

보안과제( ), 일반과제(○) / 공개(○), 비공개( ) 발간등록번호(○)  
작물바이러스 및 병해충 대응 사업화 기술개발사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004597-01

# 혼합 미생물군 기반 서류 작물병 방제 신규 소재 및 제품 개발

2024. 06. 12.

주관연구기관 / (재)농축산용미생물산업육성지원센터  
공동연구기관 / 전남대학교 산학협력단  
공동연구기관 / 보란파마

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

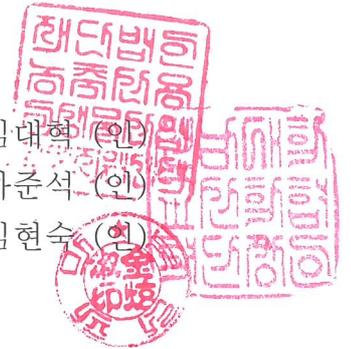
## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “혼합 미생물군 기반 서류 작물병 방제 신규 소재 및 제품개발”  
(개발기간 : 2021.04.01 ~ 2023.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024.06.12.

주관연구기관명 : (재)농축산용미생물산업육성지원센터 (대표자) 김대혁 (인)  
공동연구기관명 : 전남대학교 산학협력단 (대표자) 하준식 (인)  
공동연구기관명 : 보란과마 (대표자) 김현숙 (인)



주관연구책임자 : 한 귀 환  
공동연구책임자 : 상 현 규  
공동연구책임자 : 김 현 숙

국가연구개발혁신법 제17조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서				보안등급							
				일반[ <input checked="" type="checkbox"/> ], 보안[ <input type="checkbox"/> ]							
중앙행정기관명	농림축산식품부		사업명	사업명	작물바이러스 및 병해충 대응 사업화 기술개발사업						
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)	방제기술개발						
공고번호	제 농축2021-25호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		321099-3						
			연구개발과제번호								
기술분류	국가과학기술 표준분류	LA0903	50%	LA0908	50%	%					
	농림식품과학기술 분류	RA0303	50%	RA0305	30%	RA0304 20%					
연구개발과제명	국문	혼합 미생물군 기반 서류 작물병 방제 신규 소재 및 제품 개발									
	영문	Development of nobel agents and products for bulb and tuber crop disease control based on microbial community									
주관연구개발기관	기관명	(재)농축산용미생물산업육성지원센터		사업자등록번호	624-82-00030						
	주소	(56212) 전북 정읍시 참다교로 241		법인등록번호	211222-0006871						
연구책임자	성명		한귀환		직위	팀장					
	연락처	직장전화			휴대전화						
		전자우편			국가연구자번호						
연구개발기간	전체		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31( 2년 9개월)								
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2021. 04. 01 - 2022. 12. 31( 1년 9개월)								
		2단계	2023. 01. 01 - 2023. 12. 31( 1년 개월)								
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계	연구개발비 외 지원금		
		현금	현금	현물	현금	현물	현금			현물	합계
	총계		990,000	1,700	41,800				991,700	41,800	1,033,500
	1단계	1년차	270,000		14,000				270,000	14,000	264,000
		2년차	360,000		12,500				360,000	12,500	372,500
2단계	1년차	360,000	1,700	15,300				361,700	15,300	377,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편		비고				
							역할	기관유형			
	공동연구개발기관	전남대학교 산학협력단	상현규	교수			공동	대학			
	보란파마	김현숙	대표				수요	중소기업			
위탁연구개발기관											
연구개발기관 외 기관											
연구개발담당자 실무담당자	성명		임성훈		직위		책임연구원				
	연락처	직장전화			휴대전화						
		전자우편			국가연구자번호						

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024 년 05 월 23 일

연구책임자: 한 귀 환 (인)

주관연구개발기관의 장: (재)농축산용미생물산업육성지원센터 (직인)

공동연구개발기관의 장: 전남대학교 산학협력단 (직인)

위탁연구개발기관의 장: 보란파마 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## < 요약 문 >

사업명		작물 바이러스 및 병해충 대응 사업화 기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)		방제기술개발			연구개발과제번호		321099-3	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0903	50%	LA0908	50%		%	
	농림식품 과학기술분류	RA0303	50%	RA0305	30%	RA0304	20%	
연구개발과제명		혼합 미생물군 기반 서류 작물병 방제 신규 소재 및 제품 개발						
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31( 2년 9개월)						
총 연구개발비		총 1,033,500 천원 (정부지원연구개발비: 990,000 천원, 기관부담연구개발비 : 43,500 천원)						
연구개발단계		기초[ ] 응용[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 개발[ ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )		
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 혼합미생물군 기반 자연 친화적 작물병 방제 시스템 확립을 위하여 유용미생물을 선발하고, 생화학 및 분자생물학적으로 분석된 병증완화 메커니즘 및 억제효과를 토대로 서류(고구마, 감자) 작물병 방제 신규소재 개발 및 제품 상품화</li> </ul>				
		전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 서류(고구마·감자) 주요 작물병 방제 유용 미생물 선발 및 개선</li> <li>• 선발된 혼합미생물의 상호관계 및 병증 완화 작용점 분석</li> <li>• 혼합미생물의 최적 병증 억제 효과 환경 분석</li> <li>• 혼합미생물 제품화 및 사업화 시스템 개발</li> </ul>				
		1단계 (해당 시 작성)		목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 서류작물(고구마, 감자) 주요 질병제어용 유용미생물 선발 및 개선</li> <li>• 혼합미생물의 작용점 분석</li> <li>• 혼합미생물의 최적 억제 효과 및 환경 분석</li> </ul>			
		2단계 (해당 시 작성)		내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 고구마 주요 질병(덩굴썩음병, 검은무늬병)의 길항미생물 선발</li> <li>• 감자 주요 질병(검은무늬썩음병, 균핵병)의 길항미생물 선발</li> <li>• 선발 미생물의 내생력 검정 및 활성 유지 검증 균주 선발</li> <li>• Diffusible signal factor 등 소통요소 분석</li> <li>• 선별 유용미생물 상호관계 및 병증 완화 관련 메카니즘 분석</li> <li>• 병 방제 유효활성 물질 규명 및 유도저항성(SAR, ISR) 여부 판단</li> <li>• 독성시험 및 선별 미생물 환경(토양 오염, 분해율 등) 영향 검토</li> <li>• 선별 미생물 처리 후 잔존율에 따라 억제효과 분석</li> <li>• 처리방법에 따른 억제 효과 분석</li> </ul>			
		3단계 (해당 시 작성)		목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 혼합미생물제제의 제품화</li> <li>• 현장적용 및 사업화 시스템 개발</li> </ul>			
4단계 (해당 시 작성)		내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 혼합미생물제제 최적조합 구성 및 합제기술 개발</li> <li>• 미생물제제 대량생산 공정 및 제형기술개발</li> <li>• 시제품의 현장 적용 및 사용 매뉴얼 제작·보급</li> <li>• 제품등록, 마케팅 전략 수립 및 사업화</li> </ul>					

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 논문3건, 특허 출원 2건, 특허 등록 1건, 학술발표 11건, 고용창출 13건</li> </ul>												
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 미생물 유래 활성 대사산물 정성분석 및 작용기작 구명(특허, 논문)</li> <li>• 유용미생물의 대량배양 공정 및 제형화 기술 개발(특허, 논문)</li> <li>• 개발된 미생물제제의 산업화 관련 언론매체 홍보(언론홍보)</li> <li>• 유용미생물 복합제제의 산업화 공정 개발 및 현장적용(기술 실시) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제형화 공정 확립 및 시제품 제작</li> <li>- 현장 실증 적용을 위한 사용 매뉴얼 제작 및 보급</li> </ul> </li> <li>• 수요자 맞춤형 미생물제제의 제형화(특허, 논문, 상품화, 홍보)</li> <li>• 본 연구에서 얻어진 미생물제제 활용 시스템의 기술이전 및 현장 보급</li> <li>• 마이크로바이옴 유래 미생물의 특허 출원 및 효능이 강화된 신규 복합제제 개발</li> <li>• 기능성 미생물제제의 방제 및 활성 기작 구명을 통한 효과적인 방제 방법 개발</li> <li>• 대량배양 및 제형화 기술 개발을 통한 유용미생물제제의 실용화 시스템 개발</li> <li>• 다양한 종류의 유용미생물 및 활성 대사산물을 함유한 단일 또는 복합제제 개발</li> <li>• 각각의 적용 분야에서 최대의 활성/효과를 발휘하게 개발된 사용지침서/매뉴얼 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미생물제제의 사용 시기 및 횟수에 따른 활성/효과 검증</li> </ul> </li> <li>• 기능성 유용미생물제제의 개발을 통한 관련 분야 산업 성장</li> <li>• 미생물제제의 실용화 공정 확립을 통한 미생물 산업화 기술 확보</li> <li>• 친환경, 고부가가치/선도 농업 창출을 통한 동종업계 산업 발전의 토대 마련</li> <li>• 유용미생물/대사산물 발굴 및 기능 구명으로 국내자원 보존 및 우수자원 산업화</li> <li>• 유용미생물제제의 사용을 통한 화학농약 사용량 저감으로 농업 환경 개선 및 국민 복지 증진</li> <li>• 국민소득 향상과 더불어 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 식품(농산물)의 선택 기준이 양적 만족보다는 신선하고, 안전한 식품을 우선적으로 고려하는 소비심리가 증가하고 있는 실정임을 고려할 때, 미생물을 활용한 오염된 토양 및 하수 등의 무독화 처리 기술은 1차, 2차 산업 발전에 기여함과 동시에 국민의 안전한 먹거리 창출을 통한 국민 건강 증진에 기여</li> <li>• 무분별한 불량 제제의 사용으로 인한 농업 피해 경감</li> <li>• 합성농약 대체물질 사용을 통한 친환경적 관리체계 구축으로 농업 생태계 보호</li> </ul>												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신제품		
								생명 정보	생물 자원		정보	실물	
	3	2						2					
국문핵심어 (5개 이내)	식물병			방제		혼합미생물 제제		서류작물		대량생산 공정			
영문핵심어 (5개 이내)	Plant disease control			Prevention		Mixed microbial formulation		Bulbs and tubers plant		Mass production process			

---

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요-----	5
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용-----	17
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도-----	44
4. 목표 미달 시 원인분석-----	120
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도-----	122
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획-----	123

별첨 자료 (참고 문헌 등)

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발의 개요

서류작물(고구마, 감자 등)은 전체 식량작물중 미곡에 이어 생산량 2위를 차지하는 중요 식량자원 임. 안전 농산물에 대한 수요는 점차 증가하는 추세이며, 이와 같은 요구도에 따라 정부는 GAP인증제도 등 다양한 정책을 시행하고 있음. 또한 농산물을 생산하는 농업인들의 잔류걱정 없이 안정적으로 병해충을 방제할 수 있는 친환경 방제제 요구 역시 매우 빠르게 증가하고 있음

본 연구개발에서는 핵심 식량자원인 서류작물의 주요 질병(덩굴썩음병, 검은무늬병 등)을 방제하고, 안전한 식량을 안정적으로 생산할 수 있는 친환경방제제를 개발하고자 함



### <서류작물병 방제를 위한 신규소재 및 제품 개발연구>

본 연구개발 사업에서는 대표적 서류작물인 고구마와 감자의 안정적 생산 및 친환경 농업 환경 조성을 위한 병해방제용 신규소재(혼합미생물)를 발굴하고, 방제 효능에 대한 정량/정성 분석, 현장적용 및 안전성평가를 수행하고자 함. 또한 기 보유한 방제제의 성능개선 기술을 개발하고, 농업현장에서 효율적인 활용을 위한 실증을 수행함으로써 표준화된 활용 매뉴얼 개발을 목표로 함. 최종적으로는 실용기술 개발 및 매뉴얼 보급을 통해 농업 현장에서 생산자의 자발적 친환경 농업 경영을 유도함으로써 사회적 농업시대에 기여하고자 함.

## 1-2. 연구개발의 대상의 국내·외 현황

1) 식량작물에 포함되는 서류(감자, 고구마, 아콘 등)는 미곡(논벼, 밭벼), 맥류(겉보리, 쌀보리, 맥주보리, 밀 등), 두류(콩, 팥, 녹두 등) 그리고 잡곡(옥수수, 메밀 등)과 함께 먹거리를 생산할 수 있는 작물임

### (1) 감자

- 서류작물에서 감자는 벼, 보리, 콩, 옥수수와 함께 국가품종목록등재 5대작물로 지정되어 있으며, 2017년 말 기준으로 새로 육성된 만강, 은선, 강선을 포함하여 약 70여 품종이 출원(등록)되어 있음
- 감자 재배면적은 과거와 비교하여 점차 줄어드는 추세이지만, 새로운 품종 육성과 씨감자의 품질 향상 그리고 재배기술의 발달로 단위면적당 생산성이 향상되어 총 생산량에서는 오히려 증가하고 있는 상황임



<서류작물 감자(봄감자)의 연간 재배면적 및 생산량 추이>

- 2019년 봄감자 생산량은 46만 5,948톤으로 전년의 38만 5,244톤 보다 8만 704톤 증가된 20.9% 상승률을 보였고, 재배면적은 14.7%, 10a당 생산량은 5.4% 증가되었음
- 한국농수산식품유통공사 보고에 따르면 수미 감자 품종의 경우 1kg 도매가가 연평균 2016년 1,402원에서 2017년 1,920원, 2018년 2,609원, 2019년 1,970원으로 상향되는 경향을 보였음

### <국내 감자 연도별 생산성 비교>

구분	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
재배면적(ha)	16,302	19,126	17,424	20,977	15,596	14,545	15,259	14,943	15,819	18,150
생산성(톤/ha)	24.2	23.9	23.9	27.2	27.7	25.2	25.8	21.5	24.3	25.7
생산량(천 톤)	394,000	458,000	417,000	571,000	432,000	367,000	394,000	322,000	385,000	466,000
지수*	100	99	99	113	115	104	107	89	101	106

출처: 2019년 통계청 보도자료 "2019년 봄감자 생산량 조사 결과", \*생산량 지수: 2010년 대비

- 감자는 세계주요 재배작물 중 단위면적당 에너지 공급량과 생산량이 가장 많은 작물로서 인구 증가에 의한 식량부족 문제를 해결하기 위해서 생산량이 계속 증가할 전망됨

- 감자는 전 세계 150여개국에서 재배되며 연간 2억 4,000만 ~ 3억 7,600만 톤이 생산되고 있으며 생산량으로는 옥수수, 벼, 밀 다음으로 4위, 재배면적으로는 8위를 차지하는 주요작물 임
- 주요 생산국은 중국, 인도, 러시아, 우크라이나, 미국, 독일 등이며, 전체 생산량 대비 중국 25.5%, 인도 12.0%, 러시아 8.0%, 우크라이나 5.9%, 미국 5.3%, 독일 2.6%로 조사됨
- 전 세계 평균 1인당 연간 소비량은 나라별로 다르지만 약 70kg정도 되며, 2018년 기준 10년간 세계의 감자재배 면적은 1,900만~2,000만ha를 유지하고 있음

**<세계 감자 재배면적과 생산량>**

구분	1970	1980	1990	2000	2010	2012	2014	2016
재배면적(천ha)	20,773	18,788	17,656	20,088	18,694	19,376	18,963	19,246
생산성(톤/ha)	14.3	12.8	15.1	16.3	17.8	19.1	20.1	19.6
생산량(천 톤)	298,048	240,496	266,825	327,600	333,617	370,595	380,967	376,827
지수*	112	90	100	123	125	139	143	141

출처: FAO 통계 (2016년), \*생산량 지수: 1990년 대비

- 우리나라의 감자 평균 생산성은 선진국의 약 50~70% 수준이므로 기술개발에 의해 생산성을 높일 수 있는 잠재력이 매우 크다고 할 수 있음

**<국내 주요 감자 품종>**

품종	육성년도	숙기	내병성		용도	적응지역
			역병	바이러스		
수미	1978	조생	●	●	식용, 칩가공용	전국
대지	1978	중만생	●	●	식용(두번짓기)	중남부 평야
조풍	1988	조생	●●●●●●	●●●●●●	식용	전국
대서	1995	조생	●●●●	●●●●	칩가공용	전국
후백	1999	조생	●●●●	●●●●●	식용(두번짓기)	전국
하령	2005	조중생	●●●●●●	●●●●●●	식용	전국
서흥	2006	중생	●	●●●●	식용	전국(제주 제외)
고운	2006	조중생	●●●●	●●●●	칩가공용(두번짓기)	전남북,경남, 충남 서해안
자영	2007	만생	●	●●●●●	식용, 가공용	고령지
홍영	2007	중생	●	●●●●	식용, 가공용	고령지
새롬	2010	조생	●●●●	●●●●●●	칩가공용(두번짓기)	제주, 남부지방
금선	2014	조중생	●●●●●	●●●●	식용(두번짓기)	제주, 남부지방
남선	2015	조중생	●●●●	●●●●	칩가공용(두번짓기)	제주, 남부지방
대광	2015	중생	●●●●●●	●●●●	식용	전국(제주 제외)
은선	2015	조중생	●●●●	●●●●	칩가공용(두번짓기)	제주, 남부지방
만강	2016	만생	●●●●●●	●●●●	식용, 칩가공용	고령지
강선	2016	중만생	●●●●●●	●	식용(두번짓기)	제주, 남부지방

출처: 농촌진흥청, 감자 - 농업기술길잡이 31 (2018.12.28)

- 감자 육종과 선발된 품종은 크게 재배 시기, 용도, 익는 시기(숙기)에 따라 구분되며, 씨감자를 순결하게 유지하는 것이 매우 중요함
- 우리나라의 감자 육종체계는 교배 육종이 주를 이루며, 육종에 있어서 중요시되는 것은 육종 및 선발 과정에서 발생하는 바이러스 감염을 차단하는 것임

<감자의 주요 병해 및 방제>

구분	병해명	방제방법
진균성 (곰팡이)	검은무늬썩음병	이어짓기는 병원균의 토양 내 서식밀도를 증가시킴 비기주 작물과 돌려짓기함 저항성 품종 개량 및 건전한 씨감자를 철저히 보관하여 사용
	균핵병	비기주 작물을 4년 이상 돌려짓기하고 살균제를 발생 초기에 살포하 거나 밭에 물을 가두어 균핵을 파괴함
	감자역병	공기 중 상대습도를 낮추는 조치가 병의 진전을 낮춤 예방차원의 약제를 처리하고, 역병 증상이 나타나면 살균제를 중심으로 약제를 살포함
	겉동근무늬병	덩이줄기 감염을 방지하기 위하여 수확전에 지상부 잎줄기를 제거하고, 덩이줄기 표피가 마르고 기계적 상처에 저항성이 생길 때까지 휴 속에 유지 콩과나 벼과작물과의 돌려짓기로 병원균 밀도를 줄임
	시들음병	무병 씨감자를 철저히 보관하며, 소독하여 사용 저항성작물인 벼과작물, 목초 또는 콩과작물을 돌려짓기함
	가루더덩이병	병원균 휴면포자는 토양에서 오랫동안 생존이 가능하기 때문에 돌려 짓기로 이를 방지함 비기주 작물과 돌려짓기함
	마른썩음병	감자 식물체 지상부가 죽으면 덩이줄기를 수확하고, 수확 작업 중 상처 발생을 최소화 함
	잿빛곰팡이병	작용기작이 서로 다른 약제의 살균제를 교호로 사용
세균성	무름병	무병 씨감자를 철저히 보관하여 사용하고 비기주 작물을 돌려짓기함
	줄기검은병	씨감자 조각은 심기 전 다른 병원균의 침입을 막기위하여 절단면을 치유하거나 적당한 살균처리를 실시함
	더덩이병	더덩이병 증상이 있는 씨감자의 사용을 금지하고 감자 이외의 비기주 작물과 돌려짓기를 하거나, 씨감자 파종전에 풋거름 작물을 재배하여 토양에 투입하여 이를 예방함
	풋마름병	무병 씨감자를 철저히 보관하여 사용 가지과작물이 아닌 비기주 작물을 선택하여 4~5년간 돌려짓기 함
바이 러스성	감자 잎말림바이러스 (PLRV)	무병 씨감자를 철저히 보관하여 사용하며, 약제살포 또는 파종전에 침투성 살충제를 입제처리
	감자Y바이러스 (PVY)	무병 씨감자를 철저히 보관하여 사용하며, 침투이행성 살충제처리
	감자X바이러스 (PVX)	무병 씨감자를 철저히 보관하여 사용하며, 절단칼, 농기구를 소석회 포화액으로 소독하거나 가능한 식물체의 접촉을 피함
	감자S바이러스 (PVS)	무병 씨감자를 철저히 보관하여 사용하며, 씨감자 절단시 절단도를 끓는 물에 소독하여 사용
	감자M바이러스 (PVM)	무병 씨감자를 철저히 보관하여 사용하며, 진딧물 방제를 철저히하고 잎이 접촉하지 않도록 광폭재배함

(2) 고구마

- 고구마는 대표적인 알칼리성 식품으로 각종 비타민과 무기질, 단백질 및 양질의 식이섬유가 함유되어 있으며 종별로 주황색 고구마는 항암과 항산화 효과가 있는 베타카로틴을 자색고구마는 활성산소 제거와 간 기능 개선 그리고 항암효과 등이 있다고 알려져 있는 안토시아닌 성분이 함유되어 있어 건강 기능성 식품으로서 인기가 높음
- 과거 고구마는 배고픔을 달래주던 구황작물 역할을 하였지만, 2000년대 웰빙문화 정착에 따른 현대인들의 건강 기능성 보조식품으로 자리매김하면서부터 새로운 도약의 계기가 마련됨
- 우리나라의 2015년의 고구마 재배 면적은 1만 9,400ha로 1965년에 비해 약 13% 감소하였으나 1990년대 이후 최근 들어 증가 추세를 보이고 있음
- 단위면적당 생산량은 1985년 이후 식용고구마의 재배가 확산되면서 전업농가의 다수확 영농에 의해 매우 높은 수량을 유지하고 있음
- 우리나라의 1인당 고구마 연간 소비량의 변화는 1985년을 기점으로 3kg 정도의 안정적 추이를 보였으나 2000년과 2005년에 다소 증가하였고 2011년에도 3.4kg으로 연간 소비량은 꾸준한 추세임
- 세계의 고구마 재배 면적은 1975년 1,202만 8,000ha에서 5년 이후인 1980년 1,075만 9,000ha로 약 11% 감소하였음
- 1980년 이후에는 해에 따라 다소의 증감은 있으나 대체로 910만ha 내외로 지속되었으나 2000년 978만 7,000ha까지 늘었다가 다시 감소하여 2014년 835만 2,000ha 수준에 머물고 있음
- 단위면적당 생산량은 점차 증수되는 경향으로 1975년 ha당 11,749kg에 비하여 2000년 약 21%, 2014년 약 9%가 증가하였으며 재배면적은 감소하였으나 단위면적당 생산량은 증가하고 있음

<고구마의 주요 병해 및 방제>

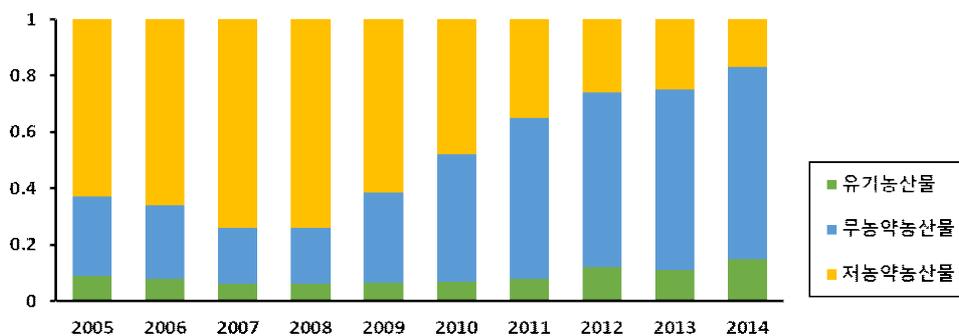
구분	병해명	방제방법
세균성	세균성 마름병	저항성 품종 사용하고 삼식 시 상처발생에 주의하며 고구마 순 담은 상자를 염소에 소독 및 윤작
	더텅이병	병이 없는 지역에서 수확한 고구마를 증서로 이용하며 황을 이용한 약산성 토양 유지 및 토양이 건조하지 않게 관수
진균성 (곰팡이)	덩굴쪼김병	녹비작물을 윤작 한 휴경지에 이용하며 묘상에서 채순시 지상에서 5cm 이상 띄워 자르고 3~4일간 경화시켜 사용
	검은무늬병	이식묘는 지표면으로부터 2cm 이상되는 부위에서 자르고 병 발생이 심한 밭은 다른 비주기 작물과 돌려짓기
	둥근무늬병	묘상 온도가 너무 높지 않으면서 과습하지 않게 유지하고 늦게 발병된 포장은 조기 수확
	자주빛날개 무늬병	병든 고구마는 불에 태워버리고 수확 후 밭에서 고구마 줄기를 제거해야 하며 병이 발생한 토양에는 다음해 고구마를 절대로 재배하지 않아야 함

	줄기마름병	비기주 작물로 2년간 윤작 실시
	무름병	적기에 수확하며 습도가 높으면 발병이 심해지므로 비오는 날에는 수확하지 않음
	마른무름병	건전한 씨고구마를 사용하고 비기주 작물로 2년간 윤작 실시
	먼지곰팡이병	가축분뇨 등이 들어 있는 미숙퇴비를 사용하지 않고 시설재배 시 과습하지 않도록 관리
해충	뒷날개 흰밤나방	약제방제는 다발생 시기에 에토펜프록스 수화제나 메톡시페노자이드 액상수화제를 수확 7일전까지 살포
	굼벵이류	약제방제는 터플루트린 입제나 베테트린 터부포스 입제를 10a당 6g을 삼식전에 포장 전면에서 살포
	뿌리혹선충	발생이 심한 포장은 비기주작물인 화본과 작물과 돌려짓기를 하고 휴한기에는 녹비작물을 재배해 발생 억제
	방아벌레 (철사벌레)	고구마 생육기에 발생하면 발생초기에 전용약제를 살포해야 하며 약제 방법은 비펜트림, 이미다클로프리드 입제를 10a당 3kg을 삼식전에 포장전면 살포
바이러스	바이러스 류	모주로 사용할 고구마는 조직배양등을 통해 건전한 고구마를 사용하고 시설재배시 담배가루이나 진딧물의 매개충 방제를 철저히 해야 하며 묘상관리를 엄격히 하면서 발병주 조기 제거

### 1-3. 연구개발의 중요성

- 2019년 기준, 서류작물은 전체 식량작물 중 미국에 이어 생산량 2위를 차지하는(25만 2천톤-생서 105만톤, 전년대비 생산량이 23% 이상 증가, 2019년 통계청 자료) 중요 자원임
- 잔류성 농약으로부터 야기되는 폐해로부터 무너진 환경의 복구와 안전한 먹거리 확보를 위하여 친환경 병방제 기술개발, 농가의 인식개선 노력, 정부 및 지자체의 정책 수행 등 종합적인 대책이 요구됨
- 구조적으로 안정하여 자연 분해가 어려운 잔류 농약의 제어를 위하여 환경 미생물의 능력을 활용하는 생물학적 처리법에 대한 관심이 높아짐
- 환경으로부터 발굴되어 친환경적으로 다양한 작물병 방제 효능 미생물 연구 보고는 활발하게 이루어지고 있지만, 실제 현장 적용에는 많은 난관이 존재함
- 특히, 미생물제제의 토양 내 낮은 정착력과 병방제 메커니즘의 구명은 생물학적 처리법의 정착을 위하여 해결해야 하는 과제임
- 따라서 친환경 작물병 방제 미생물의 실용화를 위하여 현장 환경에서 높은 활성을 지닌 미생물 발굴과 현장 적용 및 검증, 효율 증진 기술 개발이 절실히 요구됨
- 국내에는 대부분 하나의 미생물에 대한 미생물제제 (just one biological control agent)가 등록되어 있지만, 단일 종으로 개발된 미생물제제는 다종의 병원균 제어가 어렵고 환경 변화에 민감하여 이상기후 등 급변하는 환경에서 효력이 감소하는 경향이 있음
- 최근 국외 연구의 경우 한 가지 미생물이 아닌 두 가지 이상의 다른 미생물 (세균, 진균, 고세균 등)을 혼합(consortia)하여 식물병 방제에 이용하고 있고, 이러한 혼합 미생물제제를 제품화하여 국내에도 수입하고 있음

- 국제적으로 혼합미생물 기반 식물병 방제의 연구의 증가에도 불구하고 국내에는 연구 기반이 매우 미흡한 상황으로 혼합미생물제제의 연구 및 개발이 시급함
- 식물보호제를 포함하는 농약시장은 고품질화된 농산물 수요 충족과 공간적으로 한정된 재배지를 고효율로 활용하기 위한 시대적 흐름에 따라 농업경제의 중요한 요소로 여겨짐
- 농산물의 헥타르(ha)당 생산량이 증가함에 따라 경제 및 보건 측면에서 투자 수익률을 극대화하면서, 소비자의 건강한 먹거리 수요 증가의 흐름으로 식물보호제에 대한 인식 변화가 시작됨
- 식물보호제로 정리되는 농약의 사용은 농산물 생산량을 비약적으로 향상시켜 식량부족 문제 해결에 큰 영향을 미침
- 초기 화학 농약의 사용은 그렇지 않았을 경우와 비교하여, 곡류는 169%, 채소 227% 그리고 과수는 무려 909% 생산량이 증가하였음
- 또한, 농업에 들어가는 노동력의 효율성이 향상됨
- 그러나, 화학농약은 환경오염을 비롯하여 생태계의 파괴, 건강의 위협 등 삶의 질 하락으로 이어져 미래 생존을 위한 새로운 과제를 안겨주었음
- 이에 전 세계적으로 식물보호제의 화학 성분에 대한 규제를 강화하였으며, 소비자들의 식재료와 환경 영향에 대한 인식 수준이 높아지면서 유기농 식품 등 각종 친환경 농산물에 대한 수요의 증가로 유기농식품 시장 규모 확대됨
- 안전한 먹거리에 대한 인식 변화는 친환경 농법을 통한 농산물 생산법과 관리법으로 확대되었고, 유기농산물, 무농약 혹은 저농약 농산물에 대한 출하량 비중을 증가시켰음



출처: 국민농산물품질관리원 친환경인증통계정보

### <친환경농산물 출하량 비중>

- 우리나라 친환경농산물 인증관련 통계는 2014년 크게 감소한 이후 지속적으로 정체되는 양상을 보이고 있음
- 최근(2016~2018년) 유기농산물 인증면적은 연평균 11.3% 확장되었고, 인증농가 수도 9.7% 증가하였으나, 친환경농산물 인증실적의 약 70%를 차지하고 있는 무농약농산물 인증면적은 연평균 4.9% 감소되고 인증 농가 수도 7.8% 줄어듦

- 이에 따라, 화학농약이 지닌 유해성의 문제로부터 벗어나 지속적으로 안정적인 농업을 실현하게 하는 생물 농약에 대한 관심도 고조되고 있음
- 생물농약의 시장은 고품질 농식품에 대한 수요 증가와 함께 빠르게 성장

〈표 1〉 연도별 친환경농산물 인증실적 변화 추이

구분	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2016~18년 연평균 증감률(%)	전년 대비 증감률(%)	
유기	농가 수(천 호)	13.9	11.6	11.6	12.9	13.4	15.5	9.7	15.9
	면적(천 ha, A)	21.1	18.3	18.1	19.9	20.7	24.7	11.3	19.2
	호당 면적	1.5	1.6	1.6	1.5	1.5	1.6	2.9	5.9
	비중(% A/D)	1.23	1.08	1.08	1.21	1.28	1.55	13.0	20.7
	출하량(천 톤)	117	95.7	94.4	110.1	113.5	105.1	-2.3	-7.4
	ha당 출하량(톤)	5.5	5.2	5.2	5.5	5.5	4.3	-12.0	-22.3
무농약	농가 수(천 호)	89.6	56.8	48.4	49.1	46	41.7	-7.8	-9.3
	면적(천 ha, B)	98	65.1	57	59.6	59.4	53.9	-4.9	-9.3
	호당 면적	1.1	1.1	1.2	1.2	1.3	1.3	3.7	-0.7
	비중(% B/D)	5.73	3.85	3.39	3.63	3.67	3.38	-3.6	-8.0
	출하량(천 톤)	693.3	479.4	365.6	461.2	382.9	345.8	-13.4	-9.7
	ha당 출하량(톤)	7.1	7.4	6.4	7.7	6.4	6.4	-8.7	0.3
합계	농가 수(천 호)	103.5	68.4	60	61.9	59.4	57.3	-3.8	-3.6
	면적(천 ha, C)	119.1	83.4	75.1	79.5	80.1	78.5	-0.6	-1.9
	호당 면적	1.2	1.2	1.3	1.3	1.3	1.4	2.7	5.5
	비중(% C/D)	6.96	4.93	4.47	4.84	4.94	4.92	0.8	-0.4
	출하량(천 톤)	810.3	575.1	460.1	571.2	496.4	450.9	-11.2	-9.2
	ha당 출하량(톤)	6.8	6.9	6.1	7.2	6.2	5.7	-10.7	-7.4
경지면적(천 ha, D)	1,711	1,691	1,679	1,644	1,621	1,596	-1.5	-1.5	

자료: 국립농산물품질관리원 친환경인증통계정보(<http://www.enriagro.go.kr>). 경지면적은 통계청의 농업면적조사를 바탕으로 함.

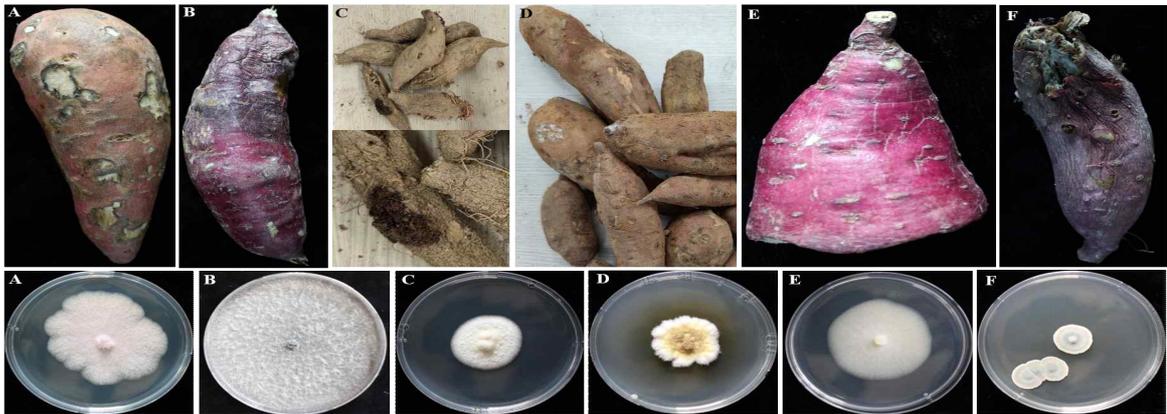
- 생물농약이란 동물, 식물, 박테리아나 바이러스 및 특정 무기물 등에서 추출된 유효성분을 통해 농작물에 피해를 주는 병해충 및 잡초를 방제하는 식물보호제로 정의됨
- 생물농약은 자연 환경에서부터 선발된 미생물, 생물 또는 성분으로 구성됨에 따라 환경에 주는 영향이 매우 적으며 특히 화학농약에서 자주 문제가 되는 잔류농약으로 인한 부작용이 없음
- 생물농약의 기전은 항생, 기생, 경쟁 및 저항성 유도 등의 방식으로 나눌 수 있음
  - 항생: 유효성분이 병원균의 생육 억제, 세포막 또는 세포 자체를 용해 방식
  - 기생: 병원균이나 해충에 미생물이 기생하여 방제 효과를 얻는 방식
  - 경쟁: 병원균과 경쟁함으로써 병원균의 영양분 사용을 방해
  - 저항성유도: 식물의 면역력을 자극하여 병해충으로부터 식물을 지키는 방식
- 대표적 생물농약인 바실러스 투링겐시스(*Bacillus amyloliquefaciens*)가 함유된 미생물제제를 사용할 경우 식물체에 묻어 있는 바실러스 투링겐시스 유래 독소를 알칼리성 소화기관을 지닌 해충이 먹고 독성이 활성화되어 살충력이 발휘되며, 산성의 위액을 통한 소화 이루어지는 인간을 포함한 포유류에는 독성을 지니지 않음
- 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)는 경쟁의 방식으로 병원균을 방제하는 생물농약 소재로, 병원균과의 영양분 경쟁에 우위를 점함으로써 방제의 효능을 지님

## 1-4. 선행연구 결과

### 1) 작물질병 방제 미생물 선발 및 효능 검증 연구

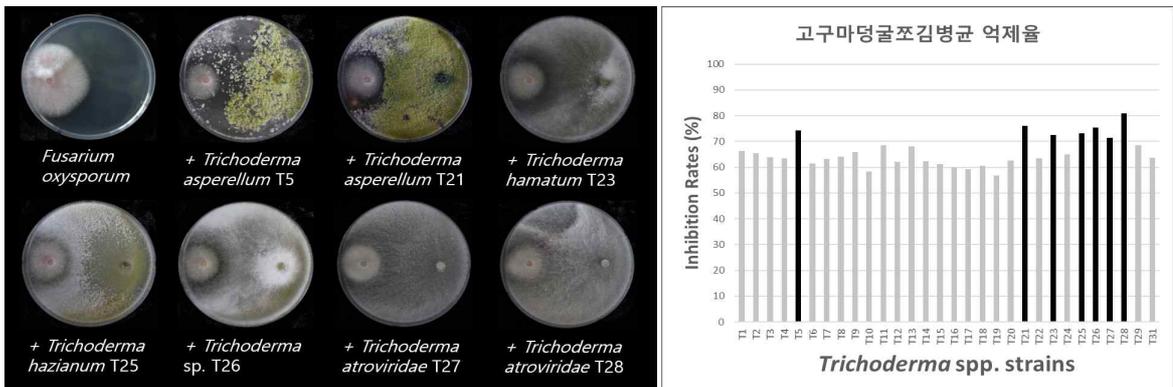
가. 고구마 질병방제 유용미생물 선발연구

- **고구마 주요 질병 분리·동정 및 확보** : 고구마 표피썩음병 (또는 덩굴썩김병)의 원인균인 *Fusarium oxysporum* (아래 그림 A), 고구마검은썩음병균 *Macrophomina phaseolina* (B), 고구마저장병균 *Aspergillus* sp. (C), 푸사리움썩음병균 *Fusarium incarnatum* (D), 푸사리움 뿌리썩음병균 *Fusarium solani* (E), 고구마저장병균 *Penicillium* sp. (F) 등 **총 68균주 분리 및 ITS영역으로 동정하여 병방제 연구용 균주 확보함.**
- 고구마 검은무늬병균 균주 (*Ceratocystis fimbriata* KACC 58679) 확보함



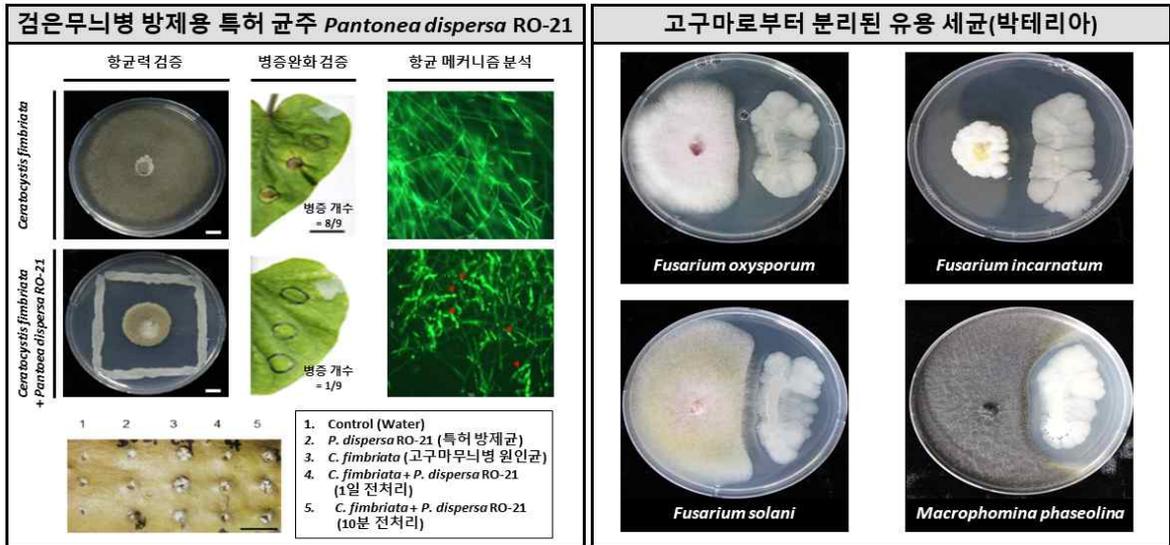
<분리·동정 및 확보한 고구마 주요병원균의 병징 및 배지사진>

- **고구마 질병제어용 진균 확보 및 선발** : 토양, 옥수수, 잔디, 후박/황칠 나무 뿌리 등에서 분리한 총 31개의 *Trichoderma* spp. 균주들의 ITS영역으로 동정 후 고구마덩굴썩김병균인 *Fusarium oxysporum* 균주와 대치배양으로 덩굴썩김병 제어용 진균 7균주 선발함



<고구마덩굴썩김병균에 대한 우수 병제어용 진균 선발>

- **고구마 질병제어용 세균 특허균주 확보 및 신균주 분리·동정·선발** : 고구마 **검은무늬병 (흑반병) 방제용 특허 균주 *Pantonea dispersa* RO-21 확보** 및 덩굴썩김병균, 푸사리움 썩음병균, 고구마저장병균, 검은썩음병균에 대한 항균 활성을 보이는 **고구마 내생균 분리·선발함**



<검은무늬병 및 덩굴쪄김병 방제용 균주의 병제어 능력 및 항균 활성 평가>  
(특허균주연구출처: 등록특허10-1910506)

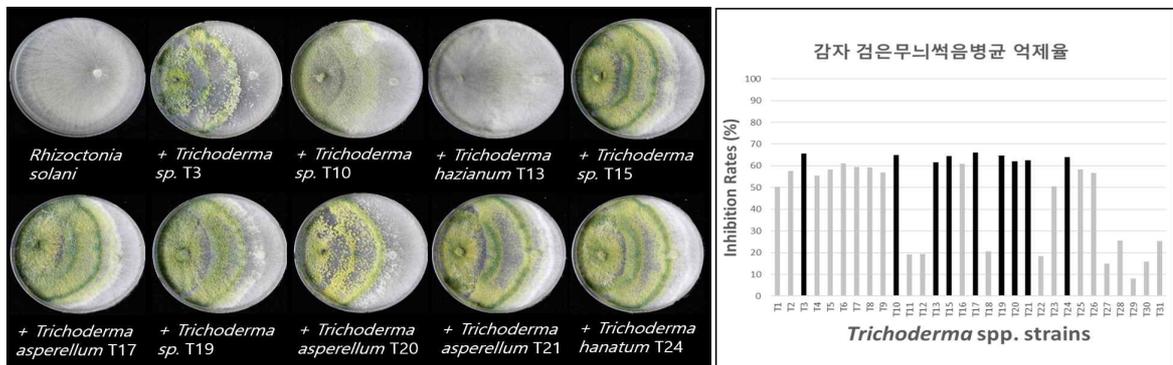
나. 감자질병 방제 유용미생물 선발연구

- 감자질병 주요 원인균 확보 : 검은무늬썩음병균(*Rhizoctonia solani*)과 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*) 균주들을 씨앗은행(KACC)에서 확보함
- 감자 질병제어용 세균 확보 및 선발 : 토양, 잔디, 식물뿌리 등에서 분리된 근권 및 내생균 300점을 이용하여 검은무늬썩음병균에 항균활성을 보이는 *Bacillus* sp. 2종 선발



<검은무늬썩음병균에 대한 병억제용 세균 선발>

- 감자 질병제어용 진균 확보 및 선발 : 토양, 옥수수, 잔디, 후박/황칠 나무 뿌리 등에서 분리·동정된 총 31개의 *Trichoderma* spp. 균주들의 감자 검은무늬썩음병균인 *Rhizoctonia solani* 균주와 대치배양으로 검은무늬썩음병 제어용 진균 9균주 선발함



<감자 검은무늬썩음병에 대한 우수 병제어용 진균 선발>

## 2) 유용 미생물 고농도 대량배양 연구

가. 작물생육촉진 및 방제 미생물 대량배양 공정 개발

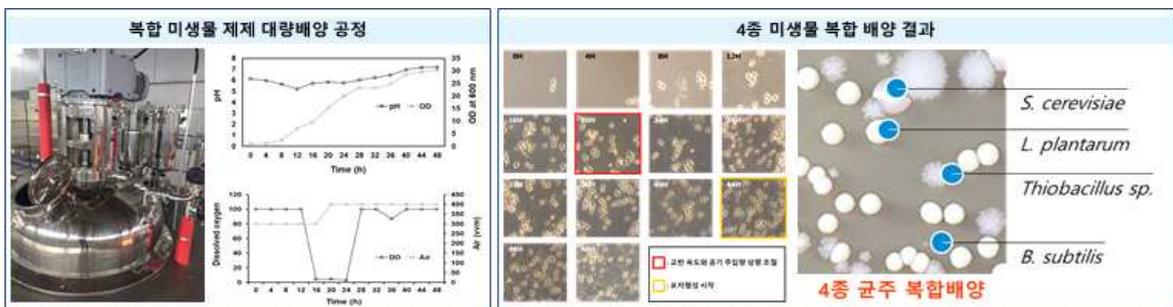
- **유용 미생물 대량배양 산업배지 개발** : 작물생육을 촉진하며 질병 방제에 관여하는 유용 미생물의 고농도 배양을 위하여 선발된 미생물의 생리적 특성과 영양요구도를 고려하여 **양산 생산이 가능한 경제적인 산업배지를 개발함**
- 기존 배지에서는 최대 약  $8.1 \times 10^7$  cfu/ml 수준에서 머무르던 균의 성장을 최대 약  $1.4 \times 10^9$  cfu/ml으로 끌어 올려 생산성을 약 10% 이상 향상시킴



<유용 미생물 고농도 대량 배양 공정 최적화>

나. 기능성 미생물 복합배양 공정 개발

- 기능성 미생물의 산업화 공정 개발 연구의 일환으로 **4종 유용미생물을 하나의 공정으로 고농도 대량배양함**
- 농축산업에서 작물 및 가축의 생산성 향상과 토양질과 공기질을 포함하는 환경 개선을 위하여 기능성으로 사용되는 미생물제제, 고초균(*Bacillus subtilis*), 유산균(*Lactobacillus plantarum*), 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 그리고 황산화균(*Thiobacillus sp.*)의 복합 배양 최적화 연구를 수행하였으며, 결과적으로 **상기 4종 미생물을 한 회(1 time)의 발효조 운용으로 상용화 가능 수준( $\sim 10^8$ cfu/ml 이상) 톤 단위 양산형 고농도 배양 공정을 확립함**



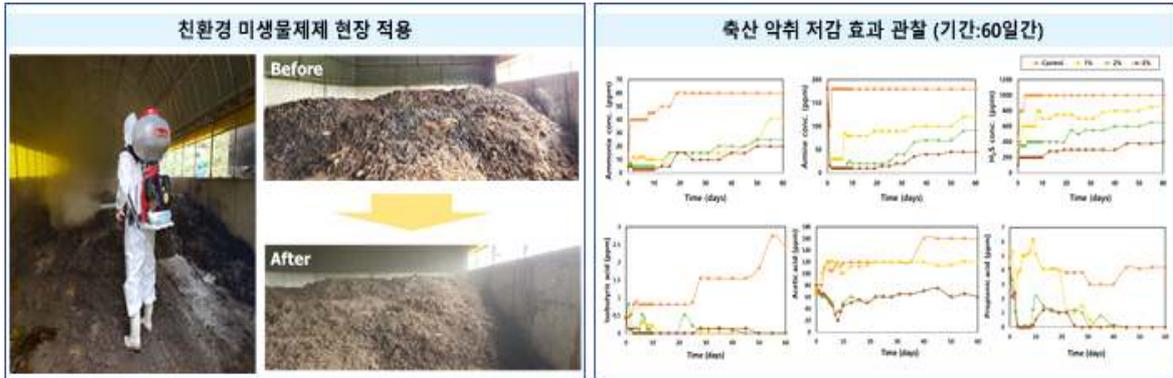
<유용미생물 4종 복합 배양 최적화 공정 개발>

## 3) 친환경 미생물제제 개발 연구

가. 축산 약취 저감용 복합미생물제제 개발 및 현장 실적용

- 축산업의 4대현안(약취, 분뇨, 가축질병, 안전한 축산물) 중 해결의 사안이 시급한 축산 현장의 냄새(약취) 문제를 해결하기 위하여 **약취의 주원인으로 지적되어온 암모니아, 아민, 황화수소, 휘발성지방산 등을 효과적으로 제어할 수 있는 미생물제제를 개발함**

- 천연물 소재와 3종 이상의 미생물을 혼합하여 개발된 연구팀의 복합미생물제제는 악취 발생지에 도포되어 생화학적 막을 형성함으로써 **악취 확산을 신속히 차단하며, 악취 원인 물질을 지속적으로 분해하여 저감효과가 유지됨**



<축산 악취 저감용 복합미생물제제 개발 및 현장 실적용>

나. 현장 맞춤형 미생물제제 제형 최적화 및 시제품 개발

- 연구실에서 개발된 미생물제제의 현장적용 단계에서 미생물이 지닌 효능을 극대화하기 위하여, **보관 온도에 상관없이 생균수를 유지하며 토양 정착력을 강화**하는 연구를 수행함
- 미생물제제의 제형공정에 도입되는 보존제, 보조제, 코팅제를 탐색하였으며 **가혹경시 평가에서 생균수가 일정하게 유지되는 최적 성분비를 도출**함
- 미생물제제의 성분에 대한 접근과 더불어 액상, 분말, 펠렛, 환 등 다양한 형태적 접근을 함께 고려하여 실제 농가(현장)에서 요구되는 상황별 최적 조건의 제형을 개발함



<미생물제제 제형 공정 개발 및 시제품 개발>

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 1) 서류(감자, 고구마) 주요 작물병 길항미생물 선발

#### • 서류작물(감자, 고구마)과 근권 토양으로부터 미생물 분리

- 검은무늬썩음병과 균핵병과 같은 감자 주요 작물병과 덩굴쪄짐병, 검은무늬병과 같은 고구마 주요 작물병 방제를 위하여 길항미생물 선발 연구를 수행함
- 건강한 감자와 고구마, 그리고 이들이 수확된 토양에는 병원균 감염을 회피할 수 있는 우수한 길항미생물이 존재할 것으로 판단되어 내생미생물과 토착미생물 순수 분리연구를 수행함
- 엄격히 구획되어 화학농약 및 전염성 질병에 대하여 상대적으로 차단되어 있는 시험 재배지(전라남도 나주시 소재)로부터 건강한 감자와 고구마, 그리고 토양 시료를 채취함
- 이때, 3곳 이상의 상호 독립적인 장소에서 각 시료를 채취하여 발굴되는 미생물의 종 다양성을 확보함
- 내생 미생물 분리를 위하여, 수확된 감자와 고구마는 증류수, 70% 알코올, 그리고 50% 표백제를 순차적으로 사용하여 외부 오염원(토양 및 오염균)을 제거한 후 순수하게 감자 괴경 또는 고구마 괴근에 위치한 내생균을 순수 분리함
- 근권 토양 미생물 분리를 위하여, 채취된 근권 토양을 멸균수에 연속 희석하여 고체 영양배지에 도말하여 세균 또는 진균을 순수 분리함

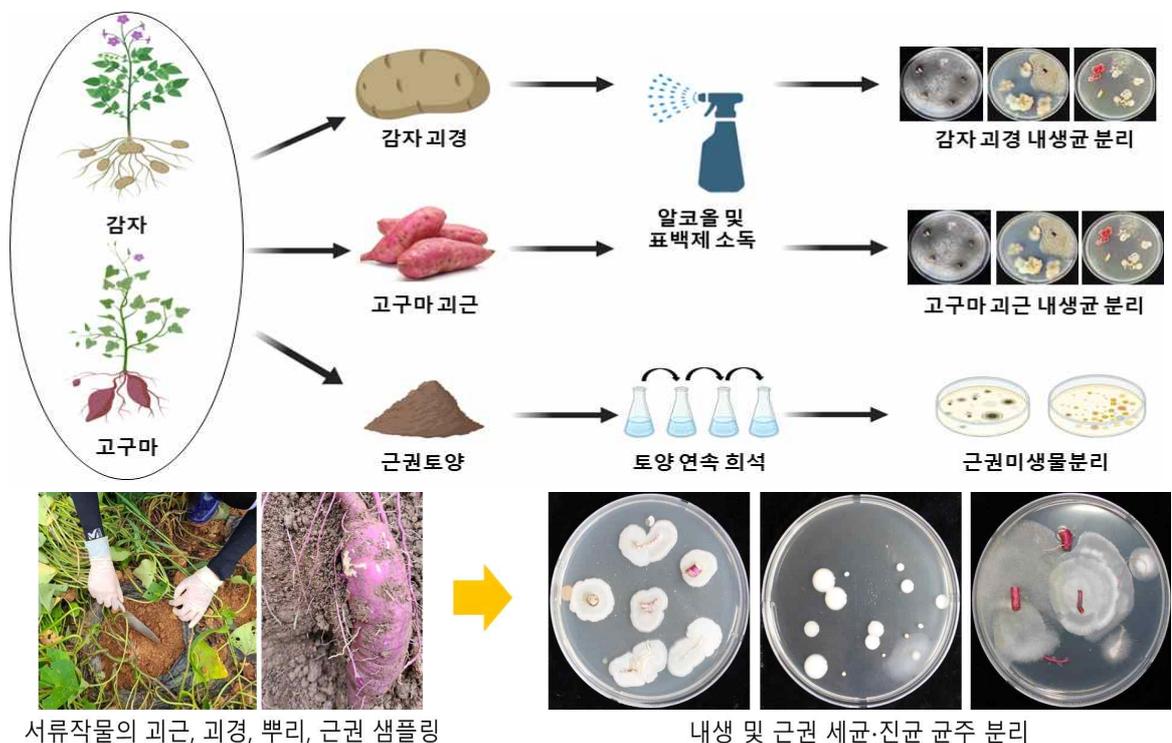


그림 1. 서류작물의 내생 그리고 근권에 존재하는 우수 길항미생물 선발

#### • 우수 길항미생물 선발을 위한 대치배양시험 수행

- 순수 분리되어 획득된 내생 미생물과 토양미생물은 감자 질병 병원균인 검은무늬썩음병균 (*Rhizoctonia solani*)과 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*), 그리고 고구마 질병 병원균인 덩굴쪄짐병균(*Fusarium oxysporum*)과 검은무늬병균(*Ceratocystis fimbriata*)과의 대치 배양을 통해 우수한 길항미생물을 선발함

