

발간등록번호

11-1543000-000643-01

유기농산물 생산을 위한 난방제용 토양병, 선충, 진딧물
방제용 미생물제 및 방제 매뉴얼 개발

(Development of Effective Microbial Pesticides and
Manuals to Control Soilborne Diseases, Nematodes, Aphids
for Production of Organic Agricultural Products)

전남대학교 산학협력단 친환경농업연구소

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “유기농산물 생산을 위한 난방제용 토양병, 선충, 진딧물 방제용 미생물제 및 방제 매뉴얼 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 8 월 19 일

주관연구기관명 : 전남대학교

주관연구책임자 : 김 영 철

세부연구책임자 : 김 인 선

연 구 원 : 김 현 정

연 구 원 : 양 시 영

연 구 원 : 김 태 현

협동연구기관명 : (주) 그린바이오텍

협동연구책임자 : 이 재 호

협동연구기관명 : 전남농업기술원

협동연구책임자 : 강 범 용

요 약 문

I. 제목

유기농산물 생산을 위한 난 방제용 토양병, 선충, 진딧물 방제용 미생물제 및 방제 매뉴얼 개발

II. 연구개발의 목표 및 필요성

1. 목표

유기농산물 생산에 가장 문제시 되는 방제 방법이 전무한 토양병해, 진딧물, 선충 방제용 미생물 농자재와 이를 유기농에 손쉽게 사용할 수 있는 종합적인 방제 매뉴얼을 동시에 개발하여 친환경 고효율 농자재를 수요자인 농업인에게 제공하는 것이 목표였다.

- 1) 시들음병, 탄저병 방제용 친환경유기목록 (방제가 60%이상) 등록
- 2) 뿌리혹 선충 방제용 친환경유기목록 자재 (방제가 60%이상) 등록
- 3) 복숭아혹 진딧물 방제용 친환경유기목록 자재 (방제가 60%이상) 등록
- 4) 개발된 미생물 자재의 방제 지침 개발

2. 필요성

국내 유기농산물 시장 규모는 2010년에 3,512억이었고, 2020년에는 1조 306억원으로 신장할 것으로 전망되었다. 2015년 저농약 농산물이 폐지되며, 무농약농산물 시장의 경우도 2010년 5,026억원이었고 2020년에는 5조 5,976억원의 시장을 형성할 것으로 전망되고 있다. 유기 가공식품 규모도 2008년 2,158억원이었으나, 연평균 23.3%씩 성장하고 있지만, 국산 원료 비율이 13.7%에 불과하고, 수입원료와 수입완제품이 86.3%차지하고 있는 실정이다. 최근 중국의 수출위주 유기농산물 육성전략에 따른 국내 유기농산물 발전에 위협이 되고 있다. 우리나라에서도 2015년까지 제 3 차 친환경농업 육성 5개년 계획을 수립, 5년간 4조 4,607억을 투자할 예정이고, 무농약과 유기농 인증비율을 2009년 4.9%에서 2015년 12%로 확대할 목표를 설정하였다. 이를 위해 화학농약과 화학비료 사용량을 매년 3%씩 감축하고, 유기농 특화단을 2015년까지 50곳 신설 조성할 예정이다. 하지만 유기농업의 가장 핵심 부분인 병해충 방제 방법에 사용될 소재와 제제가 미비하고, 효능이 검증되지 않은 자재가 난립하여 국가적인 문제로 대두되고 있는 실정이다.

국내에는 현재 까지 17개의 미생물살균제가 등록되어 있지만, 대부분이 지상부 병해를 방제하기 위한 자재들이 개발되어 있음. 뿌리혹선충에 대한 미생물농약은 없는 상태이며, 또한 국내에서 지금까지 개발된 미생물살균제의 경우 에코센스 (*Bacillus pumilus* QST2808; 고추 역병)를 제외하고는 작

물에 발생하는 토양전염병을 방제할 수 있는 제품은 개발되지 않은 상태이다. 토마토의 경우 대개 뿌리혹선충은 풋마름병과 시들음병의 발생과 큰 연관이 있고, 특히 시들음병의 경우 선충이 낸 상처를 통하여 병원균이 침투하는 것으로 알려져 있기 때문에 선충과 시들음병균을 동시에 방제할 수 있는 균주를 사용하는 것은 효과적인 미생물농약 개발이 절대 필요하다. 국내에는 현재 진딧물을 방제하는 생물농약은 없는 실정이며, 시판되고 있는 진딧물 방제용 제제도 4종 복합비료 형태로 등록된 친환경농자재인 제충국, 님오일, 데리스, 고삼 등의 추출물 제제가 전부이다. 시설재배 작물의 대표적인 해충인 진딧물의 효율적인 관리를 위해 국내에서 원료공급이 가능한 형태의 제제 개발에 대한 연구가 매우 필요함을 의미한다. 따라서 다른 유효성분으로 구성된 제제나 혹은 기존 유효성분에 복합적 성분을 이용하여 제제화하는 기술개발 관련 연구가 매우 필요하다.

국내에서 농가에서 많이 사용되고 있는 자가배양용 미생물은 QC가 되지 않고 효능이 인정되지 않은 다양한 자가배양 미생물이 난립하고 있는 실정이다. 지자체에서 배양기 사업을 통해 다양한 미생물을 제공하고 있지만, 원제에 대한 명확한 작용기작과 QC가 인증된 제품을 활용할 필요가 있다. 국내의 미생물농약 산업의 경우 미생물 발굴 기술, 미생물 배양기술, 약효검정 기술, 천연물질 규명 기술, 작용기작 규명 기술 등은 선진국 수준에 도달하였으나, 고체배양 시설, 대규모 미생물배양 시설, 대량 발효 기술, 미생물제제 기술 등이 선진국에 비하여 부족한 것으로 나타나 선진국 수준의 제품을 개발하지 못하는 것으로 판단된다. 따라서 대규모 미생물배양 시설, 발효시설, 제제 시설이 갖추어진 생물방제센터에서 QC가 검정된 제형을 생산할 필요가 있다.

선진국의 산업기술 수준 대비 우리나라 미생물농약 산업기술의 애로점은 다음과 같다. 고가의 비용을 필요로 하는 고체배양 시설, 대규모 미생물 배양시설, 대량 발효기술 등이 부족하고, 일관성 있는 효율을 지니는 미생물 제제화 기술개발이 부족하기 때문이다. 개발의 핵심을 활성물질에 두는 것보다 균체수를 늘려 병해충을 방제하고자 하는 기술이 대부분이고, 국내에서 원료공급원을 확보하는 방안이나 대책이 미비하다. 또한 국외 경쟁력이 낮아 마케팅이 국내에 국한되어 있으며, 연구방향이 산업화 보다는 논문이나 특허를 사업성과물로 인정하는 제도적 관념에서 온다고 할 수 있다.

따라서 우리나라 생물농약 산업화를 위해 고려해야 할 사항은 다음과 같이 제시할 수 있다. 유기농에 사용이 가능한 생물소재를 개발을 위해 본 연구팀을 통해 정량적 성과를 산출 가능한 집중적 연구 필요하고, 미생물의 대량배양 및 배양액을 제제화에 연결할 수 있는 생물방제센터 시설이 필요하다. 제제개발을 활성물질에 중심을 두고 물질의 안정성과 균일성, 효과성을 유지할 수 있는 기술 필요하고, 해충의 경우 세대간 개체수 변화가 심하므로 제제의 침투율을 증가시킬 수 있는 보조제 개발 필요하다. 미생물 배양액을 적절한 비율로 희석을 하여도 방제효과가 유지될 수 있는 배합기술이 필요하고, 기존 합성농약 살초 권장농도의 10-50 배 수준의 농도에서도 방제효과가 유지되는 미생물 확보가 중요하다. 따라서 본 연구팀에서는 이러한 배경을 고려하여 해충방제 및 병 방제/예방을 위한 미생물농약을 개발하여 산업화하고자 하였다.

따라서 본 연구팀에서 확보된 다양한 미생물을 이용하여 유기농업에 사용 가능한 뿌리혹선충 방제용 미생물 제품과 *Bacillus velezensis* NSB-1와 *Trichoderma harzianum* GBF-1048를 이용하여 갯빛곰팡이병, 탄저병, 역병, 모잘록병 및 흰가루병 등 난방제성 토양병해를 효과적으로 방제하는 미생물살균제, 그리고 복숭아 흑진딧물 방제용 미생물 제품들을 개발하고자 하였다. 또한 이들 우수한 미생물제의 효능이 최적으로 발휘할 수 있는 조건을 확립하고, 이 미생물제가 포장에서 가장 효과적인 방제를 보여줄 수 있는 조건을 확립하려고 하였다. 이들 제품을 농민들이 효율적으로 사용할 수 있는 사용 매뉴얼을 제작하여 유기농업 확산에 기여하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

참여 연구자들이 보유한 난방제성 토양병해, 진딧물, 선충 방제용 미생물과 기술을 곡성 생물방제센터가 보유한 발효와 제형화 시설을 이용하여 방제 능력이 최적으로 발현 되는 조건에서 멸균, 무균 배양에 의해 시제품을 제작하고, 이들 미생물의 DNA와 metabolite 마커를 이용하여 모든 제형이 quality control이 되는 제품을 개발하고자 하였다. 개발된 제품은 생물농약 제품 뿐만 아니라, 친환경 유기 농자재로 등록하고 실내, 온실, 소면적, 포장 검정을 통해 이들 시제품의 효능을 검증하고, 다양한 포장 검증을 통해 수요자인 유기농과 무농약 생산자가 손쉽게 사용할 수 있는 방제 매뉴얼을 개발하여 실증하고, 개발된 제품을 활용하는 종합적인 방제 대책을 수립하고자 하였다. 본 과제の内容 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

1. 뿌리혹선충 방제 미생물을 선발하고 효능을 분석을 통해 이들의 살 선충 방제용 기전을 밝히고, 이들 살선충 활성 물질의 생산 최적 조건과 제형화 기술을 확립하여 시제품을 개발하고 이들의 시제품을 유기농산물 생산에서 뿌리혹선충 방제 매뉴얼을 제작하고 보급.

2. 식물성 오일 유래 당지질성 생산 미생물을 이용하여 복숭아 흑진딧물 방제용 미생물 제품 개발하기 위해 살충활성 물질을 동정하고 이들 물질의 최적생산 조건을 확립하고 이를 이용하여 제형화하고, 이들의 제품을 사용하기 위한 농가 사용 매뉴얼 제품 개발

3. 난 방제성 토양병 방제용 미생물 제품을 개발하기 위해, 최적배지 조성을 디자인하고 대량 배양 조건 확립 및 공정을 개발하고 유기농산물 생산에 사용이 가능한 토양 병해 방제용 친환경농자재 등록하고 이들을 농민이 사용 가능한 사용 매뉴얼 개발

4. 토마토 *Fusarium*시들음병 방제용 유기농자재를 개발하기 위해 살균물질 최적화 기술을 개발하고, 이를 이용하여 제형화하고, 시제품을 유기농산물 생산에 사용이 가능한 녹비작물을 활용하여 농가 사용 매뉴얼 개발.

IV. 연구개발결과

1. 뿌리혹선충 방제 미생물 선발 및 효능 분석

뿌리혹선충에 효능이 있는 *Pseudomonas chlororaphis* O6, *P. fluorescens* Wayn1R과 키틴분해 미생물 복합체, *Chromobacterium* sp. C61, *Serratia* sp. S-2, *Lysobacter enzymogenesis* C-1균주를 확보하여 이들의 뿌리혹선충 방제 효능을 확인하였다. 또한 본 연구에 사용된 뿌리혹선충의 동정을 위해 뿌리혹선충 특이 마커를 이용하여 동정하여 본 결과, 고구마뿌리혹선충임을 밝혔고, 분리된 미생물의 배양된 조건하에서 예방위주로 살포할 때 배양액을 1:10이상으로 희석한 경우는 살 선충 능력이 감소함을 밝혔다.

2. 키틴분해 미생물 *Chromobacterium* sp. C61의 생물방제 기작 규명

본 연구에 사용된 C61균주의 생물적 방제에 관련된 물질을 규명하기 위해 다양한 유기용매로 추출하여 다양한 방법으로 활성이 있는 순수 분리된 물질은 신규 cyclic lipopeptide인 chromobactomycin으로 동정하였고, extracellular chitinase와 chromobactomycin이 C61균주에 생물적 방제에 있어서 중요한 인자임을 밝혔다.

3. 키틴분해 미생물 *Chromobacterium* sp. C61의 quorum sensing이 항균활성과 생물적 방제의 중요한 조절 인자

본 연구에 사용된 C61균주의 생물적 방제에 관련된 기전을 규명하기 위해 돌연변이주를 선발하여 항균활성을 검정하여 2종류의 돌연변이주를 분리하였다. 이들 돌연변이주의 flanking분석과 유전자 분석을 통해 chromobactomycin을 생합성 유전자군 (*depA* 오페론)을 분리하였고, 또한 quorum sensing에 관여하는 homoserine lactone을 생합성(*luxI*)하는 유전자군을 분리하고 특성을 규명하였다. DepA돌연변이주 뿐만 아날 LuxI돌연변이주에서 chromobactomyin의 생성이 상실되었고 생물적 방제 능력이 상실되어 quorum sensing이 C61균주에서 중요한 역할을 수행하고 있음을 밝혔다.

4. 키틴분해세균, 키틴 및 그들의 산물이 함유된 미생물제제에 의한 오이의 뿌리혹선충 방제

키틴함유배지에서 배양된 3종의 키틴분해세균(*Chromobacterium* sp. C-61, *Lysobacter engymogenes* 및 *Serratia* sp.) 혼합액(미생물제)은 뿌리혹선충 알의 부화에 영향을 미치지 않았지만 2령충을 더 빨리 사멸시키고, 그 살충율은 단일 균주보다 3균주의 배양액에서 더 높았다. 이 미생물제는 포트 조건에서 오이의 생육을 증진시키고, 뿌리혹과 뿌리혹선충의 밀도를 감소시켰다. 이 미생물제를 75배 희석하여 정식한 날부터 물 대신에 점적 관수하면, 오이의 생육이 촉진되고 뿌리의 혹이 현저히 감소되었다. 한편, 뿌리혹선충에 심하게 감염되어 생육이 저조한 오이에 미생물제 원액을 10일 간격 3회 토양 관주하였을 경우에는 오이가 죽지 않고 생육이 회복되었다.

6. *Pseudomonas chlororaphis* O6와 *P. fluorescens* Wayn1R 미생물의 살선충 관련 유전자 분리 및 기능 분석.

O6균주와 Way1R균주의 살선충관련 기전을 규명하기 위해 이들 균주가 생산한다고 알려져 있는 생물적 방제관련 유전자들의 돌연변이주를 조제하여 살선충활성을 검정하였다. O6균주의 경우는 hydrogen cyanide 생합성 유전자 돌연변이주(HcnA)가 살선충 활성이 상실되었으며, 살충 단백질인 FitD단백질 돌연변이주는 희석하였을 때 상실되어, HCN이 단기간의 살선충에 중요한 역할을 하며, FitD단백질은 선충의 장내에 균주가 정착하였을 때 중요한 역할을 수행함을 밝혔다. 또한 Way1R의 경우는 이 균주가 생산하는 항균물질인 2,4-diacetylphloroglucinol 생합성 유전자 돌연변이주는 다양한 식물병원 곰팡이의 생육을 억제할 뿐만 아니라 생물검정에서도 다양한 식물병에 대해 방제 능력이 현저히 감소하였고, 살선충 능력도 현저히 감소하여, DAPG가 생물적 방제에 있어서 중요한 역할을 수행함을 밝혔다. 또한 이들 유전자들의 암호화된 유전자 특이 primer조제하여 분석하여 이들 특이 유전자가 이들 미생물의 QC마커로 활용될 수 있음을 밝혔다.

7. 식물선충 방제용 미생물의 제형화 및 최적 제형 선발

뿌리혹선충 방제용 미생물제품의 산업화 및 제품화를 위해 장기간 보관 미생물배양 조건, 최적 살선충 미생물 배양조건을 설계, Pilot(50L, 500L)규모 및 5,000L 산업화 규모 대량배양공정 설계, 동결건조 공정설계, 최적 동결 부재 및 수화제형 개발 완료하였다. 유화제, 액상제, 분말 수화제 시제품을 조제하여 생존율과 살 선충 효능을 분석해 본 결과 분말수화제의 살

선충 효능과 생존율이 높게 나타나 분말 수화제를 최종 제형화로 시제품을 조제하였다. 이 분말 시제품을 네마토킬이라고 명명하고, 뿌리혹 선충 방제 등에 대한 실내 시험을 완료하였고, 약효시험결과 방제가가 60%이상을 보였다.

8. 살선충 O6균주와 C61균주 제품의 등록에 필요한 독성 및 미생물 검정

살선충 활성이 있는 시제품 O6균주의 분말 수화제 (네마토킬)과 C61균주 (다자바)의 친환경유기목록 자재로 등록하기 위해 시제품의 독성, 병원성 미생물 검출, 액해 등의 시험분석을 다양한 인증기관에 시제품을 보내서 분석시험을 실시하였다. 네마토킬의 경우는 독성시험 및 이화학적 분석시험, 액해 등의 분석시험 결과 모든 요건을 충족하여 현재 친환경유기목록 자재 등록번호를 얻기 위해 진행 중이다. 하지만 시제품 다자바의 경우 독성 시험에서 토끼 눈에 독성테스트 결과가 유기목록 자재에 등록하기 어려운 독성을 나타내어 시제품을 등록을 할 수가 없었다. 네마토킬의 경우 그람음성균으로는 처음으로 토양선충 방제용 미생물 제품으로 최초로 본 연구를 통하여 친환경농자재 목록공시에 등재될 것이다 (공시번호: 공시-).

9. 식물성 오일 유래 당지질성 생산 미생물 활용 복숭아혹진딧물 방제용 농자재 개발

식물성 오일분해 미생물을 이용하여 복숭아혹진딧물 방제 미생물 살충제의 산업화 및 제품화를 위해 살충 물질인 dirhamnolipid 최적 생산을 위한 C/N율, 탄소원 및 질소원, 미량원소 조성비 설계하여, Pilot(50L, 500L)규모 및 5,000L 산업화 규모 대량배양공정 설계, 액제 및 동결건조 공정설계하여 시제품을 개발하였다. 이러한 시제품의 포장 내에서 농가들이 사용가능한 서로 다른 살충 기작을 가진 다양한 유기목록 자재와의 교호살포 및 살포 시기 등을 고려한 복숭아 혹진딧물 방제용 농가 사용 지침서를 개발하였다. 복숭아 혹진딧물 방제 효능에 대한 실내 시험을 완료하였고, 복숭아 혹진딧물 방제용 시제품의 경우 약효시험결과 방제가가 60%이상을 보였다. 개발된 시제품은 유기목록 자재 등록을 위한 제형개발, 각종 독성시험 및 이화학적 분석시험을 2012~2014년 동안 완료하였고, 연구를 통하여 친환경농자재 목록공시에 람피드라는 제품으로 등재하였다 (공시번호: 공시-3-5-0171).

10. 난방제성 토양 병해 미생물 살균제 개발 및 산업화

미생물 살균제의 산업화 및 제품화를 위해 최소 탄소원 및 질소원, 미량원소 조성비 설계, Pilot(50L, 500L)규모 및 5,000L 산업화 규모 대량배양공정 설계, 동결건조 공정설계, 최적 동결 부재 및 수화제형 개발 완료, 상온경시 2년 이상 확보 및 이화학성이 양호하였다. 잣빛곰팡이병, 균핵병, 풋마름병, 시들음병 등에 대한 실내 시험을 완료하였고, 난방제성 토양 병해에 대한 약효시험결과 방제가가 60%이상을 보였다. 토마토 시들음병, 고추풋마름병, 상추 균핵병, 인삼 잣빛곰팡이병 등 대상 병해외의 병해에 대한 작물별 적용 확대 시험을 진행하였다. 공정개발, 제형개발, 각종 독성시험 및 이화학적 분석시험을 2012~2014년 동안 완료하였고, 연구를 통하여 친환경농자재 목록공시에 탄저자비라는 제품명으로 등재하였다(공시번호: 공시-1-4-1). 또한 *Trichoderma harzianum* 시제품도 근초고왕이라는 제품으로 유기목록 자재로 등재가 진행 중이어서 과제가 종료되는 시점에 유기목록 제품으로 등록이 완성될 것이다.

11. Novel genotype 2,4-diacetylphloroglucinol생산 *Pseudomonas* sp. NJ134를 이용한 토마토 *Fusarium* 시들음병 방제

전남의 토마토 포장에서 토마토 시들음병균 *Fusarium oxysporum*에 강한 *in vitro* 항균활성을 보인 토양 근권 미생물인 NJ134균주를 분리하여 16S ribosomal DNA와 생화학적 분석을 통해 *Pseudomonas* sp.로 동정하였다. NJ134균주의 배양여액으로부터 유기용매로 추출하고, gas chromatography-mass spectrometry, infrared와 NMR분석을 통해 항균물질은 polyketide인 2,4-diacetylphloroglucinol로 동정되었다. DAPG을 생합성하는데 관여하는 유전자 중의 하나인 *phlD*의 분석에 의해 분리된 NJ134균주는 DAPG생산 유전자형 중에 novel genotype이나 유럽과 북미 지역에서 분리되는 genotype O의 variant로 추정되었다. 온실 하에서 토마토 시들음병의 생물적 방제능력을 분석을 해 본 결과, 토마토에서 시들음병을 효과적으로 방제하기 위해서는 NJ134균주를 10^8 cfu/g 토양에 접종되어야 함을 밝혔다. 이러한 결과는 DAPG를 생산하는 새로운 genotype인 *Pseudomonas* sp. NJ134균주가 토마토 시들음병의 발생이 적은 토양에서 효율적으로 생물적 방제가 가능함을 보였다.

12. 토마토 시들음병 방제용 2,4-diacetylphloroglucinol생산 *Pseudomonas* sp. NJ134의 제형화 및 생물적 방제 효능

토마토 시들음병균 *Fusarium oxysporum*에 강한 *in vitro* 항균활성을 보인 토양 근권 미생물인 *Pseudomonas* sp. NJ134의 토마토 시들음병 방제용 제품으로 산업화하기 위해, 주항균물질인 DAPG생산 최적 조건을 확립하였다. DAPG의 최적 생산은 배지에 mannitol을 배지에 첨가해 주었을 때 DAPG생산량이 최대가 되었고, 토마토 시들음병균인 *F. oxysporum*의 성장을 최대로 억제하였다. NJ134균주를 대량배양 시 mannitol을 탄소원으로 분쇄한 콩을 이용하여 제형화시켰을 때 온실 하에서 효과적으로 토마토 시들음병을 방제하였다. 제형화된 시제품은 사용한 탄소원과 농도에 따라 생물적 방제 효능이 차이를 보였다. Mannitol을 첨가한 콩을 이용한 제형 시제품에서 glucose를 첨가한 제형 시제품보다 DAPG생산량이 높았고, 장기간 보관 생존율에서도 현저히 높아 포장에서의 토마토 시들음병 방제에 효과적이었다. 이러한 결과는 본 과제에서 개발된 새로운 토마토 시들음병 방제용 제형은 포장에서 효과적으로 생물적 방제에 이용될 것이다.

13. 토마토 시들음병 방제용 미생물 시제품 등록, 사용 매뉴얼 제작을 이용한 포장실증 실험

토마토 시들음병 방제용 미생물 제품을 다양한 천연자원을 이용한 미생물 대량 배양용 천연배지를 개발하기 위하여 다양한 탄소원을 이용하여 액상과 입상을 조제하여 생균수와 배양원별 항균활성을 측정하였다. 토마토 시들음병 방제균주 슈도모나스 NJ134의 대량배양조건을 확립하기 위하여 탄소원 중 마니톨이 함유된 배양액에서 가장 높은 성장능력을 보였으며, 가장 높은 DAPG생산능력을 보여 항균능력도 시들음병균에 대해 83%의 높은 저지율을 나타냈다. 시제품을 이용하여 포장검정한 결과 정식 전 토양혼화(300kg/10a)하고 난 후 배양액(10^6 cfu/ml)을 4회 관주처리 시 시들음병에 대해 71.1%의 방제효과를 나타냈으며, 수량도 주당 2.6kg을 생산하였다. 시설내 녹비작물을 재배한 구역에서 토마토를 정식하여 재배한 후 시들음병 발병율을 조사한 결과, 녹비작물을 환원한 처리구가 토양에서 제거한 처리구보다 병발생율이 낮았으며, 특히, 밀, 클로버, 헤어리베치, 유채, 무 재배 구역에서 53% 이하의 발생율을 나타냈다. 토양 환원구역은 무처리 대비 10 ~ 40% 이상 병발생이 감소하였고 또한 녹비작물 제거구역보다 낮았다. 토마토 시들음병 방제용 NJ134를 이용한 토양 혼화용 시제품을 3종류를 제작하고, 시제

품명을 슈류탄으로 명명하였다. 공정개발, 제형개발, 각종 독성시험 및 이화학적 분석시험을 2012 ~ 2014년 동안 완료하였고, 연구를 통하여 친환경농자재 목록공시에 슈류탄라는 제품명으로 등재하였다(공시번호: 공시-3-1-66). 고추, 상추, 배추, 오이, 토마토에 정식 전에 토양훈화처리 (160kg/10a)로 사용하도록 하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 그람 음성균을 이용한 뿌리혹선충 방제용 미생물 시제품 개발 및 기전 규명

본 연구에서 개발된 뿌리혹선충 방제용 시제품인 네마토킬은 그람 음성균은 *Pseudomonas chlororaphis* O6균주를 이용한 제형화한 제품으로 아직까지 그람음성균은 미생물 농약으로 많이 개발되지 않았는데, 본 연구에서 장기간 그람 음성균의 보존할 수 있는 제형화 기술과 살선충 물질의 최적화 배양 조건 등을 이용한 미생물의 산업화 공정 기술을 개발하였는데. 이러한 기술들은 다른 우수한 그람 음성균의 미생물 농약의 제형화에 확산되어 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

또한 학문적으로도 본 연구에서 얻어진 *Chromobacterium* sp. C61의 살선충활성 물질의 규명과 이들의 발현 조절자에 대한 연구결과와 *P. chlororaphis* O6균주의 살선충 물질로 동정된 HCN과 FitD 단백질의 기능 분석에 대한 결과들은 우수한 논문과 특허로 출원할 예정이고, 또한 *P. fluorescens*균주가 생산하는 DAPG가 항균활성 뿐만 아니라 살 선충활성에 활성을 지닌 연구결과들은 우수한 논문과 특허로 출원할 예정이다. 이러한 기전연구는 또한 이들 물질의 생화학농약으로 개발 가능성이 높을 것으로 생각된다.

이와 더불어, 키틴분해 미생물 복합체를 이용한 농가 대량 배양 방법과 적용 방법 등은 유기농산물 생산에 있어서 뿌리혹선충 방제 사용 매뉴얼을 제공하고 저가 고효율 방제 방법으로 보급될 수 있을 것으로 생각된다.

2. 난 방제용 유기목록 자재 (3종)을 이용한 유기농 토양 병해 방제제 개발

본 연구에서 개발된 토마토 시들음병 방제제인 슈류탄과 역병, 시들음병, 탄저병의 방제제인 탄저자비와 근초고왕의 제품은 유기농 생산에서 개발되지 않은 토양 병해 전문 약제로 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 슈류탄의 경우는 장기간 그람 음성균의 보존할 수 있는 제형화 기술과 토마토 시들음병 방제에 중요한 물질인 DAPG의 최적화 배양 조건 등을 이용한 미생물의 산업화 공정 기술을 개발하였는데. 이러한 기술들은 다른 우수한 그람 음성균의 미생물 농약의 제형화에 확산되어 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

또한 학문적으로도 본 연구에서 얻어진 NJ134에서 그람 음성균을 제형화하는 조건으로 항균활성 물질의 최적 생산에 mannitol과 콩 분쇄물을 이용하여 최적화된 연구결과들은 2편의 국제 학술지에 발표하였지만, 추가적인 연구가 진행된다면 우수한 논문과 특허로 출원될 가능성이 높다. 이러한 기전연구는 또한 이들 물질의 생화학농약으로 개발 가능성이 높을 것으로 생각된다.

3. 개발 미생물의 지자체 배양기에 원제로 제공하여 활용하는 정책적인 방안 제시

본 연구에서 개발된 모든 자재들은 농가나 지자체에서 미생물 배양 사업을 통한 친환경

경농업의 농자재로 이용되고 있다. 본 연구 연구에서 등록된 미생물 시제품들을 대량배양하여 적용방법 등을 제시하여 실제 미생물 배양기 사업이나 농가가 효능이 검정된 자재를 배양하는 기술도 함께 제시하였다. 이들 시제품과 농가 사용 매뉴얼들은 농가에서 저가로 효율과 적용이 가능한 병해충 방제제로서의 기능을 지닌 자재를 제공하는 역할을 할 것으로 생각된다.

4. 유기농산물 생산에서의 녹비작물과 토마토 병원균의 밀도 변화에 대한 자료 제공에 의한 자료 제공

본 연구에서 개발된 녹비 작물과 식물병원균의 밀도 변화에 대한 연구결과는 최초의 보고로 지금까지는 녹비작물이 유기물과 영양분으로서만 효능에 집중되었다. 하지만 본 연구에서 일부 녹비작물을 재배하고 환원하는 구에서는 토마토 시들음병균의 밀도가 낮아지는 결과를 얻어서 실제 유기농에서 녹비작물을 이용한 순환농법에 있어서 과학적인 근거를 제시하는 역할을 하였다.

또한 학문적으로도 본 연구에서 얻어진 녹비 작물재배와 환원에 의한 식물병원균의 밀도 변화는 전 세계적으로 연구가 미비한 분야로서 추가적인 연구를 수행하여 유기농업에서 필수적인 녹비작물 재배와 토양 병원균의 영향에 대한 우수한 결과를 도출하여 우수한 논문과 특허를 출원할 예정이다.

5. 개발 미생물은 QC되는 자재이고 개발된 방제 매뉴얼은 수요자의 교육과 컨설팅에 사용되어 유기농 생산에 이용

본 연구에서 개발된 모든 시제품은 QC 마커가 개발되어 있어서 배양기를 통한 대량 배양과 효능을 검증할 수 있는 시스템을 구축하였다. 이들은 유기농산물의 가장 중요한 안정성이 확보되고, 이들 시제품의 효능을 검정하는 QC로 활용이 가능할 것으로 사료된다. 또한 시제품을 농가에서 사용할 수 있도록 방제 매뉴얼이 개발되어 있어서 이들 사용 매뉴얼은 유기농산물 생산 농가에 교육 교재와 컨설팅에 활용이 되어 유기농산물 생산에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

SUMMARY

I. Title: Development of effective microbial pesticides and manuals to control soilborne diseases, nematodes, aphids for production of organic agricultural products

II. Research objectives

With the development of industry, there is a growing demand for safer living and an increased attention in protecting the environment. Due to environmental pollution, residual toxicity, ecosystem disruption, phytotoxicity, and the production of resistant pathogen populations, the use of synthetic pesticide is restricted. In addition, the demand for organic foods is increasing. This has encouraged many scientists to look for other solutions such as biological controls using antagonistic microorganisms and safer chemicals. The purposes of this research are to develop eco-friendly microbial nematicides, insecticides, and fungicides to effectively control soilborne diseases (gray mold, tomato late blight, powdery mildew, anthracnose and cucumber damping-off) using effective microbial isolates, which are colonizing healthy plant tissue without causing overt symptoms in or apparent injury to the host,

III. Research contents and spectrum

- Development of a new microbial nematocides, aphicide, fungicide candidate using newly isolated strains
- Determine the main compounds or genes involved in biocontrol of the microbial isolated used in this study.
- Design of optimal medium composition
- Development of optimal bulk fermentation and process
- Evaluation of disease control efficacy of trial manufactured microbial products in fields
- Determine field efficacies of the trial manufactured microbial products
- Determine toxicity test of the trial manufactured microbial products
- Preparation of documents for the registration of environment-friendly agricultural & organic inputs product
- Determine instructions of the trial manufactured microbial products in filed.

IV. Results

1. Both extracellular chitinase and a new cyclic lipopeptide, chromobactomycin, contribute to the biocontrol activity of *Chromobacterium* sp. C61

Chromobacterium sp. strain C61 displays antifungal activities *in vitro* and has been used successfully for the biocontrol of plant diseases under field conditions. In this study,

the roles of extracellular chitinase and an antifungal compound produced by strain C61 were investigated to elucidate their contributions to biological control activity. The bacterium possessed a locus *chi54* encoding an extracellular chitinase, and mutation of *chi54* eliminated chitinase production. Production of the extracellular enzyme and expression of the *chi54* transcript were increased in the wild type strain when chitin was added to the culture medium. *In vitro* assays showed that purified chitinase inhibited spore germination of multiple pathogens. However, the *in planta* biocontrol activity of filtrates of cultures grown in the presence of chitin was lower than that of filtrates grown without chitin, indicating that correlation between chitinase and biocontrol activity was lacking. The analysis of C61 culture filtrates revealed an antifungal cyclic lipopeptide, chromobactomycin, whose structure contained a unique nonameric peptide ring. The purified chromobactomycin inhibited the growth of several phytopathogenic fungi *in vitro*, and plant application significantly reduced disease severity for several pathogens. Furthermore, the production of chromobactomycin was reduced in cultures amended with chitin. These data suggest that the production of both the extracellular chitinase Chi54 and the newly identified antibiotic chromobactomycin can contribute, in an interconnected way, to the suppression of plant disease by *Chromobacterium* sp. strain C61.

2. Quorum sensing is a key regulator for antifungal and biocontrol activity of the chitinase-producing strain *Chromobacterium* sp. C61

Chromobacterium sp. strain C61 has strong biocontrol capacities, but the full suite of genetic and biochemical determinants of its plant disease suppressing capacities remain unknown. Here, we report on the identification and characterization of two new determinants of biocontrol activity in C61. Transposon mutagenesis was used to identify several mutants related to fungal suppression. These included insertions into a gene homologous to a *depD* gene, which is one of structural genes in a *dep* operon encoding a protein involved in non-ribosomal peptide synthesis, and another into an homolog of the *luxI* gene encoding homoserine lactone synthase. The *luxI* and *depD* mutant had no antifungal activity *in vitro* and a dramatically reduced capacity to suppress different plant diseases. These traits of the *luxI* mutant were restored by complementation of the *luxI* mutant. Other phenotypes associated with effective biological control, including motility and lytic enzyme secretion, were affected by the *luxI* mutation. Biochemical analysis of ethyl acetate-extracts of culture filtrates of the mutants and C61 showed that a key antifungal compound, chromobactomycin, was produced by C61 and the complemented *luxI* mutant, but not by the *luxI* or *depD* mutants. These data suggest that multiple biocontrol-related phenotypes are regulated by homoserine lactones in C61. Thus quorum sensing plays an essential role in the biological control potential of diverse bacterial lineages.

3. Mass-production of chitin-based bioformulation and its control efficacy against root-knot

nematodes of cucumber

Formulation of three chitinolytic bacteria, *Chromobacterium* sp strain C-61, *Lysobacter engymogenes* and *Serratia plymuthica*, were prepared in minimal medium supplemented with chitin. The hatching of *Meloidogyne* spp. eggs were not affected *in vitro* by the bioformulations of a single or combined strains. However, the second stage juveniles were killed more early in the bioformulations than in the media as a control, and its killing efficacy was higher in combination of three strains than in a single strain. In the pot test, the formulation of three strains enhanced growth of cucumber, and reduced galls of root and nematode populations in the rhizosphere compared with the untreated control. When the 75-fold diluted formulation was treated six times from the transplanting date under the greenhouse condition, the growth of cucumber plants was promoted and galls of root was remarkably reduced compared with the untreated control. When the bio-formulation was treated three times in the severely infested plant, the cucumber plants were restored in the growth without dead plants compared with the untreated control. These results suggest that the developed bioformulation could be a new effective system to control root-knot nematode in cucumber.

4. Preventive and curative effect of chitin-based bioformulation against root-knot nematodes of zucchini

Three chitinolytic bacteria, *Chromobacterium* sp strain C-61(C61), *Lysobacter engymogenes* (C3) and *Serratia plymuthica* (S2) were formulated in minimal medium supplemented with chitin. The preventive effect was evaluated by drip-watering for 6 times at 5 days interval from transplant date with the 60x dilution of the bioformulation. Growth of zucchini such as plant height, and size and color of leaves was more superior in the treated plot than in the control plot. The nematode populations of the treated plots were lowest in 60 days after transplanting compared with those of control treatment, and its suppression efficacy was 87.5%. The curative effect was evaluated by drenching for 4 times at 5 days interval and 2 times at 10 days on zucchini plant infected severely by root-knot nematodes. Plant height and size of leaves were enhanced by treatment of the bioformulation, and its enhancing efficacy was more superior in treatment of 5 days interval. The suppression of nematode populations in the rhizosphere were highest in 20 days after last treatment, and their suppressive efficacies were 74.1 and 49.0% in treatment of 5 days and 10 days interval, respectively, compared with the control treatment.

5. Development of a biocontrol Agent of *Pseudomonas* sp. EP-3 for aphid control

Plant oil-degrading microorganism, *Pseudomonas* sp. EP-3 that produces dirhamnolipid as an insecticidal metabolite against green peach aphid (*Myzus persicae*) was examined to develop as a biocontrol agent. The optimal conditions for the production of the insecticidal metabolite were investigated by determining carbon and nitrogen sources,

carbon to nitrogen (C/N) ratio, micro ingredient and formulation process. The optimal carbon sources were determined to be 2.0% (v/v) glucose and 0.2% (v/v) soybean oil. Sodium nitrate and P-MSM+TE were determined to be optimum nitrogen and mineral sources. The C/N ratio that exhibits the best growth and the highest insecticidal activity was determined to be 50:1. The large-scale cultivation of EP-3 was successfully achieved since the cultivation showed aphicidal activity more than 80%. Cells and aphicidal activity of the large-scale cultures lasted for 6 month under room temperature. The control manual against the aphids by using the EP-3 agent was developed on the basis of application time, alternation applications with a number of products that combined with commercial biocontrol agent. *In vivo* experiments under greenhouse conditions showed more than 60% control values for the aphids. The EP-3 agent has been registered as a biocontrol agent on the National Biocontrol, Database with the registration number, registration number for organic agricultural-product-3-5-0171.

6. Development of effective fungicides to control soil-borne diseases

We have developed several conditions of cultivation of *Bacillus velezensis* NSB-1 and *Trichoderma harzianum* GBF-1048. The optimum concentration of carbon source, nitrogen source and micro ingredient in cultivation broth were developed, and the optimum cultivation and formulation process (freeze drying method) was designed. The store stability of product was up to 2 year, and the physical property was good.

(*Bacillus velezensis* NSB-1 and *Trichoderma harzianum* GBF-1048) show high efficacy on gray mold disease, Sclerotinia rot, bacterial rot, Fusarium wilt, and show especially 60% efficacy on soilborne diseases.

We are testing an efficacy of (*Bacillus velezensis* NSB-1 and *Trichoderma harzianum* GBF-1048) on many other plants and disease (like powder mildew, and so on).

Process development, formulation development, efficacy test and toxicity test were completed at from 2012 to 2014. We've the developed product was registered as environment-friendly agricultural & organic inputs product (Notice number: 공시-1-4-1).

7. Biocontrol of tomato Fusarium wilt by a novel genotype of 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas* sp. NJ134

The rhizobacterium NJ134, showing strong in vitro antifungal activity against *Fusarium oxysporum*, was isolated from field grown tomato plants and identified as *Pseudomonas* sp. based on 16S ribosomal DNA sequence and biochemical analyses. The antifungal compound purified by gas chromatography-mass spectrometry, infrared, and nuclear magnetic resonance analyses from NJ134 cultures was polyketide 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG). Analysis of the sequence of part of one of the genes associated with DAPG synthesis, *phlD*, indicated that the DAPG producer NJ134 was a novel genotype or variant of existing genotype termed O that have been categorized based

on isolates from Europe and North America. A greenhouse study indicated that about 10⁸ CFU/g of soil NJ134 culture application was required for effective biocontrol of Fusarium wilt in tomato. These results suggest that a new variant genotype of a DAPG-producing strain of *Pseudomonas* has the potential to control Fusarium wilt under the low disease pressure conditions.

8. Mannitol amendment as a carbon source in a bean-based formulation enhances biocontrol efficacy of a 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas* sp. NJ134 against tomato Fusarium wilt

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* has become a serious problem world-wide and relies heavily on chemical fungicides. We selected *Pseudomonas* sp. NJ134 to develop an effective biocontrol strategy. This strain shows strong antagonistic activity against *F. oxysporum*. Biochemical analyses of ethyl-acetate extracts of NJ134 culture filtrates showed that 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) was the major compound inhibiting *in vitro* growth of *F. oxysporum*. DAPG production was greatly enhanced in the NJ134 strain by adding mannitol to the growth media, and *in vitro* antagonistic activity against *F. oxysporum* increased. Bioformulations developed from growth of NJ134 in sterile bean media with mannitol as the carbon source under plastic bags resulted in effective biocontrol efficacy against Fusarium wilt. The efficacy of the bioformulated product depended on the carbon source and dose. Mannitol amendment in the bean-based formulation showed strong effective biocontrol against tomato Fusarium wilt through increased DAPG levels and a higher cell density compared to that in a glucose-amended formulation. These results suggest that this bioformulated product could be a new effective biocontrol system to control Fusarium wilt in the field.

V. Research application

CONTENTS

Chapter I Project introduction	-----	17
Chapter II Current status of technology trends	-----	37
Chapter III Results	-----	40
Chapter IV Future perspectives	-----	404
Chapter V Achievement and application	-----	410
Chapter VI New information collected from abroad	-----	418
Chapter VII References	-----	419

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	-----17
제 2 장	국내외 기술개발 현황	-----37
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	-----40
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	-----404
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	-----410
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	-----418
제 7 장	참고문헌	-----419

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구 개발의 필요성

가. 유기농산물 생산의 현황 및 전망

국내 유기농산물 시장 규모는 2010년에 3,512억이었고, 2020년에는 1조 306억으로 신장할 것으로 전망되고 있고, 2015년 저농약 농산물이 폐지되며, 무농약농산물 시장의 경우도 2010년 5,026억이었고 2020년에는 5조 5,976억의 시장을 형성할 것으로 전망된다. 유기 가공식품 규모도 2008년 2,158억원이었으나, 연평균 23.3%씩 성장하고 있지만, 국산 원료 비율이 13.7%에 불과하고, 수입원료와 수입완제품이 86.3%차지하고 있는 실정이다. 최근 중국의 수출위주 유기농산물 육성전략에 따른 국내 유기농산물 발전에 위협이 되고 있어, 우리나라에서도 2015년까지 제 3 차 친환경농업 육성 5개년 계획을 수립, 5년간 4조 4,607억을 투자할 예정이다. 또한 무농약과 유기농 인증비율을 2009년 4.9%에서 2015년 12%로 확대할 목표로 화학농약과 화학비료 사용량을 매년 3%씩 감축할 계획이다. 하지만 유기농업의 가장 핵심 부분인 병해충 방제 방법에 사용될 소재와 제제가 미비하고, 효능이 검증되지 않은 자재가 난립하여 국가적인 문제로 대두되고 있다.

농산물	2010	2011	2012	2014	2015	2020
전체	36,506	39,678	48,622	53,111	46,475	66,283
무농약	15,026	18,449	28,026	32,426	39,249	55,976
유기농	3,521	4,118	5,782	6,563	7,226	10,306
저농약	17,958	17,112	14,814	14,122	-	-

출처 : 한국농촌경제연구원 2011 농업전망 단위 : 억원

나. 국내 병해충 관리기술의 문제점 및 연구개발의 필요성

국내에는 현재 까지 17개의 미생물살균제가 등록되어 있지만, 대부분이 지상부병해를 방제하기 위한 자재들이 개발되어 있다. 하지만 최근 문제가 되고 있는 뿌리혹선충에 대한 미생물농약은 없는 상태이며, 또한 국내에서 지금까지 개발된 미생물살균제의 경우 에코센스 (*Bacillus pumilus* QST2808; 고추 역병)를 제외하고는 작물에 발생하는 토양전염병을 방제할 수 있는 제품은 개발되지 않은 상태이다. 토마토의 경우 대개 뿌리혹선충은 꽃마름병과 시들음병의 발생과 큰 연관이 있다. 특히 시들음병의 경우 선충이 낸 상처를 통하여 병원균이 침투하는 것으로 알려져 있기 때문에 선충과 시들음병균을 동시에 방제할 수 있는 균주를 사용하는 것은 효과적인 미생물농약 개발이 절대 필요하다.

이와 더불어 국내에는 현재 진딧물을 방제하는 생물농약은 없는 실정이며, 시판되고 있는 진딧물 방제용 제제도 4종 복합비료 형태로 등록된 친환경농자재인 제충국, 님오일, 테리스, 고삼 등의 추출물 제제가 전부이다. 시설재배 작물의 대표적인 해충인 진딧물의 효율적인 관리를 위해 국내에서 원료 공급이 가능한 형태의 제제 개발에 대한 연구가 매우 필요함을 의미한다. 따라서 다른 유효성분으로 구성된 제제나 혹은 기존 유효성분에 복합적 성분을 이용하여 제제화하는 기술개발 관련 연구가 매우 필요한 상황이다.

다. 미생물 농약의 제형화 및 자가배양 문제점과 해결 방안

국내에서 농가에서 많이 사용되고 있는 자가배양용 미생물은 QC가 되지 않고 효능이 인정되지 않은 다양한 자가배양 미생물이 난립하고 있는 실정이다. 지자체에서 배양기 사업을 통해 다양한 미생물을 제공하고 있지만, 원제에 대한 명확한 작용기작과 QC가 인증된 제품을 활용할 필요가 있다. 국내의 미생물농약 산업의 경우 미생물 발굴 기술, 미생물 배양기술, 약효검정 기술, 천연물질 규명 기술, 작용기작 규명 기술 등은 선진국 수준에 도달하였으나, 고체배양 시설, 대규모 미생물배양 시설, 대량 발효 기술, 미생물제제 기술 등이 선진국에 비하여 부족한 것으로 나타나 선진국 수준의 제품을 개발하지 못하는 것으로 판단된다. 따라서 대규모 미생물배양 시설, 발효시설, 제제 시설이 갖추어진 생물방제센터에서 QC가 검정된 제형을 생산할 필요가 있다.

라. 국내산업의 애로기술 및 해소방안

선진국의 산업기술 수준 대비 우리나라 미생물농약 산업기술의 애로점은, 고가의 비용을 필요로 하는 고체배양 시설, 대규모 미생물 배양시설, 대량 발효기술 등이 부족하고, 일관성 있는 효율을 지니는 미생물 제제화 기술개발이 부족하고, 개발의 핵심을 활성물질에 두는 것보다 균체수를 늘려 병해충을 방제하고자 하는 기술이 대부분이고, 국내에서 원료공급원을 확보하는 방안이나 대책이 미비하고, -국의 경쟁력이 낮아 마케팅이 국내에 국한되어 있으며, 연구방향이 산업화 보다는 논문이나 특허를 사업성과물로 인정하는 제도적 관념에서 온다고 할 수 있다.

따라서 우리나라 생물농약 산업화를 위해 고려해야 할 사항은 다음과 같이 제시할 수 있다. 유기농에 사용이 가능한 생물소재를 개발을 위해 본 연구팀을 통해 정량적 성과를 산출 가능한 집중적 연구 필요하고, 미생물의 대량배양 및 배양액을 제제화에 연결할 수 있는 생물방제센터 시설이 필요하고, 제제개발을 활성물질에 중심을 두고 물질의 안정성과 균일성, 효과성을 유지할 수 있는 기술이 요구되고, 해충의 경우 세대간 개체수 변화가 심하므로 제제의 침투율을 증가시킬 수 있는 보조제 개발 필요하다. 또한 미생물 배양액을 적절한 비율로 희석을 하여도 방제효과가 유지될 수 있는 배합기술이 필요하고, 기존 합성농약 살초 권장농도의 10-50 배 수준의 농도에서도 방제효과가 유지되는 미생물 확보가 요구된다. 본 연구팀에서는 이러한 배경을 고려하여 해충방제 및 병 방제/예방을 위한 미생물농약을 개발하여 산업화하고자 함.

제 2 절. 연구개발의 목표

본 연구에서 개발된 유기농자제는 주요 방제 대상 병해충은 아직까지 친환경적인 방법으로 방제가 어려운 난방제성 토양병해인 시들음병, 잿록병, 뿌리혹선충, 및 복숭아혹진딧물이다. 본 연구팀에서는 국내에서 식물병해충 생물적 방제균의 제형화를 위한 시설을 갖춘 생물방제센터가 참여하여 모든 미생물제품은 멸균된 조건에서 대량생산한 제품을 이용하였다. 또한 제품을 이용하는 측면에서도 정부와 지자체에서 보급한 미생물 배양기를 활용하는 차원에서 개발된 시제품을 배양기에 공급하고, 제품에 대한 quality control하는 마커들을 활용하여 유해요소나 오염을 방지하는데 이용될 것이다. 일부 제품은 생물 농약으로 개발하여 국내 제품의 국제 경쟁력을 강화하고자 하였다. 본 연구에서 개발될 모든 제품은 수요자인 유기농 및 친환경 농업인들이 손쉽게 사용할 수 있는 방제매뉴얼을 동시에 개발하여 개발된 제품과 방제매뉴얼을 활용하여 본 연구에서 방제하고자 하는 병해충을 방제하는 현장적용형 연구이다. 위의 연구를 통해서 다음과 같은 세부적인 목표를 달성하고자 하였다.

1. 토양병해 방제용 유기목록농약 (방제가 60% 이상) 1건 이상 등록
2. 시들음병, 탄저병 방제용 친환경유기목록 (방제가 60% 이상) 자재 1건 이상 등록
3. 뿌리혹 선충 방제용 친환경유기목록 자재 (방제가 60% 이상) 1건 이상 등록
4. 복숭아혹 진딧물 방제용 친환경유기목록 자재 (60%) 1건 이상 등록
5. 개발된 미생물 자재의 방제 지침 개발 3건 이상
6. 개발된 미생물 제품 QC용 DNA와 metabolite marker 개발 4건 이상

제 3절. 연구 내용

1. 뿌리혹선충 방제 미생물 선발 및 효능 분석

가. 미생물체의 대량생산체계 확립

(1) 실내실험 : 키틴분해세균들을 키틴함유배지(본 연구자의 특허)에서 단독 혹은 혼합 배양하여 microplate 상에서 뿌리혹선충의 부화 및 살충효율을 조사하고, 살충효과가 가장 우수한 조합을 100mL의 키틴함유배지에 배양하면서 배양기간에 따른 각 균주의 밀도, chitinase 활성, 부화 및 살충효율 조사하여 살충효과가 가장 우수한 배양기간을 선정하였다.

(2) 실외 실험 : 가장 우수한 조합의 균주를 키틴함유배지가 들어 있는 500L의 대량배양기에 배양하면서 배양기간에 따른 각 균주의 밀도, chitinase 활성, 부화 및 살충효율 조사하고, 살충효과가 가장 우수한 배양기간을 선정하였다.

나. 뿌리혹선충의 방제효과 검증

(1) 뿌리혹선충의 증식 : 전남 순천지역 시설재배 내 오이 뿌리의 혹에서 분리, 증식하여 사용한다. 즉, 혹이 형성된 뿌리를 물로 씻어 절단한 다음 0.5% sodium hypochloride에서 3분간 흔들어 200 mesh와 500 mesh를 이용하여 알을 세척하고 모아서 오이 뿌리에서 증식하여 사용하였다.

(2) 포트에서의 방제효과 검증 : 뿌리혹선충을 접종한 토양에 미생물체 처리구와 대조구로서 배지 처리구로 나누고, 뿌리혹선충을 접종하지 않은 토양에 배지를 처리하여 상호 비교하였다. 오이에서 순수 증식된 뿌리혹선충 함유 토양은 새로운 상토와 1:1(v:v)의 비율로 섞어서 플라스틱 포트(길이 58 cm × 폭 9 cm × 높이 15 cm)에 넣고, 여기에 발아 후 30일된 오이 유묘(장형낙합)를 포트 당 4주씩 심고, 각 주에 미생물체 원액 또는 배지를 10일 간격 3회 처리하였다. 마지막 처리 10일 후 오이 줄기, 잎, 뿌리의 생육과 뿌리에 형성된 혹의 수, 토양에 있는 뿌리혹선충의 밀도를 비교, 분석하였다. 뿌리혹선충 밀도는 각 처리구로부터 토양시료를 채취하여 2 mm 표준체로 거르고, 체를 통과한 토양은 Sieve and baermann funnel technique을 이용하여 선충을 분리하였다. 분리된 선충은 24-well culture plate에 옮겨 도립현미경(Leica. DMIL)하에서 뿌리혹선충 밀도를 조사하였고, 뿌리의 혹은 뿌리 5 cm에 붙어 있는 수를 세어서 평균을 구했다.

2. 시설재배 작물에 대한 뿌리혹선충 방제용 미생물제제의 최적 방제 체계 확립

가. 미생물제의 예방효과

전남 순천시 대대동 비닐하우스 재배단지에서 오이, 호박을 친환경적으로 재배하면서 뿌리혹선충에 피해가 심했던 600평의 포장에 작물을 정식하고, 포장의 1/2(300평)에 정식 후 물에 희석된 미생물제를 점적 관수하고, 나머지 300평은 동일 조건으로 물을 점적 관수하여 작물의 초장과 뿌리의 혹 및 근권의 선충밀도 등을 조사하였다. 아울러, 미생물제가 살포되었을 부분과 바로 인접해 있지만 살포되지 않았을 부분에 대한 뿌리혹선충 감염여부를 평가하여 미생물제의 접촉여부에 따른 방제효과를 조사하였다.

나. 미생물제의 치료효과

정식 후 무처리구에서 뿌리혹선충에 의해서 생육이 현저히 낮은 작물의 반은 미생물제 원액을 토양 관주하고, 나머지 반은 동량의 물을 관주하여 작물의 초장, 생존율 및 근권의 선충 밀도를 조사하였다. 근권의 선충은 Sieve and baermann funnel technique을 이용하여 분리 후, 80℃에서 증탕하여 사멸시켜 24-well plate에 옮겨 1 ml씩 분주하고 도립현미경하에서 총 선충 밀도, 식물기생 선충 밀도, 뿌리혹선충 밀도를 조사하고 식물기생선충도감과 비교하여 분류하였다.

3. 뿌리혹선충 방제용 미생물제의 실용화 방안

가. 미생물제처리에 의한 작물 생육 상태 및 뿌리혹선충 방제효과 시험

전년도 선충피해가 심했던 비닐하우스 포장(약 300평)을 임대하여 토마토를 정식하고, 10배 희석된 미생물제를 정식일 부터 5일 간격 6회 점적호스 관주하였다. 그 후 토마토의 초장, 근권의 선충 밀도와 뿌리의 혹 수를 조사하였다. 여기에서 미생물제는 *Lysobacter enzymogenes*와 *Serratia plymuthica*를 키틴 합성배지에서 10일 동안 배양한 액을 사용하였다.

나. 선충 방제효과 검증을 위한 조사

미생물제의 처리에 따른 작물의 초장, 엽면적, 잎의 형태 및 색깔 등과 뿌리에 형성된 혹의 정도, 근권에 분포하는 선충의 밀도 등을 비교, 분석하여 뿌리혹선충에 의한 작물의 피해 정도를 비교, 분석하고 미생물제에 의해서 그 피해를 감소시킬 수 있는 정도를 비교, 분석하여 일반농가에서 실제 활용할 수 있는 방안을 모색하였다.

2. 선충 방제제의 선발, 효능 검정, 기전 규명 및 QC마커 개발

가. 토마토 뿌리혹선충의 분자생물학적 동정

먼저 뿌리혹선충은 토마토에서 피해를 주고 있는 뿌리혹선충을 분리하여 전남대학교 온실에서 토마토에 증식하고 있는 뿌리혹선충을 이용하였다. 공시된 뿌리혹선충의 동정을 위해서 뿌리혹으로 감염된 토마토 뿌리를 각각 0.1 - 1g씩 막자사발과 액체질소를 이용해서 분쇄하여 lysis buffer와 PowerSoil DNA extraction kit (MoBio Laboratories, Inc., 미국)를 이용하여 선충의 DNA를 분리하였다. 뿌리혹선충의 rDNA cistrons과 intergenic spacer (IGS2)부위를 증폭하기 위해 Primer 194, 5'-TTA ACT TGC CAG ATC GGA CG-3'와 195 5'-TCT AAT GAG CCG TAC GC-3'를 이용하여 약 713 bp의 PCR product를 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 PCR purification kit (Bioneer Inc., 대전, 대한민국)을 통하여 정제한 다음 정제된 PCR product를 template로 다시 *Meloidogyne*뿌리혹선충을 특이적으로 증폭하기 위하여 JMV1 5'-GGA TGG CGT GCT TTC AAC-3'과 JMV2 5'-TTT CCC CTT ATG

ATG TTT ACC C-3'의 primer 쌍을 이용하여 PCR을 통하여 PCR을 통하여 약 500 bp의 PCR 산물이 증폭되었다. 기존의 연구에 의하면 2번째 PCR을 통해서 증폭된 PCR 크기가 약 510 bp일 경우는 *Meloidogyne incognita* (고구마뿌리혹선충), *M. arenaria* (땅콩뿌리혹선충), *M. javanica* (자바니카뿌리혹)선충 중의 하나이다. *M. hapla* (당근뿌리혹선충)은 2차 PCR산물이 400bp라고 밝혀져. 본 과제에서 사용되고 있는 뿌리혹선충은 전자 3개의 뿌리혹선충 중의 하나임을 알 수 있었다 (그림 1). 정확한 뿌리혹선충의 동정을 위해 1차 PCR product을 sequencing하여 genbank에 등록이 된 type 뿌리혹선충들의 IGS2 sequence들과 비교 분석하여 본 결과, *M. hapla*와는 독립적인 그룹에 속해 있었고, 나머지 3개의 뿌리혹선충 그룹에 속해 있었으며, *M. incognita*와 가장 가까운 근연관계를 보여 본 연구에 사용된 뿌리혹선충은 고구마뿌리혹선충임을 밝혔다 (그림 2).

나. 뿌리혹선충 방제용 미생물제의 배양배지별 살선충 *in vitro*검정

본 시험에 공시된 다양한 살선충 방제용 균주들의 배양 배지별 살선충 효능을 검증하여 대량배양시 혹은 종균을 배양하는 배지선발을 위해 다양한 배지를 이용하여 살선충 효능을 조사하였다. 연구에 사용된 균주들은 기존에 살선충 효능이 밝혀진, *Pseudomonas chlororaphis* O6를 비롯해서 기존에 키틴 배지를 이용한 세가지 균주, *Lysobacter enzymogenes*, *Serratia plymuthica*, *Chromobacterium* sp. C-61, DAPG producing *Pseudomonas fluorescens* Wayn1R 균주 등을 공시하여 살선충 효능을 분석하였다.

In vitro 살선충 효능 분석을 위해 전남대학교 유리 온실에서 증식중인 고구마뿌리혹선충에 감염된 토마토 뿌리를 채취하여 클로락스로 30초정도 흔들어서 씻어내어 난탕에서 선충알을 회수하여 회수된 선충알을 상온에서 3일간 부화시켜 2령 유충을 회수하여 사용하였다. 다양한 미생물 배양액과 1:1로 혼합하여 3시간동안 방치한 다음, 죽은 선충의 수를 실체 현미경하에서 특수제작된 기구로 터치해서 움직이는지 여부로 살선충 효능을 분석하였다.

다. 균주 및 성장 조건

Chitinolytic *Chromobacterium* sp. C61 는 나주 근교의 토양에서 분리되었고, 28±℃에서 50 µg/ml의 ampicillin과 0.2 % colloidal chitin을 함유한 nutrient broth (NB) 또는 Luria bertani (LB) 배지에서 성장시켰다. *Chromobacterium* sp. C61의 돌연변이 조제를 위해서 유전자 조작에 이용된 대장균들은 LB에 37 °C에서 성장시켰다. Helper plasmid인 pRK20173은 spectinomycin (50 µg/ml), 플라스미드 pRL648 및 pCRII (Invitrogen, CA, USA)를 포함하는 균주의 성장을 위해서는 kanamycin (50 µg/ml), marker exchange mutagenesis vector인 pCPP54의 성장을 위해서는 tetracycline (12.5 µg/ml)이 함유된 배지에서 성장시켰다. 모든 균주는 -80 °C에서 15 % glycerol에 저장하면서 이용하였다. 식물병원 곰팡이에 대한 길항 작용을 평가하기 위해 사용된 박테리아 균주는 LB에서 생육시킨 다음 원심 분리하고, OD600nm로 세포를 1±10⁸ CFU/ml가 되게 멸균수로 현탁하였다.

라. *Chromobacterium* sp. C61의 chitinase mutant조제

플라스미드 DNA는 AccuPrep 플라스미드 추출 키트 (바이오니아 사, 대전, 대한민국)을 이용하여 분리하고, 게놈 DNA는 CTAB-NaCl을 방법에 의해 분리하였다. 제한 효소 및 modified 효소는 New England Biolabs (MA, USA)에서 구입하였다.

chi54 유전자 발현의 손상된 돌연변이를 조제하였다. *Chromobacterium* sp. C61의 *chi54* 유전자를 가지고 있는 플라스미드 pChi54의 유일한 제한 효소 부위인 *Bam*HI으로 절단한 부위에 pRL648로부터 동일 제한효소로 절단한 kanamycin 저항성 유전자 0.9 kb *Bam*HI 절편을 삽입시켜 돌연변이주 조제

에 사용하였다. 돌연변이된 *chi54* 유전자는 앞에서 설명한 것과 pCPP54 homologous exchange vector 벡터를 이용하여 염색체 야생형 chitinase 유전자와 교환하여 돌연변이주를 조제하였다. Putative chitinase 돌연변이체는 kanamycin 저항성과 tetracycline 감수성 유무와 5 % sucrose 포함하는 평판 배지에서 생육 여부 등으로 확인하였다.

Chitinase과다 발현 돌연변이주는 C61T는 *chi54*의 유전자 서열의 세린을 티로신의 교체하여 수정한 유전자를 이용하여 조제하였다. 조제된 세균의 chitinase 생산의 확인은 0.1 % 콜로이드 키틴-50 % LB 한천 배지에 10 μ l을 떨어뜨려 clear zone을 형성하는 것으로 측정하였다.

CTAB-method로 추출된 DNA를 사용한 PCR 분석은 *chi54* 특이적 프라이머로 *chi54*F-5'-GAA CGC GTG CTG TTG TAA GA-3' 및 *chi54*R-5'/GAA TTG AGG AGG TCC GAA TG-3'와 바이오니아 PCR premix (대전, 한국)를 이용하여 *chi54* 돌연변이주에서의 chitinase 유전자의 존재와 T218S chitinase과다 발현 돌연변이주의 확인하는데 이용되었다.

마. Chi54 transcript 분석

Chromobacterium sp. C61 세포는 potato dextrose broth 배지에서 0.5% colloidal chitin를 첨가하거나 하지 않은 조건에서 생육시키면서 OD_{600nm}=0.7의 mid-log 단계의 세포를 회수하였다. Total RNA는 제조업체의 설명서 (Invitrogen)에 따라 Trizol™를 사용하여 분리하였다. 역전사-PCR (reverse-transcript PCR)는 QuantiTect SYBR Green RT-PCR 키트 (Qiagen, CA, USA)를 사용하여 실시하였다. 두 specific 프라이머; forward (5'-AGA ACA AGC GCC GCT ACT AC -3') 및 reverse (5'-AGA ACA AGC GCC GCT ACT AC -3') *chi54* 유전자, 그리고 *Chromobacterium* sp.의 16S rRNA 유전자에 특이 프라이머, forward (5'-CCC ACT GCC TCC CGT AAG GA -3') 및 reverse (5'-TGG CTC AGA ACG AAC의 GCT GG -3')를 사용하였다. 25 μ l의 reaction mixture에서 50 °C에서 30분 동안 배양하면서 역전사를 수행하였다. 정량적 RT-PCR은 Rotor gene-3000 real time PCR cycler (Corbett Research Inc., 시드니, 호주)를 이용하여 수행하였고, QRT-PCR 반응은 24 사이클의 끝에서 정지시키고, PCR 생성물은 1.5 % agarose gel에서 전기영동 후 EtBr로 염색하여 확인하였다.

마. 키티나제 활성의 평가

Chromobacterium sp. C61균주는 48 시간 동안 28 °C에서 콜로이드 0.2 % 키틴 또는 chitin없이 PDB에서 교반 성장시켰다. 세포를 원심 분리하고 세포를 제거한 다음, 키티나제 활성은 상등액을 이용하여 측정하였다. 효소 활성은 0.1 mM 기질 및 효소를 함유하는 100 mM의 KH₂PO₄ 완충액 (pH 7.0)을 반응 혼합물에서 4-methylumbellifery- β -D-N,N-diacetylchitobioside (Sigma, MO, USA)의 가수 분해량을 측정하여 분석하였다. 37 °C에서 10 분간 배양 한 후, 반응물에 0.1 ml의 0.2 M Na₂CO₃를 첨가하여 반응을 중지시킨 다음, chromogen의 형성을 360 nm의 파장을 excitation 파장대로 emission은 440nm파장대로 Bio-Tek FLX-8000 형광 분석기 (Winooski, VT, USA)를 이용하여 측정하였다. 키티나제 활성의 one unit는 배양액 ml 또는 정제 키티나제의 mg당 유리된 4-methylumbelliferone/min/ml의 μ M로 표현했다. 또한 Chitinase 활성은 테스트 샘플을 0.2 % 콜로이드 키틴을 포함하는 LB 플레이트 상에서 clear zone을 측정하였다.

부분 세포의 chitinase 정제는 50 %의 황산 암모늄가 되게 세포의 상등액에 만든 후 24 시간 동안 4 °C에서 교반하면서 침전시켰다. 침전된 단백질을 30 분 동안 8,000 rpm에서 원심 분리에 의해 수확하고 -20 °C에 저장하기 전에 1 ml의 20 mM의 sodium acetate 완충액 (pH 6.0)에 용해시켰다. 각 시료의 단백질 농도는 (Bio-Rad lab., CA, USA)에서 분석 염색 시약 방법을 이용하여 595 nm에서 흡광도를

측정하여 결정하였다. *Chromobacterium* sp. C61야생형, chitinase돌연변이주에서의 chitinase생성량은 Park 등의 방법을 따랐다 (2007). 간단히, 부분적으로 배양 여액에서 정제된 동일한 양(20 μ g)를 SDS-PAGE 젤에 전기영동하였다. SDS-PAGE 젤의 단백질은 Western blot 분석을 위해 Coomassie blue로 염색하였고, 분자량은 low range SDS-PAGE standard (Bio-Rad Laboratory)와 비교하여 결정하였다. 전개된 단백질은 negative charged nylon membrane (Roche Applied Science, 독일)에 electroblotting에 의해 옮긴 후 정제 Chi54의 키티나제를 이용하여 제조된 polyclonal antibody와 함께 24 시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 배양하였다 (Park et al., 2005). TBS-T 완충액 (20 mM Tris-HCl PH7, 100 mM의 NaCl, 0.5 % Tween 20)로 두 번 세척 한 후, membrane을 1 시간 동안 실온에서 rabbit secondary antibody (Sigma)와 함께 배양하였고, TBS-T 완충액으로 2번 세척한 다음 공기 중에서 건조하였다. Chitinase 밴드는 membrane을 Western LightingTM plus-ECL enhanced chemiluminescence substrate (PerkinElmer Inc., CA, USA)에 노출시켰다. 또한 세포 배양여액으로부터 부분적으로 정제된 chitinase 샘플도 동일한 양의 단백질 (20 μ g)을 SDS-PAGE 젤 상에 전기영동하여 단백질을 전개하였고, chitinolytic 활성 밴드는 4-acetyl- β -D-glucosamine(4-MU-(GlcNAc₂))를 사용하여 젤 상에서 검출하였다.

사. *Chromobacterium* sp. 균주와 세포의 물질의 항진균활성

Rhizoctonia solani (KACC 40111) 및 *Botrytis cinerea* (KACC 40573)은 Korea Agriculture Type Culture Collection Center (수원)에서 분양받아 이용하였다. 식물 병원곰팡이는 28 $^{\circ}$ C에서 PDA (Difco)에서 생장시켜 사용하였다. *Chromobacterium* sp. C61 균주들은 항진균 활성을 측정하기 위해 colloidal chitin이 함유되거나 되지 않은 PDA 플레이트에서 현탁액을 떨어뜨린 다음 각 병원균의 균사체를 함유하고 있는 한천 디스크 (0.5 cm 직경)를 플레이트의 중앙에 배치하였다. 각 균주의 길항 활성은 세균 현탁액을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 식물병원균의 곰팡이 균사의 저해 정도를 측정하여 결정하였다. 세포를 함유하지 않은 세균 배양 여액의 항진균 활성을 측정하기 위해서 0.2 % 콜로이드 키틴을 함유한 PDB배지에서 200 rpm로 교반하면서 실온에서 3 일 동안 생장시켰다. 배양여액을 100도에서 5분 동안 가열하여 항진균 활성의 대조구로 이용하였다. 대조구와 가열한 세포외 여과액은 PDA agar plate에 떨어뜨려 *R. solani*와 *B. cinerea*의 생장 억제 능력을 측정하는데 이용하였고, colloidal chitin을 함유한 배지에 떨어뜨려 chitinase활성 측정하였다.

자. *chi54* 돌연변이의 생장 비교.

Chromobacterium sp. C61야생형과 *chi54* 돌연변이 균주의 생장을 0.2 % 콜로이드 키틴을 함유하거나 함유하지 않은 PDB 배지에서 200 rpm으로 진탕 배양하면서 25 $^{\circ}$ C에서 측정하였다. 세균을 24 시간동안 Potato dextrose broth배지에서 200rpm/min교반하면서 배양한 다음, 600 nm에서 optical density (OD)를 0.1로 조정하였다. 배양액을 멸균수로 희석한 다음, C61균주의 야생형은 50 μ g/ml의 ampicillin, *chi54* 돌연변이주는 50 μ g/ml의 kanamycin이 함유된 LB agar plate에 도말하여 추가적으로 colony forming units/ml를 측정하였다.

차. 정제된 Chi54의 항진균 활성 측정

기존에 보고된 대장균에서 expression vector에 *chi54*가 발현시켜 정제한 C61 Chi54 단백질을 이용하여 곰팡이 포자 발아 억제를 조사하였다. 4가지 곰팡이 병원균, *Colletotrichum gloeosporioides* (KACC4003), *Botrytis cinerea* (KACC40573), *Cladosporium sphaerospermum* (KACC43548) 및 *Fusarium oxysporum* (KACC40183)은 Korean Agriculture Type Culture Collection Center (수원)에서

분양반아 수행하였다. 곰팡이 병원균의 포자 현탁액은 (1×10^5 spore/ml) PDA 배지에 생장한 곰팡이에 멸균수로 현탁하여 조제하였다. 10mM sodium acetate 완충액 (pH 6.0) 단독, 혹은 Chi54 (0.02, 0.2, 2 mg/ml)을 동량의 진균 분생포자 현탁액 (1×10^3 conidia/mL)을 튜브에서 혼합하고, 28 °C에서 10시간 동안 배양하였다. 곰팡이 포자의 발아는 혈구계를 이용하여 샘플을 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다.

카. 항 진균성 화합물의 분리 및 동정

C61은 50L LB 배지에서 36 시간 동안 27 °C에서 진탕시키면서 배양시켰다. 세균 세포는 10,000 xg에서 20분 동안 원심 분리에 의해 제거한 다음 상등액을 동량의 ethyl acetate로 (EtOAc)로 2 회 추출하였다. EtOAc 추출물을 45 °C에서 증발 건조시키고, EtOAc/메탄올 (90:10, V/V)의 혼합물에 용해시켰다. 추출물을 SPE (Supelco, PA, USA) silica gel cartridge column에 EtOAc/메탄올 (90:10, V/V) 용매 시스템에 전개시켰다. 메탄올 농도를 10%에서 100 %까지 올리면서 각 농도의 용매에서 용출액을 회수하였다. 용출액은 45 °C에서 수거하고, 회전식 증발기에서 농축 건조했다.

아래의 방법에 의해 각 용출액의 항 진균활성을 측정 한 후, 활성분획을 메탄올에 용해하고 210 nm Dionex PDA-100 model photodiode array detector와 Dionex P680 model dual pump가 장착된 prep-HPLC에 주입하였다. HPLC 컬럼은 μ -Bondapak C-18 stainless steel column ($7.8 \times 300 \text{mm}^2$, 10 μm 필름 두께)을 이용하였다. 용매계는 0.1 % trifluoroacetic acid를 함유된 85 % 메탄올 (v/v)이었고, 유속은 2.0 ml/분으로 분획하였다. HPLC 분석에 의해 검출된 각 피크를 수집하고, 곰팡이 항균활성 생물 검정을 실시하였다. 사용되는 모든 용매는 HPLC 등급을 이용하였다 (Fisher Scientific, PA, USA).

타. 기기 분석 방법

212-LC Binary LC system과 Prostar 335 photodiode array detector (210, 260 280nm)이 장착된 Varian Model 500MS ion trap liquid chromatography (LC) mass spectrometer (Varian, CA, USA)를 이용하여 세균 배양액내에서의 분리된 항균활성 물질의 동정에 사용하였다. HPLC 컬럼은 Chromsep C18 stainless steel column (150 x 2.0 mm)을 이용하였다. 이동상은 acetonitrile과 0.1% formic acid를 함유하고 있는 초 순수 물을 이용하였고, 0.2 ml/분의 유속으로 30 분에 걸쳐 10-90% (V/V)로 증가시켰다. HPLC 시스템은 양성 이온 모드에서 electrospray ionization (ESI) interface가 장착된 LC-MS2 system을 장착하였다. 건조 가스 온도와 압력은 각각 300 °C와 20 PSI를 이용하였고, capillary voltage는 80V를 이용하였다. 질량 스펙트럼은 m / z 100-1500범위에서 얻었다.

질량 스펙트럼은 정확한 질량을 측정하기 위해 10,000 full width half maximum의 mass resolution 양이온 모드 ESI source를 장착한 Hybrid ion-trap TOF mass spectrometer로 측정하였다 (Shimadzu, 도쿄, 일본). 분석 조건은 스캔 범위, m / z 700-1500; spray voltage, +4.50 kV; 검출기 전압, 1.70 kV; skimmer 전압, 8.0V; TOF 지역의 압력, 2.2×10^{-4} Pa, 온도, 40 °C; 이온 소스의 온도, 200 °C; 트랩 냉각 가스 (AR) 속도, 94 ml/분 flow; 이온 트랩 압력, 1.8×10^2 Pa; collision gas (AR) 속도 43 ml/분 유량; 이온 축적 시간, 10 ms; 전구체 이온 선택 폭, 3.0 m/Z 단위; 선택 시간, 50 밀리 초; collision-induced dissociation collision time, 30 ms; 충돌 에너지, 100 %; $q_z=0.251$, MSⁿ data는 targeted function를 이용하여 획득하였다. Shimadzu Composition Formula Predictor를 이용하여 동정을 확인하는데 이용하였다. Varian 모델 Unity INFINITY plu 125 MHz의 NMR 분광계 및 INOVA 500 MHz의 NMR 분광계를 ¹³C와 ¹H 분석에 이용하였다.

파. biosurfactant 활동의 결정

세포 배양 여액의 Biosurfactant 활성은 DuNouy 모델 3010 tensiometer(DuNouy, 도쿄, 일본)를 이용하여 측정하거나 (Kim et al., 2007), 10W-40 Penzoil (Penzoil 제품, 휴스턴, TX, USA)를 이용한 drop collapse assay를 이용하여 측정하였다 (Birch et al., 2010). 세균 상층액을 10 분 동안 12,000 × g에서 원심 분리하여 분리하고, 잔류 세균 세포를 제거하기 위해 0.2 μm의 millipore filter로 여과하였다. 표면 장력 측정을 위해 장비는 공기와 물로 72.75 mN/ml의 수치로 측정하여 이용하였다. 표면 장력 측정 및 drop collapse assay는 샘플 당 3반복으로 3번의 독립적인 실험을 실시했다.

하. *In vitro* 항 진균 활성의 측정

C61 야생형 및 돌연변이주에서 세포 외 chromobactomycin 생산을 측정하기 위해 3 일간 0.2 % colloidal chitin이 첨가되거나 첨가되지 않은 PDB에서 생육시켰다. C61균주에서 chromobactomycin은 위에서 기술한 방법으로 EtOAc로 추출하여 HPLC로 분획을 한 후 methanol로 녹여서 사용하였다. 식물 병원성 곰팡이 병원균 *Alternaria longipes* (KACC 40028), *Rhizoctonia solani* (KACC 40111), *Pyricularia grisea* (KACC40439), *Fusarium oxysporium* (KACC 40183), *Phytophthora capsici* (KACC 40157), *Botrytis cinerea* (KACC 40573), 및 *Collectrichum gloesporioides* (KACC4003)를 Korea Agriculture Type Culture Collection Center에서 분양받아 이용하였다. 이들 병원균들은 28 °C에서 PDA (Difco)에서 생장시켰다. *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Bacillus subtilis* SQST713균주는 LB agar 배지에서 희석 배양법에 의해 접종한 다음 정제된 chromobactomycin의 항 세균활성 측정을 28 °C에서 배양하면서 측정하였다. 배양된 세균들은 원심분리하여 회수한 다음 멸균수에 재 현탁하여 OD600nm = 0.1로 조정 한 다음 세균 현탁액 1 ml를 신선한 LB agar plate에 도말하였다. 메탄올 에 녹인 정제된 CLP를 멸균 페이퍼 디스크 (직경 8mm, ADVANTEC, 일본)에 떨어뜨리고, 건조시키고 세균 현탁액으로 도말된 LB agar plate에 놓아 두었다. 배지는 28 °C에서 배양하면서 filter paper 주위에 clear zone을 3일 후에 측정하였다.

Chromobacterium sp. C61균주들의 항균활성을 측정하기 위해 PDA배지 한 쪽 끝에 옮겨서 측정하였다. 정제된 물질을 함유한 filter paper를 이용하여 PDA plate상에서 균사 생장 억제를 측정하였다. 메탄올을 음성 대조군으로 사용하였다. 살균된 페이퍼 디스크 (직경 8mm, ADVANTEC)에 메탄올에 용해한 분리 정제한 화합물 (400 μg/디스크)로 처리하였다. 페이퍼 디스크는 건조시킨 후 병원균이 자라고 있는 부위(5mm 플러그 직경)로 부터 약 2.5 cm의 떨어진 곳에 위치시켰다. 배지는 27 °C에서 배양하면서, 곰팡이의 생장율을 5일 후에 측정하였다.

거. 식물병 억제 생물 방제 분석

Chromobacterium sp. C61균주들의 생물적 방제는 여섯 가지 식물 병해, 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 밀 녹병, 토마토 잿빛곰팡이병과 잎 역병, 고추 탄저병에 대해서 병 억제 능력을 검정하였다. In vivo 항 진균 생물 검정하였다. 요약하면, 식물 유묘들은 비닐 포트에서 25±5 °C에서 1-4 동안 생장시킨 후, 식물체를 1:3으로 희석한 C61, C61Chi54M, C61Chi54TS 균주들을 PDB배지에서 chitin을 함유하거나 함유하지 않은 배지에서 3일간 생육시킨 균주의 상등액, 또는 정제된 chromobactomycin (50 μg/ml)을 tween 20을 습윤제로 첨가하여 분무살포하였다. Tween 20과 증류수를 음성 대조군으로 사용하였다. 처리 된 식물 모종은 24 시간 후 여섯 식물 병원균 중 하나의 포자 또는 균사 현탁액을 접종했다 (Kim et al., 2001). 병원균에 따라 접종 후 3-7 일 후에 발병을 측정하였다. 각 처리구당 3개의 식물체를 이용하였고, 3반복하여 수행하였으며, 무작위 블록 디자인 방법으로 배열하여 처리하였다. Disease index는 감염된 잎 면적의 백분율을 측정하였다. 각 실험은 세 번 수행하였다.

너. *luxI* mutant에서 autoinducer 생산 검증

Chromobacterium sp. C61 세포에서 AHLs 추출은 전에 발표한 논문에 기준하여 28 °C에서 50 ml LB broth에서 정체가까지 생육시킨 세포에서 분리하였다. 정제된 AHLs C-18 reversed-phase silica TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany)에 spotting하였고, TLC plate는 ethanol/water (60:40, v/v)에서 전개한 다음, *Chromobacterium violaceum* CV026 indicator strain를 함유한 0.7% LB agar를 TLC 판에 도말하여 검출하였다. N-butyryl-L-homoserine lactone (C4), N-hexanoyl-homoserine lactone (C6), N-octanoyl-homoserine lactones (C8)를 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 standard로 이용하였다.

더. *luxI* 돌연변이주에서의 *Dep* gene 조절

최근 본 연구팀에서 C61의 draft genome sequencing을 수행하여 본 결과 *C. violaceum*에서 CLP 생합성에 관련된 operon과 유사한 *dep* operon이 지니고 있음을 확인하였다. 이 operon에서 nonribosomal peptide synthase를 암호화하고 있는 *depA* gene가 첫 유전자로 cyclic lipopeptide, chromobactomycin의 생합성에 관련된 여러 개의 유전자들이 존재하였다. 따라서 quorum sensing에 의해 *dep* operon이 조절되는지를 RT-PCR분석을 통해서 수행하였다. 세균을 LB에서 late-log기까지 생육시킨 후 RNeasy Mini Kit와 RNA protect Bacterial Reagent를 이용하여 분리하였다 (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Reverse transcription PCR analysis은 QuantiTech SYBR Green RT-PCR kit를 이용하여 수행하였다 (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Reverse transcription을 위해 25 µl 반응액을 50 °C에서 30 분 동안 수행하고 난 후, 특이적인 primer를 이용하여 RT-PCR를 수행하였다. specific *depA* primer; forward (5'-CGT CGC TGC GTT ACG CGT TG-3') and reverse (5'-CGG CGG TCA CTT TCA GCG T-3'). Specific primer set *Chromobacterium* sp. C61 16S rRNA gene, forward (5'-TGG CTC AGA TTG AAC GCT GGC GGC-3') and reverse (5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG-3')를 internal standard로 수행하였다. Stratagene Mx3000P qPCR system (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 35 cycles를 다음과 같은 프로그램으로 수행하였다. 94 °C for 15 s, annealing at 55 °C for 30 s and a 30 s extension step at 72 °C. 회사의 Software를 이용하여 RT-PCR분석을 수행하였고, end point PCR products 2% agarose gel electrophoresis에서 수행하였다. 야생형과 돌연변이주에서의 *depA* 유전자의 발현은 comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$ method)를 이용하여 수행하였다. 연구는 3반복을 수행하였고, standard deviation으로 표시하였다. 16S rRNA gene의 transcript abundance를 대조구로 이용하였다.

3. 선충방제제 시제품 조제 및 방제 효능 검증, 사용 매뉴얼 개발

가. 미생물제제의 조제와 뿌리혹선충의 증식

미생물제제는 3종의 키틴분해세균이 키틴+최소영양배지에서 배양된 액으로서 일반농가에서 직접 배양할 수 있는 500L용 미생물배양기(흙살림)를 이용하여 조제하였다(Kim *et al.*, 2008). 즉, 배양기에 물을 채우고 80 °C의 온도로 높여서 소독한 다음 키틴+최소영양배지(물

1L당 (NH₄)₂SO₄ 0.6g, KH₂PO₄ 0.8g, K₂HPO₄ 0.6g, MgSO₄·7H₂O 0.04g, 키틴 2g)를 넣었다. 여기에 28℃, 180rpm의 Nutrient broth에서 1일간 배양한 *Chromobacterium* sp. strain C-61, *Lysobacter enzymogenes* 및 *Serratia plymuthica*의 배양액 100ml 씩을 접종하고 28℃에서 10일 동안 배양하여 시험에 사용하였다.

뿌리혹선충은 전남 순천시 시설재배오이의 뿌리에 형성된 혹으로부터 알을 분리하여 오이가 심어진 포트에서 증식하여 시험에 사용하였다.

나. 뿌리혹선충에 대한 미생물제제의 방제효과 검정(포트 시험).

뿌리혹선충에 대한 미생물제제의 방제효과를 검정하기 위하여 순천대학교 구내 온실에서 포트 시험을 수행하였다. 시험은 뿌리혹선충을 접종한 토양에 미생물제제 처리구와 대조구로서 배지 처리구로 나누고, 뿌리혹선충을 접종하지 않은 토양에 배지를 처리하여 상호 비교하였다. 오이에서 증식된 뿌리혹선충은 새로운 상토와 혼합하여 플라스틱 포트에 넣었다. 여기에 발아 후 30일된 오이 유묘(장형낙합)를 포트 당 4주씩 심고, 각 주에 미생물제제 원액 또는 배지를 10일 간격 2회 처리하였다. 마지막 처리 10일 후 오이 줄기, 잎, 뿌리의 생육과 뿌리에 형성된 혹의 수, 토양에 있는 뿌리혹선충의 밀도를 비교, 분석하였다. 뿌리혹선충 밀도는 각 처리구로부터 토양시료를 채취하여 음건한 후 2 mm 표준체로 걸렀다. 체를 통과한 토양은 Sive and baermann funnel technique을 이용하여 선충을 분리하였다(Southey, 1986). 분리된 선충은 24-well culture plate에 옮겨 도립현미경(Leica. DMIL)하에서 뿌리혹선충 밀도를 조사하였다. 뿌리의 혹은 뿌리 5cm에 붙어 있는 수를 세어서 평균하였다. 모든 실험은 각 처리별로 3반복 수행하였다.

다. 뿌리혹선충에 대한 미생물제제의 예방 및 치료효과 검정(포장 시험).

전남 순천시 대대동 비닐하우스 재배단지에서 오이, 호박을 친환경적으로 재배하면서 뿌리혹선충에 피해가 심했던 600평의 포장을 선정하여 2012년 3월 23일에 오이 유묘 (장형낙합)를 정식하였다. 뿌리혹선충에 대한 미생물제제의 예방 효과를 검정하기 위하여 300평은 정식 후 미생물제제(75배 희석)를 1개월 동안 5일 간격으로 점적 관수하고, 나머지 300평은 동일 조건으로 물을 점적 관수하였다. 정식 일부터 한 달 간격으로 2개월간 오이의 초장과 근권의 선충밀도를 조사하고, 정식 3개월 후 여러 위치에 분포하고 있는 주름잎의 뿌리혹선충 감염(뿌리혹 형성) 여부를 조사하였다.

뿌리혹선충에 대한 미생물제제의 치료 효과를 검정하기 위하여 정식 45일 후 무처리구에서 뿌리혹선충에 의해서 생육이 현저히 낮은 지점의 오이들을 선정하였다. 이들 오이의 반은 미생물제제 원액을 10일 간격 3회 관주하고, 나머지 반은 동량의 물을 관주하여 10일 간격으로 오이의 초장, 생존율 및 근권의 선충 밀도를 조사하였다. 근권의 선충은 Sive and baermann funnel technique을 이용하여 분리 후, 80℃에서 중탕하여 사멸시켜 24-well plate에 옮겨 1ml씩 분주하고 도립현미경하에서 총 선충 밀도, 식물기생선충 밀도, 뿌리혹선충 밀도를 조사하고 식물기생선충도감[NAAS, 2001]과 비교하여 분류하였다.

4. 복숭아 흑진딧물 방제용 미생물의 개발 및 방제 매뉴얼 개발

가. 기초제제 연구

(1) 살충물질 최적 생산 배양조건 조사

(가) 살충물질 생산을 위한 최적 탄소원 조사

미생물 배양 및 살충물질의 생산을 위한 공시균주의 최적 탄소원 조사는 glucose, fructose, sodium-acetate, sucrose, glutamate 그리고 식물성오일을 대상으로 실시하였다. 탄소원을 0.2, 1.0, 2.0% (v/v) 수준으로 함유한 최소 무기염류배지에 공시균주를 1.0% (v/v) 수준으로 접종한 다음 96시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 원액, 5배, 10배, 100배 희석한 다음 진딧물에 국소적 처리하여 살충효율을 Abbott (1925) 방법에 의거하여 조사하였다.

(나) 살충물질 생산을 위한 최적 질소원 조사

미생물 배양 및 살충물질의 생산을 위한 공시균주의 최적 질소원의 조사는 ammonium nitrate, ammonium sulfate, sodium nitrate 그리고 urea등을 대상으로 실시하였다. 상기에서 선정된 최적 탄소원과 질소원을 함유한 최소 무기염류배지에 공시균주를 1.0% (v/v) 수준으로 접종한 다음 배양 후 상기와 같이 살충효율을 조사하였다.

(다) 살충물질 생산을 위한 탄소원 대비 질소원 비율(C/N) 조사

미생물 배양 및 살충물질의 생산을 위한 공시균주의 탄질(C/N) 비율의 조사는 최적 탄소원과 최적 질소원의 함량을 고려한 비율을 기준으로 실시하였다.

(라) 살충물질 생산을 위한 최적 무기염류 조성 조사

미생물 배양 및 살충물질의 생산을 위한 최소 무기염류 조성은 예비실험에서 선정된 배지로서 표 2에 제시한 바와 같이 최적 탄소원과 질소원이 함유된 각각의 무기염류 배지에서 공시균주를 배양한 다음 진딧물 살충효율을 조사하였다.

(마) 살충물질의 정성분석

살충물질의 정성적 분석을 위해 배양 후 얻은 각 상징액을 ethyl acetate로 용매추출한 다음 추출물을 thin layer chromatography (TLC, silica gel 60 F254, 20 x 20 cm, Merck)에 전개하여 분석을 수행하였다. TLC분석에 사용된 전개용매는 Chloroform₃ : methanol (4:1, V/V) 이었으며 전개 후 10% H₂SO₄를 분사하여 100℃ 오븐에서 건조시키면서 발색시켰다.

나. 시제품 제작 및 효능 평가

(1) 액체형 제형 연구

미생물의 액체형 제제를 연구하기 위해 상기균주를 100 L와 3,000 L 용량으로 배양하였다. 배양액은 실내에서 보관하면서 정기적으로 일부를 취해 원액, 5배, 10배, 100배 희석액을 진딧물에 국소처리하여 진딧물의 살충활성을 조사하였다. 배양액에 함유된 살충물질의 정성분석은 상기와 같이 TLC 분석을 수행하였다. 균주의 배양조건(100 L)은 온도가 25℃, 회전수는 70 rpm, 그리고 시간은 96시간이었다. 또한, 3000 L 용량의 대량배양 조건은 온도가 25℃, 회전수는 40 rpm, 압력 0.4 kg/cm², 그리고 공기주입량 900 L/min이었으며 시간은 96시간이었다.

(2) 고체형 제형 연구

균주의 고체형 제형 연구를 수행하기 위해 분말 고체제형과 종균보급형 상토제형을 제조한 뒤 각각의 제형에 따른 진딧물 살충효율을 조사하였다. 분말제의 경우 배양액에 전분(전-사이즈, 삼양제넥스)을 배양액 부피의 25-50% (w/v)에 해당하는 양을 첨가한 후 혼합액을 건조하여 분말수화제 형태의 제제를 조제하였다. 분말제제의 진딧물 살충효능은 일정량의 제제를 물에 희석하여 진딧물에 대한 살충효율을 조사하였다.

종균보급형 상토제형의 경우 다음과 같이 수행하였다. 멸균된 상토(10 g)를 플라스틱 용기(6 x 12 cm)에 넣은 다음 0.2% 콩기름 (v/v)과 0.05% Tween-80 (v/v) 및 동일한 부피의 멸균증류수를 각각 첨가한 후 회전식 교반기에서 혼합하였다. 혼합하는 동안 상기에서 얻은 미생물 배양액을 1% (v/w) 수준으로 첨가하여 접종균수가 10^8 cfu/g 수준이 되도록 하였다. 이때 대조구는 동일하게 준비된 상토에 균을 접종하지 않은 시료였다. 균을 접종한 후 경시적인 균체수의 변화는 상토를 증류수로 격렬하게 진탕되어 추출되어 나온 미생물의 수를 ampicillin (50 mg/L) 과 kanamycin (50 mg/L)이 함유된 LB 한천배지에 희석평판하여 배양 후 나타난 콜로니를 조사하여 수행하였다.

(3) 보조제 첨가 액체형 제형 연구

보조제 첨가 액체형 제형 연구를 수행하기 위해 일정량의 xanthan gum이 함유된 공시 균주의 배양액을 진딧물에 살포하여 살충효율을 조사하였다. 균일한 크기의 복숭아혹진딧물(2령)을 세절된 배추잎(5 x 5 cm)에 붓을 사용해 20마리 안치한 후 보조제 함유 배양액을 소형 분무기를 이용해 살포하였다. 이후 진딧물의 이동을 차단하기 위해 안치된 배추잎은 유리원통(15 x 25 cm)에 옮겨 매달아 놓은 후 진딧물 살충효율을 조사하였다.

(4) 농가현장 배양

(가) 농가현장 배양을 위한 최적 탄소원 조사

멸균 조건에서 농가현장 배양 최적 탄소원을 조사하기 위해 농가에서 저렴하게 구입이 가능한 함수포도당(대상주식회사)과 당밀(케이시 산업환경)를 이용하여 균주의 생장을 조사하였다. 탄소원이 함유된 영양배지를 120°C에서 15분간 멸균한 다음 균주를 1%(v/v)수준으로 접종하여 배양하였다. 배양 96시간 후 배양액을 진딧물에 국소 처리하여 살충효율을 조사하였다.

(나) 농가현장 배양을 위한 최적 질소원 조사

멸균 조건에서 농가현장 배양 최적 질소원을 조사하기 위해 농가에서 저렴하게 구입이 가능한 요소태 복합비료(맞춤16호, 남해화학), 질산태 복합비료(성장엔, 동부한농), 인산을 첨가한 질산태 복합비료(인산+맞춤16호) 등의 3개의 질소원을 이용하여 균주의 생장을 조사하였다. 탄소원으로 최적 함량의 함수포도당과 당밀을 이용하였으며 각각의 탄소원이 함유된 배지에 상기의 질소원을 첨가한 다음 120°C에서 15분간 멸균 하였다. 멸균 후 균주를 1%(v/v) 수준으로 접종하여 배양하였다. 배양 96시간 후 배양액을 진딧물에 국소처리하여 살충효율을 조사하였다.

(다) 농가현장 배양을 위한 최적 탄소원 대비 질소원 비율(C/N) 조사

별균 조건에서 농가현장 배양 최적 탄소:질소(C/N) 비율을 조사하기 위해 단일 탄소원으로 함수포도당과 질소원으로 요소태 복합비료와 질산태 복합비료를 이용하였다. 각각의 질소원은 함수포도당에 대한 질량비를 계산하여 최소영양배지에 첨가 한 후 균주를 1%(v/v) 수준으로 접종하였다. 배양 96시간 후 각각의 배양액의 균체수와 진딧물 살충효율을 조사하였다.

(라) 미생물의 비멸균 조건 배양 조사

균주의 실제 농가현장 배양 적용을 위해 비멸균 조건에서 상기와 같은 탄소원과 질소비료를 이용하여 100 mL 과 500 L 용량으로 균주를 배양하였다. 농가 지하수에 탄소원을 2%(v/v) 수준으로 첨가 한 후 요소태 복합비료를 질소원으로 첨가하였다. 한편, 100 mL 용량 배양의 경우 균주는 1%(v/v) 수준으로 접종하였으며 실험실 조건에서 배양하였다. 또한, 500 L 용량 배양의 경우 균주를 10%(v/v) 수준으로 접종하였으며 남평읍 평산리 농가에서 배양하였다. 배양 96시간 후 각각의 배양액을 진딧물에 국소 처리하여 살충효율을 조사하였다.

(5) 소포장 시험

소포장 조건에서 진딧물에 대한 살충효율 및 작물의 생리학적 조사는 농촌진흥청 약효시험기준법에 따라 실시하였다. 진딧물은 시설재배 고추에서 자연적으로 발생한 진딧물을 대상으로 실시하였다. 진딧물의 개체수가 20마리 이상 수준으로 발생하는 고추나무 5개를 선정하고 각 나무당 5개의 잎에 발생하는 진딧물에 소형 분무기를 이용하여 공시균주의 시제품을 살포하였다. 살충효율은 시제품을 살포한 24시간 후 전체 충수에 대한 사충수의 백분율로 산출하였다. 또한, 공시균주의 시제품 살포에 따른 작물생장의 변화는 시제품을 살포한 뒤 일정기간동안 작물의 마디수, 신초 엽수, 분지수, 열매수 등의 차이를 대조구와 비교하여 조사하였다. 대조구는 물을 처리하였으며 참조구는 진딧물방제용 합성농약인 코니도를 처리하였다. 시험포장은 전남대학교 농생대 시설재배 단지였다.

(6) 유기농업자재 공시 시험

공시제의 유기농업자재 목록공시를 위해 농촌진흥청 유기농업자재 공시 및 품질인증기준에 따라 시제품의 유효성분 분석 및 유해성분 분석 그리고 독성시험을 실시하였다. 각각의 시험은 농촌진흥청 인증기관에 의뢰하여 수행되었으며 모든 기준은 유기농업자재 공시 및 품질인증 기준에 의거하여 수행되었다.

다. 시제품의 농가현장 효능 평가 및 매뉴얼 연구

(1) 시험포장 및 작물 재배환경 조건

시험포장은 전라남도 나주시 남평읍 평산리에 위치하였으며 시험을 위해 친환경 재배 고추포장(600 m²)을 임차하였다. 재배 작물은 고추(청량)로서 3월 초에 50 cm 간격으로 정식하였으며 시험 대상은 총 538주였다. 작물의 양분공급을 위한 비료시비는 우리나라 무농약 농산물 재배기준에 준하였다.

(2) 진딧물 방제 매뉴얼 연구

진딧물방제 매뉴얼 연구의 일환으로 본 연구에서 개발한 시제품과 시판자재를 교호적

으로 처리하여 진딧물의 밀도를 조사하였다. 이를 위해 공시균주의 시제품과 유효성분이 상이한 천연식물 추출물 자재 3종을 선발하였다. 선발된 자재는 실험실 조건에서 고농도(권장농도 2배)와 권장농도 그리고 저농도(권장농도 1/3)로 진딧물에 국소처리 하여 살충효율을 검증하였다. 시제품과 선발자재의 교호적인 최적처리 순서를 조사하기 위해 실험실 조건에서 각각의 자재를 교호적 처리하여 진딧물 밀도의 변화를 조사하였다. 한편, 농가포장조건에서 매뉴얼 연구는 실내조건에서 선정된 자재의 교호적인 처리법에 기준하여 재배지수별 진딧물 밀도지수를 조사하였다. 자재의 살포는 진딧물의 밀도가 적정수준으로 관찰 되었을 때 시행하였다.

5. 토양 난방제 작물병 방제용 유기목록 자재 개발

가. *Bacillus velezensis* NSB-1균주의 대량배양공정개발

(1) *Bacillus velezensis* NSB-1균주 선발

Bacillus velezensis NSB-1(이하 *B. velezensis* NSB-1이라함) 균주는 난방제성 토양병해인 균핵병, 탄저병, 뿌리썩음병 병원균에 항균력이 우수한 특허균주(특허 제10-0976760호)로 본 연구과제를 통하여 친환경유기농자재로의 등재를 목적으로 하였다. 본 균주의 산업성 타당여부를 판단하기 위한 준비단계로 scale 단계별 배양공정 설계 및 토양병해에 대한 약효, 약해 시험을 다음과 같이 수행하였다.

(2) *B. velezensis* NSB-1의 Lab scale 최적조건 확립

B. velezensis NSB-1의 최적배양배지를 확립하기 위하여 Davis minimal medium(glucose 0.5%, K_2HPO_4 0.7% , KH_2PO_4 , 0.2%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%)을 기본배지로 하여 Carbon sources(Glucose, Fructose, Mannose, Sucrose, Maltose, Lactose, Starch, Pectin, Xylose, Galactose), Inorganic nitrogen sources(NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$, KNO_3 , $(NH_4)HPO_4$, NH_4HCO_3 , $NaNO_3$, NH_4NO_3), Organic nitrogen sources(Yeast extract, Tryptone, Malt extract, Beef extract, Peptone, Urea, Soytone, Soybean meal), Inorganic salts(Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $NH_4H_2PO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $NaCl$, KCl , $CaCO_3$, $ZnSO_4$)을 달리하여 최적배지 후보균을 선정하였다. 그 결과 Glucose, $(NH_4)_2SO_4$, Yeast extract, Soybean meal, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 등을 배지원으로 하는 최적배지후보균 1,2를 선정하였으며 또 다른 최적배지 후보균으로 당사에서 기개발한 생산배지(GB 생산배지1~5)를 선정하였다. 비교 배양실험은 5L jar-fementer를 이용하여 다른 온도 (20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C), 다른 pH (pH4, pH5, pH6, pH7, pH8) 조건 속에서 aeration, 내부 압력 조절 등 세부 배양 공정을 조절하며 수행하였다. 선정기준은 배양액의 영양세포 및 포자수를 기준으로 하였으며 수율이 현저히 낮은 GB생산배지 3~5는 비교대상에서 제외하였다.

선정된 최적배지를 이용하여 5L-jar fermenter상에서의 *B. velezensis* NSB-1의 시간별 생육을 확인하였다. Culture profile을 작성하기 위하여 배양 중 일정 시간마다 pH, DO 및 미생물 총수 및 포자수를 지속적으로 확인하였으며 시간대별 샘플을 분석하여 전반적인 생산상태 점검 및 생산 기간, pH 등에 대한 정보를 획득하였다 (최적배지 조성을 이용하였으며 동일한 조건에서 5회 시생산을 실시함).

(3) *B. velezensis* NSB-1의 Pilot scale 최적조건 확립

50L 및 500L fermenter를 이용하여 pilot scale에서의 생산조건 및 parameter 설정 시험을 실시하였다. 배지 조성 및 생산 공정은 lab scale에서 기 검토된 조건을 이용하였으며 lab scale과 동일하게 culture profile을 작성하기 위하여 시험 일정 시간마다 pH, DO 및 미생물 총수 및 spore수를 지속적으로 확인하였다.

(4) *B. velezensis* NSB-1의 Plant scale 최적조건 확립

Pilot scale에서의 culture profile 및 생산 공정 최적화 시험을 토대로 실제 상업화 모델인 plant scale에서의 생산 조건 검토 및 parameter 설정 시험을 실시하였다. 시험용 5,000L fermenter는 실제 미생물농약을 생산하는 설비를 이용하였으며 배지 조성 및 생산 공정은 pilot scale에서 재조정된 조건을 이용하였다. Pilot scale cultivation과 마찬가지로 culture profile을 작성하기 위해 시험 일정 시간마다 pH, DO 및 미생물 포자수를 지속적으로 확인하였으며 시간대별 샘플을 분석하여 전반적인 배양 상태 점검 및 배양 기간, pH, DO 등을 조사하였다. 5,000L fermenter의 경우 500L fermenter에서 배양한 배양액을 seed로 사용하여 시배양을 실시하였다.

수율개선 시험을 통한 배지 조성은 기 개발된 GB 생산배지 1의 배지 조성을 변형시킨 배지인(GB생산배지1-1)을 이용하였으며 동일한 조건에서 2회간 생산을 실시하였다. 2시간 간격으로 배양액을 채취하여 균수 및 오염도, pH, DO 등을 조사하였으며 지속적으로 육안 관찰하여 배양 중 이상 유무를 관찰하였다. 배양 종료 시점은 최종적으로 시간 당 미생물의 증가속도가 감소하여 spore형성정도가 95%수준이 되었을 때로 선정하였다. 배양 종료 후 배양액의 상태를 조사하고 상온, 고온(45℃), 저온(2℃)에서 장기간 보관하여 배양액의 상태 변화를 조사하였다.

(5) *Bacillus velezensis* NSB-1의 배양 후 공정 확립

최적으로 확립된 대량배양공정을 기반으로 생산한 배양액 대상으로 액상제(AS, 미생물 배양원액을 추가적인 제조단계를 거치지 않고 물에 희석하여 사용하거나 배양된 미생물을 액상으로 제제화하여 물에 희석하여 사용하는 제품) 혹은 액상현탁제(SM, 배양원액 또는 배양된 미생물을 물과 혼합하여 액상으로 제제화한 것으로 물에 희석하여 사용하는 제품)로 하여 제품화할 경우 배양종료 후 배양액을 바로 포장 할 경우 gas발생 및 제품 경시의 단기화 등 많은 문제점이 있어 이를 개선할 배양 후 공정을 확립하였다.

(가) pH조정

B. velezensis NSB-1 5ton 배양 후 배양물의 경우 외부미생물로부터 오염이 될 위험성이 높기 때문에 배양종료(안정적으로 Spore형성유무확인 후 종료) 직 후 배양기 내에서 pH를 적절한 상태로 조정하였다.

(나) 보존제 또는 계면활성제처리

친환경 유기농자재의 경우 배양 후 아무런 약제를 첨가할 수 없고 유기농자재에 사용할 수 있는 허용원료를 사용하여 배양액(*B. velezensis* NSB-1)의 약효의 증진과 제품의 이화학적 적합성, 경시안정성 등 여러 가지 시너지효과를 발생시킬 수 있는 보존제 또는 계면활성

제를 확인하였다. 그 결과 다양한 종류를 대상으로 확인 한 결과 Polyoxyethylene sorbitan monooleate(9005-65-6)가 가장 적합하여 계면활성제로 선정하였고, 최종 처리농도는 경제성과 안정성, 약효증진 등 여러 인자들과 경제성을 고려한 결과 2%가 가장 적합한 농도로 나타나 제품 내 2% 투입하는 것으로 최종 선정하였다.

(다) 생산 시제품의 적적할 QC방법 모색

① 생균수 측정

- 연속희석법(serial dilution)을 이용하여 원하는 농도까지 제품을 희석하였다.
- 희석한 제품을 LB agar에 적량 도말한 후 Incubator(30℃)에서 1-2일 배양 후 Colony를 계수하였다.

② 이화학성 측정

- 배양 종료 후 수거한 배양액을 적량 희석하여 수화성 등을 조사하였다.

③ 보존성 test

- 보존성을 실험할 시료는 30, 40℃에서 보관하여 1, 3, 6, 10, 15주에 pH, 형태적 이상 유무, 총균수, 향균활성 등을 검사하였다.

나. *Bacillus velezensis* NSB-1(탄저자비)의 독성안정성시험

개발되어진 탄저자비액상제(AS, 미생물 배양원액을 추가적인 제조단계를 거치지 않고 물에 희석하여 사용하거나 배양된 미생물을 액상으로 제제화하여 물에 희석하여 사용하는 제품)제품의 인축독성 및 생태독성 등 안정성을 확인하기 위하여 (주)한국생물안정성연구소를 통하여 검사를 하였다(친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 기준: 2014.06.02이후에는 친환경유기농자재목록공시 등재를 위하여 인증기관성적서만 인정됨). 이후 친환경유기농자재 대행기관 농업기술실용화재단을 통하여 농촌진흥청 친환경 유기농자재에 신청하였다.

(1) *B. velezensis* NSB-1(탄저자비)의 인축독성시험

친환경유기농자재 병해충관리용 자재의 경우 인축독성에 대한 분석을 진행하여야 하며 그 항목으로는 급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성, 안점막자극성에 대한 평가를 통하여 제품을 상업화하기 위한 안정성 시험을 진행하였다.

(2) *B. velezensis* NSB-1(탄저자비)의 생태독성시험

친환경유기농자재 병해충관리용 자재의 경우 환경독성에 대한 분석을 진행하여야 하며 그 항목으로는 급성어류독성(담수어류), 꿀벌급성접촉독성(개화기처리 제품, 경영처리 제품 해당)에 대한 평가를 통하여 제품을 상업화하기 위한 안정성 시험을 진행하였다.

(3) *B. velezensis* NSB-1(탄저자비)의 생물활성시험

친환경유기농자재 병해충관리용 자재의 경우 유식물 5가지 작물을 대상으로 한 약해시험에 대한 평가를 통하여 제품을 상업화하기 위한 안정성 시험을 진행하였다. 약해시험 결과 5가지 작물인 고추(슈퍼마니파), 배추(불암3호), 상추(선풍2호), 오이(싱그런백다다기), 콩(백태)를 이용하였다.

5. 토마토 시들음병 방제용 미생물제 개발 및 사용 매뉴얼 개발

가. 토마토 시들음병균의 동정

주사전자현미경관찰에서 형태를 관찰하였고, 이 균주는 KB 배지에서 황갈색 형광성 색소를 생성하였고, 그람 음성균의 다양한 탄소원을 이용하는 패턴을 이용하여 동정하는 API20 NE identification system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 분석하였다. 또한 이 균주의 16S rDNA 는 fd1와 rP2 universal primers를 이용하여 증폭하여 이들 염기서열을 분석하였다. NJ134균주로 증폭된 1.5 kb PCR product의 comparative 16S rDNA sequence analysis을 통해서 분석하였다. 분리된 strain NJ134의 16S rDNA sequence (1514 nt)는 GenBank에서 initial BLAST searches를 통해서 분석하였고, phylogenetic analyses을 수행하였다.

나. 배지별 항균활성 및 생물적 방제 능력 검정

Pseudomonas sp. NJ134의 주 항균활성 물질을 결정하기 위해, strain NJ134는 1% (w/v) mannitol을 첨가한 modified KB (proteose peptone #3 20 g, K₂HPO₄ 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.4 g per 1 L)에서 상온에서 7일 동안 호기 조건하에서 생육시켰다. Crude NJ134 metabolites는 다양한 동일한 양을 이용하여 추출하였다. 유기용매 추출 분획들은 바로 in vitro배지에서 식물병원 곰팡이병원, *F. oxysporum*의 생육을 억제하는 능력을 조사하였다. NJ134균주의 배양여액의 ethyl acetate추출 항균물질은 preparative thin-layer chromatography (Merck, Darmstadt, Germany)에 의해 정제하였다. 정제된 항균물질은 a single gas chromatographmass spectrometry (GC-MS) (Shimadzu Prominence, Tokyo, Japan)을 통해 분석하였다. 정제된 항균활성 물질은 nuclear magnetic resonance (NMR)와 mass spectral analysis (Bruker Company, Bad Herrenalb, Germany)을 통해서 결정하였다. ¹H와 ¹³C NMR, infrared spectra, melting point, 그리고 elemental analyses를 통해서 분리정제된 구조를 확인하였다.

다. DAPG생산 NJ134균주의 genotype 분석

추가적인 GC-MS analysis analyses을 통해 NJ134균주가 DAPG를 생성하는지를 확인하였다. 추가적으로 DAPG생합성에 가장 중요한 *phlD* 유전자가 존재하고 발현되는 지를 알아보기 위해, *phlD* 유전자를 타겟팅하는 rapid PCR방법에 의해 분석하였다. NJ134의 *phlD* 유전자의 다양성에 기초한 genotype을 16S ribosomal DNA 유전자와 partial *phlD* gene sequence analysis의 phylogenic analyses을 기존에 보고된 방법에 준하여 수행하였다 (McSpadden-Gardener et al., 2001). NJ134로 부터 Phl2a와 Phl2b primers (McSpadden Gardener et al., 2001)를 이용하여 626 bp *phlD* gene fragment를 증폭하였다. Phylogenetic analyses은 MEGA 4.0 software를 이용하여 neighbor-joining method 방법으로 분석을 하였다.

라. 시제품과 분리 균주의 토마토 시들음병 생물 검정

토마토 시들음병 이병 토양은 *F. oxysporum*을 이용하여 조제하였다. 병원균을 10% PDB (Difco Lab)에서 상온에서 진탕배양을 하면서 배양한 21일 후에, 균사체를 제거하기 위해

sterile glass wool을 통과시켜 제거하였다. Microconidia을 8,000 × g에서 20분동안 원심분리하여 회수하여, 다시 10 mM MgSO₄로 재 현탁하여 다양한 농도의 분생포자를 potting soil-sand mixture (12:5, v/v)로 혼합하였다. 접종한 토양은 polyethylene bags에서 3-5동안 상온에서 보관한 후, 4도의 저온에서 저장하였다. 각 접종원의 생균수는 serial dilution 후, peptone pentachloronitribenzene (PCNB) medium에서 측정하였다. 접종원은 멸균된 토양으로 희석하여 농도를 조절하였고, 실험은 각 처리구당 30개의 식물체를 이용하여 2번 수행하였다.

다양한 농도의 NJ134균주를 접종하고, 고농도의 병원균을 접종한 조건하에서 생물적 방제 능력을 검증하였다. DAPG생산 균주인 NJ134 genotype을 1×10^1 to 1×10^{10} cells g⁻¹ 토양 농도로 토마토 시들음병균인 *F. oxysporum* of 1×10^5 spore g⁻¹ 토양에 접종하여 생물적 방제 능력을 조사하였다.

마. 토마토 시들음병 생물적 방제 포장 검정

10^8 CFU/ml NJ134 batch cultures를 이용하여 실제 포장하에서 토마토 시들음병 방제 능력을 측정하였다. 나주에 위치한 온실에서 18-20 엽기의 토마토를 이용하여 봄과 여름에 수행하였다 (Unicorn, Hungnong Seeds, Seoul, South Korea). NJ134균주는 정식 후 60일 동안 4번에 걸쳐 10^8 CFU/ml로 뿌리에 관주하였다. 토마토 정식 후 70일 후에 *F. oxysporum* 10^6 spore/g의 농도로 상처 접종하였다. 접종 후 6-8 weeks 발병 지수 (0-5)를 측정하였다.

바. 천연자원을 이용한 토마토 시들음병 방제용 시제품 조제 및 효능 분석

다양한 천연자원을 이용한 미생물 대량 배양용 천연배지를 개발하기 위하여 다양한 탄소원을 이용하여 액상과 입상을 조제하여 생균수와 배양원별 항균활성을 먼저 측정하였다.

바. 시제품 조제 및 포장 적용 연구

1. 30 L 배양(중균) : 27°C, pH 6.5~7.5, 150 rpm, 9 L air(0.3 vvm), 24시간 배양
2. 3,000 L 배양 : 27°C, pH 6.5~7.5, 75 rpm, 900 L air(0.3 vvm), 108시간 배양
3. 수확 : Ceramic membrane filter system 이용, 최종 300 L
4. 동결건조 : 5% Mannitol과 4% skim milk(부피 기준) 혼합 후 -45°C까지 동결 후 진행

슈도모나스 NJ134의 대량배양용 시제품을 1차, 2차, 3차 제작 후 생존능력을 장기간 조사하였다. 또한 기질을 이용한 시제품을 보완하기 위하여 효모추출액과 미량요소(구리, 아연, 폴리브덴 등)를 첨가하여 조사하였다.

이렇게 조제한 시제품을 다양한 농도로 처리하여 포장하에서 시들음병 방제 능력을 온실에서 검정하였다.

사. 녹비작물 처리에 의한 시들음병균 밀도 변화 조사(실내검정, 처리 30일 후)

녹비작물 처리에 의한 토마토 시들음병균의 밀도 조사를 위해서 아래의 조건하에서 재배하였고, 처리하였다.

처리수	처리구	반복수	총처리 구수	처리당 면적(m ²)	총면적(m ²)
9	2	2	36	8	288

처리수 : 화본과(밀, 보리, 라이그라스), 콩과(알팔파, 클로버, 헤어리베치), 십자화가(유채, 무), 무처리

처리구 : 녹비작물 토양환원 처리구, 녹비작물 토양내 제거 처리구

녹비작물 파종: 2011/11/29(1차), 2012/10/02(2차), 토마토 정식: 2012/04/13(1차), 2013/04/03

파종량(g/32m²): 밀(480), 보리(480), 라이그라스(160), 알팔파(80), 클로버(96), 헤어리베치(160), 유채(96), 무(160)

각 녹비작물 뿌리 동결체가 함유된 배양체에서 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*(race 1)의 후막포자 밀도변화를 광학현미경을 통해 조사하였다. 또한 *F. oxysporum*의 rDNA-intergenic spacer와 avirulence 유전자를 기본으로 제작한 primer로 qPCR 방법으로 분생포자의 밀도를 조사하였다.

아. 휴경기 녹비작물 재배시 시들음병균 밀도(포장검정)

휴경기 시설 내 녹비작물 재배 포장에서 녹비 생육기, 녹비작물 재배 후 토양환원 처리구, 녹비작물 토양제거 처리구에서 각각 토양 시들음병균의 밀도변화를 조사하였다. 포장내에서 녹비작물의 생육기와 재배 후에 *F. oxysporum*의 후막포자에서 발아한 분생포자의 밀도를 qPCR을 이용하여 조사하였다. 시설내 녹비작물을 재배한 구역에서 토마토를 정식하여 재배한 후 시들음병 발병율을 조사하였다

자. 토마토 시들음병 방제용 시제품 제작 및 각 제형별 약효지속기간 및 안정성 평가

토마토 시들음병 방제용 NJ134를 이용한 토양 혼화용 시제품을 3종류를 제작하고, 시제품명을 슈루탄으로 명명하였다. 혼합액을 *P. fluorescens* NJ134, yeast extract, mannitol, ZnSO₄, 분말대두, 해조추출물을 이용하였다

성분	함량(%)
찜콩(루핀)	65
찜옥수수	5
혼합액*	30

차. 슈루탄 시제품의 유효미생물 동정(분석기관 : 목원대학교 미생물생태자원연구소)

16S rRNA 유전자 전염기서열 해석 : 시제품 1g을 순차적으로 희석하여 Nutrient Agar(Difco)에 접종하고 28℃에서 3일간 배양한 후 우점세균 NJ017-B1 콜로니를 대표 유효균주로 선발하여 순수분리하고 16S rRNA 유전자의 PCR 증폭하여 분석하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 생산 및 시장현황

1. 작물병해충 방제용 생물농약의 국내외 현황 및 전망

가. 3P 분석에 기초한 대상기술의 국외 현황

미생물살균제 중에서 다양한 곰팡이가 살균제로 개발되었음: 대표적인 균주로 *Ampelomyces quisqualis*, *Trichoderma harzianum* 미생물 살균제로 가장 많이 개발되었다. 세균으로는 대표적인 세균은 *Bacillus* 속과 *Pseudomonas* (*Burkholderia* 속 포함) 속 미생물이 대부분이다. 전체적으로 보면 천연물질을 이용한 생화학농약 개발보다는 미생물을 이용한 제품이 많이 개발되어 있다. 대표적인 살충성 미생물로서 *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Paecilomyces. Hirsutilla*. 등이 알려져 있으며 최근 미국의 EPA에 따르면 미생물농약의 경우 세균류를 이용한 생물농약이 가장 많은 수를 차지하였고, 진균과 바이러스를 이용한 생물농약의 개발이 증가하고 있다.

식물 유래 활성물질 경우 Neem(넴) 추출물, 굴나무과 추출물, Pyrethrum(제충국) 추출물, *Cyperus rotundus* L.(향부자) 및 Sedge(사초)와 Cyperaceae(사초과) 추출물, 강활 추출물, Cupressaceae(측백나무과) 추출물 등을 활용한 기술이 주류를 이루고 있다. 해충관리 개발기술 국외현황을 종합하여 보면 제형기술, 식물 유래 물질, 미생물 유래 물질을 활용한 제제개발 기술이 질적수준이 높은 분야이며 이를 통해 전 세계의 시장을 공략하고 있다. 특히, 미생물 유래 제제의 경우 균체수를 고려한 기술보다 미생물이 생산하는 활성물질을 원료로 하는 제제화 기술개발을 주로 수행하고 있다.

나. 3P 분석에 기초한 대상기술의 국내 현황

국내의 경우 식물병을 방제하기 위한 생물농약 개발에는 주로 미생물을 이용한 제품 개발에 대부분의 연구진들이 집중하고 있다. 국내의 경우 미생물살균제로 17개 제품이 등록되어 있는데, 이 중에 4개의 제품은 수입한 제품이고, 나머지 13개 제품은 국내에서 개발된 제품이다. 17개 제품들 중에서 13개 제품이 *Bacillus* 속 균주이며, 1개 균주가 이와 거의 유사한 *Paenibacillus* 속 균주이며, 2개의 균주가 *Streptomyces* 속 균주 그리고 나머지 한 균주는 *Ampelomyces* 속 균주다. 또한 그 동안 대부분의 연구자들이 공기전염 식물병을 방제하고자 하는 제품 개발을 주로 하였지만, 최근 한국화학연구원, 고려대학교 등을 중심으로 고추 역병, 토마토 시들음병, 토마토 꽃마름병, 배추 뿌리혹병 등의 토양전염 식물병 방제를 위한 기술 개발에 연구를 집중하고 있는 것으로 나타났다.

국내의 경우 상기와 같이 다양한 미생물 및 천연물 소재를 이용한 친환경 식물병 방제 기술 개발에 대한 연구를 활발하게 진행하고 있음에도 불구하고 대부분의 기술이 아직 산업화에는 성공하지 못하였는데, 이는 발효 및 수확을 위한 설비 및 장치 부족, 발효 기술 부족, 제제 기술 부족 등이 주요 원인인 것으로 나타났다. 해충 방제제는 천연물 유래 작물보호제 개발이 주로 이루어지고 있다. 해외 기술현황에서 보는 바와 같이 제충국 추출물, 데리스 추출물, 넴 추출물, 고삼 추출물, 담배 추출물, 마늘 추출물 등 원료를 해외에서 수입하여 제조하는 기술이 주류를 이루고 있다.

국내의 기술은 섭식성인 나방류 해충을 방제하는 제제개발이 주로 수행되고 있으며, 특히 Bt 균

이 생산하는 내독소 살충단백질을 제제로 사용하는 기술이 주류를 이루고 있다. 이에 반해 진딧물 같은 흡즙성 해충을 방제하는 미생물제제 개발에 대한 연구는 식물성 오일을 분해하는 미생물을 활용하는 연구가 진행되고 있으나, 현재까지 진딧물 방제용 생물농약은 국내에 전무하다.

제 2 절. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

(1) 미 국

○ 미국의 경우 생물농약 시장은 주로 중소 업체들이 이끌어 가고 있으며, 대표적인 기업으로는 Certis-USA사 · AgraQuest사 등이 있다.

○ 최근 FMC와 BASF등의 글로벌 화학농약 회사에서 미국내 이들 주요 벤처기업 등을 합병 인수하여 전 세계적으로 마케팅을 강화하고 있는 추세이다.

○ 이들 글로벌 화학회사의 생물농약에 시장 진입은 벤처기업이 보유했던 각각 대표적인 살충 · 살균제 제품들을 보유하고 있으며 글로벌 사업을 진행하고 있고 특히 미국뿐만 아니라 전 세계의 distributors들을 이용하여 글로벌 사업을 진행할 계획이다.

