선별한 후 시료의 염기서열 분석은 Genotech corp. (Daejeon, Korea)에 의뢰하였다. 이 후 확인된 insert를 준비한 pWH1520 vector에 ligation한 후, 또 다시 *E. coli* top 5 α 에 transformation하고 LB (ampicilline 50ug/ml)배지에서 colony를 선별하였다. 선별 형질전환체는 앞서와 동일한 방법으로 배양 후 plasmid를 추출하고 올바른 재조합 plasmid 를 선별하였다.

나. Transformation to *Bacillus* sp.

Bacillus 형질전환은 Gang 등(1999)에 의한 방법에 의해 *Bacillus* electro-competent cell을 먼저 제작하였는데, 이때 *Bacillus* cell 배양액을 0.5 M sorbitol 이 함유된 LB 배지에 1/20 volume으로 접종하고 37°C에서 세균농도가 600 nm에서 OD 0.85-0.95가 될 때까지 배양되면 이를 얼음에서 10분간 냉각한 뒤, 원심분리 (4°C, 5000 X g, 5분)하여 cell을 획득하였다. 획득된 cell은 EP buffer (LB containing 0.5 M sorbitol, 0.5 M mannitol and 10% glycerol)로 4회 washing 한 후 다시 EP buffer로 현탁하여 세균농도가 1×10^{10} cfu/ml(1/40로 희석)되도록 competent cell을 제작한 뒤, -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

한편, Electroporation을 위해, 60 μ l의 competent cell과 1 μ l(50 ng/ μ l)의 recombinant

plasmid DNA를 잘 혼합하고, 1.6kV 의 전압을 가하여 전기 충격을 준 뒤, 1 ml의 recovery medium (LB containing 0.5 M sorbitol and 0.38 M mannitol)을 첨가하고 3시간동안 배양하였다. 형질전환체(transformants)는 selection medium (containing 20 ppm tetracycline)에서 선발되었다.

다. RT-PCR

Bacillus amyloliquefaciens A-2, A-2 transformants, *B. licheniformis* N1, *B. licheniformis* CH-1, *B. subtilis* 168 및 *B. subtilis* 168 transformants에서 total RNA를 분리하고 1.0 μ g RNA와 유전자 특이 primer(CHI-F3, RTR1)를 사용하여 역전사를 실시하였다. 역전사는 역전사효소 M-MLV Reverse-transcriptase 를 이용하여 42 °C에서 1시간 반응하였다. 역전사 산물을 template 로 PCR 을 수행하였는데, PCR 조건은 Mygenie 32 thermal block (Bioneer, Korea)을 이용하여 94 °C pre-denature 3분, 94 °Cdenaturation 30초, 53 °C annealing 30초, 72 °C elongation 30초로 30회 반복하여 RT-PCR을 수행하였다. 결과는 1.5% agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다.

라. *B. subtilis* 168, *B. amyloliquefaciens* A-2에 chitinase 유전자 발현

Bacillus sp.에서 N1 chitinase의 발현은 Fluorogenic 4-methylumbelliferone을 기질로 이용한 chitinase assay 방법을 사용하였다. *B. subtilis* 168, *B. amyloliquefaciens* A-2를 대조구로 하고 chitinase 처리구는 *B. subtilis* 168, *B. amyloliquefaciens* A-2에 pBex WH1-4가 형질 전환된 변이체에서 발현을 유도하였다. 반응 후 30분과 24시간 후의 UV illuminator에서 효소 활성을 확인하였다.

2. 연구결과

가. *Bacillus* sp.에서 발현용 vector cloning

N1 유래의 chitinase gene을 *Bacillus* 에서 발현하기위해 N1 chitinase의 promoter 부위까지 포함한 유전자를 pWH1520 벡터에 cloning하였다(Fig. 12). 이때, N1의 chitinase는 CH-1 chitinase와 holomolgy가 유사하여 본 발현용 vector system 구축에서 N1 chitinase 만을 사용하였다.

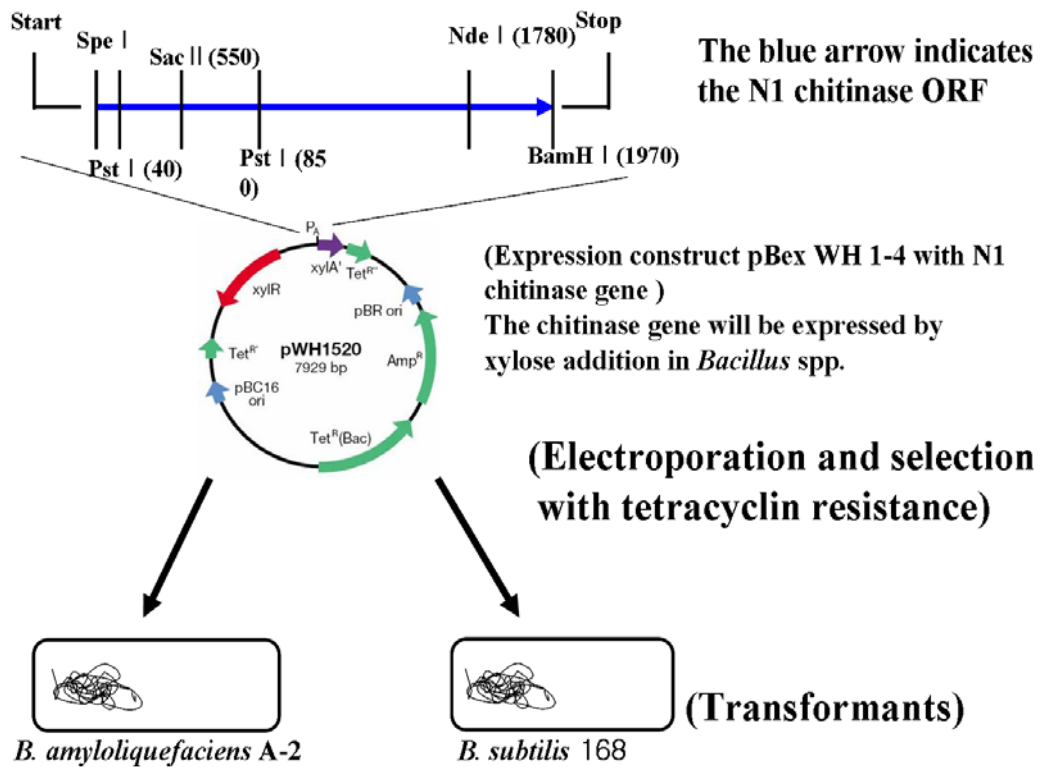


Fig. 12. Schematic diagram of the constructed recombinant plasmids, pBEX WH1-4, expression of N1 chitinase gene in *B. amyloliquefaciens* A-2 and *B. subtilis* 168

나. *Bacillus* sp.의 형질전환

표준균주인 *B. subtilis* 168 는 *Bacillus* strain 에서 N1 chitinase 에서 발현 양상을 관찰할 수 있는 발현 host 로써 *B. amyloliquefaciens* A-2 에 형질 전환에 앞서 실시하였다. *B. subtilis* 에 pBex WH 1-4 와 pWH1520 을 형질전환 하여서 Tetracycline 배지에서 selection 하였다. 변이체 확인은 PCR 기법을 이용해서 변이체를 확인하였다. *B. amyloliquefaciens* A-2 에는 pBex WH 1-4 만 형질전환 한 후 똑같이 PCR 기법으로 확인하였다(Fig 13). lane 1에서 약 1.3kb, lane 3 에선 0.8kb lane 6에서는 450 bp 가 나왔다. lane 7 은 control 로 *E. coli* DH5a /pBex WH 1-4 을 template 로 증폭하여 확인한 결과 약 830bp에서 band 가 형성이 되었다. 이로써 *B. amyloliquefaciens* A-2 에 pBex WH 1-4의 형질전환이 최종으로 이루어 졌다.

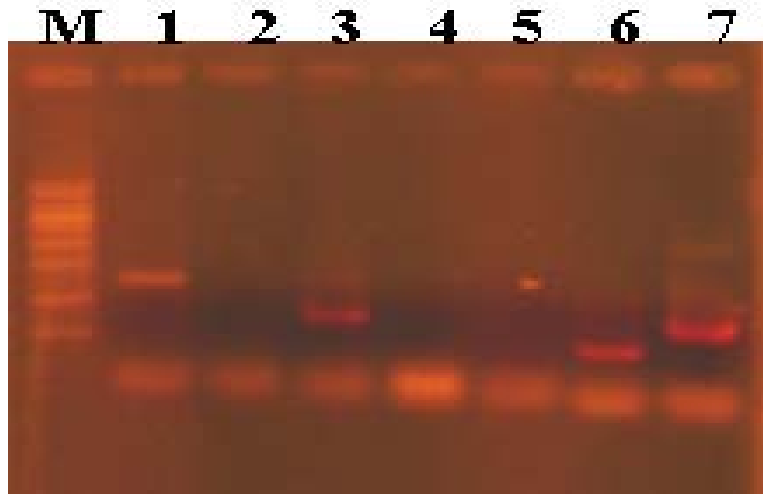


Fig. 13. PCR detection of N1 chitinase gene from recombinant *B. amyloliquefaciens* A-2 Lane 1~6 using A-2 wild type and the recombinant as template, lane 7, using *E. coli* DH5 α /pBex WH 1-4 as a control; lane 1, PCR result with the primer Chi-F2 and RTR2; lane 2, PCR result with the primer Chi-F2 and RTR1; lane 3, PCR result with the primer Chi-F3 and RTR1; lane 4, PCR result with the primer Chi-F3 and Chi-R2; lane 5, PCR result with the primer RTF1 and Chi-R1; lane 6, PCR result with the primer RTF1 and Chi-R2; lane 7, PCR result with the primer RTF1 and Chi-R1. Note the 834 bp PCR product amplified from control PCR (lane 7) and the same band from lane 3.

다. RT-PCR 을 이용한 발현확인

B. subtilis 168과 *B. amyloliquefaciens* A-2에서 total RNA 를 분리하여 이를 template 와 specific primer(Table 1)를 혼합하여 RT-PCR를 실시하였다. *B. subtilis* 168과 *B. amyloliquefaciens* A-2에서는 band가 생성되지 않았고, pBex WH 1-4 를 포함하는 형질전환체 에서만 유전자가 발현되어 RT-PCR 산물이 생성되었다. 또한 A-2에서 xylose 를 첨가하지 않은 시료에서도 band가 생성되는 것으로 보아 N1 chitinase는 xylose inducer와 독립적으로 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 14).

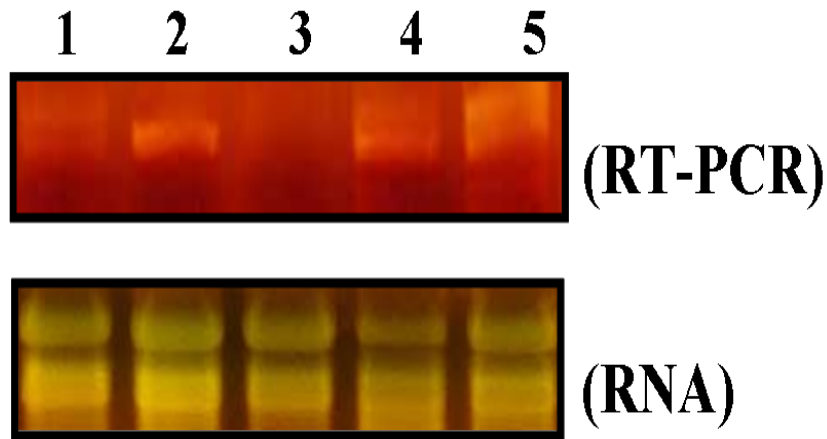


Fig. 14. Expression analysis of N1 chitinase by RT-PCR in *Bacillus subtilis* 168/pBex WH 1-4, *B. subtilis* 168, *B. amyloliquefaciens* A-2, *B. amyloliquefaciens* A-2/pBex WH 1-4 1, *B. subtilis* 168; 2, *B. subtilis* 168/pBex WH 1-4; 3, *B. amyloliquefaciens* A-2; 4, *B. amyloliquefaciens* A-2/pBex WH 1-4 (supplement of xylose); 5, *B. amyloliquefaciens* A-2/pBex WH 1-4(no supplement of xylose)

라. *Bacillus* strain (168, A-2) 에서의 N1 chitinase assay

Fluorogenic 4-methylumbelliferone을 기질로 이용하여 발현 실험을 해 본 결과, RT-PCR 결과와 마찬가지로 inducer 인 xylose 를 첨가하지 않아도 발현이 되지만 상당히 느리게 발현이 일어나며, 그 양도 매우 작아서 24시간이 지나야지 *B. amyloliquefaciens* A-2 transformant 에서 N1 chitinase 가 검출되었다. 또한 *B. subtilis* 168 transformant에서 xylose 기질 첨가 시 30분 후 4MDD(4-methylumbelliferyl- β -D-*N,N*-diacetylchitobioside)와 4MDT(4-methylumbelliferyl- β -D-*N,N',N''*- triacetylchitotrioside)에서 동시에 반응이 일어났지만 xylose 기질을 첨가 하지 않았을 때에는 4MDT(4-methylumbelliferyl- β -D *N,N',N''*-triacetylchitotrioside)에서만 반응이 일어났다. 이는 N1 chitinase promoter가 작용하지만 pWH1520의 xylose promoter 보다 상대적으로 적게 발현이 유도되는 것으로 짐작이 된다. 그리하여 24 시간이 지난 후에야 그 활성이 조금 씩 나타나는 것이다. 그러나 *B. amyloliquefaciens* A-2 transformant 에서는 기질 첨가와 관계 없이 24 시간이 지난 후에야 4-methylumbelliferyl- β -D *N,N',N''*-triacetylchitotrioside 에서만 반응이 보였다. 또한 host 의 종류에 따라 chitinase 발현 양상이 약간 틀려지는 것이 관찰되었다.

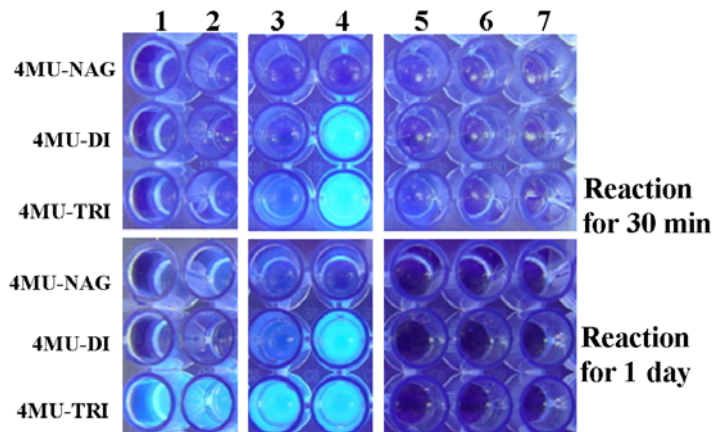


Fig. 15. Chitinase activity using Fluorogenic 4-methylumbelliferine substrates

1, 2 : Supernatant of *B. amyloliquefaciens* A-2 transformant

3, 4 : Supernatant of *B. subtilis* 168 transformant

5, *B. amyloliquefaciens* A-2;

6, *B. subtilis* 168;

7, D.W

2, 4, 6 : 0.5% xylose induction

제 5절 형질전환 균주(*Bacillus subtilis* 168)의 길항능 조사

1. 연구수행방법

가. 형질전환체에 의한 잎곰팡이병 포자 발아 억제능 조사

Chitinase에 의한 항균물질활성(antifungal activity)을 조사하기 위해 chitinase 처리구는 *Bacillus subtilis* 168균주에 pBexWH1-4가 형질전환된 세균의 배양상등액을 이용하였고, 대조구로서 168균주에 pWH1520만 삽입된 형질전환체의 배양상등액을 이용하였다. 이때 잎곰팡이 병원균인 *Fulvia fulva*의 conidia suspension (1×10^5 conidia/ml)을 제조하고 이에, 세균배양액의 상등액 200 μ l와 병원균포자부유액 10 μ l(1×10^3 conidia)를 혼합하여, 37°C에서 배양하였는데 각 처리구당 10개씩 3 반복으로 시행하였다. 그 후 시간대 별로 sampling하여 포자 발아율을 관찰하였다. 대조구는 세균을 배양하지 않은 배지에 tetracycline (20 ul/ml)을 첨가한 것을 동량 사용하였다.

1. 연구결과

B. subtilis 168/pBex WH-14 처리구는 chitinase를 분비하지 않은 대조구에 비해 6시간 이후부터 포자 발아율이 확연히 차이 나기 시작하였으며, 12 시간 지난 후 부터는 대조구와 2배 가까운 발아율의 차이를 나타내었다. 이는 *Bacillus subtilis* 168/pBex WH-14 형질전환체에서 분비되는 N1 유래의 chitinase 가 포자 발아율에 영향을 주는 것으로 사료되며, 이는 family 18 유래의 chitinase는 주로 항균활성 효과가 없고, family 19 유래에서만 항균활성이 있다라는 보고에 따라, 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다(Fig. 16).

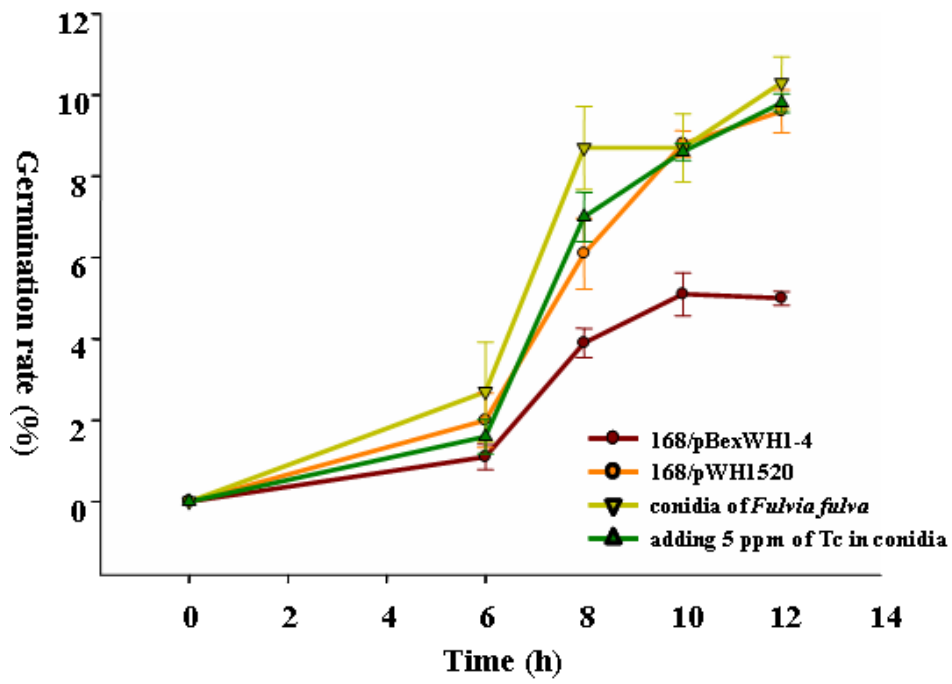


Fig. 16. Inhibition of spore germination by N1 chitinase expressed in *B. subtilis* 168

제 2 세부과제 : 고품질활성 키티나아제 활성 균주를 이용한 미생물제제 제조기술확립

연구책임자 : 문 병 주

제 1 절 서 론

국제화시대인 21 세기에는 고품질의 고기능성 채소 활성을 위해 국제간의 경쟁이 치열해질 것으로 예상되며, 우리나라 역시 작물의 수출 가치를 높이기 위해 모든 작물의 고품질화를 목표로 국산채소의 소비를 촉진시키고 국가경쟁력을 강화하여야 한다. 이러한 추세에 미루어 고품질 활성을 위한 집중적인 기술이 필요하며, 특히 최근에 일고 있는 채소의 이용 증대 효과를 지속적으로 뒷받침하기 위해 채소의 재배법 개발 및 병 방제의 연구 개발이 지속적으로 이루어 져야 한다(농림부, 2002). 최근, 생물학적인 방법에 의해 농작물을 보호하려는 연구가 활기를 띠고 있어, 생물학적 제제의 실용화 가능성이 부각되어 외국에서는 진균과 세균을 이용한 주요 미생물 농약이 상업적으로 판매되고 있다. 현재 세계 생물농약시장은 전체 농약시장 규모 약 300억 달러(97년 기준)의 3% 정도로 소규모이지만, 2010년에는 500% 증가되어 430억 달러의 10%를 차지할것이라고 예측되고 있으며, 미생물농약 분야는 연간 15~20%의 고속성장을 지속하여 2013년에는 생물농약의 시장규모가 세계적으로 50억불이 될 전망이다. 국내 역시 2010년에는 전체시장의 약 10%로 증가하여 약 1,220 억원의 시장이 예상되고 있다.

미생물농약의 제형화는 저장, 배송 및 대상작물과 토양에서 적용 방법이 기존의 화학적 산물과는 다른 접근이 필요한데, 미생물 농약의 안정성은 적어도 1년 이상은 지속되어야한다. 길항세균에게 안정적인 영양 공급을 해야하며, 저장 산물에서의 독소의 대사과정을 제거해야 하고, 세균을 치사시키지 않는 범위에서 대사활성을 낮추어야 한다(David K Rodham, 1999). 또한, 길항세균의 치사량을 최소화하려면 복합적인 배지를 사용하여 세균을 성장시켜야 하고 건조 방지를 위하여 보호제를 첨가하여 안정성에 있어 유리하게 조정해 주어야한다.

국내외의 토마토 잎곰팡이병 방제에 관련된 연구가 미흡하고, 또한 생물학적 방제를 위한 미생물제제의 개발 또한 전무하여, 토마토에 발생하는 잎곰팡이병을 방제하고, 농가의 수익을 극대화하기 위하여 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 본 연구에서 개발한 미생물농약이 제품으로 개발될 경우, 국내 공급은 물론 세계적으로 토마토의 주요활성 국가로의 수출이 가능하며, 국내의 토마토 활성 효율을 증대시켜 농가 소득 향상은 물론 전반적인 농업경쟁력 재고에 기여

할 수 있을 것이다.

제 2 절 유용미생물의 탐색 및 동정

1. 연구수행 방법

가. 토마토 잎곰팡이병 발생과 병원균 분리 및 동정

1) 토마토 잎곰팡이병 발병율 및 병징 조사

부산광역시 강서구 대저 2동 소재 토마토 재배 농가에서 발생한 토마토 잎곰팡이병의 발병율을 2005년 2월부터 3월까지 조사하고 이들의 병징을 수시로 관찰하였다. 발병율은 토마토 재배 플라스틱 하우스 4동을 6구역(구역 당 200×60 cm)으로 임의 선정하여, 총 토마토 주수(4동×100주×6구역)에 대한 이병주수를 조사하여 이병엽율로 환산하였다. 이병엽율(%)은 병반 면적율을 조사하여 다음과 같이 환산하였다.

$$\text{이병엽율(\%)} = \frac{(\text{발병수} \times \text{계수})}{4 \times \text{엽수}} \times 100$$

계수 : 0- 발병무,

1- 병반면적율 1~5%,

2- 병반면적율 5.1~20%,

3- 병반면적율 20.1~40%

4- 병반면적율 40% 이상

2) 이병잎에서의 병원균 분리 및 공시 병원균의 포자부유액 선발

가) 병원균 분리

부산광역시 강서구 대저 2동의 토마토 재배 플라스틱하우스에서 잎 표면에 소형의 흰

색 점무늬가 나타나고, 뒷면에 용단모양의 균층이 형성되어 잎곰팡이병 증상을 보이는 병든 잎을 채집하여 발병부위에서 병원균 총 45균주를 분리하였다. 병든 토마토의 잎 면적이 1 cm²가 되도록 잘라 자른 조각을 5.25% sodium hypochlorite에 약 1분간 표면 살균한 후 살균수로 2~3번 세척하고, 흡수지로 물기를 제거하여 감자한천배지(PDA, Potato Dextrose Agar)와 streptomycin 50 ppm이 첨가된 물한천배지(WA, Water agar)에 올려 22°C, 암조건의 항온기에서 7일간 배양하고, PDA 배지에 3회 정도 계대배양하여 순수 분리하였다. 분리된 균주들은 PDA 사면배지에 계대하여 22°C에서 7일간 배양한 후, 4°C 저온 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

나) 병원균의 포자부유액 선별

병원균 접종 시 분생포자의 효과적인 포자부유액 선발을 위한 예비실험으로 24well culture plate를 이용한 방법과 포트에 분무 접종하여 이병엽을 조사 하였다. 먼저 24 well plate에서는 PDB, 멸균수(D.W)와 30% tomato juice (상품명:가야) 처리구외에 토마토 전즙을 이용하여 조사하였다.(Fig. 2). 각 well당 처리구 2 ml에 공시균주를 20 μ l(1×10^4 conidia/ml)을 접종하여 포자형성량을 측정하였다. 또한, 분리된 45 균주를 각각 PDA, OMA, V-8A배지를 공시하여 22°C에서 16일간 배양한 후 생성된 포자수를 측정하여 포자형성수가 많은 PDA배지를 병원균 배양배지로 선별하였다.

3) 병원성 검정

가) 공시 품종

토마토는 현재 농가에서 통상적으로 사용하고 있는 서광(상품명: 주이코 102)품종을 공시하여 생육상 내와 온실 내 포트 검정 및 온실 내 토경 검정에 사용하였다.

나) 병원성 검정

병원성 검정 시 접종원으로서 분생포자의 효과적인 포자부유액 선발을 위하여 30% tomato juice(상품명:가야)와 PDB배지와 D.W. 등 3종류의 분생포자 부유액을 공시하였고, 24 well culture plate를 이용하여 분생포자 부유액 선발실험에 임하였다. 45균주 중 병원성이 강한 것으로 확인된 토마토 잎곰팡이병균 *Fulvia fulva* TF 13균주를 배양한 PDA 평판배지에 멸균수를 부어 살균된 면봉으로 긁어내고 4겹의 살균된 거즈로 균사를 걸러내어 포자부유액을 만들었다. 부유액에 첨가한 분생포자의 농도는 Hemocytometer를 이용하여 1.0×10^5 conidia/ml로 조정하였다.

토마토는 종자를 플러그포트에 파종한 후 3~4엽이 되었을 때, 포트에 이식하여 본엽이 5~6엽 정도 되어 1화방이 형성되기 직전 무렵의 식물체를 사용하였고, 20±2℃, 상대습도 90% 조건인 생육실에서 24시간 보관한 후에 잎의 뒷면에 공시한 분생포자 부유액이 잎에 맺힐 정도로 분무 접종한 후 같은 조건의 생육실에서 보관하였다. 토마토는 각 처리 당 5주씩 3반복으로 하였고, 접종 48시간 후에 플라스틱 하우스로 옮겨 이병엽율(%)을 조사하여 병원성이 가장 강한 균주를 선발하여 공시하였다.

나. 항균물질 활성균 및 키티나아제 활성균의 분리 및 선발

1) 항균물질활성균의 분리

부산시 강서구 대저 2동의 토마토 채배 포장에서 병원균에 길항 능력을 지니는 유용 미생물의 분리를 위해 근권 토양 1g에 멸균수 10ml로 현탁한 후 warning blender로 수초간 혼합하고 다시 멸균된 살균수를 이용하여 일정배율로 희석한 뒤, NA(Nutrient agar, Difco)배지에 0.1ml씩 도말하여 30℃에서 1주간 배양한 평판배지에 나타난 균총을 수회에 걸쳐 순수 분리하였다. 균주들은 장기간 보존을 위해 20% glycerol 용액에 현탁시켜 deep freezer(-70℃)에 보관하면서 실험에 이용하였다.

가) 항균물질활성균의 1차 선발

*In vitro*에서 항균활성 검정은 PDA배지상에서 병원균인 *Fulvia fulva* TF13의 군사절편과 대치배양하여 공시 세균과 병원균 사이에 형성되는 저지대 크기를 조사하여 항균활성이 높은 9 균주를 1차로 선발하였으며, 이를 제차 검정하여 2 균주를 2차 항균물질활성균으로 최종 선발하였다.

나) 생육실내 방제효과 검정 및 최종 선발

분리한 세균 600여 균주들 중에서 1차 선발된 길항세균 2균주를 생육실내 방제효과 검정을 실시하여 우수한 항균물질활성균을 최종 선발하였다. 토마토 잎곰팡이병의 방제효과 검정 방법은, NB배지에 24시간 배양한 1차 길항세균의 부유액(1×10^{10} CFU/ml)을 각각 포트당 50ml씩 토마토 잎의 앞, 뒷면에 분무 접종하고 24시간 후 병원균 *Fulvia fulva* TF13 균주의 분생포자 부유액(1×10^6 conidia/ml)을 처리하여 22℃, 상대습도 90%이상 생육실에 5일간 보관 후, 플라스틱 하우스로 옮겨 2일 간격으로 이병엽율(%)을 조사하여 방제가를 환산하였다.

다) 항균물질활성균 A-2균주의 항균물질에 의한 포자발아 억제

선발된 A-2 균주에서 활성화되어지는 항균물질활성균성 물질의 온도에 대한 영향 및 활성화 방법을 검토하기 위하여 병원균 TF13 균주의 포자액 (1×10^5 conidia/ml PDA)을 PDA에 첨가하여 배지를 조제하였다. 항균물질활성균성 물질 시료는 A-2 균주를 NB 배지에서 2일간 배양 (35°C, 180 rpm)한 다음 상등액을 냉동건조시킨 시료를 100배 희석하고, 각각 10, 20, 40, 80 μ l 으로 양을 달리하여 병원균의 포자가 포함된 배지에 떨어뜨려 25°C에서 4일간 배양한 후 배지 위에서 형성되는 Inhibition zone을 측정하였다.

2) 우수 항균물질활성균 A-2균주의 동정

앞곰팡이병 방제용 우수항균물질활성균으로 최종 선발된 A-2균주를 API test, TEM을 이용한 형태 관찰 및 16S rDNA gene sequence analysis 와 *gyrA* sequence analysis를 이용하여 동정을 실시하였다.

가) TEM(Transmission electronic microscopy)을 이용한 형태 관찰

A-2균주를 1일간 NA 배지에서 배양한 후 세균 현탁액을 3차 증류수에 1/2, 1/4, 1/16, 1/32의 순으로 희석하고, grid를 각각 현탁액에 묻힌 후, 1% aqueous uranyl acetate를 떨어뜨려 1~2분 방치한 후에 세균의 형태와 편모를 관찰하였다. 이때, negative staining으로 grid 위에 1% aqueous uranyl acetate를 처리한 것을 사용하였다.

나) 16S rDNA gene sequence analysis

A-2 균주의 정확한 동정을 위하여, LB배지에서 1일간 배양한 각 세균의 chromosomal DNA promega genomic DNA purification kit (Promega., U.S.A.)를 사용하여 genomic DNA를 준비하고(Chun, 1995), 이를 universal primer set를 사용해 16S rDNA를 PCR amplification하였다. PCR product를 QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN Inc., German)를 사용하여 정제한 후, pGEM-T vector (Promega., U.S.A.)에 cloning 하여, ABI 100 automated DNA sequence(Takara Korea, Korea)로 분석하고, 이 염기서열을 기초로 NCBI 에 Blast 하여 동정 하였다.

다) *gyrA* sequence analysis

Bacillus 속균에 포함하는 A-2 균주의 정확한 속 동정을 위해 gyrase subunit A sequence 분석을 실시 하였다. Wizard genomic DNA extraction kit (Promega., U.S.A.)를 이용

하여 각 균주들의 genomic DNA를 Universal primer(p-gyrA-F 5'CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT3', p-gyrA-r 5'CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT3')를 이용하여 PCR amplification 하였으며, 이PCR product를 Qia Quick spin column (Qiagen Inc, German)을 이용하여 다시 정제한 후 pGEM-T vector (Promega Inc., U.S.A)에 ligation후 *E. coli*로 증폭하였다. plasmid extraction kit(Atman bio, Korea)를 통해 추출한 *gyrA* gene의 sequence를 NCBI의 blast을 통해 동정하였다.

다. 키티나아제 활성균의 분리 및 동정

1) 키티나아제 활성균 CH-9와 CH-10의 분리

키티나아제 활성이 강한 균주를 분리하기 위해서 미리 chitin 분말을 섞은 토양을 토마토 재배 하우스 부근과 산림에 부엽토가 많이 쌓인 토양에 묻어두고 1~2 개월이 지난 후 colloidal chitin 이 함유된 배지에서 키티나아제 활성 균주를 분리하였다. 투명환이 생긴 균주를 50여종을 분리 하여 가장 활성이 우수한 균주를 순수 분리하였다. 이들을 0.5% colloidal chitin 배지에서 다시 계대하여 그 활성이 재차 검정하였다.

2) 키티나아제 활성균 CH-67 분리

예비실험에서 선발된 항균활성균 A-2 균주와 키티나아제 활성균 CH-10 균주의 삼각플라스크배양에서의 잎곰팡이병원균의 균사억제가 100%인데 비해 이들의 미생물제제인 A2-H와 CH-10G제제를 처리할 경우 방제가가 다소 저조해짐을 관찰하고 항균활성과 키티나아제 분비능을 동시에 가지는 우수한 미생물을 지속적으로 분리하였다. 이때, 침엽수림 주변의 chitin이 첨가된 토양에서 채취한 토양 200 g을 실험실로 가져와 토양산도를 측정하고 10단계 평판희석법으로 2% colloidal chitin이 포함된 MG agar (Manitol 10 g, L-glutamic acid 2 g, KH₂PO₄ 0.5 g, NaCl 0.2 g, MgSO₄ 0.2g, Agar 15 g, 1L D.W, pH 7.0)배지에 도말하여 25℃ incubator에 배양하면서 투명환을 나타내는 균주를 선발하였다

3) 키티나아제 활성균(CH-9, CH-10 과 CH-67)의 동정

잎곰팡이병 방제용 키티나아제 분비능과 우수 항균물질활성균들인 CH-9, CH-10과 CH-67균주를 API test, TEM을 이용한 형태 관찰 및 16S rDNA gene sequence analysis를 이용하여 동정을 실시하였다.

가) TEM(Transmission electronic microscopy)을 이용한 형태 관찰

CH-9, CH-10과 CH-67균주를 1일간 NA 배지에서 배양한 후 세균 현탁액을 3차 증류수에 1/2, 1/4, 1/16, 1/32의 순으로 희석하고, grid를 각각 현탁액에 묻힌 후, 1% aqueous uranyl acetate를 떨어뜨려 1~2분 방치한 후에 세균의 형태와 편모를 관찰하였다. 이때, negative staining으로 grid 위에 1% aqueous uranyl acetate를 처리한 것을 사용하였다.

