

RS-2021-
IP321101

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
작물바이러스 및 병해충대응산업화기술개발사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004595-01

벼 키다리병 방제를 위한 발병인자 억제 생물소재 개발

2024. 06. 12

주관연구기관 / 한국화학연구원
공동연구기관 / 서울대학교 산학협력단
공동연구기관 / (주)제일그린산업

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

벼 키다리병 방제를 위한 발병인자 억제

생물소재 개발 최종보고서

2024

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “벼 키다리병 방제를 위한 발병인자 억제 생물소재 개발”(개발기간 : 2021. 04. ~ 2023. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 06. 12.

주관연구기관명 : 한국화학연구원 (이영국)
공동연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (김재영)
공동연구기관명 : ㈜제일그린산업 (정영륜)



주관연구책임자 : 김 현
공동연구책임자 : 손 호 경
참여기관책임자 : 이 정 은

국가연구개발혁신법 제17조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

〈 요약 문 〉

사업명		작물바이러스 및 병해충대응사업		총괄연구개발 식별번호			
내역사업명		방제기술개발		연구개발과제번호		321101-3	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0304	60%	LB0303	20%	LB0302	20%
	농림식품 과학기술분류	RA0303	60%	RA0302	20%	RA0304	20%
총괄연구개발명							
연구개발과제명							
전체 연구개발기간							
총 연구개발비							
연구개발단계							
연구개발과제 유형							
연구개발과제 특성							
연구 개발 목표 및 내용	최종 목표	<p style="text-align: center;">키다리병균의 주요 발병인자로 알려진 지베렐린과 푸모니신 등의 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 천연소재를 발굴하고 이를 활용한 유기농업자재를 개발하고자 함</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 1 단계: 2개 이상의 후보생물소재 발굴 ○ 2 단계: 1개 이상의 벼 키다리병 방제용 유기농업자재 개발 ○ 고효율의 발병인자 억제 천연소재 스크리닝 시스템 확립 ○ 선발소재로부터 유효생리활성물질 분리 및 화학구조 동정 3건 이상 ○ 선발소재의 발병인자 억제 및 살균활성 작용기작 구명 					
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고효율의 발병인자 억제 천연소재 발굴 시스템 구축 및 탐색 ○ 발병인자 억제 선발소재의 <i>in vivo</i> 방제활성 평가 ○ 발병인자 억제 선발소재의 생리활성물질 분리 및 구조 분석 ○ 선발소재 및 활성물질의 발병인자 억제 및 살균활성 작용기작 구명 ○ 국내 분리균의 병원형 분석 ○ 국내 벼 보급품종의 키다리병 저항성 분석 ○ 후보미생물의 배양학적 특성연구 ○ 후보미생물의 병원형에 따른 <i>in vivo</i> 방제효과 검증 ○ 후보미생물의 온실내 약효평가 ○ 후보미생물의 유효성분 분석법 개발 ○ 안전성 평가 및 약효·약해 자료 생산 					

		○ 완제품 제작 및 포장 약효시험 ○ 유기농업자재 등록
1 단계	목표	키다리병균 발병원자 억제 천연소재 확보 및 특성 구명
	내용	○ 고효율의 발병원자 억제 천연소재 발굴 시스템 구축 및 탐색 ○ 발병원자 억제 천연소재의 <i>in vivo</i> 방제활성 평가 ○ 발병원자 억제 천연소재의 생리활성물질 분리 및 구조 분석 ○ 후보미생물의 병원형에 따른 <i>in vivo</i> 방제효과 검증 ○ 후보미생물의 배양학적 특성연구 ○ 후보미생물의 온실내 약효평가 ○ 후보미생물의 유효성분 분석법 개발 ○ 국내 분리균의 병원형 분석 ○ 후보미생물의 제제화 연구 ○ 미생물제제의 풋트 효과 시험 ○ 미생물제제의 포장 방제 시험 ○ 미생물제제의 인축 및 환경 독성 평가
2 단계	목표	벼 키다리병 방제용 유기농업자재 개발
	내용	○ 벼 포장으로부터 신규 내생균 자원 확보 ○ 선발소재의 유효생리활성물질 분리 및 구조 분석 ○ 선발소재의 유효성분 분석법 개발 ○ 선발소재의 발병원자 억제 및 살균활성 메커니즘 구명 ○ 국내 벼 보급품종의 키다리병 저항성 분석 ○ 미생물제제의 이화학 성분 및 잔류 농약 분석 ○ 완제품 제작 및 포장 약효시험 ○ 유기농업자재 공시 등록

연구개발성과	○ 정량적 연구개발성과 목표 달성도				
			단계		
	성과지표명		계획	실적	달성도(%)
	전담기관 등록·기탁지표	특허출원	3	5	167
		특허등록	1	2	200
		SCI 논문	4	8	200
		비SCI 논문	1	2	200
		학술발표	8	11	138
		인력양성	2	3	150
	연구개발과제 특성 반영 지표	제품화	1	1	100
고용창출		4	6	150	
홍보전시		1	1	100	
계		25	38	100	

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 정성적 연구개발성과 <ul style="list-style-type: none"> - 벼 키다리병 방제용 유기농업자재 개발 - 고효율의 발병인자 억제 천연소재 스크리닝 시스템 확립 - 길항미생물 4건 확보 및 이의 유효생리활성물질 구명 8건
--	--

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>[활용계획]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 유기농업자재로 공시된 미생물제(키리에)는 (주)제일그린산업에서 사업화(자체 생산 및 판매)할 예정 ○ 해외사업: 국내에서 안정적인 매출 발생 및 사용방법 정립시 해외사업 추진 ○ 추가 확보된 천연소재: 기업에 제공되어 사업화 가능성을 평가받은 후, 가능성이 인정된 경우 기업에 기술 이전하여 바이오 살균제 개발에 활용 <p>[기대효과]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 바이오 살균제 개발을 통한 합성농약 원제 수입대체 효과 ○ 수확 전 처리가 제한적인 합성 살균제를 대체하거나 보완할 수 있는 친환경 방제제 개발을 통해 안전한 농작물 생산에 기여 ○ 합성농약 사용 절감을 통한 저항성 병원균 발생억제 및 농업 생태계 보전 ○ 확립한 기술들의 보급을 통하여 국내 천연 식물보호제 개발 활성화
------------------------------	--

연구개발성과 비공개 여부 및 사용	비공개 대상 아님
--------------------------	-----------

연구개발성과 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구시설 · 장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정 보	실 물
10		5							1			

연구시설· 장비 종합정보 시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 · 장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치 장소)	ZEUS 등록번호

국문핵심어 (5개 이내)	벼	키다리병	발병인자	생물소재	병원형
------------------	---	------	------	------	-----

영문핵심어 (5개 이내)	Rice	Bakanae disease	Virulence factor	Biomaterial	Pathotype
------------------	------	--------------------	---------------------	-------------	-----------

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요-----	5
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용-----	14
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도-----	69
4. 목표 미달 시 원인분석(해당없음)-----	76
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도-----	77
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획-----	78

1. 연구개발과제의 개요

1) 국내외 현황 및 문제점

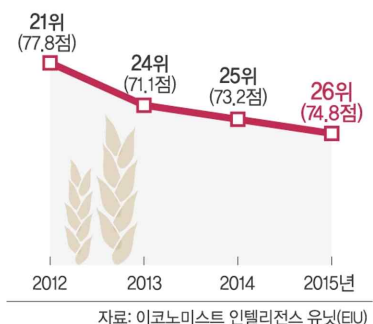
(1) 국제정세 및 기후변화에 따른 식물 병해관리의 중요성

가. 농산업의 변화와 국제정세의 불안정으로 인한 식량안보 위협 증가

- 국민 식습관 및 농업 환경의 변화로 국내 농업은 원예작물 및 특용작물 중심으로 재편되고 있으며 우리나라 곡물자급률은 23%로 OECD국가 중 최하위이며 국제 평균인 101%에 비해 매우 낮음(FAO, 2019).
- 국내 부족한 주곡작물의 공급은 자유무역을 기반으로 한 수입에 의존하고 있으나 최근 전 세계적으로 발발하고 있는 무역전쟁으로 인하여 식량안보의 위협이 급증하고 있음.



세계식량안보지수 한국 순위 추이



<식량안보와 벼 재배 생산성 증대의 필요성>

나. 기후변화 및 외래 식물병해충의 유입으로 인한 농업 환경의 황폐화 위협

- 아프리카돼지열병의 사례에서 보듯이 농·축산업에서 외래병해충의 갑작스러운 국내 유입은 해당 산업의 존폐를 위협할 정도로 큰 피해를 입힘.
- 자유무역과 해외여행의 증가로 인하여 외래 병원균의 유입 가능성이 높아지고 있음. 최근 과수 농업에서는 과수의 구제역이라고 불리는 과수화상병이 전국 90% 이상의 과수 농가에 큰 피해를 입히고 있으며, 외래병해충(매미충, 꽃매미, 미국선녀벌레 등)의 유입으로 국내 농업환경이 황폐화되고 있음.
- 기후의 급격한 변화로 인하여 새로운 식물병이 출현하고 있으나 효과적이고 체계적인 방제가 이루어지지 못하고 있음(국내 단위면적당 농약사용량은 OECD국가 중 가장 높음). 이는 국내 농업이 지향해야 할 선진국형 지속가능한 농업과 대치되고 있으며 국내 농산품의 국제경쟁력을 저하시킴(FAO, 2019).

다. 주곡작물 생산에서의 식물곰팡이병 위협의 증가

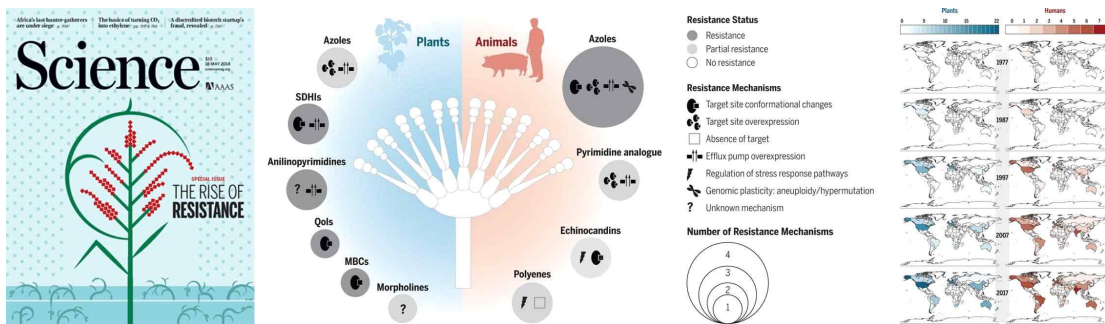
- 벼, 밀, 보리, 옥수수 등 대부분의 주곡작물 생산에 막대한 피해를 입히는 붉은곰팡이병, 밀 생산에 큰 피해를 주는 녹병과 잎마름병, 벼와 최근에는 밀에도 피해가 보고되고 있는

도열병 등 주곡작물을 가해하는 식물병원성 곰팡이에 의한 피해가 지속적으로 증가하고 있음(Fisher et al, 2012, Nature).

- 곰팡이에 의한 식물병 발생은 세균이나 바이러스와는 달리 막대한 생산량 감소와 함께 인축에 심각한 중독증을 일으키는 곰팡이독소를 감염된 작물에 잔류시키는 경우가 많아 더 위협적임.
- 가격 경쟁력 확보를 위해 대량 농업이 주곡작물 생산에 도입되면서 단일 작물의 획일화된 재배 방식은 식물병원성 곰팡이가 빠르게 주요 품종의 병 저항성을 무력화시키고, 농약에 저항성을 획득하게 하고 있음(Fisher et al, 2018, Science).

라. 화학농약 오남용으로 인한 문제점 증가

- 식물병 방제를 위해 주로 화학농약을 사용하여 왔지만, 화학농약의 오남용으로 인하여 환경오염, 생태계 파괴, 잔류 독성, 저항성 병해충 및 잡초의 발생 등의 문제점이 발생하였음.
- 지속적인 동일계통의 화학농약 사용은 저항성 균주의 출현을 야기하고 있으며, 저항성 균주의 출현은 농업현장에서 더 많은 양의 화학농약 사용을 유도하고 있어 많은 문제점이 발생하고 있음.



<식물 및 동물 곰팡이병원균의 합성 살균제에 대한 저항성 출현 문제>

- 화학농약의 오남용으로 인한 문제를 해결하기 위하여 우리나라를 포함한 OECD 국가들은 화학농약의 사용량을 줄이고자 하는 친환경 농업정책을 펼치고 있음
- 화학농약 사용량을 감축하는 정책추진과 더불어 이를 대체할 수 있는 생물농약(유기농업 자재 포함)이 중요한 이슈로 떠오르고 있으며, 특히 생물농약의 자원인 미생물 및 천연식물 유래 활성소재를 탐색하는 연구가 활발하게 수행되고 있음(최근 5년간 NCBI PubMed 기준 17,000여편 관련 연구논문 검색).

☞ 화학농약의 사용을 감축하기 위한 국내외 범국가적 정책 추진 사례

<국외> Integrated Pest Management(IPM): Pesticide Problems, 2014년, Springer 출판

- 미국: 90년대 IPM 농업 추진 「Huffaker project」 시행, 2000년까지 미국 농산물 70% IPM 농업 추진 및 고독성 농약사용 70~80% 감축, 2003년 연방정부 IPM 추진위원회 설립하여 살충제 및 살균제 사용량 감축을 위한 펀드 조성

- 프랑스: 「Ecophyto」프로그램을 추진하여 2018년까지 2008년 대비 농약 사용량 50% 감축 추진
- 독일: 2021년까지 잔류농약 규제 불합격 농산물 1% 미만 달성을 위한 농약 사용량 감축 추진
- 스웨덴: 농약 모니터링 강화 ⇒ 농경지 90%를 80% IPM 농업과 10% 유기농업으로 전환 추진

<국내>

- 자료: 2016년 농림축산식품부 「친환경농업육성 5개년 계획 추진 현황 및 성과 요약」
- 2001년 1차 친환경농업육성 5개년 계획을 통한 농약 사용량 30% 감축
- 2006년 2차 계획을 통해 2013년까지 농약 사용량 40% 감축
- 2011년 3차 계획을 통해 매년 농약 사용량 3% 이상 감축
- 2016년부터 2020년까지 4차 계획을 통해 매년 농약 사용량 1.5% 이상 감축하는 정책 추진

(2) 기존 방제 전략의 한계에 따른 신규 방제 전략 수립의 필요성

가. 주곡작물의 주요 식물곰팡이병에 대한 저항성 작물 육종의 한계

- 가장 효과적인 식물병 제어 방법은 해당 병원균에 저항성을 갖는 작물을 육종하여 산업화 하는 것이지만 현재 농촌진흥청을 중심으로 한 대부분의 식물병 연구들은 병원균-식물 상호작용 연구를 기반으로 저항성 작물 육종에 초점을 맞추고 있음. 특히, CRISPR/Cas9 등 진보된 분자육종 기술의 발달로 기주를 중심으로 한 식물병 연구의 흐름이 가속화되고 있음.
- 저항성 작물 육종을 목적으로 하는 식물병 연구는 식물의 수직저항성(질적저항성)을 활용하는 세균병에 주로 초점을 맞추고 있으며, 육종을 통한 식물병 제어가 어려운 난방제성 곰팡이병에 대한 저항성 작물 육종 연구는 거의 이루어지고 있지 않음.
- 주곡작물에서 심각하게 문제가 되고 있는 주요 곰팡이병(붉은곰팡이병, 벼 키다리병, 밀 녹병, 잎 마름병 등)에 대한 저항성 유전자는 거의 알려져 있지 않으며, 알려진 저항성 조차 실제 농업환경에서는 쉽게 무력화되고 있음.

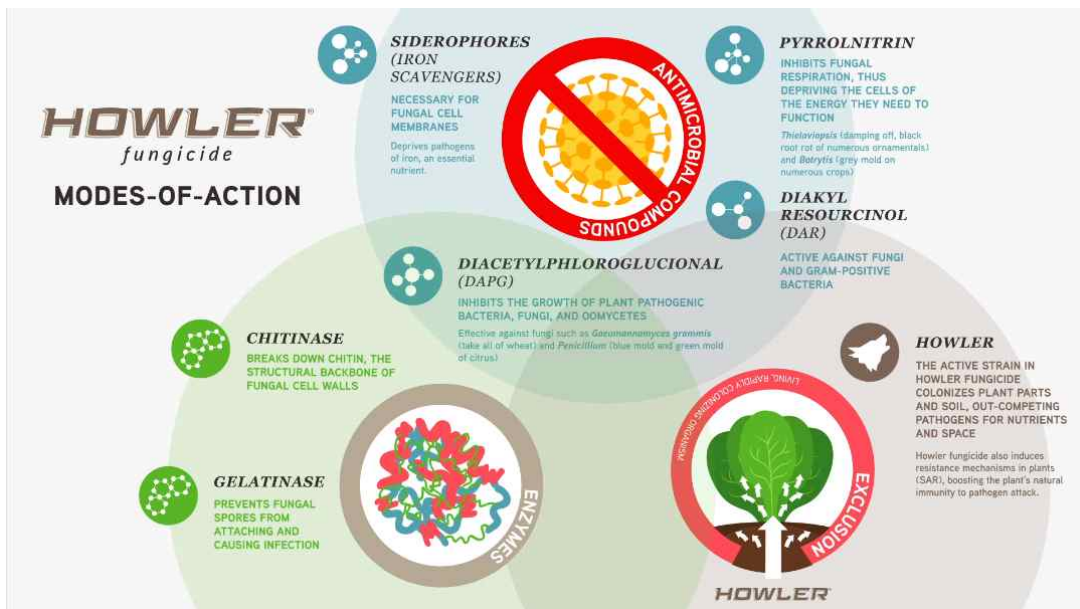
나. 난방제성 식물곰팡이병에 대한 화학적 방제의 한계

- 지금까지 *Fusarium*, *Colletotrichum* 속의 곰팡이에 의한 식물병 방제는 대부분 농약 살포 등 화학적 방제 방법에 의존하였지만 동일계통 살균제의 광범위한 사용으로 저항성 균주의 출현이 전 세계적으로 보고되고 있음. 이로 인해 농약 살포를 통한 식물병 방제 효율이 급격히 떨어지고 있음.
- 벼 키다리병의 경우, 주로 prochloraz, tebuconazole, benomyl 등의 살균제가 종자소독용으로 사용되고 있음. 대표적인 키다리병 방제제인 prochloraz는 α -demethylase inhibitor 살균제로서 ergosterol 생합성을 저해하는 대표적인 살균제로 침투이행성이 뛰어난 약제로 알려져 있음. 하지만, 이 약제에 대하여 저항성을 가지는 균주들이 최근 포장에서 나타나고 있으며 이로 인해 벼 키다리병의 발생이 증가하고 있는 것으로 보고되어 있음.

- 화학적 방제 전략은 주로 기주 식물에 감염된 병원균의 생육 억제를 목표로하였기 때문에 병원균 측면에서 이러한 선택압(selection pressure)를 극복하기 위한 돌연변이체의 출현이 빈번히 발생하였으므로 이러한 문제점을 극복하고 새로운 방제 전략 수립의 기반 구축을 위해 다양한 유전체학과 오믹스 분석 방법을 통한 식물 병 발생의 원리와 식물 병원균 집단의 진화, 유전적 다양성 등의 규명이 시도되고 있음.
- 농산물 안전성 및 친환경이라는 시대적 요구에 부응할 수 있으며, 주요작물에 적용가능한 새로운 난방제성 식물곰팡이병 방제전략 개발이 요구됨.

다. 천연소재를 이용한 바이오 작물보호제의 개발 현황

- 바이오 작물보호제 관련 연구는 1980년대에 태동하여 1987년에는 인삼 뿌리썩음병 방제용 바이코나의 개발로 시작되었음. 본격적인 바이오 작물보호제 연구개발은 1990년대 후반부터 이루어졌으며, 한국화학연구원과 한국생명공학연구원, 농업과학기술원 등의 연구소, 경상대학교, 순천대학교, 서울대학교 등의 대학교, 그리고 팜한농, 경농, 제일그린산업, 고려바이오 등의 기업체에서 개별적으로 연구를 진행해 왔음.
- 대부분의 미생물 살균제는 *Bacillus* 속 균주를 이용하였는데, 이는 *Bacillus* 균이 배양과 수확 및 제제가 용이하기 때문임. *Bacillus* 속 이외에 *Streptomyces* 속 방선균과 *Simplicillium* 및 *Trichoderma* 등의 진균이 활용된 바 있음.
- 한국화학연구원에서 발굴된 *Simplicillium lamellicola* BCP 균주는 미생물 살균제로 개발되었으며, 잣빛곰팡이병, 녹병, 시들음병 등의 진균에 의한 식물병 뿐만 아니라 풋마름병 등 세균병 방제에도 우수한 효과가 입증됨.



<Agbiome에서 개발한 미생물 농약의 작용기전>

- 국내 바이오 작물보호제 개발에 대한 요구에도 불구하고, 아직까지 산업적으로 큰 성공을

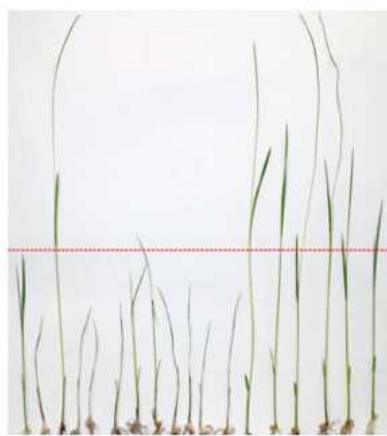
거둔 제품이 출시되지 못하고 있는 실정임. 이는 발효와 수확을 위한 설비 및 장치 부족, 발효기술 부족, 제형기술 부족 등이 주요 원인으로 지목되고 있음.

- 최근 해외에서 개발되는 바이오 작물보호제들의 경우, 제품 등록 또는 개발 단계에서 원천 소재에 대한 작용기전 구명이 함께 연구되고 있음. 하지만, 국내에서는 바이오 작물보호제의 작용기전과 관련된 연구 분야가 미흡한 실정임.

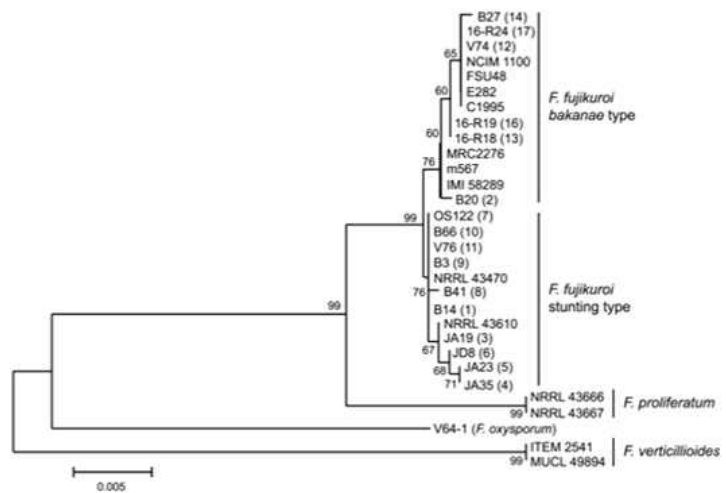
(3) 벼 키다리병 관련 국내의 연구현황

가. 벼 키다리병의 연구현황 및 문제점

- 벼 키다리병은 *Fusarium fujikuroi*에 의해 발생하는 대표적인 종자전염성 병해로 육묘시 부터 본답시기까지 발생하는 병해이며, 벼를 재배하는 지역의 대다수에서 키다리병이 보고되고 있음. 1828년 일본에서 처음 발견되었으며, 묘가 비정상적으로 신장하는 병징 때문에 bakanae disease라 불림.
- 1960년대 국내 벼 키다리병은 유기수은제의 사용으로 문제시 되지 않는 병이었으며, 유기수은제가 사용 금지된 이후에도 철저한 종자소독에 의한 방제되는 병으로 알려져 왔음. 하지만, 최근 기온 상승 및 친환경 재배 등 여러 가지 원인에 의해 키다리병의 발생이 증가하고 있으며, 2013년에는 31%의 발병율을 보여 문제시된 바 있음. 또한, 지역이나 품종에 따라 차이가 있지만, 종자소독을 실시한 종자에서도 키다리병이 발생하는 경우가 있음.
- 벼 키다리병의 대표적인 증상으로 식물체 내 감염 *F. fujikuroi* 곰팡이에 의해 지베렐린(gibberellin)이 과다 생성되어 벼의 키가 정상보다 약 2배가량 커지고, 이후 벼의 줄기가 얇아지며 이삭이 패지 않는 ‘키다리 증상’이 주요 병징으로 인식되어 왔음.



대조군 줄기마름형 (stunting type) 키다리형 (bakanae type)



<국내 벼키다리병균 집단에 우점하는 줄기마름형과 키다리형 병원형(pathotypes)>

- 최근, 순천향대학교 윤성환 교수 연구팀(본 과제 공동연구기관1 참여)에 의해 키다리병균은 푸모니신(fumonisin)과 푸사린산(fusaric acid)이라는 독성 이차대사산물을 특이적으로

생성함으로써, 이미 알려진 ‘키다리 증상’이외에도 벼의 줄기 생장을 위축시킨 후 말라 죽게 하는 ‘줄기마름 증상’을 야기하고 있음을 구명함. 즉, ‘줄기마름 증상’ 병원형 균주 (stunt pathotype)는 푸모니신 생합성 유전자만, ‘키다리 증상’ 병원형 균주(bakanae pathotype)는 지베렐린 생합성 유전자만 특이적으로 발현하며, 이들 이차대사산물의 생합성 유무가 두 가지 병원형 발생의 직접적 원인임을 규명하였음(Niehaus et al. 2017. PLoS Pathog).

- 집단유전학 연구를 통하여 우리나라 벼 재배 지역 내 존재하는 벼 키다리병균 집단은 크게 ‘키다리 증상’과 ‘줄기마름 증상’ 병원형으로 나뉘지만, ‘줄기마름 증상’ 병원형의 분포 비율이 ‘키다리 증상’ 병원형 보다 월등히 높은 것으로 본 과제의 공동연구기관1 연구팀에 의해 밝혀짐(벼씨 감염 키다리병균 집단 중 약 65%, 벼 재배지역 대기 중 존재 집단 중 65% 차지). 또한, ‘줄기마름 증상’ 병원형 균주는 벼 식물체 내 증식 속도나 살균제 저항성이 ‘키다리 증상’ 병원형 균주에 비해 최소 20% 이상 높은 양상을 나타내고 있음.
- 따라서, 국내 분포하고 있는 벼 키다리병균 집단 내 우점으로 존재하는 두 병원형(키다리형, 줄기마름형)의 발병인자(지베렐린, 푸모니신)를 고려한 방제 시스템 구축이 필요함.

나. 기 수행된 키다리병 관련 국내 연구과제 현황 및 분석

- 국내에서 2000년 이후 수행된 벼 키다리병 관련 국가 연구과제는 NTIS 기준 총 48건으로 44건은 농촌진흥청, 4건은 농림축산식품부의 지원으로 수행됨. 이 중 24건은 저항성 QTL 및 유전자 선발, 분자마커 개발을 위한 중간 모본 개발, 표현체학(phenomics)등 병 저항성 품종 육종과 관련된 과제이며, 나머지 24건은 벼 키다리병 병리생태 연구 및 종자 처리/병 방제 기술개발과 관련된 연구과제임.

☞ 벼 키다리병 관련 기 수행 국가연구과제

<종자처리 기술연구>

- 벼 병해 발생 경감을 위한 종자처리기술개발(전북대학교, 2012)
- 벼 종자건전도에 따른 종자소독제의 반응 및 주요 품종별 키다리병 발생특성 구명(농촌진흥청, 2012)
- 벼 키다리병 종자 소독방법 개선기술 개발(농촌진흥청, 2013)
- 플라즈마를 이용한 벼 종자소독 기술개발(광운대학교, 2013)

<병방제 기술연구>

- 벼 키다리병 발생생태 및 방제체계 확립(농촌진흥청, 2006)
- 유용균 및 나노캡슐 이용 식물병, 선충 방제 연구(농촌진흥청, 2011)
- 벼 키다리병의 친환경 방제 기술개발(농촌진흥청, 2012)
- 농업미생물의 전남지역 현장 활용 기술 개발(전라남도농업기술원, 2012)
- 화학농약 절감형 벼 병해충 관리기술 개발(농촌진흥청, 2012)
- 유기농 천연농자재 현장적용 효과 분석(경남고성군농업기술센터, 2012)
- 유기농 기준에 적합한 작과촉진 생리활성 물질 개발(안동대학교, 2013)

<병리생태연구>

- 벼와 고추 침해 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 발병유전체 분석 및 기능연구(순천향대학교, 2015)

- 벼 병원성 *Fusarium* 곰팡이의 병 발생 기작 규명 및 제어 기술 개발(순천향대학교, 2018)
- 지베렐린 불활성화 유전자가 병 방어에 미치는 영향 연구(농촌진흥청, 2014)
- 채종지의 종자감염 모니터링 체계구축(농촌진흥청, 2014)
- 충남 지역 돌발병해의 발생실태 조사 및 영향요인 분석 연구(충청남도농업기술원, 2020)

- [종자처리 기술연구] 관련 과제의 경우 종자 소독방법에 따른 벼 키다리병 병 발생 특성을 분석하거나 기존 종자 소독방법을 개선하기 위한 기술연구가 주로 수행되었으며 “플라즈마를 이용한 벼 종자소독 기술 개발(광운대학교, 2013)”와 같은 도전적인 연구가 수행된 적은 있으나 연구결과가 실제 산업화되지는 않았음.
- [병 방제 기술연구] 관련 과제의 경우 대부분 발병 조사를 기반으로 병 관리기술 확립에 초점을 맞추어 수행되었으며, 2년간 연속성 있게 수행된 “유용균 및 나노캡슐 이용 식물병, 선충 방제 연구 (농촌진흥청, 2011)”와 “벼 키다리병의 친환경 방제 기술개발 (농촌진흥청, 2012)” 과제에서는 벼 키다리병 방제를 위한 종자소독제 및 방제기술 개발을 목표로 과제를 수행하였음. *Bacillus subtilis*에 의한 종자소독 효과와 최적 종자소독 조건을 검증하였으며, 목초액, 식물정유, 나노물질 등을 활용한 종자소독용 대체 소재 선별 연구를 수행하였음. 하지만, 관련된 논문, 특허, 사업화 실적이 미흡하였음.
- [병리생태연구] 관련 과제의 경우 본 과제의 공동연구기관1에 의해 주도적으로 관련 과제가 수행되어 왔으며, 본 과제의 과학적 근거가 된 벼키다리병균의 유전체 분석, 병원형 분석 및 발병 기작 구명연구를 포함하고 있음. 또한, 2015년까지 전국적으로 벼키다리병균 조사가 이루어진 적이 있으며, 충청남도농업기술원에 의해 최근 충남지역에 한정되어 병원균 조사연구가 수행되었음.

