

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001184-01

황토가공나노신소재 이용 친환경 농식품 개발 사업단
(Center for Development of Environmental-friendly
Agricultural Food Products using Red Clay Processed
nano-Materials)

동국대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “황토가공나노신소재 이용 친환경농식품 개발 사업단에 관한 연구” 과제의
보고서로 제출합니다.

2015년 2월 29일

주관연구기관명 : 동국대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 박정극

세부연구책임자 : 박정극

세부연구책임자 : 강호덕

세부연구책임자 : 성정석

협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 박 우 준

협동연구기관명 : 단국대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 이 영 승

참여기업 : 신계양만

참여기업 : 세명양만

참여기업 : 경일양만

참여기업 : (주)성보화학

요 약 문

I. 제 목

황토가공나노신소재 이용 친환경농식품 개발사업단

II. 연구성과 목표 대비 실적

1. 황토 SiO₂ 이온화 가공 수율
 - 목표 : 80%
 - 실적 : 90.08%
2. 황토가공소재 분쇄기술
 - 목표 : 평균입도 200nm
 - 실적 : 습식분쇄에서 나노사이즈보다 마이크로사이즈가 수율 및 경제성에서 유리하여 마이크로사이즈로 가공
3. 황토가공소재의 비료 효능
 - 목표 : 기존 수용성규산질비료 대비 15% 이상 성장 촉진
 - 실적 : 오이의 경우 최대 31.7% 수량 증대
4. 황토가공소재의 농약 효능
 - 목표 : 기존 농약 효능의 50% 달성
 - 실적 : 벼 도열병 방제가 63.4%
5. 장어 수율증대 기술
 - 목표 : 15% 이상 증가
 - 실적 : 장어사료 첨가시 19% 증가
6. 치어 폐사율감소 기술
 - 목표 : 폐사율 5% 이하
 - 실적 : 생존율 95% (대조구 81.7%)
7. 황토가공나노신소재 활용 무/배추 및 과실류용 유기농비료 및 적용 농법 개발
 - 목표 : 적용 농작물 기초 생육조사 및 시비조건 최적화, 적용 농작물 생리적 특성 조사, 무/배추/과실류용 황토가공나노신소재 비료 개발
 - 실적 : 무 100평당 0.5kg (2주 2회), 배추 2000 ppm (2주 3회), 토마토 200배 (2주 4회), 오이 1000배 희석액 (2주 4회); 엽록소 및 카르테노이드 함량 분석, 광합성 및 형광반응 효율 측정, 아스코르브산 함량 분석, 과실 수분 함량 분석, 환원당 함량 증가 및 당도 확인; 무/배추 생육증진, 토마토 생육/수량 증진 및 열과 현상 감소, 오이 생육/수량 증진 및 구부러짐 현상 감소, 기존 규산질 비료 대비 작물 생육 우수
8. 황토가공나노신소재를 활용한 특용작물 재배용 비료 및 농법 개발
 - 목표 : 기능성 비료의 특용작물 재배 적용 및 생육·생리적 특성 조사, 기능성 비료 활용 특용작물 생산 농법 및 향상된 기능성 복합비료 개발

- 실적 : 가공황토 1000배 희석액 처리구에서 생육 가장 우수, 사포닌함량은 1000배 희석액 처리구에서 가장 높음; 왕겨와 가공황토 1000배 희석액을 함께 처리할 경우 장뇌삼의 생육 증진 및 사포닌 함량 증가
9. 황토가공나노신소재 처리 토양에서의 병원균 억제효과 조사를 통한 병해방제기법 개발
- 목표 : 토양전염 식물병원균 방제에 대한 *in vitro* 평가, 황토가공나노신소재 처리 토양 내 식물 병원균 억제 효능 분석, 황토가공나노신소재의 제조공법 및 처리농법 유형 별 토양전염 병해 제어에 대한 농법 제시 (화학적 농약 대비 50% 친환경 방제효율)
 - 실적 : 식물병원성 세균 3종 및 진균 5종 항균효능 발굴, 식물병 유형 별 토양 내 병원성 미생물 감소 처리 농도 및 기간 선정 제시, 배추뿌리혹병 소재 단독처리 농법 제시 및 방제가 53% 획득
10. 농작물의 신선도 향상을 위한 황토가공나노신소재 적용 농법 개발
- 목표 : 황토가공나노신소재의 세균 작용에 대한 *in vitro* 평가, 황토가공나노신소재의 제조공법 및 처리농법이 다양화된 토양에서의 농작물 재배, 농작물 무기질 함량 및 신선도 평가를 통해 황토가공나노신소재를 이용한 농작물 재배 최적화 기법 제시
 - 실적 : 병원성 미생물 억제 작용기전 분석 결과 확보, 배추무름병 및 인삼잘록병에 대한 소재 적용 유용미생물 활성화 농법 2건 제시, 소재 농약 혼용처리 농법 4건 제시(농약대비 방제가): 배추뿌리혹병(286%), 배추검은무늬병(101%), 고추탄저병(99%), 벼키다리병(98%)
11. 황토가공나노신소재 기술 적용 농업용, 토양오염정화용 미생물 제제 개발
- 목표 : 미생물 독성 저감 능력 검증, 오염물질 분해균주와 혼합 배양 최적조건 테스트, 환경정화용 미생물제제 조정 및 처리 방법 최적화
 - 실적 : 독성 오염 물질에 대한 미생물 저항성 증가 확인, 미생물 생장 촉진을 위해 1% 미만 최적화 농도로 처리 조건의 최적화 완료, 1% 미만 농도에서 오염 물질 정화 기능 향상 확인
12. 오염토양환경 개선을 위한 황토가공나노신소재 처리 방법 최적화
- 목표 : 농업미생물에 대한 생물 독성 경감 기능 확인, 오염물질 독성저감에 의한 작물 생장 촉진기능 검증, 토양 처리 방법 및 향후 모니터링 방안 마련,
 - 실적 : 황토 처리에 의한 미생물의 독성 저항 능력 증진 확인, 오염 물질 분해 세균과 복합 처리를 통한 식물생장 촉진 검증, 오염 물질 및 토양 미생물 군집 모니터링 방안 확립
13. 농수산 제품 기능성 평가 표준화 기술개발
- 목표 : 일반성분, 항산화효과, 특수성분, 물리적 특성
 - 실적 : 총폴리페놀함량, DPPH radical 소거능, FRAP, 인삼엑기스 동적유동특성(저장/손실 탄성률, 복소점도), 냉해동 저장 TPA 조직감 , 영양성분(비타민,미네랄,아미노산,지방산)
14. 농수산 제품 품질 평가 표준화 기술개발
- 목표 : 유연학적 특성, 열적 특성, 특수성분 , 관능검사 평가 기술 표준화
 - 실적 : 인삼엑기스정상유동특성(겉보기점도,점조도지수,유동지수), 냉해동 저장 TPA 조직감, 진세노사이드 Rg1, Rb1, Rg3 분석, 묘사분석, 렉시콘 개발

Ⅲ. 연구개발의 목적 및 필요성

전 세계적으로 농약 및 화학비료의 오·남용으로 토양의 산성화, 토양 침식, 지하수 오염, 생태계 파괴, 내성병원균의 출현 등 많은 지구환경 문제가 야기되고 있어 자연생태계의 보존이 위

협받고 있다. 또한, 국민들의 의식 수준 향상과 삶의 질에 대한 관심에 높아지고 있어 자연스레 안전·건강지향적 농산물 및 식품에 대한 선호도가 증가하고 있어 생산자는 농작물의 재배 단계부터 신중히 고려해야 할 필요가 있다. 이에 따라 생태계오염을 최소화 하고 기존의 오염된 토양을 복원시키면서 안전한 농산물을 생산하기 위한 환경 친화적 농자재 개발이 필요한 실정이다. 생태계의 오염을 최소화하기 위한 환경 친화적 생물 비료 및 농약의 개발이 현재 이루어지고 있으나 기존의 생물농약은 비용이 많이 들고 보관기간이 짧으며 방제가 제한적이라는 단점이 있다. 규소 (Silicon)는 토양의 기본성분으로 모든식물이 필요로 하는 물질이다. 벼는 규소를 흡수하는 대표적인 식물이고 규소의 적당한 흡수에 의해서 벼의 수광태세가 좋아져서 광합성을 잘 하게되므로 도복 및 병충해에 대한 예방효과가 있다는 것은 이미 알려져 있다. 규소원으로 규산나트륨을 농업분야에서 대부분 사용하고 있으나 규산나트륨 외에 여러가지 미네랄 성분을 추가하여야 효과가 나타난다. 본 사업단에서는 황토를 원료로 사용하여 규산나트륨 외에 여러 가지 미네랄 성분 및 SiO₂가 제거된 황토를 포함하는 새로운 황토가공신소재를 개발하여 친환경 농업, 식물병해 방제농법개발과 토양식물병원균의 억제효능규명, 뱀장어양식 적용 가능성 및 생산된 농수산물의 맛/영양성 평가를 수행하였다.

IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 황토가공나노신소재 제조공정개발 및 양만장 적용기술 개발

- 황토가공소재 생산을 위한 반응조건확립
- 황토가공소재가 양만장 사육수 수질개산 및 장어수율에 미치는 영향조사
- 친환경유기농자재 목록공시 신청을 위한 시험분석
- 생산공정표준화
- 품질관리규격설정
- 황토가공소재의 경쟁력 분석

2. 황토가공나노신소재 비료 기능성 평가 및 농작물 적용 기술 개발

- 황토가공신소재 기능성 비료 처리에 따른 농작물의 생육분석
- 황토가공나노신소재 적정 시비 조건 규명
- 황토가공나노신소재 처리에 따른 토양의 이화학적 영향 평가
- 황토가공나노신소재를 활용한 과실류와 특용작물의 생육변화 영향 평가
- 농가 보급 가능한 실효성 있는 재배방법 확립 및 매뉴얼 제작

3. 황토가공나노신소재를 이용한 농작물 병해 제어 및 신선도 향상 기법 개발

- 황토가공소재의 식물병원균에 대한 in vitro 생장 저해 효과 평가
- 황토가공소재를 이용한 토양전염 농작물 병해 제어에 대한 친환경 병해방제 농법 제시

- 황토가공소재 적용 식물병원성 미생물 억제 메커니즘 구명 및 농작물 생육촉진 및 병해방제를 위한 황토가공소재 이용 농법 최적화

4. 황토가공나노신소재 유용 토양미생물 작용 및 토양오염 개선 최적화기법 개발

- 황토가공소재의 디젤 분해 촉진 효과 검증
- 황토가공소재의 토양 미생물 생균 수 증가 효과 확인
- 황토가공소재와 디젤 오염에 의한 토양 미생물 군집 변화 연구
- 유류 오염 물질 분해 세균 *Acinetobacter oleivorans* DR1의 유전자 발현 변화에 끼치는 영향 연구
- 황토가공소재에 의한 DR1 alkane 분해 촉진 기작 규명
- 질소 고정 세균의 풍부도 증가 효과 확인
- 황토소재처리 및 식물생장촉진 세균의 효과 연구
- 정기적 황토 처리에 의한 토양 미생물 군집 안정화 효과 검증
- 황토 처리에 의한 생태계 기능 변화 연구하여 토양 생태계 변화를 예측
- 미생물 군집과 토양 생균수, 토양 효소 활성에 미치는 황토가공소재의 농도 별 효과

5. 황토가공나노신소재 적용 농수산물 품질평가 및 가공식품 개발

- 황토가공소재 적용 장어 품질평가
- 황토가공소재 적용 농산물 품질평가
- 황토가공소재 적용 농수산물 평가 표준화 기술 개발
- 황토가공소재 적용 장뇌삼 품질 평가
- 황토가공소재 적용 가공식품 개발을 위한 제품 스크리닝
- 황토가공소재 적용 가공식품 개발
- 황토가공소재 적용 가공식품 품질 평가

V. 연구개발결과

1. 황토가공나노신소재 제조공정개발 및 양만장 적용기술 개발

- 농업용을 위한 황토가공신소재(RCPM-A)는 황토와 가성소다를 혼합한 후 1200°C 조건의 용해로에서 생산 되었다. 본 소재는 SiO₂ 성분을 제거한 황토를 포함하는 soluble part 와 규산나트륨 및 미네랄을 포함하는 non-soluble part로 구분된다.
- 반응조건은 NaOH 첨가량 30%, 반응온도 1200°C, 반응시간 1시간 정도에서 가장 높은 수율을 나타내었다.
- 10mm 지름의 알루미늄볼이 장착된 볼밀을 이용한 습식분쇄 추출공정에서 유효규소 수율은 90.07%를 나타내었다. 이렇게 제조된 RCPM-A의 pH는 12 정도의 강 알칼리 상태이고, 이 상태에서 규소 및 미네랄 성분이 물 가장 잘 녹기 때문에 식물이 쉽게 흡수할 수 있다.

- RCPM-A의 생산추정가는 시중에 유통되는 규산액제 가격의 약 25% 정도로 계산되었다.
- RCPM-A를 산처리하여 pH 5 정도의 RCPM-AS 를 생산할 수 있고, 이것을 사료첨가제로 사용이 가능하며 어류의 수율증대 및 면역증진 기능을 나타낸다.
- RCPM-A를 더욱 산처리하여 pH 4 정도의 RCPM-WT를 생산할 수 있고, 이것은 응집·흡착 기능이 우수하여 수처리제 및 악취제거제로 사용이 가능하다. 암모니아 가스 제거능을 시험한 결과 99.7%를 나타내었고, 수질중의 질소, 인, 부유물질 제거에 탁월한 효과를 보였다.

2. 황토가공나노신소재 비료 기능성 평가 및 농작물 적용 기술

- 황토가공신소재 기능성 비료 처리에 따른 농작물의 생육분석 : 배추, 무, 오이, 토마토, 참외, 수박, 딸기, 상치 의 수량증대. 특히 배추의 경우 무름병 발생 저해. 방울토마토에 적용시 성장촉진
- 토마토에 적용시 과육 무게증가에는 유의성이 없었으나 과육지름, 잎 길이, 잎 너비, 당도, 수량은 유의적으로 증가
- 오이에 적용시 생육 및 수량 증가. 오이의 구부러짐 현상 감소
- 양배추에 적용시 잎과 수량 증가. RCPM 1000, 2000ppm 처리시 무게 증가
- RCPM 처리시 2000ppm 농도에서 광합성 증대 ($25.15 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
- 장뇌삼 적용시 성장에는 차이가 없었으나 사포닌 함량 증가. Re, Rg1, Rb1 함량은 1000ppm에서 가장 높았고, Rb2 함량은 500ppm에서 가장 높음
- 장뇌삼 적용시 발아율 16.17% 증가. 2000배 희석 RCPM 처리와 왕겨 적용시 발아율 38.52% 증가. 사포닌 Rb 1 은 잎 부분에 존재하였고, Rg1 은 뿌리쪽에 존재

3. 황토가공나노신소재 적용 친환경 농법 개발

- 황토가공소재 처리 식물병원균 억제 효능 평가 : 식물병원성 세균 *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *A. tumefaciens* 및 식물병원성 진균 *A. rolfsii*, *F. oxysporum*, *F. oxysporum*, *P. ultimum*, *G. cingulata* 에 대한 생장 억제 효과 구명
- 황토가공소재 입자 및 수용액층의 병원균 생장 억제 효과 평가: 가공 소재의 입자의 흡착을 통한 병원성 진균 생장 억제 구명
- 황토가공소재 장기간 처리 토양 내 병원균 군집 분석을 통한 식물병해 진균의 저감화 효과 검증
- 황토가공소재 처리 병해 억제 효과 포장시험 분석 : 배추 뿌리혹병 및 무름병, 고추잘록병, 인삼잘록병에 대한 황토가공소재 병해억제 효능 구명 및 원인 병원균 저해 효과 구명
- 황토가공소재 처리 병해방제 친환경농법 제시 : 토양 병원균 억제 및 식물병 이병주율 감소 효능을 가지는 황토가공소재의 최적 처리 조건 확립

4. 황토가공나노신소재 유용 토양미생물 작용 및 토양오염 개선 최적화기법 개발

- 황토가공소재의 디젤 분해 촉진 효과 검증
 - 디젤 오염 마이크로코즘에 황토가공소재 첨가 시 30일 후 잔류량 64%임. 이것은 아무 처리도 하지 않았을 때보다 6.6배 분해 효율이 촉진된 것임

- 황토가 첨가된 토양 시료에서 토양 미생물 성장 촉진됨.
 - 대표적인 토양 미생물인 *Acinetobacter oleivorans* DR1, *Pseudomonas putida* KT2440, *Cupriavidus necator*의 성장이 황토가공나노신소재에 의해서 촉진됨
 - 토양에 황토를 처리하고 30일 간 생균수 변화를 측정해 본 결과 디젤만 처리 되었을 때 보다 2배가량 증가함
 - 생균수뿐만 아니라 지방족 탄화수소 방향족 탄화수소 분해균주의 증가 (최대 14배 증가)
- 디젤과 황토가 처리된 토양에서 발생하는 미생물 군집의 변화 연구
 - 지방족 탄화수소 방향족 탄화수소 분해균주 분리하여 Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) 및 염기서열 분석으로 계통수 분석
 - 454 Pyrosequencing으로 군집 변화 연구. 디젤 오염이 발생하였을 때에는 *Nocardioideae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Caulobacteraceae*의 증가가 관찰되었음. 특히 가공황토가 디젤과 함께 처리되었을 때에는 *Pseudomonadaceae*의 증가가 구별되는 특징이었음.
 - Principle component analysis (PCA)로 분석하여 시료간의 유사성을 비교
- 정기적 황토 처리에 의한 농업 토양 미생물 군집의 반응 연구
 - 황토가 처리되지 않은 토양에서 각 군집이 매우 큰 폭으로 매월 변화한 것과는 달리 군집의 구조와 다양성이 비교적 일정하게 유지
 - 군집 구조 분석결과에는 *Rhizobiales* 가 상당 수 존재함. 질소 고정균 다양성은 *Bradyrhizobium* > *Rhizobium* > *Mesorhizobium* 순서로 높은 것으로 나타났음.
- 세포 수준에서 황토에 의한 오염 물질 분해 증진 기작 규명
 - Alkane 1-monooxygenase는 hexadecane만 처리한 조건에서 더 많이 발현 되었지만 황토와 함께 처리한 조건에서도 충분한 발현을 보이고 있었음. 황토를 처리했을 때 지방산 대사에 관련된 유전자들의 발현량이 크게 증가한 것을 확인할 수 있었음.
 - sulfate 대사와 관련된 유전자들이 많이 발현된 것을 확인. alkane을 분해할 때 sulfate 요구량이 증가한다는 사실을 실험을 통해 증명함.
 - Fatty acid methyl ester (FAME) 분석을 통해 유동성의 정도를 측정했음. 그 결과 hexadecane이나 succinate를 첨가한 배지에서는 크게 차이가 없으나 황토를 처리한 균주에서는 유동성 정도가 큼.
- 황토가공나노신소재 및 토양 유용 세균에 의한 식물 성장 촉진
 - 식물의 뿌리에서 동정한 *Pantoea* sp. SBR1이 식물 성장을 촉진하는 신호물질인 indole acetic acid (IAA)를 분비하는 것을 확인
 - 녹두 (*Phaseolus radiatus* L)와 엇갈이 (*Brassica campestris* L.spp. *pekinensis* (Lour.) Rupr.)를 4주 동안 처리 후 관찰한 결과 황토를 처리한 식물들 사이에서 공통적으로 식물의 잔뿌리가 많은 것을 확인할 수 있었음.
 - 두 식물 모두에서 길이 성장이 촉진된 것을 확인할 수 있었으며 SBR1과 같이 처리했을 때 (SBR1 + red)는 이러한 효과가 극대화 된 것을 확인할 수 있었음
 - 대조군보다 DR1을 처리한 식물군에서 줄기의 길이가 더 긴 것으로 나타났음. 황토와 DR1을 같이 처리한 식물군에서는 식물의 성장이 월등히 일어난 것을 줄기 길이를 통해 알 수 있었음. 이는 DR1이 토양에 있는 디젤을 분해한 결과로 식물의 성장이 증가했으며 황토는 이러한 DR1의 성장을 촉진시키므로 더 활발한 디젤 분해가 일어났을 것으로 기대됨.

- 황토 처리에 의한 생태계 기능 변화를 메타지놈 방법으로 연구하고 기능 변화를 예측
 - 미생물 다양성이 다른 토양에 황토를 처리할 경우 나타나는 군집 구조의 변화가 서로 다름 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE로 확인)
 - 메타지놈 데이터로 서로 다른 다양성에서 나타나는 황토의 효과를 분석함. 일반 황토 처리에 의해서는 *Proteobacteria*의 비율은 그대로 유지되는 반면 *Actinobacteria*의 비율이 4.2%에서 13.7%로 상승하였음. 희석 접종에 의해 군집 다양성이 감소할 경우 *Actinobacteria*가 최고 우점문 (phylum)으로 나타났음.
 - 디젤의 잔여 농도를 분석한 결과 다양성이 높은 군집보다 낮은 군집에서 황토 및 가공 황토 처리 시 alkane 분해가 증가되었음. alkane 분해는 *Rhodococcus*, *Nocardioideis*, *Gordonia specie*의 alkane monooxygenase의 증가 때문일 것이라고 판단됨.
 - 메타지놈 분석 결과로 미루어 볼 때 미생물 다양성 감소에 의해 nitrate reduction을 제외한 탈질화 과정에서 큰 감소를 나타내는 것으로 여겨짐.
- 미생물 군집과 토양 생균수, 토양 효소 활성에 미치는 황토가공소재의 농도 별 효과
 - 1000X 와 100X 희석 황토 처리에서는 생균수가 증가하는 것을 알 수 있음. 그러나 5% 까지 높은 농도로 황토를 처리하였을 때 생균수가 관찰되지 않았음. 5% 정도의 높은 농도는 오히려 미생물 성장에 독성이 미치고 나아가서 농업 환경개선에 도움이 되지 않을 가능성이 있음.
 - DGGE 분석 결과를 생균수 측정 결과와 함께 고려하면 황토 농도에 따라 세균 수뿐만 아니라 군집의 구조에도 영향을 미칠 수 있다는 것을 보여주는 결과임. 특히 5%에서는 생균수도 측정되지 않았고 DGGE 밴드도 관찰되지 않았기 때문에 미생물에 독성작용을 일으키는 농도로 여겨짐.

5. 황토가공나노신소재 적용 농수산물 품질평가 및 가공식품 개발

- 동일한 환경에서 양식한 가공황토소재 무처리 장어와 황토처리 장어의 품질 비교 분석
 - 영양성분: niacin 함량 처리구가 무처리 대비 더 높은 함량 나타냄. Tocopherol은 가공황토소재로 양식한 시료에서 무처리구 대비 약 3배 이상 함량 존재
 - 조직감: 냉.해동 저장기간 동안 처리구가 무처리구 대비보다 안정된 조직감을 나타냄
 - 항산화성: DPPH 라디칼 소거능과 FRAP value 분석 결과, 처리구의 항산화 활성이 유의적으로 높게 나타남
 - 묘사분석: ‘기름진 정도’가 무처리구에 비하여 처리구에서 낮게 평가되었으며, 이는 보다 담백하면서 기능성이 강화된 장어의 생산이 가능함을 나타냄
 - 친환경 가공황토소재로 양식한 장어의 경우 기능성이 강화되고 맛이 향상된 고부가가치 제품으로 생산 가능함
- 동일한 환경에서 재배한 황토무처리 배추와 황토처리 배추의 품질 비교 분석
 - 영양성분: 가공황토 처리구에서 칼륨의 함량이 무처리구와 생황토 처리구보다 높게 나타남. 나트륨의 함량은 유의적으로 적게 나타남
 - 조직감: 4주 저장 동안 가공 황토 처리 배추의 견고성이 다른 두 처리군에 비하여 유의적으로 높은 수치를 나타냄. 또한 저장기간 동안 견고성 감소율이 낮아 가공 황토 처리구의

경우 생황토처리구에 비하여 장기간 안정적인 조직감의 유지가 가능한 것으로 판단됨.

- 무처리구, 가공황토소재 처리구1 (4000ppm 8주 재배)와 처리구2 (1차 4000ppm+2차 4000ppm)처리 무의 품질비교
 - 일반성분: 조회분과 조지방 함량에서 처리구1, 2가 대조구 대비 더 높은 함량 나타냄
 - 영양성분: 분석된 모든 무기성분 및 비타민 함량에서 처리구1, 2가 대조구 대비 유의적으로 높은 함량을 나타냄. 처리구1, 2에서 비타민 C의 함량이 대조구보다 높게 나타남과 동시에 항산화 활성 또한 유의적으로 높은 것 확인됨
 - 조직감: 대조구 대비 처리구1, 2의 경우 저장기간 동안 견고성 감소율이 낮아 저장기간 동안 조직감의 유지 향상됨
 - 무 재배 시 친환경 가공황토소재를 화학비료 대신 적용하여 재배할 경우 무의 저장성이 강화된 고품질의 무 생산이 가능해지고 기능성이 부가된 다양한 무를 활용한 고부가가치 제품의 생산 가능
- 무처리구, 처리구(가공황토소재 500, 1000, 2000ppm 적용) 처리 장뇌삼의 품질비교
 - 황토가공소재 처리 장뇌삼 진세노사이드 함량의 증가는 없으나 Rg1과 Rb1의 합계는 5.11~6.44 mg/g으로 나타나 건강기능식품규격(일일섭취량 3-80 mg/g)에 적합함. 향 후 6년 근까지 황토가공소재를 처리하여 진세노사이드 함량 변화 모니터링 예정
- 무처리구, 생황토처리구, 가공황토 처리구 오이/토마토의 품질비교 평가
 - 황토가공소재(가공황토소재 20, 5, 1mL/L 적용)로 재배한 오이, 토마토의 저장 후 견고성이 대조구 대비 안정적으로 유지됨.
- 황토가공소재 적용 장뇌삼활용 제품의 품질평가 표준 프로토콜 개발 및 핵심 지표 발굴
 - 진세노사이드: Rg1, Rb1, Rg3 분석
 - 정상유동특성: 겔보기 점도, 점조도 지수 및 유동지수 엑기스 제품의 품질지표로 활용
 - 동적유동특성: 저장탄성률(G'), 손실탄성률(G''), 복소점도 품질지표로 활용
 - 관능특성: 총 13개의 핵심 관능지표 발굴. 엑기스 제품의 품질지표로 활용
- 장어통조림, 장어육포 개발 및 품질평가
 - 장어통조림: 콩치 통조림과 유사한 맛으로 부드러운 조직감이 특징. 대조구 대비 가공황토소재 적용 장어 통조림의 비타민A가 약 3배, 비타민E가 약 2.5배 높게 나타남
 - 장어육포: 장어 육포제조 공정에서 육포의 조직감을 가지기 위해서는 육포제조 시 오븐 온도와 시간이 가장 중요함. 육포와는 질감이 다소 상이함
 - 장뇌삼 분말 캡슐: 진세노사이드 Rg1의 분석결과, 대조군(1.59 mg/g)에 비해 가공황토 500ppm(1.75 mg/g), 1000 ppm(1.97 mg/g), 2000 ppm(1.74 mg/g)에서 유의적으로 증가함. 진세노사이드 Rb1의 분석결과, 대조군(3.10 mg/g)에 비해 진세노사이드 Rb1의 함량이 가공황토 500 ppm(3.24 mg/g), 1000 ppm(3.89 mg/g)순으로 유의적으로 증가함. 장뇌삼 분말의 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합계는 4.69~5.86 mg/g으로 나타나 건강기능식품규격에 적합함. 원료(장뇌삼)를 세척, 건조, 분말화의 공정을 거쳐서 장뇌삼 건조분말을 제조한 후, 이를 캡슐 충전기를 이용하여 캡슐화하여 정제형 제품으로 개발 완료
- 단무지 및 오이 피클
 - 조직감: 대조구 대비 처리구의 경우 저장기간(25일) 동안 견고성 감소율이 낮아 저장기간 동안 조직감의 유지 향상됨
 - 항산화성: 처리구의 항산화성이 대조구 대비 높게 나타남

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

- 특허 및 상표권 출원 11편
- 특허 및 상표권 등록 9편 (미국특허등록 1편)
- 논문 : SCI 5편 (3편은 in press), 비 SCI 3편
- 학술발표 15편
- 홍보 6건
- 창업 1건
- 기술실시 1건 (연구원 자체 사업화)
- 계약 1건 (현장시험 후 납품)
- 인력양성 15명 (박사 4, 석사 8, 학사 4)

2. 활용계획

- 황토가공신소재 이용 비료 및 병충해 방제제로 사업화
- 황토가공신소재 이용 사료첨가제로 사업화
- 황토가공신소재 이용 수처리제로 사업화
- 황토가공신소재 혼합 농약 사업화
- 황토가공신소재 이용 유류오염토양 복원제로 사업화
- 황토가공신소재 이용 농수산물 및 가공식품 사업화 (장어, 배추, 무, 토마토, 오이, 장어통조림, 장어육포, 피클 등)

SUMMARY

I. Title

Center for development of environmental-friendly agriculture food products using red clay processed nano-materials

II. Comparison of Objectives and Result

1. Production yield of available SiO₂ from red clay

- Objective : 80%
- Result : 90.08%

2. Milling technology of RCPM

- Objective : average particle size of 200nm
- Result : Processing into micro-size was determined because micro-size is excellent in yield and economical feasibility than nano-size

3. Fertilizer efficacy of RCPM

- Objective : 15% increase in quantity than commercial silicate fertilizer
- Result : 31.7% increase in cucumber quantity

4. Pesticide efficacy of RCPM

- Objective : 50% efficacy of commercial pesticide
- Result : the rice blast control of 63.4%

5. Technology for increasing the yield of eel

- Objective : Above 15%
- Result : 19% increase when added in eel feed

6. Technology for decreasing the mortality of juvenile eel

- 목표 : Below 5%
- 실적 : Survival rate of 95% (Control : 81.7%)

7. Technological development of functional fertilizer evaluation and agricultural application of red clay processed nano material

- Objective : To measure the basic growth, physiological characteristics and fertilizer condition optimization for crops such as radish, cabbage, and various fruits (tomatoes, cucumber, watermelon etc.) with the application of red clay processed nano material (RCPM) fertilizer.
- Result: Application of RCPM fertilizer to individual crops was as follows: Radish - 0.5 kg fertilizer per square meter was used once every 2 weeks (total twice). Cabbage - was treated with 2000 ppm once every 2 weeks (total 3 times). Tomato - 200 times dilution once per week (total 4 times). Cucumber: 1000 fold dilution once per week (total 4 times). Each crop was analyzed for the following parameters to determine the effect of RCPM - photopigment content analysis, photosynthesis, chlorophyll fluorescence efficiency, ascorbic

acid content, fruit water content, reducing sugars as well as brix degree. The results obtained for the crops were as follows: radish and cabbage growth and development were promoted, tomato growth, development and yield improved with fruit cracking decreased, cucumber growth, development and yield improved along with fruit bending decreasing. Overall, crop growth and development improved with existing silicate fertilizer treatment.

8. Horticulture and agricultural fertilizer of special crops application of red clay processed nano material

- Objective : To investigate the cultivation application of functional fertilizer on the growth and physiological characterization of special crops for the development of agricultural production techniques and improvement of functional composite fertilizer on special crops.
- Result : Excellent growth and development was observed in 1000 fold dilution of RCPM application. Saponin content was highest at 1000 fold dilution treatments; when dealing with rice husks and 1000 fold dilution with RCPM, growth and development were promoted along with saponin content in ginseng.

9. Development of agricultural methods through research of inhibitory effects of RCPM on plant pathogens in soil.

- Objective : In vitro evaluation of RCRM on growth inhibition of soil borne plant pathogens and development of environmentally friendly agricultural method for plant disease control to prevent soil-borne crop diseases by using RCPM (efficacy of RCPM over 50% compared to chemical pesticide).
- Result : Efficacy of RCPM at 53% against clubroot of chinese cabbage. Antimicrobial activity against 3 bacterial and 5 fungal plant pathogens. Determination of concentration and time of RPM for the control of each detrimental microorganisms in soil.

10. Development of agricultural applications for enhancing freshness of cultivated vegetables.

- Objective : Determination of the mechanisms involved in antimicrobial effects of RCPM and optimization of agricultural techniques using RCPM to control various pathogenic diseases for each crop cultivation.
- Result : Determination of the pathway for inhibitory effect of RCPM on plant pathogens, Guideline of 2 agricultural techniques using RCPM for activation of effective microorganisms. Guideline of 4 agricultural techniques (with efficacy against plant pathogenesis) using RCPM mixed with chemical pesticide to control clubroot of chinese cabbage (286%), black spot disease of chinese cabbage (101%), *Colletotrichum gloeosporioides* (99%), and bakanae disease (98%).

11. Application of RCPM with a microbial agent for agriculture and bioremediation

- Objective : Identification of toxicity-reduction effect on bacterial cells, Optimization of culture condition for bioremediation via pollutant-degrading bacteria and RCPM, Application of RCPM and bacterial cells in agricultural field.
- Results : Bacterial growth promotion at low concentration of RCPM, Enhanced diesel bioremediation by applying low concentration of RCPM

12. Optimization of RCPM treatment condition for bioremediation in polluted agricultural soil

environment

- Objective: Reduction in toxic effect of pollutant on bacterial cells, Plant growth promotion via diesel bioremediation by bacterial cells and RCPM. Monitoring of soil environment after RCPM treatment.
 - Result : Enhancement of bacterial resistance against a toxic pollutant, Plant growth promotion via combined treatment of RCPM and bacterial cells, Monitoring biodegradation profile and bacterial community in agricultural soil.
13. Development of standard quality protocols of functionality for agriculture and fisheries products
- Objective : Proximate composition, antioxidant activities, physical properties
 - Results : total polyphenol contents, DPPH radical scavenging, FRAP, dynamic rheology of ginseng extracts(storage modulus, loss modulus), freeze-thaw stability, TPA, nutrients(vitamin, mineral, amino acid, fatty acid)
14. Development of standard quality protocols for agriculture and fisheries products
- Objective : rheological behaviors, standard protocols for sensory evaluation
 - Results : Steady rheology of ginseng extracts(apparent viscosity, consistency index and flow index), freeze-thaw stability, TPA, Ginsenosides: Rg1, Rb1, Rg3 analysis, descriptive analysis, lexicon development

III. Purpose and necessity

Globally, accumulation of chemical pesticides causes environmental problems including acidification of soil, soil erosion, underground water pollution, ecosystem destruction and emergence of resistant pathogens. Because of such reasons, the conservation of natural ecosystems is under threat. Also, the performance for safe and health-oriented agricultural and food products is growing naturally from the improved level of consciousness and increasing the interest in the life quality of the people. So, the agricultural cultivation process have to be considered carefully by the farmer. Accordingly, development of environmental-friendly agricultural materials is required for the production of safe agricultural product with the minimal contamination of the ecosystem and the contaminated soil remediation. Although eco-friendly bio-pesticides and fertilizer were developed to minimize the contamination of the ecosystem, it's application is limited due to high cost, shorter storage period and inefficiency in plant disease control. It is required to develop new agricultural material and environment-friendly agriculture technique, which is cost effective and applicable to plant pathogen prevention. Silicon is a major component of soil, and that is also present in all kinds of plants. The rice plant is a representative silicon-absorbing plant. It is known that resistance to lodging, disease, pests, and insects increases with an increase in the photosynthetic performance of rice plants. This improved performance is a consequence of improved light reception resulting from adequate silicon absorption [3]. In

cases of silicon depletion in rice, necrosis, wilting, and decreases in crop yields have been observed [4]. Furthermore, the use of silicon-containing fertilizer is known to increase the soil pH, improve the decomposition of organic materials, increase the nutrient-supplying power of soil, and decrease nitrogen leaching by increasing the efficiency of nitrogen use [5,6]. Recently, Na_2SiO_3 has found widespread application as a silicon source in agricultural fields. However, because it is prepared using pure silica sand, application of Na_2SiO_3 in agriculture is hampered by the requirement for addition of other minerals.

In this study, RCPM (red clay processed materials) was produced as a substitute for silicon, as well as clay and minerals. The objectives of this study are to: (1) determine the production conditions and cost of LPM derived from loess, (2) investigate the effect of its application on water treatment and the growth in eel farm, various crops, the main crop disease control, the bioremediation of contaminated soil, and the quality and functionality for the food from the agricultural products treated by RCPM

IV. Contents and Scopes

1. Development of manufacturing process for RCPM (red clay processed nano-material) and application technology in eel farm

- Determination of reaction conditions for the production of RCPM
- Investigation for the effect of RCPM on water treatment and the growth in eel farm
- Test analysis for disclosure application of environmental-friendly organic agro-materials
- Standardization of optimal production process
- Specification establishment of quality control
- Cost-effectiveness analysis

2. Development of agricultural application by evaluating multi-functionalities of red clay-processed nano material in cultivation of agricultural products

- Evaluation of RCPM on the growth of various crops
- Evaluation of proper fertilization in cultivation of cabbage, tomato, and cucumber
- Evaluation of RCPM on the physico-chemical properties of soil
- Evaluation for the effect of RCPM on the growth and quality of special crops
- Establishment of cultivation method.

3. Development of agricultural application to control soil born plantpathogens and freshness of agricultural products using red clay-processed nano material

- In vitro evaluation of RCRM on growth inhibition of soil borne plant pathogens

- Development of agricultural methods through research of inhibitory effects of RCPM on plant pathogens in soil
 - Determination of the mechanism involved in inhibitory effect of RCPM on microbial pathogens and optimization of agricultural methods using RCPM to promote crop growth and disease control
4. Optimization of microbial functions in the agricultural application and bioremediation using red clay-processed nano material
- Effect of red clay on diesel biodegradation
 - Growth enhancement of soil bacteria evidenced in the number of viable cells
 - Change in the microbial community structure by diesel contamination and red clay
 - Differential gene expression of hydrocarbon degrading *Acinetobacter oleivorans* DR1 by red clay
 - Mechanism of enhancement of alkane degradation by DR1
 - Increased abundance of nitrogen-fixing bacteria in red clay-treated soil
 - Plant growth promotion by red clay and plant-growth-promoting bacteria (PGPB)
 - Maintenance of soil bacterial community by regular treatment of red clay
 - Analysis of changes in soil ecological function by red clay
 - Concentration-dependent effect of red clay on microbial community, the number of viable cell, and soil enzyme activity.
5. Processed food products and quality evaluation and development of eel and agricultural products developed using red clay processed nano materials
- Quality evaluation of RCPM-treated eels
 - Quality evaluation of RCPM-treated agriculture products
 - Establishment of standard quality protocols for RCPM-treated agriculture and fisheries products
 - Establishment of standard quality protocols for RCPM-treated mountain cultivated ginseng
 - Screening for RCPM-treated processed products
 - Development of RCPM-treated processed products
 - Quality evaluation of RCPM-treated processed products

V. Results

1. Development of manufacturing process for RCPM (red clay processed nano-material) and application technology in eel farm

- RCPM-A for agricultural use, which is produced from the reaction of loess and NaOH in a furnace at a temperature of 1200 °C, contains non-soluble part of red clay removing SiO₂ and soluble part such as Na₂SiO₃ and minerals.
- The production conditions of RCPM-A were determined to be an NaOH addition ratio of 30%, a reaction temperature of 1200°C, and a reaction time of 1 hr.
- The extraction yield for available SiO₂ from RCPM, using a wet ball milling process with an alumina ball (diameter=10mm), was 90.07%.
- pH of RCPM-A is about 12 and absorbed it easily by the plants because the components of silicon and minerals is easily soluble in water.
- The estimated cost for the production of RCPM-A was 25% that of commercial silicon fertilizer.
- RCPM-AS for feed addition, which shows the function increasing the growth and the level of immunity for eel, is produced about pH 5 by acid-treatment of RCPM-A.
- RCPM-WT for water treatment, which shows strong adsorption function, is produced about pH 4 by severe acid-treatment of RCPM-A.
- RCPM-A was not toxic at acute dermal toxicity and oral toxicity, and showed non-phytotoxicity. In the efficacy test on rice blasts, control value showed 63.4%.
- RCPM-WT showed ammonia deodorization function of 99.7% and the removal function of phosphorous, NH₃-N, and SS(Suspended solid).

2. Development of agricultural application by evaluating multi-functionalities of red clay-processed nano material in cultivation of agricultural products

- Application of RCPM results in the increase for the number of leaves and weights of cabbage, radish, cucumber, tomato, water melon, oriental melon, strawberry and lettuce. Especially, When treated the cabbage, it is effective against inhibition of soft rot. RCPM application to cherry tomato resulted in positive growth responses.
- The effects of the concentration of RCPM on the tomato was investigated. It was shown that it is non-significant in fruit weight but significant in fruit diameter, leaf length, leaf width, brix.
- Cucumber growth was increased by the increase of RCPM concentration. Silicate fertilizer(SF) has risen the growth. Also, number of curved cucumber was decreased in treatment with RCPM and SF. Cucumber number was 133 in the treatment of 200-fold diluted RCPM. that was increased 32 than control.
- Number and length of cabbage leaves were increased in RCPM treatment and weight was stimulated in the 1000, 2000 ppm. Fresh weight measured was relatively high in 1000, 2000 ppm.
- Photosynthetic capacity of RCPM was the highest 25.15 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ (c) at concentration 2,000 ppm and utilization efficiency is tend to show the higher concentration level.

- No difference on growth of ginseng but content of saponin is higher in site treated RCPM of saponin than control. Contents of Re, Rg1, Rb1 were highest in RCPM 1000 ppm, Content of Rb2 was highest in RCPM at concentration of 500ppm.
- The growth and ingredient analysis of ginseng was treated with RCPM and environment friendly cover material. The germination percentage was increased up to 16.17% than control in plots treated with RCPM due to the environmental friendly materials cover that used in ginseng's germination rate. Especially, It was shown over 30% germination rate of RCPM treatment plots over, and rice husks + diluted RCPM of 2000 level with 38.52%. Saponin contents(Rb1, Rg1) were present in different part of ginseng. Rb 1 was present in top part, Rg1 was in underground part.

3. Development of agricultural application to control soil born plant pathogens and freshness of agricultural products using red clay-processed nano material

- We determined the growth inhibitory effect of RCPM against soil borne plant pathogens by in vitro evaluation and established the optimal treatment conditions for RCPM to control plant pathogenic fungi and bacteria .
- Based on the results of inhibitory effect of long-term treatment of RCPM against soil-borne pathogens, we established the method for RCPM treatment with soil to reduce plant disease microorganisms in soil.
- We determined the mechanism involved in growth inhibition of plant pathogenic fungi and suggested eco-friendly agricultural technique for disease control by using RCPM through the crop field test.

4. Optimization of microbial functions in the agricultural application and bioremediation using red clay-processed nano material

- Enhancement of diesel biodegradation by RCPM was confirmed. After 30 days, remaining diesel was reduced to 64% when RCPM was added. This value is 6.6-folds increase more than control.
- Growth enhancement of soil bacteria evidenced in the number of viable cells. Based on 454 pyrosequencing data, the abundance of *Nocardioideae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, and *Caulobacteraceae* were increased in the diesel-contaminated soil. Increase of *Pseudomonadaceae* was the characteristic of RCPM added soil contaminated with diesel.
- Expression of alkane 1-monooxygenase was high in cell growing on hexadecane and hexadecane+RCPM. Highly induced expression of fatty acid metabolism was the

characteristics of cells growing on hexadecane+RCPM. Permeability was increased in the cell growing on hexadecane and hexadecane+RCPM.

- We identified plant growth promotion enhanced by RCPM and the introduced bacteria. Indole acetic acid-producing *Pantoea* sp. SBR1 was isolated from rhizosphere. Growth of root hair of *Phaseolus radiatus* L and *Brassica campestris* L.spp. *pekinensis* (Lour.) Rupr. was confirmed when RCPM was added after 4 weeks. Ecological function in soil ecosystem was altered by RCPM.
- Metagenomic analysis was applied to investigate the effect of RCPM. The portion of *Actinobacteria* was soared to 13.7% from 4.2% by RCPM. The abundance of *Rhodococcus*, *Nocardioidea*, *Gordonia* specie-related alkane monooxygenase was identified in the low-diversity community by metagenomic analysis.

5. Processed food products and quality evaluation and development of eel and agricultural products developed using red clay processed nano materials

- The RCPM-treated processed food products were developed and their quality including proximate analysis, antioxidant capacity, nutrient, texture, rheology, and sensory evaluation was evaluated. These products are environment-friendly and would give high value addition to agriculture and fisheries products in Korea.
- For the RCPM-treated eels, tocopherol of treatments showed greater than 3 times of tocopherol compared to that in control. Treatments showed better texture stability over freeze-thaw cycles than that in control. Treatments showed higher antioxidant activities by DPPH radical scavenging and FRAP value than those in control.
- For the RCPM-treated radish and cabbage, treatment showed better texture stability over freeze-thaw cycles than that in control.
- For the RCPM-treated mountain cultivated ginseng, total amount of Rg1 and Rb1 was 5.11-6.44 mg/g and it was appropriate for health functional food standard (daily intake 3-80 mg/g).
- RCPM-treated cucumber and tomato showed better texture stability than control. In addition, processed products manufactured by RCPM-treated eels, radish, cabbage, and mountain cultivated ginseng showed superiority in texture, nutrients and anti-oxidant activities to the control was observed.

VI. Achievement and its practical use

1. Achievement

- Patent application (including trade mark rights) : 11
- Patent registration (including trade mark rights) : 9 (US patent registration 1)
- Paper : SCI 5 (in press : 3), Non-SCI 3
- Conference : 15
- Promotion : 6
- Company founded : 1
- Technology implementation : 1
- Delivery agreement after field test : 1
- Human resource : 15 (Ph.D. 4 people, Master 8 people, Bachelor 4 people)

2. Practical use

- Fertilizer using RCPM
- Pesticide containing RCPM
- Agent for water treatment using RCPM
- Deodorization agent using RCPM
- Agent for restoration of oil-contaminated soil using RCPM
- Agricultural products using RCPM (eel, cabbage, radish, tomato, cucumber, etc.)
- Processed food products using agricultural products cultivated from RCPM (canned eel goods, pickle, eel jerky, etc.)

CONTENTS

Chapter 1. Introduction and outcome of the research project-----	1
Section 1. Background of research and development-----	1
Section 2. Objective of research and development-----	9
Section 3. Outcome compared to research plans-----	10
Chapter 2 Current status of domestic and foreign technology-----	13
Chapter 3 Contents and results of research and development -----	19
Section 1. Development of manufacturing process for red clay processed nano-material and application technology in eel farm-----	19
Section 2. Development of agricultural application by evaluating multi-functionalities of red clay processed nano-material in cultivation of agricultural products-----	119
Section 3. Development of agricultural application to control soil born plantpathogens and freshness of agricultural products using red clay processed nano-material -----	182
Section 4. Optimization of microbial functions in the agricultural application and bioremediation using red clay processed nano-material -----	238
Section 5. Processed food products and quality evaluation and development of eel and agricultural products developed using red clay processed nano-materials-----	275
Chapter 4. Goal achievement and contribution to the related field-----	355
Section 1. Goal achievement-----	355
Section 2. Contribution to the related field-----	360
Chapter 5. Outcome of research and development and utilization plan -----	362
Section 1. Outcome of research and development-----	362
Section 2. Utilization plan-----	367
Chapter 6. International scientific and technological information obtained during the process of research and development-----	372
Chapter 7. Status of research facility and equipment-----	372
Chapter 8. Performance of laboratory safety management-----	372
Chapter 9. References-----	374
Attachment (Analysis reports for paper, patent, and market)-----	383

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표 -----	1
제 1 절 연구의 필요성 -----	1
제 2 절 연구개발의 목적 -----	9
제 3 절 연구성과 목표 대비 실적 -----	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	19
제1절 황토가공나노신소재 제조공정 및 양만장 적용기술 개발-----	19
제2절 황토가공나노신소재 비료 기능성 평가 및 농작물 적용 기술-----	119
제3절 황토가공나노신소재 적용 친환경 농법 개발-----	182
제4절 황토가공나노신소재 유용토양미생물 작용 및 토양오염개선 최적화기법 개발	238
제5절 황토가공나노신소재 적용 농수산물 품질평가 및 가공식품 개발-----	275
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	355
제1절 목표달성도 -----	355
제2절 관련분야에의 기여도 -----	360
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	362
제1절 연구개발 성과 -----	362
제2절 성과 활용계획 -----	367
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	372
제 7 장 연구시설·장비 현황 -----	372
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적 -----	372
제 9 장 참고문헌 -----	374
첨부 (특허, 논문, 시장분석보고서)-----	383

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구의 필요성

최근 산업발전의 고도화에 따른 환경오염 등으로 인해 현대인들은 인체에 유익한 요소를 찾게 됨은 물론 친환경농식품에 대해 지대한 관심을 쏟고 있다. 이러한 현대사회의 생활환경 및 현대인들의 건강에 대한 관심 속에 건강 사업은 21세기 유망산업으로 자리를 잡아가고 있으며, 환경친화적이면서도 인체에 유익한 요소를 갖도록 하는 소재 및 제품개발을 위해 전 세계적으로 활발한 연구가 진행되고 있다. 특히, 친환경 산업을 위한 항균, 항진균, 탈취, 적조방제, 병충해 방제기능, 식물성장촉진 및 토양개량, 수질개선 등의 기능을 나타내는 소재개발에 대한 연구가 국내에서도 활발하게 진행되어 실생활을 비롯한 다양한 분야에 적용되고 있다. 21세기로 접어들면서 전세계적으로 행복한 삶을 추구하는 문화적 성향이 증가하면서 환경과 위생문제에 대한 인식이 확산되고 있다. 신종플루, 사스, 조류독감, 에이즈 등과 같은 바이러스 감염, 농약과 중금속 오염, 그리고 구제역, 광우병 등과 같은 대규모 전염병의 확산으로 농수산식품 안전성에 대한 관심과 법적 규제가 강화되고 있는 실정으로, 무농약/무화학비료/무항생제 친환경 농수산식품 과 이러한 식품원료를 생산하는 친환경농법 및 친환경 비료·농약·사료기능의 신소재의 개발은 국민 위생과 건강 그리고 경제적 측면에서 매우 중요한 의미를 가진다. 의식주는 물론 모든 생활에 이르기까지 웰빙(Well-being)이 적용되지 않는 곳이 없을 정도로 관심이 증대되어 천연자원을 이용한 제품들이 크게 각광을 받고 있다. 특히, 황토는 예로부터 다방면으로 많이 사용되어 왔기 때문에 생물공학기술을 이용한 기능성 제품 개발은 경쟁력 있는 산업으로 발전 할 수 있음. 지금도 이를 이용한 의약품, 건강보조식품, 친환경 건축자재, 항균제, 비료, 사료 등의 제품개발이 활발히 수행되고 있는 실정이다. 우리나라 천연항균/항생제, 생물농약, 천연비료/사료 등의 친환경산업 분야의 연구개발 수준을 선진국과 비교해보면 소재 분야가 상대적으로 취약한 것으로 보고되고 있다. 따라서 외국의 친환경산업과의 경쟁에서 우위를 선점할 수 있는 것은 새로운 천연 소재의 개발이 될 것으로 판단된다. 한편, 합성 살충제는 독성 때문에 사용량과 용도가 제한적이어서 충분한 효과를 얻지 못할 뿐만 아니라 만성적인 부작용으로 인해 국민건강이 위협받고 있는 실정이다. 반면 천연 살충제는 합성 살충제에 대한 경시와 천연물에서 유래되는 천연제에 대한 선호경향에 따라 많이 사용하지만, 자연적으로 드물게 존재하여 찾기 힘들고, 대부분 유기성분이어서 온도, 화학물질, UV(자외선), 생물학적 저항성 등의 주위 환경변화에 따라 변질되기 쉬운 단점이 있다. 그러나 무기성 천연물질 유래의 항균제 및 천연 살충제는 유기성 천연 살충제의 이러한 단점을 극복할 수 있다. 황토는 자연계로부터 얻어지는 광물로서 지구표면의 약 10%를 덮고 있고 건조 지역과 반건조 지역에 널리 분포되어 있다. 황토는 다공성 구조를 가진 물질로서 흡착, 탈취, 완충작용, 이온교환 및 원적외선 방사 등의 기능 때문에 농축수산분야, 건축소재, 화장품 첨가제 기타 건강증진 목적의 제품에 많이 응용되고 있다. 황토의 주성분인 순수 SiO₂ 실질적으로 불용성이기 때문에, 단순히 이를 주성분으로 하는 황토의 미세분말을 시비할 경우에는 토양과 작물에 유용한 효과를 기대하기는 어렵다. 그러나 본 사업단의 특허기술에 따라 SiO₂가 주성분인 황토에 일정량의 Na, K, Ca, Mg, Zn, Mn, Mo, Co, Cu 등의 물질을 단독 또는 일정배합비율로 혼합한 후 고온에서 가열, 용융시키면 SiO₂의 조직이 깨지면서 SiO₃²⁻형태의 이온으로 존재하게 되어 물과 접촉

시 용해될 수 있다. 이렇게 가공된 나노신소재는 다공성 구조를 가지고 있어서 강력한 흡착기능을 나타내며, 규산 및 미네랄 용출, pH 완충작용 등의 멀티기능성을 나타내고 인체에 무해하며, 탈취, 원적외선 방사, 수질개선 및 토양개량, 규산과 미네랄 제공, 미생물 성장촉진, 병충해방제 등 신개념의 친환경 비료/농약 및 사료로서 크게 기여할 것으로 사료된다. 천연광물은 아래의 표 1-1에 나타난 것처럼 여러 산업분야에 다방면으로 사용되고 있다. 이 중에서 아직 덜 인식되어 있고 개발이 필요한 것이 점토광물이다. 점토광물은 토양의 생성과정에서 재합성된 2차 광물이며, 크기가 0.002mm 이하인 작은 입자이므로 활성표면적이 매우 커서, 각종 성분의 흡착, 방출, 고정, 산도(pH), 통기성, 통수성 등 물리 화학적 성질을 좌우하는 데 커다란 효과를 발휘하는 특성을 가진다. 점토광물은 표 1-2에 나타난 것처럼 주로 규산질(SiO₂)나 알루미늄(Al₂O₃) 성분을 함유하고 있으며, 이들 두 성분이 전체 비율의 75% 이상을 차지하고 있는 것으로 나타난다.

표 1-1. 천연광물의 종류 및 용도

천연광물	용도
인회석(apatite)	비료, 성냥, 인유기화학물, 가축사료
운모(mica)	전기절연체, 펄프제조시 첨가제, 고무, 플라스틱, 페인트, 벽지, 반도체
금강석(diamond)	보석, 연마제, 절단기, 시추용 비트
장석(feldspar)	유리, 에나멜, 유약, 치과용, 장식용, 도자기, 타일
강옥(corundum)	연마제, 보석(루비, 사파이어)
석영(quartz)	유리, 광학기구(현미경), 진동판, 내화벽돌, 보석(자수정)
방해석(calcite)	소다, 칼슘카바이드, 암모니아, 표백분, 유리, 설탕, 용광로의 용재, 편광프리즘, 시멘트
흑연(graphite)	전극, 윤활제, 원자로, 도자기, 연필심, 철강공업, 염료
점토(clay)	요업, 도자기
점토광물 (clay mineral)	요업용(도자기, 내화제), 공업용(섬유, 고무, 화장품, 의약품, 윤활유, 탈색제, 촉매제, 건조제, 계면활성제 등), 토목 건축용, 농업용(토양개량제, 비료, 농약), 환경(오염토양복원, 폐수처리, 방사능폐기물 처리, 쓰레기 매립지, 방수제, 정수제), 서비스업(황토방)

표 1-2. 점토광물의 종류 및 조성

	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃ *	TiO ₂	CaO	MgO	K ₂ O	Na ₂ O	P ₂ O ₅	L.O.I.**
Red clay (본연구 사용)	49.3	26.2	6.9	0.7	0.06	0.73	3.34	n.d.	0.06	11.52
Bentonite	63.3	13.5	2.2	0.2	1.77	1.51	1.63	1.96	0.05	13.2
Clay white	53.1	28.6	2.0	0.1	0.14	0.92	8.12	0.52	0.01	5.95
Diatomite	70.6	11.6	3.5	0.5	0.16	0.63	1.55	0.35	0.11	10.7
Kaolin white ¹	62.7	20.6	1.5	0.2	0.46	0.70	3.78	0.41	0.03	8.98
Kaolin white ²	61.5	21.0	2.0	0.2	0.44	0.72	4.64	1.23	0.02	7.80
Kaolin pink	56.7	25.8	2.2	0.2	0.21	0.56	3.56	0.14	0.03	9.96
Kaolinite	74.6	15.0	0.9	0.1	0.23	0.32	2.38	0.59	0.02	5.60
Pearlite	73.7	13.1	0.8	0.1	0.76	0.16	4.63	3.13	0.02	3.02
Prophyry ¹	69.5	15.0	2.5	0.4	2.22	0.65	3.00	4.42	0.08	1.94
Prophyry ²	69.0	14.8	2.9	0.4	1.43	1.22	2.98	2.97	0.10	3.71
Zeolite	64.1	13.0	1.65	0.27	1.10	0.95	2.55	2.76	0.05	12.9

* 총 Fe 함량; ** 감열광량 (loss on ignition); 1) 및 2) 서로 다른 지역에서 채취

n.d.: 검출되지 않음

점토광물 중에서 황토(Red clay)는 가장 대표적인 건강-환경관련 제품이라 할 수 있다. 옛날부터 이용되던 황토방이나 찻질방 이외에도 황토침대나 매트, 황토방석 등으로도 이용되고 있다. 최근에는 이용분야가 더욱 넓어져 황토내의, 황토신사복, 황토구이판 등 다방면에 이용되고 있고, 비누 첨가제, 건축 마감재, 농업용 비료, 양식장의 사료, 토양오염 정화 또는 적조발생시에 적조 퇴치용 등으로도 이용되고 있다. 이렇게 다방면으로 이용되고있는 황토는 다공질 구조와 흡착능, 탈취, 완충, 이온교환, 원적외선 방사 등의 기능을 가지고 있기 때문이다. SiO_2 성분이 다량 함유된 맥반석 이나 자갈을 분쇄하여 1700°C 이상의 고온에서 알칼리 물질과 반응시켜 수용성 규산염으로 변화시킨 후 부식 및 스케일 방지제, 농업용 규산질 비료 등으로 사용하고 있다. 그러나 기존 공정은 1700°C 의 고온에서 장시간 반응시켜야 하므로 에너지 비용이 상당히 많이 들어 원가를 높이는 문제를 발생시키고 규산추출수율도 매우 낮은 단점이 있다. 황토의 특징은 균질하고 $0.05\text{--}0.005\text{mm}$ 인 미사(silt)가 50% 이상이고 일반적으로 탄산염의 결핵체를 포함하여 미립성, 가소성, 소성고결, 이온교환성, 흡착성, 촉매성, 현탁성, 계면전기성, 수분의 흡수 및 탈수작용, 완충작용등의 성질을 띤다. 황토를 분석한 결과 필수성분으로 40 내지 80 중량%의 SiO_2 , 10 내지 30 중량%의 Al_2O_3 및 0.5 내지 20 중량%의 Fe_2O_3 를 포함하고, 부가성분으로 CaO , MgO , K_2O , Na_2O , TiO_2 및 P_2O_5 등으로 구성되어 있어 미네랄 함량이 높게 함유되어 있는것을 알 수 있다. 이처럼 SiO_2 가 주성분인 황토에 수산화나트륨 등과 같은 염기성 물질과 미네랄성분을 일정량 혼합한 후 고온에서 가열, 용융시키면 하기 반응식에 따라 SiO_2 의 조직이 깨지면서 SiO_3^{2-} 형태의 이온으로 전환된다. 이온 상태의 SiO_3^{2-} 는 친수성을 나타내기 때문에 물과 접촉 시 쉽게 친화될 수 있어 SiO_2 본연의 강한 흡착력, 항균 및 탈취, 미네랄 용출, 용존산소량 증가 등의 기능을 용이하게 발휘할 수 있고 Na, K, Mn, Mg 등과 같은 여러종류의 미네랄을 제공할 수 있다. 최근에 수산물이 건강식품이라는 인식이 확산됨에 따라 수산물의 소비가 증가하고 있으며 이에따라 어류양식 또한 양적으로 증가하고 있다. 그러나, 최근 연안의 오염과 양식생물의 질병 등으로 어류양식을 통한 수산물 공급량은 크게 늘지 않고 있는 실정이며, 이러한 원인은 적극적으로 양식어장을 개발하지 못한 데에서 그 이유를 찾을수 있으나, 근본적으로 연안어장의 오염이 수반된 양식환경의 악화로 연중 양식 생물이 질병에 노출되면서 생산성이 크게 떨어졌기 때문이다. 이에 해상가두리나 육상 넙치양식장의 경우 연간 총생산 경비의 10% 이상을 질병예방 및 치료목적으로 사용하고 있어 수산 양식산업의 경제성을 크게 악화시키고 있다. 또한, 이와같이 양식생물의 질병예방이나 치료목적으로 각종 약제를 남용함에 따라 양식생물의 식품안정성은 떨어지고 내병성도 나빠질 뿐만 아니라 국내외적으로 제기되고 있는 PCB나 다이옥신등의 환경호르몬으로 식품안정성에 대한 의구심이 증폭되고 있어 양식생물에 대한 기호도가 크게 떨어지고 있다. 따라서, 각종 수산약품 및 항생제를 사용하지 않고 식품안정성이 확보된 신선한 양식어류를 공급하기 위해서는 질병이 발생되기 이전에 특정 병원체에 대한 백신을 적극 활용하거나 면역증강물질의 투여로 어체의 면역기능을 강화시키는 것이 필수적이다. 이와같이 불특정 질병에 저항할 수 있도록 어류 자체의 면역능을 증강시켜 주는 물질에 관한 연구가 폭넓게 연구되고 있으며, 이러한 물질로는 β -glucan, 기생충 구제제인 levamisole, 달걀유래 산생물인 EF203 등 많은 연구가 진행되고 있는 물질부터, 감귤발효액, 미역/다시마/파래와 같은 각종 해조류에 이르기 까지 매우 다양하게 연구된 바 있다. 특히 최근에는 각종 생약제를 사료에 첨가하여 사료 효율개선 및 면역 기능 증가 효과가 있다는 보고가 이어지고 있으나 아직까지 식품안전성을 보장하면서 어류 자체의 면역능을 증강시켜 줄 수 있

는 물질에 대한 연구는 미비한 형편이다. 한편, 장어는 고단백 스테미너 식품으로, 비타민 A, B, E가 많이 함유되어 있다. 또한, 장어의 지방에는 DHA 1332mg 과 EPA 742mg 그리고 레시틴(Lecithin) 성분이 풍부하게 포함되어 있어서 인체의 세포막을 구성하는 주성분으로 뇌세포에는 없어서는 안 될 귀중한 물질이다. 장어는 성장단계가 여러단계로 나뉘어져 있으며 인공산란, 부화를 할 수 없는 특이 종으로 그 생리적 특성 때문에 성장중간 단계인 실장어를 체포하여 적당한 환경에서 양식해야 하는데, 실장어 에서 시용장어까지의 일반적 양식과정에서 대량 밀집 형태의 양식으로 인한 세균성 질병 및 기생충성 질병 등 각종 감염성 질병이 발병하여 양식장어가 집단 폐사하는 사례가 많다. 이를 막기위해 양식현장에서 각종 어병균의 구제 목적으로 세균성질환에 대한 항생제를 사료에 첨가하거나 양식장의 물에 첨가하여 사용하고 있으나, 바이러스나 일부 기생충 등의 병원체에 의한 감염성 질환에는 효과가 없고, 이에 대해 수온조절 및 담수 등의 극단적인 물리적 방법을 사용한다 하더라도 감염의 예방 및 치료에 효과적으로 대처하지 못하고 있다. 참여기업중의 하나인 신계양만 양만장의 경우 pH가 매우 낮게 유지되는데 이런 환경조건하에서 양식하는 경우 질병이 발생할 확률이 매우 높으므로 이를 해결하기 위하여 탄산칼슘과 같은 알칼리성 물질을 투입하는 실정이다. 그러나 이러한 약품은 pH 완충능력이 없기 때문에 다시 pH를 하락시키는 단점이 있어서 4시간 단위로 계속 투입해야하는 경우가 발생하고, 이러한 과다 투여에 의해 장어의 폐사를 유발하는 경우가 종종 발생한다. 그러나 황토가공나노신소재를 이용하여 현장실험한 결과 장어에 전혀 독성이 없었고, pH 완충기능이 있기 때문에 소량만 투입해도 pH를 안정적으로 유지할 수 있었다. 또한 규산과 여러종류의 미네랄성분을 방출하기 때문에 수질개선 및 양만장 사육수에 존재하는 미생물의 성장을 촉진시키는 효과도 기대된다.

현대농업은 화학비료나 농약이 다량으로 사용되고 있어 이로 인한 지하수의 오염, 토양침식 등을 야기하고 있으며 야생생물 생식지의 감소 등 환경에 악영향을 미친다. 이 때문에, 생태환경보전형 농업의 추진이 요구되고 있으며 농산물의 안전성을 위해 유기농업에 관한 관심도 높아지고 있다. 하지만, 현재 생산성, 품질, 노동시간 등에 문제점을 가지고 있으며 유기농업 시행을 위한 농업기술 개선법을 찾아내지 못하고 있다. 70년대 이후부터 우리나라 농업은 증산위주의 다수성 품종 및 고투입 농업에 의한 다비재배로 녹색혁명을 달성하였으나, 농경지 토양은 비료와 농약의 과다 사용 등으로 생태계파괴와 토양 및 수질오염 등 농업환경이 악화되어 지속가능한 농업생산이 위협받고 있는 실정이다. 또한 최근 웰빙 붐과 함께 우리나라에도 친환경 농업과 유기농산물에 대한 관심이 증대되고 있으나 유기농법을 이용하는 농민들이 경제적 이득을 위해 작물재배에만 초점을 맞추어 유기농업에 실패하는 경우를 종종 볼 수 있다. 농업에서 가장 중요한 것은 토양으로 양질의 토양은 미생물을 포함하여 여러 유기체들로 구성된다. 토양 미생물들은 유기물질들을 식물이 흡수할 수 있는 작은 물질로 분해함으로써, 직·간접적으로 식물 성장에 영향을 미치고 있다. 또한 근권 미생물들은 뿌리를 에워싸고 있어 토양으로부터 침입하는 여러 병충해들에 대항하는 방패역할을 수행하기도 한다. 농산물의 수입이 자유화되고 있는 현대사회에서 국내 농업이 살아 남기위해서는 세계흐름에 따라 생태자연친화적 농업에 눈을 돌리는 것이 현 시대의 흐름에 역행하지 않는 동시에 외국의 농산물에 경쟁할 수 있는 농산물의 생산기술개발을 통해 차별화된 전략이 따라줘야 함은 분명해졌다. 최근 경제발전과 더불어 국민 소득수준이 향상되면서 소비자들의 고품질 안전농산물에 대한 인식이 크게 변하고 있다. 특히, 최근에는 사회전체에 웰빙(well-being) 트렌드의 확산으로 자연보전은 물론 안전한 양질의 농산물, 즉 비싸더라도 안전한 먹거리를 선호하는 소비 의식과 요구가 높아감에

따라 친환경 농산물에 대한 수요와 생산이 빠른 속도로 증가하고 있다. 21세기의 농업은 기본적인 영양연쇄 과정에서 요구되는 양분을 생태계 내에서의 안정된 물질수지를 통하여 농산물의 생산성을 일정수준까지 향상시키고, 안전성 유지를 위한 순환농업이 되어야 한다. 이들 순환농업이란 좁은 의미에서 임업·축산·경종농업이 물질순환으로 연계된 식량생산체계라고 할 수 있으며, 넓은 의미에서는 마을, 또는 지역 내 유기물의 완전 순환을 통한 균형 있는 물질수지를 유지시켜 생태계를 보전하고 안전한 농산물을 생산하는 일이며, 최종적으로는 이를 기본으로 한 자연순환형 사회가 구축되어야 한다. 생태환경보전 신농법은 농업과 자연(생태)의 조화로 무화학 농약 및 무화학 비료를 최종목표로 천연물 유래(광물, 식물, 미생물)의 농약과 비료를 사용함으로써 지속가능한 농업생산을 유도해 농가소득을 증대하고 생태환경을 보전하면서 동시에 농산물의 안정성을 추구하는 농업을 말하며 궁극적으로 자연생태환경보전과 경제발전의 양립을 추구하는 농업이라 할 수 있다. 토양속에서 유지되고 있는 미생물 군락은 화학비료와 농약의 과용으로 그 평형이 종종 깨어진다. 연작 또한 토양을 황폐화 시키고 고질적인 각종 병충해의 요인이 된다. 최근 자연친화농업에 대한 중요성의 강조로 인해 화학비료와 농약의 사용으로 산성화되고 오염된 토양을 복원할 필요성이 대두되면서 생물학적 방제 목적뿐만 아니라 토양 개량을 위한 미생물 제제의 수요가 계속 증가하고 있다. 본 기술연구의 선행 연구 결과에 따르면 황토가공나노추출물을 재배환경에 투입함으로써 작물의 생장을 증대시키는 효과가 있으며 대표 토양 미생물의 활성을 증가시키는 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 토양에 투입된 황토추출물에 의해 활성이 증가한 미생물은 전체 토양 미생물 군집을 우점 할 것으로 예상된다. 이러한 원리에 따라 황토추출물 처리 토양에서 우점 세균을 선발하여 미생물 제제 개발에 이용하는 것을 연구 개발의 목표로 한다. 미생물 제제는 작물재배환경 및 오염농업 토양환경을 대상으로 하여 개발할 예정이다. 본 기술의 안정성 확보 및 기술 효과 분석을 위해서 해당 농업환경에 존재하고 있는 토착 미생물 군집에 대한 정보 획득이 선행되어야 한다. 최근 염기서열 분석관련 기술의 급격한 발달은 미생물 군집 분석 효과적인 도구로 이용되고 있다. 비교적 저렴한 비용과 간편한 실험 기법이 요구되는 Pyrosequencing 과 같은 기술을 이용하여 미생물 군집 분석 연구를 진행할 예정이며 이를 통해 도출된 결과는 농업환경에 도입되는 미생물과 황토가공나노신소재의 영향을 정확하게 파악하여 본 과제의 기술 효율 증가 검증, 효과 개선에 과학적인 근거를 제시할 것이다. 또한 작물생산이 촉진된 토양에서 우점한 미생물의 종류를 파악하여 추가적인 농화 배양 및 균주 선발에 필요한 실험적 접근 방법에서도 필수적인 정보로 활용될 것이다. 토양에 투입된 미생물 균주가 해당 환경에서 얼마나 잘 살아남아 우점종으로 자리잡을 수 있는가 하는 것은 미생물 제제 활용 과정에서 제기되는 일반적인 문제이다. 또한 새롭게 적용되는 환경에서 예상한 활성을 동일하게 거둘 수 있는가도 중요하게 다루어져야 할 부분이다. 작물생육에 필요한 기본적인 요소는 광, 온도, 공기, 물, 양분이며 이들 요소중 물과 양분은 주로 뿌리로부터 흡수된다. 토양의 역할은 작물생육에 필요한 양수분과 뿌리가 뺏어나가는 공간을 제공하며, 작물 뿌리는 지상분을 지지하면서 생육에 필요한 물과 양분을 공급한다. 이러한 토양과 뿌리가 기능을 원활하게 발휘할 수 있도록 토양환경을 정비하여 토양의 작물 생산능력을 향상시키기 위하여 토양을 개선할 필요가 있다. 토양비옥도를 결정짓는 주요한 요인은 바로 그 토양속에 미생물의 양과 질에 의하여 결정되는 것이다. 살아있는 토양을 만들기 위해서는 토양미생물의 종류와 숫자가 증가하여야 한다. 그러나 현재 농경지나 산림지는 화학비료와 농약위주의 사용으로 미생물의 숫자가 현저히 감소하였고 토양이 산성화되어 미생물의 증식에 열악한 환경이며 작물 재배에 많은 피해를 주고 있는 실정이다. 전통적

인 개념의 토양비옥도는 토양 중에 존재하고 있는 유기물과 질소, 인 등 식물에게 요구되는 기본적인 무기물의 함량을 측정하여 그 양에 따라 비옥한 정도를 판단하는 것이다. 그러나 이렇게 화학적 방법으로 직접 측정하는 것은 토양에서 실제로 진행되고 있는 생물학적 과정과 토양비옥도를 연과지어 설명하기에는 부족하다. 게다가 비료 시비, 농약 살포 등의 방법이 가져오는 부정적 영향을 평가하기 어렵고 반대로 유기 농법 등과 같이 친환경 농작물 생산 방법의 장점을 부각시키기 어려운 단점을 지니고 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위해서 식물에게 요구되는 주요한 영양 성분인 탄소, 질소, 인 화합물의 분해에 관여하는 미생물의 효소를 토양으로부터 직접 측정하면 토양 미생물에 의해 진행되는 영양물질 순환과정을 파악할 수 있으며 미생물 성장 촉진과 작물 생산 증대 효과를 아울러 설명할 수 있는 효과적인 방법으로 활용할 수 있다. 현재 많은 연구 및 기술 개발 영역에서 이용되고 있는 토양 미생물 효소의 종류는 다음과 같다: 유기물 분해 - β -glucosidase, cellobiosidase, β -xylosidase, phenol oxidase, peroxidase; 질소 화합물 분해 - chitinase, leucine aminopeptidase, glutamate aminopeptidase, aspartate aminopeptidase; 인 화합물 분해 - phosphatase. 이러한 효소들은 환경 변화에 따라 그 효율이 달라지는 경향을 보이므로 본 연구 기술의 결과로 증가되는 토양 비옥도를 대변하기 위한 중요한 지표로 사용될 수 있다. 토착토양미생물에 의한 생물학적인 변화를 측정하기 위한 또 하나의 방법으로는 생물학적 프로세스에 관련된 유전자의 풍부도를 조사하는 것이다. 토양 내에 존재하는 유전자의 다양성 및 풍부도는 환경적인 요인에 의해 큰 영향을 받기 때문에 농업환경용미생물제제의 투입이나 황토가공나노신소재 기술의 적용이 가져오는 농업토양환경에 긍정적인 효과와 더불어 유전적 풍부도 및 다양성에도 변화를 가져올 것이다. 기술 개발 효과의 향상과 최적화 기법을 마련하기 위해서는 식물영양물질을 공급하는 미생물 유전자의 풍부도 증대가 요구되기 때문에 유전자 변화 모니터링 기법 또한 요구되는 바이다. 이러한 목적을 달성하기 위해 Quantitative real-time PCR 기법을 수행할 것이며 토양 내 유전자를 종류별로 정량분석하여 기술 적용 방법에 따른 유전자 모니터링 방법으로 활용할 것이다.

국내외적으로 자연생태계 보존과 다양성이 강조되는 지구환경문제가 제기되고 있는 가운데, 화학물질로부터 자연 및 농업생태계에 있어서 오염 최소화를 위한 환경 친화적인 생물 비료 및 농약의 개발이 요구되고 있다. 친환경 농업, 합성농약과 비료의 대체수단으로 핵심소재개발은 안전한 농산물생산, 새로운 자원의 산업화를 위한 친환경농업의 핵심이라 할수있다. 좀 더 환경 친화적이고 인축에 대해 안전하며 효과적인 소재 개발이 절실한 실정이다. 연작의 증가와 전통적 퇴비 생산비용의 증가에 따라 저비용 고효율의 토양 개선 및 병해방지 친환경 소재의 적용 농법이 필요한 상황이다. 본 연구에서 개발되는 황토가공나노소재는 농작물 재배 토양의 장기적인 개질과 더 나아가 기존 화학오염제제의 개질을 유도하고 토양전염 병충해의 방제가 가능한 새로운 친환경 제제로서, 이를 기존 화학제제와 대체하는 시장 개척과 이러한 농법을 통한 고품질의 농작물 생산 증대 농법 개발이 필요한 상황이다. 작물생산의 중요한 제한요인은 병, 해충 및 잡초 등의 유해생물에 의한 수량 감소이며 지금까지 이들을 방제하기 위해 필요 이상의 과도한 합성농약이 투입되어 오고 있다. 농약의 계속적인 오남용으로 인한 환경오염과 인축독성의 심각성이 증대되었고, 저항성 유해생물의 증가로 방제효과의 저해를 가져온다. 이에 최근에 보다 친환경, 친생태계적인 생물학적 방제(biological control)기술 개발이 활발하게 진행되고 있다. 황토가공소재 가공 시 배합비에 따른 항균효능에 의한 선택적 방제효과에 의하여 유해 생물방제는 물론 작물 생산성 향상에 긍정적으로 작용하는지에 대한 연구가 필요하다. 기존 친환경 농약은 주로 미생물을 직접 처리하거나 미생물의 분비물 등을 이용하는 BT제가 주

류였으며 이는 비용이 많이 들고 보관기간이 짧으며 방제 대상의 선택 폭이 좁고 제한적이라는 단점이 존재하였다. 이에 친환경 소재로서 경제성을 가지며 방제효력이 우수한 소재를 이용한 친환경 농약의 개발이 요구된다. 이에 황토가공소재의 처리 방법에 따라 다양한 식물병해의 방제에 대한 연구가 필요하다. 기존의 생물농약이 유용미생물의 병원균에 대한 길항작용을 활용하는 기작이 많았던 것을 바탕으로 황토가공소재의 처리로 유용미생물의 길항작용에 어떠한 변화가 존재하는지와 황토가공소재의 시비 조건에 따라 토양전염 식물병해 미생물의 직간접적 방제효과의 개발을 통하여 친환경 농법의 가이드라인이 확립되어야한다.

식품안전에 대한 소비자들의 경각심이 급속히 높아지면서 원산지 표시에 대한 요구 뿐 아니라 유기농, 무농약, 무첨가물, 건강소재 등 건강을 고려한 소비자들의 안전·건강 지향욕구는 세대와 계층을 불문하고 관심을 불러일으키고 있다. 미국의 한 여론조사에 의하면 대부분의 소비자들은 박테리아, 호르몬, 항생제, 살충제, 비료, 방사능, 유전자 재조합 등을 우려하고 있는데 소비자의 79%가 천연원료 또는 유기농 원료 사용 식품을 선택한 이유가 식품 안전에 대한 우려 때문이라고 했으며 소비자의 44%는 향후 5년 안에 천연원료 또는 유기농 식품을 더욱 소비할 계획을 갖고 있으며 젊은 세대(18~24세)의 78%는 천연 원료 또는 유기농 식품의 소비가 장기적으로 건강과 웰빙을 위한 선택의 한 요소라고 보는 견해가 조사된 바 있다. 일본 소비자의 69.7%도 천연원료 또는 유기농 식품을 구매하는 이유가 농약이 적고 안전하기 때문이라고 하였다. 우리나라에서도 가공식품의 안전에서 가장 위해가 되는 요인으로는 농약, 식품첨가물, 광우병, 화학물질, GMO, 수입식품으로 조사되었다. 이러한 위험을 예방하기 위해 소비자의 85%는 친환경 농산물에 긍정적 구입 의향을 나타냈다고 보고한 바 있다. 따라서,친환경적인 기술인 황토가공나노신소재를 이용하여 생산된 농수산 제품은 생산수율에 있어서의 증가 뿐 아니라, 농약 또는 화학물질의 식품으로의 유입을 막고 친환경적인 기술을 사용한 새로운 친환경 식품소재로서 사용되어 질 수 있다. 장어는 장어목, 장어과에 속하는 민물고기로서 최대 크기는 130 cm에 달하며 일본어로 우나기(unagi)라 한다. 장어류는 보양식으로 알려져 있어 동의보감이나 본초강목에서 폐결핵이나 요통, 신경통, 폐렴, 관절염, 성기능 회복을 위한 민간요법으로 권장해 왔음. 장어는 일반 어류와 달리 단백질, 고도불포화지방산 및 비타민 A의 함량이 높아 오늘날 수산자원으로서 이용가치가 매우 높다. 장어에 함유된 EPA(eicosapentanoic acid), DHA(docosahexanoic acid)는 뇌기억력 향상, 혈소관 응집 억제, 혈관 확장, 혈중 콜레스테롤 농도 저하, 중성지방 저하 작용 등의 기능을 가지고 있고, 장어의 비타민A 함량은 쇠고기보다 200배나 높으며 피로 회복, 눈의 보호, 발육 촉진, 피부탄력 유지 및 임산부의 수유에 탁월한 효능이 있다고 알려져 있다. 장어는 맛이 좋으며 조직감이 유연하고 불가식 부위가 적어 수율 측면에서도 가공상의 여러 장점을 갖고 있다. 그러나 기존의 장어류의 소비형태와 유통방법을 보면 대체로 반가공제품으로 냉동되고 있으며, 또한 기호면에 있어서도 일부 소비자계층의 경우에만 한정되어 있어 앞으로 장어소비확대를 위한 다양한 가공제품 개발 및 유통방법의 모색이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 최근 웰빙시대에 식생활 수준이 높아짐에 따라서 건강기능성 식품에 관한 관심이 높아지고 있으며 건강기능성 식품의 소비가 계속 증가하고 있다. 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오갈피나무과(Araliaceae) 인삼속(*Panax*)에 속하는 다년생 초본으로 오래 전부터 신비의 영양으로 애용되고 있으며, 현대에 이르러서는 자양강장, 노화억제 항암 등의 각종 약리작용으로 인해 세계적으로 가장 우수한 건강식품 혹은 의약품으로 평가받고 있다. 인삼의 화학성분은 ginsenoside, 정유 성분, polyacetylene 성분, phenol 성분, 알칼로이드 성분, 다당체, 아미노산, 유기산, 유리당, 비타민, 무기질 등으로 이루어져 있다. 인삼은 최

소 2,000년 동안 동양의 전통 약물로서 널리 사용되어 왔으며 인삼의 효능으로는 항암활성을 비롯하여 항당뇨, 항산화, 혈중 콜레스테롤 저하, 신경세포보호, 간기능 개선 및 항스트레스 활성 등이 흔히 알려져 있다. 이러한 효능을 발현하는 주요 활성성분으로는 ginsenoside 성분이 가장 많이 알려져 있다. 인삼은 일반 식품, 건강기능식품의 원료이면서 의약품의 원료로도 사용되고 있다. 국내 건강기능식품의 제 1위 품목을 홍삼이 차지하고 있는데, 이것은 전통적인 고려인삼에 대한 높은 인지도와 최근 인삼, 홍삼 가공품에 대한 소비자의 높은 신뢰도를 반영하는 것이다. 무는 남서 유럽의 지중해 연안이 원산지로서 우리나라에는 삼국시대에 중국을 거쳐서 전파되어 재배되었다. 무는 우리나라에서 많이 소비되는 채소 중 한 가지이고 전국적으로 재배되고 있다. 무는 수분이 약 94% 이상 차지하고 있고 단백질과 지질의 함량은 낮은 수준이며, 무에는 포도당과 설탕이 포함되어 있어서 단맛을 내고 무기질은 골고루 함유하고 있다. 비타민 C의 함량이 높은 편인데, 껍질 부분에 많이 포함되어 있으므로 비타민 C의 섭취를 위해서는 조리할 때 껍질을 과도하게 제거하지 않아야 한다. 무에는 소화를 돕는 효소인 다이아스테이스(diastase), 글리코시테이스(glycosidase) 등이 들어있고, 과산화수소를 분해하는 카탈레이스(catalase)도 포함되어 있어서 산화작용을 저해하는 기능이 있으며, 무의 잎에는 베타카로틴이 다량 함유되어 있고 비타민 C의 함량도 높다. 배추는 중국 북부 지방이 원산지로서 우리나라, 중국, 일본 등에서 중요한 채소의 하나이며, 우리나라에는 고려시대에 도입되어 재배되기 시작하였다. 우리나라에서 배추는 주로 김치용으로 이용되며 주요 산지는 강원, 경기, 전남, 전북이다. 배추의 성분 중 약 95%가 수분으로서 열량이 다른 채소류와 마찬가지로 낮은 편이며, 고형분 중 섬유소의 함량이 높아 섭취하였을 때 활발한 장운동을 유발하여 배변활동을 도움을 준다. 배추는 비타민 C의 함량이 많은 편인데 김치로 가공한 뒤에도 손실되는 양이 많지 않다. 황토가공나노신소재를 양만장에 적용하여 생산된 장어류는 황토가공나노신소재의 작용에 의해 생산수율의 증가뿐 아니라, EPA·DHA와 같은 불포화 지방산의 함량의 증가를 야기함으로써, 뇌기억력 개선 및 고지혈증 예방을 위한 장어의 건강기능성을 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 선행연구에서 황토가공소재를 살포하여 재배한 배추의 성분분석결과 무처리군에 비해 총 미네랄 함량과 각각의 미네랄 성분 및 총세균수가 증가하는 효과를 보여, 기존 배추와 비교하여 미네랄 성분 및 함량의 증가에 따른 생리활성의 향상이 가능하다. 반고체식품(인삼, 배추, 무 추출물 및 스프 등)의 가공공정 중 기계장치, 수송, 저장 등에서 발생하는 유동현상을 정확하게 예측하고 제조가공 공정의 조절과 최적화를 위해서는 위의 식품들의 점성거동 및 동적점탄성 특성 뿐만 아니라 항복응력과 시간의존성 등 반고체식품들의 레올로지 특성에 대한 여러 정보들이 필요하다. 특히 항복응력과 전단담화 비뉴튼 유체 성질을 가지고 있는 인삼, 배추, 무 추출물 및 스프는 스프으로 떼을 때 일정한 형태를 유지할 수 있어야 하고, 수분 및 다른 식품재료와 혼합할 때 퍼짐성 및 분산성이 우수해야 하는 특성 때문에 바람직한 품질을 가진 액기스 및 스프 제품을 생산하기 위해서는 체계적인 레올로지 특성 연구가 요구된다. 황토가공나노소재를 이용한 농수산물 및 이를 이용한 가공식품의 관능적 품질 특성과 소비자 기호도 조사를 통해 무처리군 대비 품질우위 특성들을 파악하고 제품화 가능성을 검증하여 향후 시장에 런칭되었을 때 제품의 시장성을 극대화하여 매출 증대에 기여할 수 있다. 따라서, 본 연구에서 황토가공나노신소재를 이용하여 친환경적 기술에 의해 생산된 장어, 인삼, 무, 배추의 생리활성 기능은 각 식품소재의 분자구조, 이화학적 특성 및 레올로지 특성과 밀접한 연관이 있을 것이라고 사료되며, 또한 각 식품소재의 생리활성을 설명하기 위한 중요한 자료로서 사용되어질 수 있다. 그리고, 친환경 기술에 의해 생산 및 가공된 건강기능성 식품은 국내·외적으

로 웰빙 지향형 식품으로서 높은 가치를 가지고 있으며, 국내 농산물 및 건강기능성 식품 시장의 경쟁력 제고에 크게 기여할 수 있으며, 본 연구개발을 통해 그 시장 영역을 확대함으로써 국내 농수산물 및 이를 소재로 한 식품의 고부가가치화 및 농산물 판로 확대에 기여할 수 있다.

제 2 절 연구개발의 목적

본 사업단은 새로운 친환경 농산업 창출을 궁극적 목표로 보유특허기술인 멀티기능성을 나타내는 황토가공나노신소재를 이용하여 친환경농자재 개발, 친환경신농법 및 이를 활용한 가공식품 개발로 연평균 100억이상의 매출달성을 근본 목적을 두며, 이를 성취하기 위한 세부 목표를 아래와 같이 설정하였다.

- 황토가공신소재를 이용한 친환경농자재, 뱀장어수율증대 및 양만장 수처리제 개발
- 토양오염개선 최적화 방법 /유용토양미생물 복합체 개발/병해제어/신선도 향상기법을 통한 친환경 신농법 개발
- 친환경 농작물 특수성분 분석 및 기능성식품 개발

관련하여 ① 황토가공조건 확립 및 생산공정 표준화, 친환경농자재로서의 사용을 위한 성분, 효능시험을 통한 품질관리규격을 설정 및 양만장 적용을 위한 뱀장어 수율증대와 사육수 수질 개선 효능평가를 수행하여 제품화에 목표를 둔다. ② 황토가공신소재를 이용한 배추, 무, 장뇌삼, 오이, 토마토 재배에 대한 효능평가를 수행한다. ③ 황토가공신소재 처리에 의한 토양 식물 병해 미생물의 in vitro 및 field 내의 방제효과 분석 및 기법 개발을 수행한다.④ 농업 환경에서 일어날 수 있는 토양 유류 오염을 정화할 때 정화 촉진재로서의 황토가공나노신소재의 용도를 검증하고 그 기작을 미생물학적 연구 기법을 도입하여 밝혀낸다. 또한 토양 생태계에 황토가공나노신소재를 사용하였을 때 발생할 수 있는 군집의 변화와 생태계 기능의 변화를 연구하여 황토가공나노신소재의 안정성을 생태계 기능적인 측면에서 검증한다. ⑤ 황토가공나노신소재를 이용하여 친환경적 기술에 의해 생산된 장어, 장뇌삼, 무, 배추, 오이의 품질평가 수행 및 검증을 통해 동 제품을 이용한 건강식품의 개발을 수행한다.

제 3 절 연구성과 목표 대비 실적

항목	목표	실적
황토 SiO ₂ 이온화 가공 수율	80%	81.76%
황토가공소재 분쇄기술	평균입도 200nm	습식분쇄에서 나노사이즈보다 마이크로사이즈가 수율 및 경제성에서 유리하여 마이크로사이즈로 가공
황토가공소재의 비료 효능	기존 수용성규산질비료 대비 15% 이상 성장 촉진	비료 : 최대 31.7% (오이)
황토가공소재의 농약 효능	기존 농약 효능의 50% 달성	벼 도열병 방제가 63.4%
장어 수율증대 기술	15% 이상 증가	장어사료 첨가시 : 19% 증가
치어 폐사율감소 기술	폐사율 5% 이하	생존율 95% (대조구 81.7%)
황토가공나노신소재 활용 무/배추 및 과실류용 유기농비료 및 적용 농법 개발	적용 농작물 기초 생육조사 및 시비조건 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - 무: 100평당 0.5kg, 2주 2회 사용 - 배추: 2000 ppm, 2주 3회 사용 - 토마토: 200배 희석액, 2주 4회 사용 - 오이: 1000배 희석액, 2주 4회 사용
	적용 농작물 생리적 특성 조사	<ul style="list-style-type: none"> - 엽록소 및 카르테노이드 함량 분석 - 광합성 및 형광반응 효율 측정 - 아스코르브산 함량 분석 - 과실 수분 함량 분석 - 환원당 함량 증가 및 당도 확인
	무/배추/과실류 용 황토가공나노신소재 비료 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 무/ 배추에 사용한 결과 생육증진 효과 확인 - 토마토에 사용한 결과 생육, 수량 증진 및 열과 현상 감소 확인

		<ul style="list-style-type: none"> - 오이에 사용한 결과 생육, 수량 증진 및 구부러짐 현상 감소 확인 - 시중에 있는 규산질 비료 비교한 결과 가공황토 신소재 처리구의 작물 생육이 우수함을 알 수 있었음
황토가공나노신소재를 활용한 특용 작물 재배용 비료 및 농법 개발	황토가공나노신소재 특성 조사	황토가공나노신소재 처리 후 모든 작물에서 생중량과 열매 수 증가함을 확인
	기능성 비료의 특용작물 재배 적용 및 생육·생리적 특성 조사	<ul style="list-style-type: none"> - 가공황토 1000배 희석액 처리구에서 생육이 가장 좋음 - 사포닌함량은 1000배 희석액 처리구에서 가장 높게 나옴
	기능성 비료 활용 특용작물 생산 농법 및 향상된 기능성 복합비료 개발	왕겨와 가공황토 1000배 희석액을 함께 처리할 경우 장뇌삼의 생육 증진 및 사포닌 함량 증가
황토가공나노신소재 처리 토양에서의 병원균 억제효과 조사를 통한 병해방제 기법 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 토양전염 식물병원균 방제에 대한 <i>in vitro</i> 평가 - 황토가공나노신소재 처리 토양 내 식물 병원균 억제 효능 분석 - 황토가공나노신소재의 제조공법 및 처리 농법 유형 별 토양전염 병해 제어에 대한 농법 제시 (화학적 농약 대비 50% 친환경 방제효율) 	<ul style="list-style-type: none"> - 식물병원성 세균 3종 및 진균 5종 항균효능 발굴 - 식물병 유형 별 토양 내 병원성 미생물 감소 처리 농도 및 기간 선정 제시 - 배추뿌리혹병 소재 단독처리 농법 제시 및 방제가 53% 획득
농작물의 신선도 향상을 위한 황토가공나노신소재 적용 농법 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 황토가공나노신소재의 세균 작용에 대한 <i>in vitro</i> 평가 - 황토가공나노신소재의 제조공법 및 처리 농법이 다양화된 토양에서의 농작물 재배 - 농작물 무기질 함량 및 신선도 평가를 통해 황토가공나노신소재를 이용한 농작물 재배 최적화 기법 제시 	<ul style="list-style-type: none"> - 병원성 미생물 억제 작용기전 분석 결과 확보 - 배추무름병 및 인삼갈록병에 대한 소재 적용 유용미생물 활성화 농법 2건 제시 - 소재 농약 혼용처리 농법 4건 제시(농약대비 방제가): 배추뿌리혹병(286%), 배추검은무늬병(101%), 고추탄저병(99%), 벼키다리병(98%)
황토가공나노신소재 기술 적용 농	-미생물 독성 저감 능력 검증	- 독성 오염 물질에 대한 미생물 저항성 증가 확인

<p>업용, 토양오염정화용 미생물 제제 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> -오염물질 분해균주와 혼합 배양 최적조건 테스트 -환경정화용 미생물제제 조정 및 처리 방법 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> - 미생물 성장 촉진을 위해 1% 미만 최적화 농도로 처리 조건의 최적화 완료 - 1% 미만 농도에서 오염 물질 정화 기능 향상 확인
<p>오염토양환경 개선을 위한 황토가 공나노신소재 처리 방법 최적화</p>	<ul style="list-style-type: none"> -농업미생물에 대한 생물 독성 경감 기능 확인 -오염물질 독성저감에 의한 작물 성장 촉진기능 검증 -토양 처리 방법 및 향후 모니터링 방안 마련 	<ul style="list-style-type: none"> - 황토 처리에 의한 미생물의 독성 저항 능력 증진 확인 - 오염 물질 분해 세균과 복합처리를 통한 식물성장 촉진 검증 - 오염 물질 및 토양 미생물 군집 모니터링 방안 확립
<p>농수산 제품 기능성 평가 표준화 기술개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 일반성분 - 항산화효과 - 특수성분 - 물리적 특성 	<ul style="list-style-type: none"> - 총폴리페놀함량, DPPH radical 소거능, FRAP - 인삼엑기스 동적유동특성(저장/손실 탄성률, 복소점도) - 냉해동 저장 TPA 조직감 - 영양성분(비타민,미네랄,아미노산,지방산)
<p>농수산 제품 품질 평가 표준화 기술개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 유변학적 특성 - 열적 특성 - 특수성분 - 관능검사 평가 기술 표준화 	<ul style="list-style-type: none"> - 인삼엑기스 정상유동특성(겉보기점도,점조도지수,유동지수) - 냉해동 저장 TPA 조직감 - 진세노사이드 Rg1, Rb1, Rg3 분석 - 묘사분석, 렉시콘 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 규소비료 연구동향

규소 (Silicon)는 토양의 기본성분으로 모든식물이 필요로 하는 물질이다. 토마토의 경우 규소가 생식생장에 영향을 미치는 것으로 보고된 반면 [1], 오이의 경우 규소가 부족하면 개화단계에서 새로이 피는 잎에 기형을 발생시키거나 수정을 감소시키는 성장반응을 보이는 것으로 보고되었다[2].벼는 규소를 흡수하는 대표적인 식물이고, 규소의 적당한 흡수에 의해서 벼의 수광태세가 좋아져서 광합성을 잘 하게되므로 도복 및 병충해에 대한 예방효과가 있다는 것은 이미 알려져 있다[3]. 또한, 벼의 경우에 규소의 결핍은 괴사와 시들음 현상이 발생하고 수율이 감소하게 된다[4]. 또한, 규산질 비료는 토양의 pH를 증가시키고, 유기물의 분해와 양분의 공급력을 촉진시키고, 질소 흡수율을 증가시켜서 질소의 침출현상을 방지한다[5,6]. 그 외에도 많은 연구에서 규소성분이 수율과 수량을 증가시키고 질병을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다 [7-11]. 황토는 필수성분으로 40내지 80%의 SiO_2 , 10-30%의 Al_2O_3 , 0.5-20%의 Fe_2O_3 를 포함하고 부가성분으로 CaO , MgO , K_2O , Na_2O , TiO_2 등을 0.1-5% 함유하는 자연계로부터 얻어지는 광물이다. 이러한 황토와 같은 점토광물은 토양의 생성과정에서 재합성된 2차 광물이며 활성 표면적이매우 커서, 각종성분의 흡착, 방출, 고정, 산도(pH), 통기성, 통수성 등 물리 화학적 성질을 좌우하는 데 커다란 효과를 발휘하는 특성을 가진다. 대부분 규산염계(silicate)에 속하는 점토광물들은 일반적으로 이온교환용량이 높고, 동물이 섭취하였을 때 미량무기물을 비롯한 영양소 이용성을 개선하며, 장내 유해가스의 흡착 및 연변방지 등의 효과가 인정되어 왔다(사료자원 핸드북 1976). 또한 일부 점토광물은 보수력(water holding capacity)과 양이온 치환능력이 높아서 배합사료공정에서 펠렛제조에 결착제용으로 첨가되어 사용되어 왔다. 황토(Loess, red clay)는 가장 대표적인 건강-환경관련 제품이라 할 수 있는 자연계로부터 얻어지는 광물로서 지구 표면의 약 10%를 덮고 있고 건조 지역과 반 건조 지역에 널리 분포되어 있다[12]. 황토는 다공성 구조를 가진 물질로서 흡착, 탈취, 완충작용, 이온교환 및 원적외선 방사 등의 기능 때문에 농축수산분야, 건축소재, 화장품 첨가제 기타 건강증진 목적의 제품에 많이 응용되고 있다. 최근에는 이용분야가 더욱 넓어져 황토내의, 황토신사복, 황토구이 판 등 다방면에 이용되고 있고, 비누 첨가제, 건축 마감재, 농업용 비료, 양식장의 사료, 토양오염 정화 또는 적조발생 시에 적조 퇴치용 등으로도 이용되고 있다 (표 1, 2). 농업분야에서 vermiculite, chlorite, illite, kaolin, and ferrihydrite 같은 점토광물은 토양안에서 미생물, 바이러스, 효소 및 유/무기영양물 들과 상호작용을 한다. 또한, pH 완충, 공기와 물의 투과성, 흡착, 흡수, 토양내 여러 성분들을 고정화 시키는 물리화학적 성질을 나타낸다. 이러한 기능들은 유기물에 대한 미생물의 공격으로부터 방어하는 역할을 하고 독성물질과의 상호작용을 통해 해독하는 기능과 토양내 미생물의 군집변화로 생태 및 토양효소활성에 영향을 미친다 [13-19]. 규산나트륨 및 규산칼륨과 같은 수용성 규산염은 많은 산업분야에서 널리 적용되는 중요한 화학물질이다. 일반적으로, 수용성 규산염은 많은 적용분야에서 법적 사용허가가 인정된 위험성이 적은 안전한 물질로 분류된다. 수용성 규산염 세제, 비누, 세정제, 제지, 수처리, 토양경화 및 코팅 등의 분야에 많이 사용된다[20,21].

최근, 규소원으로 규산나트륨을 농업분야에서 대부분 사용하고 있으나 농작물에 효능을 나타내려면 규산나트륨 외에 여러가지 미네랄 성분을 추가하여야 한다[1,2]. 황토의 주성분인 순수 SiO_2 는 실질적으로 불용성이기 때문에, 단순히 이를 주성분으로 하는 황토의 미세분말을 살포할 경우에는 물리적 성질을 이용할 뿐 화학적 성질은 전혀 이용하지 못한다. 그러나 SiO_2 가 주성분인 황토에 일정량의 NaOH 를 혼합한 후 고온에서 가열, 용융시키면 SiO_2 의 성분이 Na_2SiO_3 (규산나트륨)으로 전환하게 되어 습식분쇄를 통한 추출공정을 거치면 규소성분은 물에 쉽게 용해될 수 있다[12,22-24]. 이렇게 가공된 형태의 황토가공신소재는 SiO_2 가 제거된 황토성분과 규산나트륨 및 미네랄이 혼합되어 있는 물질로 불용성 물질과 수용성 물질이 혼합되어 있어 규소, 점토, 미네랄 성분의 대체제로 활용할 수 있다. 수용성 물질에는 규소 및 미네랄 성분을 함유하고 있고, 점토기능의 불용성 물질은 강력한 응집/흡착기능과 pH 완충작용 등 여러 가지 기능을 나타낼 수 있다. 본 사업에서는 SiO_2 가 주성분인 천연황토에 NaOH 등의 염기성 물질을 첨가한 후 고온에서 용융 반응시켜 황토의 주요성분인 SiO_2 를 규산나트륨으로 전환하여 응집/흡착기능, pH 완충작용, 규소과 미네랄 용출 등의 여러 기능을 나타나게 하는 것이다[23, 24]. 특히, 양식장의 부유물질의 침전제거 효과, 질소/인 성분의 감소, 청소작업 편리성 등의 기능을 나타내게 하여 양식장 수질개선 및 양식어류 병해방지용으로도 활용이 가능하다. 국내의 장어 양식은 2010년 기준 양식장 약 500곳, 7,500 톤의 생산규모와 생산총액이 약 1,900억에 이르고 있으며[25], 배합사료의 시장 역시 약 900억 규모로 성장하고 있는 추세이다. 양식산 장어는 인위적인 사료공급을 통해 사육되므로 자연산과 다르게 영양적 특성을 통한 품질개선이 이루어질 수 있다. 그러나 장어 양식에 있어서 가장 큰 문제점은 배설물 등으로 인하여 수질의 pH가 매우 낮게 유지되는 데 있다. 현재 양식장에서는 이러한 문제를 해결하기 위하여 탄산칼슘과 같은 알칼리성 물질을 투입하고 있으나 이는 pH 완충능력이 없기 때문에 지속적인 투입(4시간 간격)을 통하여 pH 하락을 방지하고 있다. 탄산칼슘 과다 투여에 의해 장어의 폐사를 유발하는 경우도 종종 발생하고 있다[26, 27].

2. 식물병원균 방제 목적의 생물농약 시장 동향 분석

(1) 기술 개발 현황

생물농약의 분류는 나라에 따라 조금씩 차이가 있으며 우리나라의 경우 미생물 농약과 생화학 농약으로 분류되며 미생물 농약은 살아있는 미생물을 이용한 농업용 미생물 방제제를 뜻하고 생화학 농약은 천연화합물 또는 페로몬 등의 생물통신물질을 이용한 농업용 생물질 또는 생약 방제제를 뜻한다.

현재 전 세계적으로 등록된 생물농약은 188종이며 이 중 살충제가 135종(75%), 살균제가 29종, 제초제가 10종, 식물 생장 조절제 및 기타 약제가 각각 7종을 차지하고 있다. 대부분 미생물에 근간한 미생물 농약이 주를 이루며 60여 종의 미생물 농약, 45여 종의 생화학 농약, 40여 종의 천연부분이 있으며 이것이 전체의 77%를 차지한다. 우리나라의 경우 천연부분은 생물농약에서 제외하여 따로 관리하고 있다.

국내 및 국외시장 분석결과 천연항균/항생제, 생물농약, 천연비료/사료 등의 친환경제품이 생산

및 판매가 이루어지고 있으나, 자연적으로 드물게 존재하여 찾기 힘들고, 대부분 유기성분이어서 온도, 화학물질, UV(자외선), 생물학적 저항성 등의 주위 환경변화에 따라 변질되기 쉬운 단점이 있다.

기존에는 인공적으로 제조된 맹독성 화학물질이나 특정 EM의 특이적 길항작용으로 병원균을 제어하는 기존 농법에서 벗어나지 못한 화학제제 및 미생물제제에 대한 생산과 판매가 주를 이루고 있었으나 최근 유기농법의 증가 및 토양 개선과 보존에 대한 수요 증가로 기존 농법의 단기적인 대처법이 한계를 맞고 있다.

작물생산의 중요한 제한요인은 병, 해충 및 잡초 등의 유해 생물의 제어이며, 지금까지 이들을 방제하기 위해 필요이상의 과도한 화학농약이 투여되고 있다. 농약의 지속적인 오남용으로 인한 환경오염과 인축독성의 심각성이 증대되었으며, 저항성 유해생물의 증가로 방제효과의 저해를 유발한다. 이에 최근 보다 친환경, 친생태계적인 생물학적 방제(biological control)기술 개발이 활발하게 진행되고 있다.

(2) 생물농약의 세계시장 현황 및 전망

2005년 당시 세계 농약시장의 2.5%가 생물농약시장으로 형성되었으며 2010년 4.25%의 생물농약 시장을 통하여 1,075 Million US\$의 시장 형성이 예측되었으며 BT제와 기타 미생물제제가 4:6의 비율로 형성되어 있다 (그림 2-1).



그림 2-1. 세계 생물농약 시장 동향

자료 : The New Biopesticide Market (2006)

2001년 기준 세계 생물농약시장의 규모를 살펴보면 미생물을 이용한 제제가 2억3500만 달러의 시장을 형성하고 나머지 천연화합물, 천연물질 등이 1억5300만 달러를 구성하고 있어 천연화합물과 관련된 시장의 개발이 필요하다 (표 2-1).

표 2-1. 세계 생물농약 시장 규모

(단위 : 백만 달러)

	EUROPE	NAFTA	LATIN AMERICA	AFRICA	ASIA	OCEANIA	TOTAL
MACROBIALS	60	80	10	5	20	15	190
MICROBIALS:							
-Bacteria	20	90	10	5	15	30	170
- Virus	6	4	5	1	3	2	21
- Fungi	5	15	10	1	7	6	44
Subtotal	31	109	25	7	25	38	235
Others (biorationals)							
- Natural products	20	42	10	3	12	10	97
- Semiochemicals	6	25	4	3	15	3	56
Sub total	26	67	14	6	27	13	153
TOTAL	117	256	49	18	72	66	578

자료 : 2001 BCA그룹

(3) 생물농약의 일본시장 현황 및 전망

일본의 생물농약시장 또한 점차적으로 증가하는 추세이며 시장 동향에 따르면 200년 기준 12억 엔으로 그 중 살충성 생물농약이 약 10.9억 엔으로 85%를 차지하며 BT제가 7.6억 엔이며 살균성 생물농약이 1.2억 엔에 불과하다. 또한 전체농약에 생물농약이 차지하는 비율은 2000년 현재 0.34%로 역시 세계시장보다 미약한 실정이다. 그러나 2000년 22개 품목이 존재했던 생물농약이 2003년 기준 60개로 늘어 생물농약의 발전가능성이 있다 (그림 2-2, 표 2-2).

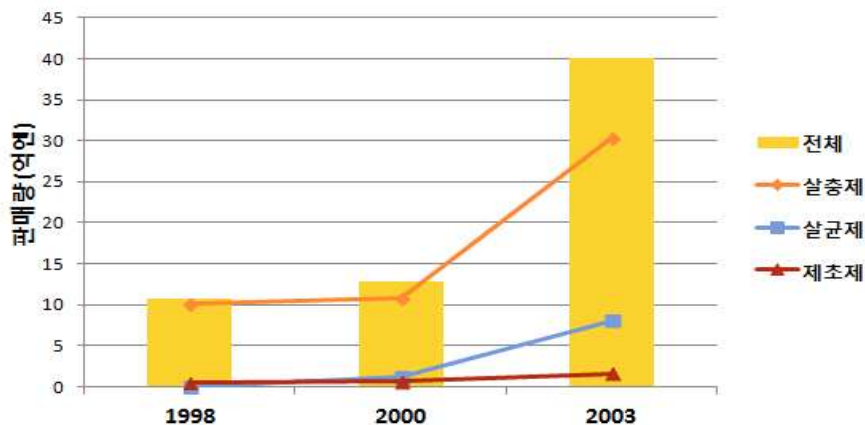


그림 2-2. 일본 생물농약 시장 동향

출처 : 일본 생물농약 전문 회사 셀테이스즈야판 (2004)

표 2-2. 일본의 생물농약 시장현황

(단위 : 백만 달러)

연도	계(전체농약에 대한 비율)	살충제			살균제	제초제
		BT제	기타제	소계		
1998	1,075(0.27)	799	221	1,020	5.2	49.8
1999	1,174(0.30)	844	252	1,096	5.4	72.6
2000	1,272(0.34)	756	332	1,088	118.0	65.7
2003	4,000	2,100	930	3,030	810	160

자료 : 2000 농약요람, 일본식물 방역협회

※ 2003년 수치는 2004 일본 생물농약 전문회사 셀테이스ジャパン 발췌

(4) 생물농약의 국내시장 현황 및 전망

국내 미생물 농약시장은 세계시장과 마찬가지로 BT제가 주이며 2000년에는 판매액이 33억 원 정도였고 살충, 살균효과가 있다고 주장하는 토양미생물 제제의 판매액을 추정할 금액을 더하면 77억 원 정도이며 그 중 BT제를 제외한 살충제가 13억 원, 살균제는 31억 원으로 추정되며 전체 농약시장의 0.31%에 해당되는 극히 미약한 시장을 형성하고 있다 (표 2-3).

표 2-3. 국내 생물농약 시장현황

(단위 : 백만 원)

연도	계	BT제※	토양미생물제제(추정치)***			천적 등
			살충제	살균제	제초제	
1995	4,359	4,359	-	-	-	-
1998	3,723	3,423	300	1,000	-	-
1999	6,933	3,133	800	3,000	-	-
2000	7,682	3,282	1,300	3,100	-	-

자료 : 한국식물환경연구소

※ BT제는 농약연보에서 발췌

***토양미생물제제는 등록된 제제중 살균, 살충효과가 있다고 주장하는 제품의 판매액의 추정량임.

2006년도 생물농약이 세계적으로 차지하는 매출액은 전체농약시장 300억 불 중 1%에 해당하는 3억불로 추정되며 국내시장은 8000억 정도로 추정된다. (농약연보, 2006년).

3. 식물병원균 방제 목적의 친환경 제제 특허 기술 동향 분석

(1) 세계 특허 기술 동향

친환경제제 대상특허 160건 전체에 대해 각 국가의 연도별 출원동향을 살펴볼 때, 2008년까지 일정 수준의 특허 출원이 이루어지며 전반적으로 증가하는 양상이 나타났으나 2009년 증감을 반복하다가 2010년 이후부터 최근까지 감소하는 추세를 보이고 있다. (2013년 기준 자료)

출원규모에서 한국이 97건(61%)으로 가장 높은 점유율을 보이고 있으며, 미국 47건(29%), 일본과 유럽이 각각 8건(5%)의 특허점유율을 가진다 (그림 2-3).

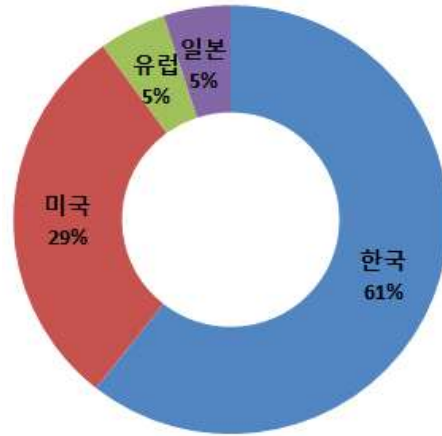


그림 2-3. 친환경제재의 국가별 특허 출원동향

(2) 국내 특허 기술 동향

친환경제재의 국내특허의 출원건수는 연도별로 증감을 반복하였으나 2010년 이후 감소 추이가 나타나고 있으며 내국인 출원비율은 2006년부터 최근까지 꾸준히 99% 이상의 높은 비율을 유지하고 있다 (그림 2-4).

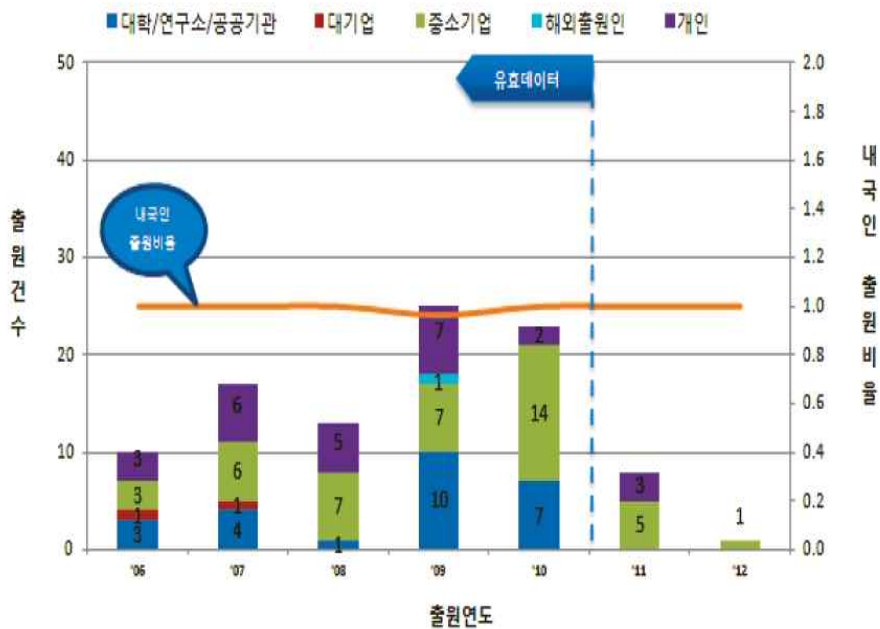


그림 2-4. 국내 친환경제재의 연도별 특허 출원동향

제 3 장 연구개발수행내용 및 결과

제 1 절 황토가공나노신소재 제조공정 및 양만장 적용기술 개발

1. 황토가공나노신소재 제조공정개발

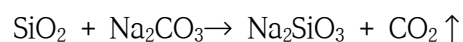
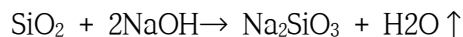
가. 황토가공소재 생산을 위한 반응조건의 영향

(1) 반응조건이 유효규소 (available SiO₂) 생산농도에 미치는 영향

(가) 반응온도가 유효규소 (available SiO₂) 생산농도에 미치는 영향

황토(Gochang Hwangto Co, Korea)와 알칼리물질을 일정비율로 혼합한 후 1L 용량의 알루미늄도가니를 이용하여 전기로(Ajeon Heating Industrial Co., Korea)에서 반응 시켰다. 반응물은 상온에서 1일 냉각 후 크라샤 (Wonder Blender, Sanplatech Corp., Japan)를 이용하여 분쇄하였고 시브(75 μ m, Chung Gye Sang Gong Sa, Seoul, Korea)를 사용하여 75마이크로 이하의 입자크기만을 회수하여 다음실험에 사용하였다. 반응조건으로 온도, 반응시간, 알칼리 물질의 종류, 알칼리물질의 첨가농도에 대하여 조사하였다.

황토와 알칼리 물질인 sodium hydroxide 나 sodium carbonate가 반응할 경우 아래식에 나타낸 것처럼 sodium silicate 성분이 생성되고 이것이 규산질 비료 기능등 다기능성을 나타낸다.



반응온도에 대한 영향을 조사하기 위하여 황토에 NaOH를 30%(wt/wt) 혼합한 후 각각의 온도에서 반응시킨 결과 그림 3-1-1 에 나타낸것과 같이 온도가 증가할수록 유효규산함량도 증가하였지만 1200도 이상에서는 오히려 유효규소 함량이 감소하였다. 이것은 너무 높은온도에서 반응시키는 경우 반응물의 결합력을 증가시켜 강도를 강하게 하므로서 유효규산함량 분석을 위한 추출조건에서 추출율을 감소시키기 때문으로 사료된다.

(나) 반응시간이 유효규소 (available SiO₂) 생산농도에 미치는 영향

반응시간에 대한 영향을 조사한 결과 그림 3-1-2 에 나타낸 것처럼 반응시간이 증가함에 따라 유효규소 함량이 증가하였고 1시간 이하로 반응시킨 경우는 유효규소 함량이 감소하였고 1시간 이상 반응시키는 경우 유효규소함량이 일정하게 유지되었다.

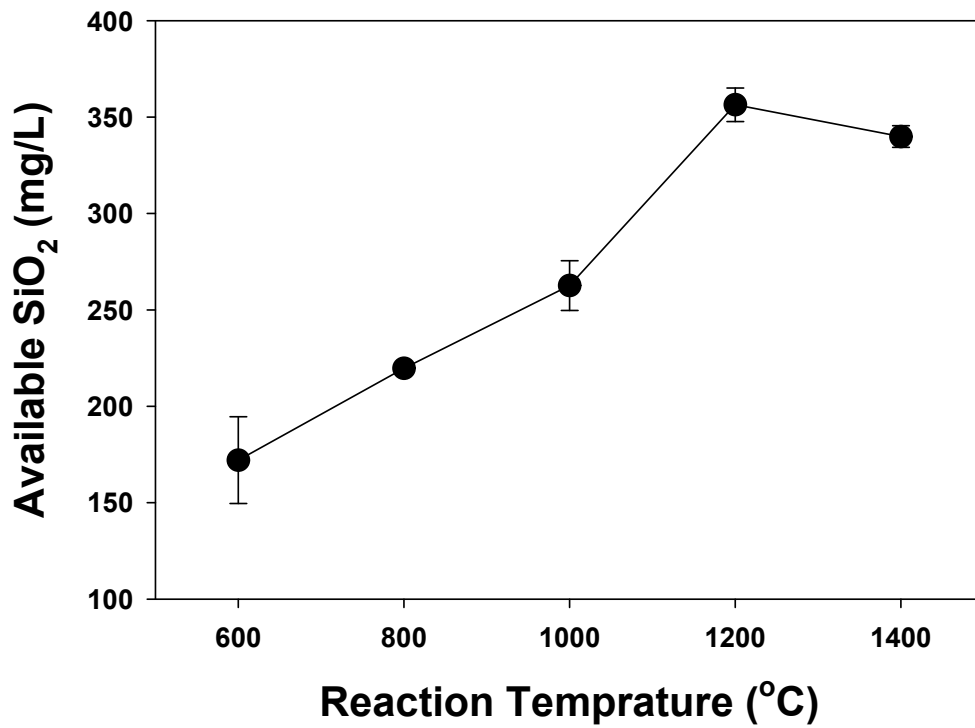


그림 3-1-1. 황토와 가성소다를 이용한 반응에서 available SiO₂ 생산농도에 미치는 반응온도의 영향

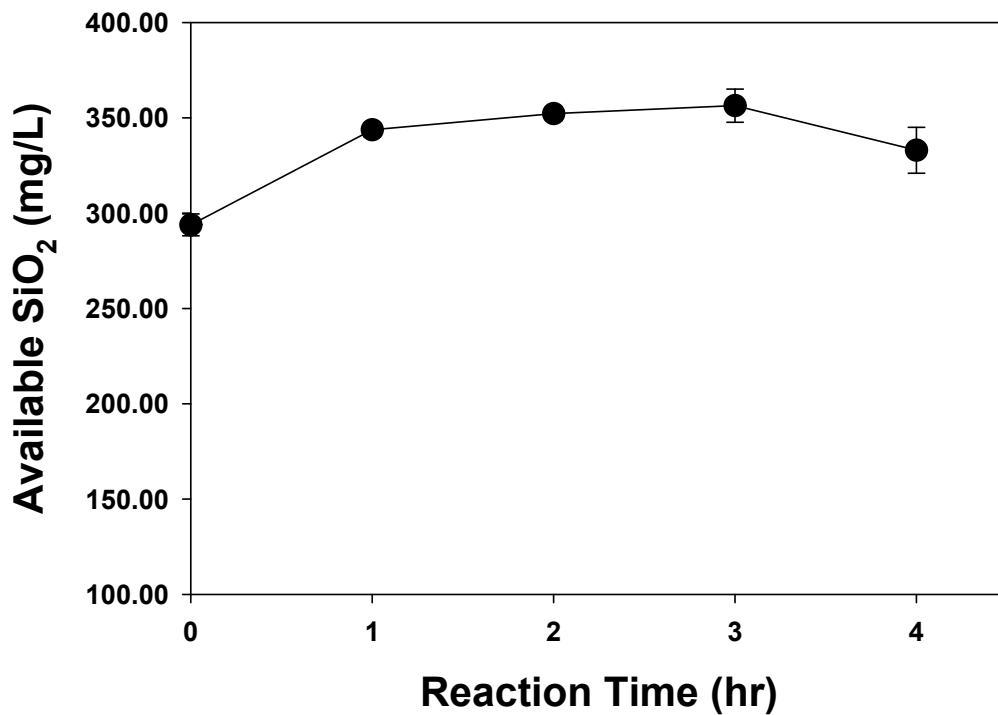


그림 3-1-2. 황토와 가성소다를 이용한 반응에서 available SiO₂ 생산농도에 미치는 반응시간의 영향.

(다) 알칼리물질 종류 및 첨가량이 유효규소 (available SiO₂) 생산농도에 미치는 영향

Sodium hydroxide의 첨가량에 대한 영향을 조사한 결과 그림 3-1-3 에 나타난 것처럼 첨가량이 증가할수록 유효규소 함량이 증가하는 것을 확인 하였다. 상기 반응에서 황토의 SiO₂ 1몰에 대하여 2몰의 NaOH (황토혼합시 40% 첨가)가 NaOH 반응몰수는 이론 반응식과 유사하게 나타났다. 알칼리 물질 종류에 대한 영향을 조사하기 위하여 sodium hydroxide 와 sodium carbonate를 황토의 SiO₂ 몰 기준 같은 몰수로 첨가한 후 전기로에서 1200 °C, 3 hr 동안 반응시킨 결과 그림 3-1-4 에 나타난 것처럼 SH(sodium hydroxide) 나 SC(sodium carbonate) 모두 이론 반응식과 유사하게 유효규소 함량을 나타내었다. 본 실험결과로 황토가공소재 제조시 황토에 NaOH 40%(wt/wt) 를 첨가한 후 1200°C 에서 1시간 이상 반응시키는 경우가 유효규소 함량을 가장 높게 유지시키는 반응조건으로 확인되었다.

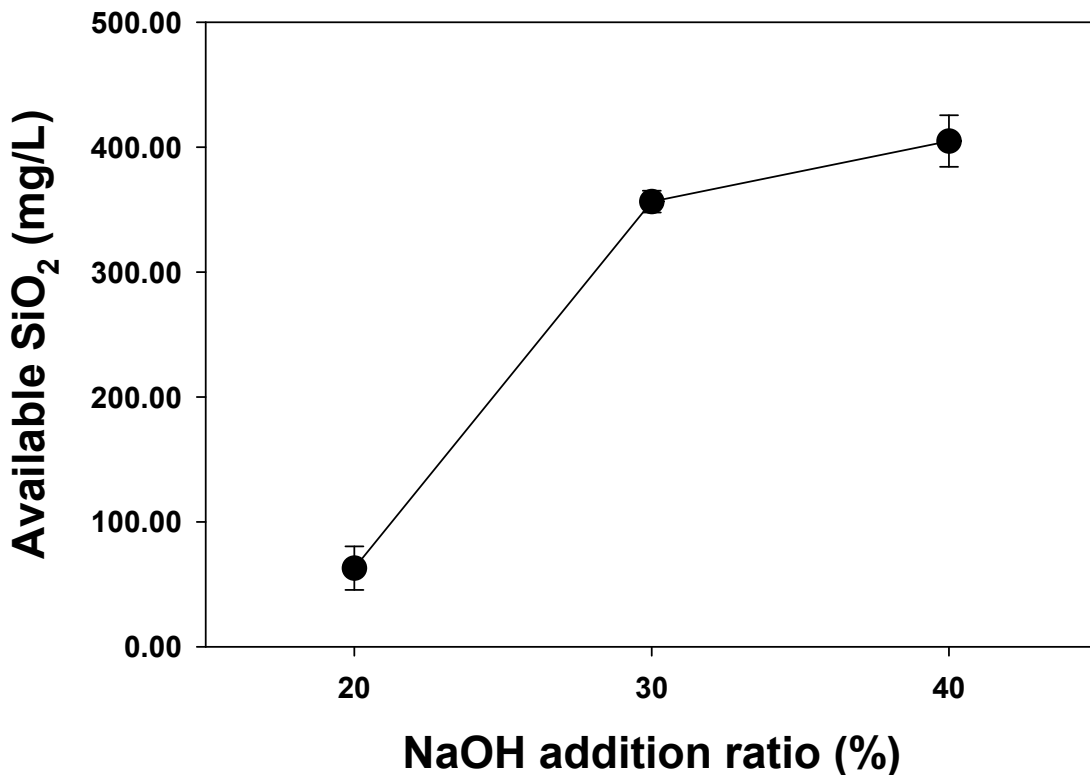


그림 3-1-3. 황토와 가성소다를 이용한 반응에서 available SiO₂ 생산농도에 미치는 NaOH 첨가량의 영향

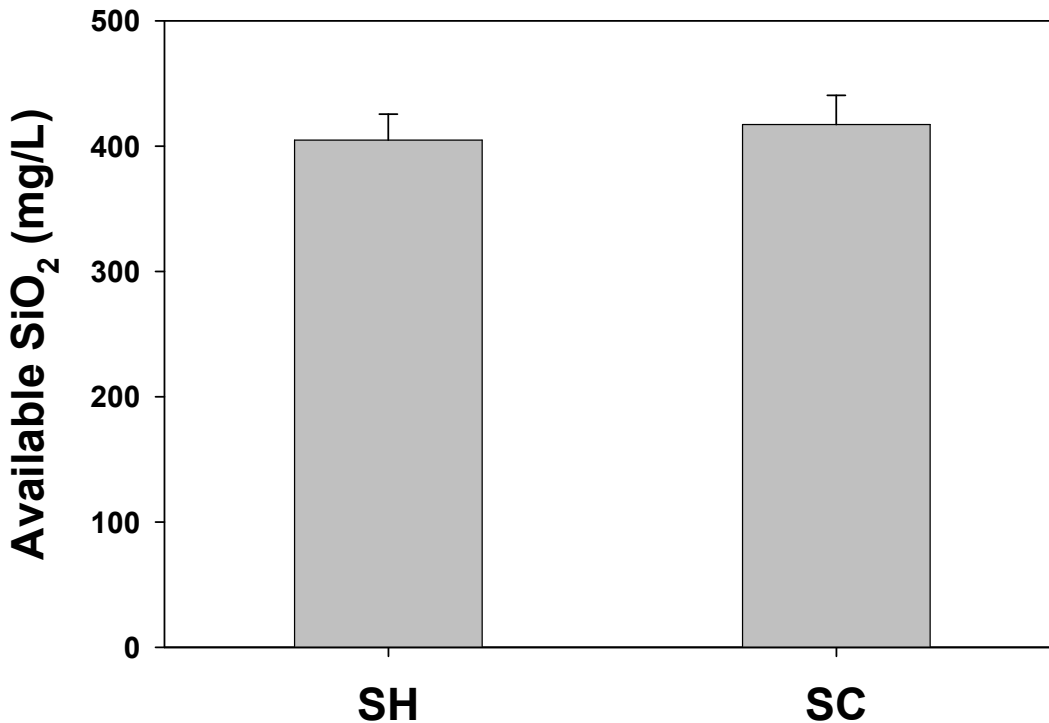


그림 3-1-4. available SiO₂ 생산농도에 미치는 NaOH와 Na₂CO₃ 영향

(2) 반응조건이 유효규소 (available SiO₂) 생산수율에 미치는 영향

(가) NaOH 첨가량이 유효규소 (available SiO₂) 생산수율에 미치는 영향

황토(고창황토) 70g에 가성소다 20, 30, 40g을 첨가한 후 혼합하여 전기용해로(Ajeon Heating Industrial Co., Korea)를 사용하여 1200°C에서 3시간 반응시킨 후 1일 냉각 후 회수하여 분쇄기(Wonder Blender, Sanplatech Corp., Japan)로 분쇄 후 75μm 메시에 통과한 샘플을 준비하였다. 샘플 0.5g을 증류수 1L에 희석한 후 아래 분석방법 (p 127)에 따라 분석 하였다.

수율 계산식은 아래와 같다.

$$\text{Yield (P-SiO}_2\text{/R-SiO}_2\text{, \%)} = (\text{생산된 황토가공소재의 SiO}_2\text{ 총량/투입황토 내의 SiO}_2\text{ 총량}) \times 100$$

$$\text{Yield (P-SiO}_2\text{/R-NaOH, \%)} = (\text{생산된 황토가공소재의 SiO}_2\text{ 총량/NaOH 첨가량}) \times 100$$

실험결과는 그림 3-1-5와 같이 가성소다 함량이 증가할수록 Yield (P-SiO₂/R-NaOH, %)는 증가하다가 30% 이상에서는 감소하였다. Yield (P-SiO₂/R-NaOH, %)에 대한 최적의 가성소다 첨가량은 30% 로 사료된다.

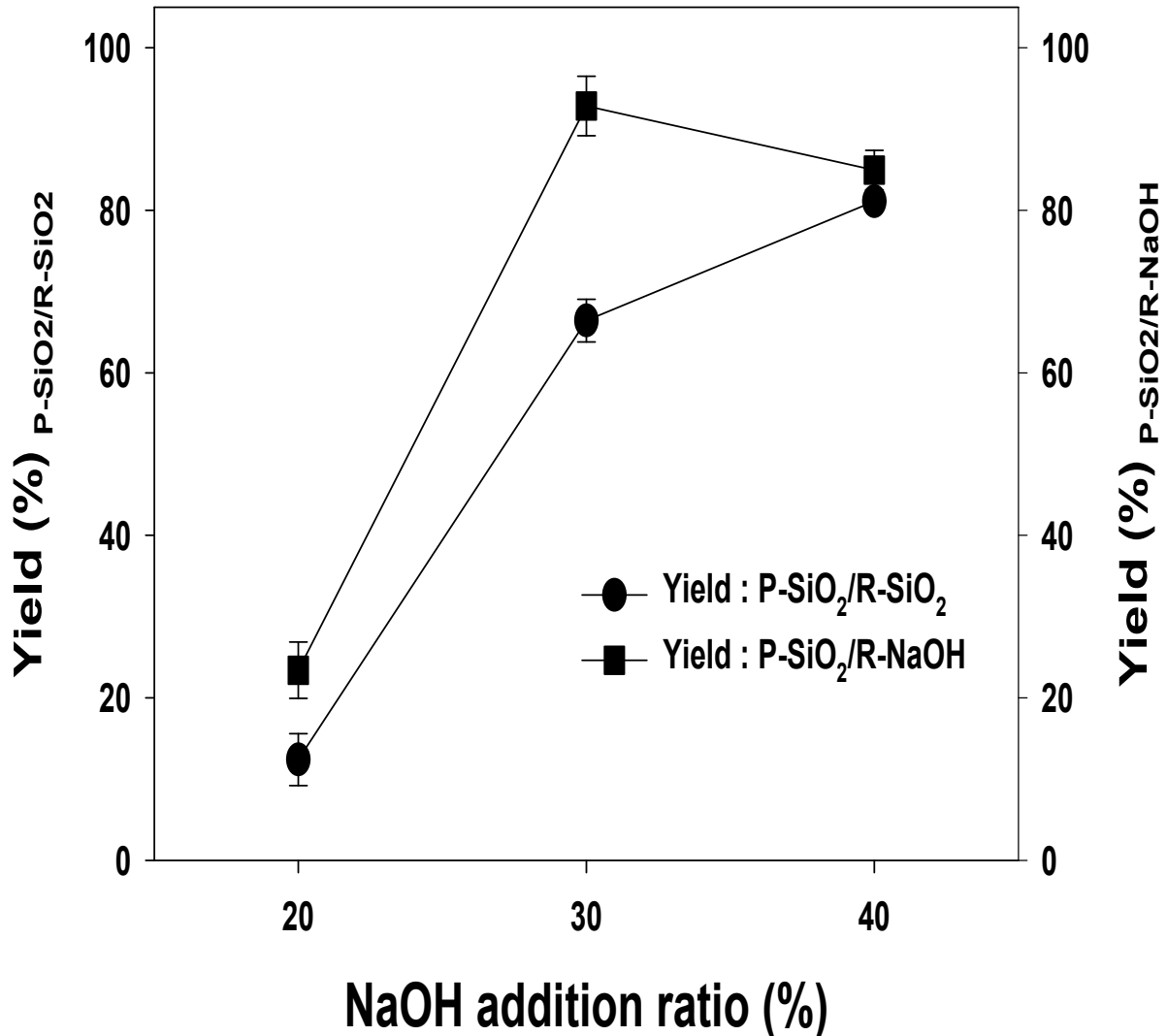


그림 3-1-5. 황토와 NaOH를 이용한 반응에서 NaOH 첨가농도가 available SiO₂ 생산수율에 미치는 영향

(나) 반응온도가 유효규소 (available SiO₂) 생산수율에 미치는 영향

황토(고창황토) 70g에 가성소다 30g을 첨가한 후 혼합하여 전기용해로 (Ajeon Heating Industrial Co., Korea)를 사용하여 600, 800, 1000, 1200, 1400°C에서 3시간 반응시킨 후 1일 냉각 후 회수하여 분쇄기 (Wonder Blender, Sanplatech Corp., Japan)로 분쇄 후 75μm 메시에 통과한 샘플을 준비하였다. 샘플 0.5g을 증류수 1L에 희석한 후 아래 분석방법 (p 127)에 따라 분석하였다. 수율계산은 상기와 동일하게 하였다. 실험결과는 그림 3-1-6에 나타난 것과 같이 반응온도가 증가할수록 Yield (P-SiO₂/R-SiO₂, %)와 Yield (P-SiO₂/R-NaOH, %) 모두 증가하였고 1200°C 이상에서는 일정하게 유지되어 가공온도를 1200°C로 정하였다.

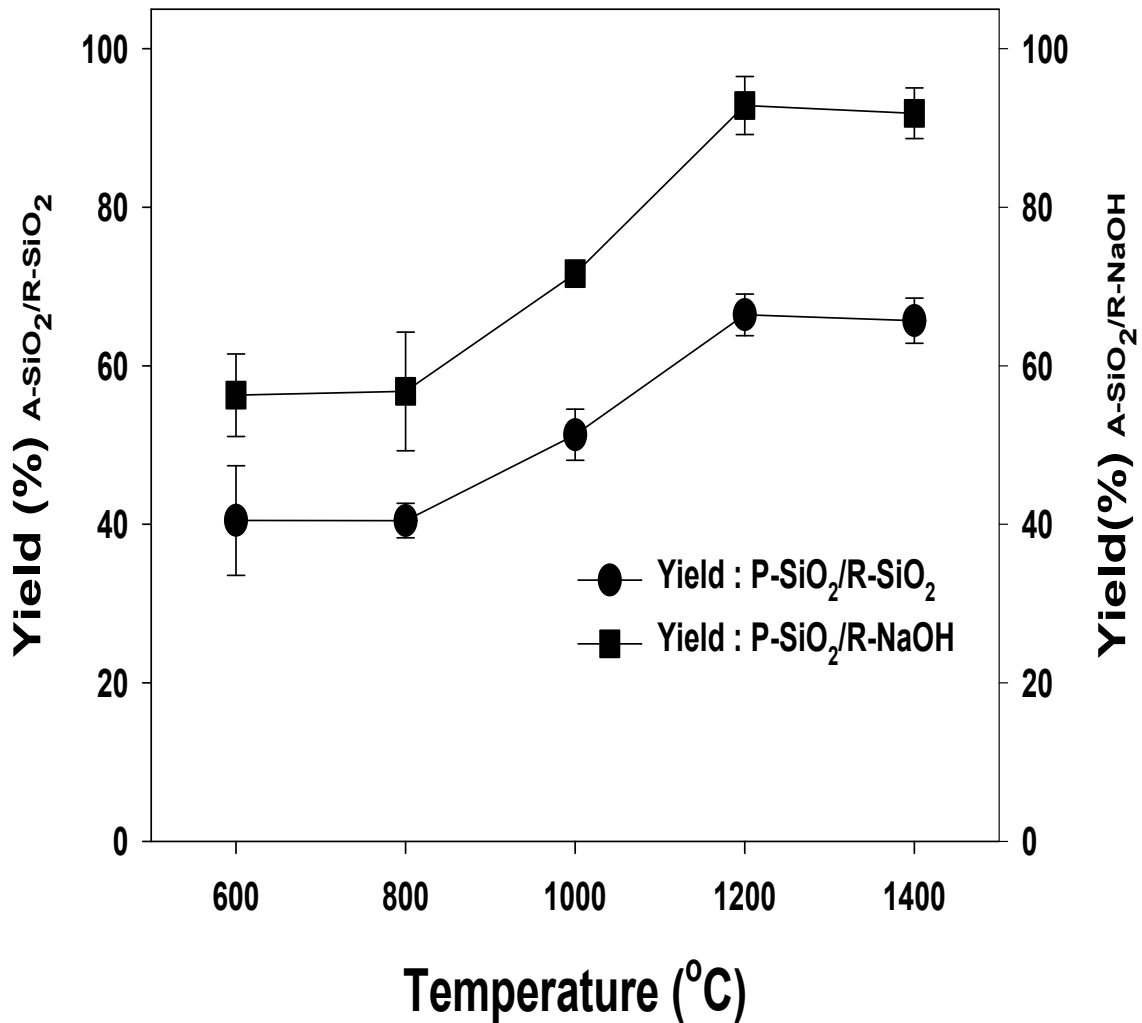


그림 3-1-6. 황토와 NaOH를 이용한 반응에서 반응온도가 available SiO₂ 생산수율에 미치는 영향

(다) 반응시간이 유효규소 (available SiO₂) 생산수율에 미치는 영향

황토(고창황토) 70g에 가성소다 30g을 첨가한 후 혼합하여 전기용해로 (Ajeon Heating Industrial Co., Korea)를 사용하여 1200°C에서 1, 2, 3, 4시간씩 각각 반응시킨 후 1일 냉각 후 회수하여 분쇄기 (Wonder Blender, Sanplatech Corp., Japan)로 분쇄 후 75 μ m 메시에 통과한 샘플을 준비하였다. 샘플 0.5g을 증류수 1L에 희석한 후 아래 분석방법 (p 127)에 따라 분석 하였다. 실험결과는 그림 3-1-7에 나타낸 것처럼 반응시간 1시간 경과 후 부터는 Yield (P-SiO₂/R-SiO₂, %) 와 Yield (P-SiO₂/R-NaOH, %) 모두 증가하여 반응시간은 1시간 이상으로 정 하였다.

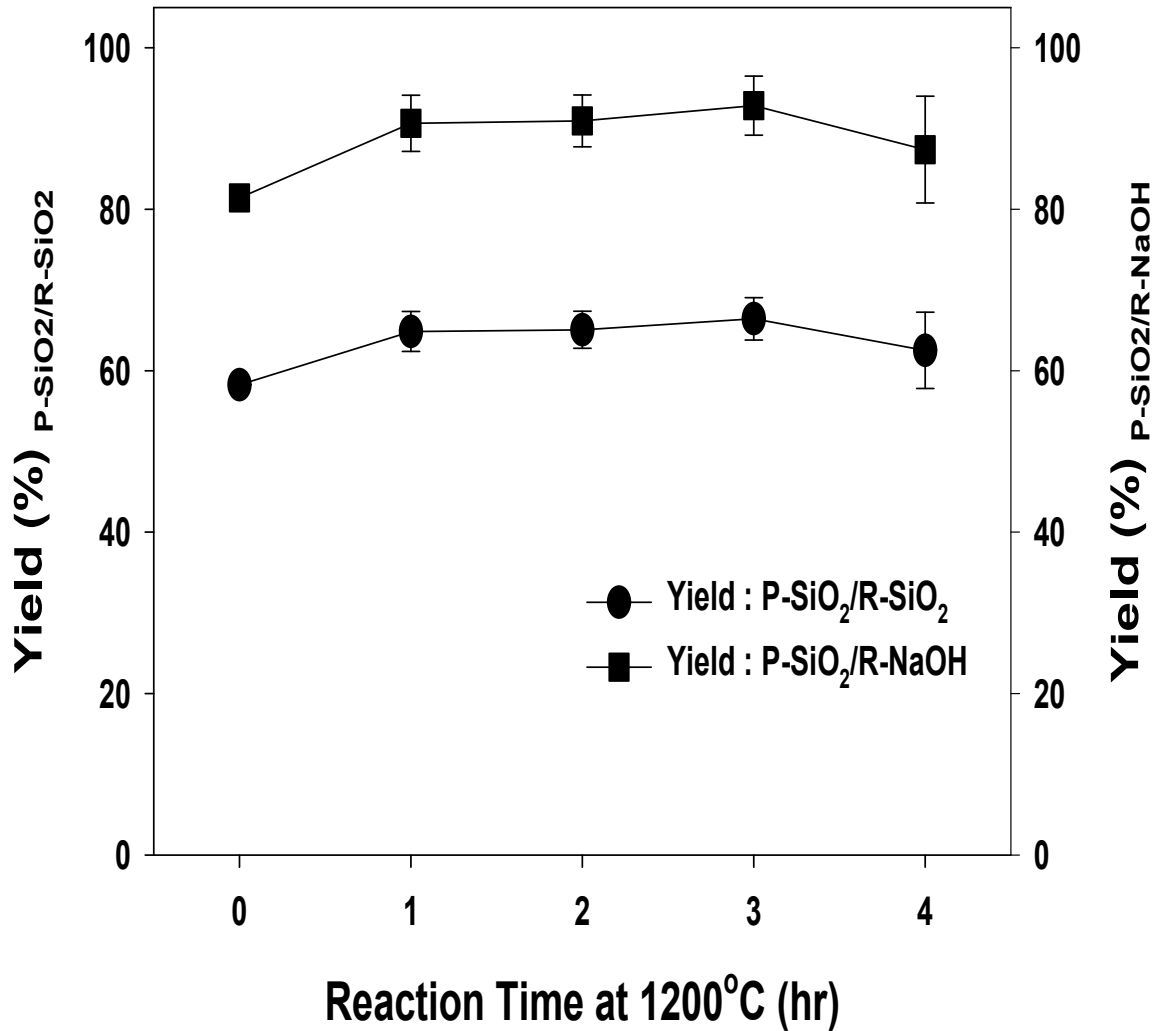


그림 3-1-7. 황토와 NaOH를 이용한 반응에서 반응시간이 available SiO₂ 생산수율에 미치는 영향

(라) 황토가공소재 대량생산 용해로 운전조건 확립

○ 황토가공소재 대량 생산을 위하여 20kg/batch 용량의 도가니를 용해로 내에 장착후 황토와 NaOH 혼합물을 투입후 1200°C 에서 3시간동안 반응 시켰다. 한달정도 운전한 경우 용해로에 구멍이 생기는 현상이 발생하여 도가니를 교체해야 했다. 이런 현상이 발생하는 원인을 분석한 결과 NaOH량이 과잉으로 투여되어 황토의 SiO₂ 성분과 반응하고 남은 NaOH 성분이 흑연 도가니와 반응하여 구멍을 내는 것으로 판단되었다. 이런 문제는 경험적으로 해결하는 방법밖에 없어서, NaOH량을 황토의 SiO₂ 성분과 반응하는 몰수보다 점차적으로 적은량을 투입하면서 도가니 상태를 지속적으로 확인하였다. 원료황토(고형분 82%) 60kg 대비 NaOH 18kg을 투입하는 경우 와 Na₂CO₃ 25kg을 투입하는 경우에 도가니에 구멍이 나는 현상이 생기지 않았다.

○ NaOH 와 Na_2CO_3 현장사용을 위한 비교검토를 수행하였다. NaOH의 경우는 입자가 커서 그대로 황토와 혼합하여 용해로에 투입하면 반응이 일어나지 않는 단점이 있었다. 그래서 NaOH를 소량의 물로 용해시킨 후 혼합기에서 황토와 혼합 후 용해로에 투입하였을때 정상적으로 반응이 일어났다. 그러나 물이 첨가가 되면 황토가 반죽이 되어 점도가 높아지므로 정량 및 이송에서 작업이 매우 어려운 단점이 발생하였다. Na_2CO_3 의 경우 분말형태로 구입이 되므로 황토와 그대로 혼합한 후 용해로에 투입하여도 정성적으로 반응이 일어났다. 그러나, Na_2CO_3 를 사용한 생성물을 냉각시켰을때 경도가 매우 높아져서 분쇄하는데 어려움이 발생하였고, Soluble한 물질이 적게 추출되는 단점이 있다. 이러한 장단점과 가격적이 측면에서 NaOH를 사용하는것이 바람직할 것으로 판단되었다.

(마) 불밀가동시 입도크기가 규소 추출수율에 미치는 영향

○ 용해로로부터 생산된 황토가공소재를 햄머크라샤를 이용하여 <3mm 크기로 1차 분쇄 후 불밀을 이용한 습식분쇄실험을 수행하였다. 내부지름 18cm x 높이 22cm 크기의 지르코니아 불밀을 제작하여 사용하였고, 알루미나 불 500g, 황토가공소재 500kg, 물 500g을 불밀에 투입한 후 300rpm의 조건에서 10일 가동하였다. 알루미나 불 크기는 1mm, 5mm, 10mm, 20mm를 비교하였다.

○ 알루미나 불 크기가 유효규소 추출수율에 미치는 영향을 그림 3-1-8에 나타내었다. 유효규소 추출수율은 불 크기 10mm까지 증가할수록 증가하였고, 20mm 알루미나 불을 사용시 추출수율은 감소하였다. 이 결과는 추출수율이 불의 collision force와 표면적에 영향을 받는다는 것을 보여준다. 불 크기의 증가는 collision force를 증가시켜 추출수율을 증가시키지만, 20mm 지름의 알루미나 불 사용은 표면적을 감소시켜 추출수율은 감소시킨다. 그러므로 황토가공소재의 습식불밀공정에서 유효규소 추출수율을 가장 높게 생산하기 위한 최적의 불 지름을 10mm로 나타났다.

(바) 황토가공소재 습식불밀 공정에서 나노입도와 마이크로입도의 경제성 비교

○ 황토가공소재의 습식불밀공정에서 마이크로입도와 나노입도의 수율 및 경제성비교를 아래 그림 3-1-9, 3-1-10에 나타내었다. 500 nm 크기의 입도는 나노밀을 보유한 회사(이온코리아(주))에 위탁생산하여 제조하였고, 20 μm 크기의 입도는 동국대 소재 파일롯트 플랜트 내의 불밀(2 m³)을 사용하여 제조하였다. 나노사이즈 입도를 제조하는 나노밀은 1 mm 크기의 지르코니아 비드밀을 사용하였고 생산 후 평균 입도분석결과 0.494 μm 를 나타내었고, 10 mm 알루미나 불밀이 충전되어진 마이크로사이즈 입도 생산 불밀을 사용하여 생산한 결과 평균 입도는 19.5 μm 였다. 지르코니아 비드밀은 알루미나 불밀에 비해 약 10배정도 높은 가격을 유지한다. 생산단가를 비교시 나노사이즈의 경우 약 3000원/kg 정도 비용이 발생하였고, 마이크로사이즈의 경우는 약 292원/kg 정도의 비용이 발생하였다. 주성분인 Si 에 대한 추출수율도 1 mm 크기의 지르코니아 불을 사용한 경우보다 20 mm 이하 크기의 알루미나 불을 사용한 경우가 훨씬 높게 나타났다. 그 이유는 황토가공소재의 경우 경도가 매우 강하므로

수율은 표면적(surface area)보다 충돌력(collision force)에 의존하기 때문에 사료된다.