나) 16S rDNA gene sequence analysis

CH-9, CH-10과 CH-67균주의 정확한 동정을 위하여, LB배지에서 1일간 배양한 각 세균의 chromosomal DNA promega genomic DNA purification kit (Promega., U.S.A.)를 사용하여 genomic DNA를 준비하고(Chun, 1995), 이를 universal primer set를 사용해 16S rDNA를 PCR amplification하였다. PCR product를 QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN Inc., German)를 사용하여 정제한 후, pGEM-T vector (Promega., U.S.A.)에 cloning 하여, ABI 100 automated DNA sequence(Takara Korea, Korea)로 분석하고, 이 염기서열을 기초로 NCBI 에 Blast 하여 동정 하였다.

라. 선발항균 및 키틴나아제 활성균주에 의한 병원균 생육억제 효과 검증

1) 플라스크내 검증

2차 실험에서는 키틴나아제 활성균으로 선발된 CH-9, CH-10 균주와 A-2 균주를 단독 또는 혼합처리하고, 접종 3일 후 병원균의 건중량을 조사하여 병원균 생장억제효과를 검증하였다. 병원균의 균체량 측정은 dry weight(건중)을 사용하여 측정하였다. Dry weight는 배양액을 filter paper(Whatman No.1)를 이용하여 감압 여과한 후 증류수로 잔여 배지성분을 세척한 다음 80℃에서 항량이 될 때까지 건조하여 질량을 측정하였다. 포자의 농도는 haemocytometer를 이용하여 측정하였다.

2) 현미경내 균사억제능 관찰

500 ml 플라스크에 200 ml을 넣고 병원균을 접종하고 항균활성이 높은 A-2 균주와 chitinase 활성균주를 단독 및 혼합처리한 후, 25℃, 150 rpm 조건에서 24시간 배양하여 항균물질 활성균과 키틴나아제 활성균, 두 균주의 단독 또는 혼합처리에 의한 병원균의 생장 억제효과를 광학현미경상에서 검정하였다.

3) 항균물질활성균 A-2균주와 키틴나아제 활성균 CH-10균주의 동시배양에 의한 병원균의 생육억제

앞서 우수한 항균 활성능력을 나타낸 A-2균주를 키틴나아제 활성균과 플라스크내 단독 혹은 혼합배양을 통하여 두 균주의 병원균 생장억제능력의 상승효과 여부를 검정하였다. 우선 500 ml 플라스크에 PDB 200ml을 넣고 병원균 분생포자 부유액 (1×10^4 conidia/ml)을 5ml씩 접종하였다. 25°C, 150rpm조건에서 24H 배양 후, 길항세균인 A-2균주를 $A_{600}=4.0$ 농도에서 10ml을 접종하였으며, 키틴나아제 혼합처리구의 경우 키틴나아제 활성이 높은 것으로 확인된 CH-10 균주의 배양상층액 400ml을 농축하여 0.2% 농도로 첨가하였다. 3일간 진탕배양후, 병원균의 균체량을 측정하여 병원균 생장억제 효과를 조사한 결과 A-2 단독처리구에 비하여 A-2와 키틴나아제 혼합처리구에서 다소 높은 억제효과를 나타내었다.

마. 생육실내 포트상에서의 방제효과

1) A-2, CH-9, CH-10균주의 단독 및 혼합처리에 의한 방제효과

뛰어난 항균물질활성을 보이는 A-2균주와 높은 키틴나아제 활성을 보이는 CH-9과 CH-10균주를 각각, NB배지와 colloidal chitin이 3% 포함된 LB배지에 20시간 배양(30°C, 200 rpm)한 후 $A_{550}=1.0$ 으로 보정한 세균부유액을 각각 30일 된 성체 식물에 A-2균주 부유액은 30 ml과 50 ml 씩 골고루 살포하고 CH-9과 CH-10균주 부유액은 50 ml 씩 골고루 살포한 후 생육실(23.5°C, 상대습도 90% 이상)에서 하루 동안 보관하였다. 이때, Triflumizole는 농약사용지침서에 따라 3.00qofh 희석하여 살포하였으며 처리 24시간 후 *F. fulva* TF13 균주의 균사조각부유액을 $A_{550}=0.4$ 로 보정하여 포트당 10 ml씩 토마토에 접종하고 생육실에 7일간 보관하면서 발병도를 방제가로 환산하였다.

2) CH-67균주 단독처리에 의한 방제효과

앞서의 항균물질활성과 chitin 분해능이 뛰어나 선발된 CH-67균주를 먼저, NB배지에 20시간 배양(30°C, 200 rpm)하고 대량배양용 배지로서 *Pseudomonas* 배양용 기초배지에 3%의 현미유(Rice oil)와 0.5%의 $(NH_4)_2SO_4$ 를 첨가한 배지에 3일간 배양(30°C, 350rpm, 1.5 atm)한 후 배양액을 세균과 배양상등액으로 나누어 30일 된 성체식물에 50 ml씩 골고루 살포하고 생육실(23.5°C, 상대습도 90% 이상)에 보관하였다. 이때, Triflumizole는 농약사용지침서에 따라 3.00qofh 희석하여 살포하였으며 처리 24시간 후 *F. fulva* TF13 균주의 균사조각부유액을

A₅₅₀=0.4로 보정하여 포트당 10 ml씩 토마토에 접종하고 생육실에 7일간 보관하면서 발병도를 방제가로 환산하였다.

2. 연구 결과

가. 토마토 잎 곰팡이병 발생과 분리, 동정 및 병원성 검정

1) 토마토 잎곰팡이병의 발병율 및 병징 조사

부산광역시 강서구 대저 2동의 토마토 재배 농가에서 발생한 토마토 잎곰팡이병의 발병율을 조사한 결과, 2005년 2월과 3월의 평균 이병엽율은 각각 28.8%, 16.7%로 조사되었으며 (Table 1), 초기의 병징은 잎 표면에 흰 점무늬의 소형 점무늬가 나타나다가 병세가 진전되면 잎 뒷면에 용단 모양의 담황색 균층이 발생되면서 병반이 점차 확대되었다. 이 병은 아래로부터 순차적으로 발생하며 병세가 심해지면 잎 전체가 황화되어 말라죽었다(Fig. 1).

Table 1. Occurrence of leaf mold caused by *Fulvia fulva* on the tomato leaves at plastic house in Taejeo, Pusan.

Plastic house	Disease incidence (%) ^c	
	Feb ^a	March
A ^b	32.0	21.1
B	29.7	14.1
C	24.4	19.4
D	29.2	12.3
Average(%)	28.8	16.7

^a 2005 Year

^b Tested total of Tomato ; A, 2600 ; B, 2700 ; C, 2700 ; D, 2700

^c Disease incidence (%) was made by estimating the number of tomato leaves infected by *Fulvia fulva*.



Fig. 1. Symptoms of leaf mold of tomato caused by *Fulvia fulva* at Taejeo, Busan in 2005.

2) 공시병원균 및 포자부유액 선발

성체 토마토의 이병엽에서 1차로 분리한 45 분리균 중 예비 실험을 통해 병원성이 강한 TF13 등 6균주를 선발하여 배지의 구성에 따른 분생포자 형성량에 미치는 영향을 조사하고 이들 중 가장 병원성이 우수한 병원균을 최종 선발하였다. 이때, 병원균 포자부유액의 영양배지로 PDB 배지, tomato juice 30% (상품명:가야), 토마토전즙, 살균수를 선정하여 각 병원균의 분생포자부유액을 제조하고 최종 분생포자 농도를 1×10^4 conidia/ml로 조정하여 24-well culture의 각 well 당 2 ml씩 분주하여 매일 포자형성량을 관찰하였다. 그 결과, 총 6 균주 모두 PDB 배지와 30% tomato juice 의 분생포자부유액에서 1.1×10^6 conidia/ml 이상의 분생포자 형성량을 보였는데, 이는 전반적으로 살균수의 1.1×10^4 conidia/ml와 토마토전즙의 6.0×10^5 conidia/ml보다도 우수하였다 (Table 2). 또한, PDB와 tomato juice 30%의 분생포자부유액에서 각각 TF4와 TF13 균주가 분생포자형성량이 우수하여 1차로 선발되었다(Fig. 2).

Table 2. Selection of suitable inoculum medium for the pathogenicity by various *Fulvia fulva* strains.

inoculum	3days			
	PDB	boiled tomato leaf	30% tomato juice	sterile water
TF3	1.1×10^6	2.5×10^5	2.6×10^6	1.0×10^4
TF4	2.1×10^6	2.5×10^5	2.6×10^6	1.0×10^4
TF6	1.4×10^7	1.0×10^4	1.8×10^7	1.0×10^4
TF10	1.6×10^6	2.5×10^5	4.1×10^6	1.0×10^4
TF11	1.3×10^6	6.0×10^5	3.0×10^6	1.0×10^4
TF13	5.0×10^6	1.3×10^5	2.7×10^6	1.0×10^4

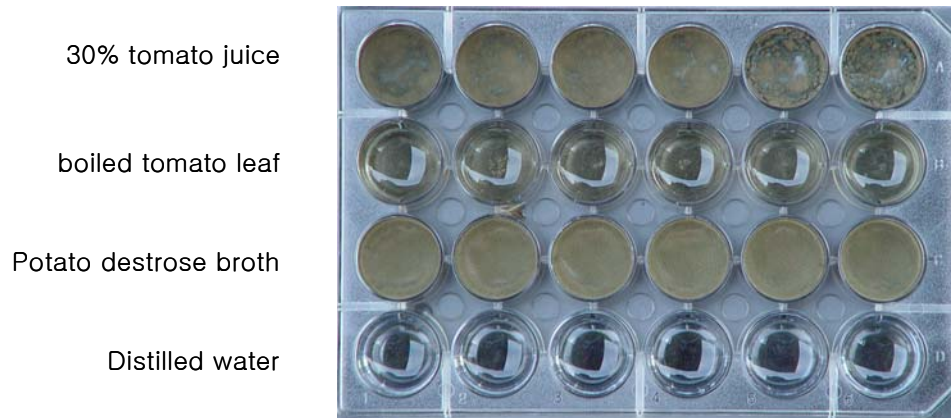


Fig. 2. Experiment for selection of suitable inoculum medium for *Fulvia fulva*.

또한, 이후의 모든 생육상내 포트 검정을 위해 성체 토마토에 적용될 효과적인 분생포자 부유액을 최종 선발하였는데, tomato juice 30%(상품명:가야), PDB, 살균수 등의 분생포자부유액을 1×10^4 conidia/ml 농도로 토마토에 처리하고 이병엽을 조사한 결과, TF13 균주의 경우 PDB 배지 처리구에서 2일째 이후부터 병이 발생하기 시작하여 접종 4일째에 81.5% 발병율을 보였고, tomato juice 30% 처리구와 살균수 처리구에서는 각각 100%와 0%로 대부분의 균주에서 발병이 너무 심하거나 전혀 발병이 일어나지 않아 분생포자부유액으로 부적합한 것으로 조사되었다. 따라서, 최종적으로, 4일째에 82.6%의 가장 적절한 발병율을 보인 TF13 균주를 공시병원균으로 선발하였고, PDB배지를 가장 효과적인 분생포자부유액의 영양배지로 최종 선발하였다(Table 3).

Table 3. The disease incidence of leaf mold caused by *F. fulva* strains isolated on tomato in growth chamber

Isolates	Disease incidence (%) ^a								
	4 days			6 days			8 days		
	tomato			tomato			tomato		
	PDB	juice 30%	D.W.	PDB	juice 30%	D.W.	PDB	juice 30%	D.W.
TF3	34.2%	100%	0%	45.6%	100%	0%	46.0%	100%	0%
TF4	80.4%	95.6%	0%	81.0%	97.0%	0%	81.5%	97.0%	0%
TF6	80.5%	90.7%	0%	81.3%	92.5%	0%	82.0%	92.8%	0%
TF10	70.8%	100%	0%	72.3%	100%	0%	72.3%	100%	0%
TF11	55.6%	100%	0%	57.5%	100%	0%	58.2%	100%	0%
TF13	81.5%	100%	0%	82.4%	100%	0%	82.6%	100%	0%

3) 병원성 검정

앞서 24-well culture에서 선발된 TF4균주와 TF13균주를 이용한 PDB 분생포자부유액을 각 포트당 30ml씩 분무접종하여 최종적으로 병원성을 검정한 결과, 5일째에 TF4와 TF13 균주의 발병도가 각각 84.4%, 97.0%로 높은 병원성을 나타내었고, TF13균주가 TF4균주보다 전반적으로 병원성이 높아 공시 병원균으로 최종 선발되었다(Table 4, Fig. 3).

Table 4. Disease incidence of leaf mold caused by *Fulvia fulva* strains on tomato in a growth chamber

Isolates	Disease incidence (%) ^a			
	1 days	3 days	5 days	7 days
TF4	24.7%	77.9%	84.4%	90%
TF13	24.5%	80.1%	97.0%	100%



Fig. 3. *Fulvia fulva* TF13 isolated from diseased tomato at Taejeo, Busan in 2005

나. 항균물질활성 균주 선발 및 동정

1) 우수 항균물질활성균 분리

가) 항균물질활성균의 1차 선발

토마토 재배 하우스의 근권 토양 및 건전 토마토 잎으로부터 분리된 600여 균주를 잎곰팡이병균과 대치배양한 결과 9 균주 중 1차 우수활성균 으로 선발 하였는데 그중에서도 이들의 균사생육저지 효과를 PDA 평판배지상에서 조사하였다. A-2와 A-7 균주가 각각 8.4 mm, 6.7 mm로 가장 높은 저지대를 나타내었다(Table 5, Fig. 4).

Table 5. Inhibition of 9 bacterial isolates against the mycelial growth of *Fulvia fulva* TF13 on PDA medium

Isolates	Inhibition zone(mm)*
KT25	5.5c
RH-1	6.2b
LY11	5.9b
N1	4.3c
A-2	8.4a
A-7	6.7b
pro-EB-15	4.7c
CT11	5.1c
CT13	5.8b

* Antibiotic production was determined by inhibition zone on PDA after 14 days incubation



Fig. 4. Growth inhibition of *Fulvia fulva* TF 13 by antagonistic bacterium A-2 on PDA medium

나) 생육실내 방제효과 검정 및 최종 선발

앞서 1차 선발된 9균주의 세균부유액을 포트에 정식한 뒤 10일된 토마토 잎에 처리하고 생육상에 24시간 보관한 뒤, TF13 병원균의 분생포자부유액을 접종하여 토마토 잎곰팡이병에 대한 방제효과를 검정하였다. 그 결과, A-2 균주가 78.6%로 방제효과가 가장 높았고 다음으로는 A-7 균주가 66.2% 이었다. 따라서, A-2 균주를 토마토 잎곰팡이병 방제용 우수 항균물질활성균으로 최종 선발하였다(Table 6).

Table 6. Disease control effect of 9 isolates of antagonistic bacteria against *Fulvia fulva* TF13

Isolates	9 days after	
	Disease incidence (%)	Control value (%) ^a
KT25 + Pa ^b	58.3	41.7d
RH-1 + Pa	51.0	49.0d
LY11 + Pa	56.6	43.4d
N1 + Pa	49.3	50.7c
A-2 + Pa	21.4	78.6a
A-7 + Pa	33.8	66.2b
pro-EB-15 + Pa	47.2	52.8c
CT11 + Pa	63.3	36.4e
CT13 + Pa	61.9	38.1e
Pathogen only	100	0.0f
Control	0.0	100a

^a Means followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range (P=0.05%)

^b Pa = pathogen (*F. fulva* TF13)

다) 항균물질활성균 A-2 균주에 의한 포자발아억제

최종 선발된 A-2 균주에서 활성화되어지는 항균성 물질의 병원균 포자발아 억제능을 조사하기 위해 먼저, 병원균 TF13 균주의 분생포자부유액을 1×10^5 conidia/ml 농도로 보정하여 PDA배지상에 도말하고, 여기에 배양농축액 시료를 농도별(10, 20, 40, 80 μ l)로 달리하여 살균된 여과지에 집적한 후 25C에서 7일간 배양하였다. 이때, 시료는 열에 대한 안정성을 위해 100℃에서 10분간 끓인 후 사용하였다. 그 결과, 모든 농도에서 항균 활성이 관찰하였으며, 처리 농도가 높아 질수록 저지대(inhibition zone)의 크기도 증가되었다(Fig. 5).



Fig. 5. A plate assay showing fungal growth inhibition by culture supernatant concentrate of the A-2 isolate. the A-2 culture supernatant was 100-fold concentrated by freeze-dry method. (A) 10 µl; (B) 20 µl; (C) 40 µl; (D) 80 µl.

2) 우수 항균물질활성균 A-2 균주의 동정

항균물질활성균 A-2 균주의 동정을 위하여 먼저 형태학적 조사 결과, 전형적인 간균의 형태를 보였으며, 운동성을 지닌 편모가 관찰되었다(Fig. 6.). 또한, A-2 균주의 정확한 동정을 위해 16s rRNA 분석을 통하여 *Bacillus* sp.와 99%, *Bacillus subtilis*와 99% 그리고 *B. amyloliquefaciens*와는 98%의 유사성이 있음을 확인하였다(Fig. 7). 하지만, *Bacillus*종의 경우 종래의 생화학적 특성에 따른 분류방법으로 정확하게 구분하기가 어려운 것으로 알려져 있고, 16S rRNA 분석법의 경우 근접한 종에서의 염기서열의 유사도(99.2~99.6% 염기서열 유사도)가 거의 비슷하여 확실한 결론을 내릴 수가 없었다. 그러나, 최근에는 높은 유전자 변이율을 가지는 단백질 유전자를 분석하여 세균의 분류에 응용하는 방법들이 개발(Ash 등, 1991; Nakamura, 1999)되어, 이들 방법 중 gyrase A 유전자의 염기서열분석에 의한 *Bacillus*종의 동정 분류법을 이용하여 동정하고자 하였다(Chun & Bae (2000). gyrase A 유전자 증폭을 위해 p-gyrA-f(5'-CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT-3')와 p-gyrA-r(5'-CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT-3')의 프라이머를 사용하여 gyrase A 유전자를 PCR로 증폭한 후 PCR fragment를 partial sequence를 GeneBank에서 BLAST를 이용하여 검색한 결과, *B. amyloliquefaciens*와 95%의 유사도를 보였다(Fig. 8). 결론적으로 A-2 균주의 동정을 위해 최종적으로 *B. amyloliquefaciens*로 동정되었

으며, 본 균주를 *B. amyloliquefaciens* A-2으로 명명하였다.

현재까지 *B. amyloliquefaciens*의 길항능에 대한 보고에 의하면 식물병원균의 세포벽 성분중의 하나인 chitin을 분해시킴으로서 용균작용을 유도하는 키틴나아제 연구를 중심으로 많은 보고가 있다 (한 등, 2001; Wang 등, 2002). 그러나 본 연구에서 분리된 A-2 균주의 경우는 키틴나아제 활성 능이 없는 것으로 확인되어 항균활성 물질만으로도 높은 길항능을 발휘하는 것으로 사료된다.

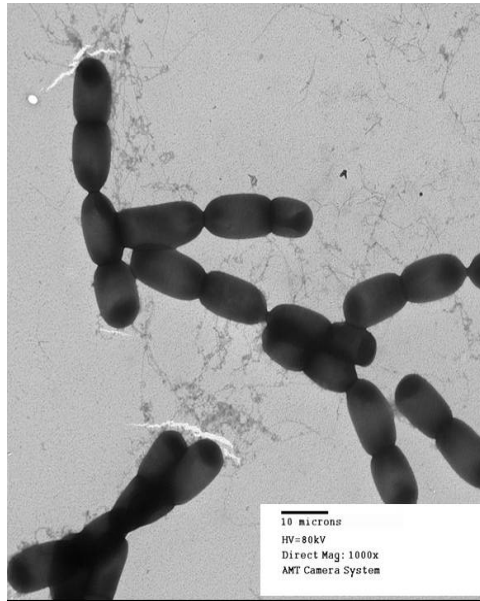


Fig. 6. Transmission electron microscope (TEM) image of antagonistic bacteria A-2.

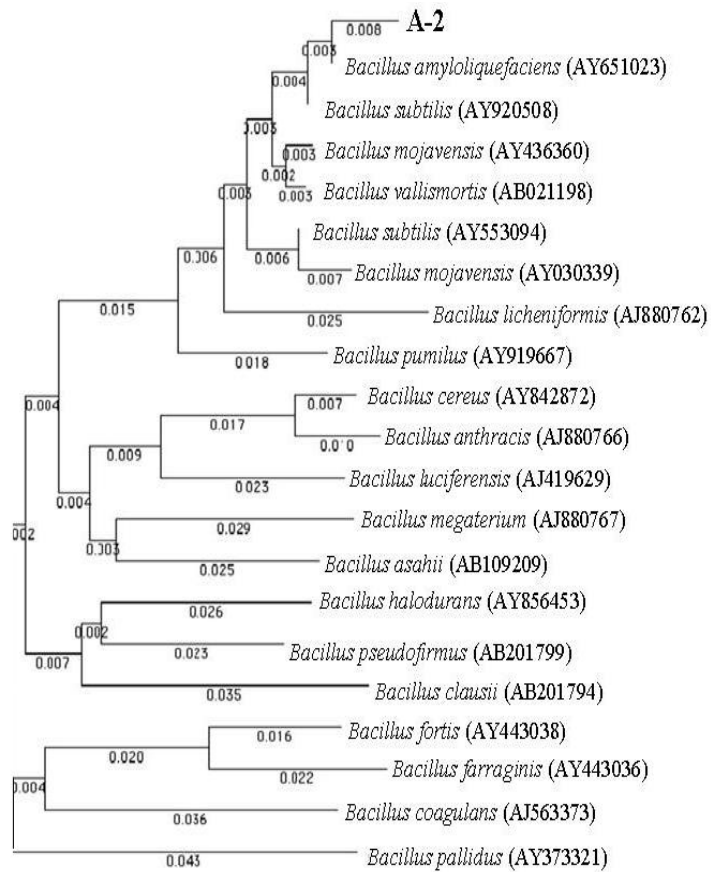


Fig. 7. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence of the strain A-2 with other *Bacillus* species. The relative branch length of this dendrogram indicates the distance between the different strains.

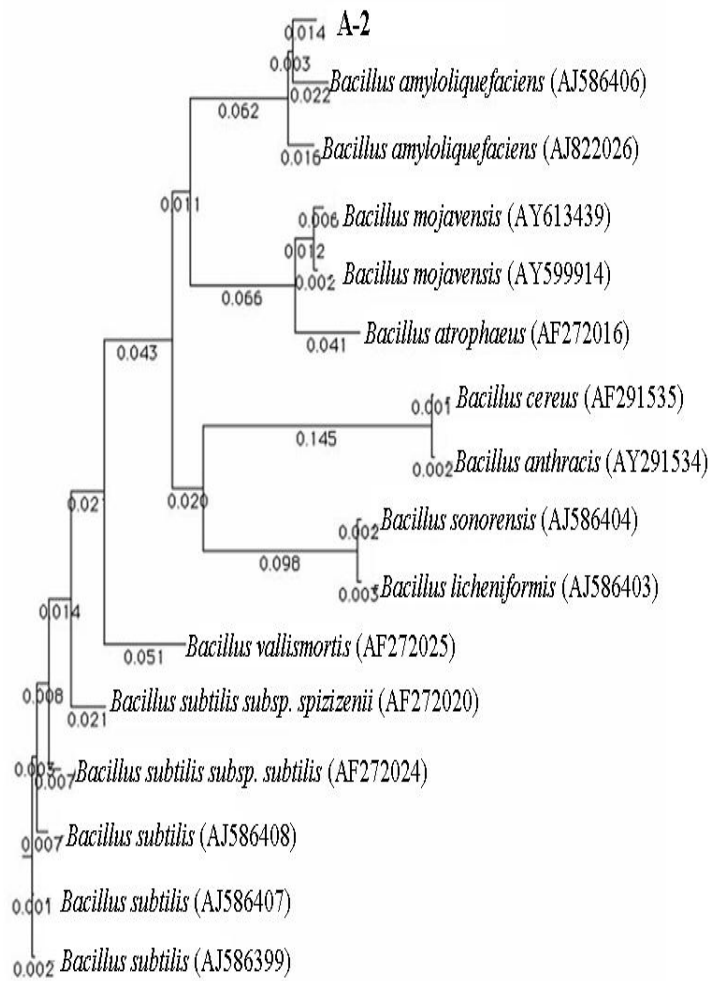


Fig. 8. Phylogenetic analysis of *gyrA* gene sequence of the strain A-2 with other *Bacillus* species. The relative branch length of this dendrogram indicates the distance between the different strains.

다. 키틴나아제 활성균의 분리 및 동정

1) 키틴나아제 활성균 CH-9와 CH-10의 분리

토마토 재배 하우스의 건전한 근권 토양으로부터 채집한 토양 sample을 멸균수로 희석하여 0.5% colloidal chitin이 함유된 NB 배지에서 키틴나아제 분비 세균을 분리하였다. 72시간동안 배양된 세균에서 키틴나아제 활성을 보이는 투명환을 형성하는 균주들을 1차 선발하였으며, 그 결과 CH-9 와 CH-10 균주가 가장 높은 활성을 나타내어 키틴나아제 분해능이 우수한 균주로 1차 선발되었다(Fig. 9).

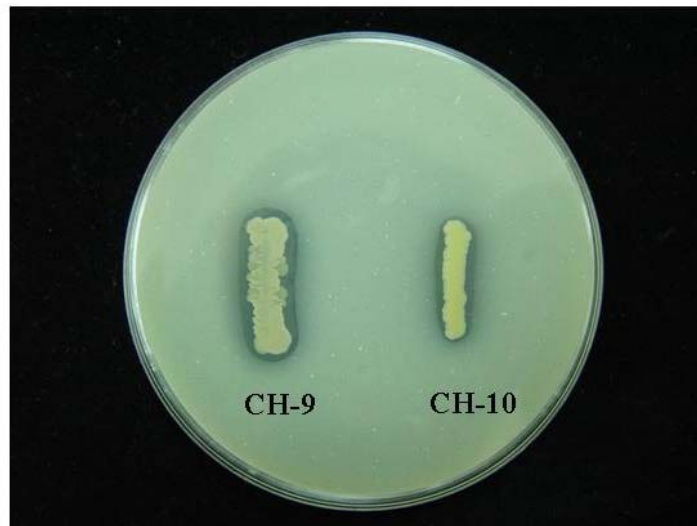


Fig. 9. Chitinase activity shown on colloidal chitin agar plate by the strain CH-9 and the strain CH-10. The photograph was taken after 72 hrs culture at 35°C.

2) 키틴나아제 활성균 CH-67의 분리

Chitin을 정기적으로 enrichment한 토양에서 2차로 약 50여 균주를 분리한 후 키틴나아제 활성 조사와 잎곰팡이병원균 *F. fulva* TF13에 대한 포자발아억제효과를 PDA 평판 배지에서 조사한 결과, 분리균 중에서 CH-67 균주에서 가장 투명환이 크고 잎곰팡이병원균의 포자부유액이 도말된 평판배지에서도 항균활성을 나타내어 키틴나아제 분해와 항균활성을 동시에 가지는 우수 균주로 선발되었다(Fig. 10)

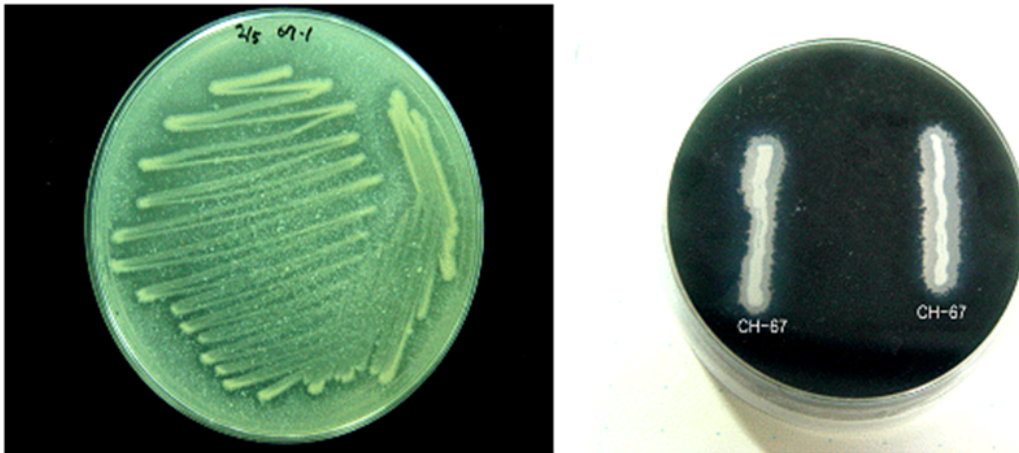


Fig. 10. Chitinase activity shown on 0.1% colloidal chitin agar plate and growth inhibition of *F. fulva* on PDA by the strain CH-67

3) 키티나아제 활성균의 동정

가) CH-9 균주

키티나아제 활성균주 CH-9 균주의 동정을 위하여 먼저 투과 전자현미경(TEM)을 이용한 형태적 특성을 조사한 결과, CH-9 균주는 간상형의 형태를 보였으며(Fig. 11), 정확한 동정을 위해 16s rRNA 영역의 염기서열을 분석한 결과, *Paenibacillus pabuli* (AB056094)의 16s rDNA 염기서열과 99%의 높은 상동성을 나타내었고, *Paenibacillus amylolyticus* (AY509233)와 *Paenibacillus xylanilyticus* (AY427832)와도 높은 유연관계를 나타내었다(Fig. 12).



Fig. 11. Transmission electron microscope (TEM) image of the strain CH-9.

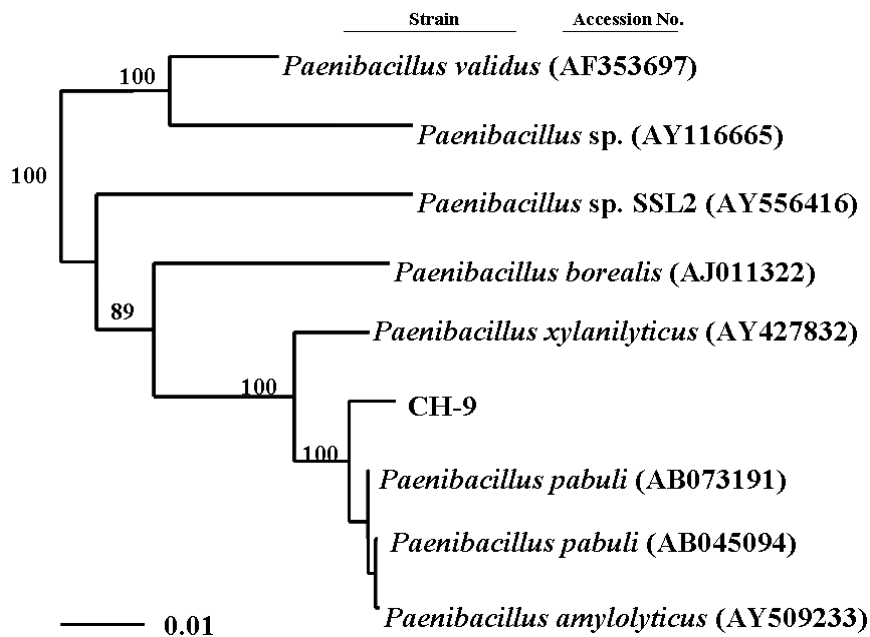


Fig. 12. Phylogenetic tree by 16S rRNA gene analysis of *Paenibacillus pabuli* CH-9.

indicates soil clones. Bootstrap values are shown for each node that had 50% support in a bootstrap analysis of 1,000 replicates. The scale bar indicates 0.1 change per nucleotide.

나) CH-10 균주

CH-10 균주의 동정을 위한 TEM 사진 촬영 결과, 단간균의 형태적 특성을 지녔으며, 세포 직경 크기는 $0.34 \times 0.65 \mu\text{m}$ 였다(Fig. 13). 한편, 생리 생화학적 특성조사는 Table 7과 같으며 아래와 같다(Table 7). 또한, 보다 정확한 동정을 위하여 16s rDNA 영역의 염기서열을 분석한 결과, CH-10 균주는 *Cellulosimicrobium cellulans* DSM43879의 16s rDNA 염기서열과 99%의 높은 상동성을 나타내었으며, *Cellulosimicrobium funkei*와 비교적 높은 유연관계를 나타내었다(Fig. 25.). 그러나, 생화학적 특성조사에서 *Cellulosimicrobium cellulans*와 근접하여 이를 *Cellulosimicrobium cellulans* CH-10으로 최종 동정 명명하였다.



Fig. 13. Transmission electron microscope (TEM) image of the strain CH-10.