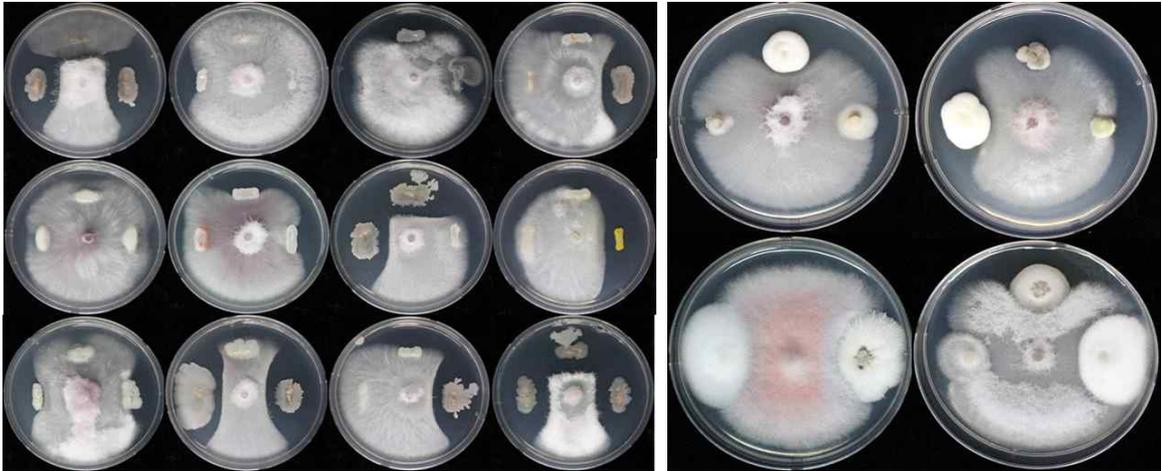


그림 2. 우수 길항세균(좌), 우수 길항진균(우)를 선발하기 위한 대치배양 및 병제어 검정

## 2) 선발 미생물의 동정을 위한 분자계통학적 분석

### • 선발 미생물의 동정

- 검정을 통해 병 제어능이 관찰된 미생물(세균 또는 진균)은 16s rRNA(세균)와 ITS(진균) 서열분석을 실시하여 속명을 동정하였고, 계통분류학적 분석을 실시함
- 종명을 동정하기 위해서 세균은 16s rRNA 영역과 더불어 gyrB 유전자의 염기서열 분석과 분자계통학적 분석으로 종명 동정을 하였고, 선발된 길항진균은 ITS, EF1- $\alpha$ , Calmodulin 영역의 염기서열을 분석 및 분자계통학적 분석을 통하여 종명 동정하였음

## 3) 기 확보된 서류작물병 제어 미생물의 효능검증 및 특성분석

### • 기 확보된 길항세균 (CMML20-18, CMML20-20)의 효능검증 및 특성분석

- 기 확보된 *Bacillus velezensis* CMML 20-18 균주와 *B. velezensis* CMML 20-20 균주의 감자 질병 병원균인 검은무늬썩음병균, 균핵병균과 고구마 질병 병원균인 덩굴쪄김병균, 검은무늬병균에 대해 균주 배양액, 배양여과액, 균주가 생산하는 휘발성 유기화합물의 항진균활성을 검정함. 먼저 균주 배양액의 항진균활성을 검정하기 위해 대치배양을 진행함. 구체적으로, *B. velezensis* CMML 20-18, *B. velezensis* CMML 20-20 균주를 TSB 액체배지에 진탕배양한 후, 총 균수를  $1 \times 10^7$  CFU/ml로 희석함. 10  $\mu$ l의 배양액을 PDA 페트리디쉬 중심에서 3 cm 떨어진 세 지점에 접종하여 25  $^{\circ}$ C 항온기에서 배양함. 배양액 접종 24시간 후 5 mm 코르크 보러를 이용하여 각 고구마 및 감자 병원균의 플러그를 페트리디쉬 중앙에 치상함. 대조군의 경우 균주 배양액 접종 없이 병원균 플러그만 치상한 플레이트로 사용함. 대조군과 실험군 플레이트는 25  $^{\circ}$ C 항온기에서 7 내지 14일간 배양한 후 병원균이 자라는 정도를 측정함. 대조군과 실험군의 병원균 생장이 저해되는 정도를 비교하여 백분율로 나타내어 수치화함
- 다음으로 균주 배양여과액의 항진균활성을 검정하기 위해 균주 배양 여과액을 혼합한 PDA 배지를 제작해 병원균의 생장이 저해되는 정도를 확인함. 구체적으로, *B. velezensis* CMML 20-18 균주를 TSB 액체배지에 30  $^{\circ}$ C에서 일주일간 진탕배양한 후, 원심분리하여 상등액을 0.2  $\mu$ m 크기의 주사기 필터로 여과하여 배양 여과액을 획득함. 배양 여과액을 PDA 배지에 각 1%, 5%, 10% 혼합하여 배양 여과액을 포함한 PDA 배지를 제작함. 5 mm 코르크 보러를 이용하여 각 고구마 및 감자 병원균의 플러그를 각 농도별 페트리디쉬 중앙에 치상함. 대조군의 경우 균주 배양 여과액을 희석하지 않은 PDA 플레이트에 병원균을 치상함. 대조군과 실험군 플레이트는 25  $^{\circ}$ C 항온기에서 7 내지 14일간 배양한 후

---

병원균이 자라는 정도를 측정함. 대조군과 실험군의 병원균 생장이 저해되는 정도를 비교하여 백분율로 나타내어 수치화함

- 균주가 생산하는 휘발성 유기화합물의 항진균 효과분석은 샌드위치 플레이트 방법을 수정하여 진행함. 구체적으로, *B. velezensis* CMML 20-18 균주를 TSB 액체배지에 30 °C에서 진탕배양한 후, 총 균수를  $1 \times 10^7$  CFU/ml로 희석함. 100  $\mu$ l의 배양액을 TSA 배지 플레이트에 접종하여 도말하여 30 °C 항온기에서 배양함. 배양 24시간 이후 5 mm 직경의 코르크 보러를 사용하여 각 고구마 및 감자 병원균의 플러그를 PDA 배지 플레이트 중앙에 접종하고 미리 균주를 배양한 TSA 배지를 마주보게 겹치게 두고 파라필름으로 밀봉한 후 25 °C 항온기에서 7 내지 14일간 배양함. 대조군의 경우 균주를 도말하지 않은 TSA 배지와 병원균을 접종한 PDA 배지를 마주보게 하여 사용함. 대조군과 실험군의 병원균 생장이 저해되는 정도를 비교하여 백분율로 나타내어 수치화함
- 기 확보된 *B. velezensis* CMML 20-18균주와 *B. velezensis* CMML 20-20 균주의 감자 질병 병원균인 검은무늬썩음병균, 균핵병균과 고구마 질병 병원균인 덩굴쪄김병균, 검은무늬병균에 대해 감자 괴경과 고구마 괴근에서 병 억제력 효능을 검증함. 구체적으로, 감자 괴경과 고구마 괴근을 1% 차아염소산나트륨 (NaOCl)을 이용하여 표면살균한 후 멸균수를 이용해 세척한 후 클린벤치에서 말려 준비함. *B. velezensis* CMML 20-18 균주를 TSB 액체배지에 30 °C에서 진탕배양한 후, 총 균수를  $1 \times 10^7$  CFU/ml로 희석한 배양 희석액을 준비함. 감자 괴경과 고구마 괴근에 5 mm 코르크 보러를 사용해 깊이 약 1 cm의 구멍을 뚫어 100  $\mu$ l의 배양 희석액을 접종한 후 1 시간 후 5 mm의 각각 감자 병원균과 고구마 병원균 플러그를 접종함. 대조군의 경우 균주를 배양하지 않은 TSB 배지를 접종한 후 병원균을 접종하여 사용함. 배양희석액과 병원균을 접종한 감자 괴경과 고구마 괴근을 습실 처리하여 병원균 별로 4 내지 5 주간 배양하여 병징의 크기를 측정함

#### • 기 확보된 길항진균의 효능검증 및 특성분석

- 기 확보된 *Trichoderma asperellum* CMML 20-29 균주의 감자 및 고구마 질병 병원균인 덩굴쪄김병균, 검은무늬병균, 균핵병균, 검은무늬썩음병균과의 대치배양을 진행함. CMML 20-29 균주와 덩굴쪄김병균, 검은무늬병균, 균핵병균, 검은무늬썩음병균을 7 일간 배양한 후, 90 mm 크기의 PDA 배지에 5 mm 너비의 CMML 20-29 균주의 플러그와 5 mm 너비의 질병 병원균 플러그를 5 cm의 간격을 두고 치상함. 대조군으로는 90 mm PDA 배지에 질병 병원균 플러그만을 치상해 사용함. 대조군과 실험군 모두 25°C 항온기에서 7 일간 배양 후, 대조군의 질병 병원균의 균사 길이 대비 실험군의 질병 병원균의 균사 길이를 측정해 방제율을 측정함
- *T. asperellum* (CMML 20-29) 균주의 배양여과액의 고구마 질병 병원균 항균활성을 확인함. 5mm 너비의 CMML 20-29 균주 플러그를 PDA 배지에 치상 후, 7일간 25°C 항온기에서 배양함. 배양한 CMML 20-29 균주 PDA 배지에 멸균수를 붓고, 멸균한 스프레더로 균총표면을 비벼서 얻은 현탁액을 거즈로 걸러 포자현탁액을 제작함. 포자현탁액의 포자 수를  $1 \times 10^7$  spore/ml로 맞추기 위해 멸균수로 희석해 사용함. 포자현탁액을 250 mL의 PDB 배지에 2.5mL 접종하고, 7 일간 25 도 진탕배양기에서 배양함. 진탕 배양한 균사와 포자를 Miracloth, Whatman 1호 필터 페이퍼, 포어 사이즈 0.2  $\mu$ m의 필터로 걸러 배양여과액을 분리함. 배양여과액과 PDA 각 50%의 비율로 섞어 배양 여과액을 포함한 PDA 배지를 제작함. 5 mm 코르크 보러를 이용하여 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균의 플러그를 배양 여과액을 포함한 PDA 배지 정중앙에 치상함. 대조군으로는 배양 여과액을 포함하지 않은 PDA 배지를 사용함. 대조군과 실험군 배지 모두 25°C

항온기에서 7 일간 배양 후, 병원균의 균사 생장 길이를 측정하여 CMML 20-29 균주의 배양 여과액의 방제율 측정함

- 기 확보된 *T. asperellum* CMML 20-29 균주의 고구마 질병 병원균인 덩굴쪄김병균, 검은무늬병균에 대해 고구마 괴근에서 병 억제력 효능을 검증함. 고구마 괴근을 1% 차아염소산나트륨 (NaOCl)을 이용하여 표면살균한 후 멸균수를 이용해 세척한 후 클린벤치에서 말려 준비함. *T. asperellum* CMML 20-29 균주를 25도 항온기에서 7일간 배양한 후, 포자 현탁액을 분리함. 포자 수를  $1 \times 10^6$  spore/ml로 맞추기 위해 멸균수로 희석함. 고구마 괴근에 5 mm 코르크 보러를 사용해 깊이 약 1 cm의 구멍을 뚫어 10  $\mu$ l의 포자현탁액을 접종한 후 1 시간 후 5 mm의 고구마 병원균 플러그를 접종함. 대조군의 경우 멸균수를 동일한 방법으로 접종한 후 병원균을 접종하여 사용함. 포자현탁액과 병원균을 접종한 고구마 괴근을 습실 처리하여 병원균 별로 4 내지 5 주간 배양하여 병징의 크기를 측정함

#### 4) 기 확보된 서류작물병 제어 미생물의 병방제 메커니즘 분석

##### • 길항진균 *Trichoderma asperellum* CMML 20-29 균주의 형질전환법 개발

- 혼합된 길항미생물 혹은 길항미생물-병원균, 미생물-작물 사이의 상호 질병방제 메커니즘을 분석하기 위하여 길항미생물 *Trichoderma asperellum*의 형질전환법을 개발함

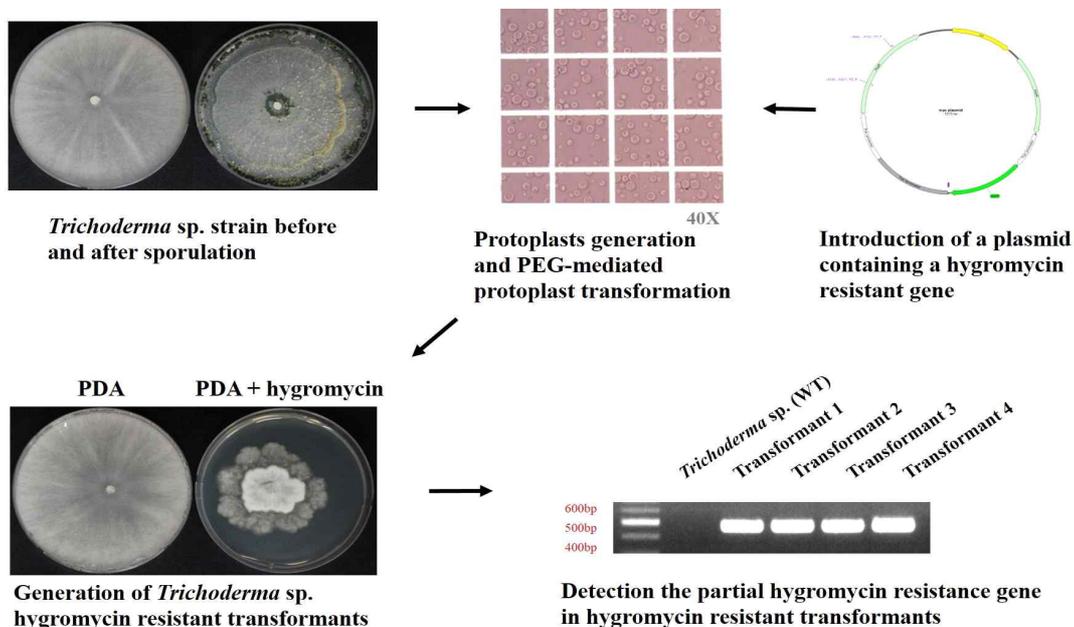


그림 3. 미생물간 상호 질병 메커니즘 연구를 하기 위한 길항미생물 *Trichoderma* 균주의 형질전환법 개발

- 먼저, 벡터를 넣기 위한 *T. asperellum* CMML 20-29 균주의 원형질체를 제작함. GYEC 액체 배지(1.5% glucose, 0.3% yeast extract, 0.5% N-Z-Amine) 100mL에 포자현탁액 ( $1 \times 10^7$  spore/ml) 1 mL을 접종해 25도 진탕배양기에서 160 rpm으로 18시간 배양함. 배양액을 Miracloth로 걸러 균사를 분리한 뒤, Osmotic solution (50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 M Mannitol, 50 mM MES, pH 5.5)로 균사에 묻은 배지를 씻어냄. 분리한 균사 0.2 g당 0.1 g의 Lysing enzyme (Sigma Chemicals Co.)과 7 mL의 osmotic solution을 섞어 50mL 팔콘 튜브에 넣고, 상온에서 120rpm으로 배양함. 최대 4시간에서 8시간 동안 원형질체 수를 시간마다 측정해 원형질체 수가  $1 \times 10^6$  protoplast/ml 정도 되었을 때,

---

배양을 멈추고 원형질체 현탁액을 Miracloth에 거른 뒤 8000 rpm, 4도에서 20 분 동안 원심분리를 진행함. 분리한 원형질체는 osmotic solution 2 mL에 다시 희석시켜 사용함

- 제작된 원형질체 현탁액 250 $\mu$ l와 pDht\_SK\_PE 벡터 5 $\mu$ g을 에펜도르프 튜브에 넣고 플리킹한 후 얼음에 20 분 동안 배양함. 현탁액과 벡터가 섞인 튜브에 350 $\mu$ l의 40% Polyethylene glycol을 넣고 즉시 42도 히팅블럭에 1분 동안 둠. 그 후 30분간 얼음에 배양 후, 50mL 팔콘 튜브에 Regeneration media 5 mL와 원형질체 현탁액을 모두 넣고 30도, 180rpm으로 12 시간 이상 배양함. 그리고 Hygromycin 500ppm을 넣은 RM agar 배지에 12시간 배양한 현탁액을 멸균한 스프레더로 도말함. 도말한 배지는 30도 항온기에서 3-7일 동안 배양하고, 콜로니가 올라오면 현미경으로 GFP를 확인해 새로운 Hygromycin 500ppm 배지에 계대함

- **항진균성 유효활성 물질 규명을 위한 *Trichoderma asperellum* CMML 20-29 GC-MS 분석**

- *Trichoderma asperellum* CMML 20-29의 휘발성 물질의 항균 활성 능력을 확인하기 위해 Sandwich plate assay를 진행함. 5mm의 CMML 20-29 균주 플러그를 PDA 배지에 치상해 6일간 25도 항온기에서 배양함. 배양한 CMML 20-29 균주 PDA 배지 플레이트를 5mm의 고구마 병원균인 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균 플러그를 치상한 PDA 배지 플레이트와 맞대어 파라필름으로 플레이트 틈을 밀봉함. 대조군으로는 무균 PDA 배지 플레이트와 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균 플러그를 치상한 PDA 배지 플레이트를 밀봉해 사용함. 밀봉한 플레이트를 25도 항온기에 7일 간 배양한 후 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균의 균사 성장 길이를 측정함
- 항진균력이 검증된 CMML 20-29 균주의 휘발성 물질 규명을 위해 Gas-chromatography-mass spectrometry(GC-MS) 분석을 수행함. GC-MS 분석을 위해 20 mL Headspace vial에 5 mL 용량의 PDA 사면 배지를 균힘. 그리고 5mm의 CMML 20-29 균주 플러그를 PDA 배지에 치상해 6일간 25도 항온기에서 배양함. 5 mm 코르크 보러를 이용해 CMML 20-29 균주 플러그를 Headspace vial 내의 사면배지 정중앙에 치상하고, 7일 간 스크류 캡을 닫지 않은 상태로 배양함 25도 항온기에서 배양함. 7일 동안 배양한 후에, 스크류 캡을 완전히 닫고 파라필름으로 휘발성 물질이 유출되지 않도록 완전히 밀봉함. 대조군으로는 무균상태의 PDA 사면배지 headspace vial을 사용함. 실험군과 대조군 모두 25도 항온기에 4일을 배양함.
- CMML 20-29 균주의 휘발성 물질을 분석하기 위해 SPME fiber(65  $\mu$ m PDMS/DVB)를 이용해 80도에서 60분동안 headspace gas를 수집함. 컬럼은 DB-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m)를 이용하고, 이동상 가스인 헬륨의 유속은 분당 1 mL이며 injection mode는 splitless mode를 사용함. 컬럼 오븐 온도는 40 $^{\circ}$ C(2분 유지), 10 $^{\circ}$ C/분씩 200 $^{\circ}$ C까지 승온하고, 25 $^{\circ}$ C/분 260 $^{\circ}$ C까지 승온하고 정치 5분 유지함
- GC-MS(TQ 8050, Shimadzu, Kyoto, Japan)을 사용하여 electron impact ionisation 70eV, source 온도 230 $^{\circ}$ C, 45-400 m/z 범위에서 full-scan 모드로 질량 분석(mass spectrometry)을 수행함
- GC-MS analysis Labsolutions 소프트웨어를 이용하여 m/z와 molecular formula를 검출하고, 휘발성 물질의 식별을 위해 검출된 m/z와 molecular formula, Retention index 결과와 NIST library를 통해 화합물 성분 확인함

- **기 확보된 길항세균 CMML 20-20 균주의 항균활성 물질 분석**

- 200mL의 LB 배지가 포함된 삼각 플라스크에서 기확보된 *Bacillus velezensis* CMML 20-20 균주를

30°C에서 150rpm으로 48시간 동안 진탕하여 성장시킴. 배양물을 4°C에서 15분간 9,000 × g로 2회 원심분리한 후, 상등액을 무균여과(0.45µm)함. 상등액을 6M HCl을 사용하여 pH 2.0으로 조정한 후 밤새 4°C에서 침전시킴. 산 침전물을 4°C에서 15분간 9,000 × g로 원심분리한 후 상등액을 제거하고 펠렛을 수집하여 1 mL 메탄올 용매에 용해시킴. speedvac 농축기 ISS110을 사용하여 진공 하에서 메탄올을 증발시킨 후 1 mL의 메탄올에 다시 용해시킴. 0.2µm 친수성 필터막을 통해 불순물을 여과하여 리포펩타이드를 얻음. 농축된 여과액은 C<sub>18</sub> 컬럼(4.6mm × 250mm, Atlantis, T3, Waters)이 장착된 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)로 분석함. 세 가지 리포펩타이드 계열의 RP-HPLC 분획 그룹은 0.5 mg mL<sup>-1</sup> 표준 이틀린, 펜기신 및 셸팩틴을 사용하여 식별함. 이동상은 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)을 함유한 정제수(A) 및 아세토니트릴(B)을 이용함. 아세토니트릴-정제수 이동상 시스템에 대한 최종 최적화된 기울기 전략은 0~3분: 45% 아세토니트릴에서 50% 아세토니트릴; 3-8분: 50% 아세토니트릴에서 80% 아세토니트릴; 8-25분: 80% 아세토니트릴에서 100% 아세토니트릴. 이동상은 0.8 mL/min의 속도로 용리되며 크로마토그램은 205 nm에서 획득함

## 5) 기 확보된 서류작물 병방제 미생물의 실적용

### • 기 확보된 서류작물병 제어 미생물의 현장 적용

- 확보된 길항미생물인 *Bacillus velezensis* CMML 20-18, *Bacillus velezensis* CMML 20-20, *Trichoderma asperellum* CMML 20-29 균주의 고구마의 덩굴쪄김병과 검은무늬병 병역제능을 시험 재배지에서 현장 적용 평가를 진행함. 최근 3~5년 이내 고구마를 재배하지 않은 시험 재배지에 베니하루카 품종의 고구마 순을 식재했으며, 식재 후 균주 CMML 20-18, CMML 20-20 배양액 (1X10<sup>7</sup> CFU/ml), CMML 20-29 (1X10<sup>6</sup> spore/ml) 포자현탁액을 포장에 4회 관주처리함. 길항 미생물을 관주 처리 시 동시에 아족시스트로빈 (100ppm) 100ml를 4회 관주처리함. 균주 혼합 처리구의 경우는 각 균주 배양 희석액과 포자 현탁액을 50ml씩 처리함. 2회차 길항 미생물 관주 처리 1 일 후, PDB 배지에서 배양한 고구마 병원균의 균사체를 갈아 고구마에 발병시킴. 최종 처리 후 2달 뒤 고구마 병 발생 정도를 0 ~ 7단계로 측정해 방제값을 계산함. 감자(새봉)의 균핵병균, 검은 무늬썩음병균 방제를 위한 포장 시험도 동일한 방법으로 진행되었음



고구마 순 심기

고구마 포장 (전라남도 나주시)

감자 포장 (전라남도 나주시)

고구마 수확

그림 4. 기 확보된 길항미생물에 대한 서류작물 포장시험 수행

## 6) 선발된 길항미생물의 상호관계 및 병증완화 메커니즘 분석

### • 선발된 길항미생물의 효능검증 및 특성분석

- 선발된 서류작물병 제어 미생물인 *Bacillus velezensis* CMML 21-47, *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 감자 질병 병원균인 검은무늬썩음병균, 균핵병균과 고구마 질병

병원균인 덩굴쪄김병균, 검은무늬병균에 대해 균주 배양액의 항진균활성을 검정하기 위해 대치배양을 진행함. 구체적으로, *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주를 TSB 액체배지에 진탕배양한 후, 총 균수를  $1 \times 10^7$  CFU/ml로 희석함. 10  $\mu$ l의 배양액을 PDA 페트리디쉬 중심에서 3 cm 떨어진 세 지점에 접종하여 25 °C 항온기에서 배양함. 배양액 접종 24시간 후 5 mm 코르크 보러를 이용하여 각 병원균의 플러그를 페트리디쉬 중앙에 치상함. 대조균의 경우 균주 배양액 접종 없이 병원균 플러그만 치상한 플레이트로 사용함. 대조균과 실험균 플레이트는 25 °C 항온기에서 7 내지 14일간 배양한 후 병원균이 자라는 정도를 측정함. 대조균과 실험균의 병원균 생장이 저해되는 정도를 비교하여 백분율로 나타내어 수치화함

- 선발된 서류작물병 제어 미생물인 *Bacillus velezensis* CMML 21-47, *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 생육 조건, 효소 생성능, 사이드로포어 생산능, 식물 성장 촉진인자 형성능을 확인함. 먼저 선발된 균주의 생육 조건을 확인하기 위해 온도와 pH 별로 배양한 후 성장 곡선 그래프를 그려 확인하였다. 구체적으로 온도 별 성장 곡선을 확인하기 위해 *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주를 각각 TSB 액체배지에 접종하여 각각 10 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C에 150 rpm 조건에서 진탕배양함. 각 시간 간격으로 600 nm 파장에서 흡광도를 측정함. pH 별 성장 곡선도 마찬가지로 *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주를 각각 pH4, pH5, pH6, pH7, pH8, pH9의 TSB 액체배지에 접종하여 30 °C, 150 rpm 조건에서 진탕배양한 후 각 시간 간격으로 600 nm 파장에서 흡광도를 측정함
- 다음으로 선발된 균주의 단백질 분해효소 생성능을 확인하기 위해 *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주를 각각 TSB 액체배지에서 전배양한 후, 10  $\mu$ l의 배양액을 카제인 평판 배지 (skim milk 100 g/L, agar 20 g/L)에 접종하여 30 °C 항온기에서 배양하여 균주 주변의 투명대를 확인함
- 선발된 균주의 사이드로포어 생산능을 확인하기 위해 *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주를 각각 TSB 액체배지에서 전배양한 후, 10  $\mu$ l의 배양액을 CAS (chrome azurol S)가 포함된 최소 배지인 CAS 블루 고체배지에 접종하여 30 °C 항온기에서 배양하여 균주 주변 배지의 색 변화를 확인함.
- 마지막으로 선발된 균주의 식물 성장 촉진인자인 Indole-3-acetic acid (IAA) 생성능을 확인함. 구체적으로, *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주를 각각 NB 액체배지에 접종하여 30 °C, 150 rpm 조건에서 24시간 배양한 후 L-tryptophan을 첨가한 NB 배지에 균주 배양액 100  $\mu$ l를 접종하여 각각 24, 48 및 72 시간 동안 배양함. 배양액을 6000 rpm으로 원심분리한 후 얻은 상등액을 같은 용량의 Salkowski reagent와 반응시켜 나타나는 색을 530 nm의 파장에서 흡광도를 측정함
- 선발된 서류작물병 제어 미생물인 *Bacillus velezensis* CMML 21-47, *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 고구마 저장병 억제에 대한 상호작용을 확인하기 위해 저장된 고구마에 *B. velezensis* CMML 21-47, *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주 배양액을 단독 또는 혼합 배양액을 직접 살포 또는 도말한 평판 배지와 함께 저장하여 고구마 저장 병 방제와 품질 유지 능력을 확인함. 구체적으로, *B. velezensis* CMML 21-47, *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주를 TSB 액체배지에 30 °C에서 진탕 배양한 후 총 균수가  $1 \times 10^8$  CFU/ml이 되도록 희석하여 균주 배양액을 준비함. 혼합 배양액은 두 균주의 배양액을 1:1로 섞어서 사용함. 분무 처리의 경우, 두 균주의 단독 배양액과 혼합 배양액을 1 ml씩 소형 분무기로 고구마에 개별적으로 고르게 살포한 후 종이상자에 담고, 멸균한 플라스틱 상자에 넣어 저장함. 무처리구는 균주를 배양하지 않은 TSB

배지를 살포하여 사용함. 휘발성 물질 처리의 경우, 두 균주의 배양액을 TSA 고체 배지에 200  $\mu$ l 씩 도말하여 30 °C 항온기에서 24시간 이상 배양함. 멸균한 플라스틱 박스에 각 균주 단독 또는 혼합하여 고체배양한 페트리디쉬의 뚜껑을 열어 고구마와 함께 보관함. 단독 처리의 경우 각 균주 페트리디쉬 30개를 함께 보관하였고, 혼합 처리의 경우 두 균주를 각각 15개씩 넣어 보관함. 무처리구의 경우 균주를 도말하지 않은 TSA 배지 30개를 함께 보관하여 사용함. 이후 무처리구와 각 균주의 단독 또는 혼합 처리구에서 저장병 발병률을 계산하여 방제가를 계산함

- 서류작물병 발병 억제 미생물로 선발한 *Trichoderma hamatum* CMML 21-62, *Trichoderma virens* CMML 21-65 균주의 감자 및 고구마 질병 병원균인 덩굴쪄김병균, 검은무늬병균, 균핵병균, 검은무늬썩음병균과의 대치배양을 진행함. CMML 21-62, CMML 21-65 균주와 덩굴쪄김병균, 검은무늬병균, 균핵병균, 검은무늬썩음병균을 7 일간 배양한 후, 90 mm 크기의 PDA 배지에 5 mm 너비의 CMML 21-62, CMML 21-65 균주의 플러그와 5 mm 너비의 질병 병원균 플러그를 5 cm의 간격을 두고 치상함. 대조군으로는 90 mm PDA 배지에 질병 병원균 플러그만을 치상해 사용함. 대조군과 실험군 모두 25 도 항온기에서 4일 내지 7 일간 배양 후, 대조군의 질병 병원균의 균사 길이 대비 실험군의 질병 병원균의 균사 길이를 측정해 방제율을 측정함
- *Trichoderma virens* CMML 21-65, *Trichoderma hamatum* CMML 21-62을 7일간 25도 항온기에 배양함. CMML 21-65, CMML 21-62 균주의 균총에 멸균수를 붓고, 멸균한 스프레더로 균총을 비벼 포자현탁액을 분리해 거즈로 거름. 포자현탁액의 포자 수가  $1 \times 10^7$  포자/mL가 되도록 멸균수로 희석하고, 단독배양을 위해 200mL의 PDB 액체 배지에 1mL씩 CMML 21-65, CMML 21-62 균주를 접종함. 또 공배양을 위해 CMML 21-65, CMML 21-62 균주를 500 $\mu$ l씩 200 mL PDB 액체 배지에 접종함. 접종한 PDB 배지는 25도 진탕배양기에서 160 rpm으로 7일간 배양함. 두 균주를 PDB에 공배양해 얻은 배양여과액과 단배양해 얻은 배양여과액을 PDA 배지에 50% 비율로 첨가함. 대조군으로는 5 mm 코르크 보러를 이용하여 PDA 배지에 서류작물병균을 치상해 사용함. 배양여과액 배지에 5 mm 코르크 보러를 이용해 서류작물병균을 정중앙에 치상해 대조군 대비 균사 생장의 길이를 확인해 백분율로 측정함
- Chitinase의 활성을 보기 위해, chitinase detection medium을 제작함. 균주가 Collidal chitin과 지시약인 bromocresol purple을 배지에 첨가해 *Trichoderma virens* (CMML 21-65), *Trichoderma hamatum* CMML 21-62 두 균주를 7일간 25도 항온기에서 배양함. *Trichoderma* 균주의 chitinase활성으로 인하여 colloidal chitin이 chitin monomer형태로 변성되고, chitin monomer의 염기로 배지의 pH가 상승해, bromocresol purple로 포함한 Plate의 색이 변하는 것으로 Chitinase의 활성 측정 가능함

## 7) 서류작물병 방제 유효활성 물질 규명 및 유도저항성 (SAR, ISR) 여부 판단

### • 기확보된 *Bacillus velezensis* CMML 20-20 유도저항성 유전자 발현 분석

- 고구마 '베니하루카' 품종을 pot에 담고 25  $\pm$  2°C의 식물배양실에서 21일 동안 재배함. TSB 배지에서 배양된 *Bacillus velezensis* CMML 20-20 ( $1 \times 10^7$  cfu ml<sup>-1</sup>) 20 ml를 고구마 뿌리 근처 토양에 관주 처리하고, 멸균수는 대조군으로 사용함. CMML 20-20 균주를 접종 후 48시간 후에 고구마 뿌리 시료를 수집함. 멸균수를 이용하여 고구마 뿌리를 세척하고 Direct-Zol™ RNA MiniPrep Plus Kit를 사용하여 RNA를 추출한 후 QuantiTect® Reverse Transcription Kit를 사용하여 RNA를 cDNA로 역전사시킴. 분석에 사용된 유전자 특이적 프라이머는 다음과 같이 사용됨:  *$\beta$ -Actin*(Forward: 5'-AGC

AGC ATG AAG ATT AAG GTT GTA GCA C-3', Reverse: 5'-TGG AAA ATT AGA AGC ACT TCC TGT GAA C-3'), *lbPAL*(Forward: 5'-TCA CTG TGG GTG CTA ATG GAG-3', Reverse: 5'-GGC TTG GCG GAG TTT CTG-3'), *lbNPR1*(Forward: 5'-AGT CCG TTC TTC AGG AGC GT-3', Reverse: 5'-TTC CGC AAT AAA GGT AAG CC-3'), *lbPR1*(Forward: 5'-GCA AGA TTA CCT AAA CCC CCA-3', Reverse: 5'-GGA GTT GGC GTA GTT CTG CG-3'), *lbLOX*(Forward: 5'-GTG CTG AAC AAC ACG CTT TTA G-3', Reverse: 5'-GTT TTA AGG TAG AAC TCA TTG GGA T-3'), *lbPDF1. 2*(Forward: 5'-GGC TTC ATC TCT TCG TTC ATT T-3', Reverse: 5'-GCA GTT GCT GTC CCG AGA A-3').  $\beta$ -Actin은 샘플의 DNA 함량을 표준화하는 데 사용됨. SYBR Green qPCR 분석은 Universal SYBR Green Supermix를 사용하여 수행됨. 반응 혼합물은 각 프라이머 1 $\mu$ l, SYBR Green Supermix 10 $\mu$ l, template DNA(10ng genomic DNA) 1 $\mu$ l 및 DW 7 $\mu$ l로 구성되어 총 부피는 20 $\mu$ l임. qPCR(CFX96TM Real-Time System) 프로그램은 다음과 같음: denaturing 98°C에서 2분 30초, 이어서 95°C에서 15초, annealing 57°C에서 20초, extension 65°C의 5초, 39사이클. qPCR 분석은 3번의 기술적 반복과 함께 3번의 생물학적 반복으로 수행됨. 목적 유전자의 상대적인 발현은 housekeeping 유전자인  $\beta$ -actin 유전자를 참조하여 평가하였고, 비교 CT 방법을 이용하여 계산됨

• **선발된 길항미생물의 항진균성 유효활성 물질 규명을 위한 UPLC-QTOF-MS 분석**

- 선발된 서류작물병 제어 미생물인 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주의 lipopeptide 생성 유전자 클러스터를 확인하기 위해 전체 유전자 분석을 수행함
- 선발된 서류작물병 제어 미생물의 lipopeptide 추출물의 항진균력을 평가하기 위해 선발된 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 배양 상층액에서 산 침전법과 용매 추출법을 이용해 lipopeptide를 순수 분리함. 구체적으로, *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주를 TSB 배지에 접종하여 30 °C에서 24시간 진탕배양한 후 10,000 rpm에서 원심 분리 후 상등액을 획득함. HCl 용액을 이용하여 상등액의 pH를 pH 2로 낮춘 후 4 °C에서 24시간 보관 후 다시 10,000 rpm에서 원심 분리하여 얻은 정제되지 않은 lipopeptide를 소량의 MeOH에 녹인 후 균질기를 이용하여 균질화함. 다시 10,000 rpm에서 원심 분리하여 얻어진 상등액을 0.22  $\mu$ m 크기의 필터로 여과한 후 진공 농축기를 이용해 40 °C에서 분획을 농축함. 건조된 시료의 무게를 측정하고 얻어진 향균물질 lipopeptide 추출물을 PDA에 혼합해 각각 농도가 5000, 500, 50, 5 ppm이 되도록 하여 lipopeptide를 혼합한 배지를 제작함. 이후 5 mm 코르크 보러를 이용하여 감자 및 고구마 병원균의 플러그를 각 농도별 페트리디쉬 중앙에 치상함. 대조균의 경우 lipopeptide를 혼합하지 않은 PDA 플레이트에 병원균을 치상함. 대조균과 실험균 플레이트는 25 °C 항온기에서 5 내지 7일간 배양한 후 병원균이 자라는 정도를 측정함. 대조균에 비해 실험균의 병원균 성장 억제율을 계산함
- 항진균력이 검증된 선발 서류작물병 제어 미생물인 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 lipopeptide 계열 유효 활성 물질 규명을 위해 ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS)분석을 실시함. ACQUITY UPLC BEH C18 컬럼(2.1×100 mm, 1.7  $\mu$ m; Waters)이 장착된 UPLC TOF Acquity UPLC I-Class PLUS(Waters) 사용하였으며, gradient 방법으로 이동상 용매 A(0.1% formic acid in water), 용매 B(0.1% formic acid in acetonitrile), 유속 0.4 mL/min 조건을 설정함

Xevo-G2-XS QTOF LC-MS(Waters)를 사용하여 100-1600 Da 범위에서 positive mode, capillary voltage 3.0 kV, source 온도 150°C, Ar을 collision gas로 설정하여 질량 분석 (mass spectrometry)을 수행함. MassLynx 소프트웨어(Waters Corporation, Milford, United States)를 이용하여 m/z와 molecular formula를 검출하였으며, 대사산물의 식별을 위해 검출된 m/z와 molecular formula를 기반으로 다양한(온라인 및 선행문헌) database 통하여 물질을 탐색하고, 표준물질(iturin, fengycine, surfactin (sigma, USA))과 비교 검증함

- 항진균력이 검증된 선발 서류작물병 제어 미생물인 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 lipopeptide 계열 유효 활성 물질의 분획, 정제 및 항진균활성을 검정하기 위해 LC-20AP chromatography (Shimadzu, Tokyo, Japan) system을 이용함. 구체적으로, Lipopeptide 물질을 진공농축기로 농축시킨 후 추출한 시료를 완전히 증발시키고 MeOH를 이용하여 농도를 150 mg/ml로 만듦. 이후 최종적으로 0.2 µm의 주사기 필터로 여과하여 샘플을 획득함. 샘플 내 lipopeptide의 분석을 위해 Acquity UPLC C18 column (Water µ-Bondapak c18 20 X 250 mm)를 이용함. 이동상으로 0.1% formic acid (A)와 acetonitile (B)을 0-60min: A;30%, B;70%, 60-100min: A;90%, B;10%의 조건으로 함. lipopeptide 시료는 100분에 걸쳐 분석하였으며 검출 파장은 205 nm, 이동상 유속은 1 ml/min, 컬럼 온도는 30°C를 유지하였고 injection volume은 10µl 설정함. 각 분획에서 확인된 물질 회수 후, 회전증발농축기를 사용해 농축시킨 후 이를 99% MeOH로 녹여 5000ppm으로 정량함. 질량분석은 UPLC-QTOF-MS (Waters, XEVO G2-XS QTOF, USA)로 수행함. MassLynx 소프트웨어 (Waters Corporation, Milford, United States)를 이용해 m/z와 molecular formula를 검출하였으며, 대사산물의 식별을 위해 다양한 (온라인 및 선행문헌) database를 통하여 물질을 탐색하고, 표준물질(iturin, fengycine, surfactin (sigma, USA))과 비교 검증함

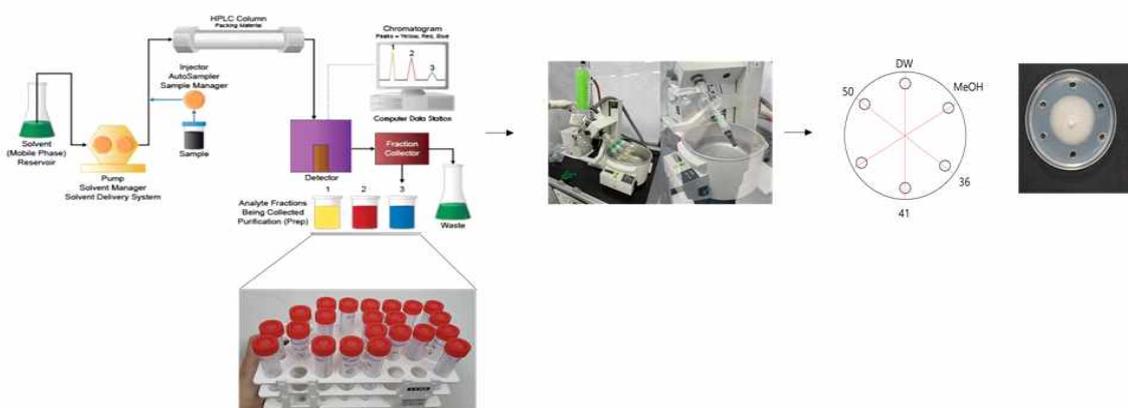


그림 5. HPLC prep을 이용한 lipopeptide 분획 및 정제

- 정제된 lipopeptide를 고구마의 덩굴쪄김병균, 검은무늬병균과 감자의 균핵병균에 대한 항진균 활성 분석을 수행하기 위해 agar well diffusion method를 수정하여 사용함. 구체적으로, 3종의 고구마 및 감자 병원균을 PDA 고체 배지에 접종한 후 25 °C 항온기에서 5~7일간 배양함. 병원균의 균사체가 중심부로부터 0.5cm 정도 뻗어 나올 때, 플레이트 가장자리에 5 mm 코르크보리로 구멍을 뚫은 후 각 peak별 fraction을 50 µl씩 접종하여 3 내지 5일 배양 후 항진균 활성을 확인함. 대조균은 메탄올로 사용함
- 선발된 서류작물병 제어 미생물인 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens*

CMML 21-49 균주의 휘발성 유기화합물 분석을 위해 가스 크로마토그래프 질량분석 (GC-MS)을 수행함. 구체적으로, *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주를 TSB 배지에 접종하여 30 °C에서 24시간 진탕배양한 후 10 ml TSA 배지가 담겨진 100 ml 바이알에 균주 배양액 ( $1 \times 10^8$  CFU/ml)을 5% 접종하고 30 °C 항온기에서 3일간 배양함. 대조군의 경우 균주를 접종하지 않은 바이알을 사용함. 각 균주에 의해 생성된 휘발성 유기화합물은 50 °C에서 20분간 SPME (soild phase micro-extracion) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)로 headspace를 수집함. DB-5MS column (30 m X 0.25 mm I.d. X 0.25  $\mu$ m, Agilent, CA, USA)을 사용하여 270 °C에서 30초간 열탈착을 위해 SPME fiber GC (Nexis GC-2030 Shimadzu, Kyoto, Japan)를 주입포트에 주입 후 탈착 시킴. 10,000 rpm에서 원심 분리 후 상등액을 획득함. 주입구의 초기온도는 50 °C로 하였고 column의 온도는 50 °C에서 3분간 유지시킨 후 300 °C까지 10분 증가시키고 5분간 유지시킴. mass spectrometer의 Ionization voltage는 70 eV였고 GC-MS interface 온도는 각각 270 °C와 300 °C로 설정됨. GC-MS (TQ 8050, Shimadzu, Kyoto, Japan)는 휘발성 유기화합물 분석을 위해 m/z 범위가 45~500에서 full-scan mode로 분석됨. 휘발성 화합물의 질량 스펙트럼 데이터는 NIST17-1 / NIST17s MS library (similarity set at > 90 %)로 비교하여 확인됨

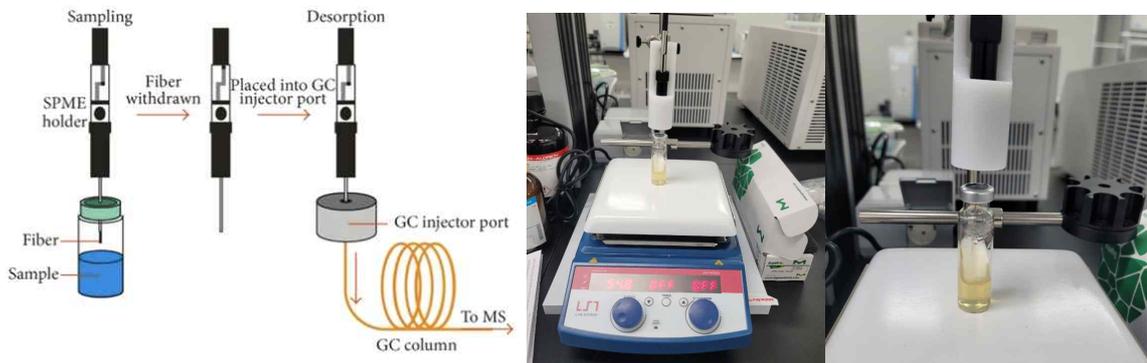


그림 6. SPME를 이용한 균주 내 휘발성 유기화합물 분석

• 서류작물병 방제 유도저항성 (SAR, ISR) 여부 판단

- SAR(전신획득저항성), ISR(유도전신저항성) 관련 유전자 발현을 확인하기 위해 유전자 특이적 프라이머를 제작하고, pot에서 키운 고구마 뿌리에 기확보된 미생물을 처리한 후 RNA 추출 및 cDNA 합성을 통해 정량적 PCR 진행 이후  $\beta$ -액틴 유전자를 참조하여 표적 유전자의 발현 확인함

8) 미생물제제 처리 후 잔존율에 따른 억제 효과 분석

• 미생물제제 처리 후 유효미생물 토양잔존율 분석

- 건강한 상태에서 획득되어 미생물제제로 개발된 우수 길항미생물의 높은 정착률(토양 및 작물)은 친환경 작물병 방제제의 사용횟수의 간소화는 물론 작물 재배지에 내재된 잠재적 병원균의 원천차단을 위한 중요한 요소임
- 이에, 본 연구팀은 서류작물(감자, 고구마)의 실재배지 토양에 개발된 미생물제제를 처리하고 유효미생물의 토양잔존율을 분석함
- 고구마 재배지로는 해남 산이면의 A농가와 무안 현경면의 B농가 토양을 채취하였고, 감자 재배지로 평창 팽림면 C농가와 원주 호저면 D농가, 그리고 정읍 감곡면 E 농가의 토양을 채취하여 연구에 사용함

- 각 농가의 토양 시료에 포함된 흙 이외의 소재(돌, 작물 수확 후 잔여물 등)는 채(mesh)를 이용하여 충분히 제거한 후 고압멸균기(121°C, 15분)를 이용하여 기존 미생물을 멸균함. 멸균이 완료된 토양시료는 60도 건조오븐에서 3일 이상 보관하며 수분을 제거함. 또한, 토양 입자별 질량차에 따른 오차값을 최소화 하기 위하여 고속 믹서기를 이용하여 토양을 최대한 분말화 함
- 각 토양 시료에는 유효미생물  $1.0 \times 10^8$  CFU/g 이상의 생균수가 고르게 분포하도록 충분히 혼합하였고, 50ml tube에 정량(15g)씩 소분하여 상온(20~24°C, 자연적 변온)에 방치하며 1주일 단위로 잔존하는 유효미생물의 생균수를 계수함

## 9) 서류작물병 방제 길항미생물의 최적 산업배지 개발

### • 선발된 길항미생물의 최적 산업배지 개발

- 미생물은 배양 조건과 배지의 영양 성분에 의해 성장과 대사산물 생산에 영향을 받으므로 탄소원, 질소원, 무기질 등과 같은 필수 에너지원과 영양소의 적절한 공급이 생산성 측면에서 매우 중요하게 작용함
- 이러한 관점에서 선발된 길항미생물(CMML 21-47, CMML 21-49)의 성장과 항균물질 생산성을 증진시키기 위해 배지의 다양한 영양원 조건(탄소원, 질소원, 미량원소)을 매개변수로 설정하였으며, 매개변수에 따른 균의 성장(흡광도, 총균수, 건조균체량)과 항균물질 생산(lipopeptide 수율)을 평가하여 최적 산업배지를 개발함
- 길항미생물의 성장지표로서 흡광도는 배양액을 10,000 rpm에서 20분간 원심 분리 후 멸균 증류수로 세척하고, 1 mL의 멸균 증류수에 재부유하여 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 OD (optical density)를 측정함
- 균체량은 배양액을 10,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 침전된 균을 멸균 증류수로 세척하고 80°C에서 항량에 도달할 때까지 건조 후 건조균체량(dry cell weight, DCW)의 무게를 측정함
- 균수는 배양액을 멸균수에 다단 희석 한 후 TSA 배지 plate에 0.1 mL씩 분주·도말 (spread plate method)하여 48시간 동안 배양한 후 CFU (colony forming unit)를 확인함
- 항균물질 생산지표로서 lipopeptide 수율은 무세포 배양여액을 산 침전법과 methanol 추출법을 이용하여 lipopeptide를 추출한 다음 회전진공농축기로 건조시켜 배양액에 대한 건조된 lipopeptide의 중량으로 나타냄

### • 선발된 길항미생물의 기본 배지 조성 설정

- 선발된 길항미생물의 기본 배지 조성을 설정하기 위해 바실러스 배양에 이용되는 배지 4종(B1, B2, B3, B4)을 구성하였으며, TSB 배지에서 전 배양된 균주(OD 0.5)를 각 배지에 1% (v/v)로 접종 후 bioreactor를 이용하여 30°C에서 56시간 동안 배양하면서 균의 성장을 평가함

### • 선발된 길항미생물 배지의 최적 질소원(nitrogen source) 선정

- 길항미생물의 성장과 항균물질 생산에 대한 최적 질소원을 선정하기 위해 5종(CMML 21-47: yeast extract, beef extract, peptone, sodium glutamate, ammonium sulfate, CMML 21-49: yeast extract, beef extract, peptone, sodium nitrate, ammonium sulfate)의 질소원을 평가함. 기본 배지 조성에서 질소원을 제외한 이외 영양소의 변화를 주지 않고 배지의 1%(w/v) 농도로 5종 질소원을 달리하여 배지를 제조함. 그 다음 배지의 1%(v/v) 농도로 전 배양된 균주(OD 0.5)를 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 48시간 동안 진탕 배양하면서 균의 성장(흡광도, 균수, 건조 균체량)과 lipopeptide 수율을 분석함

---

- **선발된 길항미생물 배지의 최적 탄소원(carbon source) 선정**

- 길항미생물의 성장과 항균물질 생산에 대한 최적 탄소원을 선정하기 위해 단당류와 이당류로 구성된 6종(glucose, fructose, galactose, sucrose, maltose, lactose) 탄소원을 평가함. 기본 배지 조성에서 나머지 영양분의 변화를 주지 않고 배지의 1%(w/v) 농도로 6종 탄소원을 달리하여 배지를 제조함. 그 다음 배지의 1%(v/v) 농도로 전 배양된 균주(OD 0.5)를 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 48시간 동안 진탕 배양하면서 균의 성장(흡광도, 균수, 건조 균체량)과 lipopeptide 수율을 분석함

- **선발된 길항미생물 배지의 미량원소(trace element source)의 첨가**

- 길항미생물의 성장과 항균물질 생산에 대한 4종( $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ) 미량원소 영향을 평가함. 앞서 선정된 최적 질소원 및 탄소원, 이외 영양소를 고정하고 배지의 0.01%(w/v) 농도로 4종 미량원소를 각각 첨가하여 배지를 제조함. 그 다음 배지의 1%(v/v) 농도로 전 배양된 균주(OD 0.5)를 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 48시간 동안 진탕 배양하면서 균의 성장(흡광도, 균수, 건조 균체량)과 lipopeptide 수율을 분석함

## 10) 서류작물병 방제 길항미생물의 배양조건 최적화

- **선발된 길항미생물의 배양 시간 설정**

- 배양 시간에 따른 2종 길항미생물의 성장 및 항균물질 생산을 조사하기 위해 앞서 도출된 최적 배지에 1%(v/v) 균주(OD 0.5)를 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 96시간 동안 진탕 배양하면서 24, 48, 72, 96시간에 성장(흡광도, 균수, 건조 균체량)과 lipopeptide 수율을 분석함

- **선발된 길항미생물의 배양 최적 pH 설정**

- 초기 pH에 따른 2종 길항미생물의 성장 및 항균물질 생산을 조사하기 위해 pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 (in 0.1N HCl or 0.1M NaOH로 조정된 최적 배지에 균주를 접종(OD 0.5)하여 30°C에서 150 rpm으로 48시간 동안 진탕 배양하면서 균의 성장(흡광도, 균수, 건조 균체량)과 lipopeptide 수율을 분석함

- **선발된 길항미생물의 배양 온도 설정**

- 배양 온도에 따른 2종 길항미생물의 성장 및 항균물질 생산을 조사하기 위해 앞서 최적 배지에 균주를 접종(OD 0.5) 하여 다양한 배양 온도(30°C, 33°C, 37°C, 40°C)에서 150 rpm으로 48시간 동안 진탕 배양하면서 균의 성장(흡광도, 균수, 건조 균체량)과 lipopeptide 수율을 분석함

## 11) 혼합미생물제제 최적 조합 구성 및 합제기술 개발

- **선발 미생물의 혼합미생물제제 최적 조합 및 합제 기술 개발**

- 미생물 제제는 유통 및 저장되는 동안 다양한 온도에 노출되기 때문에, 열안정성을 갖는 미생물을 활용하는 것이 제형화 공정 및 제품의 저장성 측면에서 유리하게 작용함
- 내생포자(endospore)를 형성하는 미생물은 증식과정에서 영양분의 결핍이나 열악한 환경조건에서 탈수된 세포로 변모하여 휴면상태의 강한 열 안정성을 나타냄에 따라 미생물 제제로서 개발이 용이함
- 이에 따라, 제형화 및 저장성 관점에서 혼합미생물제제의 최적 조합 구성을 위해 선발된

- 
- Bacillus velezensis* (CMML 21-47), *Bacillus amyloliquefaciens* (CMML 21-49), *Pseudomonas kribbensis* (CMML 21-48)를 48시간 동안 배양한 후 현미경 검경을 통해 포자형성 유무를 관찰하고 배양액을 60°C에서 30분 동안 열처리하여 내생포자수와 포자화율을 분석함
- 선발 미생물의 포자형성도, 항균물질 생산(lipopeptide 수율)을 토대로 혼합 균주 및 적정 조합비를 설정하였으며, 도출된 최적 배양 조건을 바탕으로 길항미생물을 각각 배양한 후 두 균주를 합제하여 서류작물 병 방제 혼합미생물제제 시제품(액상제)을 제조함

## 12) 선발된 서류작물병 방제미생물의 현장적용 평가

### • 선발된 서류작물병 제어 미생물의 현장 적용

- 선발된 서류작물병 제어 미생물인 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 고구마 검은무늬병과 덩굴쪄김병 억제능을 시험 재배지에서 현장 적용 평가를 진행함. 구체적으로, 고구마 베니하루카 품종을 최근 3~5년 내 고구마를 재배하지 않은 시험 재배지에 식재 후 각 균주의 배양액 ( $1 \times 10^7$  CFU/ml)과 기존에 사용되는 농약인 아족시스트로빈 (100 ppm) 100 ml을 2주 간격으로 총 3번 관주 처리함. 균주 혼합 처리구의 경우는 각 균주 배양 희석액을 50 ml씩 처리함. 두 번째 관주 처리 후 하루 뒤 PDB 배지에서 배양한 고구마 병원균의 균사체를 갈아 고구마에 발병시킴. 최종 처리 후 2주 뒤 고구마 병 발생 정도를 0-7단계로 측정하여 방제가를 계산함
  - 선발된 서류작물병 제어 미생물인 *Trichoderma hamatum* CMML 21-62 균주의 고구마 검은무늬병과 덩굴쪄김병 병억제능을 시험 재배지에서 현장 적용 평가를 진행함. 구체적으로, 고구마 베니하루카 품종을 최근 3~5년 내 고구마를 재배하지 않은 시험 재배지에 식재 후 포자 현탁액 ( $1 \times 10^6$  spore/ml)과 기존에 사용되는 농약인 아족시스트로빈 (100 ppm) 100 ml을 2주 간격으로 총 3번 관주 처리함. 두 번째 관주 처리 후 하루 뒤 PDB 배지에서 배양한 고구마 병원균의 균사체를 갈아 고구마에 발병시킴. 최종 처리 후 2주 뒤 고구마 병 발생 정도를 0-7로 측정하여 방제가를 계산함
  - 선발된 서류작물병 제어 미생물인 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주, *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주와 *Trichoderma hamatum* CMML21-62, *Trichoderma virens* CMML 21-65 균주의 감자 검은무늬썩음병과 균핵병 병억제능을 시험 재배지에서 현장 적용 평가를 진행함. 구체적으로, 감자 새봉 품종을 최근 3~5년 내 감자를 재배하지 않은 시험 재배지에 식재 후 *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 배양액 ( $1 \times 10^7$  CFU/ml), *Trichoderma virens* CMML 21-65 균주와 *Trichoderma hamatum* CMML 21-62 균주의 포자 현탁액 ( $1 \times 10^6$  포자/ml)과 기존에 사용되는 농약인 미래빛 (183.5ppm) 100 ml을 2주 간격으로 총 3번 관주 처리함. *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 혼합 처리구의 경우는 각 균주 배양 희석액을 50 ml씩 처리함. 첫 번째 관주 처리 후 하루 뒤 식재한 감자 괴경에 구멍을 뚫고 다시 하루 뒤 병원균 균사를 토양과 혼합하여 상처 부위에 처리하여 발병시킴. 최종 처리 후 2주 뒤 감자 병 발생 정도를 정도를 0-7로 측정하여 방제가를 계산함
-