습식 볼밀공정에서 유효규소 추출수율에 미치는 알루미나 볼 지름의 영향

항목	Ball diameter, mm			
	1	5	10	20
황토가공소재 투입량(g)	500	500	500	500
황토가공소재 SiO ₂ 함량 (%)	30.10	30.10	30.10	30.10
SiO ₂ 투입량(g)	150.5	150.5	150.5	150.5
생산량 (g)	122.3	389.5	532.2	532.7
생산품 SiO ₂ 함량 (%)	30.54	29.84	25.47	22.04
SiO ₂ 생산량(g)	37.35	116.23	135.55	117.41
추출수율 (%)	24.82	77.23	90.07	78.01

추출수율 (%) = SiO₂ 생산량(g) / SiO₂ 투입량(g) x 100

그림 3-1-8. 황토가공신소재 습식볼밀공정에서 유효규소 추출수율에 미치는 알루미나 볼 지름의 영향

	평균입도 0.5 μm	평균입도 20 μm	비고
볼 사이즈	1mm	<20mm	
볼 재질	지르코니아	알루미나	지르코니아 가격 약 10배 높음
RPM	8000	30	
유효규소 생산수율	65.27%	90.07%	
분쇄비용	3000원/kg	292원/kg	

그림 3-1-9. 황토가공신소재 습식볼밀공정에서 마이크로입도와 나노입도의 수율 및 경제성 비교

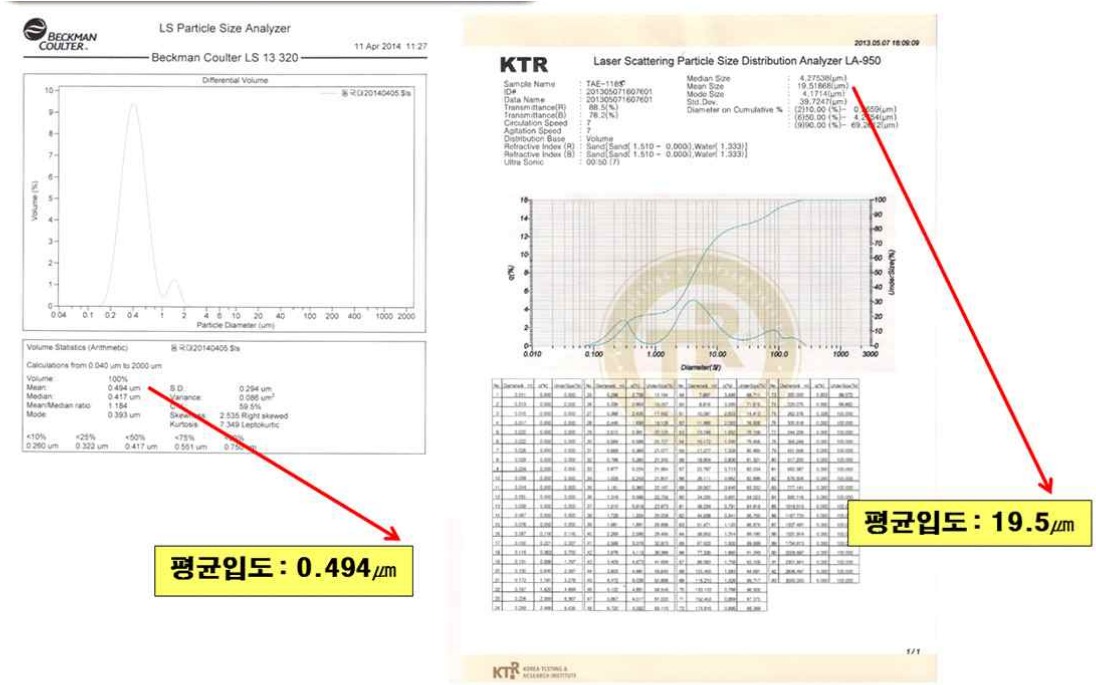


그림 3-1-10. 황토가공신소재 습식분말공정에서 입도 분석결과

(마) 원료황토 및 황토가공소재 시제품의 성분분석

충남보령으로부터 구입한 황토원료(보령황토) 및 보령황토 가공소재와 고창으로부터 구입한 황토원료(고창황토) 및 황토 가공소재에 대한 성분 및 중금속분석을 한국화학융합시험연구원에 의뢰하여 분석하여 비교한 결과 보령황토에서는 중금속이 검출되지 않았으나, 고창황토에서는 납이 15.6ppm 검출되었고, 황토가공소재의 경우 두 원료 모두 중금속이 검출되지 않았다. 샘플은 모두 105°C에서 건조 후 분석 하였다. 황토원료에 납이 검출되었더라도 황토가공소재에서는 납이 검출되지 않았다. 이것은 황토가공공정에서 첨가물에 의해 황토원료가 희석되어 지는 효과와 1200°C에서 3시간이상 고온 가공공정에서 증발 되었을 수도 있다. 황토가공소재의 성분중 Soluble한 물질이 규산소다(Sodium Silicate, Na₂SiO₃)이고, 규산질 비료 및 병충해 방제기능을 나타내므로 SiO₂+Na₂O 성분의 합 과 중금속 검출 여부로 품질의 기준을 정하였다. 보령황토를 원료로 사용한 경우SiO₂+Na₂O 성분의 합이 약 55.70%로 나타났고, 고창황토를 원료로 사용한 경우 SiO₂+Na₂O 성분의 합이 약 71.09%로 확인 되었다. 고창에서 구입한 고창황토와 보령에서 구입한 보령황토 샘플을 비교분석한 결과 SiO₂ 성분에서 상당한 차이를 보여 지역마다 황토성분에서 차이가 많이 발생하는 것을 확인 하였고, 보령황토의 경우 황토가공소재의 SiO₂+Na₂O 성분이 낮을 지라도 가격이 고창황토에 비해 경쟁력이 있고, 또한 원료에 중금속이 함유되어 있지 않으므로 향후 모든 실험에 보령황토를 사용하였다. 1차년도 연구목표에 평균입도 400nm 달성은 황토가공소재의 성분중 약 50-70%정도가 용해성 물질로 상기 연구결과 밝혀졌으므로 나노분쇄는 의미가 없었다. 마이크로 사이즈 정도로 분쇄후 살포하여 토양내에서 규산용출이 서서히 일어나게 하는것이 유리하므로 400nm 입도 보다 마이크로 분쇄가 유리할 것으로 사료된다.

표 3-1-1. 원료황토 성분분석

시험항목	결과치(%)				비고
	보령황토 (입도 3mm 이하)	보령황토 가공소재	고창황토 (입도 75 μ m 이하)	고창황토 가공소재	
SiO ₂	37.1	30.1	54.7	39.3	
Al ₂ O ₃	32.1	19.0	24.9	15.0	
Fe ₂ O ₃	13.4	7.47	7.30	4.42	
CaO	0.02	0.95	0.14	0.08	
MgO	0.75	0.73	0.71	0.43	
K ₂ O	1.95	1.30	1.66	2.30	
Na ₂ O	0.21	25.6	0.04	31.79	
TiO ₂	1.28	0.94	0.78	0.54	
As	검출안됨	검출안됨	검출안됨	검출안됨	
Pb	검출안됨	검출안됨	15.6ppm	검출안됨	
Cd	검출안됨	검출안됨	검출안됨	검출안됨	
Hg	검출안됨	검출안됨	검출안됨	검출안됨	

나. 황토가공신소재 생산공정 표준화

황토가공신소재는 황토에 가성소다를 혼합하여 고온에서 용융반응시키므로써 황토의 이산화규소(SiO₂) 성분을 규산나트륨(Na₂SiO₃)으로 전환하여 황토로부터 이산화규소 성분을 제거한 물질과 규산나트륨(Na₂SiO₃) 및 미네랄성분이 혼합되어 있는 물질이다(그림 3-1-11).



그림 3-1-11. 황토가공신소재 특허기술 및 적용분야

규소성분은 토양의 기본성분으로 모든종류의 식물이 필요로 하는 물질이지만, 토양이나 황토와 같은 천연광물에 존재하는 규소성분은 식물이 직접 이용할 수 없다. 반면 상기와 같이 고온에서 간단한 가공을 거치면 천연광물내에 존재하는 규소성분을 물에 녹게할 수 있으므로 식물이 쉽게 흡수할 수 있게된다.

황토가공신소재의 표준 제조공정을 그림 3-1-12 에 나타내었다. 황토와 NaOH를 일정비율로 혼합 한 후 1200℃에서 3시간이상 용융반응 시킨 후 상온에서 냉각하여 햄머 크라샤를 이용하여 1차 분쇄를 실시한다. 이때 입도 크기는 5mm 이하 정도이다. 1차 분쇄된 소재 와 물을 1:1 로 혼합 한 후 20mm이하 크기의 알루미나 불이 장착된 볼밀에서 약 10일 정도 습식분쇄 하여 pH 12±0.5의 A 제품을 생산한다. 이때 입도 크기는 평균 20µm 정도 이다. A 제품의 황토가공 소재 슬러리에 황토가공소재 슬러리 대비 물을 37.5% 첨가하고 70% 황산을 10% 첨가한 후 볼 밀에서 1일 더 혼합 분쇄하여 pH 7±0.5의 B 제품을 생산한다. A 제품의 황토가공소재 슬러리에 황토가공소재 슬러리 대비 물을 50% 첨가하고 70% 황산을 17.5% 첨가한 후 볼밀에서 1일 더 혼합 분쇄하여 pH 4±0.5의 B 제품을 생산한다. 각각의 제품을 회수 한 후 100℃ 이상의 열풍건조기에서 24시간 건조한 후 분말화 하여 사용한다.

황토가공신소재는 크게 세가지로 분류된다. pH 12 정도로 제조된 소재는 농업용으로 규소 및 미네랄성분이 쉽게 물에 녹아(soluble part) 식물의 흡수가 용이하고 토양내 미생물 성장 및 토양효소활성을 증가시켜 작물의 영양성분 흡수를 촉진시키는 역할을 하고, 이산화규소성분이 제거된 황토성분(non-soluble part)은 토양내에 존재하는 비료성분 및 미생물들을 흡착시켜 비가와도 쉽게 유실되지 않도록 도와주는 역할을 한다. 반면, pH 7 정도로 제조된 소재는 사료첨가제로 사용이 가능하여 축산/수산 동물의 면역기능을 증가시켜 항생제 사용의 감소화가 기대되며, pH 4 정도로 제조된 소재는 응집·흡착능이 우수하여 녹조/적조 제거, 수질중의 질소/인 제거, 악취제거 등에 응용이 가능하다.

황토를 가성소다와 일정비율로 혼합하여 용융반응 후 습식분쇄를 하면 SiO₂ 성분이 제거된 황토입자와 규산나트륨 및 미네랄 성분이 생성되고 pH 12 정도의 알칼리 물질로 된다. 이것을 황산을 사용하여 pH 7 또는 pH 4 정도로 산처리하면 규산나트륨은 그림 3-1-13 과 같이 규산으로 전환된다.

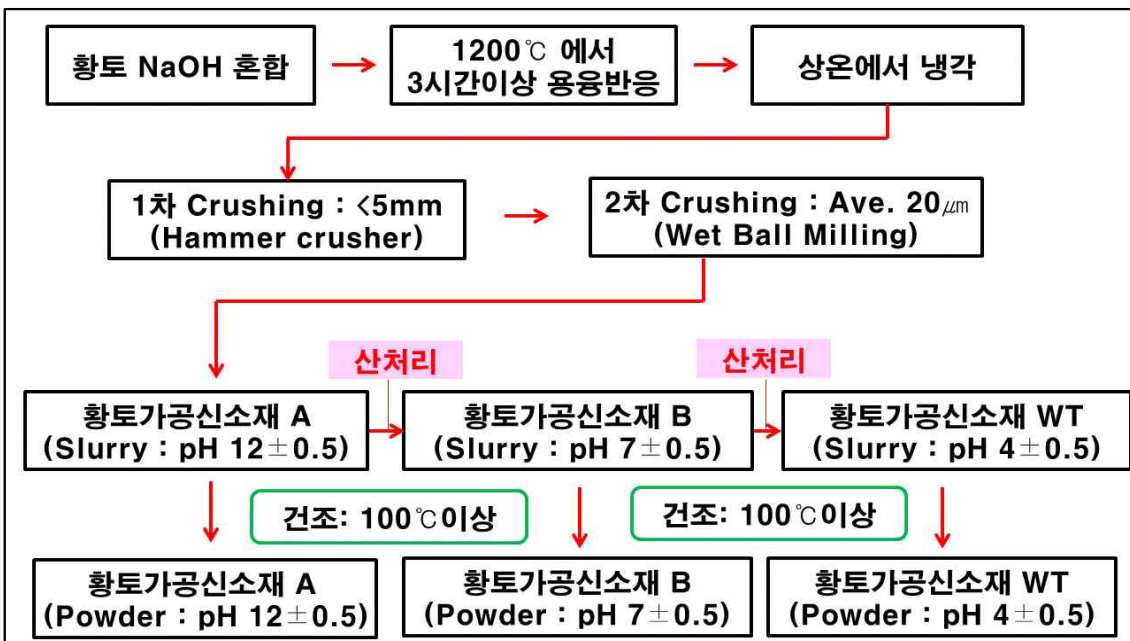


그림 3-1-12. 황토가공신소재 제조공정도

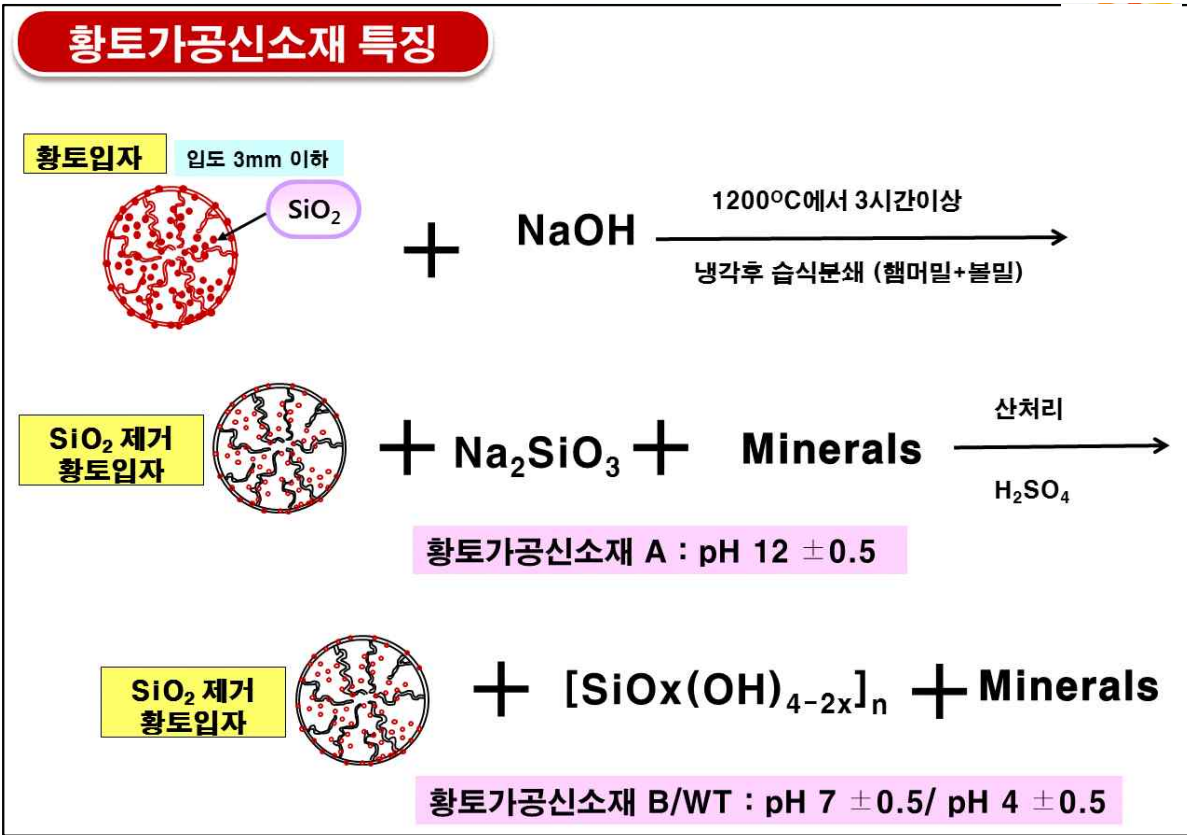


그림 3-1-13. 제조공정별 황토가공소재의 특성

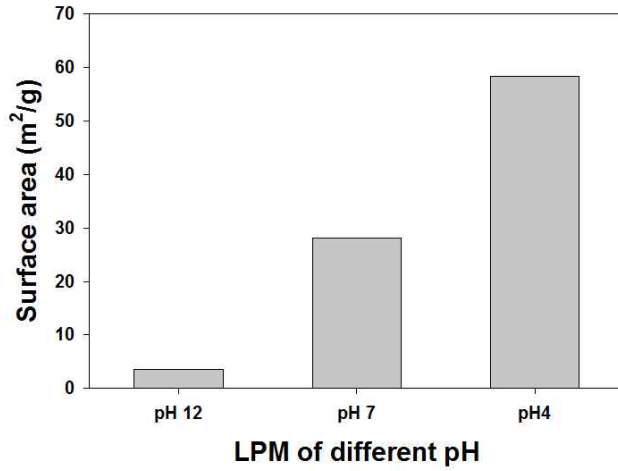
다. 황토가공신소재 다기능성 효능평가

(1) 황토가공신소재의 pH에 따른 비표면적 분석

○ 황토가공신소재 분말에 대한 pH에 따른 비표면적 조사결과를 아래그림 3-1-14 에 나타내었다. pH 가 감소할수록 비표면적은 증가하는 경향을 나타내었다. 이것은 낮은 pH에서 흡착기능이 월등히 우수하게 나타낸다는 것을 의미한다. 비표면적이 증가하는 이유는 pH가 높은 상태에서는 수용성 규산나트륨형태로 존재하여 황토가공소재의 기공을 막기 때문에 사료되고 pH가 감소할수록 규산나트륨이 규산으로 전환되어 기공으로부터 빠져나오는 것으로 사료된다.

(2) 황토가공신소재의 pH에 따른 암모니아 탈취능 분석

○ 황토가공신소재 분말에 대한 pH에 따른 암모니아 탈취력에 대한 시험결과를 아래그림 3-1-15 에 나타내었다. pH 7 (상품명 : 복룡간점토 B)과 4 (상품명 : 복룡간점토 WT)에서는 암모니아 탈취능이 30분경과시 99.6% 였고, pH 12 (상품명 : 복룡간점토 A) 의 경우 77.6%를 나타내었다. pH가 감소할수록 탈취능은 증가하는 것으로 사료되고 다른 일반황토의 경우 (30분 경과시 87.8%)보다 탈취능이 높게 나타났다. 이것은 상기 비표면적 조사결과와 마찬가지로 pH가 낮을수록 비표면적이 증가하고 규산나트륨성분도 규산으로 전환되므로써 흡착기능이 증가하는 것으로 사료된다.



LPM : Loess Processed Material

LPM (pH 12±0.5)	LPM (pH 7±0.5)	LPM (pH 4±0.5)	황토	비고
3.4856	28.074	58.2770	58.1780	· 시험방법 : BET 비표면적 분석법 · 단위 : m ² /g

그림 3-1-14. 황토가공소재 pH별 비표면적 변화

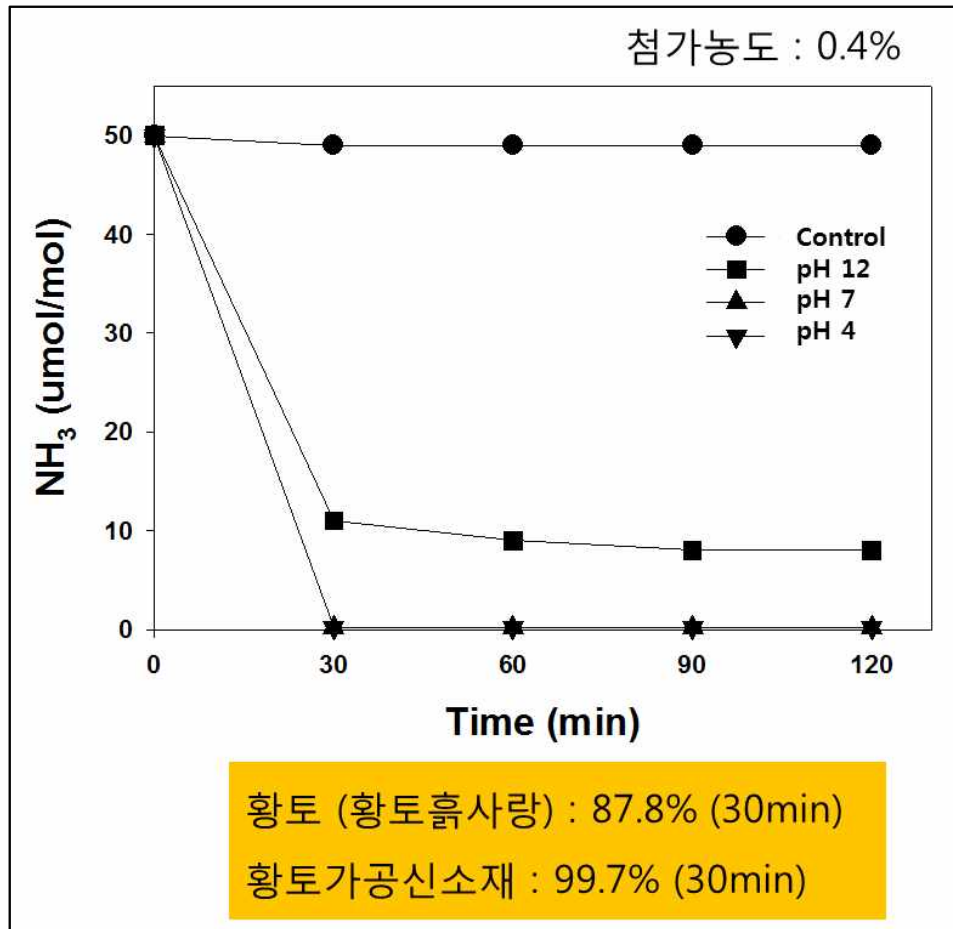

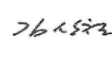


그림 3-1-15. 황토가공신소재 pH에 따른 암모니아 가스 제거효과

시험성적서

1. 성적서 번호 : CT15-036893
2. 의뢰자
 - 업체명 : 동국대학교 산학협력단
 - 주소 : 경기도 일산동구 동국로32 동국대 바이오메디캠퍼스 상영바이오관 7층 763호
 - 의뢰일자 : 2015년 03월 24일
 - 시험기간 : 2015년 03월 24일 ~ 2015년 04월 03일
3. 시험성적서의 용도 : 품질관 (pH 4)
4. 시료명 : 복통간점도 WT
5. 시험방법
 - (1) 의뢰자제시

확인	작성자 성명	이형욱		기술책임자 성명	김상철	
비고 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.						

2015년 04월 03일
한국건설생활환경시험연구원장



군포시험실 : 435-010 경기도 군포시 공단로 149 1' VALLEY군포 805호 (031)389-9100
 결과문의 : 건강생활공간사업본부추진TF ☎ (031)389-9185

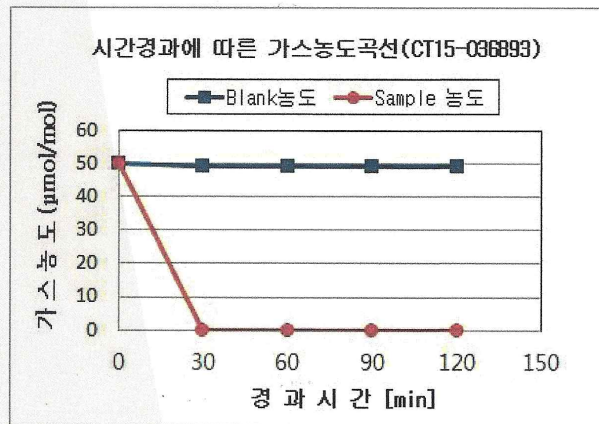
시험성적서

성적서번호 : CT15-036893

6. 시험결과

시험항목	단위	시험방법	시험결과			시험환경	
			Blank농도 ($\mu\text{mol/mol}$)	Sample농도 ($\mu\text{mol/mol}$)	탈취율 (%)		
탈취 시험 암모니아 NH_3	0 분	%	(1)	50	50	0.0	(21.4 \pm 0.3) $^{\circ}\text{C}$ (44.9 \pm 1.6) % R.H.
	30 분	%		49	< 0.2	99.6	
	60 분	%		49	< 0.2	99.6	
	90 분	%		49	< 0.2	99.6	
	120 분	%		49	< 0.2	99.6	

※ 검출한계 0.2 $\mu\text{mol/mol}$



※ 의뢰자제시 (조달청 MAS등록 시험방법 조건)

1. 의뢰자가 제시한 시료 20 g를 5 L 크기 반응기에 넣고 밀봉함.
2. 시험가스의 초기농도를 50 $\mu\text{mol/mol}$ 으로 주입하고 시험가스의 농도를 초기(0분), 30분, 60분, 90분, 120분에서 측정하고 이를 sample 농도라 함.
3. 시험가스의 농도는 가스검지관 (구 KS I 2218)에 의해 측정함.
4. 시험 중 온도는 (23.0 \pm 5.0) $^{\circ}\text{C}$, 습도는 (50 \pm 15) % R.H.를 유지함.
5. 이와 별도로 시료가 없는 상태에서 위의 2 ~ 4에 의해 시험을 진행하고 이를 blank 농도라 함.
6. 각 시간대별 시험가스의 제거율은 다음 식에 의해 계산함.

$$\text{시험가스의 제거율(\%)} = \frac{[(\text{blank 농도}) - (\text{sample 농도})]}{(\text{blank 농도})} \times 100. \text{ 끝.}$$

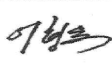
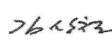
----- 이 하 여 백 -----


총 2 페이지 중 2 페이지

양식QP-20-01-06(3)

시험성적서

1. 성적서 번호 : CT15-036892
2. 의뢰자
 - 업체명 : 동국대학교 산학협력단
 - 주소 : 경기도 일산동구 동국로32 동국대 바이오메디캠퍼스 상영바이오관 7층 763호
 - 의뢰일자 : 2015년 03월 24일
 - 시험기간 : 2015년 03월 24일 ~ 2015년 04월 03일
3. 시험성적서의 용도 : 품질관리
4. 시료명 : 복통간점도 B (pH 7)
5. 시험방법
 - (1) 의뢰자제시

확인	작성자 성명	이형욱		기술책임자 성명	김상철	
비교 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.						

2015년 04월 03일
한국건설생활환경시험연구원 

군포시험실 : 435-010 경기도 군포시 공단로 149 1' VALLEY군포 805호 (081)389-9100
 결과문의 : 건강생활공간사업본부추진TF ☎ (031)389-9185

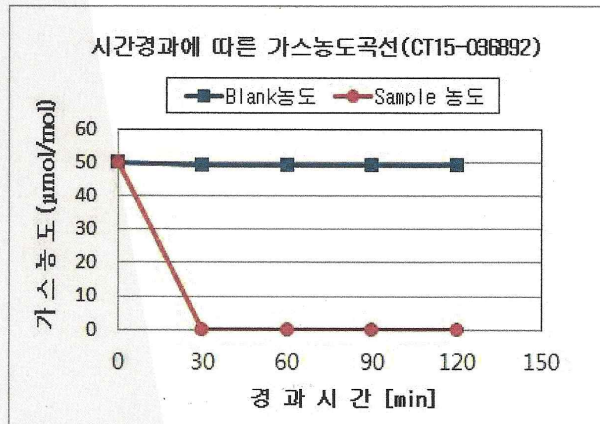
시험성적서

성적서번호 : CT15-036892

6. 시험결과

시험항목	단위	시험방법	시험결과			시험환경	
			Blank농도 ($\mu\text{mol/mol}$)	Sample농도 ($\mu\text{mol/mol}$)	탈취율 (%)		
탈취 시험 암모니아 NH_3	0 분	%	(1)	50	50	0.0	(21.4 \pm 0.3) $^{\circ}\text{C}$ (44.9 \pm 1.6) % R.H.
	30 분	%		49	< 0.2	99.6	
	60 분	%		49	< 0.2	99.6	
	90 분	%		49	< 0.2	99.6	
	120 분	%		49	< 0.2	99.6	

※ 검출한계 0.2 $\mu\text{mol/mol}$



※ 의뢰자제시 (조달청 MAS등록 시험방법 조건)

1. 의뢰자가 제시한 시료 20 g를 5 L 크기 반응기에 넣고 밀봉함.
2. 시험가스의 초기농도를 50 $\mu\text{mol/mol}$ 으로 주입하고 시험가스의 농도를 초기(0분), 30분, 60분, 90분, 120분에서 측정하고 이를 sample 농도라 함.
3. 시험가스의 농도는 가스검지관 (구 KS I 2218)에 의해 측정함.
4. 시험 중 온도는 (23.0 \pm 5.0) $^{\circ}\text{C}$, 습도는 (50 \pm 15) % R.H.를 유지함.
5. 이와 별도로 시료가 없는 상태에서 위의 2 ~ 4에 의해 시험을 진행하고 이를 blank 농도라 함.
6. 각 시간대별 시험가스의 제거율은 다음 식에 의해 계산함.

$$\text{시험가스의 제거율(\%)} = \frac{\{(\text{blank 농도}) - (\text{sample 농도})\}}{(\text{blank 농도})} \times 100. \text{ 끝.}$$



----- 이 하 여 백 -----

총 2 페이지 중 2 페이지

양식QP-20-01-06(3)

시험성적서

1. 성적서 번호 : CT15-036891
2. 의뢰자
 - 업체명 : 동국대학교 산학협력단
 - 주소 : 경기도 일산동구 동국로32 동국대 바이오메디캠퍼스 상영바이오관 7층 763호
 - 의뢰일자 : 2015년 03월 24일
 - 시험기간 : 2015년 03월 24일 ~ 2015년 04월 03일
3. 시험성적서의 용도 : 품질관리
4. 시료명 : 복통간점토 A (pH 12)
5. 시험방법
 - (1) 의뢰자제시

확인	작성자 성명	이형욱		기술책임자 성명	김상철	
비고 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.						

2015년 04월 03일
한국건설생활환경시험연구원장



군포시험실 : 435-010 경기도 군포시 공단로 149 I' VALLEY군포 805호 (031)389-9100
 결과문의 : 건강생활공간사업본부추진TF ☎ (031)389-9185

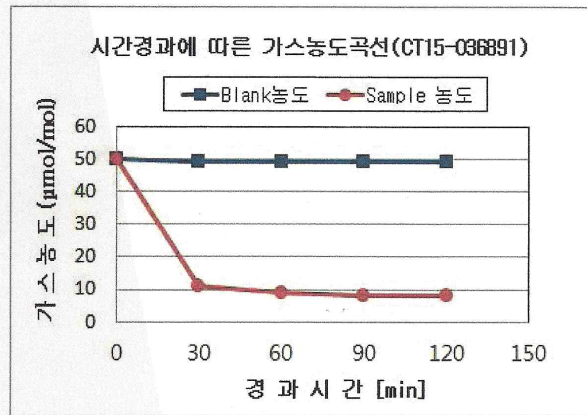
시험성적서

성적서번호 : CT15-036891

6. 시험결과

시험항목	단위	시험방법	시험결과			시험환경	
			Blank농도 ($\mu\text{mol/mol}$)	Sample농도 ($\mu\text{mol/mol}$)	탈취율 (%)		
탈취 시험 암모니아 NH_3	0 분	%	(1)	50	50	0.0	(21.4 \pm 0.3) $^{\circ}\text{C}$ (44.9 \pm 1.6) % R.H.
	30 분	%		49	11	77.6	
	60 분	%		49	9	81.6	
	90 분	%		49	8	83.7	
	120 분	%		49	8	83.7	

※ 검출한계 0.2 $\mu\text{mol/mol}$



※ 의뢰자제시 (조달청 MAS등록 시험방법 조건)

1. 의뢰자가 제시한 시료 20 g를 5 L 크기 반응기에 넣고 밀봉함.
2. 시험가스의 초기농도를 50 $\mu\text{mol/mol}$ 으로 주입하고 시험가스의 농도를 초기(0분), 30분, 60분, 90분, 120분에서 측정하고 이를 sample 농도라 함.
3. 시험가스의 농도는 가스검지관 (구 KS I 2218)에 의해 측정함.
4. 시험 중 온도는 (23.0 \pm 5.0) $^{\circ}\text{C}$, 습도는 (50 \pm 15) % R.H.를 유지함.
5. 이와 별도로 시료가 없는 상태에서 위의 2 ~ 4에 의해 시험을 진행하고 이를 blank 농도라 함.
6. 각 시간대별 시험가스의 제거율은 다음 식에 의해 계산함.

$$\text{시험가스의 제거율(\%)} = \left[\frac{\{(\text{blank 농도}) - (\text{sample 농도})\}}{(\text{blank 농도})} \right] \times 100. \text{ 끝.}$$

----- 이 하 여 백 -----

총 2 페이지 중 2 페이지

양식QP-20-01-06(3)

(3) 황토가공신소재의 pH에 따른 CEC 분석

○ 황토가공신소재 분말에 대한 pH에 따른 CEC(Cation Exchange Capacity, 양이온 교환능)에 대한 시험결과를 아래 표 3-1-2 에 나타내었다. 일반적으로 pH 와 표면적이 증가할수록 CEC 값은 증가하므로 pH 12의 경우가 가장 높게 나타났다. pH 4 가 pH 7보다 높게 나타난 이유는 표면적이 높기 때문으로 사료된다. 우리나라 점토의 CEC 값이 평균 17-54 정도 이므로 황토가공신소재의 경우 80으로 높은 값에 속하므로 황토가공소재 처리시 비료사용의 감량화 효과가 기대된다.

표 3-1-2. 황토가공신소재 pH 에 따른 CEC 변화

LPM-A (pH 12±0.5)	LPM-B (pH 7±0.5)	LPM-WT (pH 4±0.5)	비고
80	58	73	<ul style="list-style-type: none"> • 토양의 평균 CEC : 10 • 시험방법 : 농촌진흥청 고시 제 2013-29호 • 단위 : cmol/kg

우리나라토양의 점토 CEC : 17.0 - 53.9 cmol/kg

Hyun et al. 1991. Soil CEC for textural classes in Korea. *J. Korean Soc. Soil Sci. Fer.* 24: 10-16



YOUR PARTNER FOR THE BEST QUALITY

TEST REPORT

우 150-038 서울특별시 영등포구 버드나루로 155 (영등포동8가) TEL (02)2164-0011 FAX (02)2634-1008

성적서번호 : TAK-002166

접수 일자 : 2015년 03월 05일

대표자 : 김삼동

시험완료일자 : 2015년 03월 18일

업체명 : 동국대학교 산학협력단

주소 : 서울특별시 중구 필동로1길 30 (장충동2가, 동국대학교)

시료명 : 복용간 점토 B (pH 7)

시험결과

시험항목	단위	시료구분	결과치	시험방법
CEC(염기치환용량)	cmol ⁺ / kg	-	58	농촌진흥청고시 제2013-29호

* 용도 : 품질관리용

- 비고 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지 않으며, 성적서의 진위확인은 홈페이지(www.ktr.or.kr) 또는 QR code로 확인 가능합니다.
 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용 등으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.
 3. 이 성적서는 원본(등본 포함)만 유효하며, 사본 및 전자 인쇄본/파일본은 결과치 참고용입니다.

Jung Jun Ho

작성자 : 정준호
Tel : 031-999-3124

Kim Sun-il

기술책임자 : 김선일
E-mail : ksiku@ktr.or.kr

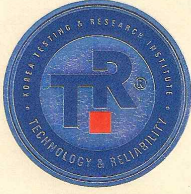
2015년 03월 18일

KTR 한국화학융합시험연구원



위변조 확인용 QR code

Page : 1 of 1



YOUR PARTNER FOR THE BEST QUALITY

TEST REPORT

우 150-038 서울특별시 영등포구 버드나루로 155 (영등포동8가) TEL (02)2164-0011 FAX (02)2634-1008

성적서번호 : TAK-002167

접수 일자 : 2015년 03월 05일

대표자 : 김삼동

시험완료일자 : 2015년 03월 18일

업체명 : 동국대학교 산학협력단

주소 : 서울특별시 중구 필동로1길 30 (장충동2가, 동국대학교)

시료명 : 복용간 점토 WT (pH 4)

시험결과

시험항목	단위	시료구분	결과치	시험방법
CEC(염기치환용량)	cmol ⁺ / kg	-	73	농촌진흥청고시 제2013-29호

* 용도 : 품질관리용

- 비고 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지 않으며, 성적서의 진위확인은 홈페이지(www.ktr.or.kr) 또는 QR code로 확인 가능합니다.
 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용 등으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.
 3. 이 성적서는 원본(등본 포함)만 유효하며, 사본 및 전자 인쇄본/파일본은 결과치 참고용입니다.

Jung Jun Ho

작성자 : 정준호
Tel : 031-999-3124

Kim Sun-il

기술책임자 : 김선일
E-mail : ksiku@ktr.or.kr

2015년 03월 18일

KTR 한국화학융합시험연구원장



위변조 확인용 QR code

Page : 1 of 1

(3) 황토가공신소재의 원적외선 분석

○ 황토가공신소재 pH 4 분말에 대한 원적외선 방사율과 방사에너지를 측정한 시험결과를 아래 표 3-1-3에 나타내었다. 일반 황토와 비교한 결과 방사율과 에너지 모두 우수한 결과를 나타내었다.

표 3-1-3. 황토가공소재와 일반황토의 원적외선분석 비교

항목	황토 (황토흙사랑)	황토가공신소재(pH 4)
원적외선 방사율	0.925	0.941
원적외선 방사에너지 (W/m ²)	3.73 x 10 ²	3.80 x 10 ²

시험성적서

1. 성적서 번호 : CT15-075274
2. 의뢰자
 - 업체명 : 동국대학교 산학협력단
 - 주소 : 경기도 일산동구 동국로32 동국대 바이오메디캠퍼스 상영바이오관 7층 763호
 - 의뢰일자 : 2015년 07월 06일
 - 시험기간 : 2015년 07월 06일 ~ 2015년 07월 22일
3. 시험성적서의 용도 : 연구용
4. 시료명 : 복룡간점도 WT (pH 4)
5. 시험방법
 - (1) KCL-FIR-1005:2011

6. 시험결과

1) 복룡간점도 WT

시험항목	단위	시험방법	시험결과	시험환경
원적외선 방사율 (측정온도 : 40 °C, 측정파장 : 5 μm ~ 20 μm)	-	(1)	0.941	(22.3 ± 0.1) °C (24.5 ± 0.3) % R.H.
원적외선 방사에너지 (측정온도 : 40 °C, 측정파장 : 5 μm ~ 20 μm)	W/m ²	(1)	3.80 × 10 ²	(22.3 ± 0.1) °C (24.5 ± 0.3) % R.H.

* 본 시험결과는 FT-IR Spectrometer를 이용한 Black Body대비 측정 결과임. 끝.

확인	작성자 성명	조형호	기술책임자 성명	김상철
비교 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.				

2015년 07월 22일
한국건설생활환경시험연구원장



군포시험실 : 435-010 경기도 군포시 공단로 149 1' VALLEY군포 805호
 결과문의 : 그린소재평가센터 ☎ (031)389-9127

라. 황토가공신소재 품질관리 규격설정

황토가공신소재의 물리화학적 성질 및 효능시험에 대한 결과를 아래표 3-1-4에 요약 정리하였다. 성분, 독성, 약해시험에서 안전성을 검증하였고, 약효, 흡착, 탈취, 수처리, 사육, 영양성/맛 시험에서 효능을 확인하였다. 농촌진흥청 지정기관인 (주)식물보호연구소에 벼 도열병에 대한 약효시험결과를 아래표에 나타내었다. 30% 고품분 슬러리 기준 200배 희석액을 10일간격으로 2회 경엽처리한 결과 방제가는 63.4% 였다. 벼에대한 약해시험에서는 약해없음 판정을 받았다.

표 3-1-4. 황토가공신소재 시험성적

항목	결과	시험기관	비고
고형분	>95%	자가시험	샘플A (파우더)
규산나트륨 함량	50-70%	자가시험	샘플A (파우더)
평균입도	20 μ m	KTR	샘플A (슬러리)
비소	N.D.	KTR	샘플A (파우더)
납	N.D.	KTR	샘플A (파우더)
카드뮴	N.D.	KTR	샘플A (파우더)
수은	N.D.	KTR	샘플A (파우더)
급성경구독성	>4등급	KCL	샘플A (슬러리)
급성경피독성	>4등급	KCL	샘플A (슬러리)
어류(잉어)급성독성	>4등급	KCL	샘플A (슬러리)
약해시험	약해없음	식물보호연구소	샘플A (슬러리)
약효시험 (벼 도열병)	방제가 63.4%	식물보호연구소	샘플A (슬러리)
CEC (cmol/kg)	80	KTR	샘플A (파우더)
인흡착능	>99%	자가시험	샘플WT (파우더)
암모니아 가스 흡착능	99.7%	KCL	샘플WT (파우더)
원적외선	방사율 : 0.941 방사에너지(W/m2): 3.8x102	KCL	샘플WT (파우더)
토양오염복원	토양내 디젤분해 6.7배 증가	고려대 환경생태공학부	샘플A (슬러리)
사육실험 (성장률/사료효율)	대조구 및 항생제 OTC 대비 유의적으로 증가	부경대 해양바이오신소재학과	샘플B (슬러리) 무지개송어, 뱀장어
사육실험 (효소분석)	대조구 및 항생제 OTC 대비 면역인자(Lysozyme, SOD) 유 의적으로 증가	부경대 해양바이오신소재학과	샘플B (슬러리) 무지개송어, 뱀장어
사육실험 (공격실험)	대조구 및 항생제 OTC 대비 생존율 유의적으로 증가	부경대 해양바이오신소재학과	샘플B (슬러리) 무지개송어(절창증) 뱀장어(에드워드병)
양만장 수처리실험	암모니아성 질소 제거율 >90% 및 pH 완충, 청소용이	동국대, 신계양만	샘플A (슬러리)
장어 품질	비타민 E 3배 증가 항산화활성 증가, 기름양 감소, 탄력성/씹힘성 증가	단국대 식품영양학과	샘플A (슬러리)
무 품질	칼륨함량 10배 증가 조희분, 조지방, 무기질, 비타민, 항산화, 조지방, 조지방, 저장성	단국대 식품영양학과	샘플A (슬러리)

	유의적으로 증가		
배추 품질	칼륨함량증가 견고성, 저장성 증가	단국대 식품영양학과	샘플A (슬러리)

마. 황토가공신소재 제조원가 계산 및 경쟁력 분석

○ 황토가공신소재의 제조원가를 계산한 결과를 아래 표 3-1-5 에 나타내었다. 연간 (1년 300 일 기준) 1000톤(고형분 50% 기준) 생산을 가정했을 때 고형분 1.67톤/day 용량이므로 연속식 용해로와 분쇄를 동시에 수행할 수 있는 시스템 (Zibo Longtai Cave Industry Technology Co., Ltd., 중국 :http://korean.alibaba.com/supplier_zbltty_200224114/video.html)을 구비시 약 4억 정도로 가능할 것으로 사료되고, 불밀 용량은 1회분 5일 가동을 기준으로 1년 (300일 기준)에 1000톤 생산이므로 1년에 가동회수는 총 60회분 (300일/5일 = 60) 이고 1회분당 16.7톤 생산으로 계산된다. 불밀의 working volume을 50%로 가정하면 불밀 용량을 33m³ 정도이고 구입비는 1억정도면 충분할 것으로 사료된다. 불밀의 경우 새로 제작하여 구입하면 철관값 등의 비용이 많이 소요되므로 중고기계의 내부만 수리하여 사용하는 것이 더욱 효율적일 것이다. 기타 원료 가격 과 인건비, 유지비등을 계산하여 기업이윤을 20%로 가정하였을 때 출고가는 약 826원/kg (고형분 50% 슬러리 기준) 정도로 정할 수 있다. 생산용량이 증가할수록 연속식 용해로의 에너지소비 등 전반적으로 모든 항목에서 비용이 감소하므로 출고가는 더욱 낮아질 수 있다.

표 3-1-5. 황토가공신소재 제조원가 계산

생산량 : 1000톤(50% 고형분)/년 기준				
항목	금액 (원)/ 년	금액(원) / kg	비고	
원료	황토	25,680,000	25.6800	428톤 (60,000원/톤),VAT 별도
	가성소다	102,720,000	102.7200	128.4톤 (800원/kg),VAT 별도
Utility	전기	4,320,000	4.3200	240kw/day x 300 day x 60원/kw
	LNG	225,000	0.2300	5kcal/kg x 500,000kg x 90원/1000kcal
	물	213,000	0.2130	600톤 x 355원/톤
인건비	관리자	50,000,000	50.0000	1인x50,000,000
	작업자	40,000,000	40.0000	3인 x 40,000,000
	분석	30,000,000	30.0000	1인 x 30,000,000
	판매	40,000,000	40.0000	1인 x 40,000,000
기타	유지관리	160,000,000	160.0000	10% (시설수리 + 운임 + 기타)
	포장용기	150,000,000	150.0000	페일통 3000원/개 x 50,000개
	공장임대료	30,000,000	30.0000	공장 : 건평 약 100평
감가상각	장비	55,000,000	55.0000	장비비 : 5.5억 / 10년 =0.55억 연속식 용해로 + 분쇄 = 4억 불밀 (30루베): 1억 건조기 : 0.5억
합계		688,158,000		
기업이윤		137,631,600	137.6316	20%
출고가		825,789,600	825.7896	

○ 황토가공신소재와 기존제품들과의 가격 경쟁력을 비교한 결과를 아래 표 3-1-6 에 나타내었다. 황토가공신소재 파우다 출고가를 1800원/kg (슬러리 : 826원/kg)으로 정할 경우, 시중에 판매되는 농업용 실리콘액제의 경우 약 16,000원/kg이고, 사료첨가용으로 사용되는 프로폴리스는 50,000원/kg, 유기산은 10,000원/kg 정도이고, 수산용 항생제인 OTC (Oxytetracycline)는 11,000원/kg 정도 이므로 사용량을 감안하더라도 황토가공신소재가 1/4 ~ 1/7 정도의 상당히 낮은 가격이므로 가격경쟁력은 충분하다고 할 수 있다.

표 3-1-6. 기존제품들과의 가격경쟁력 비교

	판매가	사용량	비고
황토가공신소재 (50% 슬러리)	826원/kg	농업: 200배 희석 사용	년간 1000톤 이상생산 기준
황토가공신소재 (파우다)	1,800원/kg	사료첨가 : 0.4%	
실리콘액제	16,000원/kg	농업 : 1000배 희석	
프로폴리스	50,000원 /kg	사료첨가: 0.1%	
유기산 (80%)	10,000원/kg	사료첨가 : 0.5%	
수산용 OTC (24%)	11,000원/kg	사료첨가 : 0.2%	

바. 황토가공신소재 브랜드

○ 황토가공신소재의 브랜드명을 복룡간으로 정하였고 상표등록을 하였다 [상표등록번호 : 40-0958422(01류), 40-0958423(3류), 40-0958424(19류), 40-0958425(30류), 40-0958426(31류); 등록결정: 2013년 3월 5일]. 복룡간은 조심토, 부월하토, 부하토, 조중황토라고도 한다. 본초강목에 의하면 복룡간은 아궁이 밑에 오랫동안 가열처리된 누런 진흙을 말하며, 10년 이상된 아궁이 바닥을 30cm 깊이로 파면 자주빛이 나는 진흙이 나오는데 그것을 사용하였고 성질이 약간 따듯하고, 맛은 맵고 짜며, 독이 없는 특징이 있어 황토중의 최고의 황토로 칭한다. 복룡간을 현대과학적으로 해석하면 아궁이를 때는데 장작을 사용하였고 장작이 타고남은 재의 성분은 Na, Ca, K, Mg, Mn 등의 미네랄이다. 이러한 미네랄이 황토 성분중의 SiO₂와 오랜기간 반응하여 규산염 계통의 물질을 생성하는 것으로 사료된다. 상기의 천연 복룡간은 현재 구할 수 없는 물질로 제조공정이 황토가공신소재와 유사하여 천연복룡간의 생성원리를 이용하여 황토를 1200℃의 고온에서 반응시킨 황토가공신소재를 “인공 복룡간”으로 명명하였다 [특허등록번호 : 10-0886082(2009.02.20) 다기능성 천연광물 가공소재 및 이의 제조방법, 미국특허등록번호 US

사. 황토가공소재의 생산 및 지속적 공급

황토가공신소재 슬러리를 동국대 운길산 학술림 소재 파일롯트 플랜트에서 월 2 ton 씩 생산하여 참여기업 인 경일양만, 신계양만, 세명양만, 정보화학에 지속적으로 공급하여 현장시험에 사용할 수 있게 하였다. 또한 2,3세부와 1협동에도 연구용으로 사용할 수 있도록 지속적으로 공급하였고, 기타 토마토, 벼, 닭 농장 등에도 공급하여 실 수요자의 현장 타당성도 검토 하였다.

아. 친환경 유기농자재 목록공시 신청 검토

“농림축산식품부 소관 친환경 농어업육성 및 유기식품등의 관리·지원에 관한 법률”에 의거 새로운 물질을 친환경 유기농자재로 사용하기 위해서는 농촌진흥청에 목록공시 신청을 해야한다. 친환경유기농자재 허용물질 등재를 위한 선정기준 및 절차는 아래 그림 3-1-13에 나타내었다.

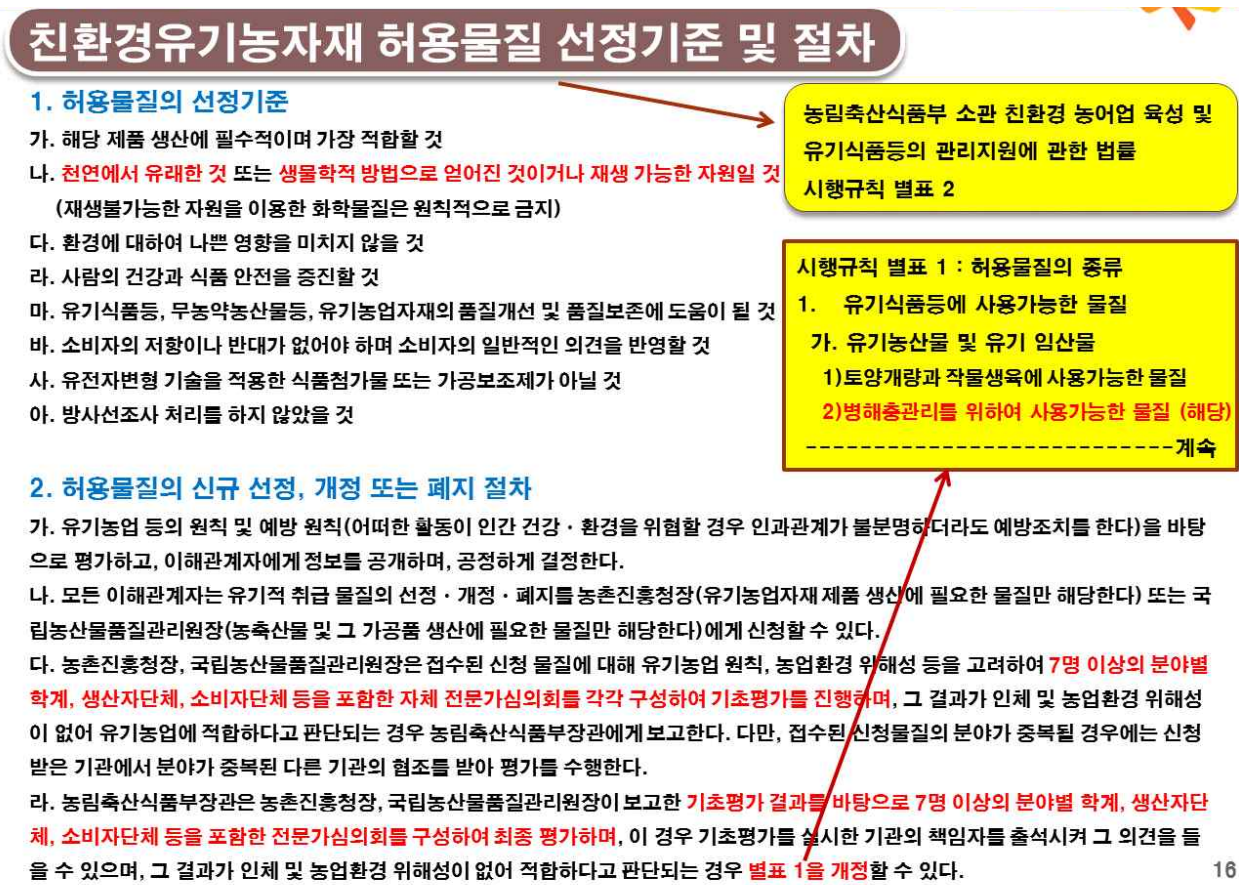


그림 3-1-13. 친환경유기농자재 허용물질 선정기준 및 절차

상기 선정기준 및 절차에서 원료로 가성소다를 사용하므로 가성소다가 사용가능한 물질인지에

대한 법적근거를 찾아보았다. “친환경유기농자재 제품의 공시 및 품질인증 등에 관한 세부실시요령 [제정 2011. 10. 20 농촌진흥청 고시 제2011-28호]일부개정 2012. 3. 5 농촌진흥청 고시 제2012-22호 제4조(농자재공시등 심사)에서 ⑩ 화학합성 보조제는 병해충관리용 자재의 제조과정상 그 사용이 불가피한 경우 미국 환경보호국(EPA)에서 정하는 농약제품에 허용된 불활성 성분목록(Inert Ingredients List) 3 또는 4에 해당하는 보조제는 그 함량이 주원료 투입비율을 초과하지 않는 범위 내에서 사용하는 경우에는 허용할 수 있다.” 라고 명시되어 있고, 가성소다는 EPA 불활성 성분목록 4B에 가성소다(sodium hydroxide)가 포함되어 있다. 그러므로, 황토 가공소재의 경우 상기 선정기준 및 절차에 모두 부합되는 것으로 사료된다. 다만, 화학물질은 원칙적으로 금지라는 항목이 있다. 황토와 NaOH가 1200도의 고온에서 용융시키는 것을 화학 반응으로 볼수 있다. 그러나, 현재 시행규칙 별표 1에 병충해 방제용 제제로 규산나트륨이 등재되어 있다. 규산나트륨 또한 98% 이상의 천연규사와 Na_2CO_3 를 고온에서 용융반응시켜 규산나트륨(Na_2SiO_3)으로 전환시키는 공정이다. 단지, 허용물질로 등재되어 있는 규산나트륨은 순수한 천연규사를 사용하여 규산나트륨외에 다른물질은 거의 존재하지 않는반면, 황토의 경우는 규산나트륨이 70% 정도이고 30% 정도가 나머지 물질이라는 차이가 있다. 그러나, 이 나머지 30% 물질이 오히려 환경에 긍정적인 작용을 한다는 것이 본 연구사업단의 연구결과로 입증되었으므로 친환경 유기농자재 허용물질로 등재가 가능할 것으로 사료된다. 목록공시 신청을 위해서는 제품 설명서, 성분분석, XRD 분석, 급성경구독성, 급성경피독성, 어류독성 및 약해, 약효 시험에 관한 공인기관 시험성적서를 첨부해야 한다. 관련하여 아래와 같이 공인기관에 시험 의뢰 하여 시험성적서를 발급 받은 결과 모두 기준을 통과하는 결과를 보였다.

(1) 성분 분석

물질의 성분은 모두 정량 분석하여 각 물질명에 따른 합계가 중량비 100% (±5%)에 이르는 분석치를 제시해야한다. 시험결과 SiO₂ 가 주성분으로 나타났고 중금속은 검출되지 않았으며, 전체 분석항목의 중량비 합계는 99.46% 로 나타나서 중량비 100% ±5% 범위안에 들었다.



YOUR PARTNER FOR THE BEST QUALITY

TEST REPORT (등본)

우 150-038 서울특별시 영등포구 버드나루로 155 (영등포동8가) TEL (02)2164-0011 FAX (02)2634-1008

성적서번호 : TAE-003055
 대표자 : 이종태
 업체명 : 동국대학교 산학협력단
 주소 : 서울 중구 필동3가 26

접수 일자 : 2010년 10월 13일
 시험완료일자 : 2010년 10월 28일

시료명 : 황토가공소재

시험결과

시험항목	단위	시료구분	결과치	시험방법
SiO ₂	%	-	39.3	KS E 3805 : 1977
Al ₂ O ₃	%	-	15.0	KS E 3805 : 1977(ICP)
Fe ₂ O ₃	%	-	4.42	KS E 3805 : 1977(ICP)
CaO	%	-	0.08	KS E 3805 : 1977(ICP)
MgO	%	-	0.43	KS E 3805 : 1977(ICP)
K ₂ O	%	-	2.30	KS E 3805 : 1977(ICP)
Na ₂ O	%	-	31.79	KS E 3805 : 1977(ICP)
TiO ₂	%	-	0.54	KS E 3805 : 1977(ICP)
P ₂ O ₅	%	-	0.00	KS E 3805 : 1977(ICP)
As	mg/kg	-	검출안됨	EPA 3052 : 1996(준용, ICP)
Ge	mg/kg	-	검출안됨	EPA 3052 : 1996(준용, ICP)
Se	mg/kg	-	검출안됨	EPA 3052 : 1996(준용, ICP)
Pb	mg/kg	-	검출안됨	EPA 3052 : 1996(준용, ICP)
Cd	mg/kg	-	검출안됨	EPA 3052 : 1996(준용, ICP)
Hg	mg/kg	-	검출안됨	EPA 3052 : 1996(준용, ICP)
lg.loss	%	-	5.6	KS E 3805 : 1977

* 용도 : 품질관리용

비고 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다.
 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용 등으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.

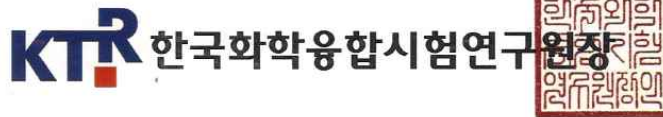
Han Sang-won

실무자 : 한상원
 Tel : 031-999-3113

Lyu Musang

기술책임자 : 유무상
 E-mail : ymsang@ktr.or.kr

2010년 10월 28일



Page : 1 of 1

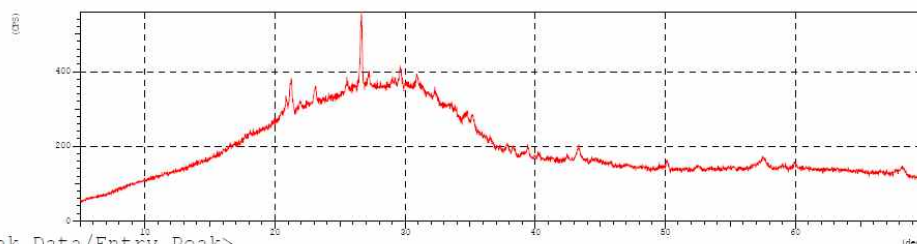
등본발급일자: 2014년 04월 04일

***** SEARCH / MATCH RESULT *****

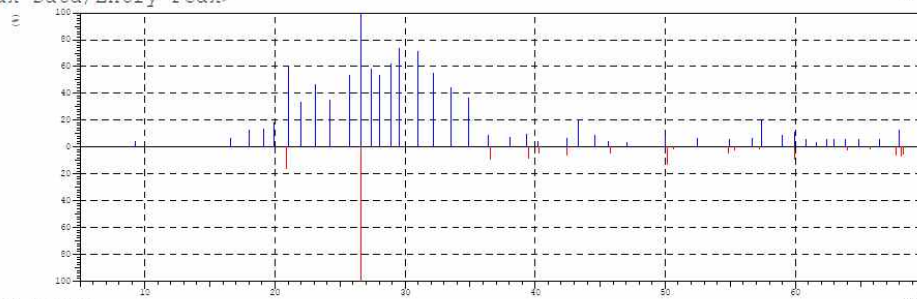
<Unknown Data>

Group Name : Bong
 Data Name : TAK4301
 File Name : TAK4301.PKR
 Sample Name :
 Comment :
 Date & Time : 05-06-14 08:17:59

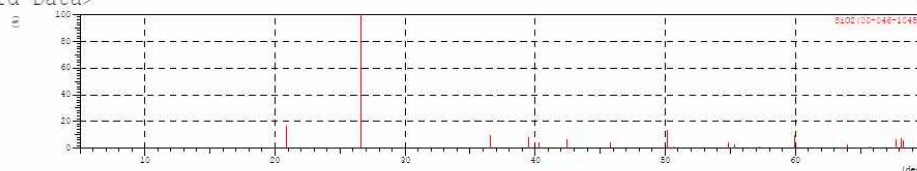
<Raw Data>



<Peak Data/Entry Peak>



<Card Data>



***** SEARCH / MATCH RESULT *****

Group Name : Bong
 Data Name : TAK4301
 File Name : TAK4301.PKR
 Sample Name :
 Comment :

<Entry Card>

No.	Card	Chemical Formula	S	L	d	I	R
		Chemical Name (Mineral Name)	Dx		WT%	S.G.	
1	00-046-1045	SiO2	0.967	0.722	(13/58)	0.767	0.673 0.745
		Silicon Oxide (Quartz, syn)	2.65			P3221	

***** SEARCH / MATCH RESULT *****

Group Name : Bong
 Data Name : TAK4301
 File Name : TAK4301.PKR
 Sample Name :
 Comment :

<Card List>

No.	Card	Chemical Formula Chemical Name (Mineral Name)	S	L	d	I	R
				Dx	WT%	S.G.	
1	00-010-0033	Na6Al4Si4O17 Sodium Aluminum Silicate	0.482	1.000(7/12)	0.813	0.670 1.000
				2.69	-----		F-43m
2	00-033-0306	Ca1.5SiO3.5·xH2O Calcium Silicate Hydrate	0.618	1.000(3/ 3)	0.711	0.648 0.921
				-----	-----		-----
3	00-010-0031	Na4Al2Si2O9 Sodium Aluminum Silicate	0.502	1.000(7/12)	0.813	0.563 0.915
				2.96	-----		F-43m
4	00-043-0264	K2Fe2Si0.29O4.58 Potassium Iron Silicate	0.489	1.000(7/ 7)	0.623	0.723 0.901
				3.63	-----		F
5	00-041-0540	LiGaSi0.88O2 Lithium Gallium Silicate	0.392	1.000(6/ 6)	0.673	0.620 0.835
				-----	-----		F
6	00-040-0169	Na0.25Ca0.75Mg0.75Al0.25Si2O6 Sodium Calcium Magnesium Aluminum Silicate	0.088	0.750(3/ 5)	0.585	0.916 0.804
				-----	-----		-----
7	00-049-1051	CsAlSi3O8 Cesium Aluminum Silicate	0.747	0.875(7/ 8)	0.755	0.600 0.792
				3.28	-----		C
8	00-048-0515	Cs2Li2SiO4 Cesium Lithium Silicate	0.873	0.714(5/ 7)	0.624	0.863 0.770
				4.30	-----		P-1
9	00-042-1125	NbO Niobium Oxide	0.085	1.000(3/ 7)	0.878	0.858 0.753
				7.12	-----		Fm-3m
10	00-046-1045	SiO2 Silicon Oxide (Quartz, syn)	0.967	0.722(13/58)		0.767	0.673 0.745
				2.65	-----		P3221
11	00-047-1526	Fe4Sc2S7 Iron Scandium Sulfide	0.306	1.000(3/ 6)	0.924	0.789 0.729
				4.49	-----		Fd-3m
12	00-051-0521	Na3Zr1.667P2.333Si0.667O12 Sodium Zirconium Phosphate Silicate	0.654	0.700(7/10)	0.716	0.719 0.720
				3.21	-----		R-3c
13	00-046-0012	NaAlSi2O6 Sodium Aluminum Silicate	0.595	0.909(20/22)		0.637	0.607 0.703
				-----	-----		-----
14	00-039-0267	K2CdSiO4 Potassium Cadmium Silicate	0.539	0.909(10/13)		0.572	0.662 0.689
				-----	-----		F
15	00-024-0949	RbFeSi3O8 Rubidium Iron Silicate	0.576	0.750(15/20)		0.605	0.757 0.686
				3.09	-----		C2/m
16	00-039-0100	Na8Ga10Si2023·10H2O Sodium Gallium Silicate Hydrate	0.498	0.818(18/29)		0.666	0.628 0.684
				-----	-----		-----
17	00-019-0524	AuPr Gold Praseodymium	0.306	1.000(3/ 7)	0.850	0.802 0.682
				11.40	-----		Pm-3m
18	00-049-0715	Bi0.96Pb0.24SrCaCu1.6O5+x Calcium Copper Lead Strontium Bismuth Oxid	0.100	1.000(3/ 4)	0.858	0.789 0.677
				-----	-----		-----
19	00-028-0470	InPd3C Indium Palladium Carbide	0.109	1.000(3/ 9)	0.907	0.729 0.661
				11.79	-----		Pm-3m
20	00-043-0596	SiO2 Silicon Oxide	0.581	1.000(6/ 6)	0.612	0.537 0.657
				2.68	-----		P3221

***** SEARCH / MATCH RESULT *****

Group Name : Bong
 Data Name : TAK4301
 File Name : TAK4301.PKR
 Sample Name :
 Comment :

<Card List>

No.	Card	Chemical Formula Chemical Name (Mineral Name)	S	L	d	I	R
				Dx	WT%	S.G.	
21	00-054-0411	RbH Rubidium Hydride	0.576	1.000 (4/ 4)	2.62	0.865	0.744 0.644 Fm-3m
22	00-034-0612	CaSiO3 Calcium Silicate	0.105	1.000 (5/ 6)	4.56	0.513	0.627 0.643 -----
23	00-040-0363	Li2NiZrO4 Lithium Nickel Zirconium Oxide	0.094	1.000 (3/ 4)	4.90	0.951	0.667 0.635 -----
24	00-011-0579	KAlSiO4 Potassium Aluminum Silicate (Kalsilite, s	0.705	0.636 (14/29)	2.62	0.618	0.790 0.622 P63
25	00-033-0215	Bi4(SiO4)3 Bismuth Silicate (Eulytite, syn)	0.555	0.762 (16/27)	6.78	0.672	0.605 0.620 I-43d
26	00-043-0601	CsI Cesium Iodide	0.214	1.000 (3/ 3)	-----	0.757	0.810 0.613 -----
27	00-036-0831	Si3Al12O9N10 Aluminum Silicon Oxide Nitride	0.410	0.875 (14/17)	-----	0.635	0.539 0.599 -----
28	00-009-0189	LiH Lithium Hydride	0.103	1.000 (3/10)	0.78	0.747	0.797 0.596 Fm-3m
29	00-024-1232	SrSiO3 Strontium Silicate	0.479	0.846 (11/13)	3.88	0.652	0.538 0.594 -----
30	00-022-0019	Al2Si3F18·3H2O Aluminum Silicon Fluoride Hydrate	0.577	0.857 (6/ 7)	1.79	0.497	0.691 0.589 -----
31	00-043-1004	CoO Cobalt Oxide	0.078	1.000 (3/10)	6.44	0.813	0.721 0.587 Fm-3m
32	00-026-0591	Dy2O3 Dysprosium Oxide	0.587	1.000 (4/ 4)	8.05	0.818	0.718 0.587 I
33	00-022-0170	CsAlSiO4·1.2H2O Cesium Aluminum Silicate Hydrate	0.557	0.667 (8/12)	-----	0.621	0.709 0.587 -----
34	00-025-1385	Na0.2(Mg,Li)3Si4O10(OH)2·4H2O Lithium Sodium Magnesium Silicate Hydroxid	0.182	1.000 (5/12)	-----	0.503	0.582 0.586 P
35	00-051-0520	Na3Zr1.75P2SiO12 Sodium Zirconium Phosphate Silicate	0.589	0.900 (9/10)	3.19	0.528	0.616 0.585 R-3c
36	00-039-0101	(Na2O)0.33NaAlSiO4 Sodium Aluminum Silicate	0.523	1.000 (8/10)	-----	0.553	0.528 0.585 F-43m
37	00-017-0548	FeSiO3 Iron Silicate (Clinoferrosilite, syn)	0.727	0.667 (8/12)	4.07	0.651	0.672 0.583 P21/a
38	00-012-0198	(K,Na)AlSiO4 Potassium Sodium Aluminum Silicate (Nephe	0.613	0.652 (15/23)	-----	0.705	0.622 0.572 P63
39	00-040-0102	Na6(AlSiO4)6·8H2O Sodium Aluminum Silicate Hydrate	0.521	0.895 (17/20)	2.38	0.543	0.585 0.569 P-43n
40	00-046-0225	Nd3Al3Si3O12N2 Aluminum Neodymium Silicon Oxide Nitride	0.611	0.700 (7/10)	-----	0.604	0.672 0.568 -----

***** SEARCH / MATCH RESULT *****


Group Name : Bong
 Data Name : TAK4301
 File Name : TAK4301.PKR
 Sample Name :
 Comment :

<Card List>

No.	Card	Chemical Formula Chemical Name (Mineral Name)	S	L	d	I	R
				Dx	WT%	S.G.	
41	00-011-0221	NaAlSiO4 Sodium Aluminum Silicate	0.579	0.800(8/13)	0.505	0.701	0.567
				2.40	-----		F
42	00-017-0504	Ba-Ti-Si-O Barium Titanium Silicate (Unnamed mineral	0.494	0.789(15/21)	0.566	0.634	0.566
				-----	-----	-----	
43	00-036-0437	Ca2FeAl2(SiO4)(Si2O7)(OH)2·H2O Calcium Iron Aluminum Silicate Hydroxide H	0.660	1.000(14/14)	0.555	0.506	0.562
				-----	-----	-----	
44	00-048-1719	CoO Cobalt Oxide	0.078	1.000(3/ 8)	0.796	0.704	0.560
				6.43	-----		Fm-3m
45	00-009-0456	(Na,Ca)(Si,Al)4O8 Sodium Calcium Aluminum Silicate (Albite,	0.793	0.632(12/19)	0.697	0.636	0.560
				-----	-----		C-1
46	00-020-0386	Na3Mg4AlSi8O22(OH)2 Sodium Magnesium Aluminum Silicate Hydroxi	0.825	0.650(13/20)	0.715	0.602	0.560
				2.97	-----		C2/m
47	00-035-0037	Tl8Si5O14 Thallium Silicate	0.700	0.667(16/24)	0.654	0.641	0.559
				6.95	-----		C2/c
48	00-027-0085	Ca3Mn2Si3O12 Calcium Manganese Silicate	0.470	0.692(9/13)	0.775	0.516	0.554
				3.84	-----		I
49	00-046-1440	(K,Na)(Mg,Fe,Ti)3(Si,Al)4O10(OH,O)2 Potassium Sodium Iron Magnesium Aluminum T	0.701	0.591(13/22)	0.711	0.657	0.552
				2.99	-----		C
50	00-040-0981	USb Antimony Uranium	0.288	1.000(3/ 5)	0.810	0.678	0.549
				12.55	-----		Fm-3m
51	00-048-0730	Na1.88Al2Si2.77O9.48 Sodium Aluminum Silicate	0.922	0.545(12/22)	0.648	0.770	0.544
				-----	-----	-----	
52	00-041-0454	Ba5Cu7Y2Ox Barium Copper Yttrium Oxide	0.717	0.889(8/ 9)	0.832	0.734	0.543
				-----	-----	-----	
53	00-047-0162	Na12Al12Si12O48·27H2O Sodium Aluminum Silicate Hydrate	0.607	0.636(7/11)	0.651	0.655	0.543
				-----	-----	-----	
54	00-029-0783	Pb3SiO5 Lead Silicate	0.678	0.667(4/ 6)	0.601	0.674	0.540
				8.06	-----		F
55	00-009-0427	Fe3+2Al2(SiO4)3 Iron Aluminum Silicate (Almandine)	0.491	0.923(12/28)	0.579	0.501	0.535
				4.31	-----		Ia-3d
56	00-021-0399	KNa4Ba2Ln(Fe,Ti)Nb2Si8O28·5H2O Potassium Sodium Barium Rareearth Iron Nio	0.661	0.857(12/14)	0.635	0.491	0.534
				-----	-----		P63/mcm
57	00-029-0788	Pb(UO2)SiO4·H2O Lead Uranyl Silicate Hydrate (Kasolite)	0.833	0.750(15/20)	0.528	0.664	0.526
				6.42	-----		P21/a
58	00-025-0649	(K,Ca,Na)(Al,Mg,Fe)2(Si,Al)4O10(OH) Potassium Aluminum Silicate Hydroxide (Mu	0.575	0.882(15/17)	0.523	0.567	0.524
				-----	-----		C2/c
59	00-037-0203	Pb2SiO4 Lead Silicate	0.687	0.786(11/14)	0.720	0.460	0.520
				-----	-----	-----	
60	00-032-0201	CeSiO2N Cerium Silicon Oxide Nitride	0.513	0.923(12/14)	0.557	0.504	0.518
				-----	-----	-----	

(3) 입도분석

입도는 마이크로사이즈로 분쇄해도 수율이 90% 이상 나오므로 굳이 가격이 비싼 나노분쇄기를 이용할 필요가 없어서 볼밀을 사용하여 마이크로 사이즈로 분쇄 하였다. 평균 입도는 19.5 μ m로 나왔다.



YOUR PARTNER FOR THE BEST QUALITY

TEST REPORT

우 150-038 서울특별시 영등포구 영등포동8가 88-2 TEL (02)2164-0011 FAX (02)2634-1008

성적서번호 : TAE-001185 접수 일자 : 2013년 04월 29일
 대 표 자 : 공영대 시험완료일자 : 2013년 05월 08일
 업 체 명 : 동국대학교 산학협력단
 주 소 : 서울 중구 필동3가 26

시 료 명 : 황토가공소재 습식분쇄물

시험 결과

시험항목	단위	시료구분	결과치	시험방법
입도분석	-	-	Chart 참조	KS A ISO 13320-1 : 2004

* 입도분석장비 : HORIBA, LA-950V2


용 도 : 품질관리용

비 고 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다.
 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용 등으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.


Cho Youngbin
 작성자 : 조영빈
 Tel : 031-999-3159


Kim Jaehong
 기술책임자 : 김재홍
 E-mail : kjhong@ktr.or.kr

2013년 05월 08일




한국화학융합시험연구원






Page: 1 of 1



KTR-KP-T09-F01(01)

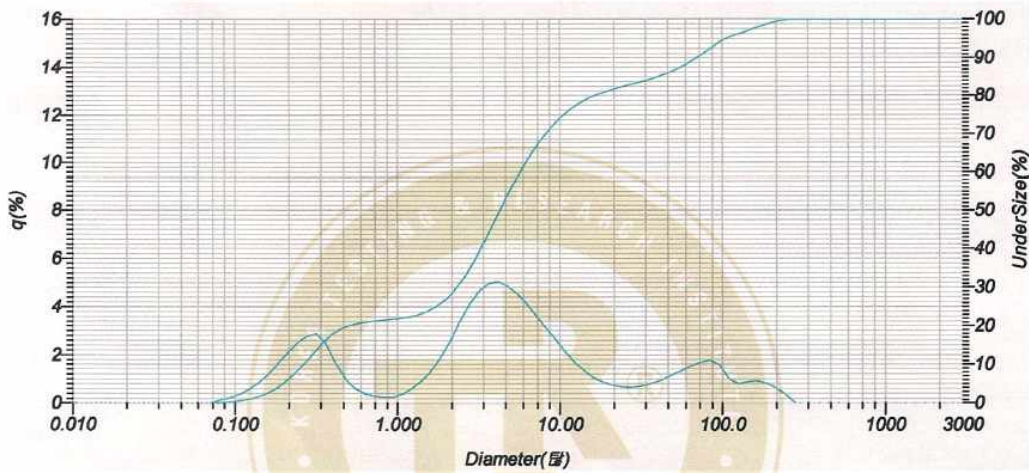


A4(210 X 297)

KTR

Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

Sample Name	: TAE-1185	Median Size	: 4.27538(μ m)
ID#	: 201305071607601	Mean Size	: 19.51868(μ m)
Data Name	: 201305071607601	Mode Size	: 4.1714(μ m)
Transmittance(R)	: 88.5(%)	Std.Dev.	: 39.7247(μ m)
Transmittance(B)	: 78.2(%)	Diameter on Cumulative %	: (2)10.00 (%) - 0.2659(μ m)
Circulation Speed	: 7		: (6)50.00 (%) - 4.2754(μ m)
Agitation Speed	: 7		: (9)90.00 (%) - 69.2612(μ m)
Distribution Base	: Volume		
Refractive Index (R)	: Sand[Sand(1.510 - 0.000i),Water(1.333)]		
Refractive Index (B)	: Sand[Sand(1.510 - 0.000i),Water(1.333)]		
Ultra Sonic	: 00:50 (7)		



No.	Diameter(μm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(μm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(μm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Diameter(μm)	q(%)	UnderSize(%)
1	0.011	0.000	0.000	25	0.296	2.758	12.194	49	7.697	3.596	68.711	73	200.000	0.803	99.072
2	0.013	0.000	0.000	26	0.339	2.863	15.057	50	8.816	3.099	71.810	74	229.075	0.590	99.662
3	0.015	0.000	0.000	27	0.389	2.435	17.492	51	10.097	2.603	74.413	75	262.376	0.338	100.000
4	0.017	0.000	0.000	28	0.445	1.636	19.128	52	11.665	2.093	76.606	76	300.518	0.000	100.000
5	0.020	0.000	0.000	29	0.510	0.991	20.120	53	13.246	1.652	78.158	77	344.206	0.000	100.000
6	0.022	0.000	0.000	30	0.594	0.589	20.707	54	15.172	1.298	79.456	78	394.244	0.000	100.000
7	0.026	0.000	0.000	31	0.669	0.369	21.077	55	17.377	1.028	80.485	79	451.556	0.000	100.000
8	0.029	0.000	0.000	32	0.766	0.264	21.340	56	19.904	0.836	81.321	80	517.200	0.000	100.000
9	0.034	0.000	0.000	33	0.877	0.224	21.564	57	22.797	0.713	82.034	81	592.387	0.000	100.000
10	0.039	0.000	0.000	34	1.005	0.243	21.807	58	26.111	0.652	82.686	82	678.504	0.000	100.000
11	0.044	0.000	0.000	35	1.151	0.360	22.167	59	29.907	0.646	83.332	83	777.141	0.000	100.000
12	0.051	0.000	0.000	36	1.318	0.589	22.755	60	34.255	0.691	84.023	84	890.116	0.000	100.000
13	0.059	0.000	0.000	37	1.510	0.918	23.673	61	39.234	0.791	84.815	85	1019.515	0.000	100.000
14	0.067	0.000	0.000	38	1.729	1.334	25.008	62	44.938	0.941	85.755	86	1187.725	0.000	100.000
15	0.076	0.000	0.000	39	1.981	1.891	26.898	63	51.471	1.120	86.875	87	1337.481	0.000	100.000
16	0.087	0.116	0.116	40	2.269	2.596	29.495	64	58.953	1.314	88.190	88	1531.914	0.000	100.000
17	0.100	0.221	0.337	41	2.599	3.379	32.873	65	67.623	1.500	89.689	89	1754.613	0.000	100.000
18	0.115	0.363	0.700	42	2.976	4.113	36.986	66	77.339	1.660	91.349	90	2009.687	0.000	100.000
19	0.131	0.556	1.257	43	3.409	4.673	41.659	67	88.683	1.758	93.108	91	2301.841	0.000	100.000
20	0.150	0.830	2.087	44	3.905	4.981	46.640	68	101.460	1.583	94.691	92	2636.467	0.000	100.000
21	0.172	1.191	3.278	45	4.472	5.026	51.666	69	116.210	1.026	95.717	93	3000.000	0.000	100.000
22	0.197	1.620	4.899	46	5.122	4.851	56.516	70	133.103	0.788	96.505				
23	0.226	2.069	6.967	47	5.867	4.517	61.033	71	152.453	0.869	97.375				
24	0.259	2.468	9.436	48	6.720	4.082	65.115	72	174.616	0.895	98.269				

(4) 급성경구독성시험

급성 경구독성은 한국건설생활환경시험연구원에 의뢰하여 시험하였고 시험결과 반수치사량(LD₅₀)이 2000mg/kg 이상으로 나와 친환경유기농자재(병충해방제제) 등록기준에 부합하였다.



시험성적서

- 1. 성적서번호 : CT13-121900
- 2. 의뢰자
 - 업체명 : 동국대학교 산학협력단
 - 주소 : 서울 중구 필동 3가 26
 - 의뢰일자 : 2013.12.19
 - 시험발급일 : 2014.02.19
- 3. 시험성적서의 용도 : 거래처제출
- 4. 시료명 : 황토가공소재 슬러리
- 5. 시험방법
 - (1) 농촌진흥청 (농약 및 원제의 등록기준)

6. 시험결과

1) 황토가공소재 슬러리

시험항목	시험방법	시험결과	비고
일반독성 급성경구독성시험 설치류	(1)	LD ₅₀ (반수치사량) = 2,000 mg/kg 이상	첨부 성적서 참조

— 이 하 여 백 —

확인	작성자 성명	안규섭		기술책임자 성명	이진규	
비고 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.						

한국건설생활환경시험연구원장



바이오융합연구소 : 406-841 인천 연수구 갯벌로 145 번길 8. 032-858-0011

□ Sprague-Dawley 랫드를 이용한 황토가공소재 슬러리의 급성경구독성시험

1. 요약

시험물질 황토가공소재 슬러리의 독성증상과 반수치사량 (LD₅₀)을 조사하기 위하여, Sprague-Dawley (SD) 계통 암컷 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 경구투여 하였다. 각 단계별 3 마리의 시험동물을 이용하여 2,000 mg/kg 용량으로 2 회(1 및 2 단계) 시험을 실시하였으며, 실험기간 동안 사망동물의 발생유무, 일반증상, 체중변화 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다.

- 1) 실험기간 동안 모든 시험군에서 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.
- 2) 체중측정결과, 모든 시험동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.
- 3) 실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.

따라서, 본 시험조건에서 황토가공소재 슬러리의 반수치사량 (LD₅₀)은 2,000 mg/kg 이상인 것으로 판단된다.

2. 시험방법 및 시험항목

- 1) 시험물질: 황토가공소재 슬러리
- 2) 시험계: 특정병원체 부재 (Specific Pathogen Free, SPF) Sprague-Dawley (SD) rats, 8 주령 (투여시)
- 3) 시험물질 조제: 투여당일 2 ml의 시험물질을 칭량한 후 멸균증류수에 넣고 총 부피 10 ml이 되도록 만든 후 균일하게 분산시켜 2,000 mg/kg 용량군을 조제하였다. 대조군은 멸균증류수를 준비하였다.
- 4) 시험기준: 농촌진흥청 고시 제 2013-21 호 농약 및 원제의 등록기준
- 5) 투여경로 및 투여방법: 투여 전 하루밤 동안 절식시켜 위 내용물을 비운 후 투여 당일 측정된 체중을 기준으로 10 ml/kg의 투여액량을 계산하였고, 경구투여용 삼입관을 이용하여 강제 경구투여 하였다.
- 6) 시험군의 구성

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여용량 (mg/kg)
G1	Female	3	G1-1 ~ G1-3	10	2,000
G2	Female	3	G2-4 ~ G2-6	10	2,000

- 7) 일반증상 관찰: 투여당일은 투여 후 6 시간까지 매 시간 관찰하였으며, 투여 후 1 일째부터는 매일 1 회, 14일 동안 일반증상을 관찰하였다.
- 8) 체중측정: 모든 생존동물에 대하여 투여 전, 투여 후 1, 7 및 14 일에 체중을 측정하였다.
- 9) 부검: 투여 후 14 일째에 모든 생존동물을 CO₂ 가스를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 복대동맥과 후대정맥을 절단하는 방법으로 방혈처사 시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

3. 시험결과

- 1) 사망률: 실험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 2) 일반증상: 실험기간 동안 모든 시험군에서 특이한 일반증상이 관찰되지 않았다.
- 3) 체중변화: 모든 시험동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.
- 4) 부검소견: 실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.

4. 고찰 및 결론

시험물질 황토가공소재 슬러리의 독성증상과 반수치사량 (LD₅₀)을 조사하기 위하여, Sprague-Dawley (SD) 계 통 암컷 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 경구투여 하였다. 각 단계별 3 마리의 시험동물을 이용하여 2,000 mg/kg 용량으로 2 회(1 및 2 단계) 시험을 실시하였으며, 실험기간 동안 사망동물의 발생유무, 일반 증상, 체중변화 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다.

1 및 2 단계 시험군(2,000 mg/kg)에서 실험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상이 관찰되지 않았다.

체중측정결과, 모든 시험동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.

실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 본 시험조건에서 황토가공소재 슬러리의 반수치사량 (LD₅₀)은 2,000 mg/kg 이상인 것으로 판단된다.

5. Tables

1) Table 1. Mortalities and clinical signs of female rats

INDIVIDUAL DATA OF MORTALITIES AND CLINICAL SIGNS				
STUDY : CT13-121900			SEX : FEMALE	
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	DATE DOSED	OBSERVATIONS	TIME OCCURRED
G1 (2,000)	G1-1	21-Jan-2014	No abnormalities detected	Day 0 - 14
	G1-2	21-Jan-2014	No abnormalities detected	Day 0 - 14
	G1-3	21-Jan-2014	No abnormalities detected	Day 0 - 14
G2 (2,000)	G2-4	28-Jan-2014	No abnormalities detected	Day 0 - 14
	G2-5	28-Jan-2014	No abnormalities detected	Day 0 - 14
	G2-6	28-Jan-2014	No abnormalities detected	Day 0 - 14

2) Table 2. Body weight changes of female rats

INDIVIDUAL DATA OF BODY WEIGHT CHANGES						
STUDY : CT13-121900				SEX : FEMALE		
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Gain
G1 (2,000)	G1-1	188.87	203.29	234.53	246.41	57.54
	G1-2	192.81	212.59	233.35	234.89	42.08
	G1-3	196.26	227.48	243.42	250.67	54.41
	Mean	192.65	214.45	237.10	243.99	51.34
	S.D	3.70	12.20	5.50	8.16	8.17
G2 (2,000)	G2-4	200.33	218.82	234.33	257.54	57.21
	G2-5	198.52	214.48	230.42	244.09	45.57
	G2-6	205.08	218.15	233.69	240.91	35.83
	Mean	201.31	217.15	232.81	247.51	46.20
	S.D	3.39	2.34	2.10	8.83	10.70

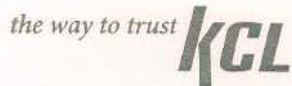
Gain : Body weight gains between day 0 and day 14

3) Table 3. Gross findings of female rats

INDIVIDUAL DATA OF GROSS FINDINGS				
STUDY : CT13-121900			SEX : FEMALE	
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	FATE (DATE)	ORGAN	OBSERVATIONS
G1 (2,000)	G1-1	Terminal sacrifice (04-Feb-2014)		No organ with gross findings
	G1-2	Terminal sacrifice (04-Feb-2014)		No organ with gross findings
	G1-3	Terminal sacrifice (04-Feb-2014)		No organ with gross findings
G2 (2,000)	G2-4	Terminal sacrifice (11-Feb-2014)		No organ with gross findings
	G2-5	Terminal sacrifice (11-Feb-2014)		No organ with gross findings
	G2-6	Terminal sacrifice (11-Feb-2014)		No organ with gross findings

(5) 급성경피독성시험

급성 경피독성도 한국건설생활환경시험연구원에 의뢰하여 시험하였고 시험결과 반수치사량(LD₅₀)이 4000mg/kg 이상으로 나와 친환경유기농자재(병충해방제제) 등록기준을 통과하였다.



시험성적서

- 1. 성적서 번호 : CT13-126155
- 2. 의뢰자
 - 업체명 : 동국대학교 산학협력단
 - 주소 : 서울 중구 필동 3가 26
 - 의뢰일자 : 2013. 12. 19
 - 시험발급일 : 2014. 02. 19
- 3. 시험성적서의 용도 : 거래처제출
- 4. 시료명 : 황토가공소재 슬러리
- 5. 시험방법
 - (1) 농촌진흥청 (농약 및 원제의 등록기준)

6. 시험결과

1) 황토가공소재 슬러리

시험항목	시험방법	시험결과	비고
일반독성 급성경피독성시험 설치류	(1)	LD ₅₀ (반수치사량) = 4,000 mg/kg 이상	첨부 성적서 참조

— 이 하 여 백 —

확인	작성자 성명	안규섭		기술책임자 성명	이진규	
비고 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.						

한국건설생활환경시험연구원장



바이오융합연구소 : 406-841 인천 연수구 갯벌로 145 번길 8. 032-858-0011

□ Sprague-Dawley 랫드를 이용한 황토가공소재 슬러리의 급성경피독성시험

1. 요약

시험물질 황토가공소재 슬러리의 독성증상과 반수치사량 (LD₅₀)을 조사하기 위하여, Sprague-Dawley (SD) 계 통 암·수 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 경피투여 하였다. 4,000 mg/kg의 기초시험군으로 시험을 실시 하였으며, 실험기간 동안 사망동물의 발생유무, 일반증상, 체중변화 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다.

- 1) 실험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았으나 모든 시험동물에서 시험물질 투여후 1 일째에 투여부위에 발적(erythema)이 나타났고 그 이후 14 일까지 가피형성(crust formation)이 관찰되었다.
 - 2) 체중측정결과, 시험물질에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.
 - 3) 실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 모든 시험동물의 등배부 투여부위 피부에서 가피 및 육아조직 (crust and granulation, skin of dorsal back)이 관찰되었다.
- 따라서, 본 시험조건에서 황토가공소재 슬러리의 반수치사량 (LD₅₀)은 4,000 mg/kg 이상인 것으로 판단된다.

2. 시험방법 및 시험항목

- 1) 시험물질: 황토가공소재 슬러리
- 2) 시험계: 특정병원체 무재 (Specific Pathogen Free, SPF) Sprague-Dawley (SD) rats, 8 주령 (투여시)
- 3) 시험물질 조제: 시험물질 원액을 직접 적용하였다.
- 4) 시험기준: 농촌진흥청 고시 제 2013-21 호 농약 및 원제의 등록기준
- 5) 투여경로 및 투여방법: 투여 전 구간배부를 중심으로 체표면적의 약 20 %를 제모하였다. 투여당일 침포 용 거즈에 시험물질을 균일하게 도포하고 피부에 밀착시킨 후 비자극성 비닐로 덮은 다음 비자극성 테이프와 탄력붕대로 고정시켰다. 약 24 시간이 지난 후 투여부위에서 제거하고 미온수로 시험물질을 닦아주었다.

6) 시험군의 구성

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (mL/kg)	투여용량 (mg/kg)
G1	Male	5	G1-1 ~ G1-5	4	4,000
	Female	5	G1-6 ~ G1-10		

- 7) 일반증상 관찰: 투여당일은 투여 후 6 시간까지 매 시간 관찰하였으며, 투여 후 1 일째부터는 매일 1 회, 14일 동안 일반증상을 관찰하였다.
- 8) 체중측정: 모든 생존동물에 대하여 투여 전, 투여 후 7 및 14 일에 체중을 측정하였다.
- 9) 부검: 투여 후 14 일째에 모든 생존동물을 CO₂ 가스를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 복대동맥과 후대정맥을 절단하는 방법으로 방혈치사 시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

3. 시험결과

- 1) 사망률: 실험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 2) 일반증상: 암컷 4,000 mg/kg 시험군의 4 레에서 시험물질 투여후 30 분째에 신음(Groaning)이 관찰되었다. 암·수 모든 시험동물에서 시험물질 투여후 1 일째에 투여부위의 발적(erythema)이 관찰되었으며 그 이후 14 일째까지 가피형성(crust formation)이 관찰되었다.
- 3) 체중변화: 암컷 4,000 mg/kg 시험군의 1 레에서 시험물질 투여후 7 일째 체중이 투여전에 비하여 감소하였다. 그 외 시험동물에서는 정상적인 체중증가가 관찰되었다.
- 4) 부검소견: 실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 모든 시험동물의 등배부 투여부위 피부에서 가피 및 육아조직(crust and granulation, skin of dorsal back)이 관찰되었다.

4. 고찰 및 결론

시험물질 황토가공소재 슬러리의 독성증상과 반수치사량 (LD_{50})을 조사하기 위하여, Sprague-Dawley (SD) 계통 암·수 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 경피투여 하였다. 4,000 mg/kg의 기초시험군으로 시험을 실시하였으며, 실험기간 동안 사망동물의 발생유무, 일반증상, 체중변화 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다.

실험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았으나 시험물질 투여적후 암컷 4 레에서 신음이 관찰되었다. 투여후 1 일째에는 모든 시험동물에서 투여부위에 발적이 나타났고 그 이후 14 일까지 가피형성이 관찰되었다.

체중측정결과, 암컷 1 레에서 일시적인 체중감소가 관찰되었으나 그 정도가 매우 경미하고 다른 시험동물의 체중변화를 고려하여 볼 때 시험물질에 의한 변화는 아닌 것으로 사료된다.

실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 모든 시험동물의 등배부 투여부위 피부에서 가피 및 육아조직이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 본 시험조건에서 황토가공소재 슬러리의 반수치사량 (LD_{50})은 4,000 mg/kg 이상인 것으로 판단된다.

5. Tables

1) Table 1. Mortalities and clinical signs of rats

INDIVIDUAL DATA OF MORTALITIES AND CLINICAL SIGNS				
STUDY : CT13-126155			SEX : MALE	
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	DATE DOSED	OBSERVATIONS	TIME OCCURRED
G1 (4,000)	G1-1	22-Jan-2014	No abnormalities detected	Day 0
			Erythema	Day 1
			Crust formation	Day 2 - 14
	G1-2	22-Jan-2014	No abnormalities detected	Day 0
			Erythema	Day 1
			Crust formation	Day 2 - 14
	G1-3	22-Jan-2014	No abnormalities detected	Day 0
			Erythema	Day 1
			Crust formation	Day 2 - 14
	G1-4	22-Jan-2014	No abnormalities detected	Day 0
			Erythema	Day 1
			Crust formation	Day 2 - 14
	G1-5	22-Jan-2014	No abnormalities detected	Day 0
			Erythema	Day 1
			Crust formation	Day 2 - 14

1) Table 1. Mortalities and clinical signs of rats (Continued)

INDIVIDUAL DATA OF MORTALITIES AND CLINICAL SIGNS				
STUDY : CT13-126155			SEX : FEMALE	
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	DATE DOSED	OBSERVATIONS	TIME OCCURRED
G1 (4,000)	G1-6	22-Jan-2014	No abnormalities detected	Hour 1 - 6
			Groaning	Hour 0.5
			Erythema	Day 1
			Crust formation	Day 2 - 14
	G1-7	22-Jan-2014	No abnormalities detected	Hour 1 - 6
			Groaning	Hour 0.5
			Erythema	Day 1
	G1-8	22-Jan-2014	Crust formation	Day 2 - 14
			No abnormalities detected	Hour 1 - 6
			Groaning	Hour 0.5
G1-9	22-Jan-2014	Erythema	Day 1	
		Crust formation	Day 2 - 14	
		No abnormalities detected	Day 0	
G1-10	22-Jan-2014	Erythema	Day 1	
		Crust formation	Day 2 - 14	
		No abnormalities detected	Hour 1 - 6	

2) Table 2. Body weight changes of rats

INDIVIDUAL DATA OF BODY WEIGHT CHANGES					
STUDY : CT13-126155					SEX : MALE
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 7	Day 14	Gain
G1 (4,000)	G1-1	251.31	288.53	330.37	79.06
	G1-2	253.08	286.04	329.35	76.27
	G1-3	255.01	292.56	334.82	79.81
	G1-4	260.19	292.62	340.50	80.31
	G1-5	261.52	301.99	350.32	88.80
	Mean	256.22	292.35	337.07	80.85
	S.D	4.45	6.07	8.62	4.71
					SEX : FEMALE
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 7	Day 14	Gain
G1 (4,000)	G1-6	220.37	239.19	249.73	29.36
	G1-7	221.14	235.95	247.87	26.73
	G1-8	227.22	260.45	270.37	43.15
	G1-9	228.96	244.26	253.56	24.60
	G1-10	236.99	235.49	253.59	16.60
	Mean	226.94	243.07	255.02	28.09
	S.D	6.74	10.33	8.93	9.68

Gain : Body weight gains between day 0 and day 14

3) Table 3. Gross findings of rats

INDIVIDUAL DATA OF GROSS FINDINGS				
STUDY : CT13-126155			SEX : MALE	
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	FATE (DATE)	ORGAN	OBSERVATIONS
G1 (4,000)	G1-1	Terminal sacrifice (05-Feb-2014)	Skin	Crust and granulation, Dorsal back, application site
	G1-2	Terminal sacrifice (05-Feb-2014)	Skin	Crust and granulation, Dorsal back, application site
	G1-3	Terminal sacrifice (05-Feb-2014)	Skin	Crust and granulation, Dorsal back, application site
	G1-4	Terminal sacrifice (05-Feb-2014)	Skin	Crust and granulation, Dorsal back, application site
	G1-5	Terminal sacrifice (05-Feb-2014)	Skin	Crust and granulation, Dorsal back, application site
			SEX : FEMALE	
GROUP (mg/kg)	ANIMAL ID	FATE (DATE)	ORGAN	OBSERVATIONS
G1 (4,000)	G1-6	Terminal sacrifice (05-Feb-2014)	Skin	Crust and granulation, Dorsal back, application site
	G1-7	Terminal sacrifice (05-Feb-2014)	Skin	Crust and granulation, Dorsal back, application site
	G1-8	Terminal sacrifice (05-Feb-2014)	Skin	Crust and granulation, Dorsal back, application site
	G1-9	Terminal sacrifice (05-Feb-2014)	Skin	Crust and granulation, Dorsal back, application site
	G1-10	Terminal sacrifice (05-Feb-2014)	Skin	Crust and granulation, Dorsal back, application site

(6) 어류(잉어)급성독성시험

어류급성독성도 한국건설생활환경시험연구원에 의뢰하여 시험하였고 잉어를 대상으로 한 시험 결과 주성분 기준 반수치사량(LD₅₀)이 10mg/L 이상으로 나와 친환경유기농자재(병충해방제제) 등록기준을 통과하였다.

시험성적서



1. 성적서 번호 : CT13-126161
2. 의뢰자
 - 업체명 : 동국대학교 산학협력단
 - 주소 : 서울 중구 필동3가 동국대학교26번지
 - 의뢰일자 : 2013. 12. 30
 - 시험발급일 : 2014. 03. 24
3. 시험성적서의 용도 : 거래처 제출용(농촌진흥청)
4. 시료명 : 황토가공소재 슬러리
5. 시험방법
 - (1) 농촌진흥청 고시 제 2013-21 호(2013년 06월 28일) '농약 및 원제의 등록기준' 내 별표 13 '환경생물 독성 시험기준과 방법'

6. 시험결과

1) 황토가공소재 슬러리

시험항목	단위	시험방법	시험결과	비고
어류(잉어)급성독성시험	mg / L	(1)	LC ₅₀ (48 시간 및 96 시간 반수치사농도) > 10	첨부 페이지 참조

— 이 하 여 백 —

확인	작성자 성명	김기영 	기술책임자 성명	이진규 
비고 : 1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 2. 이 성적서는 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.				

한국건설생활환경시험연구원장

바이오융합연구소 : 406-840 인천광역시 연수구 갯벌로145번길 8 (송도동, 독성·안전성평가센터)
032-858-0011

□ 어류(잉어)급성독성시험

시 료 명 : 황토가공소재 슬러리

시료조제 : 어류실험실내의 시험용수를 이용하여 대조군을 포함한 총 2 단계의 농도군으로 조제 하였다.

시 형 계 : 잉어(*Cyprinus carpio*)

개체수 : 단계별 11 마리

노 출 농 도 : 0.000, 10.000 mg / ℓ

시 형 방 법 : 농촌진흥청 고시 제 2013-21 호(2013 년 06 월 28 일) '농약 및 원제의 등록기준' 내
별표 13 '환경생물 독성 시험기준과 방법'

○ 요 약

본 시험은 담수어류 중 잉어에 대한 황토가공소재 슬러리의 급성독성영향을 평가하기 위해 설정농도 0.000, 10.000 mg / ℓ 수준에서 시험을 수행하였다.

그 결과는 다음과 같다.

- 1) 시험에 이용된 시험용액의 수온과 용존산소(Dissolved oxygen, DO) 및 pH 의 값(최저~최고)은 각각 22.7 ~ 23.1 ℃, 100.2 ~ 110.4 %, 7.56 ~ 8.09 였다.
- 2) 시험용액의 상태는 노출 농도군의 경우 혼탁함과 침전물이 관찰되었고 대조군의 경우는 시험 종료 시까지 투명한 상태를 유지하였다.
- 3) 본 시험조건 하에서 황토가공소재 슬러리의 48 시간 및 96 시간 반수치사농도(LC₅₀)는 10.000 mg / 이상인 것으로 확인되었다.

○ 시험항목 및 시험방법

1) 시험종 및 계통: 잉어(*Cyprinus carpio*)

2) 시험물질 조제방법

본 시험은 시험물질 내 주성분 함량(45.21 %)을 고려하여 시험물질을 처리한 후 사육수(희석수)에 희석하여 농도 설정 하였다. 설정된 농도는 대조군(사육수) 및 10.000 mg / ℓ 였다.

3) 시험군의 구성

Concentration (mg / ℓ)	총개체수	전장(cm)	무게(g)	수조당 총액 양 (ml)
0.000	11	3.9 ~ 4.9	0.49 ~ 1.74	11,000
10.000	11			11,000

4) 시험절차

본 시험의 노출방법은 지수식으로 진행되었고 시험용액 상태 확인을 위하여 노출 개시 직후부터 노출 종료 시까지 대조군과 노출 농도군에서 육안 관찰하였으며 시험용액의 수온, 용존산소 및 pH 값은 노출 개시 전 및 노출 개시 후 24 시간 마다 측정하였다.

5) 관찰항목

시험물질 처리 후 96 시간 까지 24 시간 간격으로 관찰하며 이 때 형태이상, 유영이상, 출혈 등의 중독증상과 치사개체 수를 관찰하여 기록하였다.

6) 자료의 통계처리

어류급성독성시험결과, 모든 노출 농도수준에서 치사개체가 관찰되지 않아 통계자료는 산출하지 않았다.



○ 시험결과 및 고찰

1) 일반증상 및 치사개체 확인[Table 1, 2]

시험물질 처리 후 관찰결과, 48 시간 및 96 시간 노출 후 대조군(0.000 mg / ℓ) 및 10.000 mg / ℓ 수준에서 다른 특이 증상 및 치사개체가 관찰되지 않았다.

2) 시험 용액의 수질상태 확인 (수온, 용존산소, pH)[Table 3, 4, 5]

시험기간 동안 시험용액의 육안적 수질상태는 노출 농도군의 경우 혼탁함과 침전물이 관찰되었고 대조군의 경우는 실험 종료 시까지 투명한 상태를 유지하였다. 시험기간 동안 시험용액의 수온, 용존산소 및 pH 값(최저~최고)은 각각 22.7 ~ 23.1 ℃, 100.2 ~ 110.4 %, 7.56 ~ 8.09를 나타내었다.

3) 반수 치사 농도(Median lethal concentration, LC₅₀)[Table 6]

해당 시험조건 하에서 황토가공소재 슬러리의 48 시간 및 96 시간 반수치사농도(LC₅₀)는 10.000 mg / ℓ 이상인 것으로 확인되었다.



▷ Table

Table 1. 잉어 치사 개체 수

Concentration (mg / ℓ)	No. of fish	48-hour		96-hour	
		Mortality No.	mortality rate ¹⁾ (%)	Mortality No.	mortality rate ¹⁾ (%)
0.000	11	0	0 %	0	0 %
10.000	11	0	0 %	0	0 %

1) mortality rate: The number of mortality / No. of fish × 100

Table 2. 잉어의 일반증상 관찰

Concentration (mg / ℓ)	Abnormal response *			
	24-hour	48-hour	72-hour	96-hour
0.000	N ¹⁾	N	N	N
10.000	N	N	N	N

1) 정상개체- N.

Table 3. 시험용액의 수온

(Unit : ℃)

Concentration (mg / ℓ)	0-hour	24-hour	48-hour	72-hour	96-hour	Mean(±S.D. ¹⁾)
0.000	22.8	23.1	23.0	23.1	22.7	22.9(±0.2)
10.000	22.8	23.0	22.9	23.0	22.7	22.9(±0.1)

1) Standard Deviation - S.D.

Table 4. 시험용액의 용존산소(DO)

(Unit : %)

Concentration (mg / ℓ)	0-hour	24-hour	48-hour	72-hour	96-hour	Mean(±S.D. ¹⁾)
0.000	108.0	100.2	109.8	110.4	109.4	107.6(±4.2)
10.000	106.9	103.2	108.6	108.7	108.5	107.2(±2.3)

1) Standard Deviation - S.D.

Table 5. 시험용액의 pH

Concentration (mg / ℓ)	0-hour	24-hour	48-hour	72-hour	96-hour	Mean(±S.D. ¹⁾)
0.000	7.76	7.62	7.56	7.76	7.83	7.71(±0.11)
10.000	8.09	7.60	7.76	7.92	7.89	7.85(±0.18)

1) Standard Deviation - S.D.

Table 6. LC₅₀ (48-시간 및 96-시간 노출)


(Unit : mg / ℓ)

Test substance	48-시간		96-시간	
	LC ₅₀ ¹⁾	95 % confidence imits	LC ₅₀	95 % confidence imits
황토가공소재 슬러리	>10.000	-	>10.000	-

1) Median lethal concentration LC₅₀

(7) 약해시험

약해시험은 농촌진흥청 지정기관인 (주)식물보호연구소에 의뢰하여 시험하였고 5가지작물(고추, 배추, 오이, 참외, 토마토)를 대상으로 한 시험결과 5가지 작물 모두 약해증상없음으로 나왔다.

 **식물보호연구소**
Plant Protection Institute

415-802 경기도 김포시 풍무로 214 청우빌딩3층(사우동) Tel : 031-996-2577 Fax : 031-996-2578

문서번호 : 식보연-14-06

시행일 : 2014. 03. 14

수신 : 동국대학교 산학협력단

참조 :

제목 : 유기농업자재 목록공시를 위한 약해 시험

1. 귀 단의 무궁한 발전을 기원합니다.

2. 저희 (주)식물보호연구소에 의뢰된 유기농업자재 목록공시를 위한 약해시험 성적서를 첨부와 같이 송부하오니 업무에 참고하시기 바랍니다.

- 아 래 -

구분	항 목 명	시험약제수	발급부수
약효	벼 도열병 약제방제 효과시험	1	-
약해	유기농업자재 목록공시를 위한 약해시험	1	1
총 1항목			1부

* 첨부 : 유기농업자재 목록공시를 위한 약해시험 성적서 1부. 끝.

(주)식물보호연구소장



본 성적서는 의뢰사 요청에 의하여 재발행된 원본입니다.

약해 시험 결과 보고서

2014. 3. 14

위탁자 : 동국대학교 산학협력단

연구기관 : (주)식물보호연구소 (인)



1/7



본 성적서는 의뢰사 요청에 의하여 재발행된 원본입니다.

항목명 : 유기농업자재 목록공시를 위한 약해 시험

- 시험기관 : (주)식물보호연구소
- 시험년도 : 2014년
- 담당자 : 이재은, 임명택
- 실험개시일 : 1월 27일
- 실험 종료일 : 2월 17일
- 시험장소 : 경기도 김포시 사우동(시설)

1. 시험목적 : 작물의 약해를 검토하여 유기농업자재 목록공시를 위한 자료로 활용하고자 함.

2. 시험방법

- 가. 농촌진흥청 고시 “농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법” 에 준함.
- 나. 시험작물(품종) : 고추(녹광), 배추(노랑쌈), 오이(낙동청장), 참외(조은대), 토마토(도태랑다이하)
- 다. 처리방법

공시자재	주성분명	주성분함량 (%)	처리시기 및 방법	약해시험		의뢰회사
				기준량	배량	
황토가공소재 슬러리	규산나트륨	16.17	유식물 경엽처리 (2/10)	200배 (2/10)	100배 (2/10)	동국대
무처리	-	-	-	-	-	-

다. 경종개요

- 1) 재배방법 : 3~4엽의 공시작물을 1월 27일에 pot에 정식하였고, 2월 10일 공시자재를 1회 경엽처리 하였음.

라. 시험구배치 및 면적: 완전임의배치법 3반복

구분	작물수	처리수	반복수	구당pot수	소요pot수	총소요pot수
약해	5	3	3	5	225	225



본 성적서는 의뢰사 요청에 의하여 재발행된 원본입니다.

4. 조사 방법

구 분	조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약해시험	약해조사	3	2/13, 2/15, 2/17	약해 유무 달관조사

* 농촌진흥청고시 2012-13호(2012. 2. 7) “농약 및 원제의 등록기준”
별표11 “약해시험기준과방법”의 약해조사기준에 준하여 조사함.

5. 시험성적(처리후 3일(2/13), 5일(2/15), 7일(2/17))

공시자재 (상표명)	작물 (품종)	약해정도(0-5)		약해증상
		기준량	배량	
황토가공 슬러디	고추 (녹광)	0	0	약해없음
	배추 (노랑쌈)	0	0	약해없음
	오이 (낙동청장)	0	0	약해없음
	참외 (조은대)	0	0	약해없음
	토마토 (도테랑다이아)	0	0	약해없음









본 성적서는 의뢰사 요청에 의하여 재발행된 원본입니다.



<시험포장>









본 성적서는 의뢰사 요청에 의하여 재발행된 원본입니다.

	ODAT(2/10)	3DAT(2/13)
기준량		
배량		
무처리		
	고추 오이 토마토 배추 참외	고추 오이 토마토 배추 참외

5/7



본 성적서는 의뢰사 요청에 의하여 재발행된 원본입니다.

	5DAT (2/15)	7DAT (2/17)
기준량		
배량		
무처리		
	고추 오이 토마토 배추 참외	고추 오이 토마토 배추 참외



본 성적서는 의뢰사 요청에 의하여 재발행된 원본입니다.

6. 결과요약

- 공시자재인 황토가공슬러리는 고추, 배추, 오이, 참외, 토마토에 대한 약해 증상이 없었다.

7. 시험 담당자 의견

- 공시자재인 황토가공슬러리는 고추, 배추, 오이, 참외, 토마토에 대한 약해가 없어 농가보급시 문제가 없을 것으로 사료된다.

본 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 위의 기준을 준수하여 실시하였으며, 시험 결과는 생성된 모든 시험기초자료를 토대로 작성 되었다.

2014년 3월 14일

시험책임자 임 은 상

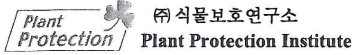


(주) 식물보호연구소 장



(8) 약효시험

약효시험은 농촌진흥청 지정기관인 (주)식물보호연구소에 의뢰하여 시험하였고 벼 도열병을 대상으로 한 시험결과 방제가 63.4%를 보였고 벼에 대한 약해증상은 없으므로 나왔다.



415 - 802 경기도 김포시 풍무로 214 청우빌딩3층(사우동) Tel : 031-996-2577 Fax : 031-996-2578

문서번호 : 식보연-15-22

시 행 일 : 2015. 8. 10

수 신 : 동국대학교 산학협력단

참 조 :

제 목 : 벼 잎도열병 약제방제 효과시험 성적서 송부

1. 귀 단의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 저희 (주)식물보호연구소에 의뢰된 벼 잎도열병 약제방제 효과시험에 대한 성적서를 첨부와 같이 송부하오니 업무에 참고하시기 바랍니다.

- 아 래 -

구분	항 목 명	시험약제수	발급부수
약효	벼 잎도열병 약제방제 효과시험	1	1
총 1항목			1부

* 첨부 : 벼 잎도열병 약제방제 효과시험 성적서 1부. 끝.

(주)식물보호연구소



본 성적서는 의뢰사 요청에 의하여 재발행 된 원본입니다.

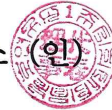
PPI-15OFM-F01-DGU

약효 시험 결과 보고서

2015. 8. 10

위탁자 : 동국대학교 산학협력단

연구기관 : (주)식물보호연구소 (인)



1/4

.....
.....
.....
.....
.....

본 성적서는 의뢰사 요청에 의하여 재발행 된 원본입니다.

PPI-15OFM-F01-DGU

3. 조사 방법

구 분	조 사 항 목	조사횟수	조사일자	조 사 방 법
약효시험	병반면적률	1회	8/4	최종약제처리 26일후에 구당 30주에 대한 병반면적률 조사
약해시험	외관상 약해유무	3회	7/2, 7/4, 7/6	외관상 나타나는 약해유무 3회 (약제처리 후 3, 5, 7일) 달관조사

4. 시험성적

가. 약효시험

○ 벼 잎도열병에 대한 약제방제 효과 (최종약제처리 26일후)

시험약제	병반면적률 (%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
황토가공소재 슬러리	0.83	0.73	0.81	0.79	b	63.4
무처리	2.07	2.12	2.28	2.16	a	-

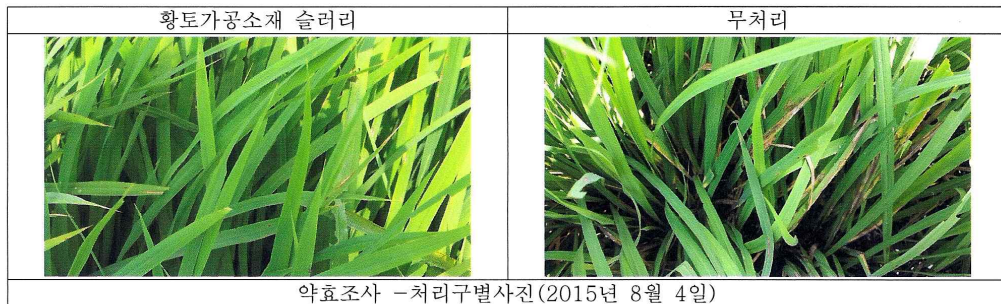
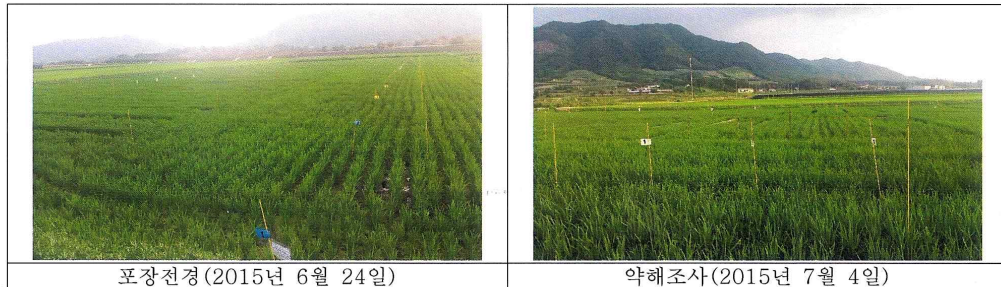
C.V.(%) ----- 5.6

나. 약해시험

○ 약해 조사(약제처리 3, 5, 7일후)

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도(0 - 5)		비고
		기준량	배량	
황토가공소재 슬러리	벼 (추청벼)	0	0	약해 없음

다. 사진자료



본 성적서는 의뢰사 요청에 의하여 재발행 된 원본입니다.

PPI-15OFM-F01-DGU

5. 결과요약

가. 약효

○ 시험약제인 황토가공슬러리는 무처리와 비교하여 우수한 방제효과를 나타냈음.

나. 약해

○ 시험약제인 황토가공슬러리는 기준량 및 배량에서 약해가 관찰되지 않았음.

6. 시험담당자 의견

○ 시험약제인 황토가공슬러리는 벼에 대해 약해를 나타내지 않았으며, 무처리와 비교하여 우수한 방제효과를 나타내어 벼 잎도열병에 대한 유기농업자재로 실용성이 있는 것으로 판단됨.

본 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 위의 기준을 준수하여 실시하였으며, 시험 결과는 생성된 모든 시험기초자료를 토대로 작성 되었다.

2015년 8월 10일

시험책임자 임은상



(주) 식물보호연구소장



본 성적서는 의뢰사 요청에 의하여 재발행 된 원본입니다.

PPI-15OFM-F01-DGU

항목명 : 벼 잎도열병 약제방제 효과시험

- 시험기관 : (주)식물보호연구소
- 시험년도 : 2015년
- 담당자 : 이재은, 박출영
- 실험개시일 : 6월 29일
- 실험 종료일 : 8월 4일
- 시험장소 : 충남 보은군 삼승면(노지)

1. 시험목적 : 벼 잎도열병에 대한 우수방제약제를 선발하여 유기농업자재 품질인증을 위한 자료로 활용하고자 함.

2. 시험방법

- 가. 농촌진흥청 고시 “농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법” 에 준함
- 나. 대상병해 : 잎도열병 (*Magnaporthe grisea*)
- 다. 시험작물(품종) : 벼(추청)
- 라. 대상병해 발생상황 : 무처리 병반면적률이 2.16%로 약효를 검토하기에 충분히 발병하였음.
- 마. 처리내용

시험약제	주성분명	주성분 함량 (%)	약효시험		약해시험		의뢰 회사
			희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법	추천량	배량	
황토가공소제 슬러리	규산나트륨	16.17	200배	이양후 30일부터 10일간격 2회 경엽처리 (6/29, 7/9)	200배 (6/29)	100배 (6/29)	동국대
무처리	-	-	-	-	-	-	-

바. 경종개요 : 5월 30일 이양, 재식거리 30×14cm, 시험기간 중 시험약제 이외의 유기농업자재 및 살균제 무살포

사. 시험구배치 및 면적: 난괴법 3반복

구 분	처리수	반복수	총구수	구당면적	소요면적	총소요면적
약 효	2	3	6	30m ²	180m ²	270m ²
약 해	3	3	9	10m ²	90m ²	

아. 약제살포 전후 기상상황 : 약효 및 약해에 영향을 미칠만한 기상변화 없었음. (보은기상)

월/일	강수량(mm)	최고기온(℃)	최저기온(℃)	평균기온(℃)
6/29*	-	31.8	17.9	24.5
6/30	0.5	26.0	18.2	21.4
7/9*	34.0	24.3	18.7	21.3
7/10	-	29.3	19.7	2.9

*약제처리일

- 2차 약제처리일인 7월 9일에 시험포장에는 강우가 없었음.

2. 황토가공나노신소재 (RCPM, Red Clay Processed Nano-Material) 양만장 적용기술 개발

가. 황토가공신소재 (RCPM) 첨가가 양만장 사육수 수질개선에 미치는 영향 조사

(1) 황토가공신소재 (RCPM)의 양만장 사육수 응집·침전 효능평가

○ 내수면 양식에서 발생하는 오염물질중 어류의 생장에 영향을 미치는 성분으로 단백질, 부유고형물, 유기물, 암모니아 등이 있으며 그 중 단백질은 생물학적 분해에 의해 암모니아를 발생시키고 용존산소를 감소시키는 물질이며 부유고형물은 어류의 아가미에 직접적인 충격을 미치는 오염물질로서 신속한 제거가 필요하다. 암모니아는 수중에서 비이온성 암모니아(NH_3)와 이온성 암모니아(NH_4^+) 형태로 평형을 이루고 있으며 온도와 pH에 따라 존재비율이 달라진다. 두 성분 모두 total ammonium nitrogen (TAN)으로 표시되며, 비 이온성 암모니아가 동물의 세포벽을 통과하여 저농도에서도 어류에게 치명적인 피해를 주게되어 더 독성이 강한 성분이다. 0.1 mg $\text{NH}_3\text{-N}$ / L 이상의 농도가 어류에 해로운 것으로 알려져 있고 실질적으로 50ug / L 이상의 $\text{NH}_3\text{-N}$ 농도로 어류가 지속적으로 노출되어서는 안된다.

○ 암모니아의 산화에 의해 생성되는 수중의 아질산성 질소의 축적은 어류 및 수생생물에 유독성 물질일 수 있다. 아질산은 헤모글로빈과 반응하여 산소전달을 방해하는 methhemoglobin을 형성하여 methhamoglobinemia 또는 Brown blood disease 를 초래한다. 문헌에 따르면 0.2 mg/L $\text{NO}_2\text{-N}$ 에서 12 mg/L $\text{NO}_2\text{-N}$ 농도 범위가 aquaculture system에서 안전한 수준으로 보고 있다. 물에서 암모늄 이온과 아질산을 제거하기 위한 능력 때문에 *nitrobacter* 와 *nitrosomonas* 는 어류양식 시스템에서 중요한 역할을 한다. *nitrosomonas* 나 *nitrobacter* 는 doubling time이 12 에서 32시간으로 느리게 성장하는 미생물이기 때문에 효율적인 nitrification을 위해서 여러 종류의 biological filter 및 commercial microbial product가 연구되어 지고 있으나 이들 공정들의 선택은 설치비용, 운전조건, 청소의 난이도 등의 문제가 발생한다.

○ 양만장 현장시험에 사용하기 위한 황토가공소재의 나노슬러리형태 분쇄를 위하여 이온코리아(경북 진천소재)에 위탁 가공을 수행하였다. 아래 분석표에 나타내었듯이 평균 입도는 약 500nm를 유지 하였다.

○ 황토가공 나노슬러리를 이용하여 양만장에서 채취한 물에 투입 후 응집 침전효과를 조사하였다. 황토가공소재 슬러리 300 mg/L 농도로 첨가하여 24시간동안 방치한 후 침전 정도를 확인한 결과 그림 3-1-16에 나타낸 것처럼 외관상으로도 부유물질이 완전히 침전되는 것을 확인하였고, 상등액을 GF/C 필터로 여과한 후 SS (Suspended Solid)를 분석한 결과 대조구는 51 mg/L 인데 비해 실험구는 5 mg/L 로 측정 되었다. 암모니아성 질소, 아질산성 질소, 및 질산성 질소는 단순 첨가에 의해 감소하지는 않았다.

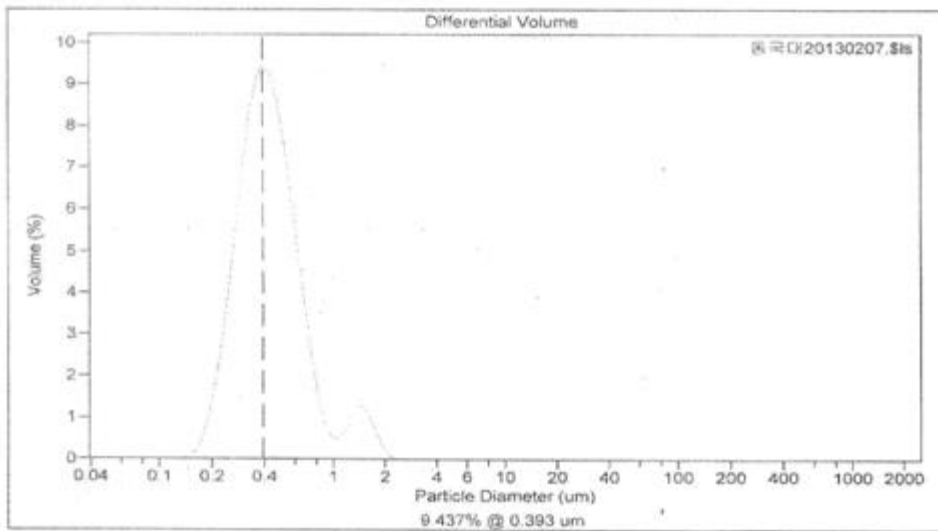
1. 품 명 : 나노슬러리
2. Lot No. : DGU20130129 작업시작: 2013년 1월 29일.
3. 원료무게: 280Kg 작업완료: 2013년 2월 6일.
4. 슬러리 농도 : 25wt% 출 하 : 2013년 2월 12일예정
5. 총 중량 : 1,120Kg
6. 포장단위: 20Kg. 총 56통
7. pH : 13.91
8. 입자크기 : 아래 그래프 참조 평균:494nm(목표 : 500nm 이하)



LS Particle Size Analyzer

7 Feb 2013 16:21

Beckman Coulter LS 13 320



Volume Statistics (Arithmetic) DGU20130207.\$ts

Calculations from 0.040 um to 2000 um

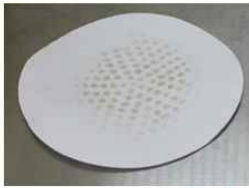
Volume:	100%	S.D.:	0.294 um
Mean:	0.494 um	Variance:	0.086 um ²
Median:	0.417 um	C.V.:	59.5%
Mean/Median ratio:	1.184	Skewness:	2.535 Right skewed
Mode:	0.393 um	Kurtosis:	7.349 Leptokurtic

<10%	<25%	<50%	<75%	<90%
0.260 um	0.322 um	0.417 um	0.551 um	0.750 um

장어양식장 부유물질 침전제거시험



● RCPM 300mg/L



● 상등액 GF/C 필터링



처리전

처리후

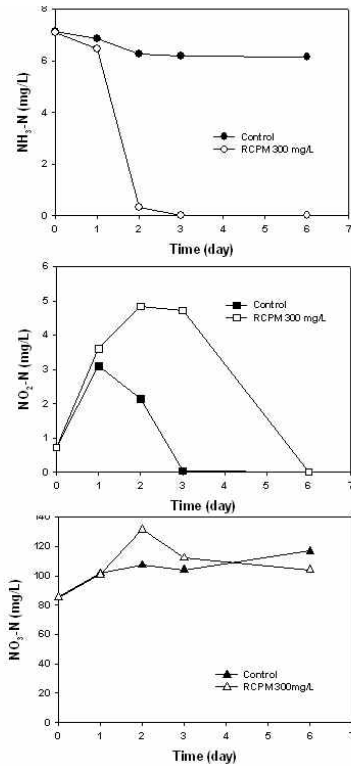
항목	대조구	실험구
pH	6.46	7.95
SS (mg/L)	51	5
NH3-N	8.11	7.78
NO2-N	0.53	0.55
NO3-N	91.16	79.11

- RCPM 처리 : 300mg/L, 1hr
- RCPM 처리가 pH와 SS는 증가시키지만 암모니아성 질소, 아질산성 질소, 질산성 질소는 변화를 주지 않았음

그림 3-1-16. 황토가공소재 첨가에 의한 양만장 사육수 SS (Suspended Solid) 침전 제거효과

(2) 황토가공신소재가 양만장 사육수 질화과정 (Nitrification) 에 미치는 영향

○ RCPM이 양만장 사육수의 nitrification 에 미치는 영향을 조사하기 위하여 RCPM을 300mg/L 투입한 실험구와 투입하지 않은 대조구를 준비하여 shaking incubator(150 rpm, 26℃)에서 호기적 조건으로 배양을 수행하였다. Nitrification 공정은 아래 그림 3-1-17 에 나타난 것처럼 미생물 (AOB, Ammonia Oxidizing Bacteria; NOB, Nitrite Oxidizing Bacteria) 작용에 의하여 암모니아가 아질산 및 질산으로 전환되는 공정을 의미한다. 그림 3-1-15에서 초기에 암모니아성 질소는 급격히 감소하였고 아질산성 질소 농도를 증가시켰다. 사육수 배양을 지속적으로 수행한 결과 아질산성 질소도 감소하였고, 물에 존재하는 미생물 수는 대조구의 경우 14×10^4 CFU/ml 인데 비해 실험구의 경우 118×10^4 CFU/ml 로 8.4배 증가하였다. 본 결과로 RCPM의 처리가 양만장 물의 nitrification에 영향을 주는 것으로 판단된다.



황토가공소재(RCPM)이 양만장 물 Nitrification 에 미치는 영향

Nitrification Process

$\text{NH}_3 + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^-$ AOB: Ammonia Oxidizing Bacteria (ex. *Nitrosomonas*)
 $\text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$ NOB: Nitrite Oxidizing Bacteria (ex. *Nitrobacter*)

- RCPM 처리 농도 : 300mg/L
- 장어양식장 물 처리조건
 - Baffle flask (100ml)
 - shaking incubator (150 rpm, 26°C)

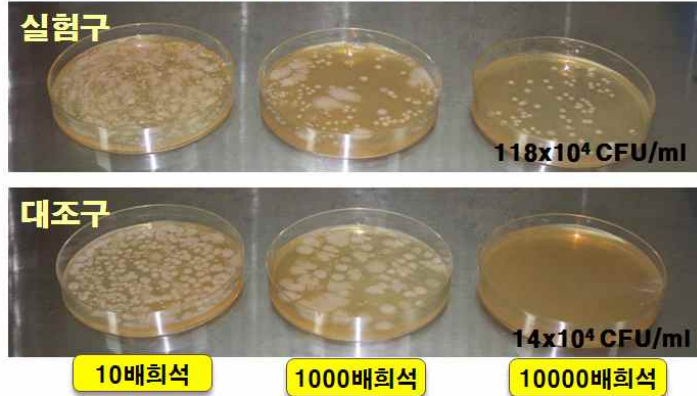


그림 3-1-17. 황토가공소재 첨가가 양만장 사육수의 nitrification에 미치는 영향

○ 양만장의 경우 pH가 매우낮게 유지되는데 이를 해결하기 위하여 탄산칼슘과 같은 알칼리성 물질을 투입하는 실정이다. 그러나 이러한 약품은 pH 완충능력이 없기 때문에 다시 pH를 하락시키는 단점이 있어서 4시간 단위로 계속 투입해야하는 경우가 발생하고, 이러한 과다 투여에 의해 장어의 폐사를 유발하는 경우가 종종 발생한다.

○ 양만장 현장시험을 위하여 황토가공소재를 한달에 400kg 생산하여 나노슬러리형태로 약 1.5-2.0 ton씩 현장에 공급하였다. 분쇄공정은 햄머 크라샤로 3 mm 이하로 분쇄한 후 불밀로 10 μ m 이하로 분쇄 후 나노밀로 평균 500nm 사이즈로 습식분쇄 하였다.

○ 전남영광 소재 신계양만, 경일양만 및 세명양만의 300 m³ 규모 6개수조를 사용하여 3개수조는 대조구로 기존방식대로 탄산칼슘을 사용하여 pH를 조절하였고, 다른 3개 수조는 실험구로 황토가공소재 슬러리(고형분 25%, wt/wt)를 처리하였다. 양만장의 수조는 시멘트로 구성되어 있고 비닐하우스로 밀폐공간이며 장어의 생리상 암실을 유지하였다. 온도는 24-26도를 유지하였고, 에어공급을 위해 paddle wheel aerators를 사용하였다. 신계양만의 경우 5-10g 크기의 장어를 접종하였고, 사료로 치만을 하루 20kg 씩 2회, 황토가공소재는 하루 2kg 씩 2회 처리하였다. 세명양만, 경일양만의 경우 150-200g 크기의 장어를 접종하였고 사료로 치만을 하루 48kg 씩 2회, 황토가공소재는 하루 40kg 씩 2회 처리하였다. 수조당 장어수는 약 30,000 마리 이고, 황토가공소재 슬러리는 10배 희석 후 사용하였다.

○ 약 46일 정도 실험한 결과 세명양만의 경우 표 3-1-7 에 나타난 것처럼 실험구의 경우 암

모니아성 질소와 아질산성 질소가 항상 낮게 유지 되었다. 경일양만과 신계양만의 경우 작업자의 샘플링 실수로(샘플링 수조 오인) 중간에 중단 하였다. 양만장의 경우 특히 아질산성 질소의 증가로 인해 장어 폐사현상이 종종 발생하나 본 황토가공소재처리로 아질산성 질소를 감소시키는 고무적인 결과를 도출하였다. 본 결과는 현장에서 황토가공소재의 사용이 효과를 나타낼 수 있다는 잠재성 제공한다고 볼 수 있다.

표 3-1-7. 황토가공소재 첨가가 양만장 사육수 수질에 미치는 영향

[단위 : mg/L]

시험항목	20일 처리		46일 처리	
	대조구	실험구	대조구	실험구
DO	74.8%	86.9%	32.2	42.8
암모니아성 질소	1.17	0.76	0.76	0.65
아질산성 질소	0.68	0.09	2.03	0.71
질산성 질소	121.93	89.90	83.12	95.18
pH	4.79	5.04	4.63	4.50

☞ 세명양만 : 3개월 양식 예정 (소재 20kg 투입/1일)

☞ 양식장 수조 용량 : 300 m³

나. 양만장 사육수 수질개선을 위한 황토가공신소재 (RCPM) 첨가농도 탐색

황토가공소재슬러리를 양만장에서 채취한 사육수(경일양만)에 농도별로 첨가하여 pH, 암모니아성 질소, 아질산성 질소 및 질산성 질소의 변화를 조사하였다. 사육수 200ml을 배플플라스크에 첨가한 후 Shaking incubator에서 26℃, 150rpm의 조건으로 1주간격으로 분석하였다. 황토가공소재는 고형분 기준 0.0, 3.6, 9.0, 18.0, 36.0 mg/L 씩 각각 첨가하였다. 황토가공소재 첨가가 사육수 pH에 미치는 영향을 조사한 결과 그림 3-1-18에 나타난 것처럼 첨가농도가 증가할수록 pH를 증가시켰으나 ppm 단위의 첨가로 pH에 큰 영향은 주지 않았다. 황토가공소재 첨가가 사육수 암모니아성 질소 감소에 미치는 영향을 조사한 결과 그림 3-1-19에 나타난 것처럼 첨가농도가 증가할수록 암모니아성 질소를 감소시켰고, 18.0 mg/L 이상의 농도에서는 일정하게 유지되었다. 황토가공소재 첨가가 사육수 아질산성성 질소 감소에 미치는 영향을 조사한 결과 그림 3-1-20에 나타난 것처럼 무첨가나 황토가공소재 첨가 모두 아질산성 질소를 감소시켜서 황토가공소재의 첨가에 대한 영향을 확인할 수 없었다. 이것은 사육수 샘플로 사용한 경일양만장의 경우는 아질산을 감소시키는 미생물이 풍부하게 존재하는 것으로 사료된다. 황토가공소재 첨가가 사육수 질산성 질소 감소에 미치는 영향을 조사한 결과 그림 3-1-21에 나타난 것처럼 첨가농도가 증가할수록 질산성 질소를 감소시켰고, 18.0 mg/L 이상의 농도에서는 오히려 증가시키는 결과가 도출되어 사육수내 최적 첨가농도는 18.0 mg/L 로 판단된다.

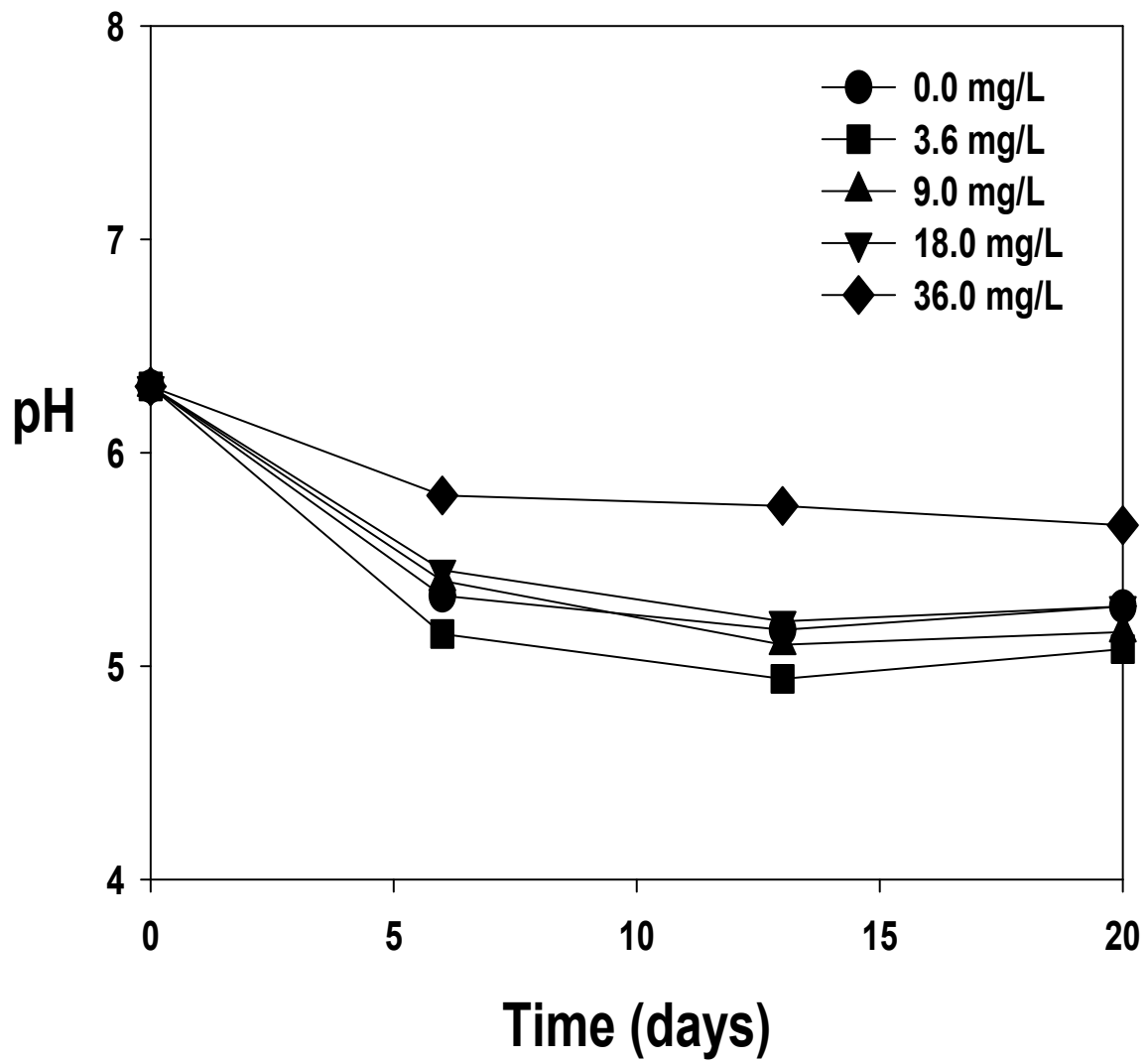


그림 3-1-18. 황토가공소재 첨가가 양만장 사육수 pH에 미치는 영향

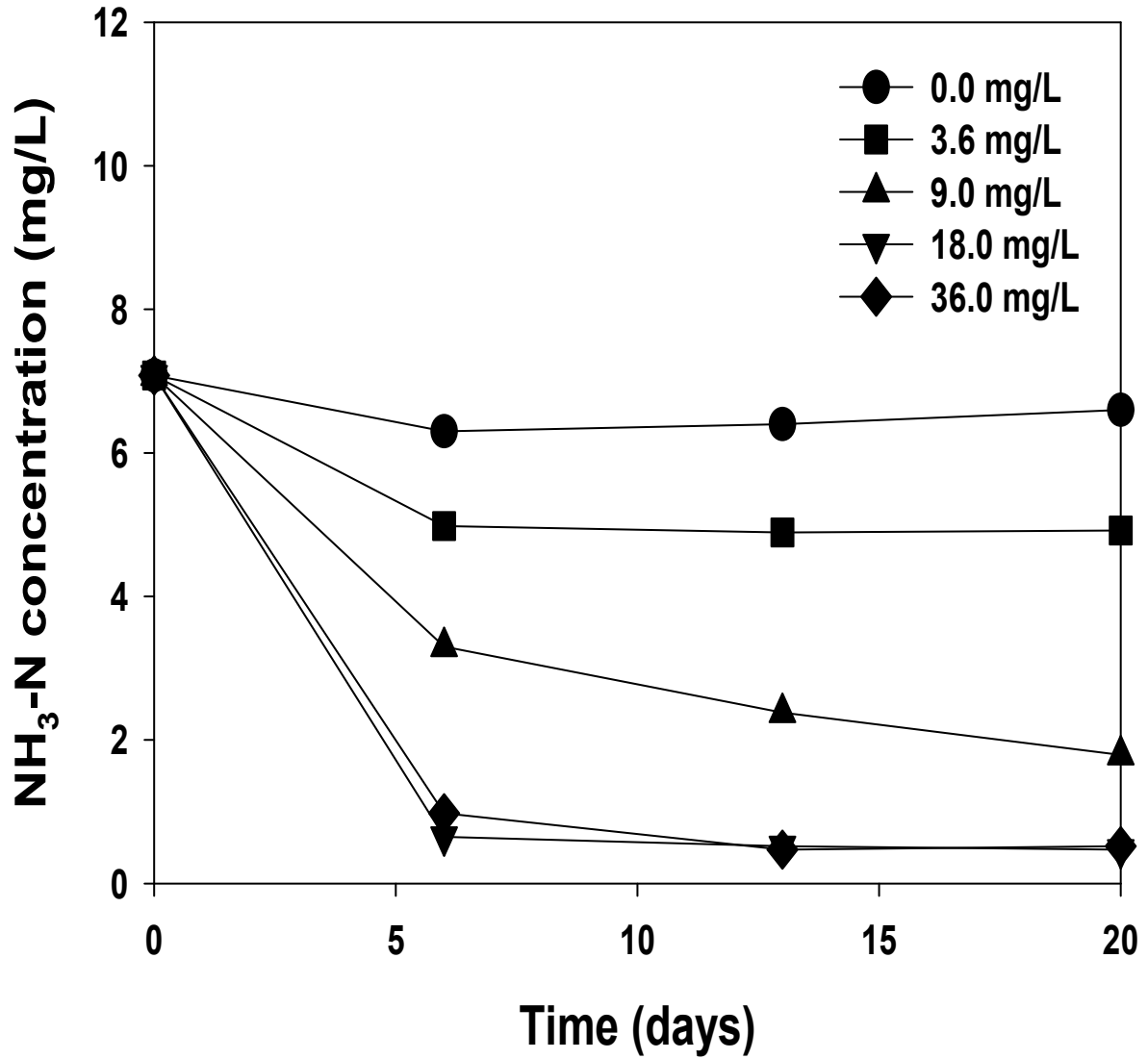


그림 3-1-19. 황토가공소재 첨가가 양만장사육수 암모니아성질소 감소에 미치는 영향

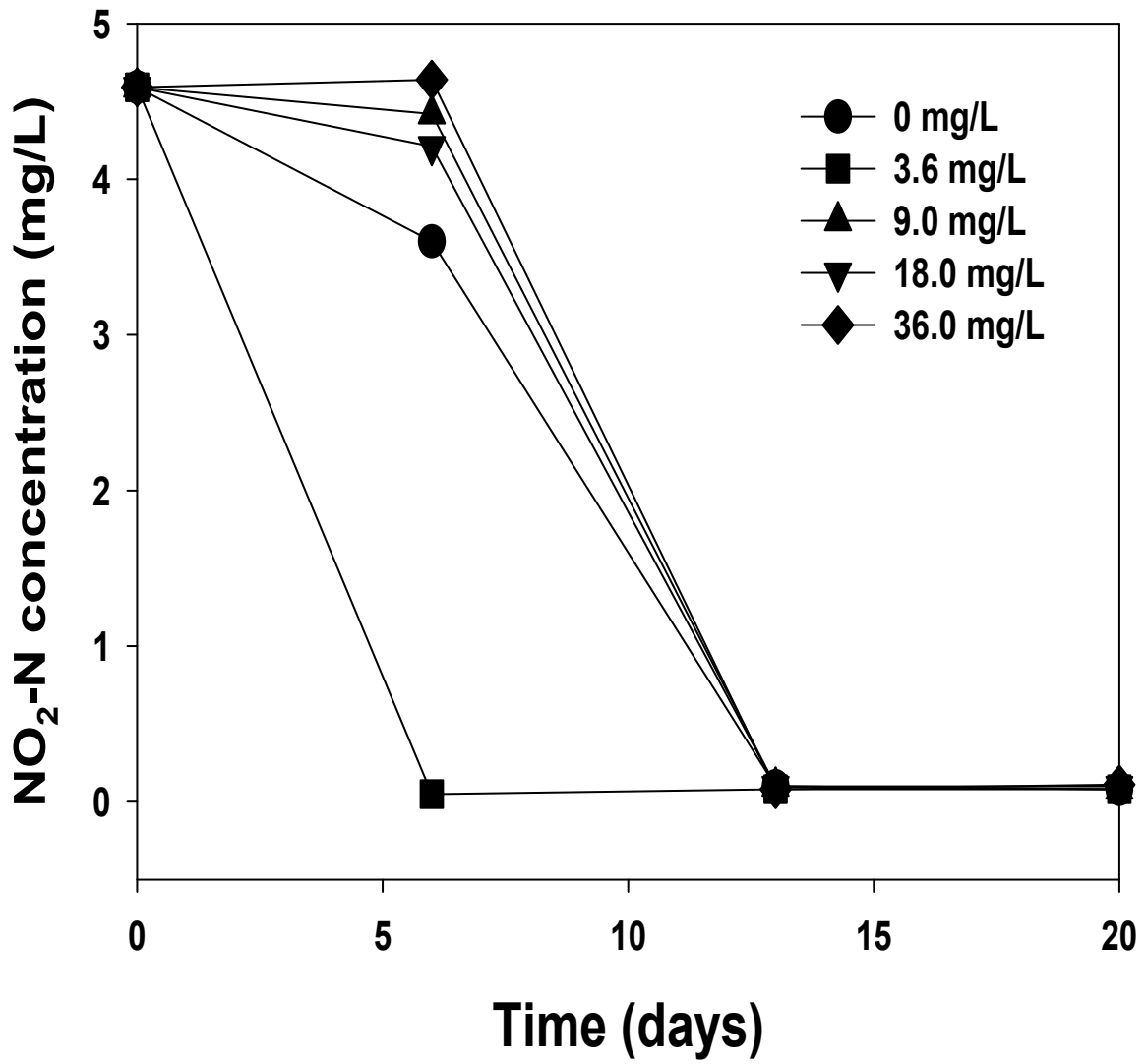


그림 3-1-20. 황토가공소재 첨가가 양만장 사육수 아질산성질소 감소에 미치는 영향

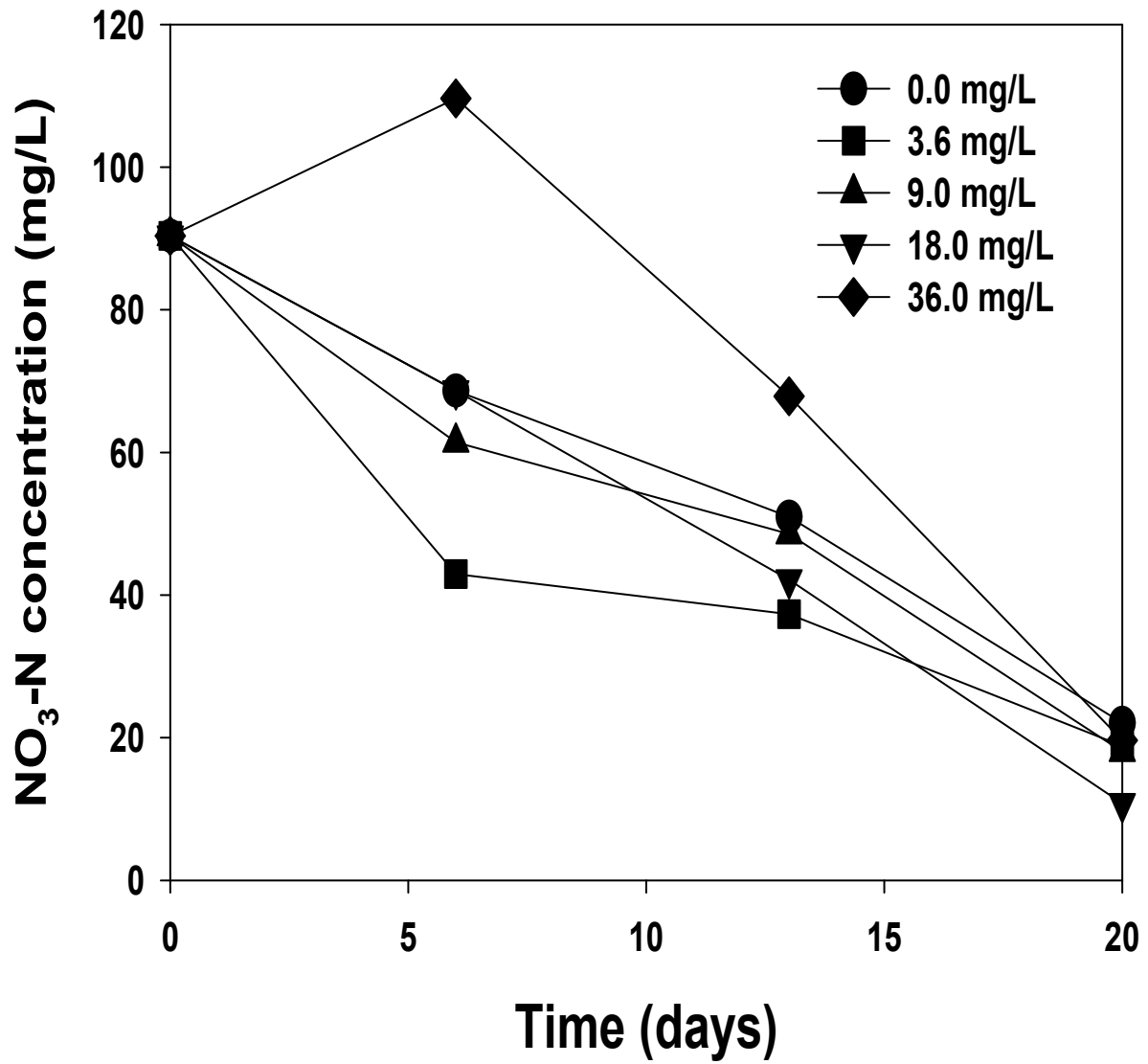


그림 3-1-21. 황토가공소재 첨가가 양만장 사육수 아질산성질소 감소에 미치는 영향

다. 황토가공신소재 (RCPM) 첨가가 양만장 사육수 수질개선에 미치는 영향 조사 (현장실험)

황토가공소재를 경일양만 호지에 20kg/일 씩 93일 동안 지속적으로 첨가하면서 첨가하지 않은 호지 (대조구)와 pH, SS(Suspended Solid), 암모니아성 질소, 아질산성 질소, 질산성 질소를 비교 분석하여 보았다. pH는 대조구(무첨가구)에 비해 증가하였고 (그림 3-1-22), SS는 대조구와 동일하게 증가 하였다 (그림 3-1-23). 암모니아성 질소, 아질산성 질소, 질산성 질소는 모두 대조구에 비해 감소하는 현상을 나타내었다 (그림 3-1-24, 3-1-25, 3-1-26).

