

RS-2021
-IP32110
3

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

발간등록번호

11-1543000-004631-01

국내 토양 미생물 대사체 기반 내성 흰가루병 방제제 개발

2024.06.12

주관연구기관 / 전북대학교 산학협력단
공동연구기관 / 한경대학교 산학협력단
공동연구기관 / (주)케이글로벌

2024

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 토양 미생물 대사체 기반 내성 흰가루병 방제제 개발”(개발기간 : 2021. 04. 01 ~ 2023. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 06. 12.

주관연구기관명 : 전북대학교 산학협력단
공동연구기관명 : 한경국립대학교 산학협력단
공동연구기관명 : (주)케이글로벌
위탁연구기관명 : (사)한국농자재시험연구기관협회

손 정 민 (인)
윤 덕 훈 (인)
강 대 선 (인)
이 광 하 (인)



주관연구책임자 : 윤 봉 식
공동연구책임자 : 강 희 완
공동연구책임자 : 강 대 선
위탁연구책임자 : 이 상 업

국가연구개발혁신법 제17조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서						보안등급				
						일반[0], 보안[]				
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	작물 바이러스 및 병해충 대응 산업화 기술개발					
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)	방제기술개발					
광고번호	제농축2021-55호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
				연구개발과제번호		321103-3				
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0304	50%	LB0401	30%	LB0404	20%			
	농림식품과학기술분류	RA0303	40%	RA0304	40%	RA0305	20%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	국내 토양 미생물 대사체 기반 내성 흰가루병 방제제 개발								
	영문	Development of control agent for powdery mildew using metabolites of native soil-borne microorganisms								
연구개발과제명	국문	국내 토양 미생물 대사체 기반 내성 흰가루병 방제제 개발								
	영문	Development of control agent for powdery mildew using metabolites of native soil-borne microorganisms								
주관연구개발기관	기관명	전북대학교 산학협력단		사업자등록번호	402-82-15272					
	주소			법인등록번호	210171-0005625					
연구책임자	성명		윤봉식		직위		교수			
	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)							
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계	연구책임 외 지원금	
		현금	현물	지방자치단체 기타()	현금	현물	현금			현물
총계	715,000	1,900	48,400					716,900	48,400	765,300
1단계	1년차	195,000	-	14,000				195,000	14,000	209,000
	2년차	260,000	-	17,500				260,000	17,500	277,500
2단계	1년차	260,000	1,900	16,900				261,900	16,900	278,800
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고		역할	기관유형	
공동연구개발기관	한경대산단	강희완	교수			공동	대학			
	케이글로벌	강대선	대표			수요	중소기업			
위탁연구개발기관	(사)한국농 자재시험연 구기관협회	이상엽	본부장			위탁	기타			
연구개발담당자 실무담당자	성명				직위					
	연락처	직장전화				휴대전화				
		전자우편				국가연구자번호				

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

2024년 02월 28일

연구책임자: 윤 봉 식

주관연구개발기관의 장: 전북대학교 산학협력단장(직인)
 공동연구개발기관의 장: 한경국립대학교 산학협력단장(직인)
 공동연구개발기관의 장: 케이글로벌대표(직인)
 위탁연구개발기관의 장: (사) 한국농자재시험연구기관협회(직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)	방제기술개발			연구개발과제번호			321103-3
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0304	50%	LB0401	30%	LB0404	20%
	농림식품 과학기술분류	RA0303	40%	RA0304	40%	RA0305	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국내 토양 미생물 대사체 기반 내성 흰가루병 방제제 개발						
연구개발과제명	국내 토양 미생물 대사체 기반 내성 흰가루병 방제제 개발						
전체 연구개발기간	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)						
총 연구개발비	총 765,300천원 (정부지원연구개발비: 715,000천원, 기관부담연구개발비 : 50,300천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[O] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(3단계) 종료시점 목표(8단계)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							

연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<p><시판되는 친환경 유기농자재의 문제점></p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 시판되는 유기농자재의 주요 문제점으로 검증되지 않은 미생물 활용과 현장에서의 낮은 활성 및 불안정성, 합성농약에 비하여 현저히 높은 가격 등이며, 이 같은 이유로 소비자로부터 하여금 친환경 유기농자재의 불신을 야기하고 있음. ▶ 따라서 정부의 다양한 지원책으로 국내 흰가루병 방제를 위해 등록된 농약만 약 280여개의 제품이 있으나 매년 많은 피해를 주고 있는 실정임. 따라서 안정한 효능을 바탕으로 믿을 수 있는 흰가루병 방제제의 개발이 시급한 실정임. <p><최종 목표 ⇒ <u>시판되는 유기농자재의 문제를 극복한 미생물 대사체기반 흰가루병 방제용 스타 유기농자재 개발</u>></p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 본 과제는 선행연구에 의하여 개발한 주원료 미생물 배양체에 부속버섯 수확 후 배지를 혼합한 독자기술제품을 개발하고자 하는 것임. 즉 흰가루병에 탁월한 활성을 지닌 미생물 대사체에 초점을 맞추어 효능을 혁신적으로 개선하고, 친환경 유기농자재의 문제점을 극복하여 시장요구도가 높은 star 제품을 개발하고자 하는 것임. ▶ 따라서 본 과제에서는 기존 제품과 차별화를 통하여 높은 시장 경쟁력을 갖춘 아래에 명시된 친환경 유기농자재 제품의 개발을 최종목표로 함. <ul style="list-style-type: none"> ◆ 내성 흰가루병에 탁월한 미생물 대사체에 초점을 맞추어 완전한 quality control 체계를 갖춘 유기농자재 개발 ◆ 활성성분 고생산을 위한 균주개량과 양산을 위한 배양조건 확립을 통하여 가격경쟁력을 갖춘 유기농자재 개발 ◆ 궁극적으로 시장에서 난립하고 있는 유기농자재의 단점을 극복한 시장요구도 및 소비자 만족도가 높은 복합형 차세대 스타 유기농자재 개발
-----------------	-------	--

<p>연구개발 목표 및 내용</p>	<p>전체 내용</p>		<p><1세부연구과제: 활성성분의 규명 및 QC 체계 확립></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 활성성분의 분리, 정제 및 화학구조 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 활성 화합물의 분리 및 정제 - Mass 분석 및 NMR 분석에 의한 화학구조 규명 - 물리화학적 특성 규명 ○ 활성성분을 이용한 Quality Control 체계 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 활성지표성분의 안정성 조사 - 활성지표성분 간편 분석을 위한 추출방법 개발 - HPLC를 활용한 정량적 활성지표성분 분석 방법 확립 ○ 미생물 대사체 증진을 위한 활성 미생물의 균주개발 <ul style="list-style-type: none"> - UV mutagenesis를 위한 조건 설정 - UV mutagenesis를 통한 활성물질 생산 최적화 균주 확보 <p><1협동연구과제: 유용 미생물의 방제효능 및 기전 분석></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 선행연구에 의하여 확보한 활성균주 및 개량균주의 방제 효능 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 활성균주 및 개량균주의 균주 특성 규명 - 공시균주 및 활성물질의 항균활성 및 약효검정 - 배양액과 부자재 혼합비율별 흰가루병 방제 효과 검정 - 배양액 및 물질의 처리시기별 흰가루병 억제 효과 검정 - 후보균주 및 물질의 주요 병원균에 대한 스펙트럼 검정 ○ 미생물 대사체 물질과 미생물제형 처리에 따른 식물면역 반응 유도효과 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 대사체 물질과 제형 처리에 따른 식물면역 반응 유도 효과 - 식물 병 저항성 유전자 발현유도 - 병 저항성 유도 페놀성분과 Salicylic acid 함량 측정 ○ 활성균주 및 개량균주의 포장 실증 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 선발균주 및 시제품의 오이흰가루병의 방제 효능 검정 - 식물 성장촉진 및 병저항성 조사에 의한 방제기구 구명 <p><2협동연구과제(참여기업): 흰가루병 방제 유기농자재 등록 및 산업화 연구></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 흰가루병 방제제 산업화 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 후보균주 및 물질과 WESMS, CSMS등 최적화 부재선발 및 혼합제제의 제형 개발 - 혼합제형의 원료의 특성 연구 - 혼합제형의 성분검사, 경시변화, 유효기간설정 연구 - 혼합제형의 제조공정 및 품질관리에 대한 연구 - 혼합제형의 주성분 검사, 미생물동정 및 균수검사, 보증 성분 ○ 생물검정 및 유기농자재 등록 <ul style="list-style-type: none"> - 혼합제형의 생육시험 및 약효 약해시험 - 혼합제형의 유해성분검사, 병원성미생물, 항생물질, 잔류농약 검사, 독성시험(인축독성, 환경독성) - 유기농업자재 등록
<p>연구개발 목표 및 내용</p>	<p>1단계</p>	<p>목표</p>	<p>미생물 활성 대사체의 분석 및 방제 효능 규명</p> <hr/> <p>내용</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 활성성분의 분리, 정제 및 화학구조 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 활성 화합물의 분리 및 정제 - Mass 분석 및 NMR 분석에 의한 화학구조 규명 ○ 미생물 대사체 증진을 위한 활성 미생물의 균주개발 <ul style="list-style-type: none"> - UV mutagenesis를 위한 조건 설정 - UV mutagenesis를 통한 활성물질 생산 최적화 균주 확보 ○ 활성균주 및 개량균주의 방제 효능 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 활성균주 및 개량균주의 균주 특성 규명 - 최적 활성물질 생산 mutant의 배양조건 확립 - 공시균주 및 활성물질의 항균활성 및 약효검정 - 배양액 및 물질의 처리시기별 흰가루병 억제 효과 검정 - 흰가루병 외 주요 병원균에 대한 방제 스펙트럼 검정

연구개발 목표 및 내용	2단계	목표	흰가루병 방제 유기농자재 기전 분석, 등록 및 산업화 연구
		내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활성성분을 이용한 Quality Control 체계 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 활성지표성분 간편 분석을 위한 추출방법 개발 - 활성성분 정량 분석과 이를 통한 시험법 확립 및 검증 ○ 돌연변이 균주 BSM-320의 식물면역 반응 유도효과 검증 <ul style="list-style-type: none"> - BSM-320 처리에 따른 식물면역 반응 유도 효과 검증 - 식물 병 저항성 유전자 발현 유도 검증 - 병 저항성 유도 페놀성분과 Salicylic acid 함량 측정 ○ 돌연변이 균주 BSM320-7의 활성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - BSM320-7 및 시제품의 오이흰가루병 방제 효능 검증 - 식물 병저항성 조사에 의한 방제기구 구명 ○ 흰가루병 방제제 산업화 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 최적화 부재선발 및 혼합제제의 제형 개발 - 혼합제형의 원료의 특성, 조성비, 물리성 연구 - 혼합제형의 성분검사, 경시변화, 유효기간설정 연구 - 혼합제형의 제조공정 및 품질관리에 대한 연구 - 주성분 검사, 미생물동정 및 균수검사, 보증성분 ○ 생물검정 및 유기농자재 등록 신청 <ul style="list-style-type: none"> - 혼합제형의 생육시험 및 약효 약해시험 - 혼합제형의 유해성분검사, 병원성미생물, 항생물질, 잔류농약 검사, 독성시험(인축독성, 환경독성) - 유기농업자재 등록 신청

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활성 증진을 위한 모균주 <i>Bacillus</i> sp. BS061의 UV-mutagenesis <ul style="list-style-type: none"> - UV-mutagenesis 조건을 확립: 포자수, UV 조사 시간 등을 확립함 - UV-mutant의 선발: 총 974균주 확보 및 glycerol stock에 보존함 - UV-mutant의 활성 검증: 흰가루병균은 순환물기생균으로 활성평가에 어려움이 있어 <i>R. solani</i>와 <i>Diaporthe</i>를 이용, 대치배양법으로 전균주 항균활성을 검증함 - 우수 균주의 선발: 생육상태, 항균활성 등을 토대로 BSM-189, BSM-216, BSM-320, BSM-398 등 4종을 1차적으로 선발함 ○ 모균주 <i>Bacillus</i> sp. BS061과 선발된 4종 돌연변이 균주의 lipopeptide 생성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - HPLC 분석을 통한 lipopeptide 계 화합물 iturin, fengycin을 확인함 - LC-ESI-Mass 분석을 통한 Iturin A1, Iturin A2, Iturin C3, Iturin A3/A4/A5, Iturin C2와 Fengycin C15, Fengycin C19의 생성을 확인함 - 선발한 4종 돌연변이 균주는 모두 fengycin과 surfactin을 생성함 - 돌연변이 균주 중 BSM-189를 제외하고는 모두 iturin을 생성하는 것으로 확인함 ○ 모균주 및 돌연변이 균주로부터 흰가루병 방제물질의 분리, 정제 및 화학구조 분석 <ul style="list-style-type: none"> - Diaion HP-20, Dowex-50, Cellulose, Sephadex LH-20 등을 이용한 column chromatography와 MPLC를 활용하여 흰가루병 방제물질 3종을 분리, 정제함 - NMR 및 ESI-mass 분석을 수행하여 흰가루병 방제물질 3종의 화학구조를 phenylalanine, tryptophan, lysine으로 규명하고, 주 효능성분이 lysine임을 밝힘 ○ 모균주 <i>Bacillus</i> sp. BS061과 선발된 돌연변이 균주의 흰가루병 억제활성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 원균주의 경우 87%의 흰가루병 방제가를 나타내었으나 선발한 BSM-320 균주는 90%, BSM-398 균주는 84%의 방제가를 나타냄 - 흰가루병 방제가 및 추가 mutation을 통하여 최종 산업화 균주 BSM320-7 선발 ○ 최종 선발 돌연변이 균주 BSM320-7를 이용한 활성성분의 분석 방법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 산업화 균주 BSM320-7의 배양액으로부터 활성성분 lysine의 분석 방법 확립 - 검량선 작성 및 활성성분 정량 분석과 이를 통한 시험법 확립 및 검증 ○ <i>Bacillus</i> sp. BS061 균주 및 BSM-320 균주의 특성 구명 및 항균활성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Bacillus</i> sp. BS061 균주의 유전학적 특성 구명: 16S rDNA 분석에 의한 원균주 <i>Bacillus</i> sp. BS061의 분류 및 동정을 수행함 - 주요 식물병원성 곰팡이에 대한 모균주 및 개량균주의 항균효과를 구명함 ○ 흰가루병 포자 발아 조건 확립 및 포자 발아 저해물질 신속검정시스템개발 <ul style="list-style-type: none"> - <i>In vitro</i> 오이 흰가루병 접종 및 발병조건 확립과 포자 발아 조건 확립 - 흰가루병 포자 발아 저해물질 신속검정시스템을 개발함
--------	--

- **표고 수확 후 배지 퇴비(LeCSMS) 물 추출물의 활용 및 특성 구명**
 - 표고 수확 후 배지 퇴비(LeCSMS) 물 추출물을 이용한 배양 검토: 단가측면에서 저렴하고 높은 활성을 확인함
 - 표고 수확 후 배지 퇴비(LeCSMS) 물 추출물의 이화학적 특성을 구명함
- **모균주 BS061과 개량균주 BSM-320의 오이 흰가루병 방제 효과**
 - Pot test를 통한 오이 흰가루병 방제효과를 검정한 결과 표고 수확 후 배지 퇴비 추출물에 배양하여 처리한 결과 65%(대조 농약 75%)의 방제효과를 나타냄
 - 후보균주 *Bacillus* sp. BS061의 1차 및 2차 활성도 평가: 오이 흰가루병의 만연과 강우량으로 인하여 정확한 결과를 확보하지 못함
 - Leaf disk를 이용한 방제효과를 구명한 결과 BSM-320 균주는 약 10%의 발병도를 나타내어 방제가가 우수한 것으로 나타남
- **표고버섯 수확 후 배지 퇴비 추출물을 이용한 BSM-320 균주의 배양 및 흰가루병 억제 효과 구명**
 - 표고버섯 수확 후 배지 퇴비 추출물에 다양한 탄소원을 첨가하며 BSM-320 균주를 배양한 결과 당밀과 Glucose 첨가 시 균 밀도가 가장 우수함
 - 이들 배양액의 흰가루병 방제효과를 구명한 결과 1% glucose 첨가 시 5%의 발병도를 나타내었으나 당밀 첨가 시에는 방제효과가 낮음
- **BSM-320 균주의 흰가루병균 포자발아 억제 효과 구명**
 - 표고버섯 수확 후 배지 퇴비 추출물을 이용하여 배양한 BSM-320 균주의 오이 흰가루병균 포자발아 억제율을 조사한 결과 포자 발아율이 26%로 현저히 감소함
 - 오이 흰가루병의 포자발아를 억제하여 항균활성을 나타냄을 확인함
- **돌연변이 균주 BSM-320 배양체의 병 저항성 유전자 발현 연구**
 - BABA 처리 시 오이 감염 잎과 정상 잎의 병 저항성 유전자 발현량을 qRT-PCR로 분석한 결과 *PAL*, *PR3*, *PR1*, *LOX1*, *LOX23*, *LecRK6.1*, *WRKY20* 및 *Cupi4*가 각각 2.7, 53.1, 25, 2.7, 2.8, 4.4, 0.6 및 21.6 배의 전사량이 증가함
 - BABA 처리 시 SA 함량을 LC-mass 분석법을 사용하여 측정한 결과, 2000과 5000 mg/L 농도에서 각각 3.84 ng/mL과 14.1 ng/mL으로 증가함.
 - BSM-320 배양액 처리 시 오이 잎에서 *CsLOX1*, *CsLOX23* 유전자 발현이 각 13.3배와 3.6배 증가되고, *LecRK6.1*은 8.01배, *WRKY20*은 7.07배 증가됨
 - BSM-320 배양액에 오이 병 저항성 유전자 발현을 유도하는 유효물질 존재 확인
- **오이 흰가루병 억제 물질 lysine의 식물 병 방제기전 구명**
 - 오이 흰가루병 억제 물질로 lysine, phenylalanine 및 tryptophan을 확인함
 - 특히 주요 활성성분이 lysine임을 확인하고 식물 병 방제기전을 구명함
 - Lysine 500, 2000, 5000 mg/L 처리시 흰가루병 발병도는 56%, 8%, 2%임
 - Lysine 500, 2000, 5000 mg/L 처리시 농도 의존적으로 salicylic acid 함량 증가
 - Lysine이 SA 의존적 신호전달에 의한 SAR 병 저항성을 유도함을 밝힘
- **BSM-320 배양액 처리에 의한 식물 성장촉진 효과**
 - BSM-320 배양액 처리는 식물성장 촉진효과가 있음을 확인함
 - 식물성장촉진은 영양성분 및 성장촉진 성분이 배양액에 존재하는 것으로 판단
 - 결론적으로 BSM-320는 오이 흰가루병 방제효과와 식물생육 촉진효과를 갖는 복합기능성 생물방제제로 활용 가능함을 확인함
- **돌연변이 균주 BSM-320의 배양**
 - 돌연변이 균주 BSM-320의 pilot 배양을 검토하기 위하여 참여기업인 케이글로벌에서 제작한 배양기에 배양함
 - Pilot 배양액을 유기농자재 분석기관에 의뢰하여 유전자 염기서열 상동성 검색을 통하여 균주를 재확인함
- **돌연변이 균주 BSM-320을 이용한 제형개발**
 - 버섯 수확 후 배지 추출액으로 배양된 BSM-320을 수확제 제형으로 제형화를 시도함. 수용성이 빠르고 잔유물이 남지 않고 좋은 결과를 나타냄
- **시제품 제작 및 병해관리용 유기농업자재 공시신청**
 - 시제품의 제조 및 생산계획 확립
 - 유기농업자재 원료의 특성 및 제조 조성비 확립
 - 제품공정도 및 작업표준서 연구 및 정립
 - 작업표준서 제작
 - 시제품의 검사성적서 발행 및 유기농업자재 공시서 확보

<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<p>- 연구개발결과의 기대성과 -</p> <p><기술적 측면></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 시판되는 유기농자재의 문제점을 극복한 환경친화형 복합 유기농자재 개발 ○ 친환경 미생물제제 공급을 통한 화학 합성농약의 대체기술 개발 ○ UV mutagenesis를 통한 안전한 활성을 지닌 미생물 확보 및 제제 개발 ○ 지적재산권 확보, 논문 투고 및 원천기술 개발을 통한 과학기술 경쟁력 제고 ○ 친환경 및 지속가능한 농업을 통한 농업생태계 보호 및 환경오염 방지 <p><경제적, 산업적 측면></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 수입대체 및 수출을 통한 국내 유기농자재 산업의 활성화 및 경제적 이익 ○ 안전한 고품질 농산물의 생산 및 공급을 통한 국민보건 향상 증진 ○ 친환경 유기농자재 개발을 통한 국내 바이오산업의 경제적 활성화 ○ 유기농자재의 수입대체 및 수출을 통한 국내 유기농자재 산업의 활성화 <p>- 상품화 및 사업화 활용을 통한 기대효과 -</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구에서는 미생물 활성 물질에 초점을 맞추어 안전한 활성과 재현성이 높은 제품을 개발하여 사업화함 ○ 특히 바실러스 균주가 흰가루병 방제를 위한 유기농자재로 다수 등록되어 있으나 본 연구에서 처음으로 활성물질을 lysine으로 규명함. 이는 lysine의 정량분석을 통하여 제품의 QC가 가능하게 되어 효능의 안정성이 보장된 제품을 확보하게 됨 ○ UV mutagenesis를 통하여 활성성분 고생산 균주를 확보하고 배양 방법의 최적화를 통하여 활성성분의 생산량 증가와 더불어 균밀도를 높여 궁극적으로 가격경쟁력을 갖춘 제품을 개발하여 상품화하게 됨 ○ 흰가루병의 발생 특성상 토양 잔류를 최대한 제어하여야 함. 따라서 토양 내 잔재하는 흰가루병균의 억제를 위하여 본 연구팀이 개발한 버섯 수확 후 배지 추출물을 활용하여 발병원을 제어하는 복합 농자재를 개발함 												
<p>연구개발성과의 비공개여부 및 사유</p>	<p>비공개과제 아님</p>												
<p>연구개발성과의 등록·기탁 건수</p>	<p>논문</p>	<p>특허</p>	<p>보고서 원문</p>	<p>연구 시설 ·장비</p>	<p>기술 요약 정보</p>	<p>소프트 웨어</p>	<p>표준</p>	<p>생명자원</p>		<p>화합물</p>	<p>신품종</p>		
	<p>4</p>	<p>1</p>						<p>생명 정보</p>	<p>생물 자원</p>		<p>정보</p>	<p>실물</p>	
<p>연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황</p>	<p>구입 기관</p>	<p>연구시설 ·장비명</p>	<p>규격 (모델명)</p>	<p>수량</p>	<p>구입 연월일</p>	<p>구입가격 (천원)</p>	<p>구입 처 (전화)</p>	<p>비고 (설치장소)</p>	<p>ZEUS 등록번호</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>흰가루병</p>		<p>토양 미생물</p>		<p>미생물 대사체</p>		<p>유기농자재</p>		<p>살균제</p>				
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Powdery mildew</p>		<p>Soil-microbes</p>		<p>Microbes- metabolome</p>		<p>Organic materials</p>		<p>Antifungal agent</p>				

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요-----	1
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용-----	3
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도-----	74
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)-----	83
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도-----	84
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획-----	85
별첨 자료 (참고 문헌 등)-----	86

1. 연구개발과제의 개요

- 식물병 방제는 살균제에 의존하고 있으며, 다량살포에 의한 약제 저항성균주와 변이 균주의 출현, 농약의 오·남용에 의한 잔류문제 등 안전성의 문제 제기에 따른 환경 친화적 새로운 방제제의 개발이 절실함.
- 친환경·웰빙 등 안전·안심 먹을거리에 대한 국민 수요 증대에 힘입어 친환경농산물 국내외적으로 유기농 등 친환경 농산물의 요구도가 빠르게 증대되고 있음.
- 따라서 친환경농업 실천이 가능하도록 안전하면서도 저비용의 고품질 친환경자재 보급 시스템 구축 필요성이 증대되고 있음.
- 일반적으로 미생물농약은 미생물이 생산하는 항균활성물질에 의존하여 추진되고 있으며, 환경 변화에 따라 효과가 다르게 나타나는 것이 큰 단점으로 나타남. 따라서 효능이 안전한 미생물제제의 개발은 여전히 요원한 상태임.
- 흰가루병(白粉病, Powdery mildew; *Sphaerotheca fusca*)은 자낭각의 형태로 병든 식물체의 잔재에서 겨울을 지내고 1차 전염원이 되며, 시설재배에서는 분생포자가 공기전염 되어 계속해서 발생함. 흰가루병은 일반적으로 17~25℃에서 많이 발생하며, 32℃ 이상의 고온에서는 병 발생이 억제됨.



◇ 병 명 : Powdery mildew
 ◇ 기 주 : 세계적으로 11,800여종
 국내에서는 400여종의
 식물에 발생
 ◇ 발병 적온 : 17~25 ℃

◇ 주요 피해 기주식물 :
 오이, 참외, 호박, 딸기, 토마토
 장미 등
 ◇ 발병원인 :
 일조량부족, 환기불량, 밀식재배
 질소비료 과용 등

- 국내 시설채소재배지에서 큰 피해를 일으키는 흰가루병은 시설 재배지에서 연작 재배로 인한 병원균 밀도가 증가하여 작물재배의 전생육시기에 발생할 수 있어 매우 방제가 시급한 식물병임.
- 비닐하우스나 온실에서 시설재배하는 작물이 흰가루병에 가장 취약하며 흰가루병 대상 작물은 박과류 및 가지과 작물뿐만 아니라 대부분의 작물에서 발병되며 국내 흰가루 방제를 위해 등록된 농약만 약 280여개의 제품에 이를 만큼 매년 큰 피해를 주고 있는 실정임.
- 특히 오이 흰가루병의 연작장애 피해의 실상은 매우 심각하며, 단지권내 재배 패턴을 보면 시설재배단지로서 작기가 끝난 후에 잔재물을 외부로 반출시킬 수가 없는 현실에서 관행적으로 시설 재배지 내에 그대로 갈아엎을 수밖에 없는 관행으로 인하여 토양 내 흰가루병을 포함한 잔재물이 그대로 토양 내 묻히고 그로 인한 재발병 피해가 매년 반복되는 경우임.

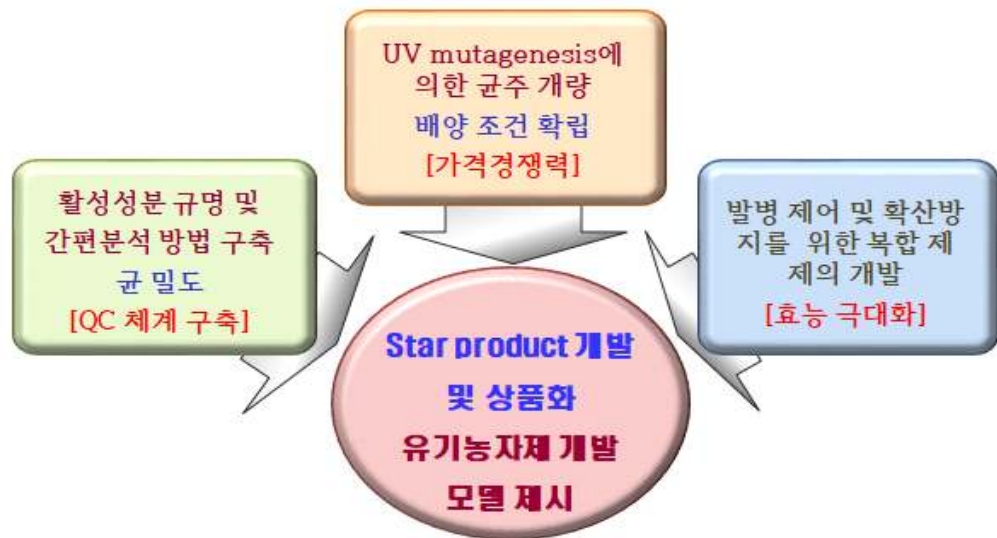
- 이같이 흰가루병의 심각성이 날로 커지고, 친환경농자재의 요구도 크게 증가하고 있으며, 특히 기존 화학농약의 사용량 감축에 따른 대안으로 친환경농자재를 포함한 다양한 친환경 제품에 대한 필요성이 날로 높아지고 있으나, 실용적인 제품 및 시장의 요구를 대변할 수 있는 제품의 출현은 여전히 요원한 실정임.

▶ **친환경 유기농자재의 문제점**

- 검증되지 않은 미생물제제의 난립
- 현장에서의 낮은 방제가 및 불안정한 효과
- 합성농약에 비하여 높은 가격

소비자들의 불신 및 기피 팽배
→ 그럼에도 불구하고 '친환경 농업육성 정책'을 위한 농약사용 억제 필요

▶ **문제 극복 방법**



- 또한, 현재 상용화되어 유통되고 있는 흰가루병 방제용 친환경 농자재는 병발현 이전에 대한 정보 부족과 활성성분, 활성기전을 간과한 채 단순히 미생물의 항균력과 균체수만을 내세워 판매되고 있음. 이로 인하여 살균제의 quality control에 한계를 나타내고 불안정한 활성으로 농가의 불신을 야기하고 있는 실정임.
- 따라서 본 과제에서는 기존 제품과 차별화를 통하여 높은 시장 경쟁력을 갖춘 제품을 개발하는 것이며, 이를 위하여 1) 미생물 대사체 유래 활성성분에 초점을 맞추어 완전한 quality control 체계를 갖춘 흰가루병 방제용 친환경 농자재, 2) 활성 대사체의 고생산을 위한 균주개량과 배양조건 확립을 통하여 가격경쟁력을 갖춘 흰가루병 방제용 친환경 농자재, 3) 시장에서 난립하고 있는 미생물제제의 단점을 극복한 시장요구도 및 소비자 만족도가 높은 복합형 차세대 유기농자재를 개발하고자 하는 것임.
- 본 과제는 본 연구팀이 선발한 흰가루병 방제효능이 뛰어난 자생 토양 미생물과 본 연구팀이 개발한 신소재인 버섯수확후배지추출물을 활용하여 발병원을 제어하는 흰가루병 방제용 복합 친환경 농자재를 과학적 접근법으로 개선하여 시장요구도가 높은 star 제품으로 개발하고자 하는 것임.
- 또한, 본 연구팀은 버섯수확 후 배지 추출물의 식물병 저항성 유도 및 식물생육촉진 효과에 대한 독보적 기술을 보유하고 있는 바 이를 흰가루병 방제 미생물과의 복합제제 개발에 활용하여 흰가루병 방제 활성뿐만 아니라 병저항성 유도 및 식물생육촉진 효과를 지닌 복합기능의 흰가루병 방제제를 개발하고자 함.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

[제1세부과제: 전북대학교 산학협력단]

<활성 증진을 위한 UV-mutagenesis>

▶ *Bacillus* sp. BS061 균주의 배양 및 stock 제조

BS061 균주를 Lysogeny broth (LB) 배지에 접종하여 배양함. 즉 1L 삼각플라스크에 LB 500 mL를 분주하여 121 °C에서 15분간 고압증기멸균을 실시하고 여기에 ampule에 보관중인 BS061을 접종하여 4일간 27 °C, 120 rpm으로 진탕배양함. 진탕배양이 끝난 배양액을 3000 rpm에서 15분간 centrifuge하여 상층액을 제거한 pellet에 30% glycerol 30 mL을 넣고 1 ml씩 stock vial에 옮겨담아 -80 °C에서 보관하여 mutagenesis에 활용함.

▶ UV-mutagenesis 조건 확립

- 희석배수 설정

BS061의 포자 stock을 멸균된 증류수를 이용하여 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 으로 순차적으로 희석하여 LB agar 배지에 각 200 μ l씩 도말한 뒤 27 °C에서 배양하며 발생한 colony의 수를 확인함. 각 실험은 3반복으로 수행하였으며, 희석 구간 중 colony 수가 500-1000개 정도로 발생하는 희석구간을 UV 조사 조건에 이용함.

- UV 조사 시간 설정

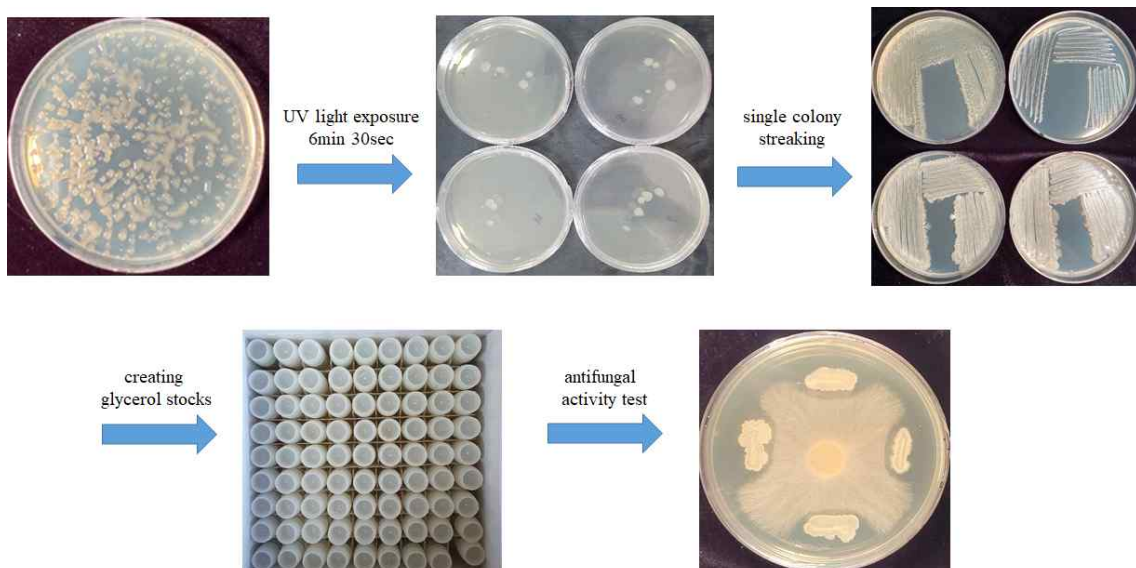
선발된 희석배수 조건을 이용하여 유리 petri-dish에 점적한 후, 문이 있는 UV box [(27 cm (W)×18 cm (H), 15 cm (D))]에 넣고, UV filtered lamp (vilber lourmat, 254 nm, French)를 이용하여 조사함. 3분-7분까지 UV를 조사하며 30초 간격으로 200 μ l 씩 취하여 LB agar 배지에 도말하고, 호일을 감싸 빛을 차단한 후 37 °C에 배양하여 colony의 발생 수를 관찰함. 각 실험은 3반복으로 수행하였으며, 0.1%-1%의 생존율을 나타내는 UV 조사시간을 설정함.

▶ UV-mutant의 선발

돌연변이 균주를 선발하기 위하여 빛이 들어가지 않는 UV box 안의 15 cm 높이에서 UV filtered lamp (vilber lourmat, 4W, France)를 이용하여 254 nm에서 조사함. UV 조사 후 18시간 후 생존한 균주를 백금으로 picking하여 LBA 배지에 옮겨 배양한 후 single colony를 분리하고, 30% glycerol stock을 만들어 -80 °C에서 보관하여 활성검정을 수행함.

▶ UV-mutant의 활성 검정

흰가루병균은 살아있는 식물체에서만 기생하는 순환물기생균으로 배양이 불가능하기 때문에 검정균은 배양이 용이한 식물병원균 *Rhizoctonia solani*와 *Diaporthe* sp.에 대하여 항균활성을 검정함. LBA배지에 멸균한 요지로 돌연변이 주를 접종하고, 가운데에 검정균을 놓아 3일간 27 °C에서 배양한 후 검정균의 성장억제능을 조사함.



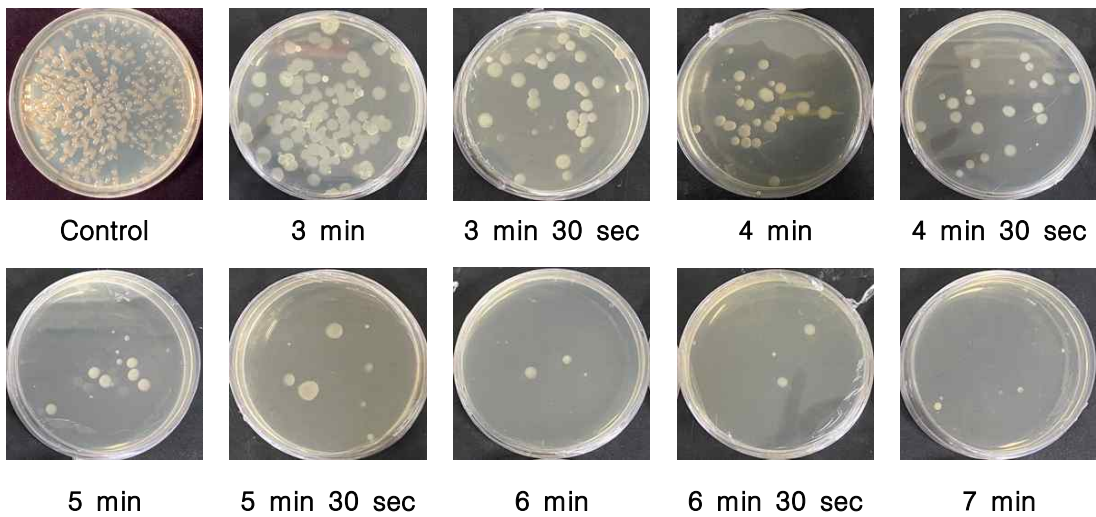
<*Bacillus* sp. BS061 균주의 활성 증진을 위한 UV-mutagenesis의 과정>

⇒ UV-mutagenesis 결과

▶ UV-mutagenesis를 위한 조건 확립

활성증대를 위한 UV-mutagenesis 조건을 확립한 결과 BS061 균주 stock 10^{-2} 200 μ l를 도말한 결과 약 500개의 colony를 확인함. 또한, UV 조사 시간을 설정한 결과 6분 30초를 조사한 경우 약 0.6% 정도의 survival rate를 나타냄.