고구마 포장 (전라남도 나주시) 고구마 포장 (광주광역시) 감자 포장 (전라남도 나주시)

그림 7. 선발된 길항미생물에 대한 서류작물 포장시험 수행

### 13) 서류작물병 방제미생물의 독성시험 및 환경영향 평가

#### 가. 주요 서류작물병 방제용 미생물제제(시제품)의 독성시험

##### • 유식물 5종에 대한 약해시험

- 미생물제제의 사용시 주변 환경에 미치는 영향을 평가하기 위하여 유식물(토마토, 오이, 고추, 상추, 배추)을 대상으로 약해시험을 실시함
- 생균수 함량  $2.0 \times 10^8$  CFU/mL 기준으로 제작된 시제품을 권장 사용 기준인 500배 희석과 2배 수준이 250배 희석하여 사용하였으며, 유식물 5종의 유묘기에 관주처리함
- 실험은 pot assay로 진행하였으며 각 시험구 당 5 pot 씩 1 set로 하여 3 set을 준비하였고, 각 3 반복 시험함(각 유식물 별 총 45 pots)
- 이때 포트는 직경 10cm 규격을 사용하였고, 양토와 상토를 5:5 비율로 사용
- 16~17°C 항온이 유지되도록 비닐하우스 내에서 시험을 진행하였으며, 약해시험은 "농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법"에 준하여 실시함
- 약해시험에 사용된 각 유식물의 품종은 슈퍼도태랑(토마토), 은성백다다기(오이), 칼라볼패(고추), 선풍(상추), 그리고 춘광(배추)로 선정함

##### • New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극성시험

- "농약 및 원제의 등록기준" 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2021-4호) 중 12-2-6. 피부자극성 시험에 준하여 피부자극성시험을 실시함
- 농촌진흥청고시 제2021-4호 인축독성시험 기준과 방법에는 백색 토끼를 사용하도록 되어 있으며 New Zealand White 계 토끼는 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가가 용이하여 선택됨
- 동물을 구입한 후 초기 및 확인시험으로 각각 9일, 15일 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용함
- 이때 제모를 실시하여 피부에 이상이 없는 동물만 선택하여 시험하였으며, 시험의 사육환경은 온도  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 20\%$ , 환기시설(공조기), 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시) 및 조도 150~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육함
- 시험동물은 시험물질 처리 24시간전에 전기면도기를 이용하여 경배부(등부위)의 털을 15×15 cm 넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용함
- 2×3 cm로 절개한 거즈를 이용하여 0.5 mL의 미생물제제(생균수  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL)를 처리부위에 도포한 후 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기 위하여 비자극성 테이프로 고정 및 유지시켜 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리함. 대조부위는 증류수 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용함

---

- **New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막자극성시험**

- 피부자극성시험과 동일한 종의 토끼개체와 동일한 사육환경에서 안점막자극성시험을 실시 함
- 미생물 생균수 최대 처리량은  $2.0 \times 10^6$  CFU/mL으로 설정하였으며, 시험동물은 시험개시 전 24시간 이내에 육안으로 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 것을 확인함
- 미생물제제의 처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 한 차례 처리하였고, 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하함
- 무처리한 우안은 대조부위로 하여 처리부위와 증상관찰 비교용으로 활용하였다. 미생물제제 처리 후 1, 24, 72시간 및 7일까지 각막혼탁, 홍채이상, 결막 발적, 부종의 평점을 기록함

- **랫드를 이용한 급성경구독성/병원성 시험**

- "농약 및 원제의 등록기준" 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2021-4호) 중 12-2-1. 급성경구독성/병원성시험에 준하여 피부자극성시험을 실시함
- 미생물제제의 급성경구/병원성 시험을 위하여 랫드 시험동물 당  $4.0 \times 10^7$  CFU를 1회 경구 투여한 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 장기를 육안으로 관찰한 다음 체내 잔존 미생물 수와 1일, 3일, 7일 및 14일째의 체외 배출 미생물 수를 검사함
- 또한, 전 시험기간 동안 일반증상을 관찰하였으며 투여 전, 투여 후 3일, 주 1회씩 체중을 측정함
- 시험의 사육환경은 온도  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 20\%$ , 환기시설(공조기), 조명시간 12시간 (오전 8시~오후 8시) 및 조도 150~300 Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육함
- 시험군(투여군)은 암수 각각 3마리씩 4군 24마리를 (중간부검군-2개군, 최종부검군) 각 군의 비투여대조군으로 암수 각 2마리씩 4군 16마리, 총 40마리를 사용하여 시험함
- 미생물 체외 배출을 평가하기 위하여 각 시험일마다 대변 내 미생물의 수를 측정하였고, 체내잔존상황을 평가하기 위하여 시험동물 부검후 신장, 뇌, 간장, 폐 비장, 위, 혈액, 임파절을 채취하여 미생물의 수를 측정함

- **랫드를 이용한 급성경피독성시험**

- "농약 및 원제의 등록기준" 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2021-4호) 중 12-2-2. 급성경피독성시험에 준하여 피부자극성시험을 실시함
- 급성경구독성/병원성시험과 동일한 종의 랫드 개체와 동일한 사육환경, 그리고 동일한 미생물제제 사용량으로 시험을 실시함
- 시험 동물 수는 암수 각각 5마리씩 10마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 유성매직을 사용하여 각 개체의 피부에 표시함
- 미생물제제처리 하루 전에 등부위에 제모기를 이용하여  $5 \times 6$  cm 이상 크기 넓이로 제모하고,  $4 \times 4$  cm 크기 면적의 거즈에 미생물제제 시험용액을 균일하게 묻힌 다음 제모된 부위에 고정/유지시킴
- 도포시킨 시험물질은 24시간 후제거하고 피부에 묻은 잔여 물질은 증류수로 잘 닦고 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 관찰을 실시함

**나. 주요 서류작물병 방제용 미생물제제(시제품)의 환경독성 평가**

- **담수어류 잉어(*Cyprinus carpio*)를 이용한 환경독성시험**

- "농약 및 원제의 등록기준" 환경생물 독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2020-34호)에 준하여 환경독성시험을 실시함
-

- 본 시험에 사용된 *Cyprinus carpio*는 수생 생태계의 유해성 평가에 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 농촌진흥청 및 OECD 가이드라인에서 추천된 종이기 때문에 선정함
- 미생물제제는  $1.3 \times 10^5$  CFU/mL 농도로 적용하였으며 시험용액은 주 1회 간격으로 교체하여 반지수식으로 시험을 진행하여 총 4주간 실시함
- 시험 기간동안 중독증상 및 치사율, 수질측정(수온, pH, DO), 전장 및 체중 측정, 시험용액의 미생물 생균수 측정, 병리검사, 그리고 최대무작용량(NOCE)을 확인함

#### 14) 서류 작물 질병 방제용 혼합 미생물 대량 생산 공정 및 제형 기술 개발

##### • 서류작물(고구마,감자) 병방제용 혼합미생물제제 대량생산 공정 및 제형기술 개발

- 최적 배지를 기반으로 5~100L 발효기를 이용한 최적 발효조건 정립
- 서류작물병 방제 활성물질인 lipopeptide의 대량생산을 위하여 1.5ton 발효기를 이용하여 CMML 21-47과 CMML 21-47 균주를 42시간 배양함
- 병원균 제어 대사산물인 lipopeptide의 생산량을 확인하기 위하여 CMML 21-47과 CMML 21-49, 두 균주에 대하여 1.5 ton 대량 배양을 수행하고, 최적 배양조건을 구축함

표 1. 시간별 lipopeptide 함량 확인을 위한 대량배양 프로세스

Main culture	Culture condition of fermenter (1.5 ton)
<b>Medium composition</b>	
Lactose	10 kg
Yeast	10 kg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5 kg
NaCl	1.5 kg
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.5 kg
MgSO <sub>4</sub>	1 kg
MnSO <sub>4</sub>	0.1 kg
<b>Culture condition</b>	
Inoculum volume (10 <sup>8</sup> cells/ml)	2 L
Temperature	30°C
Impeller speed	200 rpm
Incubation time	48 h

##### • 선별된 미생물의 고농도 배양을 위한 배양 조건 최적화

- 1.5 ton 배양에 따른 두 균주 CMML 21-47과 CMML 21-49의 안정적인 배양 및 성장 효율, 성장 시기 분석을 위하여 1.5ton 배양 시 DO(용존산소), 온도, pH의 변화 양상을 분석함
- 또한, 포자 형성율과 포자 형성 시기를 확인하기 위하여 시간에 따라 포자 형성을 확인함

## 15) 현장 활용 맞춤형 제형 개발

### 가. 연구기관에서 보유한 제형화 장비 활용을 위한 제형 종류의 선정

- (재)농축산용 미생물산업육성지원센터가 보유하고 있는 장비를 활용하여 현장 맞춤형 제형을 진행하고자 분말수화제로 미생물제제를 결정하였음
- 두 균주의 배양액을 이용한 분말수화제를 조제하기 위하여 상기 두 균주 CMML 21-47과 CMML 21-49를 최적 배지에서 진탕배양 후 상기 배양액을 분무 건조 후 블랜더에 넣어 분쇄하여 분말 수화제 원제로 사용하였음
- 이를 통하여 미생물 분말을 생산하였으며, 이후 제품의 안정성과 저장성 시험을 수행하였음

### 나. 맞춤형 제형화(액상, 입상 수화제 등) 공정 개발

#### • 미생물 분말의 저장안정성 실험

- 선발된 후보 미생물인 CMML 21-47과 CMML 21-49, 두 균주로 제조된 미생물 분말에 대하여 제품의 안정성과 저장 안정성을 확인하기 위해 농약제품의 품질검사 중 경시 안정성 확인 분석 기준 가열 안정성 시험의 기준에 따라 4°C, 25°C, 54°C 세 개의 저장 온도에서 6주에 걸쳐 생균수를 확인함

[별첨 1.] 경시변화 시험기준과 방법 (미생물농약 및 생화학농약 공통)

1. 경시변화시험은 상온에서 약효보증기간 동안에 시간이 경과함에 따라 물리·화학적으로 변화되는 주성분 또는 물리성을 분석하는 것을 원칙으로 하되, 다음의 기준에 의한 학대시험 성적도 인정할 수 있다. 다만, 약효보증기간이 1년 미만인 약제는 상온에서 약효보증기간 동안 시험한 성적만 인정한다.

#### 1-1. 가열안정성시험

- 가. 약효보증기간 1년 설정약제는 54±2°C에서 2주일 이상 시험한 성적
- 나. 약효보증기간 2년 설정약제는 54±2°C에서 4주일 이상 시험한 성적

#### • 최적 제형 개발에 필요한 부형제 선발

- 미생물 등을 이용한 제품 제조 시 미생물 포자는 여러 개가 뭉쳐 있게 되며 이는 곧, 포자가 병원균이나 작물 표면에 고르게 접촉하지 못하여 방제가가 낮아지는 결과를 가져옴
- 최적 제형 개발에 필요한 부형제 선발 실험을 통하여 미생물제제의 분산성을 높여주고, 포자의 wetting력을 증진시켜 병원균 표면에 효율적으로 접촉할 수 있도록 하기 위하여 부형제를 선별하였음
- 후공정 제형화를 위하여 최종 제품의 물리화학적 특성 및 제품의 안정성, 분산성 등을 고려하였음. CMML 21-47과 CMML 21-49, 두 균주를 이용하여 제제화한 제품의 물리성은 「농약관리법」에 의거하여 농약의 이화학적 검사 및 역가검사 기준에 준하여 수화성, 분산성을 실험하였음
- 보조제의 기능을 고려하여 증량제 및 결합제, 부착성 증진제 중 제올라이트, 말토덱스트린 등의 총 7가지 종류의 부형제를 선별하였음

**표 2. 시험에 사용한 부형제의 종류**

7가지 종류의 부형제						
						
제올라이트	말토덱스트린	규조토	스킴밀크	카오린	납석	옥수수전분

**• 후보군 부형제 종류별 수화성 선별시험**

- 분말 수화제의 경우 현장에 적용 시 수화제를 물에 넣고 혼합하기 때문에 미분말이 수중에서 분산되는 현탁액을 사용함
- 이러한 이유로, 수화제 제품은 살포 기계 탱크에서 물 등과 혼합하였을 때 신속하게 젖어드는 지를 평가하는 수화성이 중요하게 여겨지고 있음
- 수화성 테스트는 후보군 부형제를 메스실린더에 표준경수를 넣고 부형제를 한 번에 수면으로 떨어뜨려 검체를 가할 때부터 완전히 젖을 때까지의 시간을 측정하는 방법으로 진행되고 있음

**표 3. 부형제 종류별 수화성 선별시험**

						
제올라이트	말토덱스트린	규조토	스킴밀크	카오린	납석	옥수수전분

**• 후보군 부형제 종류별 분산성 선별 시험**

- 두 균주를 이용하여 만들어진 분말수화제가 물에 희석되어 살포액으로 조제될 때 분산된 약제가 침전되지 않고 물에서 분산되는 성질도 분말수화제의 중요한 요소임으로 후보군 부형제가 가지고 있는 분산성(suspensibility)을 시험함
- 메스실린더에 표준경수와 부형제를 넣어 진탕한 후 10분 후 침전물의 부피를 측정함

**표 4. 부형제 종류별 분산성 선별시험**

						
제올라이트	말토덱스트린	규조토	스킴밀크	카오린	납석	옥수수전분

**다. 현장 맞춤형 제형화 공정 및 시제품(액상/분상/입상) 개발**

• **미생물 제제 제형화를 위한 부형제 선별 및 적용**

- 앞선 실험을 통해 최종적으로 maltodextrin이 부형제로 선별되었으며, 선별된 부형제의 안정성을 테스트하기 위해 분무건조 된 최종 배양 원제 CMML 21-47와 CMML 21-49의 목표 생균수를 설정하여 maltodextrin을 혼합한 미생물제제 제조함

**표 5. 부형제 안정성 시험을 위한 혼합비율**

목표 생균수 (CFU/g)	CMML 47+49	CMML47	CMML49
2.5 X10 <sup>10</sup>	(47) 5 g + (49) 5 g + maltodextrin 90 g	원제 10 g + maltodextrin 90 g	원제 10 g + maltodextrin 90 g
2.5 X10 <sup>9</sup>	(47) 2 g + (49) 2 g + maltodextrin 96 g	원제 4 g + maltodextrin 96 g	원제 4 g + maltodextrin 96 g

• **선별된 부형제를 혼합한 미생물제제(시제품) 물리성 평가**

- 선별 부형제를 혼합한 미생물제제(시제품) 대한 안정성 및 물리성을 평가하기 위하여 앞서 진행한 농진청에서 고시한「농약관리법」에 의거 농약 검사기준에 따른 농약의 이화학적 검사 및 역가검사 기준에 준하여 수화성과 분산성 평가를 동일하게 실시하였음

**16) 혼합미생물제제의 사용 매뉴얼 제작**

• **혼합미생물제제 “포테토킹”의 사용 매뉴얼 제작**

- 서류작물 병해 방제용 혼합미생물제제 “포테토킹”의 사용방법, 보관방법, 처리 시기, 횟수, 주의사항 등 제품 개발 과정에서 확보된 정보를 중심으로 현장 사용 매뉴얼을 제작함
- 사용 매뉴얼은 유기농업자재 공시 기준을 준하여 제작하였으며, 실제 사용자의 이해와 편의성을 고려하여 참고 자료를 추가함

**17) 혼합미생물제제의 사용자 매뉴얼 보급/교육**

• **혼합미생물제제 “포테토킹”의 사용자 매뉴얼 보급/교육**

- 제한된 재배 공간에서 다양한 작물의 연작이 이루어지는 우리나라 농사 구조 특성상 토양의 관리는 매우 중요한 문제이나, 연중 발생하는 시비(비료주기)과정에서 재배지 토양의 과영양화는 작물에 발생된 병원균의 토양 내 정착과 우점화 확률 높이는 요소로 작용됨
- 특히, 서류작물과 같은 식량자원은 탄수화물 등 높은 영양분(열량원)으로 토양 내 잠재적 병원균의 잠식이 쉽게 발생됨
- 이에, 본 연구팀은 서류작물병 방제용 혼합미생물제제 “포테토킹”의 사용 매뉴얼을 제작하여 농업 종사자 및 농자재 납품 업체에 이를 보급함
- 또한, 제품 설명자료를 제작하여 농민, 구매자, 그리고 도소매 판매자를 대상으로 제품 설명 및 홍보, 교육을 실시함

## 18) 혼합미생물제제의 유기농업자재 등록 및 품질관리 표준화

### • 서류작물 병방제용 혼합미생물제제 최종 선정

- 기 선발되어 연구를 진행한 유용 길항미생물을 대상으로 병방제 효능 및 사업화 가능성을 종합적으로 검토한 결과, 고구마의 덩굴쪄김병과 검은무늬병, 감자의 검은무늬썩음병과 균핵병에 대한 방제 효능이 우수한 *Bacillus velezensis* CMML 21-47(이하, CMML21-47)과 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49(이하, CMML21-49)를 혼합한 미생물제제를 대상으로 제품 등록 절차를 진행함
- 제품의 유통과 사용의 편의성을 고려하여 제품 성상을 “분상”으로 결정하였으며, 주관연구기관인 (재)농축산용미생물산업육성지원센터에서 확립된 제형 최종본을 제품에 도입함
- 서류작물 병방제용 혼합미생물제제의 제품명을 “포테토킹”으로 결정함

### • “포테토킹”의 대표 유효미생물 검정

- 미생물제제 검정은 희석 평판법(Standard plate count)를 기초하여, 농촌진흥청 「비료 공정규격설정 및 지정 별표 3」 및 국립농산물품질관리원 「유기농업자재 공시 기준 별표 5」의 규정에 의하여 진행함
- “포테토킹” 30g을 생리식염수 270ml에 혼합하여 1:10 희석액을 만든 후 이를 10mL 취하여 생리식염수 90mL에 넣어 1:10<sup>2</sup> 희석액을 제작함. 이를 반복하여 1:10<sup>3</sup>부터 1:10<sup>7</sup>까지 조제한 후 각각 100ul를 Difco™ LB Agar, Miller(Becton, Dickinson and Company)가 들어 있는 Petri dish에 도말함. 도말이 완료된 Petri dish를 30°C에서 24시간 동안 배양하여 확인된 형태의 콜로니를 계수한 후 평균값을 산출하여 1g 당 CFU(colony forming unit)로 측정함
- 이어서, 유전자 염기서열 상동성 검색을 통한 균주의 동정 및 인증을 진행함. “포테토킹”을 1:10<sup>7</sup> 으로 희석하여 Difco™ LB Agar, Miller(Becton, Dickinson and Company) 배지에 100ul 씩 접종하고, 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 우점 미생물 콜로니를 선발함. 선발된 콜로니 중 대표 유효미생물과 동일한 형태의 콜로니를 순수 분리함. 순수 분리된 콜로니의 유전자 염기서열(16S rRNA)를 분석하고 상동성을 비교함

### • “포테토킹”의 병원성미생물 및 잔류농약 검사

- 유기농업자재 등록을 위하여 “포테토킹” 내 병원성 미생물과 잔류농약 유무를 농촌진흥청 「비료공정규격설정 및 지정 별표 3」 및 국립농산물품질관리원 「유기농업자재 공시 기준 별표 5」의 규정에 의하여 진행함
- 병원성미생물 검사를 위한 시료 조제를 위하여 포테토킹 25g을 취하여 각각의 증균 배지 225ml에 가한 후 35~37°C에서 24±2시간 증균 배양함
- 병원성 대장균(*Esherichia coli* O157:H7) 검사를 위하여 증균배양액을 MacConkey sorbitol 한천배지에 접종하여 35~37°C에서 18시간 배양한 후 sorbitol을 분해하지 않는 무색집락을 취하여 EMB 한천배지에 배양하여 녹색의 금속성 광택이 있는 콜로니 유무를 확인함
- 병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 검사를 위하여 증균배양액을 Xylose Lysine Desoxycholate Agar 배지에 접종 한 후 이를 35~37°C에서 24±2시간 배양하여 검은색 환을 가진 붉은색 콜로니 유무를 확인함

- 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 검사를 위하여 증균배양액을 Baird Parker Agar 배지에 접종 한 후 이를 35~37°C에서 24±2시간 배양하여 검은색 콜로니 유무를 확인함
- 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*) 검사를 위하여 증균배양액을 Oxford Agar 배지에 접종 한 후 이를 35~37°C에서 24~48시간 배양하여 검은색 콜로니 유무를 확인함
- 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 검사를 위하여 조제된 시료를 Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar 배지에 접종 한 후 이를 30°C에서 24~48시간 배양하여 연분홍 콜로니의 유무를 확인함
- 포테토킹의 잔류농약 검출을 위하여 「유기농업자재 공시 기준」 별표 5. 유기농업자재 공정분석법(제8조 관련)의 “1.1.5.2. 다성분 동시분석법”을 실시하였고, 2,4,6-trichlorophenol 등 463종에 대한 GC/MS/MS 및 LC/MS/MS 등의 분석 장비를 활용함

• “포테토킹”의 유식물 약해시험

- 포테토킹의 병해관리용 자재 공시를 위하여 「농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법」에 준하여 작물(고구마, 고추, 배추, 상추)에 미치는 약해 검증 시험을 실시함
- 고구마는 대유미 품종을, 고추는 에이알돌격탄, 배추는 휘파람골드, 상추는 선풍골드를 대상으로 진행하였으며, 각 작물의 정식 후 기준량과 배량을 토양관주처리의 방법으로 처리함



그림 8. 포테토킹의 유식물 약해시험의 시험구 배치 및 약제처리

- 시험은 완전임의배치법을 기초로 3반복하여 진행하였으며, 약제처리 후 7일간격 3회에 걸쳐 외관상 약해 유무를 달관 조사함

• New Zealand White계 토끼를 이용한 포테토킹의 피부자극성시험

- 포테토킹의 인축독성 평가 중 피부자극성시험을 위하여 인증기관인 (주)한국생물안전성 연구소에 의뢰하여 “농약 및 원제의 등록기준” 인축독성시험 기준과 방법(농촌진흥청 고시 제2023-13호) 중 12-2-6. 피부자극성 시험에 준하여 시험을 진행함

- 시험에 사용된 "포테토킹"은 *Bacillus amyloliquefaciens* 3.7×10<sup>8</sup> CFU/g, *Bacillus velezensis* 1.5 × 10<sup>9</sup> CFU/g로 생균수가 검증된 제품을 사용함
- 시험물질 처리량은 처리 군별 공히 0.5g으로 설정하였으며, 시험동물은 시험물질 처리 24시간 전에 전기면도기를 이용하여 경배부(등부위)의 털을 15×15cm 넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용함. 2×3cm로 절개한 거즈를 이용하여 0.5g의 시험물질을 처리부위에 도포하고 증류수로 습윤처리한 후 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기 위해 비자극성테이프(Tegaderm, 3M)와 Coban(self-adherent wrap, 3M), 의료용 테이프(Micropore surgical tape, 3M)로 고정 및 유지시켜 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리함. 대조부위는 증류수로 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용함
- 초기 및 확인시험은 단일 첩포를 4시간 노출 후 제거하여 피부에 묻은 잔여물질은 증류수로 세척하여 모두 제거한 후 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어둠
- 시험물질 처리 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유무를 관찰하였으며, 처리직전과 처리 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정함
- 시험물질 도포 종료 후 1, 24, 48, 및 72시간까지 부종, 홍반 및 가피형성 유무를 관찰함
- 피부반응의 평가는 하단의 [피부반응 평가표]에 준하여 실시하였고, 결과에 대한 자극성은 [피부 1차 자극표]의 자극성 기준에 따라 자극성을 판정함

[피부반응 평가표]

(1) 홍반과 가피형성	
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
명확한 홍반	2
중간정도부터 심한 홍반	3
심한 홍반과 홍반을 평가할 수 없을 정도의 가피형성	4
총 가능한 홍반과 가피 점수	4
(2) 부종형성 평점	
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종 (뚜렷하게 부어올라서 노출부위가 분명히 구별될 정도)	2
중간정도의 부종 (약 1 mm 정도 부어오른 상태)	3
심한 부종 (1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖까지 확장된 상태)	4
총 가능한 부종 점수	4

[피부 1차 자극표]

구분	분류기준
강도	다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① pH 2 이하 또는 pH 11.5 이상인 물질 ② 동물시험 결과 3마리 중 1마리 이상에서 시험 물질 노출 즉시 또는 4시간 노출 중에 피부 손상(부식 세포손상 등)이 나타나고 관련 증상이 14일까지 지속되는 경우
	다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① 동물시험(3마리, 최대 4시간 노출 조건) 결과 24, 48 및 72시간에 대한 개체별 평균값이 적어도 2마리에서 해당 범위에 포함될 경우 (단, 반응이 늦게 발현된 경우에는 피부 반응 발생 후 3일간을 연속평가) 2.3 ≤ 홍반 or 부종 평균값 ≤ 4.0 ② 동물시험(3마리, 최대 4시간 노출 조건) 결과 적어도 2마리의 시험동물에서 통상 14일간의 관찰기간 종료까지 염증, 특히 (제한된 부위에 대한)탈모증, 각화증, 비후(중식), 피부각질화 증상 등이 지속되는 경우
경도	동물시험(3마리, 최대 4시간 노출 조건) 결과 24, 48 및 72시간에 대한 개체별 평균값이 적어도 2마리에서 해당 범위에 포함될 경우 (단, 반응이 늦게 발현된 경우에는 피부 반응 발생 후 3일간을 연속평가) 1.5 ≤ 홍반 or 부종 평균값 < 2.3
없음	경도이상 분류기준에 해당하지 않는 경우

그림 9. 포테토킹의 피부반응에 대한 평가와 자극성 판정 기준

• **New Zealand White계 토끼를 이용한 포테토킹의 안점막자극성시험**

- 포테토킹의 인축독성 평가 중 안점막자극성시험을 위하여 인축기관인 (주)한국생물안전성 연구소에 의뢰하여 "농약 및 원제의 등록기준" [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제2023-13호) 중 12-2-5. 안점막자극성시험에 준하여 시험을 진행함
- 시험에 사용된 "포테토킹"은 *Bacillus amyloliquefaciens* 3.7×10<sup>8</sup> CFU/g, *Bacillus velezensis* 1.5 × 10<sup>9</sup> CFU/g로 생균수가 검증된 제품을 사용함

- 시험물질은 미생물 유기농업자재로 미생물 시험법에 의거 개체당  $10^7$  단위에 해당하는 약제를 투여해야 하므로 시험물질(미생물 균수 측정값 :  $1.9 \times 10^9$  CFU/g)의 처리약량을 0.05 g/개체 ( $9.5 \times 10^7$  CFU/개체)를 처리약량으로 설정하여 투여함
- 초기시험은 1마리의 동물을 사용하였으며, 시험동물은 시험개시 전 24시간 이내에 육안으로 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물로서 약제처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 시험물질 0.05g을 한번에 넣어 처리하고 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지함. 무처리 우안은 대조부위로 하여 처리 부위와 증상관찰 비교 용도로 활용함. 초기시험에는 어떠한 눈 손상도 관찰되지 않아 이후 2마리의 동물을 사용하여 확인시험을 진행함
- 시험물질 처리 후 7일까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유무를 관찰하였으며 시험물질 처리직전과 처리 후 48, 72시간 및 7일에 개체별 체중을 측정함
- 안반응 평가는 하단의 [안반응 평가표]에 따라 실시함. 시험물질 처리 후 1, 24, 48, 72, 96시간 및 7일까지 각막혼탁, 홍채이상, 결막 발적, 부종의 평점을 기록함
- 또한 [안반응 평가표]에 의한 개체별 자극정도를 평가하고 이 결과로 [안점막 자극표]에 따라 자극성의 정도를 구분함

[안반응 평가표]

1) 각막	평가
혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)	0
• 화농이나 혼탁이 없음	0
• 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나(정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름) 홍채의 말단이 명확히 관찰됨	1
• 반투명한 부분이 쉽게 관찰되면서 홍채의 말단이 약간 불명확함	2
• 진주색깔을 나타내면서 홍채의 말단이 관찰되지 않음, 동공의 크기가 가까스로 관측됨	3
• 각막이 불투명하고 혼탁 때문에 홍채가 관찰 안됨	4
2) 홍채 반응지	평가
• 정상	0
• 현저한 주름의 형성, 충혈, 증창 혹은 각막주위에 중등도의 충혈을 보이거나 홍채가 빛에 대해 반응함	1
• 홍채가 빛에 대해 반응이 없거나 출혈 또는 대부분 파괴된 상태	2
3) 결막 발적(안검결막, 안구결막에 한함, 홍채 제외)	평가
• 혈관 정상	0
• 일부 혈관 충혈	1
• 많은 심홍색을 띄거나 각각의 혈관이 쉽게 관찰 안됨	2
• 짙은 선홍색	3
결막부종	평가
• 부풀지 않음	0
• 정상보다 약간 증창(순막 포함)	1
• 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 증창	2
• 눈이 반쯤 잠길 정도의 안검의 증창	3
• 눈이 반 이상 잠길 정도의 안검의 증창	4

[안점막 자극표]

구분	분류기준
강도	다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① 피부 강도 자극성인 부식성 물질 ② pH 2 이하 또는 pH 11.5 이상인 물질 ③ 최소한 1마리의 동물에서 각막, 홍채 또는 결막에 대한 영향이 회복되지 않을 것이라 예상되거나 일반적으로 관찰기간 21일 내에 완전히 회복되지 않는 경우 ④ 시험동물 3마리 중 최소한 2마리에서, 시험물질 주입 후 24, 48 및 72시간에서의 평균 점수로서 계산된 수치가 아래 기준에 어느 하나라도 해당하는 경우: ○ 각막 불투명도 $\geq 3$ ○ 홍채 $> 1.5$
중도	다음 어느 하나에 해당하는 물질 ① 피부 중도 자극성 물질 ② 동물 시험결과 3마리 중 최소한 2마리에서, 아래 기준에 어느 하나라도 해당되고, 관찰기간 21일 이내에 완전히 회복되는 경우 ○ 각막 불투명도 점수 $\geq 1$ ○ 홍채 점수 $\geq 1$ ○ 결막 발적 점수 $\geq 2$ ○ 결막 부종 점수 $\geq 2$
경도	중도 조건에 해당하는 자극성이 7 일 이내에 완전히 회복되는 경우
없음	경도 이상에 해당하지 않는 경우

그림 10. 포테토킹의 안반응에 대한 평가와 자극성 판정 기준

• 랫드를 이용한 포테토킹의 급성경구독성/병원성시험

- 포테토킹의 인축독성 평가 중 급성경구독성/병원성시험을 위하여 인증기관인 (주)한국생물 안전성연구소에 의뢰하여 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법(농촌진흥청 고시 제2023-13호) 중 12-2-1. 급성경구독성/병원성시험에 준하여 시험을 진행함
- 농촌진흥청 고시 「농약 및 원제의 등록기준」에 의하면 급성경구독성/병원성시험의 투여량은 개체당  $10^8$  단위에 해당하는 미생물을 투여하도록 되어 있어 시험물질의 투여약량을  $3.8 \times 10^8$  CFU/ml/개체가 되도록 투여약량을 설정함

- 조제된 시험용액을 투여하기 전 하룻밤 정도 먹이를 주지 않았고, 랫드 경구투여용 존데(zonde)를 이용하여 경구투여 경로로 단회 위내에 시험용액을 강제 투여함. 사료는 투여 3~4시간 후에 급여함
- 투여 당일과 투여 후 매일 1회 이상 일반중독증상 및 치사된 동물수를 21일간 관찰·조사하였으며, 시험물질 투여직전과 투여 후 3일, 주 1회 및 부검 시에 체중을 측정함
- 시험용액 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일째에 대변을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질화한 다음 10배 단계 희석하여 nutrient agar에 접종하고, 30°C에서 24시간 배양하여 체외 배출되는 미생물의 수를 육안으로 측정함
- 시험용액 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절을 채취하여 멸균생리식염수에 넣고 균질화한 다음 10배 단계 희석하여 nutrient agar에 접종하고, 30°C에서 24시간 배양하여 체내 잔존하는 미생물의 수를 육안으로 측정함

#### • 랫드를 이용한 포테토킹의 급성경피독성시험

- 포테토킹의 인축독성 평가 중 급성경구독성/병원성시험을 위하여 인증기관인 (주)한국생물안전성연구소에 의뢰하여 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 12] 인축독성시험 기준과 방법(농촌진흥청 고시 제2023-13호) 중 12-2-2. 급성경피독성시험에 준하여 시험을 진행함
- 농촌진흥청 고시 「농약 및 원제의 등록기준」에 의하면 미생물제제의 급성경피독성시험 투여량은 개체당  $10^8$  단위에 해당하는 미생물을 투여하도록 되어 있고, 저독성임을 확인하고자 해당 시험물질의 투여약량을 개체당  $7.6 \times 10^8$  CFU로 투여약량을 설정함
- 시험동물은 시험물질 처리 하루 전에 등 부위에 제모기를 이용하여 체표의 10%이상 (5×6 cm 이상) 크기 넓이로 제모하고, 4×4 cm 크기 면적의 거즈에 시험용액을 균일하게 묻힌 다음 제모된 부위에 coban (self-adherent wrap, 3M)과 의료용테이프 (micropore surgical tape, 3M)로 고정/유지함
- 등 부위에 도포시킨 시험물질은 24시간 후 제거하고 피부에 묻은 잔여 물질은 증류수로 잘 닦고 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어둠
- 처리 당일은 처리 후 30분, 1시간에서 4시간까지 매 시간마다 일반중독증상 및 치사수를 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일째까지 관찰 및 조사함.
- 시험된 모든 동물에 대하여 시험물질 투여 직전에 체중을 측정하였고, 생존한 동물에 한하여 투여 후 3일, 7일, 시험종료일인 14일째 개체별 체중을 측정함

#### • 포테토킹의 꿀벌(*Apis mellifera*) 영향시험

- 포테토킹의 환경독성 평가 중 꿀벌 영향시험을 위하여 인증기관인 (주)한국생물안전성 연구소에 의뢰하여 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 13] 환경생물 독성 시험기준과 방법(농촌진흥청 고시 제2023-13호) 중 13-2-4. 꿀벌영향시험에 준하여 시험을 진행함
- 대조군 및 추천사용약량 (1,000배 희석)의 농도인 1배 농도와 이의 10, 100배 높은 농도로 설정하여 시험농도 당 25마리씩 3반복으로 수행함
- 시험물질은 20ml volumetric flask에 각각 0.020, 0.200 및 2.000g씩 넣고, 50% (w/v)

---

자당용액을 일부 가하여 현탁시킨 다음 표선까지 정용함. 이후 vortex mixer를 이용해 충분히 교반하여 추천사용약량 (1,000배 희석)의 1배 농도 및 10, 100배 높은 농도의 시험용액을 조제함

- 각 시험농도의 케이지마다 유리급식관에 시험용액을 넣어 공급하였으며, 48시간 동안 섭식할 수 있도록 함
- 시험한 모든 케이지에 대하여 시험물질 노출 후 4시간 및 관찰종료 시까지 매일 꿀벌의 이상증상, 일반 중독증상, 특이증상 및 치사 개체를 관찰하였고, 치사개체의 판정은 육안으로 관찰하여 움직임이 없고 주사침을 이용하여 건드렸을 때 더듬이, 다리 및 몸통의 움직임이 중단된 경우 치사로 판정함
- 시험 중 치사 개체는 2차 감염을 막기 위하여 관찰 즉시 꺼내었으며, 치사 개체에 한하여 시험물질에 의한 미생물 감염 여부를 조사함

#### • 포테토킹의 담수어류(송사리, *Oryzias latipes*) 영향시험

- 포테토킹의 환경독성 평가 중 담수어류 영향시험을 위하여 인증기관인 (주)한국생물안전성 연구소에 의뢰하여 “농약 및 원제의 등록기준” [별표 13] 환경생물 독성 시험기준과 방법(농촌진흥청 고시 제2023-13호)에 준하여 시험을 진행함
- 시험물질의 농도는 생균수  $1.9 \times 10^9$  CFU/g을 기준으로  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml 및 무처리 대조군으로 예비시험을 실시하였고, 예비시험결과  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml에서 치사 개체가 없었으므로  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml 농도군 및 무처리 대조군으로 시험을 실시함
- 시험물질 2.632g을 각각 3반복씩 정확하게 평량하여 3개의 6L 시험수조에 각각 넣고 5L가 되도록 시험용수를 채운 후 완전히 현탁될 때까지 충분히 교반시켜 시험용수로 사용함
- 농도유지확인 시험결과 시험물질을 노출한 후 시간이 경과함에 따라 시험수 중 미생물 농도는 7일차까지 최초 노출한 농도보다 상회하는 농도가 유지되는 것을 확인하였고, 시험용액을 7일 이하의 간격으로 교체하여 반지수식으로 시험을 진행함. 시험용액의 교체는 시험 실시 후 7, 14, 21, 28일에 실시함
- 시험개시 1시간 후 그리고 24시간 간격으로 일반중독증상 및 치사어를 기록하였으며 치사어의 판정은 시험생물을 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 최종 판정함
- 시험 종료 후 생존한 전 개체를 부검하여 육안으로 미생물 감염여부를 대조군과 비교하여 검사함

#### • “포테토킹”의 품질관리 표준화

- 친환경 유기농업자재의 품질 규격화를 위하여, 연구개발 성과를 토대로 확립한 표준 작업서를 기준으로 제품 생산(홍보용 시제품 포함)하며, 생산시마다 무작위 선별에 의한 자체 시험성적서를 발급하고, 품질관리보고서를 통해 이를 지속 관리하는 품질관리 체계를 확립함
- 제품의 종균과 산업배지 성분의 관리를 위하여 분기 또는 반기, 년단위로 공인기관에 시료를 의뢰하여 제품의 안정성을 증빙함

---

## 19) 서류작물병 방제용 혼합미생물제제의 사업화 시스템 개발

### • 포테토킹의 사업화 시스템 개발 및 적용

- (재)농축산용미생물산업육성지원센터와 전남대학교, 보란파마가 공동개발한 서류작물 병방제용 혼합미생물제제 "포테토킹"의 사업화 전략을 위하여 유기농업자재 공시를 통한 제품의 효능(약효/약해)에 대한 국가 인증기관으로부터 공인 성적서를 발급 받음.
- 친환경 제품으로서 "포테토킹"의 안전성과 효력을 검증하는 시험성적서를 발급받고, 국제 인증 및 해외 등록에 활용하여 제품의 해외 진출 판로를 마련함
- 제품 개발과정에서 확립된 연구개발 성과를 중심으로 농림축산식품부에서 "신기술인증 (NET)" 및 "혁신제품"에 등록하며, 한국산업기술진흥원의 "녹색기술"인증과 조달청의 시범구매 및 시범사용 선정을 위한 일련의 절차를 준비함
- 공동연구기관인 보란파마는 해외 다수의 국가를 상대로 국제무역 및 의약품 생산 계약 체결과 수행을 실시한 바 있음. 이러한 과정에서 형성된 국제 사업망을 통하여 "포테 토킹"의 해외 시장 진출 방안을 마련함

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 3-1. 연구수행 결과

##### 1) 서류(감자, 고구마) 주요 작물병 길항미생물 선발

- 서류작물(감자, 고구마)과 근권 토양으로부터 미생물 분리
  - 감자 괴경과 근권에서 세균 총 55 균주를 분리함(괴경 2 균주, 근권 53균주)
  - 감자 괴경에서 진균 총 35 균주를 분리함
  - 고구마 괴근·뿌리와 근권에서 세균 총 140 균주를 분리함  
(괴근·뿌리 67 균주, 근권 73 균주)
  - 고구마 괴근·뿌리와 근권에서 진균 총 142 균주를 분리함  
(괴근·뿌리 102 균주, 근권 40 균주)



그림 11. 고구마 괴근·뿌리와 근권에서 분리된 세균(좌), 진균(우) 균주 예시

표 6. 서류작물 내생 및 근권 토양 미생물 순수 분리 결과

구 분 (단위:균주)	감자			고구마		
	내생 미생물 (괴경·뿌리)	토양 미생물 (근권 토양)	합계	내생 미생물 (괴근·뿌리)	토양 미생물 (근권 토양)	합계
세균	2	53	55	67	73	140
진균	35	-	35	102	40	142
<b>합계</b>	<b>37</b>	<b>53</b>	<b>90</b>	<b>169</b>	<b>113</b>	<b>282</b>

##### • 감자 질병 병원균 성장 억제 미생물 선발

- 감자의 내생 및 근권 토양으로부터 분리한 세균 총 55 균주에 대하여 검은무늬썩음병균과 균핵병균에 대한 대치 배양을 한 결과 길항세균 1균주(병원균 군사 억제율 60%)을 선발함
- 순수 분리된 진균 35균주에 대하여 검은무늬썩음병균과 균핵병균에 대한 대치 배양을 한 결과 길항진균 1균주(병원균 군사 억제율 80%)을 선발함



그림 12. 감자 검은무늬썩음병원균과 균핵병균 길항세균(좌)와 길항진균(우) (빨간색 화살표)

• 고구마 질병 병원균 생장 억제 미생물 선발

- 고구마의 내생 및 근권 토양에서 분리한 세균과 진균 총 283 균주에 대하여 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균에 대한 대치 배양을 한 결과 총 2개의 길항세균(덩굴쪄김병균 균사 억제율 50%이상, 검은무늬병균 균사 억제율 70%이상)을 선발하였고, 2개의 길항진균(병원균 균사 억제율 68% 이상)을 선발함

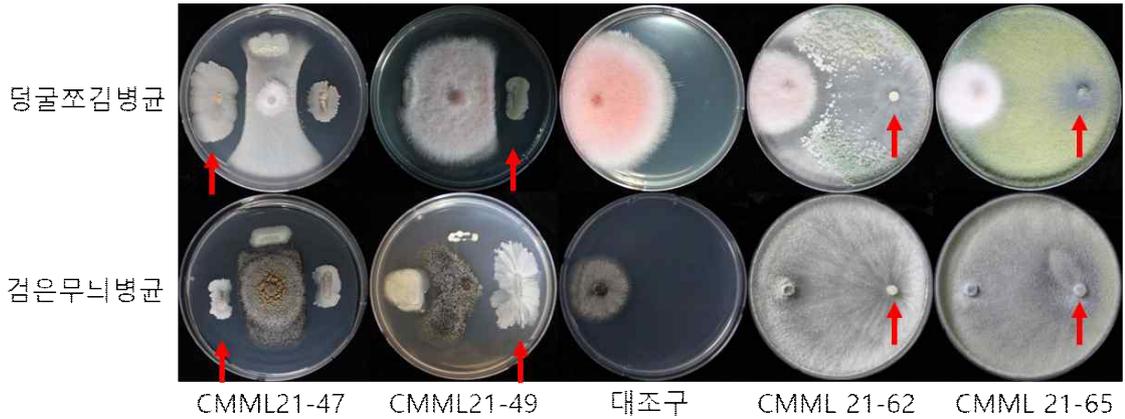


그림 13. 고구마 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균 길항세균(좌)와 길항진균(우) (빨간색 화살표)

2) 선발 미생물의 동정 및 분자계통학적 분석

• 선발 미생물의 동정

- 감자에서 선발된 길항세균 CMML 21-48은 16s rRNA와 gyrB 유전서열을 분석하여 *Pseudomonas kribbensis*로 동정되었고, 선발된 길항진균 CMML 21-51은 ITS와 EF1- $\alpha$  영역 유전서열을 분석하여 *Trichoderma koningiopsis*로 동정됨

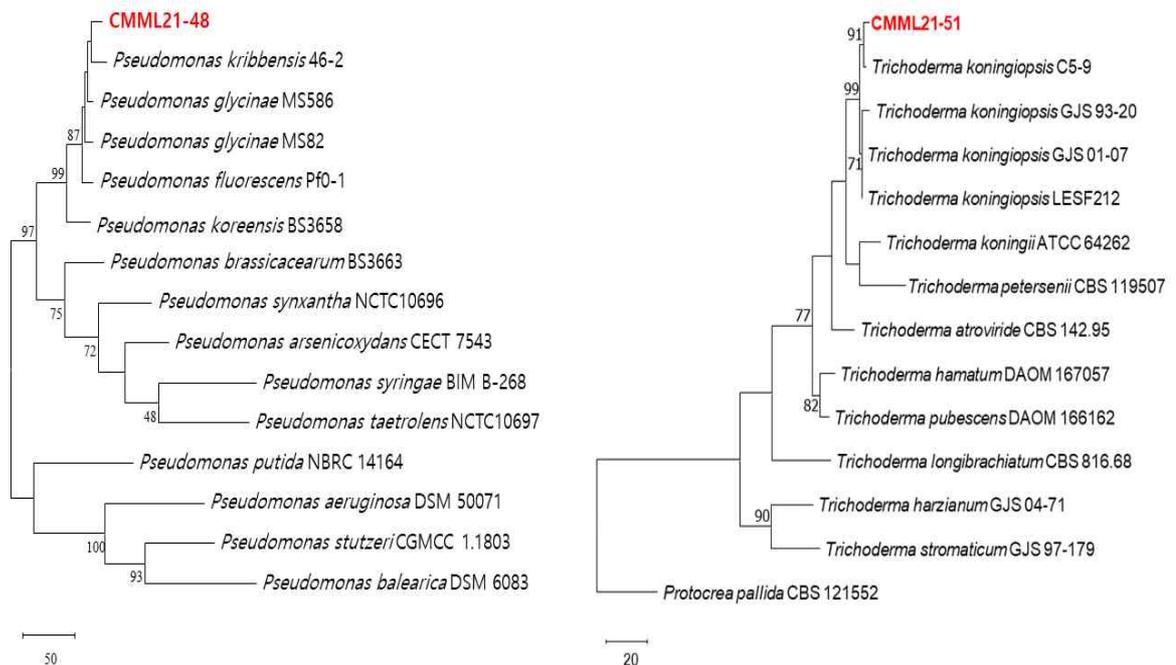


그림 14. 감자유래 선발 세균과 진균의 동정을 위한 계통수. 선발 세균 균주 CMML 21-48은 *Pseudomonas kribbensis*로 동정되었고(좌), 선발 진균 균주 CMML 21-51은 *Trichoderma koningiopsis*로 동정됨(우)

- 고구마에서 선발된 길항세균 CMML 21-47, CMML 21-49은 16s rRNA 유전 서열을 분석하여 각각 *Bacillus velezensis* (CMML 21-47), *Bacillus amyloliquefaciens* (CMML 21-49)로 동정되었고, 선발된 길항진균 CMML 21-62, CMML 21-65은 ITS, EF1- $\alpha$ , Calmodulin 영역 유전서열을 분석하여 각 *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma virens*으로 동정됨

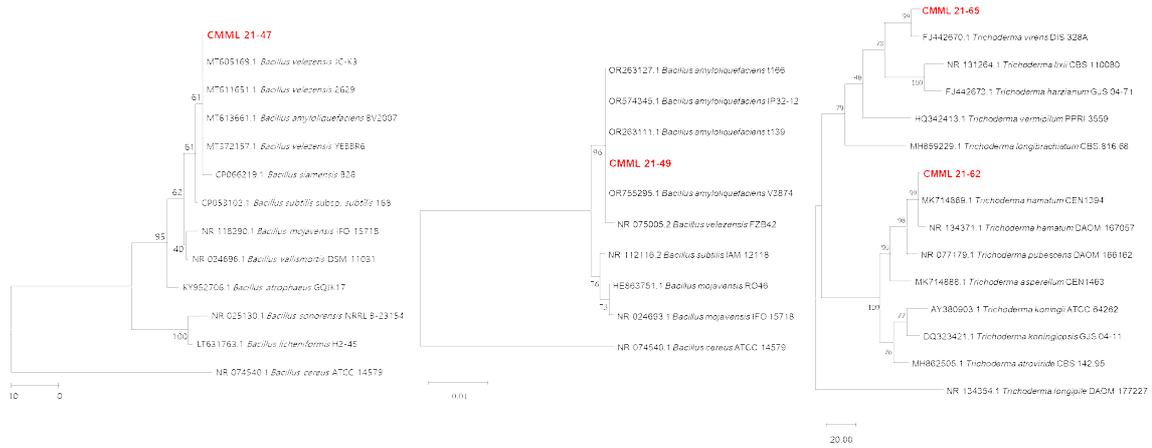


그림 15. 고구마유래 선발 세균과 진균의 동정을 위한 계통수. 선발 세균 균주 CMML 21-47, CMML 21-49은 각각 *Bacillus velezensis* (좌), *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정되었고 (중앙), 선발 진균 균주 CMML 21-62, CMML 21-65은 *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma virens*로 동정됨 (우)

### 3) 기 확보된 서류작물병 제어 미생물의 효능검증 및 특성분석

#### • 기 확보된 길항미생물의 효능검증 및 특성분석

- 기 확보된 길항세균 *B. velezensis* CMML 20-18과 *B. velezensis* CMML 20-20과 유용진균 *Trichoderma aspererillum* CMML 20-29에 대하여 서류작물병 원인균과 대치 배양을 수행한 결과 병원균 성장을 매우 효과적으로 억제하는 것으로 평가됨
- 고구마 질병의 병원균인 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균에 대한 3종 미생물의 대치배양 결과는 아래와 같음

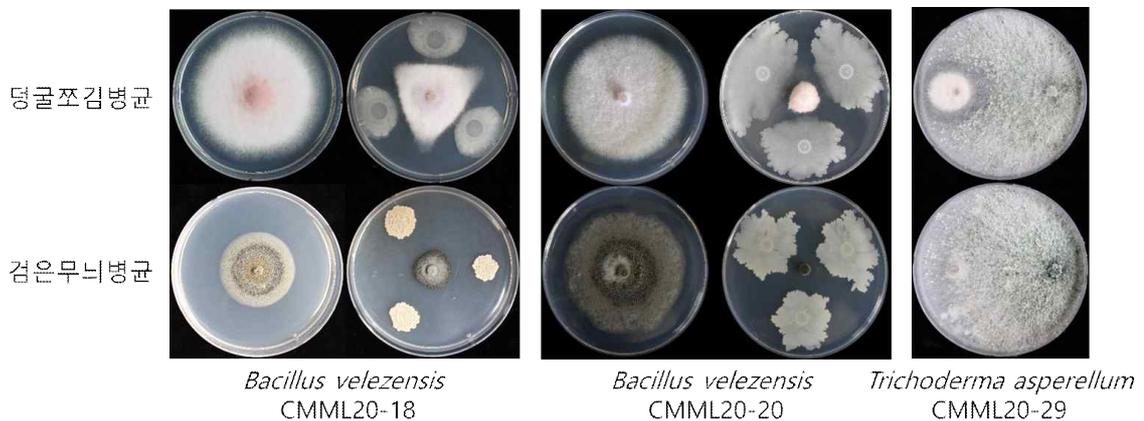


그림 16. 고구마 병원균에 대한 기 확보 유용 미생물 3종의 항균 활성 검정 결과

- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주의 경우 대조구와 비교하여 덩굴쪄김병균에 대해서는 약 45.7%, 검은무늬병균에 대해서는 약 48.3%의 균사 성장 억제율을 보임

- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-20 균주의 경우 대조구와 비교하여 덩굴쪄김병균에 대해서는 약 79.6%, 검은무늬병균에 대해서는 약 89.2%의 균사 성장 억제율을 보임
- 기 확보된 유용진균 *Trichoderma asperellum* CMML 20-29 균주의 고구마 질병 원인균과 대치 배양을 수행한 결과 덩굴쪄김균에 대하여 68.2%의 방제율을 보이는 것과, 검은 무늬병균에 대하여 89.7%의 방제율을 보이는 것을 확인함
- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주의 경우 대조구와 비교하여 검은 무늬썩음병균에 대해서는 약 52.7%, 균핵병균에 대해서는 약 59.7%의 절반 이상의 균사 성장 억제율을 보임
- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-20 균주의 경우 대조구와 비교하여 검은 무늬썩음병균에 대해서는 약 82.3%, 균핵병균에 대해서는 약 89.7%의 균사 성장 억제율을 보임
- 기 확보된 유용진균 *Trichoderma asperellum* CMML 20-29 균주의 감자 질병 원인균과 대치 배양을 수행한 결과 검은무늬병균에 대하여 62.4%의 방제율을 보이는 것과, 균핵병균에 대하여 70.5%의 방제율을 보이는 것을 확인함

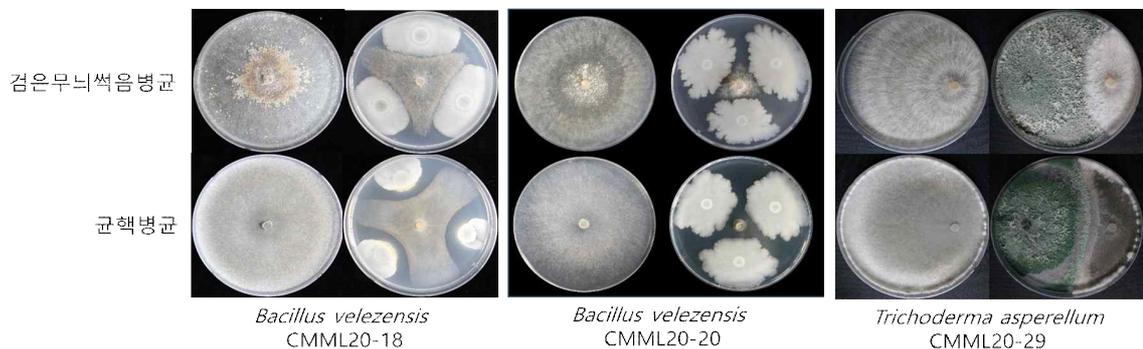


그림 17. 감자 병원균에 대한 기 확보 유용 미생물 3종의 항균 활성 검정 결과

- 기 확보된 길항세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주의 배양 여과액은 서류작물병 병원균 성장을 매우 효과적으로 억제하는 것으로 평가됨
- 고구마 질병의 병원균인 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균에 대한 기 확보 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주 배양 여과액 실험 결과는 아래와 같음
- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주 배양 여과액의 농도가 높은 배지일수록 대조구와 비교하여 고구마 병원균의 균사 생장이 억제됨. 덩굴쪄김병균에 대해서는 최대 30.4%, 검은무늬병균에 대해서는 최대 55.0%의 균사 성장 억제율을 보임