다. 기술·시장 현황을 바탕으로 한 신규과제 연구방향 설정

- 기 수행된 국가 연구과제와 전략분석을 통해, 향후 수행될 키다리병 관련 과제의 연구 방향을 설정함.

<신규과제 연구방향 설정을 위한 국가 연구과제 AS-IS, TO-BE 분석>

AS-IS	TO-BE
<ul style="list-style-type: none"> - 기존 종자처리 기술연구 <ul style="list-style-type: none"> · 화학제제를 활용한 종자처리를 기반으로 소독 방법 개선 연구가 주를 이루었으며 친환경농자재를 활용한 종자처리 연구는 미흡함. · 최신의 기술을 활용한 종자 소독 기술이 시도되었으나 현장에서의 활용도가 낮음. 	<ul style="list-style-type: none"> - 친환경 종자처리 기술연구 <ul style="list-style-type: none"> · 천연소재 또는 화학제제와의 합제에 의한 벼 키다리병 방제 기술 개발이 요구됨. · 제품개발과 이에 맞는 종자처리 기술개발이 요구되며, 적극적인 농업현장 적용이 요구됨.
<ul style="list-style-type: none"> - 병 방제 기술연구 <ul style="list-style-type: none"> · 발병 조사를 기반으로 한 병 관리기술 확립에 초점을 맞추어 수행됨. 	<ul style="list-style-type: none"> - 목적 지향적 병 방제 기술 제품화 연구 <ul style="list-style-type: none"> · 친환경농자재 개발을 위한 최적의 목표 지향적 산-학-연 과제 구성이 요구됨.

<ul style="list-style-type: none"> · 친환경 종자소독제 및 방제기술 개발 연구가 수행된 적이 있으나 관련 학술적·산업적 실적이 미흡함. 	<ul style="list-style-type: none"> · 일회성 연구과제가 아닌 산업화 전문성과 가치 제고화를 위한 학술적 전문성을 기반으로 한 연구과제 수행이 요구됨.
<p>- 병리생태연구</p> <ul style="list-style-type: none"> · 본 연구팀 주도의 벼 키다리병균의 유전체 분석, 병원형 분석 및 발병 기작 구명연구가 이루어졌으나 활용되지 않고 있음. · 최근 국내 벼 키다리병균 병원형 및 집단 특성에 대한 자료가 부족함. 	<p>- 병 방제 전략 맞춤형 병리생태연구</p> <ul style="list-style-type: none"> · 벼 키다리병균 병원형 별 발병 기작을 활용한 병 제어 전략이 요구됨. · 효과적인 병 방제 전략 수립을 위한 최신의 벼 키다리병균 병원형 및 집단 특성 분석이 요구됨.

2) 국내 연구개발의 필요성

(1) 벼 키다리병 신규 방제 전략 개발의 필요성

가. 병원형을 고려한 방제 전략

- 친환경재배, 상자육묘 등 벼 재배환경 변화에 따라 벼 키다리병 발생이 만연되고 있고 병 발생에 의한 수량감소 및 방제노력 가중으로 경제적 손실이 초래되고 있음.
- 약제소독, 온탕소독 등 종자소독 방법과 약제혼합처리, 체계처리 등 종자소독 기술은 실용화되어 이용되고 있지만, 최근 벼 키다리병 종자소독 효과 저하로 병 발생이 증가하고 있음.
- 벼 키다리병 종자소독 방법과 기술이 개발되어 농업현장에 활용되고 있으나, 방제효과가 불안정하고 저하되는 문제가 발생되고 있음. 이를 위해, 1) 사용되고 있는 종자소독기술의 개선보완 연구, 2) 약제 저항성 균주 출현에 대한 대응기술 개발, 3) 종자감염 신속진단 및 약제저항성 균주에 대한 진단기술개발, 4) 건전종자 생산을 위한 벼 채종지의 관리기술개발 등에 관한 연구가 필요함.
- 우리나라 벼 재배 지역 내 존재하는 벼키다리병균 집단은 ‘줄기마름 증상’ 병원형의 분포 비율이 ‘키다리 증상’ 병원형보다 월등히 높은 것으로 보고되어 있음. 또한, ‘줄기마름 증상’ 병원형 균주는 벼 식물체 내 증식 속도나 살균제 저항성이 ‘키다리 증상’ 병원형 균주에 비해 높은 양상을 나타내고 있음.
- 따라서, 국내 분포하고 있는 벼 키다리병균 집단 내 우점으로 존재하는 두 병원형(키다리형, 줄기마름형)의 발병인자(지베렐린, 푸모니신)를 고려한 방제 시스템 구축이 필요함.

나. 약제저항성 및 환경을 고려한 방제 전략

- 화학농약 및 비료 사용으로 인한 토양노후화, 환경생태오염, 정부의 “친환경농업육성” 계획 추진과 함께 저독성/대체 작물보호제에 대한 수요가 급증하고 있음.
- 지금까지 벼키다리병균이 속한 *Fusarium* 속 곰팡이에 의해 발생하는 식물병 방제는 대부분 병원균 생육억제를 통한 화학적 방제 방법에 의존하였으며 이로 인하여 약제 내성 균주의 전 세계적으로 출현하여 식물병 방제 효율이 급격히 떨어지고 있음.

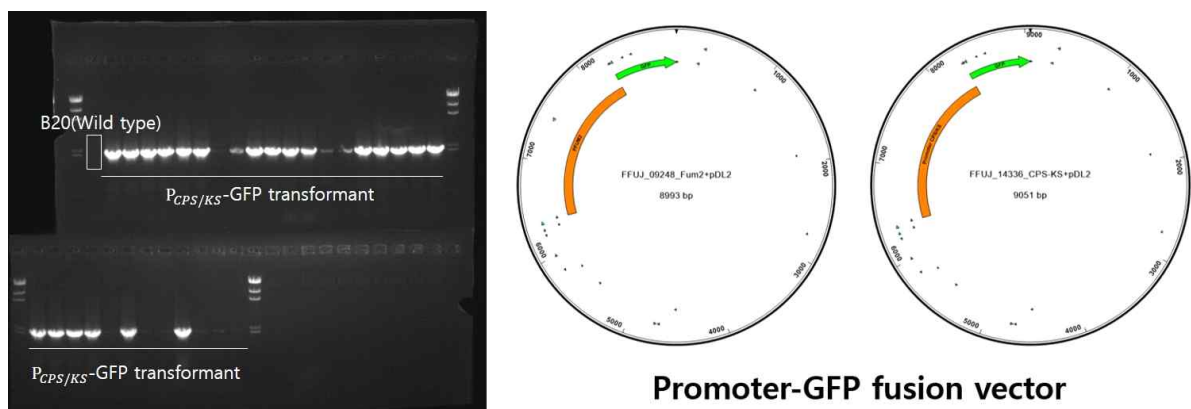
- 환경생태오염과 약제저항성 출현에 따른 방제효율 감소의 부작용을 줄일 수 있도록 선행 축적된 기반 연구내용을 바탕으로 특이적인 병 제어 타깃을 기반으로 한 새로운 페러다임의 병 제어 전략 개발이 요구됨.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 녹색형광단백질(GFP) 기반의 발병인자 억제 천연소재 탐색 시스템 구축 및 이를 활용한 유용미생물 소재 선발

(1) 녹색형광단백질(GFP) 기반의 발병인자 억제 천연소재 탐색 시스템 구축

- 벼 키다리병을 일으키는 *Fusarium fujikuroi*는 지베렐린과 푸모니신 등 독성 이차대사산물을 생성하는 식물병원성곰팡이로 알려져 있음. ‘줄기마름 증상’병원형 균주(stunt pathotype)는 푸모니신 생합성 유전자만, ‘키다리 증상’병원형 균주(bakanae pathotype)는 지베렐린 생합성 유전자만 특이적으로 발현하며, 이들 이차대사산물의 생합성 유무가 두 가지 병원형 발생의 직접적 원인임이 연구된 바 있음.
- 녹색형광단백질 기반 스크리닝 시스템은 별도의 화학 물질 처리 없이 형광 현미경으로 단백질 발현 양상을 손쉽게 확인할 수 있음. 따라서 luciferase 기반 스크리닝의 단점을 보완하기 위해 본 연구에서는 녹색형광단백질 기반 스크리닝 시스템을 개발하였음. 유전자의 프로모터에 형광단백질을 융합시켜 프로모터의 발현 정도에 따라 녹색형광단백질의 형광발현이 달라지는 현상을 이용함. 해당 스크리닝 시스템은 이차대사산물 생합성 유전자의 발현량을 시각적으로 확인 가능하며 특정 생물 소재를 병원균에 처리하였을 때 이차대사산물의 저장 효과를 간편하게 관별할 수 있음.
- 본 연구에서는 지베렐린 생합성에 관여하는 유전자인 *CPS/KS*와 푸모니신 생합성에 관여하는 유전자인 *FUM2*의 프로모터 서열을 GFP서열과 융합시킨 벡터를 각각 키다리형 병원형 균주(B20)와 줄기마름형 병원형 균주(B14)에 삽입하여 $P_{CPS/KS}$ -GFP, P_{FUM2} -GFP 균주를 제작함(그림1). 해당 유전자의 프로모터로 추정되는 유전자 ORF의 앞부분 2 kb의 서열을 얻음. 해당 서열을 pDL2 벡터에 클로닝하여 프로모터 서열과 GFP 서열을 융합시킴. 클로닝은 Yeast shuttle vector 시스템을 통해 이루어짐. 제작된 벡터는 ‘줄기마름 증상’ 병원형 균주인 B14, ‘키다리 증상’ 병원형 균주인 B20에 각각 형질 전환을 수행함. 균주 확인은 GFP 서열을 확인하는 PCR을 통해 수행함(그림 1).

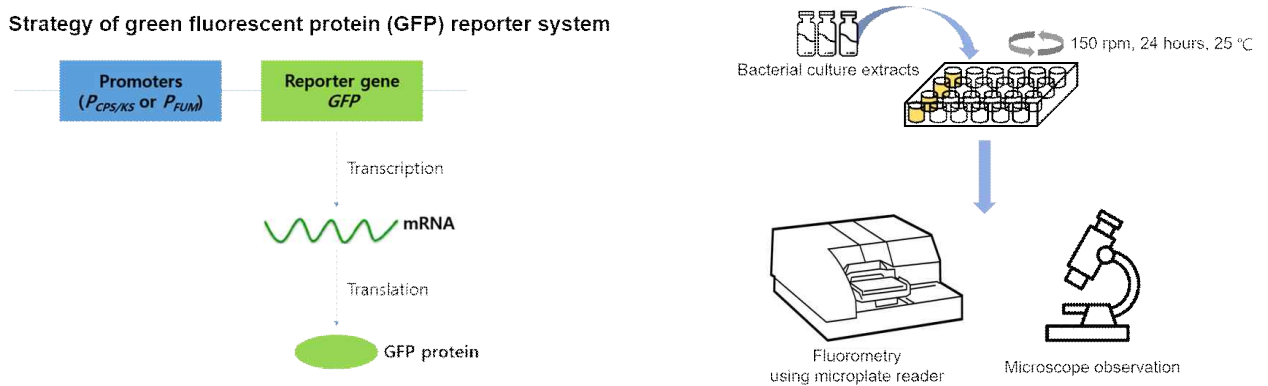


<그림 1. 제작된 벡터의 유전자 지도 및 PCR을 통한 형질전환체 확인>

- 확정된 균주 및 성장 조건 아래에서 녹색형광단백질의 발현을 형광 현미경을 통해 확인함(그

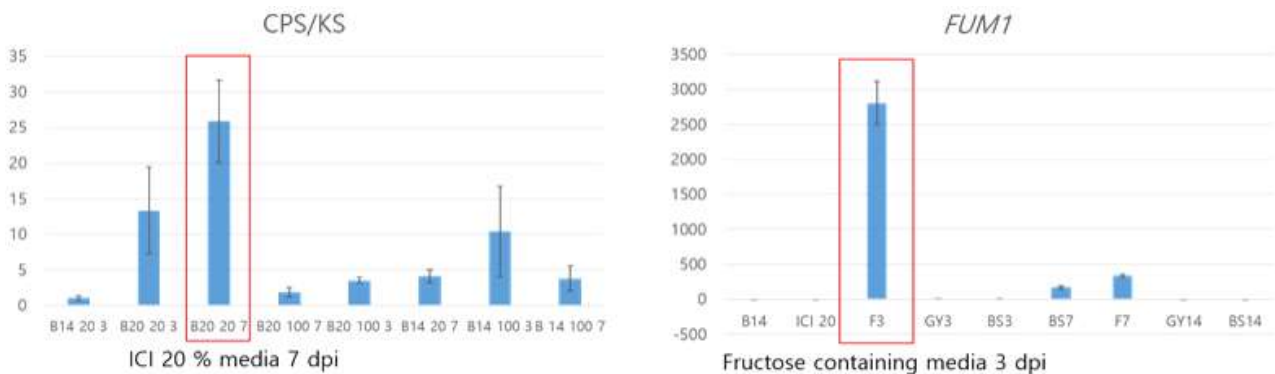
림 2). 녹색형광단백질을 융합시킨 두 균주($P_{CPS/KS}$ -GFP, P_{FUM2} -GFP) 모두 야생형 균주보다 녹색형광단백질의 발현이 유의미하게 높은 것을 시각적으로 확인할 수 있음.

Strategy of green fluorescent protein (GFP) reporter system



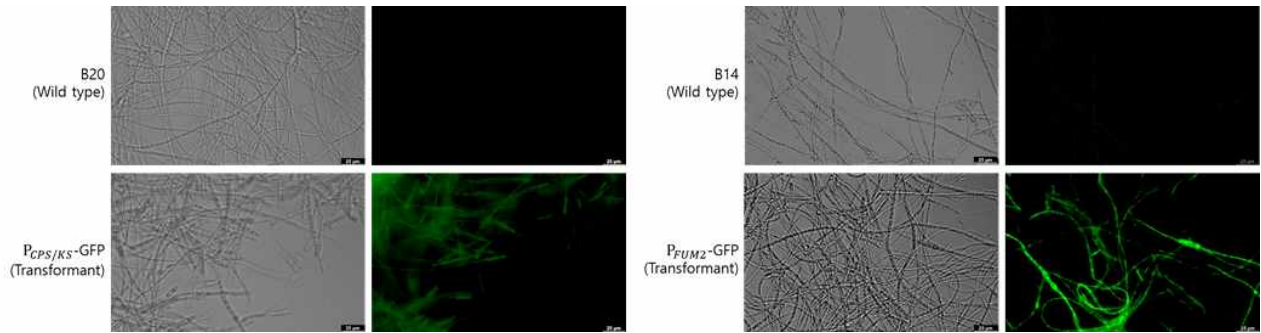
<그림 2. 녹색형광단백질(GFP) 발현 원리 및 녹색형광단백질 스크리닝 시스템 모식도>

○ 지베렐린과 푸모니신 생성 최적 조건을 확인하고자 함. 다양한 배지 및 성장 조건에서 얻은 곰팡이의 유전자 발현량을 파악하기 위해 RT-qPCR을 진행함. 그 결과 지베렐린 생합성의 경우 ICI 20% 배지에 glutamine 6 mM을 첨가하여 7 일간 배양하였을 때 CPS/KS 유전자의 발현량이 가장 높음을 확인함. 푸모니신 생합성의 경우 fructose를 포함한 배지조건에서 3일간 배양하였을 때 $FUM2$ 와 같이 푸모니신 생합성에 관여하는 $FUM1$ 유전자의 발현량이 가장 높음을 확인함. 따라서 해당 조건으로 배지 및 성장 조건을 확정함(그림 3).



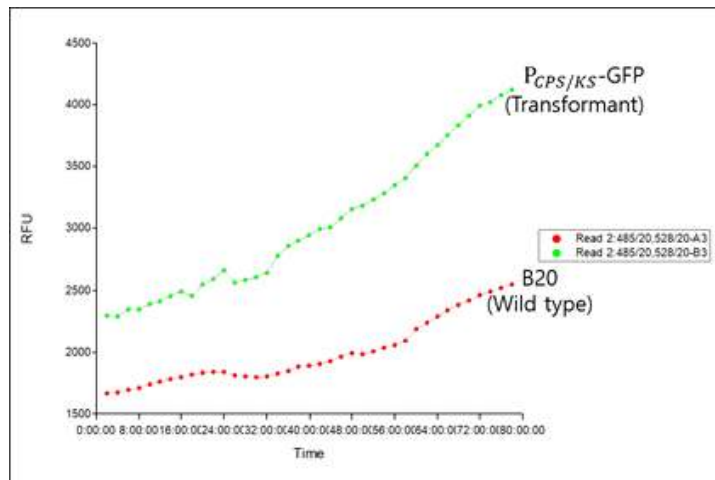
<그림 3. 다양한 배지 및 성장 조건에서의 CPS/KS , $FUM1$ 유전자 발현 양상>

○ 확정된 균주 및 성장 조건 아래에서 녹색형광단백질의 발현을 형광 현미경을 통해 확인함(그림 4). 녹색형광단백질을 융합시킨 두 균주($P_{CPS/KS}$ -GFP, P_{FUM2} -GFP) 모두 야생형 균주보다 녹색형광단백질의 발현이 유의미하게 높은 것을 시각적으로 확인할 수 있음.



<그림 4. 지베렐린 및 푸모니신 유도조건에서 녹색형광단백질을 융합시킨 두 균주($P_{CPS/KS}$ -GFP, P_{FUM2} -GFP)의 녹색형광단백질 발현량 관찰>

- 마이크로플레이트 리더기를 통해 야생형 균주와 $P_{CPS/KS}$ -GFP 균주 간 형광 발현 양상을 확인한 결과, 야생형 균주에 비해 $P_{CPS/KS}$ -GFP 균주의 형광 발현이 증가하는 것을 알 수 있음 (그림 5).

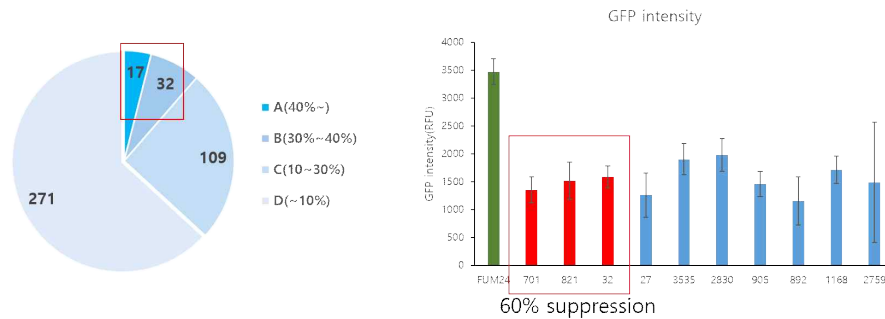


<그림 5. 배양 시간에 따른 형광 발현의 변화>

(2) 미생물 배양여액 라이브러리를 이용한 푸모니신 억제 소재 스크리닝

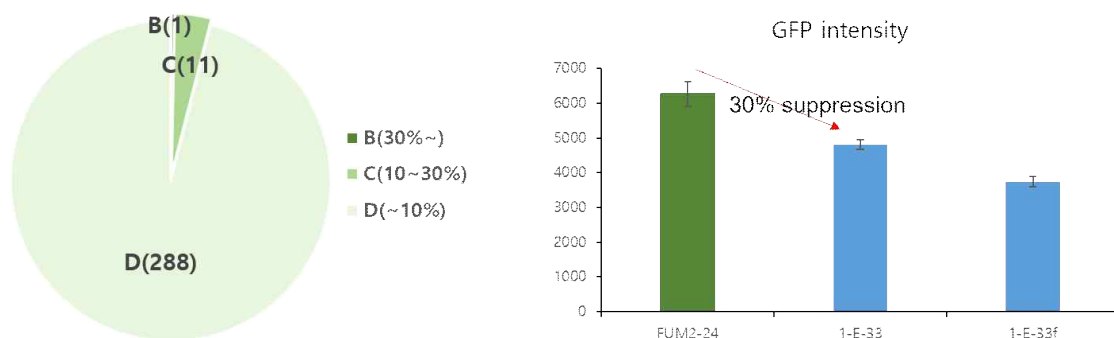
- 생물소재를 버키다리병균에 처리하였을 때 미처리구에 비해 형광 발현량이 감소하는 후보 생물소재를 선별하고자, 푸모니신 유도배지에서 3일간 배양한 녹색형광단백질 발현 균주 (P_{FUM2} -GFP) 배양여액을 24구 플레이트로 옮긴 후, 세균 배양액을 20% 처리하고 하루 뒤에 녹색형광단백질의 발현을 마이크로플레이트리더기로 확인함.
- 해양바이오뱅크(MBRIS)에서 분양받은 해양 세균 429 균주를 대상으로 녹색형광단백질 스크리닝 시스템을 이용하여 푸모니신 저감효과가 있는 후보 생물 소재를 찾고자 함. 푸모니신 저감효과는 P_{FUM2} -GFP 균주의 녹색형광단백질 발현을 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 측정된 형광 세기를 미처리구와 비교하여 정량화함. 저감효과 정도에 따라 A 등급(40% 이상 저해), B 등급(30%~40% 저해), C 등급(10~30% 저해), D 등급(10% 미만 저해)로 등급화함. 스크리닝 결과 271 균주는 유의미한 푸모니신 저감효과가 없는 것으로 여겨지는 D

등급으로 판별되었으며, 158 균주는 저감효과가 있다고 여겨지는 C 등급 이상으로 분류됨. 나머지 49 균주들은 반복실험을 통해 30% 이상의 푸모니신 저감효과를 보이는 B 등급 이상으로 분류되었음(그림 6).



<그림 6. 해양 세균의 푸모니신 저감 효과 등급 및 상위 10 개 균주의 형광 발현량 그래프>

○ 또한, 벼, 보리, 밀 재배지의 토양 및 식물에서 분리한 내생세균 419 균주를 대상으로 녹색형광단백질 스크리닝 시스템을 이용하여 푸모니신 저감효과가 있는 후보 생물소재를 찾고자 함. 해양 세균과 마찬가지로 스크리닝 결과는 녹색형광단백질 발현 저해 정도에 따라 등급화로 표현함. 내생균 400 주는 푸모니신 저해 효과가 없었으며 (D 등급), 푸모니신 저해 효과를 보이는 C 등급 이상 균주는 19 주임(그림 7). 그 중, 40% 이상의 효과를 보이는 A 등급으로 분류된 균주는 한 균주도 없었음. 유일하게 30% 이상 형광 발현량 감소(B 등급)를 보여 내생균 중 가장 높은 푸모니신 저해효과를 갖을 것으로 보이는 1-E-33 균주는, 16s rDNA 서열 분석 결과 *Plantibacter flavus*로 동정됨(표 1). 해당 균주는 배양 후 균을 제거한 배양 여과액에서도 동일한 형광 발현량 감소를 보여 내생세균 중 푸모니신 저감효과가 가장 우수하였음.



<그림 7. 국내 포장에서 분리한 내생 세균의 푸모니신 저감 효과 스크리닝 결과 및 B 등급 균주(1-E-33)의 형광 발현량 그래프>

○ 내생균 중 푸모니신 저감효과 C 등급 이상 균주들을 대상으로 16s rDNA 서열 분석을 진행하였으며, 푸모니신 저감 효과를 보인 대부분의 세균이 *Rhodococcus* 및 *Micrococcus* 속에 해당됨(표 1). *Rhodococcus* 속은 벼키다리병균(*F. fujikuroi*)의 근연종인 *Fusarium graminearum*의 곰팡이독소인 DON 생성을 억제한다는 선행연구 결과가 존재하며,

Micrococcus 속은 *F. fujikuroi*의 푸모니신 생성을 억제한다는 연구 결과가 존재함. 따라서 본 연구 스크리닝 결과와 선행 연구 결과가 일치하는 양상을 보임을 알 수 있었음.

<표 1. 푸모니신 저해 효과 B, C 등급 내생 세균의 종 정보>

Strain No.	Isolation region	Grade	16s rDNA blast	Identity
1-E-33	Bacteria from Wheat Stem	B	<i>Plantibacter flavus</i>	98.80%
1-b-19	Bacteria from Barley Stem	C	<i>Rhodococcus fascians</i>	99.17%
1-E-19	Bacteria from Wheat Root	C	<i>Rhodococcus fascians</i>	99.92%
2-C-39	Bacteria from Wheat Stem	C		
4-C-11	Bacteria from Wheat Stem	C	<i>Pseudomonas koreensis</i>	99.93%
1-J-24	Bacteria from Soil	C	<i>Rhodococcus fascians</i>	99.77%
1-J-26	Bacteria from Soil	C	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	99.57%
2-B-10	Bacteria from Soil	C	<i>Pseudomonas corrugata</i>	99.50%
3-D-35	Bacteria from Wheat Head	C		
3-A-3	Bacteria from Barley Head	C		
3-I-19	Bacteria from Soil	C	<i>Microbacterium oxydans</i>	99.64%
4-B-11	Bacteria from Soil	C	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	100%
4-F-12	Bacteria from Soil	C	<i>Mycolicibacterium mucogenicum</i>	99.31%
4-G-26	Bacteria from Soil	C		
4-G-40	Bacteria from Wheat Head	C	<i>Pantoea eucalypti</i>	99.49%
1-C-18	Bacteria from Barley Stem	C	<i>Micrococcus antarcticus</i>	99.63%
1-E-29	Bacteria from Wheat Stem	C	<i>Micrococcus antarcticus</i>	99.47%
1-F-20	Bacteria from Wheat Root	C	<i>Rhodococcus cercidiphylli</i>	99.39%

(3) 푸모니신 생성 억제 미생물 *Pseudalkalibacillus hwajinpoensis* 선발

가. *P. hwajinpoensis*의 형태학적 관찰 및 푸모니신 저감 활성 확인

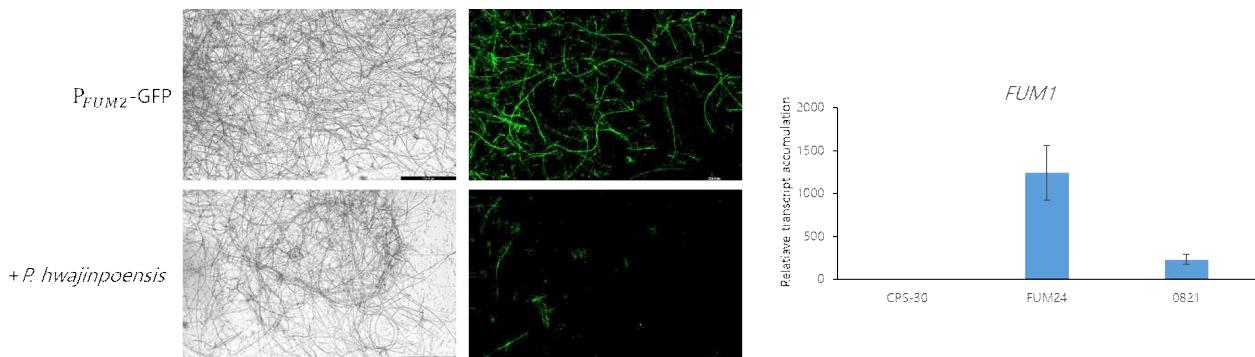
- 스크리닝 결과에서 가장 높은 푸모니신 저감효과를 보인 상위 10 균주들 중 701, 821, 32 균주가 동일한 *P. hwajinpoensis* 종이며 모두 60% 이상의 저해 효과를 보였음(그림 6). 해당 균주의 배양액에서 균을 제거한 후 여과액을 이용했을 때에도 비슷한 수준의 저해 효과를 확인하여 *P. hwajinpoensis*를 푸모니신 저해효과가 뛰어난 해양생물소재로 선정함.
- *P. hwajinpoensis* 배양여액 및 이의 유기용매 분획물의 푸모니신 생합성 저감 활성을 조사하였음. 베키다리병균 형광변이균주 P_{FUM2}-GFP의 균사디스크(직경 6 mm) 6개를 250 mL-baffled Erlenmeyer flask에 50 mL의 CM 배지에 접종하고, 25℃에서 2일 동안 150 r/min로 진탕하여 전배양하였음. 250 mL-baffled Erlenmeyer flask에 담긴 50 mL의 푸모니신 유도 배지(2% fructose, 0.1% peptone, 0.1% yeast extract, 0.05% malt extract, 0.1% KH₂PO₄, 0.03% MgSO₄, 0.03% KCl, 0.005% ZnSO₄, 0.002% CuSO₄)에 전배양액을 0.5% 접종하고, 면전으로 플라스크 입구를 막은 다음, 25℃에서 3일 동안 150 r/min로 진탕배양하여 베키다리병균 형광변이균주 배양액(50 mL)을 얻었음. 형광변

이균주 배양액에 *P. hwajinpoensis* 배양여액(20%)을 첨가한 다음에 25°C에서 3일 동안 150 r/min로 진탕배양한 다음 수확한 균사를 형광현미경으로 관찰하고 GFP를 측정하였음.

