

과제번호
118025-3

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

농축산자재산업화기술사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003487-01

배양공정개량에 의한 마이크로바이옴
분리한 균주와 식물추출물 혼합에 의한
토양병해와 점박이응애 방제제 개발

2021.02.08.

주관연구기관 / 전남대학교 산학협력단
협동연구기관 / (주) 현농

배양공정개량에 의한 마이크로바이옴
분리한 균주와 식물추출물 혼합에 의한
토양병해와 점박이응애 방제제 개발

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

<제출문>

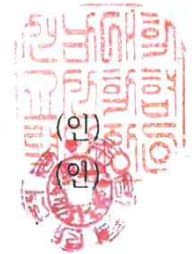
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “배양공정개량에 의한 마이크로바이옴 분리한 균주와 식물추출물 혼합에 의한 토양 병해와 점박이응애 방제제 개발”(개발기간 : 2018.04.26 ~ 2020.12.31)과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2021. 02. 08.

주관연구기관명 : 전남대학교 산학협력단 (대표자) 민 정 준 (인)
협동연구기관명 : (주)현 농 (대표자) 김 철 흥 (인)



주관연구책임자 : 강 범 용

협동연구책임자 : 김 철 흥

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	118025-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.26.~ 2020.12.31	단 계 구 분	최 종
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농축산자재산업화기술사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	배양공정개량에 의한 마이크로바이옴 분리한 균주와 식물추출물 혼합에 의한 토양 병해와 점박이응애 방제제 개발			
연구책임자	강 범 용	해당단계 참여연구원 수	총: 14명 내부: 11명 외부: 3 명	해당단계 연구개발비	정부: 450 천원 민간: 151 천원 계: 601 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 14명 내부: 11명 외부: 3 명	총 연구개발비	정부: 450 천원 민간: 151 천원 계: 601 천원
연구기관명 및 소속부서명	전남대학교 산학협력단		참여기업명 (주)현농		
국제공동연구	상대국명:		상대국 연구기관명:		
위탁연구	연구기관명:		연구책임자:		

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반과제
-------------------------	------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설· 장비	기술요약 정보	소프트 웨어	회합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	0144-8617	10-2201524 10-2201525									
	0882-4010										
	2287-2051										
	2287-2051										

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) 보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 연구는 생태학적 변화에 의한 작물재배환경 개선을 통한 토양내 미생물 상 변화 조성으로 병원균 밀도 감소를 유도하면서 작물 마이크로바이옴 기반 식물과 미생물의 상호작용과정을 통한 식물면역증진에 의한 예방적 효과와 더불어 병해충에 대해 직접적인 살균·살충효과를 나타내는 식물추출물을 혼합한 기존 작물보호제로 방제하기 어렵고 방제방법이 없는 시들음병과 점박이응애를 방제할 수 있는 다기능 고효율의 복합 작물보호제를 개발하고 이를 산업화 구축을 하는데 그 최종목표가 있음</p>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 미생물 대사물질과 천연소재 혼합물에 의한 시들음병, 점박이 응애 병해충 복합 방제제 개발 <ul style="list-style-type: none"> ●기질을 토대로 한 배양공정개발으로 특허미생물의 강력한 항균·항충 대사물질 추출 및 생산 ●항균·항충물질과 혼합 가능한 3종 선발 식물추출 유래 물질 이용 대상 병해충 복합 방제 ●병해충 동시 방제제의 액상 및 입상 형태별 제형화 후 방제효과 검증 - 신속 정확한 병해충 분자진단과 작물 면역기능 증진에 의한 예방적 효과검정 <ul style="list-style-type: none"> ●토양 및 식물체내 병원균 특이 마커에 의한 신속한 분자진단 및 방제시기 결정 ●식물체내 면역 기능 활성화 증진을 통한 작물의 병해충 예방적 방제 효과 ●특이 마커 이용 병원균 밀도변화와 개발 제품의 최소저해농도 및 살포량 결정 - 유기농자재 등록 및 분자 진단 통합시스템에 의한 방제지침서 개발 <ul style="list-style-type: none"> ●지상부와 지하부의 병해충 발생별 진단 결과를 수식화하여 약제 살포시기 결정 ●유기농자재 등록을 위한 독성 및 약효 시험을 통한 포장검정 ●현장 진단 결과 값을 기초로 방제 지침서 및 매뉴얼 작성 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 기술성과: 특허 출원(3건) 및 등록(2건), 제품화(1건), 기술이전(1건), 방제매뉴얼 및 QC 마커(2건) - 학술성과: 국내 및 국외 학술발표(10건), 논문 게재(SCI 2건, 비SCI 2건) - 교육성과: 농업대학 및 농업현장 교육지도와 컨설팅(2건) - 홍보성과: 언론 홍보 및 전시(2건) - 사업성과: 과제기간내 병해충 방제 기술관련 상품화를 통한 매출액 창출 - 고용창출: 병해충 효과검정 및 제형연구 관련 전문인력 고용 창출(2명) 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>마이크로바이옴</p>	<p>식물추출물</p>	<p>혼합 제형</p>	<p>토양 병해</p>	<p>점박이응애</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Microbiome</p>	<p>Plant extract</p>	<p>mixture</p>	<p>soil-borne disease</p>	<p>two spotted spider mite</p>

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	12
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	112
4. 연구결과의 활용 계획 등	113
붙임. 참고 문헌	115

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 본 연구는 생태학적 변화에 의한 작물재배환경 개선을 통한 토양내 미생물상 변화 조성으로 병원균 밀도 감소를 유도하면서 작물 마이크로바이옴 기반 식물과 미생물의 상호작용과정을 통한 식물면역증진에 의한 예방적 효과와 더불어 병해충에 대해 직접적인 살균·살충효과를 나타내는 식물추출물을 혼합한 기존 작물보호제로 방제하기 어렵고 방제방법이 없는 시들음병과 점박이응애를 방제할 수 있는 다기능 고효율의 복합 작물보호제를 개발하고 이를 산업화 구축을 하는데 그 최종목표가 있음
- 상기의 최종 목표를 달성하기 위하여 미생물 또는 식물추출물의 단제 형식의 방제제를 탈피하여 미생물의 대사산물 및 균체성분과 식물추출물의 유효성분을 혼합한 제형화를 기반으로 작물의 면역기능 활성화 증진 연구와 생물적 방제능력이 탁월한 기능성 물질을 생산하는 특허균주와 식물 원료에서 순수 항균·항충 성분을 분리하는 정제능력의 노하우를 지닌 개발팀과 유기농자재의 제형 개발과 농자재 등록 등 산업화와 연구능력을 보유한 팀으로 구성되어 새로운 식물과 미생물 상호작용의 통합 시스템에 의한 생물소재의 작물보호제를 개발하고자 함.



1-2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 개요

(1) 연구개발 대상의 국내·외 현황

1) 국내 기술 수준 및 시장 현황

□ 마이크로바이옴 기반 생물적 방제를 위한 작물보호제 개발

○ (마이크로바이옴) 최근 유전체학, 전사체학, 단백질체학과 더불어 오믹스 분야를 이용한 대사체학 연구 등 생명공학 응용 기술의 비약적인 발전으로 '마이크로바이옴'이라는 새로운 차원의 생명과학이 등장하였음

* 마이크로바이옴이란, 미생물군집(microbiota)과 유전체(genome)의 합성어로 '미생물군유전체'라고 할 수 있음. 인간 마이크로바이옴, 장내 마이크로바이옴, 식물 마이크로바이옴, 레지스툼(항생제 내성관리) 등으로 분류함

- 미생물군은 지구 생태계뿐만 아니라 인간보건, 농업, 기후변화, 식량 안보 등 광범위하게 영향을 미침. 특히 농업과 마이크로바이옴 간 상호작용을 구명함으로써 농업생태계 복원 및 작물보호·생육촉진 등을 통한 농업생산성 향상에 활용이 가능함

- 식물 마이크로바이옴은 식물내부와 주변에 미생물이 서식하면서 식물의 생육 및 작물보호에 많은 영향을 미치며 모든 식물 기관에서 발견되고 부위마다 미생물의 종류와 역할이 다름

- 농식품 미생물자원을 포함한 의약품, 식품, 농업, 환경, 자원 및 에너지 드루이 다양한 산업 분야에서 미생물로부터 얻어지는 생체 활성물질, 생육 조절물질 및 다양한 생화학물질 등의 자원 등을 개발에 이용하고 있음

- 미생물 유래 기능성 물질 생산에 관한 기술개발은 미생물의 종류도 중요하지만 기질의 종류(천연물, 식물성 오일, 탄수화물, 당류 등)가 매우 중요함. 예를 들어 발효과정에 의한 기능성물질을 생산하는 미생물의 경우 원료 또는 공정 과정에 따라 미생물의 유전자/단백질 발현이나 효소활성이 변화하기 때문에 생산하는 대사물질 또한 양적·질적으로 종류가 상이함. 따라서 미생물의 배양공정이 복잡할수록 QC가 매우 어려우며 이를 해결하기 위한 기술의 연구 및 확립의 중요성이 대두되고 있음

- 미생물 자원의 작물보호제 활용에서 기존 다양한 문제점을 해결하기 위한 기술로 최근 대사체학적 접근의 관심이 증대되고 있는 추세임. 이러한 연구개발의 집중은 최종 대사산물인 대사체를 연구함에 따라 미생물의 다양한 환경, 기질, 배양시간, 온도, 공정상 발생하는 스트레스 발생 등에서 오는 대사물질의 변화 및 생리활성물질 생산 등을 배양공정상 프로파일링을 통하여 해결하고 있음

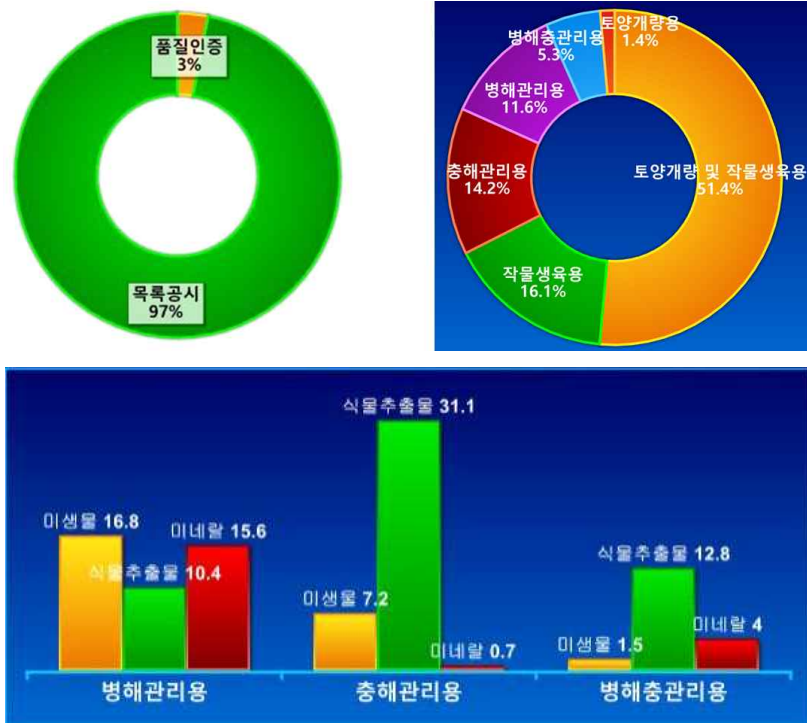
○ 기후변화에 따른 미래 병해충 방제 전략은 생물적 방제임.

- 향후 탄소배출 등 기후변화에 따른 병해충 방제 대책으로 저항성을 이용한 방제는 전반적으

로 부정적인 영향을 끼치고, 약제 방제는 작용기작에 따라 긍정적 및 부정적인 영향을 미치고, 생물적 방제는 긍정적인 영향으로 작용함(한림연구보고서, 2010).

- 현시점에서 합성농약 시장에 비해 생물농약 시장 규모는 작고 성장률이 낮은 것으로 파악되나, 생물농약은 친환경농산물의 생산유통량 증가와 선호도가 높아지는 추세에서 점진적으로 합성농약 시장을 잠식하여 대체하고 있음.
 - 생활 패턴의 변화와 친환경 농산물의 수요 증대로 합성농약을 대체할 친환경 제품 개발의 필요성이 증대하고 있음. 과거 합성농약 과다사용으로 농업환경 생태계 파괴와 농약잔류, 중독, 염류집적 등의 부작용을 겪으면서 친환경 농자재의 사용 확산으로 농업환경 생태계 보존과 수입 농산물과 차별화되어 가격 경쟁력 향상 제고 등으로 친환경 농자재 개발의 필요성이 증대되고 있음.
 - 현재 시장에서 판매되는 친환경 농자재들은 가격이 비싸 친환경 농산물의 가격 경쟁력이 저하되는 주 원인이 되고 있으며, 기존 화학합성농약에 의해 해결하기 어려운 각종 식물병을 친환경적으로 해결할 수 있는 방안을 제시할 수 있는 소재 개발의 필요성이 증대되고 있음.
- 토양개량 및 작물생육용 유기농자재 중심이며 병해충 방제용 농자재 개발은 부족한 실정임
- FTA 시행에 따른 친환경 농산물의 국가간 거래 활성화로 Codex기준, IFOAM(국제유기농업 운동연맹) 등 국제 인증 조건에 맞는 친환경 농자재 개발이 시급히 요구되고 있음.
 - 바이오를 사용한 자원과 신소재 시장이 확대되면서 생리활성기능이 증진된 식물, 미생물, 미네랄 및 이들로부터 유래한 소재나 생화학적 기술이 적용된 병해충 방제제 시장이 형성되고 있음.
 - 특히, 최근 생화학농약에 대한 등록기준 마련 등으로 미생물, 천연물질 관련 농업소재들이 정식으로 등록되면서 친환경자재 시장규모도 전문화되고 확대되고 있는 추세이며, 관련 인프라 개선으로 그 영세성을 탈피하는 방향으로 전환중임.
 - 친환경 병해충 방제제 개발은 지식 집약 고부가치 산업으로서 젊고 유능한 인력들이 몰려 있는 벤처기업들이 대부분 사업을 추진하고 있는 바 상당한 개발비 부담을 정부에서 정책적으로 꾸준히 지원할 경우 이 분야에서 국가경쟁력을 갖게 될 것임.
 - 2020년 3월 현재 우리나라에 등록된 친환경 유기농자재의 수는 총 1737종이며, 총 업체 수는 500여개 달함. 2020년 3월 유기농자재는 97% 목록공시로 등록되어 있고, 토양개량 및 작물생육용 자재가 66.8% 이상 등록되어 있고 총해(16.2%), 병해(10.8%), 기타 등으로 등록됨(농촌진흥청, 2020).
 - 생물적 방제를 위해 병해충 관리용으로 등록된 농자재의 유효성분은 병해 관리용이 미생물(16.8%)과 미네랄(15.6%)이며, 총해 관리용은 주로 식물추출물이 31.1%로 대부분 차지하였음.
- 대부분 흰가루병과 진딧물류 방제제이며, 토양 병해와 응애류 방제를 위한 작물보호제 부족

- 기존 친환경(바이오) 병해충 방제제는 우수한 미생물과 식물자원을 보유하면서 제품개발의 공정개발에 성공한 반면에, 개발인력의 부족, 제품화와 산업화 연관 기술력의 취약, 상업화 전략의 취약성, 농민에 대한 기술보급 미흡, 합성농약에 비해 가격 경쟁력의 취약성으로 현장에서 충분한 효과를 발휘하기가 어려운 상황임.



<병해충 관리용 자재 등록현황(농진청, 2018)>

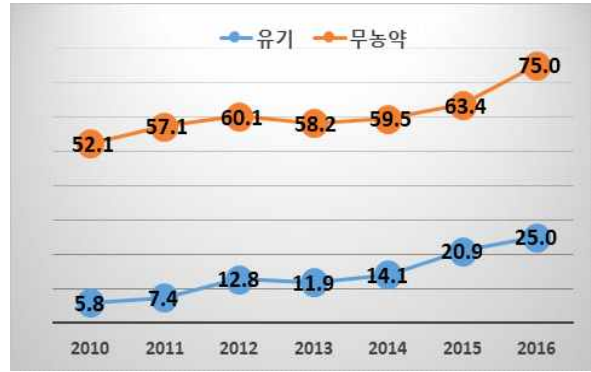
- 국내 미생물농약 외에 다른 병해충 방제제들은 등록 가이드라인이 설정되어 있어도 시장이 초기 형성 단계에 머물러 있고, 아직은 합성농약에 비해 비교적 적은 범위의 병해충에 대한 제품군으로 개발되어 마케팅에 어려움이 있음.
- 현재 병해충 방제제로 사용가능한 대상병해는 대부분 유향을 유효성분으로 흰가루병, 해충은 진딧물류로 주성분은 고삼, 님이 59%를 차지하고 있음.
- 따라서 흰가루병과 진딧물류를 제외한 병해충 방제제를 사용하지 않을 경우 생산량 대비 곡류는 59%, 채소는 44%, 과수는 11%만 최종 생산량을 얻음(농진청, 2012)
- 기존 개발되어 있는 유기농자재들은 대부분 수도작 병해충 방제용 농자재가 차지하고 있지만, 육묘상자처리제 개발과 초기 방제를 위한 방제매뉴얼 개발 등으로 사용빈도가 감소한 반면, 원예용 작물보호제 시장의 비중이 2000년대부터 높아져서 2013년 농약출하비중은 원예용 52%, 제초제 24.4%, 수도작용 12.8%로 원예 병해충 방제제의 비중이 높아지고 병해충 발생이 다양해져 방제의 어려움을 가짐(농자재신문, 2015).

□ 유기·무농약 농산물 시장 및 미생물제 현황 및 전망

○ 국내 유기 친환경농업 시장 현황

- 친환경농산물 생산은 '01년도 이후 연평균 약 30% 정도 성장하여, 전체 농업 대비 10% 정도의 비중을 차지
- '10년 저농약 신규 인증 중단('16년 전면 폐지) 유기·무농약 인증은 증가하는 추세임
- 친환경 유기·무농약 인증농가의 채소류 생산은 유기·무농약 모두 꾸준히 증가하고 있음 (2018, 국립농산물품질관리원)

구분	'02	'06	'13
재배면적 (천ha)	11	75	142
농가수 (천호)	12	131	127
생산량 (천톤)	200	1,128	-



- 친환경농산물 시장 규모는 지속적으로 성장하여 '20년에는 7.5조원 규모에 이를 것으로 전망 ('13, KREI)

	2009	2011	2012	2013	2015	2016	2017	2020
유기농	2,426	3,000	4,081	4,575	6,510	7,891	9,346	14,296
무농약	13,178	16,420	17,175	19,322	27,444	33,369	39,521	60,453
저농약	18,514	12,257	9,552	7,476	4,779	-	-	-
전체	34,117	31,677	30,809	31,373	38,732	41,259	48,867	74,749

< 인증별 친환경농산물 시장규모 전망 > (단위 : 억원)

○ 미생물 산업 규모 및 사용량 전망

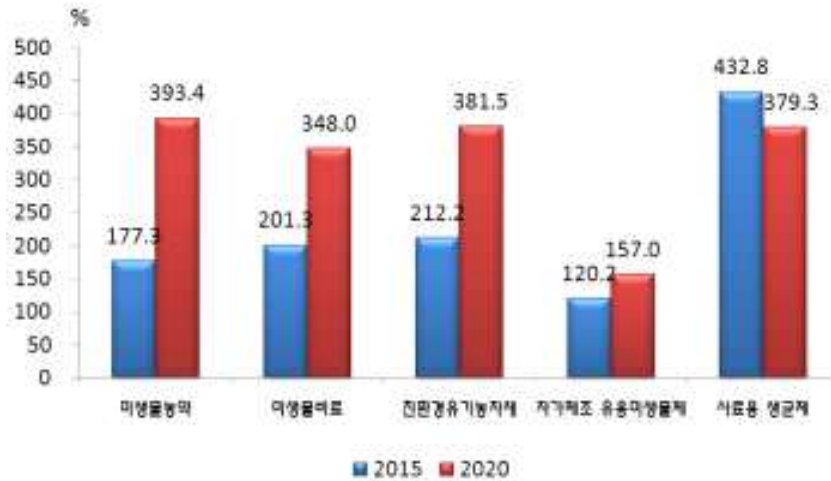
- 2016년 기준 국내 농축산용 미생물산업 시장규모는 3,000억원 정도 추정되며 2012년 1,840억원 규모에서 연평균성장률(CAGR) 약 15% 가량 성장하고 있는 것으로 나타남(농업미생물 정책현황 및 전망, 농업미생물산업발전협의회 발족회의 발표자료, 2017).

* 미생물농약(천연 작물보호제) 1,029억원, 미생물비료(미생물제제) 291억원, 미생물 사료첨가제 1,658억원으로 추정됨

- 2020년에는 자가제조 유용미생물제를 제외한 미생물농약, 미생물비료(토양미생물제제), 친환경유기농자재의 사용량이 각각 3.9배, 3.4배, 3.8배 수준으로 모두 크게 증가할 것으로 전망하고 있음.
- 친환경 농산물 재배시 병해충 방제용 자재로는 생물농약 보다는 친환경유기농자재를 대부분

사용하고 있음. 그 이유는 1) 생물농약 등록 시 비용이 친환경유기농자재에 비하여 매우 많이 필요하며, 2) 친환경유기농자재의 경우 정부 및 지자체에서 지원이 있기 때문임

- 친환경농업의 가장 핵심 부분인 병해충 방제 방법에 사용될 소재와 제제가 미비하고, 효능이 검증되지 않은 자재가 난립하여 국가적인 문제로 대두되고 있음.



<미생물제제 종류별 사용량 전망>

○ 농업용 미생물 개발자재 시장 성장

- 기존의 친환경농업 인증 재배면적의 증가 추세와 사료용 생균제 시장의 성장 추세를 바탕으로 미생물제제의 국내 수요 규모를 종합적으로 전망하면 <표>에서 보는 바와 같음.
- 국내 개발 및 수입 미생물농약 살균제 시장은 2009년 기준 약 45억원으로 조사되었으며 이 중 국내 개발 미생물농약 살균제 시장이 약 41억원을 차지하고 있음
- 국내 살충제는 2015년 5월 현재 36품목(*Monacrosporium thaumasium*, *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis* 등)이 등록되어 있으며, 살균제는 대부분이 *Bacillus subtilis*가 주를 이루고 있고, 일부 *Streptomyces spp.*와 *Trichoderma spp.* 의 제품이 등록되어 있음

2) 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 글로벌 천연 소재 실용화 기술 개발 및 시장의 국외 현황 및 전망

- 최근 FTA, 나고야의정서 발효 등에 따른 농업분야의 경쟁력강화가 필요한 시점에서 고부가 가치 농생명식약소재의 기술개발 연구가 집중투자되고 있음. 따라서 세계 경쟁시장에서의 경쟁력 우위를 차지하기 위해 차별화된 신소재개발이 매우 절실함
- 기존 화학 작물보호제가 식품뿐만 아니라 생태계에도 잔류할 것이라는 우려가 커지며 EU를 비롯한 선진국을 중심으로 관련 규제가 강화되고 있음

- 화학 작물보호제의 내성 이슈로 지속적인 신원제 발굴 및 새로운 화학제품의 개발이 요구되고 있으나 막대한 R&D 비용투자가 요구됨. 이에 대한 대안 혹은 보완의 영역으로 천연 식물보호제가 꾸준히 거론되고 있음
- 글로벌 천연 작물보호제의 시장 규모는 2015년 기준 25억 달러 규모로 전체 작물보호제 시장의 4%를 차지함
- 전세계 생물적 방제 시장은 2010년 현재 1,560 M US\$로 전체 작물보호제 시장의 약 5%를 점유하고 있음(Global Strategic Business Report-Biopesticides, 2011). 전체 생물적 방제 시장에서, 곤충 병원성 세균인 *B. thuringiensis* (Bt)가 가장 높은 시장 점유율 (40%)을 가지고 있으며, 다음으로 곤충 병원성 곰팡이 및 바이러스가 뒤를 따르고 있음
- 글로벌 미생물제를 포함함 천연 작물보호제의 시장 규모는 2015년 기준 25억 달러 규모로 전체 작물보호제 시장의 4%를 차지함
- 화학성분 기반 합성농약의 발암물질 이슈 등 인체독성에 대한 우려가 꾸준히 제기되고 있으며 점차 화학성분 기반 농약의 입지는 점차 약화되고 있는 추세임
- 지난 10년 동안 전체 식물보호제 시장은 5-6% 대의 성장률을 보였으나 천연 식물보호제는 17% 이상의 성장률을 나타냈으며 이는 전 세계적으로 기존 화학성분 기반 식물보호제(화학농약)에 대한 규제 강화에 의한 것으로 판단됨
 - * 유럽연합(EU)은 2009년 이후 작물보호제 관련 규제를 대폭 강화하였고 식품에 대한 농약의 잔류허용치(MRLs; Maximum Residual Limits)를 지속적으로 낮추고 있음
- 화학성분 기반 식물보호제(화학농약)는 거대 농화학기업 6개가 전체 시장의 70% 이상을 점유하고 있는 반면 천연 식물보호제의 경우 200개가 넘는 소규모 회사들이 시장에 참여하고 있음
- 현재 천연 작물보호제 시장은 초기 형성단계이며 향후 유전자 조작을 통한 다양한 형태의 제품들이 출시되면 더 많은 기업들이 참여할 것으로 예상됨

○ 세계 유기농업 시장 현황

- 전세계 162개국 3천 7백 2십만 ha에서 유기농업 실천('13, FiBL-IFOAM)

	호주	미국	중국	독일	캐나다	한국	일본	전체
재배면적(천ha)	12,002	1,949	1,900	1,016	841	19	9	37,246
전체대비(%)	2.9	0.6	0.4	6.1	1.2	1.0	0.2	0.9

<주요국 유기농업 면적('11)>

- 전세계 유기시장 규모는 '00년 175억 달러에서 2010년 591억달러로 세 배 이상 증가('12, FiBL-IFOAM)

대륙	시장 규모 (전체 대비 비중, %)	주요 국가	시장 규모 (전체 대비 비중, %)
북미	29,224 (49.4)	미국	21,702 (45.1)
유럽	26,118 (44.1)	독일	7,976 (13.5)
아시아	2,867 (4.8)	프랑스	4,658 (7.9)
오세아니아	899 (1.5)	영국	2,650 (4.5)
남미	50 (0.1)	캐나다	2,522 (4.3)
아프리카	0.4 (0.0)	일본	1,324 (2.2)
(합계)	59,158 (100)	중국	1,048 (1.8)
		한국	300 (0.5)

<대륙별.주요 국가별 유기시장 규모('10) (단위 : 백만\$)>

(2) 국내외 경쟁기관 기술 수준 및 현황

○ 작물보호 마이크로바이옴 실용화 기술 개발 집중

- 화학성분 기반 식물보호제(화학농약)의 독성과 내성문제는 꾸준히 제기되어 유럽과 미국 등 선진국을 중심으로 농작물의 잔류 농약 허용치 관련 규제가 지속적으로 강화되고 있음
- 안전한 친환경 식물보호제에 대한 요구가 높아짐에 따라 글로벌 농화학기업들은 천연 식물 보호제 개발에 대한 역량을 M&A를 통해 확보한 후 방제 스펙트럼을 넓히고 안정적 효능을 낼 수 있는 다운스트림 기술 개발에 역량을 집중하고 있음
- 이와 동시에 단독 미생물 혹은 통합 미생물군으로 새로운 미생물 원제를 개발하려는 업스트림 기술개발에도 박차를 가하고 있음
- 최근 유전체 분석을 위한 염기서열결정 비용 감소로 식물유전체와 토양미생물군 메타지놈 분석이 가능해졌으며 이를 바탕으로 RNA간섭(RNA interference), 유전체 편집 및 마이크로바이옴(microbiome) 등 혁신기술이 등장하여 기존 사업 모델의 다각화가 이루어지고 있음
- 주요 미생물제제로는 *Azospirillum* spp., *Azoarcus* spp., *Azotobactor* spp., *Bacillus* spp., *Burkholderia* spp., *Cyanobacteria* spp., *Herbaspirillum* spp., *Rhizobium* spp. 등을 이용한 제제로 토양미생물의 종류 대비 이용효율이 5% 미만인 실정으로 우수 균주의 지속적인 탐색이 필요함
- 2016년 미국에서 '국가 마이크로바이옴 이니셔티브(National Microbiome Initiative, NMI)' 계획을 발표하였으며 작물·가축과 미생물간 상호작용 연구, 인체질병과 미생물간 상호작용 연구 등을 지원하는 NMI사업에 2년간 1억 2,100만 달러(약 1,440억원)가 투입계획을 밝혔음

기업	합병 및 기술 협력 현황
BASF	Ecker Underwood('12) 인수
Bayer	AgraQuest('12), Prophyta 인수('13), Biagro Group('14) 인수
Syngenta	Pasteuria Bioscience('12), deVGen('12) 인수, DSM 협력
Monsanto	Agradis('13), Preceres('13) 인수, Novozymes 협력
Dow-Dupont	Taxon Biosciences('15) 인수, Radiant Genomics, Synthace 협력
FMC	Center for Agricultural and Environmental Biosolutions('13) 인수, Chr Hansen 협력
Valent Bioscience (Sumitomo)	Mycorrhizal Applications('15) 인수
Arysta LifeScience	Goemar('15) 인수
Certis USA(Mitui&Co)	Montana State University, Montana BioAgriculture, UAP Canada 협력

<글로벌 농화학 기업들의 천연 식물보호제 시장 진출 현황, LG경제연구소, 2018>

- 미국, 유럽 등 주요 선진국들은 정부주도의 바이오산업을 육성하고 있으며 자본력이 우수한 중국 등 신흥국가들도 인수합병 등을 통해 관련 시장에 적극적으로 진출하고 있음
- The Wall Street Journal (WSJ, 2016.9.18.)에 따르면 많은 벤처캐피탈 업체들이 마이크로바이옴 기술에 많은 관심을 보이고 있으며 2015년 대비 458.8%(2015년 114.5 백만 달러)가 증가한 616.9 백만 달러(약 7,000억 원, 2016년 9월 기준)이 투자되었다고 보도하였음

부처	내용	예산요구
농무부(USDA)	토양미생물이 작물과 동물에 미치는 영향 연구	\$2,400만
국립보건원(NIH)	미생물이 감염병, 비만, 정신건강에 미치는 영향 연구	\$2,000만
과학재단(NSF)	다양한 마이크로바이옴 연구	\$1,600만
에너지부(DOE)	바이오연료 생산	\$1,000만
항공우주국(NASA)	외계생물 탐사와 미생물이 우주인에게 미치는 영향 연구	\$1,250만

<미국 행정부 NMI '17년 예산요구 내역, NMI정책, 융합연구정책센터, 2016>

- 최근에는 질병을 위한 마이크로바이옴 뿐만 아니라 가축, 작물 등 농·축산업으로 연구개발과 사업이 확장되고 있으며 DuPont 역시 사람, 동물, 식물용 미생물 연구를 진행하고 있음

○ 미생물 농약 개발 현황 및 수준

- 국외 미생물농약은 2013년 현재 1,813백만 달러의 시장이 형성되어 있는 것으로 추정됨 (Phillips McDougall, 2013). 아시아가 782백만 달러로 전체 43.1%를 차지하고 있음(중국: 233백만 달러, 일본 203백만 달러) (Phillips McDougall, 2013).

- *B. thuringiensis* 균을 이용한 미생물 살충제로서 2005년 348백만 달러로서 천적을 포함한 전체 생물농약의 52%를 차지하는 것으로 보고되고 있음 (The New Biopesticide Market, Business Communications Co., Inc., 2006. 1).
- 미생물농약 살균제인 *B. subtilis*의 Serenade(Agraquest 社)는 2009년에 1억 달러 이상 판매한 것으로 알려져 있음.
- 현재 미국에서 등록 중인 미생물농약도 주로 특정 병해충에만 효능이 있는 다양한 미생물과 생화학 농약이 등록 중임.
 병해 방제용; *B. amyloliquefaciens*, *Trichoderma asperelloides*, *Muscador albus*.
 해충 방제용; *Beauveria bassiana*, Serricornin(페로몬), 1,2-octanediol.
- *Lecanicillium* spp. 이용; 진딧물, 가루이 방제용 미생물이 흰가루병에도 방제효과가 있음 이 알려져 있고, Vertalac과 Mycotal 제품으로 판매 중임
- 곤충 병원성 곰팡이 *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* 이용; 진딧물, 가루이, 총체벌레, 응애 뿐만 아니라 식물병원균 흰가루병, 녹병, 푸른곰팡이, 뿌리썩음병 등에 효능이 있음
- 일부 살균능력이 있는 생물적 방제균인 *Pseudomonas*균주도 파밤나방, 담배거세미나방, 진딧물 등에 살충효능이 있으며, 일부 살균 *Bacillus* 균주도 살 진딧물 효능이 있음이 밝혀짐

(3) 국내외 지식재산권 현황

○ 미생물 또는 식물추출물 이용 병해충 방제에 관한 특허현황

- 미생물을 이용한 병해충 방제관련 특허는 국내는 192건, 해외(일본)는 305건이며, 식물추출물은 국내 141건, 해외 25건으로 분석되었으나 병해충을 동시에 방제할 수 있는 특허내용은 34건으로 조사되었으며 대부분 지상부 병해충을 대상으로 특허분석이 되었음.

등록번호	발명의 명칭	국가
1020100113819	옷 추출물을 이용한 식물의 병해충 방제제	한국
1020020046124	한약추출물을 이용한 식물병해충 방제제 및 그 제조방법	"
1020050094135	미생물공정을 이용한 비료 가용화에 의한 발효비료 및 그의제조방법	"
1020100082145	죽자초에서 분리한 해충살충조성물, 상기 해충살충조성물을 함유한 해충 방제제 및 이를 이용한 방제방법	"
1020140008200	유황 보르도액의 제조 방법 및 상기 방법을 이용하여 제조한 유황 보르도액	"
1020130161283	밤나무 종실탄저병에 대한 방제 효능을 갖는 친환경 방제제	"
1020150154573	천연 병해 방제제 조성물	"
1020110009792	사프로레그니아 속 미생물에 대한 생물학적 방제용 프로바이오틱스	"
1020050064510	만수국 또는 표고버섯을 포함하는 식물 흰가루병 방제제	"

1020150138549	머귀나무 종자 추출물을 포함하는 벚나무 잣빛곰팡이병 및 줄기마름병 방제용 조성물 및 이를 이용한 방제방법	”
1020150109128	영롱향 추출물을 유효성분으로 함유하는 감귤 검은점무늬병 방제용 조성물, 마이크로캡슐 및 이를 이용한 감귤 검은점무늬병 방제 방법	”
1020107023062	유해 생물 방제제 조성물 및 유해 생물의 방제 방법	”
1020120131194	신규미생물 파라코니오씨리움 미니탄스 S134와 이를 함유하는 미생물제제 및 미생물농약	”
11092320 1999092320	토양 병해를 억제하는 농업 자재	일본
30503626 2018503626	식물의 성장을 촉진하기 위한 바실루스 리케니포르미스(Bacillus) RT1184 조성물-	”
19099749 2007099749	4-시클로프로필(cyclopropyl)-1, 2, 3-티아디아졸(thiadiazole) 유도체 및 농원예용 식물 병해 방제제 및 그 사용 방법	”
21275036 2009275036	유해 생물 방제제 조성물 및 유해 생물의 방제 방법	”
27044752 2015044752	농원예용 살충제 조성물 및 그 사용 방법	”
WO2012086768	벤질옥시(benzyloxy) 피리미딘(pyrimidine)(pyrimidine) 유도체 및 그 유도체를 함유하는 농원예용 살충제 및 그 사용 방법	”
18008675 2006008675	치환 피라진(pyrazine) 카르복산(carboxylic acid) 아닐리드(anilide) 유도체 또는 그 염류, 그 중간체 및 농원예용 약제 및 그 사용 방법	”
22528989 2010528989	해충 구제용의 치환 아미노 thiourea 화합물	”

1-3. 연구개발 범위

가. 미생물 대사물질과 천연 혼합물에 의한 병해충 복합 방제제 개발

- (1) 기질을 토대로 한 배양공정개량으로 특허미생물의 강력한 항균·항충물질 생산
- (2) 생리대사물질과 혼합 가능한 식물추출 유래 물질 이용 대상 병해충 복합 방제
- (3) 병해충 복합 방제제의 제형별 방제효과 검증

나. 신속 정확한 병해충 분자진단법 및 작물 면역기능 증진에 의한 예방적 효과검정

- (1) 병원균 특이 마커에 의한 신속한 분자 진단
- (2) 식물체내 면역 기능 활성 증진을 통한 작물의 병해충 예방적 방제 효과
- (3) 토양내 생태환경 조성에 의한 병원균 밀도변화와 최소저해농도 및 살포량 결정

다. 유기농자재 등록 및 분자 진단 통합시스템에 의한 방제지침서 개발

- (1) 병해충 발생별 진단 결과를 수식화하여 약제 살포시기 결정
- (2) 유기농자재 등록을 위한 독성 및 약효 시험을 통한 포장검정
- (3) 현장 진단 결과 값을 기초로 방제 지침서 및 매뉴얼 작성

2. 연구수행 내용 및 결과

제 1 세부과제 : 배양공정개량에 의한 마이크로바이옴 분리한 균주와 식물추출물 혼합에 의한 토양병해와 점박이응에 방제제 개발

2-1. *Bacillus amyloliquefaciens* PPL (Ba) 균주 특성과 생리활성물질 최적 조건 확립

가. Ba의 2차 대사물질 분리동정 및 기능 분석

분리균주 Ba의 병해충 방제를 위한 생리활성물질을 규명하기 위해 대사물질들을 분리 하였다. Ba 균주는 TSB 배지를 기본으로 하고 각 영양원별로 식물곰팡이 병원균의 생육저지 능력을 검정하였다(그림 1). 각각의 균주들은 기본 영양배지에서 28°C에서 3일 배양한 후 접종원으로 사용하였다. PDA 배지에서 25°C, 7일 동안 자란 각각의 식물병원균의 균사에서 5 mm 절편을 치상한 후 페이퍼 디스크에 각 배양균주들을 처리하고 곰팡이 병원균 균사조직이 위치한 반대편에 치상한 후 25°C에서 5일간 배양하였다. 그 결과 Ba 균주는 토양병해인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*(FOL), *Rhizoctonia solani* AG-1 KACC 40101(Rs), *Phythium ultimum*(Pu)에 대해서 균사생육억제능력이 탁월하였다.

※ *Pseudomonas fluorescens* 균주1(Pf)은 Ba 균주2와 동시에 연구 진행 중 Pf 균주1의 주요 유효 성분인 2,4-diacetylphloroglucinol의 FOL 병원균에 대한 약효는 우수하나 식물 추출물 혼합제형 후 생물 검정 과정에서 농도에 따른 일부 안전성(약해)에 영향을 미쳤음. 따라서 최종적인 균주 선발에서는 FOL의 포자발아억제의 약효 유효성에서 Pf 균주도 우수하지만 식물추출물과 증진제 등의 첨가에 의한 제형 우수성 및 안전성 측면에서 우수한 Ba를 선발하여 진행하였음.

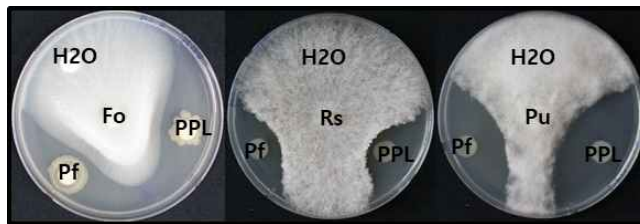


그림 1. 분리 균주의 토양병원균에 대한 균사생장억제. PPL, *Bacillus amyloliquefaciens*; Fo, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; Rs, *Rhizoctonia solani* AG-1 KACC 40101; Pu, *Phythium ultimum*

(1) Ba 균주의 성장능력과 분류학적 동정

분리균주인 Ba 균주의 항균활성능력과 분류학적인 동정을 조사하였다(그림 2). 선발된 Ba는 다른 분리균주들보다 식물곰팡이균(FOL)에 대해 균사생육 저지 능력이 높게 나타났다 (그림 2A). TSB 배지에서 28°C, 150 rpm으로 5일간 배양되면서 균주의 생육밀도를 조사하였다(그림 2B). 균주의 영양세포 생육밀도는 생육초기(mid-log)에서 4.12 log cfu/ml이었으며 생육후반의 정지기에는 9.66 log cfu/ml의 밀도를 형성하였다. 내생포자형성은 생육 중반에 1.12 log

cfu/ml로 생육 후기의 정지기에는 2.95 log cfu/ml를 생산하였다. 또한 각 생육기별 배양액을 0.22 µm 필터(Millipore Filter Corp., Bedford, MA, USA)를 이용하여 세포를 제거한 후 상등액을 회수하였다. Filtering한 배양 상등액에 균주의 오염을 확인하기 위해 TSB 배지에 도말하여 균주의 존재여부를 확인한 후 사용하였다. 배양 여액의 경시적인 표면장력 변화는 Surface Tensiometer(K6, KRUSS GmbH, Hamburg, Germany)를 이용한 ring method로 수행하였다. 표면장력의 대조구로는 멸균수와 배지를 사용하였다. 배양여액의 surface tension은 mid-log기(평균 34 mN/m)보다 late-log기와 정지기(평균 30 mN/m)에서 유의하게 낮았다. 대조구로 사용된 멸균수와 TSB 배지의 surface tension값은 73 mN/m였다.

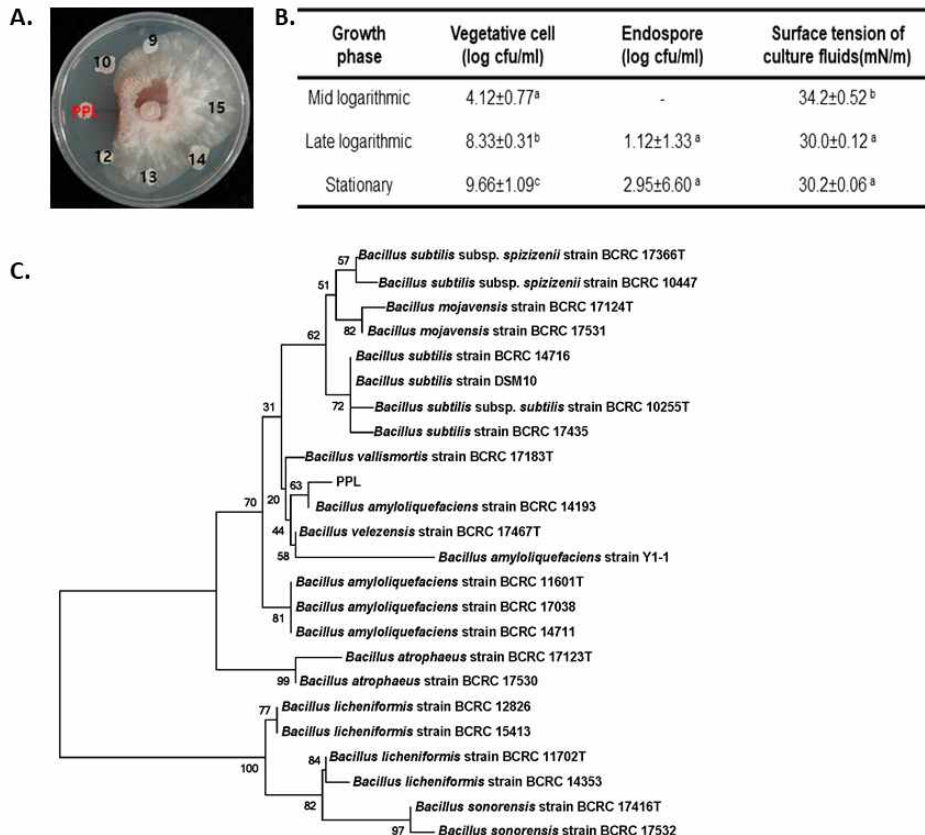


그림 2. Ba 균주의 성장능력과 분류학적 동정. A, FOL에 대한 균주 분리 및 항균활성능력. B, 생육기별 성장밀도 및 surface tension. C, Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic positions of strain PPL and representatives of some other related taxa, based on 16S rRNA gene sequences. Boots trap values (expressed as percentages of 1000 replications) are shown at branch points.

균주 동정을 위해 유전적 특성은 16S rRNA 유전자 분석을 수행하였으며, 균주를 LB 배지에서 배양한 후 Genomic DNA Prep Kit (Solgent Co., Ltd, Daejeon, South Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다 (그림 2C). 16S rRNA 유전자 증폭을 위해 universal primer는 27F (5'-AGAGTTTGTATCATGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGATACCTTGTACGACTT-3')을 이용하였다. 염기서열 분석은 Solgent ASSA service (Solgent Co., Ltd, Daejeon, South Korea)에 의뢰하여 분석하였으며, 염기서열은 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)에서 받아 MEGA6 program으로 계통도를 작성하였다. 계통도

는 neighbor joining 알고리즘을 이용하여 작성하였고, bootstrapping을 1,000회 반복하여 견고성을 확인하였다. 생화학적 특성은 Vitek2 compact system (bioMérieux, France)을 이용하여 46가지의 특성을 분석하였다. 순수 배양된 균주를 0.45% NaCl이 함유되어 있는 생리식염수에 혼합하여 Vitek densichek (bioMérieux, France)로 탁도 2 McFarland로 현탁한 후, BCL card (bioMérieux, France)에 분주하여 Vitek2 system에서 생화학 특성을 분석하였으며, Vitek2 Advanced Expert System (AES) software로 판독하여 균주를 동정하였다. 그 결과 균주는 1.4 kb 16S ribosomal RNA 유전자 염기서열을 분석결과 *B. amyloliquefaciens*로 확인되었다. *Bacillus* spp.의 분자계통도 분석결과에서 Ba 균주는 *B. amyloliquefaciens* BCRC 14193과 99.6%의 높은 상동성으로 일치하였다. 또한 염기서열을 바탕으로 한 계통수 분석에서도 Bootstrap 값이 63%로 비교적 높은 것으로 확인되었다. Vitek 2 system을 이용한 생화학적 특성 검정 결과 *B. amyloliquefaciens*와 90% 유사하였다. 균주는 β -xylosidase, Ala-Phe-Pro arylamidase, L-pyrrolydonyl-arylamidase, α -galactosidase, phenylalanine arylamidase, β -glucosidase를 생산하였고, D-mannitol, D-mannose, pyruvate, D-trehalose, palatinose, myo-inositol을 이용하였다. 또한 esculin hydrolysis, methyl-A-D-glucopyranoside acidification, tetrazolium red production, polymyxin B, kanamycin resistance을 나타냈으며 6.5%의 NaCl에서 견디는 특성으로 나타났다.

(2) Ba 균체성분의 농도에 의한 항균활성 및 상관관계 분석

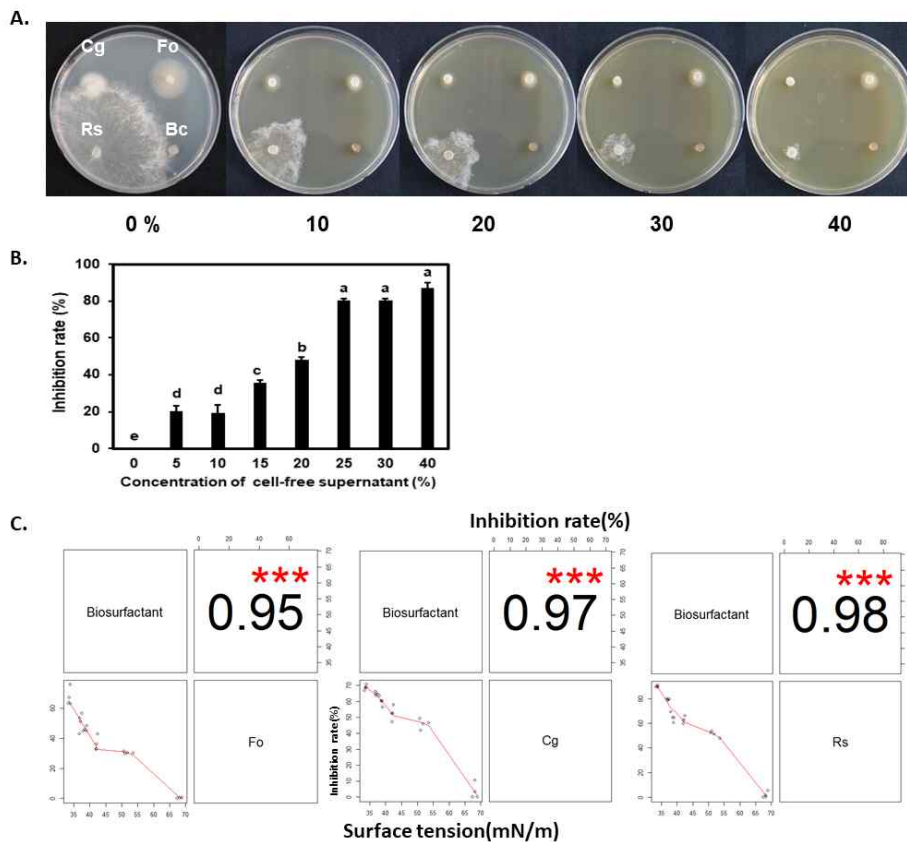


그림 3. Ba 균체성분의 농도별 항균활성 및 상관관계. Cg, *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40003; Fo, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* KACC 40032; Rs, *Rhizoctonia solani* AG-1 KACC 40101; Bc, *Botrytis cinerea*

Ba의 배양 여액내 생리활성물질의 함량별 항균활성을 조사하고 그 농도별 상관관계를 조사하였다(그림 3). 항균 활성을 측정하기 위해서는 배양 여액이 0~40% 함유농도와 PDB 60~100% plate들을 조제하였다. PDA에 5일간 배양한 공시 병원균 *F. oxysporum*(Fo), *C. gloeosporioides*(Cg), *R. solani*(Rs)의 균사 선단에서 직경 5 mm의 균사 조각을 떼어내어 상등액 함유별로 조제된 PDA 혼합 배지 위에 치상 5일 후 균사 생육 길이를 측정하였다. 균사 생육 억제율(%)은 균주 상등액이 포함되지 않은 PDA에서 균사생육길이에 대한 각 상등액 함유 비율별로 포함된 PDA에서의 균사 생육 길이로 나타냈다. 식물곰팡이균들에 대한 항균활성을 조사한 결과 다양한 식물병원균에 대한 균사생육억제 능력이 배양여액의 농도와 직접적인 연관이 있었다. 즉 배양 여액 40% 함유된 PDA배지에서 공시한 병원성 곰팡이의 균사생육억제는 75.3 ~ 89.7%로 강한 항균 활성을 나타냈다(그림 3AB). 배양 여액 20%는 식물병원균의 균사생육을 50% 이상 억제하였지만, 20% 이하에서는 균사생장억제 능력이 현저히 감소하였다. 배양 여액의 함량과 포자발아억제는 높은 부의 상관관계를 보였고($R = 0.761, P < 0.001$), *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*과 *R. solani*에 대해 각각 $R=0.973^{**}, 0.951^{**}, 0.977^{**}$ 로 0.01% 수준에서 고도로 유의하였다(그림 3C). *C. gloeosporioides*와 *R. solani*의 경우 surface tension이 42.0과 51.8 mN/m인 정지기 배양 여액 10%에서 약 50% 이상의 균사생육억제 능력을 나타냈지만, *F. oxysporum*은 37.1(30%) mN/m에서 50% 이상의 항균 활성 능력을 나타냈다.

(3) Ba 균주의 대사물질 분리 및 항균활성 분석

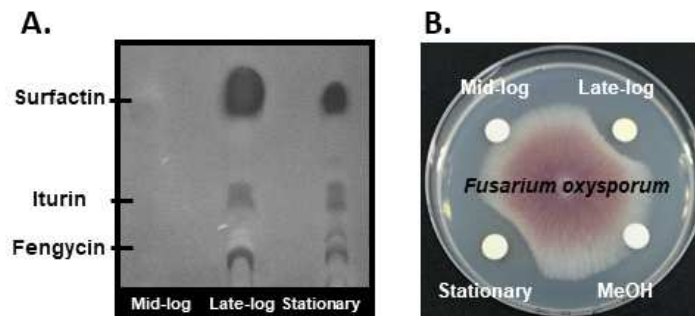


그림 4. Ba 대사물질 분리 (A) 및 *F. oxysporum*에 대한 추출 대사물질의 항균 활성(B)

Ba가 생성하는 대사물질 분리는 유기용매에 의한 추출물에 의한 얇은막 박층 크로마토그래피(TLC) 방법을 이용하였다(그림 4). TSB 배지에서 28°C 배양하면서 생육별로 부탄올을 이용하여 추출하였다. 유기용매에 의한 분획층을 진공농축장치로 완전 농축하여 메탄올로 녹인 후 TLC(silica gel 60, Merck, Germany) 플레이트에 전개시킨 후 물로 발색시켜 확인하였다. 시험 표준물질로 사용한 surfactin, iturin A, fengycin은 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)로부터 구매하여 사용하였고, 또한 표준물질 값에 의해 비교 검토하였다. 균주의 배양여액을 TLC 플레이트에서 분석한 결과, Rf 0.08-0.2인 fengycin 그룹, Rf 0.3인 iturin 그룹과 Rf 0.7-0.75인 surfactin 그룹들이 균주의 배양여액에서 관찰되었다. 이러한 항균 리포펩타이드(cyclic lipopeptide, CLP)들의 생성량은 late log와 정지기의 배양여액에서 대량으로 검출되었지만, 지수기의 배양여액에서는 소량이 검출되었다(그림 4A). 또한 생육기별 배양 여액은 다양한 식물병원성 곰팡이의 균사생육억제 효과를 보였지만, 지수기 배양여액은 균사생육억제 능력을 보이지 않았다(그림 4B). 이러한 결과는 Ba 균주의 surfactin, iturin, fengycin같은 CLP들은 생육초기

보다는 late-log기부터 생산하고, 이러한 대사물질을 함유한 배양 여액이 식물병원균의 생육을 억제하였다.

나. Ba의 배양공정 개량에 따른 특성 및 병해충 생물검정

Ba 균주의 병해충 방제에 대한 생리활성물질 생성을 증가시키기 위하여 배양공정 개량을 하였다. 배양에 사용될 영양원들을 탐색하고 각 영양원들에 대한 조합과 생리활성물질 생성에 따라 배양배지를 개량하였다. 토양의 병원균과 점박이응애 해충을 복합적으로 방제하기 위하여 천연물질을 포함한 영양원들을 선발하였다. 배양배지의 영양원으로 마니톨과 펩톤을 기본 탄소원으로 사용하였고, 녹두를 대상으로 60°C에서 40분 중탕한 후 거즈를 이용하여 추출물을 획득하였다. 또한 점박이응애의 살충력과 균주의 특정 CLP 생산을 높이기 위해 난황과 식물성 오일을 현탁액으로 만들어서 영양원으로 사용하였다.

(1) 영양원 구성비율별 성장능력 및 병해충 방제효과 검정

1) 영양원 구성비율별 성장능력 및 biosurfactant 생산량

그림 5A와 같이 탄소원으로 마니톨(mannitol)과 펩톤 및 녹두추출물, EY 현탁액(난황+식물성오일)등을 구성성분으로 하는 MP 배양배지의 공정을 이용하여 생육, 대사물질 생산량, FOL의 포자발아억제율, 토마토 시들음병에 대한 유묘검정하였다.