Table 7. Analysis of physiological and biochemical characteristics of *Cellulosimicrobium cellulans* and the CH-10 strain

Chacteristic	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	the CH-10 strain
colony type	circular, cinvex	circular, cinvex
color	yellow-whitish	yellow-whitish
Utilization of:		
Glucose	+	+
mannose	+	+
maltose	+	+
sucrose	+	+
D-xylose	+	+
L-arabinose	+	+
D-ribose	+	+
m-inositol	+	-
glycerol	+	+
cellobiose	+	+
lactose	+	+
gluconate	+	+
mannitol	+	-
pyruvate	+	+
raffinose	-	-
Starch hydrolysis	+	+
Gelatin liquefy	slowly	slowly
Catalase produced	+	+
Nitrate reduction	+	+

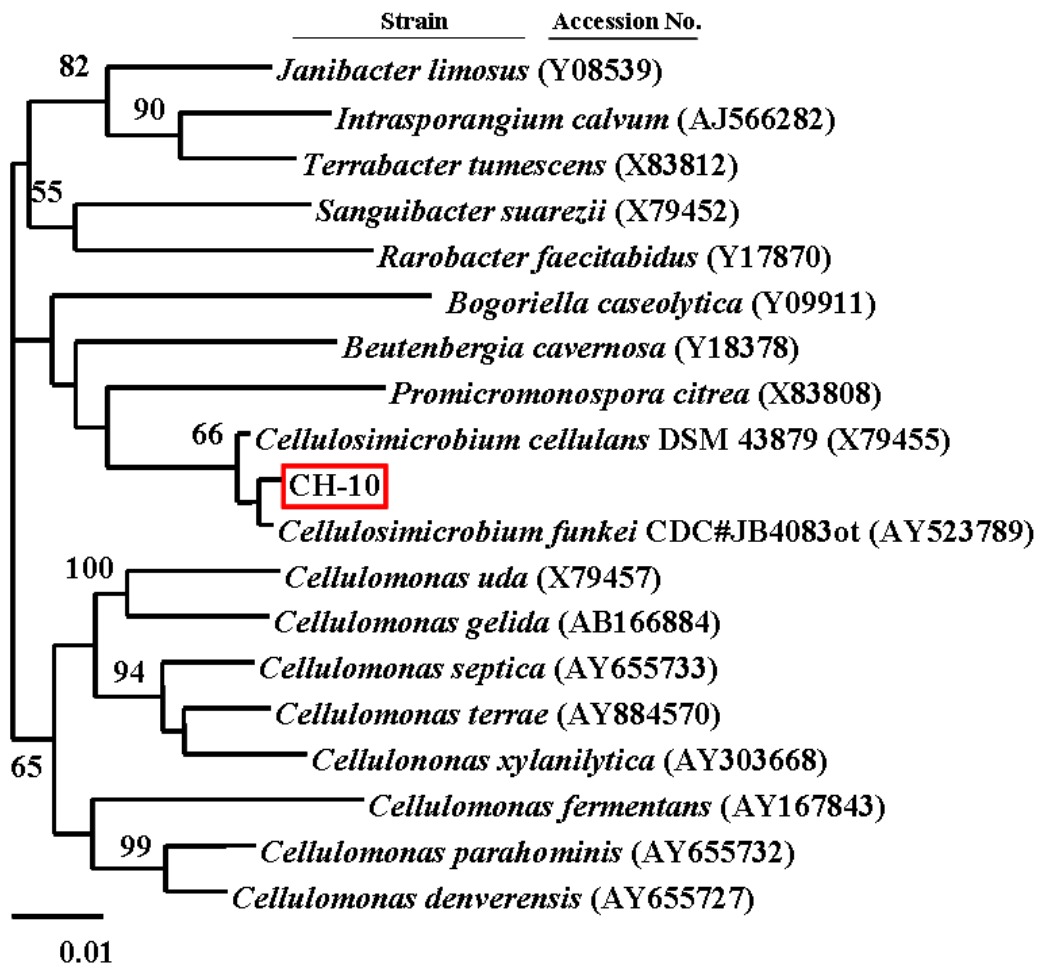


Fig. 14. Phylogenetic tree by 16S rRNA gene analysis of *Cellulosimicrobium cellulans* CH-10. indicates soil clones. Bootstrap values are shown for each node that had 50% support in a bootstrap analysis of 1,000 replicates. The scale bar indicates 0.1 change per nucleotide.

다) CH-67의 동정

CH-10 균주의 동정을 위한 16s rDNA 영역의 염기서열을 분석한 결과, CH-67 균주는 *Burkholderia cepacia* complex group 의 염기서열과 99%의 높은 상동성을 나타내어 이를 *Burkholderia cepacia* CH-67 으로 최종 동정 명명하였다(Fig. 15).

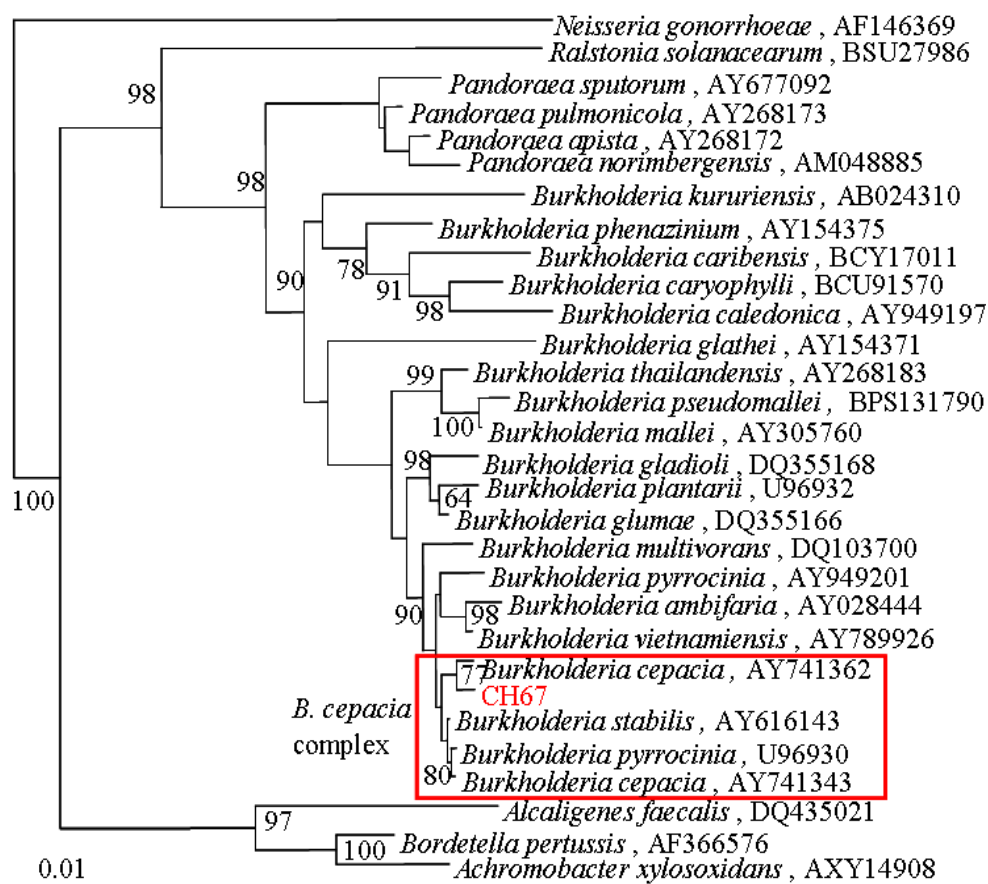


Fig. 15. Phylogenetic tree by 16S rRNA gene analysis of *Burkholderia cepacia* CH-67. indicates soil clones. Bootstrap values are shown for each node that had 50% support in a bootstrap analysis of 1,000 replicates. The scale bar indicates 0.1 change per nucleotide.

라. 선발 항균물질 활성 및 키틴나아제 활성 균에 의한 병원균 생육억제효과 검증

1) 플라스크 내 검증

500ml 플라스크에 PDB 200ml을 제조하여 넣고 잎곰팡이병원균 *F. Fulva* TF13 균주를 접종하고 여기에 항균활성 균주인 A-2 균주 및 키틴나아제 활성 균주인 CH-9와 CH-10 균주를 단독 또는 혼합 접종하여 25℃, 150 rpm 조건에서 배양한지 3일 후 건중량을 조사하여 병원균 생장억제효과를 조사하였다(Table 8). 그 결과, A-2 단독처리에서는 병원균의 건중량이 1.06 mg으로 각각 CH-9와 CH-10 균주에 의한 1.95 mg와 1.35 mg보다 낮게 조사되어 항균물질활성균주 A-2가 키틴나아제 활성균주인 CH-9 와 CH-10균주보다 병원균단독처리구의 2.6 mg에 비해 약 50% 정도의 병원균 균사생장의 감소율을 보였다(Table 8). 한편, 혼합 처리구인 A-2+CH-9의 경우 1.00 mg과 A-2+CH-10의 경우에는 0.87 mg으로 단독처리보다 혼합처리가 전반적으로 효과적이었다. 따라서 *B. amyloliquefaciens* A-2균주와 *C. cellulans* CH-10균주의 단독처리보다는 혼합처리할 경우 가장 병원균 균사생육의 억제효과가 높은 것으로 확인되었다(Table 8).

Table 8. Inhibition effects of mycelial growth of *Fulvia fulva* TF13 by inoculating with antifungal strain A-2 isolate and/or with 키틴나아제 producing strain CH-9, CH-10 in PDB media

Isolates	mycelial dry weight of <i>Fulvia fulva</i> TF13 (mg, 10 days after)
A-2 + Pa	1.06 d
CH-9 + Pa	1.95 b
CH-10 + Pa	1.35 c
A-2+ CH-9 + Pa	1.00 d
A-2+ CH-10 + Pa	0.87 e
Pathogen (Pa) only	2.60 a
Control	0.00 f

2) 현미경내 균사억제능 관찰

앞서 각 처리구에 의한 병원균 생육억제에 대한 활성 조사를 광학현미경상에서 검정한 결과, 항균물질활성균 또는 chitinase 활성균을 처리하지 않은 대조구에서는 병원균의 균사체가 정상

적으로 생육하였으나, A-2 처리구에서는 빨간색 색소와 함께 병원균의 균사체가 엉켜져 더 이상 성장하지 못하고 사멸되어지는 현상을 관찰할 수가 있었다(Fig. 15). 한편, CH-10균주 단독 처리구의 경우에는 A-2 처리구와는 달리 균사의 세포벽이 분해되어 세포내 물질이 용출되어지는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 이러한 현상은 CH-10 균주에서 생산되는 키티나아제에 의한 세포벽의 분해에 의한 것으로 판단되어진다(Fig. 16).

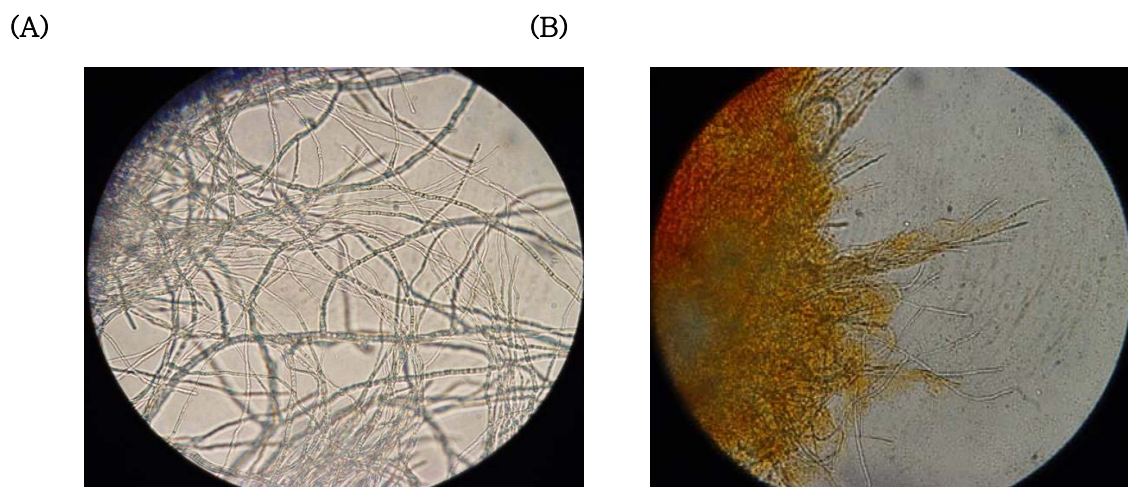
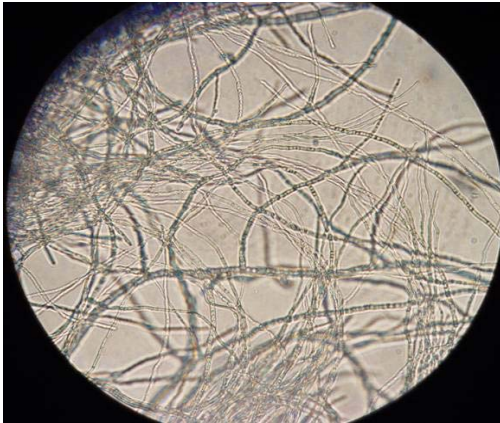


Fig. 15. Microscopy of the mycelium of *Fulvia fulva* TF13 co-cultured with *B. amyloliquefaciens* A-2 strain for 2 days at 25°C. A 200 ml PDB media was inoculated with 1×10^4 conidia/ml. After incubation for 1 day, the A-2 culture (OD550=2.0) 10 ml was inoculated in mycelim culture. This photograph was taken at 2 days after the A-2 inoculation. (A) pathogen only; (B) pathogen co-cultured with the A-2 isolate.

(A)



(B)



Fig. 16. Microscopy of the mycelium of *Fulvia fulva* TF13 co-cultured with *C. cellulans* CH-10 strain for 2 days at 25°C. A 200 ml PDB media was inoculated with 1×10^4 conidia/ml. After incubation for 1 day, the CH-10 culture (OD550=2.0) 10 ml was inoculated in mycelium culture. This photograph was taken at 2 days after the CH-10 inoculation. (A) pathogen only; (B) pathogen co-cultured with the CH-10 isolate.

3) A-2 균주와 CH-10균주의 동시배양에 의한 병원균의 생육억제효과

키틴아아제 활성을 유도하는 colloidal chitin이 함유된 LB배지 400 ml에 CH-10 균주의 배양상등액을 동결건조한 시료를 첨가하고 여기에 길항세균 A-2 균주를 병원균에 동시접종하여 길항세균과 키틴아아제 활성에 의한 균사생장억제의 상승효과를 조사하고자 하였다. 이때, CH-10 균주를 의 배양상등액 동결건조하여 A-2 균주와 함께 병원균 배양액에 접종해서 균사체의 생육억제효과를 관찰하였다. 그 결과, A-2 단독 처리구에 비해서 CH-10 균주의 배양상등액 시료가 첨가된 처리구에서 더 효과적인 균사체 억제현상이 나타났다(Fig. 17).

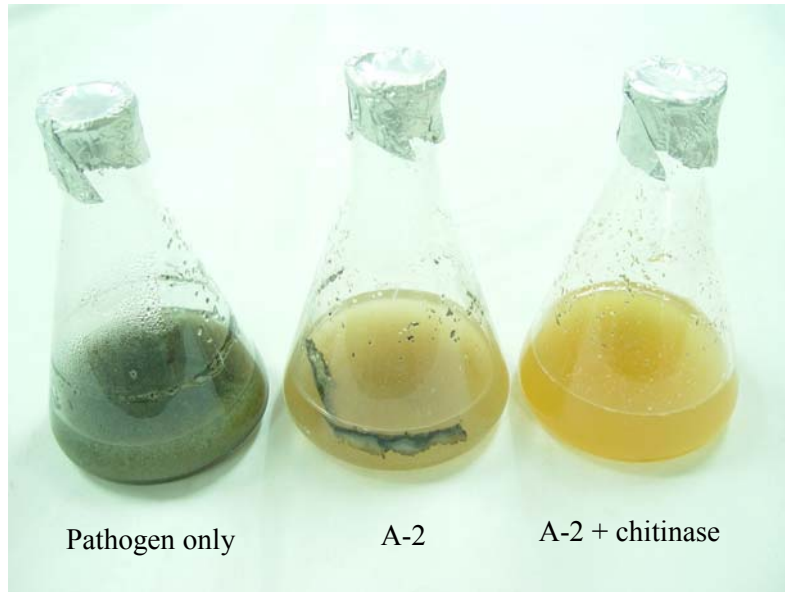


Fig. 17. Synergic effect of *B. amyloliquefaciens* A-2 and the crude 키티나아제 of *C. cellulans* CH-10 against the mycelium growth of *Fulvia fulva* TF13. The fungus *Fulvia fulva* was co-cultured with the A-2 strain and the CH-10 crude enzyme for 2 days at 25°C. A 200 ml PDB media was inoculated with 1×10^4 conidia/ml. After incubation for 1 day, the A-2 culture (OD550=2.0) 10 ml and the CH-10 crude enzyme were inoculated in mycelim culture. This photograph was taken at 2 days after the inoculation. The CH-10 crude enzyme was prepared by lyophilized 400 ml of the LB broth culture with colloidal chitin of CH-10.

마. 생육실내 포트상에서의 방제효과

1) A-2 CH-9, CH-10 균주의 단독 및 혼합처리에 의한 방제효과

병원균생육 억제효과가 높았던 항균물질활성균 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주와 키티나아제 활성균주 *P. pabuli* CH-9, *C. cellulans* CH-10 균주를 이용하여 포트내 방제효과를 검정하였다. 그 결과, A-2 균주의 단독 처리구의 경우 세균부유액 50 ml 처리구가 30 ml처리구보다 유의성은 없으나 83.7%로 방제가가 높았으며, A-2 균주 단독 처리구보다 CH-9, CH-10 균주의 혼합 처리한 처리구의 방제가가 각각 90.3, 86.6%로 나타내어 유의성이 없었다. 따라서, 항균활성균과 키티나아제 활성균의 혼합처리에 의한 방제효과에 대한 상승효과가 확인되지 않았다(Table 9).

Table 9. Disease control of antifungal and 키티나아제 activity bacterial isolates against leaf mold caused by *Fulvia fulva* TF 13 on tomato at pots in a growth chamber

Isolates of antiagonistic bacteria	9 days after	
	Disease incidence (%)	Control value (%)
A-2 (30ml ^a)	28.8	71.2b
A-2 (50ml)	16.3	83.7ab
CH-9	37.4	62.6c
CH-10	35.9	64.1c
A-2 (30ml)+ CH-9	26.0	74.0b
A-2 (30ml)+ CH-10	26.9	73.1b
A-2 (50ml)+ CH-9	9.7	90.3a
A-2 (50ml)+ CH-10	13.4	86.6a
Pathogen only	100	0.0de
Control	0.0	100a

^a 50ml, 30ml ; quality of treated bacterial suspension

2) CH-67 균주 단독처리에 의한 방제효과

추가로 선발된 키티나아제 활성세균 CH-67 균주를 삼각플라스크 및 발효기에서 배양하여 정식한지 3~4주된 토마토에 처리하여 토마토 잎곰팡이병원균에 대한 방제효과를 생육실내 포트에서 검정하였다. 그 결과, 플라스크배양에서의 세균배양액(cell culture, 항생물질+ 세균), 배양상등액(supernatant, 항생물질), 세균집균액(cell suspension, 세균부유액) 처리구는 각각 98.7%, 98.0%, 93.5%의 방제가가 조사되었으며 서로간의 유의차는 없었다. 또한, 발효기내 배양에서는 세균배양액(cell culture, 항생물질+ 세균), 배양상등액(supernatant, 항생물질), 세균집균액(cell suspension,

세균부유액) 처리구에서 각각 91.3%, 96.7%, 95.0%로 플라스크배양과 마찬가지로 매우 높은 방제가를 나타내었다(Table 10, Fig. 18)

이상의 실험결과. 토마토 잎곰팡이병균에 대하여 항균물질활성균으로 확인된 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주는 *in vitro* 와 *in vivo* 실험에서 우수 길항균으로 최종 선발 되었다. 또한, Chitinase 활성균으로 확인된 CH-9, CH-10 와 CH-67 균주도 *in vitro*와 *in vivo* 실험결과 우수 길항균으로 최종 선발 되었다.

Table 10. Disease control effects of culture, cell, supernatant of *B. cepacia* CH-67 and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* on treated tomato plants in a growth chamber

Culture conditions	Treatments	2 days			
		Disease severity (%) ^a			Control value (%) ^b
flask culture	cultures+Pa	1.1	1.1	0.4	98.7 (±1.3) ab
	supernatant+Pa	1.1	0.4	1.8	98.0 (±3.6) ab
	cell+Pa	3.2	4.0	3.6	93.5 (±0.7) ab
fermenter culture	cultures+Pa	7.9	4.0	2.5	91.3 (±5.1) b
	supernatant+Pa	1.8	2.2	1.4	96.7 (±0.8) ab
	cell+Pa	2.5	4.0	1.8	95.0 (±2.8) ab
	Triflumizole	3.6	6.5	2.5	92.4 (±3.8) ab
	Pathogen(Pa) only	61.5	58.3	45.7	0.0(±0.0) c
	Control	0.0	0.0	0.0	100 (±0.0) a

^a : Disease severity index (%) was made by estimating the percent (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva* TF13

^b : Control value (%) = [(Disease severity index in control plants - Disease severity index in treated plants) / Disease severity index in control plants] x 100

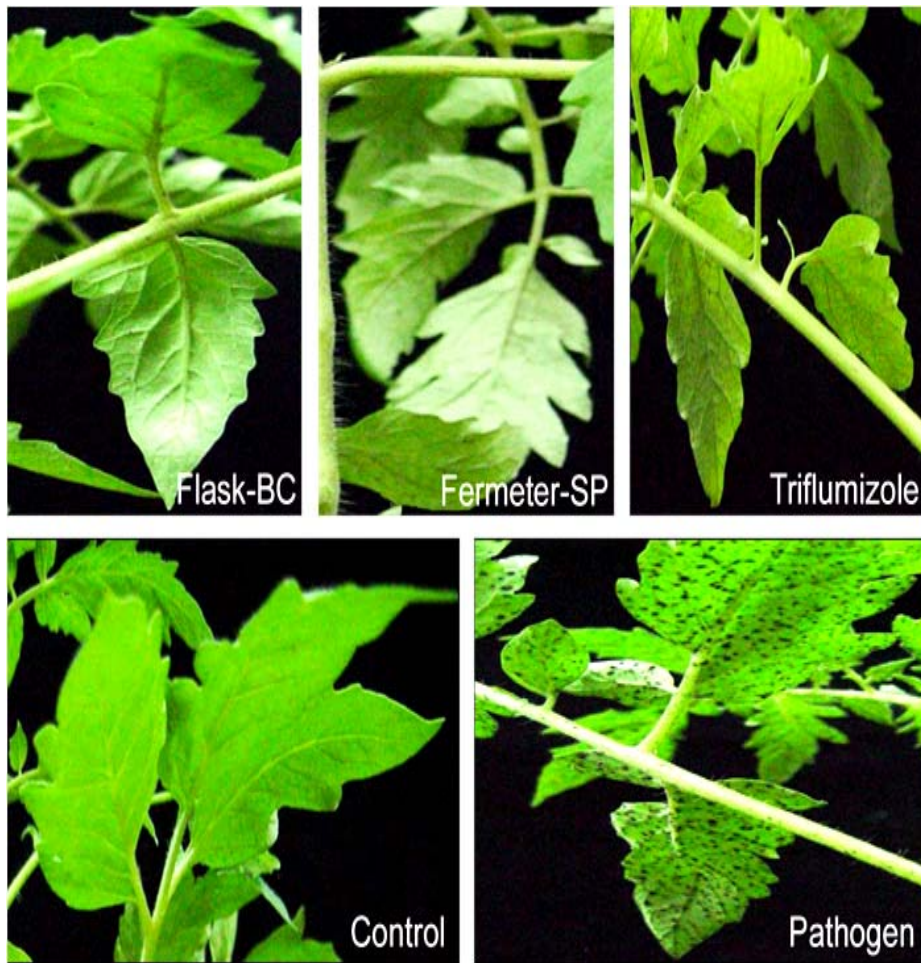


Fig. 18. Disease control effects of bacterial cultures from a flask culture, cell-free culture supernatant from a fermentation and chemical fungicide against the leaf mold caused by *F. fulva* TF13 on tomato plants in a growth chamber.

제 3 절 항균물질 활성균의 대량배양기술확립

1. 연구수행 방법

가. *B. amyloliquefaciens* A-2 균주의 최적배양조건 확립

1) 삼각 플라스크 배양

가) 최적 배양 시간, 생육온도 pH의 영향

잇곰팡이병균 (TF 13)에 대하여 우수한 길항력을 보인 A-2 균주의 최적 배양 시간, 생육온도 및 pH를 조사하였다. 최적 배양 시간의 검정방법은 NB배지에서 24시간 종균 배양한 A-2균주의 세균부유액 5 ml을 500 ml의 삼각플라스크의 NB배지에 접종하여 35℃에서 160 rpm으로 24시간 진탕 배양하여 매 2시간마다 증식정도를 조사하였다. 각 시료는 10배 희석하고 spectrophotometer (550 nm)에서 OD값을 측정하였다.

앞서의 생육조사에서와 동일한 방법으로 생육온도 및 pH의 영향을 조사하였다. 온도 범위는 5℃ 간격으로 20~45℃사이에서 실시하였고, pH의 영향조사는 pH 4~8사이에서 pH 1 간격으로 조사되었다. 24시간 배양한 각 시료는 10배 희석하여 분광광도계 (spectrophotometer, Pharmacia, Biotech, UK)에서 OD값을 조사하였다.

나) 탄소원

우수 길항세균인 A-2 균주의 성장과 항균물질 활성에 효과적인 배지를 선별하기 위하여, 질소원 yeast extract 0.5%가 포함된 기초배지 (0.05% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0005% $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.0005% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.0025% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$)에 저분자 탄소원 4종류 (glucose, fructose, lactose, sucrose)와 고분자 탄소원 4종류 (corn starch, rice oil, rice flour, molasse,)의 탄소원 3.0%를 종류별로 첨가하여 공시 길항세균을 접종 후 3일간 진탕배양 (35℃, 180 rpm) 하였다. 이때, 균주의 증식조사를 위해 24, 36, 48시간 췌 균체를 회수하여 10단계 희석평판도말법으로 생균수를 측정하였다. 대조구로는 NB배지를 사용하였다.

다) 질소원

A-2균주의 생육에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위해 기초배지에 앞서의 실험에서 공시세균 증식에 효과적인 탄소원으로 확인된 3% rice oil (상품명 : 세림현미)를 첨가하고 질소원

2종류 (yeast extract, NH_4NO_3)을 각각 0.5%로 첨가하여 세균부유액 ($A_{550}=1.0$) 1 ml을 접종한 후 진탕배양 (35°C , 180 rpm)한 뒤 30 시간 쯤 균체를 회수하여 10단계 희석평판도말법으로 생균수를 측정하였다.

2) 발효기 배양

발효기 (7 L jar fermenter)에 삼각플라스크실험에서 우수하였던 rice oil (세림현미)과 yeast extract를 4 L의 기초배지에 각각 3%, 0.5%씩 첨가하고 NB배지에 종균 배양된 길항세균 A-2를 400 ml접종한 후 35°C , 350 rpm, 1.5 atm에서 72 시간 배양하였다. 발효가 진행되는 동안 배양기내의 생균수를 24시간 간격으로 72시간 까지 측정하여 발효기 배양에서의 생균밀도를 검정하였다.

나. 키티나아제 활성균주의 최적 배양조건

1) 최적 배양온도와 pH

앞서의 생육조사와 동일한 방법으로 수행하며 온도는 5°C 간격으로 $25\sim 40^\circ\text{C}$ 사이에서 조사하고, pH는 pH 1의 간격으로 $5\sim 8$ 사이에서 조사되었다. 각 시료는 10배 희석하고 spectrophotometer를 사용하여 chitinase activity (mU/ml)를 측정하였다. 각 처리구당 5반복, 3회 실시하였다.

2) 탄소원

길항세균 A-2 균주의 대량배양을 위한 탄소원 선발 실험에서와 같은 방법으로 행하였으며, 대조구로서 LB배지와 0.5% colloidal chitin이 포함된 LB배지를 추가하여 키티나아제 활성량을 조사하였다.

다. *B. cepacia* CH-67 균주의 최적배양조건 확립

1) 삼각플라스크 배양

가) 탄소원

200 ml *Pseudomonas* 배양용 기초배지 (K_2HPO_4 0.125%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, KH_2PO_4 0.038%)에 탄소원(Glucose, Lactose, Fructose, Ethanol, Sucrose, Glycerol)을 각각

3% 되도록 500 ml 용 삼각플라스크에 첨가하였다. 여기에 NB배지에서 24시간 동안 전배양한 세균부유액 ($A_{550}=1.0$) 1 ml을 접종하고 65시간 동안 진탕배양 (30°C , 180 rpm)하여 배양액을 회수하여 분광광도계 (550 nm)로 O.D 값을 측정하였다. 이때 대조구로는 기초배지를 사용하였다. 또한 고분자 물질 (Rice oil, Rice bran, Wheat bran, Sun cremy, Corn starch, Yeast food)을 기초배지에 3% 되도록 첨가하여 NB배지에서 24시간 동안 전배양한 세균부유액 ($A_{550}=1.0$) 1 ml을 접종하고 78시간 동안 진탕배양 (30°C , 180 rpm)하여 24시간 간격으로 균체를 회수하여 10단계 희석평판도말법으로 생균수를 측정하였다.

나) 질소원

CH-67균주의 생육에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위해 기초배지에 탄소원으로 Glucose (3%)를 첨가하고 공시된 저분자 질소원 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , KNO_3)을 각각 0.5%로 첨가하여, 세균부유액 ($A_{550}=1.0$) 1 ml을 접종한 후 64시간 동안 진탕배양 (30°C , 180 rpm)한 뒤 배양액을 회수하여 분광광도계 (550nm)에서 측정하였다. 이때 대조구로서 기초배지를 사용하였다.

2) 발효기 배양

Pseudomonas 배양용 기초배지 4 L에 삼각플라스크배양에서 선발된 질소원 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%와 고분자 물질인 Rice oil, Wheat bran, Rice bran 을 각각 3%로 첨가하여 7 L 발효기에 넣은 후, 전 배양된 CH-67균주 부유액 ($A_{550}=1.0$) 400 ml을 접종하고 300 rpm, 1.5 atm, 30°C 의 환경 하에서 배양하면서 12시간 간격으로 96시간까지 배양액내 pH와 D.O값의 변화를 측정하고 균체를 획득하여 10단계 희석평판법을 통하여 생균수를 검정하여 최적배양조건을 최종적으로 확립하였다.

2. 연구결과

가. *B. amyloliquefaciens* A-2 균주의 최적배양 조건 확립

1) 항균물질활성균 A-2균주의 배양적 특성 조사

가) 삼각플라스크배양

(1) 배양시간, 생육온도 및 초기 pH의 영향

우수 길항균으로 선발된 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주의 최적배양 조건을 조사한 결과, A-2 균주는 배양 14 시간 쯤 최대 값에 도달하였으며 24시간 이후에는 서서히 감소하는 양상을 보였다(Fig. 19). A-2균주의 증식에 적합한 온도는 35℃에서 $A_{550}=0.8$ 로 세균밀도가 가장 높아 적합하였으며, 그 다음으로 30℃, 40℃순 이었고, 25℃ 이하와 45℃에서는 세균밀도가 낮았다(Fig. 20). 한편, 배양액의 초기 pH가 4.0일 때는 세균의 생육이 대부분 저지되는 것을 확인하였고, pH 5와 pH 8에서는 생육정도가 양호하였으나, pH 6과 pH 7에서 세균밀도가 가장 높았다(Fig. 21).

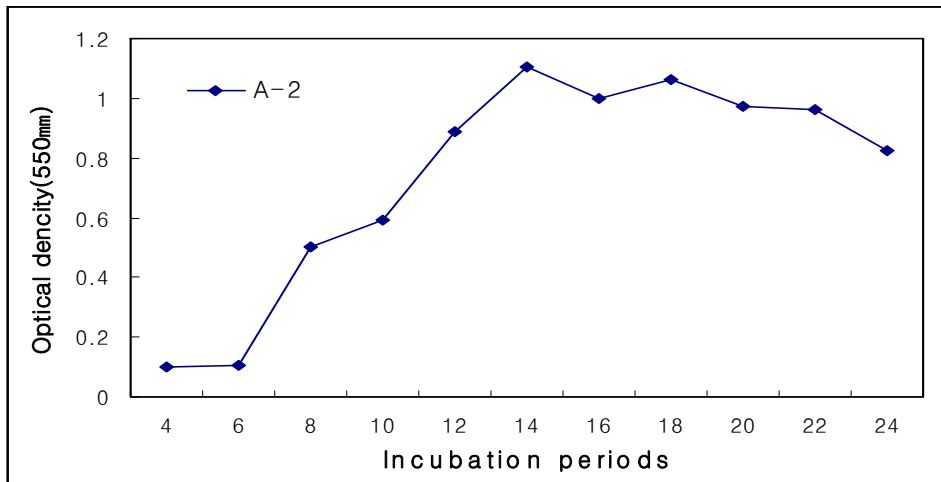


Fig. 19. Growth curve of *B. amyloliquefaciens* A-2 strain in NB medium at 35℃ for 24 hours.

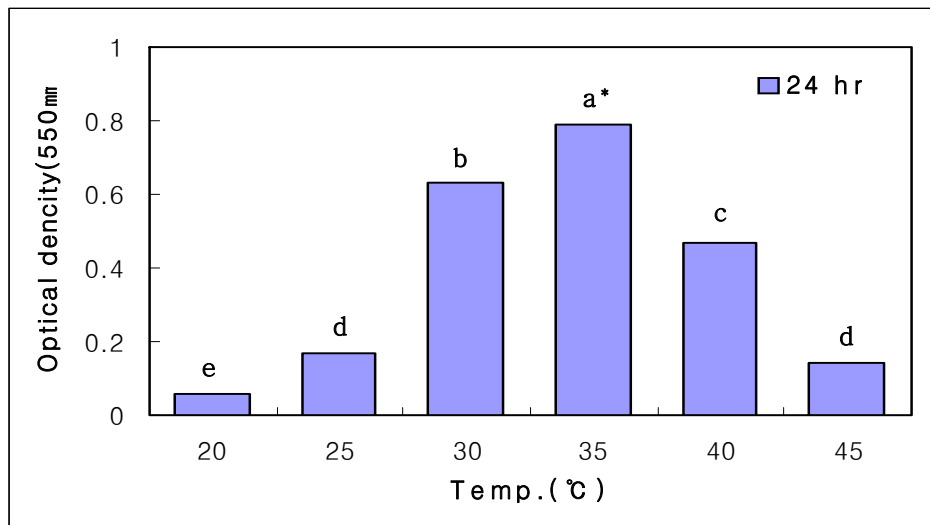


Fig. 20. Effect of temperature (°C) for the growth of *B. amyloliquefaciens* A-2 strain in NB medium for 24 hours.

* The same letter indicates the means are not significantly different ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test.

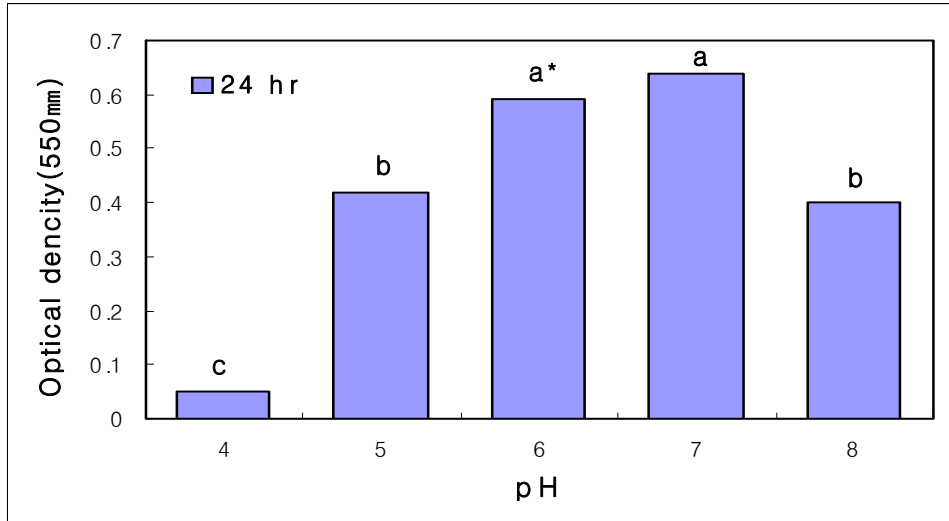


Fig. 21. Effect of pH for the growth of *B. amyloliquefaciens* A-2 strain in NB medium for 24 hours.