- *P. hwajinpoensis*는 국내에서 분리된 세균종으로 marine agar 상에서 황색의 콜로니 표현형을 보였음(그림 8). 세균배양액을 녹색형광단백질 발현 균주에 처리한 결과 녹색형광단백질 형광이 감소하는 것을 현미경으로 관찰했고, 푸모니신 생합성 유전자인 *FUM1*의 발현량이 75% 감소하였음을 qRT-PCR을 통해 확인할 수 있었음(그림 9). 이를 통해 해당 세균은 베키다리병균의 푸모니신의 생합성을 유의미하게 억제하며, 이는 곧 푸모니신 생성량 감소로 이어질 것이라 여겨짐.



<그림 8. 푸모니신 저감 효과를 나타내는 미생물 *P. hwajinpoensis*>



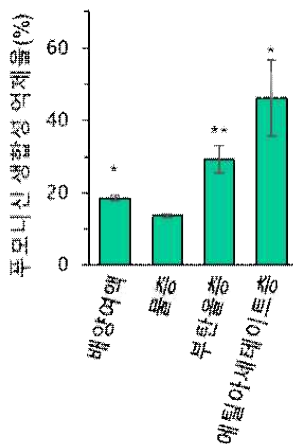
<그림 9. *P. hwajinpoensis* 배양여액을 베키다리병균 형광변이균주 P_{FUM2} -GFP에 처리하였을 때, 형광 발현 및 유전자 발현량 감소 양상>

나. *P. hwajinpoensis* 배양여액으로부터 유효활성물질 분리 및 구조 동정

- *P. hwajinpoensis* 배양여액으로부터 베키다리병균의 푸모니신 생합성을 억제하는 활성물질을 규명하기 위한 실험을 수행하였음. Marine agar 배지에 형성된 *P. hwajinpoensis* 단일 균총 1개를 500 mL-baffled Erlenmeyer flask에 100 mL의 NB 배지(0.3% beef extract, 0.5% NaCl)에 접종하고, 27°C에서 1일 동안 160 r/min로 진탕하여 전배양하였음. 1 L-baffled Erlenmeyer flask에 담긴 200 mL의 NB 배지에 전배양액을 1% 접종하고, 27°C에서 1주일 동안 160 r/min로 진탕배양하여 균주 배양액(1 L)을 얻었음. 균주 배양액을 10,000 × g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분리하고, 여과지로 걸러서 배양여액을 제조하였음. 분액여두(separatory funnel)에 *P. hwajinpoensis* 배양여액(1 L)을 넣고 동량의 에틸아세테이트와 진탕혼합한 다음 정치시켜 에틸아세테이트층을 분리하고,

남은 물층을 다시 동량의 부탄올과 진탕혼합한 다음 정치시켜 부탄올층을 분리하였고, 감압농축하여 에틸아세테이트 분획물(63.8 mg), 부탄올 분획물(946.7 mg), 물 분획물(47.3 g)을 획득하였음.

- *P. hwajinpoensis* 배양여액 및 이의 유기용매 분획물의 푸모니신 생합성 저감 활성을 조사하였음. 베키다리병균 B14 균주의 균사디스크(직경 6 mm) 6개를 PDB 배지에 접종하고 25°C에서 2일 동안 진탕배양(150 r/min)하여 전배양액을 준비한 후 배양여액(20%) 또는 이의 유기용매 분획물(0.5 mg/mL)이 첨가된 푸모니신 유도 배지(2% fructose, 0.1% peptone, 0.1% yeast extract, 0.05% malt extract, 0.1% KH₂PO₄, 0.03% MgSO₄, 0.03% KCl, 0.005% ZnSO₄, 0.002% CuSO₄)에 전배양액을 0.5% 접종하고 25°C에서 6일 동안 150 r/min으로 진탕배양한 다음에 여과지(Whatman No.1 filter paper)로 걸렀음. 여과액(10 mL)을 Sep-Pak C18 Plus 카트리지(Waters)에 흡착시키고, 2 mL의 70% 아세토나이트릴 수용액으로 용출시킨 추출물 일부(100 µL)를 새로운 바이알에 옮기고 0.05 M borate 버퍼(pH 8-9)와 OPA 용액(1 mg *o*-phthalaldehyde, 50 µL β-mercaptoethanol, 10 mL 아세토나이트릴)을 100 µL씩 첨가하여 혼합하고, 실온에서 15분 반응한 다음 500 µL 0.01 M borate 버퍼-아세토나이트릴(6:4, v/v)을 첨가하여, 실린지필터(0.2-µm pore)로 여과하여 시료(800 µL)를 준비하였음. 시료 중 20 µL를 Agilent Pursuit XRs 컬럼(250 × 4.6 mm, 5 µm)이 장착된 Shimadzu LC-20AR system에 로딩하고, 분당 1 mL의 유속으로 50 mM KH₂PO₄-아세토나이트릴(45:55, v/v; pH 3.3)로 용출시켰고, Shimadzu RF-20A 형광검출기로 푸모니신을 검출하였으며, 미리 작성한 푸모니신(fumonisin B₁)의 표준곡선을 이용하여 정량분석 하였고, 무처리구 대비 처리구의 푸모니신 생산량을 조사하여 푸모니신 생합성 억제율(%)을 계산하였음.
- *P. hwajinpoensis* 배양여액(20%), 부탄올 분획물(0.5 mg/mL), 에틸아세테이트 분획물(0.5 mg/mL)을 첨가한 베키다리병균 B14 배양액에서 푸모니신 생합성이 유의미한 수준으로 감소함을 확인할 수 있었고, 특히 에틸아세테이트 분획물을 첨가했을 때 푸모니신 생산이 가장 크게 감소함(46%)을 확인하였음(그림 10).

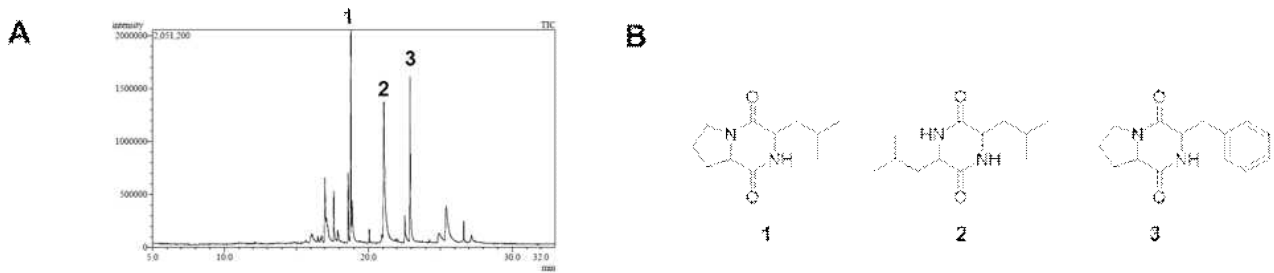


<그림 10. *P. hwajinpoensis* 배양여액 및 이의 유기용매분획물을 베키다리병균에 처리하였을 때, 푸모니신 생합성 저감 양상>

- 에틸아세테이트 분획물을 5 mg/mL의 농도로 메탄올에 용해시키고, 실린지필터(0.2 µm-pore)로 걸러서 시료를 준비하였음. 시료(1 µL)를 Shimadzu GCMS-QP2020 장치에 연결된 Agilent DB-5 컬럼(30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 µm)에서 분석되었음. 인젝션 온도는 250°C였고 1:10의 스플릿모드(split mode)로 1 µL 주입하였으며, 이동

상으로 헬륨 가스를 분당 1.64 mL의 유속으로 흘려주었음. 컬럼 오븐온도는 80°C에서 5분간 유지하다가 분당 10°C씩 올려서 320°C까지 증가시키고, 320°C에서 10분간 유지하였음. 이온소스 온도는 230°C였고, 인터페이스 온도는 280°C였으며, m/z 500 미만의 이온을 검출하였음.

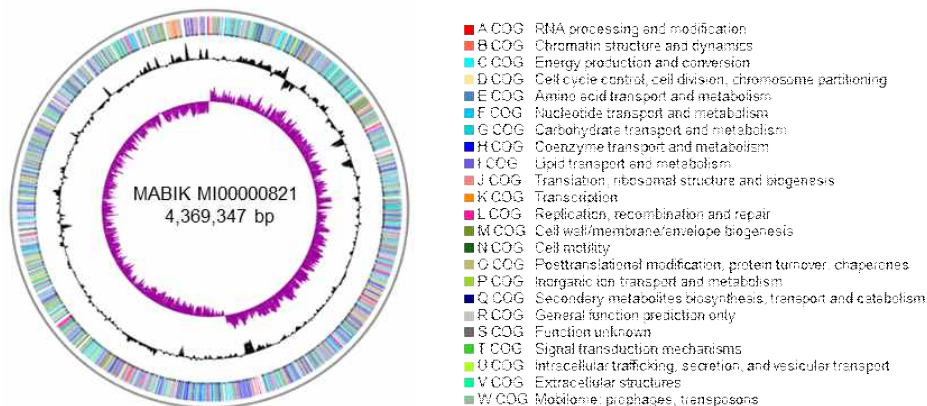
- 검출된 피크를 NIST 라이브러리와 대조 분석하여 에틸아세테이트 추출물의 주요 화합물 3종의 화학구조를 동정하였음: 화합물 1, $\text{cylco(L-Leu-L-Pro)}$; 화합물 2, $\text{cylco(L-Leu-L-Leu)}$; 화합물 3, $\text{cylclo(L-Phe-L-Pro)}$ 로 동정하였음(그림 11). 하지만, 이들 화합물들은 푸모니신 억제효과를 나타내지 않았음.



<그림 11. *P. hwajinpoensis* 에틸아세테이트 분획물의 GC-MS 분석. (A) total ion chromatogram에서 나타난 주요 화합물 1-3 (B) 펩타이드 화합물 1(= $\text{cylco(L-Leu-L-Pro)}$), 2(= $\text{cylco(L-Leu-L-Leu)}$), 및 3(= $\text{cylclo(L-Phe-L-Pro)}$)의 화학구조>

다. *P. hwajinpoensis*의 게놈 분석

- *P. hwajinpoensis* 가 생성하는 이차대사산물이 유전자 수준에서 구명할 수 있는지 알아보기 위해 전장 유전체 시퀀싱(whole genome sequencing)을 수행함. PacBio RSII 시스템을 사용하여 전체 유전체 서열을 확보하였으며, 해당 유전체는 평균 GC 함량이 40.1%인 4,369,347 bp 길이의 단일 원형 염색체로 구성됨. 또한 해당 유전체에서는 4,351개의 단백질 코딩 유전자, 86개의 tRNA 유전자 및 27개의 rRNA 유전자를 예측할 수 있었음(그림 12). AntiSMASH 분석을 통해 terpen, polyketide 및 siderophore 과 같은 이차대사산물을 합성하는 생합성 유전자가 존재할 것이라 예측함.



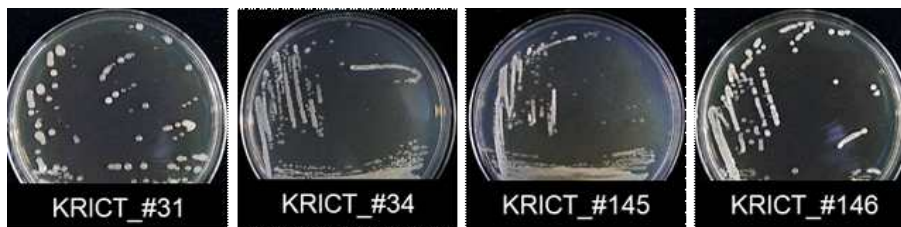
<그림 12. *P. hwajinpoensis* 의 전체 유전체 및 기능에 의한 카테고리화>

2) 살균활성 기반 벼 키다리병 방제용 길항미생물 선발

(1) 후보 길항미생물 *Paenibacillus elgii* KRICT#146 선발

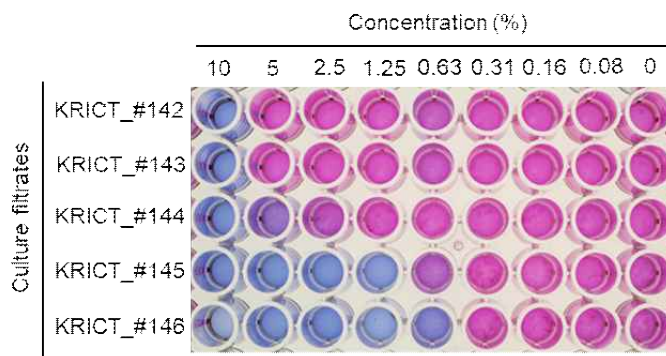
가. KRICT#146 미생물 소재의 항균활성 및 동정

- 벼 키다리병의 원인균인 *F. fujikuroi* B14 균주를 대상으로 살균활성스크리닝을 수행하였음. *F. fujikuroi* B14를 potato dextrose agar (PDA) 배지에 접종하고 25℃에서 1-2주 동안 배양한 다음 균사에 형성된 포자를 멸균수를 넣고 붓으로 긁어서 수확함.
- 약 280여 종의 바실러스 균주를 tryptic soy broth (TSB) 배지에 접종 후 30℃에서 3일간 진탕배양(180 r/min)한 균주배양액을 원심분리(10,000 × g, 20 min)한 후 여과지(또는 거즈)로 걸러서 배양여액라이브리리를 제조함. 96-웰 플레이트에서 배양여액(0%, 5%, 10%, 20%)과 *F. fujikuroi* (10⁵ spores/ml)를 potato dextrose broth (PDB) 배지에 넣고 25℃에서 2-3일간 배양한 다음 곰팡이 생장을 완전히 억제하는 시료를 선발함.
- *F. fujikuroi*에 대한 살균활성 스크리닝을 통해 KRICT_#31, #34, #145, #146 균주가 길항미생물로 선발됨(그림 13).



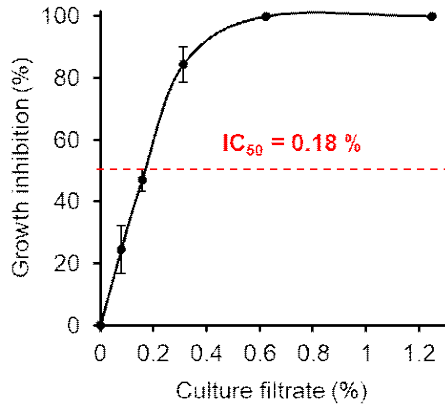
<그림 13. 살균활성 기반 선발된 미생물 균주의 균총>

- 96-웰 플레이트에서 배양여액(0%, 0.08%, 0.16%, 0.31%, 0.63%, 1.25%, 2.5%, 5%, 10%, 20%)과 *F. fujikuroi* B14(10⁵ spores/ml)를 potato dextrose broth (PDB) 배지에 넣고 25℃에서 2-3일간 배양한 다음, PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific) 염색하여 벼키다리병균의 생장을 정밀 분석함(그림 14).



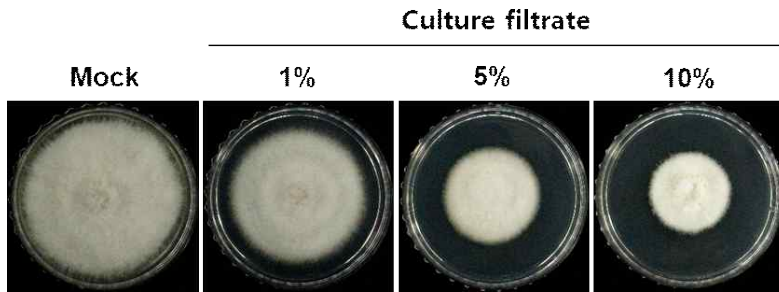
<그림 14. 액체미량희석법과 PrestoBlue 염색법을 이용한 키다리병균에 대한 선발미생물 배양여액의 살균활성도>

- 그림 15에 나타난 바와 같이, KRICT_#146 균주 배양여액은 0.63%의 낮은 처리농도에서도 효과적으로 벼키다리병균의 생장을 억제하는 우수한 활성을 나타냄.



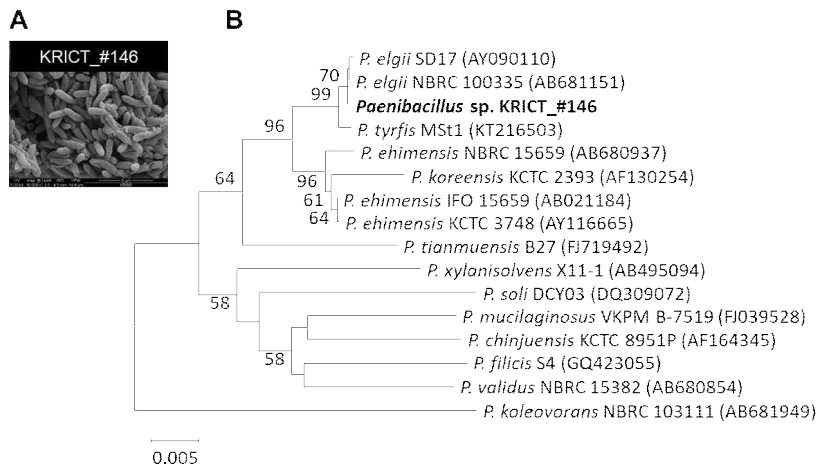
<그림 15. KRICT_#146 균주 배양여액의 베키다리병균의 포자발아 억제 활성>

○ 또한, 배양여액(0%, 1%, 5%, 10%)을 포함하는 PDA 배지에 B14 agar plug(직경 8 mm)를 정가운데에 접종하고, 25°C에서 7일간 배양한 다음, 균사생장 직경을 조사하였음. 배양여액 5%와 10%가 첨가된 배지에서 키다리병균의 균사생장 억제가 관찰됨(그림 16).



<그림 16. KRICT_#146 균주 배양여액의 *F. fujikuroi* 균사생장 억제효과>

○ KRICT_#146 균주의 분자생물학적 동정을 위해 CTAB법을 사용하여 유전체 DNA를 추출하였음. 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 27F 및 1492R 유니버설 프라이머 세트를 사용하였음. 정제한 PCR 산물은 Macrogen 사의 염기서열분석 서비스를 이용하여 분석함. NCBI BLAST 데이터베이스에서 얻은 KRICT_#146 균주와 근연한 *Paenibacillus* 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 MEGA X 프로그램의 ClustalW로 정렬하고, Neighbor-joining 법(1,000회 반복)으로 계통수 분석을 수행함.

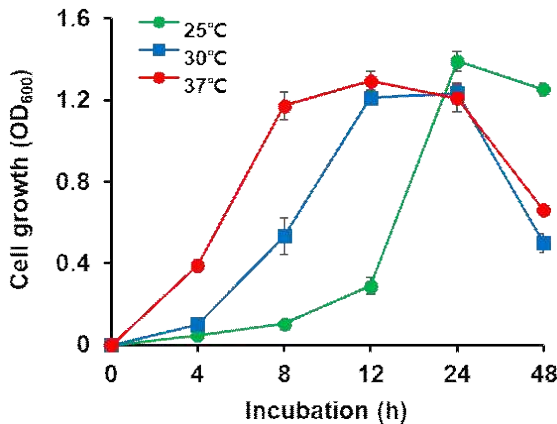


<그림 17. KRICT_#146 균주의 SEM 전자현미경 사진 (A) 및 근연한 *Paenibacillus* 균주와의 16S rRNA 비교를 통한 계통수 분석 (B)>

- 그림 17에 나타난 바와 같이, KRICT_#146 균주는 전형적인 바실러스 형의 세포형태를 나타냄을 확인하였고, 계통수 분석결과 이 균주는 *Paenibacillus elgii* SD17과 NBRC 100335 균주와 근연함을 확인함. 상기 결과를 토대로 KRICT_#146 균주를 *P. elgii* 균주로 동정함.

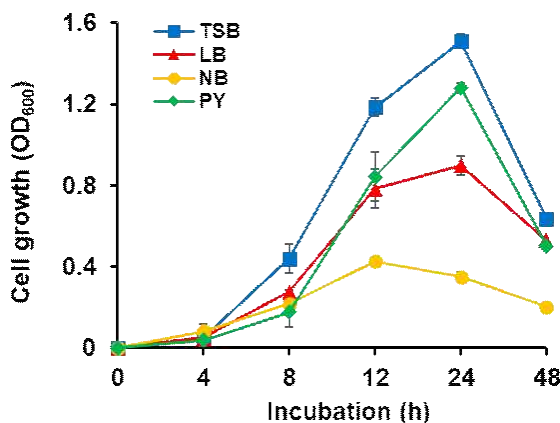
나. *P. elgii* KRICT_#146 미생물 소재의 살균활성 최적화를 위한 배양조건 탐색

- 배양조건 최적화를 위하여, 배지종류 및 배양온도에 따른 KRICT_#146 균주의 생장을 조사함. 우선, 배양온도를 최적화하기 위하여, KRICT_#146 균주를 서로 다른 배양온도(25, 30, 37°C)에서 진탕배양(180 r/min) 하고, TSB 배지 접종 후 0, 4, 8, 12, 24, 48시간 배양액의 OD₆₀₀ 값을 측정함. 그림 18에 나타난 바와 같이, KRICT_#146 균주의 생장은 37°C 배양조건에서 접종 후 8시간에, 30°C 배양조건에서는 접종 후 12시간에, 25°C 배양조건에서는 접종 후 24시간에 정체기(stationary phase)에 도달했으며, 배양온도가 높을수록 균주의 성장속도가 빠른 것을 확인하였음. 하지만, 높은 온도에서 변이형이 관찰되는 바, 30°C 배양조건이 보다 적합한 것으로 판단됨.



<그림 18. KRICT_#146 균주의 배양온도에 따른 성장곡선>

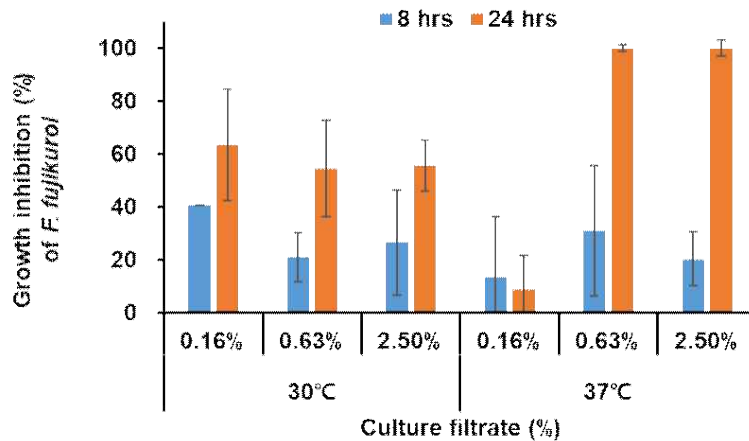
- 또한, 4종류의 액체배지(TSB, LB, NB, PY)에 KRICT_#146 균주를 접종 후 30°C에서 진탕 배양(180 r/min) 한 다음에 0, 4, 8, 12, 24, 48시간 배양액의 OD₆₀₀ 값을 측정함.



<그림 19. KRICT_#146 균주의 배양배지에 따른 성장곡선>

- 그림 19에 나타난 바와 같이, 접종 후 24시간일 때 KRICT_#146 균주는 생장은 TSB 배지에서 가장 왕성했음(OD₆₀₀ = 1.5). 살균활성물질 생산에 적합한 배양조건을 확립하기 위하여,

균주생장이 왕성했던 30℃와 37℃ 균주배양액의 살균활성을 비교하였음. 이를 위해, TSB 배지 접종 후, 30℃와 37℃에서 배양하였음. 각각 8시간 및 24시간 배양한 KRICT_#146 균주 배양액을 원심분리(10,000 × g, 20 min)한 다음에 실리지필터(0.2 μm pore size)로 여과하여 4종류의 배양여액을 준비함. 96-웰 플레이트에서 배양여액(0%, 0.16%, 0.63%, 2.5%)과 *F. fujikuroi* (10⁵ spores/ml)를 PDB 배지에 넣고 25℃에서 2-3일간 배양한 다음, PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific)로 염색하여 *F. fujikuroi*의 성장을 조사함.



<그림 20. KRICT_#146 균주의 배양온도(30℃, 37℃) 및 배양시간(8시간, 24시간)에 따른 *F. fujikuroi* B14 균주에 대한 살균활성>

- 그림 20에 나타난 바와 같이 KRICT_#146 균주의 생장이 최대가 되었던 37℃, 24시간 배양 여액에서 가장 강한 살균활성(MIC = 0.63%)을 나타내었고, 균주의 살균활성물질 생산은 정 체기 후기(접종 후 24시간)에 활성화됨을 확인함.

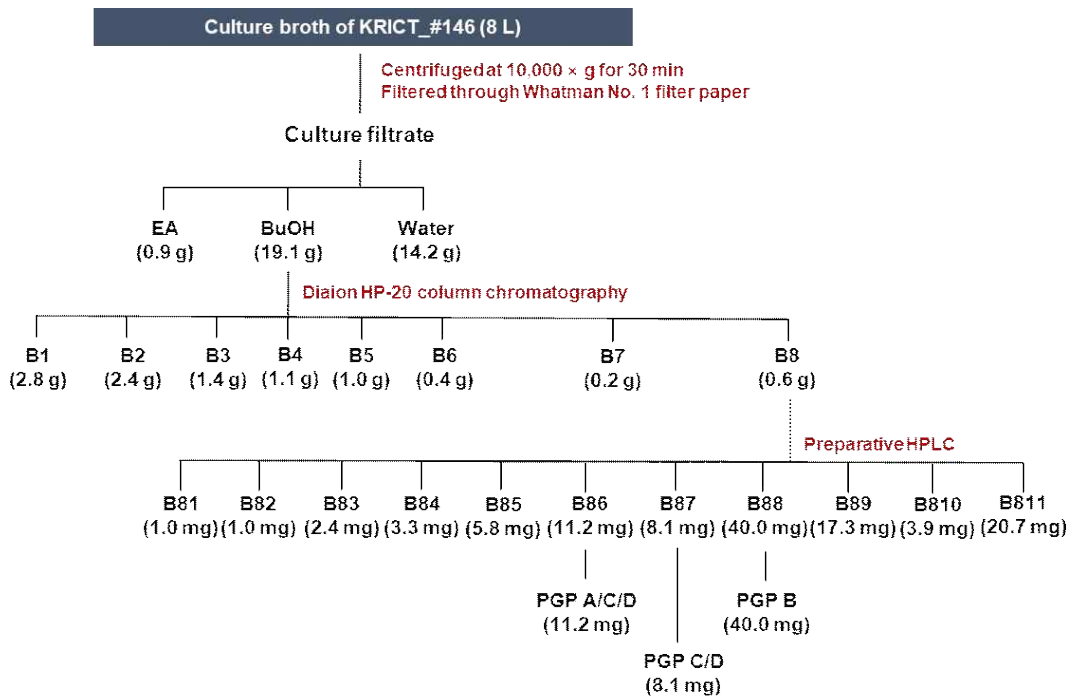
다. *P. elgii* KRICT_#146 배양여액으로부터 유효활성물질 분리 및 구조 동정

- 한국화학연구원의 선발균주인 KRICT_#146 균주를 TSB 배지에 접종하고 30℃에서 3일 동안 진탕배양(180 r/min)한 균주배양액을 원심분리(10,000 × g, 20 min)한 후 여과지(또는 거즈)로 걸러서 배양여액을 제조함. 살균활성을 나타내는 물질의 특성(지용성, 수용성)을 규명하기 위해 용매분획을 수행하였고, 분액여주(separatory funnel)를 사용하여 배양액(8 L)을 여과한 다음 동량의 에틸아세테이트, 부탄올로 2회씩 순차적으로 추출하여, 에틸아세테이트층(0.9 g), 부탄올층(19.1 g), 물층(14.2 g)으로 나누고, 각각 감압농축하여 건조시켜 용매분획물을 제조함.
- 96-웰 플레이트에서 용매분획물(0, 0.8, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25, 50, 100, 200 μg/ml)과 *F. fujikuroi* (10⁵ spores/ml)를 PDB 배지에 넣고 25℃에서 2-3일간 배양한 다음, PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific)로 염색하여 용매분획물의 *F. fujikuroi*의 성장억제효과를 조사함.

<표 2. *F. fujikuroi* B14에 대한 최소억제농도>

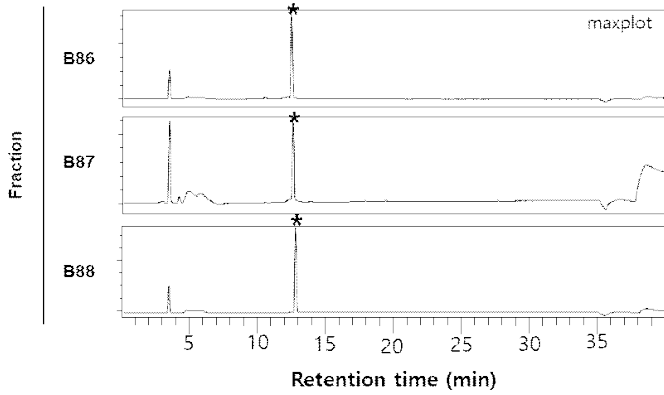
용매분획물	건조중량(g)	최소억제농도(μg/ml)
에틸아세테이트층	0.9	100
부탄올층	19.1	50
물층	14.2	>200

- 표 2에 나타난 바와 같이, 에틸아세테이트와 부탄올 분획물에서 살균활성이 나타나는 것을 확인하였고, 활성물질이 물보다는 유기용매에 잘 녹는 지용성이 강한 물질임을 확인함. KRICT_#146 균주가 생산한 살균활성물질이 부탄올분획물에 다량 함유되어 있음을 확인함.
- 부탄올 분획물로 부터 살균활성물질을 분리하기 위하여 Diaion HP-20(Mitsubishi chemical) 컬럼 크로마토그래피와 Shimadzu Prominence 고압액체크로마토그래피(high pressure liquid chromatography; HPLC) 시스템을 조합 사용함. 0.6 g의 분획물 B8을 분취용 HPLC로 정제하여, 최종적으로 3가지 분획물 B86(11.2 mg), B87(8.1 mg), B88(40.0 mg)을 얻었음. 각각의 분획물은 Waters 515 시스템에 장착된 Varian Pursuit XRs 컬럼(4.7 mm × 250 mm, 5 μm)에 로딩하고 농도구배조건으로 20–100% 메탄올수용액(0.1% 개미산 포함)을 0–15분간 그리고 100% 메탄올수용액을 15–30분간 용출시키고, photo diode array 검출기로 화합물을 정제 수준을 확인함.(그림 21)



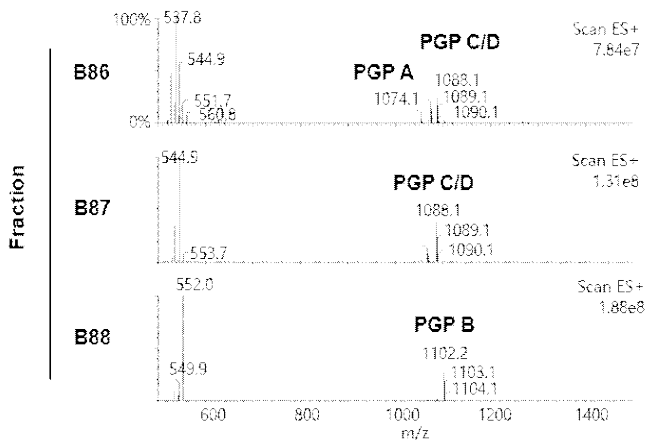
<그림 21. KRICT_#146 균주 배양여액의 부탄올 분획물로부터 활성물질을 분리하는 공정도>

- 그림 22에 나타난 바와 같이, HPLC 분석에서 분획물 B86, B87, B88은 RT 12.9분에 단일 피크를 나타나 높은 순도로 정제가 되었음을 확인함. 따라서, 이의 ESIMS 분석을 수행함.