(2) 유 럽

○ 유럽의 경우 주로 Koppert사와 같은 천적을 이용한 제품과 미국에서 개발된 다양한 생물 농약을 시설원예에 이용하고 있는 생물농약을 유통 판매하는 기업들이 많으며, 매년 생물 농약 전시회와 회의를 개최하여 다양한 정보들을 교환하고 있다.

○ 특히, 유럽은 전 세계 어느 지역보다 생물농약 개발에 많은 시간과 비용이 소요되는 지역으로 보통 6년 ~ 8년이 소요된다고 볼 수 있으며, 최근에는 독성에 대한 자료제출의 요구수준이 높아지고 있는 추세이다.

(3) 중 국

○ 1996년부터 기존의 각성과 농민중심의 생물농약 사용이 2001년부터 시작된 국가발전개혁위원회의 생물기술 산업화프로젝트 가운데 생물농약 산업화개발이 포함되어 있었다. 제 1 생물농약 산업화 세부항목으로 진균제제 산업화가 채택되었으며 정부로부터 지원이 되고 있고, 생물농약산업화제품은 2001년에 13개가 되었다.

(4) 세계시장 종합

○ 전 세계 생물농약 시장은 2001년 현재 세계 농약 시장의 약 2%인 5.8억불이었으나, 2005년 전체 농약 시장의 2.5% 점유율을 보이고 있으며, 2010년에는 4.3%의 시장 점유율로 10억 7,500만 달러의 시장이 형성될 것으로 추정되는데, 생물농약 시장은 Bt제와 기타 미생물제제가 4:6의 비율로 형성될 것으로 예상된다. 최근에는 OECD국가를 중심으로 한 친환경농업 정책으로 인하여 그 시장규모가 2013년에는 세계 농약시장의 약 15%인 45억불에 달할 것으로 추정되고 있다 (Santander Investment, 1998).

2. 산업화를 통한 기대효과

따라서 국내에서도 글로벌 경쟁력을 가진 저가 고효율 유기 농자재를 개발하고 지원하여 수출이 가능한 제품을 개발하는데 주력해야 할 것 같다. 본 연구에서 개발된 제품들은 글로벌 스탠다드를 충족한 제품으로 추가 연구에 의해 뿌리혹선충, 토양 난 방제 작물병, 복숭아혹진딧물 방제제로서의 제품으로 등록이 가능할 것이다.

또한 화학비료와 농약의 과다 사용에 따른 인축독성 및 환경 악화로 대체재 개발이 시급하며, 신바이오 작물보호제 개발에 따른 농약대체효과가 2,400억원 이상('12년)일 것으로 예상되고 있다.

본 연구에서 개발된 제품들의 직접 경제효과를 측정하기 위한 산정기준은 다음과 같다

- **진딧물제제 랍피드 제품**

1,476억원(진딧물 화학농약 시장)x 7.9%(전체 농산물 대비 친환경농산물 최근 3년간 평균 시장성) x 20%(대상 해충 방제용 자재의 예상 시장성) = 약 23.3억원/년

- **뿌리혹선충제제 네마토킬**

274억원(뿌리혹선충 화학농약 시장)x 7.9%(전체 농산물 대비 친환경농산물 최근 3년간 평균 시장성) x 30%(대상 해충 방제용 자재의 예상 시장성) = 약 6.5억원/년

- **시들음병제제 슈류탄, 탄저자비, 근초고왕**

147억원(시들음병 화학농약 시장)x 7.9%(전체 농산물 대비 친환경농산물 최근 3년간 평균 시장성) x 20%(대상 병해 방제용 자재의 예상 시장성) = 약 2.3억원/년

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과					33	330	
경제적 파급효과					330	3,300	
부가가치 창출액					330	3,300	
합 계					693	6,930	

※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치

※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치

※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 뿌리혹선충 방제 선발 미생물의 효능 분석

다양한 선충 방제용 길항미생물들이 보고되고(Abo-Elyousr 등, 2010; Atkins 등, 2003; Aballay 등, 2013; Chen 등, 2006; Cronin 등, 1997; Lamovsek 등, 2013; Lee 등, 2013; Mittal 등, 1995), 이들로부터 선충을 억제하는 항생물질(Park 등, 2004), protease와 chitinase 등(Khan 등, 2004; Liang 등, 2010)이 보고되었으며, 이들을 활용한 선충방제기술 등도 많이 보고되어 왔다. 특히, 키틴, 키틴나아제, 키틴분해미생물과 선충의 억제에 관련된 연구가 많은데, 이들을 요약하면 다음과 같다.

1. 키틴은 식물의 영양원으로 작용하고 식물의 생장을 촉진하며 식물의 방어반응을 유도한다(Sharp, 2013).

2. 토양에 키틴분해미생물과 키틴을 함께 처리하면 선충에 대한 억제와 식물에 저항성이 유도되어 선충에 대한 방제효과가 더 좋아진다 (Kalaiarasan 등, 2006; Mittal 등, 1995; Sarathchandra 등, 2000; Tian 등, 2000).

3. 토양에 키틴을 첨가하면 키틴분해미생물들이 증가되어 선충이 억제되거나 키틴이 분해되면서 방출된 암모니아에 의해서 억제된다(Bell 등, 2000; Godoy 등, 1983; Hallmann 등, 1998).

4. chitinase는 난각을 분해하여 부화를 억제하고, 그것의 생산은 키틴이나 키토산에 의해서 유도된다(Palma-Guerrero 등, 2010; Zhang 등, 2009).

5. 키틴의 유도체인 키토올리고머는 선충을 직접 억제한다(Khalil 등, 2012).

6. 다양한 길항 미생물을 혼합처리하면 단독처리하였을 때 보다 선충방제효과가 더 증가한다(Golzari, 등, 2011; Hashem, 등, 2011).

따라서 본 연구과제에서는 국내.외에서 보고된 기술들을 종합하여 선충에 보다 더 좋은 방제효과를 낼 수 있는 미생물제를 개발하였다. 즉, 선충을 억제하는 특정의 한 균주가 아니라 여러 키틴분해세균을 포함하고, 그들이 생산하는 항생물질, chitinase를 비롯한 여러 가수분해효소를 포함하며, 선충 방제에 직, 간접적으로 역할을 할 수 있는 키틴과 다양한 키틴올리고머를 포함하도록 하여 지금까지 국내외에서 보고된 미생물제들 보다 더 우수하게 하였다. 또한 본 연구에 사용된 길항 미생물들의 생물적 방제 작용 기작과 이들 미생물을 유기목록 자재로 등록하여 친환경 유기농업 자재로 등록함을 목표로 수행하였다.

본 미생물제는 뿌리혹선충에 감염되어 생육이 저조한 오이, 호박, 토마토의 생육을 증진시켰을 뿐만 아니라 그들의 뿌리에 형성된 혹을 감소시켰고, 근권에 분포하는 뿌리혹선충의 밀도도 감소시켰다. 이로 인하여 정식한 날부터 회석된 미생물제를 물 대신에 점적 관수해 주거나 뿌리혹선충에 심하게 감염되어 생육이 저조한 작물에 관수해 주면, 뿌리혹선충에 의한 피해를 감소시켜 주었다. 따라서 본 미생물제는 시설재배작물의 뿌리혹선충 방제에 넓게 활용될 수 있으리라 판단되었다.

1. 선충 방제제의 선발, 효능 검정 및 QC마커 개발

가. 토마토 뿌리혹선충의 분자생물학적 동정

먼저 뿌리혹선충은 토마토에서 피해를 주고 있는 뿌리혹선충을 분리하여 전남대학교 온실에서 토마토에 증식하고 있는 뿌리혹선충을 이용하였다. 공시된 뿌리혹선충의 동정을 위해서 뿌리혹으로 감염된 토마토 뿌리를 각각 0.1 - 1g씩 막자사발과 액체질소를 이용해서 분쇄하여 lysis buffer와 PowerSoil DNA extraction kit (Mo Bio Laboratories, Inc.)를 이용하여 선충의 DNA를 분리하였다. 뿌리혹선충의 rDNA cistrons과 intergenic spacer (IGS2)부위를 증폭하기 위해 Primer 194, 5'-TTA ACT TGC CAG ATC GGA CG-3'와 195 5'-TCT AAT GAG CCG TAC GC-3'를 이용하여 약 713 bp의 PCR product를 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 PCR purification kit (Bioneer Inc., 대전, 대한민국)을 통하여 정제한 다음 정제된 PCR product를 template로 다시 *Meloidogyne*뿌리혹선충을 특이적으로 증폭하기 위하여 JMV1 5'-GGA TGG CGT GCT TTC AAC-3'과 JMV2 5'-TTT CCC CTT ATG ATG TTT ACC C-3'의 primer 쌍을 이용하여 PCR을 통하여 PCR을 통하여 약 500 bp의 PCR 산물이 증폭되었다. 기존의 연구에 의하면 2번째 PCR을 통해서 증폭된 PCR 크기가 약 510 bp일 경우는 *Meloidogyne incognita* (고구마뿌리혹선충), *M. arenaria* (땅콩뿌리혹선충), *M. javanica* (자바니카뿌리혹)선충 중의 하나이다. *M. hapla* (당근뿌리혹선충)은 2차 PCR산물이 400bp라고 밝혀져. 본 과제에서 사용되고 있는 뿌리혹선충은 전자 3개의 뿌리혹선충 중의 하나임을 알 수 있었다 (그림 1). 정확한 뿌리혹선충의 동정을 위해 1차 PCR product를 sequencing하여 genbank에 등록이 된 type 뿌리혹선충들의 IGS2 sequence들과 비교 분석하여 본 결과, *M. hapla*와는 독립적인 그룹에 속해 있었고, 나머지 3개의 뿌리혹선충 그룹에 속해 있었으며, *M. incognita*와 가장 가까운 근연관계를 보여 본 연구에 사용된 뿌리혹선충은 고구마뿌리혹선충임을 밝혔다 (그림 2).

나. 뿌리혹선충 방제용 미생물제의 배양배지별 살선충 *in vitro*검정

본 시험에 공시된 다양한 살선충 방제용 균주들의 배양 배지별 살선충 효능을 검증하여 대량배양시 혹은 종균을 배양하는 배지선발을 위해 다양한 배지를 이용하여 살선충 효능을 조사하였다. 연구에 사용된 균주들은 기존에 살선충 효능이 밝혀진, *Pseudomonas chlororaphis* O6를 비롯해서 기존에 키틴 배지를 이용한 세가지 균주, *Lysobacter enzymogenes*, *Serratia plymuthica*, *Chromobacterium* sp. C-61, DAPG producing *Pseudomonas fluorescens* Wayn1R 균주 등을 공시하여 살선충 효능을 분석하였고, 미생물의 QC분석에 이용하였다 (표 1). 각 균주의 배양 배지는 표 2에 제시한 배지를 이용하여 생육과 활성증진에 기초 배지로 활용하였다 (표 2).

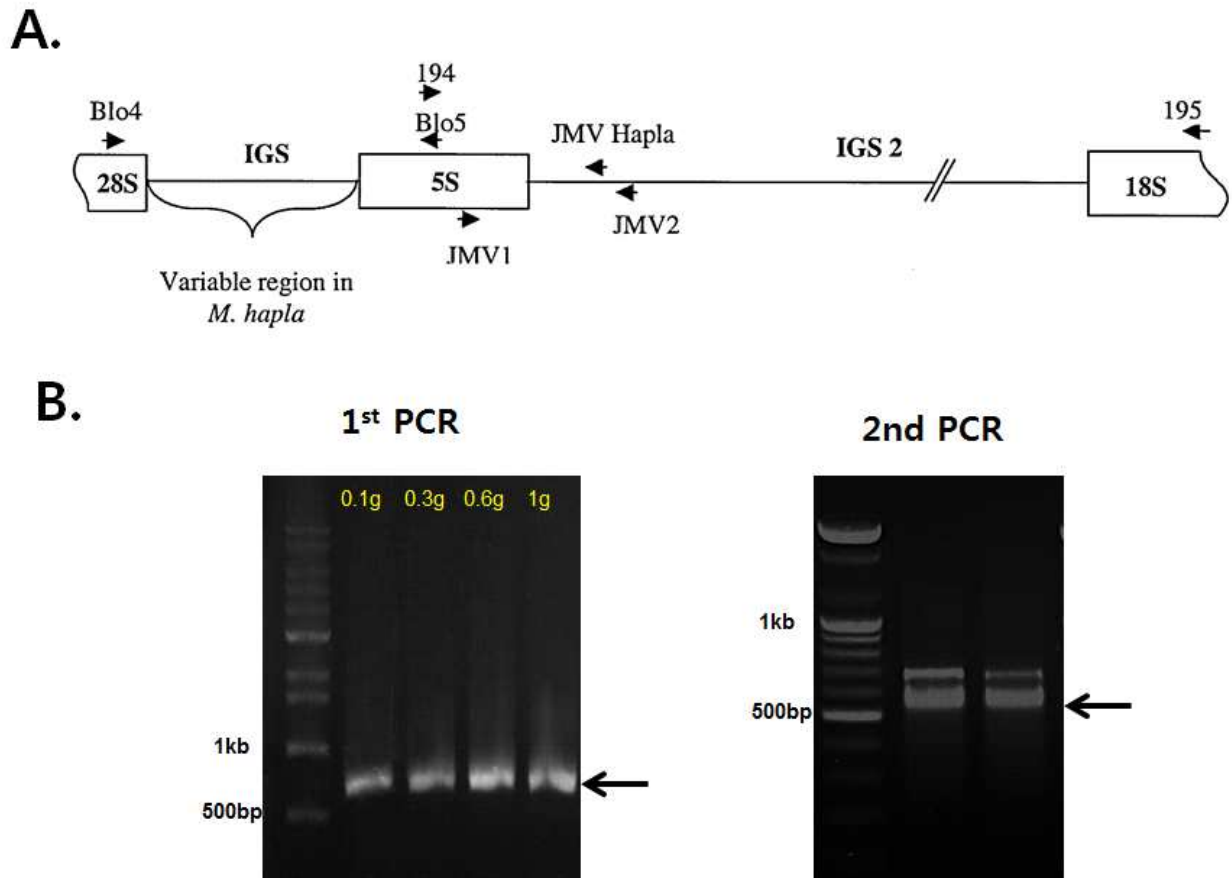


Fig. 1. 토마토 뿌리혹 형성 선충의 동정. (A) 본 연구에서 사용된 뿌리혹선충 rDNA cistrons과 intergenic spacer (IGS)의 primer set의 부위. (B) 토마토뿌리혹에서 분리된 선충 DNA의 농도별 primer 194와 195를 이용한 PCR, 약 714bp의 PCR product가 증폭됨 (1st PCR). 정제된 1st PCR product를 template로 JMVI와 JMVI2 primer를 이용한 second PCR.

Model : Nucleotide: Maximum Composite Likelihood

Display only topology

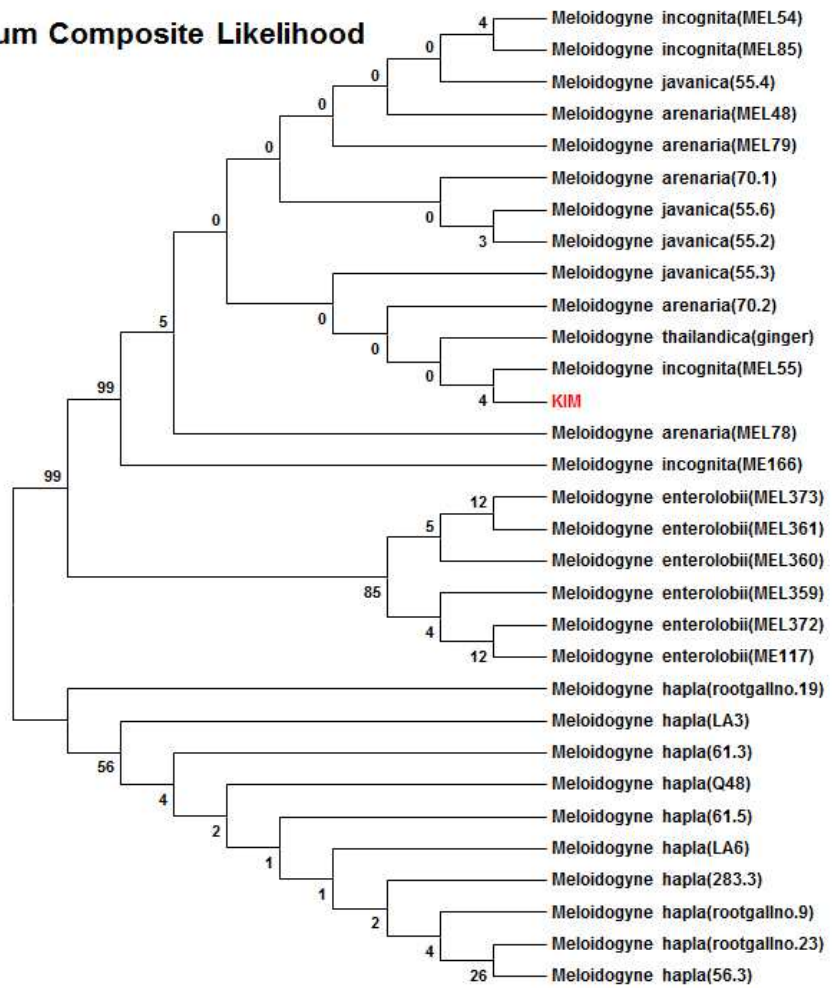


Fig. 2. 선충 특이 증폭 Primer 194와 195에 의해 증폭된 토마토 뿌리혹선충 유래 1st PCR 산물(714 bp)의 sequence의 분자계통학적 분석. 다양한 type 선충의 sequence를 genbank에서 얻은 다음, 얻어진 증식하고 있는 토마토뿌리혹선충의 sequence와 분자계통학적 분석.

표 1. 사용된 균주와 생물적 방제와 관련된 특성

균주	특성	비고
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6	유도저항성, 항균활성, 살선충, 살충	Lee et al., 2011 Kim et al., 2011
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Wayn1R	항균활성, DAPG생성균주	Unpublished data
<i>Chromobacterium</i> sp. C-61	키틴분해균주, 항균, 살선충 균주	Kim et al., 2008; 2010
<i>Serratia plymuthica</i> C-1	키틴분해균주, 항균, 살선충 균주	Kim et al., 2008; 2010
<i>Lysobacter enzymogenes</i> C-3	키틴분해균주, 항균, 살선충 균주	Kim et al., 2008; 2010

표 2. 사용된 균주와 배양 배지 조성표 (g/L)

사용 배지 구성요소					
KB (g/L)		PMM (g/L)		Chitin minimal medium (g/L)	
Protease peptone	20.0 g	Sodium citrate	0.3 g	게껍질가루	10.0 g
Glycerol	15.0 ml	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.6 g	Na ₂ HPO ₄	2.0 g
K ₂ HPO ₄	4.4 g	KH ₂ PO ₄	2.7 g	K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.4 g	NaCl	0.5 g
		K ₂ HPO ₄	6.3 g	NH ₄ Cl	1.0 g
		MgSO ₄ 7H ₂ O	0.25 g	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5 g
		Sucrose	2.0 g	CaCl ₂	0.5 g
				Yeast extract	0.1 g
LB (g/L)		PDB (g/L)		NPK배지 (g/L)	
Protease peptone	10.0 g	Potato starch	4.0 g	게껍질	1.0 g
Yeast extract	5.0 g	Dextrose	20.0 g	NPK복합비료 (21-17-17)	3.0 g
NaCl	5.0 g	KH ₂ PO ₄	2.7 g	Sucrose	3.0 g
				FeCl ₃	0.5 g

In vitro 살선충 효능 분석을 위해 전남대학교 유리 온실에서 증식중인 고구마뿌리혹선충에 감염된 토마토 뿌리를 채취하여 클로락스로 30초정도 흔들어서 씻어내어 난탕에서 선충알을 회수하여 회수된 선충알을 상온에서 3일간 부화시켜 2령 유충을 회수하여 사용하였다. 다양한 미생물 배양액과 1:1로 혼합하여 3시간동안 방치한 다음, 죽은 선충의 수를 실체 현미경하에서 특수 제작된 기구로 터치해서 움직이는지 여부로 살선충 효능을 분석하였다 (그림 3).

표 1에 공시한 균주들의 살선충 효능을 1차 스크리닝하기 위해 각 균주들을 KB나 LB broth와 같은 고영양배지에서 2일 배양하여 배양액의 원액과 고구마뿌리혹선충 30마리와 1:1로 혼합하여 3시간 후에 살선충 효능을 검정하였다. 대부분의 미생물배양액은 살선충 효능을 보이지 않았지만, 기존에 살선충 효과가 있다고 알려진 *Pseudomonas chlororaphis* O6이외에 *Chromobacterium* sp. C61과 DAPG생성 생물적 방제균인 *Pseudomonas fluorescens* Wayn1R균주가 100% 살선충 능력을 보였으며, *Serratia plymutica* C-1배양액은 60%의 살선충율을 보였다. 따라서 본 연구에서는 Chitin분해 미생물인 *Chromobacterium* sp. C61, *Serratia plymutica* C-1, *Lysobacter enzymogenes* C-1, *Pseudomonas chlororaphis* O6균주를 선발하여 추가 연구를 수행하였다.

다. 선발된 살선충 미생물배양액의 예방 및 치료 선충 방제 효능 검증

키틴 분해 미생물 중 가장 살선충 효능이 뛰어난 C61균주 단독 배양액과 C1+C3+C61혼합배양액과 *Pseudomonas chlororaphis* O6균주 단독 배양액의 선충 예방효과와 치료효과를 온실 포트하에서 수행하였다. 토마토 뿌토 품종을 파종한 후 14일 후에 각 균주를 제시한 배지에서 7일간 배양한 후, OD600nm=0.1로 조정된 후 각 포트별로 10ml씩 관주한 다음, 8일 후에 고구마뿌리혹선충 2령 유충을 150 - 200마리를 접종한 다음 2주 후에 토마토의 생육을 비교하였다 (Fig. 4). C61균주를 관주한 토마토에서만 선충 예방효능이 있어서 초장이 대조구에 비해 선충예방효과가 95% 신뢰수준에서 유의성이 있었으며, 분지수에서는 유의성을 보이지 않았다.

C61균주 단독 배양액과 C1+C3+C61혼합배양액과 *P. chlororaphis* O6균주 단독 배양액의 선충 치료효과를 온실 포트하에서 수행하였다. 토마토 뿌토 품종을 파종한 후 14일 후에 고구마뿌리혹선충 2령 유충을 150 - 200마리를 접종한 다음, 8일 후에 각 균주를 동일배지에서 7일간 배양한 후, OD600nm=0.1로 조정된 후 각 포트별로 10ml씩 관주하여 2주 후에 토마토의 생육을 비교하였다 (Fig. 5). 모든 미생물 배양액에서 선충 치료 효능이 탁월하여 대조구에 비해 초장의 식물생육이 유의성이 있게 신장되었으나, 미생물 배양액 처리구 간에는 유의성이 없었다. C61 단독 처리구가 세 균주 혼합처리구와 유의성이 없는 살선충 효능을 보여 C61가 세 균주에서 중요한 살선충 미생물임을 입증하였다.

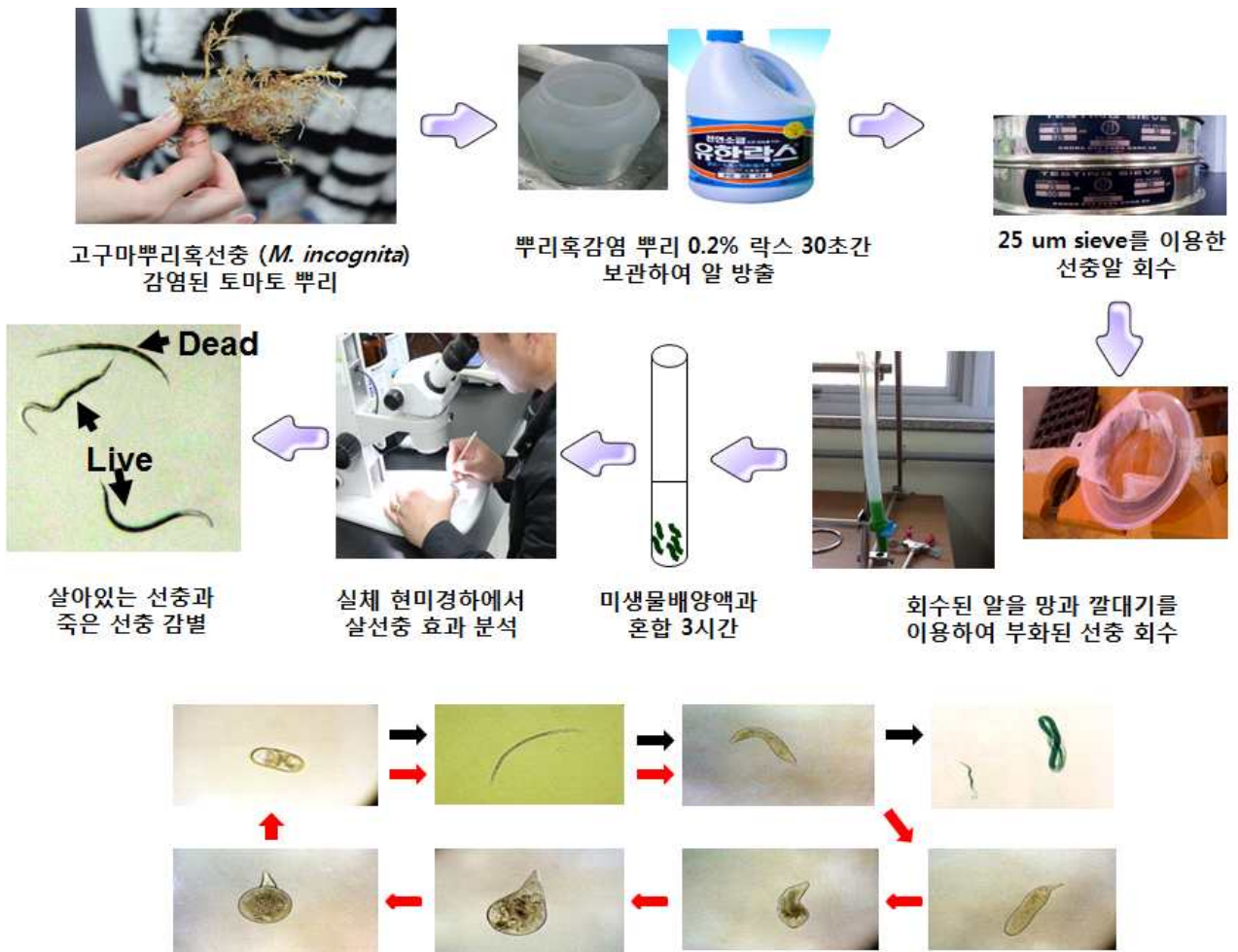


Fig. 3. 본 연구에서 *in vitro* 살선충 효능 분석 bioassay 시스템. 뿌리혹선충에 감염된 토마토 뿌리에서 알을 회수한 다음, 망과 깔대기를 이용하여 부화시켜서 2령 유충을 살 선충 효능 검정에 활용하였다. 다양한 미생물배양액과 혼합하여 3시간 후에 선충의 생사여부를 실체 현미경하에서 관찰함.

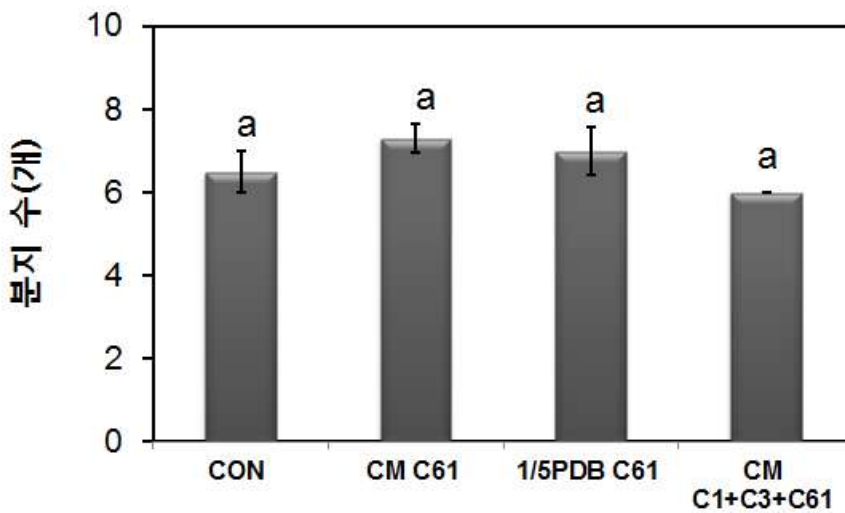
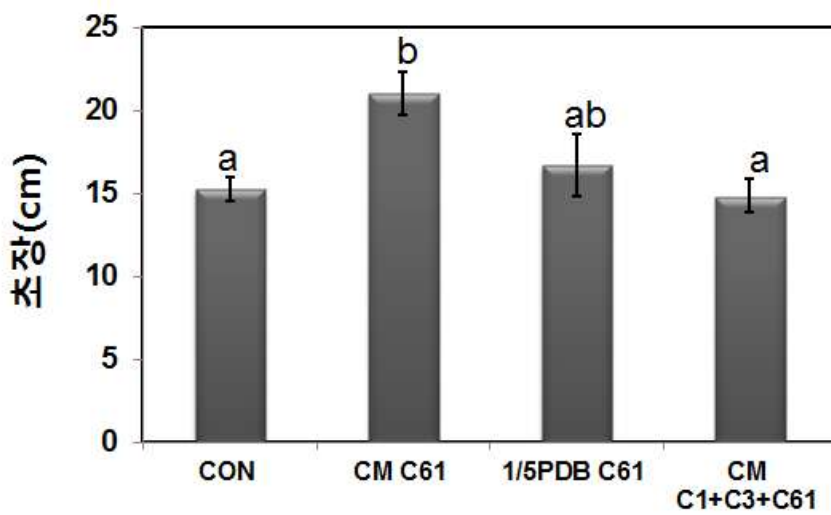


Fig. 4. 선발된 미생물 배양액의 선충 예방효과. C61균주를 chitin minimal medium과 1/5 PDB에서 5일간 배양한 배양액과 chitin minimal medium에 C1+C3+C61균주를 혼합배양액을 2주 키운 토마토 유묘에 관주한 1주일 후에 2령 유충 고구마뿌리혹선충을 접종하여 식물의 생육을 측정함.

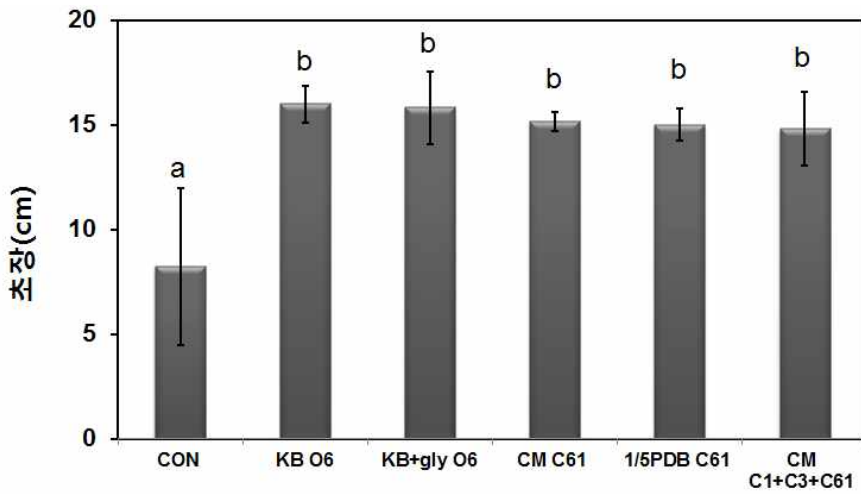
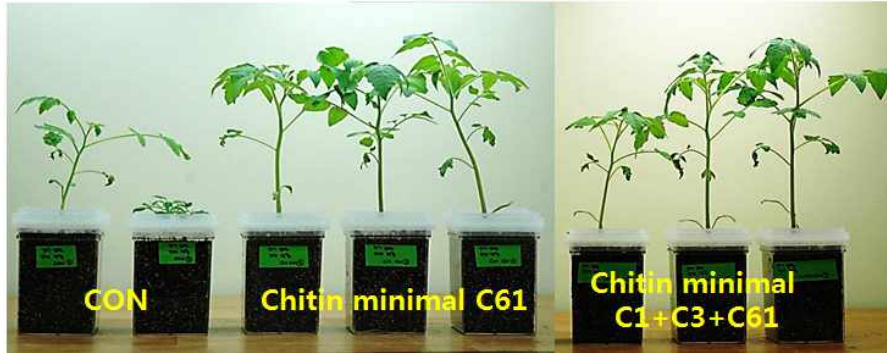


Fig. 5. 선발된 미생물 배양액의 선충 치료효과. *P. chlororaphis* O6균주를 KB와 KB에 glycine에서 생육시킨 배양액과 *Chromobacterium* sp. C61 균주를 1/5 PDB에서 5일간 배양한 배양액과 chitin minimal medium에 C1+C3+C61균주를 혼합배양액, 2주 키운 토마토 유묘에 2령 유충 고구마뿌리혹선충을 접종한 8일 후에 관주한 1주일 후에 식물의 생육을 측정함.

제 2 절 키틴 분해 미생물 *Chromobacterium* sp. C61의 생물방제 기작 규명

1. 실험 배경 및 목적

다양한 근권미생물이 식물의 성장 혹은 식물병해충 억제하는 능력이 있다고 알려져 있다 (Lugtenberg and Kamlikova, 2009). 식물 병해 억제에 관련된 메카니즘은 항균물질 생성, 영양분이나 niche경쟁, 및 작물에 병해충 저항성 유도가 기여하는 것으로 추정되고 있다. 이러한 여러 가지 생물적 방제 기작이 알려져 있음에도 불구하고 실제 유기농 작물을 재배하는 포장에서는 성공한 경우와 제품으로 개발된 경우는 드물다. 따라서 생물적 방제균의 병해충 방제 기작에 대한 연구를 통해서 완벽한 이해가 되어야 하지만 현재까지는 단편적인 측면에서 접근하고 있기 때문입니다 (Kim et al., 2011B).

많은 생물적 방제균은 곰팡이의 세포벽을 분해하는 세포 용해 효소, 특히 chitinases를 생성하여 병원균이나 선충의 침입을 억제한다고 알려져 있다 (Dahiya et al., 2006; Kobayashi et al., 2002) 많은 chitinase를 생산하는 미생물들은 여러 식물 병원성 진균이나 선충과 같은 해충의 세포벽에 존재하는 chitin중합체의 β -1,4 - 결합을 가수 분해하는 chitinase 효소 (EC 3.2.1.14)를 생산하여 병해충을 생장을 억제하기 때문에 생물적 방제제로 연구되고 있다 (Flach et al., 1992). Chitinases들은 catalytic domain에서 아미노산의 유사성에 따라 여러 family로 분류된다 (Cohen-Kupiec and Chet, 1998). Endo-chitinases로서 family 19에 속하는 식물 chitinases 및 *Streptomyces* sp. chitinase는 라이소자임 활성을 가지고 있고 항균활성을 지니고 있다 (Watanebe et al., 1999), 대부분의 세균이 생산하는 chitinases는 family 18에 속하고, 이들은 family 19 chitinases 보다 낮은 항균활성을 보인다 (Dahiya et al., 2006). 그러나, 일부 연구에 따르면 생물 방제 활성을 지닌 근권미생물들이 생산하는 family 18 chitinase가 식물 병원성 곰팡이의 성장을 억제한다는 보고도 있다 (Arora et al., 2007; Kobayashi et al., 2002; Lee et al., 2008).

생물적 방제균이 생산하는 항생물질과 다른 대사물질은 식물병원균을 직 간접적으로 식물병원성 곰팡이의 생육을 억제한다. 토양 근권 생물적 방제균인 형광성 *Pseudomonas*균주는 다양한 Pyrrolnitrin, pyoluteorin, 2,4 - diacetylphloroglucinol (DAPG), 및 phenazines를 생성하여 식물병원균의 성장을 억제하여 생물적 방제의 기작 중의 하나로 작용한다고 알려져 있다 (Dubuis et al., 2007) 다른 생물적 방제균들은 Cyclic peptide, 글리코 펩티드, cyclic lipopeptides (CLPs)를 생성하여 다양한 식물 병원성 병원균의 용해하거나 성장을 억제한다고 알려져 있다 (Raaijmakers et al., 2010). 예를 들어, 생물적 방제 *Bacillus* 종이 생산하는 CLPs인 fengycins 및 iturin 등은 식물병원 곰팡이균인 *Fusarium graminearum* (Wang et al., 2007), *Colletotrichum dematium* (Hiradate et., 2002), 그리고 *Magnaporther grisea* (Tendulkar et al., 2007) 등에 항 진균활성을 보였다. 그러나 이러한 DAPG 및 CLP를 같은 화합물은 다양한 방법으로 병원균과 식물 기주 모두에 영향을 미치는, 예를 들어 기주의 방어 상태에 영향을 미치거나 뿌리 형성의 패턴을 변경하는 등 다양한 기능을 가지기 하고 한다 (Kim et al., 2011B).

식물 근권에서 chitinase를 생산하는 생물적 방제균의 하나로 *Chromobacterium* sp. C61를 분리하여 유용한 생물적 방제균으로 활용하고 있다 (Kim et al., 2008). *Chromobacterium* sp. C61균주는 다른 2가지 균주들과 formulation를 통해서 배양액을 활용하여 실제 농가 포장에서 인삼의 *Alternaria* 마름병과 인삼의 탄저병 (Kim et al., 2010)와 고추의 역병 (Kim et al., 2008)를 효과적으로 방제하는데 활용하였다. C61균주가 생산하는 Chitinase 활성이 식물병원 곰팡이인 *Rhizoctonia solani*의 성장을 억제하는 능력이 있을 것으로 추정하였다 (Park et al., 2005). *Chrobobacterium* sp. C61균주가 생산하는 주요

chitinase는 54 kDa의 분자량과 pI 8.7를 가지고 있었다 (Park et al., 2007). 최근 *Chromobacterium* sp. C61의 draft genome sequence 분석이 완료되었는데 (Kim HJ et al., 2011A), 한 개의 chitinase가 확인되었고, 이 유전자의 site-directed mutagenesis를 통해 218번째 아미노산인 serine를 tyrosine으로 교체하였을 경우 chitinase 활성이 증가됨을 확인하였다 (Park et al., 2007).

아직까지 *Chromobacterium* sp. C61 균주의 생물적 방제에 관련된 chitinase의 역할이나 항균물질 등에 대한 연구가 진행되지 않아서 본 연구에서 C61의 chitinase 돌연변이주를 조제하였고, 또한 새로운 lipopeptide를 분리하여 신규 곰팡이 화합물을 동정하였다. *Chromobacterium* sp. C61 균주가 생산하는 cyclic lipopeptide와 chitinase가 이 균주의 생물적 방제에 중요한 역할을 수행하는 것으로 사료된다.

2. 재료 및 방법

가. 균주 및 성장 조건

Chitinolytic *Chromobacterium* sp. C61 (Park et al., 2005)는 나주 근교의 토양에서 분리되었고, 28±℃에서 50 µg/ml의 ampicillin과 0.2 % colloidal chitin을 함유한 nutrient broth (NB) 또는 Luria bertani (LB) 배지 (SamBrook et al., 1989)에서 성장시켰다. Colloidal chitin의 조제는 기존의 방법에 준하여 제조하였다 (Park et al., 2007). *Chromobacterium* sp. C61의 돌연변이 조제를 위해서 유전자 조작에 이용된 대장균들은 LB에 37 °C에서 성장시켰다 (SamBrook et al., 1989). Helper plasmid인 pRK20173은 spectinomycin (50 µg/ml), 플라스미드 pRL648 (Elhai and Wolk, 1988) 및 pCRII (Invitrogen, CA, USA)를 포함하는 균주의 성장을 위해서는 kanamycin (50 µg/ml), marker exchange mutagenesis vector인 pCPP54 (Miller et al., 1997)의 성장을 위해서는 tetracycline (12.5 µg/ml)이 함유된 배지에서 성장시켰다. 모든 균주는 -80 °C에서 15 % glycerol에 저장하면서 이용하였다. 식물병원 곰팡이에 대한 길항 작용을 평가하기 위해 사용된 박테리아 균주는 LB에서 생육시킨 다음 원심 분리하고, OD600nm로 세포를 1±10⁸ CFU/ml가 되게 멸균수로 현탁하였다.

나. *Chromobacterium* sp. C61의 chitinase mutant 조제

돌연변이 조제에 사용된 cloning과 subcloning 방법은 Sambrook et al 방법 (1989)과 Ausubel et al.,의 방법에 준하여 수행하였다. 플라스미드 DNA는 AccuPrep 플라스미드 추출 키트 (바이오니아 사, 대전, 대한민국)을 이용하여 분리하고, 게놈 DNA는 CTAB-NaCl을 방법 (Sambrook et al., 1989)에 의해 분리하였다. 제한 효소 및 modified 효소는 New England Biolabs (MA, USA)에서 구입하였다.

chi54 유전자 발현의 손상된 돌연변이를 조제하였다. *Chromobacterium* sp. C61의 *chi54* 유전자를 가지고 있는 플라스미드 pChi54 (Park et al., 2007)의 유일한 제한 효소 부위인 *Bam*HI으로 절단한 부위에 pRL648로부터 동일 제한 효소로 절단한 kanamycin 저항성 유전자 0.9 kb *Bam*HI 절편 (Elhai and Wolk 1988)을 삽입시켜 돌연변이주 조제에 사용하였다. 돌연변이된 *chi54* 유전자는 앞에서 설명한 것과 pCPP54 homologous exchange vector 벡터를 이용하여 염색체 야생형 chitinase 유전자와 교환하여 돌연변이주를 조제하였다 (Miller et al., 1997). Putative chitinase 돌연변이체는 kanamycin 저항성과 tetracycline 감수성 유무와 5 % sucrose 포함하는 평판 배지에서 생육 여부 등으로 확인하였다.

Chitinase 과다 발현 돌연변이주는 C61T는 *chi54*의 유전자 서열의 세린을 티로신의 교체하여 수정한 유전자를 이용하여 조제하였다 (Park et al., 2007). 조제된 세균의 chitinase 생산의 확인은 0.1 % 콜로이드 키틴-50 % LB 한천 배지에 10 µl을 떨어뜨려 clear zone을 형성하는 것으로 측정하였다.

CTAB-method로 추출된 DNA를 사용한 PCR 분석 (Ausubel et al., 1989)은 *chi54* 특이적 프라이머로 *chi54F*-5'-GAA CGC GTG CTG TTG TAA GA-3' 및 *chi54R*-5'GAA TTG AGG AGG TCC GAA TG-3'와 바이오니아 PCR premix (대전, 한국)를 이용하여 *chi54* 돌연변이주에서의 chitinase유전자의 존재와 T218S chitinase과다 발현 돌연변이주의 확인하는데 이용되었다.

다. Chi54 transcript 분석

Chromobacterium sp. C61 세포는 potato dextrose broth배지에서 0.5% colloidal chitin를 첨가하거나 하지 않은 조건에서 생육시키면서 OD600nm=0.7의 mid-log 단계의 세포를 회수하였다. Total RNA는 제조업체의 설명서 (Invitrogen)에 따라 Trizol™를 사용하여 분리하였다. 역전사-PCR (reverse-transcript PCR)는 QuantiTect SYBR Green RT-PCR 키트 (Qiagen, CA, USA)를 사용하여 실시하였다. 두 specific 프라이머; forward (5'-AGA ACA AGC GCC GCT ACT AC -3') 및 reverse (5'-AGA ACA AGC GCC GCT ACT AC -3') *chi54* 유전자, 그리고 *Chromobacterium* sp.의 16S rRNA 유전자에 특이 프라이머, forward (5'-CCC ACT GCC TCC CGT AAG GA -3') 및 reverse (5'-TGG CTC AGA ACG AAC의 GCT GG -3')를 사용하였다. 25 μ l의 reaction mixture에서 50 °C에서 30분 동안 배양하면서 역전사를 수행하였다. 정량적 RT-PCR은 Rotor gene-3000 real time PCR cyclers (Corbett Research Inc., 시드니, 호주)를 이용하여 수행하였고, QRT-PCR 반응은 24 사이클의 끝에서 정지시키고, PCR 생성물은 1.5 % agarose gel에서 전기영동 후 EtBr로 염색하여 확인하였다.

라. 키티나제 활성의 평가

Chromobacterium sp. C61균주는 48 시간 동안 28 °C에서 콜로이드 0.2 % 키틴 또는 chitin없이 PDB에서 교반 생장시켰다. 세포를 원심 분리하고 세포를 제거한 다음, 키티나제 활성은 상등액을 이용하여 측정하였다. 효소 활성은 0.1 mM 기질 및 효소를 함유하는 100 mM의 KH₂PO₄ 완충액 (pH 7.)을 반응 혼합물에서 4-methylumbellifery- β -D-N,N-diacetylchitobioside (Sigma, MO, USA)의 가수 분해량을 측정하여 분석하였다, 37 °C에서 10 분간 배양 한 후, 반응물에 0.1 ml의 0.2 M Na₂CO₃를 첨가하여 반응을 중지시킨 다음, chromogen의 형성을 360 nm의 파장을 excitation 파장대로 emission은 440nm파장대로 Bio-Tek FLX-8000 형광 분석기 (Winooski, VT, USA)를 이용하여 측정하였다. 키티나제 활성의 one unit는 배양액 ml 또는 정제 키티나제의 mg당 유리된 4-methylumbelliferone/min/ml의 μ M로 표현했다. 또한Chitinase활성은 테스트 샘플을 0.2 % 콜로이드 키틴을 포함하는 LB 플레이트 상에서 clear zone을 측정하였다.

부분 세포의 chitinase 정제는 50 %의 황산 암모늄가 되게 세포의 상등액에 만든 후 24 시간 동안 4 °C에서 교반하면서 침전시켰다. 침전된 단백질을 30 분 동안 8,000 rpm에서 원심 분리에 의해 수확하고 -20 °C에 저장하기 전에 1 ml의 20 mM의 sodium acetate 완충액 (pH 6.0)에 용해시켰다. 각 시료의 단백질 농도는 (Bio-Rad lab., CA, USA)에서 분석 염색 시약 방법을 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. *Chromobacterium* sp. C61야생형, chitinase돌연변이주에서의 chitinase생성량은 Park 등의 방법을 따랐다 (2007). 간단히, 부분적으로 배양 여액에서 정제된 동일한 양(20 μ g)를 SDS-PAGE 젤에 전기영동하였다. SDS-PAGE 젤의 단백질은 Western blot 분석을 위해 Coomassie blue로 염색하였고, 분자량은 low range SDS-PAGE standard (Bio-Rad Laboratory)와 비교하여 결정하였다.전개된 단백질은 negative charged nylon membrane (Roche Applied Science, 독일)에 electroblotting에 의해 옮긴 후 정제 Chi54의 키티나제를 이용하여 제조된 polyclonal antibody와 함께 24 시간 동안 4 °C에서 배양하였다 (Park et al., 2005). TBS-T 완충액 (20 mM Tris-HCl PH7, 100 mM

의 NaCl, 0.5 % Tween 20)로 두 번 세척 한 후, membrane을 1 시간 동안 실온에서 rabbit secondary antibody (Sigma)와 함께 배양하였고, TBS-T 완충액으로 2번 세척한 다음 공기 중에서 건조하였다. Chitinase 밴드는 membrane을 Western Lighting™ plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate (PerkinElmer Inc., CA, USA)에 노출시켰다. 또한 세포 배양여액으로부터 부분적으로 정제된 chitinase 샘플도 동일한 양의 단백질을 (20 µg)을 SDS-PAGE 겔 상에 전기영동하여 단백질을 전개하였고, chitinolytic 활성 밴드는 4-acetyl-β-D-glucosamine (4-MU-(GlcNAc)₂)를 사용하여 겔 상에서 검출하였다.

마. *Chromobacterium* sp. 균주와 세포의 물질의 항진균활성

Rhizoctonia solani (KACC 40111) 및 *Botrytis cinerea* (KACC 40573)은 Korea Agriculture Type Culture Collection Center (수원)에서 분양받아 이용하였다. 식물 병원곰팡이는 28 °C에서 PDA (Difco)에서 생장시켜 사용하였다. *Chromobacterium* sp. C61 균주들은 항진균 활성을 측정하기 위해 colloidal chitin이 함유되거나 되지 않은 PDA 플레이트에서 현탁액을 떨어뜨린 다음 각 병원균의 균사체를 함유하고 있는 한천 디스크 (0.5 cm 직경)를 플레이트의 중앙에 배치하였다. 각 균주의 길항 활성은 세균 현탁액을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 식물병원균의 곰팡이 균사의 저해 정도를 측정하여 결정하였다. 세포를 함유하지 않은 세균 배양 여액의 항진균 활성을 측정하기 위해서 0.2 % 콜로이드 키틴을 함유한 PDB배지에서 200 rpm로 교반하면서 실온에서 3 일 동안 생장시켰다. 배양여액을 100도에서 5분 동안 가열하여 항진균 활성의 대조구로 이용하였다. 대조구와 가열한 세포의 여과액은 PDA agar plate에 떨어뜨려 *R. solani*와 *B. cinerea*의 생장 억제 능력을 측정하는데 이용하였고, colloidal chitin을 함유한 배지에 떨어뜨려 chitinase활성 측정하였다.

바. *chi54* 돌연변이의 생장 비교.

Chromobacterium sp. C61야생형과 *chi54* 돌연변이 균주의 생장을 0.2 % 콜로이드 키틴을 함유하거나 함유하지 않은 PDB 배지에서 200 rpm으로 진탕 배양하면서 25 °C에서 측정하였다. 세균을 24 시간동안 Potato dextrose broth배지에서 200rpm/min교반하면서 배양한 다음, 600 nm에서 optical density (OD)를 0.1로 조정하였다. 배양액을 멸균수로 희석한 다음, C61균주의 야생형은 50 µg/ml의 ampicillin, *chi54* 돌연변이주는 50 µg/ml의 kanamycin이 함유된 LB agar plate에 도말하여 추가적으로 colony forming units/ml를 측정하였다.

사. 정제된 Chi54의 항진균 활성 측정

기존에 보고된 대장균에서 expression vector에 *chi54*가 발현시켜 정제한 C61 Chi54 단백질을 이용하여 곰팡이 포자 발아 억제를 조사하였다 (Park et al., 2007). 4가지 곰팡이 병원균, *Colletotrichum gloeosporioides* (KACC4003), *Botrytis cinerea* (KACC40573), *Cladosporium sphaerospermum* (KACC43548) 및 *Fusarium oxysporum* (KACC40183)은 Korean Agriculture Type Culture Collection Center (수원)에서 분양받아 수행하였다. 곰팡이 병원균의 포자 현탁액은 (1 x 10⁵ spore/ml) PDA 배지에 생장한 곰팡이에 멸균수로 현탁하여 조제하였다. 10mM sodium acetate 완충액 (pH 6.0) 단독, 혹은 Chi54 (0.02, 0.2, 2 mg/ml)을 동량의 진균 분생포자 현탁액 (1 x 10³ conidia/mL)을 튜브에서 혼합하고, 28 °C에서 10시간 동안 배양하였다. 곰팡이 포자의 발아는 혈구계를 이용하여 샘플을 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다.

아. 항 진균성 화합물의 분리 및 동정

C61은 50L LB 배지에서 36 시간 동안 27 °C에서 진탕시키면서 배양시켰다. 세균 세포는 10,000 xg에서 20분 동안 원심 분리에 의해 제거한 다음 상등액을 동량의 ethyl acetate로 (EtOAc)로 2 회 추출하였다. EtOAc 추출물을 45 °C에서 증발 건조시키고, EtOAc/메탄올 (90:10, V/V)의 혼합물에 용해시켰다. 추출물을 SPE (Supelco, PA, USA) silica gel cartridge column에 EtOAc/메탄올 (90:10, V/V) 용매 시스템에 전개시켰다. 메탄올 농도를 10%에서 100 %까지 올리면서 각 농도의 용매에서 용출액을 회수하였다. 용출액은 45 °C에서 수거하고, 회전식 증발기에서 농축 건조했다.

아래의 방법에 의해 각 용출액의 항 진균활성을 측정하고, 활성분획을 메탄올에 용해하고 210 nm Dionex PDA-100 model photodiode array detector와 Dionex P680 model dual pump가 장착된 prep-HPLC에 주입하였다. HPLC 컬럼은 μ -Bondapak C-18 stainless steel column (7.8x300mm², 10 μ m 필름 두께)을 이용하였다. 용매는 0.1 % trifluoroacetic acid를 함유된 85 % 메탄올 (v/v)이었고, 유속은 2.0 ml/분으로 분획하였다. HPLC 분석에 의해 검출된 각 피크를 수집하고, 곰팡이 항균활성 생물 검정을 실시하였다. 사용되는 모든 용매는 HPLC 등급을 이용하였다 (Fisher Scientific, PA, USA).

자. 기기 분석 방법

212-LC Binary LC system과 Prostar 335 photodiode array detector (210, 260 280nm)이 장착된 Varian Model 500MS ion trap liquid chromatography (LC) mass spectrometer (Varian, CA, USA)를 이용하여 세균 배양액내에서의 분리된 항균활성 물질의 동정에 사용하였다. HPLC 컬럼은 Chromsep C18 stainless steel column (150x2.0 mm)을 이용하였다. 이동상은 acetonitrile과 0.1% formic acid를 함유하고 있는 초 순수 물을 이용하였고, 0.2 ml/분의 유속으로 30 분에 걸쳐 10-90% (V/V)로 증가시켰다. HPLC 시스템은 양성 이온 모드에서 electrospray ionization (ESI) interface가 장착된 LC-MS2 system을 장착하였다. 건조 가스 온도와 압력은 각각 300 °C와 20 PSI를 이용하였고, capillary voltage는 80V를 이용하였다. 질량 스펙트럼은 m / z 100-1500범위에서 얻었다.

질량 스펙트럼은 정확한 질량을 측정하기 위해 10,000 full width half maximum의 mass resolution 양이온 모드 ESI source를 장착한 Hybrid ion-trap TOF mass spectrometer로 측정하였다 (Shimadzu, 도쿄, 일본). 분석 조건은 스캔 범위, m / z 700-1500; spray voltage, +4.50 kV; 검출기 전압, 1.70 kV; skimmer 전압, 8.0V; TOF 지역의 압력, 2.2×10^{-4} Pa, 온도, 40 °C; 이온 소스의 온도, 200 °C; 트랩 냉각 가스 (AR) 속도, 94 ml/분 flow; 이온 트랩 압력, 1.8×10^2 Pa; collision gas (AR) 속도 43 ml/분 유량; 이온 축적 시간, 10 ms; 전구체 이온 선택 폭, 3.0 m/Z 단위; 선택 시간, 50 밀리 초; collision-induced dissociation collision time, 30 ms; 충돌 에너지, 100 %; $q_z=0.251$, MSⁿ data는 targeted function를 이용하여 획득하였다. Shimadzu Composition Formula Predictor를 이용하여 동정을 확인하는데 이용하였다. Varian 모델 Unity INFINITY plu 125 MHz의 NMR 분광계 및 INOVA 500 MHz의 NMR 분광계를 ¹³C와 ¹H 분석에 이용하였다.

차. biosurfactant 활동의 결정

세포 배양 여액의 Biosurfactant 활성은 DuNouy 모델 3010 tensiometer(DuNouy, 도쿄, 일본)를 이용하여 측정하거나 (Kim et al., 2007), 10W-40 Penzoil (Penzoil 제품, 휴스턴, TX, USA)를 이용한 drop collapse assay를 이용하여 측정하였다 (Birch et al., 2010). 세균 상층액을 10 분 동안 12,000 x g에서 원심 분리하여 분리하고, 잔류 세균 세포를 제거하기 위해 0.2 μ m의 millipore filter로 여과하였다. 표면 장력 측정을 위해 장비는 공기와 물로 72.75 mN/ml의 수치로 측정하여 이용하였다. 표면 장력 측정

및 drop collapse assay은 샘플 당 3반복으로 3번의 독립적인 실험을 실시했다.

카. *In vitro* 항 진균 활성의 측정

C61 야생형 및 돌연변이주에서 세포 외 chromobactomycin 생산을 측정하기 위해 3 일간 0.2 % colloidal chitin이 첨가되거나 첨가되지 않은 PDB에서 생육시켰다. C61균주에서 chromobactomycin은 위에서 기술한 방법으로 EtOAc로 추출하여 HPLC로 분획을 한 후 methanol로 녹여서 사용하였다. 식물 병원성 곰팡이 병원균 *Alternaria longipes* (KACC 40028), *Rhizoctonia solani* (KACC 40111), *Pyricularia grisea* (KACC40439), *Fusarium oxysporium* (KACC 40183), *Phytophthora capsici* (KACC 40157), *Botrytis cinerea* (KACC 40573), 및 *Collectrichum gloesporioides* (KACC4003)를 Korea Agriculture Type Culture Collection Center에서 분양받아 이용하였다. 이들 병원균들은 28 °C에서 PDA (Difco)에서 성장시켰다. *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Bacillus subtilis* SQST713균주는 LB agar 배지에서 희석 배양법에 의해 접종한 다음 정제된 chromobactomycin의 항 세균활성 측정을 28 °C에서 배양하면서 측정하였다. 배양된 세균들은 원심분리하여 회수한 다음 멸균수에 재 현탁하여 OD600nm = 0.1로 조정 한 다음 세균 현탁액 1 ml를 신선한 LB agar plate에 도말하였다. 메탄올 에 녹인 정제된 CLP를 멸균 페이퍼 디스크 (직경 8mm, ADVANTEC, 일본)에 떨어뜨리고, 건조시키고 세균 현탁액으로 도말된 LB agar plate에 놓아 두었다. 배지는 28 °C에서 배양하면서 filter paper 주위에 clear zone을 3일 후에 측정하였다.

Chromobacterium sp. C61균주들의 항균활성을 측정하기 위해 PDA배지 한 쪽 끝에 옮겨서 측정하였다. 정제된 물질을 함유한 filter paper를 이용하여 PDA plate상에서 균사 성장 억제를 측정하였다. 메탄올을 음성 대조군으로 사용하였다. 살균된 페이퍼 디스크 (직경 8mm, ADVANTEC)에 메탄올에 용해한 분리 정제한 화합물 (400 µg/디스크)로 처리하였다. 페이퍼 디스크는 건조시킨 후 병원균이 자라고 있는 부위(5mm 플러그 직경)로 부터 약 2.5 cm의 떨어진 곳에 위치시켰다. 배지는 27 °C에서 배양하면서, 곰팡이의 성장을 5일 후에 측정하였다.

타. 식물병 억제 생물 방제 분석

Chromobacterium sp. C61균주들의 생물적 방제는 여섯 가지 식물 병해, 벼 도열병, 벼 잎집무늬 마름병, 밀 녹병, 토마토 잿빛곰팡이병과 잎 역병, 고추 탄저병에 대해서 병 억제 능력을 검정하였다 (Kim et al., 2001). *In vivo* 항 진균 생물 검정은 기존에 보고한 방법에 의해 실시하였다 (Kim et al., 2001). 요약하면, 식물 유묘들은 비닐 포트에서 25±5 °C에서 1-4 동안 성장시킨 후, 식물체를 1:3으로 희석한 C61, C61Chi54M, C61Chi54TS 균주들을 PDB배지에서 chitin을 함유하거나 함유하지 않은 배지에서 3일간 생육시킨 균주의 상등액, 또는 정제된 chromobactomycin (50 µg/ml)을 tween 20을 습윤제로 첨가하여 분무살포하였다. Tween 20과 증류수를 음성 대조군으로 사용하였다. 처리 된 식물 모종은 24 시간 후 여섯 식물 병원균 중 하나의 포자 또는 균사 현탁액을 접종했다 (Kim et al., 2001). 병원균에 따라 접종 후 3-7 일 후에 발병을 측정하였다. 각 처리구당 3개의 식물체를 이용하였고, 3반복하여 수행하였으며, 무작위 블록 디자인 방법으로 배열하여 처리하였다. Disease index는 감염된 잎 면적의 백분율을 측정하였다. 각 실험은 세 번 수행하였다.

파. 통계 분석

모든 데이터는 IBM SPSS 통계 버전 19 (IBM 사, NY, USA)를 사용하여 분산 분석을 실시하였다. 세균의 식물병 억제 효과의 효능은 던컨의 다중 범위 시험 ($P < 0.05$)으로 측정하였다. 성장 배지에

서 키틴의 존재 유무가 chitinase생성에 미치는 영향은 스튜던트 t-테스트 ($P < 0.01$)를 사용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *Chromobacterium* sp. C61 chitinase돌연변이주의 생물적 방제 능력

야생형 균주가 강한 chitinase가 분비함을 polyclonal antibody를 이용한 western blot과 SDS-PAGE 전개 후 Chitinase활성 염색법을 통해 확인하였다 (그림 1). 돌연변이 C61Chi54M에서는 chi54 유전자에 kanamycin이 삽입되어 불활성화되었음을 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)를 이용하여 돌연변이 유전자 증폭하여 확인하였다. Chi54 돌연변이는 유일한 탄소원으로 키틴을 첨가할 때는 성장하지 않았으며, Chi54 활성 또한 효소 활성 검정용 염색 또는 항체 분석에 의해서도 세포 배양여액에서 검출되지 않았다 (그림 1). 세린 아미노산을 티로신으로 교체한 site directed 돌연변이주 (Park et al., 2007)는 야생형보다 약 1.5배 이상의 chitinase 활성을 보였다 (그림 1C).

야생형 *Chromobacterium* sp. C61과 chitinase과다 발현 돌연변이 C61Chi54TS 식물을 이용한 생물적 방제능력이 벼 도열병, 토마토 잎 역병, 밀 녹병에 대해서 아주 높은 생물적 방제 능력을 보였다 ($P < 0.05$, 그림 2). 대조적으로, chitinase 생성 돌연변이주인 C61Chi54M의 세포 외 배양여액의 생물적 방제 능력은 현저히 감소하였다 (그림 2). 이러한 결과는 C61이 생산하는 세포외 chitinase가 식물병의 생물적 방제에 관여한다는 것을 보여 주는 결과였다.

나. C61에서 키틴이 chitinase발현, *in vitro*와 *in planta*생물적 방제에 미치는 영향

전사체 분석결과, 배지에 colloidal chitin을 첨가한 배지에서 야생형 C61균주의 정지기에서 chi54의 유전자가 발현됨을 확인하였다 (그림 3a). 세포 외 chitinase는 야생형 및 C61Chi54TS 돌연변이를 키틴이 함유된 배지에서 생육시켰을 때 발현되었고, 예측한 대로 C61Chi54M 돌연변이주에서는 extracellular chitinase활성이 검출되지 않았다 (그림 3B). 그러나, *R. solani*와 *Botrytis cinerea*에 대한 *in vitro* 곰팡이 항균활성은 야생형 *Chromobacterium* sp. C61균주를 chitin을 첨가하지 않은 PDA에서 생육시켰을 때 훨씬 더 높은 항균활성을 보였는데 (그림 3C), 이는 배지상에서 chitinase생성이 전체 항균활성을 억제하는 것을 나타냈다. 이와 더불어, C61Chi54M 돌연변이는 항균활성이 감소하였지만, C61Chi54TS와 야생형 사이에서는 항균활성의 차이는 유의성이 관찰되지 않았다.

Chitinase가 곰팡이의 성장을 억제하는 지 알아보기 위해 정제된 Chi54단백질은 *in vitro*상에서 측정하였다. 정제 Chi54의 항진균 활성은 시험 관내에서 수행하였다. 10 시간 배양한 결과, 모든 대부분의 테스트 곰팡이 병원균의 포자 발아는 포자 발아가 2 mg/ml과 0.2 mg/ml ($P < 0.05$)처리구에서는 유의하게 감소하였다. 하지만 *Fusarium oxysporium*, *Collectotrichum gloesporioides* 및 *Botrytis cinera*에 대한 길항 작용은 0.2 mg/ml (그림 4) 이하의 농도에서는 관찰되지 않았다. *Cladosporium sphaerospermum*포자의 발아가 정제된 Chi54의 처리에 가장 감수성이었고, *F. oxysporium*이 가장 저항성이었다.

Chromobacterium sp. C61의 세포외 상등액을 이용한 식물체에서의 생물적 방제능력은 *in vitro*의 결과가 상이한 결과를 보였다. 예를 들어, C61균주를 키틴이 함유되지 않은 PDB배지에서 생육시킨 세포 외 상등액은 벼 도열병, 벼 잎집 마름병, 토마토 잿빛 곰팡이 병, 토마토 잎 역병, 밀 녹병 (그림 5)에 대해 유의성이 있게 생물적 방제 능력을 보인 반면에, 키틴이 첨가된 배지에서 성장시킨 C61균주의 세포 외 상등액은 생물적 방제 능력이 유의성있게 감소하였다. 이러한 결과는 C61에서 분비 Chi54 이외의 다른 세포외 산물이 생물적 방제에 기여할 것으로 추정되었다.

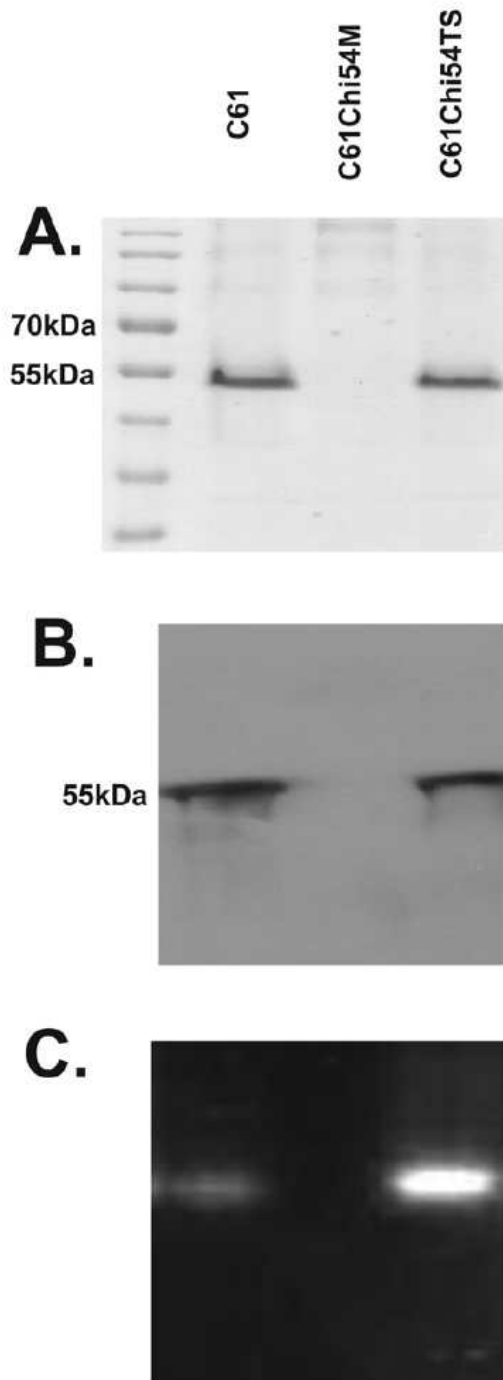


Fig. 1. *Chromobacterium* sp. C61야생형 균주(C61), chitinase돌연변이주(C61 Chi54M), chitinase과다발현 돌연변이주(C61 Chi54TS)의 chitinase활성 비교. 각 균주를 0.2% colloidal chitin이 첨가된 LB배지에서 배양한 다음, 배양액으로부터 부분 정제된 세포의 단백질(20 μ g)을 SDS-PAGE에 전기영동한 다음, Coomassie blue staining(A), Western blot(B)과 chitinase activity staining(C)을 수행함

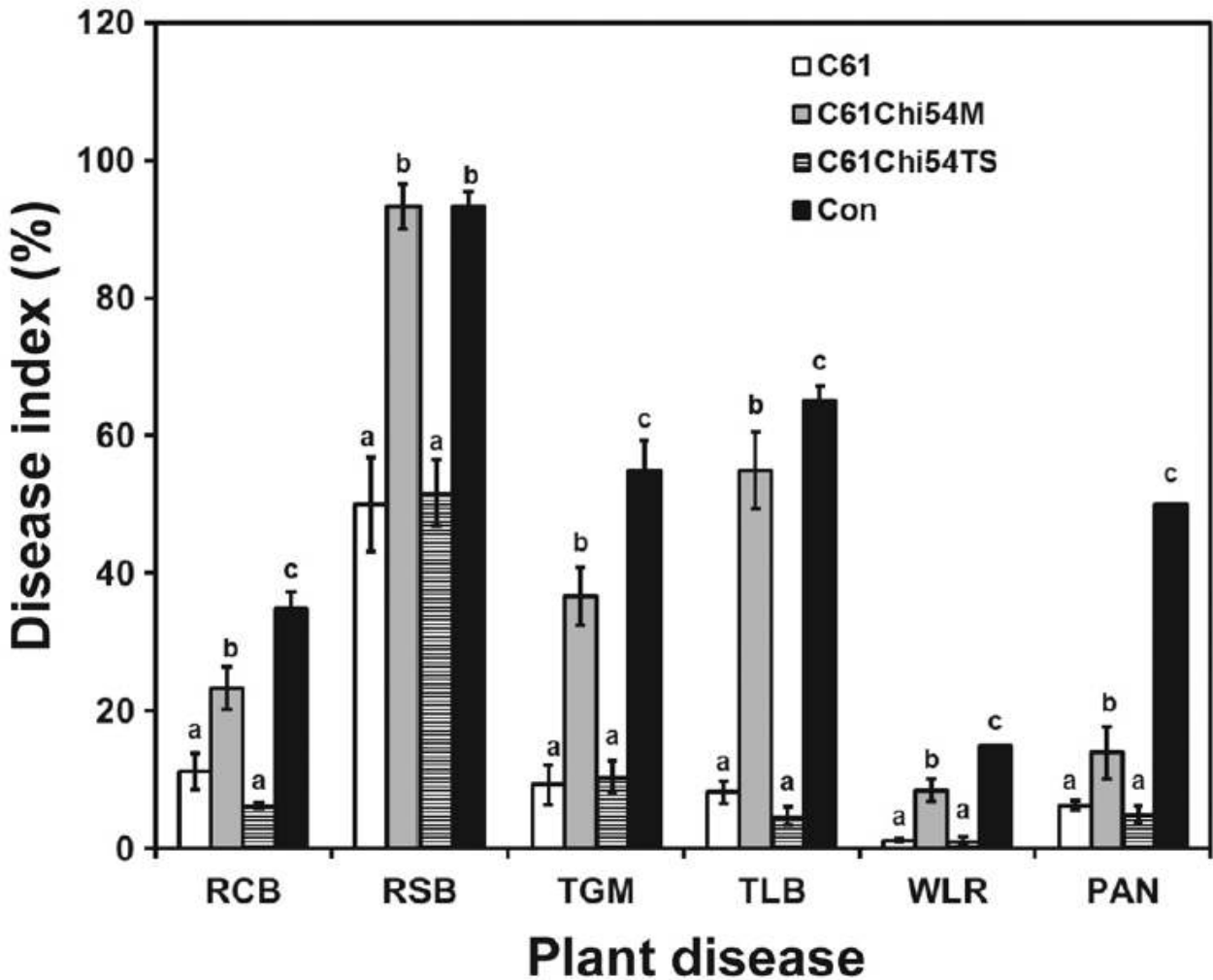


Fig. 2. *Chromobacterium* sp. C61야생형 균주(C61), chitinase돌연변이주(C61Chi54M), chitinase과다발현 돌연변이주(C61Chi54TS)의 *in planta* 생물적 방제 효능 비교. 각 식물체 유묘에 C61 야생형(C61), C61Chi54M와 C61Chi54TS (1:3 희석액)의 배양액을 살포하였고, 대조구로는 물을 살포하였다. 각 처리구 살포 2일 후 각 병원균의 포자 현탁액이나 균사체를 처리한 다음 1-2주 후에 식물병 발생도를 측정하였다. PAN, 고추 탄저병; RCB, 벼 도열병; RSB, 벼 잎집무늬마름병; TGM, 토마토 잿빛곰팡이병; TLB, 토마토 역병; WLR, 밀 녹병. 각 데이터는 반복 당 9개의 식물체를 이용하였고, 3반복을 수행한 평균과 표준편차를 나타내었다. Bars에 서로 다른 글자로 표시된 것은 각 병원균 처리구에 의해 던컨 검정을 통해 $P < 0.05$ 수준하에서 유의성을 있음을 표시한 것이다.

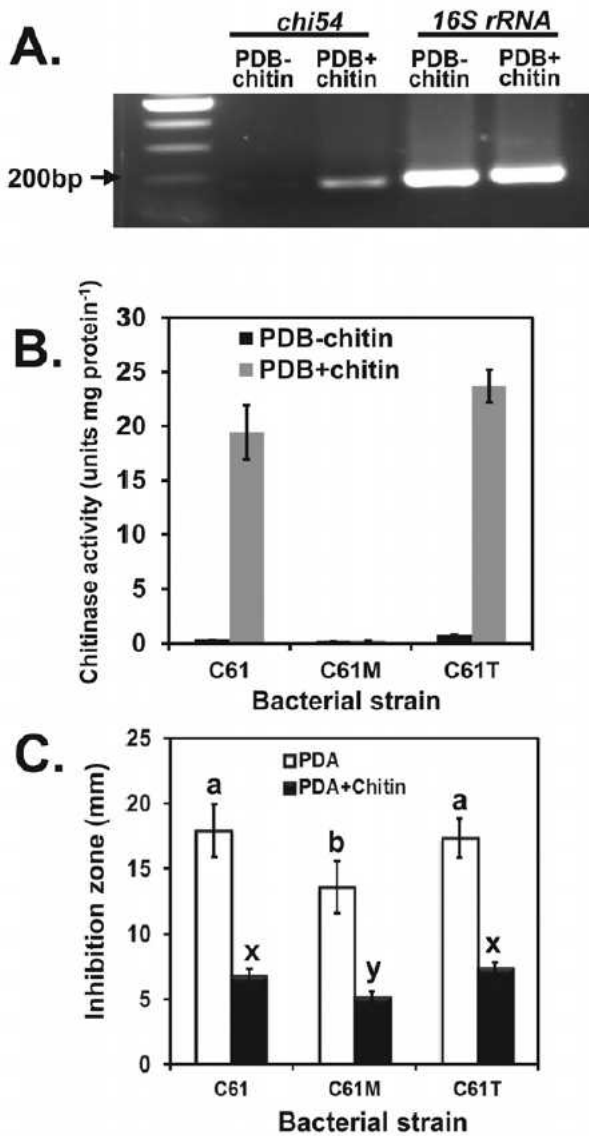


Fig. 3. *Chromobacterium* sp. C61의 배양 배지에 chitin첨가에 의한 세포의 chitinase생성과 항균활성에 미치는 영향. (A) *Chromobacterium* sp. C61 *chi54* 전사체 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석. 야생형 균주를 chitin을 첨가하거나 첨가하지 않은 PDB배지에서 정체기 [optical density at 600 nm (OD600 nm) > 2.4]까지 배양한 균주로부터 total RNA를 추출하였다. RT-PCRs은 24 cycles 증지시켰고, PCR products를 1.5% agarose gel 전기영동한 후 ethidium bromide염색하여 관찰하였다. 3반복을 수행하였고, 동일한 결과를 얻었다. (B) 동일한 배지 조건에서 생육한 배양액으로부터 total 단백질을 추출하여 Chitinase 활성을 측정함 (C) *Chromobacterium* sp. C61, C61Chi54M와 C61Chi54TS을 potato dextrose agar (PDA) 또는 chitin을 첨가한 PDA plate에서 생육시킨 후 모잘록병균 *Rhizoctonia solani*에 대한 항균활성 측정. 서로 다른 글자를 가진 Data는 던컨 검정에 대한 유의성 검정 결과임($P < 0.05$).

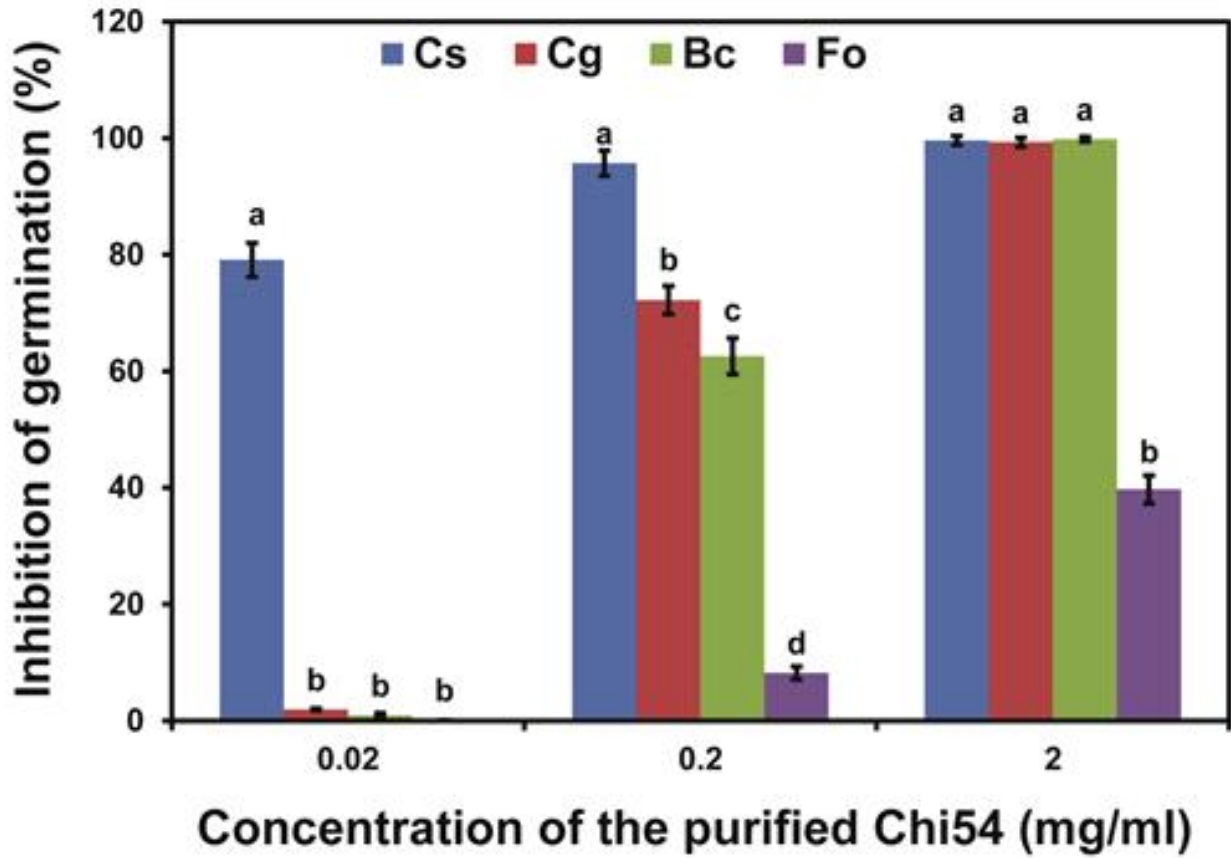


Fig. 4. 정제된 Chi54 단백질의 식물병원 곰팡이의 포자 발아 억제 능력. *Colletotrichum gloesporioides* (Cg), *Botrytis cinerea* (Bc), *Cladosporium sphaerospermum* (Cs), and *Fusarium oxysporum* (Fo) 포자 현탁액을 다른 농도의 정제된 Chi54 단백질에 의한 발아억제 능력을 검정함. 포자현탁액과 정제된 단백질을 혼합한 후 10 후에 발아율을 phase contrast microscope하에서 hemacytometer를 이용하여 측정하였다. 본 데이터는 2반복을 수행한 결과이고, 표준편차를 나타내었다. 정제된 단백질의 농도별 처리에 의한 다른 기호는 각 병원균사이에 던컨 검정에 의해 유의성을 나타냄 ($P < 0.05$).

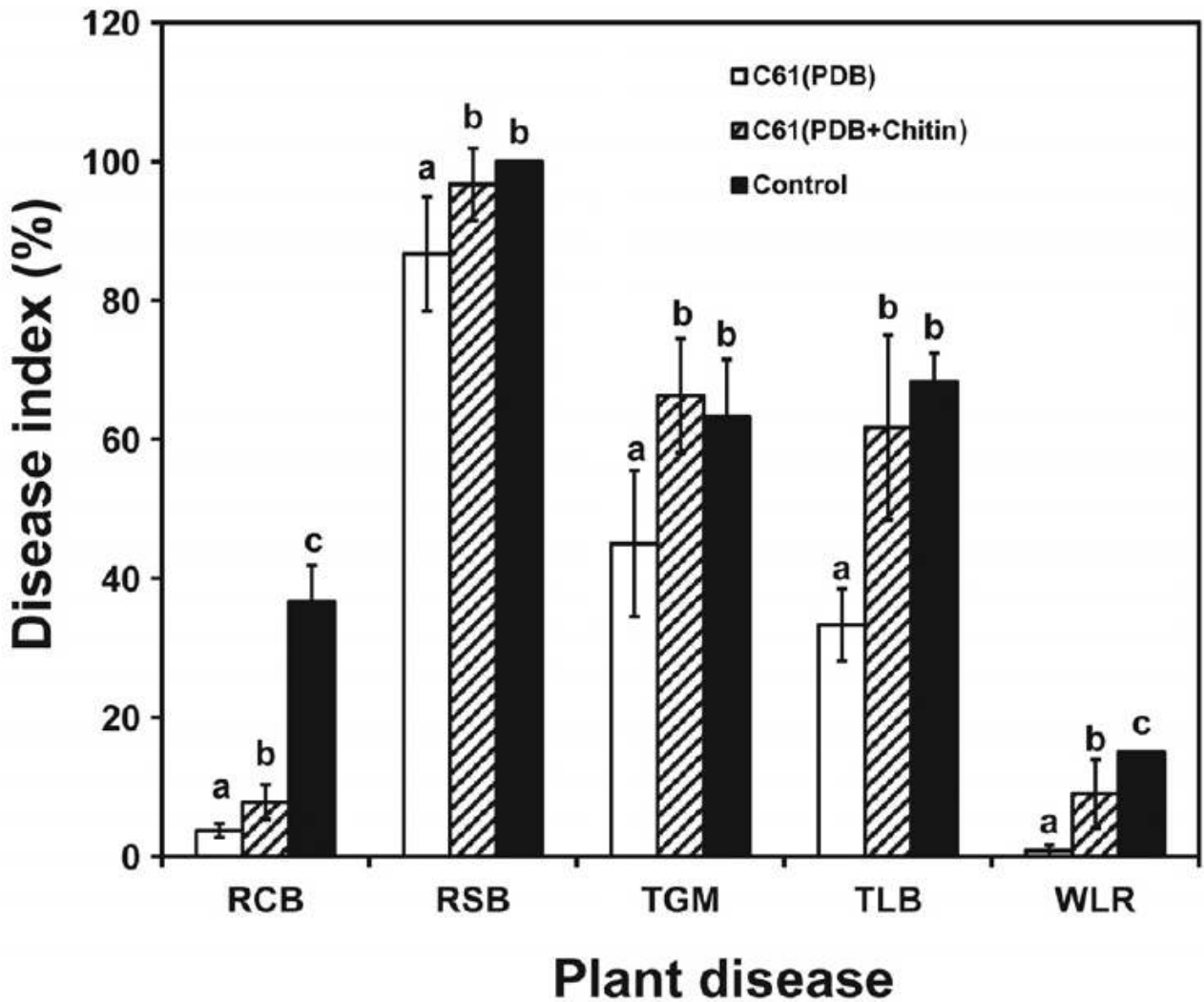


Fig. 5. *Chromobacterium* sp. C61의 배양 배지에 chitin첨가에 의한 세포배양액의 *in planta* 식물병 방제 효능. C61균주를 chitin이 첨가한 PDB나 첨가되지 않은 PDB에서 생육한 다음 배양액(1:3희석액)을 식물체 유묘에 살포하였고, 대조구로는 멸균수를 살포하였다. 각 처리구 살포 2일 후 각 병원균의 포자 현탁액이나 균사체를 처리한 다음 1-2주 후에 식물병 발생도를 측정하였다. PAN, 고추 탄저병; RCB, 벼 도열병; RSB, 벼 잎집무늬마름병; TGM, 토마토 잿빛곰팡이병; TLB, 토마토 역병; WLR, 밀 녹병. 각 데이터는 반복 당 9개의 식물체를 이용하였고, 3반복을 수행한 평균과 표준편차를 나타내었다. Bars에 서로 다른 글자로 표시된 것은 각 병원균 처리구에 의해 던컨 검정을 통해 $P < 0.05$ 수준하에서 유의성을 있음을 표시한 것이다.

다. C61가 생산하는 항진균 물질의 동정

야생형 C61에서 새로운 항진균제 대사 산물을 분리 동정하기 위해 균주를 배양한 배지에서 에틸 아세테이트로 추출하였다. 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 이용하여 야생형 배양 추출물로부터 높은 항균활성을 보이는 분획을 확인하였다 (용출 시간 8.5 분, 그림 6). 활성이 있는 정제된 물질의 구조는 two-dimensional 1H - 1H correlation spectroscopy (2D 1H - 1H COSY), 1H - 1H rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy (1H - 1H ROESY), 1H - 1H total correlation spectroscopy (1H - 1H TOCSY), 1H - 13C heteronuclear multiple-quantum correlation spectroscopy (1H - 13C HMQC), 1H - 13C heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy (1H - 13C HMBC), distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) and 13C spectroscopy in methanol-*d*4 and dimethyl-sulphoxide (DMSO)-*d*6을 이용하여 분석하였다. 분리 정제된 항균물질은 하나의 β -hydroxymyristate (HMS)와 9개의 아미노산을 함유하는 신규물질로 chromobactomycin으로 명명하였다 (그림 7).

Chromobactomycin의 Time of flight mass spectrometry (TOF-MS) 분석 결과, m/z 1196.6에서 peak (M + H)를 보여 $C_{57}H_{86}N_{12}O_{16}$ 의 분자식을 가진 물질로 확인되었다 (그림 8). 환형 펩티드가 THR-2의 카르복실기와 Thr-9의 아민기 사이의 연결로 형성되어 있었다. NMR 및 MS 분석에 근거 chromobactomycin 대한 제안된 구조는 그림 8에 나타냈다.

라. 정제된 chromobacteriomycin의 생물적 방제 활성.

정제된 chromobactomycin 400 μ g/디스크의 농도는 *R. solani*, *Pyricularia grisea*, *B. cinerea*, *Alternaria longipes*와 *C. gloeosporioides*의 균사 생장이 억제되었지만, *Phytophthora capsici*와 *Fusarium oxysporium*의 균사 생장은 억제되지 않았다 (표 1). 하지만, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 또는 *Bacillus subtilis*의 생장은 억제되지 않았다 (표 1). 부분적으로 정제 chromobactomycin (50 μ g/ml)을 엽면 살포하였을 때 4가지 식물병에 대해 병 발생 억제 능력이 확인되었다 (그림 9).

C61 균주의 세포의 배양액의 surface tension은 72.7mN/ml로 물의 표면 장력과 비슷하였다. 하지만, 정제된 chromobactomycin 400 μ g/ μ L의 surface tension은 42mN/ml biosurfactant활성이 확인되었다. 이러한 결과는 C61 균주에 의해 생성된 chromobactomycin 약한 계면 활성제 활성을 보유하고 있음을 나타냈다.

비록 chitin을 함유한 성장배지에서 C61균주는 chitinase생산이 증가하지만, chromobactomycin생산량이 감소하여 항균활성이 감소함을 확인하였다 (표 2). 야생형에 chromobactin 수준 ($326.67 \pm 24.63 \times 10^4$) 및 C61Chi54TS 돌연변이 샘플 ($303.67 \pm 14.81 \times 10^4$)은 C61Chi54M 돌연변이 ($22.71 \pm 9.18 \times 10^4$) 수준보다 훨씬 더 높았다. 이러한 CLP 수준에서 이러한 차이에 아마도 배지에서 성장률이 다를 가능성이 있어서 모든 균주의 성장율은 키틴이 첨가되지 않은 LB배지에서는 동일하였지만, chitin이 첨가된 배지에서는 C61Chi54M 돌연변이주는 6-9시간 정도의 유도기를 보였다 (그림 10).

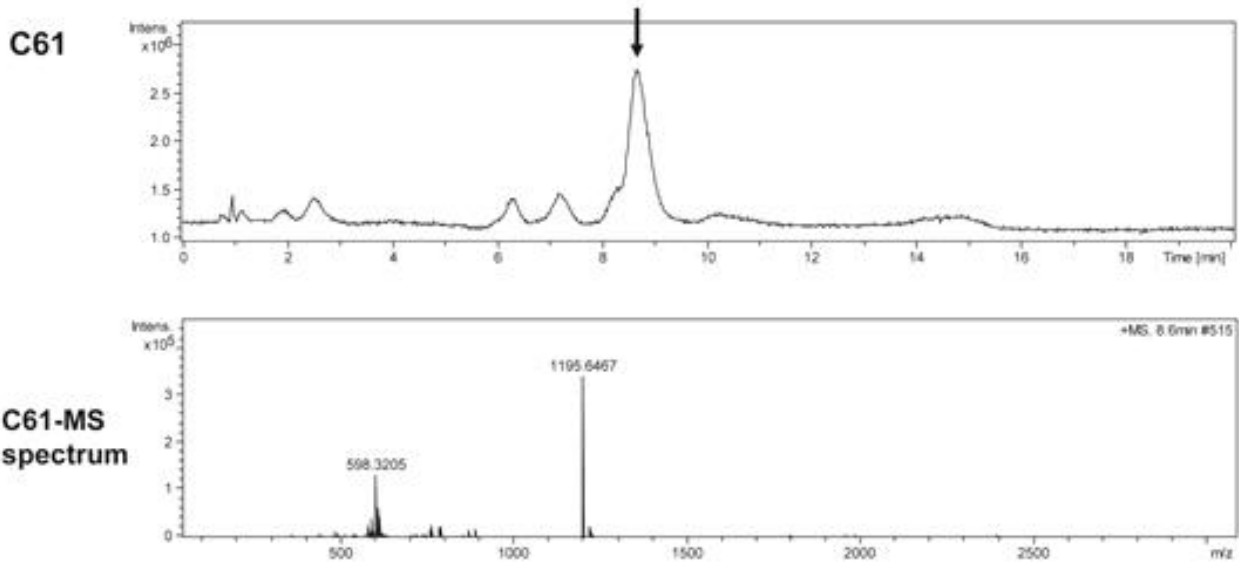


Fig. 6. *Chromobacterium* sp. C61의 상등액 ethyl acetate 추출 항생물질의 HPLC 분석. 유기용매 시스템은 0.1% trifluoroacetic acid을 첨가한 85% (v/v) aqueous methanol을 2.0 ml/min 조건하에서 분석하였고, peaks는 210 nm에서 관찰하였다. *Chromobacterium* sp. C61의 chromobactomycin peak는 화살표로 표시를 하였고, 물질을 정제하여 TOF-MS spectrum 분석에 이용하였음.

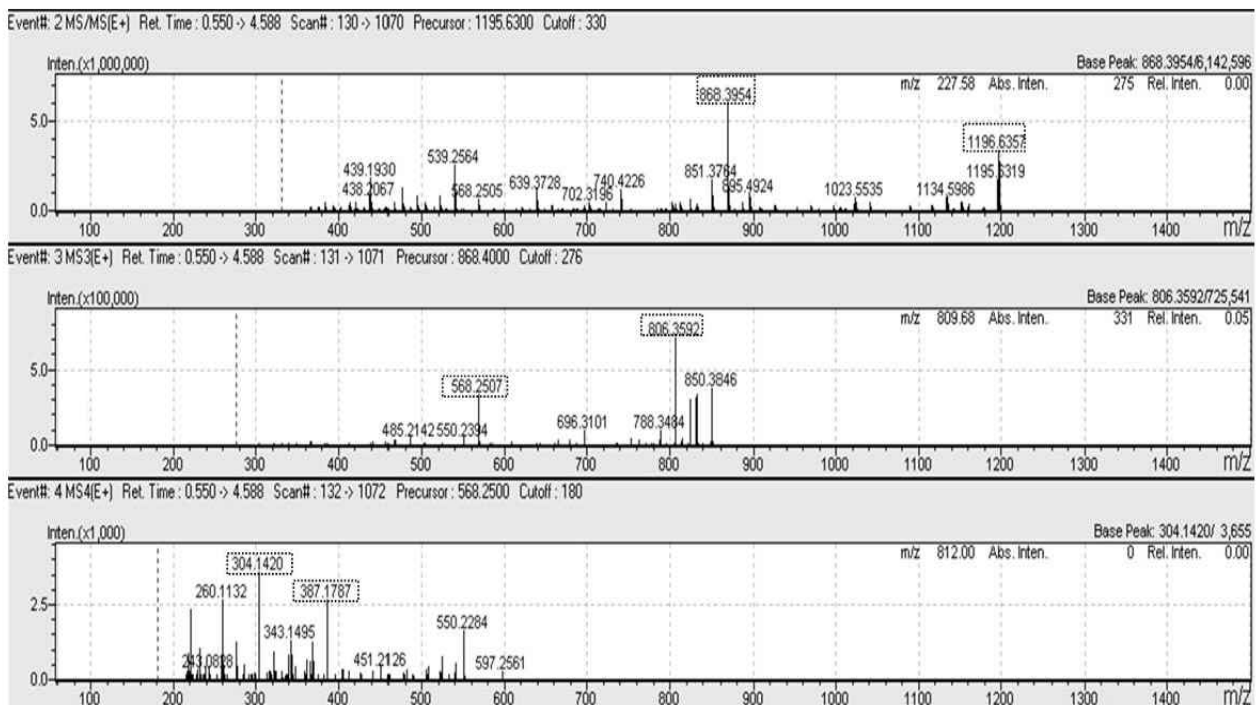


Fig. 7. 순수 정제된 항균물질의 Ion-trap-time-of-flight mass spectrometry (IT-TOF MS). MS², MS³ data를 제시함.

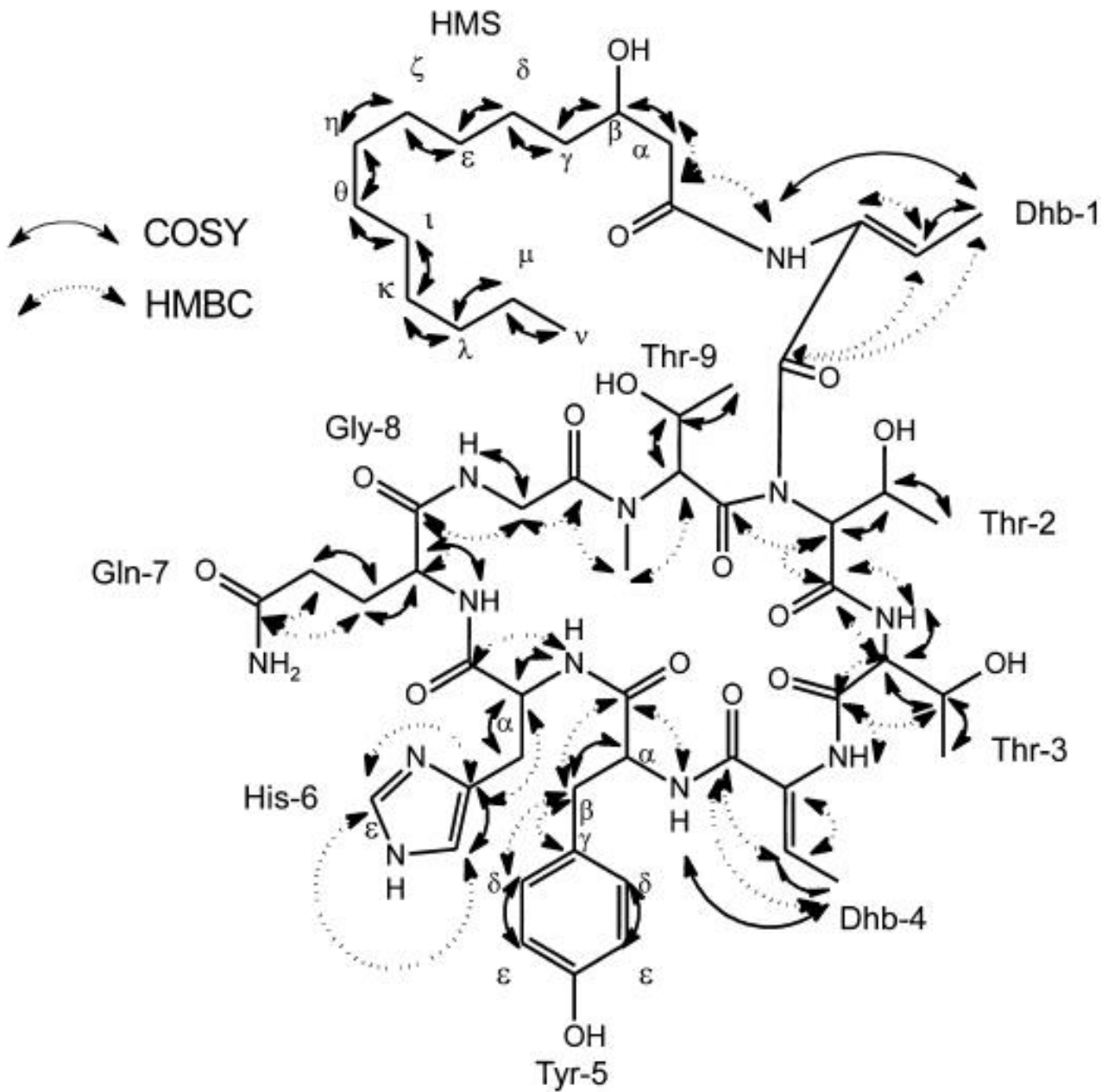


Fig. 8. Chromobactomycin의 correlation spectroscopy (COSY)와 heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy (HMBC)에 의한 화학적 구조. 실선 화살표와 점선 화살표는 각각 1H - 1H와 1H - 13C correlations를 표시한 것임. Dhb, dihydroxybutyric acid; Gln, glutamine; Gly, glycine; His, histidine; HMS, β-hydroxymyristate; Thr, threonine; Tyr, tyrosine.

Table 1. Chromobactomycin의 다양한 식물병원 곰팡이와 세균에 대한 항균활성

Microorganism	Inhibition zone (mm)
<i>Rhizoctonia solani</i> (KACC40111)	6.0*
<i>Pyricularia grisea</i> (KACC40439)	6.0
<i>Fusarium oxysporum</i> (KACC40183)	-†
<i>Phytophthora capsici</i> (KACC40157)	-
<i>Botrytis cinerea</i> (KACC40573)	7.0
<i>Alternaria longipes</i> (KACC40028)	5.0
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (KACC40003)	5.5
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	-
<i>Bacillus subtilis</i> QST713	-

* Chromobactomycin (400 µg/disc)을 처리한 paper disc의 가장자리와 곰팡이 균사나 세균의 도달한 주위에 형성된 저지대 (mm)를 측정하였다. Data는 2반복의 평균을 표시한 것이다.

+ 저지대가 형성이 되지 않았음.

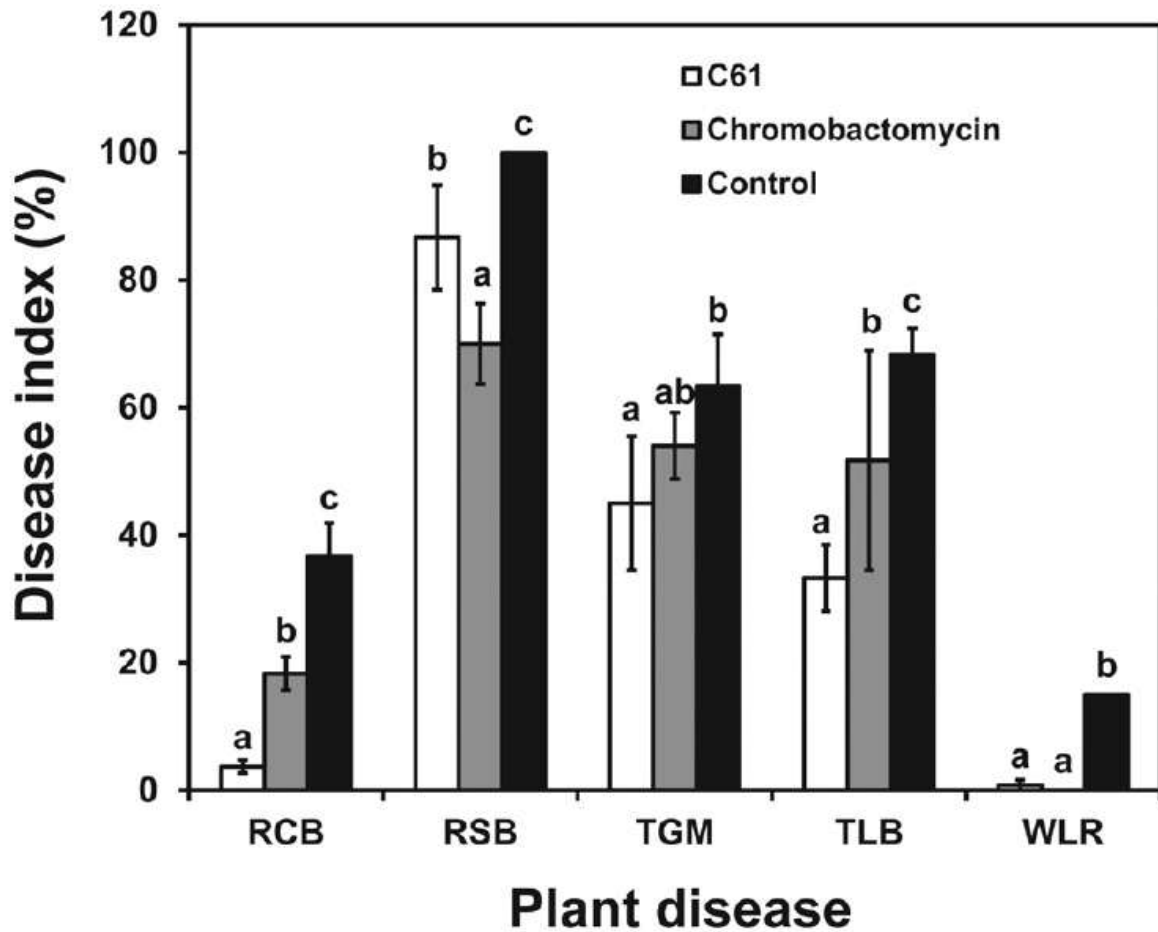


Fig. 9. *Chromobacterium* sp. C61의 세포배양액과 정제된 chromobactomycin의 *in planta* 식물병 방제 효능. C61균주를 chitin이 첨가한 PDB 배양액(1:3희석액)나 부분 정제된 chromobactomycin (50 µg/ml) 을 식물체 유묘에 살포하였고, 대조구로는 멸균수를 살포하였다. 각 처리구 살포 2일 후 각 병원균의 포자 현탁액이나 균사체를 처리한 다음 1-2주 후에 식물병 발생도를 측정하였다. PAN, 고추 탄저병; RCB, 벼 도열병; RSB, 벼 잎집무늬마름병; TGM, 토마토 잿빛곰팡이병; TLB, 토마토 역병; WLR, 밀 녹병. 각 데이터는 반복 당 9개의 식물체를 이용하였고, 3반복을 수행한 평균과 표준편차를 나타내었다. Bars에 서로 다른 글자로 표시된 것은 각 병원균 처리구에 의해 던컨 검정을 통해 $P < 0.05$ 수준하에서 유의성을 있음을 표시한 것이다.

Table 2. *Chromobacterium* sp. C61 배양 시 Chitin의 첨가에 의한 chitinase생성, chromobactomycin생성, *in vitro* 항균활성.

Strain	Growth condition	Chitinase activity (U/mL/min)†	Concentration of chromobactomycin (mg/L)‡	Inhibition zone (mm)§	
				<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
C61	-Chitin	20.9±0.7	88.2±13.9	10.7±0.6*	11.8±1.1*
C61	+Chitin	59.8±7.4*	60.8±19.5	6.3±0.6	7.5±0.5

† *Chromobacterium* sp. C61를 potato dextrose broth (PDB)에 chitin을 첨가하거나 첨가하지 않은 조건하에서 3일동안 생육한 다음, 세포외 상등액에서 chitinase활성을 형광성 기질인 4-methylumbelliferyl-β-D-N,N-diacetylchitobioside을 이용하여 측정하였다.

‡ 야생형 균주의 두 배양 조건하에서 세포외 상등액에서 chromobactomycin 농도는 정제된 chromobactomycin을 기준으로 high-performance liquid chromatography(HPLC) 분석하였다.

§ *Chromobacterium* sp. C61를 chitin을 첨가하거나 첨가하지 않은 potato dextrose agar (PDA) plates하에서 *R. solani*와 *B. cinerea*에 대한 생육 저지대를 측정하였다.

Data는 3반복의 평균과 표준편차를 나타낸 것이다. 별표는 Student's *t*-test at $P < 0.01$ 하에서 유의성이 있음을 나타낸 것이다.

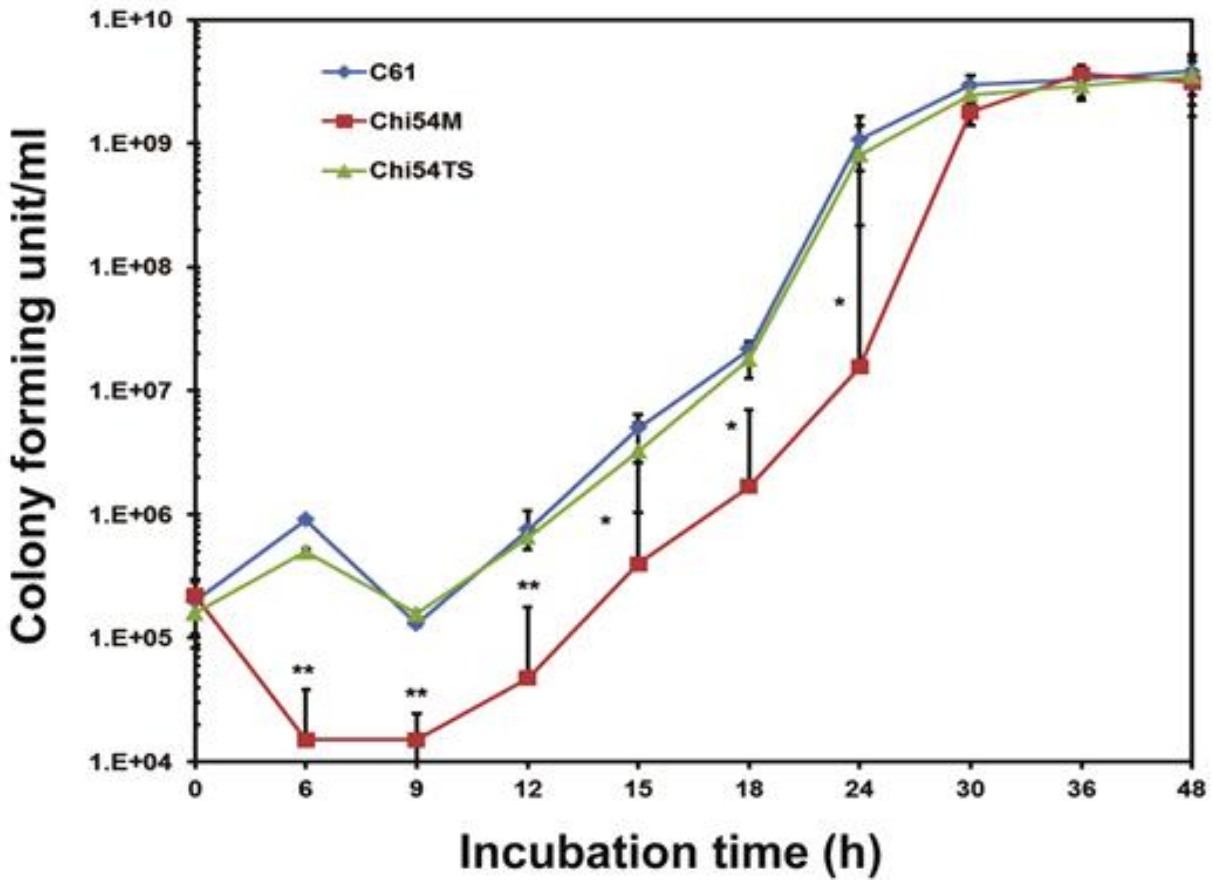


Figure 10. *Chromobacterium* sp. C61의 *chi54* 돌연변이에 대한 chitin 존재 하에서 생육. *Chromobacterium* sp. C61, chitinase 돌연변이주(Chi54M), chitinase 과다발현 돌연변이주 (Chi54TS)의 생육을 PDB배지에 0.2% chitin이 첨가된 배지에서 생육시키면서 희석에 의해 생균수(colony forming units/ml)를 측정하였다. 각 측정 시간대별로 세균의 밀도에 대한 유의성 검정은 ANOVA 분석에 의해 수행하였고, 각 군주별 CFU per/ml는 Duncan's multiple range test (*, $P < 0.05$ 와 **, $P < 0.01$)를 이용하여 유의성 분석을 수행하였다. 각 data는 3반복한 실험의 평균과 표준편차를 나타낸 것이다.

생물 방제균은 다양한 기작으로 식물병을 억제할 수 있기 때문에 여러 포장 조건에서 어떤 기작이 가장 중요한 지 알아내는 것이 중요하다 (Kim et al., 2011B). 본 연구에서 *Chromobacterium* sp. C61 균주가 생산하는 세포 외 chitinase와 새로운 cyclic lipopeptide (CLP)가 생물적 방제에 중요한 역할을 수행함을 증명하였다 (그림 2와 5). 병원균의 세포벽 분해 효소와 CLP는 다양한 생물적 방제균에서 중요한 생물 방제 기작으로 알려져 있습니다. 키틴은 곰팡이의 세포벽과 곤충 외골격 (Gooday, 1990) 및 토양에 chitin시용이 chitinolytic 미생물 (Wang et al., 2002)의 밀도가 증가됨이 밝혀졌다. 그러나, 본 연구가 한 개의 생물적 방제균 *Chromobacterium* sp. C61에서 chitinase와 CLP가 모두 *in vitro*와 *in planta* 생물적 방제 능력에 관여함을 처음 밝힌 연구입니다.

흥미롭게도, C61를 액체 배지에서 배양할 때 chitinase와 chromobactomycin생산이 관련이 되어 있는 것 같다. 특히, 배지에 chitin을 첨가하였을 때 Chi54 생산이 증가한 반면 (그림 3) 동시에 chromobactomycin의 감소가 유도되었다. 현 시점에서는, chitinase와 chromobactomycin 생산 및/또는 분비를 조절하는 기작은 명확하지 않다. 최근에, quorum sensing관련 homoserine lactone 생합성 유전자 돌연변이주가 chitinase생산과 항균활성이 상실됨을 밝혔다(김 등., 결과 미제시). 따라서, Chi54 및 chromobactomycin 생산은 퀴럼 센싱에 의해 조절됨을 추정할 수 있었다. *Chromobacterium violaceum*에서 quorum sensing이 주요 chitinase 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Stauff와 Bassler, 2011). 그리고 다른 생물적 방제균인 슈도모나스의 CLP를도 퀴럼 센싱에 의해 조절된다 (Raaijmakers et al., 2006). 따라서 chitinase돌연변이주의 chromobactomycin생산이 감소하는 이유는 돌연변이가 chitin이 첨가된 배지에서 생육할 때 6-9 시간의 long lag phase와 관련이 있을 것으로 사료된다. 왜냐하면 lag phase가 길어진 돌연변이주는 quorum sensing발현에 필요한 고 밀도의 균주가 도달하는 것이 시간적으로 제약을 받기 때문이라도 생각된다. 또 다른 가능성은 C61 균주에서 chromobactomycin 생산은 N-아세틸 글루코사민 등의 키틴 분해의 대사 산물에 의해 영향을 받은 것입니다.

비록 *Serratia marcescens*에서 chitin에 의해 양성적으로 조절되지만 (Monreal and Reese, 1969), 포도당과 N-아세틸 글루코사민의 존재에 의해 음성적으로 조절됨이 보고되어 있다 (Watanebe et al., 1997). 따라서 주변 환경이나 생육 영양 조건이 다른 보고와 같이 C61의 chitinase 및 CLP 생산 조정의 역할을 할 수 있는 것 같다 (Fernando et al., 2005)

Chromobacterium sp. C61의 chromobactomycin CLP는 microcystin의 heptapeptides (Sano and Kaya, 1995, 1998)에서 보고된 Dhb (2-amino-2-butanolic acid, DHB)가 존재하였다. 또한 Dhb는 다른 슈도모나스가 생산하는 다른 CLPs, tolaasin과 syringomycin에도 존재하였다 (Raaijmakers et al., 2006). DHB-1는 HMS와 연결되어 있고, 선형 peptide와 연결되어 있는 thiotemplate 메커니즘이 관련되어 있을 것으로 사료된다 (Christensen et al., 2008). chromobactomycin의 nonameric 펩타이드는 다른 박테리아에 의해 생성된 다양한 CLP 항생제 중 유일하다 (Ongena et al., 2007; Raaijmakers et al., 2006). 향후 대규모 발효와 분리 방법과 관련된 chromobactomycin연구는 다양한 병원균에 대한 LD50를 정확하게 결정될 수 있으며, 또한 일부 phytopathogens의 저항성을 보이는 특성을 연구하는데 중요한 재료를 제공할 것으로 사료된다.

흥미롭게도, CLP는 식물 유용 미생물에서 생태계에서 다양한 역할을 수행한다는 보고가 있다 (Raaijmakers et al., 2010). 많은 CLP들은 biosurfactant활성을 지니고 있어서, 콜로니 확산, 식물 표면에서 biofilm 형성과 식물 뿌리 정착에 중요한 역할을 한다 (Ongena and Jacques, 2007). 특정 CLP들은 식물병에 대해 저항성을 유도하는 것으로도 알려져 있다 (Jourdan et al., 2009; Ongena et al., 2007; Raaijmakers et al., 2010.). CLP들의 항균활성은 다양하다. orfamide 및 putisolvins은 유주자의 운동성을 억제하고 유주자를 용해하지만, 균사 생장에 영향이 없다 (de Bruijn et al., 2007; Kruijt et al., 2009).

C61균주가 생산하는 chromobactomycin은 약한 biosurfactant활성을 보였다. 현재 *Chromobacterium violaceum*의 CLP에서 보고된 바와 같이 (Chenng et al., 2007) chromobactomycin도 항암 활성이 있는지 검토하고 있습니다. 이러한 연구는 C61에 chromobactomycin의 생합성 유전자 돌연변이주를 조제하여 항암활성 뿐만 아니라 본 균주에서 생물적 방제에서의 항생제의 상대적 중요성을 확인하는데 필수적인 연구가 수행이 되어야 한다. 이미 *Chromobacterium* sp. C61의 draft genome sequence에서 잠재적인 CLP 오페론이 존재함을 확인하였다 (Kim et al., 2011A). 그것은 환경적 요인이 생물학적 방제에 필요한 대사체에 미치는 영향을 조사하기 위해 흥미로운 일이 될 것이다. 이러한 결과는 현장 조건에 따라 생물학적 방제균의 활용을 극대화에 기여할 것입니다.

제 3 절 키틴분해 미생물 *Chromobacterium* sp. C61의 quorum sensing이 항균활성과 생물적 방제의 중요한 조절인자

1. 실험 배경

다양한 근권미생물들이 식물의 생장을 촉진하거나 식물병해를 억제하는 능력을 가지고 있다 (Lugtenberg and Kamlikova, 2009). 생물적 방제균에서 식물병의 생물적 방제에 관련된 기작은 다양한 인자, 항생물질 생산, 영양분이나 서식처 경쟁, 기주의 병 저항성 유도 등의 다양한 인자들이 작용하여 자연상태에서 식물병을 방제한다고 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2011b). 다양한 미생물 대사 물질들이 식물병원 곰팡이의 생장을 억제하는데 관여한다고 알려져 있다. 형광성 슈도모나스가 pyrrolnitrin, pyoluteorin, 2,4-diacetylphloroglucinol, 그리고 다양한 형태의 phenazines 등의 항균물질을 생산한다고 알려져 있다 (Dubuis *et al.*, 2007). 식물병원 곰팡이와 선충의 세포벽을 분해하는 세포 외 chitinases가 식물병원균의 억제에 관여한다는 보고가 있다 (Dahiya *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2002). 많은 생물적 방제균들이 생산하는 Cyclic lipopeptides (CLPs) 다양한 병원균에 대해 용해 능력 뿐만 아니라 항균활성도 가지고 있음이 알려져 있다 (Raaijmakers *et al.*, 2010). 생물적 방제균 *Bacillus*균주가 생산하는 fengycins과 iturin CLPs들은 다양한 식물병원균 *Fusarium graminearum* (Wang *et al.*, 2007), *Colletotrichum dematium* (Hiradate *et al.*, 2002), and *Magnaporthe grisea* (Tendulkar *et al.*, 2007)의 생장을 억제한다고 알려져 있다.

식물관련 그람 음성균에서 많은 이차대사산물들은 acyl-homoserine lactone (AHLs)의 축적과 관련이 있는 quorum sensing에 의해 조절된다 (Whitehead *et al.*, 2001). LuxI 단백질은 AHL생합성에 관련된 유전자이고, LuxR단백질은 AHLs가 결합한 후에 transcript regulator로 작용한다고 알려져 있다 (Fuqura *et al.*, 2001). 식물관련 *Pseudomonas* species에서는 QS이 GacS/GacA regulatory system에 의해 조절된다고 알려져 있다 (Heeb and Haas, 2001).

토양과 물에 존재하는 *Chromobacterium violaceum*에서 AHLs은 violacein pigment, hydrogen cyanide, antibiotics, exoprotease, 및 chitinase 생산을 조절한다고 알려져 있다 (Chernin *et al.*, 1998; Morohoshi *et al.*, 2007). AHL 전자 조절자, CviR은 a chitinase, a type VI secretion-related protein, a guanine deaminase,뿐만 아니라 the AHL synthase, CviI을 암호화하고 있는 다양한 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있다 (Stauff and Bassler, 2011).

본 연구에 사용된 식물 뿌리 근권 정착균인 *Chromobacterium* sp. strain C61은 강한 생물적 방제 능력을 보이는 균주이다 (Kim *et al.*, 2008). *Chromobacterium* sp. C61와 다른 키틴 분해 미생물, 그리고 물리적인 방법과 경종적 방법을 이용하여 인삼에서 *Alternaria* blight와 탄저병을 성공적으로 방제하는데 활용되었고 (Kim *et al.*, 2010) 포자에서 고추 역병을 방제하는 성공적으로 활용되었다 (Kim *et al.*, 2008). 앞 절에 제시한 바와 같이 novel cyclic lipopeptide, chromobactomycin 가 chitin존재 유무에 의해 생성이 조절되고 생물적 방제에 있어서 중요한 물질로 밝혀졌다 (Kim *et al.*, 2014). 본 연구에서는 생물적 방제에 있어서 중요한 인자들이 AHL생성에 의해 조절되는 지를 알아보려고 수행하였다. 이러한 과정 중에 C61에서 생물적 방제에 관련된 중요한 유전자를 규명하였다.

2. 결과 및 고찰

가. C61 항균활성 상실 돌연변이주 분리 및 특성 규명

Chromobacterium strain C-61 균주는 50 µg/ml의 ampicillin이 함유된 nutrient broth (NB, Difco, Detroit, MI)배지나 Luria Bertani (LB)배지에서 28 °C에서 생육시켰다 (Sambrook et al. 1989). *Chromobacterium* C61 항균활성 돌연변이주를 선별하기 위해 Tn5-transposon PRL1063a를 이용하여 transposon이 무작위로 삽입된 약 2,000개의 돌연변이주 library를 조제하였다. 이 transposon은 kanamycin-resistance gene인 *nptII* 유전자와 promoterless-*luxAB* cassette를 지니고 있는 transposon이다(Wolk et al., 1991). Helper plasmid pRK2073 (spectinomycin resistance)을 지닌 대장균을 이용하여 transposon을 수용세균인 *Chromobacterium* sp. C61 strain (ampicillin resistance) 접합을 통해 옮겨주고, Tn5 mutants 돌연변이주들은 ampicillin과 kanamycin이 함유된 배지에서 선별하였다. *Chromobacterium* C-61의 Putative antifungal-deficient 돌연변이주들은 *Rhizoctonia solani* (KACC 40111)에 대한 항균활성을 potato dextrose agar (PDA) (Difco, Ditroit, MI) plates에서 28 °C에서 dual culture에 의해 선별하였다. 오이에 모 잘록병을 일으키는 *R. solani*균주는 Korea Agriculture Type Culture Collection Center (Suwon, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 항균활성 측정을 위해, *Chromobacterium* sp. C61 돌연변이주들을 PDA plates의 한 쪽 끝에 접종하고, plates들은 27 °C에서 병원 곰팡이와 dual culture을 하면서 5일 후에 곰팡이의 생장을 측정하였다.

야생형에 비해 *R. solani*에 대해 항균활성이 감소하거나 상실된 여러 개의 *Chromobacterium* sp. C61 돌연변이주들이 선별되었다. 이들 돌연변이주들의 생물적 방제에 중요한 인자 중의 하나라고 생각되는 extracellular chitinase생산량을 검정하였다. Chitinase생산은 0.2% colloidal chitin을 함유하고 있는 LB agar plate상에서 clear zone생성 유무로 검정하였고, extracellular protease from *Chromobacterium* sp. C61 돌연변이주는 0.7% skim milk 을 함유한 LB agar plates하에서 clear zone생성 유무로 검정하였다.

항균활성 돌연변이주들에서 transposon 삽입부위 부위의 flanking sequences을 염기서열 분석을 실시하였다. 돌연변이주의 genomic DNA는 Ausubel et al., 등이 기술한 CTAB-NaCl 방법에 의해 추출하였다 (1989). 추출한 돌연변이주들의 genomic DNA는 Tn5 - *nptII* sequence을 절단하지 않은 제한효소 *EcoRI*으로 절단하였고, dig-labelled pRL1063a probe와 Southern hybridization을 수행하였다. 돌연변이주의 transposon flanking 부위는 self ligation을 통해 recircularization시킨 후 대장균에 형질전환하였다. Transposon의 flanking sequence부위는 transposon pRL1063a의 끝부분의 primer left (5' -TAC TAG ATT CAA TGC TAT CAA TGA G-3') and right (5' -AGG AGG TCA CAT GGA ATA TCA GAT-3')를 이용하여 sequencing분석을 실시하였다. 염기서열 분석은 an ABI1301 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster city, CA)를 이용하여 Korea Basic Science Institute, Gwangju Branch에서 수행하였다. 항균활성 상실 돌연변이주 M28균주의 NCBI Blast program and Expsy 서버를 이용한 homology분석 결과 transposon은 *luxI* gene 부위에 transposon이 삽입되어 있음을 확인하였다. 한 개의 *luxI* homolog 부위가 *Chromobacterium* sp. C61 draft genome에서 확인되었다 (Fig. 1; Kim et al., 2011). *Chromobacterium* sp. C61 *luxI* Tn-5 mutant는 chitinase와 protease활성도 감소하였다 (표 1).