UV light Exposure (min)	Number of colony appear	Survival rate (%)	UV light Exposure (min)	Number of colony appear	Survival rate (%)
0	500	100	5	12	2.4
3	95	19	5.5	11	2.2
3.5	54	10.8	6	5	1
4	27	5.4	6.5	3	0.6
4.5	25	5	7	2	0.4



<UV 조사시간에 따른 BS061 균주의 생존율>

▶ 돌연변이 균주 974 균주의 확보

돌연변이 균주를 확보하기 위하여 15 cm 높이에서 UV filtered lamp (vilber lourmat, 4W, France)를 이용하여 254 nm에서 6분 30초 동안 조사함. UV 조사 후 18시간 후 생존한 돌연변이 균주를 백금으로 picking하여 LB agar 배지에 옮겨 single colony를 분리하고, 30% glycerol stock을 만들어 -80°C 에서 보관함. 이를 반복 수행하여 1차년도 525균주, 2차년도 450균주를 확보하여 총 974 균주를 확보하고 BSM-1~BSM-974로 명명함.

▶ 선발한 돌연변이 균주의 항균활성 검정

분리한 돌연변이 균주를 대상으로 대치배양법을 이용하여 항균활성을 검정함. 검정균은 식물 병원균 *Rhizoctonia solani*와 *Diaporthe sp.*를 사용함. 총 525개의 균주 중 433개의 균주의 활성 정도를 형성된 clear zone의 형태에 따라 +++(강함), ++(보통), +(약함), -(없음)으로 나타냄. 아래의 그림과 표에 나타낸 바와 같이 다수의 균주가 모체보다 더 강한 항균활성을 나타내었고, 그 중에서도 BSM-153, BSM-189, BSM-216, BSM-320, BSM-398 균주가 뛰어난 항균활성 및 우수한 생육을 나타내는 것을 확인함.

<선발한 돌연변이 균주의 항균활성 검정 결과>

균주번호	<i>R. solani</i>	<i>Diaporthe</i>	균주번호	<i>R. solani</i>	<i>Diaporthe</i>	균주번호	<i>R. solani</i>	<i>Diaporthe</i>
wild type	++	+	BSM-1	+++	+	BSM-2	++	+
BSM-3	+	+	BSM-4	++	+	BSM-5	++	+
BSM-6	++	+	BSM-7	++	+	BSM-8	++	+

BSM-9	++	+	BSM-10	+	+	BSM-11	++	+
BSM-12	++	+	BSM-13	+++	+	BSM-14	++	+
BSM-15	++	+	BSM-16	++	+	BSM-17	++	+
BSM-18	+++	+	BSM-19	+	-	BSM-20	++	+
BSM-21	++	+	BSM-22	+++	+	BSM-23	+	+
BSM-24	-	-	BSM-25	+++	++	BSM-26	++	+
BSM-27	++	+	BSM-28	++	+	BSM-29	++	+
BSM-30	+	+	BSM-31	++	+	BSM-32	+++	+
BSM-33	++	++	BSM-34	++	+	BSM-35	++	++
BSM-36	+++	++	BSM-37	++	++	BSM-38	++	++
BSM-39	+++	++	BSM-40	++	++	BSM-41	++	+
BSM-42	++	+	BSM-43	+	+	BSM-44	++	++
BSM-45	++	+	BSM-46	++	+	BSM-47	-	+
BSM-48	++	+	BSM-49	++	+	BSM-50	++	+
BSM-51	++	+	BSM-52	+++	+	BSM-53	+++	+
BSM-54	++	+	BSM-55	++	+	BSM-56	-	-
BSM-57	++	+	BSM-58	++	+	BSM-59	+	+
BSM-60	++	+	BSM-61	+++	++	BSM-62	++	++
BSM-63	++	++	BSM-64	+	+	BSM-65	+	+
BSM-66	++	+	BSM-67	++	++	BSM-68	++	+
BSM-69	+++	++	BSM-70	++	+	BSM-71	++	+
BSM-72	+++	+	BSM-73	++	+	BSM-74	++	+
BSM-75	++	+	BSM-76	+	+	BSM-77	+++	+
BSM-78	+	+	BSM-79	++	+	BSM-80	++	+
BSM-81	++	++	BSM-82	++	+	BSM-83	++	+
BSM-84	++	++	BSM-85	+++	++	BSM-86	+++	+
BSM-87	+++	+	BSM-88	+++	+	BSM-89	++	++
BSM-90	++	+++	BSM-91	++	++	BSM-92	+	-
BSM-93	++	+	BSM-94	++	+	BSM-95	++	+
BSM-96	++	+	BSM-97	++	+	BSM-98	++	++
BSM-99	++	+	BSM-100	++	+	BSM-101	++	++
BSM-102	++	+	BSM-103	-	-	BSM-104	++	+
BSM-105	+++	++	BSM-106	++	+	BSM-107	++	+
BSM-108	+++	+	BSM-109	++	++	BSM-110	++	++
BSM-111	++	++	BSM-112	-	-	BSM-113	+++	++
BSM-114	+++	+	BSM-115	+++	+	BSM-116	++	+
BSM-117	++	++	BSM-118	+++	+	BSM-119	+++	+
BSM-120	+++	+	BSM-121	++	++	BSM-122	++	+
BSM-123	++	++	BSM-124	++	++	BSM-126	+	+
BSM-127	++	+	BSM-128	++	+	BSM-129	+++	+
BSM-130	++	+	BSM-131	++	+	BSM-132	++	+
BSM-133	++	++	BSM-134	++	+	BSM-135	++	+
BSM-136	++	+	BSM-137	++	++	BSM-138	+	+
BSM-139	+	+	BSM-140	++	++	BSM-141	++	++
BSM-142	+	+	BSM-143	++	+	BSM-144	+	++
BSM-145	++	++	BSM-146	+	+	BSM-147	++	+
BSM-148	+	+	BSM-149	+++	+	BSM-150	++	+
BSM-151	++	+	BSM-152	++	+	BSM-153	+++	+++
BSM-154	+++	++	BSM-155	+++	++	BSM-156	+++	++
BSM-157	++	+	BSM-158	++	+	BSM-159	++	+
BSM-160	++	+	BSM-161	++	+	BSM-162	+	-
BSM-163	++	+	BSM-164	++	-	BSM-165	+	+
BSM-166	++	+	BSM-167	+	-	BSM-168	++	+
BSM-169	++	+	BSM-170	-	-	BSM-171	++	+
BSM-172	++	++	BSM-173	++	+	BSM-174	++	+
BSM-175	++	+	BSM-176	++	+	BSM-177	++	+++
BSM-178	++	+	BSM-179	-	+	BSM-180	++	++
BSM-181	-	-	BSM-182	++	+	BSM-183	++	++
BSM-184	+	+	BSM-185	++	+	BSM-186	++	+

BSM-187	+	+	BSM-188	+++	++	BSM-189	+++	+++
BSM-190	++	+	BSM-191	-	-	BSM-192	++	+
BSM-193	+	++	BSM-194	+	+	BSM-195	+	+
BSM-196	+	+	BSM-197	+	++	BSM-198	+	+
BSM-199	+	+	BSM-200	+	+	BSM-201	+	+
BSM-202	+	+	BSM-203	+	+	BSM-204	+	+
BSM-205	-	-	BSM-206	++	++	BSM-207	++	+
BSM-208	++	++	BSM-209	-	-	BSM-210	++	+
BSM-211	++	+	BSM-212	++	+	BSM-213	++	+
BSM-214	+	+	BSM-215	-	-	BSM-216	+++	+++
BSM-225	++	+	BSM-226	++	+	BSM-227	++	+
BSM-228	++	+	BSM-229	++	++	BSM-230	++	+
BSM-231	-	+	BSM-232	++	+	BSM-233	++	+
BSM-234	++	+	BSM-235	++	+	BSM-236	-	-
BSM-237	-	-	BSM-238	++	+	BSM-239	-	-
BSM-240	++	+	BSM-241	+	-	BSM-242	-	-
BSM-243	+	+	BSM-244	++	+	BSM-245	-	-
BSM-246	-	-	BSM-247	-	-	BSM-248	++	++
BSM-249	-	-	BSM-250	-	-	BSM-251	++	-
BSM-252	-	-	BSM-253	++	+	BSM-254	-	-
BSM-255	+	+	BSM-256	+	++	BSM-257	++	++
BSM-258	+++	++	BSM-259	+++	++	BSM-260	+++	++
BSM-261	++	+	BSM-262	++	+	BSM-263	++	++
BSM-264	++	+	BSM-265	++	++	BSM-266	+	-
BSM-267	+	-	BSM-268	+	+	BSM-269	+++	+
BSM-270	++	+	BSM-271	-	-	BSM-272	+	+
BSM-273	+	+	BSM-274	++	-	BSM-275	+	+
BSM-276	++	-	BSM-277	-	-	BSM-278	-	-
BSM-279	++	+	BSM-280	-	-	BSM-281	+	+
BSM-282	-	-	BSM-283	-	-	BSM-284	-	-
BSM-285	-	-	BSM-286	-	-	BSM-287	-	-
BSM-288	++	+	BSM-289	++	+	BSM-290	++	+
BSM-291	++	++	BSM-292	++	+	BSM-293	++	++
BSM-294	++	++	BSM-295	+	+	BSM-296	-	-
BSM-297	++	+	BSM-298	++	+	BSM-299	++	+
BSM-300	++	-	BSM-301	-	-	BSM-302	+	++
BSM-303	++	+	BSM-304	-	-	BSM-305	+	++
BSM-306	+	+	BSM-307	++	++	BSM-308	-	+
BSM-309	-	-	BSM-310	-	-	BSM-311	-	-
BSM-312	-	-	BSM-313	-	+	BSM-314	-	-
BSM-315	+++	-	BSM-316	+	-	BSM-317	++	+
BSM-318	+	+	BSM-319	+	+	BSM-320	++	+++
BSM-321	++	+	BSM-322	++	+	BSM-323	++	+
BSM-324	+++	+	BSM-325	+	+	BSM-326	+++	+
BSM-327	+	+	BSM-328	++	-	BSM-329	++	+
BSM-330	++	+	BSM-331	++	++	BSM-332	++	+
BSM-333	++	+	BSM-334	++	+	BSM-335	-	-
BSM-336	++	-	BSM-337	+	++	BSM-338	-	-
BSM-339	+	+	BSM-340	-	-	BSM-341	+	+
BSM-342	++	-	BSM-343	++	+	BSM-344	++	+
BSM-345	-	-	BSM-346	-	-	BSM-347	-	-
BSM-348	++	+	BSM-349	+	+	BSM-350	-	-
BSM-351	+	+	BSM-352	+++	+	BSM-353	+++	++
BSM-354	+++	+	BSM-355	++	+	BSM-356	+++	-
BSM-357	++	+	BSM-358	++	+	BSM-359	++	+
BSM-360	++	+	BSM-361	+++	++	BSM-362	+	+
BSM-363	++	-	BSM-364	++	+	BSM-365	-	-
BSM-366	-	-	BSM-367	+++	++	BSM-368	++	+
BSM-369	+	+	BSM-370	++	+	BSM-371	++	+

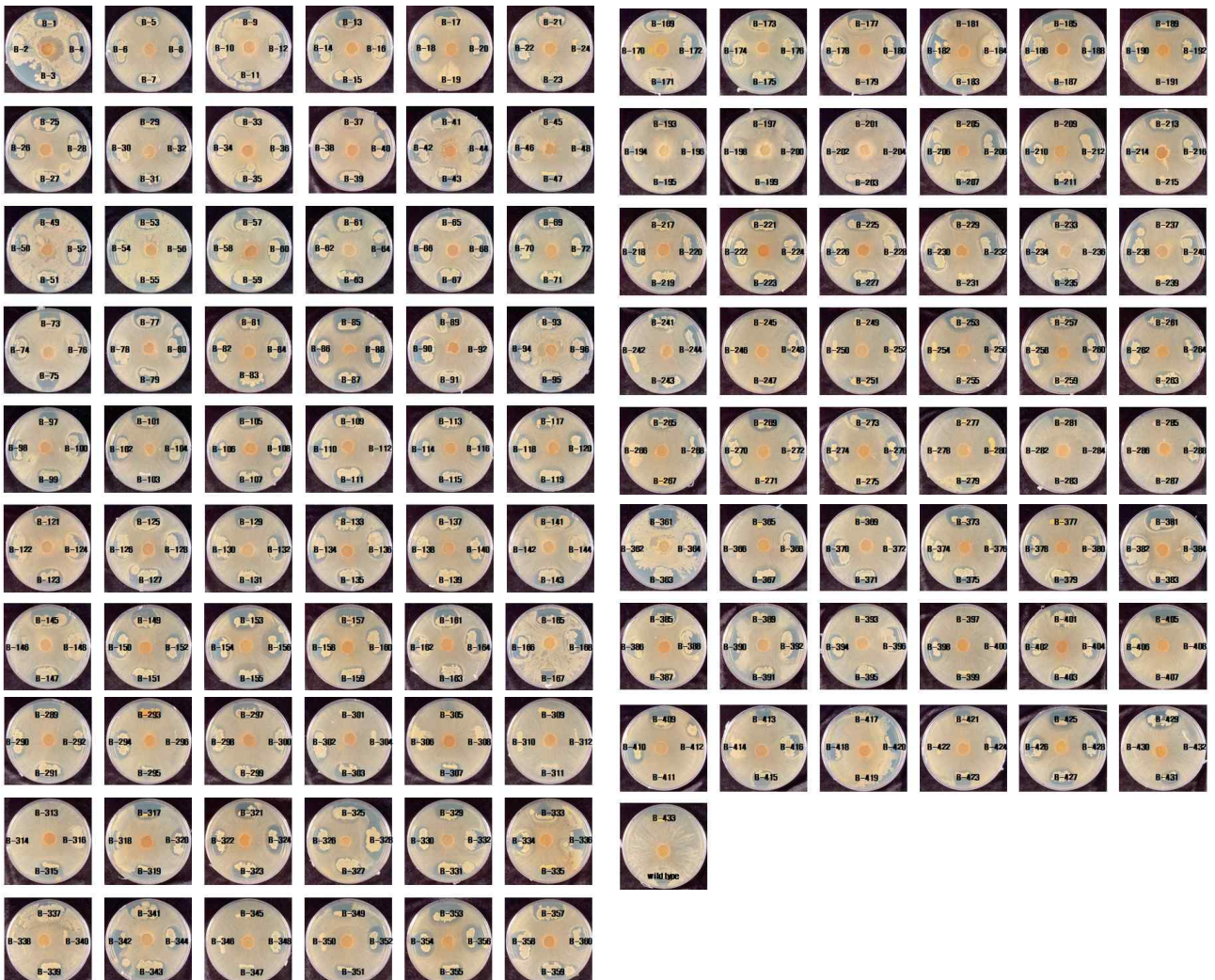
BSM-372	-	-	BSM-373	+++	-	BSM-374	++	+
BSM-375	++	+	BSM-376	+	-	BSM-377	-	-
BSM-378	++	+	BSM-379	++	+	BSM-380	+	+
BSM-381	+++	+	BSM-382	+	+	BSM-383	+	+
BSM-384	++	+	BSM-385	++	+	BSM-386	+	+
BSM-387	++	+	BSM-388	++	+	BSM-389	++	+
BSM-390	++	-	BSM-391	+	++	BSM-392	++	+
BSM-393	-	-	BSM-394	++	+	BSM-395	++	+
BSM-396	++	+	BSM-397	-	-	BSM-398	+++	+++
BSM-399	-	+	BSM-400	-	-	BSM-401	++	+
BSM-402	++	-	BSM-403	++	+	BSM-404	++	-
BSM-405	++	++	BSM-406	++	++	BSM-407	-	-
BSM-408	-	-	BSM-409	++	+	BSM-410	+++	+
BSM-411	-	-	BSM-412	-	-	BSM-413	++	++
BSM-414	+	-	BSM-415	++	+	BSM-416	++	+
BSM-417	-	-	BSM-418	++	+	BSM-419	-	-
BSM-420	++	+	BSM-421	++	+	BSM-422	-	-
BSM-423	++	-	BSM-424	++	+	BSM-425	+++	++
BSM-426	+++	+	BSM-427	++	+	BSM-428	+++	+
BSM-429	++	++	BSM-430	-	-	BSM-431	++	+
BSM-432	-	-	BSM-433	+	+	BSM-434	++	++
BSM-435	+	+	BSM-436	+	-	BSM-437	+	-
BSM-438	+	-	BSM-439	+	-	BSM-440	+	-
BSM-441	-	-	BSM-442	++	-	BSM-443	-	-
BSM-444	+	-	BSM-445	-	-	BSM-446	-	-
BSM-447	+	-	BSM-448	+	-	BSM-449	-	-
BSM-450	+	-	BSM-451	+	-	BSM-452	+	-
BSM-453	-	-	BSM-454	-	-	BSM-455	+	-
BSM-456	-	-	BSM-457	+	-	BSM-458	++	-
BSM-459	++	+	BSM-460	+	-	BSM-461	-	-
BSM-462	+	-	BSM-463	++	-	BSM-464	++	-
BSM-465	++	+	BSM-466	+++	+	BSM-467	+	-
BSM-468	++	+	BSM-469	+	-	BSM-470	+	-
BSM-471	+	-	BSM-472	++	-	BSM-473	+	+
BSM-474	++	-	BSM-475	+	-	BSM-476	+	-
BSM-477	-	-	BSM-478	+	-	BSM-479	++	-
BSM-480	++	-	BSM-481	+	-	BSM-482	++	+
BSM-483	++	-	BSM-484	+	-	BSM-485	-	-
BSM-486	-	-	BSM-487	+	-	BSM-488	++	-
BSM-489	-	-	BSM-490	-	-	BSM-491	+	-
BSM-492	-	-	BSM-493	++	-	BSM-494	+	+
BSM-495	++	+	BSM-496	+	-	BSM-497	+	-
BSM-498	-	+	BSM-499	+	+	BSM-500	+++	++
BSM-501	-	-	BSM-502	+	+	BSM-503	++	+
BSM-504	+	-	BSM-505	+	+	BSM-506	+	-
BSM-507	-	-	BSM-508	++	-	BSM-509	-	+
BSM-510	-	-	BSM-511	+	-	BSM-512	+	+
BSM-513	-	+	BSM-514	+	-	BSM-515	++	-
BSM-516	-	-	BSM-517	-	-	BSM-518	-	-
BSM-519	+	-	BSM-520	+	+	BSM-521	-	-
BSM-522	++	-	BSM-523	+	-	BSM-524	+	-
BSM-525	++	-	BSM-526	-	-	BSM-527	+	-
BSM-528	+	-	BSM-529	++	-	BSM-530	++	+
BSM-531	++	+	BSM-532	++	-	BSM-533	++	-
BSM-534	+	-	BSM-535	+	-	BSM-536	++	-
BSM-537	+	-	BSM-538	+	+	BSM-539	++	+
BSM-540	+	-	BSM-541	+	-	BSM-542	++	+
BSM-543	++	+	BSM-544	++	-	BSM-545	++	-
BSM-546	+	+	BSM-547	+	++	BSM-548	++	-

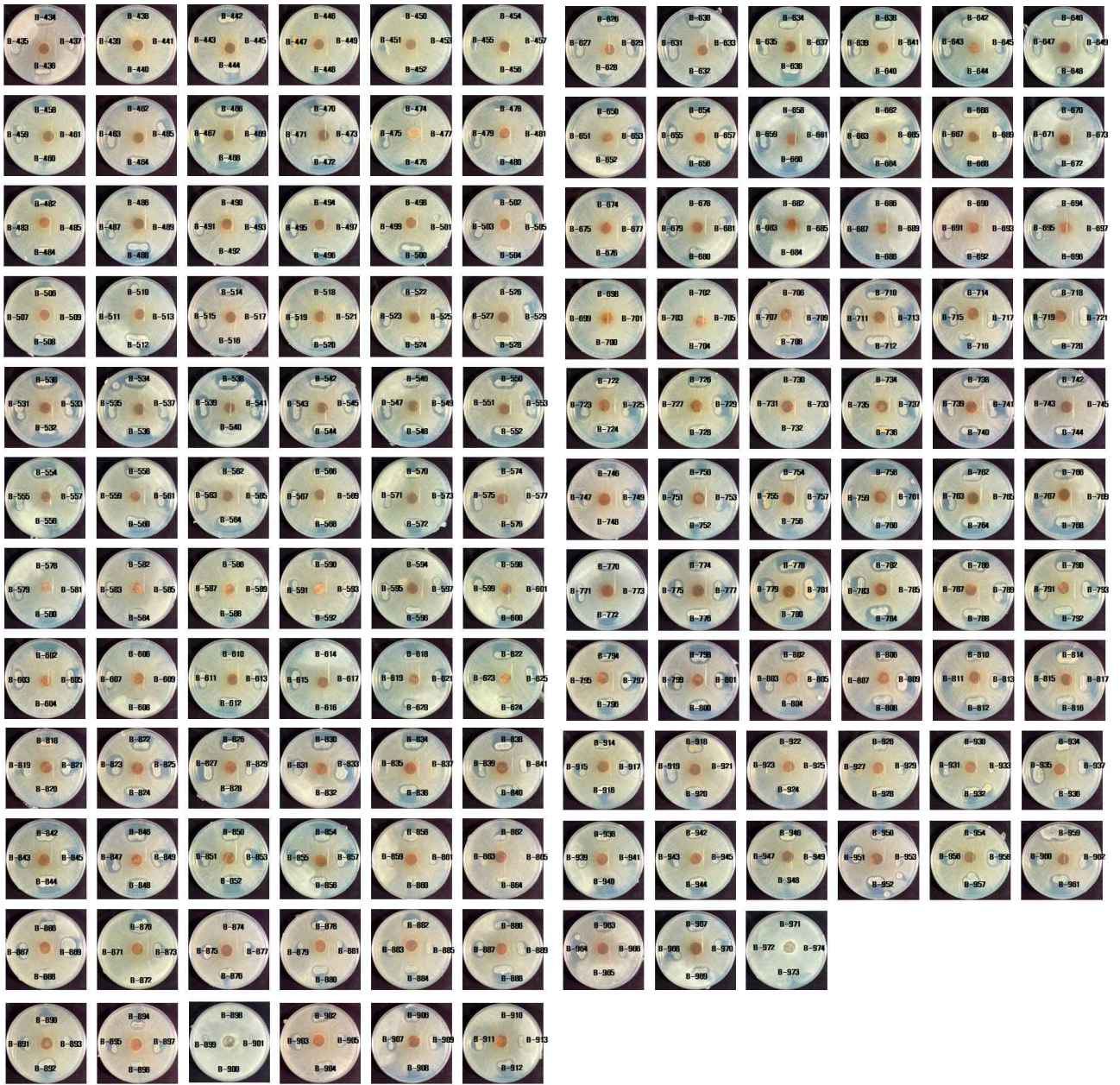
BSM-549	++	+	BSM-550	++	-	BSM-551	-	-
BSM-552	++	+	BSM-553	++	-	BSM-554	++	-
BSM-555	+	-	BSM-556	+	-	BSM-557	++	-
BSM-558	+	+	BSM-559	-	-	BSM-560	++	+
BSM-561	+	+	BSM-562	+	+	BSM-563	+	+
BSM-564	++	+	BSM-565	++	-	BSM-566	+	-
BSM-567	+	-	BSM-568	+	-	BSM-569	-	-
BSM-570	+	-	BSM-571	+	-	BSM-572	+	-
BSM-573	++	-	BSM-574	+	-	BSM-575	+	-
BSM-576	+	-	BSM-577	+	-	BSM-578	+	-
BSM-579	+	-	BSM-580	+	+	BSM-581	-	-
BSM-582	++	-	BSM-583	+	-	BSM-584	+	-
BSM-585	+	-	BSM-586	+	-	BSM-587	+	-
BSM-588	+	-	BSM-589	+	-	BSM-590	+	-
BSM-591	+	-	BSM-592	+	-	BSM-593	+	-
BSM-594	+	-	BSM-595	+	-	BSM-596	+	-
BSM-597	+	+	BSM-598	++	-	BSM-599	+	-
BSM-600	+	-	BSM-601	+	-	BSM-602	+	-
BSM-603	++	-	BSM-604	-	-	BSM-605	++	-
BSM-606	-	-	BSM-607	++	-	BSM-608	-	-
BSM-609	-	-	BSM-610	+	+	BSM-611	++	+
BSM-612	+	+	BSM-613	++	-	BSM-614	-	-
BSM-615	++	+	BSM-616	-	-	BSM-617	-	-
BSM-618	-	-	BSM-619	++	-	BSM-620	+	-
BSM-621	++	-	BSM-622	++	-	BSM-623	-	-
BSM-624	+	-	BSM-625	++	-	BSM-626	++	-
BSM-627	++	-	BSM-628	+	-	BSM-629	+	-
BSM-630	+	+	BSM-631	++	+	BSM-632	+	+
BSM-633	-	-	BSM-634	++	+	BSM-635	+	-
BSM-636	+	+	BSM-637	++	-	BSM-638	++	-
BSM-639	++	-	BSM-640	+	-	BSM-641	++	-
BSM-642	-	+	BSM-643	++	+	BSM-644	++	+
BSM-645	+	-	BSM-646	++	+	BSM-647	+	+
BSM-648	+	+	BSM-649	+	-	BSM-650	+	+
BSM-651	-	-	BSM-652	+	+	BSM-653	++	+
BSM-654	+	+	BSM-655	++	+	BSM-656	++	+
BSM-657	+	-	BSM-658	-	-	BSM-659	++	+
BSM-660	+	-	BSM-661	+	+	BSM-662	-	+
BSM-663	++	+	BSM-664	++	-	BSM-665	++	-
BSM-666	++	-	BSM-667	+	+	BSM-668	+	+
BSM-669	+	-	BSM-670	+	+	BSM-671	+	+
BSM-672	-	-	BSM-673	-	-	BSM-674	+	+
BSM-675	-	-	BSM-676	+	+	BSM-677	++	-
BSM-678	-	-	BSM-679	++	-	BSM-680	-	+
BSM-681	+	-	BSM-682	-	-	BSM-683	++	-
BSM-684	-	-	BSM-685	-	-	BSM-686	-	-
BSM-687	-	-	BSM-688	-	-	BSM-689	-	-
BSM-690	-	-	BSM-691	+	-	BSM-692	+	-
BSM-693	-	-	BSM-694	+	-	BSM-695	-	-
BSM-696	-	+	BSM-697	-	-	BSM-698	-	-
BSM-699	-	-	BSM-700	-	-	BSM-701	-	-
BSM-702	-	-	BSM-703	-	-	BSM-704	+	+
BSM-705	-	-	BSM-706	-	-	BSM-707	++	+
BSM-708	+	-	BSM-709	+	+	BSM-710	++	-
BSM-711	++	+	BSM-712	++	+	BSM-713	+	-
BSM-714	++	+	BSM-715	+	-	BSM-716	+	-
BSM-717	+	-	BSM-718	++	+	BSM-719	++	-
BSM-720	+	-	BSM-721	++	+	BSM-722	++	+
BSM-723	++	+	BSM-724	+	+	BSM-725	+	+

BSM-726	++	-	BSM-727	-	+	BSM-728	+	-
BSM-729	++	-	BSM-730	-	-	BSM-731	-	-
BSM-732	-	-	BSM-733	-	-	BSM-734	+	-
BSM-735	-	-	BSM-736	+	-	BSM-737	++	+
BSM-738	++	+	BSM-739	+	+	BSM-740	+	+
BSM-741	+	-	BSM-742	++	+	BSM-743	-	-
BSM-744	++	+	BSM-745	-	-	BSM-746	++	+
BSM-747	+	-	BSM-748	-	-	BSM-749	+	-
BSM-750	+	-	BSM-751	+	-	BSM-752	+	+
BSM-753	+	-	BSM-754	+	+	BSM-755	+	-
BSM-756	+	-	BSM-757	++	+	BSM-758	+	-
BSM-759	+	-	BSM-760	++	-	BSM-761	++	+
BSM-762	+	+	BSM-763	+	-	BSM-764	++	-
BSM-765	-	-	BSM-766	+	+	BSM-767	+	-
BSM-768	++	+	BSM-769	-	-	BSM-770	+	-
BSM-771	+	-	BSM-772	+	-	BSM-773	-	-
BSM-774	+	-	BSM-775	++	-	BSM-776	++	-
BSM-777	++	-	BSM-778	++	+	BSM-779	++	+
BSM-780	++	+	BSM-781	++	-	BSM-782	++	+
BSM-783	++	-	BSM-784	++	+	BSM-785	-	-
BSM-786	++	+	BSM-787	-	-	BSM-788	++	+
BSM-789	++	+	BSM-790	++	+	BSM-791	++	+
BSM-792	++	+	BSM-793	++	+	BSM-794	+	-
BSM-795	+	-	BSM-796	+	-	BSM-797	+	-
BSM-798	++	+	BSM-799	++	-	BSM-800	++	-
BSM-801	++	-	BSM-802	++	-	BSM-803	++	-
BSM-804	+	-	BSM-805	++	+	BSM-806	++	+
BSM-807	-	-	BSM-808	++	-	BSM-809	++	+
BSM-810	+	+	BSM-811	+	-	BSM-812	++	+
BSM-813	+	+	BSM-814	+	+	BSM-815	++	-
BSM-816	++	+	BSM-817	+	-	BSM-818	+	-
BSM-819	+	-	BSM-820	-	+	BSM-821	+	+
BSM-822	++	+	BSM-823	++	+	BSM-824	++	+
BSM-825	++	+	BSM-826	++	+	BSM-827	++	+
BSM-828	++	+	BSM-829	+	+	BSM-830	++	+
BSM-831	+	-	BSM-832	+	+	BSM-833	++	+
BSM-834	++	-	BSM-835	-	-	BSM-836	+	-
BSM-837	-	-	BSM-838	++	+	BSM-839	+	-
BSM-840	++	+	BSM-841	+	-	BSM-842	++	+
BSM-843	+	+	BSM-844	++	+	BSM-845	+	-
BSM-846	++	-	BSM-847	++	+	BSM-848	++	-
BSM-849	+	-	BSM-850	+	-	BSM-851	+	-
BSM-852	+	+	BSM-853	+	-	BSM-854	+	-
BSM-855	+	-	BSM-856	+	+	BSM-857	+	-
BSM-858	+	+	BSM-859	+	-	BSM-860	-	-
BSM-861	+	-	BSM-862	+	-	BSM-863	-	-
BSM-864	-	-	BSM-865	-	-	BSM-866	+	+
BSM-867	+	+	BSM-868	+	+	BSM-869	+	+
BSM-870	+	+	BSM-871	-	-	BSM-872	-	-
BSM-873	+	+	BSM-874	-	-	BSM-875	+	+
BSM-876	+	-	BSM-877	+	+	BSM-878	+	-
BSM-879	+	-	BSM-880	+	-	BSM-881	+	-
BSM-882	+	-	BSM-883	+	-	BSM-884	+	+
BSM-885	-	-	BSM-886	+	+	BSM-887	+	+
BSM-888	++	-	BSM-889	+	-	BSM-890	+	+
BSM-891	+	+	BSM-892	+	+	BSM-893	+	+
BSM-894	+	-	BSM-895	+	-	BSM-896	+	-
BSM-897	+	-	BSM-898	-	-	BSM-899	-	+
BSM-900	-	-	BSM-901	-	+	BSM-902	+	+

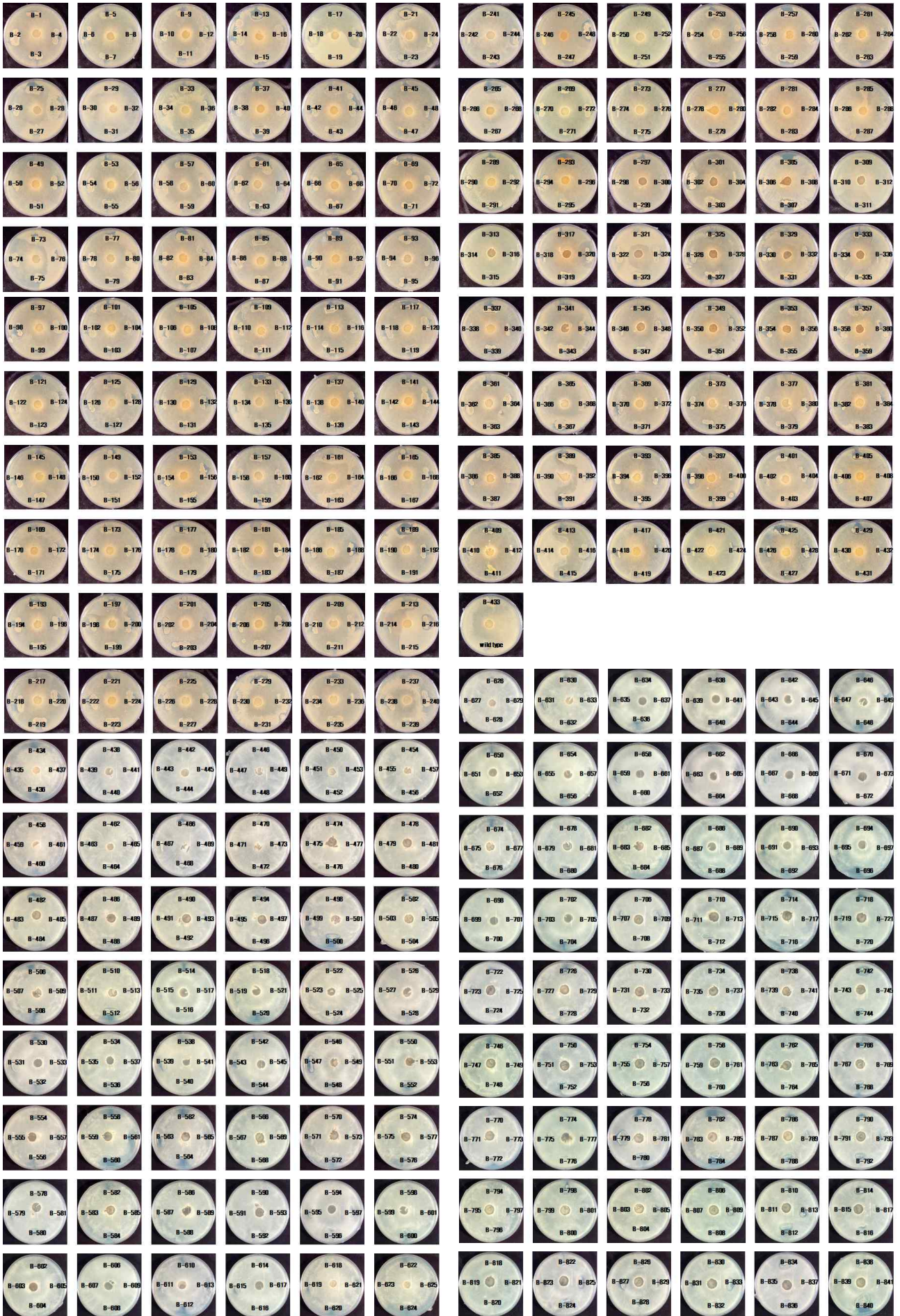
BSM-903	++	+	BSM-904	+	-	BSM-905	+	-
BSM-906	+	-	BSM-907	+	+	BSM-908	+	-
BSM-909	+	-	BSM-910	-	-	BSM-911	+	-
BSM-912	+	-	BSM-913	+	-	BSM-914	+	+
BSM-915	+	+	BSM-916	+	+	BSM-917	+	+
BSM-918	+	-	BSM-919	+	+	BSM-920	+	+
BSM-921	-	-	BSM-922	+	-	BSM-923	-	-
BSM-924	++	+	BSM-925	-	-	BSM-926	+	-
BSM-927	+	-	BSM-928	+	+	BSM-929	+	-
BSM-930	+	-	BSM-931	+	-	BSM-932	+	+
BSM-933	-	+	BSM-934	+	-	BSM-935	+	-
BSM-936	+	-	BSM-937	+	-	BSM-938	+	+
BSM-939	+	-	BSM-940	++	-	BSM-941	+	-
BSM-942	+	-	BSM-943	+	+	BSM-944	+	+
BSM-945	+	-	BSM-946	+	-	BSM-947	+	-
BSM-948	+	-	BSM-949	+	+	BSM-950	+	+
BSM-951	++	+	BSM-952	+	+	BSM-953	+	-
BSM-954	++	-	BSM-955	+	-	BSM-956	+	-
BSM-957	++	-	BSM-958	+	-	BSM-959	+	-
BSM-960	+	-	BSM-961	+	-	BSM-962	+	-
BSM-963	+	+	BSM-964	-	+	BSM-965	+	-
BSM-966	+	+	BSM-967	+	-	BSM-968	+	+
BSM-969	+	+	BSM-970	-	+	BSM-971	-	-
BSM-972	-	+	BSM-973	-	+	BSM-974	-	-
wild type	++	+						

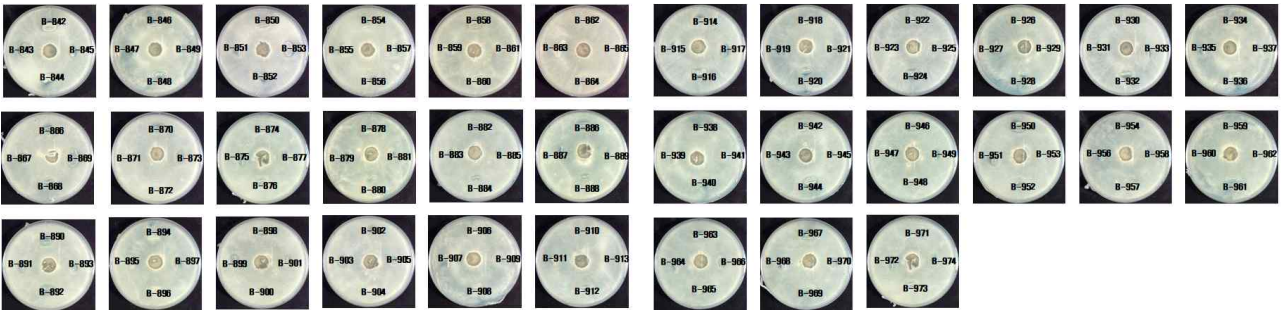
<돌연변이 균주의 항균활성 검정: *Rhizoctonia solani*>





<돌연변이 균주의 항균활성 검정: *Diaporthe* sp.>





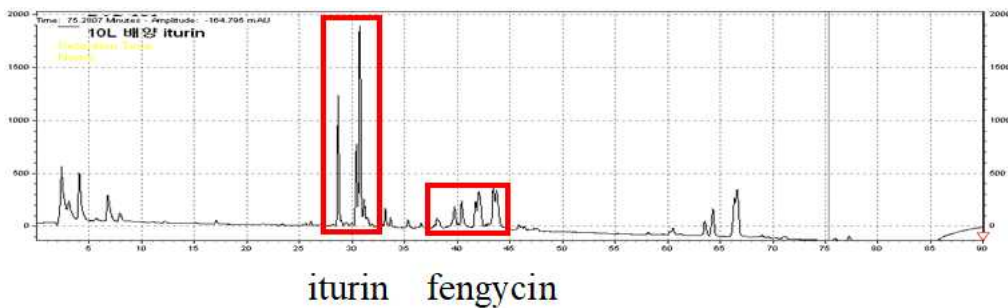
< Bacillus sp. BS061 배양액으로부터 항균물질의 분리 및 정제 >

▶ Bacillus sp. BS061 배양액으로부터 항균성 lipopeptide의 분석

Bacillus sp. BS061 배양액 100 mL에 HCl을 첨가하여 pH를 1.0으로 맞춘 후 4°C에서 12시간 동안 정치하여 lipopeptide 화합물을 침전시킨 후, 3000 rpm에서 15분간 centrifuge 하여 상층액을 제거함. 이후 침전물은 메탄올을 이용하여 용해시키고 filter paper로 필터한 뒤, HPLC와 ESI-Mass를 이용하여 항균물질을 분석함. HPLC 분석은 ODS column (TOSOH, 4.6 mm I.D. × 150 mm, 5 um, TSKgel ODS-100V, Japan)을 이용하고 3 ml로 농축한 시료 10 µl를 주입함. 이동상으로는 5% acetonitrile/0.04% trifluoroacetic acid와 acetonitrile을 이용하여 아래 조건으로 분석을 수행함.