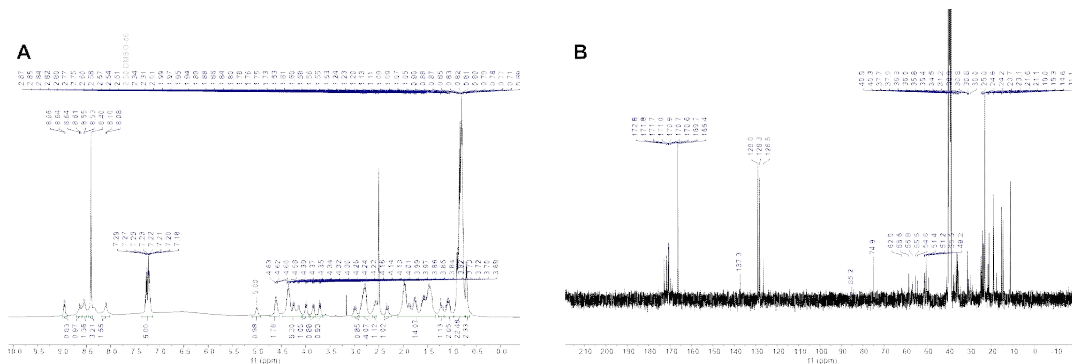
<그림 22. 분리한 활성 화합물 B86, B87, B88의 HPLC 크로마토그램>

○ 정제된 분획물 B86, B87, B88은 펩타이드 항생물질 pelgipeptin (PGP) 계열 화합물의 $[M + H]^+$ 이온값을 나타냄(그림 23). 분획물 B86은 m/z 1074 (= PGP A) 및 m/z 1088 (= PGP C 또는 D)의, 분획물 B87은 m/z 1088 (= PGP C 또는 D)의, 분획물 B88은 m/z 1102 (= PGP B)의 $[M + H]^+$ 양이온이 검출됨. 다른 분획물과는 달리 한 종류의 화합물(= PGP B)만을 함유한 분획물 B88을 대상으로 NMR 분석을 수행함.



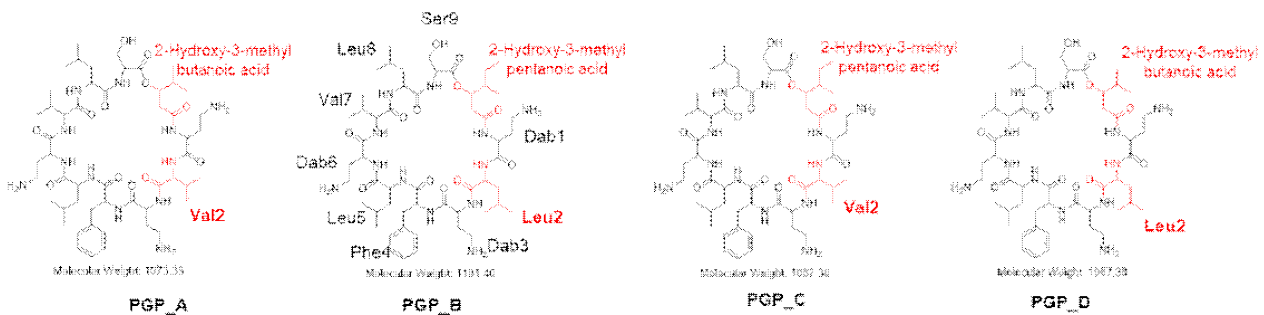
<그림 23. 분리한 활성 화합물 B86, B87, B88의 ESI-MS 분석>

○ 분획물 B88의 NMR 데이터는 전형적인 펩타이드 화합물의 피크 패턴을 나타내었고(그림 26), 문헌에 나타난 PGP B의 NMR 데이터와 일치하는 것을 확인하였음. ESIMS 및 NMR 데이터를 바탕으로 분획물 B88을 환형 펩타이드 항생물질 PGP B로 동정함(그림 24).



<그림 24. 분리한 활성 화합물 B88의 수소(A) 및 13-탄소(B) NMR 데이터>

- 분획물 B86, B87, B88에 함유되어있는 환형 펩타이드 항생물질 PGP A, B, C, D의 화학구조를 다음과 같이 정리함(그림 25).



<그림 25. 분리한 활성화합물의 화학적 구조>

- 96-웰 플레이트에서 용매분획물(0, 0.8, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/ml)과 *F. fujikuroi* (10^5 spores/ml)를 PDB 배지에 넣고 25°C에서 2-3일간 배양한 다음, PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific)로 염색하여 용매분획물의 *F. fujikuroi*의 생장억제효과를 조사함. 표 3에 나타난 바와 같이, 분획물 B86, B87, B88은 12.5-25 µg/ml의 처리농도범위에서 *F. fujikuroi*의 생장을 완전히 억제하는 우수한 살균활성을 나타냄. 특히, PGP B를 함유한 B88 분획물에서 가장 강한 살균활성(MIC = 12.5 µg/ml)이 나타나는 것을 확인함. 상기 결과들은 *P. elgii* KRICT_#L146 균주 및 균주가 생산하는 환형 펩타이드 항생물질(= PGP)이 *F. fujikuroi*가 유발하는 식물병을 제어하는데 유용함을 시사함.

<표 3. 분획물 B86, B87, B88의 *F. fujikuroi* B14에 대한 최소억제농도>

Fraction	Pelgipeptin (PGP)	MIC (µg/ml)
B86	PGP A, C/D	25
B87	PGP C/D	25
B88	PGP B	12.5

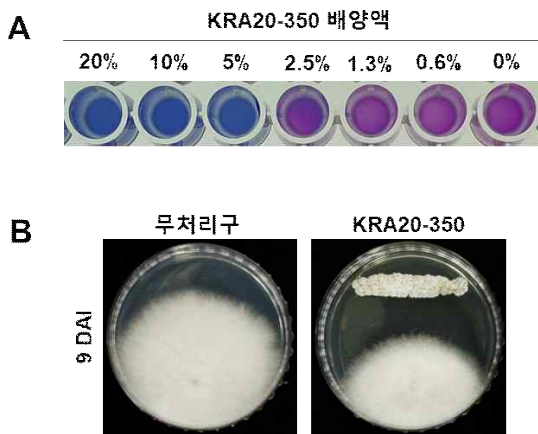
(2) 후보 길항미생물 *Streptomyces* sp. KRA20-350 선발

가. KRA20-350 미생물 소재의 항균활성 및 동정

- 우리나라 각지에서 채취한 토양으로부터 분리한 방선균(actinomycetes)을 배지에 형성된 단일 균총 1개를 500 mL-baffled Erlenmeyer flask에 100 mL의 M3 배지(1% glucose, 2% soluble starch, 1% soytone, 0.3% CaCO₃, 0.02% FeSO₄, 0.1% antifoamer; pH 7.2)에 접종하고, 27°C에서 7일 동안 160 r/min로 진탕배양한 후, 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분리하고, 이를 여과지로 걸러서 배양여액을 제조하였음.
- 제조한 배양여액 항균활성을 확인하기 위해, 96-웰 플레이트의 100 µl 웰에 B14의 포자가 1×10^4 spores/mL 농도가 되도록 넣어주고, 방선균 배양여액을 각각 0%, 0.6%,

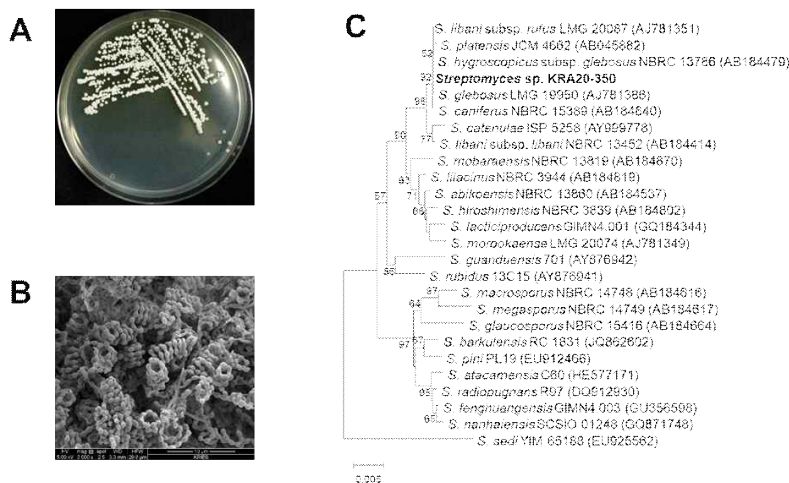
1.3%, 2.5%, 5%, 10%, 20%의 농도가 되도록 각 웰에 처리하였음. 이때 증류수만 첨가한 것을 무처리구로 사용하였음. 2일 동안 미생물 생장이 최적인 온도에서 배양한 다음, 육안으로 관찰했을 때 곰팡이의 생장이 완전히 억제되는 농도를 최소억제농도로 결정하였음. KRA20-350의 배양여액이 5% 처리농도에서 베키다리병균(*F. fujikuroi*) B14의 생장을 완전히 억제하는 것을 확인함(그림 26).

- 또한, KRA20-350 균주를 베키다리병균(*F. fujikuroi*) B14와 Bennett 한천배지(0.1% beef extract, 1% glucose, 0.2% N-Z amine A, 0.1% yeast extract, 1.5% agar; pH 7.3)에서 대치배양 했을 때, 접종 후 9일째까지 KRA20-350 균주가 베키다리병균에 대하여 강한 길항작용을 나타냄을 확인함(그림 26).



<그림 26. KRA20-350의 베키다리병균 (포자현탁액(A) 및 대치배양(B))에 대한 항균효과>

- KRA20-350 균주는 Bennett 한천배지(0.1% beef extract, 1% glucose, 0.2% N-Z amine A, 0.1% yeast extract, 1.5% agar; pH 7.3)에서 7일 동안 배양했을 때, 흰색 기중균사가 특징인 균총을 형성하는 것을 확인함(그림 27). 또한, 주사전자현미경(scanning electron microscope)으로 관찰했을 때, ISP4 한천배지(1% soluble starch, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 0.1% NaCl, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.2% CaCO₃, 0.0001% FeSO₄·7H₂O, 0.0001% MnCl₂·7H₂O, 0.0001% ZnSO₄·7H₂O, 1.5% agar)에서 형성된 KRA20-350 균주의 포자가 둥근 계란형으로 나선연쇄를 이루고 있는 것을 확인함(그림 27).



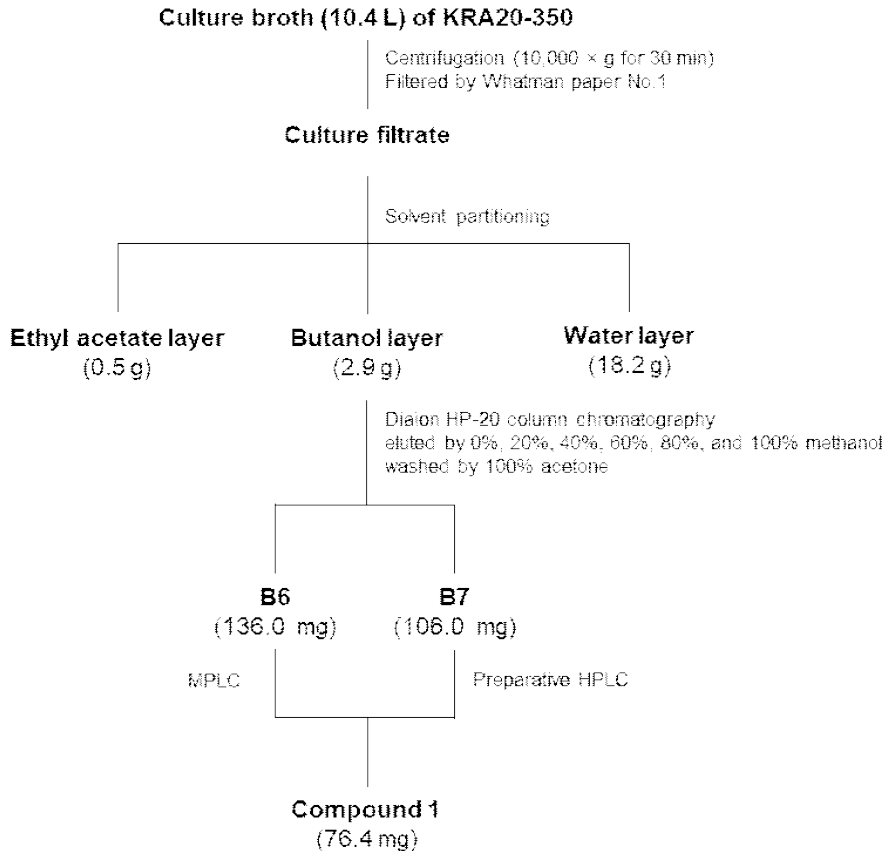
<그림 27. KRA20-350의 형태학적 특징 및 분자계통학적 분석. (A) Bennett 한천배지에서 배양한 KRA20-350의 균총 사진. (B) 주사전자현미경을 관찰한 KRA20-350의 포자 사진. (C) 16S rRNA 유전자를 기반으로 한 phylogenetic tree>

- KRA20-350 균주의 계통분류학적 분석을 위하여 Bennett 한천배지로부터 자란 균체에서 AccuPrep DNA 추출 키트(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 gDNA를 추출하였음. 추출된 DNA를 주형으로 하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였음. PCR은 정방향 프라이머 fD1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 역방향 프라이머 rP2(5'-TACGGCTACCTTGTTCAGACTT-3')와 Ex Taq polymerase(Takara, Otsu, Japan)를 이용하여 94℃에서 5분간 1회, 94℃에서 30초, 55℃에서 45초, 72℃에서 90초를 35회 반복, 72℃에서 10분간 1회 조건에서 진행되었음. 수득한 PCR 수득물을 전기영동하고 Expin PCR purification kit(GeneAll, Seoul, Korea)를 사용하여 정제한 후, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 위해 시퀀싱 분석 서비스(Macrogen, Daejeon, Korea)를 의뢰하였음.
- 시퀀싱된 16S rRNA 유전자 염기서열 결과를 바탕으로 NCBI BLASTn 데이터베이스에 등록된 다른 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열과 비교 분석하였음. ClustalW 알고리즘으로 염기서열을 정렬한 후 Tamura-Nei 모델과 1,000회의 부트스트랩(bootstrap) 방법으로 MEGA 프로그램을 사용하여 계통수(neighbor-joining tree)를 작성하였음(그림 27)
- 상기 서열번호를 이용하여 계통수를 작성한 결과, KRA20-350는 스트렙토마이세스 플라텐시스(*Streptomyces platensis* = *S. libani* subsp. *rufus* = *S. hygrosopicus* subsp. *glebosus*)에 속하는 JCM 4662, LMG 20087, NBRC 13786 균주와 높은 상동성(99% 이상)을 나타냈고, KRA20-350를 *S. platensis* KRA20-350 균주로 명명하고, 2021년 8월 17일자로 농촌진흥청 농업유전자원센터(KACC)에 수탁번호 KACC 81164BP로 기탁하였음.

나. *Streptomyces* sp. KRA20-350 배양여액으로부터 유효활성물질 분리 및 구조 동정

- KRA20-350 배양여액으로부터 베키다리병균에 대한 항균활성물질을 분리하기 위한 실험을 수행하였음. Bennett 한천배지에 형성된 KRA20-350 단일 균총 1개를 500 mL-baffled Erlenmeyer flask에 100 mL의 M3 배지에 접종하고, 27℃에서 1일 동안 160 r/min로 진탕하여 전배양하였음. 2 L-baffled Erlenmeyer flask에 담긴 400 mL의 M3 배지에 전배양액을 1% 접종하고, 면전으로 플라스크 입구를 막은 다음, 27℃에서 1주일 동안 160 r/min로 진탕배양하여 균주 배양액(10.4 L)을 얻었다. 균주 배양액을 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분리하고, 이를 여과지로 걸러서 배양여액을 제조하였음.
- 분액여두(separatory funnel)에 KRA20-350 배양여액을 넣고 동량의 에틸아세테이트와 혼합하여 진탕시킨 다음 정치하고 층 분리가 일어나면 유기용매층 및 수용액층을 얻었음. 수용액층에 다시 동량의 부탄올을 혼합하여 진탕시킨 다음 정치하여 유기용매층을 분리하고 각각을 감압농축하여 에틸아세테이트 분획물(0.5 g), 부탄올 분획물(2.9 g), 물 분획물(18.2 g)을 획득하였음(그림 28).
- 베키다리병균 B14를 대상으로 분획물의 항균활성을 시험하였음. 96-웰 플레이트의 100μl 웰에 B14의 포자가 1×10^4 spores/mL 농도가 되도록 넣어주고, 분획물을 메탄올 또는 증류수에 20 mg/mL의 농도로 녹인 다음 각각 0, 0.8, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25, 50, 100,

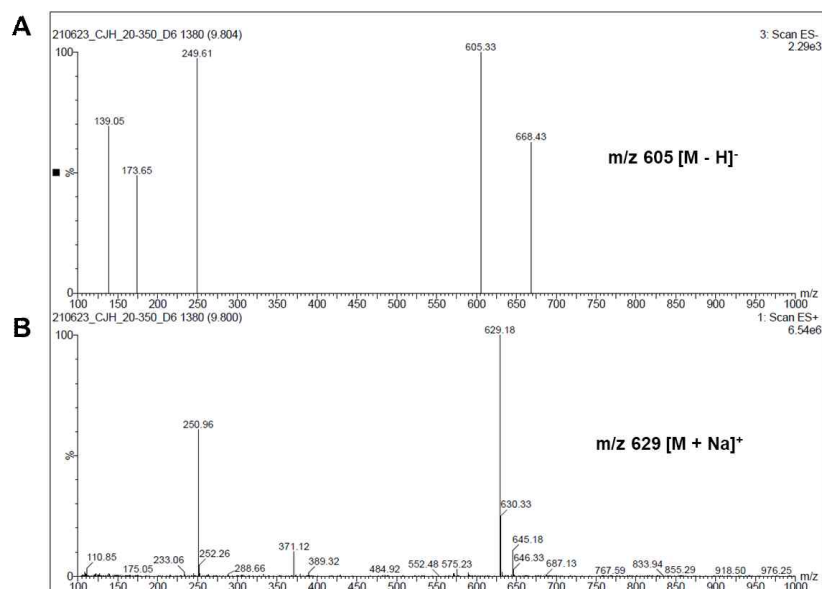
200 µg/mL의 농도가 되도록 각 웰에 처리하였음. 이때 1% 메탄올만 첨가한 것을 무처리구로 사용하였으며, 2일 동안 버키다리병균 생장이 최적인 온도에서 배양한 다음, 육안으로 관찰했을 때 부탄올 분획물이 25 µg/mL의 최소억제농도를 나타냄을 확인하고, 이로부터 항균활성물질을 분리하는 실험을 수행하였음.



<그림 28. KRA20-350 균주로부터 화합물 1을 분리하는 공정도>

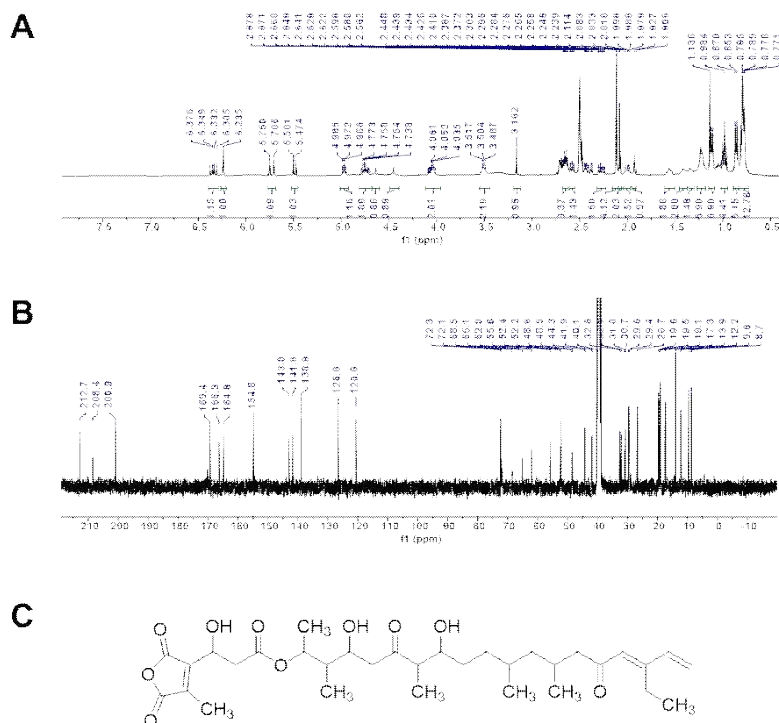
- 부탄올 분획물(2.9 g)을 Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan) 컬럼에 로딩하고, 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 메탄올 수용액 및 100% 아세톤으로 용출시켜, 분획물 B1-B7를 얻었음. 활성 분획물 B6(136 mg)를 Biotage SNAP Ultra C18 카트리지가 장착된 중압컬럼크로마토그래피(MPLC) 시스템에 로딩하고, 20-100% 메탄올수용액(0.1% 개미산)으로 용출시켰음.
- 또 다른 활성 분획물 B7(106 mg)은 Agilent Polaris C18-A(250×21.2 mm, 5 µm) 컬럼이 조합된 Shimadzu LC-6AD 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 시스템에 로딩하고, 20-100% 메탄올수용액(0.1% 개미산)을 분당 5 mL의 유속으로 용출시켰다. 활성을 나타내는 분획물을 모아서 최종적으로 화합물 1(76.4 mg)을 분리하였음(그림 28).
- 분리된 화합물의 화학구조 규명을 위하여 핵자기공명(nuclear magnetic resonance; NMR)과 질량분광분석(mass spectroscopy; MS) 방법을 사용하였음. 분리한 화합물 1을 DMSO- d_6 (99.9 atom% D; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA)에 녹여 Bruker Avance 400 MHz 핵자기공명장치를 이용하여 ^1H -과 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 얻었다. NMR 용매에 첨가된 TMS(tetramethylsilane) 피크를 기준으로 화학적이동(chemical shift) 값을 δ (ppm)으로 나타내었음.

- 분리한 화합물 1은 ESI-MS에서 m/z 605 $[M-H]^-$ 의 음이온(A)과 m/z 629 $[M+Na]^+$ 의 양이온(B)으로 검출되었고, 화합물 1의 분자량을 606 Da으로 결정하였음(그림 29).



<그림 29. 화합물 1의 ESI-MS 분석 데이터. (A) ESI 음이온 모드 (B) ESI 양이온 모드>

- 화합물 1의 1H -와 ^{13}C -NMR 스펙트라(그림 5A 및 5B)는 tautomycetin으로 알려진 dialkylmaleic anhydride계 화합물의 NMR 데이터와 일치함을 확인한 바, 화합물 1를 tautomycetin으로 동정하였음(그림 30). 화합물 1(= tautomycetin)의 NMR 실험 결과는 다음과 같이 정리하였음(표 4).



<그림 30. 화합물 1의 NMR 분석 데이터 및 화학구조. (A) 1H NMR 스펙트라 (B) ^{13}C NMR 스펙트라 (C) 화합물 1(= tautomycetin)의 화학구조>

<표 4. 화합물 1의 NMR 데이터(400 MHz, DMSO-d6)>

Position	Chemical shift (δ in ppm)	
	δ_C , Type	δ_H (J in Hz)
1	13.9, CH ₃	0.98 t (7.4)
2	19.6, CH ₂	2.65
3	154.8, C	
3-Vinly-CH	138.9, CH	6.34, dd (17.5, 10.8)
3-Vinly-CH ₂	120.6, CH ₂	5.73, d (17.5); 5.49 d (10.8)
4	126.6, CH	6.23 s
5	200.9, CO	
6	55.8, CH ₂	2.41
7	26.7, CH	
7-CH ₃	19.7, CH ₃	
8	44.3, CH ₂	
9	29.6, CH	
9-CH ₃	19.5, CH ₃	1.13
10	32.5, CH ₂	
11	30.7, CH ₂	
12	72.1, CH	3.50, m
13	52.2, CH	2.58
13-CH ₃	12.2, CH ₃	0.86
14	212.7, CO	
15	48.5, CH ₂	2.67
16	65.1, CH	4.04, m
17	41.9, CH	1.56
17-CH ₃	8.4, CH ₃	0.77
18	72.3 CH	4.76, m
18-CH ₃	17.4, CH ₃	1.11
1'	169.4, CO	
2'	39.8, CH ₂	2.68
3'	62.0, CH	4.97
4'	141.8, C	
5'	143.0, C	
5'-CH ₃	9.6, CH ₃	
6'	166.3, CO	
7'	164.8, CO	

다. 식물병원성 곰팡이 및 세균에 대한 화합물 1의 *in vitro* 활성 시험

- 순수분리한 화합물 1(= tautomycetin)의 키다리병균을 포함한 여러가지 식물병원균에 대한 살균활성 스펙트럼을 조사하였음: 식물병원성 곰팡이는 배추과작물검은무늬병균 (*Alternaria brassicicola*), 토마토잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 오이검은별무늬병균 (*Cladosporium cucumerinum*), 고추탄저병균(*Colletotrichum coccodes*), 인삼뿌리썩음병

균(*Cylindrocarpon destructans*), 토마토시들음병균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), 벼키다리병균(*F. fujikuroi*), 벼도열병균(*Magnaporthe oryzae*), 감자/토마토 역병균(*Phytophthora infestans*) 및 벼잎집무늬마름병균(*Rhizoctonia solani*)을 이용하였고, 식물병원성 세균으로 호접란세균성갈색점무늬병균(*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*), 박과과실썩음병균(*Acidovorax citrulli*), 과수뿌리혹병균(*Agrobacterium tumefaciens*), 세균성벼알마름병균(*Burkholderia glumae*), 고추퀘양병균(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), 호접란무름병균(*Dickeya chrysanthemi*), 과수화상병균(*Erwinia amylovora*), 채소무름병균(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*), 키위퀘양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*), 오이세균성모무늬병균(*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*), 가지과작물꽃마름병균(*Ralstonia solanacearum*), 복숭아세균성구멍병균(*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*)을 사용하였음 (표 5).

〈표 5. 화합물 1(= tautomycetin)의 최소억제농도〉

분류	학명	최소억제농도 (µg/ml)
	<i>Alternaria brassicicola</i>	3.13
	<i>Botrytis cinerea</i>	3.13
	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	3.13
	<i>Colletotrichum coccodes</i>	25
식물병원성 곰팡이	<i>Cylindrocarpon destructans</i>	>200
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	12.5
	<i>Fusarium fujikuroi</i>	12.5
	<i>Phytophthora infestans</i>	6.25
	<i>Magnaporthe oryzae</i>	6.25
	<i>Rhizoctonia solani</i>	12.5
	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	>200
	<i>Acidovorax citrulli</i>	>200
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	>200
	<i>Burkholderia glumae</i>	>200
	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	>200
식물병원성 세균	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	>200
	<i>Erwinia amylovora</i>	>200
	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	>200
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	>200
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	>200
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	>200
	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	>200

- 각각의 곰팡이와 세균을 배양한 후, 곰팡이는 포자 농도가 1.0×10^4 spores/ml이 되도록 그리고 세균은 1.0×10^4 bacterial cells/ml의 농도가 되도록 준비한 후에 이들을 96-웰

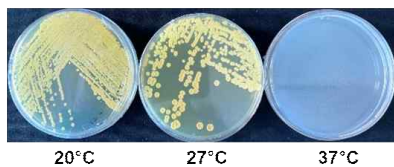
플레이트의 각 웰에 99 μ l를 넣어 주었음. 여기에 화합물 1(20 mg/mL)을 20 mg/mL의 농도로 녹인 다음 각각 0, 0.8, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/mL의 농도가 되도록 각 웰에 처리하였음. 이때 메탄올의 함량은 1% 미만이었음, 1% 메탄올만 첨가한 것을 무처리구로 사용하였음.

- 곰팡이의 경우 Czapek-Dox 배지(3% sucrose, 0.25% casamino acid, 0.2% NaNO_3 , 0.1% yeast extract, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% KCl, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02% trace element solution, 1% vitamin solution)를 사용하였고, 세균의 경우 TSB 배지를 사용하였음.
- 96-웰 플레이트를 곰팡이는 20°C 내지 25°C에서 그리고 세균은 28°C 내지 30°C에서 2일 내지 3일 동안 배양한 다음 육안으로 관찰했을 때, 곰팡이 및 세균의 생장이 완전히 억제 되는 농도를 MIC 값으로 결정하였음. 표 5에서 확인되는 바와 같이, 화합물 1(= tautomycetin)은 3.13 내지 12.5 μ g/ml 농도 범위에서 베키다리병균 뿐만이 아니라 여러 가지 식물병원성 곰팡이의 생장을 효과적으로 억제하는 우수한 활성을 나타냈음. 한편, 유의미한 항세균활성을 확인할 수 없었고, 화합물 1(= tautomycetin)의 항미생물 효과는 대부분 곰팡이를 대상으로 나타냈음.