다른 항균활성 상실 돌연변이주 M1에는 Tn5이 *C. violaceum*의 *depD*와 상동성이 있는 유전자에 transposon이 삽입되어 있었다 (Fig. 1). *C. violaceum*에서 *depD* 유전자는 lipopeptide FK228을 생합성하는 operon의 한 유전자라고 알려져 있다 (Cheng *et al.*, 2007). C61 M1 돌연변이주는 야생형과 동일한 수준의 chitinase와 protease를 생산하였지만, chromobactomycin을 생산하지 않았다. 이러한 결과는 *Chromobacterium* sp. C61에서 *dep* operon이 식물병원곰팡이의 성장을 억제하는 주요 대사물질로 밝혀진 chromobactomycin(Kim *et al.*, 2014).의 생합성에 관련된 중요한 유전자군임을 나타내는 것으로 사료된다.

luxI mutant를 complementation시키기 위해서 *Chromobacterium* sp. C61의 *luxI* nucleotide sequence의 특이적이 primer를 디자인하여 이용하였다. Forward 5'-TCC ATG CCC TTG TCC CAA C-3', reverse 5'-AGA GCG CGT TGC CCT ATC TGC-3'. *Chromobacterium* sp. C61의 *luxI* 유전자가 존재하는 1,365 bp PCR product를 TA cloning kit의 pCRII vector (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA)에 클로닝하고, 염기서열 분석을 통해 확인한 다음, a broad host range vector pCPP45로 전이시켰다 (Han *et al.*, 2006). *Chromobacterium* sp. C16의 full-length *luxI* gene을 지니고 있는 1.4 kb PCR fragment가 클로닝된 pCPP45 공여체로 pRK2073을 지닌 대장균을 helper strain의 도움으로 *luxI* 돌연변이주를 triparental mating 방법에 의해 complementation하였다. Complemented *luxI* 돌연변이주는 tetracycline과 kanamycin저항성을 기초로 LB배지에서 선발하여 colony PCR을 통해서 *luxI* 돌연변이주에 *luxI* 유전자가 plasmid에 존재함을 *luxI* specific primer를 이용하여 검증하였다. Complemented *luxI* mutant 야생형 균주와 동일한 수준의 *R. solani*에 대한 항균활성과 extracellular chitinase와 protease를 생산하였다 (표 1).

나. *luxI* mutant에서 autoinducer생산 검증

Chromobacterium sp. C61세포에서 AHLs추출은 전에 발표한 논문에 기준하여 28 °C에서 50 ml LB broth에서 정체기까지 생육시킨 세포에서 분리하였다 (Park *et al.*, 2011). 정제된 AHLs C-18 reversed-phase silica TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany)에 spotting하였고, TLC plate는 ethanol/water (60:40, v/v)에서 전개한 다음, *Chromobacterium violaceum* CV026 indicator strain를 함유한 0.7% LB agar를 TLC 판에 도말하여 검출하였다. N-butyryl-L-homoserine lactone (C4), N-hexanoyl-homoserine lactone (C6), N-octanoyl-homoserine lactones (C8)를 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 standard로 이용하였다.

TLC를 이용한 생화학적 분석에 의해 *luxI* 돌연변이주에서는 AHLs 생성이 관찰되지 않았지만 (그림 2), complemented *luxI* strain에서는 AHLs생성이 과다발현되었고, 특히 C6 and C8 homoserine lactone, 하지만 C8 homoserine lactone은 C61 wild type 균주에서만 생성이 되었다 (그림 2). 이러한 결과는 선발된 *luxI* gene가 *Chromobacterium* sp. C61에서 주 homoserine lactone생합성에 유전자로 작용하고, 생물적 방제에 관련된 형질들도 quorum sensing에 의해 조절된다고 사료된다.

다. Quorum sensing이 chromobactomycin 생성을 조절 .

Chromobacterium sp. C61 야생형과 돌연변이주들로부터 Chromobactomycin 분리는 LB 배지에서 28 °C에서 36 시간동안 배양한 후 분리하였다 (Kim *et al.*, 2014). 동량의 ethyl

acetate (EtOAc)로 향균물질을 추출한 다음, extracts액을 SPE (Supelco Bellefonte, PA) silica gel cartridge columns을 통과시키고, a prep-HPLC system equipped with a Dionex P680 model dual pumps and a Dionex PDA-100 model photodiode array detector at 210 nm로 주입하였다 (Kim et al., 2014). HPLC column은 a μ -Bondapak C-18 stainless column (7.8×300 mm, 10 μ m film thickness)을 장착하여 분리하였고, chromobactomycin retention time 8.9 분에서 용출되었다 (그림 3). Chromobactomycin peak는 수집하여 농도는 a Varian model 500MS ion trap LC mass spectrometer (LC-MS) connected with a 212-LC Binary LC system (Varian, CA, USA) with a Prostar 335 photodiode array detector at 210, 260 and 280 nm으로 정량하였다. Chromobactomycin의 mass는 hybrid ion-trap time-of-flight mass spectrometer (LC-MS-IT-TOF, Shimadzu, Japan) equipped with an electron spray ionization (ESI) source in positive ion mode at a mass resolution of 10,000 full-width at half maximum를 이용하여 mass spectra를 결정하였다.

luxI 와 *depD* 돌연변이주들은 chromobactomycin를 분비하지 않았지만 (Kim et al., 2014; 그림 3) Complementation of *luxI* 는 야생형과 비슷한 수준의 Chromobactomycin을 생성하였다.. Q-TOF-MS quantification에 분석에 따르면 Chromobactomycin relative masses는 야생형은 $304 \pm 125 \times 10^4$, complemented *luxI* mutant는 $327 \pm 25 \times 10^4$, 그리고 *luxI* mutant는 $9.3 \pm 8.8 \times 10^4$ 로 정량되었다 (그림 3, 표 1).

라. *luxI* 돌연변이주에서의 *Dep* gene 조절

최근 본 연구팀에서 C61의 draft genome sequencing을 수행하여 본 결과 *C. violaceum* 에서 CLP 생합성에 관련된 operon과 유사한 *dep* operon이 지니고 있음을 확인하였다 (Kim et al., 2011). 이 operon에서 nonribosomal peptide synthase를 암호화하고 있는 *depA* gene가 첫 유전자로 cyclic lipopeptide, chromobactomycin의 생합성에 관련된 여러 개의 유전자들이 존재하였다 (그림 1). 따라서 quorum sensing에 의해 *dep* operon이 조절되는지를 RT-PCR분석을 통해서 수행하였다. 세균을 LB에서 late-log기까지 생육시킨 후 RNeasy Mini Kit와 RNA protect Bacterial Reagent를 이용하여 분리하였다 (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Reverse transcription PCR analysis은 QuantiTech SYBR Green RT-PCR kit를 이용하여 수행하였다 (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Reverse transcription을 위해 25 μ l 반응액을 50 °C에서 30 분 동안 수행하고 난 후, 특이적인 primer를 이용하여 RT-PCR를 수행하였다. specific *depA* primer; forward (5'-CGT CGC TGC GTT ACG CGT TG-3') and reverse (5'-CGG CGG TCA CTT TCA GCG T-3'). Specific primer set *Chromobacterium* sp. C61 16S rRNA gene, forward (5'-TGG CTC AGA TTG AAC GCT GGC GGC-3') and reverse (5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG-3')를 internal standard로 수행하였다. Stratagene Mx3000P qPCR system (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 35 cycles를 다음과 같은 프로그램으로 수행하였다. 94 °C for 15 s, annealing at 55 °C for 30 s and a 30 s extension step at 72 °C. 회사의 Software를 이용하여 RT-PCR분석을 수행하였고, end point PCR products 2% agarose gel electrophoresis에서 수행하였다. 야생형과 돌연변이주에서의 *depA* 유전자의 발현은 comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$ method)를 이용하여 수행하였다 (Livak and Schmittgen, 2001). 연구는 3반복을 수행하였고, standard deviation으로 표시하였다. 16S rRNA

gene의 transcript abundance를 대조구로 이용하였다. The *luxI* mutant에서 야생형보다 낮은 *depA* 발현량을 보였고, complemented *luxI* mutant에서 가장 높은 유전자 발현량을 보였다 (그림 4).

마. 야생형 C61와 *luxI* mutant에서의 생물적 방제능력

Chromobacterium sp. wild type과 돌연변이주들의 식물체에서 생물적 방제능력은 4가지 병원균을 이용하여 수행하였다 (Kim et al., 2001): 벼 도열병(*Magnaporthe grisea*), 벼 잎집무늬마름병 (*Rhizoctonia solani*), 토마토 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)와 밀 녹병 (*Puccinia recondita*). 식물체들은 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 비닐 포트에서 1 - 4주 동안 생육시켜 이용하였다. 식물체는 세균을 LB액체 배지에서 3일동안 배양한 배양액을 1:3으로 희석하여 처리하였다. 멸균수를 대조구로 이용하였고, Tween 20 (0.2%)을 처리하는 용액에 a wetting agent로 추가하였다.

처리 24시간 후에, 유묘 식물체들은 식물병원 곰팡이의 포자나 균사체를 처리하였다. 병원균을 처리한 pot들은 randomized complete-block design으로 배치하고, 각 처리구당 3반복을 수행하였고, 반복수당 9개의 식물체를 이용하였다. 병원균을 처리한 후 병원균에 따라 3일 - 7일 후에 발병을 측정하였다. 처리구 당 방제율은 $100[(A - B)/A]$, A = 대조구 발병율 and B = 처리구당 발병율을 수식을 이용하여 측정하였다. *luxI* 돌연변이주는 야생형이나 complemented *luxI* 돌연변이주를 처리한 식물체보다 생물적 방제능력이 현저히 감소하였다 (그림 5)

생물적 방제균들은 식물병원균의 생물적방제에 중요한 역할을 하는 다양한 항생물질을 생성한다고 알려져 있다 (Ongena and Jacques, 2007; Raaijmakers et al., 2010). 전장에서 기술한 바와 같이 본 연구에 사용된 *Chromobacterium* sp. C61의 생물적 방제에 novel cyclic lipopeptide, chromobactomycin가 중요한 역할을 수행할 것이라고 증명하였다 (Kim et al., 2014). Chromobactomycin는 CLP class 항생물질이었고 (Ongena et al., 2007; Raaijmakers et al., 2006) non-ribosomal synthesis (NRPS)에 의해서 합성될 것으로 추정되었다 (Furumai et al., 2002; Rajgolikar et al., 1998). 본 연구에서 항생물질 돌연변이주 M1에는 한 개의 Tn5가 *C. violaceum depD* gene (Cheng et al., 2007)와 유사한 C61의 non-ribosomal peptide synthase를 암호화하고 chromobactomycin합성에 관여하는 *depD* 유전자에 삽입되었음을 확인하였다. *C. violaceum*의 보고에 의하면 *depD* 유전자는 14개의 유전자(*depA*에서 *depN*)로 이루어진 *dep* operon의 한 유전자로 알려져 있다 (Cheng et al., 2007). 따라서 *Chromobacterium* sp. C61에서 chromobactomycin은 non-ribosomal synthesis (NRPS)에 의해서 생성되는 것으로 사료된다. 최근 C61 균주의 genomic analysis of C61을 통해서 C61가 *C. violaceum*에서 NRPS *dep* operon과 유사한 *dep* operon이 존재함을 확인하였다 (Kim et al., 2011). NRPS pathways는 *Bacillus*와 *Pseudomonas* strains에서 많은 CLPs생성에 관여한다고 알려져 있고, 다양한 식물병원균의 항균활성에 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다 (Furumai et al., 2002; Rajgolikar et al., 1998). Chromobactomycin의 항균활성은 *in vitro*에서는 확인하였지만, *in planta* 활성을 측정하기 위한 충분한 양을 확보하지는 못하였다.

본 연구에서 C61 *luxI* homolog 유전자자가 chitinase, protease, chromobactomycin과 항진균활성 관련에 중요한 역할을 하는 C6와 C8 AHLs생성에 관여함을 밝혔다. QS은 생물적

방제균에서 중요한 생물적 특징을 조절한다고 알려져 있지만, 본 연구가 처음으로 생물적 방제균인 *Chromobacterium* 속에서 밝힌 결과이다.

자연상태에서 생물적 방제는 여러 가지 요소가 관여하기 때문에 (Kim *et al.*, 2011), 생물적 방제에 관련된 다양한 경로가 다양한 환경조건에서 반응하고 상호작용하는지를 알아내는 것이 중요하다. 생물적 방제균 *P. chlororaphis* O6에서 pyrrolnitrin 생성과 생물적 방제 능력은 glucose와 같은 다양한 영양분의 존재에 따라 영향을 받았다 (Park *et al.*, 2011). 또한 polyketide antibiotic인 2,4-diacylphloroglucinol도 식물과 병원균에 영향을 받아서 발현이 조절된다고 알려져 있다 (Brazelton *et al.*, 2008; Raudales *et al.*, 2009). 따라서 C61에서 chromobactomycin 생성 또한 식물 기주 뿐만 아니라 다양한 영향에 의해 조절되는 지 밝히는 것이 중요할 것으로 사료된다.

Table 1. *Chromobacterium* sp. C61 에서 *luxI* 유전자의 돌연변이에 의한 *in vitro* 생물적 방제의 표현형 분석.

Strain	Inhibition of <i>Rhizoctonia solani</i> (mm) ¹	Chitinase activity (mm) ²	Protease activity (mm) ²	Production of chromobactomycin (x 10 ⁴) ³
wt	12.8 ± 0.8 a ⁴	6.0 ± 0.5 a	10.7 ± 0.6 a	303.7 ± 124.8 a
<i>luxI</i> -	0 b	3.8 ± 0.3 b	8.0 ± 0.6 b	9.3 ± 8.8 b
<i>cluxI</i> -	12.2 ± 1.3 a	6.2 ± 0.3 a	10.5 ± 0.5 a	326.7 ± 24.7 a

¹ *Chromobacterium* sp. C61 야생형 균주(wt), *luxI* 돌연변이주(*luxI*-), complemented *luxI* 돌연변이주(*cluxI*-)을 potato dextrose agar (PDA) plates 하에서 *Rhizoctonia solani*에 대한 생육 저지대를 5일 후에 측정하였다.

² 각 균주의 세포외 효소 생산 능력(chitinase와 protease)을 indicator plates에서 clear zone(mm)을 측정하였다.

³ 각 균주의 상등액에서 chromobactomycin 농도는 정제된 chromobactomycin을 기준으로 high-performance liquid chromatography(HPLC) 분석하였다(Kim et al., 2014).

⁴ 각 data는 3반복한 실험의 평균과 표준편차를 나타낸 것이다. 야생형 균주와 돌연변이주들의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test ($P < 0.05$)를 이용하여 유의성 분석을 수행하였다.

Tn5 flanking sequences of an antifungal deficient mutant

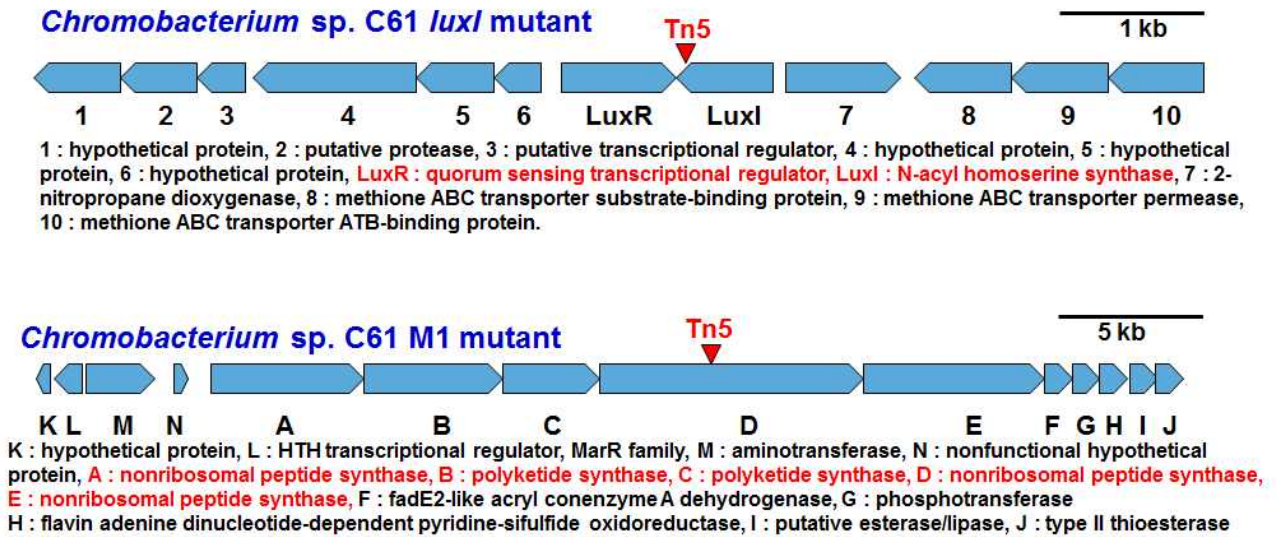


Fig. 1. *Chromobacterium* sp. C61의 항균활성 상실 돌연변이주들의 Tn5 flanking gene arrangement. 화살표 표시는 transposon Tn5가 삽입된 부위를 표시한 것임.

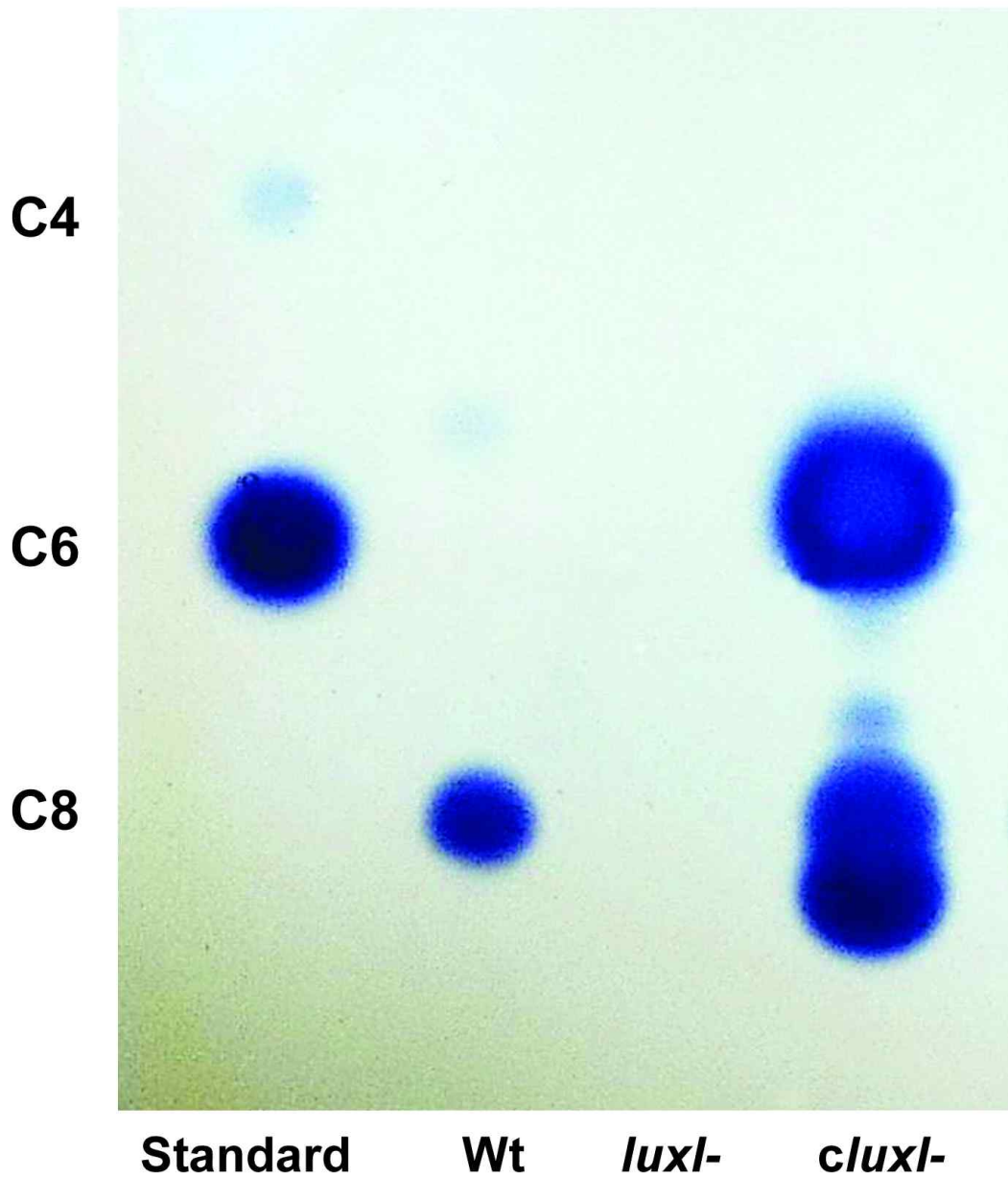


Fig. 2. *Chromobacterium* sp. C61 and *luxI* 돌연변이주들의 acyl homoserine lactone 생성. 야생형 균주(Wt), *luxI* 돌연변이주(*luxI*⁻), complemented *luxI* 돌연변이주(*cluxI*⁻)를 LB broth 배지에서 2일간 생육시켰다. 세포배양액에 존재하는 homoserine lactone은 indicator세균인 *Chromobacterium violaceum* CV026를 이용하였고, standards로 N-butyryl-HSL (C4), N-hexanoyl-HSL (C6), N-octanoyl-HSL (C8)을 이용하였다. 본 데이터는 3반복을 수행하였고, 동일한 결과를 얻었다.

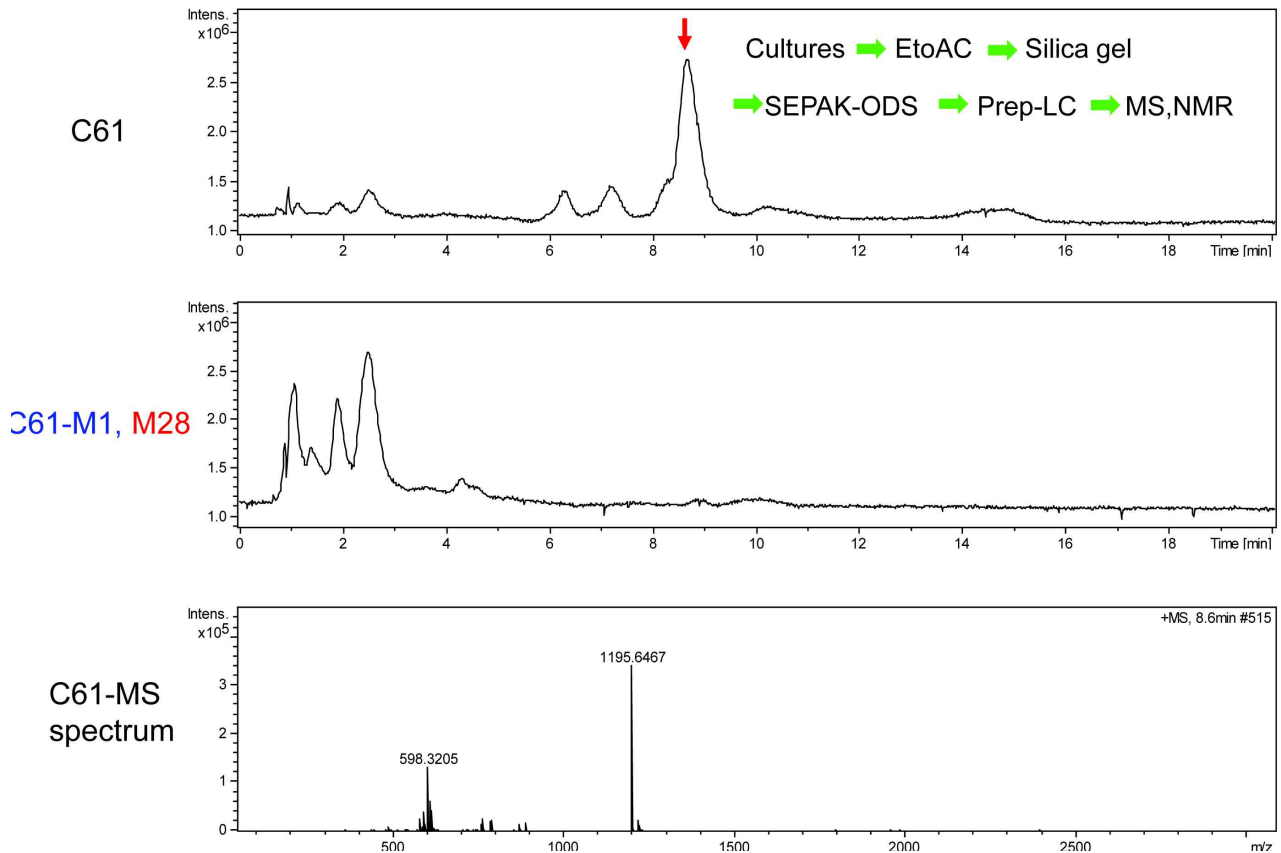


Fig. 3. *Chromobacterium* sp. C61 야생형과 돌연변이주에서의 chromobactomycin 생성. *Chromobacterium* sp. C61, *luxI* mutant (M1), *depD* mutant (M28) 상등액에서 ethyl acetate 추출 항생물질의 HPLC 분석. 유기용매 시스템은 0.1% trifluoroacetic acid을 첨가한 85% (v/v) aqueous methanol을 2.0 ml/min 조건하에서 분석하였고, peaks는 210 nm에서 관찰하였다. *Chromobacterium* sp. C61의 chromobactomycin peak는 화살표로 표시를 하였고, 물질을 정제하여 TOF-MS spectrum 분석에 이용하였음.

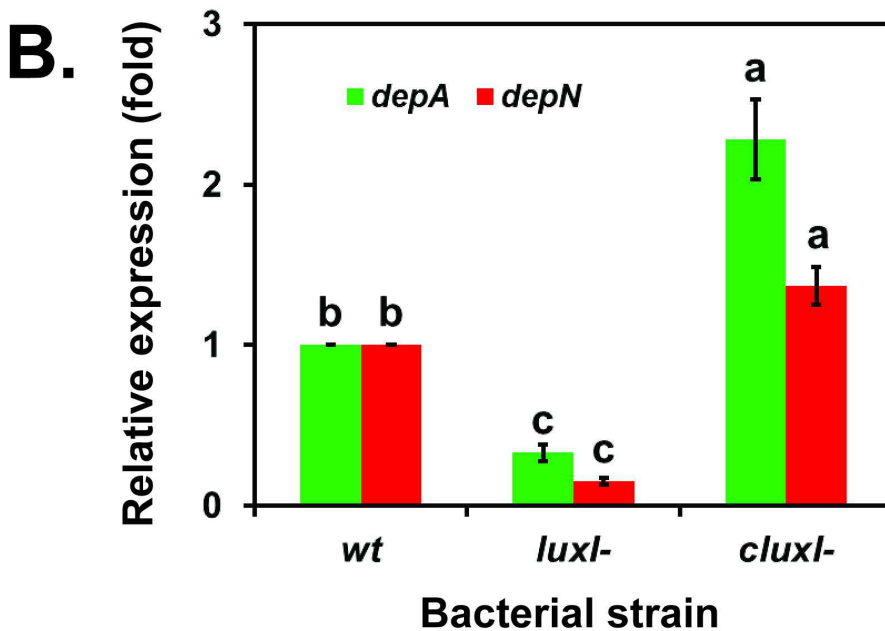
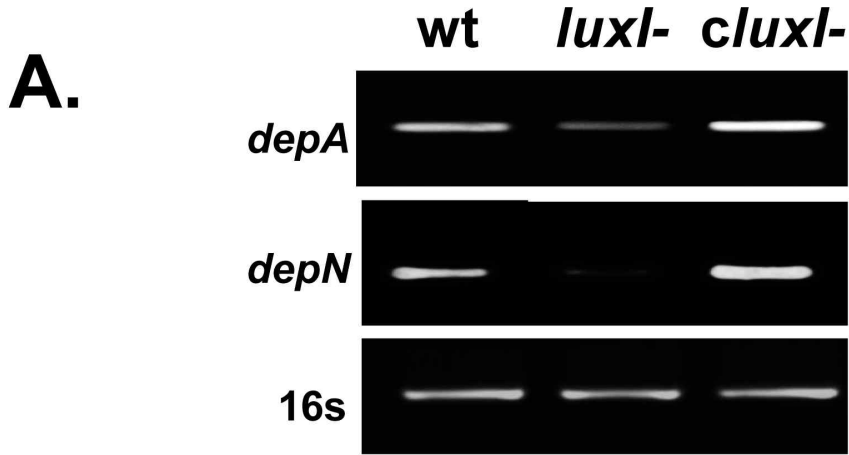


Fig. 4. *Chromobacterium* sp. C61와 *luxI*돌연변이주에서 *depA*유전자의 발현양상.

야생형균주, *luxI*돌연변이주(*luxI*⁻), complemented *luxI*돌연변이주 (*cluxI*⁻)를 LB broth배지에서 [optical density at 600 nm (OD₆₀₀ nm)=0.84]까지 배양한 균주로부터 total RNA를 추출하였다. RT-PCRs은 17 cycles 중지시켰고, PCR products를 2.0% agarose gel 전기영동한 후 ethidium bromide염색하여 관찰하였다(A). 3반복을 수행하였고, 동일한 결과를 얻었다. (B) *depA* 전사체의 발현량을 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법으로 정량하였다. 3반복을 수행하였고, 평균과 표준편차를 표시하였다. 서로 다른 글자를 가진 Data는 던컨 검정에 대한 유의성 검정 결과임($P < 0.05$).

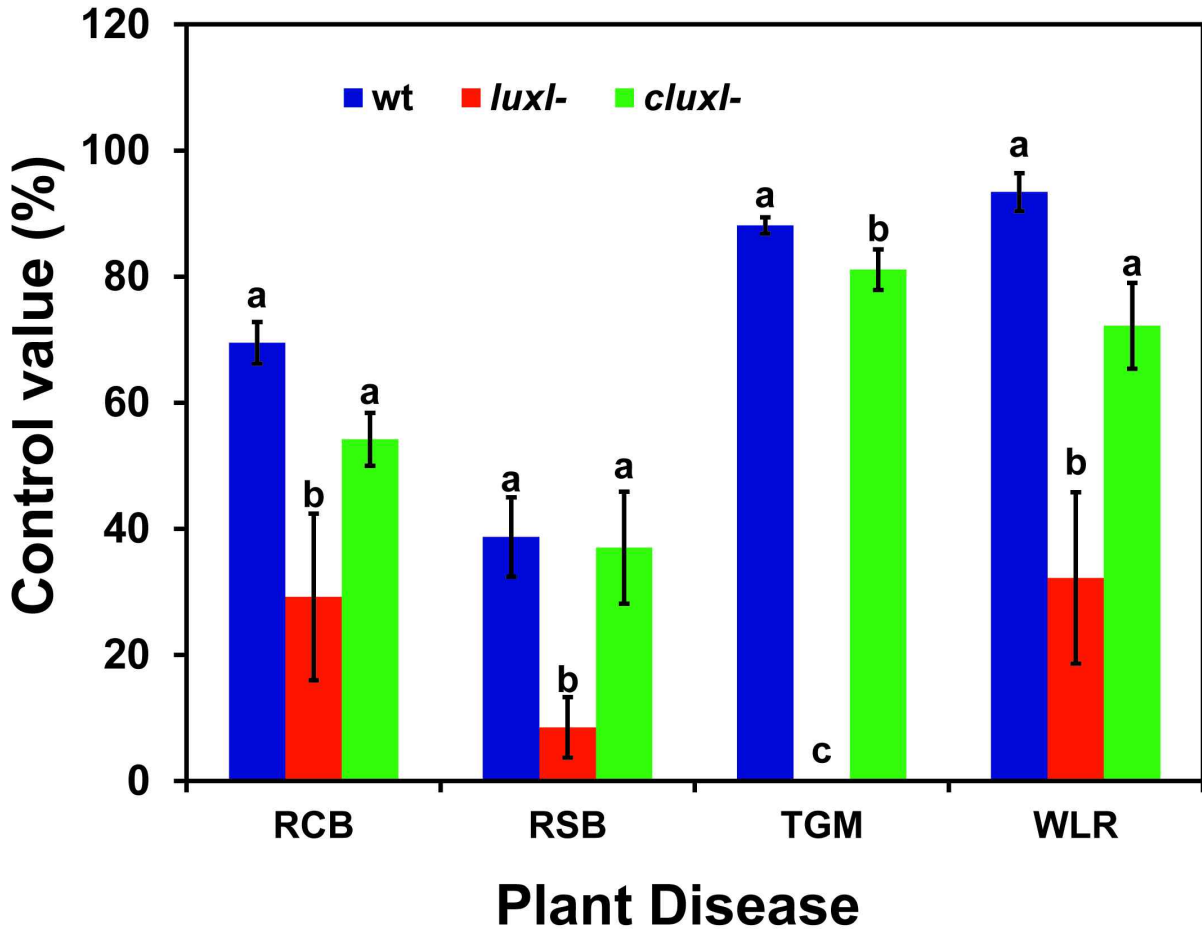


Fig. 5. *Chromobacterium* sp. C61와 *luxI*돌연변이주의 *in planta* 식물병 방제 효능. 야생형균주, *luxI*돌연변이주(*luxI*-), complemented *luxI*돌연변이주 (*cluxI*-)를 LB배지에서 3일간 생육시킨 배양액을 1:3으로 물로 희석하여 식물체 유묘에 살포하였고, 대조구로는 멸균수를 살포하였다. 각 처리구 살포 1일 후 각 병원균의 포자 현탁액이나 균사체를 처리한 다음 1-2주 후에 식물병 발생도를 측정하였다. PAN, 고추 탄저병; RCB, 벼 도열병; RSB, 벼 잎집무늬마름병; TGM, 토마토 잿빛곰팡이병; TLB, 토마토 역병; WLR, 밀 녹병. 각 데이터는 반복 당 9개의 식물체를 이용하였고, 3반복을 수행한 평균과 표준편차를 나타내었다. Bars에 서로 다른 글자로 표시된 것은 각 병원균 처리구에 의해 던컨 검정을 통해 $P < 0.05$ 수준하에서 유의성을 있음을 표시한 것이다.

제 4 절 키틴분해세균, 키틴 및 그들의 산물이 함유된 미생물제제에 의한 오이의 뿌리혹선충 방제

1. 서론 및 실험 배경

뿌리혹선충(*Meloidogyne* spp.)은 전 세계적으로 96종이 기술되었는데, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* 및 *M. hapla*의 4종이 약 95%를 차지하며, 3000종 이상의 식물을 침입한다(Rich *et al.*, 2008). 국내에는 6종의 뿌리혹선충이 서식하는데(Cho *et al.*, 2000) *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* 및 *M. hapla*의 3종이 문제시 되고, 기주식물로서 오이, 참외, 토마토, 고추, 배추, 인삼 등 24종이 보고되었다(Choi and Choo, 1978). 이러한 뿌리혹선충은 국내 시설재배 포장의 약 54%에 감염되어 있고, 밀도도 상당히 높은데(Cho *et al.*, 2000; Kim, 2001), 오이의 경우 정식 전 뿌리혹선충이 100cm³당 10마리 이상이면 수량이 약 39% 감소되는 것으로 알려져 있다 (Kim and Lee, 2008). 특히, 전남 순천 인근의 시설재배지역에서는 연중 내내 오이, 호박, 토마토 등을 재배하고 있기 때문에 뿌리혹선충에 의한 피해가 크다.

이러한 뿌리혹선충을 방제하기 위하여 유기합성농약이 많이 사용되어지고 있다. 그러나 유기합성농약은 인간의 건강뿐만 아니라 자연 환경을 파괴하기 때문에 사용이 금지되거나 제한되어 가는 추세이다(Abawi and Windmer, 2000). 이를 대체하기 위한 수단으로 태양열처리, 객토, 윤작 등을 실시할 수 있으나(Kim *et al.*, 2001) 비용, 노력 및 시간 등의 제약이 따른다. 또한 생물적 방제에 대한 연구가 많이 이루어졌는데(Kim *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013; Radwan *et al.*, 2012), 유기합성농약에 비하여 방제효과가 낮고 안정된 방제효과를 보여주지 못하는 실정이다(Lamovsek *et al.*, 2013). 따라서 유기합성농약의 사용을 줄이기 위해서는 방제효과가 더 높으면서도 더 적은 비용으로 생산될 수 있는 생물적 방제원의 개발이 필요하다.

선충에 길항하는 미생물들은 키틴분해미생물에서 많이 보고되었고, 이들은 주로 선충의 큐티클과 난각의 침입을 용이하게 수 있는 chitinase, protease 및 collagenase를 분비하거나(Khan *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2010), 선충을 죽이는 항생물질을 분비한다(Park *et al.*, 2004). 특히, 키틴은 선충 난각의 주요 구성성분으로서 chitinase는 난각을 분해하여 부화를 억제하고 (Min *et al.*, 2009), 그것의 생산은 키틴이나 키토산에 의해서 유도된다(Palma-Guerrero *et al.*, 2010). 또한 토양에 키틴을 첨가하면 키틴분해미생물들이 증가되어 선충이 억제되거나(Hallmann *et al.*, 1998) 키틴이 분해되면서 방출된 암모니아에 의해서 억제되고(Godoy *et al.*, 1983), 키틴의 유도체인 키토산은 선충을 직접 억제하는 것으로 알려져 있다 (Khalil and Badawy, 2012). 이러한 효과 이외에 키틴은 식물의 영양원으로 작용하고 식물의 성장을 촉진하며 식물의 방어반응을 유도하는 것으로 보고되었다 (Sharp, 2013). 따라서 키틴분해미생물과 키틴을 함께 처리하면 단독으로 처리했을 때보다 선충에 대한 방제효과가 더 좋고 (Mittal *et al.*, 1995; Tian *et al.*, 2000), 그러한 효과는 선충에 대한 억제와 식물에 유도된 저항성 때문이라는 보고도 있다(Kalaiarasan *et al.*, 2006). 따라서 선충 방제용 길항미생물들은 항생물질(독소), protease와 chitinase 등의 분비에 의한 직접적인 억제와 선충 인식부위의 방해, 영양분에 대한 경쟁, 식물에 대한 저항성 유도 등과 같은 간접적인 효과를 지닌다(Lamovsek *et al.*,

2013).

이러한 기작들에 근거하면 저희 연구팀에서 개발한 식물병 방제용 미생물제제는 뿌리혹선충의 방제에도 효과가 있을 것으로 생각된다. 즉, 이 미생물제제는 키틴분해미생물들을 키틴함유배지에서 배양한 액이기 때문에, 뿌리혹선충 방제에 기여할 것으로 판단되는 키틴분해세균, 키틴 및 키틴올리고당, chitinase를 비롯한 다양한 분해효소, 항균물질들이 들어 있다(Kim *et al.*, 2008, 2010; Kim *et al.*, 2014). 더욱이 미생물제제에 들어 있는 *Chromobacterium* sp. 균주는 감자시스트선충의 부화를 억제하고(Chronin *et al.*, 1997), *Lysobacter enzymogenes*는 뿌리혹선충을 비롯한 다양한 선충(Chen *et al.*, 2006), *Serratia plymuthica*는 뿌리혹선충을 억제하는 것으로 보고되었고(Alballay *et al.*, 2013), 이들로부터 다양한 항생물질, protease 및 chitinase 등도 보고되었다 (Dunne *et al.*, 1997; Frankowski *et al.*, 2001; Yuen *et al.*, 2006).

이 연구에서는 식물병 방제용으로 개발된 미생물제제가 뿌리혹선충의 방제에도 활용될 수 있겠는가를 알아보기 위하여 포트 상태에서의 방제효과를 확인하고, 포장에서 오이 정식일 부터 물 대신에 희석된 미생물제제를 살포하였을 경우의 예방효과와 뿌리혹선충에 심하게 감염된 오이에 미생물제제 원액을 살포하였을 경우의 치료효과를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 미생물제제의 조제와 뿌리혹선충의 증식

미생물제제는 3종의 키틴분해세균이 키틴+최소영양배지에서 배양된 액으로서 일반농가에서 직접 배양할 수 있는 500L용 미생물배양기(흙살림)를 이용하여 조제하였다(Kim *et al.*, 2008). 즉, 배양기에 물을 채우고 80 °C의 온도로 높여서 소독한 다음 키틴+최소영양배지(물 1L당 (NH₄)₂SO₄ 0.6g, KH₂PO₄ 0.8g, K₂HPO₄ 0.6g, MgSO₄·7H₂O 0.04g, 키틴 2g)를 넣었다. 여기에 28°C, 180rpm의 Nutrient broth에서 1일간 배양한 *Chromobacterium* sp. strain C-61, *Lysobacter enzymogenes* 및 *Serratia plymuthica*의 배양액 100ml 씩을 접종하고 28°C에서 10일 동안 배양하여 시험에 사용하였다.

뿌리혹선충은 전남 순천시 시설재배오이의 뿌리에 형성된 혹으로부터 알을 분리하여 오이가 심어진 포트에서 증식하여 시험에 사용하였다.

나. 뿌리혹선충에 대한 미생물제제의 방제효과 검정(포트 시험).

뿌리혹선충에 대한 미생물제제의 방제효과를 검정하기 위하여 순천대학교 구내 온실에서 포트 시험을 수행하였다. 시험은 뿌리혹선충을 접종한 토양에 미생물제제 처리구와 대조구로서 배지 처리구로 나누고, 뿌리혹선충을 접종하지 않은 토양에 배지를 처리하여 상호 비교하였다. 오이에서 증식된 뿌리혹선충은 새로운 상토와 혼합하여 플라스틱 포트에 넣었다. 여기에 발아 후 30일된 오이 유묘(장형낙합)를 포트 당 4주씩 심고, 각 주에 미생물제제 원액 또는 배지를 10일 간격 2회 처리하였다. 마지막 처리 10일 후 오이 줄기, 잎, 뿌리의 생육과 뿌리에 형성된 혹의 수, 토양에 있는 뿌리혹선충의 밀도를 비교, 분석하였다. 뿌리혹선충 밀도는 각 처리구로부터 토양시료를 채취하여 음건한 후 2 mm 표준체로 걸렀다. 체를 통과한 토양은 Sive and baermann funnel technique을 이용하여 선충을 분리하였다(Southey, 1986). 분리된 선충은 24-well culture plate에 옮겨 도립현미경(Leica. DMIL)하에서 뿌리혹선충 밀도를 조사하였다. 뿌리의 혹은 뿌리 5cm에 붙어 있는 수를 세어서 평균하였다. 모든 실험은 각 처리별로 3반복

수행하였다.

다. 뿌리혹선충에 대한 미생물제제의 예방 및 치료효과 검정(포장 시험).

전남 순천시 대대동 비닐하우스 재배단지에서 오이, 호박을 친환경적으로 재배하면서 뿌리혹선충에 피해가 심했던 600평의 포장을 선정하여 2012년 3월 23일에 오이 유묘 (장형낙합)를 정식하였다. 뿌리혹선충에 대한 미생물제제의 예방 효과를 검정하기 위하여 300평은 정식 후 미생물제제(75배 희석)를 1개월 동안 5일 간격으로 점적 관수하고, 나머지 300평은 동일 조건으로 물을 점적 관수하였다. 정식 일부터 한 달 간격으로 2개월간 오이의 초장과 근권의 선충밀도를 조사하고, 정식 3 개월 후 여러 위치에 분포하고 있는 주름잎의 뿌리혹선충 감염(뿌리혹 형성) 여부를 조사하였다.

뿌리혹선충에 대한 미생물제제의 치료 효과를 검정하기 위하여 정식 45일 후 무처리구에 서 뿌리혹선충에 의해서 생육이 현저히 낮은 지점의 오이들을 선정하였다. 이들 오이의 반은 미생물제제 원액을 10일 간격 3회 관주하고, 나머지 반은 동량의 물을 관주하여 10일 간격으로 오이의 초장, 생존율 및 근권의 선충 밀도를 조사하였다. 근권의 선충은 Sive and baermann funnel technique을 이용하여 분리 후, 80℃에서 중탕하여 사멸시켜 24-well plate에 옮겨 1ml씩 분주하고 도립현미경하에서 총 선충 밀도, 식물기생선충 밀도, 뿌리혹선충 밀도를 조사하고 식물기생선충도감[NAAS, 2001]과 비교하여 분류하였다.

3. 결 과

가. 포트 조건에서 뿌리혹선충 감염 오이에 대한 미생물제제의 방제효과.

뿌리혹선충을 접종한 토양의 오이에 미생물제제를 처리한 결과, 배지를 처리한 대조구에 비하여 잎, 줄기의 생육이 월등히 우수하였다. 그러나 뿌리혹선충을 접종하지 않은 토양에서의 생육 보다는 못하였다. 따라서 뿌리혹선충은 오이의 생육을 크게 억제하고, 미생물제제는 뿌리혹선충에 의한 생육 억제를 막아준다는 것을 알 수 있었다(그림 1A). 또한 본 미생물제제는 뿌리의 생육을 더 좋게 하고, 뿌리의 선충 흑도 더 적게 한다는 것을 알 수 있었다(그림 1B).

이러한 미생물제제가 어느 정도의 범위에 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 하나의 포트 내에 가장 왼쪽 첫 번째 1주에는 미생물제제, 그 나머지 3주에는 배지를 처리하였다. 그 결과, 첫 번째 1주는 매우 우수한 생육을 보여 준 반면에 2번째 주는 중간 정도의 생육, 3, 4번째 주는 아주 저조한 생육을 보였다. 즉, 첫 번째 주에 살포된 미생물제제가 2번째 주까지는 어느 정도 스며들어 영향을 미치나 3, 4번째 주에는 전혀 영향을 미치지 못한 것으로 판단되었다. 즉, 본 미생물제제는 직접 접촉되어야만 효과가 발휘될 수 있다는 것을 알 수 있었다 (그림 1C).

미생물제제가 토양의 뿌리혹선충에 미치는 영향을 알아보기 위하여 토양의 선충 밀도와 뿌리에 감염된 흑의 수를 조사하였다. 그 결과, 뿌리혹선충은 토양 100cm³ 당 미생물제제 처리구에서 61 마리, 배지 처리구에서 165.7 마리로서 미생물제제 처리에 의해서 약 63%가 감소되고, 뿌리의 흑은 5cm당 미생물제제 처리구에서 4.7개, 배지 처리구에서 8.2개로서 미생물제제를 처리함으로써 약 43%가 감소되었다(그림 2).

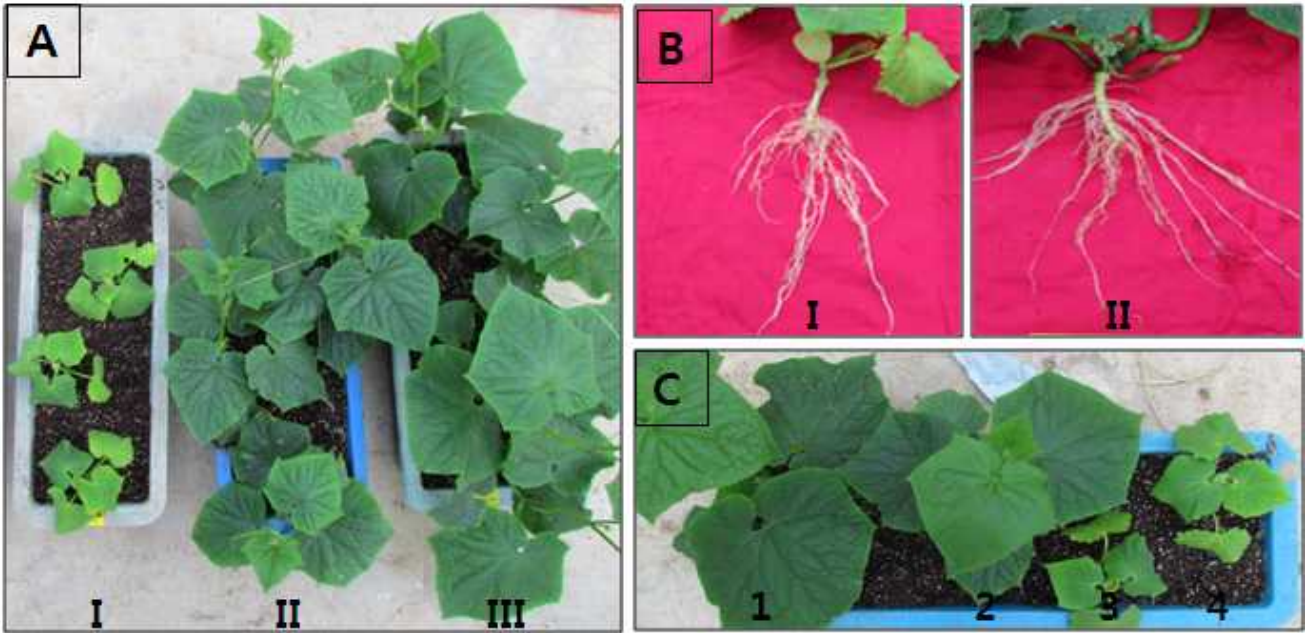


Fig. 1. Chitin분해 미생물 혼합물 처리에 의한 오이 식물의 성장(A, C), 뿌리혹(B) 억제 능력. 3가지 Chitin분해 미생물은 chitin이 첨가된 최소배지에서 생육시켰다. 미생물 배양액과 미생물 생육 최소배지를 대조구로 정식 후 2번 10일 간격으로 관주한 다음, 20일 후에 식물의 성장과 뿌리혹 형성량을 측정하였다. A와 B에서, I은 chitin최소배지를 II은 미생물배양액을 뿌리혹선충이 감염된 토양에 관주한 것이고, III은 뿌리혹선충이 감염되지 않은 토양에 관주한 것이다. C에서 1처리구는 뿌리혹선충이 감염된 토양에서 미생물 배양액을 관주한 것이고, 2, 3, 4 식물체는 키틴 최소배지만을 관주한 것이다.

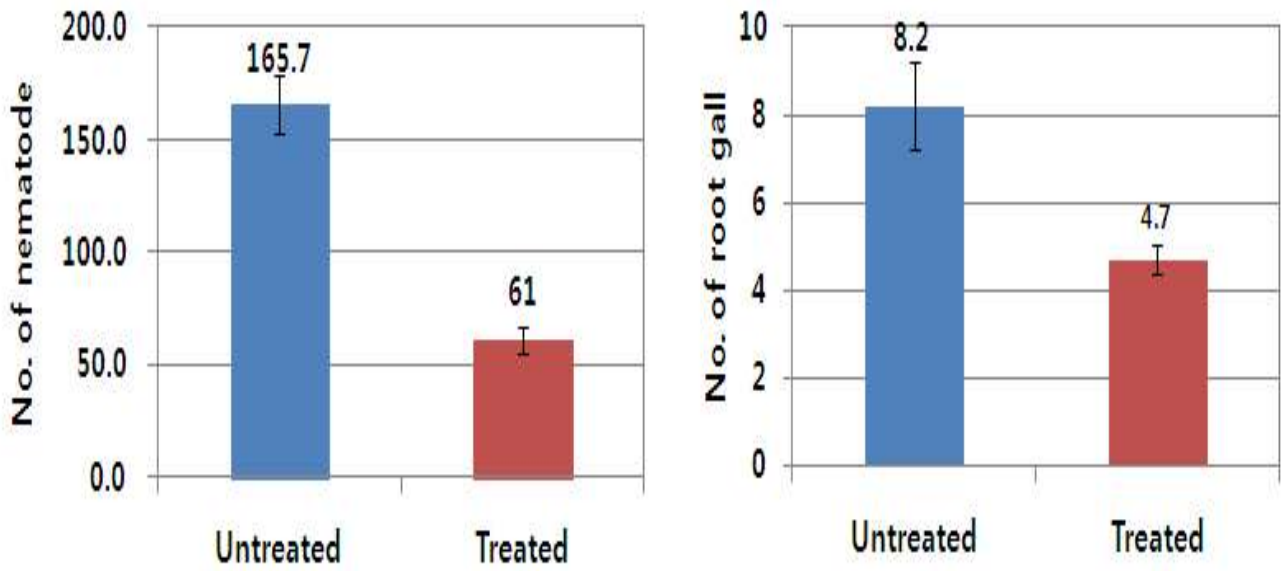


Fig. 2. Chitin분해 미생물 혼합물 처리에 의한 오이 뿌리혹선충의 밀도에 미치는 영향. 3가지 Chitin분해 미생물은 chitin이 첨가된 최소배지에서 생육시켰다. 미생물 배양액(treated)과 미생물 생육 최소배지(untreated)를 대조구로 정식 후 2번 10일 간격으로 관주한 다음, 20일 후에 오이 뿌리혹선충(A)과 뿌리혹수(B)를 측정하였다. 뿌리혹선충 수는 100cm³ 당 선충수를 측정 한 것이고, 오리 뿌리에서 뿌리혹수는 5cm 뿌리에 형성된 수를 측정한 것이다. 3반복을 수행하였고, 평균과 표준편차를 표시하였다.

나. 비닐하우스 재배 오이에서 뿌리혹선충에 대한 미생물제제의 예방효과.

비닐하우스재배 오이에서 뿌리혹선충에 대한 미생물제제의 예방효과를 알아보기 위하여 정식한 날부터 물 대신에 75배 희석된 미생물제제를 한 달간 점적 관수하고, 오이의 생육과 토양 속의 선충 밀도를 조사하였다. 그 결과, 미생물제제를 처리하면 물만 처리한 대조구에 비하여 오이의 초장은 정식 30일에 6.5%, 60일 후에는 10.1% 증가하고, 근권의 뿌리혹선충밀도는 정식 30일에 77.6%, 60일 후에 69.3% 감소되었다(표 1).

정식 3개월 후 오이 주변의 잡초(주름잎)에 뿌리혹선충이 감염(뿌리혹 형성)되어 있어서 미생물제제의 방제 효과가 어느 정도 범위에서 일어나는가를 알아보기 위하여 다양한 위치에서의 선충감염 여부를 조사하였다. 그 결과, 미생물제제가 충분히 살포되었을 점적호스 안쪽에서는 조사한 모든 뿌리 (47개)가 전혀 감염되어 있지 않았으나 미생물제제가 도달하지 않았을 점적호스 바깥쪽에서는 80% 정도가 감염되어 있었다. 한편 미생물제제가 처리되지 않은 대조구에서는 점적호스 안쪽에서 37.5%, 바깥쪽에서 34.7%가 감염되어 있었다. 따라서 미생물제제가 살포된 지역의 뿌리혹선충들은 살포되지 않은 인접지역으로 이동해 가는 것으로 판단되었다 (그림 3).

다. 비닐하우스 재배 오이에서 뿌리혹선충에 대한 미생물제제의 치료효과.

정식 45일 후경 물만 처리한 지역에서 뿌리혹선충에 심하게 감염되어 오이의 초장이 현저히 작은 곳이 군데군데 관찰되었다. 이러한 오이에 대한 치료효과를 알아보기 위하여 미생물제 원액을 10일 간격 3회 관주하고 오이의 초장 및 생존과 토양의 선충 밀도를 조사하였다. 오이의 초장은 첫 번째 처리 후 약 22%, 두 번째 처리 후 약 36%, 세 번째 처리 후 약 37% 증가하였다. 또한 무처리구에서는 죽은 식물이 나오기 시작하여 30일 후에는 37%가 고사되었는데, 미생물처리구에서는 한 주도 죽지 않았다. 근권에 분포하는 뿌리혹선충의 밀도도 미생물제를 처리함으로써 감소하였는데, 첫 번째, 2번째 및 3번째 처리 후 각각 37.9%, 68.3%, 81.6% 감소되었다 (표 2). 그러나 미생물제 처리에 의해서 회복된 오이의 생육이 뿌리혹선충에 감염되지 않은 다른 오이들에 비하여 왕성하지 못하였다.

라. 오이 뿌리혹선충에 대한 미생물제의 치료효과

비닐하우스 포장에서 뿌리혹선충에 의해서 생육이 현저히 낮은 지점의 오이를 선정하여 미생물제 원액을 10일 간격 3회 관주하고 오이의 초장, 생존율 및 토양의 선충수를 조사하였다(그림 3).

무처리구는 오이의 생육이 더디고 처리 30일 후에는 약 37.5%가 죽었지만, 미생물제 처리구에서는 생육이 진전되고 죽은 개체수도 없었다 (표 3). 또한 토양 속에 분포하고 있는 선충의 밀도도 미생물제를 처리함으로써 감소되었다 (표 4).

3종의 키틴분해세균(*Chromobacterium* sp. C-61, *Lysobacter engymogenes* 및 *Serratia plymuthica*)을 키틴이 함유된 최소기본배지에서 배양하여 오이의 뿌리혹선충에 대한 방제효과를 조사하였다. 이 배양액(미생물제)은 난의 부화에 영향을 미치지 않았지만 2령충을 더 빨리 사멸시키고, 그 살충율은 단일 균주보다 3균주의 배양액에서 더 높았다. 포트 조건에서 미생물제는 대조구에 비하여 오이의 생육을 증진시키고, 뿌리혹과 뿌리혹선충의 밀도를 감소시켰다. 비닐하우스에서 정식한 날부터 물 대신에 75배 희석된 미생물제를 5일 간격으로 6회 오이에 점적 관수하면, 오이의 생육이 촉진되고 뿌리의 흑이 현저히 감소되었다. 한편, 뿌리혹선충에 심하게 감염되어 생육이 저조한 오이에 미생물제 원액을 10일 간격 3회 토양 관주하였을 경우에는 오이가 죽지 않고 생육이 회복되었다. 따라서 본 미생물제는 오이 뿌리혹선충의 방제에 활용 가능하리라 판단되었다.

Table 1. 미생물 배양 처리에 의한 온실 하에서 오이의 생육 및 뿌리혹 선충의 밀도 변화.

Days after Transplanting	Plant height(cm)		Increase ^b (%)	No. of J2/100cm ³ soil		Reduction ^c (%)
	Treated	Untreated		Treated	Untreated	
0	19.2 ± 0.35	19.3 ± 0.53	- 0.5	26.3 ± 4.04	24.0 ± 7.94	-
30	55.5 ± 3.56	52.1 ± 3.76	6.5	19.7 ± 6.11	80.3 ± 10.02	77.6
60	127.8 ± 6.40	116.1 ± 9.58	10.1	59.3 ± 9.71	177.0 ± 19.23	69.3

- a 온실을 2개의 처리구로 구분하여, 한 개의 구역에는 미생물배양액을 처리하였고 (treated), 다른 한 구역은 물을 대조구로 처리하였다(untreated). 미생물 배양액은 물과 1:75로 희석한 다음 오이를 정식한 날로부터 (3월 23일)부터 5일 간격으로 점적 관수 호스를 통해서 6회 처리하였다.
- b 식물의 성장을 증가하는 다음의 공식에 의해서 측정하였다. [(처리된 오이의 신장-처리하지 않은 식물체의 신장)/처리하지 않은 오이의 신장]x100
- c 감소율은 Henderson과 Tilton의 공식 (1955)을 이용하여 측정하였다. 감소율 (%)=1-TaUb/TbUa x 100. Tb와 Ta는 미생물 배양액 처리구에서의 처리 전 (0일째) 혹은 처리 후 (30일, 60일)에 뿌리혹 선충 2령 유충의 수. Ub와 Ua는 대조구에서의 처리 전 (0일째) 혹은 처리 후 (30일, 60일)에 뿌리혹 선충 2령 유충의 수

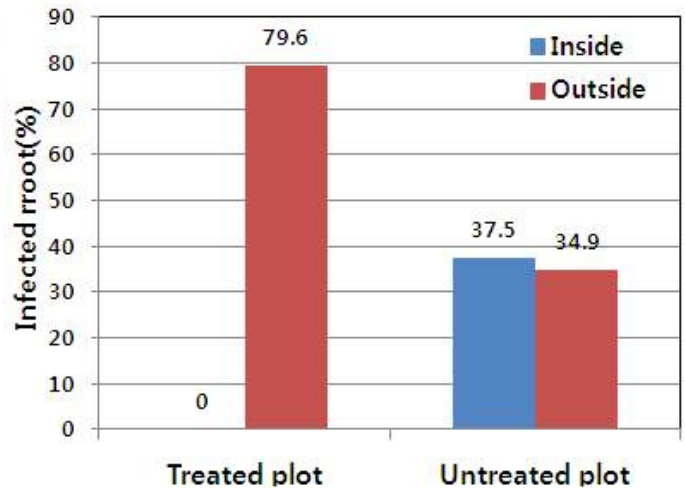


Fig. 3. 오이 포장에서 미생물 배양액을 처리한 구와 처리하지 않은 구에서 잡초(*Mazus japonicus*)에 형성된 뿌리혹수 형성. 뿌리혹에 감염된량은 감염된 식물 뿌리수/측정한 식물 뿌리수 x 100으로 측정하였다. Inside와 outside는 점적 관주 호스의 안쪽과 바깥쪽을 의미한다.

Table 2. 미생물 배양 처리에 의한 심하게 뿌리혹선충에 감염된 온실 하에서 오이의 생육 및 뿌리혹 선충의 밀도 변화.

Days after 1st treat	Plant height(cm)		Increase ^b (%)	Dead plant(%)		No. of J2/100cm ³ soil		Reduction ^c (%)
	Treated	Untreated		Treated	Untreated	Treated	Untreated	
0	51.4±5.95	50.7±6.77	1.4	0	0	171.9±12.31	162.9±13.16	-
10	67.4±5.03	55.1±7.27	22.3	0	5.0±5.00	124.6±22.46	190.0±25.01	37.9
20	87.2±6.69	64.0±8.53	36.3	0	13.3±2.89	87.7±15.00	262.5±24.75	68.3
30	91.3±7.48	66.8±6.78	36.7	0	36.7±7.64	72.8±13.95	376.0±80.76	81.6

a 뿌리혹선충에 심하게 감염된 오이 온실을 2개의 처리구로 구분하여, 한 개의 구역에는 미생물배양원액을 처리하였고 (treated), 다른 한 구역은 물을 대조구로 처리하였다(untreated). 미생물 배양원액을 5월 8일부터 10일 간격으로 점적 관수 호스를 통해서 3회 처리하였다. 첫 처리한 후 10일 간격으로 조사를 수행하였다.

b 식물의 성장을 증가하는 다음의 공식에 의해서 측정하였다. [(처리된 오이의 신장-처리하지 않은 식물체의 신장)/처리하지 않은 오이의 신장]x100

c 감소율은 Henderson과 Tilton의 공식 (1955)을 이용하여 측정하였다. 감소율 (%)=1-TaUb/TbUa x 100. Tb와 Ta는 미생물 배양액 처리구에서의 처리 전 (0일째) 혹은 처리 후 (30일, 60일)에 뿌리혹 선충 2령 유충의 수. Ub와 Ua는 대조구에서의 처리 전 (0일째) 혹은 처리 후 (30일, 60일)에 뿌리혹 선충 2령 유충의 수



(무처리구)



(처리구)

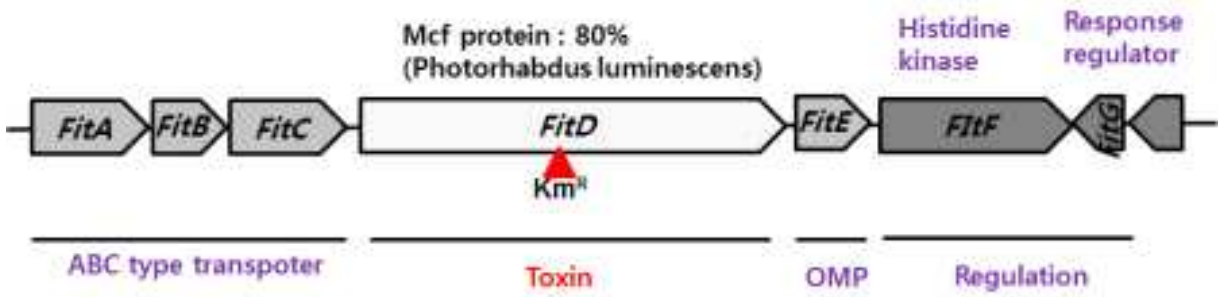
Fig. 4. 비닐하우스에서 오이 뿌리혹선충에 대한 미생물제의 치료효과 (처리 후 30일). *동일 포장내에서 선충에 감염되어 생육이 부진한 오이 선택→미생물제 10일 간격, 3회 관주→ 처리 후 10일 간격, 오이의 초장, 생존율 및 토양의 선충수 조사.

제 5 절 *Pseudomonas chlororaphis* O6와 *P. fluorescens* Wayn1R 미생물의 살선충 관련 유전자 분리 및 기능 분석

살 선충 효능이 밝혀진 *P. chlororaphis* O6균주와 *P. fluorescens* Wayn1R균주의 살선충관련 기작을 규명하기 위해 두 균주의 genome sequence에서 살선충에 관련되어 있을 것으로 생각되는 유전자들을 target으로 클로닝하고 돌연변이주를 조제하여 살선충 효능을 야생형 균주와 비교하였다. 또한 이들 target유전자들을 추가로 각 균주의 specific target QC마커로 이용하였으며, 각 균주의 배양이나 제품 제형화 시 유해미생물의 존재 여부도 PCR 마커와 생화학적 선택배지 등을 이용하여 측정하였다.

1. *P. chlororaphis* O6균주의 살선충 관련 유전자의 선발 및 살선충 효능 검증.

P. chlororaphis O6의 살선충 관련 물질을 규명하기 위해 O6균주의 genome sequence가 완료되어 candidate 유전자를 선발하였다. 기존의 본 연구실에서 발표한 논문에 기초하여 Global regulator인 GacS에 의해 조절되는 hydrogen cyanide(HCN, Lee et al., 2011)와 최근 살선충 및 살충 능력이 있는 것으로 보고된 살충 단백질 FitD를 살선충 원인물질임을 규명하기 위해 각 물질생산 돌연변이주를 조제하였다. FitD 살충 toxin유전자는 일부 *Pseudomonas*에만 존재하면 배추좀나방, 담배박가시나방, 파밤나방의 유충에 살충 효능이 있다고 알려져 있다. O6의 genome sequence분석을 통해 FitD 살충 독소 유전자가 operon내에 존재하였고, hydrogen cyanide생합성 operon이 존재함을 확인하였다 (Fig. 2). 각 유전자의 돌연변이주를 조제하기 위해 Ez-Tn transposon을 이용하여 *in vitro* mutagenesis방법을 통해 *fitD* 유전자의 open reading frame과 hydrogen cyanide생합성 유전자 *hcnB*의 ORF에 transposon이 삽입된 클론들을 선발하여, marker exchange vector인 pEX18-TC에 옮긴 후, *P. chlororaphis* O6균주에 triparental mating을 통해 형질도입시켰다. 각 유전자의 돌연변이주는 LB agar배지에서 5% sucrose와 kanamycin이 첨가된 배지에서 선발하여 최종 FitD돌연변이주와 HcnA 돌연변이주를 조제하였다 (그림 1). HcnA돌연변이주는 야생형 3.4 kb full length *hcn* operon (*hcnABC*)를 PCR primer를 조제하여 증폭한 다음, broad host range vector인 pCPP45 벡터에 클로닝하여 HcnA돌연변이주의 complementation에 사용하였다.



Hydrogen Cyanide

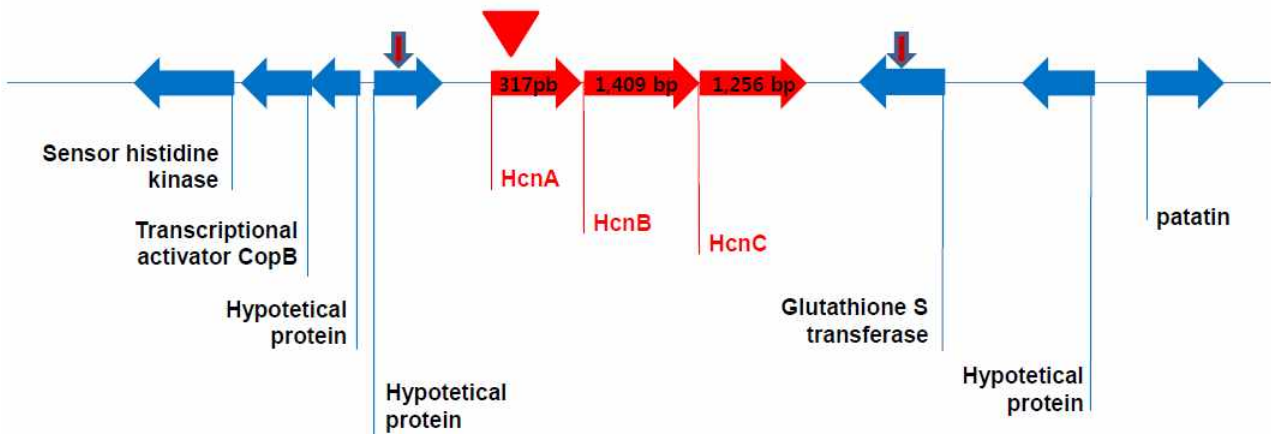


Fig. 1. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주의 살선충 관련 유전자(*fitD* operon과 *hcn* operon)의 배열과 돌연변이 부위 (▼).

P. chlororaphis O6균주의 FitD돌연변이주의 살선충 활성을 야생형 균주와 비교해 보기 위해 성주 참외에서 채집한 뿌리혹에서 선충의 알을 부화시켜 2령 유충에 처리하여 살선충율을 비교하였다. 야생형 O6배양균주는 1:100으로 희석한 처리구에서도 100% 살선충율을 보인 반면에, FitD돌연변이주의 배양액은 원액에서만 100% 살선충율을 보이고, 1:10이나 1:100희석한 배양액에서 살선충 능력이 상실되었다. 대조구로 사용한 살선충활성이 있다고 알려진 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*도 1:20배양액에서 살선충을 나타냈다. 이러한 결과는 O6균주의 살 선충율은 기존에 보고된 Bt균에 비해 살선충활성이 높았으며, FitD가 살 선충활성에 중요한 독소로 작용한다는 것을 알 수 있었다. 하지만 FitD돌연변이주의 배양원액에서도 100% 살 선충활성이 나타났다.

이와는 반대로 HcnA돌연변이주는 배양원액의 *in vitro*배양 원액의 살선충율이 야생형, FitD돌연변이주, Complemented HcnA돌연변이주보다 감소하였다. 야생형 균주와 FitD돌연변이주의 경우는 90% 이상의 살 선충율을 보인 반면, HcnA돌연변이주는 약 30%정도의 살 선충율을 보여 현저히 살 선충율 감소를 보였다 (그림 2).

이러한 결과는 아마도 FitD와 HCN이 살선충 활성화에 중요한 물질로 작용하고, HCN는 빠른 시간내의 살선충 활성화에 중요한 역할을 하지만, FitD독소는 선충의 장내에서 균주 증식하여 장내 환경내에서 생산되어 서서히 살선충 활성을 나타내는 중요한 물질로 추정된다.

P. chlororaphis O6 야생형 균주를 glycine이 첨가된 배지에서 생육시켰을 때는 HCN의 생산량이 증가함으로 살 선충 효능이 증가될 것으로 생각되어 다양한 조건하에서 균주들을 생육시킨 후 그들의 살 선충율을 비교하였다. 동일한 농도의 야생형 균주를 glycine이 첨가된 KB배지에서 생육시킨 배양액은 glycine을 첨가하지 않은 배지에서 생육시킨 배양액보다 살 선충율이 유의성이 있게 높았다. 이러한 결과는 glycine이 첨가된 배지에서 생성된 HCN이 살 선충에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되었다. 이러한 추정은 HCN돌연변이주가 살 선충활성이 상실되는 결과로 증명되었다 (그림 3). HCN이 생성되지 않은 GacS돌연변이주에서도 살 선충능력이 상실되었다. Complemented HCN돌연변이주는 야생형과 비슷한 정도의 살 선충활성을 보였다. 하지만 FitD돌연변이주에서는 살 선충율이 야생형과 비슷한 정도로 나타났다. 본 연구에서 사용된 살 선충율의 조건은 1-3시간동안 관찰한 것으로 HCN이 짧은 시간에 살 선충에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

이러한 결과는 아마도 FitD와 HCN이 살선충 활성화에 중요한 물질로 작용하고, HCN는 빠른 시간내의 살선충 활성화에 중요한 역할을 하지만, FitD독소는 선충의 장내에서 균주 증식하여 장내 환경내에서 생산되어 서서히 살선충 활성을 나타내는 중요한 물질로 추정된다.

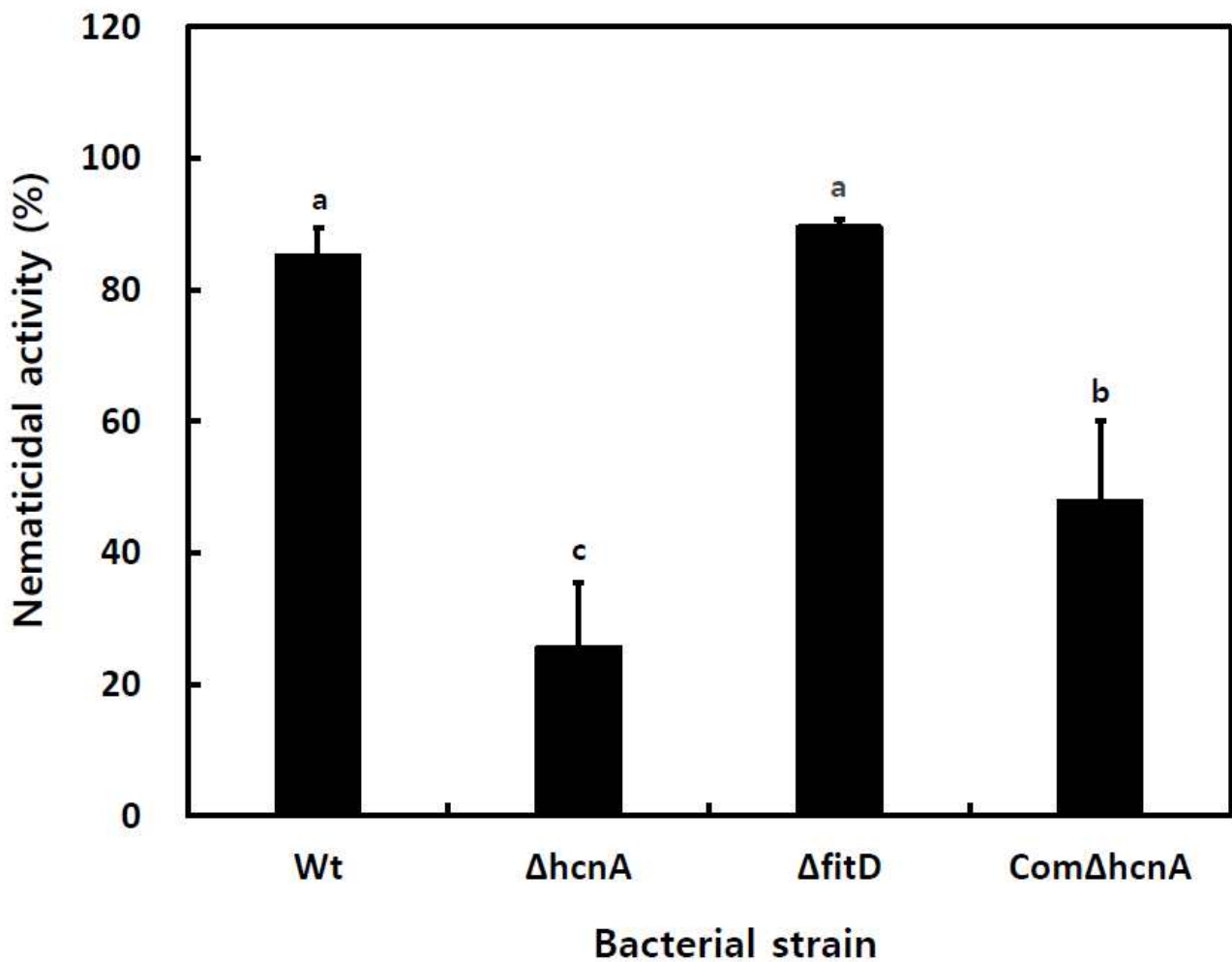


Fig. 2. *Pseudomonas chlororaphis* O6야생형 균주와 FitD독소 돌연변이주와 HcnA돌연변이주 배양액의 살선충 능력. 각 균주들은 KB배지에서 48시간 동안 생육시킨 후 멸균수로 100배 희석하였다. *In vitro* 조건하에서 분리된 선충을 적어도 100마리씩에 동일한 양의 균주들을 처리하였다. 균주 처리 후 3시간 이후에 살 선충율을 현미경하에서 측정하였다.

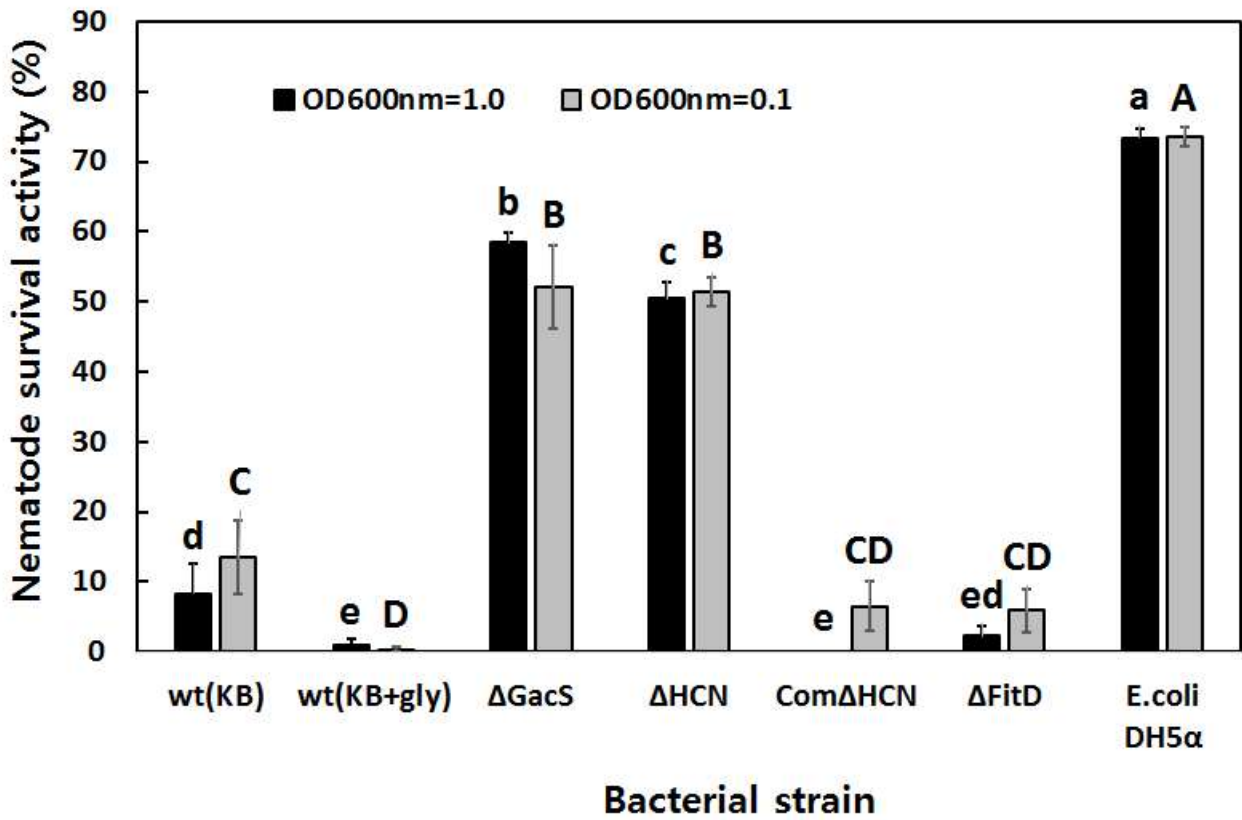


Fig. 3. *Pseudomonas chlororaphis* O6야생형 균주와 FitD독소 돌연변이주와 HcnA돌연변이주. 배양 조건이 다른 배양액의 살 선충 능력. O6균주의 돌연변이주와 complemented 돌연변이주는 KB에 glycine(KB+gly)배지에서 3일 동안 배양한 배양액을 OD600nm로 1.0과 0.1로 멸균수를 이용하여 맞춘 후 살아있는 선충의 수를 측정하여 *in vitro*에서 살 선충율을 조사하였음.

Pseudomonas fluorescens Wan1R균주는 2협동과제에서 사용하고 있는 NJ134균주와 같이 2,4-diacetylphloroglucinol(DAPG)를 생성하여 다양한 균주에 항균활성을 가진 균주로 알려져 있으면, 이들 DAPG가 뿌리혹선충의 살유충 효능이 있다고 알려져 있다. 따라서 다양한 항균활성 돌연변이주를 선별하기 위해 transposon인 Ez-Tn를 이용하여 다양한 항균활성 돌연변이주를 분리하였다. 그 중 항균활성이 상실된 2개의 균주를 선별하였고, 항균활성이 증가한 1개의 돌연변이주를 최종 선별하였다. 이들 돌연변이주들의 Tn5 flanking sequence를 분석하여 본 결과, 2F 돌연변이주에는 acetylglutamate kinase 유전자가 돌연변이되었고, *phlD* 돌연변이주에는 DAPG를 생합성하는 operon중의 하나인 *phlD* 유전자에 돌연변이가 되었다. 항균활성이 증가한 돌연변이주인 4F 돌연변이주는 Na²⁺/H⁺유전자에 돌연변이가 되었다. *PhlD*돌연변이주를 제외한 2F와 4F돌연변이주는 야생형 유전자를 PCR를 이용하여 증폭하여 broad host range 벡터인 pCPP46를 이용하여 complemented 2F와 4F 돌연변이주를 조제하였다. 조제된 돌연변이주들의 항균활성을 알아보기 위해 모잘록병균인 *Rhizoctonia solania*와 2협동과제에서 이용되고 있는 토마토 시들음병균인 *Fusarium oxysporum*에 대한 항균활성을 PDA배지에서 대치 배양을 통해 측정해 본 결과, DAPG를 생산하지 못하는 *PhlD*돌연변이주는 두 병원균의 생육을 억제하지 못하였고, 2F돌연변이주도 항균활성이 유의하게 감소하였다. 4F돌연변이주의 경우, *R. solani*에 대한 항균활성은 야생형 균주에 비해 크게 증가하였지만, *F. oxysporum*에 대한 항균활성은 야생형 균주가 차이가 없었다. 야생형 유전자로 complement한 2F돌연변이주에서는 상실된 항균활성이 야생형 수준으로 회복된 반면, complemented 4F돌연변이주의 경우 *F. oxysporum*에서는 항균활성이 감소하였으나, *R. solani*에 대해서는 항균활성이 야생형 수준으로 회복되지 못하였다 (표 1).

조제된 *P. fluorescens* Wayn1R 돌연변이주와 야생형 균주의 살선충 활성을 참외 뿌리혹선충의 2령 유충과 2협동과제에서 이용되고 있는 토마토 시들음병에 대한 방제능력을 조사하였다. 야생형 균주와 각 돌연변이주를 KB배지에서 배양한 다음 멸균수로 1:10으로 희석하여, 건전한 방울 토마토 유묘(40개체씩)에 10ml씩 관주하여 처리한 다음, 12시간 후에 토마토 유묘를 토마토 시들음병 이병토에 정식하여 시들음병 발병지수를 조사하였다 (그림 4). 항균활성을 상실한 모든 돌연변이주에서 뿐만 아니라 항균활성이 증가한 4F돌연변이주도 토마토 시들음병 방제 능력이 현저히 감소하였으면, complement한 돌연변이주들은 토마토 시들음병에 대한 방제능력이 야생형 수준으로 회복되었다 (그림 4).

DAPG생성 돌연변이주 *PhlD*균주는 참외 뿌리혹선충에 대한 살선충활성이 완전히 상실되었지만, 다른 항균활성 돌연변이주들의 경우는 살 선충활성이 감소하거나 증가하여 DAPG가 살 선충활성에 중요한 역할을 수행함을 증명하였다 (그림 5). 그 이유로 *PhlD*돌연변이주에서만 DAPG가 생성이 되지 않았으며, 2F와 4F돌연변이주에서는 DAPG의 생산이 야생형 균주와 차이가 없었다(그림 5). 이러한 결과는 생물적 방제균인 *P. fluorescens* Wayn1R이 생산하는 DAPG가 항균활성 뿐만 아니라 살 선충활성에도 중요한 역할을 수행함을 증명한 것이다.

Table 1. *Pseudomonas fluorescens* Wayn1R과 항균활성 돌연변이주의 항균활성

Bacterial strain	Inhibition size of the pathogen (mm)	
	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
Wayn1R WT	5.01±0.26	6.77±1.27
2F M	2.41±0.63 **	0.07±0.05 **
2F Com	6.21±0.51	7.07±1.51
4F M	10.36±0.77 **	6.45±1.48
4F Com	9.48±0.49 **	2.25±2.8 **

각 균주의 유의성 검정은 ANOVA 분석에 의해 수행하였고, 각 균주별 CFU per/ml는 Duncan's multiple range test (**, $P < 0.01$)를 이용하여 유의성 분석을 수행하였다. 각 data는 3반복한 실험의 평균과 표준편차를 나타낸 것이다.

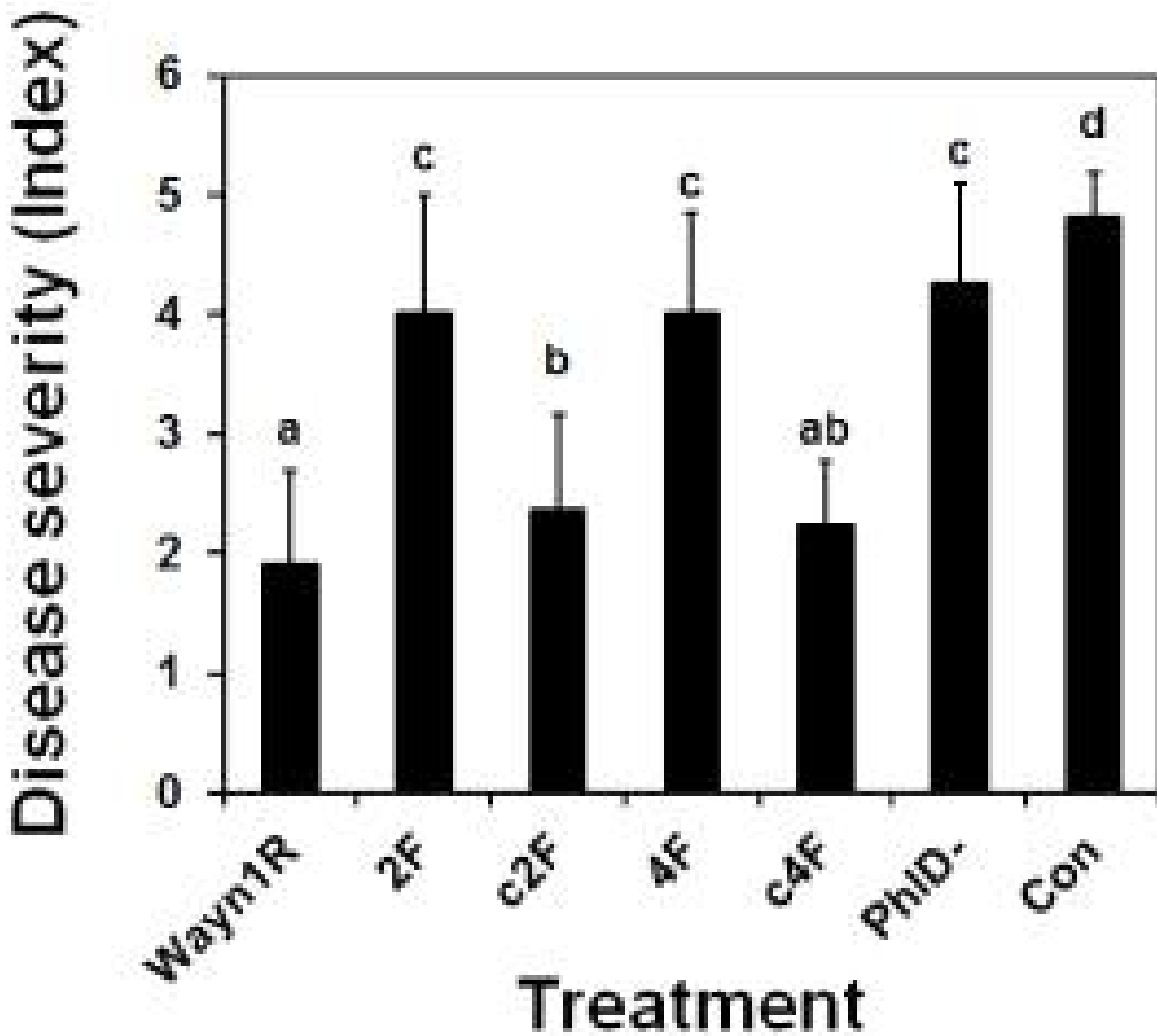


Fig. 4. DAPG생산 *Pseudomonas fluorescens* Wayn1R균주와 항균활성 돌연변이주들의 토마토 시들음병 방제능력. 각 균주를 KB배지에서 배양한 후 배양액을 토마토 시들음병균에 감염된 토양에 이식한 토마토에 토양 관주하여 처리하였다. 병원균 처리 4주 후에 토마토 시들음병의 발병지수 (1-5)를 측정하였다. 각 실험은 처리구별 30개의 식물체를 가지고 2반복하였다.

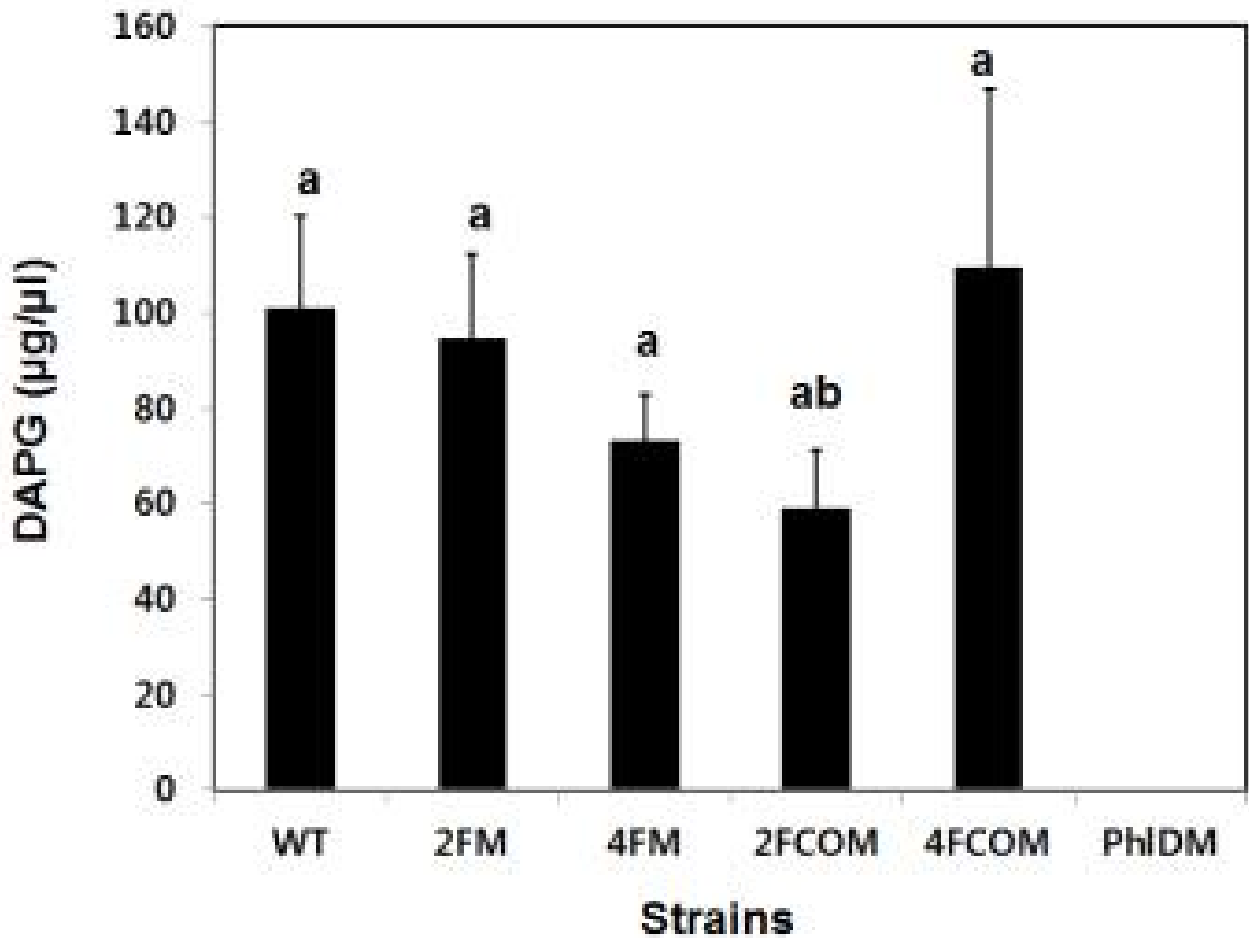


Fig. 5. *Pseudomonas fluorescens* Wayn1R균주와 항균활성 돌연변이주들의 2,4-diacetyl phluoglucinol 생산 능력 비교. 각 균주들은 KB배지에서 48시간 동안 생육시킨 후 유기용매로 추출하여 DAPG를 추출한 다음, 각 균주가 생성한 DAPG의 양을 HPLC를 이용하여 정량하였다.

제 6 절 식물선충 방제용 선발 미생물의 제형화 및 최적 제형 선발

1. 다양한 제형화 및 균주 보존성 검정

O6균주와 Wayn1R균주의 액제, 유화제 분말 수화제 등의 제형화 방법을 확립하고 제형화별 균주 보존성을 검정을 실시하여 시제품 제작의 최적 제형화 방법을 확립하였다.

가. 살선충 미생물의 제형화

살선충이 확인된 *Pseudomonas chlororaphis* O6, *Chromobacterium* sp. C61, *Serratia plymuthica* C-1균주의 최적 제형화 조건을 확립하기 위해 액상과 동결건조의 두가지 조건으로 제형을 조제하여 균주의 생존율을 측정하였다. 각 균주의 액상 제형화를 위해서는 Dual culture방법으로 10가지 배양배지로 배양을 한 각 균주들을 2차 배지조건에서 재 생육시켜 각 균주의 생존율을 6개월 이상 상온에서 보관하면 최적 액상 배지 조건을 확립하였다.

O6균주의 경우 저영양배지인 배지 2에서 dual culture하여 보관한 균주에서 10^8 생균수/ml이상의 생균수가 6개월 정도 유지하였으며, 배지 6과 10에서도 5×10^7 생균수/ml의 농도로 유지되었다 (그림 1). 키틴 분해 미생물인 C-61과 C-1균주에서도 배지 2에서만 10^8 생균수/ml이상을 유지하였으며, 공시한 다른 배지를 이용하였을 때는 생존수가 현저히 감소하였다.

곡성생물방제 연구원의 제형화 시설을 이용하여 확립된 균주의 시제품을 제작하였다. O6균주의 종균배양 단계와 조건 및 동결건조 조건을 아래의 자료에 준하여 실시하였다.

종균배양 단계	배지	배양조건
1차 종균배양	LB 배지	50 ml/250 ml baffled flask, 30℃, 130 rpm, 12hrs
2차 종균배양	LB 배지	300 ml/2000 ml baffled flask, 30℃, 120 rpm, 10hrs
3차 종균배양(본배양용)	아래표 참조	2번 항목 참조

	30 L/50L 발효기	3,000L/5,000L 발효기
Proteose Peptone #3	50 g	3,000 g : 0.1%
K ₂ HPO ₄	30 g	1,800 g : 0.06%
ZnSO ₄ *7H ₂ O	10 g	600 g : 0.02%
mannitol	100 g	18,000 g : 0.6%
Sucrose		12,000 g : 0.4%
분말대두	150 g	9,000 g : 0.3%

- 본배양용 종균 배양조건 : 27°C, pH6.5~7.5, 150 rpm, 9 L air(0.3 vvm) - 배양시간 : 24시간

3. 본배양

본배양 부피 : 3,000 L - 본배양 조건 : 27°C, pH6.5~7.5, 75 rpm, 900 L air(0.3 vvm); 본 배양시간 : 4일 12시간

4. 수확

- 사용장비 : Ceramic membrane filter system

5. 동결건조

- 동결건조 보존제 : 5% Mannitol & 4% skim milk(부피 기준) - -45°C까지 동결 후 동결건조 진행

- 동결건조 프로그램

선반 온도	-45℃	-20℃	-20℃	-10℃	-10℃	0℃	0℃	10℃	10℃	20℃	20℃
시간	overnight	120분	600분	120분	600분	120분	600분	120분	600분	120분	지속 유지

•균 주 : *Pseudomonas chlororaphis* O6, *Chromobacterium* sp. C-61, *Serratia* sp. C-1, *Lysobacter enzymogenesis* C-3

• 종균 배양 : King's Medium B아래 표 참고

• 대량 배양 배지 1 King's medium B

- 본 배양용 종균 배양조건 : 27°C, pH6.5~7.5, 150 rpm, 9 L air (0.3 vvm)

- 배양시간 : 24 - 36 시간

	1 L 발효기
Proteose Peptone #3	20 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g
glycerol	15 ml

대량 배지 2 1/10 KB

- 본 배양용 종균 배양조건 : 27°C, pH6.5~7.5, 150 rpm, 9 L air (0.3 vvm)

- 배양시간 : 48 - 60시간

동결건조

- 동결건조 보존제 : 15 - 20 % skim milk 또는 lactose (w/w)

액체 제형화 방법으로는 다양한 배양조건하에서 다양한 탄소원을 이용하여 균주 보존성을 검토하였다. Agar plate에서 2일간 배양한 O6균주를 1/10 KB 500ml에 접종하여 3일간 25도에서 150 rpm의 조건하에서 fermentor에서 생육시켰다. 생육시킨 균주를 다시 원심분리하여 세균을 회수한 다음 1%와 5%의 다양한 탄소원을 함유한 1/10 KB에 동일한 volume에 재현탁하여 상온에 보관하면서 생균수를 측정하였다.

다중유화제 방법은 O6균주와 Wayn1R균주를 1/10 KB배지 500ml배지에서 3일간 배양한 배양액을 이용하여 다중유화제를 조제하였다. 균주 배양기간동안 오일상 [식용유+Span 60(1%)]과 외부수상 [3차 증류수+1.5% gelatin+tween20 total 부피의 1%]]를 조제한 다음 121도에서 15분간 멸균하여 준비하였다. 배양액과 오일상이 1:2가 되도록 준비하고 배양액을 오일상에 부으면서 polytron를 이용하여 3,500rpm으로 5분간 균질하였다. 배양액을 모두 넣은 후 유윗빛에 가까워지도록 5분간 균질하여 W/O형을 조제하였다. W/O형액과 외부수상이 1:1이 되도록 준비하고 W/O형을 외부수상에 부으면서 polytron을 이용하여 2,000rpm으로 10분간 균질하고, 모든 W/O형을 넣은 후 우윗빛에 가까워지도록 2,500rpm을 5분간 더 균질하여 W/O/W형을 조제하였다.

분말수화제 조제 방법은 O6균주를 배양배지 KBM media (yeast extract 20g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g, glycerol 45ml/L)에 500L fermenter이용하여 36시간 배양한 다음 100L 연속원심분리기를 이용하여 세균을 회수하고 동결건조제 skim milk, MSG, vitamin C를 투입하여 최종 5L로 농축하여 FD 20Kg 동결건조기 이용하여 동결건조하였다. 동결건조 진행완료된 분말을 분쇄기를 이용하여 분쇄한 다음 원제 10%(O6균체 분말)+보존제 90%(제오라이트, 규조토) 배합 후 균체 보존성과 살 선충활성을 검정하였다.

제형별 균주 보존성을 검정해 본 결과, 액체 제형의 경우는 1/10 KB에서 1% glucose나 1% glycerol이 첨가된 배지에서 상온에서 30일 보관하였을 경우, 1×10^9 cfu/ml이상의 균주가 생존하였으나, 다른 배지나 탄소원을 이용하였을 때는 생존율이 현저히 감소하였다. 다중 유화제형의 경우는 상온에서 30일 보관하였을 경우, 1×10^8 cfu/ml의 균주가 생존하였다 (그림 1). 이와 반면 분말수화제의 경우는 조제한 날짜의 균수와 비슷한 4×10^9 cfu/g의 농도가 6개월이 지난 현재에도 고농도로 유지되고 있다 (그림 2). 이러한 결과는 O6균주는 균주 보존성은 분말 수화제가 최적의 제형화 조건임을 알 수 있었다. 그람 음성균의 경우는 제형화하여 고농도를 유지하는 것이 어려운데, O6균주의 경우 특이적으로 모든 제형에서 높은 균수를 유지하였고, 특히 분말 수화제의 제형이 가장 좋은 조건이었다. 현재 같은 방법으로 3톤의 대량 배양 조건으로 scale up으로 제품을 조제하여 유기목록 제품으로 등록을 하였다.

나. 제형화된 제품들의 살선충 효능 분석

제형화된 제품들의 살선충 활성을 비교하기 위해 성주 참외에서 분리한 뿌리혹선충 2령 유충에 대한 살선충 효능을 *in vitro*에서 검정하였다. 다중유화제형(W/O/W)과 액체 제형(LF)의 경우 1:20으로 희석한 처리구에서 대조구로 이용한 *Bacillus thuringensis* var. *kurstaki* 1:20(BTK)으로 희석하여 처리한 구와 같이 100% 살선충율을 보였지만, 두 제형 모두 1:200과 1:2,000으로 희석하였을 때는 살선충율이 상실되었다 (그림 2). 하지만 분말수화제 제형(FW)에서는 1g/1L의 농도에서도 100%살선충율을 보여 강한 살선충능력을 보였다 (그림 2). 따라서 본 연구결과 분말수화제 제형에서 보증 생균수가 장기간 보관해도 유지되고 살선충효능도 높아 분말수화제 제형으로 제품을 생산 중이다.

제형화된 제품과 균주의 배양액과의 살선충율을 비교하기 위해 분말수화제와 균주를 O6균주와 FitD돌연변이주를 1/KB에서 배양하여 1:20으로 희석하여 참외에서 분리한 뿌리혹선충을 접종하기 전에 균주를 접종한 것(예방)과 2령 유충을 접종한 후 7일 후에 미생물을 접종한 것(치료)들의 방제능력을 조

사하였다 (그림 3). 분말수화제의 경우 1g/L의 제형을 접종한 구에서도 대조구에 비해 식물의 생장이 현저히 증가하였으며, O6균주를 배양하여 처리한 구에서도 동일한 방제효과가 보였으나, FitD돌연변이주를 접종한 구에서 방제능력이 감소하였다. 치료효과에서는 분말수화제 5g/L을 처리한 구에서만 대조구에 비해 살선충효능을 보였지만, 다른 균주 처리구에서는 방제능력에 차이는 보이지 않았다. 이러한 결과는 분말수화제 제형이 최적의 살선충 효능을 보였으며, 균주를 배양하여 처리한 구보다도 높은 살선충능력을 보였다 (그림 3).

추가적으로 O6균주에서 HCN의 살선충에 관여하는 지를 검정하기 위해 균주를 KB배지에 glycine 유무 조건하에서 배양하여 배양액을 1:20으로 희석하여 토마토 뿌리혹선충에 대한 살선충 효능을 비교하기 위해 토마토 유묘에 고구마뿌리혹선충 2령 유충을 접종한 후 1주일 후에 희석한 배양액을 접종하여 본 결과, 뿌리혹선충에 의한 토마토 생육 억제 능력에는 방제효능이 인정되었으며, KB 배지에 glycine을 첨가한 배지에서 생육시킨 균주를 접종한 식물체에서 분지수가 KB에서 배양한 균주보다 높았다.

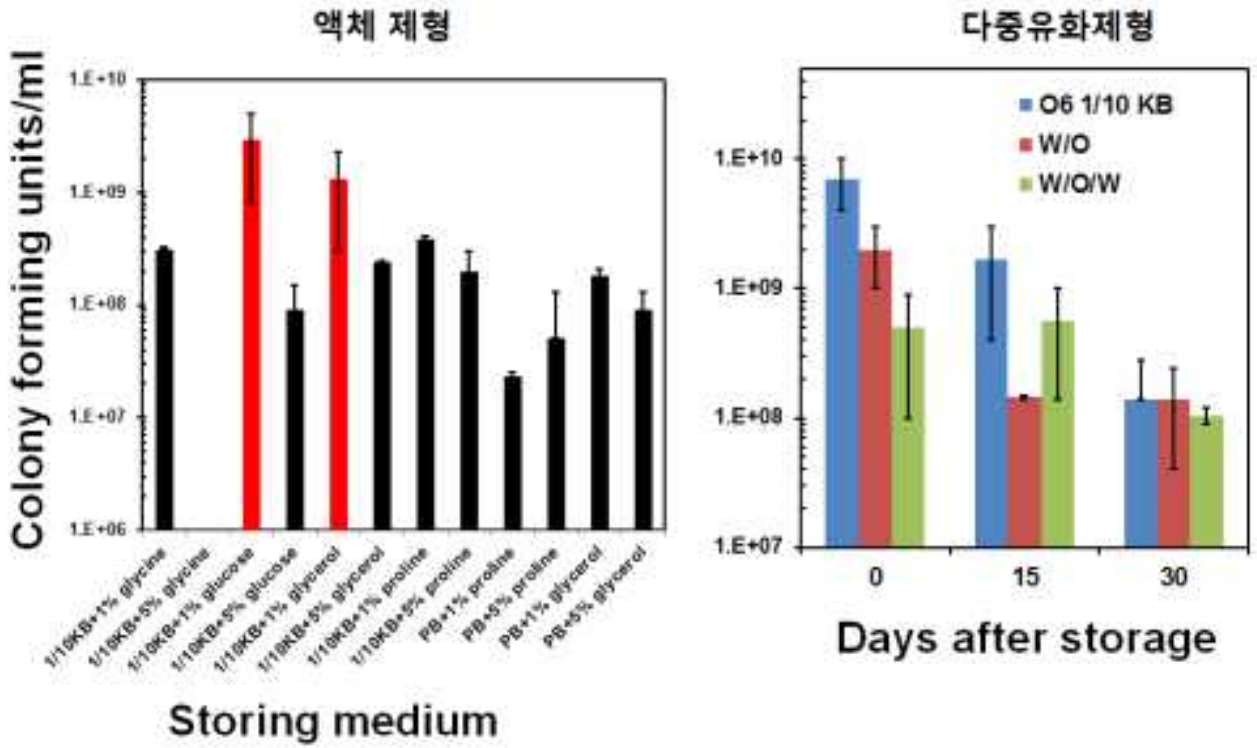


Fig. 1. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주의 액체 제형과 다중 유화 제형의 보관 생존율. 각 제형별로 조제된 시제품을 상온에서 보관하면서 표시된 시간대에 생균수를 멸균수에 희석하여 LB배지에 도말하여 측정하였다. 각 시제품은 3개의 반복수로 측정된 결과이다.

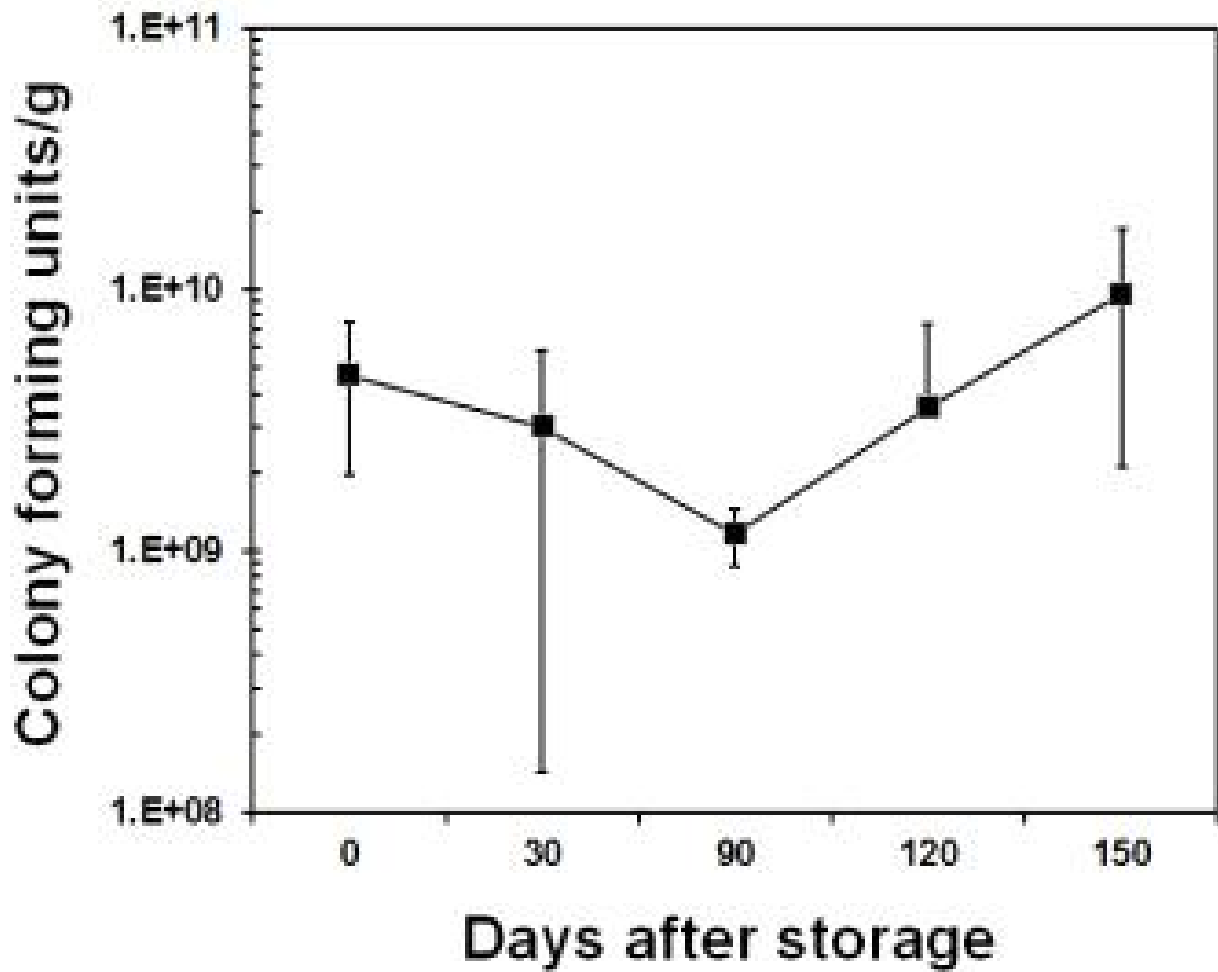


Fig. 2. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주의 분말수화제 제형의 균수 생존율. 분말 수화제로 조제된 시제품을 상온에서 보관하면서 표시된 시간대에 생균수를 멸균수에 희석하여 LB배지에 도말하여 측정하였다. 각 시제품은 3개의 반복수로 측정된 결과이다.

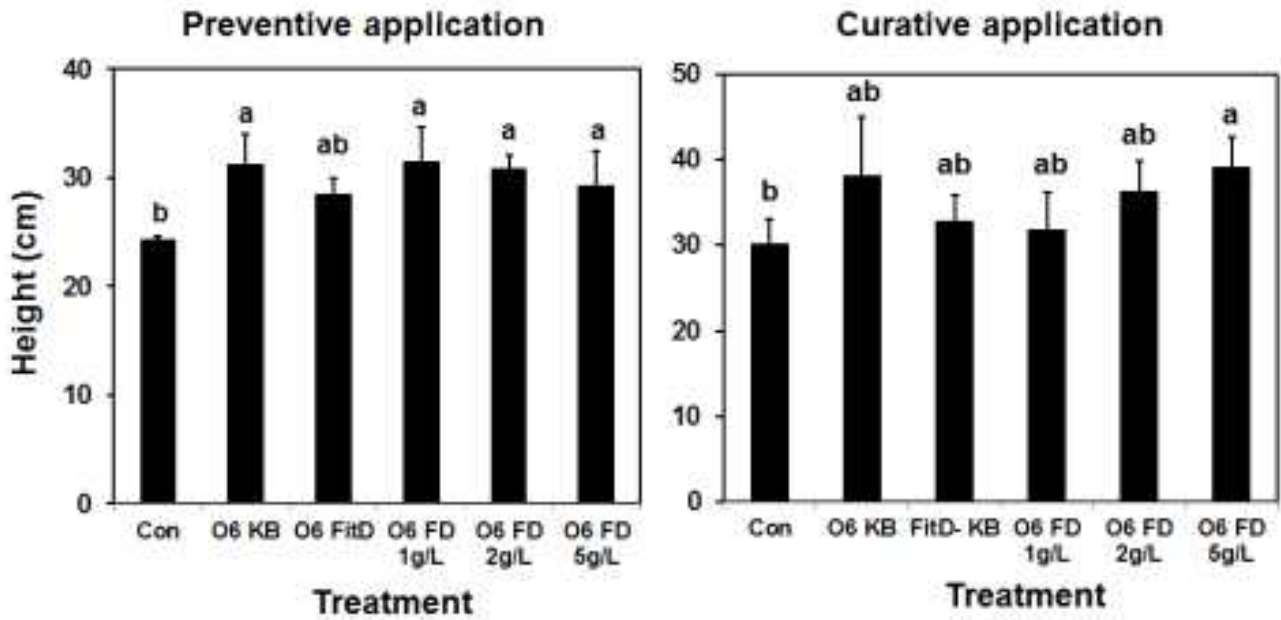


Fig. 3. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주 분말수화제와 배양액의 참외 뿌리혹선충 방제 효능 *in planta* bioassay. 각균주의 배양액과 다른 농도의 분말수화제 시제품을 희석하여 2주 된 토마토 유묘에 관주하고 난 5일 후에 선충 2령 유충을 500마리 씩 각 식물체에 접종하였다. 선충 접종 후 1달 후에 식물체의 지상부 길이를 측정하였다. 각 처리구 당 3개의 식물체를 이용하였고, 실험은 3반복하였다.

다. 시제품 네마토킬의 살 선충 효능 및 식물생장 효능 분석

네마토킬로 분말 수화제를 시제품으로 제작하고 이들의 살 선충 효능을 검정하였다. O6배양액과 FitD돌연변이주의 배양액과 시제품 분말 수화제를 선충을 처리하기 5일 전에 3주된 토마토 유묘에 관주 (5ml)하고 난 뒤 2령 선충을 분리하여 각 식물체 당 500마리를 접종하였다. 선충을 접종한 후 1달 후에 식물체의 길이, 각 식물체 당 잎 수, 그리고 각 식물체 당 뿌리 혹 선충의 수를 측정하였다.

선충을 처리한 식물체에서는 식물체의 길이가 선충을 처리하지 않은 대조구에 비해 현저히 감소하였고, 다른 O6처리구에 비해서도 통계학적으로 유의성이 있게 감소하였다 (그림 4). 또한 O6와 FitD돌연변이주 간의 선충 방제 효능에는 유의성이 없었다. 이와 더불어 시제품을 처리한 식물체에서 배양액을 처리한 구보다 현저하게 효능이 좋았고, 특히 네마토킬 1g/L, 2g/L로 희석하여 처리한 식물체에서 최고의 효능을 보였다.

선충을 처리한 식물체에서는 식물체의 잎 수가 선충을 처리하지 않은 대조구에 비해 현저히 감소하였고, 다른 O6처리구에 비해서도 통계학적으로 유의성이 있게 감소하였다 (그림 5). 하지만 모든 O6 관련 균주와 제품을 처리한 구에서는 선충을 처리한 구에 비해 현저한 잎 수의 변화가 관찰되었다. 하지만 O6와 FitD돌연변이주 간의 선충 방제 효능에는 유의성이 없었다. 이와 더불어 시제품을 처리한 식물체에서 배양액을 처리한 구보다 현저하게 효능이 좋았고, 특히 네마토킬 2g/L로 희석하여 처리한 식물체에서 최고의 효능을 보였다 (그림 5).

선충을 처리한 식물체에서는 식물체 당 약 70개의 뿌리혹이 관찰되었지만, O6 처리구에서는 모두 뿌리 당 뿌리혹 수가 현저히 감소하였다 (그림 6). 하지만, FitD돌연변이주 처리한 식물체에서는 선충만을 처리한 구와는 유의성이 없었다. 이와 더불어 시제품을 처리한 식물체에서 O6배양액을 처리한 식물체와 비슷한 정도로 모든 희석 배수에서 효능을 보였다 (그림 6). 이러한 결과를 종합해 보면, 시제품 네마토킬을 2g/L로 희석하여 예방 처리하였을 때 살 선충 효능이 확인되었다.

네마토킬로 분말 수화제를 시제품과 O6균주와 돌연변이주들을 이용하여 살 선충 능력의 예방이나 치료의 효능을 검정하였다. 처리구의 예방 효능을 알아보기 위해 O6배양액, HCN돌연변이주, complemented HCN돌연변이주, FitD돌연변이주의 배양액과 시제품 분말 수화제, 살 선충제 화학농약 선충탄을 선충을 처리하기 5일 전에 3주된 토마토 유묘에 관주 (5ml)하고 난 뒤 2령 선충을 분리하여 각 식물체 당 500마리를 접종하였다. 치료 효능을 알아보기 위해, 동일한 방법으로 선충을 처리한 5일 후에 동일한 다양한 자재와 균주를 처리하였다. 선충을 접종한 후 1달 후에 식물체 지상부 신선충, 각 식물체의 뿌리 신선충, 그리고 각 식물체 당 뿌리 혹 선충의 수를 측정하였다.

예방과 치료 효능 처리구 모두에서 뿌리 신선충에는 모든 처리구에서 유의성을 보이지 않았다. 선충의 처리 농도가 낮아서 뚜렷한 차이가 선충을 처리하지 않은 대조구와도 차이가 보이지 않았다. 하지만 O6를 처리한 구에서는 예방처리구와 치료 처리구에서 신성증이 높게 나타났다 (그림 7).

예방 처리구에서만 지상부의 신선충에서 유의성을 보였다. 특히 네마토킬 처리와 O6배양액을 예방차원에서 처리한 구에서만 유의성이 있게 지상부의 신선충에 차이가 보였다 (그림 8). 유일하게 Complemented HCN돌연변이주 처리구에서 선충 단독 처리구와 유의성이 없었다. 치료 처리구에서는 모든 처리구에서는 유의성이 보이지 않았다 (그림 8). 이러한 결과는 O6 균주 처리구와 네마토킬 시제품이 토마토 유묘에 식물생장 촉진 능력과 유도 저항성 능력이 관여하여 단기간의 살 선충 효능에서 식물 생장에 유의성을 보이는 것으로 사료된다.

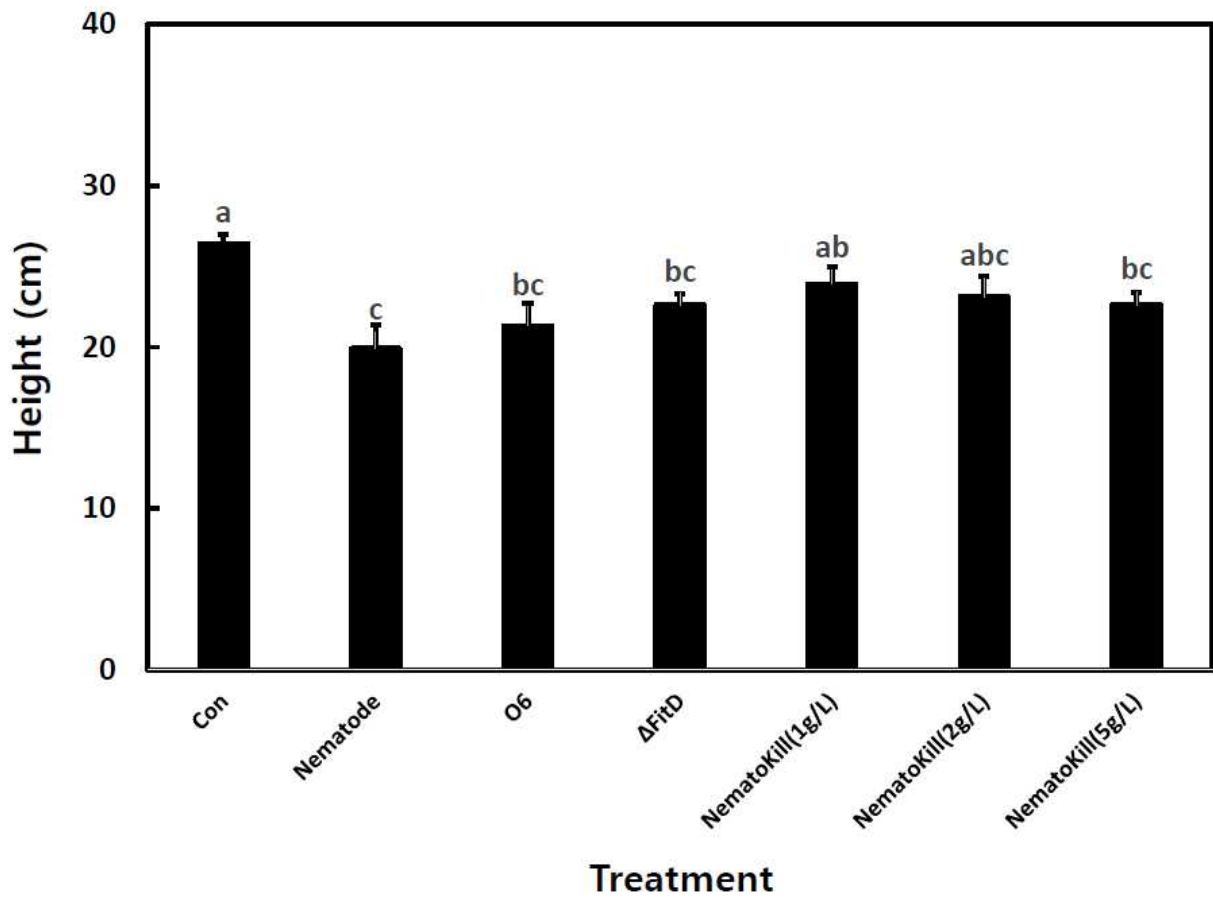


Fig. 4. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주와 분말수화제 시제품의 농도별 예방 처리 후 식물체의 생육 변화. 각 균주의 배양액과 다른 농도의 분말수화제 시제품을 희석하여 2주 된 토마토 유묘에 관주하고 난 5일 후에 선충 2령 유충을 500마리 씩 각 식물체에 접종하였다. 선충 접종 후 1달 후에 식물체의 지상부 길이를 측정하였다. 각 처리구 당 3개의 식물체를 이용하였고, 실험은 3반복하였다.