<HPLC 용매 조건>

Time (min)	5% ACN+0.04% TFA	ACN	Flow rate (ml/min)
0	90	10	1
80	0	100	1
85	90	10	1
90	90	10	1

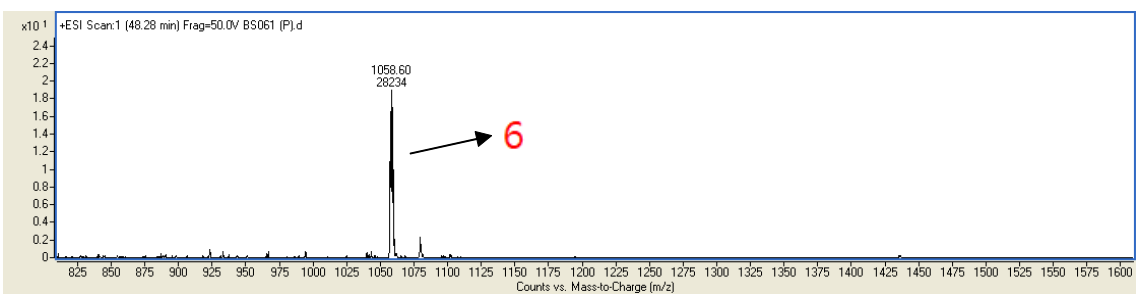
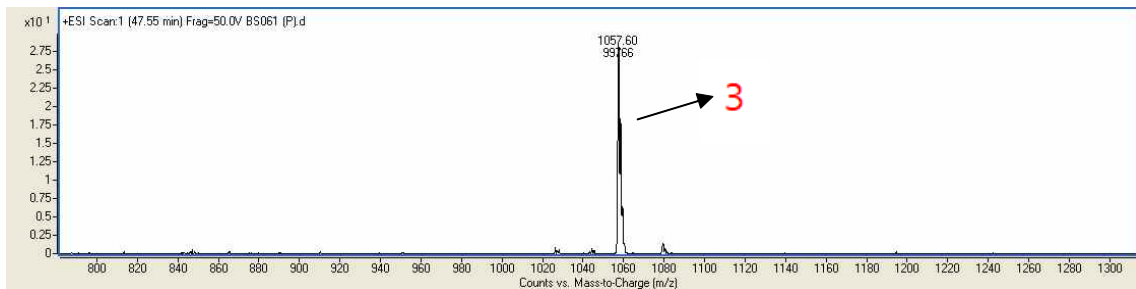
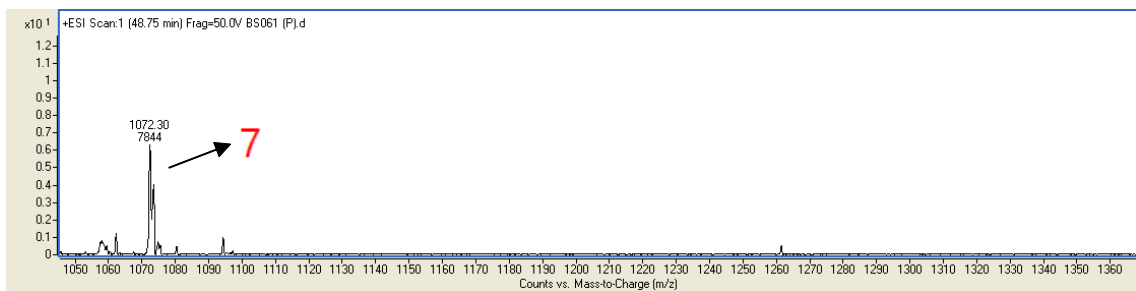
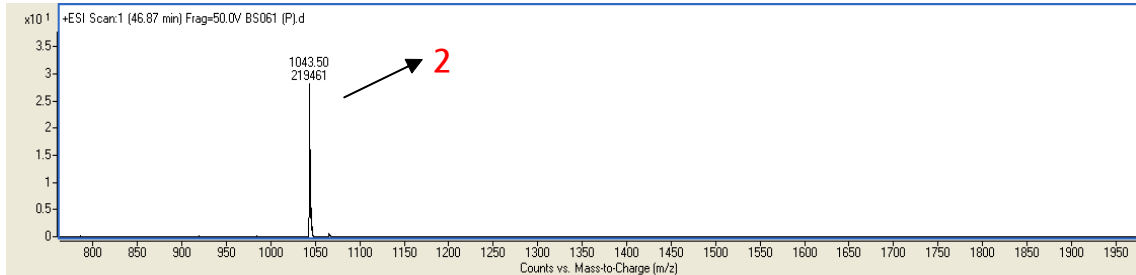
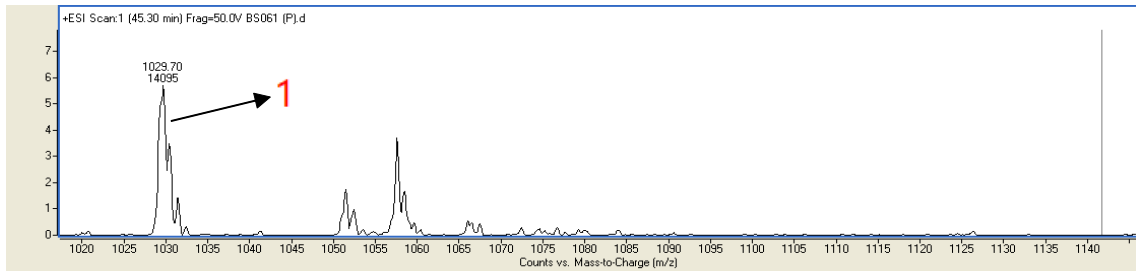


< Bacillus sp. BS061 균주가 생산하는 lipopeptide 화합물의 HPLC 분석 >

HPLC 분석 결과 retention time 25-35분 사이와 40분 근처에서 다수의 피크가 관찰되었으며, retention time으로부터 이는 각각 Bacillus 속 항균물질로 대표되는 lipopeptide 계 항생물질 iturin과 fengycin 계 화합물로 유추됨.

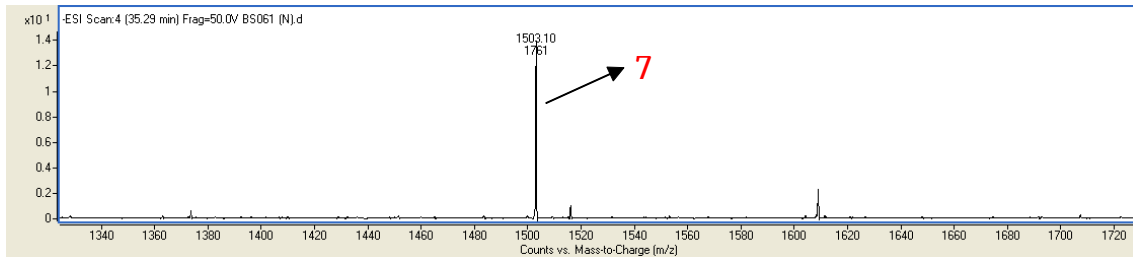
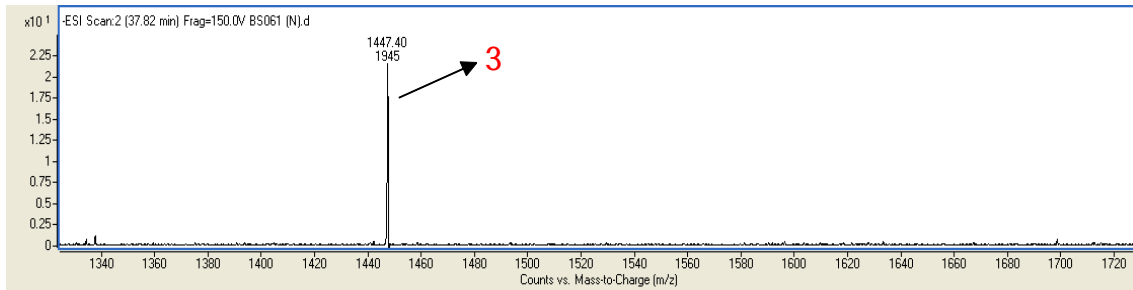
HPLC 분석 결과 iturin과 fengycin 계 화합물이 존재함을 확인하였으며, 각 피크의 화합물을 확인하기 위하여 LC-ESI-Mass 분석을 수행함. Positive mode에서 LC-ESI-Mass 분석을 수행한 결과 m/z 1029.7, 1043.5, 1072.3, 1057.6, 1058.6에서 [M+H]⁺ 피크가 관찰되었고, 이를 기 보고된 Iturin의 질량과 비교한 결과 각각 Iturin A1, Iturin A2, Iturin C3, Iturin A3/A4/A5, Iturin C2로 유추함.

1. Iturin A1 C13 MW 1028.5	2. Iturin A2 C14 MW 1042.5
3. Iturin A3/A4/A5 C15 MW 1056.5	4. Iturin A6/A7 C16 MW 1070.5
5. Iturin C1 C14 MW 1043.5	6. Iturin C2 C15 MW 1057.5
7. Iturin C3 C16 MW 1071.4	



또한, Negative mode에서 ESI-Mass 분석을 수행한 결과 m/z 1447.4, 1503.1에서 $[M-H]^-$ 피크가 관찰되었고, 이는 각각 Fengycin C15, Fengycin C19로 유추됨.

1. Fengycin C13 MW 1420	2. Fengycin C14 MW 1434
3. Fengycin C15 MW 1448	4. Fengycin C16 MW 1462
5. Fengycin C17 MW 1476	6. Fengycin C18 MW 1490
7. Fengycin C19 MW 1504	8. Fengycin C20 MW 1518
9. Fengycin C21 MW 1532	10. Fengycin C25 MW 1588



▶ **Bacillus sp. BS061 배양액으로부터 흰가루병 길항물질의 분리 및 정제**

Bacillus sp. BS061 배양액 10 L를 6000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 버리고 상층액을 한번 더 filter paper를 이용하여 여과함. 이후 흡착성 수지인 Diaion HP-20 resin을 이용하여 배양액 분리를 진행한 후 각 분획물에 대해 활성 평가를 진행함. 그 결과 활성을 나타낸 Pass 분획물(BS061-1)과 acetone 분획물(BS061-2)을 확보함. 각 분획물의 흰가루병균에 대한 길항활성은 제1공동연구기관인 한경대학교에서 수행하였으며, 한경대학교에서 확립한 흰가루병균 발아 억제 활성 평가시스템을 활용하여 각 분획물의 항균활성을 검정함. 그 결과, 아래 표에 나타낸 바와 같이 Pass 분획물(BS061-1)과 acetone 분획물(BS061-2) 모두 1000 ppm 이상에서 흰가루병균의 발아를 강력하게 억제하였으며, 특히 Pass 분획물보다 acetone 분획물에서 더 좋은 효과가 나타냄. 따라서 acetone 분획물에 물과 ethyl acetate를 부가하여 용매 분획한 후 활성검정을 진행하였으나 활성을 나타내지 않음. 즉 재현성을 나타내지 않았으며, 이는 추후 논의하겠으나 양전하를 나타내는 산성조건에서는 활성을 나타내나 중화된 중성조건에서는 활성이 급격히 감소되는 것으로 나타남.

<*Bacillus sp.* BS061 배양액의 Diaion HP-20 column chromatography 분획물의 오이 흰가루병균(*Sphaerotheca fusca*) 발아 억제 효능>

Treatment	Germination ratio (%) on 100 spores
BS061-1 500 ppm	10%
BS061-1 1000 ppm	2.2%
BS061-1 2000 ppm	1.9%
BS061-2 500 ppm	5.8%
BS061-2 1000 ppm	0.5%
BS061-2 2000 ppm	0.6%
농약 아미스타 Azoystrobin 17%+difenoconazole 11.3%	1%
Distilled water	44%

Pass 분획물(BS061-1)은 양이온교환수지인 Dowex-50을 이용하여 column chromatography를 수행하였으며, 용출용매는 1N ammonia를 사용함. 그 결과 Dowex-50 1N ammonia 분획(BS061 1-1)과 Dowex-50 Pass (BS061 1-2) 분획을 확보하였으며, 각각 흰가루병 발아 억제효과에 대한 활성을 평가한 결과 1N ammonia 분획(BS061 1-1)이 500 ppm이상에서 다른 분획물보다 흰가루병균의 발아를 강력하게 억제하는 것을 확인함.

<Dowex-50 column chromatography 분획물의 오이 흰가루병균 발아 억제 효능>

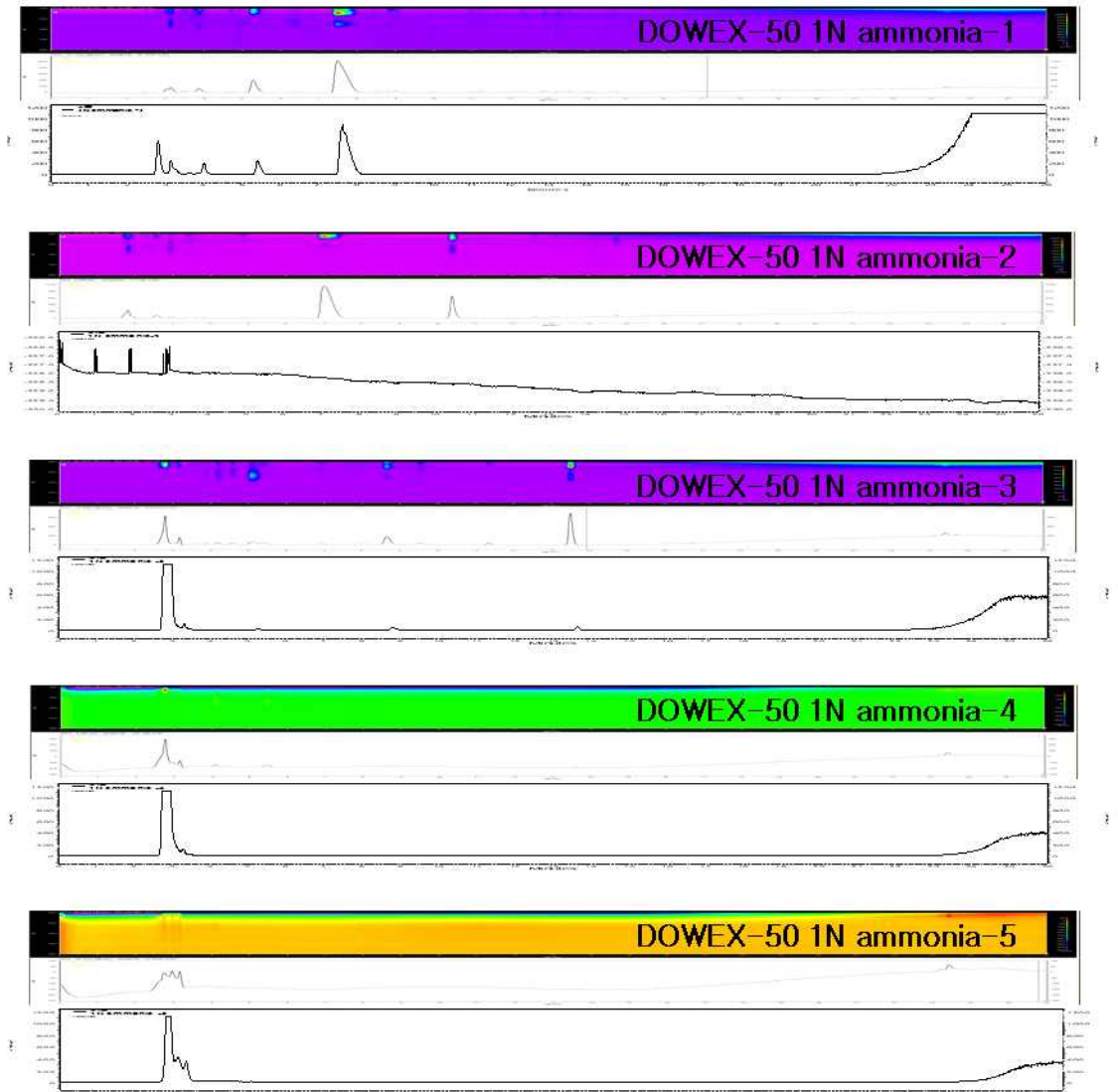
Treatments (mg/L) (ppm)	Germination ratio (%) on 100 spores
Distilled Water	41.49%
Azoxystrobin 17%+difenoconazole 11.3% (1/2000)	1.59%
Dowex-50 1N ammonia (500) (BS061 1-1)	0.93%
Dowex-50 1N ammonia (1000) (BS061 1-1)	2.79%
Dowex-50 1N ammonia (2000)(BS061 1-1)	1.37%
Dowex-50 PASS (500) (BS061 1-2)	3.94%
Dowex-50 PASS (1000) (BS061 1-2)	19.09%
Dowex-50 PASS (2000) (BS061 1-2)	0.51%

따라서, Dowex-50 1N ammonia (BS061 1-1) 분획을 농축한 후 순상 TLC에서 용매조건 butanol:methanol:water=4:1:1, 4:1:2 (v/v)와 cellulose TLC에서 용매조건 isopropyl alcohol:1N ammonia=7:5, 7:2 (v/v)로 전개하여 ninhydrin 시약으로 발색하여 추가적인 분리 조건을 설정함. 설정한 조건을 바탕으로 용출용매를 isopropyl alcohol (A)과 1N ammonia (B)를 사용하여 A:B의 비율을 0:10부터 3:7까지 순차적으로 증가시켜 cellulose column을 이용한 MPLC를 진행하였으며, 그 결과 다섯 분획(Dowex-50 1N ammonia-1~5)으로 나누었으며, 이들 분획에 대하여 흰가루병균 발아 억제효과를 검정함.

<Cellulose MPLC 분획물의 오이 흰가루병균 발아 억제 효능>

Treatments	Germination ration (%) on 100 spores
Amistar(chemical pesticide)	21 ±2.9b
Dowex-50 1N ammonia-1	20 ±4.6b
Dowex-50 1N ammonia-2	미량으로 활성검정 불가
Dowex-50 1N ammonia-3	20.67 ±0.3b
Dowex-50 1N ammonia-4	23 ±2.6b
Dowex-50 1N ammonia-5	28.67 ±5.7b
Water	51 ±5.5a

활성검정결과 Dowex-50 1N ammonia-1~5 분획물 모두에서 활성을 나타내었으며, 이들 분획에 대하여 ELSD detector를 이용하여 HPLC 분석(ODS column (OSAKA SODA, i.d. 4.6 mm×250 mm, 5 um, CAPCELL PAK, Japan)을 수행함. 이동상으로는 5% Methanol/0.04% trifluoroacetic acid (a)와 methanol (b)을 이용하여 a:b의 비율이 100:0→0:100%가 되도록 methanol 비율을 높여가며 gradient로 30분간 진행하였으며, 분석결과는 아래 그림과 같음. HPLC분석결과를 바탕으로 3개의 분획 즉 Dowex-50 1N ammonia-1, Dowex-50 1N ammonia-2, Dowex-50 1N ammonia-4 분획에 대하여 분리를 진행하기로 함. Dowex-50 1N ammonia-1 분획은 용출용매를 methanol과 증류수를 이용하여 0→30% methanol 수용액이 되도록 순차적으로 methanol을 증가시키며 C₁₈ ODS column을 사용하여 MPLC를 수행하여 두 개의 화합물 Dowex-50 1N ammonia 1-A, Dowex-50 1N ammonia 1-B를 정제함. Dowex-50 1N ammonia-2 분획은 methanol과 증류수를 이용하여 0→60% methanol 수용액이 되도록 순차적으로 methanol을 증가시키며 C₁₈ ODS column을 사용하여 MPLC를 수행하여 네 개의 화합물 Dowex-50 1N ammonia 2-1~4를 정제함. 또한 Dowex-50 1N ammonia-4 분획은 50% methanol을 용출용매로 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 한 개의 화합물 Dowex-50 1N ammonia 4-1을 정제하였으며, 양적으로 부족한 Dowex-50 1N ammonia 1-A 화합물을 제외한 나머지 6개의 화합물에 대하여 흰가루병균 발아 억제효과를 검정함.

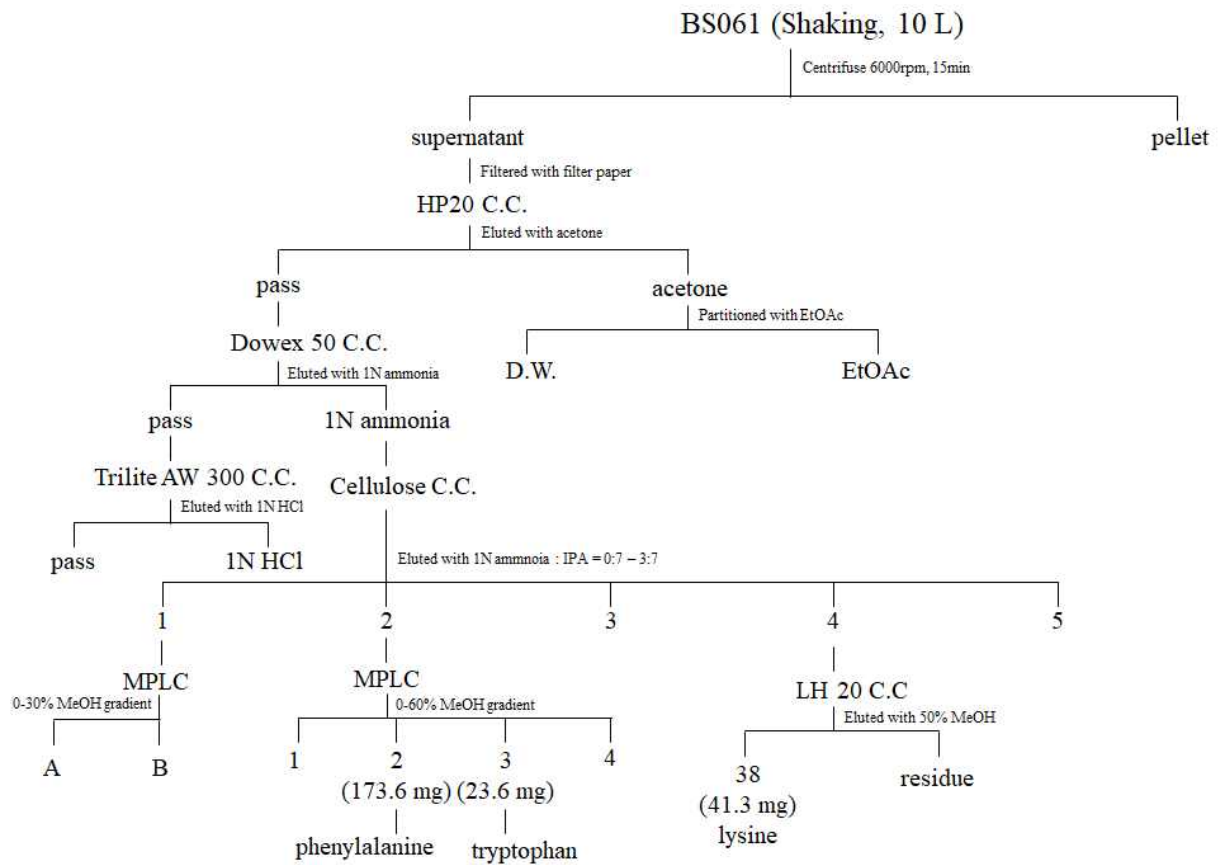


<Cellulose MPLC 분획물인 Dowex-50 1N ammonia-1~5 분획물의 HPLC 분석>

<ODS MPLC 및 Sephadex LH-20 column chromatography로부터 분리한 화합물 6종의 오이 흰가루병균 발아 억제 효능>

Treatments	발병도(%)	방제가(%)
DW	100	0
Pesticide	0	100
Dowex-50 1N ammonia 1-B	75	25
Dowex-50 1N ammonia 4-1	81	19
Dowex-50 1N ammonia-2-1	41	59
Dowex-50 1N ammonia-2-2	56	44
Dowex-50 1N ammonia-2-3	44	56
Dowex-50 1N ammonia-2-4	9	91

Dowex-50 1N ammonia-2-4는 흰가루병균 발아억제에 대해 우수한 활성을 나타내었으나 양이 부족하여 실험을 더 진행하지 못함. 화합물 중 흰가루병균 발아 억제효과 활성이 있고, 순도가 높으며 양적으로 많은 Dowex-50 1N ammonia-2-2 (compound 1), Dowex-50 1N ammonia-2-3 (compound 2), Dowex-50 1N ammonia 4-1 (compound 3)에 대해서 NMR 및 ESI-mass spectrum을 측정하여 화학구조를 규명함. 최종 정제 과정을 아래의 그림에 도시함.

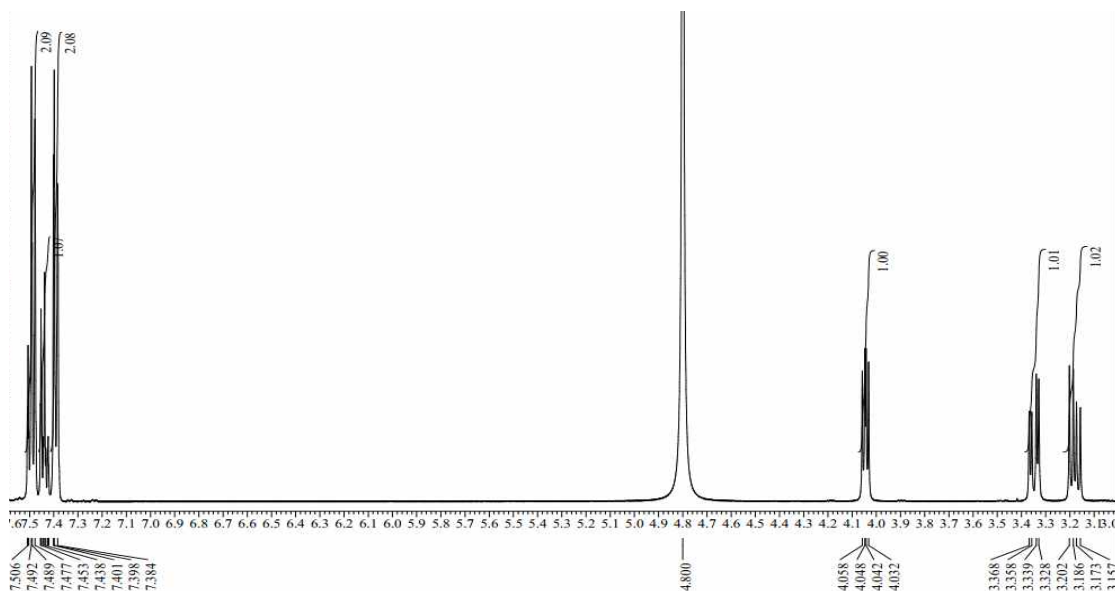


<오이 흰가루병균(*Sphaerotheca fusca*) 발아 억제 물질의 정제 과정>

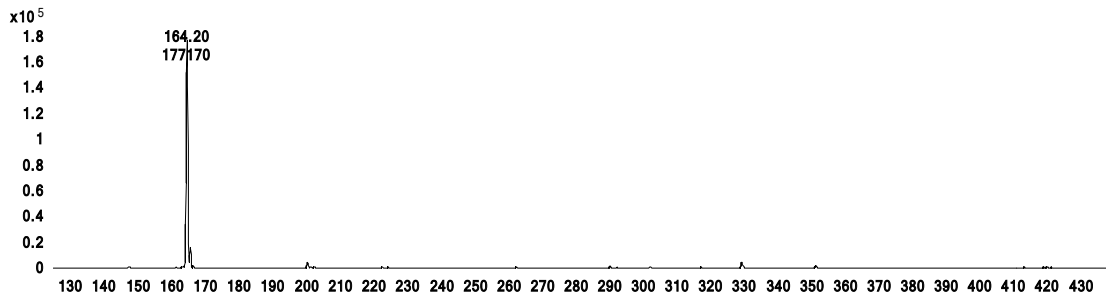
▶ 흰가루병균 발아 억제 물질의 화학구조 분석

- Compound 1 (DOWEX-50 1N ammonia-2-2)의 화학구조 규명

Compound 1을 D₂O에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정한 결과 δ_H 7.49 (2H, t, J = 7.2 Hz), 7.44 (1H, t, J = 7.5 Hz), 7.39 (2H, d, J = 6.9 Hz)에서 phenyl기에 유래한 aromatic proton, δ_H 4.05 (1H, dd, J = 8.0, 5.2 Hz), 3.35 (1H, dd, J = 14.6, 5.2 Hz), 3.18 (1H, dd, J = 14.6, 8.0 Hz)에서 proton 피크가 관찰됨. 또한, negative mode에서 ESI-mass를 측정한 결과 m/z 164.2에서 [M-H]⁻ 이온 피크가 관찰되어 분자량이 165임을 확인함. 이상의 분석 결과 compound 1을 phenylalanine으로 규명함.



<Compound 1의 ¹H NMR spectrum>



<Compound 1의 ESI-mass spectrum (negative mode)>

O

OH

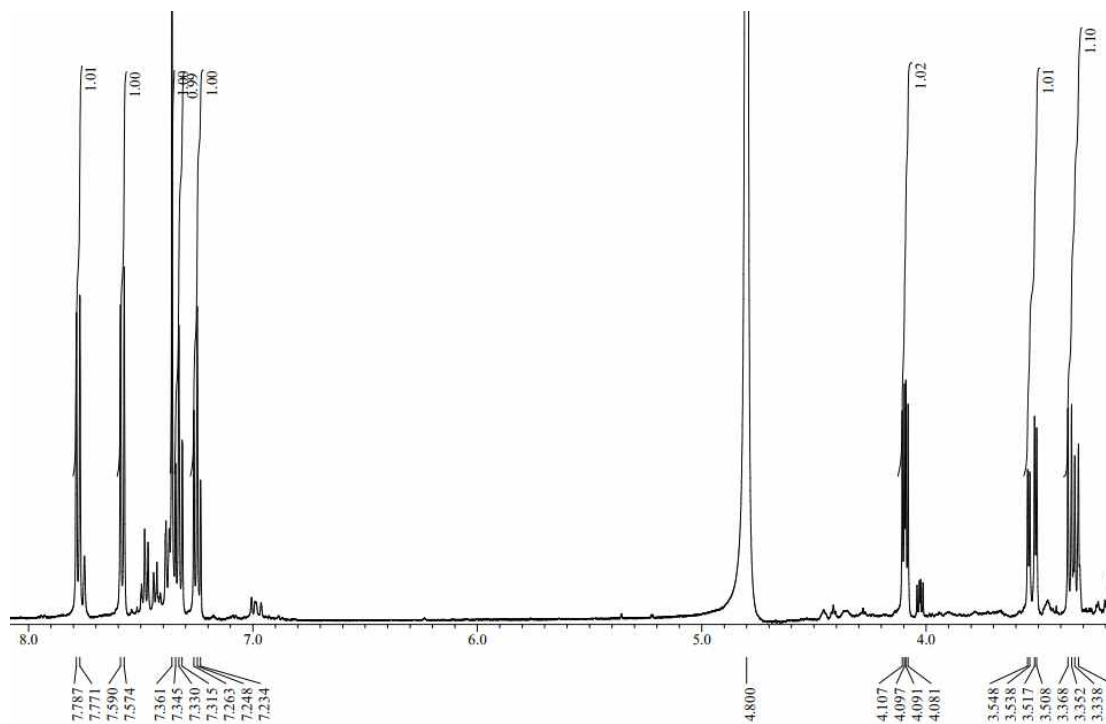
NH₂

C₉H₁₁NO₂
Phenylalanine

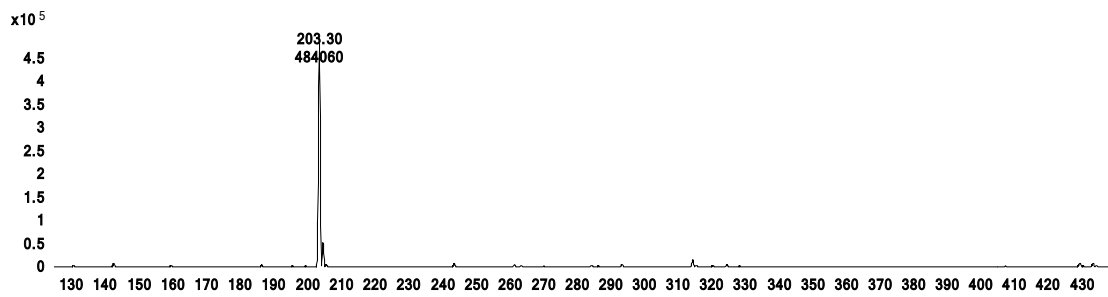
<Compound 1의 화학구조>

- Compound 2 (DOWEX-50 1N ammonia-2-3)의 화학구조 규명

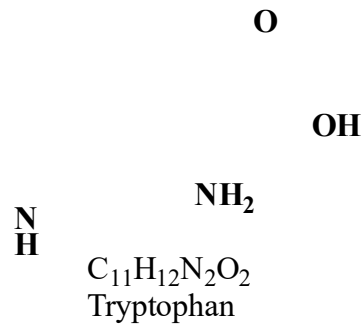
Compound 2를 D₂O에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정한 결과 δ_H 7.78 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.58 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.36 (1H, s), 7.33 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 7.25 (1H, t, *J* = 7.3 Hz)에서 한 개의 1,2-disubstituted benzene에서 유래하는 aromatic proton을 포함하는 5개의 proton, δ_H 4.09 (1H, dd, *J* = 8.0, 4.9 Hz), 3.53 (1H, dd, *J* = 15.5, 4.9 Hz), 3.35 (1H, dd, *J* = 15.5, 8.0 Hz)에서 proton 피크가 관찰됨. 또한, negative mode에서 ESI-mass를 측정한 결과 *m/z* 203.3에서 [M-H]⁻ 이온 피크가 관찰되어 분자량이 204임을 확인함. 이상의 분석 결과 compound 2를 tryptophan으로 동정함.