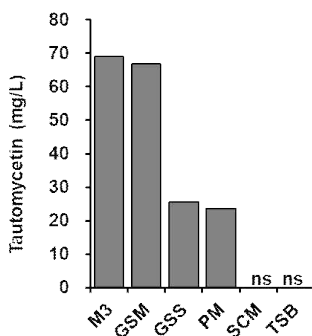
라. KRA20-350의 유효활성물질의 생산 최적화

- Bennett 한천 배지에서 KRA20-350의 배양온도별 생장을 시험했을 때, 20°C와 27°C에서는 정상적으로 균총의 크기가 커졌으나, 37°C에서는 자라지 못함을 확인하였음(그림 31).

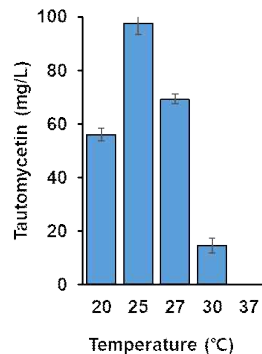
A



B



C



<그림 31. Tautomycetin 생산량 증대를 위한 KRA20-350의 배양 조건 최적화.

(A) 배양온도에 따른 KRA20-350의 생장
(B) 배양온도에 따른 tautomycetin 생산
(C) 배지종류에 따른 tautomycetin 생산>

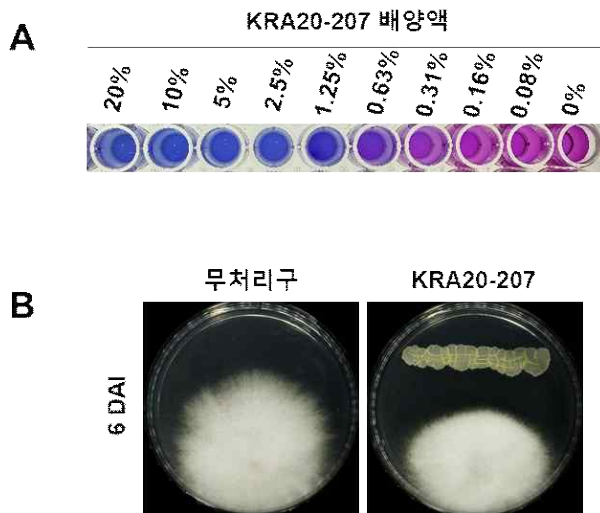
- 6종의 방선균 발효배지인 GSS 배지(1% glucose, 1% soluble starch, 2.5% soy bean meal, 0.4% yeast extract, 0.1% beef extract, 0.2% NaCl, 0.05% KH_2PO_4 ; pH 7.0) GSM 배지(2% glucose, 1% soluble starch, 0.5% molasses, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.2% CaCO_3 ; pH 7.0), SCM 배지(1.5% soluble starch, 2% soytone, 0.01% CaCl_2 , 0.15% yeast extract, 1.05% MOPS; pH 7.2), PM 배지(3% glucose, 3%

soybean meal, 0.5% Pharmamedia, 0.1% yeast extract, 0.3% CaCO₃), TSB 배지 및 M3 배지를 사용하여 KRA20-350을 27°C 160 r/min으로 7일간 진탕배양한 후 부탄올로 추출하였음. HPLC 정량분석을 통해서 KRA20-350의 배양배지별 tautomycetin 생산을 평가했을 때, M3 배지에서 tautomycetin의 생산이 최대가 됨을 확인하였음(그림 31). 또한, KRA20-350의 배양온도별 tautomycetin 생산 조건 결과에 따라 25°C에서 tautomycetin의 생산이 최대가 됨을 확인할 수 있었다(그림 31).

(3) 후보 길항미생물 *Streptomyces wistariopsis* KRA20-207 선발

가. KRA20-207 미생물 소재의 항균활성 및 동정

- 우리나라 각지에서 채취한 토양으로부터 분리한 방선균을 배지에 형성된 단일 균총 1개를 500 mL-baffled Erlenmeyer flask에 100 mL의 M3 배지에 접종하고, 27°C에서 7일 동안 160 r/min로 진탕배양하였다. 균주 배양액을 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분리하고, 이를 여과지로 걸러서 배양여액을 제조하였음.
- 베키다리병균 B14 strain를 대상으로 제조한 배양여액 항균활성 스크리닝을 수행하였다. 96-웰 플레이트의 100 µl 웰에 B14의 포자가 1 × 10⁴ spores/mL 농도가 되도록 넣어 주고, 방선균 배양여액을 각각 0%, 0.6%, 1.3%, 2.5%, 5%, 10%, 20%의 농도가 되도록 각 웰에 처리하였다. 이때 증류수만 첨가한 것을 무처리구로 사용하였음. 2일 동안 미생물 생장이 최적인 온도에서 배양한 다음, 육안으로 관찰했을 때 곰팡이의 생장이 완전히 억제되는 농도를 최소억제농도로 결정하였음.
- 토양방선균 KRA20-207의 배양여액이 1.25% 처리농도에서 베키다리병균의 생장을 완전히 억제하는 것을 확인하여, 이를 선발함(그림 32).

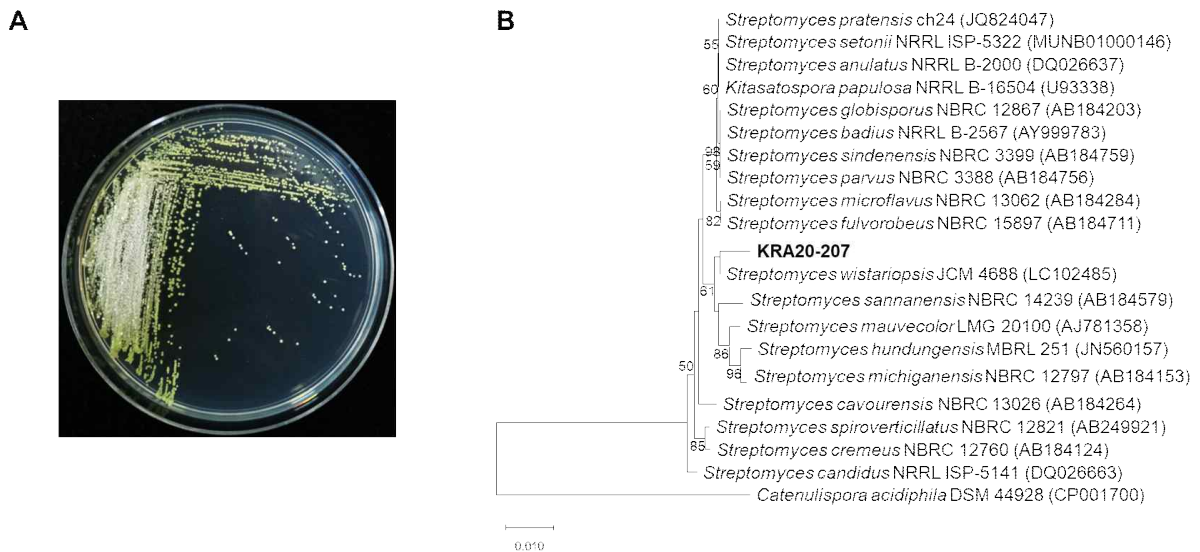


<그림 32. KRA20-207의 베키다리병균(포자현탁액(A) 및 대치배양(B))에 대한 항균효과>

- KRA20-207 균주의 계통분류학적 분석을 위하여 Bennett 한천배지로부터 자란 균체에서 AccuPrep DNA 추출 키트(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 gDNA를 추출하였음. 추출된 DNA를 주형으로 하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였음. PCR은 정방향 프라이머 fD1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 역방향 프라이머 rP2(5'

-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')와 Ex Taq polymerase(Takara, Otsu, Japan)를 이용하여 94℃에서 5분간 1회, 94℃에서 30초, 55℃에서 45초, 72℃에서 90초를 35회 반복, 72℃에서 10분간 1회 조건에서 진행되었음. 수득한 PCR 수득물을 전기영동하고 Expin PCR purification kit(GeneAll, Seoul, Korea)를 사용하여 정제한 후, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 위해 시퀀싱 분석 서비스(Macrogen, Daejeon, Korea)를 의뢰하였음.

- 시퀀싱된 16S rRNA 유전자 염기서열 결과를 바탕으로 NCBI BLASTn 데이터베이스에 등록된 다른 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열과 비교 분석하였음. ClustalW 알고리즘으로 염기서열을 정렬한 후 Tamura-Nei 모델과 1,000회의 부트스트랩(bootstrap) 방법으로 MEGA 프로그램을 사용하여 계통수(neighbor-joining tree)를 작성하였음(그림 33). 상기 서열번호를 이용하여 계통수를 작성한 결과, KRA20-207은 *Streptomyces wistariopsis* JCM 4688 균주와 가장 근연하여(99% 이상 상동성), KRA20-207를 *S. wistariopsis* KRA20-207 균주로 명명하였음(그림 33).



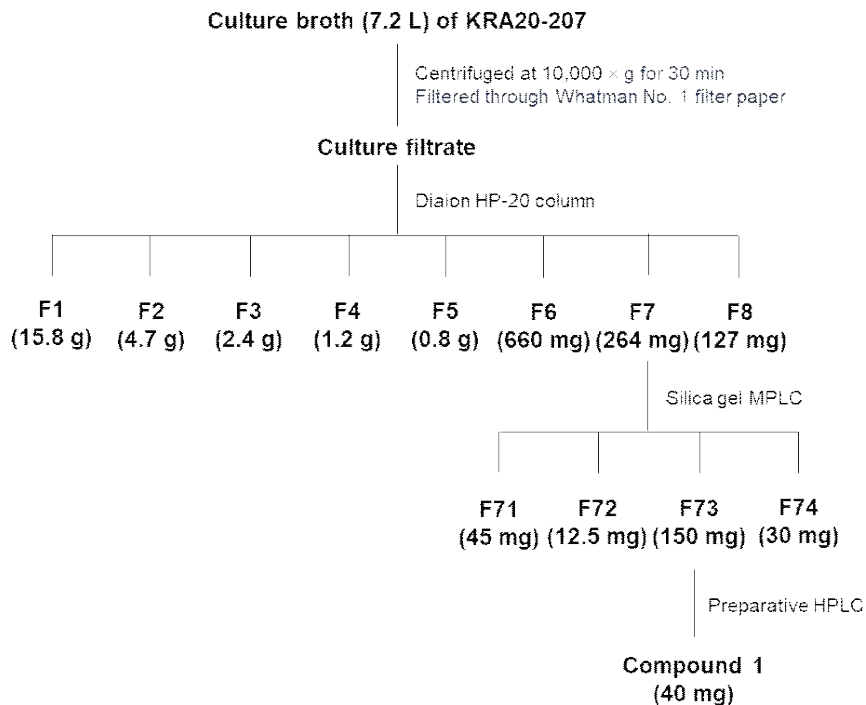
<그림 33. KRA20-207의 형태학적 특징 및 분자계통학적 분석. (A) Bennett 한천배지에서 배양한 KRA20-207 균주의 균총 사진. (B) 16S rRNA 유전자 기반 계통수>

나. *S. wistariopsis* KRA20-207 배양여액으로부터 유효활성물질 분리 및 구조 동정

- KRA20-207 배양여액으로부터 버키다리병균에 대한 항균활성물질을 분리하기 위해, Bennett 한천배지에 형성된 KRA20-207 단일 균총을 500 mL-baffled Erlenmeyer flask에 100 mL의 M3 배지에 접종하고, 27℃에서 1일 동안 160 r/min로 진탕하여 전배양하였음. 2 L-baffled Erlenmeyer flask에 담긴 400 mL의 M3 배지에 전배양액을 1% 접종하고, 면전으로 플라스크 입구를 막은 다음, 27℃에서 1주일 동안 160 r/min로 진탕 배양하여 균주 배양액(7.2 L)을 얻었고, 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분리한 후, 여과지로 걸러서 배양여액을 제조하였음.
- 분액여두(separatory funnel)에 KRA20-207 배양여액을 넣고 동량의 에틸아세테이트와 혼합하여 진탕시킨 다음 정치하고 층 분리가 일어나면 유기용매층 및 수용액층을 얻었음.

수용액층에 다시 동량의 부탄올을 혼합하여 진탕시킨 다음 정지하여 유기용매층을 분리하고 각각을 감압농축하여 에틸아세테이트 분획물(0.5 g), 부탄올 분획물(2.9 g), 물 분획물(18.2 g)을 획득하였음.

- 베키다리병균 B14를 대상으로 분획물의 항균활성을 시험하였음. 96-웰 플레이트의 100 μ l 웰에 B14의 포자가 1×10^4 spores/mL 농도가 되도록 넣어주고, 분획물을 메탄올 또는 증류수에 20 mg/mL의 농도로 녹인 다음 각각 0, 0.8, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/mL의 농도가 되도록 각 웰에 처리하였음. 이때 1% 메탄올만 첨가한 것을 무처리구로 사용하였으며, 2일 동안 베키다리병균 생장이 최적인 온도에서 배양한 다음, 육안으로 관찰했을 때 부탄올 분획물이 25 μ g/mL의 최소억제농도를 나타냄을 확인하고, 이로부터 항균활성물질을 분리하는 실험을 수행하였음.
- 배양여액을 Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan) 컬럼에 흡착시키고, 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 메탄올 수용액 및 100% 아세톤으로 용출시켜, 분획물 F1-F8을 얻었음. 활성 분획물 F7 (264.5 mg)을 Biotage SNAP KP-Sil 카트리지(50 g)가 장착된 중압컬럼크로마토그래피(MPLC) 시스템에 로딩하고, 크로로포름-메탄올-물(9:1:0, 2:1:0.1, 12:10:1, 6:5:1, 3:8:1, v/v/v)을 500 mL씩 순차적으로 용출시켜, 분획물 F41-F44를 얻었음. 활성 분획물 F43(150 mg)을 YMC-Pack ODS-A 컬럼(250 \times 20 mm, 5 μ m)이 장착된 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 시스템에 로딩하고, 분당 5 mL 유속으로 73% 메탄올수용액을 용출시켜 화합물 1(40 mg)을 분리하였음(그림 34).

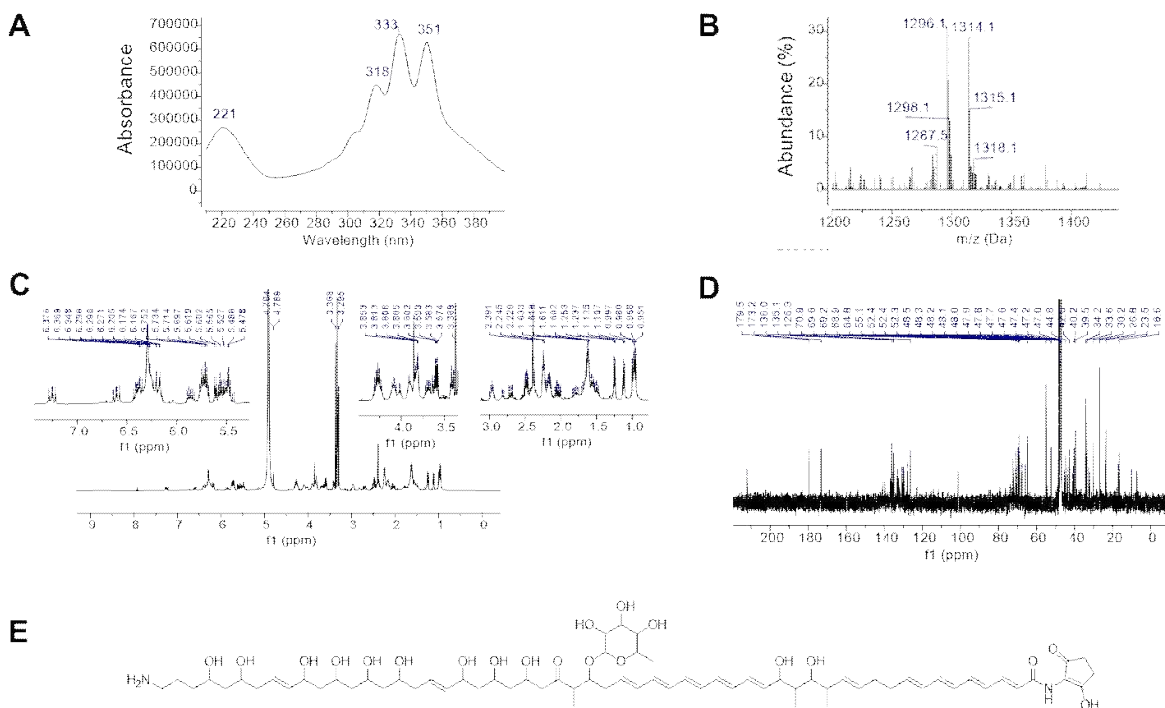


<그림 34. KRA20-207 균주로부터 화합물 1을 분리하는 공정도>

- 분리한 화합물 1의 화학구조 규명을 위하여 핵자기공명(nuclear magnetic resonance; NMR)과 질량분광분석(mass spectroscopy; MS) 방법을 사용하였음. 화합물 1을

CD₃OD(99.8 atom% D; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA)에 녹여 Bruker Avance 400 MHz 핵자기공명장치를 이용하여 ¹H-과 ¹³C-NMR 스펙트럼을 얻었고, 용매피크(δ_H 3.31 ppm; δ_C 49.0 ppm)를 기준으로 화학적 이동(chemical shift) 값을 δ (ppm)으로 나타내었음.

- 화합물 1은 손가락모양의 UV 흡광패턴(318, 333, 351 nm)은 pentaene 부분구조를 나타내고 있고, ESI-MS에서 m/z 1299 [M+H]⁺의 양이온으로 검출되었음(그림 35).
- 또한, 화합물 1의 ¹H-와 ¹³C-NMR 데이터는 ECO-02301(분자량 1298 Da)로 알려진 선형 폴리엔 화합물의 NMR 데이터와 일치함을 확인한 바, 화합물 1를 ECO-02301로 동정하였음(그림 35).



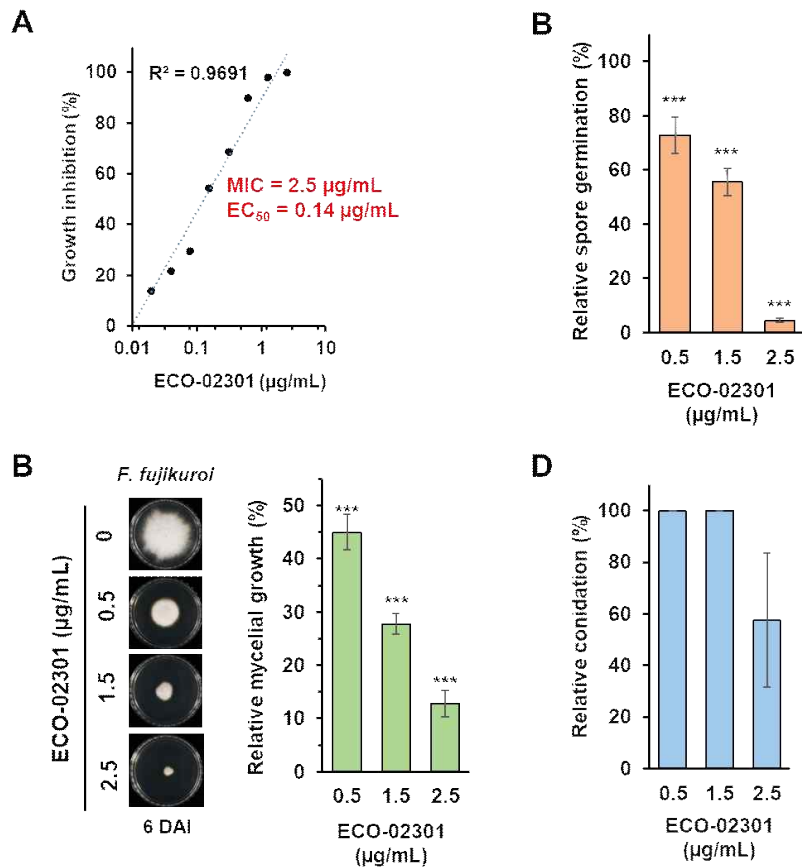
<그림 35. 화합물 1의 분광학 데이터 및 화학구조. (A) UV 흡광도. (B) ESI 양이온 데이터. (C와 D) ¹H 및 ¹³C NMR 데이터. (E) 화합물 1(= ECO-02301)의 화학구조>

다. KRA20-207로부터 분리된 유효생리활성물질 ECO-02301의 *in vitro* 활성 시험

- PDB 배지(BD Difco)에 베키다리병균의 포자 농도가 1×10^4 spores/mL이 되도록 준비한 다음 96-웰 플레이트의 각 웰에 99 μ l를 넣어주었고, 화합물 1(= ECO-02301)을 20 mg/mL의 농도로 메탄올에 녹인 다음 각각 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 μ g/mL의 농도가 되도록 각 웰에 처리하였으며, 이때 메탄올의 함량은 1% 미만이었으며, 1% 메탄올만 첨가한 것을 무처리구로 사용하였음. 96-웰 플레이트를 25°C에서 1일 동안 배양한 다음 육안으로 관찰했을 때, 곰팡이의 생장이 완전히 억제되는 농도를 MIC 값으로 결정하였고, OD₆₀₀ 값을 측정하여 EC₅₀ 값을 계산하였음.
- 화합물 1(=ECO=02301)이 베키다리병균의 포자발아에 미치는 영향을 조사하기 위해서

PDB 배지에 버키다리병균의 포자 농도가 5×10^5 spores/mL이 되도록 준비하고, 화합물 1을 0.5, 1.5, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가한 다음에 홀 슬라이드 글라스에 50 μL 씩 올려 25°C 상대습도 100%에서 6~12시간 배양하면서 광학현미경으로 포자발아(발아관이 포자의 장경보다 길게 자란 것을 발아한 것으로 간주함)를 모니터링하였고, 관찰한 포자의 수 대비 발아한 포자의 수를 백분율(%)로 나타내었음.

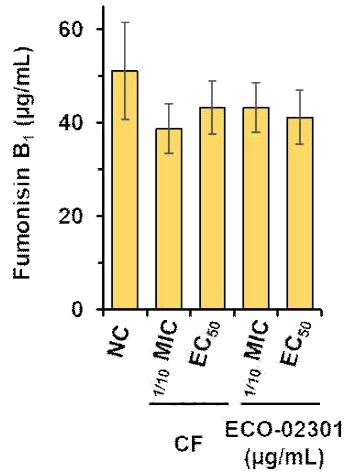
- 한편, PDA 배지를 고압멸균 후 배지가 완전히 식기 직전에 화합물 1(= ECO-02301)을 0.5, 1.5, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도가 되도록 첨가하고, 이를 페트리디쉬에 분주하고 굳힌 다음에 한천배지 중심에 버키다리병균의 균사디스크(1 mm²)을 접종한 후 25°C에서 6일 배양하고, 무처리구의 균총 지름 대비 처리구의 균총 지름을 백분율(%)로 계산하였음. 또한, 6일 배양한 페트리디쉬에 멸균수 10 mL을 넣고 붓으로 긁어서 포자를 수확하였고, 각 처리구의 균총의 면적과 포자의 수를 측정한 다음, 버키다리병균의 균총 단위 면적당 생성된 포자의 수를 계산하였음.
- 화합물 1(= ECO-02301)의 MIC 값과 EC₅₀ 값은 각각 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 과 0.14 $\mu\text{g/mL}$ 이고, 농도의존적으로 버키다리병균의 균사생장과 포자발아를 효과적으로 억제하는 효과를 나타내었으나, 포자형성에는 유의미한 수준의 영향을 주지는 않았음(그림 36).



<그림 36. 버키다리병균에 대한 화합물 1(= ECO-02301)의 *in vitro* 억제 활성. (A) MIC 및 EC₅₀ 값. (B) 포자발아 억제 효과. (C) 균사생장 억제 효과. (D) 포자형성 억제 효과>

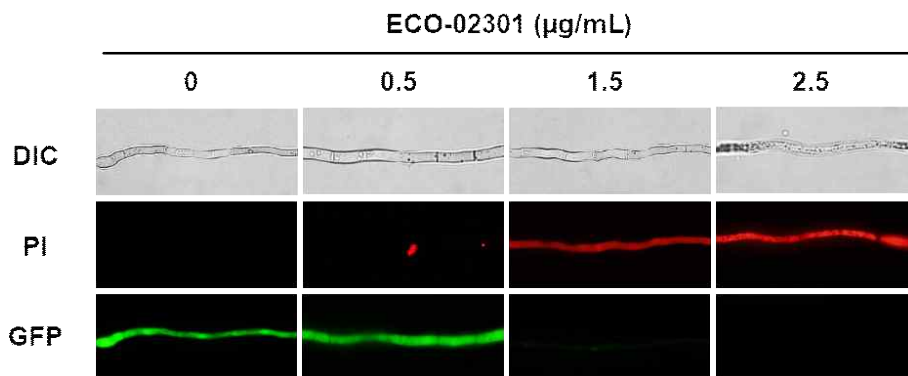
- KRA20-207 배양여액 또는 화합물 1(ECO-02301)이 푸모니신 생성에 미치는 영향을 조

사하기 위해서 앞서 기술한 방법에 따라 실험을 수행하였음. 배양여액 및 화합물 처리 후 6일째, 처리구들로부터 푸모니신을 정량분석한 결과, KRA20-207 배양여액과 화합물 1(= ECO-02301)은 살균활성농도 이하(1/10 MIC 및 EC₅₀)에서 벚키다리병균의 푸모니신 생산에 유의미한 영향을 미치지 않음을 확인함(그림 37).



<그림 37. KRA20-207 배양여액(CF)와 화합물 1(= ECO-02301)이 벚키다리병균 푸모니신 생산에 미치는 영향. NC, 무처리구>

- 화합물 1(= ECO-02301)의 살균활성 작용기전을 구명하고자, 화합물 1을 0.5, 1.5, 2.5 µg/mL의 농도로 PDB에 첨가하였고, 균사를 접종하고 25°C에서 24시간 배양한 후 균사에 propidium iodide (PI) 시약을 2 µM의 농도로 처리한 후 4°C에서 30분 기다린 후 형광현미경으로 관찰하였음. 또한, GFP 상시 발현 벚키다리병균 변이균주 GFP11(*F. fujikuroi* B14::pII99-GFP)의 균사를 이용하여 화합물 1(= ECO-02301)의 살균활성 정도를 비교 분석하였음. 화합물 1(= ECO-02301)은 1.5 µg/mL의 처리농도에서부터 벚키다리병균의 세포투과성에 영향을 주는 것을 확인하였으며, 그에 따른 살균활성이 나타남을 확인하였음(그림 38).



<그림 38. 벚키다리병균에 대한 화합물 1(= ECO-02301)의 세포투과성 활성. DIC, 미분간섭현미경; PI, propidium iodide 염색; GFP, green fluorescent protein>

- 순수분리한 화합물 1(= ECO-02301)의 여러가지 식물병원균에 대한 살균활성 스펙트럼을 조사하였음. 대상 병원성 곰팡이와 세균 및 실험방법은 앞서 적시된 KRA20-350 후보미생물의 활성 실험과 동일함. 표 8에서 확인되는 바와 같이, 화합물 1(= ECO-02301)은 0.1-1.6 µg/mL 농도 범위에서 여러 가지 식물병원성 곰팡이의 생장을 효과적으로 억제하

는 우수한 활성을 나타냈으나, 유의미한 항세균활성을 확인할 수 없었고, 항미생물 효과는 곰팡이를 대상으로 나타남을 확인함(표 8).