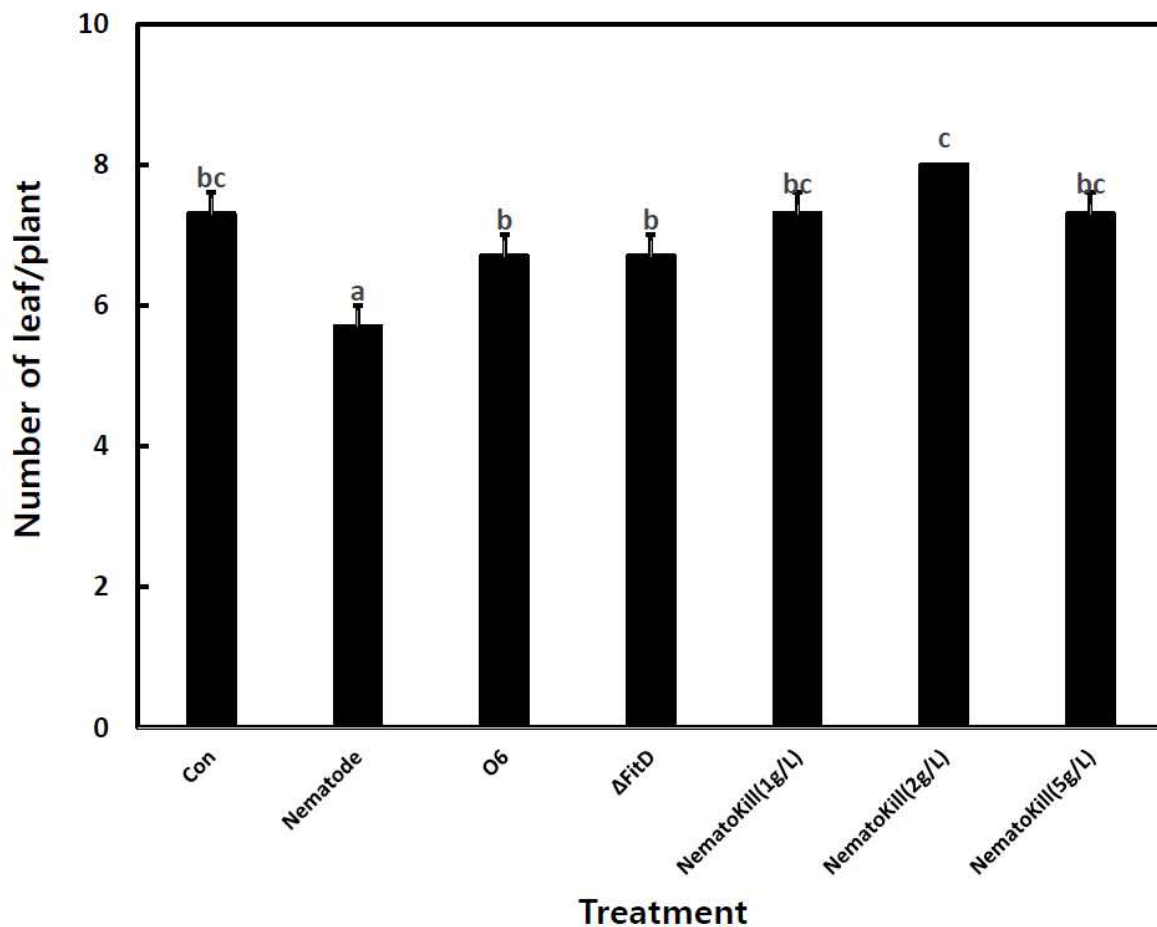


Fig. 5. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주와 분말수화제 시제품의 농도별 예방 처리 후 식물체의 생육 변화. 각 균주의 배양액과 다른 농도의 분말수화제 시제품을 희석하여 2주 된 토마토 유묘에 관주하고 난 5일 후에 선충 2령 유충을 500마리 씩 각 식물체에 접종하였다. 선충 접종 후 1달 후에 식물체의 잎 수를 측정하였다. 각 처리구 당 3개의 식물체를 이용하였고, 실험은 3반복하였다.

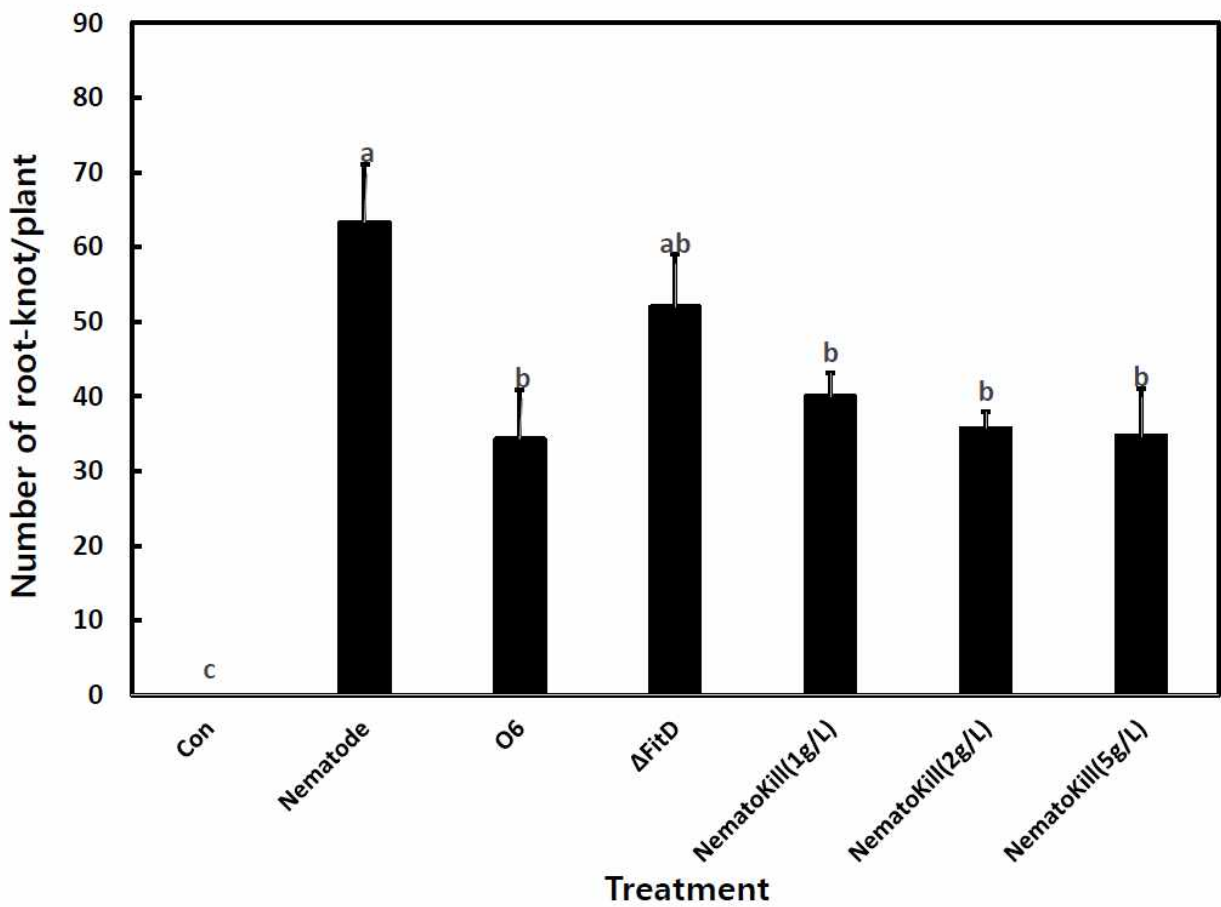


Fig. 6. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주와 분말수화제 시제품의 농도별 예방 처리 후 식물체의 생육 변화. 각 균주의 배양액과 다른 농도의 분말수화제 시제품을 희석하여 2주 된 토마토 유묘에 관주하고 난 5일 후에 선충 2령 유충을 500마리 씩 각 식물체에 접종하였다. 선충 접종 후 1달 후에 식물체의 지상부 길이를 측정하였다. 각 처리구 당 3개의 식물체를 이용하였고, 실험은 3반복하였다.

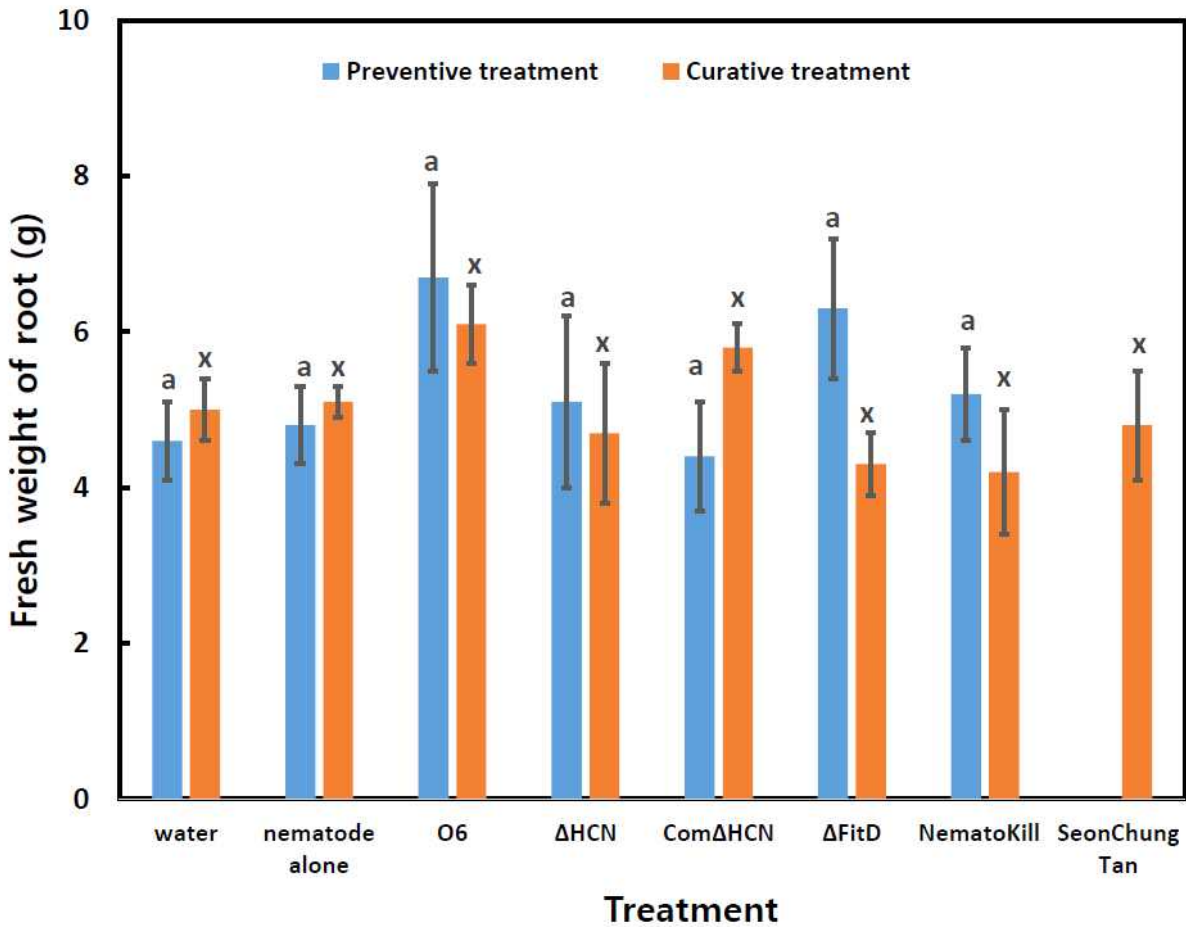


Fig. 7. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주와 분말수화제 시제품 (2g/L), 선충탄 예방 및 치료 처리에 의한 식물체의 생육 변화. 각 균주의 배양액, 분말수화제 시제품을 희석액, 선충탄 정량을 2주 된 토마토 유묘에 관주하고 난 5일 후에 선충 2령 유충을 500마리 씩 각 식물체에 접종(예방) 하거나 선충 처리 후 각 균주와 분말수화제 시제품을 5일 후에 처리(치료)하였다. 선충 접종 후 1달 후에 식물체의 뿌리를 회수하여 신선중을 측정하였다. 각 처리구 당 3개의 식물체를 이용하였고, 실험은 3반복하였다.

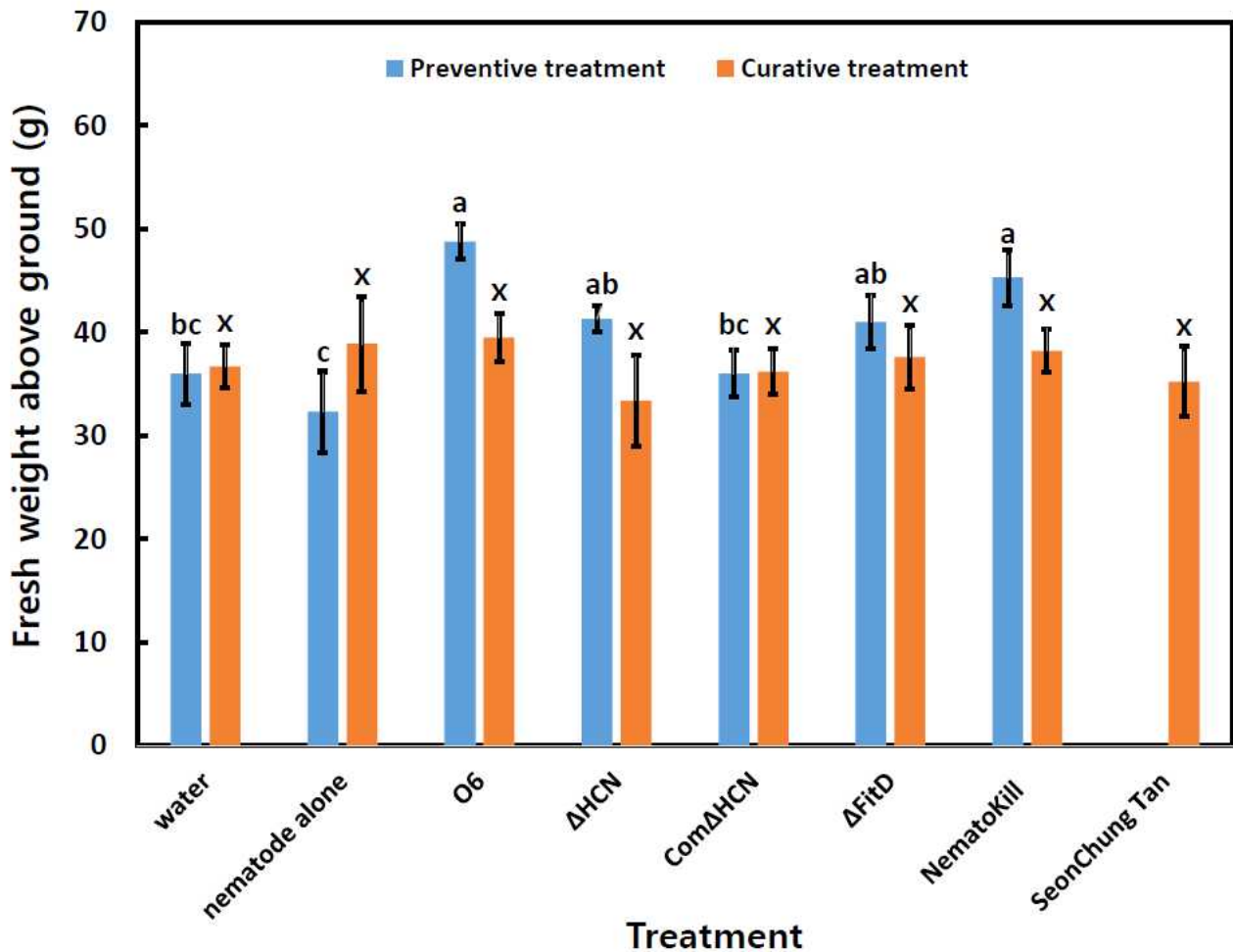


Fig. 8. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주와 분말수화제 시제품 (2g/L), 선충탄 예방 및 치료 처리에 의한 식물체의 생육 변화. 각 균주의 배양액, 분말수화제 시제품을 희석액, 선충탄 정량을 2주 된 토마토 유묘에 관주하고 난 5일 후에 선충 2령 유충을 500마리 씩 각 식물체에 접종(예방) 하거나 선충 처리 후 각 균주와 분말수화제 시제품을 5일 후에 처리(치료)하였다. 선충 접종 후 1달 후에 식물체의 뿌리를 회수하여 지상부를 회수하여 신선중을 측정하였다. 각 처리구 당 3개의 식물체를 이용하였고, 실험은 3반복 하였다.

예방 처리구에서는 O6모든 처리구에서 선충 단독 처리구보다 유의성이 있게 식물체 당 뿌리혹의 생성이 감소하였다. 하지만 HCN돌연변이주를 처리한 식물체에서는 뿌리혹선충 방제 능력이 상실되어 HCN이 식물 선충 방제에 있어서 중요한 물질로 사료된다 (그림 9). 치료 처리구에서는 O6처리구와 네마토킬 처리구에서의 효능이 많이 감소하여 선충 단독 처리구에서와의 처리구에 유의성이 없었지만, complemented HCN돌연변이주 처리구와 FitD처리구에서는 치료 처리구에서도 유의성을 보여 현저히 뿌리혹선충 방제 효능을 보였다 (그림 9). 이러한 결과는 O6 균주 처리구와 네마토킬 시제품이 토마토 유묘에 예방 차원에서 처리하였을 때 효능이 나타날 것으로 추정되었다.

네마토킬로 분말 수화제를 시제품과 O6균주 배양액, 선충탄을 이용하여 살 선충 능력의 예방이나 치료의 효능을 검증하였다. 각 균주의 배양액, 분말수화제 시제품을 희석액, 선충탄 정량을 2주 된 토마토 유묘에 관주하고 난 5일 후에 선충 2령 유충을 500마리 씩 각 식물체에 접종(예방) 하거나 선충 처리 후 바로 처리한 구 (동시 처리구), 선충 처리 후 각 균주와 분말수화제 시제품을 5일 후에 처리(치료)하였다. 선충 접종 후 45일 후에 식물체의 지상부를 회수하여 신선충을 측정하였다. 각 처리구 당 3개의 식물체를 이용하였고, 실험은 3반복하였다. 시제품을 처리한 구에서 예방처리하였을 때 지상부의 생육이 다른 처리구보다 유의성이 있게 나타났고, 다른 처리구에서는 모두 유의성이 없었다. 하지만 선충탄을 정량을 관주한 처리구에서는 약해가 나와 지상부의 생육이 현저히 감소하였다. 또한 동시 처리구에서도 네마토킬을 처리한 구에서도 효능이 있었지만, 치료효과는 보이지 않았다 (그림 10).

뿌리 신선충에서도 네마토킬을 처리한 구에서 동시와 예방 처리구에서만 유의성이 있게 뿌리의 신선충이 높았다. 다른 처리구에서는 모두 유의성이 없었다. 하지만 선충탄을 정량을 관주한 처리구에서는 약해가 나와 지상부의 생육이 현저히 감소하였다. 또한 동시 처리구에서도 네마토킬을 처리한 구에서도 효능이 있었지만, 치료효과는 보이지 않았다 (그림 11).

시제품을 처리한 구에서 예방처리하였을 때 식물체의 뿌리혹수가 O6와 네마토킬 처리구에서 유의성을 보였다. 치료효과에서도 O6를 처리한 구에서 유의성이 선충탄과 비슷한 수준으로 선충에 대해 효능을 보였다 (그림 12). 이러한 결과를 종합해 보면 O6균주의 시제품인 네마토킬을 2g/L를 예방차원에서 관주하였을 때 효능이 있어서 사용 매뉴얼 작성 시 활용하였다.

라. 선충 방제용 농가사용 매뉴얼 제작 및 실증

농가포장에서 선충 방제를 위해서는 시제품인 네마토킬과 키틴 분해 미생물을 대량 배양한 배양액을 포장에서 정식하기 전에 토양에 혼화하여 살포하는 것을 권장하였다. 또한 정식 후에도 점적 관수를 통해서 지속적으로 4회 이상 네마토킬이나 키틴분해 미생물 제품을 관주하였을 때 선충에 의해 피해를 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

고추의 재배기간과 선충의 생육주기를 고려하였을 때 서로 다른 유효성분을 갖는 약제를 교호적으로 처리하기 위해서는 4-5 종의 자재가 필요할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서 시제품의 적용은 선충 방제 자재의 다양성 측면에서 기존의 식물추출물 자재와 더불어 효율적으로 사용될 것으로 사료된다. 이상의 결과를 종합적으로 판단하여 볼 때 ① 선충이 정식하기 전에 토양 내에 존재하는 수를 발생 예찰을 통해 정식전에 방제를 시작하고, ② 작물의 재배지수를 고려하면서 유효성분이 상이한 자재를 교호적으로 살포하여 선충의 밀도수를 일정한 수준으로 유지하여 선충을 관리하는 방법이 효율적인 방제 매뉴얼인 것으로 사료되었다. 본 연구에서 개발된 선충 방제용 제제는 국내 시판되는 선충 방제용 농자재와 교호적으로 적용될 수 있으며, 이 제제를 통해 유효성분과 품목수가 한정된 국내 농자재의 열악함을 부분적으로 극복할 수 있을 것으로 기대되었다.

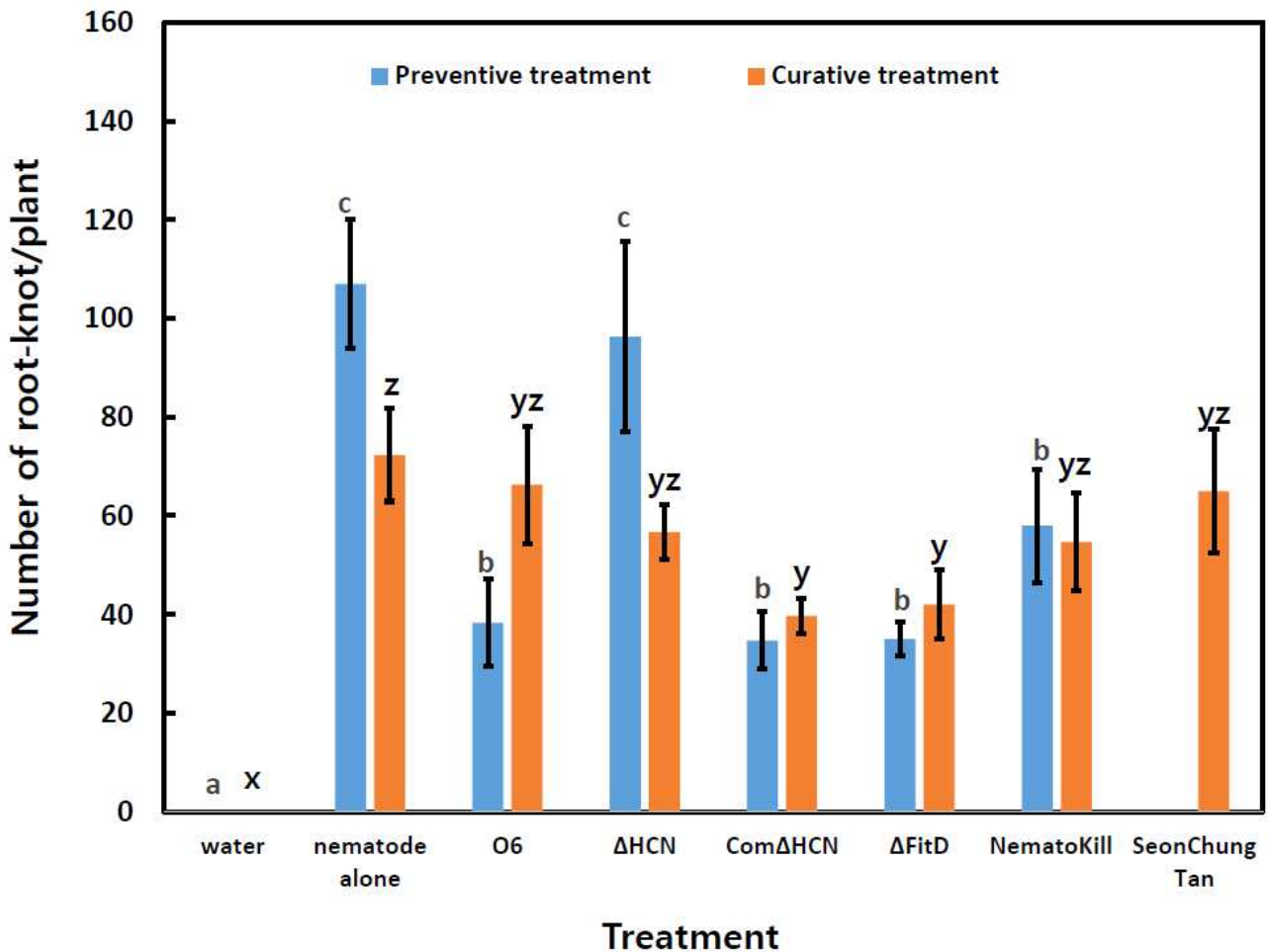


Fig. 9. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주와 분말수화제 시제품 (2g/L), 선충탄 예방 및 치료 처리에 의한 식물체 뿌리혹 선충 발병에 대한 효능. 각 균주의 배양액, 분말수화제 시제품을 희석액, 선충탄 정량을 2주 된 토마토 유묘에 관주하고 난 5일 후에 선충 2령 유충을 500마리 씩 각 식물체에 접종(예방)하거나 선충 처리 후 각 균주와 분말수화제 시제품을 5일 후에 처리(치료)하였다. 선충 접종 후 1달 후에 식물체의 뿌리를 회수하여 뿌리혹 수를 측정하였다. 각 처리구 당 3개의 식물체를 이용하였고, 실험은 3반복하였다.

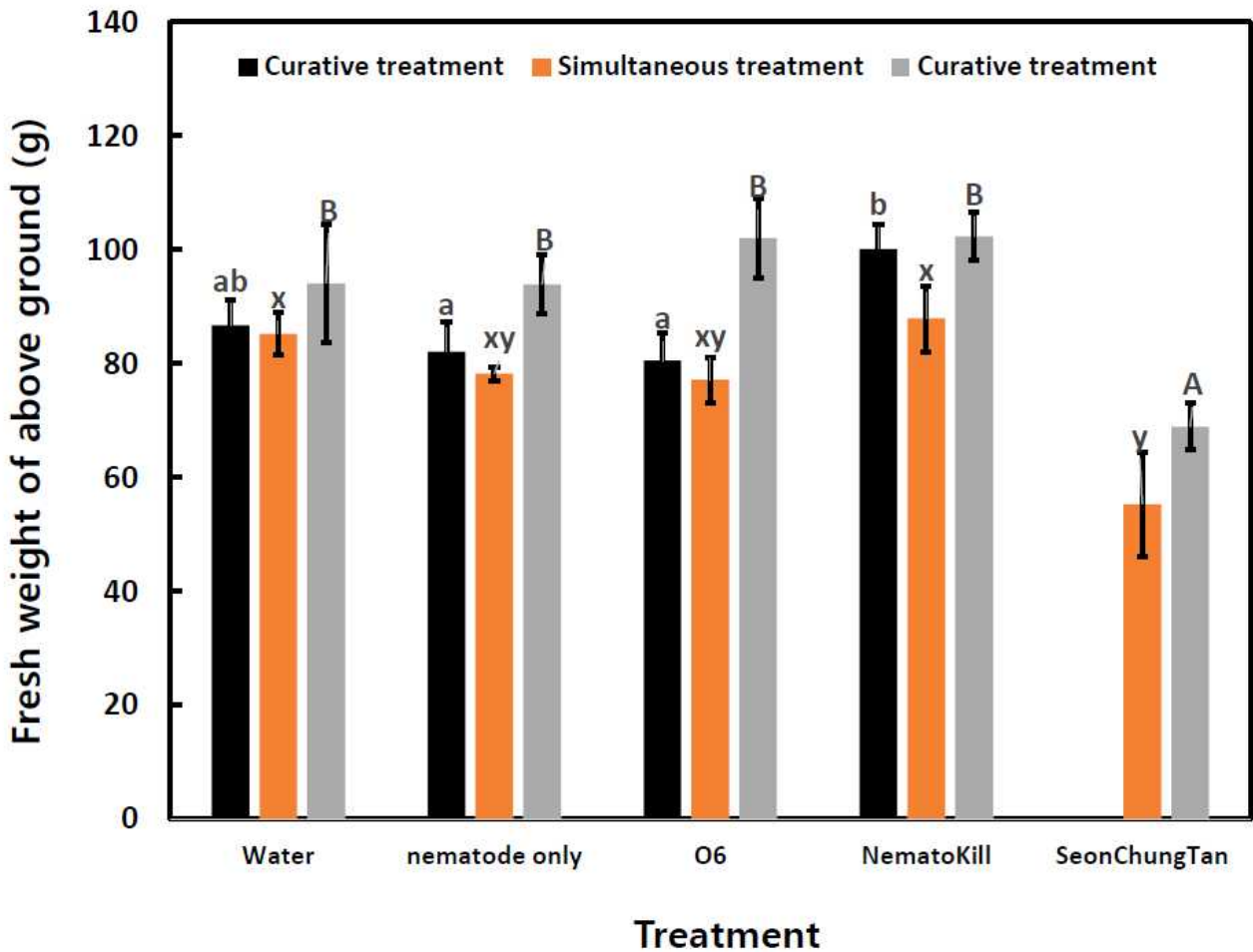


Fig. 10. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주와 분말수화제 시제품 (2g/L), 선충탄 예방, 동시 처리, 치료 처리에 의한 식물체의 생육 변화. O6균주의 배양액, 분말수화제 시제품을 희석액, 선충탄 정량을 2주 된 토마토 유묘에 관주하고 난 5일 후에 선충 2령 유충을 500마리 씩 각 식물체에 접종(예방) 하거나 선충 처리 후 바로 처리한 구 (동시 처리구), 선충 처리 후 각 균주와 분말수화제 시제품을 5일 후에 처리(치료)하였다. 선충 접종 후 45일 후에 식물체의 지상부를 회수하여 신선중을 측정하였다. 각 처리구 당 3개의 식물체를 이용하였고, 실험은 3반복하였다.

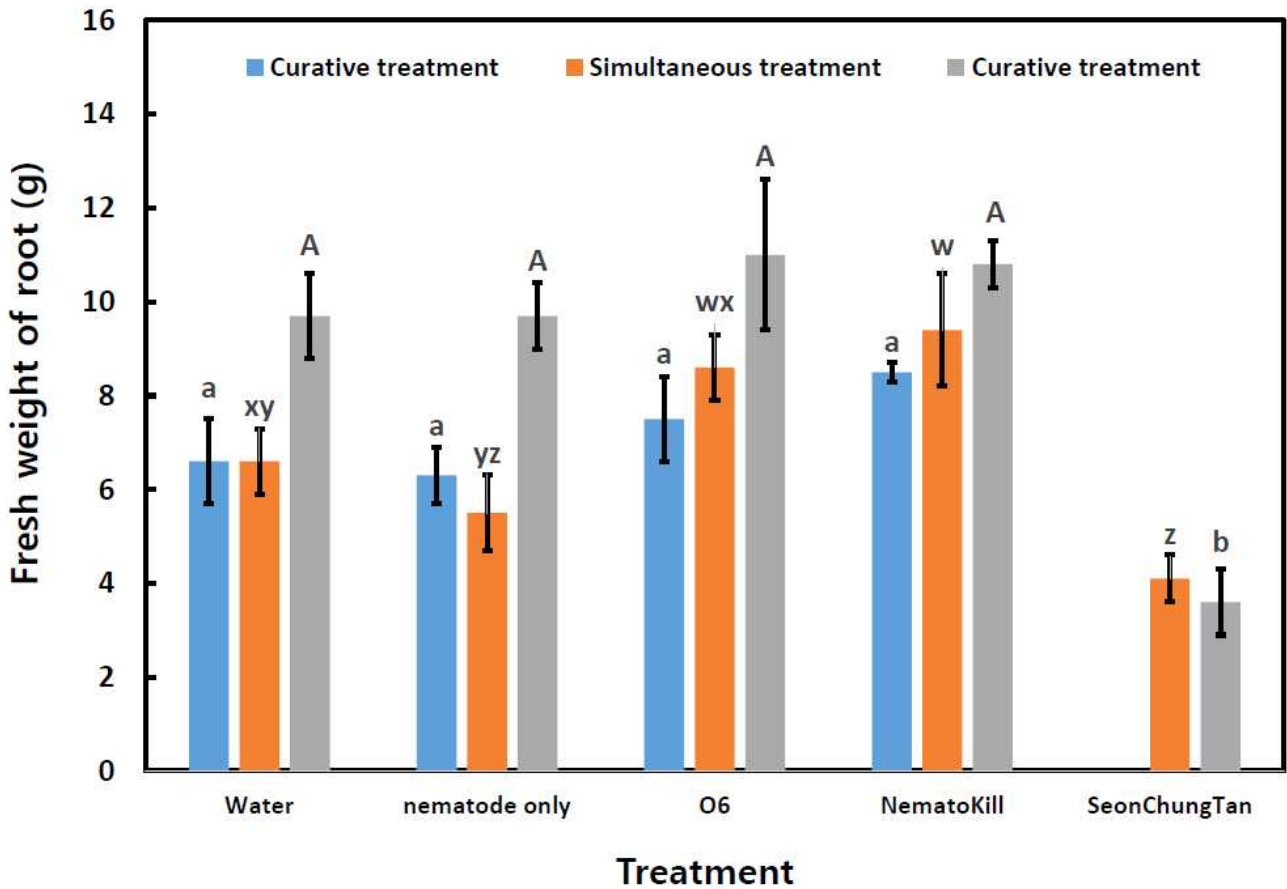


Fig. 11. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주와 분말수화제 시제품 (2g/L), 선충탄 예방 및 치료 처리에 의한 식물체의 생육 변화. O6균주의 배양액, 분말수화제 시제품을 회석액, 선충탄 정량을 2주 된 토마토 유묘에 관주하고 난 5일 후에 선충 2령 유충을 500마리 씩 각 식물체에 접종(예방) 하거나 선충 처리 후 바로 처리한 구 (동시 처리구), 선충 처리 후 각 균주와 분말수화제 시제품을 5일 후에 처리(치료)하였다. 선충 접종 후 45일 후에 식물체의 뿌리를 회수하여 신선중을 측정하였다. 각 처리구 당 3개의 식물체를 이용하였고, 실험은 3반복하였다.

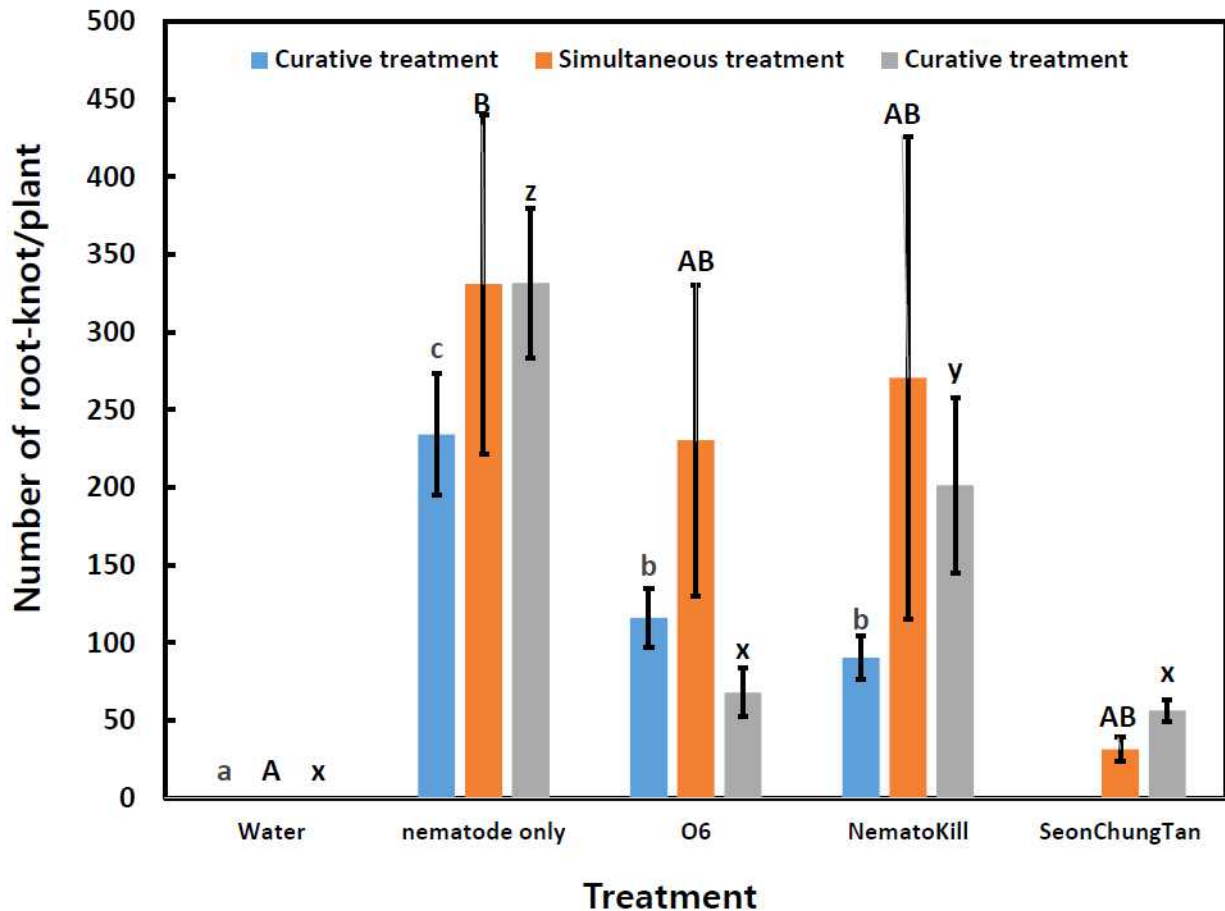


Fig. 12. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주와 분말수화제 시제품 (2g/L), 선충탄 예방 및 치료 처리에 의한 식물체의 생육 변화. O6균주의 배양액, 분말수화제 시제품을 희석액, 선충탄 정량을 2주 된 토마토 유묘에 관주하고 난 5일 후에 선충 2령 유충을 500마리 씩 각 식물체에 접종(예방) 하거나 선충 처리 후 바로 처리한 구 (동시 처리구), 선충 처리 후 각 균주와 분말수화제 시제품을 5일 후에 처리(치료)하였다. 선충 접종 후 2달 후에 식물체의 뿌리를 회수하여 뿌리혹 수를 측정하였다. 각 처리구 당 3개의 식물체를 이용하였고, 실험은 3반복하였다.

제 7 절. 살선충 O6균주와 C61균주 제품의 등록에 필요한 독성 및 미생물 검정

살선충 효능이 인정된 *Pseudomonas chlororaphis* O6와 *Chromobacterium* sp. C61균주에 대한 독성검사와 미생물 제품의 약해에 대한 유기농자재 인증 자재 등록에 필요한 기초자료를 수행하였고, 유기목록 자재 등록을 실시하였다. 상기에 기술한 방법으로 O6의 시제품 (네마토킬, Fig. 1)과 *Chromobacterium* sp. C61균주 (다자바)의 시제품을 조제하여 유기 목록 자재 등록에 필요한 독성 및 미생물 검정을 한국화학연구원의 생물안전성 센터와 실용화재단에 의뢰하여 약해 및 미생물 검정을 의뢰하였다.

가. 미생물 제품의 독성 검사

O6균주를 네마토킬이라는 분말 수화제 제형으로 C61균주의 경우 다자바 라는 제품으로 우선 한국생물안전성연구소에 용역을 의뢰하여 토끼와 랫드에 급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성, 안점막 자극성에 대한 독성검사와 잉어에 대한 어류 독성을 진행하였다. O6의 경우는 모든 동물독성 검사와 잉어의 어독성에도 친환경유기농자재로 등록이 가능하게 저독성으로 인정되었다 (표 1). 하지만 C61의 경우에는 각막의 혼탁과 홍채의 충혈, 결막의 박적 및 부종 그리고 배설물이 관찰되었고, 급성아자극지수 (A.O.I)는 35.7로 산출되어 토끼의 안점막에 적용시 안점막 자극표에 의해 중도자극성 물질로 확인되었다 (Table 2). 따라서 지금까지 연구재료로 이용되고 있었던 *Chromobacterium* sp. C61균주를 친환경유기농자재 등록을 할 수가 없었다. 따라서 네마토킬만을 유기목록 자재로 등록을 진행하였다. 또한 키틴분해 미생물의 대량배양에서도 C61균주를 배제한 제형으로 상기의 연구를 수행하였다.

나. 시제품 네마토킬의 유기목록 자재 등록 진행

Pseudomonas chlororaphis O6균주 시제품 네마토킬분말수화제의 약해를 조사하여 친환경유기농자재 목록공시제 등록에 필요한 모든 사항 참여기관인 곡성생물방제연구원에서 실용화재단 (병원성 미생물 검출, 미생물), 한국생물안전성 센터 (독성), 목원대 (약해)에 의뢰하여 현재 친환경유기목록 자재로 등록 중이고, 조만간 유기목록등록인정서를 받을 수 있을 것으로 생각된다.



배양액 O.C 사진



농축액 O.C 사진



동결건조 분말 수거 사진



40℃ 경시 안정성 테스트 시료 사진



네마토킬 제품 등록 중
전남 생물방제연구원



Fig. 1. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주의 분말 수화제 시제품 (네마토킬) 조제.

Table 1. *Pseudomonas chlororaphis* O6균주 시제품(네마토킬)의 독성 검사 결과표

시험종류 (기간)	실험동물	투여방법	투여량	LD50	시험기관 (보고년도)	독성구분
급성경구독 성/병원성 (21일)	Rat	경구투여	1×10 ⁸ cfu/2ml	1×10 ⁸ cfu/2ml	한국생물안전성 연구소 (2012년)	4급 (저독성)
급성경피독 성 (14일)	Rat	경피투여	1×10 ⁸ cfu/2ml	1×10 ⁸ cfu/2ml	한국생물안전성 연구소 (2012년)	
피부자극성 (72시간)	White rabbit	피부도포	1×10 ⁷ cfu/0.5ml	비자극성 (1×10 ⁸ cfu//0.5ml) (P.I.I.=0.0)	한국생물안전성 연구소 (2012년)	
안점막자극 성 (7일)	White rabbit	결막낭내투 여	1×10 ⁷ cfu/0.1ml	비자극성 1×10 ⁷ cfu/0.1ml (M.O.I=0.0) (A.O.I.=0.0)	한국생물안전성 연구소 (2012년)	
구분	시험생물종	시험약제	LC50	시험기관 (보 고년도)	독성구분	
담수어류	잉어 (Cyprinus carpio)	1×10 ⁹ cfu/ml	>1×10 ⁶ cfu/ml	한국생물안전성연 구소 (2012년)	저독성	
꿀벌 급성접촉	꿀벌 (Apismellifera)	경피투여		한국생물안전성연 구소 (2012년)	안정성	

Table 2. *Chromobacterium* sp. C61 시제품(다자바)의 독성 검사 결과표

시험종류 (기간)	실험동물	투여방법	투여량	LD50	시험기관 (보고년 도)	독성구분
급성경구독 성/병원성 (21일)	Rat	경구투여	1×10^8 cfu/2ml	1×10^8 cfu/2ml	한국생물안전성연 구소 (2012년)	4급 (저독성)
급성경피독 성 (14일)	Rat	경피투여	1×10^8 cfu/2ml	1×10^8 cfu/2ml	한국생물안전성연 구소 (2012년)	
피부자극성 (72시간)	White rabbit	피부도포	1×10^7 cfu/0.5ml	비자극성 (1×10^8 cfu//0.5ml) (P.I.I.=0.0)	한국생물안전성연 구소 (2012년)	
안점막자극 성 (7일)	White rabbit	결막낭내투 여	1×10^7 cfu/0.1ml	중도자극성 1×10^7 cfu/0.1ml (M.O.I=0.0) (A.O.I.=35.7)	한국생물안전성연 구소 (2012년)	중도자극 성

유기농업자재 공시 [] 품질인증 신청서

※ 뒤쪽의 작성방법을 읽고 작성하시기 바라며, []에는 해당되는 곳에 √표를 합니다.

(앞쪽)

접수번호	접수일자	처리기간	3개월
------	------	------	-----

신청인	업체명 재단법인 전남생물산업진흥원 생물방제연구원	사업자등록번호 408-82-17259
	대표자 성명 신현경	생년월일 1944. 12. 29.
	주 소	본 사 전라남도 나주시 동수농공단지길 30-5 (전화번호 061-339-1312) 제조장 및 보관창고 전라남도 곡성군 입면 입면로 437 (전화번호 061-362-0630)

신청내용	자재의 명칭 : 미생물제제(살충제)		
	생산 구분	<input checked="" type="checkbox"/> 국내	
		[] 수입	수입국:
			제조회사명:
			제조장주소:
			수입상표명:
		인증기관:	
	주성분 (원료)	성분(원료)명	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 분말
함량(%)		<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 1.×10 ⁷ cfu/g 이상	
상 표 명		네마토킬	
자재의 구분		[]토양개량 및 작물생육, <input checked="" type="checkbox"/> 병해충관리	
세부 내용			

「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조제1항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」(이하 “규칙”이라 한다) 제48조제1항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시(품질인증)를 신청합니다.

년 월 일

신청인

(서명 또는 인)

순천대학교 산학협력단장 귀하

첨부서류	뒤쪽 참조	수수료 없음
------	-------	-----------

210mm×297mm[백상지 80g/㎡(재활용품)]

유기농업자재 **공시** **생산계획서**
 품질인증

1. 신청 업체명: (재)전남생물산업진흥원 생물방제연구원 (서명 또는 인)
2. 자재의 명칭: 네마토킬
3. 자재별 생산시설(m²): 생물방제연구원 발효생산동 495m²
4. 자재별 생산설비: 네마토킬

장비명	규격	용도	비고
50L Fermenter	50L	미생물배양	
500L Fermenter	500L	미생물배양	
5,000L Fermenter	5,000L	미생물배양	
농축기	ceramic filter 0.2um	배양액 농축	
동결건조기	300kg	농축용액 동결건조	
분쇄기	100mesh	분쇄	
포장기	20봉/분	제품 포장	

5. 자재별 생산 계획량(kg/년):

제품명	1회 배양량 (L)	1회 생산량 (KG)	보유장비 (대)	장비가동 횟수(회)	총 생산량 (kg)
네마토킬	3,000	50	1	10	500

세부 심사 자료

신청 구분	① 접수번호	② 자재종류	③ 자재명(상표명)	④ 사업자등록번호
공시 <input checked="" type="checkbox"/> 품질인증 <input type="checkbox"/>		병해충자재	(네마토킬)	408-82-17259
⑤ 책임보험증서번호		⑥ 비료등록번호		⑦ 시료번호
항 목	제출내역요약			검토 결과
① 원료	<ul style="list-style-type: none"> - 국명 : 슈도모나스 크로로라피스 오6 - 학명 : <i>Pseudomonas Chlororaphis</i> O6 - 분리 : 식물근권에서 분리 - 작용 : <i>Pseudomonas Chlororaphis</i> O6의 2차 대사산물인 Hydrogen cyanide(HCN)에 의해 선충을 방제 			
검토내용				
② 원료의 특성 및 유래	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Pseudomonas Chlororaphis</i> O6 <ol style="list-style-type: none"> 1) 기원 및 분포 : 식물근권 2) 유효 구성물질의 종류 및 함량 : : <i>Pseudomonas Chlororaphis</i> O6 배양액 3) 자재구분의 사용용도를 뒷받침할 자료(학술자료, 연구논문, 시험성적 등) : : Nematicidal Activity of a Nonpathogenic Biocontrol Bacterium, <i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6(붙임1 참조) 、 4) 농업분야 사용현황 : 5) 생산지, 제조사, 구매경로 : 자체 배양 、 			
검토내용				

③제조조성비	<병해충관리용>				
원료명		성분별 함유 내역			원료 투입율 (%)
		물질명 (화학명)	원료함유량 (%)	EPA list	
[주원료] <i>Pseudomonas chlororaphis</i> 06 배양배지		글리세린 (Glycerine)	4.50%		5%
		효모추출분말 (Yeast extract)	2.00%		
		1인산칼륨 (K_2HPO_4)	0.15%		
		황산마그네슘 ($MgSO_4$)	0.15%		
건조제	skim milk	2.00%			
보존제	규조토			95%	
검토내용					
④유효성분 검사	[미생물동정]				
구분	시험 년도	시험 기관	시험항목 (속, 증명)	시험결과	
동정	2013년 11월	농업기술 실용화재단	16s rDNA sequence (<i>Pseudomonas</i> , <i>chlororaphis</i>)	동정 : <i>Pseudomonas</i> <i>chlororaphis</i> 밀도 : 9.6×10^7 CFU/g	
검토내용					
⑤유해성분 검사	<병원성미생물>				
구분	시험 년월	시험 기관	시험항목 (속, 증명)	시험결과	
오염 미생물	2013년 11월	농업 기술 실용화 재단	병원성대장균	불검출	
			살모넬라	불검출	
			황색포도상구균	불검출	
			리스테리아 모노사이토제네스	불검출	
			바실러스 세레우스	불검출	
검토내용					

⑥유식물 등에 대한 비해·약해 시험	시험 년도	시험 기관	시험 결과	작물	처리시기 및 방법	사용량
	2013	목원대학교 미생물생태자 원연구소	약해없음	배추 오이 아욱 상추 무	토양처리 (관주처리)	1,000배 희석
검토내용						
⑦비효/비해 시험성적서	시험 년도	시험 기관	시험 결과	작물	처리시기 및 방법	사용량
			[비효] [비해]			
검토내용						
⑧약효/약해 시험성적서	시험 년도	시험 기관	시험 결과	작물	처리시기 및 방법	사용량
			[약효] [약해]			
검토내용						
⑨인축독성	시험 년도	시험 기관	시험 항목	시험결과		독성구분
	2013 /12 ~ 2014 /1	㈜한국 생물안전성 연구소	급성경구	LD50> mg/kg		급 (기준:Ⅲ급/Ⅳ급)
			급성경피	LD50> mg/kg		급 (기준:Ⅲ급/Ⅳ급)
			안점막자극성	평가결과		표시문구 및 그림문자
			피부자극성	평가결과		표시문구 및 그림문자
검토내용						

⑩ 환경독성	시험 년도	시험 기관	시험 항목	시험결과	독성구분
	2013 /12	㈜한국 생물안전성 연구소	급성어류독성	독성노출비(TER) > 100이상	급 (기준: III급 TER 100이상)
			물벼룩 급성유영저해	EC50 > mg/L	(기준: TER 20이상)
			꿀벌접촉독성	시험결과	표시문구 및 그림문자
검토내용					
⑪ 제조공정	순서	공정명	시간	품질관리	배지
	1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 고체 평판 배양	24		LB agar 배지
	2	1차 Seed Flask culture	12		LB 배지
	3	2차 Seed Flask culture	12	오염여부 확인	LB 배지
	4	50L Fermenter Seed culture	12	오염여부 확인	첨부한 배지 조성
	5	500L Fermenter Seed culture	12	오염여부 확인	첨부한 배지 조성
	6	5,000L Fermenter Seed culture	36	오염여부 확인	첨부한 배지 조성
	7	배양액 농축액	8		
	8	농축액 동결건조	96		
	9	동결건조 분쇄	8	품질검사 (평판도말회 석법)	
	10	제품 포장	16		
	11	출하 전 보관창고 보관	-		
검토내용					

	공정	항목	내용
⑫품질관리	원료	입고 원료 관리	미생물 배양을 위해 입고되는 원료를 Lot 별로 시험성적서 보관 관리한다.
	배양	종균 배양 및 본 배양 시 오염 발생 할 경우	미생물 배양 시 오염 발생하면 전량 폐기 처리 한다.
		<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 배양액 viable cell counting (Quality control)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6 배양 종료된 배양액을 첨부한 미생물 분석법에 따라 최종 균수를 확인한다.
	포장	제조일자 및 Lot No. 관리	제조일자 및 Lot No.를 부여하여 포장제품을 관리한다.
		Lot No. 별 시료 보관	- Lot No. 별로 제품 포장시 무작위 20개를 선정 보관하여 제품 유통기한 동안 상온 보관한다. - 추후 출하 제품에 문제가 생길시 대조 샘플로 사용한다.
서류 관리	제조기록 서류 보관	- Lot 별 미생물 배양 일지 작성 및 보관 - Lot 별 제품 포장 일지 작성 및 보관 - Q.C(cfu/g) 성적서 작성 및 보관 - Lot 별 제품 출하 내역 관리	
검토내용			
⑬포장지 표기방법	<p>공시등 내용</p> <p>가. 공통사항</p> <p>유기농업자재의 포장 또는 용기에 제49조에 따라 발급한 유기농업자재 공시서 등에 기재된 사항을 다음 각 호와 같이 표기하여야 한다.</p> <p>1) 업체명·주소·전화번호</p> <ul style="list-style-type: none"> - (재)전남생물산업진흥원 생물방제연구원 - 전남 곡성군 입면 입면로 495 - 061-362-0630 <p>2) 유기농업자재 공시등 번호</p> <p>3) 자재의 명칭 및 구분과 상표명</p> <ul style="list-style-type: none"> - 총해관리자재(미생물제제) 네마토킬 		

	<p>4) 제조장 소재지 - 전남 곡성군 입면 입면로 437</p> <p>5) 제조 또는 수입 연월일 - 2014년 2월</p> <p>6) 유통기간 - 1년</p> <p>7) 주성분(원료)명·함량, 실중량, 사용방법 - Pseudomonas Chlororaphis 06 1×10^7 cfu/g - 실중량 : 200g - 사용방법 : 1,000배 희석</p> <p>8) 농촌진흥청장이 정하여 고시한 독성시험결과에 따른 표시문구 및 그림문자</p> <p>9) 보관·사용 시 주의사항 - 햇볕이 강할 때나 기온이 높을 시에는 사용하지 마십시오. - 제품의 보관시 직사광선을 피하시고 서늘한 곳에 보관하십시오. - 제품 개봉 후 습기에 조심하시고, 빠른 시일내에 사용하십시오.</p> <p>나. 공시품</p> <p>1) “이 자재는 효과와 성분함량 등을 보증하지 아니 하고 유기농산물 생산을 위해 사용가능 여부만 검토한 자재입니다.”</p> <p>2) 배추, 오이, 아욱, 상추, 무의 작물에 약해시험을 실시하였습니다.</p>
검토내용	
⑭ 농약 또는 비료 등록 증빙서류	해당없음
검토내용	
⑮ 책임보험가입증서	해당없음
검토내용	
⑯ 사업자등록증	별도 첨부 (붙임 7)
검토내용	
⑰ 외국의 자재 인증관련 자료	해당없음
검토내용	

다. 살선충 미생물들의 균주의 마커를 이용한 단계별 QC

살선충 미생물들을 제형화나 대량배양시 손쉽게 사용할 수 있는 QC마커를 개발하기 위해 ARDRA 방법과 각 균주의 생화학 마커들을 개발하였다. 각 미생물 배양액을 10분간 boiling한 다음, 공시한 세균의 경우, 16S rDNA을 증폭하는 primer인 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3')와 1492R (5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3')를 이용, 곰팡이의 경우, Intergenic spacer region primer 4와 5를 이용하여 증폭한 다음, *MspI*이나 *HhaI*으로 절단하여 2% agarose겔에 전기영동하여 밴드 패턴 양상을 통해 각 균주의 amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)마커를 균주별로 구분하였다. 본 연구를 위해서 표 1에 제시한 동일 속의 균주와 병원세균 등 다양한 균주들과 비교하여 본 연구에 사용된 균주의 band pattern에 의해 다른 균주의 오염도와 균주의 동정을 동시에 수행하고자 하였다.

공시한 균주들은 동일한 속에 속하는 균주들은 *MspI*으로 절단한 전기영동상에서 비슷한 크기의 밴드양상을 보였다 (그림 2와 표 3 표 4). 3개의 *Pseudomonas* 균주들은 약 600 bp와 540 bp fragment의 주 밴드를 보였고 밴드양상도 비슷하였으나, 2세부과제의 진딧물 방제균주인 EP-3균주는 band 양상이 다른 *Pseudomonas*와는 달리 나타내었다. *Lysobacter*와 *Bacillus*도 비슷한 결과를 보였고, 다른 속의 균주는 다른 밴드 패턴을 보여 손쉽게 마커로 활용할 수 있는 좋은 QC마커로 활용될 것이다.

상기와 동일한 방법으로 증폭한 세균의 ribosomal DNA와 곰팡이의 ITS 부위를 제한효소인 *HhaI*으로 절단하여 LabChip장비에 전기영동하여 각 균주별 밴드 패턴과 크기를 측정하였다 (그림 3과 표 4). *Pseudomonas* 그룹에서는 EP-3만 다르게 밴드 패턴을 보였으나, 다른 공시균주들은 동일한 밴드 패턴을 보였으며, *Bacillus* 그룹에서 *Bacillus amyloliquefaciens*와 *Bacillus subtilis*도 동일한 밴드 패턴을 보였다. 하지만 다른 속의 균주들을 상이한 밴드패턴을 보였다. 특히 탄저병균과 시들음병균도 unique한 밴드 패턴을 보여 QC마커로 활용하였다.

각 살선충 미생물들의 생화학적 마커는 기존에 보고된 항균활성 물질과 본 연구에서 살선충에 관련되어 있다고 증명된 DAPG등의 배양액에서 측정하여 생화학적 마커로서 이용가능성을 검토하였다. 우선 배양액을 유기용매로 추출하여 TLC plate상에서 전개하여 *P. chlororaphis* O6의 경우 phenazine과 pyrrolinitrin의 생성 여부로 검정하였다 (그림 4). *P. fluorescens* Wayn1R의 경우 DAPG생성 여부를 TLC에서 검정하여 생화학적 마커로 활용하였다. 하지만 *Chromobacterium* sp. C61의 경우 이 균주가 생성하는 항균활성 물질인 chromobactomycin이 TLC를 이용하여 검출이 되지 않고, MALDI-TOF방법으로만 검출이 가능하여 (그림 5) chitinase생성 3가지 균주의 경우는 chitinase생성 여부로 생화학적 마커로 이용하였다.

O6균주와 Way1R균주의 경우는 *fitD*유전자와 Wayn1R균주의 *phlD*유전자의 specific primer를 이용하여 각 균주의 배양액에서의 QC마커로 활용하였다. O6균주의 *fitD*유전자의 specific primer (Forward 5'-CCC TTG TCG CTG GCA GTA-3'와 reverse 5' TCG AAT ACA CCG AGC ACA GC-3')를 이용하였으면 PCR product크기는 727bp이었으며, Wayn1R specific primer로는 *phlD* specific primer로 forward 5'-ACC CAC CGC AGC ATC GTT TAT GAG C-3'와 reverse primer로 5'-CCG CCG GTA TGG AAG ATG AAA AAG TC-3')를 이용하였으며 600bp의 PCR product가 증폭되게 디자인하여 이용하였다 (그림 6). 다양한 균주로부터 genomic DNA를 분리하여 두 primer의 특이성을 검정해 본 결과, O6균주의 *fitD* primer의 경우, O6에서만 727bp의 특이 밴드가 관찰되었으나, Wayn1R과 *Serratia* sp. C1에서도 non specific band가 관찰되었다. Wayn1R균주의 *phlD*유전자 특이 primer의 경우는 Way1R에서만 특이적인 band가 관찰되어 이 두 primer를 균주의 QC마커로 활용하였다 (그림 6).

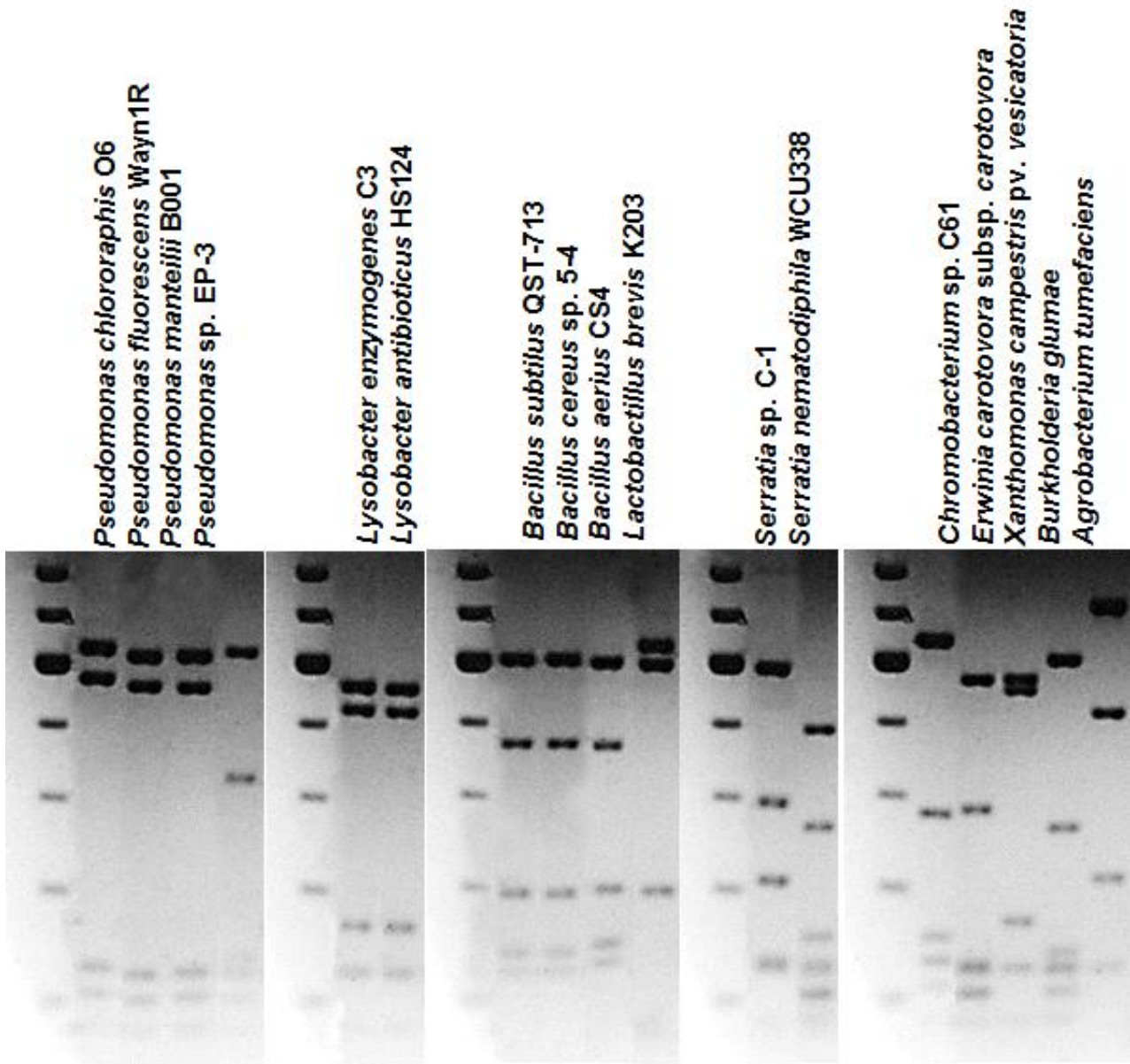


Fig. 2. 공시한 균주들의 amplified ribosomal DNA restriciton analysis 패턴. 배양한 균주 배양액을 10분간 가열한 다음 원심분리하고 상등액을 PCR의 template로 이용함. PCR product들은 제한효소 MspI으로 절단한 다음, 2% agarose겔에서 전기영동한 다음 염색하여 ARDRA 패턴을 측정하였음.

표 3. 각 균주별 ARDRA 마커 크기

<i>Msp</i> I digestion	1	2	3	4
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6	602.6	548.6		
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Wayn1R	592.8	543.7		
<i>Pseudomonas mantellii</i> B001	597.7	543.7		
<i>Pseudomonas</i> sp. EP-3	597.7	381.8		
<i>Lysobacter enzymogenes</i> C3	519.2	479.9	111.9	
<i>Lysobacter antibioticus</i> HS124	533.9	494.7	126.6	
<i>Bacillus subtilis</i> QST-713	587.9	440.7	180.6	
<i>Bacillus cereus</i> sp. 5-4	641.9	440.7	185.5	
<i>Bacillus aerius</i> CS4	583	440.7	190.4	
<i>Lactobactillus brevis</i> K203	612.4	583	190.4	
<i>Serratia</i> sp. C-1	568.3	337.6	200.2	
<i>Serratia nematodiphila</i> WCU338	465.2	298.4	102.1	
<i>Chromobacterium</i> sp. C61	612.4	313.1	102.1	
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	553.5	327.8		
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	553.5	533.9	131.6	
<i>Burkholderia glumae</i>	586.9	298.4		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	676.2	494.7	210.1	

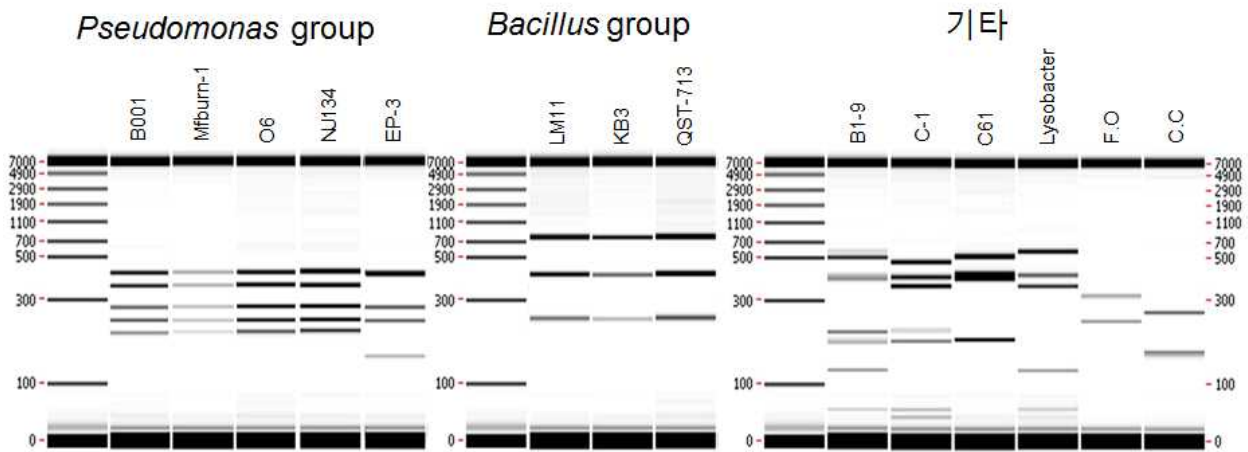


Fig. 3. 공시한 균주들의 amplified ribosomal DNA restriction analysis 패턴. 배양한 균주 배양액을 10분 간 가열한 다음 원심분리하고 상등액을 PCR의 template로 이용함. PCR product들은 제한효소 *HhaI*으로 절단한 다음, LabChip장비를 이용하여 ARDRA 패턴을 측정하였음.

표 4. 각 균주별 ARDRA 마커 크기

<i>Hha</i> I digestion	1	2	3	4	5
<i>Pseudomonas mantelii</i> B001	228.3±11	258.2±11.1	286.3±6.6	379.5±21.9	440±21.3
<i>Pseudomonas cedrina</i> Mfburn-1	231.1±11.2	259.1±11.2	288.7±7.6	384.6±23.2	442.1±19.7
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> O6	224.8	251.8	284.5	369.5	427.7
<i>Pseudomonas</i> sp. NJ134	235±12.8	260.9±11.5	290.9±10	385.3±25	448.5±24.8
<i>Pseudomonas</i> sp. EP-3	174.2±12.4	258.3±12.3	287.7±7.5	437±22.6	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KB3	266±15.6	437±29.7	863.8±97.8		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LM11	266.8±15.9	438.7±25.9	860.7±98		
<i>Bacillus subtilis</i> QST-713	263.2±8.3	433.9±15.8	845.6±61.4		
<i>Serratia</i> sp. C-1	224.8	251.8	284.5	369.5	427.7
<i>Chromobacterium</i> sp. C61	216.9±12.8	418.9±19.9	440.6±19	550.6±40.1	
<i>Pantoea ananatis</i> B1-9	141.7±11.8	209.5±13.4	230.1±8.3	414.1±18.3	529.4±39.1
<i>Lysobacter enzymogenes</i>	133.7	368.9	421.1	585.8	
<i>Fusarium oxysporum</i>	251	326			
<i>Collectotrichum cocodes</i>	178	273			

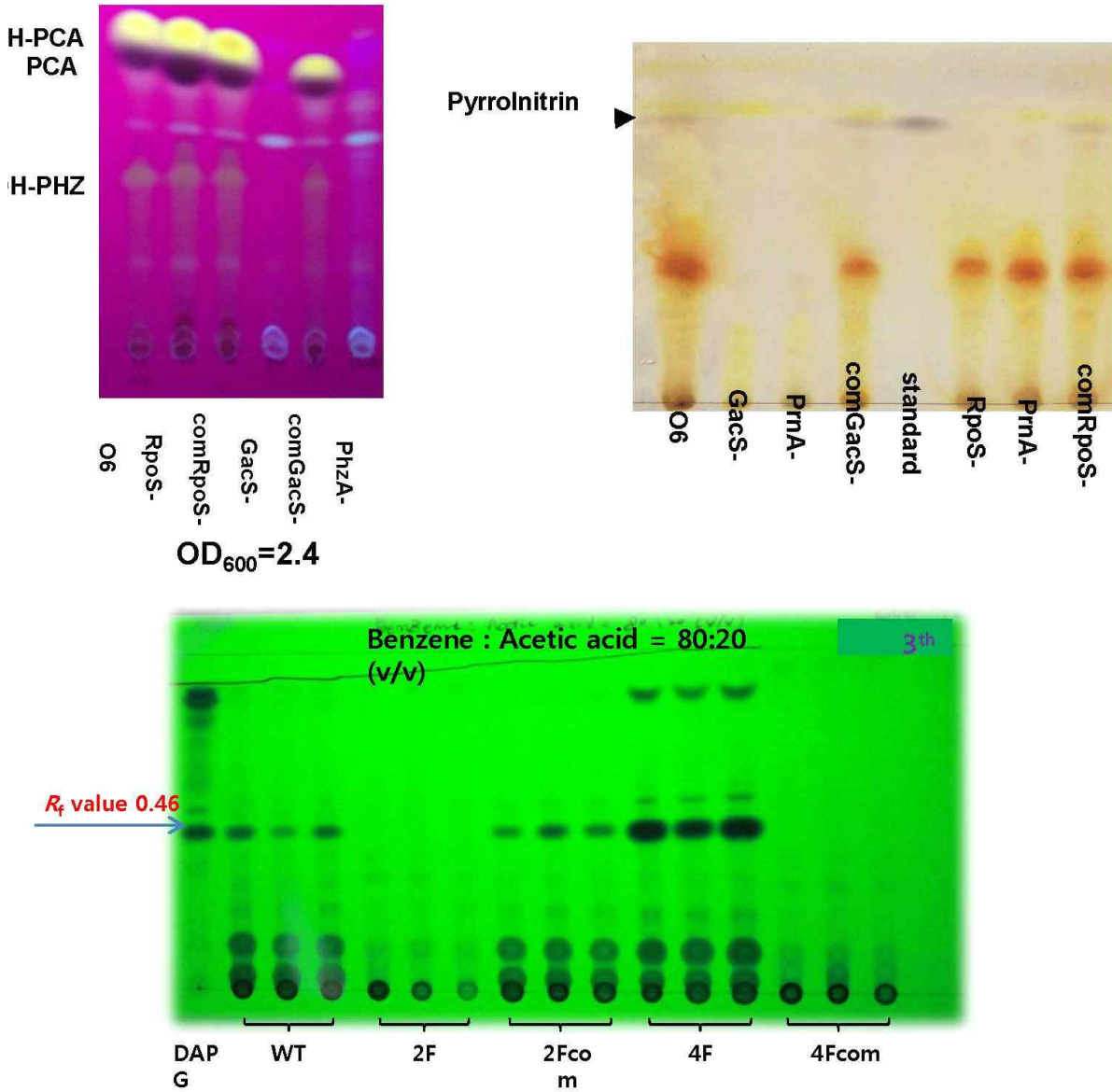


Fig. 4. 살선충 미생물 *Pseudomonas chlororaphis* O6 와 *P. fluorescens* Wayn1R 배양액의 유기용매 추출액의 TLC에 의한 생화학적 마커. O6균주의 경우 phenazine orange 색깔의 항균물질이나 pyrrolnitrin 생성 여부로 *P. fluorescens* 균주의 경우 DAPG 생성 여부로 검출이 가능함.

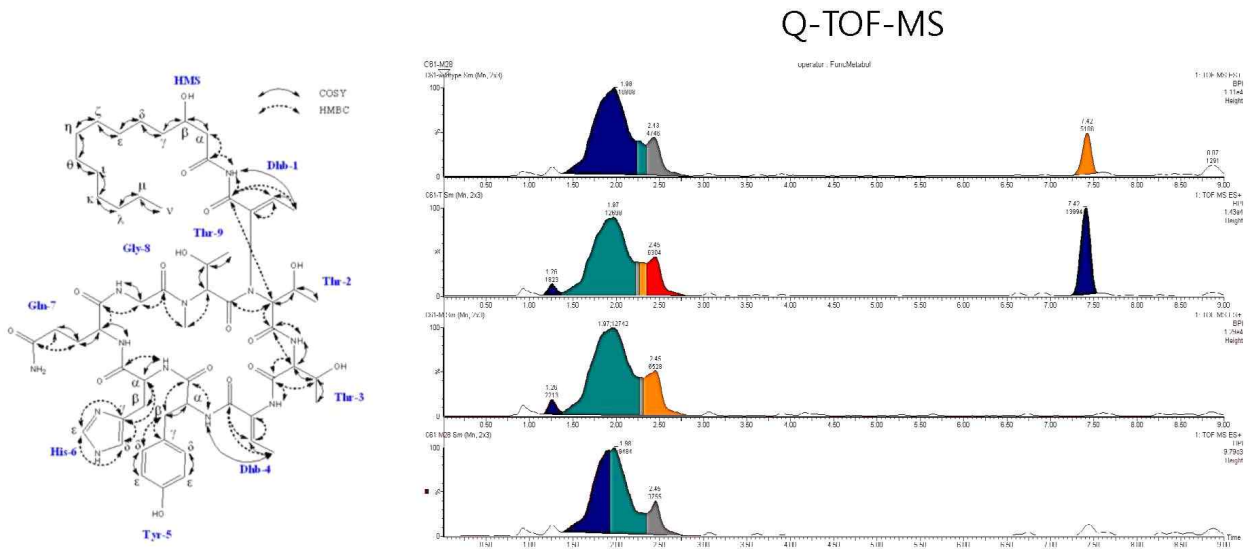
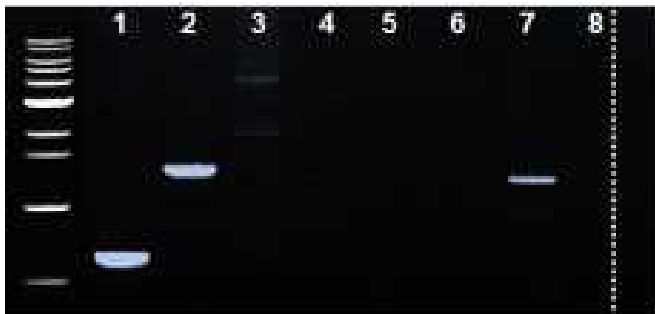


Fig. 5. 살선충 미생물 *Chromobacterium* sp. C61 배양액의 유기용매 추출액의 MALDI-TOF-MS 분석에 의한 생화학적 마커. Chromobactomycin 생성 여부로 검출이 가능함.



fitD specific primer



phlD specific primer

1. *Pseudomonas chlororaphis* O6
2. *Pseudomonas fluorescens* Wayn1R
3. *Pseudomonas marneffii* B001
4. *Chromobacterium* sp. C61
5. *Bacillus subtilis* QST-713
6. *Lysobacter antibioticus* HS124
7. *Serratia* sp. C-1
8. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Fig. 6. *Pseudomonas chlororaphis* O6와 *P. fluorescens* Wayn1R specific primer sets, *fitD* specific primer와 *phlD* specific primer를 이용한 다양한 세균에 대한 특이성 분석

또한 배양하는 동안 유해 미생물의 오염도를 측정하기 위해 배양한 균주나 제형화된 제품의 미생물에서 genomic DNA를 분리하여 template로 이용하여 다음의 식품 병원 미생물의 specific primer를 이용하여 PCR를 통해서 검정하였다 (그림 7). 디자인된 primer의 특이성을 검증하기 위해 *E. coli* DH5a, *E. coli* 0157, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteridis*의 genomic DNA를 분리하여 검정하여 본 결과, 각 primer는 특이적인 미생물에서 예상되는 PCR product크기가 증폭되어 식품 유해 미생물의 검사에 이용하였다 (그림 8).

상기의 두 종류의 primer와 1차 년도에서 개발된 ARDRA primer들을 이용하여 O6균주와 Wayn1R primer들을 이용하여 실제 미생물의 배양과정이나 시제품에서 QC마커로 활용 중이다. 일례로 실제 500 L fermentor에서 두 균주를 배양한 다음 배양액 1ml에서 간단한 boiling 방법으로 genomic DNA를 분리하여 주형으로 식품유해미생물 특이 primer와 O6와 Wayn1R 특이 primer를 이용하여 PCR를 수행하여 QC하였다 (그림 9).

추가적으로 제품화된 Food System 71680 (기산바이오텍, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Bacillus*, *Listeria*, Yeasts와 moulds)과 식품공전 미생물배지(기산바이오텍, *Bacillus cereus*, *E. coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*)를 구입하여 배양된 균주에서의 식품유해 미생물의 검출을 생화학적 방법을 통해서도 검사하였다 (표 5와 표 6). 상기의 방법을 이용하여 배양된 균주와 시제품에는 식품유해 미생물이 검출되지 않음을 검증하고 추후 연구를 수행하였다. 본 연구에서 배양액이나 시제품에서는 상기의 PCR과 생화학적 배지 방법 등을 이용한 QC에서 유해 미생물이 검출되지 않았다.

Staphylococcus aureus

16S-F

GTGCACATCTTGACGGTACC

16S-R

CGAAGGGGAAGGCTCTATC

target gene ; 16S rDNA product size; 565bp

Listeria monocytogenes

hlyA-F

CAAGTCCTAAGAGGCCAATC

hlyA-R

ATAAAGTGTAGTGCCCCAGA

target gene ; Listeriolysin O product size; 1,412bp

***Escherichia coli* O157:H7**

eaeA-F

AGGTCGTCGTGCTGCTA

eaeA-R

CCGTGGTTGCTTGGGTTTG

target gene ; Intimin product size; 255bp

Salmonella enteritidis

invA-F

TCCCTTTGCGAATAACATCC

invA-R

ATTACTTGTGCCGAAGAGCC

target gene ; Invasion protein product size; 786bp

Shigella flexneri

ipaH-F

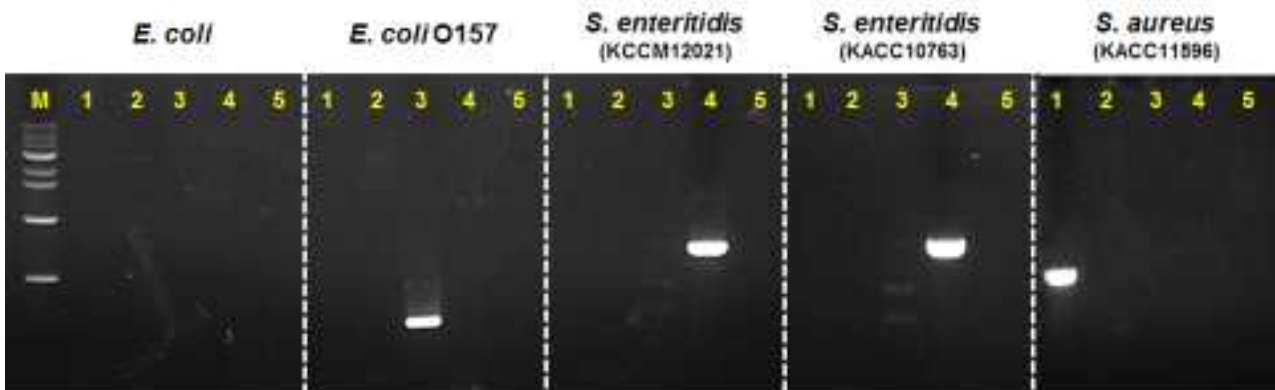
GGGAGAACCAGTCCGTAAA

ipaH-R

CGCATCTCTGAAACATCTTGA

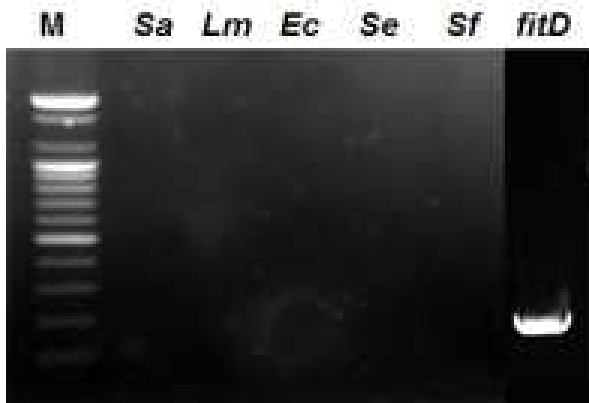
target gene ; Invasion protein product size; 1,088bp

Fig. 7. 미생물 배양과 제형화된 제품에서 식품 유해 미생물 QC마커로 이용된 미생물과 target 유전자 및 primer sequences.



1; 16S (*S. aureus* - 565bp), 2; *hlyA* (*L. monocytogenes* - 1,412bp), 3; *eaeA* (*E. coli* O157:H7 - 255bp), 4; *invA* (*S. enteritidis* - 786bp), 5; *ipaH* (*Shigella flexneri* - 1.088bp)

Fig. 8. 식품 유해 미생물 5종 특이 primer를 이용한 특이성 검정. 각 병원균 균주를 멸균수에 현탁하여 10분 동안 boiling하여 원심분리하여 세균 찌꺼기를 제거하여 상등액을 PCR의 template로 이용하였다.



Pseudomonas chlororaphis O6
액체 제형화 샘플



Pseudomonas fluorescens Wayn1R
액체 제형화 샘플

Fig. 9. *Pseudomonas chlororaphis* O6와 *P. fluorescens* Wayn1R의 500L 1/10 KB에서 배양한 액체 제형화 샘플에서의 식품유해 미생물 검출 primer와 각 균주 특이 primer를 이용한 QC

Table 5. Food system 71680키트를 이용한 유해 미생물 검정 방법

Well	Biochemical reactions for identification	Well colour			
		Positive reaction		Negative reaction	
1-LDS	Decarboxylation of lysine	red	✓ ✓	yellow	
2-H2S	Production of hydrogen sulphide	Black	✓	yellow	✓
3-UR	Hydrolysis of urea	red	✓ ✓	yellow	
Well	Presumptive identification	Well colour			
		Positive reaction		Negative reaction	
4-PRO	<i>Proteus spp./Providencia spp.</i>	brown-black		yellow	✓ ✓
5-PSE	<i>Pseudomonas spp.</i>	turbid green	✓ ✓	colourless	
6-STA	<i>Staphylococcus aureus</i>	black	✓ ✓	yellow	
7-ESC	<i>Escherichia coli</i>	blue		grey-red	✓ ✓
8-IND	Indole test	pink-red ring		yellow	
9-BCE	<i>Bacillus cereus</i>	turbid green	✓	yellow	✓
10-LIS	<i>Listeria spp.</i>	black	✓	yellow	✓
11-CAT	Catalase test	bubbles development	✓	absence of bubbles	✓
12-Y/M	Yeast and moulds	yellow		green	✓ ✓

Table 6. 식품공전 미생물 배지를 이용한 유해 미생물 검정

Selection medium	의심집락 검출여부	
	O6배양	Wayn1R 배양
XLD (Xylose Lysine Desoxycholate) agar - <i>Salmonella</i>	×	×
BS (Bismuth Sulfite) agar - <i>Salmonella</i>	×	×
SS (Salmonella Shigella) agar - <i>Salmonella, Shigella</i>	×	×
MYP (Mannitol Egg Yolk Polymixin) agar- <i>Bacillus cereus</i>	×	×
Baird-parker agar - <i>Staphylococcus aureus</i>	×	×
<i>Staphylococcus</i> medium 110 - <i>Staphylococcus aureus</i>	×	×
MacConkeySorbitol agar - <i>E. coli</i> O157	×	×
EMB (Eosin Methylene Blue) agar - <i>E. coli</i> O157	×	×
Listeria Enrichment agar - <i>Listeria monocytogenes</i>	×	×
Listeria oxford agar - <i>Listeria monocytogenes</i>	×	×
MacConkey agar - <i>Salmonella, Yersinia enterocolitica</i>	×	×

제 8 절 식물성 오일 유래 당지질성 생산 미생물 활용 복숭아혹 진딧물 방제용 농자재 개발

1. 연구배경 및 필요성

가. 국내외 배경

깨끗하고 안전한 농산물을 선호하는 사회적 욕구가 극대화되고 있는 현실에 입각하여 우리나라는 친환경농업육성을 위한 다양한 범국가적 정책을 적극적으로 추진하고 있다. 친환경농업은 병해충 관리 및 작물의 생육관리를 위해 합성농약과 합성비료의 사용을 절제하고 생물이나 천연자원에서 유래된 소재와 기능을 이용하는 농업시스템을 말한다. 친환경농업의 육성을 위한 우리나라의 투자예산의 크기는 약 3,600여억원에 이를 정도로 높으며, 이를 통해 장기적인 실천계획(1차 5개년 및 2차 5개년)을 세우고 다양한 연구개발을 비롯한 시설투자, 보조금 사업, 그리고 산업화 등에 집중적인 정책을 추진하고 있다. 이러한 상황은 친환경농업의 발전을 위해 과학기술 분야에서 다양한 농업기술개발을 위한 노력이 필요함을 시사한다.

관행재배 농산물의 생산을 위해서 뿐만 아니라 친환경농산물의 생산에서도 가장 큰 애로사항은 병해충 관리를 어떻게 할 것인가라고 할 수 있다. 현재 관행재배 농산물 생산을 위해 약 4,000여개의 합성농약이 적절하게 사용되고 있지만 친환경농업에 사용되는 병해충 방제용 농자재의 경우 그 품목수가 극히 소수에 불과하다. 더군다나 유효성분을 기준으로 병해충 관리용 친환경농자재를 분류해보면 그 한계성은 더욱 크게 부각된다. 2013년 현재 농촌진흥청에 유기농자재로서 관리되고 있는 병해충 관리용 친환경농자재의 수는 약 600여개로 많지만 유효성분을 기준으로 볼 때 제품명만 다르고 동일한 유효성분으로 구성된 제형화된 농자재가 대부분이어서 실질적인 농자재수는 매우 적다(김과 김, 2009). 이는 관행농업 못지않게 친환경농업에 필요한 다양한 병해충 관리용 제제를 개발하는 연구가 매우 필요함을 의미한다.

한편, 우리나라 친환경농업에서 사용되고 있는 병해충 관리용 농자재는 크게 미생물 유래 기능과 소재를 이용한 미생물농약과 천연식물 유래 소재를 이용한 생화학농약이 있다. 이들 중 미생물농약의 경우 대부분이 미생물 생균제인 살균제가 대부분이고 살충제는 국히 일부이다. 등록된 살충제의 경우도 섭식성 해충인 나방류를 방제하는 제제가 대부분이며 진딧물 같은 흡즙성 해충을 방제하기 위한 제제는 아직까지 전무하다(그림 1).

우리나라에서 가장 많이 사용되고 있는 진딧물 방제용 생화학농약은 제충국, 님오일, 데리스, 고삼 등을 원료로 하여 가공된 천연식물 추출물 유래 농자재들이 대부분으로서 인축에 대한 독성이 낮아 생태적이고 방제효과가 속효성 제제라는 장점이 있어 널리 사용되고 있다. 천연식물 추출물 제제에 대한 현황을 농촌진흥청에 등록된 친환경유기농자재를 기준으로 살펴보면 진딧물 방제용 천연식물 제제는 표 1에서 보여준 바와 같이 2010년도 현재 고삼 제제가 38%, 님 제제가 24%, 데리스제제가 6%, 식물성오일 제제가 26%, 제충국 제제가 3%, 그리고 담배 제제가 3%를 차지하고 있다. 세계적으로 안전한 농산물에 대한 선호도가 높아지면서 친환경농자재에 대한 수요가 증가함에 따라 식물추출물 원료의 가격이 급등하면서 2014년도에는

가격이 비교적 저렴한 고삼 제제와 님 제제가 전체 천연식물 제제의 약 60%를 차지할 정도로 여전히 국내에서 많이 사용되고 있다. 이에 반해 대표적인 진딧물 방제용 천연식물 제제이며 knockdown 효과가 탁월하여 속효성 제제로 알려진 제충국 제제와 담배 제제는 원료가격이 폭등하면서 2010년 이후 국내수입이 급감하여 2014년에 등록된 제제는 없는 실정이다. 한편, 제충국 제제와 담배 제제의 대안으로서 계피 제제가 10%, 차나무와 식물성오일 제제가 각각 5%와 21%를 차지하고 있지만 약효가 미약하고 적용해충이 광범위하지 않다는 단점이 있다. 이렇듯 식물추출물 제제는 유효성분이 한정되면서 등록된 품목수와 적용 스펙트럼도 매우 제한적이라는 것을 알 수 있다. 더구나 천연식물 제제는 원료를 해외에서 수입해야 하므로 가격의 불안정 등으로 인해 농가에서 사용할 때 경제적인 부담을 줄 수 있다는 점에서 그 활용성이 매우 제한적이라고 할 수 있다.

흡즙성 해충방제용 미생물 제제의 개발에 대한 해외의 사례를 주로 곤충에 기생하는 병원성 곰팡이를 원료로 하는 제제가 개발되어 사용되고 있다(Fournier과 Brodeur, 2000; Lopez-Llorca와 Carbonell, 1998; Marshall 등, 2003). 이 제제는 원료인 곰팡이가 포자를 발아할 수 있는 조건을 만들어야 주어야하기 때문에 노지재배 작물을 대상으로 사용이 불가능하며 포자의 발아를 위해 온도 및 습도, 그리고 광조건 등을 최적조건으로 장기간 유지해주어야 한다. 뿐만 아니라 이 제제는 방제효과가 느리고 유통 및 저장성이 매우 낮아 실효성이 떨어진다는 단점이 있다(Ekesi 등, 1999; Glare 등, 1986; Ouedraogo 등, 1997; Yeo 등, 2003).

시설재배 작물에서 발생하는 대표적인 흡즙성 해충인 진딧물은 작물의 즙액을 흡즙하여 작물에게 직접적인 피해를 일으키며 바이러스를 매개하여 이차적인 질병을 일으키는 간접적인 피해를 가져온다(Chan 등, 1991). 진딧물을 방제하는 친환경농자재로서 상기에서 언급한 천연식물 추출물 제제가 사용되고 있지만 한정된 유효성분의 반복적인 사용으로 인해 진딧물의 저항성이 농가현장에서 들려오고 있어 유효성분이 다른 새로운 제제가 개발되지 않으면 식물추출물 제제에 대한 진딧물의 저항성은 전반적으로 발생할 우려가 있다. 그러므로 천연식물의 한계와 해충의 저항성을 줄일 수 있는 다양한 제제의 개발이 필요하다.

본 연구에서는 진딧물 방제용 제제를 개발하는데 있어서 진딧물의 큐티클 층을 공략할 수 있는 대사물질을 생산하는 것으로 알려진 미생물을 소재로 하였다. 이를 위해 살충성 대사물질을 생산하는 최적 배양조건을 조사하고 확립된 배양조건에서 얻은 미생물배양액을 진딧물 방제용 기초제제로 개발하여 이의 방제효능을 평가한 다음, 기초제제를 토대로 농가현장에서 방제효능을 검증할 수 있는 시제품을 개발하여 진딧물 방제 매뉴얼을 연구하고자 하였다.

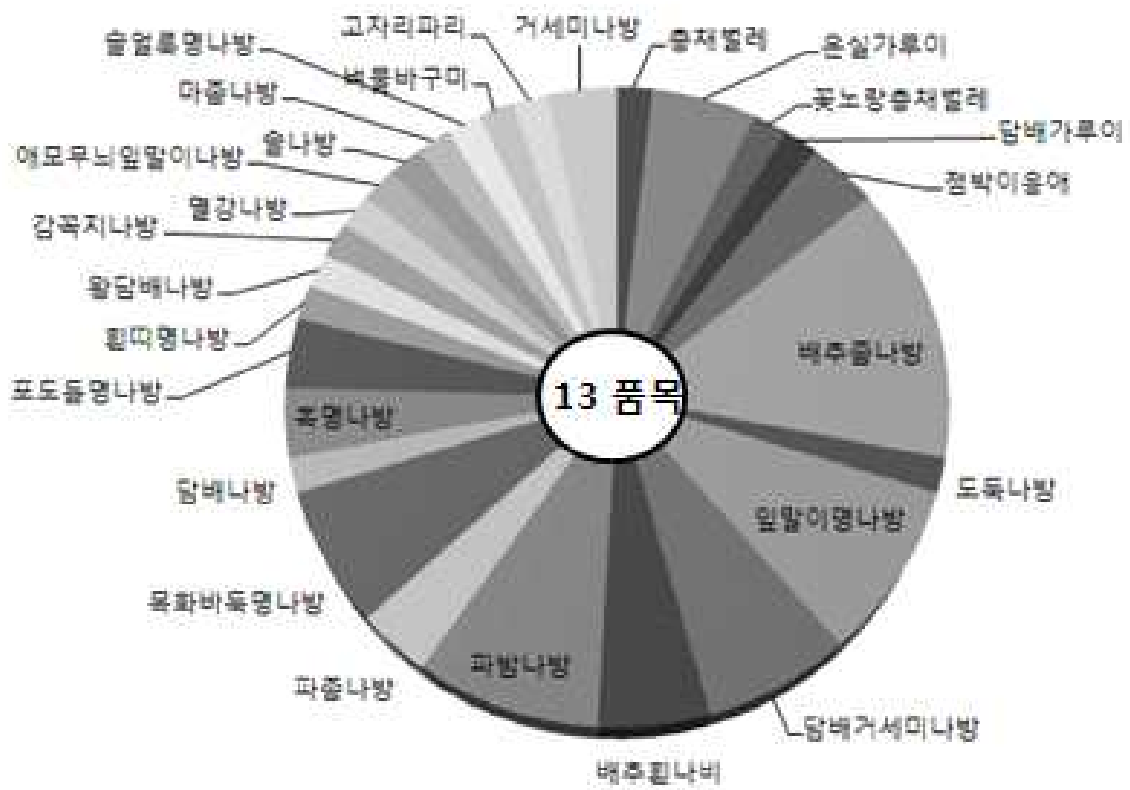


그림 1. 국내에 등록된 미생물 살충제의 적용 해충 분류 현황.

표 1. 진딧물 방제용 천연식물 추출물 제제의 국내 등록 현황

천연식물	천연식물 제제의 국내 등록비율(%)	
	2010년	2014년
고삼	38	26
넝	24	33
계피	-	10
차나무	-	5
데리스	6	5
식물성 오일	26	21
제충국	3	-
담배	3	-

나. 기술적 배경

진딧물은 생후 3일부터 임신이 가능하며 생후 7일이 되면 10여 마리의 새끼를 낳고 약 30-40일간 일생을 보내면서 한 마리당 100마리 이상의 새끼를 낳을 정도로 번식이 매우 빠른 해충이다. 뿐만 아니라 진딧물은 매 16시간마다 큐티클을 탈피하는 특성이 있기 때문에 살포된 약제가 12시간 이내에 큐티클 층을 통과하여 작용점에 도달하지 않으면 만족할만한 효능을 얻을 수 없다. 따라서 진딧물을 효율적으로 방제하려면, ① 12시간 이내에 큐티클 층을 통과하여 knock down 효과를 가져 오거나, ② 큐티클 층을 파괴하는 살충물질을 적용해야 한다. 본 연구에서는 이러한 진딧물의 특성을 이해하고 그림 2와 3에서 보여준 바와 같이 진딧물의 큐티클 층을 파괴하는 살충물질을 생산하는 미생물을 이용하여 제제를 개발하고자 하였다(Kim 등, 2011).

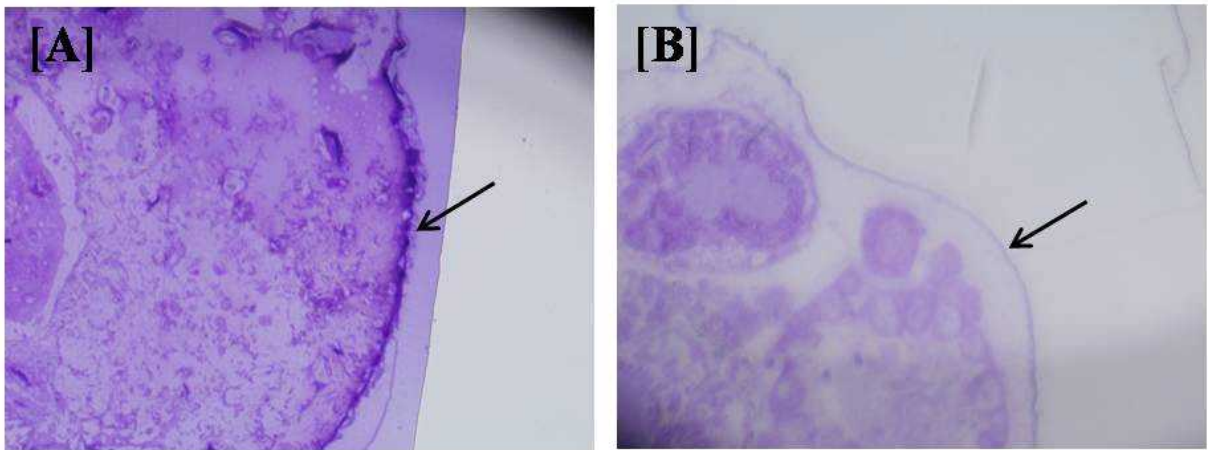


그림 2. 진딧물 큐티클 광학현미경 사진: A. 대조구, B. 미생물 처리구 (Kim 등, 2011)

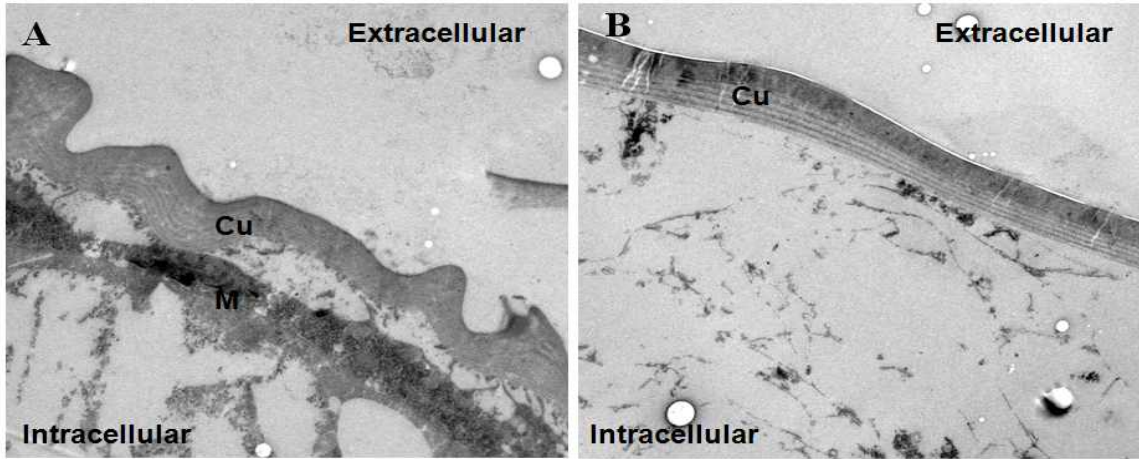


그림 3. 진딧물 큐티클 투과현미경 사진: A. 대조구, B. 미생물 처리구, (Kim 등, 2011)

2. 연구내용 및 방법

가. 기초제제 연구

(1) 살충물질 최적 생산 배양조건 조사

(가) 살충물질 생산을 위한 최적 탄소원 조사

미생물 배양 및 살충물질의 생산을 위한 공시균주의 최적 탄소원 조사는 glucose, fructose, sodium-acetate, sucrose, glutamate 그리고 식물성오일을 대상으로 실시하였다. 탄소원을 0.2, 1.0, 2.0% (v/v) 수준으로 함유한 최소 무기염류배지에 공시균주를 1.0% (v/v) 수준으로 접종한 다음 96시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 원액, 5배, 10배, 100배 희석한 다음 진딧물에 국소적 처리하여 살충효율을 Abbott (1925) 방법에 의거하여 조사하였다.

(나) 살충물질 생산을 위한 최적 질소원 조사

미생물 배양 및 살충물질의 생산을 위한 공시균주의 최적 질소원의 조사는 ammonium nitrate, ammonium sulfate, sodium nitrate 그리고 urea등을 대상으로 실시하였다. 상기에서 선정된 최적 탄소원과 질소원을 함유한 최소 무기염류배지에 공시균주를 1.0% (v/v) 수준으로 접종한 다음 배양 후 상기와 같이 살충효율을 조사하였다.

(다) 살충물질 생산을 위한 탄소원 대비 질소원 비율(C/N) 조사

미생물 배양 및 살충물질의 생산을 위한 공시균주의 탄질(C/N) 비율의 조사는 최적 탄소원과 최적 질소원의 함량을 고려한 비율을 기준으로 실시하였다.

(라) 살충물질 생산을 위한 최적 무기염류 조성 조사

미생물 배양 및 살충물질의 생산을 위한 최소 무기염류 조성은 예비실험에서 선정된 배지로서 표 2에 제시한 바와 같이 최적 탄소원과 질소원이 함유된 각각의 무기염류 배지에서 공시균주를 배양한 다음 진딧물 살충효율을 조사하였다.

(마) 살충물질의 정성분석

살충물질의 정성적 분석을 위해 배양 후 얻은 각 상징액을 ethyl acetate로 용매추출한 다음 추출물을 thin layer chromatography (TLC, silica gel 60 F254, 20 x 20 cm, Merck)에 전개하여 분석을 수행하였다. TLC분석에 사용된 전개용매는 Chloroform₃ : methanol (4:1, V/V) 이었으며 전개 후 10% H₂SO₄를 분사하여 100℃ 오븐에서 건조시키면서 발색시켰다.

표 2. 미생물 최소배지 조성(g/L)

최소배지 구성요소					
P-MSM (g/L)		L-MSM (g/L)		P-MSM+TE (g/L)	
NaNO ₃	15.0 g	Na ₂ HPO ₄	2.0 g	NaNO ₃	15.0 g
KCl	1.1 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4 g	KCl	1.1 g
NaCl	1.1 g	KH ₂ PO ₄	1.0 g	NaCl	1.1 g
FeSO ₄	0.28 mg	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g	FeSO ₄	0.28 mg
KH ₂ PO ₄	3.4 g			KH ₂ PO ₄	3.4 g
K ₂ HPO ₄	4.4 g			K ₂ HPO ₄	4.4 g
MgSO ₄	0.5 g			MgSO ₄	0.5 g
Yeast extract	0.5 g			Yeast extract	0.5 g
+0.5 % trace element	(g/L)	+0.2% trace element	(g/L)	+0.5% trace element	(g/L)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.29 g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂ ·4H ₂ O	0.24 g	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.08 g	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.08 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25 g	LiCl	0.05 g	LiCl	0.05 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.17 g	Al(OH) ₃	0.1 g	Al(OH) ₃	0.1 g
		SnCl ₂ ·2H ₂ O	0.05 g	SnCl ₂ ·2H ₂ O	0.05 g
		KI	0.05 g	KI	0.05 g
		H ₃ BO ₃	0.05 g	H ₃ BO ₃	0.05 g
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 g	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 g
		NiSO ₄ ·6H ₂ O	0.1 g	NiSO ₄ ·6H ₂ O	0.1 g
		BaCl ₂	0.05 g	BaCl ₂	0.05 g
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₄ ·H ₂ O	0.05 g	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₄ ·H ₂ O	0.05 g

나. 시제품 제작 및 효능 평가

(1) 액체형 제형 연구

미생물의 액체형 제제를 연구하기 위해 상기균주를 100 L와 3,000 L 용량으로 배양하였다. 배양액은 실내에서 보관하면서 정기적으로 일부를 취해 원액, 5배, 10배, 100배 희석액을 진딧물에 국소처리하여 진딧물의 살충활성을 조사하였다. 배양액에 함유된 살충물질의 정성분석은 상기와 같이 TLC 분석을 수행하였다. 균주의 배양조건(100 L)은 온도가 25°C, 회전수는 70 rpm, 그리고 시간은 96시간이었다. 또한, 3000 L 용량의 대량배양 조건은 온도가 25°C, 회전수는 40 rpm, 압력 0.4 kg/cm², 그리고 공기주입량 900 L/min이었으며 시간은 96시간이었다.

(2) 고체형 제형 연구

균주의 고체형 제형 연구를 수행하기 위해 분말 고체제형과 종균보급형 상토제형을 제조한 뒤 각각의 제형에 따른 진딧물 살충효율을 조사하였다. 분말제의 경우 배양액에 전분(썬-사이즈, 삼양제넥스)을 배양액 부피의 25-50% (w/v)에 해당하는 양을 첨가한 후 혼합액을 건조하여 분말수화제 형태의 제제를 조제하였다. 분말제제의 진딧물 살충효능은 일정량의 제제물에 희석하여 진딧물에 대한 살충효율을 조사하였다.

종균보급형 상토제형의 경우 다음과 같이 수행하였다. 멸균된 상토(10 g)를 플라스틱 용기(6 x 12 cm)에 넣은 다음 0.2% 콩기름 (v/v)과 0.05% Tween-80 (v/v) 및 동일한 부피의 멸균증류수를 각각 첨가한 후 회전식 교반기에서 혼합하였다. 혼합하는 동안 상기에서 얻은 미생물 배양액을 1% (v/w) 수준으로 첨가하여 접종균수가 10⁸ cfu/g 수준이 되도록 하였다. 이때 대조구는 동일하게 준비된 상토에 균을 접종하지 않은 시료였다. 균을 접종한 후 경시적인 균체수의 변화는 상토를 증류수로 격렬하게 진탕되어 추출되어 나온 미생물의 수를 ampicillin (50 mg/L) 과 kanamycin (50 mg/L)이 함유된 LB 한천배지에 희석평판하여 배양 후 나타난 콜로니를 조사하여 수행하였다.

(3) 보조제 첨가 액체형 제형 연구

보조제 첨가 액체형 제형 연구를 수행하기 위해 일정량의 xanthan gum이 함유된 공시균주의 배양액을 진딧물에 살포하여 살충효율을 조사하였다. 균일한 크기의 복숭아혹진딧물(2령)을 세절된 배추잎(5 x 5 cm)에 붓을 사용해 20마리 안치한 후 보조제 함유 배양액을 소형 분무기를 이용해 살포하였다. 이후 진딧물의 이동을 차단하기 위해 안치된 배추잎은 유리원통(15 x 25 cm)에 옮겨 매달아 놓은 후 진딧물 살충효율을 조사하였다.

(4) 농가현장 배양

(가) 농가현장 배양을 위한 최적 탄소원 조사

멸균 조건에서 농가현장 배양 최적 탄소원을 조사하기 위해 농가에서 저렴하게 구입이 가능한 함수포도당(대상주식회사)과 당밀(케이시산업환경)를 이용하여 균주의 생장을 조사하였다. 탄소원이 함유된 영양배지를 120°C에서 15분간 멸균한 다음 균주를 1%(v/v)수준으로 접종하여 배양하였다. 배양 96시간 후 배양액을 진딧물에 국소처리하여 살충효율을 조사하였다.

(나) 농가현장 배양을 위한 최적 질소원 조사

멸균 조건에서 농가현장 배양 최적 질소원을 조사하기 위해 농가에서 저렴하게 구입이 가능한 요소태 복합비료(맞춤16호, 남해화학), 질산태 복합비료(성장엔, 동부한농), 인산을 첨가한 질산태 복합비료(인산+맞춤16호) 등의 3개의 질소원을 이용하여 균주의 생장을 조사하였다. 탄소원으로 최적 함량의 함수포도당과 당밀을 이용하였으며 각각의 탄소원이 함유된 배지에 상기의 질소원을 첨가한 다음 120℃에서 15분간 멸균 하였다. 멸균 후 균주를 1%(v/v) 수준으로 접종하여 배양하였다. 배양 96시간 후 배양액을 진딧물에 국소처리하여 살충효율을 조사하였다.

(다) 농가현장 배양을 위한 최적 탄소원 대비 질소원 비율(C/N) 조사

멸균 조건에서 농가현장 배양 최적 탄소:질소(C/N) 비율을 조사하기 위해 단일 탄소원으로 함수포도당과 질소원으로 요소태 복합비료와 질산태 복합비료를 이용하였다. 각각의 질소원은 함수포도당에 대한 질량비를 계산하여 최소영양배지에 첨가한 후 균주를 1%(v/v) 수준으로 접종하였다. 배양 96시간 후 각각의 배양액의 균체수와 진딧물 살충효율을 조사하였다.

(라) 미생물의 비멸균 조건 배양 조사

균주의 실제 농가현장 배양 적용을 위해 비멸균 조건에서 상기와 같은 탄소원과 질소비료를 이용하여 100 mL 과 500 L 용량으로 균주를 배양하였다. 농가 지하수에 탄소원을 2%(v/v) 수준으로 첨가한 후 요소태 복합비료를 질소원으로 첨가하였다. 한편, 100 mL 용량 배양의 경우 균주는 1%(v/v) 수준으로 접종하였으며 실험실 조건에서 배양하였다. 또한, 500 L 용량 배양의 경우 균주를 10%(v/v) 수준으로 접종하였으며 남평읍 평산리 농가에서 배양하였다. 배양 96시간 후 각각의 배양액을 진딧물에 국소처리하여 살충효율을 조사하였다.

(5) 소포장 시험

소포장 조건에서 진딧물에 대한 살충효율 및 작물의 생리학적 조사는 농촌진흥청 약효시험기준법에 따라 실시하였다. 진딧물은 시설재배 고추에서 자연적으로 발생한 진딧물을 대상으로 실시하였다. 진딧물의 개체수가 20마리 이상 수준으로 발생하는 고추나무 5개를 선정하고 각 나무당 5개의 잎에 발생하는 진딧물에 소형 분무기를 이용하여 공시균주의 시제품을 살포하였다. 살충효율은 시제품을 살포한 24시간 후 전체 충수에 대한 사충수의 백분율로 산출하였다. 또한, 공시균주의 시제품 살포에 따른 작물생장의 변화는 시제품을 살포한 뒤 일정기간동안 작물의 마디수, 신초잎수, 분지수, 열매수 등의 차이를 대조구와 비교하여 조사하였다. 대조구는 물을 처리하였으며 참조구는 진딧물방제용 합성농약인 코니도를 처리하였다. 시험포장은 전남대학교 농생대 시설재배 단지였다.

(6) 유기농업자재 공시 시험

공시제의 유기농업자재 목록공시를 위해 농촌진흥청 유기농업자재 공시 및 품질인증기준에 따라 시제품의 유효성분 분석 및 유해성분 분석 그리고 독성시험을 실시하였다. 각각의 시험은 농촌진흥청 인증기관에 의뢰하여 수행되었으며 모든 기준은 유기농업자재 공시 및 품질인증 기준에 의거하여 수행되었다.

다. 시제품의 농가현장 효능 평가 및 매뉴얼 연구

(1) 시험포장 및 작물 재배환경 조건

시험포장은 전라남도 나주시 남평읍 평산리에 위치하였으며 시험을 위해 친환경 재배 고추포장(600 m²)을 임차하였다. 재배 작물은 고추(청량)로서 3월 초에 50 cm 간격으로 정식하였으며 시험 대상은 총 538주였다. 작물의 양분공급을 위한 비료시비는 우리나라 무농약 농산물 재배기준에 준하였다.

(2) 진딧물 방제 매뉴얼 연구

진딧물방제 매뉴얼 연구의 일환으로 본 연구에서 개발한 시제품과 시판자재를 교호적으로 처리하여 진딧물의 밀도를 조사하였다. 이를 위해 공시균주의 시제품과 유효성분이 상이한 천연식물 추출물 자재 3종을 선발하였다. 선발된 자재는 실험실 조건에서 고농도(권장농도 2배)와 권장농도 그리고 저농도(권장농도 1/3)로 진딧물에 국소처리 하여 살충효율을 검증하였다. 시제품과 선발자재의 교호적인 최적처리 순서를 조사하기 위해 실험실 조건에서 각각의 자재를 교호적 처리하여 진딧물 밀도의 변화를 조사하였다. 한편, 농가포장조건에서 매뉴얼 연구는 실내조건에서 선정된 자재의 교호적인 처리법에 기준하여 재배지수별 진딧물 밀도지수를 조사하였다. 자재의 살포는 진딧물의 밀도가 적정수준으로 관찰 되었을 때 시행하였다.

3. 연구결과

가. 기초제제 연구

미생물을 이용한 농자재 개발에 있어서 미생물이 생산하는 기능성 물질의 최적 생산조건에 대한 연구는 매우 중요하다. 대사산물의 생산량을 높이기 위한 주요한 방법으로는 균주를 돌연변이(GMO)시켜 생산량을 증대시키거나 균주의 최적배양조건을 선정하여 생산량을 증대시키는 방법이 있다. 하지만, 현재 GMO를 농업환경에 적용하기에는 생태계에 미치는 영향에 대한 연구가 부족한 실정이며 우리나라의 경우 법적으로 유기농업자재의 등록이 금지되고 있다. 따라서 본 연구에서는 높은 살충효율을 갖는 기초제제의 개발을 위해 미생물이 생산하는 살충물질인 당지질성물질의 최적배양 조건을 조사하였다. 이를 위해 탄소원, 질소원, 탄소/질소 비율, 무기염류 조성에 따른 균주의 성장 및 진딧물에 대한 살충효율을 조사하였다.

(1) 살충물질 최적 생산 조건 조사

(가) 탄소원 조사

살충물질의 생산을 위한 최적 조건을 조사하기 위해 탄소원에 따른 진딧물 살충효율을 조사하였다. 탄소원은 *Pseudomonas* 속 미생물이 일반적으로 이용 가능한 탄소원이었으며 식물성 오일은 균주의 특이 기질로서 선택하였다. 탄소원을 0.2, 1.0, 2.0% (v/v) 농도수준으로 첨가하여 미생물을 배양 한 후 배양액의 살충효능을 조사하였다. 탄소원에 따른 진딧물 살충효율은 표 3과 같았다. 탄소원의 농도가 증가할수록 glutamate를 제외한 모든 탄소원에서 진딧물

살충효율이 증가하였으며, 2.0%로 탄소원을 첨가하였을 경우 glutamate와 sucrose를 제외한 모든 탄소원에서 100.0%의 진딧물 살충효율이 관찰되었다. 이러한 결과를 바탕으로 최적 탄소원은 2.0% 수준의 glucose, fructose, sodium acetate 그리고 식물성 오일로 조사되었다.

미생물 배양액을 원액수준으로 처리한 경우 최적 탄소원을 선별하기가 어려워 배양액을 5, 10, 100배씩 희석하여 진딧물에 처리한 후 살충효율을 조사한 결과 glucose, fructose, sodium acetate는 5배 희석액에서 각각 100.0%, 100.0%, 76.0%의 살충효율이 관찰되었으며 100배 희석하여 처리하였을 경우 각각 56.0%, 36.0%, 15.0%의 살충효율이 관찰되었다. 식물성 오일의 경우 soybean oil, canola oil, olive oil 배양액을 5배 희석하여 처리하였을 때 약 60% 수준의 살충효율이 관찰되었으며 100배 희석하였을 경우 50.0%, 42.6%, 40.7%의 살충효율이 관찰되었다 (표 4). 이상의 결과를 바탕으로 100배 희석액에서 50.0% 이상의 살충효율이 관찰된 2.0% glucose와 0.2% soybean oil을 최적 탄소원으로 선정하였다.

또한, glucose의 경우 2.0%(v/v) 수준과 5.0%(v/v) 수준에서 살충효율이 유사하였으며 10% 수준에서는 살충효율이 감소하였다 (표 5). 이에 glucose를 탄소원으로 이용하여 배양할 경우 경제적인 비용과 살충효율을 고려하였을 때 glucose의 최적농도는 2.0%(v/v)가 적정하다고 판단하였다.

식물성 오일을 최적 탄소원으로 하여 배양하였을 경우 농도의 증감에 따라 살충효율 또한 증가하였다. 하지만, 0.2%(v/v) 농도수준 이상에서는 배양액의 층이 분리됨이 관찰되었다. 이는 균주가 고농도의 식물성 오일을 분해하지 못하여 탄소원으로 이용하지 못한 것으로 판단된다. 따라서 균주를 식물성오일을 탄소원으로 하여 배양할 경우 0.2% 수준의 soybean oil이 적정한 것으로 판단되었다.

(나) 질소원 조사

살충물질의 생산을 위한 최적 질소원을 선정하기 위하여 ammonium nitrate, ammonium sulfate, sodium nitrate, urea를 첨가하여 균주를 배양하였으며, 이때 탄소원으로 2.0% (v/v) glucose를 사용하였다. 배양액을 원액과 5배 희석하여 처리한 경우 질소원에 따른 살충효율의 차이가 관찰되지 않아 배양액을 10배 및 100배 희석하여 처리한 경우 질소원으로 sodium nitrate가 살충효율이 각각 100.0%와 36.0%로서 가장 높았다 (표 6). 이상의 결과를 바탕으로 glucose를 탄소원으로 이용할 경우 sodium nitrate가 최적 질소원으로 조사되었다.

또한, 최적탄소원을 0.2%(v/v) soybean oil로 하여 ammonium nitrate, ammonium sulfate, sodium nitrate, urea등을 질소원으로 배양한 경우 배양액의 희석배수에 따라 살충효율은 질소원 사이에 현저한 차이는 관찰되지 않았으며 sodium nitrate의 경우 다른 질소원에 비해 높은 살충효율이 관찰되었다 (표 7). 이와 같은 결과를 바탕으로 식물성 오일을 탄소원으로 하여 균주를 배양할 경우 sodium nitrate가 최적 질소원으로 선정되었다.

표 3. 탄소원에 따른 공시균주의 진딧물 살충효율

탄소원	진딧물 살충 효율(%)*		
	탄소원 함량(%)		
	0.2	1.0	2.0
Glucose	90.0 ± 7.8	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Fructose	75.5 ± 12.5	96.3 ± 5.1	100.0 ± 0.0
Sodium acetate	66.6 ± 21.9	93.9 ± 1.7	100.0 ± 0.0
Sucrose	4.4 ± 9.4	28.0 ± 1.7	19.5 ± 0.0
Glutamate	83.3 ± 1.5	17.0 ± 20.6	3.6 ± 25.8
Soybean oil	98.8 ± 1.5	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Canola oil	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Olive oil	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0

*3반복 평균 ± 표준 편차

표 4. 미생물 배양액의 희석조건에 따른 진딧물 살충효율

탄소원	함량 (%)	진딧물 살충 효율 (%)*		
		배양액 희석 비율		
		5	10	100
Glucose		100.0 ± 0.0	84.7 ± 9.9	56.5 ± 3.7
Fructose	2.0	100.0 ± 0.0	84.8 ± 3.8	36.9 ± 13.6
Sodium acetate		76.1 ± 6.5	45.7 ± 3.8	15.2 ± 6.5
Soybean oil		72.2 ± 9.6	70.4 ± 8.5	50.0 ± 0.0
Ccanola oil	0.2	61.1 ± 5.6	63.0 ± 6.4	42.6 ± 3.2
Olive oil		63.0 ± 3.2	51.9 ± 6.4	40.7 ± 3.2

*3반복 평균 ± 표준 편차

표 5. Glucose 농도에 따른 미생물 배양액의 진딧물 살충효율

Glucose 비율 (%)	진딧물 살충 효율 (%)*			
	배양액 희석 비율			
	1	5	10	100
2.0	100.0 ± 0.0	96.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	60.0 ± 13.8
5.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	60.0 ± 13.8
10.0	86.0 ± 12.5	70.0 ± 6.0	52.0 ± 12.0	4.0 ± 27.5

*3반복 평균 ± 표준 편차

표 6. 질소원에 따른 미생물 배양액의 진딧물 살충효율

탄소원	질소원	진딧물 살충 효율 (%) [*]		
		배양액 희석 비율		
		5	10	100
	Amonium nitrate	100.0 ± 0.0	98.6 ± 2.3	31.1 ± 10.7
	Amonium surfate	86.5 ± 16.7	67.6 ± 16.2	14.9 ± 26.6
Glucose	Sodium nitrate	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	36.5 ± 4.6
	Urea	100.0 ± 0.0	91.9 ± 14.0	24.3 ± 20.4

*3반복 평균 ± 표준 편차

표 7. 질소원에 따른 미생물 배양액의 진딧물 살충효율

탄소원	질소원	진딧물 살충 효율 (%) [*]		
		배양액 희석 비율		
		5	10	100
soybean oil	Amonium nitrate	73.0 ± 16.4	31.1 ± 7.0	2.7 ± 29.2
	Amonium surfate	78.4 ± 6.2	29.7 ± 10.2	10.8 ± 24.6
	Sodium nitrate	90.5 ± 13.3	24.3 ± 10.2	13.5 ± 13.0
	Urea	58.1 ± 15.3	26.7 ± 12.4	- 8.1 ± 42.2

*3반복 평균 ± 표준 편차

(다) 탄소원과 질소원 함량 (C/N) 비율 조사

C/N 비율에 따른 미생물 배양액의 살충효율을 조사하기 위해 glucose와 sodium nitrate의 함량 비율을 조사한 결과 (표 8), 배양액 10배 희석액에서 C/N 비율 50:1과 70:1 조건에서 100.0%의 살충효율이 관찰되었으며 배양액 100배 희석액에서는 C/N 비율 50:1에서 가장 높은 살충활성 능력이 관찰되었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 glucose와 sodium nitrate를 이용한 최적 C/N 비율은 50:1로 조사되었다.