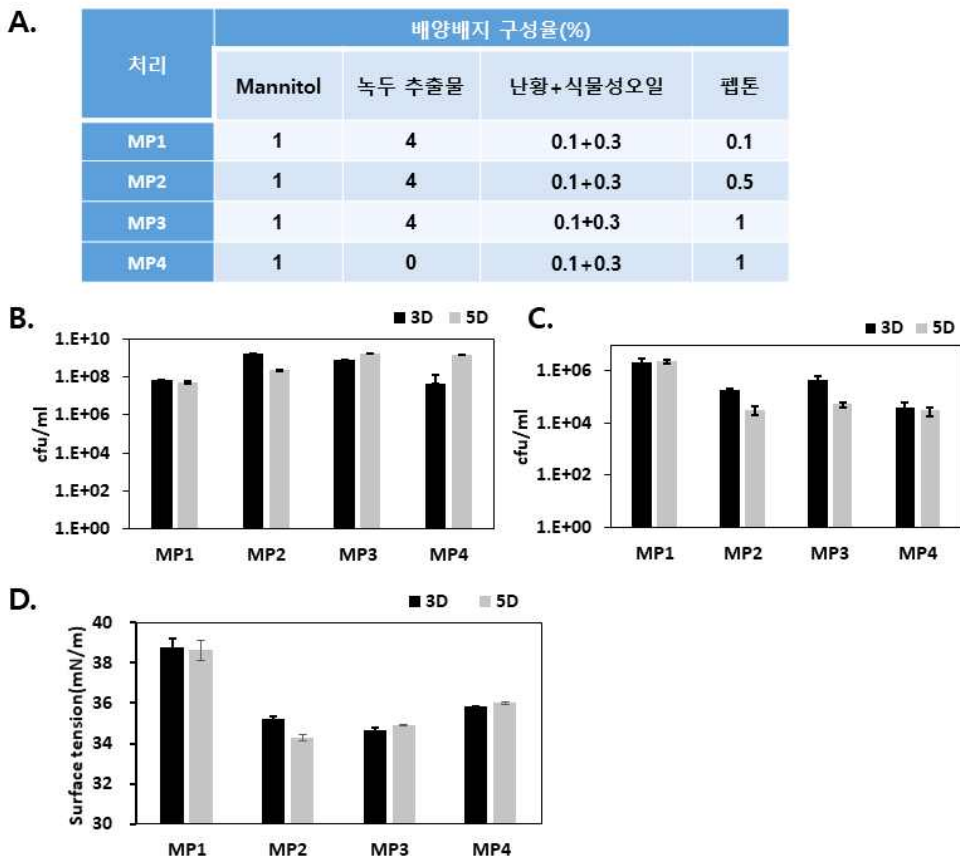


그림 5. MP 배양공정(녹두추출물:펩톤:난황현탁액)의 혼합비율에 의한 Ba의 성장과 biosurfactants 생성 능력. A, 녹두추출물:펩톤 비율별 배양공정 구성. B, 균주의 MP 공정에서 영양세포 밀도. C, 내생포자 생성밀도. D, biosurfactant 생성량 측정을 위한 surface tension

마니톨:EY의 기본 함량과 녹두추출물:펩톤의 비율별 혼합에 의한 각 공정에서 28°C, 150rpm에서 5일 동안 배양하면서 균주의 성장밀도를 조사하였다(그림 5B). 녹두추출물:펩톤의 4:1 비율로 함유된 MP3 배양공정에서 균주의 영양세포는 배양 3일째 8.0×10^8 cfu/ml에 도달하였으며, 5일 배양에서는 1.7×10^9 까지 도달하였다(그림 5B). 펩톤의 함량이 감소할수록 5일 배양 동안 균주밀도는 감소하는 경향을 나타냈으나, 녹두추출물이 함유되어 있지 않은 MP4의 경우 대수기 도달은 다른 공정에 비해 시간적으로 늦지만 최종적으로 5일 배양된 정체기의 균주밀도는 1.4×10^9 cfu/ml으로 MP3의 기준배양공정과 유사하였다. 따라서 펩톤의 함량은 균주의 영양세포 밀도와 비례하였으며 정의 상관관계를 나타냈다. 각 공정에 의한 내세포자의 생성은 5일 배양하면서 정체기로 갈수록 다소 밀도가 감소하는 경향을 나타냈으나 10^4 cfu/ml을 유지하였다(그림 5C). 영양세포 성장과 달리, 펩톤의 함량이 감소할수록 내세포자 생성밀도는 높았다. 5일 배양하면서 펩톤의 함량비가 1%로 가장 낮은 공정인 MP1 영양세포의 밀도는 다른 공정에 비해 5.3×10^7 cfu/ml으로 낮았지만, 내세포자 생성밀도는 2.3×10^6 cfu/ml으로 가장 높았다. 따라서 펩톤의 함량과 내세포자 생성밀도와의 관계는 부의 상관관계를 나타냈다. 또한 Ba의 항균활성을 나타내는 biosurfactant 생성을 측정하기 위하여 배양여액의 surface tension을 측정하였다(그림 5D). 5일 배양하면서 펩톤의 함량이 높을수록 surface tension의 값은 36.0~34.9 mN/m로 펩톤 0.1%의 함량 공정들의 34.3~38.6 mN/m보다 낮았으며, 녹두추출물 함량이 없는 MP4 공정이 3일째 35.8 mN/m을 나타냈다. 이러한 결과는 펩톤에 의한 영양세포 밀도 증가는 biosurfactants 생산량 증가에 의한 surface tension의 값이 낮아지는 결과를 가져왔다.

2) 영양원 구성비율별 토마토 시들음병원균 포자발아 억제 및 유묘검정

각 MP 공정에 의한 배양물들의 포자발아억제 조사를 위한 시험은 다음과 같이 진행하였다. 병원성 곰팡이균 FOL을 PDA 배지에 접종하여 25°C에서 7일간 배양한 후 20ml 멸균수를 넣어 분생포자를 수집하고 4겹의 멸균된 cheese cloth를 이용하여 포자현탁액을 회수하였다. 포자는 hemacytometer(Paul Marienfield GmbH & Co., Lauda-Konigshofen, Germany)를 사용하여 접종농도를 조절하였다. 포자 발아율 조사는 12 well plate(SPL Life Sciences, Korea)에 0 ~ 40%의 배양 여액과 60% PDB로 희석하여 1 ml을 조제하였다. 조제된 배양여액에 200 μ l의 포자현탁액(1×10^4 spores/ml)을 혼합하고 25°C에서 20시간 동안 120 rpm으로 배양하면서 발아율을 조사하였다. 광학현미경하에서 발아관의 길이가 포자 장경의 1/2 이상인 것을 발아한 것으로 계산하여 각 반복별 100개의 포자에 대한 발아 유무를 관찰하였으며 3반복으로 조사하였다. 대조구는 멸균된 TSB 배지와 60% PDB 함유배지를 사용하였다.

또한 FOL 시들음병원균에 대한 토마토 유묘검정은 각 균주의 상등액을 200배 농도로 희석하여 3일 간격으로 3회, 20ml씩 4엽기 토마토(품종:텐텐) 유묘에 관주한 후 최종 관주 3일 후에 FOL을 접종하였다. 본 연구에서 사용된 토마토 시들음병 방제효과 검정은 토마토 유묘에 지제부에서 1cm 떨어진 곳에서 45도 각도 2cm 깊이로 뿌리를 향하여 찔러서 뿌리에 상처를 주고 상처난 뿌리에 FOL 포자 현탁액(1×10^7 spores/ml)을 관주한 후 4주 후에 시들음병 병조사를 하였다. 토마토 시들음병 병조사는 도관의 갈변 여부와 생육 억제로 발병 정도를 조사하였다. 발병 지수는 0 = 건전, 1 = 도관이 갈변되나 지상부의 생육은 정상인 것, 2 = 도관이 갈변되고 지상부의 생육이 약간 억제된 것, 3 = 도관이 갈변되고 지상부는 생육이 억제되며 약간 황화한 것, 4 = 생육이 심하게 억제 되고 황화하여 시들고 낙엽된 것, 5 = 고사 등 6단계로 하였다.

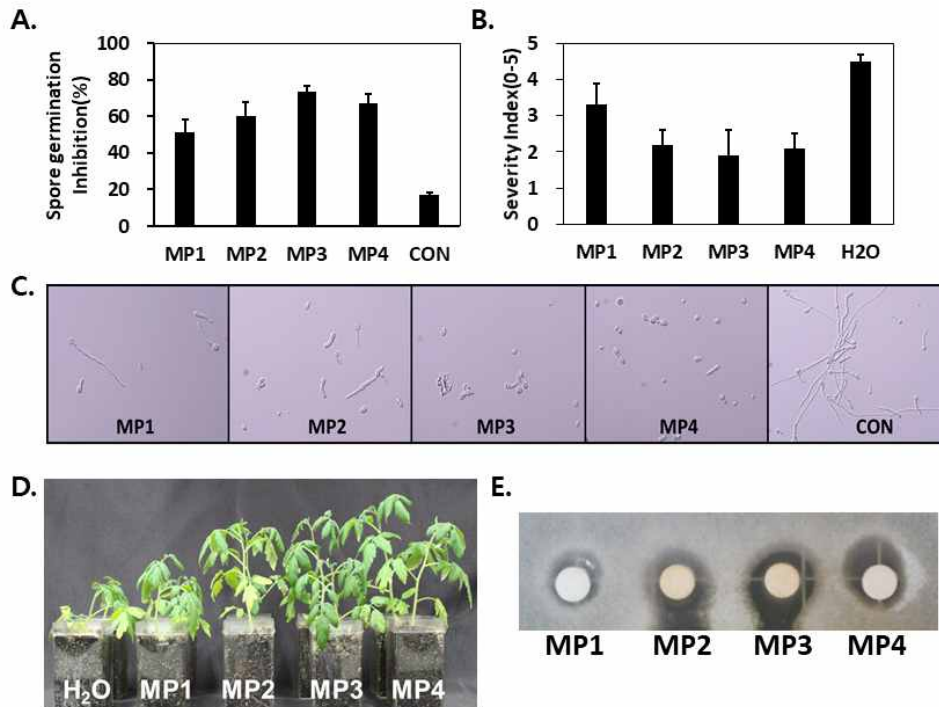


그림 6. MP 배양공정의 혼합비율별 FOL 포자발아 억제 및 토마토 시들음병 방제효과. A, FOL 포자발아억제율. B, 토마토 시들음병 유묘검정. C, FOL 포자발아 광학현미경 사진. D, 토마토 시들음병 유묘검정 사진. E, FOL 포자발아 억제능력 검정.

Ba 균주의 각 MP 공정의 배양여액별 FOL 포자 발아억제 능력을 검정한 결과, 녹두추출물:펩톤=4:1의 비율로 혼합된 공정에서 배양된 MP3 처리구가 FOL의 포자를 73.7%로 가장 높게 억제하였다(그림 6A). 또한 녹두추출물이 포함되지 않고 펩톤의 함유량이 1% 비율로 포함된 MP4 공정의 배양여액도 67.4%의 FOL 포자발아 억제효과가 있었다. 각 공정에 의한 배양여액의 토마토 시들음병에 대한 유묘검정을 한 결과 도관의 갈변현상은 있지만 정상적인 생육을 보인 MP3가 발병도 1.9로 방제효과가 높았다(그림 6B). 각 공정별로 Ba 균주에 의해 생산된 biosurfactant를 부탄올 유기용매를 이용하여 추출한 후 FOL의 포자발아억제 검정을 위해 PDA 배지 위에서 수행하였다(그림 6E). 그 결과 모든 공정의 처리물에서 포자 발아를 억제하여 균사체 형성을 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 Ba 배양에서 MP 공정은 토마토 시들음병 방제 효과에서 우수하였으며, 특히 MP 영양원 중에서 펩톤이 중요한 요소 중의 하나인 것을 확인하였다.

3) 영양원 구성비율별 점박이응애 생물검정

녹두추출물:펩톤:난황현탁액을 영양원으로 하는 MP3 배양공정에서 배양된 균주의 배양여액에 의한 점박이응애의 방제효과를 곤충사육접시(10×4.5cm, insert breeding dish)에 여과지를 넣고 그 위에 수분방지용 탈지면을 일정한 크기(5×5cm)로 잘은 후 콩잎을 놓은 다음 처리당 점박이응애를 50마리씩 3반복으로 접종하였다. 페트리디쉬에 분무기를 이용하여 처리물질을 30cm 거리에서 1회 살포하여 희석된 배양공정에 의한 균주 상등액을 잎과 해충에 골고루 묻게 한 후 사육실(25°C, 16L:8D)에서 처리후 경과된 시간별로 사충수를 조사하였다(그림 7). MP3 공정에

의해 배양한 상등액 60%를 살포 후 7일 동안 점박이응애의 살충율을 조사한 결과 7일 후 25.8%의 살충효과를 나타냈다.

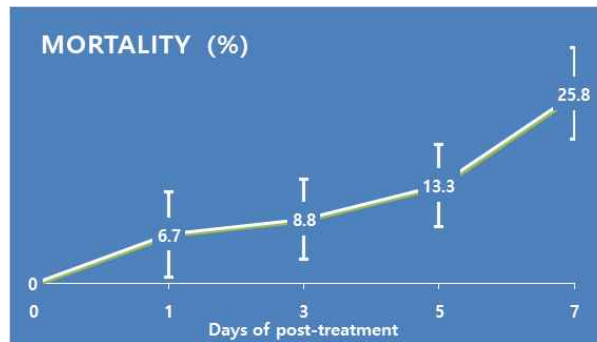


그림 7. Ba 균주의 MP3 공정에 의한 점박이응애 사충율

(2) 영양원 유효성분 추출물의 배양 혼합별 효과검정

MP 배양공정에 의한 병해충 방제효과 증진을 위해 영양원 난황에서 주요 유효성분 레시틴을 추출하여 배양공정상 영양원으로 사용하였다. 순도 95%(v/v) 이상의 에탄올을 난황과 1:3 비율로 혼합하여 60°C에서 가온하면서 레시틴 유효성분의 지질을 추출하였다. 난황 추출 유효성분 레시틴을 이용한 배양공정과 식물추출물 혼합에 의한 방제효과를 검정하였다.

처리	배양배지 구성율(%)		
	펩톤:레시틴+mannitol	녹두추출물	식물성오일
MP	0.5:0.1+1	4	-
MP-O	0.5:0.1+1	4	0.5
MP0.4	0.5:0.1+1	0.4	-
MP0.4-O	0.5:0.1+1	0.4	0.5

그림 8. 녹두추출물:펩톤:레시틴 영양원 배양 배지 구성

배양영양원 유효성분 추출물에 의한 배양공정에서 리포펩타이드(CPL)를 유효성분으로 하는 균주의 시들음병 유묘검정과 점박이응애 사충율을 조사하였다. 배양배지의 구성은 그림 8와 같다. 선발된 녹두추출물:펩톤:레시틴을 영양원에서 28°C, 5일간 배양된 균주를 4700 rpm에서 30분간 원심분리를 하여 각 균주의 상등액을 회수 후 0.2um 여과지를 통과시켜 균체의 상등액을 얻었다. 균주의 상등액을 200배 농도로 희석하여 3일 간격으로 3회, 20ml씩 4엽기 토마토(품종:텐텐) 유묘에 관주한 후 3일 후에 FOL을 접종하였다. 시들음병 방제효과 검정은 토마토 유묘에 지제부에서 1cm 떨어진 곳에서 45도 각도 2cm 깊이로 뿌리를 향하여 찔러서 뿌리에 상처를 주고 상처난 뿌리에 FOL 포자 현탁액(1×10^7)을 관주한 후 4주후에 시들음병 병조사를 하였다. 모든 검정은 각 처리당 10주씩 3반복으로 진행하였다. 토마토 시들음병 병조사는 도관의 갈변 여부와 생육 억제로 발병 정도를 조사하였다. 발병 지수는 0 = 건전, 1 = 도관이 갈변되나 지상부의 생육은 정상인 것, 2 = 도관이 갈변되고 지상부의 생육이 약간 억제된 것, 3 = 도관이 갈변되고 지상부는 생육이 억제되며 약간 황화한 것, 4 = 생육이 심하게 억제되고 황화하여 시들고 낙엽된 것, 5 = 고사 등 6단계로 하였다.

점박이응애의 방제효과검정은 Petri dish에 일정한 크기(5 x 5cm)의 수분이 공급된 여과지와 탈지면을 놓은 후 고추 잎과 강낭콩 잎을 놓은 다음 점박이응애를 접종하였다. Petri dish에 준비된 각 해충에 분무기로 1 ml씩 약제를 30cm 거리에서 잎 절편에 골고루 묻게 살포한 후, 약제 처리 후 1 시간 동안 음건하였다. 각 처리구들은 $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (16L : 8D, RH 50 ~ 60%) 조건에서 보관하면서 생충수와 사충수를 조사하였다. 치사여부는 가는 붓으로 충체를 접촉하여 반응이 없거나 이동하지 못하는 개체를 죽은 것으로 판단하였다.

1) 영양원 유효성분 추출 배양공정에 의한 성장능력 및 토마토 시들음병 방제효과 검정

배양공정별 성장능력을 조사한 결과 영양세포 밀도가 $3.16 \times 10^8 \sim 5.68 \times 10^9$ CFU/ml 였으며, 내생포자는 $1.46 \times 10^4 \sim 1.78 \times 10^5$ CFU/ml로 모든 구성비에서 높은 성장능력을 나타냈다(그림 9A). 배양공정의 영양원 중 MP0.4-O 공정에서 내생포자 생산능력이 가장 높았으며, 토마토 시들음병에 대한 방제효과면에서도 0.4% 녹두추출물과 식물성오일이 함유된 MP0.4-O 처리구에서 가장 높은 방제 효과를 나타냈다(그림 9B). 이러한 결과들은 난황의 유효성분 추출물을 배양 영양원으로 구성된 배양공정은 균체의 증가뿐만 아니라 시들음병 방제효과 증진 효과도 나타냈다.

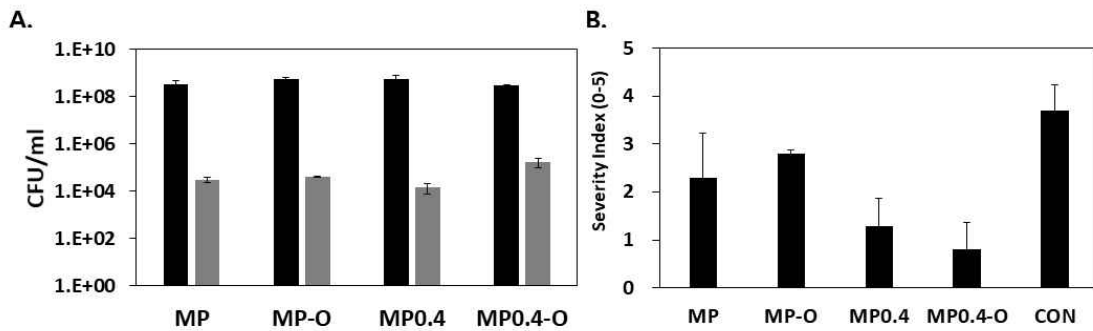


그림 9. 영양원 유효성분 추출 배양공정에 의한 균주 성장능력 및 토마토 시들음병 유묘검정. A, 성장능력. B, 토마토 시들음병 유묘검정.

2) 영양원 유효성분 추출 배양공정에 의한 점박이응애 방제효과 검정

난황 유효성분 추출물을 영양원으로 사용한 배양공정에서 각 상등액을 60% 함유농도로 살포 7일 후 점박이응애에 대한 살충율을 조사한 결과 MP0.4-O 배양공정에서의 살충효과가 43.8%로 다른 배양공정보다 더 높은 결과를 나타냈다(그림 10). 이러한 결과는 유효성분 추출물의 배양공정이 균주의 살충효과를 11.7~14.6% 더 향상시켰다.

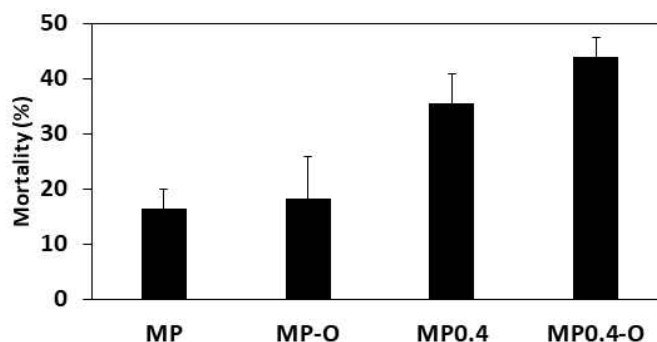


그림 10. 영양원 유효성분 추출 배양공정에 의한 균주의 점박이응애 사충율

(3) 배양공정에 따른 유효성분 변화 및 함량분석

배양공정 개량에 따른 녹두추출물:펩톤:레시틴의 MP 배양공정에 의한 상등추출물의 유효성분을 표준물질과 대비하여 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다. Ba 균주의 기본 배양배지로 사용한 TSB(Becton Dickinson, Germany) 대조구와 비교하여 각 영양원의 배양액 상층액을 부탄올을 이용하여 유기용매 층을 분리하였다. 분획층은 진공농축장치로 완전 농축하여 메탄올로 녹인 후 0.2 µm 주사기 필터(Whatman,PTFE)로 여과하여 LC-MS/MS 분석을 위해 사용하였다. LC-MS/MS (API-3200, AB SCIEX, Framingham, MA,USA) 분석에 사용된 컬럼은 Capcell Core C18 (2.1 mm I.D×150mm, 2.7 µm)이며, 분리용매는 A (0.1% formic acid in distilled water)와 B (0.1% formic acid in methanol)를 사용하였다. 모든 화합물은 ESI (electro spray ionization) 및 positive mode에서 이온화하였고 MRM (Multiple Reaction Monitoring, 그림 11) mode로 분석하였다. 표준용액은 Sigma-Aldrich와 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다: fengycin(CAS Number 102577-03-7), surfactin (CAS Number 24730-31-2), iturin A (CAS Number 52229-90-0), 2,4-diacetylphloroglucinol (CAS 2161-86-6). 각 표준액을 농도별로 희석하여 LC-MS/MS로 측정 후 얻어진 크로마토그램상의 피크 면적을 검량선과 비교하여 정량하였다. 표준용액을 각각 용매에 용해하여 1,000 mg/L의 stock solution을 조제하였다. 이를 단계별로 희석하여 0.005, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L의 working solution을 조제하여 각각 LC-MS/MS로 측정 후 얻어진 크로마토그램상의 peak면적을 기준으로 검량선을 작성하였다. 검출농도는 다음과 같이 계산하여 표기하였다.

$$\text{검출농도}(mg/kg) = \text{기기검출량}(ug/ml) \times \frac{\text{추출용매량}(ml)}{\text{시료량}(g)} \times \frac{\text{희석부피}(ml)}{\text{분취량}(ml)} \times \frac{\text{희석부피}(ml)}{\text{분취량}(ml)}$$

Compound	Precursor ion (Da)	Product ion (Da)	DP ^{b)} (volts)	EP ^{c)} (volts)	CE ^{d)} (volts)	Ionization mode
Iturin A	1043.1	70.2 ^{a)}	86.0	12.0	125.0	Positive
		184.2	86.0	12.0	93.0	ESI ^{e)}
Surfactin	1036.3	86.1	86.0	11.0	121.0	Positive
		685.1	86.0	11.0	39.0	ESI
Fengycin	731.9	70.2	56.0	8.5	127.0	Positive
		84.2	56.0	8.5	95.0	ESI

그림 11. LC-MS/MS MRM transition. ^{a)}Quantitation ion, ^{b)}Declustering potential, ^{c)}Entrance potential, ^{d)}Collision energy

각 배양액별 유효성분의 정량은 iturin, surfactin, fengycin의 표준물질 피크와 추출물질의 크로마토그램 피크의 비교를 통해 실시하였다(그림 12). Iturin과 surfactin 표준물질의 검출시간은 각각 10.61분과 18.19분이었으며, fengycin 표준물질은 11.90, 12.12, 12.48분이 유효 검출 시간이었다(그림 12A). 생물적 방제균 *Bacillus* sp. 항균물질은 리포펩타이드(surfactin, iturin, fengycin)를 생성한다고 알려져 있다. Surfactin은 직접적으로 항균활성을 나타내거나 생물막

(biofilm)을 형성하여 식물 뿌리 표면에 병원균이 붙지 못하게 하여 식물을 보호하며, iturin과 fengycin은 다양한 병원균에 대해 강력한 항균작용을 한다고 알려져 있다.

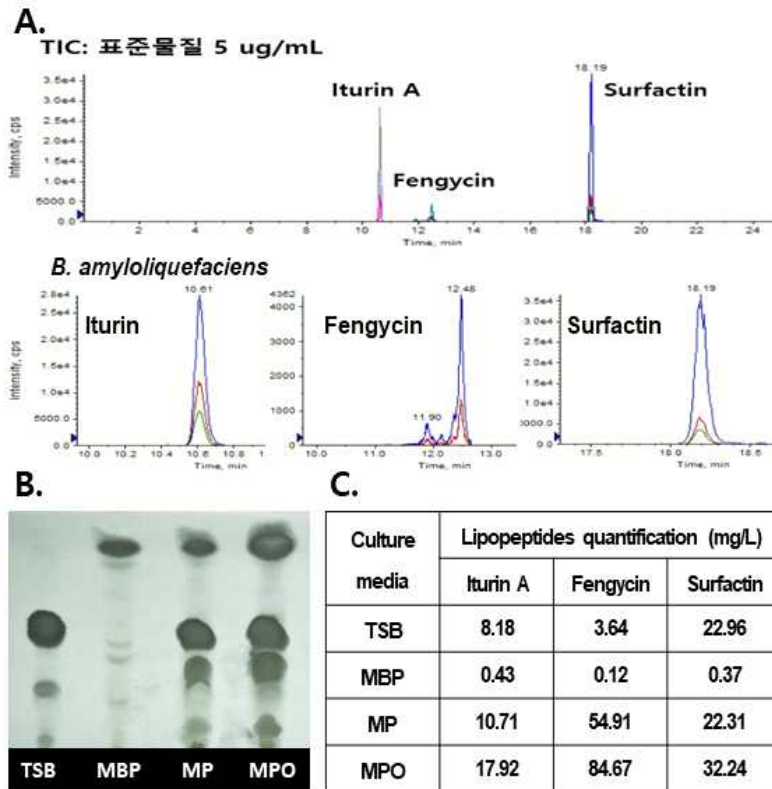


그림 12. 배양공정 개량에 의한 유효성분의 LC-MS/MS 분석. A. 표준물질과 Ba 균주의 유효 물질 분석. B. 배양공정별 유효성분의 TLC상 분리. C. 분획물질물의 LC-MS/MS 검출량. TSB, 합성배지 대조구; MBP(대조구), 마니톨:녹두추출물:펩톤=1:0.4:0.5; MP, 마니톨:녹두추출물:펩톤:레시틴=1:0.4:0.5:0.1; MPO, 마니톨:녹두추출물:펩톤:레시틴:식물성오일=1:0.4:0.5:0.1:0.5.

배양공정 개량에 따른 각 공정별 균주의 유효성분 생산을 최대로 하는 영양원을 획득하기 위하여 각각 배양액의 유효성분을 분석하였다(그림 12BC). 각 공정별 유효성분이 함유된 추출물을 TLC에서 분리한 결과 대조구로 사용된 TSB 배양의 유효성분은 배양공정을 개량한 배양추출물과는 다른 패턴으로 분리되었다. 각각의 검출량은 각 표준액을 농도별로 희석하여 LC-MS/MS로 측정 후 얻어진 크로마토그램상의 피크면적을 검량선과 비교하여 정량하였다. 토마토 시들음병에 대해 방제효과가 우수했던 MPO 배양공정에서 유효성분 함량은 레시틴 함유와 함께 0.5% 식물성오일이 함유된 배양공정에서 가장 많은 양이 측정되었고 그 결과 방제효과에서도 큰 영향을 미쳤다. 하지만 레시틴과 식물성오일이 함유되지 않은 배양공정에서는 대조 배양공정보다 유효성분의 함량이 상대적으로 낮았다. 또한 식물성오일이 함유되지 않은 MP 공정은 TSB 대조공정보다는 유효성분 검출량이 높았지만, MPO 공정보다는 상대적으로 낮은 검출량을 확인하였다. 특히, 배양공정을 개량한 결과 TSB 배양보다 모든 성분이 높게 검출되었으며, iturin과 fengycin의 함량이 상대적으로 높게 생산되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 분석결과는 레시틴과 식물성오일이 함유된 배양공정이 토양병해를 방제하기 위한 주요 영양원이라는 것을 확인하였으며, 성분 함량 조절을 통한 대량배양의 최적 조건을 확립할 수 있는 구성성분으로 결정하였다.

2-2. 식물추출물의 항균활성 및 살충효과 검증

가. 식물추출물의 항균활성 검증

본 과제의 선발후보 식물추출물 호두, 님오일, 데리스(로테논, rotenone), 담배잎차(니코틴, nicotine)을 이용하여 처리 농도별로 FOL의 포자발아억제 효과를 조사하였다. 식물추출물 님 (azadirachtin 0.75%), 데리스(rotenone 0.05%), 담배잎 추출물(nicotine 2.2%)은 원재를 구입하여 본 연구에서 사용하였다. 호두추출물은 검은호두의 외피를 건조한 후 분쇄과정을 거쳐 외피에 포함된 물질을 추출하기 위하여 증류수 60°C에서 진탕 후 KOH로 pH를 조정하였다.

(1) 식물추출물 단독처리에 의한 항균활성 검증

처리	처리농도별 <i>F. oxysporum</i> 포자발아억제율(%)	
	반량(10%)	기준량(20%)
호두추출물	69.1 ±2.4	73.2 ±7.3
님오일	62.1 ±0.7	61.8 ±1.4
로테논	64.1 ±5.3	77.7 ±6.6
니코틴	46.1 ±4.6	49.1 ±5.2
PDB(대조)		5.8 ±0.7

그림 13. 식물추출물의 처리농도별 FOL 포자발아억제율

각 식물추출물에 대한 기준 살포농도(20%)와 설정기준량의 반량(10%)에서 FOL에 대한 포자발아억제능력을 조사하였다 (그림 13). 기준설정 살포농도 20%에서 로테논 처리구가 77.7%로 가장 높은 발아억제효과가 있었으며, 호두추출물이 73.2% 이상 억제하였다. 니코틴 49.1%를 제외하고는 모든 처리구에서 60% 이상의 높은 포자발아억제효과가 있었다. 기준량의 반량(10%) 처리 결과는 호두추출물이 69% 이상으로 가장 높았으며, 니코틴이 46.1%로 처리간 가장 낮았다. 반량으로 살포한 결과 로테논은 13.6% 발아억제율의 편차가 가장 높았다. 하지만 님오일은 살포농도의 변화에 따른 FOL 포자발아억제효과에서는 급격한 변화없이 61% 이상 일정한 발아억제효과를 나타냈다. 이러한 결과를 님오일과 다른 생물적 방제제들과 혼합시 안정적인 방제효과와 급격한 농도변화로 오는 약해와 약효변화에 대해 안전할 것으로 기대되는 결과를 얻었다.

(2) 식물추출물 혼합물에 의한 항균활성 검증

호두추출물, 님오일, 로테논, 니코틴 등을 혼합한 식물추출물 혼합물의 FOL 포자발아억제에 대한 효과를 검증하였다(그림 14). 각 식물추출물 5%(v/v) 농도로 조합하여 혼합한 후 200 μl의 포자현탁액(1×10^4 spores/ml)을 제조하여 25°C에서 20시간 동안 120 rpm으로 배양하면서 발아율을 조사하였다. 그 결과 각 식물추출물의 혼합 조합 중 로테논:님오일(Ro:Ne), 호두추출물:담배잎차(Bw:To) 2종을 선발하였다. 로테논:님오일의 혼합물 처리구는 65%로 FOL 포자발아를 가장 높게 억제하였다. 이들의 단일 10% 농도 처리와 혼합 5% 농도 처리의 포자발아억제 효과가 유사하였으며, 두 식물추출물간의 조합은 FOL에 대한 항균활성에서 서로간의 상승작용 효과를 나타냈다. 또한 호두추출물과 혼합한 담배잎차의 5% 처리구는 62.3%로 담배잎차를 단제

로 처리하였을 때보다 15% 이상 높았다. 하지만 다른 혼합 조합처리구는 47.5~27.2%로 50% 이하의 낮은 결과를 나타냈다.

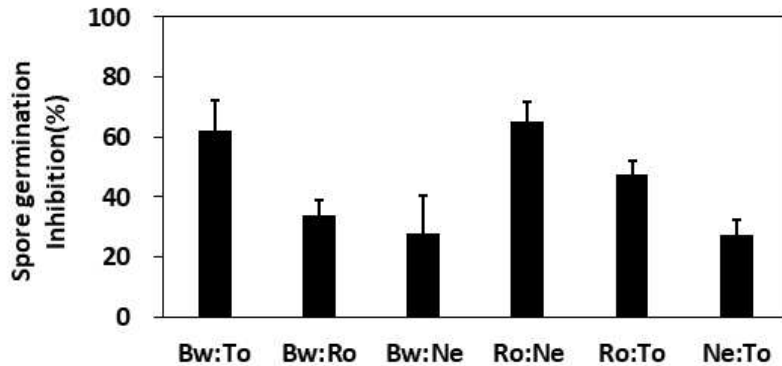


그림 14. 식물추출물 혼합에 의한 FOL 포자발아억제율. 호두추출물:담배잎차(Bw:To), 호두추출물:로테논(Bw:Ro), 호두추출물:넴오일(Bw:Ne), 로테논:넴오일(Ro:Ne), 로테논:담배잎차(Ro:To), 넴오일:담배잎차(Ne:To).

나. 식물추출물의 살충효과 검정

점박이응애에 대한 검정방법은 여과지와 수분방지용 탈지면을 곤충사육접시에 넣은 후 기주 식물로 사용한 콩잎을 올린 후 처리당 점박이응애를 50마리씩 3반복으로 접종하였다. 점박이응애가 접종된 페트리디쉬에 식물추출물을 각각의 농도로 30cm 거리에서 1회 분무 살포하여 잎과 해충에 골고루 묻게 한 후 사육실(25°C, 16L:8D)에서 보관하면서 경과된 시간별로 사충수를 조사하였다.

(1) 식물추출물의 단독처리에 의한 점박이응애 살충율

처리	함유농도(% v/v)	사충율(%)	방제효과(%)
호두추출물	10	94.7±1.5	94.5
	20	100.0±0.3	100.0
담배잎차(니코틴)	10	53.2±4.2	50.5
	20	62.5±5.1	60.0
넴오일	10	62.3±3.3	60.0
	20	67.1±4.2	65.3
로테논	10	68.6±3.1	66.3
	20	72.4±5.2	70.5
대조구(물)		5±3.9	-

그림 15. 식물추출물의 함유농도별 점박이응애 사충율과 방제효과

호두추출물, 넴오일, 로테논, 니코틴 등 식물추출물의 함유농도별로 점박이응애의 살충효과를 검정하였다(그림 15). 그 결과 10% 함유 식물추출물에 대한 점박이응애에 대해서 53% 이상의 높은 방제효과를 나타냈다. 특히, 호두추출물은 94.7%의 높은 사충율로 95% 이상의 높은 방제효과를 나타냈다. 로테논은 10% 함유농도에서 68.6%의 우수한 사충율로 66% 이상의 방제효과를 나타냈으며, 20%에서는 70.5%의 높은 방제효과를 나타냈다. 또한 20% 담배잎차와 10% 넴오일도 62% 이상의 사충율로 60% 이상의 방제효과를 나타냈다.

(2) 식물추출물 혼합 처리에 의한 점박이응애 살충율

각각의 식물추출물 혼합물에 대한 점박이응애 살충효과를 검정하였다(그림 16). 각각의 식물추출물은 2.5%(v/v) 호두추출물, 5% 님오일, 5% 로테논, 5% 니코틴 농도로 조합한 후 혼합하였다. 식물추출물의 혼합조합된 모든 처리구에서 점박이응애에 대해 60% 이상의 사충율과 방제효과를 나타냈다. 특히, 호두추출물:담배잎차(2.5+5%, v/v)의 혼합조합물은 79%의 사충율을 나타냈으며, 로테논:님오일(5+5%, v/v) 혼합조합물도 77.3%의 사충율로 76% 이상의 높은 방제효과를 나타냈다. 로테논:님오일의 경우 단재로 사용할 경우보다 10% 이상의 상승효과가 있었다.

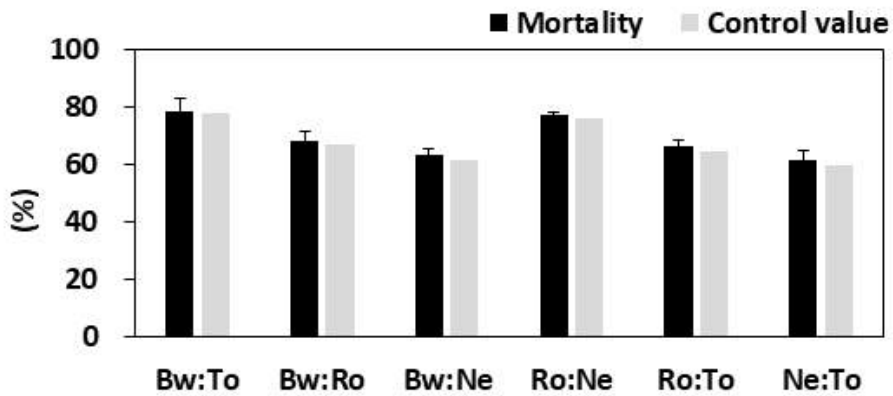


그림 16. 식물추출물 혼합에 의한 점박이응애 살충율과 방제효과. 호두추출물:담배잎차(Bw:To), 호두추출물:로테논(Bw:Ro), 호두추출물:님오일(Bw:Ne), 로테논:님오일(Ro:Ne), 로테논:담배잎차(Ro:To), 님오일:담배잎차(Ne:To).

2-3. 균주와 식물추출물 혼합 제형에 의한 항균활성 및 살충효과 검정

Ba과 식물추출물 혼합 제형은 MP 공정에 의한 미생물 배양상등 추출액과 식물추출 농자재들을 이용하여 제조하였다. Ba 균주는 MP 배지에서 28°C, 120 rpm으로 5일 진탕 배양하면서 1×10^8 cfu/ml 농도로 사용하였다. 균주의 상등액을 회수한 후 0.2 μ m 여과막(Millipore Filter Corp., Bedford, MA, USA)으로 여과하여 균을 제거하고 사용하였다.

(1) 균주와 식물추출 혼합물의 항균활성 검정

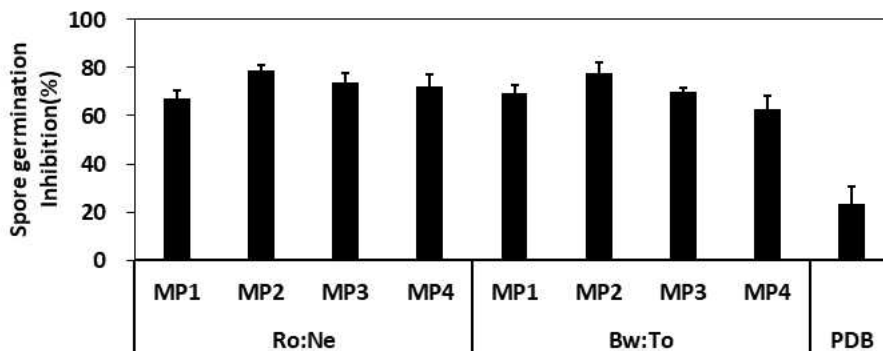


그림 17. 균주(60%)와 식물추출(2%) 혼합물의 FOL 포자발아억제율. 로테논:님오일(Ro:Ne), 호두추출물:담배잎차(Bw:To).

미생물 배양추출물(60%)와 로테논:님오일(Ro:Ne, 2%, v/v)와 호두추출물:니코틴(Bw:To, 2%)의 혼합 2종 제형물을 이용하여 생물 검정을 하였다. (그림 17). 로테논:님오일을 혼합한 처리구에서는 펩톤 0.5%가 함유된 MP2 공정의 제형물 처리구에서 79.1%로 가장 높은 포자발아억제를 나타냈다. 호두추출물:니코틴과 혼합한 MP2 공정의 혼합 제형물 처리구에서도 77.5%로 가장 높은 결과를 나타냈다.

(2) 균주와 식물추출 혼합물의 살충효과 검정

1) 균주(60%)+식물추출(2%, v/v) 혼합 제형의 살충효과

그림 12의 혼합 제형물에 대한 점박이응애에 대한 생물 검정 효과를 조사하였다(그림 18). 로테논:님오일과 혼합한 균주 배양상등추출액 처리구들은 균주 배양공정에서 펩톤의 함량이 증가하는 영양원일수록 방제효과가 높은 경향을 나타냈다. 특히, 펩톤 1%가 함유된 MP3 공정 제형물 처리구에서 87% 이상의 높은 방제효과를 나타냈다. 또한 호두추출물:니코틴과 혼합한 MP3 처리구에서 92.8%의 높은 사충율과 93%의 방제효과를 나타냈다. 이 결과들은 식물추출물간 혼합처리에서도 77% 이상의 방제효과가 있었는데, 식물추출물의 함유농도가 감소하더라도 MP 공정의 균주와 혼합한 제형일 경우 식물추출물 단독처리보다 10% 이상 상승시키는 방제효과를 나타냈다.

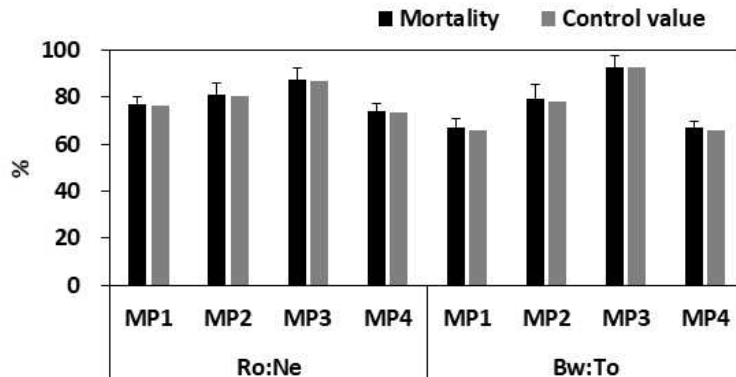


그림 18. 균주(60%)와 식물추출(2%) 혼합물의 점박이응애 살충율 및 방제효과. 로테논:님오일 (Ro:Ne), 호두추출물:담배잎차(Bw:To).

2) 식물추출 조합비율에 따른 혼합 제형의 살충효과

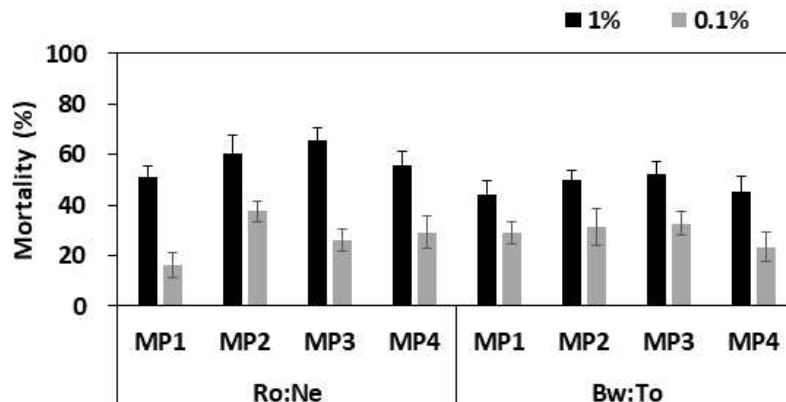
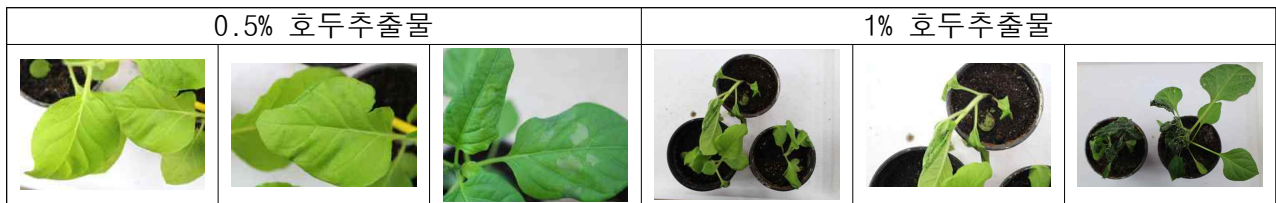


그림 19. 식물추출물 혼합비율별 점박이응애 사충율. 로테논:님오일(Ro:Ne), 호두추출물:담배잎차(Bw:To).

그림 18의 결과를 토대로 식물추출물 혼합비율별 혼합 제형물에 대한 점박이응애의 살충율을 조사하였다(그림 19). MP 배양공정별 상등추출액(60%)과 식물추출물의 함유농도를 0.1%와 1%로 조합하여 각각의 혼합 제형물을 제작하였다. 로테논:님오일(Ro:Ne) 1% 혼합물에서는 모두 50% 이상의 사충율을 나타냈으나, 0.1%로 낮추어진 식물추출물 함유농도 혼합물 처리구에서는 40% 이하의 사충율을 나타냈다. 식물추출물의 함유농도가 2%에서 1% 반량으로 감소했을 때 21.6% 사충율이 낮았다. 또한 호두추출물:담배잎차(Bw:To)의 1%와 0.1% 혼합 제형 결과는 53% 이하의 사충율을 나타냈다. 호두추출물:님오일 함유량(2%→1%)에 따른 사충율 변화도 평균 28.5% 감소하는 경향을 나타냈다.

<참고:약해시험> 호두 추출물(1%)이 식물 약해 시험 중 잎 가장자리와 전체의 물러짐 현상과 말림현상의 약해가 나타나 후보물질에서 제외하고 담배잎차(니코틴) 추출물로 시험을 진행하기로 함.



(3) 유효성분 추출 함유 균주 배양추출과 식물추출 혼합물의 토마토 시들음병 방제효과 검정

레시틴 추출 영양원에 의한 MP 배양공정에 의해 확보된 추출상등액 반량과 식물추출물의 혼합에 의한 방제효과를 검정하였다 (그림 20).

처리	배양배지 구성요소	식물추출물 혼합율(%)	
		Ro:Ne	To
	MP0.4(뿔톤:레시틴+mannitol+녹두추출물)		
T1	MP0.4 (0.5 : 0.1 : 1 : 0.4)	2	
T2	MP0.4 + 식물성오일(0.5)	2	
T3	MP0.4		2
T4	MP0.4 + 식물성오일(0.5)		2

그림 20. 레시틴 추출 영양원 배양공정에 의한 배양추출물과 식물추출 혼합물. 로테논:님오일 (Ro:Ne), 담배잎차(To).

전체 함량에서 5일 배양한 균주 추출상등액 30%와 식물추출물 2%(v/v) 농도로 혼합제형한 후 토마토 시들음병은 200배 농도로 희석하여 7일 간격으로 20ml씩 2회 토마토 유묘에 관주 3일 후에 FOL을 접종하였다. 접종 4주 후에 시들음병에 대한 토마토 시들음병 병징에 대한 방제효과를 조사하였다(그림 21). 로테논:님오일(Ro:Ne)과 담배잎(To) 추출물 혼합제형 모두 식물성오일이 함유된 처리구(T2와 T4)가 시들음병을 방제하는데 우수하였다. 앞선 난황 현탁액을 사용한

MP공정과 식물추출 혼합물의 처리구에서 FOL 포자발아억제율이 가장 높은 것과 같이, 유효성분 추출에 의한 배양에서도 식물성오일이 함유된 혼합 처리구가 토마토 유묘검정에서도 같은 결과를 나타냈다.

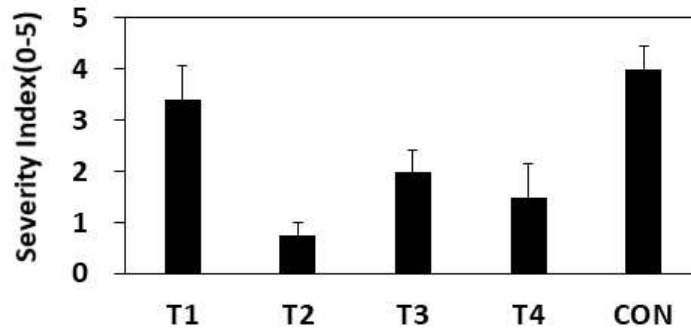


그림 21. 레시틴 추출 영양원 배양공정 추출배양물과 식물추출 혼합비율의 토마토 시들음병 유묘검정

2-4. 증진보조제 첨가에 의한 혼합 조건별 방제효과 검정

MP0.4 배양공정 과정의 안정성과 제형성을 높이기 위해 증진제 첨가에 의한 FOL 병원균 포자발아억제 시험과 시들음병 방제효과 유묘검정을 실시하였다. 증진제 및 첨가원의 여러 후보군으로 시험을 한 결과 배양공정에서 가장 안정적이고 균주의 CLP 대사산물 중에 fengycin 생산에 영향을 주었던 yeast extract를 MP 공정에 구성비율별로 첨가하여 병해충 방제효과를 조사하였다(그림 22).

처리	증진제 (%)	식물추출물 혼합율(%)	
	yeast extract	Ro:Ne	To
T1	1	-	2
T2	0.5	-	2
T3	0.1	-	2
T4	0.05	-	2
T5	0.01	-	2
T6	1	2	-
T7	0.5	2	-
T8	0.1	2	-
T9	0.05	2	-
T10	0.01	2	-

그림 22. 증진제 혼합 배양 배지 구성. 로테논:넴오일(Ro:Ne), 담배잎차(To).

MP 공정에 0.01~1% 비율로 yeast extract를 첨가한 후 5일 배양한 상등 추출액을 전체 함량 대비 30%(v/v)와 2%(v/v)의 식물추출물(Ro:Ne 및 To)과 혼합한 후 처리구별 원액에 대한 FOL의 포자 발아억제율을 조사하였다 (그림 23). 담배잎차와 혼합제형 처리구 중에서 T1(1% yeast extract)이 83.6%로 포자발아 억제율이 가장 높았으며, 로테논:넴오일(Ro:Ne)과 혼합제형 처리구 중에서는 T8(0.1% yeast extract)와 T10(0.01% yeast extract)에서 90.4와 85.5%로 가

장 높았다. 담배잎차와 혼합한 배양추출물은 yeast extract 첨가 비율에 따라 포자발아억제율에서 처리간 42.3%로 높은 편차를 나타냈으며, 첨가 비율이 높을수록 그 효과도 높았다. 로테논:님오일 처리구는 첨가제의 함유량이 낮더라도 처리간 병원균의 포자발아억제율 차이는 12.6%로 그 편차가 상대적으로 낮았다.

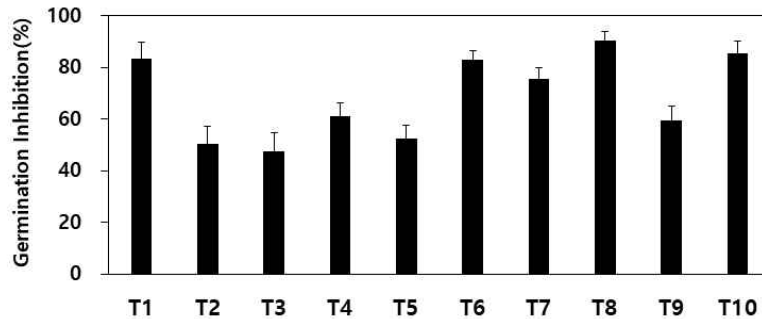


그림 23. 증진제 혼합에 따른 토마토 시들음병원균 포자발아억제 효과

그림 22에 의한 각 혼합 구성물의 증진제 첨가에 따른 토마토 시들음병에 대한 방제효과를 검정하였다(그림 24A). 그 결과 토마토 유묘검정에서는 배양 추출물과 담배잎차 혼합물(T1-T5)의 경우 yeast extract를 1% 첨가한 처리구(T1)에서 발병도 1.0(방제가 62.5%)으로 가장 효과가 높았다. 또한 배양 추출물+로테논:님오일(T6-T10)의 모든 처리구는 무처리보다 높은 방제효과를 나타냈으며, 특히 0.01% 첨가한 처리구(T10)에서 가장 높은 87.5% 방제효과를 나타냈다. 이러한 결과는 포자발아억제에 대한 평가값과 유사한 경향을 나타냈다. 점박이응애에 대한 방제효과검정은 담배잎차와 혼합한 T1-T5 제형의 경우 T5(0.01% yeast extract)와 처리구를 제외하고는 45.9~55.8%의 사충율을 나타냈다(그림 24B). 로테논:님오일과 혼합한 경우 T10(0.01% yeast extract) 처리구가 64.4%로 가장 높은 방제효과를 나타냈다. 균주 배양추출+식물추출 혼합물의 점박이응애 방제효과에서는 배양추출물의 유효성분보다는 식물추출물의 유효성분이 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

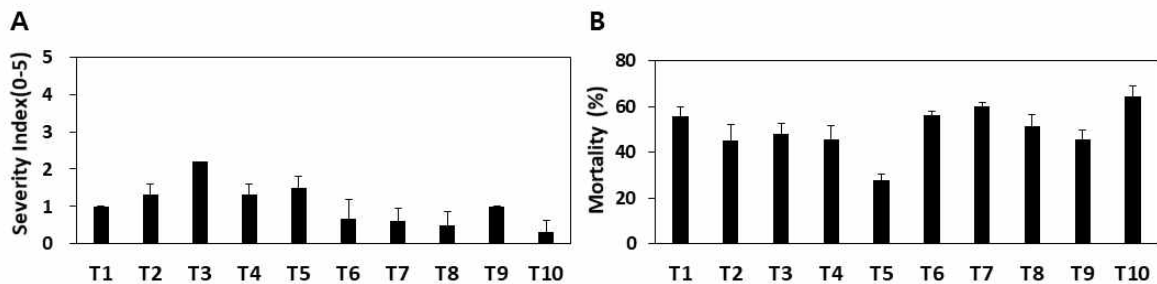


그림 24. 증진제 혼합에 따른 병해충 방제효과 검정. A, 토마토 시들음병에 대한 유묘검정. B, 점박이응애에 대한 방제효과

2-5. 시제품 제작을 위한 혼합제형물 병해충 제어조건 확립

MP 공정에 의한 생물적방제균 Ba의 CLP 유효성분과 식물추출물 혼합물을 이용한 토양병해 시들음병과 점박이응애를 복합적으로 방제하기 위해 시제품 혼합제형물 제작과 그 제어조건을 설정하였다.

(1) 시제품 혼합제형물의 균주 최소함유비율 결정

그림 19의 결과에서 병해충 방제효과가 우수한 4종을 대상으로 MP 배양영양원(녹두:펩톤:레시틴:마니톨+오일+yeast extract)에 의한 상등추출액과 식물추출물의 혼합 함량별 시들음병 방제효과를 조사하였다(그림 25). 그림 25A와 같이 모든 처리구에서 배양 상등추출액을 전체 함량 대비 30%로 식물추출물과 혼합할 경우 63.3~88.3%로 FOL 포자발아를 억제하였다. 15% 함량 처리구에서는 T10 처리구에서 69%로 가장 높은 포자발아 억제효과가 있었다. T10의 혼합제형물에 대해 토마토 유묘에서 200배 희석하여 3일 간격으로 2회 관주한 후 시들음병 방제효과를 조사하였다(그림 25BC). FOL 포자 발아억제효과의 결과와 같이 MP 배양 상등추출액의 함량이 높을수록 그 방제효과도 높은 정의 상관관계를 나타냈다. 대조구 대비 30% 함유 혼합물의 처리구에서는 정상적인 생육과 병징이 거의 나타나지 않았으며, 그 발병도도 0.8로 78.4%의 방제가를 나타냈다. 15% 처리구에서도 도관부는 약간 갈변되었지만 정상적인 생육으로 1.3의 발병도로 65%의 방제가를 나타냈다. 하지만 10%의 처리구는 FOL 포자발아억제 결과와 같이 38% 이하의 방제효과를 나타냈으며, 처리구의 토마토 유묘는 아랫잎 황화현상과 도관부 갈변현상, 그리고 지상부 생육이 억제되는 병징이 나타났고 2.3의 발병도를 나타냈다. 따라서 균주 배양추출액의 최소함유비율은 전체 함량 대비 15% 함유비율의 결과를 얻었으며, 이 MP 배양공정에 의한 균주의 배양 추출과 식물추출 혼합비율을 바탕으로 제1협동과제에서 시제품을 제작하였다.