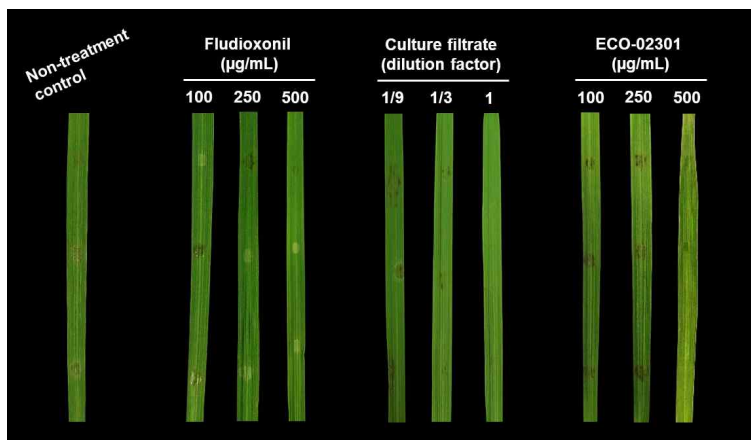
<표 6. 화합물 1(= ECO-02301)의 최소억제농도>

분류	학명	최소억제농도 (µg/ml)
식물병원성 곰팡이	<i>Alternaria brassicicola</i>	0.8
	<i>Botrytis cinerea</i>	0.1
	<i>Colletotrichum coccodes</i>	1.6
	<i>Phytophthora infestans</i>	0.4
	<i>Magnaporthe oryzae</i>	0.4
식물병원성 세균	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	>100
	<i>Burkholderia glumae</i>	>100
	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	>100
	<i>Erwinia amylovora</i>	>100
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	>100

라. 벼키다리병균에 대한 화합물 1의 *in vivo* 활성 시험

- 화합물 1(= ECO-02301)의 *in vivo* 방제 효과 실험을 위해, 종자소독제(스포탁, 한국삼공) 처리 후 최아처리한 벼(*Oryzae sativa* L. cv. Chuchung) 종자를 수도용 상토(부농)에서 2엽기 까지 생육시켜 실험에 사용하였음.
- 약제를 처리하기 전 엽면에 Tween 20을 250 µg/mL 엽면 사포 후 KRA20-207 배양여액(9배, 3배 희석액 및 원액), 화합물 1 또는 대조약제(100, 250, 500 µg/mL)를 점 접종법으로 5 µL 씩 처리하였고, 풍건한 후 벼키다리병균의 포자현탁액(1×10^4 spores/mL)을 약제가 처리된 동일 지점에 점 접종법으로 5 µL씩 접종하고, 28°C, 상대습도 100%에서 12시간 광암조건에서 2일 배양한 후 형성된 병반면적율(%)을 조사하여 병방제가(%)를 하기 식을 이용하여 계산하였음.

$$\text{병 방제가(\%)} = [1 - (\text{처리구의 병반면적율} / \text{무처리구의 병반면적율})] \times 100$$



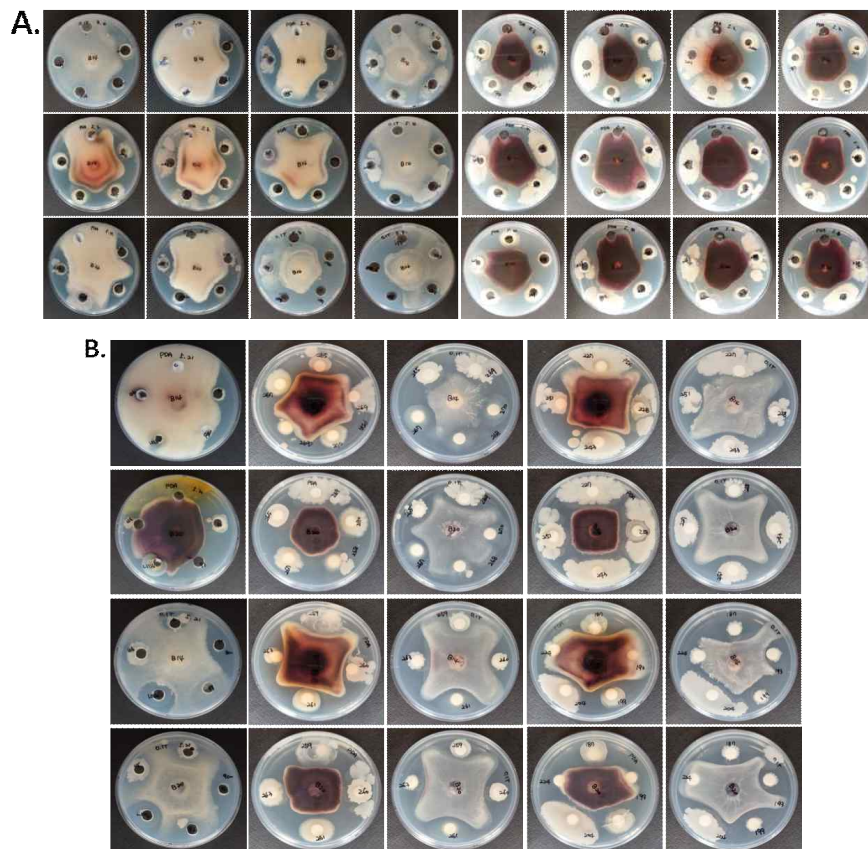
<그림 39. 화합물 1(= ECO-02301)의 벼키다리병 방제 효과>

- KRA20-207 배양여액 원액 처리구 및 화합물 1(=ECO-02301)의 500 µg/mL 처리구에서 97% 이상의 벼키다리병 방제 효과를 확인할 수 있었음(그림 39).

(4) 상업화 후보 길항미생물 *Bacillus velezensis* JG260 선발

가. 길항미생물 JG260의 선발 및 항균활성 비교 분석

- 키다리병균 B14 및 B20 균주에 대한 억제 효과를 시험하기 위하여 PDA 배지와 1/10TSA 배지(Tryptic Soy Broth 3g, Agar 18g/증류수 1L)에서 대치 배양하였음. 병원균 Disc를 각 배지 중앙에 올리고 2~3일간 25°C에서 진탕 배양(25°C, 160 rpm)한 후 분리된 미생물 배양액을 병원균 주변에 일정한 간격을 두고 접종하였음. 병원균과 미생물을 함께 접종한 배양기를 25°C에서 1주일 동안 더 배양하면서 병원균의 성장을 잘 억제하는 미생물 균주를 선발하였음.
- 다양한 시료에서 세균 100여 종을 순수 분리하였고 100여 종의 길항 미생물 균주들을 줄기마름형 및 키다리형 병원균과 대치 배양한 결과 억제 효과가 좋은 5종(JG199, JG228, JG243, JG260, JG265)을 1차 선발함(그림 40; 표 7).



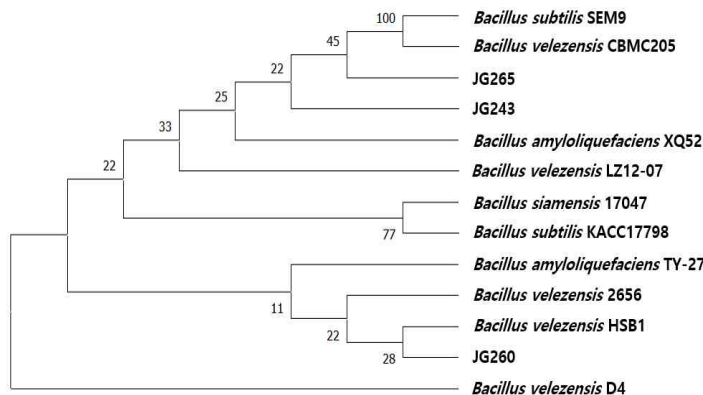
<그림 40. 줄기마름형(B14) 및 키다리형(B20) 균주와 길항 미생물과의 대치 배양. (A) 분리 미생물과 병원균과의 대치 배양 시험. (B) 억제 활성이 좋은 균주의 억제 효과 시험>

<표 7. 주요 분리 미생물의 줄기마름형(B14) 및 키다리형(B20) 병원균 억제 활성>

균주명	줄기마름형(B14)		키다리형(B20)	
	0.1 × TSA	PDA	0.1 × TSA	PDA
KRICT_#142	+	-	+	+
KRICT_#143	+	-	+	+
KRICT_#144	+	-	+	+
KRICT_#145	+	-	++	+
KRICT_#146	+++	++	+++	++
KRA20-350	+++	++	++	++
KRA20-207	++	++	++	++
JG199	+++	+++	+++	+++
JG204	++	++	++	++
JG219	++	+	+	++
JG228	++	++	++	++
JG229	++	++	++	++
JG243	++	++	+++	+++
JG251	+	++	++	+++
JG258	++	++	+	++
JG260	+++	++	++	+++
JG261	++	+	++	+
JG263	++	+	-	++
JG265	+++	++	++	+++
JG267	+++	+	+	++

*세균의 길항력은 28℃에서 7일간 배양한 후 균사 생장 억제 정도를 측정하였음:
+, <3mm; ++, 4-5mm; +++, 6-7mm

- 본 과제를 통해 선발된 후보 길항미생물들 가운데, 살균활성이 가장 우수하며 대량배양이 용이하여 상업화 가능성이 높은 JG260 균주를 최종 상업화 후보균주로 선정하였음. 후보미생물을 선발하는 과정에서 신규로 발굴된 길항미생물에 대한 추가 동정을 실시하였음. 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석한 결과 JG199와 JG228 균주는 *Paenibacillus polymyxa* 와 99%의 상동성을 나타냈으며 JG243, JG260과 JG265 균주는 *Bacillus velezensis*와 99% 상동성을 보였음(그림 41).



<그림 41. JG260 상업화 균주 및 선발미생물 (JG243, JG260, JG265) 균주들의 계통분류학적 분석>

○ 또한, 상업화 후보균주로 선발된 JG260의 생리·생화학적 분석은 경상대학교 공동실험실습관에 의뢰하여 VITEK 시스템으로 조사하였음(표 8).

<표 8. 최종 선발미생물 JG260 균주의 생화학적 분석(VITEK)>

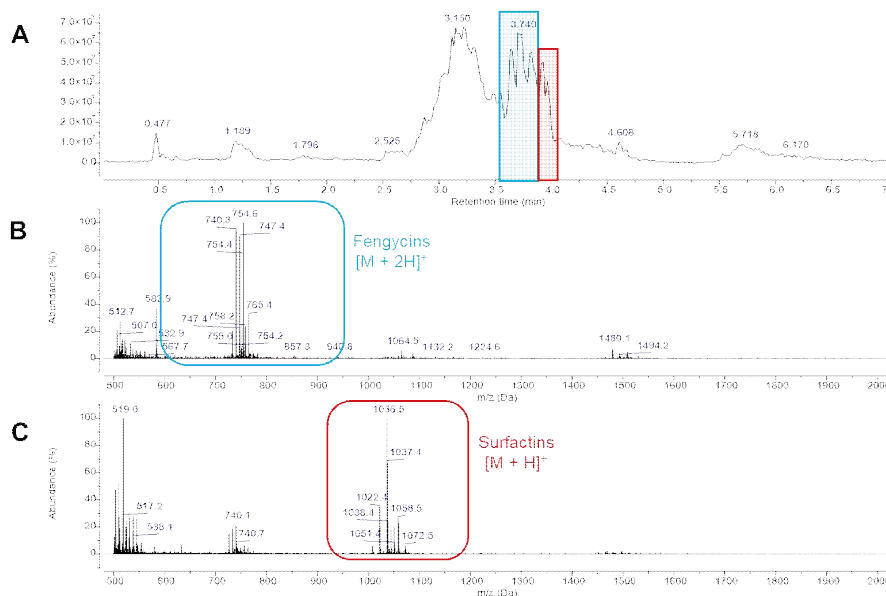
Characteriatic	JG260	Characteriatic	JG260
β-Xylosidase	+	D-Mannitol	+
L-Lysine-Arylamidase	-	D-Mannose	+
L-Aspatate Arylamidase	-	D-Melezitose	-
Leucine Arylamidase	-	N-Acethyl-D-GlucosamineAG	-
Phenylalanine Arylamidase	-	Palatinose	+
L-Proline Arylamidase	-	L-Rhamnose	-
β-Galactosidase	-	β-Glucosidase	+
L-Pyrrolydonyl-Arylamidase	+	β-Mannosidase	-
α-Galactosidase	+	Phosphoryl Choline	-
Alanine Arylamidase	-	Pyruvate	+
Tyrosine Arylamidase	-	α-Glucosidase	-
β-N-Acethyl-Glucosaminidase	-	D-Tagatose	-
Ala-Phe-Pro Arylamidase	+	D-Trehalose	+
Cyclodextrine	-	Inulin	-
D-Galactose	-	D-Glucose	+
Glycogene	+	D-Ribose	+
myo-Inositol	+	Putrescine assimilation	-
Methyl-A-D-Glucopyranoside acidification	+	Growth in 6.5% NaCl	+
Ellman	-	Kanamycin Resistance	-
Methyl D-Xyloside	-	Oleandomycin resistance	-
α-Mannosidase	-	Esculin hydrolyse	+
Maltotriose	-	Tetrazolium Red	+
Glycine Arylamidase	-	Polymixin B Resistance	-

나. JG260 상업화 균주의 유효생리활성물질 분리 및 구조 분석

○ TSB 배지를 400 mL씩 채운 2 L-Erlenmeyer flask를 5개 준비하고, JG260 균주의 단일 균총을 접종한 후 30°C에서 3일 동안 진탕배양(150 r/min) 하였음. JG260 균주배양액(2 L)를 원심분리(10,000 × g, 20 min)하고, 여과지(Whatman No. 1)로 걸러서 배양여액을 제조

하였음.

- 유효생리활성물질의 특성(지용성, 수용성)을 규명하기 위해 용매분획을 수행하였고, 분액여주(separatory funnel)를 사용하여 배양여액을 동량의 에틸아세테이트, 부탄올로 2회씩 순차적으로 추출하여, 에틸아세테이트층(57 mg), 부탄올층(76.4 mg), 물층으로 나누고, 각각 감압농축하여 건조시켜 용매분획물을 제조하였음. 용매분획물 중에서 부탄올추출물에서 *F. fujikuroi*의 균사생장을 억제하는 효과가 나타남(최소억제농도 = 125 µg/mL). 부탄올추출물을 5 mg/mL의 농도로 메탄올에 녹여서 시료를 준비하고 RP-18 UPLC 컬럼이 조합된 Waters ACQUITY UPLC 시스템에 시료를 주입하고, Waters SQ Detector 2를 사용하여 ESI-MS 분석을 수행하였음.
- 아세트나이트릴 수용액 농도구배 조건(5%-100%)에서 Rt 3.53-3.88분에 m/z 740, 747, 754, 765 [M + 2H]⁺의 fengycin과 Rt 3.90-4.02분에서 m/z 1022, 1036, 1051 [M + H]⁺의 surfactin이 검출되었음(그림 42).



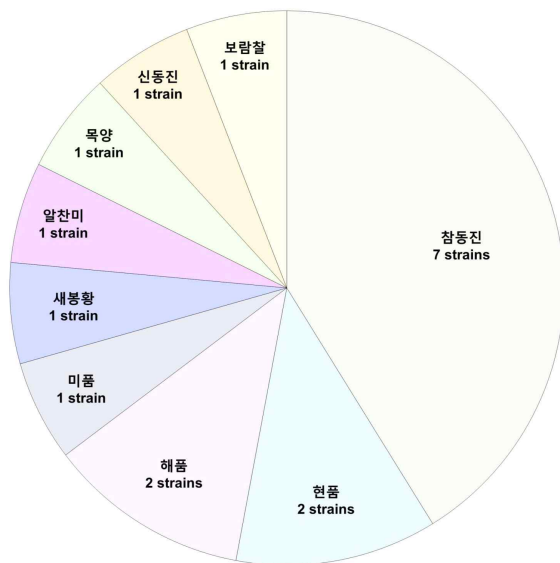
A, Total ion chromatography (TIC) for JG260; B and C, ESI positive MS spectra at retention time of 3.53–3.88 min (blue) and 3.90–4.02 min (red), respectively.

<그림 42. JG260 균주 배양여액의 부탄올분획물을 UPLC-ESI-MS로 분석>

- 따라서, 상업화 후보균주 JG260 배양액에서 키다리병균에 활성을 나타내는 물질은 펩타이드 항생물질 fengycin과 surfactin으로 분석되었음(그림 43).

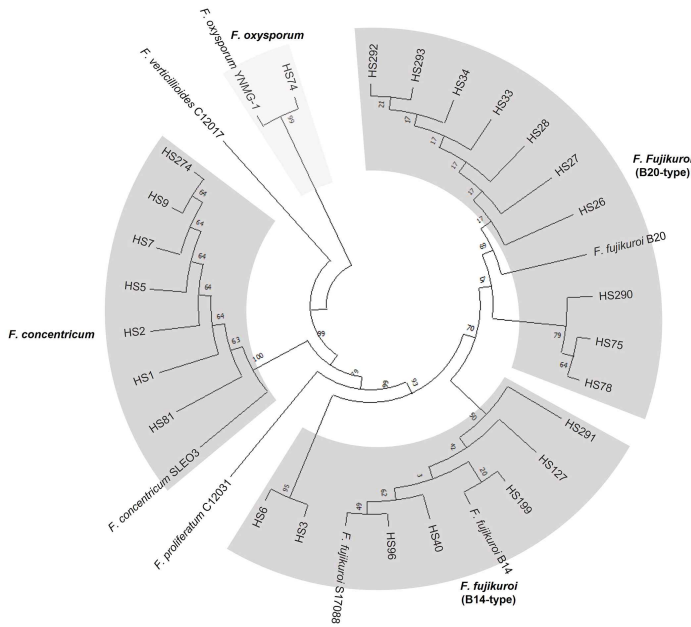
에는 다양한 푸자리움 근연종들이 포함되어 있으며 일반적으로 균류 동정에 이용되는 DNA 바코드 서열인 internal transcribed spacer(ITS)로는 벼 키다리병균을 정확히 동정할 수 없음. 따라서, 벼키다리병균으로 추정되는 균주를 동정 하기위해 ITS와 translation elongation factor 1-alpha(*TEF1a*) 유전자 염기서열을 이용하여 분자 동정하였음.

- 일반적으로 균류를 분자 동정할 때, genomic DNA를 독성 유기용매를 사용해서 추출하는 과정이 필요함. 해당 과정은 매우 복잡하고 시간이 많이 소모되는 단점이 있음. 이를 해결하기 위해 genomic DNA를 추출하지 않고 소량의 균사를 직접 PCR 반응 혼합물에 넣어 표적 염기서열을 증폭하는 direct PCR 방법을 개발함(그림 44). 이 direct PCR 방법을 이용하여 벼 키다리병균 추정 균주들을 단시간에 효율적으로 분자 동정할 수 있었음.
- 분리된 28개 균주의 ITS와 *TEF1a* 부분을 증폭하여 염기서열분석을 수행하고 분석된 염기서열들을 NCBI, Fusarium MLST 데이터베이스(<https://fusarium.mycobank.org/>)에서 BLASTN 분석한 결과 17 균주가 벼키다리병균으로 동정이 되었음. 참동진 품종에서 가장 많은 7 균주가 분리되었고, 현품, 해품에서 각각 2 균주, 보람찰, 신동진, 목양, 알찬미, 새봉황, 미품에서 각각 한 균주씩 분리되었음을 확인함(그림 45).



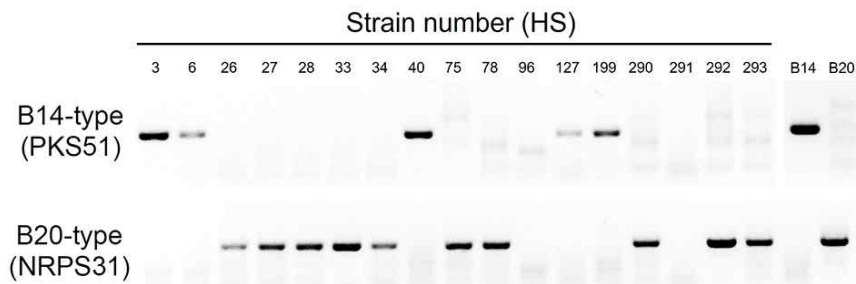
<그림 45. 품종별 벼키다리병균 분리 빈도>

- 선행연구를 통해 벼 키다리병의 대표적인 증상인 지베렐린(gibberellin) 과다 생성으로 인한 키다리 증상' 뿐만 아니라 벼의 줄기 성장을 위축시킨 후 말라 죽게 하는 '줄기마름 증상'을 야기하는 또 다른 병원형의 키다리병균이 있음이 구명됨. '줄기마름 증상' 병원형 균주(stunt pathotype, B14-type)는 푸모니신 생합성 유전자만, '키다리 증상' 병원형 균주(bakanae pathotype, B20-type)는 지베렐린 생합성 유전자만 특이적으로 발현하며 이들 이차대사산물의 생합성 유무가 두 가지 병원형 발생의 직접적인 원인임이 알려짐. 줄기마름형 대표균주 (*F. fujikuroi* B14)와 키다리형 대표균주(*F. fujikuroi* B20)를 참조균주로 포함하여 *TEF1a* 유전자 염기서열을 이용해 계통도를 분석한 결과 분리된 균주들이 각각 줄기마름형 (B14-type) 또는 키다리형(B20-type)으로 나뉠 수 있었음(그림 46).



<그림 46. 분리된 균주들의 TEF1a 염기서열을 이용한 계통 분석 결과>

- 선행연구에서 유전체 비교를 통해 줄기마름형 병원형 균주(B14-type)에는 푸모니신 생합성 유전자군이, 키다리형 병원형 균주(B20-type)에는 지베렐린 생합성 유전자군이 각각 특이적으로 존재함을 확인함. 이를 기반으로 개발된 푸모니신 생합성 유전자(*PKS51*), 지베렐린 생합성 유전자(*NRPS31*) 특이적인 프라이머 세트를 이용하여 분리된 벚키다리병균들의 병원형을 예측하고자 함. Direct PCR을 수행하여 증폭산물들을 전기영동해 본 결과 대부분의 균주들이 계통분석 결과와 일치함을 확인할 수 있었음(그림 47). 줄기마름형 병원형 균주들 중 PCR 방법을 이용한 병원형 예측이 어려운 경우가 있다는 선행연구결과와 앞서 수행한 *TEF1a* 염기서열을 이용한 계통도 분석 결과에 따라 HS96과 HS291 균주에서 두 프라이머 세트들을 이용한 PCR 반응에서 모두 증폭산물을 얻지 못한 원인은 두 균주 모두 줄기마름형 병원형 균주들이기 때문이라고 추측됨.



<그림 47. 키다리병균 병원형 진단용 프라이머를 이용한 PCR 결과>

- 푸모니신 생성유무를 확인하기 위해 분리한 균주들을 쌀배지에서 3주간 배양한 후 85% 메탄올을 이용하여 푸모니신을 추출하여 Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 수행함(표 9). 총 17 균주 중 푸모니신을 생성한 7 균주는 모두 계통수분석과 PCR 진단 결과에서 B14-type 병원형에 속하는 균주들임. 한편, 푸모니신이 검출되지 않은 10개 균주들은

B20-type 병원형에 속하는 균주들로 확인할 수 있었음. 계통수분석과 PCR 진단 결과는 실제 푸모니신 분석결과와 모두 일치함을 확인함.

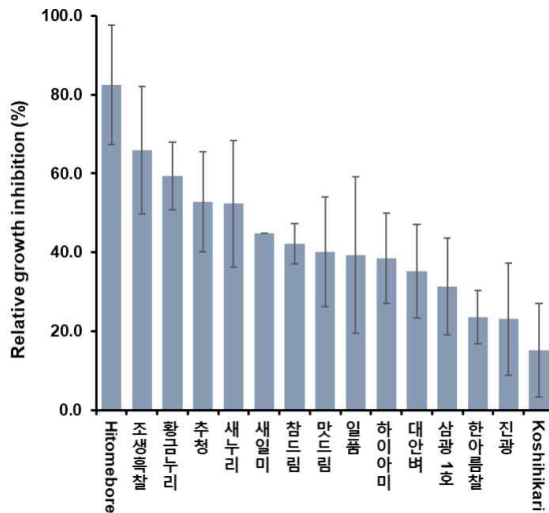
<표 9. 별씨로부터 분리된 키다리병균 균주들의 푸모니신 생성량>

균주	품종	병원형 (B14/B20-type)	푸모니신 생성량(mg/g)
HS3	현품	B14	46 ± 10
HS6	현품	B14	53 ± 13
HS26	참동진	B20	ND
HS27	참동진	B20	ND
HS28	참동진	B20	ND
HS33	참동진	B20	ND
HS34	참동진	B20	ND
HS40	보람찰	B14	72 ± 20
HS75	해품	B20	ND
HS78	해품	B20	ND
HS96	미품	B14	117 ± 25
HS127	알찬미	B14	122 ± 33
HS199	목양	B14	85 ± 30
HS290	신동진	B20	ND
HS291	새봉황	B14	205 ± 99
HS292	참동진	B20	ND
HS293	참동진	B20	ND

- 키다리병균 B14에 대하여 벼 품종에 따른 줄기마름형 병 발생 차이를 조사하기 위하여 2021년 한국에서 재배하는 벼 품종의 재배 면적이 0.1% 이상인 품종을 선별하여 씨앗은행으로 분양받았음. 조생중계 품종의 진광과 조생흑찰, koshihikari, 중생중계 품종의 하이아미와 맛드림, 삼광 1호, 화선찰벼, 한아름찰, hitomebore, 중만생중계 품종의 대안벼와 새누리, 일품, 황금누리, 새일미, 참드림 그리고 한국화학연구원에서 보유하고 있는 추청을 포함하여 총 15 가지의 품종을 이용하였음.
- 15 품종에 대한 병 발생 정도를 확인하기 하기 위해, 가로 20 mm, 세로 150 mm의 시험관을 사용하여 원예용 상토와 버미큘라이트를 3:1의 비율로 상토를 준비하고, 4 cm 정도 상토를 채운 뒤 25°C, PDA에서 7일 동안 배양한 B14의 직경 9 mm의 agar block을 올려주었음. 이후 준비한 상토를 1.5 cm 채운 뒤 최아 처리한 종자를 1 cm 깊이로 심어주었음. 식물이 자라기 위해 증류수 3 mL을 관수해주었고, 공기가 통하는 플라스틱 뚜껑을 덮어두었다. 종자의 최아 처리는 스포탁을 2000배 희석액에 28°C에서 24시간 침지한 후 증류수에 28°C에

서 24시간 침지하였음. 식물체를 7일 동안 배양한 뒤 지상부 길이를 측정하여 방제가를 조사하였음.

- 실험에 사용된 15개의 품종 중, hitomebore와 조생흑찰의 생장이 무처리구 대비 80%와 65.9%의 성장 억제율을 보였음. 진광과 koshihikari가 15.2%와 23.1%의 성장 억제율을 보였으며, 그 외의 품종은 약 60%에서 23% 사이의 억제율을 보였음(그림 48). 추청과 새일미 품종의 경우 잎의 백화 현상을 나타내었으며, hitomebore의 경우는 싹이 괴사하였음.



<그림 48. 벼 품종별 키다리병균 B14 접종에 따른 성장 억제 분석 결과>

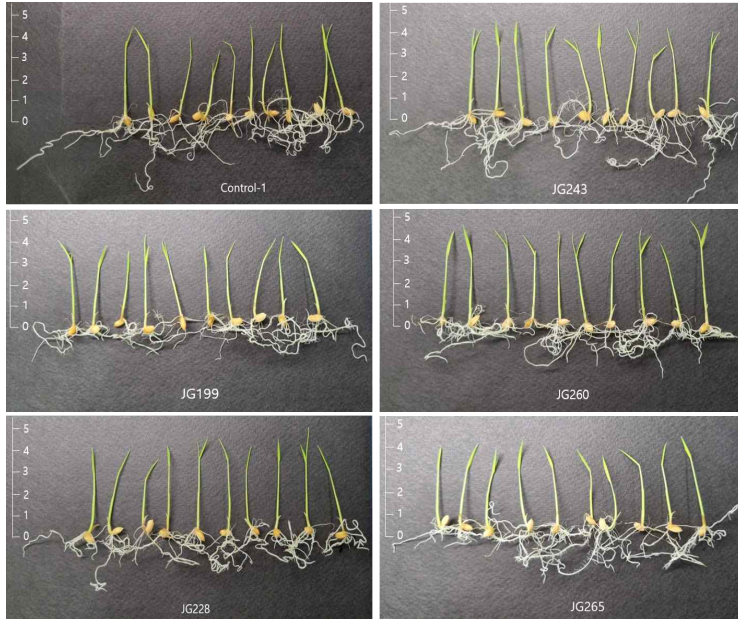
4) 후보미생물 JG260의 범사에 미치는 영향 조사

- 후보미생물 JG260을 포함하여 선발 미생물들의 벼 발아율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 미생물 균주를 0.5 × TSB 배지에서 24시간 동안 진탕배양 후 배양액을 범사에 처리하여 발아율을 조사하였음. 무처리구와 처리구로 나눠 각각 플레이트를 준비하고 증류수로 거즈를 적셔 수분을 유지하였고 플레이트 당 범사(추청벼) 50립씩 골고루 배치하였다. 무처리구에는 증류수 5 ml을 처리하였고 처리구에는 각 균주의 배양액(O.D.≈1.0)을 5 ml씩 접종한 후 뚜껑을 닫아 식물 생육상(28℃, 8h light, 16h dark)에 두고 4일간 관찰하였음. 모든 처리구는 3반복으로 시험하였고, 4일 후 완전히 발아된 범사만을 골라 각 처리구당 발아율을 계산하였음.

<표 10. 선발미생물 5 균주의 배양액 처리 4일 후 범사 발아율>

처리구	발아 범사 수(개)			평균	발아율(%)
	I 반복	II 반복	III 반복		
control 1(DW)	46	45	46	45.7	91.4
control 2(0.5 × TSB)	45	47	44	45.3	90.6
JG199	48	47	48	47.7	95.4
JG228	45	44	48	45.7	91.4
JG243	47	46	46	46.3	92.6
JG260	49	48	46	47.7	95.4
JG265	45	43	40	42.7	85.4

- 벼 발아율을 확인한 결과 JG265 균주를 제외한 처리구과 무처리구 모두 90% 이상의 발아율을 보였으며 그 중 JG199와 JG260 균주 처리구에서 가장 높은 발아율(95.4%)을 보였음(표 10). 발아된 벼씨들을 균주별로 확인한 결과 JG199 균주는 뿌리 생장이 다른 처리구와 비교해 저조한 것을 볼 수 있었음(그림 49).



<그림 49. 선발 미생물 5 균주의 배양액 처리 후 벼씨 발아 모습>

5) 후보미생물 JG260의 대량배양 조건 조사

- 대량배양을 위하여 TSA 배지에서 배양된 JG260 균주의 단일콜로니를 50 ml TSB(Tryptic Soy Broth) 배지에서 12시간 동안 증배양하고, 배양액 30 ml를 3 L 배지에 첨가하여 24시간 배양하여 대량배양을 위한 종균으로 사용하였음. 500 L 배양기에 350 L 배지를 준비하고 종균배양액 5 L를 첨가하여 30℃에서 90~120 rpm으로 48시간 동안 배양하였음(표 11). 최종 배양액을 분말화한 후 생균수 및 sequencing으로 균주를 확인하였음.