또한, soybean oil과 sodium nitrate의 비율을 조사한 결과 배양액 10배 희석액에서 C/N 비율 50:1, 70:1 조건에서 100.0%의 살충효율이 관찰되었다. 배양액 100배 희석액에서는 C/N 비율 50:1에서 가장 높은 살충효율이 관찰되었다 (표 9). 이와 같은 결과를 바탕으로 soybean oil과 sodium nitrate의 최적 C/N 비율은 50:1로 조사되었다.

(라) 무기염류 조성 조사

상기에서 조사된 최적 탄소원 및 질소원 그리고 C/N 비율 조건에서 무기염류 조성에 차이에 따른 미생물 배양액의 살충효율을 조사하였다. 실험방법에서 제시한 무기염류로서 P-MSM을 첨가하여 배양할 경우 배양액 원액과 5배 및 10배 희석하였을 때 배양액의 진딧물 살충효율은 각각 95.7%, 98.5%, 84.3%이었다. 또한, P-MSM+TE를 첨가하여 배양할 경우 배양액의 원액은 100.0%의 살충률을 보였으며 5배와 10배 희석했을 때 각각 97.0%, 92.9%이었다. L-MSM을 첨가하여 배양할 경우 살충효율은 68.6%로서 실험군 중 가장 낮았으며 5배와 10배 희석하여 처리하였을 때 각각 37.0%, 28.5%로서 살충률이 현저하게 감소하였다 (표 10). 배양액에 함유된 살충물질의 정성분석을 위해 동일한 부피의 용매로 추출 한 후 TLC 분석을 수행한 결과 3개의 무기염류 배지 모두 Rf value 0.4에서 살충물질이 검출었으며 특히 살충효율이 가장 높은 P-MSM+TE 배양액에서 다른 무기염류 배양액에 비해 현저하게 높은 살충물질의 spot이 관찰 되었다 (그림 4). 이러한 결과는 무기염류조성이 살충물질의 생산량에 영향을 미친다는 것을 의미하였으며 살충물질을 생산하기 위한 최적 무기염류 배지는 P-MSM+TE로 선정되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 살충물질을 생산하기 위한 최적 조건은 탄소원으로서 glucose와 soybean oil이 각각 2.0% 및 0.2% 수준이었으며 최적 질소원은 sodium nitrate로서 C/N 비율은 50, 그리고 무기염류는 P-MSM+TE로 조사되었다.

표 8. Glucose와 sodium nitrate의 함량 비율에 따른 미생물 배양액의 진딧물 살충효율

탄소/질소 비율	진딧물 살충 효율 (%) [*]		
	배양액 희석 비율		
	5	10	100
3.8	90.9 ± 15.7	93.1 ± 6.8	22.7 ± 15.7
10	94.5 ± 3.9	72.7 ± 6.8	2.2 ± 3.9
30	100.0 ± 0.0	95.4 ± 3.9	20.4 ± 20.8
50	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	31.8 ± 18.0
70	97.7 ± 3.9	100.0 ± 0.0	29.5 ± 15.5
90	95.4 ± 3.9	93.1 ± 0.0	13.6 ± 0.0
110	100.0 ± 0.0	90.9 ± 3.9	18.1 ± 7.8
130	95.4 ± 3.9	97.7 ± 3.9	13.6 ± 7.8
150	100.0 ± 0.0	86.3 ± 6.8	6.8 ± 3.9

*3반복 평균 ± 표준 편차

표 9. Soybean oil과 sodium nitrate 비율에 따른 미생물 배양액의 진딧물 살충효율

탄소/질소 비율	진딧물 살충 효율 (%) [*]		
	배양액 희석 비율		
	5	10	100
0.7	80.7 ± 8.8	44.0 ± 14.8	23.0 ± 6.7
10	96.1 ± 3.3	76.9 ± 5.7	17.3 ± 3.3
30	100.0 ± 0.0	96.1 ± 3.3	32.7 ± 17.6
50	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	42.3 ± 15.2
70	98.0 ± 3.3	100.0 ± 0.0	40.3 ± 13.3
90	96.1 ± 3.3	94.2 ± 0.0	26.9 ± 6.6
110	100.0 ± 0.0	92.3 ± 3.3	30.7 ± 0.0
130	96.1 ± 3.3	98.0 ± 3.3	26.9 ± 6.6
150	100.0 ± 0.0	88.4 ± 5.8	21.1 ± 3.3

*3반복 평균 ± 표준 편차

표 10. 미량원소 조성에 따른 미생물 배양액의 진딧물 살충효율

무기염류 배지 ¹⁾	진딧물 살충 효율 (%) ²⁾		
	배양액 희석 비율		
	1	5	10
P-MSM	95.7 ± 4.2	98.5 ± 2.4	84.3 ± 2.4
P-MSM+TE	100 ± 0.0	97.1 ± 2.4	92.9 ± 12.3
L-MSM	68.6 ± 10.7	37.1 ± 8.9	28.5 ± 20.2

¹⁾재료 및 방법 참조

²⁾3반복 평균 ± 표준 편차

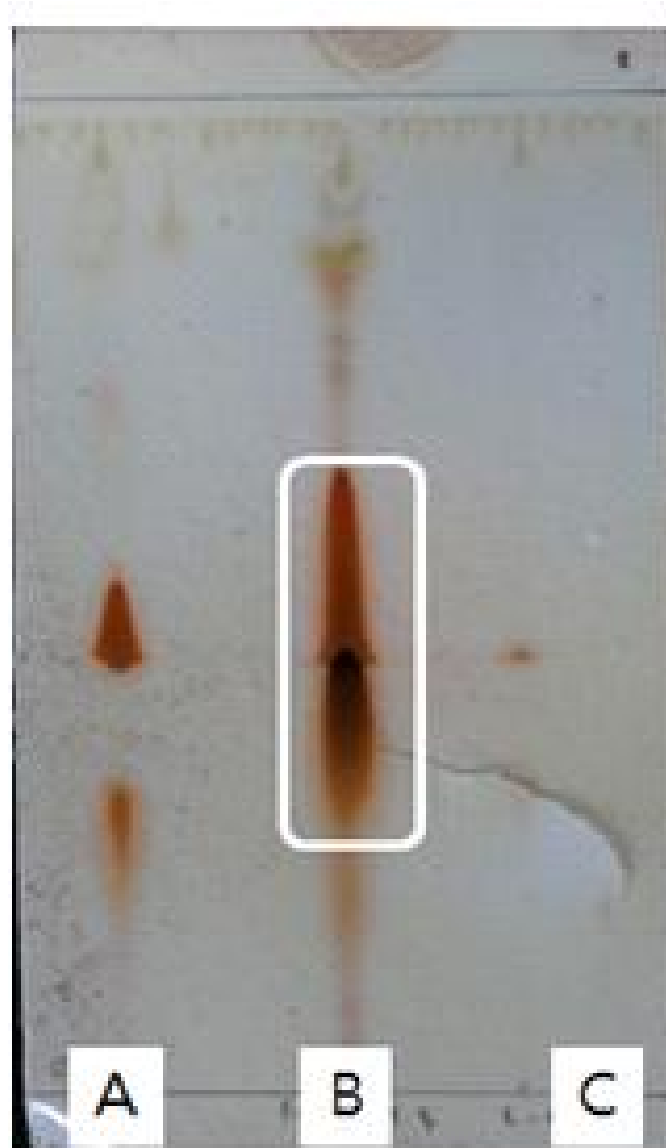


그림 4. 미생물 배양액에 함유된 살충물질의 TLC 분석 (A: P-MSM, B: P-MSM+TE, C: L-MSM).

나. 시제품 제작 및 효능 평가

(1) 액체형 제형 연구

상기의 최적 배양조건을 바탕으로 액체형 시제품을 개발하기 위해 대량배양을 실시하였다. 본 연구는 미생물이 원료로 사용되기 때문에 원료의 대량생산과 그에 따른 효능검증은 매우 중요한 사항이라고 할 수 있다. 이에 본 연구에서는 중용량 100 L와 대용량 5,000 L 에서 균주를 배양하여 그에 따른 살충효율과 보관 시간에 따른 살충효율의 지속성을 조사하였다. 균주의 대량배양은 그림 5와 같이 진행되었다.

(가) 중용량 배양연구 (100 L)

상기에서 확립한 미생물의 최적 배양조건을 고려하여 100 L 용량에서 0.2% soybean oil을 탄소원으로 하여 3회에 걸쳐 배양을 시도한 결과 그림 6과 같았다. 배양액에 대한 QC를 살충효율 검정과 살충물질 정성분석으로 실시한 결과 살충효율은 평균 80% 이상의 수준이었으며 TLC 분석에서 살충물질을 뚜렷하게 확인할 수 있었다.

또한, 100L 용량의 배양액을 상온에서 약 5개월 동안 20 L 플라스틱 용기에 보관하면서 30일 간격으로 배양액을 취하여 살충효율을 조사한 결과 경시적인 살충효율은 그림 7과 같이 90% 이상의 수준으로 유지되었다. 이와 같은 결과는 본 미생물이 생산하는 당지질성 살충물질이 상온에서 5개월 이상 안정하다는 것을 의미하였다.

(나) 대용량 배양연구 (5,000 L)

상기에서 확립한 최적 배양조건을 이용하여 0.2% soybean oil과 2.0% 함수포도당을 탄소원으로 하여 5,000 L 용량에서 미생물을 배양하였다.

콩기름을 탄소원으로 하여 얻은 배양액의 희석에 따른 살충효율은 원액과 5배 희석액 처리시 80% 이상의 살충효율이 관찰되었으며 함수포도당의 경우 70% 이상의 살충효율이 관찰되었다 (그림 8). 배양액의 저장성을 시험하기 위해 보관시간에 따른 살충효율을 조사한 결과 그림 9와 같이 6개월 동안 상온에서 보관하였을 때 90% 이상의 살충효율이 유지되었다.

또한, 대용량 배양액 중 살충물질의 정성분석을 위해 TOF-MS 분석을 실시한 결과 그림 10에서 보는 바와 같이 살충물질을 확인할 수 있었다. 그림 10에 화살표로 표기된 분자량은 살충활성물질인 당지질성 물질을 의미한 것으로 배양액 중 살충물질이 6개월 동안 경시적으로 안정하다는 것을 확인하여 주었다.

이상의 결과를 통해 공시균주를 활용하여 진딧물 방제용 제제로서 액체형 제제가 안정적이라는 것을 알 수 있었다.



균주 도말



종균 배양



대량배양 100 L



대량배양 5,000 L

그림 5. 액체형 제형 개발 과정

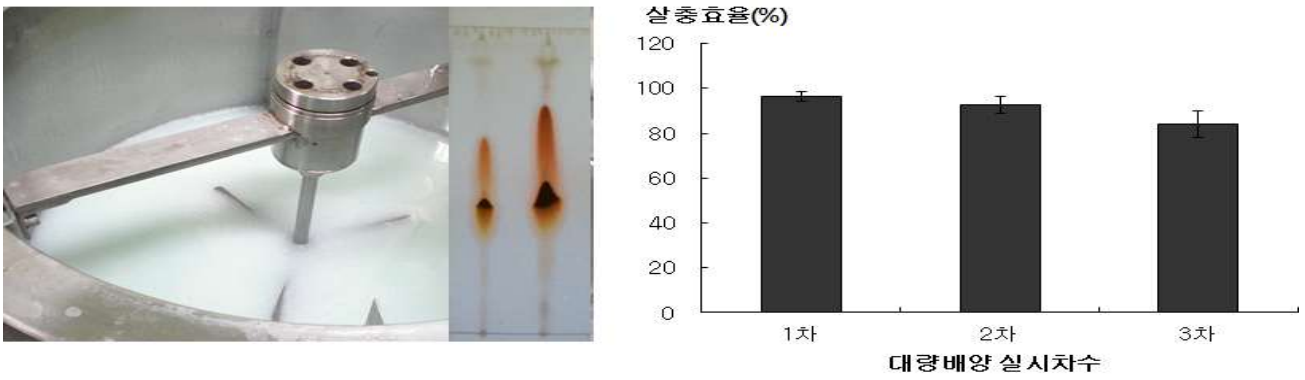


그림 6. 미생물의 증용량(100 L) 배양과 배양액의 살충효능 및 TLC 분석.

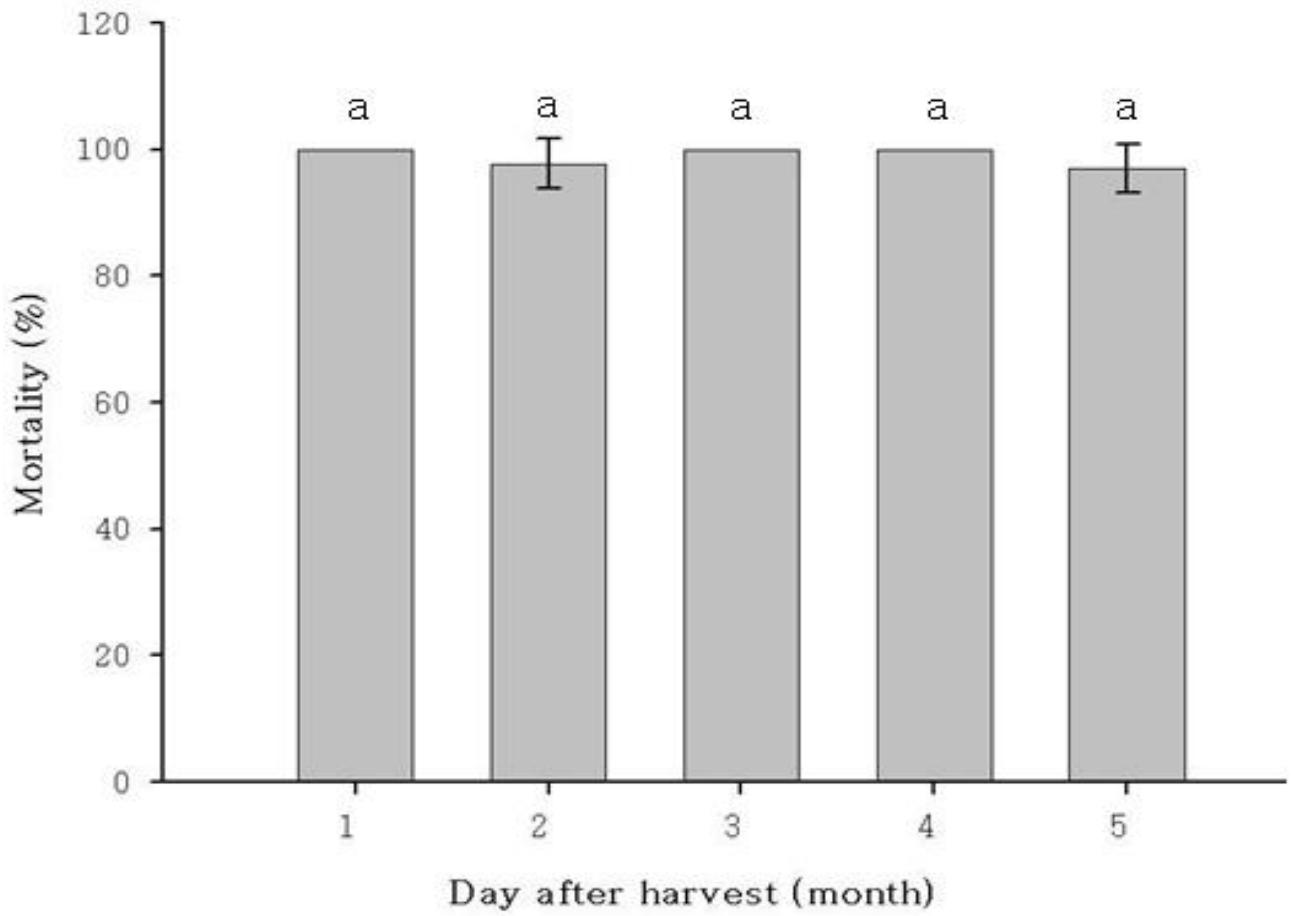


그림 7. 미생물의 증용량(100 L) 배양액의 실내 보관중 경시적 살충효율.

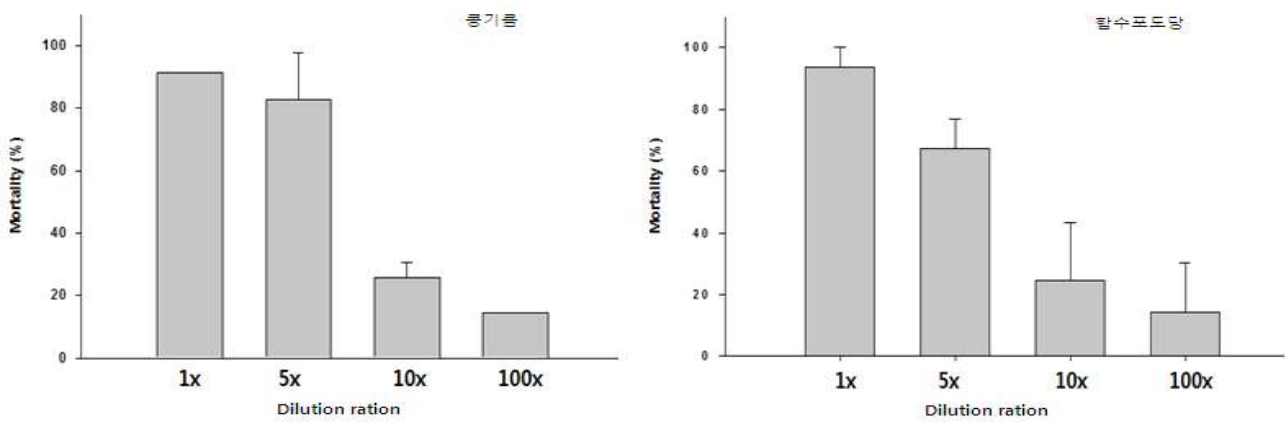


그림 8. 대량배양액의 희석배수에 따른 진딧물 살충효능.

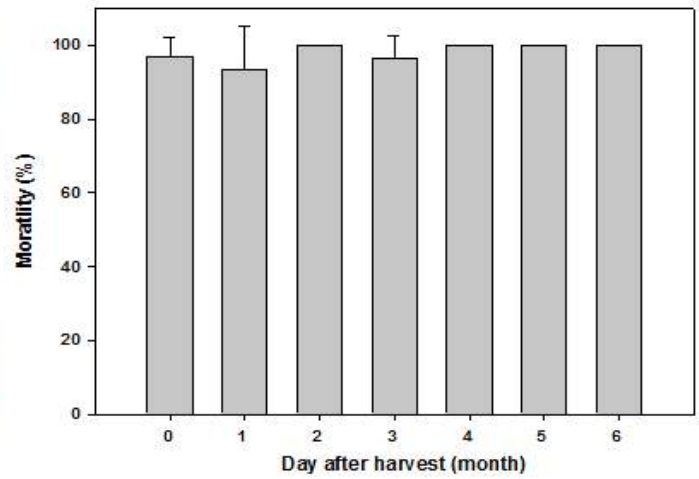


그림 9. 미생물의 대용량(5,000 L) 배양과 배양액의 경시적 살충효능 및 TLC 분석.

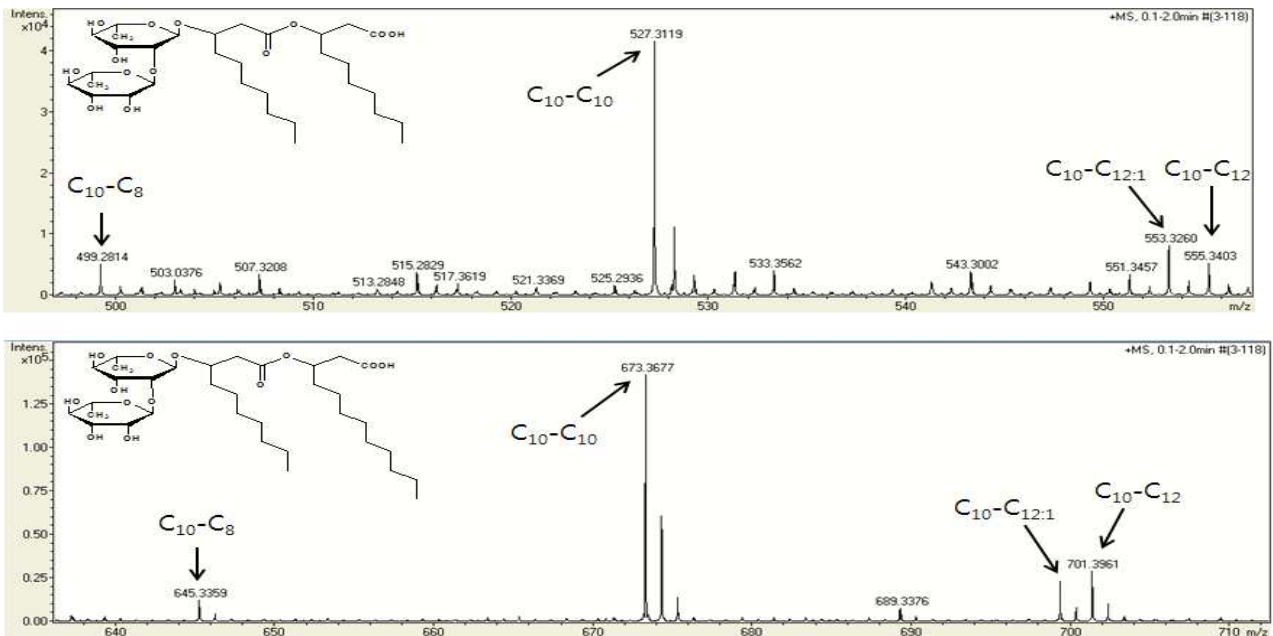


그림 10. 미생물의 대용량(5,000 L) 배양액 중 살충물질의 TOF-MS 분석.

(2) 고체 제형 연구

(가) 열풍건조 고체형 제형 연구

고체형 시제품의 개발을 위해 상기에서와 같이 미생물을 5,000 L 용량으로 배양 한 후 이를 열풍 건조하였다. 건조된 배양액을 0.5%(w/w) 분말 수화제 형태로 조제한 다음 물에 용해하여 진딧물 살충효율을 조사하였다. 조제된 분말은 0.1 g/mL 수준에서 약 60%의 살충효율을 보였으며 배양액 원액수준에 해당하는 0.001 g/mL 수준에서는 40% 이하의 살충효율을 보였다 (그림 11). 이는 공시균주 배양액이 80% 이상의 살충효율을 보인 것에 비해 현저하게 낮은 결과로서 공시균주를 고체 제형으로 제조하기에는 살충효율, 제형의 살포용량 기준 소요량 및 경제성을 고려하여 적절하지 않은 것으로 판단되었다.

열풍건조 고체 제형이 시제품의 제형으로 적절하지 않아 농가에 균주를 종균으로 보급하여 활용될 수 있는지에 대해 조사하였다. 이를 위해 균주의 탄소원인 콩기름을 함유하고 있는 상토에 균주를 접종하여 경시적인 균체수를 조사하였다(그림 12).

상토 제형 제조 2주 후 균체수는 약 10^8 CFU/mL 수준으로 일정하게 유지되었다. 제형 제조 12주 후에는 균체수가 급격히 감소되어 10^6 CFU/mL 수준이었으며 16주 후에는 10^6 CFU/mL 이하의 수준이었다 (그림 13). 이는 시험초기의 균체수인 10^8 개 보다 현저히 낮은 결과로서 상토를 이용한 제형이 적절하지 않다는 것을 의미하였다.

(3) 액체 제형의 보조제 연구

액체형 제형의 살충력을 증가시키기 위해 고착성을 가지고 있는 xanthan gum을 0.02% (v/v) 수준으로 배양액에 첨가하여 살충효율을 조사하였다 (그림 14). 보조제가 첨가된 액체형 제형의 살충효율은 표 11과 같았다. Xanthan gum 만을 살포한 처리구는 살충효능이 20% 이하로 매우 낮아 이 물질 자체에 의한 살충효능의 영향은 낮은 것으로 조사되었다. 공시균주 배양액을 살포하였을 경우 살충효능은 원액과 5배, 10배, 50배 희석액에서 각각 100%, 91%, 75%, 25% 였다. 한편, xanthan gum이 첨가된 배양액의 경우 살충효능은 원액과 5배, 10배, 50배 희석액에서 각각 100%, 72%, 53%, 14% 로서 Xanthan gum을 첨가하지 않은 배양액에 비해 살충효율이 낮았다. 이러한 결과는 xanthan gum의 효과가 미비함을 의미하였으며 공시균주의 배양액만으로 높은 살충효능을 가져올 수 있음을 시사하였다.

이와 같은 연구결과를 통해 공시균주를 진딧물 방제용 자재로서 활용하기 위해서는 균주를 대량배양하여 액제로 사용하는 것이 살충효율과 경제성 측면에서 효율적임을 알수 있었다.

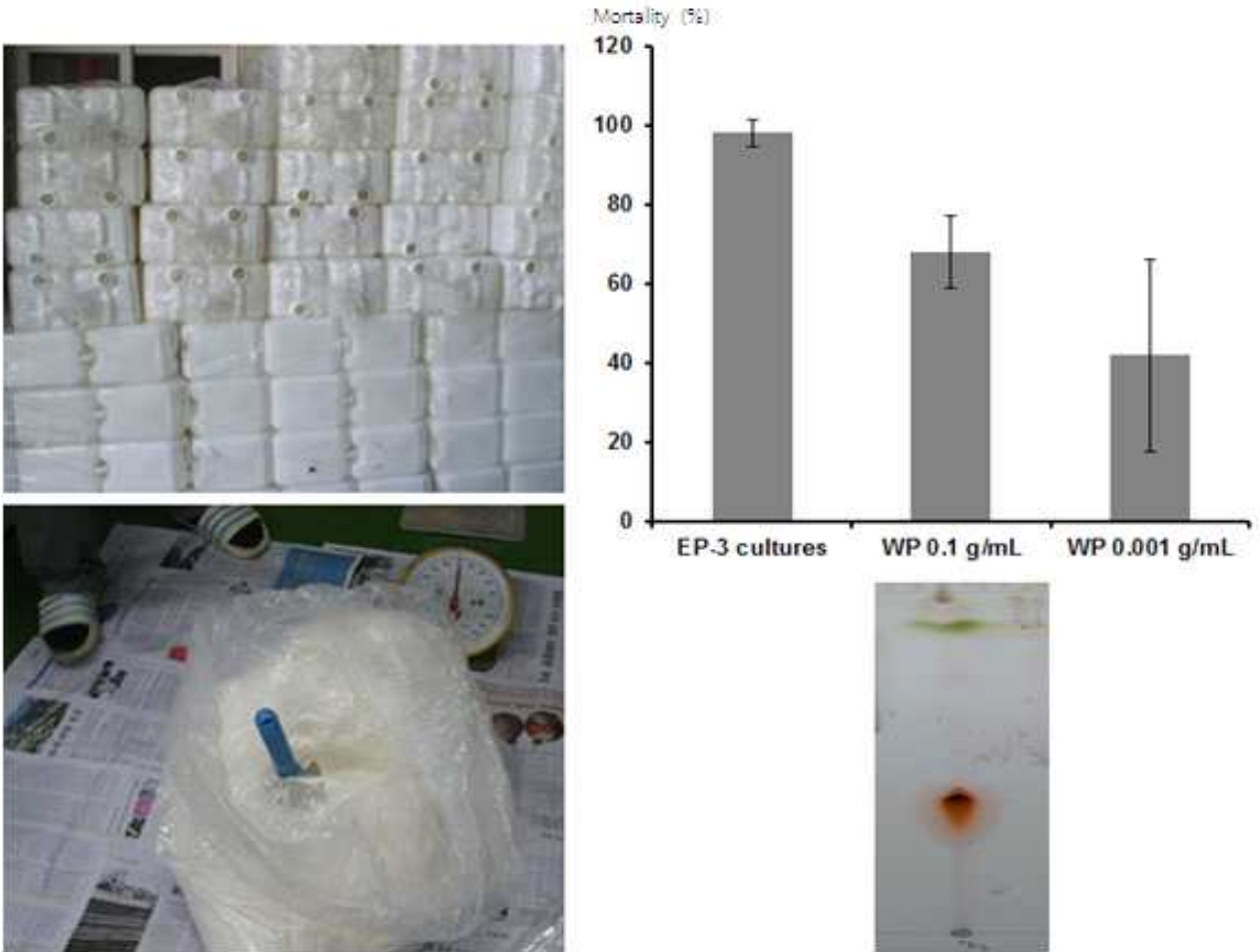


그림 11. 대용량(5,000 L) 배양액에서 얻은 열풍건조 고체제형의 살충효율 및 TLC 분석.
(나) 상토 제형 연구



상토 10 g



0.2 % Oil+0.05 % Tween-80



EP-3 배양액 20 mL

그림 12. 미생물의 배양액의 상토 제형 제조 과정.

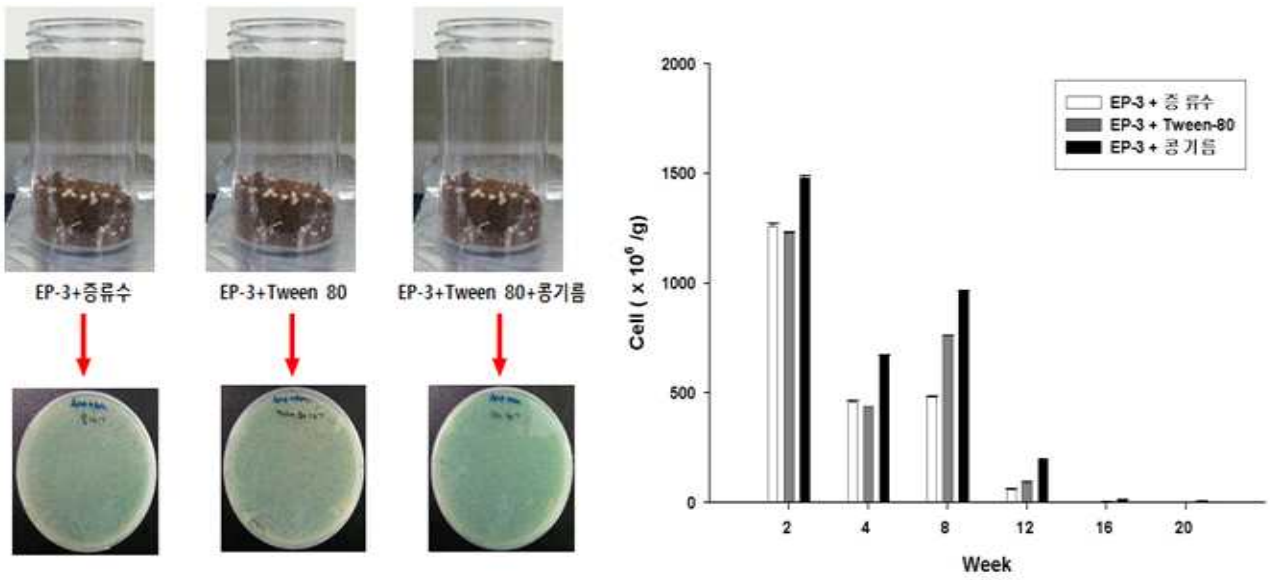


그림 13. 미생물 상토 제형의 경시적인 균체수 변화.



그림 14. Xanthan gum이 살충효능에 미치는 영향 실험.

표 11. Xanthan gum 첨가에 따른 미생물 배양액의 살충효율

살포 제형	살충 효율 (%) [*]			
	희석 비율			
	1	5	10	50
Xanthan gum	18.7 ± 0.0	-	-	-
공시 액제	100.0 ± 0.0	91.7 ± 14.3	75.0 ± 13.0	25.0 ± 10.8
공시 액제 + Xanthan gum	100.0 ± 0.0	72.9 ± 7.2	53.0 ± 13.0	14.5 ± 15.7

*3반복 평균 ± 표준 편차

(4) 농가현장 배양시험

농가현장 조건에서 공시균주가 배양될 수 있는지 조사하기 위해 농가현장에서 얻은 지하수에 미생물을 접종하여 멸균 및 비멸균 조건에서 배양하였다. 배양 후 배양액의 살충효능 시험과 살충물질의 분석을 수행하였다.

탄소와 질소(C/N) 비율을 결정하기 위해 농가에서 채취한 지하수에 2.0%(v/v) 함수포도당을 탄소원으로 첨가하고 요소태 복합비료 (맞춤 16호), 질산태 복합비료 (성장엔) 그리고 인산이 보강된 질산태 복합비료 (성장엔+인산)를 무기질소원으로 첨가한 다음 실험실 조건에서 멸균하였다. 멸균된 지하수 조건에서 공시균주를 배양한 결과 살충효능과 균체수는 표 12, 13 그리고 14와 같았다. 탄소원으로 함수포도당과 무기질소원으로 요소태 복합비료를 사용하여 균주를 배양 할 경우 탄소와 질소비율 10:1과 30:1에서 10^8 CFU/mL 수준의 균체수와 90% 이상의 살충효능이 관찰되었다 (표 12).

또한, 탄소원으로 함수포도당과 무기질소원으로 질산태 복합비료를 사용하여 균주를 배양할 경우 때 탄소와 질소 비율 10:1에서 10^8 CFU/mL 수준의 균체수와 70% 이상의 살충효능이 관찰되었다 (표 13).

한편, 함수포도당을 탄소원으로, 그리고 인산 함량이 보강된 질산태 복합비료를 무기질소원으로 하였을 때 탄소와 질소 비율 10:1에서 10^9 CFU/mL 수준의 균체수와 100%의 살충효능이 관찰되었다 (표 14).

균주가 생산하는 살충물질은 균주의 성장과 깊은 연관이 있을 것으로 판단하였다. 이에 각각의 질소비료에서 10^8 cfu 이상의 균체수를 나타낸 C/N 10을 최적 탄질률로 결정하였다. 한편, 질산태 복합비료의 경우 배양 후 pH가 9 이상을 나타내어 작물에 약해가 있을 것으로 판단되었다. 따라서 농가현장배양 최적 질소원으로는 요소태 복합비료를 선정하였다. 선정된 C/N 비율을 토대로 요소태 복합비료를 무기질소원으로 하여 포도당과 당밀의 사용적합성을 조사한 결과 실험실 조건에서 배양하였을 때 표 15에 보여준 바와 같이 균체수와 살충효능이 각각 10^8 CFU/mL과 70% 이상의 수준이었다. 이와 같은 균체수와 살충효율은 농가현장에서 500 L 이상 대량배양 한 후 배양액을 살포하였을 경우 진딧물 방제에 실효성이 있을 것으로 판단되었다.

이상의 결과를 바탕으로 농가현장과 유사한 비멸균 조건에서 균주의 배양이 가능한지에 대해 조사하기 위해 전라남도 남평읍 평산리의 농가지하수를 취하여 비멸균 조건에서 상기와 같이 균주를 배양하였다. 배양용량은 100 mL 이었으며 온도와 RPM은 상기의 배양조건과 동일하였다. 비멸균 지하수를 활용하여 실험실에서 배양한 결과 표 16에 보여준 바와 같이 함수포도당과 당밀을 탄소원으로 배양하였을 때 균체수와 살충효능은 각각 10^7 cfu/mL 이상과 80% 이상의 살충효율이 관찰되었으며 살충물질에 대한 정성분석을 위해 TLC 분석결과 살충물질의 spot이 뚜렷하게 검출되었다.

표 12. 함수포도당과 요소태복합비료를 함유한 멀균 지하수 조건에서 배양한 미생물 배양액의 균체수와 살충효능

탄소:질소(C/N) 비율	균체수(C·F·U)	살충효능(%)*
10:1	60×10^7	97.8 ± 3.8
30:1	110×10^7	100 ± 0.0
50:1	1×10^4	8.7 ± 0.0
100:1	1×10^4	10.9 ± 11.3

*3반복 평균 \pm 표준 편차

표 13. 함수포도당과 질산태복합비료를 함유한 멸균 지하수 조건에서 배양한 미생물 배양액의 균체수와 살충효능

탄소:질소(C/N) 비율	균체수(C·F·U)	살충효능(%)*
10:1	50 x 10 ⁷	78.6 ± 12.4
30:1	90 x 10 ⁷	19.6 ± 22.9
50:1	4 x 10 ⁷	14.3 ± 37.8
100:1	1 x 10 ⁴	4.8 ± 8.3

*3반복 평균 ± 표준 편차

표 14. 함수포도당과 인산 함량이 보강된 질산태복합비료를 함유한 멸균 지하수 조건에서 배양한 미생물 배양액의 균체수와 살충효능

탄소:질소(C/N) 비율	균체수(C·F·U)	살충효능(%)*
10:1	160×10^7	100.0 ± 0.0
30:1	2×10^4	19.6 ± 13.6
50:1	1×10^4	19.6 ± 24.7
100:1	1×10^6	22.6 ± 2.6

*3반복 평균 ± 표준 편차

표 15. 요소태복합비료와 함수포도당 혹은 당밀을 함유한 멸균 지하수 조건에서 배양한 미생물 배양액의 균체수와 살충효능

탄소/질소(10:1)	균체수(C·F·U)	살충효능(%)*
함수포도당/요소태복합비료	20×10^8	97.4 ± 4.6
당밀/요소태복합비료	5×10^8	73.7 ± 24.1

*3반복 평균 \pm 표준 편차

표 16. 함수포도당 혹은 당밀과 요소태복합비료를 함유한 비멸균 지하수 조건에서 배양한 미생물 배양액의 균체수와 살충효능 실내시험 결과

탄소원	균체수(C·F·U)	살충효능(%)*
함수포도당	2×10^7	82.5 ± 24.1
당밀	10×10^7	85.0 ± 7.5



*3반복 평균 ± 표준 편차

또한, 농가현장 비멸균 조건에서 균주의 배양을 수행하였다. 농가현장 지하수에 상기에 서 시험한 배지조성을 준비한 후 균주를 500 L 용량에서 배양하였다. 배양은 그림 15와 같이 전라남도 남평읍 평산리 친환경재배 농가에서 실시하였다.

배양결과 표 17에 나타낸 바와 같이 균체수는 10^6 cfu/mL 수준이었으며 살충효능은 37% 이하로 낮았다. 또한, 당지질성 살충활성물질을 TLC 분석을 통해 확인해 본 결과 당지질성 살충물질의 spot이 검출되지 않았다. 결과를 볼 때 동일한 양분조건과 지하수를 사용하여 실험실 조건에서 배양한 결과와 상이하였다. 이는, 실험실과 농가현장의 배양조건이 매우 상이한데서 비롯된 결과로 판단되었다. 이러한 결과는 비멸균 조건에서 균주의 농가현장배양이 이루어지지 않는다는 것을 의미하였다. 이는 공시균주가 지하수에 존재하는 다른 미생물과의 공간과 먹이, 그리고 산소를 대상으로 경쟁에서 이기지 못한 결과에서 비롯된 것으로 사료되었다.

따라서 공시균주를 이용한 진딧물 방제용 제제의 개발은 멸균조건에서 대량생산 한 후 액체형 제제로서 활용되어야 할 것으로 판단되었다.

(5) 시제품의 소포장 방제효능 시험

소포장 방제효능시험은 98 m² 면적의 시설하우스에서 실시하였으며 이를 위해 6개 시험구를 그림 16과 같이 마련하여 시험구당 50 cm 간격으로 고추(녹광)를 8개씩 정식하였다.

시험에서 대조구는 물을 처리한 시료, 참조구는 진딧물 방제 합성농약인 코니도를 권장량으로 처리한 시료, 처리구는 공시균주의 액체형 시제품을 처리한 시료였다. 시험은 농촌진흥청 약효시험법을 참조하여 실시하였으며 진딧물이 20마리 이상 관찰된 고추나무를 3-5점을 선정하여 제제를 살포하였다. 살충효능은 처리 후 총 마리수에 대한 사충수의 비율로 계산하였다.

함수포도당을 탄소원으로하여 배양한 시제품 처리구의 경우 진딧물 살충효율은 각각 77.4%, 83.3%, 72.0%, 45.5%, 47.0%로서 평균 65.2% 수준이었다. 또한 콩기름을 탄소원으로 배양한 시제품 처리구의 경우 살충효율은 각각 100.0%, 84.6%, 77.8%, 100.0%, 70.0%로서 평균 86.48% 수준이었다 (표 18).

제제처리 후 진딧물 밀도의 경시적인 변화를 보면 참조구인 합성농약 코니도 처리구의 경우 처리 1일후부터 현저한 감소를 보였으며 그 이후 처리 8일까지 일정한 밀도를 보였다 (그림 17). 한편, 시제품 처리 후 진딧물 밀도의 경시적인 변화를 보면 처리 1일 후 현저한 감소를 보였으며 그 이후 4일까지 일정한 밀도를 보였다. 일시적인 밀도의 증가는 제 2차 처리에 의해 다시 현저한 감소를 보였다 (그림 18). 이러한 결과는 액체형 제제의 처리가 진딧물의 밀도를 효과적으로 제어 할 수 있다는 것을 의미하였다.



종균 접종



배양 1일 후



배양 4일 후

그림 15. 미생물의 비멸균 농가 현장 배양 사진.

표 17. 농가현장 비멸균 지하수 조건에서 배양 후 균체수와 살충효능 시험결과

탄소원	균체수(C·F·U)	살충효능(%)*
함수포도당	2×10^6	22.9 ± 14.9
당밀	1.0×10^6	36.10 ± 17.4



*3반복 평균 ± 표준 편차



그림 16. 시제품의 진딧물 방제효능 소포장 시험.

표 18. 액체형 시제품의 진딧물 방제효능 시험결과

처리구	방제 효능 (%)*	
	시제품의 배양 탄소원	
	함수포도당 (2.0 %)	soybean oil (0.2%)
1	77.4	100.0
2	83.3	84.6
3	72.0	77.8
4	45.4	100.0
5	47.0	70.0
참조구	79.6	79.6
대조구	0.0	0.0

*3반복 평균 ± 표준 편차

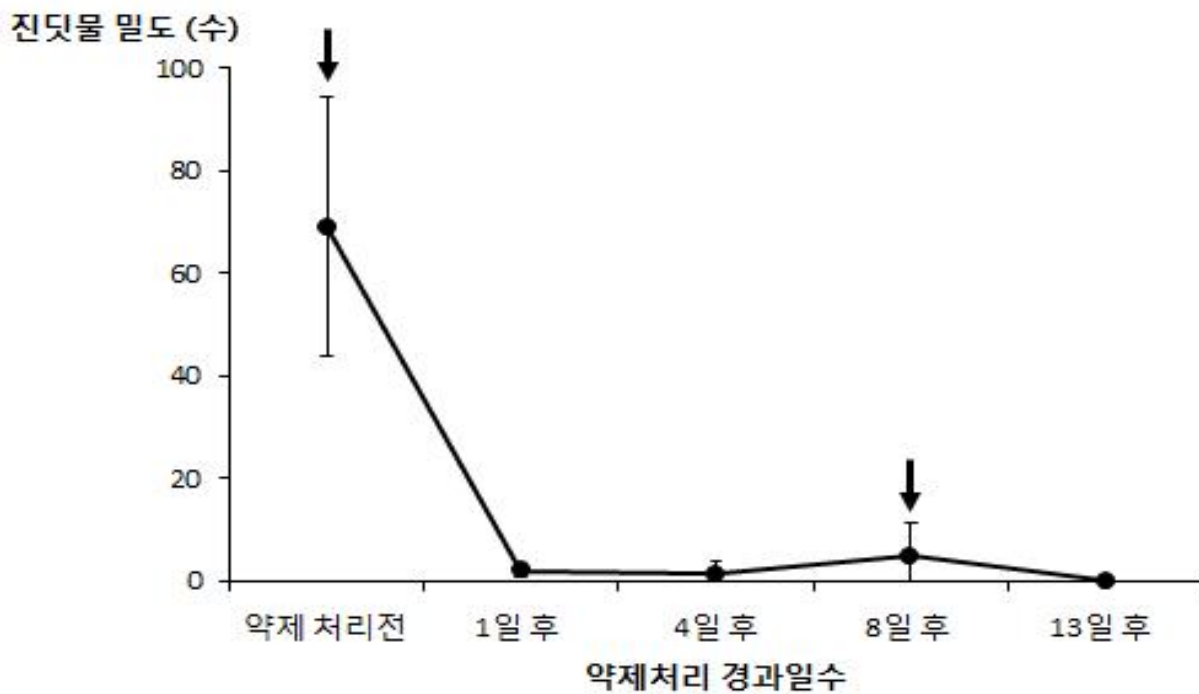


그림 17. 코니도 처리에 따른 진딧물의 경시적인 밀도변화(화살표는 제제처리 시기를 나타냄).

진딧물 밀도 (수)

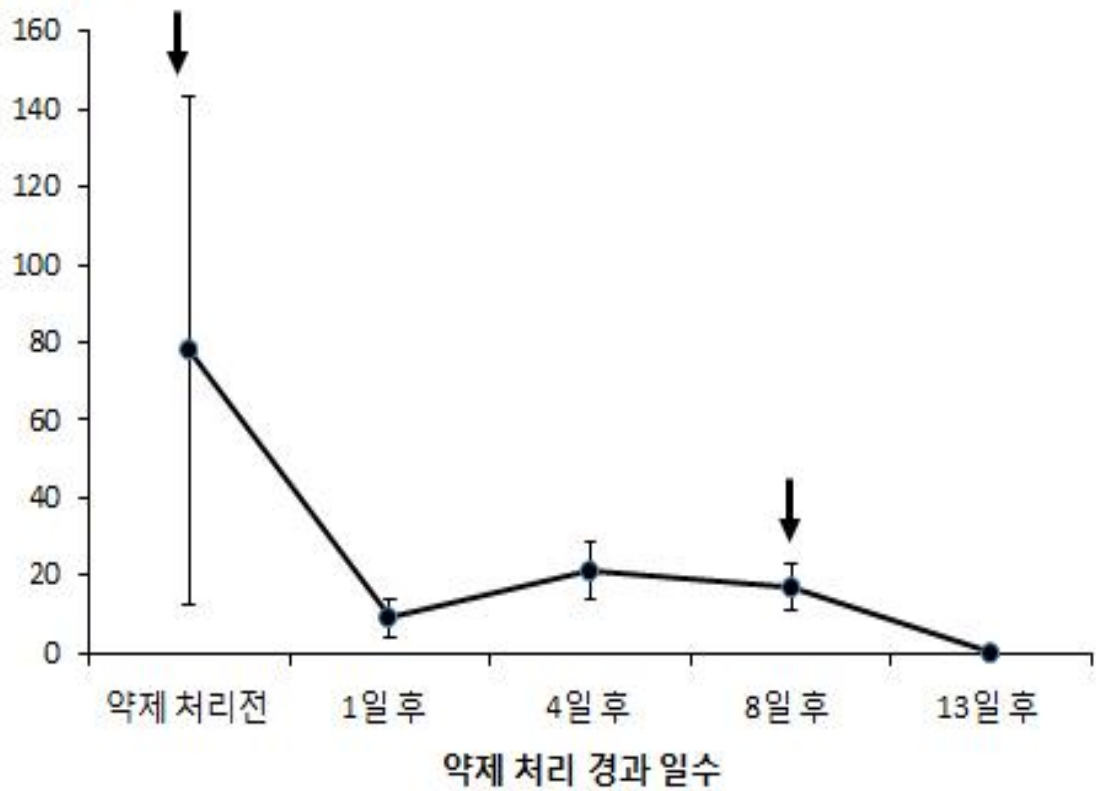


그림 18. 미생물 시제품 처리에 따른 진딧물의 경시적인 밀도변화(화살표는 제제처리 시기를 나타냄).

(6) 시제품의 처리가 작물의 생육에 미치는 영향

시제품의 처리가 작물의 생육에 미치는 영향을 농촌진흥청의 약해시험방법을 참조하여 형태학적 및 생리학적 측면에서 조사하였다. 참조구와 대조구는 각각 코니도 처리구와 물처리구 이었다 (그림 19).

시제품 처리 1일 후부터 3일 간격으로 3회 동안 형태학적 변화를 관찰한 결과 모든 고추에서 약해지수가 0으로서 육안으로 약해가 인정되지 않았다 (표 19).

또한, 시제품 처리 후 경시적인 생리학적 변화를 관찰한 결과는 표 20과 같았다. 시제품 처리구는 대조구에 비해 고추의 마디 수, 분지 수, 신초열 수가 비교적 적었으나 5 cm 이상의 고추의 수는 상대적으로 많았다. 과채류인 고추는 과실을 생산하는 것이 주된 목적이기 때문에 균형적인 영양생장과 생식생장이 중요하다. 따라서 본 연구의 결과를 볼 때 공시균주의 시제품은 고추의 생육에 해로운 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

(7) 유기목록 공시 시험

시제품을 진딧물 방제용 유기농업자재로서 등록하기 위해 시제품의 유효성분 검사, 유해성분 검사, 식물에 대한 약해시험, 독성검사 등을 농촌진흥청 공인인증기관에 의뢰하여 수행하였다.

(가) 유효성분 검사

시제품의 유효성분 검사는 원료인 종균에 대한 종속명 분석과 당지질성 살충활성 물질의 함량 평가로 나누어 수행되었다.

① 미생물 동정

시제품의 미생물 동정은 목원대학교 미생물생태자원 연구소에 의뢰하여 수행하였다. 균주의 종속명을 확인하기 위해 16s rRNA 염기서열 분석과 계통학적분석와 지방산 조성분석이 수행하였다. 미생물에 대한 계통학적분석 및 지방산 조성에 대한 결과는 그림 20과 같았다. 공시균주의 16s rRNA 염기서열 결과를 바탕으로 계통학적 분석 결과 균주는 *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50083^T와 가장 높은 상동성을 보였다. 또한, 지방산 특성을 알아본 결과 *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50083^T와 지방산 조성이 매우 유사한 것으로 조사되었다. 이와 같은 결과를 통해 공시균주는 *Pseudomonas chlororaphis*로 확인되었다. *P. chlororaphis*는 비병원성 미생물로서 계면활성 물질을 생산하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 공시균주의 계통학적 분석은 매우 신뢰성이 높다고 할 수 있다 (Nereus W. Gunther IV 등, 2005).

② 유효성분 분석

농촌진흥청 유기농업자재 공시 및 품질인증 기준에 의하면 유기목록 공시를 위한 시제품의 경우 시제품에 함유된 유효성분의 분석방법을 정립하여야 한다. 이에 당지질성 살충물질의 표준물질을 구입하여 LC-MS/MS를 활용한 분석방법을 정립하였다. 상기 당지질성 물질은 2개의 rhamnose와 fatty acid가 결합되어 있는 구조로서 MS/MS를 이용하여 각각의 fragment를 정량 및 정성 지표물질로서 이용하였다. LC-MS/MS를 활용한 분석결과는 그림 21과 같았다.



그림 19. 제제 처리가 작물의 생육에 미치는 영향 시험.

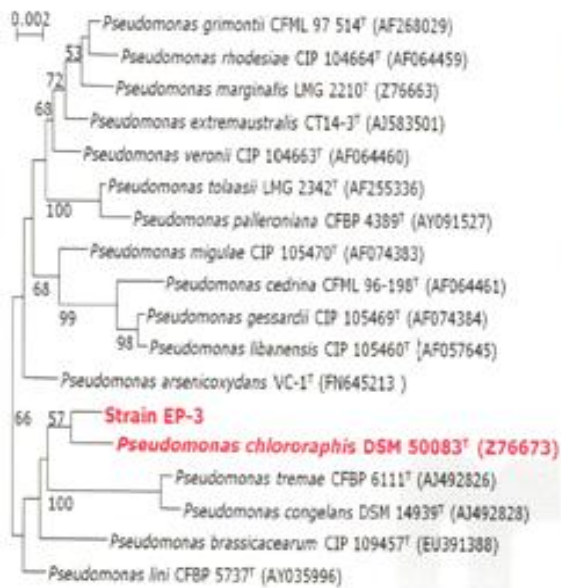
표 19. 시제품의 고추나무에 대한 약해증상 관찰 결과

약해지수	약해증상	발생률(%)
0	육안으로 약해가 인정되지 않음	100
1	아주 가벼운 약해로서 작은 약반이 약간 인정됨	0
2	처리된 잎이 일부 부분에 약해가 인정됨	0
3	처리된 잎의 50% 정도 약해가 인정됨	0
4	상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아 있음	0
5	심한 약해를 받고 고사 상태임	0

표 20. 시제품의 처리에 의한 고추나무의 생리학적 변화

항 목	단 위	관찰 결과*	
		대조구	처리구
고추나무 본줄기 마디수	개	14.0 ± 0.0	12.6 ± 0.5
고추나무 본줄기 분지 수	개	6.9 ± 0.5	6.6 ± 0.5
주분지 잎 면적지수(잎맥 길이 x 잎맥 넓이)	cm ²	83.0 ± 4.0	77.1 ± 11.9
3분지 이상 잎 수	개	101.1 ± 8.5	94.6 ± 11.5
열매 수(5 cm 이상)	개	11 ± 1.0	17.0 ± 1.0
본줄기 마지막 신초잎 수	개	61.3 ± 7.2	41.0 ± 2.0

*3반복 평균 ± 표준 편차



의뢰균주(*Pseudomonas chlororaphis* EP-3)의 균체지방산 특성

Fatty acid(%)	<i>P. chlororaphis</i> EP-3	<i>P. chlororaphis</i> DSM 50083 ^T
Saturated acids		
C _{12:0}	15.20	11.5
C _{14:0}	1.68	0.6
C _{16:0}	5.61	3.4
Cyclo		
C _{17:0} cyclo	7.43	2.4
C _{19:0} cyclo w/6c	0.85	0.1
Hydroxy		
C _{10:0} 3-OH	17.53	13.9
C _{12:0} 2-OH	25.89	25.3
C _{12:0} 3-OH	17.59	14.3

그림 20.공시균주의 계통학적 분석 및 지방산 분석.

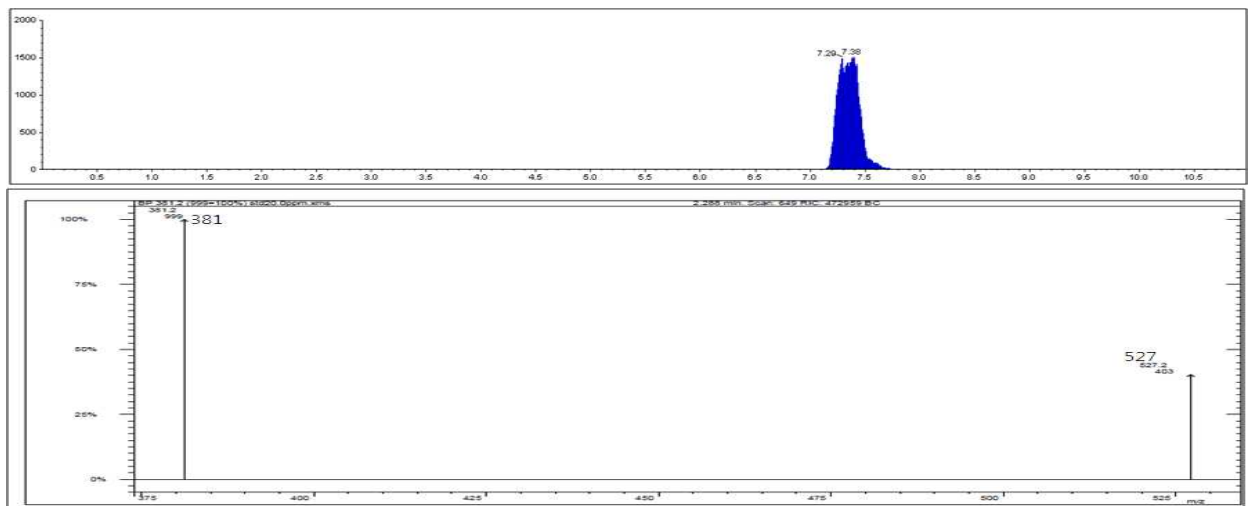


그림 21. 당지질성 표준물질의 LC-MS/MS 분석 결과.

당지질성 표준물질의 분석결과 m/z 527, 381 값을 갖는 주요한 fragment가 관찰되었다. 분석에서 m/z 527은 모화합물에서 하나의 rhamnose가 제거된 결과이며 m/z 381은 지방산이 제거된 결과로 확인되었다. 이상의 분석방법을 바탕으로 농촌진흥청 유효성분 분석 공인인 증업체인 한국생물안전성연구원에 시제품에 대한 정량적인 분석을 의뢰하였다. 그 결과 시제품에 함유된 유효성분의 함량은 표 21와 같이 0.06% (v/v)로 확인되었다.

(나) 유해성분 검사

시제품의 유해성분 검사는 목원대학교 미생물생태자원연구소에 의뢰하여 수행하였다. 농촌진흥청 유기농업자재 공시 및 품질인증 기준에 의하면 살아있는 미생물을 원료로 사용한 유기농업자재는 병원성미생물의 검출을 제한하고 있다. 유기농업자재 공시 및 품질인증 기준에 의거하여 검출이 제한되어진 병원성미생물은 표 22에 제시한 바와 같다.

병원성 미생물들의 존재 유무를 판단하기 위해 각각의 균들만이 성장할 수 있는 선택배지에 시제품을 10^{-1} 희석하여 평판 도말하였으며 48시간 후 콜로니의 형성을 관찰하였다. 시험결과 시제품에서 병원성미생물은 관찰되지 않았다 (표 23).

(다) 약해시험

유기목록자재 공시를 위해 시제품의 약해시험을 실시하였다. 시제품의 약해시험은 목원대학교 미생물생태자원 연구소에 의뢰하여 수행되었으며 대상작물은 배추, 오이, 무, 상추, 파 등의 5가지 작물이었다. 시제품을 각각의 작물에 경엽처리 한 후 일정기간의 시간이 지난 뒤 육안으로 약해를 평가하였으며 각각의 실험은 3회 반복되었다. 시제품의 약해시험결과는 표 24에서 제시한 바와 같이 모든 처리구 에서 약해 증상이 발견되지 않았다.

(라) 독성시험

유기목록자재 공시 및 품질인증 기준에 따르면 병해충관리를 위한 자재의 경우 인축 및 환경독성 시험을 수행하여야 한다. 상기 시제품의 경우 진딧물 방제를 목적으로 개발되었기 때문에 인축 및 환경독성 시험을 수행하였다. 독성시험은 농촌진흥청 공인기관인 (주) 크로엔리서치와 동방아그로 연구소에 의뢰하여 수행하였다.

① 인축에 대한 독성평가

시제품의 인축독성은 Sprague-Dawley 계통의 암컷 랫드와 New Zealand white 계열의 토끼에 대해 급성경피, 급성경구, 안점막, 피부자극등의 독성실험을 수행하였다. 공시기준에 따르면 급성경구와 경피의 경우 독성구분 3급 이하로 측정되어야 하며 안점막자극성과 피부자극성의 경우 자극지수에 따라 농자재로 판매될 시 표시문구 및 그림문자로서 상기 자극을 표시하여야 한다. 시제품의 인축독성 결과는 표 25에 제시한 바와 같이 급성경구 및 경피의 독성등급은 5급으로 조사되었으며 안점막자극성과 피부자극성은 자극지수 0.0으로 조사되었다.

표 21. 시제품의 유효성분 함량

유효성분	함량 (%) [*]
Di-rhamnolipid	0.06 ± 0.00

*3반복 평균 ± 표준 편차

표 22. 유기농업자재 공시 및 품질인증 기준에 따른 병원성 미생물

	시험 미생물	학명
병원성미생물	병원생대장균	<i>Escherichia coli</i> O157 : H7
	살모넬라	<i>Salmonella</i> spp
	황색포도상구균	<i>Staphylococcus aureus</i>
	리스테리아 모노사이토제네스	<i>Listeria monocytogenes</i>
	바실러스 세레우스	<i>Bacillus cereus</i>

표 23. 시제품의 병원성미생물 검출 시험결과

	시험 미생물	시험 결과
병원성미생물	병원생대장균	불 검 출
	살모넬라	불 검 출
	황색포도상구균	불 검 출
	리스테리아 모노사이토제네스	불 검 출
	바실러스 세레우스	불 검 출

표 24. 시제품의 약해시험 결과

	시험 작물	시험 결과
약해 평가	배 추	약해 없음
	오 이	약해 없음
	무	약해 없음
	상 추	약해 없음
	파	약해 없음

표 25. 시제품의 인축독성평가 결과

독성시험항목	시험결과	독성구분
급성경구	LD50 > 2,000 mg/kg	5 급
급성경피	LD50 > 2,000 mg/kg	5 급
안점막자극성	안자극 지수 0.0	해당 사항 없음
피부자극성	일차피부자극지수 0.0	해당 사항 없음

② 환경에 대한 독성평가

시제품의 환경독성평가는 담수잉어, 물벼룩, 꿀벌에 대해 시제품을 노출시킨 후 이들이 갖는 독성 등급을 평가하였다. 시제품의 생태독성에 대한 평가는 표 26과 같았다. 급성어류독성의 경우 독성노출비가 10이상으로 유기목록자재 공시 및 품질인증 기준에 적합하였으며 물벼룩과 꿀벌의 경우 어떠한 독성도 관찰되지 않았다. 이상의 결과는 상기제품이 인축 및 환경에 안전하다는 것을 의미하였다.

이와 같은 독성등급은 인축 및 환경에 영향이 없는 무해한 등급으로서 공시균주와 더불어 균주가 생산하는 당지질성 살충물질 또한 독성이 낮은 안전한 물질임을 시사한 결과이다. 균주가 생산하는 진딧물 살충물질인 당지질성 물질은 *Pseudomonas* sp.가 생산하는 대표적인 생계면활성 물질로서 biofungicide가 Zonix™ 이라는 제품으로 EPA에 등록되어 판매되고 있다. 이는 공시균주가 생산하는 물질이 인축과 환경에 안전하다는 것을 의미하며 공시균주의 시제품을 농가현장에 적용하였을 때 생물학적 및 환경 생태학적으로 안전하다는 것을 의미한다.

이상의 결과를 통해 공시균주의 배양기술을 (주) 현농에 기술이전 하였으며 시제품을 ‘람피드’라는 이름으로 유기목록자재로 공시하는 것을 진행하였다. 본 연구의 기술을 이전 받은 회사에서는 람피드를 진딧물 방제에 적용할 때 희석배수에 따른 방제효과의 감소와 제품을 제조하는 경제적인 비용을 고려하여 람피드와 다른 시판 농자재를 적절하게 혼용하여 사용하는 방향으로 사업을 수행하는 계획을 추진하고 있다.

표 26. 시제품의 환경독성평가 결과

시험항목	시험결과	독성구분
급성어류독성	독성노출비(TER) > 10이상	3 급
물벼룩 급성유영저해	EC50 > 10 mg/L	해당 사항 없음
꿀벌접촉독성	LD50 > 100 ug/bee	해당 사항 없음

기술정보
AGRICULTURAL TECHNOLOGY

- RDA 인터레방
- 농업기술종합정보
- 영농기술보급정보
- 농자재정보**
 - ▶ 농약직권시험상시수요조사
 - 농약일반
 - 농약등록현황및사용기준
 - 농약안전사용교육실시요령
 - ▶ 비료품질검사및시료채취
 - ▶ 유기농업자재
 - ▶ 농자재시험연구기관
 - ▶ [세칭] 농기계사후검정
 - ▶ 농업생명자원관리
 - ▶ 농자재 관련법령

농자재정보

인쇄 | 스크린

유기농업자재

- ▶ 제조사명 : (주)현농 ▶ 연락처 : 061-362-2014
- ▶ 주소 : 전남 곡성군 입면 송전리 1050 생물방제센터 시험생산단지행정관 104
- ▶ 공시(품질인증)번호 : 공시-3-5-017 ▶ 등재일자 : 14.04.25 / (20140425~20170424)
- ▶ 자재종류 : 작물충해관리용자재 ▶ 자재명 (상표명) : 미생물추출물 (람피드)
- ▶ 원료명 : 미생물추출물(Dirhamnolipid) 100% ▶ 사업자등록번호 : 409-81-95886
- ▶ 책임보험증서번호 : ▶ 품목등록여부 :
- ▶ 주의사항 :
- ▶ 가격정보 : 35,000원/1L

그림 22. 시제품의 유기농업자재 목록공시 등록 현황.

다. 시제품의 농가현장 효능 평가 및 방제 매뉴얼 연구

시제품의 농가현장 효능평가 및 진딧물 방제 매뉴얼 연구는 실내에서 진딧물 방제 효율을 검증하여 선발된 자재와 상기 시제품을 중심으로 수행하였다. 선발된 자재는 유효성분이 상이한 3종의 천연식물추출물 자재로서 유효성분은 마트린(참진), 님오일(선초), 너삼씨앗추출물(다이아)등 이었다. 각각의 자재들은 실내에서 살충효율을 검증한 후 진딧물 방제 예비 매뉴얼 도출을 위해 실험실조건에서 시제품과의 교호적인 처리에 따른 진딧물 밀도수를 조사하였다.

(1) 식물추출물 자재의 실내조건에서 방제효능 평가 및 시제품의 농가현장 방제 효율

공시 자재들의 방제효능을 평가하기 위해 상기 자재들을 권장농도 2배(고농도), 권장농도, 권장농도의 1/3(저농도) 수준으로 진딧물에 처리하여 살충효율을 조사하였다. 고농도와 권장농도로 처리 하였을 경우 참진(마트린), 다이아(너삼씨앗추출물)의 경우 80% 이상의 살충효율이 관찰되었다. 반면 선초(님오일)의 경우 70% 수준의 살충효율이 관찰되었다. 또한, 권장농도의 1/3 수준인 저농도를 처리하였을 때 모든 자재에서 50-60% 수준의 살충효율이 관찰되었다 (그림 23).

한편, 시제품의 농가포장 방제효율을 조사하기 위해 전라남도 나주시 남평읍 평산리의 고추 시험포(그림 24)에서 진딧물 살충효율을 조사하였다. 시제품의 살충효율은 농촌진흥청 약효시험법에 준하여 실시하였다.

시제품을 2배, 5배, 10배 희석하여 살포하였으며 살포 24시간 후 총 마리수에 대한 사충수의 비율로 살충효율을 계산하였다. 시제품의 농가포장에서 살충효율은 표 27에 보여준 바와 같이 시제품을 2배 희석하여 살포하였을 때 평균 살충효율은 87% 수준이었으며 5배희석하여 살포하였을 때 68% 수준이었다. 한편 10배 희석하여 살포하였을 경우 살충효율은 18% 수준으로 현저히 낮았다.

(2) 실내조건 진딧물 방제 예비 매뉴얼 연구

진딧물 방제 예비 매뉴얼을 도출하기 위해 진딧물 살충효율이 검증된 식물추출물 자재와 상기 시제품과의 교호적인 처리순서에 따른 진딧물의 밀도수 변화를 조사하였다. 각각의 자재 및 시제품의 살포농도는 진딧물을 50-60% 제어할 수 있는 농도 수준으로 살포하였다. 실내 시험구는 진딧물의 이동을 막기 위해 그림 25와 같이 투명한 아크릴판으로 분리하여 준비하였으며 진딧물 60마리를 배추에 옮겨 시험을 수행하였다. 총 7개의 시험구로서 자재의 처리는 표 28과 같았으며 약제의 처리는 2일 간격으로 실시하였다.

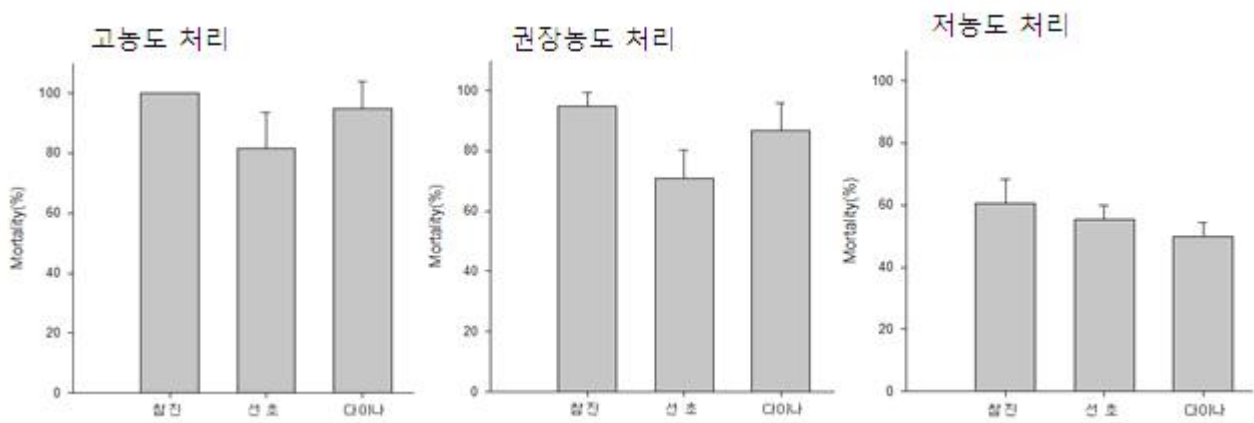


그림 23. 선별된 친환경 자재의 진딧물 살충효율. (고농도: 권장농도 2배, 권장농도: 제품에 표기된 권장농도, 저농도: 권장농도 1/3배).



그림 24. 시제품의 살충효능 평가 및 방제 매뉴얼 연구용 포장 (600m²).

표 27. 시제품의 희석배수에 따른 농가현장 살충효율

처리구	살충 효율 (%)		
	희석 비율		
	2	5	10
1	96.1	90.8	20.6
2	94.1	56.1	15.7
3	95.7	65.7	8.1
4	71.2	64.1	30.2
5	82.4	68	19.6



그림 25. 교호적인 약제처리를 위한 실내 시험구.

표 28. 자재의 교호적 처리 순서

시험구	약제 처리순서			
	1	2	3	4
1	참진	선초	시제품	다이나
2	다이나	선초	참진	시제품
3	선초	다이나	참진	시제품
4	참진	다이나	시제품	선초
5	선초	시제품	다이나	참진
6	다이나	시제품	선초	참진
대조구	물	물	물	물

상기 자재의 교호적인 처리 결과는 그림 26에 보여준 바와 같이 진딧물의 밀도수는 물 처리구의 경우 206 마리로 8일 사이에 343% 증가하였다. 반면, 자재를 처리한 모든 시험구는 대조구에 비해 진딧물의 밀도수가 현저히 감소하였다. 특히, 시험구 1번과 4번에서는 진딧물 수가 각각 6마리와 5마리로서 최초 진딧물 밀도의 10%와 8% 수준이었다. 진딧물 밀도수 제어 가 우수한 시험구 1번과 4번은 1차 방제제로 참진을 살포하였던 시험구로서 참진은 실험실 검증에서 다른 식물추출물제에 비해 가장 높은 살충효율이 관찰되었다. 따라서 진딧물 발생초기에 가장 효과가 우수한 자재를 살포하여 진딧물의 밀도를 적정수준 이하로 낮추면 진딧물 밀도수의 급속한 증가가 억제되어 효율적으로 방제할 수 있을 것으로 사료되었다.

(3) 진딧물 방제 매뉴얼 도출

진딧물 방제 매뉴얼 도출을 위해 상기의 예비 방제매뉴얼에서 가장 높은 효율을 보였던 시험구 4 (참진-> 다이나-> 시제품-> 선초)를 적용하여 작물재배지수에 따른 진딧물의 밀도지수를 조사하였다. 진딧물 밀도지수는 표 29에 제시한 바와 같이 산출하였으며 밀도조사는 3월 말부터 1주일 간격으로 실시하였다. 또한, 밀도지수의 산출은 다음과 같은 식을 이용하여 실시하였다. 밀도 지수 = $\{(A \text{ 고추수} \times 1) + (B \text{ 고추수} \times 2) + (C \text{ 고추수} \times 3) + (D \text{ 고추수} \times 4) + (E \text{ 고추수} \times 5) / \text{전체 고추수}\} \times 100$

농가포장에서 교호적인 약제처리에 따른 진딧물 밀도지수는 그림 27과 같았다. 시험포장에서 진딧물은 정식 2달 후인 5월 초에 최초로 발생하였으며 이후 진딧물의 밀도지수는 경시적으로 급격하게 증가하다가 약제를 교호적으로 살포한 이후 지속적으로 감소하여 밀도지수가 32.1 수준이었다. 본 연구에서는 진딧물밀도의 한계지수(Threshold)를 100으로 선정하였다. 이 지수는 모든 고추에서 50마리 미만의 진딧물이 1-20 앞에서 관찰되는 수준이다. 상기 수치에 도달하면 약제를 처리하여도 방제되는 진딧물의 개체수보다 새롭게 탄생하는 진딧물의 개체수가 많아 작물 생산량에 크게 영향을 주는 것으로 간주하였다. 이와 같은 관점에서 유효성분이 서로 다른 자재를 효율적으로 활용하여 밀도지수를 50 이하로 유지함으로써 진딧물이 작물생산량에 영향을 주지 않게 하는 것이 본 방제 매뉴얼의 특징이라고 할 수 있다. 시제품의 처리에 따른 진딧물 밀도지수를 보면 시제품 처리 전 밀도지수는 40.1로서 관찰되었으며 시제품 처리 후에는 40.0으로 유지되었다 (그림 27). 이는 작물의 생육이 왕성한 시기에 진딧물의 밀도가 급상승하는 현상을 고려할 때 시제품 처리에 의해 진딧물의 밀도가 효율적으로 관리되었음을 의미하였다.

고추의 재배기간과 진딧물의 생육주기를 고려하였을 때 서로 다른 유효성분을 갖는 약제를 교호적으로 처리하기 위해서는 4-5 종의 자재가 필요할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서 시제품의 적용은 진딧물 방제 자재의 다양성 측면에서 기존의 식물추출물 자재와 더불어 효율적으로 사용될 것으로 사료된다. 이상의 결과를 종합적으로 판단하여 볼 때 ① 해충발생예찰을 통해 발생초기에 방제를 시작하고, ② 작물의 재배지수를 고려하면서 유효성분이 상이한 자재를 교호적으로 살포하여 진딧물의 밀도수를 일정한 수준으로 유지하여 해충을 관리하는 방법이 효율적인 방제 매뉴얼인 것으로 사료되었다. 본 연구에서 개발된 진딧물 방제용 제제는 국내 시판되는 진딧물 방제용 농자재와 교호적으로 적용될 수 있으며, 이 제제를 통해 유효성분과 품목수가 한정된 국내 농자재의 열악함을 부분적으로 극복할 수 있을 것으로 기대되었다.

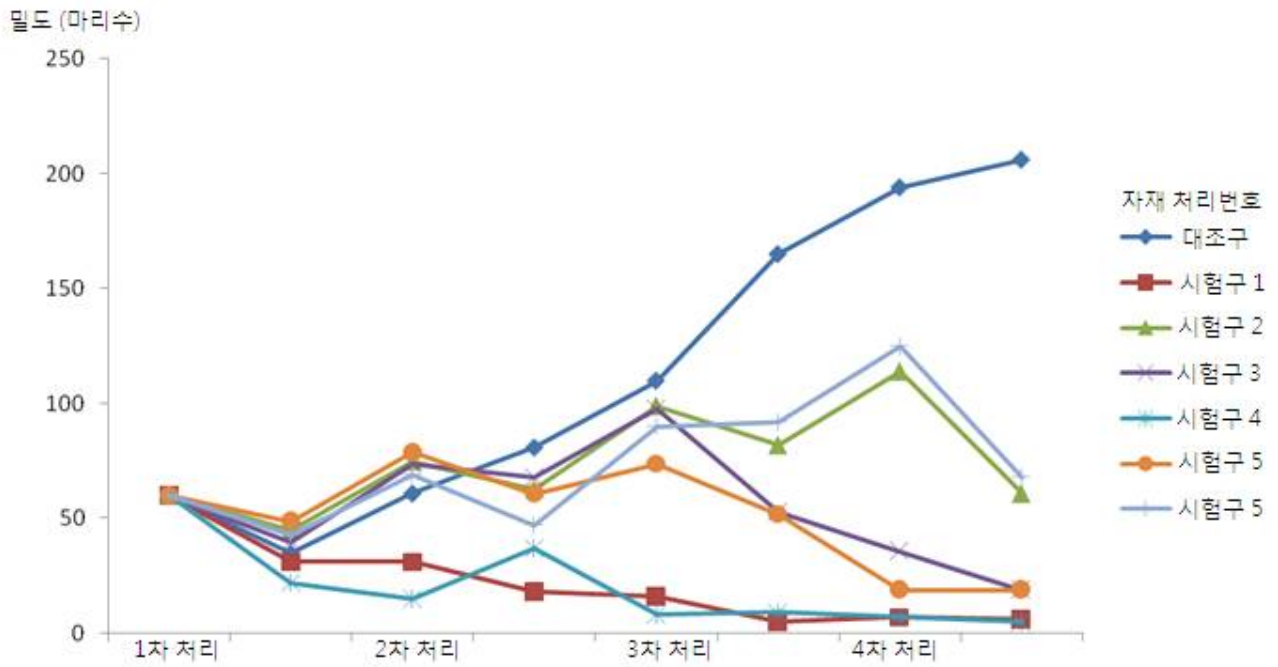


그림 26. 교호적인 약제처리에 따른 진딧물 밀도수의 변화.

표 29. 진딧물 밀도관찰 기준

밀도기준	진딧물 발생 현황
0	진딧물이 관찰되지 않음
1 (A)	1-20 잎에서 잎당 50마리 미만의 진딧물이 관찰
2 (B)	1-20 잎에서 잎당 50마리 이상의 진딧물이 관찰
3 (C)	20-절반 이하의 잎과 꽃에서 진딧물 관찰
4 (D)	절반이상의 잎과 꽃에서 진딧물 관찰
5 (E)	한 주 전체에서 진딧물이 관찰

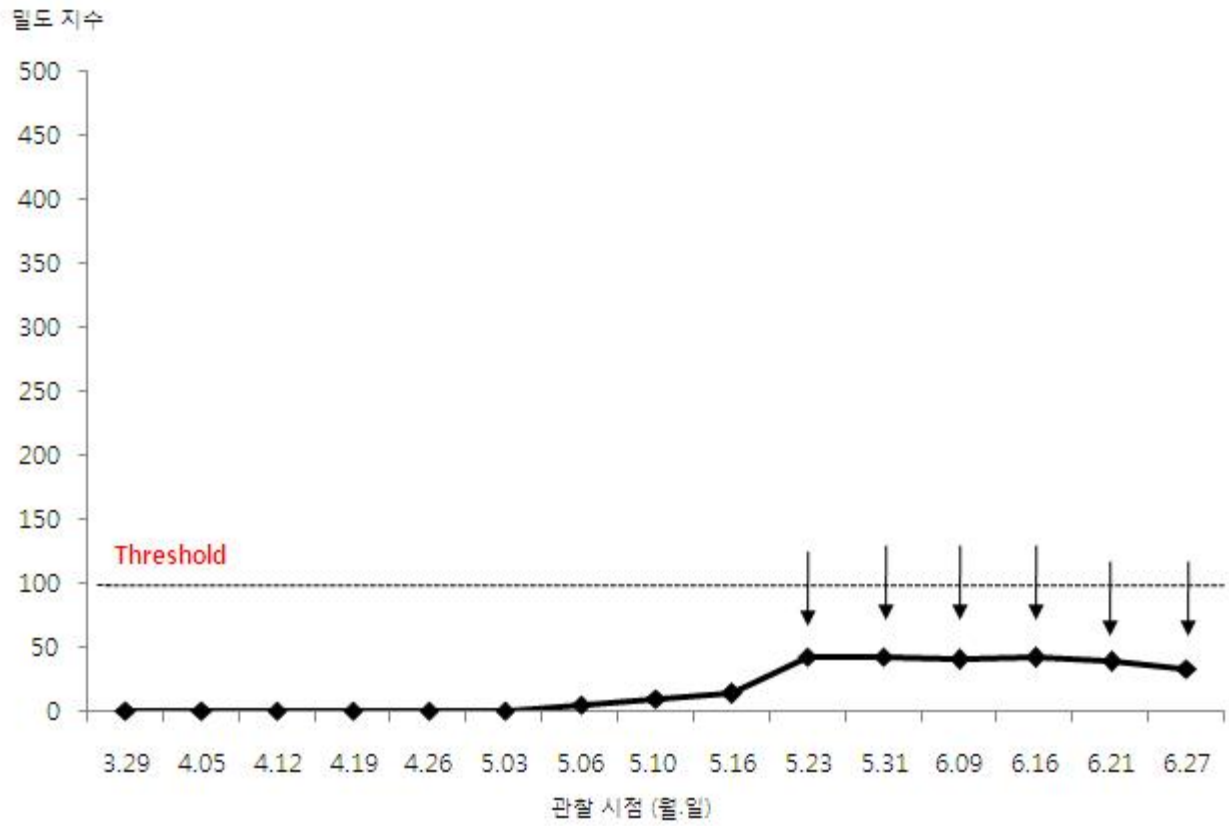


그림 27. 방제 매뉴얼 적용에 따른 진딧물 밀도수 변화(화살표는 자재 처리 시기를 나타냄).

제 9 절 난방제성 토양병해 방제용 미생물살균제 개발 및 산업화

1. *Bacillus velezensis* NSB-1균주를 이용한 미생물살균제 개발

가. *Bacillus velezensis* NSB-1균주의 대량배양공정개발

(1) *Bacillus velezensis* NSB-1균주 선발

Bacillus velezensis NSB-1(이하 *B. velezensis* NSB-1이라함) 균주는 난방제성 토양 병해인 균핵병, 탄저병, 뿌리썩음병 병원균에 항균력이 우수한 특허균주(특허 제10-0976760호)로 본 연구과제를 통하여 친환경유기농자재로의 등재를 목적으로 하고 있다(Fig 1). 본 균주의 산업성 타당여부를 판단하기 위한 준비단계로 scale 단계별 배양공정 설계 및 토양병해에 대한 약효, 약해 시험을 다음과 같이 수행하였다.

(2) *B. velezensis* NSB-1의 Lab scale 최적조건 확립

B. velezensis NSB-1의 최적배양배지를 확립하기 위하여 Davis minimal medium(glucose 0.5%, K_2HPO_4 0.7% , KH_2PO_4 , 0.2%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%)을 기본배지로 하여 Carbon sources(Glucose, Fructose, Mannose, Sucrose, Maltose, Lactose, Starch, Pectin, Xylose, Galactose), Inorganic nitrogen sources(NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$, KNO_3 , $(NH_4)HPO_4$, NH_4HCO_3 , $NaNO_3$, NH_4NO_3), Organic nitrogen sources(Yeast extract, Tryptone, Malt extract, Beef extract, Peptone, Urea, Soytone, Soybean meal), Inorganic salts(Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $NH_4H_2PO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $NaCl$, KCl , $CaCO_3$, $ZnSO_4$)을 달리하여 최적배지 후보균을 선정하였다. 그 결과 Glucose, $(NH_4)_2SO_4$, Yeast extract, Soybean meal, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 등을 배지원으로 하는 최적배지후보균 1,2를 선정하였으며 또 다른 최적배지 후보균으로 당사에서 기개발한 생산배지(GB 생산배지1~5)를 선정하였다. 비교 배양실험은 5L jar-fementer를 이용하여 다른 온도 (20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C), 다른 pH (pH4, pH5, pH6, pH7, pH8) 조건 속에서 aeration, 내부 압력 조절 등 세부 배양 공정을 조절하며 수행하였다.

선정기준은 배양액의 영양세포 및 포자수를 기준으로 하였으며 수율이 현저히 낮은 GB생산배지 3~5는 비교대상에서 제외하였다. 실험 결과 “GB생산배지1”의 조성이 가장 높은 수율과 안정성을 나타내어 향후 scale up 실험의 생산 배지로 활용하였다(Table 1). Lab scale(5L jar fermenter)상에서 배양 최적 환경인자 별로 조사한 결과 pH는 6.0~8.0범위에서 생육이 일어난 반면, 산성 조건에서는 cell growth가 거의 일어나지 않았다. 온도는 저온과 고온 보다는 30°C에서 가장 안정적인 생산력을 보였다. 초기 접종농도의 경우 1~5% 모두 우수한 결과를 나타내었으나 경제성을 고려하여 2%의 접종농도로 설정하였다 (Fig.2).

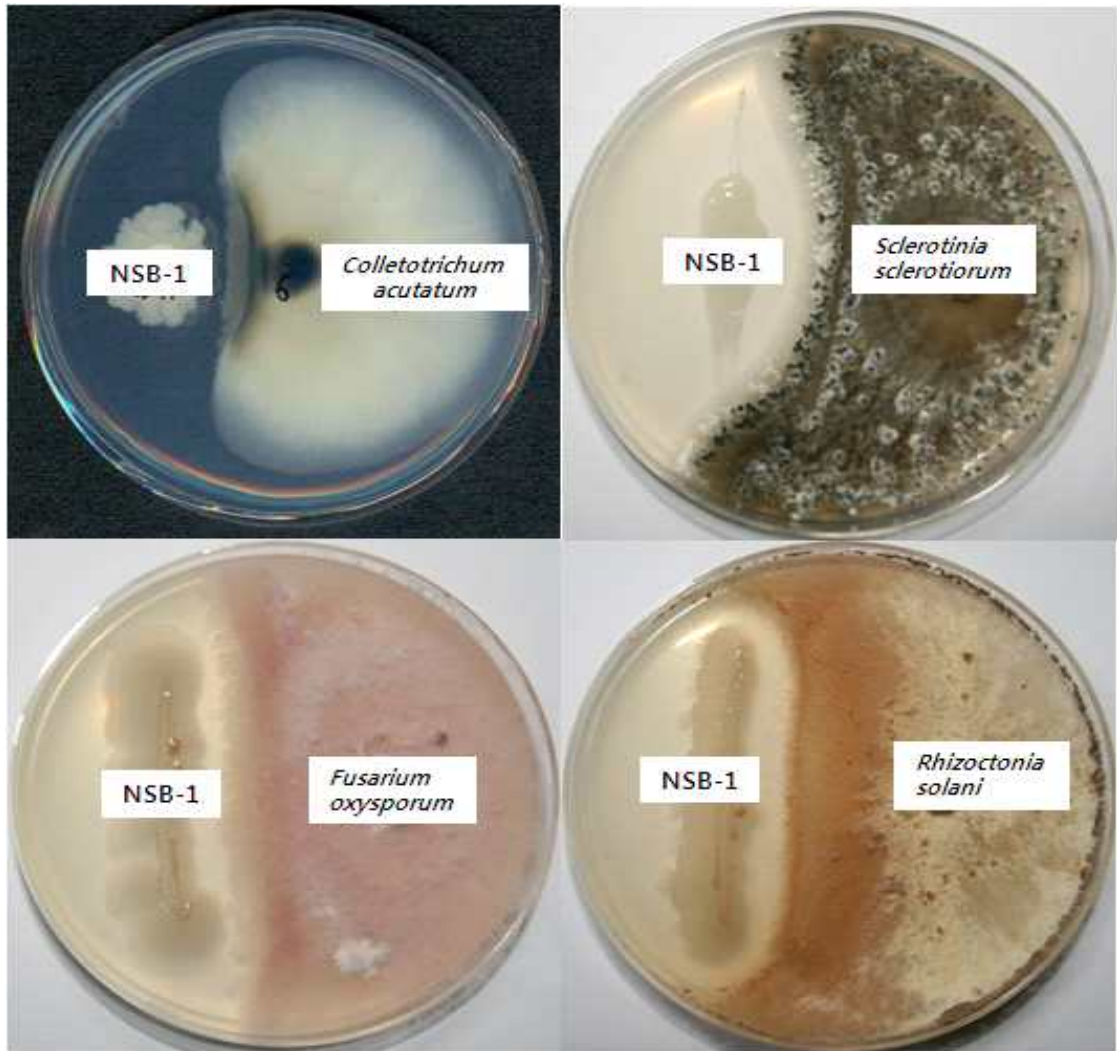


Fig. 1. *B. velezensis* NSB-1의 토양병해에 대한 항진균력

Table 1. 배지 종류별 *B. velezensis* NSB-1의 총 균수 및 spore형성 비교

	Davis minimal medium	최적배지1	최적배지2	GB생산배지1	GB생산배지2
영양세포수 (cfu/ml)	1.5E+07	>3.2E+08	5.2E+08	1.7E+09	4.5E+07
포자수 (cfu/ml)	>1.0E+06	>1.0E+06	4.3E+08	1.4E+09	>1.0E+06

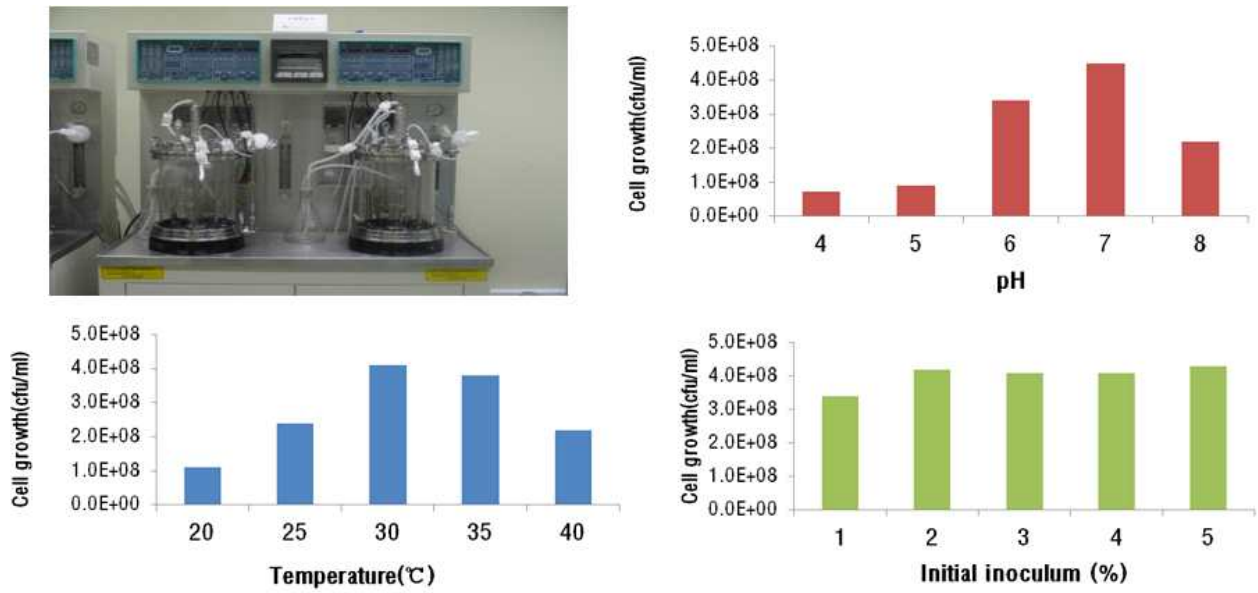


Fig. 2. *B. velezensis* NSB-1의 배양최적 환경인자 결과.

선정된 최적배지를 이용하여 5L-jar fermenter상에서의 *B. velezensis* NSB-1의 시간별 생육을 확인하였다. Culture profile을 작성하기 위하여 배양 중 일정 시간마다 pH, DO 및 미생물 총수 및 포자수를 지속적으로 확인하였으며 시간대별 샘플을 분석하여 전반적인 생산 상태 점검 및 생산 기간, pH 등에 대한 정보를 획득하였다(최적배지 조성을 이용하였으며 동일한 조건에서 5회 시생산을 실시함).

5L-jar fermenter상의 culture profile을 작성한 결과(Fig 3), 배양 시작 후 약 1~2시간 후부터 증식이 이루어지기 시작하여 약 22~31시간 사이에 급속한 증가를 이루었으며 최대 증식기의 총 균수는 $8.5E+08$ cfu/ml 수준으로 목표치로 하고 있는 ($1.0E+09$ cfu/ml 이상)수준에 유사한 결과를 보였다. 하지만 spore의 경우 약 40시간 이후에 형성되기 시작하여 약 60시간 이후에 90%이상의 spore를 형성하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 4).

최적배지를 이용한 배양액의 경시 안정성을 조사한 결과, 저온(2°C)과 상온에서는 3개월 보관 후 초기 포자수의 약 1%수준의 감소가 발생하였으며 고온(45°C)에서는 6주 보관(경시 1년 기준) 할 경우 포자수가 초기 포자수의 5% 수준 이하로 감소하였다. 비교적 생산단가가 낮은 액상 형태에서 안정적인 경시를 보여 산업성에는 큰 문제가 없다고 판단되어 1차적으로 액상수화제 타입을 선정하였으나, 제형의 다양화를 통하여 사용현장에서의 다양한 선택성을 높이기 위하여 동결건조 및 분무건조를 활용한 분상수화제 등 다양한 제형을 개발하였다.

(3) *B. velezensis* NSB-1의 Pilot scale 최적조건 확립

50L 및 500L fermenter를 이용하여 pilot scale에서의 생산조건 및 parameter 설정 시험을 실시하였다. 배지 조성 및 생산 공정은 lab scale에서 기 검토된 조건을 이용하였으며 lab scale과 동일하게 culture profile을 작성하기 위하여 시험 일정 시간마다 pH, DO 및 미생물 총수 및 spore수를 지속적으로 확인하였다.

Flask culture한 배양액을 seed로 사용하여 50L fermenter에서 배양을 실시하였으며 (Fig 5) 배양은 시간 당 미생물의 증가 속도가 감소하였을 때 종료하였다. 각 시간별 배양액의 성장 수준은 Fig 6과 같았다. 배양 시작 후 약 4시간 이후부터 균수가 증가하기 시작하였으며 약 40시간 경과 후 가장 높은 수율($2.5E+09$ cfu/ml)을 보였다. 이는 목표 수치를 넘어선 수치로 우수한 결과라 할 수 있으나 5L jar fermenter 결과와 같이 spore의 형성시간이 늦게 되었다(Fig. 7). Spore형성의 문제점을 해결하기 위하여 포자형성 유도제 및 여러 영향인자를 대상으로 한 해결책을 모색하여 최단시간내에 생산이 가능하도록 수율개선실험을 진행하여 GB생산지1-1을 추후 개발 하였다.

500L fermenter의 경우 50L fermenter에서 배양한 배양액을 seed로 사용하여 500L fermenter에서 시배양을 실시하였다(Fig. 8).

배양 시작 후 약 3시간 이후부터 총 균수가 증가하기 시작하였으며 약 45시간 경과 후 가장 높은 증가율을 보였다($9.0E+08$ cfu/ml). 증가율은 약 50시간 이후부터 감소하기 시작하였으며 최종 배양 종료 시 포자수는 $7.5E+08$ cfu/ml 수준으로 나타났는데 이는 lab scale 및 pilot scale(50L)에서 생산보다 다소 낮은 수치였다(Fig 9). Pilot scale *B.velezensis* NSB-1의 spore는 배양 38시간부터 형성되기 시작, 약 55시간 이후 90%이상을 형성하여 60시간 후에는 100% 전환되었다(Fig. 10).

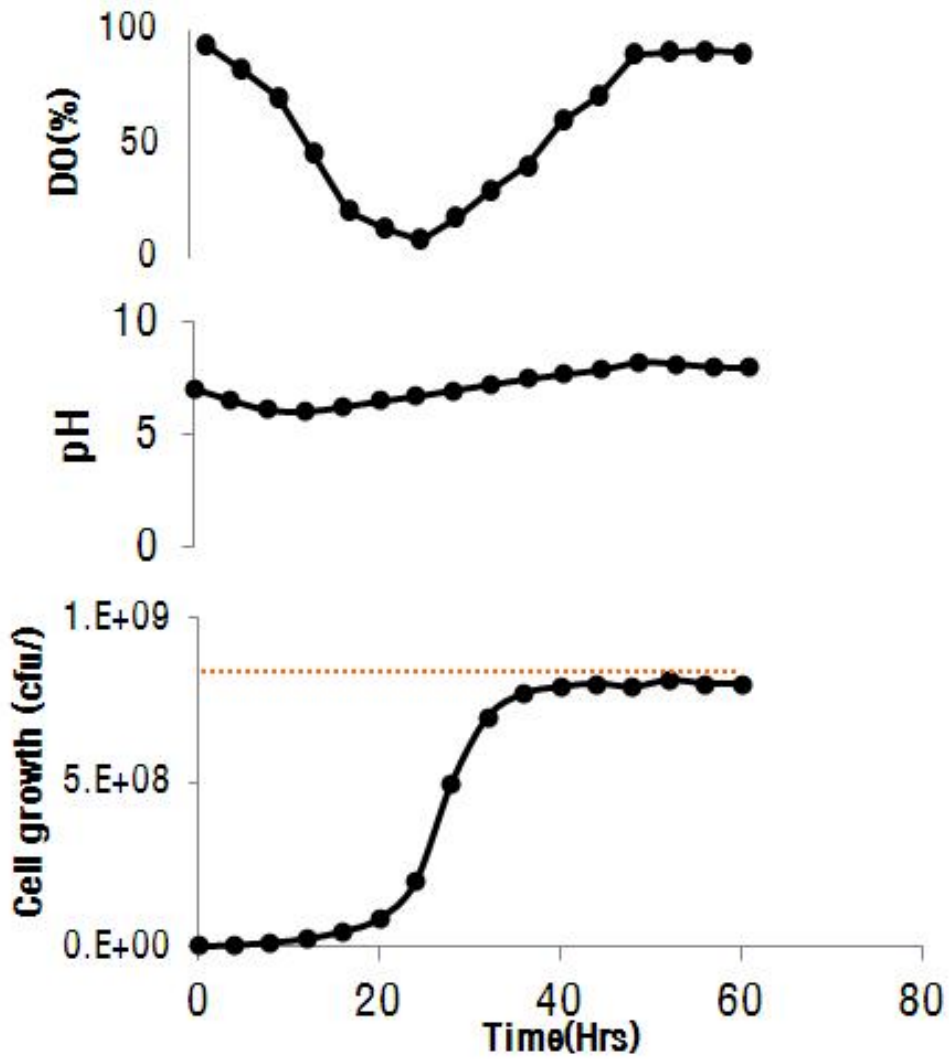


Fig. 3. 5L-jar fermenter상의 *B. velezensis* NSB-1균의 생육.

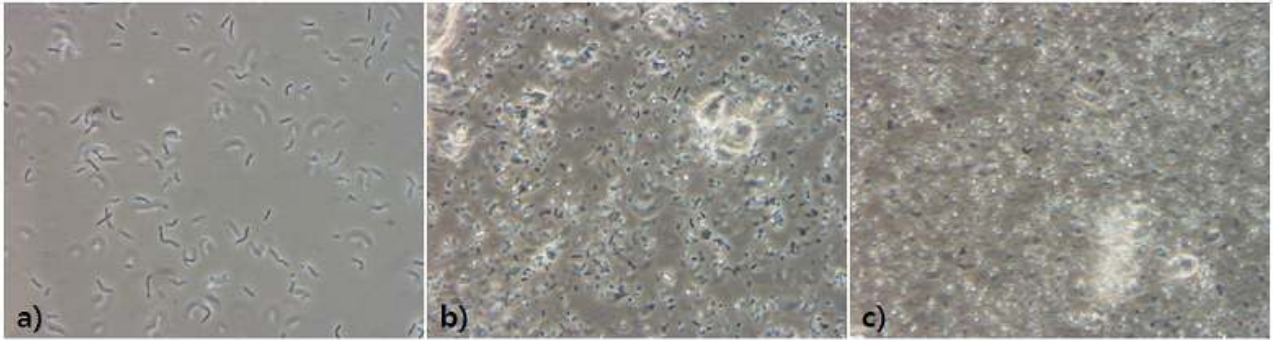
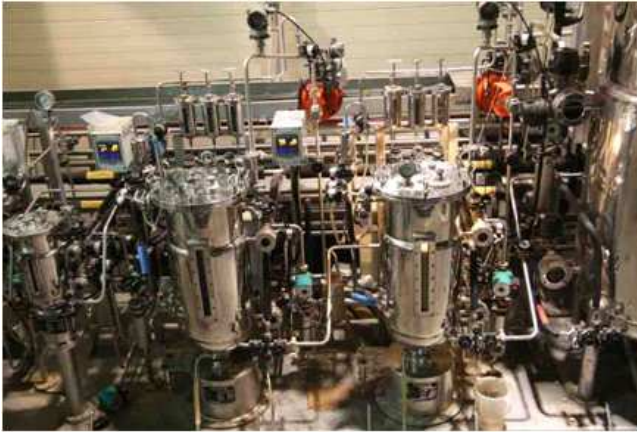


Fig. 4. *B. velezensis* NSB-1의 현미경 사진

(a: *B. velezensis* NSB-1의 영양세포, b: 영양세포내 형성중인 spore, c: 배양종료 후 spore).



Main culture
(working volume 40L/50L – fermenter)

- A. Medium : GB생산배지 1
- B. Cultivation temp. : 30 °C
- C. Cultivation time : 48 hrs
- D. RPM : 150 rpm
- E. Pressure : 0.5 Kg/cm²
- F. Air : 0.5 vvm

Fig. 5. 50L-fermenter 모습과 주요 배양조건.

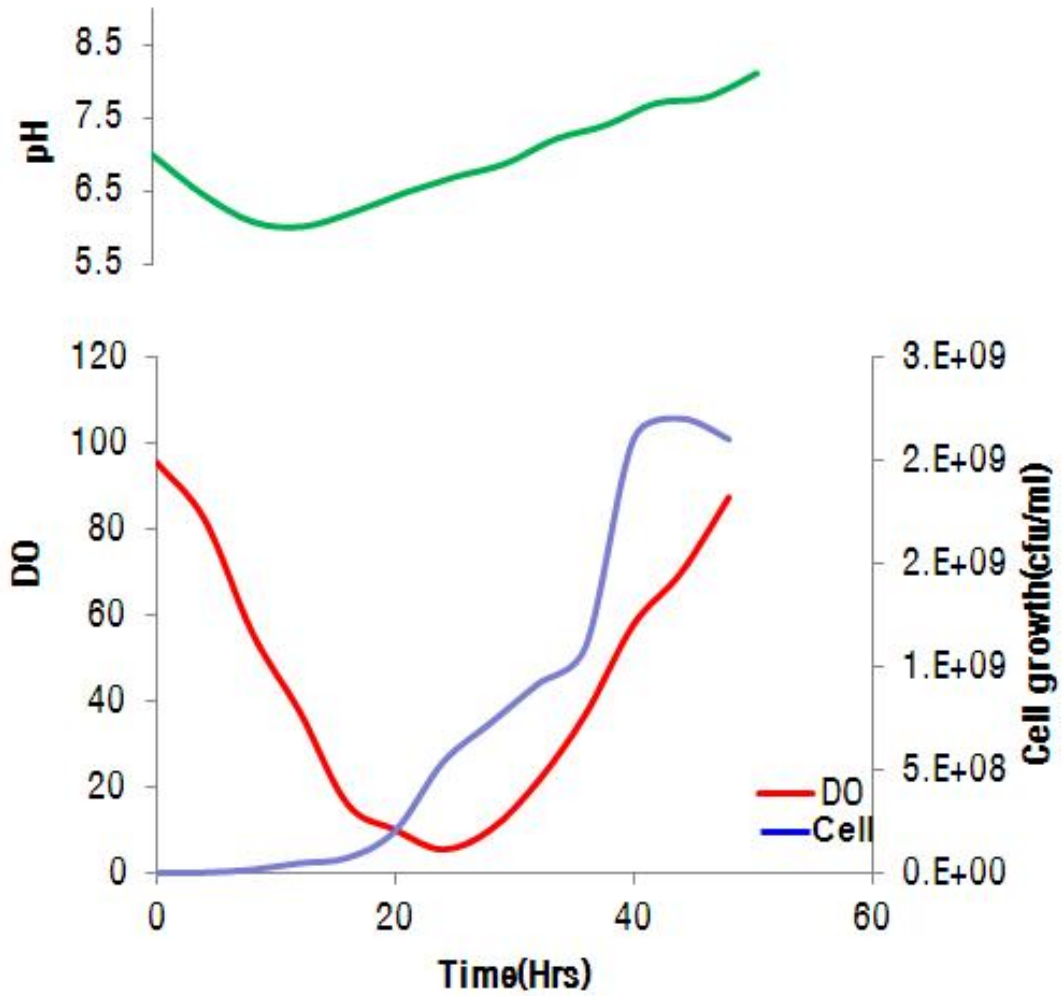


Fig. 6. 50L-fermenter상의 *B. velezensis* NSB-1균의 생육.

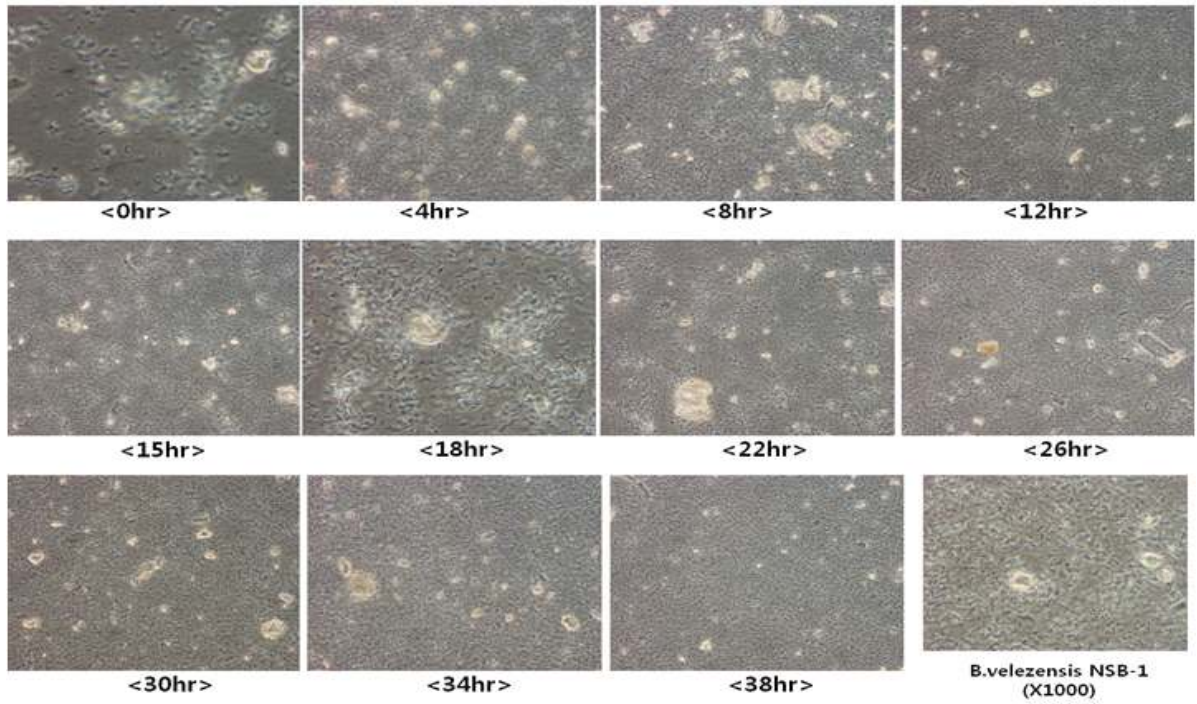


Fig. 7. 50L-fermenter상의 *B.velezensis*NSB-1균의 배양시간에 따른 현미경사진.



Main culture
(working volume 300L/500L – fermenter)

- A. Medium : GB생산배지 1
- B. Cultivation temp. : 30 °C
- C. Cultivation time : 72 hrs
- D. RPM : 120 rpm
- E. Pressure : 0.5 Kg/cm²
- F. Air : 0.5 vvm

Fig. 8. 500L fermenter 모습과 주요 배양조건.

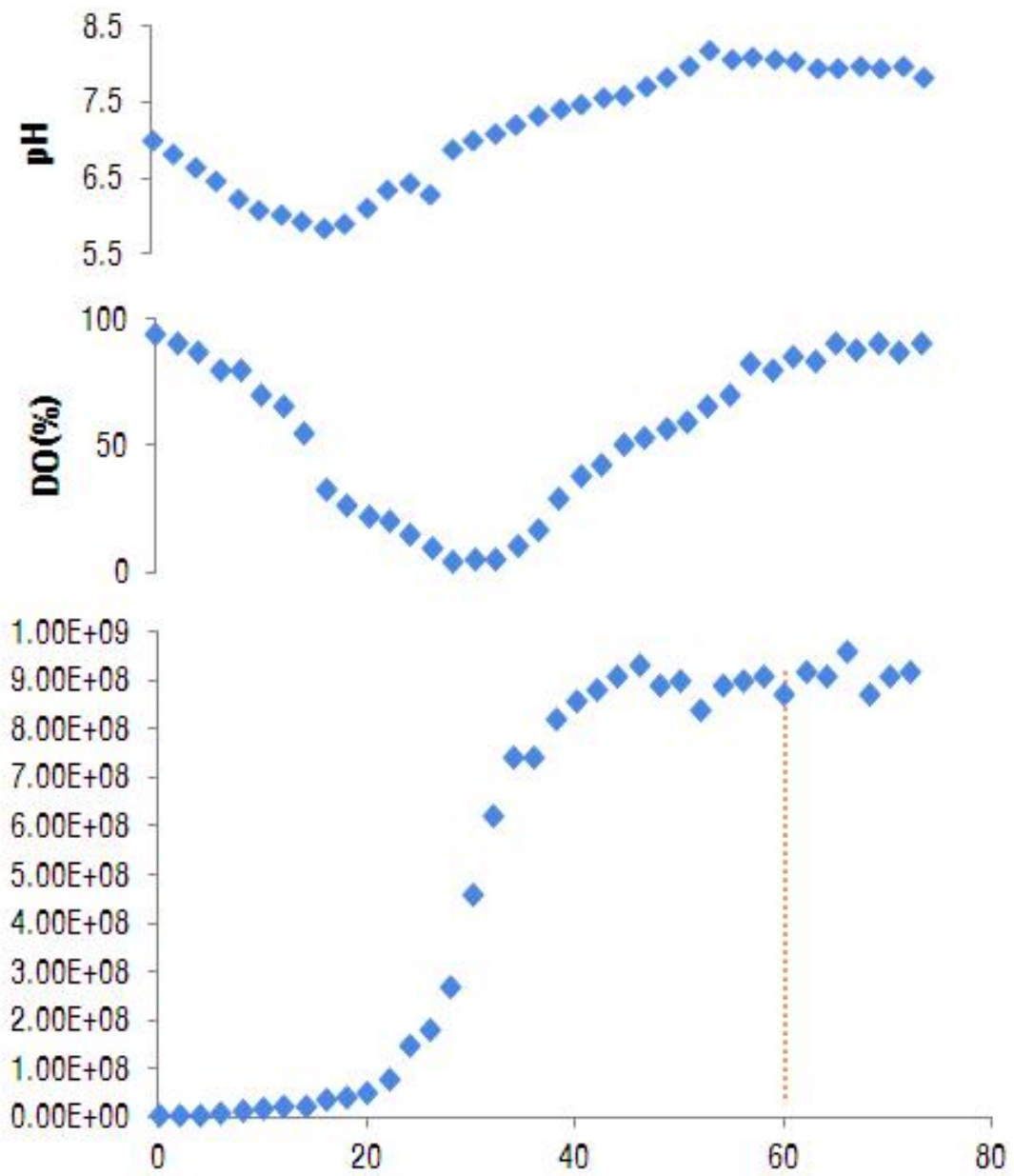


Fig. 9. 500L-fermenter상의 *B. velezensis* NSB-1균의 생육.

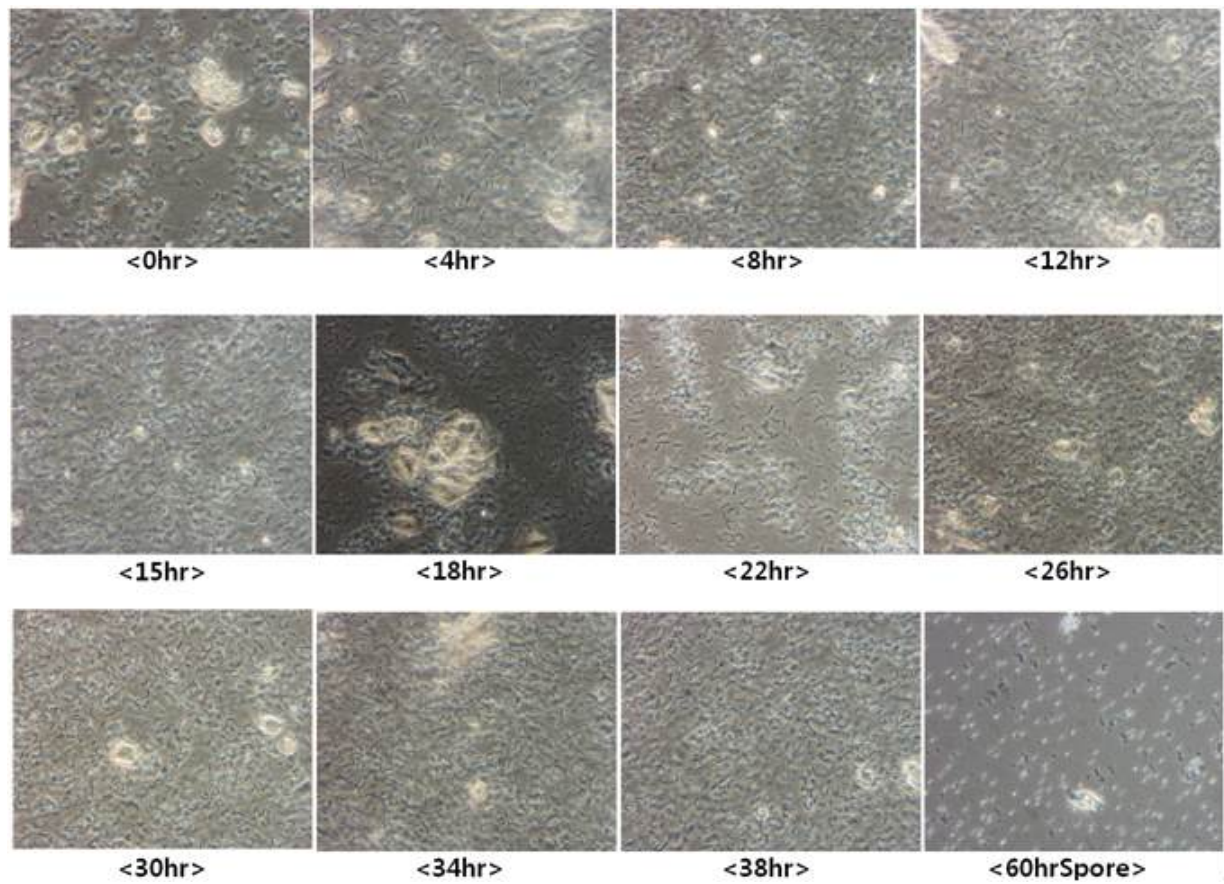


Fig. 10. 500L-fermenter상의 *B. velezensis* NSB-1균의 배양 시간에 따른 현미경 사진.

(4) *B. velezensis* NSB-1의 Plant scale 최적조건 확립

Pilot scale에서의 culture profile 및 생산 공정 최적화 시험을 토대로 실제 상업화 모델인 plant scale에서의 생산 조건 검토 및 parameter 설정 시험을 실시하였다. 시험용 5,000L fermenter는 실제 미생물농약을 생산하는 설비를 이용하였으며 배지 조성 및 생산 공정은 pilot scale에서 재조정된 조건을 이용하였다. Pilot scale cultivation과 마찬가지로 culture profile을 작성하기 위해 시험 일정 시간마다 pH, DO 및 미생물 포자수를 지속적으로 확인하였으며 시간대별 샘플을 분석하여 전반적인 배양 상태 점검 및 배양 기간, pH, DO 등을 조사하였다. 5,000L fermenter의 경우 500L fermenter에서 배양한 배양액을 seed로 사용하여 시배양을 실시하였다 (Fig. 11).

수율개선 시험을 통한 배지 조성은 기 개발된 GB 생산배지 1의 배지 조성을 변형시킨 배지인(GB생산배지1-1)을 이용하였으며 동일한 조건에서 2회간 생산을 실시하였다. 2시간 간격으로 배양액을 채취하여 균수 및 오염도, pH, DO 등을 조사하였으며 지속적으로 육안 관찰하여 배양 중 이상 유무를 관찰하였다. 배양 종료 시점은 최종적으로 시간 당 미생물의 증가속도가 감소하여 spore형성정도가 95%수준이 되었을 때로 선정하였다. 배양 종료 후 배양액의 상태를 조사하고 상온, 고온(45°C), 저온(2°C)에서 장기간 보관하여 배양액의 상태 변화를 조사하였다.

Plant scale fermenter에서의 생산 결과에 따라 culture profile을 작성하였다(Fig. 12). 배양 시작 후 약 4시간 이후부터 포자수가 증가하기 시작하였으며 약 20시간 경과 후 가장 높은 증가율을 보였다($2.2E+09$ cfu/ml). 그리고 그동안 문제시되었던 spore형성이 배양 20시간부터 형성하기 시작하여 36시간에 약 95%이상의 spore형성능을 보였으며, 최종 배양 종료 시 포자수는 $1.8E+09$ cfu/ml 수준으로 나타났다(Fig. 13). 이는 기존 배양 공정에 비해 spore 형성시간 단축 및 spore수가 크게 증가한 것으로 후공정 과정의 농축 등을 고려할 경우, 상업화 적정선인 $1.0E+09$ cfu/ml 을 넘어서는 결과를 나타낸다. 이는 수율면에 있어 미생물 배양물이 높은 산업성을 나타내고 있다 볼 수 있다. pH는 초반에 7.0에서 5.5까지 떨어지나 spore가 형성하는 시간부터 증가하기 시작, 전반적으로 6.5~7.0범위를 유지하는 것으로 나타났다. 이는 영양생장 및 포자 형성을 하면서 내부의 물질을 소모한 결과로 보인다. DO의 경우 총 균수가 급격히 늘어남에 따라 급격히 낮아지다가 일정 수준 이하에서 다시 증가하여 배양 종료 시에는 균일하게 유지되는 경향을 나타내었다. 이상에서 확보한 culture profile 및 생산 조건 등을 토대로 대량생산 공정을 설계하였다.

(5) *B. velezensis* NSB-1의 생산수율개선

Plant scale까지의 배양공정을 수행한 결과, 목표로 하는 균수에는($1.0E+09$ cfu/ml 이상) 도달 하였으나 배양시간의 장기화 문제(spore형성시간의 장기화)등의 문제점이 노출되었다. 이를 보완하기 위하여 기존 설계된 제조 공정도를 조정하였으며 생산 원가 절감 및 효율적인 공정을 위하여 각 공정을 아래와 같이 개선하였다(Table 2).

개선한 공정에 따라 pilot , plant scale cultivation을 실시한 결과 미생물의 생육이 증대되었으며 sporulation의 시간 또한 많이 단축되어졌다.



Fig. 11. 5,000L fermenter 모습과 주요 배양조건.

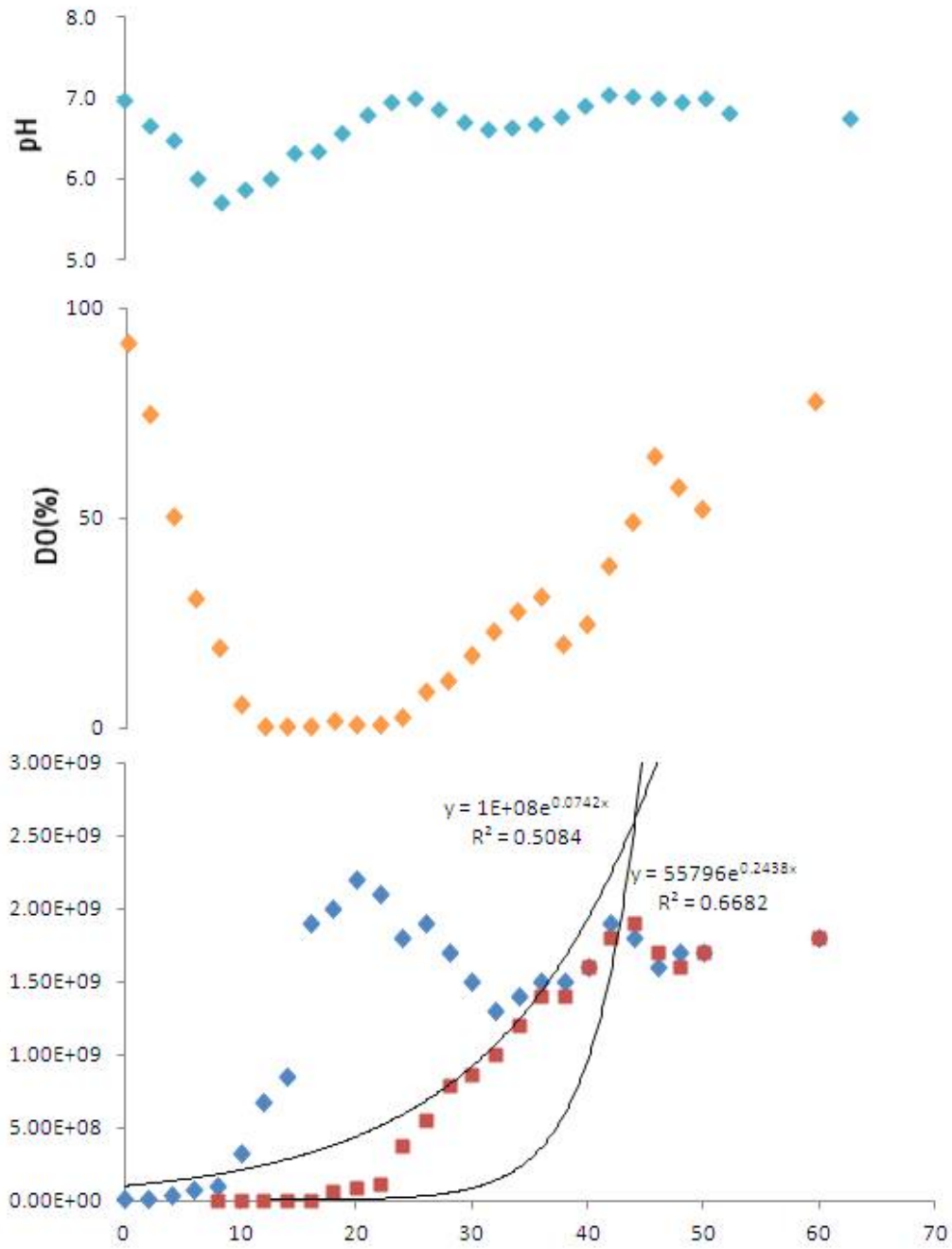


Fig. 12. 5000L-fermenter상의 *B. velezensis* NSB-1균의 생육.