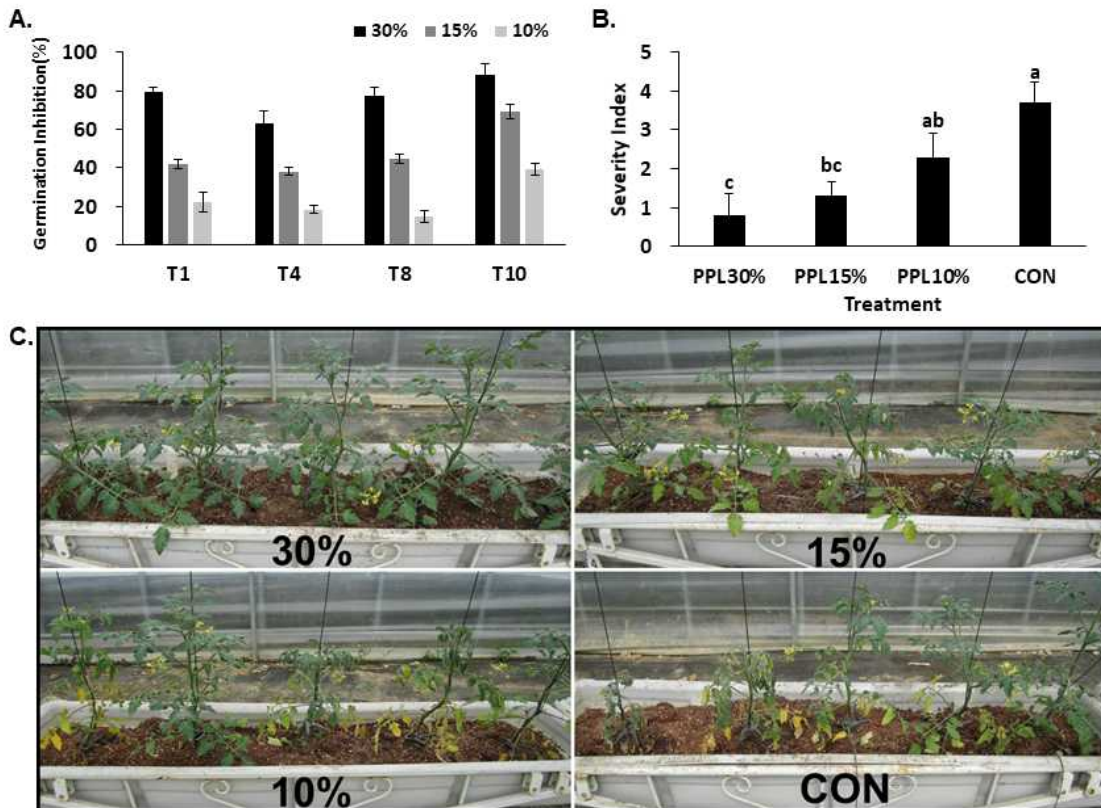


그림 25. 식물추출물(2%)와 배양상등추출액 함유량(10~30%)별 FOL 포자발아억제율(A) 및 토마토 유묘검정(B,C)

(2) 최적 혼합제형을 위한 살포농도별 살포회수 결정

시제품 제작을 위한 MP 공정과 식물추출 혼합물의 점박이응애 방제효과를 조사하였다(그림 26). 그림 26A와 같이 모든 처리구에서 배양 상등추출액을 전체 함량 대비 30%로 혼합할 경우 51.9~60.6%로 점박이응애에 대한 사충율을 나타냈다. 15% 함량 처리시 T10 처리구에서 60%로 가장 높은 사충율을 나타냈으며, 10% 함량 처리시에도 59%의 효과가 있었다. T10 혼합물을 가지고 농도별과 살포회수별로 점박이응애에 대한 방제효과를 조사하였다(그림 26B). T10 혼합물의 100~1000배 농도로 희석하여 1번 또는 3일 간격으로 총 2회 살포한 결과 100배로 희석하여 살포한 처리구에서는 85.9~98.6% 사충율로 높은 방제효과를 나타냈다. 250배 희석농도 처리시에는 2회 살포할 경우 17.1% 더 높은 85%의 사충율을 나타냈다. 또한 500배 희석하여 2회 살포할 경우에도 58.4%의 사충율을 보였다.

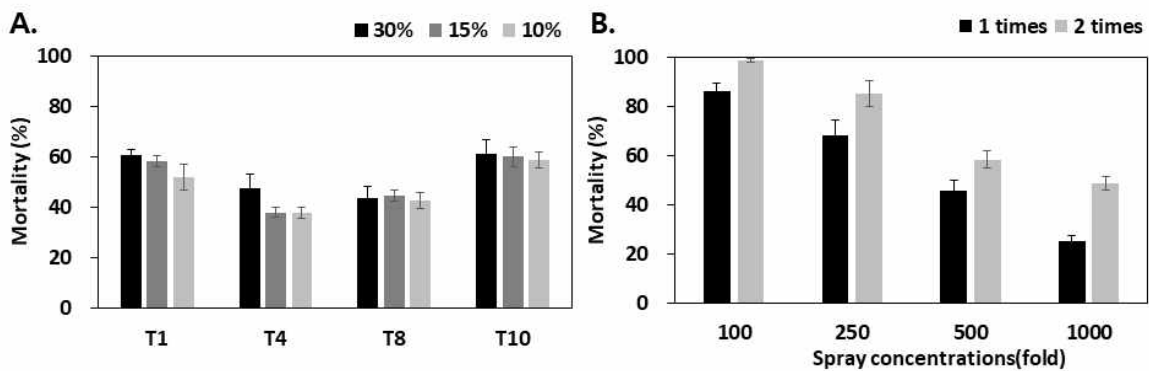


그림 26. 식물추출물(2%)와 배양상등추출액 함유량(10~30%)별 점박이응애 방제효과 검정. A, 배양상등추출액 혼합비율별 점박이응애 방제효과. B, T10 혼합물의 살포농도 및 살포회수별 방제효과

2-6. 시제품의 병해충 방제효과 검정

(1) 시제품의 토마토 시들음병 방제효과

1) 시제품 실내 항균활성 및 유묘 검정

제1협동과제에서 제작한 액상 제형물 TB(T1 혼합물 제형, 균주 배양추출+담배잎 추출 혼합물)와 NR(T10 혼합물 제형, 균주 배양추출+로테논:님오일 추출 혼합물)을 대상으로 토마토 시들음병에 대한 항균활성 검정을 실시하였다. 각 시제품에 대한 토마토 시들음병원균의 포자발아 억제 조사를 위한 시험은 병원성 곰팡이균 FOL을 PDA 배지에 접종하여 25°C에서 7일간 배양한 후 20ml 멸균수를 넣어 포자를 수집하고, 멸균된 cheese cloths를 이용하여 포자현탁액을 회수하였다. 포자는 hemacytometer (Paul Marienfield GmbH & Co., Lauda-Konigshofen, Germany)에서 포자 현탁액 농도를 조절하여 사용하였다. 포자발아억제능력 조사는 12 well plate (SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)에 각 혼합 제형물 1%와 PDB (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) 10%를 혼합하고 200 μ l의 포자현탁액(1×10^4 spores/ml)을 제조하여 25°C에서 20시간 동안 120 rpm으로 배양하면서 포자발아억제율을 조사하였다. 광학현미경하에서 발아관의 길이가 포자 장경의 1/2 이상인 것을 발아한 것으로 계산하

여 각 반복별 100개의 포자에 대한 발아 유무를 관찰하였으며 3반복으로 조사하였다. 대조구는 멸균된 10% PDB 배지를 사용하였다.

실내 유묘검정은 각 혼합제형물을 200배로 희석하여 4엽기 토마토(*Solanum lycopersicum* L. cv. TenTen) 유묘에 3일 간격으로 2회 20 mL씩 관주한 후 3일 후에 병원균을 접종한 후 생육실 및 온실(25 ± 3°C, 16L : 8D, RH 50 ~ 60%)에서 실시하였다. 병원균 접종은 토마토 유묘에 지제부에서 1 cm 떨어진 곳에서 45°로 2 cm 깊이의 뿌리에 상처를 주고 FOL 포자 현탁액 (1×10⁶ conidia/mL)을 관주한 후 4주 후에 병조사를 하였으며, 처리당 5주씩 4반복 수행하였다. 토마토 시들음병 병조사는 발병지수에 의해 도관부의 갈변 여부와 생육 상태로 발병 정도를 조사하였다. 발병 지수는 0 = 건전, 1 = 도관이 갈변되나 지상부의 생육은 정상인 것, 2 = 도관이 갈변되고 지상부의 생육이 약간 억제된 것, 3 = 도관이 갈변되고 지상부는 생육이 억제되고 약간 황화한 것, 4 = 생육이 심하게 억제 되고 황화하여 시들고 낙엽된 것, 5 = 고사 등 6단계로 하였다.

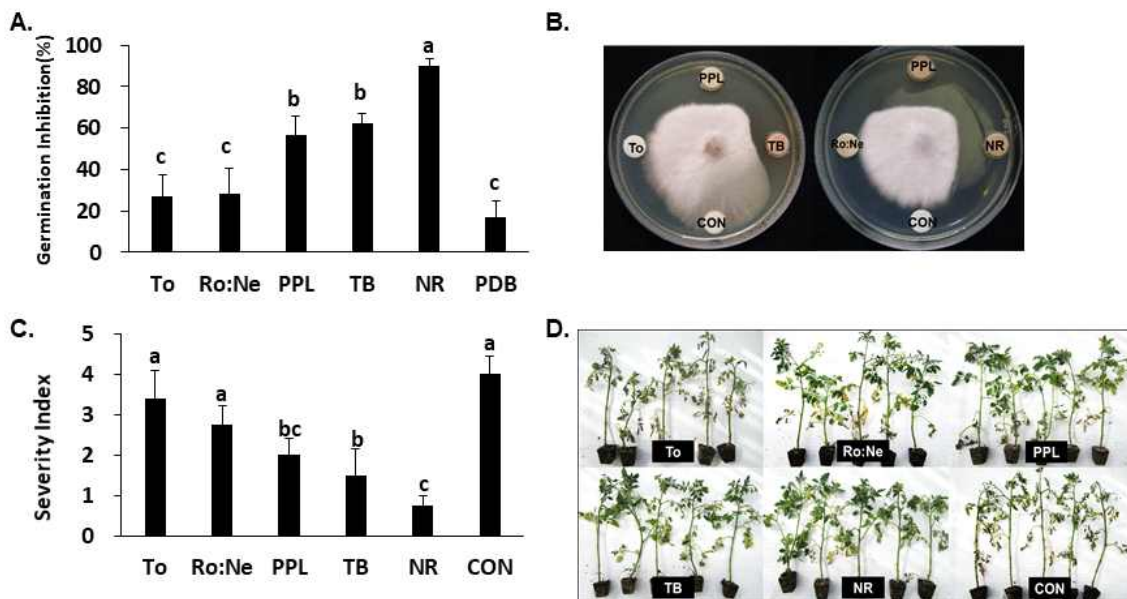


그림 27. 시제품 TB와 NR 제형물의 토마토 시들음병 실내 및 유묘 검정. A, FOL 포자발아 억제 효과. B, FOL 균사 생육 억제효과. C, 토마토 시들음병에 대한 유묘검정. D, 병원균 접종 4주 후 토마토 유묘사진. To, 담배잎 추출물; Ro:Ne, 로테논(0.05%)과 님오일(0.75%) 혼합물; PPL, 균주 상등추출액; TB, 시제품; NR, 시제품.

시제품의 토마토 시들음병원균에 대한 균사생육 및 포자발아 억제 능력을 조사한 결과, PDB 배지 대조구와 미생물 및 식물추출물 단독 처리보다 억제효과가 높았다(그림 27AB). 특히, NR 처리는 TB 처리보다 병원균의 포자발아를 27.3% 더 억제하였으며, 균주(PPL)과 식물추출물 (To, Ro:Ne) 단독 처리보다 33 ~ 77.1% 높았다. 단독 처리된 각 식물추출물들은 FOL의 포자발아억제에 영향을 미치지 못했으며, 균주 PPL은 대조구보다 유의적으로 39.6% 더 억제하였다. 시제품의 토마토 유묘에서 시들음병에 대한 방제효과를 검정한 결과, 병원균 포자억제능력과 유사한 경향의 결과를 나타냈다(그림 27CD). 두 혼합제형물 모두 PPL 균주 처리를 제외하고 유의적 차이가 있었으며, NR은 미생물 및 식물추출물 단독 처리구와도 통계적으로 유의하였다. 200 배 농도로 3일 간격, 2회 처리한 혼합제형물 중 NR 처리구의 토마토 유묘는 도관부가 일부 갈

변되는 현상이 나타났지만, 지상부의 생육은 전체적으로 정상적이었다. TB 처리구도 일부 도관부에서 갈변현상이 나타나면서 아랫잎이 황화현상이 나타났다. 그러나 식물추출물 단독처리구에서는 물 처리구(대조구)와 같이 생육이 심하게 억제되고 황화되어 시들고 낙엽지는 현상이 나타났다. 토마토 유묘검정 결과에서도 식물추출물은 병원균의 식물체 도관부 침입 저지에서 큰 역할을 하지 못하였다. 이러한 결과들은 시제품에 함유된 균주 추출의 biosurfactant들과 식물추출물간의 항균활성 작용은 상승작용을 나타내는 결과를 가져왔으며, 토마토 시들음병 방제효과면에 대해서 TB보다는 NR 혼합제형물에서 그 길항능력이 더 우수하였다. 구성성분이 유사한 혼합제형물간에서 나타난 식물병원균과 해충에 대한 상승효과의 차이는 님, 로테논과 니코틴 등 식물추출물 성분은 주로 해충에 대한 섭식 저해, 탈피 억제, 접촉 독성 및 기피제로 잘 알려진 물질들이기 때문에 방제효과면에서 식물병원균보다는 해충에서 효과가 더 높았다. 또한 식물추출물은 대부분 약제 특성상 직접 접촉에 의한 독성효과가 높지만 잔효성이 낮아 살포 후 새로운 개체수 증가 시 살충효과가 낮아지기 때문에 다른 화합물 또는 미생물과 혼용하여 사용할 경우 효과가 극대화되는 것으로 나타났다. 지금까지 식물병원균에 대한 식물추출물과 미생물과의 혼용살포 효과는 뚜렷한 보고가 없으며, 그 방제효과도 살균제 및 살충제의 효과만큼 높지 않았다. 따라서 본 연구결과 보고서에서도 식물추출물의 유사한 경향을 나타냈으며, 병원균에 대한 항균활성 효과는 식물추출물의 유효성분보다는 미생물의 대사산물에 의한 효과임을 확인하는 결과를 얻었다.

2) 시제품의 온실 토양에서의 토마토 시들음병 방제효과 검정

온신토양 유묘검정은 전남대학교 농생물관리단의 비닐하우스에서 공시된 토마토 품종(텐텐)을 파종하여 6주된 유묘를 40 × 35 cm 간격으로 두 줄로 토경재배 하였다. 혼합제형물은 각 처리구역(200 × 40 cm)에 정식 후 30일차에 농도별, 살포회수별로 처리하였고, 각 처리구는 10주씩 3반복 난괴법으로 실시하였다. 시들음 병원균접종은 혼합제형물을 처리하기 5일 전에 이병토(FOL 2.1 × 10⁵ conidia/g of soil)를 지면에서 5 cm 깊이에 100 g씩 접종하였다. 처리농도별 처리는 7일 간격으로 100, 250, 500, 750, 1000배로 희석하여 5회 처리하였고, 살포회수별 처리는 250배 희석된 각 혼합제형물을 7일 간격으로 1, 3, 5회 처리한 후 병 발생율을 조사하였다. 병 발생조사는 제형 혼합물 최종 처리 30일 후에 발병 지수를 나타냈으며, 병발생율((Σ 발병지수 × 평가된 식물수) / 총 식물수 × 5) × 100)은 발병 지수를 기준으로 조사하였다. 본 연구에서 사용한 모든 방제가(%)는 발병지수에 따른 무처리 대비 발병율로 도출하였다.

시제품 2종을 대상으로 살포농도별 및 살포회수별로 처리한 후 토마토 시들음병 발병율을 조사하였다(그림 28). 온신포장에서 토마토 생육상태는 최종 약제처리 후 10일까지는 모든 처리구에서 시들음병 증상의 발병도 편차가 크지 않았으나, 20일후부터는 건전 식물체 대비 일부 무처리구에서는 병발생이 심해지면서 시들음 증상이 높아졌다. 처리농도별로 최종약제 처리 30일 후에 병 발생율을 조사하였다(그림 28A). NR 250배 처리구의 생육은 정상으로 16 ~ 20%의 발병율로 80 ~ 75% 이상의 방제가를 나타냈고, 그 이상의 희석농도에서는 50% 이하의 방제효과가 있었다. TB 처리구에서는 100배 처리구에서만 60% 이상의 방제를 나타냈고, 그 외 희석농도에서는 도관부가 갈변되면서 지상부까지 시들음 현상이 나타났으며 50% 이하의 방제효과가 있었다. 액상 혼합제형에서 250배 희석된 처리구에서 높은 방제효과를 나타낸 것은 균주가 생산한 fengycin, iturin, surfactin 등과 같은 CLP가 식물병원성 곰팡이에 대한 강한 길항작용 물질로

서 작용하였고 제형화 후에도 유지되고 있음을 의미한다. 또한 처리회수별 방제효과를 조사하였다(그림 28B). 모든 처리구에서 무처리구 대비 7일 간격으로 5회 처리한 경우 24 ~ 32% 발생하였으며 60% 이상의 방제효율을 나타냈다. NR 제형의 3회 처리구도 36%의 병발생율로 55%의 방제효과가 있었지만, TB 처리구에서는 시들음 증상이 48% 보였으며 40%의 방제효과를 나타냈다. 종합적으로 본 연구에서 사용한 미생물과 식물추출물 혼합제형물 시제품 2종에 대한 토마토 시들음병 방제에서 NR과 TB 제형물은 토마토에 7일 간격으로 250배의 희석농도로 3회 이상 관주하는 제어조건으로 결정하였다.

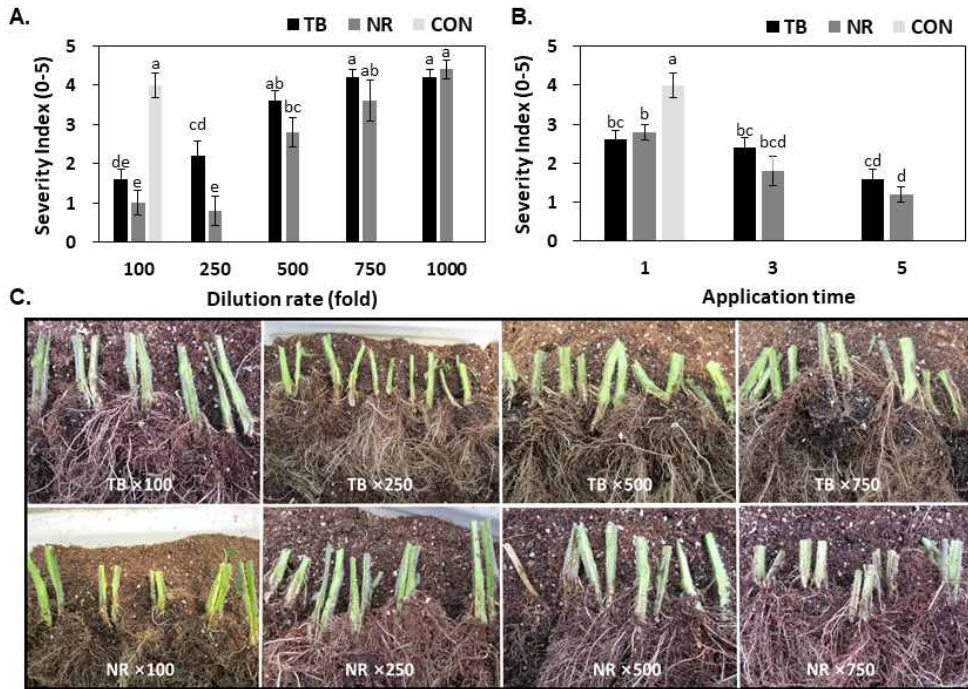


그림 28. 시제품의 토마토 시들음병 온실 토양 방제효과 검정. A. TB와 NR의 살포농도별 토마토 시들음병 방제효과 검정. B. 시제품 살포회수별 토마토 시들음병 온실검정. C. 처리구별 토마토 관부 절단면.

3) 시제품의 토마토 시들음병에 대한 시설 포장검정

시설내 포장검정은 전남 나주와 담양 농가(방울토마토)에서 실시하였다. 6주된 유묘를 160 × 30 cm 간격으로 두 줄로 토경재배 하였다. 액상 형태의 시제품은 각 처리구역(200 × 40 cm)에 정식 30일 후, 입상 시제품은 정식전 20일 전에 각 농도별로 처리하였다. FOL 병원균은 시제품을 처리하기 5일 전에 이병토(FOL 1.1 × 10⁶ conidia/g of soil)를 지면에서 5 cm 깊이에 100 g씩 접종하였다. 입상 시제품은 정식전 각각 20, 15, 10, 5g/m² 토양혼화 처리하였고, 액상 시제품은 7일 간격으로 250와 500배로 희석하여 처리하였고, 7일 간격으로 3회 처리하였다. 각 처리구는 20주씩 3반복 난괴법으로 실시하였다. 병 발생조사는 각 시제품 최종 처리 30일 후부터 7일 간격으로 조사하였으며, 병발생 조사는 발병 지수로 나타내고 발생율((\sum (발병지수 × 평가된 식물수) / 총 식물수 × 5) × 100)은 발병 지수를 기준으로 조사하였다. 본 연구에서 사용한 모든 방제가(%)는 발병지수에 따른 무처리 대비 발생율로 도출하였다.

시제품 2종을 대상으로 시설 포장내 토마토 시들음병 발병율을 조사하였다(그림 29). 액상

시제품에 대한 시설내 포장 토마토 생육상태는 건전 식물체 대비 무처리구에서는 최종 약제처리 후 20일부터 생육에서 차이가 나타나기 시작하였다(그림 29ABCG). NR 시제품은 각 농도별로 처리한 후 조사기간 동안 일부 식물체에서 도관이 갈변되는 증상이 나타났으며, TB 처리구는 일부 도관 갈변 현상과 지상부 생육이 약간 억제되는 증상을 나타냈다. 처리농도별 병발생은 NR 시제품의 경우 무처리 대비 약 30~34%, TB 시제품은 약 16~28% 감소하였으며. 모든 처리구에서 500배보다는 250배 농도에서 효과가 더 우수하였다. NR 시제품은 250배 처리농도에서 무처리 대비 54.8%의 방제가를 나타냈다. 대조구 합성농약(etridiazole(10%)+thiophanate-methy(55%))은 14% 병발생율을 나타냈고 무처리 대비 77.4% 방제가를 나타냈다. 입상 시제품의 처리 농도가 높을수록 병발생율은 낮았으며, 액상 시제품처럼 NR 시제품에서 방제효과가 높은 경향을 나타냈다(그림 29DEFG). 무처리 대비 각 시제품의 병발생율은 NR은 15~41%, TB는 29% 감소하였으며, 각각 20g/m² 처리시 69.6과 52.1%의 방제가를 나타냈다. 시제품 모두 15g/m² 이상 처리한 토마토 식물체에서 일부 갈변현상이 나타나기도 하였으나, 지상부의 생육은 시제품 처리 구 모두에서 정상을 나타냈다. 모든 결과에서 시제품에 대한 제어조건을 포장검정에 적용한 결과 시들음병에 대한 방제효과는 무처리 대비 NR 시제품이 더 우수한 결과를 나타냈다.

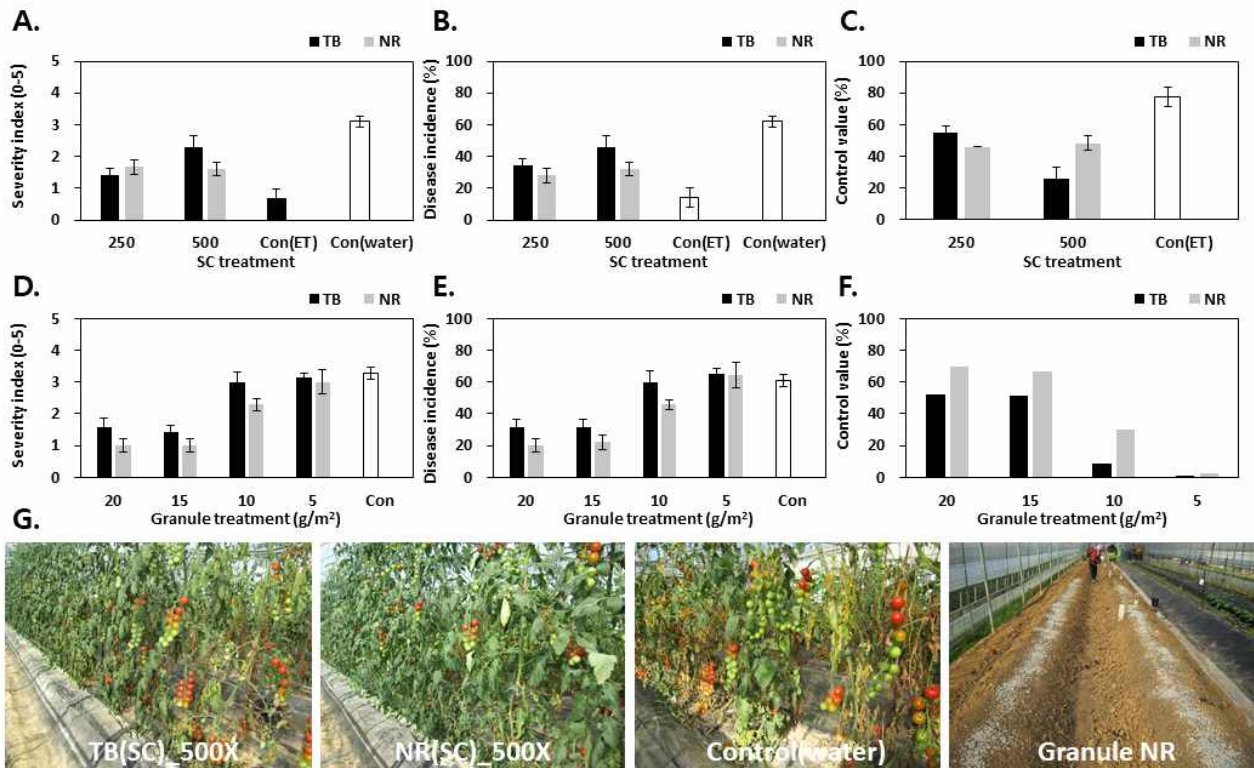


그림 29. 시제품의 토마토 시들음병 시설 포장 검정. 액상 시제품의 살포농도별 토마토 시들음병 방제효과 검정(ABC). 입상 시제품의 토마토 시들음병 방제효과 검정(DEF). G. 각 시제품 처리구별 포장 검정 사진.

4) 시설 포장내 시제품 처리에 의한 FOL 병원균 밀도 변화

시설내 액상 시제품을 예방적 및 치료적 체계처리 후 30일 동안 FOL의 밀도변화를 조사하였다(그림 30). 예방적 살포는 각 시제품 1회 또는 7일 간격으로 3회 250배 농도로 처리 후 FOL 병원균을 7일 후에 접종하였으며, 치료적 살포는 병원균 접종 7일 후 1회 또는 3회 살포

후 방제효과를 조사하였다. 병발생은 두 시제품 모두 예방적 살포시 정상적인 생육을 나타내면서 53% 이상의 방제효과를 나타냈으며, 특히 NR 시제품을 3회 예방적으로 살포시 무처리구 대비 1.3의 발병정도로 정상 생육과 함께 69.2%의 높은 방제가를 나타냈다(그림 30A). 치료적 살포 처리구는 두 시제품 모두 도관이 갈변되고 지상부 생육이 억제되어 약간의 황화현상을 나타내면서 40% 이하의 방제가를 나타냈다. 그러나, TB를 병 감염 후 3회 살포시에 지상부의 생육이 약간 억제되었을 뿐 38.4%의 방제가로 2.7의 발병정도를 나타냈다(그림 30C). 또한 소포장 하우스내 병원균의 밀도변화를 병원균 접종 후 15일 간격으로 조사하였다(그림 30BD). 포장내 무처리구의 병원균 밀도는 10^5 cfu/g soil을 유지하였다. 시제품을 예방적으로 처리시 30일 후에 밀도는 낮아지는 경향을 나타냈으며, 특히 3회 처리할 경우 시제품 처리구의 밀도는 초기 병원균 밀도보다 감소율은 더 높았다. 시제품간 처리비교에서 TB 처리구보다는 NR 처리구에서 초기 2.5×10^5 conidia/g soil에서 9.1×10^3 conidia/g of soil으로 FOL 밀도 증가를 가장 높게 억제하였다. 치료적 살포에 의한 모든 처리구의 병원균 밀도도 조사기간 동안 10^5 conidia/g soil으로 존재하였으며, 약제 살포 15일 후에는 감소하는 경향이 나타났지만, 30일 후에는 다시 증가하였다. 모든 처리구의 토마토 식물체는 도관부가 갈변되어 시드는 현상이 나타나고 약간의 생육이 억제되는 증상이 있었다. 치료적 처리구는 시제품 모두 병원균을 직접적으로 억제시키면서 밀도를 낮추는 효과가 있었으나, 이미 병원균에 의해 감염된 토마토는 시제품에 의해 FOL의 밀도를 낮추더라도 병의 진전을 감소시키는 작용에는 큰 영향을 미치지 못했다. 따라서 본 연구의 시제품은 치료적 살포에 의한 병방제효과 보다는 예방적 살포에 의한 토양내 병원균 밀도 감소효과에 의한 병방제효과를 확인할 수 있었다.

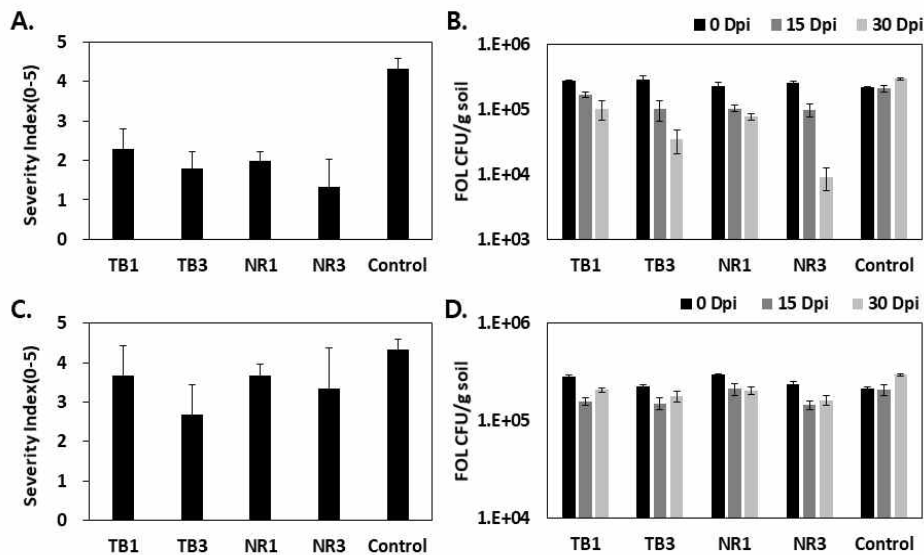


그림 30. 액상 시제품의 예방적 및 치료적 체계처리에 의한 시설 토양내 토마토 시들음병 발병 및 밀도변화. A. 예방적 처리에 의한 토마토 시들음병 발병. B. 예방적 처리에 의한 FOL 밀도변화. C. 치료적 처리에 의한 토마토 시들음병 발병. D. 치료적 처리에 의한 FOL 밀도변화

5) 시설 포장의 토양내 미생물상 및 이화학적 특성 조사

병해충 발생 및 시제품 등 처리에 의한 포장검정을 위한 시설 토양내 미생물상, 토양 특성 및 화학성 분석을 위한 토양 샘플은 처리 구역당 3반복으로 20cm 깊이의 표토를 채취하였다.

미생물상을 조사하기 위하여 200g 토양을 풍건하여 2mm 체를 통과한 후 50g의 토양샘플을 준비하여 선택배지에서 밀도를 조사하였다(그림 31). 시설내 하우스 A와 B동의 토양내 존재하는 미생물들의 분포를 조사한 결과 호기성 세균이 69.2~75.4%로 가장 많이 분포해 있었으며, 바실러스류가 22.4~26.9%를 차지하고 있었다. 그 외에 형광성 세균과 사상균 그리고 방선균 등이 일부 존재하였다.

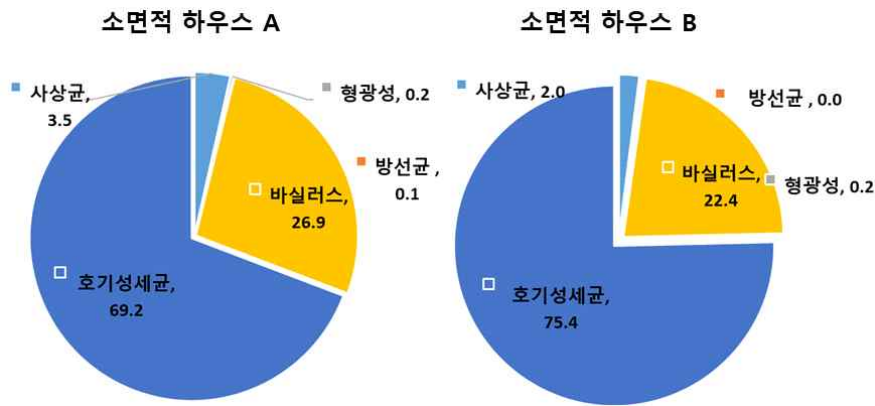


그림 31. 병해충 발생 및 시제품 약효검정을 위한 시설 포장의 토양내 미생물상 분포

농촌진흥청에서 정한 토양분석 표준분석법에 준하여 토양 이화학성을 분석하였다(그림 32). 시설내 토양 화학성 분석은 시제품 처리 후 토마토 생육기인 7월에 실시하였으며, 토양의 일반 화학성 분석항목은 EC, 유기물, 유효인산, 치환성 K, Ca, Mg, Na 등을 분석하였다. 시설 재배지 A와 B의 토양 pH는 6.7~6.9, 유효인산 381~371 mg/kg으로 농촌진흥청 시설재배의 적정범위에 분포하였다. 하지만 전기전도도 2.75 dS/m(A 하우스), 토양 유기물 20~21 g/kg, 치환성 야이온 칼리 0.3, 칼슘 13.7~14.5, 마그네슘 5.9~6.7 cmol⁺/kg로 조사되어 적정범위의 분포는 아니었다. 따라서 토마토 생육에 있어서 유기질 비료 등의 시비로 유기물 함량 증가, 유효인산 증가의 토양 환경 개선이 필요하였으며, 특히 유기질 비료 시비로 인하여 칼리 함량이 낮아지는 것을 고려하여 토마토 재배시 추가적인 칼리 시비가 필요할 것으로 판단되었다.

	pH (1:5)	EC (dS/m)	OM (g/kg)	P2O5 (mg/kg)	Ex. Cations (cmol ⁺ /kg)		
					K	Ca	Mg
소면적 하우스 A	6.71	2.75	20	381	0.33	14.48	6.69
소면적 하우스 B	6.92	1.85	21	371	0.28	13.67	5.91
적정범위(농촌진흥청)	6.0-7.0	<2	25-35	300-550	0.5-0.8	5.0-6.0	1.5-2.0

그림 32. 시설 소면적 하우스 토양 일반화학성분 특성

(2) 시제품의 점박이응애에 대한 방제효과

1) 시제품의 점박이응애 살충효과(실내검정)

본 실험에서 사용한 점박이응애는 전남생물산업진흥원의 친환경농생명연구센터에서 분양받아 25 ± 3°C의 유리온실에서 사육하였다. Petri dish (SPL, Insect breeding dish 90 × 15 mm, ventilation hole size 40 mm, Pocheon, Korea)에 일정한 크기(5 x 5 cm)의 수분이 공

급된 filter paper와 탈지면을 놓은 후 고추 잎 또는 강낭콩 잎을 놓은 다음 점박이응애를 엽절편 하나에 각각 20마리씩 접종하고 3반복 3회 검정하였다. Petri dish에 준비된 각 해충에 분무기로 1 ml씩 약제를 25cm 거리에서 잎 절편에 골고루 묻게 살포한 후, 약제 처리 후 1 시간 동안 음건하였다. 각 처리구들은 25 ± 3°C (16L : 8D, RH 50 ~ 60%) 조건에서 보관하면서 생충수와 사충수를 조사하였다. 치사여부는 가는 붓으로 충체를 접촉하여 반응이 없거나 이동하지 못하는 개체를 죽은 것으로 판단하였다.

시제품 NR과 TB의 처리농도별로 딸기의 점박이응애를 대상으로 살충효과를 조사하였다(그림 33). NR을 처리한 결과 250 ~ 500배 농도까지 70%의 높은 살충율을 나타냈으며, 반수치사 시간일은 3.60 ~ 6.74일이었다. 하지만 750 ~ 1000배 농도까지 희석한 처리구에서는 21 ~ 40% 이하의 살충효과가 있었다. TB 처리구에서는 500배까지 희석한 처리구에서 58% 이상의 살충율을 나타냈다. PPL 균주의 상등액을 50배 희석하여 처리한 경우 점박이응애에 대한 살충율은 28%로 효과가 낮았으나, 시제품 처리구에서는 53%까지 살충효과가 증대되었다. 살포 농도 500 배 이상 처리구의 경우 균주 단독 처리구보다 높은 살충율을 나타냈으며 두 처리간의 통계적으로 모두 유의한 차이를 나타냈다. 균주의 대사물질이 함유된 물질은 점박이응애에 대해서 단독 처리할 경우 살충율이 낮았으나, 식물추출물과 혼합한 제형들에서는 그 효과가 상승하였다. TB 처리의 살포농도가 높아질수록 살충율은 더 높아질 것으로 예상하였으나 250배에서 500배 희석 농도에서는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 또한 NR과 TB의 처리구 모두 각각 750배와 1000배 농도부터 살충율이 급격히 감소하였다. 따라서 두 시제품 중 방제효과가 우수한 NR은 MP 공정에 의한 균주 배양액의 대사물질과 님·데리스 추출물을 혼합 제형하여 살포한 결과 500 배 이상의 농도에서는 우수한 살비효과가 있는 것을 확인하였다.

Treatment	Dilution (fold)	Mortality (%)	LT ₅₀ (day)	Control value (%)
NR formulations	250	80.9±5.4 a ^{a)}	3.60	80.3
	500	69.6±5.6 ab	6.74	68.5
	750	39.5±5.3 c	8.44	37.4
	1000	20.7±3.6 cd	12.67	17.8
TB formulations	250	64.4±4.4 b	6.88	63.1
	500	58.1±2.2 b	7.33	56.6
	750	37.7±3.8 c	8.71	35.5
	1000	35.9±3.8 c	8.91	33.6
Cell free supernatant	50	28.3±3.3 d		

그림 33. 시제품의 살포농도별 딸기 점박이응애 방제효과 실내검정.

2) 시제품의 점박이응애 포장 방제효과

시제품 대하여 포장 내 방제효과를 조사하였다. 포장검정은 전남 나주와 담양의 딸기(품종: 설향) 시설 재배포장에서 수행하였다. 처리약제는 점박이응애 밀도가 반복당 50마리를 초과하였을 때 처리하였으며, 500배 농도로 7일 간격 2회 잎 뒷면까지 문도록 엽면살포 처리하였다. 대조구 약제로는 합성농약 피플루부마이드 액상수화제(10%)를 2000배 농도로 2회 살포하였다. 무

처리구는 동일한 방법으로 물만 처리하였다. 시험구는 처리구당 10 m² 씩 난괴법 3반복으로 수행하였다. 점박이응애 밀도는 구당 30엽을 반복별로 채취하여 아이스박스에 보관하여 실험실에서 해부현미경을 통해 성충 및 약충 수를 조사하였다. 방제효과 조사는 약제 처리전과 처리 7일 간격으로 구당 30엽에 대한 생충수를 조사하였고, 실내검정과 동일한 방법으로 사망 유무를 판단하였다. 방제가(%)는 무처리 대비 [(무처리구 마리수-처리구 마리수)/무처리구 마리수] × 100으로 산출하였다. 모든 처리의 반복 당 조사 주수는 10주로 하였다.

시제품 NR과 TB의 처리농도별로 딸기의 점박이응애를 대상으로 시설포장에서 살충효과를 조사하였다(그림 34). 시제품을 처리하기 전 시설내 처리구의 점박이응애 밀도는 엽당 평균 51.7~59.7마리로 약효를 검토하기에 충분한 발생을 보였다. 시제품을 처리한 딸기엽에서 7일 동안 관찰한 결과 약해 증상은 나타나지 않았다. 처리 3일 후 무처리 대비 생충율은 NR 보다는 TB 처리구가 25.8% 더 높았으며, 방제가는 TB와 NR에서 각각 70.8과 83.9%였다. 또한 TB는 처리 3일후부터 생충율이 21.6%로 급속히 증가한 후 14일후부터 자연 감소한 반면, NR 처리구는 처리 7일후부터 18.7% 증가한 후 10일후부터 자연 감소하였다. 따라서 시제품의 포장 방제 효과에서는 NR 시제품이 약효 및 지속성 효과면에서 TB 시제품보다 더 우수한 경향을 나타냈다. 이에 반해 대조구로 사용된 Pyflubumide는 약효 및 잔류효과에 의한 지속성이 처리 10일후까지 나타났다.

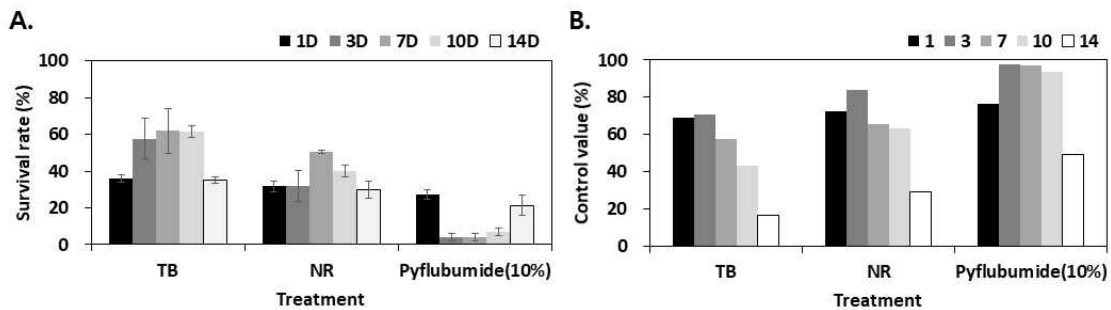


그림 34. 시제품 점박이응애 포장 방제효과 검정. A. TB와 NR의 점박이응애 생충율 검정. B. 시제품 점박이응애 방제가. Pyflubumide(10%), 대조구(점박이응애 방제용 합성농약, 2000배)

2-7. 시제품 병해충 방제 스펙트럼 검정

(1) 시제품과 병해충 방제용 제품과의 혼용 가능성 검토

시험에 사용한 약제는 총 16종으로 합성농약 8종과 유기농자재 8종을 대상으로 시제품 NR과 혼용하여 살포한 후 토마토 시들음병에 대한 방제효과를 조사하였다. 시험약제들의 제형은 수화제를 대상으로 하였고, 살포 희석농도는 추천농도로 혼용하였으며, 유효성분과 목록은 그림 27과 같다. 시제품과 혼용한 각 처리구들은 본 연구에서 사용한 토마토 유묘검정법으로 처리한 후 발병지수에 의한 발병율로 방제효과를 조사하였다(그림 35).

시제품 NR과 각 합성농약과 유기농자재들과 혼용한 후 토마토에 처리한 결과 14일째까지 16종 모두에 대해 토마토에 대한 약해 현상은 나타나지 않았다(그림 36). 합성농약과 혼용한 처리구에서의 토마토 시들음병에 대한 유묘검정 결과, 합성농약 4종은 무처리 대비 50% 이상의

방제가를 나타냈으며, NR 시제품 단독 처리보다 더 방제가가 높은 제품은 농3번 약제였으며, 농1번과 농6번 약제는 시제품의 약효에 영향을 미치지 않았다(그림 36AB). 하지만 나머지 5종 약제는 시제품의 약효를 감소시키는 결과를 나타냈다. 유기농자재들과의 시제품 혼용 효과는 5종은 무처리 대비 50% 이상의 방제가를 나타냈다(그림 36CD). 또한 유3번 자재는 방제효과가 NR 단독처리보다 더 우수하였으며, 유4번, 유5번, 유6번, 유8번은 방제효과가 비슷하여 시제품 약효에 큰 영향을 미치지 않았다. 하지만 나머지 3종은 시제품 약효를 약 10.9% 감소시키는 결과를 나타냈다. 따라서 각 합성농약과 유기농자재들과 혼용 사용 측면에서는 시제품의 단독 처리를 추천하며, 시험약제들에 대해서는 약해 발생은 없었다.

A.

구분	유효성분(함량)	대상병해충
농1	fluazinam(50%)	갈색점무늬병, 잿빛곰팡이병, 탄저병
농2	dimethomorph(16%)+pyraclostrobin(9.5%)	역병, 탄저병, 흰가루병
농3	polyoxin D zinc salt(2.25%)	덩굴마름병, 잿빛곰팡이병, 잘록병,
농4	pyribencarb(20%)	흰비단병, 균핵병, 탄저병, 검은무늬병, 시들음병, 잎곰팡이병
농5	picoxystrobin(25%)	역병, 탄저병, 점무늬병
농6	pyraclostrobin(20%)	갈색점무늬병, 역병, 탄저병, 흰비단병, 모잘록병
농7	Azoxystrobin(8)+Dimethomorph(15)	역병, 탄저병, 노균병, 흰가루병
농8	ametoctradin(27)+dimethomorph(20)	역병, 노균병, 뿌리혹병,

B.

구분	유효성분(함량)
유1	Copper hydroxide(77%)
유2	<i>Ampelomyces quisqualis</i> AQ94013
유3	<i>Bacillus subtilis</i> QST-713
유4	<i>B. pumilus</i> QST2802
유5	<i>Paenibacillus polymyxa</i> AC-1
유6	<i>Bacillus subtilis</i> GB-0365
유7	식물추출물 유기농자재
유8	<i>Streptomyces rimosus</i>

그림 35. 혼용 사용한 시판 제품. A. 합성농약. B. 유기농자재

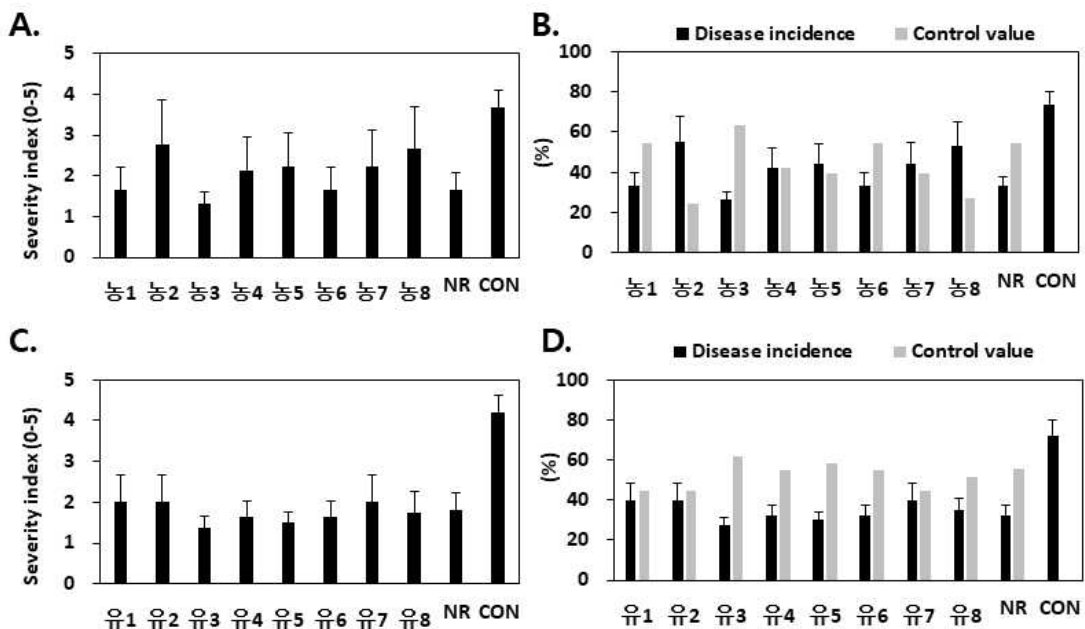


그림 36. 혼용 시판 제품들의 토마토 시들음병 방제효과(유묘검정). 합성농약 혼용 후 방제효과 (A, B). 유기농자재 혼용 효과(C, D)

(2) 시제품의 병해충 방제 적용확대

1) 시제품의 고추 모잘록병과 역병 방제효과검정

Rhizoctonia와 Pythium 모잘록병과 Phytophthora 역병균은 PDA에 접종하고 25°C에서 5일간 배양한 후 균총으로부터 균사조각을 잘라내어 각각의 접종배지(*R. solani* 왕겨배지, *P. ultimum* 감자배지, *P. capsici* V8배지)에 10개씩 접종하고 14일간 배양하였다. *R. solani*와 *P. ultimum* 접종 토양을 준비하기 위하여, 1시간 동안 멸균한 원예용상토에 준비한 병원균 배양체를 혼합하여 병원균 접종 토양을 만들었다. 60구 연결포트에 준비한 병원균 접종 토양을 넣고 고추 종자를 각각 구당 2립씩 파종하였다. 병원균 접종 토양에 파종하고 시제품 처리 14일 후에 무처리구에서 모잘록병이 충분히 발생하였을 때 병조사 하였다. 발병율(%)은 병조사 시기별로 (병발생 유묘 개수/각 처리에 사용한 유묘 개수)×100으로 나타냈다.

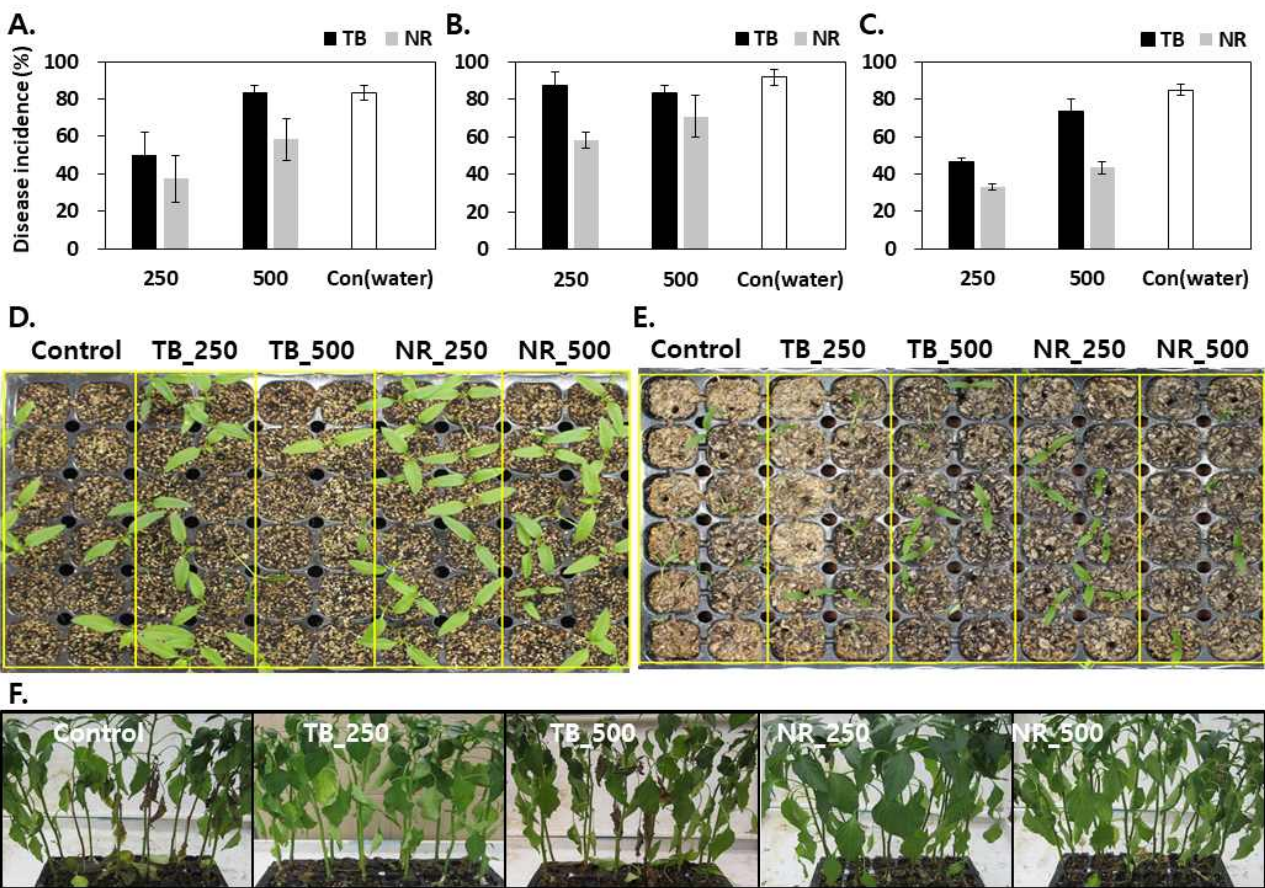


그림 37. 시제품의 모잘록병(*Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*)과 역병(*Phytophthora capsici*) 방제에 대한 적용확대 검정. A. *Pythium* 모잘록병 발생율, B. *Rhizoctonia* 모잘록병 발생율, C. *P. capsici* 병발생율, D. *P. ultimum* 병발생 사진, E. *R. solani* 병발생 사진, F. *P. capsici* 병발생(유묘검정)

*P. capsici*의 유주자낭을 형성시키기 위해 잘게 조각낸 균사 부분을 멸균수 20ml에 넣고 온도변화를 주면서 5일 동안 액상배양하면서 유주자를 유출시켰다. 접종농도는 10^4 zoospores/ml으로 맞춘 후 고추묘에 접종하였다. 병발생 조사는 발병지수에 따른 무처리 대비

발병율로 도출하였다. 발병 지수는 0 = 건전, 1 = 줄기 갈변하면서 약간 시들음 현상, 2=1~2엽 탈락과 잘록현상 보이거나 30~50% 고사, 3 = 상위엽 황화 또는 탈락되고 엽병까지 갈변하고 50~70% 고사, 4 = 갈변현상이 지제부에서 10cm 이상 진전되고 최상위 잎만 남고 모두 탈락되고 줄기 시들고 70~90% 고사, 5 = 고사 등 6단계로 하였다. 병 발생조사는 제형 혼합물 최종 처리 30일 후에 발병 지수를 나타냈으며, 병발생율($(\sum(\text{발병지수} \times \text{평가된 식물수}) / \text{총 식물수} \times 5) \times 100$)은 발병 지수를 기준으로 조사하였다. 본 연구에서 사용한 모든 방제가(%)는 발병지수에 따른 무처리 대비 발병율로 도출하였다. 시제품은 250배와 500배로 희석한 후 3일 간격으로 2회 관주 처리하였고, 병원균 접종 토양에 종자 파종과 유묘 이식한 직후에 처리하였다. 무처리구는 증류수를 시제품 처리와 같은 방법으로 처리하였다.

고추의 모잘록병에서 무처리구는 83.3%와 91.7%의 병발생율을 나타냈다(그림 37AB와 37DE). 모든 처리구에서 NR 시제품이 TB시제품보다 병발생율이 낮았으며, NR 250배 처리구에서는 55%의 방제가를 나타냈다. *in vitro* 결과와 달리 병원균의 직접적인 접촉에 의한 균사생육 억제효과는 높았지만, 토양내 존재하는 모잘록병원균에 대한 효과는 기대만큼 높지 않았다. 또한 모잘록병원균은 포자를 형성하여 식물체에 침입하는 것이 아니라 균사체 형태로 감염시키기 때문에, 시제품 유효성분의 포자발아 억제효과를 기대할 수 없었기 때문에 모잘록병에 대한 방제 효과가 다소 낮은 것으로 사료된다. 또한 역병에 대한 무처리구는 85%의 병발생율을 나타냈으며(그림 37C와 37F), 다른 처리와 유사하게 NR 처리구가 TB 처리구보다 방제효과가 더 우수하였고, 250배 처리구의 방제가는 61%를 나타냈다. 따라서 시제품의 토양병해 방제를 위한 적용확대 시험에서 TB 시제품은 모든 처리구에서 방제가 50%를 나타내지 못했으나, NR 시제품은 250배 농도처리에서 *Rhizoctonia* 모잘록병을 제외한 *Pythium* 모잘록병과 역병의 토양병해에 대해 각각 55%와 61% 이상의 우수한 방제효과를 나타냈다.