* The same letter indicates the means are not significantly different ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test.

(2) 탄소원

플라스크 배양에서 탄소원이 세균생장에 미치는 영향을 조사하기 위해 질소원 (yeast extract)이 0.5% 포함된 기초배지에 저분자와 고분자 탄소원을 각각 3.0% 씩 첨가한 후, A-2균주의 세균부유액 (1.0×10^8 cfu/ml)를 접종하고 3일간 진탕배양하여 균주의 증식 정도를 조사하였다. 그 결과, 저분자 탄소원은 lactose와 sucrose가 24시간 배양 시 각각 5.0×10^{10} cfu/ml, 1.0×10^{10} cfu/ml로 높았으며(Table 11), 고분자 탄소원에서는 현미유가 24시간 배양 시 가장 높은 세균밀도인 5.1×10^{12} cfu/ml를 나타내었다(Table 12). 현미유는 72시간 배양까지는 시간이 지남에 따라 밀도가 다소 낮아지는 양상을 보이나, 다른 처리구 보다는 높은 세균밀도를 나타내어 현미유를 A-2균주의 생육에 우수한 탄소원으로 선발되었다.

Table 11. Effect of low molecular weight of carbon sources on the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 at 35°C, 180 rpm in a flask culture

Carbon sources	Cell density (cfu/ml) ^a		
	24 hrs	36 hrs	48 hrs
glucose	1.0×10^9	1.2×10^9	9.0×10^8
fructose	2.0×10^9	4.8×10^9	2.6×10^9
lactose	5.0×10^{10}	7.5×10^{10}	1.5×10^{10}
sucrose	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.1×10^{10}
control (NB)	7.5×10^7	1.4×10^8	3.4×10^7

^a The number of cells was counted by a number of colony on a NA media with 10-fold dillution methods

Table 12. Effect of high molecular weight of carbon sources on the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 at 35°C, 180 rpm in a flask culture

Carbon sources	Cell density (cfu/ml) ^a		
	24 hrs	36 hrs	48 hrs
corn starch	3.7×10^8	6.0×10^8	3.8×10^8
rice oil	5.1×10^{12}	7.5×10^{11}	2.9×10^{11}
rice flour	4.5×10^{10}	1.8×10^{10}	7.6×10^9
molasse	9.0×10^{11}	6.9×10^{10}	1.0×10^9
dough conditioner	1.6×10^9	3.0×10^9	6.7×10^8
control (NB)	7.5×10^7	1.4×10^8	3.4×10^7

^a The number of cells was counted by a number of colony on a NA media with 10-fold dillution methods

(3) 질소원

A-2균주의 증식에 우수한 탄소원인 현미유에 질소원으로 yeast extract 또는 NH_4NO_3 를 첨가하여 세균증식의 효과를 조사하였다. 질소원인 yeast extract를 현미유에 첨가하여 30시간 배양한 경우 생균수가 5.9×10^{11} cfu/ml로 가장 높았다(Table 13).

따라서, 기초배지 (K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%, FeSO_4 0.0025%)에 현미유 3.0%, yeast extract 0.5%를 첨가한 조성을 A-2 균주의 대량배양용 배지로 최종 선발하였으며, 이를 현미유배지로 명명하였다.

Table 13. Effect of nitrogen sources on the growth of *B. amyloliquefaciens* A-2 at 35°C, 180 rpm in a flask culture

Carbon source (3%)+Nitrogen sources (0.5%)	30 hrs (cfu/ml) ^a
rice oil + yeast extract	5.9×10^{11}
rice oil + NH_4NO_3	2.6×10^9
rice oil only	4.8×10^7
control (NB)	3.2×10^7

^a The number of cells was counted by a number of colony on a NA media with 10-fold dillution methods

나) 발효기(Jar fermenter)에서의 배양

삼각플라스크 배양에서 대량배양용 배지로 선발된 현미유 배지를 발효기 (35℃, 350 rpm, 1.5 atm, pH 6~7)에서 A-2균주를 72시간 대량배양하여 생균수를 측정한 결과, 초기 세균 수 1×10^8 cfu/ml에서 7.0×10^{11} cfu/ml로 증가되었다(Table 14).

Table 14. Population increase of *B. amyloliquefaciens* A-2 in rice oil medium using 7 L jar fermenter at 35℃ and 350 rpm and 1.5 atm

Culture time	Cell density (cfu/ml) ^a
0 hr	1.0×10^8
24 hrs	1.4×10^{11}
48 hrs	2.0×10^{11}
72 hrs	7.0×10^{11}

^a The number of cells was counted by a number of colony on a nutrient agar plate with 10-fold dillution methods

나. 키티나아제 활성균 CH-10의 대량배양용 배지선발

1) 생육온도, 초기 pH 조건

키티나아제 활성균 CH-10의 최적 생육온도를 조사한 결과, 25℃ 배양 시에 가장 높은 효소활성을 나타내었으며, 전반적으로 배양온도에 따른 효소에는 큰 변화를 보이지 않았다. 하지만, 접종 36시간 이후에는 활성이 서서히 감소되는 양상을 보였으며, 48시간 이후에는 효소활성은 급격히 감소하였다(Fig. 22).

최적 초기 pH 조사에서는 pH 6에서 36시간 배양하면 가장 높은 효소활성을 보였으나 48시간 후 효소활성도가 감소되었으며, 반면 pH 7에서는 안정적인 효소활성이 관찰되었다. 이에 반해 pH 5에서는 활성이 거의 나타나지 않았으며, pH 8에서는 36시간 배양이후 급격하게 활성이 낮아졌다(Fig. 23). 따라서 안정적인 효소의 활성을 유도할 수 있는 조건으로 pH 7의 배양배지를 최종 결정하였다.

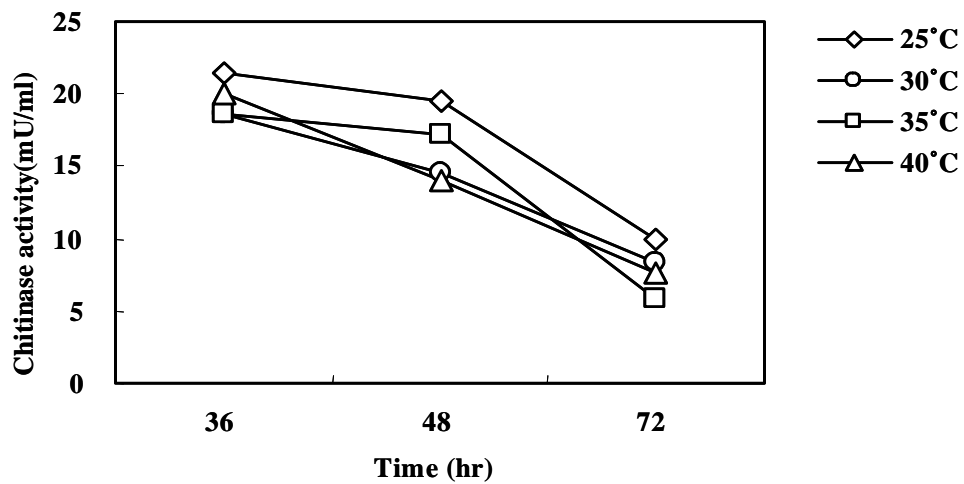


Fig. 22. Effect of temperature on the extracellular chitinase production of *Cellulosimicrobium cellulans* CH-10, using *p*-nitrophenyl- β -D-N,N'-diacetylchitobiose as the substrate. The CH-10 strain was grown in LB medium supplemented with 0.2% colloidal chitin.

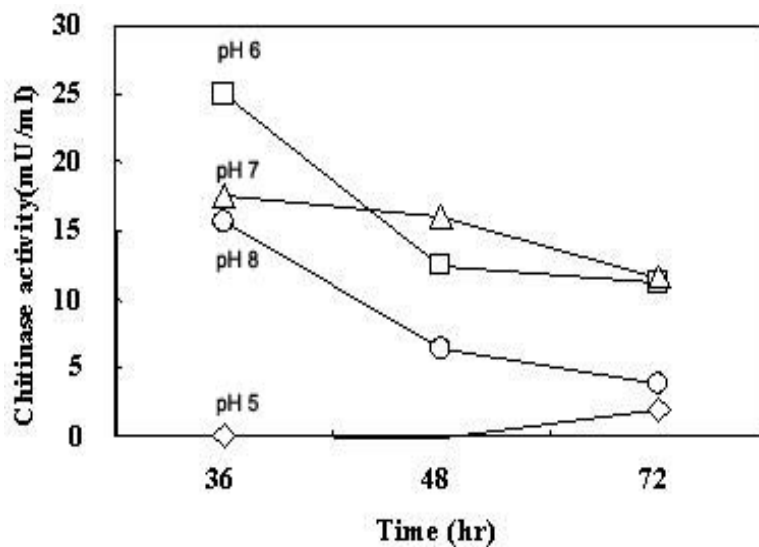


Fig. 23. Effect of pH on the extracellular chitinase production of *Cellulosimicrobium cellulans* CH-10, using *p*-nitrophenyl- β -D-N,N'-diacetylchitobiose as the substrate. The CH-10 strain was grown in LB medium supplemented with 0.2% colloidal chitin.

2) 탄소원

저분자 탄소원 4종과 고분자 탄소원 5종을 공시하여 질소원인 yeast extract 0.5%를 첨가한 기초배지에 CH-10균주를 접종하고 삼각플라스크에서 3일간 진탕배양 후 세균의 증식정도를 조사한 결과, 저분자 탄소원 Fructose에서 24시간 배양 시 2.0×10^{10} cfu/ml, 48시간 배양 시 7.9×10^{10} cfu/ml로 지속적으로 증가하는 양상을 보였으며, 고분자 탄소원에서는 개량제가 36시간 배양까지 9.2×10^{11} cfu/ml로 LB배지에 chitin 0.5% 첨가한 것보다 높았다. CH-10균주의 증식에 우수한 최적 탄소원으로는 개량제 (dough conditioner)가 선발되었다(Table 15).

따라서, 기초배지(0.05% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0005% $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.0005% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.0025% $FeSO_4$)에 개량제 3.0%를 첨가한 개량제배지가 CH-10균주의 대량배양용 배지로 선발되었다.

Table 15. Effect of various carbon sources on cell growth of *Cellulosimicrobium cellulans* CH-10 at 35°C, 180 rpm in a flask culture

Carbon sources	Cell density (cfu/ml) ^a		
	20 hrs	30 hrs	45 hrs
glucose	5.7×10 ¹⁰	2.9×10 ¹¹	1.0×10 ¹⁰
fructose	2.0×10 ¹⁰	5.7×10 ¹¹	7.9×10 ¹⁰
lactose	8.8×10 ⁸	4.0×10 ⁹	1.2×10 ⁹
sucrose	6.3×10 ⁸	4.0×10 ⁹	9.0×10 ⁸
corn starch	4.5×10 ⁸	3.0×10 ⁹	1.3×10 ⁹
rice oil	8.1×10 ⁹	6.0×10 ¹⁰	2.2×10 ⁹
rice flour	3.0×10 ⁹	3.2×10 ¹⁰	6.0×10 ⁹
molasses	4.4×10 ¹⁰	1.8×10 ⁹	9.2×10 ⁹
dough conditioner	6.3×10 ¹¹	9.2×10 ¹¹	3.4×10 ¹⁰
LB+ Chitin 1.5%	1.5×10 ¹⁰	1.7×10 ¹⁰	2.3×10 ⁹
control (LB)	4.1×10 ⁹	5.4×10 ¹⁰	2.6×10 ¹⁰

^a The number of cells was counted by a number of colony on a LB agar plate with 10-fold dilution methods

다. *B. cepacia* CH-67 균주의 최적배양조건 확립

1) 삼각플라스크배양

가) 탄소원

Pseudomonas 배양용 기초배지에 탄소원 3%를 종류별로 첨가하고, CH-67균주의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과, 저분자 탄소원의 실험에서 Sucrose와 Glucose가 65 시간 췌에 각각 $A_{550}=2.78$, $A_{550}=2.76$ 으로 가장 좋았다(Fig 23). 그러나, 고분자 탄소원 선발에서는 고분자 물질인 밀기울 (Wheat bran), 미강 (Rice bran)에서 78 시간 췌에 각각 1.7×10^9 cfu/ml, 1.5×10^9 cfu/ml로 가장 높은 생균수가 조사되었으며, 대조구인 Glucose의 7.4×10^8 cfu/ml에 비해 현저히 높았다(Fig 24). 따라서, CH-67 균주의 생육에 가장 효과적인 고분자 탄소원을 1차적으로 밀기울과 미강으로 선발하고, 더불어 사용이 편리하고 영양분이 풍부한 현미유 (Rice oil)를 첨가하여 발효기내 배양실험을 통해 최종적으로 최적 고분자 탄소원을 선발하고자 하였다.

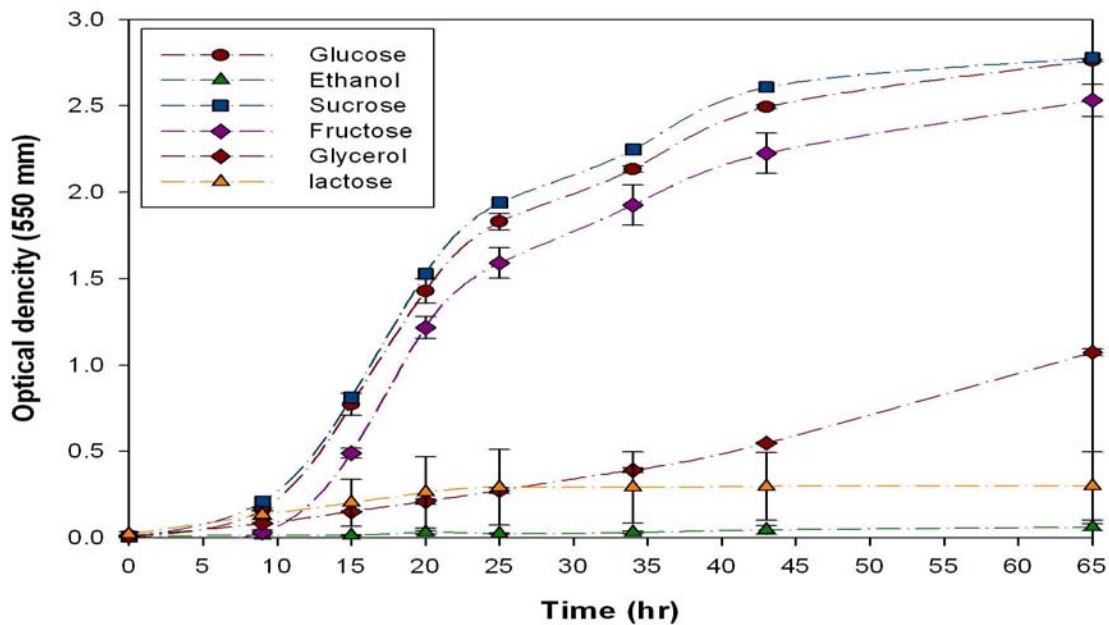


Fig. 23. Population increase of *Burkholderia cepacia* CH-67 in the basal medium with 3% of various carbon sources at 30°C, 180 rpm in flask culture for 65 hr

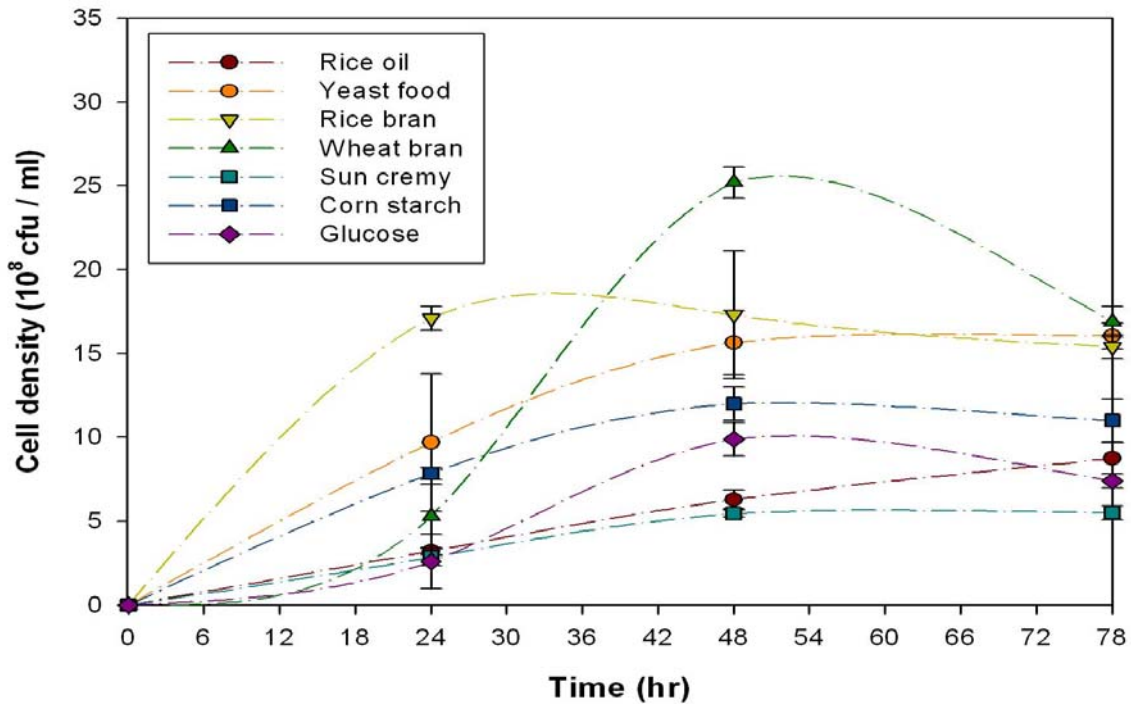


Fig. 24. Population increase of *B. cepacia* CH-67 in the basal medium with 3% of high molecular weight carbon sources and 0.5% of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

나) 질소원

CH-67 균주의 생육에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위해 Glucose (3%)가 첨가된 *Pseudomonas* 배양용 기초배지에 질소원으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , KNO_3 을 각각 0.5% 첨가하고 전 배양된 CH-67균주를 접종하여 64시간동안 O.D값을 측정 한 결과 각각 $A_{550}=2.4$, $A_{550}=2.3$, $A_{550}=2.2$ 로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 가장 높게 나타났다(Fig 25). 이상의 플라스크배양의 실험 결과로 CH-67 균주의 대량배양용 질소원으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 선발되었다.

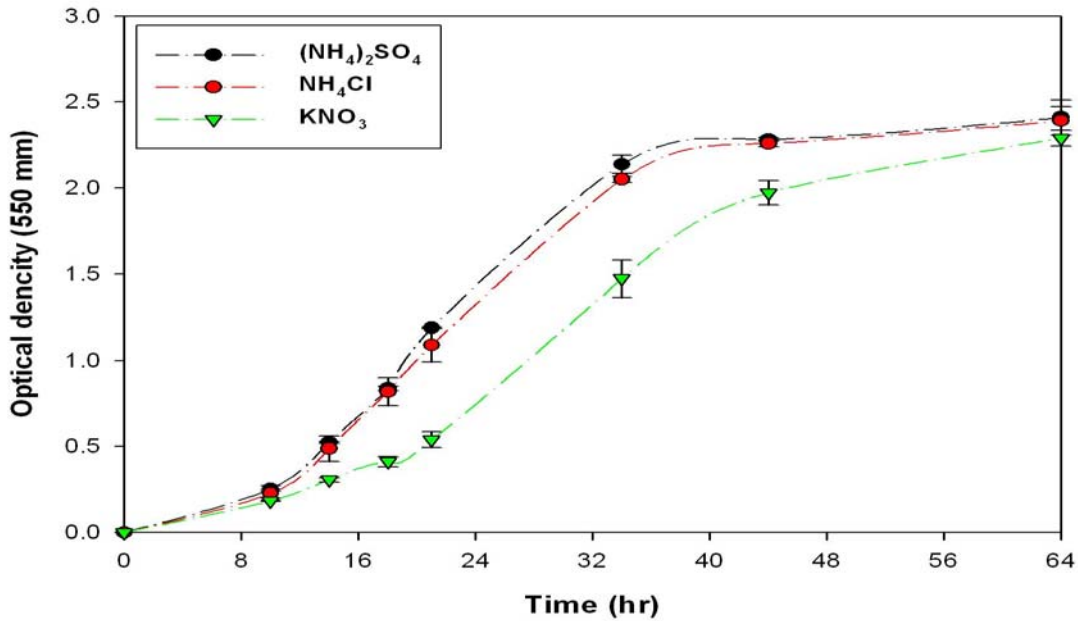


Fig. 25. Effect of nitrogen sources on the cell growth of *B. cepacia* CH-67 in the basal medium

2) 발효기 배양

대량배양용 배지를 최종선발하기 위해 플라스크배양 실험에서 우수한 질소원으로 선발된 (NH₄)₂SO₄ 0.5%가 첨가된 기초배지 4 L에 고분자물질인 밀기울 (Wheat bran), 미강 (Rice bran), 현미유 (Rice oil) 3%를 각각 첨가한 후 여기에 종균배양된 CH-67 배양액 400 ml을 접종하여 96시간 동안 시간별로 세균밀도를 조사하였다. 그 결과, 최대 세균증식 시기에 따라 각각 밀기울, 미강에서의 생균수는 4.0×10^9 cfu/ml, 1.3×10^9 cfu/ml로 조사되었고, 현미유에서는 1.7×10^{10} cfu/ml로 앞서의 플라스크 배양시보다 생균수가 높게 나타났다(Fig 26-28).

이상의 플라스크 및 발효기 배양 결과로 기초배지에 3%의 현미유 (Rice oil)와 0.5%의 (NH₄)₂SO₄를 첨가한 배지를 CH-67균주의 대량배양용 배지로 최종 선발하였다.

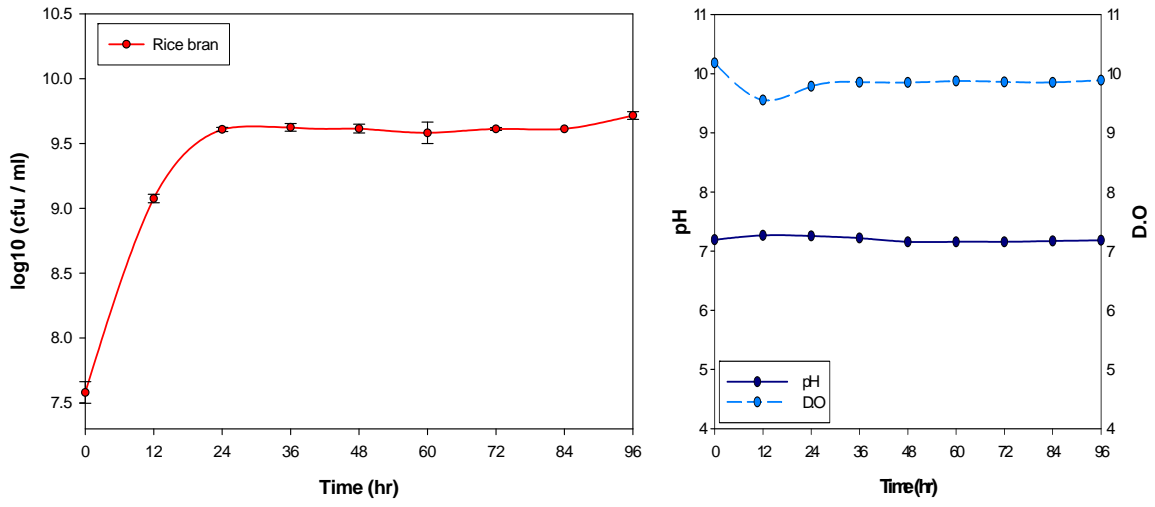


Fig. 26. Population growth of *B. cepacia* CH-67 in rice bran media using 7-L jar fermenter at 30°C and 300 rpm and 1.5 atm.

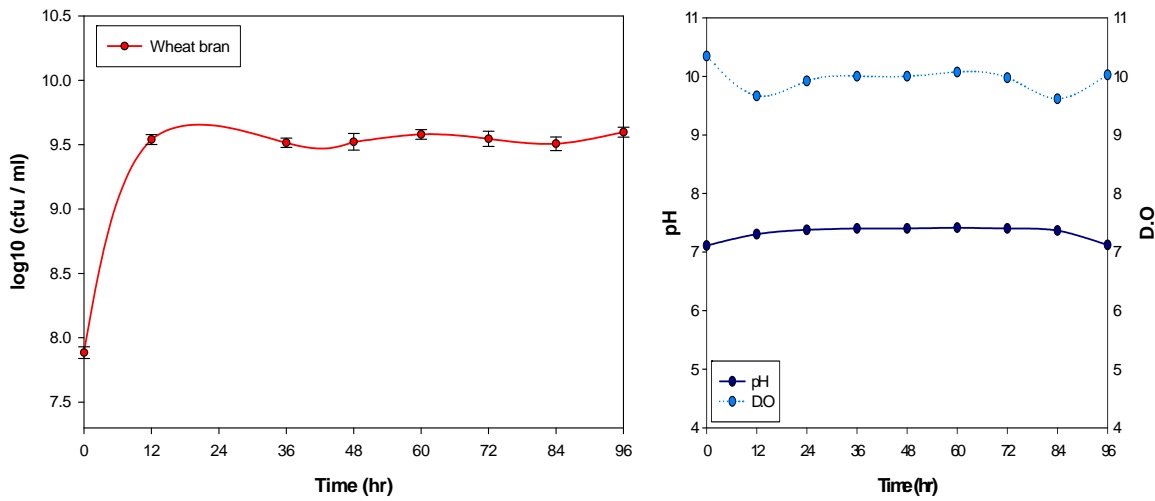


Fig.

3. Fig. 27. Population growth of *B. cepacia* CH-67 in wheat bran media using 7-L jar fermenter at 30°C and 300 rpm and 1.5 atm.

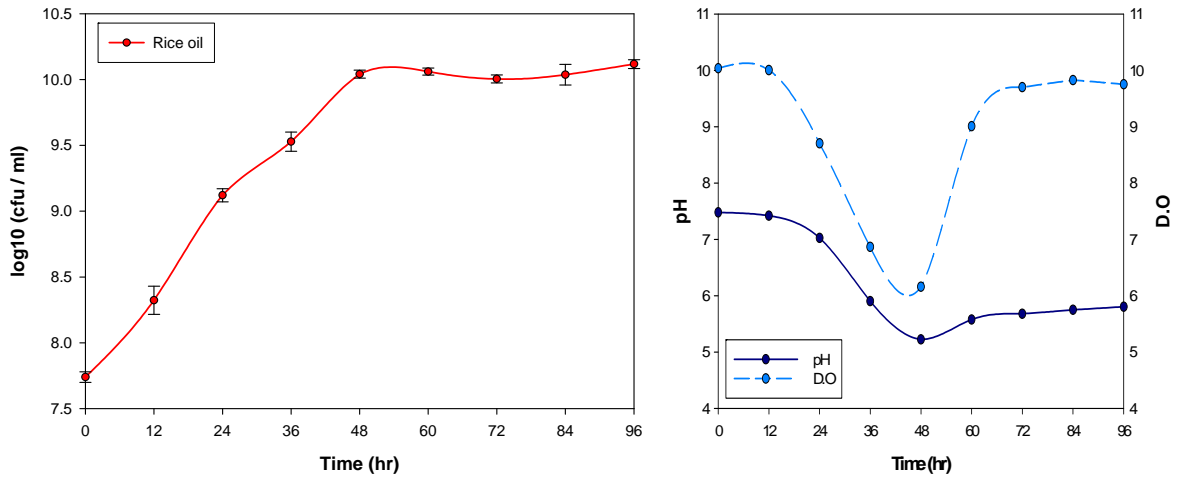


Fig. 28. Population growth of *B. cepacia* CH-67 in rice oil media using 7-L jar fermenter at 30°C and 300 rpm and 1.5 atm.

제 4 절 잎곰팡이병 방제용 엽면살포제 미생물농약 제조기술확립

1. 연구수행 방법

가. A-2 균주를 이용한 수화제형 및 액상수화제형의 제형화

1) 1차 제형화 (A2-A~A2-L 수화제)

7 L 발효기에 현미유배지 4 L 넣고 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주를 72시간 배양 후, 여기에 옥수수 전분, 타피오카 전분, 변성전분, 썬크리미, 썬사이즈, 썬슈퍼젤, 썬프리젤 등의 전달매체를 혼합하여 수화제형 10종(A2-A, A2-B, A2-E, A2-F, A2-G, A2-H, A2-I, A2-J, A2-K, A2-L), 액상수화제형 2종(A2-C, A2-D)의 미생물농약을 제조하였다

2) 2차 제형화 (A2-M, A2-MP, A2-O 수화제)

7 L 발효기에 현미유배지 4 L를 넣고 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주를 접종하여 72시간 배양(30℃, 350 rpm, 1.5 atm, pH 6~7)하고 이 배양액에 기존의 구슬형(Bead type) 타피오카 전분의 단점으로 인해 이를 끊이거나 파우더형의 타피오카전분 등을 사용하여 이를 전달매체로 첨가하고 혼합하여 수화제형 3종 (A2-M, A2-MP, A2-O)을 추가 제조하였다.

나. CH-10균주를 이용한 수화제형 미생물농약의 제형화

7 L 발효기에 대량배지인 개량배지 4 L를 넣고 키티나아제 활성이 우수한 것으로 확인된 *C. cellulans* CH-10 균주를 접종하여 72시간동안 대량배양하였다. 이 배양액에 타피오카 전분, 변성전분, 올리브유 등의 전달매체를 첨가하고 혼합하여 수화제형 미생물농약 5종 (CH10-G, CH10-H, CH10-I, CH10-J, CH10-K)을 제조하였다.

다. CH-67 균주를 이용한 수화제형 미생물농약의 제형화

1) 1차 제형화 (CH67-A, CH67-B, CH67-C 수화제)

7 L 발효기에 현미유배지 4 L를 넣고 *B. cepacia* CH-67 균주를 접종하여 72시간 배양(30℃, 350 rpm, 1.5 atm, pH 6~7)하고 이 배양액에 Beads type의 타피오카 전분, Sun creamy, Dextrin, Sugar 등의 전달매체를 첨가하고 혼합하여 수화제형 CH67-A, CH67-B, CH67-C를 제조하였다(Table 20).

2) 2차 제형화 (CH67-D, CH67-F 수화제)

7 L 발효기에 현미유배지 4 L를 넣고 *B. cepacia* CH-67 균주를 접종하여 72시간 배양 (30℃, 350 rpm, 1.5 atm, pH 6~7)하고 이 배양액에 Powder type Tapioca, Sun creamy, Sucrose등의 전달매체를 혼합하여 수화제형 CH67-D, CH67-F를 제조하였다.

2. 연구결과

가. A-2균주를 이용한 수화제형 및 액상수화제형의 제형화

1) 전달매체 선발

제형화 선발을 위한 전달매체로써 Beads type의 타피오카 전분, 옥수수 전분, 변성전분, 썬크리미, 썬사이즈, 썬슈퍼젤, 썬프리젤 등을 사용하여 수화제형으로 제조하였다. 그러나 Beads type의 타피오카 전분이 물에 대한 용해성이 떨어지고 살포기의 입구를 막는 등 여러가지 단점이 있어 이를 보완하기 위해 물에 대한 용해도도 높고 증량제의 효과도 있는 Powder type의 타피오카와 썬크리미, 슈크로오스 (Sucrose) 등을 혼합하여 제형화를 재시도하였다. 본 연구에서 시도된 제형화 기술은 변성전분과 타피오카 전분으로써 가격 면에서도 저렴하여 산업경쟁력이 있으며, 자외선 차단 및 부착정도와 증량제로서의 기능도 있어 이를 전달매체로 선발하였다.

2) 제형화

가) A2-A~A2-L 수화제

7 L 발효기에 현미유배지 4 L넣고 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주를 72시간 배양 후, 여기에 옥수수 전분, 타피오카 전분, 변성전분, 썬크리미, 썬사이즈, 썬슈퍼젤, 썬프리젤 등의 전달매체를 혼합하여 수화제형 10종 (A2-A, A2-B, A2-E, A2-F, A2-G, A2-H, A2-I, A2-J, A2-K, A2-L), 액상수화제형 2종 (A2-C, A2-D)의 미생물농약을 제조하였다(Table 16, 17).

Table 16. Composition of wettable powder-type and suspension concentrate wettable powder-type formulations using commercial additive, carrier and *B. amyloliquefaciens* A-2

Type	Formulation	Composition per liter of bacterial culture broth
Wettable powder	A2-A	corn starch 400 g , modified starch 100 g
	A2-B	corn starch 400 g , olive oil 50 g , sucrose 25 g
Soluble concentrate	A2-C	sun creamy 80 g
	A2-D	sun size 80 g
Wettable powder	A2-E	sun supersel 80 g
	A2-F	sun fregel 400 g

Table 17. Composition of wettable powder-type formulations using commercial additive, carrier and *B. amyloliquefaciens* A-2

Type	Formulation	Composition per liter of bacterial culture broth
Wettable powder	A2-G	bead typed tapioca starch 400 g , modified starch 100 g
	A2-H	bead typed tapioca starch 400 g , olive oil 50 g , sucrose 25 g
	A2-I	bead typed tapioca starch 400 g , sun fregel 400 g
	A2-J	bead typed tapioca starch 400 g , sucrose 100 g
	A2-K	bead typed tapioca starch 400 g
	A2-L	corn starch 400 g

나) A2-M, A2-MP, A2-O 수화제

7 L 발효기에 현미유배지 4 L를 넣고 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주를 접종하여 72시간 배양(30℃, 350 rpm, 1.5 atm, pH 6~7)하고 이 배양액에 기존의 구슬형(Bead type) 타피오카 전분의 단점으로 인해 이를 끊이거나 파우더형의 타피오카전분 등을 사용하여 이를 전달매체로 첨가하고 혼합하여 수화제형 3종을 추가 제조하였다(Table 18).