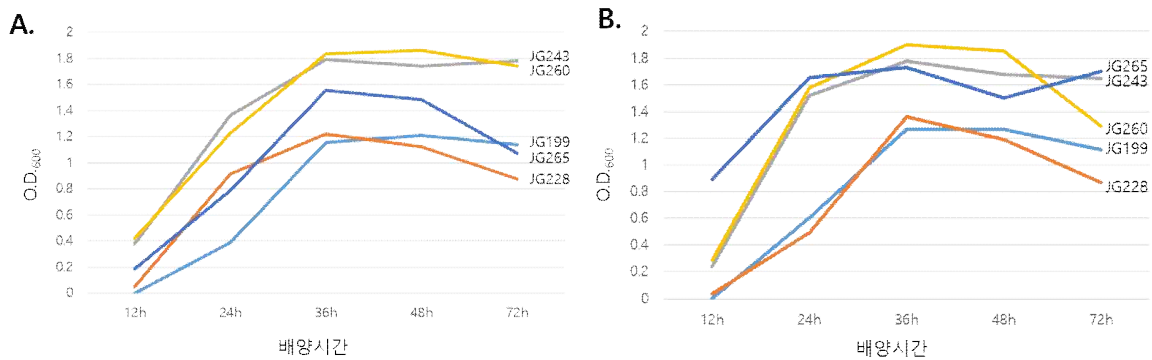
<표 11. *B. velezensis* JG260의 350L 배양 조건>

항 목	350 L 배양 조건
온도 (Temp.)	30 ± 0.5 ℃
시간 (h)	48
교반 속도 (RPM)	90 ~ 120 rpm
내압 (Inner pressure)	0.4 kg/cm ²
통기량 (Aeration rate)	0.5 ~ 0.6 vvm
종균 접종량	5.0 L/500 L (1%)

- 또한, 선발 미생물 5 균주를 20℃와 25℃에서 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 72시간 배양

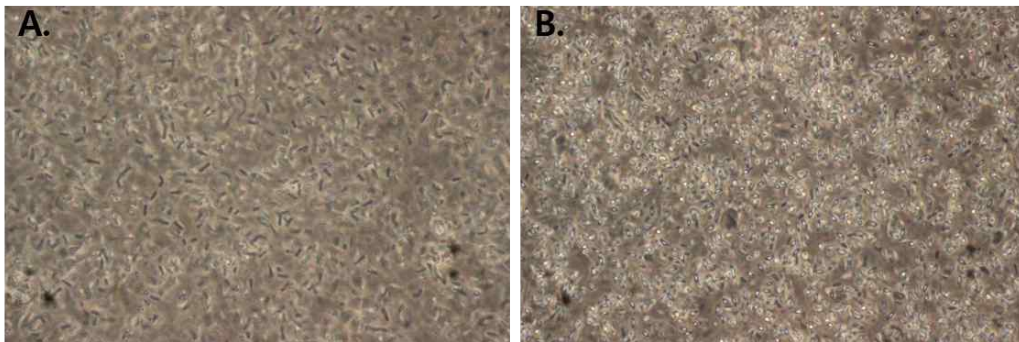
후 흡광도(OD₆₀₀)를 측정한 결과 5 균주 모두 배양 온도 20℃에서 36시간까지 증식기를 갖고 JG243과 JG260 균주는 72시간까지 높은 흡광도(OD₆₀₀=1.8)를 유지하였지만 JG199, JG228과 JG265 균주는 36시간 이후 흡광도(OD₆₀₀<1.5)가 떨어지는 것이 확인되었음.

- 반면, 배양 온도를 25℃를 유지할 경우, JG243과 JG260 균주는 20℃에서 배양할 때와 유사하게 흡광도가 유지되나 JG260 균주는 48시간째부터 흡광도가 떨어지기 시작하였음. JG265 균주는 20℃ 배양시보다 미생물 생장이 좋았고 JG199와 JG228 균주는 20℃ 배양시와 유사한 성장 곡선을 보였음(그림 50).



<그림 50. 선발미생물 5 균주의 온도 및 시간별 배양 곡선.(A) 배양 온도 20℃ (B) 배양 온도 25℃>

- 최종 선발된 *B. velezensis* JG260의 본 배양 시, 배양 44시간 이후에는 약 95% 정도의 포자 형성을 확인할 수 있었으며, 배양액과 최종 분말 원제의 생균수는 각각 2×10^8 cfu/ml와 5×10^{10} cfu/g 이었음(그림 51; 표 12).



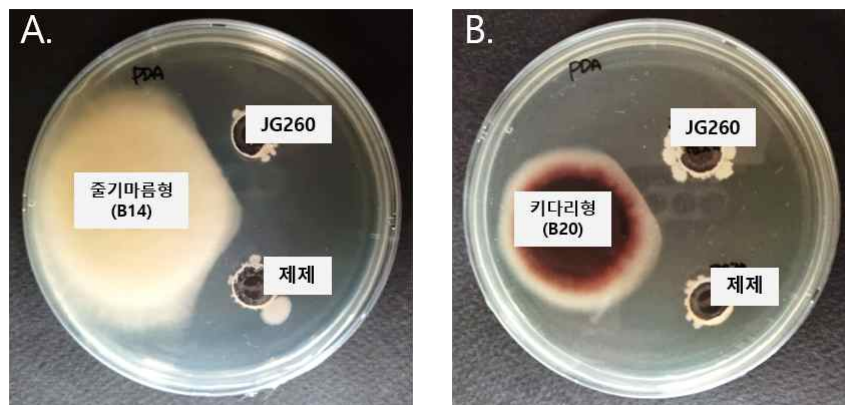
<그림 51. JG260의 대량 배양 중 포자 형성 확인(A. 영양세포, B. 포자형성)>

<표 12. *B. velezensis* JG260의 350 L 대량 배양 시간 및 균밀도>

항 목	작업 내용	
배양 시간	종균배양	24시간
	본배양	48시간
Q.C	배양액	2.1×10^8 cfu/ml
(균밀도)	건조 원제	5.0×10^{10} cfu/g

6) 후보미생물 JG260의 대량 생산 공정 개발 및 제제화

- 후보미생물 *B. velezensis* JG260의 원제와 유기농업자재에 허용된 부자재를 혼합하여 벚키다리병 병원균에 대한 억제 효과를 확인하며 혼합비율을 최적화하였음. 최적화된 제제를 시제품으로 생산하고 유기농업자재 공시 등록을 위하여 시제품의 미생물 동정 및 균수 분석을 인증시험 연구기관에 의뢰하였음.
- 미생물제제 2,000배 희석액과 JG260 균주 배양액의 벚키다리병 병원균(줄기마름형, 키다리형)에 대한 억제 효과를 확인하며 제제를 최적화하였음(그림 52, 53). 미생물제의 제품화를 위해 JG260 균주를 특허 미생물로 기탁(KACC81229BP) 하였으며, 제품명은 ‘키리에(Kyrie)’로 결정하고 상표 출원하였음. 개발 미생물제제의 미생물 동정 및 균수 밀도 분석 결과 *B. velezensis* 1.1×10^{10} cfu/g으로 확인되었음.



<그림 52. JG260 균주의 배양액과 제제 희석액의 벚키다리병(A.줄기마름형, B.키다리형) 병원균에 대한 억제 효과>



<그림 53. 개발 미생물제제(시제품) 및 내용물>

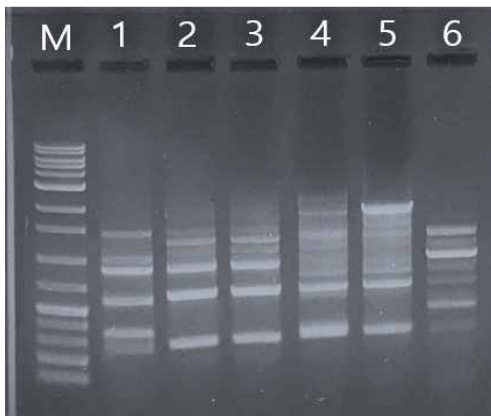
7) 개발 미생물제의 Q.C. 방법 확립

- *B. velezensis* JG260을 주성분으로 하는 미생물 제제의 품질관리를 위하여 균 수와 유전적 확인 방법을 시행하였음. 균 수는 희석평판법에 따라 3반복으로 수행하였고 0.1 × TSA 배지에 100 ul를 도말하고 28℃에서 48시간 배양하여 육안으로 균총 수를 확인하였으며, 개발 미생물 제제의 균 수는 평균 3.8×10^8 cfu/g으로 확인하였음(그림 54).



그림 54. JG260 미생물 제제 밀도 조사 결과

- 유전적 확인 방법으로는 BOX-PCR 방법을 선택하였으며, BOX-PCR 분석을 위한 프라이머는 BOXAR1(5'-CATCGGCAAGGCGACGCTGACG-3')을 사용하였음. PCR 조건은 초기 95℃에서 7분, 35회 반복되는 과정은 각각 90℃에서 30초, 40℃에서 1분, 72℃에서 3분, 최종 72℃에서 10분간 반응시켜 증폭시켰음. 이러한 과정을 거쳐 얻은 PCR 산물에 대해 1% LE agarose gel(Seakem)을 이용하여 밴드 패턴을 확인하였음. 원제(*B. velezensis* JG260)와 미생물제제의 주성분 미생물의 BOX-PCR 결과는 동일한 밴드 패턴을 보여주었음(그림 55).



- M. 1,000bp marker
- 1. YC7007(본사 바실러스 제품)
- 2. JG260_미생물제제
- 3. JG260_원제
- 4. *B. velezensis* KCTC13012
- 5. *B. methylotrophicus* KACC13105
- 6. *B. subtilis* subsp. *subtilis* KACC17798

그림 55. JG260 미생물 제제의 유전적 확인(BOX-PCR) 결과

8) 개발 미생물제제의 이화학 성분 및 잔류 농약 분석

(1) 열 안정성 시험

- 희석평판법 과정과 동일하게 시료를 준비하고 각 온도(20℃, 40℃, 60℃)별로 3시간 동안 시

협관을 보관하였음. 각 온도별 시료는 3반복으로 준비하였고 희석배수대로 각 3장의 1/10 TSA배지에 100 ul씩 분주한 후 glass roader로 문질러 균일하게 분포시켰음. 각 plate는 28℃에서 2-3일간 배양하였고 각 배지에서 자란 콜로니 수를 측정하였음. 안정성에 대한 평가는 처리 전 균 수와 처리 후 균 수의 차이를 계산하여 처리 전 균 수의 ±10배로 하여 허용범위를 정하였음.

- 농약 및 원제의 등록기준[제2023-13호]에 따라 열 안정성 시험을 실시한 결과 ‘키리에’의 유효성분인 *B. velezensis*의 처리 전·후 생균수 변화가 허용범위 안에 있어 처리별 온도에서 안정하다고 판단됨(표 13).

표 13. ‘키리에’의 온도별 열 안정성 결과

LOT No.	처리 전 (10 ⁸ cfu/ml)	처리 후(10 ⁸ cfu/ml)		
		20℃	40℃	60℃
1	5.8	4.7	7.7	9.2
2	7.8	5.4	7.8	11.2
3	7.5	3.8	6.0	10.2
평균	7.0	4.6	7.2	10.2

(2) 경시변화시험(가열 안정성)

- 실제 상품화될 포장용기(PE, 원통형, 원터치뚜껑)에 ‘키리에’를 담아 54 ± 2℃ incubator에 보관하며 시험개시일과 2주 경과 시마다 유효성분의 생균수를 희석평판법으로 조사하였음. 각 시료는 3반복으로 시행하였고, 시험개시일 균 수와 2주 경과 시마다 시험한 균 수의 차이를 계산하여 시험개시일 균 수의 ±10배로 하여 허용범위를 정하였음.
- 가열 안정성 시험을 실시한 결과 54 ± 2℃에서 10주간 보관하여도 ‘키리에’의 유효성분인 *B. velezensis*의 생균수 변화가 허용범위안에 있음을 확인하였음. 농약 및 원제의 등록기준에 따라 약효보증기간 1년 추가시는 54 ± 2℃에서 2주일씩 추가됨으로 ‘키리에’의 약효보증기간은 5년으로 볼 수 있음(표 14; 그림 56).

표 14. ‘키리에’의 경시변화시험에 따른 생균수 변화

LOT No.	생균수(10 ⁸ cfu/g)					
	시험 개시일	2주차	4주차	6주차	8주차	10주차
1	5.8	6.6	2.9	9.1	15	9.7
2	7.8	5.9	1.4	8.6	13	8.0
3	7.5	7.6	1.0	8.6	14	8.6
평균	7.0	6.7	1.8	8.8	14	8.8

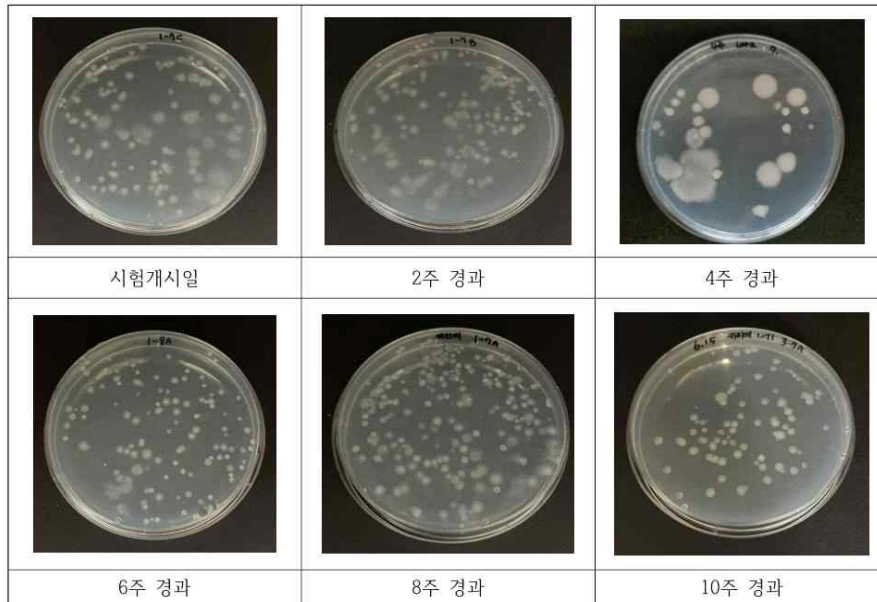


그림 56. '키리에'의 경시변화시험시 2주 간격 대표 플레이트 사진

(3) 병원성 미생물 분석

○ '키리에' 시제품에 병원성 미생물의 포함 여부를 확인하기 위해, 시제품 25g을 취하여 병원성 미생물 5종(병원성 대장균, 병원성 살모넬라, 황색포도상구균, 리스테리아 모노사이토제네스, 바실러스 세레우스)을 위한 각 종균 배지에 도달한 후 적정 배양온도와 배양시간이 경과한 후 병원성 세균(콜로니)의 유무를 확인하였음(표 15). 그 결과, '키리에'로부터 대상 병원성 미생물 5종은 검출되지 않았음(그림 57).

표 15. 병원성 미생물 검사방법

병원성 미생물	사용배지	배양온도(℃)	배양시간(h)	판별방법
병원성 대장균 (<i>Escherichia coli</i> O157:H7)	MacConkey Sorbitol	37	18	sorbitol을 분해하지 않는 무색집락을 취하여 EMB 한천배지에 내양하여 녹색의 금속성 광택이 있는 콜로니의 유무확인
병원성 살모넬라 (<i>Salmonella</i> spp.)	Xylose Lysine Desoxycholate Agar	37	24	검은색 환을 가진 붉은색 콜로니의 유무 확인
황색포도상구균 (<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>)	Baird Parker Agar	37	24	검은색 콜로니의 유무 확인
리스트리아 모노사이토제네스 (<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>)	Oxford Agar	37	24~48	검은색 콜로니의 유무 확인
바실러스 세레우스 (<i>Bacillus cereus</i>)	Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar	30	24~48	연분홍색 콜로니의 유무 확인

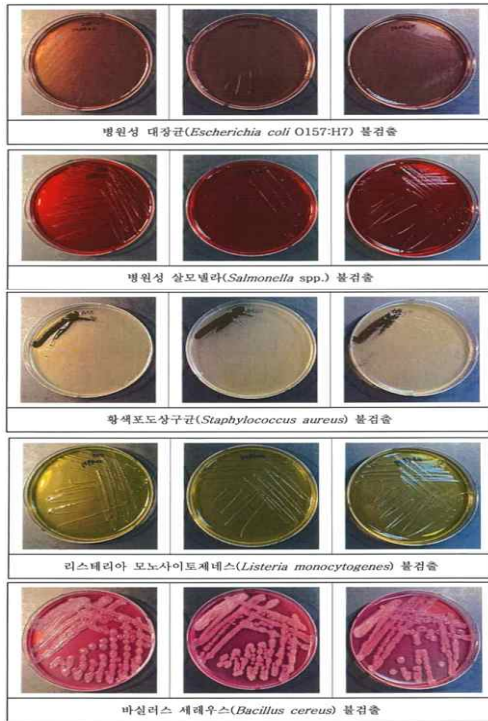


그림 57. 병원성 미생물 검사 결과

(4) 잔류농약 검사

- ‘키리에’ 제품에 대한 2,4,6-trichlorophenol 외 463종의 농약 성분의 정량한계 검출 여부를 분석한 결과 불검출되었음.

9) 미생물제제 ‘키리에’의 풋트 효과 시험

(1) 병원균 준비

- 시험에 사용할 벼키다리병 병원균(B14, B20)에 감염된 흙을 만들기 위하여 2종의 벼키다리병 병원균(B14, B20)을 PDA 배지에 접종하고 포자가 형성될 때까지 28℃에서 2주간 배양하였다. 일반 흙과 수도용 상토를 채에 걸러 불순물을 제거한 흙 250g과 잘게 썰은 감자 25g을 삼각플라스크에 넣고 멸균하였고 각각의 키다리병 병원균 디스크(직경 0.5 mm) 5개를 멸균된 삼각플라스크에 병원균 별로 구분하여 넣고 흙과 잘 섞이도록 혼합하였음. 병원균이 접종된 삼각플라스크를 1주일에 한 번씩 잘 섞어주며 28℃에서 약 한 달간 배양하였음. 삼각플라스크의 옆면과 흙 겉면에 병원균이 자라는 것을 확인하고 각각의 병원균이 자란 흙을 채(2 mm mesh)에 걸러 고운 흙을 분리하여 병원균 접종원으로 사용하였음. 병균 접종원의 밀도는 Fusarium 선택배지(2.5 mg malachite green, 10 g potato dextrose broth, 15 g agar/1 L DW, 멸균 후 30 mg streptomycin)에서 배양한 후 콜로니 수로 확인하였음.

(2) ‘키리에’ 종자처리

- 볍씨(영호진미)를 소금물(4.24 g/20 L)에 담궈 위로 뜨는 볍씨는 제거하고 가라앉은 볍씨만 골라 상수로 여러번 세척하였음. 무처리구(상수)와 ‘키리에’ 처리구(500배, 1,000배, 2,000배

희석액)를 준비하여 볍씨 약 120 g씩을 담귀 상온에서 48시간 동안 침지 후 포트에 파종하고 뚜껑을 덮어 상온에서 7일간 키웠음.

(3) 온실 포트 시험

- 포트 시험에 사용할 흙은 일반 흙과 수도용 흙을 동일한 비율로 혼합하였고 평균한 흙과 평균하지 않은 흙으로 준비하였음. 평균된 흙은 병원균을 접종(10 g/kg, 6×10^5 cfu/g)한 처리구와 병원균을 접종하지 않은 비접종 처리구로 준비하였으며, 평균하지 않은 흙도 같은 방법으로 접종 및 비접종 처리구로 준비하였음. 각 처리구는 5 반복으로 하였으며 준비된 각 처리구의 포트에 실험 방법의 무처리구와 ‘키리에’ 처리구의 육묘 10주씩을 각각 심었음. 매일 물을 주며 약 한 달 후 각 처리구의 벼들을 육안으로 관찰하여 병든 주를 세어 이병율을 계산하였음.

이병율(Disease Incidence) = 처리구별 포트 당 병든 주 수의 합/반복수

- ‘키리에’ 500배, 1,000배, 2,000배 희석액에 볍씨를 담귀 48시간 경과 한 볍씨를 포트에 파종한 후 약 7일간 키운 결과 무처리구에 비해 2,000배 희석액 처리구에서 생육 촉진 효과가 높음을 확인하였음(그림 58). ‘키리에’ 500배와 1,000배 희석액 처리구에서는 무처리구와 생육의 차이가 없어 종자처리시 고배율 희석보다는 2,000배를 권장 사용량으로 결정하였음. 처리구 별 포트에 종자 처리된 육묘를 심어 벼키다리병 방제 효과를 확인한 결과 무처리구의 포트에서 병발생률이 낮아 충분한 비교 검증은 할 수 없으나 병원균을 접종하지 않은 포트보다 병원균 접종원을 넣은 포트에서 벼키다리병 이병율이 높았고 ‘키리에’ 처리구에서 무처리구보다 이병율이 낮음을 확인하여 병원균 접종과 ‘키리에’의 벼키다리병에 대한 억제 효과는 확인되었다고 사료됨(그림 59).



<그림 58. 무처리구와 ‘키리에’ 처리구별(500, 1,000, 2,000배 희석액) 볍씨 생육 정도>



<그림 59. 처리구 포트(왼쪽) 및 정상모와 병든 모 비교(오른쪽)>

<표 16. 처리구별 벼키다리병에 대한 이병율 및 방제>

구분	병원균 (B14+B21)	무처리 이병율	x1,000		x2,000	
			이병율	방제(%)	이병율	방제(%)
멸균 흙	미접종	0.8	0.6	25	0.6	25
	접종	5.4	1.2	77.8	1.0	81.5
비멸균 흙	미접종	1.0	0.8	20	0.8	20
	접종	2.8	1.2	57.1	0.6	78.6

이병묘: 도장묘, 도장 후 고사묘, 1-2본엽또는 2-3엽사이가 45도이상 벌어진 묘, 파종 3주 후에도 3본엽이 출현하지 않는 묘(농약 및 원제 등록기준 [별표10. 약효 시험기준과방법])

10) 미생물제제 ‘키리에’ 포장방제 시험

(1) 벼 키다리병에 대한 약효·약해 시험

- 유기농업자재 공시를 위해 ‘키리에’의 벼 키다리병에 대한 방제 효과 시험을 국립농산물품질관리원 지정 유기농업자재 시험연구기관에 시험분석을 의뢰하였고 농촌진흥청 고시 ‘농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법’에 따라 효과를 검증하였음
- 시험농가는 강원도 화천군 간동면과 경기도 가평군 상면의 농가를 선정하였고 시험구 배치는 단구제 내 3반복으로 실시하였음. 시험작물인 벼의 품종은 각각 골든퀸 3호와 삼광 1호이며 약효 및 약해 시험을 위해 파종 전 ‘키리에’ 2,000배(추천사용약량)와 1,000배(배량) 희석액을 준비하였음. 두 농가 모두 4월 22일에 각 희석액에 48시간동안 침지 처리하여 4월 24일에 육묘상 파종하였음. 파종 후 잘 자란 어린 모를 강원도 화천군 농가는 재식거리 30 × 20 cm(5월 25일), 경기도 가평군 농가는 재식거리 25 × 15 cm(5월 28일)로 기계 이앙하였음. 시험기간 동안 타 살균제는 살포하지 않았으며, 약효조사는 이앙 47일 후 총 조사주에 대한 이병주율을 조사하였으며 약해 조사를 위한 출아율은 파종 7일 후 400립에 대한 발아수를 조사하였음. 발아 후 3, 5, 7일차 외관상 3회 달관 조사하여 나타나는 약해유무를 조사하였음
- 강원도 화천군과 경기도 가평군 시험 농가에서 발생한 벼 키다리병의 무처리구 평균 이병주율은 각각 13.5%와 12.7%로 조사되어 약효 검정하기에 충분하였으며 ‘키리에’ 처리구에서는 각각 55.6%와 52.6%의 방제율을 나타내어 무처리구 대비 통계적으로 유의한 결과를 얻었음. 또한 약제의 추천약량 및 배량 처리시 외관상 나타나는 약해 증상은 관찰되지 않았고 발아율에 어떠한 영향도 없었음(표 17, 18; 그림 60).

<표 17. 벼 키다리병에 대한 ‘키리에’의 약효·약해 시험(강원도 화천군)>

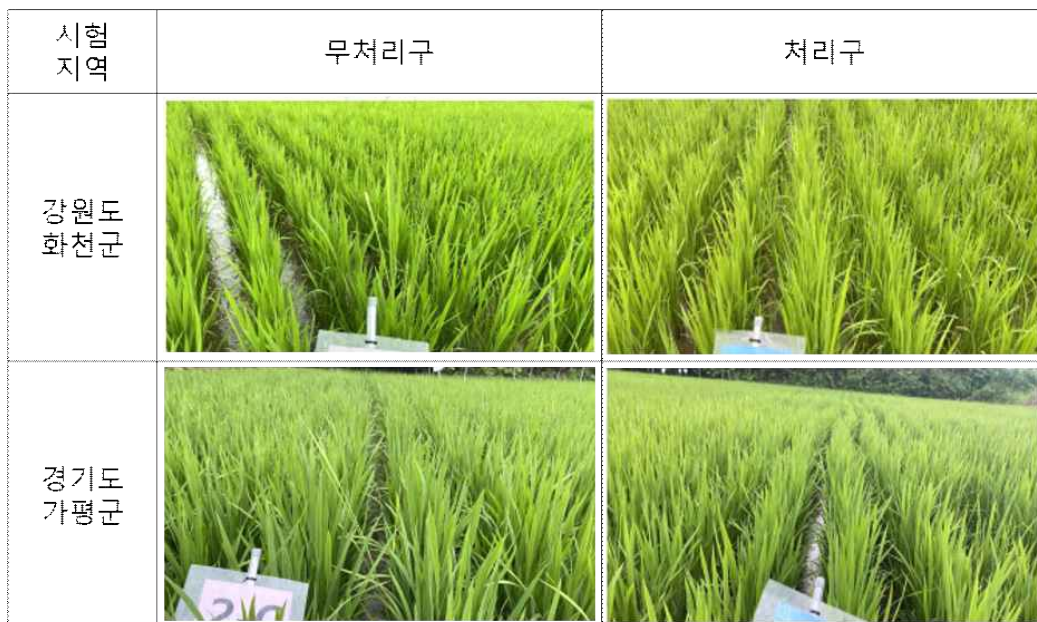
처리구	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
키리에	5.5	8.0	4.5	6.0	b	55.6
무처리	12.0	13.5	15.0	13.5	a	-
C.V.(%)	-----				19.2	

처리구	작물병	약해정도(0~5)		조사결과
		기준량	배량	
키리에	벼(골든퀸3호)	0	0	약해없음

<표 18. 벼 키다리병에 대한 ‘키리에’의 약효·약해 시험(경기도 가평군)>

처리구	발병과율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
키리에	6.5	4.5	7.0	6.0	b	52.6
무처리	14.0	12.5	11.5	12.7	a	-
C.V.(%)	-----				14.3	

처리구	작물병	약해정도(0~5)		조사결과
		기준량	배량	
키리에	벼(삼광1호)	0	0	약해없음



<그림 60. ‘키리에’의 벼 키다리병에 대한 약효시험>

(2) ‘키리에’의 벼키다리병에 대한 농약대조 약효·약해시험

- 사업화를 위하여 개발 미생물제인 ‘키리에’와 농약대조시험을 통해 벼키다리병에 대한 방제 효과를 실시하였음(표 19). 경기도 수원시의 벼 재배농가(품종: 추청)를 선정하여 법씨 소독 시 3가지 처리구(무처리구, ‘키리에’ 처리구, 농약(플루디옥소닐 액상수화제) 대조처리구)로 나누어 각각 처리하였고 처리구는 완전임의 배치법으로 5반복 하였음(표 19).
- 약효 조사는 약제 처리 21일 후 처리구당 전체묘수에 대한 발병묘수를 조사하였고 약해시험에서는 100립에 대한 출아율과 출아 후 3, 7, 10일 차 외관상 약해 유무 달관 조사로 실시하였음. 벼 키다리병에 대한 약제 방제 효과는 ‘키리에’ 처리 시 54.9%의 방제가를 나타냈으며, 농약 처리구에서는 84.2%의 방제가를 확인하였음(표 20).
- 키리에 처리에 따른 법씨 출아율(99%)이나 약해에는 영향이 없었음(표 21). 개발 미생물제는 농약 처리시 보다 종자 침지 처리시 방제가에서 차이를 보이거나 유기농업자재 및 천연식물보호제(미생물제) 등록 기준을 만족하며 본 밭에서의 병원균 감염에 대한 예방 효과, 농약에 대한 내성균 발생과 기후이상에 대한 대안으로 개발 미생물제 ‘키리에’의 실용성이 있다고 판단됨.

표 19. 처리구 당 약제 처리 내용

약제명	주원료 투입 비율(%)	약효시험		약해시험	
		희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법	기준량	배량
키리에 (<i>B. velezensis</i>)	10	2,000배	과종 전 48시간 종자 침종처리	2,000배	1,000배
플루디옥소닐 액상수화제	20	1.25 ml/kg	종자kg당 약액 1.25ml를 물 1.25ml에 희석하여 과종직전 습종자분의 처리	-	-
무처리	-	-	-	-	-

표 20. 벼 키다리병에 대한 '키리에'의 약효·약해 시험



시험약제	이병과율(%)						유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	IV 반복	V 반복	평균		
1. 키리에	7.8	5.3	5.8	4.5	6.6	6.0	b	54.9
2. 플루디옥소닐 액상수화제	3.6	2.1	2.4	1.2	1.1	2.1	c	84.2
3. 무처리	14.5	10.0	12.6	12.7	16.9	13.3	a	-
C.V.(%)						24.5		

표 21. '키리에'의 벼씨 출아율 및 약해 조사

시험약제	이병과율(%)				유의차 (DMRT)	약해정도 (0~5)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
키리에 기준량	100	99	99	99.3	a	0
키리에 배량	99	97	100	98.7	a	0
무처리	100	98	96	98.0	a	-
C.V.(%)						1.5

(3) '키리에'의 감귤 궤양병에 대한 약효·약해시험

- 타 작물 및 타 병해 확대를 위해 감귤 궤양병에 대한 약효·약해 시험을 진행하였음. 감귤 궤양병은 우리나라 주요 수출 과수인 감귤의 재배지 북상과 감귤 재배시 문제가 되고 식물방역법에 따라 수출입시 제한되는 심각한 병해로 친환경 방제제 개발이 필요함.
- 시험농가는 경북 경산시 자인면과 전북 완주군 삼례읍에 위치한 농가를 선정하였고 시험구 배치는 완전임의배치법 3반복으로 실시하였음. 시험작물인 감귤의 품종은 부지화이고 경북 경산시 자인면 농가는 7년생, 전북 완주군 삼례읍 농가는 9년생 감귤을 재배하였음. 약효 및 약해 시험을 위하여 새순 굳기 전 2주 간격으로 '키리에' 2,000배 희석액(기준량) 또는

1,000배 희석액(배량)을 4회 경엽처리하였음. 약효 조사는 최종 약제 처리 14일 후 구당 총 조사 엽수(200엽이상)에 대한 이병엽수의 백분비를 산출하여 이병엽율로 표시하였고 약해 조사는 약제 처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무를 3회 달관 조사하였음.