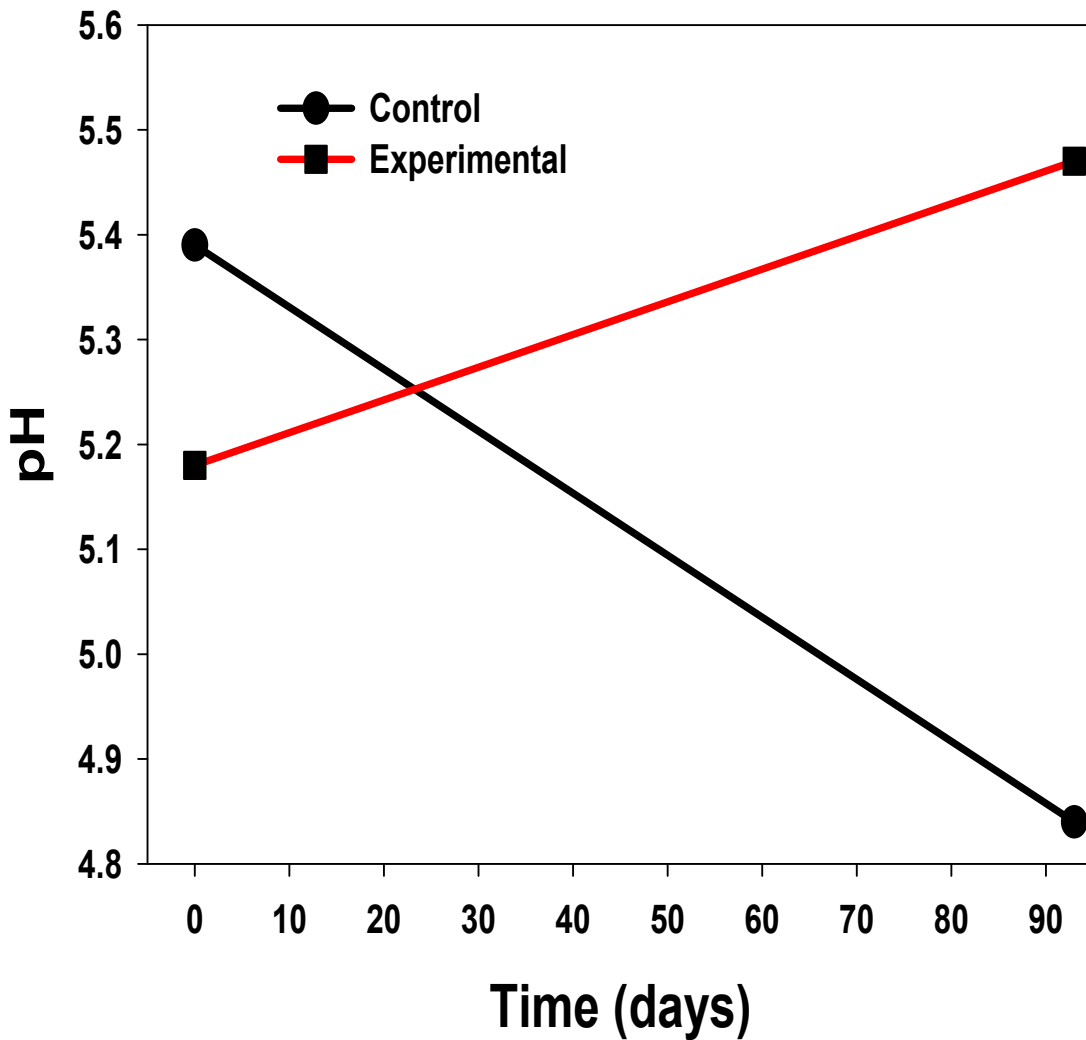


그림 3-1-22. 양만장 현장 호지에서 황토가공소재 첨가가 사육수 pH 에 미치는 영향

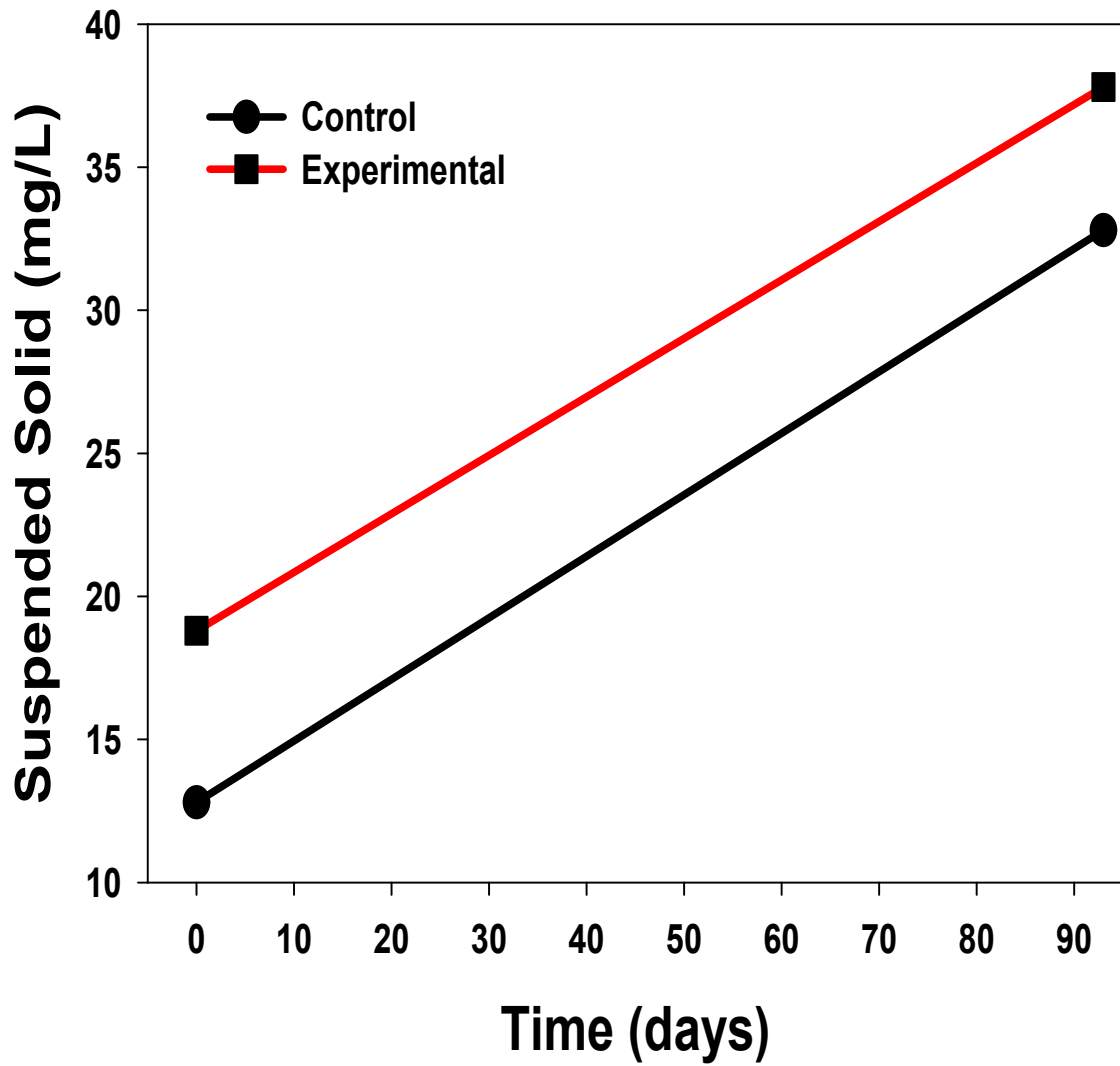


그림 3-1-23. 양만장 현장 호지에서 황토가공소재 첨가가 사육수 SS(Suspended solid) 에 미치는 영향

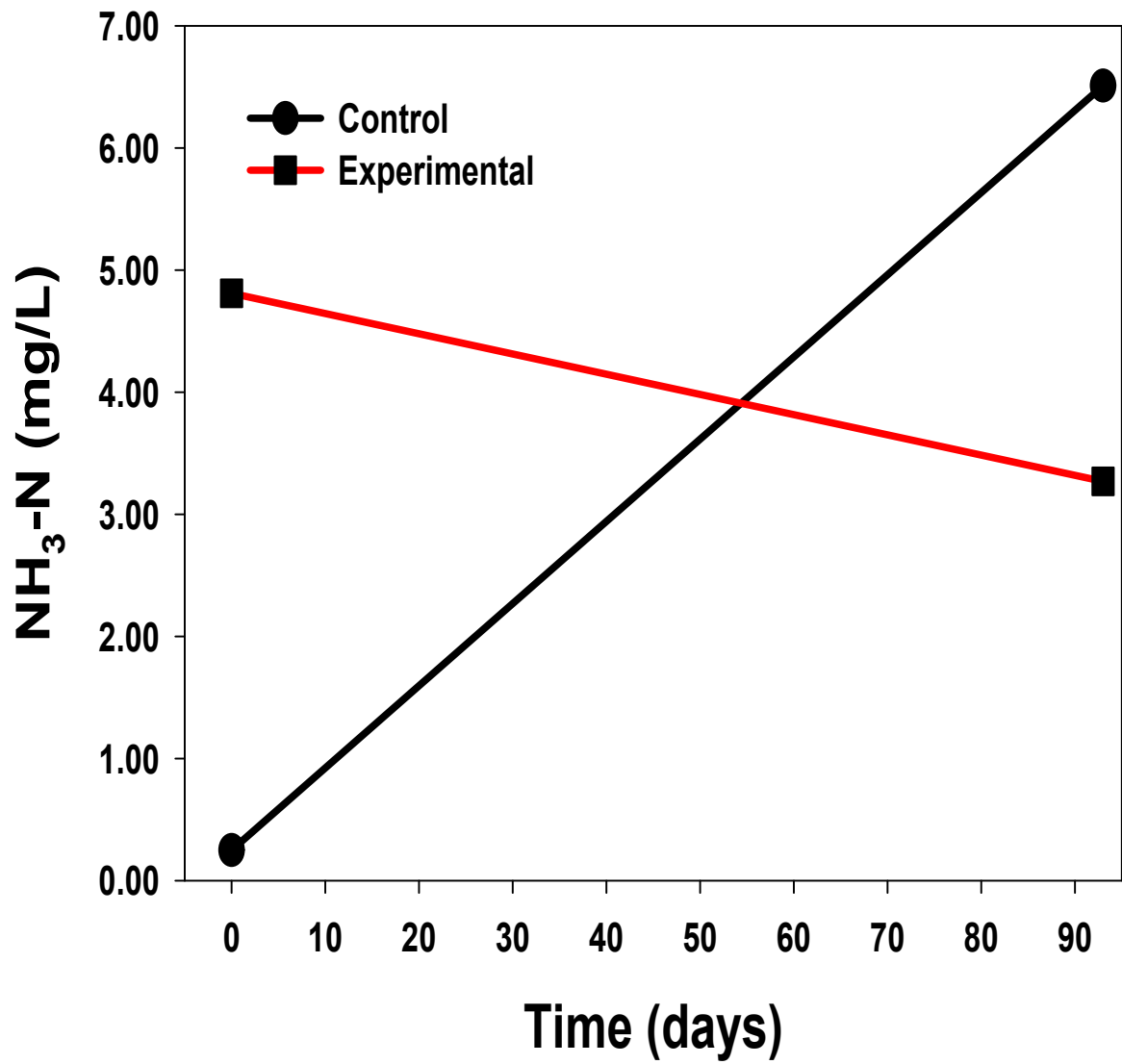


그림 3-1-24. 양만장 현장 호지에서 황토가공소재 첨가가 사육수 암모니아성질소 농도에 미치는 영향

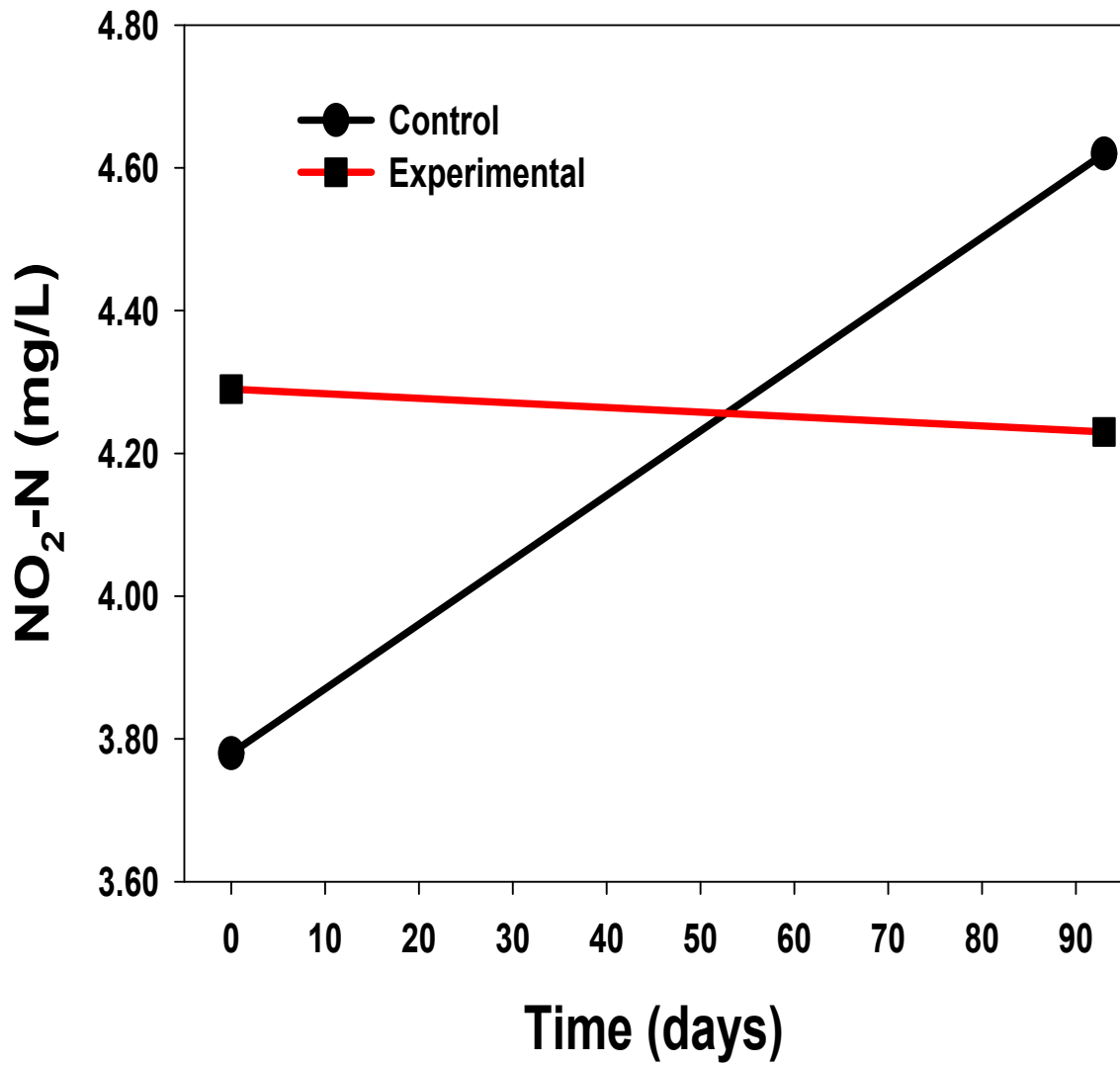


그림 3-1-25. 양만장 현장호지에서 황토가공소재 첨가가 사육수 아질산성 질소 농도에 미치는 영향

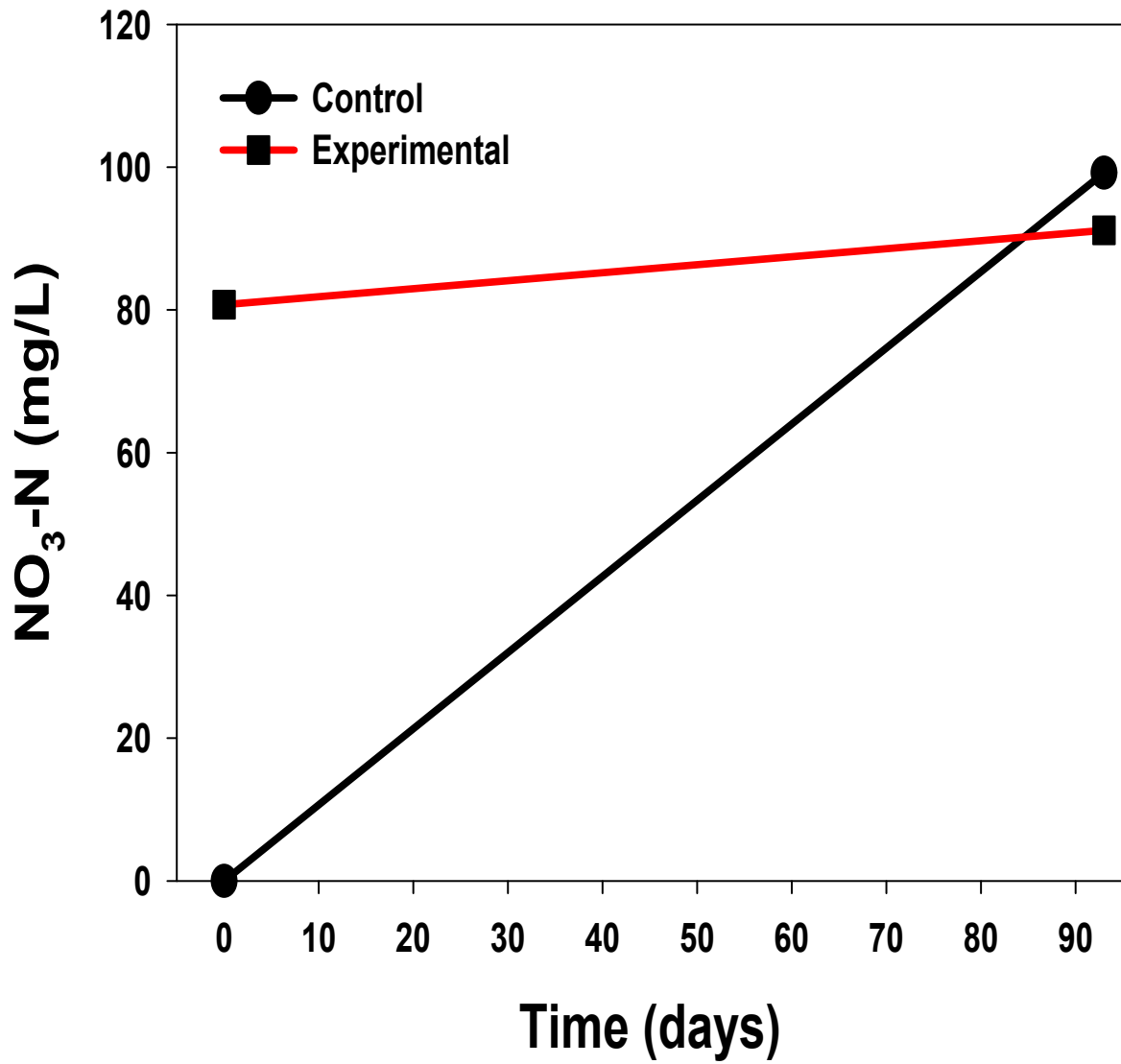


그림 3-1-26. 양만장 현장 호지에서 황토가공소재 첨가가 사육수 질산성 질소 농도에 미치는 영향

라. 황토가공신소재 (RCPM) 첨가가 수용성 인 제거에 미치는 영향 조사

○ 황토가공신소재 분말에 대한 pH에 따른 수용성 인 흡착능에 대한 시험결과를 아래그림 3-1-27, 3-1-28, 3-1-29에 나타내었다. 일반적으로 pH가 증가할수록 흡착능은 감소하는 경향을 나타내었다. pH 4 로 준비된 분말의 경우 인 흡착능이 99% 이상을 나타낸 반면 pH 7로 준비된 분말과 pH 12로 준비된 분말의 경우 흡착능이 현저히 감소하였다. 대조구로 사용된 황토와 활성탄에 비해서도 (그림 3-1-30, 3-1-31) pH 4 로 제조된 황토가공신소재 분말의 경우가 현저히 높은 흡착능을 보였다. 활성탄의 경우가 비표면적이 월등히 높은데도 불구하고 pH 4 로 제조된 분말이 흡착능이 우수하게 나타난 이유는 비표면적의 영향보다 황토가공신소재 안의 규산 및 알루미늄계통의 물질이 흡착능에 상당한 영향을 미치는 것으로 사료된다.

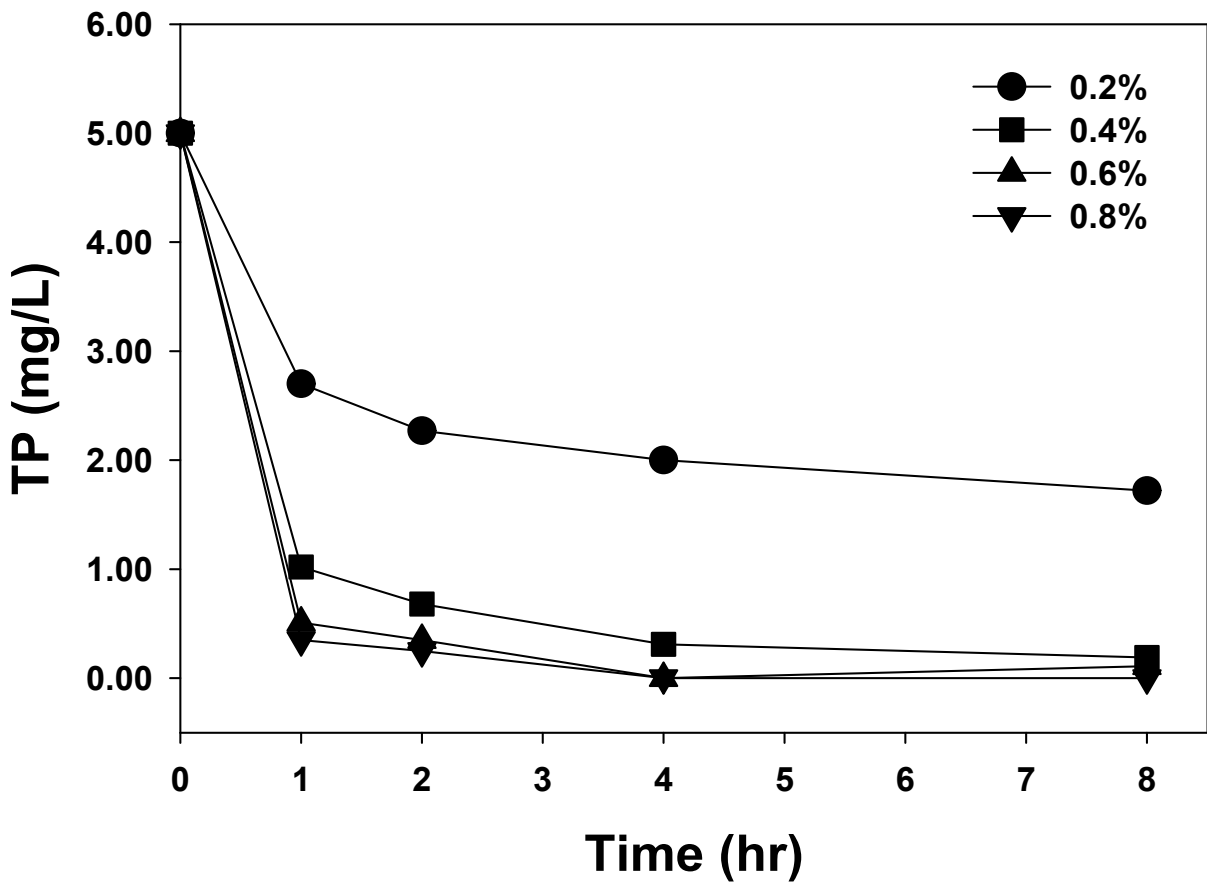


그림 3-1-27. pH 4 로 제조된 RCPM 분말이 KH_2PO_4 용액의 수용성 총인 흡착제거에 미치는 영향 (반응온도 = 20°C, rpm = 200)

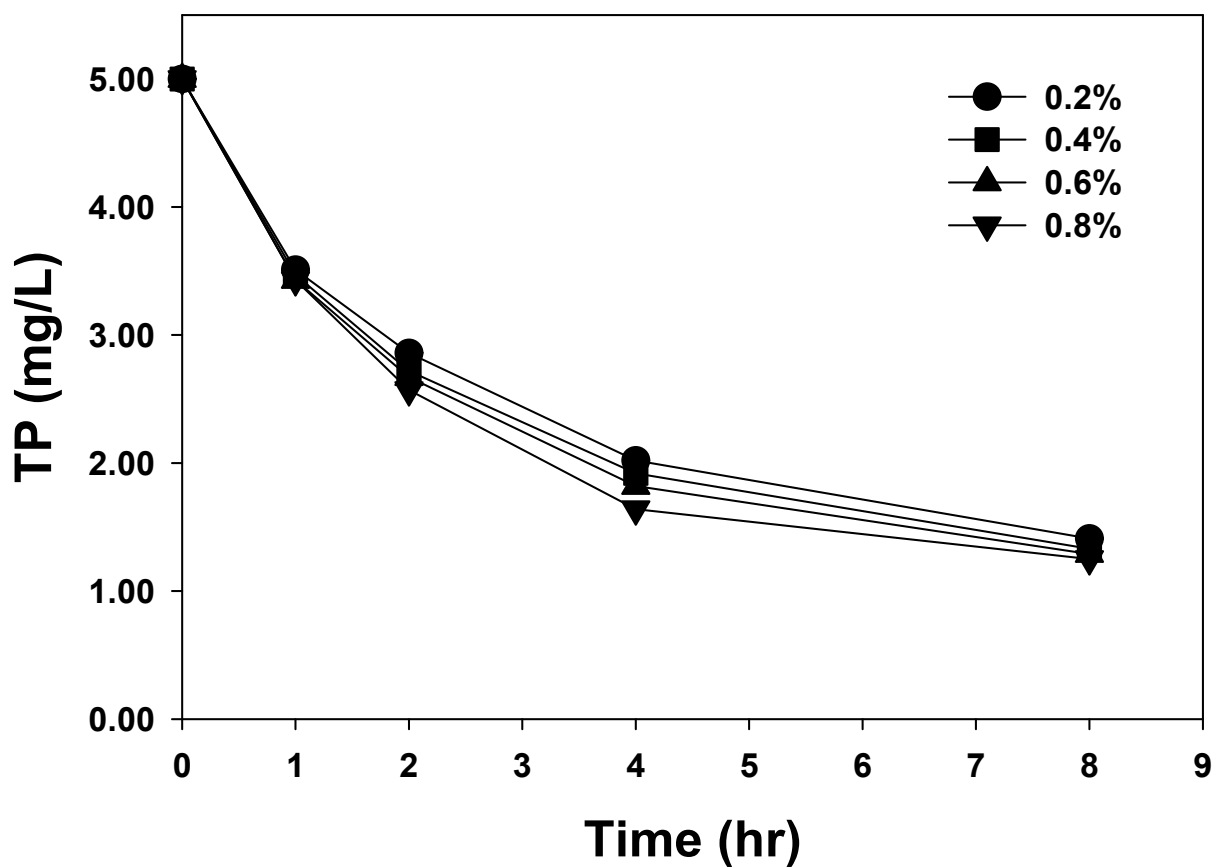


그림 3-1-28. pH 7 로 제조된 RCPM 분말이 KH_2PO_4 용액의 수용성 총인 흡착제거에 미치는 영향 (반응온도 = 20°C , rpm = 200)

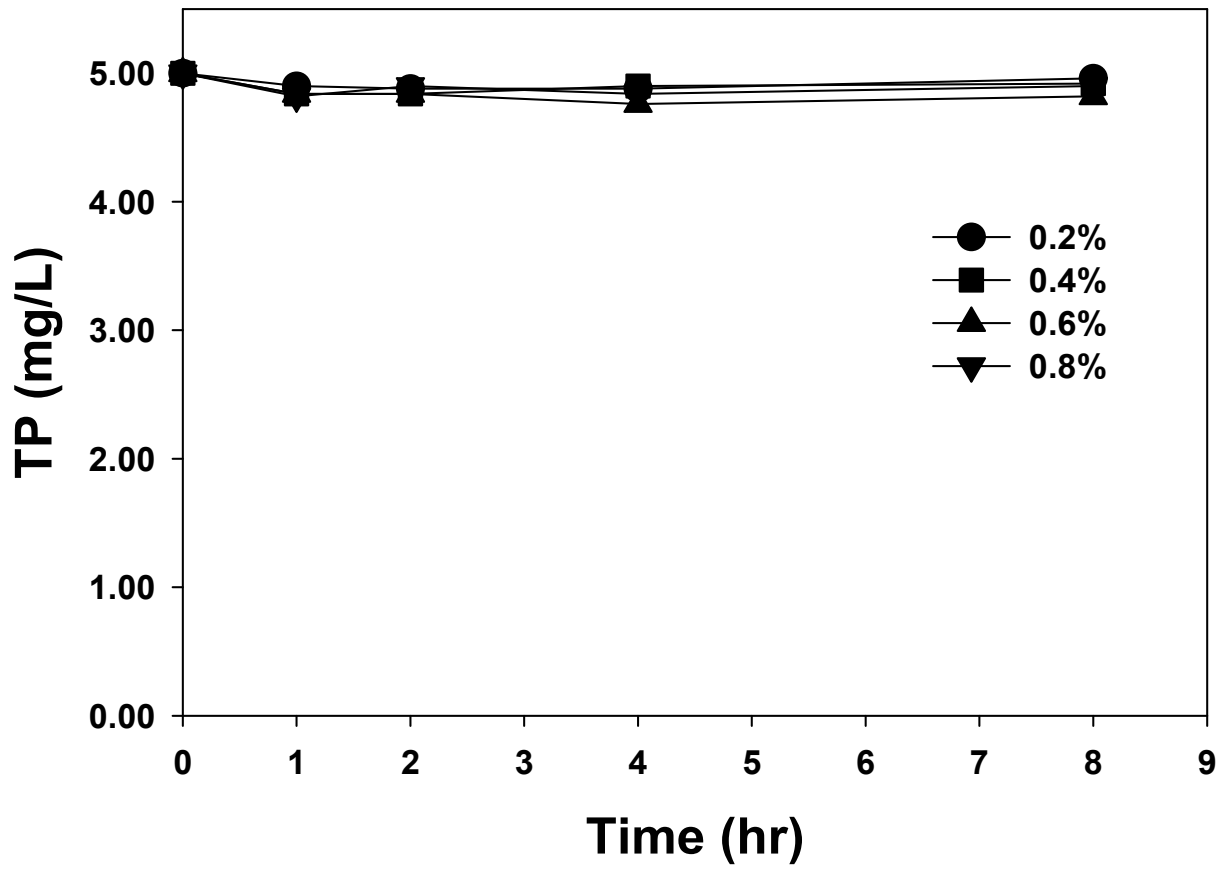


그림 3-1-29. pH 12 로 제조된 RCPM 분말이 KH_2PO_4 용액의 수용성 총인 흡착제거에 미치는 영향 (반응온도 = 20°C , rpm = 200)

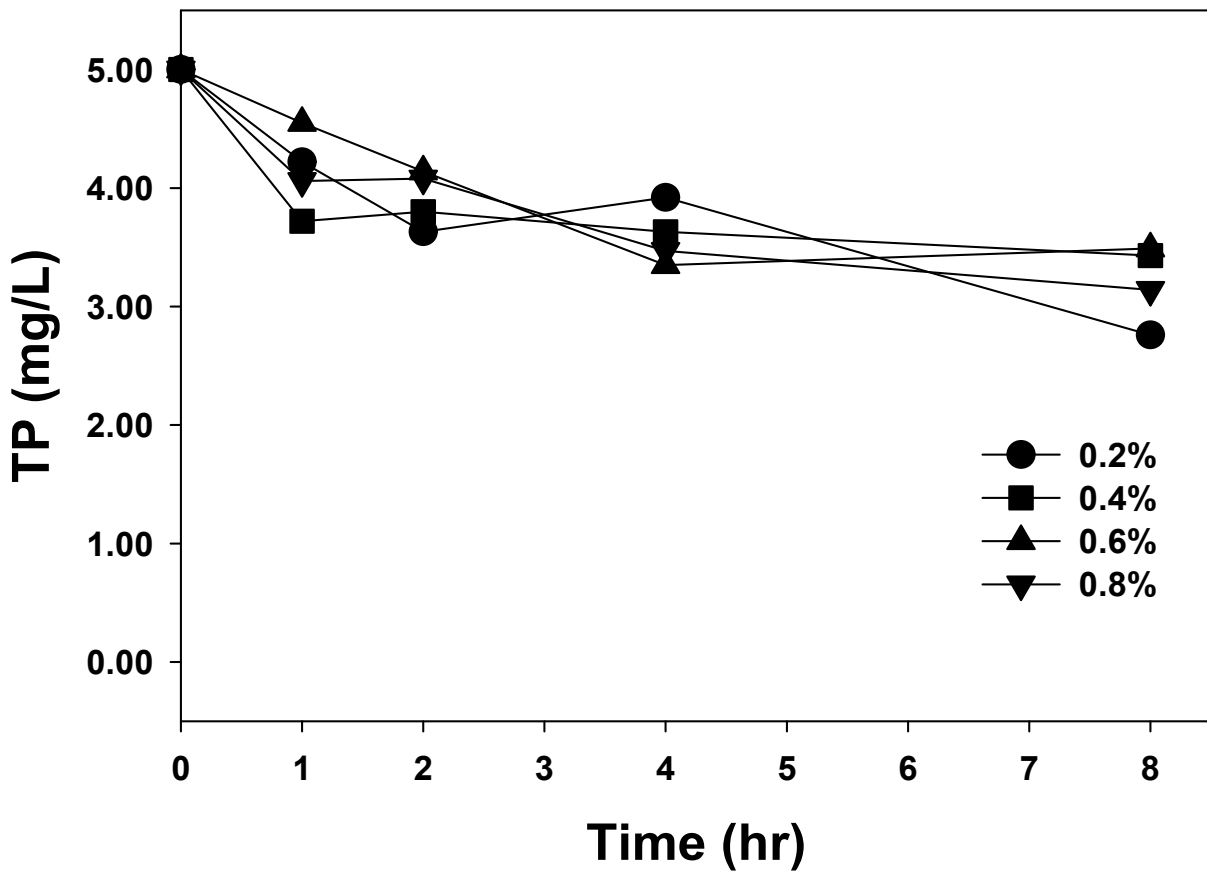


그림 3-1-30. 황토분말이 KH_2PO_4 용액의 수용성 총인 흡착제거에 미치는 영향 (반응온도 = 20°C, rpm = 200)

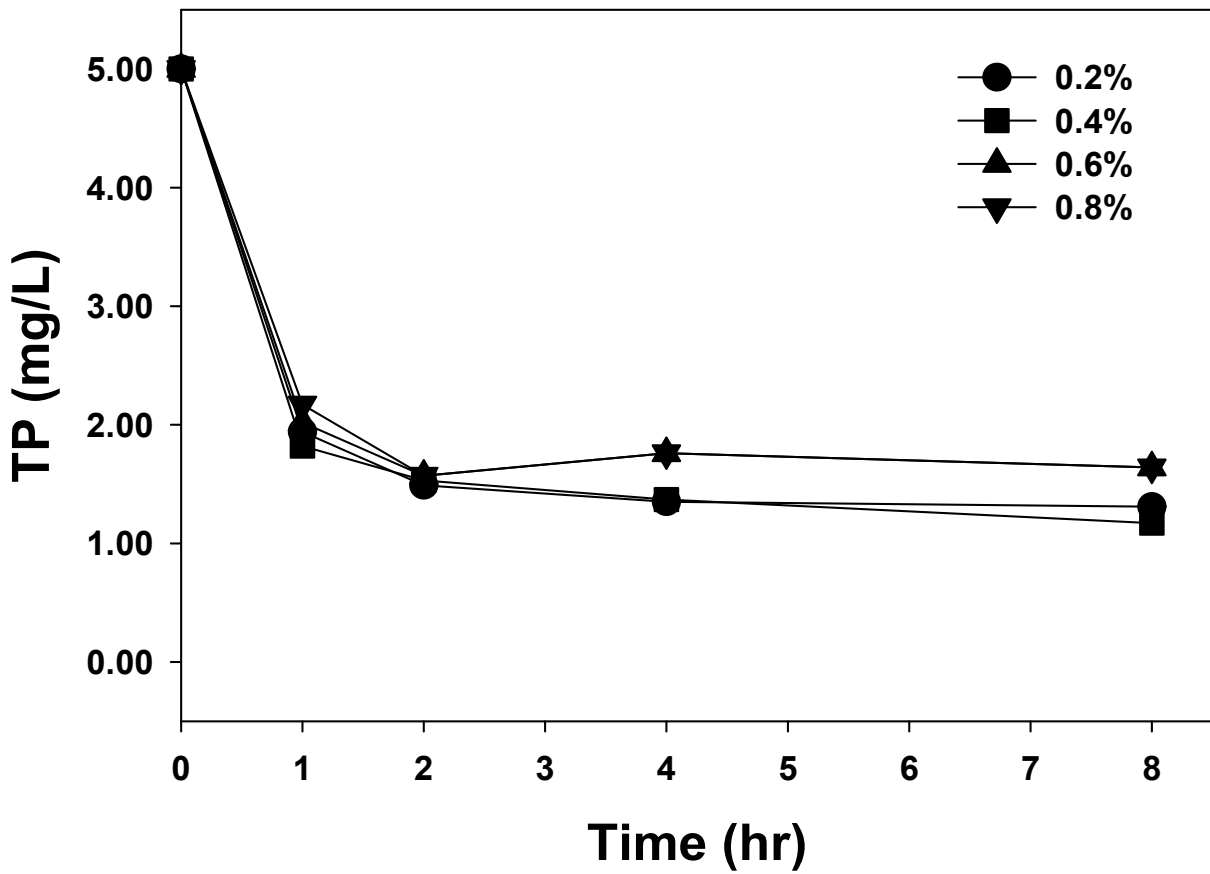


그림 3-1-31. 황성탄분말이 KH_2PO_4 용액의 수용성 총인 흡착제거에 미치는 영향 (반응온도 = 20°C , rpm = 200)

마. 분석방법

(1) 고형분 분석

- ① 증발접시를 깨끗이 씻은후 Dry oven에서 100℃에서 18시간 건조후 데시케이터에 보관한다.
- ② 증발접시의 무게를 측정한다
- ③ 시료를 증발접시에 넣고 무게를 측정한다 (1-2g 투입)
- ④ 100℃에서 18시간 건조 시킨후 데시케이터에서 냉각시킨다.
- ⑤ 냉각후 무게를 측정한다.
- ⑥ 계산

$$\text{고형분 (wt/wt\%)} = (\text{건조후 무게} - \text{증발접시 무게}) / \text{시료무게} \times 100$$

(2) 유효규산 분석

(가) 시약

① 침출액 1N-NaOAc

Acetic acid (CH_3COOH) 49.2ml 와 Sodium acetate (CH_3COONa) 14.8g을 혼합하여 1L로 희석하고 pH 4.0이 되도록 1N- CH_3COONa 나 1N- CH_3COOH 로 조절한다.

② 0.6N HCl

HCl 48ml를 증류수에 희석하여 1L로 한다. (HCl 순도가 다르므로 계산하여 조절할 것)

③ 10% Ammonium molybdate 용액

Ammonium molybdate [$(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] 100g을 따뜻한 증류수에 용해하여 1L로 한다. (Ammonium molybdate 순도가 다르므로 계산하여 시약조제 할 것)

④ 17% Sodium sulfite

170g의 Sodium sulfite(Na_2SO_3)를 따뜻한 증류수에 용해하여 1L로 한다.

⑤ 표준용액

Si Standard solution 1000ppm 시약을 침출액으로 100ppm이 되도록 희석후 0, 3, 6, 9, 12, 15ppm으로 단계적으로 침출액으로 희석해서 만든다.(Si Standard solution 조제 후 유리병에다 절대 보관하지 말고 PP, PE 시약병에 담아 보관한다.

(나) 실험방법

- ① 시료 1g을 100ml PP, PE 삼각플라스크에 넣고 침출액 50ml을 가한 다음 60°C water bath 상에서 90분간 진탕한다
- ② 냉수로 5분간 급냉시킨후 NO.6 여과지로 여과한다.
- ③ 시험관에 시료액 5ml을 취하고 0.6N HCl 2.5ml을 넣고 10% Ammonium molybdate 2.5ml을 넣은다음 3분후에 17% Sodium sulfite 5ml을 넣는다
- ④ 시험관 혼합기로 혼합후 30°C 에서 20분간 항온시킨후 파장 700nm에서 비색 측정한다.
- ⑤ Si Standard solution 0, 3, 6, 9, 12, 15ppm도 동일한 방법으로 동시 분석한다.

(다) 계산

아래 그림 3-1-32의 Calibration Curve에 따라 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{유효규산 (mg/L)} = [57.9810 \times \text{O.D.} - 0.0410] \times \text{희석배수}$$

(3) 암모니아성 질소, 아질산성 질소, 질산성 질소 분석

암모니아성 질소, 암모니아성 질소, 아질산성 질소, 질산성 질소 분석 은 Tetra 키트 (Tetra GmbH, Germany)를 응용하여 분석하였다.

(가) 암모니아성 질소 (NH₃-N) 분석

- ① 시험관에 시료 5ml을 취한다
- ② 1번시약 14방울을 첨가한 후 부드럽게 흔들어준다
- ③ 2번시약을 7방울 첨가한 후 부드럽게 흔들어준다
- ④ 3번시약을 7방울 첨가한 부드럽게 흔들어준다
- ⑤ 색깔이 발생하도록 20분 기다린다.
- ⑥ 스펙트로포토미터용 튜브에 반응액 0.5ml 첨가하고 증류수 4.5ml 첨가하여 섞은후 640nm에서 OD 값을 읽는다 (증류수로 blank 실험).
- ⑦ 계산 : 아래 Calibration curve 식을 이용하여 계산한다 (그림 3-1-33).

$$\text{NH}_3\text{-N (mg/L)} = 1.3501 \times \text{O.D} - 0.0055$$

- ⑧ Calibration curve : 암모니아수를 시료로 농도별로 같은 분석실험을 수행하여 도출한다.

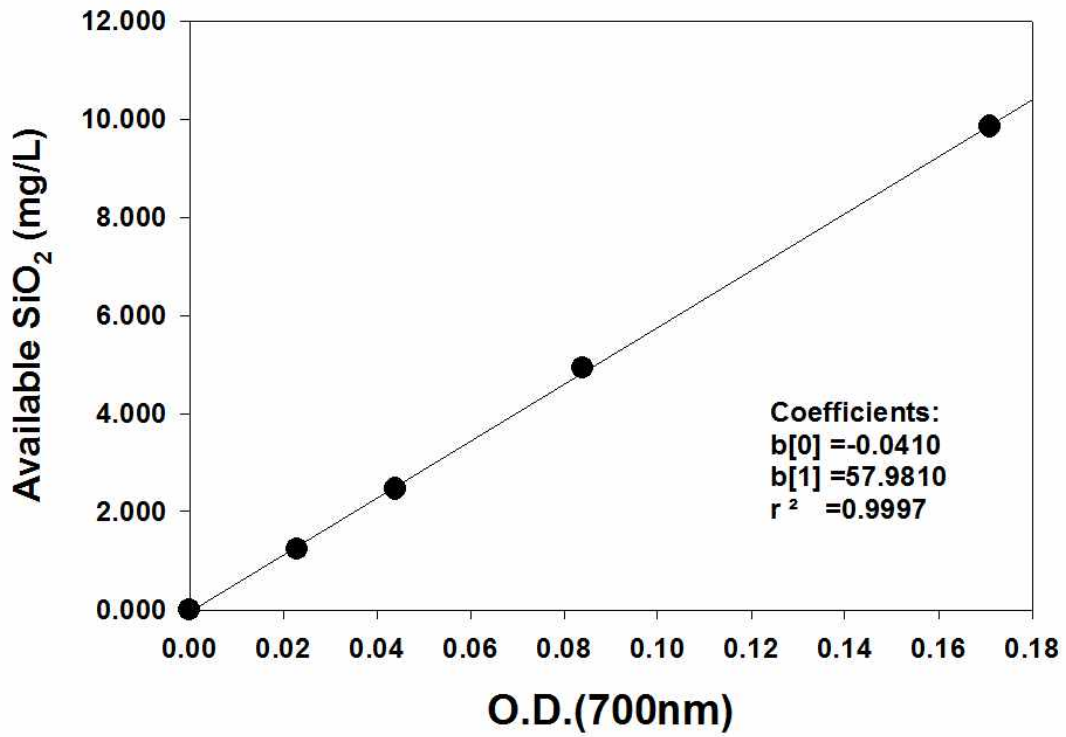


그림 3-1-32. 유효규산농도 계산을 위한 Calibration curve

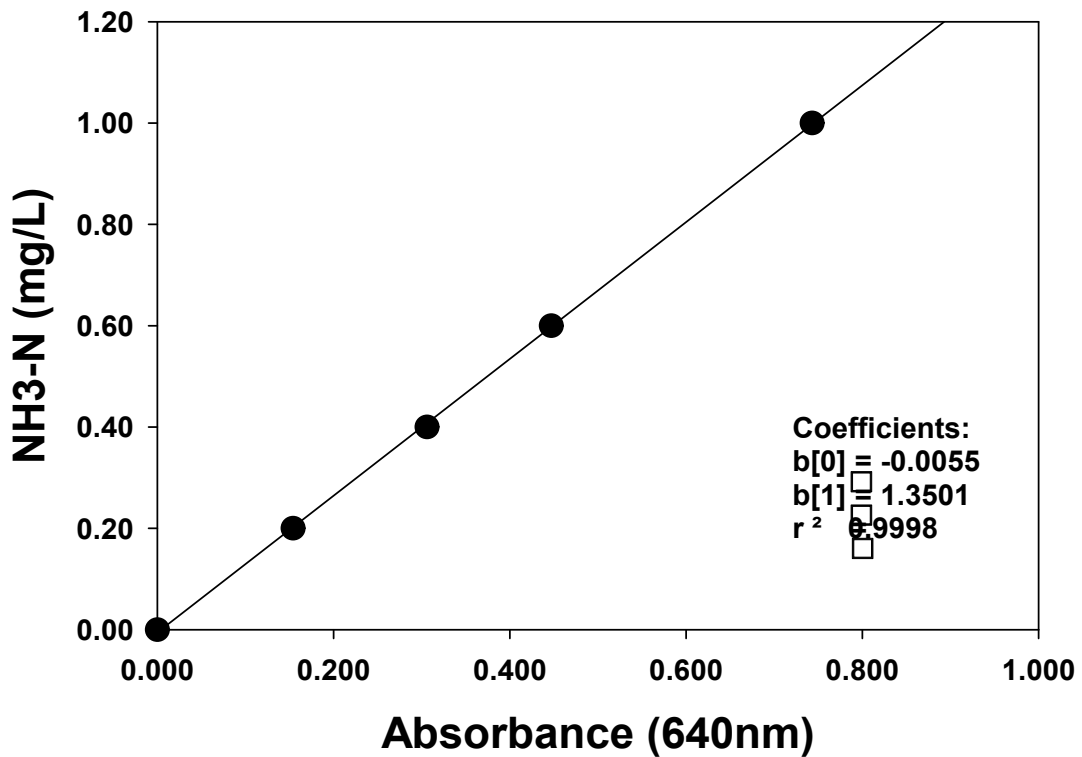


그림 3-1-33. 암모니아성 질소 계산을 위한 calibration curve

(나) 아질산성 질소 (NO₂-N)

- ① 시험관에 시료 5ml은 취한다
- ② 1번시약 7방울을 첨가한 후 부드럽게 흔들어준다
- ③ 10초 놓아둔 후 2번시약을 7방울 첨가한 후 부드럽게 흔들어준다
- ④ 색깔이 발생하도록 5분 기다린다.
- ⑤ 스펙트로포토미터용 튜브에 반응액 0.5ml 첨가하고 증류수 4.5ml 첨가하여 섞은후 540nm에서 OD 값을 읽는다 (증류수로 blank 실험).
- ⑥ 계산 : 아래 Calibration curve 식을 이용하여 계산한다 (그림 3-1-34).

$$\text{NO}_2\text{-N (mg/L)} = 3.1091 \times \text{O.D} + 0.0174$$

- ⑧ Calibration curve : 아질산나트륨을 시료로 농도별로 같은 분석실험을 수행하여 도출한다.

(다) 질산성 질소 (NO₃-N)

- ① 시험관에 시료 5ml은 취한다
- ② 1번시약 14방울을 첨가한 후 부드럽게 흔들어준다
- ③ 2번시약을 7방울 첨가한 후 부드럽게 흔들어준다
- ④ 파우더를 1스푼 첨가한 후 20초동안 강하게 흔들어준다
- ⑤ 3번시약을 7방울 첨가한 후 부드럽게 흔들어준다.
- ⑥ 색깔이 발생하도록 10분 기다린다.
- ⑦ 스펙트로포토미터용 튜브에 반응액 0.5ml 첨가하고 증류수 4.5ml 첨가하여 섞은후 410nm에서 OD 값을 읽는다
- ⑧ 계산 : 아래 Calibration curve 식을 이용하여 계산한다 (그림 3-1-35).

$$\text{NO}_3\text{-N (mg/L)} = 45.5835 \times \text{OD} + 2.0016$$

- ⑧ Calibration curve : 질산나트륨을 시료로 농도별로 같은 분석실험을 수행하여 도출한다.

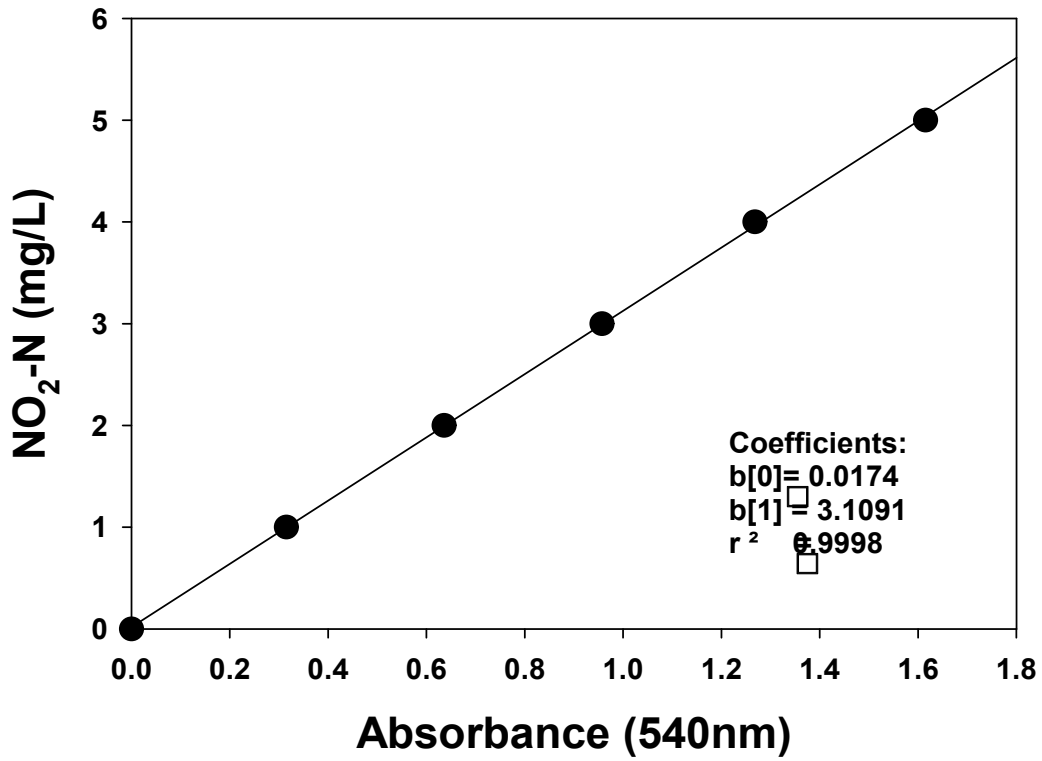


그림 3-1-34. 아질산성 질소 계산을 위한 calibration curve

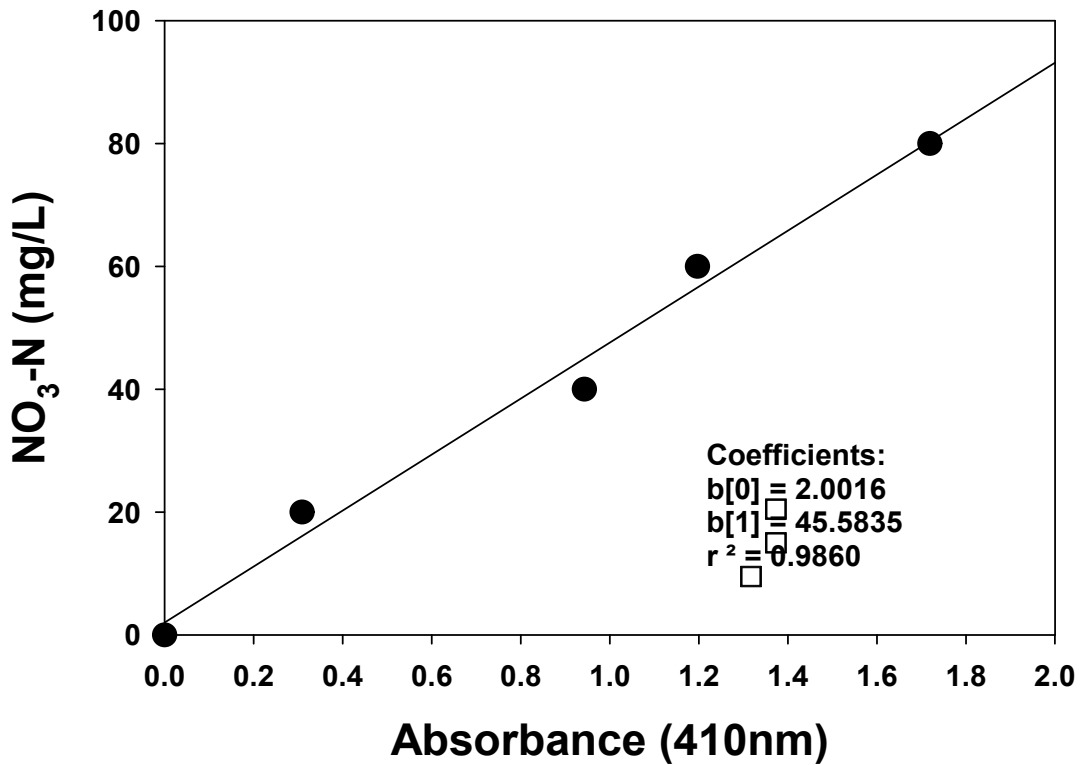


그림 3-1-35. 질산성질소 계산을 위한 Calibration curve.

(4) SS (Suspended Solid) 분석

- ① GF/C 필터 (Whatman, 지름 150mm)의 무게를 측정한다.
- ② GF/C 필터를 진공여과기에 장착후 사육수 500ml을 여과한다.
- ③ 여과시킨 GF/C 필터를 100℃ 에서 18시간 건조 시킨 후 데시케이터에서 냉각시킨다.
- ⑤ 냉각후 무게를 측정한다.
- ⑥ 계산

$$SS \text{ (mg/L)} = (\text{건조후 무게} - \text{건조전 무게}) / 0.5 \text{ L} \times 100$$

(5) 총인(Total phosphorous) 분석

(가) 시약

- ① 황산 (2+1)
증류수 100ml에 황산 200ml 첨가후 혼합한다
- ② 7.2% 아스코르빈산
7.2g 아스코르빈산을 증류수 90ml에 첨가하여 혼합 후 100ml로 맞춘다
- ③ 몰리브덴산암모늄 · 아스코르빈산 혼합액
증류수 300ml에 몰리브덴산암모늄 6g 과 주석산안티몬칼륨 0.24g 첨가후 황산(2+1) 120ml 첨가하고 술포민산암모늄 5g 첨가한후 증류수를 첨가하여 500ml로 맞춘다. 여기에 7.2% 아스코르빈산용액 100 ml을 혼합한다.

(나) 실험방법

- ① 시료 10ml을 튜브(50ml)에 넣고 과황산칼륨용액(4 w/v%) 2ml을 넣어 마개를 살짝 닫고(꼭 닫지 말 것) 오토클레이브 (121℃)에서 30분동안 가열 후 방냉한다.
(증류수로 blank 실험)
- ② 상기 시료액(12ml)에 몰리브덴산 · 아스코르빈산혼합액 2ml를 넣어 흔들어 섞은다음 40℃ 에서 30분간 방치한다.
- ③ 이용액의 일부를 흡수셀에 옮겨 시료용액으로 하고 blank액을 대조액으로 하여 880nm에서 흡광도를 측정한다.
- ④ 미리 작성한 검량선을 이용하여 총인의 양을 산출한다.

(다) 계산

아래 그림 3-1-36 의 Calibration Curve에 따라 아래와 같이 계산하였다.

$$TP \text{ (mg/L)} = 1.9622 \times \text{O.D.} - 0.0023$$

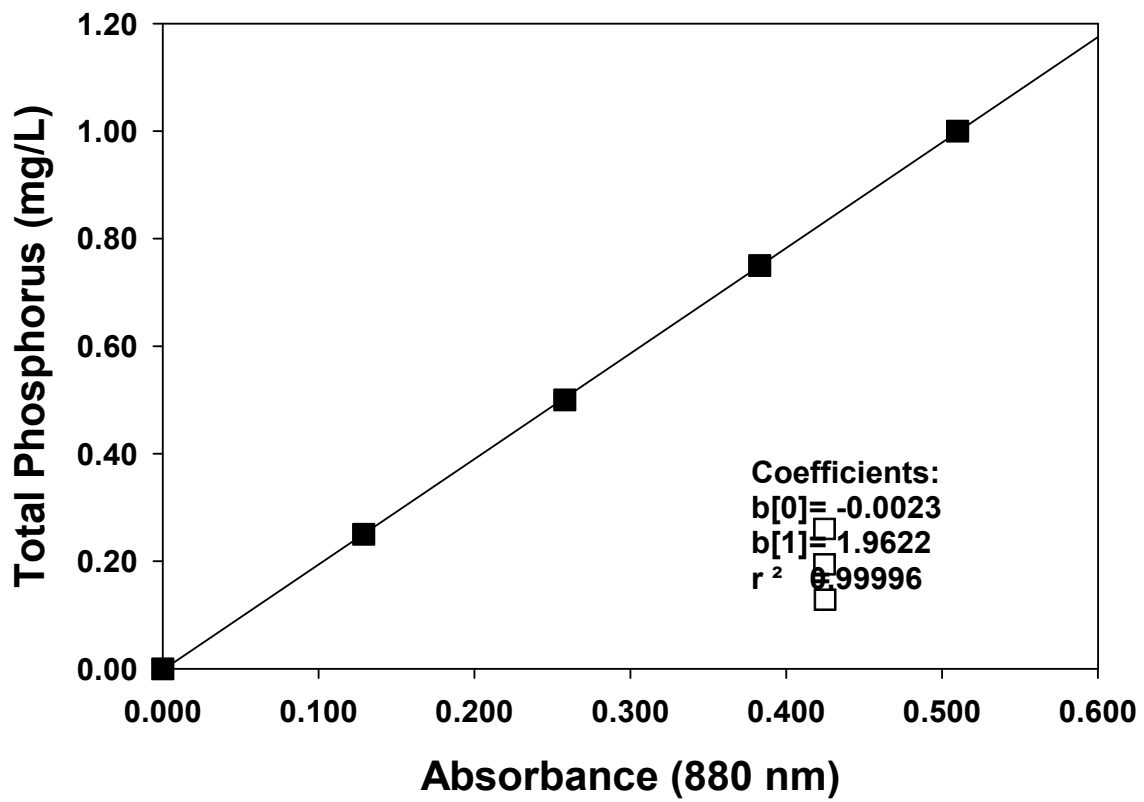


그림 3-1-36. 총인 농도 계산을 위한 Calibration curve

바. 황토가공소재 사료첨가가 뱀장어 성장에 미치는 영향

(1) 실험방법

실험어는 전라남도 영광에 소재한 양만장으로부터 구입한 치어기 뱀장어를 부경대학교 사료영양연구소로 운반하여 실험에 들어가기에 앞서 60L 수조에 4주간 기초사료를 주면서 예비사육하였다. 예비사육 후, 평균 어체중 $11.5 \pm 0.4\text{g}$ 인 치어기 뱀장어를 각 실험구별 20마리 씩 3반복으로 무작위 배치하여 12주간 사육실험을 진행 하였다. 각 수조 당 충분한 산소공급을 위해서 에어스톤을 설치하여 산소를 공급하였으며, 평균수온은 $28.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 사료공급은 1일 2회, 어체중의 1.5~2.0%로 공급하였다. 실험에 사용된 실험사료의 배합표는 표 3-1-8에 나타내었다. 실험사료의 단백질원으로는 어분, 카제인을 사용하였으며, 탄수화물원으로는 옥수수전분, 지질원으로는 어유와 대두유를 사용하였다. 실험사료는 조단백질 함량을 50%, 조지방 함량을 15%로 동일하게 제조 하였으며, 항생제 및 항생제 대체물질인 황토가공신소재의 첨가수준에 따라 총 6개 실험구 (CON, YL0.5, YL1.0, YL2.0, OTC, AMX ; CON:대조구, YL: 황토가공신소재(%), OTC:Oxytetracycline, AMX:Amoxicillin)로 제작 하였다. 모든 사료원을 골고루 섞은 뒤 펠렛 제조기로 압출 성형 하며, 실온에 이틀 건조 후 sieve를 이용해 입자크기를 고르게 한 후, 밀봉하여 -20°C 에 냉동 보관하여 사용하였다. 어체 측정은 실험 종료 후, 성장률을 측정하기 위하여 24시간 절식시킨 후 전체무게를 측정하여 증체율 (weight gain, %), 사료효율 (feed efficiency, %), 일간성장률 (specific growth rate, %/day), 단백질전환효율 (protein efficiency ratio), 생존율 (survival rate, %)을 조사 하였다. 상기 측정 항목들의 계산식은 다음과 같다.

Weight gain : $[(\text{final wt.} - \text{initial wt.}) / \text{initial wt.}] \times 100.$

Specific growth rate : $[(\text{loge final wt.} - \text{loge initial wt.}) / \text{days}] \times 100.$

Feed efficiency : $(\text{wet wt. gain} / \text{dry feed intake}) \times 100.$

Protein efficiency ratio : $\text{wet wt gain} / \text{protein intake}.$

Survival rate : $(\text{total fish} - \text{dead fish}) / \text{total fish} \times 100$

실험사료의 일반성분은 AOAC(Association of Official Analytical Chemists, 1995)방법으로 분석하였는데, 수분은 상압 가열 건조법으로, 조회분은 직접 회화법, 조단백질은 Kjeldahl 질소 정량법($N \times 6.25$), 조지방은 Soxtec system 1046 (Tacator AB, Sweden)을 사용하여 Soxhlet 추출법으로 각각 분석하였다. 결과는 표 3-9에 나타내었다. 면역학적 인자인 lysozyme 분석은 각각의 실험구별 어류에서 분리한 혈청 0.1 ml과 0.05M sodium phosphate buffer (pH 6.2)에 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml)를 부유시킨 suspension 2 ml과 혼합한다. 반응은 20°C 조건에서 분광 흡광도계의 흡광도 530 nm에서 0.5분과 4.5분 에 측정한다. lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소 양으로 정의한다. SOD의 활성 분석은 각각의 실험구별 어류에서 분리한 혈청으로 SOD Assay Kit (Sigma-Aldrich, 191600)을 사용하여 제조사의 지시를 따라 WST-1(Water Soluble Tetrazolium dye) 와 xanthine oxidase으로 효소의 저해율을 백분위로 계산한다. 각각의 샘플이 Incubator에 37°C 로 20분간 반응시켜 평행시간에 도달하였을 때, 450nm파장(WST-1과 활성산소가 반응하여 나타난 유색을 측정하기 위한 파장의 흡광도)에서 흡광도를 측정한다. 저해율은 mg protein당 SOD 활성 단위로 나타낸다. 모든 자료는

SAS Program 으로 ANOVA(analysis of variance) test를 실시하여 최소유의차검정 (LSD : Least Significant Difference)으로 평균간의 유의차 ($P < 0.05$)를 검정하였다.

표 3-1-8. 실험사료 조성 (% , 건물기준)

Ingredient	Diets					
	CON	YL0.5	YL1.0	YL2.0	OTC	AMX
Fish meal ¹	59	59	59	59	59	59
Casein	8	8	8	8	8	8
Corn starch	17	17	17	17	17	17
Soybean oil ²	7	7	7	7	7	7
Fish oil ³	3	3	3	3	3	3
Cellulose	2	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0
Yellow loess ⁴ (or OTC ⁵ ,AMX ⁶)	0	1.5	1.0	0	1.5	1.0
Vitamin mix ⁷	2	2	2	2	2	2
Mineral mix ⁸	2	2	2	2	2	2
Total	100	100	100	100	100	100

¹ Provided by Su-hyup Feed Co. Ltd., Uiryeong, Republic of Korea

² Provided by Cheiljedang Oil Co. Ltd., Seoul, Republic of Korea

³ Provided by E-Wha Oil Co. Ltd., Busan, Republic of Korea

⁴ Provided by Dongguk Univ,Seoul, Republic of Korea.

⁵ Provided by Samyang anipharm.

⁶ Provided by Unibiottech.

⁷ Contains (as mg kg⁻¹ in diets): Ascorbic acid, 300; DL-Calcium pantothenate, 150; Choline bitartrate,3000; Inositol, 150; Menadione, 6; Niacin, 150; Pyridoxine HCl, 15; Riboflavin, 30; Thiamine mononitrate,15; dl- α -Tocopherol acetate, 201; Retinyl acetate, 6; Biotin, 1.5; Folic acid, 5.4; B12, 0.06

⁸ Contains (as mg kg⁻¹ in diets): NaCl, 437.4; MgSO₄·7H₂O, 1379.8; NaH₂P₄·2H₂O, 877.8; Ca(H₂-PO₄)₂·2H₂O, 1366.7; KH₂PO₄, 2414; ZnSO₄·7H₂O, 226.4; Fe-Citrate, 299; Ca-lactate, 3004; MnSO₄, 0.016;FeSO₄, 0.0378; CuSO₄, 0.00033; Calcium iodate, 0.0006; MgO, 0.00135; NaSeO₃, 0.00025

표 3-1-9. 실험사료의 일반성분¹

	Diets					
	CON	YL0.5	YL1.0	YL2.0	OTC	AMX
수분(%)	6.58	6.82	6.65	6.85	6.69	6.67
회분(%)	10.2	10.5	10.9	11.5	10.3	10.4
조지방(%)	14.5	14.6	14.6	14.7	14.4	14.5
조단백(%)	49.9	49.6	49.4	49.7	49.5	49.9

¹Results reported on the dry matter basis, average of triplicate

(2) 실험결과

총 12주의 사육실험을 토대로 한 성장요인결과를 아래 표 3-1-10에 나타내었다. 증체율과 일간성장률에 있어서 YL2.0과 OTC 실험구는 CON과 YL0.5에 비해 유의적으로 높은 값을 나타냈으며 YL0.5, YL1.0과 AMX 실험구간 또는 YL1.0, YL2.0, OTC와 AMX 실험구 간에는 유의적인 차이가 없었다. 사료효율과 단백질전환효율의 경우 CON 실험구는 YL0.5, YL1.0, YL2.0, OTC와 AMX 실험구에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타냈으며 YL0.5, YL1.0, YL2.0, OTC와 AMX 실험구간에는 유의한 차이가 없었다. 생존율에 있어서 YL0.5, YL1.0, YL2.0, OTC와 AMX 실험구간에는 유의한 차이가 없었고 CON 실험구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다.

표 3-1-10. 실험사료에 의한 12주간 사육실험에서의 증체율(WG), 일간성장률(SGR), 사료효율(FE), 단백질전환효율(PER), 생존율(Survival)¹

	CON	YL0.5	YL1.0	YL2.0	OTC	AMX	Pooled SEM
WG(%)	108 ^c	120 ^b	125 ^{ab}	127 ^a	127 ^a	122 ^{ab}	1.74
SGR(%)	1.02 ^c	1.10 ^b	1.13 ^{ab}	1.14 ^a	1.14 ^a	1.11 ^{ab}	0.01
FE(%)	59.6 ^b	67.6 ^a	68.9 ^a	71.1 ^a	69.7 ^a	68.7 ^a	1.01
PER	1.23 ^b	1.33 ^a	1.35 ^a	1.37 ^a	1.37 ^a	1.36 ^a	0.01
Survival (%)	81.7 ^b	93.3 ^a	93.3 ^a	95.0 ^a	91.7 ^a	91.7 ^a	1.49

¹Values are means from triplicate groups of fish where the values in each row with different superscripts are significantly different (P<0.05)

면역인자인 Lysozyme activity의 경우 CON 실험구는 다른 모든 실험구에 비하여 유의하게 낮은 값을 나타냈다. YL2.0, OTC, AMX 실험구는 CON, YL0.5 실험구에 비하여 유의하게 높은 값을 나타내었지만 YL1.0 실험구와는 유의한 차이가 없었고 YL1.0 실험구는 YL0.5 실험구와도 유의한 차이가 없었다. SOD activity의 경우 CON 실험구가 YL0.5, YL1.0, YL2.0, OTC와 AMX 실험구보다 유의적으로 낮은 값을 나타냈으며 YL0.5, YL1.0, YL2.0, OTC와 AMX 실험구간에는 유의적인 차이가 없었다 (표 3-1-11).

표 3-1-11. 실험사료에 의한 12주간 사육실험 후, 면역학적 분석¹

	CON	YL0.5	YL1.0	YL2.0	OTC	AMX	Pooled SEM
Lysozyme(U/ml)	1.95 ^c	2.40 ^b	2.52 ^{ab}	2.65 ^a	2.66 ^a	2.58 ^a	0.06
SOD(% inhibition)	97.2 ^b	99.9 ^a	100 ^a	101 ^a	100 ^a	100 ^a	0.31

¹Values are means from triplicate groups of fish where the values in each row with different superscripts are significantly different (P<0.05)

뱀장어 양식장에서 주로 발생하는 것으로 보고되는 에드워드병의 원인균인 *E. tarda* 를 뱀장어 복강내에 주사하여 생존율의 변화를 비교분석하는 공격실험을 수행하였다. 치어기 뱀장어의 누적생존율을 조사한 결과 그림 3-1-37에 나타난 것처럼 CON 실험구에서는 복강주사 2일 후부터 폐사개체가 나타나기 시작하였고, 4일째부터 모든 YL과 항생제 실험구보다 유의적으로 낮은 값을 나타냈으며 7일째에는 YL1.0, YL2.0과 OTC 실험구보다 유의적으로 낮은 값을 나타내었고 10일 후에 모든 실험어가 폐사하였다. 실험 12일째부터 모든 실험구간에서 유의적인 차이가 없었다.

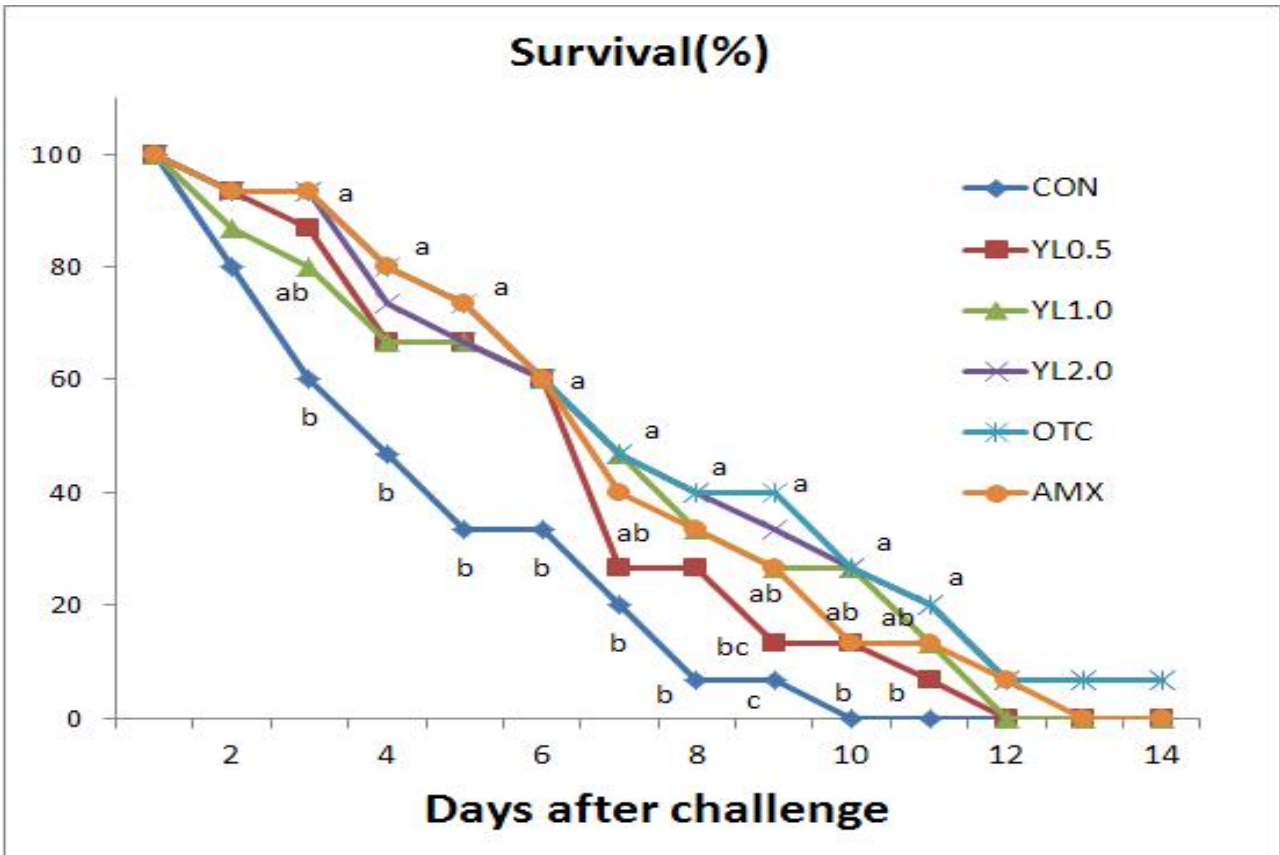


그림 3-1-37. *E. tarda* 균의 복강 내 접종 후 뱀장어의 누적생존율 조사

제 2 절 황토가공신소재 비료 기능성 평가 및 농작물 적용 기술 개발

1. 황토가공신소재 처리가 각 작물의 생육에 미치는 영향

가. 연구목적

본 연구에 적합한 작물을 선정하기 위하여 황토가공신소재를 처리하여 작물 별 생육을 조사하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 시험장소

본 연구는 경기도 일산시 식사동에 위치한 동국대학교 바이오생태자원 농장 온실과 노지, 경기도 남양주시 조안면 진중리에 위치한 동국대학교 학술림에서 실시하였다.

(2) 공시재료 및 생육조건

배추(불암3호, 흥농씨앗)는 포트에 파종하여 식재하였으며, 무(청운, 흥농씨앗)는 직파하였다. 오이, 토마토, 수박, 참외, 딸기, 상추는 모종식재 하였다. 화학비료는 사용하지 않았으며, 황토가공신소재(고형분 25%, pH 7~8)는 100평당 0.5 kg을 사용하였다. 파종 전 시비처리로 황토가공신소재 5 kg을 살포하였으며, 한 달 간격으로 황토가공신소재를 추가적으로 처리하여 황토가공신소재의 처리 횟수에 따른 식물체의 신장(cm), 근장(cm), 둘레(mm), 엽수(장), 무게(kg) 등을 조사하였다.

① 바이오생태자원 농장 내에 시설 재배

배추는 2013년 2월 25일 포트에 파종하여 유식물체를 생산하였으며, 1개월 후 정식식재 하였고, 무는 직파하였으며 상추와 방울토마토는 모종 식재하였다. 모종 식재 3주 후 1차 황토가공신소재 처리를 하였으며, 식재 6주 후 2차 황토가공신소재 처리를 하였다. 정식 식재 7주 후 방울토마토를 제외한 배추, 무, 상추를 수확하였으며 방울토마토는 식재 4개월 후 2차례에 걸쳐 수확하였다(표 3-2-1).

표 3-2-1. 바이오생태자원 농장 온실 내 각 작물별 황토가공신소재 실험 계획

	2월 25일	3월 27일	4월 10일	5월 8일	5월 24일	5월 30일
배추	포트파종	정식식재	황토가공 신소재 1차처리	황토가공 신소재 2차처리	황토가공 신소재 2차처리	수확
무		직파				
상추		모종 정식식재				
방울토마토		모종 정식식재				7월 25일/29일 수확

② 농장옥외

농장옥외에는 토마토와 오이, 참외, 수박을 모종식재 하였으며, 5월 24일 황토가공신소재 처리 하였다. 6월 28일 토마토와 오이에는 황토가공신소재 2차 처리를 하여 7월 2번에 걸쳐 수확하였으나 참외와 수박은 장마로 인하여 식물체의 소실로 실험 진행에 어려움을 보였다(표 3-2-2).

표 3-2-2. 바이오생태자원 농장 내 작물별 황토가공신소재 처리 노지 재배 계획

	5월 8일	5월 24일	7월 25일/29일
토마토	모종준비 및 정식 식재	황토가공신소재 1차 처리	수확
오이			
참외			-
수박			

③ 학슬림

학슬림에서는 배추는 모종식재, 무는 직파하였으며, 파종 3주 후 황토가공신소재 1차 처리하였고 파종 6주 후 황토가공신소재 2차 처리, 파종 9주 후 3차 처리를 실시한 후 파종 10주차에 모든 식물체를 수확하였다(표 3-2-3).

표 3-2-3. 학슬림 내에 무/배추 황토가공신소재 실험 계획

	3월 25일	4월 18일	5월 22일	6월 6일	6월 13일
배추	모종 식재	황토가공신소재	황토가공신소재	황토가공신소재	수확
무	직파	1차 처리	2차 처리	3차 처리	

다. 결과 및 고찰

(1) 황토가공신소재 처리에 따른 무의 생육 조사

황토가공신소재 처리에 따른 무의 생육 특징을 조사한 결과, 무의 뿌리부터 줄기까지의 총 길이가 생황토 처리에서 다른 처리구에 비해 84 cm로 가장 생육이 왕성하였으며, 무처리, 황토가공신소재 3차 처리, 황토가공신소재 2차 처리, 황토가공신소재 순으로 발달하였다. 무의 직경은 황토가공신소재 2차 처리에서 91 mm로 가장 발달하였으며, 동일한 조건에서 무의 지상부 및 지하부 무게가 가장 발달한 것을 확인하였다(표 3-2-4, 그림 3-2-1). 이에 따라 무 재배 시 황토가공신소재를 2차 처리함으로써 무의 생육을 촉진시키는 것으로 판단된다.

표 3-2-4. 황토가공신소재와 생황토 처리가 무의 생육에 미치는 영향

처리구	길이(cm)			직경 (mm)	무 계 (kg)	
	지상부	지하부	총길이		지상부(T)	지하부(R)
무처리	52.06	31.50	83.56	82.21	0.83	0.60
생황토	53.24	30.80	84.04	85.06	0.89	0.57
황토가공신소재	46.20	24.40	70.6	82.30	0.67	0.47
황토가공신소재 2차	48.40	28.90	77.3	91.76	1.08	0.60
황토가공신소재 3차	50.30	32.10	82.4	90.26	0.97	0.59

무처리 생황토 황토가공신소재 황토가공신소재 2차 황토가공신소재 3차



그림 3-2-1. 황토가공신소재 처리에 따른 무의 생육

(2) 황토가공신소재 처리에 따른 배추의 생육 조사

황토가공신소재를 횡수에 따라 달리 처리하여 배추의 생육 특징을 조사하였다. 엽장의 크기는 황토가공신소재 2차 처리구가 31.43 cm으로 가장 높게 나타났고, 생황토 처리구 29.87 cm, 황토가공신소재 3차 처리구에서는 29.83 cm, 황토가공신소재 1차 처리구는 29.08 cm, 무처리구 순으로 나타났다. 엽폭은 황토가공신소재 2차 처리구가 19.77 cm로 가장 높게 나타났고, 다음으로 생황토(18.37 cm), 무처리구(18.00 cm), 황토가공신소재 3차 처리구(17.83 cm), 황토가공신소재 1차 처리구 순으로 나타났다. 엽경과 무게에서도 황토가공신소재 처리구가 가장 높은 수치를 나타냈다. 또한 본 실험을 통해 배추의 무름 정도에 대한 차이를 확인하였다. 무처리구의 모든 식물체에서 무름의 피해가 발생하였으나, 황토가공신소재를 처리함으로써 무름의 피해를 낮출 수 있었다(그림 3-2-2). 또한 황토가공신소재 2차 처리구에서 가장 낮은 무름의 피해를 확인할 수 있었다(표 3-2-5, 그림 3-2-3). 따라서 추후 황토가공신소재 처리에 따른 배추의 무름병 저항성에 관한 정량적 연구가 필요한 것으로 판단된다. 이는 질소와 칼슘을 함께 처리할 때 무처리보다 무름의 발병이 적게 나타나며, 여러 식물에서 칼슘의 농도가 높을수록 내병성을 향상시킨다는 연구 결과가 보고된 바 있다[48]. 배추의 칼슘처리는 지상부에 비해 지하부의 생육을 촉진시키며 엽육 세포벽을 두껍고 조직을 치밀하게 만들어 수확 시 품질이 우수하고 무름병에 대한 저항성을

높일 수 있다. 따라서 황토가공신소재를 배추에 처리할 경우 고농도의 칼슘을 식물체가 흡수하도록 돕는 것으로 사료된다. 또한 규산질 비료의 사용은 pH상승 및 유기물질의 분해를 촉진하여 토양의 양분 공급력을 높이고, 식물체 질소 흡수량을 감소시킨 반면 규산 흡수량을 증가시킬 수 있다고 판단된다.

표 3-2-5. 황토가공신소재와 생황토 처리가 배추 생육과 무름병에 미치는 영향

처리구	엽장	엽폭	엽경 (mm)	무게 (kg)	무름 피해도(%)
	(cm)				
무처리	22.90	18.00	7.75	2.53	100.00
생황토	29.87	18.37	8.63	3.07	40.58
황토가공신소재	29.08	16.46	8.23	3.16	21.05
황토가공신소재 2차	31.43	19.77	9.76	2.99	5.88
황토가공신소재 3차	29.83	17.83	8.62	2.84	16.67

무처리

생황토

황토가공신소재

황토가공신소재
2차

황토가공신소재
3차



그림 3-2-2. 황토가공신소재와 생황토 처리에 따른 배추의 생육 상태



그림 3-2-3. 배추에 발병된 무름병

학술림에서 실시한 연구에서는 근장을 제외하고 농장에서 실시한 생육조사보다 생육이 발달하였다. 엽수의 경우 무처리구 보다 평균 10장 이상이 많은 것으로 측정되었다. 무게 또한 600 g 정도의 차이를 보였다(표 3-2-6).

농장과 학술림 모두 황토가공신소재 처리구가 가장 생육이 좋은 것으로 평가되며, 무름병 병원균에 노출된 정도가 낮아 고온과 장맛비에 노출된 여름 배추의 상품성에도 영향을 미치는 것으로 판단된다.

표 3-2-6. 황토가공신소재와 생황토 처리가 배추의 생육에 미치는 영향(운길산 학술림)

처리구	엽장	엽폭	근장	근경	엽수(장)	무게(g)
	(cm)					
무처리	8.183	5.000	16.33	1.97	50.33	1073.33
생황토	7.317	4.567	18.83	2.27	53.67	1354.57
황토가공신소재	8.617	5.583	16.00	2.50	60.33	1683.00

(3) 황토가공신소재 처리에 따른 상추의 생육 조사

황토가공신소재처리에 따른 상추의 생육조사는 엽수와 엽무게에 비중을 두어 조사하였다. 배추와 마찬가지로 황토가공신소재처리한 상추에서 엽수 38.67개, 무게 1286g 으로 높은 수치를 나타내었다(표 3-2-7, 그림 3-2-4).

표 3-2-7. 황토가공신소재와 생황토 처리가 상추의 생육에 미치는 영향

처리	엽수(개)	무게(g)
무처리	34.33	998
생황토	35.00	1144
황토가공신소재	38.67	1286



그림 3-2-4. 황토가공신소재와 생황토 처리가 상추의 생육에 미치는 영향

(4) 황토가공신소재 처리에 따른 토마토의 생육 조사

토마토는 2회에 걸쳐 수확하였으며, 정량적으로는 황토가공신소재 처리가 열매 무게와 둘레에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 무처리구의 무게는 183.49 g이고 황토가공신소재 처리구는 239.46 g으로 두 처리구의 토마토 무게의 차이가 55.97 g정도 났으며, 2차 수확한 무게도 68.66 g의 차이가 있었다. 무처리구 토마토의 둘레는 1차와 2차 수확 때 각각 5.93 cm, 7.39 cm로 측정되었으며, 황토가공신소재 처리구는 6.51 cm (2.8%)와 8.23 cm (11.4%)로 그보다 증가하는 값을 나타내었다. 병해충에 대한 피해도를 정성적으로 조사한 결과 황토가공신소재 처리구가 무처리구보다 진딧물의 피해를 덜 받았으며, 토마토 과실이 무르지 않음을 알 수 있었다. 또한 1차 수확 시 토마토 식물체의 신장을 측정한 결과 황토가공신소재를 처리한 것이 1.41 cm로 가장 높게 나타났다(표 3-2-8, 그림 3-2-5).

이는 토마토의 경우 개화기까지 규소의 영향을 받지 않으나, 개화기이후 규소가 부족하면 잎의 발생이 비정상적이고 수분작용에 지장이 초래되며, 심하면 결실이 불량해지는 것으로 보고하였다[44]. 또한 규산은 작물의 생육과 수량을 증가시키는 작용을 하고, 잎의 빛 흡수를 도와 광합성 효율이 높아지며 도복현상과 병해충에 대한 피해를 예방할 수 있다고 보고 한 바 있다[38].

표 3-2-8. 황토가공신소재와 생황토 처리가 토마토의 생육에 미치는 영향

	처리구	열매무게(g)	열매길이(cm)	열매둘레(cm)	신장(m)
1차 수확 (7/25)	무처리구	183.49	4.52	5.93	1.27
	생황토	206.42	4.98	5.99	1.27
	황토가공신소재	239.46	4.76	6.51	1.41
2차 수확 (7/29)	무처리구	211.04	6.60	7.39	-
	생황토	197.66	6.74	7.97	
	황토가공신소재	279.70	6.19	8.23	

무처리



생황토



황토가공신소재



그림 3-2-5. 황토가공신소재와 생황토 처리가 토마토의 생육에 미치는 영향

(5) 황토가공신소재 처리에 따른 오이의 생육 조사

오이에서 1, 2차 수확 시 다른 작물과 마찬가지로 열매 무게가 황토가공신소재 처리구에서 증가 하였다. 1차 수확에서 과실의 평균 무게는 523.60 g이었고, 2차 수확에서는 543 g으로 가장 높게 나타났다. 오이 둘레의 경우 1차 수확 시 무처리구에서 3.09 cm로 가장 높았으나 2차 수확에서 황토가공신소재 처리구가 4.92 cm로 가장 높게 나타남을 알 수 있었다. 또한 1차 수확 시 황토가공신소재를 처리한 오이의 식물체 높이는 무처리구에 비해 0.6 m 이상 차이 남을 알 수 있었다(표 3-2-9). 오이에서 가장 눈에 띄는 차이는 같은 시기에 수확한 무처리구와 생황토 처리구의 경우 과실의 구부러짐이 심했으며, 황토가공신소재처리구보다 노란색으로 변하는 속도가 빠름을 알 수 있었다(그림 3-2-6). 이는 황토가공신소재처리가 오이의 노화에 관여할 것으로 추정할 수 있다. 또한 토마토에서와 마찬가지로 병해충에 저항성을 가지는 것을 알 수 있었다. 오이, 머스크멜론, 주키니호박과 같은 박과식물 재배 시 규소를 배양액에 첨가하거나 엽면 살포할 경우 흰가루병을 방제하는데 효과적이었으며[45], 오이, 멜론등과 같은 채소작물이나 밀, 벼 등에서 병충해에 대한 저항성을 높인다고 보고한 바 있다[44]

표 3-2-9. 황토가공신소재와 생황토 처리가 오이의 생육에 미치는 영향

	처리구	열매			높이(m)
		무게(g)	길이(cm)	둘레(cm)	
1차 수확 (7/25)	무처리	516.80	31.00	3.09	1.76
	생황토	449.40	33.00	2.85	0.73
	황토가공신소재	523.60	33.80	2.94	1.15
2차 수확 (7/29)	무처리	452.40	30.60	4.58	-
	생황토	391.20	28.80	4.40	
	황토가공신소재	543.00	33.70	4.92	

무처리

생황토

황토가공신소재



그림 3-2-6. 황토가공신소재와 생황토 처리가 오이의 생육에 미치는 영향

(6) 황토가공신소재 처리에 따른 방울토마토의 생육 조사

방울토마토는 열매길이, 무게, 둘레에서 모두 높은 수치를 나타냈다. 특히 과실 무게는 28.65 g으로 무처리구보다 9.11 g 높았으며, 과실 둘레는 무처리구보다 19.03 g 높은 46.24 g으로 확인한 차이를 나타냈다(표 3-2-10, 그림 3-2-7).

표 3-2-10. 황토가공신소재와 생황토 처리가 방울토마토의 생육에 미치는 영향

처리구	열매		
	길이(cm)	무게(g)	둘레(mm)
무처리	3.84	19.15	27.21
생황토	3.66	17.46	25.96
황토가공신소재	4.78	28.65	46.24

무처리

생황토

황토가공신소재



그림 3-2-7. 황토가공신소재와 생황토 처리가 방울토마토의 생육에 미치는 영향

2. 황토가공신소재 처리가 토양에 미치는 영향

가. 연구목적

황토가공신소재 처리가 배추, 무, 상추의 토양에 미치는 영향을 알아보기로 본 실험을 실시하였다.

나. 재료 및 방법

토양의 이화학적 분석은 pH 분석 등 11종과 중금속 분석으로 토양오염 공정시험법, 국립농업과학원 토양화학분석법에 의거하여 시험 분석하였다(표 3-2-11).

표 3-2-11. 토양의 이화학적 분석 방법

	분 석 항 목	분 석 방 법	비 고
1	수소이온농도(pH)	1:5 DW 법	토양오염공정시험법
2	전기전도도(EC)	1:5 DW 법	토양오염공정시험법
3	총 유기물함량(OM)	Walkley-Black 법	국립농업과학원 토양화학분석법
4	총 질소(TN)	Kjeldahl 증류법	국립농업과학원 토양화학분석법
5	총 인(TP)	아스코빅산 법	국립농업과학원 토양화학분석법
6	무기태 질소(Ex-N) (NH ₄ ⁺ +NO ₃ ⁻ +NO ₂ ⁻)	KCl 침출-발색적정	국립농업과학원 토양화학분석법
7	유효인산(Av.P, P ₂ O ₅)	Bray No.1 법	국립농업과학원 토양화학분석법
8	치환성 양이온 (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺)	Ammonium acetate 침출법	국립농업과학원 토양화학분석법
9	중금속 분석	전함량 분석	토양오염공정시험법

(1) 수소이온농도(pH)

풍건토 10 g을 100 mL 비커에 취하여 증류수 50 mL를 가하고 30분간 Shaking 후 pH meter (Thermo orion, USA) 보정을 위한 buffer 용액은 pH 4.01과 7.01를 사용하였으며, 보정 후 깨끗하게 씻은 초자 및 표준적극을 넣고 60초 이내에 측정하였다.

(2) 전기전도도(EC)

풍건토 10 g을 100 mL 비커에 취하여 증류수 50 mL를 가하고 30분간 Shaking 후 0.01M KCl를 사용하여 Calibration한 EC meter(Thermo orion, USA)를 사용하여 측정하였다.

(3) 총 유기물 함량(OM)

총 유기물 함량분석은 Walkley-Black 법을 사용하였으며, 풍건토양 1 g을 유기물 flask에 담고, 10 mL의 1 N 중크롬산칼륨(K₂Cr₂O₇) 용액을 가하고 토양이 기벽에 묻지 않도록 천천히 흔들어 주었다. conc. H₂SO₄ 20 mL을 넣고 천천히 흔들어 주었으며 10분 후 증류수 100 mL를 가하고

균일하게 서서히 혼든 후 여과지(Whatman No. 2)를 이용하여 여과하였다. 표준시료는 이미 유기물함량을 알고 있는 토양의 양을 달리하거나 Glucose의 양을 달리하여 Standard로 측정하였으며(표 3-2-12), UV/Vis Spectrophotometer (Shimadzu, JAPAN)로 파장 610 nm에서 비색정량하였다.

표 3-2-12. 표준 제조 방법

D-Glucose	12.5 mg	25 mg	37.5 mg	50 mg
Carbon	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg

(4) 총 질소(Total Kjeldahl Nitrogen)

conc. H₂SO₄(비중=1.84), 45 % NaOH, 2 % 붕산용액, 혼합지시약, 황산표준용액을 준비하였다. 총 질소 함량 측정은 전처리 후 Tube를 block digester(VELP, Germany)에 넣은 후 처음 30 분간은 150°C 정도에서 가열하였으며, 300 °C까지 점차 온도를 증가시켜 용액이 무색이 될 때까지 분해하였다. 분해 후 냉각시켜 적당량의 증류수로 희석시킨 후 No. 42 여과지로 여과한 후 100 mL로 표선에 맞추었으며, 분해액 25 mL를 Kjeldahl flask에 넣고, 50 mL Erlenmeyer flask에 2% Boric acid 20 mL, 45% NaOH 50 mL를 가하여 산성을 alkali화하여 수기로 약 75 mL 정도 증류하였다.

(5) 총 인(TP)

총 인산 함량 측정을 위한 시약 준비는 perchloric acid 70%와 질산을 준비하였다. Ascorbic acid 인산발색시약 제조를 위해 ammonium paramolybdate 용액(250 mL의 증류수에 12 g의 ammonium paramolybdate[(NH₄)₆Mo₇O₂₄]를 녹이고 100 mL의 증류수에 0.2908 g의 potassium antimony tartarate(KSbO₃.C₄H₄O₆)을 녹인 후 5 N 황산(H₂SO₄)용액 1,000 mL에 위의 두 용액을 부어 넣고 증류수로 2,000 mL가 되도록 눈금을 맞추고 잘 혼합하였다. Ascorbic acid 용액, 인(P) 표준용액(50 ppm)은 KH₂PO₄ 0.2197 g을 증류수에 용해시킨 후 25 mL의 3.5 M H₂SO₄를 추가하여 증류수로 1 L를 맞춰 용액을 준비하였다.

총 인산 함량 측정을 위하여 풍건토(< 0.5 mm) 2 g을 30 mL의 HClO₄를 가한 후 130 °C에서 유기물이 제거될 때 까지 가열 후 200°C에서 20분간 가열하면 flask 밑에 백사상의 침강물(규산)과 푸른 황색의 상징액 등을 확인하였다. 계속해서 10 분 정도 분해를 더 하면 분해가 완전히 종료되었으며 냉각 후 증류수 250mL를 가하여 삼각 flask 내의 침강물을 잘 흔들어 여과하였다. pH 조절 후 파장 720nm 또는 840~880nm범위에서 흡광도(Shimadzu, JAPAN)를 측정하였다.

(6) 무기태 질소 (Ex-N)

무기태 질소 측정을 위한 시약 준비는 2 N-KCl, 질소 측정과 동일하고 NaOH는 사용하지 않았다. 풍건토 5 g을 삼각플라스크에 취하고 2 N-KCl 50 mL 가하고, 30 분간 Shaking 후 Whatman No. 2 여과지로 여과하였다. 100 mL 삼각플라스크에 2% Boric acid 10 mL를 넣은 후 여액 25 mL를 Kjeldahl flask에 넣고 MgO 0.2 g을 가하여 증류하고, NH₄⁺-N를 다 받으면 Devarda's Alloy 0.2 g을 가하여 증류하여 황산표준액 0.005 N H₂SO₄로 적정 하였다.

(7) 유효 인산 (Bray No.1)

시약준비는 1N NH₄F 15 mL + 0.5 N HCl 25 mL + 460 mL DW 침출액과 인산 발색시약(총인 시약제조 동일)을 제조하였다. 유효 인산 측정을 위해 풍건세토 2 g을 취하고 침출액 14 mL 용액을 가하고 실온에서 상하회전식 진탕기로 1시간 진탕한 뒤 여과(No. 42)하여 Ascorbic acid method(총인 분석법과 동일)로 정량하였다.

(8) 치환성 양이온(Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺)

치환성 양이온 측정을 위한 시약은 1N-NH₄OAc(pH 7.0) : 77.08 g CH₃COONH₄를 증류수에 녹여 1 L로 표선하고 용액의 pH는 NH₄OH나 CH₃COOH로 7.0에 맞추어 제조 하였다. 풍건토 5 g을 100 mL 삼각플라스크에 취하고 1N-NH₄OAc(pH 7.0) 용액 50 mL를 가하였으며, 30분 동안 Shaking한 여과지로 여과(No. 42)하여 ICP-OES(Varian, USA)로 측정하였다.

(9) 중금속 분석

중금속 분석을 위한 시약은 HCl, HNO₃을 준비하였다. 중금속 분석은 풍건토 0.5 g (0.15 mm)에 왕수 HCl:HNO₃=3:1을 가한 후 70도에서 1시간동안 분해한 후 증류수를 넣어 여과를 위해 Whatman No. 42에 여과하였다. 이후 ICP-OES(Varian, USA)로 측정하였으며 각 중금속별 ICP-OES 분석 파장은 토양오염 공정시험방법에 준하여 측정하였다.

다. 결과 및 고찰

치환성 양이온 중에는 칼슘의 양이 시설재배 작물별(배추, 무, 상추) 적정범위에 비해 다소 높게 측정되었으며, 유효인산의 경우는 토양관리 적정 범위보다 낮아 인산관리가 필요할 것으로 사료 된다(표 3-2-13). 작물의 생육시기별 질소, 인, 칼리의 양분 흡수양상으로 조사하였으며, 그 결과 배추는 무와 상추에 비해 토양 내 존재하는 무기성분(질소, 인산, 칼리)의 흡수량이 높은 것으로 측정되었다. 따라서 재배 작물의 처리구별 성장량과 작물별에 따라 토양 내 존재하는 식물 이용 가능한 양분 형태인 무기태 질소(NH₄⁺+NO₃⁻+NO₂⁻)와 유효인산(P₂O₅)의 흡수량에도 차이가 있을 것으로 예상된다.

표 3-2-13. 경기도 고양시 일산동구 식사동 지역 작물 경영 시설 적정 토양 (soil.rda.go.kr)

	pH (1:5)	EC (μ S cm ⁻¹)	OM (%)	유효인산 (mg kg ⁻¹)	exchangeable cations (cmol+/kg)		
					K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
배추	6.0~6.5	0.0~2000	2.5~3.5	350~450	0.65~0.8	5.0~6.0	1.5~2.0
무	6.0~6.5	0.0~2000	2.0~3.0	350~450	0.6~0.7	5.0~6.0	1.5~2.0
상추	6.5~7.0	0.0~2000	2.0~3.0	250~400	0.4~0.6	6.0~7.0	2.0~2.5

황토가공신소재를 처리한 배추의 경우, 토양 내 무기태 질소와 유효인산 함량은 무처리구에 비해 낮은 함량으로 존재하는 것으로 나타났다(표 3-2-14, 그림 3-2-8). 황토가공신소재 처리는 배추의 성장에 긍정적인 영향을 미치게 되어 양분요구가 증가하게 됨에 따라 토양 내 존재하는 식물이 이용 할 수 있는 성분의 함량이 낮게 측정된 것으로 예상된다.

표 3-2-14. 황토가공신소재와 생황토 처리한 배추 재배 토양의 화학적 분석 결과(일산 농장)

	pH	EC	OM	TN	ex-N	TP	Av. P	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
	1:5	$\mu\text{S cm}^{-1}$	%	mg kg^{-1}				$\text{cmol+}/\text{kg}$			
무처리	7.4	1215	2.8	5498	640.9	291.1	238.4	0.5	0.7	12.4	1.6
생황토	7.1	1128	2.8	2395	738.5	405.9	174.7	0.4	0.9	14.9	2.1
황토가공신소재 1회	7.1	795	2.1	5278	427.0	326.4	179.1	0.3	0.6	9.1	1.7
황토가공신소재 2회	7.1	870	2.8	5187	465.5	351.3	157.3	0.3	0.6	13.9	1.7
황토가공신소재 모자	7.0	1004	2.8	3633	507.5	332.4	181.4	0.3	0.6	9.9	1.6

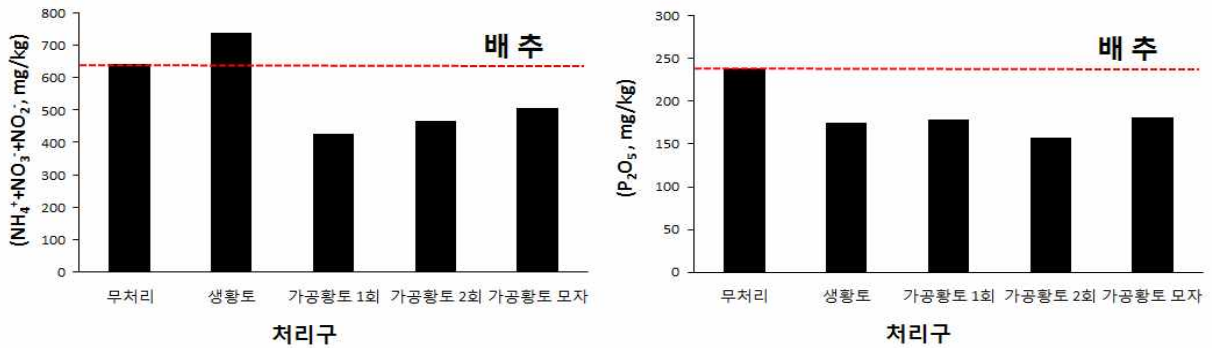


그림 3-2-8. 배추의 처리구별 토양내 무기태 질소(NH₄⁺+NO₃⁻+NO₂⁻)와 인(P₂O₅) 함량

황토가공신소재를 처리한 무와 상추의 경우, 무처리 토양의 무기태 질소와 유효인산의 함량이 무처리구 보다 증가한 것으로 나타났다(표 3-2-15~16, 그림 3-2-9~10).

표 3-2-15. 황토가공신소재와 생황토 처리한 무 토양의 화학적 특성

	pH	EC	OM	TN	ex-N	TP	Av. P	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
	1:5	$\mu\text{S cm}^{-1}$	%	mg kg^{-1}				$\text{cmol+}/\text{kg}$			
무처리	7.1	814	2.9	3736	290.9	389.5	194.4	0.4	0.6	11.2	1.7
생황토	7.4	471	2.1	3788	132.2	387.3	196.7	0.4	0.5	11.1	1.6
황토가공신소재 1회	7.0	2012	2.8	3064	738.9	319.4	214.3	0.7	0.9	12.2	2.1
황토가공신소재 2회	6.8	1399	2.2	2926	766.9	319.7	181.4	0.5	1.0	9.1	2.1
황토가공신소재 모 자	7.3	1209	2.9	3126	714.0	240.9	216.4	0.6	0.8	12.5	1.7

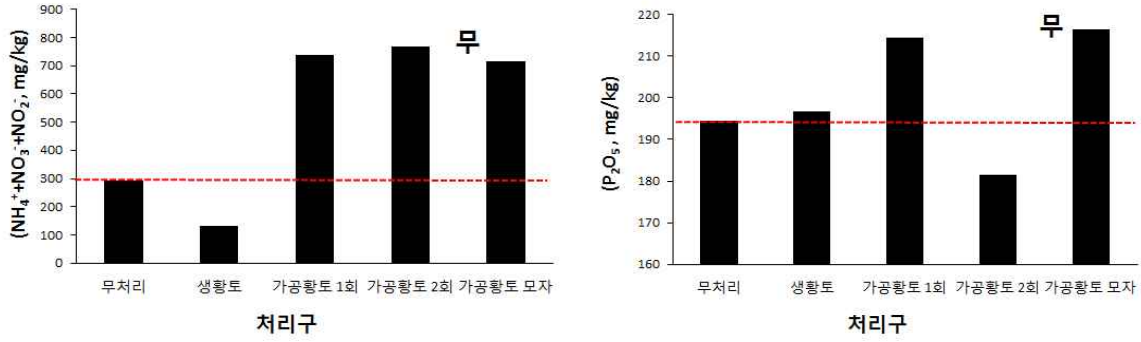


그림 3-2-9. 무의 처리구별 토양내 무기태 질소(NH₄⁺+NO₃⁻+NO₂⁻)와 인(P₂O₅) 함량

표 3-2-16. 황토가공신소재와 생황토 처리한 상추 토양의 화학적 특성

처리구 \ 분석항목	pH	EC	OM	TN	ex-N	TP	Av. P	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
	1:5	μS cm ⁻¹	%	mg · kg ⁻¹			cmol+/kg				
무처리	7.4	1809	2.8	5331	995.6	292.5	181.4	0.8	0.9	26.5	1.6
생황토	7.3	1339	2.4	6255	701.6	282.3	155.0	0.5	0.7	13.0	1.5
황토가공신소재	6.8	2316	2.4	7033	1485.6	331.6	321.7	0.8	1.8	11.5	2.6

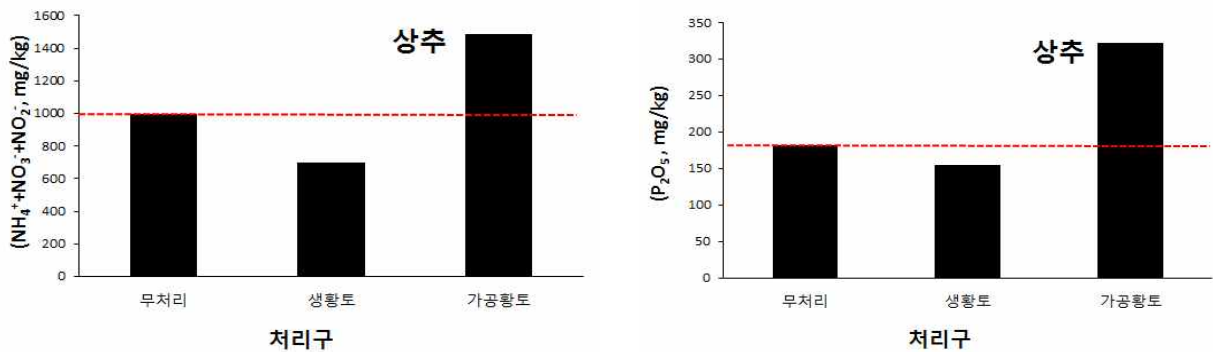


그림 3-2-10. 상추의 처리구별 토양 내 무기태 질소(NH₄⁺+NO₃⁻+NO₂⁻)와 인(P₂O₅) 함량

무와 상추는 배추에 비해 토양 내 양분흡수량이 적으므로 황토가공신소재 처리에 의해 공급된 토양 무기성분이 토양 내 잔존되어 높게 측정된 것으로 사료된다(표 3-2-17).

표 3-2-17. 황토가공신소재와 생황토 처리한 배추 토양의 화학적 특성(운길산 학술림)

	pH	EC	OM	TN	ex-N	TP	Av. P	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
	1:5	$\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$	%	$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$				cmol^+/kg			
무처리	8.0	352.0	3.1	7721	140.0	514.7	455.5	1.2	0.2	36.6	1.1
생황토	8.1	349.0	3.4	6178	136.5	589.0	435.8	1.4	0.3	22.6	1.4
황토가공신소재	8.0	255.1	3.4	3172	77.0	665.3	444.5	1.0	0.2	22.5	1.3

(2) 토양 중금속 1차 분석결과

토양오염의 기준항목은 토양오염물질인 11개 항목에 대하여 1, 2, 3지역으로 토양의 용도를 구분하고 각각에 대하여 오염정도에 따라 토양오염 우려기준과 토양오염 대책기준으로 구분한다. 토양오염의 정도가 사람의 건강과 동·식물의 생육에 지장을 초래할 우려가 있어 토지의 이용 중지, 시설의 설치 금지 등 규제조치가 필요한 정도의 오염상태를 토양오염대책기준으로 설정하였고, 대책기준의 약 40%정도로 더 이상의 오염이 심화되는 것을 예방하기 위한 오염수준을 토양오염우려기준으로 구분 되어있다(표 3-2-18).

본 연구대상지역은 1지역 답(밭)에 해당되므로 1지역에 대한 중금속 토양오염 기준을 비교하여 토양 오염도를 평가하였다. 해당 중금속 항목에 따른 중금속 농도는 토양오염 우려기준 이하이므로 중금속에 대한 농작물의 오염은 없는 것으로 사료된다(표 3-2-19~23).

표 3-2-18. 토양 오염 방지 대책과 토양 내 중금속 오염 기준(www.me.go.kr)

환경부 기준(1지역)	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
	mg kg^{-1}					
토양오염 우려기준	25	4	150	100	200	300
토양오염 대책기준	75	12	450	300	600	900

표 3-2-19. 황토가공신소재와 생황토 처리한 배추 토양 내 중금속 함량

	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
	mg kg^{-1}					
무처리	7.7	0.8	51.0	48.9	28.2	128.7
생황토	ND*	1.2	42.7	48.5	27.6	128.3
황토가공신소재 1차	13.2	1.0	47.5	48.6	30.8	127.4
황토가공신소재 2차	2.9	0.7	43.3	49.4	31.5	136.1
황토가공신소재 모자	4.4	0.8	43.4	49.4	33.4	124.3

* ND : Not Detect

표 3-2-20. 황토가공신소재와 생황토 처리한 무 토양 내 중금속 함량

	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
	mg kg ⁻¹					
무처리	ND*	ND	43.6	50.8	28.4	131.9
생황토	ND	1.0	39.6	47.1	31.3	124.0
황토가공신소재 1차	5.4	0.8	41.6	46.1	33.5	120.2
황토가공신소재 2차	4.8	0.8	36.5	44.1	28.8	113.7
황토가공신소재 모자	7.0	0.8	47.5	49.5	32.0	127.2

* ND : Not Detect

표 3-2-21. 황토가공신소재와 생황토 처리한 상추 토양 내 중금속 함량

	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
	mg kg ⁻¹					
무처리	7.6	0.7	46.2	50.8	30.8	126.0
생황토	2.9	1.2	44.7	46.4	28.0	121.8
황토가공신소재	ND*	1.0	49.3	49.6	31.0	125.6

* ND : Not Detect

표 3-2-22. 황토가공신소재와 생황토 처리한 배추 토양 내 중금속 함량(운길산 학술림)

	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
	mg kg ⁻¹					
무처리	20.8	0.6	34.8	11.4	20.5	80.1
생황토	10.0	0.5	29.1	13.9	22.9	88.3
황토가공신소재	13.7	0.2	32.8	10.2	21.3	84.1

표 3-2-23. 생황토와 TKS + 운길산 상토 내 중금속 함량(운길산 학술림)

	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
	mg kg ⁻¹					
Normal pot mix(TKS)+ 운길산	2.1	0.6	35.7	29.8	21.2	72.3
황토	5.9	0.7	66.2	18.4	22.0	77.1

3. 황토가공신소재 농도별 처리 시 배추에 미치는 효과 구명

가. 연구목적

황토가공신소재를 배추에 처리할 경우 무처리구보다 우수한 생육이 나타나는 것을 확인하였으며, 농가에 황토가공신소재 재배 농법을 보급하기 위하여 배추에 다양한 농도를 처리하여 적정 농도를 구명하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 시험 장소 및 재배 환경

본 시험은 2013년 9월 2일부터 11월 27일까지 경기도 일산구 식사동에 소재한 동국대학교 바이오자원 생태농장에서 황토가공신소재가 배추 생장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시되었으며, 시설재배를 통해 이뤄졌다. 시설 내 하우스 온도는 평균 25 ± 5 °C로 유지 하였다. 배추 종자는 홍농 씨앗(종자번호 제 10-안성-2011-10-02호) 불암 3호를 사용하였다. 배추는 9월 2일 플러그상자에 파종하였으며, 육묘용 토양으로는 일반상토 2호를 사용하였다. 배추 재배시험 포장 은 8월 23일 10 a당 퇴비 1000 kg을 기비처리하고 경운한 후 150 × 70 cm로 이랑을 만든 후 9월 23일 정식 식재 하였다. 처리조건은 무처리구, 황토가공신소재 500ppm, 1000ppm, 2000ppm 난괴 법 3반복으로 배치하였으며, 황토가공신소재 외에 농약처리는 하지 않았다. 처리기간은 2주 간격으로 1차(10월 1일), 2차(10월 15일), 3차(10월 29일)에 걸쳐 총 3회 실시 하였다. 최종 수확은 종자파종 약 120일 후인 2013년 11월 27일에 하였다(그림 3-2-11).



그림 3-2-11. 바이오생태자원 농장 온실 내 황토가공신소재 처리한 배추의 생육상태

(2) 생육조사

배추 수확 후 생육 조사는 농촌진흥청의 연구조사분석기준[29]에 준하여 총 엽수, 엽폭과 엽장, 주중 등을 조사하였다.

(3) 형광반응 및 광합성조사

배추의 광합성능력은 portable photosynthesis system(LCi-SD System, ADC BioScientific, UK)를 이용하여 광합성 특성을 분석하기 위해 광합성 속도 및 광포화점에 도달하는데 소요되는 시간을 조사하여 분석하였다. 휴대용 광합성 측정 장치의 측정 시 광도를 조절 할 수 없는 점을 고려

하여 권장시간 오전 8시~10시 사이에 2시간 동안 광합성 반응을 측정하였다. 광합성능(Assimilation rates), 증산량(Evaporation rate)를 측정하였으며 수분이용효율(Water Use Efficiency)은 다음의 공식을 이용하여 산정하였다

$$WUE = A/E$$

A: Assimilation rates

E: Evaporation rate

WUE: Water Use Efficiency

각 조건에 따른 배추의 엽록소 형광반응 측정은 광합성 엽록소 형광측정계(OS-30P, ADC Bioscientific Ltd., UK)를 이용하여 잎의 절편에 sample clip을 사용해 빛을 차단하고 측정 전 20분간 암 조건에 적응시킨 후 엽록소 형광의 변화를 측정 하였다. 순간적인 포화광을 비추게 되면 초기 형광반응(Fo)에서 최대 형광반응(Fm)까지 증가하게 된다. 이러한 조건에서 광계 II의 전자 수용체가 환원하게 되고 광계 II의 최대광화학반응 효율(Fv/Fm)을 측정하여 비교 분석하였다.

(4) 항산화조사

(가) Ascorbate 함량 분석

잎 시료(0.1 g)에 액체질소를 가하여 분말화 한 뒤 2 mL의 metaphosphoric acid(5%)를 이용하여 균질화 하였다. 이를 $22,000 \times g$ (4°C)에서 15분간 원심분리한 뒤 상등액을 취하여 Kampfenkel 방법을 응용하여 총 ascorbate 및 dehydroascorbate 함량 분석에 이용하였다. 총 ascorbate 함량은 반응액 10 mM DTT, 0.15 M sodium phosphate buffer(pH 7.4), 5 mM EDTA, 0.5% NEM에 추출액을 넣은 뒤 42°C에서 15분간 반응시켰다. 이 후 발색시약 10% TCA, 44% H₃PO₄, 4% α , α' -dipyridyl(in 70% Ethanol), 3% FeCl₃을 이용하여 42°C에서 40분간 발색시켰으며, UV-visible spectrophotometer (UV-2450, Shimadzu, Japan)를 이용하여 525 nm에서의 흡광도 변화를 통해 측정하였다. Dehydroascorbate 함량은 총 ascorbate 함량 측정을 위한 반응액에서 dehydroascorbate 환원을 위한 DTT 및 NEM을 제외시켜 반응시킨 후 동일한 발색시약을 이용하여 발색시켰으며, 이로부터 ascorbate 함량을 측정한 뒤 총 ascorbate 함량과의 차이를 통해 dehydroascorbate(DHA) 함량을 산정하였다.

(나) DPPH (2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 분석

시료 0.2 g에 100% Methanol 10 mL을 가하여 균질화한 뒤, 해당 추출액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 이 후 상청액 1 mL을 취해 0.6 mM DPPH 1 mL과 섞어준 후, 30분간 암소에서 반응시켰으며, 남아있는 상청액 중 1 mL은 100% methanol 1 mL과 섞어준 후, 동일하게 30분간 암소에서 반응시켰다. 이 후, UV-visible spectrophotometer(UV-2450, Shimadzu, Japan)를 이용하여 517 nm에서의 두 반응액에 대한 흡광도를 측정하였으며, 다음과 같은 식을 통해 항산화능력(antioxidative capacity)을 추정하였다.

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(\text{Abs. sample} - \text{Abs. empty sample}) \times 100}{\text{Abs. control}} \right]$$

Abs. sample = 0.6 mM DPPH 1 mL + extraction sample 1 mL

Abs. empty sample = methanol 1 mL + extraction sample 1 mL

Abs. control = 0.6 mM DPPH 1 mL + methanol 1 mL

다. 결과 및 고찰

(1) 생육조사

생육조사는 황토가공신소재가 배추에 미치는 영향을 나타내는 가장 기초적인 지표로서 소재의 비료 가능성을 나타내는 조건 중 하나이기도 하다. 황토가공신소재의 농도는 1세부에서 제공한 ppm 매뉴얼을 참고하여 물 10 L를 기준으로 황토가공신소재 원액을 희석하여 제조하였다. 황토가공신소재를 처리하지 않은 무처리구와 500, 1000, 2000 ppm의 농도별로 처리한 배추의 생육을 조사한 결과 배추의 성장량이 황토가공신소재 처리구가 무처리구보다 비교적 높게 측정되었다. 처리구에서의 엽수와 엽장의 값이 전체적으로 높게 측정되었으며, 생중량은 500, 1000 ppm 처리구에서 상대적으로 높게 측정되었다. 또한 엽폭 측정결과 500 ppm 처리구에서 가장 높게 측정되었다(표 3-2-24).

표 3-2-24. 황토가공신소재 농도별 처리한 배추의 생육 조사

	Leaf number (pcs.)	Leaf weight (g)	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)
Control	73.6 ± 4.4 a	1553.2 ± 480 a	21 ± 3.8 ab	34 ± 4.8 a
PR 5	91.6 ± 1.6 b	2339.2 ± 340 bc	25 ± 3.8 ab	47 ± 5.3 b
PR 10	87.4 ± 9.0 b	2849.6 ± 456 c	27 ± 2.2 bc	48 ± 3.0 b
PR 20	91.7 ± 1.5 b	2503.6 ± 212 c	28 ± 2.1 c	48 ± 6.0 b

※PR 5 : Processed-Red soil 500 ppm, PR 10 : Processed-Red soil 1000 ppm, PR 20 : Processed-Red soil 2000 ppm

(2) 형광반응 및 광합성조사

식물의 CO₂ 와 수분 교환은 90% 이상 기공을 통해 일어난다. 기공을 통해 흡수된 CO로 광합성을 하고, 증산을 통해 수분조절을 한다. 식물이 기공을 닫게 되면 엽육 세포내 CO₂ 농도는 낮아지게 되고, 이에 따라 광합성 능력이 떨어지는 현상을 동반한다. 이와 같이 광합성과 수분조절은 밀접한 관계성을 갖고 있다. 따라서 무처리구와 처리구의 광합성능력, 증산량, 수분 이용효율을 측정된 결과, 가공 2000 ppm의 광합성능력이 25.14 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ (c)로 가장 높게 나타났다(표 3-2-25). 수분 이용효율 또한 처리 농도가 높아질수록 수치가 높게 나타나는 경향을 보였다. 이는 황토가공신소재가 배추의 광합성 능력과 수분이용 효율에 긍정적인 영향을 미치는 요소를 포함하고 있으며, 시비 농도가 높을수록 더 효과적인 것으로 판단된다.

표 3-2-25. 황토가공신소재 농도에 따른 배추의 광합성률, 수분이용효율, 증산량

	E (mmol m ⁻² s ⁻¹)	A (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	WUE
Control	2.52 ± 0.33 a	14.40 ± 1.76 a	5.76 ± 0.87 a
PR 5	2.50 ± 0.46 a	14.91 ± 2.10 a	6.01 ± 0.44 a
PR 10	3.31 ± 0.46 b	22.76 ± 5.11 b	6.79 ± 0.73 b
PR 20	3.27 ± 0.40 b	25.14 ± 0.45 c	7.70 ± 0.32 c

※PR 5 : Processed-Red soil 500 ppm, PR 10 : Processed-Red soil 1000 ppm, PR 20 : Processed-Red soil 2000 ppm

※E : Evaporation rate, A : Assimilation rate, WUE : Water Using Efficiency

형광반응분석에서 암 조건에 적응시킨 잎에 파장이 낮은 빛을 비춰줄 때의 반응을 초기 형광반응(Fo)이라 하는데, 초기에는 엽록소가 흡수한 빛 에너지는 광합성에 이용되지 못하고 방출되며, 반응 중심에 에너지를 전달하지 못하는 엽록소 분자들이 많아질수록 Fo값이 증가하게 된다. 실험 결과를 보면, 무처리구에서 Fo 값이 가장 크게 나타났으며, 황토가공신소재 2000 ppm에서 Fo값이 가장 낮게 측정 되었다(표 3-2-26). 이것은 다른 조건에 비해 엽록소가 흡수한 빛 에너지를 광합성에 더 많이 이용하여 스트레스를 가장 적게 받고 있는 것을 의미한다 [39]. 반대로 암 조건에 적응시킨 잎에 강한 빛을 비춰주게 되면 광합성을 할 수 없는 상태가 되어 방출되는 형광은 최대치를 보이게 되는데, 이때의 값을 최대형광(Fm)이라고 하며 보통 식물이 스트레스를 받게 되면 Fm 값이 낮게 나타남을 알 수 있다. 하지만 Fm값에선 유의성을 나타내지 못하였으나, 측정값은 무처리구보다 황토가공신소재 처리구가 높게 나타났음을 알 수 있다.

표 3-2-26. 황토가공신소재 처리에 따른 형광반응효율

	Fo	Fm	Fv/Fm
Control	214.16 ± 15.89 a	0950.75 ± 119.81 a	0.7729 ± 0.02 a
PR 5	203.22 ± 15.59 ab	1031.44 ± 070.71 a	0.8023 ± 0.01 b
PR 10	211.00 ± 24.12 ab	1026.83 ± 101.61 a	0.7932 ± 0.02 b
PR 20	193.67 ± 11.12 b	1019.89 ± 090.18 a	0.8090 ± 0.01 b

※PR 5 : Processed-Red soil 500 ppm, PR 10 : Processed-Red soil 1000 ppm, PR 20 : Processed-Red soil 2000 ppm

※Fo : Initial fluorescence Fm : Maximum fluorescence Fv/Fm : Chlorophyll fluorescence

본 실험에서의 Fv/Fm값은 무처리구와 처리구 사이에 유의성을 나타냈다. 황토가공신소재를 처리하지 않은 무처리구에서는 0.8이하의 낮은 광화학효율의 비가 측정되었음을 볼 수 있다. Fv/Fm값은 광화학 반응에 대한 양자수율의 최대치를 의미한다. 즉, Fv/Fm의 값이 높을수록 광화학반응 효율이 높은 것으로 판단할 수 있다. 보통 건강한 고등식물의 잎은 값이 항상 0.8정도를 유지하는데 이보다 낮은 값을 가지는 경우는 식물이 스트레스 환경에 있는 것으로 간주된다. 반면 황토가공신소재 처리한 배추에서는 전체적으로 0.8 이상의 높은 값이 나타났다. 즉, 황토가공신소재를 처리함으로써 스트레스 적게 받음을 알 수 있으며, 배추의 생장에 있어 긍정적인 영향을 미치는 것으로 조사되었다.

(3) 항산화 함량 분석

일반적으로 건조, 고온 및 강한 빛의 세기 등, 생육에 적합한 범위를 벗어난 환경스트레스 조건에서는 식물체의 산화스트레스가 증대된다. 이와 같은 산화스트레스는 에너지 공급과 수요의 불균형을 통해 형성되는 활성산소가 주된 원인으로, 환경스트레스 조건은 주로 광합성 관련 기구의 활성을 저해시킴으로써 흡수된 광에너지와 이에 대한 수요 사이에 불균형을 증대시킬 수 있다[37]. 이에 대해 식물체는 다양한 항산화체계를 통해 활성산소를 소거하거나 산화스트레스의 유해한 영향으로부터 세포를 보호한다. 따라서 식물체의 항산화체계는 주위 환경조건에 대해 식물체가 갖는 대사 및 생리적인 적응기작에 있어 매우 중요한 기능을 담당하며, 산화스트레스가 가중됨에 따라 일반적으로 이들 항산화체계를 구성하는 다양한 항산화물의 함량 및 산화도 증가와 더불어 주요 항산화효소의 활성 증대가 관찰된다[35]. 한편 활성산소는 주로 광합성과 호흡 등, 일반적인 대사과정의 불가피한 부산물로서도 발생되는데, 광, 수분 및 양분조건 등은 이들 대사활성에 영향을 미침으로써 이와 같은 내생적 활성산소 발생량에도 영향을 미칠 수 있다. 본 연구에서는 황토가공신소재 처리에 따른 배추의 대사활성 변화가 내생적 활성산소 발생량에 미치는 영향을 평가하기 위해 식물 세포 내 주요 항산화물 가운데 하나인 ascorbate의 총 함량 및 산화도 변화를 분석하였다(표 3-2-27). Ascorbate는 대부분의 고등식물 세포 내에 가장 풍부하게 존재하는 수용성 비타민으로 활성산소의 직접적 소거 혹은 주요 항산화효소의 기질로 작용함으로써 식물 세포 내에서 매우 중요한 항산화기능을 담당한다. 황토가공신소재 처리구의 경우 500 ppm처리구에서는 무처리구와 차이를 보이지 않았으나 1000 ppm에서는 무처리구에 비해 약 14% 정도 유의하게 낮은 경향을 나타냈고 2000 ppm 처리구에서는 약 21% 정도 유의하게 높은 경향을 보여 처리농도에 따른 변이가 큰 것으로 조사되었다. 특히 총 ascorbate 함량에 대한 환원형 ascorbate의 비율은 모두 무처리구에 비해 낮은 수준으로 나타났으나, 처리 농도에 따라서는 총 ascorbate 함량 변화와 유사한 경향을 보이는 것으로 조사되었다(그림 3-2-12)

표 3-2-27. 황토가공신소재 농도 처리에 따른 배추 잎의 환원형, 산화형 아스코르브산에 미치는 영향

Treatment	Redox state of ascorbic acid [(AsA ^z +DHA ^y)/DHA]
Control	6.83±2.84
PR 5	4.56±1.21
PR 10	3.94±0.76
PR 20	5.84±1.14

※PR 5 : Processed-Red soil 500 ppm, PR 10 : Processed-Red soil 1000 ppm, PR 20 : Processed-Red soil 2000 ppm

^zreduced form of ascorbate; ^yoxidized form of ascorbate

Ascorbate는 세포 내 항산화기작 이외에도 다양한 효소의 cofactor로서 작용하며, 세포벽의 신장과 리그닌화 등, 다양한 생리반응에도 관여하는 것으로 알려져 있다[33, 46]. 따라서 황토가공신소재 처리 농도에 따라 배추 잎에서 관찰된 총 ascorbate 함량 및 상대적 산화도의 불규칙적인 반응 양상은 산화스트레스 이외에 황토가공신소재 처리에 따라 유도되는 다양한 생리적 변화가 원인일 것으로 추측된다. 특히 황토가공신소재 처리 농도가 높을수록 총 항산화능력 역시 낮아지는 경향을 보였는데(그림 3-2-13), 이는 세포 내 ascorbate의 상대적 산화도 증

대가 곧 내생적 혹은 외부 환경요인에 의한 산화스트레스의 증대를 의미하지는 않을 수 있음을 제시하는 결과로 생각된다.

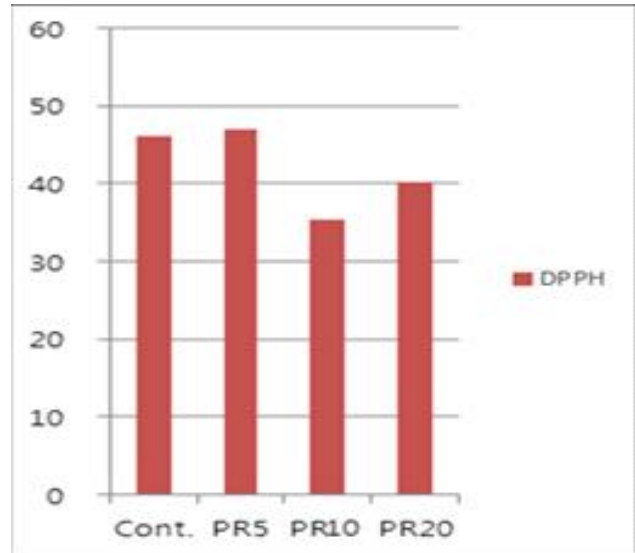
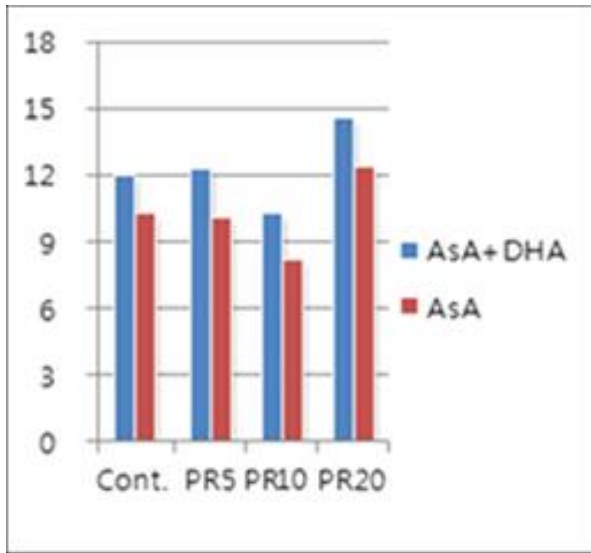


그림 3-2-12. Effect of different treatments on the content of ascorbic acid in the leaves of *Brassica campestris* L.

그림 3-2-13. Effect of different treatments on the antioxidative capacity expressed as DPPH inhibition in the leaf of *Brassica campestris* L.

※Cont. : Control, PR 5 : Processed-Red soil 500 ppm, PR 10 : Processed-Red soil 1000 ppm, PR 20 : Processed-Red soil 2000 ppm

4. 황토가공신소재 농도별 처리 시 토마토에 미치는 효과 구명

가. 연구의 목적

황토가공신소재를 토마토에 처리할 경우 생육에 긍정적인 효과를 미치는 것으로 나타났으며, 적정농도를 구명하고자 본 연구를 수행하였다.

나. 재료 및 연구방법

(1) 시험장소 및 재배환경

본 실험은 동국대학교 바이오자원생태농장(경기도 고양시 식사동 소재)에서 노지 포장 재배 시험을 수행하였다(3-2-14). 시험구의 기상정보는 다음과 같다(표 3-2-28). 토마토 종은 아시아종묘의 흑수이며, 경운처리 2주 전 10 a 당 퇴비 1000 kg 기비처리 하였다. 시험구의 토양정보는 다음과 같다(표 3-2-29). 초기 성장에 필요한 영양분을 제공하기 위해 식재 후 토마토 작물표준시비량을 기준으로 추비 10 a 당 N: 8.8 kg을 사용하였으며, 질소비료는 요소비료를 사용하였다. 영양생리를 유리하게 하기 위해 측지제거 작업을 실시하였다. 모종은 아시아종묘 흑수토마토로 초장 25 ~ 28 cm, 제 1화방이 3~5매가 형성된 것을 식재하였다. 처리구는 180 × 240 cm이며, 처리구당 모종 6개씩 2014년 5월 23일 식재하였다. 처리구는 임의 배치하여 3반복하였다. 실험 처리조건은 무처리, 황토가공신소재 200배 희석액, 1000배 희석액, 시중에 판매하는 수용성 규산질비료((주)산수원 수용성규산 22%, 가리 12%) 1000배 희석액을 사용하여 관주시비하였다(표 3-2-30). 재식 후 5월 30일 처리를 시작으로 2주 간격으로 한 처리구당 1.5 L씩 총 4회 처리하였으며, 7월 21일 성숙한 토마토의 2, 3 과방을 최종 수확하여 조사하였다.



그림3-2-14 일산 바이오자원생태농장 내 토마토 처리구

표 3-2-28. 일산의 평균 온도, 강수량, 상대습도, 일조량 (출처:기상청)

2014	1	2	3	4	5	6	7
temp.(°C)	-3.1	-0.2	6	12.1	16.8	21.7	24.7
precipit.(mm)	7.8	19.5	5.1	18.7	70.7	59.4	164.6
humid(%)	63.6	62.8	61.7	61.2	64.4	73.3	76.1
duration of sunshine(hr)	191.4	182.1	219.2	205.1	301.4	196.8	200.9

표 3-2-29. 일산 바이오자원생태농장 내 토양의 화학 특성

	pH	EC	OM	Avail. P ₂ O ₅	Avail SiO ₂	T-N	Exch. cation		
	(1:5)	dSm ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹		%	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
							cmol _c kg ⁻¹		
Control	7.4	1.57	6	257	260	0.07	0.59	8.5	3.3

표 3-2-30. 황토가공신소재와 규산질 비료 희석 방법

Diluted solution	Red soil-processed material (mL)	water(L)
Control	0	
200×	50	10
1000×	10	
S	10	

*200x : Processed-Red soil diluted 200-fold, 1000x : Processed-Red soil diluted 1000-fold, S : slouble silicate fertilizer diluted 1000-fold

(2) 생육조사

생육조사는 농업과학기술 연구조사분석기준[29]에 준하여 과경, 과폭, 엽장 등을 측정하였다.

(3) 형광반응 및 엽록소 함량

각 조건별 토마토의 형광반응 측정은 광합성 엽록소 형광측정계(OS-30P, ADC Bioscientific Ltd., UK)를 이용하여 3화방이 달린 줄기의 가장 끝에 있는 잎을 선택하여 sample clip을 사용해 측정 전 15분간 빛을 차단하여 암 조건에 적응시킨 후 엽록소 형광의 변화를 측정 하였다. 배추 형광반응 측정과 동일한 방법으로 $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ 을 이용하여 최대광화학반응 효율 (F_v/F_m)를 측정하여 비교 분석하였다.

엽록소 함량과 카로티노이드 함량을 분석하기 위해 각 처리구에 있는 6개의 토마토 줄기 동일한 위치에 있는 가장 자리 부분의 성숙한 엽을 채취하였다. 실험하기 위해 잎 0.1g을 아세톤 (80%) 10 mL에 침지시켜 냉암소에서 7일간 침출 시킨 후 흡광도를 측정한다. 흡광도 측정은 UV/VIS spectrophotometer(UV-2100, Shimadzu, Japan)을 이용하였다. 클로로필 함량을 측정하기 위해 사용한 파장은 663 nm, 645 nm, 470 nm이다. 엽록소 함량은 mg mL^{-1} 기준으로 하여 계산 하였다[41].

$$\text{Chlorophyll } a = 12.7 * A_{663} - 2.69 * A_{645}$$

$$\text{Chlorophyll } b = 22.9 * A_{645} - 4.68 * A_{663}$$

$$\text{Total Chlorophyll } (a+b) = 20.29 * A_{645} + 8.02 * A_{663}$$

$$\text{Total Carotenoid} = (1000 * A_{470} - 1.82 * \text{chl}a - 85.02 * \text{chl}b) / 198$$

(4) 유리당 함량 분석

유리당 분석은 시료 0.5 g을 취하여 50% EtOH 20 mL를 넣고 혼합한 후 80°C에서 30분간 초음파를 이용하여 추출하였다. 그 다음 원심분리기를 이용하여 3000 rpm (25°C)에서 10분 동안 원심 분리하여 여과 후 HPLC(Shiseido Nanospace SI-2, Japan)를 이용하여 분석 하였다. 분석에 사용된 Column은 Unison UK-Amino (250 × 3.0 mm, Imtakt co.), detector는 RID(shodex, Japan)를 사용하였다. Mobile phase는 90% acetonitrile를 이용하였고, column 온도는 55°C, flow rate는 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 이었다.

(5) 항산화 분석

토마토 시료(0.1 g)에 액체질소를 가하여 분말화 한 뒤 2 mL의 metaphosphoric acid(5%)를 이용하여 균질화 하였다. 이를 22,000 × g (4°C)에서 15분간 원심분리한 뒤 상등액을 취하여 Kampfenkel의 방법을 응용하여 총 ascorbate 및 dehydroascorbate 함량 분석에 이용하였다. 총 ascorbate 함량은 반응액 10 mM DTT, 0.15 M sodium phosphate buffer(pH 7.4), 5 mM EDTA, 0.5% NEM에 추출액을 넣은 뒤 42°C에서 15분간 반응시켰다. 이 후 발색시약 10% TCA, 44% H_3PO_4 , 4% α, α' -dipyridyl(in 70% Ethanol), 3% FeCl_3 을 이용하여 42°C에서 40분간 발색시켰으며, UV-visible spectrophotometer (UV-2450, Shimadzu, Japan)를 이용하여 525 nm에서의 흡광도 변화를 통해 측정하였다. Dehydroascorbate 함량은 총 ascorbate 함량 측정을 위한 반응액에서 dehydroascorbate 환원을 위한 DTT 및 NEM을 제외시켜 반응시킨 후 동일한 발색시약을 이용하여 발색시켰으며, 이로부터 ascorbate 함량을 측정한 뒤 총 ascorbate 함량과의 차이를 통해 dehydroascorbate(DHA) 함량을 산정하였다.

(6) 토양분석

토양분석은 토양 및 식물체 분석법[28]에 준하여 실시하였다. 토양 시료 채취는 1개의 시험구에서 10군데를 채취하여 고루 섞은 후 풍건한 후 20 mesh 체를 이용하여 조제하였다.

(가) 산도(pH) 측정

토양 시료 5 g을 50 mL 비커에 취하여 증류수 25 mL를 넣고 유리봉으로 저어주면서 1시간 방치 후 60초 이내에 pH meter를 이용하여 측정하였다.

(나) EC(전기전도도)

100 mL 삼각 플라스크에 10 g의 토양을 넣고 50 mL 증류수를 가하여 30분간 진탕하였다. 그 다음 여과지(No. 2)를 이용하여 여과한 후 pH meter를 이용하여 전기전도도를 측정하였다.

$$EC \text{ (dS m}^{-1}\text{)} = \text{증류수 (mL)/토양무게 (g)} \times \text{측정치 (dS m}^{-1}\text{)} \times \text{온도보정계수}$$

(다) 유기물 분석

토양의 유기물 분석은 Tyurin법을 이용하여 분석하였다. 시료 0.5 g을 250 mL 삼각 플라스크에 취하여 10 mL의 0.4 N 중크롬산칼리황산 혼합용액을 가한 다음 소형 깔데기를 덮고 200°C의 전열판에서 가열하였다. 플라스크 바닥에서 기포가 발생하기 시작할 때부터 정확히 5분간 끓인 후 차가운 물에 냉각시키고 증류수 150 mL를 가하였다. 그 다음 5 mL 85% H₃PO₄과 diphenylamin 5 방울을 가한 후 0.2 N 황산제1철암모늄으로 적정하였다

$$\text{토양 유기물 함량 (g kg}^{-1}\text{)} = C \text{ (\%)} \times 1.724 \times 10$$

(라) 치환성 양이온

토양 5 g을 100 mL 삼각 플라스크에 넣고 1M NH₄OAc 침출액 50 mL로 30분 동안 진탕하였다. 진탕이 끝난 시료를 여과지(No. 2)로 여과한 후 ICP (Optima 8300, PerkinElme, USA)로 측정하여 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Ex. Ca (cmol}^+\text{kg}^{-1}\text{)} = \text{표준곡선 (mg L}^{-1}\text{)} \times 10 \text{ (mL g}^{-1}\text{)} \times 1/200.4 \times \text{희석배수}$$

$$\text{Ex. K (cmol}^+\text{kg}^{-1}\text{)} = \text{표준곡선 (mg L}^{-1}\text{)} \times 10 \text{ (mL g}^{-1}\text{)} \times 1/391 \times \text{희석배수}$$

$$\text{Ex. Mg (cmol}^+\text{kg}^{-1}\text{)} = \text{표준곡선 (mg L}^{-1}\text{)} \times 10 \text{ (mL g}^{-1}\text{)} \times 1/121.5 \times \text{희석배수}$$

(마) 전질소 (Total-N)

토양의 전질소는 block digester법을 이용하여 수행하였다. 토양 시료 0.5 g을 켈달플라스크에 넣고 황산염혼합분말 1.5 g과 H₂SO₄ 5 mL를 넣은 다음 시료가 무색이 될 때까지 분해하였다. 히팅 맨틀을 장치한 후 증류수를 채운 둥근 플라스크를 설치한 다음 증기를 이용하여 시료를 가열시켰다. 가열 시켜 분해된 시료에 45% NaOH 용액 50 mL를 가하여 H₂SO₄ 표준용액으로 적정하였다.

$$T-N \text{ (\%)} = (T - B) \times N \times f \times 14 \times 1/1,000 \text{ mL} \times 1/W \times 100$$

T: 황산표준용액 (mL)

B: Blank의 황산표준용액 (mL)

f: 황산표준용액의 보정치 (factor)

N: 황산표준용액의 노르말농도

W: 토양시료의 무게 (g)

(바) 유효인산 (Lancaster 법)

토양 시료 5g에 침출액 20 mL를 넣고 10분간 진탕 후 여과지(No. 2)를 이용하여 여과하였다. 표준용액과 시료액 3 mL를 시험관에 넣고 조작액 6 mL씩 넣은 다음 0.4 mL의 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 용액을 가하여 혼합하여 30°C에서 항온한 후 720 nm에서 비색측정 하였다.

$$\text{Av. P}_2\text{O}_5 \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{표준곡선 ppm} \times 10 \text{ (mL g}^{-1}\text{)} \times 2.29$$

(사) 유효규산

토양 5 g을 100 mL 삼각 플라스크에 넣고 1 M NaOAc 50 mL를 가한 후 60°C에서 90분간 진탕하였다. 그 다음 냉수로 5분간 식힌 후 여과지(No. 6)로 여과하였다. 시험관에 표준용액과 시료액 5 mL를 넣고 0.6 M HCl 2.5 mL, 10% ammonium molybdate 2.5 mL를 첨가한 다음 3분 후에 17% sodium sulfite 5 mL를 가하였다. 30°C에서 20분간 항온한 후 파장 700 nm에서 비색측정 하였다.

$$\text{토양중 SiO}_2 \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{표준곡선 ppm} \times 10 \text{ (mL g}^{-1}\text{)} \times 2.14^*$$

*2.14 = Si를 SiO₂로 환산하는 값

(6)통계분석

본 실험에 공시된 데이터는 평균(means) ± 표준편차(standard deviation)로 산출하였으며, 집단 간 편차를 살펴보기 위해 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 통계적 유의성은 5%에서 Duncan의 다중검정방법을 통해 비교하였다. 모든 통계처리는 SPSS Version 21(IBM Corp., USA)를 이용하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 생육조사

황토가공신소재 처리구, 무처리구와 규산질 비료 처리구의 토마토의 생육을 조사한 결과 유의미 있게 나타났다. 특히 엽장, 엽경, 과중, 당도에 있어서 황토가공소재 200배 희석액 처리구에서 무처리구에 비해 증가하는 경향을 나타냈다. 또한 토마토의 수량도 200배 희석액 처리구에서 무처리구보다 8.3% 증가하였으나, 규산질비료와 황토가공소재 1000배 희석액 처리구에서 무처리구보다 감소하는 경향을 나타냈다. 이는 수용성 규산으로 토마토에 흡수가 되어야 하며, 농도에 있어서도 영향을 받을 수 있다. 연구 결과에 따르면 황토에 많이 함유되어 있는 규소가 식물체의 생육뿐만 아니라 토마토 과실의 품질향상에도 영향을 미친다고 보고되었으며[51], 규산의 영향으로 토마토 과실 내

당의 함량도 증가 한다고 보고한 바 있다[49]. 일반적인 토마토의 당도는 4~7° 로 우리나라에서는 과실의 크기는 균일하면서 당도가 높은 고품질 토마토를 선호하고 있다. 가격도 일반 토마토 보다 2배 이상의 가격으로 판매되고 있는 실정이다. 따라서 친환경자재인 황토가공신소재를 이용하여 토마토가 생산되는 환경적 요인을 최적의 상태로 관리한다면, 고부가가치의 토마토를 재배할 수 있을 것으로 사료된다.