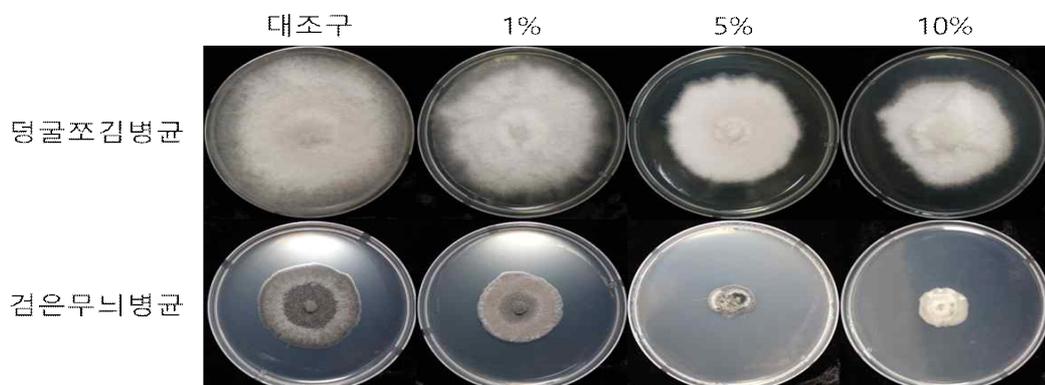


그림 18. 고구마 병원균에 대한 기 확보 유용 미생물 CMML 20-18 균주 배양 여과액의 항균 활성 검정 결과

- 감자 질병의 병원균인 검은무늬썩음병균과 균핵병균에 대한 기 확보 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주 배양 여과액 실험 결과는 아래와 같음
- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주 배양 여과액의 농도가 높은 배지일수록 대조구와 비교하여 감자 병원균의 균사 생장이 억제됨. 검은무늬썩음병균에 대해서는 최대 29.9%의 균사 생장 억제율을 보이며, 균핵병균에 대해서는 최대 94.1% 이상의 가장 높은 균사 생장 억제율을 보임

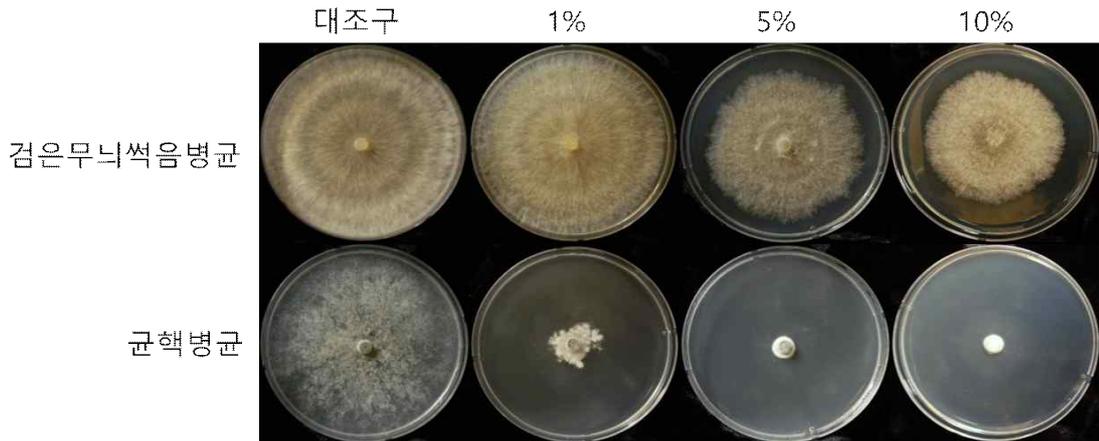


그림 19. 감자 병원균에 대한 기 확보 유용 미생물 CMML 20-18 균주 배양 여과액의 항균 활성 검정 결과

- 기 확보된 길항세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주가 생성하는 휘발성 유기화합물은 서류작물병 병원균 생장을 매우 효과적으로 억제하는 것으로 평가됨
- 고구마 질병의 병원균인 덩굴썩김병균과 검은무늬병균에 대한 기 확보 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주 휘발성 유기화합물 실험 결과는 아래와 같음
- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주가 생산하는 휘발성 유기화합물에 의해 대조구와 비교하여 검은무늬병균의 균사생장이 약 63.1% 이상 억제됨

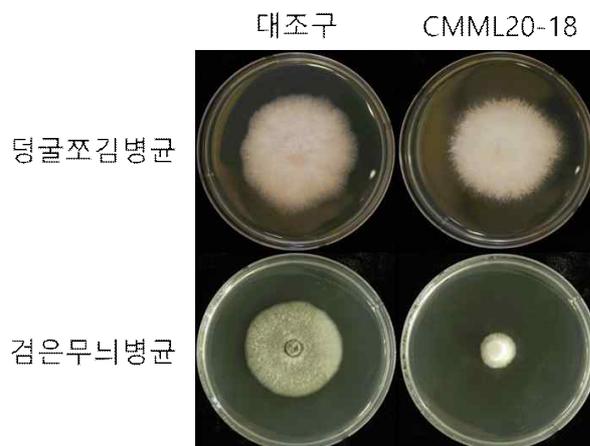


그림 20. 고구마 병원균에 대한 기 확보 유용 미생물 CMML 20-18 균주의 휘발성 유기화합물의 항균 활성 검정 결과

- 감자 질병의 병원균인 검은무늬썩음병균과 균핵병균에 대한 기 확보 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주 휘발성 유기화합물 실험 결과는 아래와 같음

- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주가 생산하는 휘발성 유기화합물에 의해 대조구와 비교하여 감자 병원균의 균사 생장이 억제됨. 검은무늬썩음병균에 대해서는 약 31.3%, 균핵병균에 대해서는 약 72.6% 이상의 높은 균사 생장 억제율을 보임

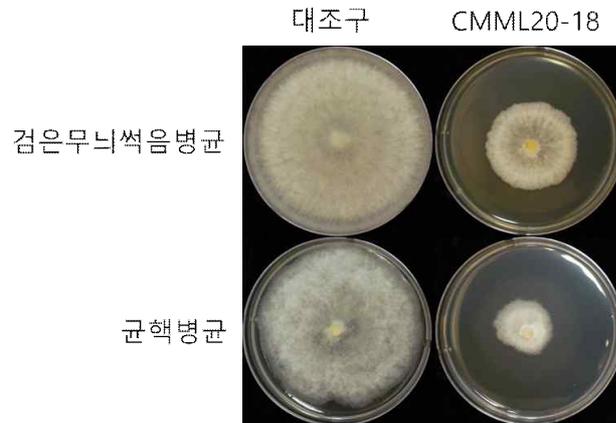


그림 21. 감자 병원균에 대한 기 확보 유용 미생물 CMML 20-18 균주의 휘발성 유기 화합물의 항균 활성 검정 결과

- 기 확보된 길항미생물 *Trichoderma asperellum* CMML 20-29 균주 배양 여과액 실험 결과 덩굴썩김병균에는 16.6%, 검은무늬병균에는 100%의 방제 효과를 보임. 또한 CMML 20-29 균주 휘발성 물질의 항균 활성 확인 결과, 덩굴썩김병균과 검은무늬병균의 성장한 균사 길이를 측정했을 때 방제율은 5.8%, 30%로 다소 방제율이 높지 않았지만 균사가 PDA 배지 위로 성장하지 못하는 것을 확인함

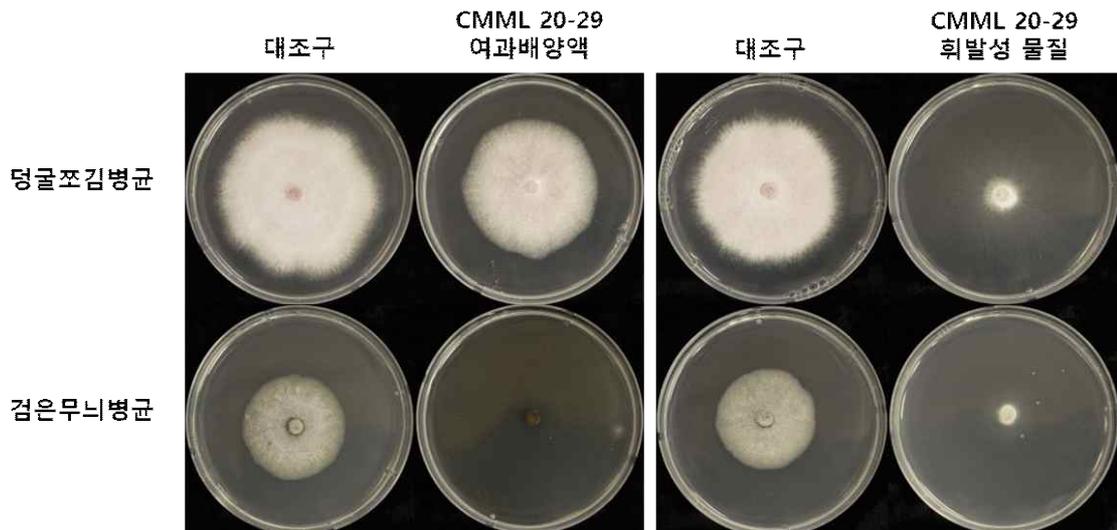


그림 22. 고구마 병원균에 대한 기 확보 유용 미생물 CMML 20-29 균주 배양 여과액과 휘발성 물질 항균 활성 검정 결과

- 기 확보된 길항세균 *B. velezensis* CMML 20-18과 *B. velezensis* CMML 20-20은 고구마 괴근과 감자 괴경에 높은 병억제율을 보여줌
- 고구마 질병의 병원균인 덩굴썩김병균과 검은무늬병균에 대한 기 확보 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주의 고구마 괴근에서 병 억제능 평가 실험 결과는 아래와 같음
- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주를 고구마 괴근에 처리하였을 때 무처리구와 유사한 수준으로 병징이 감소함



무처리구      덩굴쪄김병균      덩굴쪄김병균 + CMML 20-18      검은무늬병균      검은무늬병균 + CMML 20-18

**그림 23. 고구마 괴근에서 병원균에 대한 기 확보 유용 미생물 CMML 20-18 균주 병 억제능 평가 결과**

- 고구마 질병의 병원균인 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균에 대한 기 확보 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-20 균주의 고구마 괴근에서 병 억제능 평가 실험 결과는 아래와 같음
- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-20 균주를 고구마 괴근에 처리하였을 때 병원균에 대한 높은 억제율을 보여줌



무처리구      덩굴쪄김병균      덩굴쪄김병균 + CMML 20-20      검은무늬병균      검은무늬병균 + CMML 20-20

**그림 24. 고구마 괴근에서 병원균에 대한 기 확보 유용 미생물 CMML 20-20 균주 병 억제능 평가 결과**

- 감자 질병의 병원균인 검은무늬썩음병균과 균핵병균에 대한 기 확보 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주의 고구마 괴근에서 병 억제능 평가 실험 결과는 아래와 같음
- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주를 감자 괴경에 처리하였을 때 균핵병균의 경우 무처리구와 유사한 수준으로 병징이 감소함

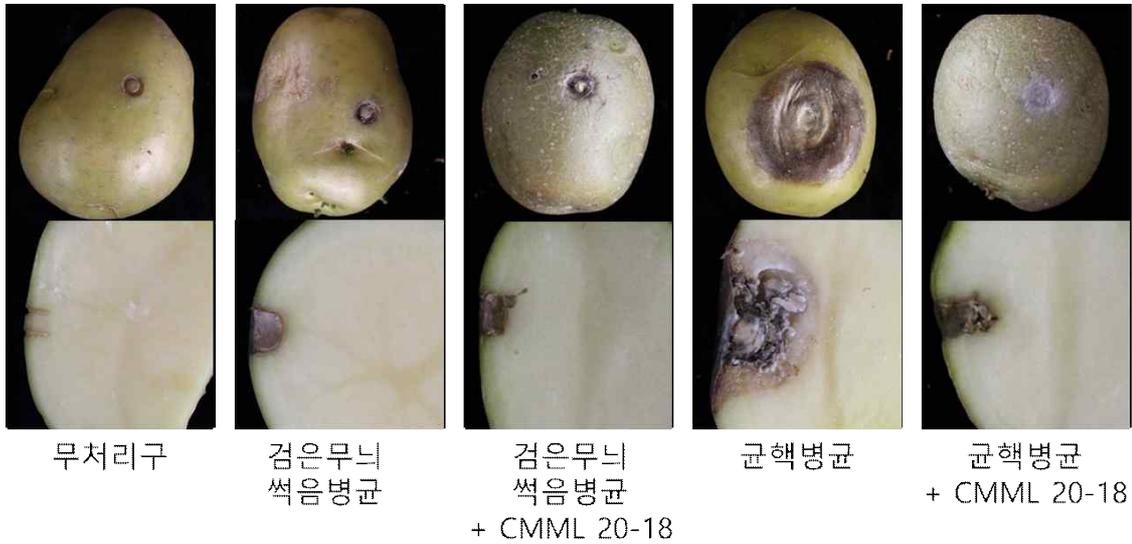


그림 25. 감자 괴경에서 병원균에 대한 기 확보 유용 미생물 CMML 20-18 균주 병 억제능 평가 결과

- 감자 질병의 병원균인 검은무늬썩음병균과 균핵병균에 대한 기 확보 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-20 균주의 고구마 괴근에서 병 억제능 평가 실험 결과는 아래와 같음
- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-20 균주를 감자 괴경에 처리하였을 때 무처리구와 유사한 수준으로 병징이 감소함

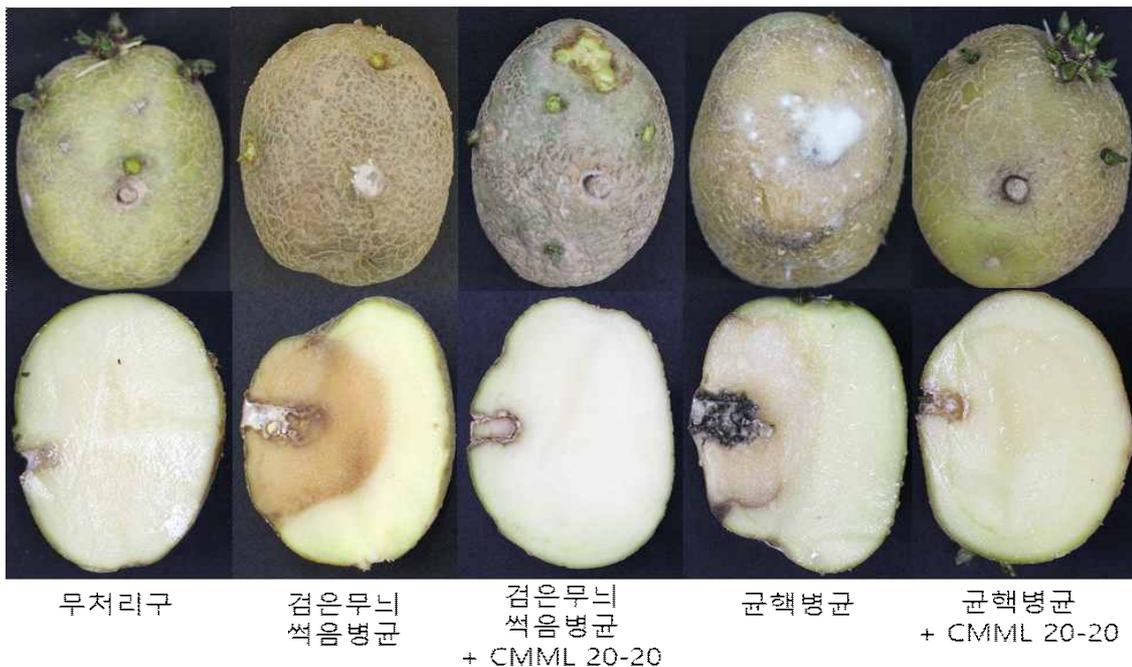


그림 26. 감자 괴경에서 병원균에 대한 기 확보 유용 미생물 CMML 20-20 균주 병 억제능 평가 결과

- 기 확보된 유용 미생물 *Trichoderma asperellum* CMML 20-29 균주 고구마 괴근에서 병 억제능 평가 실험 결과 CMML 20-29 균주 포자 현탁액( $1.0 \times 10^6$  cell/mL) 10 $\mu$ L을 처리한 구에서 덩굴썩음병균과 검은무늬썩음병균 병반의 크기가 대조군보다 감소하는 것을 확인해 고구마 괴근의 질병 억제 효능이 있는 것을 검증함

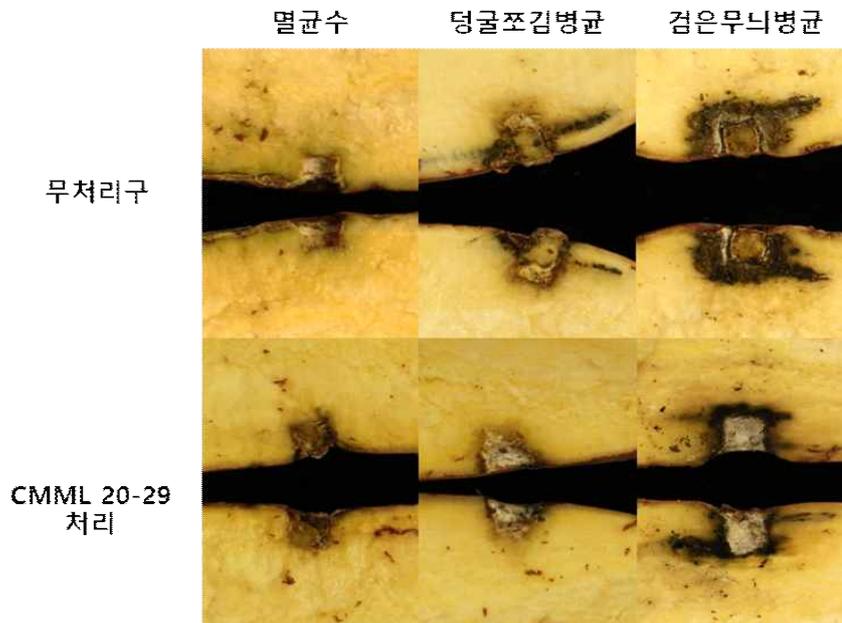
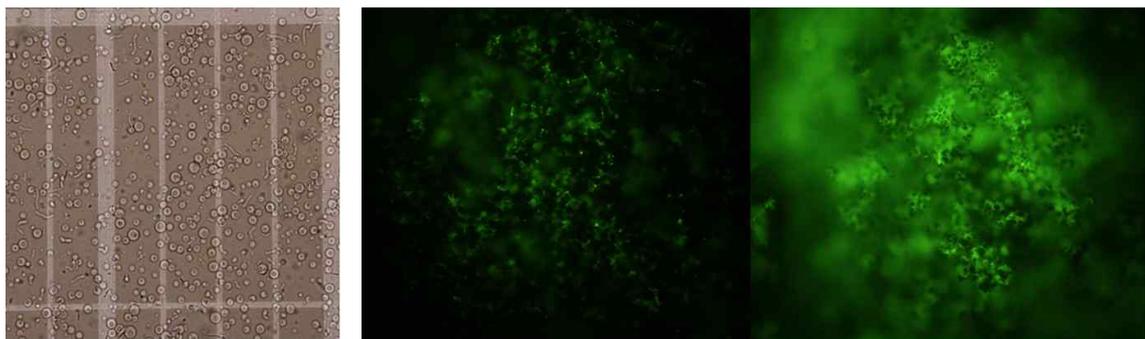


그림 27. 고구마 괴근에서 병원균에 대한 기 확보 유용 미생물 CMML 20-29 균주 병 억제능 평가 결과

#### 4) 기 확보된 서류작물병 제어 미생물의 병방제 메커니즘 분석

- 유용미생물 *Trichoderma* spp. 형질전환법 개발

- *T. asperellum* (CMML 20-29)의 원형질체( $1.0 \times 10^8$  cell/mL)를 제작하고, pDht\_sk\_PE 벡터 내부의 Green fluorescent protein(GFP) 유전자의 발현을 확인함



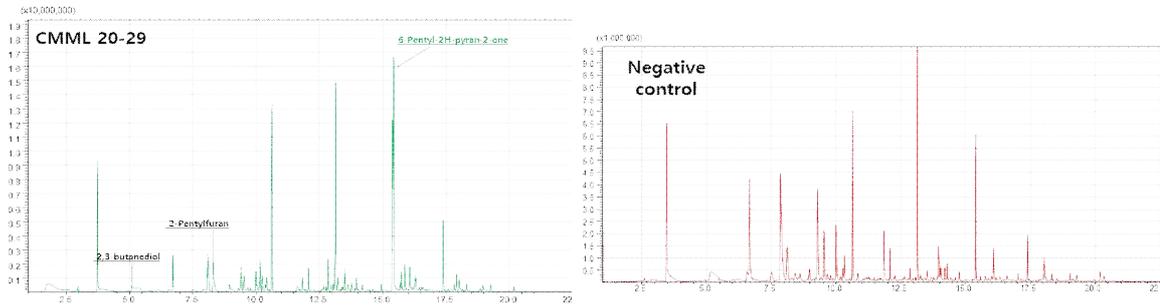
CMML 20-29 원형질체

CMML 20-29 Green fluorescent protein 발현 형질전환체

그림 28. 기 확보 유용 미생물 CMML 20-29 균주의 GFP 형광 발현 현미경 사진

- 항진균성 유효활성 물질 규명을 위한 *Trichoderma asperellum* CMML 20-29 Gas Chromatography-Mass Spectrum 분석

- *T. asperellum* CMML 20-29 휘발성 물질의 덩굴썩김병원균과 검은무늬병원균 성장 저해능을 Sandwich plate assay로 확인함. 휘발성 물질 규명을 위해 GC-MS 분석을 수행함. 항진균성 물질의 식별을 위해 주요 peak에 대한 Mass spectrum 분석을 실시한 결과, 5.09분, 8.311분, 15.434분, peak에서 45, 81, 95, 의 m/z가 검출되었으며, 각각  $C_4H_{10}O_2$ ,  $C_9H_{14}O$ ,  $C_{10}H_{14}O_2$ 의 molecular formula가 확인됨. 이를 NIST 라이브러리 database를 통해 탐색한 결과 2-Pentylfuran, 2,3-butanediol, 6-Pentyl-2H-pyran-2-one으로 확인됨



Retention time(min)	m/z	Area	Compound name	Molecular formula
5.09	45	393962	2,3-butanediol	C4H10O2
8.311	81	3114666	2-Pentylfuran	C9H14O
15.434	95	9073724	6-Pentyl-2H-pyran-2-one	C10H14O2

그림 29. *Trichoderma asperillum* CMML 20-29 균주의 GC-MS 분석 결과

• 기 확보된 CMML 20-20 균주의 항균활성 물질 분석

- HPLC 분석 결과 머무름 시간 (Retention time)은 7분에서 10분사이, 10분에서 15분 사이, 20분에서 30분사이에 다수의 피크 (Peak)가 검출되었고, 이들 피크의 머무름 시간과 표준물질의 머무름 시간을 비교한 결과 같은 시간에 피크가 검출됨

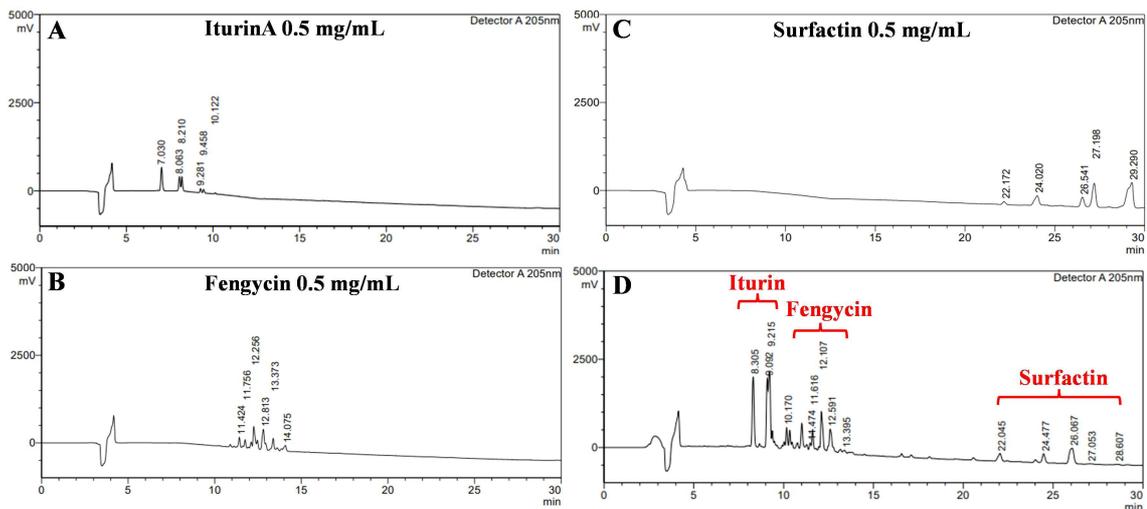


그림 30. HPLC로 분석한 바실러스 벨레젠시스 CMML 20-20 균주의 무세포 배양 상층액에서 메탄올 추출물. (A) 이틀린 표준; (B) 펜기신 표준; (C) 설파신티 표준; (D) CMML 20-20

5) 기 확보된 서류작물 병방제 미생물의 실적용

• 기 확보된 길항미생물의 서류작물 포장시험 결과

- *B. velezensis* CMML 20-18, *B. velezensis* CMML 20-20, 그리고 *Trichoderma asperillum* CMML 20-29 균주를 단독 또는 혼합(세균+진균 조합) 처리하였을 경우, 고구마 질병인 덩굴쪄짐병과 검은무늬병에 대한 병발생률과 발병정도가 병 처리만한 plot에 비해 현저하게 낮게 확인되었고, 이는 살진균제인 azoxystrobin과 유사한 수준의 결과로 관찰됨



그림 31. 기 확보 유용세균과 유용진균의 병방제 포장시험 사진 (덩굴쪄김병 예시)

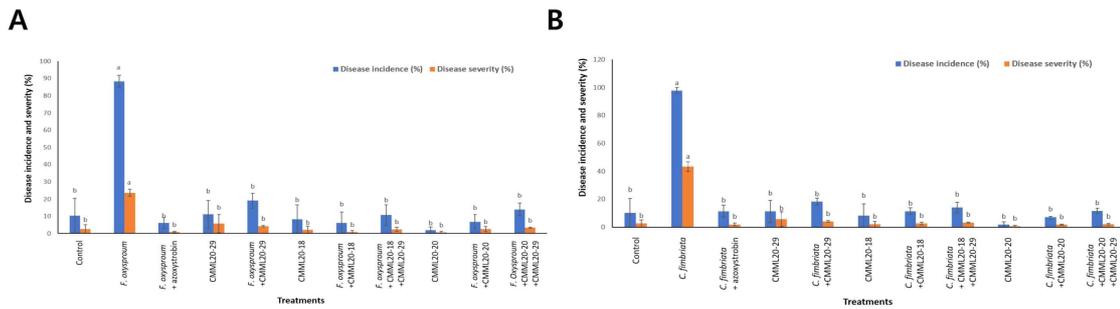


그림 32. 고구마 덩굴쪄김병(A), 검은무늬병(B) 에 대한 기 확보 유용세균과 유용진균의 병방제 포장시험 결과

- 감자에 대하여 *B. velezensis* CMML 20-20과 *Trichoderma aspererllum* CMML 20-29 균주를 단독 또는 혼합처리한 결과에 대한 검은무늬썩음병과 균핵병균에 대해 높은 병방제력을 나타냈음

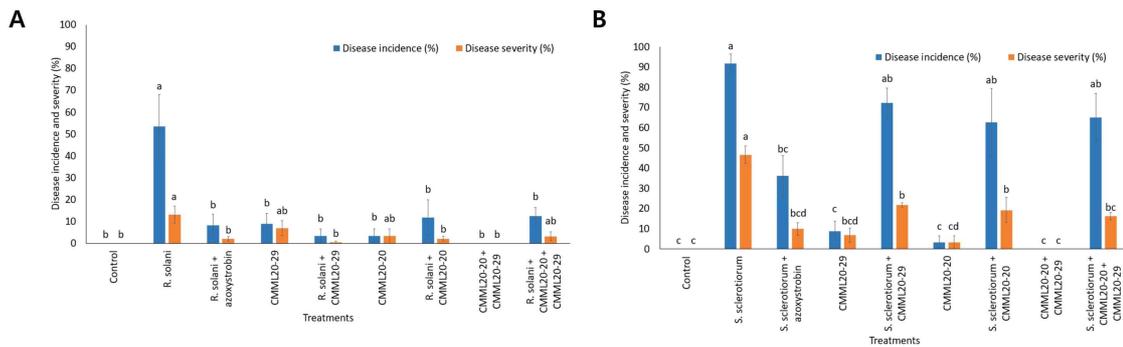


그림 33. 감자 검은무늬썩음병(A), 균핵병균(B) 에 대한 기 확보 유용세균과 유용진균의 병방제 포장시험 결과

## 6) 선발된 길항미생물의 상호관계 및 병증완화 메커니즘 분석

### • 선발된 길항미생물의 효능검증 및 특성분석

- 선발된 *Bacillus velezensis* CMML 21-47, *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49, *Trichoderma virens* CMML 21-65 균주와 *Trichoderma hamatum* CMML 21-62 균주에 대하여 서류작물병 원인균과 대치 배양을 수행한 결과 병원균 생장을 매우 효과적으로 억제하는 것으로 평가됨

- 감자 질병의 병원균인 검은무늬썩음병균과 균핵병균, 고구마 질병의 병원균인 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균에 대한 선발된 미생물 *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 대치배양 결과는 아래와 같음

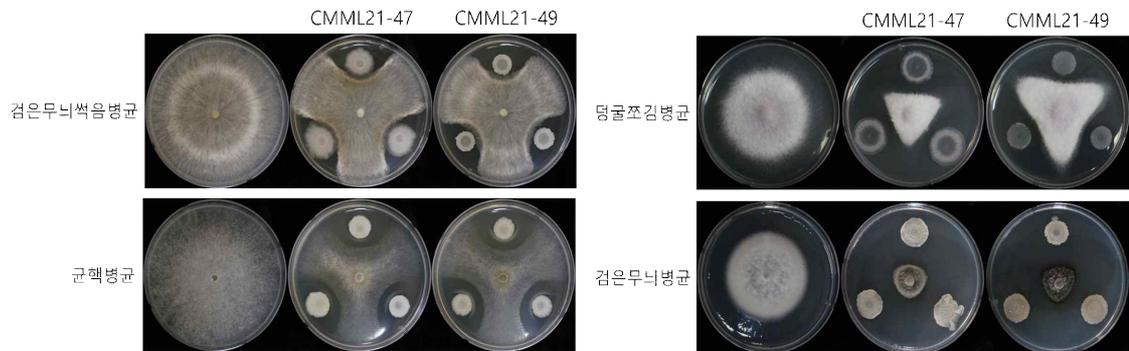


그림 34. 서류작물 병원균에 대한 선발 미생물 CMML 21-47, 21-49의 항균 활성 검정 결과

- 선발된 미생물 *B. velezensis* CMML 21-47 균주의 경우 대조구와 비교하여 검은무늬썩음병균에 대해서는 약 57.4%, 균핵병균에 대해서는 약 62.2%, 덩굴쪄김병균에 대해서는 약 63.3%, 검은무늬병균에 대해서는 약 66.6%의 모든 서류작물 병원균에 대해서 절반 이상의 높은 균사 성장 억제율을 보임. 선발된 미생물 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 경우 대조구와 비교하여 검은무늬썩음병균에 대해서는 약 48.7%, 균핵병균에 대해서는 약 55.9%, 덩굴쪄김병균에 대해서는 약 48.5%, 검은무늬병균에 대해서는 약 61.6% 이상의 균사 성장 억제율을 보이며 특히 검은무늬병균에 대해서 가장 높은 균사 성장 억제율을 보임



그림 35. 서류작물 병원균에 대한 선발 미생물 CMML 21-65, 21-62 균주의 항균 활성 검정 결과

- *T. vires* CMML 21-65, *T. hamatum* CMML 21-62는 고구마 질병 병원균인 덩굴쪄김병균에 대해 71.8%, 68.25% 방제율을 보이고, 검은무늬병균에 대해 85.4%, 77.8%의 방제율을 확인함. 감자 질병 병원균인 검은무늬썩음병균에 대해 77.6%, 74.4%의 방제율을 보이고, 균핵병균에는 65.8%, 72.0%의 방제율을 보인 것을 확인함. 4종의 서류작물 병원균에 대해 두 균주 모두 65% 이상의 방제율을 보인 것을 보아 항균 활성 억제능 있다고 판단함
- 선발된 *Pseudomona kribbensis* CMML 21-48와 검은무늬썩음병균, 균핵병균, 덩굴쪄

김병균, 검은무늬병균과의 대치배양으로 선발균주의 항균력 검증함

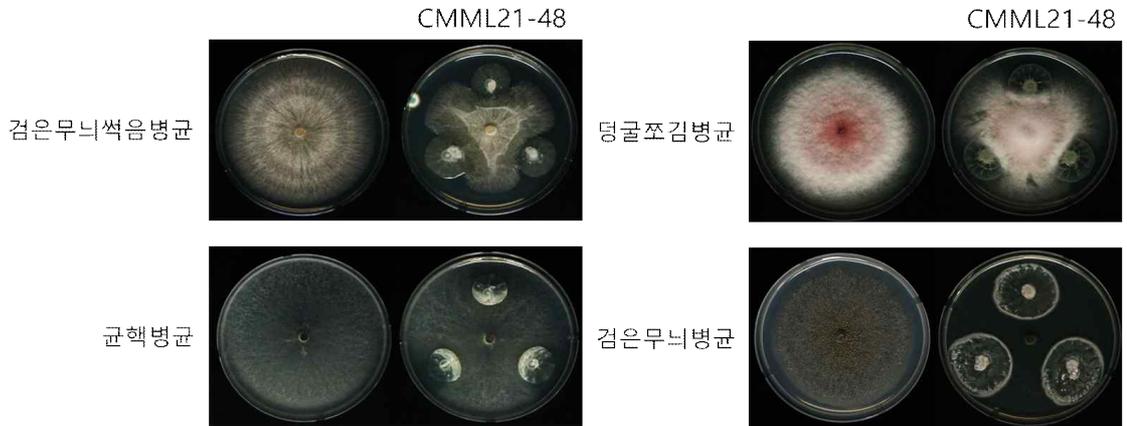


그림 36. 서류작물 병원균에 대한 선발 미생물 CMML 21-48의 항균 활성 검정 결과

- 선발된 *Trichoderma virens* CMML 21-65 균주와 *Trichoderma hamatum* CMML 21-62 균주의 단배양과 공배양의 배양여과액 항균활성능을 확인함

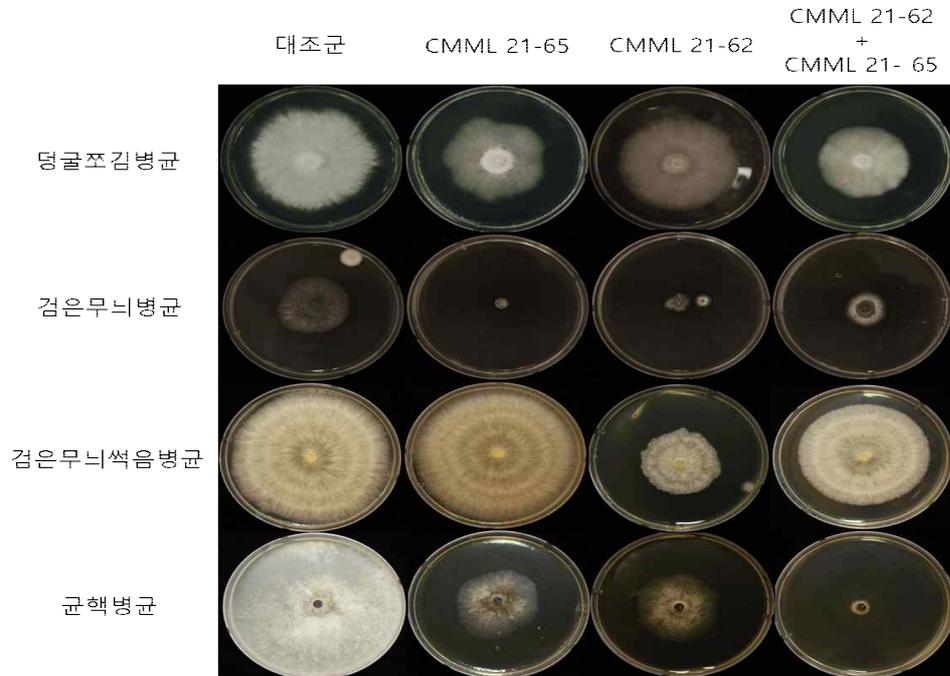


그림 37. 서류작물 병원균에 대한 선발 미생물 CMML 21-65, 21-62 균주 배양 여과액의 항균 활성 검정 결과

- 고구마 질병 병원균인 덩굴쪄김병균에는 CMML 21-62, 65 균주의 공배양 배양여과액 배지에서 단배양 배지보다 방제율이 높았지만, 검은무늬병균에는 공배양 배양여과액 배지에서의 방제율이 단배양 배지보다 20% 이상 감소하는 결과를 보임. 감자 질병 병원균인 균핵병균에는 단배양 배양여과액 배지보다 공배양 배지에서 35% 이상의 방제율을 보이고, 검은무늬씩음병균에는 공배양 배양여과액 배지와 CMML 21-65 균주 단배양 배지에서는 30% 이하의 방제율을 보이지만 CMML 21-62 단배양 배양여과액 배지에서는 63% 이상의 방제율을 보이는 것을 확인함. 결과적으로 선발 균주마다 질병 병원균에 대해 다른 항균 활성능을 가지는 것을 검증하고, 배양 여과액 배지 실험을 통해 CMML 21-62와 CMML 21-65의 공배양 시 나오는 물질이 항균 활성능이 있다는 것으로 판단함

• 선발된 길항미생물의 기초 배양 조건(배양온도, 초기 pH) 및 특성

- 선발된 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 온도와 pH 별로 최적 생육 조건 결과는 아래와 같음
- 선발된 미생물 *B. velezensis* CMML 21-47 균주의 경우 20~45 °C 온도 범위에서 자랐으며 최적의 배양온도는 30 °C이고 최고 배양온도는 45 °C로 확인되었으며 최소 pH 5.0 이상, 최고 pH 9.0 이하에서 배양가능하고 가장 바람직한 pH는 7.0~8.0으로 확인됨

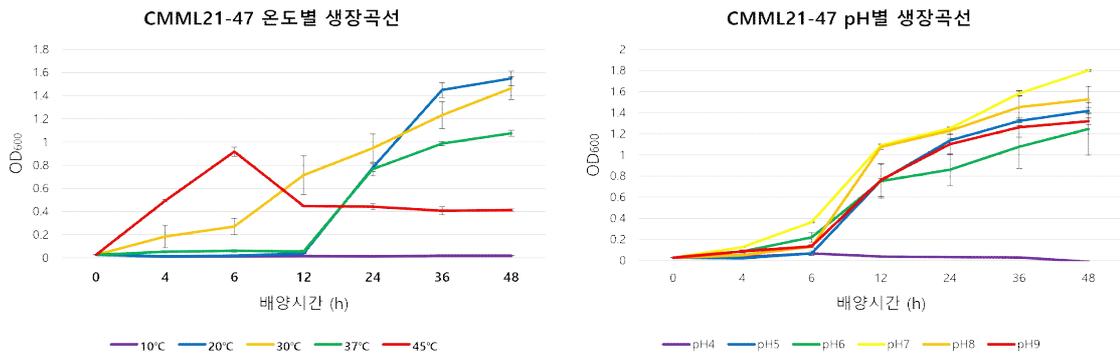


그림 38. 선발 미생물 CMML 21-47의 온도별 성장곡선(좌), pH별 성장곡선 (우)

- 선발된 미생물 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 경우 20~45 °C 온도 범위에서 자랐으며 최적의 배양온도는 37 °C이고 최고 배양온도는 45 °C로 확인되었으며 최소 pH 5.0 이상, 최고 pH 9.0 이하에서 배양가능하고 가장 바람직한 pH는 6.0~7.0으로 확인됨

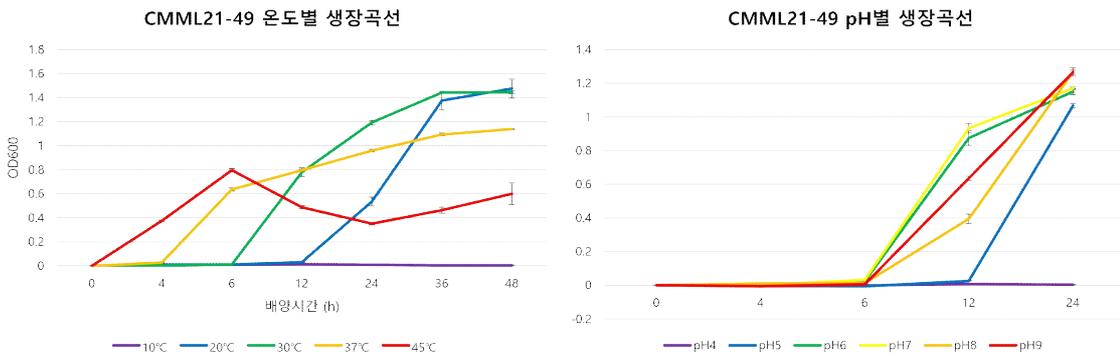


그림 39. 선발 미생물 CMML 21-49의 온도별 성장곡선(좌), pH별 성장곡선 (우)

- 선발된 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 단백질 분해효소 활성 검정 결과 두 균주 모두 균주 주변의 배지가 투명해진 것을 확인할 수 있고, 우수한 단백질 분해 효소 분비능을 확인할 수 있음

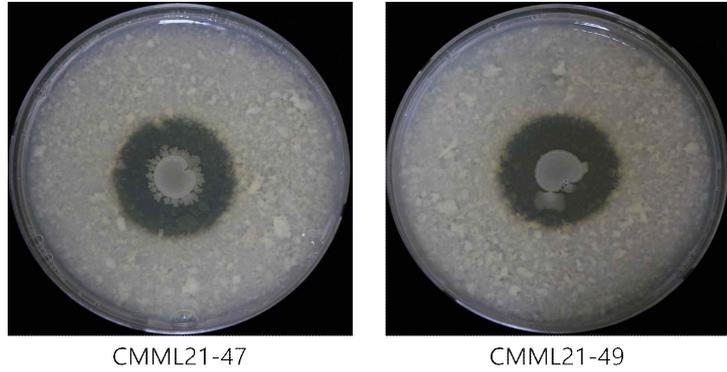


그림 40. 선발 미생물 CMML 21-47, CMML 21-49의 단백질 분해 효소 분비능

- 선발된 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 사이드로포어 (siderophore) 생산능 검정 결과 균주 모두 균주 주변의 배지의 색상이 노랗게 변한 것을 확인하여 사이드로포어 생성능을 확인할 수 있음

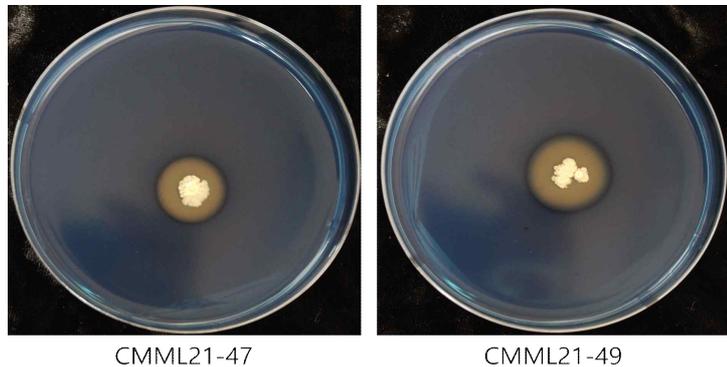


그림 41. 선발 미생물 CMML 21-47, CMML 21-49의 사이드로포어 생성능

- 선발된 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 IAA 형성능 검정 결과 두 균주 모두 식물의 성장을 촉진하는 인자인 IAA를 3일간 각각 15 $\mu$ M, 12 $\mu$ M 가량 생성하는 것을 확인할 수 있음

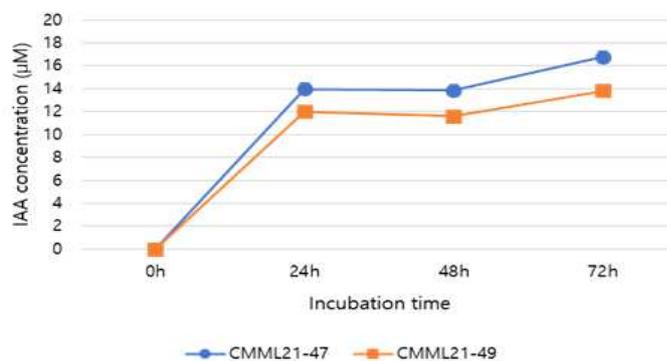
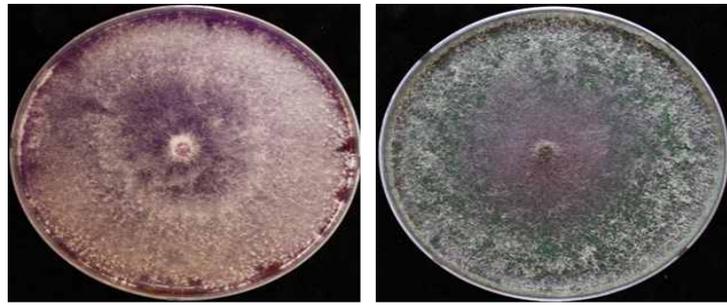


그림 42. 선발 미생물 CMML 21-47, CMML 21-49의 IAA 형성능

- 선발된 *Trichoderma virens* CMML 21-65 균주와 *Trichoderma hamatum* CMML 21-62 균주의 키틴 분해효소 형성능 검증 결과 두 균주에서 생산하는 키틴 분해효소의 활성으로 인해 chitin monomer가 다량 생산되어 pH의 증가함. 높아진 pH로 인해 bromocresol purple 지시약을 포함한 plate가 노란색에서 보라색으로 변색됨



CMML 21-62  
(*T. hamatum*)

CMML 21-65  
(*T. virens*)

그림 43. 선발된 길항진균 *Trichoderma hamatum* CMML 21-62와 *Trichoderma virens* CMML 21-65의 chitinase 활성 결과

- 선발된 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 고구마 저장병 억제에 대한 상호작용을 확인한 결과는 아래와 같음
- 선발된 미생물 *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 배양액을 단독 또는 혼합으로 처리한 결과 CMML 21-47 균주 단독 처리구에서 가장 높은 방제가를 확인하였으며 CMML 21-49균주 단독 또는 혼합 처리구에서도 무처리구와 비교하여 79% 이상의 높은 방제가를 확인함



미생물 배양액 살포	방제가 (%)
무처리구	-
CMML 21-47	91.52±0.8
CMML 21-49	81.85±2.1
혼합	79.46±11.1

그림 44. 선발 미생물 CMML 21-47, CMML 21-49 배양액 단독 또는 혼합 살포시 고구마 저장병 방제능

- 선발된 미생물 *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 휘발성 유기화합물을 단독 또는 혼합으로 처리한 결과 CMML 21-49 균주 단독 처리구에서 가장 높은 방제가를 확인하였으며 CMML 21-49 균주 단독 또는 혼합 처리구에서도 무처리구와 비교하여 64% 이상의 높은 방제가를 확인함



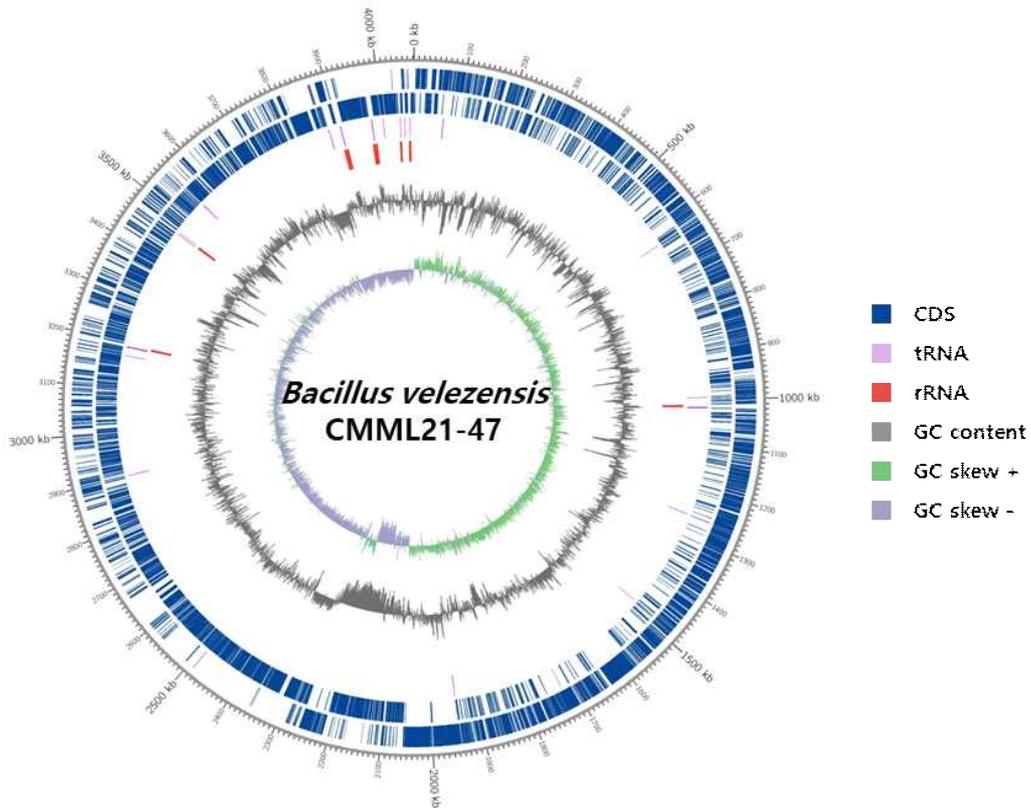
휘발성 유기화합물	방제가 (%)
무처리구	-
CMML 21-47	72.4±7.6
CMML 21-49	81.94±2.8
혼합	64.55±3.4

그림 45. 선발 미생물 CMML 21-47, CMML 21-49 휘발성 유기화합물 단독 또는 혼합 살포시 고구마 저장병 방제능

7) 서류작물병 방제 유효활성 물질 규명 및 유도저항성 (SAR, ISR) 여부 판단

• 선발된 길항미생물의 항진균성 물질 규명을 위한 UPLC-QTOF-MS 분석

- 선발된 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주의 전체 유전자 분석을 수행 결과 CMML 21-47 균주는 하나의 원형 염색체를 가지며 총 4,071,979 bp의 크기임. 또한 전체 유전자의 COG 분석을 수행한 결과, 총 3,917개의 유전자 중 3,367개의 유전자가 분석되었음



Property/attributes	CMML21-47	Property/attributes	CMML21-47
Finishing quality	Complete genome	Predicted genes	3,917
Sequencing platform	PacBio Sequel	Protein coding genes	3,367
Total bases (Mb)	1,356.8	rRNA genes	27
Genome size (bp)	4,071,979	tRNA genes	86
GC content (%)	46.2	ncRNA genes	4

그림 46. 선발 미생물 CMML 21-47의 전체 유전자 분석 결과

- 선발된 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주의 이차대사산물 생성 관련 유전자의 경우 13개의 유전자 클러스터가 있음. 각각 surfactin, fengycin, bacilibactin, bacillaene, locillomycin/locillomycin B, C, difficidin, macrolactin, butirosin A/butirosin B, mersacidin, bacilysin 합성에 관여하는 유전자임

표 7. 선발 미생물 CMML 21-47의 이차대사산물 생산 관련 유전자 클러스터 분석 결과

Cluster	Length	Type	Most similar known cluster	Similarity (%)	BGC-ID
1	143,822-167,101	Lanthipeptide	Mersacidin	100	BGC0000527
2	308,958-350,376	Other	Bacilysin	100	BGC0001184
3	882,322-934,115	NRP	Bacillibactin	100	BGC0000309
4	1,556,715-1,649,090	Polyketide	Difficidin	100	BGC0000176
5	1,778,361-1,818,970	-	-	-	-
6	1,885,324-1,905,451	-	-	-	-
7	1,933,776-2,374,442	NRP	Fengycin	100	BGC0001095
8	2,274,479-2,374,442	Polyketide+NRP	Baciilaene	100	BGC0001089
9	2,598,004-2,685,801	Polyketide	Macrolactin	100	BGC0000181
10	2,983,578-3,004,318	-	-	-	-
11	3,086,372-3,127,616	Saccharide	ButirosinA/butirosinB	7	BGC0000693
12	3,661,573-3,726,367	NRP	Surfactin	82	BGC0000433
13	3,799,103-3,876,830	Polyketide+NRP	Locillomycin/LocillomycinB, C	28	BGC0001005

- 선발된 미생물 *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주가 생산한 정제되지 않은 lipopeptide 추출물의 항진균력을 평가한 결과는 아래와 같음
- 선발된 미생물 *B. velezensis* CMML 21-47 균주의 비정제 lipopeptide는 5000 µg/ml 농도일 때 덩굴쪄김병균에 43.5%, 검은무늬병균에 76.8%, 균핵병균에 85.3%, 검은무늬썩음병균에 37.6%의 균사 성장 억제율을 보임

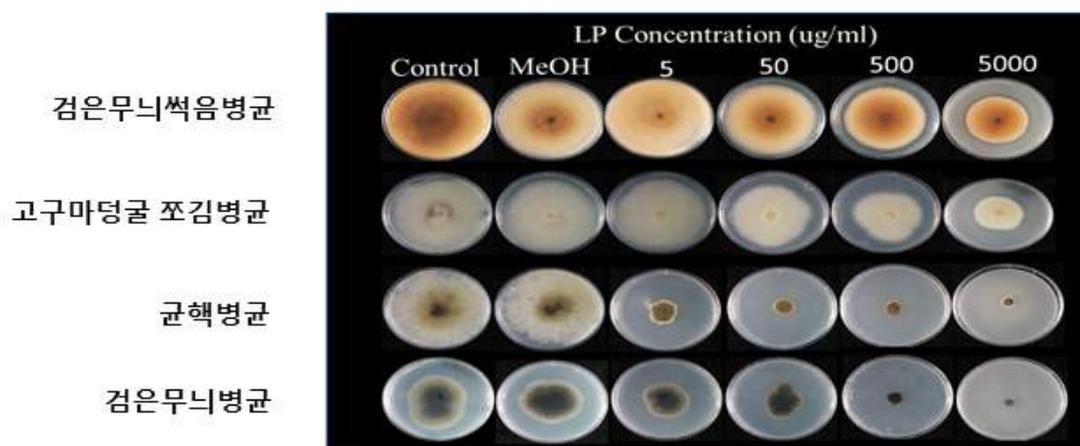


그림 47. 선발된 미생물 CMML 21-47의 비정제 lipopeptide의 항진균력평가 결과

- 선발된 미생물 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 비정제 lipopeptide는 5,000 µg/ml 농도일 때 덩굴쪄김병균에 48.3%, 검은무늬병균에 88.4%, 균핵병균에 87.6%, 검은무늬썩음병균에 54.3%의 균사 성장 억제율을 보임