<Compound 2의 ¹H NMR spectrum>



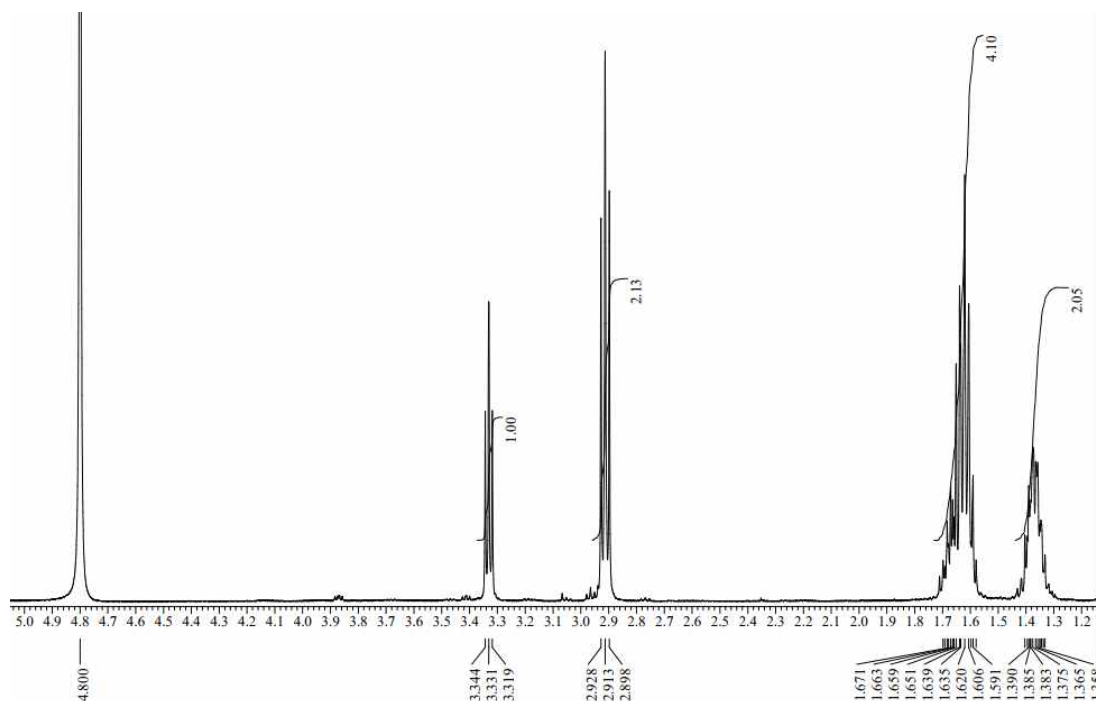
<Compound 2의 ESI-mass spectrum (negative mode)>



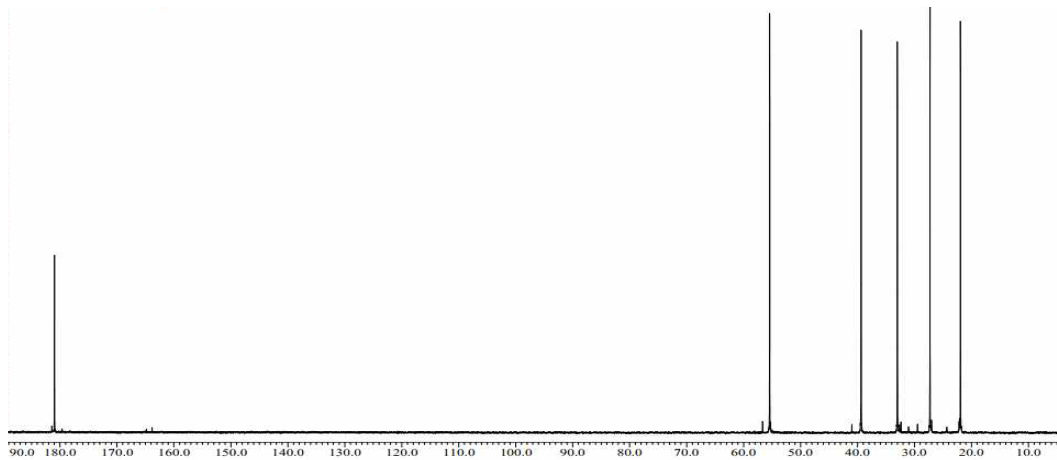
<Compound 2의 화학구조>

- Compound 3 (DOWEX-50 1N ammonia-4-1)의 화학구조 규명

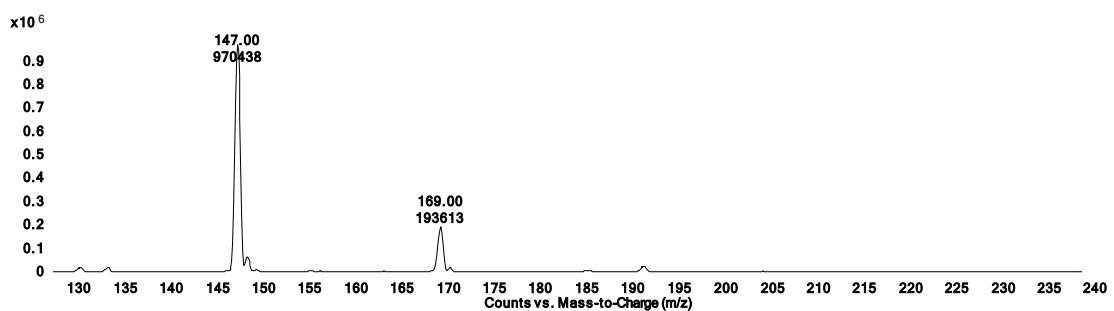
Compound 3을 D₂O에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정한 결과 δ_H 3.33 (1H, t, J = 6.5 Hz), 2.91 (1H, t, J = 7.5 Hz), 1.62 (4H, m), 1.37 (2H, m)에서 proton 피크가 관찰됨. 또한 ¹³C NMR spectrum을 측정한 결과 δ_C 181.0에서 한 개의 carbonyl carbon, δ_C 55.4에서 한 개의 methine carbon, δ_C 39.4, 33.0, 27.3, 21.9에서 네 개의 methylene carbon이 관찰됨. 또한, positive mode에서 ESI-mass를 측정한 결과 m/z 147에서 [M+H]⁺, 169에서 [M+Na]⁺ 이온 피크가 관찰되어 분자량이 146임을 확인함. 이상의 분석 결과 compound 3을 lysine으로 동정함.



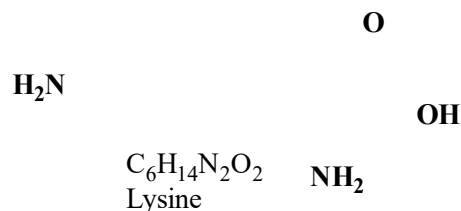
<Compound 3의 ¹H NMR spectrum>



<Compound 3의 ^{13}C NMR spectrum>



<Compound 3의 ESI-mass spectrum (positive mode)>



<Compound 3의 화학구조>

<Bacillus sp. BS061균주와 선발 돌연변이 균주의 lipopeptide 생성능 및 흰가루병 억제활성 검정을 통한 산업화 균주 선발>

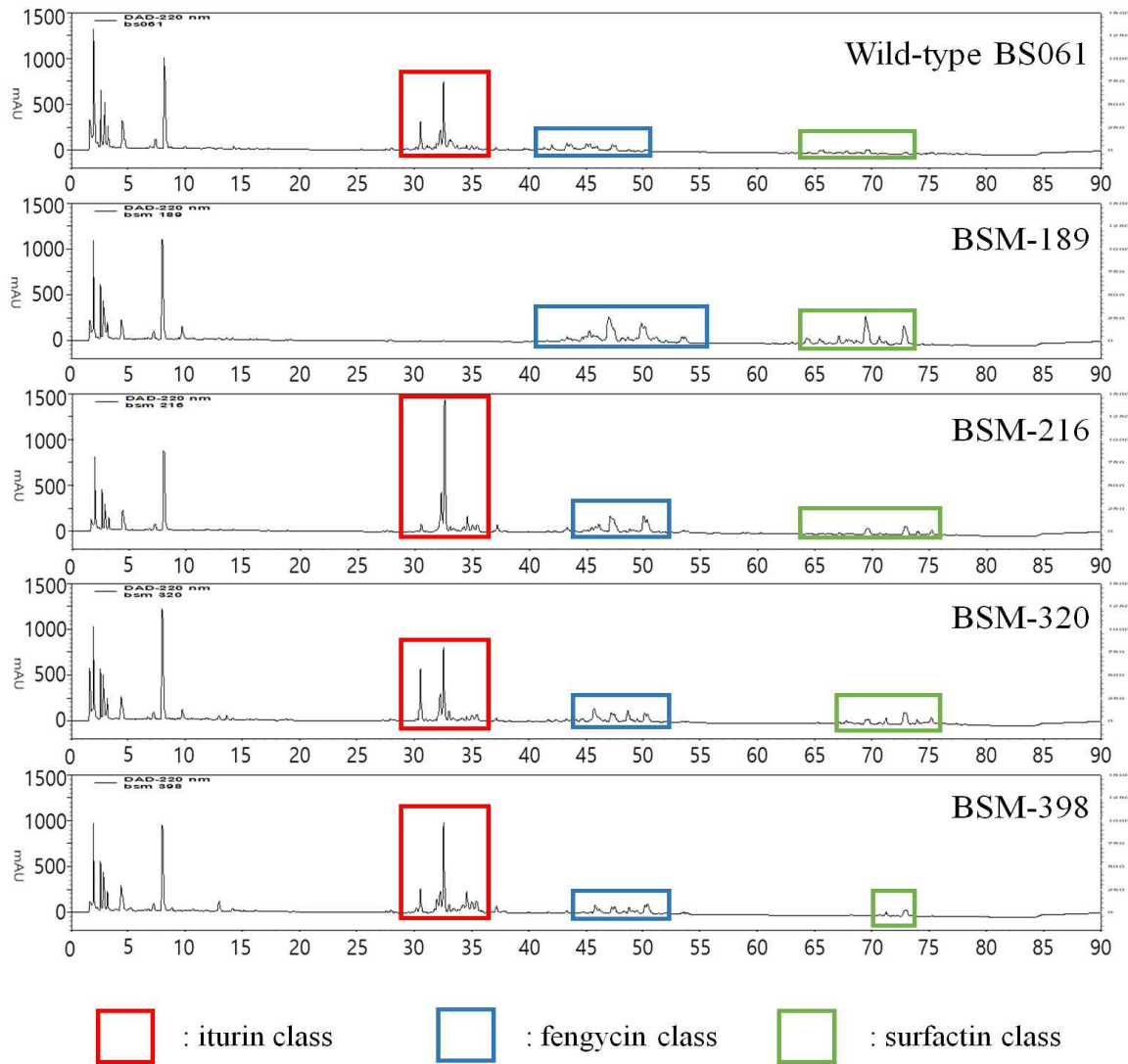
▶ 원균주 *Bacillus* sp. BS061균주와 선발된 돌연변이 균주의 lipopeptide 화합물 생성 분석

원균주인 *Bacillus* sp. BS061과 UV-mutagenesis를 통하여 확보한 974개의 돌연변이 균주 중 항균활성 및 생육특성을 고려하여 선발한 균주 BSM-189, BSM-216, BSM-320, BSM-398를 배양한 후 lipopeptide 계 항균활성물질의 생성여부를 비교함. 즉 배양액 100 mL에 HCl을 첨가하여 pH를 1.0으로 맞춘 후 4°C에서 12시간 동안 정치하여 lipopeptide 계 화합물을 침전시킨 후, 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 확보함. 침전물은 메탄올에 용해하여 filter paper로 필터한 뒤, HPLC를 이용하여 항균물질을 분석함. HPLC 분석은 ODS column (TOSOH, i.d. 4.6 mm × 150 mm, 5 μm, TSKgel ODS-100V, Japan)을 이용하고 3 ml로 농축한 시료 10 μl를 주입함. 이동상으로는 5% acetonitrile/0.04% trifluoroacetic acid와 acetonitrile을 이용하여 아래 조건으로 분석을 수행함.

<HPLC 분석을 위한 이동상 조건>

Time (min)	5% ACN+0.04% TFA	ACN	Flow rate (ml/min)
0	90	10	1
80	0	100	1
85	90	10	1
90	90	10	1

HPLC 분석 결과 retention time 25-35분, 45-55분, 65-75분 사이에서 다수의 피크가 관찰되었으며, retention time으로부터 이는 각각 *Bacillus* 속이 생산하는 대표적인 lipopeptide 계 항생 물질인 iturin, fengycin, surfactin으로 판단되었으며, BSM-189 균주는 iturin 계열의 화합물을 생성하지 않았고, surfactin과 fengycin 계열의 양이 증가하였으며, BSM-216 균주는 iturin 계열 화합물의 양이 증가함. BSM-320과 BSM-398 균주는 wild-type과 비슷한 lipopeptide 계열 항균물질을 생성함.



<원균주 *Bacillus* sp. BS061과 선발된 돌연변이 균주 BSM-189, BSM-216, BSM-320, BSM-398의 lipopeptide 계 항균물질의 HPLC profile>

▶ 원균주 *Bacillus* sp. BS061균주와 선발된 돌연변이 균주의 흰가루병 억제활성 검정

원균주인 *Bacillus* sp. BS061과 UV-mutagenesis를 통하여 확보한 974개의 돌연변이 균주 중 항균활성 및 생육특성을 고려하여 선발한 균주 BSM-320, BSM-398을 배양한 후 흰가루병 억제활성을 검정함. 원균주와 돌연변이 주에 대한 흰가루병 억제활성 결과를 아래의 표에 나타냄. 그 결과 BSM-320 균주가 가장 우수한 활성을 나타냄. 또한, BSM-320 균주를 대상으로 추가적으로 UV-mutagenesis를 수행하여 9개의 colony (BSM320-1~BSM320-9)를 선발하였으며, 이들의 활성 및 안정성 등을 종합적으로 판단하여 최종적으로 이들 콜로니 중 활성이 우수하고 배양 시 균체가 엉김없이 균일하게 성장하며 안정성이 높은 BSM320-7 균주를 최종 산업화 균주로 선발함.

<원균주 *Bacillus* sp. BS061 균주와 선발된 돌연변이 균주의 흰가루병 억제 활성>

Treatments	발병도(%)	방제가(%)
DW(control)	97	3
BTH	66	34
BABA	75	25
LeCSM(control)	84	16
LeCSMS BSM-398	16	84
LeCSMS BSM-320	10	90
LeCSMS BS061	13	87
LB BS061	13	87
30% Azoxystrobin+difenoconazole 1/1000 dilution (합성농약)	0	100

<BSM-320 균주 2차 돌연변이 균주의 오이흰가루병 억제 활성>

처리	발병도 (%)
Water	97
BSM320-1	43
BSM320-2	15
BSM320-3	17
BSM320-4	11
BSM320-5	13
BSM320-6	12
BSM320-7	10
BSM320-8	14
BSM320-9	16
30% Azoxystrobin+difenoconazole 1/1000 dilution (합성농약)	0

▶ 돌연변이 BSM-320 균주로부터 흰가루병 억제물질의 분리 및 정제

원균주 *Bacillus* sp. BS061 균주가 생성하는 흰가루병균 발아 억제물질은 아미노산으로 규명됨. 본 연구에서는 돌연변이 BSM-320 균주도 동일한 화합물에 의하여 활성을 나타내는지 혹은 활성이 다른 균주들 보다 우수하게 나타나 다른 흰가루병 억제물질이 존재하는지를 확인하기 위하여 흰가루병 억제물질을 규명하고자 함. 돌연변이 BSM-320 균주를 500 mL의 전배양 배지 LB broth에 접종한 후, 27°C, 120 rpm으로 1일간 교반 배양하여 접종원으로 사용함. 본 배양은 전배양과 동일한 LB 배지를 1 L 삼각플라스크에 500 mL 씩 분주하고 1.5 기압 121°C로 15분간 고압 살균하여 제조함. 제조된 배지에 전배양한 BSM-320균 배양액을 플라스크 당 5%(v/v)의 양으로 접종한 후 27°C, 120 rpm으로 3일간 진탕 배양하여 총 10 L의 배양액을 얻음. 배양 후 6000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 버리고 상층액을 한번 더 filter paper를 이용하여 여과함. 필터한 여과액에 ethyl acetate를 부가하여 용매 분획한 뒤 활성검정을 진행하였으며, 그 결과 물층(23-H320 D.W.)에서 흰가루병 억제 활성이 나타났으며, 활성결과를 아래에 나타냄.

<돌연변이주 BSM-320 배양액의 ethyl acetate 용매 분획물의 오이 흰가루
병균 발아 억제 효능>

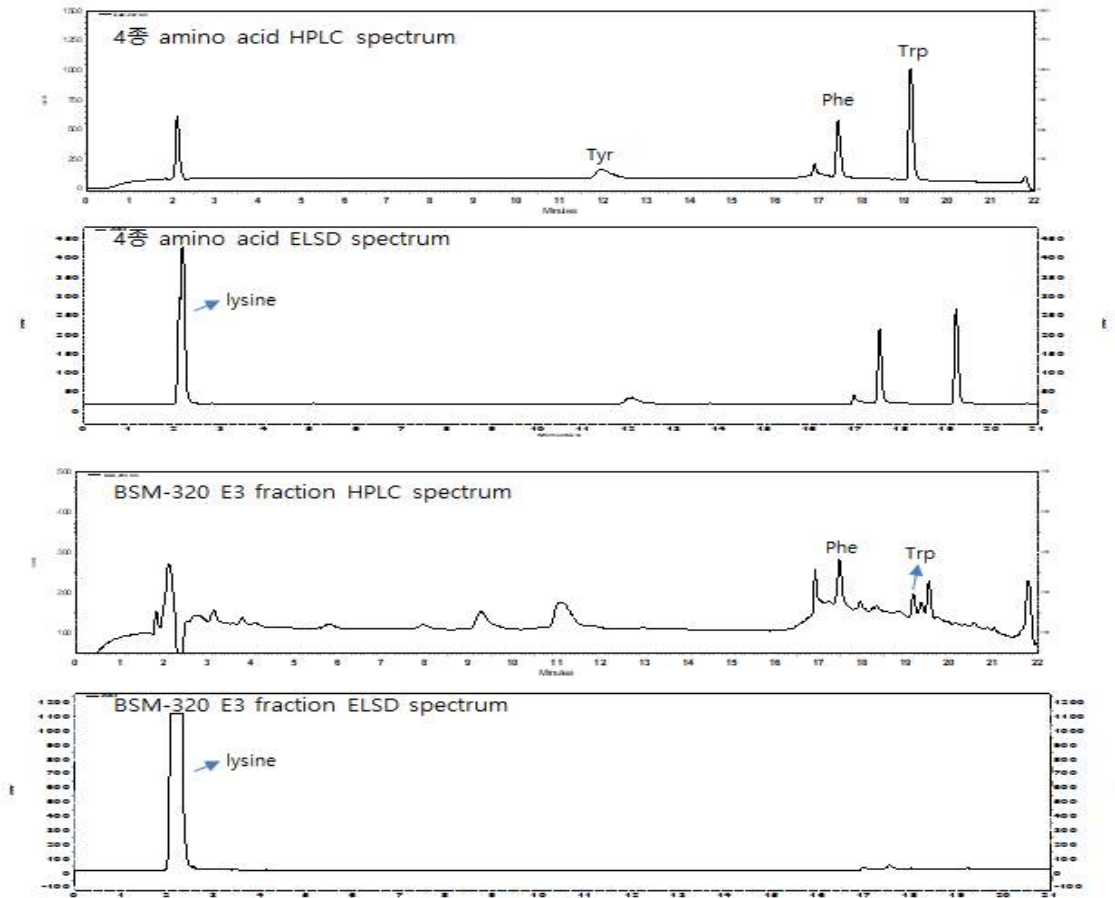
처리구	발병도	방제가
DW	100%	0%
23-H320 E.A.	100%	0%
23-H320 D.W.	44%	56%
울스탑	0%	100%

따라서, 물층(23-H320 D.W.)분획을 양이온교환수지인 Dowex-50을 이용하여 column chromatography를 수행하였으며, 용출용매는 1N ammonia를 사용함. 그 결과 총 4개의 분획 (23-H320 D.W. Pass, 23-H320 D.W. E1, 23-H320 D.W. E2, 23-H320 D.W. E3)분획을 확보하였으며, 각 분획에 대하여 흰가루병 발아 억제효과를 평가한 결과는 아래와 같음.

<Dowex-50 column chromatography 분획물의 오이 흰가루병균 발아 억제 효능>

처리구	발병도	방제가
DW	100%	0%
23-H320 D.W. 1000 ppm	57%	43%
23-H320 D.W. 2000 ppm	70%	30%
23-H320 D.W. 5000 ppm	45%	55%
23-H320 D.W. pass 1000 ppm	83%	17%
23-H320 D.W. pass 2000 ppm	87%	13%
23-H320 D.W. pass 5000 ppm	53%	47%
23-H320 E1 1000 ppm	63%	37%
23-H320 E1 2000 ppm	62%	38%
23-H320 E1 5000 ppm	43%	57%
23-H320 E2 1000 ppm	77%	23%
23-H320 E2 2000 ppm	55%	45%
23-H320 E2 5000 ppm	25%	75%
23-H320 E3 1000 ppm	57%	43%
23-H320 E3 2000 ppm	43%	57%
23-H320 E3 5000 ppm	7%	93%
농약(chemical)	3%	97%

활성검정결과 23-H320 E3 5000 ppm에서 흰가루병균의 발아를 강력하게 억제하는 것을 확인하였으며, 순상 TLC에서 ninhydrin 시약으로 발색한 결과 분홍색으로 발색되었음. 이는 아미노산 계열이 활성성분임을 나타냄. 따라서 standard로 tryptophan, lysine, phenylalanine, tyrosine을 사용하여, 23-H320 E3 분획에 대하여 ELSD detector를 이용한 HPLC 분석을 수행함. 분석결과를 아래 그림에 도시하였으며, 분석결과 3종의 아미노산 lysine, phenylalanine, tryptophan이 존재함을 확인함. 특히 lysine이 23-H320 E3 분획의 주요 성분임을 확인하였으며, 따라서 주 활성성분이 lysine임을 확인함.



HPLC condition
 Column: COSMOSIL 4.6ID x 150mm
 Method: 10-40% acetonitrile gradient method
 running time: 22 mins, flow rate: 1 mL/min, DAD detector.

<ELSD detector를 활용한 분획물 23-H320 E3의 HPLC chromatogram>

따라서, 23-H320 E3 분획의 주성분인 lysine을 분리하기 위하여 용출용매를 isopropyl alcohol (A)과 1 N ammonia (B)를 사용하여 A:B의 비율을 0:10부터 3:7까지 순차적으로 증가시켜 cellulose column을 이용한 MPLC를 진행함. 또한 50% methanol을 용출용매로 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 분리함. 분리된 화합물은 ESI-mass 분석을 통해 wild-type *Bacillus* sp. BS061에서 분리한 lysine과 동일한 화합물임을 확인하였으며, 선광도값을 측정한 결과 +9.9 ($c = 0.1$, MeOH)의 값을 나타내어 입체는 L-form으로 L-lysine으로 규명됨. 또한, 분획의 메인 조성물인 lysine을 비롯한 tryptophan과 phenylalanine 총 3종 아미노산의 흰가루병 억제 활성을 오이 자연발아 실험을 통해 확인하였으며, 그 결과는 아래의 그림과 같으며, 이상의 결과 3종의 아미노산 중 주요 활성성분이 L-lysine임을 밝힘.

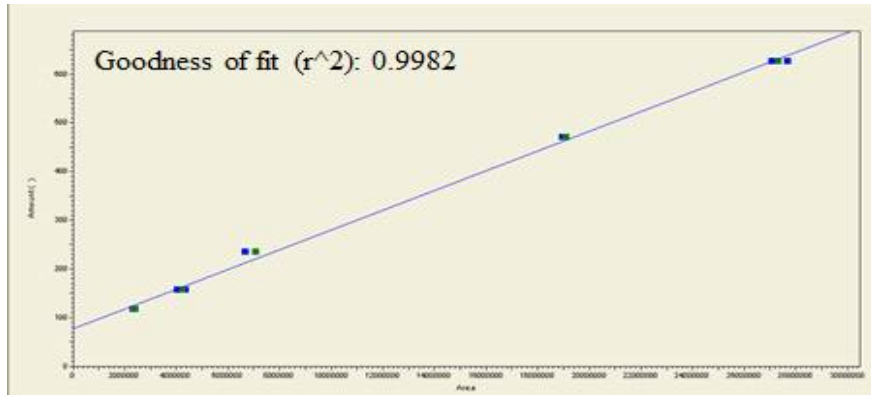
<활성성분의 분석 방법 확립 및 시험법 검증>

돌연변이주 BSM-320 배양액으로부터 오이 흰가루병을 억제하는 활성성분은 L-lysine으로 규명되었음. 따라서 제품의 효능 안정성을 위하여 lysine을 이용한 분석 방법의 확립과 시험법 검증을 수행함. 산업화 균주 배양액의 효능 안정성을 위한 QC 분석법을 확립하고자 돌연변이주 BSM320-7 균주의 배양액을 대상으로 ELSD detector를 이용한 HPLC 분석 방법을 개발함. 그 결과, L-lysine의 분석 방법을 확립할 수 있었으며, 확립된 분석법을 활용하여 돌연변이주 BSM320-7 배양액에서 lysine의 정량 분석을 실시함. 분석장비로는 ELSD detector, autosampler L-2200, pump L-2130을 사용하였으며, L-lysine standard 시약은 sigma-aldrich사의 56-87-1, $\geq 97\%$ 를 사용함. 표준물질 6.26 mg에 증류수 10 mL을 넣어 630 ppm의 농도를 만든 후, 물로 희석(470, 250, 235, 156.7, 117.5 $\mu\text{g/mL}$)하여 표준용액을 제조하여 아래 조건으로 정량분석을 수행함.

<정량분석 조건>

항목	조건
컬럼	입자 5 μm, 직경 4.6 mm × 250 mm, CAPCELL PAK C ₁₈ , OSAKA SODA, Japan
주입량	10 μl
이동상/ 유속	A : 메탄올, B : 3차 증류수+0.04% TFA 100% B for 16.5 mins, 1 ml/min
검출기	ELSD detector

표준용액 L-lysine과 돌연변이주 BSM320-7 배양액을 분석하여 검출된 peak를 확인함. 즉, L-lysine와 돌연변이주 BSM320-7 배양액에서 약 6분대에 peak가 검출되어 동일한 물질임을 확인함. 돌연변이주 BSM320-7 배양액에서 주변 peak와의 분리가 완전히 이루어짐을 확인함. 또한, 직진성을 평가하기 위하여 L-lysine의 검출농도 117.5~630 ug/mL 범위에서 3회 반복하여 HPLC 분석을 수행함. 분석결과 R²는 0.9916, 즉 99.16%의 직진성을 확인할 수 있었으며 calibration curve를 아래와 같이 제작함.

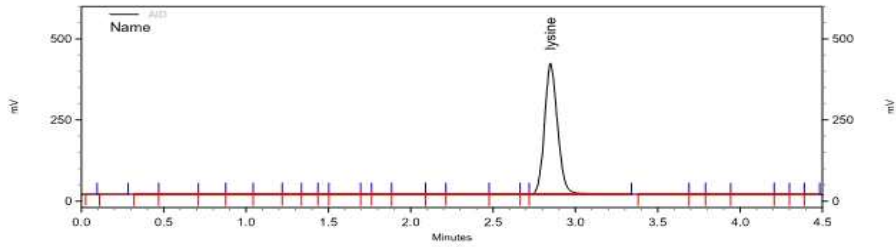


<L-lysine 표준용액의 직진성을 나타낸 calibration curve>

돌연변이주 BSM-320 배양액의 L-lysine의 평균함량은 25.127±0.865 mg/g으로 나타남. 정량분석 결과를 표로 정리하였으며, 분석결과를 아래 그림으로 도시함.

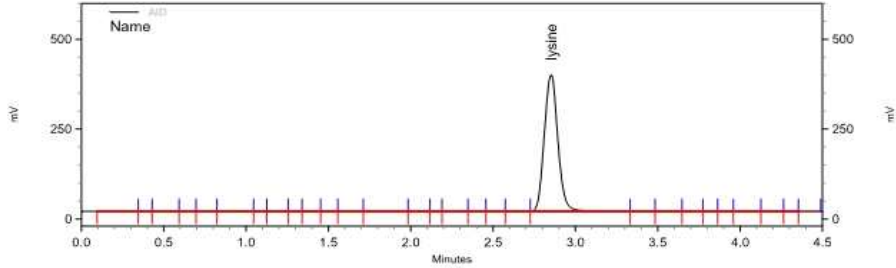
<L-lysine 정량분석 결과>

	검량선결과 (ug/mL)	최종량 (mL)	시료무게 (g)	함량 (mg/g)	평균 함량 (mg/g)
BSM-1	253.871	1000	9.9662	25.473	25.127 ±0.865
BSM-2	258.219	1000	10.022	25.765	
BSM-3	241.227	1000	9.9921	24.142	



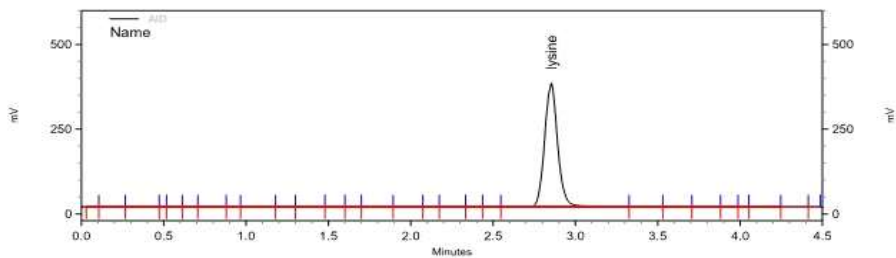
AID Results

Name	Retention Time	Area	PPM
lysine	2.847	8933605	258.219



AID Results

Name	Retention Time	Area	PPM
lysine	2.853	8719806	253.871



AID Results

Name	Retention Time	Area	PPM
lysine	2.853	8098085	241.227

<L-lysine 정량분석을 위한 HPLC profile>

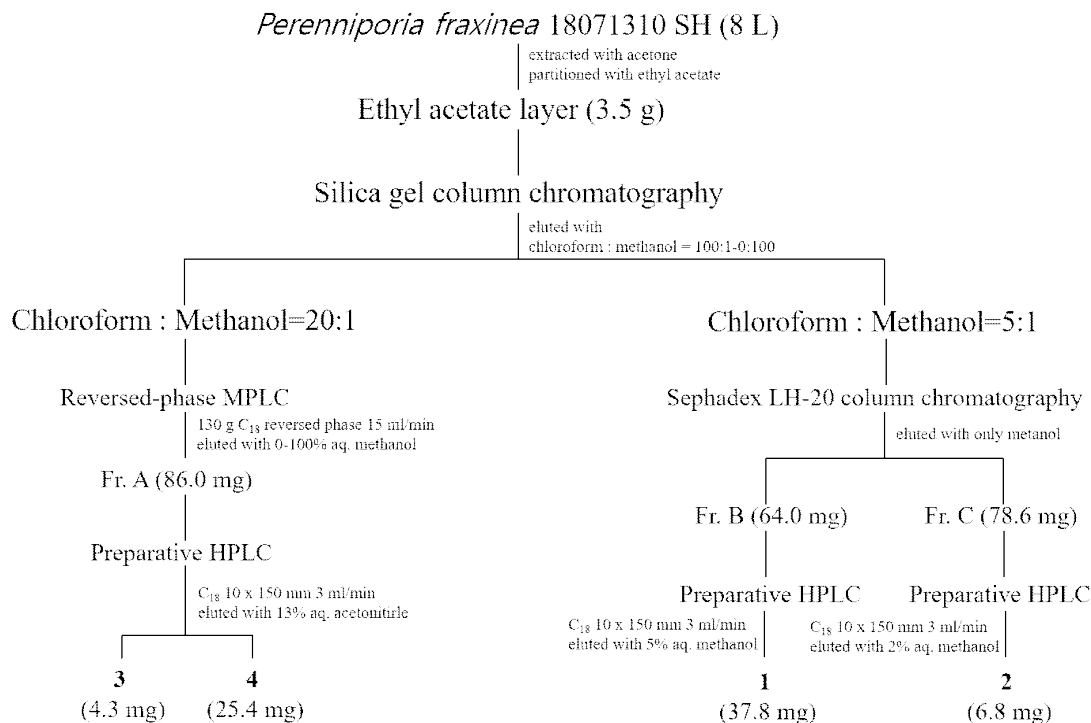
<곰팡이 균주 배양액으로부터 오이 흰가루병 길항물질 탐색>

본 연구에서는 당초 목표를 기반으로 바실러스 균주를 이용한 흰가루병 방제제의 개발과 곰팡이 대사산물 유래 흰가루병 억제 물질과 합성 전착제를 대체할 수 있는 천연 전착제의 연구도 병행하여 수행함. 합성 전착제는 효모로부터 탐색되었으나 바실러스가 생산하는 전착제인 surfactin을 산업화 균주가 이미 생산하는 바 추가적인 연구는 진행하지 않았으나 곰팡이 균주 배양액으로부터 신규 오이 흰가루병 억제물질을 발견함. 즉 20여종의 항균활성 곰팡이 배양액을 ethyl acetate로 추출한 후 추출물의 오이 흰가루병 억제활성을 스크리닝한 결과 곰팡이 *Perenniporia fraxinea* (아까시흰구멍버섯)에서 오이 흰가루병 억제활성이 나타냄. 따라서 활성물질을 분리, 정제하고 화학구조를 규명함.

- ▶ *Perenniporia fraxinea* 배양액으로부터 오이 흰가루병균 발아 억제물질의 분리 및 정제

선발 균주인 아까시흰구멍버섯 유래 곰팡이 균주를 potato dextrose broth (PDB) 배지에 진탕 배양하여 8 L의 배양액을 확보함. 배양액을 동량의 acetone으로 24시간 추출한 추출물을 여과한 후 여과액을 감압 농축하여 acetone을 제거한 뒤 ethyl acetate로 분배 추출함. Ethyl acetate 추출물을 감압 농축하여 chloroform : methanol (100:1-0:100, v/v)을 용출용매로 사용하여 silica gel column chromatography를 수행함. 분획물 중 chloroform : methanol (5:1, v/v) 분획을 농축한 후 100% aqueous methanol을 용출용매로 사용하여 Sephadex LH-20 column

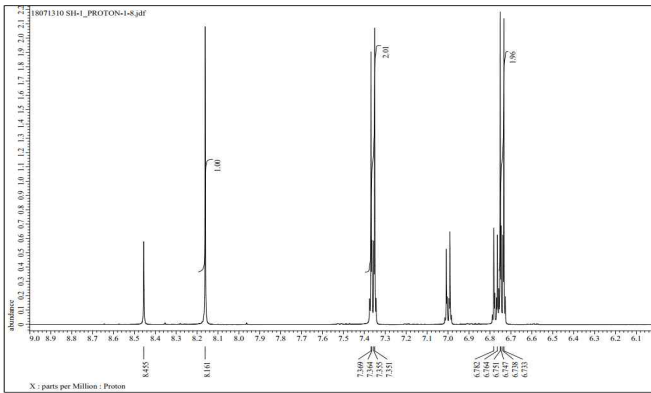
chromatography를 수행한 후 5% aqueous methanol, 2% aqueous methanol을 용출용매로 preparative HPLC를 수행하여 compound 1 (37.8 mg)과 compound 2 (6.8 mg)를 정제함. 분획물 중 chloroform : methanol (20:1, v/v) 분획을 농축한 후 0→100% aqueous methanol gradient를 용출용매로 사용하여 MPLC를 수행 한 후 13% aqueous acetonitrile을 용출용매로 사용하여 preparative HPLC를 수행하여 compound 3 (4.3 mg)과 compound 4 (25.4 mg)를 정제하여 총 4개의 화합물을 정제 하였으며 아래 그림에 정제 과정을 도시함. 또한, 분리한 4개 화합물의 화학구조를 규명하기 위하여 CD₃OD, DMSO-*d*₆에 녹여 ¹H NMR, ¹³C NMR 등의 1차원 NMR을 비롯하여 2차원 NMR인 ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC를 측정하여 해석함. 또한 ESI-mass 분석을 수행하여 화학구조를 확인함. 4개의 화합물 중 양적으로 주성분인 compound 1과 4의 흰가루병균 발아 억제활성을 검정한 결과, 1 mg/mL의 농도에서 42% 정도의 억제활성을 나타냄.



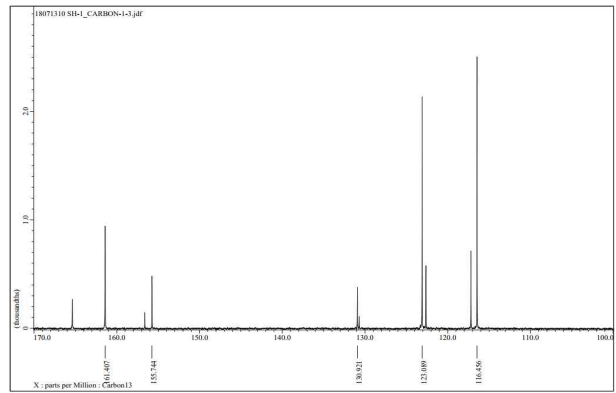
<*Perenniporia fraxinea* 배양액으로부터 오이 흰가루병균(*Sphaerotheca fusca*) 발아 억제 물질의 정제 과정>

- ▶ *Perenniporia fraxinea* 배양액으로부터 오이 흰가루병균 발아 억제물질의 화학구조 분석
 - Compound 1의 화학구조

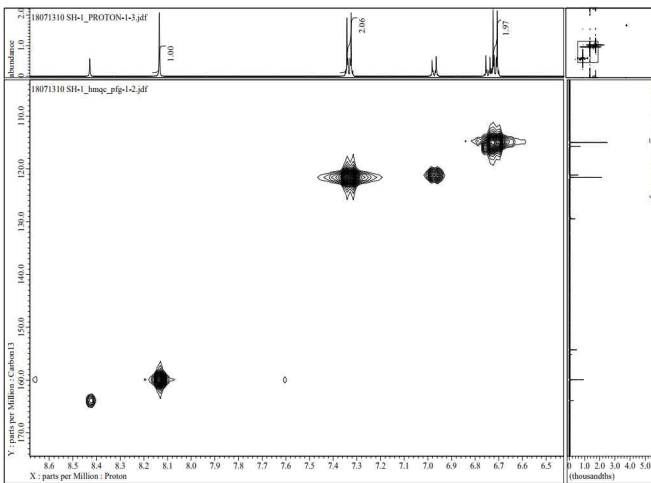
Compound 1을 CD₃OD에 녹여¹H NMR spectrum을 측정한 결과 δ_H 8.16에서 aldehyde proton, δ_H 7.37, 6.75에서 네 개의 aromatic methine proton이 관찰됨. ¹³C NMR spectrum을 측정한 결과, δ_c 161.4에서 한 개의 amide carbonyl carbon, δ_c 155.7에서 oxygenated sp² quaternary carbon, δ_c 130.9에서 sp² quaternary carbon, δ_c 116.5, 123.1에서 4개의 aromatic methine carbon이 관찰됨. HMQC spectrum을 측정하여 proton-bearing carbon (¹J_{C-H})을 규명할 수 있었고, HMBC spectrum을 측정하여 해석한 결과, 각각의 proton으로부터 관찰된 long-rang correlation으로부터 본 화합물의 화학구조를 4-Hydroxyformanilide 결정함. 또한, ESI-mass spectrum을 측정한 결과, *m/z* 136.0에서 [M-H]⁻ 분자 이온 피크가 관찰되어 분자량이 137임을 확인하였고 분자식이 C₇H₇NO₂임을 확인함. 이는 NMR 분광분석에 의하여 결정된 화학구조와 정확히 일치하였으며 분석결과와 화학구조를 아래에 도시함.