2) 시제품의 복숭아혹진딧물 살충효과

복숭아혹진딧물에 대한 실내검정은 25±3°C 생육실에서 사육하면서 조사하였으며, Petri dish(90 × 15 mm, ventilation hole size 40 mm)에 일정한 크기(5 × 5 cm)의 수분이 공급된 filter paper와 탈지면을 놓은 후 담배 잎을 놓은 다음 복숭아혹진딧물을 접종하였다. 복숭아혹진딧물은 무시충을 사용하였으며, 각 해충들을 엽절편 하나에 각각 20마리씩 접종하고 3반복 3회 검정하였다. Petri dish에 준비된 해충에 분무기로 1ml씩 약제를 25 cm 거리에서 잎 절편에 골고루 묻게 살포한 후 약제 처리 후 1시간 동안 음건하였다. 각 처리구들은 25±3°C(16L:8D, RH 50~60%) 조건에서 보관하면서 생충수와 사충수를 조사하였다. 치사여부는 가는 붓으로 충체를 접촉하여 반응이 없거나 이동하지 못하는 개체를 죽은 것으로 판단하였다.

복숭아혹진딧물의 처리 결과에서 NR을 1000배까지 희석한 처리구는 91~100%의 우수한 살충율을 나타냈으며, 반수치사시간은 1.18~4.74일이었다(그림 38). TB에서는 500배까지 희석한 처리구에서 97%의 높은 살충율을 나타냈으며, 반수치사시간은 1.12~2.57일이었다 1000배 처리구에서도 87%의 높은 살충율을 나타냈다. 대조구로 사용한 균주 상등액을 50배 희석하여 처리한 경우 살충율은 79%였으나, 식물추출물과 혼합한 제형물의 처리구는 8~21%의 살충효과가 증대되었다. 살포농도 1000배 이상 처리구의 경우 균주 처리구보다 높은 살충율을 나타냈으며 두 처리간의 통계적으로 모두 유의한 차이를 나타냈다. NR 시제품의 살포농도가 높아질수록 살충율

이 더 높아질 것으로 예상하였으나 250배에서 1000배 희석농도에서는 통계적으로 유의한 살충율의 변화가 없었다.

Treatment	Dilution (fold)	Mortality (%)	LT ₅₀ (day)	Control value (%)
NR formulations	100	100±0 a ^{a)}	2.18	100
	250	97.0±3 ab	4.14	96.9
	500	90.2±5.3 b	4.54	89.8
	1000	90.9±1.1 b	6.74	90.6
TB formulations	100	100±0 a	2.12	100
	250	97.0±3 ab	4.87	96.9
	500	97.0±3 ab	4.57	96.9
	1000	86.8±8.3 bc	6.91	86.3
Cell free supernatant	50	78.5±17.2 c	-	

그림 38. 시제품의 살포농도별 복숭아혹진딧물 방제효과 검정(실내)

시제품에 대한 포장검정은 전남대학교 농생물관리단의 비닐하우스에서 공시된 고추(품종:청양) 재배포장에서 수행하였다. 처리약제는 복숭아혹진딧물 밀도가 반복당 50마리를 초과하였을 때 처리하였으며, 500배 농도로 1회 잎 뒷면까지 문도록 엽면살포 처리하였다. 무처리구는 동일한 방법으로 물만 처리하였다. 시험구는 처리구당 5 m² 씩 난괴법 3반복으로 수행하였다. 방제효과 조사는 점박이응애 조사방법과 같으며, 약제 처리전과 처리 후 구당 30엽에 대한 생충수를 조사하였고, 실내검정과 동일한 방법으로 사망 유무를 판단하였다. 방제가(%)는 무처리 대비 [(무처리구 마리수-처리구 마리수)/무처리구 마리수] × 100으로 산출하였다. 모든 처리의 반복당 조사 주수는 5주로 하였다.

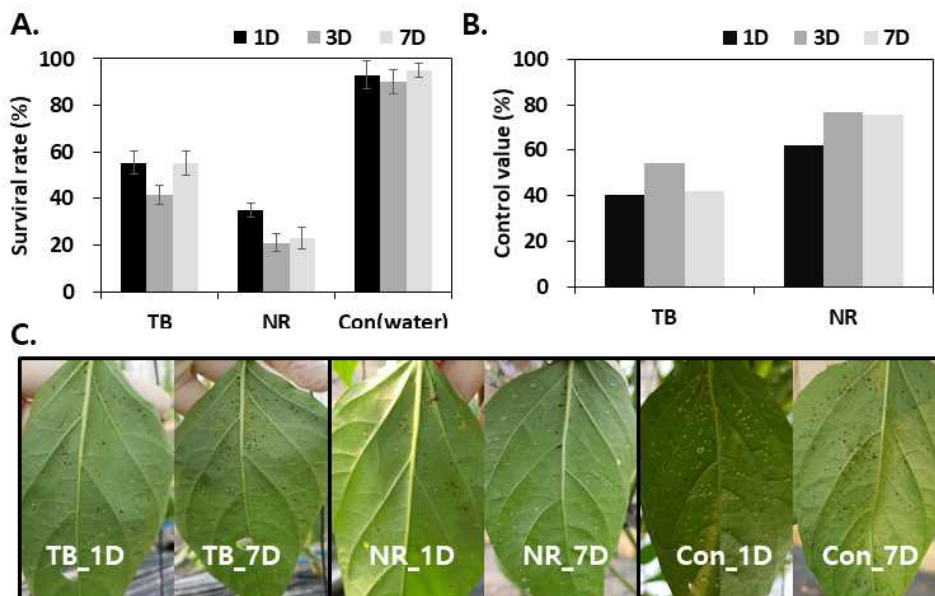


그림 39. 시제품의 복숭아혹진딧물 포장방제효과 검정. A. 복숭아혹진딧물의 생충율(500배 희석농도). B. 복숭아혹진딧물에 대한 방제가. C. 포장 검정 사진

또한 시제품의 포장검정은 처리하기 전 엽당 복숭아혹진딧물의 밀도는 평균 98~105마리로 약효를 검토하기에 충분한 발생을 보였으며, 개체는 시설내 자연발생 조건에서 시험하였다. 고추 잎에 처리한 7일 동안 뚜렷한 약해 증상은 나타나지 않았다. 조사기간 동안 무처리구의 생충율은 90~95%를 유지하였다(그림 39). TB 시제품은 처리 후 7일 동안 무처리 대비 방제효과가 40~55%였으며, NR은 62~77% 나타냈다. 지금까지의 결과처럼 TB의 약효보다는 NR 시제품이 20~32% 더 우수한 방제효과를 나타냈다.

2-8. 토마토 시들음병 검출을 위한 특이마커 개발

토마토 시들음병원균(*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, FOL)을 검출 및 판별할 수 있는 특이마커를 개발하기 위해 total genomic DNA(gDNA)는 DNeasy Powder soil Pro Kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 추출하였다. FOL에 대한 동정, 판별마커 검정, 농도별 상관관계(in vitro) 조사를 위한 FOL의 gDNA는 PDB에서 균사체를 회수하였고, 접종원으로 사용된 이병토에서는 0.5g을 취한 후 추출하였다. 토마토 시들음병에 감염된 식물체에서는 뿌리를 포트 및 토마토 근권 토양에서 제거한 후 멸균된 브러쉬로 뿌리에 있는 토양을 조심스럽게 털어서 수집하였다. 수집된 토양들은 건조시킨 후 샘플 1g당 2ml 튜브에 0.5g씩 취한 후 total gDNA를 추출하였고, 토양 및 식물체에서 FOL 분리 및 밀도조사는 komada agar 배지를 사용하였다. 처리당 5주씩 3반복 실시하였다. 모든 샘플들은 bead homogenizer에 의해 분리한 후 gDNA를 추출하였고, Nanodrop 2000c(Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)을 사용하여 DNA를 정량하였다. qPCR은 Brilliant SYBR® Green QPCR Master (Agilent)와 qPCR Mix for TaqMan(mgmed) 이용하였다. 각 10 pmole primer와 5 pmole probe 농도로 혼합한 후 Stratagene MX3005P system (Stratagene, CA,USA)에서 수행하였다. 각 유전자의 상대적인 발현량 분석을 위하여 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 사용하였다.

가. 토마토 시들음병원균 및 이병 식물체 판별 마커 제작

(1) 토마토 시들음병원균 분리·동정 및 판별마커

토양내 존재하는 토마토 시들음병원균 (FOL)은 race1, race2, race3 생리형으로 분화되어 있다. 각 생리형과 토마토 품종 특이성에 따라 병발생율이 다소 차이는 있지만 토마토 정식 후 뿌리 활착이 되는 시기부터 감염되어 도관부에 피해를 주면서 병원균의 진전이 활발한 온도와 습도가 되면 병발생이 심해져서 전체적으로 시들음이 발생하게 된다. 최근 전국 토마토 재배지에서 시들음병 발생이 전체 토마토 재배면적의 11% 면적에서 발생한다(발생면적 2~20%, 최대발병율 40%, 농촌진흥청). 국내에서 재배되는 토마토 품종은 대부분 race1과 race2에 저항성을 나타내고 있다. 따라서 본 연구에서 보유하거나 수집·분리한 토마토 시들음병을 일으키는 *F. oxysporum* 생리형을 간이적으로 구별할 수 있는 PCR 기반의 프라이머를 제작하였다. 특이마커 프라이머는 토마토 시들음병원균 FOL의 polygalacturonase 유전자 *pgI*과 *pgx4*의 특이적인 염기서열을 이용하여 총 3종을 제작하였다. uni primer(670bp)는 FOL 병원균을 검출할 수 있는 universal primer이며, 각 생리형 race1과 race3을 검출할 수 있는 f13(450bp), race2와 3의 f23(520bp)을 제작하여 수집분리 균주들을 검정하였다(그림 40와 41). 10개 분리한 병원균을

각각 제작한 primer를 이용하여 증폭시킨 결과 race1은 5종, race2는 4종, race3은 6종, 그리고 1종은 검출되지 않았다.

균주번호	작물	PCR product 검정			
		uni	f13	f23	race 판별
47	토마토	+	+	-	race1
46	토마토	+	+	-	race1
43	토마토	+	+	-	race1
15010	토마토	+	+	-	race1
15011	토마토	+	+	-	race1
37	토마토	+	-	+	race2
15007	토마토	+	-	+	race2
15008	토마토	+	-	+	race2
15009	토마토	+	-	+	race2
32	토마토	+	+	+	race3
13001	토마토	+	+	+	race3
15003	토마토	+	+	+	race3
15004	토마토	+	+	+	race3
15002	토마토	+	+	+	race3
15005	토마토	+	+	+	race3

그림 40. 수집 · 분리한 토마토 시들음병원균 및 특이마커 이용 race 판별

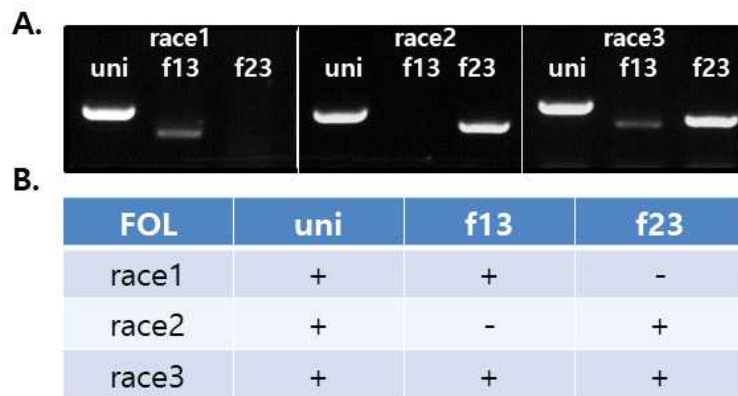


그림 41. PCR 이용 특이마커에 의한 FOL race 판별. A. 특이 마커 primer에 의해 생산된 PCR product. B. 특이 primer의 FOL race 판별표.

(2) 토마토 식물체 및 토양에서 병원균 판별 마커

그림 41의 특이마커 프라이머는 FOL 병원균의 race 판별 primer이지만, 토마토 식물체 또는 토양내에서 FOL의 감염여부 및 밀도 확인을 위해 qRT-PCR을 위한 특이마커 primer를 개발하였다(그림 42AB). 토마토 시들음병원균에 의한 감염여부 판독은 토마토 식물체의 gDNA에서 토마토에 침입한 FOL의 race를 정확하고 신속하게 판별하기 위하여 사용되었다. FOL 병원균은 토마토에 감염되는 동안 토마토의 도관부에서 SIX(secreted in xylem)라는 독특한 단백질을 분비하는데, 이들 중 일부는 병원성을 가지고 있어 병원균의 독성을 촉진시키거나 반대로 시

들음병에 대한 저항성을 유도하는 단백질로 알려져 있다. 토마토 식물체 면역반응은 병원성 유전자에 대응하기 위한 내성 유전자를 발현시켜서 병원균에 대한 저항성을 일으킨다. 이러한 병원성 유전자에 대응하는 비병원성 유전자(Avr) 단백질 Six1-Avr3, Six3-Avr2 및 Six4-Avr1은 저항성 반응에 관련된 유전자들을 활성화시켜 병원균에 대한 저항성을 일으킨다. SIX 중에서 FOL 병원성을 인지하기 위해서 토마토에서 분비하는 필수적인 유전자로 Six1, Six3, Six5 등이 보고가 되어있고, FOL 병원성 인자 중 Six3(Avr2)와 Six5는 그들의 발현을 조절하는 1609-bp upstream region을 공유하기 때문에 이런 특징들을 이용하여 primer를 제작하였다. 신속하고 정확한 race 판별을 위해서 각 마커의 최종합성물 크기는 약 150~200bp로 제작하였다. 각 레이스 별로 토마토 시들음병을 접종시킨 후 7일 후에 FOL 15011(race 1)에 의해 감염된 토마토 뿌리, FOL 15008(race 2)과 FOL 15003, 15005(race 3)에 의한 토마토 줄기에서 gDNA를 추출하여 각 프라이머를 PCR 조건에 의해 생산물을 획득하였다(그림 42C). 그 결과 각 race별로 접종한 토마토에서 정확하게 검출되었고 판독표에 의해 분류하였다. R1에 증폭된 산물은 FOL 15001(race 1)만 검출되었지만, race3(13001, 15003, 15005)은 R1은 증폭되지 않았다. 또한 race 2(FOL 15007)에 의해 감염된 토마토는 R1, R2 R3 모두에서 증폭되었다.

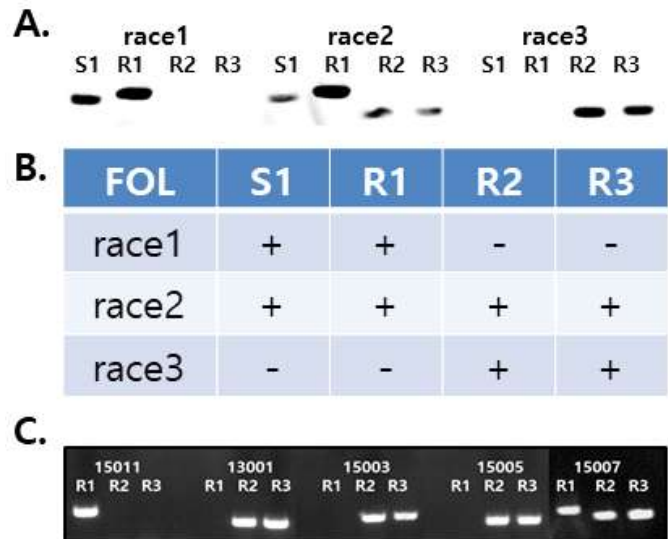


그림 42. qRT-PCR 이용 토마토 및 토양근권에서 시들음병원균 race별 검출용 특이마커. PCR 조건 94°C, 2분, 35 cycle: 94°C, 45초-60°C, 45초-72°C, 45초, 72°C, 6분.

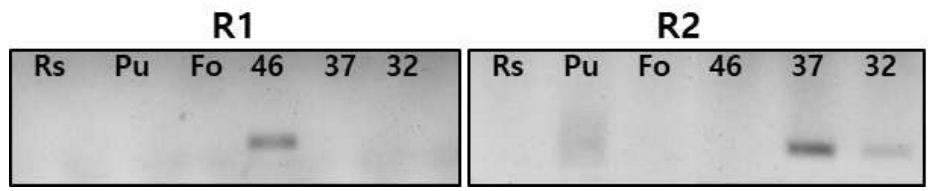


그림 43. SIX 단백질의 유전자의 토마토 시들음병원균 및 토양 병원균들에 대한 검출 검정. Rs, *Rhizoctonia solani*; Pu, *Pythium ultimum*; Fo, *Fusarium* spp.(비병원성); 46, FOL 46(race1); 37, FOL 37(race2); 32, FOL 32(race3).

토마토 시들음병 검출을 위한 특이 primer를 이용하여 이병된 식물체와 다른 토양병원균에 대해 검출여부를 조사하였다(그림 43). 각 레이스별 토마토 시들음병원균 FOL, 대조구 토양병원균인 *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, 비병원성 *Fusarium* spp.의 gDNA를 추출하여

특이 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 R1과 R2의 토마토 시들음병에 대한 특이 유전자의 증폭은 FOL의 각 race에 감염된 토마토에서는 증폭된 산물이 검출되었다. 하지만 비병원 *Fusarium* spp., *R. solani*, *P. ultimum* 처리구는 특이 프라이머에 의해 증폭된 산물이 없었다. FOL에 접종된 토마토에서의 각 특이 프라이머 특성에 의한 race별로 판별이 가능할 정도로 PCR 산물이 증폭되었다. 이러한 결과는 토마토 정식 전 또는 정식초기에 토마토 유묘들을 샘플링하여 토마토 시들음병에 대한 감염여부를 미리 판단하여 수확기에 극심하게 나타나는 시들음병에 의해 생산량 감소에 의한 경제적 피해를 막는 해결책으로 제시할 수 있는 기술로 사료된다.

나. 토마토 시들음병원균 밀도별 검출 발병 예측 및 상관관계

(1) qRT-PCR을 이용한 FOL DNA 농도와별 병발생 예측 모델(온실 포트검정)

FOL 밀도별 시들음병 발병 예측 모델 제작을 위해 SIX5 단백질 유전자를 이용한 특이 마커와 probe를 제작하여 real-time PCR에 의한 유전자의 발현량을 응용하여 발병 예측을 조사하였다(그림 36). qPCR을 위해 제작한 SIX5p primer에 의한 합성물은 109bp이며 probe를 포함하여 제작하였다. 모든 회귀분석은 IBM SPSS Statistics 23.0 software (IBM Co., USA)를 사용하였고, 회귀분석에 대한 상관관계의 통계적 분석은 R 통계(ver. 3.2.3) 프로그램을 사용하였다.

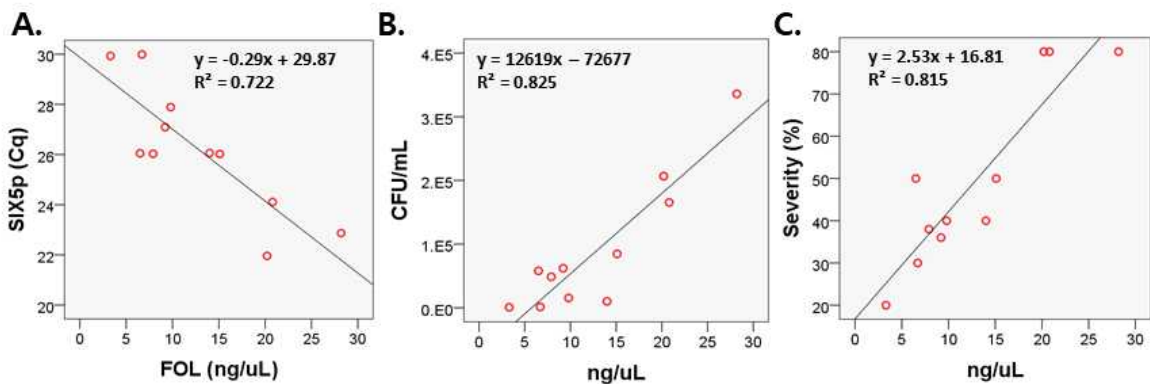


그림 44. FOL DNA 농도별 토마토 시들음병 발생 예측모델 분석(*in vitro*). FOL에서 추출한 DNA 농도별 특이마커(SIX5p)(A), FOL 병원균 밀도(C) 및 토마토 시들음병 발병(C) 간의 회귀분석

우선 FOL DNA 농도별 병원균 밀도 및 토마토 시들음병 발병관계 분석을 위해 접종원으로 사용된 이병토에서 밀도별 DNA를 추출한 후 각 농도별 병발생과 특이마커에 의한 qPCR 검출 능력을 조사하였다. 또한 이병토를 희석된 농도별로 토마토(품종:텐텐)에 접종하고 14일 후에 뿌리 주변의 근권을 회수하여 FOL의 DNA를 추출하여 분석하였다. 각 이병토의 FOL 밀도는 $6.7 \times 10^2 \sim 3.4 \times 10^5$ CFU/mL로 조사되었으며, FOL 밀도별 DNA 농도는 3.3~28.2 ng/uL로 추출되었다. 각 농도별 gDNA에서 판별마커에 의한 qPCR에 의한 특이마커의 발현량 표준 증폭곡선을 설정하였다. 표준 곡선은 역치주기(threshold cycle, Cq) 값에 대한 FOL(race 2) DNA 농도의 로그를 플로팅하여 설정하였다. Cq 값은 샘플이 SIX5p과 probe에 의해 검출된 형광과 관련된 배경 형광보다 높게 증가하는 상대적 측정값의 주기 수로 정의되었다. Cq 값은 SIX5p에 의

해 측정된 FOL DNA 농도의 로그와 반비례하였고, Cq 값이 낮을수록 FOL DNA 양이 높았다(그림 44A). SIX5p primer와 probe에 의해 증폭된 FOL DNA 샘플들은 Cq 값과 DNA 농도간의 선형 상관 관계를 보였으며, $P < 0.001$ 에서 결정계수(R^2)는 0.722이고 예측모델식은 $y = -0.29x + 29.87$ 로 설정되었다. FOL DNA 농도와 FOL 밀도간에 선형 관계가 나타났고, R^2 은 0.825로 $y = 1.26x - 7.27$ 의 모델식이 완성되었다(그림 44B). 각 농도별 토마토 유묘에서의 발병율간의 관계에서 R^2 은 0.815였으며, 회귀식은 $y = 2.53x + 16.81$ 이었다(그림 44C). 이러한 결과들은 각각의 FOL 농도별 토마토 시들음병원균 농도 및 밀도 검출에 의한 회귀식으로 병발생을 예측할 수 있는 기초자료를 제공할 수 있게 되었다.

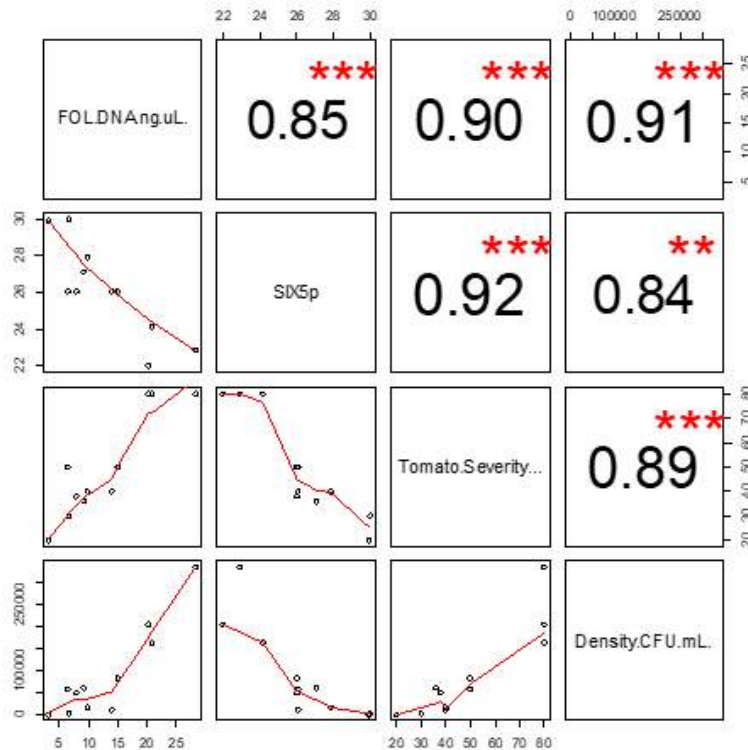


그림 45. 회귀분석에 의한 토마토 시들음병 발생 예측모델(*in vitro*)의 통계적 상관관계 분석. FOL DNA 농도별 특이마커(SIX5p), 토마토 시들음병 발병 및 FOL 밀도 변화 간의 R 통계 프로그램에 의한 상관관계 분석

FOL의 병발생 예측모델간의 회귀분석식에 의한 상호 상관관계를 R 통계 프로그램에 의해 그 유의성을 분석하였다(그림 45). FOL 밀도와 DNA 농도간의 상호관계는 정의 상관관계를 나타내었고, 신뢰구간 99.9%($p = 0.001$)의 유의수준에서 상관계수 0.91로 FOL 밀도가 증가함에 따라 DNA 농도도 증가하는 것을 확인하였다. FOL 밀도와 DNA 농도간의 관계에서도 특이마커에 의한 Cq 값의 상관관계도 분석하였다. FOL 밀도에 따른 Cq값은 $p = 0.01$ 에서 상관계수 0.84로 부의 상관관계로 통계적으로 유의적이었다. 즉, FOL 밀도가 증가함에 따라 특이마커에 의한 qPCR에 의한 Cq값은 낮아지는 것이 회귀분석에 의한 결과값이 유의한 것을 확인하였다. 또한 그 FOL DNA 농도도 Cq값에 의한 검출도 상관계수 0.85($p = 0.001$)로 부의 상관관계로 FOL 밀도 검출과 같은 결과를 나타냈다. 회귀분석에서 제시한 토마토 뿌리주변의 FOL 밀도에 따른 토마토 시들음병 발병 예측모델도 상관계수 0.89($p = 0.001$)로 매우 높은 유의성이 있는 것을 확인하였다. 각 이병토의 FOL(밀도 $6.7 \times 10^2 \sim 3.4 \times 10^5$ CFU/mL)에서 추출된 DNA 농도($3.3 \sim 28.2$

ng/uL)도 토마토 시들음병 발병 예측이 가능한 범위를 제시한 예측모델도 높은 정의 상관관계 ($p=0.001$, $r=0.90$)로 통계적으로도 매우 높은 유의성을 보였다. 따라서 이병토에 의한 포트에서의 토마토 시들음병 발병을 특이마커로 검출하여 Cq값($r=0.92$, $p=0.001$)으로 제시한 범위로 발병을 예측할 수 있는 자료를 기초로 포장에서 적용하였다.

(2) 토마토 시들음병 발생 예측 모델의 포장검정 적용

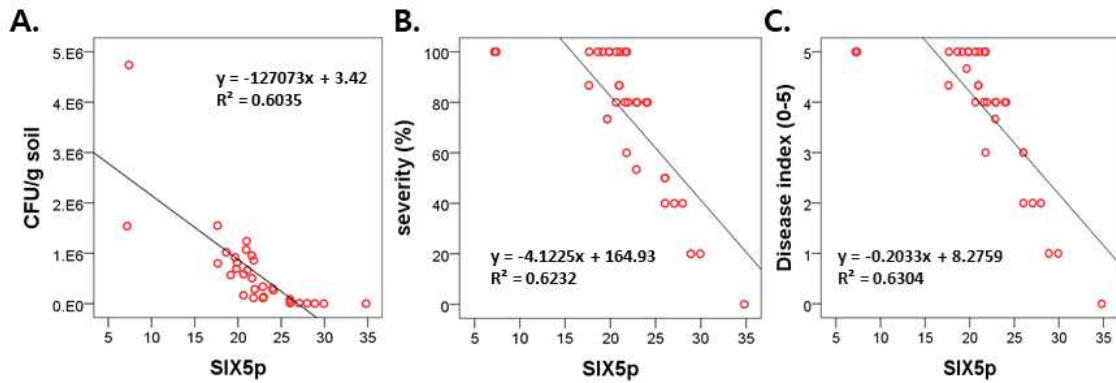


그림 46. 토마토 재배 포장내 특이마커(SIX5p)에 의한 토마토 시들음병 발생 예측모델 적용. 판별마커와 토양내 병원균 밀도(A), 병발생율(B), 발병지수(C)간의 회귀분석

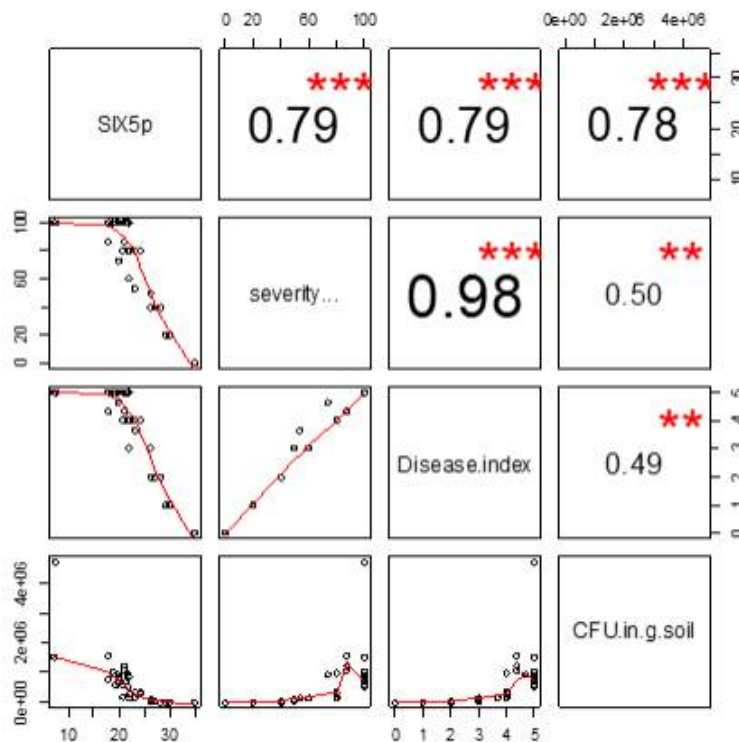


그림 47. 특이마커(SIX5p)에 의한 토마토 시들음병 발생 예측모델의 통계적 상관관계 분석.

포트 검정에 의해 작성된 토마토 시들음병 발병예측 모델을 토마토 재배지의 포장에서 적용하였다. 토마토 시설 포장에 시들음병 발병을 유도하기 위해 토마토 정식 3개월 전에 이병토 (1.4×10^4 CFU/g, FOL race 2)를 접종하였다. 토마토 정식 15일전, 정식 후 30일 간격으로 밀도를 komada 배지에서 조사하면서 토양내 FOL DNA를 추출하여 FOL 검출 primer와 probe를 이용하여 qPCR로 발현량을 조사한 후 발병예측 모델에 의해 시들음병 발병 예측 구간별로

NR 시제품을 250배로 7일 간격으로 3회 살포하면서 밀도변화 및 시들음병 발병을 조사하였다 (그림 46) 토양내 FOL 밀도 $1.5 \times 10^3 \sim 4.7 \times 10^6$ CFU/g 범위에서 NR 시제품 적용 후 토마토 발병은 20~100%까지 발병하였다. 그림 36의 FOL 밀도 발병예측모델에 의해 FOL DNA 15.1 ug/uL(1.2×10^5 CFU/mL)에서 토마토 시들음병 발병은 55% 발병이 예측되었는데 실제 포장에서는 1.1×10^5 CFU/g soil 밀도에서 약 59% 발병되었다. 또한 토양내 FOL DNA 농도에 따른 발병예측 모델에 의해 시제품 처리를 처리한 결과 6.7×10^2 CFU/g soil 이하 밀도에서는 토마토 시들음병을 100% 방제하여 발병이 되지 않았다. 따라서 이러한 결과들을 바탕으로 포장내 발병예측 모델에 의한 시제품 처리에 의한 토마토 시들음병 발병관계를 회귀분석에 의한 상관관계를 분석하였다(그림 47). 발병예측모델을 근거로 시제품 처리 한 포장 검정결과 토양내 밀도별 발병율은 상관계수 0.50($p=0.01$)을 나타냈으며, 특이마커에 의한 토양내 FOL 밀도 검출도 상관계수 0.78($p=0.001$)로 높은 유의성을 확인하였다. 특이마커에 의해 토양내 밀도별 검출에 의한 토마토 시들음병 발병율도 0.79로 통계적으로 높은 유의성으로 부의 상관관계를 나타냈다. 종합적으로 토마토 재배 생육기동안 예측모델에 의한 토양내 밀도 및 DNA 농도변화별로 시제품을 예방적으로 미리 처리함으로써 병발생에 의한 피해를 감소시키는 자료로 충분하였다.

다. 시제품 이용 토마토 시들음병 방제력 작성

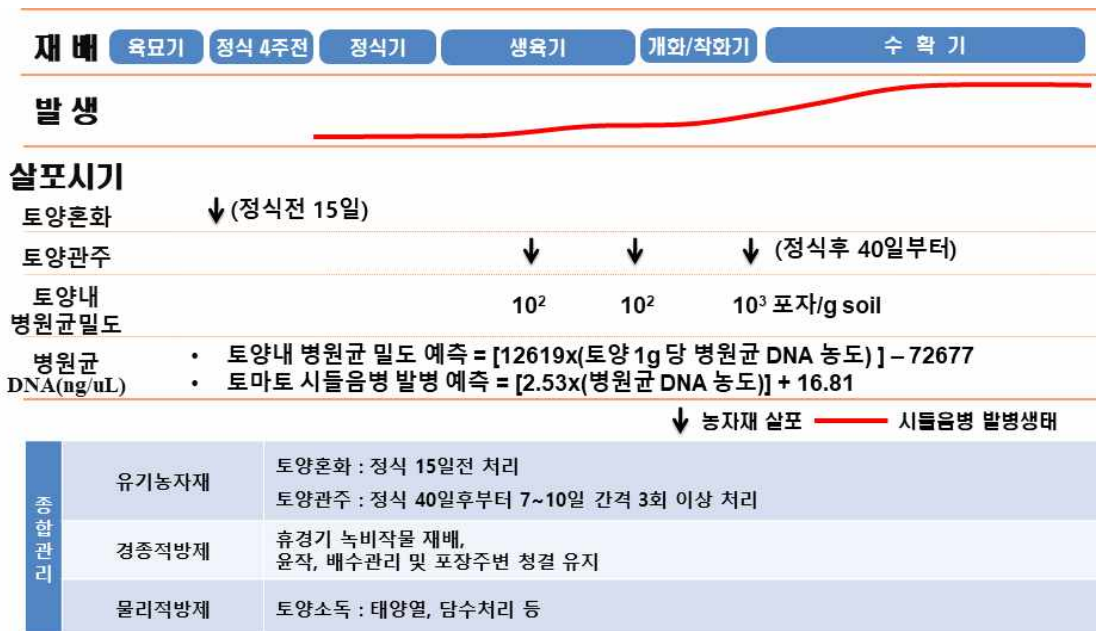


그림 48. 시제품 이용 토마토 시들음병 방제력 작성.

토마토 재배기간 동안 시제품 체계처리에 의한 시들음병 발병과 토양내 밀도를 예측하면서 방제할 수 있는 방제력을 작성하였다(그림 48). 토마토 정식전부터 수확기간동안 시제품을 이용한 방제 매뉴얼은 지금까지의 결과들을 종합적으로 고려하여 작성되었다. 토마토 시들음병은 육묘장에서부터 감염되어 오는 경우보다는 시설내 포장의 병원균 밀도에 의해 발병되는 경우가 대부분의 사례이다. 따라서 병원균의 밀도변화를 예측할 수 있는 모델을 근거로 발병율을 예측하고, 액상 및 입상 시제품의 사용방법에 따라 토마토 시들음병을 방제하였다. 우선 정식전에는 입상 시제품을 최소 정식전 15일전까지 $10 \sim 20 \text{ kg/m}^2$ 토양혼화하여 처리하였으며, 정식 이후에는 액상 시제품을 7~10일 간격으로 3~5회 관주처리하였다. 또한 토양내 병원균 밀도가 10^3

conidia/g soil 이상이 되면 반드시 처리하여 주어야 한다. 토마토 근권의 토양내에서 FOL DNA를 추출하여 제시한 발병을 및 밀도 예측모델을 이용하여 액상 시제품을 처리하여 주었다. 포장내 종합적인 관리를 위해서는 본 연구과제에서 제시된 유기농자재 및 합성농약에 준하여 혼용처리가 가능하며, 시설 내 휴경기 동안에는 유채, 클로버 등의 녹비작물 등의 유기물을 토양내 공급하여 FOL 병원균의 후막포자가 생성되는 것을 차단하면 입상 및 액상 시제품으로 병원균 포자를 억제하는 효과를 높일 수 있다.

2-9. 시제품 처리에 의한 병저항성 관련 식물면역기능 활성 조사

Gene family	Specific class	Forward and reverse primers sequences
PR1	PR1a, acidic PR1	F: 5'-TCTTGTGAGGCCCAAATTC-3'
		R: 5'-ATAGTCTGGCCTCTCGGACA-3'
PR2	GLUA, acidic b-1,3-glucanase	F: 5'-GGTCTCAACCGCGACATATT-3'
		R: 5'-CACAAAGGGCATCGAAAAGAT-3'
PR3	CHI3, acidic chitinase	F: 5'-TGCAGGAACATTCACCTGGAG-3'
		R: 5'-TAACGTTGTGGCATGATGGT-3'
Lipoxygenase	LOXD	F: 5'-CCTGAAATCTATGGCCCTCA-3'
		R: 5'-ATGGGCTTAAGTGTGCCAAC-3'
Phenylalanine ammonia lyase	---	F: 5'-CCAACCTGAAATGGTTGCCGA-3'
		R: 5'-ACACATGTGAAGGCAACATGC-3'
ACTIN	Ubiquitin	F: 5'-AGGCACACAGGTGTTATGGT-3'
		R: 5'-AGCAACTCGAAGCTCATTGT-3'

그림 49. quantitative RT-PCR에 사용된 병저항성 관련 유전자 primer

식물은 옥신(IAA), 지베렐린(GA), 살리실산(SA), 에틸렌(ET), 자스모닉산(JA) 등을 포함한 호르몬을 생산하는데, 이들은 상승적 또는 길항적 방식으로 작용하여 식물 면역 반응 메커니즘에 관련된 스트레스 반응 유전자의 발현을 조절한다. SA 의존성 신호전달체계는 일반적으로 활물기생균 또는 반활물기생균에 대한 내성과 연관되어 있지만, JA와 에틸렌은 상승적으로 사물기생균에 대한 방어를 조절한다. 이러한 신호전달체계에 관한 광범위한 상호작용은 식물이 생물체들로부터 가장 적절한 방어 체계로 전환하고 다른 유형의 병원균과 해충들로부터 면역체계를 조절할 수 있게 된다. 본 연구에서 개발한 미생물과 식물추출물은 병 저항성에 관련되어 있다면 병원균에 대한 직접적인 독소로서 작용과 함께 식물체에는 간접적으로 면역반응을 유도하는 기능을 동시에 수행하여 병방제효과를 더욱 더 상승시킬 수 있다. 따라서 시제품 처리에 의한 토마토 식물체에서 병 저항성 관련 유도반응은 특정 유전자에 의한 발현양상을 qRT-PCR을 이용하여 조사하였다. 처리구는 MP 공정에 의한 Ba 상등추출액(대조구), FOL 단독 처리(대조구), 액상 시제품(TB, NR)을 250배 농도 희석하여 관주 처리하였다. 시제품 처리 24시간 후 FOL을 접종하고 7일후에 토마토 유묘 잎을 수집하였다. 각 샘플들의 total RNA는 NucleoZOL reagent (Macherey-Nagel, Düren, Germany)를 이용하여 회사의 protocol에 따라 분리하였다. DNase I (Qiagen Inc., Hilden, Germany)을 처리한 2 µg의 총 RNA는 Oligo dT primer와 moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(MMLV-RT, Enzymomics, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR은 QuantiTect SYBR Green RT-PCR(Qiagen Inc.)의 qPCR Master Mix(2X), 각 0.2µM primer, 1 ul의 cDNA를 혼합한 총 20 ul 사용하여 Stratagene MX3005P system (Stratagene, CA,USA)에서 수행하였다. 최초 95°C 10분간 반응

시치고, 95°C에서 30초, 60°C 에서 55초, 72°C에서 30초간의 cycle을 40회 증폭시켜 각 3회 반복으로 실시하였다. 각 유전자의 상대적인 발현량 분석을 위하여 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 사용하였다. 각 primer는 그림 49와 같다.

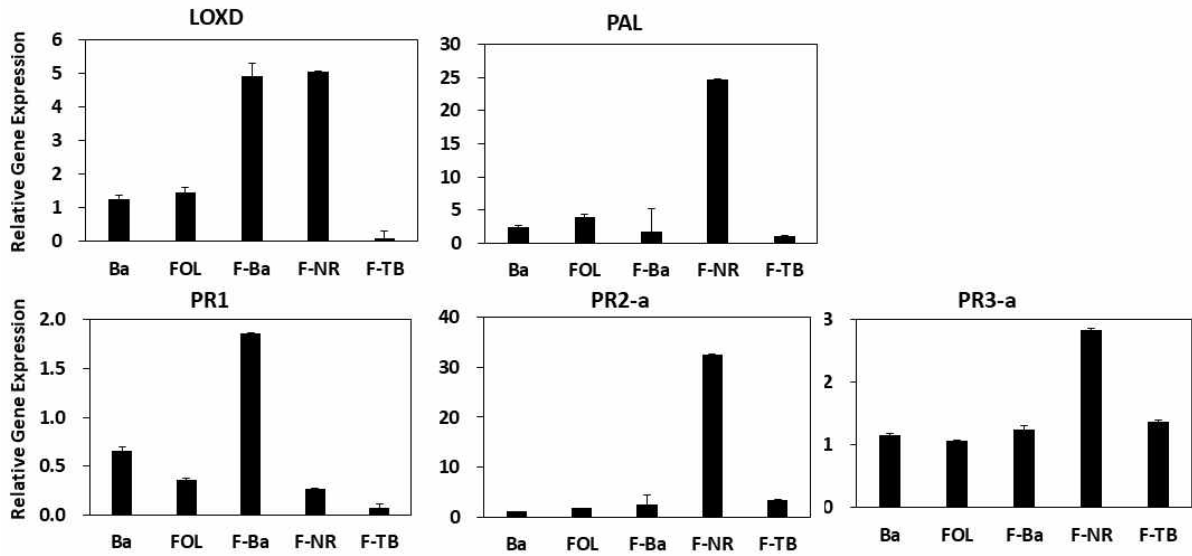


그림 50. 시제품 처리에 의한 병저항성 관련 유전자 발현양상

토마토 시들음병에 대해 방제효과가 있는 MP 배양공정에 의한 상등추출액과 시제품의 토마토 병 저항성과 면역기능활성에 관련된 PR-1, PR-2, PR-3, lipoxygenase (LOXD), phenylalanine ammonia-lyase(PAL) 유전자의 발현을 qRT-PCR을 통해 수행하였다(그림 50). JA 생합성과 관련된 LOXD는 Ba 상등추출액+FOL을 처리하였을 때 FOL 병원균만 처리하였을 때보다 3.4배 더 높게 발현되었다. NR+FOL 처리구도 상대적으로 FOL 처리보다 3.6배 발현이 증가하였지만, TB+FOL은 FOL 단독 처리구보다 유전자 발현이 낮았다. 이러한 결과는 MP 공정에 의한 Ba 미생물에 의해 생산된 병저항성 유도물질들은 대부분 JA 신호전달체계와 관련이 있는 LOXD의 발현을 증가시켰으며, NR 시제품 구성성분인 로테논:님오일 성분도 Ba 유효성분과 함께 JA 관련 식물면역반응에서 상승적으로 작용한다는 것을 확인하였다. PAL은 병원체, UV 및 저온과 같은 biotic/abiotic 스트레스에 반응하는 유도인자로서 식물 방어작용에 있어서 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 PAL은 NR+FOL 처리시 FOL과 비교해서 20.8배의 유전자 발현이 증가하였지만, 다른 처리구에서도 FOL 단독 처리보다 발현량이 높지 않았다. PAL은 식물의 전신 획득저항성(SAR)에 관련된 필수 신호전달자인 SA 생합성에 관여하며, 병원균 감염, 상처, 영양분의 불균형, UV, 온도 스트레스 같은 다양한 스트레스에 반응시 PAL 유전자는 발현하게 된다. 따라서 Ba 균주는 JA와 SA 신호전달체계에 의한 식물 병저항성 반응을 유도하지만 로테논:님오일의 식물추출물이 병저항성에 관련된 식물면역반응에서 상승작용으로 역할을 하는 것을 확인하였다. 식물체는 스트레스에 관련된 유전자의 활성화를 통해 병원균의 공격에 대한 여러 저항성 및 방어 매커니즘을 유도시켜 과민감반응(HR), 파이토알렉신 생산, 세포벽의 리그닌화와 강화, PR 단백질의 생합성 반응을 통해 면역반응을 일으킨다. 따라서 FOL 병원균 감염에 따른 3종의 PR 유전자의 반응을 조사하였다. qRT-PCR 결과 PR-1은 FOL 단독 처리와 비교해서 시제품 처리구에서 상대적으로 감소하였다. PR-2 유도체 β -glucanase는 모든 처리구에서 증가하였으며, 특히 NR 시제품 처리구에서는 30.7배로 가장 높게 증가하였다. PR3(acidic)에서는 시제품의

모든 처리구에서 FOL 대비 0.3~1.8배 증가하였다. 따라서 MP 배양공정에 의한 Ba 추출 유효성분은 식물체의 병 저항성 관련 식물면역 기능을 유도하였다. 특히, NR 시제품의 구성성분인 로테논:님오일은 JA와 SA 신호전달체계에 Ba 추출 유효성분과 상승작용 역할을 하였으며, 그 결과 식물의 면역기능을 활성화함으로써 토마토 시들음병 방제효과에도 큰 영향을 주는 것으로 나타났다.

제 1 협동과제 : 기능성 복합제형에 의한 병해충 복합 방제제 실용화 및 제품화

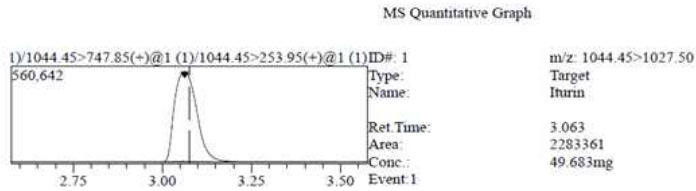
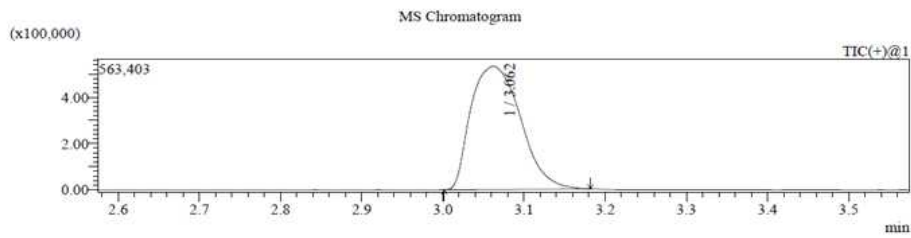
가. 대량배양을 위한 배양공정별 유효성분 분석

1. 선발균주 Ba(균주2)의 기능 및 유효성분 탐색 및 분석

시제품 제작을 위한 Ba 균주의 대량배양조건을 확립하기 위해서 각 공정별 영양원에 따른 유효성분인 리포펩타이드(iturin과 fengycin)의 생산량을 조사하고 그 상대적인 함량을 탐색 및 분석하기 위하여 조건 설정을 하였다(그림 1). 제1세부과제에서 개발한 Ba 균주의 MP 공정에서 유효성분 생산 및 함량에 영향을 미치는 주요 영양원을 조사하기 위해 각 구성원별 배양에 의한 추출물들을 분석하였다. 모든 공정에서 Ba 균주의 배양조건은 녹두추출물과 난황을 기본으로 마니톨과 펩톤 함유비율을 조정하면서 28°C, 180rpm 조건에서 5일간 또는 배양일별로 배양한 후 각 추출용매에 의해 유효성분 함유물질을 추출하였다. 대조 배양 배지는 TSB 배양액을 사용하였다. 각 배양액 또는 제형물은 원심분리를 통하여 상층액을 회수한 후 각 추출용매별로 *n*-butanol, ethylacetate, hexane 등을 이용하여 유효성분이 함유되어 있는 biosurfactants 층을 분리하였다. 유기용매 분획층은 진공농축장치로 40°C에서 완전 농축하여 최종 methanol로 녹인 후 보관하면서 물질을 분석하였다. 각 추출물질은 0.2 µm syringe filter (Whatman, PTFE)로 여과하여 LC-MS/MS 분석을 위해 사용하였다. LC-MS/MS (Simadzu LC8040) 분석에 사용된 컬럼은 SHISEIDO C₁₈(2.7µm, 2.1 mm * 150 mm)이며, Column temperature은 40°C이며 Flow rate는 0.3 ml/min이었다. 분리용매는 A (0.1% acetic acid in water)와 B (0.1% acetic acid in Acetonitrile)를 사용하였다. 모든 화합물은 ESI (electro spray ionization) 및 positive mode에서 이온화하였다. Biosurfactant의 표준용액은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다: fengycin (CAS Number 102577-03-7), surfactin (CAS Number 24730-31-2), iturin A (CAS Number 52229-90-0). 각 분석값의 검출농도에 의한 상대적인 정량은 다음과 같이 수행하였다. 구입한 표준용액을 농도별로 희석하여 LC-MS/MS로 측정 후 얻어진 크로마토그램상의 peak 면적을 검량선과 비교하여 정량하였다. 표준품을 각각 용매에 용해하여 1,000 mg/L의 stock solution을 조제하였다. 이를 단계별로 희석하여 0.005, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L의 working solution을 조제하여 각각 LC-MS/MS로 측정 후 얻어진 크로마토그램상의 peak면적을 기준으로 검량선을 작성하였다. 검출농도는 다음과 같이 계산하여 표기하였다.

$$\text{검출농도}(mg/kg) = \text{기기검출량}(ug/ml) \times \frac{\text{추출용매량}(ml)}{\text{시료량}(g)} \times \frac{\text{희석부피}(ml)}{\text{분취량}(ml)} \times \frac{\text{희석부피}(ml)}{\text{분취량}(ml)}$$

A. Iturin standard calibration



Calibration Curve

ID# : 1 m/z : 1044.45>1027.50

Name : Iturin

Quantitative Method : External Standard

Function : $f(x)=45284.1*x+33515.3$

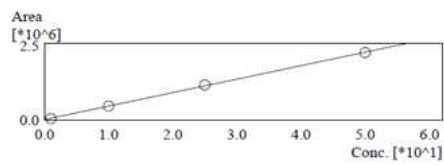
Rr1=0.9997694 Rr2=0.9995389

MeanRF: 5.176312e+004 RF SD: 8.987937e+003 RF %RSD: 17.363592

FitType : Linear

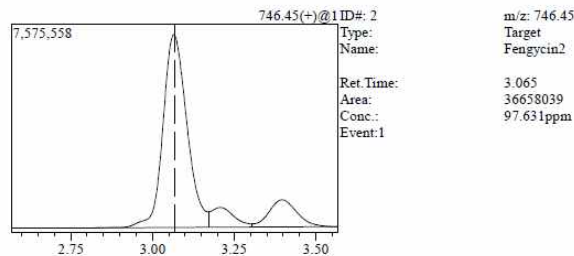
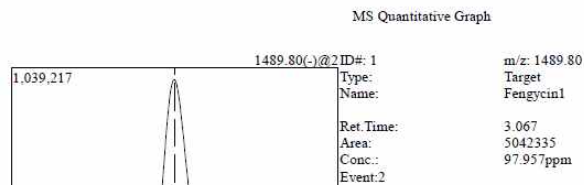
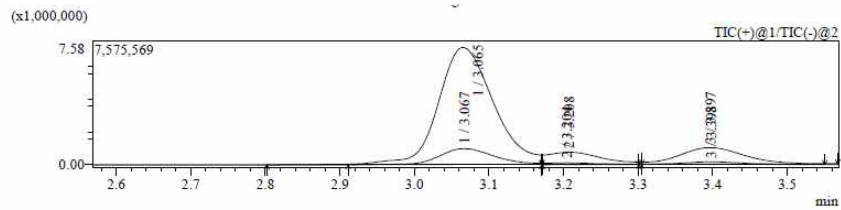
ZeroThrough : Not Through

Weighted Regression : None



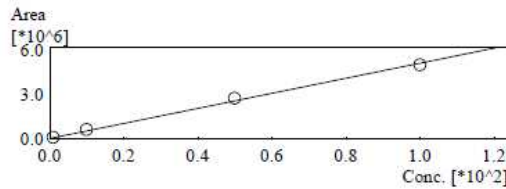
#	Conc (Ratio)	MeanArea	Area
1	1	65127	65127
2	10	484299	484299
3	25	1195708	1195708
4	50	2283361	2283361

B. Fengycin standard calibration



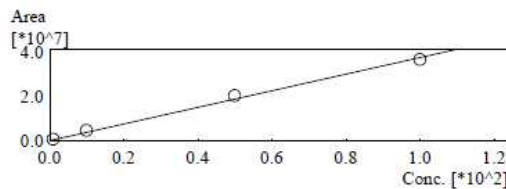
Calibration Curve

ID# : 1 m/z : 1489.80
 Name : Fengycin1
 Quantitative Method : External Standard
 Function : f(x)=51475.1*x+0
 Rr1=0.9988570 Rr2=0.9977154
 MeanRF: 6.134512e+004 RF SD: 1.256395e+004 RF %RSD: 20.480769
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Through
 Weighted Regression : None



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	1	79153	79153
2	10	604934	604934
3	50	2765523	2765523
4	100	5042335	5042335

ID# : 2 m/z : 746.45
 Name : Fengycin2
 Quantitative Method : External Standard
 Function : f(x)=375477*x+0
 Rr1=0.9985238 Rr2=0.9970498
 MeanRF: 4.742214e+005 RF SD: 1.281036e+005 RF %RSD: 27.013445
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Through
 Weighted Regression : None



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	1	656186	656186
2	10	4668227	4668227
3	50	20364816	20364816
4	100	36658039	36658039

그림 1. Iturin/fengycin standard calibration

표 1. 영양원 구성비율별 배양기간에 따른 유효성분 생성량 분석

Media Condition		Iturin(mg/kg)	Fengycin(mg/kg)
3일 배양	녹두추출물+난황 (0.4%+0.1%, v/v)	마니톨:펩톤=1:0%	0.084
		마니톨:펩톤=0:1%	2.791
		마니톨:펩톤=1:1%	2.492
5일 배양	녹두추출물+난황 (0.4%+0.1%, v/v)	마니톨:펩톤=1:0%	0.094
		마니톨:펩톤=0:1%	3.580
		마니톨:펩톤=1:1%	2.186
5일 배양	TSB(대조)	일반합성배지	5.458
			0.593

MP 공정에 의한 각 영양원의 구성비율별 배양기간에 따른 유효성분 생산과의 관계를 설정하기 위하여 배양일별 유효성분의 함유량을 조사하였다(표 1). MP 배양공정 중 녹두추출물+난황(0.4%+0.1%, v/v)은 기본 영양원으로 함유하면서 마니톨, 펩톤의 구성비율별 3일과 5일 동안 배양하면서 유효성분의 생산량을 분석하였다. 배양기간에 따른 유효성분 fengycin의 생산은 모든 배양공정에서 3일 보다는 5일 배양에서 더 높게 검출되었으며, iturin도 마니톨:펩톤= 1:1 배양액을 제외하고는 배양일에 따라 생산량이 증가하였다. 탄소원의 비율을 1:1로 사용한 배양원의 fengycin 생산의 경우 대조구로 사용된 일반 합성배지보다 138.4 mg/kg 더 많이 생산하였으며,

마니톨의 함량보다 펩톤의 함량이 fengycin 생산에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 결과적으로 MP 공정에 의한 배양조건은 TSB 대조구에 비해 iturin 생산은 낮았지만, fengycin 함량은 높아지는 영양원의 구성성분임을 확인하였다.