표 3-2-31. 황토가공신소재의 농도별 처리와 규산질비료 처리에 따른 토마토의 생육 및 생산량

Treatments	Leaf		Fruit				
	Length(mm)	Width(mm)	Length(mm)	Diameter(mm)	Weight(g)	Brix(°)	Number
Control	8.34±0.82ab	5.28±0.50a	52.60±3.55b ¹	52.88±3.84a	82.34±16.08a	5.5±0.17a	96
200×	9.60±0.85c	6.21±0.47b	52.79±2.93b	53.99±3.45ab	88.84±14.56b	5.9±0.15c	104
1000×	7.86±0.52a	5.06±0.43a	52.96±2.55b	54.53±3.77b	89.32±15.92b	5.8±0.15bc	90
S	9.00±1.04bc	5.80±0.75b	51.63±3.14a	53.02±4.47a	81.95±17.55a	5.7±0.28ab	78
P-value	***	***	*	**	**	**	-

※ 200x : Processed-Red soil diluted 200-fold, 1000x : Processed-Red soil diluted 1000-fold, S : slouble silicate fertilizer diluted 1000-fold

토마토의 병해 중 하나인 열과는 꼭지 부근에서 방사상으로, 어깨부분에서 동심원상으로 벌어지거나 측면이 벌어지는 등의 현상을 말하며, 노지재배 할 경우에 많이 일어난다(그림 3-2-15). 열과 증상은 과일이 비나 이슬에 젖거나 코르크층의 수분 흡수와 잦은 온도변화로 인하여 발생되며, 정성적으로 열과 발생을 측정한 결과 무처리구가 13.3%, 200배 희석액 0%, 1000배 희석액 7% 그리고 규산질 비료에서는 6.82%가 발생하였다. 규산의 경우 토마토는 규산을 작게 흡수하면서도 개화 후에 열매를 맺는 데 작용을 많이 하는 것으로 알려져 있다. 또한 식물체에 집적된 규산은 조직을 물리적으로 보호하고 표피조직을 통해서 수분 배출을 막아주는 역할을 한다. 이러한 규산 작용이 열과가 발생하는 것을 막을 수 있을 것으로 사료된다.



그림 3-2-15. 황토가공신소재 처리가 토마토 열과 현상에 미치는 효과

(2) 형광반응 및 엽록소 함량

Fo 값에서는 무처리구와 200배액이 5% 유의수준에서 높게 나타났으며, Fm은 무처리구에서 높게 나타났다. Fv/Fm에서는 유의성이 나타나지 않았지만, 규산질비료 처리구와 무처리구에서 유의미한 차이를 보였다(표 3-2-32). 무처리구와 처리구 모두 0.8 이하의 값이 나타난 것으로 보아 암 조건에 스트레스를 받는 것으로 나타났다. 최대형광(Fm)이라고 하며 보통 식물이 스트레스를 받게 되면 Fm 값이 낮게 나타남을 알 수 있다. 하지만 Fm값에서는 유의성을 나타냈으며, 무처리구가 가장 높게 나타났음을 알 수 있다.

형광반응분석에서 암 조건에 적응시킨 잎에 파장이 낮은 빛을 비추줄 때의 반응을 초기 형광반응(Fo)이라 하는데, 초기에는 엽록소가 흡수한 빛 에너지는 광합성에 이용되지 못하고 방출되며, 반응 중심에 에너지를 전달하지 못하는 엽록소 분자들이 많아질수록 Fo값이 증가하게 된다. 실험 결과를 보면, 무처리구에서 Fo 값이 가장 크게 나타났으며, 규산비료에서 Fo값이 가장 낮게 측정 되었다. 이것은 다른 조건에 비해 엽록소가 흡수한 빛 에너지를 광합성에 더 많이 이용하여 스트레스를 가장 적게 받고 있는 것을 의미한다[39].

표 3-2-32. 황토가공신소재와 규산질 비료 처리에 따른 형광반응효율

	Fo	Fm	Fv/Fm
Control	125.45 ± 15.50b	567.25 ± 78.60c	0.7740 ± 0.04b
200×	120.00 ± 16.39b	509.84 ± 70.59b	0.7596 ± 0.05ab
1000×	105.32 ± 13.99a	437.11 ± 53.38a	0.7547 ± 0.05ab
S	103.05 ± 11.01a	397.74 ± 54.54a	0.7359 ± 0.05a

※200x : Processed-Red soil diluted 200-fold, 1000x : Processed-Red soil diluted 1000-fold, S : slouble silicate fertilizer diluted 1000-fold

처리구별 엽록소 함량 분석결과 총 엽록소를 포함한 모든 결과가 황토가공신소재 200배 희석액 처리구에서 가장 높은 값을 나타냈으며, 통계분석결과 유의성이 있는 것으로 나타났다(표 3-2-33). 엽록소 함량이 적게 나타나는 것은 식물의 성장조건이 좋지 못하거나 또는 잎에 있어서 노화가 진행될 때 나타날 수 있는 현상이다. 따라서 스트레스 지표로 사용할 수 있으며, 황토가공신소재 처리구가 무처리구보다 생장에 있어서 스트레스를 덜 받는 것으로 추측할 수 있다. 엽록소는 식물이 광합성을 하는데 있어서 필요한 빛을 흡수하는 색소이다. 엽록소에는 엽록소a,b,c,d,e와 박테리오 클로로필, 카르티노이드 등 여러 종류가 있는데, 그 중 가장 보편적인 것은 엽록소 a와 b이다. 엽록소a는 광합성을 하는 식물에 모두 들어있으며, 엽록소 b는 육상식물과 유글레나등에 함유되어 있으며, 그 밖에 조류 등은 엽록소c, d를 가진 것들도 있다. 엽록소는 보통 엽록소 a:b의 비율이 약 3:1로 알려져 있으며, 빛에너지를 직접 전달하는 것은 엽록소a라고 알려져 있으며, 다른 색소가 흡수된 빛 에너지도 엽록소a에 전달되었다가 다시 화학반응계에 전달되는 것으로 추정되고 있다.

표 3-2-33. 황토가공신소재와 규산질 비료 처리에 따른 토마토의 엽록소 함량

Treatments	Chl a ¹	Chl b	Chl a+b	Car
Control	11.97±1.00a ²	4.21±0.44a	16.26±1.35a	2.66±0.21a
200× ³	13.68±0.69b	5.25±0.17c	18.98±0.86c	3.07±0.12b
1000×	12.85±1.08ab	4.64±0.36b	17.52±1.44ab	2.90±0.25b
S	12.82±1.01ab	4.87±0.51bc	17.72±1.52ab	2.88±0.18b
P-value ³	*	***	**	**

¹Means ± standard deviation

²200x : Processed-Red soil diluted 200-fold, 1000x : Processed-Red soil diluted 1000-fold, S : slouble silicate fertilizer diluted 1000-fold

³NS, and * represent significant value at Not significant and significant at p< 0.05. The value followed by the same letter are not significantly different based on the Duncan' s Multiple range test (P<0.05)

(3) 유리당 함량 분석

토마토의 종류에 따라 약간의 차이는 있으나 일반적으로 유리당 중 glucose와 fructose가 주성분이고 이를 제외한 몇 개의 야생종만 sucrose가 주성분이라고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 토마토의 유리당의 주성분인 fructose와 glucose 함량을 분석하였다(표 3-2-34).

Fructose의 함량은 규산질비료에서 2.38%로 무처리구 보다 1.75% 유의성 있게 증가하였고, 황토가 공신소재 처리구와 무처리구간의 유의성은 없었으나 증가하는 경향을 나타냈다.

Glucose의 함량은 1000배 희석액 처리구가 2.14%로 무처리구(2.05%) 증가함을 알 수 있었다. 반면에 황토가공신소재 200배 희석액 처리구와 규산질 비료 처리구는 무처리구에 비해 감소하는 경향을 나타냈으나 유의성은 나타나지 않았다. 황토의 주요성분인 규소는 토마토의 생장과 품질에 영향을 주고 수경 재배 시 규소 함량이 높을수록 Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase의 활성이 높아져 토마토 과실 내 유리당 함량이 증가되었다고 보고하였다[43].

표 3-2-34. 황토가공신소재와 규산질 비료 처리에 따른 성숙한 토마토의 유리당 함량

Treatments	Fructose	Glucose
Control	1.75 ± 0.148a ¹	2.05 ± 0.557a
200× ²	1.93 ± 0.254a	1.88 ± 0.225a
1000×	2.03 ± 0.004ab	2.14 ± 0.076a
S	2.38 ± 0.084b	1.72 ± 0.018a
P-value ³	*	NS

¹Means ± standard deviation

²200x : Processed-Red soil diluted 200-fold, 1000x : Processed-Red soil diluted 1000-fold, S : slouble silicate fertilizer diluted 1000-fold

³NS, and * represent significant value at Not significant and significant at p< 0.05. The value followed by the same letter are not significantly different based on the Duncan' s Multiple range test (P<0.05)

(4) 항산화 분석

본 연구에서는 가공황토 처리에 따른 토마토의 대사활성 변화가 내생적 활성 산소 발생량에 미치는 영향을 평가하기 위해 토마토 과실의 ascorbic acid(AsA)와 Dehydroascorbic acid(DHA) 함량을 분석하였으며, ASA/DHA 비율을 계산하였다(그림 3-2-15).

총 ascorbate 함량은 200배 희석액 처리구가 57.58 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 무처리구보다 63%(35.28 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW), 1000배 희석액 처리구는 53.40 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW으로 무처리구보다 51% 증가하였다. 규산질 비료는 56.02 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW으로 58% 증가하였다. ASA/DHA 비율은 무처리구에서 1.14

로 가장 높게 측정되었으며, 200배 희석액 처리구는 1.10, 1000배 희석액 처리구는 1.12, 규산질 비료 처리구에서는 0.8로 나타났다. 하지만 처리구간 유의성은 나타나지 않았다.

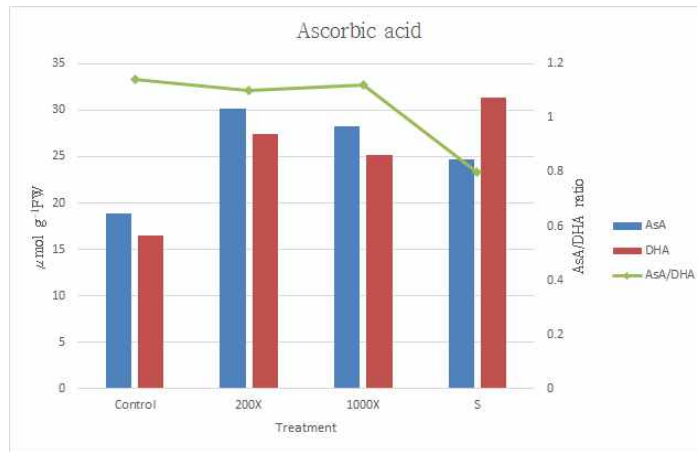


그림 3-2-16. 황토가공신소재와 규산질 비료 처리에 따른 성숙한 토마토의 아스코르브산 함량과 비율

작물에 있어서 일반적으로 건조, 고온과 강한 광조건 등 생육에 적합하지 않은 환경에서는 산화스트레스가 증대된다. 산화스트레스는 에너지 공급과 수요의 불균형을 통해 형성되는 활성산소가 주요 원인으로 주로 광합성 관련 기구의 활성을 저해하므로 작물생육에 있어 피해를 준다. 활성산소는 주로 광합성과 호흡 등, 일반적인 대사과정의 부산물로도 발생되는데, 이때 광, 수분 및 양분조건 등은 이들 대사활성에 영향을 미침으로써 활성산소 발생량에도 영향을 미칠 수 있다. 이에 대해 식물체는 다양한 항산화 체계를 통해 활성산소를 소거 하거나 산화스트레스에서의 유해한 영향으로부터 세포를 보호한다. 따라서 식물의 항산화체계는 환경조건에 대한 식물의 대사 및 생리적인 적응기작에 있어 매우 중요한 기능을 담당할 뿐만 아니라, 산화스트레스가 가중되면 주요 항산화효소의 활성증대가 관찰된다. 광의의 비타민 C는 환원형과 산화형의 ascorbic acid를 말하며, 그 중 ascorbic acid는 산화·환원상태나 세포내에서 다른 효소들과의 면역체계를 조절하는 역할을 한다. 게다가 ascorbic acid는 인간을 포함한 모든 유기체에서 신진대사 반응에 필요한 미량요소의 기능을 가진다. 따라서 채소와 과일의 섭취는 인간에게 항암, 항노화, 항산화를 증진시키는 역할을 하고 있으며, 이러한 작용을 하는 생리물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

(5) 토양 이화학적 분석

황토가공신소재를 처리한 토마토의 토양 성분 함량은 다음과 같다(표 3-2-35). 무비구의 pH는 7.0, EC는 0.34 dS m⁻¹, 유기물함량은 6 g kg⁻¹이고, 유효인산은 47 mg kg⁻¹, 유효규산은 187 mg kg⁻¹ 으로 분석되었다. pH는 200배액에서 7.4로 가장 높게 나타났는데, 이는 황토가공신소재의 높은 농도에 의해 pH가 상승한 것으로 판단된다. 규산질 비료첨가를 할 경우 산성

개량의 효과도 있어 pH 값이 증가함을 보인다. EC의 값이 증가할수록 토마토의 당 함량에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. EC의 값은 1000배액이 1.26 dS m⁻¹으로 가장 높게 측정되었다. EC 값을 증가시키는 것은 토마토 당도를 높일 수 있는 방법 중 하나로 토마토의 품질 향상에 중요한 의미를 갖게 된다. 토마토 당도에 염 처리를 할 경우 과실의 개수가 줄어들거나 과실의 형태가 불량해지는데, 황토가공신소재 처리구의 EC의 값과 과실의 개수 증가에 도움을 주는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 EC의 값의 증가로 인하여 과실의 당도가 증가한 것으로 사료된다. 유효인산, 유효규산과 총질소의 함량은 황토가공신소재 처리구와 규산질 비료 처리구에서 높은 수치를 나타냈다. 유효규산의 함량은 200배액에서 283 mg kg⁻¹로 가장 높게 나타났는데, 이는 황토가공신소재 내에 수용성으로 녹아 있는 규산의 영향일 것으로 사료된다.

표 3-2-35. 황토가공신소재와 규산질 비료 처리한 토마토의 토양의 화학적 특성

Treatments	pH	EC	OM ¹	Av. P ₂ O ₅	Av. SiO ₂	T-N	K	Ex. cation ²	Mg
	(1:5)	dS m ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	%		cmol*kg ⁻¹	
Control	7.0	0.34a	6a	47a	187a	0.042a	0.27a	5.8a	2.9d
200× ²	7.4	0.47c	9b	76c	283d	0.054b	0.27a	6.8b	2.4a
1000×	7.0	1.26d	9b	75b	225c	0.054b	0.29b	7.2c	2.7c
Fertilizer(1000×)	7.1	0.43b	11c	74b	215c	0.052b	0.30c	6.8b	2.5b
P-value ³	-	***	***	***	***	**	***	***	***

¹Means ± standard deviation

²200x : Processed-Red soil diluted 200-fold, 1000x : Processed-Red soil diluted 1000-fold, S : slouble silicate fertilizer diluted 1000-fold

³NS, and * represent significant value at Not significant and significant at p< 0.05. The value followed by the same letter are not significantly different based on the Duncan' s Multiple range test (P<0.05)

5. 황토가공신소재 농도별 처리 시 오이에 미치는 효과 구명

가. 연구목적

황토가공신소재를 오이에 처리할 경우 생육에 긍정적인 효과를 미치는 것으로 나타났으며, 황토가공신소재의 처리 적정농도를 구명하고자 본 연구를 수행하였다.

나. 재료 및 연구방법

(1) 시험장소 및 재배환경

본 실험은 동국대학교 바이오자원생태농장(경기도 고양시 식사동 소재)의 노지에서 포장 재배 시험을 수행하였다. 시험구의 기상정보는 다음과 같다(표 3-2-36).

표 3-2-36. 일산의 평균 온도, 강수량, 상대습도, 일조량 (출처:기상청)

2014	1	2	3	4	5	6	7
temp.(°C)	-3.1	-0.2	6	12.1	16.8	21.7	24.7
precipit.(mm)	7.8	19.5	5.1	18.7	70.7	59.4	164.6
humid(%)	63.6	62.8	61.7	61.2	64.4	73.3	76.1
duration of sunshine(hr)	191.4	182.1	219.2	205.1	301.4	196.8	200.9

오이는 “은성백다다기” 품종을 대상으로 하였으며, 정식 식재는 5월 23일에 하였고 수확은 식재하고 60일 경과 후에 하였다. 경운하기 전 10 a 당 퇴비 1000 kg 기비처리 후 180 × 240 cm 로 이랑을 만들었으며, 식재거리는 60 × 60 cm로 한 처리구당 6주씩 모종 식재하였다. 시험구의 토양정보는 다음과 같다. 작물의 초기 생장을 위한 비료 사용은 작물표준 시비량을 기준으로 추비는 요소비료를 이용하여 10 a 당 N: 8.8 kg을 시비하였다. 식재 전 일산 농장의 토양을 측정된 결과 pH는 7.4였으며, EC는 1.57 dS m⁻¹, 유기물함량은 6 g kg⁻¹ 이었으며, 유효인산과 유효규산은 각각 257, 260 mg kg⁻¹ 이었다(표 3-2-37).

표 3-2-37. 일산 바이오환경생태농장 토양 화학 특성

	pH	EC	OM	Avail. P ₂ O ₅	Avail SiO ₂	T-N	Exch. cation		
	(1:5)	d Sm ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹		%	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
							cmolckg ⁻¹		
Control	7.4	1.57	6	257	260	0.07	0.59	8.5	3.3

황토가공신소재(고형분 30%)는 물 10 L에 200배 희석액, 1000배 희석액으로 조제하여 처리하였다. 또한 황토가공신소재의 비료효과를 구명하기 위하여 사용한 규산질 비료(수용성규산 22%, 알카리 12%, 수용성붕소 0.05%, 수용성몰리브덴 0.0005%)는 시중에서 판매되는 것을 사용하였으며, 표시된 사용법에 따라 물 10 L를 기준으로 1000배 희석하여 처리하였다. 오이에 대한 처리는 14일 간격으로 한 처리구 당 1.5 L 씩 총 4회 관주하였다(표 3-2-38).

표 3-2-38. 황토가공신소재와 규산질 비료 희석 방법

Diluted solution	Red soil-Processed Material(mL)	water(L)
Control	0	
200×	50	10
1000×	10	
S	10	

²200x : Processed-Red soil diluted 200-fold, 1000x : Processed-Red soil diluted 1000-fold, S : slouble silicate fertilizer diluted 1000-fold

(2) 생육조사

생육조사는 농업과학기술 연구조사분석기준에 준하여 과정, 과폭, 엽장 등을 측정하였다[29].

(3) 형광반응 및 엽록소 함량

각 조건별 토마토의 형광반응 측정은 광합성 엽록소 형광측정계(OS-30P, ADC Bioscientific Ltd., UK)를 이용하여 3화방이 달린 줄기의 가장 끝에 있는 잎을 선택하여 sample clip을 사용해 측정 전 15분간 빛을 차단하여 암 조건에 적응시킨 후 엽록소 형광의 변화를 측정 하였다. 배추 형광반응 측정과 동일한 방법으로 $Fv/Fm = (Fm - Fo)/Fm$ 을 이용하여 최대광화학반응 효율 (Fv/Fm)를 측정하여 비교 분석하였다.

엽록소 함량과 카로티노이드 함량을 분석하기 위해 각 처리구에 있는 6개의 토마토 줄기 동일한 위치에 있는 가장 자리 부분의 성숙한 엽을 채취하였다. 실험을 하기 위해 잎 0.1 g을 아세트(80%) 10mL에 침지시켜 냉암소에서 7일간 침출 시킨 후 흡광도를 측정한다. 흡광도 측정은 UV/VIS spectrochotometer(UV-2100, Shimadzu, Japan)을 이용하였다. 클로로필을 측정하기 위해 사용한 파장은 663 nm, 645 nm, 470 nm이다. 엽록소 함량은 $mg mL^{-1}$ 를 기준으로 하여 계산하였다.[40, 55]

$$\text{Chlorophyll } a = 12.7 * A_{663} - 2.69 * A_{645}$$

$$\text{Chlorophyll } b = 22.9 * A_{645} - 4.68 * A_{663}$$

$$\text{Total Chlorophyll } (a+b) = 20.29 * A_{645} + 8.02 * A_{663}$$

$$\text{Total Carotenoid} = (1000 * A_{470} - 1.82 * chl a - 85.02 * chl b) / 198$$

(4) 유리당 함량 분석

유리당 분석은 시료 0.5 g을 취하여 50% EtOH 20 mL를 넣고 혼합한 후 80°C에서 30분간 초음파를 이용하여 추출하였다. 그 다음 원심분리기를 이용하여 3000 rpm(25°C)에서 10분 동안 원심 분리하여 여과 후 HPLC(Shiseido Nanospace SI-2, Japan)를 이용하여 분석 하였다. 분석에 사용된 Column은 Unison UK-Amino (250 × 3.0 mm, Imtakt co.), detector는 RID(shodex, Japan)를 사용하였다. Mobile phase는 90% acetonitrile를 이용하였고, column 온도는 55°C, flow rate는 400 $\mu L/min$ 이었다.

(5) 토양분석

토양분석은 토양 및 식물체 분석법에 준하여 실시하였다[28]. 토양 시료 채취는 1개의 시험구에서 10군데를 채취하여 고루 섞은 후 풍건한 후 20mesh 체를 이용하여 조제하였다.

(가) 산도(pH) 측정

토양 시료 5 g을 50 mL 비커에 취하여 증류수 25 mL를 가하여 유리봉으로 저어주면서 1시간 방치 후 60초 이내에 pH meter를 이용하여 측정하였다

(나) EC(전기전도도)

100 mL 삼각 플라스크에 10 g의 토양을 넣고 50 mL 증류수를 가하여 30분간 진탕하였다. 그 다음 여과지(No. 2)를 이용하여 여과한 후 pH meter를 이용하여 전기전도도를 측정하였다.

$$EC (dS m^{-1}) = \text{증류수 (mL)/토양무게 (g)} \times \text{측정치 (dS m}^{-1}) \times \text{온도보정계수}$$

(다) 유기물 분석

토양의 유기물 분석은 Tyurin법을 이용하여 분석하였다. 시료 0.5 g을 250 mL 삼각 플라스크에 취하여 10 mL의 0.4 N 중크롬산칼리황산혼합용액을 가한 다음 소형 깔데기를 덮고 200°C의 전열판에서 가열하였다. 플라스크 바닥에서 기포가 발생하기 시작할 때부터 정확히 5분간 끓인 후 차가운 물에 냉각시키고 증류수 150 mL를 가하였다. 그 다음 5 mL 85% H₃PO₄과 diphenylamin 5 방울을 가한 후 0.2 N 황산제1철암모늄으로 적정하였다

$$\text{토양 유기물 함량 (g kg}^{-1}) = C (\%) \times 1.724 \times 10$$

(라) 치환성 양이온

토양 5 g을 100 mL 삼각 플라스크에 넣고 1M NH₄OAc 침출액 50 mL로 30분 동안 진탕하였다. 진탕이 끝난 시료를 여과지(No. 2)로 여과한 후 ICP (Optima 8300, PerkinElme, USA)로 측정하여 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Ex. Ca (cmol}^+\text{kg}^{-1}) = \text{표준곡선 (mg L}^{-1}) \times 10 (\text{mL g}^{-1}) \times 1/200.4 \times \text{희석배수}$$

$$\text{Ex. K (cmol}^+\text{kg}^{-1}) = \text{표준곡선 (mg L}^{-1}) \times 10 (\text{mL g}^{-1}) \times 1/391 \times \text{희석배수}$$

$$\text{Ex. Mg (cmol}^+\text{kg}^{-1}) = \text{표준곡선 (mg L}^{-1}) \times 10 (\text{mL g}^{-1}) \times 1/121.5 \times \text{희석배수}$$

(마) 전질소 (Total-N)

토양의 전질소는 block digester법을 이용하여 수행하였다. 토양 시료 0.5 g을 켈달플라스크에 넣고 황산염혼합분말 1.5 g과 H₂SO₄ 5 mL를 넣은 다음 시료가 무색이 될 때까지 분해하였다. 히팅멘틀을 장치한 후 증류수를 채운 둥근 플라스크를 설치한 다음 증기를 이용하여 시료를 가열시켰다. 가열시켜 분해된 시료에 45% NaOH 용액 50 mL를 가하여 H₂SO₄ 표준용액으로 적정하였다.

$$T-N (\%) = (T - B) \times N \times f \times 14 \times 1/1,000 \text{ mL} \times 1/W \times 100$$

T: 황산표준용액 (mL)

B: Blank의 황산표준용액 (mL)

f: 황산표준용액의 보정치(factor)

N: 황산표준용액의 노르말농도

W: 토양시료의 무게 (g)

(바) 유효인산 (Lancaster 법)

토양 시료 5 g에 침출액 20 mL를 넣고 10분간 진탕 후 여과지(No. 2)를 이용하여 여과하였다. 표준 용액과 시료액 3 mL를 시험관에 넣고 조작액 6 mL씩 넣은 다음 0.4 mL의 1-amino-2-naphtol-4-sulfonic acid 용액을 가하여 혼합하여 30°C에서 항온한 후 720 nm에서 비색측정 하였다.

$$\text{Av. P}_2\text{O}_5 \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{표준곡선 ppm} \times 10 \text{ (mL g}^{-1}\text{)} \times 2.29$$

(사) 유효규산

토양 5 g을 100 mL 삼각 플라스크에 넣고 1 M NaOAc 50 mL를 가한 후 60°C에서 90분간 진탕 하였다. 그 다음 냉수로 5분간 식힌 후 여과지(No. 6)로 여과하였다. 시험관에 표준용액과 시료액 5 mL를 넣고 0.6 M HCl 2.5 mL, 10% ammonium molybdate 2.5 mL를 첨가한 다음 3분 후에 17% sodium sulfite 5 mL를 가하였다. 30°C에서 20분간 항온한 후 파장 700 nm에서 비색측정 하였다.

$$\text{토양중 SiO}_2 \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{표준곡선 ppm} \times 10 \text{ (mL g}^{-1}\text{)} \times 2.14^*$$

*2.14 = Si를 SiO₂로 환산하는 값

(6)통계분석

본 실험에 공시된 데이터는 평균(means) ± 표준편차(standard deviation)로 산출하였으며, 집단 간 편차를 살펴보기 위해 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 통계적 유의성은 5%에서 Duncan의 다중검정방법을 통해 비교하였다. 모든 통계처리는 SPSS Version 21(IBM Corp., USA)를 이용하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 생육분석

오이의 생장을 조사한 결과 황토가공신소재 처리농도가 증가할수록 과경, 과장, 생체중이 모두 증가하는 경향을 나타냈으며, 규산질비료 처리구에서도 증가하는 경향을 나타냈다(표 3-2-39). 하지만 처리구간에 유의성은 나타나지 않았다. 특히 과장에서는 황토가공신소재와 규산의 처리가 오이의 구부러짐을 방지하는 것을 볼 수 있었다. 이는 규소가 식물체에 집적되어 물리적 강도를 높여주어 직립할 수 있도록 영향을 준 것으로 사료된다.

오이의 열매 개수는 황토가공신소재 200배 희석액 처리구에서 133개로 무처리구보다 31%(32

개)가 증가되었다. 이는 토마토와 동일한 결과로 나타났으며, 황토가공신소재 1000배 희석액 처리구와 규산질비료 처리구에서는 무처리구보다 감소하는 것으로 나타났다. 규산 첨가 및 규산의 농도에 따라 오이의 수량에 영향을 미친 결과가 있었으며[45], 따라서 황토가공신소재 내의 규산의 농도가 높아질수록 수량 증가에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

표 3-2-39. 황토가공신소재와 규산질 비료 처리에 따른 오이의 생육

Treatments	Length(cm)	Diameter(mm)	Weight(kg)	Number
Control	20.39±3.95 ¹	36.13±6.68	0.21±0.08	101
200× ²	20.59±3.83	37.65±7.13	0.23±0.10	133
1000×	20.45±3.24	36.44±6.99	0.22±0.09	95
S	21.31±3.24	38.29±6.03	0.24±0.08	96
P-value ³	NS	NS	NS	-

¹Means ± standard deviation

²200x : Processed-Red soil diluted 200-fold, 1000x : Processed-Red soil diluted 1000-fold, S : slouble silicate fertilizer diluted 1000-fold

³NS, Not significant

(2) 엽록소 형광반응

본 실험은 무처리구에서 $100.72 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 가장 높은 값을 가졌으며, 규산질 비료 처리구에서 $48.33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 으로 가장 낮은 값을 나타냈다. 반면에 최대형광반응(Fm) 무처리구에서 $375.39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 처리구 중 가장 높은 값을 가졌으며, 규소질비료 처리구에서 $302.50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 으로 가장 낮은 값을 가졌다(그림 3-2-17).

형광반응효율은 규소질 비료 처리구에서 0.84로 무처리구 보다 15%(0.72) 유의성 있게 증가하였으며, 황토가공신소재 200배 희석액, 1000배 희석액 처리구에서는 무처리구와 유의성을 가지지 않았다. 엽록소 형광반응효율은 이온이나 염, 그밖에 환경적인 요소에 따른 스트레스를 지표로 측정하는 신뢰성 있는 방법으로 광계 II의 구조와 기능변화를 간편하게 측정할 수 있다[54]. 또한 작물의 생육환경, 스트레스 등의 조건에 따라 다르게 측정되며 일반적으로 0.8 정도의 값이 고등식물의 건전성을 나타낸다. 따라서 규산질비료 처리구만 값이 건전한 상태로 측정되었는데, 이는 규산칼륨 처리농도에 따라 엽록소가 유의하게 증가된 것과 유사한 결과를 보인다[56]. 또한 규산은 오이의 잎에서 많이 축적되며 세포벽을 단단하게 만들고, 세포벽 내에서 리그닌 역할과 비슷한 역할을 하며[46], 규소를 공급한 식물체의 잎은 광의 이용률을 증가시켜 광합성 작용을 한다는 연구가 보고된 바 있다[31].

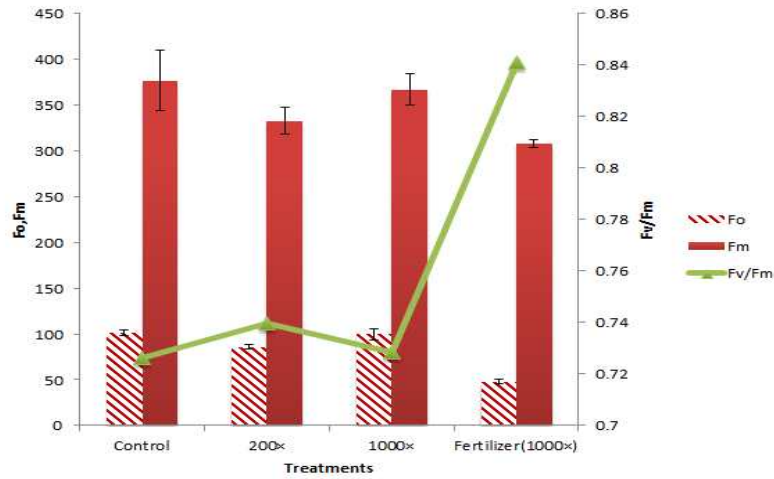


그림 3-2-17. 황토가공신소재와 규산질비료 처리에 따른 오이의 엽록소 형광반응효율

(3) 엽록소 함량 분석

엽록소 함량분석은 형광반응을 측정한 동일한 잎을 분석하였으며, 본 연구에서 처리구간 Chlorophyll 함량은 처리구 간에 유의미를 나타냈다(표 3-2-40). Chlorophyll *a* 에서 황토가공신소재 1000배 희석액이 처리구에서 15.30 mg mL^{-1} 으로 무처리구(13.51 mg mL^{-1}) 보다 14% 증가하였으며, 규산질비료 처리구는 13.72 mg mL^{-1} 로 무처리구보다 1.5% 증가했다. 반면 황토가공신소재 200배 희석액 처리구에서는 6% 유의하게 감소했다. Chlorophyll *b* 함량은 무처리구는 4.71 mg mL^{-1} 이며, 1000배 희석액은 5.14 mg mL^{-1} 로 9% 증가하는 경향을 보였으며, 규산질비료 처리구는 3.1% 증가하였고 200배 처리구에서만 무처리구보다 10% 감소하는 경향을 나타냈다.

총 엽록소 함량은 1000배 희석액 처리구가 20.77 mg mL^{-1} 로 무처리구 18.17 mg mL^{-1} 보다 14% 증가하는 경향을 보였으며, 규산질비료 처리구는 무처리구보다 2% 증가하는 경향을 나타냈다. 반면 황토가공신소재 200배 희석액 처리구는 무처리구보다 6% 감소하는 경향을 나타냈다. 작물의 엽록소 함량과 광합성 간에는 밀접한 관계가 있으며, 모든 작물의 생육과도 관련이 있다. 따라서 엽록소 함량의 차이에 따라서 광합성 능력이 달라지며 규산칼륨을 식물에 처리할 경우 규산을 흡수함으로써 줄기와 잎에서 기계적 안정성과 광흡수성이 높아져 광합성이 증가되는 결과를 나타냈다[45]. 규산칼륨 처리에 의한 잎의 엽록소 함량증가는 광합성 효율을 증가시킬 수 있다고 보고하였으며[47], 본 연구에서는 황토가공신소재 1000배 희석액을 처리할 경우 작물에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

카로티노이드 함량은 무처리구에서 3.42 mg mL^{-1} 로 처리구보다 높게 측정되었으며, 처리구 가운데 황토가공신소재 200배 희석액에서 3.08 mg mL^{-1} 로 가장 낮게 나타났다. 카로티노이드는 노란

색, 오렌지색과 빨간색을 나타내는 색소이며 모든 식물 조직과 잎에서 엽록소와 함께 엽록체 속에 존재한다고 하였다. 따라서 카로티노이드 함량이 높음과 동시에 클로로필 함량이 낮게 나타나는 것은 녹색 잎이 노란색으로 변해가고 있음을 나타내며, 잎의 노화가 황토가공신소재 처리구보다 빨리 진행되는 것으로 사료된다. 이는 규산칼륨 처리 10일 후 규산칼륨을 처리하지 않은 오이 잎이 처리구보다 노화가 촉진 된 것과 유사한 결과를 나타내었다[31].

표 3-2-40. 황토가공신소재와 규산질 비료 처리에 따른 엽록소 함량

Treatments	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a+b</i>	Car
Control	13.51±1.39a ¹	4.71±0.51ab	18.17±1.90a	3.42±0.22b
200× ²	12.69±0.70a	4.23±0.09a	17.07±0.91a	3.08±0.15a
1000×	15.30±1.37b	5.14±0.51b	20.77±1.93b	3.28±0.31ab
S	13.72±0.77a	4.86±0.27b	18.59±1.07a	3.19±0.16ab
P-value ³	**	*	**	NS

Chl *a* : Chlorophyll *a*, Chl *b* : Chlorophyll *b*, Chl *a+b* : Chlorophyll *a* + Chlorophyll *b*, Car : Carotenoid

¹Means ± standard deviation

²200x : Processed-Red soil diluted 200-fold, 1000x : Processed-Red soil diluted 1000-fold, S : slouble silicate fertilizer diluted 1000-fold

³ *, and ** represent significant value at $p < 0.05$ and 0.01 respectively. The values followed by the same letter are not significantly different based on the Duncan's Multiple range test ($P < 0.05$)

(4) 유리당 함량 분석

오이에 대한 황토가공신소재 처리구의 유리당 함량은 다음과 같다(그림 3-2-18). Fructose는 무처리구에서 1.07%, 규산질비료 처리구는 1.13%으로 무처리구보다 5.6% 증가하였으며, 황토가공신소재 처리구에서는 200배 희석액에서 1.08%으로 무처리구보다 0.9% 증가하였으나, 황토가공신소재 1000배 희석액 처리구는 무처리구와 별다른 차이가 없었다. Glucose는 무처리구에서 0.99%, 황토가공신소재 200배 희석액 처리구는 1.16%, 1000배 희석액 처리구는 1.04%, 규산질비료 처리구는 1.02%를 나타냈다.

과실 수확기에는 전분함량이 감소하며 당 함량이 증가하며, 특히 전분이 집중적으로 축적되는 시기에는 sucrose synthase가 활성화되며, 환원당 함량이 증가되는 시기에는 invertase의 활성이 증가되어 당 함량이 향상되었다고 보고하였다[57]. 또한 오이의 당 함량은 규산칼륨 농도가 증가할수록 당 함량이 유의하게 증가한다고 보고하였으며[56], 보리에 규산칼슘을 처리한 결과 RuBpcase의 활성촉진으로 인하여 당 함량이 증가되었다고 보고한 바 있다[24]. 황토가공신소재와 규산질비료 처리구 모두 당 함량이 증가함을 볼 수 있었는데 glucose는 황토가공신소재 200배 희석액 처리구에서 높게

나왔고 Fructose는 규산질비료 처리구가 높게 나왔으나 개체 간 유의성은 나타나지 않았다.

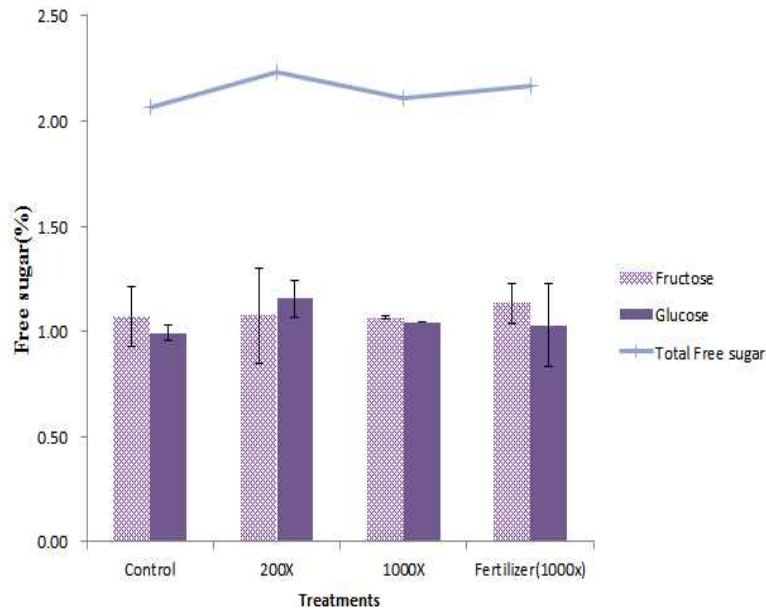


그림 3-2-18. 황토가공신소재와 규산질 비료 처리에 따른 유리당 함량

(5) 황토가공신소재 처리 후 오이 재배지의 토양 화학성분 분석

황토가공신소재와 규산질비료 처리에 따른 토양분석결과는 표 3-2-41과 같다. 오이 재배지의 토양의 적정 pH 범위는 pH 5.7~7.2으로 실험구의 토양은 약간 높은 pH 7.3~7.4로 측정되었으며, 처리구간 차이는 나타나지 않았다. 이는 하절기에 가까워지면서 토양 온도가 상승되고, 수분유입으로 인하여 수분 조건이 좋아진 물리적 영향 때문으로 사료된다[49].

EC 값은 무처리구에서 0.52 dS m⁻¹로 측정되었으며 처리구 모두 감소하는 경향을 보였다. 토양 내 유효규산 함량은 무처리구 292 mg kg⁻¹며, 황토가공신소재 200배 희석액에서는 246 mg kg⁻¹, 1000배 희석액은 265 mg kg⁻¹으로 나타났으며, 규산질비료 처리구는 236 mg kg⁻¹로 무처리구보다 모두 감소하였다. 이는 규산칼륨 배양액 실험에서도 동일한 결과로 나타났으며[56], 오이는 벼 다음으로 규산을 많이 흡수하는 것으로 알려져 있다[42]. 따라서 오이가 토양에 처리된 황토가공신소재와 규산질비료에 있는 수용성 규산을 많이 흡수했을 것으로 사료된다. 또한 황토가공신소재 200배 희석액에서 처리구 유효인산 함량은 53 mg kg⁻¹, 유효규산은 246 mg kg⁻¹, 총질소는 0.043%, K 함량은 0.28 cmol*kg⁻¹, Ca 함량은 7.4 cmol*kg⁻¹, Mg 함량은 2.7 cmol*kg⁻¹으로 모두 무처리구보다 감소하는 경향을 나타내었다. 반면 황토가공신소재 1000배 희석액에서는 유효인산이 무처리구보다 49% 증가하였다. 규산질비료 처리구는 무처리구에 비해 유기물과 총질소 그리고 치환성 양이온이 모두 증가함을 보였다.

화학비료 처리시 pH는 변화하지 않으나 유기물과 무기물이 모두 증가하는 결과 값과 유사하다고 보

고 된 바 있으며[58], 규산질비료 처리구와 유사한 값을 나타냈다. K값은 황토가공신소재 처리구에서는 감소하는 경향을 보이는 반면 규산질비료에서는 증가하였는데, 이는 식물에 규산을 처리하였을 경우 K의 흡수가 촉진된다고 하였으나 본 연구에서는 확인할 수 없었다.

그림 3-2-41. 황토가공신소재와 규산질 비료 처리에 따른 오이 재배지의 토양의 화학적 특성

Treatments	pH	EC	OM ¹	Av. P ₂ O ₅	Av. SiO ₂	T-N	K	Ex. cation ²	
	(1:5)	dS m ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹		%	cmol ⁺ kg ⁻¹		
Control	7.4b	0.52d	9b	61b	292b	0.049b	0.43c	8.6c	2.1a
200× ³	7.4b	0.41a	6a	53a	246a	0.043a	0.28a	7.4b	2.7c
1000×	7.3a	0.49c	6a	91c	235a	0.048b	0.33c	7.0a	2.6b
S	7.3a	0.45b	11b	84d	236a	0.056c	0.47d	8.8c	2.6b
P-value ⁴	**	***	***	***	***	***	***	***	***

¹ OM : Organic matter

² Ex.cation : Exchangeable cations

³200x : Processed-Red soil diluted 200-fold, 1000x : Processed-Red soil diluted 1000-fold, S : slouble silicate fertilizer diluted 1000-fold

⁴NS, *, **, and *** represent Not significant or significant value at p<0.05, 0.01 and 0.001 respectively. The values followed by the same letter are not significantly different based on the Duncan' s Multiple range test (P<0.05)

6. 황토가공신소재가 특용작물에 미치는 영향

가. 연구목적

황토가공신소재를 이용한 고소득 창출을 위하여 특용작물 중 최근 각광받고 있는 장뇌삼을 선택하였으며, 황토가공신소재처리가 장뇌삼에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 수행하였다. 본 시료는 2협동 과제 성분분석 시료로 제공되었으며 2세부에서도 5~6년근 장뇌삼을 을 이용하여 3차년도 연구수행에 앞서 사포닌 함량 등 기초 조사를 수행하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 장소 및 재배환경

본 실험은 동국대학교 운길산 학술림(경기도 남양주시 조안면 소재)에서 수행하였다(그림 3-2-19). 황토가공신소재는 2013년 11월 22일에 처음 장뇌삼 재배지에 처리 하였으며, 처리농도는 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm 희석하여 사용하였다(표 3-2-42). 처리 기간은 2주 간격으로 총 세 번 처리한 후 2014년 6월 25일 최종 수확 하였다. 학술림의 장뇌삼 처리구의 평균 기온은 30° 로 방향은 북서쪽이며, 학술림이 소재한 남양주시의 평균기온, 강수량, 상대습도 그리고 토양정보는 다음과 같다(표 3-2-43, 44).



그림 3-2-19. 운길산 학술림 내 황토가공신소재 처리를 위한 장뇌삼 처리구

표 3-2-42. 황토가공신소재의 장뇌삼 처리를 위한 희석 방법

Concentration(ppm)	Red soil-Processed Material(mL)	water(L)
Control	0	
500	5	10
1000	10	
2000	20	

표 3-2-43. 남양주의 평균온도, 강수량, 상대습도 (출처:기상청)

2013-2014	10	11	12	1	2	3	4	5	6
temp.	14.2	4.9	-1.4	-2	1.2	7.3	13.6	18.6	22.8
precipit.	17.6	75.9	21.9	16.6	18	11.7	31.6	60	97
humid	75.8	71.9	76.6	66.2	65.5	59.8	59.4	59.9	69.5

표 3-2-44. 운길산의 토양 화학 특성

	pH	EC	OM	Avail. P ₂ O ₅	Avail SiO ₂	T-N	Exch. cation		
	(1:5)	dS m ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹		%	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
							cmolckg ⁻¹		
Ungil Mt.	4.6	1.22	50	72	65	0.17	0.267	1.5	0.4

(2) 토양 분석

(가) 산도(pH) 측정

토양 시료 5 g을 50 mL 비커에 넣고 증류수 25 mL를 가하여 유리봉으로 저어주면서 1시간 방치 후 60초 이내에 pH meter를 이용하여 측정하였다.

(나) EC(전기전도도)

100 mL 삼각 플라스크에 10 g의 토양을 넣고 50 mL 증류수를 가하여 30분간 진탕하였다. 그 다음 여과지(No. 2)를 이용하여 여과한 후 pH meter를 이용하여 전기전도도를 측정하였다.

EC (d Sm⁻¹) = 증류수 (mL)/토양무게 (g) × 측정치 (dS m⁻¹) × 온도보정계수

(다) 유기물 분석

토양의 유기물 분석은 Tyurin법을 이용하여 분석하였다. 시료 0.5 g을 250 mL 삼각 플라스크에 취하여 10 mL의 0.4 N 중크롬산칼리황산 혼합용액을 가한 다음 소형 깔데기를 덮고 200°C의 전열판에서 가열하였다. 플라스크 바닥에서 기포가 발생하기 시작할 때부터 정확히 5분간 끓인 후 차가운 물에 냉각시키고 증류수 150 mL를 가하였다. 그 다음 5 mL 85% H₃PO₄과 diphenylamin 5 방울을 가한 후 0.2 N 황산제1철암모늄으로 적정하였다

토양 유기물 함량 (g kg⁻¹) = C (%) × 1.724 × 10

(라) 치환성 양이온

토양 5 g을 100 mL 삼각 플라스크에 넣고 1M NH₄OAc 침출액 50 mL로 30분 동안 진탕하였다. 진탕이 끝난 시료를 여과지(No. 2)로 여과한 후 ICP (Optima 8300, PerkinElme, USA)로 측정하여 다음 식을 이용하여 계산하였다.

Ex. Ca (cmol*kg⁻¹) = 표준곡선 (mg L⁻¹) × 10 (mL g⁻¹) × 200.4⁻¹ × 희석배수

Ex. K (cmol*kg⁻¹) = 표준곡선 (mg L⁻¹) × 10 (mL g⁻¹) × 391⁻¹ × 희석배수

Ex. Mg (cmol*kg⁻¹) = 표준곡선 (mg L⁻¹) × 10 (mL g⁻¹) × 121.5⁻¹ × 희석배수

(마) 전질소 (Total-N)

토양의 전질소는 block digester법을 이용하여 수행하였다. 토양 시료 0.5 g을 켈달플라스크에 넣고 황산염혼합분말 1.5 g과 H₂SO₄ 5 mL를 넣은 다음 시료가 무색이 될 때까지 분해하였다. 히팅 멘틀

을 장치한 후 증류수를 채운 둥근 플라스크를 설치한 다음 증기를 이용하여 시료를 가열시켰다. 가열 시켜 분해된 시료에 45% NaOH 용액 50 mL을 가하여 H₂SO₄ 표준용액으로 적정하였다.

$$T-N (\%) = (T - B) \times N \times f \times 14 \times 1/1,000 \text{ mL} \times 1/W \times 100$$

T: 황산표준용액 (mL)

B: Blank의 황산표준용액 (mL)

f: 황산표준용액의 보정치(factor)

N: 황산표준용액의 노르말농도

W: 토양시료의 무게 (g)

(바) 유효인산 (Lancaster 법)

토양 시료 5g에 침출액 20 mL를 넣고 10분간 진탕 후 여과지(No. 2)를 이용하여 여과하였다. 표준용액과 시료액 3 mL를 시험관에 넣고 조작액 6 mL씩 넣은 다음 0.4 mL의 1-amino-2-naphtol-4-sulfonic acid 용액을 가하여 혼합하여 30°C에서 항온한 후 720 nm에서 비색측정 하였다.

$$Av. P_2O_5 (\text{mg kg}^{-1}) = \text{표준곡선 ppm} \times 10 (\text{mL g}^{-1}) \times 2.29$$

(사) 유효규산

토양 5 g을 100 mL 삼각 플라스크에 넣고 1 M NaOAc 50 mL를 가한 후 60°C에서 90분간 진탕 하였다. 그 다음 냉수로 5분간 식힌 후 여과지(No. 6)로 여과하였다. 시험관에 표준용액과 시료액 5 mL를 넣고 0.6 M HCl 2.5 mL, 10% ammonium molybdate 2.5 mL를 첨가한 다음 3분 후에 17% sodium sulfite 5 mL를 가하였다. 30°C에서 20분간 항온한 후 파장 700 nm에서 비색측정 하였다.

$$\text{토양중 SiO}_2 (\text{mg kg}^{-1}) = \text{표준곡선 ppm} \times 10 (\text{mL g}^{-1}) \times 2.14^*$$

*2.14 = Si를 SiO₂로 환산하는 값

(3) 사포닌 분석

사포닌 분석은 장뇌삼 시료의 약 1 g을 정량하여 250 mL 환류용 플라스크에 넣고 50% methanol 50 mL를 가하여 70~80°C의 water bath에서 1시간동안 환류 추출한 후 냉각시키고 원심 분리하여 상등액을 취한다(상등액A). 잔류물에 다시 50% methanol 50 mL를 가하여 70~80 °C의 water bath에 1시간동안 환류 추출한 후 냉각시키고 원심 분리하여 상등액을 취한다(상등액B). 상등액 A와B를 합친 후 SPE C18 cartridge를 이용하여 clean up 단계를 거친다. 그 다음 0.22um syringe filter를 이용하여 filtering 후 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다. Column 은 BEH C8(2.1 mm ×100 mm, 1.7 μm, UPLC technology), 이동상은 용매 A를 0.1% Formic

acid, B를 Acetonitrile로 사용하여 A:B의 초기비율을 80:20으로 시작하여 2분에 68:31, 20분에 48:52, 26분에 20:80, 30분에 80:20의 비율로 단계적으로 흘려주었다(표 3-2-45).

표 3-2-45. 사포닌 분석을 위한 LC 장비 조건

Time	Acetonitrile(%)	0.1% Formic acid
Initial	20	80
0.1	20	80
2	32	68
7	33	67
20	52	48
23	53	47
26	80	20
26.9	100	0
27	20	80
30	20	80

다. 결과 및 고찰

(1) 황토가공신소재 처리에 따른 장뇌삼 재배지의 토양 이화학적 특성 분석

황토가공신소재 처리에 따른 장뇌삼 처리구의 토양분석은 다음과 같다(표 3-2-46). 무처리구에서 pH는 4.3으로 처리구보다 낮은 값을 보였다. 또한 EC값도 무처리구에서 재배 전 토양보다 1.68 d Sm⁻¹ 높아졌는데, 처리구는 무처리구보다 조금 상승한 것으로 보아 EC값에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보인다. 진세노사이드 함량은 유기물 함량이 높고 유효인산과 치환성 Na⁺, Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ 함량이 낮을수록, Cu, Zn의 함량은 많을수록 증가했다고 보고되었다[40]. 그 중 Rc, Rb2, Rd의 경우는 치환성 이온이 많을수록 낮게 나타난다고 보고했는데, 본 실험의 경우 무처리구보다 처리구가 높게 나온 것으로 보아 황토가공신소재가 처리구의 토양에 긍정적인 영향을 미친 것으로 판단된다.

표 3-2-46. 황토가공신소재 농도에 따른 장뇌삼 재배지 토양 화학 특성

	pH	EC	OM	Avail. P ₂ O ₅	Avail SiO ₂	T-N	K ⁺	Exch. cation Ca ²⁺	Mg ²⁺
	(1:5)	dSm ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹		%		cmolckg ⁻¹	
Control	4.3	2.90	52	35	92	0.18	0.40	2.2	0.7
500ppm	4.5	1.44	50	46	73	0.18	0.28	1.4	0.4
1000ppm	4.5	1.53	47	34	85	0.17	0.32	1.5	0.4
2000ppm	4.5	1.31	47	32	81	0.17	0.25	1.4	0.4

(2) 사포닌 분석

조사지 내에서 채취한 장뇌삼 시료의 형태적 차이점이 없었으며, 이는 본 연구에 사용된 시료의 연령이 4년생으로 어린 장뇌삼을 분석한 결과로 판단된다(그림 3-2-20).

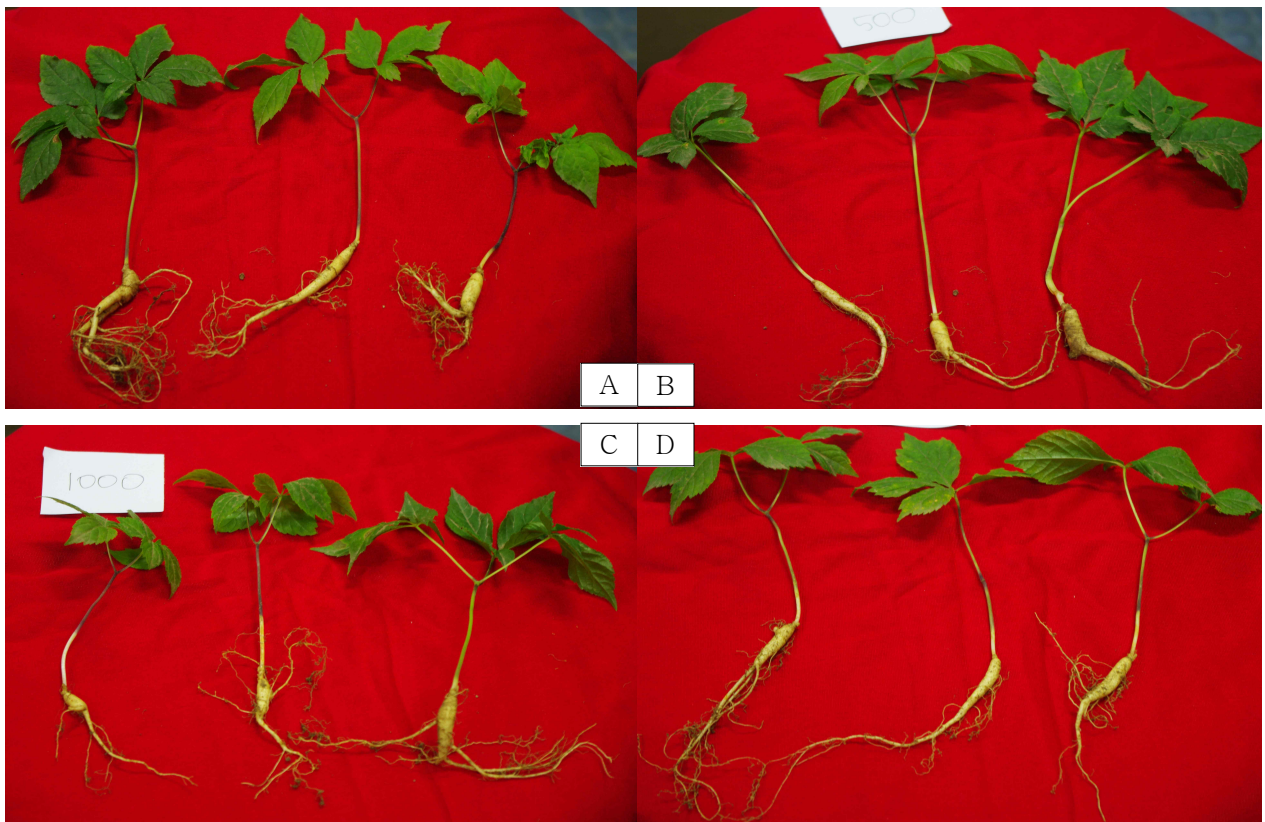


그림 3-2-20. 황토가공신소재 처리 농도에 따른 장뇌삼의 사진

A: Control, B : Processed-Red soil 500 ppm, C : Processed-Red soil 1000 ppm, D : Processed-Red soil 2000 ppm

장뇌삼 시료의 ginsenoside 함량분석은 장뇌삼 4년근을 사용하였으며, 사포닌의 대표적인 6개의 ginsenoside(Re, Rg, Rb1, Rc, Rb2, Rd)를 분석하였다(표 3-2-47). 무처리구와 비교한 결과 처리구의 모든 ginsenoside 함량이 높게 나타났다. 장뇌삼의 경우 황토가공신소재 100배 희석일 경우 Re, Rg1, Rb1이 가장 높게 나왔으며, Rc, Rb2, Rd에서는 50배 희석이 가장 높게 나왔다(그림 3-2-21).

표 3-2-47. 황토가공신소재 농도별 처리에 따른 사포닌 분석 함량

compund	Control	500ppm	1000ppm	2000ppm
	(mg g ⁻¹)			
Re	3103.76	3610.95	4519.70	3629.51
Rg1	1466.85	1907.10	2029.70	1590.69
Rb1	3194.42	3990.28	5585.25	4534.62
Rc	1229.82	1407.89	1630.59	1816.42
Rb2	1090.65	1401.65	1431.68	1719.44
Rd	1179.15	1308.25	1484.46	1992.08

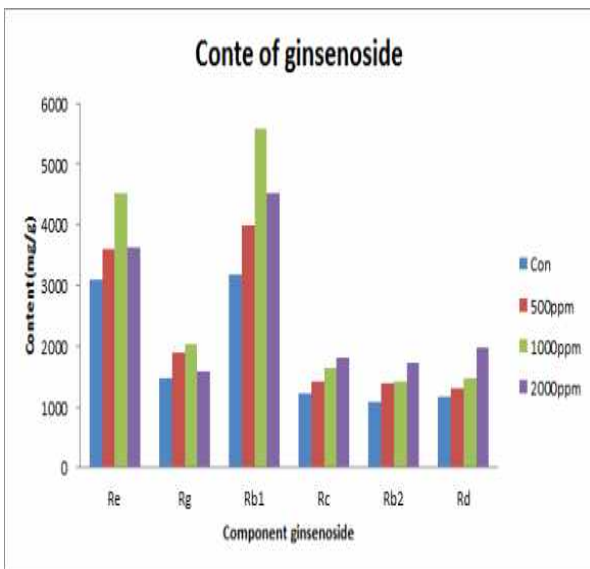


그림 3-2-21. 황토가공신소재 처리 농도에 따른 진세노사이드 함량

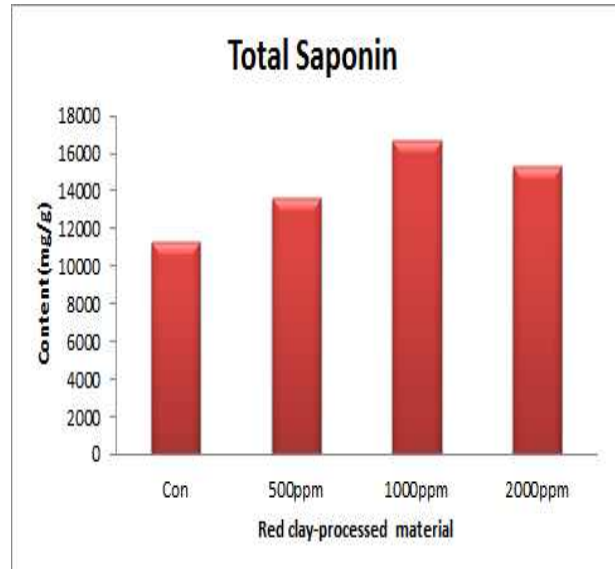


그림 3-2-22. 황토가공신소재 처리 농도에 따른 총 사포닌 함량

총 사포닌을 많이 포함하고 있다는 것은 약리 활성이 높은 것으로 말 할 수 있다. 따라서 100 배 희석 처리구가 16681.38 mg kg⁻¹로 가장 높게 나타났으며, 가장 우수한 시료로 추정할 수 있다. 분석 가능한 총사포닌 함량은 무처리구보다 황토가공신소재 처리구에서 높게 나타나는 경향을 나타냈으며, 따라서 황토가공신소재처리가 장뇌삼의 사포닌 함량에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단 할 수 있다(그림 3-2-22). 이는 황토가공신소재의 주요 성분인 규산의 작용으로 인하여 특정원소의 과잉흡수를 막아주고, 필요한 원소와 수분의 흡수에 도움이 된 것으로 생각된다. 재배지역별 생리, 생태적 특성과 성분차이에서 남양주의 7년생의 장뇌삼의 경우 Re가 3654 mg kg⁻¹, Rg1이 3654 mg kg⁻¹, Rb1이 2014 mg kg⁻¹, Rc가 1364 mg kg⁻¹, Rb2가 3674 mg kg⁻¹, Rd가 2141 mg kg⁻¹정도로 나타났다고 하였다[59]. 무처리구의 경우 Rb1을 제외한 값

들이 낮게 나오는 경향을 보였으나, 처리구의 경우 Re, Rb1, Rc에서 높은 경향을 보였다. 이는 재배지의 일조 조건과 경사도, 토양의 성분 등에 따른 차이가 있을 것으로 사료된다. 토양 내의 유기물 함량이 많을수록 뿌리의 glucose, sucrose 및 유리당의 함량에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 황토가공신소재가 장뇌삼에 미치는 영향에 대해서 좀 더 정확한 연구 결과를 얻기 위해서는 황토가공신소재처리에 따른 장뇌삼의 당류 및 유리당의 함유율과 항산화 활성 등의 생리적 분석이 필요할 것으로 생각된다. 더 나아가 장뇌삼을 구성하고 있는 물질들과 황토가공신소재의 상관관계에 있어서 규명이 필요할 것으로 사료된다.

7. 황토가공신소재와 친환경 비료의 사용이 장뇌삼에 미치는 영향 규명

가. 연구목적

선행연구를 바탕으로 왕겨와 퇴비를 피복처리하고 황토가공신소재를 농도별로 처리하여 장뇌삼 종자의 발아율에 미치는 영향을 알아보고, 생육과 장뇌삼의 주요 성분을 분석하였다. 본 연구는 황토가공신소재와 실제 농가에서 사용하는 친환경 농자재를 함께 사용하여 무처리구와 처리구의 차이를 분석하고 농가에서 효과적인 재배를 할 수 있는 방법을 규명하기 위하여 수행하였다.

나. 연구재료 및 방법

(1) 장소 및 재배환경

본 실험은 동국대학교 운길산 학술림(경기도 남양주시 조안면 소재)에서 수행하였다. 장뇌삼은 2014년 11월 26일에 한 처리구당 100 g의 종자를 파종함과 동시에 황토가공신소재를 1차 처리하였다. 황토가공신소재 처리구는 500배 희석액, 1000배 희석액, 2000배 희석액 처리구로 설계하였으며 왕겨와 퇴비 처리구도 동일한 방법으로 설계하였다. 2015년 4월 7일 종자 발아되기 전 2차 처리하였으며, 그 후 2주 간격으로 총 두 번 더 처리한 후 2015년 6월 22일 일부 수확하여 측정하였다. 학술림의 장뇌삼 처리구의 평균 기온은 30° 로 방향은 북서쪽이며, 학술림이 소재한 남양주시의 평균기온, 강수량, 상대습도 그리고 토양정보는 다음과 같다(표 3-2-48).

표 3-2-48. 남양주시의 평균온도, 강수량, 상대습도(출처: 기상청)

2014-2015	11	12	1	2	3	4	5	6
temp.	6.9	-3.6	-1.6	0.6	6.0	12.8	18.9	23.2
precipit.	36.2	13.4	13.5	22.5	9.0	96.1	34.1	83.9
humid	75.2	63.9	68.4	65.6	48.9	61.9	58.1	62.9

(2) 발아율 분석

처리구를 4등분 하여 전수조사 하였으며 구하는 식은 다음과 같다.

$$\text{발아율} = \frac{\text{총 발아수}}{\text{총 공시 종자수}} \times 100$$

(3) 생육 분석

장뇌삼의 생육 분석은 지상부와 지하부로 나누어 측정하였으며, 주근 길이와 세근의 개수, 총 중량과 줄기, 뿌리 중량을 측정하였다.

(4) 사포닌 분석

사포닌 분석은 장뇌삼 시료의 약 1 g을 정량하여 250mL 환류용 플라스크에 넣고 50% methanol 50 mL를 가하여 70~80°C의 water bath에서 1시간동안 환류 추출한 후 냉각시키고 원심 분리하여 상등액을 취한다(상등액A). 잔류물에 다시 50% methanol 50 mL를 가하여 70~80 °C의 water bath에 1시간동안 환류 추출한 후 냉각시키고 원심분리하여 상등액을 취한다(상등액B). 상등액 A와B를 합친 후 SPE C18 cartridge를 이용하여 clean up 단계를 거친다. 그 다음 0.22um syringe filter를 이용하여 filtering 후 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다. Column은 BEH C8(2.1 mm ×100 mm, 1.7 μm, UPLC technology), 이동상은 용매 A를 0.1% Formic acid, B를 Acetonitrile로 사용하여 A:B의 초기비율을 80:20으로 시작하여 2분에 68:31, 20분에 48:52, 26분에 20:80, 30분에 80:20의 비율로 단계적으로 흘려주었다(표 3-2-49).

표 3-2-49. 사포닌 분석을 위한 LC 장비 조건

Time	Acetonitrile(%)	0.1% Formic acid
Initial	20	80
0.1	20	80
2	32	68
7	33	67
20	52	48
23	53	47
26	80	20
26.9	100	0
27	20	80
30	20	80

(5) 통계처리

본 실험에 공시된 데이터는 평균(means) ± 표준편차(standard deviation)로 산출하였으며, 집단 간 편차를 살펴보기 위해 Duncan's multiple range test 방법을 사용하여 5% 수준에서 유의성을 검정하였다. 모든 통계처리는 SPSS Version 21(IBM Corp., USA)를 이용하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 발아율

친환경 비료에 황토가공신소재를 달리하여 처리한 결과 발아율은 표 3-2-50과 같이 산출되었다. 전반적으로 황토가공신소재를 처리할 경우 발아율이 증가하는 경향을 나타냈으며, 친환경 자재를 처리한 실험구가 그렇지 않은 실험구보다 발아율이 높게 나옴을 알 수 있었다. 무처리구와 왕겨 실험구의 경우 황토가공신소재의 농도가 증가할수록 발아율이 증가하는 경향을 보였으나, 퇴비의 경우는 1000배 희석액 처리구에서 34.11%로 가장 높게 발아하였다. 왕겨 처리구의 경우 대체로 발아율이 높았으며, 특히 황토가공신소재 처리구에서 모두 30% 이상의 발아율을 보였다. 특히

실험 결과 중 왕겨+2000배 희석액 처리구가 전체에서 38.52%로 가장 높은 값을 나타냈다. 왕겨 피복효과는 발아초기에 수분 증발과 잡초발생을 억제하고, 온도를 일정하게 유지하여 종자 발아력을 높이는 효과가 있다[55]. 실험실 단위의 종자발아 결과와 포장에서의 유묘 출현율의 차이가 발생하는데, 이는 발아에 빛 조건과 광의 유무 및 광원에 있어서 인위적으로 제어할 수 없기 때문이다. 또한 장뇌삼과 같이 약용작물은 소립종자가 대부분이기 때문에 발아와 관련된 빛 조건을 우선적으로 고려하여야 하며 실제 농가에 적용했을 경우 각별한 주의가 필요하다. 따라서 황토가공신소재가 발아에 미치는 효과를 구명하는 것은 농가의 직접적인 소득창출에 기여를 할 것으로 사료되며, 장기간동안 관찰하며 계속 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다.

표 3-2-50. 황토가공신소재 농도와 친환경 비료 처리에 따른 장뇌삼의 발아율

Fertilizers	RCPM (mL L ⁻¹)	germination rate (%)
Control	0	16.17
	20	29.47
	10	25.35
	5	34.88
	0	29.47
Rice husk	20	35.17
	10	32.64
	5	38.52
	0	25.82
	20	23.94
Compost	10	34.11
	5	22.11

(2) 생육 측정

황토가공신소재 농도에 따른 효과를 살펴보기 위해서 지상부와 지하부를 나눠서 생육을 측정하였다(표 3-2-51). 지상부의 줄기를 측정된 결과 퇴비 처리구에서 높은 값을 나타냈으며, 그 중 황토가공신소재 500배 희석액 처리구를 제외한 나머지 실험구에서 높게 측정되었다. 장뇌삼의 주근의 길이를 측정된 결과 비료 처리에 대해서는 유의미하지 않았으며, 황토가공신소재 1000배 희석액 처리구에서 비교적 높게 측정되었다. 장뇌삼의 세근의 개수를 세어 본 결과 비료 처리하지 않은 실험구에서 세근의 개수가 증가하는 경향을 보였으며, 1000배 희석액 처리구에서 약 16개로 가장 많음을 알 수 있었다. 생중량을 측정된 결과 왕겨를 처리한 실험구에서 유의적으로 증가함을 알 수 있었으며, 황토가공신소재 1000배, 2000배 희석액에서 증가하는 경향을 보였다. 생중량 중 지상부의 경우는 황토가공신소재 처리에 대해서는 영향을 받지 않았으며, 왕겨 처리구가 무처리구보다 증가하는 경향을 보였다. 반면 지하부의 경우 왕겨 처리구에서 무게가 증가하는 경향을 보였으며, 전반적으로 황토가공신소재 1000배, 2000배 희석액 처리구에서 증가함을 알 수 있었다. 장뇌삼의 뿌리는 지상부 성장 시에는 스펀지 상태로 무게와 밀도가 줄고 지상부가 생육이 왕성하며 광합성 양분의 40% 정도가 뿌리 생육에 사용된다[30]. 따라서 퇴비 처리를 할 경우 지하부 보다는 지상부의 생육에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 왕겨를 처리할 경우 지상부보다 지하부의 생육에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

표 3-2-51. 황토가공신소재 농도와 친환경 비료 처리에 따른 장뇌삼의 생육

Fertilizers	RCPM ₁ (mL L ⁻¹)	Length(cm)		Number of rootlet	Total weight(g)	Weight(g)	
		Stem	Root			Stem	Root
Control	0	12.56±2.27 ^{Aab1)2)}	3.76±0.91 ^{Aa}	12.65±3.44 ^{Ba}	0.23±0.04 ^{Aa}	0.14±0.02 ^{Aa}	0.06±0.02 ^{Aa}
	20	10.11±1.40 ^{Ba}	4.18±1.11 ^{Abc}	13.25±3.20 ^{Bb}	0.26±0.04 ^{Ab}	0.14±0.02 ^{Aa}	0.09±0.04 ^{Ab}
	10	11.35±0.93 ^{Bb}	5.61±1.65 ^{Ac}	16.79±5.09 ^{Bc}	0.28±0.06 ^{Ab}	0.14±0.03 ^{Aa}	0.10±0.03 ^{Ab}
	5	12.47±0.64 ^{Bb}	3.80±1.22 ^{Aab}	13.80±3.48 ^{Bb}	0.28±0.04 ^{Aab}	0.13±0.02 ^{Aa}	0.08±0.02 ^{Aa}
Rice husk	0	10.75±1.52 ^{Ab}	3.80±1.05 ^{Aa}	12.80±3.87 ^{ABa}	0.30±0.06 ^{Ba}	0.15±0.04 ^{Ba}	0.09±0.03 ^{Ba}
	20	10.55±1.38 ^{Aa}	4.55±1.28 ^{Abc}	13.31±4.11 ^{ABb}	0.33±0.04 ^{Bb}	0.17±0.03 ^{Ba}	0.11±0.03 ^{Bb}
	10	12.17±1.76 ^{Ab}	4.76±0.93 ^{Ac}	15.78±3.10 ^{ABc}	0.35±0.06 ^{Bb}	0.17±0.04 ^{Ba}	0.14±0.07 ^{Bb}
	5	11.52±1.78 ^{Ab}	4.29±0.99 ^{Aab}	12.35±3.47 ^{ABb}	0.31±0.07 ^{Bab}	0.17±0.04 ^{Ba}	0.14±0.08 ^{Ba}
Compost	0	12.20±3.30 ^{Cb}	4.00±1.48 ^{Aa}	11.19±4.51 ^{Aa}	0.27±0.08 ^{Aa}	0.14±0.02 ^{ABa}	0.09±0.02 ^{ABa}
	20	12.27±1.33 ^{Ca}	4.24±1.22 ^{Abc}	14.45±3.94 ^{Ab}	0.29±0.05 ^{Ab}	0.12±0.03 ^{ABa}	0.12±0.11 ^{ABb}
	10	11.81±1.46 ^{Cb}	3.88±1.54 ^{Ac}	12.73±4.98 ^{Ac}	0.24±0.05 ^{Ab}	0.14±0.03 ^{ABa}	0.09±0.05 ^{ABb}
	5	11.88±1.62 ^{Cb}	3.69±1.18 ^{Aab}	13.95±4.75 ^{Ab}	0.24±0.05 ^{Aab}	0.13±0.02 ^{ABa}	0.08±0.02 ^{ABa}

1) Means with different capital letters in the same column are significantly different($P<0.05$).

2) Means with different small letter in the same row are significantly different($P<0.05$).

(3) 사포닌 분석

황토가공신소재와 친환경 비료를 함께 사용하였으며 효과를 검증하기 위해서 지상부와 지하부의 사포닌을 분석하였다(그림 3-2-23~24). 지상부와 지하부의 사포닌 성분함량은 다르게 함유하고 있으며, 지상부의 경우 Rg1, 지하부는 Rb1을 많이 함유하고 있었다. 이는 봄철에 나오는 장뇌삼의 경우 지상부와 지하부를 같이 함께 씹어 삼키는 경우가 많은데, 근거를 뒷받침 할 수 있는 연구결과라 할 수 있겠다. Rb1의 함량은 지상부는 왕겨+황토가공신소재 1000배 희석액 처리구가 567.68mg kg⁻¹으로 나타났고, 지하부는 퇴비+황토가공신소재 500배 희석액 처리구가 2936.48 mg kg⁻¹으로 분석되었다. Rg1의 함량은 왕겨+황토가공신소재 1000배 희석액 처리구가 12996.35 mg kg⁻¹으로 나타났으며 지하부는 퇴비+황토가공신소재 500배 희석액 처리구가 2632.72 mg kg⁻¹으로 분석되었다. 국내 산양삼의 경우 지역 간, 연근의 차이는 있으나 Rg1은 949~3654 μg g⁻¹, Rb1은 972~2014 μg g⁻¹의 함량을 나타내며 연근 수가 높을수록 진세노사이드의 함량이 높은 것으로 나타났다[30]. 인삼의 사포닌성분은 주요 생리활성물질 중의 하나로서 다양한 약리효과와 생리활성이 밝혀져 품질평가의 지표성분으로 활용되고 있다[52].

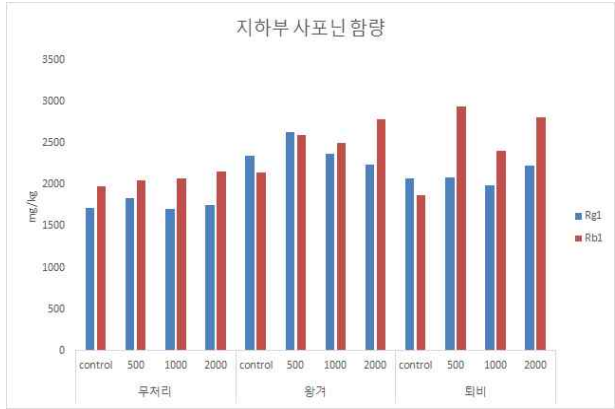


그림 3-2-23. 황토가공신소재의 농도와 친환경 비료 처리에 따른 지상부 사포닌(Rg1, Rb1) 함량

그림 3-2-24. 황토가공신소재의 농도와 친환경 비료 처리에 따른 지하부 사포닌 (Rg1, Rb1) 함량

(4) 총 폴리페놀 함량

황토가공신소재와 친환경비료를 함께 처리한 후 장뇌삼의 지상부와 지하부의 총폴리페놀 함량을 분석하였다(그림 3-2-25). 폴리페놀 물질은 대사과정 중에 발생하는 유해한 과산화물질을 제거하는 작용과 항산화 작용을 나타낸다. 또한 폴리페놀 화합물은 만성질환의 원인인 산화스트레스와 여러 가지 생리적 요인을 제거하여 세포와 조직을 보호하고 파괴를 방지하는 물질로 여겨진다. 총 폴리페놀 함량은 지상부에서 높은 함량을 나타냈으며, 무처리구에 비해 왕겨와 퇴비를 처리한 실험구에서 높게 나왔다. 지상부의 폴리페놀 함량은 왕겨+황토가공신소재 500배 희석액 처리구에 높게 나타났으며, 지하부는 퇴비+황토가공신소재 500배 희석액 처리구에서 높게 나타남을 알 수 있었다.

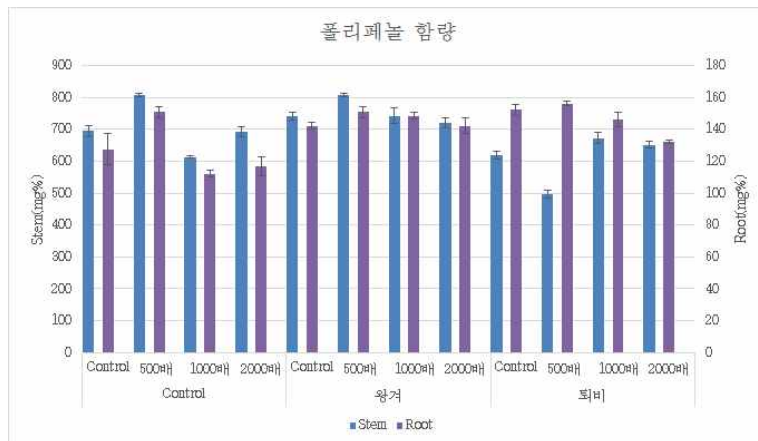


그림 3-2-25. 황토가공신소재 농도별 처리와 친환경 비료 처리에 따른 부위별 총 폴리페놀 함량

8. 황토가공신소재와 친환경 비료 처리에 따른 토양 개선에 관한 연구

가. 연구목적

선행연구를 바탕으로 왕겨와 퇴비를 피복처리하고 황토가공신소재를 농도별로 처리한 후 토양에 미치는 영향을 알아보고, 토양 개선 가능성을 분석하여 농가에 보급하기 위하여 연구하였다.

나. 재료 및 방법

본 실험은 동국대학교 운길산 학술림(경기도 남양주시 조안면 소재)에서 이루어 졌다. 2015년 6월 22일 1개의 시험구에서 10군데를 채취하여 고루 섞은 후 풍건 후 20 mesh 체를 이용하여 조제하였다. 토양분석은 토양 및 식물체 분석법에 준하여 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

황토가공신소재와 친환경 비료를 함께 처리하여 토양의 화학적 특성을 분석하였다(표 3-2-52). 토양산도는 왕겨처리구에서 평균 pH 5.22의 값을 나타내고 있으며, 영양염류는 비료처리 하지 않은 처리구에서 0.59 dS m^{-1} 의 값을 나타내고 있다. 그 중 황토가공신소재를 처리했을 때 낮은 값을 나타내는 것을 알 수 있었다. 유기물 함량은 왕겨 처리구가 높게 나타났으며, SiO_2 , Ca, Mg, K, TN 함량도 왕겨 처리구에서 높게 나타남을 알 수 있었다. 반면 P_2O_5 는 왕겨에서 가장 낮은 값을 나타냈다. 일반적으로 장뇌삼을 노지재배 할 경우 화학적 특성은 염류 농도가 0.05 mmho , pH 5.0~6.0, OM 2.0~3.5%, P_2O_5 70~200 mg kg^{-1} , K 0.2~0.5 $\text{cmol}_c\text{kg}^{-1}$ Ca 2.0~1.5 $\text{cmol}_c\text{kg}^{-1}$, Mg 1.0~3.0 $\text{cmol}_c\text{kg}^{-1}$ 이며, pH가 6.5이상, P_2O_5 300 mg kg^{-1} 이상, K 0.8 $\text{cmol}_c\text{kg}^{-1}$ 이상 Mg 4.5 $\text{cmol}_c\text{kg}^{-1}$ 이상에서 생리적 제한을 받는다고 하였다. 인삼의 경우 우량포지의 토양의 이화학적 조성이 pH 5.6, OM 20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, P_2O_5 129~168 mg kg^{-1} , K 0.46~0.55 $\text{cmol}_c\text{kg}^{-1}$ Ca 2.9~3.6 $\text{cmol}_c\text{kg}^{-1}$, Mg 1.6~1.7 $\text{cmol}_c\text{kg}^{-1}$ 이라고 하였으며[30], 염류와 질산태질소, 유효인산 나트륨이 증가할 경우 황점병, 오갈병 등이 발생하는 포지라고 하였다[59]. 본 연구에 사용된 토양은 산도와 유기물은 적절한 수준이나 전 질소량, 인산질 등은 일부 부족한 경향이 있고 칼슘, 칼륨, 마그네슘은 비교적 적합한 것으로 나타났다. 또한 산지재배로 인하여 염류과다 등에서 발생하는 병에 대해 기존의 경작지에 비하여 안전한 것으로 판단된다.

표 3-2-52. 황토가공신소재의 농도에 따른 처리와 친환경 비료 처리에 따른 장뇌삼 재배지의 토양의 화학적 특성

	RCPM	pH	EC	OM	Avail.	Avail	T-N	Exch. cation		
					P ₂ O ₅	SiO ₂		K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
	mL	(1:5)	dS m ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹		cmol _c kg ⁻¹			
						%				
Control	0	4.8	0.87	51.00	60.00	86.67	0.15	0.38	1.83	0.43
	20	4.89	0.55	53.67	65.33	69.67	0.18	0.30	2.10	0.50
	10	4.88	0.48	53.67	70.33	55.67	0.18	0.25	2.17	0.40
	5	5.11	0.45	56.33	45.33	58.00	0.16	0.26	2.37	0.50
Rice husk	0	5.30	0.56	56.00	34.33	90.67	0.19	0.37	1.80	0.40
	20	5.08	0.61	58.33	38.67	79.33	0.20	0.42	2.80	0.70
	10	5.26	0.46	57.00	37.00	85.00	0.20	0.47	3.06	0.80
	5	5.23	0.46	54.33	32.33	80.67	0.19	0.43	3.00	0.80
Compost	0	4.99	0.53	50.33	21.00	56.67	0.14	0.25	2.47	0.60
	20	5.08	0.41	50.00	32.67	56.33	0.15	0.26	2.10	0.50
	10	5.02	0.63	58.67	49.00	52.33	0.15	0.23	2.33	0.40
	5	5.27	0.54	55.00	50.67	56.00	0.14	0.23	2.00	0.40

9. 황토가공신소재와 미생물 제재를 처리하여 복합비료 개발 가능성 확인

가. 연구목표

황토가공신소재와 처리 횟수에 관하여 최종적으로 확인하고 미생물 제재를 함께 처리하여 작물에(토마토, 오이) 미치는 효과를 분석하여 복합비료 개발에 대한 가능성을 확인하고자 본 연구를 수행하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 공시 재료 및 식재 방법

2차년과 동일한 종(토마토: 아시아종묘(흑수), 오이: 흥농(백다다기))을 사용하였으며, 경운하기 전 10 a 당 퇴비 1000 kg 기비처리 후 180 × 240 cm로 이랑을 만들었으며, 식재거리는 60 × 60 cm로 한 처리구당 6주씩 모종 식재하였다.

(2) 처리 방법

황토가공신소재는 농도는 2차년도 실험결과를 바탕으로 200배 희석액을 사용하였으며, 미생물배양액도 마찬가지로 200배 희석액을 처리하였다. 처리 방법은 7일 간격으로 하였으며, 한 처리구 당 3.0 L 씩 총 4회 관주 하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 황토가공신소재와 미생물배양액을 처리한 토마토의 생육 및 토양 특성

(가) 생육특성

황토가공신소재와 미생물배양액을 처리한 성숙한 토마토의 2~3 과방을 수확하여 조사하였다(표 3-2-53). 토마토의 생육을 조사한 결과 토마토의 과실 지름과 무게, 당도)에서 유의미한 결과가 나타났으며 길이와 건중량에 있어서는 통계적으로 유의미하지 않았다. 토마토 길이와 무게, 생산량 모두 무처리구에서 증가하는 경향을 보였으며, 당도에서는 미생물처리구와, 황토가공신소재+미생물 처리구가 유의미하게 증가함을 알 수 있었다. 이는 양액배지 실험에서도 동일한 결

과를 얻을 수 있었는데, 규산의 적정 농도 이상을 처리 할수록 오히려 토마토의 크기, 생중량과 생산량이 감소하는 것을 보고한 바 있다[49]. 또한 오이에 배양액 처리 시 처리 농도가 증가할수록 잎의 크기가 줄어드는 것을 확인하였다[81]. 1, 2차년의 경우 황토가공신소재를 처리할 경우 작물의 생육이 모두 증가하였다. 이는 1,2차년의 경우 황토가공신소재를 한 번 처리할 경우 2주의 시간을 두고 하였으며, 시중에서 사용하는 규산의 사용법에도 2주에 1번 1000배 희석액을 사용하라고 명시되어 있다. 따라서 3차 년도의 황토소재 처리구의 생육이 좋지 않게 나타나는 것은 200배의 황토가공신소재를 매주 처리하여 규산이 집적되어 생육이 좋지 않은 영향을 미친 것으로 사료된다. 규산을 저농도로 처리하였을 경우 잎의 크기 및 두께, 단위면적당 건물중, 뿌리의 생체중과 건물중이 증가하였고, 뿌리의 생체중과 건물중에서도 동일한 결과를 보고하였다[31]. 따라서 황토가공신소재 소재 처리 시 작물에 따른 적정농도 기준이 필요할 것으로 판단되며, 토마토의 생육에 있어서는 가공황토 200배 희석액 처리를 2주 1번 정도 주는 것이 바람직하다고 사료된다.

표 3-2-53. 황토가공신소재 농도별 처리와 미생물 처리에 따른 토마토의 생육

Treatment	Length (cm)	Diameter (mm)	Weight (g)	Dry weight (g)	Brix (°)	Yield (pcs.)
Control	46.44±2.82a	52.35±2.64b	78.83±10.82c	1.00±0.19a	5.04±0.18a	61
황토가공신소재	46.75±2.56a	51.27±2.94ab	74.44±11.81bc	0.91±0.18a	4.90±0.40a	43
미생물	46.22±2.55a	51.08±3.35ab	73.83±11.22b	1.11±0.33a	5.56±0.41b	45
황토가공+미생물	45.61±2.32a	49.77±2.68a	68.50±9.73a	0.91±0.96a	5.48±0.19b	54

(나) 황토가공신소재 처리구에서 토마토 열과 현상 감소효과 검증

본 연구에서 3년 동안 토마토를 실험한 결과 황토가공신소재를 처리할 경우 열과 감소에 효과가 있는 것을 알 수 있었다(그림 3-2-26). 무처리구의 경우 2차 년도와 3차 년도 모두 열과 발생율이 약 28% 정도 나타났다. 2차년도에 규산질 비료와 황토가공신소재의 열과 발생율을 비교한 결과 1000배 희석액 처리구와는 비슷한 발생율을 보였으며, 200배 희석액 처리구에서는 현저히 감소하는 결과를 볼 수 있었다. 3차년도에는 열과 감소 현상 효과를 재증명하기 위하여 2차년도와 동일한 방법으로 열과 발생율을 측정하였으며, 마찬가지로 200배 희석액 처리구에서 약 4.7% 정도만 발생함을 알 수 있었고, 이는 무처리구보다 약 83% 감소하는 결과를 얻을 수 있었다. 열과 증상은 과일이 여러 가지 크기로 쪼개지거나 갈라지는 증상이며 비병원성으로 지주 재배하는 노지재배에서 많이 발생하는 증상이다. 열과가 발생하는 이유는 수분이 부족했던 작물에 비가 오거나 일정기간 습도가 높게 유지 될 때 발생한다. 또한 질소 비료를 살포하거나 온도가 갑자기 올라간 후에 이에 따라 과일이 빠르게 자랄 때 증상이 나타나게 된다. 따라서 잎이 감소하여 증산량이 적어지게 되면 흡수량과 균형이 이루어지지 못하게 되어 과일로 과도한 양의 수분이 들어가게 되는 것이다. 벼 조직의 cuticle-규산 2중층은 식물 자체가 조절할 수 없는 cuticle을 통해서 증산되는 수분 손실을 규산 시용으로 무 규산보다 33% 줄일 수 있다[42]. 따라서 규산 시용을 통하여 열과를 방지하기 위한 대책을 마련하는 것은 안정적인 토마토 생산을 위

하여 매우 중요한 작업이며 앞으로 꾸준히 연구되어야 할 것으로 사료된다.

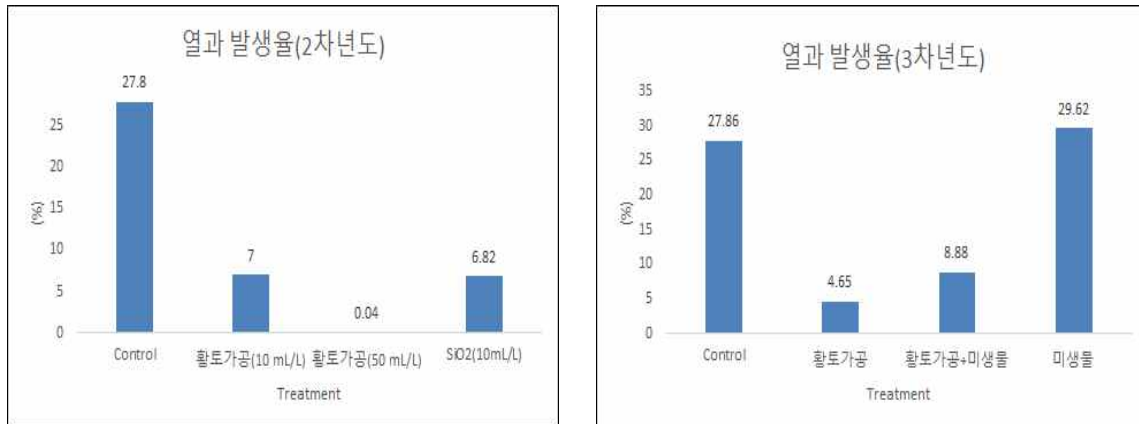


그림 3-2-26. 황토가공신소재 처리가 토마토 열과 발생 억제 효과에 미치는 영향
(좌:2차년도, 우:3차년도)

(다) 황토가공신소재와 미생물배양액 처리가 토마토 생리에 미치는 영향

① 토마토 잎의 엽록소 함량

엽록소 함량은 미생물배양액 처리구에서 총 클로로필 함량은 10.28, 카로티노이드는 1.06으로 각각 무처리구보다 증가하는 것을 볼 수 있었다(그림 3-2-27). 엽록소 함량은 식물의 생장에 관여되는 기본적인 대사 작용이다. 농산물은 생육시 엽록소 함량과 광합성 간에 밀접한 관계가 있으므로 엽록소 형성에 영향을 주는 모든 조건은 작물의 생육과 관련이 있다. 따라서 황토가공소재 단독 처리구에서 엽록소의 함량이 가장 낮게 측정된 것은 다른 처리구에 비하여 생육환경이 좋지 못했다는 것을 뜻하며 이러한 결과로 토마토의 생산량이나 과실 생육에 좋지 않은 영향을 미친 것으로 사료된다. 반면 대체적으로 미생물배양액 처리구에서 토마토의 생육이 좋게 나타났는데, 이러한 이유는 인산 가용화능이 높고 넓은 pH 범위에서 phosphatase 활성이 우수한 미생물배양액을 토마토에 처리했을 때 불용성 인산의 가용화에 의한 식물생장 촉진이 유도된다. 또한 황토가공신소재와 미생물배양액을 함께 처리한 실험구도 토마토의 생육과 엽록소 함량에 있어서 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 황토가공신소재가 식물에 유용한 미생물의 공급원이 되고, 좋지 않은 미생물은 항균작용을 하여 식물에 긍정적인 효과를 주는 것으로 사료된다

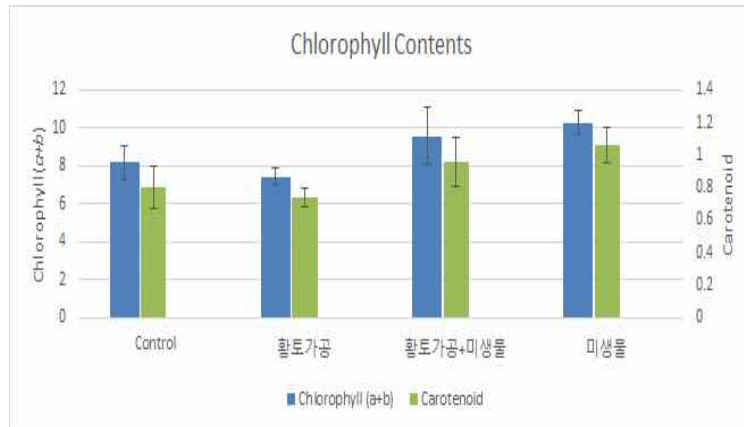


그림 3-2-27. 황토가공신소재와 미생물배양액 처리가 토마토 엽록소 함량에 미치는 영향

② 토마토의 조단백질과 조지방 함량 분석

황토가공신소재와 미생물배양액을 토마토에 처리한 결과 조단백질과 조지방 함량분석이 황토가공신소재 처리구와 황토가공신소재+미생물 처리구에서 유의적으로 증가하였다(그림3-2-28~ 29).

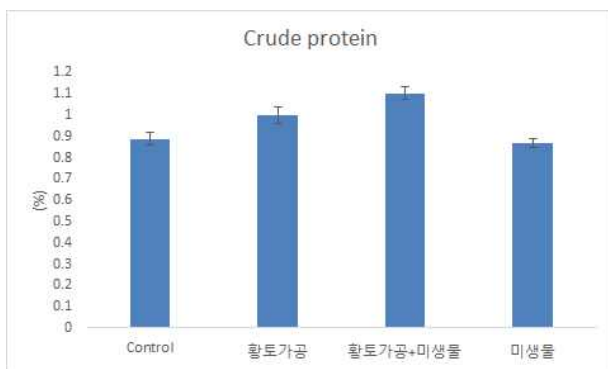


그림 3-2-28. 황토가공신소재와 미생물배양액 처리가 토마토 조단백질 함량에 미치는 영향

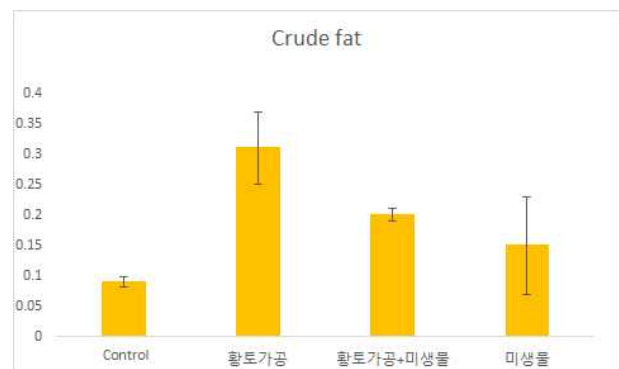


그림 3-2-29. 황토가공신소재와 미생물배양액 처리가 토마토 조지방 함량에 미치는 영향

③ 토마토의 아미노산 함량 분석

황토가공신소재와 미생물배양액을 처리한 토마토의 유리아미노산을 정량한 결과는 표 3-2-54와 같았다. 토마토의 유리아미노산 중에는 아스파르트산(ASP), 글루탐산(GLU), 글루타민(GLN) 등 15종의 아미노산이 함유되어 있었다. 그 중 통계적으로 유의미하지 않은 히스티딘(HIS), 아저닌(ARG), 글리신(GRY)은 제외했다. 유리아미노산 중 가장 많이 함유된 것은 글루탐산(GLU) 가장 많이 함유되어 있었으며, 황토가공신소재+미생물배양액 처리구(0.372%), 황토가공신소재 처리구(0.369%)에서 높게 측정되었다. 전반적으로 황토가공신소재+미생물을 함께 처리한 실험구에서 아미노산 함량이 증가함을 볼 수 있었으며, 미생물 처리구에서는 아미노산 함량이 많이 증가하지 않는 것으로 보아 황토가공신소재 처리가 토마토 아미노산 생성에 도움을 주는 것으로 판단된다. 토마토 유리아미노산 함량을 분석한 연구에 의하면 GLU가 유리아미노산 중 가장 많이 함유되어 있으며 완숙기에 접어들수록 GLU의 함량이 증가한다고 밝혔다[71], 단백질은 체내에서 아미노산으로 분해·흡수된 후에 이용되며 영양분으로서 단백질의 가치는 그 속에 함유되

어 있는 아미노산의 종류와 양에 좌우된다. 필수 아미노산은 체내에서 합성되지 않거나 합성되더라도 그 양이 매우 적어서 생리적 기능을 달성하기에 불충분하여 반드시 음식으로부터 공급되어야만 한다. 비 필수 아미노산은 체내에서 탄수화물의 중간 대사물 또는 다른 아미노산 등으로부터 합성될 수 있는 아미노산들이다.

표 3-2-54. 황토가공신소재신소재와 미생물배양액 처리가 토마토 아미노산 함량에 미치는 영향

Treatment	ASP	THR	SER	GLU	ALA	VAL	I-LE	TYR	PHE	LYS	PRO
	(%)										
Control	0.096ab	0.025ab	0.036ab	0.348b	0.023a	0.021a	0.020a	0.037a	0.029a	0.027a	0.004a
황토가공	0.100b	0.026b	0.038b	0.369c	0.024a	0.023b	0.021ab	0.040ab	0.031b	0.029a	0.005a
미생물	0.091a	0.024a	0.035a	0.329a	0.022b	0.021a	0.021ab	0.038a	0.030ab	0.027b	0.005ab
황토가공+ 미생물	0.102b	0.078c	0.042c	0.372c	0.026b	0.024b	0.022b	0.042b	0.033c	0.029b	0.006b

(라) 황토가공신소재와 미생물배양액 처리가 토마토 생육 토양에 미치는 영향

황토가공신소재와 미생물배양액을 처리한 토마토 생육토양의 화학성은 표 3-2-55와 같다. pH 값은 미생물배양액을 처리한 토양에서 pH 6.0으로 감소하였으며, EC 값은 무처리구에서 0.86 dS m⁻¹로 유의미하게 높은 값을 나타냈다. 유기물 함량은 황토가공신소재+미생물배양액 처리구에서 9 g kg⁻¹으로 무처리구보다 0.3% 증가하는 값을 가졌으며 유효인산 함량은 황토가공신소재+미생물배양액 처리구는 무처리구보다 49%(140.67 mg kg⁻¹) 증가하였으며 미생물배양액 처리구에서는 50%(141.33 mg kg⁻¹) 증가하였다. 유효규산 함량은 무처리구에서 289.67 mg kg⁻¹으로 가장 높은 값을 나타냈다. 양이온 치환은 무처리구에서 Ca 6.29 cmol_ckg⁻¹, Mg 2.8 cmol_ckg⁻¹, TN 0.07%로 높은 값을 가졌으며, K의 값은 미생물배양액 처리구에서 0.36 cmol_ckg⁻¹의 값을 나타냈다. 토양중의 규산은 특정 원소의 양이 지나치게 높아지는 것을 막아 주며, 반대로 그 양이 낮아지면 해리를 통해 공급하는 일종의 양이온 완충기능을 한다. 식물이 주로 흡수하는 토양의 H₄SiO⁻는 화학특성을 조절하고, 토양 pH 6에서는 분자상 규산인 H₄SiO₄ 형태로 존재하고 pH 7이상부터는 이온 형태로 존재한다. 보통 토양 중에는 규산과 인산이 공존하게 되며 규산은 토양의 불가급태 인산의 일부를 치환 또는 용출시키거나, 인산을 고정하고 있는 알루미늄, 철등과 결합하여 인산의 유효도를 증가시킨다. 또한 미생물배양액 처리구에는 유효인산이 상대적으로 증가하는 분석 결과를 나타냈는데, 이는 배양액 내에 포함된 미생물의 인을 활성화 시키는 역할을 하여 식물체의 생장을 촉진시키는 것으로 사료된다.

표 3-2-55. 황토가공신소재신소재와 미생물배양액 처리가 토마토 생육 토양에 미치는 영향

	pH	EC	OM	Avail. P ₂ O ₅	Avail SiO ₂	T-N	Exch. cation K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
	(1:5)	dS m ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹		%	cmolckg ⁻¹		
Control	6.66	0.86	6.67	94.00	289.67	0.07	0.32	6.29	2.80
황토가공	6.43	0.68	8.00	95.67	254.33	0.06	0.30	5.55	2.60
미생물	6.00	0.69	8.00	140.67	212.00	0.06	0.36	4.53	1.90
황토가공 +미생물	6.56	0.62	9.00	141.33	213.67	0.07	0.35	5.23	2.06

2) 황토가공신소재와 미생물배양액을 처리한 오이의 생육 및 토양 특성

(가) 생육조사

황토가공신소재와 미생물배양액을 처리한 시험구의 상품성이 있는 오이를 3번에 걸쳐 수확하여 생육과 수량을 측정된 결과는 그림 3-2-30과 같다. 오이의 길이, 두께, 생중량 및 건중량을 측정된 결과 모두 황토가공신소재 처리구에서 통계적으로 유의미하게 증가하였다. 오이의 길이나 두께의 경우 큰 차이는 나지 않았지만 생중량은 황토가공신소재 처리구가 0.37 kg으로 나머지 처리구보다 약 15% 이상 증가하는 결과를 보였다. 또한 오이의 건물중을 측정된 결과 황토가공신소재 처리구에서 1.32 g으로 높은 값을 나타냈으며, 이것은 무처리구보다 32%(1.00 g) 증가하는 값으로 황토가공신소재 처리구에서 수확한 오이가 다른 처리구에 비해 무기물 흡수를 더 많이 했으며, 과실 내에 함유량이 많은 것을 알 수 있다. 수확량은 무처리구와 황토가공신소재 처리구에서 각각 총 109개씩 수확하였으며 황토가공+미생물배양액 처리구가 108개, 미생물배양액 처리구가 77개의 열매 수확량을 나타냈다. 초기 오이 수확량은 황토가공+미생물 처리구와 황토가공신소재가 많았으나, 3차 수확 시 무처리구에서 56개로 가장 많이 수확되었으며, 그 다음은 45개로 황토가공신소재 처리구, 황토가공+미생물, 미생물 순으로 나타났다. 오이 양액재배 시 규산의 공급량이 증가할수록 오이의 길이와 생중량이 증가하였으며, 잎에 축적되는 규산의 함량이 증가함을 알 수 있었다. 또한 오이는 작물 중에 규산을 많이 흡수하는 작물로 규소를 처리할 경우 3~10%의 증수효과와 엽록소 증가, 흰가루병 방제 등 긍정적인 효과를 볼 수 있다. 하지만 3차 년도에서는 과실 증수 효과는 볼 수 없었으나, 생육에 있어서 황토가공신소재가 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다.

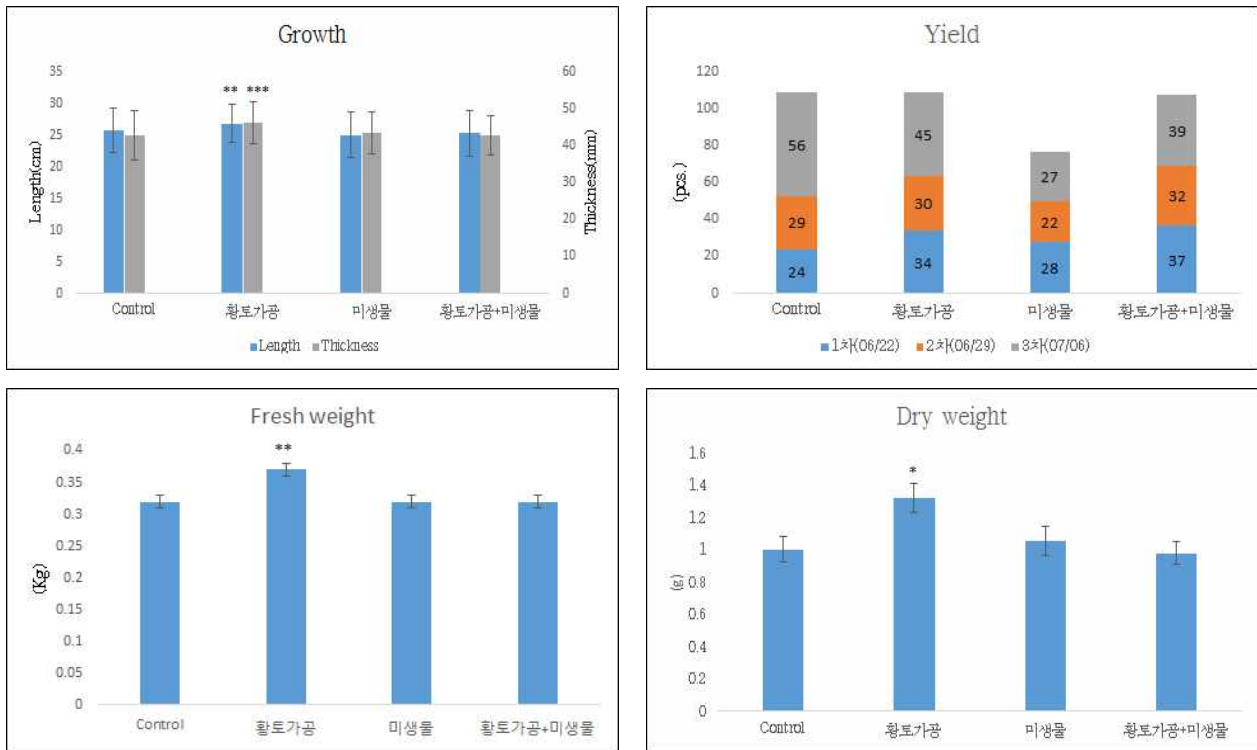


그림 3-2-30. 황토가공신소재와 미생물배양액 처리가 오이의 생육 및 생산량에 미치는 영향

(나) 황토가공신소재 처리구에서 오이 곡과 현상 감소 효과 검증

2차 년도 과제연구 수행 시 오이의 곡과에 관한 현상 감소효과를 정성적 방법으로 확인하였으며, 3차 년도는 황토가공신소재에 대한 매뉴얼을 작성 하고자 곡과 감소에 대하여 정량적으로 측정하여 감소효과를 정량적으로 검증할 수 있도록 하였다(그림 3-2-31). 생육조사 하기 전 수확한 모든 과실에 대하여 곡과발생정도를 확인하였으며, 구부러진 각도는 10° 이하로 기준을 정하였다. 무처리구는 3차 수확까지의 곡과 생산율이 50% 이상이었으며, 미생물 처리구도 70% 이상의 곡과가 발생되었다. 황토가공신소재 처리구의 경우는 50% 이하의 곡과 발생율을 나타냈다. 이는 황토가공신소재의 주요성분인 규산의 효과라고 볼 수 있으며, 규소는 식물체에 집적되어 물리적 강도를 높여주어 직립할 수 있는 역할을 한다[56]. 곡과의 원인은 암꽃의 분화기부터 개화기 사이에 환경 조건과 영양 상태가 불량하여 암꽃의 발육이 왕성하지 못해 씨방에 크기가 작게 된다. 일사량이 부족하거나 저온이 계속되거나 토양 수분이 부족하여 줄기나 잎의 발달이 불량할 때 곡과나 기형과의 생산이 많이 된다. 또한 광합성으로 인한 생산물이 공급되어 과내의 각 부위에 골고루 분배되어 각 부위의 세포비대에 필요한 양을 충족시켜 주지 않음 부족하게 되면 과의 각 부위 중 흡수력이 우수한 부위에 광합성 생산물이 많이 집적되어 그 부분의 세포가 빨리 비대하고 발육이 빨라 곡과가 생성되는 것이다. 또한 규산을 흡수한 오이의 표피조직에서는 모용 기부 둘레에 둥근 반점 모양으로 집적되며, 식물 조직의 빈 공간에 구조 모양대로 부착 집적되는 형태를 가진다.

	구부러짐:곧음
con	7:3
200x	4:6
1000x	4:6

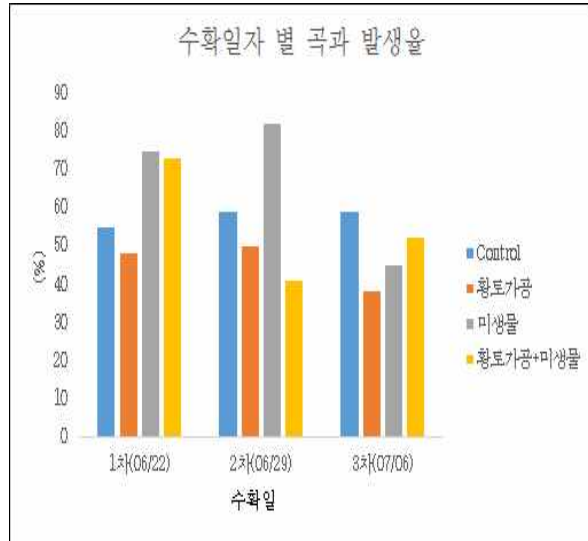


그림 3-2-31. 황토가공신소재신소재 처리가 오이의 곡과 발생 억제 효과에 미치는 영향 (좌:2차년도, 우:3차년도)

(라) 황토가공신소재와 미생물배양액 처리가 토마토 생육 토양에 미치는 영향

황토가공신소재와 미생물배양액을 처리한 토마토 생육토양의 화학성은 표 3-2-56과 같다. pH는 알카리분을 함유하고 있는 황토가공신소재를 처리함에 따라 무처리구보다 증가하는 경향을 보였으며, EC는 황토가공신소재+미생물배양액 처리구에서 0.22 dS m^{-1} 로 가장 낮게 나타났으며, 황토가공신소재 처리구는 0.36 dS m^{-1} , 무처리구는 0.48 dS m^{-1} 의 값을 나타냈다. 유기물 함량을 통계적으로 유의성을 보이지 않았으며, 유효 인산 함량은 미생물배양액 처리구에서 $114.67 \text{ mg kg}^{-1}$ 으로 가장 높은 값을 나타냈으며, 이는 천연 젖산에 의하여 토양 내에 있는 인을 활성화 시키기 때문이다. 유효규산의 함량은 황토가공신소재 처리구와, 황토가공신소재+미생물배양액 처리구에서 각각 $273.33 \text{ mg kg}^{-1}$, $274.67 \text{ mg kg}^{-1}$ 으로 통계적으로 유의미하게 증가함을 알 수 있었다. 치환성 양이온의 함량은 황토가공신소재+미생물배양액 처리구에서 유의적으로 증가하는 경향을 보였으나 K의 경우는 무처리구에서 $0.35 \text{ cmol.kg}^{-1}$ 으로 유의미하게 증가하였다.

표 3-2-56. 황토가공신소재신소재와 미생물배양액 처리가 오이의 생육 토양에 미치는 영향

	pH	EC	OM	Avail. P ₂ O ₅	Avail SiO ₂	T-N	Exch. cation K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
	(1:5)	dS m ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	%	cmolckg ⁻¹		
Control	6.67	0.48	8.00	113.67	254.00	0.07	0.35	5.68	2.43
황토가공	6.86	0.36	7.67	98.33	273.33	0.06	0.32	5.54	2.30
미생물	6.60	0.43	7.00	114.67	274.67	0.08	0.32	5.35	2.20
황토가공+미생물	7.00	0.22	8.67	90.00	262.33	0.12	0.31	5.71	2.63

10. 황토가공신소재를 처리한 포도 저장기간 변화 측정 및 포장재의 가능성 검토

가. 연구목표

신선 농산물은 수확 후에도 호흡과 증산작용 등 생명활동을 지속하며, 이는 수확 후 신선도 저하와 증량감모 등이 손실됨을 알 수 있다. 따라서 과실의 상품성에 영향을 미치는 저장법에 관한 연구와 포장법 및 유통구조에 관한 연구가 지속적으로 이뤄지고 있으며, 고농도의 이산화탄소 처리가 포도의 부패방지에 효과가 있음을 보고 한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 황토가공신소재를 처리한 포도의 저장기간 중의 변화를 측정하고 향후 포장재로써의 가능성을 검토하기 위하여 수행하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 공시 재료 및 처리 방법

본 실험에서는 영천시 금호읍에 위치가 포도원에서 비가림 재배법으로 생산된 거봉(Kyoho : *V. vinifera* x *V. labrusca*) 품종을 대상으로 하였다.

(2) 처리 방법

9월 24일 포도를 일괄적으로 수확 하여 황토가공소재를 처리하여 포장하였다. 첫 번째 처리는 황토가공소재에 두 가지 농도를 [1x-고농도(200배 희석액), 2x-저농도(1000배 희석액)] 사용하여 침지하였으며, 두 번째 처리는 황토가공소재를 포도 포장지에 처리하여 실험구와 대조구를 함께 비교하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 황토가공소재 처리 조건 별 머스트의 고형분 함량 변화

본 연구에서 분석한 4가지 조건에 따른 포도의 당도는 표 3-2-57과 같다. 수확직후 당도는 모든 처리구에서 18.8° 로 일정하게 나타났다. 수확 3주 후 당도 측정결과 처리구간의 고도의 유의성을 보이지는 않았으나 통계적으로 차이를 발견할 수 있었다. 특히 저농도의 가공황토 처리구와 황토가공소재 처리 포장지, 고농도 가공황토 처리구에서 대조구 대비 18.98° Bx 으로 당도의 변화가 적게 나타났다.

표 3-2-57. 24°C의 조건하에 포도의 당 함량 변화

	Time(week)	
	1	3
control	18.8±0.1 ¹⁾	19.52±0.55 ^{bc}
paper	18.7±0.2	19.83±0.42 ^{ab}
redsoil 2x	18.7±0.1	18.98±0.29 ^c
redsoil 1x	18.8±0.1	20.33±0.64 ^a

¹⁾ Mean±SD

(2) 저장기간에 따른 각 조건별 과실의 중량손실 변화

황토가공나노신소재를 조건 별로 처리하여 3주 동안 관찰한 결과 저장기간에 따른 각 조건별 중량변화를 보임을 알 수 있었다(그림 3-2-32). 수확 후 2주차 중량변화를 살펴보면 저농도 가공황토 처리구에서 가장 적은 중량변화를 보인 4.4%를 보였고 대조구와는 유의성 있는 차이를 보였다. 또한 3주가 지난 뒤 측정된 값에서는 12~18%의 중량변화를 관찰 할 수 있었으나 조건별 유의성을 찾을 수 없었다. 따라서 24℃ 환경에서 포도를 보관할 경우 각 조건별 중량변화에 차이가 중량손실률이 증가함을 알 수 있었다.

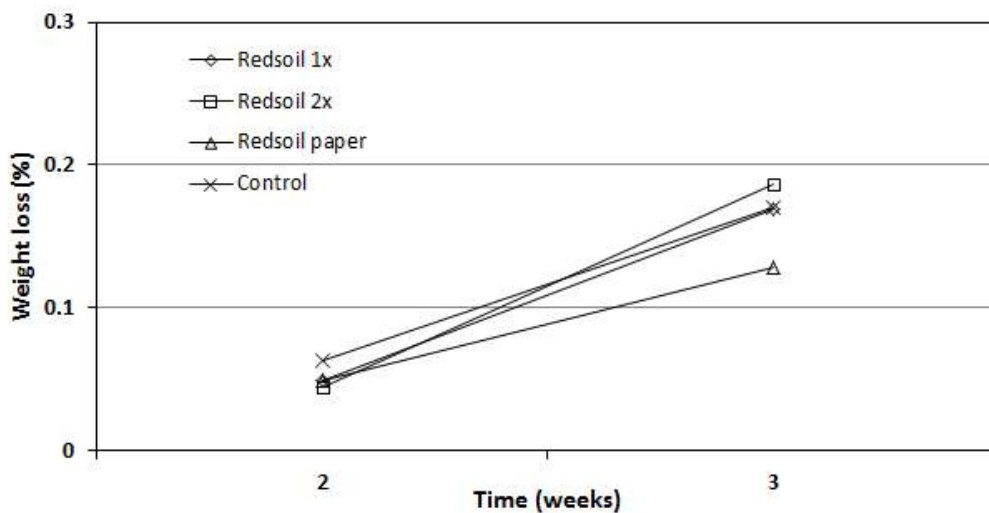


그림 3-2-32. 황토가공소재 처리 별 포도의 중량손실 변화

본 실험은 황토가공소재 처리를 다양한 용도로 사용할 수 있는 가능성을 평가함과 동시에 포도 수확 후 다양한 방법의 가공황토처리가 포도의 후숙과 당도변화 중량변화에 미치는 영향을 살펴보았다. 포도뿐 아니라 대다수의 과실은 수확 후 호흡작용을 거치며 약간의 당도가 상승하는 것으로 알려져 있다. 저장기간에 따른 각 조건별 머스트의 고형분 함량변화를 살펴본 결과 저농도의 가공황토 처리구에서 당도변화가 적게 나타나는 것을 확인하였다. 이는 상대적인 후숙이 더디게 진행되고 있는 것으로 해석 할 수 있을 것으로 사료된다. 저장기간에 따른 각 조건별 과실의 중량손실 변화를 살펴본 결과 저농도 가공황토 처리구에서 수확 후 2주차 까지 다른 조건구에 비해 유의성 있게 적은 중량손실을 보였다. 3주가 지나면 모든 조건구에서 12% 이상의 중량손실을 보였다. 결론적으로 저농도의 가공황토 처리가 수확 후 포도 중량손실을 대조구 대비 방지해 주고 당도변화를 억제하는 결과를 알 수 있었다. 향후 저장기간에 따른 각 조건별 과실의 호흡 및 증산작용의 변화를 살펴보고 좀 더 짧은 기간에 측정횟수를 늘린 추가실험을 통해 가공황토 물질이 실제 수확 과실의 생리적 반응에 미치는 영향을 구명하여야 할 것이다.

제 3 절 황토가공나노신소재를 이용한 농작물 병해 제어 및 신선도 향상 기법 개발

1. 토양전염 식물병해미생물에 대한 *in vitro* 효능 평가 및 병해 억제 효과 발굴

가. 황토가공소재의 토양전염 식물병원성 세균에 대한 항균 효능 평가를 통한 병해 억제 근거 확립

(1) 식물병원성 토양 세균의 *in vitro* 평가 기법 구축

(가) 황토가공소재의 항균 효능 평가 대상 세균

주요 국내 농작물 병해 발생의 원인성 토양전염 식물병원성 세균 중 대표적인 *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris* 3종을 선별하였다 (표 3-3-1).

표 3-3-1 주요 식물병원성 세균의 특징

시험균주 (Bacteria)	<i>E. carotovora</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>X. campestris</i>
구분	Gram-negative	Gram-negative	Gram-negative
유발 병명	무름병	근두암종병	잎마름병
발병 부위	잎, 줄기, 뿌리	잎, 뿌리줄기	잎, 열매, 뿌리
유병 작물	무, 배추, 상추 등 채소류	배, 사과, 복숭아 등 과수나무	무, 배추, 감귤 등 채소, 과수나무류
배지	Brain Heart Infusion	Nutrient	Nutrient
배양 시간	24 h	24 h	24 h
온도	30 °C	30 °C	26 °C

병징



무 무름병



배 뿌리혹병



감귤 궤양병



배추 무름병



사과 뿌리혹병



논벼 흰잎마름병

(나) 황토가공소재의 *in vitro* 항균 평가 기법 구축

① 식물병원성 세균 in vitro 및 토양 내 평가기법

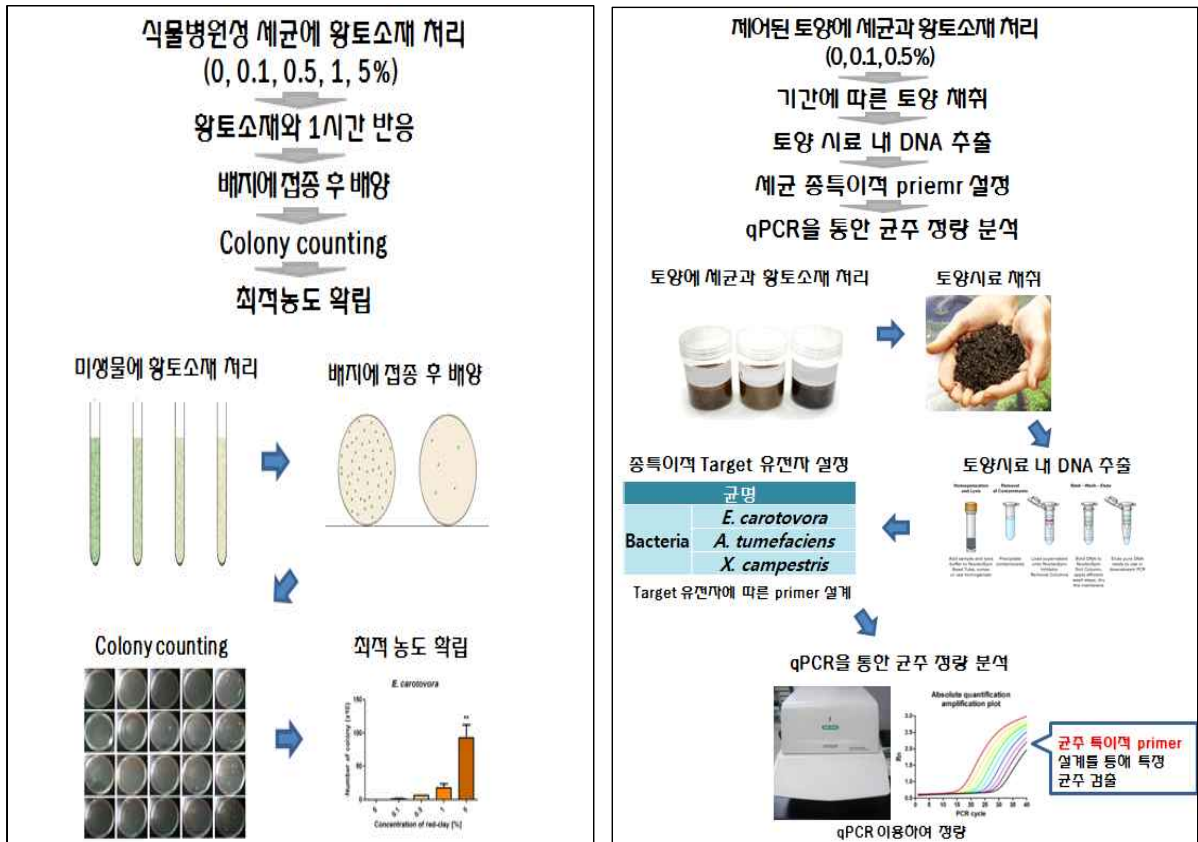


그림 3-3-1 식물병원성 세균에 대한 항균 효능 평가 기법

황토가공소재의 항균 효능 평가를 위해 소재를 식물병원성 세균에 직접 처리하여 성장억제 정도를 분석하는 Colony counting assay와 토양 내에 처리 후 토양 샘플에서 DNA 추출 후 특이적 marker를 이용하여 대상 세균에 대한 정성적 정량적 분석을 수행하는 Real-time PCR 기법을 통해 in vitro 및 토양 내 황토가공소재의 항균효능 평가 기법을 구축하였다.

② 주요 식물병원성 세균의 특이적 marker 설계 및 조건 확립

○ 대상 식물병원성 세균의 종 특이적 primer 최적화

토양 내 미생물 균집 중 대상 균주에 대하여 다른 미생물을 배제하고 분석하고자 하는 해당 종만을 특이적으로 인식하는 primer를 설계하였으며, 반복 검증을 통하여 real-time PCR을 이용하는 토양 내 세균의 정량적 측정을 최적화하였다 (표 3-3-2).

표 3-3-2 토양 내 병원성 세균 분석을 위한 종 특이적 primer

균명	Sequence (5` -> 3')				Reference
	Forward		Reverse		
<i>E. carotovora</i>	MpdEcF	ACC GCC AGC ACA TCG TC	MpdEcR	CGG AAG GCC ATC AGG AA	Atallah <i>et al.</i> 2006
Bacteria <i>A. tumefaciens</i>	A	ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT	C	TCG TGG GCT GAC TTT CGT CAT AA	Haas <i>et al.</i> 1995
<i>X. campestris</i>	DLH153F	GTA ATT GAT ACC GCA CTG CAA	DLH153R	CAC CGC TCC AGC CAT ATT	Berg <i>et al.</i> 2006

○ 토양 내 병원성 세균 분석을 위한 PCR 조건 확립

토양 내 식물병원성 세균을 정량하기 위한 균 특이적 marker인 primer를 설계하고 각각에 특이적인 real-time PCR 조건을 최적화하여 확립하였다 (표 3-3-3).

표 3-3-3 세균의 종 특이적 primer에 대한 PCR 조건

세균명	Initial denaturation		Denaturation		Annealing		Extention		Cycle number
	Tem.(°C)	Time (m)	Tem.(°C)	Time (m)	Tem.(°C)	Time (m)	Tem.(°C)	Time (m)	
	<i>E.carotovora</i>	95	3:00	95	0:10	62	0:35	72	
<i>A.tumefaciens</i>	94	2:00	95	0:30	44	0:30	72	1:00	35
<i>X. campestris</i>	94	2:00	95	0:30	46	0:30	72	1:00	35

(2) 무름병 원인세균 *E. carotovora*에 대한 항균 효능 구명

○ 황토가공나노소재 처리 시 in vitro 환경에서는 증식을 유도하나, 토양 내 0.5% 농도에서 2주 처리 후 *E. carotovora*의 성장 99%이상 억제

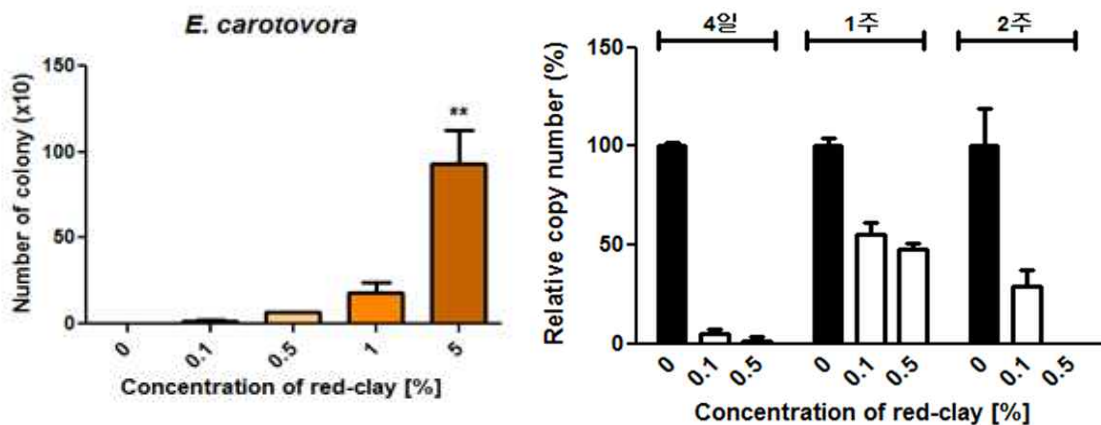


그림 3-3-2 *E. carotovora*에 대한 항균 효능

위 결과는 독립된 3회의 실험에 대해 평균치로 표시하였다. 유의성은 One-way ANOVA의 tukey's multiple comparison test를 이용하여 표시하였다. (*, p<0.05; **, p<0.005; ***,

p<0.0001)

*E. carotovora*에 황토가공소재를 처리하여 colony counting을 통하여 항균 효능을 확인하였을 경우 농도 의존적으로 생장이 증진되는 것으로 나타났으며 1%에서는 100배 이상, 5%에서는 800배 이상 생장이 촉진되었다. 반면 토양 내에서 황토가공소재 처리에 따른 *E. carotovora*의 생장을 비교하였을 경우, 처리 후 단기간에 비해 장기적인 시간 (1주 이상) 경과 후 황토가공소재 처리 시 생장이 무처리군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 특히 2주차 0.5% 처리에서는 *E. carotovora*의 생장이 99%이상 감소하여 실제 노지적용 실험 시 황토가공소재의 항균 효과가 높을 것임을 확인하였다.

(3) 근두암종병 원인세균 *A. tumefaciens*에 대한 항균 효능 구명

○ 황토가공나노소재 처리 시 in vitro 환경에서는 증식을 유도하나, 토양 내 0.1, 0.5% 농도에 서 2주 후 *A. tumefaciens*의 생장 90%이상 억제

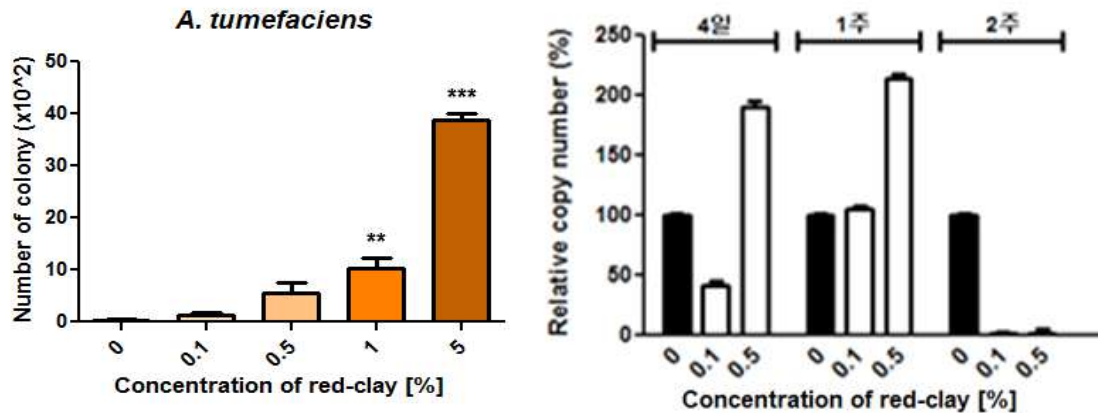


그림 3-3-3 *A. tumefaciens*에 대한 항균 효능

위 결과는 독립된 3회의 실험에 대해 평균치로 표시하였다. 유의성은 One-way ANOVA의 tukey's multiple comparison test를 이용하여 표시하였다. (*, p<0.05; **, p<0.005; ***, p<0.0001)

*A. tumefaciens*에 황토가공소재를 처리한 후 colony counting을 이용하여 항균효능을 확인한 경우 황토가공소재 처리 농도에 의존적으로 생장이 촉진되는 것으로 나타났으며 5% 농도에서는 무처리군에 비해 100배 이상 생장이 촉진된 것으로 나타났다. 반면 토양에 *A. rolfsii*를 처리한 후 황토가공소재를 처리하였을 경우 4일과 1주에는 0.1%와 0.5%에서 균의 증감이 서로 다른 양상을 보이거나 2주차에서는 0.1과 0.5%에서 모두 무처리군에 비해 90% 이상 생장이 억제되는 경향을 보였다. 이는 실제 토양 적용 시 황토 소재가 방제효과를 나타내기까지의 기간이 필요함을 제시하며, 이를 통해 황토가공소재의 방제효과와 적용 기준에 대한 근거를 확보하였다.

(4) 잎마름병 원인세균 *X. campestris*에 대한 항균 효능 구명

- 황토가공나노소재 처리 시 in vitro 환경에서는 증식을 유도하나, 토양 내 0.5% 농도에서 2주 후 *X. campestris*의 성장 억제

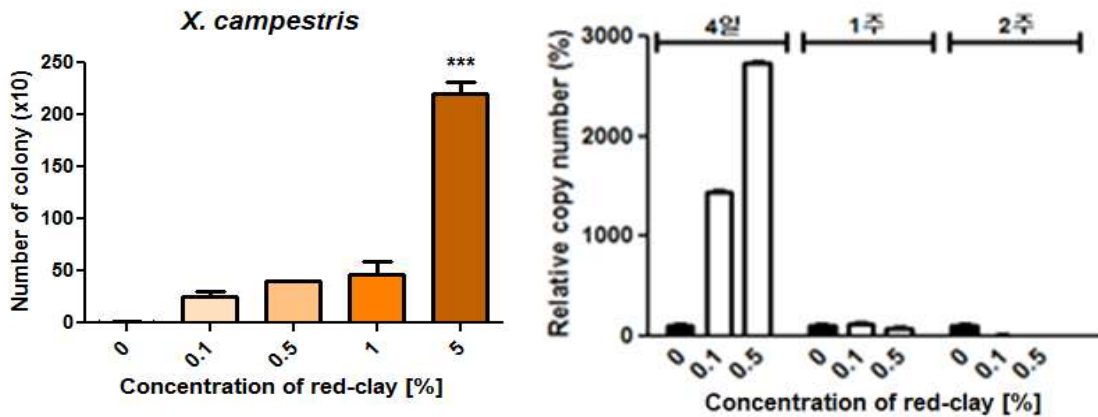


그림 3-3-4 *X. campestris*에 대한 항균 효능

위 결과는 독립된 3회의 실험에 대해 평균치로 표시하였다. 유의성은 One-way ANOVA의 tukey's multiple comparison test를 이용하여 표시하였다. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0001$)

평가 결과, 황토가공소재의 *X. campestris*에 대한 항균효능을 colony counting을 통하여 확인하였을 경우 농도 의존적으로 성장률이 증가하는 것으로 나타났다. 5% 농도에서 400배 이상 생장이 촉진되는 것으로 나타났다. 반면, 황토가공소재 처리 시 토양 내의 *X. campestris*의 변화를 확인한 결과 4일차에서는 황토가공소재를 처리했을 경우 생장이 폭발적으로 증가하였으나 2주차의 경우에만 황토가공소재를 처리하였을 때 무처리군에 비해 성장 억제 효과가 나타났다. 이를 통해 황토가공소재 처리에 따라 나타나는 토양 내 세균 억제 효과가 모든 세균에 대한 효과가 아니라 종 특이적인 효과를 가짐을 확인하였다.

(5) 황토가공소재의 식물병원성 세균에 대한 항균 효능 구명 및 병해 억제 근거 확립

- 황토가공나노소재 처리 시 병원성 세균 3종 모두 토양 내 0.5% 농도에서 2주 후 90%이상 성장 억제

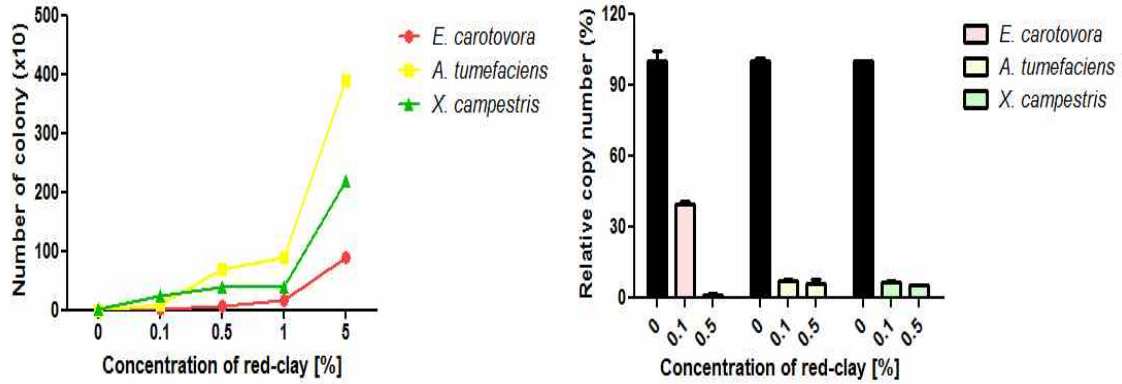


그림 3-3-5 황토가공소재의 항균 효능

본 실험은 황토가공소재의 식물병원성 세균에 대한 항균 효능을 분석하기 위한 것으로 *in vitro*의 실험 결과를 통해 식물병원성 세균을 억제하기 위한 농도 및 처리 시간 설정의 근거를 확립할 수 있다. 식물병원성 세균 3종의 실험결과 성장률의 차이는 있었으나 3종의 세균 모두 colony counting을 통한 억제 효능 실험에서는 황토가공소재 처리 시 농도 의존적으로 생장이 증가하는 경향을 보였으나 토양 내의 실험에서는 황토가공소재 처리 2주 후 0.5% 농도에서 모든 세균의 생장이 90% 이상 감소하는 경향을 보였다. Colony counting 실험의 경우 황토가공소재 처리 후 병원균의 생장에 최적화된 환경을 제공함으로써 실제 토양과의 차이가 존재하며 황토가공소재의 수용액내에 존재하는 여러 무기질 성분이 병원균의 성장을 촉진한 것으로 판단되었다. 토양 실험의 경우 동일한 농도의 황토가공소재 처리 시 생장이 억제된 것으로 보아 황토가공소재의 무기질 성분이 병원균 이외에 다른 균에도 작용하여 상호작용을 통한 억제 효능이 나타났을 것으로 분석되었다. 이외에도 4일, 1주의 기간에서는 균의 증감이 공통적이지 못한 부분을 통해 균의 적응기간이 종에 따라 다를 수 있으며 병원성 세균의 경우 2주 이상의 황토가공소재 처리 시 0.5% 농도에서 병원균에 대한 확실한 억제 효능을 확인하였다. 이를 통해 황토가공소재의 대상 식물병원성 세균에 대한 억제 효능을 발굴하고 적용조건을 확립하였다.

나. 황토가공소재의 토양전염 식물병원성 진균(곰팡이)에 대한 항진균 효능 평가를 통한 병해 억제 근거 확립

(1). 식물병원성 토양 진균의 *in vitro* 평가 기법 구축

(가) 황토가공소재의 항균 효능 평가 대상 진균

주요 농작물 병해의 원인균으로 알려진 토양전염 식물병원성 진균 중 대표적인 *Athelia rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Glomerella cingulata* (= *Colletotrichum gloeosporioides*) 5종을 선별하였다 (표 3-3-4).

표 3-3-4 주요 식물병원성 진균의 특징

시험균주 (Fungi)	<i>A. rolfsii</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>	<i>P. ultimum</i>	<i>G. cingulata</i>
유발 병명	흰비단병	시들음병	잎마름병	잘록병	탄저병
발병 부위	줄기	잎의 기부	유묘기 포기	유묘기 포기	잎, 줄기
유병 작물	난, 담배, 딸기 등 채소류	양배추, 배추, 수박 등 채소류	인삼, 무, 배추 등 채소류	호박, 배추, 참외 등 채소류	사과, 배, 피망 등의 과수나무
배지	Potato Dextrose	Potato Dextrose	Potato Dextrose	Potato Dextrose	Potato Dextrose
배양 시간	7일 이상	7일 이상	7일 이상	7일 이상	7일 이상
온도	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C

병징					
	고추 흰비단병	꽃양배추 시들음병	배추 잎마름병	고추 잘록병	사과 탄저병
					
	향나무 백견병	수박 덩굴쪼김병	배추 밑등썩음병	호박 뿌리썩음병	감귤 탄저병

(나) 황토가공소재의 *in vitro* 항진균 평가 기법 구축

① 식물병해 진균(곰팡이)의 *in vitro* 및 토양 내 평가기법

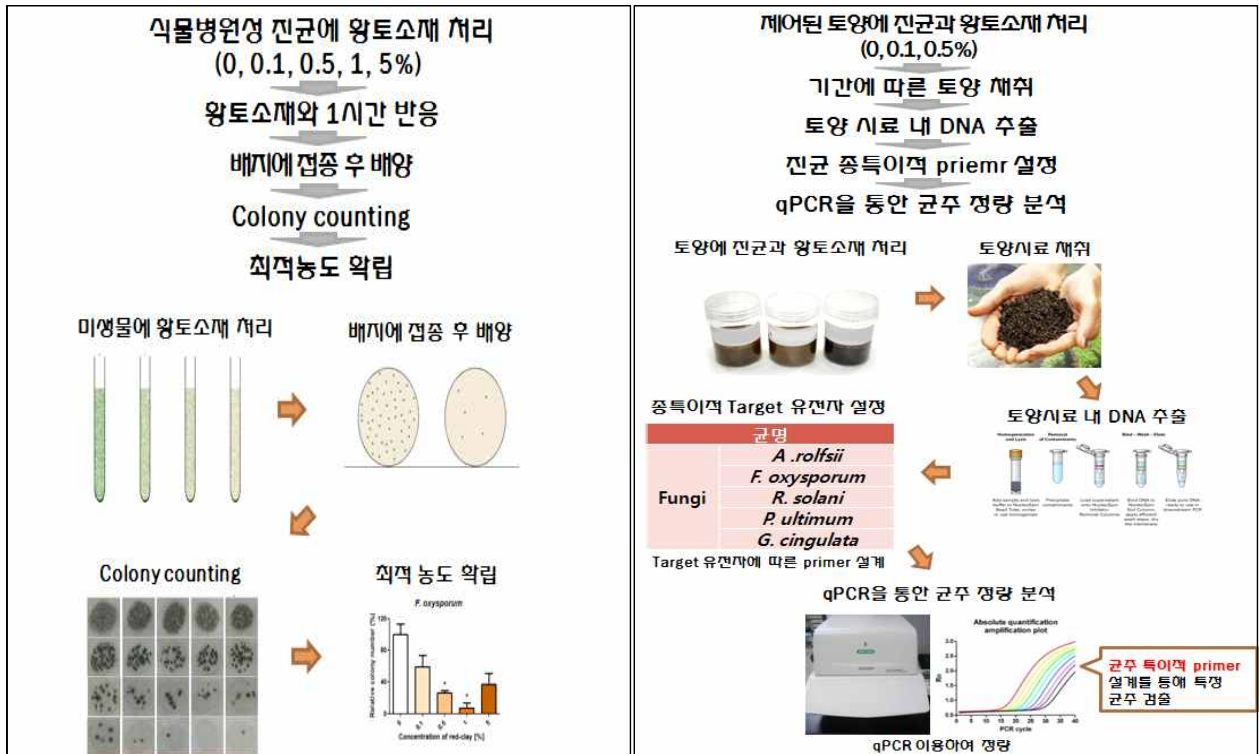


그림 3-3-6 식물병원성 진균에 대한 항진균 효능 평가 기법

황토가공소재의 항진균 효능 평가를 위해 소재를 식물병원성 진균에 직접 처리한 후 성장 억제율을 확인하는 Colony counting assay와 토양에 처리하여 토양 내 해당 진균의 특이적 DNA 마커 확인을 통해 원하는 진균만을 대상으로 정성, 정량적 분석을 수행하는 Real-time PCR 기법을 통해 항진균 효능 평가 기법을 구축하였다.

② 주요 식물병원성 진균의 특이적 marker 설계 및 조건 확립

○ 대상 식물병원성 진균 중 특이적 primer 최적화

토양 내 미생물 군집 중 대상 진균에 대하여 그 종만을 특이적으로 인식하는 primer를 설계하였으며 반복적인 검증을 통하여 primer와 real-time 조건을 최적화하였다 (표 3-3-5).

표 3-3-5 토양 내 병원성 곰팡이 분석을 위한 종 특이적 primer

균명	Sequence (5' -> 3')				Reference	
	Forward		Reverse			
Fungi	<i>R. solani</i>	ITS1	TCC GTA GGT	GMRS-3	AGT GGA ACC	Andrea. J. <i>et al</i> , 1998
			GAA CCT GCG G		AAG CAT AAC ACT	
	<i>F. oxysporum</i>	F1F	AGT ATT CTG	F1R	ACA AAT TAC	Koenraad F.M. <i>et al</i> , 2001
			GCG GGC ATG CCT GT		AAC TCG GGC CCG AGA	
	<i>A. rolfsii</i>	SSU-F	GCA TGG AAT	SSU-R2	TGC AAT GCY	Raj, M. <i>et al</i> , 2009
AAT RRA ATA GG			CTA TCC CCA			
<i>G. cingulata</i>	TB5	GGT AAC CAG	TB6	GCA GTC GCA	Talhinhas, P. <i>et al</i> , 2002	
		ATT GGT GCT GC TT		GCC CTC AGC CT		
<i>P. ultimum</i>	PulF2	GCA GGA CGA AGG TTG GTC TG	PulR2	GTC CCC ACA GTA TAA ATC AGT ATT TAG GT	Christoffel J. <i>et al</i> , 2011	

○ 토양 내 병원성 곰팡이 분석을 위한 PCR 조건 확립

토양 내 식물병원성 진균을 정량하기 위한 종 특이적 marker인 primer를 설계하고 각각에 특이적인 real-time PCR 조건을 최적화하여 확립하였다 (표 3-3-6).

표 3-3-6 진균의 종 특이적 primer에 대한 PCR 조건

진균명	Initial denaturation		Denaturation		Annealing		Extension		Cycle number
	Tem.(°C)	Time (m)	Tem.(°C)	Time (m)	Tem.(°C)	Time (m)	Tem.(°C)	Time (m)	
<i>A. rolfsii</i>	95	2:00	95	0:45	60	0:45	72	0:45	35
<i>F.oxysporum</i>	94	5:00	94	1:00	68	1:00	72	1:00	34
<i>R. solani</i>	94	4:00	94	1:00	55	1:00	72	2:00	37
<i>P. ultimum</i>	94	2:00	94	1:00	60	1:00	72	1:00	40
<i>G.cingulata</i>	95	2:00	95	0:45	60	0:45	72	0:45	30

(2) 흰비단병 원인진균 *A. rolfsii*에 대한 항진균 효능 구명

- 황토가공소재 처리 시 0.5%이상에서 *A. rolfsii* 성장에 대한 억제 효과
- 황토가공소재 1주일 이상 처리 시 토양 내 *A. rolfsii*의 효율적인 성장 억제

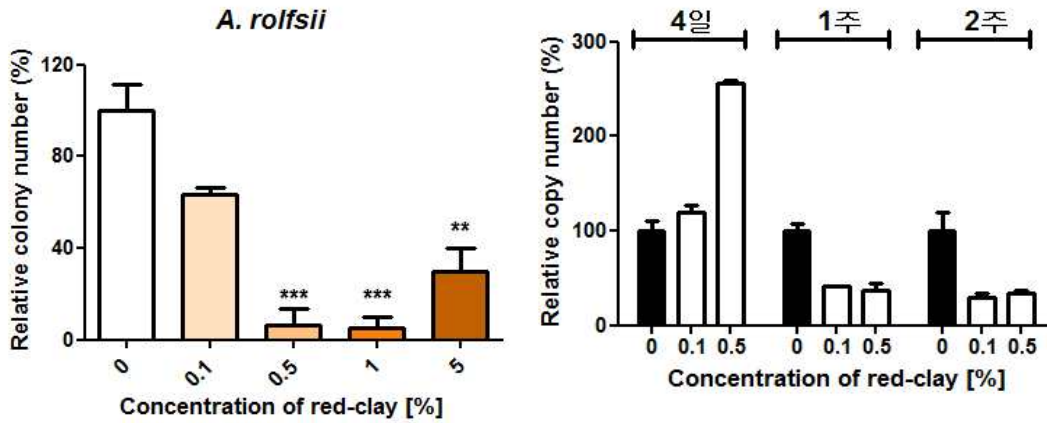


그림 3-3-7 *A. rolfsii*에 대한 항진균 효능

위 결과는 독립된 3회의 실험에 대해 평균치로 표시하였다. 유의성은 One-way ANOVA의 tukey's multiple comparison test를 이용하여 표시하였다. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0001$)

평가 결과, colony counting을 이용하여 *A. rolfsii*에 대한 황토가공소재의 항진균 효능을 확인한 경우 모든 농도에서 진균의 억제 효능이 나타났으며 특히 0.5%와 1%의 농도에서는 90% 이상의 성장 저해 효과를 보였다. 반면 토양에 처리하여 변화를 관찰하였을 경우 4일에서는 황토가공소재 처리 농도에 따라 생장이 촉진되는 것으로 나타났다. 그러나 처리 기간이 길어질수록 황토가공소재를 처리한 처리군에서 진균의 성장 저해가 일어남을 확인하였다. 이러한 억제 효과는 저농도 소재 처리에서도 나타났다. 1주차 이후에는 황토가공소재 처리군이 무처리군에 비해 50% 이상 진균의 생장이 억제되는 것으로 분석되어, 황토가공소재의 *A. rolfsii*에 대한 방제 효과에 대해 과학적 근거와 처리 조건을 확립하였다.