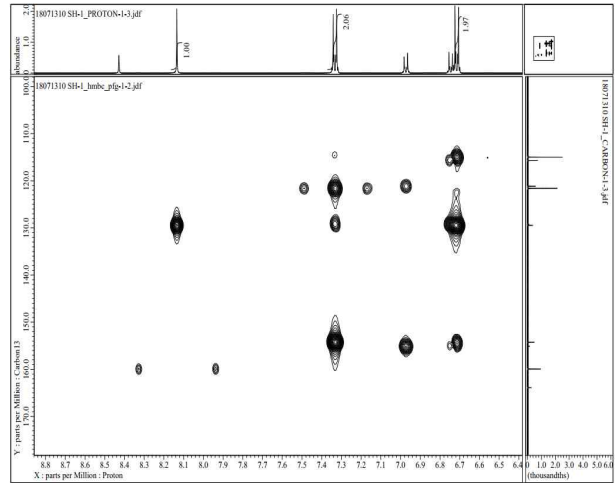
<Compound 1의 ^1H NMR spectrum>



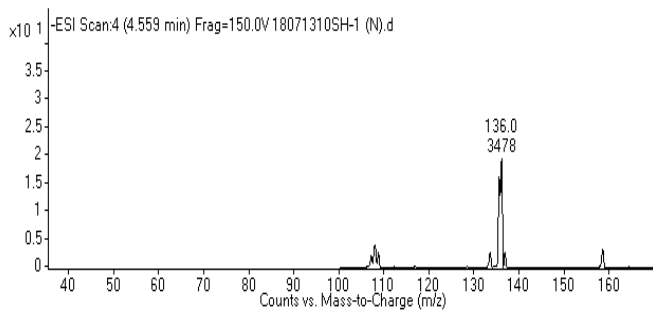
<Compound 1의 ^{13}C NMR spectrum>



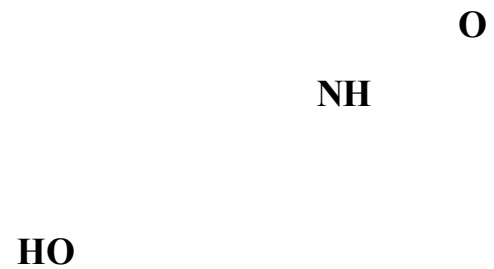
<Compound 1의 HMBC spectrum>



<Compound 1의 HMBC spectrum>



<Compound 1의 ESI-mass spectrum>

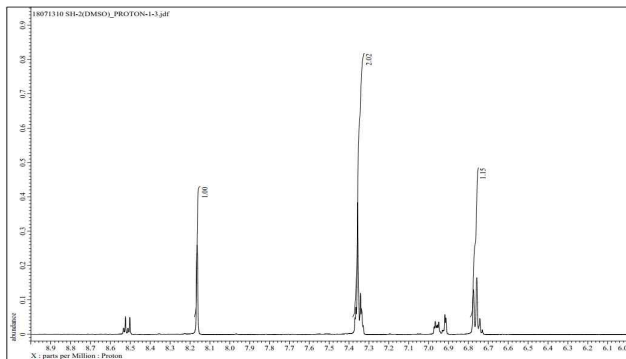


<Compound 1의 화학구조>

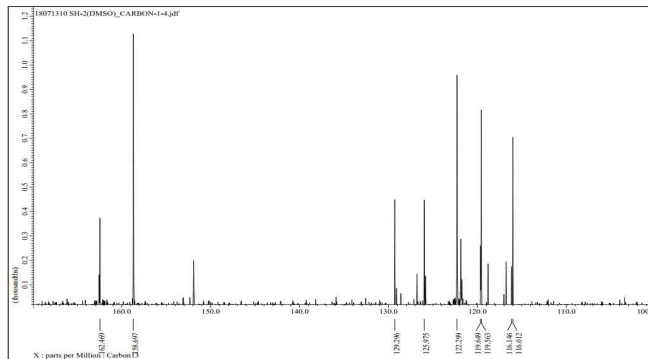
- Compound 2의 화학구조

Compound 2를 $\text{DMSO}-d_6$ 에 녹여 ^1H NMR spectrum을 측정한 결과 서로 다른 intensity를 갖는 두 set의 signal이 관찰되었으며, 이는 1:0.33의 비율로 된 혼합물의 존재를 나타내었으며 HPLC로는 분리되지 않음. 주성분은 δ_{H} 9.87에서 한 개의 amide proton, δ_{H} 8.16에서 aldehyde proton, δ_{H} 7.36, 7.35, 6.76에서 세 개의 aromatic methine proton이 관찰됨. ^{13}C NMR spectrum을 측정한 결과, δ_{C} 158.7에서 한 개의 amide carbonyl carbon, δ_{C} 129.3, 126.0에서 oxygenated sp^2 quaternary carbon, δ_{C} 122.3, 119.6, 116.0에서 3개의 aromatic methine carbon이 관찰됨. HMBC spectrum을 측정하여 proton-bearing carbon을 규명할 수 있었고, $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, HMBC spectrum을 측정하여 해석한 결과, 각각의 proton으로부터 관찰된 long-rang correlation으로부터 본 화합물의 화학구조를 신규 화합물로 결정함. 부성분은 δ_{H} 9.81에서 한 개의 amide proton, δ_{H} 8.51에서 aldehyde proton, δ_{H} 6.95, 6.91, 6.75에서 세 개의 aromatic methine proton이 관찰됨. ^{13}C NMR spectrum을 측정한 결과, δ_{C} 162.5에서 한 개의 amide carbonyl carbon, δ_{C} 153.1에서

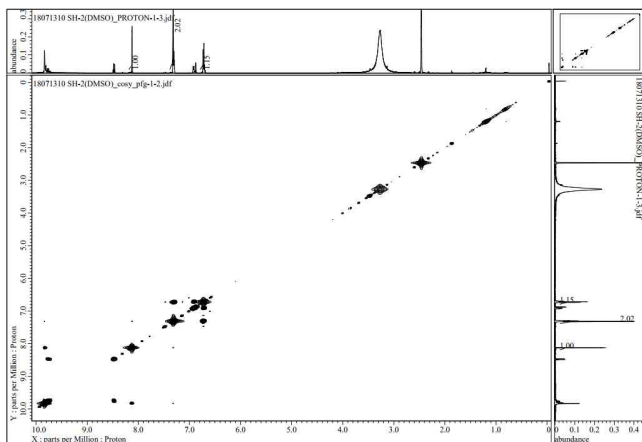
oxygenated sp^2 quaternary carbon, δ_c 129.1, 125.8에서 sp^2 quaternary carbon, δ_c 121.9, 118.8, 116.8에서 3개의 aromatic methine carbon이 관찰됨. 주성분과 부성분의 평면구조는 1H - 1H COSY, HMQC, HMBC spectrum을 해석한 결과 같은 평면구조의 rotamor로 규명함. 또한, HR-ESI-mass spectrum을 측정한 결과, m/z 295.0694 에서 $[M+Na]^+$ 분자 이온 피크가 관찰되어 분자량이 272임을 확인하였고 분자식이 $C_{14}H_{12}N_2O_4$ 임을 확인함. 이는 NMR 분광분석에 의하여 결정된 화학구조와 정확히 일치하였으며 분석결과와 화학구조를 아래에 도시함.



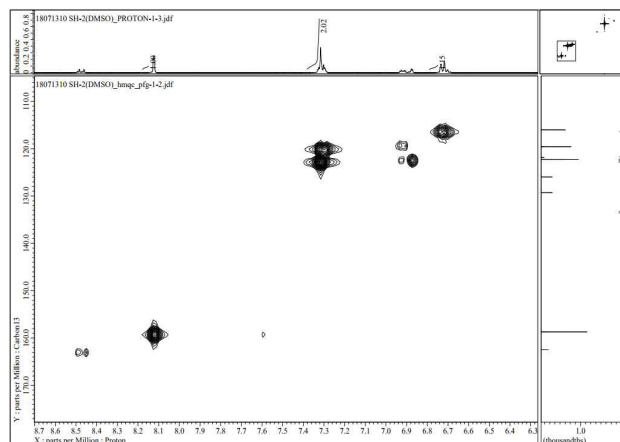
<Compound 2의 1H NMR spectrum>



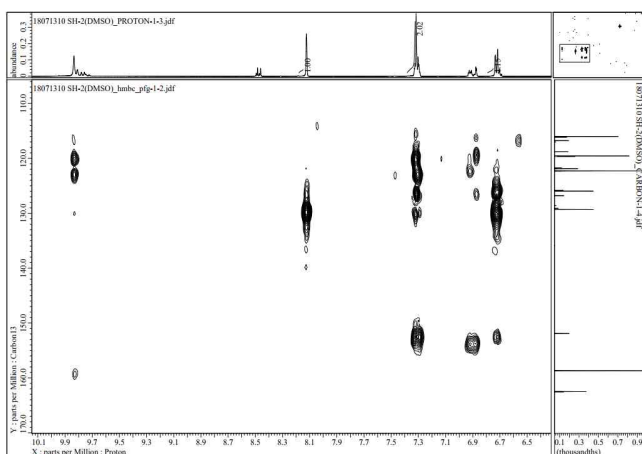
<Compound 2의 ^{13}C NMR spectrum>



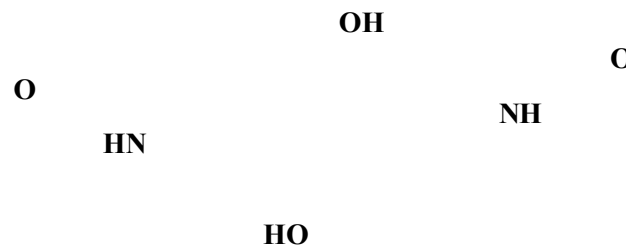
<Compound 2의 1H - 1H COSY spectrum>



<Compound 2의 HMQC spectrum>



<Compound 2의 HMBC spectrum>

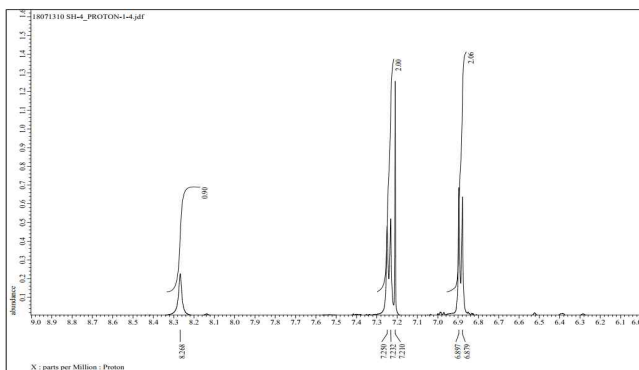


<Compound 2의 화학구조>

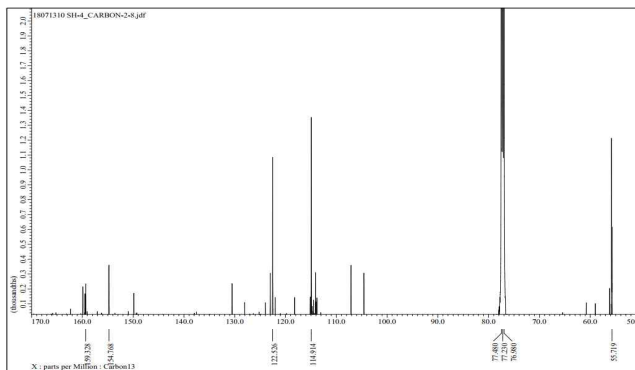
- Compound 3의 화학구조

Compound 3을 CD_3OD 에 녹여 1H NMR spectrum을 측정한 결과 δ_H 8.27에서 aldehyde proton, δ_H 7.28, 6.89에서 네 개의 aromatic methine proton, δ_H 3.78에서 methoxy proton이 관찰됨. ^{13}C NMR spectrum을 측정한 결과, δ_c 154.8에서 한 개의 amide carbonyl carbon, δ_c

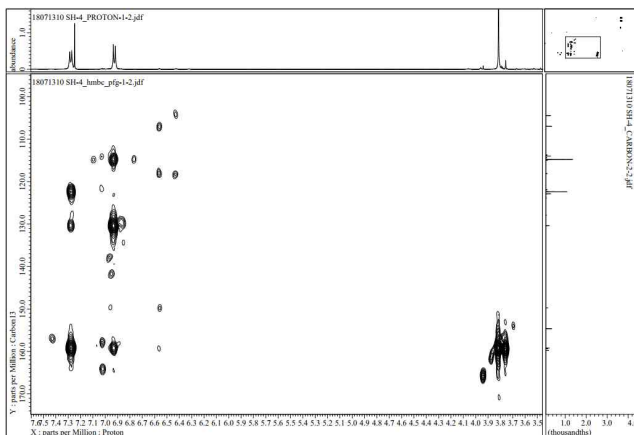
159.3에서 oxygenated sp^2 quaternary carbon, δ_c 130.5에서 sp^2 quaternary carbon, δ_c 122.5, 114.9에서 4개의 aromatic methine carbon, δ_c 55.8에서 methoxy carbon이 관찰됨. HMBC spectrum을 측정하여 해석한 결과, 각각의 proton으로부터 관찰된 long-rang correlation 으로부터 본 화합물의 화학구조를 *N*-hydroxy-4-methoxyformanilide로 결정함. 또한, ESI-mass spectrum을 측정한 결과, m/z 167.9에서 $[M+H]^+$ 분자 이온 피크가 관찰되어 분자량이 167임을 확인하였고, 분자식이 $C_8H_9NO_3$ 임을 확인함. 이는 NMR 분광분석에 의하여 결정된 화학구조와 정확히 일치하였으며 분석결과와 화학구조를 아래에 도시함.



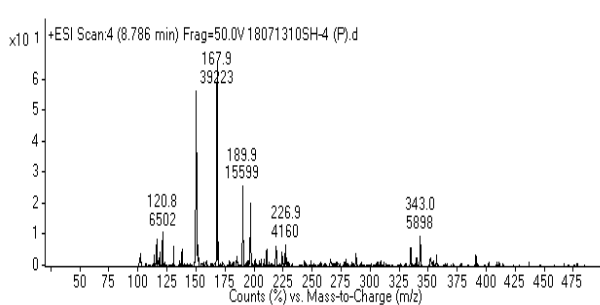
<Compound 3의 1H NMR spectrum>



<Compound 3의 ^{13}C NMR spectrum>



<Compound 3의 HMBC spectrum>



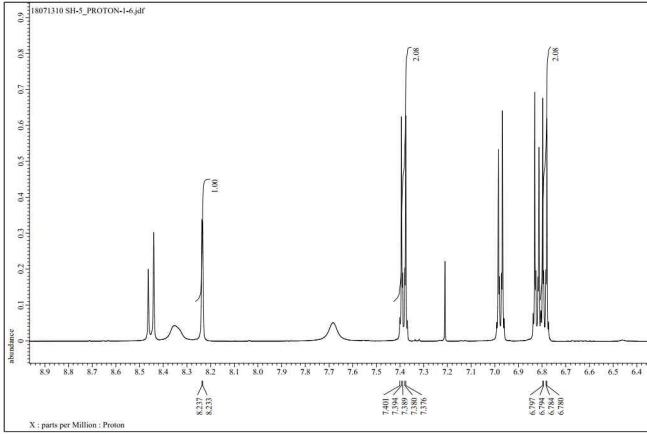
<Compound 3의 ESI-mass spectrum>



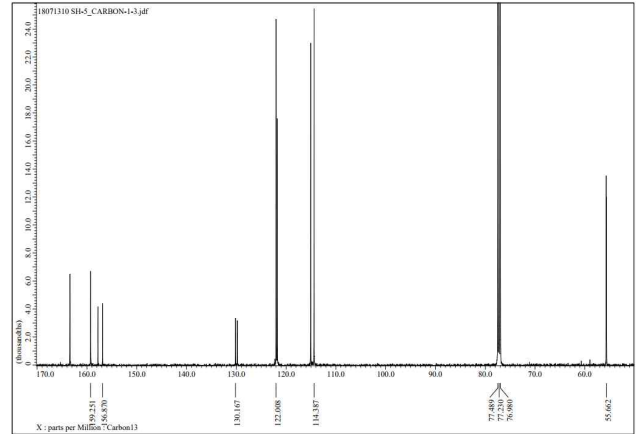
<Compound 3의 화학구조>

- Compound 4의 화학구조 규명

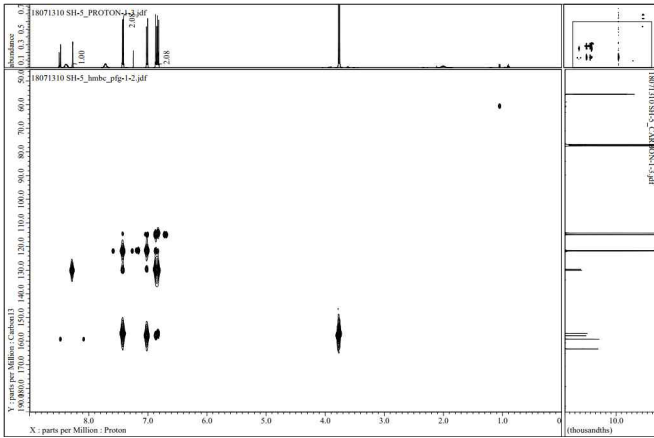
Compound 4을 $CDCl_3$ 에 녹여 1H NMR spectrum을 측정한 결과 δ_H 8.27에서 aldehyde proton, δ_H 7.42, 6.83에서 네 개의 aromatic methine proton, δ_H 3.76에서 methoxy proton이 관찰됨. ^{13}C NMR spectrum을 측정한 결과, δ_c 159.2에서 한 개의 amide carbonyl carbon, δ_c 156.8에서 oxygenated sp^2 quaternary carbon, δ_c 130.1에서 sp^2 quaternary carbon, δ_c 122.4, 114.8에서 4개의 aromatic methine carbon, δ_c 55.7에서 methoxy carbon이 관찰됨. HMBC spectrum을 측정하여 해석한 결과, 각각의 proton으로부터 관찰된 long-rang correlation 으로부터 본 화합물의 화학구조를 4-Methoxy-1-formanilide로 결정함. 또한, ESI-mass spectrum을 측정한 결과, m/z 302.9에서 $[2M+H]^+$ 분자 이온 피크가 관찰되어 분자량이 151임을 확인하였고 분자식이 $C_8H_9NO_2$ 임을 확인함. 이는 NMR 분광분석에 의하여 결정된 화학구조와 정확히 일치하였으며 분석결과와 화학구조를 아래에 도시함.



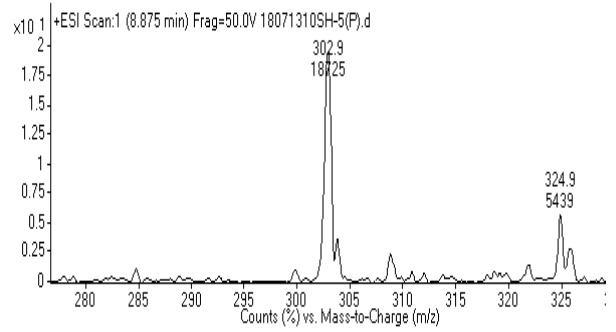
<Compound 4의 ^1H NMR spectrum>



<Compound 4의 ^{13}C NMR spectrum>



<Compound 4의 HMBC spectrum>



<Compound 4의 ESI-mass spectrum>

H
N **O**

O

<Compound 4의 화학구조>

[제1협동과제: 한경대학교 산학협력단]

<Bacillus sp. BS061 균주의 특성 구명>

▶ Bacillus sp. BS061 균주의 유전학적 특성 구명

후보균주 BS061의 16S ribosomal RNA 염기서열을 비교 분석한 결과, *Bacillus subtilis* strain 2073826과 98%의 염기서열이 일치함.

<Homology of BS061 to *Bacillus subtilis* strain 2073826 16S ribosomal RNA sequence>

Identities	Gaps
971/986(98%)	11/986(1%)

▶ Bacillus sp. BS061 균주의 식물 병원성 곰팡이에 대한 항균 활성

본 연구에 사용한 BS061의 항균력 실험은 곰팡이균이 잘 성장할 수 있는 Potato Dextrose Agar (PDA)배지를 조제하고 배지 중앙에 고추역병균(*Phytophthora capsici*) 인삼잘록병균(*Rhizoctonia solani*), 고추탄저병균(*Collectotrichum coccodes*), 시드름병균(*Fusarium oxysporium*)의 균사절편 (직경 5mm)를 접종함. 병원균 접종부위로 부터 2.5 cm 떨어진 지점에 1×10^6 의 BS061을 $5 \mu\text{l}$ 접종하여 7 내지 14일 후에 각각의 병원균의 균사 생육 억제효과를 관찰함. 그 결과 BS061 세균 집락은 4종류의 곰팡이 병원균에 대하여 70%이상의 균체 성장억제효과를 나타냄.



Phytophthora capsici *Rhizoctonia solani* *Collectotrichum coccodes* *Fusarium oxysporium*

<Antifungal activity of phytopathogenic fungi by bacterial cells of *Bacillus subtilis* BS061 cells>

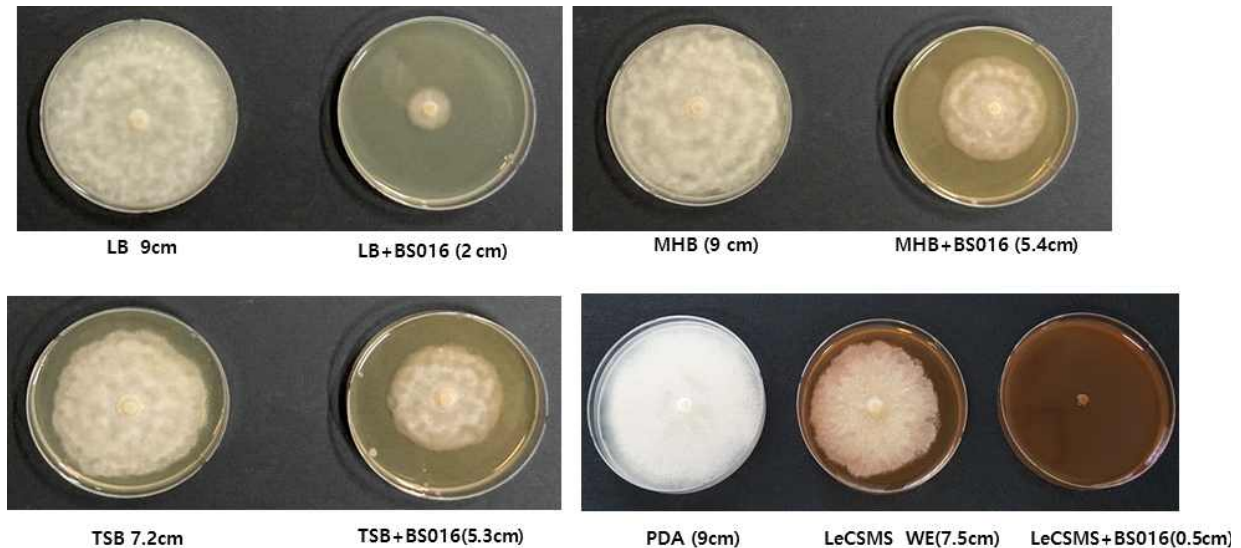
<Bacillus sp. BS061 균주의 배양조건에 따른 항균 효과>

일반적인 세균 배양배지로 가장 많이 사용되는 상용화 배지 Tryptic soy broth 배지(TSB, Triptone 17.0g, Soytone 3.0g, Sodium Chloride 5.0, Dipotassium Phosphate 2.5g, Dextrose 2.5g /물 1 L), Lurina-Bertani broth (LBB, Yeast extract 5g, Tripton 10g, NaCl 10g /물 1L), 및 Mueller Hinton broth (MHB, Beef extract 2g, Acid Hydrolysate of Casein 17.5g, Starch 1.5g, / 물 1L)를 사용함. 추가적으로 표고버섯 수확 후 배지 퇴비(LeCSMS)건조물 50 g에 물 1L를 첨가하여 실온에서 80 rpm으로 4시간 추출함. LeCSMS 건조물 찌꺼기를 7000 rpm으로 원심 분리하여 잔여물을 제거하고 LeCSMS의 water extract (WE)로 사용함. LeCSMS WE 200 ml에 당밀을 1% 첨가하고, 15기압 121°C 조건에서 15분간 가압 멸균하여 LeCSMS WE 배지로 사용함. BS061 세균 밀도 1×10^7 /ml로 조정하여 각각의 액체배지에 $50 \mu\text{l}$ 를 접종하고, 100 rpm에서 2일간 진탕 배양함. 각 BS061 세균의 성장률은 희석배양법으로 TSB에 도말하여 형성된 세균 수를 CFU/ml로 결정함. 아래 표는 그 결과로서 LeCSMS WE + 당밀 1% 배지는 Tryptic soy broth, Lurina-Bertani broth, Mueller Hinton broth 배지에 비하여, 세균 수가 100 배에서 10 배 이상 증가되었음. 따라서 LeCSMS WE 배지는 BS061 세균을 배양하는데 상용화된 배지보다 효과적인 것으로 판단됨.

<Bacterial density of *Bacillus substilus* BS061 on different media>

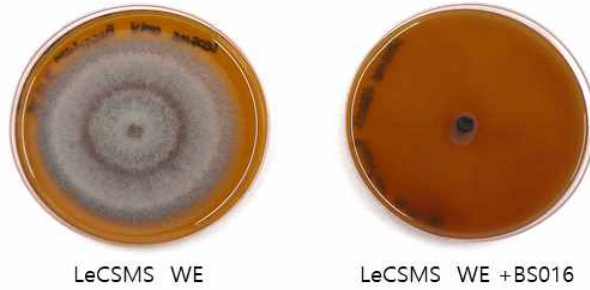
Culture Media	Bacterial density(CFU/ml)
LeCSMS WE + molasses 1%	6.2 x 10 ⁹
Triptic soy broth	4.0 x 10 ⁷
Lurina-Bertani broth	1.2 x 10 ⁷
Mueller Hinton broth	7.5 x 10 ⁸

각각의 배양체를 7000 rpm으로 원심분리하여 BS061 세균을 제거하고 1/2 PDA배지를 첨가하여 고압살균하고 배지 중앙에 고추역병균 (*Phytophthora capsici*), 인삼잘록병균 (*Rhizoctonia solani*), 고추탄저병균 (*Collectotrichum coccodes*), 시드름병균(*Fusarium oxysporium*) 균사절편(직경 5mm)을 접종하여 배양체 종류별 균사 억제효과를 조사함. 아래 그림은 고추역병과 시드름병균 균사체 절편(직경 5 mm)을 상기에서 제조한 배지의 중앙에 접종하고 배양하지 않은 배지와 비교하여 곰팡이병원균의 균사 생장억제율을 나타낸 것임. LeCSMS+BS061 배양체에서 고추역병균사체 성장이 대조구에 비하여 94%이상 억제되었으며, LB+BS061 (78%), MHB (40%), TSB (27%) 보다 탁월한 항균활성을 나타냄. 아래 그림은 시드름병균의 항균 활성을 실시한 예로서 LeCSMS 물 추출배지와 당밀 1% 조합 배지는 BS061 배양과 항균 활성을 고도화시키는 데 매우 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대됨. 일반적으로 사용되는 세균배양용 MH, TS, LB 미생물 배지는 매우 고가이며, 미생물을 대량 배양할 때 원가 상승의 주요 요인이 되고 있음. 반면에 LeCSMS 배지는 물 추출만으로 매우 저렴하게 제조할 수 있으며, 항균 활성효과가 높고 식물 생장 액상 비료 효과를 얻을 수 있어 친 환경 미생물농약 제조에 매우 유용한 재료로 활용할 수 있을 것으로 사료됨.



<Antifungal activity on different media cultured with *Bacillus substilus* BS061>

아래의 그림은 LeCSMS 물 추출배지와 당밀 1% 조합배지에 BS061 균주를 배양하여 PDA를 첨가한 배지에 시드름병원균 균사체 절편을 중앙에 접종하고 균사 생장율을 조사한 것임. 그 결과 90% 이상의 균체 생장억제 효과를 나타내어 고추역병균 뿐만 아니라 첨가적인 식물 병원균에 대한 항균 활성이 있는 것으로 나타남. 따라서 LeCSMS 물 추출 배지 배양체는 고추역병 뿐만 아니라 다양한 식물 병원균에 적용 가능할 것으로 사료됨.



<Antifungal activity of *Fusarium oxysporium* on LeCSMS media cultured with *Bacillus* sp. BS061>

<표고 수확 후 배지 퇴비 (LeCSMS) 추출물의 이화학적 특성>

LeCSMS WE 배지에 위의 방법으로 BS061 세균을 2일 동안 배양하였으며, 7000 rpm으로 원심분리하여 세균을 제거한 배양액 500 ml를 분석 전문기관인 에이티분석센터(주)에 의뢰하여 이화학적 분석을 실시함. LeCSMS WE는 BS061을 접종하지 않은 대조구를 나타내며, LeCSMS WE+BS061은 BS061을 접종한 배양체를 나타냄. 아래의 표에 나타난 바와 같이 LeCSMS+BS061의 pH는 6.25로 대조구 LeCSMS WE의 pH 7.25보다 낮았으나 EC dS/m, 질소, 인, 칼리, 마그네슘, 칼슘 성분은 소폭 상승하는 효과가 있음. 배지 안정성은 매우 높음.

<Physicochemical analysis of LeCSMS water extracts>

Items	pH	EC dS/m	T-N g/100 ml	T-P g/100 ml	T-K g/100 ml	Mg g/100 ml	Ca g/100 ml
LeCSMS WE	7.25	4.76	0.051	0.036	0.102	0.028	0.029
LeCSMS WE+BS061	6.25	5.63	0.058	0.038	0.11	0.031	0.031

한편 LeCSMS 내의 유해물질인 중금속 이온을 조사한 결과, 아래의 표에 나타난 바와 같이 모두 불검출 또는 기준치 이하로 나타나 인체 유해물질의 위험성이 없는 것으로 확인됨.

<Analysis of harmful metal ions in the medium>

Analytical items	Limited value	Results
비소As(mg/L)	45 or less	Not Detected
카드뮴Cd(mg/L)	5 or less	Not Detected
수은Hg(g/L)	2 or less	Not Detected
납Pb (mg/L)	130 or less	Not Detected
크롬Cr (mg/L)	200 or less	Not Detected
구리Cu (mg/L)	360 or less	Not Detected
니켈Ni (mg/L)	45 or less	0.48
아연Zn (mg/L)	900 or less	Not Detected

<BS061 배양배지 별 오이 흰가루병의 방제 효과>

오이(품종: 백다다기 오이)를 상토에 파종하여 온실에서 재배한 후 흰가루병 방제 효과를 검증함. 흰가루병이 초기 자연 감염된 오이 유묘에, 상기 TSB, LBB, MHB, LeCSMS WE 배지별 배양액을 3일 간격으로 2회 분무 처리한 후 7일 후에 흰가루병의 병반 면적율을 조사함. 그 결과 아래의 표에 나타난 바와 같이 LeCSMS + BS061에서 65%의 방제 효과를 나타냄. 그 밖의 배양 여액 처리 구에서는 배지별로 30에서 60%의 방제가를 나타냄. 이는 LeCSMS에서 배양한 BS061이 높

은 항균 활성과 함께 오이 잎의 병 저항성 유도와 연관된 것으로 사료 되어 앞으로 병 저항성 유도에 관한 실험을 수행할 예정임.



Water

LeCSMS + BS061

Azoxystrobin 농약

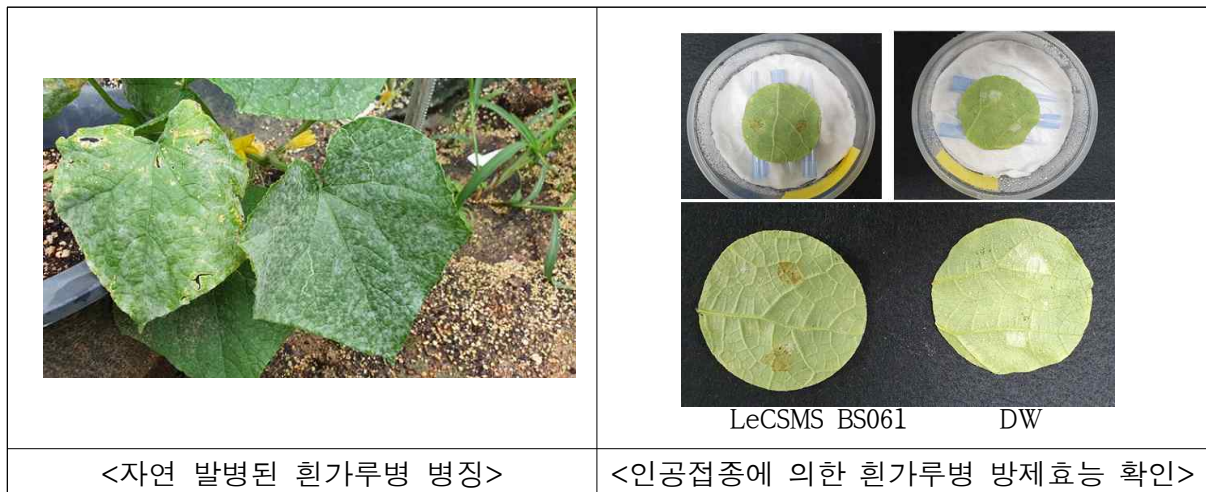
<Protective effect of LeCSMS BS061 culture filtrate against powdery mildew of cucumber>

<Control value of culture filtrates with BS061 against powdery mildew of cucumber>

Treatments	Control value(%)
TSB+BS061	40
LBB+BS061	30
MHB+BS061	60
LeCSMS WE+BS061	65
Water	0
Chemical	75

<In vitro 오이 흰가루병 인공접종>

오이 흰가루병은 절대기생균의 일종으로 인공배양이 불가능하여 병원성 또는 실내 방제 활성 검정이 매우 어려움. 따라서 흰가루병에 자연 감염 실험 포장에서 방제제 처리 효과 실험을 진행하는 것이 일반적임. 아래의 그림은 자연 감염된 흰가루병 병징을 나타냄. 흰가루병 인공접종에 의한 병 발병이 유도된다면 실험실 내에서 병 방제 효과실험이 가능할 것으로 판단되어 인공접종 시험을 수행함. 본 실험에서 오이 흰가루병균의 인공접종에 오이 잎 절편을 이용하였음. 아래의 그림에 나타낸 바와 같이 오이 잎 disk에 오이 흰가루병을 접종하여 오이 흰가루병이 발병되었으나 LeCSMS BS061 배양 여액 처리 구에서는 오이 흰가루병 병징이 나타나지 않음. 이는 LeCSMS BS061 배양여액이 흰가루병 방제 효과가 있는 것을 반증하는 것으로, 결론적으로 본 실험에서 오이 흰가루병의 인공접종에 의하여 발병유도가 가능하였고, 방제제 처리 효과실험에 적용 가능한 것으로 확인함.



<자연 발병된 흰가루병 병징>

<인공접종에 의한 흰가루병 방제효능 확인>

<BS061 배양배지 별 포자 발아 억제 효과>

BS061를 TSB, LBB, MHB, LeCSMS WE 배지에 2일 동안 배양하여 얻어진 배양여액을 이용하여 배양배지 별 포자 발아 억제 효과를 조사함. 배양여액에 Agar 2%를 첨가하여 슬라이드글라스에 도말하고 오이 흰가루병균을 자연 감염된 병반으로부터 회수하여 물에 1×10^4 /ml로 조정 후 20 μ l를 접종하고 커버글라스를 덮은 후 포화습도를 유지하여 24 시간동안 광선을 가하고 포자발아율을 조사함. 아래의 표는 그 결과로서 TSB BS061에서 4%만 오이 흰가루병이 발아하여 대조구인 물에 비하여 92%의 포자 발아 억제율을 나타냄. 다음은 LecSms BS061처리구로 4.9%의 포자발아율로 90.6%의 포자 발아 억제율이 나타냄. BS061을 배양하지 않은 LeCSMS 처리구에서는 40%의 포자 발아 억제율을 보여 LeCSMS 자체에도 포자 발아 억제 효과가 있는 것으로 판단됨. 아래의 그림은 물 처리구에서 포자로부터 발아관이 형성된 것을 관찰할 수 있었으며, LecSms BS061과 농약 처리구에서는 포자 발아 억제가 관찰됨.