Table 18. Composition of wettable power-type formulations using commercial additives, carriers and *B. amyloliquefaciens* A-2 cultures

Type	Formulation	Composition per liter of bacterial culture broth
Wettable powder	A2-M	boiled tapioca starch 400 g, olive oil 50 g, sucrose 25 g
	A2-MP	powder typed tapioca starch 400 g, olive oil 50 g, sucrose 25 g
	A2-O	Sun creamy 80 g

나. CH-10균주를 이용한 수화제형 미생물농약의 제형화

7 L 발효기에 대량배지인 개량배지 4 L를 넣고 키티나아제 활성이 우수한 것으로 확인된 *C. cellulans* CH-10 균주를 접종하여 72시간동안 대량배양하였다. 이 배양액에 타피오카 전분, 변성전분, 올리브유 등의 전달매체를 첨가하고 혼합하여 수화제형 미생물농약 5종을 제조하였다 (Table 19).

Table 19. Composition of wettable powder-type formulations using commercial additive, carrier and *C. cellulans* CH-10

Type	Formulation	Composition per liter of bacterial culture broth
Wettable powder	CH10-G	tapioca starch 400 g , modified starch 100 g
	CH10-H	tapioca starch 400 g , olive oil 50 g , sucrose 25 g
	CH10-I	tapioca starch 400 g , sun cap 100 g
	CH10-J	tapioca starch 400 g
	CH10-K	corn starch 400 g

다. CH-67 균주를 이용한 수화제형 미생물농약의 제형화

1) CH67-A, CH67-B, CH67-C 수화제형

7 L 발효기에 현미유배지 4 L를 넣고 *B. cepacia* CH-67 균주를 접종하여 72시간 배양 (30°C, 300 rpm, 1.5 atm, pH 6~7)하고 이 배양액에 Beads type의 타피오카 전분, Sun reamy, Dextrin, Sugar 등의 전달매체를 첨가하고 혼합하여 수화제형 CH67-A, CH67-B, CH67-C를 제조하였다(Table 20)

Table 20. Composition of wettable power-type formulations using commercial additives, carriers and *B. cepacia* CH-67 cultures

Type	Formulation	Composition per liter of bacterial culture broth
Wettable powder	CH67-A	Sun creamy 70 g + Dextrin 10 g
	CH67-B	Beads type Tapioca 400 g + Sugar 25 g
	CH67-C	Sun creamy 80 g

2) CH67-D, CH67-F 수화제형

7 L 발효기에 현미유배지 4 L를 넣고 *B. cepacia* CH-67 균주를 접종하여 72시간 배양 (30°C, 300 rpm, 1.5 atm, pH 6~7)하고 이 배양액에 Powder type Tapioca, Sun creamy, Sucrose 등의 전달매체를 혼합하여 수화제형 CH67-D, CH67-F를 제조하였다(Table 21).

Table 21. Composition of wettable power-type formulations using commercial additives, carriers and *B. cepacia* CH-67 cultures

Type	Formulation	Composition per liter of bacterial culture broth
Wettable powder	CH67-D	Powder type of Tapioca 400 g
	CH67-F	Powder type of Tapioca 400 g + Sun creamy 80 g + Sucrose 100 g

제 3 세부과제 : 개발 미생물제제의 방제효과 검정 및 포장 적용시험

연구책임자 : 정 순 재

제 1 절 서 론

토마토의 원산지는 남아메리카의 서부고원지대인 안데스 산맥의 고랭지대로 페루, 에쿠아도르, 볼리비아 지방에서 수많은 야생종이 발견된다. 16세기 초 이탈리아로 전파된 이후 유럽 전체로 퍼져나가 17세기에 영국으로 들어갔으나 초기에는 관상용으로 재배되다가 18세기에 이탈리아에서 처음으로 식용으로 재배가 시작되었다고 하는데, 우리나라에 처음 들어온 연대는 확실히 알 수는 없으나 지봉유설에 "남만시"로 수록된 것으로 보아 그 책의 저작연대인 1641년 보다는 앞선 것으로 생각되고 토마토가 중국에 들어간 연대가 17세기 초라고 추정되므로 중국에 들어간 직후에 우리나라 사신에 의해 전래된 것으로 짐작된다. 이와 같이 전래된 연대는 350여년 전이라고 하지만 재배가 일반화된 것은 그리 오래지 않다. 현재에는 가공용에서 생식용으로 이르기까지 다양한 종류가 개발되어 세계에서 가장 많이 재배되고 있는 채소류로 성장하였고 우리나라에서는 주로 생식용으로 재배되고 있으나 최근에는 당도가 높고 먹기에 편한 방울토마토의 수요증가와 채소류 수출의 급격한 증대로 재배면적이 크게 늘어나고 있는 추세이다.

토마토에 발생하는 병해는 수십여종이 알려져 있으나, 우리 나라의 시설, 노지재배에서 중요한 병해는 잿빛곰팡이병, 잎곰팡이병, 겹둥근무늬병, 점무늬병, 시들음병, 역병, 풋마름병, 배꼽썩음병, 모자이크병 등이며 이외에 흰가루병, 균핵병, 궤양병, 반점세균병은 지역이나 해에 따라 국부적으로 발생하여 간혹 피해를 가져온다. 이중 *Botrytis cinerea*에 의한 잿빛곰팡이병과 *Fulvia fulva*에 의한 잎곰팡이병이 가장 중요하고 다음으로는 앞서 언급한 역병과 *Alternaria* spp. 균에 의한 겹둥근무늬병, *Stemphiliium* spp. 균에 의한 점무늬병이 흔히 발생하는데, *Leveillula* spp.에 의한 흰가루병과 *Sclerotinia* spp.에 의한 균핵병은 지역적으로 간혹 발생하여 피해를 주고 있다. 위와 같은 병해들은 환경이 알맞으면 정식직후부터 수확기까지의 생육기간 동안 내내 발생할 수 있으므로 상시 병해를 대상으로 한 종합적인 방제대책이 마련되지 않으면 안되므로, 이러한 병해를 효과적으로 방제하기 위해서는 토마토의 정식 전부터 방제관리에 신경을 쓰고 특히 포장주위에 남아 있는 이병잔재물의 처리와 토양 내 분포하고 있는 토양전염성 병원균들의 사멸 혹은 밀도감소를 유도하는 대책들이다.

경상남도기술원은 최근 야간 기온이 내려가면서 밀폐된 시설하우스 내 습도가 높아짐에 따라 재배 중인 겨울철 시설채소 등 작물에 잿빛곰팡이병, 오이노균병 및 토마토 잎곰팡이병 등 저온다습한 환경에서 많이 발생하는 병해충의 발생을 우려하고 있는데, 특히 토마토 잎곰팡이병은 바깥온도가 낮고 시설재배 및 포장의 온도가 다습할 때 주로 발생한다. 병원균의 증식이 대단위로 이루어지므로 병발생 초기의 병원균 밀도가 낮을 때 방제하지 않으면 큰 피해를 가져온다. 현재까지 잎곰팡이병의 방제는 주로 화학농약에 의존하여 왔지만 이는 환경오염에 의한 생태계 파괴 및 인축에 대한 독성 그리고 약제저항성 균주의 출현으로 전 세계적으로 심각한 문제점들이 대두되고 있어 이를 위해 최근에는 길항미생물을 이용한 미생물농약 및 비료 등이 실용화되어 제품들이 시판되고 있다. 따라서, 본 연구에서 개발된 토마토 잎곰팡이병 방제용 엽면살포제들의 생물학적 방제법 및 현장 적용시험을 통한 본 미생물제제들의 제품화 개발 가능성을 탐색하고자 하였다.

제 2 절 개발 미생물제제의 방제효과 검정 및 우수제형 선발

1. 연구수행 방법

가. 항균물질활성균 *Bacillus amyloliquefaciens* A-2균주를 이용한 엽면살포제의 방제효과 검정

1) 우수제형 선발

A-2 균주를 이용하여 제조한 1차 미생물제제 (수화제형 A2-A, A2-B, A2-F / 액상수화제형 A2-C, A2-D), 2차 미생물제제 (수화제형 A2-G~A2-L), 3차 미생물제제 (수화제형 A2-H, A2-M), 4차 미생물제제 (수화제형 A2-MP, A2-O)의 잎곰팡이병 방제효과를 생육실 포트재배에서 검정하였다. 먼저, 미생물 제제 100배 희석액과 화학농약 트리플루미졸 (Triflumizole)(품목명: 트리후민 수화제) 3000배 희석액을 분무기를 사용하여 포트 재배한 7주된 토마토 잎의 앞 뒷면에 골고루 각각 30 ml씩 살포하고, 살포 24시간 후에 잎 곰팡이병균 *F. fulva* TF13 균주의 균사조각부유액 접종원 ($A_{550}=0.4$) 10 ml을 잎의 앞, 뒷면에 골고루 살포한 후, 생육실 (상대습도 90%, 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$)에 보관하였다. 접종 4일 후 이병엽율 (%)를 조사하였다. 이때 각 처리구는 포트당 1주씩 6포트. 3반복으로 3회 조사되었으며 이를 평균하여 주당 이병엽율로 표시하고 이것을 다음과 같이 방제가로 환산하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: 무처리구의 이병엽율, B: 처리구의 이병엽율

균사조각부유액은 300 ml의 PDB (Potato Dextrose broth)배지에 PDA배지에서 전 배양한 TF13 균주의 균사절편 (직경 1 mm) 12개를 접종하여 4일간 진탕배양 (25°C , 150 rpm)한 후 균사를 걸러내어 세척 후, 이를 분쇄기 (Warning, USA)로 10초간 균사를 마쇄 한 후 농도를 $A_{550}=0.4$ 이 되도록 완충용액으로 조정하여 이용하였다.

2) 우수 미생물제제의 희석배수별 방제효과 검정

토마토 잎 곰팡이병 방제용으로 최종 선발된 수화제형 A2-MP제제를 생육실 포트재배에서의 방제효과를 검정하였다. 수화제형 A2-MP제제를 각각 100, 500, 1000배로, 화학농약 트리후민 수화제는 3,000배로 희석하여 포트 재배한 7주된 토마토 잎의 앞 뒷면에 1주당 30 ml씩 골고

루 처리하였다. 24 시간 뒤 잎곰팡이병균 TF13 균주 군사조각부유액 ($A_{550}=0.4$) 10 ml을 접종하고 이를 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 90%의 생육실에서 5일간 보관한 뒤 이병엽율 (%)을 조사하여 방제가로 환산하였다. 군사조각부유액은 앞서의 생육실 포트재배에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정과 동일하였다.

나. 키티나아제 활성균 CH-10 균주를 이용한 엽면살포제의 방제효과 검정

CH-10균주를 이용하여 제조한 수화제형 미생물제제 (CH10-G~CH10-K)의 잎곰팡이병 방제효과를 생육실 포트재배에서 검정하였다. 미생물제제 100배 희석액과 화학농약 Triflumizole 3,000배 희석액을 분무기로 포트재배한 7 주된 토마토 잎의 앞 뒷면에 골고루 각각 30 ml씩 살포하고, 살포 24시간 후에 잎곰팡이병균 *F. fulva* TF13 균주의 군사조각 부유액 접종원 ($A_{550}=0.4$) 10 ml을 잎의 앞 뒷면에 골고루 살포하여, 생육실 (상대습도 90%, 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$)에 보관하였다. 접종 5일 후 이병엽율 (%)를 조사하고 방제가로 환산하였다. 군사조각부유액은 앞서의 생육실 포트재배에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정과 동일하였다.

다. 키티나아제 활성균 CH-67 균주의 최종선발 및 방제효과 검정

1) CH-67균주의 플라스크 배양액을 이용한 방제효과 검정

키티나아제 활성이 매우 높은 CH-10균주를 이용한 미생물제제 (CH10-G~CH10-K)의 방제효과 검정에서 만족할 만한 결과를 도출하지 못하였으며, 그 후 키티나아제 활성이 매우 높은 균주가 지속적으로 분리되어 CH-67과 CH-74 균주가 각각 선발되었다. 이들을 colloidal chitin이 3% 포함된 LB배지에 20시간 배양 (30°C , 200 rpm)한 후 농도를 OD 1.0으로 보정하여 이를 30 일된 토마토 잎에 50 ml씩 골고루 살포하고 생육실 ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 90% 이상)에서 하루 동안 보관하였다. 이때, 트리플루미졸(Triflumizole) 화학농약을 3,000배로 희석하여 살포하였으며 처리 24시간 후 병원균 *F. fulva* TF13 균주의 군사조각부유액을 $A_{550}=0.4$ 로 보정하여 포트당 10 ml 씩 토마토에 접종하고 생육실에 7일간 보관하면서 이병엽율을 방제가로 환산하였다.

2) CH-67 균주의 발효기 배양액을 이용한 방제효과 검정

앞서의 항균활성과 chitinase 활성이 뛰어나 선발된 CH-67균주를 대량배양용 배지인 현미유배지에 3일간 배양 (30°C , 300 rpm)한 후, 배양액을 세균과 배양상등액으로 나누어 30일된 성체 식물에 50 ml씩 골고루 살포하고 생육실 ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 90% 이상)에 보관하였다. 병원균 접종은 앞서의 CH-67 균주의 플라스크 배양액의 방제효과 검정과 동일하게 처리하였다.

3) CH-67 균주를 이용한 엽면살포제의 방제효과 검정

(가) 우수제형선발

CH-67 균주를 이용하여 제조한 1차 개발 미생물제제 (CH67-A~CH67-C)와 2차 개발 미생물제제 (CH67-D~CH67-F)의 잎 곰팡이병 방제효과를 생육실 포트재배에서 검정하였다. 먼저, 미생물제제 100배 희석액과 화학농약 Triflumizole 3,000배 희석액을 분무기로 포트재배한 7 주된 토마토 잎의 앞 뒷면에 골고루 각각 30 ml씩 살포하고, 살포 24시간 후에 잎곰팡이병균 *F. fulva* TF13 균주의 균사조각 부유액 접종원 ($A_{550}=0.4$) 10 ml을 잎의 앞 뒷면에 골고루 살포하여, 생육실 (상대습도 90%, 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$)에 보관하였다. 접종 5일 후 이병엽율 (%)를 조사하고 방제가로 환산하였다. 균사조각부유액은 앞서의 생육실 포트재배에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정과 동일하였다.

(나) 우수 미생물제제의 희석배수별 방제효과 검정

토마토 잎 곰팡이병 방제용으로 최종 선발된 수화제형 CH67-C제제를 생육실 포트재배에서의 방제효과를 검정하였다. 수화제형 CH67-C제제를 각각 100, 500, 1000배로, 화학농약 트리후민 수화제는 3,000배로 희석하여 포트 재배한 7주된 토마토 잎의 앞 뒷면에 1주당 30 ml씩 골고루 처리하였다. 24 시간 뒤 잎곰팡이병균 TF13 균주 균사조각부유액 ($A_{550}=0.4$) 10 ml을 접종하고 이를 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 90%의 생육실에서 5일간 보관한 뒤 이병엽율 (%)을 조사하여 방제가로 환산하였다. 균사조각부유액은 앞서의 생육실 포트재배에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정과 동일하였다.

라. 항균활성제제 A2-MP와 키티나아제 활성제제 CH67-C의 혼합방제 효과 검정

A-2 균주와 CH-67균주의 엽면살포용 제제로써 최종 선발된 A2-MP제제와 CH67-C제제를 이용하여 미생물제제의 잎곰팡이병 방제효과를 A2-MP제제와 CH67-C제제의 동시처리시 방제효과 증진을 알아보고자, 단독처리 또는 A2-MP제제와 CH67-C제제와의 혼합처리를 포트재배에서 검정하였다. 미생물제제 100배 희석액과 화학농약 Triflumizole 3,000배 희석액을 분무기로 포트재배한 7 주된 토마토 잎의 앞 뒷면에 골고루 각각 30 ml씩 살포하고, 살포 24시간 후에 잎곰팡이병균 *F. fulva* TF13 균주의 균사조각 부유액 접종원 ($A_{550}=0.4$) 10 ml을 잎의 앞 뒷면에 골고루 살포하여, 생육실 (상대습도 90%, 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$)에 보관하였다. 접종 5일 후 이병엽율 (%)를 조사

하고 방제가로 환산하였다. 군사조각부유액은 앞서의 생육실 포트재배에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정과 동일하였다.

마. 재조합 균주 A-2.5균주를 이용한 엽면살포제의 방제효과 검정

재조합 균주인 A-2.5 균주를 이용하여 제조한 미생물제제의 잎곰팡이병 방제효과를 A2.5-MP제제 단독처리 또는 CH67-C제제와의 혼합처리를 통하여 포트재배에서 검정하였다. 미생물제제 100배 희석액과 화학농약 Triflumizole 3,000배 희석액을 분무기로 포트재배한 7 주된 토마토 잎의 앞 뒷면에 골고루 각각 30 ml씩 살포하고, 살포 24시간 후에 잎곰팡이병균 *F. fulva* TF13 균주의 군사조각 부유액 접종원 ($A_{550}=0.4$) 10 ml을 잎의 앞 뒷면에 골고루 살포하여, 생육실 (상대습도 90%, 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$)에 보관하였다. 접종 5일 후 이병엽율 (%)를 조사하고 방제가로 환산하였다. 군사조각부유액은 앞서의 생육실 포트재배에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정과 동일하였다.

2. 연구결과

가. 항균물질활성균 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주를 이용한 미생물제제의 생육실 포트에서의 방제효과

1) 1차 제제 (수화제형 A2-A, A2-B, A2-E, A2-F / 액상수화제형 A2-C, A2-D)

하우스 내 포트 재배한 토마토 잎에 6종의 1차 제조된 미생물제제와 화학농약을 토마토 잎에 분무접종하고 24시간 후 병원균을 접종한 뒤 10일 후에 이병엽율을 조사하고 방제가로 환산하였다. 그 결과, A-2A제제와 A-2B제제의 방제가가 각각 63.2%, 72.2%로서 서로 유의차가 없이 높았으며, 화학농약 트리후민의 68.9%와 유사하였다. 반면, A2-C, A2-D, A2-E, A2-F, A2-F 제제는 60%이하의 낮은 방제가를 보여 A2-A, A2-B제제가 1차 우수제제로 선발되었다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Disease control effects of 6 formulations using *B. amyloliquefaciens* A-2 and chemical fungicide against leaf mold caused *F. fulva* TF13 on tomato plants at pots in a growth chamber

Formulations	Disease severity ^a (Control value ^b , %)
	10 days
A2-A + Pa	36.8 (63.2) a
A2-B + Pa	27.8 (72.2) a
A2-C + Pa	79.4 (20.6) cd
A2-D + Pa	39.2 (60.8) ab
A2-E + Pa	84.9 (15.1) cd
A2-F + Pa	61.2 (38.8) bc
Triflumizole + Pa	31.1 (68.9) a
Pathogen(Pa) only	100 (0.0) d
Control	0.0 (100) a

^a Disease severity index (%) was made by estimating the percentage (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva* TF13.

^b Control value (%) = [(Disease severity in control plants - Disease severity in treated plants) / (Disease severity in control plants)] x 100

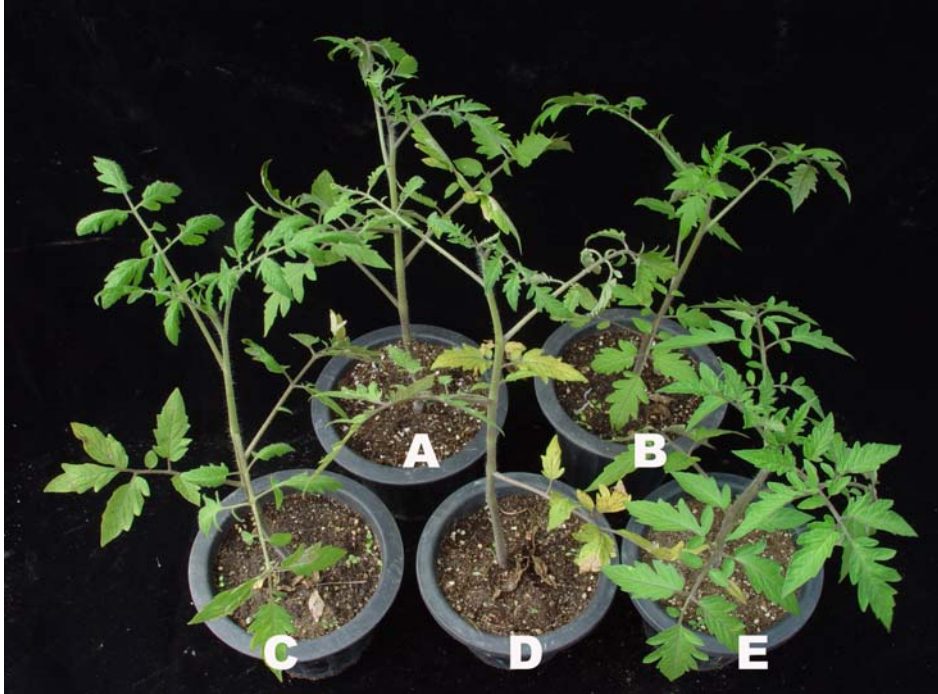


Fig. 1. Disease occurred on tomato plants treated with formulations using *B. amyloliquefaciens* A-2 and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* TF13 on tomato plants at pots in a growth chamber.

A, A-2A formulation ; B, A-2B ; C, chemical fungicide, Triflumizole ; D, Pathogen ; E, Control

2) 2차 제제 (수화제형 A2-G~A2-L)

2차 제조된 6종의 미생물농약과 화학농약을 토마토 잎에 처리하고 방제효과를 생육실에서 검정하였다. 그 결과, A2-H제제의 방제가가 82.6%로 우수한 방제가를 나타내었으며, 다음은 A2-G제제로 73.3%의 방제가를 보여 유의차가 있었다. 반면, A2-I~A2-L제제는 55% 이하의 낮은 방제가를 보였다. 따라서, A2-G, A2-H제제가 2차로 선발되었다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Disease control effects of 6 formulations using *B. amyloliquefaciens* A-2 and chemical fungicide against leaf mold caused *F. fulva* TF13 on tomato plants at pots in a growth chamber

Formulations	Disease severity ^a (Control value ^b , %)
	10 days
A2-G + Pa	26.7 (73.3) ab
A2-H + Pa	17.4 (82.6) a
A2-I + Pa	61.6 (38.4) c
A2-J + Pa	74.7 (25.3) d
A2-K + Pa	44.4 (55.6) bc
A2-L + Pa	70.5 (29.5) d
Triflumizole + Pa	32.7 (67.3) bc
Pathogen(Pa) only	100 (0.0) e
Control	0.0 (100) a

^a Disease severity index (%) was made by estimating the percentage (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva* TF13.

^b Control value (%) = [(Disease severity in control plants - Disease severity in treated plants) / (Disease severity in control plants)] x 100

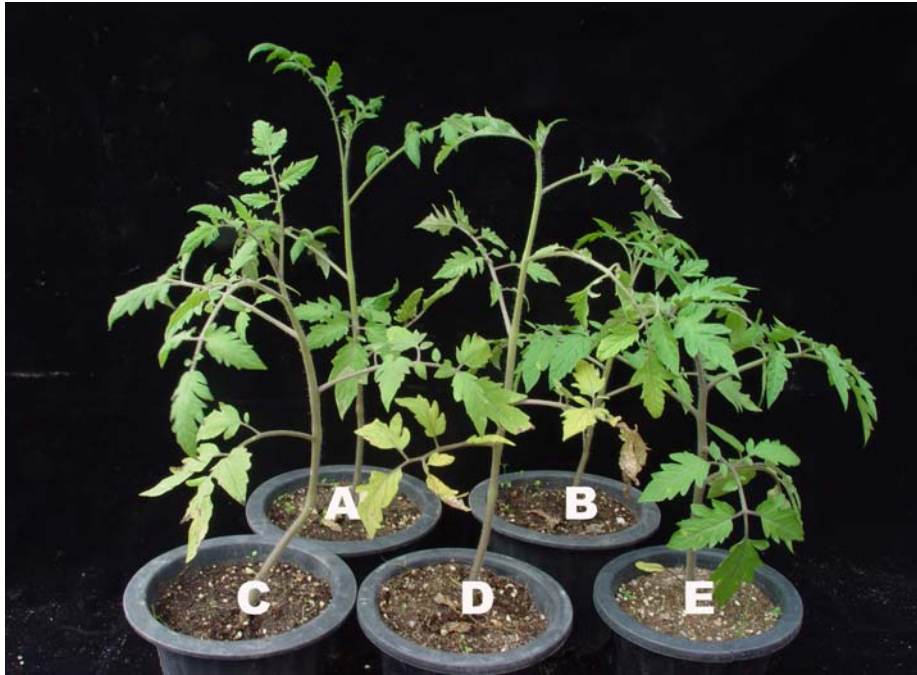


Fig. 2. Disease control effects of 6 formulations using *B. amyloliquefaciens* A-2 and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* TF13 on tomato plants at pots in a growth chamber.

A, A2-G formulation ; B, A2-H ; C, chemical fungicide, Triflumizole ; D, Pathogen ; E, Control

1차와 2차로 선발된 4종의 수화제형 미생물농약(A2-A, A2-B, A2-G, A2-H 제제)을 포트 재배한 토마토 잎에 처리하여 화학농약과 방제효과를 생육실에서 비교, 검정하였다. 그 결과, A2-H제제의 방제가가 81.6%로 가장 우수하였으며, A2-A, A2-B, A2-G제제의 방제가는 각각 55.2%, 65.3%, 62.2%로 대체로 낮았으며, 화학농약은 53.8%로 가장 낮아, A2-H제제를 우수제제로 선발하였다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Disease control effects of 4 formulations using *B. amyloliquefaciens* A-2 and chemical fungicide against leaf mold caused *F. fulva* TF13 on tomato plants at pots in a growth chamber

Formulations	Disease severity ^a (Control value ^b , %)
	10 days
A2-A + Pa	44.8 (55.2) bc
A2-B + Pa	34.7 (65.3) ab
A2-G + Pa	37.8 (62.2) abc
A2-H + Pa	18.4 (81.6) a
Triflumizole + Pa	46.2 (53.8) c
Pathogen only	100 (0.0) d
Control	0.0 (100) a

^a Disease severity index (%) was made by estimating the percentage (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva* TF13.

^b Control value (%)=[(Disease severity in control plants-Disease severity in treated plants) / (Disease severity in control plants)] x 100



Fig. 3. Disease occurrence on tomato plants treated with 4 formulations using *B. amyloliquefaciens* A-2 and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* TF13 on tomato plants at pots in a growth chamber.

A, A2-A formulation ; B, A2-B ; C, A2-G ; D, A2-H ; E, chemical fungicide, Triflumizole ; F, Pathogen ; G, Control

3) 3차 제제 (수화제형 A2-H, A2-M)

앞서 1, 2차제제에서 선발된 A-2H 제제는 80%의 높은 방제가를 보였으나, 제제의 단점인 분무기의 막힘 현상으로 인해 A2-H제제의 주재료인 타피오카를 끊어 A2-M제제를 제형화하고, 이미 우수제제로 선발되었던 A2-H제제를 화학농약인 트리후민과 방제효과를 비교 검정하였다. 그 결과, A2-H 제제와 A2-M 제제의 방제가는 각각 80.1%, 77.8%로 유의차없이 높았으며, 화학농약의 70.2%와도 유의차가 없었다(Table 4, Fig. 4).

Table 4. Disease control effects of formulation and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulvum* TF13 on treated tomato plants in a growth chamber

Treatment	5 days		
	Control value(%) (Disease severity(%))		
	I	II	means(%)
A2-H	84.8(15.3)	75.4(24.7)	80.1(20.0) ± 3.8 bc
A2-M	80.5(19.5)	75.1(24.9)	77.8(22.2) ± 2.2 bc
Triflumizole	71.6(28.5)	68.7(31.3)	70.2(29.9) ± 1.2 c
Pathogen only (Pa)	0.0(100.0)	0.0(100.0)	0.0(100.0) ± 0.0 d
Control	100.0(0.0)	100.0(0.0)	100.0(0.0) ± 0.0 a

^a Disease severity (%) was made by estimating the percentage (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva*

^b Control value (%) = [(Disease severity in control plant - Disease severity in treated plant) / (Disease severity in control plants)] × 100

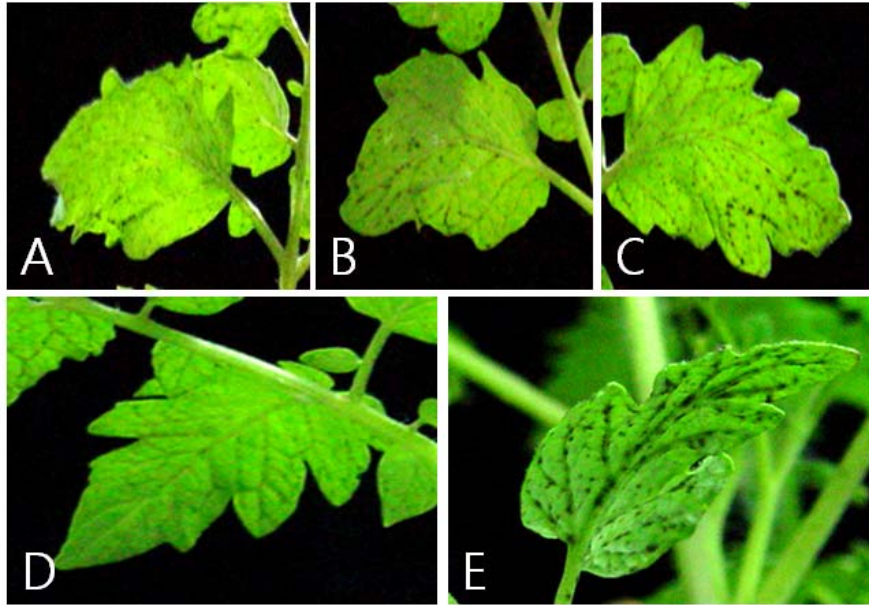


Fig. 4. Disease symptoms on tomato leaves treated with microbial formulations and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* TF13 on treated tomato plants in a growth chamber. A, A2-H formulation ; B, A2-M formulation ; C, Triflumizole ; D, Control ; E, Pathogen.

4) 4차 제제 (수화제형 A2-MP, A2-O)

3차 제형화 제제인 A2-M제제의 제조시 첨가되는 기존의 구슬형의 타피오카(Tapioca) 대신 파우더형태의 타피오카를 이용하여 제조한 A2-MP제제를 A2-M제제 및 A2-O제제와 방제효과를 비교하였다. 그 결과, A2-M과 A2-MP제제의 방제가는 각각 88.4%와 89.0%로 서로 유의차없이 우수하였으며 특히, A2-MP제제는 화학농약의 88.8%와도 유의차가 없었고 A2-O제제의 67.6%보다 월등히 우수하였다. 결론적으로 대조구인 화학농약과 유의차없이 방제가가 높고 제형화의 효율성을 고려하여 A2-MP제제를 최종 우수제제로 선발하였다(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Disease control effects of 4 formulations using *B. amyloliquefaciens* A-2 and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* on treated tomato plants in a growth chamber

Treatments	3 days			
	Disease severity (%) ^a			Control value (%) ^b
A2-M	7.9	11.2	7.9	85.4(±3.1) b
A2-MP	4.7	4.7	10.4	88.0(±4.6) ab
A2-O	23.2	17.2	19.7	67.6(±4.9) c
Triflumizole	4.3	8.6	7.9	88.8(±3.7) ab
Pathogen (Pa) only	65.0	58.6	61.8	0.0(±0.0) d
Control	0.0	0.0	0.0	100(±0.0) a

^a Disease severity (%) was made by estimating the percentage (%) of infected leaf area on each plant by *F.fulva*

^b Control value (%) = [(Disease severity in control plant - Disease severity in treated plant) / (Disease severity in control plants)] × 100

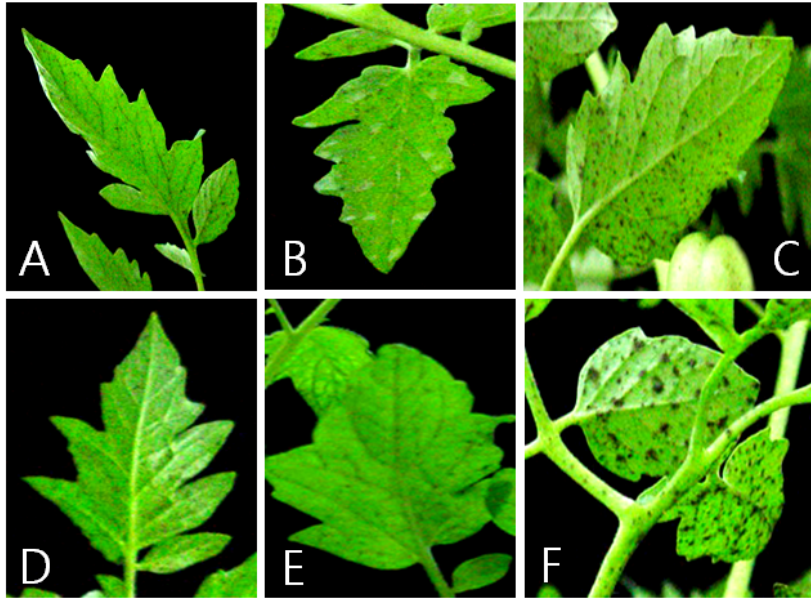


Fig. 5. Disease control effects of 4 formulations using *B. amyloliquefaciens* A-2 and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* on treated tomato plants in a growth chamber. A, A2-M formulation ; B, A2-MP formulation ; C, A2-O ; D, 트리후미졸 (Triflumizole) ; E, Control ; F, Pathogen

5) 최종 선발된 미생물제제 A2-MP제제의 희석배수별 방제효과 검증

앞서 방제효과가 가장 우수하여 최종선발된 A2-MP제제를 희석배수별로 처리하여 가장 적합한 처리농도를 선발하고자 하였다. 그 결과 100배, 500배, 1000배에서 각각 84.3%, 79.4%, 72.0%로 희석배수가 높아질수록 방제효과가 다소 감소하였으나 서로간의 유의차는 없었으며, 특히, 100배와 500배 처리구에서는 화학농약 90.8%와도 유의차가 없어 매우 효과가 우수하였다. 따라서, 경제성을 고려해 볼 때 500배의 농도로 살포되어도 적합할 것으로 조사되었다(Table 6).

Table 6. Disease control effects of formulations and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* TF13 on treated tomato plants in a growth chamber.