(3) 시들음병 원인진균 *F. oxysporum*에 대한 항진균 효능 구명

- 황토가공소재 0.5, 1% 처리에 따른 *F. oxysporum* 성장에 대한 억제 효과
- 황토가공소재 단기간 처리(4일)에 의한 토양 내 *F. oxysporum* 우수한 억제 효능

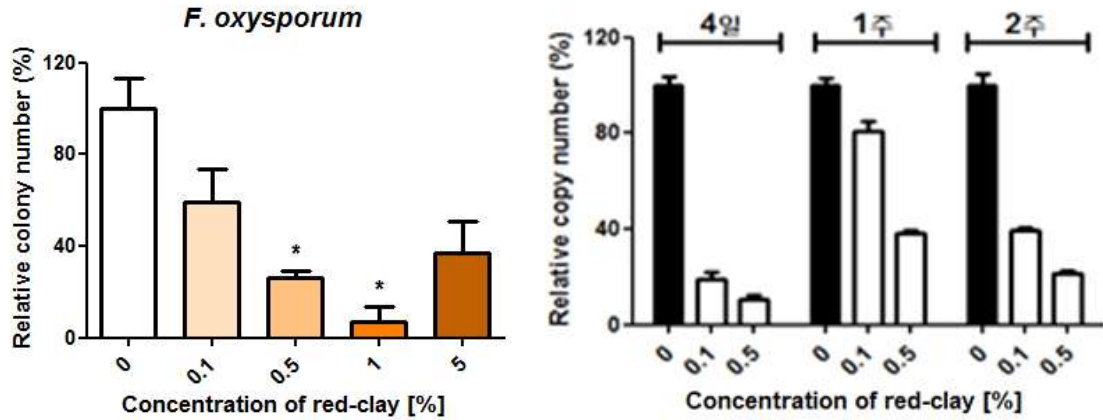


그림 3-3-8 *F. oxysporum*에 대한 항진균 효능

위 결과는 독립된 3회의 실험에 대해 평균치로 표시하였다. 유의성은 One-way ANOVA의 tukey's multiple comparison test를 이용하여 표시하였다. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0001$)

평가 결과, colony counting을 통한 억제 효능 평가 시 황토가공소재를 처리한 모든 농도에서 억제됨을 확인할 수 있었고, 또한 토양 내에서도 황토가공소재의 *F. oxysporum* 억제 효능을 확인한 결과에서도 모든 농도에서 병원균이 억제됨을 확인할 수 있었다. *F. oxysporum*의 경우 1% 농도의 황토가공소재를 처리 조건까지는 농도 의존적으로 병원균의 생장이 억제되는 경향을 보였으며 시간 경과에 따른 차이가 두드러지지 않는 토양 내에 처리하였을 경우에도 병원균의 전반적인 생장이 크게 억제되는 결과가 나타났다. 이를 통해 황토가공소재 토양 처리에 따른 *F. oxysporum*에 대한 항진균 효능을 증명하였다.

(4) 잎마름병 원인진균 *R. solani*에 대한 항진균 효능 구명

- 황토가공소재 0.5% 농도 이상의 처리군에서 유의미적 *R. solani* 억제 효과 확인
- 황토가공소재 처리 후 4일부터 0.1% 농도에서 토양 내 *R. solani*에 대한 우수한 억제 효능

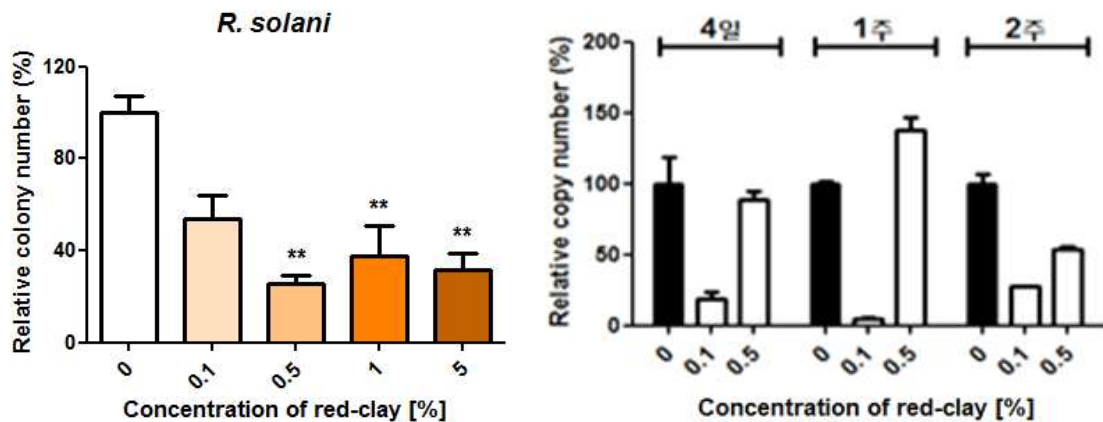


그림 3-3-9 *R. solani*에 대한 항진균 효능

위 결과는 독립된 3회의 실험에 대해 평균치로 표시하였다. 유의성은 One-way ANOVA의 tukey's multiple comparison test를 이용하여 표시하였다. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0001$)

평가 결과, *R. solani*에 대한 황토가공소재의 항진균 효능은 소재의 저농도 처리 시부터 나타났다. 농도 의존적인 변화는 아니나 0.5% 이상의 농도에서 유의미한 억제도를 보였으며, 이는 토양 내에 적용하여 관찰하였을 경우에도 유사하게 나타났다. 다만 토양 내에서 관찰한 결과에 따르면 colony counting 결과와는 달리 0.1%에서 항진균 효과가 두드러지게 나타나며 전체적으로 0.1% 농도에서 70% 이상의 억제효능을 보였다. 이를 통해 억제효과가 토양 내 소재 처리 기간과의 연관성은 적은 것으로 판단되었다. 결과적으로 황토가공소재의 처리가 진균 *R. solani* 성장 억제에 매우 효과적임을 입증하였다.

(5) 잘록병 원인진균 *P. ultimum*에 대한 항진균 효능 구명

- 황토가공소재의 모든 농도 처리군에서 *P. ultimum*의 억제 효과 확인
- 황토가공소재 처리 1주 이후부터 토양 내 *P. ultimum*의 우수한 성장 억제 효능

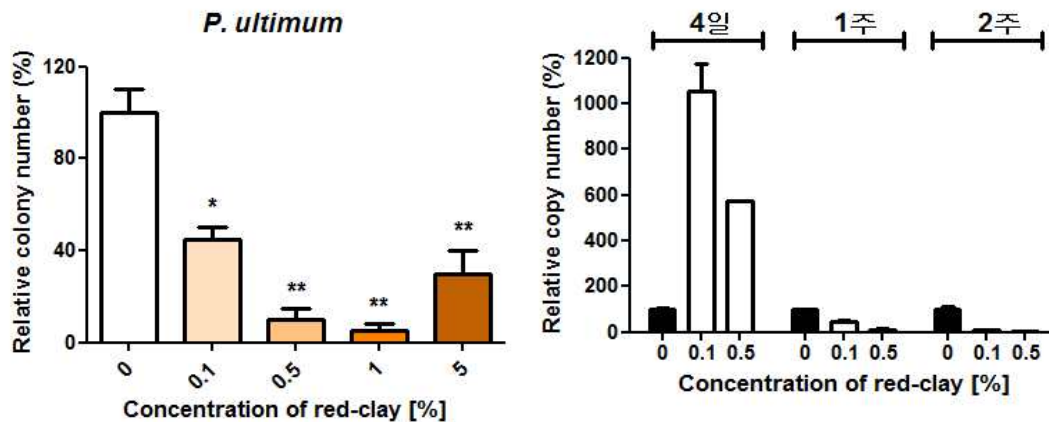


그림 3-3-10 *P. ultimum*에 대한 항진균 효능

위 결과는 독립된 3회의 실험에 대해 평균치로 표시하였다. 유의성은 One-way ANOVA의 tukey's multiple comparison test를 이용하여 표시하였다. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0001$)

평가 결과, colony counting을 이용한 *P. ultimum*의 항진균 효능 확인 시 황토가공소재를 처리한 모든 농도에서 유의미한 성장 억제가 관찰되었으며 1%까지는 농도 의존적인 경향을 나타내는 것으로 관찰되었다. 토양에 적용한 실험에서는 4일까지는 황토가공소재를 처리한 처리군에서 오히려 높은 병원균의 성장을 보인 반면 7일 이후에는 황토가공소재를 처리한 농도에 따라 진균의 성장률이 감소하는 것으로 나타났다. 이를 통해 황토가공소재를 *P. ultimum*에 장기간 (1주 이상) 적용하였을 경우 항진균 효능에 대한 근거가 확립되었다.

(6) 탄저병 원인진균 *G. cingulata*에 대한 항진균 효능 구명

- 황토가공소재의 모든 농도 처리군에서 *G. cingulata*에 대한 억제 효과 확인
- 황토가공소재 처리 1주 후 토양 내 *G. cingulata*의 성장 억제

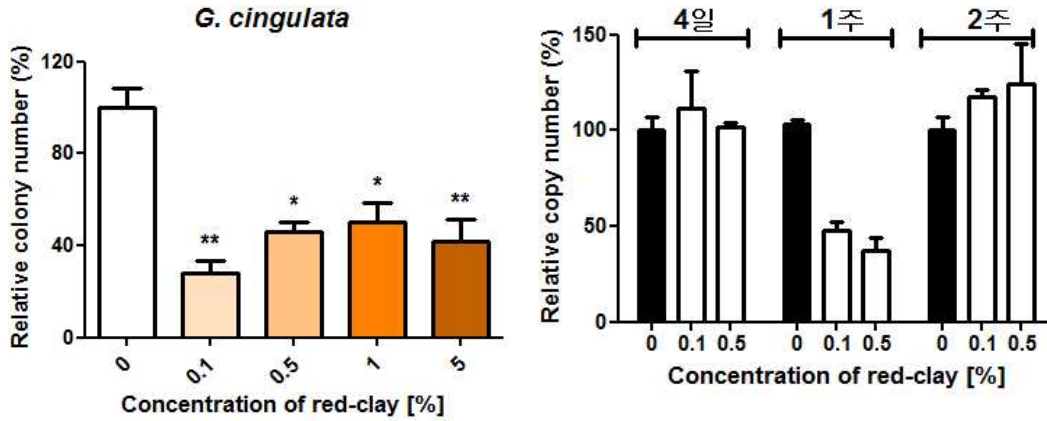


그림 3-3-11 *G. cingulata*에 대한 항진균 효능

위 결과는 독립된 3회의 실험에 대해 평균치로 표시하였다. 유의성은 One-way ANOVA의 tukey's multiple comparison test를 이용하여 표시하였다. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0001$)

평가 결과, 황토가공소재를 처리한 후 colony counting을 이용하여 관찰하였을 경우 *G. cingulata*의 생장이 모두 유의미하게 억제되나 1% 농도까지는 농도 의존적으로 억제 효능이 감소하는 경향이 나타났다. 이에 따라 0.1, 0.5% 농도를 토양 실험에 적용하여 관찰한 결과 진균의 생장이 4일차에서는 무처리군과 처리군 사이에 큰 차이가 없었으며 2주차에는 황토가공소재의 농도에 따라 생장이 증가하는 양상을 보였다. 반면, 1주차에는 황토가공소재 처리군의 농도 증가에 따라 억제 효능도 함께 증가하는 양상을 보여 황토가공소재의 적정 처리기간이 효과적임을 나타냄. 결과적으로 항진균 효능 실험을 통해 황토가공소재의 *G. cingulata*에 대한 항진균 효능과 적정 처리조건을 확립하였다.

(7) 황토가공소재의 식물병원성 진균에 대한 항진균 효능 구명 및 병해 억제 근거 확립

- 황토가공소재 처리에 따른 5종 병원성 진균 모두에서 유의성 있는 성장 억제 효능 구명
- 5종 병원성 진균을 대상으로 황토가공소재 처리 1주 후 토양 내 병원성 진균 성장 억제 조건 확립

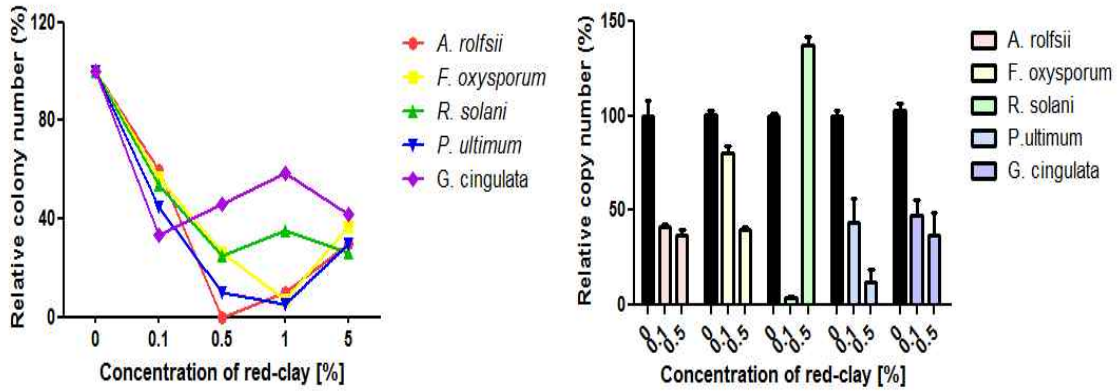


그림 3-3-12 황토가공소재의 항진균 효능

식물병원성 진균에 대한 황토가공소재의 항진균 효능을 평가하기 위한 실험 결과를 통해 식물 병원성 진균을 억제하기 위한 소재 처리 농도 및 처리 기간을 정립하였다. 식물병원성 진균 5종의 실험결과 억제 효능에 대한 차이는 존재하였으나, 5종의 진균 모두 황토가공소재를 처리하였을 때 *in vitro* 생장이 억제됨을 colony counting을 통해 확인하였다. 5가지 진균 모두에 공통적으로 억제 효능이 좋은 황토가공소재의 농도는 0.5%였으며, 이는 토양에 적용한 실험에서도 유사하게 나타났다. 식물병원성 세균의 경우 *in vitro* 배지 배양 조건에서는 황토가공소재를 처리 시 모든 농도에서 생장이 촉진된 반면 병원성 곰팡이 5종 모두에서는 황토가공소재 모든 처리 농도에서 생장이 억제되었는데, 이는 진균의 크기가 세균보다 커 황토 소재의 입자의 작용(부착 및 응집 유도)이 진균에 특이적임을 제시하였다. 또한 토양에 황토가공소재를 적용하였을 경우에도 병원성 세균과는 달리 1주차에서 전반적인 진균 억제 효능이 나타났으며 이는 진균과 소재의 상호작용이 토양 내에서 보다 효과적으로 일어남을 나타내는 결과이다. *R. solani*의 경우 0.5% 농도에서 생장이 증가하나 0.1% 농도에서는 95% 이상의 생장 억제 효능을 보여 다른 진균에 비해서도 가장 높은 억제 효능을 나타내었다. 종합적으로 *in vitro* 및 토양 내 황토가공소재 처리에 따른 식물병원성 진균의 억제 효능을 구명하고 이를 기반으로 실제 작물처리 조건을 정립하였다.

다. 황토가공소재의 식물병원성 진균에 대한 항진균 메커니즘 구명

(1) 황토가공소재의 항진균 메커니즘 분석 기법 구축

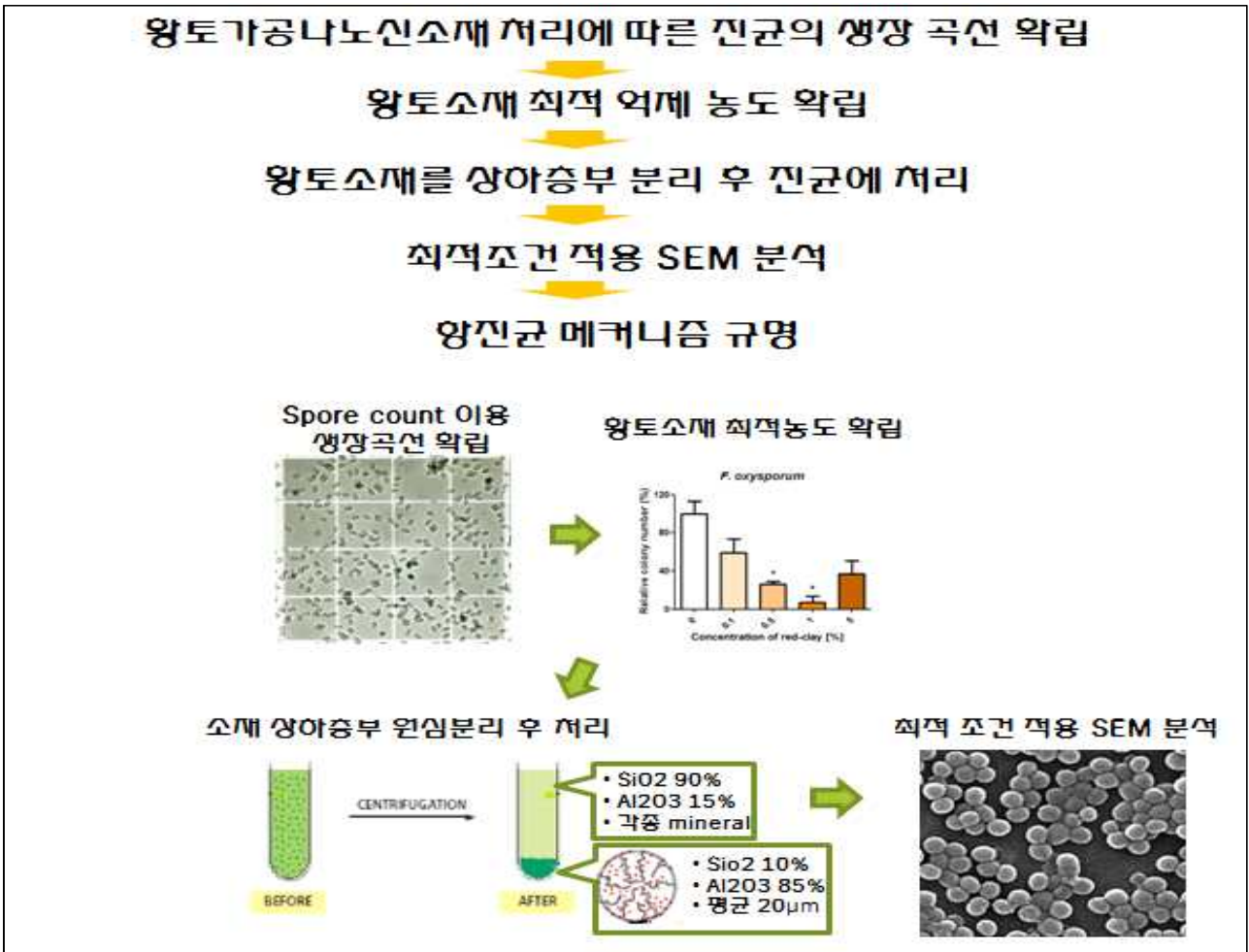


그림 3-3-13 항진균 메커니즘 분석을 위한 평가 기법

황토가공소재의 항진균 메커니즘 분석을 위해 소재와 식물병원성 진균을 함께 배양한 후 spore counting과 colony counting을 통해 생장 억제를 확인하고 이를 황토가공소재 원심분리 후 상, 하층부로 나누어 대상 소재의 작용 기작 구명을 위한 평가 기법 구축하였다.

(2) 황토가공소재 처리에 따른 방제 효과 검증

(가) 토양전염 식물병원성 진균의 선정

시장성 및 문헌 조사를 통해 선별한 5종의 토양전염 식물병원성 진균 중 분포지역이 넓고 여러 병해의 원인균으로 작용하여 방제가 어렵고 농가의 피해가 커 방제 효능의 획득에 의의가 있는 진균 2종을 선정하였다.

① 시들음병의 원인진균 *Fusarium oxysporum*

붉은 곰팡이라고 불리는 *Fusarium*은 채소나 곡식에 기생하며 독을 생산하는 곰팡이로 *Fusarium*속의 곰팡이는 생육이 빠름. *Fusarium*속에는 식물의 지하부에서 지상부까지 병을 일으

키는 다양한 종이 포함되어 있다. 그중에서도 *Fusarium oxysporum*의 경우 각종 채소류에 시들음병을 유발하여 작물의 수확에 타격을 입히는 것은 물론 날것으로 먹을 수 있는 바나나의 한 종인 그로미셀을 멸종 위기에 처하게 한 파나마병(Panama disease)의 원인균으로 세계 각지에 퍼져있고 방제가 어려워 농가의 골칫거리로 꼽힘. 해당 균의 방제기술 개발에 대한 의의가 큼.

② 잎마름병의 원인진균 *Rhizoctonia solani*

*Rhizoctonia*는 토양에 장기간 서식하는 토양곰팡이의 일종으로 각종 작물에 병해를 유발하였다. 작물에 따라 병징이 다르며 같은 작물에서도 다른 병징을 보이는 등 그 종류가 다양하였다. *Rhizoctonia solani*의 경우 뿌리, 줄기에 병해를 유발할 뿐만 아니라 지표면에 가까운 잎에서 마름 증상이나 반점 증상을 유발하기도 하며 수확 후 저장 중에도 부패를 일으킴. 또한 시설 포장과 노지 포장에서 병을 유발하는 병원균의 종류가 다르며 인삼의 잘록병을 유발하는 원인균으로 유명하여 큰 피해가 되는 균주이므로 방제법 개발에 의의가 있다.

(나) 시들음병 원인진균 *F. oxysporum*에 대한 황토가공소재 처리 최적화

○ 황토가공소재 1, 5%에서 *F. oxysporum*에 대한 최적 억제 효능 획득

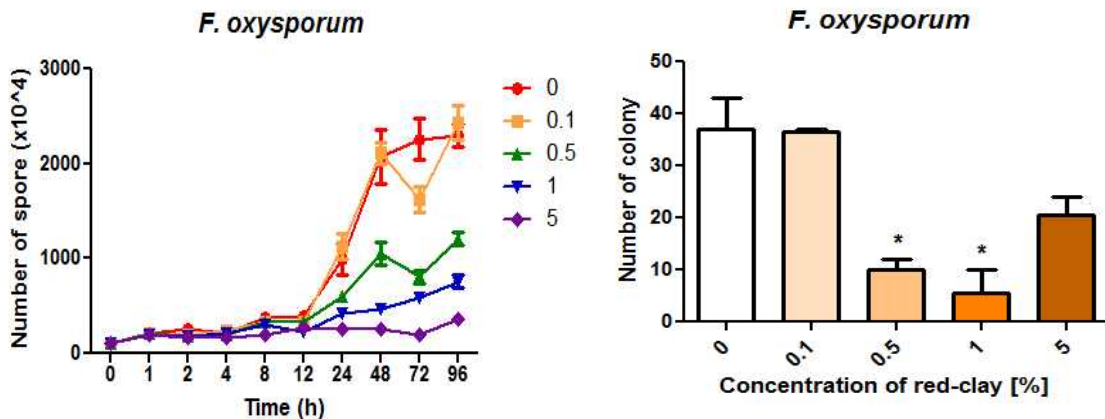


그림 3-3-14 황토가공소재의 *F. oxysporum*에 대한 억제 효능

위 결과는 독립된 3회의 실험에 대해 평균치로 표시하였다. 유의성은 One-way ANOVA의 tukey's multiple comparison test를 이용하여 표시하였다. (*, p<0.05; **, p<0.005; ***, p<0.0001)

Spore counting을 통하여 *F. oxysporum*의 생장을 확인했을 때 진균의 생장이 12시간을 기점으로 증가하기 시작하고 48시간 배양 시 최대치로 자랐다. 이를 통해 12시간에서 48시간까지가 지수증식기(log phase)이며 48시간 이후가 정상기(stationary phase)이다. 지수증식기는 세포분열이 지속적으로 일어나 증가하는 단계이며 세포의 생장이 활발할 때 황토가공소재를 처리하게 되면 그 영향이 더욱 증폭될 것이라는 가정 하에 48시간을 최적 처리시간으로 설정하였다. 황토가공소재 처리 농도에 따른 Spore 수를 측정하였을 때 성장 억제 효능이 농도 의존적으로

증가하였고 따라서 5% 농도에서 억제 효능이 가장 뛰어났다. 이를 바탕으로 colony counting 기법을 이용하여 추가 실험을 진행한 결과 1% 농도에서 가장 효과가 뛰어난 것으로 나타나 황토가공소재 1, 5% 농도를 최적화 조건으로 설정하였다.

(다) 잎마름병 원인균 *R. solani*에 대한 황토가공소재 처리 최적화

○ 황토가공소재 1, 5% 농도에서 *R. solani*에 대한 최적의 억제 효능 획득

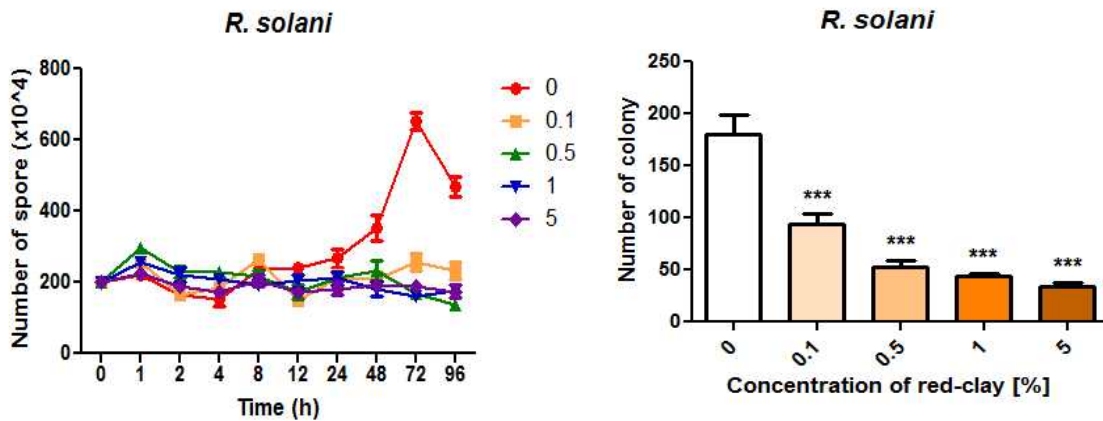


그림 3-3-15 황토가공소재의 *R. solani*에 대한 억제 효능

위 결과는 독립된 3회의 실험에 대해 평균치로 표시하였다. 유의성은 One-way ANOVA의 tukey's multiple comparison test를 이용하여 표시하였다. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0001$)

Spore counting을 통하여 *R. solani*의 성장을 확인했을 때 진균의 생장이 24시간부터 증가하기 시작했으며 72시간에서 최대에 도달하였다. 이를 통해 24시간부터 72시간까지가 지수증식기, 72시간이후가 정상기로 분류하며 96시간 지점을 사멸기로 분류하였다. 이에 따라 최적 배양시간을 72시간으로 설정하고 황토가공소재 처리 농도에 따른 spore 수를 측정하여 비교분석하였다. 그 결과 *F. oxysporum*과는 달리 *R. solani*의 경우 황토가공소재의 농도에 따른 성장 억제 효능의 차이가 두드러지지 않았다. 때문에 72시간 지점에서 가장 성장률이 적은 1% 농도를 최적 농도로 설정하였다. 추가적으로 colony counting 기법을 이용하여 실험을 진행하였으며 5% 농도에서 효과가 가장 뛰어난 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 1, 5% 농도로 처리 조건을 최적화하였다.

(3) 황토가공소재 상·하층부 분리 처리에 따른 방제 효과 검증

황토가공소재를 미네랄을 포함한 수용액 부분인 상층부와 입자를 포함한 하층부로 나누어 대상 진균에 처리한 후 억제 효능을 비교하였다.

(가) 시들음병 원인진균 *F. oxysporum*에 대한 황토가공소재 부분처리 최적화

○ *F. oxysporum*에 대한 항진균 효능은 황토가공소재 하층부 입자(particle) 처리 시 가장 우수

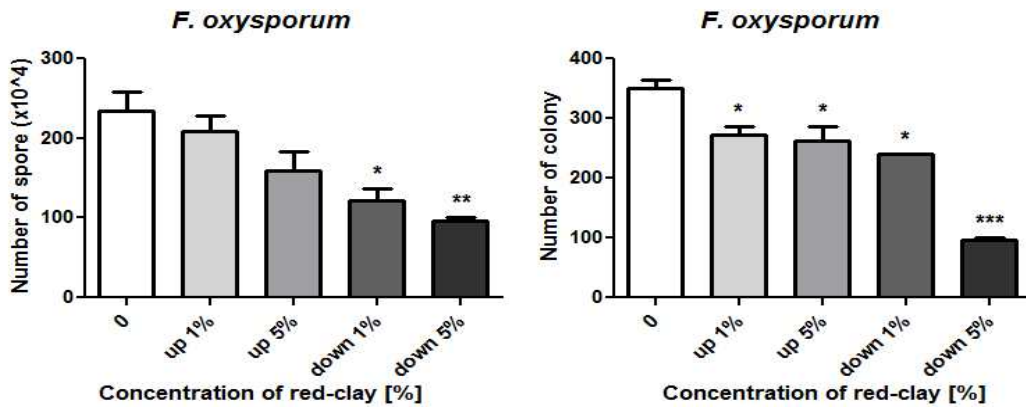


그림 3-3-16 *F. oxysporum*에 대한 황토가공소재 부분 처리

위 결과는 독립된 3회의 실험에 대해 평균치로 표시하였다. 유의성은 One-way ANOVA의 tukey's multiple comparison test를 이용하여 표시하였다. (*, p<0.05; **, p<0.005; ***, p<0.0001)

선행실험을 통해 설정한 최적 배양시간과 황토가공소재의 최적농도에 맞춰 실험을 진행하였다. 최적 농도의 황토가공소재를 상, 하층부로 원심분리기를 이용하여 분리한 후 *F. oxysporum*에 처리한 후 48시간 배양 후 spore counting 기법과 colony counting 기법을 적용하여 최적의 억제 효과를 나타내는 조건을 발굴하였다. 성장 억제 양상은 두 가지 기법에서 약간의 차이를 나타냈으나 공통적으로 5% 하층부 황토가공소재의 입자층 처리에서 다른 처리군에 비하여 가장 높은 항진균 효과를 나타냄. 따라서 황토가공소재의 상층부보다 하층부에 포함된 입자(500-1000 nm)의 작용에 따라 *F. oxysporum* 억제 효과가 뛰어난 것을 확인하였다.

(나) 잎마름병 원인진균 *R. solani*에 대한 황토가공소재 부분처리 최적화

○ *R. solani*에 대한 항진균 효능은 황토가공소재 하층부 입자(particle) 처리 시 가장 우수

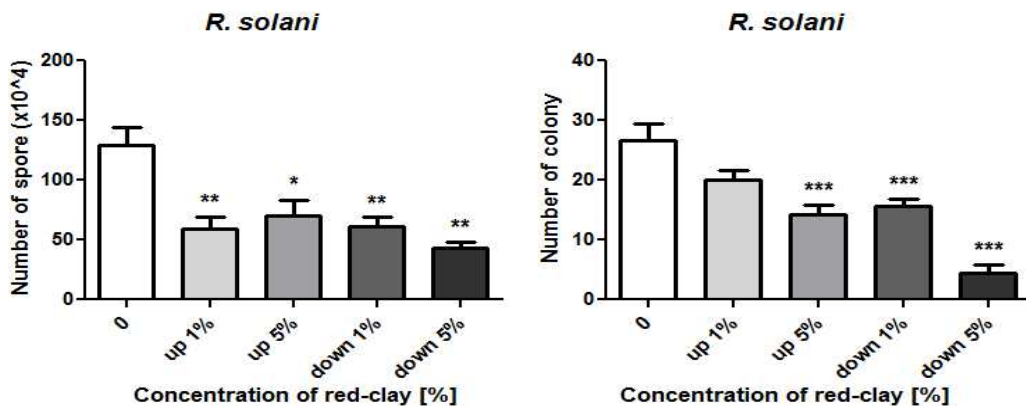


그림 3-3-17 *R. solani*에 대한 황토가공소재 부분 처리

위 결과는 독립된 3회의 실험에 대해 평균치로 표시하였다. 유의성은 One-way ANOVA의 tukey's multiple comparison test를 이용하여 표시하였다. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0001$)

선행연구를 통해 설정한 최적 배양시간과 황토가공소재의 최적농도에 따라 실험을 진행하였다. 최적 농도에 따른 황토가공소재를 원심분리를 통하여 상, 하층부로 분리한 후 *R. solani*에 처리한 후 72시간 배양하여 spore counting과 colony counting을 이용하여 최적의 억제 효과를 나타내는 조건을 발굴하였다. 생장 억제 양상은 두 가지 기법에서 차이를 보였으나 가장 높은 억제 효과가 나타나는 농도는 동일하였다. 이에 따라 5% 하층부를 *R. solani*의 최적 억제 조건으로 확인하고, 황토가공소재의 상층부보다 하층부에 포함된 입자(500-1000 nm)의 작용에 따라 진균 억제 효과가 뛰어난 것을 구명하였다.

(다) SEM analysis를 통한 황토가공소재의 작용 평가

○ 황토가공소재 입자(500-1000nm)의 곰팡이 세포벽 부착을 통한 진균 생장 억제

주사전자현미경(Scanning electron microscope, SEM) 분석을 이용하여 황토가공소재 입자에 의한 항진균 작용을 평가 및 검증하였다.

① *F. oxysporum*에 대한 황토가공소재의 작용 평가

○ 황토가공소재 하층부 5% 처리군에서 *F. oxysporum*에 대한 소재 입자 부착 및 포자간의 흡착 확인

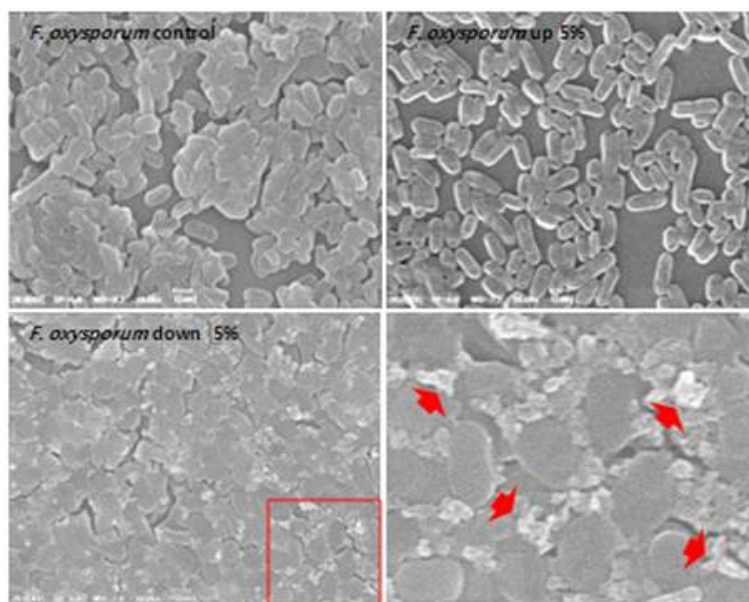


그림 3-3-18 황토가공소재를 처리한 *F. oxysporum*의 SEM image

SEM analysis를 통하여 황토가공소재의 분리 처리 관찰 시 진균의 세포벽 변화를 관찰하여 항진균 작용의 과정을 구명하였다. 무처리군과 비교 목적으로 진행한 상층부 5% 처리군과 최적

조건인 5% 하층부 처리군을 SEM analysis를 이용하여 분석하였다. 상층부 처리군이 무처리군과 별 차이가 없었던 것에 비하여 하층부 처리군의 경우 확대하였을 때 빨간 화살표와 같이 흰색의 황토가공입자가 세포벽에 부착되어 포자 간의 결합을 증가시킴을 확인하였다. 이를 통해 하층부의 진균 억제에 황토가공소재의 입자가 부착되고 포자 간의 결합이 증가하는 작용으로 인해 나타남을 구명하였다.

② *R. solani*에 대한 황토가공소재의 작용 평가

○ 황토가공소재 하층부 5% 처리 시 *R. solani*에 대한 소재 입자 부착 및 포자간의 흡착 확인

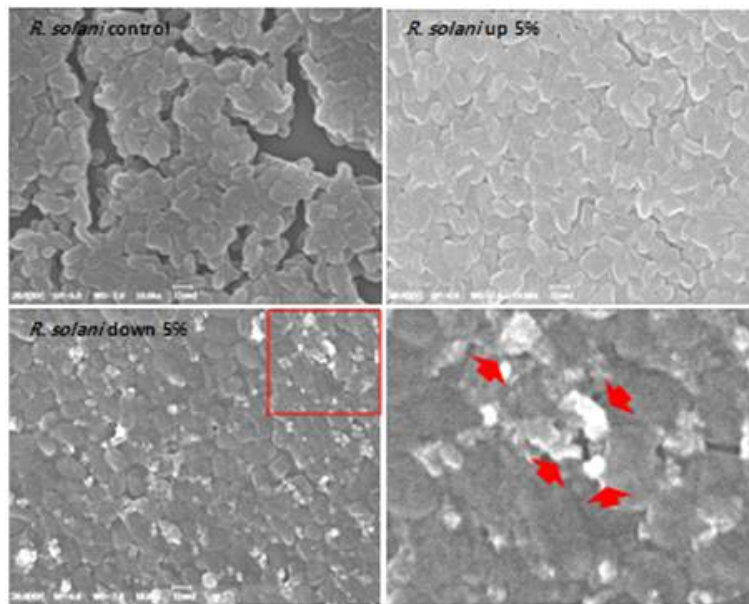


그림 3-3-19 황토가공소재를 처리한 *R. solani*의 SEM image

SEM analysis를 통하여 황토가공소재의 분리 처리 관찰 시 진균의 세포벽 변화를 관찰하여 항진균 작용의 과정을 구명하고자 하였다. 무처리군과 최적조건인 5% 하층부 처리군을 기본으로 진행하였으며 비교 목적으로 5% 상층부 처리군도 SEM analysis를 통해 확인하였다. 층부 처리군은 무처리군과 별다른 차이를 보이지 않았으나 하층부 처리군의 경우 빨간 화살표로 표시된 것과 같은 입자의 응집으로 진균의 포자 또한 전체적으로 응집되어 있는 형태를 보였다. 이를 통해 황토가공소재의 입자가 진균의 세포벽에 응집되며 포자 간의 결합을 강하게 하여 진균의 억제 작용이 나타남을 확인하였다.

(4) 황토가공소재의 항진균 메커니즘 구명

(가) *F. oxysporum*의 전사체 분석을 통한 황토가공소재의 작용 기작 확립

○ 황토가공소재의 입자 부착 및 포자간의 흡착으로 진균 성장 억제 메커니즘 유도

① 황토가공소재 처리에 따른 전사체 발현 평가

○ 황토가공소재 하층부 5% 처리 시 *F. oxysporum*의 성장 및 전사체 발현 억제

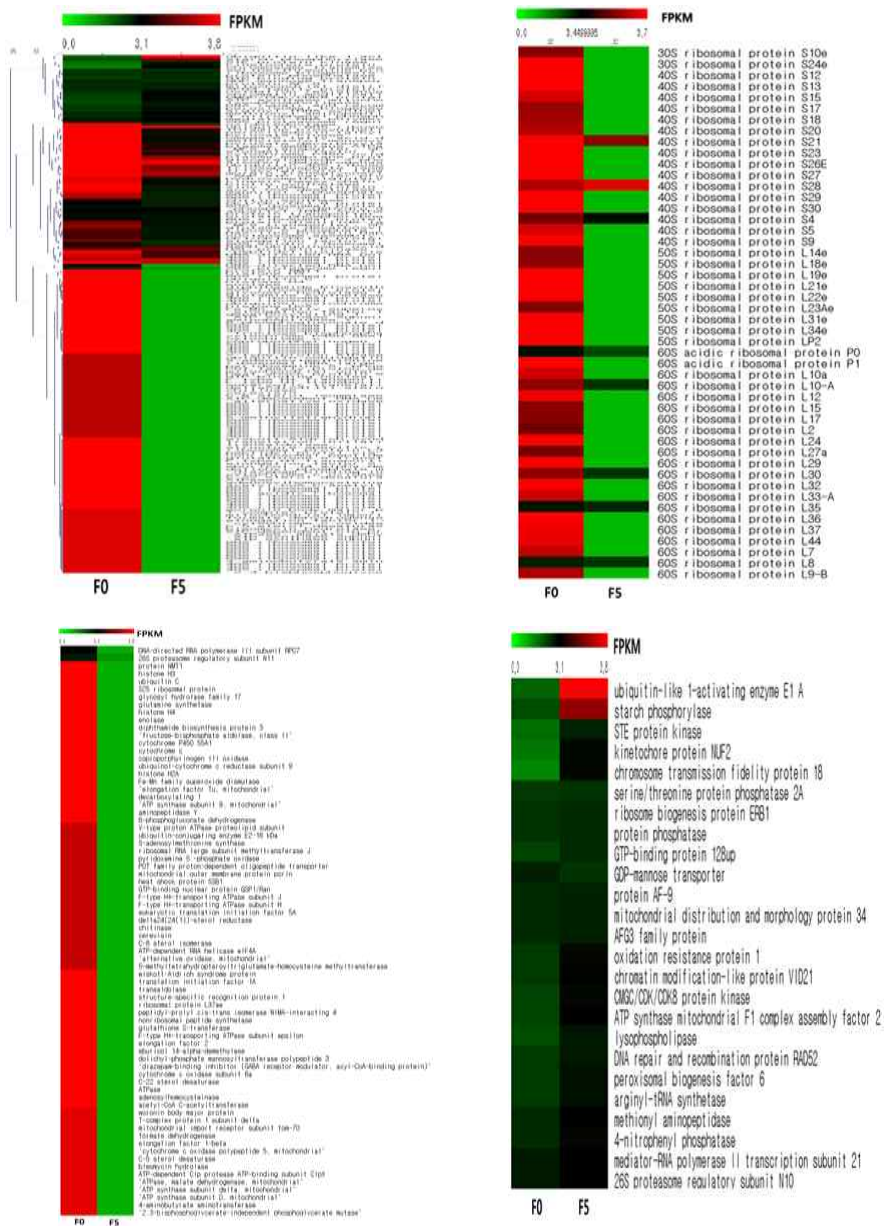


그림 3-3-20 황토가공소재 처리에 따른 전사체 발현도

*F. oxysporum*에 대한 전사체 분석을 통하여 황토가공소재 처리 시 mRNA의 변화를 관찰하여 유전자의 발현을 평가하고 소재의 작용 기작을 조사하였다. *F. oxysporum*의 reference genome 과 대응하는 유전자 중에서 특정 단백질을 지정하는 전사체를 비교하였다. 전체적인 전사체를 비교하였을 경우 황토가공소재를 처리하였을 경우 무처리군과 비교하여 전반적으로 전사체의 발현이 감소하였다. 특히 리보솜 단백질을 지정하는 전사체가 황토가공소재를 처리하였을 때 현저하게 감소함을 확인하였으며 리보솜 단백질은 세포 내의 항존유전자(항상 발현되고 세포

의 생명활동에 필수적인 유전자의 총칭)로 발현의 억제가 진균 생장의 억제를 입증하는 요소로 작용하며 이를 통해 황토가공소재 처리 시 진균의 생장이 크게 억제되었음을 확인하였다. 또한, 황토가공소재 처리에 따라 특이적으로 발현이 증가하는 그룹과 감소하는 그룹으로 전사체를 분류하여 평가하였을 때, 황토가공소재 처리 시 산화적 인산화와 관련된 전사체의 발현은 무처리군에 비하여 감소하고 ubiquitin activation enzyme, starch phosphorylase, STE protein kinase 등의 발현은 증가함을 확인하였다. 이 중에서도 starch phosphorylase는 기질 수준 인산화에 작용하는 단백질이며 STE protein kinase는 세포가 기아상태일 경우 발현이 증가하며 발현의 증가가 cell cycle arrest를 유도하는 것으로 알려져 있다. 이를 통해 황토가공소재의 처리가 특정 전사체의 발현을 억제 및 촉진하는 기작을 이용하여 진균의 생장을 억제함을 구명하였다.

② 황토가공소재 처리에 따른 대사 메커니즘 평가

○ 황토가공소재 처리에 따른 인산화 관련 전사체의 변화가 진균 성장 억제 유도

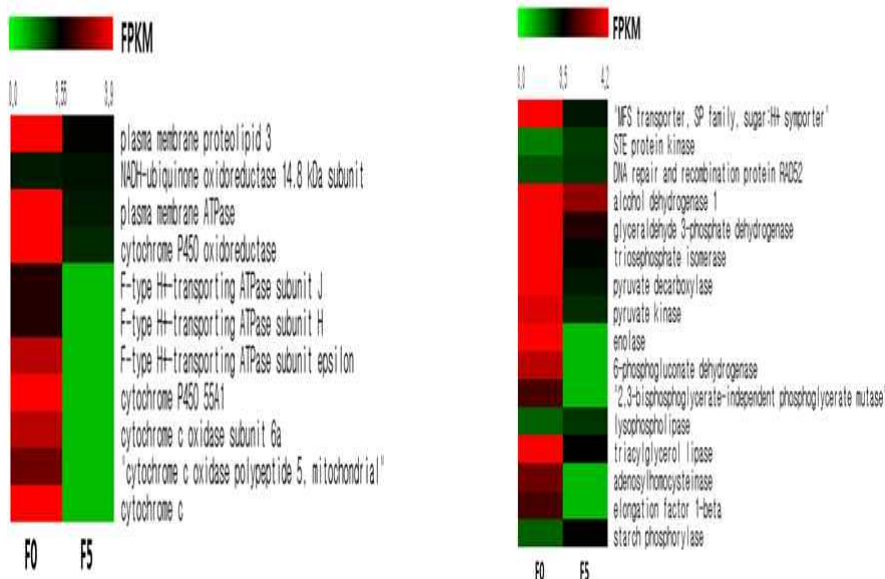


그림 3-3-21 황토가공소재 처리에 따른 인산화 관련 전사체 발현도

선행 평가를 통하여 진균 성장 억제 과정에서 전사체의 증감 변화가 세포 내 생명 활동의 기초가 되는 ATP를 생성하는 과정에서 유도되는 것으로 판단되었다. 이에 따라 전사체를 산화적 인산화와 기질 수준 인산화로 분류하여 평가하였다. 그 결과 황토가공소재를 처리하였을 경우 산화적 인산화와 관련된 전사체의 발현은 현저하게 감소하는 반면, 기질 수준 인산화와 관련된 전사체의 경우 무처리군과 발현도의 차이가 유사하거나 오히려 증가하였다. 이를 통해 ATP를 생성하는 과정에서의 차이가 진균 성장 억제를 유발할 가능성을 제시하였다.

③ 황토가공소재 처리에 따른 진균 성장 억제 메커니즘 모식도

○ 황토가공소재의 흡착이 궁극적인 진균 성장 억제 유도

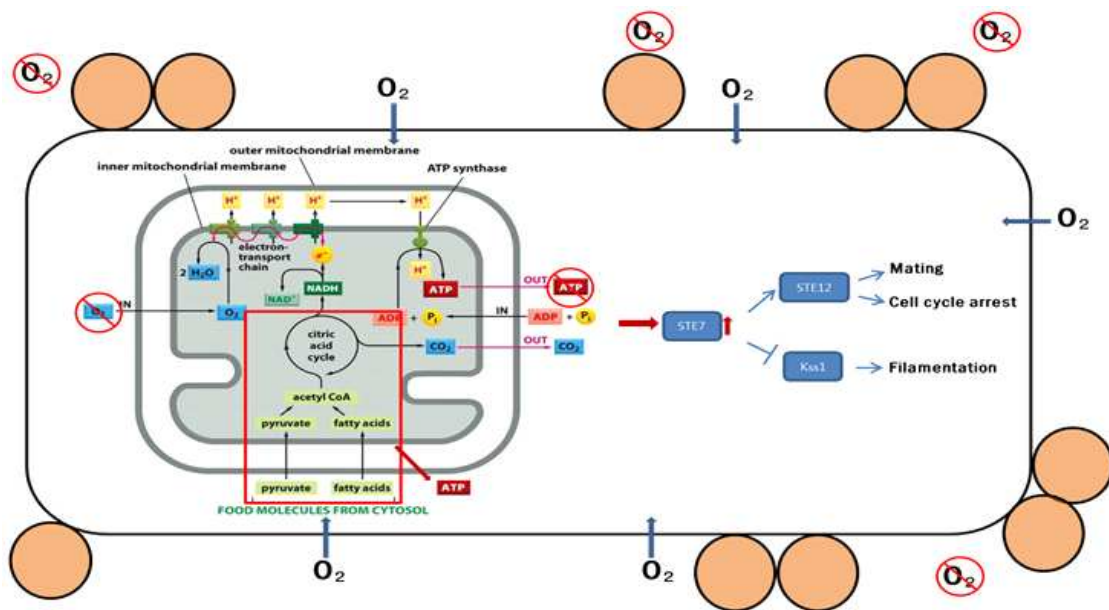


그림 3-3-22 진균 성장 억제 메커니즘

항진균 메커니즘에 관련된 연구 결과를 총괄하여 보았을 때 황토가공소재가 진균의 포자에 부착됨으로써 진균의 호흡 및 영양 흡수에 방해가 되고 이를 통해 진균 성장 억제 메커니즘이 발생함을 모식도를 통해 제시하였다.

본 연구 결과 황토가공소재의 5% 농도 처리 시 진균의 억제 효과가 가장 뛰어남을 확인할 수 있었고 그 중에서도 5% 하층부가 진균의 억제에 가장 큰 영향을 미침을 확인하였다. 황토가공소재를 가공하는 과정에서 NaOH를 첨가하여 분쇄하게 되는데 이 과정에서 SiO₂가 황토 입자 내에서 제거되게 된다. 이를 통해 황토 입자 내에 공극이 생기게 되고 이러한 공극의 발생은 입자와 균의 결합력을 높이는 조건으로 작용하게 된다. 이에 따라 진균의 표면에 황토 입자의 응집이 증가하게 되고 세포벽의 통로를 통해 공급되는 산소와 영양분이 감소하며 일반적인 경우 산화적 인산화를 통해 에너지를 얻는 진균이 기질 수준 인산화를 통해 에너지를 확보하게 된다. 그러나 기질 수준 인산화를 통하여 획득할 수 있는 ATP의 양이 산화적 인산화에 비하여 제한적이고 이러한 차이가 진균 세포의 기아 상태를 유도하게 된다. 세포가 기아상태로 변하며 STE protein kinase의 발현이 증가하게 되고 이는 cell cycle arrest를 유도하고 진균 성장의 한 단계인 filamentation(균사 성장)을 억제하는 현상을 유발한다. 결론적으로 황토 입자가 진균 표면에서 응집되어 세포 호흡을 막는 현상이 황토가공소재의 진균 성장 억제 기작으로 구명되었다.

2. 황토가공소재 장기간 처리 토양 내의 토양전염 식물병해미생물에 대한 억제 효능 평가 및 처리 조건 최적화

가. 황토가공소재 장기간 처리 토양의 이화학적 변화

(1) 황토가공신소재의 장기간 노지 토양 처리



그림 3-3-23 장기간 처리 토양 채취 조건

선행연구를 통해 확립된 0.1, 0.5, 1, 5% 농도의 황토가공소재를 경기도 고양시 덕양구 덕은동 소재의 노지 토양에 매달 1회 1 L/3.3 m² 처리하여 토양 시료를 확보하였다.

(2) 장기간 처리 토양시료의 이화학적 분석

○ 황토가공소재 장기간 처리 시 토양 내 식물 성장 촉진 성분 증가

확보된 토양 시료 중 짝수 달 시료의 이화학적 분석을 통해 성분을 확인하였다 (표 3-3-7).

표 3-3-7 황토가공소재 장기처리 토양의 성분

처리 기간	농도 (%)	유효인산 (mg/kg)	하얀다 수율 (%)	총 유기탄소 (%)	pH	T-N (mg/kg)	온도 (°C)	습도 (%)
1개월	0	154.051	17.026	1.614	7.15	198.334	16.2	42
1개월	0.1	155.629	17.254	3.092	6.61	379.941	16.2	42
1개월	0.5	180.389	18.52	2.359	6.71	289.808	16.2	42
1개월	1	142.218	18.585	2.605	6.64	320.046	16.2	42
1개월	5	171.488	18.298	2.178	7.24	267.564	16.2	42
3개월	0	111.86	17.871	2.579	7.15	316.801	30.7	50

3개월	0.1	86.78	20.983	2.379	7.12	292.281	30.7	50
3개월	0.5	134.101	19.278	3.037	7.23	373.18	30.7	50
3개월	1	145.75	20.33	3.05	7.17	374.722	30.7	50
3개월	5	104.532	21.536	1.453	7.38	178.497	30.7	50
5개월	0	154.179	4.831	2.92	7.03	358.753	27.3	62
5개월	0.1	192.28	5.25	2.629	7.22	323.009	27.3	62
5개월	0.5	141.835	6.012	2.679	7.2	329.104	27.3	62
5개월	1	157.774	6.328	2.334	7.25	286.744	27.3	62
5개월	5	139.966	7.87	2.547	7.25	312.971	27.3	62
7개월	0	91.331	11.472	2.033	7.2	249.766	14	46
7개월	0.1	135.756	12.399	2.523	6.88	309.932	14	46
7개월	0.5	165.633	11.215	2.679	7.17	329.104	14	46
7개월	1	162.862	12.432	1.916	7.24	329.104	14	46
7개월	5	122.732	13.764	2.679	7.29	235.456	14	46
9개월	0	74.937	24.526	1.554	7.21	190.93	5.8	39
9개월	0.1	119.28	21.389	2.331	7.15	273.768	5.8	39
9개월	0.5	105.057	19.614	2.341	7.22	287.595	5.8	39
9개월	1	140.337	17.922	1.786	7.23	231.591	5.8	39
9개월	5	89.816	20.351	1.081	7.31	132.796	5.8	39
11개월	0	90.026	15.263	1.714	6.66	210.545	9.1	49
11개월	0.1	90.642	16.979	2.959	6.89	363.487	9.1	49
11개월	0.5	147.377	18.643	3.241	6.88	398.175	9.1	49
11개월	1	157.031	14.637	2.662	6.94	327.021	9.1	49
11개월	5	88.83	20.541	2.784	7.17	342.01	9.1	49

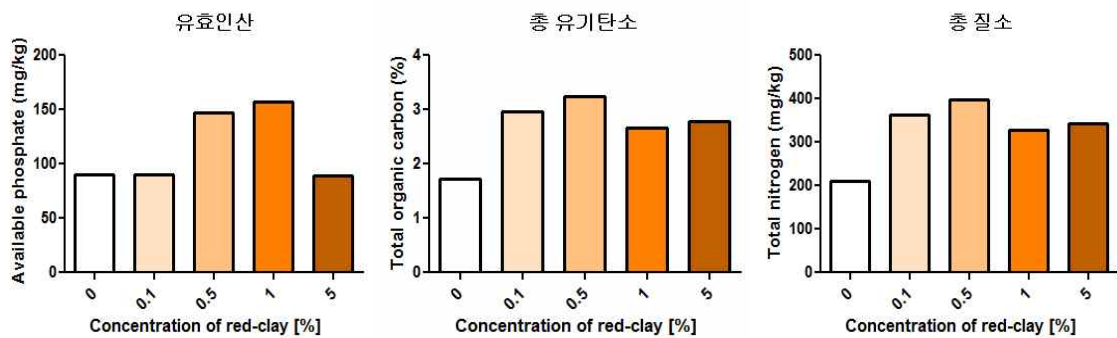


그림 3-3-24 황토가공소재 처리 최종 토양의 성분분석

황토가공소재를 조건에 따라 처리하여 매달 확보하였으며 그 중에서 격달의 시료를 이용하여 이화학적 성분을 분석하였다. 토양 시료의 성분분석은 식물 생장에 영향을 주는 성분을 중점으로 수행하였다. 유효인산은 식물의 단백질 합성과 탄수화물 대사에 필수적인 역할을 하는 성분이며 총 유기탄소의 경우 식물의 구성성분이 되는 탄소를 토양에 저장하는 형태이다. 이를 통해 식물을 구성하고 대사 작용하므로 이러한 성분이 증가함에 따라 식물의 성장도 촉진되었다. 또한 총 질소는 단백질의 구성성분이자 엽록소의 주요성분이 되는 질소를 측정하는 것으로 질소는 광합성 촉진을 유발하여 식물 생장이 촉진되었다. 이에 따라 최종 처리 토양의 성분 분석을 진행하였으며 황토가공소재 처리 시 전체적으로 식물 성장 촉진에 필수적인 성분들이 증가

함을 확인하였다. 특히, 0.5% 농도의 황토가공소재의 지속적 처리가 식물의 성장 촉진에 가장 적합한 조건으로 확립되었다.

나. 황토가공소재 장기간 처리 토양 내 식물병원성 세균 저감화 기법 개발

○ 황토가공소재 저농도(0.1, 0.5%)에서 3개월 전후의 단기 처리, 고농도(1, 5%)에서 6개월 이상의 장기 처리 조건을 식물병원성 세균 저감화의 최적 조건으로 확립

(1) 노지 토양 내 세균 저감화 기법 구축

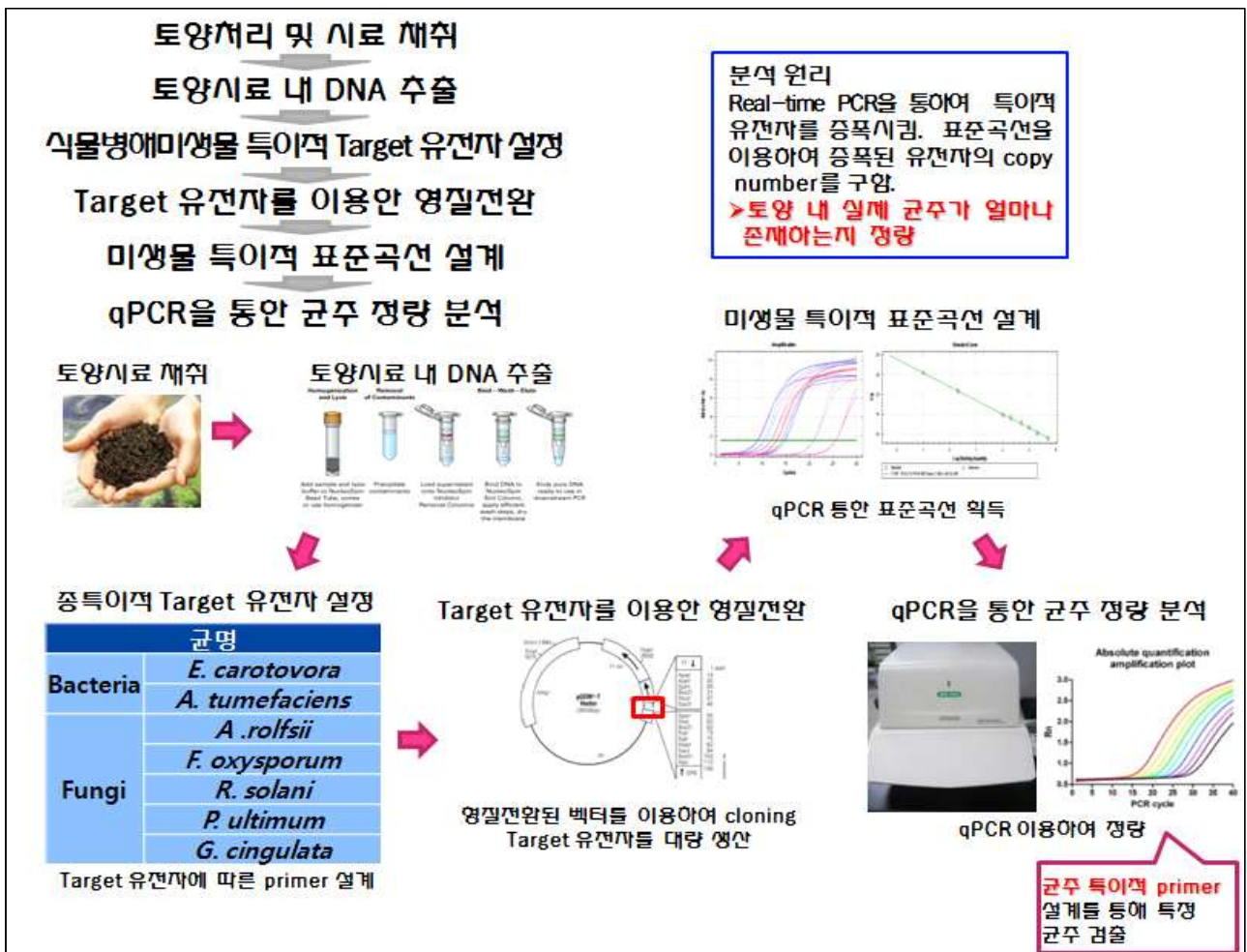


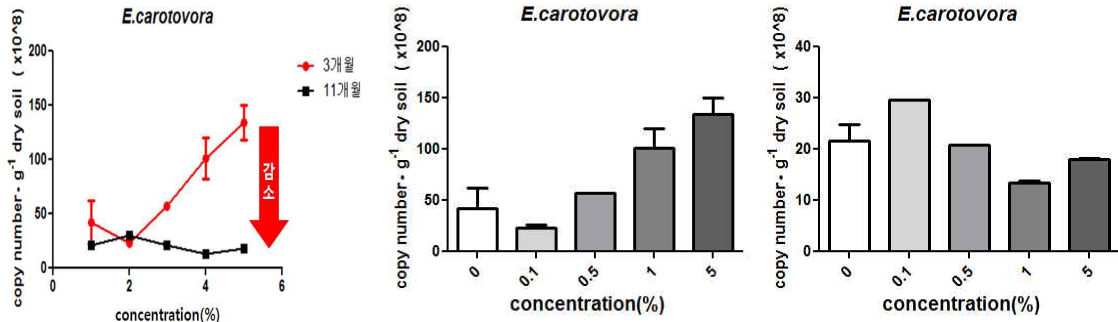
그림 3-3-25 토양 내 미생물 정량 분석법

장기간 황토가공소재를 처리한 노지 토양 시료의 DNA를 추출하여 토양 내 특정 미생물이 얼마나 존재하는지 정량 분석하는 기법을 구축하였다. 균의 primer와 PCR 조건은 선행 연구를 통해 확립한 조건을 사용하였다.

(2) 무름병 원인세균 *E. carotovora*에 대한 저감화 적용 기법 확립

○ 노지 토양 대상 황토가공소재 단기(3개월 0.1% 농도) 처리군과 장기(11개월 1% 농도) 처리

균에서 *E. carotovora*에 대한 최적 저감화 조건 확립



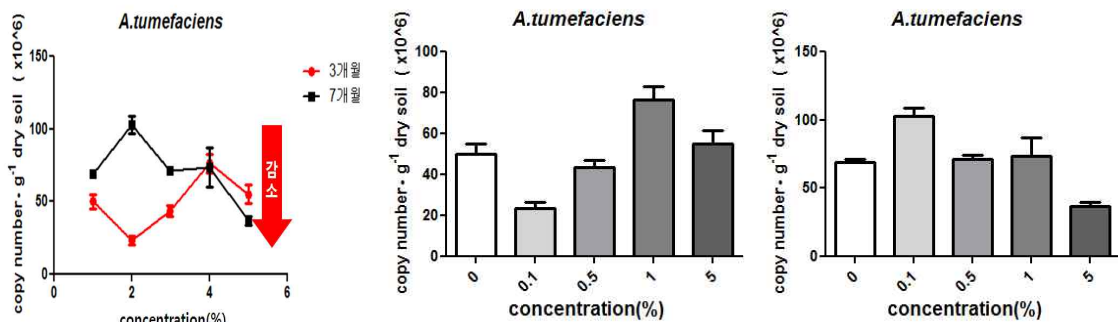
처리기간 : 3개월 처리기간 : 11개월

그림 3-3-26 황토가공소재 처리에 따른 토양 내 *E. carotovora* 변화량

황토가공소재 3개월 처리 토양과 11개월 처리 토양을 비교 분석하였다. 3개월 처리 토양의 경우 0.1% 농도에서 *E. carotovora*의 수가 감소하였으나 0.5% 이상에서 균의 생장이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 11개월 처리 토양에서는 3개월 처리와 달리 0.1% 농도에서 무처리군에 비하여 균의 생장이 증가하였으며 나머지 농도에서 감소하는 경향을 보였다. 1% 농도에서는 생장이 40% 이상 감소하여 3개월 처리군과 전혀 다른 양상을 보였다. 황토가공소재 처리에 따라 토양 내 균의 개량이 일어나게 되고 이에 따라 유용미생물의 증가 등 균집의 변화가 발생하게 되는데 기간의 차이에서 균집 변화의 차이가 발생하게 되고 이러한 차이가 기간에 따른 최적 농도의 변화를 유발하는 것이라 사료되었다. 따라서 토양 내 *E. carotovora*의 분석을 통하여 3개월 0.1% 또는 11개월 1% 처리를 병원균의 저감화에 대한 최적 조건으로 성립되었다.

(3) 뿌리혹병 원인세균 *A. tumefaciens*에 대한 저감화 적용 기법 확립

○ 노지 토양 대상 황토가공소재 단기(3개월 0.1% 농도) 처리군과 장기(7개월 5% 농도) 처리군에서 *A. tumefaciens*에 대한 최적 저감화 조건 확립



처리기간 : 3개월 처리기간 : 7개월

그림 3-3-27 황토가공소재 처리에 따른 토양 내 *A. tumefaciens* 변화량

황토가공소재 3개월과 7개월 처리 토양을 비교 분석하였다. 3개월 처리 토양의 경우 0.1% 농도에서 *A. tumefaciens*의 수가 감소하였으나 0.1%에서 1%까지 균의 생장이 농도 의존적으로 증가하였다. 7개월 처리 토양에서는 3개월 처리와 달리 0.1% 농도에서 무처리군에 비하여 균의 생장이 증가하였으며 나머지 농도에서 감소하는 경향을 보였다. 특히 5% 농도에서 50% 이상의 높은 억제 효능을 보였다. 황토가공소재의 농도에 따라 토양 내의 균집 변화를 통한 토양의 개량이 차이가 나는 것으로 사료되었다. 결론적으로 토양 내 *A. tumefaciens*의 분석을 통하여 3개월 0.1% 또는 7개월 5% 처리가 병원균의 저감화에 최적화된 조건임을 구명하였다.

연구결과에서 황토가공소재의 장기간 처리 토양 내에서 토양전염 식물병원성 세균의 억제 최적화 조건을 제시하였다. 식물병원성 세균의 경우 3개월 정도의 단기간 처리 시 0.1%의 저농도에서 균의 생장이 억제되는 일종의 토양 개량이 일어남을 확인하였다. 또한 6개월 이상의 장기간 처리 시 1% 내지 5%의 고농도 황토가공소재를 처리하는 것이 단기 처리보다는 균의 생장 억제에 더 효과적인 것으로 확인되었다. 따라서 저농도에서 3개월가량 단기 처리, 고농도에서 6개월 이상의 장기 처리가 병원균의 저감화를 위한 최적 토양 처리 기법임을 제시하였다 (표 3-3-8).

표 3-3-8 식물병원성 세균의 억제를 위한 황토가공소재의 적정 처리 농도 및 기간

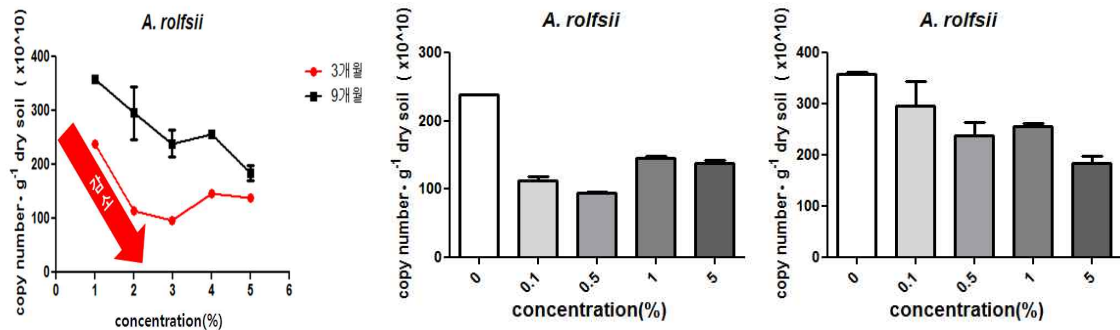
균명		황토가공소재 처리농도 (%)	처리기간
Bacteria	<i>E. carotovora</i>	0.1%	3개월
		1%	11개월
	<i>A. tumefaciens</i>	0.1%	3개월
		5%	7개월

다. 황토가공소재 장기간 처리 토양 내 식물병원성 진균 저감화 기법 개발

○ 황토가공소재 3개월 이하의 단기간 처리가 토양 식물병원성 진균 저감화의 최적 조건임을 구명

(1) 흰비단병 원인진균 *A. rolfsii*에 대한 저감화 적용 기법 확립

○ 노지 토양 대상 황토가공소재 3개월 0.5% 농도 처리군에서 *A. rolfsii*에 대한 최적 저감화 조건 확립



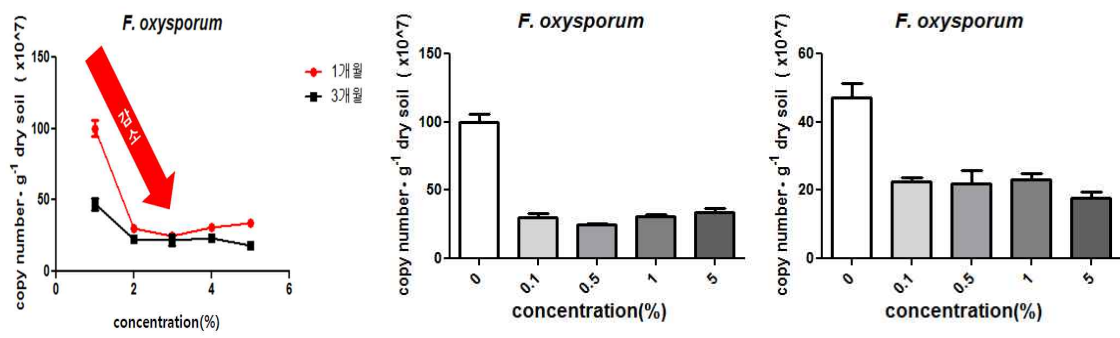
처리기간 : 3개월 처리기간 : 9개월

그림 3-3-28 황토가공소재 처리에 따른 토양 내 *A. rolfsii* 변화량

황토가공소재 3개월과 9개월 처리 토양을 비교 분석하였다. 처리기간에 관계없이 황토가공소재를 처리한 경우 모두 무처리군에 비해 진균의 생장이 억제된 것을 확인할 수 있었다. 다만, 기간에 따라 균의 억제 효능에 차이가 존재하였다. 3개월 처리군의 경우 농도에 비례한 차이는 아니었으나 모든 농도에서 50%이상의 억제 효능을 보였으며 특히 0.5%의 경우 60%의 진균 억제 효능을 보였다. 9개월 처리군의 경우 농도 의존적인 억제 효능을 보였으나 그 값이 3개월 처리군에 비해 미미하였다. 따라서 토양 내 병원성 곰팡이 *A. rolfsii*의 억제를 위해서는 0.5% 농도 황토가공소재의 3개월 시비가 최적화 조건임을 제시하였다.

(2) 시들음병 원인진균 *F. oxysporum*에 대한 저감화 적용 기법 확립

○ 황토가공소재 1개월 0.5% 농도 처리군에서 *F. oxysporum*에 대한 최적 저감화 조건 확립



처리기간 : 1개월 처리기간 : 3개월

그림 3-3-29 황토가공소재 처리에 따른 토양 내 *F. oxysporum* 변화량

황토가공소재 1개월 처리 토양과 3개월 처리 토양을 비교하였다. *F. oxysporum*의 경우 다른 균주와 달리 황토가공소재의 억제 효능이 빠르게 나타났다. 또한 황토가공소재의 농도 의존적 억제 효능을 보이지 않고 농도별로 비슷한 억제 효능을 가졌다. 1개월 처리군의 모든 농도에서 무처리군에 비해 60% 이상의 병원균 감소를 보였다. 3개월 토양에서도 모든 농도에서 진균이 감소하였으나 1개월 처리에 비해 감소 폭이 적었다. 결론적으로 토양 내 *F. oxysporum*에 대한 저감화는 황토가공소재 0.5%의 1개월 처리 시 최적화됨을 구명하였다.

(3) 잎마름병 원인진균 *R. solani*에 대한 저감화 적용 기법 확립

○ 황토가공소재 3개월 0.1% 농도 처리군에서 *R. solani*에 대한 최적 저감화 조건 확립

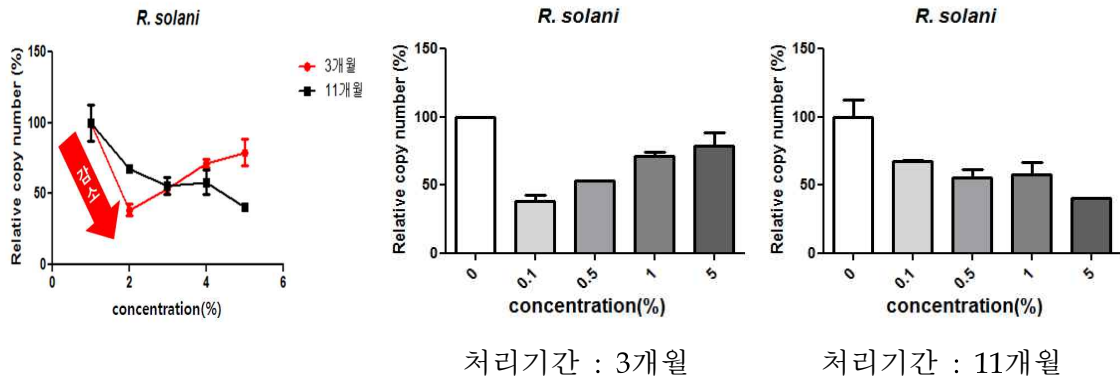


그림 3-3-30 황토가공소재 처리에 따른 토양 내 *R. solani* 변화량

황토가공소재 3개월 처리 토양과 11개월 처리 토양을 비교하였다. *R. solani*의 경우 3개월과 11개월 처리군 모두에서 황토가공소재 처리 시 균의 생장이 억제되나 3개월 토양에서는 농도 의존적으로 성장 억제가 감소하고 11개월 처리 토양에서는 농도 의존적으로 성장 억제가 증가하였다. 3개월 토양 중 0.1% 농도에서 약 65%의 생장이 억제되었고 11개월 토양 5%에서 60%의 생장이 억제되었다. 저농도에서 단기간 처리하여 성장을 억제하는 것이 효율적이며 이에 따라 3개월간 0.1% 처리를 최적화된 조건으로 확립하였다.

(4) 잘록병 원인진균 *P. ultimum*에 대한 저감화 기법

○ 황토가공소재 3개월 5% 농도 처리군에서 *P. ultimum*에 대한 최적 저감화 조건 확립

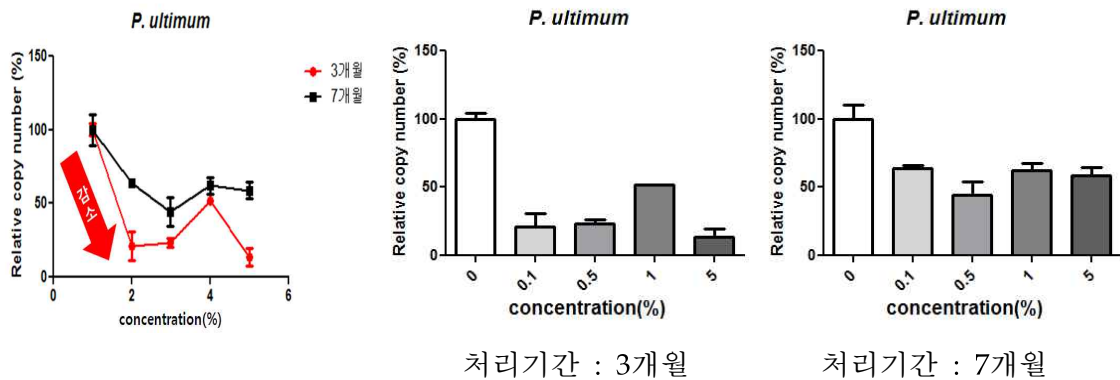


그림 3-3-31 황토가공소재 처리에 따른 토양 내 *P. ultimum* 변화량

황토가공소재 3개월과 7개월 처리 토양을 비교하였다. 두 가지 처리군 모두 *P. ultimum*의 생장이 모든 농도에서 감소하였다. 농도에 비례한 결과는 아니며 3개월 처리 토양의 경우 1%를 제외한 모든 농도에서 80% 이상의 억제 효능을 보였으며 특히 5% 농도에서 90% 이상의 감소

폭이 나타났다. 7개월 처리 토양 또한 황토가공소재 처리 시 병원균의 생장이 억제되나 그 감소 폭이 3개월 토양에 비해 적었다. 따라서 황토가공소재 5% 농도로 3개월 처리 조건을 *P. ultimum* 저감화의 최적화된 조건으로 확립하였다.

(5) 탄저병 원인진균 *G. cingulata*에 대한 저감화 기법

○ 황토가공소재 3개월 5% 농도 처리군에서 *G. cingulata*에 대한 최적 저감화 조건 확립

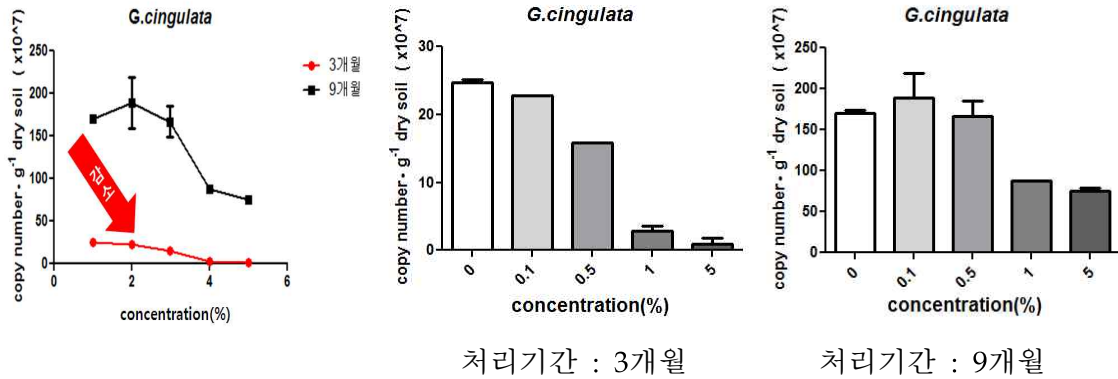


그림 3-3-32 황토가공소재 처리에 따른 토양 내 *G. cingulata* 변화량

황토가공소재의 3개월과 9개월 처리 토양을 비교 분석하였다. 두 가지 처리군 모두에서 황토가공소재 농도 의존적인 *G. cingulata*의 억제 효능이 나타났으며 9개월 처리 토양의 0.1, 0.5%의 저농도 처리군의 경우 무처리군에 비하여 생장 억제가 일어나지 않거나 별 차이가 없는 것으로 나타났다. 3개월 토양의 5% 농도의 황토가공소재 처리군의 경우 무처리군에 비하여 95% 이상 생장이 억제되어 그 효과가 뛰어난 것을 확인하였다. 9개월 처리 토양 또한 5% 황토가공소재 처리 시 생장이 크게 억제되었으나 60% 정도로 그쳐 3개월 토양에 비해서 효율이 낮았다. 이에 따라 3개월 동안 5% 농도의 황토가공소재 처리가 *G. cingulata*의 토양 내 저감화에 대한 최적화 조건으로 제시하였다.

본 연구를 통해 토양의 황토가공소재 장기간 처리 시 토양 내의 식물병원성 진균의 억제 최적화 조건을 구명하였다. 식물병원성 진균의 경우 6개월 이상의 장기간 처리보다 3개월 이하의 단기간 처리 시 진균의 생장 억제에 더욱 효과적인 결과가 나타났다. 이에 따라 3개월 이하의 단기 처리 시 진균 특이적인 최적 처리 농도를 제시하였으며, 토양 내 병원성 진균의 저감화를 위한 최적 조건을 확립하였다 (표 3-3-9).

표 3-3-9 식물병원성 진균 억제를 위한 황토가공소재의 적정 처리 농도 및 기간

균명	황토가공소재 처리농도 (%)	처리기간
<i>A. rolfsii</i>	0.5%	3개월
<i>F. oxysporum</i>	0.5%	1개월
<i>R. solani</i>	0.1%	3개월
<i>P. ultimum</i>	5%	3개월
<i>G. cingulata</i>	5%	3개월

라. 황토가공소재 장기간 처리 토양 내 진균 균집 분석을 통한 식물병해 진균의 저감화 효과 검증

(1) 토양 내 진균 균집분석 기법 구축

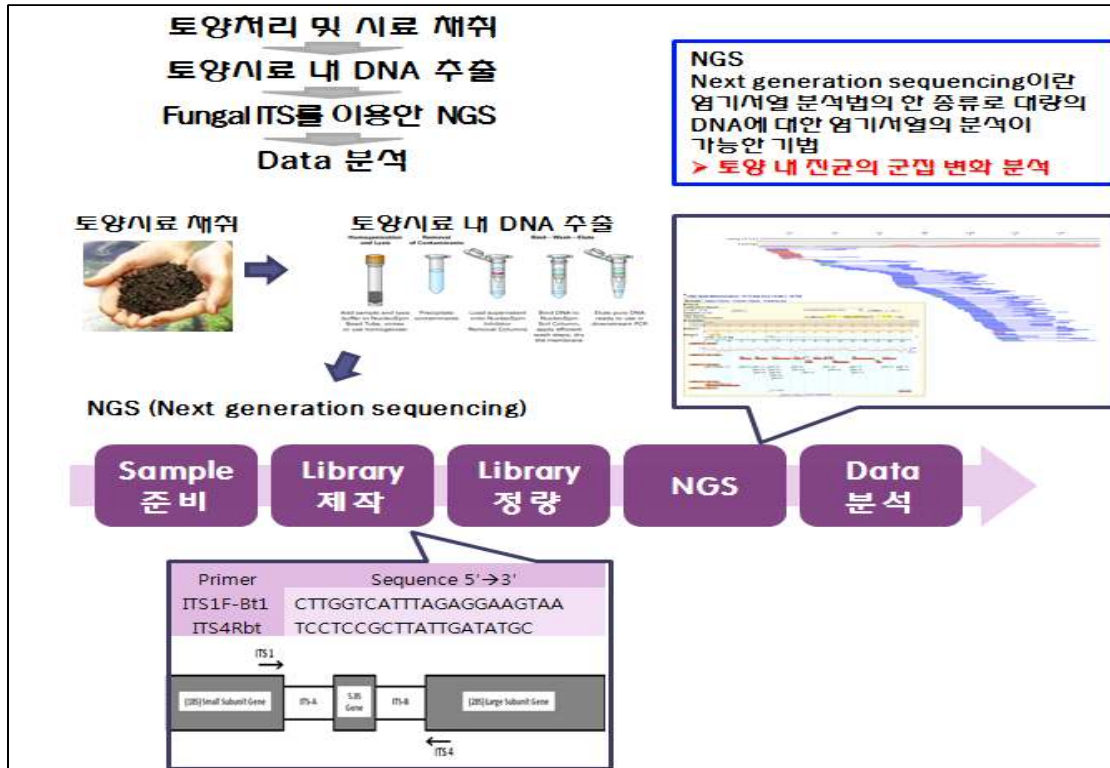


그림 3-3-33 진균 ITS 분석법

토양 내에 존재하는 진균의 균집을 분석하기 위하여 일반적인 진균에 존재하는 ITS region을 증폭시킨 후 서열에 따른 유사성 확인 후 종간의 유연관계를 확인하여 균집화 하는 분석법이다. DNA를 추출한 토양시료는 식물병원성 진균의 억제에 가장 효과적이었던 3개월 처리 토양을 이용하였다.

(2) 황토가공소재 처리 토양의 균집 변화 분석

- 황토가공소재 처리 시 토양 내 식물병원균을 다수 포함한 자낭균문(ascomycota)의 성장 억제 및 식용버섯류가 다수 포함된 담자균문(basidiomycota)의 성장 촉진
- 황토가공소재의 처리에 따른 식물병원균에 대한 특이적 억제 작용의 근거 확립 및 구명

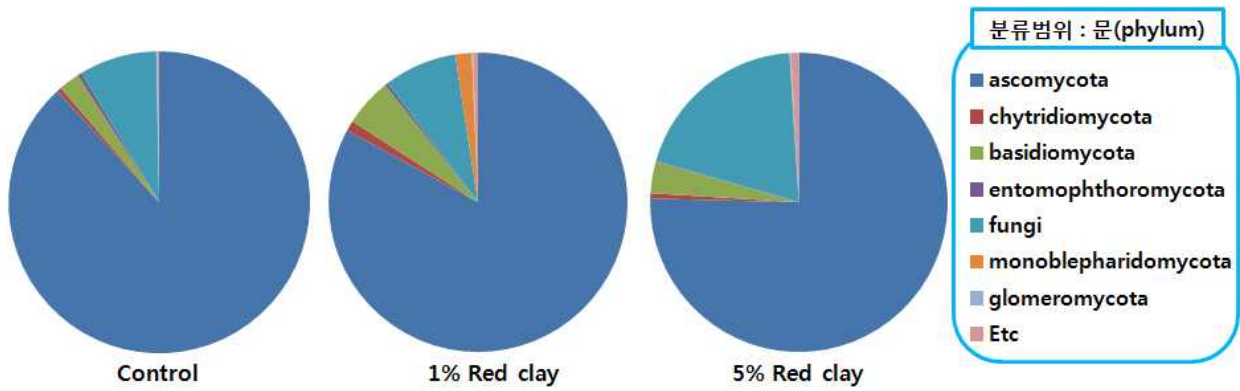


그림 3-3-34 황토가공소재 처리에 따른 균계의 균집 변화 분석

황토가공소재 3개월 처리 토양의 균집분석을 진행하였으며 문(phylum)을 분류범위로 하여 분석한 결과 진행한 결과 식물병원균이 많은 수를 차지한다고 알려진 자낭균문(ascomycota)이 황토 소재를 처리함에 따라 감소하였고 식용버섯류가 많은 수를 차지한다고 알려진 담자균문(basidiomycota)이 황토가공소재 처리시 증가하였다. 자낭균문은 5% 농도의 황토가공소재 처리시 억제가 두드러졌으며 담자균문은 1% 농도의 황토가공소재 처리시 증가 폭이 큼. 5% 농도의 황토가공소재를 처리함에 따라 급격하게 증가한 fungi의 경우 아직까지 그 계통이 정확히 밝혀지지 않은 진균들이 포함되는 것으로 식물병원균이나 식용 버섯과 같이 이미 알려진 기능이 존재하는 것에 대해서는 대부분 계통이 밝혀져 있으므로 fungi의 증가는 큰 영향이 없다. 따라서 황토가공소재의 처리에 따라 식물 병해에 부정적 영향을 끼치는 자낭균문이 감소한다는 것에 의의가 있으며 황토가공소재의 병원성 진균 억제에 대한 과학적 근거를 제시하였다.

(3) 황토가공소재 처리에 따른 자낭균문내의 균집변화

- 황토가공소재 처리에 따른 식물병원균을 포함한 hypocreales, pleosporales, helotiales(목)의 특이적 생장 억제
- 황토가공소재 처리에 의한 식용버섯류를 포함한 sordariales(목) 변화는 미미

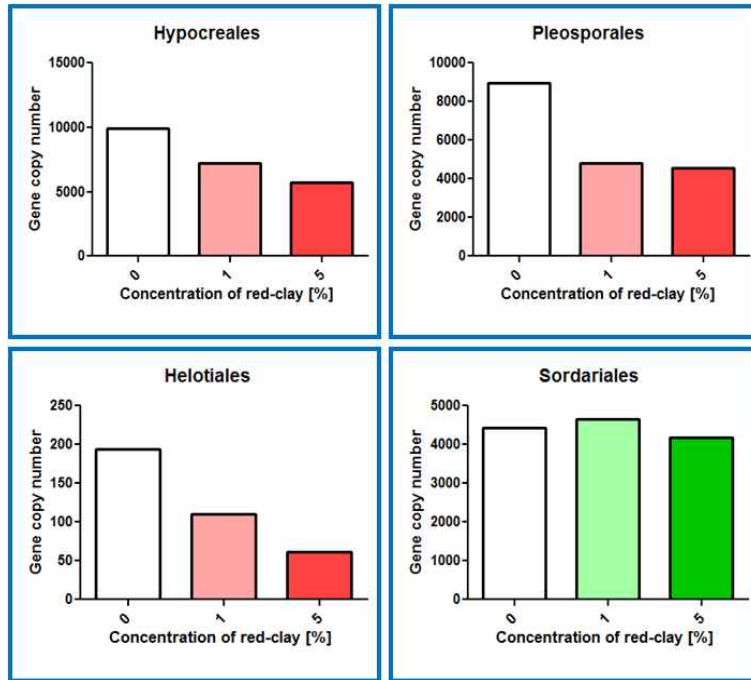


그림 3-3-35 황토가공소재 처리에 따른 자낭균문내의 군집변화 분석

황토가공소재 처리 시 자낭균문의 억제나 자낭균문내의 식물병해 미생물과 버섯류의 성장 양상의 변화를 유발하는지 분석하였다. 선행연구에 사용되었던 *F. oxysporum*이 포함되어 있으며 내생균을 형성하는 식물병원균이 다수 포함된 hypocreales와 과수와 목초류에 검은 무늬병, 썩음병 등을 유발하는 altanaria와 같은 식물병원균을 포함하는 pleosporales, 각종 채소에 균핵병을 유발하는 sclerotium을 비롯한 여러 병원균이 포함된 helotiales와 식용 버섯을 형성하는 진균이 포함되어 있고 동충하초목이라고 불리는 sordariales의 네 가지 목을 선정하여 황토가공소재 처리 시 변화 양상을 관찰한 결과 식물병원성 진균이 포함되어있는 세 가지 목에서는(빨간색; hypocreales, pleosporales, helotiales) 황토가공소재의 처리에 따라 무처리군에 비해 목의 생장이 감소하였다. 그에 반해 버섯을 형성하는 sordariales(초록색)의 경우 황토가공소재 처리 시 큰 변화가 없고 1% 농도에서는 오히려 증가하는 양상을 보였다. 즉, 황토가공소재 토양 처리에 따른 자낭균문의 감소가 버섯류의 감소가 아닌 식물병원균의 감소로 인한 결과임을 확인하였다.

(4) 황토가공소재 처리에 따른 담자균문내의 군집변화

- 황토가공소재 처리에 따른 식물병원균을 포함한 cantharellales(목)의 특이적 성장 억제
- 황토가공소재 처리 시 식용버섯류를 포함한 agricales, tremellales, Boletales(목)에 대해서는 성장 촉진

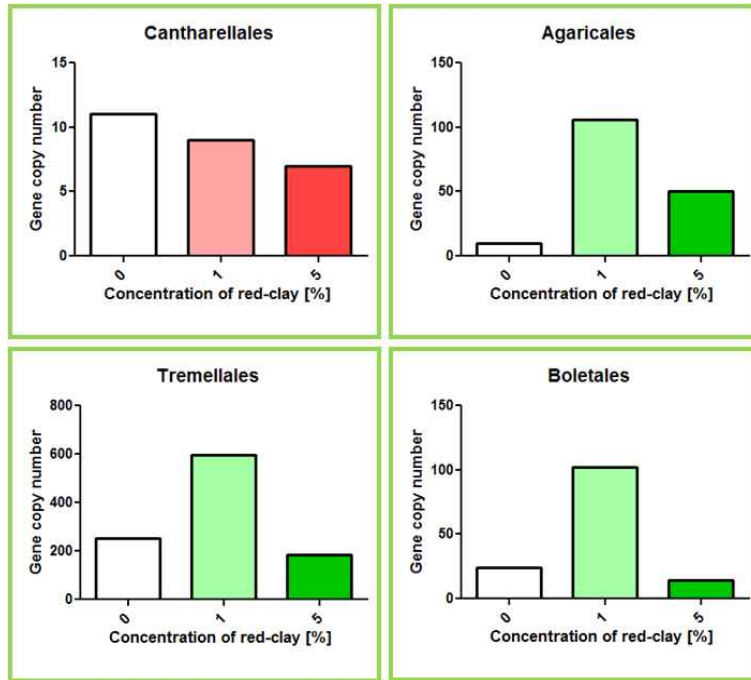


그림 3-3-36 황토가공소재 처리에 따른 담자균문내의 군집변화 분석

황토가공소재 처리에 따라 담자균문의 증식이 나타났다. 특히 1% 농도에서 그 현상이 두드러졌다. 버섯류가 많이 포함된 문이기는 하나 소수의 식물병원균의 성장을 촉진하는 현상이 있는지 담자균문 내의 식물병해미생물과 버섯류의 성장 양상 변화를 통해 분석하였다. 담자균문은 자낭균문과 달리 버섯류가 포함되는 목이 주를 이루고 있다. 일반적으로 익히 알려진 식용 버섯을 포함하였다는 agaricales와 최근 효능이 알려진 흰목이버섯이 주를 이루는 tremellales, 능이버섯을 비롯한 식용버섯이 포함된 Boletales를 선정하고 선행연구에서 사용되었던 *R. solani*를 비롯하여 여러 식물병원균이 포함된 cantharellales를 추가하여 분석하였다. 황토가공소재 처리 시 식용버섯을 형성하는 세 가지 목은(초록색; agaricales, tremellales, Boletales) 증가하였으나 식물 병원균이 포함된 cantharellales(빨간색)는 황토가공소재 처리 농도 의존적으로 생장이 억제되었다. 담자균문의 증가는 식물병원균의 영향이 아닌 식용버섯류의 영향임을 확인할 수 있다. 황토가공소재의 식물병원성 진균에 대한 특이적 억제에 대해 과학적 근거에 대해 재검증하였다.

종합적으로, 군집분석 연구결과를 통해 황토가공소재의 토양 처리가 진균 군집 내에서도 식물 병원성 진균의 성장을 특이적으로 억제함을 제시하였고, 식물병 방제에 대한 병원성 진균 억제 효과의 과학적 근거를 확립하였다.

3. 포장시험을 통한 황토가공소재 처리 농법 최적화

가. 고추잘룩병에 대한 유용미생물 적용 병해 방제 작물재배 처리 농법 개발

(1) 황토가공소재 처리에 따른 길항작용 분석 기법 구축

(가) 길항작용 분석을 위한 이병주율 및 토양 병원성 미생물 분석



그림 3-3-37 황토가공소재 적용 길항작용 분석 기법

황토가공소재 적용 유용미생물과 병원성 진균간의 길항작용을 확인하기 위한 *in vitro* 기법을 농법 개발 시험법을 구축하였다. 작물생육 및 병해 포장시험은 정보화학 실험농장에서 20 m² 초과 농지에서 수행하였다.

(나) 유용미생물 균주의 특이적 marker 설계 및 조건 확립

사전 문헌조사를 통하여 토양에 존재하여 토양 전염 식물병해미생물의 생장을 억제하는 유용미생물 *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum* 2종을 선별하였다.

① 대상 유용미생물 종 특이적 primer 최적화

토양 내 미생물 군집 중 대상 균주에 대하여 그 종만을 특이적으로 인식하는 primer를 설계하였으며 검증을 통하여 최적화하였다 (표 3-3-10).

표 3-3-10 유용미생물의 종 특이적 primer

군명	Sequence (5' -> 3')				Reference	
	Forward		Reverse			
Bacteria	<i>P. fluorescens</i>	B-F	CAC GCA TCC CAA TTG AG	B-R	CCG TTA CCT CTT GCA CC	Olga M. <i>et al.</i> , 2007
Fungi	<i>T. harzianum</i>	β-F	TTC TTG CAT TGG TAC ACT AGC G	β-R	ATC GTT CAT GTT GGA CTC AGC C	M. Montero-Barrientos. <i>et al.</i> , 2011

② 토양 내 유용미생물 특이적 분석을 위한 PCR 조건 확립

토양 내 유용미생물을 정량하기 위한 균 특이적 marker인 primer를 설계하고 각각에 특이적인 real-time PCR 조건을 최적화하여 확립하였다 (표 3-3-11).

표 3-3-11 유용미생물의 종 특이적 primer에 대한 PCR 조건

군명	Initial denaturation		Denaturation		Annealing		Extention		Cycle number
	Tem.(°C)	Time (m)	Tem.(°C)	Time (m)	Tem. (°C)	Time (m)	Tem. (°C)	Time (m)	
<i>P. fluorescens</i>	95	10:00	95	0:10	52	0:15	72	0:05	35
<i>T. harzianum</i>			95	1:00	59	0:30	72	1:30	35

토양 내 유용미생물을 정량하기 위한 균 특이적 marker인 primer를 설계하고 real-time PCR 조건을 확립하였다.

(2) 황토가공소재와 유용미생물의 상호작용 평가

○ 황토가공소재의 처리가 유용미생물의 생장은 억제하나 병원균에 대한 길항작용 효과는 증진

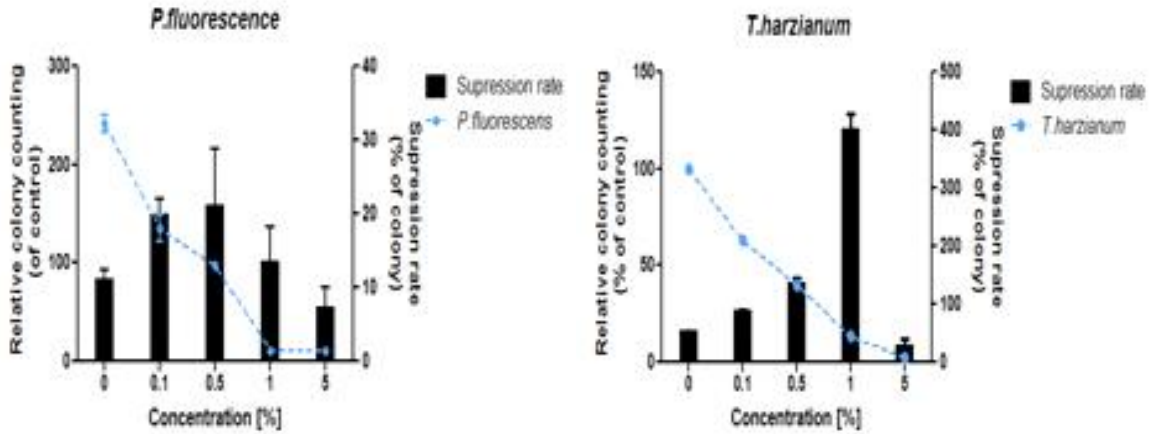


그림 3-3-38 황토가공소재와 유용미생물의 상호작용

황토가공소재를 유용미생물에 처리하였을 경우 농도 의존적으로 유용미생물의 생장이 억제되나 병원균에 대한 길항효과는 농도 의존적으로 감소하지 않았다. *P. fluorescens*의 경우 무처리군에서 균의 생장이 최대치이나 0.5% 농도에서 병원균 억제 효능이 가장 뛰어났다. *T. harzianum*의 경우에도 무처리군에서 균의 생장이 최대이나 1%에서 병원균 억제 효능이 가장 뛰어났다. 황토가공소재 처리 시 유용미생물의 생장이 억제되긴 하나 그럼에도 불구하고 병원균에 대한 길항효과는 유사한 것으로 구명되었다.

(3) 황토가공소재 장기간 처리 토양 내 유용미생물 최적화 기법 개발

- 황토가공소재 0.1% 농도 7개월 처리 시 유용세균 *P. fluorescens*의 성장 촉진 최적화
- 황토가공소재 1% 농도 1개월 처리 시 유용진균 *T. harzianum*의 성장 촉진 최적화

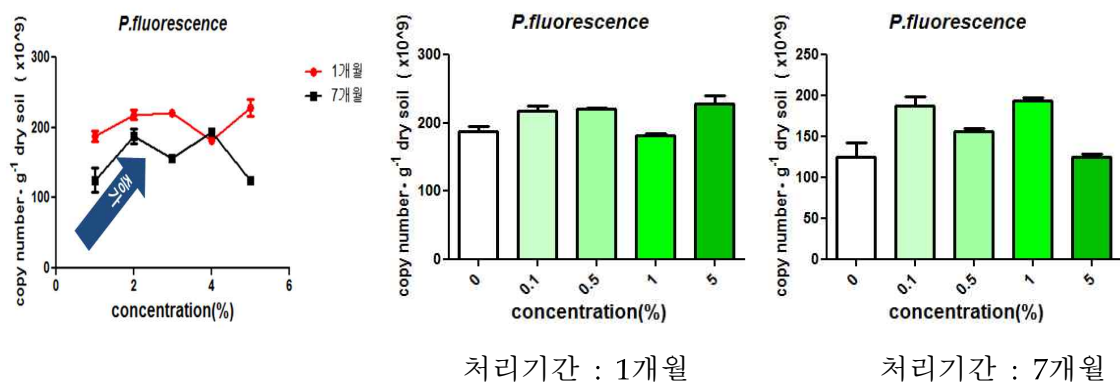
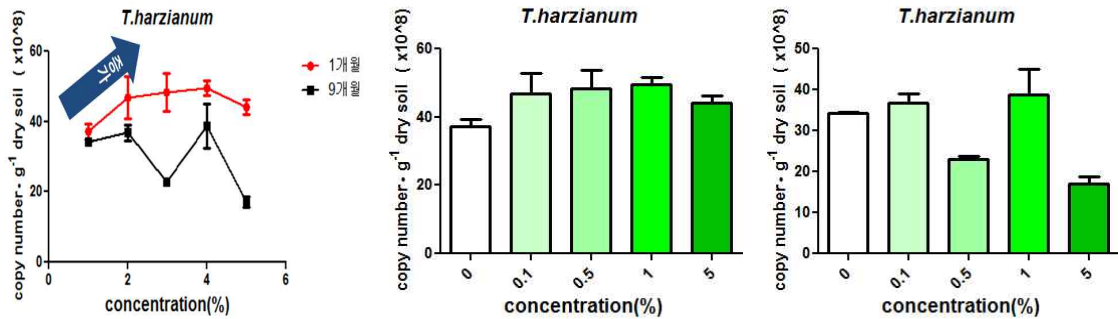


그림 3-3-39 황토가공소재 처리 토양의 *P. fluorescens* 성장율

토양 내 미생물 분석 결과, 1개월 처리 토양에서 무처리군에 비해 *P. fluorescens*의 생장이 증가하였음을 확인하였고 모든 농도에서 유용세균의 생장이 촉진되었으나 특히 5%에서 가장 높은 20%의 증가를 보였다. 반면 7개월 처리 토양에서는 저농도인 0.1%에서 무처리군에 비해 생장이 50% 이상 촉진됨을 확인하였다. 따라서 유용세균 *P. fluorescens*의 최적 조건은 0.1% 농도 7

개월 처리임을 구명하였다.



처리기간 : 1개월

처리기간 : 9개월

그림 3-3-40 황토가공소재 처리 토양의 *T. harzianum* 성장을

1개월 처리 토양에서 무처리군에 비해 모든 농도의 처리군에서 *T. harzianum*의 생장이 증가함을 확인하였고 그 중에서도 1% 농도에서 25%이상 성장하는 경향을 확인하였다. 반면 9개월 처리 시 유용진균이 모든 농도에서 성장하는 경향을 보이는 것이 아니고 1%에서 가장 높은 성장 촉진을 보이나 15%정도로 1개월 처리 토양보다 적었다. 이에 따라서 유용진균 *T. harzianum*은 1% 소재를 1개월 처리하는 것이 최적화된 조건을 제시하였다.

본 연구를 통해 토양의 황토가공소재 장기간 처리 시 토양 내의 유용미생물의 성장 최적화 조건을 구명하였다. 유용 세균의 경우 식물병원성 진균이 억제되는 6개월 이상의 장기 처리 시 생장이 증가하였고 유용 진균의 경우 식물병원성 진균이 억제되는 3개월 이하의 단기간 처리 시 생장의 증가가 나타났다. 이는 토양 내에서 유용미생물과 병원균이 길항작용을 통해 균형을 유지하기 때문이라 판단되며 이를 통해 유용미생물의 성장 최적화 조건을 확립하였다 (표 3-3-12).

표 3-3-12 유용미생물 성장을 위한 황토가공소재 처리 적정농도 및 기간

균명		황토신소재 처리농도 (%)	처리기간
유용 Bacteria	<i>P. fluorescens</i>	0.1%	7개월
유용 Fungi	<i>T. harzianum</i>	1%	1개월

(4) 고추 잘록병에 대한 병해 방제 농법 개발

- *P. fluorescens*와 황토가공소재 0.1%를 병용 시 농약대비 방제가 36.6% 획득
- *T. harzianum*과 황토가공소재 1%를 병용 시 농약대비 방제가 61% 획득

표 3-3-13 황토가공소재 처리에 따른 고추잘록병 병해방제 시험조건 및 이병주율 평가

처리조건	적용기간 및 횟수	희석비율	평균 이병주율(%)	방제가 (%)	농약대비 방제가(%)
무처리군		-	14	0	0
에트리디아졸.티플루자마이드	파종 전 토양관주처리	1:2000	0.3	97.6	100
<i>P. fluorescens</i> + 황토가공나노신소재	종자 발아 전 유용미생물 22시간, 황토가공나노신소재 2시간 침지처리	1:20	11	21.4	21.9
		1:100	10.7	23.8	24.4
		1:200	9.3	33.3	34.1
		1:1000	9	35.7	36.6
		-	10.3	26.2	26.8
<i>T. harzianum</i> + 황토가공나노신소재	종자 발아 전 유용미생물 22시간, 황토가공나노신소재 2시간 침지처리	1:20	6.3	54.8	56.1
		1:100	5.7	59.5	61
		1:200	6	57.1	58.5
		1:1000	7	50	51.2
		-	6	57.1	58.5

유용미생물 적용 고추잘록병 이병주율 평가 결과를 통해 경우 *P. fluorescens*보다 *T. harzianum*의 방제 효능이 더욱 뛰어남을 확인할 수 있었다. 반면 황토가공소재의 경우 *T. harzianum*보다 *P. fluorescens*의 길항작용을 촉진하는 효과가 더욱 크며 *P. fluorescens*는 1:1000 (0.1%)의 희석비율의 황토가공소재를 처리한 처리군에서 *P. fluorescens*만 처리한 처리군보다 30%가량 증가한 방제가를 나타냈다. *T. harzianum*은 1:100 (1%)의 희석비율에서 가장 높은 방제가를 나타냈으며 이는 농약 대비 61%의 방제가를 나타낸 것이다. 이를 통해 유용미생물과 황토가공소재를 병합하여 사용하는 경우 고추잘록병 병해의 억제 효능이 증가함을 구명하였고, 이를 통해 최적 처리 농법을 제시하였다.

나. 배추뿌리혹병에 대한 병해 방제 작물재배 처리 농법 개발

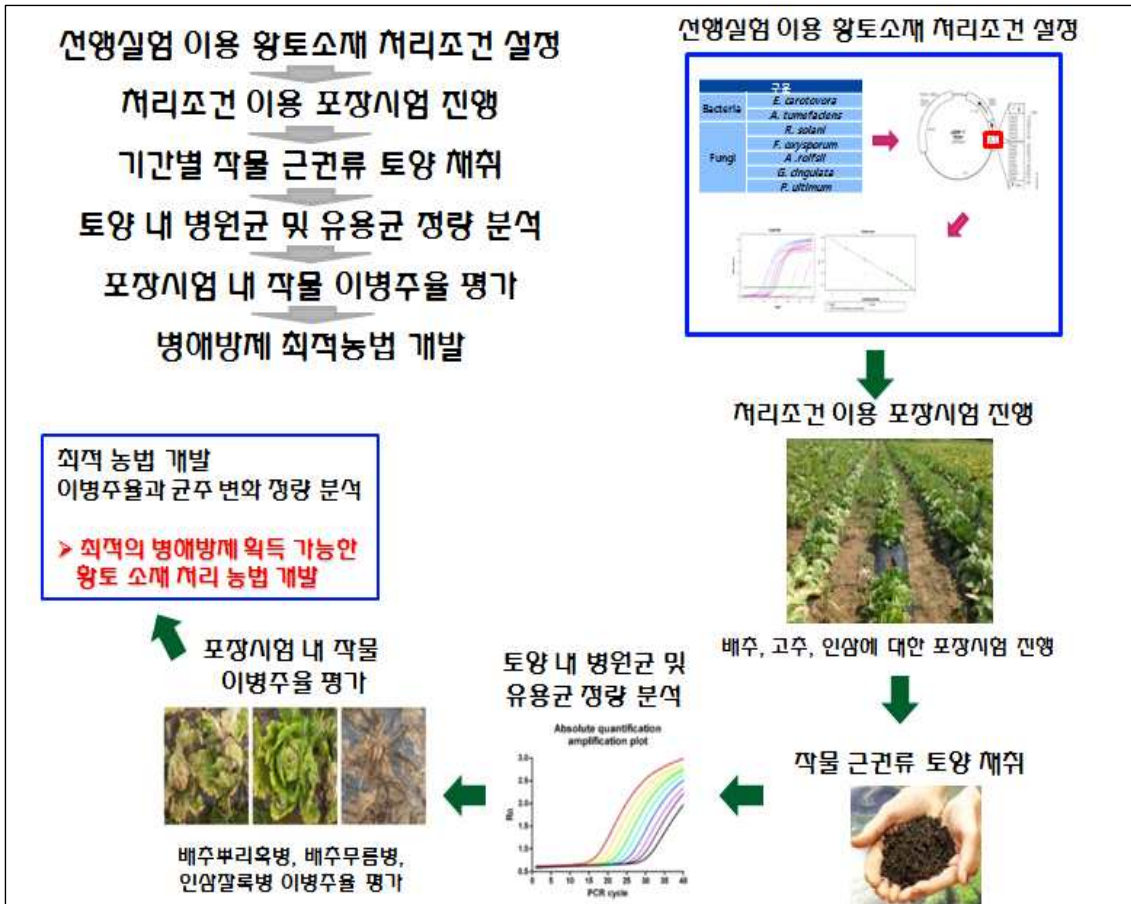


그림 3-3-41 황토가공소재 적용 친환경 병해 방제 농법 개발 시험법

선행연구를 통해 확립된 조건을 이용하여 실제 토양에서의 식물 재배 시 적용할 수 있는 농법을 개발하기 위한 배추 재배 시험법을 확립하였다. 작물생육 및 병해 포장시험은 정보화학 실험농장 및 병해발생 농지 20 m² 초과 대상 농지에서 수행하였다.

(1) 황토가공소재 처리에 따른 배추 뿌리혹병 억제 및 배추 생육 촉진 효능 평가

- 황토가공소재의 관주처리보다 경엽처리 시 배추의 생육이 촉진되며 미네랄이 포함된 상층액만 처리 시에도 배추의 생육 촉진 확인
- 배추뿌리혹병에 대한 방제효과 역시 관주처리보다 경엽처리에서 우수함을 구명

(가) 황토가공나소신소재 처리에 따른 생육 평가

사전 문헌조사를 통해 토양 Ha 당 처리 비율과 적용 기간, 횟수 등을 설정하였다 (표 3-3-14).

표 3-3-14 배추에 대한 황토가공소재의 처리 조건

처리 조건	희석비율	처리 양 (ha)	적용 기간 및 횟수
무처리	-	-	-
황토가공소재	1:500	100ml/pot	7일 간격으로 5회 토양 관주처리
	1:250	100ml/pot	
	1:100	100ml/pot	
	1:500	2000L	7일 간격으로 5회 경엽처리
	1:250	2000L	
	1:100	2000L	
	1:500	2000L	상층액을 이용하여 7일 간격 5회 경엽처리

일반적으로 농가에서 많이 사용하는 농약 방제법인 관주처리와 경엽처리 방법을 선택하여 실험을 진행하였다. 또한 상층액에 존재하는 무기질이 식물의 성장 및 병해제어에 어떠한 영향을 끼치는지 확인하고자 처리군을 추가적으로 설정하였다.

① 관주처리에 따른 생육 평가

표 3-3-15 황토가공소재 관주처리에 따른 성장 촉진 효과 평가

처리조건	희석비율	생장률			영향
		무게	뿌리 성장	생장률	
토양 관주처리	1:500	213.4	O	-	X
	1:250	233.1	O	-	X
	1:100	259.6	O	-	X
무처리군(Con)	-	269.9	O	O	X

작물의 뿌리에 관을 연결하여 직접 방제약을 흘려 넣어주는 관주처리법에 의해 황토가공소재를 처리하고 배추의 성장을 관찰하였다. 황토가공소재의 희석비율이 높아 농도가 낮아질수록 배추의 생장이 감소하였으며 황토가공소재를 처리한 처리군보다 무처리군의 배추 생장이 더욱 우수하였다. 이를 통해 황토가공소재의 관주처리법은 식물체의 성장과는 관련이 적은 것으로 나타났다.

② 경엽처리에 따른 생육 평가

표 3-3-16 황토가공소재 경엽처리에 따른 생장 촉진 효과 평가

처리조건	희석비율	생장률			영향
		무게	뿌리 생장	생장률	
경엽처리	1:500	321.4	+	++	○
	1:250	286.7	+	++	○
	1:100	346.8	++	+++	◎
경엽처리 (상층액)	1:500	315.4	++	+++	◎
무처리군(Con)	-	269.9	○	○	X

▶ + : 1~2배 생장, ++ : 2~3배 생장, +++ : 3배 이상 생장

작물의 잎에 희석한 방제약을 뿌려주는 경엽처리법에 의해 황토가공소재를 농도별로 처리하고 배추의 생장을 관찰하였다. 경엽처리는 황토가공소재와 황토가공소재의 상층액만을 분리한 처리군으로 나누어 진행하였다. 관주처리법과 달리 경엽처리의 경우 100배 희석액을 처리하였을 경우 배추의 무게는 약 1.2배 증가하였으며, 상층액을 경엽처리한 경우 1.5배까지 증가하였다. 뿌리 생장은 100배 희석액과 상층액 처리 시 1.5배 증가하였고 생장률은 3배까지 증가하였다. 황토가공소재의 경엽처리법이 관주처리 법에 비해 식물체의 생장 촉진 효과를 갖는 것으로 평가되었다. 이에 따라 황토가공소재의 경엽처리법이 작물의 생장에는 더욱 긍정적인 영향을 끼치는 것으로 확인되었다.

(나) 황토가공나소신소재 처리에 따른 배추 뿌리혹병에 대한 방제 평가

표 3-3-17 배추 뿌리혹병에 대한 황토가공소재 처리 조건

처리 조건	희석비율	처리 양(ha)	적용 기간 및 횟수
무처리	-	-	-
황토가공소재	1:50	600L	정식 전 배추 뿌리 침지처리 (3h), 10일 간격으로 3회 경엽처리
방제약 (Amisulbrom SC: ACS)	1:400	-	정식 전 배추 뿌리 침지처리 (3h)

작물의 생육촉진 평가에서 긍정적인 영향을 나타내었던 경엽처리 방법을 이용하여 배추 뿌리혹병에 대한 병해제어 평가 및 생육 촉진 평가를 진행하였다. 작물생육 및 병해 포장시험은 성보화학 실험농장 및 병해발생 농지 20 m² 초과 대상 농지에서 수행하였다.

① 황토가공소재 처리에 따른 배추 뿌리혹병의 방제효능 평가

표 3-3-18 황토가공소재 처리에 따른 배추 뿌리혹병의 상대적 방제가

처리 조건	희석비율	이병주율 (%)				상대적 방제가 (%)
		I	II	III	평균	
황토가공소재	1:50	50.0	10.0	50.0	36.7	59.2
방제 농약(ASC)	1:400	0	0	10.0	3.3	96.3
무처리군(Con)	-	90.0	90.0	90.0	90.0	-

황토가공소재의 배추 뿌리혹병에 대한 방제 효능을 평가한 실험에서, 무처리군과 방제약 또는 황토 소재로 처리군을 각각 나누어 배추 재배 실험을 진행하였다. 방제농약(Amisulbrom SC: ACS) 처리 시 무처리군의 이병주율과 비교하였을 때 상대적 방제가 97%를 나타냄. 농약 처리가 없는 조건에서 황토가공소재만을 처리한 경우 상대적 방제가 67%에 이르는 높은 식물 병 억제 효능을 확인하였다. 이를 통해 황토가공소재 처리를 통해 농약 대비 50% 이상의 작물 병해의 감염억제 효능을 가짐을 구명하였고, 실제 배추 뿌리혹병 방제를 위한 소재 처리 기간, 횟수, 방법, 농도에 대한 최적 농법(황토가공소재 1:50 희석액, 경엽처리, 7일 간격 총 5회)을 제시하였다.

② 황토가공소재 처리에 따른 배추의 생육 평가



그림 3-3-42 소재 처리에 따른 배춧잎의 상대적 성장



그림 3-3-43 소재 처리에 따른 배추 뿌리의 상대적 성장

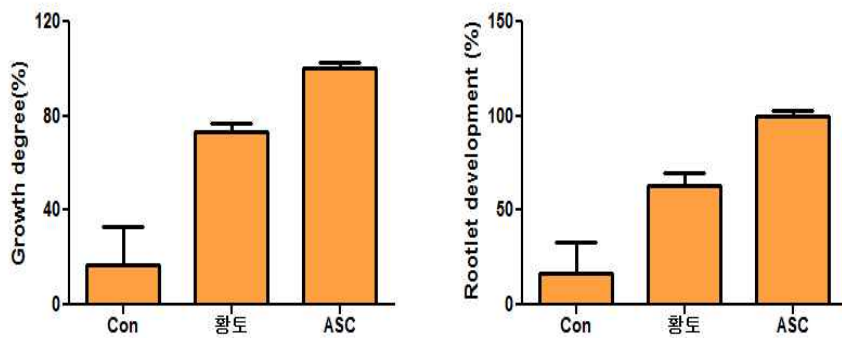


그림 3-3-44 소재 처리에 따른 배춧잎과 뿌리의 상대적 성장률 평가

황토가공소재의 배추 뿌리혹병에 대한 방제 효능 평가 실험에서 재배된 각 조건 별 배추를 잎과 뿌리로 나누어 그 성장률을 평가하였다. 무처리군과 방제약, 황토 소재로 처리군을 나누어 잎과 뿌리의 상대적 성장을 측정하였다. 방제약 처리 시 잎과 뿌리의 성장이 가장 뛰어나 이를 100%로 설정한 후 무처리군과 황토가공소재 처리에 따른 성장률을 상대적인 값으로 표시하였다. 잎의 성장은 방제약 처리군이 100일 때, 무처리군의 20, 황토 처리군이 80 이상으로 무처리군과 비교할 때 4배 이상 증가하였고, 뿌리 성장률은 방제약 처리군이 100일 때 무처리군이 20 이하로 나타났으며 황토가공소재 처리군은 60으로 나타나 3배 이상 성장했음을 알 수 있었다. 이를 통해 배추 뿌리혹병에 방제 효능이 가장 높은 조건에서의 황토가공소재 처리 시 잎과 뿌리에 대한 생육 촉진 효능이 동반됨을 확인하였다.

(2) 배추 뿌리혹병에 대한 병해 방제 농법 개발

- 황토가공소재 100배 희석액을 경엽처리 시 배추뿌리혹병에 대한 방제가 농약 대비 53% 획득

표 3-3-19 배추뿌리혹병 병해방제 시험조건 및 이병주율

시험약제	처리방법	희석배수	처리량	평균발병도(%)	방제가(%)	농약대비 방제가(%)
무처리군	-	-	-	77.7	0	0
플루셀파마이드 입제	정식전 토양 혼화처리	-	30g/m ²	8	89.7	92.2
아미살브롬 액상수화제	정식전 뿌리 침지처리	400	-	2.1	97.3	100
황토가공나노신소재	정식전 토양 관주처리	500	1L/m ²	57.3	26.3	27
		100	1L/m ²	54.6	29.7	30.5
	정식 15일 후 15일 간격 2회 경엽처리	500	0.15L/m ²	45.3	41.7	42.9
		100	0.15L/m ²	37.6	51.6	53

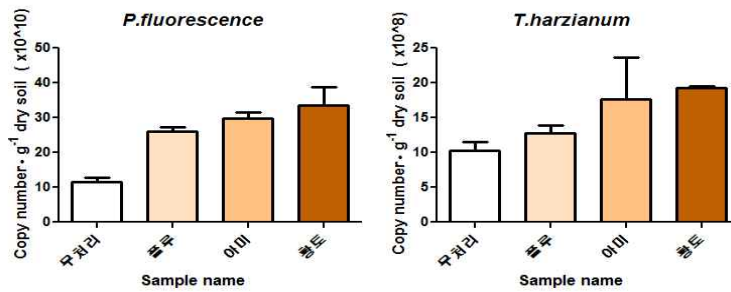


그림 3-3-45 배추뿌리혹병 시험에 따른 균주 정량 분석

이병주율 평가를 통해 관찰한 결과 배추뿌리혹병의 방제는 선행연구와 유사하게 경엽 처리에서 가장 큰 방제효과를 나타내는 것으로 나타났다. 근권류 토양을 기준으로 균주를 분석해본 결과 유용미생물의 생장이 무처리보다는 방제약을 처리하였을 때 더욱 높게 나타났고 황토가공소재 처리시에 가장 높게 나타나 황토가공소재의 병해 방제 효과가 유용미생물의 생장을 통한 토양미생물 군집 변화에 의해 나타남을 제시하였다. 황토 소재의 100배 희석액을 경엽처리 시 나타나는 농약대비 방제가는 53%에 달하며, 토양 유용미생물 개선 및 병원성 진균의 방제를 나타내는 최적의 친환경 농법 조건을 제시하였다.

(3) 황토가공소재 처리에 따른 배추의 상대적 성장 분석



<황토, x500, 토양처리> <황토, x100, 토양처리> <황토, x500, 경엽처리>



<황토, x100, 경엽처리> <방제약, 플루> <방제약, 아미> <무처리군>

그림 3-3-46 처리 조건에 따른 배추의 상대적 성장



그림 3-3-47 처리군에 따른 배춧잎의 상대적 성장



<황토>

<방제약, 플루설>

<방제약, 아미설>

<무처리군>

그림 3-3-48 처리군에 따른 배추 뿌리의 상대적 성장

본 연구 결과를 통해 병해를 억제하는 친환경 농법을 개발하였으며 배추의 상대적 성장에 따른 결과를 통해 배추 성장의 정성적 결과와 무처리군 대비 황토가공소재 처리군의 성장 및 선도축진을 확인할 수 있었다. 황토가공소재 처리군의 경우 방제약 처리를 통해 재배한 배추와 큰 차이가 없고 뿌리혹에 의해 영양분의 흡수가 저해되어 잎이 마르는 현상도 현저하게 감소함을 성장 결과를 통해 확인할 수 있었다. 종합적으로 황토가공소재를 처리하여 배추 뿌리혹병에 대한 친환경적인 병해 제어에 대한 농법을 확립하였다.

다. 배추무름병에 대한 병해 방제 작물재배 처리 농법 개발

○ 황토가공소재 100배 희석액을 경엽처리 시 배추무름병에 대한 방제가 농약 대비 53% 획득

표 3-3-20 배추무름병 병해방제 시험조건 및 이병주율

시험약제	처리방법	희석배수	처리량	평균 이병주율 (%)	방제가(%)	농약대비 방제가(%)
무처리군	-	-	-	88	0	0
스트렙토마이신 수화제	발병초 7일간격	800	-	40	54.5	90.8
옥솔린산 수화제	4회 경엽처리	1000	-	34.7	60	100
황토가공소재	정식전 토양 관주 처리	500	1L/m ²	84	4.5	7.5
		100	1L/m ²	74.7	15.1	25.2
	발병초 7일간격 4회 경엽처리	500	0.15L/m ²	98.7	0	0
		100	0.15L/m ²	60	31.8	53

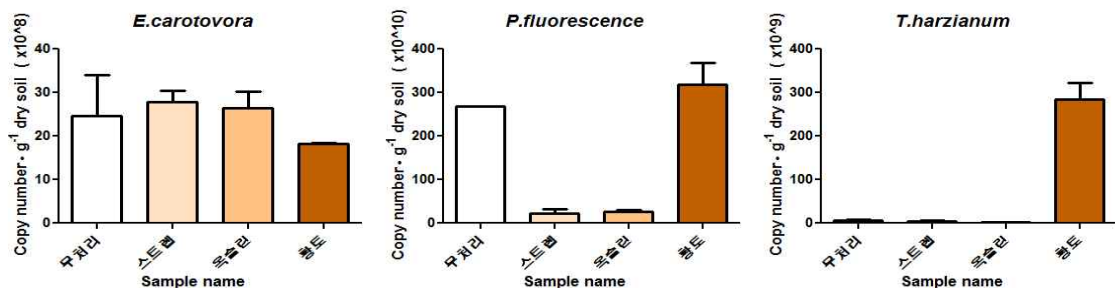


그림 3-3-49 배추무름병 시험에 따른 균주 정량 분석

이병주율 평가를 통해 관찰한 결과 배추무름병의 방제 역시 선행연구와 유사하게 경엽처리에
서 가장 큰 방제효과를 나타내는 것으로 나타났다. 근권류 토양을 기준으로 균주를 분석해본
결과 무름병 원인균은 황토가공소재 처리 시 감소하는 현상을 보였고, 유용미생물의 생장은 증
가함을 확인할 수 있었다. 황토가공소재 처리 시에 유용 미생물이 많이 증가해 황토가공소재의
병원균 억제 이외에도 유용미생물의 생장을 증진시키며 억제 효능이 증가하는 것이라 판단되
었다. 황토가공소재의 경엽처리 시 나타나는 농약대비 방제가는 53%에 달하며 이를 통하여 배
추무름병 방제에 대한 처리 기준을 제시하였다.



<황토, x500, 토양처리> <황토, x100, 토양처리> <황토, x500, 경엽처리> <황토, x100, 경엽처리>



<방제약, 스트랩> <방제약, 옥솔린> <무처리군>

그림 3-3-50 처리군에 따른 배춧잎의 상대적 성장 및 병해

본 연구 결과를 통해 병해를 억제하는 친환경 농법을 개발하였으며 배추의 상대적 성장에 따
른 결과를 통해 배추 성장의 정성적 결과와 무처리군 대비 황토가공소재 처리군의 신선도를
확인할 수 있었다. 황토가공소재 처리군의 경우 방제약 처리를 통해 재배한 배추와 큰 차이가
없고 뿌리혹에 의해 영양분의 흡수가 저해되어 잎이 마르는 현상도 현저하게 감소함을 성장
결과를 통해 확인할 수 있다. 종합적으로 황토가공소재를 처리하여 배추 뿌리혹병에 대한 친환
경적인 병해 제어 및 신선한 작물을 재배할 수 있는 기법을 제시하였다.

라. 인삼잘록병에 대한 병해 방제 작물재배 처리 농법 개발

- 황토가공소재 500배 희석액을 발병 초 관주처리 시 인삼잘록병에 대한 방제가 농약 대비 20.6% 획득

표 3-3-21 인삼잘록병 병해방제 시험조건 및 이병주율

시험약제	처리방법	희석배수	처리량	평균 이병주율(%)	방제가(%)	농약대비 방제가(%)
무처리군	-	-	-	86.7	0	0
에트리디아졸 티플루자마이드 유제 티플루자마이드 액상수화제	발병초 7일간격 4회 관주처리	2000	3L/m ²	30	65.4	100
		2000	3L/m ²	53.3	38.5	58.9
황토가공나노신소재	발아 전 1회 토양 관주처리	500	3L/m ²	90	0	0
		100	3L/m ²	86.7	0	0
	발병초 7일간격 4회 관주처리	500	3L/m ²	75	13.5	20.6
		100	3L/m ²	80	7.7	11.8

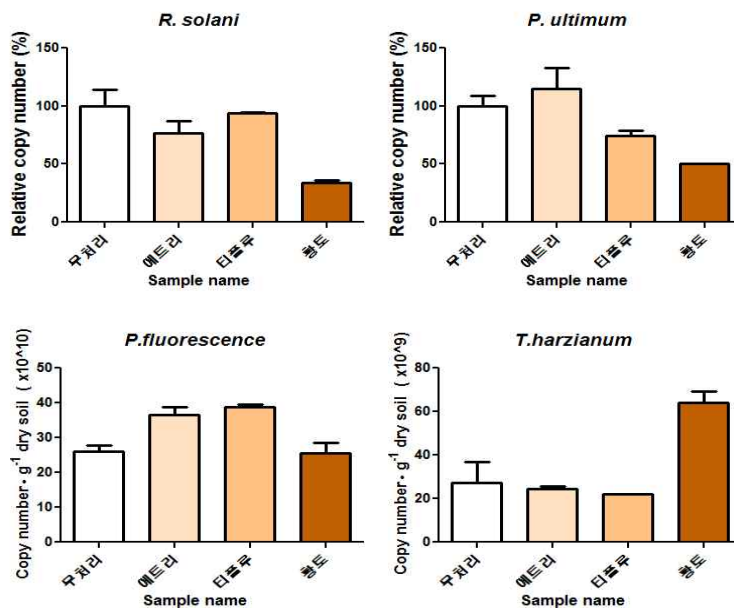


그림 3-3-51 인삼잘록병 시험에 따른 균주 정량 분석

이병주율 결과 인삼잘록병의 방제는 발병 초 관주처리를 통해 가장 큰 병해 억제 효능을 보였다. 인삼의 경우 뿌리를 사용하는 작물이므로 경엽처리보다는 관주처리가 효율적이 것이라는 판단 하에 진행하였다. 근권류 토양을 기준으로 균주를 분석해본 결과 잘록병 원인균인 *R. solani*와 *P. ultimum*은 모두 황토가공소재 처리 시 가장 크게 감소하였고 *T. harzianum*의 경우에도 황토가공소재 처리 시 무처리군의 2배 이상의 성장 촉진 현상을 나타내었다. 황토가공소재 처리 시 농약 대비 방제가가 20.6%로 나타났으며 100배 희석액보다 500배 희석액에 효과가 더 좋은 것으로 나타나 비교적 저농도에서 방제 효과가 나타났다. 이를 통해 인삼잘록병에 대한 황토가공소재 적용 친환경 농법을 제시하였다.



<황토, x500, 발아 전> <황토, x100, 발아 전> <황토, x500, 발병 초> <황토, x100, 발병 초>



<방제약, 에트리> <방제약, 티플루> <무처리군>

그림 3-3-52 처리군에 따른 인삼의 상대적 성장

본 연구 결과를 통해 인삼 잘록병을 억제하는 친환경 농법을 개발하였으며 인삼의 상대적 성장에 따른 결과를 통해 인삼 성장을 촉진하는 경향을 확인할 수 있었다. 무처리군의 경우 인삼 묘종이 눈에 띄지 않는 반면 100배 희석액의 처리시 방제약과 유사한 묘종의 성장을 확인할 수 있었다. 이에 따라 황토가공소재 처리군과 무처리군의 차이를 확인할 수 있으며, 발아 전 토양 처리보다는 발병 초기 관주처리 (7일 간격 총 4회)를 통하여 인삼 잘록병에 대한 친환경적인 병해 제어가 가능함을 제시하였다.

마. 황토가공소재 적용 친환경 병해방제 농법 개발

○ 황토가공소재 처리에 따른 주요 작물의 친환경 농법 확립

주요 작물(배추, 인삼, 고추)에 대한 병해 제어 실험 결과를 바탕으로, 황토가공소재를 활용한 친환경 농법을 제시하였다 (표 3-3-22).

표 3-3-22 황토가공소재를 이용한 친환경 농법

작물	병	희석배수	처리량	처리방법
배추	뿌리혹병	1:100	0.15L/m ²	정식 15일 후 15일 간격 2회 경엽처리
	무름병	1:100	0.15L/m ²	발병 초 7일간격 4회 경엽처리
인삼	잘록병	1:500	3L/m ²	발병 초 7일간격 4회 관주처리
고추*	잘록병	1:1000	50ml/g-seed (<i>P. fluorescens</i>)	종자 발아 전 유용미생물 22시간, 황토가공소재 2시간 침지처리
		1:100	50ml/g-seed (<i>T. harzianum</i>)	

* 본 작물의 병해제어 실험에는 유용미생물의 처리가 병행. 유용미생물은 6x10⁸ cells/ml 처리.

바. 황토가공소재와 농약의 혼용 처리 포장시험을 통한 식물병해 제어

○ 황토가공소재와 농약 혼용 처리에 따른 주요 작물의 친환경 농법 확립

(1) 황토가공소재와 농약 혼용 처리에 따른 배추 뿌리혹병의 방제효능 평가

○ 황토가공소재 100배 희석액과 방제약을 혼용하여 정식 전 뿌리 침지 및 정식 후 2회 경엽 처리 시 배추 뿌리혹병에 대한 방제가 농약 대비 286% 획득

표 3-3-23 배추 뿌리혹병 농약 혼용 병해방제 시험조건 및 이병주율

시험약제	처리방법	희석배수	처리량	평균 이병주율 (%)	방제가 (%)	농약대비 방제가 (%)
무처리군	-	-	-	2	0	0
아미설브롬 수화제	정식전 뿌리 침지처리	1333	-	1.3	35	100
황토가공소재 + 방제약	정식 전 시험약제 혼용 뿌리 침지처리 및 정식 후 15일 간격 2회 황토가공소재 경엽처리	100	0.15L/m ²	0	100	286
		1333				
		200	0.15L/m ²	1.3	35	100
		1333				

2015년 상반기의 이례적 가뭄으로 병해 발생이 미미하여 유의성은 적으나 황토가공소재 100배 희석액과 방제약을 혼용하여 사용하였을 경우 방제약의 3배에 가까운 방제가 나타났다.



<무처리군> <방제약, 아미설> <황토가공소재 100배 + 방제약> <황토가공소재 200배 + 방제약>

그림 3-3-53 시비 조건에 따른 배추 뿌리의 상대적 성장 및 병해

선행 연구를 통하여 황토가공소재가 방제약 대비 50% 이상의 방제가를 획득하는 것을 확인하였다. 기존의 방제약과의 혼용처리를 통하여 병해의 제어가 가능한지 확인한 결과 가뭄으로 인한 병 발생이 낮았지만 방제약 처리 시 몇몇의 배추에서 발생한 뿌리혹병이 100배 희석액과 방제약의 혼용 처리 시 전혀 발생하지 않았으므로 병해 제어의 가능성을 확인할 수 있었다. 이에 따라 황토가공소재 100배 희석액과 방제약을 혼용하여 정식 전 뿌리 침지 및 정식 후 2회 경엽처리 시 방제약보다 효과적인 배추 뿌리혹병 제어가 가능함을 제시하였다.

(2) 황토가공소재와 농약 혼용 처리에 따른 배추 검은무늬병의 방제효능 평가

○ 황토가공소재 100배 희석액과 방제약을 발병 초 7일 간격 4회 교호하여 경엽처리 시 배추 검은무늬병에 대한 방제가 농약 대비 101.4% 획득

표 3-3-24 배추 검은무늬병 농약 혼용 병해방제 시험조건 및 이병주율

시험약제	처리방법	희석배수	처리량	평균 이병주율 (%)	방제가 (%)	농약대비 방제가 (%)
무처리군	-	-	-	48.1	0	0
프로피네브 수화제	발병 초 7일 간격	500	0.15L/m ²	7.7	84	100
황토가공소재	4회 경엽처리	100	0.15L/m ²	31.7	34.1	40.6
황토가공소재 + 방제약	발병 초 7일 간격 4회 경엽처리 소재, 방제약 교호 살포	100	0.15L/m ²	7.1	85.2	101.4
		500				
		200	0.15L/m ²	8.3	82.7	98.5

황토가공소재 처리 시 농약 대비 방제가가 40.6%였던 것에 비해 100배 희석액과 방제약을 교호 처리하였을 경우 농약 대비 방제가가 101.4%로 방제약을 사용하는 것보다 병해의 제어가 효과적이었다. 따라서 발병 초 7일 간격으로 4회 황토가공소재 100배 희석액과 방제약을 교호하여 경엽처리할 경우 방제약보다 효과적인 배추 검은무늬병의 제어가 가능함을 제시하였다.

(3) 황토가공소재와 농약 혼용 처리에 따른 고추 탄저병의 방제효능 평가

○ 황토가공소재 100배 희석액과 방제약을 혼용하여 발병 초 10일 간격 4회 교호하여 경엽처리 시 고추 탄저병에 대한 방제가 농약 대비 98.9% 획득

표 3-3-25 고추 탄저병 농약 혼용 병해방제 시험조건 및 이병주율

시험약제	처리방법	희석배수	처리량	평균 이병주율 (%)	방제가 (%)	농약대비 방제가 (%)
무처리군	-	-	-	60.5	0	0
카벤다짐 크로르탈로닐 액상수화제	발병 초 10일 간격 4회 경엽처리	1000	0.15L/m ²	22.7	62.5	100
황토가공소재		100	0.15L/m ²	50.5	16.5	26.4
황토가공소재 + 방제약	발병 초 10일 간격 4회 경엽처리 소재, 방제약 교호 살포	100	0.15L/m ²	23.1	61.8	98.9
		1000				
		200	0.15L/m ²	25.6	57.7	92.3
1000						



<무처리군>



<방제약, 카벤다짐>



<황토가공소재 100배>



<황토가공소재 100배 + 방제약>



<황토가공소재 200배 + 방제약>

그림 3-3-54 시비 조건에 따른 고추의 상대적 성장 및 병해

황토가공소재 단일 처리 시 농약 대비 방제가 26.4%였으나 100배 희석액과 방제약을 교호 처리하였을 경우 농약 대비 방제가 98.9%로 방제약을 사용하는 것과 유사한 병해 제어 효과를 확인하였다. 따라서 발병 초 10일 간격으로 4회 황토가공소재 100배 희석액과 방제약을 교호하여 경엽처리할 경우 효과적인 고추 탄저병의 제어가 가능함을 확인하였다.

(4) 황토가공소재와 농약 혼용 처리에 따른 벼 키다리병의 방제효능 평가

○ 황토가공소재 100배 희석액과 방제약을 혼용하여 침종 전 침지처리 시 벼 키다리병에 대한 방제가 농약 대비 98.3% 획득

표 3-3-26 벼 키다리병 농약 혼용 병해방제 시험조건 및 이병주율

시험약제	처리방법	희석배수	평균 이병주율 (%)	방제가 (%)	농약대비 방제가 (%)
무처리군	-	-	22.6	0	0
피리벤카브 액상수화제 황토가공소재	침종 전 48시간 침지처리	1000	4.1	81.9	100
		100	20.3	10.2	12.5
황토가공소재 + 방제약	시험약제 혼용 침종 전 48시간 침지처리	100	4.4	80.5	98.3
		1000			
		200	4.7	79.2	96.7
		1000			



<황토가공소재 100배 + 방제약>



<황토가공소재 200배 + 방제약>



<황토가공소재 100배>



<방제약, 피리벤>



<무처리군>

그림 3-3-55 시비 조건에 따른 벼의 상대적 성장 및 병해

황토가공소재 단일 처리 시 농약 대비 방제가가 12.5%로 비교적 방제 효과가 낮았으나 100배 희석액과 방제약을 혼용하여 침종 전 48시간 침지처리 하였을 경우 농약대비 방제가가 98.3%로 나타나 방제약과 유사한 병해 제어 효과를 보였다. 따라서 침종 전 48시간 침지처리를 황토가공소재 100배 희석액과 방제약을 혼합하여 사용할 경우 방제약과 유사한 벼 키다리병 제어가 가능함을 확인하였다.

(5) 황토가공소재와 농약 혼용 처리에 따른 작물별 농법 개발

○ 황토가공소재 처리에 따른 주요 작물의 농약 혼용 농법 확립

주요 작물(배추, 고추, 벼)에 대한 병해 제어 실험 결과를 바탕으로, 황토가공소재를 활용한 친환경 농법을 제시하였다 (표 3-3-27).

표 3-3-27 황토가공소재와 농약 혼용 농법

작물	병	희석배수	처리량	처리방법
배추	뿌리혹병	1:100	0.15L/m ²	정식 전 뿌리 침지처리 정식 15일 후 15일 간격 2회 경엽처리
	검은무늬병	1:100	0.15L/m ²	발병 초 7일간격 4회 경엽처리
고추	탄저병	1:100	0.15L/m ²	발병 초 10일간격 4회 경엽처리
벼	키다리병	1:100	-	침종 전 48시간 침지처리

* 위의 표는 농약과 교호 살포한 조건

종합적으로, 황토가공소재를 이용한 포장시험 결과 황토가공소재의 단일 처리는 배추 병해에 있어 방제약 대비 50% 이상의 방제효과를 나타내는 것으로 확인되었고 농약과의 혼용 처리 시 배추 병해에 대한 방제가가 방제약 대비 100%이상 나타나 농약의 단일 처리보다 효과적인 것으로 나타났다. 벼와 고추 병해의 경우 황토가공소재 단일 처리의 경우 방제효과가 방제약 대비 50%를 넘지 않았으나 농약과의 혼용 처리 시 방제약 대비 병해 억제 효과가 98% 이상으로 평가되어 방제효과가 뛰어난 것으로 확인되었다. 황토가공소재 100배 희석액이 병해 방제에 특히 효과적인 농도로 판단되며 교호 처리 시 황토가공소재를 초기에 처리하는 것이 병해 억제에 더욱 효과적이라는 결과를 얻었다. 결론적으로 황토가공소재 단일 처리 시 배추의 병해에 있어 방제약 대비 50% 이상의 방제효과를 가지며 황토가공소재를 농약과 혼용하여 사용하였을 경우 기존의 농약 사용과 유사한 방제효과 또는 그 이상의 효과를 얻으면서 농약의 사용을 줄일 수 있어 기존의 농법보다 친환경적인 농법임을 제시한다.

제 4 절 황토가공소재 유용 토양미생물 작용 및 토양오염 개선 최적 화기법 개발

1. 황토가공소재 첨가에 의한 디젤 오염 분해 향상 효과 및 미생물 군집 변화

가. 토양 Microcosm의 형성 및 잔류 디젤 모니터링 방법

농업 토양 환경에서의 오염 분해 촉진을 연구하기 위해 상추, 고추 등이 재배되고 있는 밭으로부터 토양 시료를 확보하였다. 500ml 크기의 병에 100g씩 나누어 담고 (1) Control (처리하지 않음) (2) Diesel (디젤 2%), (3) Red clay (디젤 2% + 비가공황토 0.1%), (4) Processed red clay (디젤 2% + 황토가공소재) 의 네 개 조건으로 구분하였다. 상온에서 35일간 배양하였으며 주사바늘을 이용하여 통기시켰다.

잔류 디젤 농도를 측정하기 위해 일정 시간 간격으로 토양 5g을 채취하고 Dichloromethane 10ml을 첨가한 뒤 3분간 sonication 시켜 토양에 남아있는 디젤을 추출하였다. 이 중에서 2ul를 분석에 사용하였다. Gas chromatography 분석은 HP-5MS 컬럼과 flame ionization detector를 이용하여 수행하였으며 오븐은 50° C에서 3분, 8° C / min 의 속도로 300° C까지 승온, 300도에서 8분간 유지하는 온도 조건을 사용하였다. Injector는 250° C, Detector는 310° C로 유지되었음. Flow rate 는 150ml/min를 사용하였다. 정량분석을 위해 TPH를 이용하여 standard curve를 작성하였으며 잔류 디젤 농도 계산에 이용하였다.

나. 황토가공소재의 디젤 분해 향상 효과

디젤만을 처리한 토양에서는 35일 배양 후에 최종적인 잔류량이 초기의 94.6% 인 것으로 확인되었다 (그림 3-4-1). 추가적인 처리를 하지 않았을 경우 농업토양에서는 디젤의 분해가 짧은 시간에 쉽게 일어나지 않는 것으로 보인다. 그러나 황토가공소재를 처리하였을 경우에는 배양 후 5일부터 분해가 증진되어 15일까지 빠른 속도로 디젤이 분해되는 양상을 나타내었다. 15일부터 35일 사이에는 분해가 일어나기는 하지만 초기의 속도에 비해서는 매우 느려졌다. 황토가공소재 처리 토양에서 최종 디젤 잔류량은 초기 투입량의 64.0%로 확인되었다. 이것은 아무런 처리를 하지 않았을 때 보다 6.6 배의 분해 향상 효과를 나타낸 것이다. 가공과정을 거치기 전의 일반 황토를 처리한 시료와 비교했을 때에도 초기의 디젤 분해 촉진 효과가 나타나긴 했지만 총 분해량을 비교해보았을 때에 일반 황토를 처리하였을 때는 최종 잔류량이 73.7%로 나타났기 때문에 황토가공소재를 처리하였을 때에 디젤 분해 효율이 월등하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

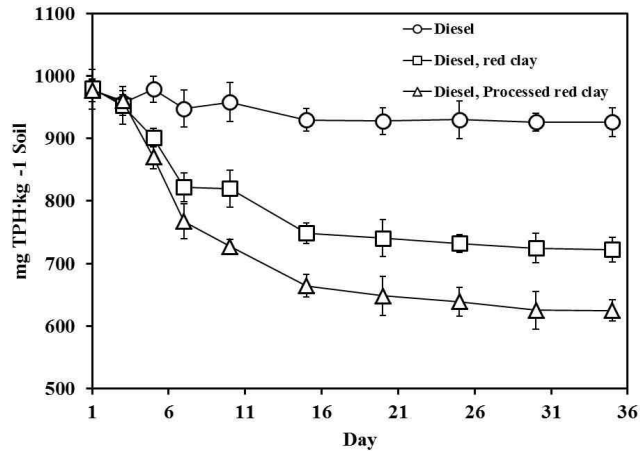


그림 3-4-1 황토가공소재 첨가에 따른 디젤 분해 효율 향상

황토가공소재는 작물 성장 촉진 효과 및 장어 양식에서의 폐사율 감소 효과 등이 검증된 바 있다. 그러나 현재까지 토양 오염 환경에서 오염 분해를 촉진시키는 효과는 연구되지 않았다. 그러나 본 연구 결과에 따르면 황토가공소재는 디젤 오염 토양에 투입되었을 경우 단기간에 분해 효율을 증진시키는 효과가 있는 것이 확인되었다. 특히 가공과정을 거친 황토가공소재의 경우는 일반적인 황토만을 처리하였을 때보다 오염물질 분해 촉진 효과가 월등한 것으로 드러났다.