<Effects on spore germination of cucumber powdery mildew by treatments of culture filtrates with BS061>

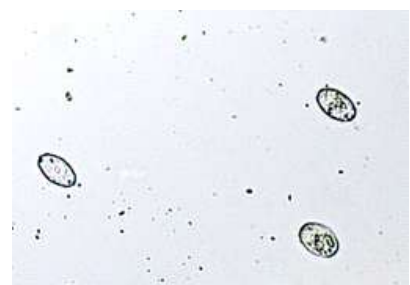
Treatments	Germination ratio (%) on 100 spores
LeCSMS	29.7
LecsMs BS061	4.9
MHB BS061	8.6
TSB BS061	4
LBB BS061	12
Water	51.6
Chemical (Azoxystrobin +difenoconazole)	0



Water



LecsMs BS061



Chemical

<Spore germination of cucumber powdery mildew by different treatments>

또한, 제1세부과제를 수행하는 전북대학교는 BS061 배양 여액으로부터 흰가루병 억제 활성 성분을 분리, 정제하고 있음. 이들 정제 과정에서 필요한 각 분획물의 활성 검정은 본 연구팀에서 수행하고 있으며, 정제 과정에서 확보한 각 분획물에 대하여 오이 흰가루병 포자발아율을 조사한 결과는 아래의 표와 같음. BS061 배양액 용매 분획물에 따라서 높은 포자발아 억제율을 나타내었으며, 특히 B2 샘플은 농도 의존적으로 98% 이상 포자 발아 억제율을 나타냄. 결론적으로 본 연구의 포자발아 실험은 분획별 또는 배양조건별 항균활성의 신속한 스크리닝에 적용할 수 있을 것으로 판단됨.

<Effects on spore germination of cucumber powdery mildew by treatments of extract from BS061 culture filtrates>

Treatments	Concentrations (mg/L)	Germination ratio (%) on 100 spores
B1	500	10
B1	1000	2.2
B1	2000	1.9
B2	500	5.8
B2	1000	0.5
B2	2000	0.6
Chemicals (Azoxystrobin +difenoconazole)	1/2000	1
Water	-	44

<Bacillus sp. BS061 유래 돌연변이 균주 BSM-320의 오이흰가루병 방제효과>

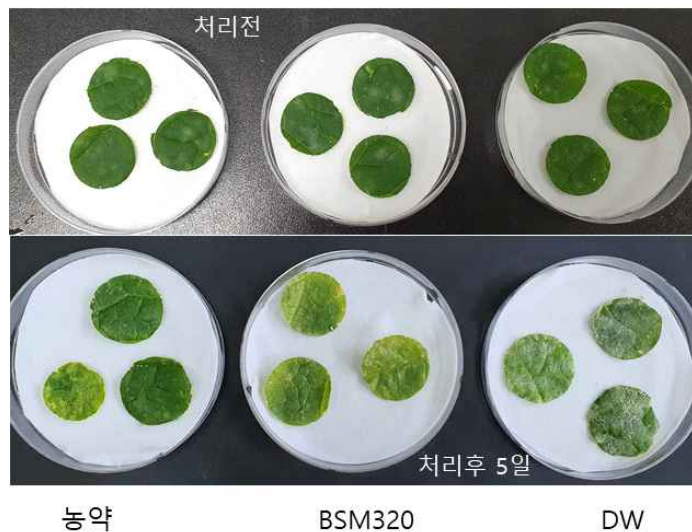
▶ 오이흰가루병 감염 오이 잎 절편을 이용한 돌연변이주 BSM-320의 흰가루병 방제효과 구명

전북대에서 분양받은 *Bacillus* sp. BS061 유래 돌연변이주 BSM-320은 항균효과가 우수하며 장기보존이 가능한 균주로 확인됨. 본 연구에서는 BSM-320 균주의 오이흰가루병에 대한 방제 효과를 조사함. 오이 흰가루병은 순환물기생성균으로 포장실험을 수행하여야하는 방제효과 검정에 난점이 있음. 특히 길항성균주 선발 및 유효성분의 방제효과의 1차 스크린에 실험실내에서의 신속검정법이 요구됨. 본 연구에서는 신속한 병 방제효과를 스크리닝하기 위하여 오이흰가루병에 초기 감염된 오이절편을 이용함.

- (1) 미생물배양: BS320를 2×10^8 /mL으로 조정한 세균세포 1 ml를 1000 ml LB 액체배지에 접종하고 48시간동안 150 rpm으로 진탕배양함.
- (2) 처리방법: 오이흰가루병에 초기 감염된 이병잎을 직경 2.5 cm로 절단하여 1/10로 희석한 BSM-320 LB 액체배양 현탁액에 감염 오이 잎절편을 하향으로 하여 2분간 처리함. 양성 대조구로 농약(Azoxystrobin + difenoconazole) 1000배 희석액을, 음성 대조구로는 살균수(Distilled Water, DW)를 동일한 방법으로 처리함. 처리된 오이잎 절편을 물을 흡습한 3장의 여과지를 포함하는 용기(10 cm)에 올려 놓고 포화습도를 유지하여 25°C에서 12시간 주기로 광을 조사하면서 5일 동안 보존함.
- (3) 처리결과: 전북대로부터 분양받은 BS061 변이체 중에서 길항성이 우수한 BSM-398과 BSM-320을 분양받아 LB 액체배지에 배양하고 LB 배양체의 세포농도는 2×10^9 cfu/mL로하여 1/10 희석액을 감염오이 잎 절편에 처리함. 감염지수를 1: 엽당 병반면적을 1-5%, 2: 엽당 병반면적을 5.1-25%, 3: 엽당 병반면적을 25.1-50%, 4: 엽당 병반면적을 50.1% 이상으로 하여 발병도를 산출함. BS016은 발병도 13%와 방제가 87%로 나타났으나 BS016은 액체상태로 1주 이상 보존할 경우 세균 세포가 lysis되는 현상이 나타나 활용적 측면에서 재고됨. BS016 변이체 중에서 BSM-398도 같은 현상이 관찰됨. 그러나 BSM-320은 발병도가 10%로 가장 우수한 방제효과를 보였으며, 장기 보관하여도 lysis 현상이 관찰되지 않아 미생물농약 균주로 적절한 것으로 판단되었음(아래 표 참조). 아래 그림은 오이 잎 disk 방법에 의하여 처리구별 흰가루병 억제효과를 나타낸 것으로 대조구 DW 처리구는 오이잎 표면에 흰가루병 포자가 전체적 옆면적에 다수 형성된 반면에 BSM-320 처리구는 흰가루병 포자가 거의 형성되지 않아 방제효과의 유효성이 인정됨.

<Suppression of cucumber powdery mildew by BS061 mutants>

Treatments	Disease incidence (%)
Water	97
BSM 398	16
BSM 320	10
BS 061	13
30% Azoxystrobin+difenoconazole 1/1000 dilution	0



<Bioassay for biological control of cucumber powdery mildew using the infected cucumber leaf discs>

BSM-320 LB 배양체의 희석농도별 오이흰가루병 억제효과를 조사한 결과 1/20까지 70%의 방제효과가 있었으며 1/40 희석농도에서는 급격히 방제효과가 떨어짐(아래 그림 참조). 따라서 1×10^8 cfu/mL 이상 일 때 방제효과가 높은 것으로 추정할 수 있음.



<Suppression effects of cucumber powdery mildew by dilution points of BSM-320>

BSM-320 LB 배양체를 7000 rpm에서 원심분리하여 배양여액과 세균세포로 나누고 1/10로 희석하여 각각 오이잎 Disk 방법으로 처리한 후 6일 후 오이 흰가루병 발병도를 조사한 결과 아래의 표와 같이 배양여액에서 32%의 발병도를 보였으나 세균세포 처리구에서는 90% 이상의 발병도가 나타나 배양여액의 항균성 물질이 유효한 오이흰가루병 발병억제력이 있으며 세균세포 자체에는 효과가 거의 없어 이를 참고하여 미생물제형 개발연구가 필요함.

<Suppression effect of cucumber powdery mildew by BSM-320 culture filtrate>

Treatments	Disease incidence (%)
DW	100
BSM-320 culture filtrate	32
BSM-320 bacterial cell	90
30% Azoxystrobin+difenoconazole 1/1000 dilution	0

▶ **흰가루병 감염 disk 절편을 이용한 항균분획물의 오이흰가루병 억제효과 구명**

길항성미생물로부터 항균성물질 분리 및 활성분석은 분리 물질이 소량이기 때문에 순환물 식물병원균인 오이흰가루병을 대상으로 포장에서 실험하기 불가능함. 따라서 본 연구에서 개발한 오이 잎 disk방법에 의하여 수행함. 전북대에서 제공한 BS016 유래 항균활성 분획물을 1000 ppm으로 조정하여 흰가루병 감염 오이 잎 disk 절편에 처리한 후 오이흰가루병 억제율을 조사한 결과, 2-4 샘플에서 발병율 9%로 오이흰가루병 억제효과를 확인함(아래 표 참조). 이 결과는 분획된 소량의 물질을 이용하여 흰가루병균에 대한 항균성 여부를 스크리닝 하는데 유용하게 활용 가능할 것으로 사료됨.

<Suppression of cucumber powdery mildew by fractions from BS061 culture filtrate provided by Jeonbuk Natl University>

Treatments	Disease incidence (%)
DW	100
Azoxystrobin+difenoconazole 1/1000 dilution	0
L-lysine	90
1-B	75
4-1	81
2-1	41
2-2	56
2-3	44
2-4	9

<표고버섯 수확 후 배지 퇴비(LeCSMS) 추출물을 이용한 BSM-320 균주의 배양 및 오이흰가루병 억제 효과>

버섯 수확 후 배지(SMS)는 농약, 중금속 등 유해물질이 없을 뿐만 아니라 표고버섯이 생산한 다양한 2차대사물과 병 저항성 유도 물질이 포함되어 있어 기능성 유기농 퇴비로 유용하게 활용 가능함. 표고버섯 수확 후 배지 퇴비(LeCSMS)화 과정은 중온단계, 고온단계, 숙성단계를 거치는데 50℃에서 70℃ 고온단계가 지속함으로써 물리 화학적 변화가 발생함. 표고버섯 SMS의 퇴비화 (composting) 과정에서 발생하는 물리 화학적 변화는 pH 6.0 이상의 식물생육에 대한 안정성과 NPK 비료성분과 미네랄성분의 증가를 가져옴. 이러한 영양원은 미생물배양에 활용할 수 있으며 김 등(2021)에 의하여 *Bacillus velezensis* HKB-1를 LeCSMS에 배양하여 고추역병 방제에 활용한 바 있음. 미생물배양을 위하여 고가의 상용화된 미생물 배지를 이용하고 있어 미생물농약 제조의 생산단가 상승의 요인이 되고 있고, 이를 해결하기 위하여 LeCSMS 추출물의 미생물생산 배지로 활용하게 되면 미생물배양 비용을 줄이면서 식물체에 생육효과를 더하는 복합효과를 기대할 수 있음. 본 연구는 LeCSMS추출물을 이용하여 BSM-320 균주를 배양하여 오이흰가루병 방제효과를 조사함.

▶ **표고버섯 수확 후 배지 퇴비 추출배지 제조 및 BSM-320 균주의 배양**

표고버섯 수확 후 배지 퇴비(LeCSMS)건조물 50 g에 물 1 L를 첨가하여 실온에서 80 rpm으로 4시간 추출하였으며 미라크로스에 걸러 여과된 액상추출물을 LeCSMS의 water extract (WE)

로 하였음. LeCSMS WE 100 mL가 들어있는 삼각 플라스크에 당밀(Molasses) 등 아래의 표에 기술한 다양한 탄소원을 1%첨가하여 15기압 121℃ 조건에서 15분간 가압 멸균함. 대조구로는 Lurina-Bertani broth(LB, Duchefa) 배지를 사용함. 탄소원이 첨가된 LeCSMS 액체배지에 1×10^7 /mL의 BSM-320 세균세포 50 μ l를 접종하고 28℃ 2일간 150 rpm에서 진탕배양하여 세균농도를 colony forming unit(cfu)/mL로 측정함. 그 결과를 아래의 표에 나타내었으며, BSM-320 균주는 Molasses 탄소원 배지에서 4.2×10^9 cfu/mL로 가장 높은 세균밀도를 나타냈으며 다음으로 Glucose, LB, Sucrose 순서였음. 그 밖의 탄소원은 세균성장에 유효성이 있는 생장촉진효과를 보이지 않았음. 따라서 당밀과 Glucose 탄소원 LeCSMS배지가 LB 배지에서 배양된 세균세포 밀도보다 우수하게 나타남. 위 결과로 LeCSMS 물 추출물에 적절한 탄소원을 첨가해 주면 BSM-320을 효율적으로 배양 가능할 것으로 사료됨.

<Effects of LeCSMS water extract containing difference carbon sources for growth rate of BSM-320 bacterial cells>

Carbon sources in LeCSMS	Bacterial cells (cfu/mL)
0	$3.0 \times 10^7 \pm 113.7$
Molasses	$4.2 \times 10^9 \pm 113.7$
Glucose	$4.0 \times 10^9 \pm 39.3$
Mannitol	$2.2 \times 10^9 \pm 30.6$
Starch	$1.28 \times 10^9 \pm 69.3$
Xylose	$7 \times 10^6 \pm 6.7$
Sorbitol	$6.07 \times 10^8 \pm 81.9$
Lactose	$5.3 \times 10^7 \pm 6.7$
Sucrose	$7.93 \times 10^8 \pm 133.8$
Dextrin	$9.6 \times 10^8 \pm 147.4$
Glycerol	$6.53 \times 10^8 \pm 40.6$
Galactose	$1.87 \times 10^8 \pm 70.6$
Maltose	$4.4 \times 10^8 \pm 11.5$
LB medium (control)	$2.287 \times 10^9 \pm 153.8$

▶ LeCSMS 물 추출물 BSM-320 배양체의 오이흰가루병 억제효과 구명

LeCSMS 물 추출물에 1%의 당밀, Glucose, Sucrose 탄소원이 BSM-320 세균생장을 촉진하는 것을 확인하였던 바 이들 배양체의 오이흰가루병 억제율의 유효 효과여부를 조사함. 조사방법은 오이감염 잎 disk에 위 배양액을 1/10희석하여 처리하였으며 5일 후 오이흰가루병 억제효과를 음성 처리구인 물처리구와 양성 대조구인 농약처리구를 비교함. 1% 당밀(Molasses) 첨가의 경우 70%의 발병을 나타내었으나, 1% Glucose 첨가의 경우 LB 배지에 배양한 것과 동일한 5%의 발병도를 나타냄. 즉 가격이 저렴한 LeCSMS 물 추출물에 1% Glucose를 첨가하면 산업적으로 배양 시 고가의 비용이 유발되는 배양배지의 단가를 낮출 수 있을 것으로 판단됨.

<Suppression effects of cucumber powdery mildew on BSM-320 cultured in LeCSMS water extracts containing difference carbon sources>

Culture media	Disease incidence (%)
LB liquid	5
LeCSMS + 1% Molasses	70
LeCSMS + 1% Glucose	5
LeCSMS + 1% Sucrose	30
DW	100
Azoxystrobin+difenoconazole 1/1000 dilution	0

<오이의 병 저항성 유전자 발현 연구>

일반적으로 ISR은 비병원성 미생물에 의하여 작동되며 Jasmonic acid (JA)와 ET (Ethylene)에 의해서 유도되는 것으로 알려져 있음. PR1과 PR3 유전자는 salicylic acid (SA) signal pass way에 포함되어 있음. LOX1에 encode되는 lipoxygenase는 JA의 생합성과정의 첫 번째 효소로 보고 된 바 있음. 지금까지 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 감염에 의한 병 저항성 유전자 발현 기구가 수행되었지만 오이 흰가루병 병 저항성 유전자 발현에 관련된 연구는 매우 미흡함. 비병원성 *Fusarium oxysporium* CS-20 감염에 의한 오이뿌리에서 병저항성 유전자 발현을 Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) 분석으로 수행된 바 있음. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) 효소는 식물 세포벽의 리그닌화에 포함되어 있으며 cucumber pathogen-induced 4 (Cupi4)와 WRKY transcription factors (TFs)는 식물병원균에 감염된 오이에서 발현되는 방어 유전자로 보고된 바 있음. 식물 면역반응에 관련된 CsLecRK6.1는 오이 저항성품종에서 *P. melonis* 감염식물에서 유도되는 것으로 보고 된 바 있음. 최근 비 병원성 CS-20 매개 방어 반응은 PR3, LOX1 및 PAL1에 의해 활성화되었으며, 병원성 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 매개 저항 반응은 PR1과 PR3에 의해 조절되는 것으로 알려짐. CS-20은 접종후 PR3, LOX1, PAL1, NPR1, CsCam7 및 CsCam12 유전자 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있음. 오이 흰가루병에 의한 유전자 발현연구에서 흰가루병 감염과 식물호르몬계열의 SA, JA, abscisic acid (ABA) 처리에 따른 LOX 유전자들을 중점으로 발현유도를 보고 한 바 있음. 본 연구는 항생물질이 병 저항성 유전자 발현에 연관성을 목표로 두고 있음. 그에 앞서 오이의 병 저항성 유전자의 발현양상을 흰가루병 감염조직과 비 감염조직을 이용하여 qRT-PCR 분석으로 조사함. 아래의 표는 본 연구에 사용된 오이 병 저항성 유전자를 표지할 수 있는 PCR primer의 염기배열임.

<Primers of defense genes in cucumber>

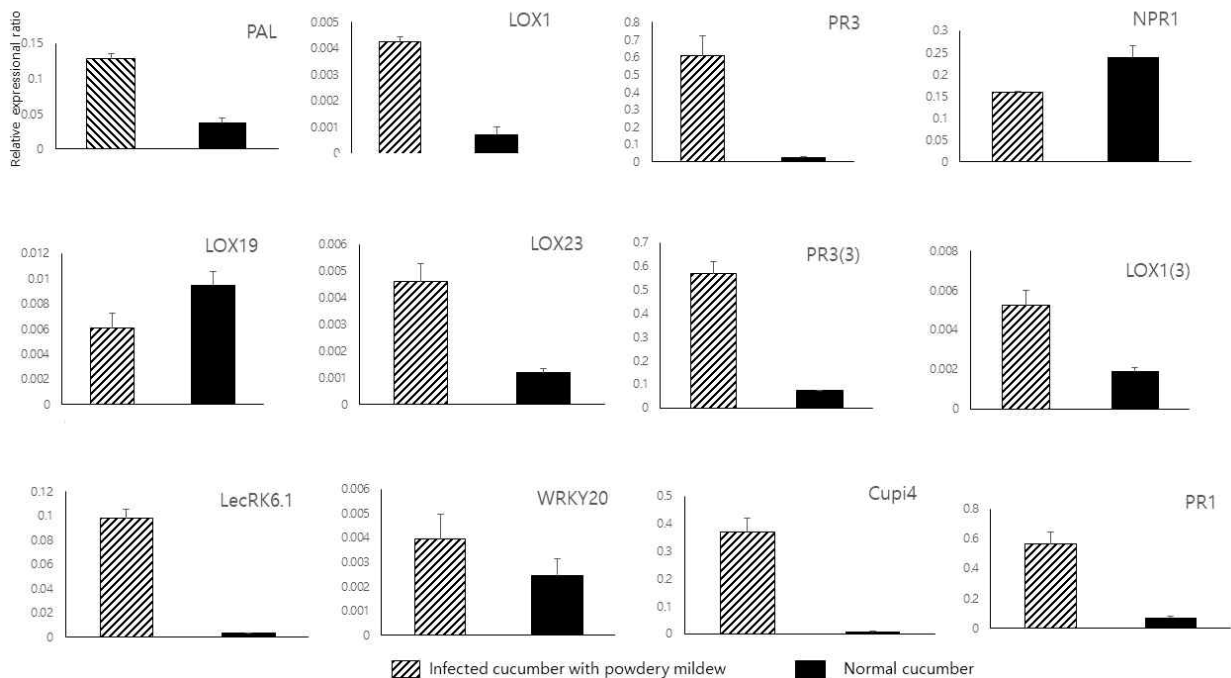
Target genes	Primer sequences
PR1	F: 5'-TGCTCAACAATATGCGAACC-3' R: 5'-TCATCCACCCACAAC-3'
PR3	F: 5'-TGGTCACTGCAACCCTGACA-3' R: 5'-AGTGGCCTGGAATCCGACT-3'
LOX1	F: 5'-TTACTGATAAGGGCAAGAAGGCC-3' R: 5'-AAAGTTCACAAAGAGCAGGATGG-3'
LOX19	F:5'-AGGGTAGTCTTCAATAGCAAGC-3' R:5'-CTTACATCATTGCAGCAAACAG-3'
LOX23	F:5'-TGCCTCCAACACCTTCTTCAA-3' R:5'-CTTCCATATCAAATCGCCACA-3'
LecRK6.1	F:5'-CGACCACAACGAAATGTCACAC -3' R:5'-TTTCTTCCACACGCCACTTCC -3'
NPR1	F: 5'-TTACTGATAAGGGCAAGAAGGCC-3' R: 5'-AAAGTTCACAAAGAGCAGGATGG-3'
PAL	F:5'-AAACACGTCGGATAAATATGGCTT -3' R:5'-CATCCATTCAGGCGTTCCAG -3'
Cupi4	F:5'-TCACTGTGGTGTGTGCTCTC-3' R:5'-ACTCAAGCCATTGCCTTCCA-3'
WRKY20	F:5'-GAAATAACGTACAGAGGGAAGC -3' R:5'-CAGGTGCTGTTTGTGGTTATG -3'
Actin	F: 5'-TCCACGAGACTACCTACAAC-3' R: 5'-GCTCATACGGTCAGCGAT-3'

F: forward, R: reverse

Total RNA 분리는 오이 감염잎과 정상적인 잎을 취하여 액체질소에 마쇄하여 TRIzol-Reagent RNA extraction Kit (Invitrogen)로 추출함. cDNA 합성은 SuperScript III First-strand Synthesis system (Invitrogen)을 사용함. Total RNA 시료 500 ng을 첨가하고 primer를 첨가하여 qRT-PCR로 분석함. PR-1, PR3 등 오이 병 저항성에 관련된 10종 primer를 사용하였으며 대조구 Actin 유전자를 타겟으로 하는 primer를 사용하였음. qRT-PCR 반응은 SYBER Green을 이용한 LightCycler 96System (Roche)에서 분석하였으며, 반응조건은 95°C/15초, 57°C/1분을 40 cycle로 하였음. 유전자 발현량은 PCR 반응물의 유전자 발현량을 아래의 식으로 산출하였음.

$$\text{유전자발현량} = \frac{\text{처리유전자발현량/대조구유전자발현량}}{\text{무처리 유전자발현량/대조구유전자 발현량}}$$

12개의 primer를 사용하여 qRT-PCR을 수행한 결과, PR1, PR3, PAL, LOX1, LOX23, LecRK6.1, Cupi4, WRKY20 유전자 발현이 5배에서 20배까지 증가되었으며, LOX19, NPR1은 발현량이 감소됨. 이 결과는 오이감염에 의하여 다양한 병 저항성 유전자가 발현되는 것으로 나타남. Hashemi 등 (2020)과 Pu (2014) 등의 보고에서 *Phytophthora melonis*, *Fusarium oxysporium*과 감염 시에 나타나는 병 저항성 유전자 발현 양상과 유사한 결과를 얻었으며, Oh 등 (2014)의 식물호르몬 SA, JA, ABA와 감염조직에서 발현이 증가되는 LOX 유전자의 결과와 유사함. 본 연구 결과를 바탕으로 돌연변이 균주 BSM-320 유래 항균물질의 병 저항성유전자 발현 양상 연구를 수행함.

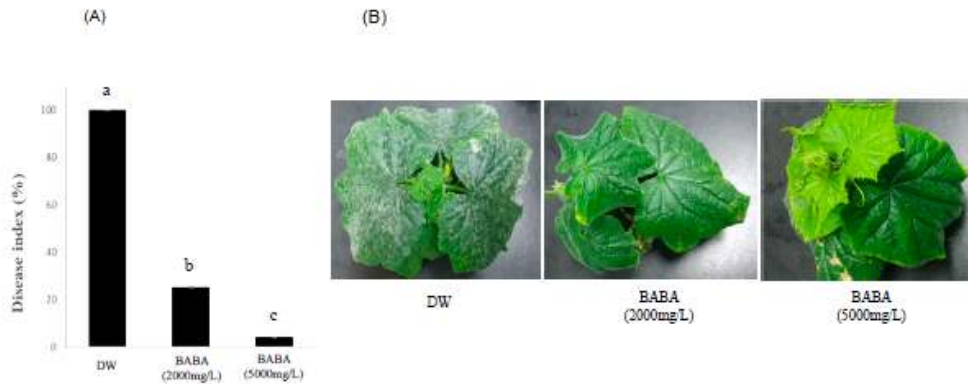


<Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis of defense genes in infected cucumber leaves with powdery mildew. Each gene expression was normalized to reference gene, *Actin*. Expression value is the average of three replications and the bar indicates the standard deviation>

▶ β-aminobutyric acid (BABA)처리에 따른 오이식물체의 병 저항성 반응

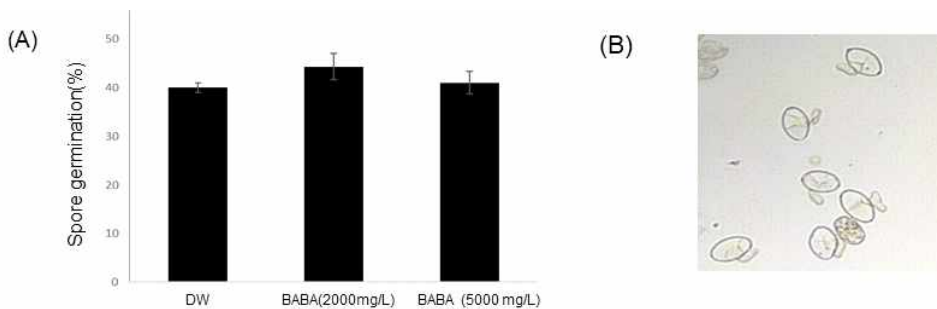
BABA는 비단백질 amino acid로 aminobutyric acid의 이성질체이며 또 다른 이성질체로는 alpha-aminobutyric acid와 gamma-aminobutyric acid가 있음. C₄H₉NO₂의 화학식을 가지며 다양한 식물체에서 병 저항성 유도에 의한 병 방제효과가 보고 됨(Luna et al., 2014). 1차적으로 BABA에 의한 오이흰가루병 방제효과를 조사함. DW 처리된 오이 잎에서는 전형적인 흰가루병 감염이 발생하여 발병도 90% 이상이었던 반면에 BABA 2000 mg/L 처리된 오이식물체는 발병도 20%였으며, BABA 2000 mg/L는 발병도 5%이하로 오이흰가루병이 억제되어 BABA는 오이흰가

루병억제에 중요한 역할을 하는 것으로 나타남.



<Protective effect of γ -aminobutyric acid (BABA) against cucumber powdery mildew. (A) Powdery mildew disease index and (B) disease index observed at 14 days after inoculation. The value represents the mean disease index standard deviation. The experiment was repeated three times. DW, distilled water. Different letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test).

BABA에 의한 오이흰가루병 방제효과가 병원균에 대한 항균활성에 의한 것인지 여부를 조사하기 위하여 BABA 2000 mg/L과 5000 mg/L농도에서 포자발아 억제율을 조사함. BABA를 포함하는 Agar 2%를 첨가하여 슬라이드글라스에 도말하고 자연 감염된 병반으로부터 오이흰가루포자를 회수하여 물에 1×10^4 /ml로 조정 후 Agar block에 $20 \mu\text{l}$ 를 접종하고 커버글라스를 덮은 후 포화습도를 유지하여 12 시간 주기로 빛을 가하고 포자발아율을 조사함. 그 결과, BABA 2000 mg/L과 5000 mg/L을 처리한 오이 흰가루병포자는 각각 45%, 42%의 포자 발아율을 보였으며 DW로 처리된 흰가루병 포자발아율 40%와 유의적인 차이를 보이지 않아 BABA의 항균 활성에 의한 오이흰가루병 방제 효과가 아닌 것임을 시사함.



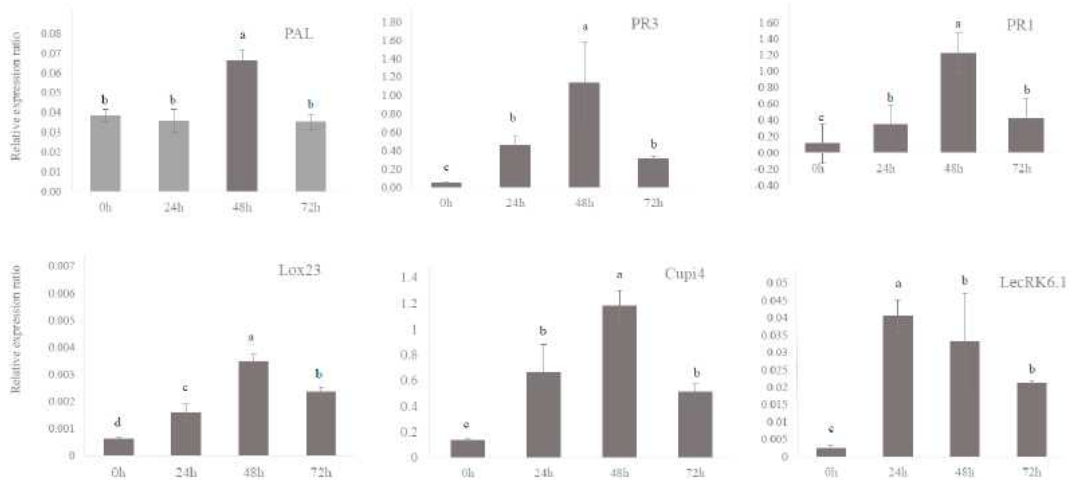
<Inhibition rate of spore germination on different concentrations of γ -aminobutyric acid against cucumber powdery mildew. (A) Spore germination rate following treatment with different BABA concentrations and (B) conidial germination of powdery mildew pathogen derived from cucumber. Letter "a" indicates significant differences between treatments ($p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test). The arrowheads indicate germ tubes formed from the spores>

따라서, 본 연구에서는 오이식물체에 BABA를 처리하여 병 저항성유전자 발현량을 qRT-PCR로 분석함. 온실에서 4주 동안 키운 오이 잎에 각각 2000 및 5000 mg/L BABA농도를 처리한 후 0, 24, 48, 72시간에 잎을 채취하여 Favorgen Kit (Favorgen, Vienna, Austria)를 사용하여 Total RNA를 추출함. Total RNA 시료 500 ng을 첨가하고 primer를 첨가하여 qRT-PCR로 분석함. PR-1, PR3 등 오이 병 저항성에 관련된 위의 Table에서 기술된 10종 primer를 사용하였으며 항시 발현 Actin 유전자를 대조구로 사용하여 아래 식에 의하여 저항성

유전자 발현량을 측정함. qRT-PCR 반응은 SYBER Green을 이용한 LightCycler 96System (Roche)에서 분석하였으며, 반응조건은 95°C/15초, 57°C/1분을 40 cycle로 함. 유전자 발현량은 PCR 반응물의 유전자 발현량을 아래의 식으로 산출함.

$$\text{유전자 발현량} = \frac{\text{처리구 유전자 발현량/대조구 유전자 발현량}}{\text{무처리구 유전자 발현량/대조구 유전자 발현량}}$$

오이에 2000 mg/L BABA를 처리한 후 qRT-PCR분석으로 0, 24, 48 및 72시간에 병 저항성 유전자의 발현량을 정량화한 결과, 오이 식물의 병 저항성 유전자 발현은 BABA 처리 후 24시간에 가장 높은 발현량을 보인 *LecRK6.1* 유전자를 제외한 저항성 유전자는 48시간에 가장 높은 발현량을 보이다가 72시간부터 감소함. *PAL*, *PR3*, *PR1*, *LOX1*, *LOX23*, *LecRK6.1*, *WRKY20* 및 *Cupi4*는 각각 2.7, 53.1, 25, 2.7, 2.8, 4.4, 0.6 및 21.6 배의 전사량이 증가됨. 따라서 BABA에 의한 오이흰가루병 억제효과는 오이식물체가 보유하는 다양한 병 저항성 유전자발현에 따른 오이식물의 저항성기구의 활성화로 기인된 것으로 사료됨.



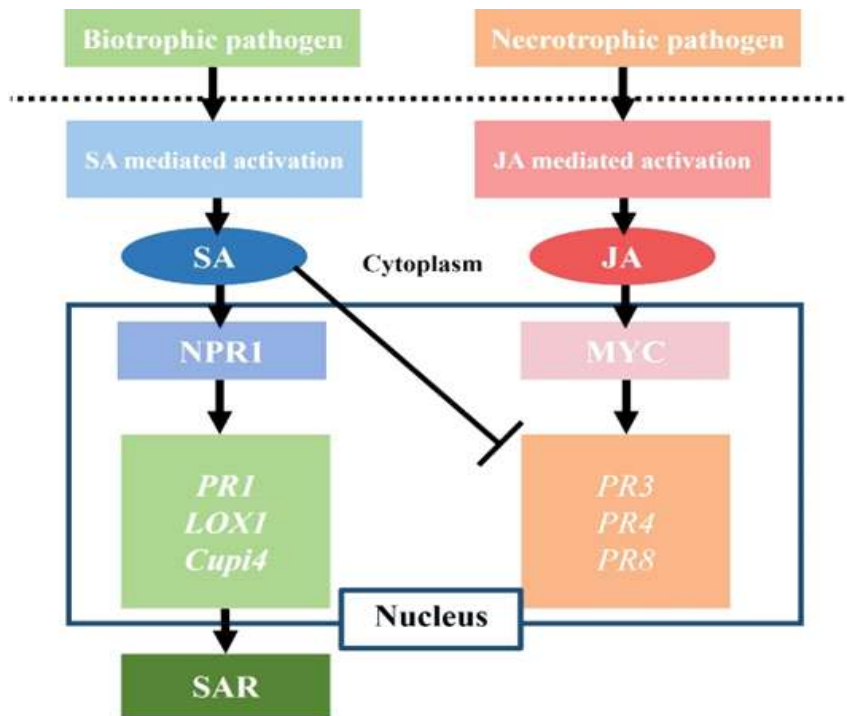
<Expression levels of defense genes in cucumber at different hours after treatment with BABA(2000 mg/L). BABA (2000 mg/L) was administered to cucumber leaves with different durations (0,24, 48, and 72 h). Each gene expression was normalized to the reference gene, CsActin. The expression value is the average of three replications, and the bar indicates the standard deviation. Different letters indicate significant differences between treatments (p < 0.05 according to Duncan's multiple range tests)>

BABA는 자연에서 발생하지 않는 비 단백질 아미노산으로 바이러스, 박테리아, 곰팡이, 선충류 등 광범위한 식물 병원체에 대한 저항성 유도제로 광범위한 활동에 관여함(Jakab et al., 2001). 이전에는 시금치 흰가루병을 제어하기 위해 다양한 농도(0.5, 2, 4 mM)의 BABA가 사용되었으며, 4 mM BABA가 흰가루병에 가장 효과적이었다고 보고된 바 있음(Zeighaminejad et al., 2016). 또한 상추 노균병을 방제하기 위해 10-100 mM BABA가 사용되었으며, 10 mM BABA가 방제에 효과적인 것으로 보고됨(Pajot et al., 2001). 본 연구에서는 2000 mg/L 이상에서 오이식물체의 병 저항성 유전자의 발현이 유도되어 기 보고된 BABA 유도 저항 유전자 발현과 다소 차이를 나타냄.

▶ BABA에 의한 salicylic acid 축적 유도

병 저항성 유도체(elicitor)는 식물세포내의 수용체에 인식되고 salicylic acid (SA) 또는 jasmonic acid (JA)와 같은 병 저항성 유도 신호전달물질을 자극하여 유전자 발현을 유도함. 유도저항성은 Systemic Acquired Resistance (SAR)과 Induced Systemic Resistance (ISR)가 있으며 SAR은 SA 의존적으로 *PR-1a*, *PR-4*를 포함하는 pathogenesis-related (PR) 유전자의

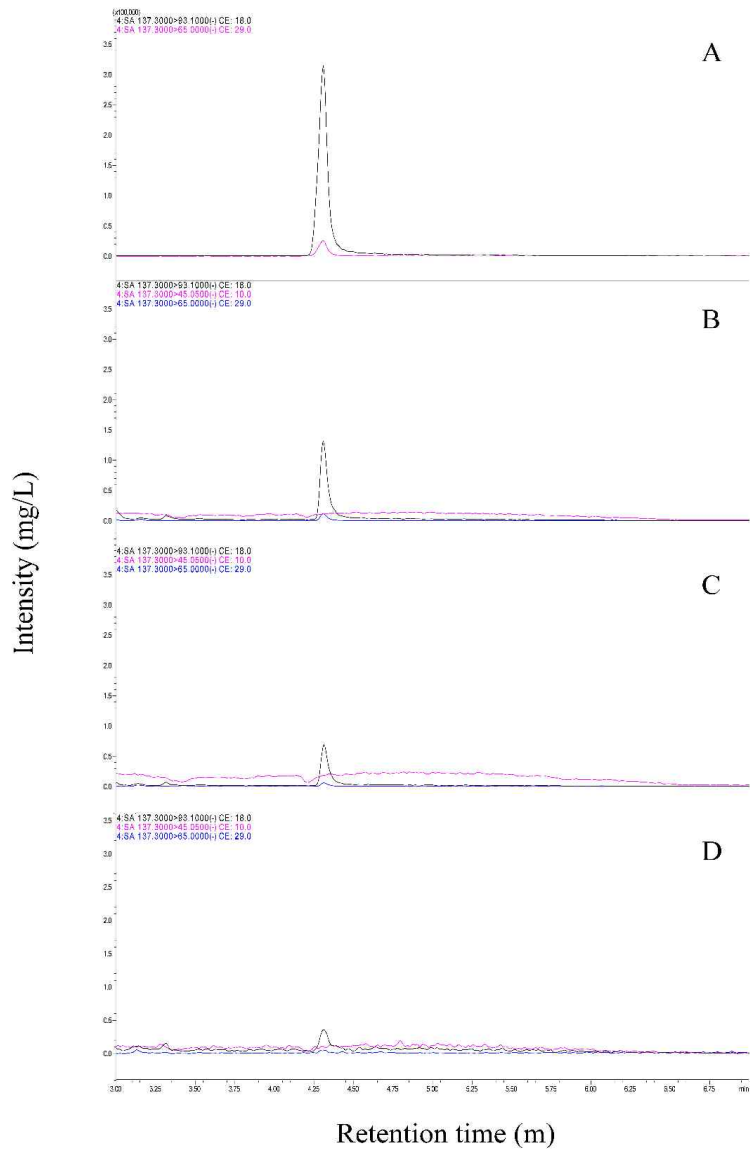
발현을 유도함. ISR은 JA와 Ethylene 의존적인 신호전달체계로 plant defensin 1.2 (PDF 1.2)와 같은 다른 PR 유전자를 유도하는 것으로 알려짐.