표 2. MP 배양공정에서 주요 구성성분의 유효성분 생산에 미치는 영향 분석

Media Condition	추출용매	Iturin (mg/kg)	Fengycin (mg/kg)	총량 (mg/kg)
난황(0.1%, v/v)	부탄올	0.025	0.019	0.044
	에틸아세테이트	0.038	0.008	0.046
녹두추출물+난황 (0.4%+0.1%, v/v)	부탄올	0.046	0.028	0.074
	에틸아세테이트	0.043	0.021	0.064
녹두추출물+난황+식물성오일 (0.4%+0.1%+0.5%, v/v)	부탄올	0.043	0.071	0.114
	에틸아세테이트	0.058	0.039	0.097

제 1세부과제에서 개발한 MP 공정 배양배지의 영양원인 난황, 녹두추출물, 식물성오일이 Ba 균주의 유효성분 생산에 미치는 영향을 조사하였다(표 2). 각 추출용매별로 난황, 녹두추출물+난황, 녹두추출물+난황+식물성오일의 구성 영양원에서 5일 배양된 Ba 균주의 상등액을 추출하여 LC-MS/MS로 분석하였다. 각각의 영양원 구성비율에 대한 추출용매별 iturin과 fengycin은 에틸아세테이트 추출방법 보다는 부탄올을 이용한 유효성분 추출방법이 검출량 분석을 위해 더 효과적인 것을 확인하였다. 또한 영양원 구성성분별 유효성분 분석은 난황 단독 배양보다는 녹두추출물을 함유한 배양조건에서 더 높은 양으로 검출되었다. 또한 식물성오일 첨가도 녹두추출물과 함께 iturin A과 fengycin 생산을 높이게하는 주요 구성성분임을 확인하였다.

표 3. 식물성오일 영양원이 유효성분 생산에 미치는 영향 분석

식물성오일 (v/v)	추출용매	Iturin (mg/kg)	Fengycin (mg/kg)	총량 (mg/kg)
0.3%	헥산	0.003	0.149	0.152
	부탄올	0.017	0.257	0.274
	에틸아세테이트	0.013	-	0.013
	총량	0.03	0.41	0.44
0.5%	헥산	0.002	0.047	0.049
	부탄올	0.052	0.285	0.337
	에틸아세테이트	0.016	-	0.016
	총량	0.07	0.33	0.40
1%	헥산	0.012	0.212	0.224
	부탄올	0.032	0.424	0.456
	에틸아세테이트	0.016	-	0.016
	총량	0.06	0.64	0.70

표 2의 녹두추출물(0.4%, v/v)+난황(0.1%)+식물성오일의 구성배지에서 식물성오일의 첨가에 의한 유효성분 생산 변화량을 조사하였다(표 3). 각각의 식물성오일 함유량에 따라 Ba 균주를 28°C에서 5일간 배양 후 배양 상등액을 회수하여 LC-MS/MS에서 유효성분을 분석하였다. 0.3~1% 식물성오일 함유농도 범위의 배양배지에서 생산한 유효성분 iturin은 0.3%보다는 농도가 높을수록 그 생산량도 상대적으로 높아지는 경향을 확인하였다. 부탄올 추출방법에 의한 fengycin 검출은 0.3~1% 오일의 농도변화에 따라 생산량도 정의 비례관계를 나타냈다. 이 결과들은 표 2의 결과처럼 식물성오일은 유효성분 생산에 영향을 미치는 배양 조건임을 확인하였고, 대량배양 조건에서는 iturin과 fengycin의 균형적인 생산을 고려해서 식물성오일은 0.5%가 적정 농도로 설정되었다. 따라서 MP공정에 의한 대량배양에서 구성성분으로 식물성오일을 첨가함으로써 fengycin의 생산을 조절할 수 있는 조건을 확립하였다.

표 4. 난황 영양원이 유효성분 생산에 미치는 영향 분석

난황 함유량 (v/v)	추출용매	Iturin (mg/kg)	Fengycin (mg/kg)	총량 (mg/kg)
0.1%	헥산	0.003	0.023	0.026
	부탄올	0.014	0.401	0.415
	에틸아세테이트	0.014	-	0.014
	총량	0.03	0.42	0.46
1%	헥산	0.001	0.013	0.014
	부탄올	0.014	0.672	0.686
	에틸아세테이트	0.02	-	0.02
	총량	0.04	0.69	0.72

또한 표 2의 녹두추출물(0.4%)+난황+식물성오일(0.5%)의 구성배지조건에 난황 비율에 의한 유효성분 생산량을 조사하였다(표 4). 0.1%와 1% 난황 함유농도 조건에서 0.5% 식물성오일과 혼합한 현탁액을 제조한 후 각 배지 조건의 영양원 함유량에 따라 Ba 균주를 28°C에서 5일간 배양 후 상등액을 회수하여 LC-MS/MS에서 유효성분을 분석하였다. 난황 함유농도에 따른 iturin의 상대적인 변화량은 낮았지만, fengycin 생산은 0.1% 난황 함유 배양보다 1% 함유에서 더 많이 생산하였다. 난황 함유농도는 유효성분 iturin 생산보다는 fengycin 생산에 상대적으로 더 큰 영향을 미치는 것을 확인하였다.

MP 공정 구성성분인 녹두추출물+난황현탁액+식물성오일(0.4+0.1+0.5%, v/v)이 포함된 기본 배지와 각각의 영양보조제 0.1%(v/v)를 추가하여 28°C에서 5일간 배양한 추출액의 유효성분 생산량을 조사하였다(표 5). 각 첨가 영양원별 유효성분의 총 생산량은 tryptone이 함유된 추출물에서 가장 높게 검출되었으며, casamino acid, glucose와 yeast extract도 다른 영양원 대비 생산량이 높았다. 추출용매에 의한 유효성분 추출은 에틸아세테이트에서보다는 부탄올에서 검출량이 높았으며, 일부 추출물의 경우 에틸아세테이트 추출방법에 의한 유효성분 중 fengycin은 검출되지 않았다. MP 공정에 의한 배양조건에서 영양 보조제 첨가 조건에 의한 유효성분 생산 증가 효과에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 제품 개발을 위해 보조 영양원의 첨가로 유효성분의 생산을 효율적으로 증가시켜 대량배양 조건으로 적합하였다. 따라서 대량배양

에 의한 제품 생산 및 생산 단가 측면에서 tryptone과 casamino acid 보다는 yeast extract, sucrose, glucose가 더 알맞은 첨가제로 적합한 조건임을 확인하였다.

표 5. 영양 보조제 첨가에 의한 유효성분량 분석

Source (0.1%, v/v)	추출용매	Iturin (mg/kg)	Fengycin (mg/kg)	총량 (mg/kg)
sucrose	부탄올	0.238	0.797	1.04
	에틸아세테이트	0.262	0.009	0.27
glucose	부탄올	0.337	1.084	1.42
	에틸아세테이트	0.282	0.013	0.30
tryptone	부탄올	1.012	3.303	4.32
	에틸아세테이트	0.430	-	0.43
fructose	부탄올	0.183	0.547	0.73
	에틸아세테이트	0.225	0.017	0.24
casamino acid	부탄올	0.663	2.678	3.34
	에틸아세테이트	0.391	-	0.39
yeast extract	부탄올	0.671	0.544	1.22
	에틸아세테이트	0.365	-	0.37

표 6. MP 배양공정 개량의 유효성분 생산효과 분석

Media Condition	추출용매	Iturin (mg/kg)	Fengycin (mg/kg)	총량 (mg/kg)
녹두추출물+난황현탁액+ 마니톨+펩톤	헥산	-	0.013	0.013
	부탄올	1.502	10.109	11.611
	에틸아세테이트	0.663	0.034	0.697
	총량	2.17	10.16	12.32
TSB	헥산	-	-	0
	부탄올	1.933	5.168	7.101
	에틸아세테이트	0.657	0.021	0.678
	총량	2.59	5.19	7.78

Ba 균주 배양공정 개량에 의한 MP 공정 구성성분인 녹두추출물+난황현탁액+마니톨+펩톤 (0.4+0.1+1+0.5%, v/v)이 함유된 영양원을 이용하여 28°C에서 5일간 배양된 배양액과 일반 합성 배지 배양액의 유효성분의 생산량을 비교하였다(표 6). MP 공정에 의한 iturin의 생산 총량은 통계적인 유의성 없이 일반합성배지가 높았지만, fengycin 함량은 일반합성배지 생산량의 2배 이상이 검출되었다. 전체적인 유효성분 생산 총량에서도 1.5배 이상 개발 배지가 우수하였다. 식물성오일이 포함되지 않은 배양공정에서도 fengycin 생산능력이 TSB 배양조건보다 높게 생산되었으며, 대량배양을 위한 구성성분 비율도 알맞은 조건으로 확립되었다. 또한 추출용매별로 검출량도 헥산, 에틸아세테이트 추출방법보다 부탄올에서 검출되는 함량이 더 높은 것 결과도 확인되었다. 이러한 결과는 제 1세부과제에서 개발한 배지성분과 구성비율 조합이 본 과제의 병해충 방제에 주 유효성분 생산에 적절하였으며, 생산단가 측면에서 고려해볼 때 충분히 대량배양을 위한 배양원으로 가능성이 있는 것을 확인하였다.

표 7. MP 공정(녹두추출물+난황현탁액+마니톨+펩톤) 배양액의 유효성분량 분석

추출성분	추출용매	Iturin (mg/kg)	Fengycin (mg/kg)	총량 (mg/kg)
상등액	헥산	-	0.02	0.02
	부탄올	1.654	9.856	11.51
	에틸아세테이트	0.514	-	0.514
	총량	2.168	9.876	12.044
균체	헥산	-	-	0
	부탄올	3.565	5.965	9.53
	에틸아세테이트	1.293	0.044	1.337
	총량	4.858	6.009	10.867

시제품을 제작을 위해 Ba 균주 배양 상등액을 회수한 후 추출가공하여 제품을 제작하는데 그 수율을 높이기 위해서 상등액 회수 후 남은 균체를 활용하고자 각각 유효성분 함량을 분석했다. 녹두추출물+난황현탁액+마니톨+펩톤(0.4+0.1+1+0.5%, v/v) 구성성분의 MP 공정에 의해 Ba 균주를 28°C에서 5일간 배양 후 4000rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액과 균체를 분리하여 각각 유효성분의 함유량을 조사하였다(표 7). iturin은 상등액보다는 균체에 함유된 양이 높았으나, fengycin은 회수된 균체보다는 상등액에서 더 높게 존재하는 것을 확인하였다. 추출방법별 유효성분 검출량을 비교한 결과 부탄올 용매에서 상등액과 균체 모두 높게 검출되었다. 대량배양 후 제품 제조를 위해 상등액 회수 후 남은 균체를 현탁액으로 제조한 후 멸균하여 2차 가공에 의한 부수물로 제형에 활용 가능할 수 있는 결과이다. 이러한 결과는 유효성분의 이용성과 대상 병해충에 대한 방제효과를 고려하여 제품 개발에 있어서 균체 또는 상등추출액의 회수율과 제형화 등 측면에서 유용하게 응용될 수 있는 결과를 얻었다.

2. 후보균주 *Pseudomonas fluorescens*(Pf, 균주1) 생산하는 유효성분 탐색 및 분석

Pf 균주1의 영양원과 배양배지에 의한 유효성분인 2,4-diacetylphloroglucinol(DAPG)의 생산과 그 변화량을 분석하기 위하여 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다(그림 2). 각 배양액의 상등액을 ethylacetate를 이용하여 물질분해층을 분리하였고, 유기용매 분획층은 진공농축장치로 완전 농축하여 methanol로 녹인 후 0.2 µm syringe filter (Whatman, PTFE)로 여과하여 LC-MS/MS 분석을 위해 사용하였다. LC-MS/MS (Simadzu LC8040) 분석에 사용된 컬럼은 SHISEIDO C₁₈(2.7µm, 2.1mm× 150mm)이며, Column temperature은 40°C이며 Flow rate는 0.6 ml/min이었다. 분리용매는 A (0.1% acetic acid in water)와 B (0.1% acetic acid in Acetonitrile)를 사용하였다. 모든 화합물은 ESI (electro spray ionization) 및 positive mode에서 이온화로 분석하였다. 표준용액은 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다(CAS 2161-86-6). 각 표준액을 농도별로 희석하여 LC-MS/MS로 측정 후 얻어진 크로마토그램상의 peak 면적을 검량선과 비교하여 정량하였다. 표준용액을 각각 용매에 용해하여 1,000 mg/L의 stock solution을 조제하였다. 이를 단계별로 희석하여 0.005, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L의 working solution을 조제하여 각각 LC-MS/MS로 측정 후 얻어진 크로마토그램상의 peak면적을 기준으로 검량선을 작성하였다. 각 표준액을 농도별로 희석하여 LC-MS/MS로 측정

한 후 얻어진 크로마토그램상의 peak 면적을 검량선과 비교하여 정량하였다. 표준품을 각각 용매에 용해하여 1,000 mg/L의 stock solution을 조제하였다. 이를 단계별로 희석하여 0.005, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L의 working solution을 조제하여 각각 LC-MS/MS로 측정 후 얻어진 크로마토그램상의 peak면적을 기준으로 검량선을 작성하였다. 검출농도는 그림 1과 같이 계산하여 표기하였다.

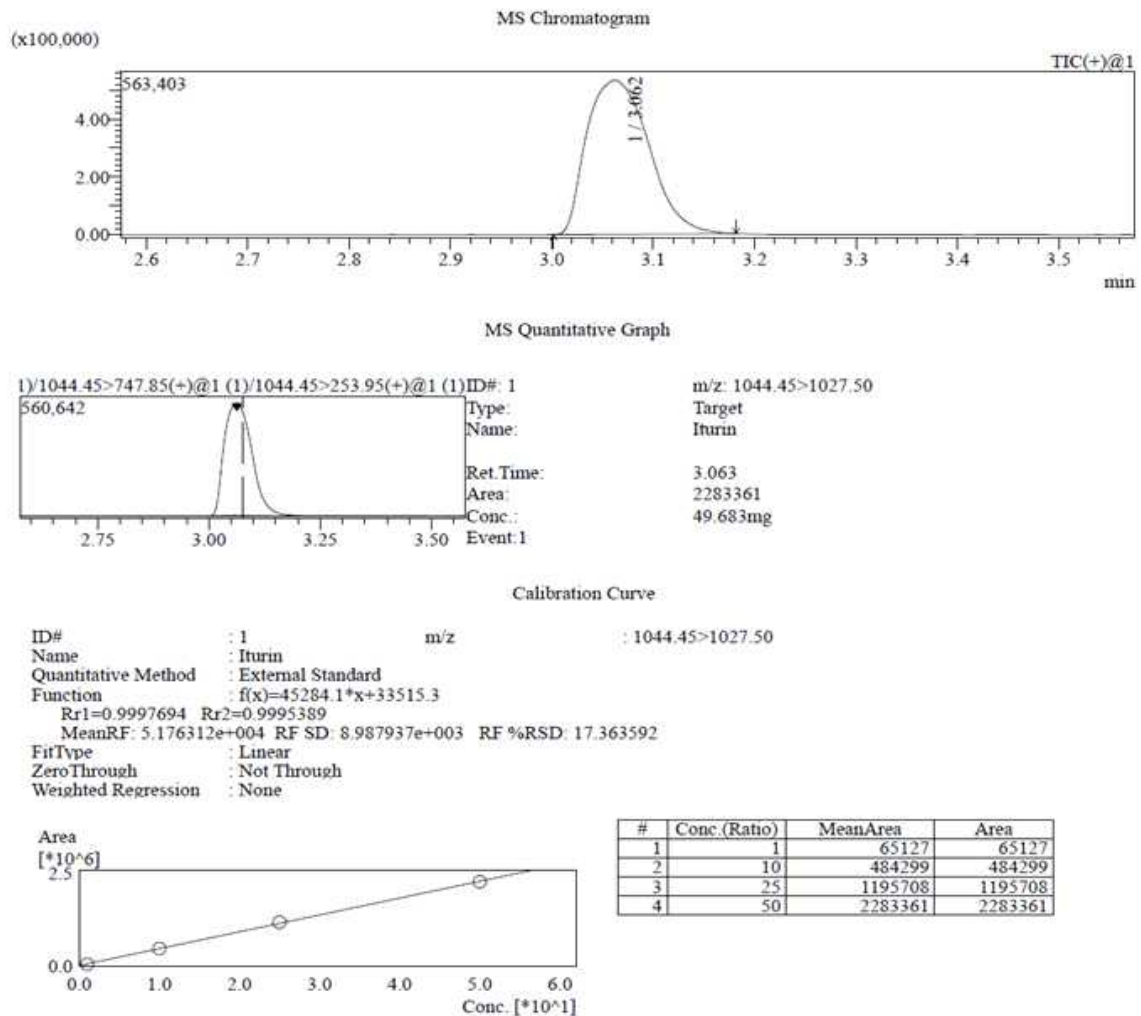


그림 2. 2,4-DAPG standard calibration

Pf 균주의 대량배양 조건을 확립하기 위해 MP(녹두추출물+난황현탁액=0.4+0.1%, v/v) 기본 구성성분 공정을 적용하였다(표 8). 대조 배양배지로 King'B(KB, Proteose Peptone#3+K₂HPO₄+MgSO₄+Glycerol)배지를 사용하였다. KB 구성성분에서 glycerol 대신 sucrose와 마니톨을 1% 농도로 대체하였고, MP 공정에서는 두 영양원을 1% 첨가하여 Pf 균주의 주요 유효성분 생산을 대조구와 상대적으로 비교 분석하였다. KB 배양배지의 마니톨 대체 상등추출액에서 19.81 mg/kg의 DAPG를 생산하였다. 하지만 배양공정을 개량한 MP 공정에 마니톨을 첨가한 배양 상등추출액은 30.1 mg/kg로 DAPG 생산량이 가장 많이 생산되었다. 이러한 결과는 제 1세부과제의 개량한 공정을 Pf 균주 대량배양 조건으로 충분한 적용 가능성을 확인하였다.

표 8. 다양한 배지 조건별 2,4-DAPG 생성량 분석

Media Condition	2,4-DAPG (mg/kg)
KB+sucrose	11.01
KB+mannitol	19.81
MP+sucrose	15.74
MP+mannitol	30.09
KB(control)	25.78

표 9. MP 공정의 탄소원별 2,4-DAPG 생성량 분석

Source (1%, v/v)	2,4-DAPG (mg/kg)
fructose	7.00
glycerol	50.32
sucrose	60.33
glucose	10.26
mannitol	80.49

Pf 균주의 탄소원별 배양에 의한 DAPG 생산을 분석하기 위해 MP(녹두추출물+난황현탁액+펩톤=0.4+0.1+0.5%, v/v) 기본 구성성분 공정을 적용하였다(표 9). 각 배양공정에 의해 Pf는 28°C 5일 배양한 후 상등추출액을 LC-MSMS로 분석한 결과, 1% 마니톨이 첨가된 공정에서 80.5 mg/kg 으로 가장 많은 함유량이 검출되었으며다. 또한 sucrose와 glycerol도 50 mg/kg 이상으로 검출되었으나, fructose와 glucose는 DAPG 생산에서 다른 구성 탄소원에 비해 낮은 수준으로 검출되었다. 따라서 Ba 균주에서 적용한 MP 공정에서 마니톨의 구성은 Pf에서도 유효 성분 생산에 영향을 미치는 중요한 탄소원으로 역할을 하였다.

표 10. 녹두추출물과 펩톤 영양원이 2,4-DAPG 생산에 미치는 영향 분석

Media Condition	2,4-DAPG (mg/kg)
녹두추출물:펩톤 = 0.4:1	119.00
녹두추출물:펩톤 = 0.4:0.1	17.87
녹두추출물:펩톤 = 4:1	451.18
녹두추출물:펩톤 = 4:0.1	44.58

제 1세부과제에서 녹두추출물과 난황추출물 영양원 배양 공정이 FOL 병원균 포자발아를 억제하는 효과가 높았기 때문에 영양원의 DAPG 생산에 미치는 영향을 조사하였다(표 10). 0.1% 난황현탁액을 기본으로 녹두추출물과 펩톤의 구성비율별 DAPG 생산량을 조사하였다. 녹두추출물:펩톤의 구성비율이 높을수록 DAPG의 생산량은 높은 수준으로 검출되었고, 펩톤보다는 녹두추출물의 함량이 유효성분 생산에 더 큰 영향을 미쳤다. 1%의 동일 함량의 펩톤이 포함된 조건에

서 녹두추출물을 0.4%와 4% 함유비율로 비교한 결과 4% 함유 배양추출에서 약 332 mg/kg 더 높은 수준으로 검출되었다. 따라서 Pf의 대량배양조건에서 마니톨 탄소원과 함께 녹두추출물도 유효성분 생산에 있어서 중요한 구성성분임을 확인하였다.

표 11. 배양일별 MP 공정에 의한 영양원이 2,4-DAPG 생성량에 미치는 영향 분석

Media Condition			2,4-DAPG (mg/kg)
3일 배양	녹두추출물+난황현탁액 (0.4+0.1%)	마니톨:펩톤=1:0%	165.1
		마니톨:펩톤=0:0.5%	141.1
		마니톨:펩톤=1:0.5%	231.2
	KB(대조)	마니톨=1%	139.6
5일 배양	녹두추출물+난황현탁액 (0.4+0.1%)	마니톨:펩톤=1:0%	208.0
		마니톨:펩톤=0:0.5%	164.5
		마니톨:펩톤=1:0.5%	239.1
	KB(대조)	마니톨=1%	175.7

Pf 균주는 MP 공정에서 마니톨과 녹두추출물을 이용하여 DAPG 유효성분을 생산하는데 중요한 영양원으로 사용하였다. Ba 균주의 대량배양을 위해 탄소원 마니톨과 펩톤이 동시에 사용되는 공정이 사용되었으나, Pf 균주 대량배양에 있어서도 같은 공정이 적용되는지 조사하였다. 녹두추출물과 난황현탁액을 포함하는 MP 기본구성과 마니톨과 펩톤의 구성비율을 조정하면서 유효성분 생산량을 비교분석하였다(표 11). 최종 5일 배양된 후 DAPG의 검출생산량은 Ba 균주 대량배양조건인 MP공정과 같이 마니톨과 펩톤을 1:0.5% 비율로 함유된 공정에서 가장 높은 수준으로 생산되었다. 또한 마니톨만 포함된 조합에서도 KB 대조구와 비교해서 33 mg/kg 더 높은 수준으로 유효성분을 생산하였다. 이 결과들은 마니톨과 펩톤의 탄소원 중에서 마니톨은 DAPG 생산에 있어서 중요한 영양원인 것을 재확인하였다. 또한 배양일에 따른 DAPG의 생산량을 비교한 결과 3일 배양의 함량이 5일 함량에 비해 생산 수준 차이가 유사한 경향을 나타냈다. 따라서 Pf에 대한 MP 공정의 적용은 녹두추출물과 마니톨을 기본 영양원으로 하면서 3일 배양공정에서도 높은 수준의 유효성분을 획득할 수 있는 조건을 확립하였다.

나. MP 배양공정별 배양추출물의 식물체 약해검정

MP 공정의 구성성분과 함량에 의해 배양한 추출물들을 기준량과 배양으로 식물체에 살포하여 약해검정을 수행하였다. 약해검정에 사용된 각 공정별 구성성분은 표 12와 같다. 최종 선발 균주와 후보균주는 각 배지배양공정 구성성분에 따라 제조한 후 28°C에서 5일 배양한 후 상등추출액을 회수한 후 기준량(200배)과 배양(100배)으로 희석하여 5종의 식물체에 대해 관주 및 엽면 살포하였다. 약해검정은 각 상등추출물 100mL을 처리한 후 1, 3, 7일 후에 식물체 경엽의 외관상 이상 유무를 조사하였다.

표 12. MP 공정에 의한 배양추출물의 약해검정을 위한 구성성분 및 함량

균주	시험약제	구성성분(% , v/v)					
		녹두추출물	난황	마니톨	펩톤	식물성오일	yeast extract
Ba	MP1	0.4	0.1	1	1	0.3	0.5
	MP2	0.4	0.1	1	1	0.5	0.5
	MP3	0.4	0.1	1	1	1	0.5
Pf	MP4	0.4	0.1	1	0.1	0.5	-
	MP5	0.4	0.1	1	0.5	0.5	-
	MP6	0.4	0.1	1	1	0.5	-

(1) 시험작물

				
부라보 고추 (아시아 종묘)	청농 치마 아욱 (청농 종묘)	웰빙청치마 상추 (삼성 종묘)	방울 토마토 (아시아 종묘)	백침다다기오이 (다농 종묘)

(2) 약해 대조 : 무처리구를 대조구로 사용

(3) 살포 농도 : 100배, 200배 희석

(4) 토양 정보 : 원예용 상토 60% + 수도용 상토 40%

(5) 시험내용

- 고추, 아욱, 상추, 토마토, 오이 종자: 포트(14cm × 13cm) 사용, 각 처리구별 6개체 3반복

(6) 시험방법 : MP 배양공정별 배양추출액을 기준량 및 배량으로 100ml씩 토양관주 및 엽면살포

(7) 시험법

- 시험작물 재배 : 유리온실에서 포트 재배

- 약제처리방법 : 기준량으로 조제된 약제를 토양 관주 처리 및 엽면살포

처리구	시험약제	처리시기 및 방법	약해
			살포농도 및 살포량 기준량:200배, 배량:100배 -토양관주 : 100ml -엽면살포 : 100ml
공시시료 처리구	MP1 외	정식 후 토양관주 및 엽면살포	-
무처리	무처리		-

- 시험구 배치 : 완전임의배치법

구분	시험작물수	처리구	반복수	반복당 포트수	총 포트수
약해	5	13	3	6	1170

(8) 약해조사 : 공시시료 처리 후 7일간 육안으로 달관 조사 실시

(9) 약해조사기준

약해정도	약해증상
0	육안으로 약해가 인정되지 않음
1	아주 가벼운 약해로서 작은 약반이 약간 인정됨
2	처리된 잎이 적은 부분에 약해가 인정됨
3	처리된 잎의 50%정도 약해가 인정됨
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아있음
5	심한 약해를 받고 고사상태임

(10) 처리 결과

1) 처리내용

시험작물	약 해 시 험		시험약제
	기준량/배량(처리일)		
고추, 아욱, 상추, 토마토, 오이	200배/100배(10/08)		MP1 외
	-		무처리

2) 약제 살포 전후 기상상황 : 실내에서 시험을 진행하였기 때문에 영향을 받지 않았으며, 약해 판정에 영향을 줄 기상변화는 없었음.

3) 조사방법

구 분	조 사 항 목	조사회수	조 사 일 자	조 사 방 법
비 해	외관상 피해유무	3	10/09, 11, 15	약제처리 후 1, 3, 7일 후 경엽의 외관상 약해 유무 달관조사

4) 시험성적

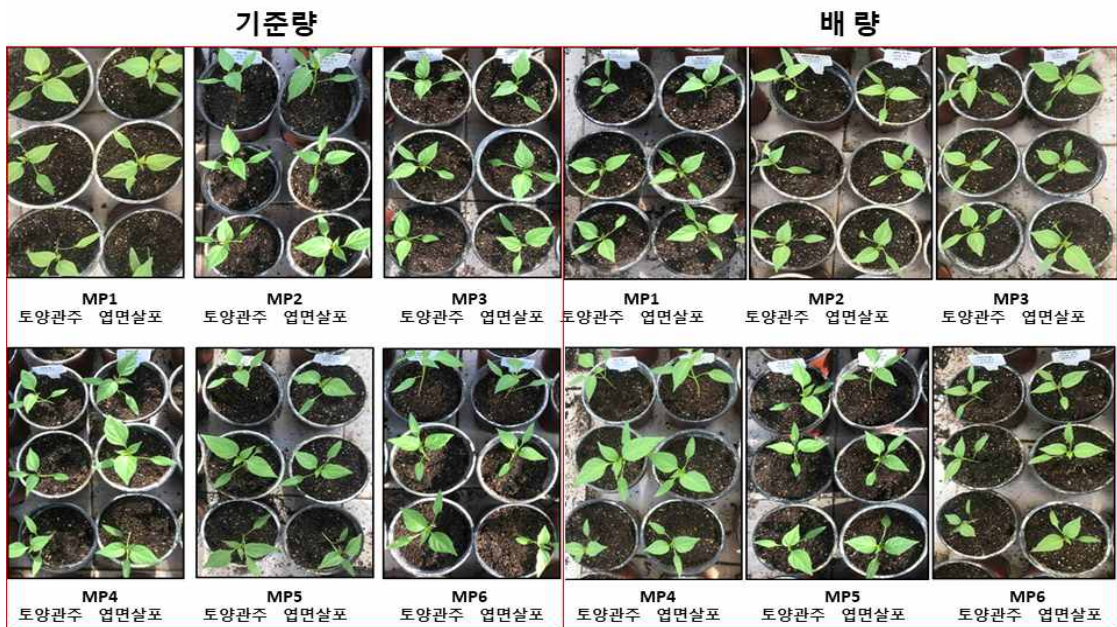
시험약제	시험작물	약해정도 (0~5)		비 고
		기 준 량	배 량	
MP1 외	고추	0	0	약해없음
	아욱	0	0	
	상추	0	0	
	토마토	0	0	
	오이	0	0	

5) 엽수 조사

시험약제	시험작물	엽수 (처리후 7일)		비 고
		기 준 량	무처리	
MP1 외	고추	4	4	무처리구 대비 엽수 차이없음
	아욱	4	4	
	상추	5	5	
	토마토	2	2	
	오이	2	2	

※ 처리사진

[고추]



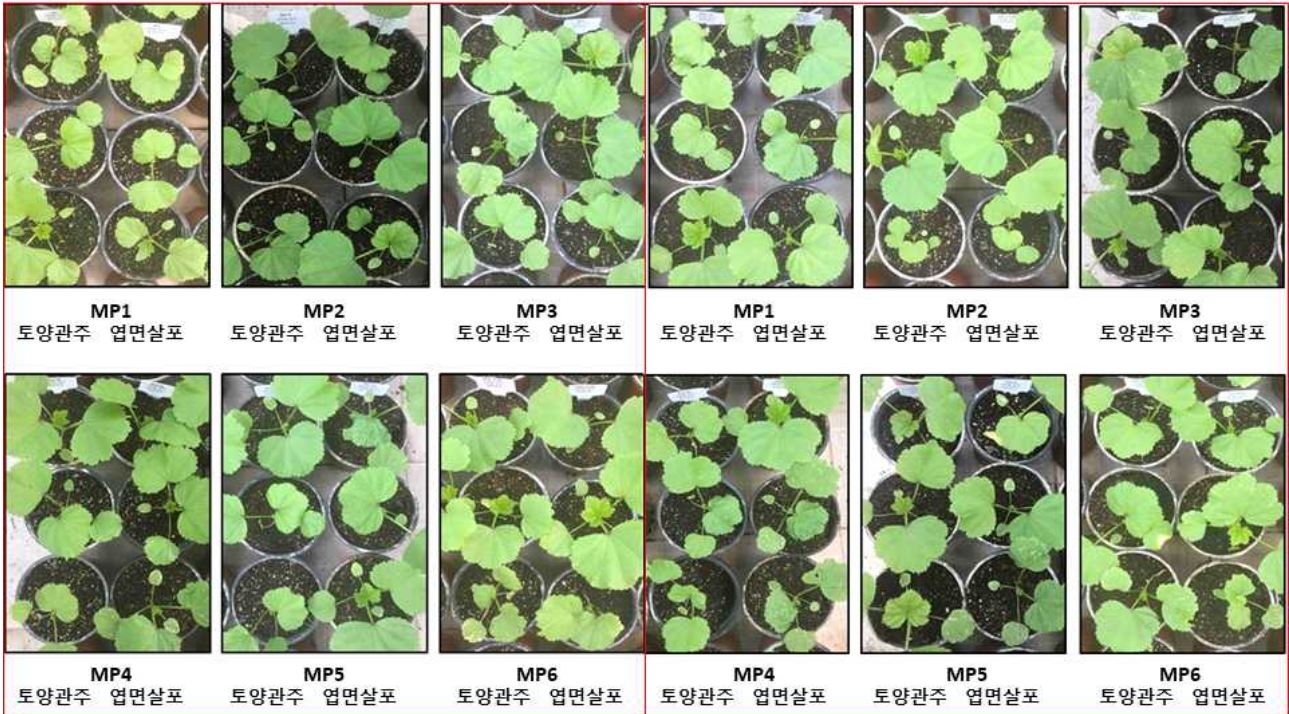
[상추]



[아욱]

기준량

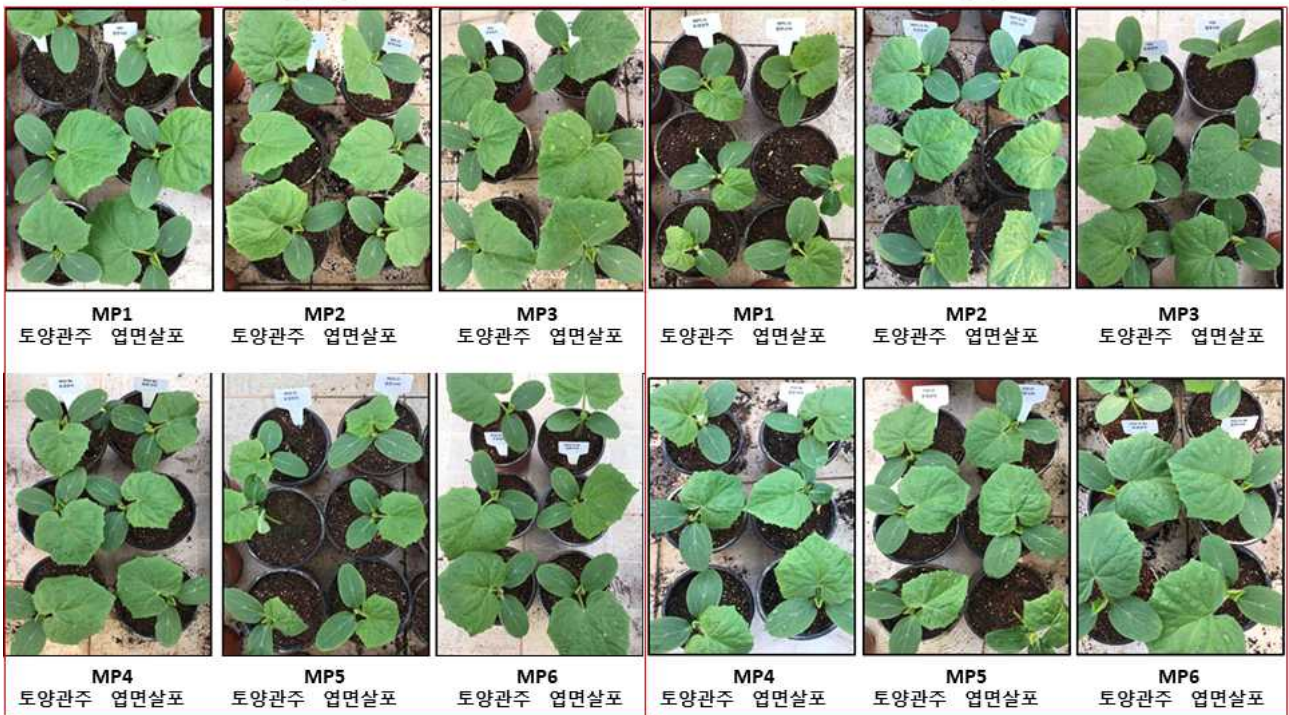
배량



[오이]

기준량

배량



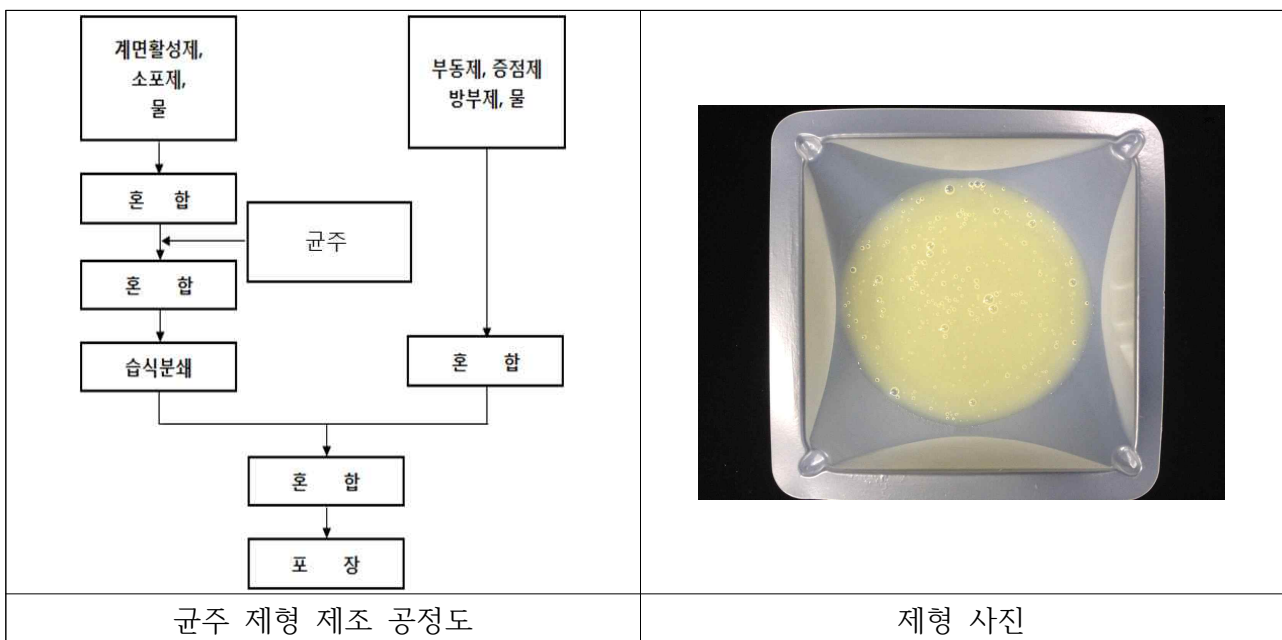
다. 대량배양에 의한 시제품 제작 및 유효성분 분석

1. 균주 대량배양에 의한 시제품 제작을 위한 소포장 액상 제형 제조

제 1세부과제에서 개발한 균주의 유효성분 물질인 DAPG와 리포펩타이드가 생산되는 대량배양 공정에 맞춰 소포장 제작하였다. 유효성분의 대량배양과 추출을 위해 수용해도가 수ppm 정도로 낮은 원제를 물에 미립자형태로 분쇄 또는 현탁시킨 액상의 제형화 공정에 준해서, 배양조성의 주성분인 마니톨, 난황 현탁액, 녹두 추출물이 포함된 MP 배양공정을 사용하였다. 또한 유박추출물은 대량배양공정에서 쉽게 이용할 수 있는 펩톤으로 대체하였으며, 그 외 분산/습윤제 적량, 저온 안정성 확보를 위한 동결방제제 일부, 유효성분의 층분리 방지를 위해 증점제를 사용하였다. 이외에 거품 발생을 방지하기 위해 소포제 일부, 부패방제를 위한 방부제를 사용하여 생물검정을 위한 기초 제형을 제작하였다(표 13).

표 13. 개발 균주의 대량배양에 의한 액상 제형 제조 처방전

Role	Composition	Input(%)	Form
원제	균주 배양추출액	60.0	황색/우윳빛 액상
계면활성제	습윤/분산제	3.0	무색 액상
보조제	보존제	rest	연황색 분상
	부동제		무색 액상
	증점제		황색 분상
Total		100.0	-

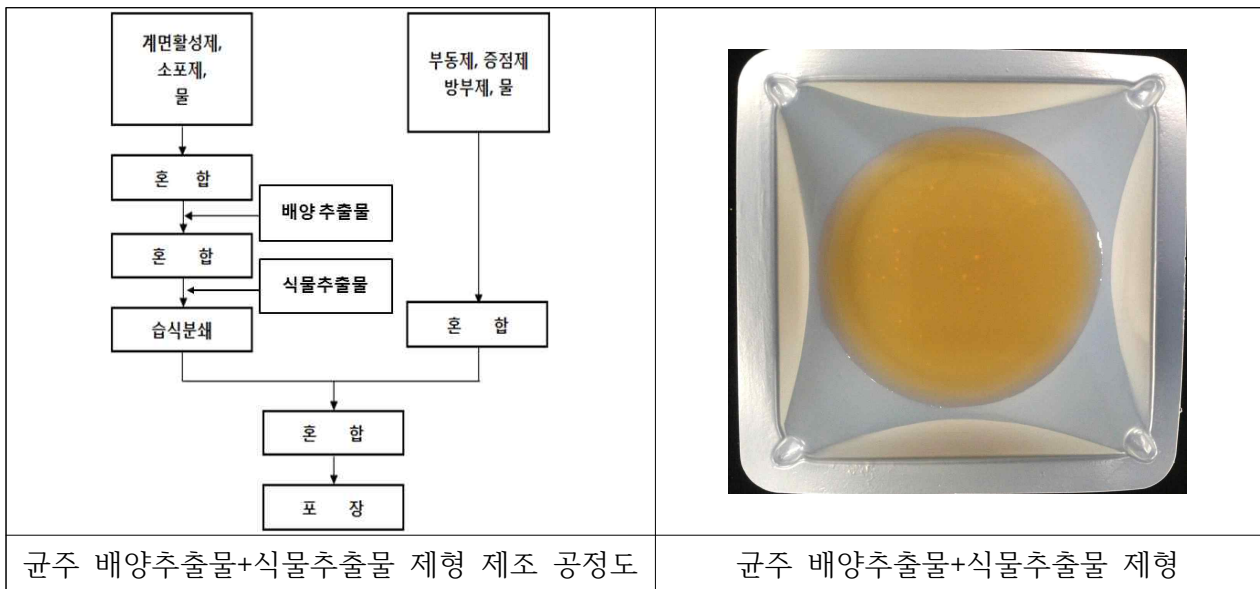


2. 균주 대량배양 추출물과 식물추출물 혼합에 소포장 액상 제형 제조

균주 배양추출물과 식물추출물을 혼합한 제형 제조를 위해 두 원제간 혼합 후 계면활성제를 물에 충분히 분산 후 유효성분을 혼합한 후 부동제에 증점제를 균일하게 분산시킨 다음 방제제 및 물을 사입 후 최종적으로 원제 혼합부:식물추출물을 60:10으로 혼합한 후 제형을 검토하였다 (표 14).

표 14. 균주 배양추출액+식물추출물 소포장 액상 제조 처방전

Role	Composition	Input(%)	Form
원제	균주 상등추출액	60.0	황색 액상
	식물추출물	10.0	갈색 액상
계면활성제	습윤/분산제	3.0	무색 액상
보조제	보존제	rest	연황색 분상
	부동제		무색 액상
	증점제		황색 분상
Total		100.0	-



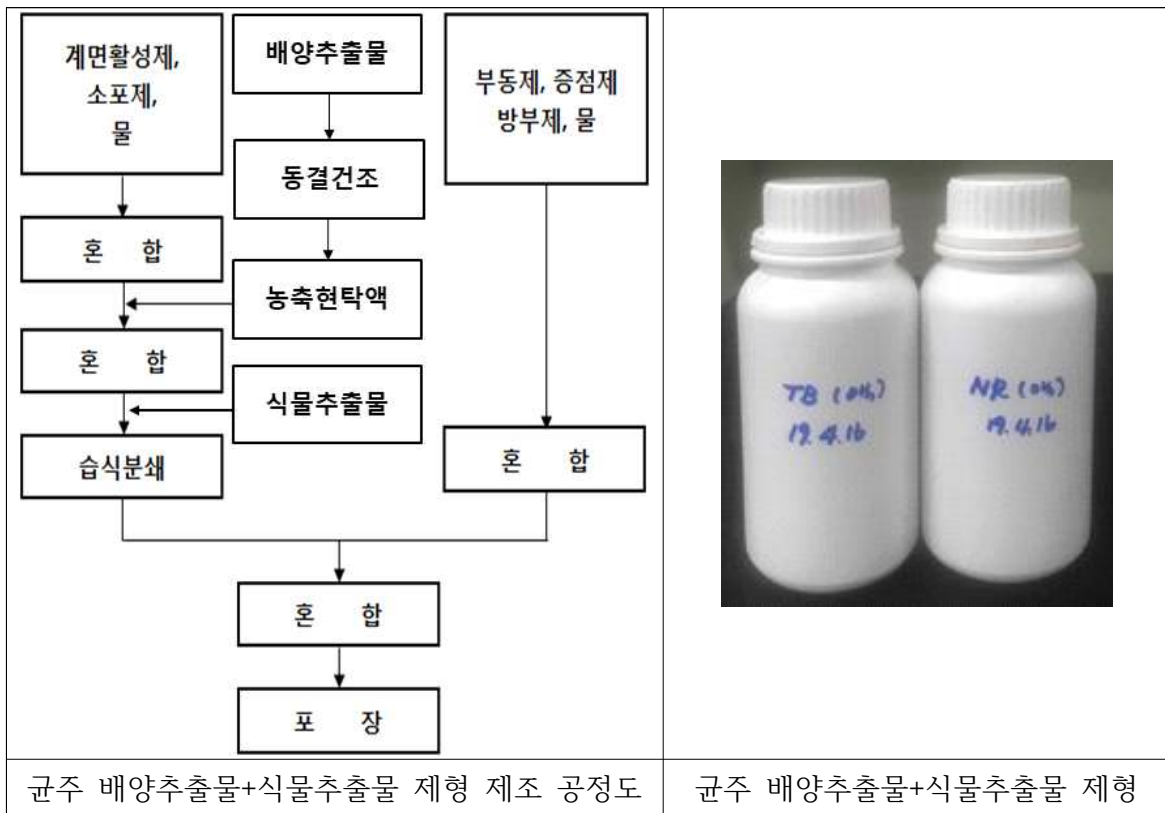
3. 최종 후보물질 추출조건에 의한 액상 시제품 제작

제 1세부과제에서 개발한 배양공정에 의한 배양된 균주2의 상등추출 농축현탁액과 로테논: 님오일 또는 담배잎차(니코틴)과 혼합하여 액상 형태의 시제품 2종과 입상 형태의 시제품 2종을 제작하였다. 액상 시제품 2종은 녹두추출물:펩톤:레시틴:마니톨+오일+1% yeast extract을 주 영양원으로 5일 배양된 Ba 균주의 상등추출 농축현탁액 30%와 10%의 담배잎차 추출물을 혼합한 TB와 균주 상등추출 농축현탁액 30%와 10% 로테논:님오일 혼합한 NR을 제작하였다(표 15). 균주와 식물추출물의 원제 혼합을 위해 계면활성제를 물에 충분히 분산 후 유효성분을 혼합한 후

부동제에 증점제를 균일하게 분산시킨 다음 방제제 및 물을 사입 후 최종적으로 원제 혼합부:식물추출물을 30:10으로 혼합한 후 제형을 검토하였다. 원제들과 보조제 혼합 후 증점제를 혼입하여 최종적으로 액상 시제품을 제작하였다.

표 15. 균주 배양추출액+식물추출물 액상 시제품 제형 제조 처방전

Role	Composition	Input(%)	Form
원제	Ba 상등추출액	30.0	황색 액상
	식물추출물	10.0	갈색 액상
계면활성제	습윤/분산제	5.0	무색 액상
보조제	보존제	1.5	연황색 분상
	부동제	5.0	무색 액상
	증점제	0.2	황색 분상
증량제	증량제	rest	무색 분상
Total		100.0	-



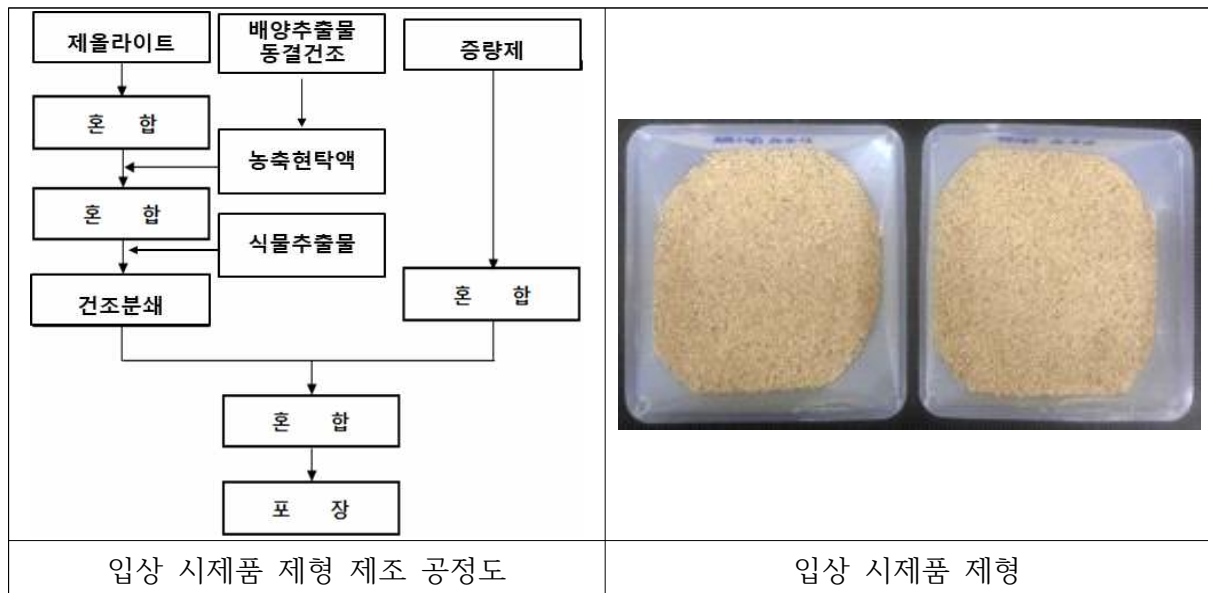
4. 최종 후보물질 추출조건에 의한 입상 시제품 제작

입상 시제품 2종의 시제품을 제작하기 위해서 MP 공정에 의한 녹두추출물:펩톤:레시틴:마니톨+오일+1% yeast extract을 주 영양원으로 5일 배양된 Ba 균주의 상등추출액을 사용하였다.

상등추출액은 동결건조에 의한 농축과정을 통해 현탁액 제조로 사용하였다. 미생물 농축현탁액 15%와 5%의 담배잎차 추출물을 혼합한 TB와 로테논:님오일 추출물을 혼합한 NR을 최종적으로 검토하였다(표 16). 입상의 기본재료는 제올라이트를 사용하였으며, 액상 시제품의 공정과 달리 각 원제들의 함유량을 50% 반감함으로써 입상 제품의 제조함량 비율을 조절하였다. 혼합과정에서 증량제 10%를 최종적으로 혼입함으로써 제품을 제작하였다.

표 16. 균주 배양추출액+식물추출물 입상 제형 제조 처방전

Role	Composition	Input(%)	Form
원제	Ba 상등추출액	15.0	황색 액상
	식물추출물	5.0	갈색 액상
보조제	제올라이트	70.0	회색 고상
증량제	증량제	rest	무색/백색 분상
Total		100.0	-



5. 액상 시제품의 약해시험

액상 시제품 2종에 대해 약해를 검정하기 위하여 5작물 (배추, 상추, 시금치, 알타리무, 아욱) 종자를 70% 에탄올에 소독 후 멸균상태에 파종하였다. 발아된 각 유묘를 포트에 정식한 후 2~3 엽기에 공시시료를 희석 농도별로 엽면살포 처리한 후 1, 3, 7일 후 경엽의 외관상 약해유무를 달관 조사하였다(표 17, 그림 3). 액상 시제품 2종의 약해를 검정하기 위하여 5작물 (배추, 상추, 시금치, 알타리무, 아욱)에 대하여 약해 검정을 한 결과 NR 액상 100배액으로 희석하여 살포한 모든 처리구에서 약해 증상은 없었으며, 그 외 250배와 추천 사용농도 500배에서도 전혀 약해가 발생하지 않았다. TB 액상 시제품은 100배에서도 식물체에 약해 발생은 없었다.

표 17. 액상 시제품의 식물체에 대한 약해 조사

시험약제	시험작물	희석농도별 약해정도 (0~5)		
		100배	250배(배량)	500배(기준)
NR 액상	배추	0	0	0
	상추	0	0	0
	시금치	0	0	0
	알타리무	0	0	0
	아욱	0	0	0
TB 액상	배추	0	0	0
	상추	0	0	0
	시금치	0	0	0
	알타리무	0	0	0
	아욱	0	0	0

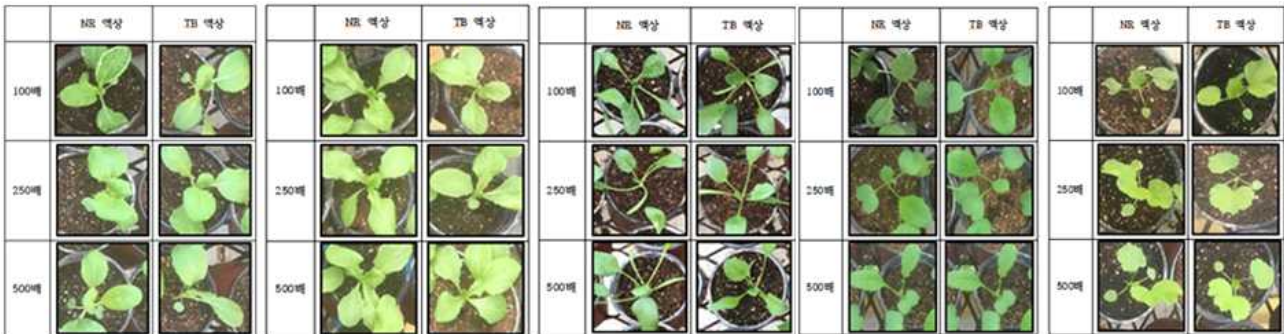


그림 3. 액상 시제품의 식물체에 대한 약해 조사

6. 입상 시제품의 약해시험

입상 시제품 2종에 대해 약해를 검정하기 위하여 5작물 (배추, 상추, 시금치, 알타리무, 아욱) 종자를 70% 에탄올에 소독 후 멸균상태에 파종하였다. 발아된 각 유묘를 포트에 정식한 후 2~3 엽기에 공시시료를 포트에 정식하였다. 정식할 때 공시시료를 각 처리농도별로 토양과 혼합 처리한 후 5, 10, 15일 후 경엽의 외관상 약해유무를 달관 조사하였다(표 18, 그림 4). 입상 시제품 2종의 약해를 검정하기 위하여 5작물 (배추, 상추, 시금치, 알타리무, 아욱)에 대하여 약해 검정을 한 결과 NR과 TB 입상 시제품 기준량과 배량, 반량 모두 약해가 발생하지 않았다.