다. 황토가공소재의 토양 미생물 성장 촉진 효과

탄화수소를 분해하여 탄소원으로 이용하는 세균은 토양을 비롯한 다양한 환경에 매우 널리 분포하고 있으며 외부에서의 추가적인 영양분이나 미생물 생장에 도움이 되는 무기물 첨가에 의해 분해 효율이 증가하기도 한다. 본 연구에서 토양에 투입된 디젤이 분해되는 것은 토양 중 미생물의 작용으로 여겨지며 황토가공소재가 토양 미생물에 어떠한 영향을 미쳐 디젤 분해 활성이 증가된 것으로 생각할 수 있다. 황토가공소재가 전체적인 세균 군집에 미치는 영향을 알아보기 위해 잘 알려진 토양 미생물인 *Acinetobacter oleivorans* DR1, *Pseudomonas putida* KT2440, *Cupriavidus necator*를 선택하여 성장 촉진 효과를 검증하였다. 그 결과 세 가지 세균 모두 낮은 농도의 황토가공소재 (0.1%) 조건에서 성장이 촉진되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-4-2) (M9 minimal media, 30° C, 220rpm shaking, 탄소원 succinate).

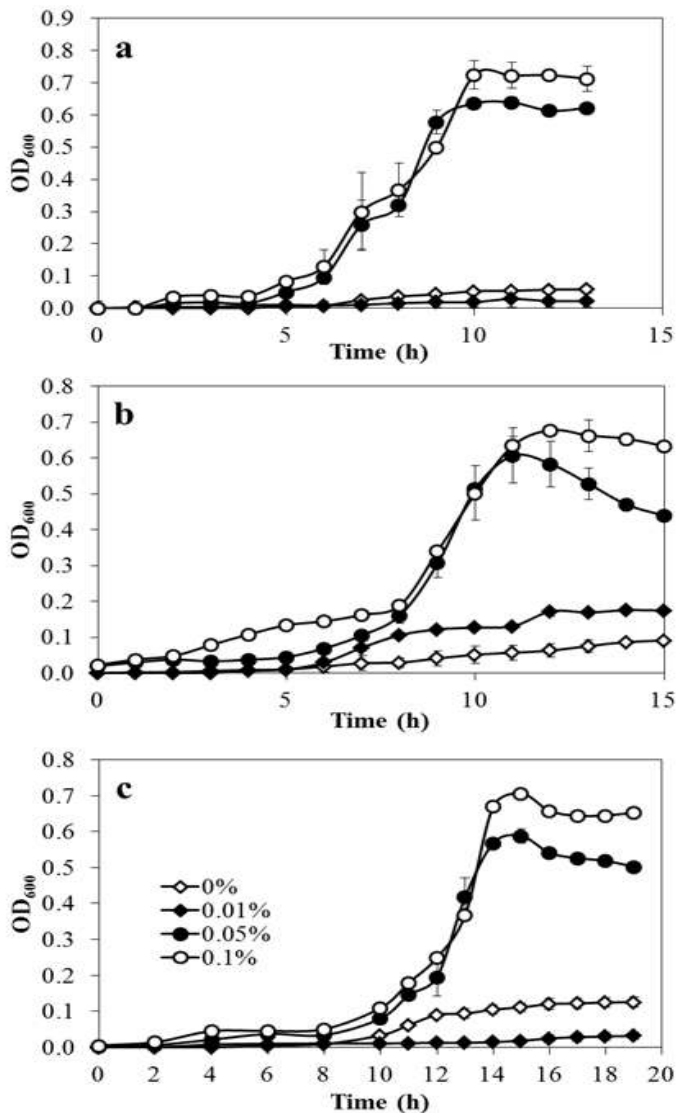


그림 3-4-2 황토가공소재에 의한 대표적 토양 미생물의 성장 촉진. of (a) *Acinetobacter oleivorans* DR1, (b) *Pseudomonas putida* KT2440, (c) *Cupriavidus necator*.

황토가공소재에 의한 대표적 토양 미생물의 성장 촉진 결과를 기반으로 실제 토양에서도 황토가공소재가 미생물 군집의 성장을 촉진할 수 있는지 확인하기 위해 총 배양가능 균주수의 증감을 비교하였다. 토양 중 배양가능 총균수를 측정하기 위해 토양 1g을 덜어낸 뒤 10ml의 멸균된 PBS를 넣고 5분간 강하게 Vortex 시켰다. 큰 토양 입자가 가라앉을 수 있도록 15분간 기다린 후 멸균된 PBS에 1/10 씩 serial dilution 하고 agar 배지에 100 μ l 씩 spreading 하였다. 상온에서 일주일간 배양 후 나타나는 콜로니의 숫자를 기준으로 배양 가능 총 균수를 측정하였다. 배지에 따라 배양되는 균의 종류와 숫자가 달라질 수도 있으므로 R2A배지와 1/10로 희석된 Nutrient 배지 두 종류를 사용하였다. 그 결과 아무것도 처리하지 않은 Control 시료와 디젤 오염 시킨 시료에서는 배양 가능 균주의 수가 크게 증가하지 않았지만

황토가공소재를 처리한 시료에서는 총균수의 증가가 매우 크게 증가함을 확인하였다(그림 3-4-3).

균수의 차이는 R2A에서 더 확연하게 드러났음. R2A 배지에서 측정된 CFU를 기준으로 비교하여 보면, 디젤만을 처리한 시료에서는 5.4×10^4 CFU/g 이 측정되었으나 황토가공소재를 처리하였을 경우 1.3×10^5 CFU/g 이 측정되었다 (2.4 배 증가). 가공하지 않은 일반 황토만을 처리하였을 때에도 배양 가능 총균수는 1.2×10^5 CFU/g로 2.2배 증가하였으나 황토가공소재에 비해서는 그 효과가 적었다. 따라서, 오염 토양에 처리된 황토가공소재는 총 균수를 증가시키는 효과가 있는 것으로 나타났으며 가공하지 않은 일반 황토보다 본 연구에서 사용한 황토가공소재의 효과가 더 탁월한 것으로 보인다.

라. 탄화수소 분해 능력 보유 미생물의 군집의 풍부도 변화

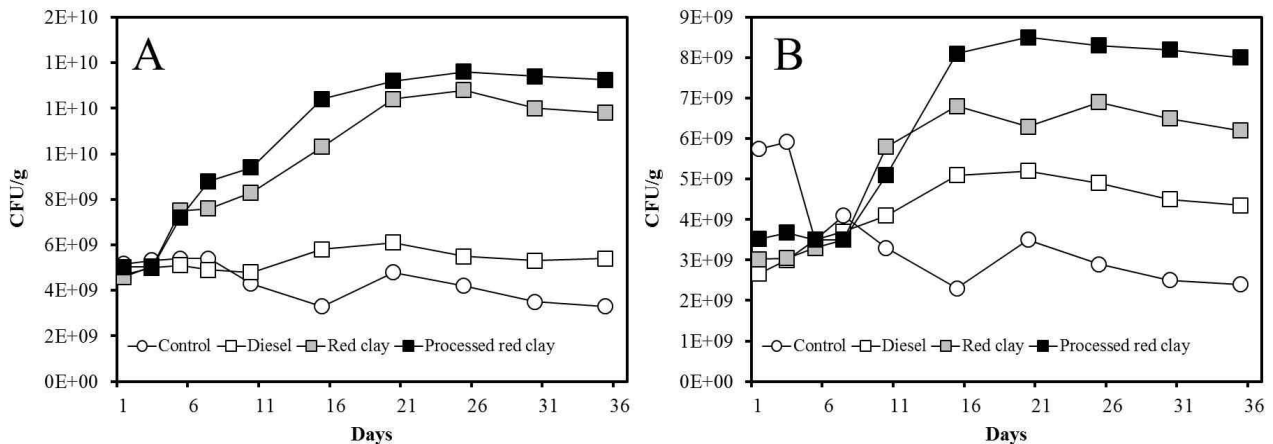


그림 3-4-3 황토가공소재의 토양 미생물 성장 촉진 효과 (A) R2A 배지와 (B) 1/10로 희석된 Nutrient 배지에서 측정된 결과

그림 3-4-3에서 나타난 결과는 황토가공소재에 의해 총 배양가능 균수가 증가한 것을 보여주지만 배양된 모든 세균이 디젤 분해에 관여하는지는 알 수 없다. 실제로 디젤 분해에 참여하는 균주를 확인하고 그 다양성을 알아보는 것이 요구되었다. 디젤은 다양한 종류의 방향족 탄화수소 및 지방족 탄화수소를 구성성분으로 하고 있기 때문에 탄화수소를 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있는지 확인하여야 한다. 배양이 종료된 토양 Microcosm으로부터 토양 1g과 멸균된 PBS 10ml을 혼합하여 5분간 강하게 Vortex하고 serial dilution 한 후 최소배지인 MSB에 나프탈렌과 액체 파라핀을 유일 탄소원으로 제공하였다. 나프탈렌은 단순한 구조의 방향족 탄화수소이기 때문에 나프탈렌 배지에서 자란 균주를 방향족 탄화수소를 분해하는 능력이 있는 것으로 간주하였으며 파라핀은 다양한 길이의 Alkane 혼합물이기 때문에 파라핀 배지에서 성장한 균주는 지방족 탄화수소를 분해하는 균주로 간주하였다. 일주일 간 상온에서 배양한 후 나타난 콜로니 숫자를 기준으로 탄화수소 분해 배양가능 균주 수를 측정하였다.

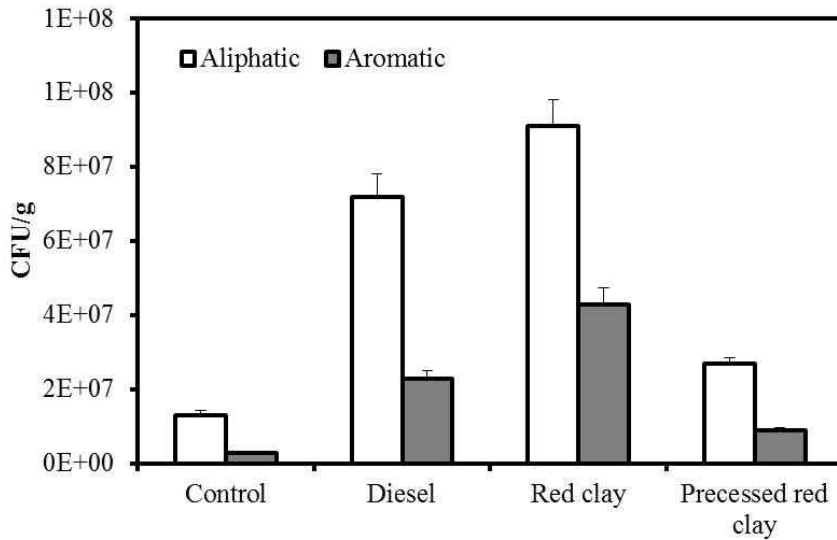


그림 3-4-4 황토가공소재에 의한 지방족 및 방향족 탄화수소 분해균주의 증가

Control 시료에서는 지방족과 방향족 탄화수소 배지에서 자란 세균이 각각 1.3×10^7 CFU/g와 3.0×10^6 CFU/g 로 측정되었다. 디젤 오염 Microcosm에서는 지방족과 방향족 탄화수소 분해세균이 7.2×10^7 CFU/g과 2.3×10^7 CFU/g로 측정되어 각각 5.5배와 7.6배로 증가하였다. 실험 토양이 기본적으로 가지고 있는 유기 탄소 외에 디젤이 첨가된 후 한 달 간 배양한 시료이기 때문에 이것을 탄소원으로 이용하는 세균의 수가 크게 증가한 것으로 생각된다 (그림3-4-4). 가공하지 않은 일반 황토를 첨가하였을 때는 증가추세가 더욱 확실했는데 지방족, 방향족 분해균주가 9.1×10^7 CFU/g 와 4.3×10^7 CFU/g으로 측정되어 각각 7.0배, 14.3배의 증가를 나타내었다. 그림 3-4-1에서 확인된 디젤 분해 향상 정도를 보았을 때 탄화수소 분해 균주의 수가 증가하여 디젤 분해가 향상되었다고 생각할 수 있다. (그림 3-4-4)

그러나 황토가공소재가 첨가된 Microcosm에서는 지방족과 방향족 탄화수소 분해균주가 2.7×10^7 CFU/g과 9.0×10^6 CFU/g으로 측정되어 Control에 비해 2.1배, 3.0배로 증가하였다. 이것은 다른 처리에 비해 미미한 정도의 증가로 생각된다. 하지만 디젤 분해 효율은 황토가공소재 처리 Microcosm에서 가장 뛰어났으므로 탄화수소 분해 능력 보유 균주에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

마. 탄화수소 분해 균주 분리 및 배양법에 의한 군집 다양성 조사

탄화수소 분해 균주의 다양성을 조사하기 위해 나프탈렌 또는 파라핀이 유일 탄소원으로 첨가된 배지로부터 콜로니를 분리하여 Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)를 수행하였다. 16S rRNA gene은 27F (5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5' -GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 프라이머를 이용하여 증폭하였다. PCR 프로토콜은 94° C에서 1분 30초, 25 싸이클의 94° C에서 45초, 55° C에서 45초, 72° C에서 45초를

사용하였고 72° C에서 10분간 final extension을 거쳤음. PCR 증폭 결과는 0.8% agarose gel에서 100V의 전압으로 25분간 전기영동하였다. 증폭된 16S rRNA gene은 *HaeIII* 제한 효소를 37° C에서 3시간 동안 처리한 후 1.5% agarose gel에서 135V 전압으로 25분간 전기영동하여 밴드의 패턴을 확인하였다.

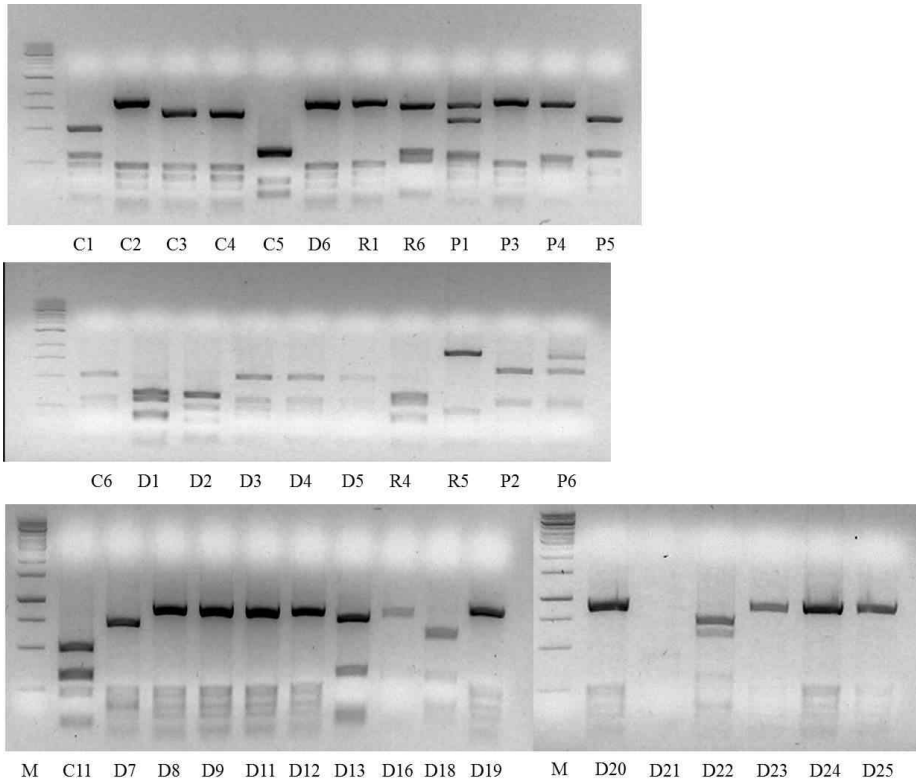


그림 3-4-5 디젤 분해 균주의 ARDRA 분석 결과

ARDRA 결과 디젤 분해 균주들로부터 다양한 패턴이 관찰되었다. 그 중에서도 C2과 C3가 보인 패턴은 다른 여러 콜로니로부터 동일하게 관찰이 되었는데 이것은 처리에 관계없이 여러 Microcosm으로부터 나타난 패턴이다. 따라서 이 균주는 실험에 사용한 발토양에 이미 많이 존재하며 또한 디젤 분해 능력 또한 가지고 있는 것으로 생각된다. (그림 3-4-5)

C2와 C3의 분류학적 정보를 얻기 위해 16S rRNA gene의 시퀀싱을 진행하였다. 16S rRNA gene은 27F (5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5' -GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 프라이머를 이용하여 증폭하였다. PCR 프로토콜은 94° C에서 1분 30초, 25 싸이클의 94° C에서 45초, 55° C에서 45초, 72° C에서 45초를 사용하였고 72° C에서 10분간 final extension을 거쳤다. 시퀀싱은 27F 프라이머로부터 수행하였으며 시퀀스 상동성은 Ezbiocloud에서 계산하였다. 계통수분석을 위한 Sequence alignment 및 Neighbor-joining phylogenetic tree, bootstrap 은 MEGA 5.2에서 수행하였다. 계통수분석시에는 27F 방향으로부터의 700bp의 nucleotide 시퀀스가 이용되었다.

시퀀싱 결과 C2와 C3 균주 모두 *Pseudomonas* 속 균주와 매우 가까운 것으로 나타났다. C2는

*Pseudomonas resinovorans*와 96.9%의 상동성을 나타내었으며 C3는 *Pseudomonas savastanoi*와 99.14%의 상동성을 나타내었다. 그 외의 다른 *Pseudomonas* 표준 균주의 16S rRNA gene 시퀀스와 함께 Neighbor joining tree로 계통수 분석하였다 (그림 3-4-6). 트리에서 볼 수 있듯이 C2와 C3 균주는 *P. tremae*, *P. congelans*, *P. mandelii*, *P. cannabina*, *P. alcaligenes* 등의 균주들과 매우 가까운 것으로 분석되었다. 토양 미생물 군집과 오염물질 분해에 관한 기존 연구들을 참고하면 *Pseudomonas* 균주는 토양에 서식하는 일반적인 균주이며 지방족, 방향족 탄화수소를 분해하는 능력이 잘 알려져 있다.

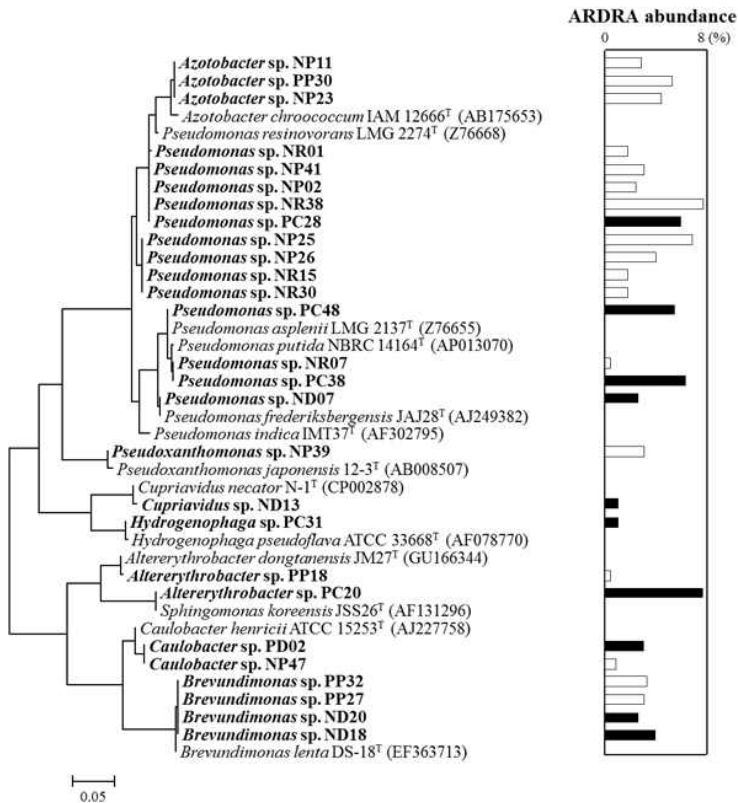


그림 3-4-6 디젤 오염 토양에 가공 황토가공소재 처리 후 유류오염 분해물질 분해 균주의 존재 확인. 그림 3-4-5에서 확인된 세균의 16S rRNA gene 유전자 서열을 기반으로 계통수 분석하고 ARDRA 패턴 빈도를 함께 나타내었다.

바. 황토가공소재와 디젤 오염이 토양 미생물 군집 조성 변화에 미치는 영향 평가

디젤 및 황토가공소재 처리에 의한 총 배양가능 균수 및 지방족, 방향족 탄화수소 분해 균주의 숫자 및 다양성을 확인하였기 때문에 토양 미생물 군집에 대한 전반적인 이해가 요구되었다. 배양법에 의한 군집 분석은 새로운 균주의 발견, 분해 과정에 참여 여부 등에 대한 정보를 얻을 수 있지만 실험 기법 상 노동력과 시간이 많이 요구되며 토양 미생물 군집에서 배양

가능한 균주는 1% 미만이고 배양 조건에 따라 성장하는 균의 종류도 다르기 때문에 데이터 획득에 한계가 있다. 따라서 균집 전체의 정보를 얻기 위해 Pyrosequencing 원리를 이용한 GS-FLX Titanium 플랫폼에서 16S rRNA gene의 High-throughput 시퀀싱을 수행하였다. 1회 분석을 통해 수십만 read의 DNA 시퀀스 정보를 얻을 수 있기 때문에 토양 중에 매우 적은 수로 존재하는 미생물 균집에 대해서도 파악하여 전체적인 균집 조성 및 다양성에 대한 정보를 확보할 수 있다.

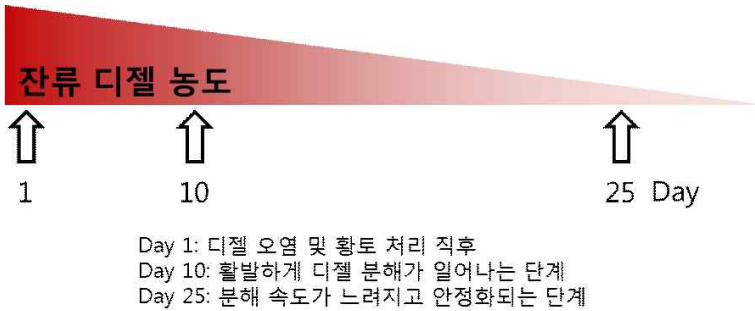


그림 3-4-7 Pyrosequencing 분석 시점

Pyrosequencing 분석 시점은 총 3개 시점을 선정하였다 (그림 3-4-7). 1일차 시료는 디젤과 황토가공소재의 처리 직후 단계로서 처리 전 토양 미생물의 균집을 분석하여 처리 후 변화양상과 비교하기 위한 것이다. 10일차 시료는 그림 3-4-1에서 나타났듯이 디젤의 분해 속도가 활발하게 일어난 시점이다. 초기 미생물 균집에 변화했을 것으로 예상되며 디젤 분해를 촉진시키는 데에 중요한 미생물이 주로 우점하고 있을 가능성이 높다. 25일은 디젤 잔류 농도는 남아있지만 분해 속도가 느려진 시점이다. 따라서 디젤 분해 과정, 디젤의 독성, 그 외 토양의 물리화학적 성질, 세균 균집간의 상호작용 등 다양한 요소에 의해 평형상태에 이른 것으로 간주할 수 있다. 그러므로 안정적인 미생물 균집 조성에 이르렀다고 생각할 수 있으며 디젤 분해 외에도 세균 균집이 가지는 다양한 생태학적 기능이 초기와 어떻게 달라졌는지 비교할 수 있는 시점이다. 본 연구에서는 총 4개의 처리구에서 3개의 시점의 시료를 분석할 예정이므로 총 12개의 시료에서 Pyrosequencing 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상하였다. Pyrosequencing은 1회 분석에 동시에 다수의 시료를 분석할 수 있으며 시퀀스 정보는 PCR 프라이머에 첨가된 바코드 시퀀스에 의해 분류하여 분석된다. 프라이머는 Adaptor-Barcode-Gene specific sequence로 이루어지며 해당정보는 표1에 나타나있다.

표 3-4-1 Pyrosequencing에 이용한 프라이머

프라이머	Sequence (5' -3')
Adaptor	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
16S rRNA specific sequence (forward)	GAGTTTGATCMTGGCTCAG
16S rRNA specific sequence (reverse)	WTTACCGCGGCTGCTGG
Barcode 1	ACGAGTGCCT
Barcode 2	ACGCTCGACA
Barcode 3	AGACGCACTC
Barcode 4	AGCACTGTAG
Barcode 5	ATCAGACACG
Barcode 6	ATATCGCGAG
Barcode 7	CGTGTCTCTA
Barcode 8	CTCGCGTGTC
Barcode 9	TCTCTATGCG
Barcode 10	TGATACGTCT
Barcode 11	CATAGTAGTG
Barcode 12	CGAGAGATAC

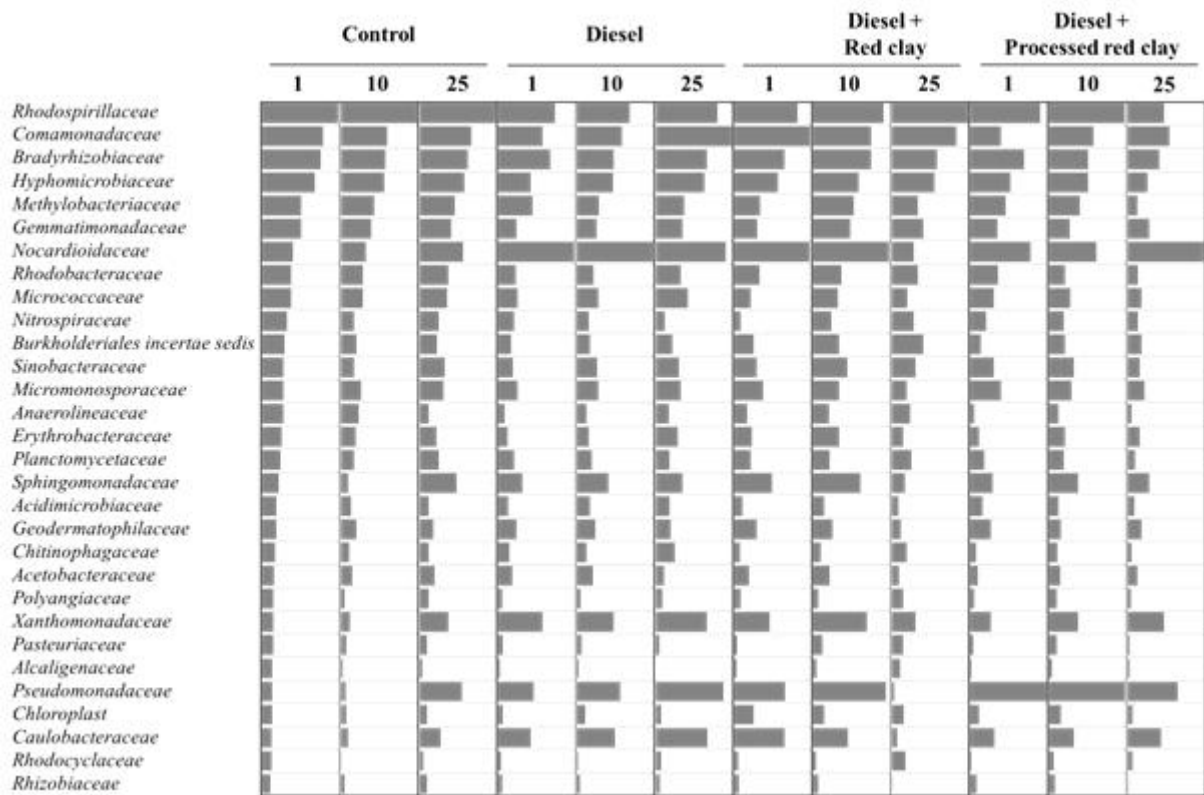


그림 3-4-8 Pyrosequencing 을 이용한 토양 미생물 군집 분석. 대조구, 디젤 오염, 디젤 오염+일반 황토, 디젤 오염 + 황토가공소재 처리 4가지 조건에서 수행하였음. 1일, 10일, 25일 3개의 시간대에서 분석하였다. 세균 군집의 상대분포를 막대 그래프로 표시하였다.

Pyrosequencing을 이용한 미생물 군집 분석 결과 *Rhodospirillaceae*가 모든 시료에서 우점 Family인 것으로 확인되었다. (그림 3-4-8). 그 외에도 *Comamonadaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae* 가 높은 비율로 존재하고 있었다. 디젤 오염이 발생하였을 때에는

Nocardioideaceae, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Caulobacteraceae*의 증가가 관찰되었다. 특히 황토가공소재가 디젤과 함께 처리되었을 때에는 *Pseudomonadaceae*의 증가가 구별되는 특징이었다. 군집 분석 결과를 Principle component analysis (PCA)로 분석하여 시료간의 유사성을 비교하였다 (그림 3-4-9). 디젤 오염 시료에서의 군집은 PCA 그래프 상에서 같은 위치에 분포하는 것으로 보아 디젤에 의한 미생물 군집 변화는 디젤 오염 발생 초기 (1일)에 빠르게 나타나는 것으로 생각되며 이것은 시간이 지나도 (25일) 크게 변하지 않는 것으로 생각된다. 디젤 오염 발생 시 황토가공소재를 처리하면 앞에서 언급한 세균 군집의 상대 비율이 증가하는 것으로 확인되었다. 그러므로 황토가공소재는 어떤 특정 세균의 성장을 촉진시키기보다 폭넓은 종류의 세균 성장을 촉진시키는 것으로 생각된다.

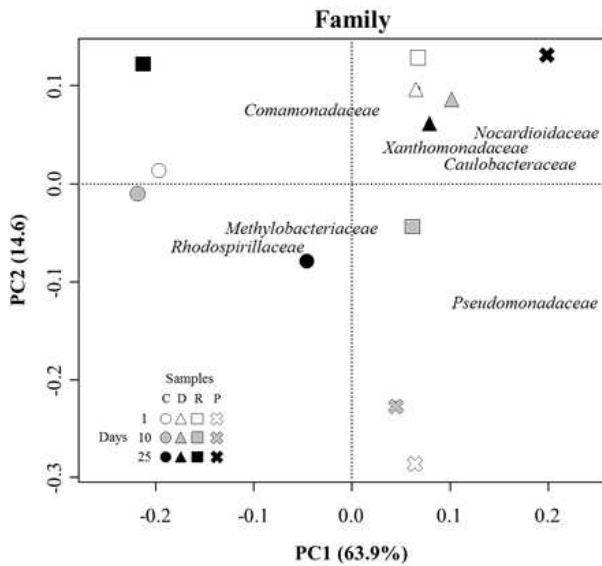


그림 3-4-9 Principle component analysis를 이용한 미생물 군집 분석 결과의 유사성 확인

사. 황토가공소재의 디젤 오염 분해 향상 효과 및 미생물 군집 변화 결론

황토가공소재는 기존에 식물성장 촉진 효과는 보고된 바가 있으나 그 외의 용도에 대해서는 언급된 바가 없다. 그러나 본 연구 결과에 의해 토양이 디젤에 오염되었을 때에 분해 촉진제로서 활용할 수 있음을 보여주었다. 디젤 오염 분해 효율의 증가는 토양 미생물의 성장 촉진과 토양 생균수의 증가로 볼 때 여러 가지 종류의 미생물 성장이 황토가공소재에 의해 촉진되고 유류 오염 물질 분해 세균의 수 또한 함께 증가하여 디젤이 세균의 탄소원으로 활용되면서 디젤 분해 효율 증가가 이루어지는 것으로 생각된다.

위의 연구 결과는 2014년 Microbiology Ecology 68권 2호 314-323 쪽에 게재되었다 (Effect of red clay on diesel bioremediation and soil bacterial community).

2. 황토가공소재 처리 일반농업토양에서의 미생물 군집 변화 연구

가. 정기적 황토가공소재 처리에 의한 농업 토양 미생물 군집 안정화 효과

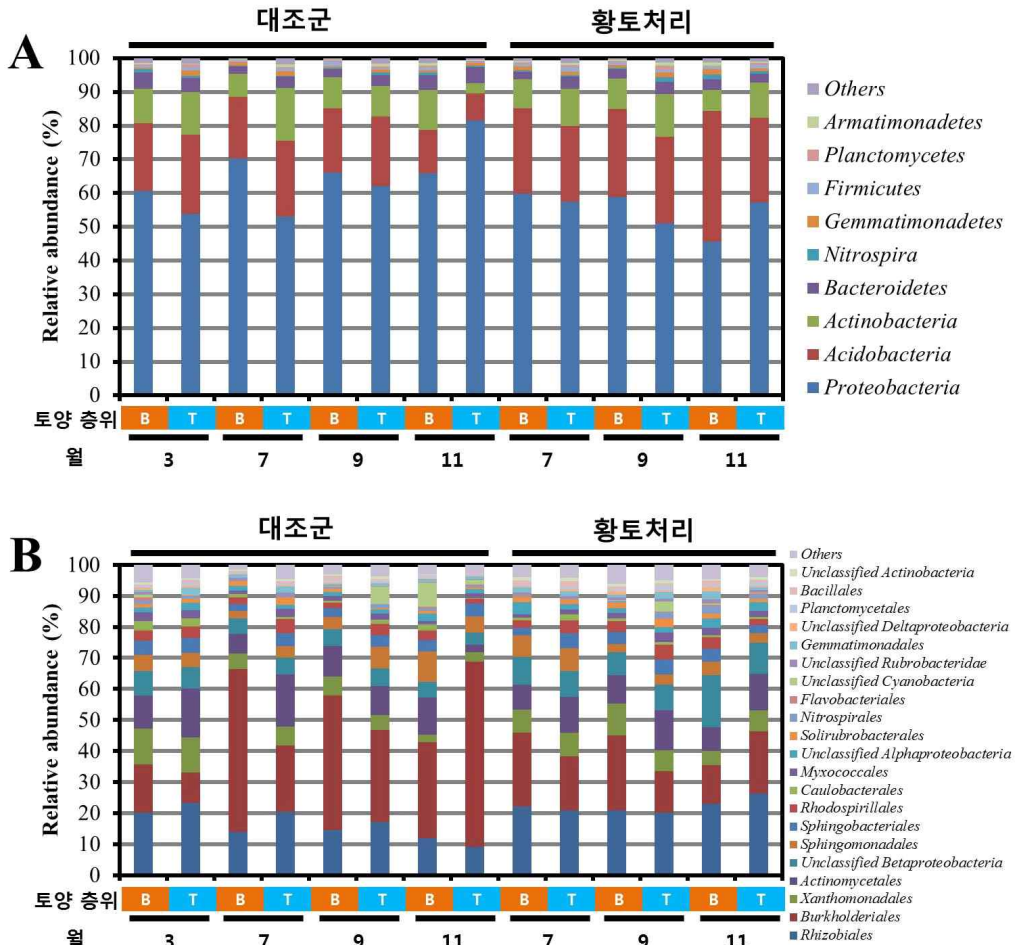


그림 3-4-10 매월 황토가공소재 처리 토양의 세균 군집 구조 변화 양상 분석 결과 (A) phylum (문) (B) order (목) 단계에서의 군집 구조 분석. B: bottom soil, T: Top soil.

황토가공소재가 농업 토양 미생물 군집에 미치는 영향을 평가하기 위해서 정보화학의 시험재배지에 매월 황토가공소재를 처리하였다. 처리 농도는 4가지 희석 배수 1000X, 200X, 100X, 20X 의 네 가지 조건을 사용하였으며 대조군 토양에는 같은 양의 물을 공급하였다. 토양 시료 채취는 3월부터 이루어졌으며 4월부터 이듬해 2월까지 지속적으로 매월 황토가공소재를 처리하였다. 토양 시료는 1m 반경에서 3반복으로 채취하였으며 0~1cm, 1~5cm, >5cm 세 가지 깊이로부터 채취하였다.

채취한 토양 시료로부터 Macherey-Nagel 사의 NucleoSpin 토양 DNA isolation kit를 이용하여 DNA를 추출하였다. 세균 16S rRNA 유전자는 27F-AMP (5' - adaptor- barcode- GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 518R (5' -adaptor- WTTACCGCGGCTG CTGG-3')

프라이머를 이용하여 증폭하고 GS-FLX titanium으로 pyrosequencing 하였다.

시퀀싱 결과는 Muthur 프로그램을 이용하여 샘플 분류, 바코드 시퀀스 제거, 노이즈 제거 등의 과정을 거치고 RDP pipeline을 이용하여 군집 분석 및 다양성 지수의 계산을 수행하였다. R 프로그램을 이용하여 principal component analysis (PCA)를 수행하였다. 그림 3-4-10에서 볼 수 있듯이 실험에 사용한 토양에는 *Proteobacteria*가 우점하고 있었다 (51%~81%). *Acidobacteria* (13~39%)와 *Actinobacteria* (3~15%)가 그 다음으로 존재하고 있었으며 그 외의 phylum은 매우 적게 (총 10% 미만) 존재하고 있었다.

그림 3-4-10B 는 Order 단계에서의 군집 구조 분석 결과를 나타낸다. 황토가공소재를 처리하기 이전인 3월 토양에서는 *Rhizobiales*가 20%~23%로 최고우점종이었으나 황토가공소재가 처리되지 않은 토양의 7, 9, 11월 시료에서는 *Burkholderiales*의 우점도가 10%~60%로 큰 폭으로 변화하고 있다. 그 외에 *Xanthomonadales*, *Actinomycetales*가 약 10% 내외로 존재하고 있다. 황토가공소재가 처리될 경우 7, 9, 11월에서 *Rhizobiales*와 *Burkholderiales*가 모두 20% 내외로 비교적 일정한 비율로 존재하고 있다. 이것은 황토가공소재가 처리되지 않은 토양에서 각 군집이 매우 큰 폭으로 매월 변화한 것과는 달리 군집의 구조와 다양성이 비교적 일정하게 유지되는 것으로 볼 수 있다.

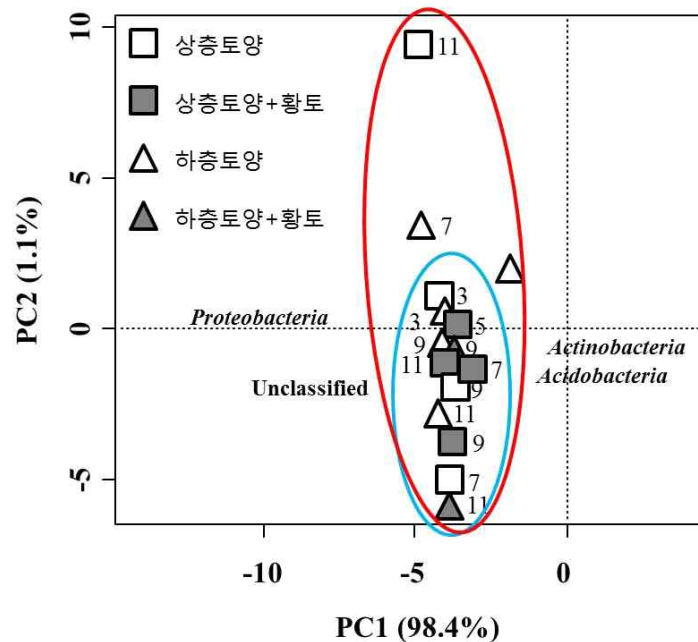


그림 3-4-11 군집 구조의 PCA 분석 결과. 붉은 색 원은 황토가공소재를 처리하지 않은 대조군 토양이며 파란 색 원은 황토가공소재를 처리한 실험구 토양 결과이다.

매월 관찰된 토양 세균 군집 구조 분석 결과 간의 상관관계를 분석하기 위해 PCA를 수행하였다. 그림 3-4-11은 phylum 분석 결과의 PCA를 보여주고 있는데 그림에서 볼 수

있듯이 황토가공소재를 처리한 시료들은 좌표 상에서 매우 가깝게 위치하고 있지만 (파란 색 원) 황토가공소재를 처리하지 않은 대조군 토양 시료들은 서로 다른 지점에 위치하고 있는 것을 알 수 있다 (붉은 색 원). 즉, 대조군 토양에서는 매월 토양 균집 구조가 크게 변화하고 있지만 황토가공소재를 처리하면 초기의 균집 구조가 매우 일정하게 유지되는 것을 나타낸다.

황토가공소재가 세균 균집 구조뿐만 아니라 다양성에도 미치는 결과를 알기 위해 Rarefaction curve를 분석하였다 (그림 3-4-12). 그 결과 일반적인 경향으로서 황토가공소재를 처리한 시료의 rarefaction curve 가 대조군 토양의 curve 보다 위쪽에 위치하는 것이 밝혀졌다. 즉, 황토가공소재는 토양 미생물 균집 구조를 안정적으로 유지시켜줄 뿐만 아니라 다양성도 높게 유지시켜주는 효과 있는 것으로 밝혀졌다.

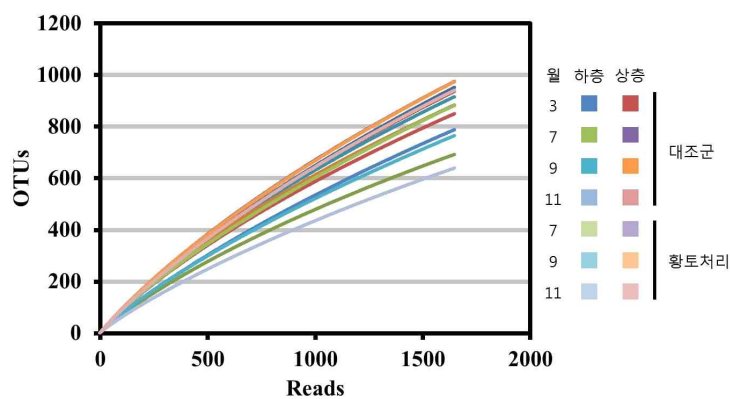


그림 3-4-12 Rarefaction curve로 나타난 균집 다양성 분석 결과

나. 황토가공소재 처리 토양에서의 질소 고정 세균 증가

그림 3-4-10에서 나타난 균집 구조 분석결과에는 *Rhizobiales* 가 상당 수 존재하는 것으로 나타나있으며 이것은 질소 고정균인 *Rhizobium* 등의 존재를 시사하는 것이다. 이 결과를 바탕으로 잘 알려진 질소 고정균인 *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Shinorhizobium*로 분류되는 시퀀스만을 추가적으로 분석하였다. *Azorhizobium*과 *Shinorhizobium*의 시퀀스는 발견되지 않았다. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* 시퀀스를 먼저 따로 분류해내고 EzTaxon-e 분석을 통해 기존에 알려진 질소 고정 세균 중 염기서열이 가장 유사한 대표적인 종의 16S rRNA 유전자와 함께 계통수분석을 수행하였다 (그림 3-4-13).

그 결과 실험 토양의 질소 고정균 다양성은 *Bradyrhizobium* > *Rhizobium* > *Mesorhizobium* 순서로 높은 것으로 나타났다. 대조군과 실험군에서 발견된 질소 고정 세균 시퀀스가 계통수 안에서 일정한 경향 없이 서로 섞여 있는 것으로 미루어 볼 때 황토가공소재 처리가 특정 종의 질소 고정 세균을 선발하여 성장을 촉진하지는 않는 것으로 보인다.

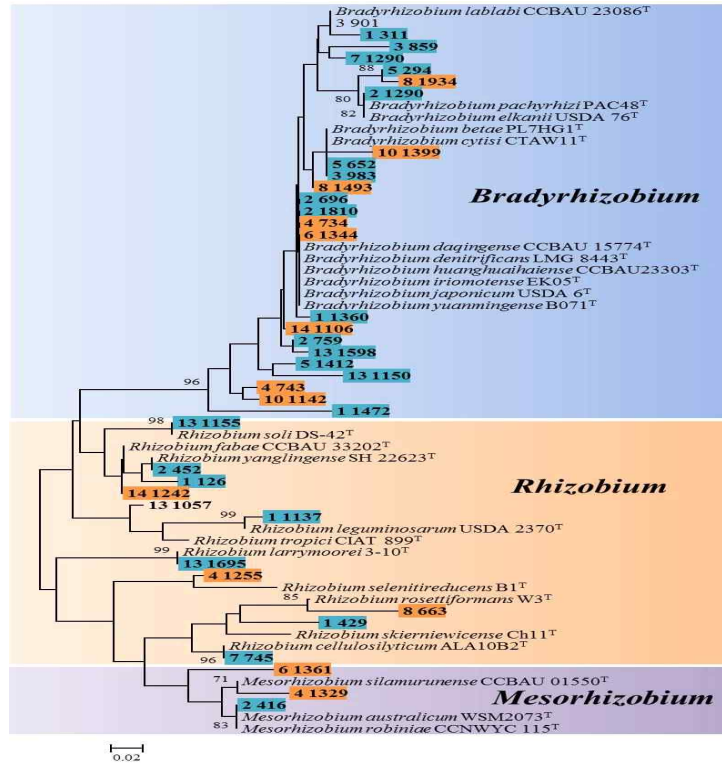


그림 3-4-13 황토가공소재 처리 토양에서의 질소 고정균 *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*의 계통 분류 분석. 굵은 글씨: 본 연구에서 발견된 질소 고정 세균의 시퀀스. 파란 박스: 대조군 토양. 주황색 박스: 황토가공소재 처리토양.

질소 고정균의 양적인 변화를 알아보기 위해 최고 우점종으로 나타난 *Bradyrhizobium betae*와 그 다음으로 존재하는 *B. lablabi*의 풍부도 변화를 분석하였다 (그림 3-4-14). 그 결과 상층토양과 하층 토양에서 모두 대조군 토양에서는 *B. betae*의 풍부도가 계속 감소하는데 비해 황토가공소재가 처리될 경우 풍부도가 대조군에 비해 높게 유지되는 것을 확인하였다. 황토가공소재 처리에 의해 작물의 성장이 증대되는 효과는 이미 알려져 있었으나 그 원인은 밝혀지지 않은 상태이다. 본 연구 결과는 작물 성장 증대 효과를 일부 설명할 수 있는 현상으로 보인다. 추가적인 검증을 위해 실제 토양에서의 질소 고정 능력 향상을 실험적으로 테스트 하고 있다.

황토가공소재가 세균의 풍부도를 증가시키는 효과가 있으므로 이 과정에서 병원균 풍부도의 변화도 함께 일어나는지 검증할 필요가 있었다. 분석대상 식물 병원성 세균은 다음과 같다: *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas oryzae*, *X. campestris*, *X. axonopodis*, *Erwinia amylovora*, *Xylella fastidiosa*, *Dickeya* species, *Pectobacterium* species.

*Pseudomonas*를 제외한 모든 세균 관련 시퀀스는 발견되지 않았고 *Pseudomonas* 시퀀스도 20개 read 이하로 발견되어서 본 연구과제에서 사용한 토양에는 병원성 세균 자체가 거의 존재하지

않는 것으로 여겨진다. 일부 발견된 *Pseudomonas* 시퀀스에 대해 추가적인 계통수 분석을 수행하여 그림 3-4-15과 같이 나타내었으나 이들 시퀀스가 병원균 존재를 의미한다는 증거를 찾을 수 없었다.

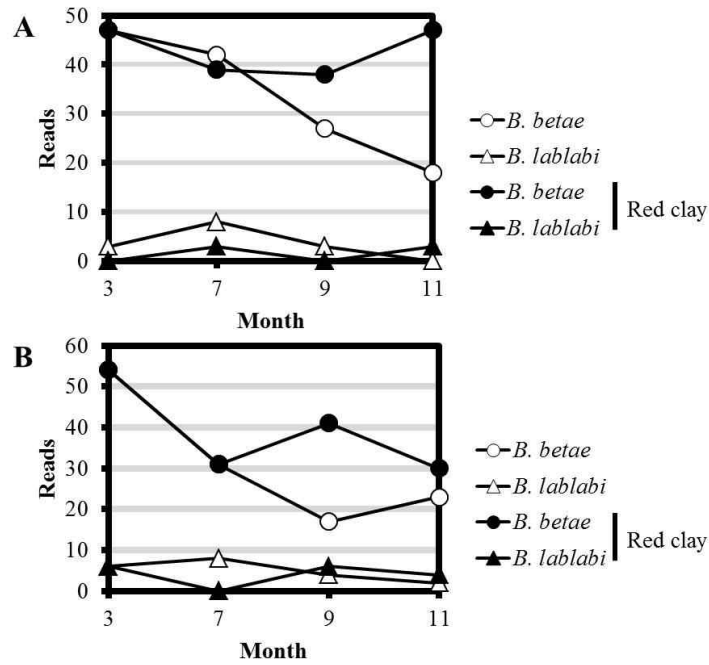


그림 3-4-14 질소 고정균 *Bradyrhizobium betae*와 *B. lablabi*의 read 수 변화. (A) 상층 토양 (B) 하층 토양

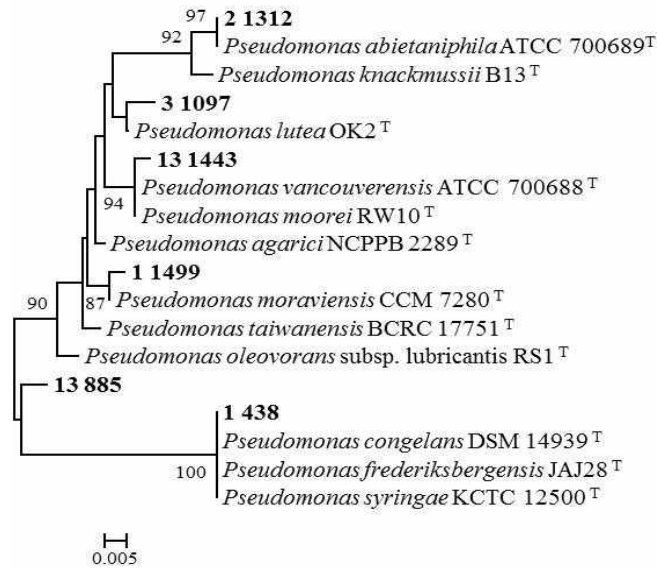


그림 3-4-15 *Pseudomonas* 시퀀스의 계통수 분석

3. 세포 수준에서 황토가공소재에 의한 오염 물질 분해 증진 기작 규명

가. 유류 오염 물질 분해 세균 *Acinetobacter oleivorans* DR1의 성장 패턴 분석

1, 2차년 연구를 통해 황토가공소재가 디젤로 오염된 토양에서 환경 정화 촉진제로 사용할 수 있는 가능성을 제시하였으며 그 기작이 토양 미생물의 성장을 촉진시키기 때문이라는 결과를 얻었다. 지난 연구 결과는 황토가공소재의 새로운 적용 방법을 연구하였다는 점에서 의의가 있으나 그 기작에 대한 이해가 아직 부족하기 때문에 추가적인 연구가 필요한 상황이다. 특히 세균 생리현상에 미치는 황토가공소재의 영향을 분석하기 때문에 세포 내에서 분자생물학적인 수준에서의 기작은 전혀 알지 못하는 실정이었다.

황토가공소재가 세균 세포에 미치는 생리적인 현상과 오염 물질 분해 양상, 유전자 발현 변화를 종합적으로 분석하여 그 기작을 밝히고자 하였다. 유류 오염 물질 분해 세균으로 이미 알려진 바 있는 *Acinetobacter oleivorans* DR1을 모델 세균으로 선정하였다. 이 세균은 이미 유전체 분석 및 유류 오염 물질 분해 연구가 진해되어 있기 때문에 본 연구에 적합하다고 판단하였다. 유전자 발현 양상을 연구하기 위해서 RNA-seq을 이용한 전사체 분석을 수행하였다.

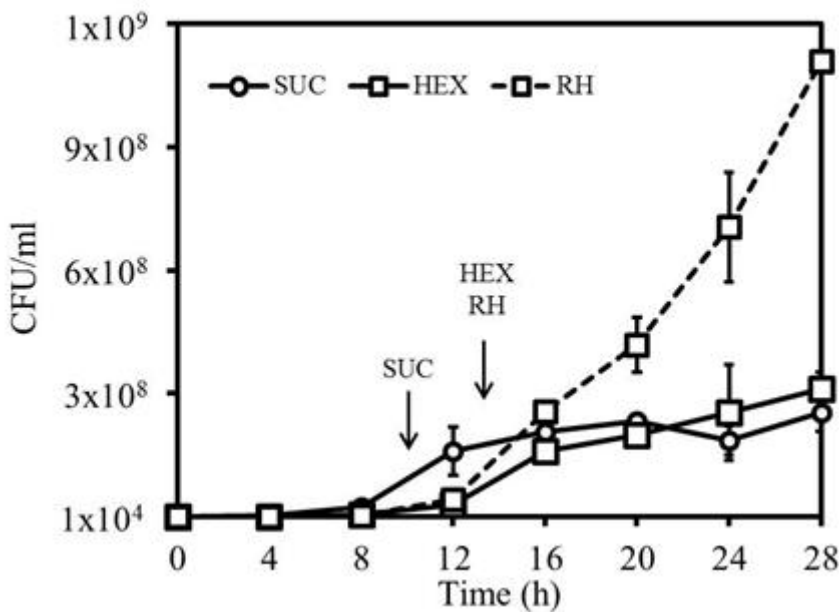


그림 3-4-16 황토가공소재를 첨가한 배지에서의 균 성장곡선 비교. 유일 탄소원으로서 succinate (SUC) 또는 hexadecane (HEX)를 제공하였으며 유류 오염 물질 분해하는 세균에 대한 황토가공소재의 효과를 연구하기 위해 Hexadecane을 황토가공소재와 함께 처리하였다 (RH)

탄소원이 들어있지 않은 최소배지 (M9)에 succinate (SUC), hexadecane (HEX), hexadecane과

황토가공소재(RH)를 첨가한 후, *Acinetobacter oleivorans* DR1 균주를 1×10^4 CFU/ml을 접종하여 성장을 관찰하였다. 그 결과 lag time은 HEX와 RH 조건일 때가 SUC 조건에서 보다 길었지만 접종한 지 16시간이 지난 후부터는 RH에서 성장이 월등히 잘 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 황토가공소재를 낮은 농도로 처리를 하게 되면 (0.1%) 균의 성장에 도움이 된다는 사실을 다시 한 번 확인할 수 있었다 (그림 3-4-16).

나. 황토가공소재 처리에 의해 발생하는 *A. oleivorans* DR1 의 유전자 발현 변화 분석

(1) 황토가공소재 처리 및 Hexadecane 분해 조건에서 발현량 변화가 관찰된 유전자의 양적 분석

○ 전사체 분석은 그림 3-4-16에서 화살표로 표시한 시점, 즉, 대수성장기에서 total RNA를 회수하여 분석하였다. Sequencing library 제작과정에서 rRNA를 먼저 제거하고 남은 mRNA로 시퀀싱 분석을 진행하였으며 MiSeq 플랫폼에서 시퀀싱하였다.

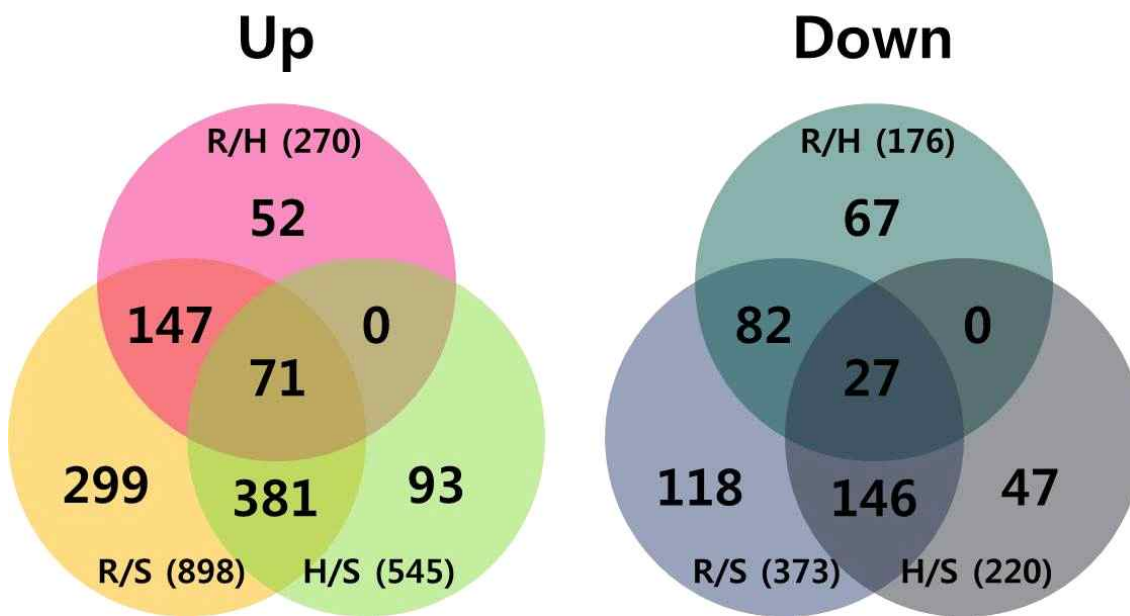


그림 3-4-17 RNA sequencing을 이용한 황토가공소재 첨가 시 발현 유도 및 억제되는 유전자 수 분석

○ 황토가공소재의 균에 미치는 영향을 분자적인 관점에서 살펴보기 위해 RNA sequencing을 하였다 (그림 3-4-17). 그 결과 452개의 유전자가 hexadecane (H)과 hexadecane, 황토가공소재를 같이 처리한 균 (R)에서 succinate를 처리한 균 (S)에 비해 2배 이상 발현이 유도되어 진 것을 확인할 수 있었다. 그 중 71개의 유전자는 hexadecane을 처리한 균에 비해 hexadecane과 황토가공소재를 같이 처리한 균에서 2배 이상 발현이 유도된다는 것을 알 수 있었다. 한편 173개의 유전자가 H와 R의 조건에서 2배 이하로 발현이 억제되는 것으로 나타났다 이 중 27개의 유전자가 황토가공소재를 처리했을 때 발현이 억제되는 것으로 확인되었다. 따라서 황토가공소재는 전체적으로 더 많은 유전자를 유도하였다. 따라서 이 후 분

석에서는 황토가공소재에 의해 발현량이 증가하는 유전자에 대해 좀 더 집중적으로 분석하기로 결정하였으며 특히 모든 조건에서 공통적으로 발현이 증가하거나 황토가공소재가 처리된 조건에서만 증가하는 유전자 또는 hexadecane과 황토가공소재가 함께 처리된 조건에서만 발현이 증가하는 유전자들이 황토가공소재에 대한 세균의 반응을 보여주는 것으로 여겨진다.

다. 발현량 변화된 유전자의 오페론 단위 분석

○ 황토가공소재가 균의 대사활동에 미치는 영향에 대해 살펴보기 위해 오페론 단위의 발현량을 확인하였다. 많은 경우 하나의 대사경로에 필요한 유전자들은 유전체 상에서 인접하여 존재하는 경우가 많기 때문에 오페론 단위의 분석을 통해 대사 활동 변화를 추측할 수 있었다. 가장 눈에 띄는 결과로는 리보솜 단백질을 생성하는 유전자가 모여 있는 유전자 지역의 발현량이 hexadecane과 황토가공소재를 처리한 균에서 2배 이하로 줄어든 것이었다. 따라서 황토가공소재가 리보솜 단백질의 발현을 억제한다는 것을 알 수 있었다 (그림 3-4-18). 이 분석에서는 다수의 hypothetical protein의 존재와 발현 변화가 큰 유전자들이 유전체 상에서 분산되어 존재하고 있었기 때문에 다수의 대사 활동을 파악하는 데에는 어려움이 있었다.

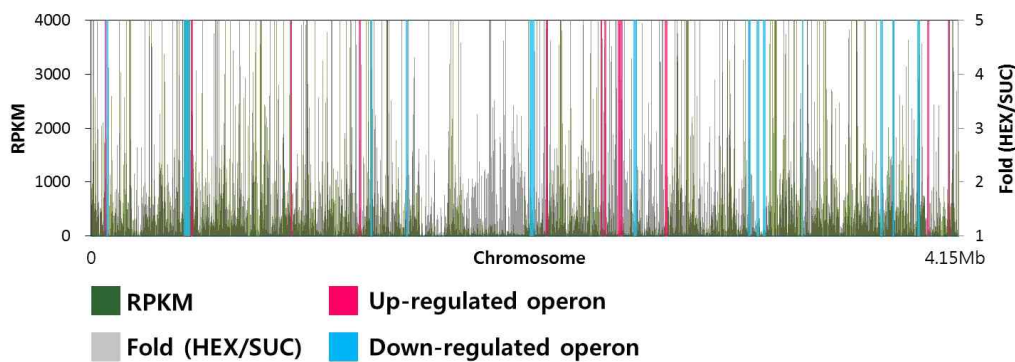


그림 3-4-18 RNA sequencing을 이용한 오페론 단위의 유전자 발현량 분석

라. Alkane 분해 대사 경로 관련 유전자의 발현 변화

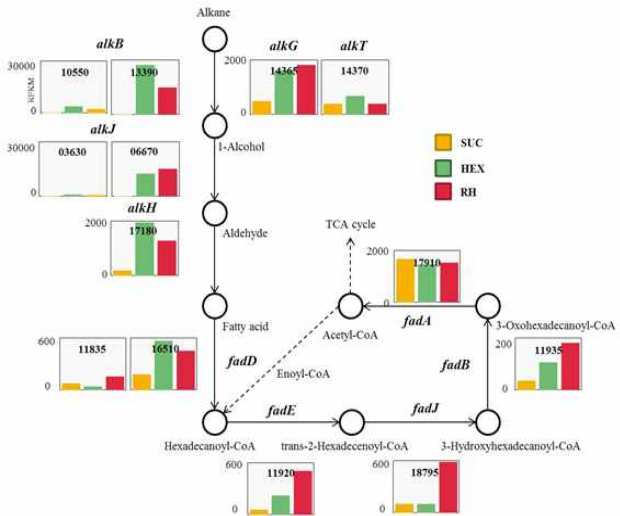


그림 3-4-19 Alkane 대사 경로 관련 유전자의 발현 변화 분석

- Alkane 을 분해하는 대사경로는 가장 먼저 alkane 1-monooxygenase에 의해 시작되며 이후 지방산 대사 과정인 Beta-oxidation 과정에 의해 최종적으로 Acetyl-CoA로 분해된다. 이렇게 생성된 Acetyl-Coa는 TCA 회로 및 Glyoxylate shut에 의해 세포의 탄소원과 다른 물질을 합성하기 위한 기초 물질을 만들어 낸다. RNA sequencing 분석 결과 hexadecane 및 hexadecane, 황토가공소재를 같이 처리한 균에서 alkane과 지방산 분해에 관련된 단백질들의 유전자가 많이 유도된 것을 확인하였다.
- Alkane 1-monooxygenase는 hexadecane만 처리한 조건에서 더 많이 발현 되었지만 황토가공소재와 함께 처리한 조건에서도 충분한 발현을 보였다 (그림 3-4-19). 특이한 것은 황토가공소재를 처리했을 때 지방산 대사에 관련된 유전자들의 발현량이 크게 증가한 것이다. 그러므로 황토가공소재가 처리되면 Alkane 분해에 의해 발생하는 중간 대사산물 (지방산)이 빠르게 대사되고 세포의 기본적인 대사 경로로 빠르게 전달되는 이점이 있을 것으로 여겨진다. 이러한 결과는 황토가공소재의 균 성장 촉진효과를 뒷받침할 수 있는 근거이다.

마. Sulfate 이용 관련 대사 경로 유전자의 발현 증가

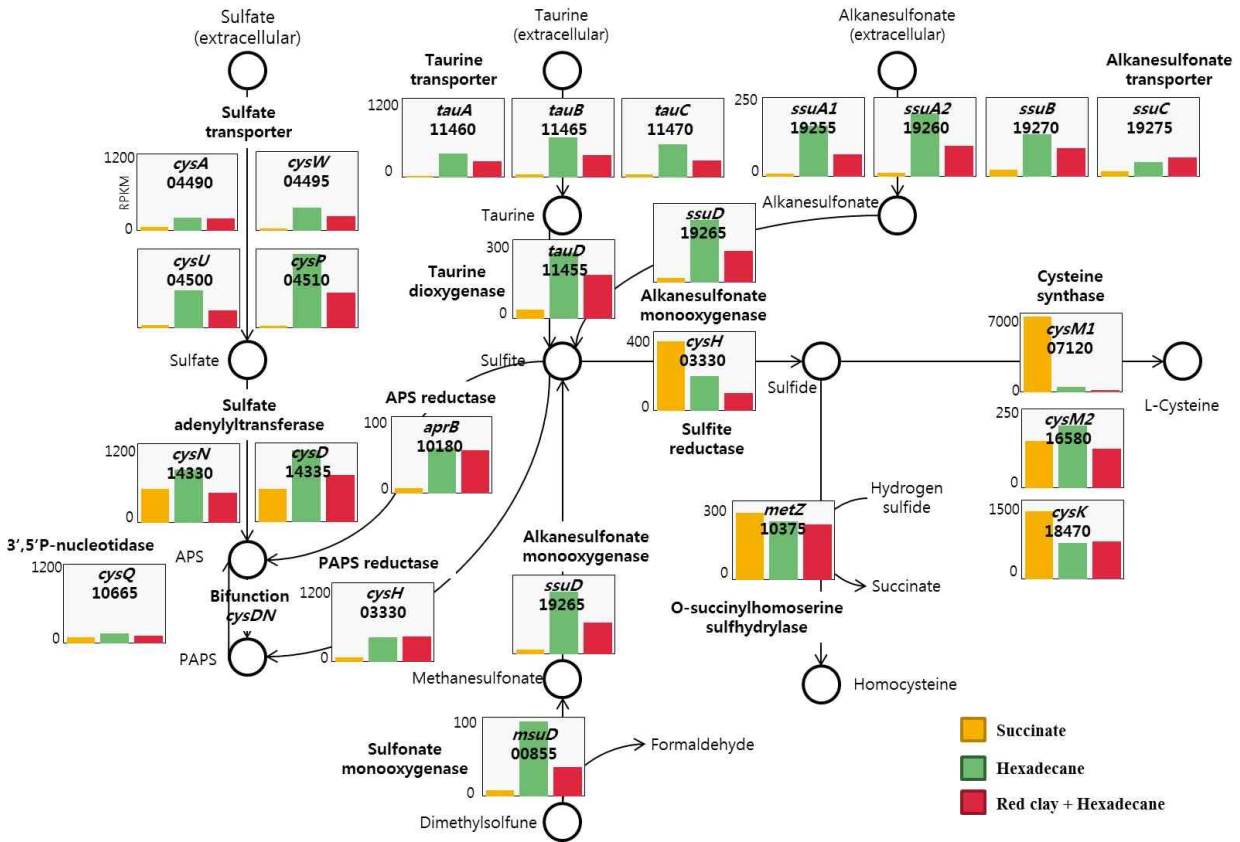


그림 3-4-20 Sulfate 대사와 관련된 유전자들의 발현 비교

○ Hexadecane과 hexadecane, 황토가공소재를 같이 처리한 환경에 자란 균들에서 sulfate 대사와 관련된 유전자들이 많이 발현된 것을 확인할 수 있었음. 이러한 사실은 황토가공소재를 처리했을 때도 비슷한 경향성이 나타남 (그림 3-4-20). 특히 sulfate 수송 단백질의 경우 hexadecane에서 3배에서 35배까지 증가한 것을 확인할 수 있었음. 따라서 hexadecane을 분해할 시 sulfate를 많이 필요 한다는 결론을 내릴 수 있음. 현재 알려진 alkane 대사 경로와 sulfate 요구도 증가 사이에 분명한 상관관계를 찾기는 어려운 상황임. 황을 포함하는 대표적 세포 내 물질로서 아미노산 중 Cysteine이 있음. 하지만 Cysteine을 합성하는 유전자들의 발현양은 저조한 것으로 보아 sulfate의 유입량 증가가 cysteine 합성과 관련이 없는 것으로 추정함. 따라서 hexadecane 분해에 따른 sulfate의 역할에 대해서는 추가적인 실험을 통해 검증이 필요함.

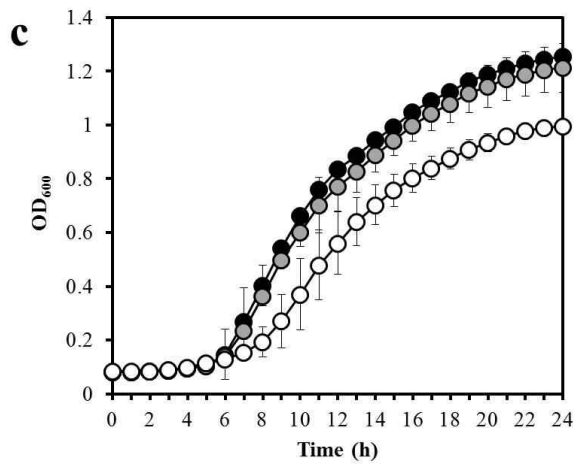
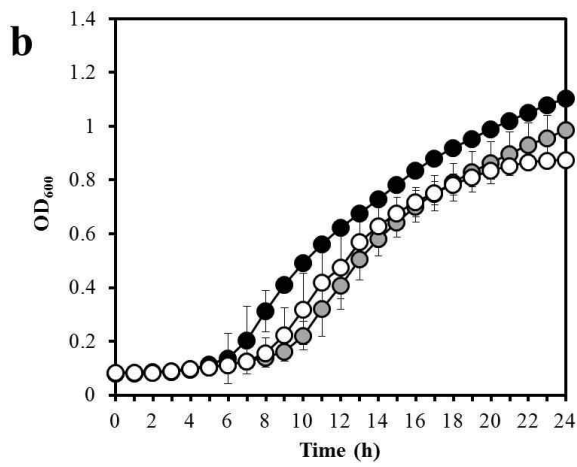
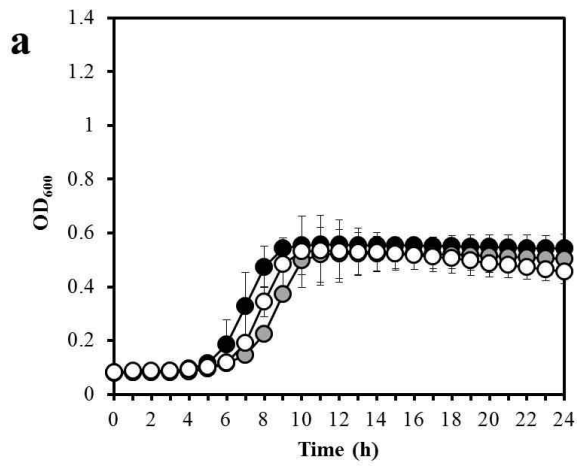


그림 3-4-21 Sulfate농도 및 탄소원에 따른 균 성장곡선

○ 그림 3-4-20 에서 sulfate 대사관련 유전자들의 발현량 데이터를 통해 내린 결론을 각 sulfate와 탄소원에 따른 균 성장곡선으로 증명하였다. Succinate를 탄소원으로 사용한 조건(그림 3-4-21a)에서는 sulfate의 농도가 2mM, 0.2mM, 0.02mM일 때 성장곡선간의 차이가 없다는 것을 확인할 수 있었으나 hexadecane을 탄소원으로 사용한 조건(그림 3-4-21b)에서는 0.2mM, 0.02mM로 sulfate 농도를 줄였을 때 성장이 저해되는 것을 확인하였다. 이러한 경향은 황토가공소재를 처리한 조건(그림 3-4-21c)에서도 sulfate의 농도를 0.02mM로 줄였을 때 나타났다. 즉, alkane을 분해할 때 sulfate 요구량이 증가한다는 사실을 실험을 통해 증명하였다.

바. 세포막 투과성의 변화

○ RNA sequencing을 통해 불포화 지방산 합성에 관여하는 유전자들 (fatty acid desaturase, delta-9-desaturase, cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase)의 발현이 황토가공소재를 처리한 균주에서 유도되었다. *A. oleivorans* DR1 세균은 hexadecane 방울에 붙어서 hexadecane을 이용하는 것이 알려져 있는데 이런 상황에서는 세포막의 투과성과 성질이 hexadecane 이용에 중요할 것으로 생각된다. 그러므로 fatty acid methyl ester (FAME) 분석을 통해 유동성의 정도를 측정했다. 그 결과 hexadecane이나 succinate를 첨가한 배지에서는 크게 차이가 없으나 황토가공소재를 처리한 균주에서는 유동성 정도가 크다는 것을 전 구간에 걸쳐 알 수 있었으며 특히 이러한 차이는 정지상에서 뚜렷하게 나타났다(그림 3-4-22). 이를 통해 황토가공소재는 세포의 막 유동성을 높여 hexadecane을 더 잘 받아들이게 하는 효과를 주기 때문에 더 높은 성장률을 보이는 것으로 생각할 수 있다.

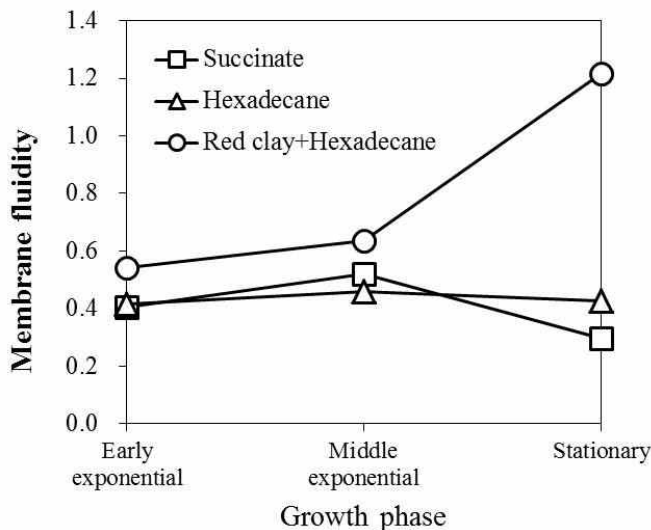


그림 3-4-22 FAME을 통한 세포막의 유동성 측정

사. 황토가공소재에 의한 *A. oleivorans* DR1의 hexadecane 분해 효율 향상 기작

○ 본 연구 결과에 의하면 황토가공소재는 *A. oleivorans* DR1 이 hexadecane을 분해할 때

Alkane 분해 과정 중에서도 beta-oxidation 관련 유전자의 발현을 증가시켜서 중간 산물로 발생하는 지방산을 빠르게 소모하는 것을 도와 전체적인 alkane 분해 과정을 촉진시키는 것으로 생각된다. 또한 황토가공소재가 처리된 조건에서 산화적 스트레스 방어 관련 유전자들도 상당한 수준으로 발현이 증가한 것을 볼 때 hexadecane 을 분해할 때 발생하는 산화적 스트레스를 효과적으로 대처할 수 있는 것으로 생각된다. Alkane은 일부 세균에서 알려진 transporter가 있긴 하지만 세포막 자체를 투과할 수도 있기 때문에 세포막 투과성의 증가가 alkane 흡수 효율과 관련 있는 현상으로 보인다. Sulfate 요구도 증가에 관한 것은 현재까지 알려진 바가 없어서 매우 새로운 현상으로 생각되며 Alkane 분해를 돕는데 어떤 역할을 하고 있는지 추가적으로 연구해 볼 필요가 있다.

4. 황토가공소재 및 토양 유용 세균에 의한 식물 성장 촉진

가. 황토가공소재 및 유용 세균 *Pantoea* sp. SBR1의 식물 성장 촉진 효과

녹두

대조군 황토 DR1 SBR1 SBR1 + 황토 DR1 + 황토

엇갈이

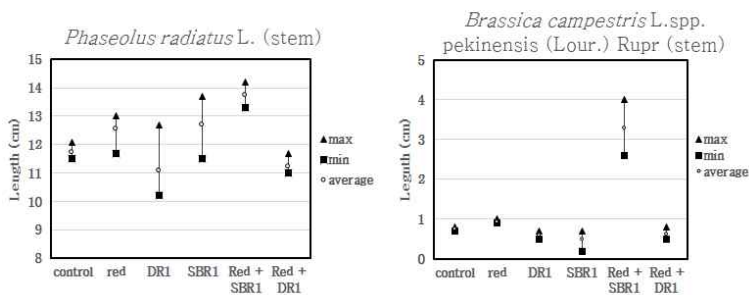


그림 3-4-23 *Pantoea* sp. SBR1과 황토가공소재의 처리에 따른 식물 성장 비교

- 식물의 뿌리에서 동정한 *Pantoea* sp. SBR1이 식물 성장을 촉진하는 신호물질인 indole acetic acid (IAA)를 분비한다는 사실을 알아내었다. 또한 낮은 농도의 황토가공소재가 세균 뿐만 아니라 식물 성장에도 도움을 준다는 사실이 입증되었다. 따라서 이를 실질적으로 적

용가능한지에 대한 여부를 확인하기 위한 실험을 진행하였다.

- 녹두(*Phaseolus radiatus* L)와 엇갈이(*Brassica campestris* L.spp. *pekinensis* (Lour.) Rupr.)를 일주일동안 증류수를 적신 멸균 휴지에서 발아를 시킨 후 멸균한 토양 100ml에 각각 10개의 씨앗을 심었다. 각 조건은 증류수만 매일 10ml씩 준 대조군과 0.2% (v/v) 황토가공소재를 3일에 한번 씩 준 실험군 (red), 3일에 한번 씩 1×10^8 CFU/ml의 *Acinetobacter oleivorans* DR1 세균을 처리한 실험군 (DR1), 3일에 한번 씩 1×10^8 CFU/ml의 *Pantoea* sp. SBR1 세균을 처리한 실험군 (SBR1), 각각의 세균에 0.2%의 황토가공소재를 첨가한 실험군 (SBR1 + 황토가공소재/ DR1 + 황토가공소재) 총 여섯 가지의 조건으로 식물 성장을 관찰하였다. 식물 성장에는 질소와 인의 비율이 영향을 미치게 되므로 질소와 인의 비율을 맞춰주기 위해 NP fertilizer를 3일마다 10ml씩 처리하였다.
- 4주 동안 처리 후 관찰한 결과 황토가공소재를 처리한 식물들 사이에서 공통적으로 식물의 잔뿌리가 많았다. 잔뿌리가 많으면 식물이 영양분을 흡수하는데 도움을 줄 수 있기 때문에 황토가공소재가 식물성장에 긍정적인 영향을 끼칠 수 있다. 이를 정확하게 정량하기 위해서 줄기의 길이를 측정하여 도식화 하였다 (그림 3-4-23). 그 결과 녹두에서는 *Pantoea* sp. SBR1 단독으로 처리한 군에서도 어느 정도 줄기에서의 길이성장이 나타난 반면 엇갈이에서는 단독으로 처리했을 때 길이성장이 크게 일어나지 않았다. 하지만 황토가공소재를 처리했을 때 (red) 두 식물 모두에서 길이 성장이 촉진되었으며 SBR1과 같이 처리했을 때 (SBR1 + red)는 이러한 효과가 극대화 되었다. 따라서 황토가공소재와 SBR1 세균의 식물성장 촉진 효과가 시너지를 이루어 극대화 되었을 거라 예상된다.

나. 디젤에 오염된 토양에 대한 *A.oleivorans* DR1의 생물학적 정화 효과

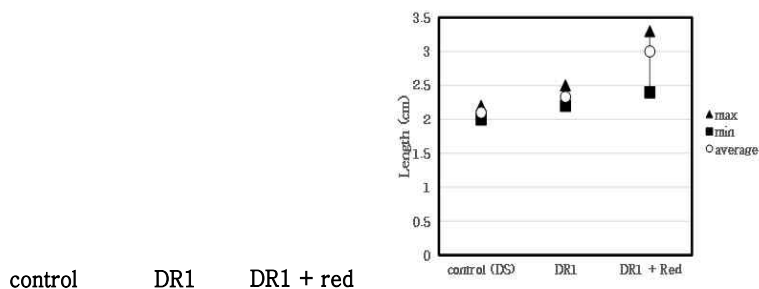


그림 3-4-24 디젤 분해균 *A.oleivorans* DR1과 황토가공소재를 처리한 식물에서의 성장 비교

- 디젤을 분해할 수 있는 *Acinetobacter oleivorans* DR1세균이 디젤에 오염된 토양에 적용시켜 식물 성장을 촉진시킬 수 있는지에 대한 여부를 살펴보기 위한 실험을 진행하였다. 디젤 (1%, v/v)을 혼합 시킨 토양을 100ml씩 분배한 후 아무것도 처리하지 않은 대조군과 DR1을 1×10^8 CFU/ml을 매일 접종한 실험군(DR1), 그리고 이와 동시에 0.2% 황토가공소재도 같이 처리한 실험군(DR1 + red)을 일주일동안 적용시켰다. 일주일이 지난 토양에 적환무(*Raphanus sativus* L. var. *sativus*)를 심고 그 이후부터는 대조군에는 증류수 10ml, 실험군에

는 3일에 한 번씩 세균과 황토가공소재를 처리하여 4주 후 측정하였다. 인과 황의 비율을 통일하기 위해 NP fertilizer를 3일에 한번 씩 10ml를 처리하였다.

- 결과는 대조군보다 DR1을 처리한 식물군에서 줄기의 길이가 더 길었다 (그림 3-4-24). 황토가공소재와 DR1을 같이 처리한 식물군에서는 식물의 성장이 월등히 일어난 것을 줄기 길이를 통해 알 수 있었다. 이는 DR1이 토양에 있는 디젤을 분해한 결과로 식물의 성장이 증가했으며 황토가공소재는 이러한 DR1의 성장을 촉진시키므로 더 활발한 디젤 분해가 일어났기 때문인 것으로 생각된다.

5. 황토가공소재 첨가에 의한 토양 생태계 기능 변화 연구 : 토양 마이크로코즘을 이용한 메타지놈 연구를 통한 디젤 오염 토양에서 황토가공소재에 의한 분해 효율 증가 기작 규명

- 1, 2 차년도 연구를 통해 황토가공소재에 의해 토양 생태계에서 미생물 군집 구조가 변화할 수 있음을 확인하였으며 일반적으로 폭넓은 종류의 미생물의 성장을 촉진하는 것을 확인하였다. 또한 세포 수준에서 전사체 연구를 통해 황토가공소재에 의한 유전자 발현 변화 결과를 분석하여 디젤 분해 촉진 기작을 이해하였다. 그러나 토양 환경에는 매우 다양한 종류의 생물이 존재하고 있으며 각 종의 기능과 상호작용 및 환경 요건의 변화에 의해 전반적인 생태계의 기능이 결정되는 것이기 때문에 세포 수준에서의 이해를 생태계 수준으로 확장하여 이해할 필요가 있다.
- 토양 생태계의 기능변화를 종합적으로 파악하기 위해 메타지놈 방법을 이용하였다. 메타지놈은 토양에 존재하는 모든 DNA 염기서열에 대한 정보를 얻을 수 있기 때문에 일부 기능에만 초점을 맞추던 기존 연구와 차별성을 가진다.

a

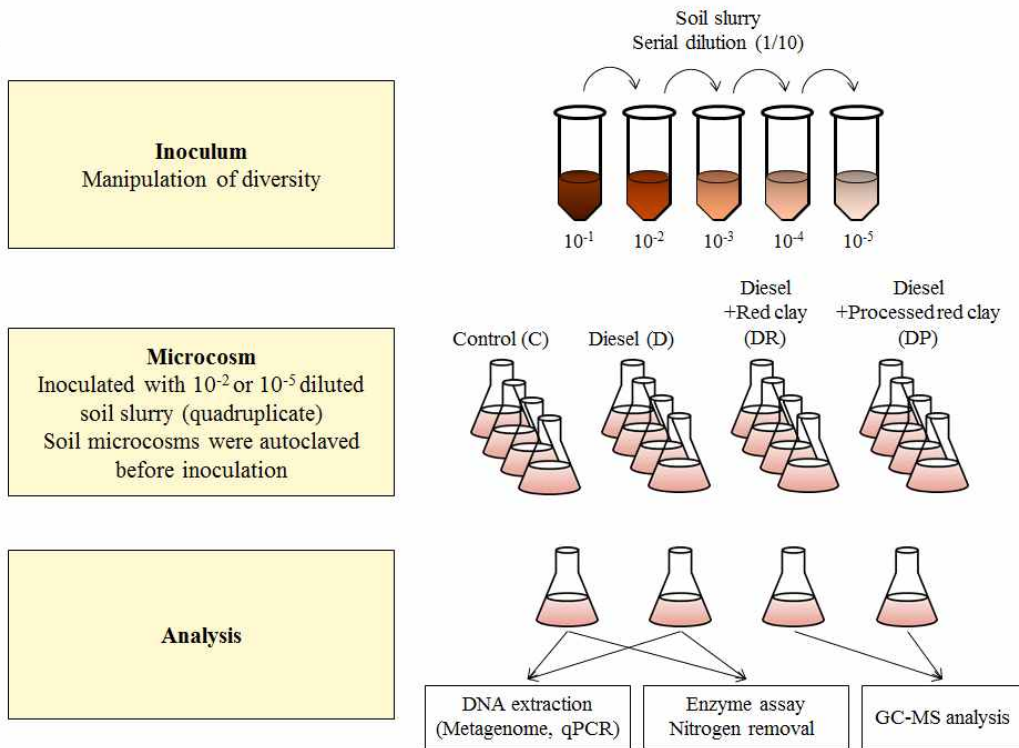
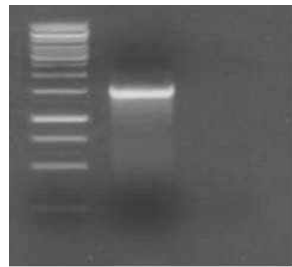


그림 3-4-25 토양 마이크로코즘에서의 메타지놈 실험 디자인

- 1차년도 연구 결과를 통해 황토가공소재의 농도에 따라 세균과 곰팡이에 미치는 영향이 다르다는 것을 이미 확인하였다. 농업 토양 생태계의 미치는 영향 평가와 함께 최적 농법을 제시하기 위해 농도 별 효과를 분석하는 것이 필수적으로 요구된다. 따라서 본 연구진은 농도에 따른 미생물 군집 변화를 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)를 통해 분석하였으며 이와 함께 토양 효소 활성을 측정하여 토양 건강성을 평가하고자 하였다. 실험에 사용한 토양은 경기도 부천에서 채취하였으며 이미 밭으로 사용되고 있는 토양이었다 (N $37^{\circ} 30' 26.44$, E $126^{\circ} 48' 39.01$). 토성은 사양토로 판별되었다. 수분함량은 30% 조건에서 실험하였으며 토양 pH는 9.44 ± 0.22 였다. 총 유기물 함량은 $13,846.15 \pm 435.14$ mg/kg 이었다.
- 황토가공소재가 토양 미생물 군집에 미치는 영향을 평가하기 위해 토양 Microcosm을 제작하였다 (그림 3-4-25). 100ml 플라스크에 밭토양 10g을 담고 Autoclave하여 멸균하고 멸균된 증류수 50ml을 넣어 soil slurry 상태를 만들었다. 밭토양 자체가 가지고 있는 유기탄소와 그 외의 무기 물질을 영양분으로 사용하여 자연 상태와 유사한 조건을 제공하기 위함이었다. 미생물 군집을 접종하기 위해 멸균하지 않은 자연상태의 토양 1g과 멸균한 증류수 10ml을 혼합하여 강하게 5분간 Vortex한 뒤 Serial dilution 하고 10^{-2} 또는 10^{-5} 으로 희석하여 토양 Microcosm에 접종하였다. 서로 다른 희석 배수를 사용하여 서로 다른 토양 미생물 군집 다양성에서 황토가공소재가 가지는 효과를 다양하게 평가하고자 하였다. 20° C에서 150rpm으로 진탕하였으며 접종 후 1일 후를 T0 으로 하여 접종된

미생물 군집이 안정화되는 시간을 주었으며 일주일 간격으로 토양 DNA를 추출하여 추가적인 실험에 이용하였다.

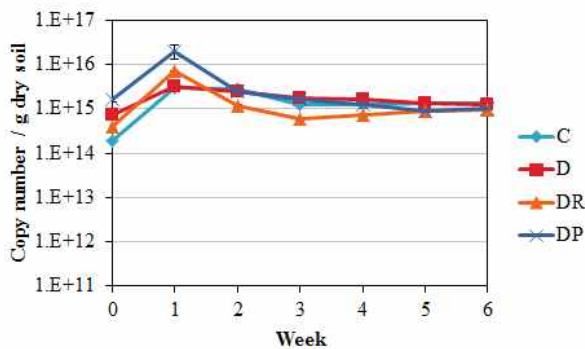


M P autoclaved soil

그림 3-4-26 멸균된 토양으로부터의 16S rRNA gene PCR 결과

○ 멸균한 토양과 Positive control인 *Acinetobacter oleivorans* DR1으로부터 16S rRNA gene을 PCR 하였을 때 DR1 균주로부터는 1.4kb 크기의 밴드가 나타났으나 멸균된 토양으로부터는 나타나지 않았다. 따라서 본 실험에서 사용한 microcosm은 멸균이 잘 이루어졌다는 것과 추후에 추출되는 DNA와 미생물 군집은 희석하여 접종한 토양 미생물 군집으로부터 동일하게 접종된 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-4-26).

b



c

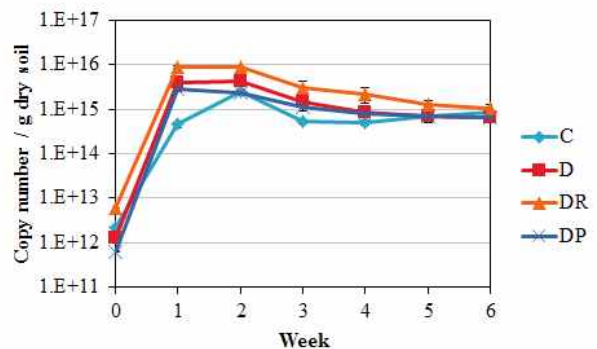


그림 3-4-27 토양 마이크로코즘 배양 기간 중 16S rRNA 유전자의 카피 수 변화

○ 메타지놈을 실시하기 이전 사전실험으로 denaturing gradient gel electrophoresis를 이용하여 토양의 미생물 군집을 모니터 하였다 (그림 3-4-27). 서로 다른 두 10^{-2} (b) 그리고 10^{-5} (c) 희석샘플에서 모두 군집의 이동의 관찰되었다. 두 샘플을 이용한 이후의 실험에서, 16S rRNA 유전자의 copy number를 통하여 정량적으로 미생물 군집을 파악하였다. 0주차의 결과에서 copy number는 각각 10^{-2} 에서 $1.88 \pm 0.14 \times 10^{14} / \text{g dry soil}$ 에서 $1.64 \pm 0.17 \times 10^{15} / \text{g dry soil}$ 의 값을, 그리고 10^{-5} 로 희석한 마이크로코즘에서 $6.30 \pm 0.26 \times 10^{12} / \text{g dry soil}$ 에서 $5.99 \pm 0.03 \times 10^{12} / \text{g dry soil}$ 사이의 값을 보였다. 이 둘의 16S RNA copy number의 차이는 10^3 으로, 초기 접종량의 차이와 일치하였다. 모든

마이크로코즘에서의 미생물 군집의 빠른 성장과 함께 16S rRNA의 값도 증가하였다. 1주차에 C5를 제외한 모든 샘플에서 가장 높은 copy number 값을 보였으며, 6주차에는 모든 샘플의 값이 약 1.0×10^{15} 로 수렴하였다. 6주차에 우리는 초기의 희석 정도의 차이가 이후 마이크로코즘의 미생물 다양성을 변화시키고 이에 따라 군집의 구조와 기능적 특징 또한 다르게 나타날 것이라고 가정하였다. 이에 따라 6주차에 모든 마이크로코즘에서 DNA를 추출하여 메타지놈 분석을 실시하였다.

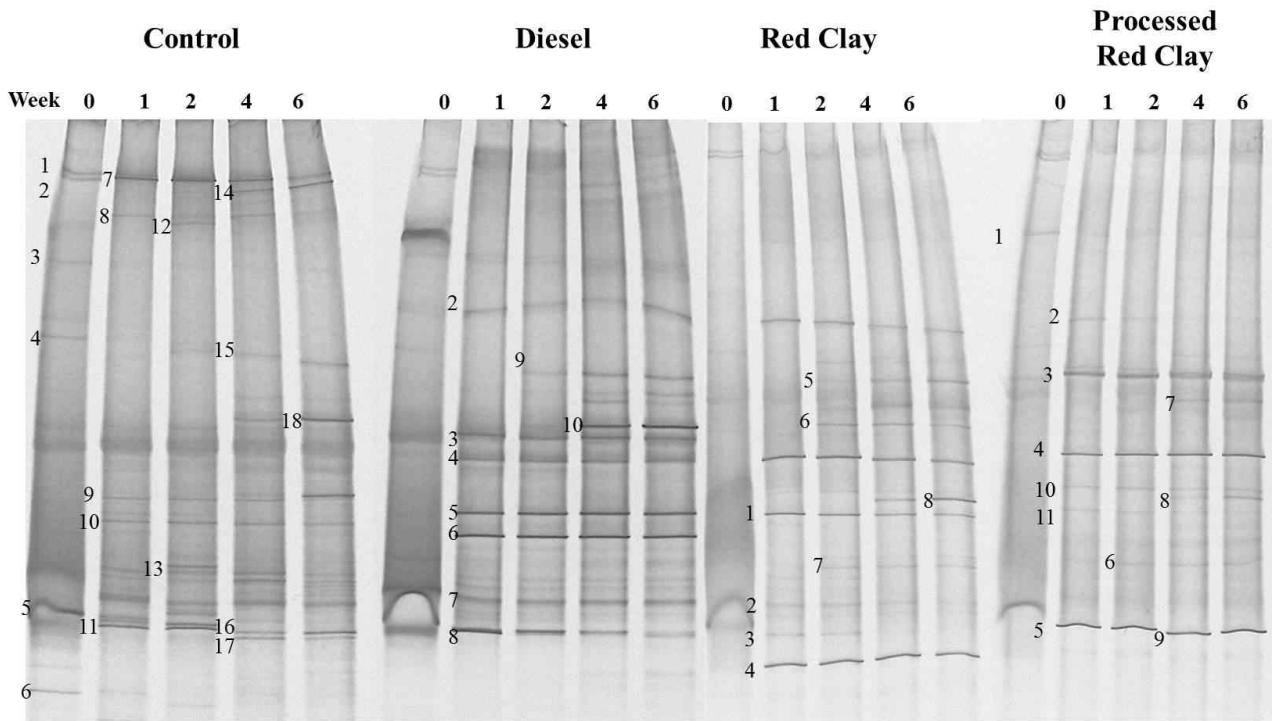


그림 3-4-28 DGGE를 이용한 디젤 오염 및 일반 황토, 황토가공소재 첨가에 따른 세균 군집 변화 모니터링

- 시간 경과에 따른 전체 세균 군집의 변화 양상을 알아보기 위해 Denaturing gradient gel electrophoresis 기법을 도입하였다. Week 0, 1, 2, 4, 6의 시간대에서 추출한 토양 DNA로부터 세균 16S rRNA gene을 증폭하였음. 프라이머는 b341 (5' -TCAGGGAGGCAGCAG-3')와 b758 (5' -CTACCAGGGTATCTAATCC-3')이 사용되었으며 forward primer인 b341의 5' 에는 GC clamp (CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCAGGGGGGCC)가 추가되었다. PCR은 토양 DNA 100ng, 프라이머 0.25 μ M, dNTP 50 μ M를 포함하는 20 μ l mixture를 이용하여 수행하였다. PCR 프로토콜은 94° C에서 1분 30초, 25 사이클의 94° C에서 45초, 55° C에서 45초, 72° C에서 45초를 사용하였고 72° C에서 10분간 final extension을 거쳤다. DGGE는 Bio-rad의 D-Code system을 이용하여 수행하였다. DGGE gel gradient는 40%-60%의 농도구배를 사용하였다. PCR product loading 후 20V에서 20분간, 70V에서 16시간동안 전기영동 하였으며 버퍼는 60° C로 유지되었다. 전기영동 후 DGGE gel은 EtBr로 10분간 염색, 10분간 탈색과정을 거친 후 UV를 통해 결과 확인하였다 (그림 3-4-28).

○ 4개 시료에서 공통적으로 Week 0에서는 진하게 관찰되는 밴드가 적었다. 희석하여 접종한 직후이기 때문에 뚜렷한 우점종이 없기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 시간이 지남에 따라 진하게 나타나는 밴드가 관찰되는데 밴드의 패턴은 처리별로 상이하게 나타나고 있다. 처리에 따라서 미생물 군집이 적응하는 양상과 미생물 간의 경쟁이 달라지기 때문에 우점하는 종도 다르게 나타나는 것으로 생각된다. DGGE의 밴드는 크게 세 종류로 나누어 볼 수 있음. 1) 배양 기간에 관계없이 밴드의 진하기가 일정하게 유지되는 경우. (밴드 3, 4, 5, 6) 2) 배양 시간이 경과할수록 밴드가 더 진해지는 경우 (5, 8, 9) 3) 초기에는 진하게 관찰되지만 시간이 지날수록 흐려지거나 사라지는 경우 (2, 8) 배양 시간이 경과할수록 세균간의 경쟁에서 밀리거나 자원 이용, 환경으로부터의 스트레스, 독성 등에 적응하지 못하여 점차 줄어들어 가는 개체군으로 여겨진다.

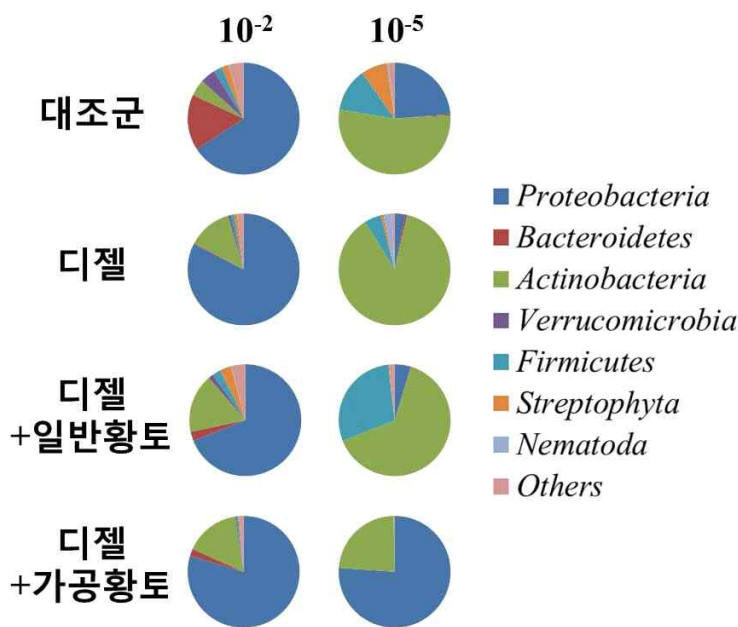


그림 3-4-29 메타지놈의 ribosomal RNA 유전자 기반으로 한 미생물 군집 분석결과 (phylum)

○ 메타지놈 시퀀싱 데이터로부터 ribosomal RNA 유전자 시퀀스만을 따로 분리하여 군집 구조를 분석하였다. 10⁻² 희석 접종 시료에서는 처리에 관계없이 *Proteobacteria*가 55%~72%로 최고 우점종이었다. 그 외에 *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* 등이 많이 존재하며 분류상 정보를 확인할 수 없는 신종 세균도 최대 19% 존재하였다 (그림 3-4-29). 디젤 첨가에 의해서는 *Proteobacteria*의 풍부도가 59%에서 72%로 급격히 증가하였으며 반면 *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*의 풍부도는 1% 미만으로 감소하였다. *Actinobacteria*는 4.2%에서 11.1%로 소폭 상승하였다. 일반적으로 영양이 풍부한 토양에서는 *Proteobacteria*의 우점이 흔하게 발견되고 있으며 앞서 연구한 매월 황토가공소재 처리 토양에서도 같은 현상을 보고하였다. 본 결과에서도 이런 결과들과 일치하며 *Proteobacteria*가 대조구 조건과 디젤과 같이 오염이 발생한 환경에서 뛰어난 성장을 보이며 중요한 역할을 하고 있을 것으로 생각된다.

- 그러나 일반 황토 처리에 의해서는 *Proteobacteria*의 비율은 그대로 유지되는 반면 *Actinobacteria*의 비율이 4.2%에서 13.7%로 상승하였다. 디젤 처리에 의해서도 *Actinobacteria*의 비율이 상승하였지만 일반 황토 처리에서는 더 큰 증가폭을 관찰할 수 있었다. 황토가공소재 처리에 의해서는 디젤 처리와 일반 황토 처리의 효과가 복합된 것과 같은 효과가 나타났는데 즉, *Proteobacteria*의 비율이 72.1%로 증가하고 *Actinobacteria*가 14.3%로 증가하였다. 황토가공소재 처리에 의해서 그 외의 *Bacteroidetes*는 1.9%로 감소하였으며 그 외의 phylum 들은 모두 1% 이하로 존재하고 있었다.
- 희석 접종에 의해 군집 다양성이 감소할 경우 *Actinobacteria*가 최고 우점문 (phylum)으로 나타났다. 대조군 토양, 디젤 처리, 디젤+일반황토 처리 시료의 군집에서 각각 53.6%, 87.5%, 64.2%를 차지하고 있었다. 디젤 처리는 특히 *Actinobacteria*의 우점 성향을 강화시키는 것으로 생각되는데 *Actinobacteria*를 제외한 나머지 모든 문의 합이 12.5% 만을 차지하고 있었다. *Firmicutes* 는 대조군 토양에서 희석접종에 의해 2.4%에서 12.6%로 5.2 배 증가하고 디젤+일반황토처리에 의해서는 29.2%로 크게 증가하였다. 가장 주목되는 현상은 희석접종 시료의 디젤+황토가공소재 처리 시료인데 *Proteobacteria*가 76.1%, *Actinobacteria*가 23.6%의 풍부도를 보이며 그 외의 모든 phyla의 합이 0.3%에도 미치지 못하는 현상을 나타내었다. 이 시료에서는 *Actinobacteria* 도 증가하였지만 *Proteobacteria*의 우점이 유지된 것이 다른 시료와 구별되는 특징으로 보인다.

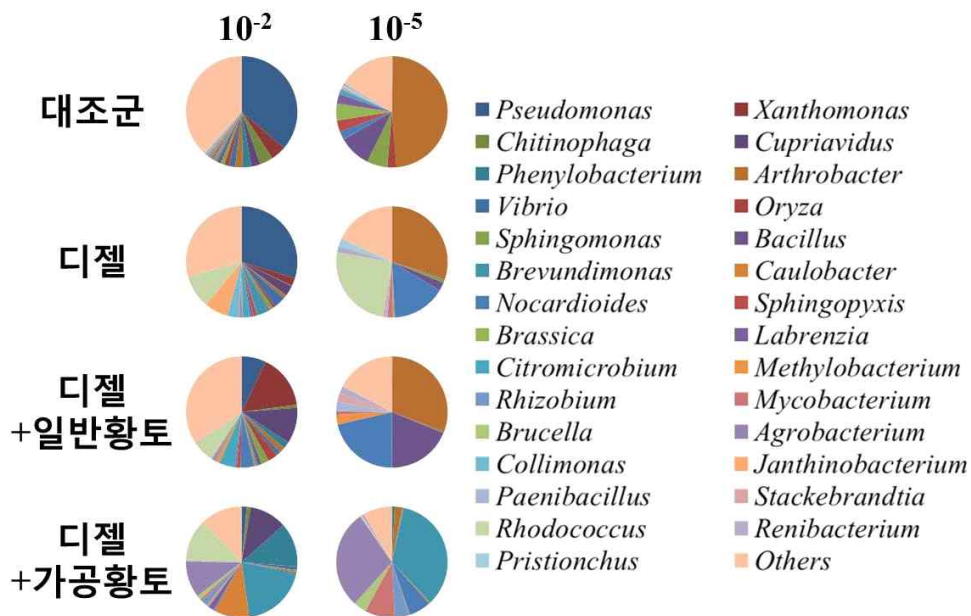


그림 3-4-30 메타지놈의 ribosomal RNA 유전자 기반으로 한 미생물 군집 분석결과 (genus)

- 메타지놈 군집 구조 분석은 phylum 이하 class, order, family, genus 모든 단계에서 수행되었으나 실제 실험 분석에 활용할 구체적인 데이터 활용을 위해 genus 단계 분석결과를 제시하였다 (그림 3-4-30). 10^{-2} 희석 접종한 대조군 토양 군집은 *Pseudomonas*가 36.2%로 우점하고 있었으며 *Xanthomonas* 등 genus가 각각 5% 미만으로

존재하였다. 디젤이 처리될 경우 *Rhodococcus*가 9.5%로 증가하는 특징이 있었다. 디젤+일반 황토 처리에서는 *Pseudomonas* 는 7.0%로 감소하는 대신 *Xanthomonas*, *Cupriavidus*, *Rhodococcus*가 각각 15.8%, 10.4%, 6.1%로 증가하였다. 일반황토 대신 황토가공소재가 첨가될 경우 *Brevundimonas*가 19.4%로 최고 우점속이 되었고 *Cupriavidus* (10.8%), *Phenylobacterium* (12.8%), *Caulobacter* (10.2%), *Agrobacterium* (10.6%), *Rhodococcus* (12.2%)로 고르게 분포하였다. 즉, 일반황토나 황토가공소재가 처리되지 않은 대조군 토양과 디젤 오염 토양의 군집은 *Pseudomonas* 의 우점이 공통적으로 관찰되지만 일반 황토나 황토가공소재는 각각 독특한 속의 생장이 관찰되었다.

- 10^{-5} 희석 접종한 대조구 토양 시료의 미생물 군집은 *Arthrobacter* 가 48.4%를 차지하였으며 같은 시료의 phylum 분석에서 *Actinobacteria*가 크게 증가한 것은 *Arthrobacter*의 증가로 인해 설명할 수 있었다. 그 외에도 *Bacillus* 가 9.4%의 풍부도를 나타냈고 그 외의 5% 미만의 많은 genus가 존재하였다. 디젤 첨가된 시료에서는 *Arthrobacter*는 최고 우점 속이었으나 그 풍부도가 29.6%로 감소하였고 대신 *Rhodococcus* (25.2%), *Nocardioides* (15.5%)의 풍부도가 증가하였다. 디젤+일반황토 시료에서 *Arthrobacter*는 30.4%로 디젤 첨가 시료에서와 비슷한 수준을 보였으나 *Rhodococcus*가 2.1%로 감소하고 대신 *Bacillus* (18.9%)와 *Nocardioides* (21.3%)가 높은 풍부도를 나타내었다. 디젤+황토가공소재 처리시료에서는 *Brevundimonas* 가 34.5%로 우점하는 독특한 패턴을 나타냈다. *Brevundimonas*는 10^{-2} 희석 접종한 디젤+황토가공소재 시료에서 비교적 높은 우점도를 나타낸 *Caulobacter*와 같은 family 라는 것이 흥미로운 사실이다. 그 외에 *Agrobacterium* 28.7%, *Mycobacterium* 8.8%의 풍부도를 나타내었다.

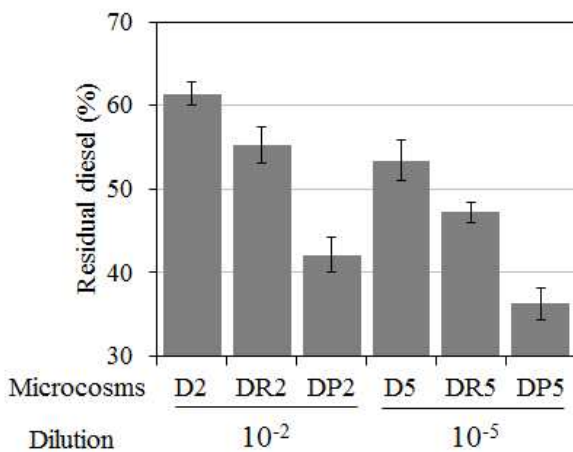


그림 3-4-31 토양 마이크로코즘 6주 배양 후 디젤 잔류량 비교

- 토양 마이크로코즘 6주 배양 후 잔류 디젤량을 Gas chromatography-Mass spectrometer (GC-MS)로 분석하였다. 그 결과 디젤만 존재할 때 보다 일반 황토를 처리하였을 때 디젤 분해 효율이 더 증가하는 것을 확인하였으며 황토가공소재가 첨가되면 그것보다 더 분해 효율이 증가하는 것을 확인하였다 (그림 3-4-31). 같은 처리가 되었지만 다양성이 다른 두 가지 시료를 비교하여 보았을 때 다양성이 더 낮은 10^{-5} 희석 시료에서 더 많은 디젤이

분해된 것을 확인할 수 있었다.

- 디젤 처리 6주 경과 후 디젤의 잔여 농도를 분석한 결과 다양성이 높은 군집보다 낮은 군집에서 일반 황토 및 황토가공소재 처리 시 alkane 분해가 증가하였다 (그림 3-4-32). Alkane oxidation에 관여하는 alkane monooxygenase, cytochrome P450, alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase 효소의 유전자 풍부도 분석 결과 alkane monooxygenase 유전자의 경우 낮은 다양성을 보이는 군집에서 2.1~13.1 배 풍부도가 높게 나타났으며, cytochrome P450 유전자 풍부도는 diesel을 처리한 조건을 제외하고는 큰 차이를 보이지 않았다. Alkane monooxygenase 와 cytochrome P450 유전자는 *Actinobacteria*로부터 유래된 것으로 보이며, genus수준에서는 *Rhodococcus*, *Nocardioides*, *Gordonia*로부터 유래된 것으로 보인다. 이러한 결과는 다양성이 낮은 군집에서 *Actinobacteria*가 주로 존재하고 있는 반면, 높은 다양성을 보이는 군집에서는 *Proteobacteria*가 일반적으로 존재하고 있다는 이전의 군집 분석의 결과와 일치한다. 따라서 낮은 다양성을 보이는 군집에서 증진된 alkane 분해는 *Rhodococcus*, *Nocardioides*, *Gordonia* specie의 alkane monooxygenase의 증가 때문일 것이라고 판단된다.

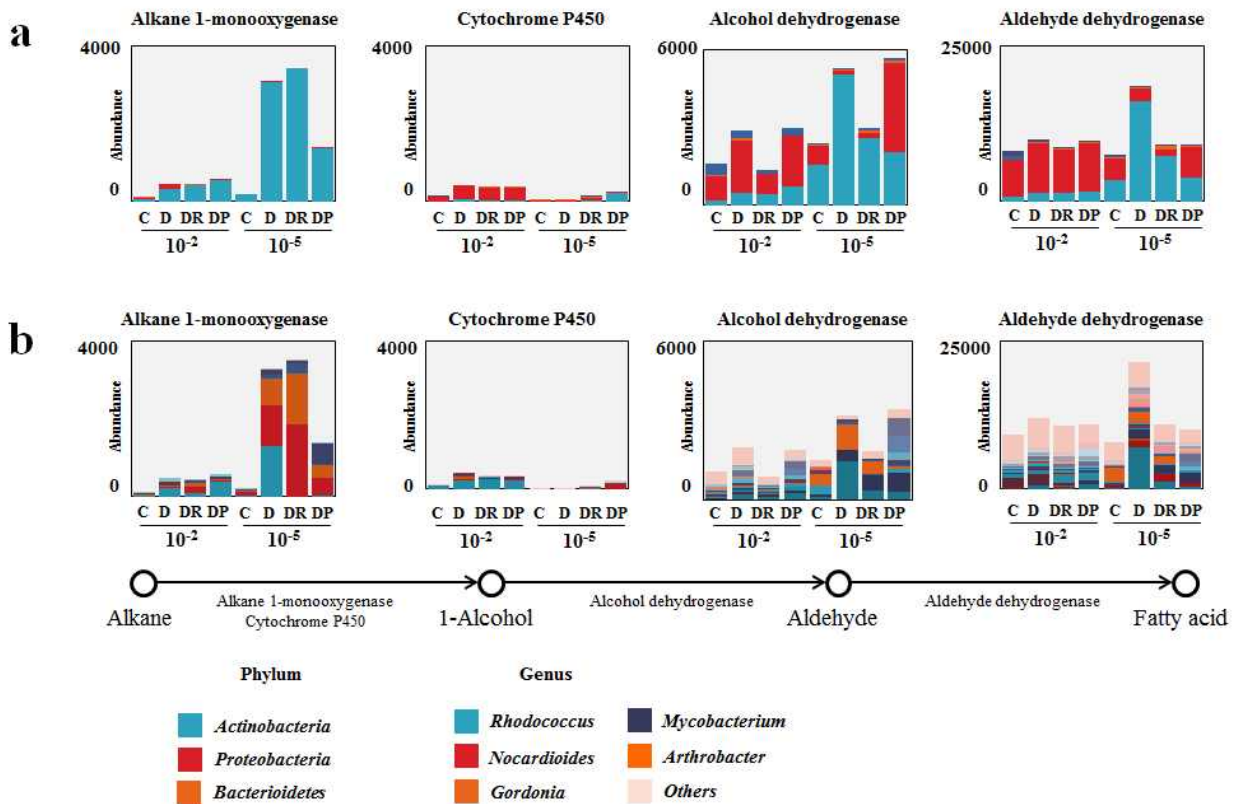


그림 3-4-32 Alkane 분해 관련 유전자의 풍부도 및 군집 조사

- 질소 순환은 중요한 생지화학적 순환의 한 가지이며 그 중에서도 탈질화 작용은 세균에 의해서만 일어나고 있기 때문에 미생물학적 측면에서의 분석이 중요하다. 또한 질소는 식물 성장에 중요한 요소 중 하나이기 때문에 비료의 주요 성분으로 사용되기도 한다. 탈질화

작용은 농업 토양에서 질소 비료의 손실이 일어나는 가장 큰 원인으로 손꼽히고 있으며 지하수로 과량이 흘러들어갈 경우 지하수 오염을 일으키고 보건적으로 문제를 야기할 수 있다. 최근에는 탈질화과정에서 발생하는 아산화질소 (N₂O)가 중요한 온실 가스 중에 하나로 떠오르면서 탈질화 작용 및 조절 기작에 대한 관심도 높아지고 있는 실정이다.

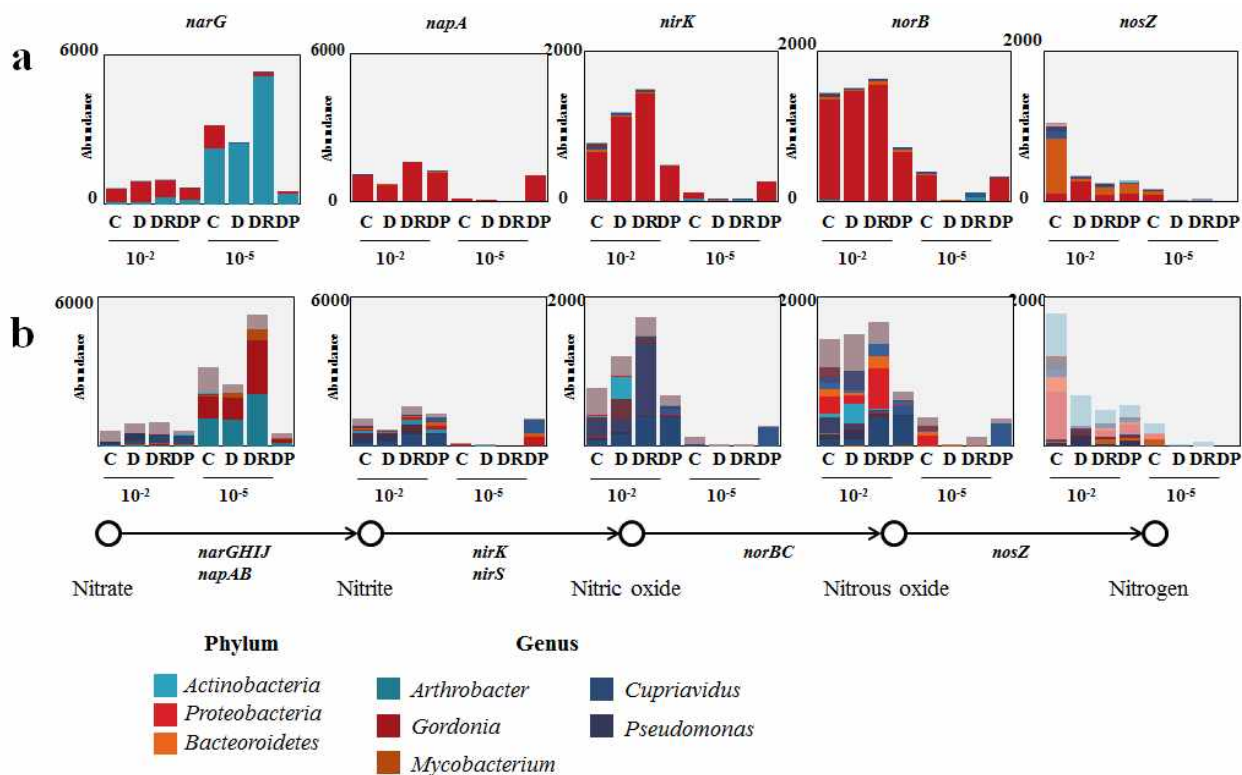


그림 3-4-33 탈질화 관련 유전자의 풍부도 및 군집 분석

○ 본 메타지놈 연구에서도 이러한 질소 순화 과정 유전자의 풍부도의 변화를 살펴보고 황토 가공 소재가 토양에 처리될 경우 발생할 수 있는 생태계 기능상의 변화를 알아보려고 하였다. 질소 순화 과정 중에서 질소 소정 및 질산화 작용 관련 유전자는 풍부도가 매우 낮게 측정이 되어서 디젤 오염이나 황토가공소재처리, 다양성 변화에 의한 변화 자체를 감지할 수가 없었다. 그러나 탈질화 과정에 관여하는 유전자의 풍부도는 급격하게 변화하였다 (그림 3-4-33). nitrate reductase (*narG*)는 낮은 다양성 시료에서 그 풍부도가 5배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었으나 디젤이나 황토가공소재 등 처리 조건에 의한 변화는 뚜렷하지 않았다. 단 황토가공소재를 처리한 10⁻⁵ 희석 접종 시료에서는 그 풍부도가 거의 변하지 않았다. *narG*와는 달리 *napA* (nitrate reductase), *norB* (nitrite reductase), *nosZ* (nitrous oxide reductase) 유전자들은 다양성이 감소하였을 때 공통적으로 크게 감소한 것을 알 수 있었다. 결론적으로 디젤 오염, 일반황토 또는 황토가공소재 처리에 의해서도 탈질화 과정에 관여하는 유전자의 풍부도가 변화하지만 토양 미생물의 군집 다양성의 변화가 더 크게 작용하는 요소임을 보여주는 결과이다.

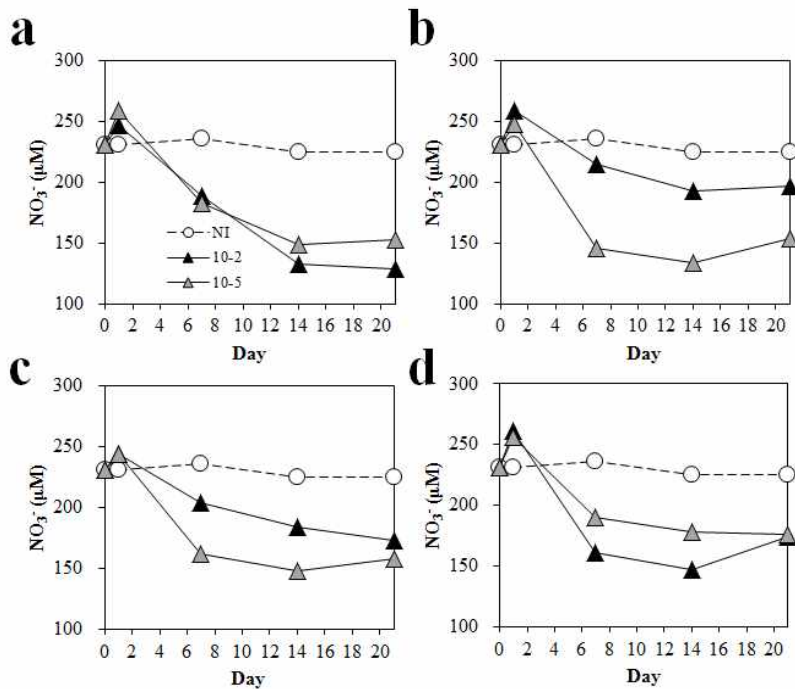


그림 3-4-34 디젤, 일반황토와 황토가공소재 조건에서 성장한 서로 다른 다양성의 미생물 군집에 의한 Nitrate 제거 실험 (a) Control (b) Diesel (c) Diesel + Red clay (d) Diesel + Processed red clay

○ 탈질화 과정 관련 유전자의 풍부도와 군집이 토양 미생물 다양성의 변화에 따라 크게 변화한 것을 확인한 후 이것이 실제 토양 중 탈질화 과정의 변화로 이어지는 지 확인하기 위해서 토양 슬러리 마이크로코즘에 각 미생물 군집을 접종한 후 과량의 nitrate가 제거되는 양상을 Ion chromatography로 확인하였다 (그림 3-4-34). 그 결과 Control과 디젤+황토가공소재 조건에서는 미생물 다양성과 관계없이 nitrate가 비슷한 속도로 감소하였지만 디젤 처리와 디젤+일반 황토 처리에서는 메타지놈 분석 결과와 유사하게 높은 *narG* 풍부도를 가진 미생물 군집에 의해서 nitrate가 빠르게 감소하였다. 즉, 메타지놈 분석 결과와 실제 nitrate 제거 실험 결과가 일치하는 것으로 보인다. 그 외에 탈질화 과정에 대한 실험적인 분석은 이루어지지 않았으나 메타지놈 분석 결과로 미루어 볼 때 미생물 다양성 감소에 의해 nitrate reduction을 제외한 탈질화 과정에서 큰 감소를 나타내는 것으로 여겨진다.

6. 황토가공소재 농법 제시를 위한 농도 별 토양 미생물 및 토양 효소 활성에 미치는 영향 연구

가. 황토가공소재 농도 별 처리에 의한 토양 미생물 생균 수 변화

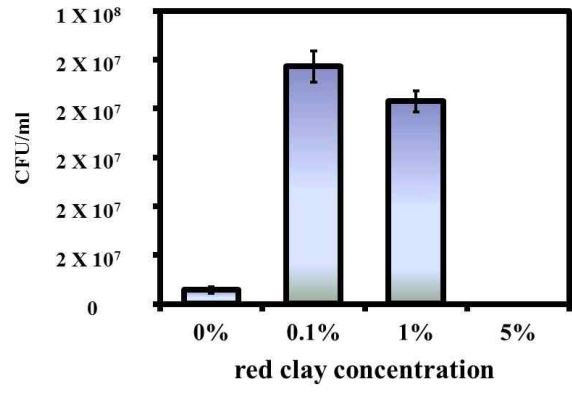


그림 3-4-35 황토가공소재 농도에 따른 생균 수 변화

○ 그림 3-4-35에서 알 수 있듯이 1000X 와 100X 희석 황토가공소재 처리에서는 생균수가 2×10^7 CFU/ml 까지 증가하였다. 그러나 5% 까지 높은 농도로 황토가공소재를 처리하였을 때 생균수가 관찰되지 않았다. 낮은 농도의 황토가공소재처리는 미생물 성장을 촉진 시키는 효과가 있는 것은 본 연구진의 Microbial Ecology 2014년도 논문과 특허에서도 알려진 바가 있으며 이런 현상은 반복적으로 관찰되고 있다. 따라서 황토가공소재는 낮은 농도 (<1%) 수준에서 사용하는 것이 토양 미생물 활성화에 도움이 되며 5% 정도의 높은 농도는 오히려 미생물 성장에 독성이 미치고 나아가서 농업 환경개선에 도움이 되지 않을 가능성이 있다.

나. 황토가공소재 농도 별 처리에 의한 토양 미생물 군집 구조 변화

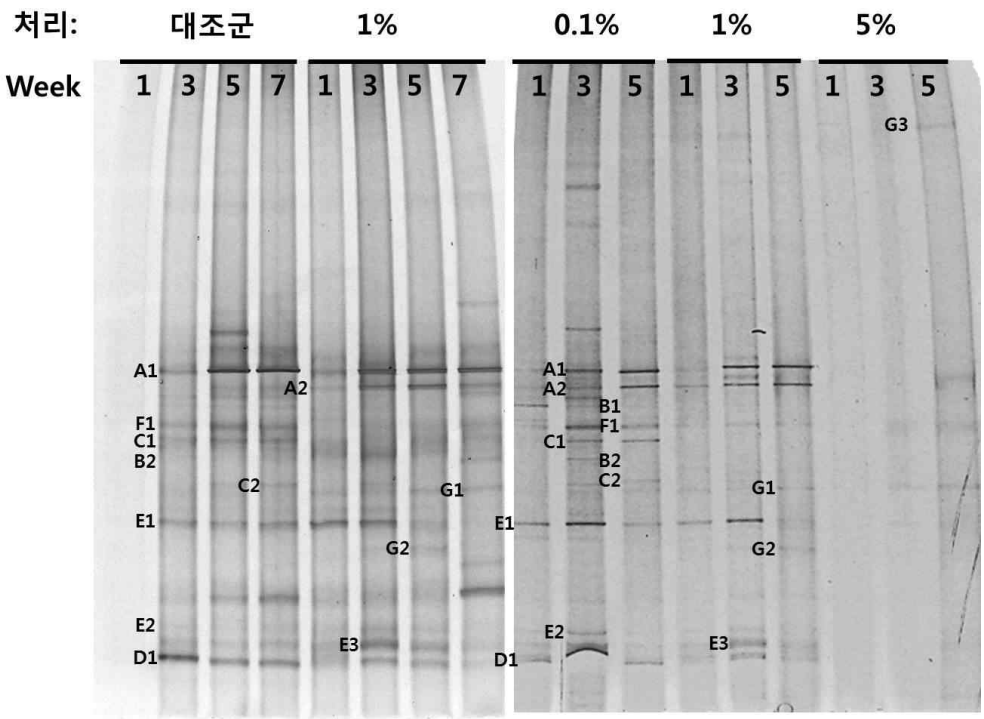


그림 3-4-36 DGGE를 이용한 황토가공소재 농도별 세균 군집 변화 연구

○ 황토가공소재 농도에 따라 변화하는 균집은 DGGE를 이용하여 모니터링 하였다 (그림 3-4-36). 풍부도의 증감에 따라 다음과 같은 패턴이 관찰되었다.

- A: 대조군, 황토가공소재 차이 없이 증가.
- B: 대조군, 1000X에만 존재하면서 사라짐
- C: 대조군, 1000X에만 존재하면서 증가
- D: 대조군, 1000X, 100X에서 등장해서 3주에서 가장 높다가 감소
- E: 1000X, 100X 에서 등장해서 3주에 가장 높다가 감소, 대조군에선 연합
- F: 대조군, 1000X에서는 높아졌다가 사라지지만 1,5에서는 서서히 등장
- G: 100X 혹은 20X에만 존재하고 천천히 많아짐.

○ DGGE 분석 결과를 생균수 측정 결과와 함께 고려하면 황토가공소재 농도에 따라 세균 수 뿐만 아니라 균집의 구조에도 영향을 미칠 수 있다는 것을 보여주는 결과이다. 특히 5%에서는 생균수도 측정되지 않았고 DGGE 밴드도 관찰되지 않았기 때문에 미생물에 독성작용을 일으키는 농도로 여겨진다.

다. 토양 효소 활성에 미치는 황고가공소재의 농도 별 영향.

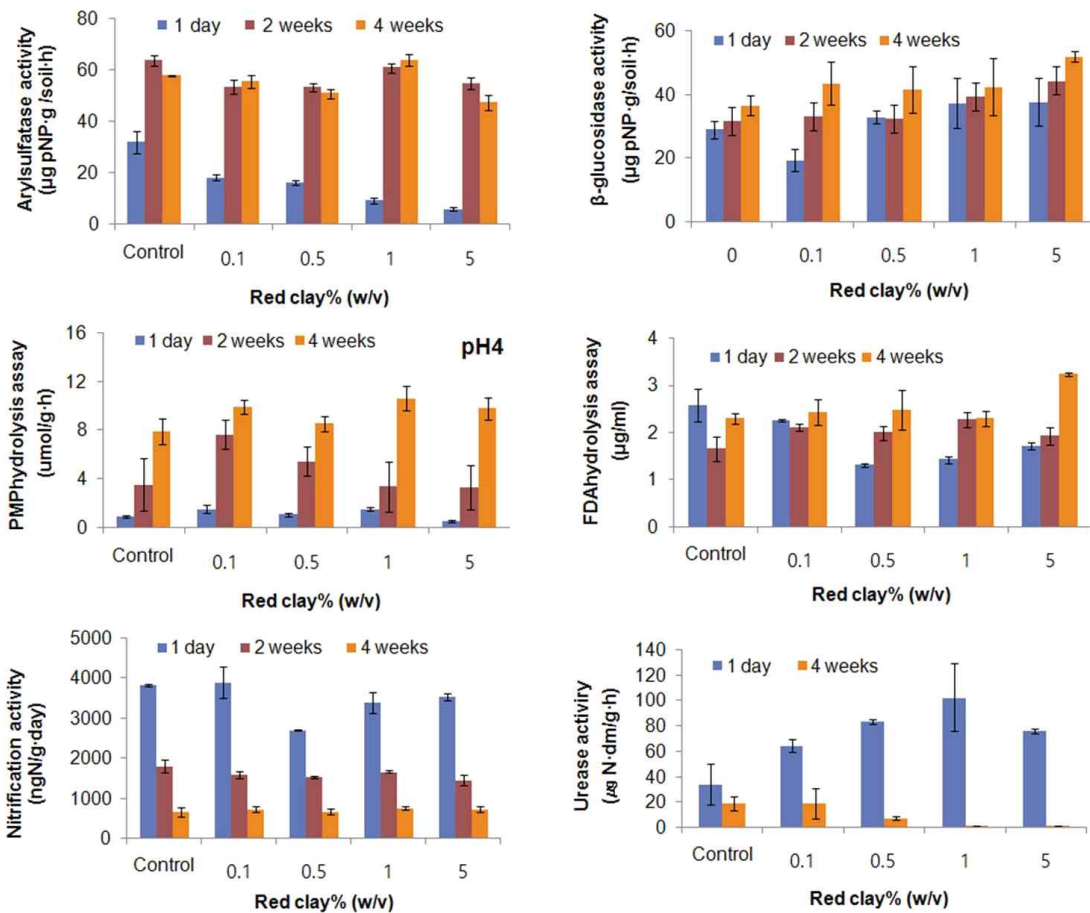


그림 3-4-37 황토가공소재 처리토양에서의 6개 토양 효소 측정을 이용한 토양 건강성 평가

- 황토가공소재를 다양한 농도로 처리하고 토양에서 발생하는 효소 활성의 변화를 측정하였다. 일반적으로 황토가공소재 처리에 의해 활성이 증가하는 효소로는 β -glucosidase, phosphomonoesterase, urease 인 것으로 생각된다 (그림 3-4-37). 그러나 독성 효과가 되는 지점이 Slurry type과 soil type microcosm 사이의 차이가 보이며 토양에서 20X 황토가공처리의 경우는 독성 미미하게 관찰되었다. 즉, 식물 영양분 순환에 관련하는 대표적 효소 활성은 황토가공소재 처리에 의해 그 활성이 변화할 수 있지만 전체적으로 통일되는 경향이 나타나지는 않는 것으로 보이며 토양 조건에 따라 크게 영향 받을 수 있음을 시사한다. 따라서 다양한 종류의 토양에서 황토가공소재의 효과를 추가적으로 검증할 필요가 있을 것으로 생각된다.
- 식물 성장 촉진 기능을 가지는 효소 보유 균주를 20여개 이상 확보하였다. 현재 각 균주의 특성에 대한 논의가 진행되고 있으며 전반적인 토양 효소 활성 변화와 연계하여 추가적인 분석이 진행될 예정이다.

제 5 절 황토가공나노신소재 장어/농산물의 기능성 평가 및 가공식품 개발

1. 황토가공소재 적용 장어

가. 일반성분분석(8-10)

표 3-5-1. 장어의 일반성분 분석

항목	시료	
	무처리	황토
수분함량 (%)	65.94±0.55 a	62.92±1.29 a
조단백(%)	15.93±2.89 a	19.16±1.05 a
조지방 (%)	12.57±0.85 a	11.52±0.76 a
조회분 (%)	1.01±0.04 a	1.07±0.01 a

*평균값±표준오차, Values sharing the same letters are not significantly different at p<0.05.

일반성분 분석 결과 수분함량, 조단백, 조지방, 조회분에 대해 대조군, 비교군 간 유의적 차이가 발견 되지 않았다. 이는 황토처리 유무가 장어의 일반성분에는 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

나. 유변물성 분석

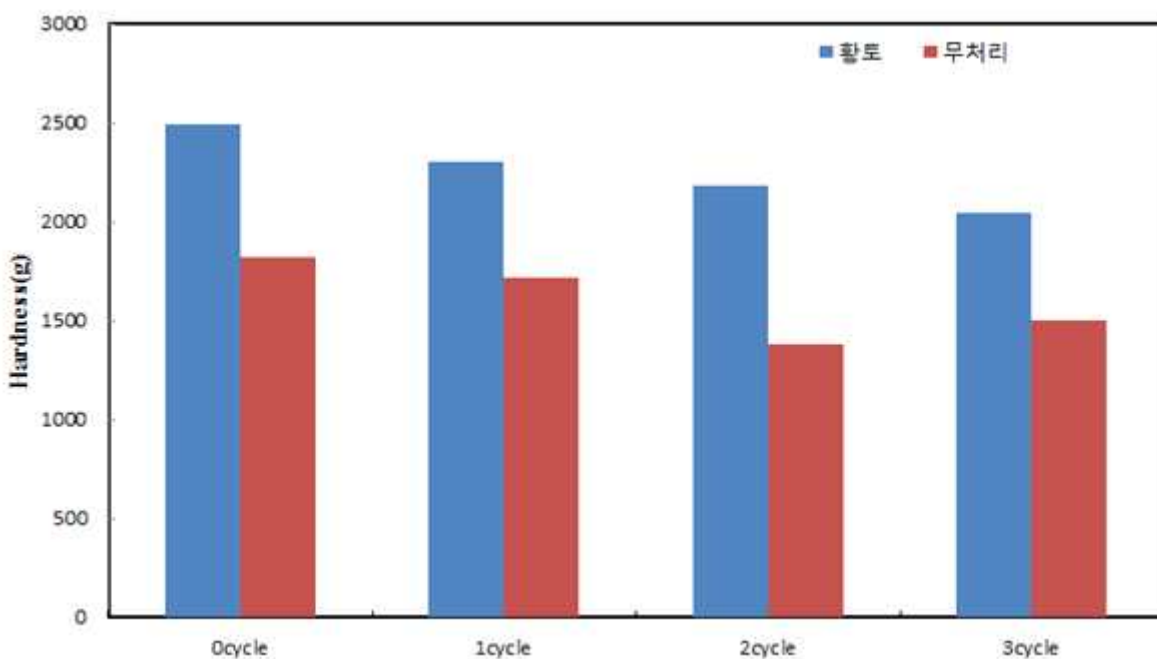


그림 3-5-1. 저장기간이 장어의 견고성 조직감 품질에 미치는 영향

황토가공소재 처리한 장어는 무처리 장어에 비해 견고성이 높게 나타났으며 냉해동 cycle이 증가할 수록 일정하게 감소한 반면 무처리 장어는 황토가공소재처리 장어에 비해서 견고성이 매우 약하게 나타났으며, 특히 2 cycle에서 급격히 견고성이 감소하여 처리구 장어에 비해 불안정한 조직감을 나타내었다.

표 3-5-2. 저장기간에 따른 장어의 견고성(g) 조직감 변화

시료	저장기간			
	0 cycle	1 cycle	2 cycle	3 cycle
황토	2490±232*	2301±118	2184±136	2045±261
무처리	1822±20.0	1716±16.4	1385±30.9	1505±67.2

*평균값±표준오차

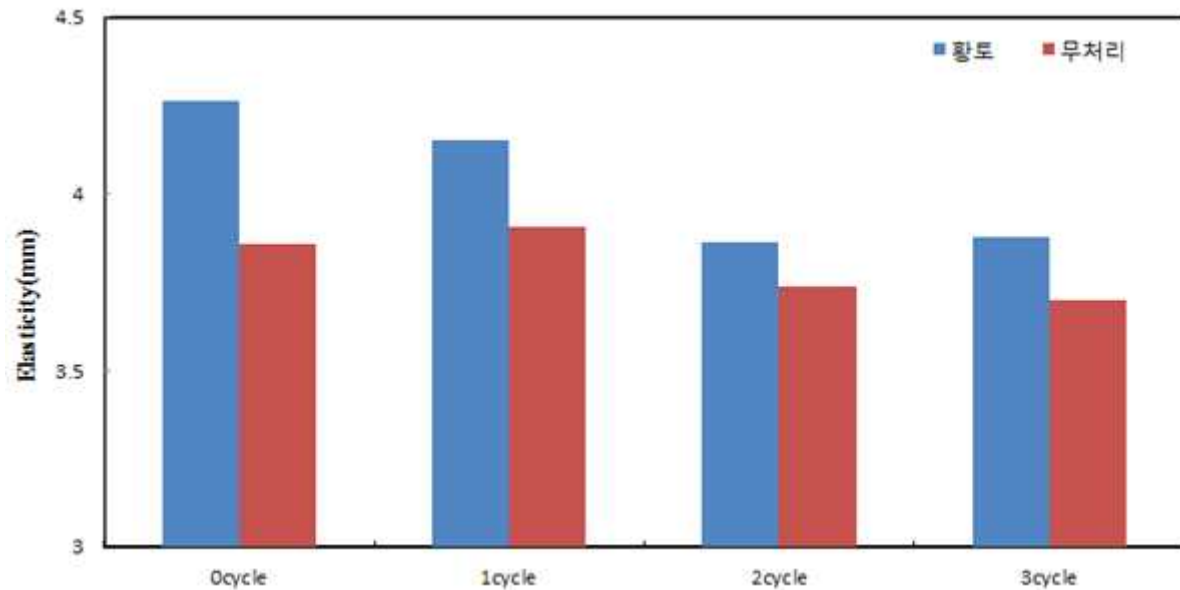


그림 3-5-2. 저장기간이 장어의 탄력성 조직감 품질에 미치는 영향

황토가공소재 처리한 장어의 탄력성이 무처리 장어보다 매우 높은 수치를 보여 주었고, 냉해동 cycle이 증가함에 따라 감소하였으며, 특히 2 cycle 이후부터 급격히 감소하는 경향을 보여주었다. 따라서 황토가공소재 처리 장어가 일반 장어에 비해 탄력성이 매우 높았으며 냉해동 1 cycle이전까지 높은 탄력성을 유지함을 알 수 있다.

표 3-5-3. 저장기간에 따른 장어의 탄력성(g) 조직감 변화

시료	저장기간			
	0 cycle	1 cycle	2 cycle	3 cycle
황토	4.26±0.16*	4.15±0.05	3.86±0.07	3.87±0.05
무처리	3.85±0.04	3.90±0.05	3.74±0.11	3.70±0.05

*평균값±표준오차

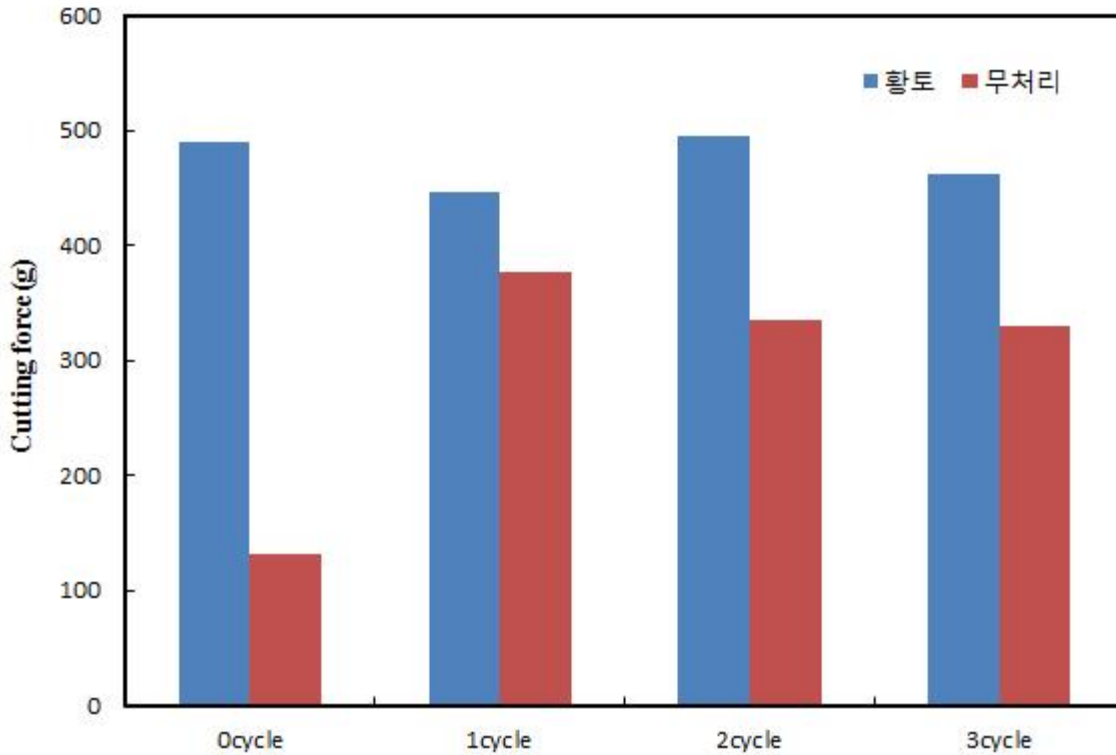


그림 3-5-3. 저장기간이 장어의 절단강도에 미치는 영향

냉해동 처리 이전 시료인 경우 황토가공소재 처리 장어가 일반장어에 비해 절단강도가 매우 크게 나타났으며, 냉해동 cycle이 증가함에 따라 절단강도 수치가 큰 변화 없이 일정하게 높은 수치를 나타냄. 따라서 황토가공소재 처리 장어는 일반장어에 비해 신선 또는 장기간 냉동 상태에서도 일정한 조직감 품질을 유지함을 알 수 있다.

표 3-5-4. 저장기간에 따른 장어의 절단강도(g) 변화

시료	저장 기간			
	0 cycle	1 cycle	2 cycle	3 cycle
황토	489±2.71*	447±2.62	494±4.21	462±36.7
무처리	199±11.2	377±21.0	335±22.1	309±21.6

*평균값±표준오차

다. 항산화분석(13-17)

표 3-5-5. 장어시료의 DPPH radical scavenging activity (mg/mL)

시료	DPPH radical scavenging activity (mg/ml)	
	무처리	황토
장어	7.56±0.15 a	6.56±0.16 b

평균값±표준오차; Values sharing the same letters are not significantly different at p<0.05.

표 3-5-6. 장어시료의 FRAP value

시료	FRAP value (MFeSO ₄ /g)	
	무처리	황토
장어	0.88±0.001 b	0.97±0.002 a

*평균값±표준오차; Values sharing the same letters are not significantly different at p<0.05.

○두 종류의 항산화 실험에 있어서 황토가공소재 처리 장어가 무처리 장어에 비해 유의적으로 높은 항산화활성을 보였으므로 장어시료에 있어서 황토가공소재 처리구에 대한 항산화활성 능력이 높다고 판단된다. 따라서, 황토가공소재를 처리한 장어의 경우 기능성이 강화된 고부가가치의 제품으로 개발이 가능하다고 할 수 있다.

라. 영양성분분석 (11-12)

표 3-5-7. 장어시료의 비타민 및 미네랄

항목	단위	무처리	황토
비타민A	$\mu\text{g RE}/100\text{g}$	$1498.79 \pm 39.38^1 \text{ a}$	$1680.12 \pm 35.43\text{a}$
비타민B1	mg/100g	$0.44 \pm 0.005\text{a}$	$0.40 \pm 0.025\text{a}$
비타민B2	mg/100g	$0.14 \pm 0.002\text{a}$	$0.11 \pm 0.006\text{b}$
나이아신	mg/100g	$8.06 \pm 0.06\text{b}$	$8.96 \pm 0.04\text{a}$
비타민E	mg/100g	$3.16 \pm 0.06\text{b}$	$10.37 \pm 0.29\text{a}$
인	mg/100g	$231.65 \pm 2.17\text{a}$	$204.79 \pm 15.37\text{a}$
칼슘	mg/100g	$106.04 \pm 9.13\text{a}$	$131.67 \pm 1.25\text{a}$
칼륨	mg/100g	$235.59 \pm 1.45\text{a}$	$221.80 \pm 6.56\text{a}$
철	mg/100g	$0.57 \pm 0.002\text{a}$	$0.36 \pm 0.02\text{b}$
나트륨	mg/100g	$58.60 \pm 0.17\text{a}$	$54.10 \pm 1.29\text{a}$

*평균값±표준오차, Values sharing the same letters are not significantly different at $p < 0.05$.

황토가공소재를 처리한 장어의 경우 무처리 장어 대비 나이아신과 비타민E의 함량이 유의적으로 높게 나타났다. 특히, 비타민E의 경우 무처리 장어 대비 약 3배 이상이 함유되어 있어 항산화 기능이 우수함이 증명되었다. 상기 항산화 실험 결과와 유사한 경향을 나타냈다. 실험구의 Riboflavin함량은 $0.11 \pm 0.006\text{mg}/100\text{g}$ 이며 대조구는 $0.14 \pm 0.002\text{mg}/100\text{g}$ 으로 대조구에 비해 실험구의 Riboflavin함량이 유의적으로 낮게 측정되었다. 반면, Niacin은 실험구에서의 함량은 $8.96 \pm 0.04\text{mg}/100\text{g}$, 대조구에서의 함량은 $8.06 \pm 0.06\text{mg}/100\text{g}$ 으로 실험구에서 더 높은 함량을 지닌 것으로 측정되었으며 Tocopherol은 실험구에서 $10.37 \pm 0.29\text{mg}/100\text{g}$, 대조구에서 $3.16 \pm 0.06\text{mg}/100\text{g}$ 으로 나노 황토가공 처리를 한 시료에서 약3배 이상의 Tocopherol함량이 측정되었다. Tocopherol은 천연 항산화제로 인체에 유용한 물질로 알려져 있으므로 대조구에 비해 나노 황토가공 처리를 한 장어시료에서 더 높은 항산화력이 측정될 것으로 판단된다. 장어시료의 무기성분은 대조구 대비 실험구의 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

표 3-5-8. 장어시료의 아미노산 조성

아미노산(mg/100g)	약자	대조구	실험구
Aspartic acid	ASP	744.231	641.301
Threonine	THR	317.694	270.715
Serine	SER	354.562	289.650
Glutamic acid	GLU	1147.409	970.435
Proline	PRO	510.068	420.493
Glycine	GLY	798.414	679.655
Alanine	ALA	707.138	595.886
Cystine	CYS	153.495	166.480
Valine	VAL	405.673	357.277
Methionine	MET	252.788	222.712
Isoleusine	ILE	345.821	294.968
Leusine	LEU	595.650	520.166
Tyrosine	TYR	262.195	194.275
Phenylalanine	PHE	330.337	278.420
Histidine	HIS	335.910	273.981
Lysine	LYG	692.539	614.171
Arginine	ARG	591.019	513.576
Tryptophane	TRY	137.800	131.174
총아미노산(%)		8.680	7.440

아미노산 조성을 분석한 결과 무처리 장어와 황토가공소재 처리 장어간 큰 차이는 발견되지 않았다. 함량에 대해서는 Cystine을 제외한 대부분의 아미노산에서 대조구가 실험구에 비하여 높은 것으로 나타났다.