<Salicylic acid and Jasmonic acid dependent resistance mechanism in plant>

BABA를 2000과 5000 mg/L농도로 오이 잎에 처리 72시간 후 잎을 취하여 액체질소로 마쇄한 10 g에 총 90 g의 silicon dioxide와 90% 메탄올 30 mL를 첨가하여 추출하고 추출물을 evaporater를 사용하여 농축함. 잔류물은 5% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1 mL와 99.8% 메탄올(w/v) 10 mL에 재 현탁함. 각 추출물을 DW를 사용하여 50 mL로 조정하고 8000 x g (RCF)에서 10분간 원심분리함. 추출물의 상층액은 Kinetex C18 컬럼 (2.6 μ m, 100 mm \times 2.1 mm, Phenomenex, Torrance, California, USA)에서 Liquid chromatography mass spectrometer (LCMS, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 SA 함량을 측정함. 검량선은 허용 가능한 정확도와 정밀도로 10-500 ng/mL의 농도 범위($R^2 > 0.99$)이었음.

SA 함량을 liquid chromatograph mass spectrometer (LCMS) 질량 분석법을 사용하여 측정한 결과, 2000과 5000 mg/L BABA가 처리된 오이에서 SA는 3.84 ng/mL와 14.1 ng/mL이 검출된 반면, 처리되지 않은 오이에서는 0.92 ng/mL의 SA가 검출됨. 이 결과는 BABA가 오이의 SA 신호전달 경로 의존적 systemic acquired resistance (SAR) 반응과 연관되어 있음을 시사함. 식물의 면역체계에는 대표적으로 SAR과 ISR이 있으며, SAR은 광범위한 병원균에 대해 방어 메커니즘을 유도하는 것으로 알려져 있음(Durrant and Dong, 2004). 병 저항성 유전자인 *PAL*, *PR1* 및 *PR3*의 발현량은 전사 수준에서 향상되었고, 병 저항성 유전자발현은 SA 의존성 신호 전달 경로를 통해 유도되는데, 이는 BABA처리로 오이에 SA 축적을 유도하는 것을 나타냄.



<Accumulation of salicylic acid (SA) in BABA-treated cucumber. (A) SA standard. Cucumber plants were treated with BABA 5000 mg/L (B), 2000 mg/L (C) and distilled water (D). SA 0.92 mg/L, 3.84 mg/L and 14.84 mg/L were detected in BABA treated B, C and D samples>

<BSM-320의 LeCSMS 물추출배지 배양체의 오이 흰가루병 방제효과 및 생물활성>

▶ BSM-320 항균스펙트럼

BS016의 변이체인 BSM-320균주의 항균활성 스펙트럼을 조사함. PDA 배지에서 BSM-320의 식물 병원성 곰팡이 *R. solani*, *C. coccodes*, *B. cinerea*, *P. capsici*, *F. oxysporum*에 대한 항균 효과를 조사한 결과, 각각 82.2%, 89.8%, 85.3%, 95%, 78.9%를 억제함.



Rhizoctonia solani

Colletotrichum coccodes

Botrytis cinerea

Phythophthora capsici

Fusarium oxysporum

<Antifungal activity of BSM-320 on different phytopathogenic fungi>

본 연구는 표고버섯 수확 후 배지 퇴비추출물을 이용한 BSM-320의 배양과 이를 활용한 생물학적 방제를 목표로 함. 전 연구에서 LeCSMS물추출배지+1% glucose에서 상용화배지 LB보다 많은 세균배양이 양호한 것을 확인한 바 있음. 따라서 LeCSMS 물 추출배지에서 배양한 배양여액에서의 항균활성도를 조사함. BSM-320 균주를 glucose 1%가 첨가된 LeCSMSWE 배지에 배양하여 배양여액의 항균활성을 조사함. BSM-320을 LeCSMS WE+1% glucose (LeG)에서 72시간 배양 후 6000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세균을 제거한 배양여액에 19.5 g/L의 PDA배지를 첨가하여 고압 살균한 다음 배지를 제조함. BSM-320 배양여액의 항균효과를 확인하기 위해서 배지 중앙에 *P. capsici*, *R. solani*, *C. coccodes*, *F. oxysporum*, *B. cinerea* 균사절편을 직경 5 mm로 접종하여 균사체 억제 효과를 대조구와 비교하여 조사함. 음성 대조구는 BSM-320을 배양하지 않은 LeG배지를 사용하였고, 양성 대조구는 LB배지의 BSM-320 배양여액을 처리함. 그 결과, LeG320 배지에서 진균류의 균사 억제 실험을 진행한 결과 *R. solani*, *C. coccodes*, *B. cinerea*, *P. capsici*, *F. oxysporum*를 각각 95.8%, 93.2%, 96.4%, 54.6%, 93.7% 억제함.

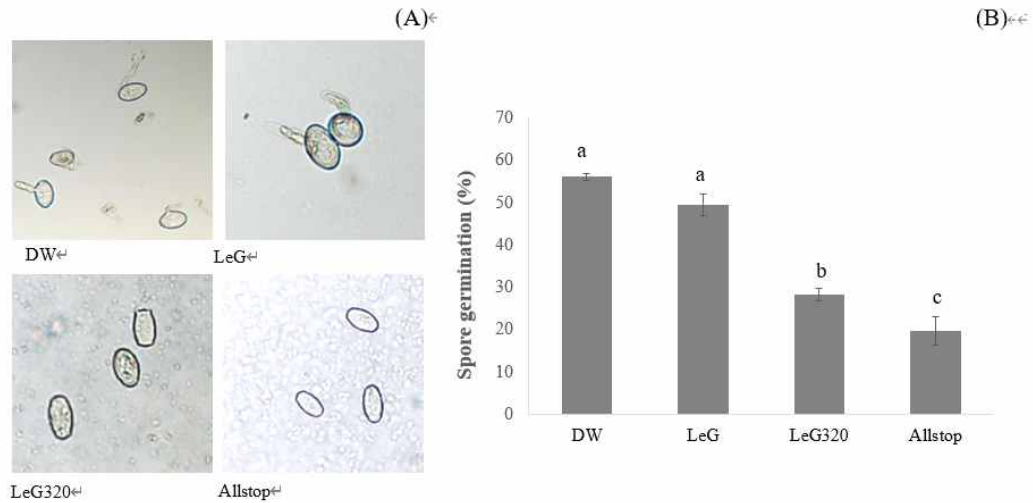


<Antifungal activities on the culture filtrate of BSM-320 cultured in LeCSMS.

Liu et al. (2015)는 *B. subtilis* B154가 *N. sitophila*와 *T. harzianum*, *F. incarnatum*, *F. solani*, *F. graminearum*, *B. cinerea*, *E. turcicum*의 균사체를 유의하게 억제하였으며, TSB 배지에서 *B. subtilis* B154의 배양과정 중 *N. sitophila*에 대한 항진균 활성을 보고함. *Bacillus* sp.에 속하는 BSM-320이 배양되면서 분비하는 물질이 진균류에 대하여 항균효과가 나타나는 것을 시사함. *Bacillus* spp.의 연구에 따르면 *B. fluorescentis*는 *F. udum*의 분리균주 4개에 항진균 활성을 나타내었으며, *B. thuringiensis*는 *Meloidogyne* sp.가 토마토에 혹을 형성하는 것을 방지하였고, *B. aerius* JS-786이 *B. cinerea*에 감염된 토마토에서 식물체와 앞에서 항진균 활성을 확인함 (Siddiqui et al., 2006; Shafi et al., 2017). 게다가 다양한 생물계면활성제를 생산할 수 있는 *B. velezensis* Tcb43 은 항진균 활성을 통해 오이 흰가루병을 예방 및 방제할 수 있는 잠재력을 가지고 있다고 보고됨 (Kuo et al., 2023). *B. subtilis*를 처리한 *Solanum betaceum*의 과실에서 대조군에 비해 *C. acutatum*의 병변이 유의하게 감소함 (Toro et al. 2017; Cavaglieri et al. 2005).

▶ BSM-320의 오이 흰가루병 방제효과

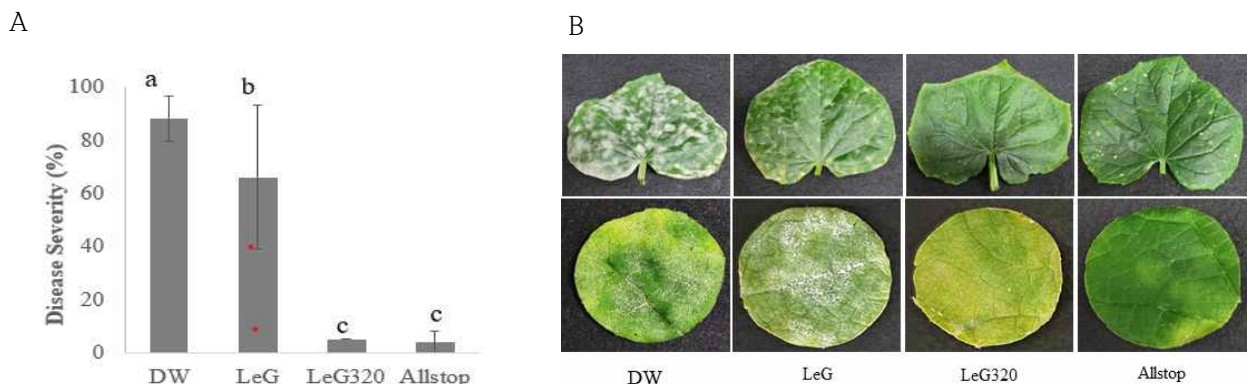
흰가루병은 오이에 발생하는 순환물 기생균으로 인공배양이 불가하여 자연병반에서 채취한 오이흰가루병 포자의 발아 억제율로 항균효과를 검정함. BSM-320 균주를 1% glucose를 함유하는 LeCSMS 물 추출배지에 배양하여 배양여액으로 오이 흰가루병의 포자발아 억제율을 조사하였으며, 양성대조구로는 상품화된 미생물농약 Allstop을 사용하여 비교분석함. DW 처리구에서 흰가루병 포자발아율이 56%, LeG (BSM-320를 배양하지 않은 것)는 50%, LeG320은 26%, 울스탑은 20%의 포자 발아율을 나타냄. 아래 그림은 오이흰가루병균 포자발아 형상을 보여주고 있으며, DW는 포자 발아관을 형성하고 있으나 LeG320은 포자발아관 형성이 억제된 것을 확인할 수 있음. 따라서 LeG320 균주는 유의성 있게 오이 흰가루병의 포자발아를 억제함으로 항균활성을 나타내는 것으로 확인함.



<Inhibition effect of BSM-320 culture filtrate on spore germination of cucumber powdery mildew (CPM). DW: distilled water, LeG : LeCSMS WE +1% glucose uncultured with BMS320, LeG320: LeCSMS WE +1% glucose cultured with BMS320, Allstop: commercial product>

기 보고에서 고추탄저병에서는 *B. velezensis* CE의 농도에 따른 *Collectotricum gloeosporioides*의 포자 발아를 감소시켰으며, *B. subtilis* 30VD-1에 의해 *C. acutatum*의 포자가 용해된 것을 관찰함(Tendulkar et al., 2007; Choub et al., 2022). *B. subtilis* ZD01은 *A. solani*의 발아율을 크게 억제하였고, *B. subtilis* LB5의 배양 여액은 *C. gloeosporioides*가 처리되었을 때 분생포자에서 발아관이 팽창하는 현상이 나타났으며 분생포자의 발아에 직접적인 사멸 영향을 미치지 않았지만 발아관이 비정상적으로 팽창함과 동시에 균락 형성 속도를 감소시킨 것을 확인됨(Ruangwong et al., 2012; Zhang et al., 2020). 이상의 결과로 포자발아 억제율은 병원균의 항균효과를 반증하는 것을 나타내고 있어 본 연구의 BSM-320의 오이흰가루병균의 포자 발아 효과는 기 연구들과 유사한 현상으로 사료됨. 또한 표고 수확 후 배지 퇴비추출물(LeCSMS)에 배양하여 유효한 효과가 얻어 졌으므로 저 비용 고 효율의 미생물 배양과 방제방법이 개발되어 산업화에 유용성이 있을 것으로 사료됨.

BSM-320는 1% glucose를 함유하는 LeCSMS 물 추출배지 배양체를 이용하여 오이흰가루병에 초기 감염된 Leaf disc에 처리하는 방법과 처리구 별 오이 유묘를 자연감염을 유도하여 오이흰가루병 억제효과를 조사함. LeG320의 1/10희석액과 올스탑 처리구는 흰 가루병에 대해 10%이하의 발병도를 보였으나 DW와 LeG 처리구는 각각 85%와 62%의 발병도를 나타냄. 따라서 LeG320처리구는 70%이상의 방제효과가 있는 것으로 확인됨. 아래의 그림은 DW와 LeG처리구에서 자연감염 오이잎과 Leaf Disk상에서 오이 흰가루병이 발생하였으나 LeG320와 양성대조구



<Protective effect of BSM-320 against cucumber powdery mildew. The disease severity was investigated by leaf disk and natural infection methods after treatments. DW: distilled water, LeG : LeCSMS WE +1% glucose uncultured with BMS320, LeG320: LeCSMS WE +1% glucose cultured with BMS320. Allstop: commercial product>

Allstop에서는 흰가루병 발생이 억제된 것을 확인함.

기 연구에서 *B. velezensis* 균주로 오이 흰가루병을 방제 한 바 있으며, *B. subtilis*를 오이에 전처리하고 대조군과 비교하였을 때, 오이의 병 발병도와 Cucumber mosaic virus (CMV) 발병율이 감소하였다고 보고됨(Elsharkawy et al., 2022). 그 밖에, *B. subtilis* 균주를 이용한 생물학적 방제는 다양한 세균병과 곰팡이병에 다양하게 적용 된 바 있음. BSM-320 처리구는 양성대조구 단일 *Bacillus* sp.을 사용했을 때 오이의 흰가루병 방제효과가 있음에도 불구하고, 본 논문에서 사용된 올스탑의 경우 3종류의 미생물을 함유하고 있어 다른 처리구들 보다 높은 방제율을 보인 것으로 사료됨.

▶ BSM-320에 의한 식물 성장촉진 효과

LeCSMS WE+1% glucose에서 배양한 BSM-320의 오이 종자 발아율을 조사함. 처리별로 오이 종자를 식물챔버에 파종 후 5일째 하배축(Hypocotyl)길이를 측정한 결과, LeG처리구의 하배축 길이가 5.61 cm였으며, LeG320은 4.38 cm, DW는 3.89 cm, 올스탑은 1.14 cm 로 나타남. 따라서 LeG320이 DW와 비교하여 오이 하배축과 뿌리 성장율이 양호하였으나, BSM-320을 배양하지 않은 LeG보다는 하배축 성장이 22%억제되어 BSM-320이 오이종자발아에 다소 억제효과가 있는 것으로 보여짐. 반면에 대조구로 사용한 상용화된 올스탑의 경우 1000 용액에서는 LeG320과 비교 하였을때 하배축이 74%억제되었으며 뿌리가 형성되지 않았음. 오이 종자 파종 후 30일째 LeG를 처리한 오이의 초장은 32.22 cm, 엽장과 엽폭은 각각 13.44 cm, 18.06 cm로 측정됨. LeG320을 처리한 오이의 초장은 35.26 cm, 엽장과 엽폭은 각각 13.1 cm, 17.54 cm이었음. 대조구로 사용된 DW를 처리한 오이의 초장, 엽장, 엽폭은 각각 31.92 cm, 11.92 cm, 16 cm로 측정되었으며, 올스탑의 경우 초장, 엽장, 엽폭은 각 12.6 cm, 13.24 cm, 17.3 cm를 나타냄. 결과적으로 LeG320은 식물성장효과에 유의적 결과를 확인할 수 있었으며, 이는 LeCSMS에 식물 성장촉진을 위한 영양성분 또는 식물 성장촉진 성분이 많이 포함하고 있는 것으로 판단됨. 오이 종자파종 후 4일 후 hypocotyl의 길이는 DW 처리구에서 3.9 cm였으며, LeG와 LeG320 처리구는 5.2 cm와 4.9 cm로 성장하였으나, Allstop의 경우는 0.6 cm로 Hypocotyl 성장이 심하게 억제되었음. 따라서 BSM-320은 오이 흰가루병 방제효과와 식물생육을 촉진하는 유효효과를 가지는 복합기능성 생물학적 방제제로 활용 가능할 것으로 사료됨.

<BSM-320 균주배양액 처리에 따른 오이 생장을

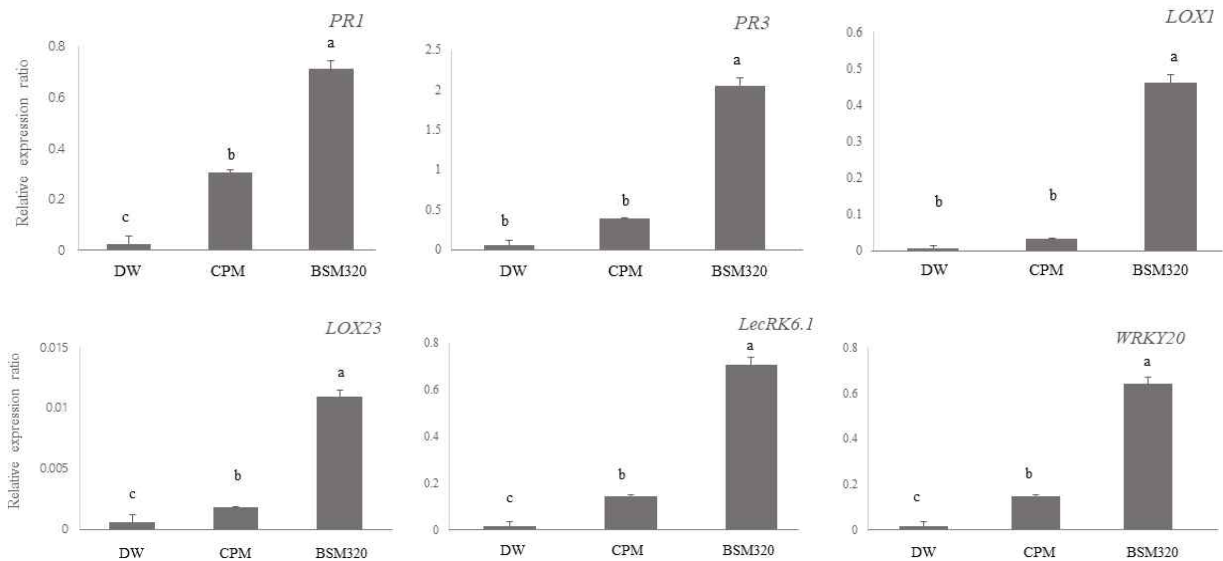
Treated	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	No. of leaves
DW	31.9 ± 4.2ab	12 ± 0.5ab	16 ± 1ab	6.6 ± 0.4a
LeG	32.2 ± 2.6ab	13.4 ± 0.6a	18.1 ± 0.3a	6.6 ± 0.5a
LeG320	35.3 ± 3a	13.1 ± 0.3c	17.5 ± 0.8ab	5.8 ± 1.1a
Allstop	12.6 ± 2.0c	13.2 ± 1a	17.3 ± 0.9ab	5.6 ± 0.5a



<ypocotyl growth from cucumber seeds treated with BMS-320 culture filtrate>

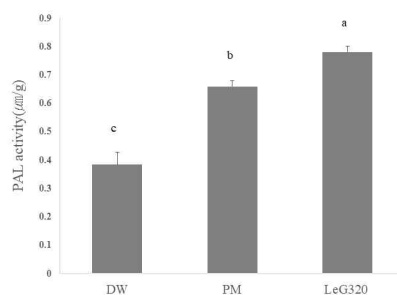
▶ BSM-320에 의한 오이의 방어 관련 유전자 발현

LeG320 배양액을 오이식물체에 처리하고 병 저항성 유전자 발현 여부를 qRT-PCR로 정량 분석함. LeG320 배양액 처리된 오이의 잎에서 PR 유전자인 *CsPR1*, *CsPR3*, *CsLOX1*, *CsLOX23*, *CsLecRK6.1*, *CsWRKY20*의 발현이 증가됨. 본 연구에서는 *CsPR1*은 대조구에 비해 LeG320이 5.41배 증가됨. 또한 *PR3*는 chitinases라고 불리며 키틴의 가수분해의 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 본 연구결과에서 BSM-320은 *CsPR3* 발현을 15.5배 증가시킨 것으로 나타났는데 BSM-320 처리 시 병원체의 세포벽을 분해하는 chitinases의 발현이 증가함으로 식물의 방어기작을 향상시키는 것으로 판단됨. BSM-320 배양액처리는 오이 잎에서 *CsLOX1*, *CsLOX23* 유전자 발현을 각 13.3배와 3.6배 증가시켰으며, *LecRK6.1*은 8.01배, *WRKY20*은 7.07배 증가됨. *Bacillus* sp.가 *LOX* 유전자 발현을 증가시킨다고 하였으며, *B. subtilis*가 처리된 오이 잎에 CMV 접종 후 2일째에 *PR1* 유전자가 증가된 것으로 보고 된 바 있음(Elsharkawy et al. 2022). *WRKY* 유전자의 증가는 생물학적 스트레스에 대한 면역을 촉발시키며(Wen et al., 2022), 방어 관련 유전자의 발현은 전사수준에서 증가되어 식물체 내의 SAR의 축적에 관여하는 것으로 추측됨. 결론적으로 본 연구의 BSM-320 배양액에는 오이 병 저항성 유전자 발현을 유도하는 유효물질이 존재하는 것으로 사료됨.



<qRT-PCR analysis of defense related genes in cucumber treated with BSM-320 culture
 DW: distilled water, PM: the cucumber infected with cucumber powdery mildew,
 BSM-320: LeCSMS WE+1% glucose cultured with BMS-320>

식물체에 elicitor를 처리 시 병원균을 억제하는 저분자물질인 phytoalexin을 생성함. phytoalexin의 일종인 phenylpropanoid은 shikimate 생합성과정에 의한 phenylalanine으로부터 시작되어 trans-cinamic acid로 전환되는데 PAL은 phenylalanine의 암모니아기를 제거하는 촉매효소로서 항진균활성의 phenylpropanoid 생합성 대사과정 가장 중요한 조절자로 알려져 있음. PAL효소활성이 증가하면 phenylpropanoid 화합물 생성이 증가됨. 특히 병원균의 초기침입단계에서 병 저항성식물은 phenylpropanoid 유도체가 다량생산되는 것이 밝혀짐(Liu et al., 2010; Kumar et al., 2020).

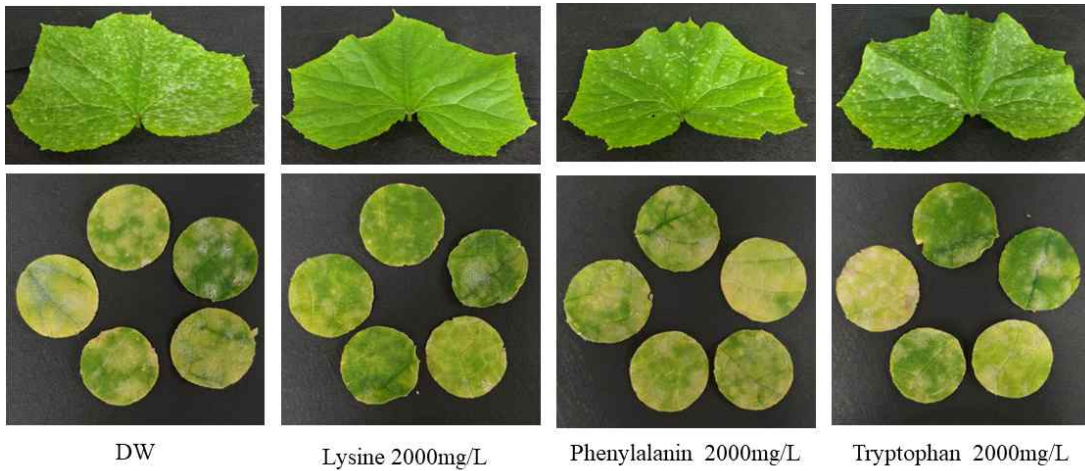


<Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in cucumber leaves treated with BSM-320>

<BSM-320 균주 배양여액으로부터 분리한 활성물질의 특성 구명>

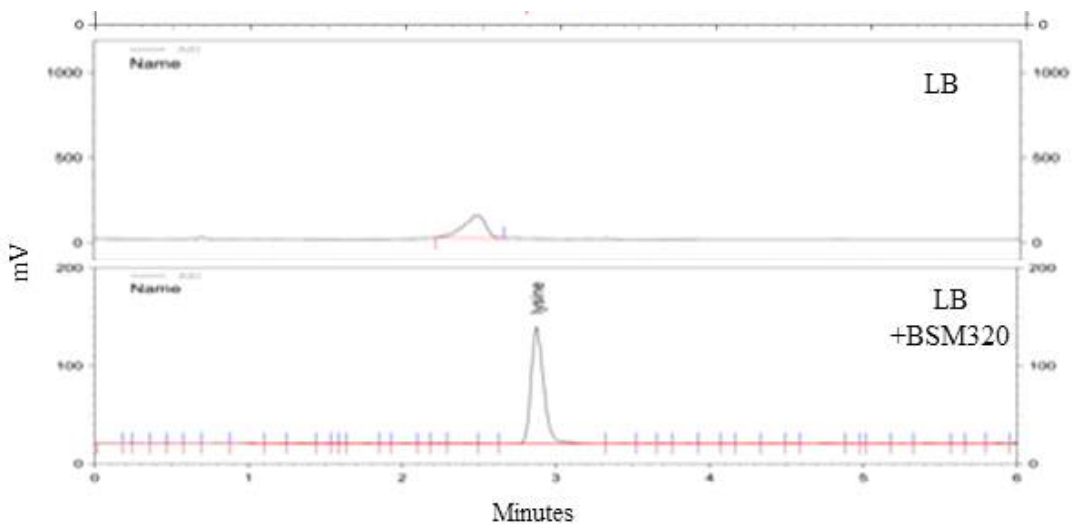
▶오이 흰가루병 억제 물질 lysine의 식물 병 방제기전 구명

BSM-320 균주 배양여액의 활성물질로 lysine, phenylalanine 및 tryptophan이 검출됨. 이들 아미노산을 2000 mg/L 농도로 조정하여 오이 유묘 잎에 살포하고 자연감염시켜 흰가루병 감염을 유도하였으며, leaf disk방법도 동시에 수행함. 그 결과 Lysine 처리구에서 70%이하의 오이흰가루병 발병도 억제효과가 유의적으로 관찰되었으나 phenylalanine 및 tryptophan 처리구는 물 처리구와 필적하게 흰가루병에 감염되어 Lysine이 오이 흰가루병에 대한 방제효과가 가장 강한 것으로 나타남.



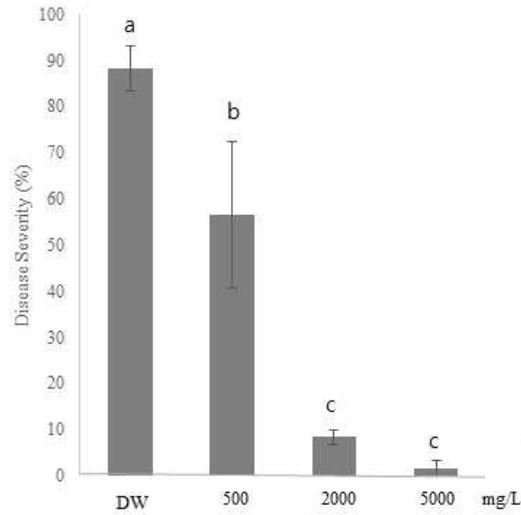
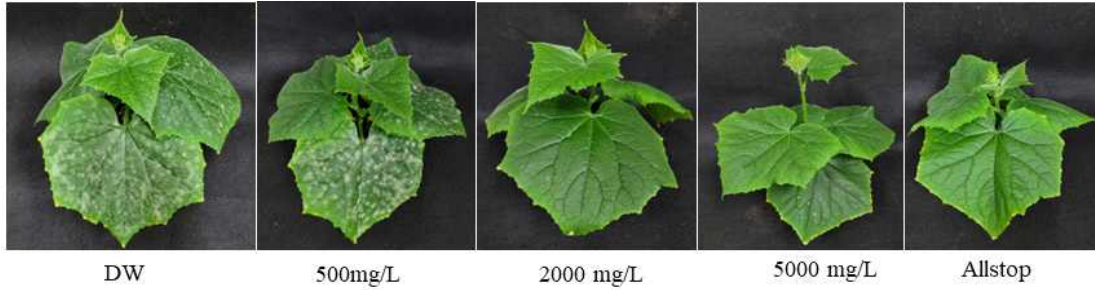
<Protective effects on cucumber leaves of amino acids, lysine, phenylalanine, and tryptophan>

LB배지 1 L에서 배양한 BSM-320 배양여액에 lysine 생성량을 HPLC로 분석한 결과 대조구 LB에서는 lysine이 거의 검출되지 않았으나 BSM-320 LB 배양여액에서 23.4 mg/g의 높은 농도로 검출되어 BSM-320는 배양과정에서 lysine을 대량생성하는 것으로 확인됨.



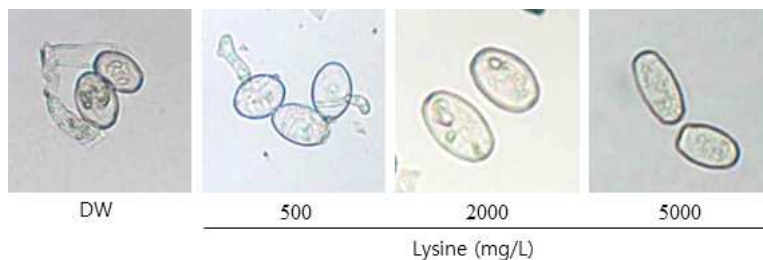
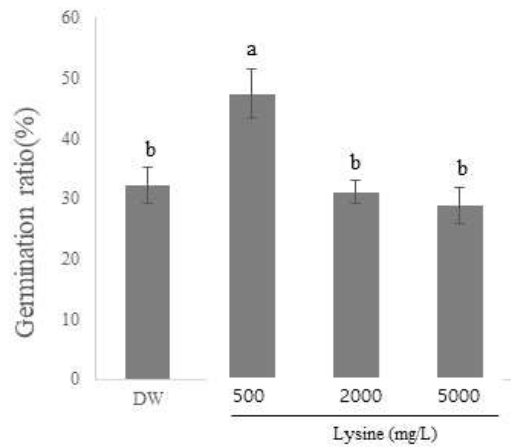
<Quantitative analysis of lysine in LB culture filtrate of BSM-320 by HPLC>

위 실험에서 lysine이 오이 흰가루병 억제 활성성분으로 밝혀짐. 따라서 lysine의 농도 별 오이 흰가루병 방제효과를 조사함. Lysine의 농도를 500, 2500, 5000 mg/L로 조정하여 오이 잎에 살포하고 감염포장에서 14일 동안 방치한 후 처리구 별 오이 흰가루병 발병도를 조사함. 음성 대조구 DW는 90%, lysine 500, 2000, 5000 mg/L 처리구는 오이 흰가루병에 대하여 각각 56%, 8%, 2%의 발병도를 나타냄. 따라서 lysine은 2000 mg/L 이상의 농도에서 흰가루병 억제효과가 매우 강한 것으로 밝혀짐.



<Lysine 처리 농도별 흰가루병 억제 효과>

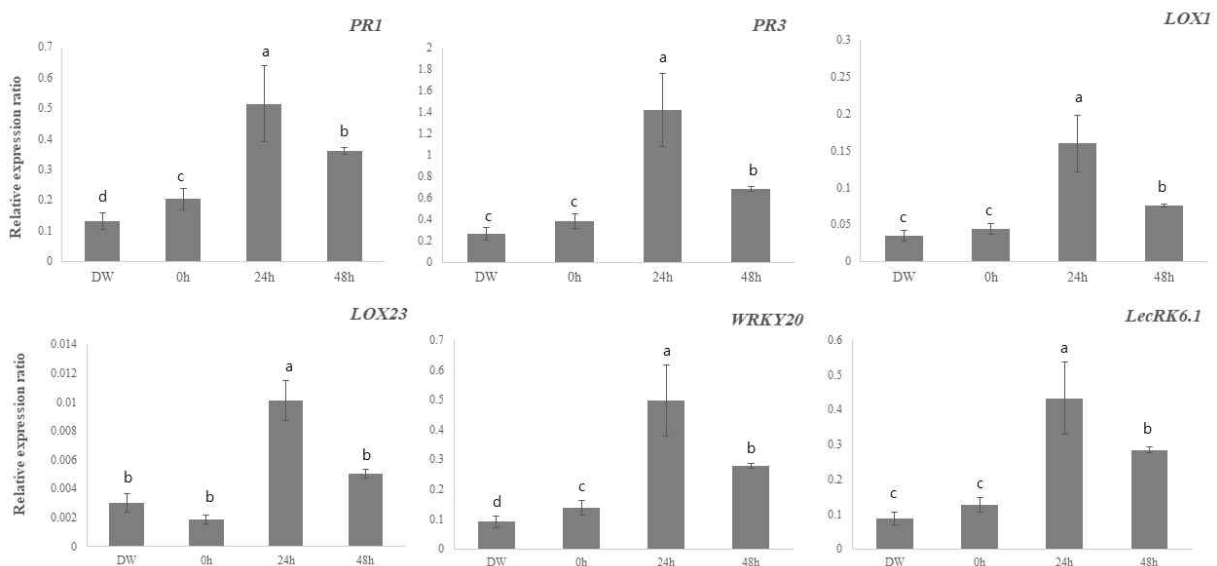
Lysine의 오이 흰가루병균에 대한 항균활성 여부를 확인하기 위해서 농도별 lysine 처리에 따른 오이 흰가루병 포자발아 억제효과를 조사함. 500 mg/L에서 47%의 높은 포자 발아율을 보였으나, 2000과 5000 mg/L lysine 처리구는 31%, 28% 포자 발아율 보여 DW의 32%의 포자발아율과 비교하여 유의적인 포자 발아 억제율이 관찰되지 않음.



<Spore germination rate of cucumber powdery mildew by lysine concentrations>

식물은 스트레스 반응을 조절하는 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질, 아미노산, 식물호르몬과 관련된 소기관 구조 및 대사 경로를 통해 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 적응하기 위한 다양한 메커니즘을 가짐. 최근 식물의 면역력을 증가시키고 병원균 발병을 억제하기 위해 다양한 아미노산의 기능연구가 보고되고 있음(Yun et al., 2015). 세균병원 *Pseudomonas syringae* 감염 시 애기장대 잎의 아미노산 농도가 60% 증가한 것으로 나타났으며, 이는 병원체 감염 시 식물에서 활성화되며 식물 면역에 중심적인 역할을 하는 것으로 보고된 바 있음(Yang et al., 2014; Hartmann et al., 2018). 또한, L-lysine의 이화 경로는 식물이 병원체에 대한 방어기작을 활성화 하며, 식물조직에서 lysine은 스트레스에 대한 반응과정에서 lysine을 glutamate로 효율적으로 변환하여 스트레스 관련 대사물질로 변환하는 역할을 하는 것으로 보고됨(Galili et al., 2001; Liu et al., 2022; Fornazier et al., 2003).

Lysine은 식물 방어 반응기작을 향상시켰으며 SAR의 중요 조절인자인 pipecolic acid를 생성 하는 것으로 알려짐. 최근 연구들에 따르면 cyclic lipopeptides 활성화는 곰팡이 세포막을 손상시켜 세포질 파괴 및 포자 발아를 억제하는 능력과 관련이 있는 것으로 나타남(Crouzet et al., 2020). 그러나 lysine이 오이 흰가루병 방제에 어떠한 기능을 갖는지는 구명되지 않음. 본 연구에서 BSM-320에 의하여 L-lysine 생성이 유도되는 것이 확인됨에 따라 lysine이 오이 흰가루병 방제에 어떠한 기능적 역할을 하는지를 구명할 필요성이 대두됨.