표 18. 입상 시제품의 식물체에 대한 약해 조사

시험약제	시험작물	희석농도별 약해정도 (0~5)		
		4.5g/m ² (반량)	9.0g/m ² (기준)	18g/m ² 배(배량)
NR 입상	배추	0	0	0
	상추	0	0	0
	시금치	0	0	0
	알타리무	0	0	0
	아욱	0	0	0
TB 입상	배추	0	0	0
	상추	0	0	0
	시금치	0	0	0
	알타리무	0	0	0
	아욱	0	0	0

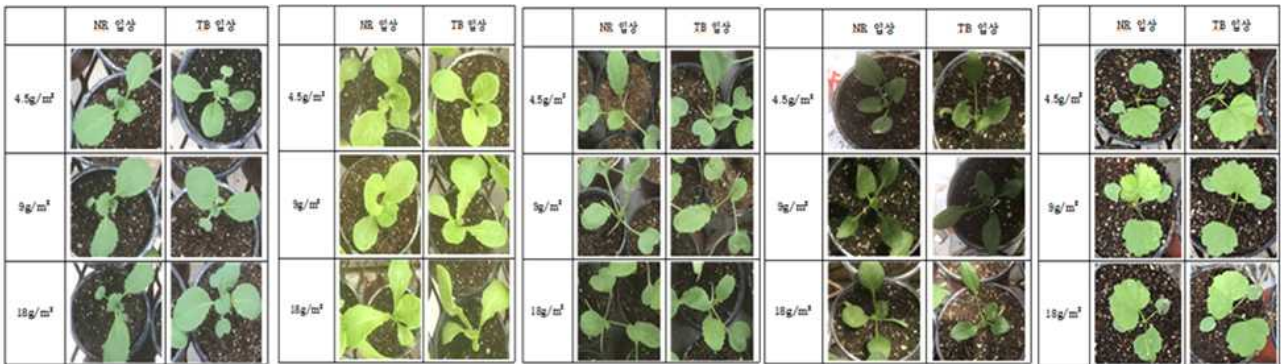


그림 4. 입상 시제품의 식물체에 대한 약해 조사

7. 시제품의 유효성분 함량 분석

(1) Iturin A 유효성분 분석

○ 유효성분 분석 조건 (Iturin)

LC-MS/MS analysis

Instrument: Simadzu LC8040

Column: SHISEIDO C₁₈(2.7um, 2.1 mm * 150 mm)

Column temperature : 40°C

Mobile phase:

Pump A: 0.1% acetic acid in water

Pump B: 0.1% acetic acid in Acetonitrile

Isocratic elution (A:B=60:40, v/v) for 20 min

Injection vol.: 5ul

Flow rate: 0.3 ml/min

Precursor : 1044.45

Product-1 : 747.85

Product-2 : 253.95

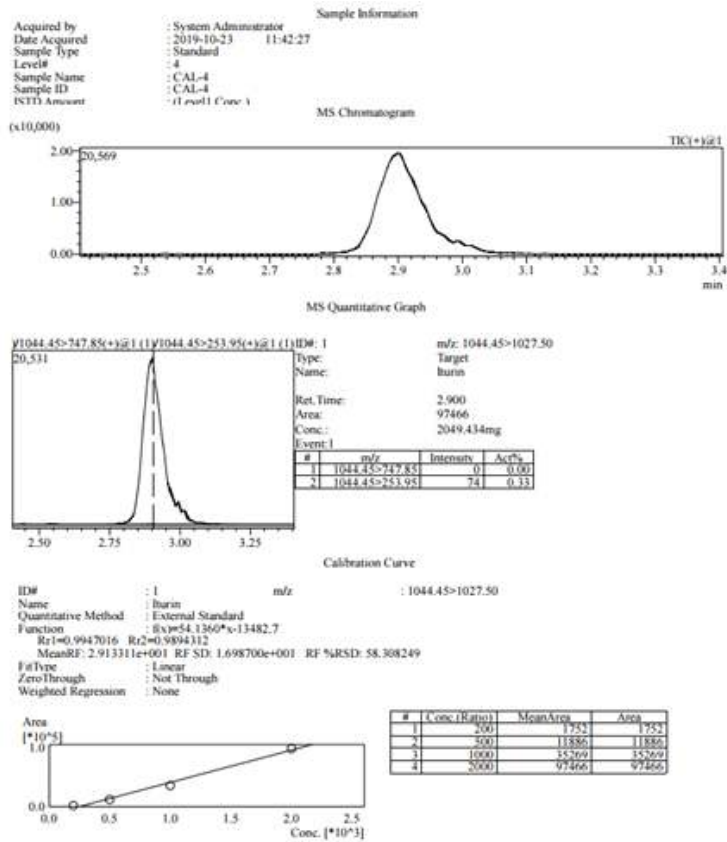


그림 5. Iturin standard calibration

각 표준액을 농도별로 희석하여 LC-MS/MS로 측정 후 얻어진 크로마토그램상의 peak 면적을 검량선과 비교하여 정량하였다. 표준품을 각각 용매에 용해하여 1,000 mg/L의 stock solution을 조제하였다. 이를 단계별로 희석하여 0.005, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L의 working solution을 조제하여 각각 LC-MS/MS로 측정 후 얻어진 크로마토그램상의 peak 면적을 기준으로 검량선을 작성하였다. 검출농도는 다음과 같이 계산하여 표기하였다.

$$\text{검출농도}(mg/kg) = \text{기기검출량}(ug/ml) \times \frac{\text{추출용매량}(ml)}{\text{시료량}(g)} \times \frac{\text{희석부피}(ml)}{\text{분취량}(ml)} \times \frac{\text{희석부피}(ml)}{\text{분취량}(ml)}$$

표 19. 시제품의 유효성분 Iturin 함량 분석

	NR 액상	TB 액상	NR입상	TB입상
Iturin(mg/kg)	0.303	0.292	0.131	0.132

각 시제품 제형들의 유효성분인 iturin을 LC-MS/MS로 분석하여 검출량을 계산한 결과 농축현탁액에 의한 식물추출물 혼합 제형에서 각 시제품간에 평균적인 함량이 검출되었다(표 19, 그림 6, 그림7). 또한 액상 시제품에서 입상 시제품보다 검출량이 더 높은 결과가 나타났다.

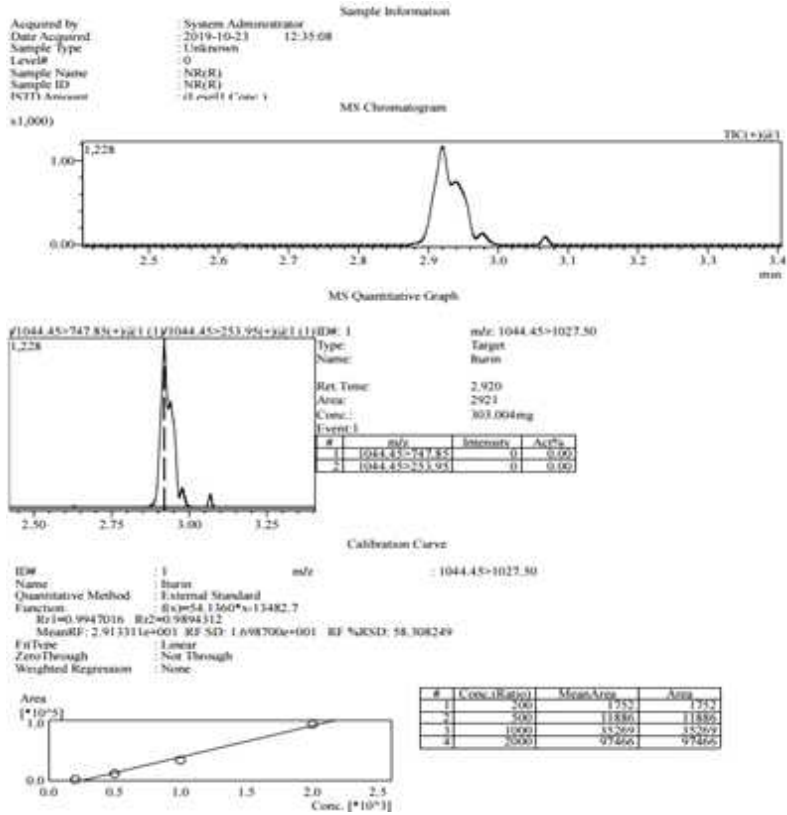


그림 6. NR 시제품 액상의 iturin 함량 분석

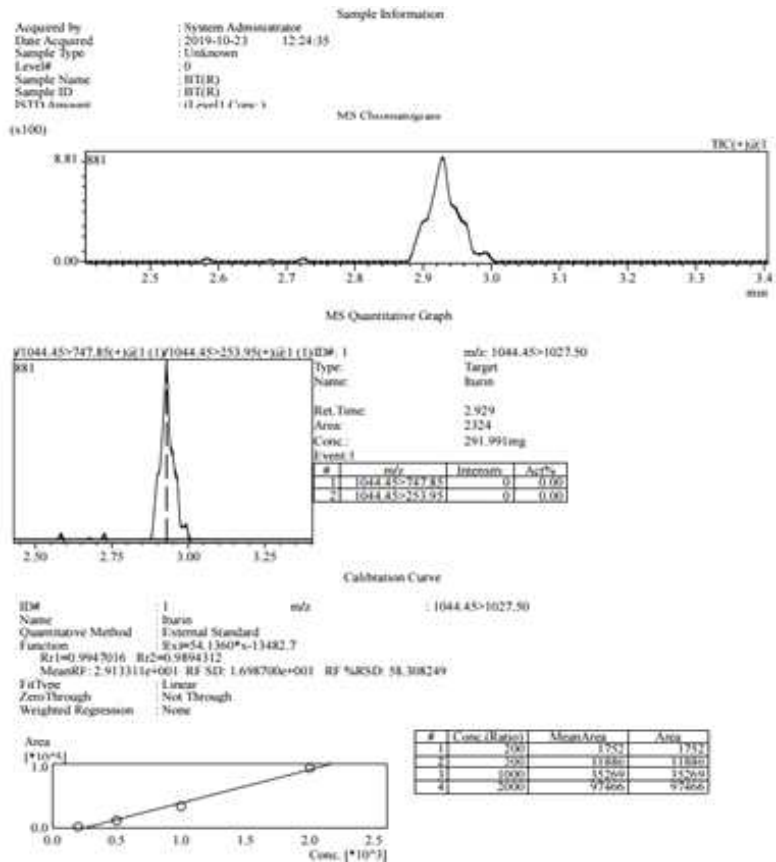


그림 7. TB 시제품 액상의 iturin 함량 분석

(2) Fengycin 유효성분 분석

○ 유효성분 분석 조건 (Fengycin)

LC-MS/MS analysis

Instrument: Simadzu LC8040

Column: SHISEIDO C₁₈(2.7um, 2.1 mm * 150 mm)

Column temperature : 40°C

Mobile phase:

Pump A: 0.1% acetic acid in water

Pump B: 0.1% acetic acid in Acetonitrile

Isocratic elution (A:B=60:40, v/v) for 20 min

Injection vol.: 10ul

Flow rate: 0.3 ml/min

Product-1 : 1489.8

Product-2 : 746.45

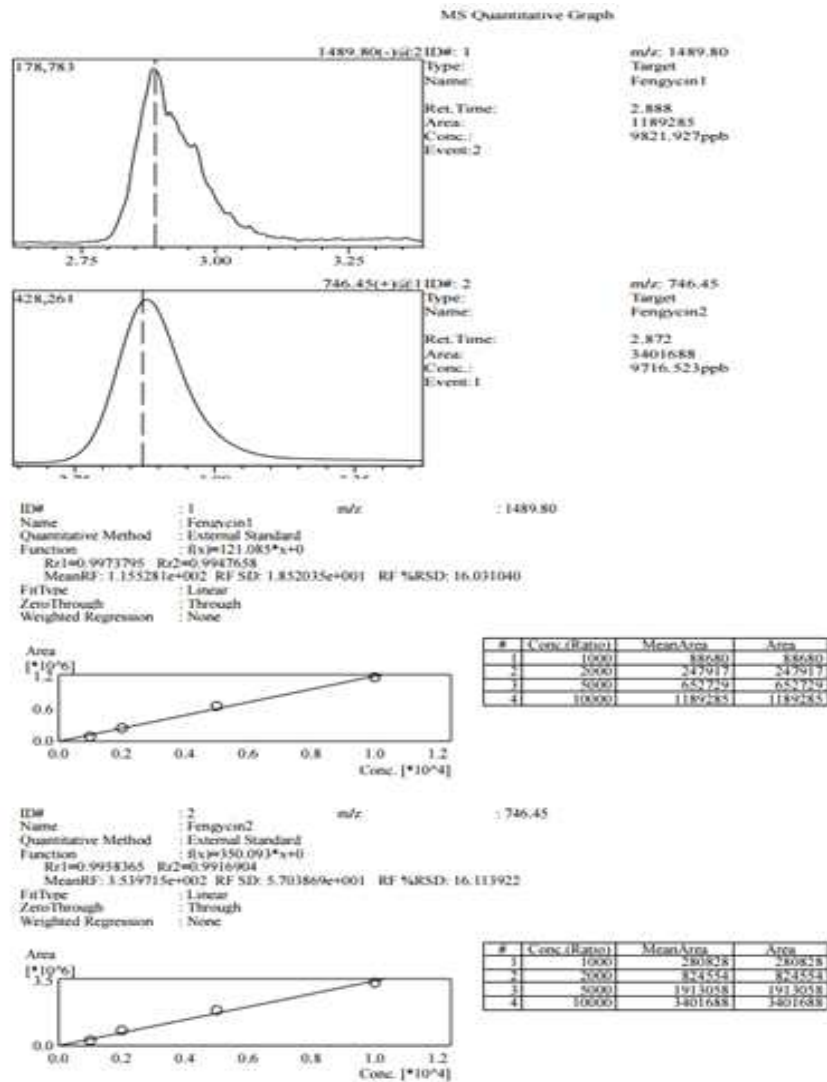


그림 8. Fengycin STD Calibration

표 20. 시제품에서 유효성분 Fengycin 함량 측정

	NR 액상	TB 액상	NR입상	TB입상
Fengycin(mg/kg)	8.4	8.6	1.6	1.2

각 표준액을 농도별로 희석하여 LC-MS/MS로 측정된 후 얻어진 크로마토그램상의 peak 면적을 검량선과 비교하여 정량하였다. 각 시제품 제형들의 유효성분인 fengycin을 LC-MS/MS로 분석하여 검출량을 계산한 결과 입상 시제품은 액상 시제품보다 fengycin의 함량이 더 낮았다(표 20, 그림 9). 또한 TB 액상 시제품보다는 NR 액상 시제품이 더 낮은 결과가 나타났지만, 각 시제품별 평균적인 함량이 검출되었다.

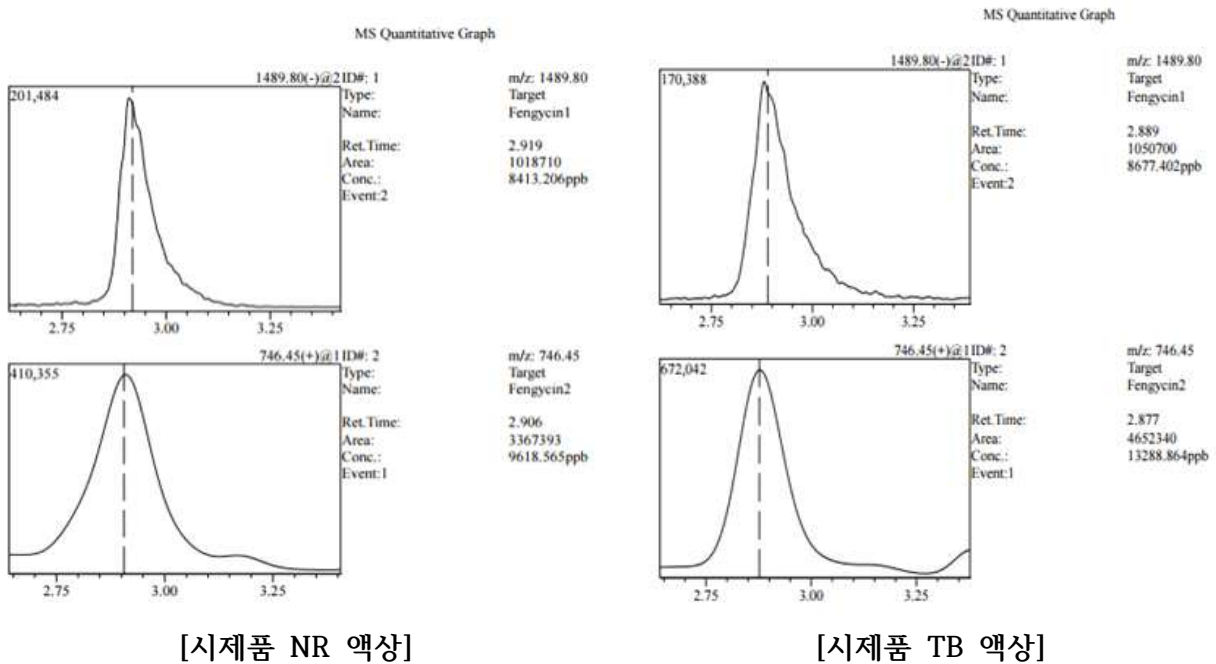


그림 9. 시제품의 Fengycin 함량 분석

라. 시제품 병해충 방제효과 포장 검정

1. 시제품 방제효과 검정 포장내 병해충 수집 및 토양내 밀도변화 조사

전남 담양, 광주 등 토마토, 딸기 재배농가 일대를 중심으로 시들음병, 점박이응애 등을 수집하였고, 토양에서 시들음병원균의 유무를 조사하고자 Komada배지에서 병원균을 분리하였다. 토양내 미생물상 조사와 이병식물에 대해 병원균을 분리하는 다음과 같다.

①토양 미생물상 조사 : 포장당 3지점에서 샘플링한 토양을 건조한 후 10g을 멸균수 100ml에

희석하여 10배씩 희석한 후 *Fusarium* spp. 선택배지인 komada 배지에서 도말하여 26°C, 72시간 배양 함.

Ingredient	1 L	500 ml
Part 1		
Distilled water	1000 ml	500 ml
Na ₂ B ₄ O ₇ ● 10H ₂ O	1 g	0.5 g
K ₂ HPO ₄	1 g	0.5 g
KCl	0.5 g	0.2 g
MgSO ₄ ● 7H ₂ O	0.5 g	0.25 g
Fe-Na-EDTA	0.01 g	0.005 g
D-Galactose	20 g	10 g
L-Asparagine	2 g	1 g
Agar	15 g	7.5 g
Part 2		
PCNB (Pentachloronitrobenzene)(Terraclor 75%)	1 g	0.5 g
Oxgall (Bile Bovine)	0.5 g	0.25 g
Streptomycin sulfate	0.3 g	0.15 g

② 균주 확보

: 배양된 각 균주들에서 병원균을 분류 및 동정하기 위해 plate에서 성장한 우점 균주를 PDA배지에서 순수 분리하였으며 26°C, 72시간 배양하여 순수한 균주만 획득하였음.

③ Total DNA추출

: Genomic DNA extraction kit를 이용한 Total DNA 추출

④ 18S rRNA 증폭

- i 18S rRNA 부위의 primer를 이용한 PCR 증폭
- ii primer sequence
 - Forward : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
 - Revers : 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'
- iii PCR program
 - 94°C : 30초
 - 55°C : 30초
 - 72°C : 1분, 30 cycle

⑤ PCR product cloning

: PGEM-T easy vector를 이용한 cloning 후 E.coli에 transformation

⑥ Plasmid 추출

: E.coli를 재배양한 후 plasmid 추출

⑦ 염기서열 분석 및 균주 동정

: 자동 염기서열 분석기(Automatic DNA sequencer : ABI prism 377)를 이용한 18S rRNA 염기서열 분석 의뢰

: NCBI의 유전자 data base를 이용한 염기서열 상동성 분석

: DNA STAR program을 이용한 Gene identity와 Phylogenic tree를 분석하여 유사도 측정

(1) 전남 담양 토마토 농가

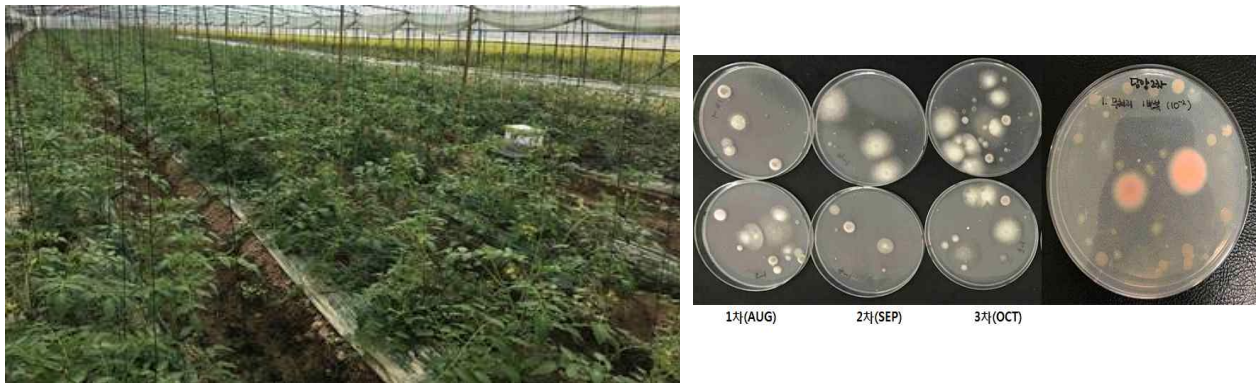


그림 10. 전남 담양군 시들음병 발생 토마토 포장에서 미생물상 조사

```
>gb|KJ562372.1| Fusarium oxysporum isolate Fox59 18S ribosomal RNA gene, partial
sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal
RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence;
and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=569

Score = 1005 bits (544), Expect = 0.0
Identities = 555/560 (99%), Gaps = 1/560 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  8  TCFCGTTGGTGACCAGCGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAA  67
      |||
Sbjct  8  TCFCGTTGGTGACCAGCGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAA  67

Query  68  CATAACCCTTGTGCTCGCGGATCAGCCCGCTCCCGTAAACCGGACGGCCCGCCAG  127
      |||
Sbjct  68  CATACCAATTGTGCTCGCGGATCAGCCCGCTCCCGTAAACCGGACGGCCCGCCAG  127

Query  128  AGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAACCATAAATAAATCAAAA  187
      |||
Sbjct  128  AGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAACCATAAATAAATCAAAA  187

Query  188  CTTTCAACAAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGACAAAATGCGATAAG  247
      |||
Sbjct  188  CTTTCAACAAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGACAAAATGCGATAAG  247

Query  248  TAATGTGAATGTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCCA  307
      |||
Sbjct  248  TAATGTGAATGTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCCA  307

Query  308  GTATCTGGCGGGCATGCGTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCTCGGGTTTGGT  367
      |||
Sbjct  308  GTATCTGGCGGGCATGCGTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCTCGGGTTTGGT  367

Query  368  GTTGGGGATCGGCGAGCCCTTGCGGCAAGCCGSCCCCGAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTG  427
      |||
Sbjct  368  GTTGGGGATCGGCGAGCCCTTGCGGCAAGCCGSCCCCGAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTG  427

Query  428  CAGCCTCCATTGCGTAGTAGTAAACCCCTCGCAACTGGAACGCGGCGCGGCAAGCCGTT  487
      |||
Sbjct  428  CAGCCTCCATTGCGTAGTAGTAAACCCCTCGCAACTGGAACGCGGCGCGGCAAGCCGTT  487

Query  488  AAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGC  547
      |||
Sbjct  488  AAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGC  547

Query  548  ATATCAATAAGCCCGAGGAA  567
      |||
Sbjct  548  ATATCAATAAGC-GGAGGAA  566
```

그림 11. 전남 담양군 시들음병 발생 토양에서 병발생 원인균의 동정 (*Fusarium oxysporum*)

토마토 시들음병 발생농가(광주, 담양)에서 작물 생육기별 토양을 채취한 후 65도 Dryoven에서 3일동안 건조시켰다. 건조된 10g의 토양을 멸균수에 희석한 후 Fusarium 선택배지인 komada 배지에 도말 후 26도 5일 배양하여 해당병원균의 cfu를 측정하였다(그림 14). 각 포장에서 측정된 병원균의 밀도는 정식 후 생육기 동안에 밀도가 증가하였으며, 수확기 후반에는 밀도가 감소하는 경향을 나타냈다.

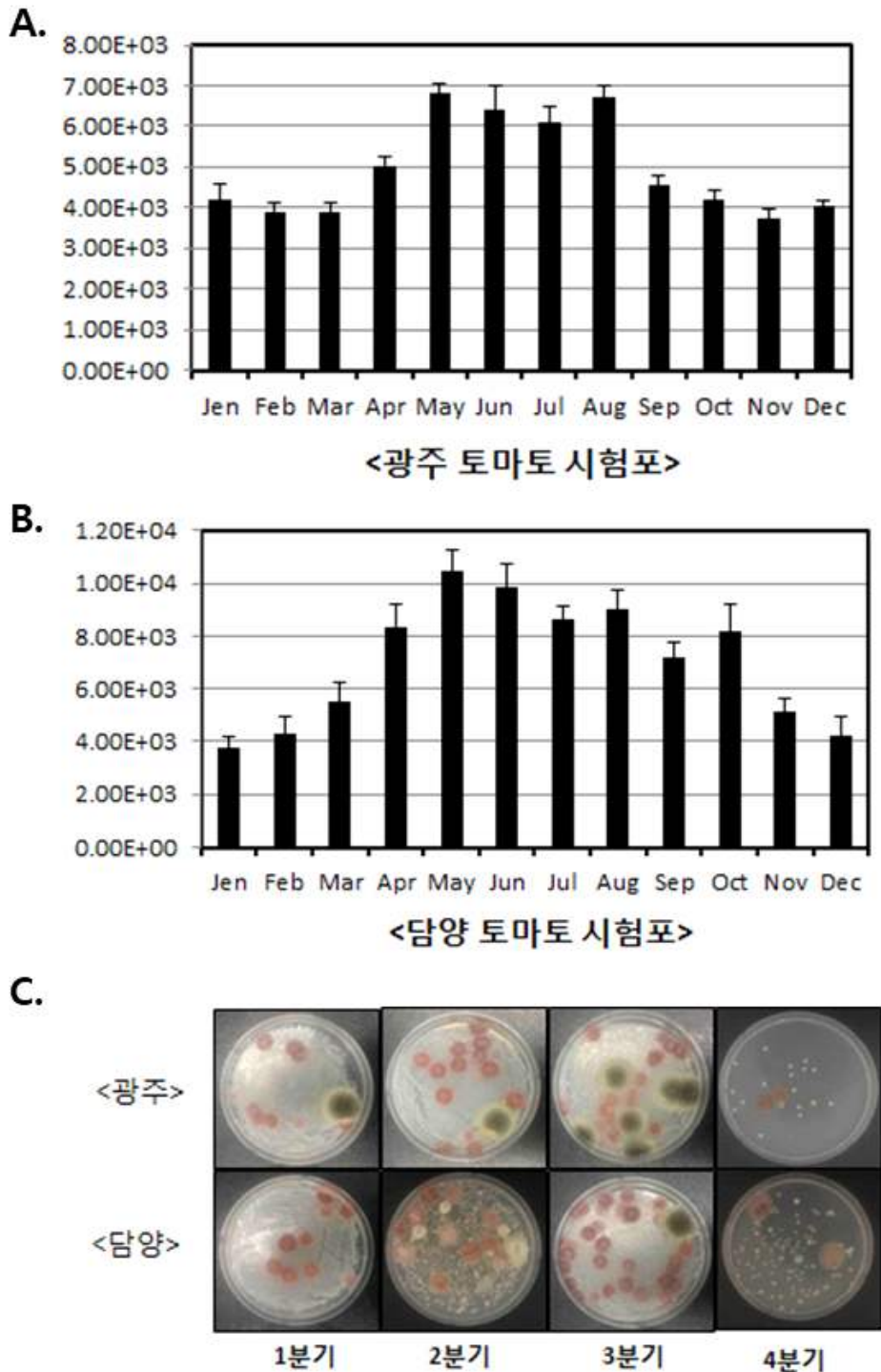


그림 14. 시험포 토양내 토마토 시들음병 밀도조사

2. 시제품 방제효과 적용확대 검정

(1) 고추 모잘록병에 대한 시제품 효과검정

액상 시제품 2종과 입상 시제품 2종의 고추 모잘록병에 대한 효능을 포트에서 검정하였다(그림 15). 고추 종자(품종: 청양)를 70% 에탄올에 종자소독을 하고 멸균된 상토에 파종 후 14일 후 발아된 유묘를 4x4 tray에 정식하였다. 정식 전에 입상 시제품 제형은 9g/m² 로 토양혼화 처리하였으며, 액상 시제품 제형은 고추 유묘에 500배 농도로 희석하여 주당 10ml씩 관주 처리하였다. 병원균인 *Pytium ultimum*은 PDA에서 7일간 배양한 후 5×5mm의 agar plug들을 상토와 혼합하였다. 병원균이 첨가된 상토를 25°C에서 2일 동안 보관한 후 트레이에 옮긴 후 발아된 고추 유묘를 트레이에 정식하였다. 각각의 제형 시제품을 처리 후 5~10일 뒤 모잘록 이병주율을 검정하였다. 각 처리는 8주씩 3반복 실시하였다.

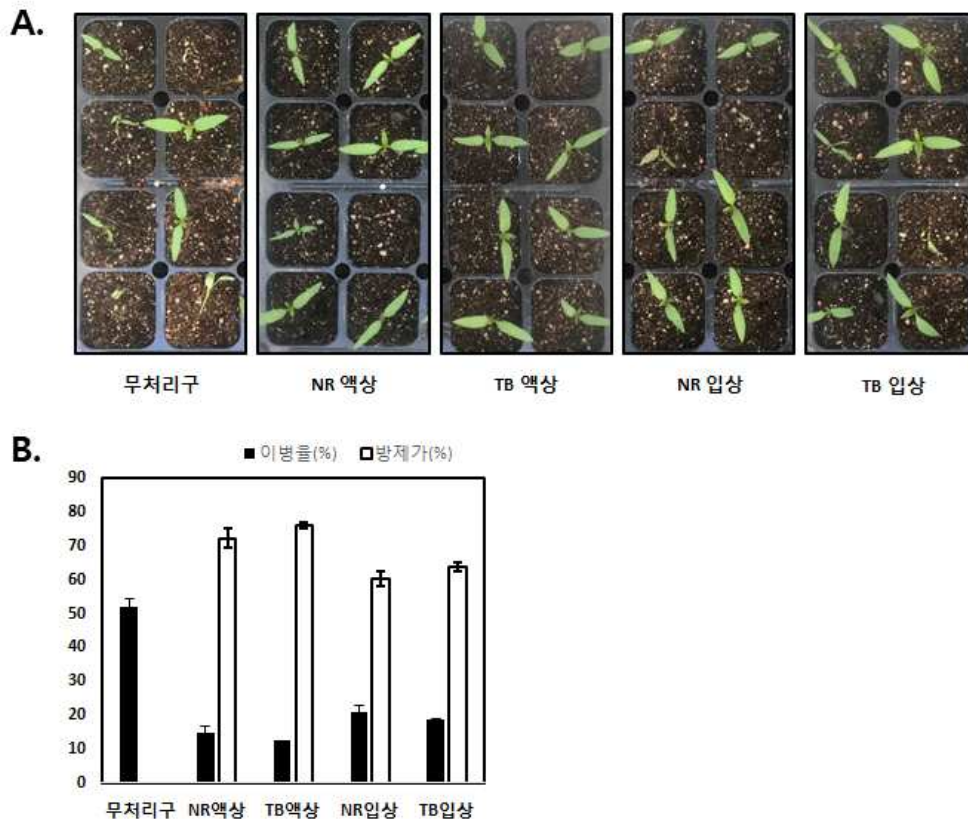


그림 15. 고추 모잘록병에 대한 액상 및 입상 시제품의 효능 효과 검정

액상 및 입상 시제품의 고추 모잘록병에 대한 효능을 검정한 결과 NR 액상 시제품의 경우 무처리구와 비교하여 14.5%의 발병율로 약 72.2%의 방제효과가 있었다. TB 액상은 모잘록병에 대해 12.5% 발병하였으며 75.9%의 방제가를 얻었다. 두 결과간 통계적인 유의성은 없는 것으로 판단되어 진다. NR 입상시제품의 경우 무처리구와 비교하여 20.8% 발병하였으며, 약 60.2% 방제효과가 있었다. TB 입상시제품은 18.7% 발병하였으며 63.9%의 방제가를 나타내었으나 두 결과에서도 서로간의 유의성이 없음을 확인하였다. 시제품 입상과 액상의 고추 모잘록병에 대한 방제효과는 입상보다는 액상 시제품의 방제효과가 더 높았음을 확인하였다.

(2) 제형별 시제품의 살포농도 및 회수별 방제효과 검정

액상 시제품 2종에 대한 고추 모잘록병에 대하여 방제 회수별 방제효과를 검정하기 위하여 위의 검정방법과 같이 70% 에탄올에 종자소독을 하고 멸균된 상토에 파종 후 7일 후 발아된 유묘를 4x4 tray에 정식하였다(그림 16). 정식 때부터 공시시료들을 500배 농도 희석액을 주당 10 ml씩 2일 간격 3회 관주처리 하였으며, 병원균인 *P. ultimum*은 PDA에서 7일간 배양한 후 구당 5x5mm의 agar plug를 상토에 첨가시킨 후 고추 유묘를 정식하였다. 정식 후 10일 후부터 이병을 및 방제가를 조사하였다.

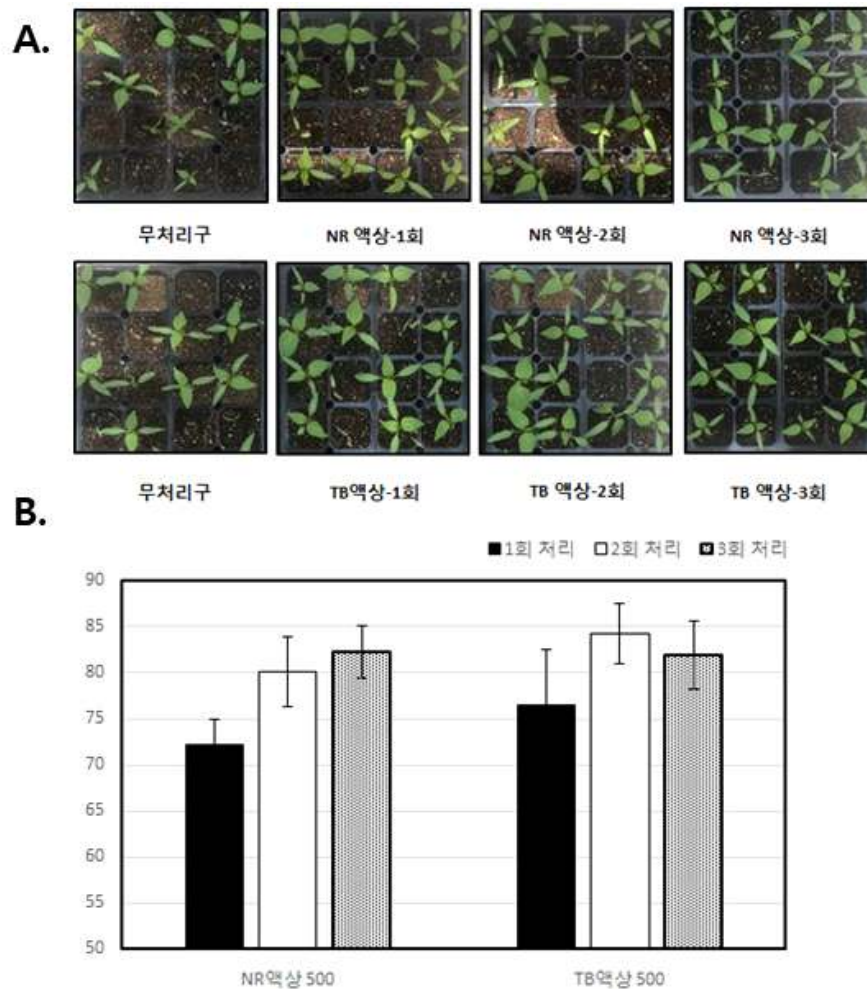


그림 16. 고추 모잘록병에 대한 시제품의 방제 회수별 효능 효과 검정

제작된 시제품의 고추 모잘록병에 대한 효능을 처리 횟수별로 검정한 결과 1회 처리시 NR 액상의 경우 무처리구와 비교하여 약 72.2%, TB액상의 경우 76.4%의 방제가를 나타내었으나 두 결과간 유의성은 없었다. 2회 처리시 NR액상의 경우 무처리구와 비교하여 약 80.1%, TB액상의 경우 84.3%의 방제가를 나타내어 1회 처리보다는 유의성 있는 수준에서 방제가가 향상되었음을 확인하였으며, 최종적으로 3회 처리시 NR액상의 경우 무처리구와 비교하여 약 82.2%, TB액상의 경우 81.9%의 방제가를 나타내어 2회 처리시와 비교하여 증진 효과는 없었다.

(3) 딸기 시들음병에 대한 시제품 효과검정

액상 시제품 2종과 입상 시제품 2종의 딸기 시들음병에 대한 효능을 검정하기 위하여 설향 유묘를 구입하여 검정하였다(그림 17). 액상 시제품 제형 처리는 딸기 자묘 설향을 각 4×4 포트 트레이에 정식한 후 500배 희석농도로 주당 10 ml씩 관주처리 하였다. 입상 시제품 제형은 각 포트에 상토와 9g/m² 로 토양혼화 처리한 후 효과를 검정하였다. 병원균인 *F. oxysporium(solani)*은 PDA에서 7일간 배양한 후 10×10mm의 agar plug를 상토와 혼합하였다. 병원균이 첨가된 상토를 25°C에서 7일 동안 보관한 후 트레이에 옮긴 후 딸기 자묘를 트레이에 정식하였다. 각각의 제형 시제품을 처리 후 20~30일 후에 이병주율을 검정하였다.

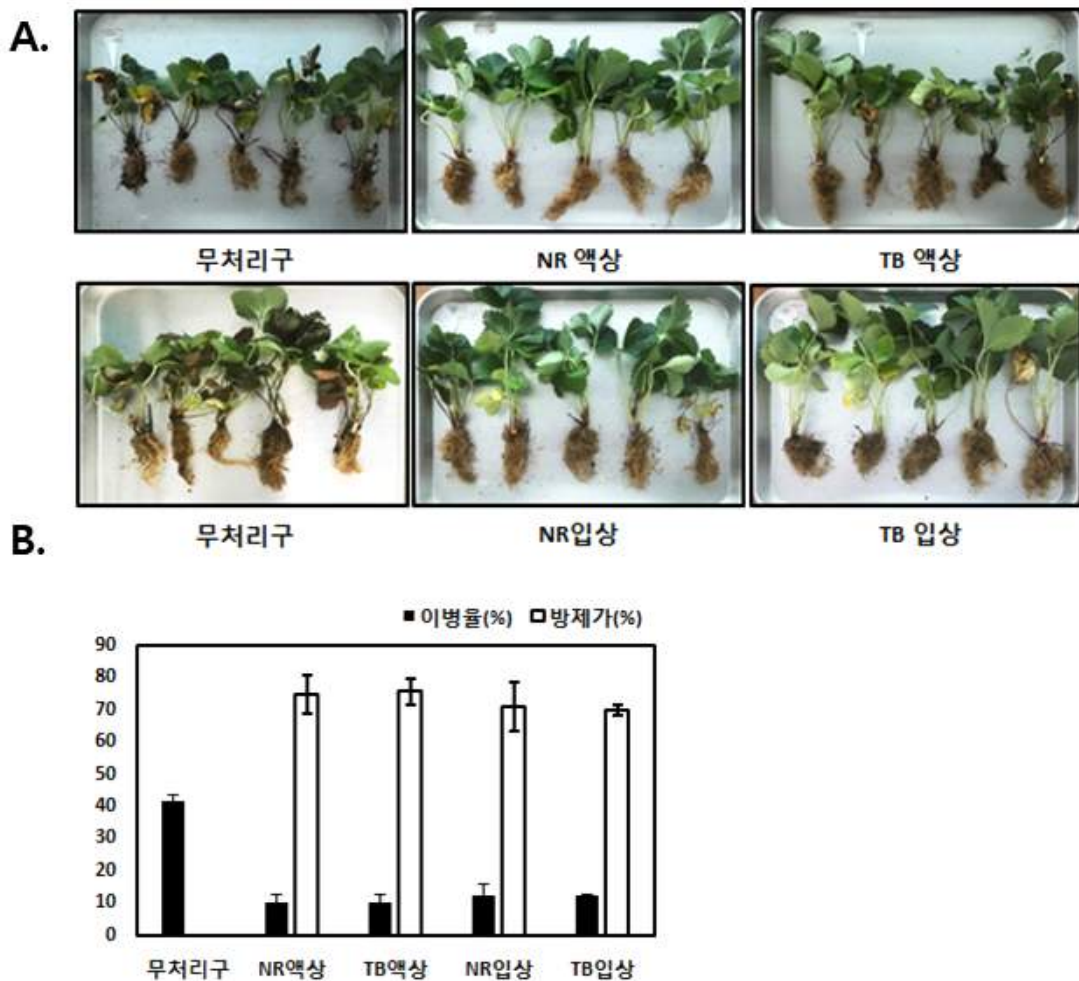


그림 17. 딸기 시들음병에 대한 액상 및 입상 시제품의 효능 효과 검정

액상 및 입상 시제품의 딸기 시들음병에 대한 효능을 검정한 결과 NR 액상 시제품의 경우 무처리구와 비교하여 10.4%의 발병율로 약 74.6%의 방제효과가 있었으며, TB 액상은 75.4%의 방제가를 얻었다. 두 결과간 통계적인 유의성은 없었다. NR 입상시제품의 경우 무처리구와 비교하여 12.5% 발병하였으며, 약 70.7% 방제효과가 있었다. TB 입상시제품은 69.9%의 방제가를 나타내었으나 두 결과에서도 서로간의 유의성이 없음을 확인하였다. 시제품 입상과 액상은 딸기 시들음병에 대하여 모두 약 70% 이상의 방제효과를 나타냈다.

3. 시제품 방제효과 포장 검정 및 약해 검정

(1) 딸기 시들음병 포장 검정(시험포 1)

공시시료 : NR 액상, TB 액상, NR 입상, TB 입상

시험포 : 전남 보성군 득량면

작물(품종) : 딸기(설향)

대상병해 : 딸기 시들음병

정식일자: 2019.09.02

처리구 : NR 액상, TB 액상, NR 입상, TB 입상, 무처리구, 대조구(코퍼)

처리 면적 : 20m², 3반복

처리 방법 : 입상-정식시 공시시료(9g/m²) 토양혼화처리(9월 2일), 액상- 정식시 7일간격 500배액 2회 관주처리, (9월 2일, 9일)

조사 일자 : 2019/09/ 09. 16. 23, 조사 방법 : 구당 60주 이병주율 조사

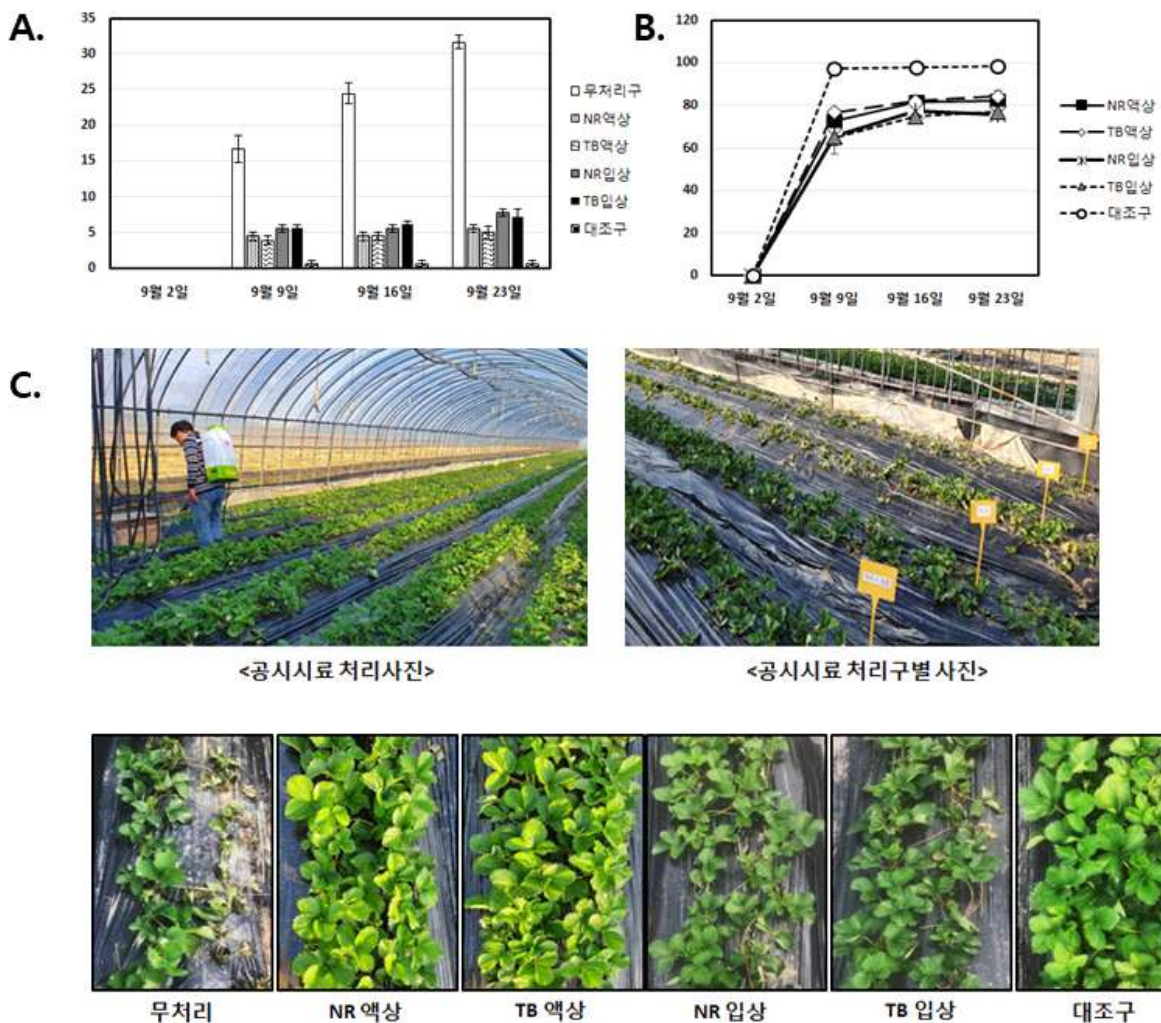


그림 18. 시제품의 딸기 시들음병 농가 실증 시험(시험포 1). A, 처리별 발병율. B, 방제효과. C, 시험포장 및 약제처리 사진.

표 21. 시제품의 딸기 시들음병에 대한 농사 실증 시험 결과

구 분		9월 9일	9월 16일	9월 23일
무처리구	이병율	16.7±1.9	24.4±1.5	31.7±1.0
	방제가	-	-	-
NR 액상	이병율	4.4±0.6	4.4±0.6	5.6±0.6
	방제가	72.5±5.2b	81.6±2.8b	82.3±82.3b
TB 액상	이병율	3.9±0.6	4.4±0.6	5.0±1.0
	방제가	76.7±1.7b	82.0±1.4b	84.3±2.9b
NR 입상	이병율	5.6±0.6	5.6±0.6	7.8±0.6
	방제가	65.8±4.6a	77.2±2.3a	75.5±1.2a
TB 입상	이병율	5.6±0.6	6.1±0.6	7.2±1.1
	방제가	65.0±7.6a	74.6±3.5a	77.0±4.0a
대조구	이병율	0.6±0.6	0.6±0.6	0.6±0.6
	방제가	97.2±2.8c	97.9±2.1c	98.3±1.7c

(2) 시제품의 딸기 시들음병 포장 검정(시험포 2)

공시시료 : NR 액상, TB 액상, NR 입상, TB 입상

시험포 : 전남 장성군 황룡면

작물(품종) : 딸기(설향)

대상병해 : 딸기 시들음병

정식일자: 2019.09.23

처리구 : NR 액상, TB 액상, NR 입상, TB 입상, 무처리구, 대조구(코퍼)

처리 면적 : 20m², 3반복

처리 방법 : 입상-정식시 공시시료 (9g/m²)토양혼화처리(9월 23일), 액상- 정식시 7일간격 500배액 2회 관주처리, (9월 23일, 30일)

조사 일자 : 2019.10.7, 2019.10.14

조사 방법 : 구당 60주 이병주율 조사

평가항목 : 딸기 시들음병 방제가

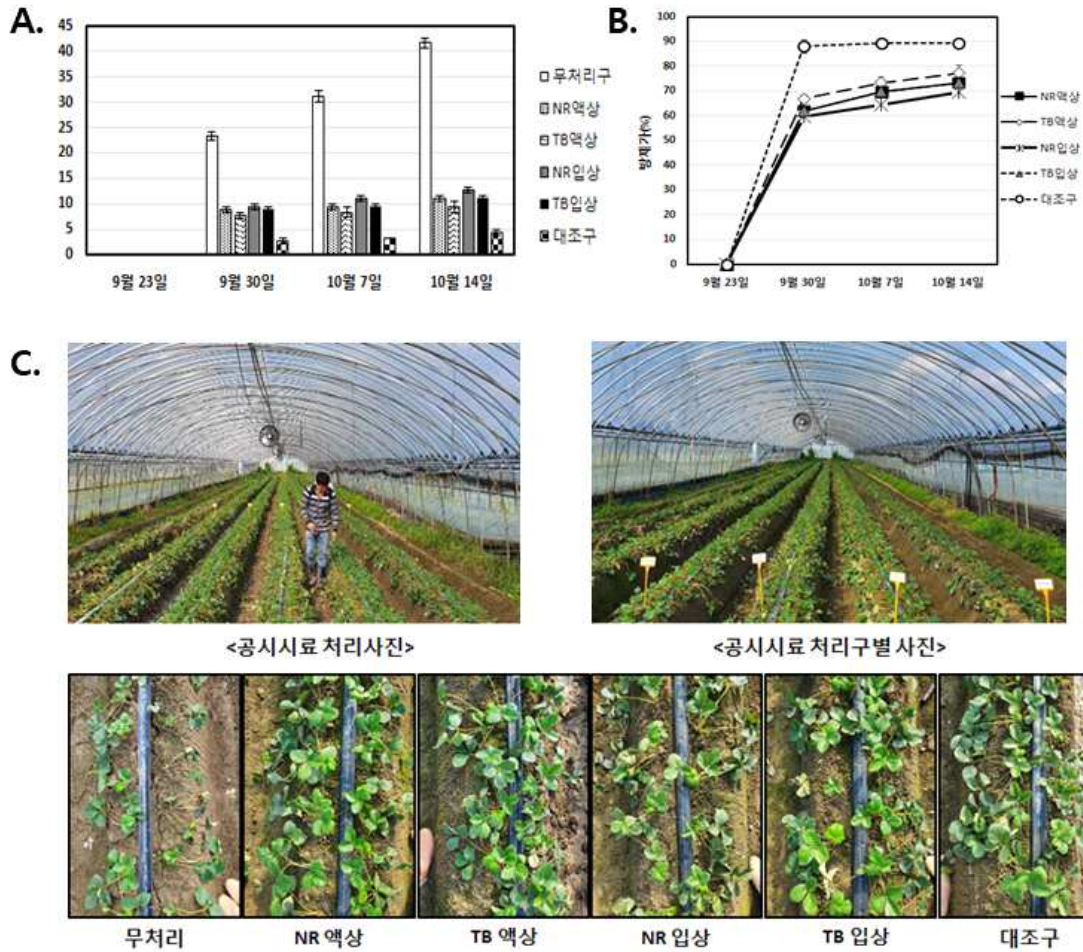


그림 19. 시제품의 딸기 시들음병 농가 실증 시험(시험포 2). A, 처리별 발병율. B, 처리별 방제율. C, 시험포장 및 약제처리 사진.