표 3-5-9. 장어시료의 지방산 조성

	지방산 (g/100g)	무처리	황토
C4:0	Butyric acid	0.000	0.000
C6:0	Caproic acid	0.000	0.000
C8:0	Caprylic acid	0.000	0.000
C10:0	Capric acid	0.000	0.000
C11:0	Undecanoic acid	0.000	0.000
C12:0	Lauric acid	0.014	0.012
C13:0	Tridecanoic acid	0.000	0.000
C14:0	Myristic acid	0.888	0.705
C14:1	Myristoleic acid	0.032	0.022
C15:0	Pentadecanoic acid	0.062	0.049
C15:1	Pentadecenoic acid	0.000	0.000
C16:0	Palmitic acid	4.860	3.746
C16:1	Palmitoleic acid	1.515	1.212
C17:0	Margaric acid	0.040	0.039
C17:1	Heptadecenoic acid	0.000	0.000
C18:0	Stearic acid	1.035	0.989
C18:1,trans			
	Oleic acid	0.069	0.071
C18:1,Cis		11.029	8.447
C18:2,trans			
	Linoleic acid	0.083	0.073
C18:2,Cis		0.825	0.600
C20:0	Arachidic acid	0.032	0.027
C18:3n-6	γ -Linolenic acid	0.000	0.000
C18:3n-3	Linolenic acid	0.361	0.170
C20:1	Gadoleic acid	0.369	0.292
C21:0	Heneicosanoic acid	0.005	0.003
C20:2	Eicosadienoic acid	0.165	0.119
C22:0	Behenic acid	0.004	0.004
C20:3n-6	Dihomo- γ -linolenic acid	0.048	0.043
C22:1n-9	Erucic acid	0.035	0.027
C20:3n-3	Eicosatrienoic acid	0.049	0.025
C20:4n-6	Arachidonic acid	0.133	0.119
C23:0	Tricosanoic acid	0.000	0.000
C22:2	Brassic acid	0.000	0.000
C24:0	Lignoceric acid	0.000	0.000
C20:5n-3	EPA	0.730	0.628
C24:1	Nervonic acid	0.031	0.021
C22:6n-3	DHA	2.886	2.029

지방산 조성을 분석한 결과 무처리 장어의 총 지방산 함량이 황토가공소재 처리 장어의 지방

산 함량보다 높게 나타났다. 관능검사 결과와 비교 분석한 결과 무처리 장어의 높은 기름진 함량에 영향을 끼쳤을 것으로 사료된다.

마. 관능검사

(1) 묘사분석 결과

표 3-5-10. 무처리, 황토가공 처리 장어의 묘사분석 결과

특성	무처리	황토가공
단맛	3.6 a	3.3 a
짠맛	4.1 a	3.9 a
감칠맛	4.5 a	4.3 a
고소한맛	6.5 a	6.4 a
비린내	5.9 a	5.8 a
기름기	7.7 a	6.7 b
탄력성	7.0 a	7.4 a
경도	4.6 a	4.8 a
씹힘성	7.5 a	8.0 a
응집성	6.9 a	6.9 a

Means within a column with different letters are significantly different at $p < 0.05$ (LSD)

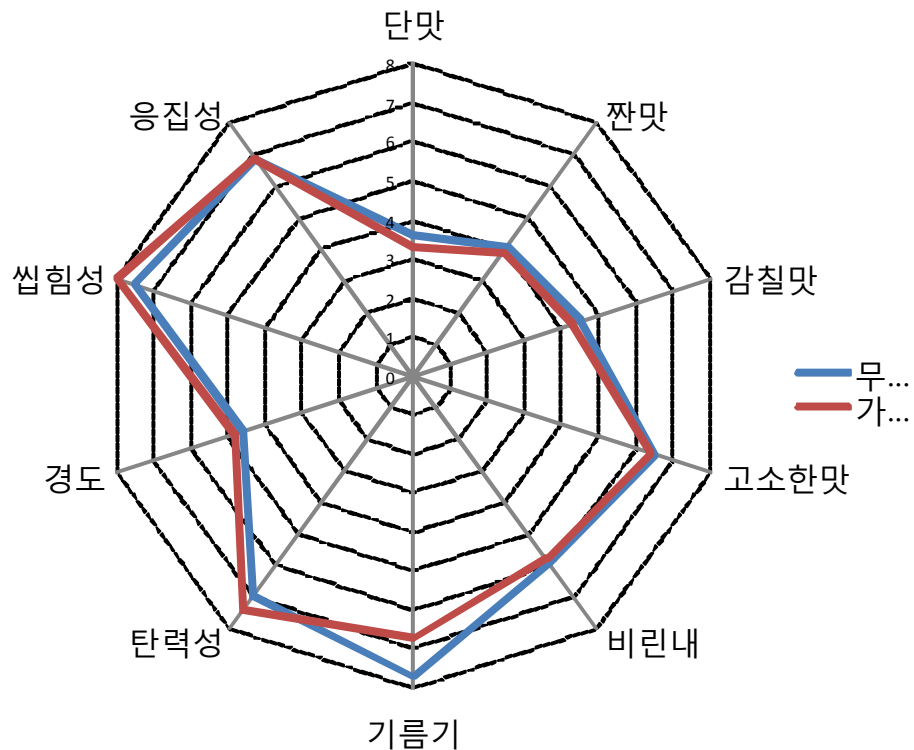


그림 3-5-4. 무처리, 황토가공 처리 장어의 관능특성 별 묘사분석 결과

전문패널에 의한 묘사분석 결과 기름기 특성을 제외한 평가된 모든 항목에서 무처리, 황토가공 소재 처리 시료의 유의적 차이가 발견되지 않았다. 기름기 특성은 황토가공을 처리한 장어가 무처리 장어 대비 유의적으로 낮게 나타났다. 이는 황토가 장어의 기름진 성분을 저감화 시켜 줄 수 있는 중요한 특성이 있음을 간접적으로 암시한다고 할 수 있다 (표10).

(2) 소비자 조사

표 3-5-11. 무처리, 황토 처리 장어의 소비자 기호도 조사 결과

	무처리	황토
전체기호도	5.9 a	5.6 a
색상	6.3 a	5.6 b
고소한맛	6.1 a	5.9 a
탄력성	5.9 a	5.7 a
씹힘성	5.9 a	5.5 a

Means within a column with different letters are significantly different at $p < 0.05$ (LSD)

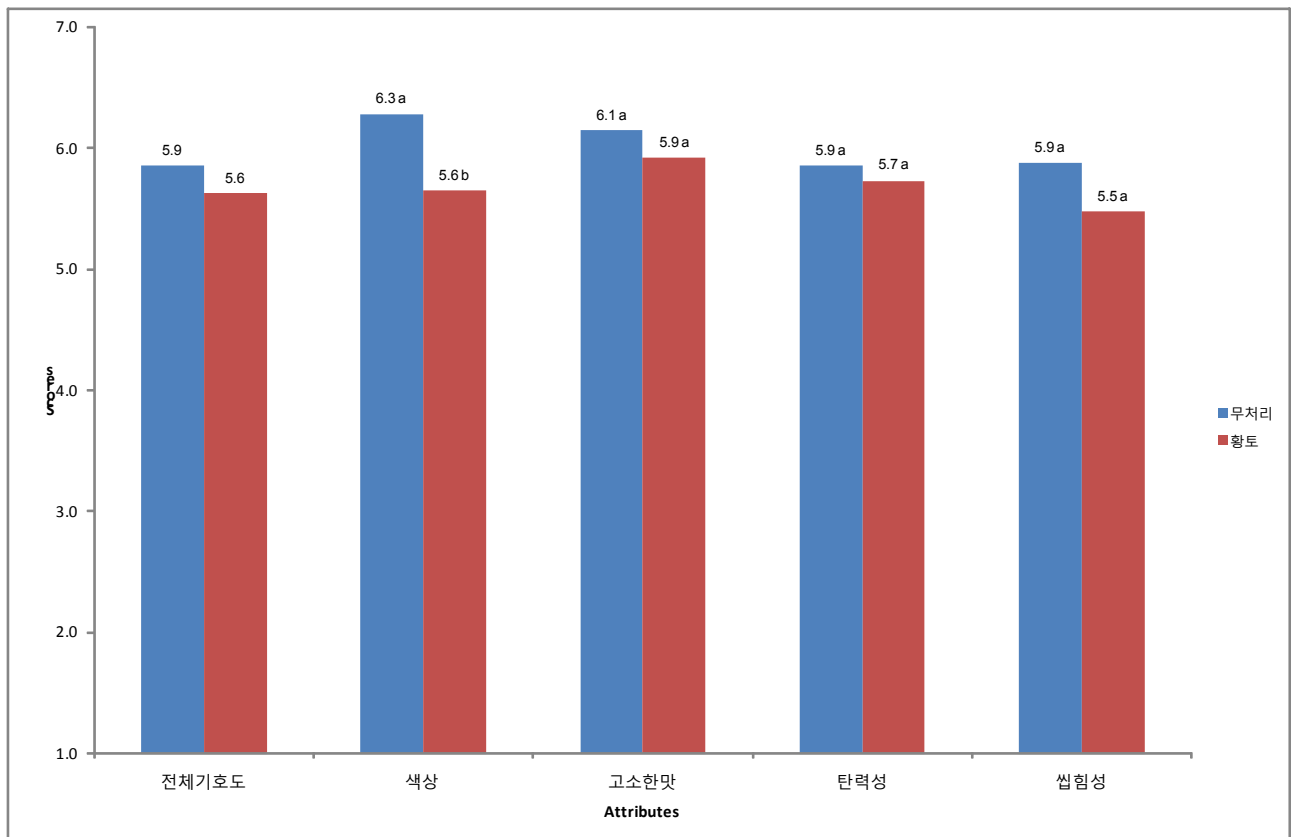


그림 3-5-5. 무처리, 황토 처리 장어의 특성 별 소비자 기호도 조사 결과

- 소비자 기호도 조사 결과 두 처리군 간 유의적 차이는 발견 되지 않았다.

2. 황토가공소재 적용 무, 배추

가. 일반성분분석

표 3-5-12. 황토 적용 무의 일반성분

항목	무		
	무처리	생황토	황토가공
수분함량 (%)	93.88±0.14 c	94.85±0.22 b	96.67±0.12 a
조단백 (%)	1.05±0.23 a	1.02±0.02 a	0.52±0.07 a
조지방 (%)	0.98±0.08 a	0.91±0.06 a	1.12±0.06 a
조회분 (%)	1.10±0.07 a	0.67±0.15 ab	0.47±0.03 b

*Average±Standard error; Values sharing the same letters are not significantly different at p<0.05.

표 3-5-13. 황토 적용 배추의 일반성분

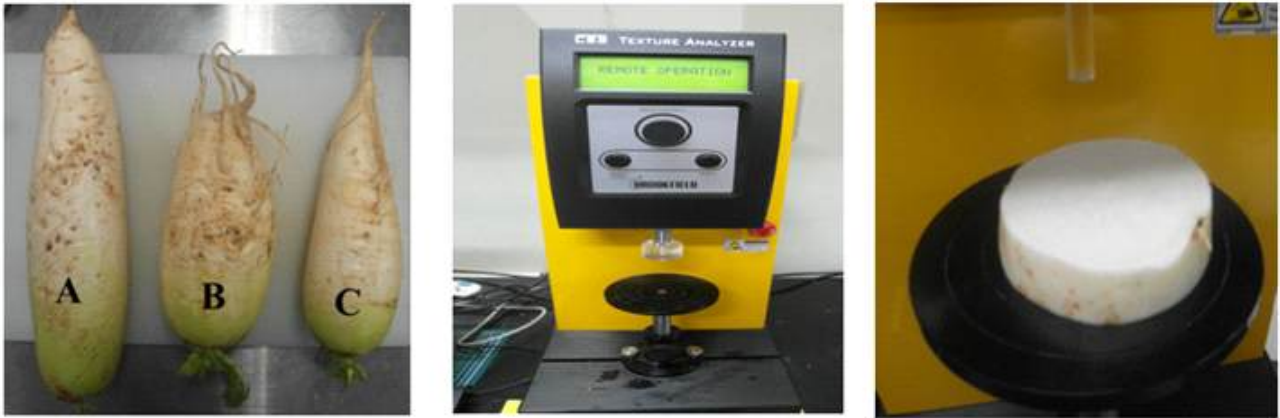
항목	배추		
	무처리	생황토	황토가공
수분함량 (%)	95.23±0.11 a	96.29±0.10 a	95.34±0.68 a
조단백(%)	1.68±0.13 a	1.00±0.08 a	1.34±0.37 a
조지방 (%)	0.001±0.001 a	0.003±0.003 a	0.01±0.01 a
조회분 (%)	0.56±0.02 a	0.45±0.05 a	0.68±0.11 a

*Average±Standard error; Values sharing the same letters are not significantly different at p<0.05.

Values sharing the same letters are not significantly different at p<0.05.

일반성분 분석 결과 배추에서는 시료 간 유의적인 차이는 없었고, 무에서는 수분함량이 경우 황토가공소재>생황토>무처리 시료의 순서대로 유의적인 차이를 보였다. 회분함량에서도 황토가공소재>무처리 시료간의 유의적 차이가 발견되었으나, 생황토 처리시료와 다른시료간의 유의적 차이는 발견되지 않았다.

나. 유변물성 분석



A

B

C

그림 3-5-6. A: 무 시료(A-생황토, B-황토가공, C-무처리), B: Brookfield Texture Analyzer, C:침투력 시험(Penetration test)

다. 냉장 저장기간에 따른 무의 경도 분석

저장기간에 따른 일반 무(황토 무처리)와 황토가공소재 처리 무와의 경도 비교를 위해 침투시험에 의한 경도(penetration force) 측정치를 나타냈다. 무는 저장기간에 따라 4주간 총 5회(0, 1, 2, 3, 4주) 측정하였으며, 0주차 비교실험에서는 생황토>황토가공소재>무처리 순으로 무의 경도가 높게 나타났다. 그러나 저장기간에 따른 비교실험에서는 황토가공소재 처리 무가 2주까지 가장 높은 경도를 유지하다가 감소했고, 생황토 무는 1주까지 높은 경도를 유지하다가 감소함. 반면에 무처리 무는 1주 후부터 지속적으로 경도가 서서히 감소하였다. 따라서 황토가공소재를 처리한 무가 저장기간에 따라 가장 좋은 조직감을 유지하는 것으로 나타났으며, 1주까지는 생황토가 무처리 보다 높은 조직감 경도를 나타내었다. 그 후에는 무처리가 생황토 보다 더 높은 강도를 보임. 따라서 냉장 저장기간에 따른 무의 경도변화 분석으로부터 황토가공소재 처리 무가 다른 무에 비해 안정적인 조직감 경도를 나타냄을 알 수 있다.

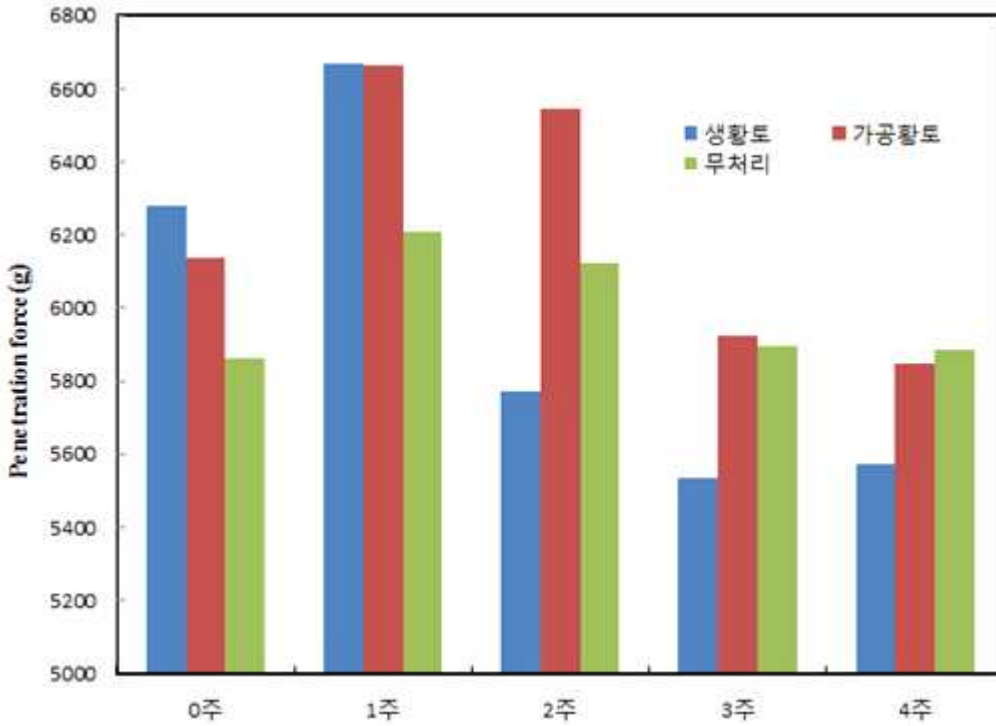


그림 3-5-7. 저장기간이 무의 경도 조직감 품질에 미치는 영향

표 3-5-14. 저장기간에 따른 무의 경도(g) 측정 변화

시료	저장기간				
	0 주	1 주	2 주	3 주	4 주
생황토 무	6280 ± 49.2*	6666 ± 54.4	5771 ± 47.7	5536 ± 62.0	5573 ± 85.8
황토가공 무	6666 ± 60.7	6661 ± 57.6	6546 ± 82.1	5922 ± 64.9	5849 ± 101
무처리 무	5864 ± 35.1	6210 ± 76.4	6122 ± 26.1	5897 ± 42.6	5884 ± 46.3

*평균값 ± 표준오차



그림 3-5-8. 배추 시료(A-생황토, B-황토가공, C-무처리)

라. 냉장 저장기간에 따른 배추의 조직감 분석

저장기간에 따른 일반 배추(황토 무처리)와 황토가공소재처리 배추와의 절단강도(cutting force) 비교를 통해 조직감 품질변화를 나타낸다. 황토가공소재 처리배추는 저장기간이 경과해도 다른 배추에 비해 가장 높은 절단강도(cutting force) 수치를 일정하게 보여주고 있으며, 생황토 배추는 무처리 배추에 비해 2주 저장기간까지만 안정적 수치를 나타냈다. 따라서 황토가공소재 처리 배추는 무처리 배추에 비해 저장기간에 따라 안정적 품질을 유지하는 것으로 나타났다(18-21). 특히 황토가공소재 배추는 장기간 저장 동안에 조직감 변화 없이 안정적 품질을 유지하는 반면에 생황토 배추는 단기 저장 기간 동안에 무처리 배추보다 좋은 품질을 유지함을 알 수 있다(22).

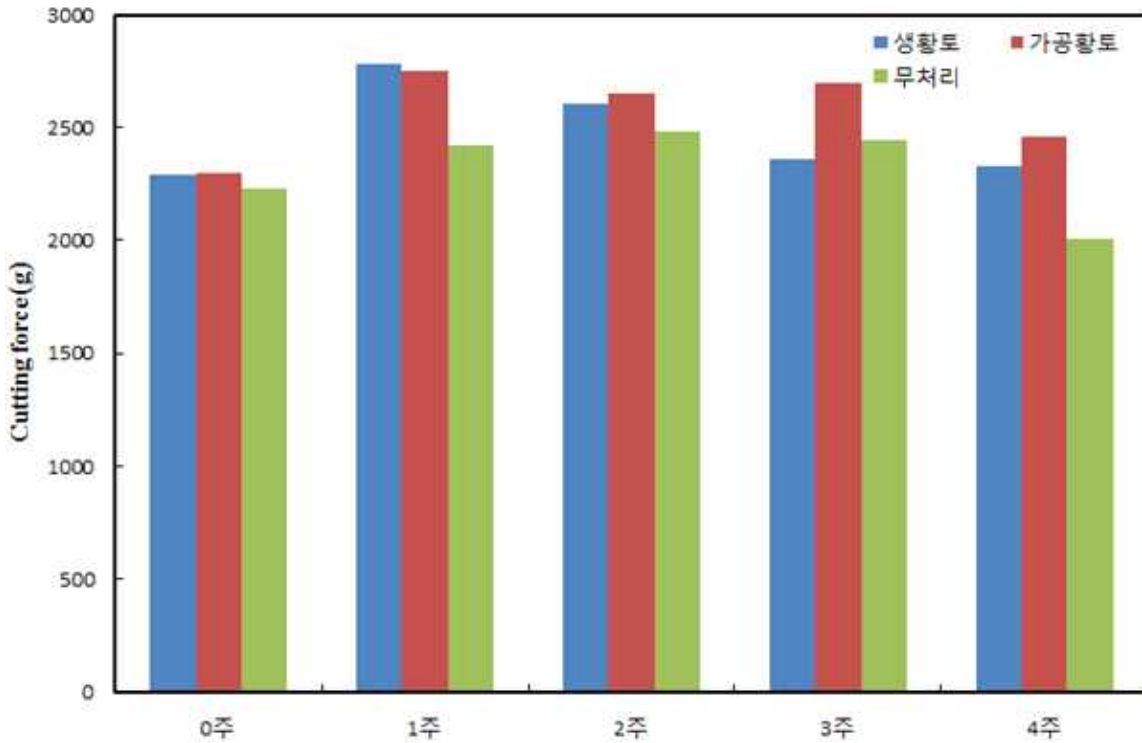


그림 3-5-9. 저장기간에 따른 배추의 절단강도에 미치는 영향

표 3-5-15. 저장기간에 따른 배추의 절단강도(g)

시료	저장기간				
	0 주	1 주	2 주	3 주	4 주
생황토 배추	2289±172*	2784±148	2606±76.5	2358±77.7	2329±72.1
황토가공 배추	2296±76.2	2755±95.8	2653±170	2697±111	2458±131
무처리 배추	2229±100	2423±110	2485±154	2448±73.6	2004±141

*평균값±표준오차

마. 항산화분석

표 3-5-16. 배추, 무시료의 DPPH radical scavenging activity (mg/ml)

시료	DPPH radical scavenging activity (mg/ml)					
	무처리		생황토		황토가공	
배추	8.98±0.22	a	7.95±0.04	b	8.82±0.16	a
무	9.94±0.03	b	9.86±0.03	b	13.72±0.40	a

표 3-5-17. 배추, 무시료의 총폴리페놀 함량

시료	총폴리페놀함량(mgGAE/g)					
	무처리		생황토		황토가공	
배추	4.45±0.35	b	9.15±0.47	a	8.50±0.21	a
무	10.32±0.32	ab	11.11±0.24	a	9.27±0.27	b

표 3-5-18. 배추, 무시료의 FRAP (Ferric reducing/ antioxidant power assay) value

시료	FRAP value (MFeSO ₄ /g)					
	무처리		생황토		황토가공	
배추	2.36±0.08	a	3.46±0.33a		2.96±0.06	a
무	0.86±0.01	b	1.63±0.05a		0.71±0.003	b

FeSO의 0~1mM/ml 의 표준곡선을 통해 각각의 시료에 대한 FRAP value를 계산하였다. 배추의 경우 세군간의 유의적인 차이는 없었으나 생황토처리구의 수치가 가장 높았고 무의 경우 생황토처리구의 FRAP value가 유의적으로 높은 수치를 보였다. 배추의 경우에는 생황토구의 DPPH radical 소거활성농도가 유의적으로 낮은 것을 확인할 수 있었으며 무의 경우 황토가공소재구가 유의적으로 높은 수치를 나타냈다.

바. 영양성분분석

표 3-5-19. 배추의 비타민, 무기질 함량

항목	무처리	생황토	황토가공
Vitamin C(mg/100g)	10.05 ± 0.15 ¹ a	8.85 ± 0.25b	5.80 ± 0.20c
VitaminB ₁ (mg/100g)	0.02 ± 0a	0.001 ± 0c	0.016 ± 0b
VitaminB ₂ (mg/100g)	0.03 ± 0b	0.04 ± 0a	0.04 ± 0a
Niacin(mg/100g)	0.03 ± 0c	0.04 ± 0a	0.04 ± 0b
Phospho(mg/100g)	24.59 ± 1.39a	23.04 ± 0.86a	27.40 ± 0.26a
Magnesium(mg/100g)	10.23 ± 0.1a	8.87 ± 0.1b	9.08 ± 0.08b
Calcium(mg/100g)	48.96 ± 0.79a	33.75 ± 0.03b	45.96 ± 0.88a
Potassium(mg/100g)	195.7 ± 0.40b	168.1 ± 1.8c	208.7 ± 1.1a
Zinc(mg/100g)	0.24 ± 0.02a	0.22 ± 0a	0.23 ± 0.01a
Manganese(mg/100g)	0.15 ± 0a	0.12 ± 0b	0.16 ± 0a
Iron(mg/100g)	1.01 ± 0.43a	0.45 ± 0.10a	0.61 ± 0.06a
Sodium(mg/100g)	25.48 ± 0.14a	23.36 ± 0.21b	15.59 ± 0.17c
Germanium(mg/kg)	불검출	불검출	불검출
β-Carotene(μg RE/100g)	96.73 ± 0a	13.86 ± 0c	50.69 ± 0b

*평균값±표준오차, Values sharing the same letters are not significantly different at p<0.05.

표 3-5-20. 무의 비타민, 무기질 함량

항목	무처리	생황토	황토가공
Vitamin C(mg/100g)	9.81±0.12 ¹ b	11.84±0.07a	11.63±0.15a
VitaminB1(mg/100g)	0.02±0c	0.03±0a	0.02±0b
VitaminB2(mg/100g)	0.02±0a	0.02±0a	0.02±0a
Niacin(mg/100g)	0.02±0a	0.02±0a	0.03±0a
Phospho(mg/100g)	39.10±0.36b	38.25±0.07b	42.02±0.78a
Magnesium(mg/100g)	10.88±0.04a	10.63±0.09ab	10.38±0.08b
Calcium(mg/100g)	27.03±0.32b	30.13±0.18a	29.93±0.33a
Potassium(mg/100g)	319.15±2.65b	299.05±2.85c	341.1±1.8a
Zinc(mg/100g)	0.17±0a	0.17±0a	0.19±0.02a
Manganese(mg/100g)	0.06±0a	0.07±0a	0.06±0a
Iron(mg/100g)	0.45±0.15a	0.49±0a	0.54±0.03a
Sodium(mg/100g)	37.87±0.10a	35.37±0.35b	33.36±0.23c
Germanium(mg/kg)	불검출	불검출	불검출
β -Carotene(μg RE/100g)	불검출	불검출	불검출

*평균값±표준오차, Values sharing the same letters are not significantly different at p<0.05.

사. 관능검사

(1) 묘사분석 결과

표 3-5-21. 시료 별 배추 잎 묘사분석 결과

특성	무처리	황토가공	생황토
배추향미	4.2 a	4.4 a	4.7 a
흡향미	3.4 a	3.2 a	3.6 a
황향미	4.2 a	4.1 a	4.7 a
단맛	3.5 a	3.2 a	3.3 a
쓴맛	4.2 a	4.7 a	4.3 a
떫은맛	4.7 a	4.9 a	4.9 a
경도	3.2 a	3.3 a	3.4 a
아삭함	4.0 a	4.2 a	3.9 a
섬유질	4.4 a	4.3 a	4.5 a
수분	4.1 a	4.2 a	3.7 a

Means within a column with different letters are significantly different at p<0.05 (LSD)

표 3-5-22. 저장 별 배추 잎 묘사분석 결과

특성	0일	7일	21일
배추향미	4.9 a	4.3 a	4.0 a
흙향미	3.7 a	3.2 a	3.2 a
황향미	3.8 a	4.2 a	4.9 a
단맛	3.6 a	3.3 a	3.1 a
쓴맛	5.6 a	3.9 b	3.7 b
뽕은맛	5.6 a	4.2 b	4.7 b
경도	3.5 a	2.9 a	3.4 a
아삭함	4.0 a	3.9 a	4.2 a
섬유질	4.9 a	4.1 a	4.2 a
수분	4.0 a	3.7 a	4.3 a

무처리, 생황토, 황토가공소재 처리 시료 모두 저장이 진행됨에 따라서 쓴맛과 뽕은맛이 저감화 되었다.

표 3-5-23. 시료 별 배추 줄기 묘사분석 결과

특성	무처리	황토가공	생황토
배추향미	4.2 a	4.2 a	4.3 a
흙향미	3.6 a	3.6 a	3.7 a
황향미	3.7 a	3.7 a	3.9 a
단맛	4.8 a	5.1 a	4.9 a
쓴맛	3.4 a	3.4 a	3.9 a
뽕은맛	4.1 a	3.9 a	4.1 a
경도	6.5 a	6.0 a	6.7 a
아삭함	7.0 a	6.7 a	7.0 a
섬유질	6.9 a	6.6 a	7.0 a
수분	5.8 a	6.1 a	5.9 a

표 3-5-24. 저장 별 배추 줄기 묘사분석 결과

특성	0일	7일	21일
배추향미	4.0 a	4.2 a	4.5 a
흙향미	3.8 a	3.5 a	3.6 a
황향미	3.3 a	4.0 a	4.1 a
단맛	5.5 a	4.7 a	4.6 a
쓴맛	3.5 a	3.6 a	3.6 a
뽕은맛	3.7 a	4.1 a	4.4 a
경도	7.0 a	5.8 b	6.4 ab
아삭함	7.3 a	6.7 a	6.7 a
섬유질	7.7 a	6.5 b	6.3 b
수분	6.3 a	6.1 a	5.5 a

무처리, 생황토, 황토가공소재 처리 시료 모두 저장이 진행됨에 따라서 경도가 낮아지고 섬유질의 양이 줄어들어 부드러워짐을 알 수 있다.

요약

본 연구는 나노 황토가공 처리여부에 따른 장어시료의 품질특성을 비교하고자 약 주간 장어시료를 양식장에서 사육하여 뼈와 내장을 분리하는 전처리 후 일반성분분석과 지방산, 아미노산, 무기질, 비타민 성분 분석을 정량적·정성적으로 진행하였으며 전처리된 시료에서 껍질을 제거하여 어육 가수분해 후 DPPH radical 소거능과 FRAP value를 측정하였다. 그 결과, 일반성분분석에 대해서는 두 군 간의 차이가 없었으며 지방산조성에 있어서는 정성적인 차이는 없었으나 정량적인 차이는 존재하였다. 아미노산조성 또한 정성적인 차이는 없었으며 정량적인 차이는 존재하였고 특히 Riboflavin함량은 대조구에 비해 실험구의 Riboflavin함량이 유의적으로 낮게 측정되었으며 Niacin은 실험구에서 더 높은 함량을 지닌 것으로 측정되었고 Tocopherol은 황토가공소재 처리를 한 시료에서 대조구에 비해 약3배 이상의 Tocopherol함량이 측정되었다 ($p < 0.05$).

DPPH radical 소거능과 FRAP value 실험결과 실험구의 항산화 활성이 유의적으로 높은 것이 확인되었다. 패넬들의 묘사분석 결과 ‘기름진 정도’ (Oily)가 대조구에 비하여 실험구에서 강도가 낮은 것을 확인할 수 있었으며 소비자 기호도 결과 차이는 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과에 따르면, 황토가공소재를 처리한 장어시료에 있어서 전반적인 지방산의 정량적인 결과가 실험구가 대조구에 반하여 적으며 묘사분석에 있어서 ‘기름진 정도’의 강도가 적으므로 황토가공소재처리가 장어시료의 지방산의 함량을 낮추어 주는 것으로 사료된다. 또한 토코페롤의 함량이 황토처리 시 약 3배 이상 높았으며 항산화 활성실험 측정 결과 황토처리구의 활성이 유의적으로 높으므로 황토가공소재처리가 식품의 산화방지를 위한 항산화능을 향상시켜주는 물질로 가치가 있을 것으로 판단된다.

3. 황토가공소재 적용 무

가. 일반성분 분석

(1) 재료 및 방법

본 실험에 사용한 황토가공소재의 나노슬러리형태 분쇄를 위하여 이온코리아(경북 진천소재)에 위탁 가공을 수행하였다. 황토소재의 분쇄공정은 3 mm이하로 분쇄한 후 불밀로 10 μ m 이하로 분쇄한 후 평균 500 nm 크기로 습식분쇄 하였다.

무 종자는 홍농씨앗 청운무(종자번호 제10-안성-2011-10-02호)를 사용하였으며 육묘용 상토(TKS-2, FloraGard, Oldenburg, Germany)와 50구 육묘용 포트를 이용하여 파종하였다. 2.0 m \times 2.0 m 처리구에 0.5 m \times 0.5 m 간격으로 9개씩 정식 하였고 처리구마다 0.5 m의 버퍼를 두

였으며, 각 처리구별 난괴법 3반복 처리하였다. 시료는 3반복 내에서 무작위로 추출하였다. 황토 무처리 군을 대조구로 사용하였고, 실험구의 조건은 황토가공소재 슬러리를 물에 4000 ppm 농도로 희석하여 사용하였으며 실험구1(10 L의 황토희석액 1차 처리 후 8주간 재배)과 실험구 2(10 L의 황토희석액 파종 시 1차 처리, 4주 후 2차 처리 후 8주간 재배)로 구분하였다. 농약살포는 하지 않았으며 최종 수확 및 재배환경(25°C) 등 모든 실험조건이 동일하게 수행되었다.

일반성분분석으로 수분함량, 조단백함량, 조지방함량, 조회분 함량을 측정하였으며 AOAC법에 준하여 실시하였다.

수분은 105°C 상압가열건조법으로 분석하였고 조단백질은 micro Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조회분은 550°C 직접회화법으로 분석하였다.

(2) 결과

표 3-5-25. 무의 일반성분 분석결과

시료	수분(%)	회분(%)	조단백(%)	조지방(%)
Control	94.7±0.67 a*	0.7±0.08 b	0.93±0.42b	0.2±0.12 c
생황토	94.3±0.35 a	0.8±0.04 b	0.92±0.54 b	0.2±0.01 c
실험구 1	94.3±0.11 a	1.1±0.07 a	1.14±0.20 b	0.7±0.22 b
실험구 2	91.9±0.23 b	0.8±0.05 b	1.43±0.13 a	1.0±0.11 a

*평균값±표준오차.

*유의적 차이를 보이는 시료는 다른 문자로 표기(유의수준 $\alpha=0.05$).

무의 일반성분분석 결과 수분이 가장 많은 함량을 차지하는 것으로 보였으며 조단백과 조지방함량에서는 실험구2가 높은 것으로 나타났다. 조지방 함량의 차이가 가장 크게 나타났는데, 무에서의 지방이 높에 나타난 경우 지용성 비타민 함량이 높은 것을 기대할 수 있을 것으로 예상된다.

나. 영양성분 분석

(1) 방법

(가) 무의 무기성분 분석

- 시료는 극초단파분해기(Multi wave 3000, anton paar, Graz, Australia)를 이용하여 분해하였으며 시료 0.3±0.3 g에 질산10 mL를 가하여 분해하였다.
- 분해된 시료액을 50 mL를 플라스크에 정용하여 시험용액으로 사용하였으며 표준용액(Multi Element calibration standard 21, 100 $\mu\text{g/mL}$, ICP grade, Perkin Elmer, MA, USA)과 함께 ICP-OES(Optima8300, Perkinelmer)를 이용하여 분석하였다.
- 유도결합질량분석기(plasma control Gas flow)의 작동조건은 Plasma 10 L/min, Auxiliary 0.2 L/min로 하였고, RF Power 1450 watts, Pum flow rate 1.5 mL/min으로 하였다.
- 각 무기성분의 검출파장은 칼륨: 766.490 nm, 칼슘: 317.933, 철:238.204, 나트륨: 589.592이

었다. 인의 경우 몰리브덴청 비색법을 이용하여 분석하였으며 가시/자외선분광광도계(Optizen 2120UV Plus, Mecasys, Daejeon, Korea)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) 무의 비타민 분석

- 비타민 함량은 식품공전의 시험방법을 기준으로 하여 비타민C, Thiamin, Riboflavin의 함량을 분석하였다. 비타민C의 경우 5% metaphosphoric acid첨가하고 sonicator를 이용하여 30분~1시간동안 추출하여 시험용액으로 사용하였다.

- 시험용액은 고속액체크로마토그래피(Agilent 1200 Series, Agilent, CA, USA)를 통하여 분석하였다. 분석조건으로 컬럼은 Peakman sp. AQ-C18(4.6 X 250 mm, 5 um, Ammerbuch, Germany)을 사용하였으며 컬럼온도 25℃, 반응액의 유속 1 mL/min, 시료주입량 20 μl으로 하였다. Thiamin, Riboflavin은 Helio와 Martin의 방법으로 추출 후 고속액체크로마토그래피(Agilent 1200 Series, Agilent)를 통하여 분석하였다.

- 분석조건으로 컬럼은 Unison US-C18(2 mm×150 mm×5 μm, Almtakt, Ringoes, NJ, USA)을 사용하였으며 컬럼온도는 35℃, 반응액의 유속은 0.3 mL/min, 시료주입량은 0.5 μL로 하였다.

(2) 결과

표 3-5-26. 무의 무기질 및 비타민 함량측정 결과(mg/100g)

	Radish		
	Control	Treatment 1	Treatment 2
P	13.870±0.798 ¹ b ²	22.966±2.523 a	20.745±0.639 a
Mg	8.120±0.078 b	10.190±0.169 a	10.445±0.148 a
K	31.190±2.687 c	340.350±6.717 b	391.650±1.061 a
Zn	0.161±0.003 c	0.183±0.004 b	0.299±0.008a
Mn	0.050±0.001 c	0.066±0.004 b	0.134±0.001 a
Na	40.585±0.629 b	32.210±0.566 c	43.060±0.325 a
VitaminC	15.249±0.046 c	17.910±0.254 b	20.850±0.014 a
Thiamin	0.012±0.000 c	0.016±0.001 b	0.017±0.000 a
Riboflavin	0.016±0.000 b	0.018±0.001 b	0.020±0.001 a

Treatment1 = RCPM was treated at the beginning of growth only.

Treatment 2 = RCPM was treated at the beginning of growth and after 4 weeks.

¹Mean±standard deviation.

²Different letters in the same row are significantly different (P<0.05).

무기성분과 비타민 분석결과 모든 분석 항목에서 실험구1, 2의 함량이 대체적으로 유의적으로 높게 나타났다. 칼륨, 아연, 망간, 나트륨의 경우 재배기간 동안 실험구2가 유의적으로 더 높은 함량을 지닌 것으로 분석되었다. 인의 대조구 함량은 13.87±0.80 mg/100g, 실험구1과 실험구2의 함량은 각각 22.97±2.52 mg/100g, 20.75±0.64 mg/100g 로 대조구 대비 각각의 실험구에서

유의적으로 더 높은 함량을 나타내었다. 마그네슘의 경우 대조구에서 함량은 8.12 ± 0.08 mg/100g, 실험구1, 2에서의 함량은 각각 10.19 ± 0.17 mg/100g, 10.45 ± 0.15 mg/100g 으로 인과 마찬가지로 실험구1, 2에서 유의적으로 더 높은 함량을 지닌 것으로 분석되었다.

다. 저장기간에 따른 무의 TA측정

(1) 방법

- 무의 저장 중 조직감 변화 측정을 위해 시료를 4°C에 저장보관 하였고 4주 동안 일주일 간격으로 조직감을 측정하였다.
- 실험 2시간 전 상온에서 무를 보관한 후 실험을 실시하였고, 세척 후 10mm 두께로 자른 무를 측정시료로 사용하였다.
- 무의 침투력 시험(penetration test)에 의한 경도측정은 Brookfield Texture Analyzer(TA-CT3, Brookfield, Middleboro, IN, USA)를 이용하여 직경 6 mm 원통형 probe로 시료 두께의 70%를 침투하여 측정하였다.
- 무의 조직감 실험은 최소 6회 반복하여 측정하였다.

(2) 결과

표 3-5-27. 4°C 저장 기간 동안 무의 견고성 변화(Unit: g)

Week	Control	Treatment 1	Treatment 2
0	$6288.75 \pm 142.03^{1A^2a^3}$	6289.00 ± 274.47 Aa	6254.25 ± 128.04 ABa
1	6026.00 ± 206.49 Bb	6344.50 ± 169.80 Aa	6330.00 ± 23.49 Aa
2	6001.00 ± 170.60 Bb	6143.50 ± 90.46 Ab	6287.00 ± 75.69 ABa
3	5439.00 ± 78.08 Cc	6550.50 ± 310.23 Aa	6129.50 ± 172.78 Bcb
4	5263.75 ± 127.11 Cb	6183.25 ± 132.94 Aa	6041.25 ± 162.44 Ca

Treatment 1 = RCPM was treated at the beginning of growth only.

Treatment 2 = RCPM was treated at the beginning of growth and after 4 weeks.

¹Mean \pm standard deviation

²Means with different capital letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

³Means with different small letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$).

무 시료의 견고성은 조직감 분석법인 침투력 시험(penetration test)에서 얻는 최대 peak값으로 나타낸다. 침투력 시험에 의한 무의 안정성 분석을 통해 견고성의 변화를 보여주고 있다. 대조구의 경우 저장기간이 길어지는 동안 견고성이 저하되는 경향이 나타난 반면, 실험구1은 저장기간 동안 견고성의 유의적인 변화는 없었으며 실험구2는 저장시작 전(0주)에 비교하여 4주차에 견고성이 유의적으로 낮은 것으로 나타났으나 이는 대조구에 비하여 견고성의 감소율이 적고 유의적으로 높은 경도를 지니는 것으로 분석 되었다. 1~4주간의 저장주기에서 대조구

의 견고성은 황토 실험구1, 2에 비하여 낮은 견고성을 나타냈다. 결과적으로 황토가공소재를 처리하여 재배한 무의 경우 일정기간동안 저장 시에도 무처리구 대비 견고성이 높을 뿐만 아니라 안정적인 조직감을 유지한다고 할 수 있다. 이는 황토가공 소재를 활용하여 재배한 무의 품질 유지 및 이를 활용한 가공품 개발 시 장점이 될 수 있다.

라. 무의 단무지 제조 후 조직감 측정

(1) 제조방법

무를 단무지로 제조한 후 염지가 무의 조직감에 미치는 영향에 대하여 분석하였다. 제조 방법은 아래와 같다.

- 무는 무청을 제거 한 후 흐르는 물에 깨끗이 씻는다.
- 가식부를 제외하고 무의 초록색 윗 부분과 뿌리 부분은 제거한다.
- 무의 무게를 잰 뒤, 증류수 100ml 당 굵은소금(대상, 신안섬보배) 60g을 용해하여 무가 완전히 침지되도록 한다.
- 무의 무게 100g 당 200g 의 하중으로 누른다.
- 7시간 동안 소금물에 절인 후 절임물에 6시간 동안 절인다.
- <절임물> 소금 : 치자 : 식초 : 설탕 = 1 : 8 : 80 : 150 비율로 넣어서 30분간 끓인 뒤 고형 물을 건어낸다.
- 60시간 동안 무가 완전히 잠긴 상태로 지퍼락에 넣은 후 냉장 보관한다.

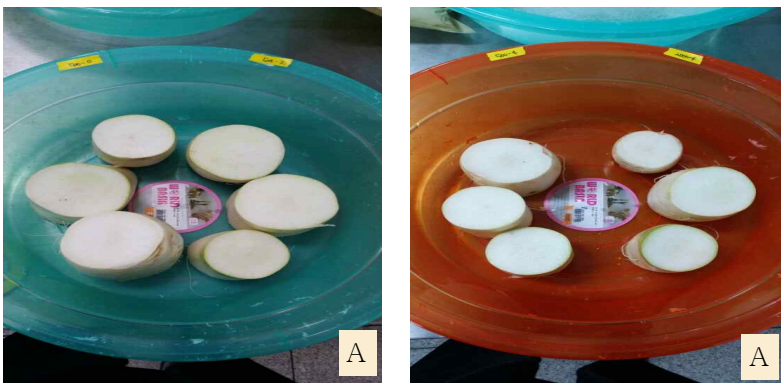


그림 3-5-10. 제조 이전 무 시료

(2) 포장 및 저장

완성된 단무지 절임시료는 조직감분석을 위한 시료 크기로 일정한 규격 (50mm*30mm*30mm) 으로 절단한 후 진공포장기(Turbovac, S-hertogenbosch, Netherlands)를 이용하여 그림과 같이 포장 후, $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하였다 이후 썰어서 개별 포장하였다.

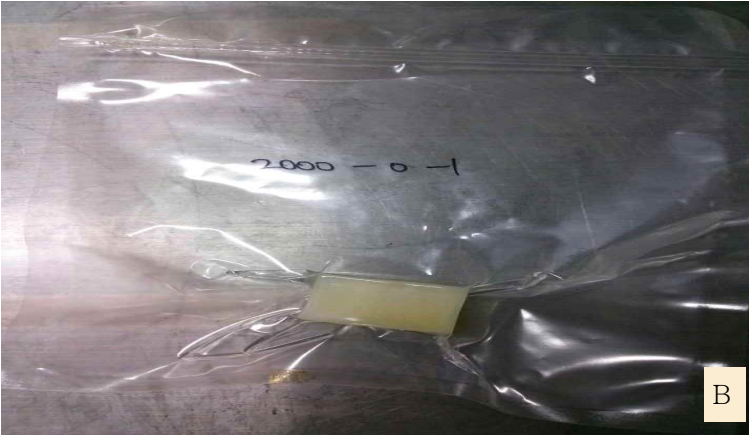


그림 3-5-11. 단무지 절임 제조 후 진공포장된 시료

(3) 무 절임(단무지) 시료의 조직감 측정

제조한 단무지 절임 시료의 물리적 특성을 관찰해 보고자 Texture Analyzer(CT3, Brookfield, Middleborough, Massachusetts, U.S.)를 이용하여 측정하였다.

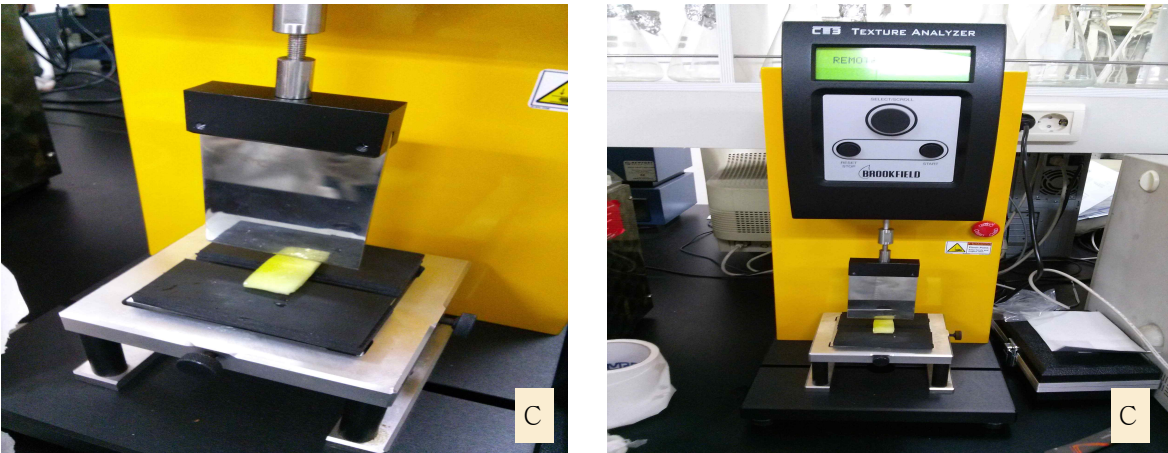


그림 3-5-12. TA측정 중인 무 시료

* 실험조건

Test type : Compression

Targer value : 10 mm

Test speed : 1mm/sec

Probe type : TA-42

Sample Height : 5 mm

* 측정방법

- Texture Analyzer 기기와 PC를 연결한다.
- PC에 설치된 Software(Texture Pro) 프로그램을 실행한다.
- 위 실험조건에 맞는 설정을 입력하고 각 처리구별 실험을 실시한다.
- 결과 DATA는 엑셀파일로 저장하여 보관한다.

※ 시료별 50 mm 두께로 정확히 잘라내어 최소 5- 7반복 실시하였다.

표 3-5-28. 단무지 절임 시료의 경도 (Hardness(g)) 측정 결과

시료	경도 (g)
무처리 무	4052.7 ± 882.2 ¹ a ²
생황토 무	3979.6 ± 980.6 a
황토가공 무(4000_0)	4748.0 ± 882.4 a
황토가공 무(4000_4)	4838.3 ± 1293.7 a

¹평균값±표준오차

²유의적 차이를 보이는 시료는 다른 문자로 표기(유의수준 α=0.05)

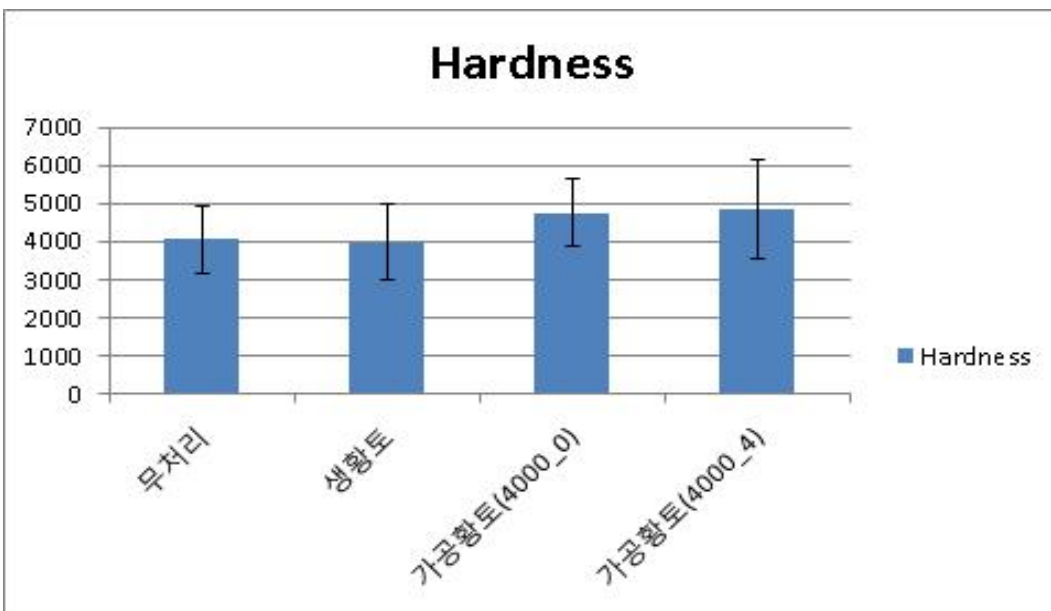


그림 3-5-13. 단무지 절임 시료의 경도 조직감(Hardness(g)) 측정 결과

표 3-5-29. 단무지 절임 시료의 Hardness-Work done(mJ) 측정 결과

시료	Hardness-Work done(mJ)
Control	151.8 ± 29.9 ¹ bc ²
생황토	123.9 ± 28.0 c
가공 4000_0	187.0 ± 26.9 ab
가공 4000_4	202.4 ± 52.4 a

¹평균값±표준오차

²유의적 차이를 보이는 시료는 다른 문자로 표기(유의수준 α=0.05)

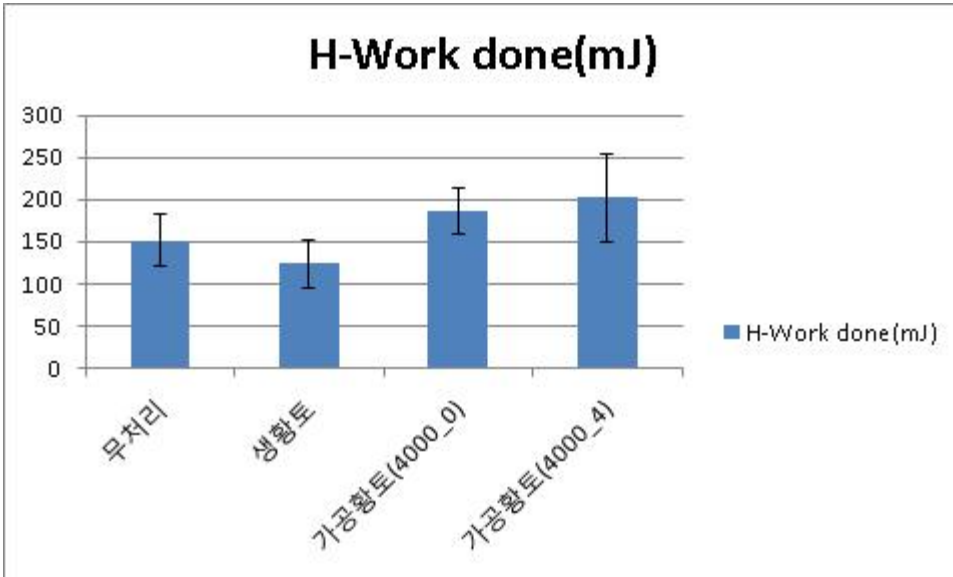


그림 3-5-14. 단무지 절임 시료의 Hardness-Work done(mJ) 측정결과

표 3-5-30. 단무지 절임 시료의 Fracturability 측정 결과

시료	Fracturability(g)
Control	4052.7 ± 882.2 ¹ a ²
생황토	3979.6 ± 980.6 a
가공 4000_0	4748.0 ± 882.4 a
가공 4000_4	4838.3 ± 1293.7 a

¹평균값±표준오차.

²유의적 차이를 보이는 시료는 다른 문자로 표기(유의수준 $\alpha=0.05$).

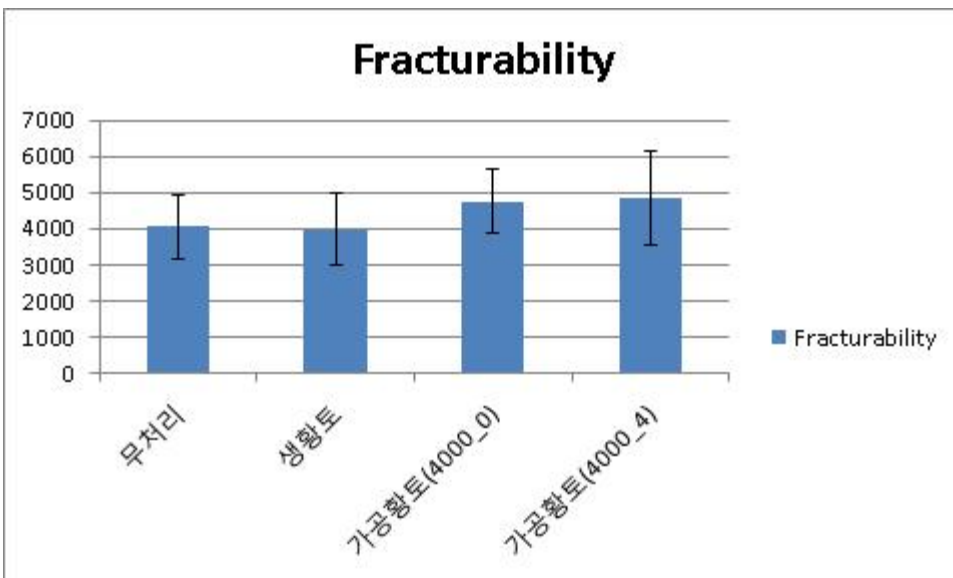


그림 3-5-15. 단무지 절임 시료의 Fracturability(g) 측정결과

각 처리구별 단무지 가공처리 이후 측정된 절단 경도(Cutting Force) 측정치를 나타내었다. 유

의수준($\alpha=0.05$)에서의 차이를 보이진 않았지만 가공처리 황토에서 더 높은 경도값의 경향을 파악할 수 있었다. 또한, 단무지 절임 시료를 절단하는데 드는 총 에너지값(Cutting Energy)은 유의수준($\alpha=0.05$)에서 유의적으로 황토가공의 Cutting Energy 값이 더 높음을 알 수 있다. 단무지 절임시료를 절단하였을 때 나타나는 깨짐성(Fracturability)을 확인할 수 있는 지표로써, 시료를 절단하는 과정에서 최종적으로 시료가 절단되었을 때 절단경도를 나타내는데, 중간에 시료가 깨지는 경우 이때의 경도값을 Fracturability(g)로 나타낸다. 따라서, 가장 높은 값을 나타낸 황토가공소재 처리 시료는 절단도중에 깨짐현상이 나타나지 않았음을 의미한다.

세 종류의 지표를 이용하여 단무지 절임 가공처리를 한 무처리, 생황토처리, 그리고 황토가공 처리구2종 총 4가지 시료에 대해서 물리적측정치를 비교 하였다. 그 결과 황토가공 처리한 시료의 Hardness(g), Hardness Work-Done(mJ), Fracturability(g) 측정치가 높게 나타났고, Hardness Work-Done(mJ) 지표에 대해서는 유의적으로 높음을 확인 할 수 있다.

마. 저장에 따른 영양성분 분석, 항산화 활성측정 및 배추 조직감 분석

※ 가공 황토 슬러리 처리

황토가공 슬러리를 희석하여 배추재배에 사용하였으며 그 희석배수는 아래와 같이 표기하였다.

-가공 50배 희석 (가공 50으로 표시)

물1L : 황토슬러리 20mL

-가공 황토 200배 희석 (가공 200으로 표시)

물1L : 황토슬러리 5mL

-가공 황토 1000배 희석 (가공 1000으로 표시)

물1L : 황토슬러리 1mL

(1) 일반성분 분석

(가) 방법

- 일반성분분석으로 수분함량, 조단백함량, 조지방함량, 조회분 함량을 측정하였으며 AOAC법에 준하여 실시하였다.

- 수분은 105°C 상압가열건조법으로 측정하였고 조단백질은 micro Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조회분은 550°C 직접회화법으로 분석하였다.

결과

표 3-5-31. 배추의 일반성분 분석결과

시료	수분(%)	회분(%)	조단백(%)	조지방(%)
Control	95.11±*0.22 a*	0.63±0.22 a	1.25±0.02 a	0.17±0.04 a
가공 50	93.76±3.25 a	0.59±0.04 a	1.08±0.02 b	0.17±0.00 a
가공 200	93.08±0.27 a	0.70±0.06 a	0.95±0.04 c	0.18±0.00 a
가공 1000	94.71±0.78 a	0.52±0.09 a	1.01±0.02 c	0.19±0.02 a

*평균값±표준오차

*유의적 차이를 보이는 시료는 다른 문자로 표기(유의수준 $\alpha=0.05$)

배추의 일반성분은 대부분이 수분으로 나타났으며 조단백함량에서 유의적인 차이가 나타났지만 수치의 차이는 매우 작게 나타났다. 회분과 조지방 함량은 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

(2) 영양성분 분석

(가) 방법

① 배추의 무기성분 분석

- 시료는 극초단파분해기(Multi wave 3000, anton paar, Graz, Australia)를 이용하여 분해하였으며 시료 0.3 ± 0.3 g에 질산 10 mL를 가하여 분해하였다.
- 분해된 시료액을 50 mL를 플라스크에 정용하여 시험용액으로 사용하였으며 표준용액(Multi Element calibration standard 21, 100 μ g/mL, ICP grade, Perkin Elmer, MA, USA)과 함께 ICP-OES(Optima8300, Perkinelmer)를 이용하여 분석하였다.
- 유도결합질량분석기(plasma control Gas flow)의 작동조건은 Plasma 10 L/min, Auxiliary 0.2 L/min로 하였고, RF Power 1450 watts, Pum flow rate 1.5 mL/min으로 하였다.
- 각 무기성분의 검출파장은 칼륨: 766.490 nm, 칼슘: 317.933, 철:238.204, 나트륨: 589.592이었다. 인의 경우 몰리브덴청 비색법을 이용하여 분석하였으며 가시/자외선분광광도계(Optizen 2120UV Plus, Mecasys, Daejeon, Korea)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② 배추의 비타민 분석

- 비타민 함량은 식품공전의 시험방법을 기준으로 하여 비타민C, Vitamin B1,2,3의 함량을 분석하였다. 비타민C의 경우 5% metaphosphoric acid첨가하고 sonicator를 이용하여 30분~1시간동안 추출하여 시험용액으로 사용하였다.
- 시험용액은 고속액체크로마토그래피(Agilent 1200 Series, Agilent, CA, USA)를 통하여 분석하였다. 분석조건으로 컬럼은 Peakman sp. AQ-C18(4.6 X 250 mm, 5 μ m, Ammerbuch, Germany)을 사용하였으며 컬럼온도 25 $^{\circ}$ C, 반응액의 유속 1 mL/min, 시료주입량 20 μ L로 하였다.
- 분석조건으로 컬럼은 Unison US-C18(2 mm \times 150 mm \times 5 μ m, Almtakt, Ringoes, NJ, USA)을 사용하였으며 컬럼온도는 35 $^{\circ}$ C, 반응액의 유속은 0.3 mL/min, 시료주입량은 0.5 μ L로 하였다.

(나) 결과

표 3-5-32. 배추의 영양성분 분석 결과(mg/100g)

	Korean cabbage			
	Control	가공50	가공200	가공1000
P	38.9±1.36 ¹ a ²	26.1±0.26c	26.4±0.20c	31.3±0.07b
Mg	17.4±0.23a	12.1±0.37c	14.0±0.12b	13.3±0.02b
K	220.7±74.95a	228.2±0.25a	237.3±0.12a	234.2±3.23a
Ca	44.2±0.46a	41.5±1.67a	35.4±0.04b	42.4±0.49a
Mn	0.3±0.00a	0.2±0.01c	0.2±0.01d	0.3±0.01c
Na	13.7±0.18b	9.2±0.02d	11.2±1.28a	9.6±0.05d
Fe	0.4±0.01b	0.4±0.01b	0.3±0.01b	0.4±0.02a
Zn	0.3±0.02a	0.2±0.02b	0.3±0.00a	0.3±0.00a
Vitamin B1	0.02±0.00b	0.017±0.00c	0.03±0.00a	0.02±0.00b
Vitamin B2	0.02±0.00b	0.03±0.00a	0.03±0.00a	0.03±0.00a
Vitamin B3	0.03±0.00c	0.02±0.00d	0.05±0.00a	0.03±0.00b
Vitamin C	20.2±0.57b	23.2±0.25a	19.8±0.12bc	23.1±0.14a

¹평균±표준편차

²시료 간 사후검정 결과 (P<0.05)

시료 처리구간 영양 성분상의 큰 차이는 없었으나 황토가공소재 처리구가 Control대비 칼륨, 비타민 B3, 비타민 C의 함량이 높은 것으로 나타났다.

(3) 항산화 활성 측정

(가) 방법

① 시료추출

본 연구에 사용된 배추는 먼저 외피의 흙을 제거한 뒤 세척하여 실험에 사용하였다. 시료를 약 2~3 mm 크기로 자른 후, 시료 당 3배에 해당하는 80% ethanol(w/v)을 가하여 실온에서 자동 교반기(VS-130SH, Vision, Korea)를 이용하여 24시간 교반하여 추출하였다. 추출액은 여과지 (Hyundai No.22, Korea)를 사용하여 여과한 후 여과한 여액을 40℃의 수욕상에서 rotary vacuum evaporator(N-N1, Eyela, Japan)를 사용하여 감압 농축하고, 동결건조기(FD8508, Ilshin, Korea)로 건조하여 -18℃ 이하로 냉동 보관하여 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정방법

- 폴리페놀 화합물 함량은 페놀성 물질인 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법을 응용하여 측정하였다.
- 20 mg/mL의 농도로 3차 증류수에 희석한 추출액 0.5 mL에 1 M Folin Ciocalteu (Sigma, USA) 0.5 mL를 가하고 3분간 정치한 다음 10% Na₂CO₃용액 1.5 mL를 가하여 암실에서 1시간 동안 정치한 후 분광광도계(Biotex unstrument powerwave XS, Pascallbio, Korea)를 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- Gallic acid (Sigma, USA)를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 mg/g로

나타내었다.

② DPPH 라디칼 소거활성

- 배추 추출물의 전자공여능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma)을 이용하여 시료의 라디칼 소거활성(radical scavenging activity)을 측정하는 Blois 방법을 응용하여 측정하였다.
- 20 mg/mL의 농도로 3차 증류수에 희석한 추출액 0.2 mL에 0.2 mM DPPH 0.6 mL를 가하고 vortex mixer를 사용하여 실온에서 15분간 반응시킨 후 분광광도계를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- 대조구는 시료 대신 3차 증류수를 넣어 측정하였으며, 배추 처리구와 무처리구의 값을 비교하여 free radical 소거활성을 결정하였다.

③ FRAP assay

- FRAP 측정 방법은 Benzie와 Strain의 방법을 응용하여 측정하였다. FRAP reagent는 50 mL acetate buffer (300 mM, pH 3.6)를 37°C에서 15분 동안 가온한 후, 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma) 5 mL와 20 mM ferric chloride($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 5 mL를 가하여 제조하였다.
- 제조된 FRAP reagent 1.5 mL에 20 mg/mL의 농도로 3차 증류수에 희석한 추출액 50 μL 를 가하고 vortex mixer를 사용하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 분광광도계를 사용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- Blank는 시료 대신 3차 증류수를 넣어 측정하였다. 0~1 mM의 농도로 작성한 ferric sulfate($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)의 표준곡선을 기준으로 FRAP 값을 나타내었다.

(나) 결과

① 총 폴리페놀 함량

무처리, 황토가공(50, 200, 1,000)의 조건으로 재배한 4종류의 배추 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량을 건조시료 1 g 당 gallic acid(그림. 5-7)를 기준으로 하여 나타낸 결과는 표 5-9와 같다. 배추에는 항산화 활성이 있는 각종 폴리페놀 물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있는데 본 연구에서 배추 추출물의 총 폴리페놀 함량은 무처리군, 황토가공 순으로 높게 나타났으며, 가공 황토의 경우 농도가 높아질수록 총 폴리페놀 함량이 높아지는 경향을 보였다. 50배 희석시료의 총 폴리페놀 함량은 3876.15 $\mu\text{g/g}$ 이었고 200배 희석시료와 1,000배 희석시료의 경우는 각각 3914.69 $\mu\text{g/g}$, 5286.56 $\mu\text{g/g}$ 으로 황토가공의 농도와 무관함을 나타내었다.

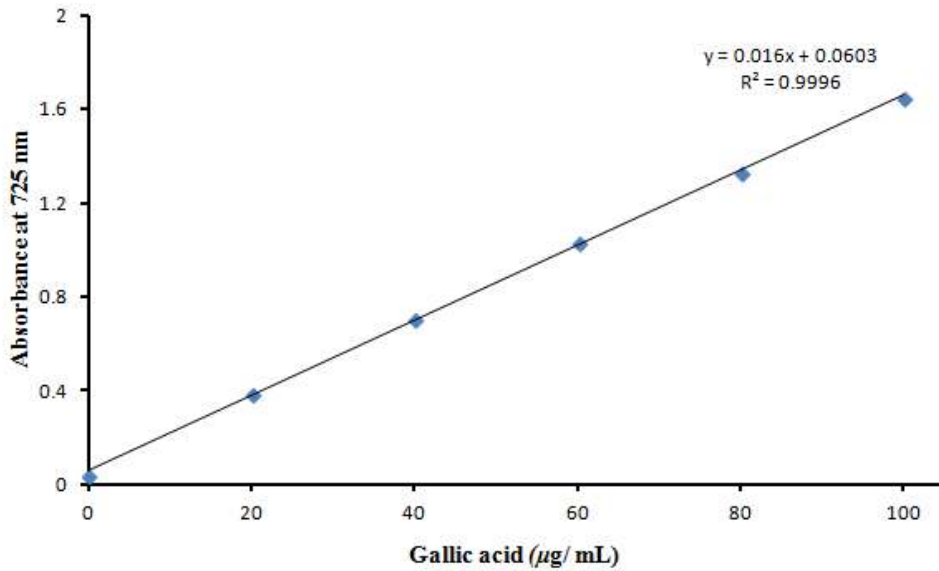


그림 3-5-16. Gallic acid 의 표준곡선

표 3-5-33. Total polyphenol 함량 측정결과

Treatments	Total polyphenol (µg/g GAE ¹⁾)
Control	6433.44 ± 12.50 ^{a2)3)}
50 ppm	3876.15 ± 4.77 ^d
200 ppm	3914.69 ± 27.78 ^c
1,000 ppm	5286.56 ± 13.62 ^b

¹⁾GAE: gallic acid equivalents.

²⁾Values are mean ± SD (n=6).

³⁾Values with different letters with in the same column differ significantly ($p < 0.05$).

② DPPH 라디칼 소거활성

DPPH 라디칼 소거 활성은 보라색 화합물인 DPPH의 비교적 안정한 free radical이 항산화 활성을 지닌 물질과 반응하여 전자나 수소를 받아 환원되어 탈색되는 특성을 이용하는 분석방법으로 다양한 식물체의 항산화 활성을 검증하는데 주로 사용된다. (+)control로는 ascorbic acid를 사용하였으며 standard 표준곡선은 그림과 같다. 토양의 조건을 달리하여 재배한 배추 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 표와 같다. 총 4종류의 배추 추출물의 DPPH radical 소거활성을 비교해 본 결과 황토가공을 이용하여 재배한 배추의 DPPH 활성은 무처리군으로 재배한 배추에 비해 낮은 것으로 나타났다. 생황토, 무처리 군은 각각 97.04%, 95.14 %로 가공 황토 군보다 높았으며 황토가공은 폴리페놀함량 측정 결과와 마찬가지로 희석배수와는 무관하였다.

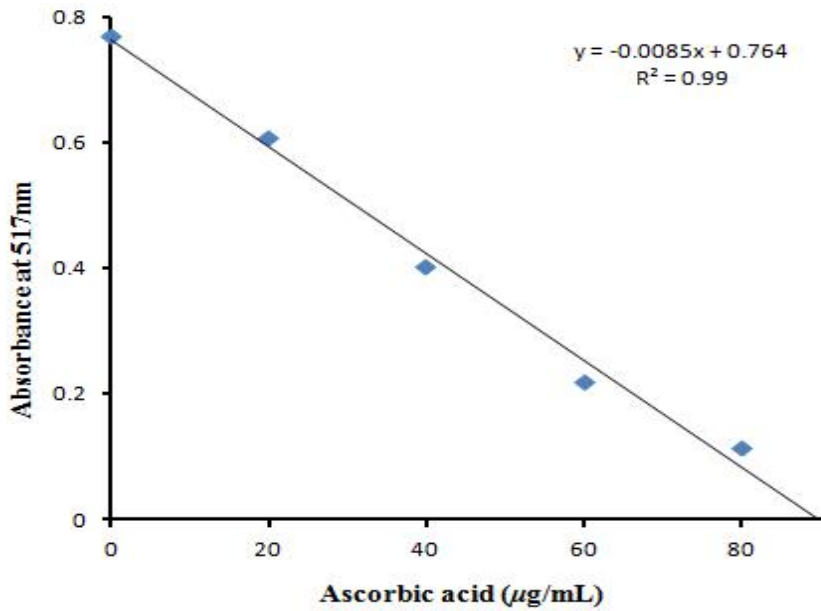


그림 3-5-17. Ascorbic acid 의 표준곡선

표 3-5-34. 배추 추출물의 DPPH radical 소거능 측정 결과

Treatments	DPPH radical scavenging activity (%) ¹⁾
Control	95.14 ± 0.12 ^{a2)}
50 ppm	87.68 ± 0.42 ^d
200 ppm	92.44 ± 0.11 ^c
1,000 ppm	94.28 ± 0.20 ^b

¹⁾Values are mean ± SD (n=6)

²⁾Values with different letters within the same column differ significantly ($p < 0.05$).

③ FRAP assay

FRAP법은 전자공여 능력을 통해 산화 활성을 검증하는 방법 중 하나로써 산화제로 작용하는 Fe^{3+} 이 항산화제와의 반응을 통해 Fe^{2+} 으로 환원되어 청색을 띠게 된다. 0~1mM의 $FeSO_4 \cdot H_2O$ 표준곡선은 그림 5-9과 같고 토양의 조건을 달리하여 재배한 배추 에탄올 추출물의 FRAP value는 표 5-11에 나타내었다. 라디칼 소거활성 (표 5-10) 패턴과 유사하게 무처리 군의 FRAP value는 황토가공 군보다 높았으며 황토가공은 농도가 높아질수록 FRAP value가 증가하는 경향을 나타내었다. 환원력이 클수록 전자공여능이 높아진다는 보고와 식물에 각종 폐놀성 화합물 존재 시 높은 FRAP 환원력을 나타낸다는 보고와 같이 본 실험의 FRAP 환원력도 같은 결과를 보였다.

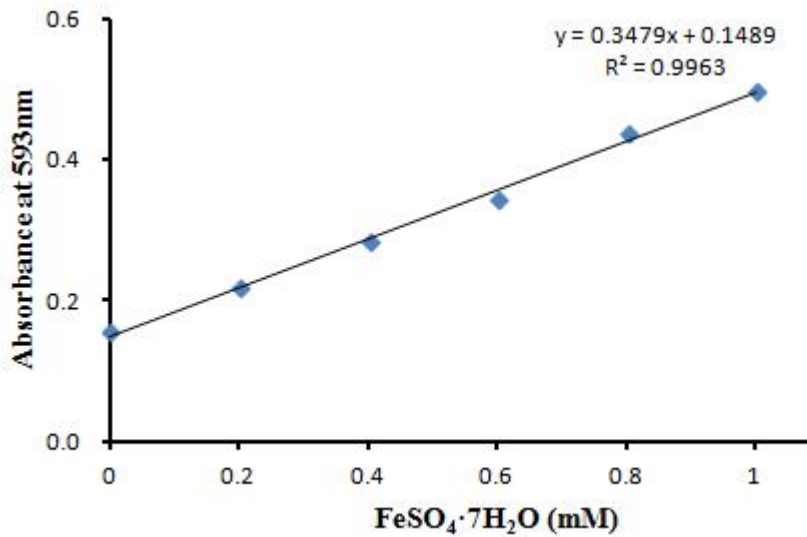


그림 3-5-18. Ferric sulfate 의 표준곡선

표 3-5-35. FRAP value of Korean cabbage extract

Treatments	FRAP value (mM) ¹⁾
Control	1.330±0.01 ^{a2)}
50 ppm	0.86±0.00 ^d
200 ppm	0.88±0.00 ^c
1,000 ppm	1.09±0.00 ^b

¹⁾Values are mean±SD (n=6)

²⁾Values with different letters within the same column differ significantly ($p < 0.05$).

본 연구에서 무처리, 황토가공소재(50, 200, 1,000)로 조건을 달리하여 재배한 배추 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하고 항산화 활성을 비교하였다. 총 폴리페놀 함량과 항산화 활성 모두 무처리, 황토가공 순이었고 이 세 가지 방법이 서로 높은 상관관계를 나타내었다. 대부분의 페놀성 물질이 radical을 효과적으로 제거하기 때문에 일반적으로 식물에 함유된 총 폴리페놀과 플라보노이드 등 페놀성 물질의 함량이 많을수록 항산화 활성이 증가되는 것으로 알려져 있다. 황토가공소재의 경우 무처리군보다 항산화 활성과 총 폴리페놀 함량이 낮았지만 적은 농도에서도 수치상 높은 항산화능력과 총 폴리페놀 함량이 높은 것으로 보아 향후 보다 많은 시료와 다양한 방법으로 재검증 할 필요가 있다고 사료된다.

(4) 조직감 측정

(가) 방법

① Texture analyzer 측정 방법

배추의 조직감 분석절차는 다음과 같다.

- 4°C에 보관한 5종의 시료를 4주 동안 일주일 간격으로 저장기간에 따른 조직감 변화를 측정하였다.
- 실험 2시간 전에 상온에서 배추를 보관한 후 실험을 실시하였다.
- 배추시료는 뿌리부분에서 겉표면이 초록색인 부분 제거한 후 가로 2cm세로 8cm 두께 0.5cm로 절단 하였다.
- Texture Analyzer를 이용하여 cutting probe를 이용하여 1mm/sec 속도로 절단 실험(cutting Test)을 수행하였다.
- 배추의 절단강도(cutting force)은 최소 7회 반복하여 측정되었다.

② 패널에 의한 조직감 측정 방법

- 냉장보관(10±1°C)한 배추의 잎사귀 부분은 제거 한 뒤 줄기부분만을 묘사분석에 사용하였으며 시료는 평가 2시간 전 상온에 방치하였다.
- 배추의 줄기부분은 8*2*0.5 cm(가로*세로*높이)로 잘라 패널들에게 제공되었다.
- 이 실험에 참여한 패널은 단국대학교 식품영양학과 대학원생 6명(여자5명, 남자1명)으로 구성되었다.
- 평가 지표는 경도, 아삭함, 질긴정도, 촉촉함으로 배추의 조직감과 관련된 핵심 관능지표로 선정하였으며 상온의 물이 palate cleanser로 함께 제공되었으며 평가는 1주일 간격으로 총 4주간 이루어졌다.



그림 3-5-19. 평가 중인 패널



그림 3-5-20. 평가배추시료

(나) 결과

저장기간에 따른 일반배추(무처리)와 황토가공소재(50, 200, 1000)처리 배추 4종류의 절단강도(cutting force) 비교를 통한 조직감 변화를 보여주고 있다. 무처리배추 실험에서 저장기간에 따라 절단강도가 일정하게 증가함을 보여주었다. 일반적으로 황토가공배추인 경우는 저장기간이 경과함에 따라 각각 다른 경향을 보여주었다. 상대적으로 적은 양인 황토가공소재 50을 처리한 황토가공배추의 경우 1주 저장 후 급격한 절단강도의 증가를 나타냈으며 황토가공소재 1000의 황토가공배추는 저장기간의 변화에 따라 완만한 증가를 보여주었다. 이러한 경향은 무처리 배추와 비슷한 경향과 강도를 나타내었다. 가공 200 시료는 3주 저장기간까지 황토가공50 배추와 비슷한 절단강도의 경향을 보여주었지만 3주 저장기간이 지나면서 점진적으로 절단강도가 감소하는 경향을 나타내었다. 위의 결과로부터 무처리 배추와 가공1000 처리 배추는 저장 기간에 따라 품질의 변화가 크게 나타나지 않았으며, 가공50의 많은 양을 첨가한 황토가공처리 배추만

이 저장기간이 증가함에 따라 급격하게 강도가 증가하여 저장 후에 품질이 좋아 지는 것으로 나타났다.



그림 3-5-21. 배추줄기의 TA측정 결과

표 3-5-36. 배추 줄기의 TA측정 결과

시료	저장기간				
	0 주	1 주	2 주	3 주	4 주
무처리	2194±90 ^{b*}	2322±70 ^a	2345±156 ^a	2376±139 ^a	2431±167 ^a
가공 50	1512±83 ^a	2676±145 ^a	2723±163 ^a	2891±104 ^b	3032±102 ^c
황토가공 200	2011±172 ^b	2586±139 ^a	2661±127 ^a	2504±62 ^{ab}	2444±73 ^{ab}
황토가공 1000	2296±153 ^b	2336±99 ^a	2443±54 ^a	2444±73 ^{ab}	2564±69 ^b

¹평균값±표준오차

표 3-5-37. 배추 줄기의 관능특성 강도

	배추															
	Control				가공 50				가공 200				가공 1000			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
경도	8 ¹	7	8	7	12	10	10	10	5	10	10	11	7	11	8	10
아삭함	12	10	10	8	13	12	10	10	6	8	10	12	13	10	8	12
질긴정도	10	10	9	5	8	7	8	5	12	13	12	4.5	13	11	8	4
촉촉함	12	11	10	8	13	13	9	8	12.5	8	6	8	10	8	8	8

¹Consensus로 나타낸 특성강도

저장기간에 따른 패널에 의한 배추줄기의 조직감 평가 결과로 경도와 아삭함의 경우 대조구 시료는 저장기간이 지나면서 감소하는 추세를 보이는 반면 황토가공 처리구는 증가하거나 유

지 되는 경향을 나타냈다. 질긴 정도의 경우 모든 시료가 비슷한 경향을 나타내었고 촉촉함의 경우 저장기간 동안 감소되는 경향을 나타내었으나 control 대비 황토가공 처리구의 감소율이 낮은 것을 확인할 수 있었다. 이는 TA 측정치와 유사한 결과를 나타내며 황토가공이 배추의 조직감 유지에 영향을 미친 것으로 판단된다.

황토가공의 처리가 배추의 영양성분 및 항산화 활성에 대하여 control 대비 높은 수치를 보이는 않았으나 배추의 저장성향상에 영향을 준 것으로 사료되며 이는 황토가공처리 배추의 상품화시 중요한 이점이 될 것으로 판단된다.

바. 토양 조건을 달리하여 재배한 장뇌삼의 진세노사이드 함량변화

(1) 재료 및 방법

장뇌삼재배를 위한 황토가공 처리 조건은 500, 1000, 2000ppm의 양으로 3반복 난괴법에 의하여 2주 간격으로 3회 처리하였다 (3년근에 처리하여 4년근째 수확).

① 재료 및 시약

본 연구에 사용된 장뇌삼은 먼저 외피의 흙을 제거한 뒤 세척하여 약 2~3 mm 크기로 자른 후, 동결건조 하여 사용하였다. 장뇌삼의 진세노사이드를 분석하기 위한 표준품인 진세노사이드 Rg₁, Rb₁는 WAKO(osaka, Japan) 제품을 사용하였으며 Rg₃(S)는 LKT laboratories(st Paul, MN, USA) 제품을 사용하였고, 아세토나이트릴과 메탄올은 SAMCHUN(Pyeongtaek, Korea) HPLC용을 사용하였다.

② UPLC 분석방법

진세노사이드 3종(Rg₁, Rb₁, Rg₃) 분석에 사용한 초고성능액체크로마토그래피(UPLC)는 Waters ACQUITY UPLC System(Milford, MA, USA)이고, 칼럼은 Symmetry C18 Column (particle size 100Å, inner diameter 3.5 µm, 4.6 mm X 75 mm; Waters, Milford, MA, USA), 칼럼온도는 35°C이며 검출기는 자외부흡광광도계 (측정파장 203 nm)를 사용하였다. 이동상은 18% acetonitrile(ACN)와 100% acetonitrile을 gradient로 하였으며 유속은 1.0 mL/min으로 하였다. 분석 중 이동상의 비율은 표 3-5-38에 나타내었다. 실험에서 사용한 진세노사이드 표준품은 총 3종(Rg₁, Rb₁, Rg₃)을 사용하였고, 표준품에 메탄올을 가하여 초음파 분산장치로 완전히 녹인 후 0.45 µm syringe filter로 여과하여 표준액으로 하였다. 진세노사이드 분석 시료는 1 g을 정밀히 달아 70% 메탄올 50 mL을 가하여 70~80° C의 수욕상에서 1시간 환류냉각 추출한 후 실온으로 냉각하고 3,000 rpm에서 원심분리한 다음 상등액을 취하였으며 잔류물에 대하여 위의 조작을 1회 더 반복하여 상등액을 합한 후 60°C 미만의 온도에서 감압농축 하였다. 농축물을 증류수 2 mL에 용해 한 다음 0.45 µm syringe filter로 여과하여 분석에 사용하였으며, UPLC 주입량은 5 µl로 하였다.

표 3-5-38. UPLC system에서 유동성 성분 구성

Time (min)	Mobile phase (%)	
	18% ACN	100% ACN
0	100	0
32	100	0
65	79	21
70	79	21
73	25	75
76	25	75
79	100	0
85	100	0

(2) 결과 및 고찰

본 연구에 사용된 장뇌삼은 무처리(대조구), 황토가공(500 ppm, 1,000 ppm, 2,000 ppm)로 총 4종을 분석하였으며 그중에서 진세노사이드 3종(Rg₁, Rb₁, Rg₃)의 표준물질을 그림 3-5-22에서 확인 할 수 있다. 또한 표 3-5-39에서 각 표준품의 분리능 및 선택성을 확인할 수 있다.

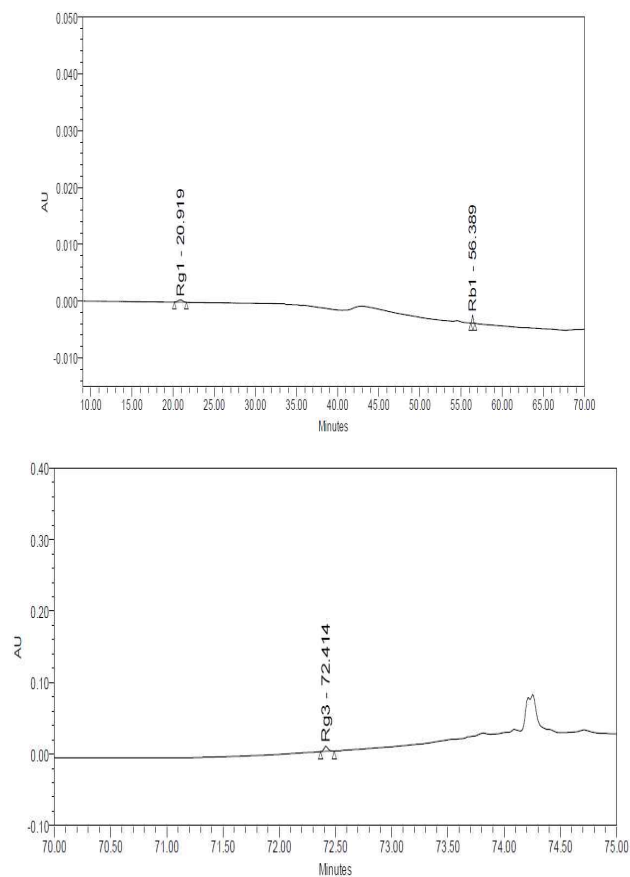


그림 3-5-22. UPLC chromatogram of ginsenosides Rb₁, Rg₁, and Rg₃

표 3-5-39. UPLC system에 의한 진세노사이드 표준물질의 매개변수

Peak name	RT	Area	Area (%)	Height	Amount
Rg ₁	20.919	181884	36.80	4086	100.000
Rb ₁	56.389	139678	28.26	13869	100.000
Rg ₃ (S)	72.414	172630	34.93	70363	85.000

진세노사이드 Rg₁의 분석결과 대조군(2.62 mg/g)에 비해 진세노사이드 Rg₁의 함량이 500 ppm(2.39 mg/g), 1,000 ppm(2.37 mg/g), 2,000 ppm(2.21 mg/g)순으로 낮아졌다. 500 ppm와 1,000 ppm에는 진세노사이드 Rg₁의 함량이 유의적인 차이는 없었으나 2,000 ppm은 Rg₁함량이 유의적으로 가장 낮음을 확인할 수 있었다.

진세노사이드 Rb₁의 분석결과 대조군(3.25 mg/g)에 비해 진세노사이드 Rb₁ 함량은 대조군과 2,000 ppm(3.21 mg/g)간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 또한, 1,000 ppm(2.95 mg/g), 500 ppm(2.68 mg/g)순으로 낮아졌으며, 500 ppm의 Rb₁함량이 가장 낮음을 확인할 수 있었다.

진세노사이드 Rg₃(S)는 홍삼에서만 특이적으로 존재하는 화합물으로써 고온 증삼조건(120° C)에서 그 생성량이 증가하는 대표적인 홍삼의 지표성분이다. 본 연구에 사용된 인삼 무처리(대조군), 생황토, 황토가공(500 ppm, 1,000 ppm, 2,000 ppm)은 검출되지 않았다.

진세노사이드 함량(Rg₁, Rb₁, Rg₃)은 대조군(5.87 mg/g)에 비해 황토가공 2,000ppm(5.42 mg/g), 1,000 ppm(5.31 mg/g), 500 ppm(5.11 mg/g)은 유의적으로 낮아졌다. 하지만 1,000 ppm와 2,000 ppm은 유의적인 차이가 없었으며 500 ppm은 총 진세노사이드 함량이 가장 낮음을 확인할 수 있었다. 황토가공처리가 장뇌삼 3년근에 처리되어 4년근이 되었을 때 수확 및 분석을 하였기 때문에 3차년 및 그 이후에도 지속적으로 황토가공처리 장뇌삼의 효과를 검증해야 할 것으로 판단된다.

현재 건강기능식품공전에서 인삼의 경우 면역력 증진, 피로개선에 도움을 줄 수 있는 가능성이 인정되었으며, 최종제품의 진세노사이드 Rg₁와 Rb₁의 합계로서 일일섭취량이 3-80 mg/g 일 경우 인삼의 건강기능성을 인정받을 수 있다. 본 실험에서 사용한 인삼 분말의 대조군, 황토가공(500 ppm, 1,000 ppm, 2,000 ppm)의 진세노사이드 Rg₁와 Rb₁의 합계는 5.11~6.44 mg/g으로 나타나 건강기능식품규격에 적합함을 확인할 수 있었다.

표 3-5-40. 장뇌삼의 진세노사이드 Rb1, Rg1, and Rg3 함량

	Ginsenosides (mg/g)			
	Rg ₁	Rb ₁	Rg ₃ (S)	Total content
Control	2.62±0.01 ^{a2)}	3.25±0.04 ^a	ND ¹⁾	5.87±0.02 ^a
500 ppm	2.39±0.04 ^b	2.68±0.06 ^c	ND	5.11±0.10 ^c
1,000 ppm	2.37±0.04 ^b	2.95±0.05 ^b	ND	5.31±0.08 ^{bc}
2,000 ppm	2.21±0.03 ^c	3.21±0.05 ^a	ND	5.42±0.08 ^b

¹⁾ND: Not detected

²⁾Values with different letters within the same row differ significantly ($p < 0.05$).

4. 시판 홍삼엑기스 제품을 활용한 장뇌삼 활용제품 품질평가 표준 프로토콜 확립 및 지표 개발

가. 시판용 홍삼엑기스 6종의 진세노사이드 함량 분석

(1) 재료 및 방법

(가) 재료 및 시약

본 연구에 사용된 시판중인 홍삼엑기스(Red ginseng extracts)는 총 6종으로 시중에서 구입하여 사용하였다. 홍삼 엑기스(Reg ginseng extracts)의 고형분 함량(Total solid)의 범위는 A 고려홍삼정골드(67.76%), B 종근당 건강 홍삼정(66.77%), C 한삼인 홍삼정 프라임(64.17%), D 정관장 G 클래스(63.28%), E 정관장 홍삼정 플러스(63.14%), F 동원 천지인홍삼정(62.61%)이며 5 ° C로 냉장보관하여 사용하였다. 진세노사이드를 분석하기 위해 표준품인 진세노사이드 Rg₁, Rb₁는 WAKO(Osaka, Japan) 제품을 사용하였으며 Rg₃(S)는 LKT laboratories(st Paul, MN, USA) 제품을 사용하였고 아세트나이트릴과 메탄올은 SAMCHUN(Pyeongtaek, Korea)의 HPLC용 제품을 사용하였다.

(나) UPLC 분석방법

진세노사이드 분석에 사용한 초고성능액체크로마토그래피(UPLC)는 Waters ACQUITY UPLC System(Milford, MA, USA)이고, 칼럼은 Symmetry C18 Column (particle size 100Å, inner diameter 3.5 µm, 4.6 mm X 75 mm; Waters, Milford, MA, USA), 칼럼온도는 35°C이며 검출기는 자외부흡광광도계 (측정파장 203 nm)를 사용하였다. 이동상은 18% acetonitrile(ACN)와 100% acetonitrile을 gradient로 하였으며 유속은 1.0 mL/min으로 하였다. 분석 중 이동상의 비율은 표 5-17에 나타내었다. 실험에서 사용한 진세노사이드 표준품은 총 3종을 사용하였고, 표준품에 메탄올을 가하여 초음파 분산장치로 완전히 녹인 후 0.45 µm syringe filter로 여과하여 표준액으로 하였다. 진세노사이드 분석 시료는 1 g을 정밀히 달아 70% 메탄올 50 mL을 가하여 70~80 ° C의 수욕상에서 1시간 환류냉각 추출한 후 실온으로 냉각하고 3,000 rpm에서 원심분리한 다음 상등액을 취하였으며 잔류물에 대하여 위의 조작을 1회 더 반복하여 상등액을 합한 후 60°C 미만의 온도에서 감압농축 하였다. 농축물을 증류수 2 mL에 용해 한 다음 0.45 µm syringe filter로 여과하여 분석에 사용하였으며, UPLC 주입량은 5 µl로 하였다.

표 3-5-41. UPLC system에서 유동성 성분 구성

Time (min)	Composition of mobile phase (%)	
	18% ACN	100% ACN
0	100	0
32	100	0
65	79	21
70	79	21
73	25	75
76	25	75
79	100	0
85	100	0

(2) 결과 및 고찰

본 연구에 사용되는 시판중인 홍삼엑기스(Reg ginseng extracts)의 고형분 함량(Total solid)의 범위는 A(67.76%), B(66.77%), C(64.17%), D(63.28%), E(63.14%), F(62.61%) 으로 총 6종을 분석하였으며 그중에서 진세노사이드 3종(Rg₁, Rb₁, Rg₃)의 표준물질을 확인 할 수 있다. 또한 각 표준품의 분리능 및 선택성을 확인할 수 있다.

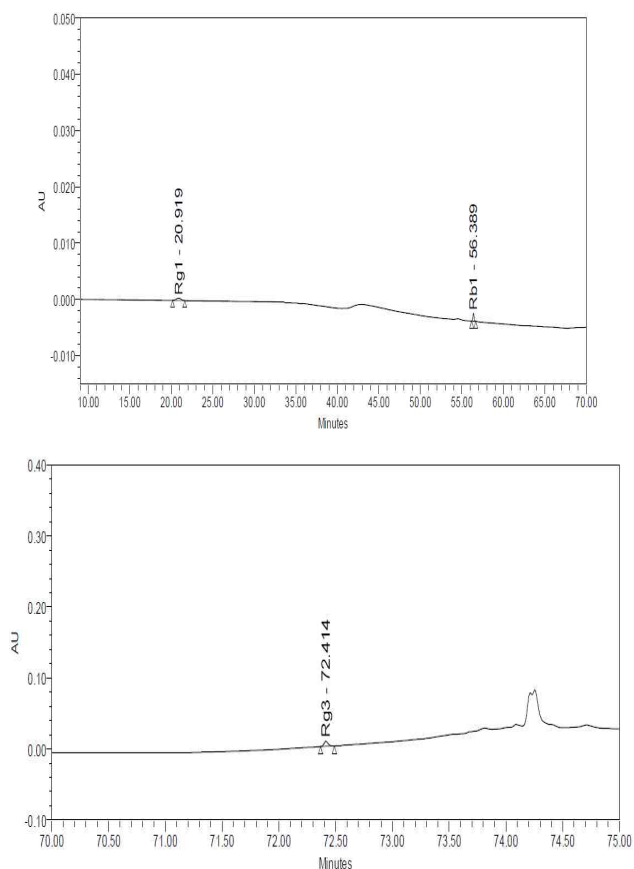


그림 3-5-23. UPLC chromatogram of ginsenosides Rb₁, Rg₁, and Rg₃.

표 3-5-42. UPLC system에 의한 진세노사이드 표준물질의 매개변수

Peak name	RT	Area	Area (%)	Height	Amount
Rg ₁	20.919	181884	36.80	4086	100.000
Rb ₁	56.389	139678	28.26	13869	100.000
Rg ₃ (S)	72.414	172630	34.93	70363	85.000

진세노사이드 Rg₁의 분석결과 F(0.70 mg/g)에 비해 A(4.35 mg/g), B(3.04mg/g), D(1.35 mg/g), E(1.31 mg/g), C(1.23 mg/g)순으로 낮아졌으며, D(1.35 mg/g)와 E(1.31 mg/g)는 유의적인 차이가 없음을 확인 할 수 있었다.

진세노사이드 Rb₁의 분석결과 F(5.06 mg/g)에 비해 A(15.56 mg/g), B(11.04 mg/g), C(6.56 mg/g), D(6.29 mg/g), E(5.52 mg/g)의 순으로 낮아졌으며 C와 D는 유의적이 차이가 없음을 확인 할 수 있었다.

진세노사이드 Rg₃(S)는 홍삼에서만 특이적으로 존재하는 화합물로써 고온 증삼조건(120° C)에서 그 생성량이 증가하는 대표적인 홍삼의 지표성분이다. 진세노사이드 Rg₃(S)분석결과 B(0.77 mg/g)에 비해 C(2.98 mg/g), F(2.71 mg/g), E(2.08 mg/g), D(2.03 mg/g), A(1.89 mg/g) 순으로 낮아졌으며 D와 E는 유의적인 차이가 없음을 확인 할 수 있었다.

진세노사이드 함량(Rg₁, Rb₁, Rg₃)은 E(8.90 mg/g)와 F(8.47mg/g)에 비해 A(21.80 mg/g), B(14.84 mg/g), C(10.76 mg/g), D(9.67 mg/g) 순으로 낮아졌으며 E와 F는 유의적인 차이가 없음을 확인 할 수 있었다.

현재 건강기능식품공전에서 홍삼의 경우 면역력 증진, 피로개선·혈소판 응집억제를 통한 혈액흐름·기억력개선·항산화에 도움을 줄 수 있다는 기능성이 인정되었으며, 최종제품의 진세노사이드 Rg₁, Rb₁, Rg₃의 합계로서 일일섭취량이 3-80 mg/g일 경우 홍삼의 건강기능성을 인정받을 수 있다. 본 실험에서 사용한 시판중인 홍삼엑기스의 진세노사이드 Rg₁, Rb₁, Rg₃의 합계는 8.47~21.80 mg/g으로 나타나 건강기능식품규격에 적합함을 확인할 수 있었다.

표 3-5-43. 홍삼의 진세노사이드 Rb₁, Rg₁, and Rg₃ 함량

Samples	Total solid (%)	Ginsenosides (mg/g)			Total content
		Rg ₁	Rb ₁	Rg ₃ (S)	
A	67.76	4.35±0.01 ^{a1)}	15.56±0.04 ^a	1.89±0.01 ^d	21.80±0.05 ^a
B	66.77	3.04±0.04 ^b	11.04±0.01 ^b	0.77±0.02 ^e	14.84±0.06 ^b
C	64.17	1.23±0.01 ^d	6.56±0.06 ^c	2.98±0.01 ^a	10.76±0.06 ^c
D	63.28	1.35±0.01 ^c	6.29±0.01 ^c	2.03±0.00 ^c	9.67±0.03 ^d
E	63.14	1.31±0.02 ^c	5.52±0.14 ^d	2.08±0.01 ^c	8.90±0.17 ^e
F	62.61	0.70±0.04 ^e	5.06±0.29 ^e	2.71±0.11 ^b	8.47±0.45 ^e

¹⁾Values with different letters within the same row differ significantly ($p < 0.05$).

나. 시판 홍삼엑기스의 레올로지 특성

(1) 재료 및 방법

(가) 재료

본 연구에 사용된 시판중인 홍삼엑기스(Red ginseng extracts)는 총 6종으로 시중에서 구입하여 사용하였다. 홍삼 엑기스(Reg ginseng extracts)의 고형분 함량(Total solid)의 범위는 A 고려홍삼정골드(67.76%), B 종근당 건강 홍삼정(66.77%), C 한삼인 홍삼정 프라임(64.17%), D 정관장 G 클래스(63.28%), E 정관장 홍삼정 플러스(63.14%), F 동원 천지인홍삼정(62.61%)이며 5° 로 냉장보관하여 사용하였다.

(나) 유변학적 특성 측정

정상유동 특성은 rheometer(Physica MCR 102, Anton Paar, Graz, Austria)의 plate-plate system 직경:50 mm, 간격:0.5 mm 을 이용하여 측정하였다. 정상유동특성 데이터는 25°C 에서 0.1-500 s⁻¹의 범위의 전단속도($\dot{\gamma}$)에서 점도를 측정하였다. 홍삼엑기스 A(67.76%), B(66.77%), C(64.17%), D(63.28%), E(63.14%), F(62.61%)의 정상유동 특성은 power law 모델식, Casson 모델식에 적용되어 계산된 σ 는 전단응력(shear stress), K는 점조도 지수(consistency index), $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(shear rate), n는 유동성지수(flow behavior index), casson 항복응력은 $\sigma_{oc}=(k_{oc})^2$, casson 점도는 $\eta_c =k_c^2$ 이다. 겔보기 점도(apparent viscosity)는 전단속도 30 s⁻¹에서 $\eta_a=K\dot{\gamma}^{n-1}$ 로 부터 결정된다.

(1) Power law model: $\sigma =k\dot{\gamma}^n$

(2) Casson model: $\sigma^{0.5}=k_{oc} + k_c\dot{\gamma}^{0.5}$

동적점탄성은 rheometer(Physica MCR 102, Anton Paar, Graz, Austria)의 plate-plate system (직경:50 mm, 간격: 0.5 mm gap)을 이용하여 측정하였다. 홍삼엑기스 A(67.76%), B(66.77%), C(64.17%), D(63.28%), E(63.14%), F(62.61%)의 동적점탄성 데이터는 25°C 에서 0.1-10.0 Hz 범위 내에서 저장탄성률(storage modulus, G'), 손실탄성률(loss modulus, G''), 복소점도(complex viscosity, η^*)가 측정되었다. 선형 점탄성 범위는 5.0 Hz에서 strain sweep으로 부터 결정되었다.

(2) 결과 및 고찰

(가) 정상유동특성 측정

시판용 홍삼 엑기스의 정상유동특성은 전단응력-전단속도 데이터를 power law 모델식(식 1)에 적용하여 얻어졌다. 시료의 전단속도가 증가함에 따라 전단응력이 증가함을 나타내었으며 이를 통해 홍삼엑기스는 전단담화(shear thinning)유체거동을 나타내고 있음을 알 수 있었다.

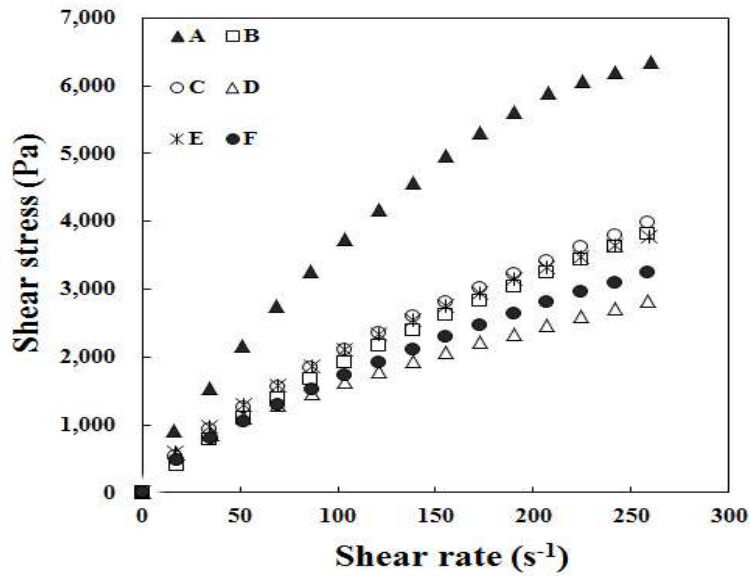


그림 3-5-24. Shear stress-shear rate plots for commercial red ginseng extracts at 25°C

유동성지수(n)에서는 시료들의 유동지수가 0.59~0.78으로 나타나 1보다 낮은 전단담화 유체이며 A(0.59)에 비해 D(0.70), C(0.70), B(0.77), E(0.78), F(0.78), B(0.78)의 순으로 높아졌으며 E, F, B는 유의적인 차이가 없음을 알 수 있었다.

겔보기 점도 $\eta_{a,100}$ (apparent viscosity, Pa · s)는 C(20.27 Pa · s)와 E(19.96 Pa · s)가 가장 높은 것으로 나타났으며 B(18.41 Pa · s), F(16.41 Pa · s), A(15.84 Pa · s), D (15.02 Pa · s)의 순으로 낮아졌다. A는 F와 D에 유의적인 차이가 없음을 알 수 있었다.

점조도 지수(Consistency index, Pa · s ^{n})에서는 A(105.78 Pa · s ^{n})가 가장 높은 것으로 나타났으며 C(68.70 Pa · s ^{n}), D(59.78 Pa · s ^{n}), E(54.64 Pa · s ^{n}), B(50.55 Pa · s ^{n}), F(46.77 Pa · s ^{n})의 순으로 유의적으로 낮게 나타났다

표 3-5-44. 시판홍삼의 Power law 변수와 겔보기 점도

Sample	Total solid (%)	Apparent viscosity $\eta_{a,100}$ (Pa · s)	Consistency index K (Pa · s ^{n})	Flow behavior index n (-)
A	67.76%	15.84 ± 0.31 ^{cd1)}	105.78 ± 0.89 ^a	0.59 ± 0.00 ^d
B	66.77%	18.41 ± 0.04 ^b	50.55 ± 0.45 ^e	0.78 ± 0.00 ^a
C	64.17%	20.27 ± 0.06 ^a	68.70 ± 0.64 ^b	0.73 ± 0.00 ^b
D	63.28%	15.02 ± 0.38 ^d	59.78 ± 0.22 ^c	0.70 ± 0.01 ^c
E	63.14%	19.96 ± 0.18 ^a	54.64 ± 0.83 ^d	0.78 ± 0.00 ^a
F	62.61%	16.41 ± 0.74 ^c	46.77 ± 1.31 ^f	0.78 ± 0.00 ^a

¹⁾Values with different letters within the same row differ significantly ($p < 0.05$).

(나) 동적 유동특성

시판용 홍삼 엑기스의 동적유동특성은 각 주파수(ω)에 따른 저장탄성률(G')과 손실탄성률(G'')의 변화를 나타낸 것이다(그림 5-17). 여기서 ω 가 증가함에 따라 G' 과 G'' 가 증가하고 있어 고분자 액체의 경우와 같이 각 주파수의 의존성이 있음을 나타내고 있다. 또한 측정된 주파수 내에서 G'' 의 수치가 G' 보다 높게 나타났고 고형분 함량이 증가할수록 G' 과 G'' 모두 증가하는 경향을 보여 주었다. 따라서 홍삼 엑기스는 탄성적 성질에 비해 점성적 성질이 보다 우세하며, 고형분 함량이 증가할수록 점성 및 탄성적 성질이 증가함을 알 수 있었다.

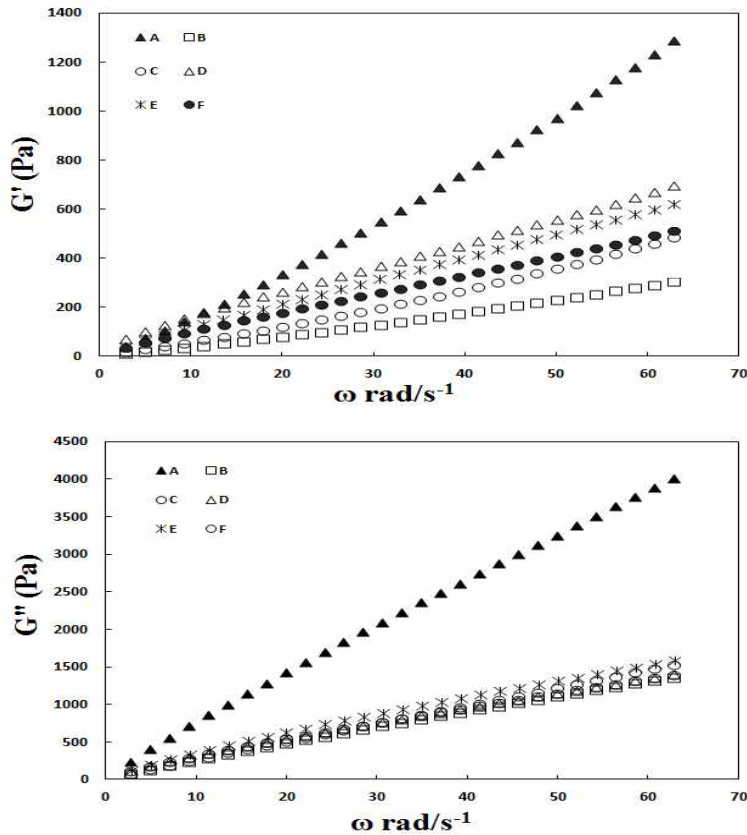


그림 3-5-25. Storage modulus (G'), Loss modulus (G'') values for red ginseng extracts at 25°C

표 5-21 에서 보여주고 있듯이 저장탄성률(G')에서는 A(536.21 Pa)가 가장 높았으며 D(376.53 Pa), E(314.20 Pa), F(263.57 Pa), C(217.80 Pa), B(131.66 Pa)순으로 저장탄성률(G')이 유의적으로 낮아졌음을 알 수 있었다.

손실탄성률(G'')에서는 A(2062.44 Pa)가 가장 높았으며 E(867.03 Pa), C(861.12 Pa), D(772.34 Pa), F(761.25 Pa), B(709.64 Pa)순으로 낮아졌으며 C와 E는 유의적인 차이가 없음을 알 수 있었다.

복소점도(η^*)에서는 A(71.03 Pa·s)가 가장 높았으며 E(30.74 Pa·s), C(29.61 Pa·s) D(28.64 Pa·s), F(26.85 Pa·s), B(24.06 Pa·s)순으로 낮아졌음을 알 수 있었다.

시료의 점탄성을 평가하는 하나의 측정치로는 G'' 과 G' 의 비율로 표현되는 손실요인 즉

$\tan \delta (G'' / G')$ 가 있다. $\tan \delta$ 가 1보다 작으면 점탄성 물질에 대해 탄성적 거동이 보다 크다는 의미이고, 반대로 1보다 크면 점성적 거동이 크다는 것을 의미한다. 모든 시료에 대해 $\tan \delta$ 값은 1보다 높은 값으로 나타나는데 이는 탄성적인 성질보다는 점성적인 성질이 보다 우세함을 의미한다.

표 3-5-45. 시판홍삼의 저장탄성률, 손실탄성률, 복소점도

Samples	Total solid (%)	Storage modulus G' (Pa)	Loss modulus G'' (Pa)	Complex viscosity η^* (Pa · s)	Tan(δ)
A	67.76%	536.21 ± 10.74 ^{ad}	2062.44 ± 7.74 ^a	71.03 ± 0.34 ^a	3.85 ± 0.06 ^b
B	66.77%	131.66 ± 1.42 ^f	709.64 ± 0.98 ^e	24.06 ± 0.04 ^f	5.39 ± 0.05 ^a
C	64.17%	217.80 ± 2.85 ^e	861.12 ± 3.89 ^b	29.61 ± 0.10 ^c	3.95 ± 0.07 ^b
D	63.28%	376.53 ± 1.68 ^b	772.34 ± 5.40 ^c	28.64 ± 0.14 ^d	2.05 ± 0.02 ^e
E	63.14%	314.20 ± 0.88 ^c	867.03 ± 15.35 ^b	30.74 ± 0.49 ^b	2.76 ± 0.04 ^d
F	62.61%	263.57 ± 1.54 ^d	761.25 ± 1.00 ^d	26.85 ± 0.05 ^e	2.89 ± 0.01 ^c

^dValues with different letters within the same row differ significantly ($p < 0.05$).

다. 시판용 홍삼엑기스 6종의 묘사분석 및 소비자평가

(1) 홍삼엑기스 Lexicon 개발



그림 3-5-26. 선정 된 6종 시료



그림 3-5-27. 평가 시료 및 표준시료모습

(가) 시료준비

- 시중에 판매되는 6종의 홍삼엑기스 제품을 선별하여 제품 설명에 따라서 물에 희석하여 시료를 제조 하였다. A 고려홍삼정골드(67.76%), B 종근당 건강 홍삼정(66.77%), C 한삼인 홍삼정 프라임(64.17%), D 정관장 G 클래스(63.28%), E 정관장 홍삼정 플러스(63.14%), F 동원 천지인 홍삼정(62.61%)
- 희석배수는 A-F제품의 제품설명을 참조하여 100ml 당 1.5-1.7g을 용해하였다.
- 6종의 희석된 시료의 Brix를 동일하게 조정하기 위하여 수분함량을 3반복 측정하였다.
- 측정된 수분 함량을 토대로 동일한 Brix의 희석시료를 평가시료로 사용하였다.

표 3-5-46. 홍삼 엑기스 수분함량 측정 결과

시료	수분함량(%)
A	32.24 ± 0.11*
B	33.23 ± 0.17
C	35.83 ± 0.13
D	36.72 ± 0.04
E	36.86 ± 0.13
F	37.39 ± 0.03

*평균값±표준편차

(나) 방법

- Screening test를 통하여 7명의 단국대학교 대학원생으로 패널선발을 한 뒤 약 1주일간 기본 맛 훈련 (10시간)을 거친 후 lexicon 개발을 시작하였다.
- 6종의 홍삼엑기스를 선별하여 공통적으로 느껴지는 객관적인 특성 13가지를 도출하였다.
- 참고문헌과 패널과의 합의를 통하여 각 특성의 reference를 개발 및 강도평가를 하였으며 개발된 reference를 토대로 6종 홍삼엑기스의 묘사분석을 15점 척도로 평가하였다.
- 평가는 1시간씩 총 5session으로 이루어졌으며 각 시료는 2반복 평가되었고 물이 palate cleanser로 제공되었다.

표 3-5-47. 홍삼엑기스의 Lexicon 및 표준시료

표준시료명	농도 및 강도(15점 척도)	
단맛	설탕 2% 용액	설탕 4% 용액
	4	8
신맛	구연산 0.05%용액	구연산 0.07% 용액
	4	8
쓴맛	카페인 0.05%용액	카페인 0.07% 용액
	4	8
떫은맛	카테킨0.05% 용액	
	6	
인공감미도	아스파탐 0.03%	
	6	
인삼향	5mm두께 인삼을 어금니로 한번 씹었을 때 느껴지는 향	
	10	
보리차향	생수 2L를 끓인 후 보리차 티백 90g을 넣고 30분 우림	
	10	
감초향	감초 20g을 생수 600g에 넣고 1시간 약불에서 끓인 후 액체시료만 사용	
	8	
당귀향	당귀 20g을 생수 450g에 넣고 30분 약불에서 끓인 후 액체시료만 사용(A)	A용액을 생수와 1:1로 희석하여 사용
	13	7
도라지향	생도라지를 씻은 후 5mm 두께로 잘라 표면에서 나는 향의 강도	
	8	
아린느낌	생강 20g을 1mm두께로 잘라 생수 400g에 넣고 30분간 약불에서 끓인 후 우려난 액체 시료만 사용	
	16	
바디감	생수 30ml	우유30ml
	1	11
갈색도	TLAS 표준 색표집 S3060-Y60R	TLAS 표준 색표집 S5040-Y60R
	7	13

표 3-5-48. 7명의 패널에 의한 묘사분석 결과-1

시료	단맛	쓴맛	신맛	떫은맛	인공감미료 맛	인삼향
A	3.8 a*	6.2 a	4.4 a	7.0 a	3.6 a	11.0 a
B	3.4 a	5.2 abc	4.6 a	6.8 a	3.2 a	9.8 a
C	3.0 a	5.4 ab	4.0 a	6.2 a	3.4 a	8.6 a
D	3.4 a	4.6 bc	4.6 a	4.8 a	3.8 a	9.4 a
E	3.0 a	4.2 c	4.0 a	5.6 a	3.4 a	8.2 a
F	3.6 a	5.6 ab	4.6 a	6.2 a	3.6 a	8.8 a

* 시료간의 유의성 검정 결과



그림 3-5-28. 평가 중인 패널



그림 3-5-29. 평가 시료

표 3-5-49. 7명의 패널에 의한 묘사분석 결과-2

시료	도라지향	당귀향	보리차향	감초향	아린느낌	바디감	갈색도
A	7.8 a*	6.0 a	3.8 a	6.6 a	6.2 a	9.8 a	8 d
B	7.6 a	6.2 a	4.2 a	7.0 a	4.8 bc	9.4 a	13 b
C	7.2 a	6.2 a	3.4 a	5.8 a	5.6 ab	9.8 a	14.5 a
D	6.4 a	5.2 ab	4.2 a	6.8 a	4.2 c	8.2 a	9.1 cd
E	6.0 a	4.8 b	3.6 a	6.4 a	4.4 c	8.6 a	9.6 c
F	7.0 a	4.6 b	4.0 a	6.2 a	5.0 bc	10.2 a	14.5 a

* 시료간의 유의성 검정 결과

패널에 의한 평가결과 쓴맛, 당귀향, 아린느낌, 갈색도에 대해서만 시료간의 유의적인 차이를 나타냈다. E제품이 가장 쓴맛이 적은 것으로 나타났으며 당귀향의 경우 E, F제품이 낮게 평가되었다. 아린느낌의 경우 D, E 제품이 낮은 것으로 나타났고 갈색도의 경우 C와 F제품이 높게 평가되었다. 제품의 특성상 단맛, 신맛과 같은 기본맛은 매우 적으며 쓴맛과 당귀향, 인삼향, 도라지향이 강하게 나타나므로 홍삼엑기스의 품질지표로 중요한 인자로 판단된다. 갈색도와 바디감도 중요인자로 간주될 수 있다.



그림 3-5-30. 묘사분석 spider web 결과

(다) 소비자평가

- 31명의 소비자에게 RCBD 실험디자인에 의하여 6종의 시판 홍삼엑기스 제품에 대한 기호도 조사를 실시하였다.
- 시료의 준비는 위의 묘사분석과 같은 시료를 사용하였으며 물과 함께 제공되었다.
- 30mL의 시료를 흰 종이컵에 3 digit random code로 표기하여 제공하였으며 시료의 순서는 랜덤하게 제공되었다.

(라) 소비자평가 결과

표 3-5-50. 시판 홍삼 엑기스 시료의 기호도 평가 결과

시료	전체품질기호 도	색상	홍삼맛(향)
A	4.4 ab	5.2 ab	4.6 a
B	3.8 b	5.0 ab	4.1 a
C	4.4 ab	4.8 b	4.3 a
D	4.6 a	5.6 a	4.4 a
E	4.7 a	5.6 a	4.8 a
F	4.6 ab	5.2 ab	4.7 a

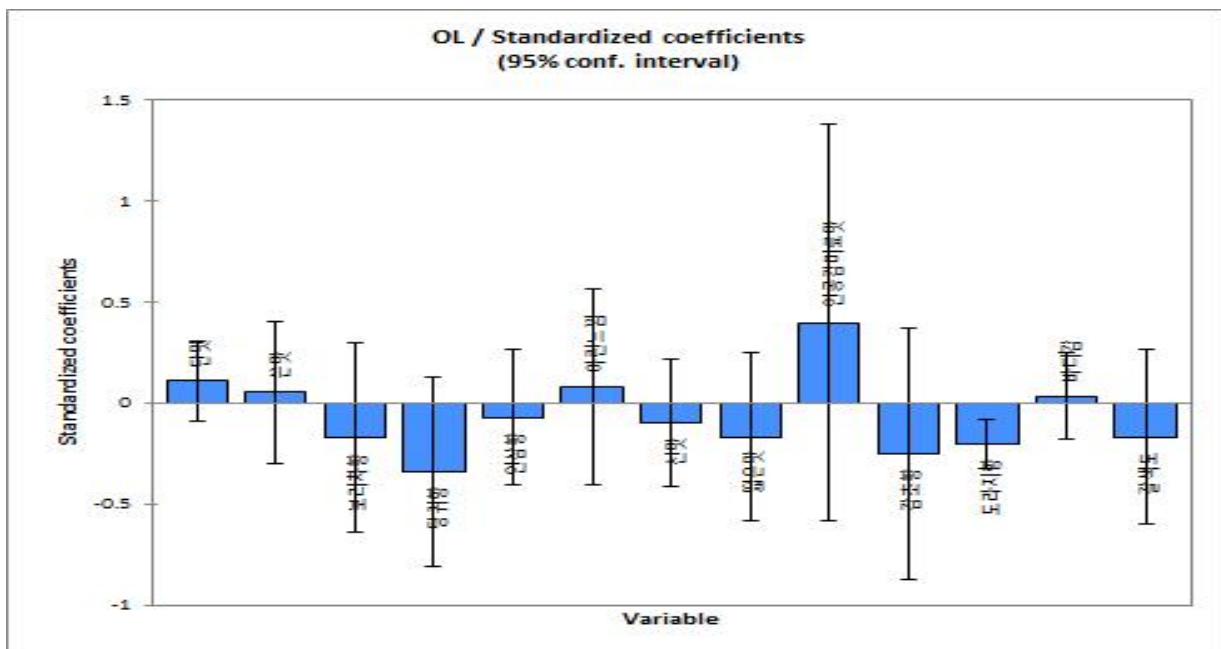


그림 3-5-31. Partial least square regression 분석결과

전반적인 전체품질의 기호도는 B를 제외한 나머지 제품에서는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 색상과 홍삼맛 향에 대해서도 제품 간 차이가 크지 않은 것으로 나타났다. 그림

5-23의 PLS분석결과 홍삼엑기스의 전반적 기호도에 기여하는 특성들 중 인공감미료맛 즉, 단맛을 제외하고는 부정적인 특성이 많은 것으로 보여지며 이는 제품의 특성상 소비자들의 섭취에 있어 부정적인 특성으로 고려되는 쓴맛과 인삼향 등이 지배적이므로 전반적품질기호도 점수가 낮게 평가되며 홍삼엑기스의 다양한 특성이 소비자의 기호도에는 부정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다. 그러므로 홍삼엑기스의 전반적기호도의 향상을 위해서는 제품 특성상 부정적인 특성으로 나타나는 떫은맛, 당귀향, 감초향 등을 줄이는 방안을 모색해야 할 것으로 생각된다.

라. 저장기간에 따른 오이 조직감 측정 및 묘사분석

※ 가공 황토 슬러리 처리

황토가공 슬러리를 희석하여 오이재배에 사용하였으며 그 희석배수는 아래와 같이 표기하였다.

-가공 50배 희석 (가공 50으로 표시)

물1L : 황토슬러리 20mL

-가공 황토 200배 희석 (가공 200으로 표시)

물1L : 황토슬러리 5mL

-가공 황토 1000배 희석 (가공 1000으로 표시)

물1L : 황토슬러리 1mL

(1) 방법

(가) Texture analysis

- 냉장보관($10\pm 1^{\circ}\text{C}$)한 오이를 높이 1cm 잘라 과육부분만 측정에 이용하였다.
- Broolfield texture analyzer를 사용하여 compression test를 실시하였고 probe는 직경 2mm의 실린더 probe를 사용하여 1mm/sec 의 속도로 시료의 7mm 침투하여 측정하였다.
- 오이의 Hardness 와 crispiness를 측정하였으며 한 조각의 시료 당 3반복 측정, 10조각을 측정하여 한 실험구당 총 30반복 측정하였다.
- 측정은 1일 간격으로 총 3일간 이루어졌다.

(나) 패널평가

- 냉장보관($10\pm 1^{\circ}\text{C}$)한 오이를 껍질을 제거한 뒤 1*1*1cm(가로*세로*높이)로 잘라 과육부분만 측정에 이용하였다.
- 이 실험에 참여한 패널은 단국대학교 식품영양학과 대학원생 7명(여자2명, 남자5명)으로 구성되었다.
- 오이의 단단함과 아삭함을 평가 하였으며 상온의 물이 palate cleanser로 함께 제공되었으며 평가는 하루 간격으로 총 3일간 이루어졌다.
- 평가는 순위법을 이용하여 진행하였다.

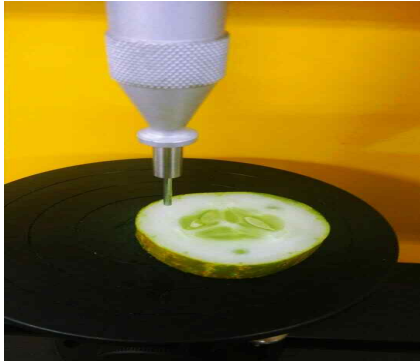


그림 3-5-32. TA측정 모습

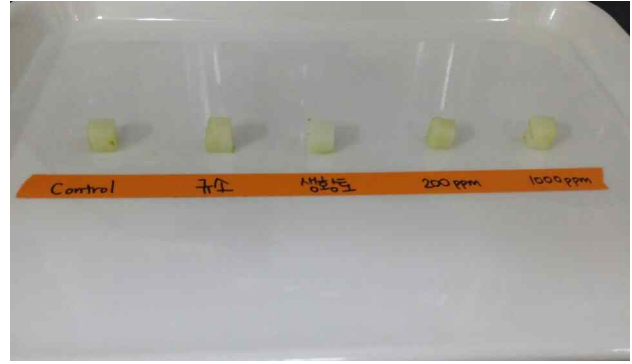


그림 3-5-33. 패널들에게 제공된 시료 모습

(2) 결과

표 3-5-51. TA로 측정한 저장기간에 따른 오이의 경도(Hardness)변화(g)

	저장기간		
	Day1	Day2	Day3
Control	398.63 ¹ ±36.09 a ² B ³	423.00±37.32 aA	353.53±35.51 cC
생활토	403.80±33.28 aA	410.33±36.37 abA	405.03±50.66 aA
규소	411.63±38.59 aA	408.73±26.39 abA	381.90±26.58 bB
가공200	377.37±24.34 bA	368.26±37.96 bA	383.63±27.22 bA
가공1000	379.53±28.50 bA	394.60±32.21 cA	387.30±25.44 bA

¹ 평균±표준편차

² a: 제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$).

³ A: 저장 기간 간의 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$).

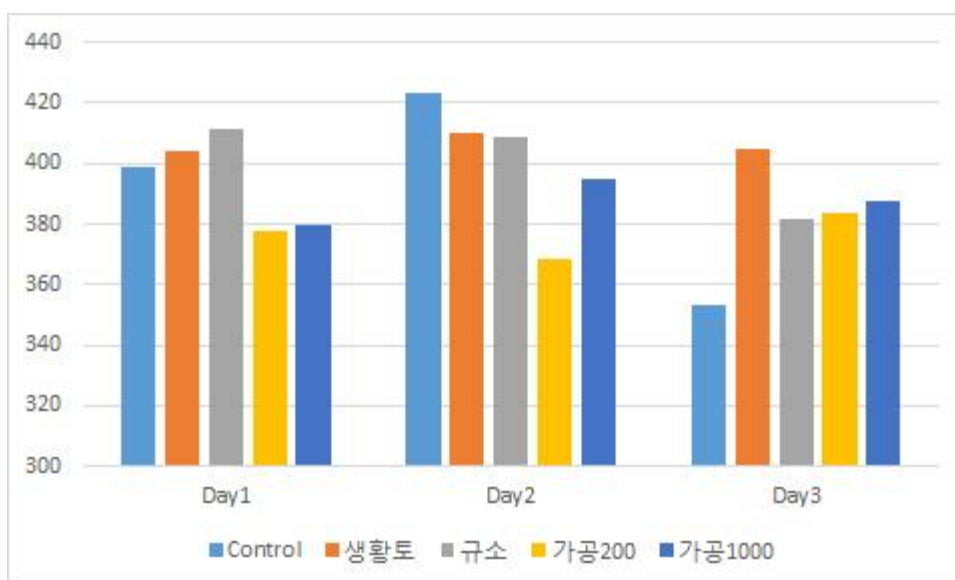


그림 3-5-34. TA로 측정한 저장기간에 따른 오이의 경도(Hardness)

표 3-5-52. TA로 측정된 저장기간에 따른 오이의 아삭함(Crispiness)변화 (Quantity of fractures)

	저장기간		
	Day1	Day2	Day3
Control	54.5 ¹ ±11.06 c ² C ³	109.70±16.80 aA	122.27±18.32 aB
생황토	64.23±7.80 bB	100.13±15.61 bcA	48.73±13.49 dC
규소	65.93±12.89 bC	105.77±13.36 abA	85.33±15.04 bB
가공200	111.07±22.59 aA	92.44±21.18 cB	51.00±8.79 dC
가공1000	67.30±14.09 bB	76.28±13.25 dA	62.50±8.22 cB

¹ 평균±표준편차

² a: 제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$).

³ A: 저장 기간 간의 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$).

황토가공소재 처리 오이시료는 Control대비 경도가 높지는 않으나, Control 시료는 저장기간이 진행될수록 감소하는 경향을 보인 반면 황토가공소재 처리구는 경도에 대한 안정성을 나타내었다. 이러한 결과는 황토가공의 처리가 오이의 견고성에 직접적인 영향을 미치는 것 보다 저장성에 영향을 주는 것으로 판단되며 이 결과는 배추, 무의 조직감 측정 결과와 유사한 경향을 나타낸다.

Quantity of fracture를 측정된 결과 시료간, 저장기간별 특별한 경향은 나타나지 않으며 이는 개체간의 차이가 큰 것으로 판단되므로 다양한 개체의 측정이 필요할 것으로 판단된다.

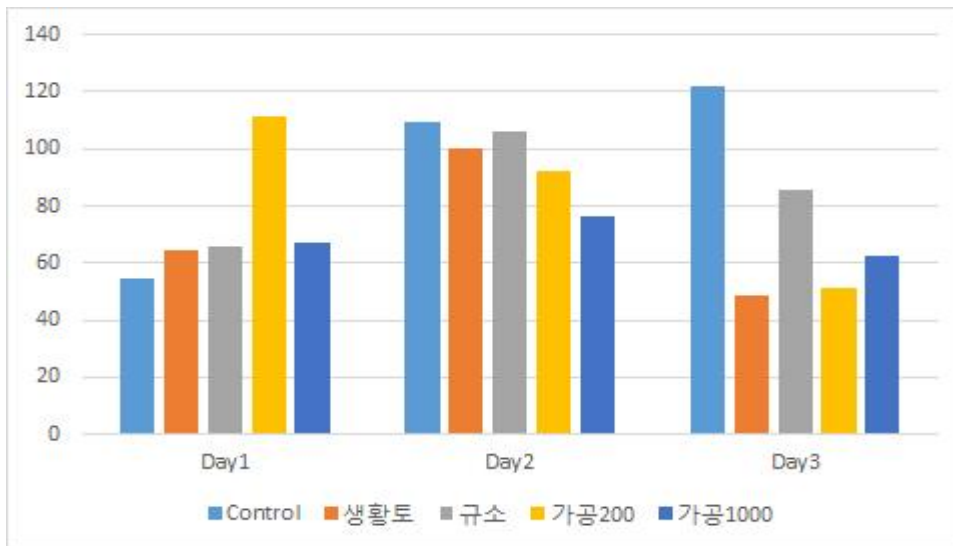


그림 3-5-35. TA로 측정된 저장기간에 따른 오이의 아삭함(Crispiness)변화

표 3-5-53. 저장 기간에 따른 오이의 조직감 순위법 평가 결과

	저장기간					
	Day1		Day2		Day3	
	경도	아삭함	경도	아삭함	경도	아삭함
Control	8 ¹ a ²	7 a	29 b	29 b	28 b	25 ab
생황토	26 b	25 b	27 ab	27 ab	25 ab	23 ab
규소	19 ab	26 b	15 ab	15 ab	20 ab	21 ab
가공200	26 b	21 ab	20 ab	20 ab	21 ab	28 b
가공1000	26 b	26 b	14 a	14 a	11 a	9 a

¹ 순위 합(낮을수록 특성강도가 높음)

² 제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$).

패널에 의한 조직감 평가에서도 Day1에서는 황토가공 처리구가 규소와 Control대비 경도에 대하여 높은 순위합을 보인 반면 Day2,3에서는 황토가공처리 시료 3종 모두 Control대비 경도가 높은 것으로 나타났다. 이는 TA 측정결과와 유사한 경향을 나타내며 황토가공의 처리가 오이의 조직감 안정성에 기여하는 것으로 사료된다.

마. 저장에 따른 토마토 조직감 측정 및 묘사분석

※ 가공 황토 슬러리 처리

황토가공 슬러리를 희석하여 토마토재배에 사용하였으며 희석배수는 아래와 같이 표기하였다.

-가공 황토 200배 희석 (가공 200으로 표시)

물1L : 황토슬러리 5mL

-가공 황토 1000배 희석 (가공 1000으로 표시)

물1L : 황토슬러리 1mL

(1) 방법

(가) Texture analysis

- 상온보관 한 토마토를 원물 그대로 측정에 사용하였다.
- Brookfield texture analyzer를 사용하여 compression test를 실시하였고 probe는 직경 2mm의 실린더 probe를 사용하여 1mm/sec 의 속도로 시료의 10mm 침투하여 측정하였다.
- 토마토의 Hardness를 측정하였으며 하나의 시료 당 4반복 측정, 2개 측정하여 한 실험구당 총 8반복 측정하였다.
- 측정은 2일 간격으로 총 4번 측정하였다.

(나) 패널평가

- 상온보관 한 토마토를 1/8등분 하여 전체 부분을 측정에 이용하였다.
- 이 실험에 참여한 패널은 단국대학교 식품영양학과 대학원생 7명(여자2명, 남자5명)으로 구성되었다.
- 토마토의 단단함과 아삭함을 순위법으로 평가하였으며 상온의 물이 palate cleanser로 함께

제공되었으며 평가는 2일 간격으로 총 4번의 평가가 이루어졌다.



그림 3-5-36. 측정 부위의 모습



그림 3-5-37. TA 측정 모습



그림 3-5-38. 패널 평가용 시료모습

(2) 결과

표 3-5-54. TA로 측정한 저장기간에 따른 토마토의 경도(Hardness)변화(g)

	저장기간			
	Day1	Day3	Day5	Day7
Control	538.88 ¹ ±68.07 a ² A ³	508.00±55.34 aA	534.75±63.99 aA	635.29±96.28 aA
생황토	459.88±36.01 aB	494.88±71.40 aB	570.00±60.64 aA	613.25±98.44 aA
규소	507.13±75.38 aA	581.5±70.21 aA	597.75±81.29 aA	610.13±108.12 aA
가공200	530.75±59.72 aB	534.88±76.83 aB	619.37±67.17 aA	605.50±93.56 aAb
가공1000	475.63±83.01 aA	540.13±45.57 aA	548.50±98.20 aA	528.00±77.73 aA

¹ 평균±표준편차

² a: 제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$).

³ A: 저장 기간 간의 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$).

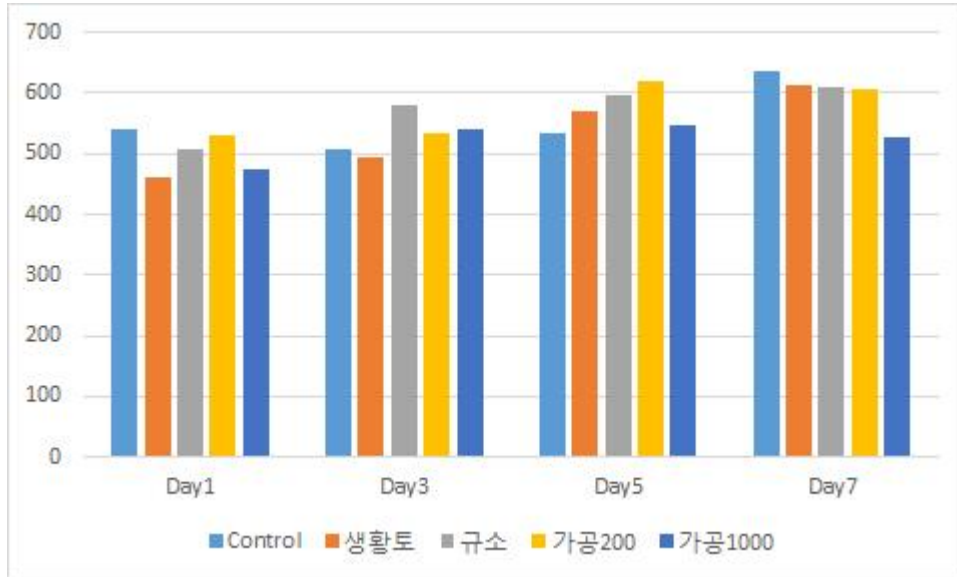


그림 3-5-39. 저장기간에 따른 토마토의 경도(Hardness) 변화

표 3-5-55. 저장기간에 따른 토마토의 조직감 순위법 평가 결과

	저장기간							
	Day1		Day3		Day5		Day7	
	경도	아삭함	경도	아삭함	경도	아삭함	경도	아삭함
Control	30 ¹ a ²	29 a	15 a	15 a	15 a	15 a	24 b	23 a
생활토	22 a	21 a	23 a	15 a	16 a	16 a	17 ab	17 a
규소	17 a	20 a	11 a	15 a	12 a	12 a	8 a	10 a
가공200	21 a	20 a	12 a	12 a	10 a	10 a	15 ab	15 a
가공1000	15 a	15 a	7 a	8 a	6 a	6 a	11 ab	10 a

¹ 순위 합(낮을수록 특성강도가 높음)

² 제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$).

TA측정 결과 토마토의 경우 시료별, 저장기간별 경도에 대한 차이는 나타나지 않았으며 이는 패널에 의한 평가에서도 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 토마토의 경우 개체간의 변이가 크므로 황토가공의 적용 및 평가방법에 대한 다양한 방법을 모색해야 할 것으로 판단된다.

황토가공처리 복숭아의 경도 및 당도 평가 실시한 결과 당도에는 큰 차이가 없으나 경도에서 황토가공 소재 처리 복숭아가 대조구 대비 다소 높은 경향 나타나 이는 예비실험 결과이므로 3차년에 좀더 많은 시료를 채취하여 지속적인 모니터링 필요하다고 판단된다.

5. 황토가공소재 적용 가공식품 스크리닝 분석

3차년 과제 목표인 황토가공소재 적용 농수산물 가공식품 개발을 위하여 다양한 문헌, 시장조사, 예비실험 등을 통하여 가공제품을 선정하였다. 장어를 활용한 제품으로는 현재 시판되고 있는 장어통조림, 장어양념구이(진공팩) 이외에 새로운 타입의 장어육포를 개발할 계획이다. 이미 1차년도에 황토가공소재를 처

리한 장어의 우수한 항산화성과 조직감이 검증되었으므로 이를 활용한 가공제품을 개발 및 시장출시 검토를 계획하고 있다. 이와 마찬가지로 황토가공소재로 재배한 무농약 친환경 무, 배추를 활용하여 단무지 및 배추김치를 제조하여 가공 후에도 황토가공소재의 효능이 유지되는지 여부 및 효능 최적화를 위한 가공조건 확립을 계획하고 있다. 황토가공소재 처리 장뇌삼의 경우 시료가 충분하지 않을 경우 장뇌삼엑기스 대신 장뇌삼추출물 또는 분말화 하여 캡슐처리된 가공제품 개발을 할 계획이다.

가. 장어통조림

장어 통조림 제조를 위한 최적 가공조건 확립 및 프로토타입 제품 개발.

(1) 제조 공정

(가) 원료 입고 및 해동

내장제거 된 1차 원물 입고 즉시 냉동보관

전처리 하루 전, 수침 해동 (냉장실 보관)

장어 해동완료 (1109.07g ,7마리)

(나) 염지 전처리

1리터 염수 (2%) 에 침지하여 30분간 염지처리

(다) 비가식 부위 선별

머리부분 제거/ 비가식 부위 선별 후 (879.5g)

(라) 1차 조리

팬조리: 후라이팬에 기름 소량 두른 후 앞뒤로 굽는다.

1차 팬조리 후 (716.7g)

(마) 관형에 맞게 절단 (40mm)

(바) 조미액 제조

정제수:설탕;소금=75:13:12 비율로 제조 후, 가열처리

(사) 관입

고형물 120g+ 액상 조미액 30g = 150g (완제품)

액상조미액=조미액 15 + 불고기 양념소스 15

관형: #307

(아) 밀봉

-주액 주입 후, 즉시 밀봉하여 외관 세척

(자) 레토르트

열수식 레토르트 조건: 114 °C , 30min / 1.5bar

(차) 냉각

레토르트 냉각 후, 남아있는 잠열 신속히 냉각 (45°C 이하)

(카) 검사/포장



그림 3-5-40. 장어통조림

(2) 소비자평가

대조군과 황토가공 처리구로 양식한 장어를 통조림 가공하여 단국대학교에 재학중인 30명의 소비자 패널을 대상으로 기호도 평가를 수행하였다. 전체적인 품질, 전반적인 향미, 고소한 맛, 쫄깃한 식감에 대한 9점 기호도 척도로 평가하였고, 짠맛, 기름기, 비린내, 경도, 쫄깃함에 대한 특성강도평가를 JAR Scale(Just About Right; 1: Too weak, 5: Too strong, 3: Just About Right)을 이용하여 평가하였다. 실험 결과는 평균 값으로 나타내었고, Minitab version 16(Minitab Inc., State College, PA, USA)를 이용해 ANOVA 분석을 하였으며, Tukey's Method에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 시료들 간 유의성 검정을 하였다.



그림 3-5-41. 장어통조림 소비자 기호도 조사

표 3-5-56. 무처리 및 황토가공소재 처리 장어로 제조한 장어통조림의 소비자평가 결과

	무처리	황토가공
전반적인 품질	5.07 ^a	5.40 ^a
전반적인 향미	5.07 ^a	5.60 ^a
고소한 맛	5.63 ^a	5.77 ^a
쫄깃한 식감	4.67 ^a	4.83 ^a
짠맛의 정도	2.57 ^a	2.80 ^a
기름기의 정도	3.13 ^a	3.33 ^a
비린내의 정도	3.27 ^a	3.27 ^a
단단함의 정도	2.20 ^a	2.17 ^a
쫄깃함의 정도	2.20 ^a	2.17 ^a

제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$)

평가 결과 황토가공소재 처리 장어통조림의 전반적 기호도가 다소 높게 나타났다. 레토르트 살균 및 가공제품의 특성상 장어 특유의 쫄깃한 조직감을 유지가 어려웠으며 이로 인해 대조구, 처리구 간 조직감의 특성 차이는 크지 않았다. 향미 특성에서 처리구의 기호도가 높게 나타나 전체적인 품질 기호도의 선호도가 높게 나타났다고 판단된다.

(3) 묘사분석

대조구, 황토가공소재로 양식한 장어를 통조림 가공하여 1년 이상 다양한 식품에 대한 묘사분석 패널 경험이 있는 6명의 패널들을 이용하여 묘사분석을 수행하였다. 단맛, 짠맛, 감칠맛, 고소한맛, 비린향, 기름진 정도, 탄력성, 경도, 응집성, 씹힘성 총 10가지 특성에 대한 강도평가를 15점 척도를 이용하여 2반복 실시하였다.



그림 3-5-42. 장어통조림 묘사분석

표 3-5-57. 무처리 및 황토가공 처리 장어로 제조한 장어통조림의 묘사분석 결과

	무처리	황토가공
단맛	4.45 ^a	4.00 ^a
짠맛	2.71 ^a	2.42 ^a
감칠맛	4.79 ^a	4.50 ^a
고소한맛	5.42 ^a	5.75 ^a
비린향	4.50 ^a	4.58 ^a
기름진 정도	7.50 ^a	6.63 ^a
탄력성	3.00 ^a	3.33 ^a
경도	2.50 ^a	2.88 ^a
응집성	6.00 ^a	5.96 ^a
씹힘성	6.00 ^a	6.17 ^a

제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$)

소비자 조사와 비슷하게 레토르트 살균 및 가공제품의 특성상 장어 특유의 쫄깃한 조직감을 유지가 어려웠으며 이로 인해 대조구, 처리구 간 조직감의 특성 차이는 크지 않았다. 그러나, 황토가공소재 처리구에서 기름진정도가 낮게 평가되었고 탄력성과 경도는 높게 평가되었다.

(4) 장어통조림 영양성분 분석

표 3-5-58. 장어통조림 무기질, 비타민 함량 비교

	대조구		처리구	
인 (mg/100 g)	198.6	A	204.3	A
VitA (μ gRE/100g)	1137.61	B	3258.09	A
Vit B1 (mg/100 g)	1.05	A	0.77	B
Vit B2 (mg/100 g)	0.38	A	0.29	B
Vit B3(나이아신) (mg/100 g)	0.26	A	0.26	A
Vit E (mg/100 g)	9.84	B	23.28	A
칼슘 (mg/100 g)	82.89	A	68.39	B
칼륨 (mg/100 g)	156.25	B	167.45	A
철 (mg/100 g)	0.04	A	0.02	A
나트륨 (mg/100 g)	340.9	A	282.1	B

제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$)

장어 통조림의 비타민, 무기질 함량 비교 결과 황토가공소재 처리 장어통조림의 비타민 A, E가 대조구 대비 약 3배가량 높은 함량을 나타내었다(표 3-5-58).

(5) 장어통조림 정성적 묘사분석

(가) 외관(appearance)

① 색

전체적으로 색이 옅고, 묽어 보임. 굴소스나 고추장과 같은 소스류를 사용하여, 색의 진하기(chroma level)를 증가시키면 외관이 개선될 것으로 사료됨.

② 수분 함량

수분 함량이 너무 많음. 국물이 너무 많으므로, 조리방법을 변경하여 조림처럼 더 걸쭉하게 바꾸면 더 향상된 제품이 될 것으로 기대됨.

③ 양

밥 1 공기를 기준으로, 반찬으로 먹는다면 적당한 양으로 보임.

(나) 풍미(flavor)

① 맛

단독으로 섭취하였을 때 약간 짜게 느껴졌으나, 밥과 함께 먹으면 적당하다고 생각됨.

② 냄새

꽂치 조림 냄새와 유사하다고 느꼈고, 비린내는 나지 않았음.

(다) 조직감(texture)

씹힐 때 부드럽게 느껴졌음. 다만 부드러기 때문에 쉽게 부서질 우려가 있으므로, 조직감이 더 탱탱하다면 소비자가 선호하는 씹힘성을 가질 수 있다고 예상됨.

또한 장어 재료의 두께가 더 두껍다면 입안에서 느끼는 조직감이 더 풍부해질 것으로 기대됨.

(6) 장어 통조림 경도 측정

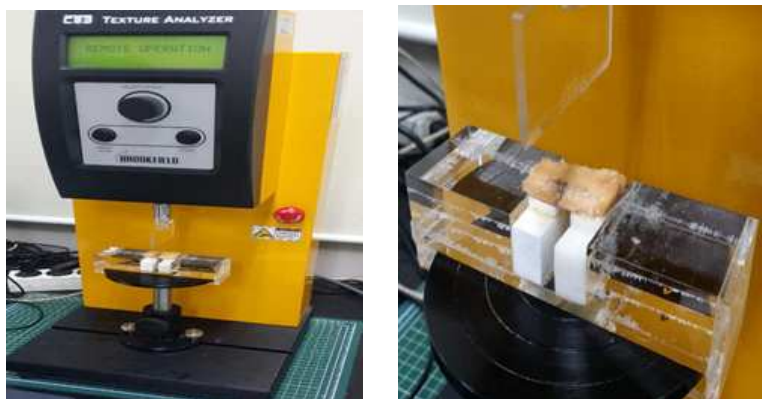


그림 3-5-43. 장어 통조림 경도 측정

통조림된 장어 시료(대조구, 처리구) 중 폭 2cm, 두께 0.5cm인 시료를 texture analyzer로 시료의 절단(cutting) 경도를 측정하였다. Texture analyzer probe는 아래 사진과 같이 시료를

cutting하기 위해 칼날 모양의 probe를 이용하였고 속도는 1mm/s, 깊이는 1cm로 측정하였다. 실험의 총 반복 횟수는 7회 반복 실험을 진행하였다.

표 3-5-59. 장어통조림 경도 측정 결과

장어 통조림	절단 경도(g)
대조구	96.7 \pm 2.87
처리구	86.8 \pm 5.14

처리구가 다소 부드러운 조직감 (경도 낮음)을 나타냈으나 대조구와의 차이는 크지 않았다.