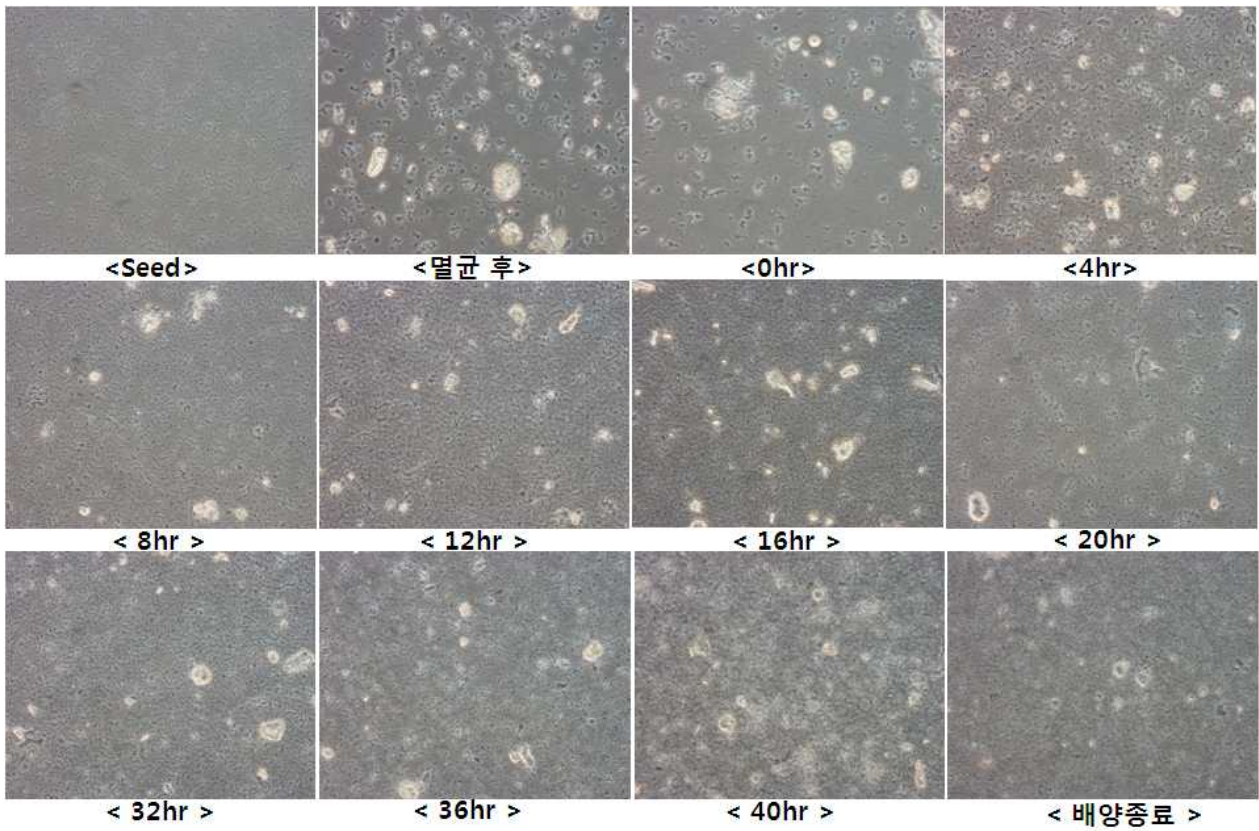


Fig. 13. 5000L fermenter상의 *B. velezensis* NSB-1 의 시간에 따른 현미경 사진

Table 2. 수율증진을 위한 배양조건의 개선사항

공정 명	개선 내역
Step 1. Agar plate 배양	
Step 2. 1st Seed culture	미조정
Step 3. 2nd Seed culture	미조정
Step 4. Main culture (30/50L)	<ul style="list-style-type: none"> - 생산배지: GB생산배지1 - 배양시간 조정 : 48hrs - Seed접종량: 1% -> 2% - 기타인자 미조정
Step 5. Main culture (250/500L)	<ul style="list-style-type: none"> - 생산배지: GB생산배지1 - 배양시간 조정 : 48hrs->20hrs - Seed접종량: 1% -> 2% - 기타인자 미조정
Step 6. Main culture (3000/5000L)	<ul style="list-style-type: none"> - 생산배지: GB생산배지1->GB생산배지1-1* - Seed접종량: 1% -> 2.5% - 배양시간 조정 : 72hrs->40hrs - RPM 조정 : 50->60 (DO량 높임) - 기타인자 미조정

* GB생산배지1-1: GB생산배지1의 배지원 종류는 고정, 그 함량의 변화를 줌.

(6) *Bacillus velezensis* NSB-1의 공정 평가 및 점검

Scale up process에서 검토한 배양 공정에 따라 아래와 같은 공정도를 작성하여 plant scale cultivation을 실시하였다.

Step 1. Agar plate 배양 : Glycerol stock에서 LB plate로 접종. 48시간 30°C 인큐베이터에서 배양한 후 single colony를 확인한다.

Step 2. 1st Seed culture (250ml-△flask/working volume 50ml)

- A. Medium : LB broth
- B. Cultivation temp. : 30°C
- C. Cultivation time : 12hrs
- D. RPM : 150rpm

* Autoclave(121°C, 15min), (step 1)의 agar plate에서 1-2콜로니 접종.

Step 3. 2nd Seed culture (2ea × 3,000ml-△flask/working volume 1,000ml)

- A. Medium : LB broth
- B. Cultivation temp. : 30°C
- C. Cultivation time : 12hrs
- D. RPM : 150rpm

* Autoclave(121°C, 15min), Seeding volume : 1%

Step 4. Main culture (working volume 30ℓ/50ℓ-Fermentor)

- A. Medium : GB생산배지1 Broth
- B. Cultivation temp. : 30°C(± 0.5)
- C. Cultivation time : 48hrs
- D. RPM : 150rpm
- E. Pressure : 0.5Kgf/cm²
- F. Air : 0.5vvm

* Autoclave(121°C, 20min), Seeding volume : 2%

Step 5. Main culture (working volume 300ℓ/500ℓ-Fermenter)

- A. Medium : GB생산배지1 Broth
- B. Cultivation temp. : 30°C(± 0.5)
- C. Cultivation time : 20hrs
- D. RPM : 120rpm
- E. Pressure : 0.5Kgf/cm²
- F. Air : 0.5vvm

* Autoclave(121°C, 20min), Seeding volume : 2%

Step 6. Main culture (working volume 3ton/5 ton-Fermenter)

- A. Medium : GB생산배지1 Broth
- B. Cultivation temp. : 30°C(± 0.5)
- C. Cultivation time : 36-40hrs
- D. RPM : 60rpm
- E. Pressure : 0.5Kgf/cm²
- F. Air : 0.5vvm

* Autoclave(121°C, 20min), Seeding volume : 2.5%

(7) *Bacillus velezensis* NSB-1의 배양후 공정 확립

최적으로 확립된 대량배양공정을 기반으로 생산한 배양액 대상으로 액상제(AS, 미생물 배양원액을 추가적인 제조단계를 거치지 않고 물에 희석하여 사용하거나 배양된 미생물을 액상으로 제제화하여 물에 희석하여 사용하는 제품) 혹은 액상현탁제(SM, 배양원액 또는 배양된 미생물을 물과 혼합하여 액상으로 제제화한 것으로 물에 희석하여 사용하는 제품)로 하여 제품화할 경우 배양종료 후 배양액을 바로 포장 할 경우 gas발생 및 제품 경시의 단기화 등 많은 문제점이 있어 이를 개선할 배양 후 공정을 확립하였다.

(가) pH조정

B. velezensis NSB-1 5ton 배양 후 배양물의 경우 외부미생물로부터 오염이 될 위험성이 높기 때문에 배양종료(안정적으로 Spore형성유무확인 후 종료) 직 후 배양기 내에서 pH를 적절한 상태로 조정한다.

(나) 보존제 또는 계면활성제처리

친환경 유기농자재의 경우 배양 후 아무런 약제를 첨가할 수 없고 유기농자재에 사용할 수 있는 허용원료를 사용하여 배양액(*B. velezensis* NSB-1)의 약효의 증진과 제품의 이화학적 적합성, 경시안정성 등 여러 가지 시너지효과를 발생시킬 수 있는 보존제 또는 계면활성제를 확인하였다. 그 결과 다양한 종류를 대상으로 확인 한 결과 Polyoxyethylene sorbitan monooleate(9005-65-6)가 가장 적합하여 계면활성제로 선정하였고, 최종 처리농도는 경제성과 안정성, 약효증진 등 여러 인자들과 경제성을 고려한 결과 2%가 가장 적합한 농도로 나타나 제품 내 2% 투입하는 것으로 최종선정 하였다.

(다) 생산 시제품의 적적할 QC방법 모색

① 생균수 측정

- 연속희석법(serial dilution)을 이용하여 원하는 농도까지 제품을 희석한다.
- 희석한 제품을 LB agar에 적량 도말한 후 Incubator(30°C)에서 1-2일 배양 후 Colony를 계수한다.

② 이화학적 측정

- 배양 종료 후 수거한 배양액을 적량 희석하여수화성 등을 조사한다.

③ 보존성 test

- 보존성을 실험할 시료는 30, 40℃에서 보관하여 1, 3, 6, 10, 15주에 pH, 형태적 이상 유무, 총균수, 향균활성 등을 검사한다(Table 3).

이상의 *B. velezensis* NSB-1 배양액을 처리한 시제품을 액상제(AS)로 “탄저자비”라 상표명을 명명하여 친환경유기농자재 목록공시에 2013년 09월에 등재(공시-1-4-1)하였다(Fig. 14, 15).

나. *Bacillus velezensis* NSB-1(탄저자비)의 독성안정성시험

개발되어진 탄저자비액상제(AS, 미생물 배양원액을 추가적인 제조단계를 거치지 않고 물에 희석하여 사용하거나 배양된 미생물을 액상으로 제제화하여 물에 희석하여 사용하는 제품)제품의 인축독성 및 생태독성 등 안정성을 확인하기 위하여 (주)한국생물안정성연구소를 통하여 검사를 하였다(친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 기준: 2014.06.02이후에는 친환경유기농자재목록공시 등재를 위하여 인증기관성적서만 인정됨). 이후 친환경유기농자재 대행기관 농업기술실용화재단을 통하여 농촌진흥청 친환경 유기농자재에 신청하였다.

(1) *B. velezensis* NSB-1(탄저자비)의 인축독성시험

친환경유기농자재 병해충관리용 자재의 경우 인축독성에 대한 분석을 진행하여야 하며 그 항목으로는 급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성, 안점막자극성에 대한 평가를 통하여 제품을 상업화하기 위한 안정성 시험을 진행하였다.

인축독성시험 결과 급성경구독성의 경우 IV급(기준: III급/IV급 이상), 급성경피독성의 경우 IV급(기준: III급/IV급 이상), 피부자극성시험의 경우 피부자극지수(P.I.I)가 0.0(기준: P.I.I 1.0이하), 안점막자극성시험의 경우 안점막자극지수(A.O.I)가 0.0(기준: A.O.I 10이하)으로 나타나 탄저자비의 경우 인축독성에 대하여 안정적인 것으로 확인되었다(Fig. 16).

(2) *B. velezensis* NSB-1(탄저자비)의 생태독성시험

친환경유기농자재 병해충관리용 자재의 경우 환경독성에 대한 분석을 진행하여야 하며 그 항목으로는 급성어류독성(담수어류), 꿀벌급성접촉독성(개화기처리 제품, 경영처리 제품 해당)에 대한 평가를 통하여 제품을 상업화하기 위한 안정성 시험을 진행하였다.

환경독성시험 결과 급성어류독성(담수어류) 분석 결과 IV급(저독성)(기준: III급, TER 10 이상)으로 나타났으며, 꿀벌급성접촉 독성의 경우 사용추천농도 500배 보다 100배 이상의 농도에서도 안정적인 것으로 나타나 환경독성에서도 안정적인 것으로 조사되었다(Fig. 17).

(3) *B. velezensis* NSB-1(탄저자비)의 생물활성시험

친환경유기농자재 병해충관리용 자재의 경우 유식물 5가지 작물을 대상으로 한 약해시험에 대한 평가를 통하여 제품을 상업화하기 위한 안정성 시험을 진행하였다.

약해시험 결과 5가지 작물인 고추(슈퍼마니파), 배추(불암3호), 상추(선풍2호), 오이(싱그런백다다기), 콩(백태) 모두 권장처리농도(500배)와 배량(250배)에서 약해가 전혀 없는 것으로 조사되었다(Fig. 18).

Table 3. *B. velezensis*NSB-1QC 검사 기준

검사 내역	기준	합격 판단
외관	색깔, 냄새, 성상	황갈색, 특유의 발효취, 외관 상 이상 없음
균수	cfu/ml	기준 보증균수의 10배수 이상 균수가 나와야 함(경시 감안)
유해미생물(5종)	검출 유·무	선택배지상 불검출 (한 종이라도 검출시 폐기)
활성	Antifungal activity	병원성곰팡이에 대한 대칭배양 결과 유의한 활성을 나타내야 함.
이화학성	수화성	물에 희석 시 잘 희석되어야 하며 영기거나 침전되면 안됨.

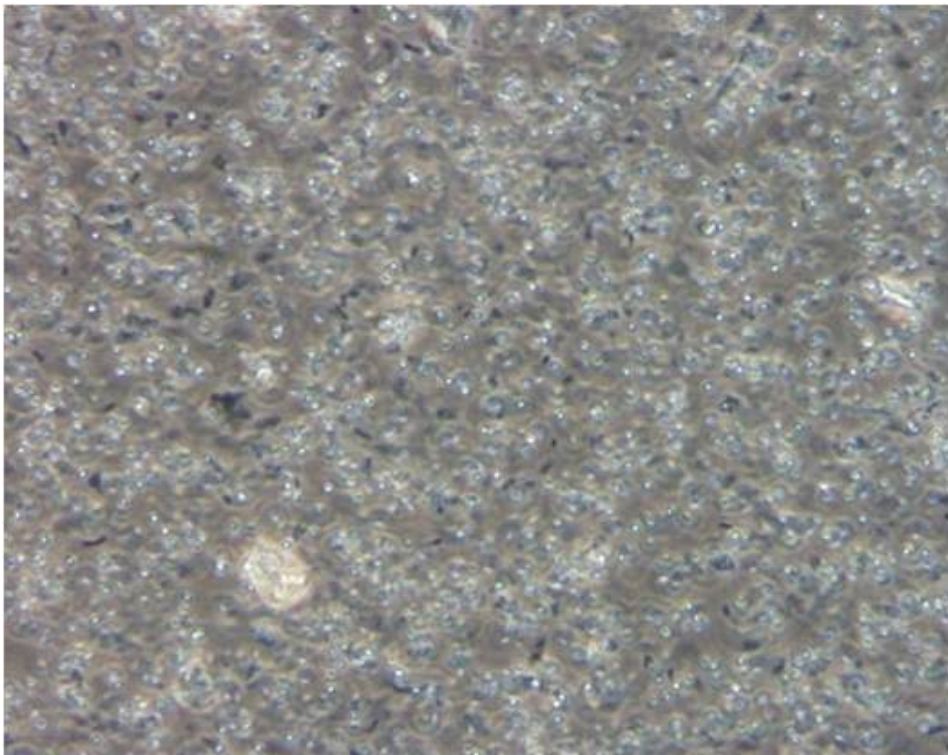


Fig. 14. *B. velezensis* NSB-1 배양액 및 시제품(상표명: 탄저자비).

공시번호: 공시-1-4-1

유기농업자재 공시서

1. 업체명: (주)그린바이오텍
2. 대표자 성명: 이재호
3. 주소(사업장): 경기도 파주시 교하읍 슬아래길 121-49
4. 자재의 명칭: 미생물
5. 자재의 구분: 병해관리용
6. 상표명: 탄저자비
7. 원료의 종류 및 함량(%): 미생물(*Bacillus velezensis* NSB-1) 98%, 계면활성제 2%
8. 유효기간: 2013.09.02. ~ 2016.09.01.
9. 제조장 주소: 경기도 파주시 교하읍 슬아래길 121-49
10. 최초 공고일: 2013.09.02.
11. 최초 공시등기관: 농업기술실용화재단

「친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조 제2항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제49조제2항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시임을 증명합니다.

2013년 09월 02일

농업기술실용화재단 이사장

Fig. 15. *B. velezensis* NSB-1(상표명: 탄저자비)의 목록공시 등재 공시서.

시험종류 (기간)	실험 동물	투여 방법	투여량	LD ₅₀	시험기관 (보고년도)	독성 구분
급성경구독성 /병원성 (21일)	랫드	경구 투여	1.0×10 ⁸ (cfu/2ml)	>1.0×10 ⁸ (cfu/2ml)	한국생물안전 성연구소 (2013)	4급 (저독성)
급성경피독성 (14일)	랫드	경피 투여	1.0×10 ⁸ (cfu/2ml)	>1.0×10 ⁸ (cfu/2ml)	한국생물안전 성연구소 (2012)	“
피부자극성 (72시간)	백색 토끼	피부 도포	1.0×10 ⁷ (cfu/0.5ml)	비자극성 (1.0×10 ⁷ cfu/0.5ml) (P.I.I. = 0, 0)	한국생물안전 성연구소 (2012)	“
안점막자극성 (7일)	백색 토끼	결막낭내투여	1.0×10 ⁶ (cfu/0.1ml)	비자극성 (1.0×10 ⁶ cfu/0.1ml) (M.O.I. = 0, 0) (A.O.I. = 0, 0)	한국생물안전 성연구소 (2012)	“

Fig. 16. 탄저자비의 인축독성시험 결과

구분	시험생물종	시험약제	LC ₅₀	시험기관 (시험년도)	독성 구분
담수 어류	잉어 (<i>Cyprinus carpio</i>)	1.0×10 ⁷ cfu/ml	>1.0×10 ⁶ cfu/ml	한국생물안전성 연구소(2012)	4급 (저독성)
꿀벌 급성접촉	꿀벌 (<i>Apis mellifera</i>)	2.0×10 ⁸ cfu/ml (추천농도 100배)	>2.0×10 ⁸ cfu/ml	한국생물안전성 연구소(2012)	안정적

Fig. 17. 탄저자비의 환경독성시험 결과

시험약제	유효성분 함량	대상작물	처리 방법	약해시험		약해정도(0~5)	
				기준량	배량	기준량	배량
탄저자비	<i>Bacillus velezensis</i> NSB-1 2.0×10 ⁹ cfu/ml	고추 (슈퍼마니파)	엽면살포	500배	250배	0	0
		배추 (불암3호)				0	0
		상추 (선릉2호상추)				0	0
		오이 (싱그런백다다기)				0	0
		콩 (백태)				0	0

Fig. 18. 탄저자비의 환경독성시험 결과

(3) *B. velezensis* NSB-1(탄저자비)의 유효·유해미생물 분석

친환경유기농자재 병해충관리용자재 중 미생물을 기반으로 제작된 제품의 경우 유효미생물<미생물동정자료-속명, 종명, 균수(CFU/ml or g) 및 유해미생물 5종에 대하여 조사여 안정적, 안전한 제품임을 나타내어야 한다.

유효미생물분석 결과 탄저자비의 제품 내 유효미생물은 *Bacillus velezensis*로 함량은 3.6×10^9 CFU/ml로 조사되었다. 이는 과제평가 착안기준의 목표치(1.0×10^9 CFU/ml이상) 보다 높은 것으로 경시안정성까지 고려한다면 충분히 안정적인 제품임을 알 수 있다(Fig. 19). 그리고 제품 내 유해미생물을 함유하는 분석한 결과 병원성대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라(*Salmonella* sp.), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 바실러스세레우스(*Bacillus cereus*) 모두 불검출 되었다(Fig. 20).

다. *Bacillus velezensis* NSB-1(탄저자비)의 타제형화 공정 확립

미생물 제제는 대상 병해의 특성, 재배 기간 동안의 강수량·기온·습도, 재배 규모 등 다양한 재배 환경에 따라 적용 방법을 다르게 해야 할 필요가 있다. 이에 따라 미생물 제제의 제형도 액상수화제(Suspension Concentrate), 수화제(Wettable Powder), 과립수화제(Water Dispersible Granule), 입제(Granule) 등 다양한 형태로 제작되어 진다. 본 연구 과제에서는 미생물 제제의 산업화를 위해 경제성 및 안정성을 우선으로 하여 1차적으로 액상제(AS, 미생물 배양원액을 추가적인 제조단계를 거치지 않고 물에 희석하여 사용하거나 배양된 미생물을 액상으로 제제화하여 물에 희석하여 사용하는 제형) 혹은 액상현탁제(SM, 배양원액 또는 배양된 미생물을 물과 혼합하여 액상으로 제제화한 것으로 물에 희석하여 사용하는 제형)제품 중 액상수화제를 최종선발하여 친환경 유기농자재 목록공시에 등재하였다. 그리고 향후 개발되어질 수화제(WP, 분상으로서 물에 희석하였을 때 수화되는 제형), 입제(GR, 입상으로서 원상태로 사용되는 제형), 입상수화제(WG, 과립상으로서 물에 희석하여 사용되는 제형) 또는 고상제(GM, 미생물배양액을 고상의 물질에 혼합하거나 흡착시킨 제제로 분제, 입제 및 수화제에 해당되지 않는 제형)를 경제성, 안정성, 편이성 등을 고려하여 다른 상품화 가능성의 기초 자료로 활용할 것이다.

우선 액상제와 같이 현재 소비자들이 가장 많이 이용하는 수화제(WP)제형을 제작하기 위하여 최적조건을 확립하였다.

(1) 수화제(WP)제형 제작을 위한 건조 공정의 확립

건조 공정은 액상 배양을 통해 제조된 미생물 배양액을 담체를 이용하여 분말형태로 제작하는 과정으로 제형 다변화의 첫 단계라 할 수 있다. 본 연구 과제에서는 미생물 제제에 일반적으로 많이 이용하는 건조 공정 중 동결건조법(Freeze-Drying, F/D)과 분무건조법(Spray-Drying, S/D), 열풍건조법(Convection oven, C/O)을 적용하였다(Mollet, 2001). 본 연구 과제에서 적용한 동결건조법은 정확히 말하자면 진공동결건조법으로 액상 시료나 다량의 수분을 함유한 재료를 동결시키고 감압함으로써 얼음을 승화시켜 수분을 제거하여 건조물을 얻는 방법이다. 조작이 저온에서 이루어지므로 열에 약한 물질의 건조법으로 유용하다. 분무건조법은 액상의 원료를 분무, 미립화하여 열풍기류에 접촉시키면 순간적으로 증발, 건조되어 일거에 분립상 제품을 얻을 수 있는 공정이다. 열풍건조법은 일반 Oven에서 열을 가해 수분을 증발시키는 원리로 단가면에서는 가장 저렴하나 열에 불안정한 제품이나 특성을 가진 제품의 경우에는 부적합한 방법이다 (Fig. 21).


검 사 성 적 서				
신 청 인	성 명	이 재 호	업 체 명	㈜ 그린바이오텍
	주 소	경기도 파주시 교하읍 상지석리 737-28		
	전 화	031-946-5614	FAX	031-946-5615
공 시 품	명 칭	탄저자비		
	형 태	미생물제제		
유효미생물 동정		<ul style="list-style-type: none"> • 16S rRNA 유전자 전염기서열 해석 • DNA gyrase subunit B 유전자 전염기서열 해석 • 균체지방산조성 분석 (MIDI) 		
유효미생물 생균수 측정		<ul style="list-style-type: none"> • 유전자 상동성 검색에 의한 동일균주 확인 • 희석평판법을 이용한 동일 균주의 계수 		
용 도		관공서 제출용		
분 석 결 과				
유효미생물		생균수 측정		
<i>Bacillus velezensis</i>		3.6 × 10 ⁹ CFU/ml		
2012 년 8 월 23 일				
농촌진흥청지정 비료 시험연구기관 농촌진흥청지정 농약 시험연구기관				
목원대학교 미생물생태자원연구소장 				
※ 본 결과성적서의 내용은 신청인이 의뢰한 시료에 대한 분석 결과로서 용도이외의 목적으로 사용함에 따라 발생하는 모든 사항에 대해서, 본 연구소는 그 어떠한 법적책임을 지지 않습니다.				

Fig. 19. 탄저자비의 유효미생물분석결과

검 사 성 적 서				
신 청 인	성 명	이 재 호	업 체 명	㈜ 그린바이오텍
	주 소	경기도 파주시 교하읍 상지석리 737-28		
	전 화	031-946-5614	FAX	031-946-5615
공 시 품	명 칭	탄저자비		
	형 태	미생물제제		
검 사 방 법		√ 병원성미생물 선택배지를 이용한 확인시험 √ 16S rRNA 유전자 염기서열 해석에 의한 확정시험		
용 도		관공서 제출용		
분 석 결 과				
병원성미생물 검사			검 출 여 부	
병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i>)			불 검 출	
병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> sp.)			불 검 출	
황색포도상구균(<i>Staphylococcus aureus</i>)			불 검 출	
바실러스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>)			불 검 출	
리스테리아 모노사이토제네스(<i>Listeria monocytogenes</i>)			불 검 출	
<p>2012 년 8 월 23 일</p> <p>농촌진흥청지정 비료 시험연구기관 농촌진흥청지정 농약 시험연구기관</p> <p>목원대학교 미생물생태자원연구소장</p>				
<p>※ 본 결과성적서의 내용은 신청인이 의뢰한 시료에 대한 분석 결과로서 용도이외의 목적으로 사용함에 따라 발생하는 모든 사항에 대해서, 본 연구소는 그 어떠한 법적책임을 지지 않습니다.</p>				

Fig. 20. 탄저자비의 유해미생물분석결과



Fig. 21. 건조 제형 제조 방법(동결건조기, 분무건조기, 열풍건조기)

(가) 건조 방법의 결정

B. velezensis NSB-1(탄저자비)의 액상 대량생산 공정 후 생산된 배양물을 대상으로 제형화를 위한 건조 방법을 탐색하였다. 배양 직후 액상 상태에서 제품의 포자수는 안정적인 경향을 나타내었지만 경시에서는 조금 보완이 필요하여 앞서 배양종료 후 1차 처리방법과 2차 최적의 보존제 처리에 따라 안정적인 경시를 나타내는 시료를 확보 하였다. 그러나 사용현장에서 편의성, 운반비의 경제성, 약효의 증가등 여러 문제점을 보완하기위하여 적합한 제형화를 진행하고자 하였고 이를 해결하고자 건조 부재를 이용한 건조 형태의 제형화 공정 탐색을 실시하였다. 건조 방법은 동결건조, 분무건조, 열풍건조의 3가지 방식으로 선정하였으며 유동층 건조법 및 기타 건조 방법은 단가 및 설비 등의 문제로 시험을 실시하지 않았다(Fig. 21).

Table 4.에서와 같이 각 제형화 방법 별 장단점을 비교하였다. 동결건조법의 경우 포자 경시보존성이나 안정성이 가장 높으나 생산 단가가 높고 생산하는데 소요되는 시간이 길어서 대량생산시 부담이 간다는 단점이 있다. 반면 분무건조 및 송풍건조의 경우 단가가 동결건조에 비해 저렴하지만 온도 및 건조로 인해 포자 안정성이 낮아지는 단점이 있다. 본 시험에서는 위 3가지 방법을 이용하여 건조 시료를 제작한 후 이화학적 및 균수, 경시안정성 등을 확인하였다 (Fig. 22).

먼저 기본적으로 가장 많이 사용되는 건조 부재를 이용하여 3가지 방법별로 각각 *B. velezensis* NSB-1 배양액을 흡착시킨 후 건조를 실시하였다. 동결건조의 경우 보조제 20%를 건조 부재로 선정하여 배양액에 혼합 후 1일간 동결한 후 자사에서 일반적으로 사용하는 동결 건조 Method를 사용하여 동결건조를 실시하였다. 분무건조의 경우 보조제에 흡착시킨 후 유기물을 포자 안정화제로 첨가하여 자사에서 *Bacillus* sp. 종류의 종균제 제작시 사용하는 분무건조기 조건으로 분무건조를 실시하였다. 열풍건조의 경우 보조제에 흡착시킨 후 50℃ 열풍으로 2일간 건조하여 제조하였다. 각 건조 방법에 따른 시료의 성상은 Fig. 18과 같다. 제형화 후 포자수를 측정된 결과 초기 액상에 비해 모든 구에서 다소 낮은 포자수가 나타났으며, 특히 열풍 건조 제형의 경우 기준 포자수에 크게 미치지 못하는 경향을 나타내었다(Table 5).

(나) 건조 부재 선정 시험

기 검토한 건조 방법에 따라 시험 시료를 제작하였으나 모든 시험구에서 원하는 수준의 포자 안정성 및 이화학적 성상 등의 결과를 얻지 못하였다. 이를 보완하고자 각 제형 별 최적 건조부재를 탐색하기 위한 시험을 실시하였다.

① 열풍건조 부재선정

열풍건조 제형에 대한 부재 탐색 시험을 실시하였다(Table 6). 담체로는 기존과 마찬가지로 V를 사용하였으며 다양한 부재를 첨가하여 건조 후 포자수를 유지하도록 유도하였다. 시험 결과 부재로 M5를 투입한 구에서 가장 높은 포자수가 나타났으나 모든 구에서 제품화 기준인 1.0E+09 cfu/g 이하로 나타나 실효성이 없을 것으로 판단되었다.

Table 4. 제형화 방법별 장단점 비교

	Freeze dryer(F/D)	Spray dryer(S/D)	Convection oven(C/O)
장점	<ul style="list-style-type: none"> - 높은 포자안정성 - 고온 stress 없음 	<ul style="list-style-type: none"> - 생산단가 비교적 저렴 - 높은 이화학적성 - 대량생산 가능 	<ul style="list-style-type: none"> - 단가가 매우 저렴함 - 초기 비용이 적게 듦
단점	<ul style="list-style-type: none"> - 높은 생산단가 - 제조시간 증가 	<ul style="list-style-type: none"> - 포자안정성 낮음 (고온 스트레스) 	<ul style="list-style-type: none"> - 포자 안정성 낮음 (건조 스트레스) - 오염 위험성 높음

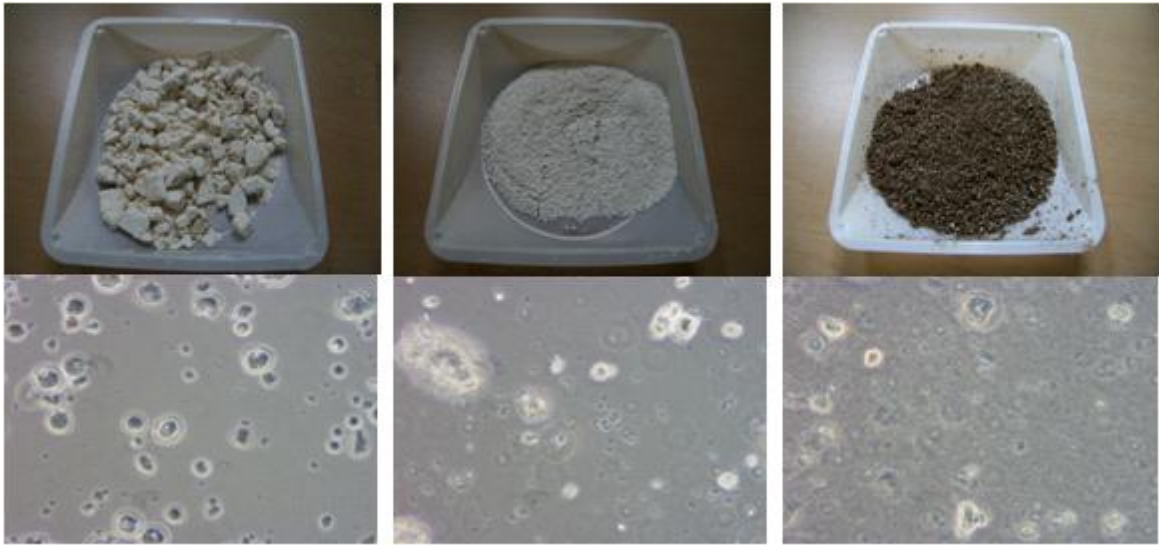


Fig. 22. 건조에 따른 제형별 성상<동결건조(좌), 분무건조(중), 송풍건조(우)>

Table 5. 건조방법 별 *B. velezensis* NSB-1의 포자 생존율 및 이화학적성

시험구 명	건조 방법 별 <i>B. velezensis</i> NSB-1제형화 결과		
	포자 생존률	이화학적성	경시변화
동결 건조	50% 이상	상	상
열풍 건조	20%	하	하
분무 건조	40%	상	중

Table 6. *B. velezensis*NSB-1의 열풍건조 건조부재 시험 및 건조 후 포자 안정성 시험

	배 합 비	건조 후 균수(cfu/g)
대조	Cultured Broth	5.0E+09(건조 전)
1	Cultured Broth 1L + V 1kg	1.0E+07이하
2	Cultured Broth 1L + V 1kg + M1 100g	2.5E+07
3	Cultured Broth 1L + V 1kg + M2 100g	1.0E+07이하
4	Cultured Broth 1L + V 1kg + M3 100g	2.0E+07
5	Cultured Broth 1L + V 1kg + M4 100g	1.0E+07이하
6	Cultured Broth 1L + V 1kg + M5 100g	6.0E+07
7	Cultured Broth 1L + V 1kg + M6 100g	4.0E+07

Table 7. *B. velezensis*NSB-1의분무건조 건조부재 시험 및 건조 후 포자 안정성 시험

	배 합 비	건조 후 균수(cfu/g)
대조	Cultured Broth	5.0E+09(건조 전)
1	L1 20%	1.0E+07이하
2	L1 10% + L2 10%	2.0E+07(흡습이 심함)
3	L3 20%	- (제형화 불가)
4	L3 10% + L2 10%	4.5E+07(흡습이 심함)
5	L4 10% + L2 10%	2.8E+08
6	L4 10% + L5 10%	7.1E+08
7	L4 10% + L3 10%	4.6E+08
8	L4 10% + L1 10%	8.7E+07
9	L4 15%	4.0E+07

Table 8. *B. velezensis* NSB-1의 분무건조 조건

항 목	조건 내용
배합비 ^a	<i>B. velezensis</i> NSB-1 배양액(100%) : L4(10%) : L5(10%)
Inlet temp.	190℃
Outlet temp.	90℃
Air pressure	0.8 bar(시료상태에 따라 변동)
시료 주입량	2.5L/hr(시료상태에 따라 변동)

a: 배합비는 시료와 담체의 중량(Wt)을 기준으로 함

② 분무건조 부재선정

분무건조 제형의 건조 부재 탐색 시험을 진행하였다(Table 7). 열풍건조 제형에서 비교적 양호한 포자 안정성을 보인 원제를 이용하여 분무 건조 시험을 실시하였다. 시험 결과 L1 20%를 투입한 시험 구에서는 자체 분석기준치 이하로 나타나 분무건조 소재로는 부적합한 것으로 나타났다. 반면 L2 투입구 및 L3 투입구는 제형화하기 어려울 뿐만 아니라 이화학적 성상이 좋지 않아 상업화가 어려울 것으로 판단되었다. 앞서 시험한 소재의 경우 흡습 및 수화성 저조 등 여러 문제로 인해 상업화가 다소 어려울 것으로 판단되어 이화학적 성상을 향상시키기 위해 L4를 담체로 선정 후 투입하였다. L4는 그 특성 상 단위 무게에 대한 부피가 크고 수분 보유력이 뛰어나서 분무건조 담체로 많이 사용되는 소재이다. 시험 결과 L4 10%에 L5 10%를 투입한 시험구에서 가장 높은 포자 안정성을 나타내었으며 비교적 양호한 이화학적 성상을 나타내었다. 시험 결과 분무건조 제형을 위한 부재로 L4 10%+L5 10%를 선정하여 경시안정성 시험을 진행하였다. 모든 구에서 제품화 기준인 $1.0E+09$ cfu/g 이하로 나타나 열풍건조와 동일하게 실효성이 없었으나 분무건조의 경우 동결건조방법에 비하여 짧은 공정시간 및 생산비용을 감안할 경우 폭넓은 부재의 탐색 및 분무조건의 변화를 줄 경우 충분한 가능성을 보이는 방법으로 사료된다.

분무건조 조건의 경우 시료의 상태에 따라 변동하여 설정하였으나 최종 선정된 부재를 기준으로 분무조건은 Table 8의 조건이다.

동결건조 제형의 건조부재 탐색을 실시하였다(Table 9). 동결건조 부재로 폐사에서 *Bacillus* sp. 외 곰팡이계열 제품 등 폭넓게 사용되며 자주 사용되는 부재를 선정하여 건조를 실시하였다(Burges, 1998, Cliquet, 1999, Shu-hui, 2007, Tan,1995). 시험 결과 F1-L1과 F3-S1을 부재로 사용한 구에서 가장 높은 포자 안정성을 나타내었다. 그러나 F3-S1을 부재로 사용할 경우 물에 잘 녹지 않아 이화학적 성상에 문제가 생길 수 있어 동결건조를 위한 담체로 F1-L1을 선정하였다. 다음 시험에서는 F1-L1을 보조하기 위한 부재로 F4-T1와 F5-W1를 투입하여 시험을 실시하였다. F4-T1는 생물체가 저온 및 건조한 환경에 견디기 위해 생성하는 물질로, 결정을 생성하나 상온에서도 흡습성이 적어 상업화가 유리한 물질이다. 시험 결과 F5-W1 10%에 F1-L1 5%, F4-T1 5%에서 가장 안정적이었다. 그러나 경시 안정성 부분에서 F5-W1 투입구 전체가 대단히 급격한 포자 감소를 나타내어 F5-W1는 보조제로 부적합하다 판단되어 배제하였다.

담체와 부재의 배합비율별 실험결과 배양종료액 대비 F1-L1과 F4-T1를 20% 대 5%로 할 경우 우수한 결과를 나타내었다.

그리고 동결보조제로 F6-P1과 F7-G1을 각각 1%와 0.25%를 첨가했을 경우 최고 $2.1E+10$ 까지 올라갔으며 경시 또한 상당히 안정적임을 알 수 있었다(Table 10).

③ 분무건조 부재선정동결건조 부재선정

이상의 결과를 바탕으로 동결건조 부재 및 보조제들은 배양종료액 Volume대비 F1-L1: F4-T1: F6-P1: F7-G1을 20%: 5%: 1%: 0.25%로 할 경우 가장 안정적이며 우수한 건조물을 얻을 수 있었다.

Table 9. *B. velezensis*NSB-1의 동결 건조 건조부재 시험 및 건조 후 포자 안정성 시험

	배 합 비	건조 후 균수(cfu/g)
대조	Cultured Broth	5.0E+09(건조 전)
1	F1-L1 20%	2.2E+09
2	F1-L1 10% + F2 10%	9.4E+08
3	F1-L1 10% + F3-S1 10%	3.6E+09
4	F1-L1 20% + F4-T1 10%	9.4E+09
5	F3-S1 20%	6.5E+09
6	F3-S1 10% + F2 10%	2.2E+09
7	F4-T1 20%	1.5E+08
8	F5-W1 10% + F1 10%	2.5E+09
9	F5-W1 10% + F4-T1 10%	3.1E+09
10	F5-W1 10% + F1-L1 5% + F4-T1 5%	9.9E+09

Table 10. *B. velezensis* NSB-1의 동결 건조 동결 보조제 첨가 시험

	배합비	건조 후 균수 (cfu/g)	경시안정성 (40°C, 7일)
대조1	F1-L1 20%	2.2E+09	9.2E+08
	F1-L1 20% + F6-P1 1%	1.2E+09	1.1E+08
대조2	F1-L1 20% + F4-T1 5%	1.5E+10	6.2E+09
	F1-L1 20% + F4-T1 5% + F6-P1 1%	1.4E+10	1.4E+09
대조3	F1-L1 20% + F4-T1 5% + F6-P1 1%	1.4E+10	-
	대조구3 + F7-G1 0.25%	2.1E+10	1.8E+10
	대조구3 + F8 5%	9.8E+09	6.8E+09
	대조구3 + F9 5%	7.0E+09	2.4E+09

(다) 각 제형별 약효시험 및 경시 안정성 시험

이상의 각 건조별(열풍건조, 분무건조, 동결건조) 시료를 대상으로 여러 작물별로 약효·약해시험을 진행할 예정이다. 또한 각 제형별로 저온(-20℃), 상온, 고온(40℃, 54℃)하에서 경시안정성을 모니터링중에 있는데 이후 경시 안전성이 확인되면 과제 종료 이후에도 *B. velezensis* NSB-1(탄저자비)분상수화제 개발을 진행하여 사업화 할 것이다.

(라) 수화제(WP)제형 제작을 위한 최적 분쇄공정 설계 시험

건조방법 및 건조 부재 탐색에 따른 각 건조별 최적건조 시료를 분쇄하여 수화제 형태로 제조하기 위해 최적 분쇄 방법을 탐색하였다. 미생물 제제의 수화제의 제작을 위해서는 건조 이후 분쇄 과정이 필요한데, 이는 수화제의 이화학 기준 중 입도 크기가 직경 기준 45 μ m 이하이고, 325mesh 체를 통과할 수 있어야 하기 때문이다. 일반적으로 건조 후에는 미생물제제의 건조물의 입도 크기가 이 기준을 충족할 수 없으므로 분쇄가 필요하다. 일반적으로 미생물 제제의 경우 분말 제조 시 분쇄 공정으로 인해 포자가 파괴되거나 영향을 받을 수 있기 때문에 분쇄 전과 분쇄 후의 포자 상태 등을 고려하여 분쇄 방법을 설정하였다. 가장 많이 사용되는 hammer miller, pin miller, airjet miller를 이용하여 시료를 분쇄한 후 분쇄 전의 시료와 비교하여 분쇄도를 측정하였다(Table 11).

시험 결과 airjet miller를 이용하여 분쇄한 시료의 경우 평균 입도가 7.1 μ m 수준으로 가장 높게 나타났고 이에 따라 300mesh 기준 99% 이상 통과하여 수화 시 미생물농약 기준을 충족하였다. 그러나 분쇄로 인한 포자 손실이 높아 실제 포자 회수율은 72% 수준으로 나타났다. Hammer miller 및 Pin miller를 이용하여 분쇄하였을 경우 각각 입도는 10.2, 11.3 μ m 수준으로 나타나 300mesh 기준 80% 이상의 투과율을 나타내었다. 이 경우 포자 회수율은 약 85-87% 수준으로 나타났다. 비용 및 설비의 용이성 등을 고려하여 산업화 최적 분쇄 공정으로 pin miller를 이용하여 조분쇄한 후 일부 미분쇄된 입자의 경우 airjet miller를 이용하여 분쇄하는 공정을 설계하였다.

본 공정에 따라 분쇄 횟수 및 속도 등을 설정하기 위해 시험을 실시하였으며, 시험 결과 50g/min 이하의 속도에서는 분쇄 효율은 높아지나 비용 및 포자 수율 등이 급격히 증가하였으며 100g/min 이상의 속도에서는 분쇄 효율이 떨어져 325mesh 기준 90% 미만의 분말도를 나타내었다. 또한 airjet-mill을 이용하여 분쇄한 시료의 포자 수율을 측정한 결과 50g/min 이하의 속도에서는 포자 수율이 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 이에 따라 최종적으로 50g/min 속도에서 airjet-mill을 이용하여 분쇄하는 공정이 제형화에 가장 적합할 것으로 보인다.

(마) 수화제(WP)제형 제작을 위한 최적 증량제 검토

B. velezensis NSB-1(탄저자비)분상수화제 원제를 상업화 가능한 제품으로 개발하려면 원제를 희석할 수 있는 증량제 및 물에 희석하였을 때 이화학성을 향상시켜주는 계면활성제 그리고 미생물원제의 오염을 막고 보존성을 증대시켜주는 보존제 등을 첨가하여야 한다(Burges, 1998). 본 공정에서는 원제를 희석하여 제품화 할 수 있도록 증량제를 검토하였다(Table 12).

Table 11. 분쇄 방법에 따른 입도, 포자 회수율 및 분말도

Miller type	Median Diameter(μm)	100% Pass (μm)	포자 회수율 (%)	300mesh 통과율
Airjet Mill	7.1	32	72	99
Hammer Mill	10.2	64	87	84
Pin Mill	11.3	48	85	89
Control	-	-	100	65

Table 12. *B. velezensis*NSB-1의 증량제 선정시험

	배합비	초기 균수 (cfu/g)	경시안정성 (40°C, 4주)
대조	원제 10% + L1 90%	3.0E+09	2.3E+09 (76.7%)
처리 구	원제 10% + G2 90%	3.1E+09	2.6E+09 (86.7%)
	원제 10% + M3 90%	2.8E+09	1.3E+09 (46.4%)
	원제 10% + L1 45% + G2 45%	3.5E+09	3.1E+09 (88.6%)
	원제 50% + L1 45% + M3 45%	3.0E+09	1.7E+09 (56.7%)
	원제 50% + G2 45% + M3 45%	2.9E+09	1.8E+09 (62.1%)

증량제 시험 결과 원제의 종류에 따라 *B. velezensis* NSB-1의 경시안정성이 다르게 나타났다. G2을 증량제로 사용했을 경우 가장 높은 경시안정성을 나타내었고 L1의 경우도 비교적 양호한 경시안정성을 나타내었으나 M3를 첨가한 시험구에서는 경시안정성이 크게 감소하는 것으로 나타났으며, 각 증량제를 혼용한 경우에서도 원제10% + L145% + G245% 혼용하였을 때 가장 우수한 결과를 보였다. 하지만 경제성을 고려 한 결과 G2만 단독으로 90% 처리하였을 경우가 가장 적합한 것으로 보여 *B. velezensis* NSB-1(탄저자비)분상수화제의 증량제는 G2로 선정하였다.

이상의 공정을 통하여 개발된 수화제 제형의 경우 실내실험(경시안정성, 이화학적특성 안정화 등)과 실외실험(포트실험, 포장 약효·약해실험, 포장내 안정성, 화학농약 혼합가부여부성, 경시안정성 등)을 진행 중에 있으며, 추후 *B. velezensis* NSB-1(탄저자비)분상수화제 개발의 기초 자료로 활용 할 예정이다.

라. *Bacillus velezensis* NSB-1(탄저자비)의 약효·약해평가

(1) 상추 균핵병에 대한 *B. velezensis* NSB-1의 약효, 약해 시험

(가) plate 검정

B. velezensis NSB-1와 균핵병 병원균인 *Sclerotinia sclerotiorum* 과의 대칭배양 결과, 뛰어난 항균활성 능력을 나타내었다(Fig. 23).

(나) 포장 약효·약해 시험

상추 균핵병은 화학농약으로도 방제가 쉽지 않은 대표적 난방제성 토양 병해이다. 본 시험은 상추 균핵병으로 매년 많은 피해를 입고 있는 인천 강화군 하점면 관행재배 농가, 경기도 양평군 지평면의 무농약인증 농가에서 진행되었다. *B. velezensis* NSB-1 시작품을 기준으로 1000배를 정량, 500배를 배량으로 설정하였으며 상추 균핵병 발생 초기 7일 간격 3회 관주와 엽면살포를 실시하였다(Table 13, Fig 24).

약효시험 결과는 시작품의 최종 처리 7일 후, 처리구 전주의 이병주율을 조사하였으며 약해시험 결과는 3회 처리 시마다 외관상 상추 잎의 약해유무를 달관조사 하였다. 약효시험 결과, 정량 처리구(1,000배)에서는 59.8%, 배량 처리구(500배)에서는 66.7%의 높은 방제가를 나타내었다(Table 14, Fig. 25). 상추 균핵병에 대한 방제가는 두 지역 모두 유사한 수치를 나타내어 지역 특성에 상관없이 안정적인 약효를 나타내었다.

(2) 딸기 탄저병에 대한 *B. velezensis* NSB-1의 약효, 약해 시험

(가) plate 검정

B. velezensis NSB-1와 탄저병 병원균인 *Colletotrichum gloeosporioides* 과의 대칭배양 결과, 뛰어난 항균활성 능력을 나타내었다(Fig. 26).

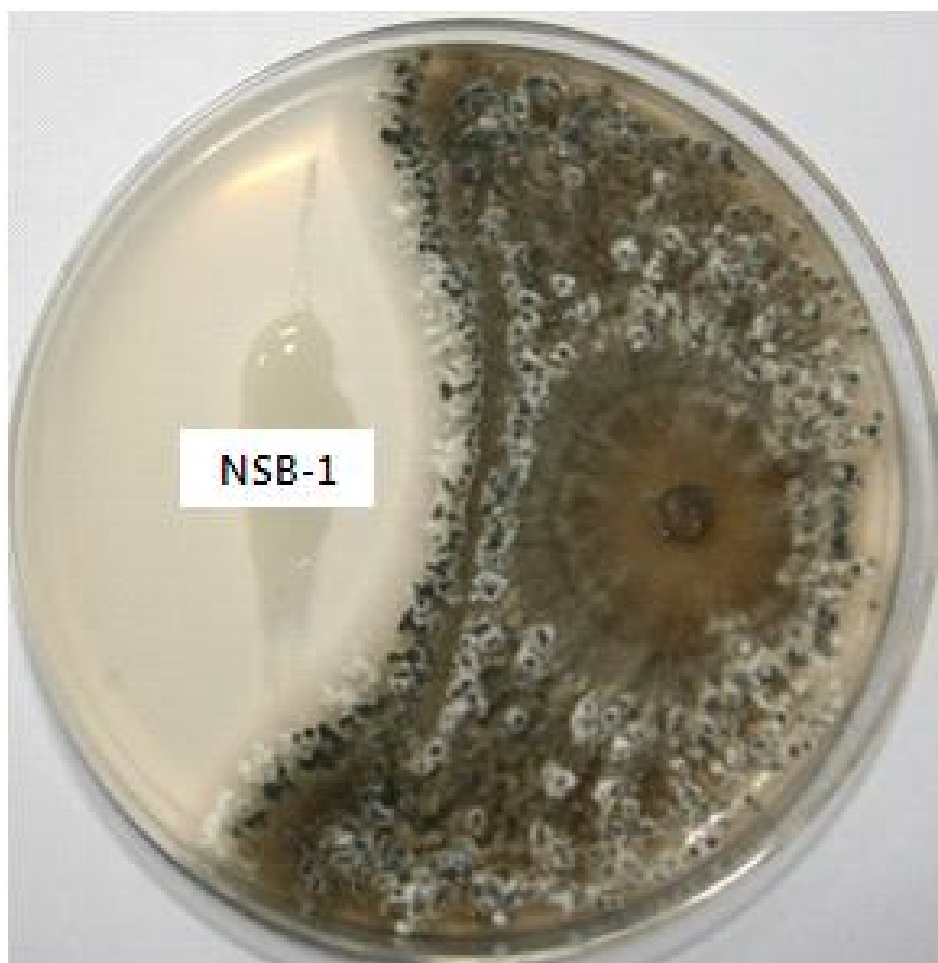


Fig. 23. *B. velezensis* NSB-1의 상추균핵병에 대한 항진균 활성결과

Table 13. 상추균핵병 포장실험 처리방법

처 리 구	처 리 방 법
<i>B. velezensis</i> NSB-1 정량	관주 및 엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 , 1000배 희석, 7일 간격 3회 처리)
<i>B. velezensis</i> NSB-1 배양	관주 및 엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 , 500배 희석, 7일 간격 3회 처리)
대조구	무처리



Fig. 24. 상추 균핵병 발병현장 및 배양액 살포(경기 양평)

Table 14. 상추 균핵병 포장에 *B. velezensis*NSB-1 배양액처리 방제가(경기 양평)

처리구	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)	약해시험 결과
	1	2	3	평균			
1,000배	11.4	13.0	13.2	12.5	a	59.8	약해 없음
5,00배	9.9	11.1	10.1	10.4	a	66.7	
무처리	33.3	29.7	30.4	31.2	b	-	-

C.V-----8.7%

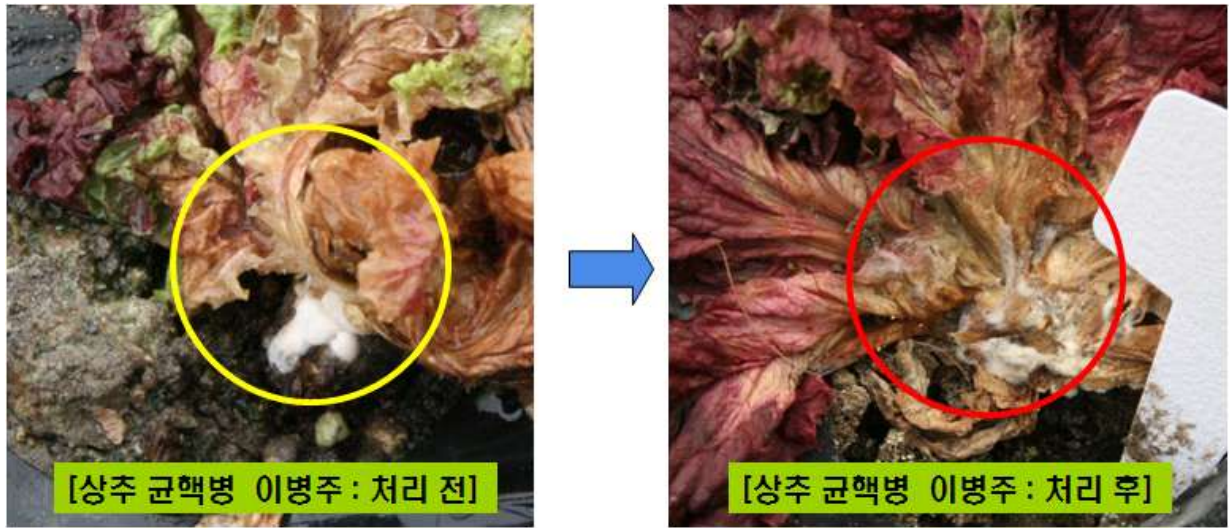


Fig. 25. *B. velezensis* NSB-1의 상추균핵병 방제사진



Fig. 26. *B. velezensis* NSB-1의 딸기탄저병에 대한 항진균 활성결과

(나) 포트 약효, 약해 시험

탄저병은 고온다습(25~35℃)과 장마시기인 6월 하순에서 9월 하순에 주로 발생하는 균이며, 포장의 경우 주로 동계에 많이 재배되어 포장 실험이전에 본 시험은 딸기를 대상으로 포트시험을 우선 진행하였다. 탄저병원균을 PDB에 5일간 배양한 후 딸기 크라운 부위에 인위 접종(감염)을 5회 실시, 크라운 바깥 부분에서 안쪽으로의 갈변여부 및 기부의 적색 변함으로 이병을 판단하였다. *B. velezensis* NSB-1 시작품을 500배 희석하여 7일 간격 3회 관주 및 엽면처리를 실시하였다(Table 15).

약효시험 결과는 배양액 최종 처리 7일 후 무처리구는 엽 내 흑색 불규칙한 반점형성 및 크라운부터 시작하여 지상부 엽이 점차 마르고 결국 고사하게 되는 양상을 보였다. 반면, *B. velezensis* NSB-1 처리구는 초기 탄저병 진진이 멈추고 정상 생육하였다(Fig. 27). 약해는 1,000배, 500배, 250배까지 엽면에 처리해보았으나 아무런 약해를 관찰할 수 없었다.

(다) 포장 약효·약해 시험

실제 포장 내 발생한 딸기 탄저병에 대해 개발 시제품의 약효를 평가하기 위하여 딸기 육묘장을 섭외하였으나 포장섭외가 어려워 발병율이 낮지만 딸기탄저병발병이력이 있는 농가들을 대상으로 포장을 조사한 결과 인천 강화군 하점면 시설 딸기하우스(관행재배)와 충남 논산시 가야곡면 시설 딸기하우스(무농약재배)를 확보할 수 있어 본 포장을 임대하여 *B. velezensis* NSB-1를 500배를 정량, 250배를 배량으로 설정하였으며 딸기 탄저병 발병 초 발생 초기 7일 간격 3회 관주 및 엽면 살포를 실시하였다(Table 16, Fig 28).

약효시험 결과는 시작품의 최종 처리 7일 후, 처리구 전주의 이병모율을 조사하였으며 약해시험 결과는 3회 처리 시마다 외관상 상추 잎의 약해유무를 달관조사 하였다. 약효시험 결과,역시 노지 본포장에서는 탄저병이 발생율이(최소발병율 15%이상) 낮아 정확한 방제가를 구할수 없었다. 하지만 대조구 대비로 구한 결과 정량 처리구(500배)에서는 50%이상, 배량 처리구(250배)에서는 60%의 방제가를 나타내는 것으로 나타났다(최소발병율 이하로 나타나 정확한 약장 값을 구할 수 없어 방제율 나타낼 수 없음).

Table 15. 딸기탄저병 포장실험 처리방법

처 리 구	처 리 방 법
<i>B. velezensis</i> NSB-1	관주 및 엽면처리(발병 초) (5.0×10^8 cfu/ml, 500배 희석, 7일 간격 3회 처리)
대조구	무처리



Fig. 27. 딸기탄저병 이병여부 및 무처리구와 *B.velezensis* NSB-1 처리구 비교

Table 16. 딸기탄저병 포장실험 처리방법

처 리 구	처 리 방 법
<i>B. velezensis</i> NSB-1 정량	관주 및 엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 , 500배 희석, 7일 간격 3회 처리)
<i>B. velezensis</i> NSB-1 배양	관주 및 엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 , 250배 희석, 7일 간격 3회 처리)
대조구	무처리



Fig. 28. 딸기탄저병 발병현장 및 배양액 살포(인천 강화)

(3) 딸기 잿빛곰팡이병에 대한 *B. velezensis* NSB-1의 약효, 약해 시험

(가) plate 검정

B. velezensis NSB-1와 딸기 잿빛곰팡이병의 병원균인 *Botrytis cinerea*와의 대칭배양 결과, 강한 항균활성 능력을 나타내었다(Fig. 29).

(나) 포장 약효·약해 시험

딸기 잿빛곰팡이병은 딸기 재배시 많이 발생하는 병징이다. 본 시험포장은 딸기 잿빛곰팡이병이 매년 발생한 포장으로 양평군 양서면 양수리의 무농약인증 농가에서 진행되었다. *B. velezensis* NSB-1 시작품을 기준으로 500배를 정량, 250배를 배량으로 설정하였으며 딸기 잿빛곰팡이병 발생 초기 7일 간격 3회 엽면살포를 실시하였다(Table 17, Fig 30).

약효시험 결과는 시작품의 최종 처리 7일 후, 처리구 전주의 이병과율을 조사하였으며 약해시험 결과는 3회 처리 시마다 외관상 딸기 잎과 과실의 약해유무를 달관조사 하였다. 약효 시험 결과, 정량 처리구(500배)에서는 50.2%, 배량 처리구(250배)에서는 59.7%의 방제가를 나타내었다.(Table 18, Fig 31).

(4) 인삼 균핵병에 대한 *B. velezensis* NSB-1의 약효, 약해 시험

(가) plate 검정

B. velezensis NSB-1와 인삼 균핵병의 병원균인 *Sclerotinia sclerotiorum*와의 대칭배양 결과, 항균활성 능력을 나타내었다(Fig. 32).

(나) 포장 약효, 약해 시험

인삼 균핵병은 모밭 보다는 본밭에서 주로 발생하며, 3년근 이상 되었을 때부터 주로 발생하여 인삼재배농가의 수확량에 큰 영향을 주는 주요 병징이다. 본 시험포장은 충북 괴산군에 위치한 곳으로 인삼수령은 4년차에 접어든 포장이다. *B. velezensis* NSB-1 시작품을 기준으로 500배를 정량, 250배를 배량으로 설정하였으며 인삼 균핵병은 이미 3년차에 발생된 상태였으며, 2013년 3월부터 주기적인 관주방법으로 초기에 처리 하였다. 이후 주기적으로 엽면살포와 관주를 병행해 가며 약제를 처리하였다(Table 19, Fig 32-1).

인삼의 경우 수확을 하여 수확량으로 방제율을 구해야 하나 현재 4년근인 관계로 3차년까지 관리하여 방제율을 구할 예정이다. 하지만 2013년 4월 포장 방문 결과와 2013년 5월에 방문한 결과를 바탕으로 조사한 결과 무처리 대비 *B. velezensis* NSB-1처리구의 방제율이 높은 것을 알 수 있었다(Fig 33, Fig 34).

그리고 2014년 4월 초 포장을 방문하여 수확전 1차적으로 각 처리구별 생산량을 확인 해본 결과 정식기준(칸당, 9 × 6) 무처리구의 경우 15%미만, 관행구의 경우 60%이상 그리고 *B. velezensis* NSB-1처리구의 경우 결과 70%이상의 삼을 수확 할 수 있었다. 또한 구당 평균 근체량을 관행구와 *B. velezensis* NSB-1처리구를 비교하여 본 결과 *B. velezensis* NSB-1처리구가 조금 더 우수한 것으로나타났다(Fig. 35).



Fig. 29. *B. velezensis* NSB-1의 딸기잣빛곰팡이병 에 대한 항진균 활성결과

Table 17. 딸기 잣빛곰팡이병 포장실험 처리방법

처 리 구	처 리 방 법
<i>B. velezensis</i> NSB-1 정량	엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 , 500배 희석, 7일 간격 3회 처리)
<i>B. velezensis</i> NSB-1 배양	엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 , 250배 희석, 7일 간격 3회 처리)
대조구	무처리



Fig. 30. 딸기 잿빛곰팡이병 발병현상 및 이병체(경기 양평)

Table 18. 딸기 잣빛곰팡이병 포장에 *B. velezensis* NSB-1 배양액처리 방제가(경기 양평)

처리구	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)	약해시험 결과
	1	2	3	평균			
500배	12.0	9.5	10.1	10.5	a	50.2	약해 없음
250배	9.3	9.5	6.8	8.5	a	59.7	
무처리	25.3	16.7	21.3	21.1	b	-	-

C.V-----23.5%



Fig. 31. 딸기 잿빛곰팡이병 무처리구와 *B.velezensis* NSB-1 처리구 비교

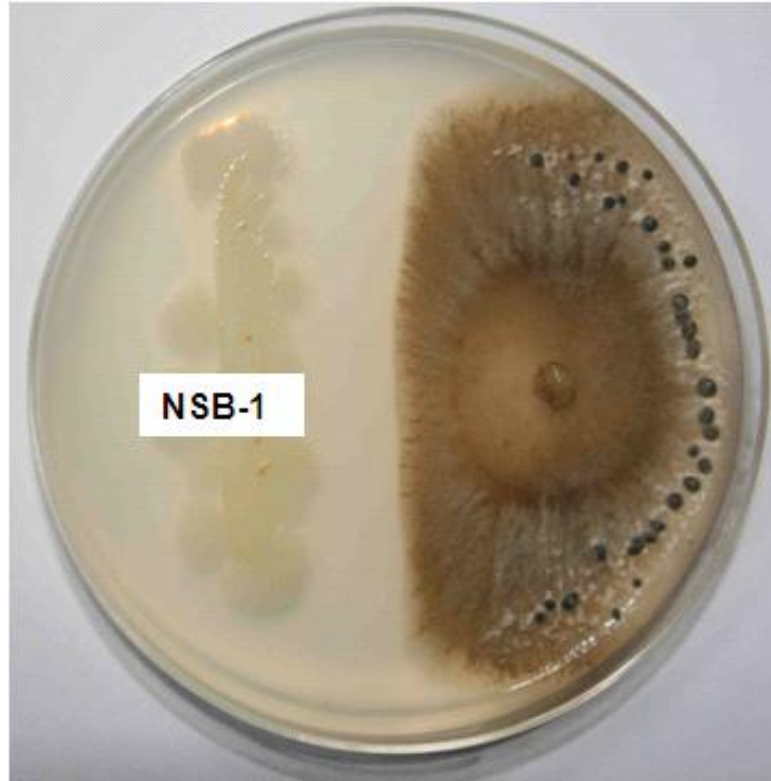


Fig. 32. *B. velezensis* NSB-1의 인삼 균핵병 에 대한 항진균 활성결과

Table 19. 인삼 균핵병 포장실험 처리방법

처 리 구	처 리 방 법
<i>B. velezensis</i> NSB-1 정량	관주 및 엽면 살포 (1.0×10^9 , 500배 희석, 관주: 2주간격, 엽면살포: 2주간격)
<i>B. velezensis</i> NSB-1 배양	관주 및 엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 , 250배 희석, 관주: 2주간격, 엽면살포: 2주간격)
대조구	무처리



Fig. 32. 인삼 균핵병 이병주 및 시제품(탄저자비) 살포(충북 괴산군)



Fig. 33. 인삼 균핵병 무처리구와 *B.velezensis* NSB-1 처리구 비교(2013년 04월 말)



Fig. 34. 인삼 균핵병 무처리구와 *B.velezensis* NSB-1 처리구 비교(2013년 05월 말)



Fig. 35.인삼 균핵병 무처리구와 *B.velezensis* NSB-1 처리구, 관행구 비교(2014년 04월 초)

(5) 인삼 탄저병에 대한 *B. velezensis* NSB-1의 약효, 약해 시험

(가) plate 검정

B. velezensis NSB-1와 인삼 탄저병의 병원균인 *Colletotrichum gloeosporioides*와의 대칭배양 결과, 강한 항균활성 능력을 나타내었다(Fig. 36).

(나) 포장 약효, 약해 시험

인삼 탄저병은 모밭과 본밭 모두에서 잘 발병하는 병으로 인삼재배농가의 수확량에 큰 영향을 주는 주요 병원균이다. 본 시험포장은 경기도 양평군에 위치한 본 포장으로 2년근 인삼 포장이다. *B. velezensis* NSB-1 시작품을 기준으로 500배를 정량, 250배를 배량으로 설정하였으며 전년도에 탄저병이 일부 발병한 곳으로 1차 관주처리 후 인삼의 죽이 오르는 시점에 7일 간격으로 3회 엽면 살포 하였다(Fig. 37).

무처리구 대비 약제처리구 전주의 이병엽율을 조사하였다. (Fig. 38)시작품 처리구의 약해시험 결과는 외관상 판단되어지는 약해는 없었으며, 약효시험 결과, 배량 처리구(250배)에서는 무처리구 대비 우수한 방제율을 보이는 것으로 보여 졌으며, 정량(500배)의 경우도 우수한 방제가 보이는 것을 알 수 있었다. 하지만 무처리구 부분이 너무 탄저병이 발생 한 후 바로 잿빛곰팡이병이 추가적으로 발생되어져 탄저병 단독의 원인으로 판정하기에는 모호한 상황 이라서 3차년에 연이어 약효를 평가 할 계획이었으나, 2014년 4월 초에 포장을 방문하여 포장을 확인한 결과 무처리구의 경우 전 포장이 거의 모종을 볼 수 없었으며 처리구의 경우 약 50% 생존한 상황이었으나 포장농가의 사정으로(계속진행 하기에는 경제적 손실이 커서 포장을 새로이 준비할 예정임) 포장실험을 계속 진행 할 수 없었다. 하지만 Fig. 38에서 보듯이 모삼을 분담에 정식 한 후 초기에 *B. velezensis* NSB-1을 처리할 경우 인삼탄저병에 대하여 효율적인 방제가 가능 할 것으로 사료된다(Fig. 38).

(6) 포도 탄저병에 대한 *B. velezensis* NSB-1의 약효, 약해 시험

(가) plate 검정

B. velezensis NSB-1와 포도 탄저병의 병원균인 *Colletotrichum gloeosporioides*와의 대칭배양 결과, 항균활성 능력을 나타내었다(Fig. 39).

(나) 포장 약효·약해 시험

포도 탄저병은 포도 재배시 많이 발생하는 병징으로 6월 중순부터 발병이 시작하여 7~8월에 가장 많이 발생하는 병징으로 특히 비가림이나 봉지를 씌우지 않을 경우 더 많이 발생하며, 발병시 생산량에 많은 영향을 준다. 본 시험포장은 포도 탄저병이 매년 발생한 포장으로 경기도 화성시 인근 노지포장농가에서 진행되었다. *B. velezensis* NSB-1 시작품을 기준으로 500배를 정량, 250배를 배량으로 설정하였으며 포도 탄저병 발생 초기 7일 간격 3회 엽면살포를 실시하였다(Table 20, Fig 40).

약효시험 결과는 시작품의 최종 처리 7일 후, 처리구 전주의 이병과율을 조사하였으며 약해시험 결과는 3회 처리 시마다 외관상 잎과 과실의 약해유무를 달관조사를 진행한 결과 무처리 대비 50%이상의 방제가를 나타내었다.



Fig. 36. *B. velezensis* NSB-1의 인삼 탄저병에 대한 항진균 활성결과



Fig. 37. 인삼 탄저병 이병주 및 시제품(탄저자비) 살포(경기 양평군)



Fig. 38. 인삼 탄저병 무처리구와 *B. velezensis* NSB-1 처리구 비교

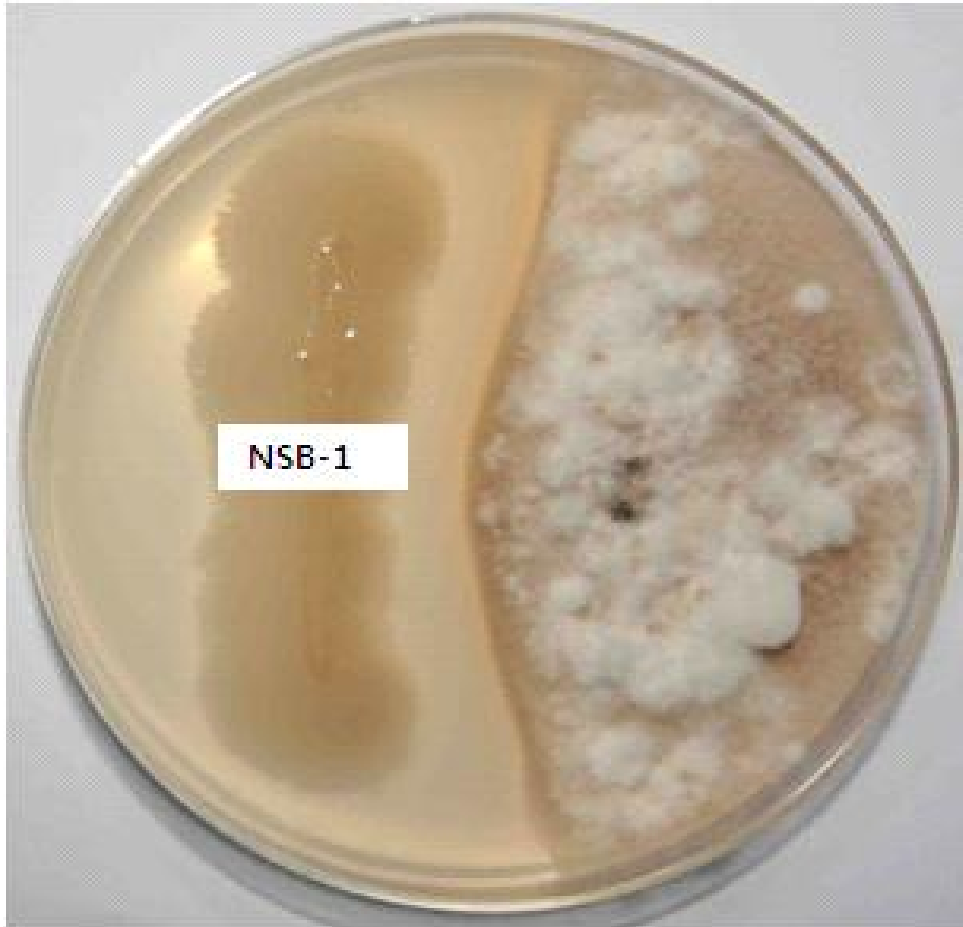


Fig. 39. *B. velezensis* NSB-1의 포도 탄저병에 대한 항진균 활성 결과

Table 20. 포도 탄저병 포장실험 처리방법

처 리 구	처 리 방 법
<i>B. velezensis</i> NSB-1 정량	엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 , 500배 희석, 7일 간격 3회 처리)
<i>B. velezensis</i> NSB-1 배양	엽면 살포(발병 초) (1.0×10^9 , 250배 희석, 7일 간격 3회 처리)
대조구	무처리



Fig. 40. 포도 탄저병 발병현장 및 탄저병 이병체(경기 화성, 2014.06)

2. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주를 이용한 미생물살균제 개발

가. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 고체대량배양공정개발

(1) *Trichoderma harzianum*균주 선발

당사에서 보유하고 있는 *Trichoderma harzianum* 균주 중 산업성이 우수하다고 판단되는 2종을 1차로 선정하였고 *Trichoderma harzianum* GBF-0208(*T.harzianum*-1)과 *Trichoderma harzianum* GBF-1048(*T.harzianum*-2) 둘 중 고체배양의 최적배지 및 배양조건의 검토를 통한 우수한 최종 1종을 선별한 후 이를 산업화하기 위하여 본 연구를 진행 하였다.

(가) 트레배양법을 통한 *Trichoderma harzianum*균주 선발 및 최적배지선정

우선 *Trichoderma harzianum*균주의 고체배양의 최적배지를 확립하기 위하여 자사 내에 보유한 고체배양실에서 *Trichoderma harzianum*의 트레이 배양을 실시하였다. 배양 조건은 25°C, 70% 습도에서 2종의 균주를 각각 검토되고 있는 배지들과 비교 배양하였다(Fig 41). 결과는 배양 시간에 따른 포자의 수율 및 배양 기간 등을 조사하였다.

자사에서 고체배양에 주로 사용되는 제올라이트, 질석, 펄라이트 등을 후보 배지원으로 선정하였으며 이외의 영양인자로 미강, 대두분, 옥수수전분, 흑설탕, starch 등을 활용하여 배지 조성을 달리하여 시험을 실시하였다.

트레이 배양종료 후 배지에서 포자를 수거하여 포자수를 조사한 결과 *Trichoderma harzianum* 2종 모두 질석을 담체로 이용한 배지에서 수율이 가장 높게 나타났으며 이를 통해 고체배지 조성을 선정하였다. 그 결과 질석에 미강과 흑설탕을 5 : 1 : 0.1에 수분30%를 유지하는 함량으로 수분을 공급하는 배합비로 혼합한 배지에서 두 균주 모두 가장 우수한(*T. harzianum*-1: 6.3E+08cfu/g, *T. harzianum*-2: 8.2E+08cfu/g) 생산능을 나타내었다(Table 21).

(나) 고체발효기를 활용한 *Trichoderma harzianum*균주 최적배양조건 확립

트레이 배양의 경우 소량의 시료를 생산하며 조건을 검토하기에는 적합하나, 대량생산 시 공정의 복잡함은 물론 인건비의 증가 등 사업성과 경제성 차원에서 부적합한 배양이므로 이를 개선할 수 있는 방안을 모색하였다. 그 방안으로 한국화학연구원에서 보유중인 고체발효기(300Kg)를 활용하여 이들 균주의 산업화를 위한 대량배양 최적 조건 확립 시험을 수행하였다(Fig. 42).

고체발효기의 최적조건을 확립하기 위하여 배양량, 교반속도, 배양시간, 수분량, 온도, air 공급량 등 각 인자별 변화로 비교 배양한 결과 *T. harzianum* 2종 모두 교반속도는 100 (3.3rpm), 배양온도는 30°C, 배양시간은 10일, seed양은 약 10%, air공급량은 200L/ min, 수분양은 평균 20%로 유지 할 경우 최고의 수율을 수확할 수 있었다(Table 22).



Fig. 41. 간이 고체배양 시설 (1: 입구, 2:내부전경, 3:항온·항습시스템, 4:배양 트레이).

Table 21. *T. harzianum*의 최적배지 선정

배양방법		배지조성(*)	목표 포자수	실제포자수	
				<i>T.harzianum</i> -1	<i>T.harzianum</i> -2
	1	대두분 흑설탕 질석 물	5.0E+08	1.2E+08	1.7E+08
고체 배양	2	미강 흑설탕 질석 물	5.0E+08	6.3E+08	8.2E+08
	3	옥수수전분 흑설탕 질석 물	5.0E+08	7.7E+07	8.4E+07

<*배합비- 질석 : X : 흑설탕 : 물 = 5 : 1 : 0.1 : 총 수분함량 30%유지>



Fig. 42. 대량배양용 고체발효기(한국화학연구원).

Table 22. 고체발효기 배양 조건

배양공정(대전-KRICT)		
구분	내용	비고
배양량	900L(300kg)(미강 150L, 질석 750L, 흑설탕 1.5kg)	고체 배양 기 공멸균, 배지 2회 멸균
seed	3.8E+07 cfu/ml, 8.5L	
배양기간	14days	배양종료 후 4일 간 건조
교반조건	교반배양.	교반속도 100(약 3.3rpm)
수분량	seed 접종 전 : 5.6% seed 접종 후 : 19.7% 배양 8일 차 : 17.1%	기준수분량 20%로 설정
온도	23°C	
공기공급	200L / min	배양종료 후 500L / min 으로 건조

한국화학연구원의 고체발효기는 임펠러 교반타입으로 배양 중 벽면에 붙어 자라는 wall growth와 교반되어지는 배지 내 증식하는 media growth로 분리되어 생육이 되었다. 배양 결과 *T. harzianum*-1의 경우 wall growth : media growth = 1 : 4의 정도의 생산비를 이루었고, 포자 수율은 wall growth는 3.7E+07cfu/g, media growth는 3.5E+05cfu/g의 수율을 나타내어 목표로 하는 수율(5.0E+08cfu/g)에 도달하지 못하였다. 하지만 *T. harzianum*-2의 경우 *T. harzianum*-1과 같이 wall growth : media growth = 1 : 4의 정도의 생산비를 이루었으나 포자 수율은 wall growth는 6.2E+08cfu/g, media growth는 4.7E+07cfu/g의 수율을 나타내어 목표로 하는 수율에 도달하였다(Fig 43, 44).

(다) *Trichoderma harzianum*의 산업화를 위한 최적 균주 선발

이상의 결과를 바탕으로 두 종의 *Trichoderma harzianum* 균주 중 *T. harzianum*-2 (*Trichoderma harzianum* GBF-1048)가 대량배양용 고체발효기에 적합한 균주로 선별되었다. 선별된 *Trichoderma harzianum* GBF-1048를 이용한 대상 토양병해의 간이 약효시험을 진행함으로써 산업화를 위한 약효·약해 평가를 수행할 계획이다. 또한 여러 가지 개선해야 할 문제점(장기간의 배양) 및 후공정 과정, 건조부재 선정, 건조 공정 설계, 포자 안정성, 최적 분쇄 공정, 액상배양법 등 연구할 것이다.

(2) *Trichoderma harzianum*의 산업화를 위한 최적배양방법 선발

선정된 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 고체대량배양의 조성을 최종적으로 (Table 23) 선정하여 고체배양을 진행하였다. 고체배양방법은 두 가지 방법을 병행하여 진행하였는데 우선 첫 번째 방법은 트레이를 활용한 고상배양법(Tray type solid culture)을 확립하였고, 두 번째로는 한국화학연구원의 고체발효기를 활용 임펠러 교반타입으로 교반식고상배양법(Horizontal agitated batch type solid culture)을 확립하였다. 배양진행 결과 고상배양법의 경우 생산수율이 우수하며, 생산Spore의 안정성도 확인 되었으나 교반식고상배양법의 경우 Spore의 안정성은 우수하나 생산효율이 고상배양법보다 못한 것으로 평가되었다. 이에 고체배양방법은 고상배양법으로 확립하였고 이후 제형화부분에 사용된 배양체는 우선 확립된 고상배양법을 통하여 공급하여 제형화를 확립하였다.

나. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 제형화 공정 확립

최적의 제형조건 도출은 최적 배양조건 확립에 못지않게 중요한 개발과정이다. 특히 본 연구와 같이 살아있는 생물을 이용하는 미생물제제에서는 더욱 중요하다. 사용상의 편이성, 즉 수화시에 균일한 확산과 살포 및 보존기간동안의 유효생물의 안정성확보가 매우 중요한 요인으로 작용한다. 최적의 제형화 공정을 도출하기 위하여 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 경우 1차로 확립된 배양조건이 고체배양체이므로 우선 수화제(Wettable Powder), 과립수화제(Water Dispersible Granule), 입체(Granule)등의 제형을 검토하였으며, 제형의 특성은 유효미생물의 보존성과 현탁성, 수화성등을 비교하여 최적 제형을 선별하였다(Fig 45). 하지만 고체배양의 경우 긴 배양시간과 비효율적인 생산량, 불균일한 생산물 등의 여러 보완되어야 할 문제점이 있어 대량배양의 방법으로 액상배양을 검토하여 확립하였으며, 액상대량배양방법이 확립된 후 배양물을 대상으로 최적의 제형을 확인하였다.

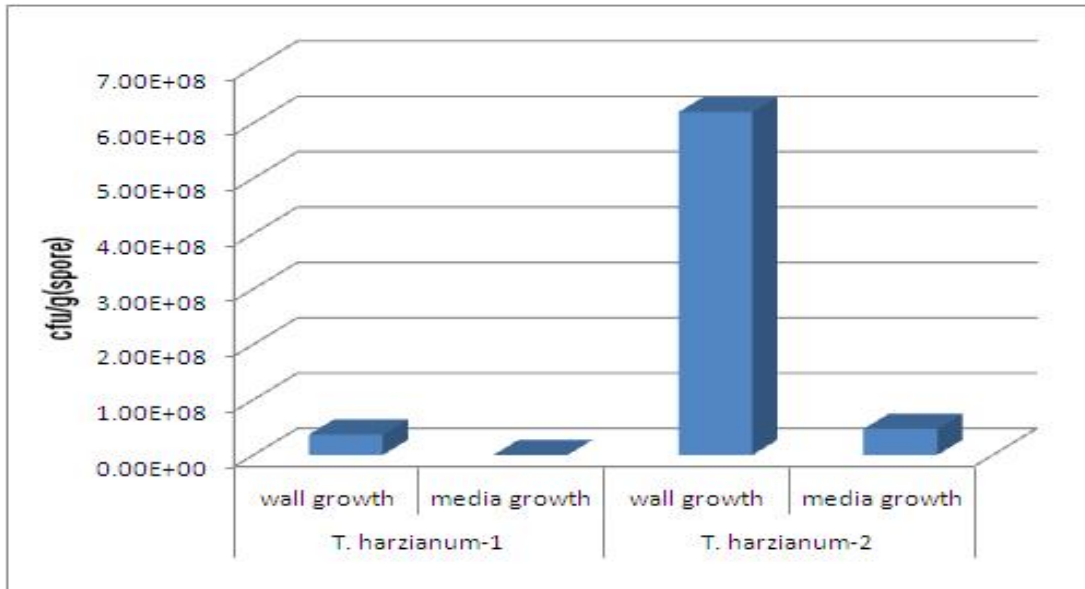


Fig. 43. *T. harzianum* 1, 2 간의 고체배양 수율비교



① 배양 후 고체배양기 내부



② *T.harzianum* 배양 결과물



③ 배양물 수거

Fig. 44 고체발효기 배양과정 및 배양물

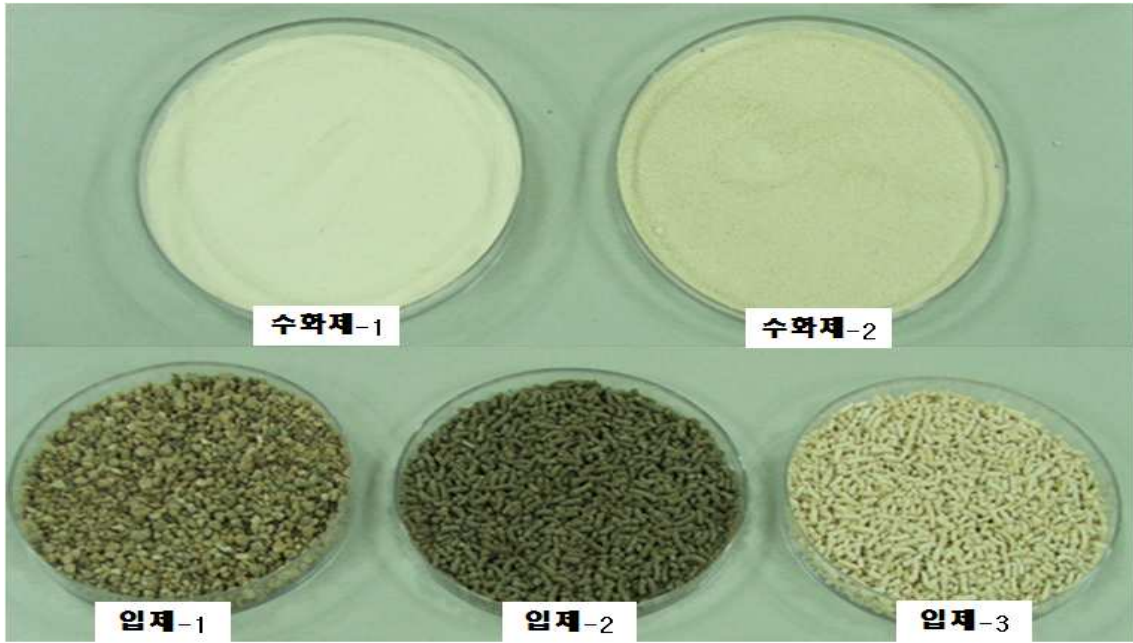


Fig. 45. *Trichoderma harzianum*균주의 체제화(상:수화제, 하:입제)

(1) *Trichoderma harzianum* GBF-1048 수화제(WP)제형 제작을 위한 보존제 검토

Trichoderma harzianum GBF-1048균주 수화제(WP)제형 제작시 균주의 경시 및 이화학성의 안정성을 증가시키기 위하여 최적 부재(증량제 겸 보존제)를 검토하였다. 그 결과 규조토(MW25)를 혼합한 것이 가장 적합한 것으로 나타났으며 혼합비율은 1:1에서 가장 우수한 결과를 나타내었다(Table 24).

(2) *Trichoderma harzianum* GBF-1048 수화제(WP)제형 제작을 위한 건조 공정의 확립

Trichoderma harzianum GBF-1048균주의 경우 고체배양체를 활용한 시료이므로 건조공정에 분무건조법(Spray-Drying, S/D)은 부적합하여 배제하였고, 동결건조법(Freeze-Drying, F/D)과 열풍건조법(Convection oven, C/O)을 비교하였으나 동결건조법의 경우 생산비용의 경제성에서 적합하지 않아 최종적으로 열풍건조법(Convection oven, C/O)을 결정 하였다(Fig. 46).

(3) *Trichoderma harzianum* 수화제(WP)제형 제작을 위한 적 분쇄공정 설계 시험

현재 기업에서 가장 많이 사용되는 Pin miller, Airjet miller 두 가지를 대상으로 조건 확립을 진행하였다(Fig. 47). 그 결과 고체배양체로 인하여 Pin miller를 사용하여 건조된 배양체를 1차 분쇄한 후 2차로 Airjet miller를 활용하여 분쇄할 경우 수화성이 우수한 분상 원제를 확보하였다.

다. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 액상대량배양공정개발

고체배양법은 대량생산을 할 경우 대규모의 전용 배양시설이 필요하고 배양 관리에 상당한 어려움이 있기 때문에 비교적 대량 산업화가 용이한 액상 배양법의 개발이 필요하다. 이를 위하여 일반적으로 곰팡이의 액상 배양에 사용되는 배지들을 대상으로 액상배양 가능성을 검토해 보았다(Table 25).

그 결과 YM배지 조성에서 가장 우수한 결과가 나타났다. 이상의 내용을 바탕으로 산업적으로 사용가능하며 생산비용에 경제성을 고려하여 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 대량액상배양배지 조성을 YM배지를 Modify하여 검토하였다.

(1) *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 Lab scale 최적조건 확립

Trichoderma harzianum GBF-1048균주의 최적배양배지를 확립하기 위하여 YM배지 (Yeast extract 0.3%, Malt extract 0.3% , Peptone 0.5%, Dextrose 1.0%)를 Modify하여 최적 배지를 확립하였다. 또한 비교 배양실험은 5L jar-fementer를 이용하여 다른 온도 (15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃), 다른 pH (pH3, pH4, pH5, pH6, pH7) 조건 속에서 aeration, 내부 압력 조절 등 세부 배양 공정을 조절하며 수행하였다. 선정기준은 배양액의 균사의 양보다는 후막포자수 및 분생포자수를 기준으로 하였다.

Carbon sources, Inorganic nitrogen sources, Organic nitrogen sources, Inorganic salts등을 달리하여 검토한 결과 자사명명 “T-1배지”(Corn starch 0.5%, Dextrose 2.0%, Yeast extract 0.3%, CSL 0.3%)가 가장 우수한 생산성을 나타내어 향후 scale up 실험의 생산 배지로 활용하였다.

Table 24. *Trichoderma harzianum*의 보존제별 포자안정성(40℃, 8주보관, cfu/g)

구분	평균입경(μm)	비중(g/cc)	Mixer 이용성	균수변화	
				0일	40℃/8주 보관
산성백토	43	-	나쁨	1.3E+09	1.2E+08
펄라이트	17	0.15	좋음	1.4E+09	4.4E+08
규조토(MW-25)	10	0.16	중흡	1.6E+09	6.1E+08
제오라이트	#325이상 3.4%	2.1	나쁨	1.4E+09	4.6E+08
탈크(Talc)	13	2.6	나쁨	1.1E+09	2.3E+08
벤토나이트	#230이상 0.6%이하	2.5	중흡	1.0E+09	4.7E+08



Fig. 46. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주 열풍건조작업(좌: 열풍건조중, 우: 건조완료모습)



Fig. 47. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주 분쇄공정장비(좌: Pin miller, 우: Airjet miller)

Table 25. *Trichoderma harzianum*의 곰팡이류 액상배양용 배지별 액상배양결과

배지명	배지조성(%)	포자수(spore/ml)
CM	Dextrose 2.0 MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.05 KH ₂ PO ₄ 0.46 K ₂ HPO ₄ 0.1 Yeast extract 0.2 Peptone 0.2	1.0E+06수준
PDB	Potato dextrose broth 2.4	포자형성 약함
TM	미강 3.0 흑설탕 0.5 Malt extract 0.2	1.0E+05수준
V8	V8 juice 20.0	1.0E+07수준
YM	Yeast extract 0.3 Malt extract 0.3 Peptone 0.5 Dextrose 1.0	1.0E+09수준
Czapek-Dox Broth	Czapek-Dox Broth 3.5	포자형성 약함
SM	물엿 10.0 Malt extract 0.2	포자형성 약함
MY	당밀 3.0 Yeast(맥주용) 0.5	1.0E+05수준
ME	Malt extract 2.0 Peptone 0.2	1.0E+05수준

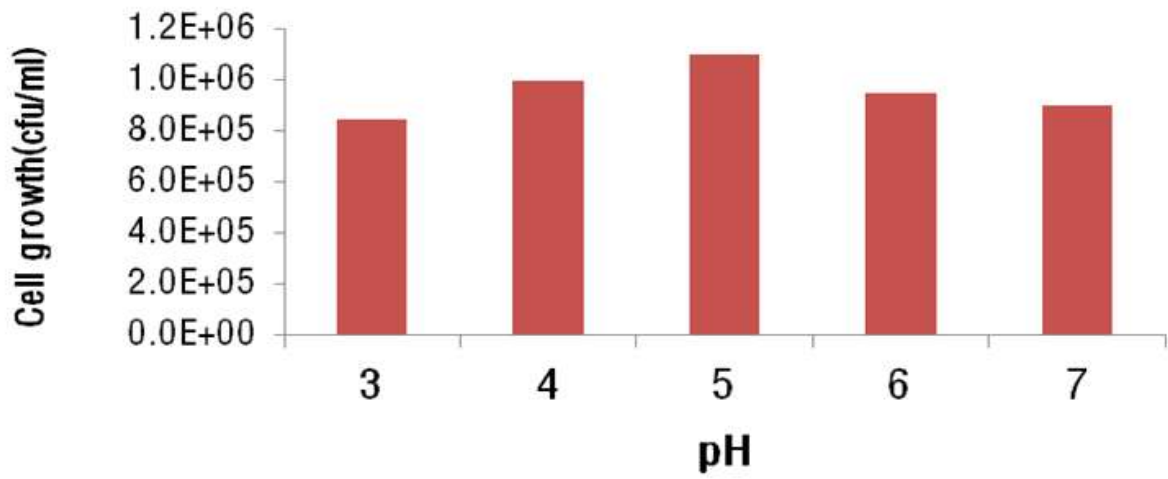


Fig. 48. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 배양최적 pH 조사결과.

Lab scale(5L jar fermenter)상에서 배양 최적 환경인자 별로 조사한 결과 pH는 3.0~8.0범위에서 생육이 일어난 반면, 강산성(pH 2.5이하) 또는 강알칼리성(pH 8.5이상) 조건에서는 균사생장이 거의 일어나지 않았다(Fig.48). 온도는 저온(15℃이하)과 고온(35℃이상) 보다는 25℃에서 가장 안정적인 생산력을 보였다. 초기 접종농도의 경우 1, 5%는 생산에 있어 배양기간 및 생산성이 모두 낮았으며, 최소 10%~20% 접종하였을 때 우수한 결과를 나타내었으나 경제성을 고려하여 10%의 접종농도를 최적으로 설정하였다(Fig.49).

선정된 최적배지를 이용하여 5L-jar fermenter상에서의 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 시간별 생육을 확인하였다. Culture profile을 작성하기 위하여 배양 중 일정 시간마다 pH, DO 및 분생포자수(또는 후막포자)를 지속적으로 확인하였으며 시간대별 샘플을 분석하여 전반적인 생산 상태 점검 및 생산 기간, pH 등에 대한 정보를 획득하였다.

5L-jar fermenter상의 culture profile을 작성한 결과, pH의 경우 배양초기에 조금 떨어졌다가 올라가 6~7사이 값을 나타내었고, DO의 경우 균사 생장이 일어나기 시작하는 시점에서부터 크게 감소하였다가 점차 증가하여 생장이 완료되었을 때 일정하게 유지되는 전형적인 경향을 나타내었다(Stanbury, 1999). 배양 시작 후 급격한 증식은 발생하진 않았으나 배양기간 동안 서서히 증가하는 경향을 나타내었다. 배양시작 약12시간 후부터 증식이 이루어지기 시작하여 균사량의 증가와 일부 후막포자의 형성이 시작되었고, 이후 균사증식은 48시간부터는 큰 변화는 없었으며, 이 시간부터 분생포자가 형성하기 시작하였다. 그리고 약 168시간(7일)까지 증가를 이루었으며 최대 증식기의 총 분생포자수는 2.8E+08 cfu/ml(3.0E+08 mfu/ml)수준으로 목표치로 하고 있는 (5.0E+08 cfu/ml or g이상)수준에 유사한 결과를 보였다(Fig. 50, 51).

T-1배지를 이용한 5L-jar fermenter배양액의 경시 안정성을 조사한 결과, 저온(2℃)에서는 3개월 보관 후 초기 분생포자수의 약 3%수준이하의 감소가 발생하였으나 상온에서는 초기 포자수의 약 10%수준의 감소가 발생하였으며, 고온(45℃)에서는 6주 보관(경시 1년 기준)할 경우 포자수가 초기 포자수의 50% 수준 이하로 감소하였다. 비교적 생산단가가 낮고 판단되는 액상 형태의 제품화 할 경우 불안정한 경시를 보이므로 산업성에 큰 문제가 된다고 판단되어 액상수화제보다는 액상배양을 한 후 분상수화제 타입으로 제형화 하는 것이 좋을 것으로 생각되며 제형의 다양화를 통하여 사용현장에서의 다양한 선택성을 높이기 위하여 동결건조 및 분무건조를 활용한 분상수화제가 적합 할 것으로 사료된다.

(2) *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 Pilot scale 최적조건 확립

50L 및 500L fermenter를 이용하여 pilot scale에서의 생산조건 및 parameter 설정 시험을 실시하였다. 배지 조성 및 생산 공정은 lab scale에서 기 검토된 조건을 이용하였으며 lab scale과 동일하게 culture profile을 작성하기 위하여 시험 일정 시간마다 pH, DO 및 미생물 총수 및 spore수를 지속적으로 확인하였다.

Flask culture한 배양액을 seed로 사용하여 50L fermenter에서 배양을 실시하였으며(Fig 52) 배양은 분생포자의 증가 속도가 감소하였을 때 종료하였다.

각 시간별 배양액의 성장 수준은 Fig 53과 같았다. 배양 시작 후 약 12시간 이후부터 균사증식이 시작하였으며 약 48시간 경과부터 분생포자가 발생하기 시작하여 약168시간에 가장 높은 분생포자(5.2E+08 cfu/ml) 생산하였다. 이는 목표 수치를 넘어선 수치로 우수한 결과라 할 수 있다(Fig. 53, 54).

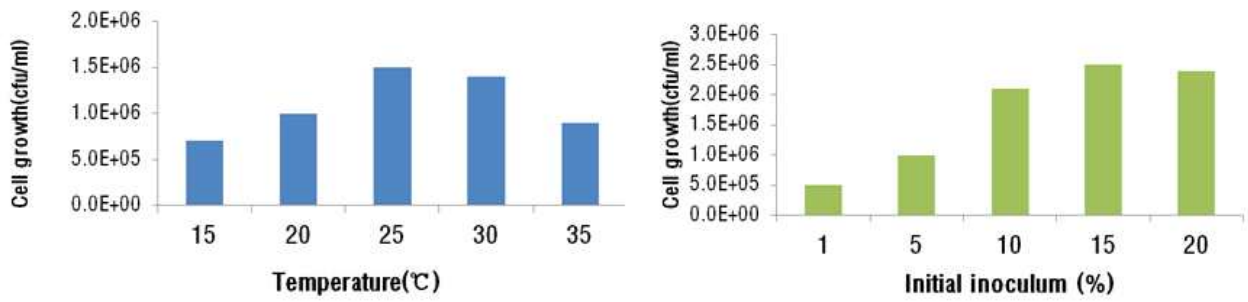


Fig. 49. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 배양최적 온도, 접종량 조사결과.

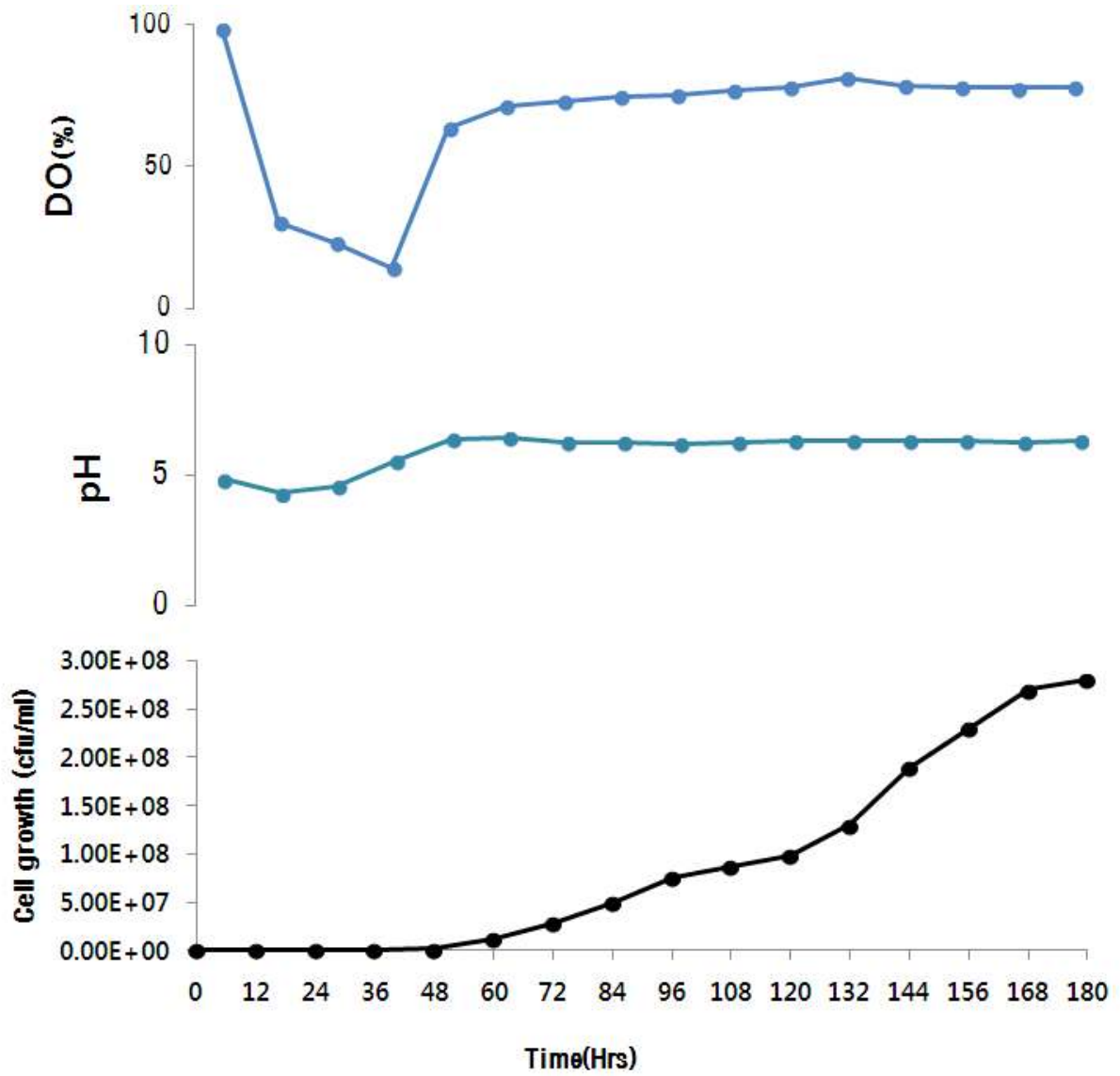


Fig. 50. 5L-jar fermenter상의 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 생육

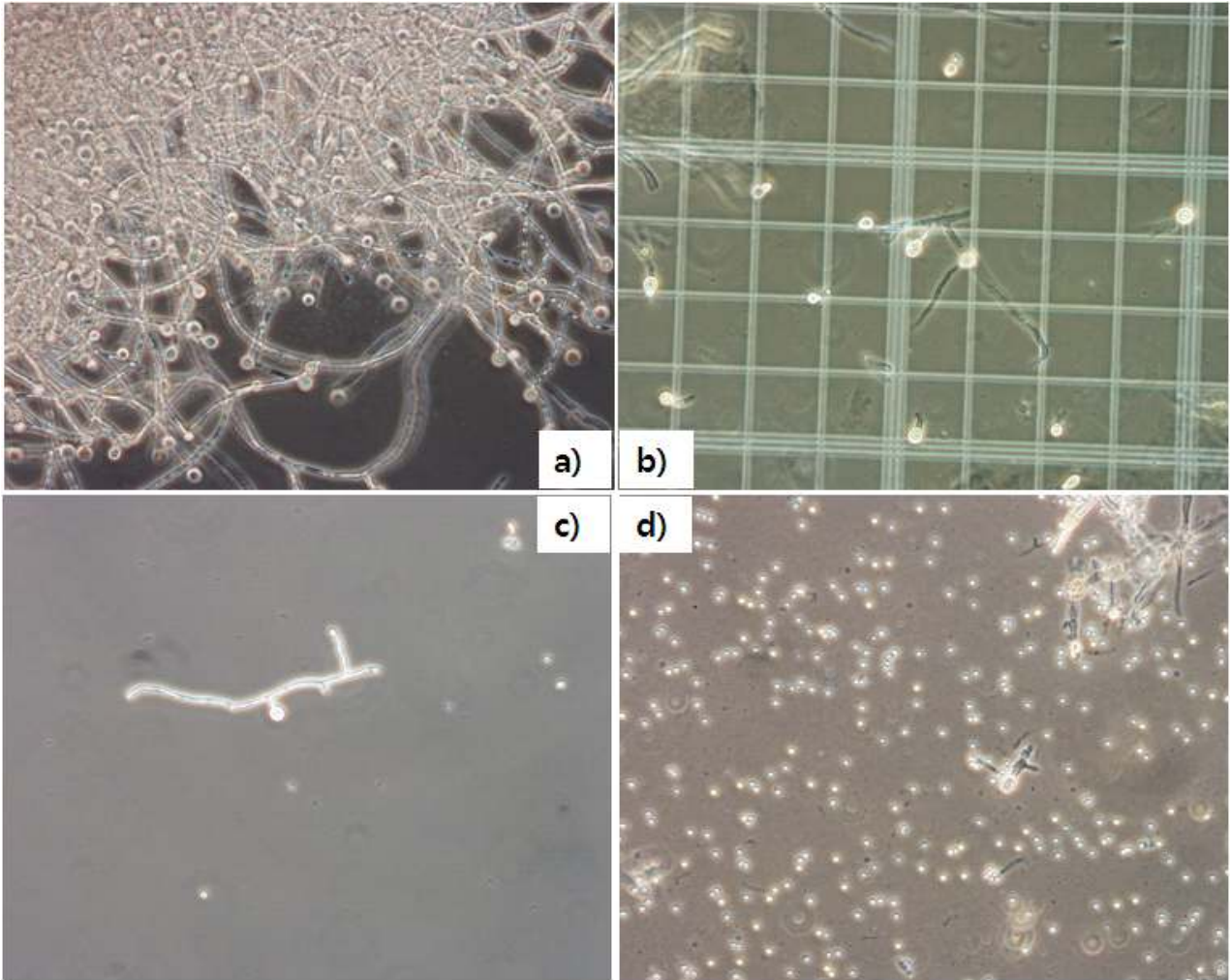


Fig. 51. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 현미경 사진 (a: *Trichoderma harzianum* GBF-1048의 균사, b: 후막포자, c: 균사생장중인 후막포자, d: 분생포자).



<u>Main culture</u>	
<u>(working volume 40L/50L – fermenter)</u>	
A. Medium	: T-1배지
B. Cultivation temp.	: 25 °C
C. Cultivation time	: 168 hrs
D. RPM	: 150 rpm
E. Pressure	: 0.5 Kg/cm ²
F. Air	: 0.5 vvm

Fig. 52. 50L-fermenter 모습과 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주 배양조건.

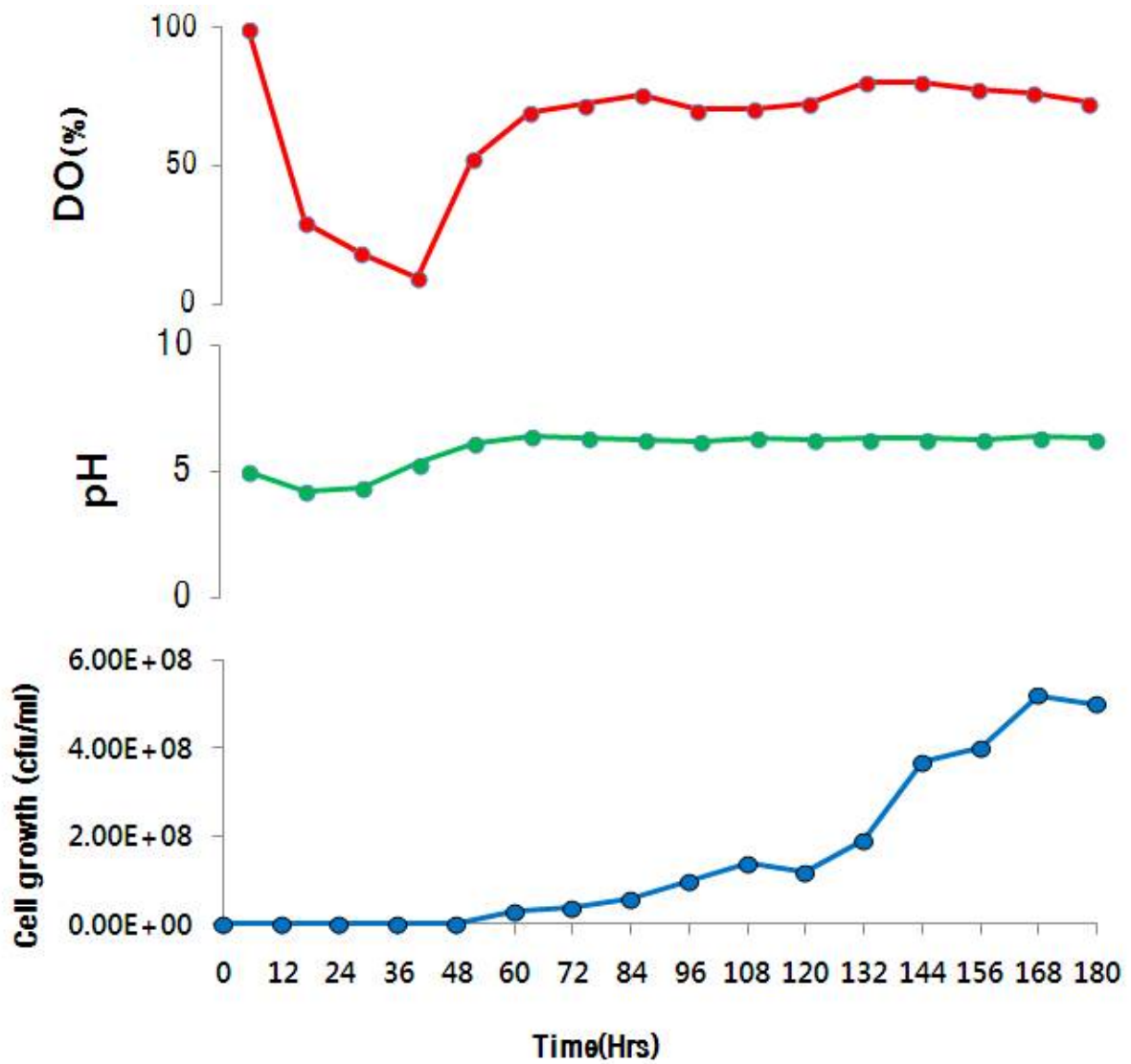


Fig. 53. 50L-fermenter상의 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 생육

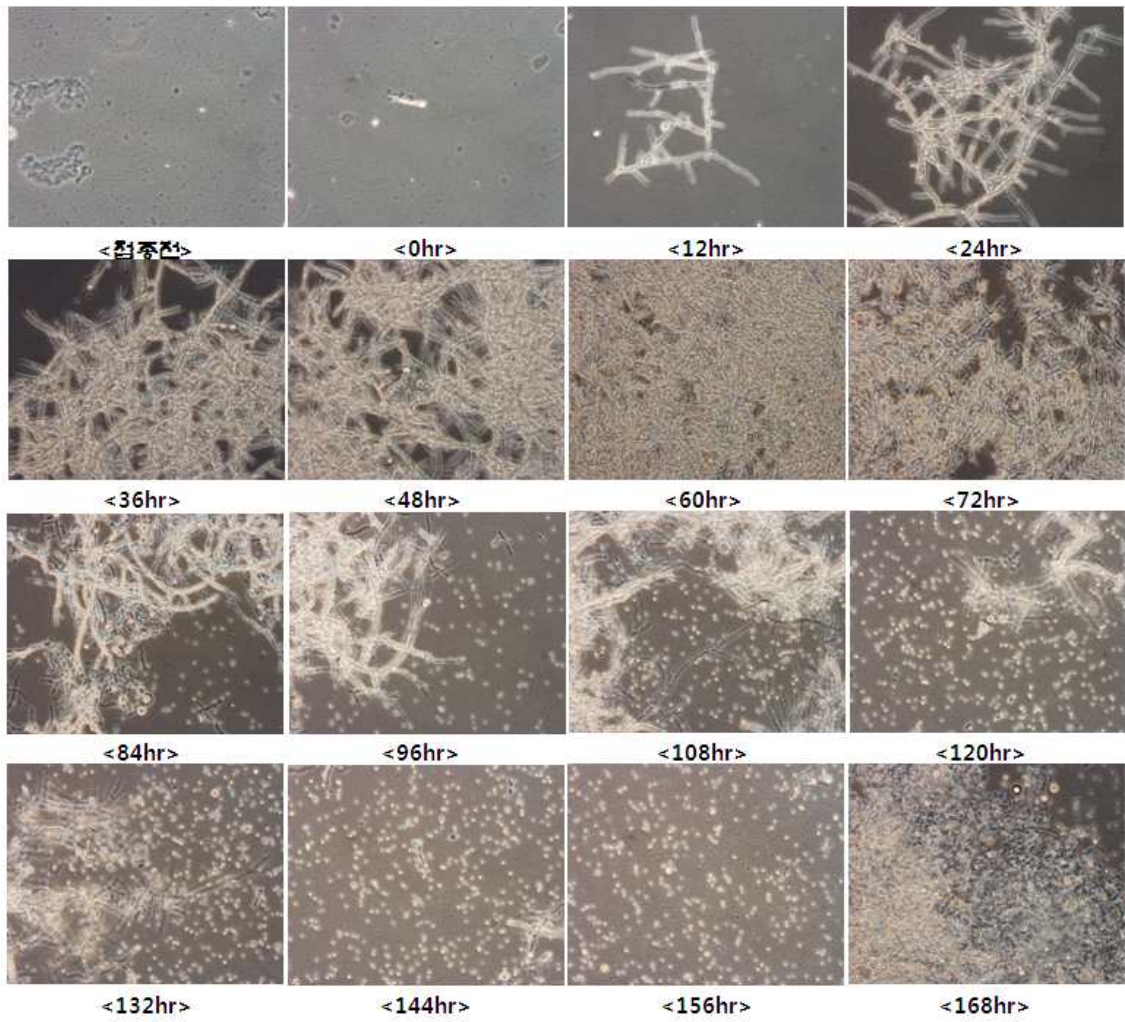


Fig. 54. 50L-fermenter상의 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 배양시간에 따른 현미경 사진.



<u>Main culture</u>	
<u>(working volume 300L/500L – fermenter)</u>	
A. Medium	: T-1배지
B. Cultivation temp.	: 25 °C
C. Cultivation time	: 168 hrs
D. RPM	: 120 rpm
E. Pressure	: 0.5 Kg/cm ²
F. Air	: 0.5 vvm

Fig. 55. 500L-fermenter 모습과 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주 배양조건.

500L fermenter의 경우 50L fermenter에서 배양한 배양액을 seed로 사용하여 500L fermenter에서 시배양을 실시하였다(Fig 8).

500L-fermenter 역시 50L-fermenter와 동일하게 배양 시작 후 약 12시간 이후부터 균사가 증가하기 시작하였으며 약 48시간 경과 후부터 분생포자가 발생 하였다. 하지만 최대 분생포자 생산기간은 기존의 168시간이 아니라 144시간에 가장 높은 증가율을 보였다($6.8E+08$ cfu/ml). 이후 증가하지도 감소하지도 않고 분생포자수를 유지하였다(Fig 56, 57).

(3) *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 Plant scale 최적조건 확립

Pilot scale에서의 culture profile 및 생산 공정 최적화 시험을 토대로 실제 상업화 모델인 plant scale 에서의 생산 조건 검토 및 parameter 설정 시험을 실시하였다. 시험용 5,000L fermenter는 실제 미생물농약을 생산하는 설비를 이용하였으며 배지 조성 및 생산 공정은 pilot scale에서 재조정된 조건을 이용하였다. Culture profile을 작성하기 위해 시험 일정 시간마다 pH, DO 및 분생포자수를 지속적으로 확인 하였으며 시간대별 샘플을 분석하여 전반적인 배양 상태 점검 및 배양 기간, pH, DO 등을 조사하였다. 5,000L fermenter의 경우 500L fermenter에서 배양한 배양액을 seed로 사용하여 시배양을 실시하였다(Fig. 58).

Pilot scale에서 개발된 T-1배지 조성을 소량 변형시킨 배지를 이용하였으며 동일한 조건에대량생산을 실시하였다. 6시간 간격으로 배양액을 채취하여 분생포자 및 오염도, pH, DO 등을 조사하였으며 지속적으로 육안 관찰하여 배양 중 이상 유무를 관찰하였다. 배양 종료 시점은 최종적으로 시간 당 분생포자 증가 속도가 감소하는 시점으로 선정하였다.

Plant scale fermenter에서의 생산 결과에 따라 culture profile을 작성하였다(Fig. 59, 60). 배양 시작 후 약 6시간 이후부터 균사체가 증가하기 시작하였으며 약 120시간 경과 후 가장 높은 증가율을 보였다($7.3E+08$ cfu/ml). 그리고 그동안 배양일이 6일이상 소요되던 것이 개선된 방법으로 배양시간을 약 24시간정도 줄일 수 있었다. 이는 기존 배양 공정에 비해 분생포자형성시간 단축 및 분생포자수가 크게 증가한 것으로 후 공정 과정의 농축 등을 고려할 경우, 상업화 적정선인 $1.0E+09$ cfu/ml 을 넘어서는 결과를 나타낸다. 이는 수율면에 있어 미생물 배양물이 높은 산업성을 나타내고 있다 볼 수 있다. 이상에서 확보한 culture profile 및 생산 조건 등을 토대로 대량생산 공정을 설계하였다.

(4) *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 생산수율개선

Plant scale 까지의 배양공정을 수행한 결과, 목표로 하는 균수에는($5.0E+08$ cfu/ml 이상) 도달 하였으나 배양시간의 장기화 문제가 있어 이를 보완하기 위하여 기존 설계된 제조 공정도를 조정하였으며 생산 원가 절감 및 효율적인 공정을 위하여 각 공정을 아래와 같이 개선하였다(Table 2).

개선한 공정에 따라 pilot, plant scale cultivation을 실시한 결과 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 생육이 증대되었으며 분생포자형성시간 또한 많이 단축되어졌다.

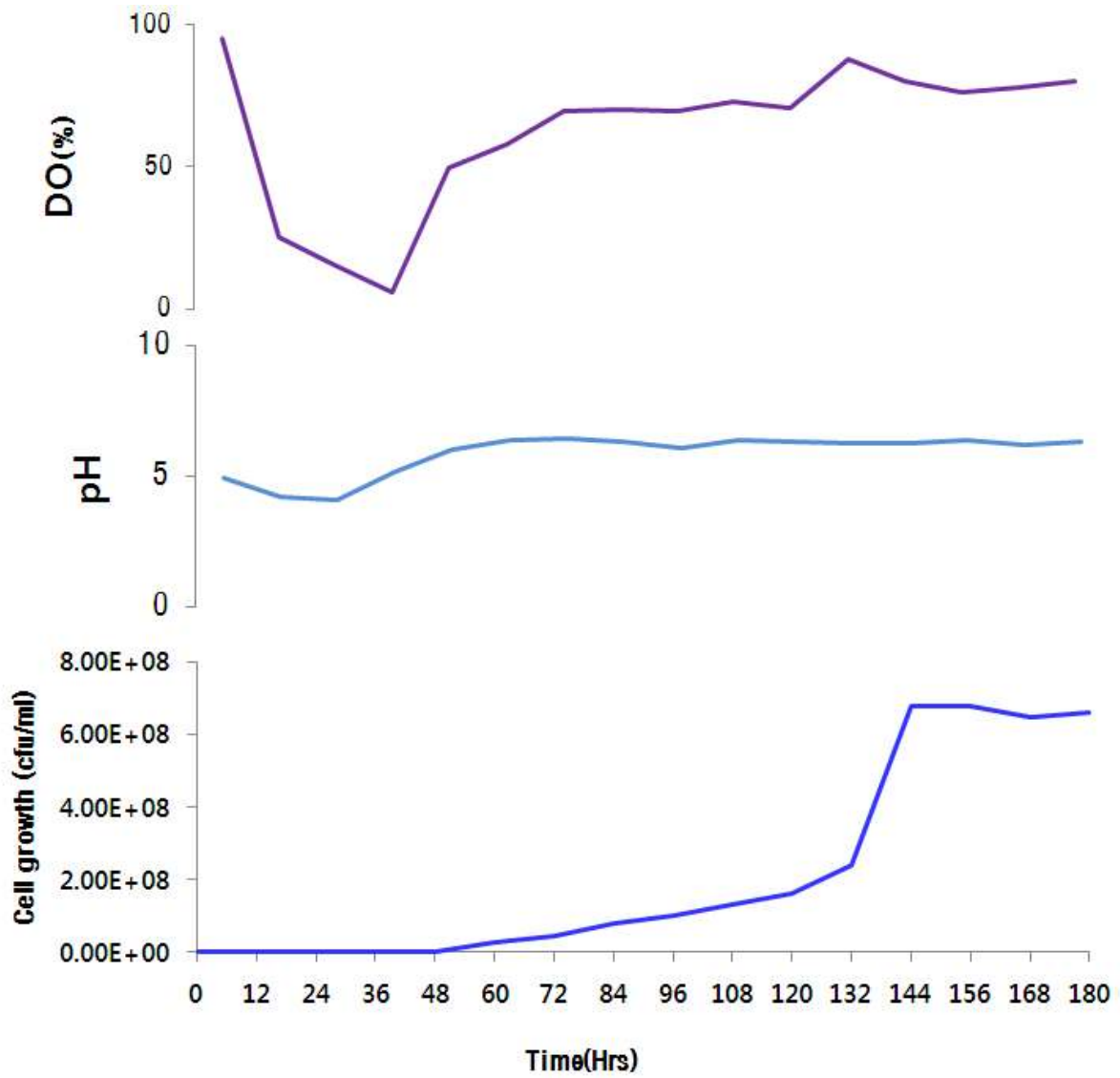


Fig. 56. 500L-fermenter상의 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 생육

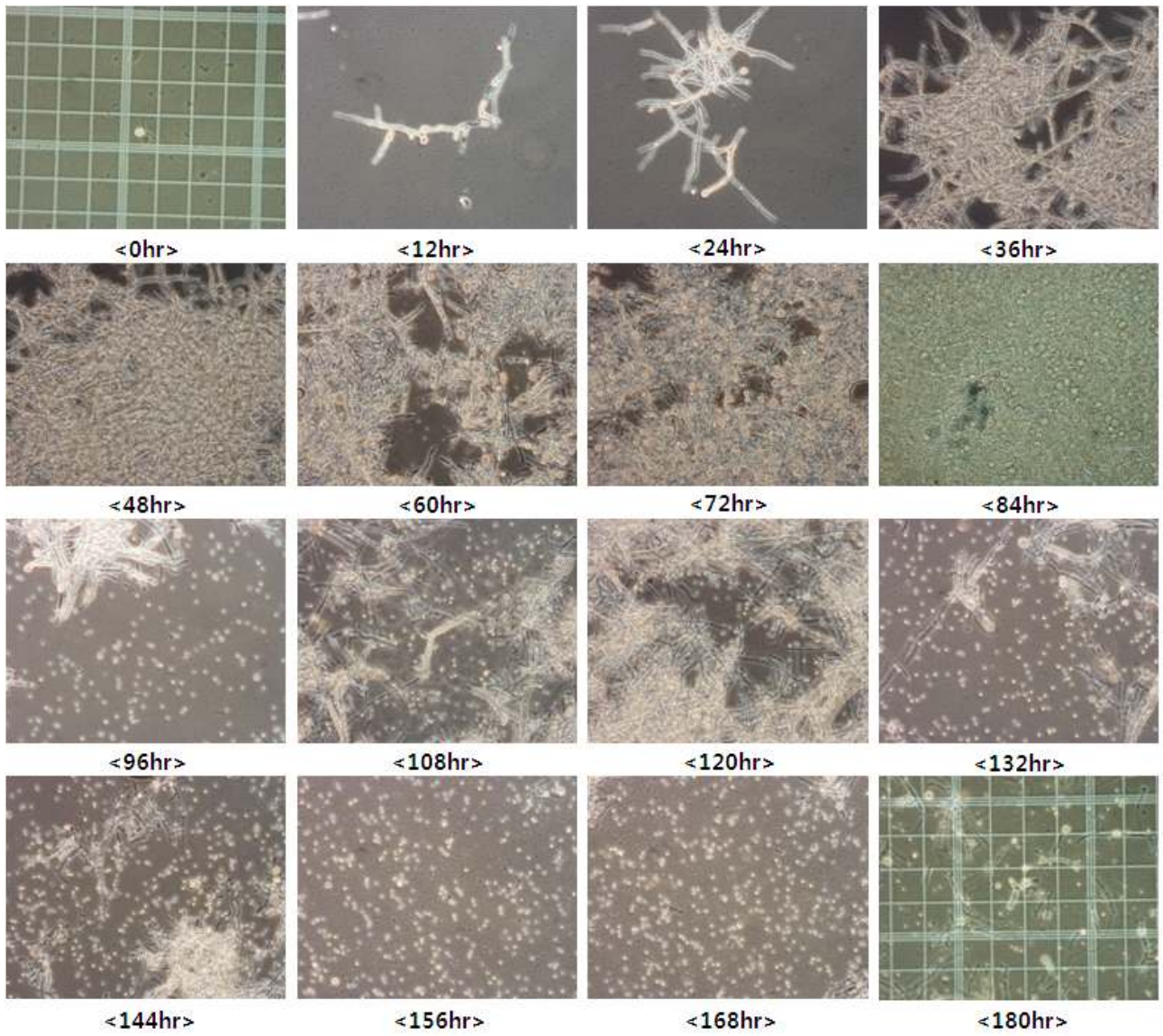


Fig. 57. 500L-fermenter상의 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 배양 시간에 따른 현미경 사진.