표 22. 시제품의 딸기 시들음병에 대한 농사 실증 시험 결과

구 분		9월 30일	10월 7일	10월 14일
무처리구	이병율	23.3±1.0	31.1±1.1	41.7±1.0
	방제율	-	-	-
NR 액상	이병율	8.9±0.6	9.4±0.6	11.1±0.6
	방제율	61.9±1.3b	69.6±1.6b	73.3±01.5b
TB 액상	이병율	7.8±0.6	8.3±1.0	9.4±1.1
	방제율	66.7±1.4b	73.3±2.3b	77.2±3.2b
NR 입상	이병율	9.4±0.6	11.1±0.6	12.8±0.6
	방제율	59.6±1.3a	64.3±1.6a	69.3±1.5a
TB 입상	이병율	8.9±0.6	9.4±0.6	11.1±0.6
	방제율	61.9±1.3a	69.6±1.6a	73.3±1.5a
대조구	이병율	2.8±0.6	3.3±0.0	4.4±0.6
	방제율	87.9±2.7c	89.3±0.4c	89.3±1.4c

(3) 시제품의 딸기 점박이응애 포장 검정

공시시료 : NR 액상, TB 액상

시험포 : 전남 담양군 봉산면

작물(품종) : 딸기(죽향)

대상병해충 : 딸기 점박이응애

정식일자: 2019.09.27

처리구 : NR 액상, TB 액상, 무처리구

처리 면적 : 20m², 3반복

처리 방법 : 정식시 발생초기 500배액 2회 엽면살포

조사 일자 : 2019.10.7, 2019.10.14

조사 시기 : 약제 처리 전 및 처리 7, 14일 후

평가항목 : 30엽 이상 생충수 측정



<공시시료 처리사진>

<공시시료 처리구별 사진>



<무처리구>

<TB액상>

<NR입상>

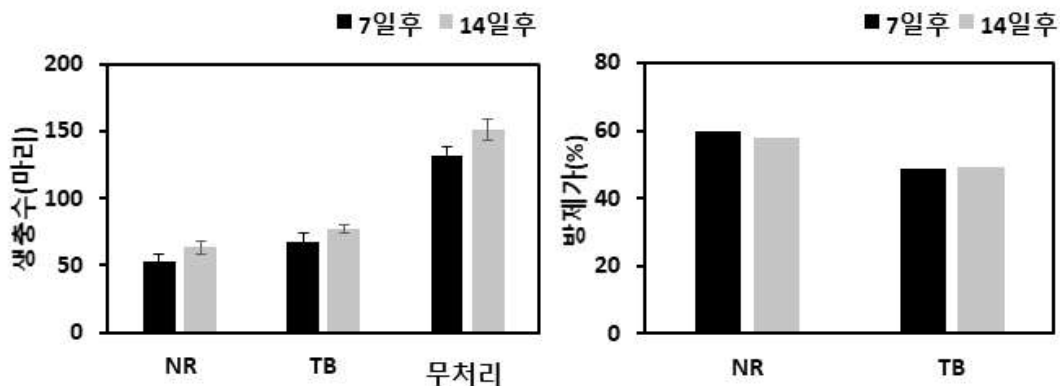


그림 20. 시제품의 딸기 점박이응애 농가 실증 시험

마. 등록 제품(파워백신)의 병해충 방제효과 포장 검정 및 약해검정

1. 등록제품의 토양병해에 대한 포장방제효과

(1) 토마토 시들음병 방제효과

약효 검정 항목 : 토마토 시들음병

공시시료 : 파워백신

작물(품종) : 방울토마토(미니마루)

대상병해 : 토마토 시들음병

정식일자 : 2020. 03. 02

멸칭일자 : 2020. 03. 06

처리구 : 무처리구, 공시시료(파워백신), 대조구(메트코나졸)

처리 면적 : 20m², 3반복

처리 방법 : 정식 후 7일간격 500배액 2회 관주처리 (3월 9일, 16일)

조사 일자 : 2020.05.01

조사 방법 : 구당 60주 이병주율 조사



시험약제	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가(%)
	1반복	2반복	3반복	평균		
파워백신	3.3	2.0	1.7	3.3	b	80.7
대조구	1.7	1.7	3.3	2.2	b	87.5
무처리	18.3	20.0	16.7	18.3	a	-

그림 21. 토마토 시들음병 방제효과 검정 (전남 나주)

개발되어진 제품인 파워백신의 효능을 검정하기 위해 토마토 정식 후 500배 희석하여 7일 간격으로 2회 관주 처리하였다. 약효 검정은 처리 후 2달(60일) 후에 이병주율을 조사하였다. 그 결과 무처리구 18.3%의 이병주율에 비해 파워백신 처리구는 3.3%의 이병주율을 보여 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 대조구인 농약 메트코나졸의 방제가가 87.5%의 효과를 보였으며, 파워백신 처리구에서 80.7%의 우수한 방제 효과를 나타내었다. 농약과 유의성에 있어서 차이를 보이지 않는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

(2) 고추 모잘록병 방제효과

약효 검정 항목 : 고추 모잘록병

공시시료 : 파워백신

작물(품종) : 고추(청양)

대상병해 : 고추 모잘록병

정식일자 : 2020. 04. 22

처리구 : 무처리구, 공시시료(파워백신), 대조구(에트리디아졸)

처리 면적 : 20m², 3반복

처리 방법 : 정식 직후 7일 간격 500배액 2회 관주처리

조사 일자 : 약제살포 후 7일 간격 4회 조사

조사 방법 : 구당 40주 이병주율 조사

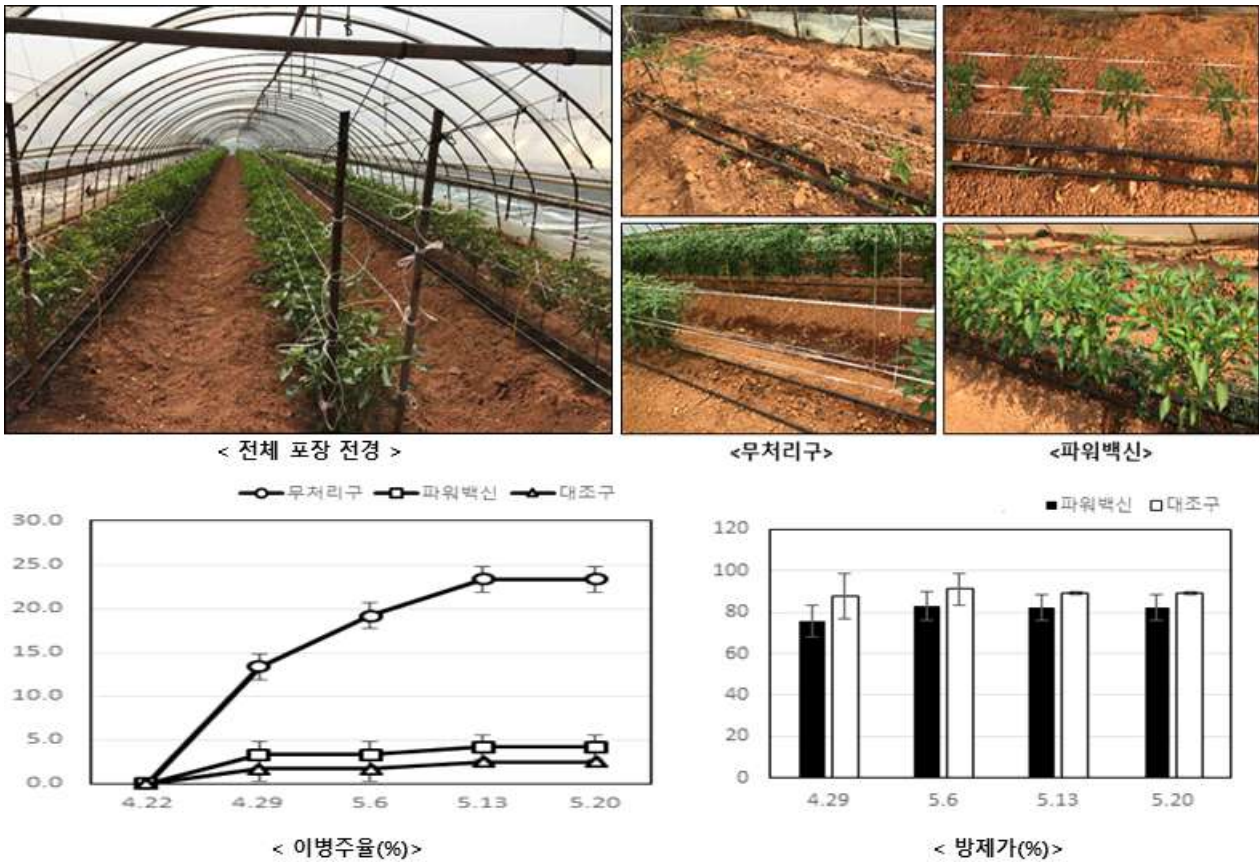


그림 22. 고추 모잘록병 방제효과 검정 (전남 나주)

개발제품 파워백신의 고추 모잘록병에 대한 방제 효과를 검정하기 위해 500배 희석액으로 7일 간격 2회 관주처리 후, 7일 간격으로 4회 이병주수를 조사하였다(그림 22). 모잘록병은 정식 초기에 발생이 많아 정식 후에 처리구당 40주씩 이병주수를 조사하였다. 정식 후 28일까지 무처리구는 잘록병이 계속 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 무처리구는 정식 초기에는 13.3%의 이병주율을 보였으나 4주 후에는 23.3%까지 증가하는 것을 볼 수 있었다. 하지만 파워백신 처리구에서는 정식초기에 4.2%의 이병주율을 보였으나 더 이상 증가하지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 파워백신 처리구는 무처리구와 비교하여 82.2%의 방제효과를 보이며 대조구인 에트리디아졸과 비슷한 수준의 방제효과를 가지고 있음을 보여주었다.

2. 등록제품의 딸기 점박이응애에 대한 포장방제효과

(1) 딸기 점박이응애 방제효과(전남 담양)

약효 검정 항목 : 딸기 점박이 응애

공시시료 : 파워백신

작물(품종) : 딸기(죽향)

대상병해충 : 딸기 점박이 응애

정식일자: 2020.09.17

처리구 : 파워백신, 무처리구, 대조구(사이에노피라펜)

처리 면적 : 20㎡, 3반복

처리 방법 : 500배액 2회 엽면살포(11월 6일, 11월 13일)

조사 시기 : 약제 처리부터 7일 간격 4회 (11월 6일, 13일, 20일, 27일)

평가항목 : 30엽 이상 생충수 측정

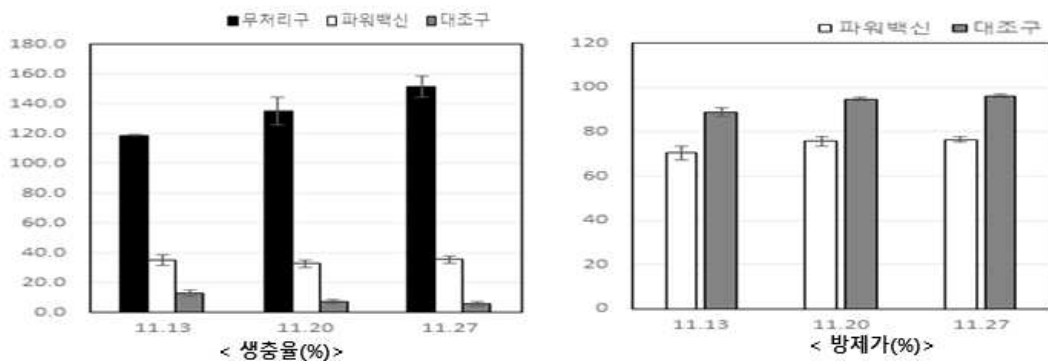


그림 23. 딸기 점박이 응애 방제효과 검정 (전남 담양)

개발제품 파워백신의 딸기 점박이 응애에 대한 방제효과를 검정하기 위해 전남 담양에서 시험을 진행하였다. 딸기 점박이응애 다발생기인 30엽 이상에서 생충수가 100마리 이상일 때 약효를 검정하기 위해 500배 희석액을 2일 간격으로 2회 경엽 살포하였다(그림 23). 딸기 점박이응애의 사전밀도는 처리구당 115마리로 약효검정 하기에 충분한 생충수였다. 무처리구는 115마리에서 174마리로 점진적으로 증가하는 반면 파워백신 1회 처리시 생충수는 40.3 마리 , 2회 처리시 37.3 마리로 무처리구 대비 개체수가 감소하는 것을 확인할 수 있었고 2회 처리 일주일 뒤에도 41마리로 살충력은 계속 유지되는 현상을 보였다. 무처리구와 비교하여 처리 일주일 후에는 70.5%, 2주 후에는 76.4%의 높은 방제가를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

(2) 딸기 점박이응애 방제효과(전남 곡성)

약효 검정 항목 : 딸기 점박이 응애

공시시료 : 파워백신

작물(품종) : 딸기(죽향)

대상병해충 : 딸기 점박이 응애

정식일자: 2020.09.17

처리구 : 파워백신, 무처리구, 대조구(사이에노피라펜)

처리 면적 : 20sq.m, 3반복

처리 방법 : 500배액 2회 엽면살포(11월 6일, 11월 13일)

조사 시기 : 약제 처리부터 7일간격 4회 (11월 6일, 13일, 20일, 27일)

평가 항목 : 30엽 이상 생충수 측정



<시험포 전경(곡성)>

<공시시료 처리사건>

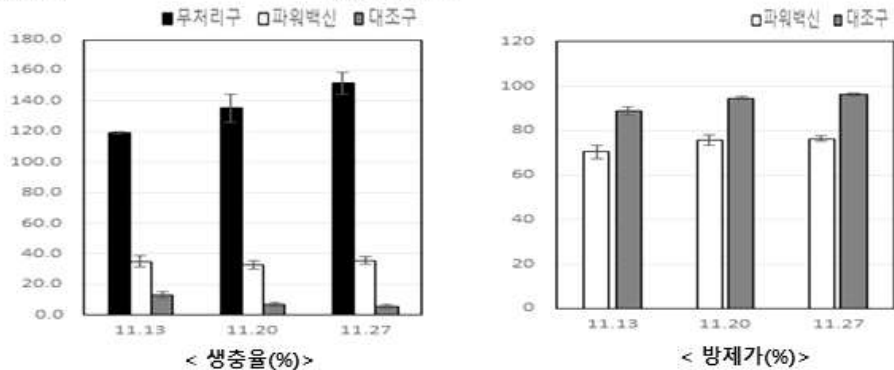




그림 24. 딸기 점박이 응애 방제효과 검정 (전남 곡성)

개발제품 파워백신의 딸기 점박이 응애에 대한 방제효과를 검정하기 위해 전남 곡성에서 2회차 시험을 진행하였다. 딸기 점박이응애 다발생기에 30엽 이상에서 생충수가 100마리 이상일 때 약효 검정하기 위해 500배 희석액을 2일 간격으로 2회 경엽 살포하였다. 딸기 점박이 응애의 사전밀도는 처리구당 108.7마리로 약효검정 하기에 충분한 생충수였다. 무처리구는 108.7마리에서 28일 후 163.7마리로 점진적으로 증가하는 반면 파워백신 1회 처리시 생충수는 38 마리, 2회 처리시 38 마리로 무처리구 대비 개체수가 감소하는 것을 확인할 수 있었고 2회 처리 일주일 뒤에도 44.7마리로 살충력은 계속 유지되는 현상을 보였다. 무처리구와 비교하여 처리 일주일 후에는 70.5%, 2주 후에는 73.9%의 높은 방제가를 나타냈다.

3. 등록제품의 약해검정

관리번호 HN20-O-02-11(A)	
시험 성적서	
의뢰인	업체명 (주)현농
	주소 전남 장성군 남면 나노산단3로 33-5
	연락처 061-393-5316
공시품 명칭	파워백신
검사항목	식물재배시험 (약해시험) 공시약제 처리에 의한 5작물의 약해시험
용도	제출용
시험 결과	
배추	약해없음
상추	약해없음
시금치	약해없음
알타리무	약해없음
오이	약해없음
2020년 10월 30일 (주)현농 기업부설연구소장 	
HYUNNONG	

시험성적서			
의뢰기관: (주)현농 시험항목: 작물재배시험(약해 시험)			
시험담당자	박주연 (인)	작성일	2020년 10월 30일
시험책임자	한승희 (인)	확인일	2020년 10월 30일
 (주)현농 HYUNNONG CO., LTD. 농촌진흥청 지정 유기농업자재 시험연구기관 (지정번호:제36호) 농촌진흥청 지정 비료시험연구기관 (지정번호:제47호) 농촌진흥청 지정 농약시험연구기관 (지정번호:제127호) 광주광역시 북구 용봉동 300 전남대학교 농생대 친환경 농업연구소 510, 511호 Tel: 062-530-5312 Fax: 062-530-5311			
HYUNNONG			

파워백신 제품 작물재배시험(약해시험) 성적서

1. 시험의 종류, 대조물질과 시험물질 정보

- (1) 시험종류 : 작물재배시험 (약해시험)
- (2) 시험목적 : 이 시험의 목적은 본 시료를 5가지 작물에 엽면처리한 후 이에 의한 약해 정도를 평가하고자 함.
- (3) 대조물질 : 약해시험의 경우 별도의 대조물질의 처리는 하지 않고 무처리구를 대조구로 사용함.
- (4) 시험물질 : 파워백신

2. 시험의뢰자 정보

- (1) 시험의뢰자 정보
- 회사명 : ㈜원농
- 대표자 : 김철홍
- 사업자등록번호 : 409-81-95886

3. 시험수행기간

- (1) 의뢰일자 : 2020년 06월 29일
- (2) 시험계획서 승인일 : 2020년 06월 30일
- (3) 시험수행기간 : 2020년 07월 01일 ~ 2020년 07월 22일

4. 시험방법

- (1) 시험작물



- (2) 약해의 대조 : 무처리구를 대조구로 사용
- (3) 사용농도의 결정 : 신청인 추천구, 2배량구
- (4) 토양 정보 : 상토 60% + 일반토양 40%
- (5) 시험반복수
- 배추, 상추, 시금치, 알타리무, 오이 : 포트 (14cm×13cm) 사용, 각 처리구별 5개씩 3반복
- (6) 시험기간 : 엽면처리후 7일간 관찰
- (7) 시험법

- 시험작물 재배 : 유리온실에서 재배

시험작물	재배방법	파종일시	정식일시
배추	온실내 포트	07월 01일	07월 15일
상추	온실내 포트	07월 01일	07월 15일
시금치	온실내 포트	07월 01일	07월 15일
알타리무	온실내 포트	07월 01일	07월 15일
오이	온실내 포트	07월 01일	07월 15일

- 약제처리방법 : 기준량, 2배량으로 조제된 약제를 엽면살포 처리한다.

처리구	시험약제	처리시기 및 방법	약해		의뢰기관
			기준량 (처리일자)	2배량 (처리일자)	
공시시료 처리구	파워백신	유식물 정식 후 엽면처리	500배 희석 (07/15)	250배 희석 (07/15)	㈜원농
무처리	무처리	-	-	-	

- 시험구 배치 : 완전임의배치법

구분	시험작물수	처리구	반복수	반복당 포트수	총 포트수
비해	5	3	3	5	225

- (8) 약해조사 : 공시시료 처리 후 7일간 육안으로 달관 조사 실시

- (9) 약해조사기준

약해정도	약해증상
0	육안으로 약해가 인정되지 않음
1	아주 가벼운 약해로서 작은 약반이 약간 인정됨
2	처리된 잎이 적은 부분에 약해가 인정됨
3	처리된 잎의 50%정도 약해가 인정됨
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아있음
5	심한 약해를 받고 고사상태임

5. 결과

- (1) 처리내용

시험작물	약해 시험		시험약제
	기준량 (처리일)	배량 (처리일)	
배추, 상추, 시금치, 알타리무, 오이	500배 희석 (07/15)	250배 희석 (07/15)	파워백신
	-	-	무처리

- (2) 약제 살포 전후 기상상황 : 실내에서 시험을 진행하였기 때문에 영향을 받지 않았으며, 약해관정에 영향을 줄만한 큰 기상변화는 없었음.

- (3) 조사방법

구분	조사항목	조사회수	조사일자	조사방법
약해	외관상 약해유무	3	07/18, 07/20, 07/22	경엽의 외관상 약해 유무 달관조사

- (4) 시험성적

시험약제	시험작물	약해정도 (0~5)		비고
		기준량	배량	
파워백신	배추	0	0	약해없음
	상추	0	0	
	시금치	0	0	
	알타리무	0	0	
	오이	0	0	

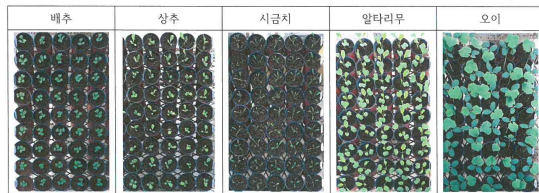
- (5) 엽수 조사

시험약제	시험작물	엽수 (처리후 7일)		비고
		기준량	배량	
파워백신	배추	4	4	무처리구 대비 엽수 차이없음
	상추	4	4	
	시금치	4	4	
	알타리무	3	3	
	오이	4	4	

- (6) 조장 조사

시험약제	시험작물	엽수 (처리후 7일)		비고
		기준량	배량	
파워백신	배추	8	8	무처리구 대비 엽수 차이없음
	상추	8	8	
	시금치	7	7	
	알타리무	11	11	
	오이	14	14	

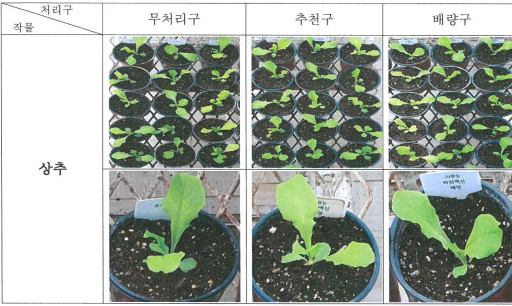
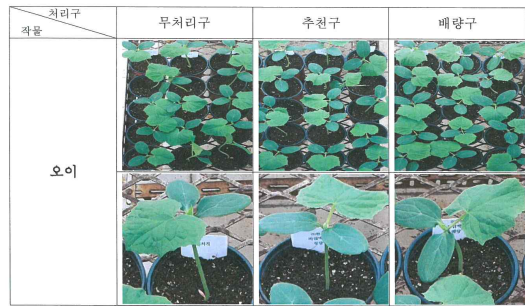
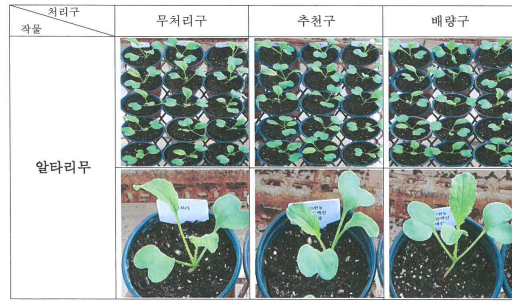
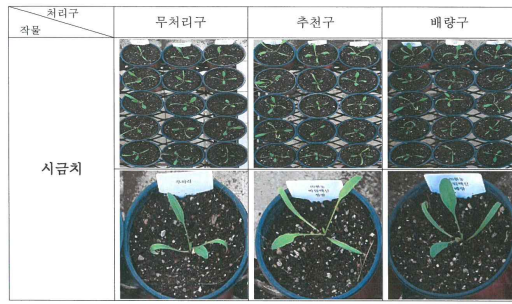
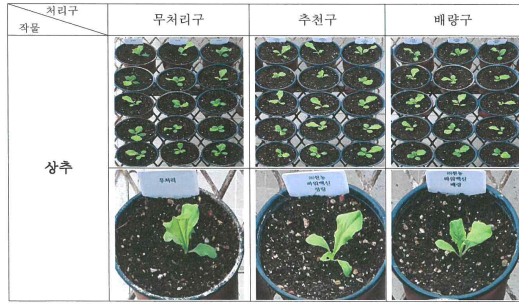
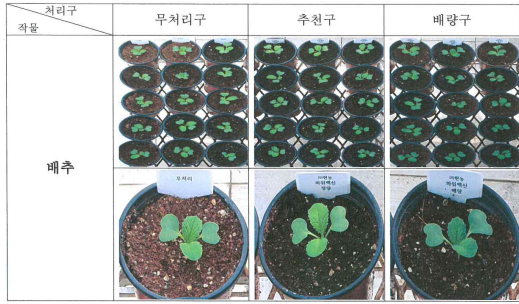
- (7) 처리구별 전경



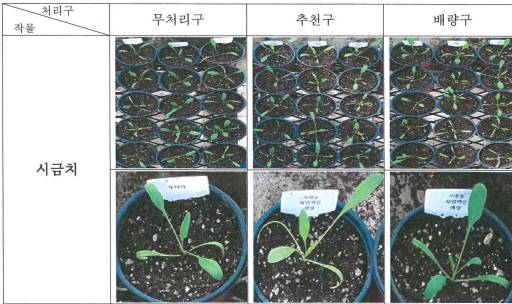
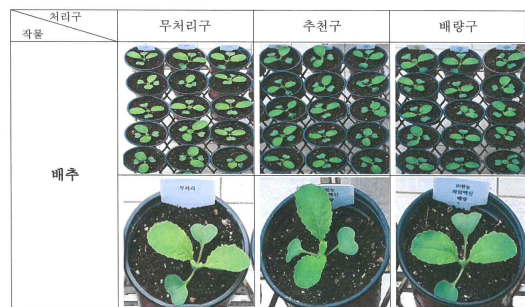
- (8) 공시시료 처리사진

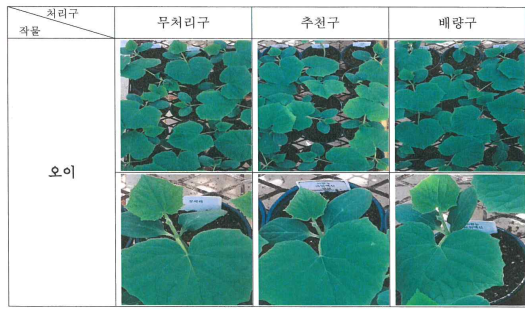
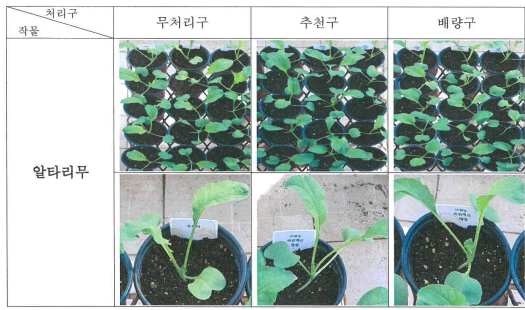


가. 공시시료 처리 후 3일째 유식물체 생육모습

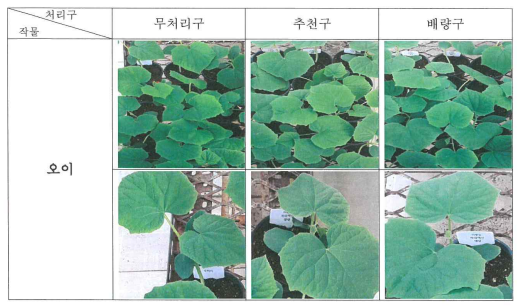
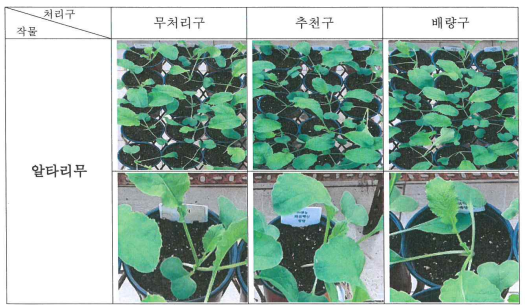
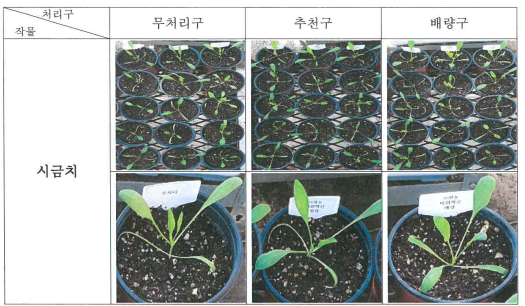
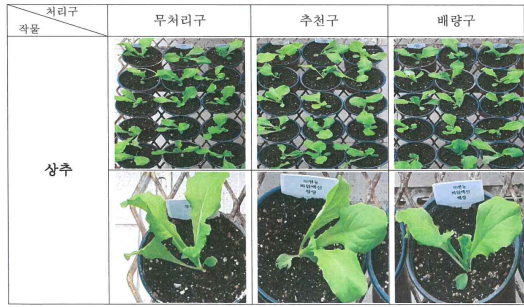
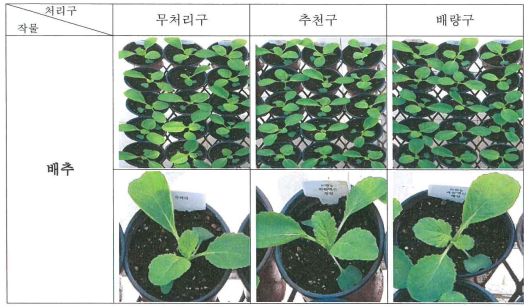


나. 공시시료 처리 후 5일째 유식물체 생육모습





다. 공시시료 처리 후 7일째 유식물체 생육모습



(9) 결과요약

공시시료의 처리에 의한 약해 발생 유무를 조사하기 위하여 공시시료를 정량, 2배량으로 나누어 작물 약해 시험을 실시하였다. 각각의 농도를 정식 후 엽면시비 처리하여 생육상태 및 피해 증상을 달관 조사한 결과, 2배량은 물론 추천 배율에서도 약해가 발생하지 않음을 확인하였다.

(10) 시험담당자 의견

본 공시시료에 대한 작물의 약해 발생 유무를 분석하기 위하여 공시시료 정량, 2배량을 엽면시비처리 후 3, 5, 7일간 관찰한 결과 모든 처리구에서 약해가 발생하지 않았다.

발급번호 제 EFAP-20-0640-A-1 호

이화학적 분석성적서

분석년월일	2020. 07. 14	제조(수입)년월일 [Batch No.]	2020. 06.
시험책임자	소속 ㈜친환경농산물안전성센터 성명 허경진		
분석의뢰자	㈜현농		
품목명	파워백신		
유효성분의 명칭 및 함유량	Surfactin		

분 석 결 과						
분석항목	분석회수	분석치(%)	분석방법			
1. 유효성분	1	0.035	LC-MS/MS를 이용한 정량 분석			
	2	0.036				
	3	0.033				
	평균치	0.035				
	표준편차	0.001				
2. 불리성	항목	검사결과				
	수화성	- 해당사항 없음 -				
	분말도	- 해당사항 없음 -				
3. 외관	성상	-	색상	-	냄새	-
4. 시험항목 (의뢰자 기재)						

첨부 자료
○ 성적계산서 및 크로마토그램

1) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과에 대해 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음.
2) 본 성적서의 결과는 광고, 컨설팅, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하실 수 없음.

2020년 07월 20일

㈜친환경농산물안전성센터

KNU-EFAP

Data File: EFAP-20-0640-A-1
 Sample Type: Unknown
 Operator: Over
 Acquisition Date: 07/14/20 02:46:10 PM
 Run Time(min): 0:00
 Vial: 17-3
 Injection Volume(μl): 1.00
 Dilution Factor: 40.00
 Instrument Method: C:\Xcalibur\data\Main\propety\METHODS\SURFACTIN-2030713
 Original Processing Method:

Component Name	Area	Height	S/N	RT	Calculated Amount	Units
C14	464339.52	130289.29	8192.89	7.37	0.0000	ppm
C13	147174.62	38314.72	7929.96	7.24	0.0000	ppm
C15	395374.62	144629.56	15437.72	7.45	0.0000	ppm

There is no signature data to report.
 C:\XCALIBUR\DATA\Main\propety\2030713\Surfactin\20200714 Page 1 of 1

제품 이화학적 분석 성적서

(주) 현농 기업부설연구소
 - 주) 500-757 광주광역시 북구 용봉로 77 전남대학교 친환경농업연구소 510호
 - 전화 062) 530-3312, 팩스 062) 530-3311
 - 홈페이지: www.hyunnong.com, 이메일: hyunnong@hyunnong.com, 영업장: 광주, 시험장: 광주, 시험장: 광주

■ 분석번호: HN20-10-168 ■ 품 목: 잔류농약검사성적서 교부
 ■ 시험일자: 2020. 10. 21 ■ 품 종: 분 품

시 험 성 적 서

1. 의뢰인

검 수 번 호	HN20-10-168	검 수 일 자	2020. 10. 21
선 찰 인	㈜현농		
수 기 사 번	친남 장성군 남면 나노산단3로 33-5		
비 고			

2. 의뢰내역

검 사 품 목	파워백신
검 사 항 목	잔류농약 322성분 (Aharactin 외)
용 도	유기농업자재 검사용
연 락 구 분	유기농업자재
비 고	

3. 시험결과

검 사 품 목	검 출 성분	검 출 량 (mg/kg)	비 고
파워백신	322성분 분결출		

* 안전내용: 해당 시료에 대한 잔류농약 시험한 결과를 유사 대한 시료에 적용할 수 없습니다.
 * 본 성적서는 시험자료의 오류, 선원동 상영적인 동이나 명적인 과인의 후도로 사용할 수 없습니다.

2020년 10월 23일

(주) 현농 기업부설연구소장

제품 잔류농약 검사성적서

관리번호 HN20-O-02-11(A)

시 험 성 적 서

의뢰인	업체명	㈜현농
	주소	전남 장성군 남면 나노산단3로 33-5
	연락처	061-393-5316
공시품	명칭	파워백신
검사항목	식물재배시험 (약해시험)	공시약제 처리에 의한 5작물의 약해시험
용도	제출용	

시 험 결 과

배추	약해없음
상추	약해없음
시금치	약해없음
말타리무	약해없음
오이	약해없음

2020년 10월 30일

(주)현농 기업부설연구소장

제품 약해시험 성적서

시험성적서

의뢰기관: (주)현농
 시험항목: 작물재배시험(약해 시험)

시험담당자	박주연 (인)	작성일	2020년 10월 30일
시험책임자	한송희 (인)	확인일	2020년 10월 30일



농촌진흥청 지정 유기농업자재 시험연구기관 (지정번호:제36호)
 농촌진흥청 지정 비료시험연구기관 (지정번호:제47호)
 농촌진흥청 지정 농약시험연구기관 (지정번호:제127호)

광주광역시 북구 용봉동 300 전남대학교 농생명 친환경 농업연구소 510, 511호
 Tel: 062-530-5312 Fax: 062-530-5311

1. 시험의 종류, 대표물질과 시험물질 정보
 - (1) 시험종류 : 작물재배시험 (약해시험)
 - (2) 시험목적 : 이 시험의 목적은 온 시료를 배에 점연시키한 후 이에 의한 약해 정도를 평가하 고자 함.
 - (3) 대표물질 : 약해시험의 경우 별도의 대표물질의 처리는 하지 않고 무처리구를 대표구로 사용함.
 - (4) 시험물질 : 파워백신
2. 시험의뢰자 정보
 - (1) 시험의뢰자 정보
 - 회사명 : (주)현농
 - 대표자 : 김 불 통
 - 사업자등록번호 : 409-81-95886
3. 시험수행기간
 - (1) 처리일차 : 2020년 06월 29일
 - (2) 시험계획서 승인일 : 2020년 06월 30일
 - (3) 시험수행기간 : 2020년 07월 01일 ~ 2020년 07월 22일
4. 시험방법
 - (1) 시험처리
 - (2) 약해의 대표 : 무처리구를 대표구로 사용
 - (3) 사용중도의 결정 : 선형인 추진구, 2배양구
 - (4) 포장 정보 : 수도용양도 60% + 일반포양 40%
 - (5) 시험물량
 - 벼 : 파2(30cm×17.4cm) 사용, 각 처리구별 5제제 3반차
 - (6) 시험기간 : 점연시키처리로 7일간 관촬
 - (7) 시험일



5. 결과
 - (1) 처리내용

시험작물	비 회 시 험		시험약제
	기준양 (처리일)	배 량 (처리일)	
벼	500배 희석 (07/15)	250배 희석 (07/15)	파워백신
	-	-	무처리

 - (2) 약제 살포 전후 기상상황 : 실내에서 시험을 진행하였기 때문에 영향을 받지 않았으며, 약 해관찰에 영향을 줄만한 큰 기상변화는 없었음.
 - (3) 조사방법

구 분	조사 항목	조사회수	조사일차	조사 방 법
약 해	외관상 약해유무	3	07/18, 07/20, 07/22	결정의 외관상 약해 유무 달관조사
 - (4) 시험장제

시험약제	시험작물	약해정도 (0~5)		비 고
		기 준 량	배 량	
파워백신	벼	0	0	약해없음
 - (5) 열수 조사

시험약제	시험작물	열수 (처리후 7일)		비 고
		기 준 량	배 량	
파워백신	벼	6	6	무처리구 대비 열수 차이없음

HYUNNONG

- 시험작물 재배 : 유리온실에서 재배

시험작물	재배방법	과공일차	정식일차
벼	온실내 포트	07월 01일	07월 15일

- 약제처리방법 : 기준양, 2배양으로 조제된 약제를 점연살포 처리한다.

처 리 구	시 험 약 제	처리시기 및 방법	약 해		외회기관
			기준양 (처리일차)	2배양 (처리일차)	
공시시료 처리구	파워백신	유식물 결식 후 점연시키	500배 희석 (07/15)	250배 희석 (07/15)	(주)현농
무처리	무처리		-	-	

- 시험구 배치 : 완전일화배치법

구 분	시험 작물수	처리구	반복수	반복당 포트수	총 포트수
비 례	1	3	3	5	45

(8) 약해조사 : 공시시료 처리 후 7일간 육안으로 달관 조사 실시

(9) 약해조사기준

약해정도	약해증상
0	육안으로 약해가 인정되지 않음
1	아주 가벼운 약해로서 작은 약반이 약간 인정됨
2	처리된 잎이 작은 부분에 약해가 인정됨
3	처리된 잎의 50%정도 약해가 인정됨
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아있음
5	심한 약해를 받고 고사상태임

HYUNNONG

5. 결과

(1) 처리내용

시험작물	비 회 시 험		시험약제
	기준양 (처리일)	배 량 (처리일)	
벼	500배 희석 (07/15)	250배 희석 (07/15)	파워백신
	-	-	무처리

(2) 약제 살포 전후 기상상황 : 실내에서 시험을 진행하였기 때문에 영향을 받지 않았으며, 약 해관찰에 영향을 줄만한 큰 기상변화는 없었음.

(3) 조사방법

구 분	조사 항목	조사회수	조사일차	조사 방 법
약 해	외관상 약해유무	3	07/18, 07/20, 07/22	결정의 외관상 약해 유무 달관조사

(4) 시험장제

시험약제	시험작물	약해정도 (0~5)		비 고
		기 준 량	배 량	
파워백신	벼	0	0	약해없음

(5) 열수 조사

시험약제	시험작물	열수 (처리후 7일)		비 고
		기 준 량	배 량	
파워백신	벼	6	6	무처리구 대비 열수 차이없음

HYUNNONG

(6) 포장 조사

시험약제	시험작물	열수 (처리후 7일)		비 고
		기 준 량	배 량	
파워백신	벼	13	13	무처리구 대비 열수 차이없음

(7) 처리구별 관촬



(8) 공시시료 처리사건



가. 공시시료 처리 후 3일째 유식물제 생육모습



나. 공시시료 처리 후 5일째 유식물제 생육모습



HYUNNONG

다. 공시시료 처리 후 7일째 유식물제 생육모습



(9) 평가요약

공시시료의 처리에 의한 약해 발생 유무를 조사하기 위하여 공시시료를 정량, 2배양으로 나누 어 각온 약제 시험을 실시하였다. 각각의 온도별 열수 및 열수조사 처리하여 유식물제 및 약해 증상을 달관 조사한 결과, 2배양은 물론 추진 대응에서도 약해가 발생하지 않음을 확인하였다.

(10) 시험담당자 의견

온 공시시료에 의한 유식물제 약해 발생 유무를 분석하기 위하여 공시시료 정량, 2배양을 점 연시키처리 후 3, 5, 7일간 관촬한 결과 모든 처리구에서 약해가 발생하지 않았다.

HYUNNONG

제품의 벼 도열병 적용확대를 위한 벼 약해검사성적서



최 종 보 고 서

TNK-2020-000387

파워백신

Rat에 대한 파워백신의 급성경구독성시험 : 급성독성등급법

한국화학융합시험연구원



시험책임자 진술서 [Study Director Statement]

시험제목 : Rat에 대한 파워백신의 급성경구독성시험 : 급성독성등급법
[Study title]
시험번호 : TNK-2020-000387
[Study number]

시험의뢰자 [Sponsor]

명칭 : (주)원농
소재지 : 전라남도 장성군 남면 나도산단3로 33-5
대표자 : 김철홍
담당자 : 김철홍 부사 : 기업부설연구소
연락처 : Tel. 062-530-5312 Fax. 062-530-5311

시험기관 [Test facility]

명칭 : (재)한국화학융합시험연구원 화순
소재지 : 전라남도 화순군 화순읍 신단길 12-63
운영책임자 : 박명규
연락처 : Tel. 061-370-7700 Fax. 061-370-7777

이 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임하에 수행되었으며, 보고서는 GLP 규정에 준수하여 실시하였다.

- 1. 유기농업자재 시험연구기관 관리 기준
 - 1.1. 국립농산물관질관리원 고시 제2017-35호 (2017-06-03), "유기농업자재 시험연구기관 지정 및 관리 기준"
 - 2. 시험방법
 - 2.1. 국립농산물관질관리원 고시 제2019-5호 (2019-06-17), "유기농업자재 검사 기준"
 - 2.2. 농촌진흥청 고시 제2020-4호 (2020-02-28), 12-1-20 급성경구독성시험 : 급성독성등급법
- 본 보고서는 승인된 시험계획서에 따라 수행되었으며, 시험 진행 중 신뢰성을 저해할 만한 상황이 발생하지 않았음을 확인하였다.

시험책임자 김혜민 2020-10-22
[Study director] 김혜민 [Kim Hye-min, M.S.] Date

운영책임자 박명규 2020-10-22
[Test facility management] 박명규 [Park Myeong-kyu, D.V.M., Ph.D.] Date

- 1 -

제품의 Rat에 대한 급성경구 독성시험 성적서

시험참여자 [Study Staffs]

다음의 시험자는 시험 중 중요한 시험단계 및 기록을 (재)한국화학융합시험연구원 화순의 표준직업자정서와 본 시험의 시험계획서에 따라 수행하였다.

시험담당자	: 김상호
	김혜민
	남예지
	박용민
	박진수
	배은진
	백형선
	임재민
	실자경
	장상용
시험물질관리 책임자	: 이진의
동물관리 책임자	: 박세철
검역 책임자	: 김혜민
보고서 작성자	: 김혜민

- II -

목 차 [Contents]

보고서표지	
시험책임자 진술서 [Study Director Statement]	1
시험참여자 [Study Staffs]	II
목차 [Contents]	III
1. 요약 (Summary)	1
2. 서론 (Introduction)	2
2.1. 동물윤리	2
2.2. 시험일정	2
3. 재료 (Materials)	3
3.1. 시험물질 및 무형제	3
3.2. 시험계	3
3.3. 사육환경	4
4. 방법 (Method)	5
4.1. 시험물질 조제	5
4.2. 시험물질 분석	5
4.3. 실험계획	5
4.4. 시험물질의 투여 경로 및 방법	5
4.5. 관찰항목	5
5. 시험계획서의 변경 및 이탈 (Amendments and deviations from the study plan)	6
5.1. 시험물질명 변경	6
5.2. 기타	6
6. 자료의 보관 (Archives)	6
6.1. 보관기록 및 자료의 종류	6
6.2. 보관장소	6
7. 결과 (Results)	7
7.1. 사망률 및 일반증상	7
7.2. 체중변화	7
7.3. 무검소견	7
8. 고찰 및 결론 (Discussion & Conclusion)	8
9. 참고문헌 (References)	9
10. Figures	10
Figure 1. Body weight of female rats (1 st step)	10
Figure 2. Body weight of female rats (2 nd step)	10
Figure 3. Body weight of female rats (3 rd step)	11
Figure 4. Body weight of female rats (4 th step)	11
11. Tables	12
Table 1. Mortality and Clinical signs of female rats	12

- III -

Table 2. Body weight of female rats	13
Table 3. Necropsy findings of female rats	14
12. Annexes	15
Annex 1. Information of test substance (Submitted by sponsor)	15
Annex 2. Certificate of analysis (Submitted by sponsor)	17
Annex 3. Receipt of test substance	18
Annex 4. Test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight	19
Annex 5. Amendments from the study plan	20

1. 요약 (Summary)

파워백신에 대한 급성경구독성시험을 실시하기 위해 SD계 암컷 rat를 사용하여 시험물질 투여 용량을 300 mg/kg B.W. (1st, 2nd step)와 2000 mg/kg B.W. (3rd, 4th step)로 단계를 나누어 각각 3 마리에 1 회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반증상 및 체중 변화를 관찰하였으며, 생존동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 검사하였다.

- 실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 체중측정 결과, 300 mg/kg B.W. (1st step)와 2000 mg/kg B.W. (4th step)에서 일부개체의 체중감소 외에는 정상적인 체중증가가 관찰되었다.
- 부검소견 결과, 모든 시험물질 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 파워백신은 국제적으로 공인되고 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5/Unclassified 로 분류되었다.

2. 서론 (Introduction)

본 시험은 rat를 이용하여 파워백신을 경구 투여 시 나타나는 급성 독성반응을 평가하기 위하여 실시하였다.

2.1 동물유리

- 동물보호법 [법률 제 16977호 (2020-02-11, 일부개정)]
- 실험동물에 관한 법률 [법률 제 15944호 (2018-12-11, 일부개정)]
- 동물윤리위원회 승인번호 : IAC2020-2352

2.2 시험일정

시험개시일	: 2020-08-12
시험개시일	: 2020-08-13
시험동물도입일	: 2020-08-13
검역 및 순화기간	: 2020-08-13 ~ 2020-08-17 (8 주령, 1 st , 2 nd step) 2020-08-13 ~ 2020-09-02 (6 주령, 3 rd , 4 th step)
군 분리일	: 2020-08-17 (1 st , 2 nd step) 2020-09-02 (3 rd , 4 th step)
투여일	: 2020-08-18 (1 st step) 2020-08-26 (2 nd step) 2020-09-03 (3 rd step) 2020-09-11 (4 th step)
일반증상 관찰기간	: 2020-08-18 ~ 2020-09-01 (1 st step) 2020-08-26 ~ 2020-09-09 (2 nd step) 2020-09-03 ~ 2020-09-17 (3 rd step) 2020-09-11 ~ 2020-09-25 (4 th step)
부검일	: 2020-09-01 (1 st step) 2020-09-09 (2 nd step) 2020-09-17 (3 rd step) 2020-09-25 (4 th step)
시험종료일	: 2020-09-25
최종보고서(초안) 제출일	: 2020-10-16
시험종료일	: 2020-10-22

3. 재료 (Materials)

3.1 시험물질 및 부형제

3.1.1 시험물질 (Annex 1, 2, 3)

시험물질명	: 파워백신
공급원	: (주)현능
KTR 코드	: TS-02202
외관 및 색상	: 불투명한 액상
보관조건	: 상온 [(15 ~ 25) °C]

3.1.2 주판료 투입비용 [Submitted by sponsor]

용명	순도 (%)	투입량 (%)	함량 (%)
Bacillus amyloquefaciens 추출물	100	100	100

3.1.3 부형제

물질명	: 멸균중류수(주사용수)
제조원	: 대한약품공업(주)
Batch No.	: C6V2B21, G2V5B21
선택사유	: 본 부형제는 독성시험용으로 널리 사용하며, 시험개시 전에 부형제 확인 결과, 조제가 가능한 부형제로 선택하였다.

3.2 시험계

계통 및 종	: Cri:CD(SD), Rat, SPF
생산처	: (주)오리엔트 바이오 (경기도 가평군 북면 화악산로 124번길 8)
공급원	: (주)지라이오 (광주광역시 광산구 첨단중앙로 182번길 62)
도입 시 성별, 동물 수	: 암컷, 14 마리
도입 시 주령, 체중범위	: 6 주령, 138.3 g ~ 154.2 g, 8 주령, 186.8 g ~ 201.4 g
투여 시 성별, 동물 수	: 암컷, 12 마리 (1 st ~ 4 th step 각각 3 마리)
투여 시 주령, 체중범위	: 9 주령, 196.6 g ~ 207.5 g (1 st step) 10 주령, 222.6 g ~ 232.1 g (2 nd step) 9 주령, 200.6 g ~ 221.3 g (3 rd step) 10 주령, 229.5 g ~ 258.1 g (4 th step)

TNK-2020-000387	Final report
<p>3.2.1 시험계의 선택사유 본 시험에 사용된 SD rat는 급성경구독성시험에 일반적으로 많이 사용되는 동물로서 비교할 많은 시험기초자료가 축적되어 있어 선택하였다.</p> <p>3.2.2 검역 및 순화 동물을 도입 후 (재)한국화학융합시험연구원 화순 동물사육실의 환경하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선택하여 시험에 사용하였다.</p> <p>3.2.3 개체식별 유성현을 이용하여 꼬리에 표시하였고, cage는 개체식별카드를 부착하여 식별하였다.</p> <p>3.2.4 군 분리 순화 후 건강한 개체를 선별하여, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 무작위법으로 군 분리를 실시하였다.</p> <p>3.2.5 전여동물의 처리 전여동물은 군 분리 후 Isoflurane (아이프린액, 하나제약, 대한민국) 마취하여 방울 치사한 후 안락사 처리하였다.</p> <p>3.3 사육환경</p> <p>3.3.1 동물실 번호</p> <p>검역 및 순화 : 청정동물 사육실 12 실험 및 관찰 : 청정동물 사육실 6, 청정동물 사육실 11</p> <p>3.3.2 환경조건</p> <p>온도 : (21.2 - 22.9) °C 상대습도 : (52.4 - 57.4) % R.H. 환기횟수 : (10 - 20) 회/h 조명주기 : 광조건 12 시간 (08:00 - 20:00) 암조건 12 시간 (20:00 - 08:00) 조도 : (150 - 300) Lux Cage 종류 : Stainless steel wire cage Cage 크기 : (270W × 500D × 200H) mm Cage당 수용마리 수 : 3 마리 이하</p> <p>동물실의 온·습도는 자동 온습도 측정기에 의하여 매 30 분마다 측정 되었으며, 조도 등의 환경조건은 표준작업지침서에 따라 측정하였다. 동물실의 환경 측정 결과, 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.</p> <p>3.3.3 사료 및 음수 공급 사료는 방사선 멸균된 Rodent Diet 20 5053 [Labdiet, USA]를, 음수는 R/O수를 자유섭취시켰다.</p>	<p style="text-align: right;">Page 4 of 20</p>

TNK-2020-000387	Final report
<p>4.5.2 체중 체중은 도입 시, 군 분리 시, 시험물질투여 개시 직전, 투여 개시 후 1, 3, 7 일 및 14 일에 측정하였다.</p> <p>4.5.3 부검 투여 후 14 일째 모든 생존동물의 외관 감사를 실시한 후, Isoflurane (아이프린액, 하나제약, 대한민국)을 이용하여 마취한 다음, 방혈치사 하여 육안으로 장기를 검사하였다. 이상 장기는 발생하지 않아 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.</p> <p>5. 시험계획서의 변경 및 일탈 (Amendments and deviations from the study plan)</p> <p>5.1 시험계획서의 변경 실험동물실의 해마 필터 교체로 인해 한시적인 사육실 변경이 있었으나, 시험결과에 영향을 미치는 요인은 없었다 (Annex 5).</p> <p>5.2 기타 이외에는 시험계획서에 대한 변경 및 일탈사항은 없었다.</p> <p>6. 자료의 보관 (Archives) 시험기간 중에 발생한 모든 시험기초자료는 해당 농약등 또는 원제의 등록일로부터 3년간 보관하며, 5년이 경과된 자료의 경우 표준작업지침서에 따라, 시험의뢰자와 협의하여 보관 및 폐기를 진행한다.</p> <p>6.1 보관기록 및 자료의 종류</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 시험계획서에 관한 기록 (2) 시험물질에 관한 기록 및 자료 (3) 시험계에 관한 기록 및 자료 (4) 관찰, 측정 및 검사에 관한 기록 (5) 시험의뢰자와의 송수신 기록 (6) 최종보고서에 관한 기록 <p>6.2 보관장소 (재)한국화학융합시험연구원 화순 자료보관실 (1)</p>	<p style="text-align: right;">Page 6 of 20</p>

TNK-2020-000387	Final report																																
<p>3.3.4 사료 및 음수 검사 사료는 제조업체의 정기적 검사에 따른 분석성적서를 사료공급자로부터 받아 확인하였다. 음수는 (재)한국화학융합시험연구원 화순의 표준작업지침서에 따른 정기적 검사를 통해 확인한 결과 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.</p> <p>4. 방법 (Method)</p> <p>4.1 시험물질 조제 시험의뢰자가 제공한 시험물질을 순도확인하지 않고 그대로 이용하여, 본 시험물질을 정량한 후 부형체에 30 mg/mL (1st, 2nd step) 및 200 mg/mL (3rd, 4th step) 농도로 조제하여 사용하였다.</p> <p>4.2 시험물질 분석 시험물질 및 시험물질 조제물의 농도, 안정성 및 균질성에 대한 분석은 별도로 시행하지 않았다.</p> <p>4.3 실험계획</p> <p>4.3.1 용량설정 시험물질의 독성정보가 없어 300 mg/kg B.W. 용량으로 하여 1 단계로 3 마리에 투여하였다. 그 이후 Annex 4. 에 첨부된 단계별 흐름도에 따라 다음 단계를 진행하였다. 시험물질 투여 용량 및 간격은 일반중상 및 정도에 의해 결정되었다 (Annex 4, Test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight).</p> <p>4.3.2 군 구성</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>시험군</th> <th>성</th> <th>동물번호</th> <th>마리수</th> <th>투여량 (mg/kg B.W.)</th> <th>투여액량 (mL/kg B.W.)</th> <th>투여경로</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>G1</td> <td>암컷</td> <td>2101 - 2103</td> <td>3</td> <td>300</td> <td>10</td> <td rowspan="4">경구</td> </tr> <tr> <td>G2</td> <td>암컷</td> <td>2201 - 2203</td> <td>3</td> <td>300</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>G3</td> <td>암컷</td> <td>2301 - 2303</td> <td>3</td> <td>2000</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>G4</td> <td>암컷</td> <td>2401 - 2403</td> <td>3</td> <td>2000</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table> <p>* G1 : 1st step, G2 : 2nd step, G3 : 3rd step, G4 : 4th step, B.W. : Body weight</p> <p>4.4 시험물질의 투여 경로 및 방법 약 18 시간 절식시킨 실험동물에 시험물질 조제물을 경구투여용 sonde를 장착한 주사기를 이용하여 위내에 1 회 강제 투여하였다.</p> <p>4.5 관찰항목</p> <p>4.5.1 일반중상 모든 동물에 대하여 매일 1 회 증상관찰을 실시하였다. 단, 투여 당일에는 투여 후 0.5, 1, 2, 3 시간을 포함하여, 4 시간까지는 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 후 14 일까지 실시하였다.</p>	시험군	성	동물번호	마리수	투여량 (mg/kg B.W.)	투여액량 (mL/kg B.W.)	투여경로	G1	암컷	2101 - 2103	3	300	10	경구	G2	암컷	2201 - 2203	3	300	10	G3	암컷	2301 - 2303	3	2000	10	G4	암컷	2401 - 2403	3	2000	10	<p style="text-align: right;">Page 5 of 20</p>
시험군	성	동물번호	마리수	투여량 (mg/kg B.W.)	투여액량 (mL/kg B.W.)	투여경로																											
G1	암컷	2101 - 2103	3	300	10	경구																											
G2	암컷	2201 - 2203	3	300	10																												
G3	암컷	2301 - 2303	3	2000	10																												
G4	암컷	2401 - 2403	3	2000	10																												

TNK-2020-000387	Final report
<p>7. 결과 (Results)</p> <p>7.1 사망률 및 일반중상 (Table 1) 실험기간 중 시험물질 투여에 의한 이상중상 및 사망동물은 관찰되지 않았다.</p> <p>7.2 체중변화 (Table 2, Figure 1 - 4) 체중측정 결과, 300 mg/kg B.W. (1st step)에서 1 례 (2101)가 투여 후 3 일 체중이 1 일 체중보다 감소하였고, 2000 mg/kg B.W. (4th step)에서 1 례 (2402)가 투여 후 7 일 체중이 3 일보다 감소하였다. 이외, 투여군에서는 정상적인 체중증가가 관찰되었다.</p> <p>7.3 부검소견 (Table 3) 부검소견 결과, 모든 시험물질 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.</p>	<p style="text-align: right;">Page 7 of 20</p>

시험참여자
[Study Staffs]

다음의 시험자는 시험 중 중요한 시험단계 및 기록물 (재)한국화학융합시험연구원 최순의 표준적업지침서와 본 시험의 시험계획서에 따라 수행하였다.

시험담당자 : 김상호
 김혜민
 남혜지
 박용빈
 박진수
 배은진
 백형선
 임재민
 설자경
 장성용

시험물질관리 책임자 : 이진희

동물관리 책임자 : 박세철

검역 책임자 : 김혜민

보고서 작성자 : 김혜민

1. 요약 (Summary)

파워백신에 대한 급성경피독성시험을 실시하기 위해 SO계 암컷 rat를 사용하여 시험물질 투여 용량을 200, 1000 및 2000 mg/kg B.W. (Range-Finding study)와 2000 mg/kg B.W. (Main study)로 단계를 나누어 각각 1 회 경피 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반 증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존동물은 무감하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 검사 하였다.

- 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 일반증상 관찰결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 체중측정 결과, 시험물질 투여에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.
- 무감소견 결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 파워백신은 국제적으로 공인되고 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5/Unclassified로 분류되었다.

2. 서론 (Introduction)

본 시험은 rat를 이용하여 파워백신을 급성경피 투여 시 나타나는 독성반응을 평가하기 위하여 실시하였다.

2.1 동물윤리

- 동물보호법 [법률 제 16977호 (2020-02-11, 일부개정)]
- 실험동물에 관한 법률 [법률 제 15944호 (2018-12-11, 일부개정)]
- 동물윤리위원회 승인번호 : IAC2020-2351

2.2 시험일정

시험개시일 : 2020-08-12

시험종료일 : 2020-08-13

시험동물도입일 : 2020-08-13

검역 및 순화기간 : 2020-08-13 ~ 2020-08-19

군 분리일 (Main study) : 2020-08-31

투여일 (Range-Finding Study) : 2020-08-20
 2020-08-24
 2020-08-28
(Main study) : 2020-09-01

일반증상 관찰기간 (Range-Finding Study) : 2020-08-20 ~ 2020-09-03
 2020-08-24 ~ 2020-09-07
 2020-08-28 ~ 2020-09-11
(Main study) : 2020-09-01 ~ 2020-09-15

무감일 (Range-Finding Study) : 2020-09-03
 2020-09-07
 2020-09-11
(Main study) : 2020-09-15

시험종료일 : 2020-09-15

최종보고서(초안) 제출일 : 2020-10-16

시험종료일 : 2020-10-22

3. 재료 (Materials)

3.1 시험물질 및 부형제

3.1.1 시험물질 (Annex 1, 2, 3)

시험물질명 : 파워백신
공급원 : (주)한농
KTR 코드 : TS-02202
외관 및 색상 : 불투명한 액상
보관조건 : 상온 [(15 ~ 25) °C]

3.1.2 주원료 투입비율 [Submitted by sponsor]

용명	순도 (%)	투입량 (%)	함량 (%)
Bacillus amyloliquefaciens 추출물	100	100	100

3.1.3 부형제

물질명 : 열균증류수(주사용수)
제조원 : 대한약품공업(주)
Batch No. : C6V2B21
선택사유 : 본 부형제는 독성시험용으로 널리 사용하며, 시험개시 전에 부형제 확인 결과, 조제가 가능한 부형제로 선택하였다.

3.2 시험계

계통 및 종 : CrI:CD(SD), Rat, SPF

생산처 : (주)오리엔트 바이오 (경기도 가평군 북면 최악산로 124번길 8)

공급원 : (주)지바이오 (광주광역시 광산구 첨단중앙로 182 번길 62, 302 호 (쌍암동))

도입 시 성별, 동물 수 : 암컷, 9 마리

도입 시 주령, 체중범위 : 7 주령, 206.6 g ~ 227.4 g

투여 시 성별, 동물 수 : 암컷, 5 마리 (Range-Finding study 각각 1 마리, Main study 2 마리)

투여 시 주령, 체중범위 : 8 주령, 240.1 g (Range-Finding Study)
 8 주령, 252.3 g (Range-Finding Study)
 9 주령, 251.0 g (Range-Finding Study)
 9 주령, 268.7 g ~ 274.9 g (Main study)

3.2.1 시험계의 선택사유
본 시험에 사용된 SD rat는 급성경피독성시험에 일반적으로 많이 사용되는 동물로서 비교할 많은 시험기초자료가 축적되어 있어 선택하였다.