Treatment	5 days			
	Disease severity (%) ^a			Control value (%) ^b
	I	II	III	mean (%)
A2-MP (100-fold spraying)	88.4 (7.5)	89.0 (8.3)	75.4 (8.8)	84.3 (8.2) ± 4.5 bc
A2-MP (500-fold spraying)	78.0 (14.3)	88.0 (9.1)	72.1 (10.0)	79.4 (11.1) ± 4.6 bc
A2-MP (1000-fold spraying)	69.9 (19.6)	78.4 (16.3)	67.8 (11.6)	72.0 (15.8) ± 3.2 c
Triflumizole	96.1 (2.5)	88.5 (8.7)	87.7 (4.4)	90.8 (5.2) ± 2.7 ab
Pathogen(Pa) only	0.0 (65.0)	0.0 (75.8)	0.0 (35.9)	0.0 (58.9) ± 0.0 d
Control	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0) ± 0.0 a

^a Disease severity (%) was made by estimating the percentage (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva*

^b Control value (%) = [(Disease severity in control plant - Disease severity in treated plant) / (Disease severity in control plants)] × 100

나. 키티나아제 활성균 CH-10을 이용한 방제효과 검증

1) CH-10균주를 이용한 미생물제제

키티나아제 활성이 우수한 *C. cellulans* CH-10균주를 이용하여 만든 5종의 수화제형 미생물제제를 공시하여 토마토 잎곰팡이병에 대한 방제효과를 생육실에서 검증한 결과, CH10-G제제의 방제가가 70.8%로 가장 높았으며, 화학농약 처리구의 51.3%보다 높은 효과를 나타내었다. 반면, CH10-H, I, J, K는 모두 55% 이하의 낮은 방제가를 보였다. 따라서, 키티나아제 활성이 우수한 미생물제제의 개발을 위해 새로운 균주의 탐색이 지속적으로 진행되었다(Table 7, Fig. 6).

Table 7. Disease control effects of 5 formulations using *Celluosimicrobium cellulans* CH-10 and chemical fungicide against leaf mold caused *F. fulva* TF13 on tomato plants at pots in a growth chamber

Formulations	Disease severity index ^a (Control value ^b , %)
	10 days
CH10-G + Pa	28.2 (71.8) a
CH10-H + Pa	44.2 (55.8) c
CH10-I + Pa	60.2 (39.8) b
CH10-J + Pa	56.9 (43.1) bc
CH10-K + Pa	63.2 (36.8) c
Triflumizole + Pa	48.7 (51.3) bc
Pathogen (Pa) only	100 (0.0) d
Control	0.0 (100) a

^a Disease severity index (%) was made by estimating the percentage (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva* TF13.

^b Control value (%)=[(Disease severity in control plants-Disease severity in treated plants) / (Disease severity in control plants)] x 100



Fig. 6. Disease on tomato plants treated with 5 formulations using *Cellulosimicrobium cellulans* CH-10 and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* TF13 on tomato plants at pots in a growth chamber.

A, CH10-G formulation ; B, CH10-H ; C, CH10-I ; D, CH10-J ; E, CH10-K ; F, chemical fungicide, Triflumizole ; G, Pathogen ; H, Control

다. 키티나아제 활성균 CH-67균주의 최종 선발과 방제효과 검정

1) CH-67 균주 배양액의 방제효과 검정

키티나아제 활성이 매우 높은 CH-67과 CH-74 균주의 배양액을 토마토 잎에 처리하고 24시간 뒤에 병원균을 접종하여 방제효과를 검정한 결과 CH-67 균주가 79.0%의 방제가로 가장 높았으며 화학농약의 71.4%보다 방제가가 높았으며 유의차가 있었다(Table 9). 따라서, CH-67 균주가 항균 활성 및 키티나아제 활성을 동시에 하는 우수길항균으로 재분리되어 미생물제제의 제형화후 방제효과가 기대되었다.

Table 9. Disease control effects of mixture of formulation, culture solution and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* on treated tomato plants in a growth chamber

Isolates	Disease severity (%) ^a	Control value (%) ^b
CH-67 + Pa	8.3±2.93	79.0b
CH-74 + Pa	17.8±8.46	54.9c
Triflumizole + Pa	71.4±2.14	71.4b
Pathogen (Pa) only	39.5±5.44	0.0d
Control	0	100a

^a Disease severity index (%) was made by estimating the percentage (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva* TF13.

^b Control value (%)=[(Disease severity in control plants-Disease severity in treated plants) / (Disease severity in control plants)] x 100

2) CH-67 균주의 발효기 배양액의 방제효과 검정

키티나아제 활성과 길항능이 동시에 높았던 CH-67 균주의 발효기 배양액을 배양액(항균물질과 세균포함), 세균만 분리하여 처리하고 방제가를 검정한 결과, CH-67 균주의 세균만을 처리한 경우 방제가 92.4%로 가장 높았으며, 다음은 세균과 항생물질이 모두 포함된 배양액에서 76.6%의 방제가로 다음으로 높았으며 서로간에 유의차가 있었다. 반면, 항생물질만이 포함된 처리구 (supernatant)에서는 50.1%의 방제가로 그 다음으로 높았으며 화학농약 37.9%의 방제가보다도 높고 유의차가 있었다. 따라서, 세균만을 처리한 경우가 항생물질만을 처리한 경우보다 우수하였으며

두가지를 혼합하면 세균만을 처리하는 경우보다는 낮고 항생물질 만을 처리하는 경우보다는 높아 지므로 이는 CH-67 균주가 분비하는 키티나아제 활성능이 항균물질 활성능보다 좀 더 우수한 것으로 예측되었다(Table 9). 따라서, chitinase 활성이 우수한 CH-67 균주를 미생물제제로 제조하여 항균활성이 높았던 A2-H제제와 복수 처리하여 방제효과를 증진시키는 연구를 수행하고자 하였다.

Table 9. Disease control effects of cell suspension, supernatant and culture solution against leaf mold caused by *F. fulva* on tomato plants in a growth chamber

Treatments	Disease severity (%) ^a	Control value(%) ^b
CH-67 cell + Pa	3.3 (±5.7)	92.4 (±13.2) a
CH-67 supernatant + Pa	21.9 (±7.3)	50.1 (±16.6) bc
CH-67 cell + supernatant + Pa	10.2 (±7.8)	76.6 (±17.8) ab
Triflumizole + Pa	27.3 (±4.5)	37.9 (±10.2) c
Pathogen (Pa) only	43.9 (±23.5)	0
Control	0	100 a

^a Disease severity index (%) was made by estimating the percentage (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva* TF13.

^b Control value (%)=[(Disease severity in control plants-Disease severity in treated plants) / (Disease severity in control plants)] x 100

3) CH-67 균주를 이용한 엽면살포제의 생육실내 포트검정

가) 1차 제제(CH67-A, CH67-B, CH67-C)

B. cepacia CH-67 균주를 이용한 3종의 미생물제제를 1차 제조하여 토마토 잎곰팡이병에 대한 방제효과를 화학농약 트리플루미졸(Triflumizole)과 비교 검정하였다. 그 결과, CH67-C 제제의 방제가가 97.0%로 화학농약의 94.1%와 유사하였다. 따라서, CH67-C제제를 우수제제로 1차 선발하였다(Table 11, Fig. 8)

Table 11. Disease control effects of formulations and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* on treated tomato plants in a growth chamber

Treatments	4 days			
	Disease severity (%) ^a			Control value (%) ^b
CH67-A + Pa	16.3	16.1	10.8	72.2 (±0.8) d
CH67-B + Pa	7.3	6.3	6.5	88.5(±0.8) c
CH67-C + Pa	2.7	0.3	2.1	97.0(±1.3) a
Triflumizole + Pa	3.7	2.3	4.3	94.1 (±1.1) b
Pathogen (Pa) only	55.5	60.6	59.3	0.0 (±0.0) e
Control	0.0	0.0	0.0	100 (±0.0) a

^a : Disease severity index (%) was made by estimating the percent (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva* TF13

^b : Control value (%) = [(Disease severity index in control plants - Disease severity index in treated plants) / Disease severity index in control plants] x 100

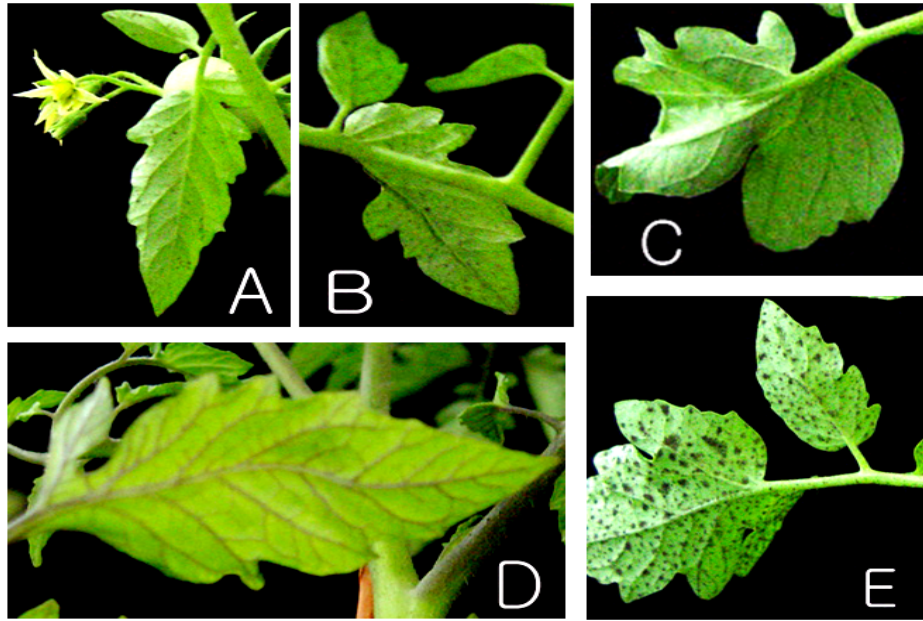


Fig. 8. Tomato leaf mold symptom on tomato treated with various formulations and chemical fungicide in a growth chamber.

A, CH67-B formulation ; B, CH67-C formulation ; C, Triflumizole ; D, Control ; E, Pathogen

나) 2차 제제(CH67-D, CH67-F)

1차 제제에서 선발된 CH67-C 제제를 포함하여 2차 제제 2종에 대한 토마토 잎 곰팡이 병에 대한 방제 효과를 화학농약 트리플루미졸(Triflumizole)과 비교 검증하였다. 그 결과, 수화제형 CH67-C, CH67-D와 CH67-F제제의 방제율은 각각 92.6%, 86.3%와 92.5%로 유의차없이 높았으며 화학농약의 89.5%와도 유의차가 없었다. 그러나 CH67-D와 CH67-F 제제는 1차 선발 제제인 CH67-C제제의 97.0%의 방제율보다 낮고 제제를 토마토에 처리 하였을 때 약흔이 발생되어 미관상 문제점이 발견되어 1차에서 선발된 CH67-C제제를 토마토 잎 곰팡이병 방제용 엽면살포제의 우수제형으로 최종 선발 하였다(Table 12, Fig. 9)

Table 12. Disease control effects of formulations and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* on treated tomato plants in a growth chamber

Treatments	4 days			
	Disease severity (%) ^a			Control value (%) ^b
CH67-C + Pa	92.8	89.8	95.2	92.6 (±1.6) a
CH67-D + Pa	78.2	94.4	79.4	86.3 (±6.6) a
CH67-F + Pa	88.5	96.3	92.7	92.5 (±2.3) a
Triflumizole + Pa	81.2	91.2	96.1	89.5 (±4.4) a
Pathogen (Pa) only	20.4	20.4	75.8	0.0 (±0.0) b
Control	0.0	0.0	0.0	100 (±0.0) a

^a : Disease severity index (%) was made by estimating the percent (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva* TF13

^b : Control value (%) = [(Disease severity index in control plants - Disease severity index in treated plants) / Disease severity index in control plants] x 100

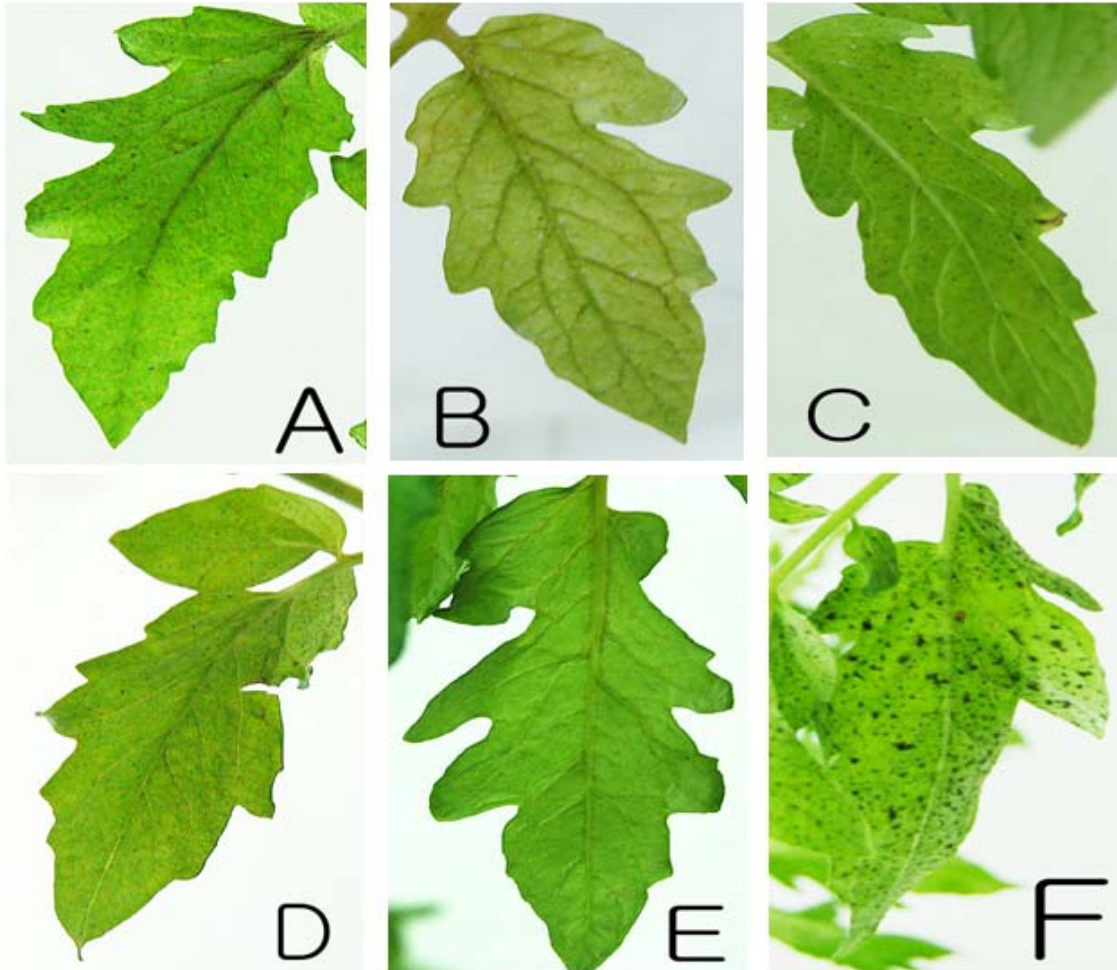


Fig. 9. Tomato disease symptoms on tomato leaves treated with microbial formulations and chemical fungicide against the leaf mold caused by *F. fulva* TF13 on tomato plants in a growth chamber.

A, CH67-C formulation ; B, CH67-D formulation ; C, CH67-F formulation ;
D, Triflumizole ; E, Contol ; F, Pathogen

4) 최종 선발된 CH67-C제제의 희석배수별 방제효과

최종 선발된 CH67-C제제를 희석배수별로 100, 500, 1000배로 희석하여 토마토 잎곰팡이 병에 대한 방제효과를 화학 농약 트리플루미졸(Triflumizole)과 비교 검정한 결과, 100, 500, 1000 배에서 각각 97.7%, 84.3%, 78.2%의 방제가로 화학농약의 83.5%와 비교하여도 유의차가 없이 높은 방제가를 보였다(Table 13. Fig. 10).

Table 13. Disease control effects of formulations and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* on treated tomato plants in a growth chamber

Treatments	4 days			
	Disease severity (%) ^a			Control value (%) ^b
CH67-C + Pa (100 fold-spraying)	9.2	8.6	0.8	89.0 (±7.1) a
CH67-C + Pa (500 fold-spraying)	8.4	7.1	5.6	84.3 (±2.8) a
CH67-C + Pa (1000 fold-spraying)	9.3	10.5	7.8	78.5 (±5.4) a
Triflumizole + Pa	14.7	6.2	4.4	83.5 (±2.1) a
Pathogen (Pa) only	20.3	34.3	35.9	0.0 (±0.0) b
Control	0.0	0.0	0.0	100 (±0.0) a

^a : Disease severity index (%) was made by estimating the percent (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva* TF13

^b : Control value (%) = [(Disease severity index in control plants - Disease severity index in treated plants) / Disease severity index in control plants] x 100

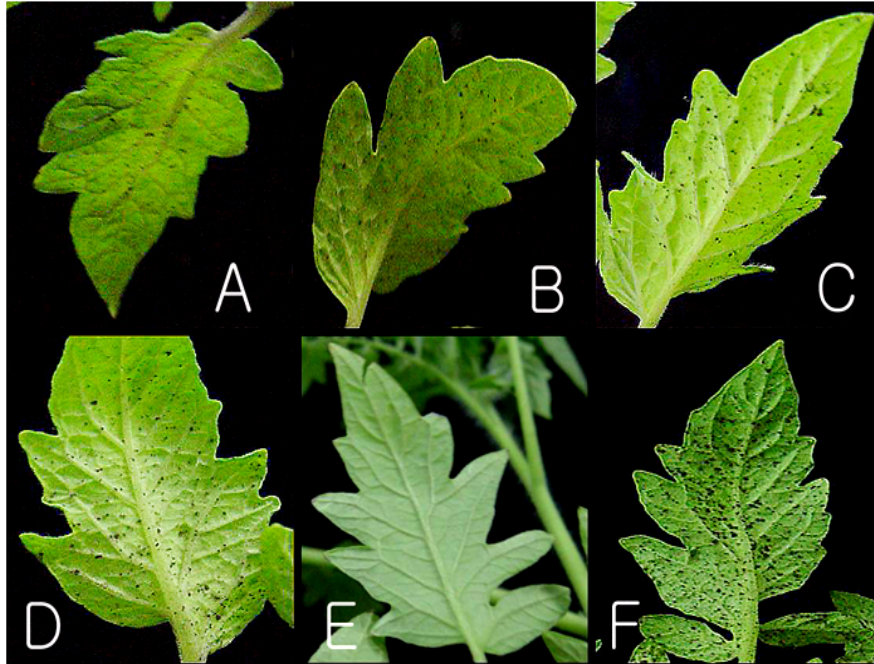


Fig. 10. disease symptoms on tomato leaves treated with formulations and chemical fungicide against the leaf mold caused by *F. fulva* TF13 on tomato plants in a growth chamber.

A, CH67-C 100-fold spaying ; B, CH67-C 500-fold spaying ; C, CH67-C 1000 fold spaying ; D, Triflumizole ; E, Contol ; F, Pathogen

라. 항균물질활성 제제(A-2MP)와 키티나아제 활성 제제(CH-67C)의 혼합방제효과 검증

A-2 균주와 CH-67균주의 엽면살포용 수화제형 제제로 최종 선발된 A2-MP제제와 CH67-C제제를 토마토 잎 곰팡이 병에 단독 또는 혼합처리하여 화학농약과 그 방제효과를 비교 검증하였다. 그 결과, 단독처리시에 CH67-C제제가 93.6%로 A2-MP제제의 78.4%보다 유의차있게 우수하였고, 혼합처리(A2-MP+ CH67-C)시에는 87.5%로 CH67-C제제의 단독처리보다는 유의차 없이 낮으나 A-2MP의 단독처리보다는 유의성있게 높았다. 반면, 화학농약은 81.5%로써 CH67-C보다 낮았으나 A2-MP제제와 유사 하였다. 따라서, CH67-C제제의 단독처리는 잎곰팡이병 방제에 매우 우수한 것으로 조사되었으며, 시너지효과를 위한 A2-MP제제와 CH67-C제제의 혼합처리는 CH67-C제제의 단독처리가 월등히 우수하여 혼합처리를 할 수가 없으니, A2-MP제제보다는 우수하므로 CH67-C제제의 단독처리 또는 A2-MP제제와 CH67-C의 혼합처리가 효과적인 것으로 판단되었다(Table 14).

Table 14. Disease control effects of 2 formulations against *F. fulva* on tomato plant at pots in a growth chamber.

Treatments	4 days			
	Disease severity (%) ^a			Control value (%) ^b
A2-MP + Pa	9.0	7.9	11.1	78.4 (± 3.8) c
CH67-C + Pa	2.5	2.9	2.9	93.6 (± 0.5) ab
A2-MP+CH67-C + Pa	4.0	9.0	3.2	87.5 (± 7.3) bc
Triflumizole + Pa	4.3	8.6	7.9	81.5 (± 2.6) c
Pathogen (Pa) only	65.0	58.6	61.8	0.0 (± 0.0) d
Control	0.0	0.0	0.0	100 (± 0.0) a

^a Disease severity index (%) was made by estimating the percent (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva* TF13

^b Control value (%) = [(Disease severity index in control plants - Disease severity index in treated plants) / Disease severity index in control plants] x 100



Fig. 11. Disease control effects of formulations and chemical fungicide against the leaf mold caused by *F. fulva* TF13 on tomato plants in a growth chamber.

A, A2-MP ; B, CH67-C ; C, A2-MP+CH67-C ; D, 트리후미졸(Triflumizole) ; E, Contol ; F, Pathogen

마. 재조합 A-2.5 균주를 이용한 미생물제제의 방제효과

항균물질 활성과 키틴나아제 활성을 동시에 가지도록 재조합된 A-2.5균주를 이용하여 A2.5-MP 제제를 제조하고 이를 CH67-C제제와 화학농약 트리후미졸(Triflumizole)에 의한 잎곰팡이병 방제를 비교 검정하였다. 그 결과, 항균물질활성균 A-2에 N1의 chitinase gene을 삽입하여 재조합 된 A-2.5균주를 이용하여 제조한 A2.5-MP제제의 방제가가 80.1%로 항균활성만 가진 A-2균주로 제조된 A2-MP 제제의 장제가 78.4%보다는 유의적으로 높지 않아서 재조합 균주에 의한 방제가의 증진은 크지 않았다(Table 14, Fig 11).

Table 14. Disease control effects of 2 formulations against *F. fulva* on tomato plant at pots in a growth chamber.

Treatments	4 days			
	Disease severity (%) ^a			Control value (%) ^b
A2-MP + Pa	9.0	7.9	11.1	78.4 (± 3.8) c
A2.5-MP + Pa	7.9	4.7	13.2	80.1 (± 10.0) b
CH67-C + Pa	2.5	2.9	2.9	93.6 (± 0.5) ab
A2.5-MP+CH67-C + Pa	3.6	7.2	3.2	89.2 (± 5.1) ab
Triflumizole + Pa	4.3	8.6	7.9	81.5 (± 2.6) b
Pathogen(Pa) only	65.0	58.6	61.8	0.0 (± 0.0) c
Control	0.0	0.0	0.0	100 (± 0.0) a

^a : Disease severity index (%) was made by estimating the percent (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva* TF13

^b : Control value (%) = [(Disease severity index in control plants - Disease severity index in treated plants) / Disease severity index in control plants] x 100

이상의 생육실에 포트검정 결과 항균물질활성균 *B. amyloliquefaciens* A-2 균주와 키티나아제 활성균 *B. cepacia* CH-67균주를 이용하여 각각 제조한 수화제형 A2-MP제제와 CH67-C제제를 토마토 잎곰팡이병 방제용 엽면 살포제로 최종 선발하였다.



Fig. 5. Disease symptoms on tomato leaves treated with formulations and chemical fungicide against the leaf mold caused by *F. fulva* TF13 on tomato plants in a growth chamber.

A, A2.5-MP ; B, CH67-C ; C, A2.5-MP+CH67-C ; D, Triflumizole ; E, Contol ; F, Pathogen

제 3 절 플라스틱 하우스내 토경재배에서의 방제효과 검증

1. 연구수행 방법

토마토 잎 곰팡이병 방제용으로 최종 선발된 수화제형 A-2MP제제와 CH-67C제제를 공시하여 플라스틱 하우스 내 토경에서 재배한 토마토에서 잎 곰팡이병에 대한 방제효과를 검증하였다. 플러그포트에 과종하여 4주 된 유묘를 하우스 내에 재식한지 15주된 토마토 잎의 앞, 뒷면에 미생물 농약을 100배로 희석하여 200 ml 씩 골고루 처리 하였다. 24시간 뒤 토마토 잎 곰팡이병원균 TF13 균주의 균사조각 부유액 접종원($A_{550}=0.4$) 60 ml 을 역시 잎 앞, 뒷면에 골고루 살포 접종 하였다. 이때 대조약제로서 화학농약 트리후민(품목명: 트리후미졸(Triflumizole) 수화제)를 3000 배 희석하여 사용하였으며, 병원균 TF13 균주의 균사조각부유액은 PDA배지에 이식한 TF13 균주를 향온기에 2주간 배양(암, 25°C)한 뒤, 절취한 균사절편(직경 1 cm)을 PDB배지에 100 ml 당 4 개씩 넣고 4~5일간 진탕배양(25°C, 150 rpm)한 다음, 배양된 균사를 걸러내어 PDB를 이용하여 분쇄기(waring, U.S.A)로 10초간 균사를 갈아 농도를 $A_{550}=0.4$ 으로 조정하여 사용하였다. 각 처리구는 한주 당 간격을 20 cm로 하여 한 처리구에 12주 씩, 3반복, 완전임의배치법 으로 실시하였다. 약제처리는 1주일 간격으로 총 3회 처리하였으며, 마지막 약제 처리 후 1주일 뒤 발병엽을 을 조사하여 방제가로 환산하였다.

2. 연구결과

가. 개발 미생물농약의 포장에서의 방제효과 검증

생육실 포트 검증에서 최종선발 된 *B. amyloliquifaciens* A-2 균주의 수화제형 A2-MP제제와 *B. cepacia* CH-67 균주의 수화제형 CH67-C제제를 공시하여 플라스틱 하우스 내 토경 재배한 토마토에서 잎 곰팡이병에 대한 방제효과를 검증하였다. 그 결과, A2-MP제제와 CH67-C 제제의 100배 희석 처리구가 각각 79.4%와 76.6%로써 유의차가 없이 우수하였다. 반면, 500배 희석처리구에서는 각각, 72.6%와 68.2%를 보여 100배 처리 구와는 서로간의 유의차는 없게 다소 낮았졌다. 한편, 화학농약 트리후미졸 처리구는 79.6%의 방제가로 모든 처리구와 유의차는 없었다 (Table 15. Fig. 12).

Table 15. Disease control effects of formulations and chemical fungicide against leaf mold caused by *F. fulva* on treated tomato plants in the field

Treatments	Total 3 weeks spray at every 1 week			
	Disease severity (%) ^a			Control value (%)
A2-MP (100-fold spraying)+Pa	12.5	17.4	12.5	79.4 (±4.1) a
A2-MP (500-fold spraying)+Pa	22.4	20.2	14.0	72.6 (±6.4) a
CH67-C (100-fold spraying)+Pa	18.5	16.0	13.8	76.6 (±3.4) a
CH67-C (500-fold spraying)+Pa	13.9	29.8	21.9	68.2 (±11.6) a
Triflumizole+Pa	15.9	11.8	14.3	79.6 (±3.0) a
Pathogen (Pa) only	65.7	77.5	63.1	0.0 (±0.0) b

^a Disease severity (%) was made by estimating the percentage (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva*

^b Control value (%) = [(Disease severity in control plant - Disease severity in treated plant) / (Disease severity in control plants)] × 100



Fig 12. Disease control effects of 2 formulations using *B. amyloliquefaciens* A-2 and *B. cepacia* against leaf mold caused *F. fulva* TF13 on tomato plants at soil in the plastic house in Dae-jeo, Kim-Hae, Gyeongsangnam-Do on February, 2007.

제 4 절 미생물농약의 자연발생 농가실증시험

1. 연구수행 방법

2007년 1월 말경 토마토 잎곰팡이병이 자연 발생하기 시작한 경상남도 김해시 대저동 소재의 농가의 플라스틱 하우스를 임대하였으며, 생육실 포트검정과 하우스내 토경재배 검정을 통하여 선발된 수화제형 A2-MP제제, CH67-C 제제 및 제조합 A-2.5균주로 제조한 A2.5-MP제제를 화학농약과 비교하여 자연발생 농가에서 방제효과를 검정 하였다. 품종은 서건을 2006년 9월 15일에 파종하고 45일 후인 11월 1일에 재식하였으며 130~140일 후에 첫 수확 하였다. 처리방법은 미생물농약 수화제형 A2-MP 제제와 CH67-C제제 그리고 A2.5-MP제제를 농도별과 처리 횟수별, 각각 제제간의 교호 및 동시처리, 제제와 화학농약간의 교호 및 동시처리로 나누어서 실험을 실시하였다. 각각의 제제를 농도별, 횟수별 처리구를 제외하고 나머지 처리구는 1주 간격으로 3회 처리되었다. 최초 약제 살포는 2007년 2월 2일에 살포되었고 방제가 최종 살포 1주일 후인 2007년 2월 23일에 발병율은 다음과 같이 발병도로 계산하고 방제가로 환산하였다. 각 처리구는 평균 면적(25 cm x 56cm) 6주씩 3반복, 완전임의배치법으로 실시하였다. 이때 사용된 화학농약은 등록고시된 트리후미줄 3,000배를 사용하였다(한국농약공업협회. 2001).

$$\text{발병도}(\%) = \frac{\sum(\text{발병 엽수} \times \text{계수})}{7 \times \text{조사 엽수}} \times 100$$

계수 0 - 발병무

1 - 병반면적율 0-20%

3 - 병반면적율 20-50%

5 - 병반면적율 50-70%

7 - 병반면적율 70% 이상

$$\text{방제가}(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: 무처리구의 발병도, B: 처리구의 발병도

2. 연구결과

가. 개발 미생물제제의 처리횟수별 방제효과

2007년 1월 말경 잎곰팡이병이 자연발생하기 시작한 토마토의 경상남도 김해시 재배포장에서 선발제제인 수화제형 A2-MP, A2.5-MP, CH67-C 제제를 각각 3주 동안 매1주마다 살포횟수별로 처리하고 화학농약 트리플루미졸(Triflumizole)과 방제효과를 비교 검정하였다. 그 결과, CH-67 제제의 경우, 매주 3회 처리가 1회와 2회 처리보다 84.1%로 월등히 높았으며 서로간에 유의차가 있었다. 반면 A2-MP제제의 경우도 역시 1회와 2회 처리에서는 각각 25.1%, 22.8%로 유의차가 없이 낮았으나 지속적인 3회 처리에서는 60.0%로 방제가가 높아졌다. 재조합균주를 이용한 A2.5-MP제제의 경우도 앞서 두 제제와 동일한 경향을 보였으며 3회 처리시의 79.1%의 방제가는 A2-MP제제의 3회 처리보다 우수하였다. 화학농약 트리플루미졸(Triflumizole) 처리구는 81.6%로 각 제제의 3회 처리와 유의차가 없이 우수하였다. 따라서, 각 제제들은 매주 1회씩 3주간 처리하는 것이 화학농약과 동일한 방제가를 보여 효과적이며, 이들 중 CH67-C제제가 가장 산업화의 가능성이 높은 제제로 확인되었다(Table 16, Fig 13).

Table 16. Disease control effects of 3 formulations against leaf mold caused by *Fulvia fulva* TF13 Three treatments with one week interval on tomato plants in the plastic house

formulations (spray times/3 weeks)	Total 3 weeks spray							
	Disease severity (%) ^a				Control value (%)			
	I	II	III	MEAN	I	II	III	MEAN
CH67-C (1time)	41.7	50.1	47.6	46.5 (±4.3)ab	33.0	19.4	23.4	25.3 (±7.0)c
CH67-C (2times)	28.7	13.6	29.7	24.0 (±9.0cd	53.8	78.0	52.2	61.3 (±14.5)ab
CH67-C (3times)	18.8	3.8	7.0	9.9 (±7.9)d	69.7	93.9	88.7	84.1 (±12.7)a
A2-MP (1time)	40.5	45.6	53.6	46.6 (±6.6)ab	34.9	26.6	13.9	25.1 (±10.6)c
A2-MP (2times)	43.6	54.3	46.2	48.0 (±5.6)a	29.9	12.7	25.7	22.8 (±9.0)c
A2-MP (3times)	25.5	17.6	31.5	37.2 (±7.0)bcd	59.0	71.6	49.4	60.0 (±11.1)ab
A2.5-MP (1time)	52.3	50.0	36.0	46.1 (±8.8)abc	15.9	19.6	42.2	25.9 (±14.2)c
A2.5-MP (2times)	48.1	52.7	33.6	44.8 (±10.0)abc	22.6	15.2	46.0	27.9 (±16.0)bc
A2.5-MP (3times)	8.6	14.8	17.6	13.7 (±4.6)d	86.2	79.5	71.6	79.1 (±7.3)a
Triflumizole	6.9	3.0	6.0	5.3 (±2.0)d	88.8	65.2	90.8	81.6 (±14.2)a
control	76.3	52.4	57.9	62.2 (±12.5)c	0.0	0.0	0.0	0.0 (±0.0)c

^a Disease severity index (%) was made by estimating the percentage (%) of infected leaf area on each plant by *F. fulva*.