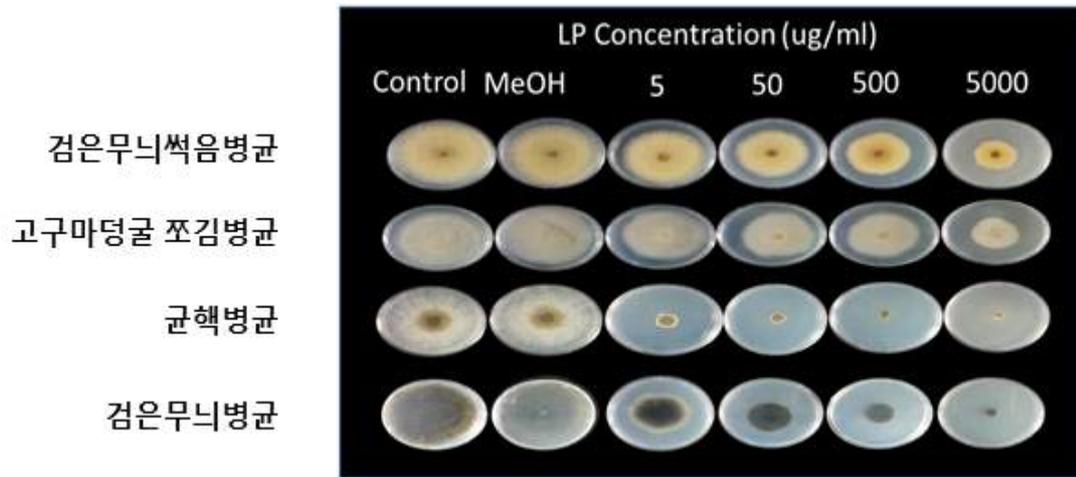


그림 48. 선발된 미생물 CMML 21-49의 비정제 lipopeptide의 항진균력평가 결과

- 선발된 미생물 *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주에 의해 생성된 대사산물을 확인하기 위해 UPLC-QTOF-MS 분석 수행 결과 Total ion chromatogram (TIC) spectrum에서 *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주 lipopeptide 추출물의 주요 peak는 7.5-13.5분에 관찰됨. 또한, 7.5-9.5분, 9.5-10.5분, 12-13.5분의 각 peak는 iturin, fengycin, surfactin 표준물질과 머무름 시간이 일치하였음

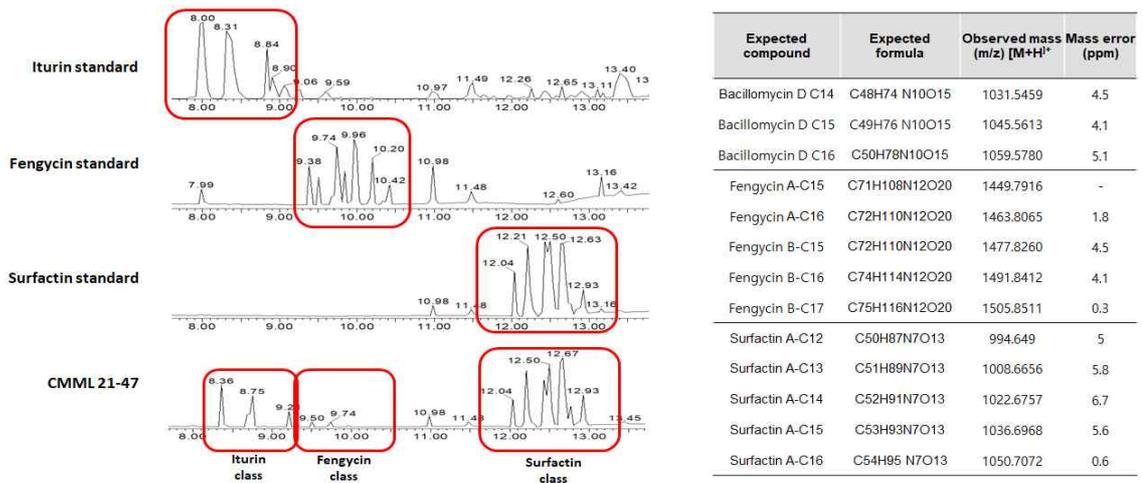


그림 49. 선발된 미생물 CMML 21-47의 UPLC-QTOF-MS 분석 수행 결과

- 항진균성 물질의 정확한 식별을 위해 주요 peak에 대한 MS spectrum 분석을 실시한 결과, 7.5-9.5분 peak에서 1031.54, 1045.56, 1059.57의 m/z가 검출되었으며, 각각 C<sub>48</sub>H<sub>74</sub>N<sub>10</sub>O<sub>15</sub>, C<sub>49</sub>H<sub>76</sub>N<sub>10</sub>O<sub>15</sub>, C<sub>50</sub>H<sub>78</sub>N<sub>10</sub>O<sub>15</sub>(1059.57)의 molecular formula가 확인됨. 이를 다양한 database를 통해 탐색한 결과 iturin 계열의 탄소수가 14, 15, 16개인 bacillomycins (bacillomycin D-C14, bacillomycin D-C15 및 bacillomycin D-C16)으로 확인됨
- 9.5-10.5분 peak의 m/z는 1449.79, 1463.80, 1477.82, 1491.84, 1505.85.42로 나타났으며, 각각 fengycin A-C15(C<sub>71</sub>H<sub>108</sub>N<sub>12</sub>O<sub>20</sub>), fengycin A-C16 (C<sub>72</sub>H<sub>110</sub>N<sub>12</sub>O<sub>20</sub>), fengycin B-C15 (C<sub>72</sub>H<sub>110</sub>N<sub>12</sub>O<sub>20</sub>), fengycin B-C16 (C<sub>74</sub>H<sub>114</sub>N<sub>12</sub>O<sub>20</sub>), fengycin B-C17 (C<sub>75</sub>H<sub>116</sub>N<sub>12</sub>O<sub>20</sub>)으로 확인됨

- 12-13.5분 peak의 m/z는 994.64, 1008.65, 1022.67, 1036.68, 1050.69, 1064.71이 검출되었으며, 이를 bacillus 속 유래 항진균 물질들과 비교해 보았을 때, 각각 surfactin A C12-C17로 확인됨
- 최종적으로 미생물 *B. velezensis* CMML 21-47 균주와 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 항진균물질은 3종의 bacillomycins (bacillomycin D-C14, bacillomycin D-C15 및 bacillomycin D-C16), 5종의 fengycins(fengycin A-C15, fengycin A-C16, fengycin B-C15, fengycin B-C16, fengycin B-C17), 5종의 surfactins (surfactin A-C12, surfactin A-C13, surfactin A-C14, surfactin A-C15, surfactin A-C16)로 확인됨

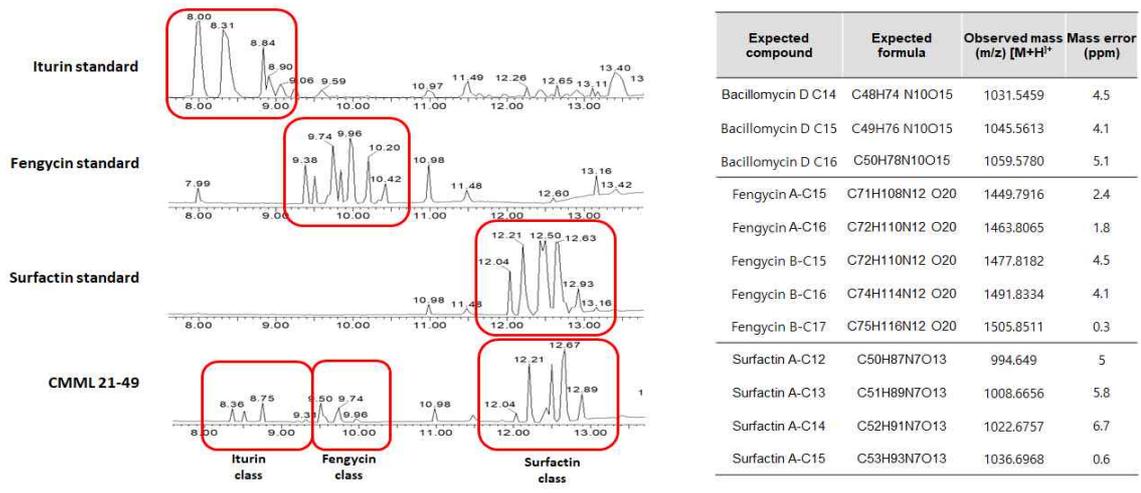


그림 50. 선발된 미생물 CMML 21-47의 UPLC-QTOF-MS 분석 수행 결과

- 선발된 미생물 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 lipopeptide 계열 유효 활성 물질의 분획 별 항진균 활성 검증 결과는 아래와 같음
- 선발된 미생물 *B. velezensis* CMML 21-47 균주의 경우, 고구마 덩굴쪄김병균과 검은 무늬병균의 균사 생장 억제는 fraction 2에서 fraction 18 사이에 관찰되었으며 이는 Bacillomycin D와 Fengycin인 것으로 확인됨. 감자의 균핵병균의 균사 생장 억제는 fraction 1부터 fraction 34 사이에 관찰되었으며 이는 Bacillomycin D, Fengycin과 일부 Surfactin인 것으로 확인됨

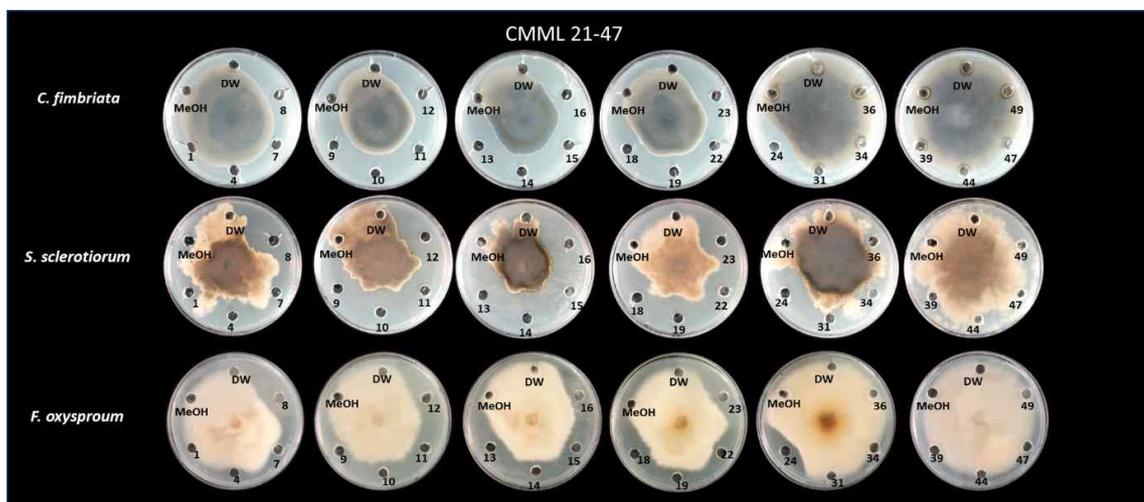


그림 51. 선발된 미생물 CMML 21-47의 lipopeptide 분획 별 항진균활성 검증

표 8. 선발된 미생물 CMML 21-47의 lipopeptide 분획 별 UPLC-QTOF-MS 분석 수행 결과

Fraction	RT	Observed mass(m/z) [M+H] <sup>+</sup>	Expected compound	Expected formula	Observed mass(m/z) [M+H] <sup>+</sup>
1	8.36	1031.5414	BacillomycinD C14	C48H74 N10O15	1031.5459
4	8.75	1045.5579	BacillomycinD C15	C49H76 N10O15	1045.5613
8	9.01	1449.7903	FengycinA-C15	C71H108N12O20	1449.7916
	9.21	1059.5690	BacillomycinD C16	C50H78N10O15	1059.5780
9	9.21	1059.5757	BacillomycinD C16	C50H78N10O15	1059.5780
10	9.21 - 9.31	1059.5757	BacillomycinD C16	C50H78N10O15	1059.5780
		1449.7903	FengycinA-C15	C71H108N12O20	1449.7916
	9.38	1463.8064	FengycinA-C16	C72H110N12 O20	1463.8065
11 - 12	9.38	1463.8064	FengycinA-C16	C72H110N12 O20	1463.8065
	9.50 - 9.57	1477.8191	FengycinB-C15	C72H110N12 O20	1477.8260
13 - 15	9.38	1463.7986	FengycinA-C16	C72H110N12 O20	1463.8065
	9.50	1477.8191	FengycinB-C15	C72H110N12 O20	1477.8260
	9.60	1477.8191	FengycinB-C15	C72H110N12 O20	1477.8260
16	9.64	1491.8353	FengycinB-C16	C74H114N12 O20	1491.8412
		1477.8191	FengycinB-C15	C72H110N12 O20	1477.8260
	9.64	1477.8191	FengycinB-C15	C72H110N12 O20	1477.8260
18	9.71	1491.8353	FengycinB-C16	C74H114N12 O20	1491.8412
	9.81	1505.8542	FengycinB-C17	C75H116N12 O20	1505.8511
	9.84	1491.8353	FengycinB-C16	C74H114N12 O20	1491.8412
19	9.84	1505.8542	FengycinB-C17	C75H116N12 O20	1505.8511
		1491.8353	FengycinB-C16	C74H114N12 O20	1491.8412
21 + 22	9.96	1491.8353	FengycinB-C16	C74H114N12 O20	1491.8412
23	9.96	1491.8353	FengycinB-C16	C74H114N12 O20	1491.8412
31	12.04	994.6482	SurfactinA-C12	C50H87N7O13	994.649
34	12.21	1008.6594	SurfactinA-C13	C51H89N7O13	1008.6656
36 - 39	12.43 - 12.46	1022.6771	SurfactinA-C14	C52H91N7O13	1022.6757
		1036.6926	SurfactinA-C15	C53H93N7O13	1036.6843
44	12.67	1022.6705	SurfactinA-C14	C52H91N7O13	1022.6757
		1036.6926	SurfactinA-C15	C53H93N7O13	1036.6843
46 + 47	12.74	1036.6926	SurfactinA-C15	C53H93N7O13	1036.6843
		1050.7041	SurfactinA-C16	C54H95N7O13	1050.6999
49	12.92	1050.7041	SurfactinA-C16	C54H95N7O13	1050.6999

- 선발된 미생물 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 경우, 고구마 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균, 감자의 균핵병균의 균사 성장 억제는 전체 분획에서 관찰되었으며 이는 1번 분획에서 Bacillomycin D, 44번과 55번 분획에서 Surfactin인 것으로 확인됨

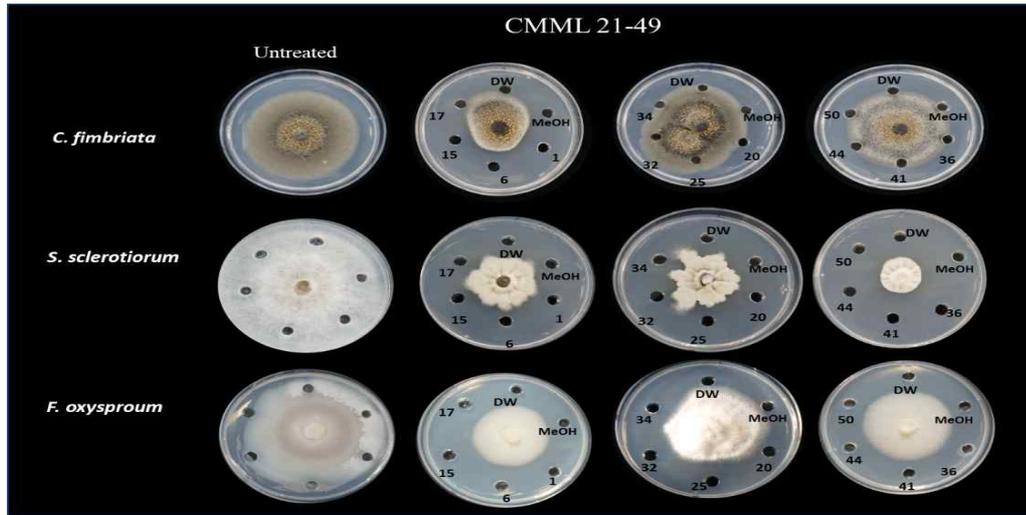


그림 52. 선발된 미생물 CMML 21-49의 lipopeptide 분획 별 항진균활성 검증

표 9. 선발된 미생물 CMML 21-49의 lipopeptide 분획 별 UPLC-QTOF-MS 분석 수행 결과

Fraction	RT	Observed mass(m/z) [M+H] <sup>+</sup>	Expected compound	Expected formula	Observed mass(m/z) [M+H] <sup>+</sup>
1	8.79	1045.553	BacillomycinD C15	C49H76 N10O15	1045.5613
		1008.636	SurfactinA-C13	C51H89N7O13	1008.6678
44	12.50	1022.672	Surfactin A-C14	C52H91N7O13	1022.6777
		1036.6874,	Surfactin A-C15	C53H93N7O13	1036.6985
50	12.04	1008.654	Surfactin A-C13	C51H89N7O13	1008.6678
		1022.672	Surfactin A-C14	C52H91N7O13	1022.6777

• 서류작물병 제어 후보 미생물 균주 유래 휘발성 유기화합물의 항진균 활성 검증

- 고구마병 병원균 4종(*Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *fsarium oxysporum*, *Ceratocustis fimbriata*)에 대한 후보 균주 CMML 21-47, CMML 21-49 유래 휘발성 유기화합물의 활성을 검증함

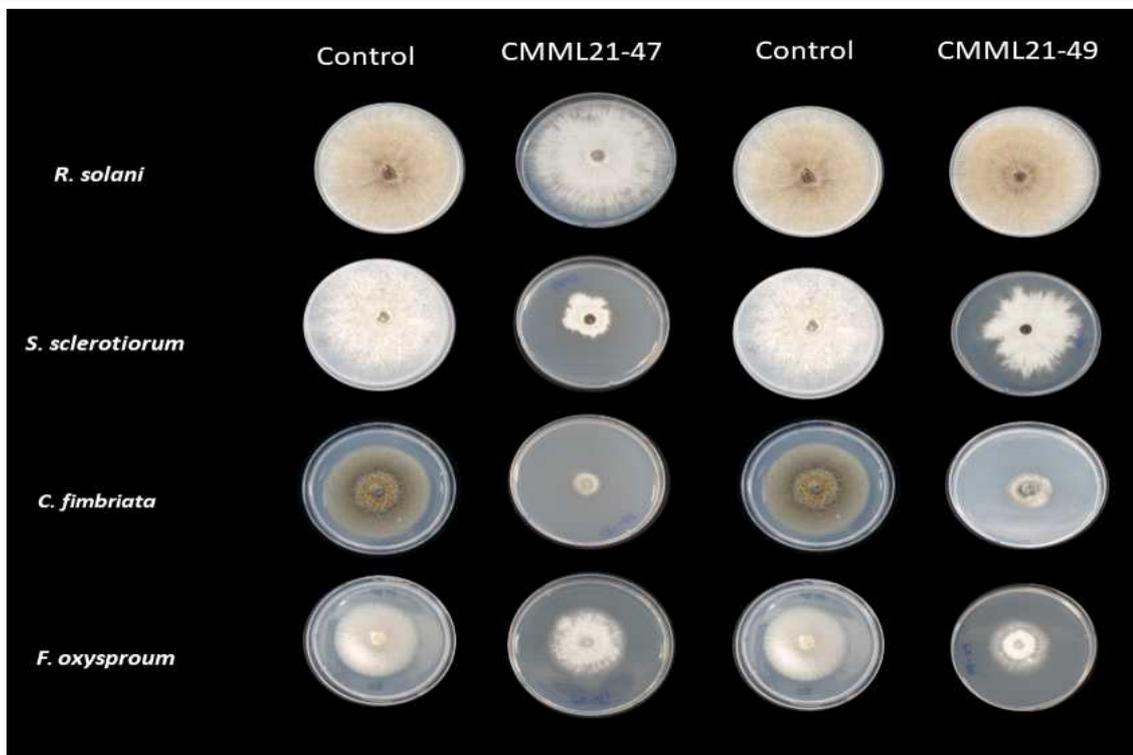


그림 53. CMML 21-47, CMML 21-49 균주의 휘발성유기화합물 활성 검증

- 검증 결과, CMML 21-47 균주에 의한 휘발성 유기화합물(VOC)은 *S. sclerotiorum*에 대해 약 50%의 항진균 활성을 나타내는 것을 확인하였으며, *C. fimbriata* 및 *R. solani*의 경우 약 30%의 활성을 보이는 것을 확인하였으나 *F. oxysporum*에 대해서는 10% 미만으로 항진균 활성이 많이 낮은 것을 확인함
- CMML 21-49 균주에서의 항진균 활성 결과는 *F. oxysporum* 균주에서 약 30% 수준의 활성을 보였으나, 나머지 3종의 균주에서는 항진균 활성이 거의 확인되지 않는 것을 확인함

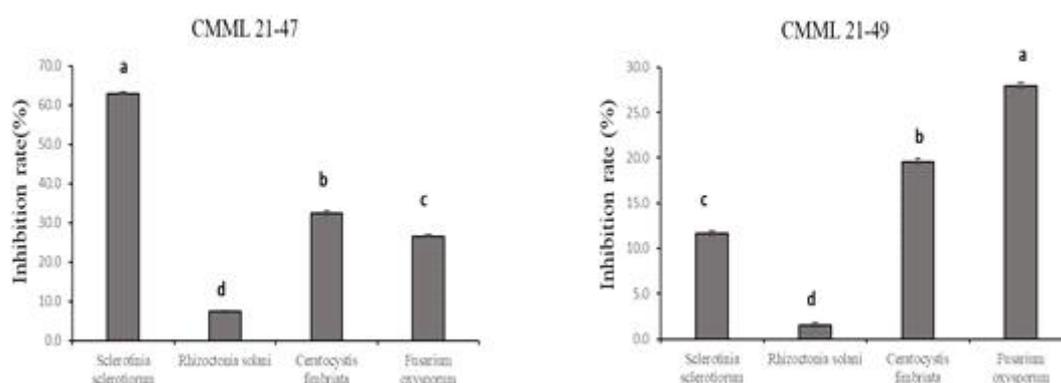


그림 54. 후보 균주의 휘발성 유기화합물 활성 양적 검증

- 선발된 미생물 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 휘발성 유기화합물 분석결과는 아래와 같음

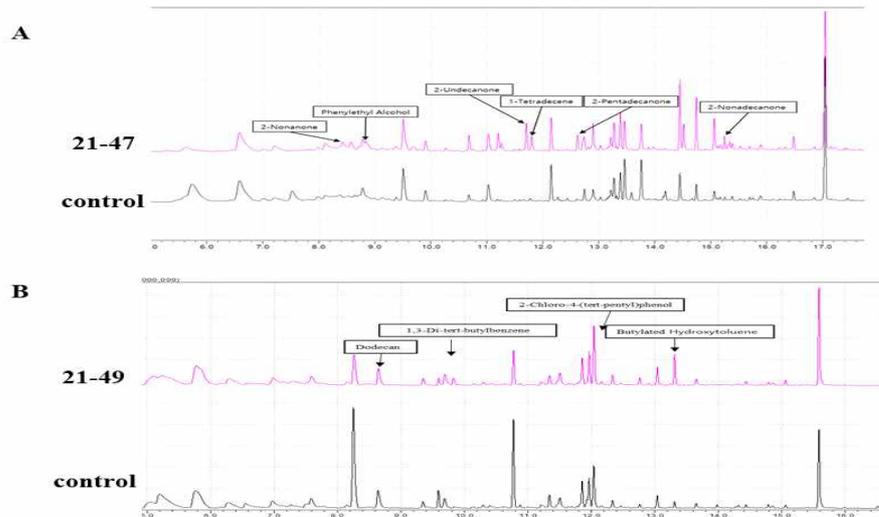


그림 55. 선발된 미생물 CMML 21-47, CMML 21-49의 휘발성 유기화합물 분석 크로마토그램

- *B. velezensis* CMML 21-47 균주는 6개의 휘발성 유기화합물 (2-Nonanone, Phenylethyl Alcohol, 2-Undecanone, 1-Tetradecene, 2-Pentadecanone, 2-Nonadecanone)이 검출되었음

표 10. GC-MS 분석을 통한 CMML 21-47 균주의 휘발성 유기화합물 분석 결과

strain	RT	Area(%)	compounds	Molecular formula	Similarity(%)
CMML 21-47	8.425	19.5	2-Nonanone	C9H18O	92
	8.875	18.4	Phenylethyl Alcohol	C8H10O	93
	11.705	35.8	2-Undecanone	C11H22O	95
	11.8	5.7	1-Tetradecene	C14H28	94
	12.625	14.9	2-Pentadecanone	C15H30O	90
	15.34	5.7	2-Nonadecanone	C19H38O	90

- *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주는 6개의 휘발성 유기화합물 (Dimethyl disulphide, Dodecan, 1,3-Di-tert-butylbenzene, 2-Chloro-4-(tert-pentyl)phenol, Butylated Hydroxytoluene, n-Hexadecanoic acid)이 검출되었음

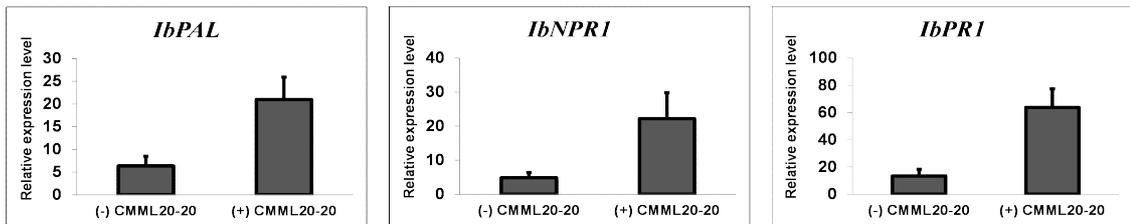
표 11. GC-MS 분석을 통한 CMML 21-49 균주의 휘발성 유기화합물 분석 결과

strain	RT	Area(%)	compounds	Molecular formula	Similarity(%)
CMML 21-49	2.38	86	Dimethyl disulphide	C2H6S2	94
	8.97	0.4	Dodecan	C12H26	91
	9.83	3.7	1,3-Di-tert-butylbenzene	C14H22	94
	12.16	1	2-Chloro-4-(tert-pentyl)ph enol	C11H15ClO	90
	13.31	8.5	Butylated Hydroxytoluene	C15H24O	95
	18.14	0.3	n-Hexadecanoic acid	C16H32O2	94

• 서류작물병 방제 유도저항성 (SAR, ISR) 여부 판단

- CMML 20-20 균주를 처리한 고구마 뿌리에서 대조군과 비교하여 살리실산(SA), 자스몬산(JA)의 생합성 및 신호전달 경로와 관련된 유전자의 발현을 유도함. CMML 20-20 균주가 살리실산(SA) 생합성 및 신호 전달 경로와 관련된 유전자 *IbPAL*, *IbNPR1* 및 *IbPR1*의 발현을 유도했음을 나타냄. *IbPR1*의 발현에서 가장 높은 상향조절이 관찰되었고, *IbNPR1*의 상향조절이 *IbPAL*의 발현보다 더 큰 결과를 나타냄. 또한, CMML 20-20 균주는 자스몬산(JA) 생합성 및 신호 전달 경로와 관련된 유전자 *IbPDF1.2* 및 *IbLOX*의 발현을 유도함. *IbLOX*의 상향 조절 수준은 *IbPDF1.2*의 상향 조절 수준보다 더 큰값을 나타냄. 이러한 유전자 발현 프로파일은 CMML20-20 균주가 고구마에서 살리실산 (SA) 및 자스몬산(JA) 생합성을 잠재적으로 향상시킨다는 것을 보여줌

SAR(전신획득저항성) Salicylic Acid biosynthesis pathway



ISR(유도전신저항성) Jasmonic Acid biosynthesis pathway

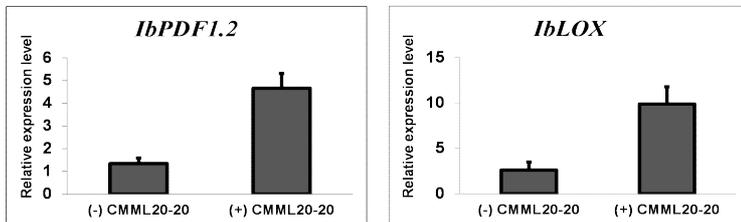


그림 56. qRT-PCR로 분석한 고구마 뿌리의 신호전달 경로와 관련된 유전자의 상대적 발현 수준

8) 미생물제제 처리 후 잔존율에 따른 억제 효과 분석

• 미생물제제 처리 후 유효미생물 토양잔존율 분석

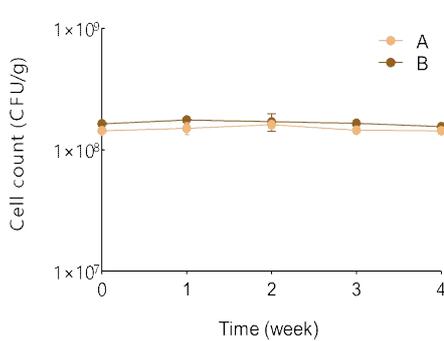
- 작물병 원인 곰팡이에 대하여 방제 효능을 지닌 우수 길항미생물의 제품화 공정 후 이를 실제 현장에 적용하였을 때, 토양 및 작물에 잔존하여 지속적으로 방제 효능이 발휘되는 미생물제제의 개발은 친환경 농업 정착을 위한 최우선의 조건임

- 미생물제제의 배양 및 제형 최적화 과정에서 획득된 유효미생물의 강건성을 검증하기 위하여 실제 서류작물(고구마, 감자) 재배지 토양에 1회 처리 후 잔존하는 미생물의 생균수를 확인함



그림 57. 서류작물(고구마, 감자) 재배지 토양 채취

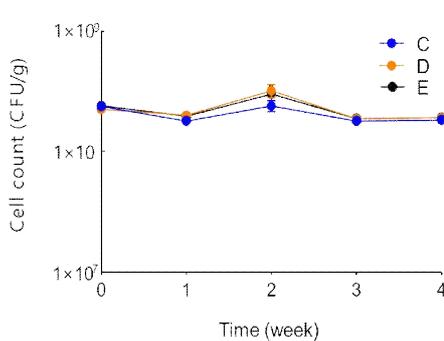
- 농촌진흥청에서 발간하는 작물 재배 지침서에 의하면, 고구마의 생육 적온은 20~30°C, 감자의 생육 적온은 14~23°C로 1년 4계절 기온 변화에 따른 적절한 작기를 안내함. 고구마 및 감자의 생육 적온을 참고하여 상온(20~24°C, 자연적 변온)에서 시험을 진행함



(Unit: CFU/g)		
Time (Week)	A (해남 산이면)	B (무안 현경면)
0	1.43±0.04×10 <sup>8</sup>	1.63±0.12×10 <sup>8</sup>
1	1.49±0.17×10 <sup>8</sup>	1.75±0.07×10 <sup>8</sup>
2	1.60±0.12×10 <sup>8</sup>	1.70±0.28×10 <sup>8</sup>
3	1.45±0.10×10 <sup>8</sup>	1.65±0.04×10 <sup>8</sup>
4	1.43±0.09×10 <sup>8</sup>	1.55±0.10×10 <sup>8</sup>

그림 58. 고구마 재배지 토양 내 유효미생물 잔존율 분석

- 고구마 및 감자 재배지로부터 채취하여 전처리한 정량 토양에 동일 농도의 미생물제제를 처리하였고, 동일 조건에서 보관하여 1주일 단위로 시료 내 생균수를 측정된 결과, 초기 생균수(> 1.0×10<sup>8</sup>CFU/g)가 1달이상 유지됨을 확인함



(Unit: CFU/g)			
Time (Week)	C (평창 방림면)	D (원주 호저면)	E (정읍 감곡면)
0	2.38±0.02×10 <sup>8</sup>	2.24±0.09×10 <sup>8</sup>	2.41±0.06×10 <sup>8</sup>
1	2.35±0.06×10 <sup>8</sup>	2.01±0.07×10 <sup>8</sup>	1.98±0.15×10 <sup>8</sup>
2	2.40±0.25×10 <sup>8</sup>	3.20±0.40×10 <sup>8</sup>	3.00±0.53×10 <sup>8</sup>
3	1.80±0.09×10 <sup>8</sup>	1.87±0.05×10 <sup>8</sup>	1.89±0.06×10 <sup>8</sup>
4	1.84±0.05×10 <sup>8</sup>	1.92±0.03×10 <sup>8</sup>	1.93±0.05×10 <sup>8</sup>

그림 59. 감자 재배지 토양 내 유효미생물 잔존율 분석

- 이러한 결과는 제품의 품질관리 및 홍보과정에서 안정성 검증의 기초 자료로 활용하는 한편, 제품의 처리 주기 및 사용 적기 설정을 위한 보조 자료로 활용함
- 또한, 제품의 예비 사용 능가 및 도소매 판매업자를 대상으로 한 사용매뉴얼 제작 및 제품 설명자료에 활용함

## 9) 서류작물병 방제 길항미생물의 최적 산업배지 개발

### • 선발된 길항미생물의 기본 배지 조성 설정

- 선발된 CMML 21-47 및 CMML 21-49 균주의 기본 배지조성을 설정하기 위한 배양 결과, 56시간의 배양시간 동안 2종 균주의 흡광도 값은 B4, B3, B1, B2 배지순서로 높은 수치가 관찰됨. 따라서, 균의 성장이 가장 우수한 B4 배지를 2종 균주의 최적배지조건 확립을 위한 기본배지 조성으로 설정함

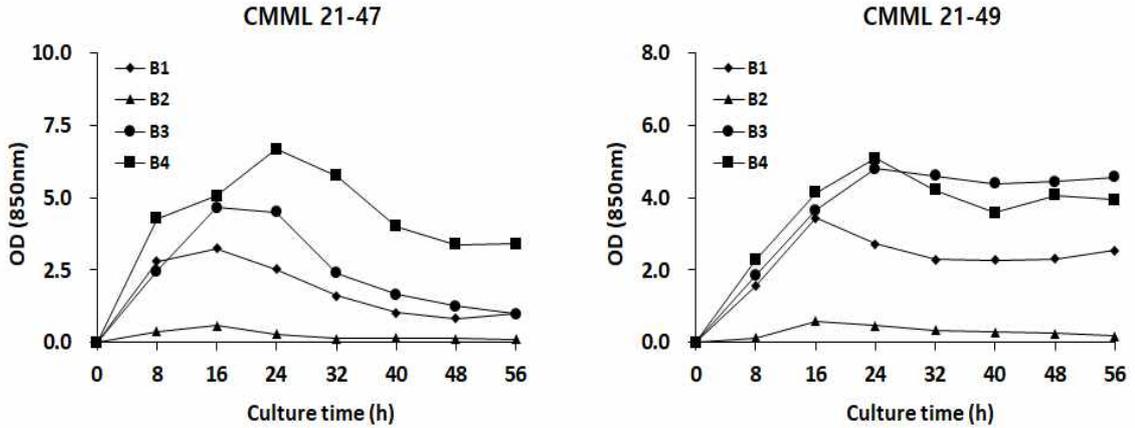


그림 60. *B. velezensis* CMML 21-47 및 *B. amyloliquefaciens* 21-49의 기본배지 설정 결과

### • 선발된 길항미생물 배지의 최적 질소원(nitrogen source) 선정

- 5종 질소원을 달리하여 2종 길항미생물의 성장 및 lipopeptide 수율을 평가한 결과, 성장지표인 흡광도, 균수, 건조균체량은 CMML 21-47의 경우 각각 5.68,  $8.36 \times 10^8$  CFU/mL, 1.47 g/L이었으며, CMML 21-49의 경우 각각 6.51,  $3.86 \times 10^8$  CFU/mL, 1.99 g/L이었음. 질소원으로 yeast extract를 이용하였을 때 2종 길항미생물은 가장 높은 성장도를 나타냈음
- 이와 유사하게, 2종 길항미생물의 lipopeptide(LP) 수율은 yeast extract를 질소원으로 이용하였을 때 가장 높은 (21-47: 0.65 g/L, 21-49: 0.78 g/L)수치가 관찰됨
- 이에 따라, 본 실험에 이용된 5종의 질소원 중 균주의 성장과 항균물질 생산에 가장 효과적인 yeast extract를 2종 길항미생물의 최적 질소원으로 선정함

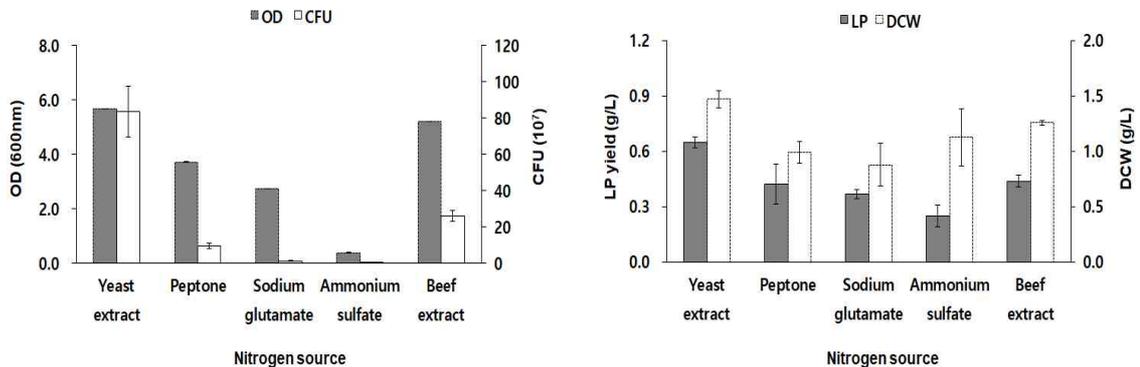


그림 61. *B. velezensis* CMML 21-47의 성장 및 항균물질 생산에 대한 질소원의 영향

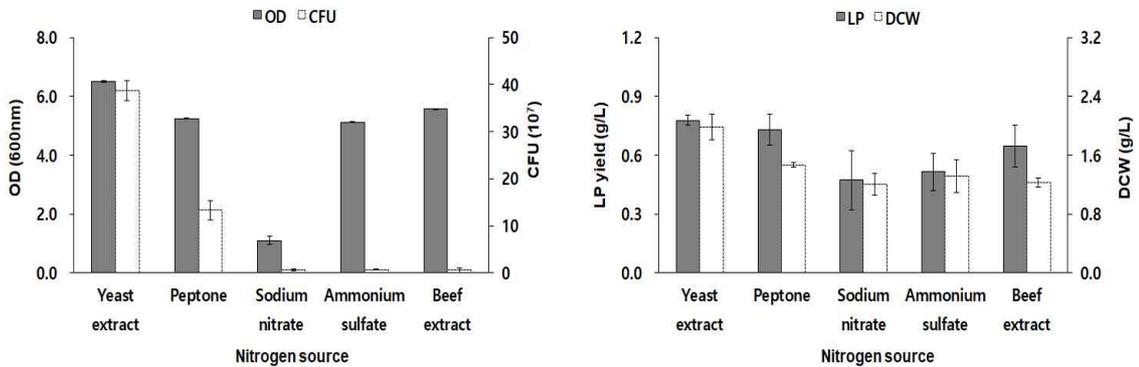


그림 62. *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49의 성장 및 항균물질 생산에 대한 질소원의 영향

• 선발된 길항미생물 배지의 최적 탄소원(carbon source) 선정

- 6종 탄소원을 달리하여 2종 길항미생물의 성장 및 lipopeptide 수율을 평가한 결과, CMML 21-47의 흡광도는 5.87-7.25 범위, 균수는  $8.0-9.3 \times 10^8$  CFU/mL 범위, 건조균체량은 1.35-1.67 g/L 범위였으며, CMML 21-49의 흡광도는 6.97-8.49 범위, 균수는  $2.6-4.4 \times 10^8$  CFU/mL 범위, 건조균체량은 1.44-2.32 g/L 범위로 나타났음
- 6종 탄소원 첨가 배지 모두에서 2종의 길항미생물은 잘 성장하는 것으로 나타났지만, 그 중 lactose 첨가 배지에서 가장 높은 흡광도, 총균수, 건조균체량 수치가 확인됨
- 또한, 2종 길항미생물의 lipopeptide 수율은 다른 탄소원과 비교하여 lactose와 maltose 첨가 배지에서 높은 수치가 관찰됨

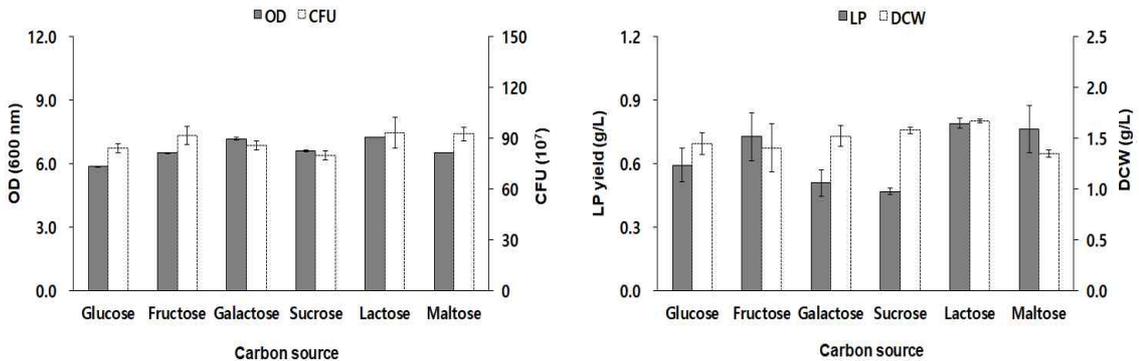


그림 63. *B. velezensis* CMML 21-47의 성장 및 항균물질 생산에 대한 탄소원의 영향

- 이러한 결과를 토대로 성장도와 항균물질 생산이 높은 lactose를 2종 길항미생물의 최적 탄소원으로 선정함

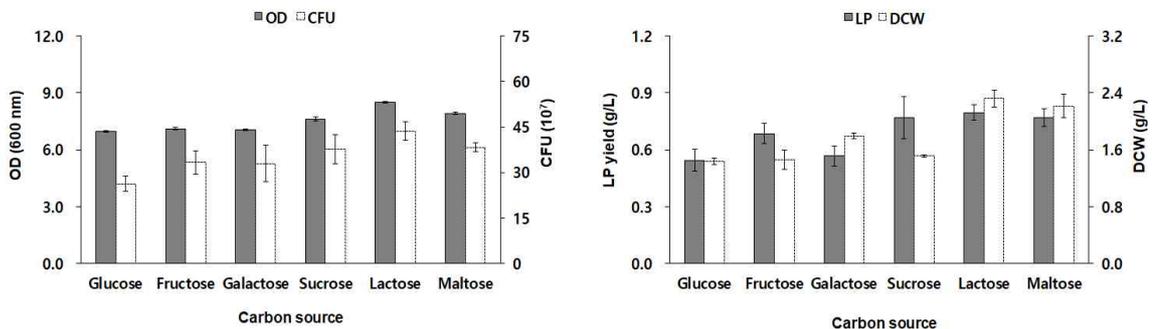


그림 64. *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49의 성장 및 항균물질 생산에 대한 탄소원의 영향

• 선발된 길항미생물 배지의 미량원소(trace element source) 첨가

- 선발된 2종 길항미생물의 성장과 lipopeptide 수율에 대한 미량원소 첨가 영향을 분석한 결과, CMML 21-47의 흡광도, 균수, 건조균체량 및 lipopeptide 수율은 CuSO<sub>4</sub>를 첨가한 배지에서 가장 낮은 수치를 나타냈으며, FeSO<sub>4</sub> 및 FeCl<sub>3</sub>를 첨가한 배지에서 무첨가구와 유사한 수치를 나타내었고 MnSO<sub>4</sub>를 첨가한 배지에서 가장 높은 수치를 나타냄
- 이와 유사하게, CMML 21-49 균주의 흡광도, 균수, 건조균체량 및 lipopeptide 수율도 CuSO<sub>4</sub> 첨가 배지에서 가장 낮은 수치를 나타냈으며, MnSO<sub>4</sub>를 첨가한 배지에서 가장 높은 수치를 나타냄
- 이러한 결과에 기초하여, CMML 21-47 및 CMML 21-49 균주의 배지조성에 MnSO<sub>4</sub>를 첨가하여 최적 배지조성을 결정함
- 경제성이 확보된 배지조성은 복합배지 단가 대비 19% 수준으로 설계되었음. (복합배지 702원/L, 최종산업배지 133원/L)

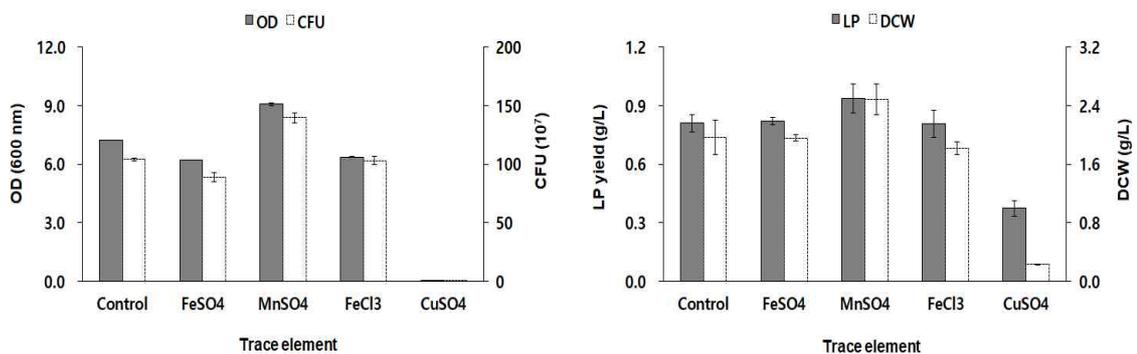


그림 65. *B. velezensis* CMML 21-47의 성장 및 항균물질 생산에 대한 미량원소의 영향

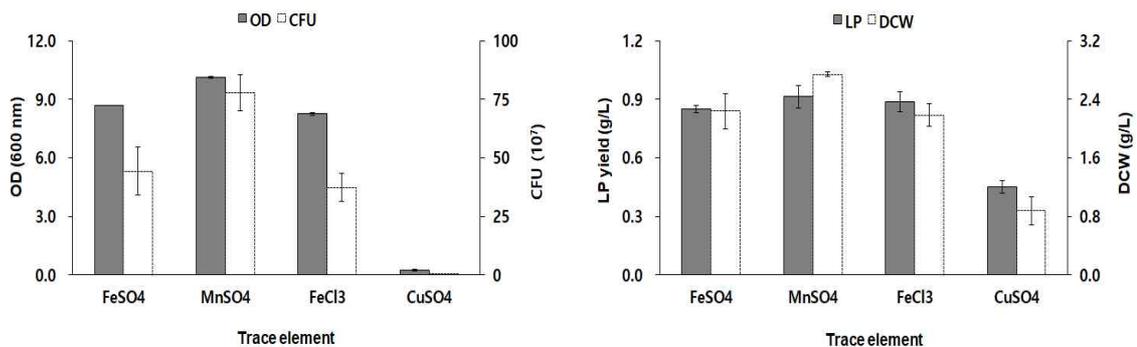


그림 66. *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49의 성장 및 항균물질 생산에 대한 미량원소의 영향

## 10) 서류작물병 방제 길항미생물의 배양조건 최적화

### • 선발된 길항미생물의 배양 시간 설정

- 배양 시간에 따른 균의 성장을 분석한 결과 흡광도 및 균수, 건조 균사체의 수치는 배양 48시간까지 급속도로 증가하는 경향을 보였으며, 배양 48시간 이후에는 더 이상 증가하지 않고 감소하는 경향을 나타냈음
- 또한, 배양 48시간까지는 배양 시간이 증가함에 따라 lipopeptide 수율이 증가하는 것으로 나타났으며, 배양 48시간에 CMML 21-47 및 CMML 21-49의 lipopeptide 수율은 각각 0.97 g/L과 0.92 g/L으로 확인됨. 그러나, 배양 48시간 이후 lipopeptide 수율 변화는 관찰되지 않았음. 따라서, 2종 균주의 최적 배양 시간을 48시간으로 설정함

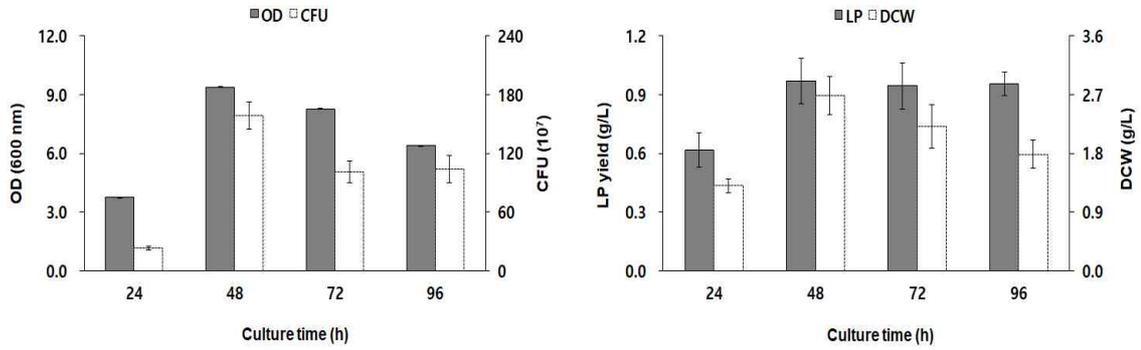


그림 67. *B. velezensis* CMML 21-47의 성장 및 항균물질 생산에 대한 배양시간의 영향

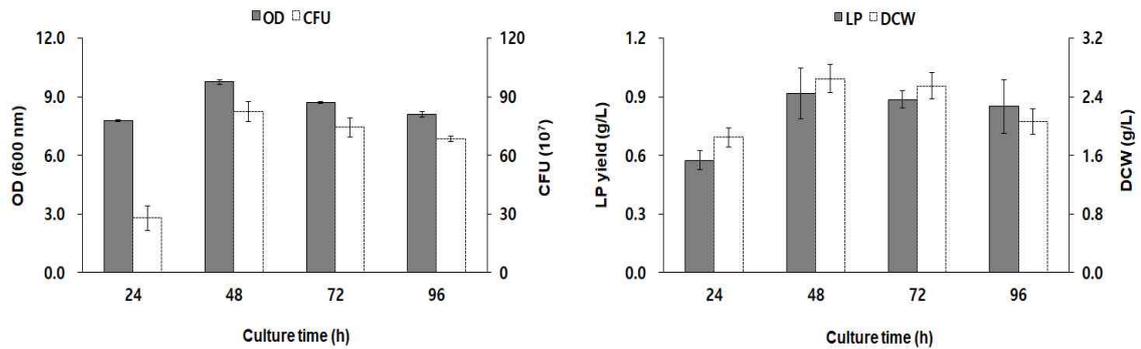


그림 68. *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49의 성장 및 항균물질 생산에 대한 배양시간의 영향

• 선발된 길항미생물의 배양 최적 pH 설정

- 초기 pH에 따른 길항미생물의 성장 및 lipopeptide 수율 분석 결과, CMML 21-47의 흡광도는 8.29-9.37, 균수는  $1.1-1.8 \times 10^9$  CFU/mL, 균체량은 2.1-2.67 g/L, lipopeptide 수율은 0.72-0.98 g/L 범위내로 나타났으며, 다른 처리구와 비교하여 pH 7.0에서 가장 높은 수치가 확인됨
- CMML 21-49의 흡광도는 8.44-9.82, 균수는  $3.5-8.1 \times 10^8$  CFU/mL, 균체량은 2.29-2.71 g/L, lipopeptide 수율은 0.71-0.92 g/L 범위 내로 나타났으며, 다른 처리구와 비교하여 pH 7.0에서 가장 높은 수치가 확인됨
- 2종 길항미생물 모두 pH 7.0에서 높은 성장과 lipopeptide 수율을 나타냈음. 일반적으로 배지의 pH는 미생물의 성장 및 항균물질 생산에 영향을 미치는 주요 인자 중 하나로 보고 되고 있으며, *Bacillus* 종의 최적 조건으로 pH 7.0~8.0 범위가 적합한 것으로 알려져 있음
- 위의 결과에 기초하여 *Bacillus* 종인 CMML 21-47 및 CMML 21-49의 성장 및 항균 물질 생산을 위한 초기 pH 조건은 7.0이 적합한 것으로 사료됨

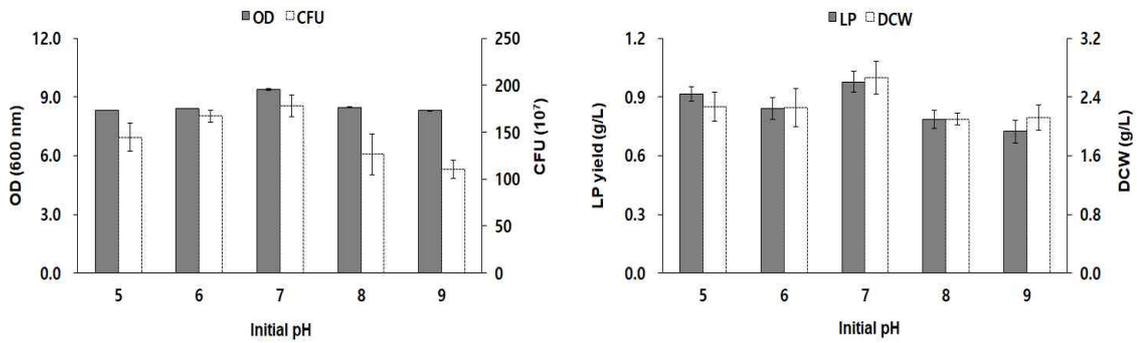


그림 69. *B. velezensis* CMML 21-47의 성장 및 항균물질 생산에 대한 초기 pH의 영향

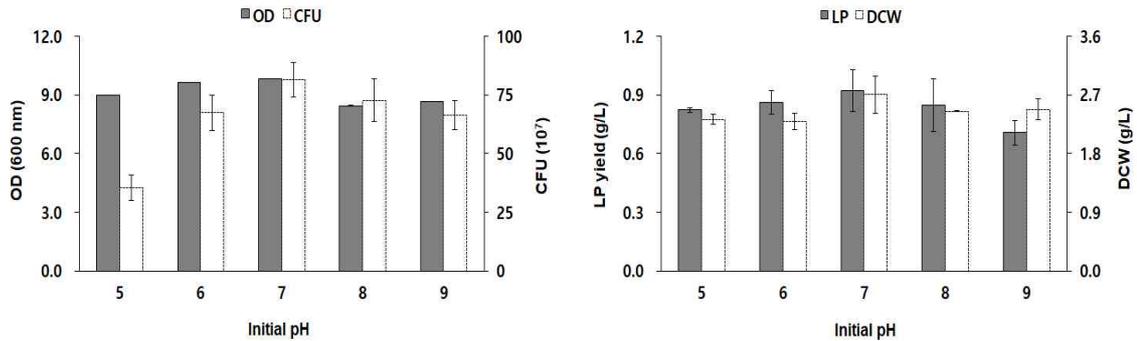


그림 70. *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49의 성장 및 항균물질 생산에 대한 초기 pH의 영향

• 선발된 길항미생물의 배양 온도 설정

- 2종 선발 미생물의 성장도 및 lipopeptide 수율은 배양 온도가 감소함에 따라 점진적으로 증가하는 것으로 나타났음. CMML 21-47의 흡광도, 균수, 균체량, lipopeptide 수율은 40°C 배양온도에서 각각 4.94,  $0.83 \times 10^9$  CFU/mL, 1.80 g/L, 0.70 g/L였으나, 30°C 배양온도에서 9.40,  $1.62 \times 10^9$  CFU/mL, 2.22 g/L, 0.96 g/L로 증가함. CMML 21-49의 흡광도, 균수, 균체량, lipopeptide 수율은 40°C 배양온도에서 6.02,  $0.61 \times 10^9$  CFU/mL, 2.12 g/L, 0.69 g/L 였으나, 30°C 배양온도에서 9.97,  $0.93 \times 10^9$  CFU/mL, 2.78 g/L, 0.93 g/L으로 증가함
- 따라서, 높은 성장도와 항균물질 생산성이 확인된 30°C를 2종 선발 유용미생물의 최적 온도로 설정함