표 22. 감귤 궤양병에 대한 ‘키리에’의 약효·약해 시험(경북 경산시 자인면)

처리구	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
키리에	1.4	2.1	1.9	1.8	b	70.5
무처리	5.6	6.7	6.0	6.1	a	-
C.V.(%)	-----				4.7	

표 23. 감귤 궤양병에 대한 ‘키리에’의 약효·약해 시험(전북 완주군 삼례읍)

처리구	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균		
키리에	1.7	1.2	2.6	1.9	b	66.1
무처리	6.1	5.2	5.6	5.6	a	-
C.V.(%)	-----				13.7	

○ 경북 경산시 자인면과 전북 완주군 삼례읍 시험농가의 무처리구에서 발생한 감귤 궤양병의 이병엽율은 각각 평균 6.1%와 5.6%로 약효를 검정하기에 충분하였고 ‘키리에’ 처리구에서의

방제가는 각각 70.5%와 66.1%로 나타났음(표 22, 23). 두 시험농가 모두 기준량 및 배량 처리시 외관상 어떠한 약해 증상도 볼 수 없었음. 감귤 궤양병에 대한 ‘키리에’의 약효는 유기농업자재 효능·효과 표시기준인 무처리 대비 50% 이상의 방제 효과를 나타내어 감귤 농가에 큰 도움이 될 것으로 보임.

11) 미생물제제‘키리에’의 인축 및 환경 독성 평가

- 유기농업자재 공시 등록을 위하여 농촌진흥청 고시 ‘농약 및 원제의 등록 기준’에 따라 [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법(농촌진흥청 고시 제2021-4호)에 준하여 국립농산물품질관리원 지정 유기농업자재 시험연구기관에서 실시하였음. 또한, 개발 미생물제는 논벼용 자재에 해당되므로 물벼룩류 급성유형저해 시험을 실시하여야 하나 담수어류 급성독성 예비시험 결과 독성없음이 확인되어 유기농업자재 공시기준(별표1, 제2020-20호)에 따라 해당 시험은 생략하였음.

(1) 피부자극성 시험

- 건강하고 어린 토끼를 실험동물로 초기시험 1마리, 확인시험 2마리를 사용하였음. 시험물질 처리 24시간 전에 전기면도기를 이용하여 경배부(등부위)의 털을 15 × 15 cm 넓이로 제모한 다음 2 × 3 cm로 절개한 거즈를 이용하여 0.5 g의 케이엠(시험물질)을 처리부위에 도포하고 소정의 증류수를 이용하여 습윤 처리한 후 비자극성 테이프와 Coban으로 고정시켜 다른 부위로 유입되지 않도록 하였음. 대조부위는 증류수를 처리하여 비교하였음. 초기시험 및 확인시험은 단일 첩포를 4시간 노출 후 제거하여 피부에 묻은 잔여 물질을 증류수로 제거하고 물기를 흡수시킨 후 케이지에 넣어 두었음. 시험물질 처리 후 72시간까지 일반중독증상(일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유무) 및 치사, 체중 측정, 처리부위를 관찰하고 피부 반응(부종, 홍반 및 가피형성 유무)은 피부반응 평가표 및 자극표에 따라 판정하였음.
- 시험결과, 모든 시험동물에서 어떠한 일반중독증상 및 치사는 발견되지 않았으며 시간이 경과함에 따라 체중은 증가하였고, 시험물질 처리 후 초기시험 및 확인시험에서 홍반 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았고 피부자극성이 없는 물질로 확인되었음.

(2) 안점막자극시험

- 미생물 시험법에 따라 개체당 10^7 단위에 해당하는 약제(0.009 g)을 투여해야 하나 처리약량이 적어 최대 처리량인 0.1 g(1×10^8 cfu/개체)를 처리약량(시험물질)으로 설정하였음. 초기시험은 토끼(New Zealand White계) 1마리를 사용하였으며 육안으로 양쪽 눈에 이상이 없는 시험동물로서 약제처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 시험물질 0.1 g을 한번에 넣어 처리하고 대조부위로 무처리한 우안과 관찰 비교하였음. 초기시험에서 눈 손상이 없는 것을 확인하고 2마리의 토끼를 사용하여 확인시험을 진행하였음. 시험물질 처리 후 7일까지 일반중독증상(일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유무)을 관찰하였고, 체중 측정과 안반응의 평가는 시험물질 처리 후 1, 24, 48, 72, 96시간 및 7일까지 각막혼탁, 홍채이상, 결막 발적, 부종의 정도에 따른 평가표에 따라 기록하였고 자극성의 평가는 자극

성의 정도에 따라 강·중·경도에 따라 정도를 구분하였음. 시험결과, 모든 시험동물에서 어떠한 일반중독증상 및 치사동물은 발견되지 않았음. 암반응 및 자극성은 초기시험과 확인시험 무처리 대조군과 비교해서 어떠한 자극성도 관찰되지 않아 안점막자극성 없음으로 확인되었음.

(3) 담수어류 급성독성

- 물벼룩류 급성유영저해 시험의 여부를 판단하기 위한 담수어류 급성독성시험 예비시험을 위해 시험생물은 담수어류 송사리(*Oryzias latipes*)를 이용하였으며 시험용수는 시험물질(*B. velezensis* JG260 1.1×10^{10} cfu/g) 1.316 g을 시험수조에 넣고 5 L가 되도록 사육용수를 채운 후 충분히 교반시켜 1.0×10^6 cfu/ml의 시험용수를 준비하였음. 음성대조군(사육용수)와 처리군(1.0×10^6 cfu/ml)으로 나누어 각 처리구별 5마리의 송사리를 2, 5, 7일간 관찰하며 치사 및 이상증상을 관찰하였음. 예비시험결과를 바탕으로 본시험의 시험농도는 1.0×10^5 , 5.0×10^5 및 1.0×10^6 cfu/ml의 농도로 용량반응시험을 실시하였음. 시험생물수는 음성대조군 10마리, 시험물질용량에 따른 3 처리군에 각 30마리씩으로 시험개시 1시간 후 그리고 24시간 간격으로 일반중독증상 및 치사어를 판정하였고 수질측정, 시험어 10마리를 무작위로 선별하여 전장 및 체중 측정, 시험용액의 미생물 측정, 시험기간 중 치사나 병원성을 보인 개체의 병리검사를 실시하여 치사 및 이상증상 개체가 발생하지 않은 시험농도를 최대무작용량의 기준으로 하였음.
- 예비시험결과 음성대조군과 처리군(1.0×10^6 cfu/ml) 모두 시험생물의 치사 및 이상증상이 관찰되지 않으나, 본 시험에서 1.0×10^5 및 5.0×10^5 cfu/ml 농도군에서는 노출기간 30일 동안 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았으나 1.0×10^6 cfu/ml 농도군에서 7일차까지 시험개체가 모두 치사하였고 치사한 개체는 치사 당일에 부검하였고 시험종료 후 생존한 전 개체를 부검하여 미생물 감염 여부를 확인한 결과 부검한 모든 개체에서 음성대조군과 비교했을 때 육안상 차이를 발견할 수 없었음. 따라서, 키리에의 송사리에 대한 30일 동안 반수치사농도 (LC_{50})는 설정농도 기준으로 5.0×10^5 cfu/ml와 1.0×10^6 cfu/ml 사이였고, 최대무작용량은 5.0×10^5 cfu/ml으로 확인되었음(표 24, 25).

<표 24. ‘키리에’의 송사리에 대한 담수어류영향시험결과(예비시험)>

Nominal concentration (cfu/ml)	2 day	5 day	7 day
Control	0/5 ^a (0%)	0/5(0%)	0/5(0%)
1.0×10^6	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)

a: Number of dead fish / Total fish

<표 25. ‘키리에’의 송사리에 대한 담수어류영향시험결과(본시험)>

Nominal concentration (cfu/ml)	Number of fish	Cumulative mortality (30 days)	LC ₅₀ ^a (cfu/ml)	NOEC ^b (cfu/ml)
Control	10	0		
1.0 × 10 ⁵	30	0	>5.0x10 ⁵	5.0x10 ⁵
5.0 × 10 ⁵	30	0	<1.0x10 ⁶	
1.0 × 10 ⁶	30	30		

a:Median lethal concentration

b:No observed effect concentration

(4) 꿀벌영향시험

- 건강하고 활동성이 좋은 일벌(*Apis mellifera*)을 채집하여 대조군 및 처리군(2,000배 희석)의 농도인 1배 농도와 10, 100배 높은 농도로 설정하여 시험농도 당 25마리씩 3반복으로 수행하였음. 시험한 모든 케이지에 대하여 시험물질 노출 후 4시간 및 관찰종료 시까지 매일 꿀벌의 이상증상 및 치사 개체를 관찰하였음. 시험 중 치사 개체는 즉시 꺼내 미생물 감염 여부를 조사하였고 관찰종료일의 누적치사 수를 기준으로 대조군 대비 각 시험농도와 비교하여 통계처리 하였음. 산출된 결과에 따라 시험물질 처리군의 영향여부를 판단하여 최대 무영향 농도(NOEC)를 산출하였음.
- 노출 후 9일차 경과 시 대조군의 누적 치사율 26.7%로 20%를 초과함에 관찰을 종료하였고 ‘키리에’ 추천사용약량인 2,000배 희석 농도인 1배 농도와 10, 100배 높은 농도의 처리군의 누적 치사율은 관찰종료일을 기준으로 각각 22.7, 25.3 및 73.3%를 나타냈음. 관찰기간동안 대조군과 처리군에서 치사개체 외에 보행장애 또는 무기력 증상을 보인 일부 개체들이 관찰되었고 치사 개체를 대상으로 미생물 감염을 조사한 결과 대조군과 1배 농도에서는 검출되지 않았고 10배 높은 농도에서는 2일과 3일차에 각각 1.6×10^7 , 9.0×10^6 cfu/ml의 미생물이 검출되었고, 이후에는 검출되지 않았음. 100배 높은 농도에서는 2, 3, 4일 및 5일차에 각각 1.1×10^7 , 4.0×10^6 , 9.5×10^7 및 2.1×10^7 cfu/ml의 미생물이 검출되었으며 이후에는 검출되지 않았음. 시험물질 노출 후 9일차까지 관찰된 대조군의 누적치사 수와 처리군의 각 농도별 누적치사 수에 대한 통계처리 결과, 대조군과 2,000배 희석 농도인 1배 농도 및 10배 높은 농도 간에 통계적으로 유의하지 않아 꿀벌에 대한 영향이 없는 것으로 나타났음. 100배 높은 농도에서는 대조군과 유의한 차이를 보여 꿀벌에 대한 최대 무영향농도(NOEC)는 추천사용약량보다 10배 높은 농도인 것으로 확인되었음(표 26).

<표 26. '키리에'의 꿀벌영향시험 결과>

Dosage ^a	Day 9 cumulative mortality(%)	NOEC ^b
0 ^c	26.7	10
1	22.7	
10	25.3	
100	73.3	

a: Multiples concentration of recommended dosage

b: No observed effect concentration

c: Untreated control

d: Concentration of recommended dosage

12) 유기농업자재 공시 등록 및 완제품 제작

- 유기농업자재 공시 등록을 위한 개발 미생물제 '키리에'의 이화학, 약효·약해시험 및 인축·환경 독성시험을 모두 마쳤고 유기농업자재 공시 등록을 위해 인증기관(강원대학교 산학협력단)의 심사를 통과하여 병해관리용 유기농업자재(공시-2-4-222)로 공시 등록되었음. 또한 '키리에(Kyrie)' 상표 등록(40-2148753, 2024.2.1.)이 최종 결정되었으며 제조법에 대한 특허를 출원(대한민국 10-2023-0030838, 2023.3.8.)하였음. 개발 미생물제 '키리에'의 공시 등록이 완료되어 홍보를 위한 포스터 제작과 완제품 제작을 시작하였음(그림 61).



그림 61. '키리에' 홍보용 포스터 및 완제품

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

가. 키다리병원균 발병원자 억제 소재 발굴을 위한 HTS 시스템 확립 및 활성소재 발굴

- 푸모니신 생합성에 관여하는 *FUM2* 유전자의 프로모터와 형광단백질을 이용하여 푸모니신 억제제 선별을 위한 HTS 시스템 확립
- 해양세균(429 균주)를 대상으로 녹색형광단백질 기반 푸모니신 저감 효과가 가장 우수한 *Pseudalkalibacillus hwajinpoensis*를 선별
- 내생세균(419 균주)를 대상으로 녹색형광단백질 기반 푸모니신 저감 효과가 가장 우수한 *Plantibacter flavus*를 선별

나. 키다리병 방제용 길항미생물 4종 선별 및 특성분석

- 병원균에 길항효과를 보이는 선별미생물 4종 확보
 - 16s rRNA 유전자 염기서열 기반 계통분류학적 동정 및 배양학적 특성 구명
 - 배지성분, 배양 온도, 시간 등에 따른 선별미생물들의 성장 및 살균활성 분석
- 선별 길항미생물 배양여액으로부터 유효활성물질 분리 및 구조 동정
 - 길항미생물 *Paenibacillus elgii* KRICT#146 균주로부터 유효살균활성물질로써 pelgipeptin A, B, C, D 복합체를 분리 및 구조 동정
 - 길항미생물 *Streptomyces* sp. KRA20-350 균주로부터 유효살균활성물질로써 tautomycetin을 분리 및 구조 동정
 - 길항미생물 *Streptomyces wistariopsis* KRA20-207 균주로부터 유효살균활성물질로써 폴리엔 계열의 ECO-02301을 분리 및 구조 동정
 - 길항미생물 *Bacillus velenzensis* JG260 균주로부터 유효살균활성물질인 fungycin과 sulfactin 생성을 확인
- 생리·생화학적 특성 및 항균활성의 종합적 고려를 통한 후보미생물 1종(JG260) 선별

다. 상업화 후보미생물 JG260의 대량 생산 공정 개발 및 제제화

- VITEK 시스템을 활용한 JG260의 생리·생화학적 특성 분석
- 후보미생물 JG260의 대량배양 최적 조건 확립
- 분말 원제와 유기농업자재로 사용할 수 있는 부자재 혼합 조건 확립
- 미생물제의 키다리병원균에 대한 억제 효과를 확인하며 제제화 최적화 확립
- 미생물제제(제품명:키리에)에 대한 동정 및 균수 분석 검사
- 최종 미생물제제의 Q.C. 방법 확립

라. 상업화를 위한 시험 연구

- 미생물제제의 풋트 효과 시험
 - 개발 미생물제제의 벼키다리병(줄기마름형, 키다리형)에 대한 풋트 방제 효과 확인
 - 선발미생물에 대한 벼씨 발아율 효과 및 생장증대 효과 확인
- 미생물제제의 포장 방제 시험을 통한 효과 확인
 - 유기농업자재 공시 등록을 위한 벼 키다리병에 대한 효과 확인
 - 적용 작물 및 병해 확대를 위해 감귤 궤양병에 대한 포장 방제 효과 확인
- 미생물제제의 인축 및 환경 독성 평가 완료
 - 유기농업자재 공시 등록을 위한 이화학시험 및 잔류농약시험 완료
 - 유기농업자재 공시 등록을 위한 인축 및 환경 독성 시험 완료
- 열 안정성 및 경시변화를 통해 제품의 안정성 확인 완료

마. 벼 키다리병 관련 기반 연구 결과

- 46품종의 벼 종자시료로부터 키다리병균 분리 및 진단 마커 개발을 통한 병원형(줄기마름형과 키다리형) 확인
- 국내 주요 벼 재배 15품종의 줄기마름형 균주에 대한 감수성 여부 확인

(2) 정량적 연구개발성과

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계	2단계	과제 종료후	계	가중치(%)
			(2021~2022)	(2023)			
전담기관 등록·기탁 지표	특허출원	목표(단계별)	2	1		3	15
		실적(누적)	3	2		5	
	특허등록	목표(단계별)		1	2	3	15
		실적(누적)		1		1	
	SCI 논문	목표(단계별)	1	3		4	
		실적(누적)	7	1		8	
	비SCI 논문	목표(단계별)		1		1	
		실적(누적)	1	1		2	
	학술발표	목표(단계별)	5	3		8	15
		실적(누적)	10	1		11	
인력양성	목표(단계별)	1	1		2	15	
	실적(누적)		3		3		
연구개발과제 특성 반영 지표	제품화	목표(단계별)		1		1	25
		실적(누적)		1		1	
	고용창출	목표(단계별)	1	3		4	10
		실적(누적)	4	2		6	
	홍보전시	목표(단계별)		1		1	5
		실적(누적)		1		1	
계							100

〈 연구개발성과 성능지표 〉

평가 항목 (주요성능)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중(%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거	
			보유국 /보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (2021~2022)	2단계 (2023)		
1	약효	방제가 (%)	10	미국 (AgraQuest)	80	≥ 50	≥50	≥50	유기농업 자재 공시 기준
2	약해	약해수준 (0~5)	10	미국 (AgraQuest)	≤ 1	≤ 1	0	0	유기농업 자재 공시 기준
3	대량배양	배양조 (L)	10	미국 (AgraQuest)	> 30톤	-	500	1,500	자체평가
4	제제화 균수	균체수 (cfu/g)	10	미국	≥ 10 ⁹	> 10 ⁸	≥ 10 ⁹	≥ 10 ⁹	자체평가
5	인축 독성	급성	20		무자극성	무자극성	무독성	무독성	유기농업 자재 공시 기준
6	환경 독성	생태	20		무영향	무영향	무영향	무영향	유기농업 자재 공시 기준
7	적용대상 추가	적용 대상 수	10		-	-	1	1	자체평가
8	등록	건수/년	20		-	-	-	1	유기농업 자재 공시 기준

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행 기관	SCIE 여부	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> antifungal activity of sorbicillinoids produced by <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Journal of Fungi	Men Thi Ngo	7	스위스	MDPI	SCI	2021.05	2309-608X	50%
2	Plant disease control efficacy of <i>Platyclusus orientalis</i> and its antifungal compounds	Plants	배소현	10	스위스	MDPI	SCI	2021.07	2223-7747	60%
3	Clerodane diterpenoids identified from <i>Polyalthia longifolia</i> showing antifungal activity against plant pathogens	Journal of Agriculture and Food Chemistry	Minh Van Nguyen	69	미국	ACS	SCI	2021.09	0021-8561	20%
4	Genome sequence of <i>Brevibacillus brevis</i> HK544,	Microbiology Resource	김보민	10	미국	ASM	비SCI	2021.08	2576-098X	50%

	an antimicrobial bacterium isolated from soil in Daejeon, Korea	Announcements								
5	Curvicollide D, a new modified γ -lactone from the culture broth of <i>Albifimbria verrucaria</i> and its antifungal activity against plant pathogenic fungi	The Journal of Antibiotics	Minh Van Nguyen	75	일본	Nature Publishing Group	SCI	2022.07	0021-8820	100%
6	Identification and characterization of fungal pathogens associated with boxwood diseases in Korea	Plant Pathology Journal	신수빈	38	한국	KSPP	SCI	2022.08	1598-2254	30%
7	First report of <i>Pseudonectria buxi</i> causing Volutella blight on boxwood (<i>Buxus microphylla</i>) in the Republic of Korea	Plant Disease	신수빈	106	미국	APS	SCI	2022.09	0191-2917	30%
8	Intron turnover is essential to the development and pathogenicity of the plant pathogenic fungus <i>Fusarium graminearum</i>	Communications Biology	최예진	5	영국	Nature Publishing Group	SCI	2022.10	2399-3642	40%
9	Detailed protocol to perform direct PCR using filamentous fungal biomass - tips and considerations	Bio-Protocol	전호성	3	미국	OA	비SCI	2023.11	2331-8325	50%
10	Application of direct PCR for phylogenetic analysis of <i>Fusarium fujikuroi</i> species complex isolated from rice seeds	Frontiers in Plant Science	전호성	5	스위스	Frontiers	SCI	2023.01	1664-462X	50%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021 KSPP Spring Online Conference	전민호	2021.04.23	Online Conference	한국
2	2021 KSPP Spring Online Conference	문희지	2021.04.23	Online Conference	한국
3	KBM 2021 48 th Annual Meeting & International Symposium	최소영	2021.06.24	부산 BEXCO	한국
4	2021 International Meeting of the Microbiological Society of Korea MSK2021	황보아람	2021.08.25	창원컨벤션센터	한국
5	2022 KMB Winter Symposium	신수빈	2022.02.17	여수 디오션리조트	한국
6	2022 KSPP Spring Conference	신수빈	2022.04.21	변산 소노벨	한국
7	2022 KSPP Spring Conference	이나현	2022.04.21	변산 소노벨	한국
8	2022 KSPP Spring Conference	이로운	2022.04.21	변산 소노벨	한국
9	KMB 2022 49 th Annual Meeting & International Symposium	김보민	2022.06.22	경주 HICO	한국

10	2022 KSPP 60 th Annual Meeting and Fall International Conference	전호성	2022.10.19	순천대학교	한국
11	2023 춘계농약과학회	이진우	2023.04.06	거제 소노캅	한국

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Bacillus velenzensis</i> JG260	KACC 81229BP	국립농업과학원 미생물은행	2022

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭	국명	출원			등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호		
1	트리코더마 롱기브라키아툼 균주로부터 유래된 살균 화합물을 포함하는 식물병 방제용 조성물 및 이를 이용한 식물병 방제 방법	한국	한국화학연구원	2021.06.28	10-2021-0084120				50%	
2	아스퍼질러스 몬테네그로이 SFC20200425-M27 균주로부터 유래된 화합물을 포함하는 식물병 방제용 조성물 및 이의 제조방법	한국	한국화학연구원	2021.08.27	10-2021-0114187	한국화학연구원	2023.11.01	10-2598551	50%	
3	곰팡이독소 억제용 조성물	한국	순천향대학교	2021.12.15	10-2021-0179565				30%	
4	벼 키다리 및 줄기 마름 증상을 일으키는 두 가지 형태 병원균 푸자리움 후지쿠로이의 길항 미생물을 이용한 키다리병 생물적 방제제 개발	한국	제일그린산업	2023.03.08	10-2023-0030838				100%	활용
5	키리에 Kyrie	한국	제일그린산업	2022.07.18	40-2022-0133504	제일그린산업	2024.02.01	40-2022-0133504	100%	활용

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		
1	농업	강원대학교 산학협력단	유기농업자재	공시-2-4-222	2023.10.26.	대한민국

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관	인증일
1	키리에	2023.11.1.	(주)제일그린산업	(주)제일그린산업	농업	2년	강원대학교 산학협력단	2023.10.26.

□ 기술 실시(이전)

번호	기술이전 유형	기술실시 계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	직접실시	벼 키다리병, 감귤 궤양병, 배추 무름병 방제를 위한 토종 미생물제 개발	(주)제일그린산업	2021.11.3	0	0

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	직접 실시	신제품 개발	국내	벼 키다리병 방제를 위한 발병인자 억제 미생물제 개발	벼 키다리병, 감귤 궤양병, 배추 무름병 방제를 위한 토종 미생물제	(주)제일그린산업	0			

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		벼 키다리병 방제용 미생물제 ‘키리에’ 개발				
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년				
	소요예산(천원)	20,000				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후		
		0	50,000	130,000		
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후	
		국내				
국외						
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		입제화 제품 개발				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후		
수출						

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)			합계
			2021년	2022년	2023년	
1	해당과제	한국화학연구원	3	1	2	6
합계			3	1	2	6

[사회적 성과]

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
		2024	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				3			1	2	1	2			

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	박람회	2023년 부산유기농친환경 귀농귀촌박람회	키리에	2023.11.23.~11.26.

2) 목표 달성 수준

추진목표	달성내용	달성도 (%)
고효율 발병인자 억제 천연소재 발굴 시스템 구축	· 푸모니신 생합성 유전자의 프로모터를 각각 녹색형광단백질과 융합시켜 형광 발현량의 변화를 통해 지베렐린과 푸모니신의 합성을 저해여부를 예측할 수 있는 HTS 시스템 개발함	100
병원성 인자 발현억제 천연소재 선발	· 해양 세균 429주와 내생 세균 419주를 대상으로 녹색형광단백질 HTS를 이용하여 푸모니신 저감효과를 보이는 2종의 미생물 (<i>Pseudalkalibacillus hwajinpoensis</i> 과 <i>Plantibacter flavus</i>) 선발함	100
키다리병 방제용 길항미생물 선발 및 이의 유효활성물질 구명	· 키다리병원균에 길항효과가 우수한 미생물 4종 선발 - 길항미생물 <i>Paenibacillus elgii</i> KRICT#146 균주로부터 유효살균활성물질 pelgipeptin A, B, C, D 복합체를 분리 및 구조 동정함. - 길항미생물 <i>Streptomyces</i> sp. KRA20-350 균주로부터 유효살균 활성물질 tautomycetin을 분리 및 구조 동정함. - 길항미생물 <i>Streptomyces wistariopsis</i> KRA20-207 균주로부터 유효살균활성물질로써 폴리엔 계열의 ECO-02301을 분리 및 구조 동정함. - 길항미생물 <i>Bacillus velenzensis</i> JG260 균주로부터 유효살균 활성물질인 fungycin과 sulfactin 생성을 확인하였음.	100

국내 분리균의 병원형 분석 및 벼 품종의 저항성 분석	<ul style="list-style-type: none"> · 46 품종의 벼 종자시료로부터 키다리병균 분리 및 진단 마커 개발을 통한 병원형(줄기마름형과 키다리형) 확인 · 국내 주요 벼 재배 15 품종의 줄기마름형 균주에 대한 감수성 여부 확인 	100
후보미생물의 생리·생화학적 배양 특성 연구	<ul style="list-style-type: none"> · 살균활성 및 배양학적 특성 기반 상업화 후보미생물(<i>B. velenzensis</i> JG260) 선정 <ul style="list-style-type: none"> - VITEK 시스템을 활용하여 생리·생화학적 배양 특성 확인 - 배양 온도 및 배지 성분에 따른 미생물 성장률 확인 - 후보미생물 특허균주로 기탁(KACC 81229BP) 	100
후보미생물 대량 생산 공정 개발 및 제제화	<ul style="list-style-type: none"> · 후보미생물의 대량배양 최적조건 확립/ 대량생산 공정 및 제제화 최적화 · 개발 미생물제제(시제품)에 대한 주성분 동정 및 균수 인증시험 연구기관에서 분석 완료(1.1×10^9 cfu/g) 	100
미생물제제(시제품)의 풋트 효과 및 포장 방제 효과 확인	<ul style="list-style-type: none"> · 개발 미생물제에 종자 처리된 벼 육모를 베키다리병균에 감염된 풋트에 심어 병 방제 효과 검증 확인(방제가 51%~81%) · 유기농업자재 공시 등록을 위하여 인증시험 연구기관에서 베키다리병에 대한 포장 방제 효과 검증 확인(방제가 55.6%, 52.1%) 	100
미생물제제의 인축 및 환경 독성 평가	<ul style="list-style-type: none"> · 유기농업자재 공시 등록을 위하여 인증시험 연구기관에서 인축 및 환경 독성 평가 완료 <ul style="list-style-type: none"> - 피부자극성 및 안점막 시험결과 무자극 - 담수어류 영향시험 결과 최대무작용량은 5.0×10^5 cfu/ml 농도임 - 꿀벌영향시험 결과 최대무영향농도(NOEC)는 추천사용약량의 10배 농도임 	100
미생물제제의 이화학 성분 및 잔류 농약 분석	<ul style="list-style-type: none"> · 개발 미생물제제의 Q.C. 방법(BOX-PCR)을 확립하여 원제 및 제품의 품질관리 체계 구축 · 열 안정성 시험 및 경시변화 시험을 통하여 미생물제의 안정성을 확인하고 유통기한을 3년으로 결정 · 잔류농약과 병원성 미생물 분석을 통하여 제품의 안전성을 확인 	100
유기농업자재 등록	<ul style="list-style-type: none"> · 병해관리용 유기농업자재로 공시 등록(공시-2-4-222) · ‘키리에’ 상표 출원 및 등록 	100
완제품 제작 및 포장 약효시험	<ul style="list-style-type: none"> · ‘키리에’ 제품의 사업화를 위하여 라벨과 박스 제작 및 완제품 생산 · 개발 미생물제의 벼 키다리병에 대한 약효 대조 시험을 위하여 화학 농약(플루디옥소닐 액상수화제) 처리구와 비교 분석 · 타작물 타병해 확대를 위해 감귤 궤양병에 대한 약효약해 검증을 위한 2포장 시험 수행(방제가 66.1%, 70.5%) 	100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당사항 없음)

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명	기관명	유형	총 연구개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술기여도	
								산정 근거	비율
며 키다리병 방제를 위한 발병인자 억제 생물소재 개발	며 키다리병 방제용 미생물제 개발	(주)제일 그린산업	중소기업	251.5	192.5	76.54	제품개발	①-①	76.54
계				251.5	192.5	76.54	-	-	76.54

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2024	2025	2026	2027	2028
국외논문	SCIE					
	비SCIE					
국내논문	SCIE					
	비SCIE					
특허출원	국내					
	국외					
특허등록	국내			1	1	
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사					
사업화	시제품개발					
	상품출시					
	기술이전					
	공정개발					
	매출액(단위 : 천원)	0	5,000	20,000	50,000	70,000
	기술료(단위 : 천원)	0	38.27	153.08	382.7	535.78
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 작물바이러스 및 병해충 대응산업화 기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 작물바이러스 및 병해충 대응산업화 기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.