^b Control value (%) = [(Disease severity in control plant - Disease severity in treated plant) / (Disease severity in control plants)] × 100

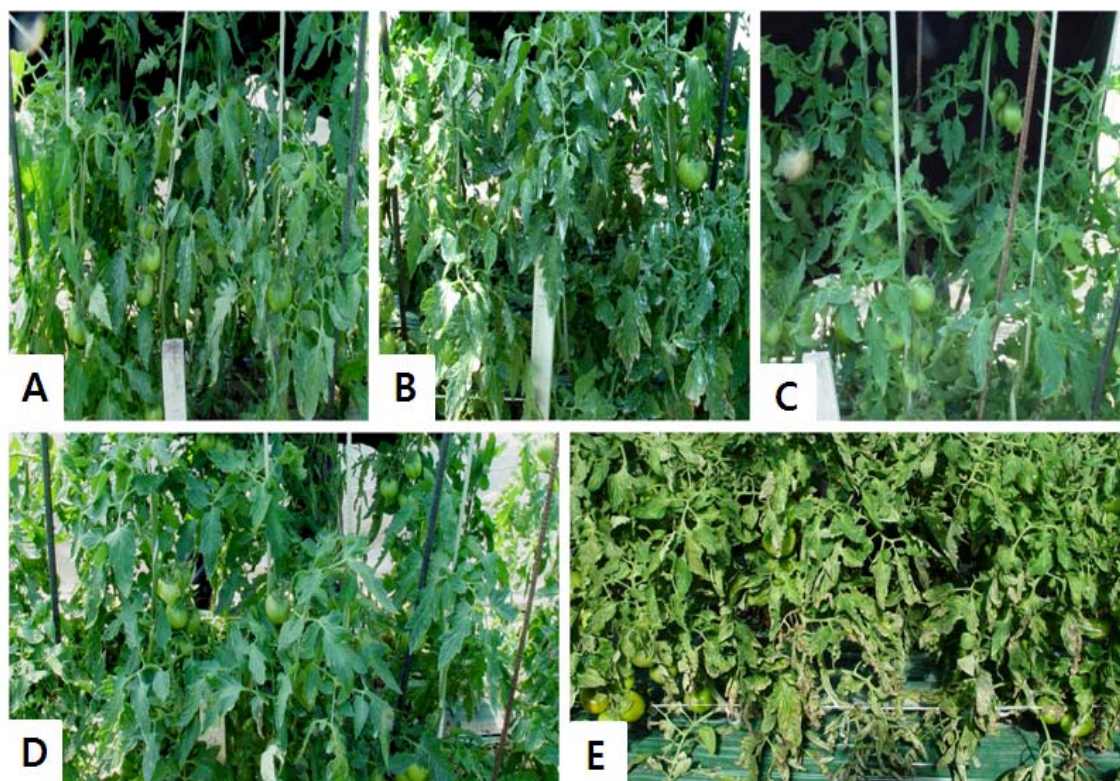


Fig. 13. Disease control effects of 3 formulations against leaf mold caused by *Fulvia fulva* TF13 Three treatments with one week interval on tomato plants in the plastic house.
A, CH67-C (3 times) ; B, A2-MP (3 times) ; C, A2.5-MP (3 times) ; D, Triflumizole ; E, Control

나. 개발 미생물제제의 혼합 및 교호처리에 의한 방제효과

수화제형 A2-MP, A2.5-MP, CH67-C 제제를 이용하여 혼합 및 교호처리에 의한 방제효과를 비교하여 검정한 결과, 혼합처리구인 CH67-C+ Triflumizole과 A2-MP+ CH67-C의 방제가는 각각 93.0%, 88.5%로 화학농약 트리후미졸(Triflumizole) 처리의 81.6%와 유의차가 없이 높았으며, 교호처리구에서는 화학농약과 교호처리한 A2-MP/Triflumizole/A2-MP의 방제가가 91.4%로 가장 높았으며, 다음으로는 CH67-C/Triflumizole/CH67-C의 90.0%와 A2-MP/CH67-C+ Triflumizole의 88.1%의 방제가 순으로 높았다. 한편, 화학농약을 1회도 처리하지 않고 제제만을 교호처리한 A2-MP/CH67-C/CH67-C처리구의 방제가가 85.5%로 화학농약 트리후미졸 3회 연속처리구의 81.6%보다 다소 높았으나 유의차가 없었다(Table 17. Fig 14). 따라서, 화학농약을 교호하여 살포하는 것이 제제만을 살포하는 경우보다 다소 우수하였으므로 화학농약과 혼합 또는 교호살포하는 것을 권장할 수 있음을 확인하였다.

Table 17. Disease control effect of mixture of formulation and chemical fungicide against leaf mold caused by *Fulvia fulva* TF13 on treated tomato plants in the plastic house.

	Total 3 weeks spray							
	Disease severity (%) ^a				Control value (%)			
	I	II	III	MEAN	I	II	III	MEAN
A2-MP+ CH67-C ^b	6.6	4.9	10.0	7.2 (±2.6)c	89.5	92.1	83.9	88.5 (±4.2)a
CH67-C+ Triflumizole	2.0	7.1	4.1	4.4 (±2.6)c	96.9	88.7	93.5	93.0 (±4.1)a
A2-MP/CH67-C/A2-MP ^c	43.1	46.7	34.8	41.5 (±6.1)b	30.7	24.9	44.0	33.2 (±9.8)b
A2.5-MP/CH67-C/A2.5-MP	48.9	45.3	50.2	48.1 (±2.5)b	21.4	27.2	19.2	22.6 (±4.1)b
A2-MP/Triflumizole/A2-MP	5.3	5.4	5.4	5.4 (±0.1)c	91.5	91.3	91.4	91.4 (±0.1)a
CH67-C/Triflumizole/CH67-C	6.7	2.9	9.0	6.2 (±3.1)c	89.2	95.3	85.6	90.0 (±4.9)a
A2-MP/CH67-C/Triflumizole	8.2	9.5	4.6	7.4 (±2.5)c	86.8	84.7	92.7	88.1 (±4.2)a
A2-MP/CH67-C/CH67-C	11.2	7.4	7.9	8.8 (±2.1)c	82.0	88.0	87.3	85.8 (±3.3)a
Triflumizole	6.9	3.0	6.0	5.3 (±2.0)c	88.8	65.2	90.8	81.6 (±3.3)a
CONTROL	76.3	52.4	57.9	62.2 (±12.5)a	0.0	0.0	0.0	0.0 (±0.0)c

^a Disease severity index (%) was made by estimating the percentage (%) of infected leaf area on each plant by *F.fulva*.

^b were equally mixed (1:1, v/v) and sprayed on the whole tomato plants for three weeks

^c Each formulation sprayed on the whole tomato plants for three weeks by turns

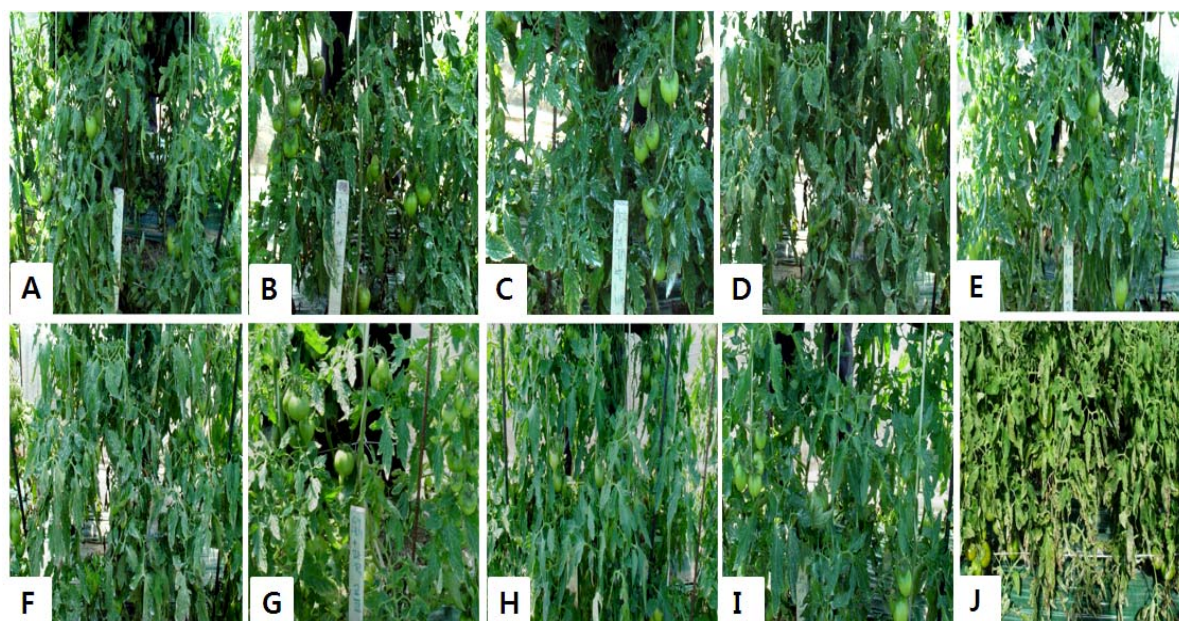


Fig. 14. Disease control effect of mixture of formulation and chemical fungicide against leaf mold caused by *Fulvia fulva* TF13 on treated tomato plants in a growth chamber
 A, A2-MP/CH67-C ; B, A2-MP+ CH67-C+ A2-MP ; C, A2-MP+ CH67-C+ CH67-C ;
 D, A2.5-MP+ CH67-C+ A2.5-MP ; E, Triflumizole ; F, CH67-C/Triflumizole ;
 G, CH67-C+ Triflumizole+ CH67-C ; H, A2-MP+ Triflumizole+ A2-MP ;
 I, A2-MP+ CH67-C+ Triflumizole ; J, Control

제 5 절 선발 미생물농약의 작물에서의 엽권정착력 및 저장안정성 검정

1. 연구수행 방법

가. 작물에서의 A7-2 제제의 엽권정착력 검정

우수 미생물제제인 액상수화제형 A2-MP제제의 엽권정착력 검정을 위해, 플라스틱하우스내 포트재배한 토마토(과종 후 7~8주)에 A-2MP 제제를 1회 처리한 후 10일까지 잎 부위별 1g 과 1cm² 당에 존재하는 *B. amyloliquifaciens* A-2균주의 생균수를 조사 하였다. 이때, 공시 된 A2-MP 제제는 A-2 균주를 rifampicin(100 µg/ml)이 포함 된 Nutrient agar(NA)배지에 1주간 계대 배양하여 획득한 rifampicin 저항성 균주(A-2R)로 액상 수화제(A2-RMP)제제로 제조하고 결구 상추 잎의 앞, 뒷면에 골구로 1회 살포 하였다. A-2 균주의 생균수는 rifampicin 100 µg/ml 이 포함 된 NA 배지에서 희석평판법으로 조사 되었으며, 제제의 초기 생균수는 1.4 X 10⁷ 이었다.

나. 저장 안정성 검정

선발된 미생물제제인 수화제형 A7-A와 액상수화제형 A7-2제제를 실온과 4℃에서 각각 보관 하면서 매달 동일한 날짜에 제제에 포함되어 있는 A-7균주의 생균수를 NA배지에서 희석평판법으로 조사하여 미생물제제의 안정성(storage stability)을 조사하였다. 또한 4℃에서 3개월과 8개월 동안 보관되어 있던 액상수화제 A7-2제제를 PDA배지상에서 균핵병원균과 대치배양하였으며, 1년간 보관하였던 A7-2제제의 농도별(100, 500, 1000배) 희석액을 균핵병원균과 대치배양하여 저지대 (inhibition zone)를 조사함으로써 이들의 장기간 보관 시의 안정성을 조사하였다.

다. 선발 미생물제제의 작물에서 생육촉진 효과 검정

선발 된 미생물인 A-2, CH-67 균주의 생육촉진 검정을 위해, NB 배지에서 24시간 종균배양 한 A-2, CH-67균주의 세균부유액 5 ml을 1,000 ml 용 삼각플라스크의 500 ml NB배지에 접종 하고 30℃에서 160rpm으로 72hr 진탕배양한 후 플라스틱 하우스 내 포트 재배한 토마토(과종 후 4주)에 1포트당 100 ml 씩 관주 하였다. 관주 후 1주일 뒤 다시 같은 양을 각각의 포트에 다시 관주 하였다. 2회 관주 처리 후 5주 뒤 각각의 처리 구별로 뿌리 및 성체식물의 생중량 및 건중량을 측정하였다.

다. 타작물의 토양병에 대한 키티나아제 활성 균주의 생물방제력 검증

잎곰팡이병 방제용으로 최종 선발된 A-2 균주와 CH-67 균주 그리고 재조합 균주 A-2.5 균주의 배양액을 이용하여 성체의 토마토, 결구상추에 처리하고 토양병원균인 *Rhizoctonia solani* 밀둥썩음병원균을 접종한 후 길항력을 조사하였다. 플러그포트에 파종하여 4주된 유묘에 A-2, CH-67, A-2.5 균주의 세균부유액을 유묘 한 주당 3 ml씩 분무접종하고 24시간 후에 병원균 접종 후 7일 뒤 50%의 발병율을 보이는 농도와 양인 $A_{550}=0.8$ 과 1 ml의 균사조각 부유액을 접종하였다. 방제가는 다음과 같이 환산하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: 무처리구의 이병엽율, B: 처리구의 이병엽율

라. 저장안정성 검증

선발된 미생물제제인 수화제형 A2-MP와 CH67-C 제제를 실온과 4℃에서 각각 보관하면서 매 달 동일한 날짜에 제제에 포함되어 있는 A-2 균주와 CH-67 균주의 생균수를 NA배지에서 희석평판법으로 조사하여 미생물제제의 안정성을 조사하였다. 또한 4℃와 실온에서 보관 중이던 A2-MP 제제를 토마토 포트상에서 잎곰팡이병에 대한 방제효과 실험을 실시하였다.

2. 연구결과

가. 플라스틱 하우스 내 포트재배한 토마토에서의 A-2제제의 엽권정착력 검정

Rifampicin 저항성 *B. amyloliquefaciens* A-2R 균주를 이용하여 제조한 액상수화제형 A2-RMP 제제를 토마토 잎에 1회 처리한 후 7일동안 A-2균주의 생균수를 잎 부위에서 측정 하였다. 그 결과 제제 처리 직후 잎에서의 초기 생균수는 2.3×10^2 cfu/g, 2.1×10^1 cfu/cm² 이었으며 경시적으로 약간 감소하였으나 처리 5일째에 잎 부위에서는 1.1×10^2 cfu/g로써 A-2균주의 엽권정착력이 5일까지 유지되는 것으로 확인되었다(Table 18).

Table 18. Survival of *Bacillus amyloliquefaciens* A-2, rifampicin resistance isolate of A-2R formulation on tomato leaves during 1 week in plastic house.

	Oday	1days	3days	5days	7days
cfu/g	2.3×10^2	9.0×10^1	3.9×10^3	1.1×10^2	0
cfu/cm ²	2.1×10^1	4.2×10^1	1.5×10^2	0	0

나. 개발 미생물제제의 작물에서 생육촉진 효과 검정

플라스틱하우스내 포트재배한 토마토에서의 생육촉진 효과 검정을 위해 A-2균주와 CH-67균주를 이용하여 토마토 1포트당 세균부유액 100 ml 씩 관주한 후 5주뒤 각각의 처리구당 뿌리와 성체식물의 생중량 및 건중량을 측정하였다. 그 결과, A-2 균주의 세균부유액 처리구의 경우, 잎의 생중량과 건중량은 각각 64.4 g와 8.3 g으로 무처리구의 41.6 g, 6.4 g 그리고 Hyponex처리구의 47.0 g과 5.5 g보다 유의차 있게 높았다. 그러나 뿌리의 생중량과 건중량은 각각 5.9 g, 1.8 g으로 무처리구의 2.9g과 1.9 및 Hyponex처리구의 생중량과 건중량인 3.7 g, 1.3 g과 비교하였을 때 서로간의 유의차는 없었다. 제제에서도 역시 전반적인 경향이 동일하였다. 하지만, CH-67 균주의 세균부유액과 CH67-C제제의 경우에는 무처리구와 생중량 및 건중량 모두 유의차없이 동일하였다. 따라서, A-2 균주는 잎곰팡이병에 대한 항균활성 뿐만 아니라, 작물의 생육촉진에도 영향을 미치는 것을 알 수 있다(Table 19, Fig 16).

Table 19. Plant growth promotion effects of cell cultures and formulations of *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 and *Burkholderia cepacia* CH-67 on fresh weight and dry weight

treatments		Fresh weight (g)		Dry weight (g)	
		leaves	root	leaves	root
cell suspension	A-2	64.4 (±9.9)a	5.9 (±2.2)a	8.3 (±1.2)a	1.8 (±0.4)a
	CH-67	47.4 (±9.4)ab	3.8 (±1.9)a	5.6 (±0.9)a	1.4 (±0.4)a
formulations	A2-MP	49.8 (±6.1)ab	4.5 (±2.4)a	8.0 (±1.5)a	1.6 (±0.4)a
	CH67-C	54.8 (±13.9)ab	2.9 (±1.4)a	6.4 (±1.4)a	1.3 (±0.3)a
Control(NB)		47.4 (±11.1)ab	3.5 (±0.6)a	6.9 (±0.9)a	1.3 (±0.4)a
Hyponex		47.0 (±8.4)ab	3.7 (±2.9)a	5.5 (±0.9)a	1.3 (±0.5)a
Control		41.6 (±11.3)b	2.9 (±1.4)a	6.4 (±2.1)a	1.3 (±0.4)a

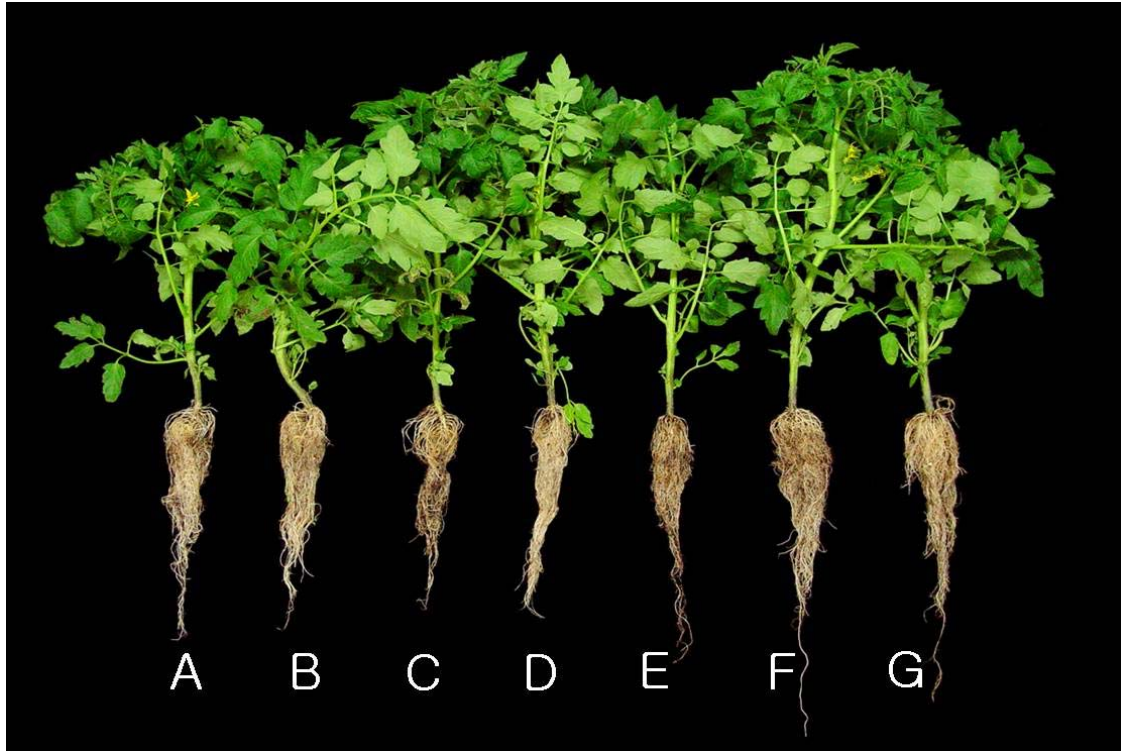


Fig 16. Growth Promotion effects of cultures and formulations using *Bacillus amyloliquefaciens*. A-2 and *Burkholderia cepacia*. CH-67. A, Control; B, Hyponex; C, NB; D, CH67-C; E, CH-67; F, A2-MP; G, A-2

다. 타작물의 토양병에 대한 방제력 검정

항균물질활성 및 키티나아제 활성균인 CH-67, 항균물질활성균 A-2 균주 그리고 항생물질에 내성 균주인 A-2.5T 균주의 세균부유액 또는 미생물제제(CH67-C, A2-MP)를 결구상추 및 토마토에 처리하여 이들의 밀둥썩음병에 대한 방제효과를 검정하고자 하였다. 그 결과, 결구상추의 경우에 CH-67 균주의 세균부유액이 82.3%의 방제가를 보여 가장 우수하였으며, A-2 균주와 A-2.5 균주의 세균부유액에서는 각각, 63.5%와 68.8%로 서로간의 유의차가 없이 CH-67 균주보다는 낮았다. 한편, CH67-C과 A2-MP 제제에서는 모두 낮은 방제가를 보였다(Table 20, Fig 17). 또한, 토마토 밀둥썩음병에 대한 방제효과를 화학농약(펜사이큐론)과 비교 검정한 결과, CH-67 균주의 세균부유액 처리구에서는 95.6%로 높은 방제가를 보였고, A-2 균주와 A-2.5 균주는 각각, 38.5%와 18.7%로 매우 낮았다. 반면, CH67-C과 A2-MP제제에서는

각각 80.1%, 14.6%로 잎곰팡이병 방제용으로 선발된 CH-67 균주 또는 CH67-C 제제에 의한 타작물의 토양병에 대해서도 우수한 방제효과가 있는 것으로 조사되었다(Table 20, Fig 18).

Table 20. Disease control effect of 2 formulations and 3 cell suspension against *R. solani* on crisphead lettuce and tomato plant at plugpots in a growth chamber.

	Head lettuce					Tomato				
	Disease severity (%)				Control value (%)	Disease severity (%)				Control value (%)
	I	II	III	Mean		I	II	III	Mean	
A-2	20.0	30.0	37.5	29.2	63.5 (±11.0) bc	65.0	56.7	41.7	54.5	38.9 (±13.3) bc
A-2.5T	22.5	27.5	25.0	25.0	68.8 (±3.2) bc	64.2	80.9	72.5	72.5	18.7 (±9.4) b
CH-67	27.5	5.0	10.0	14.2	82.3 (±14.8) ab	5.0	3.4	3.4	3.9	95.6 (±1.0) a
CH67-C	32.5	30.0	45.0	35.8	55.2 (±10.0) c	15.0	20.0	18.3	17.8	80.1 (±2.9) a
A2-MP	47.5	37.5	35.0	40.0	50.0 (±8.3) c	71.7	89.2	67.5	76.1	14.6 (±12.9) c
Pencycuron	5.0	5.0	5.0	5.0	93.8 (±0.0) a	10.9	5.9	10.8	9.2	89.7 (±3.2) a
Pathogen	82.5	80.0	77.5	80.0	0.0 (±0.0) d	88.4	92.5	86.7	89.2	0.0 (±0.0) d
Control	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0 (±0.0) a	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0 (±0.0) a

^a : Disease severity index (%) was made by estimating the percent (%) of infected leaf area on each plant by *R. solani* AG-1

^b : Control value (%) = [(Disease severity index in control plants - Disease severity index in treated plants) / Disease severity index in control plants] x 100

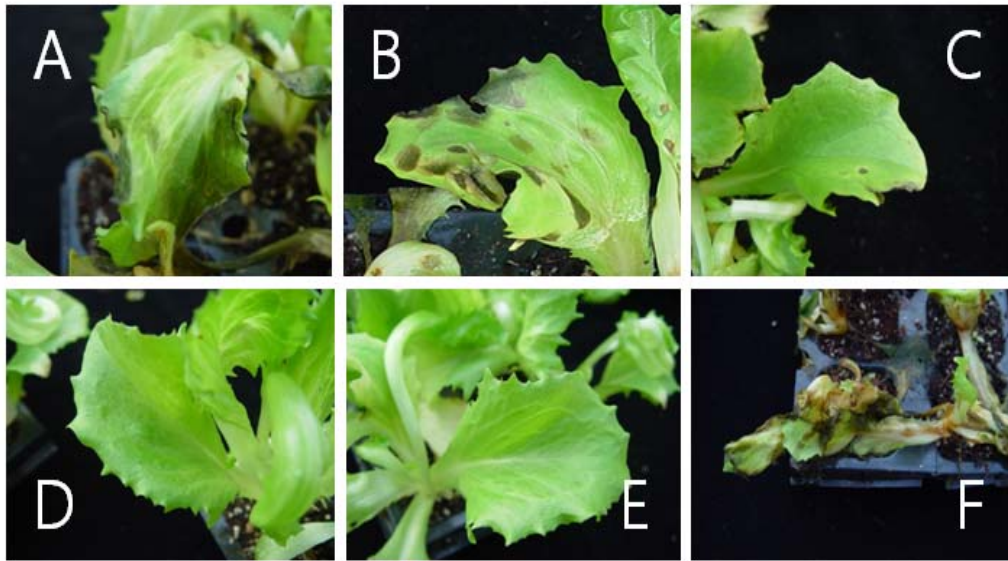


Fig 17 . Disease control effects of bacterial culture against *R. solani* AG-1 on crisphead lettuce at pots in growth chamber. A, A-2; B, A-2.5; C, CH-67; D, Chemical fungicide, Pencycuron; E, Control; F, Pathogen.

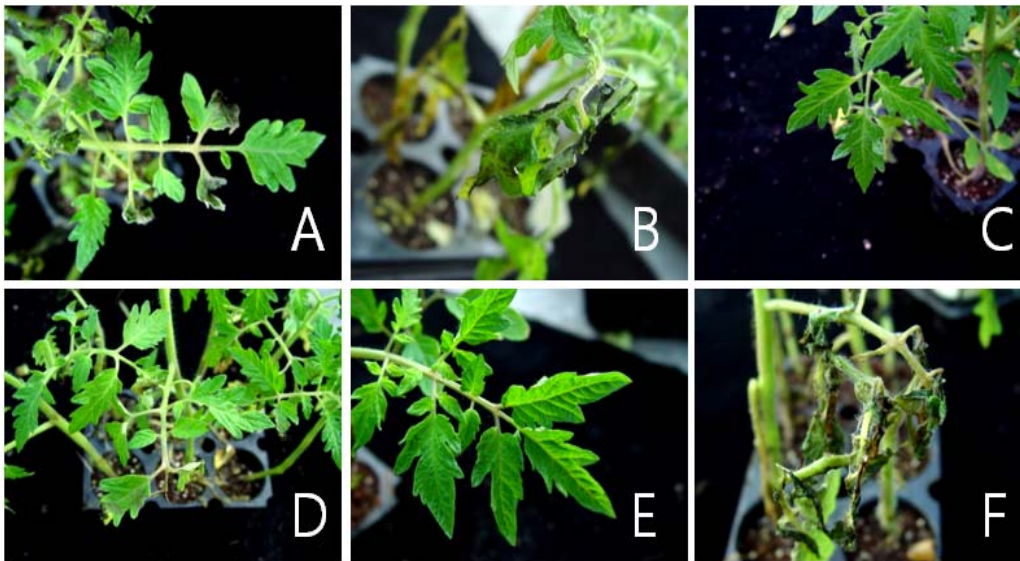


Fig 18. Disease control effects of bacterial culture against *R. solani* AG-1 on crisphead lettuce at pots in growth chamber. A, A-2; B, A-2.5; C, CH-67; D, Chemical fungicide, Pencycuron; E, Control; F, Pathogen.

라. 개발 미생물제제의 저장안정성 검정

선발된 미생물제제 수화제 A2-MP와 CH67-C제제를 저장온도 및 저장기간에 따른 안정성을 조사한 결과, A2-MP제제의 2006년 6월의 초기 세균수는 1.6×10^8 cfu/ml 이었으며, 11개월 후인 2007년 4월의 4℃와 실온에서의 세균밀도는 각각 6.0×10^6 cfu/ml 와 1.4×10^6 cfu/ml 이었다. 이는 초기의 세균수보다는 낮아졌으나 여전히 높은 밀도의 세균수가 유지되고 있었으며, 이때 실온과 4℃ 보관에 따른 세균의 밀도차이는 없었다(Table 21). 그러나, CH67-C제제의 경우, 제제를 제조 후의 세균수와 저장시 세균수가 관찰되지 않았다. 이로 보아 CH67-C제제는 CH-67균주가 분비하는 물질의 영향으로만 뛰어난 방제가를 보이는 것으로 생각된다.

Table 21. Cell density in A2-MP formulation according to storage periods at various temperature condition(℃)

Periods(Date)	Cell density (CFU/g)						
	2006/06	2006/07	2006/08	2006/09	2006/10	2006/11	2006/12
4℃	1.6×10^8	1×10^8	3×10^7	4.0×10^7	2.0×10^7	1.8×10^7	1.2×10^7
22~25℃	1.3×10^8	1×10^8	6×10^6	7.0×10^6	3.4×10^6	3.0×10^6	2.8×10^6

Periods(Date)	Cell density (CFU/g)			
	2007/01	2007/02	2007/03	2007/04
4℃	3.5×10^7	7.2×10^6	8.0×10^6	6.0×10^6
22~25℃	4.2×10^6	1.5×10^6	2.2×10^6	1.4×10^6

마. 개발 미생물제제의 장기간 보관후 방제효과 검정

4℃와 실온에서 보관중이던 A2-MP 제제를 잎곰팡이병에 대한 토마토 포트상에서 방제효과를 검정한 결과, 4℃와 실온보관 제제 각각의 방제가는 83.0%와 83.1%로 높게 나왔으며, 서로간의 유의차는 없었다. 따라서, 제제를 장기간 보관하여도 안정성이 매우 높음을 재차 확인하였다(Table 22).

Table 22. Storage stability of A2-MP formulations against *F. fulva* on tomato plant at pots in a growth chamber.

Treatment	4 days			
	Disease severity (%)			Control value (%)
A2-MP ^a +Pa	6.1	6.5	4.0	83.0(± 4.1) b
A2-MP ^b +Pa	6.1	4.7	5.7	83.1(± 2.2) b
Triflumizole+Pa	5.0	7.5	4.3	82.8(± 5.2) b
Pathogen(Pa only)	33.6	40.7	23.2	0.0(± 0.0) c
Control	0.0	0.0	0.0	100(± 0.0) a

^a : Stored at room temperature.

^b : Stored at 4°C

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척도(점수)	
1차년도 (2004년)	▶ 제1세부과제	○ chitinase 유전자의 cloning과 도입 및 발현	5
		○ chitinase 유전자의 항균활성 미생물로의 도입 및 발현	5
		○ 고향균 활성 chitinase 활성 재조합 균주 최종 선발	5
	▶ 제2세부과제	○ Chitinase 활성 균주 및 항균 활성 미생물의 지속적인 분리 및 배양적 생화학적 특성 검정과 동정	5
		○ 고향균 활성 chitinase 활성 모균주와 재조합 균주의 대량 활성을 위한 최적조건 확립	5
	▶ 제3세부과제	○ 선발 고향균 활성 모균주와 재조합 균주의 풋트상에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정	5
○ 선발 고향균 활성 chitinase 활성 모균주와 재조합 균주의 온실내에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정		5	
2차년도 (2005년)	▶ 제1세부과제	○ chitinase의 분리, 정제 및 특성 조사	3
		○ 선발 재조합 균주의 chitinase 분비능, 활성능 부가에 의한 길항력 증강 조사	2
	▶ 제2세부과제	○ 고향균 활성 및 chitinase 활성 모균주와 재조합 균주의 대량배양기술 개발	5
		○ 미생물제제 개발을 위한 Additives 선발	7
		○ 미생물제제의 제조기술확립 및 제형화	8
	▶ 제3세부과제	○ 미생물제제의 풋트상에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정	5
○ 미생물제제의 온실내에서의 잎곰팡이병 방제효과 검정		5	

3차년도 (2006년)	▶제1세부과제	○ 작물생육도(작물생육촉진) 조사 ○ 타작물의 다양한 토양병에 대한 방제력 검정	3 2
	▶제2세부과제	○ 미생물제제의 최적화실험 및 우수제형선발 ○ 미생물제제의 경시적 유효도 및 안정성 조사 ○ 미생물제제의 타작물에 대한 약해시험 조사	5 5 5
	▶제3세부과제	○ 미생물제제의 포장에서의 방제효과 실증시험 ○ 미생물제제의 실제 자연병 발생 농가하우스에서의 방제효과 실증시험	5 5
최종 평가	○ 고향균 chitinase 활성 균주의 유전학적 육종 ○ 고향균 활성 및 chitinase 활성 모균주와 재조합 균주를 이용한 미생물제제의 개발 ○ 미생물제제의 풋트, 온실 및 포장에서의 효과 검증	35 35 30	

최종목표인 미생물 농약을 개발하기 위한 본 과제의 연도별 연구개발목표에 따라 성공적으로 연구결과를 도출하였으며, 세부기관 사이에 유기적 연결에 의해 연구가 진행되었다. 이를 통해 연도별 연구 목표뿐만 아니라 최종목표를 성실히 수행하였다.

단, 본 연구의 연구목표 달성도를 연도별로 작성할 경우 본 연구결과를 이해하는데 혼돈을 초래할 수 있으므로 연도별이 아닌 연구목표에 따른 연구 결과와 기술발전의 기여도 등을 기술하였다.

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 및 기대효과

가. 기술적 측면

- 작물들의 안정적 활성 체계 확립
- 화학농약의 대체 물질의 개발
- 유용미생물을 이용함으로써 환경오염 감소
- 새로운 엽면살포용 제형화 기술의 확립
- 미생물농약 제제 개발의 독자적인 모델 구축 및 자료 제공

나. 경제 산업적 측면

- *Botrytis cinerea* 제어용 미생물농약을 개발에 이어 무공해 채소 활성으로 농가 소득 증대와 품질 향상
- 고품질의 청정 과채류 활성으로 수출 증대
- 농가부산물을 이용한 배지로 대량배양하여 제제를 개발하여 활성단가를 낮추어 세계시장에서의 충분한 경쟁력과 시장성이 있음
- 미생물농약 제조를 위한 항균성 길항균, 대량배지 제조 및 제제화 기술을 산업체에 기술을 이전, 협력하여 산업적 활성이 가능한 미생물농약을 제조됨
- 다른 병원균에도 적용이 가능하며 미생물농약 개발 분야에도 많은 부가가치 기대

다. 사회 문화적 측면

○ 실제 농가에서는 정확한 생리장해 및 병해 진단을 위한 전문가의 도움을 얻기가 어려워 적기방제 및 재배관리의 어려움으로 인해 농약을 주기적으로 살포하여 남용하는 사례가 자주 있다.

○ 미생물농약의 개발로 유기합성 농약과 비료의 남용을 줄임으로서 농산물 안전성을 향상시키고, 환경오염을 경감시키는데 기여함으로써 환경친화적 농업을 지향할 수 있다. 또한 유기농업과의 결합으로 WTO체제에 대비하여 수입농산물과 차별화한 무공해 농산물을 활성함으로써 농가소득을 올릴 수 있고, 국민들에게 우리 농산물 대한 신뢰를 얻을 수 있을 것이다.

○ 국내외적으로 토마토 잎곰팡이병에 대한 연구가 미흡하여 농민들과의 꾸준한 정기 모임을 통해 본 연구 목표와 결과에 대해 토의 한 바, 포장에서의 발병도가 실질적으로 감소되었다.