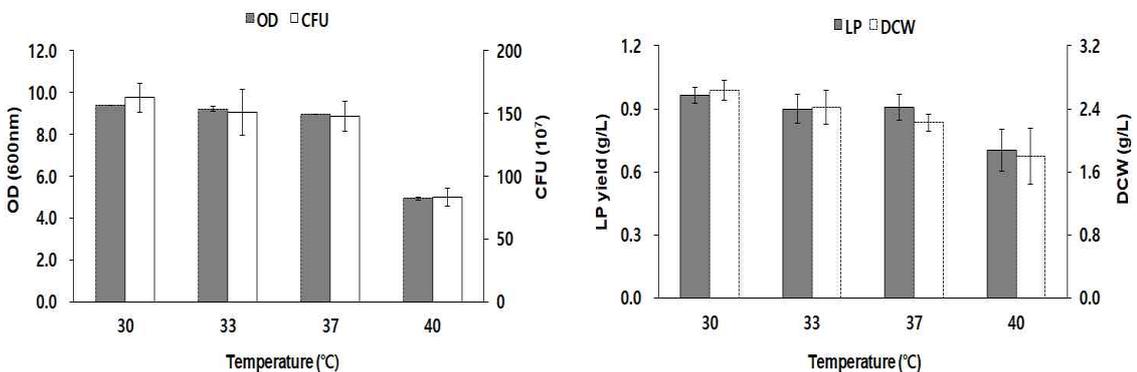


그림 71. *B. velezensis* CMML 21-47의 성장 및 항균물질 생산에 대한 배양온도의 영향

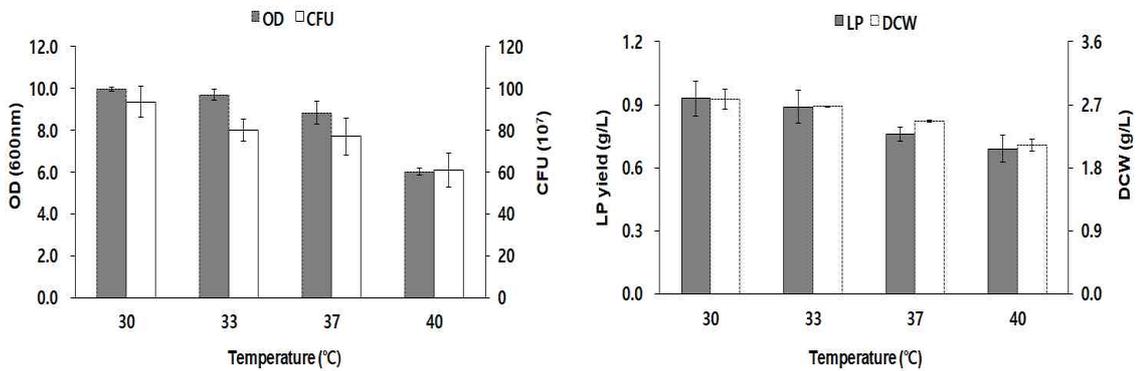


그림 72. *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49의 성장 및 항균물질 생산에 대한 배양온도의 영향

### 11) 혼합미생물제제 최적 조합 구성 및 합제기술 개발

#### • 혼합미생물제제 최적 조합을 위한 포자형성도 분석

- 선발된 미생물의 포자형성 유무 판단을 위한 현미경 검경 결과, CMML 21-47 및 CMML 21-49 균주에서는 높은 비율로 포자형성(내생포자)균이 관찰되었지만, 21-48 균주에서는 포자형성균을 관찰할 수 없었음
- 이어서, 선발 길항미생물의 포자형성률을 분석한 결과, CMML 21-47의 균수는  $1.62 \times 10^9$  CFU/mL, 내생포자 균수는  $1.22 \times 10^9$  CFU/mL로 75.4%의 포자형성률이 확인됨. CMML 21-49의 균수는  $0.93 \times 10^9$  CFU/mL, 내생포자 균수는  $0.66 \times 10^9$  CFU/mL로 70.8%의 포자형성률이 확인됨. 그러나, CMML 21-48의 균수는  $6.08 \times 10^9$  CFU/mL로 나타났지만, 열안정성을 갖는 포자형성균은 검출되지 않았음
- 따라서, 서류작물병 방제 혼합미생물제제의 혼합 균주는 내생포자를 형성하면서 높은 열안정성을 갖는 CMML 21-47 및 CMML 21-49의 조합으로 구성함



그림 73. 선발 길항미생물의 포자형성 평가 결과

표 12. 선발 길항미생물의 포자화율 평가 결과

Microorganisms	Total viable cells (CFU/mL)	Endospore cell (CFU/mL)	Sporulation (%)
CMML 21-47	$1.62 \times 10^9$	$1.22 \times 10^9$	75.4
CMML 21-48	$6.08 \times 10^9$	not detected	0
CMML 21-49	$0.93 \times 10^9$	$0.66 \times 10^9$	70.8

- 또한, 앞선 결과에서 항진균 물질인 lipopeptide의 수율은 21-47 균주의 경우 0.98 g/L, 21-49 균주의 경우 0.94g /L로 나타나, 2종 균주의 항진균물질 생산수율이 유사한 것으로 확인되었음. 이를 토대로 두 균주의 합제(혼합) 비율을 1대1로 설정하였으며, 최적화된 배양 조건에서 각각의 균주를 배양한 다음 혼합하여 서류작물병 방제 혼합 미생물제제의 시제품(액상제)을 제작함

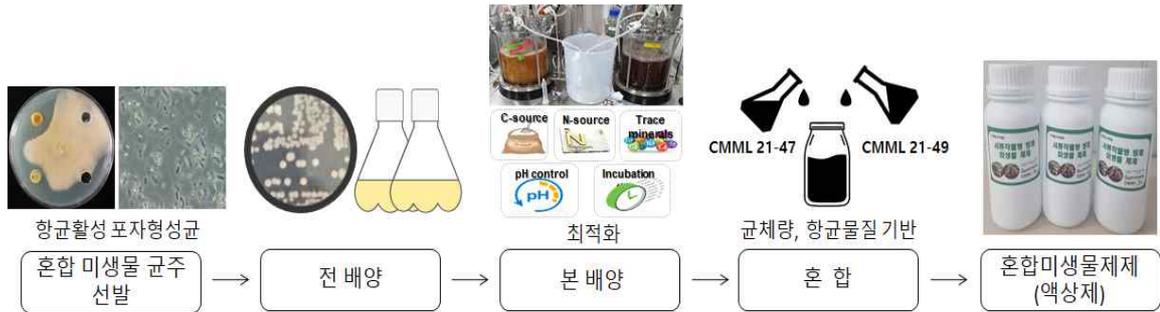


그림 74. 선발된 길항미생물의 혼합미생물제제 시제품 개발

## 12) 선발된 서류작물병 방제미생물의 현장적용 평가

### • 선발 미생물의 서류작물 포장시험 결과

- 고구마 질병인 덩굴쪄김병과 검은무늬병 접종 후, 선발된 미생물인 *B. velezensis* CMML 21-47, *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주를 단독 또는 혼합(세균+세균 조합) 처리하였을 경우, 두 병원균에 모두 높은 방제가 (70% 이상)를 보여줬고, 이는 살진균제인 azoxystrobin 보다 우수한 방제가로 확인됨. 또한 두 균주를 혼합 처리하였을 때 검은무늬병의 방제가가 가장 높은 수준으로 확인됨

표 13. 선발된 미생물 CMML 21-47, CMML 21-49의 포장 실험 결과

구 분	방제가 (%)	
	덩굴쪄김병 ( <i>Fusarium oxysporum</i> )	검은무늬병 ( <i>Ceratocystis fimbriata</i> )
무처리구	-	-
아족시스트로빈	71.5±5.6 a	71.3±3.8 a
CMML 21-47 균주	75.1±0.8 a	71.8±2.9 a
CMML 21-49 균주	71.9±1.5 a	71.3±1.3 a
혼합	71.0±2.5 a	75.4±4.8 a

- 고구마 질병인 덩굴쪄김병과 검은무늬병 접종 후, 선발된 미생물 *Trichoderma hamatum* CMML 21-62 균주를 관주 처리한 결과, 덩굴쪄김병과 검은무늬병에 살균제인 아족시스트로빈과 통계적으로 유의미한 차이가 있지 않은 것을 확인함

표 14. 선발된 미생물 CMML 21-62의 포장 실험 결과

구 분	방제가 (%)	
	덩굴쪄김병 ( <i>Fusarium oxysporum</i> )	검은무늬병 ( <i>Ceratocystis fimbriata</i> )
무처리구	-	-
아족시스트로빈	32.31±9.99 a	14.69±8.90 a
CMML 21-62 균주	23.20±6.05 a	40.86±8.95 a

- 고구마의 덩굴쪄김병을 포함하는 고구마괴근 저장병과 관련한 연구 결과를 정리하여 SCIE급 출판사인 *Journal of fungi*에 투고 및 출판하였고, 해당 저널의 표지(7권 11호)로 채택됨

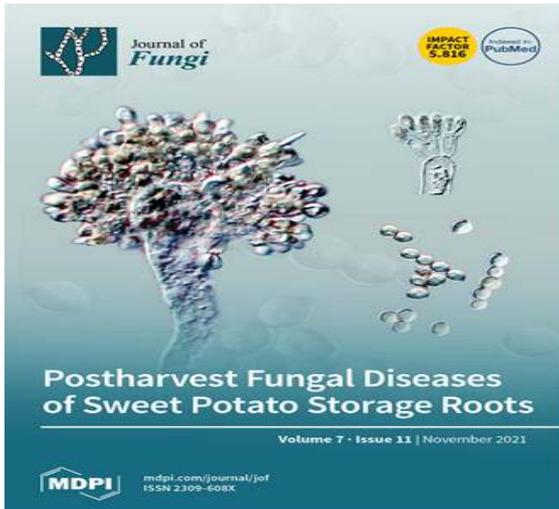


그림 75. 본 연구의 연구성과가 *Journal of Fungi* (IF=5.724)의 표지 논문으로 채택

### 13) 서류작물병 방제미생물의 독성시험 및 환경영향 평가

#### 가. 주요 서류작물병 방제용 미생물제제(시제품)의 독성시험

- 유식물 5종에 대한 약해시험

- 시험작물 정식 1일 후 유묘기에 미생물제제를 관주처리 하였으며, 약제처리 후 작물에 나타나는 외관상 약해 유무를 달관 조사한 결과 5종의 시험작물 모두에서 7일차까지 기준량과 배량에 대하여 약해(약해 판정기준 결과: 0)가 나타나지 않았다. 각 시험의 결과는 아래 그림과 같음

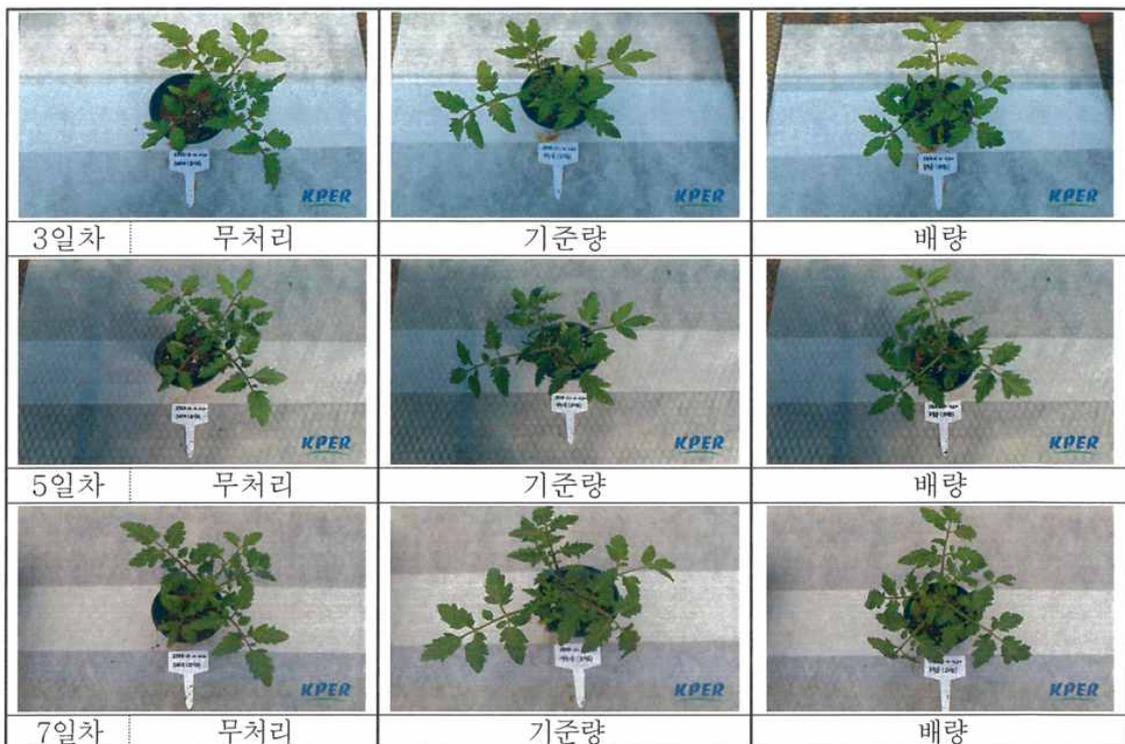


그림 76. 미생물제제의 토마토에 대한 약해시험 결과

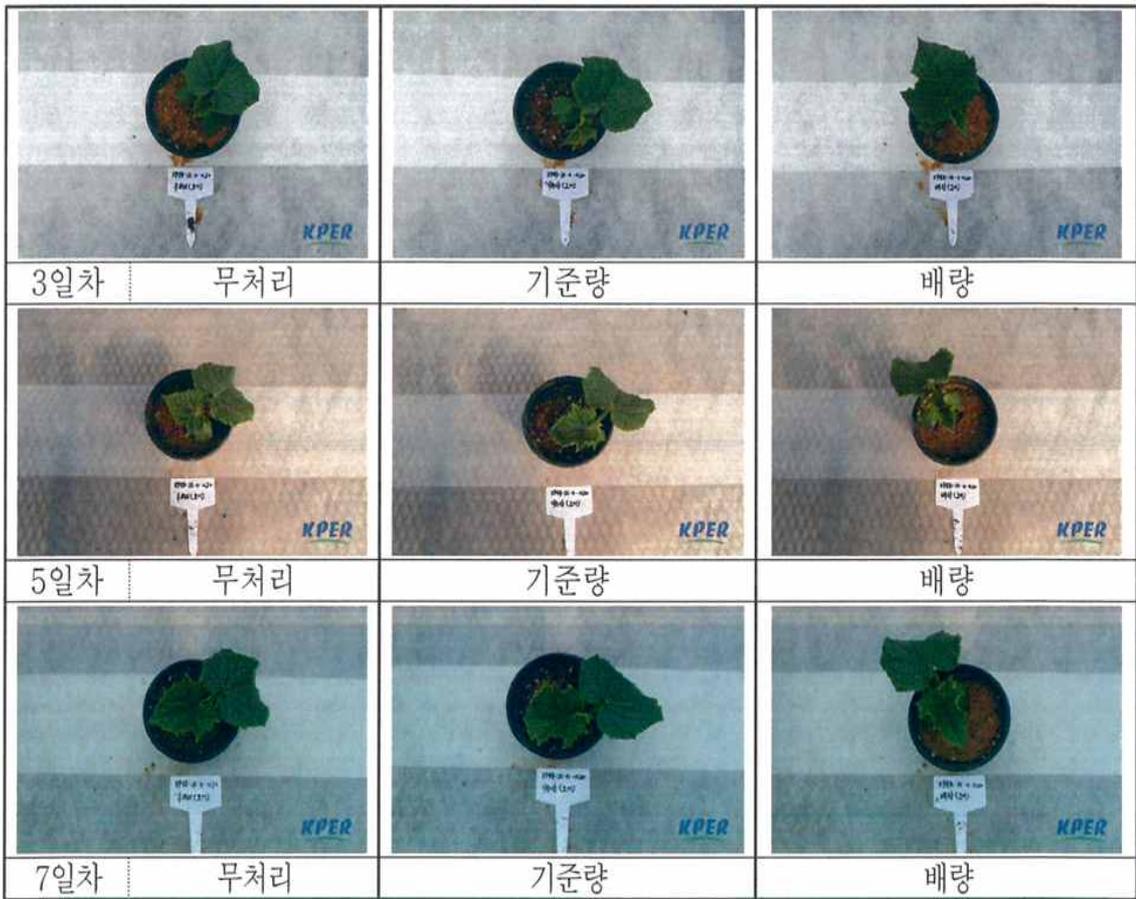


그림 77. 미생물제제의 오이에 대한 약해시험 결과

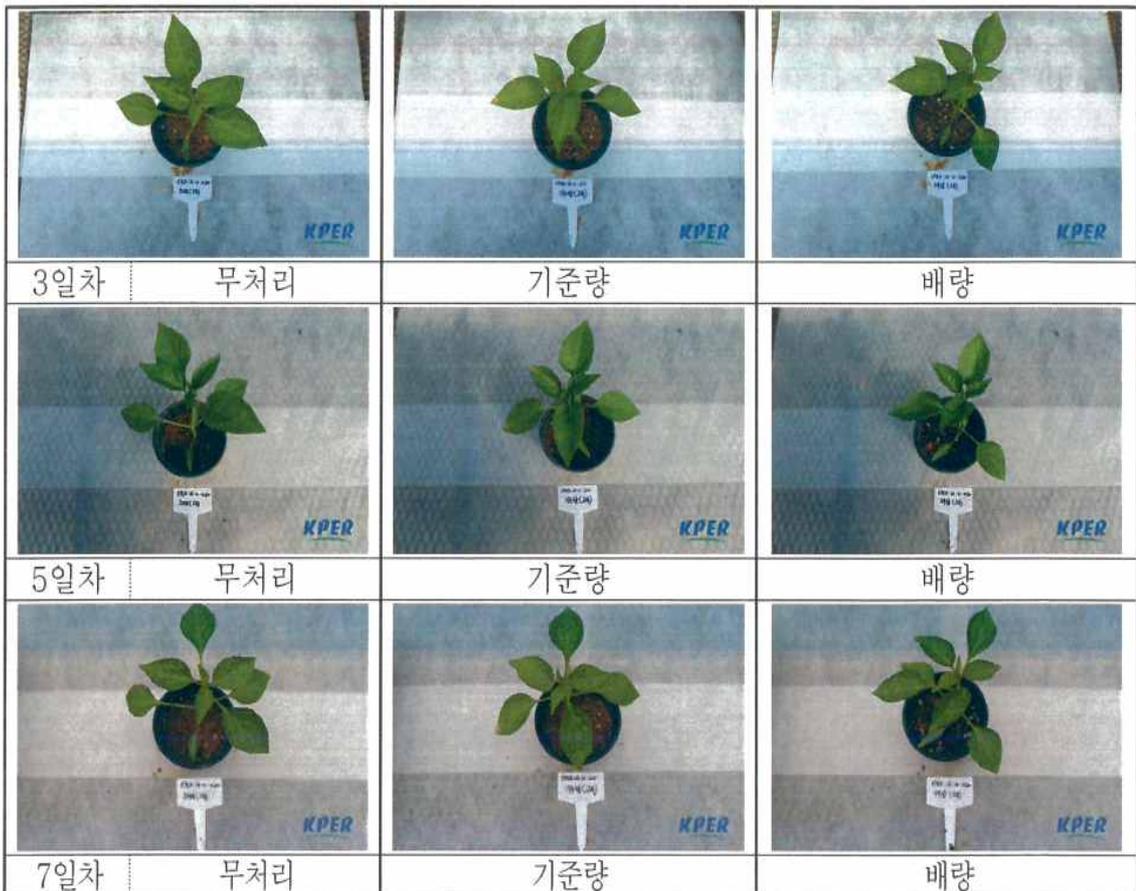


그림 78. 미생물제제의 고추에 대한 약해시험 결과

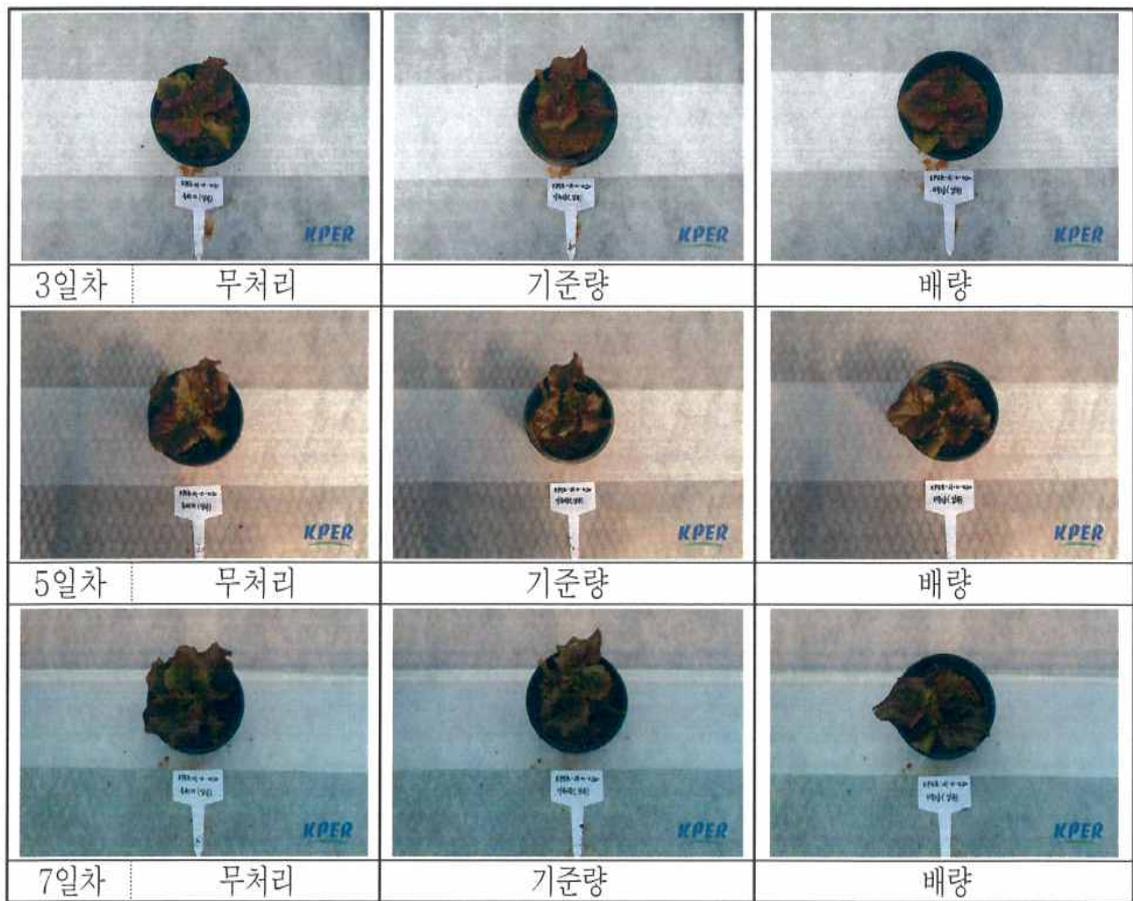


그림 79. 미생물제제의 상추에 대한 약해시험 결과

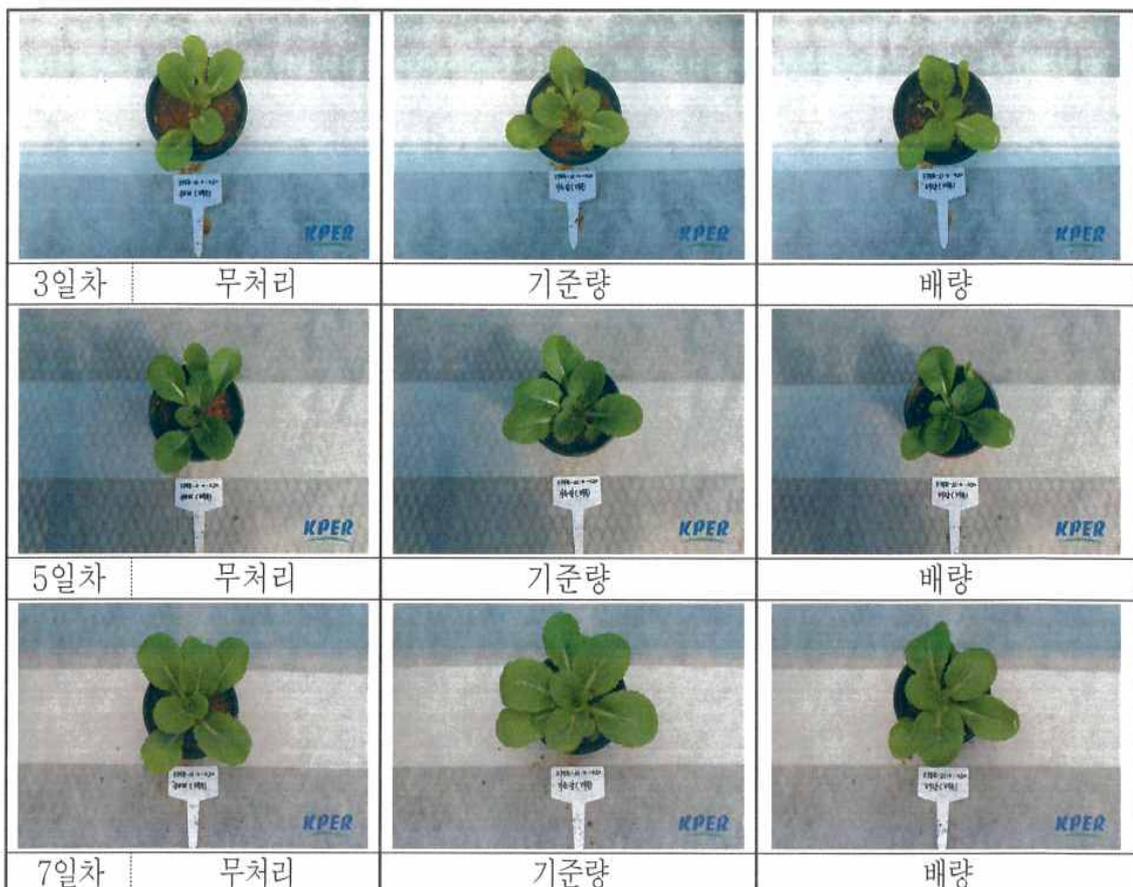


그림 80. 미생물제제의 배추에 대한 약해시험 결과

• **New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극성시험**

- New Zealand White계 토끼를 이용하여 미생물제제의 피부자극성시험을 수행하여 일반 중독증상, 치사수, 체중변화 및 피부자극성을 관찰·조사한 결과 시험기간 중 미생물제제 처리에 기인된 치사개체가 관찰되지 않았으며, 중독증상 또한 없었음
- 개체별로 시간이 경과함에 따라 체중이 증가하는 추세를 보였다. 시험물질 제거 후 처리부의 국소자극성을 관찰한 결과, 초기 개체에서 4시간 첩포 제거 후 가벼운 부종이 관찰되었으나 1시간 후 소실되었고, 확인 개체에서는 어떠한 피부자극도 관찰되지 않았음

**표 15. 피부자극성 시험 결과**

부위	피부자극 단계	시험체	처리 일수			
			0(1hr)	1	2	3
대조부위	홍반 & 가피	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0
	부종	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0
시험부위	홍반 & 가피	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0
	부종	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0

- 초기시험 동물에 각각 3분, 1시간 첩포 제거 후 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았고, 4시간 첩포 제거 후 아주 가벼운 부종이 관찰됨
- 그 후, 4시간 첩포를 기준으로 시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48 및 72시간에 피부반응을 관찰한 결과, 노출 종료 후 1시간 뒤 부종은 소실되어 정상으로 회복되었으며 이후 동일한 방법으로 확인 시험을 진행하였고, 확인 시험은 시험물질 처리 후 홍반(Erythema) 및 부종(Edema) 등 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았음

• **New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막자극성시험**

- 미생물제제의 안점막자극성시험을 수행한 결과, 미생물제제 0.1 mL (2.0×10<sup>6</sup> CFU/mL)를 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 일반중독증상 및 치사동물은 관찰되지 않았으며, 체중측정결과에서도 모든 개체가 시간이 경과함에 따라 체중이 증가함
- 시험물질 처리후 24, 48, 72시간의 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 각막 혼탁, 홍채반응의 평균점수는 모두 "0.00"이었고, 결막 발적 및 부종의 평균점수 또한 모두 "0.00"이었음

표 16. 안반응 및 자극성의 평가

시간	시험체	각막흔탁	홍채반응	결막	
				총혈	부종
1 h	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0
24 h	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0
48 h	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0
72 h	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0
7 day	A	0	0	0	0
	B	0	0	0	0
	C	0	0	0	0

- 초기시험 후 어떠한 눈 손상도 관찰되지 않아 동일한 방법으로 확인시험을 진행한 결과, 시험동물 3 개체의 비세척군 모두 1시간째 관찰시부터 7일째 관찰시까지 어떠한 자극성도 관찰되지 않았음
- 무처리 대조군인 우안 또한 어떠한 자극성도 관찰되지 않았음

• 랫드를 이용한 급성경구독성/병원성 시험

- 시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 시험동물을 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절에서의 미생물 수를 측정된 결과, 위에서 미생물이 미검출됨
- 미생물제제의 랫드를 이용한 단회 경구 투여시 장기(위)에서는 미생물이 검출되지 않았고, 대변에서 1일째까지 미생물이 검출됨
- 시험 종료시까지 중독증상 및 치사가 없는 것으로 보아 급성독성으로 인한 영향은 없는 것으로 판단함

표 17. 미생물제제의 경구투여 후 랫드의 장기별 잔여 미생물 측정

장기	투여 후 경과일									
	시험군					대조군				
	1	3	7	14	21	1	3	7	14	21
대변	D <sup>a</sup>	N.D. <sup>b</sup>	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-
신장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
뇌	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
간장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
폐	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
비장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
위	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
혈액	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
임파절	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

a: Detected, b: Not Detected

• 랫드를 이용한 급성경피독성시험

- 미생물제제 시제품을 개체당 처리약량  $4.0 \times 10^7$  CFU로 경피 노출한 결과, 생존한 모든 개체에서 특이한 일반중독증상은 관찰되지 않았으며 치사개체도 또한 관찰되지 않았음
- 모든 시험동물의 체중은 약체투여 후 경과 일에 따라 증가추세를 보였으며 반수치사약량(LD<sub>50</sub>) 평가에서도 개체당  $4.0 \times 10^7$  CFU씩 단회 경피 투여시 영향이 없는 것으로 판단됨

나. 주요 서류작물병 방제용 미생물제제(시제품)의 환경독성 평가

• 담수어류 잉어(*Cyprinus carpio*)를 이용한 환경독성시험

- 잉어(*Cyprinus carpio*)dp 대한 담수어류영향시험을  $1.3 \times 10^5$  CFU/ml의 농도로 30일 동안 반수식식으로 실시한 결과 시험 종료시까지 음성대조군 및 시험물질 처리구에서 모두 치사 개체가 관찰되지 않았고, 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았음
- 농도유지 확인 시험 기간 중 0, 3, 4 및 7일에  $1.3 \times 10^5$  CFU/ml 농도 시험용액을 100배 희석하여 생균수를 측정된 결과 7일차까지 그 수가 유지됨
- 시험기간 중 실험시작일과 미생물 농도 유지를 위하여 시험용수를 교체한 시험용수 교체일에 시험용액의 미생물을 측정된 결과, 시험기간 동안 생균수가 유지됨을 확인할 수 있었음
- 시험기간 중 치사나 병원성을 보이는 개체는 관찰되지 않았고, 시험 종료 후 생존한 전 개체에 대해 부검하여 미생물 감염 여부를 확인한 결과 아가미, 장기 및 근육에 대해 대조군과 비교하였을 때 육안상 차이를 발견할 수 없었음
- 이상의 시험결과 미생물제제의 잉어에 대한 30일 동안 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)는 설정농도 기준으로  $1.3 \times 10^5$  CFU/ml 초과였고, 최대무작용량은 설정농도 기준으로  $1.3 \times 10^5$  CFU/ml 이었음

표 18. 서류작물병 방제용 미생물제제의 환경독성시험

농도 (CFU/ml)	시험체	누적치사율 (30 days)	LC50 <sup>a</sup> (CFU/ml)	NOEC <sup>b</sup> (CFU/ml)
Control	10	0		
기준사용량의 1,000배 ( $1.3 \times 10^5$ )	30	0	$> 1.3 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$

a: Median lethal concentration, based on nominal concentration of active ingredient,  
b: No observed effect concentration

#### 14) 서류 작물 질병 방제용 혼합 미생물 대량 생산 공정 및 제형 기술 개발

##### • 최적 배지를 기반으로 5~100L 발효기를 이용한 최적 발효조건 정립

- 1.5 톤 발효기를 이용하여 CMML 21-47 균주를 대량 배양한 결과, 42시간 동안 리포 펩타이드의 생산량은 24시간에 0.79 LP yield(g/L)에서 시작하여 36시간까지는 0.81 LP yield(g/L)까지 증가했으나, 24시간 이후에는 유의적인 증가가 나타나지 않음
- 이 결과를 토대로 24시간이 CMML 21-47 균의 최대 성장 시간으로 판단됨
- CMML 21-49 균주는 12시간 배양 시에 0.28 LP yield(g/L)로 시작하여 24시간 배양까지도 0.36 LP yield(g/L)를 유지했으나, 리포펩타이드의 수율이 크게 상승하지 않았으며 36시간 경과 후에는 0.96 LP yield(g/L)로 급격히 증가함
- CMML 21-49 균주의 리포펩타이드 생산 속도는 상대적으로 느리지만, 최대 성장은 36시간에 이루어지는 양상을 확인함

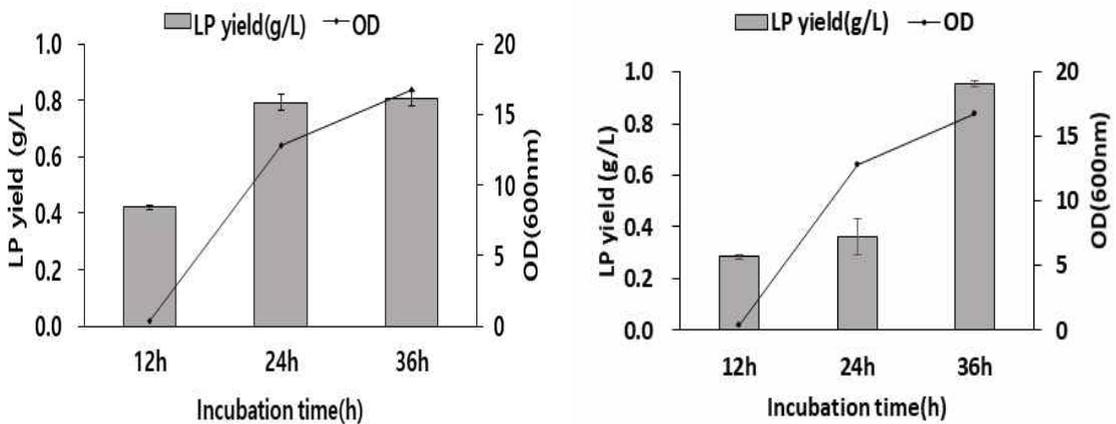


그림 81. CMML21-47(좌), CMML 21-49(우) 1.5ton 배양시 lipopeptide 생산 수율 및 흡광도(600nm)

- 1.5톤 배양 시, CMML 21-47 및 CMML 21-49 균주의 DO(용존산소), 및 pH 동향은 다음과 같았으며, 두 균주 모두 배양 온도를 30°C로 설정함

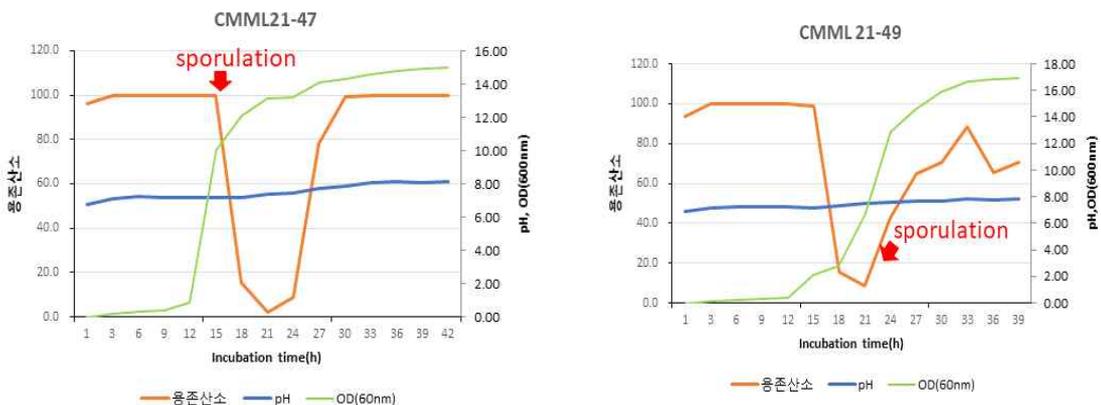


그림 82. 1.5 ton 배양 중 DO, pH, temperature 양상

- CMML 21-47 균주는 16시간부터 포자형성이 시작되었으며, 초기 pH는 6.75에서 시작하여 15시간 후에 소폭 상승하였고, 배양 40시간 최종 pH는 8.07로 확인됨
- CMML 21-49 균주의 경우, 21시간부터 포자형성이 시작되었으며, 초기 pH는 6.90에서 시작하여 17시간부터 상승하였고, 배양 40시간 최종 pH는 8.08로 확인됨
- 최종적으로, 배양 31시간에 포자형성율은 82%로 균주의 배양이 완료됨

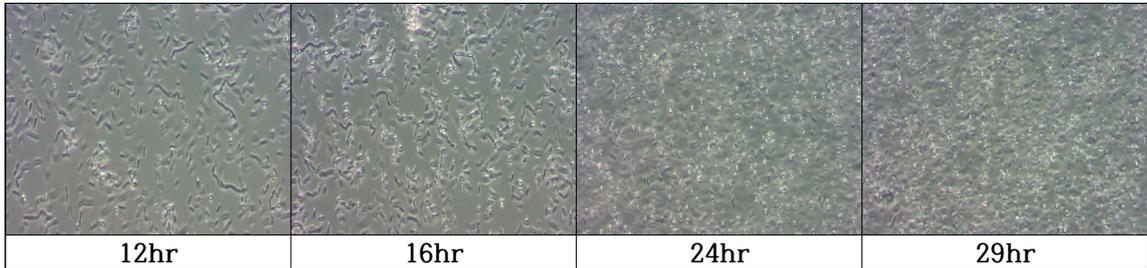


그림 83. CMMML 21-47 1.5 ton 배양 시간별 현미경 사진

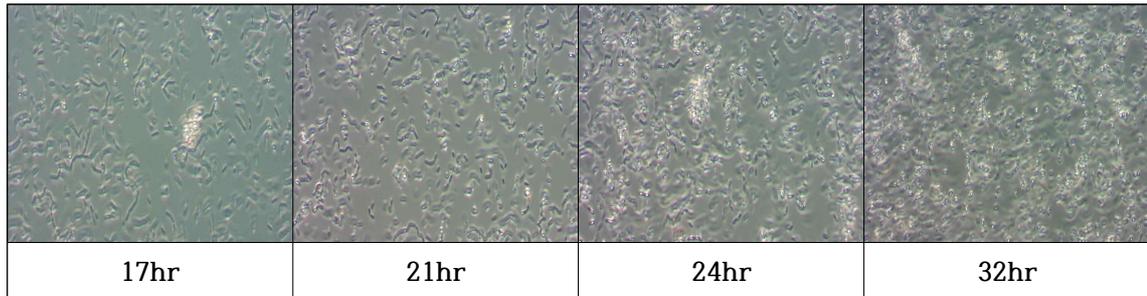


그림 84. CMMML 21-49 1.5 ton 배양 시간별 현미경 사진

15) 현장 활용 맞춤형 제형 개발

가. 연구기관에서 보유한 제형화 장비 활용을 위한 제형 종류의 선정

- 연구기관 보유 제형화 장비 활용: 분무건조기, 과립기 등 16종 장비

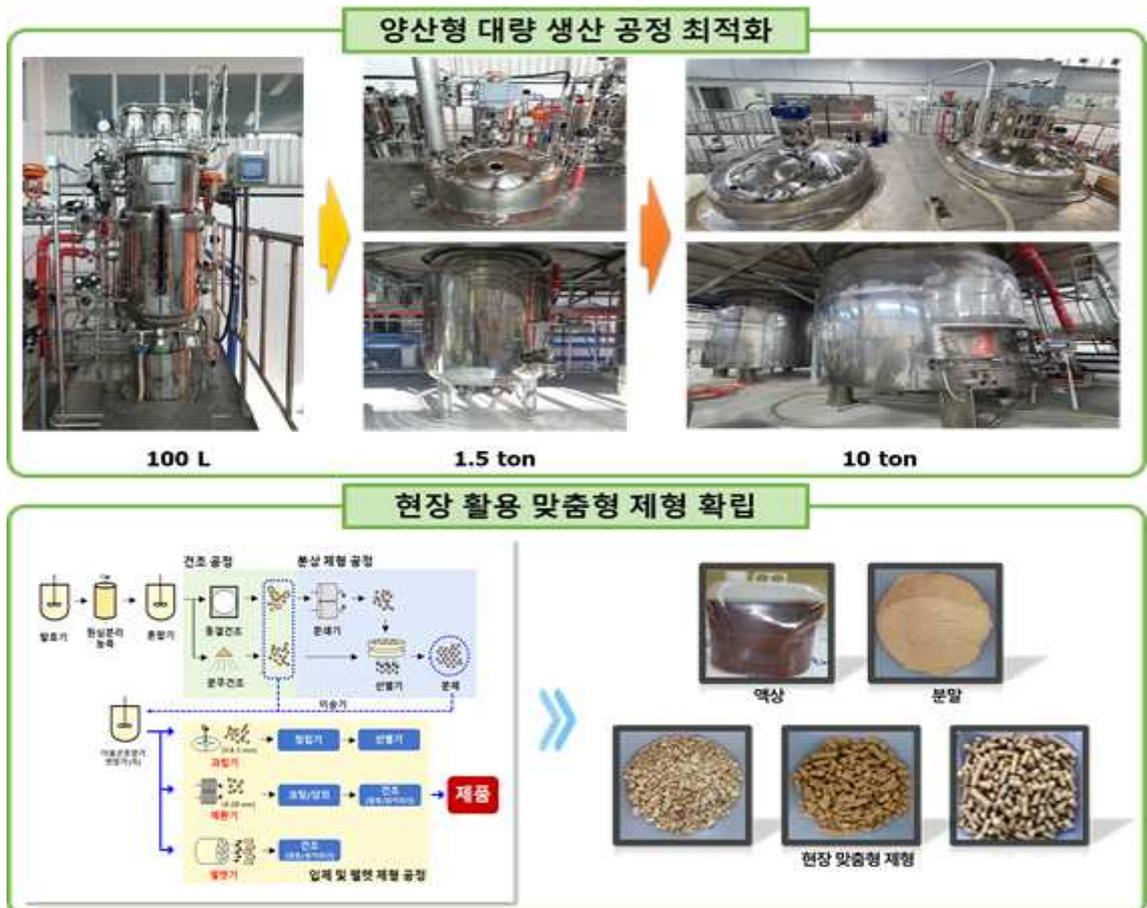


그림 85. 시제품 생산 공정도

나. 맞춤형 제형화(액상, 입상 수화제 등) 공정 개발

· 미생물 분말의 저장안정성 실험

- CMML 21-47 (*Bacillus velezensis*)과 CMML 21-49 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 두 균주의 분말 원제의 생균수는 각각  $1.07 \times 10^{11}$  CFU/g,  $1.02 \times 10^{11}$  CFU/g로 확인됨

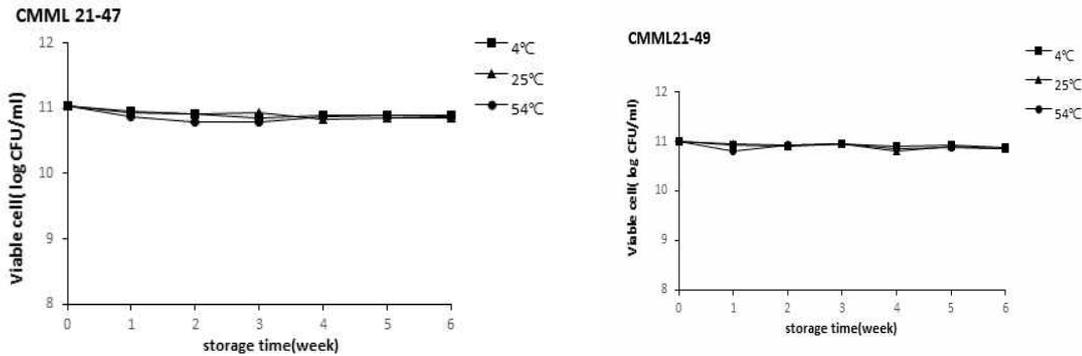


그림 86. 저장 온도에 따른 후보 균주의 생균수 변화

- 6주 동안의 저장 온도에 따른 생균수를 확인한 결과, CMML 21-47는 4°C에서  $7.2 \sim 9.2 \times 10^{10}$  CFU/g 생균수를 나타내었고, 25°C에서는  $6.9 \sim 8.5 \times 10^{10}$  CFU/g 범위에서 검출었으며, 54°C에서는  $6.1 \sim 7.7 \times 10^{10}$  CFU/g의 생균수를 나타냄

표 19. CMML 21-47 저장 온도에 따른 6주 동안의 생균수 변화

		<i>B. velezensis</i> CMML 21-47 VCC (CFU/g)						
저장 온도	저장 기간	0일	7일/1주	14일/2주	21일/3주	28일/4주	35일/5주	42일/6주
	4°C		$1.07 \times 10^{11}$	$9.20 \times 10^{10}$	$8.12 \times 10^{10}$	$7.20 \times 10^{10}$	$7.80 \times 10^{10}$	$7.80 \times 10^{10}$
25°C		$1.07 \times 10^{11}$	$8.50 \times 10^{10}$	$8.30 \times 10^{10}$	$8.40 \times 10^{10}$	$6.90 \times 10^{10}$	$7.10 \times 10^{10}$	$7.10 \times 10^{10}$
54°C		$1.07 \times 10^{11}$	$7.60 \times 10^{10}$	$6.11 \times 10^{10}$	$6.10 \times 10^{10}$	$7.30 \times 10^{10}$	$7.70 \times 10^{10}$	$7.60 \times 10^{10}$

- CMML 21-49도 비슷한 경향을 보여 4°C에서는  $7.5 \sim 8.8 \times 10^{10}$  CFU/g, 25°C에서는  $6.4 \sim 8.9 \times 10^{10}$  CFU/g 범위에서 생균수를 확인하였으며, 54°C에서도  $6.5 \sim 8.7 \times 10^{10}$  CFU/g의 생균수를 유지하는 것을 확인함

표 20. CMML 21-49 저장 온도에 따른 6주 동안의 생균수 변화

		<i>B. amyloliquefaciens</i> CMML 21-49 VCC (CFU/g)						
저장 온도	저장 기간	0일	7일/1주	14일/2주	21일/3주	28일/4주	35일/5주	42일/6주
	4°C		$1.02 \times 10^{11}$	$8.40 \times 10^{10}$	$8.18 \times 10^{10}$	$8.80 \times 10^{10}$	$7.90 \times 10^{10}$	$8.30 \times 10^{10}$
25°C		$1.02 \times 10^{11}$	$8.70 \times 10^{10}$	$8.30 \times 10^{10}$	$8.90 \times 10^{10}$	$6.40 \times 10^{10}$	$8.20 \times 10^{10}$	$7.10 \times 10^{10}$
54°C		$1.02 \times 10^{11}$	$6.50 \times 10^{10}$	$8.36 \times 10^{10}$	$8.70 \times 10^{10}$	$7.20 \times 10^{10}$	$7.40 \times 10^{10}$	$7.20 \times 10^{10}$

- 두 균주 모두 포자를 형성하여 고온 저장 조건에서도 생균수를 유지하는 결과를 보임
- 저장 기간 동안 생균수가 높게 유지된 온도는 CMML 21-47 및 CMML 21-49 균주 모두 4°C에서 각각  $7.7 \times 10^{10}$  CFU/g 및  $7.5 \times 10^{10}$  CFU/g 으로 확인됨

#### 다. 현장 맞춤형 제형화 공정 및 시제품(액상/분상/입상) 개발

##### • 미생물제제 최적 제형 개발에 필요한 부형제 선별 및 물리성 평가

- 미생물 제제 최적 제형 개발에 필요한 부형제 선별을 수행하였으며, 부형제의 기능을 고려하여 제올라이트, 말토덱스트린, 규조토, 스킴밀크, 카올린, 납석, 옥수수전분 총 7가지를 선별하였고 물리화학적 특성을 고려하여 제품의 수화성과 분산성을 평가함

표 21. 부형제의 물리성 테스트 결과

구분	Wettability		Suspensibility	
	용해시간(초)	평가결과	침전물부피(ml)	평가결과
제올라이트	12	+++	5	++
말토덱스트린	26	++	2	+++
규조토	27	++	9	+
스킴밀크	330	-	3	++
카올린	60	++	10	+
납석	300	-	3	++
옥수수전분	16	+++	7	+

※ +++: 매우 우수, ++: 우수, +: 양호, -: 불량

「농약관리법」에 의거 농약 검사기준에 따른 농약의 이화학적 검사 및 역가검사 기준에 따름

- 부형제의 수화성 시험 결과, 제올라이트(12초), 옥수수전분(16초), 말토덱스트린(26초)이 검체가 다 젖을 때까지의 시간이 빠른 것으로 확인되었으며, 스킴밀크의 경우 검체가 다 녹지 않고 표준 경수 위에 오랫동안 떠 있어 불량한 성능을 보였음
- 분산성 시험 결과, 검체를 넣은 후 10분 후 분산 정도를 관찰 하는 방법으로 진행하였으며, 그 결과, 말토덱스트린은 표준 경수에 완전히 녹아 매우 우수한 분산성을 보였으며, 납석과 스킴밀크가 다음으로 우수한 분산성을 보였음
- 이를 바탕으로 추후 보존력을 테스트하기 위한 부형제 후보군으로 말토덱스트린을 선정하였음

##### • 후보군 부형제의 경제성 평가

- 미생물 제제 제조 시 미생물농축액을 제조한 후 증량제, 자외선 차단제 및 기타 부형제를 혼합하여 제조하는 것이 일반적인 방법임.

표 22. 부형제의 가격비교

Component	농축액 5L 기준		농축액 100L 기준	
	Conc.(%)	Cost(W)	Conc.(%)	Cost(W)
제올라이트	20	5,500	20	110,000
말토덱스트린	20	2,220	20	44,450
규조토	20	4,400	20	88,000
스킴밀크	20	12,950	20	259,000
카올린	20	7,110	20	142,340
납석	20	4,500	20	90,000
옥수수전분	20	1,590	20	31,900

- 혼합비율은 배양액이 전체중량의 10~20%, 증량제 및 기타 부형제 80~90%를 넣고 혼합하는 것이 항진균 및 살충활성을 가지는 미생물제제의 제조 비율임. 생물학적제제로 이용되는 미생물제제의 경우 상대적으로 고가의 제품임을 고려하였을 때 배양액에 들어가는 부형제의 가격 또한 중요한 요소임. 최종 선별된 말토덱스트린을 넣고 농축액 100L에 대한 미생물제제를 제조한다고 가정하였을 경우 생산가격 상승에 큰 영향을 미치지 않을 정도의 적정 수준이라고 판단함

• 미생물 제제 제형화를 위한 부형제 선별 및 적용

- 말토덱스트린 부형제의 안정성을 테스트하기 위해 CMML 21-47와 CMML 21-49 두 균주를 혼합한 분말에 말토덱스트린을 혼합한 경우와 두 균주 각각에 말토덱스트린을 혼합한 미생물제제의 생균수를 확인함

표 23. 선별된 부형제를 혼합한 미생물제제 시제품 생균수 결과

목표 생균수 (CFU/g)	CMML 47+49 (CFU/g)	CMML47 (CFU/g)	CMML49 (CFU/g)
>1.0 X 10 <sup>10</sup>	1.07X10 <sup>10</sup>	1.2X10 <sup>10</sup>	2.1X10 <sup>10</sup>
>1.0 X 10 <sup>9</sup>	3.8X10 <sup>9</sup>	3.8X10 <sup>9</sup>	4.5X10 <sup>9</sup>

- 목표 생균수를 10승으로 설정한 2균주 복합 제품 실험결과 CMML 21-47 균주는 6.1X10<sup>9</sup> CFU/g, CMML 21-49는 4.6X10<sup>9</sup> CFU/g의 생균수를 각각 확인하였으며, 복합 시제품의 총 생균수는 1.07X10<sup>10</sup> CFU/g으로 목표 생균수를 달성함
- 단독 균주로 진행하였을 경우, CMML 21-47 균주는 미생물 제품의 생균수가 1.2X10<sup>10</sup> CFU/g 이었으며, CMML 21-49 균주는 2.1X10<sup>10</sup> CFU/g로 말토덱스트린을 부형제로 혼합하였을 때 생균수에 영향을 받지 않았음
- 목표 승수를 9승으로 설정하고 만들어진 미생물제제 시제품에서도 3.8~4.5X10<sup>9</sup> CFU/g 생균수를 확인하였으며, 부형제 혼합에 따른 생균수 감소가 없음을 확인함으로써 부형제의 영향이 크게 나타나지 않는 것을 확인함

• 선별 부형제를 혼합한 미생물제제(시제품)의 물리성 평가

- 선별된 부형제인 말토덱스트린을 혼합한 미생물제제의 수화성 및 분산성을 시험함
- 평가 방법은 농약관리법에 따른 농약의 물리화학적 검사 및 역가검사 기준을 발췌하여 실험에 적용함

표 24. 시제품의 물리성 테스트 결과

시료명	목표 생균수 (CFU/g)	Wettability		Suspensibility	
		용해시간(초)	평가결과	침전물부피(ml)	평가결과
CMML 47+49	>1X10 <sup>10</sup>	50	+++	0.4	+++
CMML 47	>1X10 <sup>10</sup>	78	+	0.5	+++
CMML 49	>1X10 <sup>10</sup>	49	++	0.6	+++
CMML 47+49	>1X10 <sup>9</sup>	18	+++	0.4	+++
CMML 47	>1X10 <sup>9</sup>	40	++	0.3	+++
CMML 49	>1X10 <sup>9</sup>	34	++	0.3	+++

※ +++: 매우 우수, ++: 우수, +: 양호, -: 불량

「농약관리법」에 의거 농약 검사기준에 따른 농약의 이화학적 검사 및 역가검사 기준에 따름

- CMML 21-47 제품과 CMML 21-49 제품이 대부분 60초 안에 검체가 균일하게 표준 경수에 퍼지는 것을 확인하였음
- 분산성을 확인하기 위한 검체를 표준 경수에 넣고 10분이 지난 시점에서도 미생물제제의 분산성에서는 1ml 이하의 침전물로 표준 경수에 용해가 잘 되는 것으로 관찰되었음
- 종합하여 판단한 결과, 물리성 검사에서 안정적인 것으로 판단되었음

## 16) 혼합미생물제제의 사용 매뉴얼 제작

### • 혼합미생물제제 “포테토킹”의 사용 매뉴얼 제작

- 연구실 및 소면적 포장지에서 도출된 연구결과를 토대로 서류작물 병해관리용 미생물제제 “포테토킹”의 사업화와 보급을 위하여 사용 매뉴얼을 제작함
- 사용 매뉴얼은 자재의 구분, 주성분, 보증성분량 등 유기농업자재 공시 내용을 포함하며, 제품의 이화학적 특성을 설명하여 실 사용자의 이해를 보조함
- 사용 매뉴얼에는 고구마 재배 시 발생하는 덩굴쪄짐병과 검은무늬병, 감자 재배 시 발생하는 검은무늬썩음병, 균핵병에 대한 병해 방제 효능의 내용을 포함함
- 더불어, 포테토킹의 방제 효능을 담보하는 희석 방법과 사용방법, 효과 및 효능, 제품의 보관방법을 포함함
- 살아있는 미생물을 포함하는 제품이므로 사용상 주의사항을 명시하여 제품의 오남용을 미연에 방지함
- 또한, 시제품 처리시 토양 내 잔류기간 및 점유율 등을 명시하고, 기존 재배 환경에 미치는 영향을 기재하여, 작물의 관리 및 연작 시 제품의 사용 시기를 예찰할 수 있도록 함

### 서류작물 병해관리용 포테토킹 (Potato King)

미생물 배양물  
• *Bacillus velezensis* CMML 21-47  
• *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49

포장단위 100g



**주요특성**

- 농림축산식품부의 직물바이라스 및 병해충 대응 사업 기술개발사업으로 개발된 제품
- (이동축산용)미생물산업양성지원센터와 전남대학교, 보림파마의 신핵연 공동연구개발
- 감자, 고구마 등 서류작물 재배지에서 획득된 특이방균 우수 길항미생물이 적용된 제품(제10-2574892호)
- 감자의 주요 식물병 검은무늬썩음병, 균핵병, 덩얼병
- 고구마의 주요 식물병 덩굴쪄짐병, 검은무늬병 방제
- 파종 전 토양혼합제리로 토양 내 병원균 사멸
- 수확 후 저장성 향상
- 뿌리발근 및 작물 성장촉진물질을 생산하는 우수 유용 미생물 적용으로 수량 증대 및 고품질 농산물 생산

**성분성분(%)**

<i>Bacillus velezensis</i> CMML 21-47	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CMML 21-49	보조제
10	10	80

**사용방법**

구분	사용시기	사용방법	사용량 (1,000㎡ 기준)
예방 방제	파종전	파종전 30분간 침지처리	종서 20kg 당 희석액 20리터 (물 20리터에 제품 100g 한포)
		파종전 분무처리	종서 20kg 당 100g 한포
	생육기	경엽 또는 관주처리 / 밭병 초 7일 간격	1,000배 희석 (용량 1L/㎡)

**주의사항**

- 제품의 사용방법 및 사용농도에 관한 사항 숙지 후 사용하십시오.
- 살아있는 미생물을 유효성분으로 하는 제품이므로, 개봉 후에는 직광 사용을 권장합니다.
- 미생물 정착을 위하여 재용 사용 전후 충분한 수로 공극에 주십시오.
- 침시광선을 피하여 보관하며, 상온 보관이 가능하나 외도륙 서늘한 곳 또는 저온 창고 보관 권장합니다.
- 경엽 또는 관주처리시 한포를 피하고 햇빛이 있을 때를 선택하여 적용에 고르게 살포하십시오.