3.2.2 검역 및 순화
 동물을 도입 후 (재)한국과학기술연구원 확산 동물사육실의 환경하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다.

3.2.3 개체식별
 유성팬을 이용하여 꼬리에 표시하였고, cage는 개체식별카드를 부착하여 식별하였다.

3.2.4 군 분리
 순화 후 건강한 개체를 선별하여, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 무작위법으로 군 분리를 실시하였다.

3.2.5 잔여동물의 처리
 잔여동물은 군 분리 후 Isoflurane (아이프란액, 하나제약, 대한민국)을 이용하여 안락사 시켰다.

3.3 사육환경

3.3.1 동물실 번호

검역 및 순화 : 청정동물 사육실 12
 실험 및 관찰 : 청정동물 사육실 6, 청정동물 사육실 11

3.3.2 환경조건

온도 : (21.4 ~ 22.9) ℃
 상대습도 : (52.4 ~ 57.4) % R.H.
 환기횟수 : (10 ~ 20) 회/h
 조명주기 : 광조건 12 시간 (08:00 ~ 20:00)
 암조건 12 시간 (20:00 ~ 08:00)
 조도 : (150 ~ 300) Lux
 Cage 종류 : Stainless steel wire cage
 Cage 크기 : (270W × 500D × 200H) mm
 Cage당 수용마리 수 : 3 마리 이하

동물실의 온·습도는 자동 온습도 측정기에 의하여 매 30 분마다 측정 되었으며, 기타 환경 조건은 표준작업지침서에 따라 측정하였다. 동물실의 환경 측정 결과, 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

3.3.3 사료 및 음수 공급

사료는 방사선 멸균된 Rodent Diet 20 5053 [Labdiet, USA]를, 음수는 R/O수를 자유섭취 시켰다.

3.3.4 사료 및 음수 검사

사료는 제조업체의 정기적 검사에 따른 분석성적서를 사료공급자로부터 받아 확인하였으며, 음수는 (재)한국과학기술연구원 확산의 표준작업지침서에 따른 정기적 검사를 통해 확인 하였다. 사료 및 음수검사에서 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

4. 방법 (Methods)

4.1 시험물질 조제

시험의뢰자가 제공한 시험물질을 순도확인하지 않고 그대로 이용하여, 본 시험물질을 칭량한 후 부형체에 40, 200, 400 mg/mL (Range-Finding Study) 및 400 mg/mL (Main study) 농도로 조제하여 사용하였다.

4.2 시험물질 분석

시험물질 및 시험물질 조제물의 농도, 안정성 및 균질성에 대한 분석은 별도로 시행하지 않았다.

4.3 실험계획

4.3.1 예비시험 (Range-Finding study)

시험물질의 독성정보가 없어 시작용량을 200 mg/kg B.W. 으로 하여 1 마리 동물을 대상으로 Annex 4. 에 따라 다음 단계를 진행하였다. 다음 단계 투여간격은 최소 48 시간으로 하였으며, 일반중상 및 정도에 의해 결정되었다 [Annex 4, Flow chart for the testing procedure (Range-Finding Study) 참조].

4.3.2 본시험 (Main study)

용량감정시험에서 200, 1000 및 2000 mg/kg B.W. 에서 사망동물이 발생하지 않아, 2000 mg/kg B.W. 에서 2 마리의 동물로 Annex 5. 에 따라 본시험을 수행하였다 [Annex 5, Flow chart for the testing procedure (Main Study) 참조].

4.3.3 군 구성

군	성별	동물 수	동물번호	투여용량 (mg/kg B.W.)	투여역량 (mL/kg B.W.)	투여경로
G1		1	2101F#	200		
G2	Female	1	2201F#	1000	5	경피
G3		1	2301F#	2000		
G4		2	2401, 2402	2000		

* G1 ~ G3 : Range-Finding Study, G4 : Main study, B.W. : Body weight

4.4 시험물질의 투여 경로 및 방법

투여 전날 실험동물의 등 부위를 가급적 피부가 손상 되지 않도록 닦겨 제거하였다. 도포면적은 체표면적의 10 % 정도 [rat : (4 × 4) cm²]로 하였다. 시험물질 조제물을 gauze에 적용 후 재오한 부위에 부착하고, 유실을 막기 위해 비자극성 테이프 (Tegaderm, 3M)와 탄력붕대 (Coban, 3M)로 약 24 시간동안 고정하였다. 노출 종료 후 도포물을 제거하고 피부에 남아있는 시험물질 조제물을 멸균용유수로 잘 닦아주었다.

4.5 관찰항목

4.5.1 일반중상

일반중상 관찰은 모든 동물에 대하여 매일 1 회, 시험물질 투여 후 14 일까지 실시하였다. 단, 투여 당일에는 투여 후 0.5 시간에 관찰하고, 투여 후 1 ~ 6 시간까지는 1 시간 간격으로 매 시간마다 관찰하였다.

4.5.2 체중

체중은 도입 시, 군 분리 시, 시험물질투여 개시 직전, 투여 개시 후 7 일 및 14 일째에 측정 하였다.

4.5.3 부검

시험물질 투여 후 14 일째 모든 생존동물의 외관검사를 실시하고, Isoflurane (아이프란액, 하나제약, 대한민국)으로 마취시킨 후 병형치사하여 육안으로 장기를 검사하였다. 이상 징기는 발생하지 않아 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

5. 시험계획서의 변경 및 일탈 (Amendments and Deviations from the study plan)

5.1 시험계획서의 변경

실험동물 공급 업체의 요청에 따라 업체 상호명과 주소가 변경되었고 생산처가 추가되었으나, 시험결과에 영향을 미치는 요인은 없었다 (Annex 6).

5.2 기타

이외에는 시험계획서에 대한 변경 및 일탈사항은 없었다.

6. 자료의 보관 (Archives)

시험기간 중에 발생한 모든 시험기초자료는 해당 농약등 또는 원제의 등록일로부터 3년간 보관하며, 5년이 경과된 자료의 경우 표준작업지침서에 따라, 시험의뢰자와 협의하여 보관 및 폐기를 진행한다.

6.1 보관기록 및 자료의 종류

- (1) 시험계획서에 관한 기록
- (2) 시험물질에 관한 기록 및 자료
- (3) 시험계획에 관한 기록 및 자료
- (4) 관찰, 측정 및 검사에 관한 기록
- (5) 시험의뢰자와의 송수신 기록
- (6) 최종보고서에 관한 기록

6.2 보관장소

(재)한국과학기술연구원 확산 자료보관실 (1)

4.5 관찰항목

4.5.1 일반중상

일반중상 관찰은 모든 동물에 대하여 매일 1 회, 시험물질 투여 후 14 일까지 실시하였다. 단, 투여 당일에는 투여 후 0.5 시간에 관찰하고, 투여 후 1 ~ 6 시간까지는 1 시간 간격으로 매 시간마다 관찰하였다.

4.5.2 체중

체중은 도입 시, 군 분리 시, 시험물질투여 개시 직전, 투여 개시 후 7 일 및 14 일째에 측정 하였다.

4.5.3 부검

시험물질 투여 후 14 일째 모든 생존동물의 외관검사를 실시하고, Isoflurane (아이프란액, 하나제약, 대한민국)으로 마취시킨 후 병형치사하여 육안으로 장기를 검사하였다. 이상 징기는 발생하지 않아 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

5. 시험계획서의 변경 및 일탈 (Amendments and Deviations from the study plan)

5.1 시험계획서의 변경

실험동물 공급 업체의 요청에 따라 업체 상호명과 주소가 변경되었고 생산처가 추가되었으나, 시험결과에 영향을 미치는 요인은 없었다 (Annex 6).

5.2 기타

이외에는 시험계획서에 대한 변경 및 일탈사항은 없었다.

6. 자료의 보관 (Archives)

시험기간 중에 발생한 모든 시험기초자료는 해당 농약등 또는 원제의 등록일로부터 3년간 보관하며, 5년이 경과된 자료의 경우 표준작업지침서에 따라, 시험의뢰자와 협의하여 보관 및 폐기를 진행한다.

6.1 보관기록 및 자료의 종류

- (1) 시험계획서에 관한 기록
- (2) 시험물질에 관한 기록 및 자료
- (3) 시험계획에 관한 기록 및 자료
- (4) 관찰, 측정 및 검사에 관한 기록
- (5) 시험의뢰자와의 송수신 기록
- (6) 최종보고서에 관한 기록

6.2 보관장소

(재)한국과학기술연구원 확산 자료보관실 (1)

7. 결과 (Results)

7.1 사망률 및 일반증상 (Table 1)

실험기간 중 시험물질 투여에 의한 이상증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다.

7.2 체중변화 (Table 2)

체중측정 결과, 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.

7.3 부검소견 (Table 3)

부검 시 투여부위를 포함한 모든 개체의 주요장기에 대한 육안적 관찰 결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

8. 고찰 및 결론 (Discussion & Conclusion)

파워백신에 대한 급성경피독성시험을 실시하기 위해 SD계 암컷 rat를 사용하여 시험물질 투여 용량을 200, 1000 및 2000 mg/kg B.W. (Range-Finding study)와 2000 mg/kg B.W. (Main study)로 단계를 나누어 각각 1 회 경피 투여하였다. 시험물질 투여 후 14일간 사망률, 일반 증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 검사 하였다.

실험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.

일반증상 관찰결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

체중측정 결과, 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.

부검소견 결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 파워백신은 국제적으로 공인되고 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5/Unclassified로 분류되었다.

제품의 Rat에 대한 급성경피 독성시험 첨부 보고서

최 종 보 고 서

TNK-2020-000391

파워백신

어류(잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 파워백신의 급성독성시험

한국화학융합시험연구원



시험책임자 진술서

[Study Director Statement]

시험 제목 : 어류(잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 파워백신의 급성독성시험
[Study title]

시험 번호 : TNK-2020-000391
[Study number]

시험의뢰자 [Sponsor]

명 칭 : (주)한농
소재지 : 전라남도 장성군 남면 나노산단3로 33-5
대표자 : 김철홍
담당자 : 김철홍 부 서 : 기업부설연구소
연락처 : Tel. 062-530-5312 Fax. 062-530-5311

시험기관 [Test facility]

명 칭 : (재)한국화학융합시험연구원 화순
소재지 : 전라남도 화순군 화순읍 신단길 12-63
운영책임자 : 박명규
연락처 : Tel. 061-370-7700 Fax. 061-370-7777

이 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임하에 수행되었으며, 보고서는 GLP 규정에 준수하여 실시하였다.

1. 유기농업자재 시험연구기관 관리 기준
- 1.1. 국립농산물품질관리원 고시 제2017-35호 (2017-06-03), "유기농업자재 시험연구기관 지정 및 관리 기준"
2. 시험방법
- 2.1. 국립농산물품질관리원 고시 제2019-5호 (2019-06-17), "유기농업자재 공시 기준"
- 2.2. 농촌진흥청고시 제2020-4호(2020-02-28), 13-1-1 특수어류급성독성시험

본 보고서는 승인된 시험계획서에 따라 수행되었으며, 시험 진행 중 신뢰성을 저해할 만한 상황이 발생하지 않았음을 확인하였다.

시험책임자 이 유 진 2020-10-22
[Study director] 이 유 진 [Lee Yu-jin, M.S.] Date

운영책임자 박 명 규 2020-10-22
[Test facility management] 박 명 규 [Park Myeong-kyu, D.V.M., Ph.D.] Date

- 1 -

제품의 어류에 대한 급성독성시험 성적서

시험참여자

[Study Staffs]

다음의 시험자는 시험 중 중요한 시험단계 및 기록을 (재)한국화학융합시험연구원 화순의 표준작업지침서와 본 시험의 시험계획서에 따라 수행하였다.

시험 담당자 : 이 유 진
시험물질관리 책임자 : 이 진 의
시험물질 처리 : 이 유 진
시험생물 관리책임자 : 이 유 진
보고서 작성자 : 이 유 진

- II -

목 차

[Contents]

보고서요지	
시험개요	I
시험참여자	II
목차	III
1. 요약 (Summary)	1
2. 서론 (Introduction)	2
2.1. 시험일정	2
3. 재료 및 방법 (Materials & Methods)	3
3.1. 시험물질 및 대조물질	3
3.2. 시험생물	3
3.3. 시험기구 및 장비	5
3.4. 시험조건	5
3.5. 시험방법	5
3.6. 관찰항목	6
3.7. 통계처리 및 결과표시	7
4. 시험계획서의 변경 및 이탈 (Amendments and deviations from the study plan)	7
5. 기록 및 자료 보관 (Archives)	7
5.1. 보관기록 및 자료의 종류	7
5.2. 보관장소	7
6. 결과 (Results)	8
6.1. 시험계의 순화	8
6.2. 환경모니터링	8
6.3. 사육용수(시험용수)	8
6.4. 처사 및 중독증상	8
6.5. 경시적 수질변화	8
6.6. 시험기간 중 환경변화	8
6.7. 시험계의 전장 및 체중	8

- III -

7. 결론 (Conclusion) 9

8. 참고문헌 (References) 10

9. Tables (Group summary) 11

Table 1. Cumulative mortality of *Cyprinus carpio* 11

Table 2. Symptom of intoxication of *Cyprinus carpio* 12

Table 3. Changes of pH 13

Table 4. Changes of water temperature 14

Table 5. Changes of DO 15

Table 6. Light intensity 16

Table 7. Body weight and Total length of *Cyprinus carpio* 17

Table 8. LC₅₀ values 18

10. Annexes 19

Annex 1. Information of test substance (Submitted by sponsor) 19

Annex 2. Certificate of analysis (Submitted by sponsor) 21

Annex 3. Receipt of test substance 22

Annex 4. Certificate of water quality analysis 23

11. Figure 28

Figure 1. Test solution at specific time after treatment of the test substance 28

TNK-2020-000391 Final report

1. 요약 (Summary)

어류(잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 파워백신의 급성독성시험을 실시하였다.

- 본 시험은 농촌진흥청고시 제2020-4호 (2020-02-28), 13-1-1 담수어류급성독성시험에 따라 수행되었다.
- 시험조건은 96 시간 동안 시험용액을 유지하는 지수식으로 설정하였다.
- 본시험의 시험농도는 100 mg/L (설정 농도)로 하여 한계시험 (limit test)으로 설정하였다.
- 본시험 동안 시험용액 중 시험물질의 농도에 대한 별도의 분석은 시행하지 않았다.
- 본시험 기간 중 처리군에서 치사 및 중독증상이 관찰되지 않았다.
- 본시험 기간 중 시험용액의 pH는 평균 7.15 (7.02 - 7.29)로 측정되었다.
- 본시험 기간 중 시험용액의 DO는 평균 7.21 mg/L (6.19 mg/L - 8.22 mg/L)로 측정되었고, 포화농도의 평균 84.4 % (72.2 % - 95.8 %)로 측정되었다.
- 본시험 기간 중 시험용액의 수온은 평균 23.4 °C (23.2 °C - 23.5 °C)로 측정되었다.
- 본시험 종료 후 측정된 잉어의 체중 및 전장은 대조군에서 체중 (0.5372 ± 0.0559) g, 전장 (3.3 ± 0.1) cm, 처리군에서는 체중 (0.5658 ± 0.0638) g, 전장 (3.3 ± 0.1) cm로 측정되었다.
- 본시험 조건하에서 시험의 결과는 아래와 같다.

Observation time	LC ₅₀ ¹⁾ (mg/L)	95 % Confidence interval (mg/L)	NOEC ²⁾ (mg/L)
48 h	>100	N.A. ³⁾	100
96 h	>100	N.A.	100

¹⁾ Median lethal concentration, based on nominal concentration
²⁾ No observed effect concentration
³⁾ Not applicable

Page 1 of 28

TNK-2020-000391 Final report

2. 서론 (Introduction)

본 시험은 파워백신의 어류(잉어, *Cyprinus carpio*) 급성독성시험을 통하여 시험물질의 안전성 평가 시험기초자료로 활용코자 실시하였다.

- 동물보호법[법률 제16977호(2020-02-11, 일부개정)]
- 실험동물에 관한법률[법률 제15944호(2018-12-11, 일부개정)]
- 동물윤리위원회 승인번호 : IAC2020-2356(변경전), IAC2020-3009(변경후)

2.1. 시험일정

시험개시일 : 2020-09-21

실험개시일 : 2020-09-21

예비시험 : 2020-09-22 ~ 2020-09-26

순화기간 : 2020-09-28 ~ 2020-10-05

시험물질 처리 : 2020-10-05

본시험 : 2020-10-05 ~ 2020-10-09

실험종료일 : 2020-10-19

최종보고서(초안) 제출일 : 2020-10-21

시험종료일 : 2020-10-22

Page 2 of 28

TNK-2020-000391 Final report

3. 재료 및 방법 (Materials & Methods)

3.1. 시험물질 및 대조물질

3.1.1. 시험물질 (Annex 1, Annex 2, Annex 3)

시험물질명 : 파워백신

공급원 : ㈜연농

KTR 코드 : TS-02202

외관 및 색상 : 불투명한 액상

보관조건 : 상온 [(15 - 25)°C]

3.1.2. 주원료 투입비율 (Submitted by sponsor) (Annex 2)

용명	순도 (%)	투입량 (%)	함량 (%)
Bacillus amyloliquefaciens 추출물	100	100	100

3.1.3. 사육용수(시험용수)

사육용수는 수돗물을 전처리 필터 (1.0 μm)와 세균제거 필터 (0.2 μm)를 통과시킨 후 저수조에서 48 시간 이상 대기시킨 후 사용하였다. 사육용수의 수질은 (재)한국화학융합시험연구원에서 환경부 고시 먹는물 수질공정시험기준에 따라 분석하였다 (TAK-2020-083015, 2020-06-25, Annex 4).

3.1.4. 대조물질

- 대조물질 : 사육용수(시험용수)
- 표준물질 : 3,5-dichlorophenol (Sigma-aldrich, Lot No. MKCF0053)

3.2. 시험생물

3.2.1. 종명

잉어 (*Cyprinus carpio*)

3.2.2. 입수(분양)처

명칭 : 오창양어장

주소 : 충청북도 청원군 오창읍 중산리 331

입수일 : 2020-04-01

Page 3 of 28

3.2.3. 공급원

명칭 : (재)한국화학융합시험연구원 화순
주소 : 전라남도 화순군 화순읍 산단길 12-63

3.2.4. 사용설명

(재)한국화학융합시험연구원 화순 여류사육실(2)

3.2.5. 사용환경 조건

수조 : 장방향의 전면이 유리로 된 수조
수소이온농도 : 6.0 - 8.5
용존산소량 : 포화 용존산소의 80 % 이상
수온 : (20 - 24)℃
경도 : (10 - 250) mg/L
광주기 : 광조건 16시간 (08:00 - 24:00)
암조건 8시간 (24:00 - 08:00)
조도 : (540 - 1000) Lux
사료 : 탕말(재일사료, 대한민국) 1 회/일 공급

3.2.6. 환경 모니터링

수온 : Orion 3 Star (Thermo Scientific)로 별 1 회 측정
pH 및 DO : Orion 3 Star (Thermo Scientific)로 별 1 회 측정
조도 및 광주기 : 조도계 (ANA-F11, TOKYO Photoelectric) 및 광주기기록계 (KR100, 코닉스)로 분기당 1 회 측정
여류 사육실(2)의 환경 모니터링 결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

3.3. 시험기구 및 장비

시험용기 : 원통형 유리수조 (38 cm H. × 28 cm φ, 최대용량 20 L)
수온 : Multi 9430 (WTW)
수소이온농도측정기 : Multi 9430 (WTW)
용존산소량측정기 : Multi 9430 (WTW)
경도계 : HI 96735 (Hanna Instruments)
조도계 : ANA-F11 (TOKYO Photoelectric Co., Ltd.)
저울 : MS204 (Mettler Toledo)

3.4. 시험조건

실험실 : 여류실험실(1)
노출기간 : 96 시간
노출조건 : 지수식
시험용액 용량 : 20 L
시험생물수 : 예비시험 5 마리 이상 / 처리군
본시험 10 마리 / 처리군
수소이온농도 : 6.0 - 8.5
용존산소량 : 포화농도의 60 % 이상
수온 : (20 - 24) ℃
경도 : (10 - 250) mg CaCO₃/L
광주기 : 광조건 16시간 (08:00 - 24:00), 암조건 8시간 (24:00 - 08:00)
먹이 : 실험개시 24시간부터 실험종료시까지 사료급여하지 않음

3.5. 시험방법

3.5.1. 시험농도
예비시험 결과 1, 10, 50, 100 mg/L의 시험농도(설정농도)에서 처사 및 중독증상이 관찰되지

않았다. 따라서 본시험의 농도는 100 mg/L (설정농도)로 하여 한계시험 (limit test)으로 설정하였다.

3.5.2. 시험물질용액 및 시험용액의 조제

- 시험용액 (test solution) 조제

시험군	시험농도 (mg/L)	Stock solution (g)	최종용량 (L)
대조군 ¹⁾	-	-	20
처리군 1	100	2	20

¹⁾ 대조군의 시험용액은 시험용수이다.

3.5.3. 표준물질(양성대조)시험

표준물질시험은 TNK-2020-000016 (시험기간 : 2020-09-14 - 2020-09-18)로 시험한 결과를 적용하였다 (Table 7, Table 8).

3.6. 관찰항목

3.6.1. 처사 및 이상증상 관찰

모든 시험수조에 대하여 시험시작 후 (2-3) 시간, (5-6) 시간, 24 시간(오전, 오후), 48 시간(오전, 오후), 72 시간(오전, 오후), 96 시간 경과 시에 이상증상, 특이증상 및 처사 관찰을 실시하였다. 처사의 판정은 시험계를 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 처사로 간주하였다.

3.6.2. 시험용액의 수질측정

시험 기간 중 시험용액의 수질측정은 다음과 같이 진행하였다.

구분	측정주기	모델명	SOP No.
수온	1 회/일	Multi 9430 (WTW)	KG-EQM-084(1)
pH	1 회/일	Multi 9430 (WTW)	KG-EQM-084(1)
DO	1 회/일	Multi 9430 (WTW)	KG-EQM-084(1)
경도	1 회/시험	HI 96735 (Hanna Instruments)	KG-EQM-028(1)
조도	노출일 및 노출종료일	ANA-F11 (TOKYO Photoelectric Co., Ltd.)	KG-EQM-150(1)

3.6.3. 시험계의 전장 및 체중

잉어의 체중 및 전장은 실험종료 후 대조군과 처리군에서 각각 10 마리씩을 위해 측정하였다.

3.7. 동계처리 및 결과표시

3.7.1. 반수처사농도 (LC₅₀)

시험물질 처리 후 48 시간 및 96 시간 경과시까지 처사 개체를 관찰할 수 없었으므로, LC₅₀ 및 95 % 신뢰한계는 산출하지 않았다. LC₅₀은 설정농도로 표기하였다.

3.7.2. 무영양관찰농도 (NOEC)

NOEC는 중독증상이 없고 처사개체가 발생하지 않는 최고 시험농도로 표시하였다. NOEC는 설정농도로 표기하였다.

4. 시험계획서의 변경 및 일탈 (Amendments and deviations from the study plan)

시험기간 동안 시험계획서에 대한 변경 및 일탈사항은 없었다.

5. 기록 및 자료 보관 (Archives)

시험기간중에 작성된 모든 시험기초자료는 유기농업자재의 공식 또는 인종일로부터 3년간 보관한다. 단, 최종보고서 발급 후 5 년이 경과된 자료의 경우 표준직업지침서에 따른다.

5.1. 보관기록 및 자료의 종류

- (1) 시험계획서에 관한 기록
- (2) 시험물질에 관한 기록 및 자료
- (3) 시험계에 관한 기록 및 자료
- (4) 관찰, 측정 및 검사에 관한 기록
- (5) 시험의뢰자와의 송수신 기록
- (6) 최종보고서에 관한 기록

5.2. 보관장소

(재)한국화학융합시험연구원 화순 자료보관실 (H)

6. 결과 (Results)

6.1. 시험계의 순화

본시험 순화기간 중 치사가 발생하지 않고 건강상태가 양호하여 실험에 사용하였다.

6.2. 환경모니터링

어류사육실(2) 및 어류실험실(1)의 모니터링 결과, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

6.3. 사육용수(시험용수)

사육용수(시험용수)의 검사 결과, 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다 (Annex 4).

6.4. 치사 및 중독증상

시험기간 동안 각 시험농도에서의 치사 (mortality)여부를 Table 1 에 정리하였으며, 중독증상 (symptom of intoxication)은 Table 2 에 정리하였다.

6.5. 경시적 수질변화

시험기간 중 시험용역의 수질변화는 아래와 같이 측정되었다 (Table 3, Table 4, Table 5).
 - pH는 평균 7.15 (7.02 - 7.29)로 측정되었다.
 - DO는 평균 7.21 mg/L (6.19 mg/L - 8.22 mg/L)로 측정되었고, 포화농도의 평균 84.4 % (72.2 % - 95.8 %) 로 측정되었다.
 - 수온은 평균 23.4 °C (23.2 °C - 23.5 °C)로 측정되었다.
 - 경도는 43 mg CaCO₃/L로 측정되었다.

6.6. 시험기간 중 환경변화

본시험기간 중 조도는 아래와 같이 측정되었다.
 - 조도는 평균 902 Lux (883 Lux - 926 Lux)로 측정되었다 (Table 6).

6.7. 시험계의 전장 및 체중

본시험 종료 후 측정된 잉어의 체중 및 전장은 아래와 같이 측정되었다 (Table 7).
 - 대조군은 체중 (0.5372 ± 0.0559) g, 전장 (3.3 ± 0.1) cm 이었다.
 - 처리군은 체중 (0.5658 ± 0.0638) g, 전장 (3.3 ± 0.1) cm 이었다.

7. 결론 (Conclusion)

어류(잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 파위백신의 급성독성시험을 지속적으로 실시한 결과는 아래와 같고, LC₅₀ 및 NOEC는 설정농도로 표기하였다 (Table 8).

- 48 시간 및 96 시간-LC₅₀은 100 mg/L 이상으로 나타났다.
 - 48 시간 및 96 시간-NOEC는 100 mg/L 이었다.
- 시험기간 중 결과에 영향을 미칠 수 있는 요인은 발생하지 않았다.

제품의 어류에 대한 급성독성시험 첨부 보고서

IBF U20015A

시험성적서

신청인	성명	김형준	업종명	위험농
	주소	전남 장성군 남면 나노산단3로 33-5		
공시품	영점	파위백신		
	형태	액상		
검사항목	미생물 분석	병원성미생물검사(<i>E.coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> sp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i>)		
용도	유기농업자재 공시품			
시험책임자	남효승 (인)	시험담당자	양현주 (인)	
시험결과				
<i>E.coli</i> O157:H7 (검정)		불감균		
<i>Salmonella</i> sp.(검정)		불감균		
<i>Staphylococcus aureus</i> (검정)		불감균		
<i>Listeria monocytogenes</i> (검정)		불감균		
<i>Bacillus cereus</i> (검정)		불감균		
2020년 07월 10일 (재)전남생물산업진흥원 친환경농생명연구센터장				

농촌진흥청 국립농업과학원
 (재)전남생물산업진흥원
 친환경농생명연구센터
 전남 곡성군 양면 299호 400
 Tel. 0611 362-0630
 Fax. 0611 362-0631
 www.ripb.or.kr

U20015A

(주)현농

병원성미생물 검사 시험성적서

1. 시험의뢰자 및 시험연구기관 정보

- 1) 시험의뢰자 기관 정보
 - 회사명 : 위험농
 - 대표자 : 김형준
 - 사업자등록번호 : 409-81-95886
 - 회사주소지 : 전남 장성군 남면 나노산단3로 33-5
- 2) 시험연구기관 정보
 - 시험연구기관 : (재)전남생물산업진흥원 친환경농생명연구센터
 - 시험책임자 : 생명농업연구팀 남효승 팀장
 - 시험수령자 : 생명농업연구팀 양현주 연구원

2. 시험분석 항목

- 1) 병원성대장균 (*Escherichia coli* O157:H7)
- 2) 살모넬라 (*Salmonella* sp.)
- 3) 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)
- 4) 리스테리아 모노사이토제네스 (*Listeria monocytogenes*)
- 5) 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*)

3. 시험분석 시료 : 「파위백신」



제품의 병원성 미생물 검사 시험성적서

시험성적서

JBF [재]전남생물산업진흥원
친환경농생명연구센터

농촌진흥청 지정
유기농업자재시험연구원
바이오시밀러 연구기관
농약등의시험연구원



[재]전남생물산업진흥원
친환경농생명연구센터

전남 곡성군 입다 495
Tel. 061) 362-0630
Fax. 061) 362-0631
www.jbc.kr

4. 병원성 미생물 검사 결과

1) 병원성대장균 (*Escherichia coli* O157:H7)

① 검사방법

- mEC broth에서 증균 배양한 후 MacConkey sorbitol agar plate에서 분리배양한다.
- sorbitol을 분해하지 않는 무색 colony를 위해 EMB agar plate에 접종한다.
- EMB agar plate에서 녹색의 급속성광택이 보이는 colony를 선택하여 결정형 시험을 실시한다.

② 검사결과



- EMB agar plate 상에서 녹색의 급속성광택을 보이는 colony가 검출되지 않아 병원성대장균에 대해 음성으로 판정

③ 최종결과

- 병원성대장균 (*Escherichia coli* O157:H7) : 불검출

농촌진흥청 지정
유기농업자재시험연구원
바이오시밀러 연구기관
농약등의시험연구원



[재]전남생물산업진흥원
친환경농생명연구센터

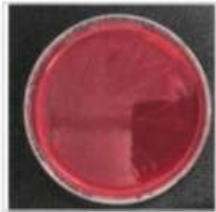
전남 곡성군 입다 495
Tel. 061) 362-0630
Fax. 061) 362-0631
www.jbc.kr

2) 살모넬라 (*Salmonella* sp.)

① 검사방법

- Rapport-Vassiliadis(RV) broth에서 배양한다.
- RV broth에서 배양한 배양액을 Xylose Lysine Desoxycholate(XLD) agar plate에서 배양한다.
- 용양에 검은환이 있는 분홍 외곽을 선택하여 결정형 시험을 통해 확인하거나 VITEK 기기를 이용하여 판정한다.

② 검사결과



- XLD agar plate에서 용양에 검은환이 있는 분홍 colony가 검출되지 않아 *Salmonella*에 대해 음성으로 판정

③ 최종결과

- 살모넬라 (*Salmonella* sp.) : 불검출

농촌진흥청 지정
유기농업자재시험연구원
바이오시밀러 연구기관
농약등의시험연구원



[재]전남생물산업진흥원
친환경농생명연구센터

전남 곡성군 입다 495
Tel. 061) 362-0630
Fax. 061) 362-0631
www.jbc.kr

3) 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)

① 검사방법

- 10% NaCl을 첨가한 Tryptic Soy broth에서 배양한다.
- 배양 후 Baird-Parker agar plate에 접종하여 배양한 후 중심부에 환을 하고 검출되어 나가는 colony를 선택하여 확인시험을 실시한다.

② 검사결과



- Baird-Parker agar plate에서 환이 있는 검은환이 나가는 colony가 검출되지 않아 *Staphylococcus aureus*에 대해 음성으로 판정

③ 최종결과

- 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*) : 불검출

4) 리스테리아 모노사이토제네스 (*Listeria monocytogenes*)

- ① 검사방법
 - Oxford agar plate에 배양한 후 투명한 colony 주변으로 검은색을 띠는 colony를 선택하여 확인시험을 실시한다.

② 검사결과



- Oxford agar plate에서 투명한고 주변의 검은색을 띠는 colony가 검출되지 않아 *Listeria monocytogenes*에 대해 음성으로 판정

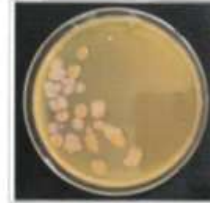
③ 최종결과

- 리스테리아 모노사이토제네스 (*Listeria monocytogenes*) : 불검출

5) 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*)

- ① 검사방법
 - MYP agar에 접종 배양 후 colony 주변에 leucithinase를 생성하는 흔적인 환이 있는 분홍색 colony를 *Bacillus cereus*로 양성으로 판정

② 검사결과



- MYP agar에 접종 배양 후 colony 주변에 leucithinase를 생성하는 흔적인 환이 있는 분홍색 colony가 검출되지 않아 *Bacillus cereus*에 대해 음성으로 판정

③ 최종결과

- 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*) : 불검출

- 본 시험은 농산물 안전성 검사에 대한 품질관리 목적으로 실시하며, 검사 결과에 따라서는 추가적인 검사나 조치 등이 필요할 수 있습니다.
 - 본 시험은 식재료의 안전성 확보를 위하여 실시하며, 검사 결과에 따라서는 추가적인 조치나 조치가 필요할 수 있습니다.

(재)전남생물산업진흥원
 친환경농생명연구센터장

제품의 병원성미생물 검사시험 첨부 보고서

(인용현황) 농촌진흥청 비료시험연구기관 제60호 & 국립농산물품질관리원 유기농업자재시험연구기관 제47호

Vito 비토분석센터(주)

시험 책임자: 전유민, 김태환
 시험 담당자: 전유민, 김태환

분석 성적서

상 호	(주)원농	사업자등록번호	409-81-95886
주 소	전라남도 곡성군 일면 송천리 1050 전라남도생물발생테마시험생산단지행정관 104		
접수일자	2020. 7. 2	용 도	유기농업자재목록공시
접수번호	2020-07-E002	시 료 명	파워백신

분석(시험)성적 결과 :

분석항목(단위)	규격	분석결과	비고
비소(mg/kg)	20이하	불검출	* 유해성분 규격은 토양개량 및 작물생육용 유기농업자재 중 시행규칙 별표 13 제1호 다목2)에 따라 농관원장이 정하는 유해중금속의 최대허용량(고형분 건조기준, 액상은 환율기준)을 기재하였음
카드뮴(mg/kg)	2이하	불검출	
수은(mg/kg)	1이하	불검출	
납(mg/kg)	50이하	불검출	
크롬(mg/kg)	90이하	1.12	
구리(mg/kg)	120이하	불검출	
니켈(mg/kg)	20이하	0.55	
아연(mg/kg)	400이하	0.44	

귀하기 당사에 의뢰한 시료에 대한 분석 성적입니다.

2020년 7월 9일

비토분석센터 주식회사



이 성적은 신청인이 제출한 시료를 분석한 것으로 관련사항 이외의 선진, 소송 등 증거자료로 사용하실 수 없습니다.

주소: 경기도 안산시 단원구 지원로107, 시화저식산업센터205호 TEL:(031)364-8181, FAX:(031) 364-8185

제품의 유해중금속검사 시험성적서

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 연구개발 목표

구분	내용
최종목표	유용 미생물과 식물추출물 혼합 제형에 의한 다기능 고효율의 복합 작물보호제 개발
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물 대사물질과 천연 혼합물에 의한 병해충 복합 방제제 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 기질을 토대로 한 배양공정개량으로 특허미생물의 강력한 항균·항충물질 생산 - 생리대사물질과 혼합 가능한 식물추출 유래 물질 이용 대상 병해충 복합 방제 - 병해충 복합 방제제의 제형별 방제효과 검증 ○ 신속 정확한 병해충 분자진단법 및 작물 면역기능 증진에 의한 예방적 효과검정 <ul style="list-style-type: none"> - 병원균 특이 마커에 의한 신속한 분자 진단 - 식물체내 면역 기능 활성 증진을 통한 작물의 병해충 예방적 방제 효과 - 토양내 생태환경 조성에 의한 병원균 밀도변화와 최소저해농도 및 살포량 결정 ○ 유기농자재 등록 및 분자 진단 통합시스템에 의한 방제지침서 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 병해충 발생별 진단 결과를 수식화하여 약제 살포시기 결정 - 유기농자재 등록을 위한 독성 및 약효 시험을 통한 포장검정 - 현장 진단 결과 값을 기초로 방제 지침서 및 매뉴얼 작성

3-2. 목표 달성여부

가. 정성적 목표

연구목표	개발 내용 및 범위	달성도(%)
배양 개량공정에 의한 항균·살충 기능성 물질 활성 조건 확립 및 특성 조사	<ul style="list-style-type: none"> ○항진균 및 살충 활성 증진을 위한 배양개량공정 최적화 및 진단 특이 마커 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▶기 분리된 균주의 살균 및 살충 대사물질 최적 조건 확립 ▶미생물 추출물과 식물추출물의 혼합 효과 검정 ▶미생물 및 병원균 특이 마커 개발 및 QC 	100
선발된 미생물 및 식물추출물의 대량 추출방법 검정 및 병해충 발생조사	<ul style="list-style-type: none"> ○미생물 및 식물추출물의 대량배양 및 추출법 확립 및 효과검정 <ul style="list-style-type: none"> ▶선발 유효성분의 대량배양 및 추출 조건방법 확립 ▶방제매뉴얼 작성을 위한 병해충 발생 및 병원균 수집 ▶선발 미생물과 식물추출물 제형의 약해검정 	100
미생물과 식물추출물의 혼합에 의한 병해충 복합 방제 및 식물면역증진 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○미생물과 식물추출물 혼합 제형의 병해충 복합방제제 개발 및 식물면역 기능에 미치는 영향 조사 <ul style="list-style-type: none"> ▶항균력 및 살충력 증진을 위한 최적 혼합 조건별 방제효과 검정 ▶토양병해의 예방·치료적 효과 증진을 위한 토양생태환경개선과 병원균 특이마커에 의한 분자진단 이용 개발 추출 혼합물 효과 검정 	100
후보 물질 혼합에 의한 시제품 제작 (액상 및 입상 제형화)	<ul style="list-style-type: none"> ○시제품 제작 및 효과검정 <ul style="list-style-type: none"> ▶후보 물질 혼합물의 제형화 및 효과검정(포트 및 실내유묘검정) ▶시제품 소포장 검정 및 약해검정(하우스 포장 검정) ▶방제 매뉴얼 작성을 위한 작물 생육기별 병해충 발생 조사 	100
분자진단 통합시스템에 의한 병해충 복합 방제 시제품의 방제지침서 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○분자진단 통합시스템과 방제지침서에 의한 방제매뉴얼 개발과 기존 유기농자재와의 혼용가능성 검토 <ul style="list-style-type: none"> ▶특이마커 분자진단에 의한 방제 시스템 개발 ▶개발 제품의 농가 사용 방법 개발 	100
제형 제품화 및 포장 실증에 의한 방제매뉴얼 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○제품화 및 방제매뉴얼 작성 <ul style="list-style-type: none"> ▶제형 제품의 병해충별 포장 방제효과검정 ▶포장 방제 매뉴얼 개발 ▶시제품 제품 안전성 및 유기농자재 등록 	100

나. 정량적 목표

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용		기타 (타 연구기반지표)
	특허출원	특허등록	품질등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	5	5		10		30	20		25				3	1			1		
최종목표	2	1		1		1	170		1				6	3			1		
연구기간내 달성실적	3	2		1	5	1	134.13		2		1	2	2	5.0	10	2		2	
종료1차년도							50							1	1				
종료2차년도							50												
종료3차년도																			
종료4차년도																			
종료5차년도																			

다. 관련분야 기여도

(1) 기술적 측면

- 기존 작물보호제와는 달리 생물적 방제 미생물의 유효성분과 식물추출물을 제형화함으로써, 난방제성인 토양병해와 점박이응애를 복합적으로 방제할 수 있는 작물보호제를 개발함.
- 대상 병해충에 대한 살균 및 살충성분을 분석한 후, 미생물의 배양공정을 개량하여 특정 유효성분을 대량으로 추출할 수 있는 공정을 개발함.
- 특이마커에 의한 토양병해 진단 및 방제를 위한 통합시스템을 적용하여 개발 제품의 과학적인 접근방법에 의한 신속·정확한 진단과 방제 효율을 높이는 기술적인 활용범위를 넓힘.

(2) 경제·산업적 측면

- 특정 병해충에 대한 방제물질로서 과학적이고 명확한 유효성분을 근거로 개발 제품의 상용화에 대한 국내 및 국제적인 시장 진출을 가능케 함.
- 난방제성 병해충에 대한 환경친화적인 작물보호제의 원천기술을 확보함으로써 작물보호 시장의 국제 경쟁력 확보가 가능해짐.
- 기존 병해충 발생 진단 및 방제에 대한 과학적인 접근과 환경친화적인 작물보호제 개발에 관한 노하우 확보 및 국가적인 연구경험 인력의 원활한 확보 시스템을 구축함.

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등) : 해당사항없음

4. 연구결과의 활용 계획

4-1. 활용방안

가. 개발 기술 성과물 활용방안

- 본 연구개발 성과물로 유기농자재 공시인증을 받은 “파워백신” 제품은 개발 연구 중에도 매출액이 발생할 정도로 효과면에서 우수성을 인정받았으며, 추후 농자재 도매회사 및 농협과

연계하여 판매 협정을 체결함으로써 국내 판매량을 확장할 계획임

- 또한 개발 제품은 각 농업기술원과 농업기술센터 등과의 시범사업을 실시함으로써 홍보와 교육을 강화하고 판매의 다양화를 갖출 계획임
- 자체 홍보 및 판매망 구축을 위해 총판 구성, 인터넷 쇼핑몰 구축, 컨설팅을 통한 가맹 농가 등 단지화를 통해 마케팅 전략을 계획함
- 해외 거점구축과 수출을 위해 중국 및 동남아 현지법인을 통한 판매망 구축과 해외 KOTRA 협조에 의한 해외 진출 방안도 모색함.

나. 제품 대량생산을 위한 생산공정 설비 구축

- 2020년부터 사업화 구축을 통한 계획을 수립하였으며, 본격적으로 2021년부터는 마케팅과 홍보 전략을 기본으로 제품의 대량생산 설비 구축 완료화함으로써, 생산 공정 확충하고 보완할 계획임
- 2019년부터 판매망을 구축한 개발제품을 유기농자재 인증에 따라 안정적인 제품 판매가 가능해졌으며, 그에 따른 판로가 더 확대되어 꾸준한 매출액 발생이 기대됨

4-2. 사업화 계획

가. 산업화 방향

- 기질 특이성을 이용한 배양공정 개량으로 기능성 미생물과 식물추출물을 혼합한 병해충 방제제로 유기농자재 등록으로 인증된 제품을 대량 생산할 계획임
- 기존 병해충 방제에 관련된 환경친화적인 제품들은 지상부의 흰가루병과 진딧물 방제 위주의 제품이 생산되거나 농업현장에서 가장 필요한 토양 병해와 점박이응애에 대한 방제제가 전무하여 유기농산물 생산 증대와 고품질 생산에 대한 가장 큰 애로사항을 해결할 것으로 기대됨.
- 따라서 선진국을 중심으로 이들 친환경 유기 농산물을 생산하기 위한 필수적인 요소인 생물 농약 수요가 급증하고 있으므로, 친환경 농산물을 생산하기 위해 반드시 필요한 병해충 복합 방제가 가능한 제품 사용으로 고품질 농산물 생산에 대한 큰 수요가 있을 것으로 기대됨.

나. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	100	200	300	500	500	1,600
경제적 파급효과	200	300	500	700	700	2,400
부가가치 창출액	100	300	400	500	800	2,100
합 계	400	800	1,200	1,700	2,000	6,100

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

붙임. 참고문헌

- Balleza D, Alessandrini A, García MJB, 2019. Role of lipid composition, physicochemical interactions, and membrane mechanics in the molecular actions of microbial cyclic lipopeptides. *J. Membr. Biol.* 252(2-3), 131-157.
- Baysal Ö, Çalışkan M, Yeşilova Ö, 2008. An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 73(1-3), 25-32.
- Borriss R. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. *Bacteria in agrobiolology: Plant growth responses*: Springer; 2011. p. 41-76.
- Geissler M, Heravi KM, Henkel M, Hausmann R. Lipopeptide biosurfactants from *Bacillus* species. *Biobased Surfactants*: Elsevier; 2019. p. 205-240.
- Han JH, Yoon J, Son S, Kim JJ, Lee S, 2015. Combination effects of organic materials and *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua*. *Korean J. Pestic. Sci.* 19,411-417.
- Hanif A, Zhang F, Li P, Li C, Xu Y, Zubair M, Zhang M, Jia D, Zhao X, Liang J, 2019. Fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis. *Toxins* 11(5), 295.
- Jung W.-J., Park R.-D. 2014. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. *Mar. Drugs*, 12(11), 5328-5356.
- Livak K. J., Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Nanjundan J, Ramasamy R, Uthandi S, Ponnusamy M, 2019. Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. *Microb. Pathog.* 128, 374-380.
- Ongena M, Jacques P, 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16,115-125.
- Shoda M, 2019. *Biocontrol of Plant Diseases by Bacillus subtilis: Basic and Practical Applications*, CRC Press.
- Sun D, Liao J, Sun L, Wang Y, Liu Y, Deng Q, Zhang N, Xu D, Fang Z, Wang W, 2019. Effect of media and fermentation conditions on surfactin and iturin homologues produced by *Bacillus natto* NT-6: LC-MS analysis. *AMB Express* 9(1), 120.
- Yáñez-Mendizábal VFalconí CE, 2018. Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on *Andean lupin* seeds by lipopeptide production. *Biol. Control* 122, 67-75.
- Yucel S, Ozarslandan A, Colak A, Ay T, 2007. Methyl bromide alternatives for controlling *Fusarium* wilt and root knot nematodes in tomatoes in Turkey. In: II International Symposium on Tomato Diseases 808. pp: 381-386.
- Zhao H, Shao D, Jiang C, Shi J, Li Q, Huang Q, Rajoka MSR, Yang H, Jin M, 2017. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101(15), 5951-5960.
- Zhao Y, Selvaraj JN, Xing F, Zhou L, Wang Y, Song H, Tan X, Sun L, Sangare L, Folly YME, 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 9(3).
- Zihalirwa Kulimushi P, Argüelles Arias A, Franzil L, Steels S, Ongena M, 2017. Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Front. Microbiol.* 8, 850.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문)배양공정개량에 의한 마이크로바이옴 분리한 균주와 식물추출물 혼합에 의한 토양 병해와 점박이응애 방제제 개발 (영문)Development of control agents for soil-borne diseases and two spotted spider mite using biocontrol bacteria and plant extract mixture by improvement of culture process				
주관연구기관	전남대학교 산학협력단	주 관 연 구	(소속)전남대학교		
참 여 기 업	(주)현농	책 임 자	(성명)강범용		
총연구개발비 (601,000천원)	계	601,000	총 연 구 기 간	2018. 04 26. ~ 2020. 12 31.(2년9개월)	
	정부출연 연구개발비	450,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	14
	기업부담금	151,000		내부인원	11
	연구기관부담금	-		외부인원	3
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>본 연구는 생태학적 변화에 의한 작물재배환경 개선을 통한 토양내 미생물상 변화 조성으로 병원균 밀도 감소를 유도하면서 작물 마이크로바이옴 기반 식물과 미생물의 상호작용과정을 통한 식물면역증진에 의한 예방적 효과와 더불어 병해충에 대해 직접적인 살균·살충효과를 나타내는 식물추출물을 혼합한 기존 작물보호제로 방제하기 어렵고 방제방법이 없는 시들음병과 점박이응애를 방제할 수 있는 다기능 고효율의 복합 작물보호제를 개발하고 이를 산업화 구축을 하는데 그 최종목표가 있음</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 대사물질과 천연소재 혼합물에 의한 시들음병, 점박이 응애 병해충 복합 방제제 개발 ● 기질을 토대로 한 배양공정개량으로 2종 특허미생물의 강력한 항균·항충 대사물질 추출 및 생산 ● 항균·항충물질과 혼합 가능한 3종 선발 식물추출 유래 물질 이용 대상 병해충 복합 방제 ● 병해충 동시 방제제의 액상 및 입상 형태별 제형화 후 방제효과 검증 - 신속 정확한 병해충 분자진단과 재배환경 개선을 통한 작물 면역기능 증진에 의한 예방적 효과검정 ● 토양 및 식물체내 병원균 특이 마커에 의한 신속한 분자진단 및 방제시기 결정 ● 식물체내 면역 기능 활성 증진을 통한 작물의 병해충 예방적 방제 효과 ● 특이 마커 이용 병원균 밀도변화와 개발 제품의 최소저해농도 및 살포량 결정 - 유기농자재 등록 및 분자 진단 통합시스템에 의한 방제지침서 개발 ● 지상부와 지하부의 병해충 발생별 진단 결과를 수식화하여 약제 살포시기 결정 ● 유기농자재 등록을 위한 독성 및 약효 시험을 통한 포장검정 ● 현장 진단 결과 값을 기초로 방제 지침서 및 매뉴얼 작성 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기술성과 : 특허 출원(3건) 및 등록(2건), 제품화(1건), 기술이전(1건), 방제매뉴얼 및 QC 마커(2건) - 학술성과 : 국내 및 국외 학술발표(10건), 논문 게재(SCI 2건, 비SCI 2건) - 교육성과 : 농업대학 및 농업현장 교육지도와 컨설팅(2건) - 홍보성과 : 언론 홍보 및 전시(2건) - 사업성과 : 과제기간내 병해충 방제 기술관련 상품화를 통한 매출액 134.13백만원 창출 - 고용창출 : 병해충 효과검정 및 제형연구 관련 전문인력 고용 창출(2명) 					

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		118025-3	
사업구분	농림축산식품 연구개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농축산자재산업화기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	배양공정개량에 의한 마이크로바이옴 분리한 균주와 식물추출물 혼합에 의한 토양병해와 점박이응애 방제제 개발			과제유형	(개발)
연구기관	전남대학교			연구책임자	강범용
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018.04.26.-2018.12.31	124,000	41,600	165,600
	2차연도	2019.01.01.-2019.12.31	163,000	54,700	217,700
	3차연도	2020.01.01.-2020.12.31	163,000	54,700	217,700
	4차연도	-	-	-	-
	5차연도	-	-	-	-
	계	2018.04.26.-2020.12.31	450,000	151,000	601,000
참여기업	(주)현농				
상대국	-	상대국연구기관	-		

2. 평가일 : 2021. 1. 20

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
전남대학교	연구교수	강범용

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	강범용
-----------	------------

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

본 연구를 통해 미생물 대사물질과 천연 혼합물에 의한 병해충 복합 방제제 개발이 우수한 성적과 기존 방제제와는 다른 방법의 접근방식에 의한 제형화는 혁신적이고 독창적이었음.

또한 특이마커를 이용한 토양내 병원균의 밀도를 파악하고 식물체의 병발생을 예측함으로써 개발한 제품의 사용방법 매뉴얼까지 개발한 결과들은 방제효율성을 높이는 우수 결과물임.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 아주우수

개발 제품과 사용지침서에 의한 현장 적용은 단일 제품으로 병해충을 복합적으로 방제할 수 있는 경제성과 효율성면에서 아주 우수한 결과물임

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 아주우수,

기존 농자재 개발 방식에서 벗어나 합성농약처럼 대상 병해충 방제를 위한 적용확대가 가능하게 되는 효과가 있음

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

최종 목표를 달성하기 위해 연구기관간에 체계적인 연구방법 및 접근으로 연구수행을 원활하게 진행한 결과 우수한 결과물들이 목표 대비 초과 달성의 결과가 나오게 함

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 아주우수

국내외 논문게재 및 학술발표, 지적소유권, 홍보 및 교육을 통한 제품 개발 및 제품화에 대한 목표대비 초과 달성한 연구성과가 우수함.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
배양 개량공정에 의한 항균·살충 기능성 물질 활성 조건 확립 및 특성 조사	20	100	특허출원 1건(초과달성), 논문발표 2건, 국제논문게재 1건(초과달성)
선발된 미생물 및 식물 추출물의 대량 추출방법 검정 및 병해충 발생조사	20	100	논문발표 3건
미생물과 식물추출물의 혼합에 의한 병해충 동시 방제 및 식물면역증진 검정	20	100	특허출원 2건, 논문게재 2건, 논문발표 3건
후보 물질 혼합에 의한 시제품 제작 (액상 및 입상 제형화)	20	100	사업화(매출액 25백만원, 초과달성), 고용창출 1명(초과달성), 교육 및 컨설팅 1건, 홍보 1건(초과달성), 국제박람회 전시회 1건
분자진단 통합시스템에 의한 병해충 동시 방제 시제품의 방제지침서 개발	10	100	기술실시 및 사업화, 특허등록 2건(초과달성), 국제논문게재 1건, 논문발표 2건(초과달성), 장려논문상 수상
제형 제품화 및 포장 실증에 의한 방제매뉴얼 개발	10	100	사업화(제품화, 매출액 109.13백만원, 초과달성), 유기농자재 공시인증(초과달성), 고용창출 1명, 교육 및 컨설팅 1건
합계	100점	-	-

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

<ul style="list-style-type: none"> - 본 연구과제는 미생물 대사산물 및 균체성분과 식물추출물의 유효성분을 혼합한 제형화 연구과제로서 토양병과 난방제성 해충을 방제할 수 있는 복합 방제방법을 찾기위해 제형화를 통한 제품화로 소포장 및 현지포장에서 각 과제 연구원들이 계획적으로 충실히 수행하였으며, 제품의 유기농자재 등록 완료함 - 예산 집행은 3년차 연구 기간동안 계획적으로 잘 집행되었음

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

해당사항 없음

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

향후 제품의 지속적인 적용확대를 통한 병해충 방제에 대한 다양화로 사업화 확대가 기대됨
--

IV. 보안성 검토 : 해당사항 없음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	배양공정개량에 의한 마이크로바이옴 분리한 균주와 식물추출물 혼합에 의한 토양 병해와 점박이응애 방제제 개발			
주관연구기관	전남대학교 산학협력단		주관연구책임자	강범용
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	450,000,000	151,000,000	-	601,000,000
연구개발기간	2018. 04. 26. - 2020. 12. 31 (33개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 지식재산권	특허출원(3건), 특허등록(2건)
② 학술성과	국내외 논문(4건) 및 학술발표(10건)
③ 기술실시(이전)	기술실시(1건)
④ 교육지도	교육지도(2건)
⑤ 사업화	제품화(1건), 고용창출(2건), 매출액(134백만원)
⑥ 기술인증	유기농자재 공시인증 (공시-2-4-176호)
⑦ 홍보/전시	신문(1건), 전시회(1건)

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품 화	매출 액	수출 액	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	5	5		10		30	20		25				3	1			1		
연구간내 달성률	3	2		1	5	1	134.13		2		1	3	2	5.0	10	2		2	
달성율(%)	100	100		100	100	100	100		100			100	100		100			100	

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	유효성분에 의한 제형화 및 병해충 방제효과 검정
②	분자진단 마커 개발에 의한 통합 시스템 개발
③	제품 유효성분 대량생산을 위한 배양공정기술
④	특정 병해충 방제를 위한 생리활성물질 분리 및 분석

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	✓	✓				✓	✓	✓		✓
②의 기술	✓	✓						✓		✓
③의 기술	✓	✓				✓	✓	✓		✓
④의 기술	✓	✓				✓	✓	✓		✓

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	지식재산권, 국제논문발표, 사업화, 홍보/전시
②의 기술	지식재산권, 국제논문발표, 사업화 홍보/전시
③의 기술	사업화
④의 기술	지식재산권, 국제논문발표

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표	정책 활용			홍보 전시		
												SCI	비SCI						논문 평균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치	5	5		10		30	20		25				3	1				1		
최종목표	2	1		1	-	1	170		1		-	1	2	-	6	3		1		
연구기간내 달성실적	3	2		1	5	1	134.13		2		1	3	2	5.0	10	2		2		
연구종료 후 성과창출 계획							65							1	1					

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	Bacillus 균주 배양 공정기술 및 제형 조건 노하우		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	5,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협약결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	6개월	실용화예상시기 ³⁾	2021년 1월
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	대량배양 생산시설		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농축산자재산업화기술사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농축산자재산업화 기술사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.