○ *Bukholderia cepacia* CH-67 균주, *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 균주 및 chitinase 유전자가 삽입된 A-2 형질전환체는 잎곰팡이병방제용 엽면살포제로 개발에 우수 길항균으로 각각 최종 선발되었는데, 이들 균주들에 의한 토마토 잎곰팡이병 방제에 대한 생물학적 방제 연구 또는 방제제 개발에 이용된 연구보고가 극히 드물어 균주 특허 및 논문투고의 활용에 기여도가 클 것으로 판단되었다.

○ 대량배양배지선발에 있어서 제빵개량제 배지와 현미유 배지는 산업화에 적용시 유용미생물의 세균밀도 증가, 항생물질 활성, 저렴한 단가 등으로 산업화에 매우 유리한 배지를 선발한 것으로 판단되며 특허출원 및 논문투고를 준비 중에 있다

○ 썬크리미로 제조된 액상수화제 (A7-2제제)는 지금까지 알려진 바가 없는 독특한 형태의 제형화 형태로서 썬크리미는 끈적임이 많고 무독성이며, 유용미생물에 영양분을 공급하는 미세한 변성전분의 전달매체로서 환경보존적인 새로운 미생물농약을 개발한 것으로 사료된다.

○ 제형화를 위한 전달매체로서 옥수수 전분, 타피오카 전분, 메주가루, 변성전분을 사용하여 수화제형을 제조하였다. 이들은 물에 대한 용해성은 높으나 결구상추 잎에 살포된 후 약혼을 남겨 미관상 좋지 않았으며 살포기의 입구를 막는 등 여러 가지의 단점이 있어 이를 보완하기 위해 약혼을 남기지 않고 끈적임의 특성이 높은 찰옥수수전분, 썬크리미, 썬테더, 썬프리젤, 썬사이즈, 썬캡, 썬슈퍼젤, 썬배터, 제오실, 변성전분, 제오실 등을 농도별로 달리하여 제형화하였다. 썬크리미와 썬캡으로 액상수화제를 개발하였으며 본 제형화 기술은 미생물농약 개발에 처음으로 시도되는 바 기술이전 등의 가치가 있을 것으로 판단되며, 본 연구에서 사용한 모든 전달매체는 저렴한 가격으로 산업경쟁력이 있으며, 환경보전적이며 자외선 차단 및 부착정도가 높은 장점이 있어 새로운 제형화 기술개발에 기여하였다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

학회 및 논문 발표

1. Cloning and expression of two chitinase genes from *Bacillus licheniformis* N-1 and *Bacillus licheniformis* CH-1. Han-Woo Kim, Kwang Youll Lee, Kwang-Ryool Heo, Young Byoung Yi, jae sung-nam, Seon-Woo Lee, Byung-Ju Moon.
2. Chitinolytic Activity from two bacterial strains *paenibacillus pabuli* and *Cellulosimicrobium cellulans*. Han-Woo Kim, Kwang Youll Lee, Ok-Ju Chun, Eu-Jin Chung, Young-Byoung Yi, Seon-Woo Lee, Byung-Ju Moon,
3. Isolation of an antagonistic bacterium active against *Fulvia fulva*, causing leaf mold on tomato. Ok Ju Chun, Han Woo Kim, Kwang Youll Lee, Ki Hyuck Choi, Hyun Young Jang, Seon Woo Lee and Byung Ju Moon.
4. Isolation of a chitin-degrading bacterium, *Cellulosimicrobium cellulans* CH-10 and its antifungal activity. Kwang Youll Lee, Han Woo Kim, Ok Ju Chun, Young Byung Yi, Soon Je Jung, Seon Woo Lee and Byung Ju Moon.
5. Selection of optimum media for mass culture of an antifungal bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 against tomato leaf mold pathogen, *Fulvia fulva*. Ok-Ju Chun, Hyun-Young Chang, Ki-Hyuck Choi, Hyeon-Gi Kong, Hyun-Ju Kim, Soon-Je Jung, Seon-Woo Lee, Byung-Ju Moon.
6. Biological control of tomato leaf mold caused by *Fulvia fulva* using wettable powder formulations of *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 strain. Ok-Ju Chun, Hyun-Young Chang, Ki-Hyuck Choi, Hyeon-Gi Kong, Hyun-Ju Kim, Soon-Je Jung, Seon-Woo Lee, Byung-Ju Moon.

7. Isolation of a potential biocontrol bacterium *Burkholderia cepacia* CH-67 to control tomato leaf mold. Ki-Hyuck Choi, Hyun-Gi Kong, Kwang-Youll Lee, Dae-Wook Kim, Kwang-Ryool Heo, Hyun-Ju Kim, Soon-Je Jung, Seon-Woo Lee, and Byung-Ju Moon.
8. Biological control of tomato leaf mold using the wettable powder formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 Cellulosimicrobium cellulans CH-10. Ki-Hyuck Choi, Hyun-Gi Kong, Dae-Wook Kim, Hyun-Young Chang, Hyun-Ju Kim, Soon-Je Jung, Seon-Woo Lee, and Byung-Ju Moon.
9. Biological control of tomato leaf mold by *Fulvia fulva* using wettable powder formulations of *Burkholderia cepacia* CH-67. Ki-Hyuck Choi, Hyun-Gi Kong, Dae-Wook Kim, Kwang-Ryool Heo, Kwang-Youll Lee, Hyun-Ju Kim, Soon-Je Jung, Seon-Woo Lee, and Byung-Ju Moon.
10. Effects of mixed treatment of *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 and *Burkholderia cepacia* CH-67 formulations to control tomato leaf mold. Ki-Hyuck Choi, Hyun-Gi Kong, Dae-Wook Kim, Kwang-Ryool Heo, Kwang-Youll Lee, Hyun-Ju Kim, Young-Byung Yi, Seon-Woo Lee, and Byung-Ju Moon.
11. Biological activity of two formulations using *Bacillus amyloliquefaciens* A-2 and *Burkholderia cepacia* CH-67 against tomato leaf mold. Ki-Hyuck Choi, Hyun-Gi Kong, Dae-Wook Kim, Kwang-Ryool Heo, Kwang-Youll Lee, Hyun-Ju Kim, Soon-Je Jung, Seon-Woo Lee, and Byung-Ju Moon.
12. Mass culture condition of *Burkholderia cepacia* CH-67, the biocontrol agent against tomato leaf mold. Hyun-Gi Kong, Ki-Hyuck Choi, Dae-Wook Kim, Kwang-Ryool Heo, Kwang-Youll Lee, Hyun-Ju Kim, Soon-Je Jung, Seon-Woo Lee, and Byung-Ju Moon.
13. Characterization of chitinase from *Bacillus licheniformis* N1 and its transformation into other *Bacillus* species. Kwang-Youll Lee, Kwang-Ryool Heo, Ki-Hyuck Choi, Hyun-Gi

Kong, Dae-Wook Kim, Hyun-Ju Kim, Young-Byung Yi, Seon-Woo Lee, and Byung-Ju Moon.

14. Isolation and Characterization of a Chitinolytic and Antifungal Bacterium *Burkholderia cepacia* CH-67. Kwang-Youll Lee, Ki-Hyuck Choi, Hyun-Gi Kong, Dae-Wook Kim, Kwang-Ryool Heo, Hyun-Ju Kim, Hyun-Young Chang, Seon-Woo Lee, Young-Byung Yi, and Byung-Ju Moon.

석사학위 논문

전옥주, 2005. 토마토 잎곰팡이병(*Fulvia fulva*) 방제 미생물농약의 개발. 동아대학교 농생물학과

특허 출원

토마토 잎곰팡이병 방제효과를 가지는 신규바실러스 아밀로리커파시엔스 A-2 균주 및 그 용도
특허출원일자 2006.09.07 10-2006-0088435

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 생물농약의 개발 현황

생물농약은 농작물의 해충, 병원미생물 및 잡초를 방제하기 위하여 자연환경에서 분리된 병원균, 기주 저항성 미생물, 천연물 농약 및 천적을 제품화한 것으로 그 역사는 1888년 California의 감귤 이세리아각지벌레를 호주산 베다리아 무당벌레(*Vedalia beetle*)로 방사하여 방제에 성공한 이후, 1920년대 영국에서 토마토 온실가루이를 온실가루이좀벌로 방제하였고, 1960년대에는 European spruce sawfly(잎벌류)를 virus로, 나방류는 *Bacillus thuringiensis*로 방제에 성공하였다. 1991년도에는 식물저항성 유도미생물로 미생물 종자처리제를 개발하여 저항성이 유도된 식물 스스로 병 발생을 억제하도록 하였다. 1998년 말 현재 미국에서는 180여종의 유효성분이 생물농약으로 등록되었고, 제품의 수는 약 700여 종에 달한다. 현재 세계적으로 상품화되어 보고된 생물농약은 크게 미생물농약, 페로몬을 포함한 생화학농약, 식물농약, 천적 및 기타로 구분하여 보고되어 있다(표 1). 이 중에는 대부분이 살충성 생물농약으로 119개 품목이 있고 다음으로 살균성, 살선충성이며 세균, 곰팡이, 바이러스 등으로 구성된 미생물 농약이 주종을 이루고 있다. 그 외 페로몬과 천적이 40-45개 품목이 보고된 것으로 보아 이 분야의 발전도 기대되고 있다.

국내에는 1930년대 사과면충을 사과면충좀벌을 이용하여 방제에 성공한 이후 1976년도에 제주도 감귤에 발생하는 루비각지벌레를 일본에서 도입한 루비붉은깡충좀벌로 방제시킨 예가 있으며, 1987년에는 인삼뿌리썩음병 방제를 위해 바이코나가 개발된 예가 있었다. 그 후 1994년에는 역병 방제용으로 AC-1을 개발하는 등 여러 종류의 길항 미생물들이 개발되어 소개되었다. 최근에는 미생물제제라고 하여 살충, 살균 효과가 있다고 알려져 있는 제품들이 34개회사로부터 72 품목이 시장에 소개되어 있는데 국내에 정식으로 등록된 토양 미생물제제는 1999년 현재 총 57개 품목이었으며 살충제 6품목, 살균제 27품목, 그 외에는 효소제나 유용미생물 제제로 되어 있다. 우리나라는 2000년도 6월에 미생물 농약의 등록 기준과 방법이 고시되어 토양미생물 제제들 중에서 살균 및 살충 효과가 인정되는 제품들도 미생물 농약의 범주에 들어오도록 제도적 뒷받침이 마련되면서 본격적인 생물 농약 시대에 접어들었다. 천적은 1996년부터 본격적으로 연구를 시작하여 아직 상업화하기에 미진한 점이 있으나 벤처기업을 중심으로 꾸준히 개발하고 있어 곧 천적에 의한 방제 사례도 많이 발생하게 될 것이다.

표 1. 1998년까지 개발된 신규 생물농약 수 및 개발 제품

(Biopesticide Manual, 1998)

구분		살균	살충	살선충	제초	계
미생물	세균	10	9	(2)	1	20
	곰팡이	11	6	1	2	20
	선충	-	7	1	-	8
	원생동물	-	1	-	-	1
	바이러스	-	11	-	-	11
페로몬		-	45	-	-	45
천적		-	40	-	-	40
계		21	119	2	3	145

2. 현재 생물 농약의 시장 규모

영국의 CPL 사에서 조사한 세계 생물농약 시장은 2000년도에 약 1억5천불 정도로 예상되었고 그 중에서 BT가 1억천불로 대부분을 차지하고 있으며 미생물 농약은 4천만불로 보고되어 있다. 이 시장은 전체 농약 시장의 약 0.5%로 미비하지만 현재 개발 중인 미생물 농약, 생화학 농약 및 천적 등과 환경친화형 농업으로 전환 추세에 있다는 것을 볼 때 시장이 확대될 것으로 예상된다(표 2).

현재 생물농약 시장의 규모는 전체 농약시장 규모 97년 기준의 약 300억 달러의 3%에 지나지 않지만 2010년에는 430억 달러의 10%를 차지할 전망이다. 2013년에는 전세계적 생물농약 시장은 약 50억불이 될 전망이다.

표 2. 세계 생물농약 시장

(단위:백만달러)

연도	계	BT계	미생물제
1996-1997	85-90	70	15-20
1998	120	90	30
1999	130-135	100	30-35
2000	150	110	40

Biopesticides 5th Edition, CPL Sci., 1999

일본 농약요람에서 조사한 생물농약 시장을 보면 2000년 현재 12억엔으로 살충성 생물농약이 약 10.9억엔으로 85%를 차지하며 그 중 BT 제가 7.6억엔이며 살균성 생물농약은 13억원에 불과하며, BT를 제외한 생물농약은 5.6억엔 규모로서 일본 전체 농약 시장의 0.34%로 세계 농약보다 미약한 실정이다. 일본에서 판매중인 생물농약은 총 22개 품목으로 살충제 17품목, 살균제 4품목, 제초제 1품목으로 전체 품목 구성도 아직 취약한 실정이다(표 3).

표 3. 일본의 생물농약시장

(단위: 백만엔)

연도	계	살충제			살균제	제초제
		BT계	기타제	소계		
1998	1,075	799	221	1,020	5.2	49.8
1999	1,174	844	252	1,096	5.4	72.6
2000	1,272	756	332	1,088	118.0	65.7

2000농약요람(일본식물방역협회)

국내 미생물농약 시장을 보면 세계 시장과 마찬가지로 BT 제가 주이며, 2000년에는 판매액이 33억원 정도였고 살충, 살균 효과가 있다고 주장하는 토양미생물제제의 판매액을 추정한 금액

을 더하면 77억원 정도이며 그 중 BT를 제외한 살충제가 약 13억원, 살균제는 31억원 정도로 추정되며 전체농약 시장의 0.31%에 해당되는 극히 미약한 시장을 형성하고 있다. 이 구성은 현재의 세계 시장에서 생물 농약이 차지하는 비율보다도 낮은 수준이지만 우리나라는 국토가 좁고 다양한 작물이 재배되고 있는 만큼 다양한 병해충 및 잡초도 많이 발생되고 있어 국내의 시장 잠재력은 크다고 하겠다(표 4).

표 4. 국내 생물 농약 시장 현황

(단위: 백만원)

연도	계	BT제*	토양미생물제제(추정치)**			천적 등
			살충제	살균제	제초제	
1995	4,359	4,359	-	-	-	-
1998	3,723	2,324	300	1,000	-	-
1999	6,933	3,133	800	3,000	-	-
2000	7,682	3,282	1,300	3,100	-	-

*BT제는 농약연보,

**토양미생물제제 중 살균, 살충효과가 있다고 주장하는 제품의 판매액 추정량

3. 국내의 생물농약 시장 추정

생물농약의 판매 가능 시장을 추정해보기 위하여 화학농약의 최근 3년 평균 판매금액을 적용 대상별로 구분하여 정리해본 결과 침투할 수 있을 것으로 예상되는 시장은 약 3310억원으로 추정되며 그 중 살균제는 958억원, 살충제는 2353억원으로 살충제 시장이 클 것으로 예상되며 제초제 시장은 불확실할 것으로 예상된다.

현재 등록된 생물농약의 분포는 살충제 75%, 살균제 15%, 제초제 5%, 기타 5% 정도를 차지하고 있다. 친환경재배지의 경우 천적은 약 5%, 살균제, 살충제는 각각 20% 정도 사용될 것으로 가정하였고, 시설재배지에서는 친환경재배와 겹치는 면적을 제외하고 천적은 10%, 살균제 살충제는 각각 20% 사용될 것으로 가정하였고, 노지재배에서는 천적이 0.5%, 살균제는 1%, 살충제는 2% 사용될 것으로 예상하여 농약사용정도가 다른 재배형태별로 2010년도 생물농약의 시장을 추정해본 결과 BT, 천적을 포함하여 821억원으로 예상되었고 그 중에서 BT 류가 약 50억원, BT를 제외한 살충제가 319억원, 살균제가 186억원, 천적이 258억원, 제초제는 약 7억원 정도로 생물농약이 전

체 농약 시장의 6.2% 정도 차지할 것으로 예상된다(표 5).

표 5. 생물농약 시장 추정(2010년)

구분		계	친환경재배	시설재배	노지재배	
재배면적(ha)		2,000,000	104,000	117,500	1,778,500	
생물농약 (백만원)	살충제	BT	5,000	500	1,500	3,000
		그외	31,950	8,320	9,400	14,230
	살균제	18,630	6,240	7,050	5,340	
	제초제	700	500	-	200	
	천 적	25,800	5,200	11,750	8,850	
	소 계	82,080	20,760	29,700	31,620	
	화학농약 (백만원)	1999년	932,700	1,000	235,200	696,500
2010년	1,242,200	26,500	196,500	1,019,200		
총계		1,324,280	47,260	226,200	1,050,820	

천적:(친환경재배×0.05+ 시설재배×0.1+ 노지재배×0.005)×100만원/ha = 258억, 살균제:(친환경재배×0.2+ 시설재배×0.2+ 노지재배×0.01)×30만원/ha = 186억, 살충제:(친환경재배×0.2+ 시설재배×0.2+ 노지재배×0.02)×40만원/ha = 319억, *노지재배 농약비에는 골프장이 포함됨

4. 해외 개발기술의 최근 연구동향

- 1) 초기에는 증량제(filler)로 peat를 썬거나 전착제를 혼합하여 살포하여 제품의 효과를 증진하려 하였으나, 최근에는 알긴산, 폴리아크릴아마이드, 카라기난 같은 생체고분자물질속에 포자를 고정화한 후, 각종 첨가제(영양원, 전착제, UV 차단제, 증강제, PGPR 등)와 혼합하여 포장에 살포하는 방법이 개발되었다(Burges, 1998).
- 2) 미생물이 활성화하는 항생물질을 대량활성하도록 하여 산업화하였다(Lumsden 등, 1995).
- 3) 미생물(*G. virens*)을 종자에 처리하여 전착제인 Pelgel로 피막화하여 종자처리제로 개발하였다(Mao 등, 1998).
- 4) *Mysobacteria*에서 발견된 soraphen 화합물이 식물병원균에 우수한 활성을 보여 진균의

acetyl-CoA carboxylase 연구가 새로운 살균제 탐색에 이용되고 있다(Gerth 등, 1994).

5) Tublin(Butters 등, 1995)과 mitochondria respiration(Anke 등 1977) 및 glucose의 transport-associated phospholylation(Arima 등, 1965)등을 억제하는 화합물들이 미생물농약 연구에 이용되고 있다.

6) 병원균에 대한 방어기작인 식물체가 활성화하는 키티나아제, β -1,3-glucanase 등의 PR 단백질 연구가 최근 진행되고 있다(Yun 등, 1997).

7) 최근, 유전공학기법에 의한 고효율성 변이주 탐색으로 미생물농약에 적용될 수 있도록 활발하게 연구되고 있다.

5. chitinase gene에 관한 특허기술정보

○ 한국특허 총1편, 미국특허 총5편, 일본특허 총6편, 유럽 특허 총 8편 등이 있다. 이 중 한국특허(KPTN199705007027)는 산토모나스 속(*XANTHOMONAS* SP.)의 균주로부터 유래된 키틴분해효소 유전자에 관한 연구였으며, 미국, 유럽, 일본특허에서는 대부분 미생물로부터의 chitin 유전자의 분리 및 발현 또는 식물방어기작연구와 식물방어조절인자에 관련된 연구들이 대부분이었다. 한편의 미국특허에서만 곤충유래 chitinase 유전자를 이용한 transgenic plant와 biocide 개발에 관한 연구내용을 실고 있었다(미국특허 USP1999025866788, Recombinant chitinase and use thereof as a biocide / Kansas State University Research Foundation).

6. 분자농업의 장점

- 1) 대량활성이 가능해 정밀화학제품 및 단백질의 활성화비용을 대폭 절감할 수 있다.
- 2) 안전성이 높다
- 3) 식물냉에서 활성화된 단백질은 인체에서와 매우 유사한 접합(folding) 형태를 지닌다.
- 4) 공기중의 탄소원과 태양에너지를 근원적인 에너지원으로 사용하여 활성화 단가가 절대적으로 저렴하다.

하지만, 분자농업에 의해 만들어진 제1세대와 제2세대 GM 작물들은 안정성 및 환경영향평가를 극복해야 하는 문제점이 남아 있다. 유전자 조작을 통해 의약품을 만들어 내는 변형된 식물의 활성화는 농업에 있어서 유전공학의 새로운 흐름을 대표하고 있는 것으로 보이지만 최근 제초제 저항성 콩,

내충성 옥수수 등의 GMO 작물에 의한 식량활성에 대해 안전성과 이것이 환경에 미치는 영향에 대한 논쟁이 시작되면서 분자농업도 이 연장선 상에서 여러 가지 우려가 제기되고 있다.

분자농업을 실험하고 있는 기업이나 연구진들은 다양한 대책마련에 부심하고 있으며, 이들의 안전성 검증을 위한 연구를 진행하고 있다. 현재 각국의 환경단체나 연구진들에 의해 분자농업에 문제점 등을 제시하면서 연구를 중단하도록 종용하지만, 미래에는 분자농업으로 활성화된 작물들이 점차 증가함에 따라 각국의 정부 당국은 이들 작물의 안전성을 확보하는 방법을 놓고 고민하고 있다.

하지만, 본 연구의 고향균활성 chitinase 활성 균주를 이용한 환경친화적 미생물제제 개발에서는 chitinase를 활성화하지 못하는 균주에 chitinase 유전자를 삽입하여 chitinase의 활성 및 고향균활성 물질 분비를 유도한 재조합 미생물을 개발하여 생물학적 방제제로 이용하는 것이므로 현재 문제되고 있는 재조합 작물이 환경에 미치는 영향은 재조합식물에 포함된 약품이 건강한 사람에게 오히려 생리적 변화를 유발할지도 모르는 것과 이러한 작물이 결국 생태계와 환경을 오염시킬 것이라고 추정하는 것이므로 본 연구와는 다른 관점으로 대처해야 할 것으로 판단된다. 또한, 재조합 미생물만을 이용한 미생물제제가 70년대 이후부터 지금까지 환경에 다량 축적된 맹독성 화학농약과 GMO에 의한 영향보다는 미약할 것으로 추정되나 실용화를 위해서는 안전성을 고려한 방제 방법 역시 간과하지 않을 수 없다. 따라서, 본 연구수행과정 중 개발 제제의 방제 효과 검정에 있어 아래와 같은 방제 방법으로 환경에 노출 될 수 있는 기회를 줄이고자 하였다.

7. 안전성을 고려한 방제 방법

- 1) 환경에 해를 끼칠 가능성을 최소화하기 위해 일반 미생물제제와는 달리 재조합 미생물제제는 생육상내 실험을 일반작물로부터 가능한 한 먼거리에서 격리하여 수행한다.
- 2) 특히, 온실내 실험 또한 일반작물로부터 떨어진 거리와 닫힌 공간에서 수행한다.
- 3) 자연발생된 포장에서의 방제효과는 지양하며, 반드시 해야 할 경우에는 닫힌 공간에서만 수행한다.
- 4) Lab testing protocol을 확립하도록 한다.
- 5) GMO와 마찬가지로 재조합 미생물제제에 의한 환경 영향평가에 대한 진단과 관련 기술정보를 수집한다.

일부 환경학자들은 유전자조작으로 만들어진 식물이 안전성 검정을 거쳐 상업적으로 유통되는 것은 규제 대상에서 제외되나, 약물을 함유하고 있는 식물의 재배는 규제대상이 된다고 하였다.

많은 규제와 제약이 따르겠지만 분자농업의 미래는 밝다고 예견하고 있으며, 보다 안전한 고발현시스템과 대사공학적 경로의 조절기능을 갖춘 작물 자체가 미래의 정밀산업과 신 바이오산업이라는 것에 대해 이의를 제기할 사람은 없으리라고 본다. 이러한 기술 조류는 앞으로 인지하지 못한 사이에 우리의 삶과 연관되어 진행될 것은 자명하며 국제적인 경쟁력을 갖추기 위해서는 분자농업에 대한 규제만을 강화하지 말고 다양한 측면에서 안전한 기술적 시스템을 확립하는데 세계의 연구자들과 발맞추어 지속적으로 연구하여 인류의 미래 환경을 더욱 안전하고 깨끗하기 유지시켜 줄수 있도록 국가적인 차원에서 기술발전의 방향을 설정해야 할 것으로 사료되는 바이다.

8. 시장 확대 가능성

생물농약은 활성비가 높고 수율이 낮고, 약효발현이 늦고, 효과발현기구가 명확하지 않으며 경영처리에서는 생물요인(포자발아)과 비생물요인(UV, 살균제 등)에 의해 영향을 쉽게 받는 단점이 있다. 특히, 토양처리에서는 토양물리성에 의해 영향을 크게 받으며, 효과에 비해 가격이 다소 고가이고 생물체 자체로 방제하므로 저장기간이 짧고 기주 특이적이라 대상 방제 범위가 좁다. 그러나 생물농약 시장의 확대를 가능케 하는 특징으로는 천연 생물 또는 천연물질이므로 부수적 피해가 없고 환경친화적이며, 먹이사슬에 축적되지 않아 수확기까지 사용될 수 있으며, 특히, 강, 호수에 오염 없이 병해충을 방제할 수 있어 저항성 병해충 방제에도 매우 효과적이다.

이처럼 생물농약은 화학농약과는 다른 특성을 가지고 있으므로 이를 개발, 보급, 유통, 판매, 사용하기 위해서는 전 분야에서 새로운 관점으로 접근해야 한다. 따라서 초기 시장 접근이 쉬운 제품을 개발해야 하는데 화학농약과 직접 경쟁되지 않는 분야에서 효과가 우수하고, 약효 발현기간이 빠르며, 사용하기 편리하고, 저장성이 우수한 제품의 개발이 필요하고 호기심으로 사용한 소비자들이 계속 사용하도록 유도해야 한다. 생물농약 시장은 적은 면적 작물, 특이한 병해충, 토양병해충, 저항성 병해충, 농약 잔류문제로 생겨나는 시장에 적용될 수 있는 제품들이 우선 개발되는 것이 좋으며, 이렇게 개발된 제품들은 시장에 정착되기 위해서 정밀한 사용 방법이 개발·보급되어야 한다. 결론적으로 화학농약을 배제한 작물보호가 아니라 화학농약을 합리적으로 적게 사용하면서 생물농약과 교호 살포하여 화학농약 수준의 방제효과를 보여주는 환경친화적이고 저농약 재배법 보급이 생물농약 시장의 확대에 중요한 역할을 할 것으로 많은 연구자들에 의해 보고되고 있다.

제 7 장 참고문헌

Anke, T., F. Oberwinkler, W. Steglich, and G. Schramm. 1977. The Strobilurins—new antifungal antibiotics from the bacidiomycetes *Strobilurus tenacellus*. *J. antibiot.* 30 : 806~810.

Biondi, N., Piccardi, R., Margheri, M. C., Rodolfi, L., Smith, G. D., Tredici, M. R. 2004. Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(6):3313-3320.

Burges, H. D. 1998. Formulation of microbial biopesticides : Beneficial microorganism, nematodes, and seed treatments. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, Boston. London.

Butters, J. A., S. J. Kendall, I. E. Wheeler, and D. W. Hollomon. 1995. Tubulins: lessons from existing products that can be applied to target new antifungals, p. 131-142. In G. K. Dixon, L. G. Copping and D. W. Hollomon (eds). *Antifungal agents -Discovery and Mode of action*, Bios Scientific Publisher, oxford.

Cook, R. J. and Baker, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS. St. Paul, Minnesota. 539pp.

Dandurand, L. M., Mosher, R. D. and Knudsen, G. R. 2000. Combined effects of Brassica napus seed meal and *Trichoderma harzianum* on two soilborne plant pathogens. *Can. J. Microbiol.* 46(11): 1051-1057

David K Rodham, 1999 David K Rodham, Youlin Wang, John B Cantwell, Peter DWinn and Jill Founding, 1999. Formulation Microcontrol agentst, *Pestic Sci.* 55: 340-342

Deborah R. Fravel, William J. Connick jr and Jack A. Lewis. Formulation of microorganisms control plant diseases. *Formulation of microbial biopesticides.* 187-202pp.

Dunne, C., Crowley, J. J., Monne-Loccoz, Y., Dowling, D. N., de Bruijn, F.J. and O'Gara, F. 1997. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology* 143:3921-3931

Fruh, T., C., P., E., J. and farooq, S. 1996. Natural products as pesticides: Two examples of stereo selective synthesis. *Pestic. sci.* 46:37-47.

Fruh, T., Chemla, P., Ehrler, J. and Farooq, S. 1996. Natural products as pesticides: Two examples of stereo selective synthesis. *Pestic. sci.* 46: 37-47.

Gerth, K., N. bedrof, H. Irschik, G. Hofle, and H. Reichenbath. 1994. The Soraphens: A family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum*. I. Soraphen A: Fermentation, isolation, biological properties. *J. Antibiot.* 47: 23 ~ 31.

Giesler, L. J. and Yuen, G. Y. 1998 Evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 for biocontrol of brown patch disease. *Crop Prot.* 17:509-51

Gutterson, N. 1990. Microbial fungicides: Recent approaches to elucidating mechanisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10: 69-91.

Hausbeck, M. K. and Moorman, G.W. 1996. Managing *Botrytis* in green house-grown flower crops. *Plant Dis.* 80:1212-1219

Herr, L. J. 1992. Characteristic of *Rhizoctonia* isolates associated with bottom rot of lettuce in organic soils in Ohio. *Phytopathology* 82:1046-1050.

Ilan C and Leonid, C. 2003. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biology and Biochemistry* 35:

Jack A. L. and Robert, P. L. 2001. Biological control of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. *Crop Protectio.* 20: 49-56.

Jack A. Lewis and Robert P. Larkin. 1998. Formulation of the biocontrol fungus *Cladorrhinum foecundissimum* to reduce Damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Biological Control*, 12(3):182-190

Jack A. L. and Robert, P. L. 2001. Biological control of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. *Crop Protectio.* 20: 49-56.

Jack, A. L. and Robert P. L. 1998. Formulation of the biocontrol fungus *Cladorrhinum foecundissimum* to reduce Damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Biological Control*. 12(3): 182-190.

Kim, C. H., Jee, H. J., Park, K. S. and Lee, E. J. 1990. Studies on biological control of Phytophthora blight of red-pepper V. Performance of antagonistic agents in fields. *Korean J. Plant Pathol.* 6(2):201-206.

Knight, S. C., Anthorny, V. M., Brady, A. M., Greenland, A.J. Heaney, S. P., Murray, D.C., Powell, K. A., Schulz, M.A., sinks, C.A., Worthington, P. A. and Youle, D. 1997. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 349-372.

Li, G. Q. Huang, H. C. and Acharya, S. N. 2003. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control* 28: 11-18.

Lumsden, R.D., J.A. Lewis, and D.R. Fravel. 1995. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. pp. 162 ~ 182. in: Biorational pest control agents formulation and delivery(F.R. Hall and J.W. Barry, eds). American Chemical Society, Washington DC.

Mordue, J. E. M. 1972. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 513.

Motes 등, 1982

Nakamura, L. K. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizisenii* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1121-1215.

Norberto J. P. and John F. B.. 1993. *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int. J. Syst. Bact.* 606-609

Parmeter 1969 Parmeter, J. R. Jr., Sherwood, R. T. and Platt, W. D. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59:1270-1278.

Pedras, M. S., Ismail, N., Quail, J. W., Boyetchko, S. M. 2003. Structure, chemistry, and biological activity of pseudophomins A and B, new cyclic lipodepsipeptides isolated from the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochemistry* 62(7): 1105-1114.

Peter W. W., 1987 Peter W. W., 1987. Studies on *Rhizoctonia solani* causing bottom rot of lettuce. B. Sc(Hons)(Leeds). 134p.

Peter William Wareing, 1987, Kim, 1993 Peter W. W., 1987. Studies on *Rhizoctonia solani* causing bottom rot of lettuce. B. Sc(Hons)(Leeds). 134p.

Whipps, J. M. and Gerlagh, M. 1992. Biology of *Coniothyrium minutans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycol. Res.*96: 897-907.

Yun D. J., Y. Zhao, J. M. Pardo, M. L. Narasimhan, B. Damsz, H. Lee, L. R. Abad, M.P. D'Urazo, P.M. Hasegawa, and R.A. Bressan. 1997. Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. USA.* 94: 7082 ~ 7078.

김완규. 1995. 작물 라이족토니아병 진단 및 방제. 농업과학기술원 작물 보호부 병리과. 167pp.

김현주, 박종영, 백정우, 이진우, 정순재, 문병주. 2004. *Rhizoctonia solani*에 의한 결구상추 밑둥 썩음병(Bottom rot)의 발생과 병원성. 식물병연구 14(4):689-695.

농경과원예사. 2001. 농경과 원예, 1:62-77

농림부, 2001 농림부. 2001. 친환경농업 5개년계획. 105pp.

농촌진흥청. 1998. 시험연구사업보고서, 고령지농업시험장.

농촌진흥청. 2000. 시험연구사업보고서, 고령지농업시험장.

문병주, 김철승, 송주희, 김현주, 이재필, 박현철, 신동범. 2002. 들깨 잿빛곰팡이병의 생물학적 방제 II. 미생물농약의 제조 및 그 방제효과. 식물병연구. 8(3):184-188.

문병주, 2002. *Botrytis cinerea*제어용 환경친화적 미생물농약개발 및 실용화 농림부. 203p

문병주, 노성환, 손영준, 강형석, 이재필, 김병섭, 정대수. 1998. *Botrytis cinerea*에 의한 들깨 잿빛곰팡이병의 발생. 한국식물병리학회지 14(5): 467-472 .

안준철, 정영재, 김성호, 김용식, 여문환, 황백, 송형철, 유광재, 김정우. 2001. 키토산올리고당이 주요 종자의 발아와 in vitro 유식물의 생육에 미치는 효과, 한국

유태웅 1997, 음식과 공합. 도서출판 등지, 서울. 255pp.

이재필, 손지희, 노성환, 손영준, 문병주. 2002. *Bacillus megaterium* N4 를 이용한 들깨 균핵병 (*Sclerotinia sclerotiorum*)의 생물학적 방제. 균학회소식 12(1): 73p.

정영륜, 신원교, 강수웅. 1993. 시설원예 작물의 잣빛곰팡이병 방제용 미생물농약 개발. 경남농촌진흥원 연구보고서. 24pp.

제주도농업기술원, 2000. 주요소득작물 재배기술. 새로운 제주 농업 제42호 12월. 19-32.

문병주, 노성환, 손영준, 강형석, 이재필, 김병섭, 정대수. 1998. *Botrytis cinerea*에 의한 들깨 잣빛곰팡이병의 발생. 한국식물병리학회지 14(5): 467-472.

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.