나. 장어육포

본 실험의 시료는 장어(통영)와 소불고기양념(청정원, (주)대상)을 사용함. 장어는 내장, 뼈, 껍질을 제거하여 fillet 처리하고 일정한 길이로 절단하여 석쇠판 위에 올려놓고 붓을 사용하여 앞, 뒷면에 양념을 고르게 발라주었다. 육포 제조를 위한 열처리 공정은 두 단계에 걸쳐 진행되어 첫 번째 열처리는 160℃ 온도의 오븐에서 60분동안 가열하였으며, 열이 고르게 전달 될 수 있도록 가열 시작 30분 경과 후 석쇠판을 뒤집어 주었다. 첫 번째 열처리를 마친 후 장어의 앞, 뒷면에 소스를 고르게 바른 뒤 70℃ 온도의 오븐에서 120분동안 두 번째 열처리를 하였다. 가열 시작 60분 경과 후 석쇠판을 뒤집어 소스를 한번 더 발라주고 열처리를 마친 장어는 상온에서 식힌 후, 진공 포장하였다.





그림 3-5-44. 장어 통조림 제조 공정

본 연구에서는 장어를 사용하여 장어육포 제조 가능성과 제조공정 개발을 위한 연구를 진행함. 황토처리 장어와 일반장어와의 조직감 비교실험이 불가능하여 일반 장어를 활용하여 육포를 제조하였다. 실험결과 장어 육포제조 공정에서 육포의 조직감을 가지기 위해서는 육포제조 시 오븐 온도와 시간이 가장 중요한 것으로 나타났으며, 관능검사 결과 일반 소고기의 육포 질감은 나오지 않았다. 그 이유는 생선의 육질은 매우 약하고 수분이 많으며, 특히 지방성분이 쉽게 빠져 나와 질감이 탄력성이 없고 바삭거리는 조직감을 보여주고 있어 장어는 육포제조 적합성이 많이 떨어진 것으로 나타났다.

다. 장뇌삼

토양 조건을 달리하여 재배한 장뇌삼의 진세노사이드 함량변화

(1) 재료 및 방법

장뇌삼 4년근을 수확하여 사용하였고, 장뇌삼재배를 위한 황토가공 처리 조건은 500, 1000, 2000ppm의 양으로 3반복 난괴법에 의하여 2주 간격으로 3회 처리하였다. 시료 채취는 아래 그림과 같은 방식으로 진행하였다.



그림 3-5-45. 장뇌삼 시료 채취

본 연구에 사용된 장뇌삼은 먼저 외피의 흙을 제거한 뒤 세척하여 약 2~3 mm 크기로 자른 후 인삼산업법의 백삼 제조방법 기준에 따라 50℃ 이하의 온도에서 일정시간 건조하여 사용하였으며, 자세한 공정은 그림 5-15에 제시하였다. 장뇌삼의 진세노사이드를 분석하기 위한 표준품인 진세노사이드 Rg1, Rb1은 Wako(osaka, Japan) 제품을 사용하였으며, 아세토나이트릴과 메탄올은 HPLC용을 사용하였다.



그림 3-5-46. 장뇌삼 시료 세척 및 건조 후 분말화

HPLC 시험 · 검사방법 및 분석(측정)조건

진세노사이드 분석에 사용한 액체크로마토그래피(High Performance Liquid chromatography., HPLC)는 Agilent HPLC system이고, 칼럼은 Supelco discovery C18 Column(4.6 mm X 250 mm, 5 μm), 칼럼온도는 40℃이며 검출기(Detector)는 MWD(측정파장 203 nm)를 사용하였다. 이동상은 20% acetonitrile(ACN)와 80% 3차 증류수로 하였으며 유속은 1.0 ml/min으로 하였다. 분석

중 이동상의 비율을 나타내었다. 실험에서 사용한 진세노사이드 표준품은 총 2종을 사용하였고, 표준품에 메탄올을 가하여 완전히 녹인 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 표준액으로 하였다. 제조한 시료는 일정량을 정밀히 달아 250ml 환류용 플라스크에 취하였다. 70% 메탄올용액 50ml를 가하여 70~80°C 수욕에서 1시간 환류 냉각한 다음 식히고, 원심분리한 후 상층액을 환저플라스크에 취하였다. 잔류물에 대해서 1회 더 반복하였다. 환저플라스크에 옮긴 상층액을 수욕 중에서 60°C 이하에서 감압농축하였다. 농축물을 20ml에 용해한 후, 0.45 μm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 하였으며, HPLC 주입량은 10 μl 로 하였다. 진세노사이드 Rg1, Rb1의 계산식은 표 5-15에 제시하였다.

표 3-5-60. HPLC system 사용된 유동성 내 성분

Time (min)	Mobile phase (%)	
	Acetonitrile(%)	3차 증류수(%)
Initial	20	80
5	20	80
20	23	77
25	30	70
30	40	60
35	50	50
60	85	15
62	85	15
65	20	80
70	20	80

표 3-5-61. 진세노사이드 Rg1, Rb1 계산식

진세노사이드 Rg1(mg/g) $= \frac{\text{시험용액의 농도}(\mu\text{g}/\text{ml}) \times \text{최종부피}(\text{mL}) \times \text{희석배수}}{\text{시료채취량}(g)} \times \frac{1}{1000}$
진세노사이드 Rb1(mg/g) $= \frac{\text{시험용액의 농도}(\mu\text{g}/\text{ml}) \times \text{최종부피}(\text{mL}) \times \text{희석배수}}{\text{시료채취량}(g)} \times \frac{1}{1000}$

(2) 결과 및 고찰

본 연구에 사용된 장뇌삼은 무처리(대조구), 황토가공(500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm)로 총 4종을 분석하였으며, 본 실험에서 사용된 표준물질 진세노사이드 2종(Rg1, Rb1)의 HPLC 크로마토그램은 그림으로 나타내었다.

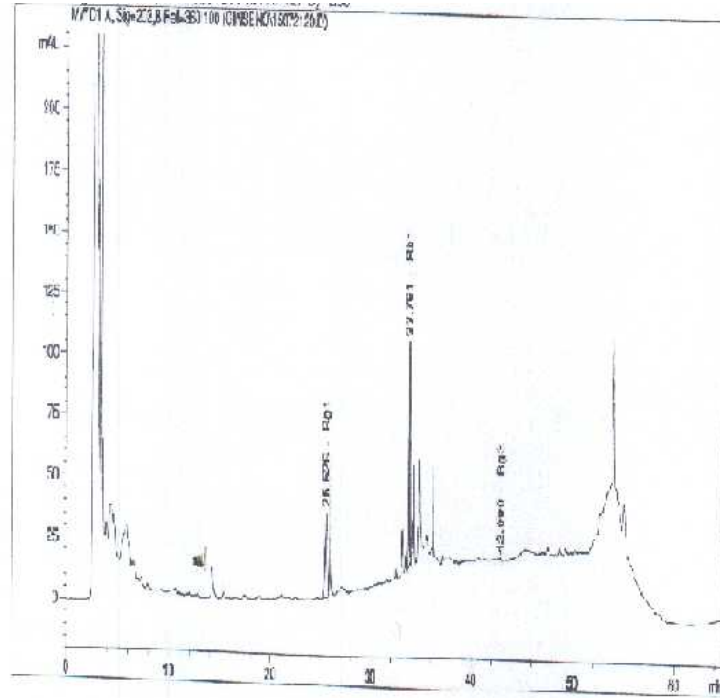


그림 3-5-47. HPLC chromatogram of ginsenosides Rg1, Rb1

표 3-5-62은 본 실험에 사용된 대조군 및 황토가공처리 장뇌삼의 진세노사이드 Rg1 및 Rb1 함량을 나타내고 있다. 진세노사이드 Rg1의 분석결과, 대조군(1.59 mg/g)에 비해 황토가공 500ppm(1.75 mg/g), 1000 ppm(1.97 mg/g), 2000 ppm(1.74 mg/g)에서 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 500 ppm와 2000 ppm은 유의적인 차이가 없었으며, 1000 ppm이 유의적으로 가장 높은 Rg1 함량을 나타내었다. 따라서 황토가공 1000 ppm이 진세노사이드 Rg1 함량의 최대화를 위한 최적화된 황토가공 처리 조건임을 확인할 수 있었다.

진세노사이드 Rb1의 분석결과, 대조군(3.10 mg/g)에 비해 진세노사이드 Rb1의 함량이 황토가공 500 ppm(3.24 mg/g), 1000 ppm(3.89 mg/g)순으로 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었고, 2000 ppm(2.94 mg/g)은 대조군보다 Rb1의 함량이 유의적으로 증가되는 경향을 보이지 않았다. 이와 같은 분석결과를 토대로, 진세노사이드 Rb1에 대하여 황토가공 1000 ppm이 최적화된 조건임을 확인할 수 있었다.

진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합은 대조군(4.69 mg/g)에 비해 황토가공 500 ppm(4.99 mg/g), 1000 ppm(5.85 mg/g)순으로 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었으며, 황토가공 2000 ppm(4.68 mg/g) 처리구의 경우는 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 최종적으로 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합에 관한 결과에서도 Rg1과 Rb1의 개별 분석결과와 마찬가지로, 황토가공 1000 ppm이 황토가공 처리를 위한 최적화된 조건인 것으로 확인되었다. 한편 황토가공처리가 장뇌삼 4년근에 처리되어 5년근이 되었을 때 수확 및 분석을 하였기 때문에 이후에도 지속적으로 황토가공처리 장뇌삼의 효과를 검증해야 할 것으로 판단된다.

현재 건강기능식품공전에서 인삼의 경우 면역력 증진, 피로개선에 도움을 줄 수 있는 기능

성이 인정되었으며, 최종제품의 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합계로서 3-80 mg/g일 경우 인삼의 건강기능성을 인정받을 수 있다. 본 실험에서 사용한 황토가공(대조군, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm)를 처리한 인삼 분말의 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합계는 4.69~5.86 mg/g으로 나타나 건강기능식품규격에 적합함을 확인할 수 있었다.

표 3-5-62. 황토가공 장뇌삼의 진세노사이드 Rb₁과, Rg₁, 함량
진세노사이드 mg/g)

	Rg1	Rb1	Rg1, Rb1의 합
대조군	1.59±0.01 ^c	3.10±0.01 ^c	4.69±0.00 ^c
500 ppm	1.75±0.01 ^b	3.24±0.05 ^b	4.99±0.04 ^b
1,000 ppm	1.97±0.01 ^a	3.89±0.01 ^a	5.86±0.00 ^a
2,000 ppm	1.74±0.01 ^b	2.94±0.03 ^d	4.68±0.02 ^c

평균 ± 표준편차(2반복).

제품 간 유의성 검정 결과(p<0.05).

(3) 장뇌삼 캡슐 제품 개발

원료(장뇌삼)를 세척, 건조, 분말화의 공정을 거쳐서 장뇌삼 건조분말을 제조한 후, 이를 캡슐 충전기를 이용하여 캡슐화하여 정제형 제품으로 개발하였으며 제조 공정도는 아래와 같다.

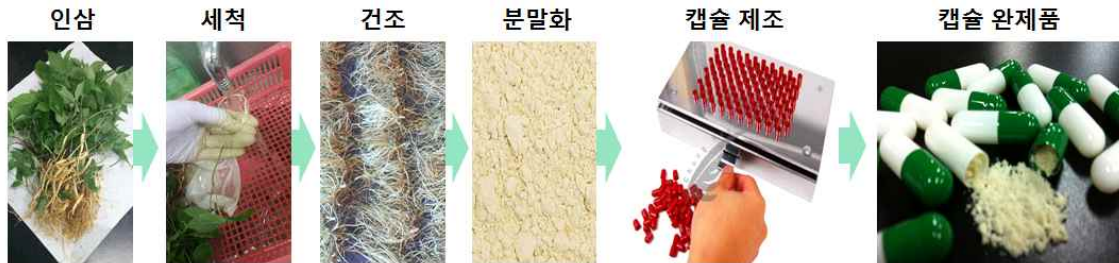


그림 3-5-48. 장뇌삼 캡슐 제조 공정도

라. 황토가공소재 처리 단무지

(1) 재료 및 방법

(가) 제조공정

- 무를 세로로 4등분하여 소금에 절인다.
- 무600g당 설탕 150g, 식초 80ml, 물 400ml, 치자 8g, 소금약간의 절임물을 만든다.
- 절임물을 붓고 누름마개로 누른다.
- 일주일 숙성한다.
- 완성된 단무지는 진공포장기로 포장한다.
- 진공포장된 단무지는 4° C에서 냉장보관 한다.



그림 3-5-49. 단무지 제조과정

표 3-5-63. 무처리 및 황토가공소재 처리 무로 제조한 단무지의 일반성분 측정 결과(단위 : %)

	무처리	황토가공
수분	79.15 ± 0.11 ^b	80.45 ± 0.16 ^a
조회분	4.25 ± 0.04 ^a	3.64 ± 0.02 ^b
조단백질	0.67 ± 0.11 ^a	0.79 ± 0.28 ^a
조지방	0.03 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.02 ^a

제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$)

본 연구에서는 무처리와 황토가공에서 재배한 오이와 무로 제조한 오이피클 및 단무지의 수분 함량, 조회분 함량, 조지방 함량, 조단백 함량을 측정하고, 무처리 및 황토가공 처리에 따른 성분 차이가 있는지 평가·비교하였다. 단무지의 조회분 함량에서 무처리가 황토 처리보다 높은 값을 보여주었고 반대로 수분 함량에서는 무처리가 황토 처리보다 낮은 값을 나타내었다. 그러나 다른 일반성분에서는 결과 값이 큰 차이가 나지 않았으며 유의적 차이를 나타내지 않았다.

(나) 영양성분분석

표 3-5-64. 무처리 및 황토가공소재 처리 무로 제조한 단무지의 비타민 및 무기질 함량

	무처리	황토가공
인 (mg/100 g)	16.58 ± 0.24 ^a	15.21 ± 0.10 ^b
마그네슘 (mg/100 g)	34.72 ± 0.28 ^a	32.64 ± 0.23 ^b
비타민 C (mg/100 g)	62.30 ± 0.71 ^a	10.01 ± 0.07 ^b
칼슘 (mg/100 g)	31.73 ± 0.04 ^a	28.75 ± 0.83 ^b
칼륨 (mg/100 g)	186.80 ± 2.62 ^a	180.20 ± 1.41 ^a
아연 (mg/100 g)	0.31 ± 0.01 ^a	0.31 ± 0.03 ^a
망간 (mg/100 g)	0.01 ± 0.01 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
철 (mg/100 g)	0.83 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.00 ^b
나트륨 (mg/100 g)	955.40 ± 9.55 ^a	899.90 ± 1.70 ^b

제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$)

본 연구에서는 무처리 혹은 황토가공(처리구)에서 자란 오이와 무로 가공한 오이피클과 단무지를 시료로 사용하였다. 수원여자대학교 식품분석연구센터에 의뢰하여 단무지는 인, 마그네슘, 비타민 C, 칼슘, 칼륨, 아연, 망간, 철, 나트륨 총 9가지 성분, 오이피클은 비타민 A, 비타민 B2, 칼슘, 철, 나트륨, 인 총 6가지 성분에 대한 분석이 이루어졌다. 처리구 별로 2반복 실시한 값으로 나타내었다. 모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었고, Minitab version 16(Minitab Inc., State College, PA, USA)를 이용해 ANOVA 분석을 하였으며, Tukey's Method에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 시료들 간 유의성 검정을 하였다.

(다) 항산화 활성



그림 3-5-50. 단무지 시료 전처리

본 연구에서는 무처리 혹은 황토가공(처리구)에서 자란 오이와 무로 가공한 오이피클과 단무지를 시료로 사용하였다. 동결건조기(FD8508, Ilshin, Korea)로 건조 시킨 오이피클 시료들을 분쇄한 후, 시료 무게의 3배에 해당하는 80% ethanol (w/v)을 가한 다음 실온에서 자동 교반기

(VS-130SH, Vision, Korea)를 이용하여 24시간 교반해 추출하였다. 여과지(Hyundai No.22, Korea)를 사용하여 여과한 추출액은 50°C로 설정한 dry oven에서 건조와 동시에 80% ethanol을 휘발시킨 후 실험 시 사용하였다.



그림 3-5-51. 오이피클 시료 전처리

(라) 총 폴리페놀 함량

각 시료 추출물에 대하여 g 당 총 폴리페놀 함량을 평가하기 위해 Folin-Denis 방법을 이용하였다. 증류수로 희석한 20 mg/mL의 추출시료 0.5 mL와 1N-Folin Ciocalteau's phenol reagent (Sigma, USA) 0.5 mL 를 혼합한 후 상온에서 3분간 반응시켰다. 반응액에 10% Na₂CO₃를 1.5 mL를 넣어 다시 혼합한 다음 이 혼합 용액을 암소에서 1시간 동안 방치한 후, 분광광도계 (Biotex unstrument powerwave XS, Pascualbio, Korea) 725 nm에서 흡광도를 평가하고 gallic acid (Sigma, USA)를 이용하여 표준곡선에 따른 검량선을 작성하여 총 폴리페놀 함량을 1g 중의 ug gallic acid로 계산하였다. Gallic acid를 이용한 표준곡선은 최종 농도가 100 ug/mL 가 되도록 하여 위와 동일한 방법으로 725 nm에서 흡광도를 평가하여 작성하였다.

(마) DPPH 라디칼 소거활성

Brand-Williams 등의 방법에 따라 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma) 라디칼 소거 활성을 평가하였다. 80% Methanol에 DPPH를 녹임으로써 0.2 mM의 안정한 DPPH 라디칼을 제조한 후, DPPH 라디칼 solution 0.6 mL와 증류수로 희석한 20 mg/mL 농도의 추출시료 0.2 mL를 혼합한 다음 암소에서 15 분간 반응 시켜 517 nm에서 흡광도를 평가하였다. DPPH 라디칼의 소거활성은 아무것도 첨가하지 않은 대조구와 시료 첨가 후 흡광도의 변화로 하여 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

A_{sample}: 시료구의 흡광도

A_{control}: 대조구의 흡광도

(바) FRAP 법

Benzie 등의 FRAP 법으로 항산화 활성을 평가하였다. 300 mM Acetate buffer (pH 3.6), 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine, Sigma), 20 mM FeCl₃ (ferric chloride)를 10 : 1 : 1 의 비율로 혼합하여 FRAP reagent를 만들었다. 1.5 mL FRAP reagent에

증류수로 희석한 20 mg/mL 농도의 추출시료 50 uL를 가하고 암소에서 30분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 평가하였다. 농도를 알고 있는 Fe(II) 표준품을 0-1 mM (FeSO₄ · 7H₂O) 농도로 제조하여 검량선을 작성한 후, 시료의 항산화 활성을 FRAP value (mM Fe(II))로 계산하였다.

(사)통계 처리

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었고, SAS version 9.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA)를 이용해 ANOVA 분석을 하였으며, Fisher's least significant differences에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 시료들 간 유의성 검정을 하였다.

(2) 결과 및 고찰

유해산소(toxic oxygen species)로 알려진 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 호흡 등과 같은 생리작용에 의해 세포에서 생성된 가스로 끊임없이 생산과 소멸을 반복하며, 정상적인 상태에서는 3-5% 정도 존재한다. 이러한 활성산소종은 superoxide anion (O₂⁻), hydroxylradical (·OH)과 같은 자유라디칼(free radical)의 형태로 존재하거나 혹은, hydrogen peroxide (H₂O₂), singleoxygen(¹O₂)과 같은 쌍을 이룬 전자를 가진 화합물의 형태로 존재한다.

이 활성산소종들은 *In-vivo*에서 정상적 대사과정에서도 끊임없이 생성되는 것으로 대식세포의 살균작용, 정보전달 등 필수불가결한 물질이나, 생체 내에서 세포막, 단백질 및 핵산 등을 손상시켜 세포기능을 억제시키고 나아가 DNA, RNA 및 단백질 등에 작용하여 각종 성인병, 노화, 암 등을 유발하기도 한다. 이러한 양면성을 가지고 있는 활성산소종으로부터 생체 내 항상성을 유지하기 위해 어떤 물질이 산화 작용을 예방 및 제거할 수 있는 항산화 활성을 갖고 있는지에 대한 분석은 중요하다.

항산화 활성을 측정하는 방법은 시료의 성질에 따라 다양한 방법이 개발되어 있으며, 이러한 방법들을 분류하자면 '직접적인 방법'과 '간접적인 방법'으로 나눌 수 있다. 본 연구에서는 토양 조건을 달리한 오이와 무로 제조한 오이피클, 단무지의 항산화 활성을 평가·비교하기 위해 총 폴리페놀 함량을 측정하고 DPPH 라디칼 소거활성, FRAP 값을 확인했는데 이 세 방법은 간접적인 방법에 속하며, 항산화 활성 측정 시 주로 사용되는 방법이다.

(가) 총 폴리페놀 함량

식물의 2차 대사산물인 phenolic compound는 식물계에 널리 분포되어 있으며, 식물이 광합성 과정에서의 스트레스 및 크고 작은 상처와 초식동물로부터 자신을 보호하는 과정에서 형성된다. Polyphenol 화합물은 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl 기를 가지는 방향족 화합물로 단백질 및 거대분자들과 쉽게 결합할 수 있어서 항산화뿐만 아니라 항노화, 항암, 항고혈압, 항염증 및 항당뇨 등 여러 생리적 및 약리적 효능을 가지고 있다.

무처리 혹은 황토가공 조건으로 재배한 오이와 무로 제조한 오이피클 및 단무지 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량을 건조시료 1 g 당 gallic acid를 기준으로 하여 나타낸 결과는 아래와 같다. 무처리 오이로 제조한 오이피클의 총 폴리페놀 함량은 472.26 ± 23.89 ug/g이었던 반면, 황토가공 처리 오이로 제조한 오이피클의 총 폴리페놀 함량은 586.94 ± 23.21 ug/g로

황토가공 처리 오이피클의 폴리페놀 함량이 유의적으로 더 높게 측정되었다. 반면에 단무지의 경우, 무처리 무로 제조한 단무지의 총 폴리페놀 함량은 $1540.71 \pm 0.84 \text{ } \mu\text{g/g}$ 였고, 황토가공 처리 무로 제조한 단무지의 총 폴리페놀 함량은 $1448.45 \pm 10.10 \text{ } \mu\text{g/g}$ 로 측정되어 오이피클의 경향성과 달리 무처리 단무지의 총 폴리페놀 함량이 황토가공 처리 단무지보다 유의적으로 더 낮게 측정되었다.

표 3-5-65. 무처리 및 황토가공 처리 무로 제조한 단무지의 총 폴리페놀 함량

시료	총 폴리페놀 함량($\mu\text{g/g GAE}^1$)
무처리	1540.71 ± 0.84^a
황토가공	1448.45 ± 10.10^b

제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$)

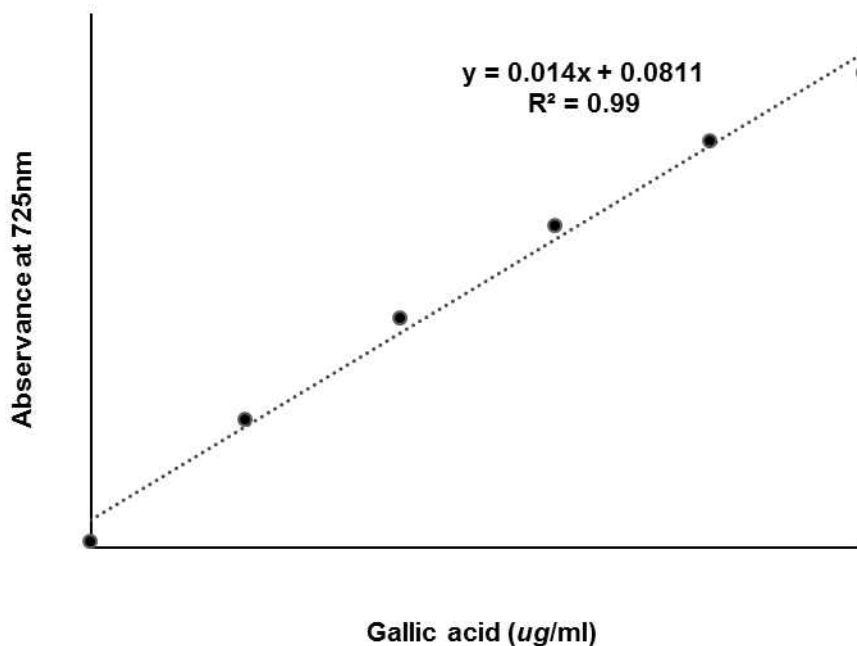


그림 3-5-52. 총 폴리페놀 함량 측정을 위한 gallic acid 표준곡선

(나) DPPH 라디칼 소거활성

DPPH에 의한 전자 공여능은 화학적으로 안정화된 자유 radical을 가지고 있는 DPPH가 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, cysteine과 같은 황 함유 아미노산, *p*-phenylenediamine이나 aminophenol과 같은 aromatic amine 등에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는 원리를 이용한다. 비교적 짧은 시간 내에 항산화능을 측정할 수 있어 다양한 천연 소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 널리 이용되고 있다. 자유 라디칼은 인체 내에서 지질 또는 단백질과 결합하여 노화 및 질병을 유발하는데 전자공여작용은 인체 내에서 생성되는 자유 라디칼을 환원시키거나 상쇄시켜 노화와 질병을 억제하는 작용의 척도로 이용되고 있다.

양성 대조구로 사용한 ascorbic acid의 표준곡선은 위 그림과 같으며, 무처리 혹은 황토가공 처리 오이 및 무로 제조한 오이피클과 단무지의 DPPH 라디칼 소거활성을 평가한 결과는 아래 표에 제시하였다. 앞서 확인했던 총 폴리페놀 함량의 경향성과 동일하게 오이피클의 경우, 황토가공 처리구의 DPPH 라디칼 소거활성이 27.02 ± 0.66 %로 23.69 ± 0.63 %인 무처리구의 DPPH 라디칼 소거활성보다 유의적으로 높게 측정되었다. 단무지 또한 무처리구의 DPPH 라디칼 소거활성(63.84 ± 0.66 %)이 황토가공 처리구의 DPPH 라디칼 소거활성(52.55 ± 2.37 %)보다 유의적으로 높게 나타나 앞서 측정한 총 폴리페놀 함량과 동일한 경향을 보였다. 무처리 혹은 황토가공 처리 오이와 무로 제조한 오이피클과 단무지의 DPPH 라디칼 소거활성과 총 폴리페놀 함량의 경향성이 동일하게 나온 이유는 각 시료의 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거활성이 비례하기 때문이라 사료된다.

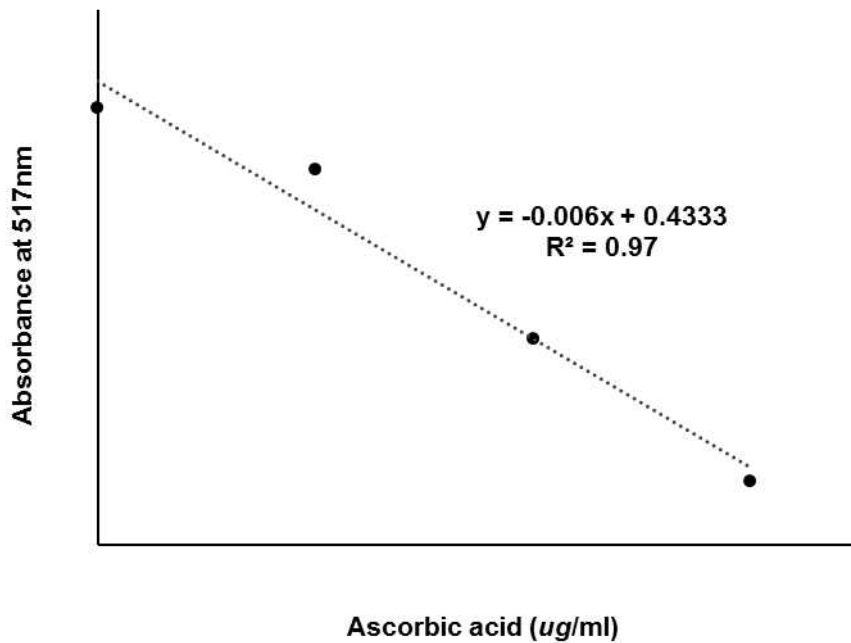


그림 3-5-53. DPPH 라디칼 소거활성 측정을 위한 ascorbic acid 표준곡선

표 3-5-66. 무처리 및 황토가공 처리 무로 제조한 단무지의 DPPH 라디칼 소거활성

시료	DPPH 라디칼 소거활성(%)
무처리	63.84 ± 0.66^a
황토가공	52.55 ± 2.37^b

평균 \pm 표준편차(3 반복).

제품 간 유의성 검정 결과($p < 0.05$).

(다) FRAP 법

FRAP 법은 비교적 최근에 Benzie 등에 의해 개발된 총 항산화 효과를 측정하는 방법이다. 이 방법은 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ)복합체가 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ)로 환원되는 것을 이용하여 측정된다. Fe^{2+} -TPTZ는 강한 청색을 가지므로 593 nm에서 모니터 될 수 있다. Benzie 등은 FRAP 법에 대해 재현성을 측정하기 쉽고, 함유되어 있는 항산화제들의 농도에 직선적으로 비례하여 FRAP 값을 나타내며, 무엇보다 총 항산화 효과를 직접적으로 측정할 수 있다는 장점을 강조하고 있다.

0-1 mM 농도로 제조한 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 표준곡선은 아래의 그림 5와 같고, 토양 조건을 달리 하여 재배한 오이 및 무로 제조한 오이피클과 단무지의 FRAP 값을 측정한 결과는 표 5와 표 6에 제시하였다. 페놀성 화합물의 양에 비례하여 전자공여능, 즉 환원력이 커진다는 기존 연구 결과에 부합하여 황토가공 처리 오이피클의 FRAP 값(49.04 ± 0.40 mM)이 무처리 오이피클의 FRAP 값(43.81 ± 0.58 mM)보다 유의적으로 높게 측정되었고, 황토가공 처리 단무지의 FRAP 값(121.97 ± 0.14 mM)이 무처리 단무지의 FRAP 값(125.52 ± 0.95 mM)보다 유의적으로 낮게 측정되었다.

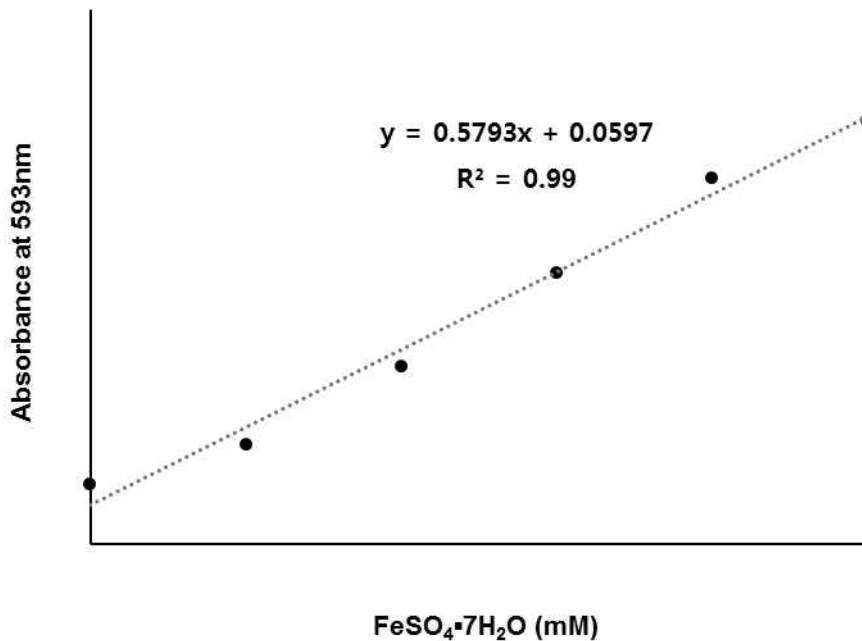


그림 3-5-54. FRAP 측정을 위한 ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)표준곡선

표 3-5-67. 무처리 및 황토가공 처리 무로 제조한 단무지의 FRAP 값

시료	FRAP 값(mM)
무처리	125.52 ± 0.95^a
황토가공	121.97 ± 0.14^b

평균 \pm 표준편차(3 반복).

제곱 가 유의성 검정 결과($n < 0.05$)

(3) 결론

본 연구에서는 무처리 혹은 황토가공에서 재배한 오이와 무로 제조한 오이피클 및 단무지 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하고, DPPH 라디칼 소거활성과 FRAP 값을 확인함으로써 무처리 및 황토가공 처리에 따른 항산화 활성을 평가·비교하였다. 오이피클의 경우 황토가공 처리구가 무처리구보다 총 폴리페놀 함량이 유의적으로 높게 측정되었으며, 항산화 활성을 나타내는 DPPH 라디칼 소거활성과 FRAP 값 또한 황토가공 처리구가 무처리구보다 유의적으로 높게 평가되었다. 단무지의 경우 오이피클의 경향과 달리 무처리구의 총 폴리페놀 함량, DPPH 소거활성, FRAP 값이 황토가공 처리구보다 모두 유의적으로 높게 측정되었으며, 오이피클과 단무지 모두 총 폴리페놀 함량, DPPH 라디칼 소거활성, FRAP 값에서 서로 높은 양의 상관관계를 보였다. 여러 식품에 널리 분포되어 있는 폴리페놀 화합물이나 플라보노이드류는 자유 라디칼을 효과적으로 제거함으로써 천연 항산화제로 작용할 수 있으며, 이들의 함량이 증가할수록 항산화 활성이 높아짐이 여러 연구들에 의해 입증되어 있으므로, 본 연구에서 토양조건을 달리한 오이피클, 단무지의 총 폴리페놀 함량과 항산화 활성이 양의 상관관계를 보인 것이 설명된다. 결론적으로 본 연구를 통해 황토가공이 처리된 토양에서 경작된 오이와 무는 황토가공 처리를 하지 않은 토양에서 자란 오이와 무에 비해 총 폴리페놀 함량과 항산화 활성이 높아짐을 밝혀냈으며, 향후 심도 있는 연구를 통해 황토가공에서 작물을 경작할 시 어떤 페놀성 화합물이 유의적으로 증가 및 생성 되는지에 대해 밝힐 필요가 있다고 사료된다.

(가) 묘사분석

본 연구에서는 무처리 혹은 황토가공(처리구)에서 자란 오이와 무로 가공한 오이피클과 단무지를 시료로 사용하였다. 오이피클과 단무지의 저장기간에 따른 조직감의 변화를 측정하였으며, 1년 이상 다양한 식품에 대한 묘사분석 패널 경험이 있는 6명의 묘사분석 패널들을 이용하여 평가하였다. 오이피클은 3일 간격으로 평가를 진행하였으며(3day, 6day, 9day, 12day, 15day), 단무지는 6일 간격으로 평가를 진행하였다(6day, 12day, 18day, 24day). 조직감의 주요 지표가 될수 있는 경도, 아삭함, 섬유질의 정도, 수분감에 대하여 15점 척도를 이용하여 평가하였고, 재현성을 위해 2반복 평가하였다.



그림 3-5-55. 단무지 묘사분석

표 3-5-68. 무처리 및 황토가공 처리 무로 제조한 단무지의 묘사분석 결과

	무처리	황토가공
경도	7.65 ^a	7.85 ^a
아삭함	7.53 ^a	7.48 ^a
섬유질의 정도	7.08 ^a	7.52 ^a
수분감	3.33 ^a	3.27 ^a

제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$)

(나) 소비자 평가

소비자 평가는 20~30대의 남, 여 대학생 30명을 대상으로 시행되었다. 평가항목은 기호도 4종(전반적품질, 전반적 향미, 경도, 아삭함, 수분감) 과 특성강도 2종(단단함의 정도, 수분감의 정도)으로 기호도는 9점척도, 특성강도는 5점척도로 평가되었다.



그림 3-5-56. 단무지 소비자 평가

표 3-5-69. 무처리 및 황토가공 처리 무로 제조한 단무지의 소비자평가 결과

	무처리	황토가공
전반적인 품질	3.94 ^a	4.31 ^a
전반적인 향미	3.79 ^a	3.89 ^a
경도(단단함)	5.09 ^a	5.23 ^a
아삭함	5.21 ^a	5.14 ^a
수분감	4.65 ^a	4.74 ^a
단단함의 정도	2.88 ^a	2.74 ^a
수분감의 정도	2.44 ^a	2.43 ^a

제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$)

마. 황토가공 소재 처리 오이피클

(1) 제조공정

- 오이를 1cm두께로 자른다.
- 오이600g당 설탕 150g, 식초 150ml, 물 400ml, 소금15g의 절임물을 만든다.
- 절임물을 붓고 누름마개로 누른다.
- 24시간 숙성한다.
- 완성된 오이피클은 4° C에서 냉장보관 한다.

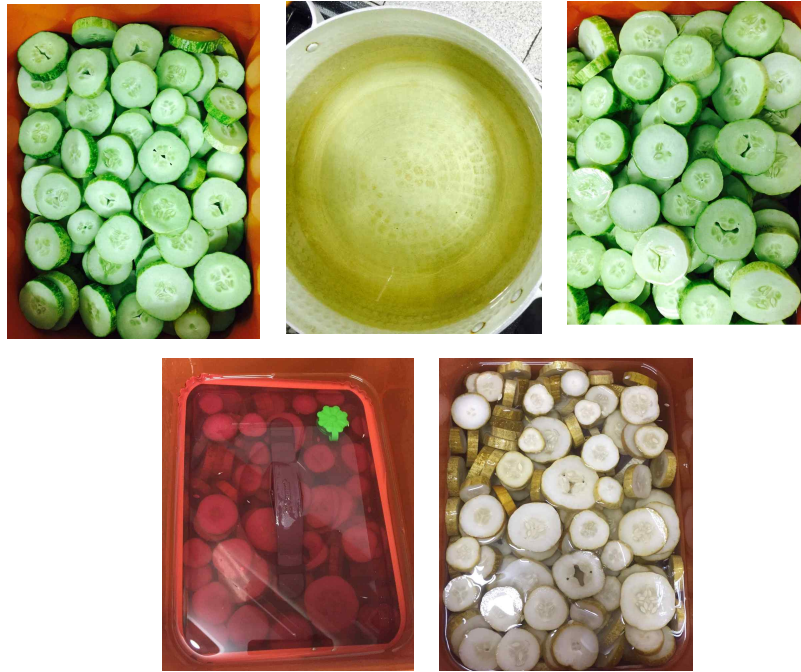


그림 3-5-57. 오이피클 제조과정

표 3-5-70. 무처리 및 황토가공 처리 오이로 제조한 오이피클의 일반성분 측정 결과(단위 : %)

	무처리	황토가공
수분	83.19 ± 0.14 ^a	83.41 ± 0.21 ^a
조회분	1.41 ± 0.02 ^a	1.52 ± 0.05 ^a
조단백질	0.66 ± 0.03 ^a	0.63 ± 0.33 ^a
조지방	0.11 ± 0.06 ^a	0.08 ± 0.01 ^a

제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$)

본 연구에서는 무처리와 황토가공에서 재배한 오이와 무로 제조한 오이피클 및 단무지의 수분 함량, 조회분 함량, 조지방 함량, 조단백 함량을 측정하고, 무처리 및 황토가공 처리에 따른 성분 차이가 있는지 평가·비교하였다. 단무지의 조회분 함량에서 무처리가 황토 처리보다 높은 값을 보여주었고 반대로 수분 함량에서는 무처리가 황토 처리보다 낮은 값을 나타내었다. 그러나 다른 일반성분에서는 결과 값이 큰 차이가 나지 않았으며 유의적 차이를 나타내지 않았다.

(2) 영양성분분석

표 3-5-71. 무처리 및 황토가공 처리 오이로 제조한 오이피클의 비타민 및 무기질 함량

	무처리	황토가공
비타민 A ($\mu\text{g RE}/100\text{ g}$)	0.43 ± 0.01^a	0.23 ± 0.04^b
비타민 B2 (mg/100 g)	0.008 ± 0.00^a	0.006 ± 0.00^b
칼슘 (mg/100 g)	16.19 ± 0.18^a	15.05 ± 0.39^a
철 (mg/100 g)	0.11 ± 0.01^a	0.08 ± 0.00^a
나트륨 (mg/100 g)	467.20 ± 2.55^a	400.70 ± 1.56^b
인 (mg/100 g)	13.34 ± 0.02^a	12.70 ± 0.01^b

제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$)

(3) 항산화 활성

분석 방법은 단무지와 동일하다.

표 3-5-72. 무처리 및 황토가공 처리 오이로 제조한 오이피클의 총 폴리페놀 함량

시료	총 폴리페놀 함량($\mu\text{g/g GAE}^{1)}$)
무처리	472.26 ± 23.89^b
황토가공소재	586.94 ± 23.21^a

¹⁾ GAE: Gallic acid equivalents

표 3-5-73. 무처리 및 황토가공 처리 오이로 제조한 오이피클의 DPPH 라디칼 소거활성

시료	DPPH 라디칼 소거활성(%)
무처리	23.69 ± 0.03^b
황토가공소재	27.02 ± 0.66^a

평균 \pm 표준편차(3 반복).

제품 간 유의성 검정 결과($p < 0.05$).

표 3-5-74. 무처리 및 황토가공 처리 오이로 제조한 오이피클의 FRAP 값

시료	FRAP 값(mM)
무처리	43.81 ± 0.58 ^b
황토가공소재	49.04 ± 0.40 ^a

평균 ± 표준편차(3 반복).
 제품 간 유의성 검정 결과(p<0.05).

(4) 묘사분석

본 연구에서는 무처리 혹은 황토가공(처리구)에서 자란 오이와 무로 가공한 오이피클과 단무지를 시료로 사용하였다. 오이피클과 단무지의 저장기간에 따른 조직감의 변화를 측정하였으며, 1년 이상 다양한 식품에 대한 묘사분석 패널 경험이 있는 6명의 묘사분석 패널들을 이용하여 평가하였다. 오이피클은 3일 간격으로 평가를 진행하였으며(3day, 6day, 9day, 12day, 15day), 단무지는 6일 간격으로 평가를 진행하였다(6day, 12day, 18day, 24day). 조직감의 주요 지표가 될수 있는 경도, 아삭함, 섬유질의 정도, 수분감에 대하여 15점 척도를 이용하여 평가하였고, 재현성을 위해 2반복 평가하였다.



그림 3-5-58. 오이피클 묘사분석

표 3-5-75. 무처리 및 황토가공 처리 오이로 제조한 오이피클의 묘사분석 결과

	무처리	황토가공
경도	9.35 ^a	9.62 ^a
아삭함	9.95 ^a	10.38 ^a
섬유질의 정도	2.84 ^a	3.07 ^a
수분감	10.20 ^a	9.91 ^a

제품 간 유의성 검정 결과 (p<0.05)

(5) 소비자 평가

단국대학교에 재학 중인 35명의 소비자패널을 대상으로 평가가 이루어졌다. 전체적인 품질, 전반적인 향미, 경도, 아삭함, 수분감에 대한 9점척도를 이용한 기호도 평가, 단단함과 수분감에 대한 특성 강도평가를 JAR Scale(Just About Right; 1: Too weak, 5: Too strong, 3:Just About Right)을 이용하여 평가하였다. 실험 결과는 평균값으로 나타내었고, Minitab version 16(Minitab Inc., State College, PA, USA)를 이용해 ANOVA 분석을 하였으며, Tukey's Method에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 시료들 간 유의성 검정을 하였다.



그림 3-5-59. 오이피클 소비자 평가

표 3-5-76. 무처리 및 황토가공 처리 오이로 제조한 오이피클의 소비자 조사 결과

	무처리	황토가공
전반적인 품질	5.68 ^a	5.77 ^a
전반적인 향미	5.59 ^a	5.57 ^a
경도(단단함)	6.14 ^a	6.03 ^a
아삭함	6.35 ^a	6.23 ^a
수분감	6.18 ^a	6.11 ^a
단단함의 정도	3.12 ^a	3.00 ^a
수분감의 정도	3.15 ^a	3.06 ^a

제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$)

(6) 오이피클 조직감 평가

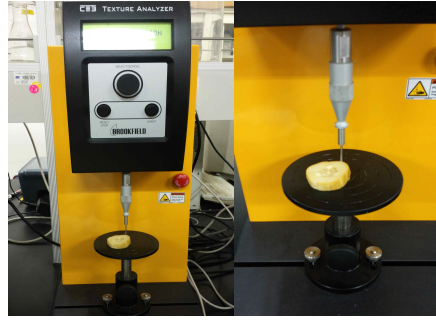


그림 3-5-60. 오이피클 조직감 평가

표 3-5-77. 무처리 및 황토가공 처리 오이로 제조한 오이피클의 저장 기간에 따른 조직감(Hardness) 측정 결과

Hardness(g)	무처리	황토가공
3day	553.53 ± 57.86 ^{Aa}	559.57 ± 58.32 ^{Aa}
6day	545.63 ± 63.52 ^{Aa}	559.24 ± 59.16 ^{Aa}
9day	562.43 ± 55.36 ^{Aa}	569.83 ± 71.20 ^{Aa}
12day	569.03 ± 73.16 ^{Aa}	561.03 ± 74.35 ^{Aa}
15day	550.93 ± 76.34 ^{Aa}	576.90 ± 75.88 ^{Aa}

제품 간 유의성 검정 결과 ($p < 0.05$)

표 3-5-78. 무처리 및 황토가공 처리 오이로 제조한 오이피클의 저장 기간에 따른 조직감(Total Energy) 측정 결과

Total Energy(mJ)	무처리	황토가공
3day	21.59 ± 2.10 ^{Aa}	21.98 ± 2.22 ^{Aa}
6day	21.57 ± 3.18 ^{Aa}	22.52 ± 2.42 ^{Aa}
9day	22.73 ± 2.57 ^{Aa}	23.12 ± 2.68 ^{Aa}
12day	22.49 ± 2.34 ^{Aa}	22.66 ± 2.94 ^{Aa}
15day	21.50 ± 3.00 ^{Aa}	22.00 ± 2.81 ^{Aa}

제품군과의 유의적차이를 알파벳 대문자로 표기
Day 별 유의적 차이를 알파벳 소문자로 표기

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표 달성도

연차	목 표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도(%)
1차년	○ 황토 가공공정 최적화 및 양만장 수질개선 효능평가	5	○ 황토 SiO ₂ 이온화 가공 수율 및 시제품 대량생산 ○ 양만장 pH 완충능, SS(Suspended Solid), 암모니아/아질산 제거 여부	100
	○ 황토가공나노신소재 기능성 비료 처리에 따른 농작물 생육 분석 및 적정 시비조건 규명	5	○ 황토가공나노신소재 처리에 주요 적용 농작물과 대한 정량적 효과 평가 ○ 황토가공나노신소재 처리에 따른 십자화과 채소 및 인삼에 대한 조건별 시비 및 시기별 시비 방법에 대한 효과 평가 ○ 주요 적용 농작물 외에 대해 황토가공나노신소재 처리에 따른 저항성 증진 효과 및 생육에 있어서 노화처리 방제평가 ○ 황토가공나노신소재 처리 조건에 따른 대상 농작물 근권토의 이화학적 성분변화 및 토양개질에 관한 평가	100
	○ 황토가공나노신소재 처리에 따른 십자화과 채소 및 인삼의 주요 토양전염 식물병원균에 대한 증식 억제 효능 <i>in vitro</i> 평가	5	○ 황토가공나노신소재의 식물병원균에 대한 <i>in vitro</i> 성장 저해 효과 평가 ○ 분자생물학적 기법 적용 황토가공나노신소재의 식물 병원균에 대한 항균 활성 평가 ○ 황토가공나노신소재 처리에 따른 십자화과 채소 배추의 생육 촉진 및 병해 방제 효과 분석	100
	○ 미생물 독성 저감 능력 검증 ○ 농업미생물에 대한 생물 독성 저감 경감 기능 확인	5	○ 황토가공나노신소재의 용도 중 디젤 오염 분해 촉진이라는 새로운 용도를 개발하고 검증함 ○ 디젤 오염 토양으로부터 다수의	100

			디젤 분해 가능 균주를 획득하여 미생물 제제로의 이용 가능성 제시함	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 황토가공소재 적용 장어 품질 평가 ○ 황토가공소재 적용 농산물 품질평가 ○ 황토가공소재 적용 농수산물 평가 표준화 기술개발 	5	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동일한 환경에서 양식한 황토무처리 장어와 황토처리 장어의 품질 비교 분석 완료(일반성분분석/항산화분석/영양성분분석/조직감분석/묘사분석/소비자조사) ○ 동일한 환경에서 제배한 황토무처리 무, 배추와 생황토처리, 가공황토 처리 무, 배추의 품질 비교 분석 완료(일반성분분석/항산화분석/영양성분분석/조직감분석/묘사분석/소비자조사) ○ 황토가공소재 적용 농수산물 평가 표준화 기술개발 완료 	100
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 황토가공나노신소재 효능평가를 위한 시제품 지속적 공급 ○ 황토가공공정 확립 ○ 친환경유기농자재 목록공시 신청을 위한 시험분석 ○ 양만장 수질개선을 위한 황토가공소재 첨가농도 조사 	5	<ul style="list-style-type: none"> ○ 황토가공소재 현장 공급여부 ○ 황토가공수율 70% 이상달성여부 ○ 시험성적서 확보여부 ○ 황토가공소재의 양만장 수질개선을 위한 현장시험여부 	100
2차년 (2013)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 황토가공신소재기능성 비료 처리에 따른 농작물 생육분석 ○ 특용작물에 대한 황토가공신소재의 효과 평가 ○ 황토가공신소재 처리 후 토양의 이화학적 성분 변화 및 토양 개질에 관한 평가 ○ 황토가공나노신소재의 병해저항성 증진효과 및 생육, 노화 개선에 관한 효과 평가 	5	<ul style="list-style-type: none"> ○ 황토가공신소재기능성 처리에 따른 배추와 토마토, 오이의 생장 및 생리작용을 농촌진흥청 연구 분석조사기준에 준하여 수행 ○ 운길산에 위치한 동국대학교 학술림에서 수행하였으며, 황토가공나노신소재 농도가 장뇌삼 성분에 미치는 영향을 시험분석 ○ 농작물의 수확을 위해 필요한 토양의 성분조사 및 황토가공나노신소재나노신소재를 처리하였을 경우, 토양성분 변화를 조사하였다. 또한 토양성분과 식물체 분석의 상관관계를 분석 ○ 황토가공신소재의 조건별 시비에 따른 오이, 토마토, 배추의 	100

			생리분석을 통하여 엽록소의 함량, 형광반응 효율, 광합성능과 항산화를 분석하여 지표로 사용	
	○ 황토가공나노신소재 처리 토양에서의 병원균 억제효과 조사를 통한 병해방제 농법 개발	5	○ 기간 별 황토가공나노신소재 처리에 따른 토양 전염 병원성 진균 및 세균의 정량 분석 ○ 황토가공나노신소재 적용 유용미생물의 식물병해미생물에 대한 길항작용 평가 ○ 황토가공나노신소재를 이용한 토양 전염 농작물 병해 제어에 대한 친환경 병해방제 농법 제시	
	○ 오염물질 분해균주와 혼합 배양 최적조건 테스트 ○ 오염물질 독성저감에 의한 작물 성장 촉진기능 검증	5	○ 디젤 오염 분해 촉진의 기작을 토양 세균을 이용해서 촉진 기작을 제시함 ○ 황토가공소재와 함께 식물 성장 촉진 세균의 동시 이용 기술에 대한 기반 연구를 수행함 ○ 황토가공소재를 정기적으로 오랫동안 처리할 때 나타나는 토양 균집 변화를 관찰하고 균집 안정화 효과가 있음을 제시함	100
	○ 황토가공소재 최적화 조건에서 양식 재배된 농수산물 품질 평가 ○ 황토가공소재 적용 농수산물 품질 평가 표준화 기술 개발	5	○ 무처리구, 처리구1(4000ppm 8주 재배)과 처리구2(1차 4000ppm+2차 4000ppm)처리 무의 품질비교 완료 ○ 무처리구, 처리구(가공황토소재 20, 5, 1mL/L 적용) 처리 배추의 품질비교 완료 ○ 무처리구, 처리구(가공황토소재 500, 1000, 2000ppm 적용) 처리 장뇌삼의 품질비교 완료 ○ 무처리구, 생황토처리, 처리구(가공황토소재 20, 5, 1mL/L 적용) 처리 오이/토마토의 품질비교 평가 완료 ○ 황토가공소재 적용 장뇌삼활용 제품의 품질평가 표준 프로토콜 개발 및 핵심 관능특성 지표 발굴 완료	100

			○ 황토가공소재 적용 농수산물 활용 가공제품 선정. 다양한 문헌, 시장조사, 예비실험 등을 통하여 가공제품 선정함. (장어 통조림, 장어육포, 홍삼추출물/분말, 단무지, 배추절임김치 등)	
3차년 (2014)	○ 황토 SiO ₂ 이온화 가공 수율 80% 이상 ○ 황토가공소재 분쇄기술 (습식 분쇄) ○ 황토가공소재 비료효능 ○ 황토가공소재 사료효능 ○ 황토가공소재 농약효능 ○ 장어 수율증대 효능 ○ 장어 폐사율 감소 ○ 기존 탄산칼슘 대체 ○ 양만장 사육수 수질개선효능 ○ 황토가공소재의 가격경쟁력 분석	10	○ 유효규산 생산수율 80% 이상 ○ 유효규산 추출수율 80% 이상 ○ 기존규산질비료대비 15% 이상 ○ 황토가공소재 사료첨가여부 ○ 방제가 50% 달성 여부 ○ 장어 수율증대 15% 이상 ○ 장어 생존율 증대 15% 이상 ○ 기존탄산칼슘 대체 여부 ○ 양만장 사육수 암모니아 제거능 90% 이상, 인 제거능 95% 이상 ○ 기존 수용성 규산액제 대비 가격 비교시 우위 여부	100
	○ 황토가공신소재 처리가 토양 미생물 개선과 대상 농작물에 생육에 미치는 영향 규명 ○ 황토가공소재의 작물 잔류 및 토양변화 연구 ○ 황토가공소재를 활용한 상토 개발 및 향상된 기능성 복합 비료 시제품 개발 ○ 황토가공신소재를 활용한 과실류(복숭아 외 2종)와 특용작물(장뇌삼)의 생육변화 분석 및 생산효율 효과 분석 ○ 무, 배추 농가 대량재배를 통한 적용가능성 높은 재배농법 매뉴얼 작성, 실효성 있는 정량지표개발 ○ 황토가공소재를 활용가능한 범위의 시장조사와 사업화 방안 수립	10	○ 황토가공소재와 토양개질변화의 상관관계 규명 ○ 황토가공소재가 첨가된 상토와 작물의 초기발아 및 생육에 관한 연구 ○ 황토가공소재와 과실수의 생장 및 생리적 특징에 관한 정량적, 정성적 평가 ○ 실효성 있고 최근 농가 보급가능한 매뉴얼 제작을 위한 농가 대량 재배실시 ○ 황토가공소재를 활용한 수용성 규산, 상토, 새로운 농법을 활용한 특용작물의 시장조사와 사업화 방안 수립	100
	○ 황토가공나노신소재 적용 식물병원성 미생물 억제 메커니	10	○ 황토가공나노신소재 적용 방제효과에 대한 과학적 기작규명	100

	<p>증 구명 및 농작물 병해 제어 가능성 증진을 위한 최적화 농법 개발</p>		<p>○ 황토가공나노신소재를 이용한 토양전염 농작물 병해 제어에 대한 농약 혼용 병해방제 농법 제시</p>	
	<p>○ 환경정화용 미생물제제 조정 및 처리 방법 최적화 ○ 토양 처리 방법 및 향후 모니 터링 방안 마련</p>	10	<p>○ 서로 다른 다양성 가진 토양에 처리된 황토 소재의 영향을 토 양 생태계 기능을 중심으로 분 석함. 오염 토양에 황토를 처리 할 때 나타날 수 있는 토양 생태 계 변화에 대해 예측하는 결과 를 제시함 ○ 농법에 적용될 수 있도록 사용 하기에 적절한 농도를 제시하고 토양 효소 활성 변화를 확인하 여 토양 건강성 평가를 수행함</p>	100
	<p>○ 황토 가공소재 적용 가공제품 개발 및 가공조건 최적화 ○ 황토 가공소재 적용 가공제품 품질 평가</p>	10	<p>○ 2차년도에서 규명된 황토 최적 처리 조건 (사용량,재배기간)에서 재배된 장어, 무, 배추, 장뇌삼을 활용한 가공제품 prototype 개발 완료(장어통조림, 장어육포, 장뇌 삼 분말 테블릿, 단무지, 오이 피클) ○ 2차년도에서 규명된 가공황토소 재 처리 농수산물의 핵심품질지 표를 최대한 함유할 수 있는 가 공처리 조건 최적화 완료 ○ 가공황토 소재 처리 가공제품의 품질평가 수행. 다양한 가공조건 처리후에도 가공황토의 효과가 지속되는지 여부 검증(일반성분, 영양성분, 항산화력, 물리적 특 성(조직감,레올로지,열적특성), 묘 사분석, 소비자기호도 조사 평 가) 완료 ○ 최종 사업화 완료 후 가공황토 처리 개발 가공제품의 종류 및 해당제품 시장현황과 사업화 방 안 제시 완료</p>	100

제 2 절 관련분야 기술발전예의 기여도

○ 정부의 2010년도 친환경농업 확산을 위한 지원정책은 아래표와 같이 2400억 정도의 예산이 필요하였다. 황토가공나노신소재의 개발로 아래 표 중에 석회 및 규산질비료의 대체가 가능하고 유기질비료 공급 확대시 유기질비료의 기능을 더욱 향상시켜준다. 또한 미생물 농약 과 해충방제 기능의 소재개발도 가능하므로 국내외적으로 자연생태계 보존과 다양성이 강조되는 지구환경문제가 제기되고 있는 가운데, 화학물질로부터 자연 및 농업생태계에 있어서 오염 최소화를 위한 환경 친화적인 신개념의 비료 및 농약의 개발이 기대된다.

정책		사업계획량(2010년)
‘흙살리기’ 위한 토양 유기물 함량 증대 및 산성도 개선 추진	화학비료감축을 위한 유기질 비료 공급확대	2,500천톤 1,450억
	산성및 유효규산함량이 낮은 농경지에 토양개량제(석회, 규산질비료) 공급으로 지력증진 도모	797천톤 848억원
원예작물 천적방제 지원사업 확대	‘05년부터 시설원에 재배농가에 대한 경영비 부담 경감을 위해 원예작물 천적방제등 지원	해충방제 천적지원: 2,500ha분(36.5억원) 미생물농약 신규공급 : 1,000ha분(8.4억원)
	환경친화적 품종 및 병해충 방제 기술 개발·보급	내병성 품종개량 : ‘13년까지 벼·원예·두류등 100종이상 유용미생물·천적(‘13년까지 42종)등을 이용한 방제기술

○ 우리나라에 약 500개의 양만장이 있으나 장어양식을 할 경우 pH가 매우낮게 유지되는데 이를 해결하기 위하여 탄산칼슘과 같은 알칼리성 물질을 투입하는 실정이다. 그러나 이러한 약품은 pH 완충능력이 없기 때문에 다시 pH를 하락시키는 단점이 있어서 4시간 단위로 계속 투입해야하는 경우가 발생하고, 이러한 과다 투여에 의해 장어의 폐사를 유발하는 경우가 종종 발생한다. 그러나 황토가공나노신소재의 경우 강알칼리성 물질이면서 독성이 없고, 또한 pH 완충 기능이 있기 때문에 소량만 투입해도 pH를 안정적으로 유지할 수 있다. 또한 여러종류의 미네랄성분을 방출하기 때문에 수질개선 및 양만장에 사용하는 광합성미생물의 성장을 촉진시키는 효과도 기대된다. 양만장에서 효과가 입증되면 수산양식 전 분야로의 과급효과가 기대된다.

○ **오염 토양개량 및 식물성장 촉진** : 황토가공나노신소재는 비료와 농약의 두가지 기능을 가지고 있으므로 농경지, 과수원의 토양 개선, 영양공급, 유무기질 분해촉진, 난분해성 유기물 분해, 병해충방제등의 작용에 의한 양질의 농산물 및 과일 생산 증대, 원예 및 잔디의 성장 촉진, 산불로 훼손된 토양 복원 및 수목류의 병충해 방제 및 성장 촉진, 소나무 재선충 방제등에 활용이 기대되며 향후 오염토양 회복과 폐수처리, 악취 및 공해물질 제거 등의 환경정화에도 응용이 기대된다.

○ **환경친화적 유기농업기술과 농가 소득증대향상** : 국내외적으로 자연생태계 보존과 다양성이 강조되는 지구환경문제가 제기되고 있는 가운데, 화학물질로부터 자연 및 농업생태계에 있어서 오염 최소화를 위한 환경 친화적인 생물 비료 및 농약의 개발이 요구되고 있다. 황토가공을 통

한 신소재의 개발은 친환경 농업, 합성농약과 비료의 대체수단으로 안전한 농산물생산, 새로운 자원의 산업화를 위한 친환경농업의 핵심이다. 좀 더 환경친화적이고 인축에 대해 안전하며 효과적인 천연광물을 이용한 첨가제의 개발로 생태적으로 건전하고 환경적으로 안전하며 사회적으로 신뢰성을 갖는 유해생물 방제법과 작물보호체계를 확립할 수 있다. 합성농약 및 비료의 오남용으로 인해 유해생물의 저항성 문제가 제기됨에 따라 생태적으로 방제하기 곤란한 이러한 유해생물을 효율적으로 방제하고 또한 화학농약의 대체수단으로 이용할 수 있기 때문에 환경오염과 인축에 대한 독성문제를 회피하며 화학농약과 비료를 개발하거나 원제를 수입할 때 드는 비용이 막대하기 때문에 황토가공나노신소재를 이용한 작물보호는 개발비용의 절감과 함께 농가 소득증대 향상 및 경제 산업적인 이득을 창출할 것으로 본다.

○ **농약사용의 감량화** : 작물생산의 중요한 제한요인은 병, 해충 및 잡초 등의 유해생물에 의한 수량감소이며 지금까지 이들을 방제하기 위해 필요이상의 과도한 합성농약이 투여되어 오고 있다. 농약의 계속적인 오남용으로 인한 환경오염과 인축독성의 심각성이 증대되었고, 저항성 유해생물의 증가로 방제효과의 저해를 가져왔다. 이에 최근에 보다 친환경, 친생태계적인 생물학적 방제(biological control)기술 개발이 활발하게 진행되고 있다. 본 소재의 항균효능에 의한 방제효과 의하여 유해 생물방제는 물론 작물 생산성 향상에 긍정적으로 작용하여 작물보호(crop protection)체계 확립에 긍정적인 영향을 줄 것으로 기대된다.

○ **비료사용의 감량화** : 종래로부터 농경지의 지력을 보전하고 양질의 농산물을 생산하기 위하여 퇴비나 비료 등을 사용하여 왔다. 특히, 현대농업에서 거의 필수적으로 사용하고 있는 화학비료는 작물의 성장 시기에 맞는 필수성분만을 구성하여 제조 판매함으로써 보다 간편하게 소비자가 사용할 수 있도록 하고 있다. 그러나 상기 화학비료는 농약과 더불어 토양을 산성화시킬 뿐만 아니라 과다사용으로 인하여 환경오염의 주범이 되고 있으며, 이로 인하여 최근 소비자들은 화학비료에 의해 생산된 농산물보다는 퇴비와 같은 유기질 또는 부산물 비료를 사용하여 재배된 농산물을 선호하고 있는 추세이다. 일반적으로 유기질 비료는 내용물의 질소, 인산, 칼륨 등 비료성분의 함량을 공정규격의 규제기준으로 적용하고 있으나, 부산물 비료는 내용물의 유기질 함량과 질소비율 규제하고 있다는 점에서 차이가 있다. 그러나 유기질 비료나 부산물 비료는 공정규격의 규제기준으로 선정된 비료성분 대부분이 퇴비화 과정을 거쳐 제조되므로 넓은 의미의 퇴비에 포함시킬 수 있다. 상기 퇴비를 만드는 기술은 농경이 시작된 역사 이래로 지속되어온 것이나, 최근에는 농가의 일손부족으로 인하여 퇴비도 산업화되는 추세이다. 즉, 대다수의 농가가 필요한 양의 퇴비를 전문적인 제조업체에서 제조된 유기질 비료나 부산물 비료를 구입하여 사용하고 있다. 상기 유기질 또는 부산물 비료의 원료에는 부숙겨, 재, 분뇨잔사, 부엽토, 아미노산 발효 부산비료, 부숙왕겨, 톱밥 또는 토양 미생물 제제 등이 있다. 특히, 가축분은 유기질과 비료가치가 높고 입자의 규격이 일정하기 때문에 질적인 측면에서 퇴비원료로 가장 널리 사용되고 있다. 그러나 이런 퇴비는 유기물의 분해가 느리고 악취가 발생하며 가격이 비싸다는 단점이 있다. 황토가공나노신소재는 토양을 이루는 기본단위로서 어디서나 손쉽게 얻을 수 있는 재료이고, 생물에 해가 없고, 또한 가격이 저렴하며 자연생태계의 물질순환이나 자연정화의 역할이 크기 때문에 유기질 비료와 함께 사용하면 비료사용을 감량할 뿐만 아니라 유기질 비료의 효능을 촉진시킬 수 있다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 연구개발 성과

(단위 : 건수)

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표	13	4	11	10	5	3	2	5			2	4	0
1차년도	목표	4	0	1	3							0	0
	실적	6	6			3		1				0	0
2차년도	목표	3	0	4	4							0	0
	실적	4	1		2	3		1		5		2	1
3차년도	목표	2	4	2	2	5	0	0	0			1	0
	실적	1	2	4	1	8		3		10		4	1
소 계	목표	9	4	7	7	5	0	0	0	0	0	1	0
	실적	11	9	5	3	14	0	0	5	15	0	6	2
종료 1차년도	1		2	2									
종료 2차년도	1		2	2									
종료 3차년도			2	2		1							
종료 4차년도				1		1	1				1		
종료 5차년도						1	1				1		
소 계	2	0	6	7	0	3	2	0		0	2	0	0
합 계	13	9	11	10	14	3	2	5		15	2	6	2

기타 : 창업 1건, 계약 1건 (현장시험 후 납품)

1. 기술실시

번호	기술명	실지구분	실시유형	기술실시일	기술료
1	친환경 황토가공신소재	자체실시	특허등록	2013-06-18	0

※ 연구원 자체 사업화

2. 사업화

번호	제품(상품명)	활용 업체명	사업화 여부	매출 발생여부	제품 매출액	고용창출	R&D 기여율
1	복룡간점토 A	(주)듀립	○	○	3,698,000원	×	100
2	복룡간점토 B	(주)듀립	○	×	0	×	100
3	복룡간점토 AS	(주)듀립	○	×	0	×	100
4	복룡간점토 WT	(주)듀립	○	×	2,000,000원	×	100
5	복룡간비누	(주)듀립	○	○	32,000,000원	×	50

3. 타연구개발사업에의 활용

번호	연구사업명	연구제목	연구자	활용년도
1	식약처 제8차 용역연구개발과제	수산물양식에서 항생제미사용을 위한 대체물질탐색 및 안전성연구	박정극 성정석	2013
2	용역연구개발사업	수산물양식에서 항생제대체물질의 유효성 평가연구	박정극 성정석	2015

4. 지식 재산권

번호	출원등록명	출원등록자명	구분	산업재산권 종류	출원등록일
1	인공복룡간 제조방법	동국대학교 산학협력단	특허출원	특허	2012-11-06
2	황토 슬러리를 이용한 유류 오염 토양의 복원 방법	상동	특허출원	특허	2014-03-26
3	항생제 대체를 위한 황토슬러리 이용 송어 양식방법	상동	특허출원	특허	2014-10-17
4	어병방제용 황토슬러리 조성물, 이를 이용한 어병 방제 및 예방방법	상동	특허출원	특허	2014-10-17
5	황토 슬러리를 이용한 배추과 작물의 뿌리혹 병 방제 조성물 및 이의 제조방법	상동	특허출원	특허	2014-01-23
6	제 [01] 류	상동	특허출원	상표	2012-03-16
7	제 [03] 류	상동	특허출원	상표	2012-03-16
8	제 [19] 류	상동	특허출원	상표	2012-03-16
9	제 [30] 류	상동	특허출원	상표	2012-03-16
10	제 [31] 류	상동	특허출원	상표	2012-03-16
11	인공 복룡간 제조방법	상동	특허등록	특허	2014-07-01
12	황토 가공 소재 및 알칼리 이온수의 제조방법	상동	특허등록	특허	2014-05-09
13	Method of preparing red clay processed material and alkali ionized water	상동	특허등록	특허	2015-05-19
14	황토 슬러리를 이용한 배추과 작물의 뿌리혹 병 방제 조성물 및 이의 제조방법	상동	특허등록	특허	2015-09-11
15	제 [01] 류	상동	특허등록	상표	2013-03-14
16	제 [03] 류	상동	특허등록	상표	2013-03-14
17	제 [19] 류	상동	특허등록	상표	2013-03-14
18	제 [30] 류	상동	특허등록	상표	2013-03-14
19	제 [31] 류	상동	특허등록	상표	2013-03-14
20	배추의 품질 평가 방법	단국대학교 산학협력단	특허출원	특허	2015-02-24

5. 논문게재

번호	논문명	학술지명	저자명	게재일자	SCI 구분
1	Economical synthesis of complex silicon fertilizer by unique technology using loess	Korean J. Chem. Eng.	Moon Young Yoon, Sora Lee, Ji Hoon Choo, Hyeonsoo Jang, Wonwoo Cho, Hoduck Kang, Jung-Keug Park	accept	SCIE
2	Comparison of Airborne Bacterial Communities from a Hog Farm and Spray Field	Journal of Microbiology and Biotechnology 25:709	Ann M. Arfken, Bongkeun Song, and Jung-Suk Sung	2015.5.28	SCI
3	Effect of Red Clay on Diesel Bioremediation and Soil Bacterial Community	Microbial Ecology 68:314	Jaejoon Jung, Sungjong Choi, Hyerim Hong, Jung-Suk Sung, Woojun Park	2014.4.18	SCI
4	Molecular Mechanisms of Enhanced Bacterial Growth on Hexadecane with Red Clay	Microbial Ecology	Jaejoon Jung, In-ae Jang, Sungeun Ahn, Bora Shin, Jisun Kim, Chulwoo Park, Seung Cheol Jee, Jung-Suk Sung, Woojun Park	in press	SCI
5	Rheological properties, ginsenosides contents, sensory evaluations of Korean red ginseng extracts.	International Journal of Food Science and Technology	Yoon Hyuk Chang, Han Sub Kwak, Byoungseng Yoo, Youngseung Lee.	2015.12.1	SCI
4	친환경 황토 가공 신소재가 장어의 품질 특성에 미치는 영향	J Korean Soc Food Sci Nutr. 43(2), 287.	서유진, 길범주, 경진석, 유병승, 장윤희, 유성률, 이영승.	2014.8.6	비SCI
5	친환경 황토가공신소재 적용 재배법에 의한 무의 품질특성	J Korean Soc Food Sci Nutr. 43(9), 1394.	서유진, 윤성진, 김성균, 조원우, 이소라, 강호덕, 윤문영, 박정극, 유병승, 장윤희, 이영승.	2014.5.28	비SCI
6	친환경 가공 황토 소재가 배추의 품질 특성에 미치는 영향.	J Korean Soc Food Sci Nutr. 44(5), 732.	서유진, 양인용, 윤성진, 김성균, 서수영, 원주인, 조원우, 이소라, 강호덕, 윤문영, 박정극, 유병승, 장윤희, 이영승.	2015.4.8	비SCI

6. 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	발표자	발표제목	발표일시	장소
1	Yooyeon Hwang	Drivers of Liking for Commercial Red Ginseng Extract According to Different Ages	2014-10-29	대전 컨벤션 센터
2	Chu In Won	Rheological properties of commercial red ginseng extracts	2014-10-29	대전 컨벤션 센터
3	길범주	황토처리 야채 및 장어의 조직감 특성	2013-11-14	전남 광주 김대중 컨벤션센터
4	Seung-Cheol Jee	Reaction conditions for the production of RCPM having the silicate fertilizer function and its control efficacy on Chinese cabbage clubroot	2013-08-12	서강대학교
5	Seung-Cheol Jee	Effect of Environment-friendly RCPM on Anti-Pathogen of Plant Pathogen and its control efficacy on Chinese cabbage clubroot	2013-10-17	경남 사천 LIG인재니움
6	Se-Hui Kang	Development of Specific Real-Time PCR Methods for Detection of Soil Borne Bacterial Pathogen	2014-08-29	부산 해운대 아르피타
7	Sora Lee	Effect of soluble sodium silicate in Redsoil on Korean wild panax Ginseng	2014-10-07	Salt Lake City, USA
8	이소라	친환경 가공황토 신소재가 배추의 생장에 미치는 영향	2014-10-24	창원 컨벤션센터(CECO)
9	이소라	친환경 황토가공소재가 장뇌삼 성분 및 토양에 미치는 영향	2014-10-24	영남대학교 천마아트센터
10	Hyun-Jin Jang	Biocontrol of red clay soil processed nano material against phytopathogenic bacteria: <i>A. tumefaciens</i> , <i>E. carotovora</i> , <i>X. campestris</i>	2013-10-17	더 케이 서울 호텔
11	Se-Hui Kang	Evaluation of agricultural application to control soil borne plant pathogens using red clay processed nano material.	2015-04-16	창원 컨벤션센터 CECO
12	Se-Hui Kang	Biological Control of Capsicum Damping-off by Utilizing Red Clay Processed Nano Material Mixed with Microbial Agent.	2015-04-16	창원 컨벤션센터 CECO
13	Seung-Cheol Jee	Effect of environment-friendly red clay processed materials (RCPM) on anti-pathogen of plant pathogen and its control efficacy on chinese cabbage club	2015-04-16	창원 컨벤션센터 CECO
14	이소라	가공황토의 농도에 따른 LED 처리가 산마늘 종자 발아에 미치는 영향	2015-04-16	라마다 프라자 제주호텔
15	Yoojin Seo	Quality Characteristics of Eel Farm-Raised by Environmental-friendly Red Clay Processed Nano-Materials	2013-11-14	광주김대중컨벤션센터
16	Inyong Yang	Quality Characteristics of Pickled cucumis sativus L. treated with Environmental-friendly Red Clay Processed Nano-Materials	2015-08-25	대전컨벤션센터
17	이소라	친환경 가공황토 소재가 토마토의 생육 및 토양에 미치는 영향	2015-05-20	농촌진흥청
18	이소라	친환경 가공황토 소재가 오이의 생육과 토양에 미치는 영향	2015-05-21	농촌진흥청(전주)

7. 홍보실적

번호	홍보유형	매체명	제목	일시
1	Internet/PC통신	연합뉴스	동국대연구팀 - 물에 녹는 황토개발	2014-04-03
2	중앙전문지	한국일보	“간단한 가공을 거친 황토는 다방면에 쓰이는 만능 소재	2014-04-23
3	중앙일간지	매일경제외	동국-(주)일미농수산 업무제휴체결	2014-12-05
4	Internet/PC통신	더데일리뉴스	황토가공나노신소재 이용 친환경 무 재배성공	2015-06-18
5	중앙전문지	한국경제	황토가공신소재 이용 친환경 무 탄생, 건강한 농촌 만들어가다	2015-06-18
6	중앙TV방송	KTV	황토활용 친환경 무 개발 농가에보급	2015-08-07

8. 기타활용 및 홍보실적

번호	일자	활용명칭 활용내역	활용내역
1	2015-09-06	현장시험계약	닭 농장에서 황토가공소재 사료첨가 급여 현장시험 후 시험성적이 기존보다 우수할 경우 닭 공급업체인 (주)하림 에 적극 추천하기로 함
2	2015-09-14	현장시험 계약	황토가공소재를 토마토 농장에 적용 후 시험성적이 기존보다 우수할 경우 사용 및 공급계약 체결
3	2015-09-14	현장시험계약	토마토농장에 황토가공소재 적용 후 기존보다 시험성적이 우수할 경우 지속적인 사용 및 공급계약 체결
4	2015-09-23	현장시험계약	황토가공소재를 서해만 간척지 벼 재배지에 적용 후 기존보다 시험성적이 우수할 경우 지속적 사용 및 공급계약 체결

9. 연구인력양성

번호	인력양성명	인력양성년도	인력양성 대상수
1	석사 최성중	2013	1
2	김정렬	2013	1
3	이민석	2015	1
4	박건현	2014	1
5	윤현호	2014	1
6	이영광	2014	1
7	최세라	2014	1
8	박정문	2013	1
9	곽병은	2013	1
10	장현수	2015	1
11	이소라	2015	1
12	로미카 찬드라	2015	1
13	조원우	2014	1
14	이송희	2013	1
15	서유진	2015	1

제 2 절. 성과 활용계획

1. 실용화·산업화 계획

- 현재 연구원 자체 사업화를 통하여 아래와 같이 제품개발이 완료되었으며 동국대 교원 창원규정에 의해 회사가 설립된 상태임. 아래 시제품에서 복룡간 점토 A (pH 12) 와 B(pH 7) 은 사육수 첨가용 및 농업용 으로, 복룡간 점토 AS (분말, pH 5)는 사료첨가용으로, 복룡간 점토 WT (분말, pH 4)는 수처리용으로 개발 완료 하였음.



- 사육수 첨가제로 전남 영광 소재 양만장 에는 현재 공급하고 있는 상태이고 사료첨가제로는 뱀장어 사료공급업체와 협업을 진행하고 있음. 맛을 상쇄시키는 문제가 있어서 이에대한 해결책을 연구하고 있는 상태임. 상기 맛에 대한 문제가 해결되면 사료첨가제로 공급할 예정임. 뱀장어에 적용 후 가두리 포함 내수면 양식 전부야로의 적용 추진 예정. 제품 허가관련하여 황토가공신소재 제조시설에 대한 문제 해결 후 비료, 사료첨가제 및 의약품 등으로 동시에 추진할 예정임. 기술이전도 열어 는 상태로 하겠다는 회사가 있으면 통상실시권 등 협의를 거쳐 이전할 계획임.
- 국내 및 국외시장 분석결과 천연항균/항생제, 생물농약, 천연비료/사료 등의 친환경제품이 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 자연적으로 드물게 존재하여 찾기 힘들고, 대부분 유기성분이어서 온도, 화학물질, UV(자외선), 생물학적 저항성 등의 주위 환경변화에 따라 변질되기 쉬운 단점이 있다. 본 연구과제에서는 무기성천연물 유래인 황토를 가공하는 방향으로 연구를 추진하여 친환경 비료/농약/사료 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.

사업자등록증

(법인사업자)

등록번호 : 201-86-33578

창업승인 협약서

제 협약당사자

"갑" 동국대학교 총장 김희국
 "을" 바이오시스템대학 의생명공학과 교수 박정국, 윤문영
 "창업회사" (주)유립 <가칭>

"갑"과 "을"은 「동국대학교 교원창업규정」(이하 "규정"이라 한다)에 의거하여 다음과 같이 협약을 체결한다.

제1조(목적) 이 협약은 동국대학교에 소속된 "을"의 교원창업에 있어서 "갑"이 이를 허락함과 동시에, 이에 따른 "갑"과 "을"의 권리(의무)관계를 명확히 함으로써, 동국대학교 및 "을"의 사회적(경제적) 성과 향상을 도모함에 그 목적이 있다.

제2조(협약 기간) 이 협약의 기간은 규정에 의한 "을"의 창업 기간으로 한다.

제3조(기본방침) "갑"과 "을"은 신의를 가지고 교원창업에 대한 관계법령과 동국대학교 규정 및 이 협약서의 각 조항을 성실히 이행하고 제1조의 목적을 달성하기 위하여 노력하여야 한다.

제4조("을"의 의무) ① "을"은 교원창업을 수행함에 있어서 동국대학교 및 소속 대학(학과)에 대하여 다음 각 호의 1에 해당하는 사항이 발생하지 않도록 최선의 노력을 다하여야 한다.

1. 정상적인 교수직 수행에 지장
2. 인적 피해
3. 금전적 피해
4. 소음(진동)·오염(공해)·수 등의 환경적 피해
5. 동국대학교 및 소속 대학(학과)의 정상적 운영에 지장을 초래하는 행위

법인명(단체명) : (주)유립
 대표자 : 박정국

개업년월일 : 2013년 06월 03일 법인등록번호 : 110111-5149920

사업장소재지 : 서울특별시 중구 퇴계로36길 2 본관-531(빌딩2가, 동국대총무로영상센터)

본점소재지 : 서울특별시 중구 퇴계로36길 2 본관-531(빌딩2가, 동국대총무로영상센터)

사업의종류 : **업태** 제조
 도소매
 도소매
 도소매
종목 점도, 규안비료
 유기농산물
 비누, 화장품
 전자상거래업

교부사유 :

사업자단위과세 적용사업자 여부 : 여() 부(Y)

전자세금계산서 전용메일주소 :

2013년 10월 04일

중부세무서장 (인)



- 기존에는 인공적으로 제조된 맹독성 화학물질이나 특정 EM의 특이적 길항작용으로 병원균을 제어하는 기존 농법에 필요한 화학제제 및 미생물제제에 대한 생산과 판매가 주를 이루고 있었으나, 현재 유기농법의 증가 및 토양 개선 및 보존에 대한 수요 증가로 이러한 단기적인 대처법에 대해 한계를 맞이하고 있음. 본 연구과제에서는 기존 화학제제 및 EM 제제와는 차별화된 자연추출물 형태의 황토가공나노신소재 물질로, 연작으로 이용되는 토양에서의 농작물 생산성과 품질을 향상시키고, 유용미생물의 증식과 토양 개질을 통해 주요 토양 전염성 농작물 병원균은 억제하는 자연친화적 비료이자 병해방제 소재를 개발하고 이를 적용하는 기법을 제시하고자 함. 이를 통해 기존의 방법보다 효과적인 방법으로 연작토양에도 효과적이며 주요 농작물병해를 예방하여 작물 생산의 증대를 꾀할 수 있는 친환경 토양전염 병해방제 제제와 이에 대한 적용 농법을 국내 및 국외에 판매 보급할 계획임.
- 국내 및 국외시장 분석결과 황토가공나노소재를 활용한 가공제품은 거의 찾아볼 수 없으므로 본 연구에서는 황토가공나노소재의 가공공정을 최적화하여 기능성, 영양성, 소비자의 기호도를 최적화한 가공제품을 개발할 계획임.
- 마케팅 전략
 - 황토가공신소재를 이용한 친환경농자재 및 사료, 농/수산물, 농수산물 가공식품 등을 참여업체((주)성보화학, 신계양만, 경일양만, 세명양만, (주)유안사료 등)을 통하여 판매 예정.
 - 상기 황토가공신소재를 현재 동국대 윤길산 학술림(경기도 남양주시)에서 파일롯트 플랜트를

가동 생산하고 있으며(생산규모 : 20ton 슬러리/년) 참여업체인 (주)성보화학, 신계양만의 2 곳과 뱀장어 사료 공급업체에 샘플을 공급하여 효능평가를 수행하고 있고 상당히 좋은 결과가 나오고 있으므로 연구원 자체사업화를 통하여 본 소재를 지속적으로 공급하면서 기술이 전도 검토할 예정임.

- 전국 양만장(약 500개 예상), 내수면 양식 및 해수어종 전부야로 적용
- 친환경 농수산물 및 기능성 식품의 경우 신규 참여업체 모집 후 기존 유통망 활용
- 전국 대리점 모집 및 해외 농수산물관련제품 agent를 통한 국내/해외 판로 확보
- 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획 : 현재 신문, 방송을 통하여 일부 홍보하고 있고, 지속적으로 관련매체에 홍보 예정
- 추가연구, 타연구 활용계획 : 어병예방 및 수율증대를 위한 사료첨가제로의 개발 시도예정, 녹조/적조 방제, 질소/인 제거 등 수처리제로의 개발 시도예정

○ 연구개발 시제품 매출 계획

- 양만장에 사용되는 pH 조절제인 탄산칼륨 사용량은 신계양만의 경우 1년기준으로 약 20,000천원 정도 소요되므로 국내 양만장 수가 500개 정도로 추정할 때 시장은 약 100억 정도로 추정됨. 황토가공소재의 경우 탄산칼슘보다 pH 조절능력이 우수할 뿐 아니라 pH 완충 기능 및 수질정화 기능도 있으므로 양만장 사용 탄산칼슘 사용분 전량 대체 가능할 것으로 사료됨. 과제종료 후 시장점유율 10%로 추정하면 연간 10억정도 예상함.
- 토양개량제로 정부에서 무상으로 공급한 금액이 2010년도 기준 약 838억원 수준이었음. 정부 공급 토양개량제의 경우 석회, 규산질비료로 석회의 칼슘성분이나 규산질 비료의 규산성분이 용출되지 않고 단지 pH 조절능 정도 이므로 황토가공소재로 대체 가능함. 과제종료후 목표치는 약 10% 정도로 추정하면 연간 80억 정도 예상함.
- 국내 친환경 농법에 적용되는 미생물 농약시장은 2000년 기준 판매액이 33억원 정도였고 살충, 살균효과가 있다고 주장하는 토양미생물 제제의 판매액을 추정한 금액을 더하면 년 77억원 정도임. 본 연구사업에서 개발된 황토가공나노신소재의 병해 방제 농자재로 적용에 대한 시장 점유율 15%를 예상하여 연간 10억의 매출을 목표로 함.
- 국내 친환경 농산물 중 채소류 와 과실류 시장규모는 2010년 기준 27,551억원 정도 이므로 본 사업단에서 개발된 친환경 농산물의 시장 점유율을 약 1% 정도 예상하면 276억원 정도를 년매출 목표로 함.
- 친환경 농식품의 경우 현재 김치시장이 약 2조4000억원 정도(한국 농어민 신문, 2011.12.12.) 이므로 시장 점유율을 약 1% 정도로 예상하면 240억원 정도를 년매출 목표로 함.
- 매출목표는 과제종료후 5년간 500억이고, 매출제품은 순수 연구성과물인 황토가공신소재 (비료, 사료첨가제, 수처리제 (녹조/적조 방제 포함), 약취제거제, 오염토양복원제, 토양개량제 등), 황토가공신소재 처리 농작물, 황토가공신소재처리 농수산물을 이용한 가공식품으로 한정함.
- 제품등록관련하여 친환경유기농자재로 검토 진행중에 있으나 “친환경 농어업육성 및 유기식품등의 관리지원에 관한 법률” 현재 법규상에 허용물질로 신규 등재하여야 하므로 시간이 오래 소요됨. 비료관리법상 토양개량제 중에 규산질 비료 기준(가용성 규산 25%, 알칼리분 40%, 구용성 고토 2%)에 적합. 비료관리법상 4중복합비료 옆면시비용으로의 등록을 검토

하고있음. 4종 복합비료로 등록하기 위해서는 공정규격 기준을 통과 하려면 질소 1%, 가리 10%, 붕소 0.05%, 폴리브덴 0.0005% 를 황토가공소재에 첨가하여 제품개발을 하여야 함.

- 향후 매출증대를 위하여 황토가공소재 사업을 희망하는 회사가 나타날 경우 기술이전을 통한 통상실시권을 부여할 계획임. 또한, 기존회사 (주)듀립의 매출을 증대하기 위하여 현재 다니고 있는 벤처농업대학에서 관련 농축수산분야 회사와 현장시험계약을 지속적으로 체결하여 납품으로 연계할 계획임.

○ 원료확보계획

- 현재 황토원료는 보령황토(충남 홍성 소재)에서 구입 사용하고 있으나, 고창황토 및 승진산업 황토도 검토하고 있음. 황토원료에 대한 품질관리 기준은 중금속 함유량과 SiO₂ 함량을 기준으로 검사함. 향후 여러 황토회사의 샘플을 수거하여 많은 거래처를 확보할 계획임.
- 황토가공소재의 생산량이 증대할 경우를 대비해서 황토구입으로는 불가능한 경우 황토광산에서 자체 채굴하는 방법도 고려중에 있음.

○ 기술이전계획

- 교원 창업회사 (주)듀립은 학교에서 창업승인을 받은후 설립한 회사이므로 본 기술에 대한 통상실시권을 행사할 수 있음. 단, 투자를 받을 경우 학교 산학협력단의 기술사업화실과 협의를 거쳐 지분관계를 정리할 계획임
- (주)듀립의 매출실적만으로는 5년간 500억 달성목표에 도달하는 것이 부족하므로 기술이전을 원하는 회사가 나타날 경우 통상실시권을 부여할 예정임.

2. 활용방안

- 기존 특허는 황토를 단순배합에 치중하고 있어 기능이 많이 감소하므로, 본 연구과제에서는 SiO₂ 성분을 이온화수율을 높이면서 다양한 기능을 나타내는 소재개발을 위하여 여러물질의 배합비를 최적화하는방향으로 연구를 추진하였으므로 비료(4종복합)/토양개량제//사료첨가제/농약첨가제/수처리제(녹조/적조 방제포함)/오염토양복원제 등으로 활용이 가능함
- 특히 황토를 이용한 농법개발은 주로 황토의 배합을 주요 목적으로 진행하고 있으나 시비 기준과 시기 등에 따른 효능 규명을 통한 최적화 농법개발이 필요하다고 판단된 바 1,3세부와 긴밀히 연계하여 효능과 천연광물의 배합정도를 평가지표로 활용함으로써 재배농법에 대한 특허 및 활용이 가능함.
- 기존 특허는 항진균 및 항균효과를 갖는 황토소재 화합물과 식물 추출물 첨가 화합물을 이용하는 청결 보습제 및 화장품 제제 적용에 치중되어 있으나, 본 연구과제에서는 황토가공 나노신소재의 유형 별 제조공정에 따른 콜로이드 제제를 및 무/배추/인삼 경작 토양 처리를 통해 토양 내 주요 전염 병원균에 대한 항균성 효과를 평가하는 연구를 추진하여 황토가공 나노신소재의 토양전염 농작물 병원균의 항진균 및 항균효과 소재와 이에 대한 적용 농법에 관한 특허 및 활용이 가능함.

- 현재 국내 시장에는 다양한 종류의 농업용 EM 제품과 오염 토양 정화를 위한 미생물 제제에 대한 특허와 이를 상품화한 제품들이 시판되고 있음. 대부분 제품은 배양액 안에 배양된 미생물이 들어있는 형태이며 일부는 고형화 시킨 형태로 시판되고 있음. 또한 경우에 따라 미생물의 생장을 촉진시키기 위한 영양염류와 함께 사용되기도 함. 본 연구를 통해 개발된 제품 및 특허는 인공적으로 제조된 화학물질 기반의 영양염류를 사용하지 않고 자연추출물 형태의 황토가공나노신소재 물질의 미생물 생장 촉진 효과를 이용하고자 하는 것임. 이를 통해 기존의 방법보다 친환경적인 방법으로 황토가공나노신소재 기술 적용 환경정화 및 농업환경개선용 미생물 제제에 대한 특허 및 활용이 가능함
- 기존 논문은 천연점토 자체를 나노화 시켜 항균 효능평가분야에 치중되어 있으므로 본 연구과제에서는 천연점토중에 황토를 선정하여 가공한 후 나노콜로이드 형태로 제조하는 방향으로 연구를 추진하였고 용도별(비료, 사료, 농약)로 논문게재 및 활용이 가능함.
- 기존에 보고된 논문은 황토만을 사용한 것이 아닌 타 물질과 황토를 혼합 한 후, 미생물을 접종시켜 식물생장에 관한 연구를 진행하였다. 본 연구과제에서는 황토를 나노콜로이드 형태로 제조한 후, 황토와 미생물을 혼합처리 함으로써 화학비료 대체제로써의 잠재력을 평가하고 식물 생장에 미치는 영향을 평가, 분석하여 이에 따른 결과를 논문게재 및 활용이 가능함.
- 기존 연구의 천연점토 자체에 대한 나노화 소재와 달리, 본 연구에서 개발되는 황토가공나노신소재는 지금까지 개발된 적이 없는 새로운 천연 소재이므로 연구가치가 크며 농업환경 및 오염토양환경 등 기존의 연구분야와 결합되어 새로운 기술을 도출해낼 가능성이 큰 물질임. 따라서 황토가공나노신소재물질을 이용한 미생물과 식물에서의 생물 독성 저감 효과와 작물 생장 증대, 오염환경정화 기능 향상에 대한 논문 발표 및 활용이 가능함.
- 기존 논문은 황토를 이용한 식물 재배 및 인체 친화적인 의료품, 제품 등의 평가에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 황토가공나노신소재 처리를 통한 토양전염 식물병원균의 항균 및 항진균 작용과 증식 억제 효능을 분석하는 방향으로 연구를 추진하여 황토가공나노신소재의 항진균 및 항균 활성 효능에 관한 논문게재 및 활용이 가능함
- 황토가공나노소재를 이용한 농수산물 및 농수산물 이용 가공제품에 대한 기능성/품질 평가에 대한 연구는 거의 없으므로 기능성/평가 기술 표준화에 대한 논문과 가공제품 품질 최적화에 대한 논문 게재 및 활용이 가능함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당 사항 없음.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당 사항 없음.

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

가. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

(1) 실험실 안전 점검 체계

○ 연구실 일상점검 실시: 연구활동 종사자가 육안으로 연구활동 시작 전 매일 1회 실시.

○ 연구실 정기점검 실시: 외부 전문기관에 의뢰하여 안전점검기기를 이용 매년 1회 실시.

○ 연구실 정밀안전진단 실시:

- 대상: 연구개발 활동에 유해 화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해 화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실.

- 실시: 2년마다 1회 실시.

(2) 연구실안전관리규정 작성: 2007년 2월 작성하여 연구실안전관리규정 준수.

나. 교육 훈련

(1) 개요: 연구(실험)실 안전 확보 및 사고예방을 위하여 연구실 법정 안전교육.

(2) 교육대상: 교수, 대학원생(이공계열 전원), 연구원, 학부생 및 연구활동 종사자.

(3) 안전교육 과목 및 시간:

시 간	과 목	대 상	비 고
1교시	화학·가스 안전	학부생	10:00~12:30
2교시	실험실 장비 및 기구 취급		
3교시	전기안전		
점 심	점 심		

4교시	연구실 안전법	산학협력단, 연구원 대학원생, 학부생	13:30~16:30
5교시	화학·가스안전		
6교시	전기안전		

* 교육 과목은 일부 변경될 수 있음.

다. 보험 가입 현황: 아래 표 내용과 같으며 매년 주관부서에서 갱신.

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
플러스연구활동 단체상해보험	상해사망, 후유장애: 1억원 상해 의료실비: 1천만원	대학원생, 연구원	대학원교학과, 산학협력단
연구활동종사자 상해보험	상해사망, 후유장애: 1억원 상해 의료실비: 1천만원	학부생	학생과
교직원 단체상해보험	상해사망, 후유장애: 1억원 질병사망, 후유장애: 3천만원 암,허혈성심질환,뇌혈관질환: 1천만원 입원 의료비 : 1천만원	전임교원, 비전임교원, 정규직원, 조교, 계약직	총무과

* 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 시행규칙 제6조에 의거 인건비의 1~2%이하의 금액을 안전관련 예산으로 반영하여야 함.

라. 연구활동 종사자 건강검진 실시: 인체에 치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동 종사자에 대하여 정기적으로 매년 건강검진 실시.

마. 추가 이행

- (1) 연구실 환경개선공사: 매년 연구실 정기점검결과를 근거로 하여 지적된 연구실의 문제점을 보완하기 위하여 지속적인 연구실환경개선공사를 실시하여 연구실의 안전 확보에 만전을 기하고 있음.
- (2) 실험실 폐기물처리: 폐기물 창고에 보관 후 외부 처리업체에 위탁처리.

제 9 장 참고문헌

1. Miyake, Y. and E. Takahashi. 1978. Silicon deficiency of tomato plant. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24(2):175-189.
2. Miyake, Y. and E. Takahashi, 1983. Effect of silicon on the growth of cucumber plant in soil culture. *Soil Sci. and Plant Nutr.*, 29(4):463-471 (1983).
3. Seebold, K.W., T.A. Kucharek, L.E. Datnoff, F.J. Correa-Victoria and M.A. Marchett, 2001. The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars of rice. *Phytopathology* 91(1):63-69 (2001)
4. Lewin, J. and B.E.F. Reimann, 1969. Silicon and plant growth. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 20: 289-304.
5. Lee, S.K., J.C. Yu, and M. Kohno, 1975. Fate of inorganic nitrogen by addition of silica materials on the fresh soil condition. *Korean J. Soil Sci. Fert.*, 8: 61-68.
6. Korndorfer, G.H. and I. Lepsch, 2001. in *Silicon in Agriculture*, L. E. Datnoff, G. H. Snyder and G. H. Korndorfer Eds., Elsevier Science, Netherlands.
7. Miyake, Y. and E. Takahashi. 1986. Effect of silicon on the growth and fruit production of strawberry plants in a solution culture. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 32: 321-326.
8. Ma, J., K. Nishimura, and E. Takahashi. 1989. Effect of silicon on the growth of rice plant at different growth stages. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 35: 347-356.
9. Datnoff L.E., R.N. Raid, G.H. Snyder, and D.B. Jones. 1991. Effect of calcium silicate on blast and brown spot intensities and yields of rice. *Plant Dis.*, 75: 729-732.
10. Deren C.W., L.E. Datnoff, G.H. Snyder, and F.G. Marin. 1994. Silicon concentration, disease, and yield components of rice genotypes grown on flooded organic histosols. *Crop Sci.*, 34: 733-737.
11. Datnoff L.E., C.W. Deren, and G.H. Snyder. 1997. Silicon fertilization for disease management of rice in Florida. *Crop Prot.*, 16: 525-531.
12. 25. Park JG, Yoon MY, 2010. Methods of preparing red clay processed material and alkali

ionized water, US Patent, 9,034,394 B2 (2015)

13. Santoro, T and G. Stotzky. 1968. Sorption between microorganisms and clay minerals as determined by the electrical sensing zone particle analyzer. *Can. J Microbiol.*, 14(4): 299-307.
14. Stotzky, G. 1972. Activity, ecology, and population dynamics of microorganisms in soil. *Crit. Rev. Microbiol.* 2: 59-137.
15. Macura, J and G. Stotzky. 1980. Effect of Montmorillonite and Kaolite on Nitrification in Soil. *Folia Microbiol.* 25(2):90-105.
16. Lipson, S.M, G. Stotzky. 1983. Adsorption of reovirus to clay minerals: effects of cation-exchange capacity, cation saturation, and surface area. *Appl. Environ Microbiol.* Sep; 46(3): 673-82
17. Schoonheydt, R. A. 1995. in *Mineral surfaces*, D. J. Vaughan and R. D. A. Patrick Eds., The Mineralogical Society of Great Britain and Ireland.
18. H. Su, X. Wang, Y. G. Kim, S. B. Kim, Y. G. Seo, J. S. Kim and C. J. Kim, 2004. Optimization of decoloring conditions of crude fatty acids recovered from crude glycerol by acid-activated clay using response surface method. *Korean J. Chem. Eng.*, **31**, 2070-2076.
19. N. S. Ahmedzeki, H. A. Rashid, A. A. Alnaama, M. H. Alhasani and Z. Abdulhussain, 2013. Removal of 4-nitro-phenol from wastewater using synthetic zeolite and kaolin clay. *Korean J. Chem. Eng.*, **30**, 2213-2218.
20. H. P. van Dokkum, J. H. J. Hulskotte, K. J. M. Kramer and J. Wilmot. 2004. Emission, Fate and Effects of Soluble Silicates (Waterglass) in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 515-521.
21. CEES. 2013. **SOLUBLE SILICATES** : Chemical, toxicological, ecological and legal aspects of production, transport, handling and application. February.
22. Park JS. 1996. South Coast of the red tide red tide occurrence and control measures by spraying loess, College of Fisheries Science, Fisheries Science Institute, Yeosu, Korea.
23. Daniel Hillel, 1980. Fundamental of soil physics, Academic Press, San Diego, USA.

24. Lim YP. 1996. Medical Environmental Geochemistry, Chun Kwang, Ansan, Korea.
25. MOMAF, 2011. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, Statistical Year Book of Maritime Affairs and Fisheries Seoul, KoreaFood Technologists. Orlando, FL, USA.
26. Hong SP, Kim SY, Jeong DY, Jeong PH and Shin DH. 2005. Mineral Contents and Fatty Acid Composition in Bone and Flesh of Cultured Eel, J Fd Hyg Safety 20, 98-102
27. Hwang JH, Lee SW, RHa SJ, Jeong DH, Han KH and Shin TS. 2010. Nutritional Characteristics of Eel(*Anguilla japonica*) Fed a Diet of Yuza (*Ditrus junos* Sieb ex Tanaka). J. Fish Aquat Sci 43(6), 573-580
28. 농촌진흥청 (RDA) (2000). 토양 및 식물체 분석법.
29. 농촌진흥청 (RDA) (2010). 농업과학기술 연구조사분석기준
30. 이동섭 (2011) 산양삼 재배의 이론과 실제, 넥서스Books
31. Adatia, M. H., Besford, R. T. (1986). The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculation nutrient solution. *Annals of Botany* 58(3): 343-351.
32. Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24(1): 1.
33. Arrigoni, O., Calabrese, G., De Gara, L., Bitonti, M. B., and Liso, R. (1997). Correlation between changes in cell ascorbate and growth of *Lupinus albus* seedlings. *Journal of Plant Physiology* 150(3): 302-308.
34. Boardman, N. (1977). Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual review of plant physiology* 28(1): 355-377.
35. Burritt, D. J., Mackenzie, S. (2003). Antioxidant metabolism during acclimation of *Begonia Xerythophylla* to high light levels. *Annals of Botany* 91: 783-794.
36. Epstein, E. (1994). The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(1): 11-17.
37. Folyer, C. H., Lelandais, M., Kunert, K. J. (1994). Photo oxidative stress in plants. *Pysiologia Plantarum* 92: 696-717.

38. Idris, M. D., Hossain, M. M., and Choudhury, F. A. "The effect of silicon on lodging of rice in presence of added nitrogen." *Plant and soil* 43.1-3 (1975): 691-695.
39. Jung, S., Kim, J. S., Cho, K. Y., Tae, G. S., and Kang, B. G. (2000). Antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus*) to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFs. *Plant Science* 153(2): 145-154.
40. Kim, Y. H., Park, K. H., and Rhoxy, H. M. (1996). Transcriptional activation of the Cu, Zn-superoxide dismutase gene through the AP2 site by ginsenoside Rb2 extracted from a medicinal plant, *Panax ginseng*. *Journal of Biological Chemistry* 271(40): 24539-24543.
41. Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophyll fluorescence signatures of leaves during the autumnal chlorophyll breakdown. *Journal of Plant Physiology* 131(1): 101-110.
42. Ma, J. F., Yamaji, N. (2006). Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in Plant Science* 11(8): 392-397.
43. Mila, S., Gould, W. A., Clements, R. L. (1969). Heat processing effect on starch, sugars, proteins, amino acids, and organic acids of tomato juice. *Food Technology* 23: 93-95.
44. Miyake, Y., and Takahashi, E. (1978). Silicon deficiency of tomato plant. *Soil Science and Plant Nutrition* 24(2): 175-189.
45. Miyake, Y., and Takahashi, E. (1983). Effect of silicon on the growth of cucumber plant in soil culture. *Soil Science and Plant Nutrition* 29(4): 463-471.
46. Smirnoff, N. (1996). Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of botany* 78(6): 661-669.
47. Voogt, P. D. E., Brinkman, U. T. (1989). Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. Halogenated biphenyls. Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products: 3-45.
48. 김병섭, 용영록 (2004). 칼슘비료 처리에 의한 배추 무름병 발생 억제. *식물병 연구*. 10(1): 82-85.
49. 김영철, 김광용, 서효덕, 박권우, 윤형권, 서태철, 이지원, 이상규 (2003). 펄라이트 수경 재배 토마토의 품질 및 저장성에 미치는 규소의 영향. *한국원예학회지* 44(3): 321-324.

50. 김현룡, 안준배. (2014). 연구논문: 방울토마토 (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) Betatini 품종의 이화학적 특성. *산업식품공학* 18(3): 222-228.
51. 나택상, 최경주, 윤봉기, 조명수, 김희곤, 김효중, 손동모, 유용권 (2013). 황토와 피스모스 혼합배지가 수경재배 토마토 'Mascar'의 품질과 배액에 미치는 영향. *시설원예·시설공장* 22(1): 1-6.
52. 박성진, 유선미, 김영언. (2012). 산삼 배양근의 영양성분 및 생리활성 탐색. *한국식품영양학회지* 25(4): 729-736.
53. 서세명, 우수영, 이동섭. (2007). 지역별, 연령별 산양삼의 광합성특성에 관한 연구. *한국임학회지* 96(3): 357-361.
54. 이경철, 김선희, 박완근, 김영설 (2014). 수분스트레스가 땃두릅나무의 광합성 능력 및 광계 II의 활성에 미치는 영향. *한국약용작물학회지* 22(1): 38-45
55. 이수광, 구자정, 조원우, 강호덕 (2013). 왕겨 피복에 따른 만삼 종자발아와 육묘를 위한 트레이, 토양 및 차광처리 효과. *한국임학회지* 102(1): 66-73.
56. 이중섭, 박종한, 한경숙 (2000). 규산칼륨 처리가 오이의 생육, 광합성 및 무기이온 흡수에 미치는 영향, *한국원예학회지* 41(5): 480-484.
57. 이한철, 이병일, 최영하, 최영환 (2001). 양액내 KCl과 NaCl 첨가에 따른 2단 밀식 토마토의 생리 및 해부학적 특성. *한국원예학회지* 2001: 25-31.
58. 정순재, 정원복, 김희태, 강경희, 이종성, 오주성. (2000). 유기농 자재의 시용이 토양의 이화학적 특성과 배추의 생육 및 체내성분에 미치는 영향. *한국유기농업학회지* 8(3): 131-146.
59. 현동운, 연병열, 이성우, 강승원, 현근수, 김영철, 김성민. (2009) 인삼 재배지의 토양 화학성에 따른 생리장해 유형 분석. *한국약용학회지* 17(6): 439-444
60. Abbas S. J., B. Ahmad and P. Karlovsky 2014. Real-time PCR (QPCR) assay for *Rhizoctonia solani* anastomoses group AG2-2 III B. *Pak. J. Bot.* **46(1)**: 353-356.
61. Atallah, Z. K. and W. R. Stevenson 2006. A methodology to detect and quantify five pathogens causing potato tuber decay using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Phytopathology* **96**:1037-1045. doi: 10.1094/PHYTO-96-1037
62. Choi, J. H., S. G. Yang, J. Y. Song and H. G. Kim 2014. Development of species-specific primers for *plasmodiophora brassicae*, clubroot pathogen of Kimchi cabbage. *Res. Plant Dis.*

20(1): 21-24.

63. Choi, Y. H., H. T. Kim, J. C. Kim, K. S. Jang, K. Y. Cho, and G. J. Choi 2006. In vitro antifungal activities of 13 fungicides against pepper anthracnose fungi. *The Kor. J. of Pesticide Sci.* **10**: 36-42
64. Dangl, J. L. and J. D. Jones 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* **411**:826-833. doi: 10.1038/35081161
65. de Kievit, T. R. and B. H. Iglewski 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* **68**: 4839-4849.
66. Holden, M. T., S. Ram Chhabra, R. de Nys, P. Stead, N. J. Bainton, P. J. Hill, M. Manefield, N. Kumar, M. Labatte, D. England, S. Rice, M. Givskov, G. P. Salmond, G. S. Stewart, B. W. Bycroft, S. Kjelleberg and P. Williams 1999. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **33**: 1254-1266.
67. Johanson, A., H. C. Turner, G. J. McKay and A. E. Brown 1998. A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheath-blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* and *R. oryzae-sativae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**: 289-294.
68. Jung, B. K., G. S. Kim, J. H. Song and S. D. Kim 2013. PCR-DGGE analysis of the fungal community of red-pepper fields utilizing eco-friendly farming methods. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **41(3)**: 292-299.
69. Lazdunski, A. M., I. Ventre and J. N. Sturgis 2004. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 581-592. doi: 10.1038/nrmicro924
70. Lee, J. W., B. H. Kim, Y. S. Park, Y. C. Song and S. C. Koh 2014. Microbial community analysis in the wastewater treatment of hypersaline-wastewater. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **42(4)**: 377-385.
71. Ma, J. F. and E. Takahashi 2002. *Soil, fertilizer and plant silicon research in Japan*. pp. 63-71 Elsevier Science BV, Amsterdam, Netherlands.
72. Paulitz, T. C. and J. E. Loper. 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of Phythium damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathology.* **81**: 930-935.
73. Quintavalla, S. and L. Vicini 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Sci.* **62**: 373-380.

74. Rajkumar, M., R. Nagendran, K. J. Lee, W. H. Lee and S. Z. Kim 2006. Influence of plant growth promoting bacteria and Cr⁶⁺ on the growth of Indian mustard. *Chemosphere*. **62**: 741-748. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.04.117
75. Salmond, G. P., B. W. Bycroft, G. S. Stewart and P. Williams 1995. The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication. *Mol. Microbiol.* **16**: 615-624.
76. Shetty, R., X. Frette, B. Jensen, N. P. Shetty, J. D. Jensen, H. J. Jorgensen, M. A. Newman and L. P. Christensen 2011. Silicon-induced changes in antifungal phenolic acids, flavonoids, and key phenylpropanoid pathway genes during the interaction between miniature roses and the biotrophic pathogen *Podosphaera pannosa*. *Plant Physiol.* **157**: 2194-2205. doi: 10.1104/pp.111.185215
77. Talhinhas, P., S. Sreenivasaprasad, J. N.-Martins and H. Oliveira 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2987-2998
78. Tierens K. F. M.-J., B. P. H. J. Thomma, M. Brouwer, J. Schmidt, K. Kistner, A. Porzel, B. M.-Mani. B. P. A. Cammue and W. F. Broekaert 2001. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-driven isothiocyanates in resistance of Arabidopsis to microbial pathogens. *Plant Physiol.* **125**: 1688-1699
79. Urashima, Y., T. Sonoda, Y. Fujita and A. Uragami 2012. Application of PCR-denaturing-gradient gel electrophoresis (DGGE) method to examine microbial community structure in asparagus fields with growth inhibition due to continuous cropping. *Microbes Environ.* **27(1)**: 43-48.
80. Varzea, V. M. P., C. J. Rodrigues, and B. G. Lewis 2002. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawae* in comparison with other related species from coffee. *Plant Pathol.* **51**: 202-207.
81. Watanabe, T., W. Oyanagi, K. Suzuki and H. Tanaka 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* **172**:4017-4022.
82. Zhou, X. and F. Wu 2012. p-Coumaric acid influenced cucumber rhizosphere soil microbial communities and the growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* Owen. *PLoS One*. **7**:e48288. doi: 10.1371/journal.pone.0048288
83. Park JS. 1996. 1996 South Coast of the red tide red tide occurrence and control measures by spraying loess, College of Fisheries Science, Fisheries Science Institute, Yeosu, Korea, p 39 ~ 61

84. Daniel Hillel, 1980. Fundamental of soil physics, Academic Press, San Diego, USA, p 449 ~ 468
85. Lim YP.1996. Medical Environmental Geochemistry, Chun Kwang, Ansan, Korea, p 30 ~ 32
86. Park JG, Yoon MY, 2010. Methods of preparing red clay processed material and alkali ionized water, Korea
87. MOMAF, 2011. Ministry of Martime Affairs and Fisheries, Statistical Year Book of Martime Affairs and Fisheries Seoul, KoreaFood Technologists. Orlando, FL, USA.
88. Hong SP, Kim SY, Jeong DY, Jeong PH and Shin DH. 2005. Mineral Contents and Fatty Acid Composition in Bone and Flesh of Cultured Eel, J Fd Hyg Safety 20, 98-102
89. Hwang JH, Lee SW, RHa SJ, Jeong DH, Han KH and Shin TS. 2010. Nutiritional Characteristics of Eel(*Anguilla japonica*) Fed a Diet of Yuza (*Ditrus junos* Sieb ex Tanaka). J. Fish Aquat Sci 43(6), 573-580
90. AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 31.
91. Morrison, W. R. and Smith, L. M. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron trifluoride-methanol. J. Lipid Res. 5:600-6
92. Korea Food and Drug Administration., 2004. Food Standards Codex. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea.
93. Helio A. Martins-Junior et. al; A Validated Method to Quantify Folic Acid in Wheat Flour Samples using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. 2008. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 19, No. 5, 971-977
94. Himaya S.W.A, Ngo DH, Ryu BM and Kim SK. 2012. An active peptide from gastrointestinal enzyme hydrolysate of Pacific cod skin gelatin attenuates angiotensin-1 converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress. J. Food Che. 132, 1872-1882
95. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1198-1200.
96. Iris F. F. Benzie and J. J. Strain. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘Antioxidant Power’ : The FRAP Assay. Anal Biochem 239, 70-76

97. Yanishlieva NV, Marinova E. 2001. Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *Eur J Lipid Sci Technol* 103, 752-797.
98. Kang DY, Shin MO, Shon JH, Bae SJ. 2009. The antioxidative and antimicrobial effects of *Celastrus orbiculatus*. *J Life Sci* 19: 52-57.
99. Moon GS, Ryu BM, Lee MJ. 2003. Components and antioxidant activities of Buchu (Chinese chives) harvested at different times. *Korean J Food Sci Technol* 35: 493-498
100. Ku KH, Lee KA, Kim YL, Lee YW. 2006. Quality characteristics of hot-air dried radish (*Raphanus sativus* L.) leaves. *Korean J Soc Food Sci Nutr* 35: 780-785.
101. Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (MIFAFF). 2013. *Agriculture food and rural affairs statistics affairs statistics yearbook*. Ministry of agriculture, food and rural affairs, Sejongsi, Korea. p 112-113.
102. Yoo KC, Lee KE. 1981. Studies on the physiology of bolting and flowering in *Raphanus Sativus* L. - VI. Bolting reaction in different seed production method on the radish and chinese cabbage. *Korean J Soc Hort Sci* 22: 73-79.
103. Baik SY, Jang KS, Choi YH, Kim JC, Choi GJ. 2011. Resistance degree of radish cultivars to *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* according to several conditions. *Korean J Hort Sci Technol* 29: 48-52.
104. Lee CH, Park SH. 1982. Studies on the texture describing terms of Korean. *Korean J Food Sci Technol* 14: 21-29.

<첨부> 특허, 논문, 시장분석보고서

1. 본 연구와 관련된 기술의 국내외 수준 비교

기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라 관련기술수준	연구사업단 보유기술수준		
황토가공을 통한 복합 실리콘 비료 생산	없음	없음	60%	90%	세계최초
황토가공소재를 이용한 장어양식기술 (수율증 대, 생존율 증대, 수처 리)	일본	30%	50%	80%	세계최초
황토가공재를 활용한 인 삼재배용 비료 및 농법 개발	대한민국	70%	65%	80%	세계최초
황토가공소재 활용 토 양농작물 병원균 방제 제제 개발	일본	30%	20%	80%	세계최초
- 기능성/품질 평가 표 준화 기술 - 농수산 제품 활용 가 공식품 공정/품질 최적 화기술	미국	30	50	80	

- 1) 기술명은 본 연구사업단과 관련(기보유기술 또는 향후 개발예정기술)된 기술을 기재
- 2) 현재 기술수준은 세계최고수준을 100%으로 할 때 우리나라 및 신청한 연구사업단의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 연구사업단 종료시의 기술수준을 세계최고수준(100%) 대비 목표로 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

2. 특허분석

대상국가	국내, 국외 (미국, 일본, 유럽, 중국)
특허 DB	특허정보원 DB (www.kipris.or.kr)
검색기간	전체
검색범위	제목 및 초록

○ 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	규산질비료 제조방법	황토지장수를 이용한 뱀장어 양식방법	수처리용 응집제 제조 방법	
Keyword	silicate fertilizer	장어 황토사료	water treatment coagulant	
검색건수	15,756	18	100,020	
유효특허건수	42	2	288	
핵심특허 및 관련성	특허명	Silicon fertilizer and its producing method	황토지장수와 지렁이 엑기스첨가제를 이용한 뱀장어 양식방법	Preparation method for water treatment coagulants
	보유국	일본	대한민국	중국
	등록년도	2005	2012	2011
	관련성(%)	70%	60%	50%
	유사성	고온에서 실리카 반응	황토지장수로부터 미네 랄성분 첨가	천연광물 이용
차이점	- 황토, 1200℃, NaOH 사용 - 수용성 규소 생산	- 황토를 가공하여 soluble 하게 제조 한 후 산처리 - 수용성 미네랄 및 규 산 풍부	- 황토를 가공한후 습 식분쇄 후 pH 4 로 산처리	

○ 결론

- 선행특허(Silicon fertilizer and its producing method)는 선철을 고온에서 가공하는 방법이고, 본 특허는 황토를 고온에서 용융; 선행특허 CaO 대신 본 특허 NaOH 사용; 선행특허는 1700-1800도의 온도 사용하나 본 특허는 1200도 정도 온도로 가능하므로 효율적임; 선행특허는 가용성 규산칼륨이 생성물이고 본 특허의 생성물은 수용성 규산나트륨, 미네랄 및 SiO₂ 가 제거된 황토 성분이 혼합되어 있음
- 선행특허(황토지장수와 지렁이 엑기스첨가제를 이용한 뱀장어 양식방법)은 황토지장수로부터 미네랄을 미량 공급하나(수용성 규산은 공급하지 못함) 본 특허는 황토를 가공하여 수용성으로 제조한 후 산처리하므로 미네랄성분 및 규산성분이 풍부함
- 선행특허(Preparation method for water treatment coagulants)는 Baotou의 회토류를 가성소다와 혼합후 100℃의 온도에서 3-4시간 처리 한 후 양생 시키는 방법 이지만 본 특허는 황토를 가성소다와 혼합한 후 1200℃의 온도에서 용융반응시킨 다음 습식분쇄 후 산처리 후 건조 사용. 경제성 및 효능에서 본 특허가 유리함.

대상국가	국내, 국외 (미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB (www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

○ 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	친환경 토양 개량제	친환경 농약	미생물 성장 제어기술
Keyword	황토, 비료	crop, pesticide, eco-friendly	식물 병해제어, 황토
검색건수	1469	163	39
유효특허건수	32	18	2
핵심특허 및 관련성	특허명	유황발효액비와 그 제조 방법, 이를 이용한 식물성 치료제 조성물 및 그 제조방법	BOTANICAL PESTICIDE FOR AGRICULTURE/HORTICULTURE CROPS
	보유국	대한민국	미국
	등록년도	2011	2012
	관련성	70%	60%
	유사점	친환경 식물병 치료방제	화학농약보다 친환경적으로 식물의 병해 억제
차이점	황토와 맥반석 분말을 이용하여 목초액, 유황 성분 등 단순혼합발효. 황토를 가공하지 않음	황토소재를 이용하지 않았으며 해충을 대상으로 하는 제제의 개발	황토를 이용하지 않음, 처리 가능한 소재가 아닌 상토

○ 결론

- 선행 특허(유황발효액비와 그 제조방법, 이를 이용한 식물성 치료제 조성물 및 그 제조방법)에서는 식물의 병충해를 친환경적으로 치료, 방제하는 점에서 본 연구와 유사성을 나타냈으나 황토와 여러 물질을 혼합하여 단순하게 발효한 물질로 본 연구에 사용한 황토가공소재와 제조 방법에 차이가 있음.
- 선행 특허(BOTANICAL PESTICIDE FOR AGRICULTURE/HORTICULTURE CROPS)에서 화학농약이 아닌 친환경적으로 식물 병해를 억제한다는 유사성을 확인하였음. 반면, 선행특허는 황토소재를 사용하지 않아 황토를 가공한 본 연구와 차이가 있으며 미생물을 대상으로 하는 황토소재와 달리 해충을 대상으로 재제를 개발하였음.
- 선행특허(미생물 성장 제어 및 근권 강화를 위한 수도용 상토 및 이의 제조방법)는 식물 생육 재료로 사용되는 자재가 미생물의 성장을 억제한다는 유사성을 가지나 본 연구와 달리 황토를 이용하지 않았으며 토양에 시비할 수 있는 소재가 아닌 상토라는 차이점이 있음.

3. 논문분석

대상국가	미국, 일본, 유럽
특허 DB	Pubmed DB (www.ncbi.nlm.nih.gov), ScienceDirect (www.sciencedirect.com)
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

○ 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	실리콘 비료가 오이류 염류저항 및 생육에 미치는 영향	
Keyword	silicon, plant	
검색건수	1380	
유효논문건수	519	
핵심특허 및 관련성	논문명	Silicon improves salt tolerance by increasing root water uptake in cucumis sativus L.
	학술지명	Plant Cell Rep.
	저자	Zhu YX et al. (중국)
	게재년도	2015
	관련성(%)	50%
	유사점	silicon이 salt tolerance 와 작물생육에 미치는 영향
	차이점	황토가공소재는 silicon, mineral 및 SiO ₂ 성분이 제거된 황토 가 혼합되어 있는 물질임

○ 결론

-선행논문에서는 silicon 만을 사용하였지만 본연구에서는 silicon, mineral 및 SiO₂ 성분이 제거된 황토 가 혼합되어 있는 물질인 황토가공소재를 사용하였음

-silicon만을 사용하는 경우보다 황토가공소재와 같이 silicon 함유 복합물질을 사용하는 것이 작물에 더 긍정적으로 작용하는 효과를 보임.

대상국가	미국, 일본, 유럽
특허 DB	Pubmed DB (www.ncbi.nlm.nih.gov), ScienceDirect (www.sciencedirect.com)
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

○ 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	황토소재를 이용한 디젤 오염 토양 정화 기법	황토소재를 이용한 디젤 오염 토양 정화 기법	황토소재를 이용한 디젤 오염 토양 정화 기법 및 식물 성장 촉진	
Keyword	soil diesel bioremediation	soil diesel bioremediation	soil diesel bioremediation	
검색건수	270	270	270	
유효논문건수	220	220	220	
핵심특허 및 관련성	논문명	Evaluation of soil bioremediation techniques in an aged diesel spill at the Antarctic Peninsula.	Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments.	Combined use of alkane-degrading and plant growth-promoting bacteria enhanced phytoremediation of diesel contaminated soil.
	학술지명	Applied Microbiology and Biotechnology	Environmental Research	International Journal of Phytoremediation
	저자	de Jesus HE, Peixoto RS, Cury JC, van Elsas JD, Rosado AS.	Silva-Castro GA, Uad I, Rodríguez-Calvo A, González-López J, Calvo C.	Tara N, Afzal M, Ansari TM, Tahseen R, Iqbal S, Khan QM.
	게재년도	2015	2015	2014
	관련성(%)	80	70	70
	유사점	유류 오염 토양 정화를 위해 미생물 또는 정화 촉진제를 사용함	오염 정화 방법에 대한 토착 미생물의 반응을 연구하였음.	유류 오염을 물질 분해하는 미생물과 식물 성장을 촉진하는 미생물을 복합 사용하였음
	차이점	추운 기후의 토양에서 미생물 활성화에 초점을 맞춘 방법임	미생물 성장이나 오염 물질 분해를 촉진할 수 있는 외부 물질을 사용하지 않았음	미생물 성장이나 오염 물질 분해를 촉진할 수 있는 외부 물질을 사용하지 않았음

○ 결론

- 유류 오염 토양을 정화하기 위해 미생물을 이용하는 것은 이미 잘 알려진 방법이다. 그러나 새로운 세균을 발굴해내거나 토착 미생물의 활성을 증가시키기 위해 비용을 사용하여 토양 중 탄소:질소:인 비율을 조절하는 등의 연구가 이루어지고 있을 뿐, 본 연구과제에서 이용한 황토가공소재의 사용은 연구된 바가 전혀 없다. 따라서 본 연구과제에서 개발한 기술은 기존 연구들과 비교해보아도 독창적인 것으로 판단할 수 있다.

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	Pubmed DB (www.ncbi.nlm.nih.gov), ScienceDirect (www.sciencedirect.com)
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

○ 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		항균성 황토가공소재	항진균성 황토가공소재	황토가공나노신소재 적용 토양 미생물 제어
Keyword		Natural mineral, silicate	silicate, antifungal, loess	silicate, bioremediation, soil microorganism,
검색건수		155	83	154
유효논문건수		3	7	12
핵심특허 및 관련성	논문명	What makes a natural clay antibacterial?	Effect of SiO ₂ -ionized Loess on the Treatment of Tinea Pedis	Functions of effective microorganisms in bioremediation of the contaminated harbor sediments.
	학술지명	Environ Sci Technol	Biotechnology and Bioprocess Engineering	J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.
	저자	Williams LB. et al	Yoon, M.Y., Park, J.K.	Ekpeghere KI
	게재년도	2011	2009	2012
	관련성 (%)	70%	50%	80%
	유사점	천연점토 나노물질의 항균성 평가	SiO ₂ 가 이온화된 황토성분의 항진균 활성 검증	황토를 사용한 생물학적 환경 정화.
	차이점	천연점토만을 사용. 특수한 가공을 거치지 않음	토양전염 식물병원균 특이적인 항진균 작용을 평가하지 않음	황토와 유용미생물을 섞어 황토볼(ball)을 만들고 이를 환경에 직접 적용함.

○ 결론

- 선행논문에서는 천연점토 또는 기존의 황토를 그대로 사용하였거나 황토와 유용미생물을 섞은 가공물질을 만들었으나 본 연구에서는 황토에 미네랄 성분을 첨가하여 개발한 황토가공소재를 이용하여 항균 평가를 함.
- 본 연구에서는 토양 전염 식물 병원성 미생물에 초점을 두어 연구를 진행하였으며 이에 따라 단순한 항미생물성 확인으로 그치는 것이 아닌 농작물 병해 제어 기법을 제시함.

대상국가	미국, 일본, 유럽
특허 DB	Pubmed DB (www.ncbi.nlm.nih.gov), ScienceDirect (www.sciencedirect.com)
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

○ 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	양식 뱀장어 품질	
Keyword	eel	
검색건수	7346	
유효논문건수	154	
핵심특허 및 관련성	논문명	Mineral contents and fatty acid composition in bone and flesh of cultured eel
	학술지명	J. Fd Hyg. Safety
	저자	S.P Hong et al. (한국)
	게재년도	2005
	관련성(%)	30%
	유사점	양식 뱀장어의 무기질 및 지방산 조성 분석
차이점	항토탄소재로 양식한 장어의 품질특성 분석(일반성분, 영양소, 항산화, 조직감, 관능검사 등)	

○ 결론

- 선행논문에서는 양식 뱀장어 및 그 부산물을 수산가공식품의 소재로 효율적으로 활용하기 위한 일련의 기초연구로 양식 뱀장어의 뼈와 육의 무기질 함량 및 지방산 조성을 분석함. 본 논문에서는 가공항토탄소재로 양식한 장어의 품질특성을 대조구와 비교, 분석(일반성분, 영양소, 항산화, 조직감, 관능검사 등)함으로써 처리구의 품질 우위를 과학적으로 증명함.

3. 제품 및 시장분석

가. 생산 및 시장현황

(1) 국내 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

○ 국내 친환경농업 확산 지원(정부 공급정책)

- 화학비료감축을 위한 유기질 비료 공급확대 : 2010년 사업계획량 2,500천톤 1,450억원
- 산성 및 유효규산 함량이 낮은 농경지에 토양개량제(석회, 규산질비료)공급으로 지력증진
도모: 2010년 사업계획량 797천톤 848억원
- 2005년부터 시설원예 재배농가에 대한 경영비 부담경감을 위해 원예작물 천적방제등지원

○ 해충방제 천적공급 : 2010년 2500ha 분(36.5억원) 지원

○ 미생물농약 신규공급 : 2010년 1000ha분(8.4억원) 지원

<출처> 친환경농업 정책방향, 농림수산식품부(2010. 1)

○ 국내 친환경농산물 시장규모 및 전망

단위: 억원

구분	2008	2009	2010	2011	2014	2015	2016	2020
곡류	7,751	10,682	10,861	11,906	14,834	16,295	14,942	21,310
쌀	7,218	10,125	10,279	11,236	13,873	15,214	13,802	19,685
채소류	8,386	9,848	10,005	10,951	13,443	14,773	13,803	19,685
과실류	4,195	8,408	8,304	8,614	9,035	9,488	5,515	7,866
서류	1,144	1,136	1,188	1,369	1,968	2,217	2,366	3,375
특작·기타	3,143	4,044	4,295	5,075	7,816	8,882	9,850	14,047
합계	31,927	34,117	36,506	39,678	48,622	53,111	46,475	66,283

<출처> 국내·외 친환경농산물의 생산실태 및 시장전망, 한국농촌경제연구원 정책연구보고서(2010. 12)

- 한편 국내 미생물 농약시장은 세계시장과 마찬가지로 BT제가 주이며 2000년에는 판매액이 33억원 정도였고 살충, 살균효과가 있다고 주장하는 토양미생물 제제의 판매액을 추정할 금액을 더하면 77억원 정도이며 그 중 BT제를 제외한 살충제가 13억원, 살균제는 31억원으로 추정되며 전체 농약시장의 0.31%에 해당되는 극히 미약한 시장을 형성하고 있다. 이 수치는 현재의 세계시장에서 생물농약이 차지하는 비율보다도 낮은 수준이지만 우리나라와 같이 국토가 좁고 다양한 작물이 재배되고 있어 다양한 병충해 및 잡초가 발생하는 우리나라에서의 시장 잠재력은 크다고 하겠다.

표 15. 국내 생물농약 시장현황

(단위 : 백만원)

연도	계	BT 제※	토양미생물제제(추정치)**			천적등
			살충제	살균제	제초제	
1995	4,359	4,359	-	-	-	-
1998	3,723	3,423	300	1,000	-	-
1999	6,933	3,133	800	3,000	-	-
2000	7,682	3,282	1,300	3,100	-	-

자료 : ※ BT제는 농약연보에서 발췌하였고

※※토양미생물제제는 등록된 제제중 살균, 살충효과가 있다고 주장하는 제품의 판매액의 추정량임.

- 2006년도 생물농약이 세계적으로 차지하는 매출액은 전체농약시장 300억불중 1%에 해당하는 3억불로 추정되며 국내시장은 8000억 정도로 추정된다(농약연보, 2006년).

○ 국내외 바이오산업 관련 시장

2009년 국내 생물산업 시장 규모는 국내판매액과 수출액을 합하여 총 5조 6천억원 이상의 금액 규모를 보이고 있음 (표 16). 본 연구과제의 기술은 친환경농수산물 생산, 농업환경개

량 및 병충해방제용 미생물제제 개발, 오염정화용 미생물제제 개발 등 이므로 바이오식품, 바이오환경, 바이오에너지 및 자원 분야에 큰 파급효과를 가져올 것으로 보임. 위의 세 개 분야의 내수시장은 총 8천억원 규모이며 수출은 1조 1천억원 가량이므로 수익성이 큰 시장으로 분석됨.

표 16. 바이오산업 분류체계 대분류별 국내 판매 및 수출 규모

(단위: 백만원)

분야	국내판매액	수출액	총합계
바이오의약	1,564,251	1,209,223	2,773,474
바이오화학	260,356	69,907	330,263
바이오식품	481,123	1,078,216	1,559,339
바이오환경	215,152	12,933	228,085
바이오전자	32,826	37,055	69,881
바이오공정 및 기기	102,853	109,876	212,729
바이오에너지 및 자원	110,653	10,059	120,712
바이오검정, 연구개발	140,234	201,480	341,714
총계	2,907,448	2,728,749	5,636,197

※출처: 한국바이오협회, 2009년

○ 국내 바이오산업 활동 분포

국내 바이오산업 기업의 활동 분야에 대한 결과를 분석하여 보면 활동기업 중의 대부분의 연구개발단계임을 알 수 있음 (표 17). 따라서 새로운 기술에 대한 수요가 높아 기술이전의 가능성이 높으며 본 연구에서 수행될 연구결과는 임상/필드테스트 단계에 필요한 많은 과학적 데이터를 제시하므로 기술이전후 실제 승인/제조판매 단계에 이르기까지의 단계를 대폭 축소할 수 있을 것으로 보임. 따라서 본 과제 수행을 통해 실제 사업 활동과 연계하여 효과적인 수익창출을 기대할 수 있을 것임.

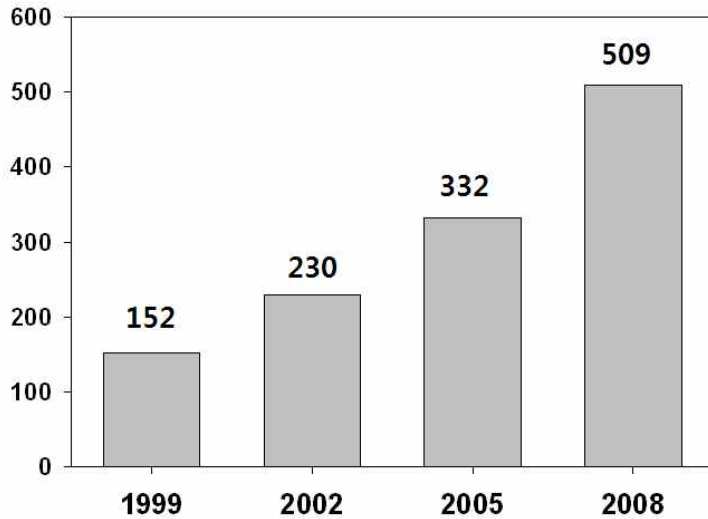
표 17. 바이오산업 활동 분포

산업분야	활동기업수	연구개발단계	임상/필드 테스트단계	조정/인허가 단계	승인/제조판매
바이오의약	315	290	79	57	169
바이오화학	187	166	45	33	125
바이오식품	241	224	35	30	146
바이오환경	129	126	11	8	85
바이오전자	40	37	7	6	22
바이오공정 및 기기	80	68	10	7	50
바이오에너지 및 자원	56	56	8	5	34
바이오검정, 연구개발	79	76	19	15	44
총계	827	771	159	125	552

※출처: 한국바이오협회, 2009년, 설문응답기업의 중복응답자료

(2) 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

○ 세계 유기식품 시장규모 (억불)



〈출처〉 IFOAM(2010)

- 영국의 CPL사의 조사연구에 의하면 세계 생물농약시장은 2000년도 현재 약 1억5천만불로 예상되며 그 중에 BT 제가 1억불로 대부분을 차지하고 있으며 미생물농약은 4천만불로 구성되어 있음을 보고 하였다. 이 시장은 전체 농약시장의 약 0.5%로 미비하지만 현재 개발 중인 미생물 농약, 생화학 농약 및 천적 등과 같은 환경친화적 농업으로 전환 추세에 있어서 앞으로 확대될 전망이다.

표 13. 세계 생물농약시장

(단위 : 백만달러)

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

자료 : Biopesticide Manual, 1998

- 한편 일본의 경우 농약 요람에서 발췌한 자료에서 생물농약 시장을 보면 2000년 현재 12억 엔으로 그 중 살충성 생물농약이 약 10.9억 엔으로 85%를 차지하며 BT제가 7.6억 엔이며 살균성 생물농약이 1.2억엔에 불과하다. 또한 전체농약에 생물농약이 차지하는 비율은 2000년 현재 0.34%로 역시 세계시장보다 미약한 실정이다. 현재 일본에서 판매중인 생물농약은 총 22개 품목으로 살충제가 17품목, 살균제가 4품목, 제초제가 1품목으로 아직은 취약한 실정에 있다.

표 14. 일본의 생물농약 시장 현황

(단위 : 백만달러)

연도	계(전체농약에 대한 비율)	살충제			살균제	제초제
		BT 제	기타제	소계		
1998	1,075(0.27)	799	221	1,020	5.2	49.8
1999	1,174(0.30)	844	252	1,096	5.4	72.6
2000	1,272(0.34)	756	332	1,088	118.0	65.7

자료 : 2000 농약요람, 일본식물 방역협회

나. 연구사업단 보유(활용)기술의 산업화 계획 및 기대효과

(1) 산업화-제품화 계획(제품의 특징, 대상 등)

- 비료기능의 황토가공나노신소재 : 다공성구조를 가지고 있는 나노입자와 규산 및 미네랄 성분이 혼합된 콜로이드 형태의 제품으로 다공성구조에 의한 오염물질 흡착기능과 규산 및 미네랄 용출기능이 있음
- 농약기능의 황토가공나노신소재 : 다공성구조를 가지고 있는 나노입자와 규산 및 항균기능의 미네랄 성분이 증가된 콜로이드 형태의 제품으로 다공성구조에 의한 오염물질 흡착기능과 규산 및 항균기능의 미네랄 용출기능이 있음
- 사료기능의 황토가공나노신소재 : 다공성구조를 가지고 있는 나노입자와 규산 및 미네랄 성분이 있는 콜로이드 형태의 제품으로 다공성구조에 의한 암모니아/아질산/질산등 오염물질과 냄새의 흡착기능과 규산 및 미네랄 용출에 의한 사료기능 및 pH 완충기능이 있음.
- 친환경 장어 : 황토가공나노신소재를 이용하여 양식한 장어
- 토착유용미생물 : 토양개량 및 길항작용 과 비료기능의 미생물 제제. 액상형태
- 친환경 농작물 : 황토가공나노신소재 와 토착미생물을 이용한 친환경 농작물(배추, 무, 쌈용야채, 인삼 등)
- 친환경 농작물 및 장어를 이용한 기능성식품 : 식품영양성분이 우수한 기능이 있음. 통조림, 액기스형태, 건조형태 등으로 제품화

(2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준					
	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	3000	3600	9000	40000	90000	145,600
경제적 파급효과	100,000	120,000	580,000	770,000	960,000	2,530,000
부가가치 창출액	30	36	1000	4500	10000	15,566
합계	103,030	123,636	590,000	814,500	1,060,000	2,691,166

※ 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

다. 3P(특허,논문,제품)분석결과 및 연구사업단 사업내에서의 활용

(1) 특허분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

- 기존 특허는 황토를 단순배합에 치중하고 있어 기능이 많이 감소하므로, 본 연구과제에서는 SiO₂ 성분을 이온화수율을 높이면서 다양한 기능을 나타내는 소재개발을 위하여 여러물질의 배합비를 최적화하는방향으로 연구를 추진하여 비료/사료/농약기능의 특허를 국내 및 국외에 출원할 계획임
- 특허 황토를 이용한 농법개발은 주로 황토의 배합을 주요 목적으로 진행하고 있으나 시비 기준과 시기 등에 따른 효능 규명을 통한 최적화 농법개발이 필요하다고 판단된 바 1,3 핵심세부와 긴밀히 연계하여 효능과 천연광물의 배합정도를 평가지표로 활용함으로써 재배농법에 관한 특허를 국내에 출원할 계획임
- 기존 특허는 항진균 및 항균효과를 갖는 황토소재 화합물과 식물 추출물 첨가 화합물을 이용하는 청결 보습제 및 화장품 제제 적용에 치중되어 있으나, 본 연구과제에서는 황토가공 나노신소재의 유형 별 제조공정에 따른 콜로이드 제제를 및 무/배추/인삼 경작 토양 처리를 통해 토양 내 주요 전염 병원균에 대한 항균성 효과를 평가하는 연구를 추진하여 황토가공 나노신소재의 토양전염 농작물 병원균의 항진균 및 항균효과 소재와 이에 대한 적용 농법에 관한 특허를 국내 및 국외에 출원할 계획임
- 현재 국내 시장에는 다양한 종류의 농업용 EM 제품과 오염 토양 정화를 위한 미생물 제제에 대한 특허와 이를 상품화한 제품들이 시판되고 있음. 대부분 제품은 배양액 안에 배양된 미생물이 들어있는 형태이며 일부는 고형화 시킨 형태로 시판되고 있음. 또한 경우에 따라 미생물의 성장을 촉진시키기 위한 영양염류와 함께 사용되기도 함. 본 연구를 통해 개발하고자 하는 제품 및 특허는 인공적으로 제조된 화학물질 기반의 영양염류를 사용하지 않고 자연추출물 형태의 황토가공나노신소재 물질의 미생물 성장 촉진 효과를 이용하고자 하는 것임. 이를 통해 기존의 방법보다 친환경적인 방법으로 황토가공나노신소재 기술 적용 환경정화 및 농업환경개선용 미생물 제제에 대한 특허를 출원할 것임

(2) 논문분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

- 기존 논문은 천연점토 자체를 나노화 시켜 항균 효능평가분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 천연점토중에 황토를 선정하여 가공한 후 나노콜로이드 형태로 제조하는방향으로 연구를 추진하여 용도별(비료, 사료, 농약)로 논문 1편씩을 국제저명학술지에 게재할 계획임
- 기존에 보고된 논문은 황토만을 사용한 것이 아닌 타 물질과 황토를 혼합 한 후, 미생물을

접종시켜 식물생장에 관한 연구를 진행하였다. 본 연구과제에서는 황토를 나노콜로이드 형태로 제조한 후, 황토와 미생물을 혼합처리 함으로써 화학비료 대체제로써의 잠재력을 평가하고 식물 생장에 미치는 영향을 평가, 분석하여 이에 따른 연구결과를 SCI급 논문으로 발표할 예정이다.

- 기존에 보고된 황토 관련 논문은 농작물 적용에 있어 처리 방법에 관한 언급은 거의 되지 않고 있다. 따라서 황토의 장점을 개발하고 단점을 보완한 황토가공소재를 적정농도를 규명하여 농법으로 개발하고 작물생장 및 토양개선이 미치는 영향을 평가, 분석하여 이에 따른 연구결과를 SCI급 논문으로 발표할 예정이다.
- 기존 연구의 천연점토 자체에 대한 나노화 소재와 달리, 본 연구에서 개발되는 황토가공나노신소재는 지금까지 개발된 적이 없는 새로운 천연 소재이므로 연구가치가 크며 농업환경 및 오염토양환경 등 기존의 연구분야와 결합되어 새로운 기술을 도출해낼 가능성이 큰 물질임. 따라서 황토가공나노신소재물질을 이용한 미생물과 식물에서의 생물 독성 저감 효과와 작물 생장 증대, 오염환경정화 기능 향상에 대한 impact 높은 SCI 연구 논문을 발표하는 것을 목표로 함.
- 기존 논문은 황토를 이용한 식물 재배 및 인체 친화적인 의약품, 제품 등의 평가에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 황토가공나노신소재 처리를 통한 토양전염 식물병원균의 항균 및 항진균 작용과 증식 억제 효능을 분석하는 방향으로 연구를 추진하여 황토가공나노신소재의 항진균 및 항균 활성 효능에 관한 논문을 국내 및 국외 SCI 학술지 등에 게재할 계획임
- 황토가공나노소재를 이용한 농수산물 및 농수산물 이용 가공제품에 대한 기능성/품질 평가에 대한 연구는 거의 없으므로 기능성/평가 기술 표준화에 대한 논문과 가공제품 품질 최적화에 대한 논문을 게재할 계획임.

(3) 제품·시장분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

- 국내 및 국외시장 분석결과 천연항균/항생제, 생물농약, 천연비료/사료 등의 친환경제품이 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 자연적으로 드물게 존재하여 찾기 힘들고, 대부분 유기성분이어서 온도, 화학물질, UV(자외선), 생물학적 저항성 등의 주위 환경변화에 따라 변질되기 쉬운 단점이 있다. 본 연구과제에서는 무기성천연물 유래인 황토를 가공하는 방향으로 연구를 추진하여 친환경 비료/농약/사료 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임
- 기존에는 인공적으로 제조된 맹독성 화학물질이나 특정 EM의 특이적 길항작용으로 병원균을 제어하는 기존 농법에 필요한 화학제제 및 미생물제제에 대한 생산과 판매가 주를 이루고 있었으나, 현재 유기농법의 증가 및 토양 개선 및 보존에 대한 수요 증가로 이러한 단기적인 대처법에 대해 한계를 맞이하고 있음. 본 연구과제에서는 기존 화학제제 및 EM 제제와는 차별화된 자연추출물 형태의 황토가공나노신소재 물질로, 연작으로 이용되는 토양에서

의 농작물 생산성과 품질을 향상시키고, 유용미생물의 증식과 토양 개질을 통해 주요 토양 전염성 농작물 병원균은 억제하는 자연친화적 비료이자 병해방제 소재를 개발하고 이를 적용하는 기법을 제시하고자 함. 이를 통해 기존의 방법보다 효과적인 방법으로 연작토양에도 효과적이며 주요 농작물병해를 예방하여 작물 생산의 증대를 꾀할 수 있는 친환경 토양전염 병해방제 제제와 이에 대한 적용 농법을 국내 및 국외에 판매 보급할 계획임.

○ 국내 및 국외시장 분석결과 황토가공나노소재를 활용한 가공제품은 거의 찾아볼수 없으므로 본 연구에서는 황토가공나노소재의 가공적성을 최적화하여 기능성, 영양성, 소비자의 기호도를 최적화한 가공제품을 개발할 계획임.

○ 마케팅 전략 :

- 황토가공나노신소재의 경우 교원창업회사를 설립하여 2016년 1월부터 이미 확보된 양만장 및 사료회사, 농약/비료회사에 공급
- 전국 양만장(약 500개 예상) 및 내수면 양식 전부야로 적용
- 친환경 농수산물 및 기능성 식품의 경우 신규 참여업체 모집 후 기존 유통망 활용
- 전국 대리점 모집 및 해외 농수산물관련제품 agent를 통한 국내/해외 판로 확보

○ 연구개발 시제품 매출 계획:

- 양만장에 사용되는 pH 조절제인 탄산칼슘 사용량은 신계양만의 경우 1년기준으로 약 20000천원 정도 소요되므로 국내 양만장 수가 500개 정도로 추정할 때 시장은 약 100억 정도로 추정됨. 황토가공소재의 경우 탄산칼슘보다 pH 조절능력이 우수할 뿐 아니라 pH 완충기능도 있으므로 양만장 사용 탄산칼슘 사용분 전량 대체 가능할 것으로 사료됨. 과제종료후 1차년도 목표지는 시장점유율 10%로 추정하면 10억정도 목표가 예상함.
- 토양개량제로 정부에서 무상으로 공급한 금액이 2010년도 기준 약 838억원 수준이었음. 정부 공급 토양개량제의 경우 석회, 규산질비료로 석회의 칼슘성분이나 규산질 비료의 규산성분이 용출되지 않고 단지 pH 조절능 정도 이므로 황토가공소재로 대체 가능함. 목표 시장점유율 10% (80억) 정도 예상함.
- 국내 친환경 농법에 적용되는 미생물 농약시장은 2000년 기준 판매액이 33억원 정도였고 살충, 살균효과가 있다고 주장하는 토양미생물 제제의 판매액을 추정한 금액을 더하면 년 77억원 정도임. 본 연구사업에서 개발되는 황토가공나노신소재의 병해 방제 농자재로 적용에 대한 시장 점유율 15%를 예상하여 목표치 약 년 10억 예상됨. (p130. 표 15. 국내 생물농약 시장현황 참조)
- 국내 친환경 농산물 중 채소류 와 과실류 시장규모는 2010년 기준 27,551억원 정도(p130. 국내·외 친환경농산물의 생산실태 및 시장전망, 한국농촌경제연구원 정책연구보고서(2010. 12) 이므로 본 사업단에서 개발된 친환경 농산물의 시장 점유율을 약 1% 정도 예상하면 목표치 약 276억원 정도 예상됨.
- 친환경 농식품의 경우 현재 김치시장이 약 2조4000억원 정도(한국 농어민 신문, 2011.12.12) 이므로 시장 점유율을 약 1% 정도로 예상하면 목표치는 240억원 정도로 예상됨.
- 기타 축산악취제거, 유류오염토양복원, 수처리, 축산사료첨가 등으로 사업 다각화 모색 예정

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 황토가공나노신소재 이용 친환경농식품 개발 사업단의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 황토가공나노신소재이용 친환경농식품 개발 사업단의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.