**병제어 효능**

• 포장시험



• 저장성 향상

• 분무처리



• 유통성분 휘발저감

• 포장시험



**특허 및 인증**



농림축산식품부

IPET 농정기술개발사업

CiAtra (사) 농작산물 품질안전관리지원센터

전남대학교

BORAN PHARMA

병해관리용 미생물제제 — 포테토킹

그림 87. 포테토킹의 사용 매뉴얼

## 17) 혼합미생물제제의 사용자 매뉴얼 보급/교육

### • 혼합미생물제제 “포테토킹”의 사용자 매뉴얼 보급/교육

- 서류작물 주요 식물병 방제에 탁월한 효능을 지닌 신규 토착 미생물 *B. velezensis* CMML 21-47과 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49를 주성분으로 하는 혼합미생물제제 “포테토킹”의 사업화를 위하여 사용자 매뉴얼을 제작하였고, 예비 구매자 대상자(농협 관계자 등 도소매 판매자 및 관련 농가)를 대상으로 시제품과 함께 이를 보급함



그림 88. 서류작물 병방제용 혼합미생물제제 포테토킹 및 사용 매뉴얼 보급/교육

- 현장 사용자들의 이해 및 제품 보급(인지도 측면)을 원활히 하기 위하여 제품 소재 자료를 추가 제작하였으며, 이를 적극적으로 활용하여 “포테토킹”의 홍보 및 보급, 교육을 실시함

**포테토킹**

www.boranpharma.com

1 우수 김철미생물 선별

2 포테토킹 주성분 균주(우수 김철미생물)

3 포테토킹 병제어 효과 검증 1

4 포테토킹의 포장 시험

5 포테토킹의 식물병 저항성 향상 시험

6 특허받은 미생물제제

7 포테토킹의 약효 및 약대 시험

8 포테토킹 사용법

9 보편포자

감사합니다

그림 89. 서류작물 병방제용 혼합미생물제제 포테토킹 소개자료

18) 혼합미생물제제의 유기농업자재 등록 및 품질관리 표준화

• 서류작물 병방제용 혼합미생물제제 최종 선정

- 서류작물 병방제용 혼합미생물제제의 시제품 원형은 액상제형으로 초점을 맞췄으나, 액상 시제품의 경시테스트 결과 포장 및 보관 단계에서 혼합 미생물간 경쟁으로 상호 영향을 주어 생균수가 줄어드는 현상이 발견됨
- 이에, 분말제형으로 제품화 방안을 모색하였고, 연구팀 간 소통을 통하여 2종 유익미생물이 혼합된 서류작물 병방제용 친환경제제 “포테토킹”을 개발함

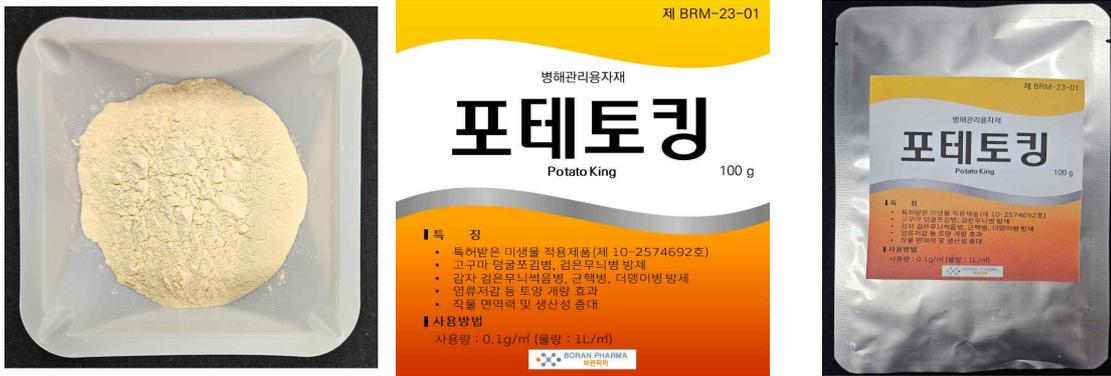


그림 90. 포테토킹의 제형 형태 및 제품포장(라벨스티커 초안)

• “포테토킹”의 대표 유효미생물 검정

- 유기농업자재 공인 분석 기관인 강원대학교 친환경농산물안전성센터(유기농업자재 시험 연구기관 제 45호)에 의뢰하여 “포테토킹”의 제품 내 유효미생물 생균수 검정을 진행함



그림 91. 포테토킹의 희석 평판법에 의한 미생물 균수 측정 결과

- “포테토킹” 내 대표 유효미생물의 생균수 측정을 3반복으로 실시한 결과 생균수는 *Bacillus amyloliquefaciens*  $3.7 \times 10^8$  CFU/g, *Bacillus velezensis*  $1.5 \times 10^9$  CFU/g으로 평가되어 “미생물제제 분석 성적서(제 EFAP-23-0556-M-1호)를 발급 받음

표 25. 포테토킹의 유효 균수 분석

(단위: CFU/mL)

구 분		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
유효균수	1	$3.9 \times 10^8$	$1.4 \times 10^9$
	2	$3.7 \times 10^8$	$1.5 \times 10^9$
	3	$3.6 \times 10^8$	$1.5 \times 10^9$
평균		$3.7 \times 10^8$	$1.5 \times 10^9$
표준편차		$1.5 \times 10^7$	$3.9 \times 10^7$

- "포테토킹" 의 대표 유효미생물을 순수분리하여 16S rRNA 유전자 염기서열분석을 진행하였으며, NCBI BLAST 상동성 검사를 진행함

> Strain EFAP-23-0601-M#1(1469bp)

```
GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCCAGCGGACAGATGGGAGCTGCTCCTGATTTAGCGGGGACGGGTG
AGTAAACAGCTGGTAACTCCCTTAAGACTCCGGTAACTCCGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTGTGTTGAACCGCATG
GTTCCAGCATAAAGGGTGGCTTCCGCTACACATGACAGTGGACCCCGGGCCATAGCTAGTTGGTGGAGTAAACCGCTACCA
AGGCGACGATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
TAGGAAATCTTCGCAATGGACGAAGTCTGACGGAGCAAGCCGGCTGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
TTAGGGAAGACAACTGGCTTCAAATAGGCGCGCTTGCACGCTTACCTAACCGAAGAGCCAGCGCTACTACGCTGGTGGCAGCG
CCGGGATATACCTAGTGGGAGCGGCTGTCCGAAATTTGGCGGTAAAGGGCTCCGAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCGCGCTCAACGGGGAGGGTCAITGGAATCGGGGACTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
GAATCGGTAGAGATGGAGAACCACTGGCGAAGCGACTCTCTGGTCTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTG
AGGACACAGATAGATACCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
AGTAAACGCTGGTAACTCCCTTAAGACTCCGGTAACTCCGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTGTGTTGAACCGCATG
GGGATGTGGTAACTCCCTTAAGACTCCGGTAACTCCGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTGTGTTGAACCGCATG
CCTTAGAGGCGGACCGCGGAGGTTGGGACGATGATTTGGG
```

> Strain EFAP-23-0601-M#2(1473bp)

```
GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCCAGCGGACAGATGGGAGCTGCTCCTGATTTAGCGGGGACGGGTG
AGTAAACAGCTGGTAACTCCCTTAAGACTCCGGTAACTCCGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTGTGTTGAACCGCATG
GTTCCAGCATAAAGGGTGGCTTCCGCTACACATGACAGTGGACCCCGGGCCATAGCTAGTTGGTGGAGTAAACCGCTACCA
AGGCGACGATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
TAGGAAATCTTCGCAATGGACGAAGTCTGACGGAGCAAGCCGGCTGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
TTAGGGAAGACAACTGGCTTCAAATAGGCGCGCTTGCACGCTTACCTAACCGAAGAGCCAGCGCTACTACGCTGGTGGCAGCG
CCGGGATATACCTAGTGGGAGCGGCTGTCCGAAATTTGGCGGTAAAGGGCTCCGAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCGCGCTCAACGGGGAGGGTCAITGGAATCGGGGACTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
GAATCGGTAGAGATGGAGAACCACTGGCGAAGCGACTCTCTGGTCTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTG
AGGACACAGATAGATACCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
AGTAAACGCTGGTAACTCCCTTAAGACTCCGGTAACTCCGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTGTGTTGAACCGCATG
GGGATGTGGTAACTCCCTTAAGACTCCGGTAACTCCGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTGTGTTGAACCGCATG
CCTTAGAGGCGGACCGCGGAGGTTGGGACGATGATTTGGG
```

Sequences producing significant alignments					
Accession	Description	Max score	Total score	Query cover	E value ident
KY357304.1 (0601-M#1)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain SP18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2713	2713	100%	0.0 100.00 %
MT375545.1 (0601-M#2)	<i>Bacillus velezensis</i> strain HAB-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2721	2721	100%	0.0 100.00 %

그림 92. 포테토킹에서 순수 분리한 미생물의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과

- 결과적으로 "포테토킹" 내에서 분리한 미생물은 각각 *Bacillus amyloliquefaciens* 와 *Bacillus velezensis*에 100% 유사성을 가지고 있는 균주로 확인되었으며, 이에 대한 성적서(제 EFAP-23-0556-M-1호)를 발급 받음

제 EFAP-23-0601-M-1호 미생물제제 분석 성적서			
위탁자	① 성명 (법인명)	보관과파	② 사업자등록번호 338-24-00046
공시품	③ 주소	서울특별시 마포구 마포대로 196, 309호	
공시품	④ 성장	고상	
	⑤ 상표명 (유효미생물)	포테토킹 ( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus velezensis</i> )	
	⑥ 제조회사	보관과파	
	⑦ 검사방법	1. 유전자 염기서열 상동성 검사를 통한 균주 확인	
	⑧ 용도	등록/인증용	
⑨ 분석항목		유효미생물	상동성 (%)
		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100
		<i>Bacillus velezensis</i>	100
1) 유기농업자재 시험연구기관 : 제 45호 2) 본 성적서는 농촌진흥청 「미생물검정규칙」 및 「검정 방법 3」 및 국립농산물품질관리원 「유기농업자재 검사 기준 방법 5」의 규정에 의한 시험성적서임. 3) 본 성적서는 시료를 3만원 분할한 후의 결과 값임. 4) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 5) 본 성적서의 결과는 광고, 진단, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하실 수 없음.			
시험제일자	2023년 5월 22일		최은화 (서명)
강원대학교 산학협력단 친환경농산물안전성센터			

제 EFAP-23-0556-M-1호 미생물제제 분석 성적서				
위탁자	① 성명 (법인명)	보관과파	② 주민등록번호 (법인등록번호) 338-24-00046	
공시품	③ 주소	서울특별시 마포구 마포대로 196, 309호		
공시품	④ 성장	고상		
	⑤ 상표명 (유효미생물)	포테토킹 ( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus velezensis</i> )		
	⑥ 제조회사	보관과파		
	⑦ 검사방법	미생물균수측정 : 희석 평판법 (Standard plate count)		
	⑧ 용도	등록/인증용		
⑨ 분석항목	유효균수	분석 회수	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 분석치 [cfu/mL(g)]	<i>Bacillus velezensis</i> 분석치 [cfu/mL(g)]
		1	3.9 × 10 <sup>8</sup>	1.4 × 10 <sup>8</sup>
		2	3.7 × 10 <sup>8</sup>	1.5 × 10 <sup>8</sup>
		3	3.6 × 10 <sup>8</sup>	1.5 × 10 <sup>8</sup>
		평균	3.7 × 10 <sup>8</sup>	1.5 × 10 <sup>8</sup>
		표준 편차	1.5 × 10 <sup>7</sup>	5.8 × 10 <sup>7</sup>
	물리성	-		
1) 유기농업자재 시험연구기관 : 제 45호 2) 본 성적서는 농촌진흥청 「미생물검정규칙」 및 「검정 방법 3」 및 국립농산물품질관리원 「유기농업자재 검사 기준 방법 5」의 규정에 의한 시험성적서임. 3) 본 성적서는 시료를 3만원 분할한 후의 결과 값임. 4) 본 성적서는 고객이 제공한 시료를 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지는 않음. 5) 본 성적서의 결과는 광고, 진단, 홍보 및 소송 등의 수단으로 사용하실 수 없음.				
시험제일자	2023년 5월 8일		최은화 (서명)	
강원대학교 산학협력단 친환경농산물안전성센터				

그림 93. 포테토킹의 유효미생물의 동정 및 검정 성적서

• “포테토킹”의 병원성미생물 및 잔류농약 검사

- 유기농업자재 공인 분석 기관인 강원대학교 친환경농산물안전성센터(유기농업자재 시험 연구기관 제 45호)에 의뢰하여 “포테토킹”의 제품 내 병원성미생물 및 중금속 유무 검정을 진행함
- 병원성 대장균의 검사 결과, 무색 콜로니가 검출되지 않아 병원성 대장균에 대한 음성으로 판정 받음



그림 94. 포테토킹 내 병원성 대장균(*Escherichia coli* O157:H7) 검출 결과(불검출)

- 병원성 살모넬라의 검사 결과, 검은색 환을 가진 붉은색 콜로니가 검출되지 않아 병원성 살모넬라 음성으로 판정 받음



그림 95. 포테토킹 내 병원성 살모넬라(*Salmonella* spp.) 검출 결과(불검출)

- 황색포도상구균의 검사 결과, 투명한 환을 가진 검은색 콜로니가 검출되지 않아 황색포도상구균 음성으로 판정 받음



그림 96. 포테토킹 내 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 검출 결과(불검출)



표 26. 포테토킹의 약해시험 결과

시험작물 (품종)	처리내용	약해정도(0~5)			최종결과
		처리 후 7일차	처리 후 14일차	처리 후 21일차	
고구마 (대유미)	기준량	0	0	0	약해없음
	배량	0	0	0	약해없음
고추 (에이알돌격탄)	기준량	0	0	0	약해없음
	배량	0	0	0	약해없음
배추 (휘파람골드)	기준량	0	0	0	약해없음
	배량	0	0	0	약해없음
상추 (선풍골드)	기준량	0	0	0	약해없음
	배량	0	0	0	약해없음

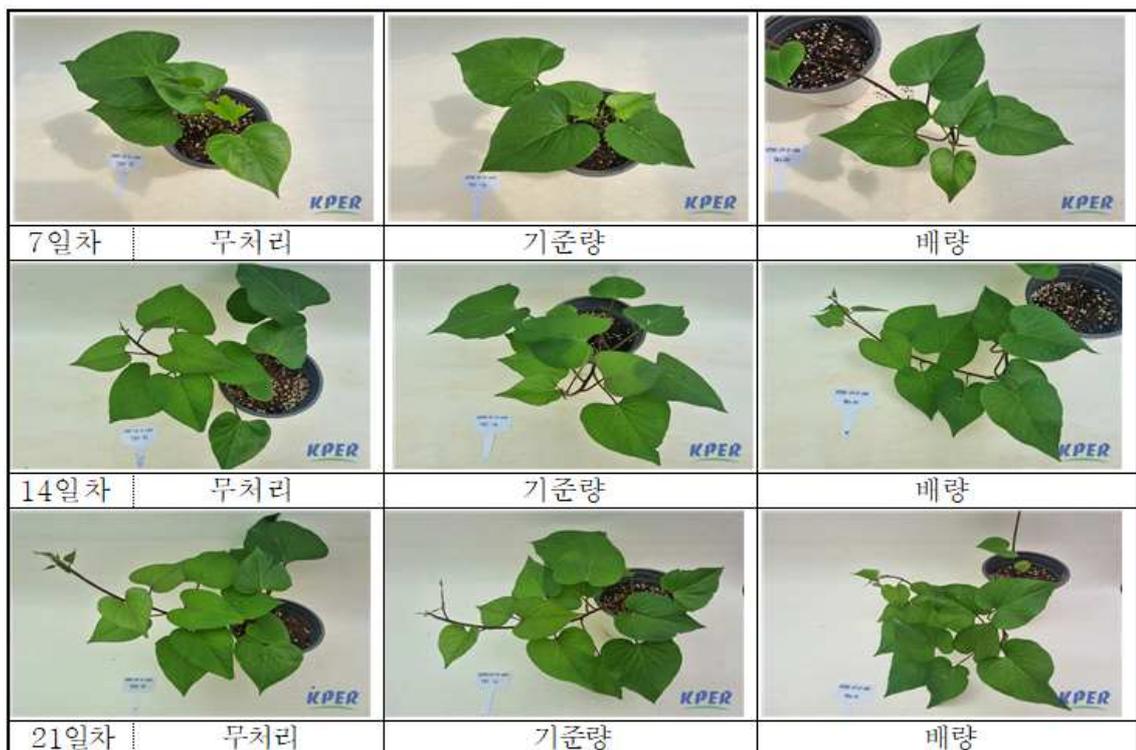


그림 99. 포테토킹의 고구마에 대한 약해시험 결과

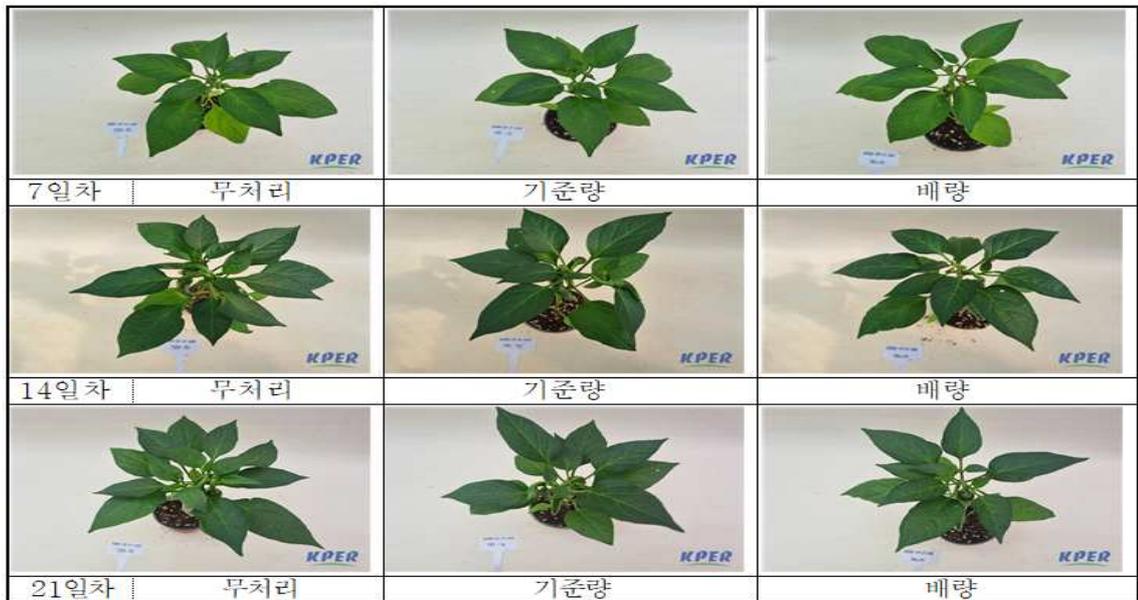


그림 100. 포테토킹의 고추에 대한 약해시험 결과

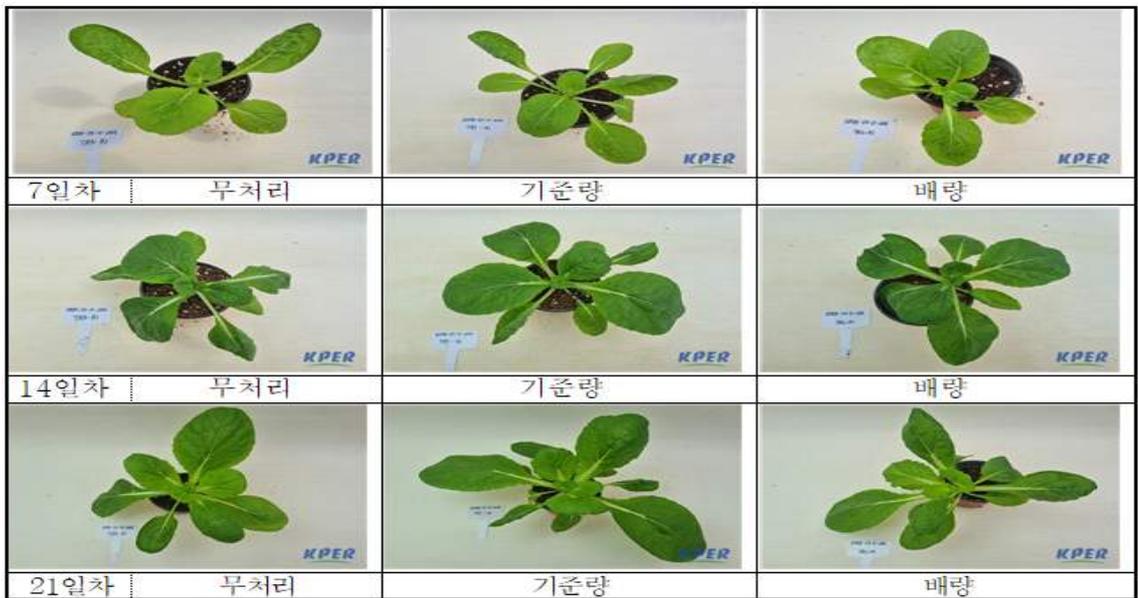


그림 101. 포테토킹의 배추에 대한 약해시험 결과



그림 102. 포테토킹의 상추에 대한 약해시험 결과

• **New Zealand White계 토끼를 이용한 포테토킹의 피부자극성시험**

- 모든 시험동물에 있어서 일반중독증상, 치사수, 체중변화 및 피부자극성을 관찰·조사한 결과 시험기간 중 미생물제제 처리에 기인된 치사개체가 관찰되지 않았으며, 중독증상 또한 없었음
- 초기시험 동물에 4시간 첩포를 기준으로 시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48 및 72시간까지 [피부반응 평가표]를 이용한 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질 처리 후 홍반(Erythema) 및 부종(Edema), 가피(Eschar) 등 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았으며, 이후 동일한 방법으로 확인시험을 진행한 결과에서도 시험물질 처리 후 72시간째 관찰시까지 홍반 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았음

**표 27. 포테토킹의 New Zealand White계 토끼에 대한 피부자극성 시험 결과**

부위	피부자극 단계	시험체	처리 일수			
			0(1hr)	1	2	3
대조부위	홍반 & 가피	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	0	0
	부종	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	0	0
시험부위	홍반 & 가피	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	0	0
	부종	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	0	0

- 더불어, 초기시험과 확인시험을 [피부반응 평가표]에 의해 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 24, 48 및 72시간의 홍반 및 가피, 부종의 평균점수 모두 "0.00"이었으며 [피부 1차 자극표]에 의해 자극성을 구분하면 "없음" 이었음
- 이상의 결과로부터 포테토킹은 New Zealand White계 토끼의 피부에 처리 시 자극성이 없는 물질로 판명됨((주)한국생물안전성연구소, ATD-23009)

• **New Zealand White계 토끼를 이용한 포테토킹의 안점막자극성시험**

- 모든 시험동물에 있어서 일반증상, 치사동물, 체중변화를 관찰·조사한 결과 시험기간 중 시험물질 처리에 기인된 치사개체는 물론 어떠한 증상도 없었으며 시간경과에 따라 체중은 증가추세를 보임
- 초기시험 후 어떠한 눈 손상도 관찰되지 않아 동일한 방법으로 확인시험을 진행하였으며, 초기시험 및 확인시험의 안반응 평가 결과는 비세척군-1(초기시험), 비세척군-2(확인

시험 1), 그리고 비세척군-3(확인시험 2) 모두 무처리 대조군인 우안에서는 어떠한 자극성도 관찰되지 않았으며, 1시간째 관찰 시부터 7일째 관찰 시까지 시험물질 처리군에서 또한 어떠한 자극성도 관찰되지 않았음

- 초기시험과 확인시험을 [안반응 평가표]에 의해 24, 48 및 72시간의 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 각막흔탁 및 홍채반응의 평균점수는 모두 "0.00"이었고, 결막의 발적 및 부종에 대한 평균 점수 또한 모두 "0.00"이었음
- 이상의 시험 결과, New Zealand White계 토끼를 이용한 포테토킹의 안점막자극성시험에서 비세척군의 자극성은 [안점막 자극표]에 의거 "없음"으로 판정됨((주)한국생물안전성 연구소, ATE-23009)

**표 28. 포테토킹의 New Zealand White계 토끼에 대한 안반응 및 자극성의 평가 결과**

시간	시험체	각막흔탁	홍채 반응	결막	
				충혈	부종
1 hr	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
24 hr	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
48 hr	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
72 hr	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
96 hr	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
7 day	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0

**• 랫드를 이용한 포테토킹의 급성경구독성/병원성시험**

- 경구 투여 후 일반중독증상은 관찰되지 않았으며, 치사동물 또한 없었음. 체중은 암·수 모두에서 시험기간 동안 증가함
- 각 부검군별 3일, 7일, 14일 및 21일째에 이산화탄소로 마취시켜 각 주요 장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과 약제투여에 의한 특이한 이상증상은 관찰되지 않았음
- 시험물질 투여 후 1일, 3일, 7일 및 14일째에 대변을 채취하여 체외 배출 미생물수를 측정하고, 7일째까지 대변에서 미생물이 검출됨

표 29. 포테토킹의 경구 투여 후 랫드의 장기별 잔류 미생물 측정

장기	투여 후 경과일									
	시험군					대조군				
	1	3	7	14	21	1	3	7	14	21
대변	D. <sup>a</sup>	D.	D.	N.D.	-	N.D. <sup>b</sup>	N.D.	N.D.	N.D.	-
신장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
뇌	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
간장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
폐	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
비장	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
위	-	D.	D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
혈액	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
임파절	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

a: Detected, b: Not Detected

- 시험물질 투여 후 3일, 7일, 14일 및 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절에서의 미생물 수를 측정한 결과, 7일째까지 장기 중 위에서 미생물이 검출됨
- 이상의 시험결과, 포테토킹  $3.8 \times 10^8$  CFU/개체 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 경구 투여 시 장기 중 위 및 대변에서 투여 후 7일째까지 미생물이 검출되었으나 시험종료일 부검배양결과 어떠한 장기에서도 잔존하지 않았고, 시험종료 시까지 일반중독증상 및 치사가 없는 것으로 보아 급성독성으로 인한 영향은 없는 것으로 판정함((주)한국생물안전성연구소, ATO-23010)

• 랫드를 이용한 포테토킹의 급성경피독성시험

- 포테토킹을 개체당 처리약량  $7.6 \times 10^8$  CFU로 경피 노출한 결과, 생존한 모든 개체에서 특이한 일반중독증상은 관찰되지 않았으며 치사개체 또한 관찰되지 않음
- 모든 시험동물의 체중은 약제투여 후 경과 일에 따라 증가 추세를 보였으며, 랫드를 이용한 포테토킹의 급성경피독성시험 결과 개체당  $7.6 \times 10^8$  CFU씩 단회 경피 투여 시 영향이 없는 것으로 판정함((주)한국생물안전성연구소, ATP-23011)

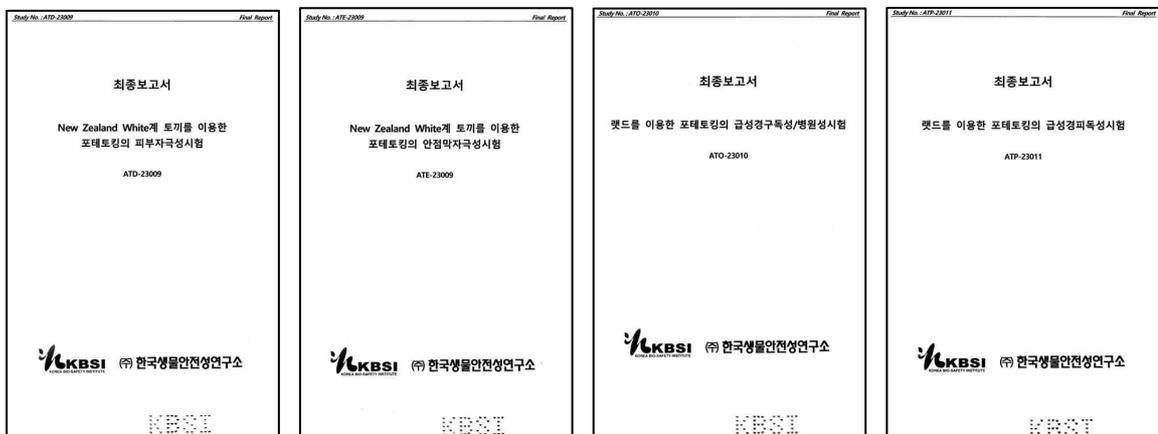


그림 103. 포테토킹의 인축독성시험의 무독성 판정 보고서

• 포테토킹의 꿀벌(*Apis mellifera*) 영향시험

- 시험물질 노출 후 8일차 경과 시, 대조군의 누적 치사율이 30.7%(누적 치사수 23/75개체)로 20.0%를 초과함에 따라 관찰을 종료함
- 추천사용약량 (1,000배 희석)의 농도인 1배 농도와 이의 10, 100배 높은 농도로 설정한 시험물질 처리군의 누적 치사율은 관찰종료일을 기준으로 각각 29.3, 29.3 및 32.0% 로 확인됨

표 30. 포테토킹의 꿀벌 영향시험 결과(누적 치사율)

약량 <sup>a</sup>	시험체 (수)	노출 후 누적 치사율									치사 /전체
		4 hr	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	
0 <sup>b</sup>	25	0	0	0	0	1	3	5	7	11	30.7% (23/75)
	25	0	0	0	0	0	2	3	4	6	
	25	0	0	0	0	0	1	3	3	6	
	전체	0	0	0	0	1	6	11	14	23	
1 <sup>c</sup>	25	0	0	0	0	1	4	6	9	10	29.3% (22/75)
	25	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
	25	0	0	0	0	0	4	5	7	9	
	전체	0	0	0	0	1	9	13	19	22	
10	25	0	0	0	1	1	1	4	6	6	29.3% (22/75)
	25	0	0	0	0	0	1	2	6	7	
	25	0	0	0	0	1	3	5	6	9	
	전체	0	0	0	1	2	5	11	18	22	
100	25	0	0	0	1	4	6	7	7	8	22.0% (24/75)
	25	0	0	0	1	1	3	5	6	9	
	25	0	0	0	1	1	1	4	5	7	
	전체	0	0	0	3	6	10	16	18	24	

a: Multiples concentration of recommended dosage, b: Untreated control, c: Concentration of recommended dosage

- 관찰기간동안 대조군에서 치사 개체를 제외한 나머지 개체들은 모두 정상으로 관찰되었고, 시험물질 처리군의 일부 개체에서는 무기력 증상이 관찰됨
- 대조군 및 시험물질 처리군의 각 농도에서 관찰된 치사 개체를 대상으로 시험물질에 의한 미생물 감염을 조사한 결과, 대조군과 해당 농도 모두 검출되지 않음
- 시험물질 노출 후 8일차까지 관찰된 대조군의 누적치사 수와 시험물질 처리군의 각 농도별 누적치사 수에 대하여 분산의 동질성 검사를 실시한 결과, 추천사용약량 (1,000배 희석)의 농도인 1배 농도 그리고 10, 100배 높은 농도 모두 대조군과의 차이가 통계적으로 유의하지 않음(tukey 사후검정, p-value 각 0.998, 0.998, 0.998 > 0.05)이 확인되어 꿀벌에 대한 영향이 없는 것으로 판단됨((주)한국생물안전성연구소, ETBE-23006)

• 포테토킹의 담수어류(송사리, *Oryzias latipes*) 영향시험

- 포테토킹의 송사리에 대한 담수어류영향시험을 1.0×10<sup>6</sup> CFU/ml의 농도로 30일 동안 반지수식으로 실시한 결과 시험 종료시까지 음성대조군 및 시험물질 처리군에서 모두 치사 개체가 관찰되지 않았고, 어떠한 중독증상도 관찰되지 않음
- 시험기간 중 치사나 병원성을 보인 개체는 관찰되지 않았고, 시험 종료 후 생존한 전 개체에 대해 부검하여 미생물 감염여부를 확인한 결과 아가미, 장기 및 근육에 대한 대조군과 비교하였을 때 육안상 차이를 발견할 수 없었음
- 시험 결과 포테토킹의 송사리에 대한 30일 동안 반수치사농도는 미생물 설정농도 기준으로 1.0×10<sup>6</sup> CFU/ml 이상이었고, 최대무작용량은 1.0×10<sup>6</sup> CFU/ml 로 판정됨((주)한국생물안전성연구소, ETF-23010)

표 31. 포테토킹의 송사리 영향시험 결과

농도 (CFU/ml)	시험체	누적치사율 (30 days)	LC50 <sup>a</sup> (CFU/ml)	NOEC <sup>b</sup> (CFU/ml)
대조구	10	0	> 1.0×10 <sup>6</sup>	1.0×10 <sup>6</sup>
시험구 (1.0×10 <sup>6</sup> )	30 (10×3)	0		

a: Median lethal concentration, based on nominal concentration of active ingredient, b: No observed effect concentration

- 현재, 포테토킹의 유기농업자재 공시를 위하여 (주)한국식물환경연구소에 시료를 의뢰하여 효능 검증을 진행 중이며, 상기 공인 인증기관의 시험성적서 및 제품 생산 공정, 원료 수급, 생산 증빙을 통하여 과제 종료 1차년 내 유기농업자재 공시 및 제품 사업화를 순차적으로 진행할 계획임

• “포테토킹”의 품질관리 표준화

- 서류작물 병방제용 혼합미생물제제 “포테토킹”은 2종 이상의 미생물이 함유된 친환경 미생물제제로서, 기존의 단일 미생물제제 또는 무기물 함유 제품과 상대적으로 면밀한 제품관리가 요구됨
- 특히, 생산 공정에서 발생할 수 있는 환경 오염은 제품 생산시부터 출하를 비롯한, 유통기한 내 추적관리가 필요함
- “포테토킹”의 생산 과정에서 발생할 수 있는 오염균 발생 및 유효성분 함량에 대하여 자체 시험성적서를 매회 발급함을 원칙으로 하며, 모든 과정은 숙련된 석박사급 연구/생산 인력이 담당함



그림 104. 포테토킹의 자체시험성적서 발급 및 누적관리

- 포테토킹의 품질 균일화 및 유통기간 내 제품의 안정성을 보증하기 위하여, 제품 포장 단계에서 무작위 선별법에 의한 세 개 제품이상 지정된 장소에 보관 중이며, 보관되는 온도 및 시간에 따른 가혹경시 테스트를 수행하여 제품의 일정한 품질을 보증함
- 제품 품질관리는 표준작업지시서를 기준으로 진행되며, 현미경을 이용한 시료의 육안 관찰을 비롯한, 고체배지 도말을 통한 주성분 균주의 보증 생균수, 오염 여부 등을 면밀히 평가하여 초기 시제품 및 유기농업자재 인증용 시료, 홍보용 견본 제품의 생산관리번호별 추적 관리 중임

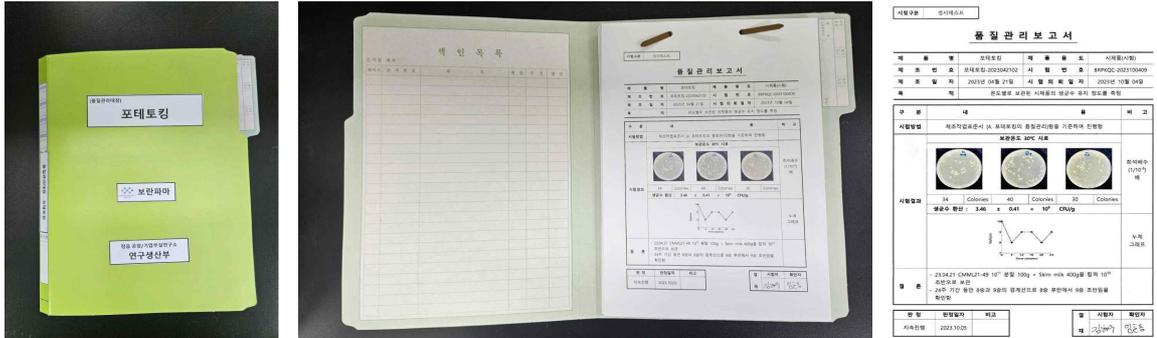


그림 105. 포테토킹의 품질관리보고서 및 생산 제품의 추적관리

### 19) 서류작물병 방제용 혼합미생물제제의 사업화 시스템 개발

- 포테토킹의 사업화 시스템 개발 및 적용
  - 연구 과제 성과로서 개발된 포테토킹의 사업화를 위하여 유기농업자재 공시를 진행하며, 공동연구기관인 보란파마의 농자재 인증 경험을 적극 도입함
  - 2공동연구기관 보란파마는 약 5년의 짧은 농생명분야에 진출 업력 대비 지난 1년동안 국가연구사업으로 지원받아 개발한 우수연구개발 성과물에 대한 농림축산식품의 신기술 인증(제52-140호)를 받은 경험이 있으며, 동 제품의 “혁신제품(제2023-022호)” 지정을 비롯하여 중소기업부의 “기술개발제품 시범구매(2023-00389)”에도 선정됨
  - 특히, 신기술 인증을 비롯한 우수연구개발 혁신제품 지정은 “조달청 혁신장터”에 제품을 판매할 수 있는 권한으로 이어져, 지자체 등 공공기관에 대한 혁신제품의 시범사용 대상 제품 선정의 성과를 달성함

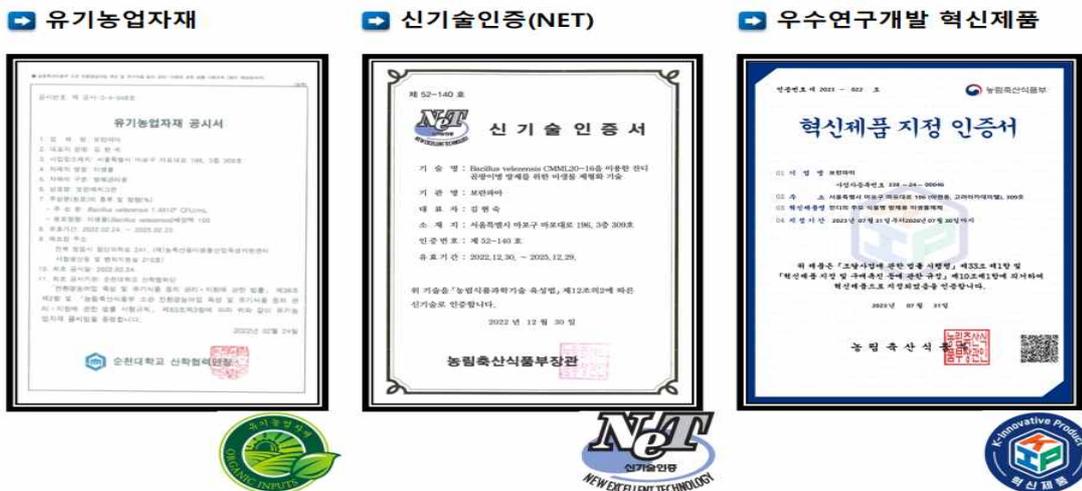


그림 106. 보란파마의 농생명 분야 사업화 역량

- 상기 경험은 서류작물 병방제용 미생물제제 “포테토킹”의 사업화에도 적용될 계획이며, 조달청의 나라장터 또는 혁신장터 등록을 통한 지자체 및 공공기관에 대한 제품의 판매를 계획함
- 이와 더불어, 개인영농인 또는 영농법인 등 농업인에 대한 농약 판매의 면단위까지 전국적 판매망이 구축된 농협중앙회 자재부와 소통하며 우수연구개발 친환경제품의 시장 판매 점유율을 높여갈 계획임



그림 107. 한국의 농약유통체계 이해 및 이를 활용한 제품 판매 전략 수립

- 나아가, 국내 패스트푸드 등 주요 서류작물 소비기업이 운영(또는 계약)하는 재배농가를 대상으로 국내 생산 친환경 유기농자재의 사용 범위 확대를 목표로함
- 제품의 해외 진출에는 보란파마의 국제 사업화 노하우를 적극 활용하고자 함
- 전세계 감자 생산량의 25.5%를 차지하는 중국은 작물의 생산 증대 및 친환경 농작물에 대한 국가 이미지 재고 등의 목적을 위하여 농산물 고급화 전략을 추진함. 국내 제품 인증을 발판으로 국가별 등록 절차를 진행함에 따라 “포테토킹”의 해외 진출을 도모함
- 인도 또한 전세계 감자 생산의 12%를 차지하는 서류작물 대농 국가로 보란파마가 보유하고 있는 수출입 네트워크를 통해 생산 증대를 위한 제품 수출을 계획함
- 이를 위하여 보란파마의 국제 사업 파트너 CAHIC(China Animal Husbandry Industry)와 제품 판로 개척에 대한 논의를 진행 중임

**인도, 중국 등으로 해외 수출**

**중국**

- 전세계 감자 생산량 25.5%
- 감자 재배면적 564만ha (\*14 기준)
- 감자 생산량 96백만톤 (\*14 기준)
- 고구마 생산량 101.9백만톤(전세계 70%)

**인도**

- 전세계 감자 생산량 12%
- 감자 재배면적 202만ha (\*14 기준)
- 감자 생산량 46백만톤 (\*14 기준)
- 감자 재배면적 급격히 증가 추세

**기존 네트워크 구축 활용**

- ◆ 동물약품 수출입을 통해 기존에 형성된 중국 농림부 산하의 국가 기업을 통한 빠른 중국 시장 진입 가능
- ◆ 생물학 제품 수출입을 통해 기존에 형성된 인도 네트워크를 통한 빠른 인도 시장 진입 가능

그림 108. “포테토킹”의 해외진출 전략

---

## (1) 정성적 연구개발성과

### [1] 서류(감자, 고구마) 주요 작물병 길항미생물 선발

#### 1) 서류작물 (감자, 고구마)과 근권 토양으로부터 미생물 분리

- 감자 괴경과 근권에서 세균 총 55 균주 (괴경 2 균주, 근권 53 균주), 진균 총 35 균주를 분리함
- 고구마 괴근·뿌리와 근권에서 세균 총 140 균주 (괴근·뿌리 67 균주, 근권 73 균주), 진균 총 142 균주 (괴근·뿌리 102 균주, 근권 40 균주)를 분리함

#### 2) 감자 질병 병원균 생장 억제 미생물 선발

- 분리한 세균 총 55 균주에 대하여 검은무늬썩음병균과 균핵병균에 대한 대치 배양을 수행해 길항세균 1 균주(병원균 군사 억제율 60%)를 선발
- 분리한 진균 총 35 균주에 대하여 검은무늬썩음병균과 균핵병균에 대한 대치 배양을 수행해 길항진균 1 균주(병원균 군사 억제율 80%)를 선발

#### 3) 고구마 질병 병원균 생장 억제 미생물 선발

- 분리한 세균 총 140 균주에 대하여 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균에 대한 대치 배양을 수행해 길항세균 2 균주(덩굴쪄김병균 군사 억제율 50%, 검은무늬병균 군사 억제율 70%)를 선발
- 분리한 진균 총 142 균주에 대하여 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균에 대한 대치 배양을 수행해 길항진균 2 균주(병원균 군사 억제율 68%)를 선발

### [2] 선발 미생물의 동정 및 분자계통학적 분석

- 감자 괴경과 근권에서 분리된 길항세균 CMML 21-48 균주의 16s rRNA, *gyrB* 유전서열을 분석하여 *Pseudomonas kribbensis*, 길항진균 CMML 21-51 균주의 ITS, EF1- $\alpha$  유전서열을 분석하여 *Trichoderma koningiopsis*로 동정함
- 고구마 괴근·뿌리와 근권에서 분리된 길항세균 CMML 21-47, CMML 21-49 균주의 16s rRNA 유전서열을 분석하여 *Bacillus velezensis* (CMML 21-47), *Bacillus amyloliquefaciens* (CMML 21-49), 길항진균 CMML 21-62, CMML 21-65 균주의 ITS, EF1- $\alpha$ , Calmodulin 유전서열을 분석하여 *Trichoderma hamatum* (CMML 21-62), *Trichoderma virens* (CMML 21-65)로 동정함

### [3] 기 확보된 서류작물병 제어 미생물의 효능검증 및 특성 분석

- 기 확보된 길항 세균 *Bacillus velezensis* CMML 20-18 균주의 경우 덩굴쪄김병균에 대해서 45.7%, 검은무늬병균에 대해서 48.3%, 검은무늬썩음병균에 대해서 52.7%, 균핵병균에 대해서 59.7%의 군사 생장 억제율을 보임
- 기 확보된 길항 세균 *Bacillus velezensis* CMML 20-20 균주의 경우 덩굴쪄김병균에 대해서 79.6%, 검은무늬병균에 대해서 89.2%, 검은무늬썩음병균에 대해서 82.3%, 균핵병균에 대해서 89.7%의 군사 생장 억제율을 보임
- 기 확보된 길항 진균 *Trichoderma aspererllum* CMML 20-29 균주의 경우 덩굴쪄김병균에 대해서 68.2%, 검은무늬병균에 대해서 89.7%, 검은무늬썩음병균에 대해서 62.4%, 균핵

---

병균에 대해서 70.5%의 군사 생장 억제율을 보임

- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주 배양 여과액의 경우 덩굴쪄김병균에 대해서 30.4%, 검은무늬병균에 대해서 55.0%, 검은무늬썩음병균에 대해서 29.9%, 균핵병균에 대해서 94.1%의 군사 생장 억제율을 보임
- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주가 생성하는 휘발성 유기화합물의 경우 검은무늬병균에 대해서 63.1%, 검은무늬썩음병균에 대해서 31.3%, 균핵병균에 대해서 72.6%의 군사 생장 억제율을 보임
- 기 확보된 길항 진균 *T. aspererllum* CMML 20-29 균주 배양 여과액의 경우 덩굴쪄김병균에 대해서 5.8%, 검은무늬병균에 대해서 30.0%의 군사 생장 억제율을 보임
- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주와 *B. velezensis* CMML 20-20 균주의 경우 고구마 괴근에서 덩굴쪄김병균과 검은무늬병균에 대해서 무처리구와 유사한 수준으로 병징을 감소하는 효과가 있음
- 기 확보된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 20-18 균주와 *B. velezensis* CMML 20-20 균주의 경우 감자 괴경에서 검은무늬썩음병균과 균핵병균에 대해서 무처리구와 유사한 수준으로 병징을 감소하는 효과가 있음
- 기 확보된 길항 진균 *T. aspererllum* CMML 20-29 균주의 경우 고구마 괴근에서 검은무늬썩음병균과 균핵병균에 대해서 병징을 감소하는 효과가 있음

#### [4] 기 확보된 서류작물병 제어 미생물의 병방제 메커니즘 분석

- 1) 유용미생물 *Trichoderma* spp. 형질전환법 개발
  - *T. aspererllum* CMML 20-29 균주의 원형질체를 제작하고 pDht\_sk\_PE 벡터 내부의 GFP 유전자의 발현을 확인함
- 2) 항진균성 유효활성 물질 규명을 위한 *Trichoderma aspererllum* CMML 20-29 Gas Chromatography-Mass Spectrum 분석
  - *T. aspererllum* CMML 20-29 균주의 휘발성 유기화합물이 덩굴쪄김병원균과 검은무늬병원균의 생장 저해능을 확인하고, GC-MS 분석을 통해 2-Pentylfuran, 2,3-butanediol, 6-Pentyl-2H-pyran-2-one 생성을 확인함
- 3) 기 확보된 *Bacillus velezensis* CMML 20-20 균주의 항균활성 물질 분석
  - *B. velezensis* CMML 20-20 균주의 HPLC 분석을 통해 Iturin, Fengycin, Surfactin 물질 생성을 확인함

#### [5] 기 확보된 서류작물 병방제 미생물의 실적용

- 포장실험을 통해서 *B. velezensis* CMML 20-18, *B. velezensis* CMML 20-20, *T. aspererllum* CMML 20-29 균주를 단독 또는 혼합 (세균 + 진균) 처리하였을 때 고구마 덩굴쪄김병과 검은무늬병에 대한 병 발생률과 발병율이 살진균제인 azoxystrobin과 유사한 정도로 감소함
- 포장실험을 통해서 *B. velezensis* CMML 20-20, *T. aspererllum* CMML 20-29 균주를 단독 또는 혼합 (세균 + 진균) 처리하였을 때 감자 검은무늬썩음병과 균핵병균에 대한 병 발생률과 발병율이 높은 수준으로 감소함

---

## [6] 선발된 길항미생물의 상호관계 및 병증완화 메카니즘 분석

### 1) 선발된 길항미생물의 효능검증 및 특성분석

- 선발된 길항 세균 *Bacillus velezensis* CMML 21-47 균주의 경우 덩굴쪄김병균에 대해서 63.3%, 검은무늬병균에 대해서 66.6%, 검은무늬썩음병균에 대해서 57.4%, 균핵병균에 대해서 62.2%의 균사 생장 억제율을 보임
- 선발된 길항 세균 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 경우 덩굴쪄김병균에 대해서 48.5%, 검은무늬병균에 대해서 61.6%, 검은무늬썩음병균에 대해서 48.7%, 균핵병균에 대해서 55.9%의 균사 생장 억제율을 보임
- 선발된 길항 진균 *Trichoderma hamatum* CMML 21-62 균주의 경우 덩굴쪄김병균에 대해서 68.3%, 검은무늬병균에 대해서 77.8%, 검은무늬썩음병균에 대해서 74.4%, 균핵병균에 대해서 72.0%의 균사 생장 억제율을 보임
- 선발된 길항 진균 *Trichoderma virens* CMML 21-65 균주의 경우 덩굴쪄김병균에 대해서 71.8%, 검은무늬병균에 대해서 85.4%, 검은무늬썩음병균에 대해서 77.6%, 균핵병균에 대해서 65.8%의 균사 생장 억제율을 보임
- 선발된 길항 진균 *T. hamatum* CMML 21-62과 *T. virens* CMML 21-65 균주 단독 배양 여과액의 경우 덩굴쪄김병균에 대해서 공배양 여과액보다 방제율이 높았지만, 검은무늬병균, 균핵병균, 검은무늬썩음병균에 대해서는 공배양 여과액이 단독 배양 여과액보다 방제율이 높은 것을 확인함. 선발된 길항 진균의 균주 별로 다른 항균 활성 메카니즘이 있다는 것을 검증하고 공배양시 나오는 물질이 항균 활성능이 있다는 것을 확인함

### 2) 선발된 길항미생물의 배양 시간 설정 및 pH 설정

- 선발된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 21-47 균주의 경우 최적 배양온도는 30 °C이고 최적 pH는 7.0~8.0으로 확인함
- 선발된 길항 세균 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 경우 최적 배양온도는 37 °C이고 최적 pH는 6.0~7.0으로 확인함
- 선발된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 21-47, *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주 모두 우수한 단백질 분해 효소 분비능을 가진 것을 확인함
- 선발된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 21-47, *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주 모두 사이드로포어 생성능을 가진 것을 확인함
- 선발된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 21-47, *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주는 3일간 각각 15µM, 12µM 생성하는 것을 확인함
- 선발된 길항 진균 *T. hamatum* CMML 21-62, *T. virens* CMML 21-65 균주 모두 키틴 분해효소 형성능을 가진 것을 확인함
- 선발된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 21-47, *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 배양액을 단독 또는 혼합 처리한 결과 CMML 21-47 균주 단독 처리구에서 가장 높은 방제가를 확인하였으며, 모든 처리구에서 무처리구와 비교하여 79% 이상의 방제가를 확인함
- 선발된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 21-47, *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 휘발성 유기화합물을 단독 또는 혼합 처리한 결과 CMML 21-49 균주 단독 처리구에서 가장 높은 방제가를 확인하였으며, 모든 처리구에서 무처리구와 비교하여 64% 이상의 방제가를 확인함