Fig. 58. 5,000L fermenter 모습과 주요 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주 배양조건

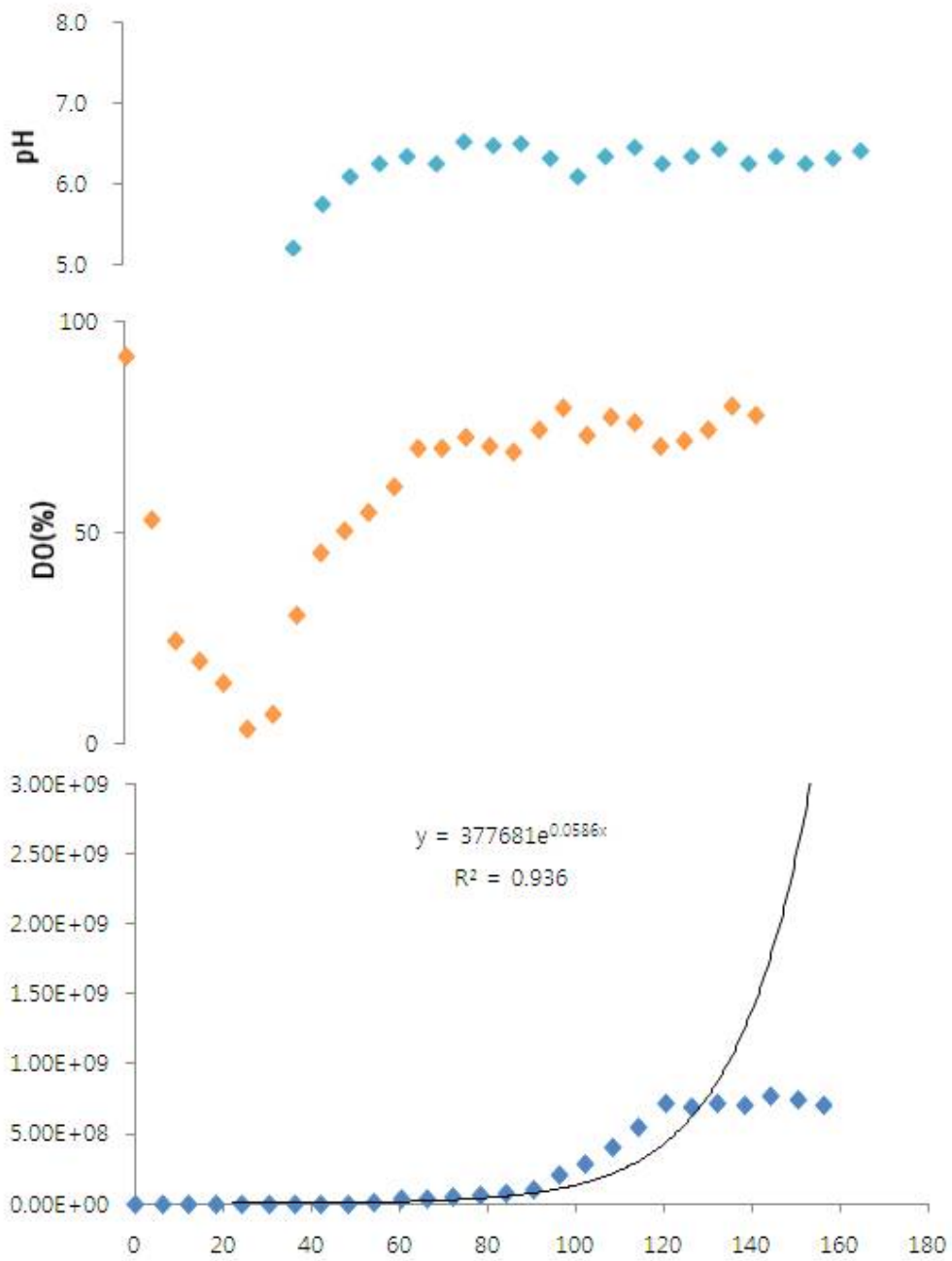


Fig. 59. 5000L-fermenter상의 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 생육.

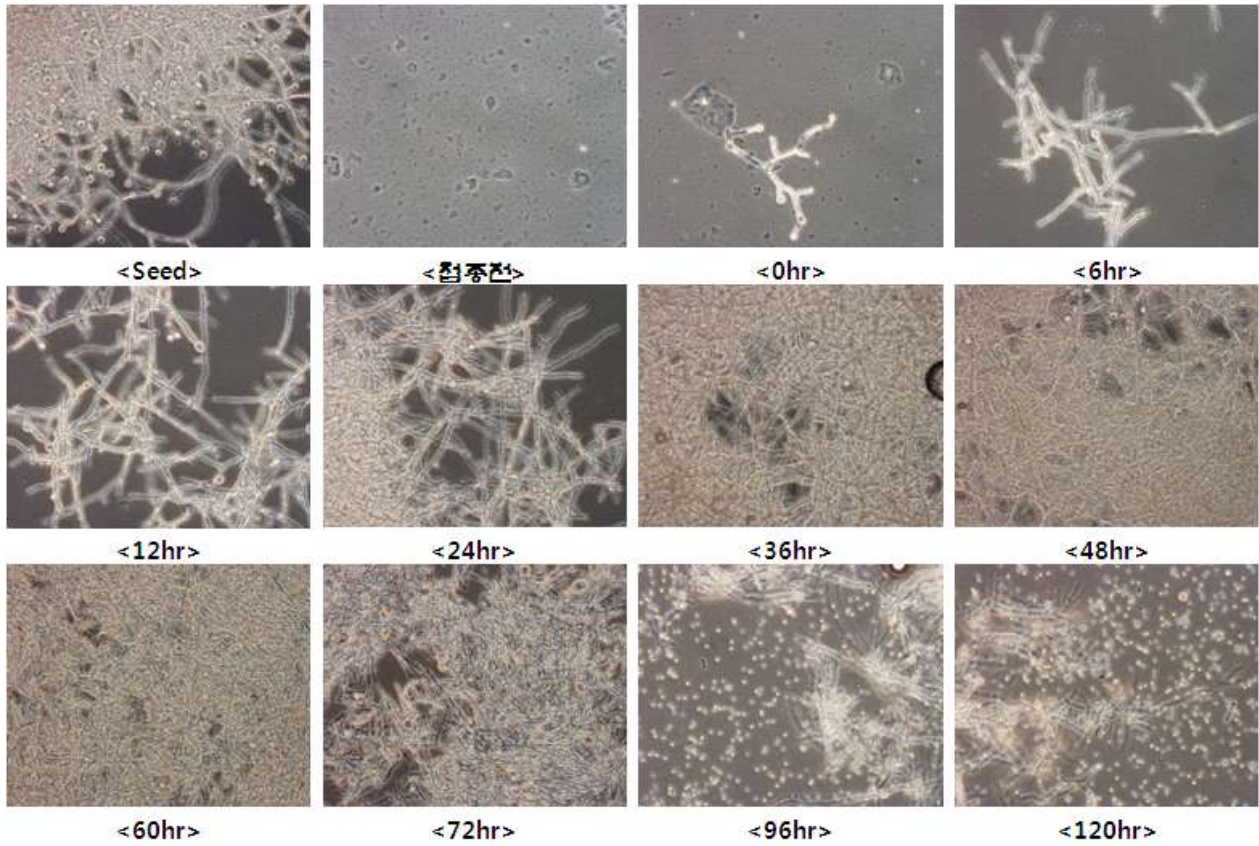


Fig. 60. 5000L fermenter상의 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 시간에 따른 현미경 사진

Table 26. *T. harzianum* GBF-1048균주 수율증진을 위한 배양조건의 개선사항

공정 명	개선 내역
Step 1. Agar plate 배양	
Step 2. 1st Seed culture	미조정
Step 3. 2nd Seed culture	미조정
Step 4. Main culture (30/50L)	<ul style="list-style-type: none"> - 생산배지: T-1배지 - 배양시간 조정 : 72hrs - Seed접종량: 10% - 기타인자 미조정
Step 5. Main culture (250/500L)	<ul style="list-style-type: none"> - 생산배지: T-1배지 - 배양시간 조정 : 24hrs - Seed접종량: 10% - 기타인자 미조정
Step 6. Main culture (3500/5000L)	<ul style="list-style-type: none"> - 생산배지: T-1배지->T-1배지-1* - Seed접종량: 10% - 배양시간 조정 : 120hrs - RPM 조정 : 50 - 기타인자 미조정

* T-1배지-1: T-1배지의 배지원 종류는 고정, 그 함량의 변화를 줌.

(5) *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 공정 평가 및 점검

Scale up process에서 검토한 배양 공정에 따라 아래와 같은 공정도를 작성하여 plant scale cultivation을 실시하였다.

Step 1. Agar plate 배양 : Glycerol stock에서 PDA plate로 접종. 7일간 25°C 인큐베이터에서 배양한 후 오염여부확인 후 사용한다.

Step 2. 1st Seed culture (250ml-△flask/working volume 50ml)

- A. Medium : PDB broth
- B. Cultivation temp. : 25°C
- C. Cultivation time : 120hrs
- D. RPM : 150rpm

* Autoclave(121°C, 15min), (step 1)의 agar plate에서 2cm × 2cm 2-3Block 접종.

Step 3. 2nd Seed culture (3ea × 3,000ml-△flask/working volume 1,000ml)

- A. Medium : PDB broth
- B. Cultivation temp. : 25°C
- C. Cultivation time : 72hrs
- D. RPM : 150rpm

* Autoclave(121°C, 15min), Seeding volume : 10%

Step 4. Main culture (working volume 30ℓ/50ℓ-Fermentor)

- A. Medium : T-1배지
- B. Cultivation temp. : 25°C(± 0.5)
- C. Cultivation time : 72hrs
- D. RPM : 150rpm
- E. Pressure : 0.5Kgf/cm²
- F. Air : 0.5vvm

* Autoclave(121°C, 20min), Seeding volume : 10%

Step 5. Main culture (working volume 300ℓ/500ℓ-Fermenter)

- A. Medium : T-1배지
- B. Cultivation temp. : 25°C(± 0.5)
- C. Cultivation time : 24hrs
- D. RPM : 120rpm
- E. Pressure : 0.5Kgf/cm²
- F. Air : 0.5vvm

* Autoclave(121°C, 20min), Seeding volume : 10%

Step 6. Main culture (working volume 3.5ton/5 ton-Fermenter)

- A. Medium : T-1배지-1
- B. Cultivation temp. : 25°C(± 0.5)
- C. Cultivation time : 120hrs
- D. RPM : 60rpm
- E. Pressure : 0.5Kgf/cm²
- F. Air : 0.5vvm

* Autoclave(121°C, 20min), Seeding volume : 10%

(6) *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주의 배양후 공정 확립

최적으로 확립된 대량배양공정을 기반으로 생산한 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주배양액의 경우 균주 특성상 액상제로 경시를 확인 한 결과 경시안정성이 떨어지는 것으로 확인되어 기 연구된 결과를 바탕으로 동결건조법(Freeze-Drying, F/D)과 분무건조법(Spray-Drying, S/D), 열풍건조법(Convection oven, C/O)중 분생포자회수율 및 경시안정성등에서 우수한 성능을 보인 동결건조법(Freeze-Drying, F/D)을 활용하여 *Trichoderma harzianum* GBF-1048 분상수화제(WP)제형 제작을 진행하였다. 문헌상에서도 곰팡이 배양액을 냉장이나 냉동상태로 전처리 할 경우 건조 후 포자 수율이 증가하는 경향을 보인다는 사례도 있기 때문이다(Adams, 2007).

(가) 농축

Trichoderma harzianum GBF-1048균주를 3.5ton 배양체를 그대로 농축 할 경우 동결건조비용이 많이 발생하므로 사전에 배양액과 균체(균사+분생포자+후막포자)를 분리하는 공정을 추가하였다(농축시 Pall-sep장비를 활용함). 이후 농축된 배양체에(약 3배 농축, 7.3E+08 cfu/ml → 1.9E+09 cfu/ml)동결건조 보존제를 추가한 후 동결건조를 진행하였다.

(나) 동결건조부재 및 보조제 선정시험

동결건조 부재로 자주 사용되는 부재를 선정하여 건조를 실시하였다. 시험 결과 L-1과 S-1을 부재로 사용한 구에서 가장 높은 포자 안정성을 나타내었다. 그러나 S-1을 부재로 사용할 경우 물에 잘 녹지 않아 이화학적 성상에 문제가 생길 수 있어 동결건조를 위한 담체로 L-1을 선정하였다. 다음 시험에서는 L-1을 보조하기 위한 보조제로 W-1과 T-1을 투입하여 시험을 실시하였다. T-1은 생물체가 저온 및 건조한 환경에 견디기 위해 생성하는 물질로, 결정을 생성하나 상온에서도 흡습성이 적어 상업화가 유리한 물질이다. 시험 결과 W-1 10%에 L-1 5%, T-1 5%에서 가장 안정적이었다. 다음으로 부재 함량을 조정하는 시험을 실시하였다. 시험 결과 L-1의 함량은 기존의 30% 수준이 가장 적절한 것으로 나타났으며 T-1의 경우 시험구들 간의 유의한 차이는 없었지만 상대적으로 T-1을 10% 투입하였을 때 가장 높은 포자 수율을 획득하였다. 시험 결과에 따라 L-1 30% 및 T-1 10%를 건조 담체로 최종 선정하였다. 포자의 경시안정성 및 열, 건조 안정성 확보를 위해 P-1과 G-1을 첨가하는 시험을 진행하였다. P-1 2% 첨가 시 미첨가 구에 비해 포자의 수율은 크게 변하지 않으나 경시 안정성이 증가하는 경향을 나타내었다. P-2를 투입한 구에서는 투입량이 증가할 수록 경시 안정성이 크게 낮아지는 경향을 나타내어 P-2 투입이 포자에 악영향을 끼친 것으로 확인되었다. 동결건조부재 및 보조제 선정시험 시험 결과 최적인 L-1 30% + T-1 10% + P-1 2% + G-1 0.5% 혼합시 가장 우수하였다 (Table 27).

Table 27. *T. harzianum* GBF-1048균주의 동결부재 및 보조제선정

	배합비	건조 후 균수 (cfu/g)
대조	L-1 30%	2.1E+09
	L-1 30% + P-1 2%	2.2E+09
대조	L-1 30% + T-1 10%	2.6E+09
	L-1 30% + T-1 10% + P-1 2%	3.2E+09
대조	L-1 30% + T-1 10% + P-1 1%	3.1E+09
	대조구 + G-1 0.25%	3.6E+09
	대조구 + G-1 0.5%	3.8E+09
대조	L-1 30% + T-1 10% + P-1 2% + P-2 0%	3.2E+09
	L-1 30% + T-1 10% + P-1 2% + P-2 5%	2.1E+09
	L-1 30% + T-1 10% + P-1 2%+P-2 10%	9.9E+08
	L-1 30% + T-1 10% + P-1 2%+P-2 20%	5.2E+08

(다) 분쇄공정 설계 시험

최적 건조 방법 및 최적 건조 부재 탐색에 따른 건조 시료를 분쇄하여 수화제 형태로 제조하기 위해 최적 분쇄 방법을 탐색하였다. 일반적으로 미생물 농약의 경우 분말 제조 시 분쇄 공정으로 인해 포자가 파괴되거나 영향을 받을 수 있기 때문에 분쇄 전과 분쇄 후의 포자 상태 등을 고려하여 분쇄 방법을 설정하였다. 가장 많이 사용되는 hammer miller, pin miller, airjet miller를 이용하여 시료를 분쇄한 후 분쇄 전의 시료와 비교하여 분쇄도를 측정하였다. 그 결과 이화학적성에서는 airjet miller가 포자안전성에서는 pin miller가 양호 하였는데 수화제를 제작하기 위하여 1차로 pin miller를 사용하여 건조체를 분쇄 한 후 2차로 airjet miller를 사용할 경우 이화학적성 및 포자안전성에도 우수하였다.

(라) 최적 증량제 검토

증량제 시험 결과 원제의 종류에 따라 *Trichoderma harzianum* GBF-1048의 경시안정성이 다르게 나타났다. G1을 증량제로 사용했을 경우 가장 높은 경시안정성을 나타내었고 L1의 경우도 비교적 양호한 경시안정성을 나타내었으나 M3를 첨가한 시험구에서는 경시안정성이 크게 감소하는 것으로 나타났으며, 각 증량제를 혼용한 경우에서도 원제10% + L130% + G260% 혼용하였을 때 가장 우수한 결과를 보였다. 하지만 경제성을 고려 한 결과 G2만 단독으로 90% 처리하였을 경우가 가장 적합한 것으로 보여 *Trichoderma harzianum* GBF-1048분상수화제의 증량제는 G2로 선정하였다.

(마) 생산 시제품의 적적할 QC방법 모색

① 생균수 측정

- 연속희석법(serial dilution)을 이용하여 원하는 농도까지 제품을 희석한다.
- 희석한 제품을 PDA Plate에 적량 도말한 후 Incubator(25℃)에서 1-2일 배양 후 균사를 계수한다.

② 물리성 측정

- 배양 종료 후 수거한 배양액을 적량 희석하여 입도, 수화성 등을 조사한다.

③ 보존성 test

- 보존성을 실험할 시료는 30, 40℃에서 보관하여 1, 3, 6, 10, 15주에 pH, 형태적 이상 유무, 총균수, 향균활성 등을 검사한다(Table 28).

이상의 *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주를 활용한 분상수화제(WP)제로 제작한 시제품을 “근초고왕”이라 상표명을 명명하여 실용화재단을 통하여 유기농업자재 목록공시에 2015년 03월까지 등재예정(공시-1-4-??)이다(Fig. 61, 62).

Table 28. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주 QC 검사 기준

검사 내역	기준	합격 판단
외관	색깔, 냄새, 정상	미갈색, 특유의 발효취, 외관 상 이상 없음
균수	cfu/g	기준 보증균수의 10배수 이상 균수가 나와야 함(경시 감안)
유해미생물(5종)	검출 유·무	선택배지상 불검출 (한 종이라도 검출시 폐기)
활성	Antifungal activity	병원성곰팡이에 대한 대칭배양 결과 유의한 활성을 나타내야 함.
이화학적	분말도, 수화성	물에 희석 시 잘 희석되어야 하며 엉기거나 침전되면 안됨.



Fig. 61. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주배양액 및 시제품(상표명: 근초고왕)

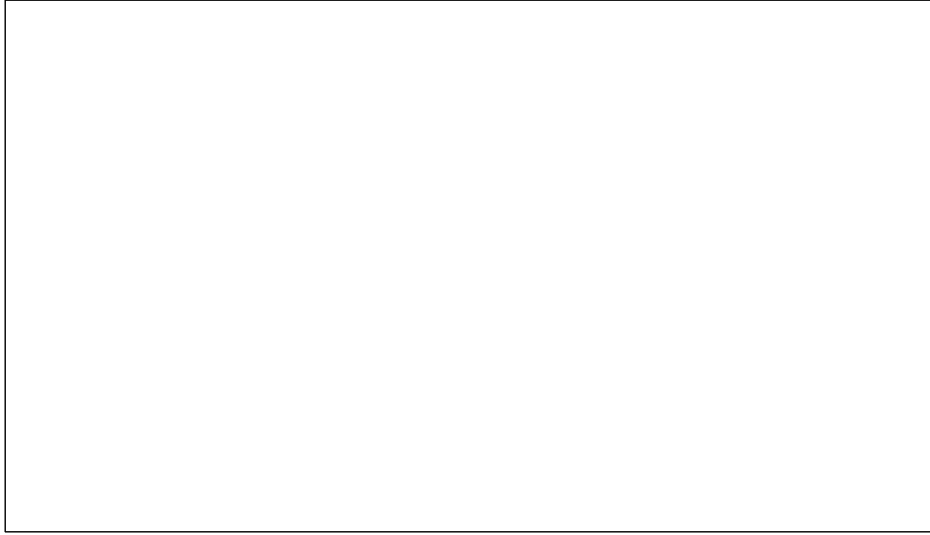


Fig. 62. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주(상표명:근초고왕)의 목록공시 등재공시서.
<2015년03월농업기술실용화재단을통하여등재예정>.

라. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주(상표명: 근초고왕)의 독성안정성시험

개발되어진 근초고왕분상수화제(WP)제품의 인축독성 및 생태독성 등 안정성을 확인하기 위하여 (주)한국생물안정성연구소를 통하여 검사를 하였다(친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 기준: 2014.06.02이후에는 친환경유기농자재목록공시 등재를 위하여 인증기관성적서만 인정됨). 이후 친환경유기농자재 대행기관 농업기술실용화재단을 통하여 농촌진흥청 친환경 유기농자재에 신청하였다.

(1) *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕)의 인축독성시험

친환경유기농자재 병해충관리용 자재의 경우 인축독성에 대한 분석을 진행하여야 하며 그 항목으로는 급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성, 안점막자극성에 대한 평가를 통하여 제품을 상업화하기 위한 안정성 시험을 진행하였다.

인축독성시험 결과 급성경구독성의 경우 IV급(기준: III급/IV급 이상), 급성경피독성의 경우 IV급(기준: III급/IV급 이상), 피부자극성시험의 경우 피부자극지수(P.I.I)가 0.0(기준: P.I.I 1.0이하), 안점막자극성시험의 경우 안점막자극지수(A.O.I)가 0.0(기준: A.O.I 10이하)으로 나타나 근초고왕의 경우 인축독성에 대하여 안정적인 것으로 확인되었다(Fig. 63).

(2) *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕)의 생태독성시험

친환경유기농자재 병해충관리용 자재의 경우 환경독성에 대한 분석을 진행하여야 하며 그 항목으로는 급성어류독성(담수어류), 꿀벌급성접촉독성(개화기처리 제품, 경영처리 제품 해당)에 대한 평가를 통하여 제품을 상업화하기 위한 안정성 시험을 진행하였다.

환경독성시험 결과 급성어류독성(담수어류) 분석 결과 IV급(저독성)(기준: III급, TER 10 이상)으로 나타났으며, 꿀벌급성접촉 독성의 경우 사용추천농도 500배 보다 100배 이상의 농도에서도 안정적인 것으로 나타나 환경독성에서도 안정적인 것으로 조사되었다(Fig. 64).

(3) *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕)의 생물활성시험

친환경유기농자재 병해충관리용 자재의 경우 유식물 5가지 작물을 대상으로 한 약해시험에 대한 평가를 통하여 제품을 상업화하기 위한 안정성 시험을 진행하였다.

약해시험 결과 5가지 작물인 고추(슈퍼마니파), 배추(불암3호), 상추(선풍2호), 오이(싱그런백다다기), 콩(백태) 모두 권장처리농도(500배)와 배량(250배)에서 약해가 전혀 없는 것으로 조사되었다(Fig. 65).

(4) *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕)의 유효·유해미생물 분석

친환경유기농자재 병해충관리용자재 중 미생물을 기반으로 제작된 제품의 경우 유효미생물<미생물동정자료-속명, 종명, 균수(CFU/ml or g) 및 유해미생물 5종에 대하여 조사여 안정적, 안전한 제품임을 나타내어야 한다.

유효미생물분석 결과 근초고왕의 제품 내 유효미생물은 *Trichoderma harzianum*로 함량은 1.0×10^8 CFU/g(원제 1.0×10^9 CFU/g이상) 이상으로 조사되었다. 이는 과제평가 착안기준의 목표치(5.0×10^8 CFU/g 이상) 보다 높은 것으로 경시안정성까지 고려한다면 충분히 안정적인

인 제품임을 알 수 있다(Fig. 66). 그리고 제품 내 유해미생물을 함유하는 분석한 결과 병원성 대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라(*Salmonella* sp.), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 바실러스세레우스(*Bacillus cereus*) 모두 불검출 되었다(Fig. 67).

마. *Trichoderma harzianum* GBF-1048균주(상표명: 근초고왕)의 약효·약해평가

(1) 상추 균핵병에 대한 *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕)의 약효, 약해 시험

(가) 포장 약효·약해 시험

본 시험은 상추 균핵병으로 매년 피해를 입고 있는 충청남도 논산시 광선면의 유기재배 농가에서 진행되었다. *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕) 시작품을 기준으로 500배를 정량, 250배를 배량으로 설정하였으며 상추 균핵병 발생 초기 7일 간격 3회 관주와 엽면살포를 실시하였다(Table 29, Fig 63).

약효시험 결과는 시작품의 최종 처리 7일 후, 처리구 전주의 이병주율을 조사하였으며 약해시험 결과는 3회 처리 시마다 외관상 상추 잎의 약해유무를 달관조사 하였다. 약효시험 결과, 정량 처리구(500배)에서는 65.9%, 배량 처리구(250배)에서는 70.8%의 높은 방제가를 나타내었다(Table 30 Fig. 64). 이는 과제시제품인 ‘탄저자비’보다 더 높은 방제가를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 트리코델마 속의 특징인 생육증진의 기능이 있어서인지 동일한 구간의 무처리구의 생산된 상추의 건조중량보다 처리구쪽의 상추의 건조중량이 역 10%이상 증진된 것을 볼 수 있었다. 이상의 결과를 보면 *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕) 시작품의 경우 상추균핵병에 대하여 높은 방제가를 가지며, 생육증진의 기능을 갖춘 제품이라 판단되며 향후 제품화 할 경우 농가에 도움이 될 것으로 사료된다.

(2) 딸기 잿빛곰팡이병에 대한 *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕)의 약효, 약해 시험

(가) 포장 약효·약해 시험

딸기 잿빛곰팡이병은 딸기 재배시 많이 발생되어 농가의 딸기 수확량에 큰 영향을 끼치는 병징으로 본 시험포장은 딸기 잿빛곰팡이병이 매년 발생한 포장으로 경기 평택시의 무농약인증 농가에서 진행되었다. *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕) 시작품을 기준으로 500배를 정량, 250배를 배량으로 설정하였으며 딸기 잿빛곰팡이병 발생 초기 7일 간격 3회 엽면살포를 실시하였다(Table 31, Fig 65).

약효시험 결과는 시작품의 최종 처리 7일 후, 처리구 전주의 이병과율을 조사하였으며 약해시험 결과는 3회 처리 시마다 외관상 딸기 잎과 과실의 약해유무를 달관조사 하였다. 약효 시험 결과, 정량 처리구(500배)에서는 56.0%, 배량 처리구(250배)에서는 64.2%의 방제가를 나타내었다.(Table 32, Fig 66). 이 또한 과제시제품인 ‘탄저자비’보다 더 높은 방제가를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 29. 상추균핵병 포장실험 처리방법

처 리 구	처 리 방 법
<i>Trichoderma harzianum</i> GBF-1048(근초고왕)시작품 정량	관주 및 엽면 살포(발병 초) (1.0×10^8 , 500배 희석, 7일 간격 3회 처리)
<i>Trichoderma harzianum</i> GBF-1048(근초고왕)시작품 배량	관주 및 엽면 살포(발병 초) (1.0×10^8 , 250배 희석, 7일 간격 3회 처리)
대조구	무처리



Fig. 63. 상추 균핵병 발병체 및 시험포장현장(충남 논산)

Table 30. 상추 균핵병 포장에 *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕)처리 방제가 (충남 논산)

처리구	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)	약해시험 결과
	1	2	3	평균			
500배	8.7	8.4	9.8	9.0	a	65.9	약해 없음
250배	7.2	8.4	7.6	7.7	a	70.8	
무처리	26.1	27.8	25.4	26.4	b	-	-

C.V-----7.4%



Fig. 64. *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕)의 상추균핵병 방제사진

Table 31. 딸기 잣빛곰팡이병 포장실험 처리방법

처 리 구	처 리 방 법
<i>Trichoderma harzianum</i> GBF-1048(근초고왕)시작품 정량	엽면 살포(발병 초) (1.0×10^8 , 500배 희석, 7일 간격 3회 처리)
<i>Trichoderma harzianum</i> GBF-1048(근초고왕)시작품 배량	엽면 살포(발병 초) (1.0×10^8 , 250배 희석, 7일 간격 3회 처리)
대조구	무처리



Fig. 65. 딸기 잭빛곰팡이병 방제 시험포장현장 및 약제살포(경기 평택)

Table 32. 딸기 잿빛곰팡이병 포장에 *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕)처리 방제가 (경기양평)

처리구	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)	약해시험 결과
	1	2	3	평균			
500배	10.2	8.8	9.7	9.6	a	56.0	약해 없음
250배	7.1	7.9	8.4	7.8	a	64.2	
무처리	27.4	18.2	19.7	21.8	b	-	-

C.V-----19.2%



Fig. 66. 딸기 잿빛곰팡이병 무처리구와 *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕) 처리구 비교

시험종류 (기간)	실험 동물	투여 방법	투여량	LD ₅₀	시험기관 (보고년도)	독성 구분
급성경구독성 /병원성 (21일)	랫드	경구 투여	1.0×10 ⁸	>1.0×10 ⁸	한국생물안전성 연구소(2014)	4급 (저독성)
급성경피독성 (14일)	랫드	경피 투여	1.0×10 ⁸	>1.0×10 ⁸	한국생물안전성 연구소(2014)	"
피부자극성 (72시간)	백색 토끼	피부 도포	5.0×10 ⁷ (cfu/0.5g)	비자극성 (5.0×10 ⁷ cfu/0.5g) (P.I.I. = 0, 0)	한국생물안전성 연구소(2014)	"
안점막자극성 (7일)	백색 토끼	결막낭내투여	1.0×10 ⁷ (cfu/0.1g)	비자극성 (1.0×10 ⁷ cfu/0.1g) (M.O.I. = 0, 0) (A.O.I. = 0, 0)	한국생물안전성 연구소(2014)	"

Fig. 67. *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕)의 인축독성시험 결과

구분	시험생물종	시험약제	LC ₅₀	시험기관 (시험년도)	독성 구분
담수 어류	잉어 (<i>Cyprinus carpio</i>)	2.0×10 ⁶ cfu/g	>2.0×10 ⁵ cfu/g	한국생물안전성 연구소(2014)	4급 (저독성)
꿀벌 급성접촉	꿀벌 (<i>Apis mellifera</i>)	1.0×10 ⁸ cfu/g (추천농도 100배)	>1.0×10 ⁸ cfu/g	한국생물안전성 연구소(2014)	안정적

Fig. 68. *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕)의 환경독성시험 결과

시험약제	유효성분 함량	대상작물	처리 방법	약해시험		약해정도(0~5)	
				기준량	배량	기준량	배량
근초고왕	<i>Trichoderma harzianum</i> GBF-1048 1.0×10 ⁸ cfu/g	고추 (슈피마니따)	엽면살포	500배	250배	0	0
		배추 (불암3호)				0	0
		상추 (선종2호상추)				0	0
		오이 (싱그런백다다기)				0	0
		콩 (백태)				0	0

Fig. 69. *Trichoderma harzianum* GBF-1048(근초고왕)의 환경독성시험 결과

시 험 성 적 서				
신 청 인	성 명	이 재 호	업 체 명	㈜ 그린바이오텍
	주 소	경기도 파주시 솔아래길 121-49(상지석동)		
	전 화	031-946-5614	FAX	031-946-5615
공 시 품	명 칭	근초고왕		
	형 태	분상		
유효미생물 동정		ITS rRNA 유전자 염기서열 해석		
유효미생물 생균수 측정		<ul style="list-style-type: none"> • 유전자 상동성 검색에 의한 동일균주 확인 • 희석평판법을 이용한 동일 균주의 계수 		
용 도		관공서 제출용		
시 험 결 과				
유효미생물		생균수 측정		
<i>Trichoderma harzianum</i>		1.0 × 10 ⁸ CFU/g		
<p>2014 년 8 월 12 일</p> <p>농촌진흥청지정 유기농업자재 시험연구기관 농촌진흥청지정 비료·농약 등의 시험연구기관</p> <p>목원대학교 미생물생태자원연구소장</p>				
<p>※ 본 시험성적서의 내용은 신청인이 의뢰한 시료에 대한 시험 결과로서 용도이외의 목적으로 사용함에 따라 발생하는 모든 사항에 대해서, 본 연구소는 그 어떠한 법적책임을 지지 않습니다.</p>				

Fig. 70. 근초고왕의 유효미생물분석결과

시 험 성 적 서				
신 청 인	성 명	이 재 호	업 체 명	㈜ 그린바이오텍
	주 소	경기도 파주시 솔아래길 121-49(상지석동)		
	전 화	031-946-5614	FAX	031-946-5615
공 시 품	명 칭	근초고왕		
	형 태	분상		
시 험 방 법		병원성미생물 선택배지를 이용한 확인시험		
용 도		관공서 제출용		
시 험 결 과				
병원성미생물 검사		검 출 여 부		
병원성 대장균		불 검 출		
병원성 살모넬라		불 검 출		
황색포도상구균		불 검 출		
리스테리아 모노사이토제네스		불 검 출		
바실러스 세레우스		불 검 출		
<p>2014 년 8 월 12 일</p> <p>농촌진흥청지정 유기농업자재 시험연구기관 농촌진흥청지정 비료·농약 등의 시험연구기관</p> <p>목원대학교 미생물생태자원연구소장</p> <p>※ 본 시험성적서의 내용은 신청인이 의뢰한 시료에 대한 시험 결과로서 용도이외의 목적으로 사용함에 따라 발생하는 모든 사항에 대해서, 본 연구소는 그 어떠한 법적책임을 지지 않습니다.</p>				

Fig. 71. 근초고왕의 유해미생물분석결과

제 10 절 Novel genotype 2,4-Diacetylphloroglucinol 생산 *Pseudomonas* sp. NJ134 이용 토마토 Fusarium 시들음병 방제

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* 에 의한 토마토 시들음병은 전 세계적으로 토마토에 심각한 피해를 초래하는 병이다 (Larkin and Fravel, 1998). Fusarium 시들음병의 초기 병징은 오래된 잎이 황화 증상이 보이고, 줄기의 유관부와 물관부가 갈색으로 변하는 병징을 보인다. 황화 병징은 전체 식물체에 보이기 시작하고, 고온에서 시들음 증상이 일어나고, 토마토가 고사한다 (Jones et al., 1991). 토마토 시들음병 발병억제 토양에서 분리된 비병원성 *F. oxysporum*과 *F. solani* 토마토의 Fusarium 시들음병의 발병을 현저히 감소시켰다 (Larkin and Fravel, 1998). 또한 Fusarium 시들음병 발병억제 토양에서 분리된 생물적 방제균, 특히 비병원성 *F. oxysporum*은 토마토 Fusarium 시들음병의 발병을 현저히 억제시켰다 (Jarvis, 1988). 토양에서 분리된 많은 *Pseudomonas*와 *Bacillus* spp. 또한 식물병 방제의 효능을 보였다 (Larkin and Fravel, 1998). 하지만, 아직까지 토마토 시들음병 방제를 위한 제품은 개발되지 않은 상황이다.

특정 작물의 뿌리나 근권에서 분리된 생물적 방제균들은 분리된 특정 작물에 적응된 생물적 방제균으로 다른 식물로 분리된 다른 생물적 방제균보다 특정 작물에 발생하는 병을 방제하는 능력이 높을 것이라고 보고되었다 (Cook, 1993). 전 세계적으로 항생물질을 생산하는 DAPG *Pseudomonas* 균주들이 분리되었고, DAPG를 생합성 유전자들은 분리된 지역별로 유사성이 높았다. 이들 유전적 다양성 연구에 따르면 DAPG를 생산하는 groups들이 유럽과 미국에서 분리된 균주들의 분석을 통해서 이루어졌다 (Keel et al., 1996; Landa et al., 2002a; Mavrodi et al., 2001; McSpadden Gardener et al., 2000). DAPG를 생산하는 *Pseudomonas* 균주들은 BOX-PCR analysis와 RFLP-*phlD* analysis을 통해서 17개의 다른 *phlD* genotypes (designated A - Q)로 분류되었다 (Landa et al., 2002a; Mavrodi et al., 2001; McSpadden-Gardener et al., 2000, 2001). 그러나 전 세계적 토양에서 존재하는 실제 genotypes과 이들의 지역별 차이는 알려져 있지 않았다 (McSpadden-Gardener et al., 2001). 예를 들어 genotype A은 체코, 가나, 이탈리아, 스위스, 우루과이, 미국의 여러 주에서 옥수수, 목화, 오이, 담배, 완두콩, 콩으로부터 분리되었고 (De La Fuente et al., 2006; Landa et al., 2002b; McSpadden-Gardener et al., 2000, 2005), genotype D은 프랑스, 독일, 스페인, 스위스, 미국의 여러 주의 여러 작물에서 분리되었다 (McSpadden-Gardener et al., 2000, 2005). 부가적으로 다른 모든 genotypes (A, B, D, E, F, G, I, J, L, O, P, T, 와 Q)들은 미국의 완두콩이나 밀 마름병 토양으로부터 낮은 농도로 분리되었다 (McSpadden-Gardener et al., 2000). 본 연구는 토마토 시들음병 Fusarium의 성장을 억제하는 세균을 전라남도의 토마토 포장에서 분리하, NJ134로 명명하고 이 균주의 특성을 규명하고자 하였다.

표 1. *Pseudomonas* sp. NJ134 특성

Test	NJ134		<i>P. fluorescens</i>	
	24 hour	48 hour	24 hour	48 hour
Denitrification (Nitrate reduction)	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-
Fermentation	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-
Hydrolysis (β -glucosidase)	-	-	-	-
Hydrolysis (protease)	+	+	+	+
API test*				
Nitrophenyl- β D-galactopyranosidase	-	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+
N-acetyl-glucosamine	-	-	-	-
D-Maltose	-	-	-	-
Potassium Gluconate	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Cell form	Rod			
Gram staining	-			
Number of flagella	(polar) > 1			
Endospore production	-			
Fluorescens pigment	+			

* API20 NE identification system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

Strain NJ134는 그람음성균이고, 짧은 간균, 주사전자현미경관찰에서 속생모를 가지고 있는 운동성이 있는 균주였다 (Table 1). 이 균주는 KB 배지에서 황갈색 형광성 색소를 생성하였고, 그람 음성균의 다양한 탄소원을 이용하는 패턴을 이용하여 동정하는 API20 NE identification system (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 분석해 본 결과 98%와 상동성을 보여 생화학적으로는 NJ134를 *Pseudomonas fluorescens* 균주 동정하였다. 또한 NJ134는 16S rDNA sequence analysis을 통해서 동정을 시도하였다. 이 균주의 16S rDNA는 fd1와 rP2 universal primers를 이용하여 증폭하여 이들 염기서열을 분석하였다 (Weisburg et al., 1991). NJ134균주로 증폭된 1.5 kb PCR product의 comparative 16S rDNA sequence analysis을 통해서 *Pseudomonas*와 가장 높은 상동성을 보였다. 분리된 strain NJ134의 16S rDNA sequence (1514 nt)는 GenBank에서 initial BLAST searches를 통해서 분석하였고, phylogenetic analyses을 수행하였다. Strain NJ134 균주는 *Pseudomonas lini*와 *P. fluorescens*와 가장 높은 상동성을 보였다 (Fig. 1). *Pseudomonas* sp. NJ134의 *in vitro* 항균활성을 다양한 식물병원 곰팡이병원균 *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* (KACC 40042), *Rhizoctonia solani* (KACC 40101), *Phytophthora infestans* (KACC 40718) and *Pyricularia grisea* (KACC 40417), *Botrytis cinerea* (KACC 40574) 과의 PDA(Difco Lab., Detroit, MI, USA)에서 dual growth에 의해 확인하였다. Strain NJ134는 토마토 시들음병원균인 *F. oxysporum*와 토마토 잿빛곰팡이병원균인 *B. cinerea*에 가장 강한 항균활성을 보였다.

Pseudomonas sp. NJ134의 주 항균활성 물질을 결정하기 위해, strain NJ134는 1% (w/v) mannitol을 첨가한 modified KB (proteose peptone #3 20 g, K₂HPO₄ 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.4 g per 1 L)에서 상온에서 7일 동안 호기 조건하에서 생육시켰다. Crude NJ134 metabolites는 다양한 동일한 양을 이용하여 추출하였다. 유기용매 추출 분획들은 바로 *in vitro*배지에서 식물병원 곰팡이병원균, *F. oxysporum*의 생육을 억제하는 능력을 조사하였다. *F. oxysporum*에 항균활성을 보인 추출물 중 ethyl acetate로 추출한 metabolite (Rf 0.62)가 5 mg/ml에서 81%의 생육 억제 효능을 보였다 (Fig. 2A). NJ134균주의 배양여액의 ethyl acetate추출 항균물질은 preparative thin-layer chromatography (Merck, Darmstadt, Germany)에 의해 정제하였다. 정제된 항균물질은 a single gas chromatographmass spectrometry (GC-MS) (Shimadzu Prominence, Tokyo, Japan)을 통해 a retention time이 21분인 peak를 보였다 (Fig. 2B). 정제된 항균활성 물질은 nuclear magnetic resonance (NMR)와 mass spectral analysis (Bruker Company, Bad Herrenalb, Germany)을 통해서 결정하였다 (Fig. 3C). 분리 정제된 mass spectrum는 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)로 알려진 ethanone 1,1-(2,4,6-trihydroxy-1,3-phenylene) bis로 일치하였다. ¹H와 ¹³C NMR, infrared spectra, melting point, 그리고 elemental analyses를 통해서 분리정제된 구조를 확인하였다. 현재까지 다양한 발병 억제 능력을 가진 항생물질이 화학적으로 동정되었는데, 질소 분자를 가진 heterocyclic인 phenazines (Brisbane et al., 1987; Gerber, 1969; Thomashow et al., 1990), pyrroltype antibiotics (Hashimoto and Hattori, 1966ab; Imanaka et al., 1965), pyo-compounds (Hays et al., 1945), and indole derivatives (Wratten et al., 1977) 등이 알려져 있다. 소수의 질소 분자를 가지지 않은 항균물질들이 형광성 *Pseudomonas*로부터 분리되었다 (Broadbent et al., 1976). 이들 항균물질 중에 DAPG는 다양한 식물 뿌리병을 방제하는데 이용되었다 (Haas et al., 1991; Keel et al., 1990).

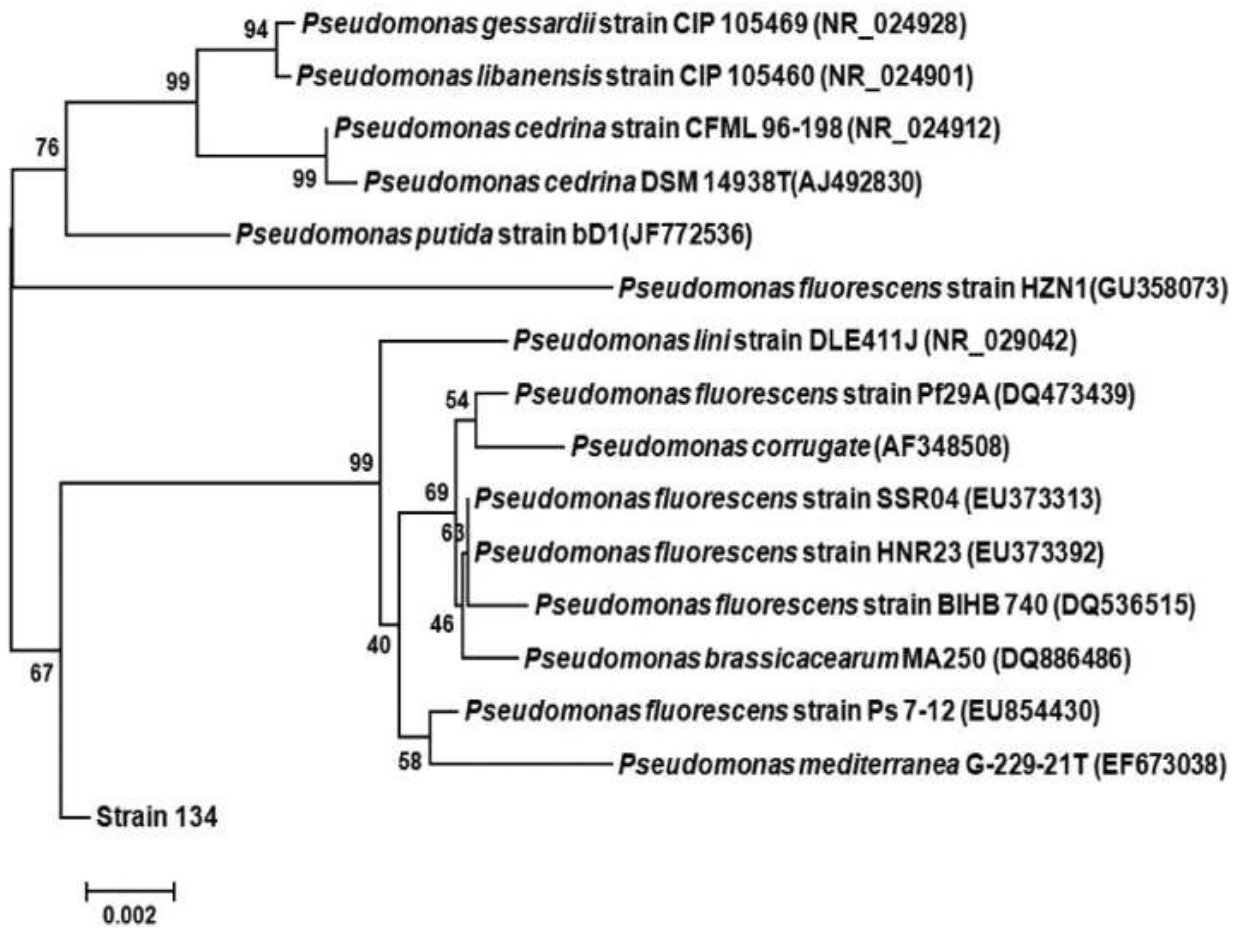


Fig. 1. NJ 134균주의 16S rDNA gene sequences를 이용한 Neighbor-joining tree 분석. Bootstrap values들은 1000 replicates의 퍼센트로 나타낸 것이다.

추가적인 GC-MS analysis analyses을 통해 NJ134균주가 DAPG를 생성하는지를 확인하였다. 추가적으로 DAPG생합성에 가장 중요한 *phlD* 유전자가 존재하고 발현되는 지를 알아보기 위해, *phlD* 유전자를 타겟팅하는 rapid PCR방법에 의해 분석하였다 (McSpadden-Gardener et al., 2001). NJ134의 *phlD* 유전자의 다양성에 기초한 genotype을 16S ribosomal DNA 유전자와 partial *phlD* gene sequence analysis의 phylogenetic analyses을 기존에 보고된 방법에 준하여 수행하였다 (McSpadden-Gardener et al., 2001). NJ134로 부터 Phl2a와 Phl2b primers (McSpadden Gardener et al., 2001)를 이용하여 626 bp *phlD* gene fragment를 증폭하였다. Phylogenetic analyses은 MEGA 4.0 software (Tamura et al., 2007)를 이용하여 neighbor-joining method 방법으로 분석을 하였다 (Fig. 3B). Strain NJ134의 BLAST tree 분석 결과, *P. fluorescens* strains 7MA20 (94%) and 7MA12 (93%) (O genotype) (Landa et al., 2002b; 2006) 그리고 MVW1 (P genotype)과 상동성이 가장 높았다. 증폭된 *phlD* 유전자의 PCR product의 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis을 통해 DAPG genotype을 결정하였다 (Fig. 3A). NJ134 *phlD* 유전자 PCR product size는 생물적 방제균인 *P. fluorescens* Pf-5와 유사하였다. NJ134 *phlD* 유전자 PCR product를 *Hae*III, *Msp*I, 혹은 *Taq*I로 절단한 후 RFLPs 분석을 통해 기존의 DAPG를 생산하는 *Pseudomonas* spp. CHA0, Pf-5, Q8r1-96, 1M1-96, 그리고 Q2-87 (McSpadden Gardener et al., 2001)와는 전혀 다른 genotype을 보였다 (Fig. 3A). *phlD* gene는 DAPG의 전구물질인 monoacetylphloroglucinol을 합성하는 polyketide synthase를 암호화한다고 알려져 있다 (Dwivedi and Johri, 2003). 이러한 결과는 본 연구에서 분리된 *Pseudomonas* spp. NJ134균주는 novel genotyp균주로 동정되었고, 한국 내에서 존재하는 DAPG를 생산하는 지리적으로 차이가 있는 균주일 것으로 사료된다.

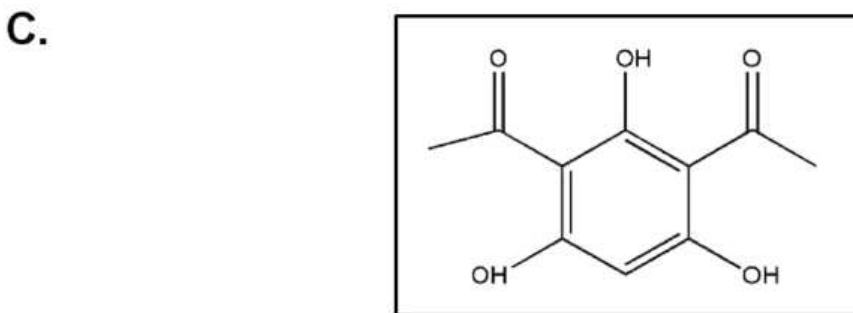
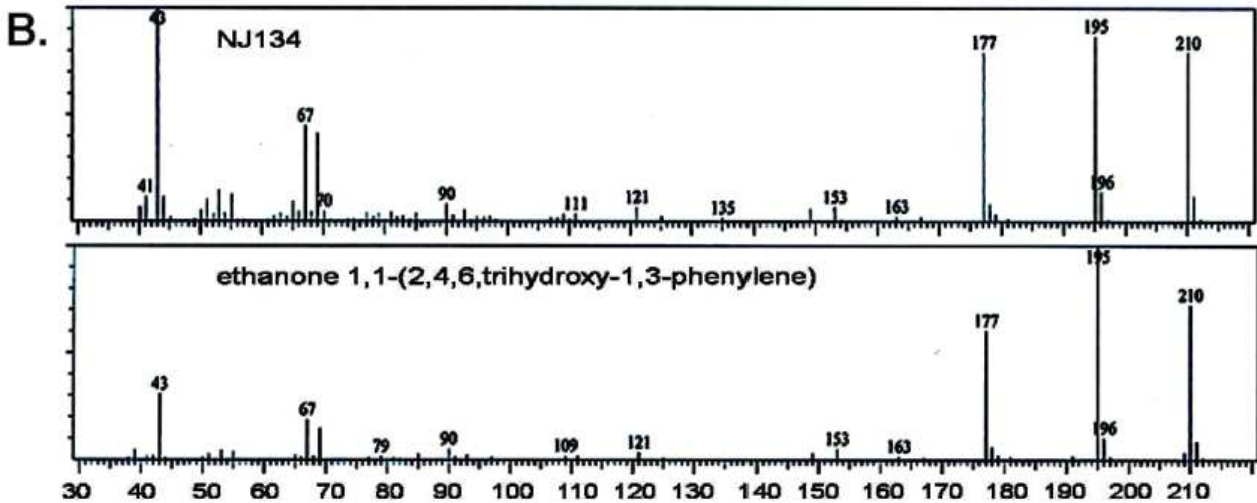
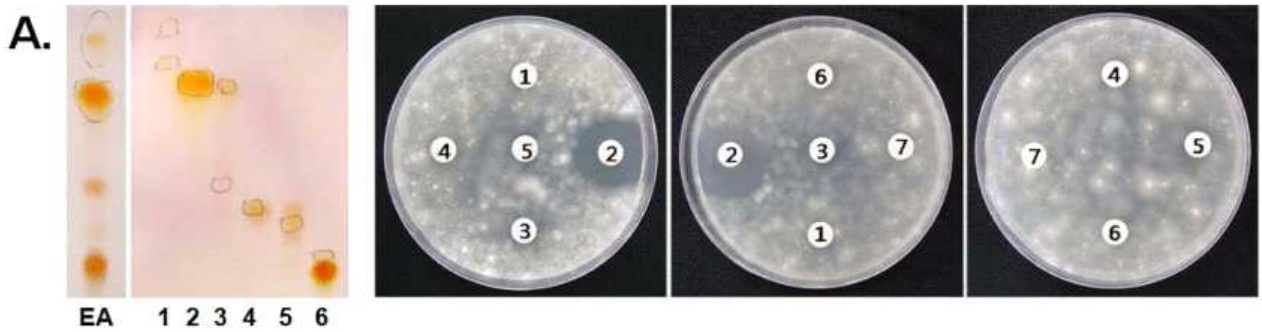
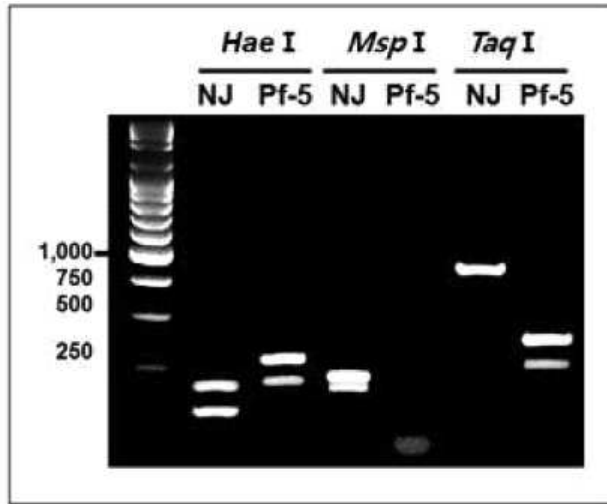


Fig. 2. *Pseudomonas* strain NJ134의 항균활성 물질 동정. NJ134균주가 생산하는 정제된 ethyl acetate(EA)로 추출한 항균활성물질의 thin layer chromatograph와 토마토 시들음병균 *F. oxysporum* 균사 생육 억제 (A). 1-6, EA extract; 7, Methanol (Control). 항균활성물질의 Gas chromatography-mass spectrometry spectra(B)와 대조 2,4-diacetylphlogucinol의 화학 구조(C).

A.



B.

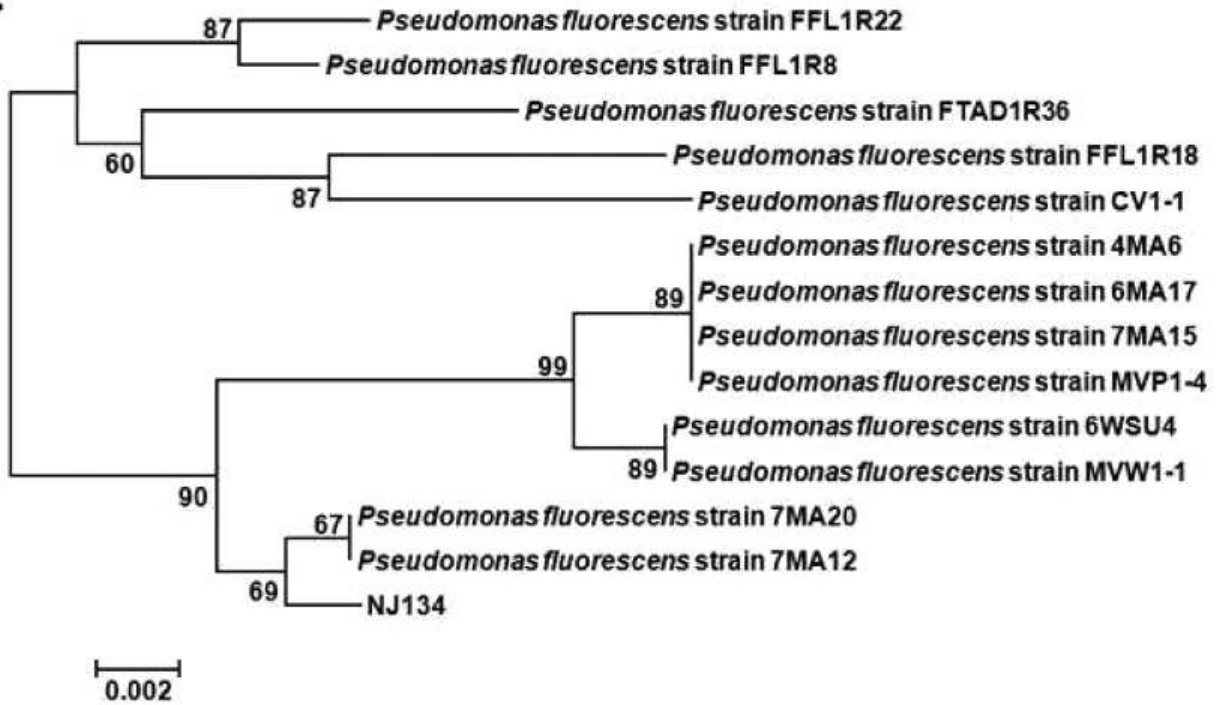


Fig. 3. *Pseudomonas fluorescens* strain Pf-5와 NJ134균주의 PCR 증폭 *phlD* gene의 제한효소 *Hae*III, *Msp*I, 또는 *Taq*I 절단 패턴 비교(A). 증폭된 *phlD*유전자의 phylogenetic 분석 결과 NJ134는 7MA12와 7MA20 (genotype O)와 가장 유사하였다(B).

일반적으로 생물적 방제 방법은 식물병 발생이 낮은 조건에서는 굉장히 효과적이지만, 식물병 발생 가능성이 높은 환경 조건하에서는 생물적 방제 효능이 현저히 감소한다 (Kim et al., 2010). 따라서 토마토 시들음병균 분생포자의 접종 농도에 발병심각도를 측정하였다 (Fig. 4A). 병원균은 이병 토양과 같이 접종하였다 (De Boer et al., 2003). 토마토 시들음병 이병 토양은 *F. oxysporum*을 이용하여 조제하였다. 병원균을 10% PDB (Difco Lab)에서 상온에서 진탕배양을 하면서 배양한 21일 후에, 균사체를 제거하기 위해 sterile glass wool을 통과시켜 제거하였다. Microconidia을 $8,000 \times g$ 에서 20분동안 원심분리하여 회수하여, 다시 10 mM MgSO₄로 재 현탁하여 다양한 농도의 분생포자를 potting soil-sand mixture (12:5, v/v)로 혼합하였다. 접종한 토양은 polyethylene bags에서 3 - 5동안 상온에서 보관한 후, 4도의 저온에서 저장하였다. 각 접종원의 생균수는 serial dilution 후, peptone pentachloronitribenzene (PCNB) medium에서 측정하였다 (Threlfall, 1972). 접종원은 멸균된 토양으로 희석하여 농도를 조절하였고, 실험은 각 처리구당 30개의 식물체를 이용하여 2번 수행하였다. 병원균을 접종한 후 토마토 시들음병의 발병 심각도 (0 - 5)를 측정하여 발병량을 측정하였다. 약 2주 후에, 1×10^4 spore g⁻¹ 토양을 접종한 토마토에서 잎에 황화 증상이 보이기 시작하였고, 병원균의 농도가 $> 1 \times 10^5$ spore g⁻¹ 토양에서 상위 엽이 시들음 증상이 보였고, 하위 잎은 고사하였다 (disease index, 4) (Fig. 4A). 하지만 $< 1 \times 10^4$ spore g⁻¹ 토양에서는 아무 병징이 보이지 않았다.

다양한 농도의 NJ134균주를 접종하고, 고농도의 병원균을 접종한 조건하에서 생물적 방제 능력을 검증하였다. DAPG생산 균주인 NJ134 genotype을 1×10^1 to 1×10^{10} cells g⁻¹ 토양 농도로 토마토 시들음병균인 *F. oxysporum* of 1×10^5 spore g⁻¹ 토양에 접종하여 생물적 방제 능력을 조사하였다 (Fig. 4B). NJ134균주의 접종 농도에 따라 토마토 시들음병의 생물적 방제 능력에 차이가 보였다. NJ134균주를 $> 1 \times 10^9$ cells g soil으로 접종한 처리구에서는 토마토 시들음병 발병 지수가 1.3였다 (Fig. 4B). 토마토 시들음병을 방제하기 위한 최적 NJ134균주의 농도는 $> 1 \times 10^{7.8}$ (disease index, 1.6)였다. 1×10^4 cells g 토양에서는 발병지수가 5.0 - 4.1로 생물적 방제 능력이 낮았다. NJ134를 고농도로 처리하였을 경우에는 어떤 약해의 증상을 보이지 않았다. 이러한 결과는 포장에서 NJ134균주가 적어도 1×10^8 이상이 존재해야 토마토 시들음병의 생물적 방제 능력이 발휘됨을 알 수 있었다. 기존의 보고에 의하면 미국 워싱턴 주에서 2,4-DAPG-producing fluorescent *Pseudomonas* spp.을 이용하여 밀 마름병을 방제하기 위한 한계농도는 10^5 CFU g root가 요구된다고 한다 (Weller et al., 2002). 따라서 10^8 CFU/ml NJ134 batch cultures를 이용하여 실제 포장하에서 토마토 시들음병 방제 능력을 측정하였다 (Fig. 5). 나주에 위치한 온실에서 18 - 20 엽기의 토마토를 이용하여 봄과 여름에 수행하였다 (Unicorn, Hungnong Seeds, Seoul, South Korea). NJ134균주는 정식 후 60일 동안 4번에 걸쳐 10^8 CFU/ml로 뿌리에 관주하였다. 토마토 정식 후 70일 후에 *F. oxysporum* 10^6 spore/g의 농도로 상층 접종하였다. 접종 후 6 - 8 weeks 발병 지수 (0 - 5)를 측정하였다. NJ134를 처리한 식물체는 평균 0.7 to 1.0의 발병율을 보였고, 무처리구에서는 2.5 발병지수를 보였다.

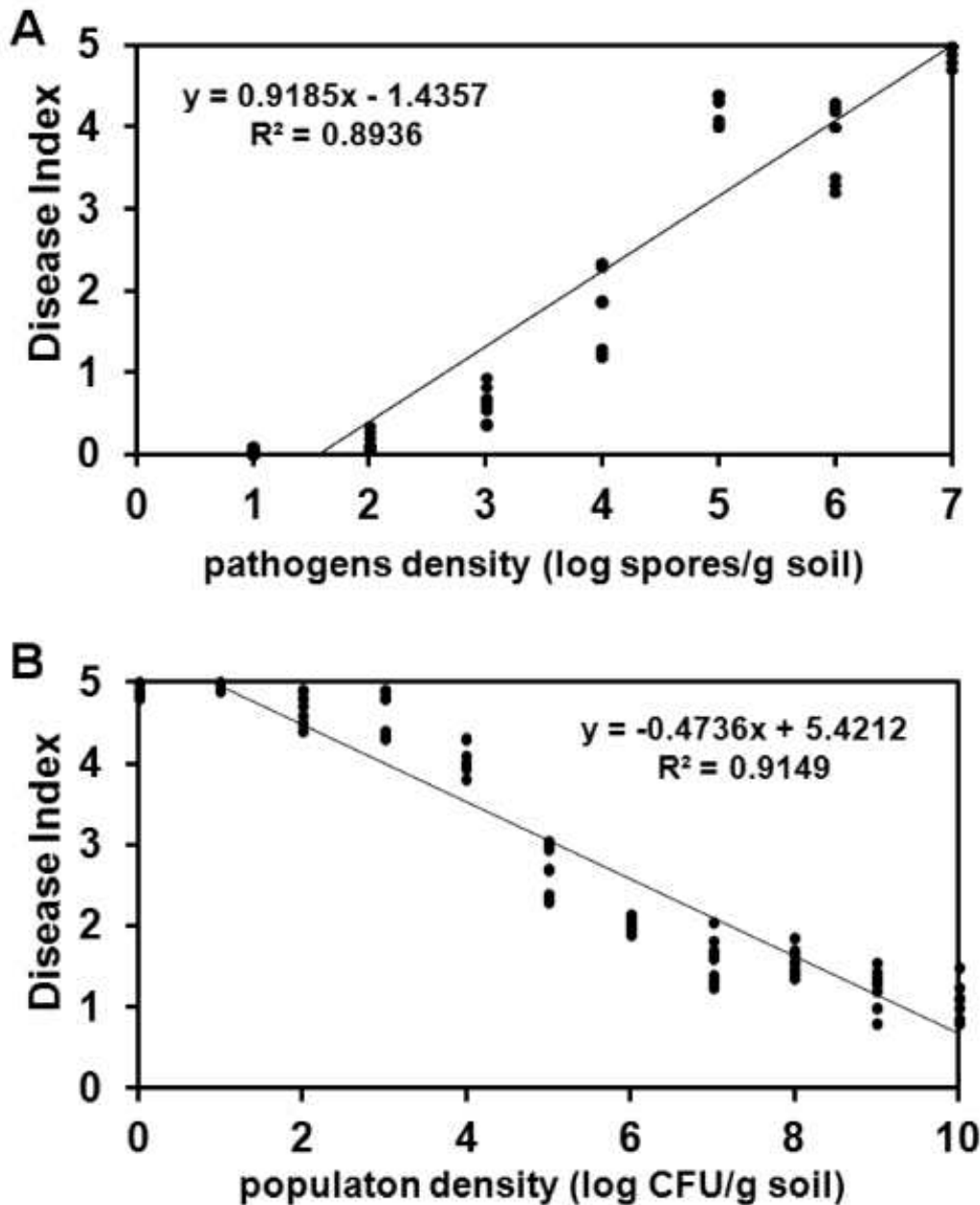


Fig. 4. A, 토양 중에 *Fusarium oxysporum* 밀도와 토마토 시들음병 발생량과 상관관계. 토마토 유묘를 토마토 시들음병균 *F. oxysporum*을 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 와 10^7 spore/g 토양에 처리하였다. B, *Pseudomonas strain* NJ134를 *F. oxysporum*이 10^5 CFU/g 토양 조건하에서 발병 억제 효과. 토마토 유묘를 NJ134로 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 와 10^{10} CFU/g 토양으로 처리한 다음 시들음병의 발병을 조사하였다. 발병지수 : 0 = 발병 무; 1 = 첫 번째 잎 황화; 2 = 하위 엽 황화; 3 = 하위 잎 고사와 상위 잎 일부 황화; 4 = 하위 잎 황화, 상위 잎 시들음; 5 = 고사. 본 실험은 처리구 당 30개의 식물체를 이용하여 2반복하였다.

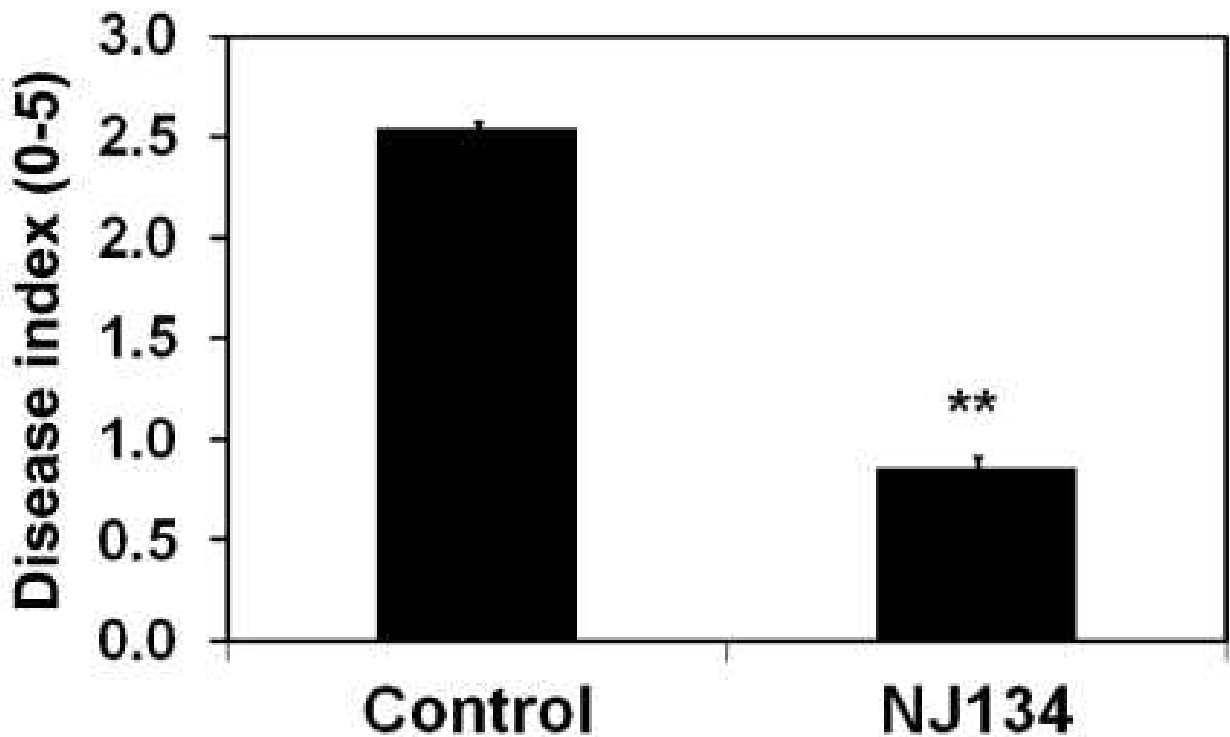


Fig. 5. 포장 하에서 NJ134균주의 처리에 의한 토마토 시들음병 방제 효능 검정. 세균은 KB에서 7일간 생육시킨 다음, 1×10^8 CFU/ml 농도로 정식 후 4회 관주하였다. 균주를 처리하거나 처리하지 않은 대조구는 토마토 시들음병균 *F. oxysporum* 10^6 CFU/mL로 상처 접종에 의해 온실에서 70일 동안 생육시킨 식물체에 처리를 하였다. 발병지수 : 0 = 발병 무; 1 = 첫 번째 잎 황화; 2 = 하위 엽 황화; 3 = 하위 잎 고사와 상위 잎 일부 황화; 4 = 하위 잎 황화, 상위 잎 시들음; 5 = 고사. 본 실험은 처리구 당 30개의 식물체를 이용하여 2반복하였다. ** student t-test에서 99% 수준에서 유의성 검정.

제 11 절 토마토 시들음병 방제용 2,4-diacetylphloroglucinol 생산 *Pseudomonas* sp. NJ134의 제형화 및 생물적 방제 효능

*Fusarium oxysporum*에 의한 Fusarium 시들음병은 전 세계적으로 토마토 재배지에서 경제적으로 큰 피해를 주는 토양병해이다 (Ishikawa et al., 2005). 지난 10여년 동안 급속한 유기농업의 확산에 의한 토마토 Fusarium 시들음병을 방제하는데 이용 가능한 생물적 방제제의 개발이 지속적으로 증가되고 있다. 다양한 항균활성을 가지는 여러 생물적 방제균들이 토마토 Fusarium 시들음병 방제제로서의 가능성을 보였다. 생물적 방제균 *Pseudomonas* spp., 곰팡이 *Trichoderma* spp., and non-pathogenic *Fusarium* 균주가 온실 조건하에서 토마토 Fusarium 시들음병 방제제로서의 가능성을 보였다 (Shishido et al., 2005; Yigit and Dikilitas, 2007). *Streptomyces* sp.의 talc based bioformulation 제형이 온실하에서 토마토 Fusarium 시들음병 방제에 이용되었다 (Anitha and Rabeeth, 2009). 여러 fluorescent *Pseudomonas* spp.들은 다양한 이차대사 산물, phenazines, pyrrolnitrin, 그리고 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)을 생산하기 때문에 생물적 방제제로 이용하기 위해 분리되었고 생물적 방제와 관련된 특성을 규명하기 위한 연구가 진행되었다 (Keel et al., 1996). DAPG는 광범위한 항균활성을 가진 polyketide antibiotic이고 다양한 genotypes과 다양한 지역에서 분리되는 fluorescent *Pseudomonas* spp.가 생산하는 항균물질이다 (Keel et al., 1996; Mavrodi et al., 2001; McSpadden-Gardener et al., 2000). DAPG를 생산하는 형광성 pseudomonads는 토마토에서 crown와 root rot, wheat take-all, 담배와 오이의 black root rot, 사탕수수 모잘록병, 그리고 토마토 Fusarium 시들음병에 억제하는 것으로 알려져 있다 (Dwivedi and Johri, 2003; Keel et al., 1996; KeU et al., 1992; Nowak-Thompson et al., 1994).

생물적 방제균의 생육배지와 영양분은 항균물질의 생산과 최종 밀도에 영향을 미치는 요인이다. *Pseudomonas* spp.에서 항생물질 DAPG glucose, gluconic acid, 그리고 zinc를 첨가해 주었을 때 고농도로 생산된다고 알려져 있다 (Duffy and Défago, 1997; 1999; Werra et al., 2009). 비록 토마토 Fusarium 시들음병을 방제하기 위한 여러 가능성이 높은 생물적 방제제가 분리되었고 생물적 방제와 관련된 특성에 대한 연구가 진행되었지만, 포장 하에서 효과적으로 토마토 Fusarium 시들음병을 방제에 활용되는 보고는 아직 없다. 효과적인 토마토 Fusarium 시들음병 생물적 방제제를 개발하기 위해, strain NJ134 한국의 전라남도 지역의 suppressive soils에서 분리되었다 (Lee, 2009). 토양에서 분리된 생물적 방제균 NJ134는 여러 중요한 식물병원성 곰팡이(KACC 40037)의 생육을 억제하는 능력이 우수한 균주였다. 16S ribosomal DNA sequence analysis에 의해 the bacterial strain은 *Pseudomonas* sp. (GenBank: FJ627993.1, National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S.A.)로 동정되었다. NJ134균주에서 분리 정제한 항균물질은 GC-MS, IR, and NMR analysis을 통해서 polyketide, 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)로 동정되었다 (Kang, 2012).

본 연구에서는 DAPG producer *Pseudomonas* sp. NJ134를 mannitol과 sucrose를 탄소원으로 이용하여 저가 고효율 생육배지를 개발하여 효율적인 제형화를 개발하고자 하였다. 제형화된 세균의 시제품을 장기간 보관 능력과 생물적 방제의 능력을 결정하고자 하였다. 부가적으로 포장하에서 토마토 Fusarium 시들음병을 효율적으로 억제하는 시제품의 농도를 결정하고자 하였다. 본 연구를 통해서 *Pseudomonas* sp. NJ134가 생산하는 DAPG가

Fusarium oxysporum 생육을 억제하고 토마토 *Fusarium* 시들음병을 방제하는 주 물질임을 밝혔다.

Fluorescent pseudomonads들은 다양한 항균물질들, phenazines, pyrrolnitrin, 그리고 DAPG를 생산하고 이들 이차대사산물들이 다양한 작물의 병의 생물적 방제에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Keel et al., 1996). 균주 NJ134의 항균물질은 ethyl acetate를 유기용매로 추출하였다. Strain NJ134배양액에서 항균물질 분리와 검출은 기존의 보고에 준하여 실시하였다 (Whister et al., 2000). Strain NJ134는 5 ml의 1% (wt/v) mannitol 혹은 glucose를 함유한 modified KB (proteose peptone #3 20 g, K₂HPO₄ 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.4 g per L)에서 배양하였다. NJ134 배양액의 ethyl acetate extracts의 High performance liquid chromatography analyses에 의해 3.4분의 an elution time을 가진 한 개의 peak가 가장 높은 항균활성을 보였다 (data not shown). Glucose를 함유한 KB배지에서 정체기까지 배양한 NJ134균주에서 DAPG (0.07 µg/ml/10⁵ colony forming units (cfu)만큼 생성이 되었다. 하지만, 배지에 유일한 탄소원으로 mannitol을 추가하였을 때 약 50배 이상 3.97 µg/ml/10⁵ cfu DAPG가 유의성이 있게 증가하였다 (Table 1). 다른 탄소원을 배지에 추가하였을 때 항균물질의 생산이 다르다는 보고가 있다. *P. chlororaphis* O6에서 항균물질 pyrrolnitrin 생산은 생육배지에 glucose가 첨가되었을 때 생산되지 않았지만, phenazine 생산량은 증가하였다 (Park et al., 2011).

본 연구에서 mannitol를 생육배지에 추가하였을 때 *Pseudomonas* sp. NJ134에서 고농도의 DAPG가 생성됨을 밝혔다. 부가적으로 mannitol를 배지에 추가하였을 때 NJ134 균주의 밀도가 1.72 × 10⁹ cfu/ml로 glucose를 첨가한 배지에서의 밀도 1.63 × 10⁸ cfu/ml의 밀도보다 유의성이 있게 높았다 (Table 1). 토마토 *Fusarium* 시들음병균인 *F. oxysporum*의 생육도 NJ134균주를 mannitol을 첨가한 배지에서 생육한 균주가 glucose를 유일한 탄소원으로 첨가한 배지에서 생육한 것보다 높았다 (Table 1). DAPG 생산은 mannitol을 탄소원으로 하여 생육시킨 NJ134에서 glucose를 탄소원으로 배양시킨 균주보다 약 1.5배 이상 높은 양을 생산하였다. 하지만, lactose나 glucose를 탄소원으로 배양한 다른 배지 조건하에서 DAPG생산량이 극소수로 생성되었다. NJ134 균주에서 mannitol첨가 농도가 DAPG생산과 병원균의 생육을 억제하는 능력과 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다. Glucose는 *P. fluorescens* HV37a에서 항균물질인 pyrrolnitrin (PLT)을 생산(Douglas and Guttererson, 1986)과 *P. fluorescens* Pf-5에서 DAPG생산이 (Nowak-Thompson et al., 1994) 최적조건이었지만, 일부 fluorescent pseudomonads (Karus and Loper, 1995; Park et al., 2011; Shanahan et al., 1992)에서 PLT 생성에는 관여하지 않은 것으로 알려져 있다. 이러한 결과는 생물적 방제균에서 항균활성 물질의 생산은 배지의 탄소원에 의해 영향을 받는다는 것을 증명한 것이다 (Park et al., 2011; Shanahan et al., 1992; Yuan et al., 1998). Ethanol을 탄소원으로 이용하였을 때, 생물적 방제균인 *P. fluorescens* S272에서는PLT와 DAPG생성이 증가되었고 (Yuan et al., 1998), *P. aeruginosa*와 *Pseudomonas* strain에서 rhamnolipids 생성이 증가되었다 (Matsufuji et al., 1997; Osman et al., 1996). 생물적 방제균 *P. fluorescens* Pf-5에서 Pyoluteorin 생성이 glucose를 첨가한 배지에서 증가하였지만, glycerol을 첨가하였을 때는 생성량이 감소하였다 (Karus and Loper, 1995). 이러한 결과를 종합해 보면, *Pseudomonas* NJ134균주에서 토마토 *Fusarium* 시들음병균인 *F. oxysporum*의 생육을 억제하는 DAPG의 생성이 생육배지의 carbon source에 의해서 영향을 받는 것을 암시한다.

Table 1. *Pseudomonas* strain NJ134의 탄소원에 따른 향생물질 생산, 밀도와 *in vitro* 항균활성

Carbon source ^a	2,4-diacetylphloroglucinol ($\mu\text{g/ml}/10^5 \text{ cfu}$) ^b	Population density (cfu/ml) ^c	Inhibition rate (%) ^d
Mannitol	$3.97 \pm 0.12 \text{ a}^e$	$1.72 \times 10^9 \text{ a}$	$83.3 \pm 5.52 \text{ a}$
Glucose	$0.07 \pm 0.02 \text{ d}$	$1.63 \times 10^8 \text{ b}$	$66.4 \pm 2.17 \text{ c}$
Sucrose	$3.01 \pm 0.08 \text{ ab}$	$1.19 \times 10^9 \text{ ab}$	$76.1 \pm 2.48 \text{ ab}$
Glycerol	$0.75 \pm 0.05 \text{ b}$	$1.01 \times 10^9 \text{ ab}$	$74.5 \pm 5.70 \text{ b}$
Lactose	$0.31 \pm 0.04 \text{ c}$	$4.52 \times 10^8 \text{ b}$	$68.2 \pm 4.06 \text{ bc}$

a 세균은 1%의 다른 탄소원을 가진 KB에서 7일 동안 배양하였다.

b 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) 생산량은 high performance liquid chromatography를 이용하여 측정하였고, DAPG/세균 밀도(10^5 cfu)로 표시하였다.

c 생균수는 배양액을 희석한 다음 KB agar 배지에서 측정하였다.

d 생육억제 능력은 PDA배지 하에서 측정하였다.

e 3반복 평균과 표준편차를 표시한 것이다. 다른 문자는 Duncan's multiple range test($P = 0.05$)에서 유의성 검정에 차이가 있음을 나타낸 것이다.

따라서, 본 연구에서는 *in vitro*에서 토마토 Fusarium 시들음병균인 *F. oxysporum* 병원균의 생육을 효과적으로 억제하는 *Pseudomonas* sp. NJ134균주의 제형화를 의해 분쇄된 lupin bean (*Lupinus luteus*)을 이용하여 조제하였다. 간단하게 설명하면, strain NJ134를 서로 다른 탄소원을 함유하고 있는 liquid KB medium에서 48시간 동안 shaking을 하면서 상온에서 생육시켰다. 루핀 콩 (1 kg)을 carrier materials로 wooden hammer로 분쇄하고, 2일간을 30분 동안 고압멸균하여 멸균하였다. 균 배양액을 1×10^8 cfu/ml로 조정하고 500 ml의 균 배양액을 1 kg의 멸균된 콩에 1% 서로 다른 탄소원에 혼합하였다. 세균 배양액과 콩은 멸균된 polythene bag에서 혼합하였고, 밀봉한 다음 일정기간동안 상온에 보관하였다. 각 10 g의 제형화된 시제품을 상온 보관 후 7, 30, 60 일 후에 DAPG 생산량과 생균수를 측정하였다 (Table 2). Mannitol을 첨가한 제형화 시제품에서 정제한 물질에서 DAPG 생성과 관련된 retention time이 4.58 min인 주 peak가 배양 후 60일 후에 관찰되었는데, 이 peak는 DAPG standard (2,4-diacetylphlorogulcinol, Toronto Research Chemicals Inc.)의 retention time인 4.48 min과 비슷한 시간대에서 관찰되었다. DAPG생산량은 mannitol을 첨가한 배지에서 glucose를 첨가한 배지보다 약 2.7배의 높은 생산량을 보였다. Strain NJ134을 제형화된 시제품 조제 시 DAPG생성 최적 조건으로 mannitol을 첨가하여 시제품을 조제하였다. 유의성있게 많은 양의 DAPG가 bean-based formulation 제형화 조건에서 생성되었고, NJ134을 생육시켰을 때 mannitol을 첨가하였을 때 *in vitro*에서 토마토 Fusarium 시들음병균인 *F. oxysporum*에 대한 가장 높은 항균활성을 보였다 (Table 2). 본 연구에서 제형화된 DAPG producer인 NJ134균주는 mannitol을 탄소원으로 생육시켰을 때 토마토 Fusarium 시들음병균인 *F. oxysporum*에 대해 강한 항균활성을 보였고, 토마토 Fusarium 시들음병 억제에 효율적이었다.

탄소원의 추가가 항균활성에는 양성적인 효능을 보였지만, 장기간 생존에는 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 제형화된 시제품을 상온에 보관하면서 생균수를 측정하였다. 장기간 보관 시 생존율은 NJ134 균주를 glucose를 첨가한 배지에서 생육시킨 시제품과 첨가하지 않은 대조구에서 mannitol을 첨가한 배지에서 생육한 균주의 시제품의 60일 후의 생균수보다 현저히 낮았다 (Table 2). 이러한 결과는 생물적 방제균의 생육배지와 영양분이 균주의 밀도와 생존율에도 영향을 미치는 것을 암시한다. 이러한 결과는 고분자 물질인 sucrose가 *Pseudomonas*와 *Enterobacteriaceae*의 생존율을 높였다는 결과 (Caesar and Burr, 1991) *Rhizobium* spp.의 분말 제형에서 생존율을 높였다는 결과 (Bushby and Marshall, 1977)와 유사하다. 또한, mannitol과 bean-based formulation의 synergy효능이 토양에서 안정성에 중요한 요인으로 작용할 것으로 사료된다. 항생물질의 생산을 활성화시키고 균주의 밀도를 높인다는 여러 보고가 있다 (KeU et al., 1992; Leeman et al., 1996; Raaijmakers et al., 1999; Wood et al., 1997). Mannitol존재 하에서 장기간 생존율이 증가하다는 직접적인 증거를 본 연구에서는 제시하지 못하여, 현재 mannitol이 균주의 장기간 생존율에 중요한 물질로 작용하는 지에 대한 가능성을 검토하고 있다.

Table 2. 다른 탄소원을 이용하여 제형화된 *Pseudomonas* strain NJ134의 항생물질 생산, 밀도와 *in vitro* 항균활성

Carbon source ^a	DAPG ($\mu\text{g/g}$ of formulation) ^b	cfu/g of formulation ^c at different days after treatment			Inhibition rate (%) ^d
		7	30	60	
Mannitol	0.19 ± 0.02 a ^e	8.27×10^8 a	2.97×10^8 a	1.65×10^7 a	71.5 ± 0.73 a
Glucose	0.07 ± 0.01 b	5.79×10^7 b	1.90×10^6 b	2.41×10^5 b	65.5 ± 0.52 b
Control	0.04 ± 0.01 c	4.06×10^6 b	2.20×10^4 b	8.05×10^2 b	40.9 ± 1.51 c

a 세균 배양액을 1 kg 멸균된 콩과 1% 탄소원을 첨가한 다음 건조시켰다. 대조구는 제형화된 시제품에 탄소원을 첨가하지 않은 것을 이용하였다.

b 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) 생산량은 liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS/MS)로 측정하였고, DAPG생산량은 1 g의 콩 기반 제형 시제품으로 나타냈다.

c 생균수는 배양액을 희석한 다음 KB agar 배지에서 측정하였다.

d 생육억제 능력은 PDA배지 하에서 측정하였다.

e 3반복 평균과 표준편차를 표시한 것이다. 다른 문자는 Duncan's multiple range test(P = 0.05)에서 유의성 검정에 차이가 있음을 나타낸 것이다.

Mannitol은 다양한 생물체에서 compatible solute와 osmoprotectant로 작용한다고 알려져 있다. Gram-negative bacteria에서 균의 생존율은 영양분이 고갈되는 정체기에서 배지의 산성화 혹은 산화스트레스에 의해 급격히 감소한다고 알려져 있다 (Ferreira et al., 2001; Kets et al., 1996; Nystrom, 2001). 자연상태에서 존재하거나 인위적으로 접종된 생물적 방제균인 DAPG 생산 균주들은 자연상태하에서 다양한 abiotic 혹은 biotic 변화에 처하게 될 것이다. 여러 abiotic factors로서는 특정 탄소원이나 질소원들이 생물적 방제균인 *Pseudomonas* spp.에서 *in situ*하에서 항생물질 생산에 중요하다는 보고가 있다 (Duffy and Defago, 1997; Shanahan et al., 1992; Slininger and Jackson, 1992). Biotic 요인으로는 DAPG를 생산하는 생물적 방제균의 항생물질 생산을 조절에 중요한 역할을 하는 균주의 밀도가 중요한 역할을 할 것이다 (Raaijmakers et al., 1999). 다양한 탄소원을 첨가한 bean-based bioformulation들은 온실 하에서 토마토 Fusarium 시들음병 방제 효능을 검정하였다. 서로 다른 시제품들은 plastic pots (200 × 40 × 30 cm)에서 멸균된 vermiculite와 sand을 1:1 (v:v)로 혼합한 토양과 혼합하였다. 토마토 유묘 (n = 18 - 20; Unicorn, Hungnong Seeds, Korea)를 시제품을 처리한 포트에 옮긴 7일 후에, 병원균들을 오염된 토양과 같이 처리하였다 (Marjan et al., 2003).

병원균은 호기조건하에서 CMCLM 배지 (15 g of carboxymethyl cellulose, 1 g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g of KH_2PO_4 , 0.5 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 1 g of yeast extract per liter)를 이용하여 상온에서 배양하였다 (Cappellini and Peterson, 1965). 상온에서 배양한 21일 후에, 배양액을 멸균된 sterile glass wool을 이용하여 응축된 균사체를 제거하였다. 거대 분생포자는 8,000 × g에서 20분 동안 원심분리하여 회수하여 10 mM MgSO_4 에 재현탁하였고, potting soil-sand mixture (12:5, v/v)와 1×10^3 spore/g soil가 되게 혼합하였다. 접종된 토양은 polyethylene bags에서 3일 동안 상온에서 배양한 다음 병원균의 potting 토양 생물 검정에 이용하였다. 병원균을 접종한 60일 후에 식물체의 외부 시들음 증상과 내부 갈색 병반을 조사하였다 (Leeman et al., 1996). 각 실험은 처리구당 30개의 식물체를 이용하였고, 2반복으로 수행하였다. 시제품의 토마토 시들음병 방제의 생물적 방제 능력을 조사해 본 결과, mannitol을 첨가한 시제품에서 시들음병의 생물적 방제에 효능을 보였다. 토마토 시들음병의 심각도는 시제품을 처리한 구에서 현저히 감소하였고, 시제품에 mannitol을 첨가한 시제품 처리구에서 생물적 방제 능력이 가장 높았다 (Table 3).

Table 3. 온실 하에서 제형화된 NJ134의 탄소원과 농도별 토마토 시들음병 억제 능력 검정

Carbon source ^a	Disease index (0–5) ^b at dosage of application (g/pot)		
	100	200	300
Mannitol	1.5 ± 0.46 a ^c	1.4 ± 0.20 a	0.7 ± 0.15 a
Glucose	2.7 ± 0.11 b	2.1 ± 0.23 b	1.4 ± 0.16 b
Control	3.3 ± 0.12 b	3.0 ± 0.22 c	2.9 ± 0.10 c
Control (Bean)	3.9 ± 0.31 c	3.5 ± 0.30 c	4.1 ± 0.13 d

a NJ134균주를 1% 탄소원을 첨가한 KB배지에서 2일간 생육시킨 다음, 약 1×10^9 cfu/ml의 500배양액에 1 kg의 콩과 1% 탄소원을 첨가한 다음 멸균된 polythene bags에서 잘 혼합하였고 밀봉하여 건조시켰다. 콩 기반 제형된 시제품은 다양한 농도로 온실에서 토양 혼합하여 처리하였다. 각 실험은 처리구별로 30개의 식물체를 가지고 2반복을 수행하였다.

b 발병지수 : 0 = 발병 무; 1 = 첫 번째 잎 황화; 2 = 하위 엽 황화; 3 = 하위 잎 고사와 상위 잎 일부 황화; 4 = 하위 잎 황화, 상위 잎 시들음; 5 = 고사. 본 실험은 처리구 당 30개의 식물체를 이용하여 2반복하였다. ** student t-test에서 99% 수준에서 유의성 검정 .

c 3반복 평균과 표준편차를 표시한 것이다. 다른 문자는 Duncan's multiple range test(P = 0.05)에서 유의성 검정에 차이가 있음을 나타낸 것이다.

Mannitol과 glucose을 첨가한 제형화된 제품 모두 고농도로 처리 (300 g/pot)하였을 때는 저농도로 처리 (100 or 200 g/pot)한 구 보다 훨씬 더 높은 생물적 방제 효능을 보였다. 더불어, *Pseudomonas* sp. NJ134 는 시제품에 mannitol을 첨가한 시제품을 처리한 구에서 높은 균주의 밀도가 확인(5.33×10^6 cfu/g of root)되었고, glucose를 첨가한 시제품을 처리한 구에서 뿌리에서 약 6.33×10^4 cfu/g of root가 처리 후 60일 후에 검출되어 mannitol을 첨가한 시제품을 토양에 접종하였을 높은 균주의 밀도가 유지되었다. 비록 그램 양성 생물적 방제균의 제형화된 제품, 즉 내생포자를 형성하는 *Bacillus* 균주들의 경우는 다양한 균주들이 미생물 농약으로 제품화되어 이용되고 있지만, 단지 몇 종류의 그램 음성 생물적 방제균이 미생물 농약으로 등록되어 이용되고 있는 가장 큰 이유는 제형화된 제품의 short shelf 기간이 가장 큰 문제점이다. 여러 키틴 분해 미생물과 키틴 분말을 영양분으로 현장 배양용으로 개발된 효과적인 생물적 방제 제형방법이 효과적으로 고추의 역병을 방제 (Kim et al., 2008)과 인삼의 탄저병이나 *Alternaria* 잎마름병을 포장에서 방제하는데 활용되었다 (Kim et al., 2008; 2010). 본 연구에서도 동일한 방법으로 키틴분해 미생물과 배지를 이용하여 상기의 방법으로 토양 선충을 성공적으로 방제하는데 활용되었다. 결론적으로, 본 연구는 NJ134의 제형화된 제품에서 DAPG가 중요한 역할을 수행하고 있으며, 토마토 *Fusarium*시들음병 방제에 효율적임을 밝혔다. 본 연구에서 개발된 bean-based formulation 는 저가 고효율적인 방법으로 그램 음성균을 생육시키는 영양분으로 이용됨을 밝혔다. 시제품 조제 시 Mannitol을 첨가하여 DAPG생성량을 증대시키고 장기간 생존율을 증가시키는 보조제로 활용될 수 있음을 밝혔다. 제형화된 시제품은 DAPG생산량이 최대가 생산될 수 있도록 최적화된 배지 조건일 뿐만 아니라 장기간동안의 생존율이 증가되어, 제형화된 균주의 배양 현탁액은 토마토 시들음병을 효율적으로 방제하는데 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에 의해 mannitol을 이용하여 NJ134균주의 DAPG생산량을 증가시켜 토마토 시들음병을 방제하는 능력을 증진시켰다. 따라서 이러한 특성을 이용하여 토마토 시들음병을 효율적으로 방제하고 시제품의 shelf life를 증가시킬 수 있는 효율적인 제형화된 시제품을 조제하였다. 이렇게 제형화된 제품은 이러한 생물적 방제균들이 고도로 특이적이고, 친환경적이고, 저가인 점을 감안하면 수확량을 증대시킬 수 있는 생물적 방제 방법으로 병을 관리하는 방제제로 활용될 수 있을 것으로 사료된다 (Commarea et al., 2002; Vidhyasekaran et al., 1997). 부가적으로 이러한 시제품은 포장에서 활용될 수 있도록 제품화를 통해서 현재 유기목록자재로 등록하여 판매되고 있다.

제 12 절 토마토 시들음병 방제용 시제품 및 사용 매뉴얼 제작을 이용한 포장 실증 실험

다양한 천연자원을 이용한 미생물 대량 배양용 천연배지를 개발하기 위하여 다양한 탄소원을 이용하여 액상과 입상을 조제하여 생균수와 배양원별 항균활성을 먼저 측정하였다 (Table 1). 토마토 시들음병 방제균 슈도모나스 NJ134를 배양원(탄소원)별 항균활성능력은 녹두 추출물을 배양원으로 사용한 경우 82%의 우수한 방제효율을 나타냈다. 슈도모나스 NJ134를 각 탄소원별 배양체와 루핀을 혼합하여 만든 시제품에서 루핀 추출물에서 배양한 처리구에서 71%의 항균활성능력을 나타냈다 (Table 2).

1. 천연배지 기질 이용 대량배양조건 확립과 시제품 개발

토마토 시들음병 방제균주 슈도모나스 NJ134의 대량배양조건을 확립하기 위하여 탄소원 중 마니톨이 함유된 배양액에서 9.24 Log₁₀ cfu/ml로 가장 높은 성장능력 (Table 3)을 보였으며, 항균능력도 시들음병균에 대해 평균적으로 83%의 높은 저지율 (Table 4)을 나타냈다.

각 탄소원별 배양액에 생성된 항균물질(DAPG)을 HPLC로 측정된 결과 마니톨 배양액에서 3.4분에서 3.97μg/ml/10⁵ CFU의 DAPG가 생성되었다 (Fig. 1).

슈도모나스 NJ134의 생육에 알맞은 기질을 이용한 시들음병 방제용 시제품을 개발하기 위하여 루핀(*Lupinus luteus*)과 혼합한 각 배양원을 60일 동안 보관하면서 조사한 결과 마니톨 시제품이 7.22 Log₁₀ cfu/ml/60일 성장능력 (Table 5)과 71.5% 항균활성능력(Fig. 1)으로 가장 우수하였으나, 글루코스 등의 시제품은 가장 낮은 활성을 나타냈다.

위의 결과를 활용하여 토마토 시들음병 방제용 시제품 제작하기 위해 곡성생물방제연구원의 발효기를 이용하여 조제하였고, 대량배양조건은 아래와 같다.

1. 30 L 배양(종균) : 27°C, pH 6.5~7.5, 150 rpm, 9 L air(0.3 vvm), 24시간 배양
2. 3,000 L 배양 : 27°C, pH 6.5~7.5, 75 rpm, 900 L air(0.3 vvm), 108시간 배양
3. 수확 : Ceramic membrane filter system 이용, 최종 300 L
4. 동결건조 : 5% Mannitol과 4% skim milk(부피 기준) 혼합 후 -45°C까지 동결 후 진행

슈도모나스 NJ134의 대량배양용 시제품을 1차, 2차, 3차 제작 (Table 6) 후 생존능력을 장기간 조사한 결과 마니톨을 함유하여 제작한 3차 시제품의 생존능력이 초기에는 가장 낮았지만, 30일이 지속되는 동안 증가하는 경향을 나타냈으며 시들음병균에 대한 항균활성능력도 80.6%로 가장 우수하였다 (Table 7).

2. 기본 제형 및 약효 증진용 보조제 농도별 최적성분 확립

기질을 이용한 시제품을 보완하기 위하여 효모추출액과 미량요소(구리, 아연, 몰리브덴 등)를 첨가하여 조사한 결과 마니톨 함유 시제품보다는 생균수와 시들음병균 저지율은 낮았다 (Table 8; Fig. 3).

이렇게 조제한 시제품을 다양한 농도로 처리하여 포장하에서 시들음병 방제 능력을 온실에서 검정하였다. 마니톨 함유(10⁸ cfu/ml) 시제품을 이용한 온실검정 결과 600kg/10a로 처리하였을 경우 97%의 높은 방제효율을 나타냈다 (Table 9).

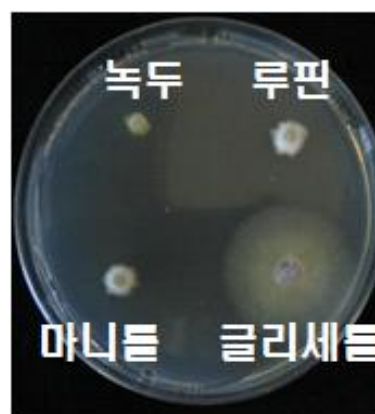
Table 1. 배양원별 항균활성능력(액상)

탄소원	성장능력 (OD _{600nm})	생균수 (cfu/ml)	항균활성능력(%)		
			대치법	침지법	평균
글리세롤	3.86 ± 0.11	2.70×10 ⁹	65.6±1.35	72.3±2.24	65.6
마니톨	4.27 ± 0.09	1.07×10 ¹⁰	72.3±0.83	73.5±1.62	72.9
녹두 추출물	4.82 ± 0.12	1.09×10 ¹⁰	80.1±0.96	81.6±0.64	80.1
루핀 ^a 추출물	4.31 ± 0.18	1.85×10 ¹⁰	79.5±2.33	80.4±1.36	80.0

^a lupin bean (*Lupinus luteus*)



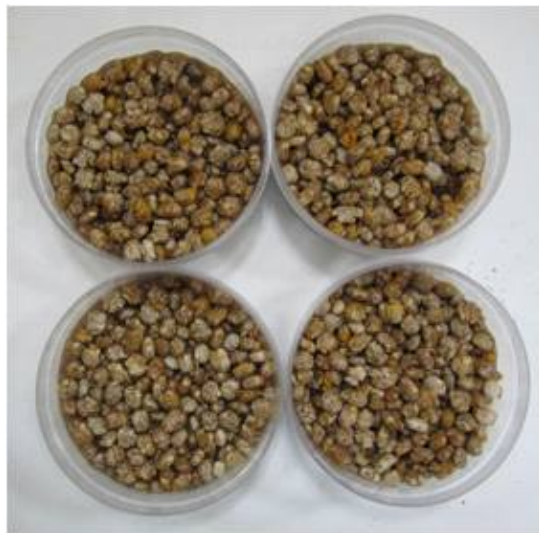
【배양원별 미생물 배양액】



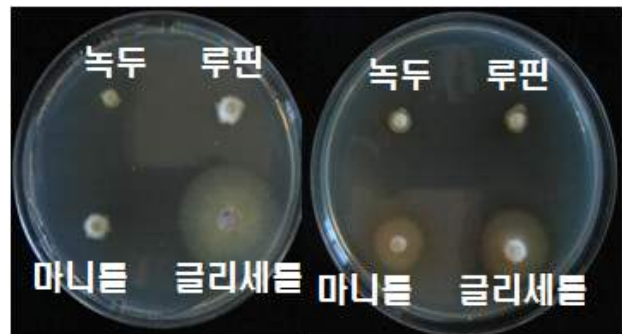
【탄소원별 배양체 항균활성능력(침지법)】

Table 2. 루핀 이용 배양배지별 항균활성능력(입제)

배양원		생균수 (cfu/ml)	항균활성능력(%)					평균
			1반복	2반복	3반복	4반복	5반복	
루핀	글리세롤	9.3×10^7	64.3	66.7	68.9	64.5	64.2	65.7
	마니톨	1.5×10^8	65.2	66.3	71.3	66.7	69.5	67.8
	녹두 추출물	4.3×10^8	69.1	70.0	69.3	65.0	73.9	69.5
	루핀 추출물	2.1×10^8	70.4	70.8	73.3	68.8	72.6	71.2



【루핀과 탄소원별 배양체에서 배양중인 미생물】



【루핀과 탄소원별 혼합배양체 항균활성(침지법)】

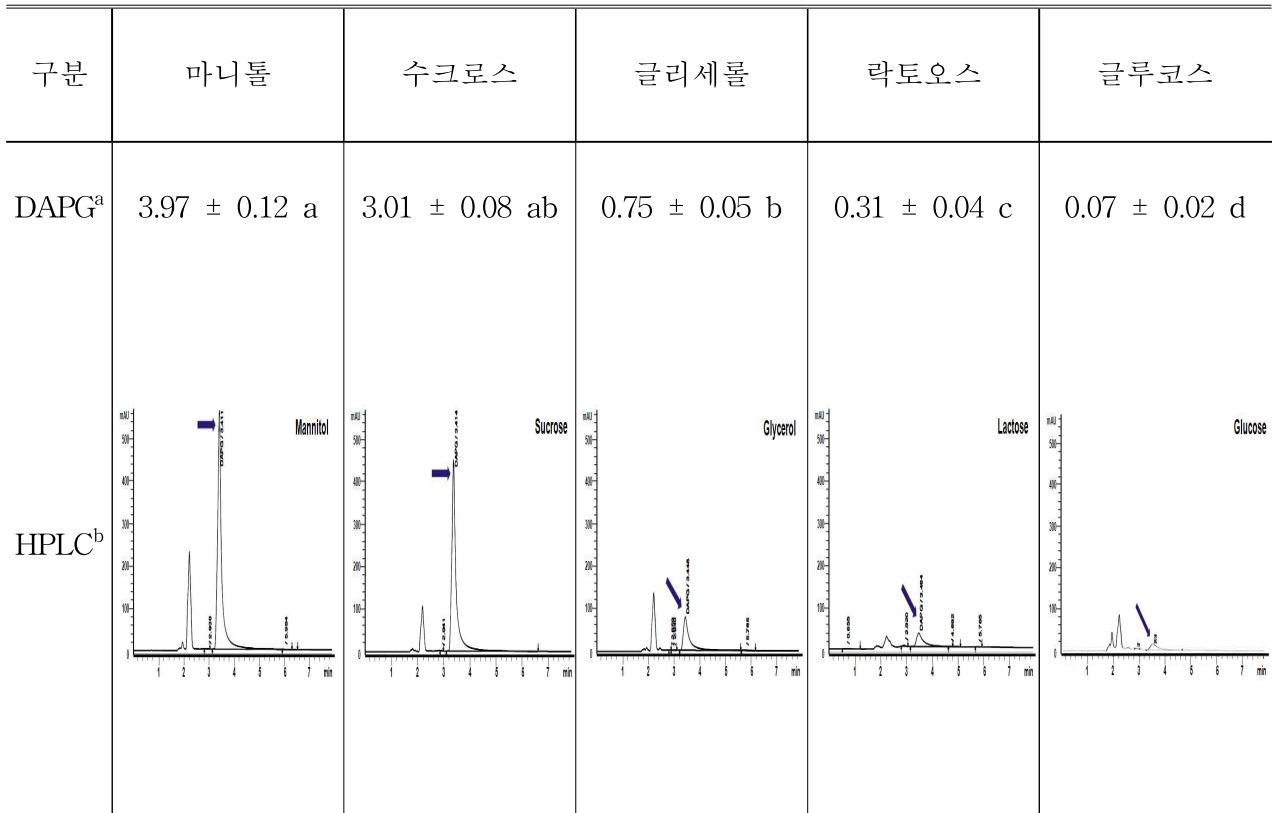
Table 3. 슈도모나스 NJ134의 탄소원별 배양액의 성장능력

배양원	생균수 (Log ₁₀ cfu/ml)			
	1반복	2반복	3반복	평균
마니톨	9.4	9.2	9.1	9.24 ± 0.12 a
수크로스	9.3	9.2	8.5	9.08 ± 0.34 ab
글리세롤	9.3	8.7	8.7	9.00 ± 0.40 ab
락토오스	9.0	8.1	8.1	8.65 ± 0.51 b
글루코스	8.3	7.9	8.4	8.21 ± 0.21 b

Table 4. 슈도모나스 NJ134의 탄소원별 배양액의 시들음병균에 대한 항균활성능력

배양원	시들음병균(<i>Fusarium oxysporum</i>) 저지율 (%)			
	1반복	2반복	3반복	평균
마니톨	76.9	86.1	86.8	83.3 ± 5.52 a
수크로스	74.4	75.0	78.9	76.1 ± 2.48 ab
글리세롤	69.2	80.6	73.7	74.5 ± 5.70 b
락토오스	64.1	72.2	68.4	68.2 ± 4.06 bc
글루코스	64.1	66.7	68.4	66.4 ± 2.17 c

Fig. 1. 슈도모나스 NJ134의 탄소원별 배양액의 항균물질 생성 효과



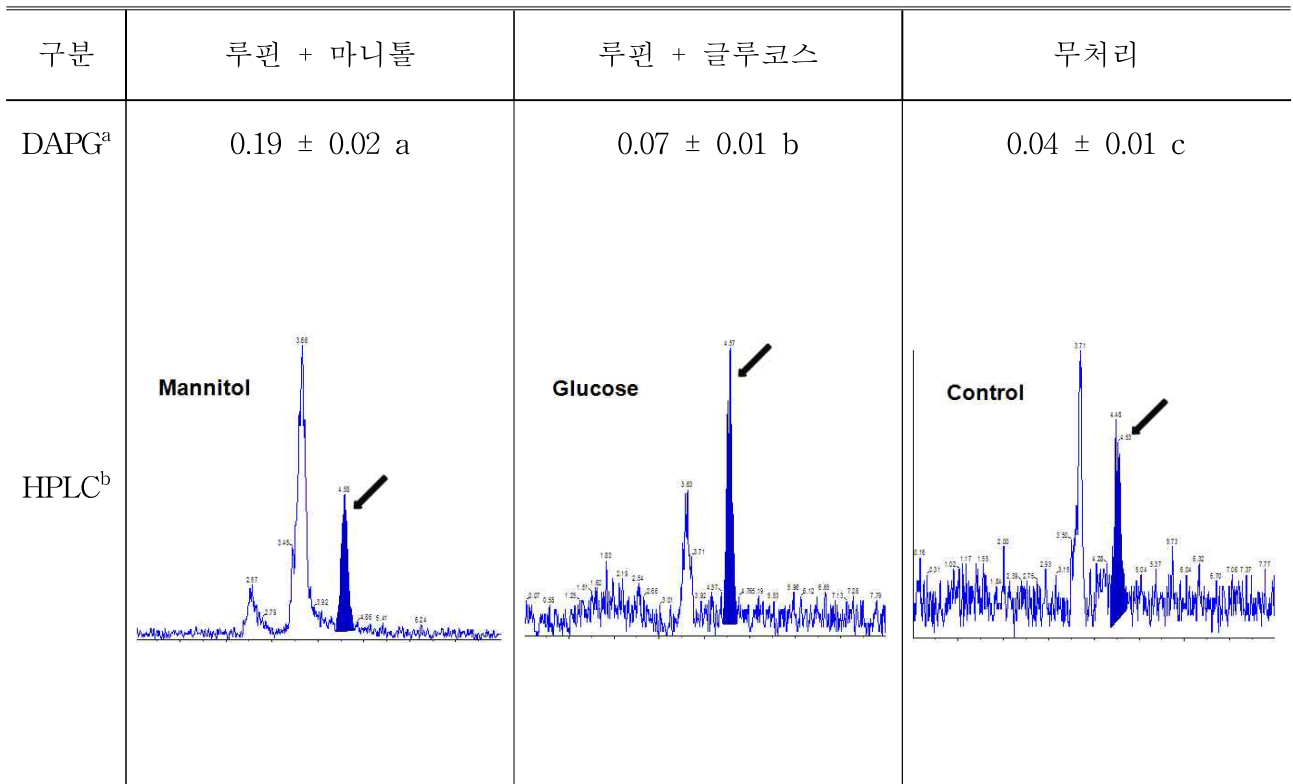
^a 2,4-diacetylphloroglucinol($\mu\text{g}/\text{m}/10^5$ CFU),

^b Standard(2,4-diacetylphloroglucinol) : 3.416 분

Table 5. 루핀 이용 탄소원별 배양액의 혼합 시제품 성장능력 및 항균활성 효과

시제품		생균수 (Log ₁₀ cfu/ml)			시들음병균 저지율(%)
		7일	30일	60일	
루핀	마니톨	8.92 a	8.47 a	7.22 a	71.5 ± 0.73 a
	글루코스	7.76 b	6.28 b	5.38 b	65.5 ± 0.52 b
	무처리	6.61 b	4.34 b	2.91 b	40.9 ± 1.51 c

Fig. 2. 슈도모나스 NJ134의 탄소원별 배양액의 혼합 시제품 향균물질 생성 효과



^a 2,4-diacetylphloroglucinol(μg/ml),

^b Standard(2,4-diacetylphloroglucinol) : 5.70 분

Table 6. 시제품 종균 배양 배지 성분

배양	배지성분
1차	Tryptone, Yeast extract, NaCl, Glycerol(pH 7)
2차	Proteose Peptone #3, K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ · 7H ₂ O, NaCl, 분말녹두(pH 7)
3차	Mannitol, Proteose Peptone #3, K ₂ HPO ₄ , ZnSO ₄ · 7H ₂ O, Sucrose, 분말대두(pH 7)

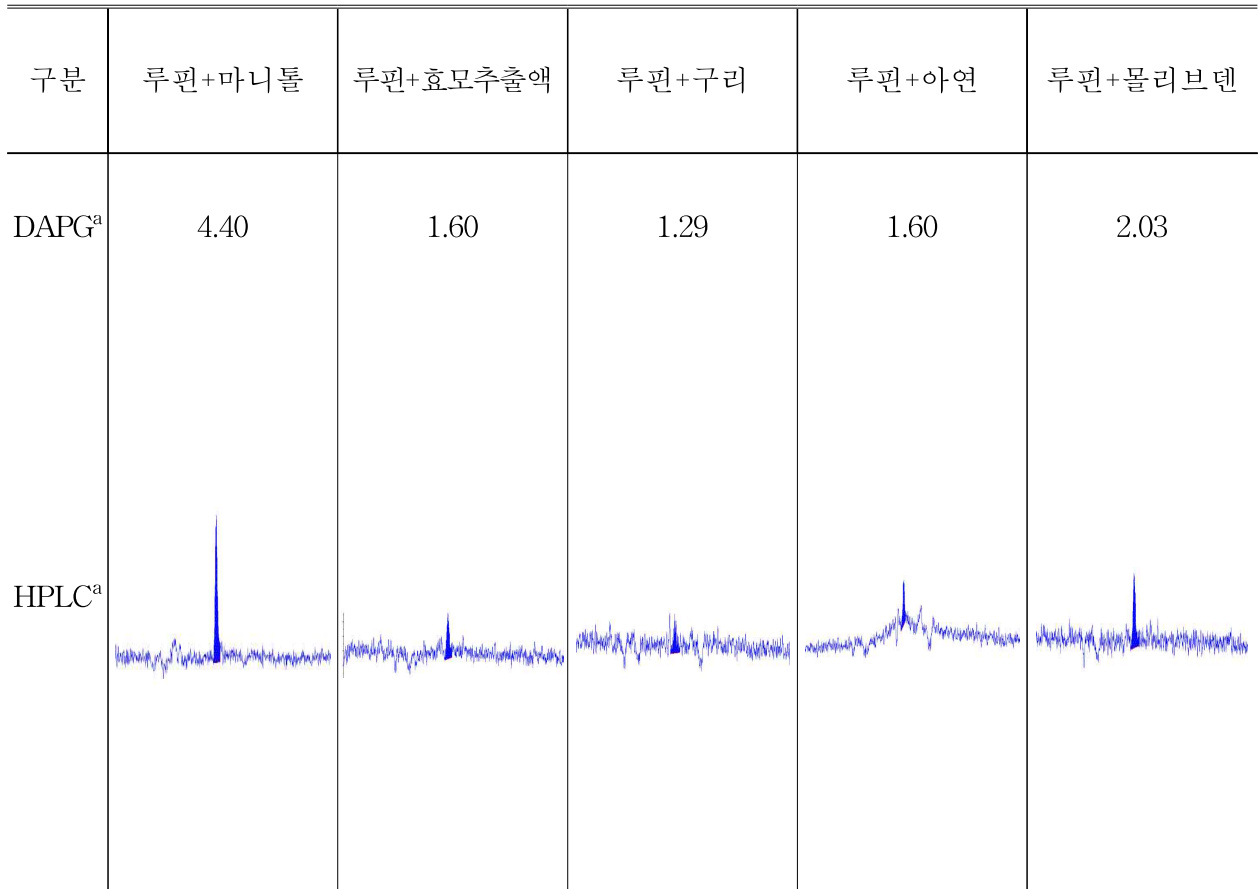
Table 7. 대량배양용 시제품 성장능력 및 항균활성 효과

시제품	생균수 (Log ₁₀ cfu/ml)			시들음병균 저지율(%)
	1일	15일	30일	
1차	7.45	6.28	6.01	65.3
2차	7.91	8.46	7.91	68.5
3차	6.40	6.78	7.86	80.6

Table 8. 보조증진제 첨가 배양액의 생균능력 및 시들음병균 항균활성 효과

배양원		생균수 (Log ₁₀ cfu/ml)		시들음병균 저지율 (%)	
		7일 후	14일 후	7일 후	14일 후
루핀 추출액	-	8.92	8.07	66.5	61.5
	효모 추출액	8.40	8.51	64.4	62.6
	구리	8.20	8.50	56.8	54.7
	아연	8.75	7.52	66.5	62.6
	몰리브덴	8.18	7.22	66.5	65.9
	마니톨	8.86	8.68	64.9	65.9
	-	8.81	9.40	65.4	69.8
녹두 추출액	효모 추출액	8.63	8.53	67.0	63.1
	구리	7.03	7.62	50.6	58.2
	아연	9.04	9.02	60.1	65.4
	몰리브덴	9.39	9.05	73.9	65.9
	마니톨	8.93	9.08	67.0	65.9
	-	8.81	9.40	65.4	69.8
	효모 추출액	8.63	8.53	67.0	63.1

Fig. 3. 보조증진제 첨가 배양액의 항균물질 생성 효과



^a 2,4-diacetylphloroglucinol($\mu\text{g/ml}$),

^b Standard(2,4-diacetylphloroglucinol) : 5.70 분

Table 9. 토양혼화제 시제품(루핀+마니톨 배양액) 이용 토마토 시들음병 온실검정

처리농도(cfu/ml)	사용량(kg/10a)	발병율(%)	방제가(%)
10 ⁶	100	54	22
	200	24	65
	300	26	62
	600	10	84
10 ⁸	100	16	76
	200	16	75
	300	2	97
	600	2	97
대조	슈도모나스 NJ134 관주(10 ⁶ cfu/ml) ^a	26	63
	슈도모나스 NJ134 관주(10 ⁸ cfu/ml)	24	65
	<i>Bacillus subtilis</i> (유기농자재)	30	57
	무처리	70	-

^a 마니톨 탄소원 배양액



【100kg/10a(10⁸cfu/ml)】



【200kg/10a(10⁸cfu/ml)】



【300kg/10a(10⁸cfu/ml)】



【600kg/10a(10⁸cfu/ml)】



【무처리(루핀단독 처리)】

Table 10. 시제품 이용 토마토 시들음병 포장검정

처 리 ^a	사용량(kg/10a)	발병율(%)	방제가(%)	수확량(g/주) ^c
토양혼화 + 배양액(10 ⁶ cfu/ml)	50	55.4	39.2	2,435
	100	38.7	57.5	2,625
	200	29.2	67.9	2,635
	300	26.3	71.1	2,648
토양혼화	50	56.7	37.8	1,781
	100	40.0	56.1	1,813
	200	33.8	62.9	2,576
	300	28.0	69.3	2,723
대조	관주(10 ⁶ cfu/ml)	58.8	35.5	2,175
	루핀 단독	90.0	1.2	1,310
	<i>B. subtilis</i> ^b	80.0	12.2	1,648
	수산화동 ^b	82.5	9.4	1,293
	무처리	91.1	-	1,380

^a토양 혼화처리 : 4/12, 토마토 정식 : 4/13(유니콘(방울)),

^b토마토 시들음병 관리용 유기농자재, ^c생육조사 : 6/20~7/4(4회방)



【100kg/10a】



【200kg/10a】



【300kg/10a】



【무처리】

시제품을 이용하여 포장검정한 결과 정식 전 토양혼화(300kg/10a)하고 난 후 배양액 (10⁶cfu/ml)을 4회 관주처리 시 시들음병에 대해 71.1%의 방제효과를 나타냈으며, 수량도 주당 2.6kg을 생산하였다 (Table 10).

3. 재배환경개선과 개발 시제품 이용 생산성 향상 기술개발

가. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 후막포자 발아

토마토 시들음병의 병원균 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*은 유기물 등 양분과 환경의 변화에 의해 내구성이 강한 후막포자를 형성하여 토양 내에 장기간 존재(Fig. 4)하면서 서식, 영양분 등 환경이 좋은 조건이 되면 분생포자로 발아하여 기주 식물체를 감염시킴. 토양병해 방제가 어려운 이유는 후막포자 형성기에 약제방제가 주로 이루어지기 때문에 방제 효과 낮은 이유 중의 하나라고 생각되기에 후막포자 형성을 낮추고 약제방제 효과를 높이는 방법과 기술을 개발하고자 하였다.

나. 녹비작물 처리에 의한 시들음병균 밀도 변화 조사(실내검정, 처리 30일 후)

녹비작물 처리에 의한 토마토 시들음병균의 밀도 조사를 위해서 아래의 조건하에서 재배하였고, 처리하였다.

처리수	처리구	반복수	총처리 구수	처리당 면적(m ²)	총면적(m ²)
9	2	2	36	8	288

처리수 : 화분과(밀, 보리, 라이그라스), 콩과(알팔파, 클로버, 헤어리베치), 십자화가(유채, 무), 무처리

처리구 : 녹비작물 토양환원 처리구, 녹비작물 토양내 제거 처리구

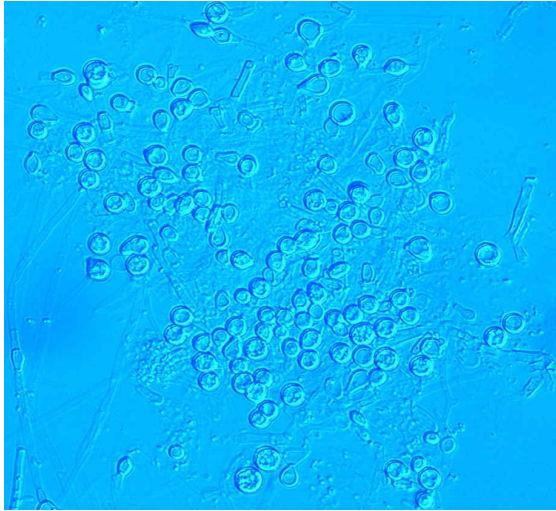
녹비작물 파종: 2011/11/29(1차), 2012/10/02(2차), 토마토 정식: 2012/04/13(1차), 2013/04/03

파종량(g/32m²): 밀(480), 보리(480), 라이그라스(160), 알팔파(80), 클로버(96), 헤어리베치(160), 유채(96), 무(160)

각 녹비작물 뿌리 동결체가 함유된 배양체에서 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*(race 1)의 후막포자 밀도변화를 광학현미경을 통해 조사한 결과, 배양체에 후막포자 접종 30일 후 무처리 대비 녹비작물 뿌리 동결체에 접종한 배양체에서 후막포자는 감소하였고, 특히, 밀, 클로버, 유채 처리구에서 초기 접종농도에 비해 낮았다 (Fig. 5).

*F. oxysporum*의 rDNA-intergenic spacer와 avirulence 유전자를 기본으로 제작한 primer로 qPCR 방법으로 분생포자의 밀도를 조사하였다. *F. oxysporum*과 각 녹비작물 뿌리 동결체를 혼합 배양한지 30일째에 후막포자에서 발아한 분생포자의 밀도는 보리, 클로버, 헤어리베치 처리에서 낮았고, 뿌리 분비액에서 생성되는 유기물 등의 영향으로 병원균의 후막포자 형성을 억제하고 발아된 분생포자의 밀도도 낮았다 (Fig. 6).