---

## [7] 서류작물병 방제 유효활성 물질 규명 및 유도저항성 (SAR, ISR) 여부 판단

- 1) 선발된 길항미생물의 항진균성 물질 규명을 위한 UPLC-QTOF-MS 분석
  - 선발된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 21-47 균주의 이차대사산물 생성 관련 유전자 클러스터는 13개로 각각 surfactin, fengycin, bacilibactin, bacillaene, locillomycin/locillomycin B, C, difficidin, macrolactin, butirosin A/butirosin B, mersacidin, bacilysin 합성 관여 유전자임
  - 선발된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 21-47 균주의 비정제 lipopeptide는 5,000 µg/ml 농도일 때 덩굴쪄짐병균에 43.5%, 검은무늬병균에 76.8%, 균핵병균에 85.3%, 검은무늬썩음병균에 37.6%의 억제율을 보임
  - 선발된 길항 세균 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 비정제 lipopeptide는 5,000 µg/ml 농도일 때 덩굴쪄짐병균에 48.3%, 검은무늬병균에 88.4%, 균핵병균에 87.6%, 검은무늬썩음병균에 54.3%의 억제율을 보임
  - 선발된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 21-47, *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주의 항진균물질은 3종의 bacillomycins (bacillomycin D-C14, bacillomycin D-C15 및 bacillomycin D-C16), 5종의 fengycins(fengycin A-C15, fengycin A-C16, fengycin B-C15, fengycin B-C16, fengycin B-C17), 5종의 surfactins (surfactin A-C12, surfactin A-C13, surfactin A-C14, surfactin A-C15, surfactin A-C16)로 확인됨
- 2) 서류작물병 방제 유도저항성 (SAR, ISR) 여부 판단
  - 기 확보된 *B. velezensis* CMML 20-20 균주가 고구마 뿌리에서 대조군과 비교하여 살리실산 (SA) 생합성 및 신호 전달 경로와 관련된 유전자 *ibPAL*, *ibNPR1* 및 *ibPR1*의 발현을 유도했음을 나타냄. 또한, 자스몬산(JA) 생합성 및 신호 전달 경로와 관련된 유전자 *ibPDF1.2* 및 *ibLOX*의 발현을 유도함. 이러한 유전자 발현 프로파일은 CMML20-20 균주가 고구마에서 살리실산(SA) 및 자스몬산(JA) 생합성을 잠재적으로 향상시킨다는 것을 보여줌

## [8] 미생물제제 처리 후 잔존율에 따른 억제 효과 분석

- 선발된 우수 길항미생물 전용의 배양 및 제형 최적화 과정에서 획득된 공정 기술을 적용하여 미생물제제에 함유된 유효미생물의 강건성을 향상시킴으로서 시료에 처리된 제제의 생균수( $1.0 \times 10^8$  CFU/g 이상)가 한달(4주)이상 일정하게 유지됨(미생물제제의 지속성)

## [9] 서류작물병 방제 길항미생물의 최적 산업배지 개발

- 선발된 길항미생물의 기본 배지 조성 설정 시험결과, 최적 질소원은 yeast extract, 탄소원은 lactose, 미량원소는  $MnSO_4$  로 확인

## [10] 서류작물병 방제 길항미생물의 배양조건 최적화

- 서류작물병 방제 길항미생물의 배양조건 최적화 (배양 시간 및 초기 pH, 배양 온도) CMML 21-47 및 CMML 21-49의 성장 및 항균물질 생산을 위한 초기 pH 조건은 7.0, 배양 시간은 48시간, 배양최적 온도는 30°C로 확인

## [11] 혼합미생물제제 최적 조합 구성 및 합제기술 개발

- 서류작물병 방제 혼합미생물제제의 사용 균주는 내생포자를 형성하고, 높은 열안정성을 갖는 CMML 21-47 및 CMML 21-49의 조합으로 구성함
  - 두 균주의 합제(혼합) 비율은 1:1로 설정하였으며, 최적 배양 조건에서 단독 배양 후 혼합하여 서류작물병 방제 혼합미생물제제의 시제품(액상제)을 제작함
-

---

**[12] 선발된 서류작물병 방제미생물의 현장적용 평가**

- 포장시험 결과, 선발된 길항 세균 *B. velezensis* CMML 21-47, *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주를 단독 또는 혼합 (세균 + 세균) 처리하였을 경우 두 병원균에 모두 70% 이상의 높은 방제가를 보이며 이는 살진균제인 azoxystrobin 보다 우수함. 또한 두 균주를 혼합 처리하였을 때 검은무늬병의 방제가가 가장 높은 수준을 보임
- 포장시험 결과, 선발된 길항 진균 *T. hamatum* CMML 21-62 균주를 관주 처리하였을 경우 살진균제인 azoxystrobin과 비교해 통계적으로 유의미한 차이가 없음을 확인함

**[13] 서류작물병 방제미생물의 독성시험 및 환경영향 평가**

- 서류작물병 방제미생물의 독성시험 및 환경영향 평가 결과, 개발된 미생물 제제 시제품의 약해시험(유식물), 피부자극성시험(토끼), 안점막자극성시험(토끼), 급성경구독성/병원성시험(랫드), 환경독성 시험(잉어)을 진행한 결과 안전한 것으로 확인

**[14] 서류 작물 질병 방제용 혼합 미생물 대량 생산 공정 및 제형 기술 개발**

- 선발된 2개의 균주를 1.5KL 규모의 산업용 대량 배양기를 이용하여 최종 배양 조건을 확보
- 배양 36시간에 항균물질(lipopeptide)의 최대 생산량을 확인하였고, 포자형성은 80% 이상 확인

**[15] 현장 활용 맞춤형 제형 개발**

- 분말 수화제 형태의 제품 생산을 위한 분무건조 조건 확보 및 혼합 부형제 선별 실험을 통해 수화성 및 분산성이 높은 제품 개발 공정을 확보

**[16] 혼합미생물제제의 사용 매뉴얼 제작**

- 연구실 및 소면적 포장지에서 도출된 연구결과를 토대로 서류작물 병해관리용 미생물제제 "포테토킹"의 사업화와 보급을 위하여 사용 매뉴얼 제작

**[17] 혼합미생물제제의 사용자 매뉴얼 보급/교육**

- 서류작물 주요 식물병 방제에 탁월한 효능을 지닌 신규 토착 미생물 *B. velezensis* CMML 21-47과 *B. amyloliquefaciens* CMML 21-49를 주성분으로 하는 혼합미생물제제 "포테토킹"의 사업화를 위하여 사용자 매뉴얼을 제작, 예비 구매자 대상자(농협 관계자 등 도소매 판매자 및 관련 농가)를 대상으로 시제품과 함께 이를 보급

**[18] 혼합미생물제제의 유기농업자재 등록 및 품질관리 표준화**

- 최종 개발된 제품의 유기농업자재 등록을 위한 제품 내 유효 균수 및 동정 시험을 완료
- 제품등록을 위한 약해시험, 독성시험을 완료
- 제품 생산 표준화를 위한 품질검사 기준 및 자세 시험성적서 규격 설정 완료

**[19] 서류작물병 방제용 혼합미생물제제의 사업화 시스템 개발**

- 공동연구기관인 '보란파마'의 농자재 인증 경험을 통한 사업화 시스템 구축 중
- 보란파마의 국제 사업 파트너를 통한 수출 판로 개척 논의 중

## (2) 정량적 연구개발성과

- 1단계 정량적 연구개발 성과 목표
  - 비 SCI논문 1건, 특허출원 1건, 학술대회 2건, 제품화 1건, 고용창출 6명
- 1단계 정량적 연구개발 성과
  - SCI 논문 1건, 특허출원 1건, 학술대회 5건, 제품화 1건, 고용창출 13명, 생명자원 기탁 2건, 홍보실적 2건
- 2단계 정량적 연구개발 성과 목표
  - SCI논문 2건, 비SCI논문 1건, 특허출원 1건, 특허등록 1건, 학술대회 2건, 제품화 1건, 고용창출 3명, 매출액 10,000 천원, 기술인증 1건
- 2단계 정량적 연구개발 성과
  - SCI논문 2건, 특허출원 1건, 특허등록 1건, 학술대회 6건

성과지표명		연도	1단계	2단계	과제 종료 후	계	가중치 (%)	
			(2021~2022)	(2023)				
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	논문 (SCI)	목표(단계별)		2		2	30	
		실적(누적)	1	2		3		
	논문 (비SCI)	목표(단계별)	1	1				
		실적(누적)						
	논문평균 (IF)	목표(단계별)		2				
		실적(누적)	5.724	4.5, 1.4 Av.2.95		Av. 3.87		
	특허출원	목표(단계별)	1	1		2		10
		실적(누적)	1	1		2		
	특허등록	목표(단계별)		1	1	2		10
		실적(누적)		1		1		
	학술대회	목표(단계별)	2	2		4		10
		실적(누적)	5	6		11		
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	제품화	목표(단계별)	1	1		2	5	
		실적(누적)	1	1		2		
	매출액 (천원)	목표(단계별)		10,000	100,000	110,000	5	
		실적(누적)						
	수출액 (천원)	목표(단계별)			200,000	200,000	5	
		실적(누적)						
	고용창출	목표(단계별)	6	3		9	10	
		실적(누적)	13	0		13		
	기술인증	목표(단계별)		1		1	15	
		실적(누적)						
계							100	

\* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[SCI Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 등 을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

\* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도, 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

평가 항목 (주요성능 <sup>1)</sup> )	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 <sup>2)</sup> (%)	세계 최고수준 보유국/보유기관	연구개발 전 국내 수준	연구개발 목표치		목표 설정 근거
			성능수준	성능수준	1단계(21~22)	2단계(23)	
대상 작물병 방제가	(%)	100	미국, 독일 (Agraquest, Bayer)	개발기술 : 中 성능수준 : 中	-	무처리구 대비 방제가 70% 이상	천연식물 보호제 등록 기준 대비 상향 목표
유효물질 수율 (균체 또는 대사체)	(%)	100	네덜란드, 미국 (Koppert, Certis USA )	개발기술 : 下 성능수준 : 下	경쟁제품 대비 유효물질 수율(균체 또는 물질) 100% 이상	생산공정 재현을 Pilot scale 대비 90% 이상	Global standard products

\* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

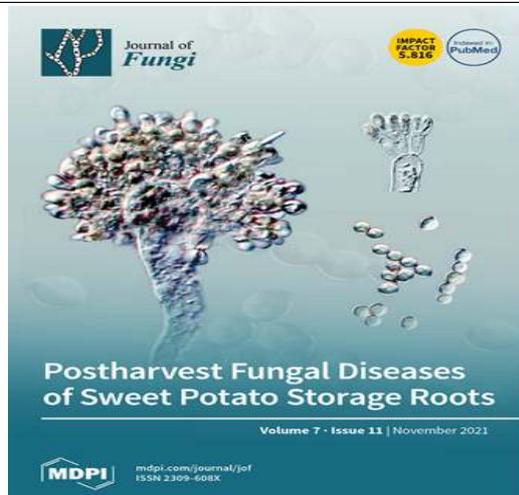
\* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

### (3) 세부 정량적 연구개발성과

#### [과학적 성과]

#### □ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Fungi Associated with Postharvest Diseases of Sweet Potato Storage Roots and In Vitro Antagonistic Assay of <i>Trichoderma harzianum</i> against the Diseases	Journal of Fungi	Narayan Chandra Paul	7	스위스	MDPI	SCIE	21.10.31	2309-608X	40%
2	First Report of Binucleate <i>Rhizoctonia</i> AG-G Causing Root Rot of Japanese Bay Tree ( <i>Machilus thunbergii</i> ) in Korea	Plant Disease	Ju Gyeong Lee	107	미국	APS	SCI	23.07.08	0191-2917	40%
3	Identification and fungicide sensitivity of <i>Fusarium asiaticum</i> causing seedling rot of Hinoki cypress in a Forest Nursery in South Korea	FOREST PATHOLOGY	Hyeongju Choi		미국	Wiley-Blackwell	SCI	23.11.15	1437-4781	50%



**Journal of Fungi**  
 Article  
**Fungi Associated with Postharvest Diseases of Sweet Potato Storage Roots and In Vitro Antagonistic Assay of *Trichoderma harzianum* against the Diseases**  
 Narayan Chandra Paul<sup>1,2\*</sup>, Sooyeon Park<sup>1,2</sup>, Hailong Liu<sup>3</sup>, Ju Gyeong Lee<sup>3</sup>, Gwi Han Han<sup>3</sup>, Hyunook Kim<sup>3</sup> and Hyunkyung Sang<sup>1,2,3\*</sup>

**Abstract:** Sweet potato (*Ipomoea batatas*) is the most important food crop in the world and an excellent source of nutrition. Postharvest diseases were investigated in sweet potato storage roots collected from the field nurseries in Korea during 2021. Several diseases including Fusarium wilt and root rot, observed in dry rot, and soft rot were observed in the postharvest sweet potatoes. A total of 68 fungal isolates were obtained from the diseased samples and the isolates were grouped into 8 different fungal colony types. Based on multilocus phylogeny and morphological analysis of 17 representative isolates, the isolates were identified as *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. verticillioides*, *F. verticillioides* var. *toruliforme*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* (the *Aspergillus* species complex), and *Martiniomyces phaeosporus*. *F. verticillioides* var. *toruliforme* was the most common pathogen of sweet potato storage roots causing the surface rot disease, and *M. phaeosporus* caused the most severe disease among the pathogens. Plant culture on potato dextrose agar (PDA) using *Trichoderma harzianum* strains CM20-26 and CM20-27. The results revealed that the two strains showed strong antagonistic activity in different ranges against all tested pathogens. The study gives an understanding of diverse postharvest diseases in sweet potatoes and suggests potential biocontrol agents to manage the diseases. In addition, this is the first report of sweet potato storage root rot diseases caused by *A. niger*, and *F. verticillioides*.

**Keywords:** fungal pathogens; postharvest diseases; sweet potato storage root; *Trichoderma harzianum*

**1. Introduction**  
 The sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Convolvulaceae) is regarded as one of the most important food crops in the world and is an alternative source of bioenergy with an annual production area of 8.0 million hectares and a total global production of 100 million metric tons (MT) (FAO 2019). Sweet potato and its roots can be used as a staple food, animal feed, and supplementary food such as chips and starch production [1,2]. Therefore, this crop is considered a high-priority crop targeted for reducing food insecurity and malnutrition in many countries [3]. Furthermore, sweet potato is an excellent source of nutrients, bioactive compounds, such as polyphenols, flavonoids, and terpenes with medicinal value owing to its anti-cancer, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities [4–11]. Additionally, functional food products, such as nutraceuticals and nutraceuticals, rather than sweet potato, making it a source of novel natural health products, nutraceuticals [12].

**Disease Note**

**Diseases Caused by Fungi and Fungus-Like Organisms**

**First Report of Binucleate *Rhizoctonia* AG-G Causing Root Rot of Japanese Bay Tree (*Nachilus thunbergii*) in Korea**  
 Ju Gyeong Lee<sup>1</sup>, Narayan Chandra Paul<sup>1,2\*</sup>, Sooyeon Park<sup>1</sup>, Hyun-Jun Kim<sup>3</sup>, and Hyunkyung Sang<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Integrative Food, Bioscience and Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea  
<sup>2</sup> Kumho Life Science Laboratory, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea  
<sup>3</sup> Department of Forest Resources, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

**Funding:** This study was supported by Chonnam National University (Grant Number 2021-2-302) and the Korea Forest Service (Grant No. 2020183K10-2022-AA02), Republic of Korea. This study was also supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry (IPEF) through Crop Viruses and Pests Response Industry Technology Development Program funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (321099-3), Republic of Korea. Plant Dis. 107:2220, 2023; published online as <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0982-PDN>. Accepted for publication 19 December 2022.

*Nachilus thunbergii* Sieb. & Zucc., commonly known as Japanese bay tree, is a large evergreen tree in the Lauraceae family widely distributed in Asia, including Korea in subtropical and tropical forest areas (Wu et al., 2006). In April 2021, a root rot disease of 2-year-old Japanese bay trees was observed in a nursery on Wando Island in Korea. Tree roots exhibited brown to black discoloration, root rot, and deterioration, and leaves were severely wilted followed by plant death, with a disease incidence of approximately 30%. Symptomatic roots were surface sterilized with 1% NaOCl for 5 min and washed three times with distilled water. The root tissues were dried and plated on potato dextrose agar (PDA) and vegetable juice agar (VJA) media. After 3 to 4 days of incubation at 25°C, brown *Rhizoctonia* fungal-like colonies grew on both culture media. Hyphae of two representative isolates (CMML21-35 and CMML21-36) exhibited typical characteristics of *Rhizoctonia*, including a constriction of branching hyphae (Alvarez et al. 2013). Also, two nuclei in each mycelial cell were observed after staining of mycelia with 0.1% Safranin O. The two isolates were identified as binucleate *Rhizoctonia* based on microscopic observation. To confirm identification of the isolates, the internal transcribed spacer (ITS) and large subunit (LSU) regions were sequenced using two primer sets, ITS1/ITS4 and LROR/LS5 (Vilgalys and Hester 1990; White et al. 1990). BLASTn search analysis revealed that the ITS sequence of isolates had 99.60% (582/584 bp) sequence similarity with the sequences of binucleate *Rhizoctonia* (accession numbers JF519837 and AY927327, respectively) and the LSU sequence matched well with the sequence of *Rhizoctonia* sp. AG-G (accession number MN977413; similarity 99.56%, 910/914 bp). The sequences were deposited in GenBank under accession numbers OM049427 and OM049428 for ITS and OM679289 and OM679290 for LSU. Phylogenetic analysis of ITS and LSU regions revealed that the isolates grouped with binucleate *Rhizoctonia* AG-G (Teleomorph: *Ceratobasidium* sp.) with a high bootstrap value. Accordingly, the morphological and molecular characteristics confirmed the causal pathogen as binucleate *Rhizoctonia* AG-G (Jiang et al. 2016; Gonzalez et al. 2016). To test pathogenicity, a 2-year-old Japanese bay tree was inoculated by creating a hole in the soil near the root rhizosphere and placing 1.5 g of ground mycelia from a 5-day-old broth culture at two time points 1 week apart (Bartz et al. 2010). The control pot was inoculated with sterilized ddH<sub>2</sub>O. Inoculated and control plant pots were incubated in plastic boxes with 100% relative humidity at 25°C for 5 days. After that, the pots were placed in the greenhouse at 23 to 25°C. One month post-inoculation, initial disease symptoms were observed, and after 2 months, severe foliar wilting and eventual plant death occurred. The noninoculated control remained healthy. The pathogen was reisolated from infected roots, fulfilling Koch's postulates. The experiment was conducted three times with three replications. This is the first report of root rot of Japanese bay tree caused by binucleate *Rhizoctonia* AG-G in Korea and in the world. Previously, a pathogenic binucleate *Rhizoctonia* AG-G was isolated from colonized apple tree roots in orchards in Italy (Keldner et al. 2012). The present study implies that this pathogen potentially causes a negative impact on the nursery and forest industries, so further research is needed on pathogenicity in other tropical and subtropical trees and also apple, an important crop in Korea.

**References:**  
 Alvarez, E., et al. 2013. Plant Dis. 97:772.  
 Bartz, F. E., et al. 2010. Plant Dis. 94:515.  
 Gonzalez, D., et al. 2016. Fungal Biol. 120:603.  
 Jiang, J.-H., et al. 2016. Plant Dis. 100:85.  
 Keldner, M., et al. 2012. Plant Sci. 187:581.  
 Vilgalys, R., and Hester, M. 1990. J. Bacteriol. 172:4238.  
 White, T., et al. 1990. Page 315 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, CA.  
 Wu, S., et al. 2006. J. Biogeogr. 33:936.

The authors declare no conflict of interest.

**e-Xtra**  
**Keywords:** binucleate *Rhizoctonia*, Japanese bay tree, root rot

Received: 25 April 2023 | Revised: 12 September 2023 | Accepted: 9 October 2023  
 DOI: 10.1111/efp.12837

**ORIGINAL ARTICLE** Forest Pathology & Fungus WILEY

**Identification and fungicide sensitivity of *Fusarium asiaticum* causing seedling rot of Hinoki cypress in a Forest nursery in South Korea**

Hyeongju Choi<sup>1</sup> | Narayan Chandra Paul<sup>1,2\*</sup> | Hyun-Jun Kim<sup>3</sup> | Hyunkyung Sang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Integrative Food, Bioscience and Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju, Korea  
<sup>2</sup>Kumho Life Science Laboratory, Chonnam National University, Gwangju, Korea  
<sup>3</sup>Department of Forest Resources, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju, Korea

**Correspondence:** Hyunkyung Sang, Department of Integrative Food, Bioscience and Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea. Email: hksang@fnu.ac.kr

**Funding Information:** Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea; Rural Development Administration, Republic of Korea

**Abstract**  
 In 2021, a seedling rot disease was observed on Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) seedlings in a barefoot forest nursery in Naju-si, Jeollanam-do Province, South Korea. Infected seedlings were yellowing at the disease outset but became black after severe infection. At onset of disease, seedlings began yellowing. As disease progressed, black rot of the leaves and roots was common and eventually wilt and seedling death was observed. Seedling mortality was about 30%. The causal organism was isolated from the seedlings on potato dextrose agar media. A total of nine isolates were recovered and two representative isolates were identified as *Fusarium asiaticum* based on morphological characterization and phylogenetic analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region, translation elongation factor (EFl- $\alpha$ ) and RNA polymerase II (RPB2) genes. Pathogenicity and fungicide sensitivity were tested to confirm pathogen viability and control efficacy of the disease. The fungal isolate caused severe disease in the inoculated Hinoki cypress seedlings. Also, the isolates were sensitive to benomyl, hexaconazole and pyraclostrobin and showed reduced sensitivity to penitriopyrad. In *in planta* assays showed 98.81 and 100% disease control by the application of pyraclostrobin and hexaconazole, respectively. The pathogen was re-isolated from the inoculated seedlings and its identity was confirmed by morphological analysis fulfilling Koch's postulates. The pathogen-causing disease in the Hinoki cypress is the first reported in the host worldwide.

**KEYWORDS:** *Chamaecyparis obtusa*, fungicide sensitivity, *Fusarium asiaticum*, molecular phylogeny, nursery, seedling disease

**1 | INTRODUCTION**  
 Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) is a conifer within the Cupressaceae family, native and widely distributed in Japan and Korea (Oh et al., 2015). The medicinal efficacy of Hinoki cypress is also well-known (Raha et al., 2018), and in South Korea, the wood is widely used in households as a structural material because of

its superior mechanical properties, excellent durability and beautiful heartwood colour (Kijidani et al., 2012). The quality of its wood can be, however, decreased by a fungal pathogen *Cistella japonica* (Yamada et al., 2003). In this study, we observed severe seedling rot in barefoot nursery container of Hinoki cypress located in Naju-si, Jeollanam-do Province, South Korea. The seedlings turned yellow to black, and

Hyeongju Choi and Narayan Chandra Paul contributed equally to this work.  
 Forest Pathology. 2023;30:e12837. <https://doi.org/10.1111/efp.12837>  
 © 2023 Wiley-VCH GmbH | 1 of 7

## □ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021 한국생물공학회 추계학술발표대회 및 국제심포지엄	임호동, 박준경, 김공민, 지정환, 류소정, 한귀환	2021.10.07	경주 경주화백컨벤션센터	대한민국
2	2022 한국생물공학회 추계학술발표대회 및 국제심포지엄	윤영석, 류소정, 임성훈, 김정원, 김공민, 지정환, 한귀환	2022.09.30	제주, 신화월드	대한민국
3	2022 한국생물공학회 추계학술발표대회 및 국제심포지엄	류소정, 윤영석, 임성훈, 김정원, 김공민, 지정환, 한귀환	2022.09.30	제주, 신화월드	대한민국
4	2022 한국균학회 추계국제학술대회	박소윤, Paul, 이주경, 한귀환, 상현규	2022.10.12	천안, 단국대학교	대한민국
5	2022 한국식물병리학회 추계국제학술대회	최형주, 임호동, 한귀환, 상현규	2022.10.18	순천 순천대학교	대한민국
6	2023 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지엄	윤영석, 류소정, 임성훈, 김정원, 지정환, 상현규, 김공민, 한귀환	2023.04.14	제주 국제컨벤션센터	대한민국
7	2023 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지엄	류소정, 윤영석, 임성훈, 김정원, 지정환, 박준경, 김공민, 상현규, 한귀환	2023.04.14	제주 국제컨벤션센터	대한민국
8	2023년 (사)한국식물병리학 회 춘계학술대회	박소윤, 이주경, Paul, 이가희, 박소윤, 마지현, 상현규	2023.04.27	라한셀렉트 경주	대한민국
9	2023년 (사)한국균학회 춘계학술대회 및 임시총회	이주경, Paul, 한귀환, 상현규	2023.05.11	경기 양평 블룸비스타	대한민국
10	2023년 한국미생물·생명공학 회 창립 50주년 기념 국제학술대회 및 정기학술대회	윤영석, 류소정, 임성훈, 김정원, 지정환, 상현규, 김공민, 한귀환	2023.06.21	경주 화백컨벤션센터	대한민국
11	MSK2023 한국미생물학회 국제학술대회	류소정, 박정웅, 임성훈, 김정원, 지정환, 박준경, 최선애, 최연웅, 김공민, 상현규, 한귀환	2023.10.25	여수 엑스포컨벤션센터	대한민국

### Growth optimization of *Bacillus velezensis* RS15-1 isolated from soil for control of foot rot disease

**Abstract**  
Foot rot and stem blight is an important leaf crop in the world. Crop conservation is a primary economic, but production yields are declining due to the increasing infestation of insects or various fungal pathogens such as *Trichoderma asperellum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, and *Fusarium solani*. In order to find sustainable control agents, we have isolated 57 soil bacteria from potato tubers and soil and tested their antifungal activities against *F. solani* and *B. cinerea* on potato tubers. *B. velezensis* RS15-1 was identified as the most effective agent for controlling foot rot disease. The growth of *B. velezensis* RS15-1 was optimized in terms of pH, temperature, and carbon source. The optimal growth conditions for *B. velezensis* RS15-1 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract. The optimal growth conditions for *B. velezensis* RS15-1 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract.

**Materials**  
Multi-Hosts Microbes in agriculture

**Results**  
Figure 1. Growth optimization of *B. velezensis* RS15-1. (a) pH, (b) Temperature, (c) Carbon source.

**Conclusion**  
The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470001) and the Key Research and Development Project of Shandong Province (Grant No. 2019YFD0800100).

### Potential use of *Trichoderma asperellum* CMML20-29 as a biocontrol agent against *Fusarium wilt* and black rot of sweet potato

**Abstract**  
Sweet potato is a major food crop in the world. *Fusarium wilt* and black rot are the most important diseases of sweet potato. *Trichoderma asperellum* CMML20-29 was isolated from sweet potato tubers and tested for its biocontrol activity against *Fusarium wilt* and black rot. The results showed that *T. asperellum* CMML20-29 has a strong biocontrol activity against *Fusarium wilt* and black rot. The optimal growth conditions for *T. asperellum* CMML20-29 were: pH 7.0, 25°C, and 10% sweet potato tuber extract.

**Materials & Methods**  
Growth optimization of *T. asperellum* CMML20-29. The optimal growth conditions for *T. asperellum* CMML20-29 were: pH 7.0, 25°C, and 10% sweet potato tuber extract.

**Results**  
Figure 1. Biocontrol activity of *T. asperellum* CMML20-29 against *Fusarium wilt* and black rot of sweet potato.

**Conclusion**  
The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470001) and the Key Research and Development Project of Shandong Province (Grant No. 2019YFD0800100).

### Antagonistic potential of *Beauveria* strain against fungal pathogens of sweet potato and potato

**Abstract**  
Sweet potato and potato are important food crops in the world. *Beauveria* strain was isolated from sweet potato tubers and tested for its antagonistic activity against *Fusarium wilt* and black rot. The results showed that *Beauveria* strain has a strong antagonistic activity against *Fusarium wilt* and black rot. The optimal growth conditions for *Beauveria* strain were: pH 7.0, 25°C, and 10% sweet potato tuber extract.

**Materials & Methods**  
Growth optimization of *Beauveria* strain. The optimal growth conditions for *Beauveria* strain were: pH 7.0, 25°C, and 10% sweet potato tuber extract.

**Results**  
Figure 1. Antagonistic activity of *Beauveria* strain against *Fusarium wilt* and black rot of sweet potato and potato.

**Conclusion**  
The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470001) and the Key Research and Development Project of Shandong Province (Grant No. 2019YFD0800100).

### Optimization of Antifungal Lipopeptide Production from *Bacillus thuringiensis* CMML 21-49

**Abstract**  
The study was aimed to optimize the lipopeptide production by *Bacillus thuringiensis* CMML 21-49 and evaluate its antifungal activity against *Trichoderma asperellum*. The results showed that the optimal growth conditions for *B. thuringiensis* CMML 21-49 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract. The optimal lipopeptide production conditions for *B. thuringiensis* CMML 21-49 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract.

**Materials & Methods**  
Lipopeptide production optimization. The optimal lipopeptide production conditions for *B. thuringiensis* CMML 21-49 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract.

**Results**  
Figure 1. Optimization of lipopeptide production from *B. thuringiensis* CMML 21-49.

**Conclusion**  
The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470001) and the Key Research and Development Project of Shandong Province (Grant No. 2019YFD0800100).

### Optimization of the Lipopeptide Production of *Bacillus velezensis* CMML 21-47 and Identification of Antifungal Metabolites

**Abstract**  
The study was aimed to optimize the lipopeptide production by *Bacillus velezensis* CMML 21-47 and identify its antifungal metabolites. The results showed that the optimal growth conditions for *B. velezensis* CMML 21-47 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract. The optimal lipopeptide production conditions for *B. velezensis* CMML 21-47 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract.

**Materials & Methods**  
Lipopeptide production optimization. The optimal lipopeptide production conditions for *B. velezensis* CMML 21-47 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract.

**Results**  
Figure 1. Optimization of lipopeptide production and identification of antifungal metabolites from *B. velezensis* CMML 21-47.

**Conclusion**  
The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470001) and the Key Research and Development Project of Shandong Province (Grant No. 2019YFD0800100).

### Trichoderma asperellum CMML20-29, a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato

**Abstract**  
Sweet potato is a major food crop in the world. *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata* are the most important diseases of sweet potato. *Trichoderma asperellum* CMML20-29 was isolated from sweet potato tubers and tested for its biocontrol activity against *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata*. The results showed that *T. asperellum* CMML20-29 has a strong biocontrol activity against *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata*. The optimal growth conditions for *T. asperellum* CMML20-29 were: pH 7.0, 25°C, and 10% sweet potato tuber extract.

**Materials & Methods**  
Growth optimization of *T. asperellum* CMML20-29. The optimal growth conditions for *T. asperellum* CMML20-29 were: pH 7.0, 25°C, and 10% sweet potato tuber extract.

**Results**  
Figure 1. Biocontrol activity of *T. asperellum* CMML20-29 against *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato.

**Conclusion**  
The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470001) and the Key Research and Development Project of Shandong Province (Grant No. 2019YFD0800100).

### Characterization of Antifungal Lipopeptide Produced by *Bacillus thuringiensis* CMML 21-47

**Abstract**  
The study was aimed to characterize the antifungal lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMML 21-47. The results showed that the optimal growth conditions for *B. thuringiensis* CMML 21-47 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract. The optimal lipopeptide production conditions for *B. thuringiensis* CMML 21-47 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract.

**Materials & Methods**  
Lipopeptide production optimization. The optimal lipopeptide production conditions for *B. thuringiensis* CMML 21-47 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract.

**Results**  
Figure 1. Characterization of antifungal lipopeptide produced by *B. thuringiensis* CMML 21-47.

**Conclusion**  
The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470001) and the Key Research and Development Project of Shandong Province (Grant No. 2019YFD0800100).

### Antifungal Activity and Identification of Lipopeptide from *Bacillus thuringiensis* CMML 21-47

**Abstract**  
The study was aimed to evaluate the antifungal activity and identify the lipopeptide from *Bacillus thuringiensis* CMML 21-47. The results showed that the optimal growth conditions for *B. thuringiensis* CMML 21-47 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract. The optimal lipopeptide production conditions for *B. thuringiensis* CMML 21-47 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract.

**Materials & Methods**  
Lipopeptide production optimization. The optimal lipopeptide production conditions for *B. thuringiensis* CMML 21-47 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract.

**Results**  
Figure 1. Antifungal activity and identification of lipopeptide from *B. thuringiensis* CMML 21-47.

**Conclusion**  
The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470001) and the Key Research and Development Project of Shandong Province (Grant No. 2019YFD0800100).

### *Trichoderma asperellum* CMML20-29, a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato

**Abstract**  
Sweet potato is a major food crop in the world. *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata* are the most important diseases of sweet potato. *Trichoderma asperellum* CMML20-29 was isolated from sweet potato tubers and tested for its biocontrol activity against *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata*. The results showed that *T. asperellum* CMML20-29 has a strong biocontrol activity against *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata*. The optimal growth conditions for *T. asperellum* CMML20-29 were: pH 7.0, 25°C, and 10% sweet potato tuber extract.

**Materials & Methods**  
Growth optimization of *T. asperellum* CMML20-29. The optimal growth conditions for *T. asperellum* CMML20-29 were: pH 7.0, 25°C, and 10% sweet potato tuber extract.

**Results**  
Figure 1. Biocontrol activity of *T. asperellum* CMML20-29 against *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato.

**Conclusion**  
The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470001) and the Key Research and Development Project of Shandong Province (Grant No. 2019YFD0800100).

### Control of Fungal Diseases of Sweet Potato Caused by *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata* with a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus thuringiensis* CMML 20-18

**Abstract**  
Sweet potato is a major food crop in the world. *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata* are the most important diseases of sweet potato. *Bacillus thuringiensis* CMML 20-18 was isolated from sweet potato tubers and tested for its biocontrol activity against *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata*. The results showed that *B. thuringiensis* CMML 20-18 has a strong biocontrol activity against *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata*. The optimal growth conditions for *B. thuringiensis* CMML 20-18 were: pH 7.0, 25°C, and 10% sweet potato tuber extract.

**Materials & Methods**  
Growth optimization of *B. thuringiensis* CMML 20-18. The optimal growth conditions for *B. thuringiensis* CMML 20-18 were: pH 7.0, 25°C, and 10% sweet potato tuber extract.

**Results**  
Figure 1. Biocontrol activity of *B. thuringiensis* CMML 20-18 against *Fusarium oxysporum* and *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato.

**Conclusion**  
The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470001) and the Key Research and Development Project of Shandong Province (Grant No. 2019YFD0800100).

### Characterization of Antifungal Metabolites Produced by *Bacillus thuringiensis* CMML 21-47

**Abstract**  
The study was aimed to characterize the antifungal metabolites produced by *Bacillus thuringiensis* CMML 21-47. The results showed that the optimal growth conditions for *B. thuringiensis* CMML 21-47 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract. The optimal lipopeptide production conditions for *B. thuringiensis* CMML 21-47 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract.

**Materials & Methods**  
Lipopeptide production optimization. The optimal lipopeptide production conditions for *B. thuringiensis* CMML 21-47 were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract.

**Results**  
Figure 1. Characterization of antifungal metabolites produced by *B. thuringiensis* CMML 21-47.

**Conclusion**  
The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470001) and the Key Research and Development Project of Shandong Province (Grant No. 2019YFD0800100).

### A Comparative Analysis of Antifungal Effect From Different Lipopeptide of *Enterobacter agglomerans* and *Enterobacter agglomerans* CMML 11-49

**Abstract**  
The study was aimed to compare the antifungal effect of different lipopeptides from *Enterobacter agglomerans* and *Enterobacter agglomerans* CMML 11-49. The results showed that the optimal growth conditions for *Enterobacter agglomerans* were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract. The optimal lipopeptide production conditions for *Enterobacter agglomerans* were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract.

**Materials & Methods**  
Lipopeptide production optimization. The optimal lipopeptide production conditions for *Enterobacter agglomerans* were: pH 7.0, 25°C, and 10% potato tuber extract.

**Results**  
Figure 1. Comparative analysis of antifungal effect from different lipopeptides of *Enterobacter agglomerans* and *Enterobacter agglomerans* CMML 11-49.

**Conclusion**  
The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470001) and the Key Research and Development Project of Shandong Province (Grant No. 2019YFD0800100).

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Bacillus velezensis</i> CMML 21-47	KCTC19037P	한국생명공학연구원 생물자원센터	2022
2	<i>Bacillus thuringiensis</i> CMML 21-49	KCTC19038P	한국생명공학연구원 생물자원센터	2022

특허미생물 기탁증	특허미생물 기탁증
2022년 10월 25일	2022년 10월 25일
김현숙 귀하	김현숙 귀하
서울특별시 마포구 마포대로 196	서울특별시 마포구 마포대로 196
2022년 10월 12일 제 8167호 귀하가 보관 기탁 신청한	2022년 10월 12일 제 8168호 귀하가 보관 기탁 신청한
특허미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 기탁번호를 통지합니다.	특허미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 기탁번호를 통지합니다.
- 다 음 -	- 다 음 -
1. 미생물 기탁번호 : KCTC19037P	1. 미생물 기탁번호 : KCTC19038P
2. 미생물의 명칭 : <i>Bacillus velezensis</i> CMML 21-47	2. 미생물의 명칭 : <i>Bacillus thuringiensis</i> CMML 21-49
한국생명공학연구원 생물자원센터장 (인)	한국생명공학연구원 생물자원센터장 (인)

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원번호	등록번호	등록인	등록일	등록번호		
1	신규 미생물 바실러스 벨레젠시스 CMML21-47, 바실러스 투린기엔시스 CMML21-49 균주 또는 이를 함유하는 미생물 제제	대한민국	김현숙	2022.11.15	10-2022-0152626					100	√
2	신규 미생물 바실러스 벨레젠시스 CMML 21-47 또는 이를 함유하는 미생물 제제	대한민국	김현숙				김현숙	2023.08.31	10-2574692	100	√
2	바실러스 벨레젠시스 CMML 21-47 균주 배양용 배지 및 이를 이용한 배양방법	대한민국	(재)농축산용미생물산업육성지원센터	2023.10.05	제10-2023-0132479호					100	√

<p style="text-align: center;">관인생략</p> <p style="text-align: center;"><b>출원번호통지서</b></p> <p>출원일자 2022.11.15  특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(0465)  출원번호 10-2022-0152626 (접수번호 1-1-2022-1215031-78)  (DAS접근코드8403)  출원인성명 김현숙(4-2018-033751-3)  대리인성명 특허법인오임(9-2018-100021-5)  발명자성명 김현숙 상현규 이주경 안귀환 윤영석  발명의명칭 신규 미생물 바실러스 벨레렌시스 CMML21-47, 바실러스 투린기엔시스 CMML21-49 균주 또는 이를 함유하는 미생물 제제</p> <p style="text-align: center;"><b>특 허 청 장</b></p> <p style="text-align: center;">&lt;&lt; 안내 &gt;&gt;</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.  2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.  ※ 납부자번호: 0131(기러코드) + 접수번호  3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 (특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서)를 제출하여야 출원 이의의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.  ※ 심사제도 안내: <a href="https://www.kipo.go.kr">https://www.kipo.go.kr</a> 지식재산제도</p> </div>	 <p style="text-align: center;"><b>특허증</b> CERTIFICATE OF PATENT</p> <p>특허 제 10-2574692 호  Patent Number</p> <p>출원번호 10-2022-0152626 호  Application Number</p> <p>출원일 2022년 11월 15일  Filing Date</p> <p>등록일 2023년 08월 31일  Registration Date</p> <p>발명의 명칭 Title of the Invention  신규 미생물 바실러스 벨레렌시스 CMML21-47 또는 이를 함유하는 미생물 제제</p> <p>특허권자 Patentees  김현숙(710827-*****)  서울특별시 마포구 월드컵로1길 14, 102동 1101호 (합정동, 마포한강푸르지오)</p> <p>발명자 Inventor  김현숙(710827-*****)  서울특별시 마포구 월드컵로1길 14, 102동 1101호 (합정동, 마포한강푸르지오)</p> <p>위의 발명은 「특허법」에 따라 특허원부에 등록되었음을 증명합니다.  This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.</p> <p style="text-align: right;">2024년 05월 03일  <b>특허청장</b>  COMMISSIONER,  KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE</p> 
<p style="text-align: center;">관인생략</p> <p style="text-align: center;"><b>출원번호통지서</b></p> <p>출원일자 2023.10.05  특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P230048KR)  출원번호 10-2023-0132479 (접수번호 1-1-2023-1092844-18)  (DAS접근코드4D7D)  출원인명칭 재단법인 농축산용미생물산업육성지원센터(1-2018-054922-7)  대리인성명 강현욱(9-2014-001358-6)  발명자성명 윤영석 류소정 안귀환 상현규 이주경  발명의명칭 바실러스 벨레렌시스 CMML21-47 균주 배양용 배지 및 이를 이용한 배양방법</p> <p style="text-align: center;"><b>특 허 청 장</b></p> <p style="text-align: center;">&lt;&lt; 안내 &gt;&gt;</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.  2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.  ※ 납부자번호: 0131(기러코드) + 접수번호  3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 (특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서)를 제출하여야 출원 이의의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.  ※ 심사제도 안내: <a href="https://www.kipo.go.kr">https://www.kipo.go.kr</a> 지식재산제도</p> </div>	<p style="text-align: center;"><b>특허 출원 증빙</b></p>
<p style="text-align: center;"><b>특허 출원 증빙</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>등록 특허 증빙</b></p>

○ 지식재산권 활용 유형

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√									

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	서류작물병 방제 미생물 제제	22.06.30	(재)농축산용 미생물산업육성지원센터		서류작물 병해 방제			
2	포테토킹	23.04.28	(재)농축산용 미생물산업육성지원센터		감자, 고구마 주요병방제용 친환경 혼합 미생물제제			

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과 제 명	혼합 미생물군 기반 서류작물병 방제 신규 소재 및 제품 개발 연구개발			
주관연구기관	(재)농축산용미생물산업육성지원센터	참여기관	전남대학교, 보란파마	
연구책임자	한귀환	연구기간	21년 04월 ~ 23년12월 (총 2년 9개월)	
총 정부출연금	990,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	( ○ )	기존 제품 공정개선	( )	
신제품(제품출시 완료)	( )	기 타	( )	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
서류작물병 방제 미생물 제제		감자, 고구마 주요 병 방제용 친환경 혼합미생물제제	22.06.30	100
상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.				

2022년 10월 27일  
연구책임자 : 한 귀 환 (서명 또는 인)

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과 제 명	혼합 미생물군 기반 서류작물병 방제 신규 소재 및 제품 개발 연구개발			
주관연구기관	(재)농축산용미생물산업육성지원센터	참여기관	전남대학교, 보란파마	
연구책임자	한귀환	연구기간	21년 04월 ~ 23년12월 (총 2년 9개월)	
총 정부출연금	990,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	( ○ )	기존 제품 공정개선	( )	
신제품(제품출시 완료)	( )	기 타	( )	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
포테토킹		감자, 고구마 주요 병 방제용 친환경 혼합미생물제제	23.04.28	100
상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.				

2023년 05월 10일  
연구책임자 : 한 귀 환 (서명 또는 인)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
	노하우	감자, 고구마 등 서류작물의 식물병 방제를 위한 미생물제제	보란파마	2023.04.28	-	-

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
	자기실시	신제품 개발	국내	감자, 고구마 등 서류작물의 식물병 방제를 위한 미생물제제	연구개발 성과물의 제품화	보란파마	-	-	-	-

\* 1) 기술이전 또는 자기실시  
\* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등  
\* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내 국외			
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
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	
1	연구개발사업	(재)농축산용미생물 산업육성지원센터	3	8	11
2	연구개발사업	보란파마		2	2
합계			3	10	13

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

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

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	박람회	2022년 국제 바이러스·박테리아 산업박람회	서유작용물병 방제 미생물 제제 홍보	22.07.18
2	박람회	2022년 국제 바이러스·박테리아 산업박람회	서유작용물병 방제 미생물 제제 홍보	22.07.18

2020년, 제1회 서울전시회 기획공모전 최종 선정작

# 2022 ViBac

Int'l Virus & Bacteria Industry Expo 연진박

국제 바이러스·박테리아 산업 박람회  
Int'l Virus & Bacteria Industry Expo

• 특별전 : 국제 마이크로바이옴 산업 박람회  
Int'l Microbiome Industry Expo

2022. 7. 18(화)~19(수) | COEX

## 세계 최초로 대한민국에서 열립니다.

대한민국이 바이러스, 박테리아산업의  
중심이 될 것입니다.

※ 행사개회 : 국제마이크로바이옴 심포지엄, 개막연간 박람회 개막식



MAKERS, ROECO, THEWISE, SEOUL U, KINH, KIPMA, KAEDI



## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
□ 서류작물(고구마, 감자) 주요 질병 제어용 유용미생물 선발 및 개선	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 서류(감자, 고구마) 주요 작물병에 대한 길항미생물을 선발함</li> <li>□ 16S rRNA(세균), ITS(진균) 분석으로 선발 미생물의 동정하고 선발함</li> </ul>	100
□ 혼합미생물의 작용점 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 병방제 메커니즘 분석을 위한 형질전환법 개발 및 HPLC를 이용한 항균활성 물질을 분석함</li> <li>□ 기 확보된 서류작물병 제어 미생물의 효능검증 및 특성분석을 위한 대치배양 및 병억제력을 평가함</li> <li>□ 기 확보된 서류작물 병방제 미생물의 현장적용 평가를 수행함</li> <li>□ 선발된 유용 미생물의 항균력 검증 및 IAA 생성능, 효소활성 확인</li> </ul>	100
□ 혼합미생물의 최적 억제 효과 및 환경 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ UPLC-QTOF-MS 분석을 통한 유효활성 물질 규명 SAR, ISR 관련 유전자 발현 확인</li> <li>□ 주요 영양원 조건을 매개변수로 평가하여 최적 배지를 개발함</li> <li>□ 다양한 환경요인을 매개변수로 평가하여 배양조건을 최적화함</li> <li>□ 포자유무, 항균물질 함량을 토대로 혼합미생물제제의 균주 및 조합비를 설정함</li> <li>□ 선발된 서류작물병 방제미생물의 현장적용 평가를 실시함</li> <li>□ 서류작물병 방제미생물의 독성시험 및 환경영향 평가</li> </ul>	100
□ 혼합미생물제제의 제품화	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 혼합미생물제제 최적조합 구성 및 합제기술 개발완료</li> <li>□ 미생물제제 대량생산 공정 및 제형기술개발 완료</li> <li>□ 시제품의 현장 적용 및 사용 매뉴얼 제작·보급</li> </ul>	95
□ 현장적용 및 사업화 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 제품등록, 마케팅 전략 수립 및 사업화 계획 수립</li> </ul>	100

---

## 4. 목표 미달 시 원인분석

### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

- 연구팀은 과제 수행 1단계 1차년에 감자, 고구마 등 서류작물 병방제를 위하여 병원균을 효과적으로 제어 할 수 있는 우수 길항 미생물 총 6종(순수 분리 미생물 총 372종 중 진균 3종, 세균 3종)을 발굴하였고, 대량배양 공정 확립 과정에서 제품화 가능성 및 사업성 측면을 충분히 고려하여, *Bacillus velezensis* CMML21-47 균주와 *Bacillus amyloliquefaciens* CMML 21-49 균주를 주성분으로 하는 미생물제제 개발을 완료함
- 개발된 제품은 최초 사용자 편의성을 고려하여 액상제로 제품 개발을 진행하였으나, 제품의 유통 및 보관 과정에서 발생될 수 있는 가혹조건(온도, 교반 등)에서 장기간 진행된 품질 안정성 시험 결과 유효 생균수가 감소하는 현상을 관찰함(1단계 2차년)
- 연구개발 제품의 안정적인 사업화와 친환경 농법 정착을 위하여 제품이 유통되는 1년 내지 2년 기간동안 유효 생균수 보장 될 수 있는 제형 개발 연구를 연이어 진행한 결과 분말형의 서류작물 병방제용 미생물제제 “포테토킹” 개발을 완료함
- “포테토킹”은 초기의 액상제보다 10배~100배 높은 생균수(백억마리~천억마리 미생물)를 포함하고, 적정 수화도가 고려된 제형으로 개발되어 작물 식재를 위한 종서(감자) 및 줄기(고구마)의 침지 및 분의처리는 물론 작기 중 관주 및 경엽처리가 용이한 제품임
- 현재, 유기농업자재 공시를 위해 요구되는 이화학분석, 약해 분석, 인축 및 환경독성 평가 보고서를 확보하였으나, 작물의 작기에 대한 확고한 규정을 적용하여 약효 분석을 진행 중임
- 안전한 먹거리 확보를 위한 미래지향적 관점에서 주요 식물병 방제를 위한 미생물제제 개발 연구는 농가 현장에 굳혀진 생물제제에 대한 부정적 시선을 불식하기 위한 접근이 필연적으로 요구되며, 이를 위한 우수한 방제 효능의 강건성있는 미생물제제의 개발은 장기적으로 안정적인 사업화 기틀 마련을 담보하여 생물제제 개발 연구의 최종 목표라고 할 수 있음
- 본 연구팀은 계획된 연구 목표를 달성을 위하여 성실히 연구를 수행하였으나, 연구 수행중 시제품의 간과할 수 없는 단점을 발견하였으며 완성도 높은 제품 개발을 위하여 집중력 있는 연구를 수행한 결과 서류작물에 치명적인 토양 내 병원균 제어에 효과적이면서 제품 활용도가 향상된 제형을 개발함
- 최종 약효 시험 결과를 확보한 후 미달성 목표인 기술인증 및 매출이 발생될 것으로 사료되며 과제 종료 후 1년 차 이내 달성 가능한 성과임

---

### 2) 자체 보완활동

---

- 서류작물 병 방제용 혼합미생물제제 “포테토킹”의 제품화 및 사업화를 위한 자체 보완 활동으로 제품에 적용된 균주의 기탁(KTCC, 한국생명공학연구원 생물자원센터)을 완료함
  - 이와 더불어, “포테토킹”의 주성분 균주에 대한 특허 출원 및 등록을 연구기간 내 완료함에 따라 원천성을 보유함
-

---

### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

- 감자 검은무늬썩음병과 균핵병, 고구마 덩굴썩김병과 검은무늬병 등 서류작물 주요 식물병의 병 방제를 위한 우수 길항 미생물 발굴 및 효능 검증 완료
  - 선발된 우수 길항미생물의 병방제 메커니즘 및 특성 분석 완료
  - 유효활성 물질 규명 및 유도저항성 분석 완료
  - 우수 길항미생물이 적용된 미생물제제 시제품의 실적용 및 방제 효능 검증 및 특성 분석
  - 선발된 우수 길항미생물 전용의 경제적 산업배지 및 고농도 대량배양 공정 개발
  - 2종 이상 우수 길항미생물이 적용된 혼합미생물제제 최적 조합 구성 및 합제 기술 개발
  - 서류작물 병방제용 혼합미생물제제 "포테토킹" 개발 및 특허 등록
  - 친환경 제품 인증을 위한 서류작물 병 방제용 혼합미생물제제의 이화학분석(병원성미생물, 잔류농약 등), 인축독성 및 환경영향(꿀벌, 담수어류) 평가 완료(공인 인증기관 성적서)
  - 농가 상황을 고려한 현장 활용 맞춤형 혼합미생물제제 확립 및 사용 매뉴얼 제작
  - 혼합미생물제제의 사용자 매뉴얼 보급 및 교육(지속 진행 중)
  - 연구개발 제품 "포테토킹"의 품질관리 표준화 시스템 확립
  - 서류작물병 방제용 혼합미생물제제의 사업화 시스템 개발 및 수행
  - 최종 정량 성과  
SCI논문 3건, 특허출원 1건, 특허등록 2건, 학술대회 11건, 제품화 1건, 고용창출 13명, 생명자원 기탁 2건, 홍보실적 2건
-

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 유용미생물/대사산물 발굴 및 기능 구명으로 국내자원 보존 및 우수자원 산업화를 통한 다양한 종류의 유용미생물 및 활성 대사산물을 함유한 단일 또는 혼합제제 기술개발 촉진에 기여
- 기능성 미생물제제의 방제 및 활성 기작 구명을 통한 효과적인 방제 방법을 통한 화학 농약 사용량 저감으로 농업 환경 개선에 기여 및 친환경, 고부가가치/선도 농업 창출을 통한 동종업계 산업 발전의 토대 마련
- 대량배양 및 제형화 기술 개발을 통한 유용미생물제제의 실용화 시스템 개발로 미생물 산업화 기술에 대한 통찰력 제공
- 무분별한 합성농약 대체물질 사용을 통한 친환경적 관리체계 구축으로 농업 생태계 보호
- 국민소득 향상과 더불어 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 식품(농산물)의 선택 기준이 양적 만족보다는 신선하고, 안전한 식품을 우선적으로 고려하는 소비심리가 증가하고 있는 실정임을 고려할 때, 미생물을 활용한 오염된 토양 및 하수 등의 무독화 처리 기술은 1차, 2차 산업 발전에 기여함과 동시에 국민의 안전한 먹거리 창출을 통한 국민 건강 증진에 기여

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명	기관명	유형	총 연구개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술기여도	
								산정 근거	비율
혼합 미생물 기반 서류작물병 방제 신규 소재 및 제품 개발	혼합 미생물 기반 서류작물병 방제 신규 소재 및 제품 개발	(재)농축산용미생물 산업육성 지원센터	재단법인 (비영리)	523	523	100.0	신규 기술개발	해없음	-
	서류작물 병제어 혼합미생물 효능 연구 및 특성화	전남대학교 산학협력단	대학 (비영리)	327	327	100.0	신규 기술개발	해없음	-
	서류작물 병제어 혼합미생물 현장적용 및 제품화	보란파마	중소기업 (영리)	188	140	74.46	기존 공정개선 및 제품화	①-①	74.47
<b>계</b>				<b>1,038</b>	<b>990</b>	<b>95.37</b>	-	-	-

## 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				
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사					
사업화	시제품개발					
	상품출시					
	기술이전					
	공정개발					
	매출액(단위 : 천원)	50,000	50,000			
	기술료(단위 : 천원)					
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

### < 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 공통 요구자료	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 연구부정행위 예방 확인서
2.	1)
	2)

## 연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오	
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	V		
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	V		
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V		
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V		
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V		
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V		
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	V		
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	V		
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	V		
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	V		
	부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	V	
		12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	V	
13		저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	V		
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	V		
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	V		
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	V		

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2023 . 12 . 20 .

기관명 : (재)농축산용미생물산업육성지원센터

점검자 : 한 귀 환

농림식품기술기획평가원장 귀하

## 연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	V	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	V	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	V	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	V	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	V	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	V	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	V	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	V	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	V	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	V	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	V	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	V	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2023 . 12 . 20 .

기관명 : 전남대학교 산학협력단

점검자 : 상 현 규 

농림식품기술기획평가원장 귀하

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 중질지(80g/m<sup>2</sup>)]

## 연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	<input type="radio"/>	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	<input type="radio"/>	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	<input type="radio"/>	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	<input type="radio"/>	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	<input type="radio"/>	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2023 . 12 . 20 .

기관명 : 보란파마

점검자 : 김현숙

(서명)

**농림식품기술기획평가원장 귀하**

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 중질지(80g/m<sup>2</sup>)]

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 작물바이러스 및 병해충 대응 사업화 기술개발사업 혼합 미생물군 기반 서류 작물병 방제 신규 소재 및 제품개발 과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 작물바이러스 및 병해충 대응 사업화 기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.