시설내 시험포장 토양에 존재하는 미생물들을 조사한 결과 호기성세균이 76%로 가장 많이 존재하였고, 바실러스류, 사상균, 형광성 세균 그리고 방선균 순으로 분포하고 있었다 (Fig. 7).



【*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 후막포자】



【발아중인 후막포자와 소형포자】

Fig. 4. 토마토 시들음병균의 후막포자와 소형포자의 현미경 관찰

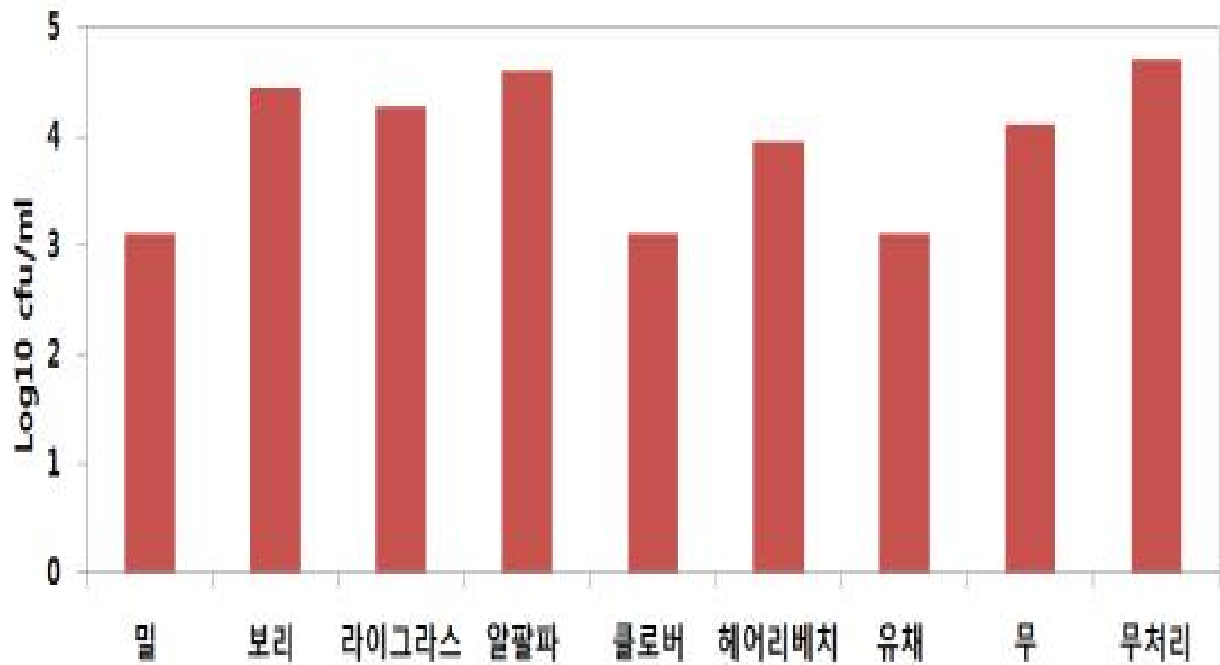


Fig. 5. 녹비작물 뿌리 동결체와 배양 시 *F.oxysporum*의 밀도 변화. 후막포자 접종농도(Log₁₀ cfu/ml)를 5.79로 조절하였고, 배양체는 멸균수+녹비작물 뿌리 동결체+*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 후막포자와 무처리는 뿌리 분비액 없이 후막포자만 배양하였다.

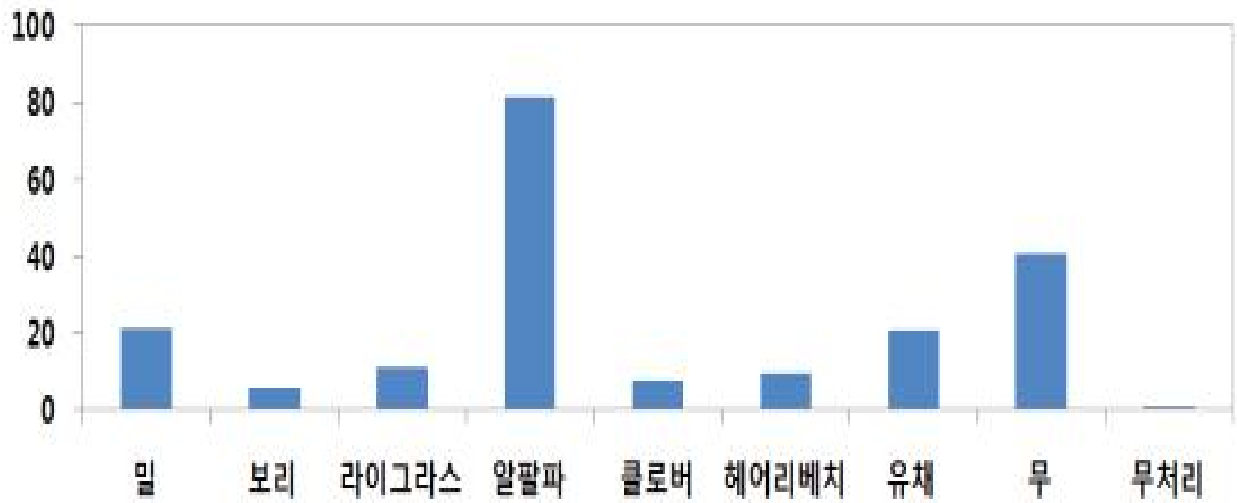


Fig. 6. 녹비작물 뿌리 분비물에 의한 후막포자의 발아율. 후막포자 접종농도(Log₁₀ cfu/ml)를 5.79로 조절하였고, 배양체는 멸균수+녹비작물 뿌리 분비물+Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici의 후막포자와 무처리는 뿌리 분비액 없이 후막포자만 배양하였다.



Fig. 7. 녹비작물 시험 포장내에서의 토양 미생물의 분포.

다. 휴경기 녹비작물 재배시 시들음병균 밀도(포장검정)

휴경기 시설 내 녹비작물 재배 포장에서 녹비 생육기, 녹비작물 재배 후 토양환원 처리구, 녹비작물 토양제거 처리구에서 각각 토양 시들음병균의 밀도변화를 조사하였다. 파종 후 병원균 분생포자 밀도가 토양환원 처리구에서 낮았으며, 특히 클로버, 헤어리베치, 유채, 무 처리구에서 낮았다 (Fig. 8).

포장내에서 녹비작물의 생육기와 재배 후에 *F. oxysporum*의 후막포자에서 발아한 분생포자의 밀도를 qPCR을 이용하여 조사하였다. 녹비작물 생육기, 재배 후 토양환원 처리구역, 제거한 구역에서 각각의 토양내 존재하는 *F. oxysporum*의 분생포자 밀도는 토양환원 처리구역에서 분생포자의 밀도가 전체적으로 감소하였다 (Fig. 9). 평판배지에 의한 토양내 병원균 밀도 조사값과 다르게 나타난 것은 후막포자가 배지내에서 발아하여 나타난 밀도까지 측정되었기 때문에 차이가 있다고 생각된다.

라. 휴경기 녹비식물 재배 후 시들음병 발병율(포장검정)

시설내 녹비작물을 재배한 구역에서 토마토를 정식하여 재배한 후 시들음병 발병율을 조사한 결과, 녹비작물을 환원한 처리구가 토양에서 제거한 처리구보다 병발생율이 낮았으며, 특히, 밀, 클로버, 헤어리베치, 유채, 무 재배 구역에서 53% 이하의 발생율을 나타냈다. 토양 환원구역은 무처리 대비 10~40% 이상 병발생이 감소하였고 또한 녹비작물 제거구역보다 낮았다 (Fig. 10).

마. 토마토 시들음병 방제용 시제품 제작 및 각 제형별 약효지속기간 및 안정성 평가

토마토 시들음병 방제용 NJ134를 이용한 토양 혼화용 시제품을 3종류를 제작하고, 시제품명을 슈루탄으로 명명하였다. 혼합액을 *P. fluorescens* NJ134, yeast extract, mannitol, ZnSO₄, 분말대두, 해조추출물을 이용하였다

성분	함량(%)
찜콩(루핀)	65
찜옥수수	5
혼합액*	30

바. 슈루탄 시제품의 유효미생물 동정(분석기관 : 목원대학교 미생물생태자원연구소)

16S rRNA 유전자 전염기서열 해석 : 시제품 1g을 순차적으로 희석하여 Nutrient Agar(Difco)에 접종하고 28°C에서 3일간 배양한 후 우점세균 NJ017-B1 콜로니를 대표 유효균주로 선발하여 순수분리하고 16S rRNA 유전자의 PCR 증폭하여 분석하였다. 그 결과 총 1,393bp 전염기서열을 분석하였고, 이 염기서열을 기준으로 하여 분자계통학적인 분석을 한 결과 *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090^T(Z76662)와 100%의 유연관계를 나타내는 것으로 확인되었음. 따라서 *Pseudomonas fluorescens*로 동정되었다.

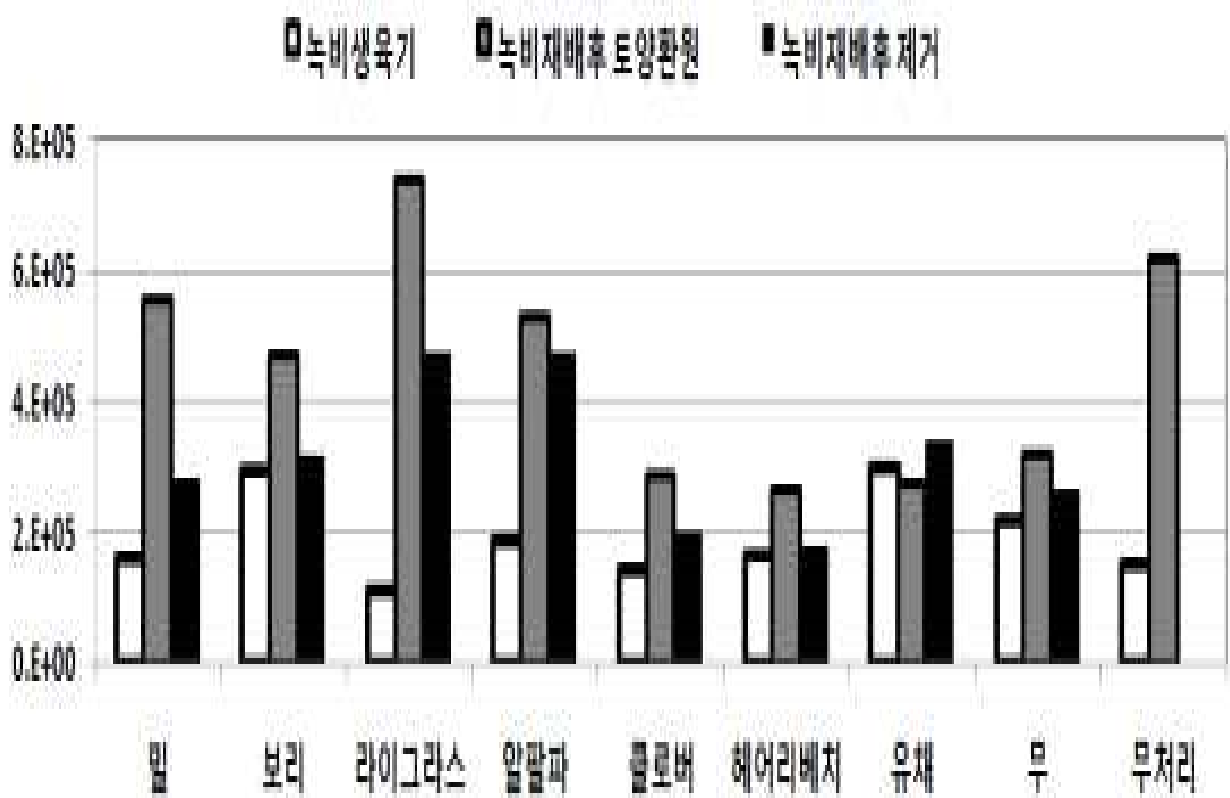
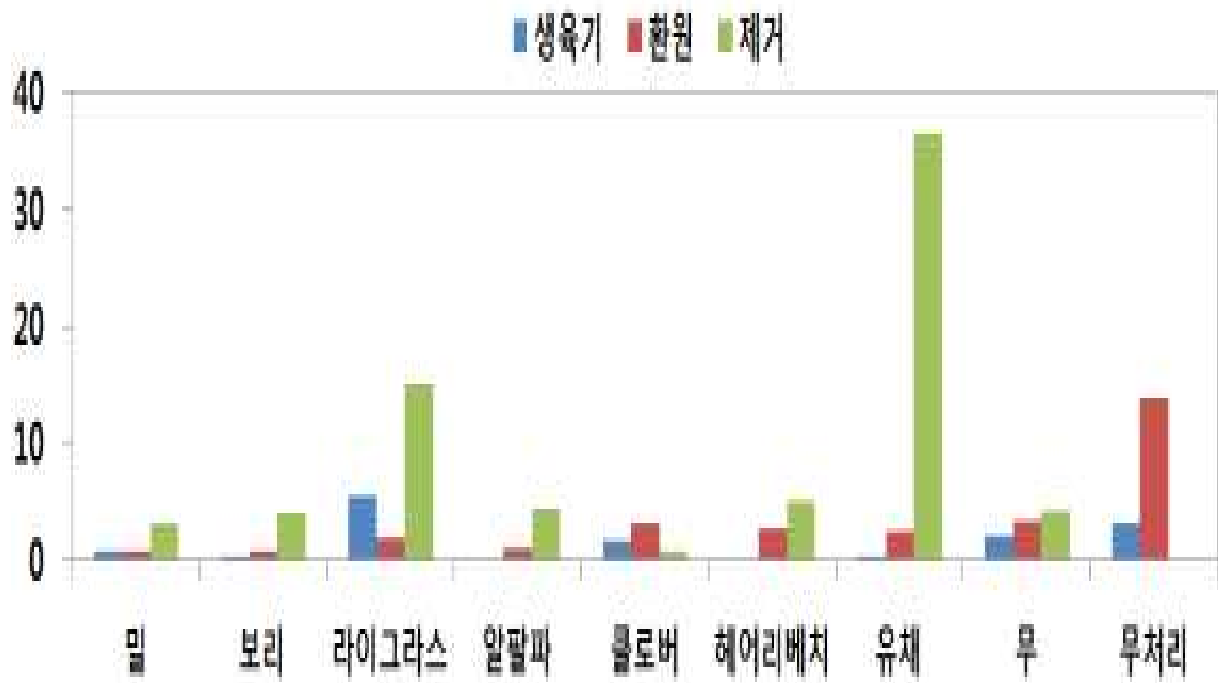


Fig. 8. 휴경기 시설 내 녹비작물 재배에 따른 토마토 시들음병균 *Fusarium oxysporum*의 밀도 변화



【녹비작물 재배】



【녹비작물 토양환원】



【녹비작물 토양제거】

Fig. 9. 휴경기 시설 내 녹비작물 재배에 따른 토마토 시들음병균 *Fusarium oxysporum*의 밀도 변화. RT-PCR방법을 통해 분석을 함

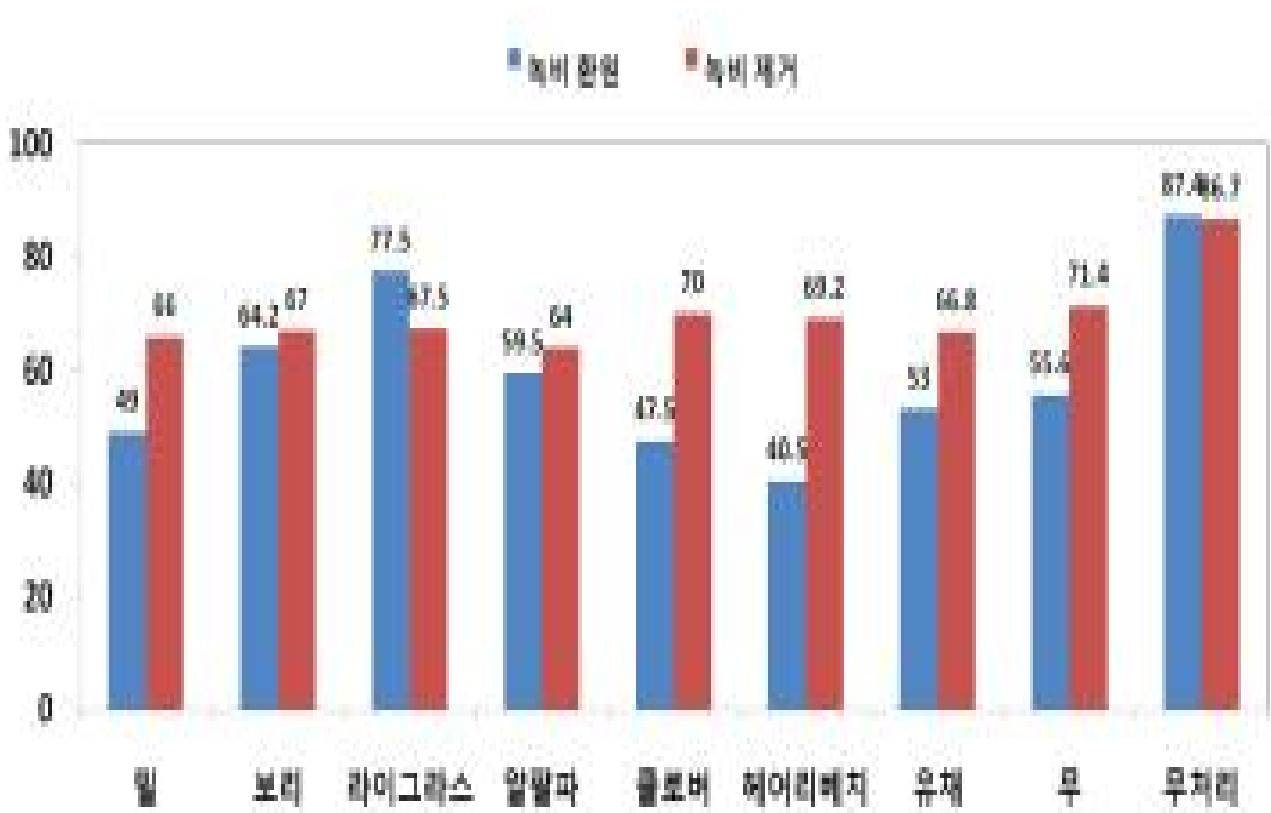
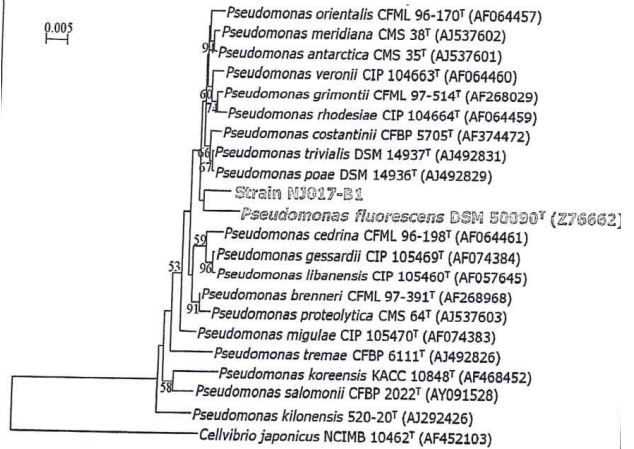


Fig. 10. 시설 내 녹비작물을 환원한 구와 녹비 작물을 제거한 구에서의 토마토 시들음병 발생율

GTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGC
 TGAGTAACACGTTGGTAACCTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCGGGAAAC
 CGGGGCTAATACCGGATGTTGTCTGAACCGCATGGTTAGACATAAAAGG
 TGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGGCGGCATTAGCTAGTTGGT
 GAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
 ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACG
 CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGGAGCAACCGCGG
 TGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAAGACAA
 GTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACTAACCGAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT
 CCGGAATATTGGGCGTAAGGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT
 GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGA
 GTGCAGAAAGAGGAGAGTGAATCCACGTGTAGCGGTTGAAATCGCTAGAG
 ATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACG
 CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTC
 CACGCGCTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTG
 CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTCCGCAAGACT
 GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT
 TTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACCAGTCTTGACATCCTCGACAA
 TCCTAGAGATAGGAGCTCCCTTCGGGGGACAGTACAGGTGTGTCATG
 GTTGTCTCAGCTCGTGTGAGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
 GCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT
 GCCGGTGACAACCGGAGGAAGTTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
 CTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGACAGAAACAAAGGCGGC
 GAAACCGGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGC
 AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTATGTAATCGCGGATCAG
 CATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCCGGTCACAC
 CACGAGAGTTTGTAAACCCGAAAGTCCGGTGAGGTA//



【16S rRNA 유전자 염기서열】

【Strain NJ017-B1의 계통학적 위치】

균체 지방산(MIDI) 분석 : 대표 유효세균 50mg을 지방산 methyl ester화 및 추출을 수행하여 분석하였다. *P. fluorescens* NJ017-B1의 주요 지방산으로 C_{16:0}(22.44%), C_{18:1 w7c}(17.69%)를 나타냈으며, C_{10:0} 2OH, C_{10:0} 3OH, C_{12:0} 3OH와 같은 다양한 Hydroxy 지방산을 함유하는 특징을 나타냈다. 또한 NJ017-B1은 *Pseudomonas fluorescens* 표준 균주의 주요 균체 지방산 조성과도 유사한 것으로 확인되었다.

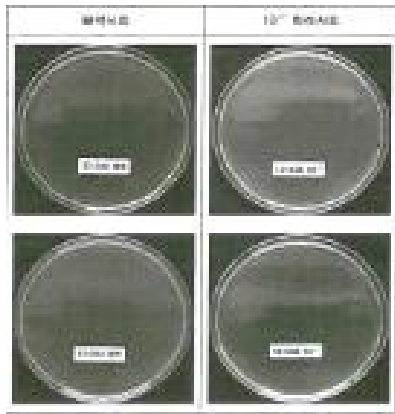
대표균주(*Pseudomonas fluorescens* NJ017-B1)의 균체지방산 특성

Fatty acid(%)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NJ017-B1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50090 ^T
Saturated acids		
C _{12:0}	8.92	0.97
C _{14:0}	2.07	-
C _{16:0}	22.44	35.86
C _{18:0}	-	1.59
Unsaturated acids		
C _{16:1 w7c}	32.88	13.45
C _{16:1 w7t}	-	1.40
C _{18:1 w7c}	17.69	16.66
Cyclo		
C _{17:0 cyclo}	1.69	18.41
C _{19:0 cyclo}	-	0.62
Hydroxy		
C _{10:0} 3-OH	5.66	2.27
C _{12:0} 2-OH	3.89	6.40
C _{12:0} 3-OH	4.77	2.37

【대표균주의 균체 지방산 특성】

사. 슈루탄 시제품의 병원성미생물 검사(분석기관 : 목원대학교 미생물생태자원연구소)

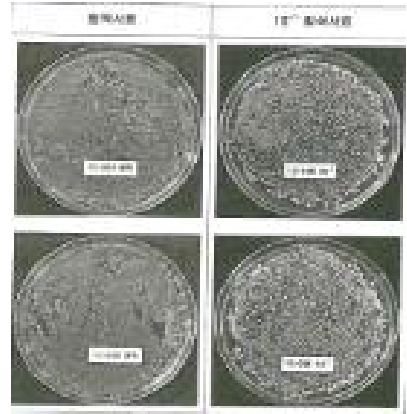
시제품의 병원성 미생물 검출여부를 총 5종인 병원성 대장균(*Escherichia coli*), 병원성 살모넬라(*Salmonella* sp.), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)에 대하여 병원성 미생물 선택배지를 이용하여 확인하였다. 최종적으로 위 5종의 병원성 미생물 검사결과 모두 불검출 되었다.



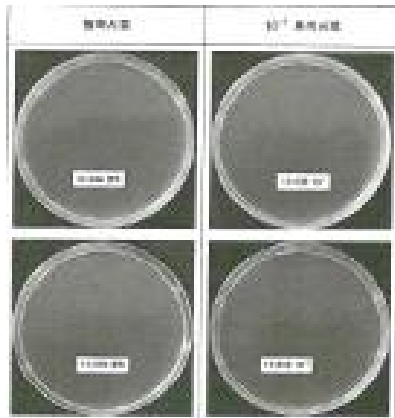
【*Escherichia coli*】



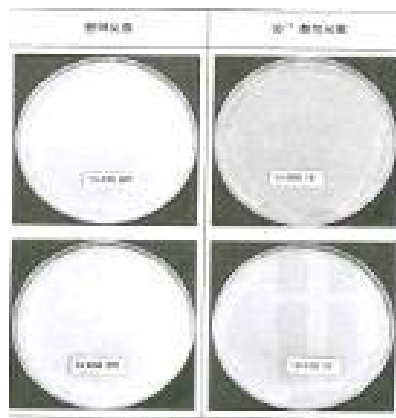
【*Salmonella* sp.】



【*Staphylococcus aureus*】



【*Listeria monocytogenes*】



【*Bacillus cereus*】

병원성 대장균 시험결과, 청록색 또는 적색의 콜로니가 검출되지 않아 음성으로 판정, 살모넬라 시험결과, 흑갈색을 띄는 콜로니가 검출되지 않아 음성으로 판정, 황색포도상구균 시험결과, 황색을 띄는 콜로니가 검출되지 않아 음성으로 판정, 리스테리아 모노사이토제네스 시험결과, 청록색을 띄는 콜로니가 검출되지 않아 음성으로 판정, 바실러스 세레우스 시험결과, 연분홍색을 띄는 콜로니가 검출되지 않아 음성으로 판정되었다.

아. 슈루탄 시제품의 유효 및 유해 성분분석(분석기관 : 전남대학교 산학협력단)

전남대학교 산학협력단에서 유효 및 유해 성분 등을 분석한 결과 농진청 고시 비료 품질검사 기준에 의거 적합으로 판명되었다. 단, 아연의 함량이 높게 나온 이유는 배양배지의 주 원료로서 사용되었기 때문에 다른 함유성분보다 높게 나온 것으로 사료되었다.

<검사결과>

원료명	검사성분	검사성적	비고
슈루탄	구리 몰리브덴 붕소 철 망간	4.107mg/kg 1.493mg/kg 19.041mg/kg 55.441mg/kg 27.629mg/kg	적합

<검사방법>

농진청 고시 비료의 품질검사방법 “비료의 이화학적 검사방법”으로 실시하였음.

본 실험의 결과는 의뢰자가 제공한 시료에 대한 실험 결과이며, 본 검사성적서의 내용은 용도 의외에 선전, 소송, 기타 법적 요건으로 사용할 수 없습니다.

2012년 11월 28일

전남대학교 산학협력단



<검사결과>

원료명	검사성분	검사성적	비고
슈루탄	비 소	ND	적합
	카드뮴	ND	
	수 은	ND	
	납	ND	
	크 롬	0.311mg/kg	
	구 리	4.107mg/kg	
	니 켈	0.871mg/kg	
	아 연	186.4mg/kg	

<검사방법>

농진청 고시 비료의 품질검사방법 “비료의 이화학적 검사방법”으로 실시하였음.

본 실험의 결과는 의뢰자가 제공한 시료에 대한 실험 결과이며, 본 검사성적서의 내용은 용도 의외에 선전, 소송, 기타 법적 요건으로 사용할 수 없습니다.

2012년 11월 28일

전남대학교 산학협력단



<검사결과>

원료명	검사성분	검사성적	비고
슈루탄	질소 인산 가리	5.12% 3.64% 4.24%	적합
	비 소 카드뮴 수 은 납 크 롬 구 리 니 켈 아 연	ND ND ND ND 0.311mg/kg 4.107mg/kg 0.871mg/kg 186.4mg/kg	적합

<검사방법>

농진청 고시 비료의 품질검사방법 “비료의 이화학적 검사방법”으로 실시하였음.

본 실험의 결과는 의뢰자가 제공한 시료에 대한 실험 결과이며, 본 검사성적서의 내용은 용도 의외에 선전, 소송, 기타 법적 요건으로 사용할 수 없습니다.

2012년 11월 28일

전남대학교 산학협력단



검 사 성 적 서

발급번호 : R20130409-0191

접수번호 : 2013030010014-0001

시 료 명	콩(대두)	제 조 일 자		유통기한(또는 품질유지기한)	
의뢰인 업체명	전남농업기술원	대표자명	박민수	검체담당자	임현철
의뢰인 소재지	전남 나주시 산포면 산재리 206-7				
접수년월일	2013-03-22	검사완료일	2013-04-09		
검 사 목 적	참고용	식품유형(재질)	콩		

시 험 항 목 및 결 과

시 험 항 목	기 준	결 과	항 목 판 정
납	0.20이하(mg/kg)	0.05	적합
카드뮴	0.20이하(mg/kg)	불검출	적합

판정 : 적합

검사자 : 임현철

책임자 : 양호철, 최경철

비고 : 이 성적은 제시된 검체에 한하며 의뢰 목적 이외의 광고 또는 선전 등에 이용할 수 없으며 용기, 포장 등에도 이를 표시 할 수 없다.

※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

2013년 04월 09일

전라남도 보건환경연구원장



534-821 전남 무안군 상황읍 남막리 1593-1번지 (남막영산길 61)

TEL : 061-240-5111

FAX : 061-240-5260

차. 개발 시제품(토양 혼화용) 토마토 생육 약해조사

시제품을 100 ~ 1,000kg/1,000m² 농도로 온실내 포트에 혼합한 후 멀칭한 경우와 비멀칭한 경우에서 4엽기의 토마토 유묘를 정식 후 0 ~ 30일 동안 약해유무를 달관 조사하였음. 일정기간동안 토마토의 외관상 생육에서 약해현상은 발생되지 않았다.

처리량 (kg/1,000m ²)	약 해(생육)	
	멀칭 처리	비멀칭 처리
100(기준량)	정상	정상
500	정상	정상
1,000	정상	정상
무처리	정상	정상

*약해 조사 : 반점 및 윤문의 유무, 황변 또는 엽소 여부, 경엽의 위조, 위축여부, 기타 발아 및 생육상태, 엽전개와 출현율(일수) 등을 무처리와 비교하여 조사함



【멀칭 처리】



【비멀칭 처리】

슈류탄 시제품의 독성검사(분석기관 : (주)크로엔 리서치)

구 분	시험항목	대상
인축독성	급성경구독성시험	마우스
	급성경피독성시험	마우스
	안점막자극성시험	토끼
	피부자극성시험	토끼
생태독성	급성어독성시험	잉어
	급성유영저해시험	물벼룩
	꿀벌 접촉독성시험	꿀벌

슈류탄 시제품의 독성 검사 결과표

시험종류 (기간)	실험동물	투여방법	투여량	LD50	시험기관 (보고년도)	독성구분
급성경구독성/병원성 (21일)	Rat	경구투여	1×10 ⁸ cfu/2ml	1×10 ⁸ cfu/2ml	한국생물안전성연구소 (2012년)	4급 (저독성)
급성경피독성 (14일)	Rat	경피투여	1×10 ⁸ cfu/2ml	1×10 ⁸ cfu/2ml	한국생물안전성연구소 (2012년)	
피부자극성 (72시간)	White rabbit	피부도포	1×10 ⁷ cfu/0.5ml	비자극성 (1×10 ⁸ cfu//0.5ml) (P.I.I.=0.0)	한국생물안전성연구소 (2012년)	
안점막자극성 (7일)	White rabbit	결막낭내투여	1×10 ⁷ cfu/0.1ml	비자극성 (1×10 ⁷ cfu/0.1ml) (M.O.I=0.0) (A.O.I.=0.0)	한국생물안전성연구소 (2012년)	

구분	시험생물종	시험약제	LC50	시험기관 (보고년도)	독성구분
담수어류	잉어 (Cyprinus carpio)	1×10 ⁹ cfu/ml	>1×10 ⁶ cfu/ml	한국생물안전성연구소 (2012년)	저독성
꿀벌 급성접촉	꿀벌 (Apis mellifera)	경피투여		한국생물안전성연구소 (2012년)	안정성

카. 슈류탄의 유기목록농자재로 등록

개발된 시제품은 주식회사 팜스코리아를 통해 슈류탄이라는 상표명으로 최종 등록되었으며, 고추, 상추, 배추, 오이, 토마토에 정식 전에 토양혼화처리 (160kg/10a)로 사용하도록 하였다.

농 > 기술정보 > 친환경유기농자재

농자재정보

제조사명 : 팜스코리아	연락처 : 061-381-0245
주소 : 전남 담양군 무정면 통안리 190-1	
공시(품질인증)번호 : 공사-3-1-66	등록일자 : 13.07.10 / (20130710~20160709)
자재종류 : 토양개량및작물생육촉진제	자재명 (상표명) : 토양미생물제제 (슈류탄)
원료명 : 미생물배양액 30%, 산이초 70%	사업자등록번호 : 409-B1-76948
책임보험증서번호 : 해당사항 없음	품목등록여부 :
○직사광선을 피하여 건조하고 서늘한 곳에 보관하고 흔들어서 사용하십시오	
주의사항 :	

시험작물 및 사용방법

작물명	사용시기	사용방법
고추, 상추, 배추, 오이, 토마토	정식 전	토양혼화처리(160kg/10a)



타. 개발 시제품의 포장검정에 의한 약효증진방안 확립

각 제형별(토양혼화용 시제품) 보조제 혼합성분

시제품의 시들음병 방제효과를 증진시키기 위하여 토양혼화용 시제품을 보조제별로 혼합하여 3종을 개발하였다.

배양	보조제 혼합 성분
시제품 1	제오라이트, 마니톨, 분말대두 등
시제품 2	부식산, 마니톨, 분말대두 등
시제품 3	루핀, 마니톨, 분말대두 등

파. 토양혼화용 시제품 성장능력(유묘검정)

각 시제품들의 성장능력을 조사하기 위하여 포트에 100kg/10a 함량으로 넣은 후 12주 동안 조사하였다. 주요 방제효과를 나타내는 균주인 *Pseudomonas fluorescens* NJ134는 7일째 부터 농도가 증가하기 시작하였으며 56일째부터 감소하였음. 특히, 시제품 3이 12주 동안 10^6 cfu/ml 이상을 유지하였다 (Fig. 11).

하. 시제품 항균물질생성 및 시들음병 방제효과(처리 30일 후, 유묘검정)

각 시제품의 항균물질 농도와 토마토 시들음병에 대한 유묘검정을 조사한 결과, 시제품 3에서 항균물질(DAPG)이 1g당 $8.3\mu\text{g/ml}$ 로 가장 높았으며, 처리 30일 후 방제효과도 69.9%로 가장 우수하였다 (Table 11).

거. 각 시제품 포장내 방제 매뉴얼 작성

토양혼화용으로 제작된 각 시제품 3종의 토마토 시들음병 방제 매뉴얼을 작성하였다. 정식 전에 100kg/1,000m²를 1회 토양혼화처리하고, 정식 후에는 관주용 시제품3을 100배 농도로 희석하여 120L/1,000m²량으로 10일 간격 4회 관주처리하였다 (Table 12).

너. 시제품 이용 토마토 시들음병 방제 포장검정

각 3종의 시제품과 관주용 시제품 3의 혼합처리에 방제 매뉴얼 이용하여 토마토 시들음병 방제 포장검정을 수행하였다. 각 시제품을 처리구역별로 정식 전 토양혼화(100kg/10a) 처리한 후 관주용 시제품 3으로 4회 관주처리(100배, 120L/10a) 하였고, 대조구로는 유기농자재 2종을 사용하였다. 시제품 모두 62% 이상의 높음 방제효과를 나타냈으며, 시제품 3 처리구에서 71.1%로 가장 높았다 (Table 13).

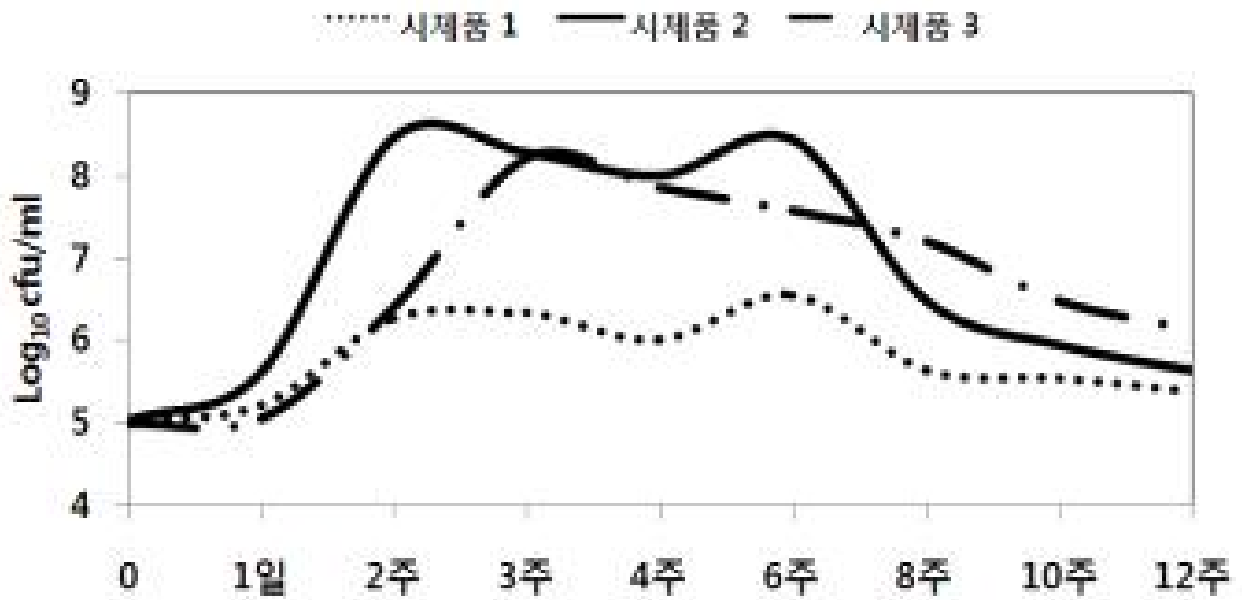


Fig. 11. 시제품의 처리에 따른 토양 내에서의 NJ134균주의 밀도 변화

Table 11. 각 시제품의 항균물질 DAPG 함량과 시들음병 방제가

시제품	항균물질 ^a	시들음병 방제효과(%)
시제품 1	6.7	64.1
시제품 2	6.9	57.8
시제품 3	8.3	69.6

^a 2,4-diacetylphloroglucinol($\mu\text{g/ml}$), ^b Standard(2,4-diacetylphloroglucinol) : 5.70 분

Table 12. 시제품의 토마토 시들음병 방제용 방제 매뉴얼

처리 시기	처리 시제품	처리 내용		
		처리 방법	처리 회수	처리량
정식 전(3월~4월)	토양혼화용 시제품 1, 2, 3	토양혼화처리	1회	100kg/1,000m ²
정식 후(6월~7월)	관주용 시제품 3*	관주처리	10일 간격 4회	100배, 120L/1,000m ²

* 관주용 시제품 3 : Mannitol, Proteose Peptone #3, K₂HPO₄, ZnSO₄·7H₂O, Sucrose, 분말대두(pH7)

Table 13. 시제품의 방제 매뉴얼에 따른 처리에 의한 토마토 시들음병 포장 방제 효율

구 분 ^a	처 리 구	발병율(%)	방제가(%)
토양혼화 + 관주용 시제품 3	시제품 1	32.1 ab	65.1
	시제품 2	35.0 b	62.0
	시제품 3	26.6 a	71.1
대조	<i>B. subtilis</i> ^b	42.5 c	53.9
	수산화동 ^b	48.6 d	47.2
	무처리	92.1 e	-

^a토양 혼화처리(100kg/10a) : 5/15 토마토 정식 : 5/22(유니콘(방울))

^b토마토 시들음병 관리용 시판 유기농자재



【정식전 시제품 토양혼화 처리】



【처리구 병발생】

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 목표달성도

연차별 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 목표 달성도를 아래의 표에 나타냈다. 연차별 연구개발 목표들은 모두 연구계획서의 진도와 같이 일치하여 달성되었으며, 연구의 최종 목표 달성도 역시 표로 나타내어 계획서의 최종목표를 충분히 달성하였다고 생각된다. 다만 2개의 유기목록 자재 근초고왕과 네마토킬의 등록이 수정 서류 보완 때문에 지연되고 있지만, 본 연구가 완료되는 시점에서는 모든 성과가 달성될 것이다.

가. 연차별 연구 목표 달성도

구분	연도	당초 연구개발의 목표		연구개발의 결과	달성도
1차년도	2012	제1세부	○뿌리혹선충 방제용 미생물의 제형화 검토 및 QC마커 개발	-뿌리혹선충 방제용 미생물들의 살선충 효능을 다양한 조건하에서 확립하고 최적 배양 조건을 확립, 2개의 미생물의 시제품을 액제, 유화제, 수화제로 효능을 분석하여 수화제가 가장 높은 활성을 보임. 또한 각 미생물의 특히 QC마커와 생화학적 마커와 본 연구에 사용된 뿌리혹선충들의 마커를 개발	100%
		제2세부	○복숭아 흑진딧물 방제용 미생물 최적 배양조건 확립	-식물성오일 미생물의 살충물질인 dirhamnolipid최적 생산을 위한 C/N율, 탄소원, 질소원, 미량원소 조성비를 설계함. 다양한 조건하에서 살충효율과 살충물질 QC를 통해 최적 살선충 대응량 배양 조건을 확립	100%
		제1협동	○선발균주를 이용한 최적 배양 조건, 대량배양공정 검토	-토양병해 방제용 후보 미생물의 최적 배양 조건을 확립하였고, 방법을 이용하여 대량배양공정을 scale up하고 항균활성, 발생포장하에서 생물적 방제 능력을 검토하여 <i>Bacillus</i> 이용 시제품을 제작함. 개발된 시제품은 시제품의 독성/병원성/약효 및 약해 시험을 진행함	100%
		제2협동	○천연배지 이용 토양병해 시들음병 방제제 개발	-토마토 시들음병 방제용 균주의 병 방제 효능은 배지에 mannitol을 첨가하고 시제품을 제작할 때 콩 분쇄물을 첨가하였을 때 시들음병 방제 효능과 생존율이 현저히 증가함. 시들음병 방제 주요 물질로 DAPG로 동정하였고 최적 배양 조	100%

				건과 DAPG의 생산량이 증가하여 생물적 방제 효능을 증가함을 밝힘. 최적 접종균수와 접종 방법 등을 확립함.	
2차년도	2013	제1세부	○뿌리혹선충 방제 미생물의 유효물질 분석, 기전 분석, 및 시제품 제작 및 사용 방법 확립	-뿌리혹선충 미생물의 살선충 효능의 주요 물질을 동정하여, hydrogen cyanide, 살충 단백질 FitD, DAPG가 주요 살선충 물질로 동정. 새로 동정된 biosurfactant인 chromobactomycin과 키틴 분해 효소도 생물적 방제에 중요한 인자임을 유전학적 생화학적 분석을 통해 밝힘. 또한 분말 수화제로 제작된 시제품의 효능이 예방 위조로 500배 1,000배 희석한 농도에서 살선충효능을 보임	100%
		제2세부	○기초제제의 제형연구에 따른 시제품 제작	-미생물 최적배양조건을 확립하여 액체, 고체, 보조제 첨가 제형연구를 대용량으로 진행, 각 미생물 제형의 살충효능과 살충물질 QC를 통해 최종 시제품(람피드)을 제작하고 농가현장 적용을 통해 최적 사용 방법을 개발	100%
		제1협동	○선발균주의 대량배양공정 및 최적조건 확립, 사용 방법 확립	- <i>Trichoderma</i> 제형 최적배양조건 부재 증량제를 검토하여 제형화 조건을 확립함. Bacillus기반 시제품은 포장에서 사용방법 및 매뉴얼을 정립하였고, 화학농약과의 혼용 가부와 친환경유기목록 자재로서 등재를 신청하여 탄저자비로 등록됨	100%
		제2협동	○토마토 시들음병 방제 시제품의 포장 최적화 및 병 관리 매뉴얼 개발	-개발된 시제품 슈류탄의 제형화하는 과정 중에 DAPG의 QC를 통해 mannitol과 bean을 이용하여 제품을 개발하고 유기목록 자재로 등록하기 필요한 시험분석을 실시하고, 유기목록 자재로 최종등록됨. 녹비작물을 재배한 유기농 포장에서 일부 녹비 작물을 재배하고 환원한 토양에서 토마토 시들음병균과 병 발생량이 감소함. 최종 개발된 슈류탄과 녹비작물을 이용한 포장검정을 통해 사용 매뉴얼을 개발함	100%
3차년도	2014	제1세부	○뿌리혹선충 방제 시제품 유기목록 등재,	-뿌리혹선충 시제품인 네마토킬의 유기목록 자재 등록에 필요한 독성, 병원 미	100%

		사용 매뉴얼 제작 및 실증	생물 검출, 약해 등의 시험분석을 통해 최종 유기목록 자재로 등록. 다자바의 제품은 독성에 문제가 생겨 등록하지 못함. 또한 개발된 시제품들을 이용하여 예방 위주로 관주하였을 때 포장에서 효능을 보임. 키틴분해 미생물의 대량 배양된 배양액을 토마토, 오이 등의 포장 연구에 의해 개발된 사용방법에 의해 효과적으로 방제	
	제2세부	○시제품의 소포장 활성 검증, 유기목록 자재 등록, 방제 매뉴얼 도출	-람피드의 소포장 방제효율을 검정하였고, 작물의 생리학적 형태학적 영향을 검증. 진딧물 방제용 package자재 검증와 유기목록 공시에 필요한 시험분석을 통해서 유기목록자재로 등록함. 람피스 시제품과 식물추출물과의 교호적인 처리에 의한 진딧물 방제 사용 매뉴얼을 제작하여 포장에서 실증함	100%
	제1협동	○개발 시제품의 유기목록 자재등록, 산업화 및 홍보	-Trichoderma기반 시제품의 최적 제형화 조건을 확립하였고 (근초고왕) 독성, 약효/약해, 병원성 시험 진행. 개발된 시제품의 농가 최적 사용 방법 정립. 개발된 시제품 탄저자비 전시회, 농민설명회를 통해 홍보. 근초고왕의 제품은 현재 유기목록 자재의 등록 서류를 제출하여 진행 중임.	95%

나. 최종 평가의 착안점 및 목표 달성도

개발 기술	평가의 착안점	목표치	달성도
난방제성 토양병해 방제용 미생물살균 제 개발 및 산업화	○유용 미생물의 대량배양공정 설계 - <i>B. velezensis</i> NSB-1. <i>Bacillus</i> sp. EML-BS2 - <i>T. harzianum</i> GBF-0208	- 1.0E+09 cfu/ml 이상 - 5.0E+08 cfu/g 이상	100%
	○미생물의 제형화 공정 설계 - 시제품의 경시안정성 - 시제품의 이화학적 안정성	- 경시안정성 1년 이상 - 이화학적 안정성	100%
	○개발된 미생물의 약효 평가 - 대상 병해 방제 및 예방 효과 - 적용 작물 : 적용 확대	- 대상 병해에 대한 방제가 70% 이상 - 3개 작물 이상 적용	100%
	○미생물살균제의 사용 매뉴얼 개발 - 사용 매뉴얼 개발	- 농가에서 바로 사용 가능한 매뉴얼 2건 이상 개발	100%
	○미생물살균제의 산업화 제품 등록	- 2품목 이상 등록 완료	95% (탄저자비 등록, 근초고왕 등록 서류 검토 중)
시들음병 방제용 미생물 농자재 개발	○미생물제제 시제품 개발건수	- 시제품 1건	100%
	○제형 시제품 방제효율 및 대상병해충 적용확대	- 대상병해충 3개 이상 및 70% 이상 방제가	100%
	○제품 현장포장 검정	- 60% 이상	100%
	○현장활용 건수	- 상품화 및 방제매뉴얼 1건	100%
복숭아혹진 딧물 방제용 미생물농자 재	○시제품의 실내 살충효율이 80% 이상인가?	- 시제품 1건	100%
	○제품의 방제효과가 농가포장 검증에서 50% 이상인가?	- 산업화 1건	100%
	○제품이 농가에 활용될 수 있는가?	- 방제 지침서 1건	100%
	○제품의 약효가 6개월 이상 지속하는가?	- 약효보증 6개월	100%
	○제품의 미생물 균체수가 6개월 이상 유지되는가?	- $10^6 \sim 10^8$	100%
	○제품의 병원성 여부는 없는가?	- 농자재 적격성 기준	100%
뿌리혹선충 방제용 미생물농자 재	○제형화된 균주가 6개월 이상 지속하는가?	- 시제품 : 1건	100%
	○미생물제가 뿌리혹선충에 대한 예방 혹은 치료효과가 있는가? (방제효과 60% 이상)	- 산업화 : 1건	100%
	○미생물제가 농가에 활용될 가능성이 있는가?	- 방제 지침서 : 1건	100%
	○미생물제품 특이 마커 개발 및 quality control 활용	- 마커개발 ; 4건	100%

제 2 절 관련 분야 기술 발전에의 기여도

1. 기술적 측면에서의 기여도

가. 미생물 제형의 조건 확립 및 사용 방법 정립에 기여

친환경 미생물 제제 및 천연물 제제를 생산하는 업체들의 경우 제품 제형에 있어 대부분이 단순한 액상 제형이고 동부한농 등의 몇몇 대형 업체만이 설비투자를 통한 입제 제제를 생산하여 판매하고 있다. 하지만 단순한 액상 제형이나 입제제형 외에 합성 농약처럼 다양한 제형의 개발이 미비한 수준이며 효과적인 첨가제나 부가제의 개발도 전무한 실정이다. 따라서 단순히 미생물 혹은 천연 추출물만을 이용하여 효과를 내기 보다는 그들의 효과를 증진시키고 부가적인 효과를 나타내기 위한 뛰어난 부가제 및 첨가제가 필요로 하다. 본 연구과제에서는 개발된 그람 음성균의 분말 수화제와 *Bacillus* 및 *Trichoderma*제형, 농가 대량 배양 제형 등을 개발하여 이들의 효율과 구체적인 최적 배양조건 등은 향후 미생물 농약 개발의 제형화 연구에 밑거름이 될 것으로 판단된다.

나. 미생물 제품의 사용 방법의 standard제시

지금까지 많은 지자체 배양기, 액비, 유기목록 미생물 자재에서 살균 및 살충 물질의 최적화와 이들 물질을 이용한 QC, 또한 효능에 대한 QC가 이루어지지 않고 있어 농가들이 이용하는 데 어려움이 있었다. 본 연구에 의해서 미생물 제품의 제형화된 제품을 개발 단계부터 QC마크와 물질을 이용하여 최적 배양 조건을 확립하고, 제형화하는 조건에서 부제와 배양하는 단계에서 이용하였고, 또한 병원성 미생물들의 검출 여부를 QC하는 단계를 거쳤다. 또한 이들 시제품을 농가에서 사용 가능한 사용 매뉴얼을 같이 개발하였다. 본 연구에서는 짧은 연구 기간 때문에 1회의 포장 연구가 수행이 되었지만, 차후 추가연구를 통해 향후 이들 사용 매뉴얼을 이용하여 효과적으로 유기농산물 생산에 효과적으로 이용할 수 있는 QC검증된 제품과 사용매뉴얼 개발이 필수적임을 향후 미생물 제품 개발에 중요한 정보를 제시하였다.

2. 학문발전에서의 기여도

가. 생물적 방제균 기작 규명 (상위 10% 저널 MPP에 게재)

본 연구에서 수행한 연구결과 중 *Chromobacterium* sp. C61가 생산하는 신규항균물질인 Chromobactomycin과 extracellular chitinase가 배지에 chitin이 존재할 때는 신규항생물질의 농도가 감소하고, extracellular chitinase생성이 증가하는 영향을 미치고, 이들은 생물적 방제에 중요한 인자로 작용함을 생화학적 유전학전 분석을 통해서 밝혀, 2014년 2월 Molecular Plant Pathology에 발표하였다. 본 저널은 Plant Science분야에서 상위 10% 이내의 저널로 impact factor도 4.4인 우수한 저널에 발표하여 그 우수성을 인정받았다. 또한 이와 더불어 4편의 SCI와 SCIE저널에 논문을 발표하였고, 한국학술진흥 재단 등재지에 논문을 발표하여 학문적으로 크게 기여하였다고 생각한다.

나. 토양 시들음병 방제균의 제형화 및 효능 (우수논문상 수상)

토양 시들음병 방제에 관련된 녹비작물과 탄소원첨가와 천연자원을 이용한 시제품 제작과 최적 발현 조건을 확립하고, 또한 QC마커로서 DAPG생성과 이들 탄소원과 천연자원이 살균물질 생성과 밀접한 관계가 있고, 최적 시제품을 이용하여 실제 포장에서 효능이 입증된 연구결과는 SCIE저널인 Plant Pathology Journal에 2편의 논문(Biocontrol of tomato fusarium wilt by a novel genotype of 2,4-diacetylphosphoglucinol producing *Pseudomonas* sp. NJ134과 Mannitol amendments as a carbon source in a bean-based formulation enhances biocontrol efficacy of a 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas* sp. NJ134 against tomato fusarium wilt)을 게재하여 그 우수성을 인정받아 2013년에 우수논문성을 받아 그 우수성을 확인하였다.

나. 복숭아 흑진딧물 방제 미생물 연구결과 (우수 포스터상 수상)

본 연구에서 도출된 연구결과들은 다양한 학술발표를 통해서 13건 이상의 학술발표를 하였다. 그 중 식물오일 분해 미생물을 이용한 복숭아흑진딧물의 연구결과들도 그 학문적 우수성이 국내외 학술발표회에서 우수논문 발표상 2건과 우수포스터상 1건을 수상하여 그 우수성을 인정받았다. 2012년도 한국응용생명화학학회에서 Microorganism-derived bioactive compounds for crop protection을 제목으로 구두발표하여 우수논문발표상을 수상하였다. 2013년 한국응용생명화학학회에서는 Microbial formation of biosurfact-producing *Pseudomonas* sp. EP-3 for aphid control이라는 제목으로 결과를 구두발표하여 우수논문발표상을 수상하였다. 또한 2014년 한국응용생명화학학회 국제학술대회에서 Production of insecticidal rhamnolipids using tangerine peel by *Pseudomonas* sp. EP-3 for control of green peach aphid라는 제목으로 우수포스터상을 수상하여 우수성을 인정받았다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 그람 음성균을 이용한 뿌리혹선충 방제용 미생물 시제품 개발 및 기전 규명

본 연구에서 개발된 뿌리혹선충 방제용 시제품인 네마토킬은 그람 음성균은 *Pseudomonas chlororaphis* O6균주를 이용한 제형화한 제품으로 아직까지 그람음성균은 미생물 농약으로 많이 개발되지 않았는데, 본 연구에서 장기간 그람 음성균의 보존할 수 있는 제형화 기술과 살선충 물질의 최적화 배양 조건 등을 이용한 미생물의 산업화 공정 기술을 개발하였는데, 이러한 기술들은 다른 우수한 그람 음성균의 미생물 농약의 제형화에 확산되어 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

또한 학문적으로도 본 연구에서 얻어진 *Chromobacterium* sp. C61의 살선충활성 물질의 규명과 이들의 발현 조절자에 대한 연구결과와 *P. chlororaphis* O6균주의 살선충 물질로 동정된 HCN과 FitD 단백질의 기능 분석에 대한 결과들은 우수한 논문과 특허로 출원할 예정이고, 또한 *P. fluorescens*균주가 생산하는 DAPG가 항균활성 뿐만 아니라 살 선충활성에 활성을 지닌 연구결과들은 우수한 논문과 특허로 출원할 예정이다. 이러한 기전연구는 또한 이들 물질의 생화학농약으로 개발 가능성이 높을 것으로 생각된다.

이와 더불어, 키틴분해 미생물 복합체를 이용한 농가 대량 배양 방법과 적용 방법 등은 유기농산물 생산에 있어서 뿌리혹선충 방제 사용 매뉴얼을 제공하고 저가 고효율 방제 방법으로 보급될 수 있을 것으로 생각된다.

제 2 절 난 방제용 유기목록 자재 (3종)을 이용한 유기농 토양 병해 방제제 개발

본 연구에서 개발된 토마토 시들음병 방제제인 슈류탄과 역병, 시들음병, 탄저병의 방제제인 탄저자비와 근초고왕의 제품은 유기농 생산에서 개발되지 않은 토양 병해 전문 약제로 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 슈류탄의 경우는 장기간 그람 음성균의 보존할 수 있는 제형화 기술과 토마토 시들음병 방제에 중요한 물질인 DAPG의 최적화 배양 조건 등을 이용한 미생물의 산업화 공정 기술을 개발하였는데, 이러한 기술들은 다른 우수한 그람 음성균의 미생물 농약의 제형화에 확산되어 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

또한 학문적으로도 본 연구에서 얻어진 NJ134에서 그람 음성균을 제형화하는 조건으로 항균활성 물질의 최적 생산에 mannitol과 콩 분쇄물을 이용하여 최적화된 연구결과들은 2편의 국제 학술지에 발표하였지만, 추가적인 연구가 진행된다면 우수한 논문과 특허로 출원될 가능성이 높다. 이러한 기전연구는 또한 이들 물질의 생화학농약으로 개발 가능성이 높을 것으로 생각된다.

제 3 절 개발 미생물의 지자체 배양기에 원제로 제공하여 활용하는 정책적인 방안 제시

본 연구에서 개발된 모든 자재들은 농가나 지지체에서 미생물 배양 사업을 통한 친환경 농업의 농자재로 이용되고 있다. 본 연구 연구에서 등록된 미생물 시제품들을 대량배양하여 적용방법 등을 제시하여 실제 미생물 배양기 사업이나 농가가 효능이 검정된 자재를 배양하는 기술도 함께 제시하였다. 이들 시제품과 농가 사용 매뉴얼들은 농가에서 저가로 효율과 적용이 가능한 병해충 방제제로서의 기능을 지닌 자재를 제공하는 역할을 할 것으로 생각된다.

4. 유기농산물 생산에서의 녹비작물과 토마토 병원균의 밀도 변화에 대한 자료 제공에 의한 자료 제공

본 연구에서 개발된 녹비 작물과 식물병원균의 밀도 변화에 대한 연구결과는 최초의 보고로 지금까지는 녹비작물이 유기물과 영양분으로서만 효능에 집중되었다. 하지만 본 연구에서 일부 녹비작물을 재배하고 환원하는 구에서는 토마토 시들음병균의 밀도가 낮아지는 결과를 얻어서 실제 유기농에서 녹비작물을 이용한 순환농법에 있어서 과학적인 근거를 제시하는 역할을 하였다.

또한 학문적으로도 본 연구에서 얻어진 녹비 작물재배와 환원에 의한 식물병원균의 밀도 변화는 전 세계적으로 연구가 미비한 분야로서 추가적인 연구를 수행하여 유기농업에서 필수적인 녹비작물 재배와 토양 병원균의 영향에 대한 우수한 결과를 도출하여 우수한 논문과 특허를 출원할 예정이다.

5. 개발 미생물은 QC되는 자재이고 개발된 방제 매뉴얼은 수요자의 교육과 컨설팅에 사용되어 유기농 생산에 이용

본 연구에서 개발된 모든 시제품은 QC 마커가 개발되어 있어서 배양기를 통한 대량 배양과 효능을 검증할 수 있는 시스템을 구축하였다. 이들은 유기농산물의 가장 중요한 안정성이 확보되고, 이들 시제품의 효능을 검정하는 QC로 활용이 가능할 것으로 사료된다. 또한 시제품을 농가에서 사용할 수 있도록 방제 매뉴얼이 개발되어 있어서 이들 사용 매뉴얼은 유기농산물 생산 농가에 교육 교재와 컨설팅에 활용이 되어 유기농산물 생산에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

6. 구체적인 교육, 정책 제안 및 홍보 성과

참고로 지난 2년 동안 본 연구에서 개발된 다양한 기술과 결과는 아래의 표에 제시한 바와 같이 다양한 농민 교육에 기여하였다. 또한 2건의 정책건의를 하였고, 많은 홍보 등 다양한 방면에 기여하였다.

교육 및 지도활용 내역				
번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도
1	2011 농업교육프로그램	2011 친환경 유기농자재 기초교육과정	식물병해 방제용 자재 사용법과 실습	2011
2	2011 농업교육프로그램	2011 친환경유기농자재 기초교육과정	식물병해 방제용 자재 사용법과 실습	2011

3	2011 농업교육프로그램	2011 친환경유기농자재 기초교육과정	식물병해 방제용 자재 사용법과 실습	2011
4	유기농자재 심화 교육	2012 친환경유기농자재 심화교육과정	작물병해 진단법과 활용과 식물생장 촉진 미생물과 환경친화 식물보호제를 이용한 친환경 병 방제 기술	2012
5	유기농자재 심화교육	2012 친환경유기농자재 심화교육과정	작물병해 발생원리 및 관리 방법 실습, 친환경자재의 조제 및 사용방법	2012
6	전남 농업마이스터 대학	딸기친환경재배	딸기 육묘와 본포 재배시 발생하는 병과 해충의 친환경자재 활용 방제법 이해와 실습	2011
7	대촌농협 조합원 교육	대촌농협 조합원 강의자료	고추 작물병 발생과정과 친환경 및 저농약 방제 방법	2012
8	미생물활용 친환경 병해충 방제 동향과 방향에 관한 교육	강의 자료	생물농약산업 활성화 방안, 생물농약 시장동향에 관한 현황설명	2012
9	영광농업대학 강의	강의 파워포인트	식물병 발생 원리 및 방제 원리 활용 친환경 병해 방제	2012
10	임곡농협 친환경농업 교육	발표 파워포인트	식물병 발생 원리와 식물병 방제 방법 바로 알기	2012
11	생물농약, 생물비료 관련 연구결과 발표	강의 파일	생물 농약 및 비료에 사용되는 미생물의 연구 결과 발표	2011
12	전남대 유기농업전문과정	2013년 친환경유기농업 전문가교육과정	해충 방제용 천연식물 제제 이론 교육	2013
13	2013 빛고을농업대학 친환경미생물과	작물병해충 방제기술 및 작물병원균 진단실습 파워포인트	작물병해충 방제 기술 및 작물병원균 진단실습	2013
14	2013년 빛고을농업대학 친환경미생물과	미생물 배양 실습 및 활용방안	미생물의 기초 이론 및 배양 원리	2013
15	2013년도 영광농업대학 친환경고추과정	주요병 진단 및 방제 파워포인트	고추 발생 주요병 발생원리 및 방제 방법	2013
16	2013 영광농업대학 친환경고추 과정	주요병 적용 미생물 배양 및 활용	병해 방제용 미생물 농약 및 미생물 종류 및 이용 방법	2013
17	2013 장흥군 농업인대학 친환경농업과정	작물병 발생원리 및 친환경적 예방 방법	주요 작물병 발생원리 및 이를 이용한 병해 방제 방법	2013
18	2013년 친환경유기농업 전문가교육과정	유기농업전문가과정	식물병의 발생원리 및 병원균 종류 실습 및 관찰	2013
19	2013 친환경유기농업 전문가교육과정	친환경유기농업 전문가교육과정	병해 방제용 농자재 조제 및 사용실습	2013
20	2013년도 친환경유기농업 전문가교육과정	친환경유기농업 전문가교육과정	작물병해 진단법과 활용	2013
21	빛고을농업대학 교육 강의	강의 파워포인트	해충 방제제 제제 조제	2013
22	빛고을농업대학 교육 강의	강의파일	해충방제용 미생물제제 교육	2013
23	장흥군 친환경농업대학	강의파일	유기농업 해충방제용 미생물제제	2013
24	친환경유기농업 전문가심화과정	파워포인트	해충방제용 미생물제제 이론 교육	2013

25	친환경유기농업 전문가심화과정	친환경유기농업 강의 과일	해충방제용 제제 조제 실습	2013
----	--------------------	------------------	----------------	------

정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)				
번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용 년도
1	정책건의	농림수산식품부/농진 청	토마토 시들음병의 방제를 위한 영농활용을 제안함	
2	정책건의	농림수산식품부/농진 청	슈도모나스 균주를 이용한 토마토 시들음병 방제 내용을 영농활용 추진	

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	제목 산업재산권 종류	일시
1	지방일간지	남도투데이	토양병해 작물생육증진 미생물제로 해결	2012-05-24
2	중앙전문지	전업농신문	토양병해 방제 생육 증진 일석이조	2012-05-29
3	지방일간지	투데이광주	미생물제 하나로 토양병해 작물생육증진 동시 해결	2012-05-29
4	지방전문지	프라임경제	전남도농기원, 병충해 방제 미생물제 개발	2012-05-23
5	중앙전문지	농촌진흥일보	미생물제 하나로 토양병해와 작물생육증진 동시 해결	2012-05-23
6	월간잡지	yestv	미생물제 하나로 토양병해 작물생육 동시해결	2012-05-23
7	월간잡지	농경과 원예	미생물제 하나로 토양병해와 작물생육 동시 해결	2012-06-01
8	월간잡지	CYLOOKS	미생물제 하나로 토양병해와 작물생육증진 동시 해결	2012-05-23
9	중앙전문지	한국농어촌경제	친환경농업, 결국 시간과 노력이 관건	2011-09-26
10	지방일간지	광남일보	인터뷰 전남대 친환경농업연구소	2011-08-16
11	Internet/PC 통신	news1	전남도농업기술원, 동계휴경기 재배용 녹비작물 선발	2013-03-13
12	중앙전문지	농촌진흥일보	동계 휴경기 재배용 녹비작물 선발	2013-03-13
13	Internet/PC 통신	해피굿팜	시설하우스 휴경기 녹비작물 재배효과 커	2013-03-15

본 연구결과에서 도출된 산업지식재산권 4건, 논문 5건 발표, 국내외학술대회 발표 13건 이상, 우수논문상 및 포스터상 수상 4건에 대한 내용은 아래와 같다.

산업재산권(발명특허, 실용신안, 의장, 규격 등), 신제품, 프로그램개발					
번호	출원등록명	출원등록자명	구분	산업재산권 종류	출원등록일
1	토마토 시들음병 방제용 미생물제제의 제조방법 및 토마토 시들음병 방제용 미생물 제제	강범용; 등	특허출원	특허	2012-05-22
2	담배 모자이크 바이러스 방제용 펩타이드 및 그의 용도	김영철; 김인선; 박주연; 양시용	특허등록	특허	2014-06-30
3	바실러스 벨레젠시스 NSB-1의 대량배양용 배지 조성물 및 이의 배양방법	이재호, 그린바이오텍	특허출원	특허	2014-07
4	트리코텔말 아지아늄 GBF-1048을 이용한 고체배양방법 및 이를 이용한 식물병 방제 방법	이재호, 그린바이오텍	특허출원	특허	2014-07

기타 홍보실적(수상실적)			
번호	일자	홍보명칭 구분	주요내용
1	2013-04-25	우수논문상 (한국식물병리학회)	본 연구에서 수행한 연구 내용으로 한국식물병리학회에서 우수논문상을 수상함
2	2012-03-31	우수논문발표상 (한국응용생명화학회)	Microorganism-derived bioactive compounds for crop protection
3	2013-01-31	우수논문발표상 (한국응용생명화학회)	Microbial formation of biosurfact-producing <i>Pseudomonas</i> sp. EP-3 for aphid control
4	2014-06-20	우수포스터상 (한국응용생명화학회)	Production of insecticidal rhamnolipids using tangerine peel by <i>Pseudomonas</i> sp. EP-3 for control of green peach aphid

논문(국내외 전문학술지) 게재					
번호	논문명	학술지명	주저자명	학술지 게재 일	SCI구분
1	Biocontrol of tomato fusarium wilt by a novel genotype of 2,4-diacetylphosphoglucininol-producing <i>Pseudomonas</i> sp. NJ134	The Plant Pathology Journal	강범용	2012-02-29	SCIE
2	Mannitol amendments as a carbon source in a bean-based formulation enhances biocontrol efficacy of a 2,4-diacetylphloroglucininol-producing <i>Pseudomonas</i> sp. NJ134 against tomato fusarium wilt	The Plant Pathology Journal	강범용	2011-12-30	SCIE
3	Isolation and characterization of oligotrophic bacteria possessing induced systemic disease resistance against plant pathogens	The Plant Pathology Journal	한송희; 김영철	2012-02-28	SCIE
4	Insight into genes involved in the production of extracellular chitinase in a biocontrol bacterium <i>Lysobacter</i> <i>enzymogenes</i> C-3	The Plant Pathology Journal	김현정; 최호성; 김영철	2012-12-31	SCIE
5	Both extracellular chitinase and a new cyclic lipopeptide, chromobactomycin, contribute to the biocontrol activity of <i>Chromobacterium</i> sp. C61	Molecular Plant Pathology	김현정, 최호성, 양시영, 김영철	2014-02-01	SCIE상위 10%
6	키틴분해세균, 키틴 및 그들의 산물이 함유된 미생물제에 의한 오이의 뿌리혹선충 (<i>Meloidogyne</i> spp.)방제	식물병연구	하우중, 김영철, 박서기	2014-06-01	학진등재

국내 및 국제 학술회의 발표				
번호	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명 출원등록일
1	양시영; 김영철; 김인선	Effect of rhamolipids on aphicidal activity against green peach aphid	2012-06-29	BEXCO/부산
2	양시영; 김영철; 김인선	The effect of carbon and nitrogen source on the aphicidal activity of <i>Pseudomonas</i> sp. EP-3	2012-11-09	광주
3	김현정; 이진희; 김인선; 박서기; 김진철; 김영철	Extracellular chitinase and a new cyclic lipopeptide, chromobactomycin, contribute synergically to bicontrol in <i>Chromobacterium</i> sp. C61	2012-10-25	서울대학교
4	류갑성; 김영철; 박서기	Control of the root-knot nematodes of cucumber by chitin-based formulation of chitinolytic bacteria	2012-10-25	서울대학교
5	이진희; 김영철; 이승환; 한송희; 이승제	Genetic and biochemical analysis of microbial traits involved in biocontrol activity of a chitinase-producing bacterium <i>Serratia plymuthica</i> C-1	2011-10-20	제주도
6	김현정; 김영철; 양시영, 김인선	A new cyclic lipopeptide, chromobactomycin, contributes substantially to the antifungal activity of the chitinase-producing biocontrol strain <i>Chromobacterium</i> sp. C61	2011-10-20	제주도
7	이진희; 양시영; 김인선; 김영철	Genetic and biochemical analysis of microbial traits involved in biocontrol activity of a chitinase producing bacterium <i>Serratia plymuthica</i> C-1	2012-06-28	BEXCO/부산
8	이진희; 김현정; 나인흠; 박서기; 김영철	Isolation and characterization of extracellular chitinase deficient mutants in a biocontrol bacterium <i>Lysobacter enzymogenes</i> C-3	2012-06-28	부산
9	강범용; 고숙주; 김도익; 최덕수; 박종대	Effect of mannitol as carbon source of <i>Pseudomonas</i> sp. NJ134 on DAPG production or population density and biocontrol on the tomato fasarium wilt	2011-10-20	무주
10	강범용; 고숙주; 김도익; 최덕수; 박종대	Mannitol regulating growth and acculating DAPG of <i>Pseudomonas</i> sp. NJ134 improved the biocontrol efficacy of the tomato fusarium wilt	2012-06-28	부산
11	김영철	A luxI gene is a key regulaotr for antifungal activity of the chitinase producing biocontrol strain <i>Chromobacterium</i> sp. C61	2013-05-21	Cololado, USA
12	김영철	Extracellular chitinases and a new cyclic lipopeptide contributes synergically to the biocontrol activity in <i>Chromobacterium</i> sp. C61	2013-05-21	Colorado, USA
13	강범용 등	Carbon source, mannitol enhances biocontrol efficacy of a diacetylphloroglucinol-producing, <i>Pseudomonas</i> sp. NJ134 to control tomato Fusarium wilt	2013-05-21	콜로라도 미국

7. 향후 성과 계획

본 연구에서 도출된 성과와 기술들은 다음과 같이 여러 분야에 활용될 수 있을 것이다.

가. 활용방안

- 개발 미생물의 대량배양공정 및 제형화(논문)
- 개발 미생물의 대량배양공정 및 제형화 연구(특허)
- 개발 미생물의 미생물살균제로의 등록(상품화)
- 개발 미생물의 산업화 관련 언론매체 홍보(언론홍보)
- 개발 미생물의 미생물살균제 산업화 공정 개발(기술 실시)
 - 농업인이 사용하기 쉬운 최적 제형개발
 - 대량 배양을 위한 산업용 배지 개발(최적 영양원 선발, 경제성 검토)
 - 미생물의 대량생산에 적합한 최적 배양조건 확립(pH, DO, 통기량, 교반속도 등)
 - scale-up(최대 5,000L) 및 배양수율의 최적화
 - 제형에 적합한 계면활성제, 분산제, 안정제, 증량제 등을 선발
 - 제형화 공정 확립 및 시제품 제작
 - 농가 실증 사업 및 유통을 위한 상품 등록
- 생물학적 활성 구명 및 현장적용방법 확립 (논문 확보, 특허 등록 및 영농활용 자료 도출)
 - 주요 경제작물과, 시설원예, 과수, 채소류 등 각각의 시험 농가를 선정하여 포장시험을 실시
- 미생물살균제로의 등록 (그린바이오텍에서 제품화할 것임)
 - 안전성 평가 시험 실시(인축 독성 및 환경독성 시험)
 - 대상 작물 병해 약효/약해 시험
 - 타작물 병해 약효/약해 시험
- 천연자원 이용 미생물 배양 및 토양병해 방제방법(특허, 논문, 영농활용, 홍보)
- 천연배지 이용 미생물제제 제형화(특허, 논문, 상품화, 영농활용, 홍보)
- 토양병해관리 매뉴얼 개발 및 보급(논문, 영농활용, 홍보)
 - 친환경농업에서 진딧물 외에 다른 해충 방제용 제제로서 활용
 - 친환경농업에서 해충방제 외에 식물병 방제용 제제로서 활용
 - 기존 병해충 방제용 친환경농자재의 협력제제로서 활용
 - 친환경농업 뿐만 아니라 관행농업에서 농약사용을 줄이는 대안형 보조제로서 활용
 - 농작물 대상 적용 이외에 축산사료 항생제 저감용 사료 첨가보조제로서 활용
 - 논문발표 및 강의자료 등 학술적 자료로서 활용
- 제형화된 길항미생물과 키틴함유배지 (산업화)
- 본 연구에서 얻어진 선충방제시스템 (특허)
- 키틴분해미생물들의 뿌리혹선충 억제 기작(논문)
- 처리시기 및 횟수에 따른 미생물제의 뿌리혹선충 방제효과(논문)
- 본 시스템과 제품의 기술이전 (참여기업인 현농) 및 농가 보급

나. 기대 성과

1. 학문적 기술적 측면

- 친환경 유기농업 재배능가를 위한 주요 병해충 피해경감 방제기술 보급
- 토양병해 종합관리 매뉴얼 개발로 친환경 유기농업 현장 애로사항 해결
- 대상병해충 방제를 위한 단편적이고 직접적인 방법을 탈피하여 주변환경과 상호작용하는 요인들의 조합으로 포괄적이고 지속적인 농업의 원천기술 확보
- 토양 병해 방제 기작 구멍을 통한 효과적인 토양 병해 방제법 개발
- 미생물 대량배양기술 및 제형화 기술 개발을 통한 유용 미생물 산업화 시스템 개발
 - 농업해충 방제용 미생물제제 개발 전문인력 양성 및 창업인력 양성
 - 미생물제제 연구인력의 국내외적 경쟁력 강화 및 미관련 인력의 취업을 재고
 - 농업해충 방제용 농가현장 consultant 육성 및 지식기반형 농산업 전문가 육성
 - 해충방제용 소재개발에 있어서 농업현장을 고려한 새로운 학문적 접근방법을 제시
 - 해충방제용 소재개발에 있어서 발생하는 실용화 문제점을 해결하는 논리적 지식 제공
 - 살충물질의 살충기작을 이해하는 기초지식을 함양
 - 미생물제제의 산업화를 위한 학문적 전략을 제시
 - 새로운 개념의 미생물제제 개발 접근법을 통해 관련 학문분야의 세계적인 우위 확보
- 생물농약 보다 방제효과가 뛰어난 미생물제가 되도록 설계되었음
 - 여러 길항미생물 함유
 - 선충 억제에 관련된 다양한 물질 함유 : 다양한 효소 및 항생물질
 - 살포된 길항 미생물의 주요 영양원인 키틴 함유
 - 키틴함유배지는 토양병원균이나 선충의 생장에 도움을 주지 못하는 물질로 구성
- 방제효과를 높일 수 있는 사용지침서
 - 살포시기 및 횟수에 따른 방제효과 검증.
- 선충이외에 토양병의 방제에도 효과 기대

2. 경제 산업적 측면

- 미생물살균제 등록을 통한 농업인의 난방제성 토양 방제제 수요 충족
- 난방제성 토양 병해를 효과적인 방제하는 미생물살균제 개발을 통한 관련 산업 성장
- 토양 병해 방제용 미생물의 산업화 공정 확립을 통한 미생물 산업화 기술 확보
- 친환경 농업 확대를 통한 동종 친환경 산업 발전의 토대 마련
- 토양 병해 방제를 통한 친환경 농산물 수확 증대로 양질의 친환경 농산물 공급 확대
- 친환경 농가 소득 증대 및 친환경 농업 보급 확대가 기대
- 천연자원을 이용한 생물농약 개발로 친환경 농업 활성화
- 유용 미생물 분리 및 기능규명으로 국내자원 보존 및 우수자원 산업화
- 친환경농업 인증농가의 가장 큰 애로사항인 토양병해 관련 제한요인을 해결함으로써 인증 농가 확대 및 유기농산물 생산으로 농가소득 창출

- 난방제성 토양 병해 방제를 통한 화학농약 사용량 저감으로 농업 환경 개선
- 화학농약 사용량 저감을 통한 환경 개선 효과 및 국민 건강 증진
- 무분별한 불량 농자재의 사용으로 인한 농가 피해 경감
- 미생물제제 산업화를 통한 친환경적 생물산업 육성기반 구축에 이바지
- 고부가가치성 친환경농산물 생산에 기여하여 농가소득 증대
- 농업분야 국가전략 사업 육성을 통한 국가 경쟁력 강화
- 세계적인 농산업시장 질서에서 우리나라 미생물농약 산업 경쟁력 강화
- 농가에서 집중적으로 요구되고 있는 해충방제용 생물제제 개발을 통한 미생물산업 수익 신장
- 해충방제용 생물제제 개발 및 보급으로 오염물질로 인한 환경파괴 경제적 손실 경감
- 타 생물산업의 파급적 효과를 통한 우리나라 산업의 동반적 상승효과 기대
- 합성농약 대체물질 사용으로 유기 농산물 생산의 친환경적 관리체계 구축으로 농업 생태계 보호
- 고품질 안전 유기농산물 생산으로 생산자와 소비자의 요구 충족
- 제형화된 길항미생물과 키틴함유배지를 사다가 조제(배양)는 농민이 직접하도록 설계되었음
 - 제형화된 길항미생물 : 적은 양의 미생물이 대량의 미생물로 전환됨 -> 생산단가 저렴
 - 키틴함유배지 : 최소의 양으로 최대의 농도를 얻을 수 있도록 설계 -> 생산단가 저렴
- 농민이 직접 조제하여 사용하도록 설계되었지만, 방제효과가 크고 많은 노력과 비용이 소요되지 않기 때문에 많은 활용이 있으리라 기대됨

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

해당사항 없음

제 8 장 참고문헌

제 1 절 참고문헌

- Arora, N. K., Kim, M. J., Kang, S. C. and Maheshwari, D. K. 2007. Role of chitinase and β -1,3-glucanase activities produced by a fluorescent pseudomonad and *in vitro* inhibition of *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*. Can. J. Microbiol. 53:207–212.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1989. Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York.
- Bardwell, J. C. A., Lee, J.-O., Jander, G., Martin, N. and Belin, D. 1993. A pathway for disulfide bond formation *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1038–1042.
- Cao, X., Studer, S. V., Wassarman, K., Zhang, Y., Ruby, E. G. and Miyashiro. 2012. The novel sigma factor-like regulator RpoQ controls luminescence, chitinase activity, and motility in *Vibrio fischeri*. mBio 3:e00285-11.
- Chang, W.-T., Chen, C.-S. and Wang, S.-L. 2003. An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. Curr. Microbiol. 47:102–108.
- Chattopadhyay, M. K., Tabor, C. W. and Tabor, H. 2009. Polyamines are not required for aerobic growth of *Escherichia coli*: Preparation of a strain with deletions in all of the genes for polyamine biosynthesis. J. Bacteriol. 191:5549–5552.
- Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R. and Oppenheim, A. 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. Plant Soil 129:85–92.
- Cohen-Kupiec, R. and Chet, I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. Curr. Opin. Biotechnol. 9:270–277.
- Dahiya, N., Tewari, R. and Hoondai, G. S. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71:773–782.
- Dutton, R. J., Boyd, D., Berkmen, M. and Bechwith, J. 2008. Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:11933–11938.
- Essenberg, R. C., Candler, C. and Nida, S. K. 1997. Brucella abortus strain 2308 putative glucose and galactose transporter gene: cloning and characterization. Microbiol. 43:1549–1555.
- Flach, J., Pilet, P. E. and Jolles, P. 1992. What's new in chitinase research? Experimentia 48:701–716.
- Henrissart, B. and Davies, G. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. Curr. Opin. Struct. Biol. 7:637–644.
- Heras, B., Shouldice, S. R., Totsika, M., Scanlon, M. J., Schembri, M. A. and Martin, J. L. 2009. DSB proteins and bacterial pathogenicity. Nature Rev. Microbiol. 7:215–225.

- Jelsbak, L., Thomsen, L. E., Wallrodt, I., Jensen, P. R. and Olsen, J. E. 2012. Polyamines are required for virulence in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. PLoS One 7:e36149.
- Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I. and Chermin, L. 2003. Soilborne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. Soil Biol. Biochem. 35:323–331.
- Kim, Y. C., Jung, H., Kim, K. Y. and Park, S. K. 2008. An effective biocontrol bioformulations against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. Eur. J. Plant Pathol. 120:373–382.
- Kim, Y. C., Lee, J. H., Bae, Y.-S., Sohn, B.-K. and Park, S. K. 2010. Development of effective environmentally-friendly approaches to control *Alternaria* blight and anthracnose diseases of Korean ginseng. Eur. J. Plant Pathol. 127:443–450.
- Kim, Y. C., Leveau, J., McSpadden Gardener, B. B., Pierson, E. A., Pierson III, L. S. and Ryu, C.-M. 2011. The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 77:1548–1555.
- Kobayashi, D. Y., Reedy, R. M., Palumbo, J. D., Zhou, J.-M. and Yuen, G. Y. 2005. A *clp* gene homologue belonging to the *Crp* gene family globally regulates lytic enzyme production, antimicrobial activity, and biological control activity expressed by *Lysobacter enzymogenes* strain C3. Appl. Environ. Microbiol. 71:261–269.
- Kobayashi, D. Y., Reedy, R. M., Bick, J. and Oudemans, P. V. 2002. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. Appl. Environ. Microbiol. 68:1047–1054.
- Lee, K. Y., Hoe, K. R., Choi, K. H., Kong, H. G., Nam, J., Yi, Y. B., Park, S. H., Lee, S.-W. and Moon, B. J. 2009. Characterization of a chitinase gene exhibiting antifungal activity from a biocontrol bacterium *Bacillus licheniformis* N1. Plant Pathology J. 25:344–351.
- Li, J.-G., Jiang, Z.-Q., Xu, L.-P., Sun, F.-F. and Guo, J.-H. 2008. Characterization of chitinase secreted by *Bacillus cereus* strain CH2 and evaluation of its efficacy against *Verticillium* wilt of eggplant. BioControl 53:931–944.
- Lorito, M., Hayes, C. K., Di Pietro, A., Woo, S. L. and Harman, G. E. 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 84:398–405.
- Nielson, J. S., Larsen, M. H., Lillebaek, E. M. S. L., Bergholz, T. M., Christiansen, M. H. G., Boor, K. J., Wiedmann, M. and Genes Involved in Chitinase Production 445
- Kallipolitis, B. H. 2011. A small RNA controls expression of the chitinase *ChiA* in *Listeria monocytogenes*. PLoS One 6:e19019.
- Ohno, T., Armand, S., Hata, T., Nikaidou, N., Henrissat, B., Mitsutomi, M. and Watanabe, T. 1996. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. J. Bacteriol. 178:5065–5070.

- Ovadis, M., Liu, X., Gavriel, S., Ismailov, Z., Chet, I. and Chernin, L. 2004. The global regulator genes from biocontrol strain *Serratia plymuthica* IC1270: cloning, sequencing, and functional studies. *J. Bacteriol.* 186:4986–4993.
- Park, S. K., Lee, M. C. and Harman, G. E. 2005. The biocontrol activity of *Chromobacterium* sp. strain C61 against *Rhizoctonia solani* depends on the productive ability of chitinase. *Plant Pathology J.* 21:275 - 282.
- Reyes-Ramirez, A., Escudero-Abaraca, B. I., Aguilar-Uscanga, G., Hayward-Jones, P. M. and Barboza-Corona, J. E. 2004. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *J. Food Microbiol. Sci.* 69:M131–M134.
- Shah, P. and Swiatlo, E. 2008. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* 68:4–16.
- Suzuki, K., Uchiyama, T., Suzuki, M., Nikaidou, N., Regue, M. and Watanabe, T. 2001. LysR-type transcriptional regulator ChiR is essential for production of all chitinases and a chitinbinding protein, CBP21, in *Serratia marcescens* 2170. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:338–347.

제 2 절 참고문헌

- Arora, N.K., Kim, M.J., Kang, S.C. and Maheshwari, D.K. (2007) Role of chitinase and β -1,3-glucanase activities produced by a fluorescent pseudomonad and in vitro inhibition of *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* 53, 207 - 212.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley.
- de Bruijn, I., de Kock, M.J.D., Yang, M., de Waad, P., van Beek, T.A. and Raaijmakers, J.M. (2007) Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol. Microbiol.* 63, 417 - 428.
- Burch, A.Y., Shimada, B.K., Browne, P.J. and Lindow, S.E. (2010) Novel highthroughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5363 - 5372.
- Cheng, Y.-Q., Yang, M. and Matter, A.M. (2007) Characterization of a gene cluster responsible for the biosynthesis of anticancer agent FK228 in *Chromobacterium violaceum* No. 968. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3460 - 3469.
- Christiansen, G., Yoshida, W.Y., Blom, J.F., Portmann, C., Gademann, K., Hemscheide, T. and Kurmayer, R. (2008) Isolation and structure determination of two microcystins and sequence comparison of the McyABC adenylation domains in *Planktothrix* species. *J. Nat. Prod.* 71, 1881 - 1886.
- Cohen-Kupiec, R. and Chet, I. (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin.*

Biotechnol. 9, 270 - 277.

- Dahiya, N., Tewari, R. and Hoondai, G.S. (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 773 - 782
- Dubuis, C., Keel, C. and Haas, D. (2007) Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. *Eur. J. Plant Pathol.* 119, 311 - 328.
- Elhai, J. and Wolk, C.P. (1988) A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene*, 68, 119 - 138.
- Fernando, W.G.D., Nakkereran, S. and Zhang, Y. (2005) Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In: *PGPR: Biocontrol and Biofertilizer* (Siddigui, Z.A., ed.), pp. 67 - 109. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Flach, J., Pilet, P.E. and Jolles, P. (1992) What's new in chitinase research? *Experientia* 48, 701 - 716.
- Gooday, G.W. (1990) The ecology of chitin degradation. *Adv. Microb. Ecol.* 11, 387 - 430.
- Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H. and Fujii, Y. (2002) Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, 61, 693 - 698.
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommès, J., Barthelemy, J.P., Thonart, P. and Ongena, M. (2009) Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol. Plant - Microbe Interact.* 22, 456 - 468.
- Kim, H.J., Park, J.Y., Han, S.H., Lee, J.H., Rong, X., McSpadden Gardener, M.B., Park, S.K. and Kim, Y.C. (2011) Draft genome sequence of the biocontrol bacterium *Chromobacterium* sp. strain C-61. *J. Bacteriol.* 193, 6803.
- Kim, J.-C., Choi, G.J., Park, J.-H., Kim, H.T. and Cho, K.Y. (2001) Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Manag. Sci.* 57, 554 - 559.
- Kim, S.K., Kim, S.R., Choi, M.S., Park, C.E., Kim, Y.C., Kim, K.Y., Whang, K.S., Oh, K.-T. and Kim, I.S. (2007) Soybean oil-degrading bacterial cultures as a potential for control of green peach aphids (*Myzus Persicae*). *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1700 - 1703.
- Kim, Y.C., Jung, H., Kim, K.Y. and Park, S.K. (2008) An effective biocontrol bioformulation against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 120, 373 - 382.
- Kim, Y.C., Lee, J.H., Bae, Y.-S., Sohn, B.-K. and Park, S.K. (2010) Development of effective environmentally-friendly approaches to control *Alternaria* blight and anthracnose diseases of Korean ginseng. *Eur. J. Plant Pathol.* 127, 443 - 450.
- Kim, Y.C., Leveau, J., McSpadden Gardener, B.B., Pierson, E.A., Pierson, L.S. III and Ryu, C.-M. (2011) The multifactorial basis for plant health promotion by plant associated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1548 - 1555.
- Kobayashi, D.Y., Reedy, R.M., Bick, J. and Oudemans, P.V. (2002) Characterization of a

- chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1047 - 1054.
- Kruijt, M., Tran, H. and Raaijmakers, J.M. (2009) Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *J. Appl. Microbiol.* 107, 546 - 556.
- Li, J.-G., Jiang, Z.-Q., Xu, L.-P., Sun, F.-F. and Guo, J.-H. (2008) Characterization of chitinase secreted by *Bacillus cereus* strain CH2 and evaluation of its efficacy against *Verticillium* wilt of eggplant. *BioControl*, 53, 931 - 944.
- Lugtenberg, B. and Kamlikova, F. (2009) Plant growth promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 541 - 546
- Lugtenberg, B. and Kamlikova, F. (2009) Plant growth promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 541 - 546.
- Miller, C.D., Kim, Y.C. and Anderson, A.J. (1997) Cloning and mutational analysis of the gene for the stationary-phase inducible catalase (*catC*) from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 179, 5241 - 5245.
- Monreal, J. and Reese, E.T. (1969) The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 15, 689 - 696.
- Ongena, M. and Jacques, P. (2007) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115 - 125.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L. and Thonart, P. (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9, 1084 - 1090.
- Park, S.K., Lee, M.C. and Harman, G.E. (2005) The biocontrol activity of *Chromobacterium* sp. strain C61 against *Rhizoctonia solani* depends on the productive ability of chitinase. *Plant Pathol. J.* 21, 275 - 282.
- Park, S.K., Kim, C.W., Kim, H., Jung, J.S. and Harman, G.E. (2007) Cloning and high-level production of a chitinase from *Chromobacterium* sp. and the role of conserved or nonconserved residues on its catalytic activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 791 - 804.
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I. and Kock, M.J.D. (2006) Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant - Microbe Interact.* 19, 699 - 710.
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., Nybroe, O. and Ongena, M. (2010) Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1037 - 1062.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sano, T. and Kaya, K. (1995) A 2-amino-2-butenoic acid (Dhb)-containing microcystin isolated from *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron Lett.* 36, 8603 - 8606.
- Sano, T. and Kaya, K. (1998) Two new (*E*)-2-amino-butenoic acid (Dhb)-containing

- microcystin isolated from *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron*, 54, 463 - 470.
- Stauff, D.L. and Bassler, B.L. (2011) Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor. *J. Bacteriol.* 193, 3871 - 3878.
- Tendulkar, S.R., Saikumari, Y.K., Patel, V., Raghutama, S., Munshi, T.K., Balaram, P. and Chattoo, B.B. (2007) Isolation, purification, and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2331 - 2339.
- Wang, J., Liu, J., Chen, H. and Yao, J. (2007) Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 889 - 894.
- Wang, S.L., Yen, Y.H., Tsiao, W.J., Chang, W.T. and Wang, C.L. (2002) Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 337 - 344.
- Watanabe, T., Kimura, K., Sumiya, T., Nikaidou, N., Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Ferrer, S. and Regue, M. (1997) Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 217. *J. Bacteriol.* 179, 7111 - 7117.
- Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S. and Miyashita, K. (1999) Family of chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology*, 145, 3353 - 3363.

제 3 절 참고문헌

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York.
- Brazelton, J., Pfeufer, E., Sweat, T., McSpadden Gardener, B. and Coenen, C. (2008) 2,4-diacetylphloroglucinol alters plant root development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 1349-1358.
- Burch, A.Y., Shimada, B.K., Browne, P.J. and Lindow, S.E. (2010) Novel high-throughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5363-5372.
- Cheng, Y.-Q., Yang, M. and Matter, A.M. (2007) Characterization of a gene cluster responsible for the biosynthesis of anticancer agent FK228 in *Chromobacterium violaceum* No. 968. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3460-3469.
- Chernin, L.S., Winson, M.K., Thompson, J.M., Haran, S., Bycroft, B.W., Chet, I., Williams, P. and Stewart, G.S.A.B. (1998) Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. *J. Bacteriol.* 180, 4435-4441.
- Choi, H. S., Kim, H.J., Kim, I.S., Park, S.K., Gardener, B.B.M., Anderson, A.J., Kim, J.-C. and Kim, Y. C. 2011. The major chitinase produced by *Chromobacterium* sp. C61 is

not a major determinant in inhibition of phytopathogenic fungi. *Mol. Plant. Pathol.* Submitted.

- Dahiya, N., Tewari, R. and Hoondai, G.S. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 773–782.
- de Bruijin, I., de Kock, M.J.D., Yang, M., de Waad, P., van Beek, T.A. and Raaijmakers, J.M. (2007) Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol. Microbiol.* 63:417–428.
- Dubuis, C., Keel, C. and Haas, D. (2007) Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. *Eur. J. Plant Pathol.* 119, 311–328.
- Fuqua, W.C., Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35, 439–468.
- Furumai, R., Matsuyama, A., Kobasshi, N., Lee, K.H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M. and Horinouchi, S. (2002) FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylase. *Cancer Res.* 62, 4916–4921.
- Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H., and Fujii, Y. 2002. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochem.* 61:693–698.
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommès, J., Barthelemy, J. P., Thonart, P., and Ongena, M. 2009. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:456–468.
- Kim, H. J., Choi, H. S., Yang, S. Y., Kim, I. S., Yamaguchi, T., Sohng, J. K., Park, S. K., Kim, J.-C., Lee, C. H., McSpadden Gardener, B. B., and Kim, Y. C. (2014) Both extracellular chitinase and a new cyclic lipopeptide, chromobactomycin, contribute to the biocontrol activity of *Chromobacterium* sp. C61. *Mol. Plant Pathol.* 15, 122–132.
- Kim, H. J., Park, J. Y., Han, S. H., Lee, J. H., Rong, X., McSpadden Gardener, B. B., Park, S. K. and Kim, Y. C. (2011) Draft genome sequence of the biocontrol bacterium *Chromobacterium* sp. strain C-61. *J. Bacteriol.* 193, 6803.
- Kim, J.-C., Choi, G. J., Park, J.-H., Kim, H. T., and Cho, K. Y. 2001. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Manag. Sci.* 57, 554–559.
- Kim, S. K., Kim, S. R., Choi, M. S., Park, C. E., Kim, Y. C., Kim, K. Y., Whang, K. S., O, K.-T., and Kim, I. S. 2007. Soybean oil-degrading bacterial cultures as a potential for control of green peach aphids (*Myzus persicae*). *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1700–1703.
- Kim, S. K., Kim, Y. C., Lee, S., Kim, J.-C., Yun, M. Y., and Kim, I. S. 2011a. Insecticidal activity of rhamnolipid from *Pseudomonas* sp. EP-3 against green peach aphid (*Myzus persicae*). *J. Agric. Food Chem.* 59, 934–938.

- Kim, Y. C., Jung, H., Kim, K. Y., and Park, S. K. 2008. An effective biocontrol bioformulations against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 120, 373–382.
- Kim, Y. C., Lee, J. H., Bae, Y-S., Sohn, B-K., and Park, S. K. 2010. Development of effective environmentally-friendly approaches to control *Alternaria* blight and anthracnose diseases of Korean ginseng. *Eur. J. Plant Pathol.* 127:443–450.
- Kim, Y. C., Leveau, J. McSpadden Gardener, B. B., Pierson, E. A., Pierson III, L. S., and Ryu, C-M. 2011b. The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:1548–1555.
- Kobayashi, D. Y., Reedy, R. M., Bick, J., and Oudemans, P. V. 2002. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1047–1054.
- Kruijt, M., Tran, H., and Raaijmakers, J. M. 2009. Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *J. Appl. Microbiol.* 107:546–556.
- Livak, J. K., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408.
- Lugtenberg, B., and Kamilikova, F. 2009. Plant growth promoting rhizobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 63:541–546.
- McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., Williams, P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiol.* 143:3703–3711.
- Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., and Ikeda, T. 2008. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC12472. *FEMS Microbiol. Lett.* 279:124–130.
- Ongena, M., and Jacques, P. 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiol.* 16:115–125.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L., and Thonart, P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9:1084–1090.
- Park, J. Y., Oh, S. A., Anderson, A. J., Neiswender, J., Kim, J.-C., and Kim, Y. C. 2011. Production of the antifungal compounds phenazine and pyrrolnitrin from *Pseudomonas chlororaphis* O6 is differentially regulated by glucose. *Lett. Appl. Microbiol.* On line, doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03036.x.
- Park, S. K., Kim, C. W., Kim, H., Jung, J. S., and Harman, G. E. 2007. Cloning and high-level production of a chitinase from *Chromobacterium* sp. and the role of conserved or nonconserved residues on its catalytic activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:791–804.

- Potharla, V. Y., Sesener, S. R., and Cheng, Y.-Q. 2011. New insights into the genetic organization of the FK228 biosynthetic gene cluster in *Chromobacterium violaceum* No. 968. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 1508–1511.
- Raudales, R. E., Stone, E., and Gardener, B. B. M. 2009. Seed treatment with 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads improves crop health in low pH soils by altering patterns of nutrient uptake. *Phytopathol.* 99:506–511
- Raaijmakers, J. M., de Bruijin, I., and Kock, M. J. D. 2006. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:699–710.
- Raaijmakers, J. M., de Bruijin, I., Nybroe, O., and Ongena, M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:1037–1062.
- Rajgolikar, G, Chan, K. K., and Wang, H. C. 1998. Effects of a novel antitumor depsipeptide FR901228, on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 51:29–38.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nded. ColdSpringHarborLaboratoryPress, ColdSpringHarbor, NY.
- Stauff, D. L., and Bassler, B. L. 2011. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor. *J. Bacteriol.* 193:3871–3878.
- Tendulkar, S. R., Saikumari, Y. K., Patel, V., Raghotama, S., Munshi, T. K., Balaram, P., and Chattoo, B. B. 2007. Isolation, purification, and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *J. Appl. Microbiol.* 103:2331–2339.
- Wang, J., Liu, J., Chen, H., and Yao, J. 2007. Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Appl. Microbiol. Biotech.* 76:889–894.
- Wolk, C. P., Cai, Y., and Panoff, J. 1991. Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:5355–5359.

제 4 절 참고문헌

- Aballay, E., Ordenes, P., Mårtensson, A. and Persson, P. 2013. Effects of rhizobacteria on parasitism by *Meloidogyne ethiopica* on grapevines. *Eur. J. Plant Pathol.* 135(1): 137–145.
- Abawi, G. S. and Widmer, T. L. 2000. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Appl. Soil Ecol.* 17: 37–47.
- Chen, J., Moore, W. H., Yuen, G. Y., Kobayashi, D. and Caswell-Chen, E. P. 2006.

- Influence of *Lysobacter enzymogenes* strain C3 on nematodes. *Journal of Nematology* 38(2): 233–239.
- Cho, M. R., Lee, B. C., Kim, D. S., Jeon, H. Y., Yiem, M. S. and Lee, J. O. 2000. Distribution of plant-parasitic nematodes in fruit vegetable production areas in Korea and identification of root-knot nematodes by enzyme phenotypes. *Kor. J. Appl. Entomol.* 39: 123–129.
- Choi, Y. E. and Choo, H. Y. 1978. A study on the root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) affecting economic crops in Korea. *Korean. J. Pl. Prot.* 17(2): 89–98.
- Cronin, D., Moënné-Loccoz, Y., Dunne, C. and O’Gara, F. 1997. Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* by chitinase-producing bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 433–440.
- Dunne, C., Crowley, J. J., Monne-Loccoz, Y., Dowling, D. N., de Bruijn, F. J. and O’Gara, F. 1997. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology* 143: 3921 - 3931.
- Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G. and Bahl, H. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Archives of Microbiology* 176: 421 - 426.
- Godoy, G., Rodríguez-Kabana, R., Shelby, R., Morgan-Jones, G. 1983. Chitin amendments for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. II. Effects on microbial population biological control, root-knot nematode, Florida. *Nematropica* 13(1): 63–74
- Hallmann, J., Rodríguez-Kábana, R. and Kloepper, J. W. 1998. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 551–560.
- Henderson, C. F. and Tilton, E. W. 1955. Tests with acaricides against the brown wheat mite. *Journal of Economic Entomology* 48: 157–160.
- Kalaiarasan, P., Lakshmanan, P. I., Rajendran, G. and Samiyappan, R. 2006. Chitin and chitinolytic biocontrol agents for the management of root knot nematode, *Meloidogyne arenaria* in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cv. Co3. *Indian Journal of Nematology* 36(2): 181–186.
- Khalil, M. S. and Badawy, M. E. I. 2012. Nematicidal activity of a biopolymer chitosan at different molecular weights against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Plant Protect. Sci.* 48(4): 170–178.
- Khan, A., Williams, K. and Nevalainen, H. 2004. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the egg shell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. *Biol. Control.* 31: 346–352.
- Kim, D. G. 2001. Occurrence of root-knot nematodes on fruit vegetables under greenhouse conditions in Korea. *Res. Plant Pathol.* 7: 69–79.
- Kim, D. G., Choi, D. R. and Lee, S. B. 2001. Effects of control methods on yields of oriental melon in fields infested with *Meloidogyne arenaria*. *Res. Plant Dis.* 7(1): 42–48.

- Kim, D. G. and Lee, J. H. 2008. Economic threshold of *Meloidogyne incognita* for greenhouse grown cucumber in Korea. *Res. Plant Dis.* 14(2): 117-121.
- Kim, H. J., Choi, H. S., Yang, S. Y., Kim, I. S., Yamaguchi, T., Sohng, J. K., Park, S. K., Kim, J. C., Lee, C. H., Gardener, B. M., and Kim, Y. C. 2014. Both extracellular chitinase and a new cyclic lipopeptide, chromobactomycin, contribute to the biocontrol activity of *Chromobacterium* sp. C61. *Mol. Plant Pathol.* 15(2): 122-132.
- Kim, S. S., Kang, S. I., Kim, J. S., Lee, Y. S., Hong, S. H., Naing, K. W. and Kim, K. Y. 2011. Biological control of root-knot nematode by *Streptomyces sampsonii* KK1024. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 44(6): 1150-1157.
- Kim, Y. C., Jung, H. C., Kim, K. Y. and Park, S. K. 2008. An effective biocontrol bioformulation against Phytophthora blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 120: 373-382.
- Kim, Y. C., Lee, J. H., Bae, Y.-S. Sohn, B.-K. and Park, S.K. 2010. Development of effective environmentally-friendly approaches to control Alternaria blight and anthracnose diseases of Korean ginseng. *Eur. J. Plant Pathol.* 127(4): 443-450.
- Lamovsek, J., Urek, G. and Trdan, S. 2013. Biological control of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) : microbes against the pests. *Acta agriculturae Slovenica.* 101(2): 263-275.
- Lee, Y. S., Park, Y. S., Kim, S. B. and Kim, K. Y. 2013. Biological control of root-knot nematode by *Lysobacter capsici* YS1215. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 46(2): 105-111.
- Liang, L., Meng, Z., Ye, F., Yang, J., Liu, S., Sun, Y., Guo, Y., Mi, Q., Huang, X., Zou, C., Rao, Z., Lou, Z. and Zhang, K. Q. 2010. The crystal structures of two cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi and their contribution to infection against nematodes. *The FASEB Journal* 24: 1391-1400.
- Min, Z. C., Xia, W. and Hua, C. X. 2009. Effect of chitinases produced by *Pochonia chlamydosporia* on egg-hatching of *Meloidogyne incognita*. *Scientia Agricultura Sinica.* 42(10): 3509-3515.
- Mittal, N., Saxena, G. and Mukerji, K. G. 1995. Integrated control of root-knot disease in three crop plants using chitin and *Paecilomyces lilacinus*. *Crop Protection* 14: 647 - 51.
- National Academy of Agricultural Science. 2001. An Illustrated plant parasite nematode book.
- Palma-Guerrero, J., Gómez-Vidal, S., Tikhonov, V. E., Salinas, J., Jansson, H.-B. and Lopez-Liorca, L. V. 2010. Comparative analysis of extracellular proteins form *Pochonia chlamydosporia* grown with chitosan or chitin as main carbon and nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology* 46: 568-574.
- Park, J., Hargreaves, J., McConville, E., Stirling, G., Ghisalberti, E. and Sivasithamparam, K. 2004. Production of leucinostatins and nematocidal activity of Australian isolates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 271-276.
- Radwan,, M. A., Farrag, S. A. A., Abu-Elamayem, M. M. and Ahmed, N. S. 2012.

- Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology* 56: 58-62.
- Rich, J. R., Brito, J. A., Kaur, R. and Ferrell, J. A. 2008. Weed species as hosts of *Meloidogyne*: a review. *Nematropica* 39: 157-185.
- Seo, C. C., Jung, H. C. and Park, S. K. 2007. Control of powdery mildew of pepper using culture solutions of chitinolytic bacteria, *Chromobacterium* sp. and *Lysobacter enzymogenes*. *Res. Plant Dis.* 13(1): 40-44.
- Sharp, R. G. 2013. A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields. *Agronomy* 3: 757-793.
- Southey, J. F. 1986. *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. Her Majesty's Stationery Office.
- Tian, H., Riggs, R. D. and Crippen, D. L. 2000. Control of soybean cyst nematode by chitinolytic bacteria with chitin substrate. *Journal of Nematology* 32(4): 370-376.
- Yuen, G. Y., Broderick, K., Moore, W. H. and Caswell-Chen, E. P. 2006. Effects of *Lysobacter enzymogenes* C3 and its antibiotic dihydromaltophilin on nematodes. *Phytopathology* 96:S128.

제 9 절 참고문헌

- Abott WS (1987) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 3, 302-303.
- Chan, C.K., Forbes, A.R. and Raworth, D.A. (1991) Aphid transmitted viruses and their vectors of the world. *Agric. Can. Res. Branch Tech. Bull.*, 1991-3E, 216.
- Isman, M.B. (1995) Leads and prospects for the development of new botanical insecticides. *Rev. Pestic. Toxicol.*, 3, 1-20
- Isman, M.B. (1997) Neem and other botanical insecticides: Barriers to commercialization. *Phytoparasitica.*, 25, 339-344.
- Eastop, V.F. (1983) The biology of the principle virus vectors. In: Plumb, R.T. and Thresh, J.M. (eds) *Plant Virus Epidemiology.*, Blackwell Scientific Publications, 115-132.
- Ekesi, S., Maniania, N.K., and Ampong-Nyarko, K. (1999) Effect of temperature on germination, radial growth, and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontr. Sci. Technol.*, 9, 177-185.
- Fournier, V., Brodeur, J. (2000) Dose-response susceptibility of pest aphids (Homoptera: Aphididae) and their control of hydroponically grown lettuce with the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*, azaridactin, and insecticidal soap. *Environ. Entomol.*, 29: 568-578.
- Glare, T.R. Milner, R.J., and Chilvers, G.A. (1986) Influence of temperature on the mortality of *Myzus persicae* (Sulzer) due to the fungal pathogen *Zoophthora phalloides*. *J. Aus. Ent. Soc.*, 25, 63-64.

- Lopez-Llorca, L.V., and Carbonell, T. (1998) Use of almond mesocarp for production of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Can. J. Microbiol.*, 44: 886-895
- Marshall, R. K., Lester, M.T., Glare, T.R., Christeller, J.T. (2003) The fungus, *Lecanicillium muscarium*, is an entomopathogen of passionvine hopper (*Scolytopa australis*). *New Zealand J. Crop Hort. Sci.*, 31: 1-7
- Milner, R.J. (1997) Prospects of biopesticides for aphid control. *Entomophaga.*, 42, 227-239.
- Nereus W. G., Alberto N., William F., Daniel K.Y.S., (2004) Production of rhamnolipid by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl. Environ. Microb.*, 5, 2288-2293.
- Ouedraogo, A., Fargues, J., Goettel, M.S., and Lomer, C.J. (1997) Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia.*, 137, 37-43.
- Yeo, H., Pell, J.K., Alderson, P.G., Clark, S.J., and Pye, B.J. (2003) Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Manag. Sci.*, 59, 156-165.
- 김인선, 김익수(2009) 친환경농업 해충방제영 제제의 현황과 전망, 그리고 산업화의 중요성, 한국환경농학회지., 28, 301-309.
- Kim, S.K., Kim, Y.C., Lee, S., Kim, J.C., Yun, M.Y., and Kim, I.S. (2011) Insecticidal activity of dirhamnolipid isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against green peach aphid (*Myzus persicae*), *J. Agric. Food Chem.*, 59, 934-938.

제 10 절 참고문헌

- Adams, G. 2007. The principles of freeze-drying. pp 15-38. *In:* Day, J. G. and Stacey, G. N. Eds. Cryopreservation and freeze-drying protocol. Humana Press Inc., New Jersey.
- Burges, H. D. 1998. Formulation of microbial biopesticides. *Springer-Verlag New York, LLC.* pp. 187-202.
- Cliquet, C. 1999. Influence of culture conditions on production and freeze-drying tolerance of *Paecilomyces fumosoroseus* blastoconidias, *J. Industrial Microbiology and Biotechnology.* **23** : 97-102.
- Mollet, H. et al. 2001. Formulation technology. *Wiley-vch*. Weinheim. page 389-398.
- Shu-hui, T. C., C. W. van Ingen, and J. A. Stalpers. 2007. Freeze-drying fungi using a shelf-freeze drier. pp 119-126. *In:* Day, J. G. and Stacey, G. N. Eds. Cryopreservation and freeze-drying protocol. *Humana Press Inc.*, New Jersey.
- Stanbury P. F., A. Whitaker, and S. J. Hall. 1999. Principles of fermentation technology. *Butterworth-Heinemann*. UK. pp. 93-116, 147-164, 243-272.
- Tan, C. S., C. W. van Ingen, H. Talsma, J. C. van Miltenburg, C. L. Steffensen, Ij. A. Vlug and J. A. Stalpers. 1995. Freeze-Drying of Fungi: Influence of Composition and Glass Transition Temperature of the Protectant. *Cryobiology.* **32** : 60-67.

제 11 절 참고문헌

- Brisbane, P. G., Janik, L. J., Tate, M. E. and Warren, R. F. O. 1987. Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1967–1971.
- Broadbent, D., Mabelis, R. P. and Spenser, H. 1976. C-acetylphloroglucinols from *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochem.* 15: 1785.
- Cho, J.-C. and Tiedje, J. M. 2000. Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5448–5456.
- Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:53–80.
- De Boer, M., Bom, P., Kindt, F., Keurentjes, J. J., van der Sluis, I., van Loon, L. C. and Bakker, P. A. 2003. Control of Fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. *Phytopathology* 93:626–632.
- De La Fuente, L., Mavrodil, D. V., Landa, B. B., Thomashow, L. S. and Weller, D. M. 2006. p_hlD-based genetic diversity and detection of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Micro. Ecol.* 56:64–78.
- Dwivedi, D. and Johri, B. N. 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. *Curr. Sci.* 85: 1693–1703.
- Gerber, N. N. 1969. New microbial phenazines. *J. Heterocyclic Chem.* 6:297–300.
- Haas, D., Keel, C., Laville, J., Maurhofer, M., Oberhansli, T., Schnider, U., Voisard, C., Wuthrich, B. and Défago, G. 1991. Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 involved in the suppression of root diseases. In: *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*, ed. by H. Hennecke and D. P. S. Verma, pp. 450–456. Kluwer Academic Publishers, Hingham, Mass.
- Hashimoto, M. and Hattori, K. 1966a. Isopyrrolnitrin: a metabolite from *Pseudomonas*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 39:410.
- Hashimoto, M. and Hattori, K. 1966b. Oxypyrrrolnitrin: a metabolite of *Pseudomonas*. *Chem. Pharm. Bull.* 14:1314–1316.
- Hays, E. E., Wells, I. C., Katzman, P. A., Cain, C. K., Jacobs, F. A., Thayer, S. A., Doisy, E. A., Gaby, W. L., Roberts, E. C., Muir, R. D., Carroll, C. J., Jones, L. R. and Wade, N. J. 1945. Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 159:725–750.
- Imanaka, H., Kousaka, M., Tamura, G. and Arima, K. 1965. Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic III. Structure of pyrrolnitrin. *J. Antibiot. Ser.* 18:207–210.
- Jarvis, W. R. 1988. Fusarium crown and root rot of tomatoes. *Phytoprotection* 69:49–64.
- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E. and Zitter, T. A. 1991. *Compendium of tomato*

- diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Keel, C., Weller, D. M., Natsch, A., Défago, G., Cook, R. J. and Thomashow, L. S. 1996. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:552 - 562.
- Keel, C., Wirthner, P. H., Oberhansli, T. H., Voisard, C., Burger, Haas, U. D. and Défago, G. 1990. Pseudomonads as antagonists of plants pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis* 9:327–341.
- Kim, Y. C., Lee, J. H., Bae, Y.-S. Sohn, B.-K. and Park, S. K. 2010. Development of effective environmentally-friendly approaches to control *Alternaria* blight and anthracnose diseases of Korean ginseng. *Eur. J. Plant Pathol.* 127:443–450.
- Larkin, R. P. and Fravel, D. R. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Dis.* 82:1022–1028.
- Landa, B. B., de Werd, H. A. E., McSpadden-Gardener, B. B. and Weller, D. M. 2002a. Comparison of three methods for monitoring populations of different genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere. *Phytopathology* 92:129 - 137.
- Landa, B. B., Mavrodi, O. V., Raaijmakers, J. M., McSpadden-Gardener, B. B., Thomashow, L. S. and Weller, D. M. 2002b. Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* to colonize the roots of pea. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3226 - 3237.
- Mavrodi, O. V., McSpadden-Gardener, B. B., Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Weller, D. M. and Thomashow, L. S. 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 91:35 - 43.
- McSpadden-Gardener, B. B., Gutierrez, L. J., Joshi, R., Edema, R. and Lutton, E. 2005. Distribution and biocontrol potential of *phlD* pseudomonads in corn and soybean fields. *Phytopathology* 95:715 - 724.
- McSpadden-Gardener, B. B., Mavrodi, D. V., Thomashow, L. S. and Weller, D. M. 2001. A rapid polymerase chain reaction based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. *Phytopathology* 91:44–54.
- McSpadden-Gardener, B. B., Schroeder, K. L., Kalloger, S. E., Raaijmakers, J. M., Thomashow, L. S. and Weller, D. M. 2000. Genotypic and phenotypic diversity of *phlD*-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1939 - 1946.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596–1599.
- Thomashow, L. S., Weller, D. M., Bonsall, R. F. and Pierson, L. S. 1990. Production of the antibiotic phenazine 1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:908–912.

- Threlfall, R. J. 1972. Effect of pentachloronitrobenzene (PCNB) and other chemicals on sensitive and PCNB-resistant strains of *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 71:173–180.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697 - 703.
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., McSpadden-Gardener, B. B. and Thomashow, L. S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 40:309 - 348.
- Woodruff, H. B. 1988. Natural products from microorganisms. Science 208:1225 - 1229.
- Wratten, S. J., Wolfe, M. S., Anderson, R. J. and Faulkner, D. J. 1977. Antibiotic metabolites from a marine pseudomonad. Antimicrob. Agents Chemother. 11:411–414.

제 12 절 참고문헌

- Anitha, A. and Rabeeth, M. 2009. Control of Fusarium wilt of tomato by bioformulation of *Streptomyces griseus* in green house condition. Afr. J. Basic Appl. Sci. 1:9–14.
- Bushby, H. V. A. and Marshall, K. C. 1977. Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on desiccation. Soil Biol. Biochem. 9:143–147.
- Caesar, A. J. and Burr, T. J. 1991. Effect of conditioning, betaine, and sucrose on survival of rhizobacteria in powder formulations. Appl. Environ. Microbiol. 57:168–172.
- Cappellini, R. A. and Peterson, J. L. 1965. Macroconidium formation in submerged cultures by a nonsporulating strain of *Gibberella zeae*. Mycologia 57:962–966.
- Commarea, R. R., Nandakumara, R., Kandana, A., Sureshb, S., Bharathib, M., Raguchandera, T. and Samiyappana, R. 2002. *Pseudomonas fluorescens* based bio-formulation for the management of sheath blight disease and leaf folder insect in rice. Crop Protect. 21:671–677.
- Douglas, W. J. and Gutterson, N. I. 1986. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. Appl. Environ. Microbiol. 52:1183–1189.
- Duffy, B. K. and Défago, G. 1997. Zinc improves biocontrol of Fusarium crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. Phytopathology 87:1250–1257.
- Duffy, B. K. and Défago, G. 1999 Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2429–2438.
- Dwivedi, D. and Johri, B. N. 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. Curr. Sci. 85: 1693–1703.
- Ferreira, A., O’Byrne, C. P. and Boor, K. J. 2001. Role of σ^B in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*.

- Appl. Environ. Microbiol. 67:4454–4457.
- Ishikawa, R., Shirouzu, K., Nakashita, H., Lee, H. Y., Motoyama, T., Yamaguchi, I., Teraoka, T. and Arie, T. 2005. Foliar spray of validamycin A or validoxylamine A controls tomato Fusarium wilt. *Phytopathology* 95:1209–1216.
- Karus, J. and Loper, J. E. 1995. Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:849–854.
- Keel, C., Weller, D. E., Natsch, A., Défago, G., Cook, R. J. and Thomas, L. S. 1996. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:552–563.
- Kets, E. P. W., Galinski, E. A., de Wit, M., de Bont, J. A. M. and Heipieper, H. J. 1996. Mannitol, a Novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J. Bacteriol.* 178:6665–6670.
- KeU, C., Schneider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D. F. and Défago, G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:4–13.
- Kim, Y. C., Jung, H. Kim, K. Y. and Park, S. K. 2008. An effective biocontrol bioformulation against Phytophthora blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. *Eur J. Plant Pathol.* 120:373–382.
- Kim, Y. C., Lee, J. H., Bae, Y.-S. Sohn, B.-K. and Park, S. K. 2010. Development of effective environmentally-friendly approaches to control Alternaria blight and anthracnose diseases of Korean ginseng. *Eur. J. Plant Pathol.* 127:443–450.
- Leeman, M., Den Ouden, F. M., van Pelt, J. A., Cornelissen, C., Matamala-Garros, A., Bakker, P. A. H. M. and Schippers, B. 1996. Suppression of Fusarium wilt of radish by co-inoculation of fluorescent *Pseudomonas* spp. and root-colonizing fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 102:21–31.
- Marjan, B., Peter, B., Frodo, K., Joost, J. B., Keurentjes, I. S., van Loon, L. C. and Bakker, P. A. H. M. 2003. Control of Fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. *Phytopathology* 93:626–632.
- Matsufuji, M., Nakata, K. and Yoshimoto, A. 1997. High production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnol. Lett.* 19:1213–1215.
- Mavrodi, O. V., McSpadden-Gardener, B. B., Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Weller, D. M. and Thomashow, L. S. 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 91: 35–43.
- McSpadden-Gardener, B. B., Schroeder, L., Kalloger, S. E., Raaijmakers, J. M., Thomashow, L. S. and Weller, A. D. M. 2000. Genotypic and phenotypic diversity of

- phlD*-containing *Pseudomonas* strains from the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1939 - 1946.
- Nowak-Thompson, B., Gould, S. J., Kraus, J. and Loper, J. E. 1994. Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Can. J. Microbiol.* 40:1064–1066.
- Nyström, T. 2001. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Arch. Microbiol.* 176:159–164.
- Osman, M., Ishigami, Y., Someya, J. and Jensen, H. B. 1996. The bioconversion of ethanol to biosurfactants and dye by a novel co-production technique. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 73:851–856.
- Park, J. Y., Oh, S. A., Anderson, A. J., Neiswender, J., Kim, J.-C. and Kim, Y. C. 2011. Production of the antifungal compounds phenazine and pyrrolnitrin from *Pseudomonas chlororaphis* O6 is differentially regulated by glucose. *Lett. Appl. Microbiol.* 52:532–537.
- Raaijmakers, J. M. Bonsall, R. F. and Weller, D. M. 1999. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 89:470–475.
- Shanahan, P., O'Sullivan, D. J., Simpson, P., Glennon, J. D. and O'Gara, F. 1992. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:353–358.
- Shishido, M., Miwa, C., Usami, T., Amemiya, Y. and Johnson, B. K. 2005. Biological control efficiency of Fusarium wilt of Tomato by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo-B2 in different environments. *Phytopathology* 95:1072–1080.
- Slininger, P. J. and Jackson, M. A. 1992. Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:388–392.
- Vidhyasekaran, P., Sethuraman, K., Rajappan, K. and Vasumathi, K. 1997. Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeon pea wilt. *Biol. Cont.* 8:166–171.
- Werra, P., Péchy-Tarr, M., Keel, C. and Maurhofer, M. 2009. Role of Gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4162 - 4174.
- Whister, C. A., Stockwell, V. O. and Loper, J. E. 2000. Lon protease influences antibiotic production and UV tolerance of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2718 - 2725.
- Wood, D. W., Gong, F., Daykin, M. M., Williams, P. and Pierson, L. S. 1997. N-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol.* 179:7663–7670.
- Yigit, F. and Dikilitas, M. 2007. Control of Fusarium wilt of tomato by combination of fluorescent *Pseudomonas*, nonpathogen *Fusarium* and *Trichoderma harzianum* T-22 in

greenhouse conditions. *Plant Pathol. J.* 6:159–163.

Yuan, Z., Cang, S., Matsufuji, M., Nakata, K., Nagamatsu, Y. and Yoshimoto, A. 1998. High production of pyoluteorin and 2,4-diacetylphoroglucinol by *Pseudomonas fluorescens* S272 grown on ethanol as a sole carbon source. *J. Ferment. Bioeng.* 86:559–563.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.