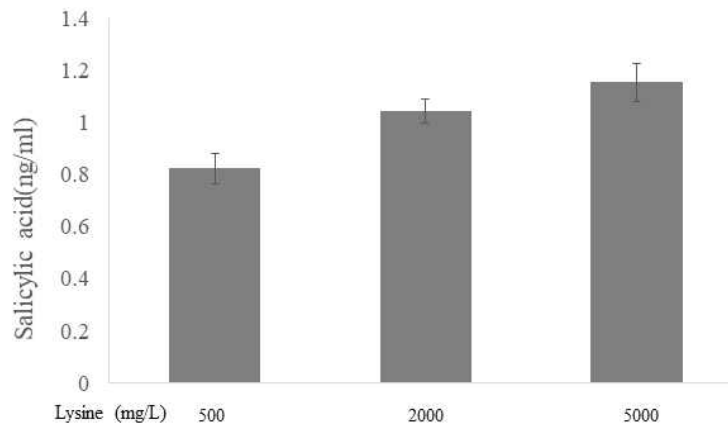


<qRT-PCR analysis of defense related genes in cucumber treated with lysine 2000 mg/L. The total RNA was isolated from the treated cucumber samples. The transcriptional expression level of each gene was quantified by qRT-PCR.. DW: distilled water>

Lysine이 오이흰가루병 방제효과가 병 저항성 유도에 기인된 것인지 여부를 알아보하고자 함. Lysine을 처리하였을 때 유도되는 식물의 병 저항성 유전자를 확인하기 위하여 *PAL*, *PR1*, *PR3*, *LOX1*, *LOX19*, *LOX23*, *NPR1*, *WRKY20*, *Cup4*, *LecRK6.1*의 10개의 primer를 사용하여 유전자 발현을 확인함. 그 결과, *PR1*, *PR3*, *LOX1*, *LOX23*, *WRKY20* 그리고 *Cup4*의 유전자 발현량이 lysine 처리 시 24시간대에서 증가되다가 48시간대부터 발현량이 감소함. 식물의 저항성 유전자 *PR1*은 일반적으로 SAR의 지표로 간주되며, 특정 곰팡이의 성장을 억제하는 것으로 알려짐(Liu et al., 2021). Lysine 2000 mg/L를 오이 잎에 처리하였을 때 *PR1*의 경우 24시간 대에서 발현량은 대조군에 비해 3.95배로 증가함. *PR3* 또한 24시간대에서 유전자 발현량이 5.42배 증가됨. 또한, *LOX1*는 4.62배, *LOX23*는 3.33배 증가함. Boubakri et al. (2013)에 의하면 다른 아미노산인 methionine은 terpenoid, thenylpropanoid 및 항산화제와 같은 여러 2차 대사산물의 생합성에 중요한 효소인 lipoxygenase를 코딩하는 *9-LOX* 유전자의 발현을 유도한다고 보고함. *WRKY20* 유전자는 24시간대에 높은 발현량이 나타났으며 대조군과 비교하였을 때 1.52배, *LecRK6.1* 유전자는 4.9배 증가됨. Liu et al. (2021)에 의하면 L-lysine 처리가 β -1,3-glucanase 및 chitinase 활성화 또는 유전자 발현 및 *PR1* 발현을 유도하였다고 보고함. Lysine은 식물 스트레스 반응과 관련된 대사 경로의 전구체 역할과 발달에도 작용함(Kishor et al., 2020). 옥신 반응 유전자인 *GH3*

에 의해 촉매 되는 아미노산은 식물 호르몬 항상성 및 식물 미생물 상호 작용에 중요한 역할을 한다고 보고된 바 있음(Okrent et al., 2009).

Phenylalanine과 같은 아미노산은 SAR에 필요한 방어 호르몬인 SA의 생합성에 연관되어 있음 (Hasabi et al., 2014; Crouzet et al., 2020). Lysine 대사산물 중 pipecolic acids는 SAR 식물 저항성 반응의 중요한 조절자로 알려져 있음(Yang et al., 2020; Liu et al., 2021). 본 연구에서는 lysine을 농도별로 처리한 오이에서 SA의 축적을 LC-mass 분석법을 이용하여 확인함. 총 SA의 함량을 측정하였으며, SA 함량은 대조군과 비교하였을 때 lysine 500, 2000, 5000 mg/L 처리군 앞에서 농도 의존적으로 0.8, 1.0, 1.2 ng/mL로 SA 함량이 증가되는 것으로 나타남. 이는 lysine이 오이식물체에서 SA 의존적인 신호전달 SAR 병 저항성 반응과 연관성이 있음을 나타냄.



<Salicylic acid content in cucumber treated with lysine>

<참고문헌>

- Knoth, C., Ringler, J., Dangl, J.L., Eulgem, T. 2007 Arabidopsis WRKY70 is required for full 32 RPP4-mediated disease resistance and basal defense against *Hyaloperonospora parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20:120-128.
- Hashemi, L., Golparvar, AR., Esfahani, MN. and Golabadi, M. 2000. Expression analysis of defense-related genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) against *Phytophthora melonis*. *Molecular Biology Reports* 47: 4933-4944
- Pu, X., Xie, B., Li, P., Mao, Z., Ling, J., Shen, H., Zhang, J., Huang, N., & Lin, B. 2014. Analysis of the defense-related mechanism in cucumber seedlings in relation to root colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* CS-20. *FEMS Microbiology Letters*, 355:142-51.

[제2협동과제: (주)케이글로벌]

<후보균주 *Bacillus* sp. BS061의 1차 활성화도 평가>

과제의 목표인 혼합제형개발을 위한 사전평가로서 후보균주 *Bacillus* sp. BS061의 흰가루병 방제를 위한 활성화도를 평가하기 위하여 2회에 걸친 필드시험을 수행함. 재료는 전북대에서 분양받은 바실러스 균주를 사용함. 처리는 8월 5일 처리하였으며, 처리 후 1일차, 5일차, 8일차를 관찰하여 조사함.

준비물

바실러스 배양액, 물, 분무기4개, 1000ml 메스실린더, 500ml 비커, 장갑, 네임테이프

처리과정

1. 아래의 표와 같이 희석 후 1 L 통에 분주함
 2. 오이에 네임텍을 이용하여 부착한 후, 접종 전 사진을 찍음
 3. 분무기를 이용하여 식물체 경엽에 흠뻑 처리함
- * 흰가루병이 감염된 4그루, 감염되지 않은 4그루로 분류하여 수행함

<처리 방법>

처리구 구분		희석배수계산	접종량
O	무처리구	(물500ml) x 2	500mlx2
T-X	균주 원액	(균주 500ml) x 2	500mlx2
T-10	균주 10배 희석액	(물450ml+균주50ml)x 2	500mlx2
T-20	균주 20배 희석액	(물475ml+균주25ml)x 2	500mlx2

<흰가루병이 감염된 오이 작물>



<무처리구: O >



<접종0일차 2021.08.05>

<접종1일차 2021.08.06>

<접종5일차 2021.08.10>

<접종8일차 2021.08.13>

<원액처리구: T-X>



<접종0일차 2021.08.05>



<접종1일차 2021.08.06>



<접종5일차 2021.08.10>



<접종8일차 2021.08.13>

<균주 10배 희석액: T-10>



<접종0일차 2021.08.05>



<접종1일차 2021.08.06>



<접종5일차 2021.08.10>



<접종8일차 2021.08.13>

<균주 20배 희석액: T-20>



<접종0일차 2021.08.05>



<접종1일차 2021.08.06>



<접종5일차 2021.08.10>



<접종8일차 2021.08.13>

<결론>

8월 초에서 중순까지 이루어진 시험에서는 이미 시험포장에 오이작물의 흰가루병이 만연되어 있었으며, 무처리구와 처리구의 발병도는 구분할 수 없는 상태로 후보균주의 흰가루병 치료효과를 보이지 않았음. 고농도 처리에 따른 배지 성분의 약해가 발생함.

<후보균주 *Bacillus* sp. BS061의 2차 활성화도 평가>

1차 평가에서는 오이작물에 흰가루병이 만연된 포장에서 치료적 효과시험을 수행하였다면 2차 시험에서는 예방적 처리를 확인하기 위하여 수행함.

<결과>

발병도조사결과는 아래의 표에 나타난 바와 같이 무처리구에 평균적으로 50.2%, 원액처리구에서는 44.7%, 10배 희석액 처리구에서는 53.6%, 20배 희석액처리구에서는 52.5%, 대조구에서는 40.7%로서 가장 낮은 발병도를 나타냄. 한편 원액처리에서 대조구 다음으로 낮은

발병도를 보였으나 약해가 관찰됨. 또한 10배 희석액은 20배 희석액보다 오히려 발병도가 높게 나타남. 따라서 추가적인 활성검정이 필요함.

* 발병도 = { $\sum(\text{발병수} \times \text{계수}) / 4N$ } x 100

<오이흰가루병 발병도 조사표>

처리구	발병지수	0%	(1-5%)	(5.1-20%)	(20.1-40%)	(40.1%이상)	발병도 %
	엽수/계수	0	1	2	3	4	
0_1	11	4	1	2	0	4	47.7%
0_2	11	3	2	1	1	4	52.3%
0_3	13	5	1	1	1	5	50.0%
0_4	11	4	1	1	1	4	50.0%
0_5	11	4	1	1	1	4	50.0%
0_6	11	3	1	1	1	5	59.1%
0_7	10	4	1	1	0	4	47.5%
0_8	11	5	1	0	1	4	45.5%
0_9	13	5	1	1	1	5	50.0%
0_10	13	5	1	1	1	5	50.0%
무처리평균							50.2%
Tx_1	9	2	1	1	1	4	61.1%
Tx_2	8	1	1	1	1	4	68.8%
Tx_3	11	5	2	1	0	3	36.4%
Tx_4	12	5	2	1	2	2	37.5%
Tx_5	11	4	1	1	1	4	50.0%
Tx_6	13	6	2	2	2	1	30.8%
Tx_7	11	4	2	1	0	4	45.5%
Tx_8	13	5	2	1	1	4	44.2%
Tx_9	9	5	1	1	1	1	27.8%
원액평균							44.7%
T10_1	12	4	3	0	0	5	47.9%
T10_2	13	5	1	1	1	5	50.0%
T10_3	13	5	2	0	2	4	46.2%
T10_4	13	4	1	2	0	6	55.8%
T10_5	11	4	1	1	0	5	52.3%
T10_6	13	5	2	0	0	6	50.0%
T10_7	10	3	1	0	0	6	62.5%
T10_8	14	5	1	1	1	6	53.6%
T10_9	14	4	2	1	0	7	57.1%
T10_10	14	4	1	1	1	7	60.7%
10배평균							53.6%
T20_1	13	5	1	0	1	6	53.8%
T20_2	9	3	1	0	1	4	55.6%
T20_3	13	5	1	0	1	6	53.8%
T20_4	12	4	1	1	0	6	56.3%
T20_5	13	4	2	1	0	6	53.8%
T20_6	12	4	1	1	0	6	56.3%
T20_7	14	4	2	1	2	5	53.6%
T20_8	11	5	1	1	0	4	43.2%
T20_9	14	6	1	1	1	5	46.4%

처리구	발병지수	0%	(1-5%)	(5.1-20%)	(20.1-40%)	(40.1%이상)	발병도 %
	엽수/계수	0	1	2	3	4	
20배평균							52.5%
Con_1	13	7	6	0	0	0	11.5%
Con_2	13	4	3	1	1	4	46.2%
Con_3	12	5	2	1	0	4	41.7%
Con_4	11	5	1	1	2	2	38.6%
Con_5	12	5	1	2	1	3	41.7%
Con_6	15	6	3	0	0	6	45.0%
Con_7	15	7	2	0	0	6	43.3%
Con_8	17	7	2	1	3	4	42.6%
Con_9	14	5	1	2	1	5	50.0%
Con_10	15	6	1	2	1	5	46.7%
대조구평균							40.7%

<원액처리구 성장점 부근 엽소 현상 관찰>



21.09.27(2차접종)_무처리



21.09.27(2차접종)_원액

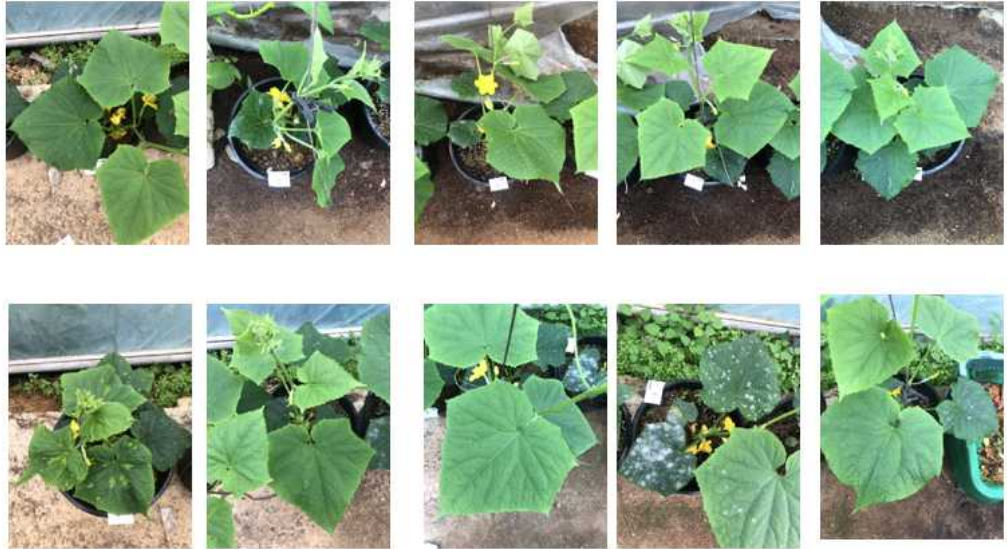


21.09.27(2차접종)_10배



21.09.27(2차접종)_20배





⇒ 상술한 포장시험 결과 활성은 인정되어 후보균주 *Bacillus* sp. 061의 균주개량을 통한 효과 증진 및 복합제형의 후보물질인 버섯 수확 후 배지 추출물 WESMS 및 CSMS의 선발, 주관연구기관과 공동연구기관의 개량균주를 활용한 활성연구 및 기전연구를 기반으로 유기농자재 공시를 신청하기로 협의함.

<*Bacillus* sp. BS061 균주 유래 돌연변이 균주 BSM-320의 배양>

주관연구기관인 전북대학교에서 UV-mutagenesis를 통하여 선발한 돌연변이 균주 BSM-320을 전배양한 배양액을 받아 산업화를 위한 배양기에 2차 배양한 후 배양물을 분석함.

▶ 돌연변이 균주 BSM-320의 산업적 배양조건 검토

물 200 L에 부숙 표고버섯 수확 후 배지를 2.5 Kg 넣고 24시간 동안 상온에서 추출한 다 음 당밀 1%를 넣어 교반하면서 전북대학교로부터 받은 돌연변이 균주 BSM-320의 전배양액 을 500 ml 첨가하여 72시간 동안 상온에서 배양함(15 min/hr 교반).



<돌연변이주 BSM-320의 배양>

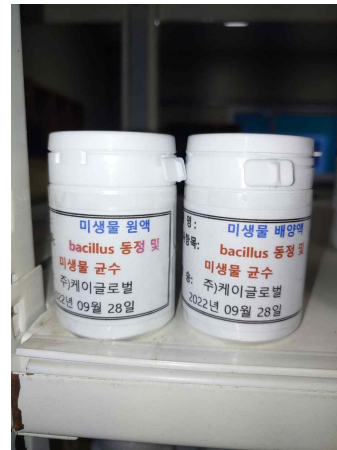
▶ 돌연변이 균주 BSM-320의 배양 분석 결과

미생물 분석은 유기농업자재 분석기관에 의뢰하여 수행하였으며 검사방법은 유전자 염기서

열 상동성 검색을 통한 균주확인을 하였음. 유효미생물은 *Bacillus subtilis* 이며 균수는 원배양액 (케이바이오 원료)은 5×10^7 cfu/mL를 보였으며 2차배양액 (케이바이오 제품)은 1.1×10^5 cfu/mL이었음. 수회 반복 실험을 진행한 결과 3.2×10^8 cfu/mL을 나타냄.



<연구기관 자체 셀카운팅>



<분석 시료>

<돌연변이 균주 BSM-320을 이용한 제형 개발>

버섯 수확 후 배지 추출액으로 배양된 미생물을 수화제 제형으로 제형화를 시도함. 수용성은 빠르고 잔유물이 남지 않고 좋은 결과를 나타냄.

수화제 제형에 검토한 재료는 유기농업자재로 활용 가능한 가오린, 실리카겔, 탈크, 벤토나이트 등에서 최적화 자재를 선발하였으며, 보조제로는 유기농업자재로 활용가능하고 미생물의 보존에 유리할 것으로 보이는 유기물로서 식물생육촉진에도 도움을 주는 아미노산, 해조추출액, 풀빅산에서 선발함.



<미생물 수화제 제형>



<물에 희석직후 양상>



<물에 희석 후 교반 결과>

<시제품 제작 및 병해관리용 유기농업자재 공시신청>

▶ 시제품의 제조 및 생산계획 연구

시제품 자재의 용도는 병해관리용 유기농업자재로서 자재의 명칭은 미생물임. 자재별 생산 시설은 100㎡로 생산설비는 오토클레이브, 미생물배양기, 혼합탱크, 액상충진기, 포장기 등이 있음. 자재별 생산계획량은 연간 3,000 L임. 자재별 소비자 판매가격은 10,000원/500 ml으로 원료 및 재료에 대한 수급계획은 전북대학교 기술이전을 통한 케이글로벌 자체 배양을 실시할

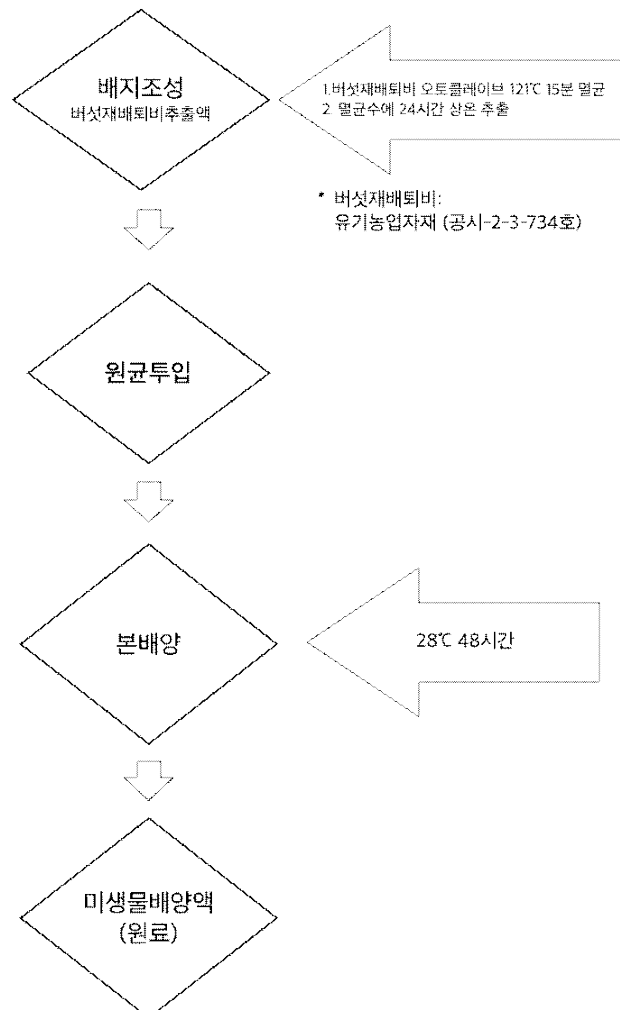
예정임. 원료 및 재료의 품질관리 계획은 원재료 생산 시 균수검사를 수행함. 자재별 제조공정은 원료투입(주원료+보조제), 교반(28℃ 48시간) 및 품질관리, 포장 공정순서에 의함. 품질관리 인력 및 시설, 장비 등 확보 계획으로써 담당자 1인을 선임하고 외부유기농업자재 시험연구기관 의뢰하여 실시함. 품질관리의 주기 및 방법 계획은 분석항목으로서 유효균수 검사, 잔류농약 검사, 병원성 미생물 5종 검사를 실시하며 시험기관은 유기농업자재 시험 연구기관에 위탁하여 연 1회 이상 실시함.

▶ 유기농업자재 원료의 특성 및 제조 조성비 연구

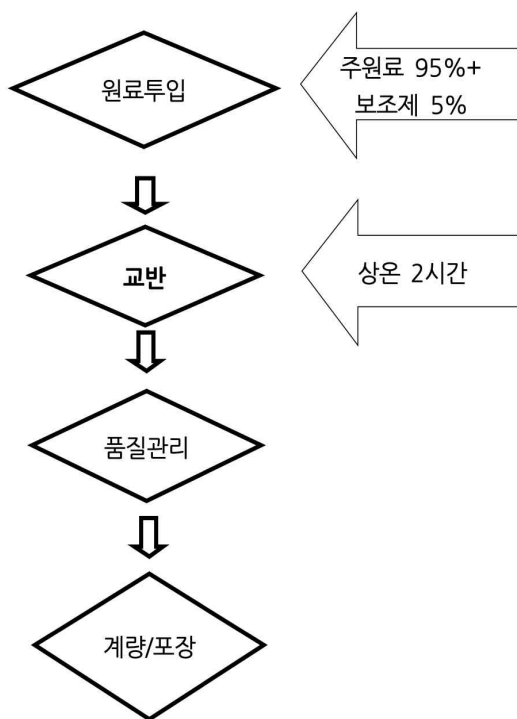
원료는 미생물 배양액(*Bacillus subtilis* BSM320-7)이다. 물질의 기원 및 분포를 살펴보면 *Bacillus subtilis* (고초균)는 대표적인 그람 양성 세균으로 그람 음성 세균인 대장균(*Escherichia coli*)과 함께 생물학 실험에서 많이 쓰임. *Bacillus* 속의 유명 종으로는 탄저균(*Bacillus anthracis*)이 있으며, 길쭉하게 막대기처럼 생긴(rod-shaped) 간균의 일종임. 흙, 공기, 물 등에 살며 일반적으로는 비병원성임. 유효 구성물질의 종류 및 함량은 *Bacillus subtilis*임. 농업분야 사용현황은 미생물 살균제로 사용될 가능성이 있는 *Bacillus sp.* BS061은 식물 잎에서 분리되었으며, *Botrytis cinerea*의 균사체 성장을 강력하게 억제하고, 오이와 딸기에서 흰가루병 발병률을 크게 감소시킴(Kim *et al.*, 2013). 자재의 제조 조성비는 주원료로서 미생물배양액 (*Bacillus subtilis*) 90%이상, 안정제로서 당밀을 나머지로 사용함. 주원료의 물질 유래는 미생물배양액으로써 국내에서 제조하였으며 최초 분리균주는 전북대학교 산학협력단이고, 제조사는 (주)케이글로벌에서 자체 배양함. 보조제인 당밀은 인도산(Deccan Overseas Pvt LTD)이며 국내 유통회사인 경기화학약품상사로부터 구매함.

<제품공정도 및 작업표준서 연구 및 정립>

▶ 미생물배양액 제조공정도



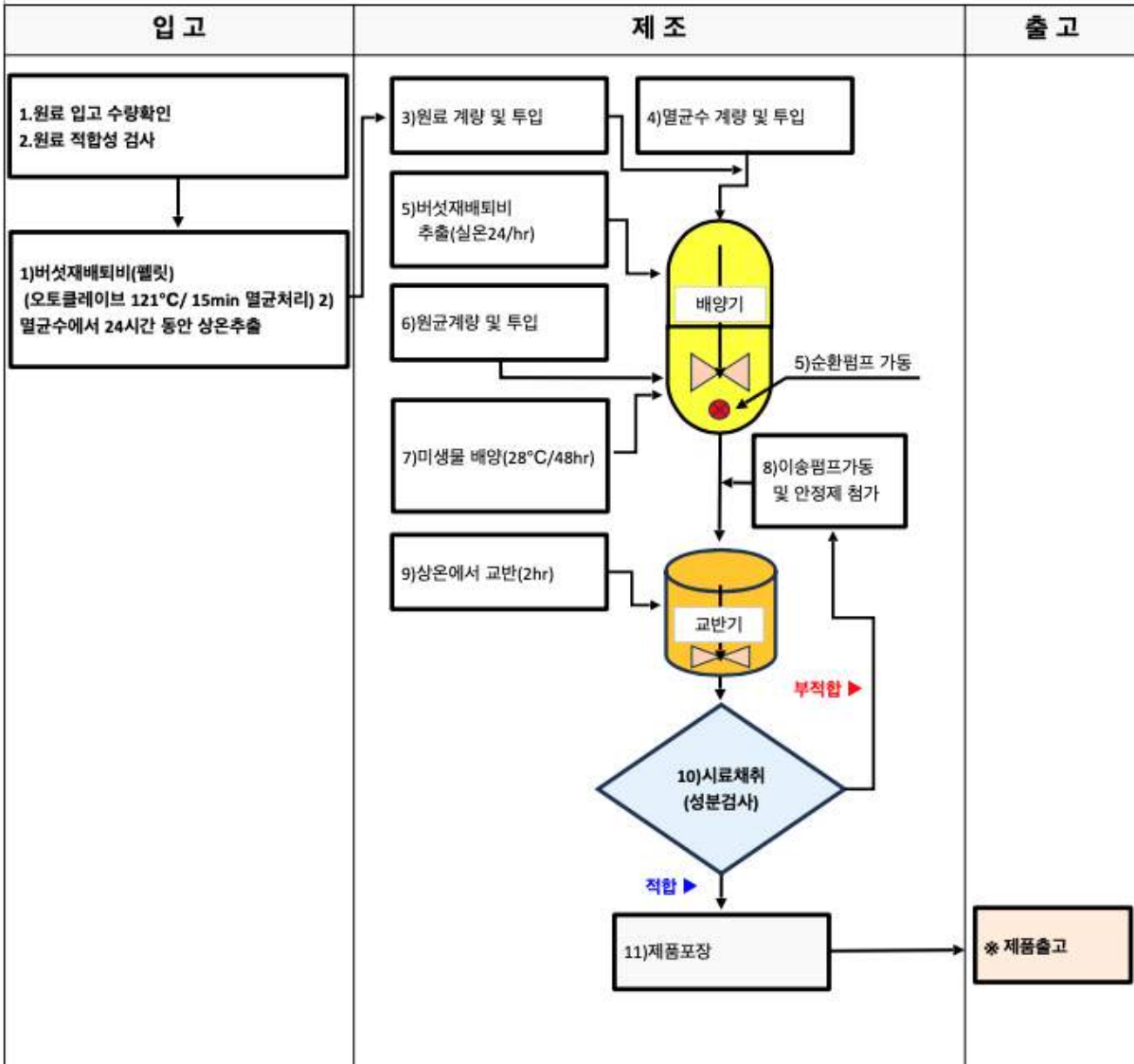
▶ 제품제조공정도



제품에 대한 품질관리는 분석항목으로 유효균수, 병원성미생물 5종, 잔류농약에 대하여 연 1회 이상 유기농업자재 시험연구기관에서 실시함. 자체보균수는 *Bacillus subtilis* 1.0×10^6 cfu/mL 임.

<작업표준서 제작>

문서번호: 23 - 1		작성일자 : 24.01.05	승인
유기농업자재 1)미생물 배양액 제조	작업표준서	개정사항 :	㈜케이글로벌



[작업순서]

※작업 개시전에 미니펌프(추출 및 배양액 순환용)를 설치 가동 준비를 완료하고 작업을 개시한다.

- 1) 버섯재배퇴비(펠릿)를 정량계량(2% : 2kg x 2EA)하여 추출백에 넣고 오토클레이브에서 121°C로 15분간 멸균처리한다.
- 2)멸균처리한 펠릿을 상온까지 자연냉각 시킨다.
- 3)배양기의 내부에 투입한다.
- 4)멸균수(증류수 170L)를 계량하여 자바라 호스를 이용하고, 배양기의 상단 투입구를 통하여 투입한다.
- 5)배양기 내부의 배양액 순환장치(미니모터)를 이용하여 24시간동안 상온에서 순환추출을 한다.
- 6)순환추출이 완료된 다음 미생물 원균(전체량의 10% 해당량)을 멸균수 투입방법과 동일한 방법으로 투입한다.
- 7)28°C로 유지하면서 48시간동안 미생물 배양을 진행한다.
- 8)미생물 배양이 완료되면 배양액을 펌프를 이용하여 믹서로 이송하고, 보조안정제(5%)를 투입한다.
- 9)상온에서 2시간 교반하여 배합을 완료한다.
- 10)배합이 완료된 제품에서 샘플을 채취하여 미생물 성분검사를 실시하고, 합격된 제품을 포장한다.
- 11)포장은 제품의 비중을 기반으로 표준온도에서의 정량에 알맞은 용량을 계량하여 분포장한다.

<포장지 표기사항 설정>

포장지 표기사항은 아래와 같음.

1. 공시 번호: 제 공시-2-4-230호
2. 자재의 명칭 및 상표명: 미생물/케이바이오
3. 자재의 구분: 병해관리용
4. 실중량 또는 실용량: 500ml
5. 주성분의 종류 및 함량: *Bacillus subtilis*
6. 원료의 종류 및 함량: 미생물배양액 (*Bacillus subtilis*) 95%, 보조제 5%
7. 제조연월일:
8. 유통기간: 제조일로부터 1년
9. 사용방법: 500배 희석 생육기 경엽처리
10. 제조장 주소(국내 제조일 경우): 전북 익산시 익산대로78길 169
11. 사용상·보관상 주의사항:
 - 사용량을 준수하십시오.
 - 타제품 혼용시 사전 소량시험후 이상이 없을 경우에 사용하십시오.
 - 보관시 5℃이상 30℃이하에서 직사광선을 피하고 건조하고 서늘한곳에 보관하십시오.
 - 어린이 손이 닿지 않는 곳에 보관하십시오.
 - 사용후 잔량은 마개를 잘 막아서 보관하고 1주일 이내에 사용하십시오.
12. 공시품 안내
 - 가. 이 자재는 효과와 성분함량 등을 보증하지 아니하고 유기농산물 생산을 위해 사용가능 여부만 검토한 자재입니다.
 - 나. 시험작물: 오이, 고추, 상추, 배추, 콩
13. 업체명, 사업장 주소, 전화번호
 - 업체명: (주)케이글로벌
 - 사업장주소: 경기도 용인시 처인구 남사읍 어진로 152-11
 - 전화번호: 삭제함

<시제품의 검사성적서 발행 및 유기농업자재 공시서 확보>

시제품의 병해관리용 유기농업자재 공시를 위한 필수 검사를 수행하고 관련 성적서를 시험기관으로 발급함. 주성분(미생물)검사성적서, 병원성미생물 검사성적서, 잔류농약 검사성적서, 유식물 농약피해시험성적서, 독성시험성적서(급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극성시험, 안점막자극성시험, 담수어류영향시험, 꿀벌영양시험), 경시변화시험을 완료 후 지적재산권협약서와 함께 유기농업자재 공시기관에 제출하여 신청함. 신청결과 아래와 같이 유기농업자재 공시서를 확보함.

■ 농림축산식품부 소관 친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙 [별지 제31호서식]

유기농업자재 공시 신청서

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

접수번호 접수일시 처리기간 3개월

신청인	업체명: (주)케이글로벌	사업자등록번호: [REDACTED]
	대표자 성명: 강대선	[REDACTED]
주소	본 사: 경기도 용인시 처인구 남사읍 어진로 152-11	[REDACTED]
	제조장 및 보관창고: 전북 익산시 익산대로 78길 169	[REDACTED]

신청내용	자재의 명칭: 미생물	[√]국내 생산	
	생산 구분	[]수입	
		수입국:	
		제조회사명:	
	주성분 (원료)	성분(원료)명	미생물배양액 (<i>Bacillus subtilis</i>), 보조제
함량(%)		95%, 5%	
상 표 명	상 표 명	케이바이오	
자재의 구분	자재의 구분	[]토양 개량, []작물 생육, []토양 개량 및 작물 생육, [√]병해 관리, []충해 관리, []병해충 관리	

「친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조제1항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」(이하 "규칙"이라 한다) 제62조제1항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시를 신청합니다.

2023년 12월 28일
신청인 강대선 (서인) (인)

첨부서류	1. 규칙 별지 제32호서식에 따른 유기농업자재 생산계획서 2. 규칙 별표 18의 붙임에 따른 제출 자료 및 서류 3. 시료 500g (ml). 다만, 병해충 관리용 시료는 100g (ml)로 합니다.	수수료 규칙 제90조 및 별표 23에 따른 수수료
------	--	--------------------------------

행정정보 공동이용 등 동의서	
1. 공시 업무처리를 목적으로 위의 신청인 정보와 신청내용을 공시 유효기간 동안 수집·이용함에 동의하십니까? * 신청인은 위 수집, 이용 동의의 거부할 권리가 있습니다. 다만, 동의하지 않을 경우 해당 정보를 활용한 안내 및 홍보, 지원 등이 제한될 수 있습니다.	[√] 동의함 [] 동의하지 않음
2. 공시 제품의 유통활성화를 목적으로 공시를 받은 자의 정보와 공시 내용을 공시기관의 인터넷 홈페이지 및 유기농업자재 정보 시스템에 공개하고, 친환경농업 육성·관리·지원 사업에 활용할 수 있도록 같은 내용을 해당 공공기관 및 지방자치단체 등에 제공함에 동의하십니까? * 신청인은 위 정보 제공 동의의 거부할 권리가 있습니다. 다만, 동의하지 않을 경우 친환경농업 지원 사업 등에 영향을 줄 수 있으며 지원 등이 제한될 수 있습니다.	[√] 동의함 [] 동의하지 않음
신청인 강대선 (서인) (인)	
210mm×297mm[복사지 80g/㎡ 또는 중질지 80g/㎡]	

■ 농림축산식품부 소관 친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙 [별지 제32호서식]

(2쪽 중 1쪽)

공시번호: 제 공시-2-4-230 호

유기농업자재 공시서

1. 업체명: (주)케이글로벌
2. 대표자 성명: 강대선
3. 사업장 소재지: 경기도 용인시 처인구 남사읍 어진로 152-11
4. 자재의 명칭: 미생물
5. 자재의 구분: 병해관리용
6. 상표명: 케이바이오
7. 주성분의 종류 및 함량: *Bacillus subtilis* 1.0×10⁸ cfu/mL
8. 원료 또는 재료의 종류 및 투입비율:
미생물배양액(*Bacillus subtilis*) 95%, 보조제 5%
9. 유효기간: 2024. 02. 22. ~ 2027. 02. 21.
10. 제조장 주소: 전북특별자치도 익산시 함열읍 익산대로78길 169
11. 최초 공시일: 2024. 02. 22.
12. 효능·효과: [√] 표시제품, [O] 미표시제품

「친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률」 제38조제2항 및 「농림축산식품부 소관 친환경농업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙」 제63조제3항에 따라 위와 같이 유기농업자재 공시임을 증명합니다.

2024년 02월 22일

강원대학교 산학협력단장



210mm×297mm[복사지 150g/㎡]

<유기농업자재 공시 신청서>

<유기농업자재 공시서>

<홍보 전시회>

- 일정: 2023. 11.2-3
- 장소: 변산 소노벨 호텔
- 주관: 2023농약과학학회

▶ 홍보전시회 사진자료



UV-mutant *Bacillus subtilis* BSM320-7 : Active compounds and biological properties

전북대학교, 한경대학교, (사)한국농자재시험연구기관협회, (주)케이글로벌

Abstract

Powdery mildews are some of the world's most frequently encountered plant pathogenic fungi. They infect leaves, stems, flowers, and fruits of nearly 10,000 species of angiosperms. In a previous study, *Bacillus* sp. BS061 was isolated and found to have antifungal properties against a range of plant pathogenic fungi, including powdery mildew-causing fungi, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum coccodes*, and *Fusarium oxysporum*. In this study, we aimed to improve the antifungal properties of BS061 through UV-mutagenesis, which resulted in a mutant strain BSM320-7 with enhanced suppression activity against powdery mildews. Cyclic lipopeptides production of this mutant was well conserved, but cyclic lipopeptides showed no activity against powdery mildews. Bioassay-guided fractionation using cucumber leaf disk assay led us to isolate two active compounds, phenylalanine and lysine.

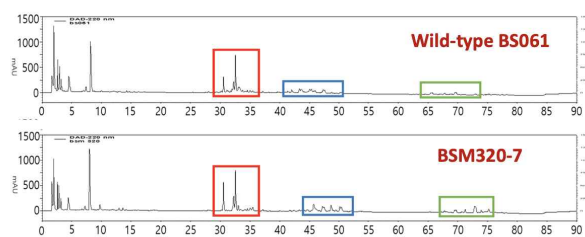
Materials & Methods

UV irradiation

The BS061 stock was spread plated onto a LB agar from 10^{-2} to 10^{-6} serial dilution under sterile conditions. The 10^{-2} serial dilution 10 mL suspension of BS061 was loaded on watch glasses (15 mm in diameter), which were placed in a UV box with a door [(27 cm (W)×18 cm (H),15 cm (D))]. Then, the suspension was UV irradiated at 254 nm for 3 min–7.5 min for a 0.1–1% survival rate. The 200 μ L of each diluted UV irradiated cell suspension was spread on an LB agar plate to select the UV mutants with high antifungal activity. After irradiation, petri dishes were immediately wrapped in aluminum foil to avoid photoreactivation and incubated at 27°C for 18 h. Mutant colonies were picked and streaked into fresh LB agar for the single colony, and stored at -80 °C in 30% glycerol for antifungal assays.

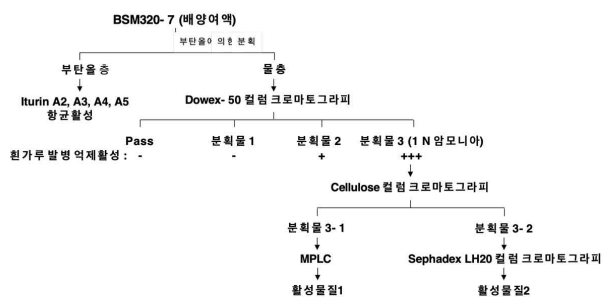
Acid precipitation

The selected UV mutant BSM320-7 was grown at 500 mL LB broths for 5 days. Each of 100 mL was added 1 N HCl and adjusted to pH 2.0. Precipitation was allowed overnight at 4°C. After centrifugation (6,000 rpm, 15 min), the pellet was extracted with methanol for a period of 6 h. The obtained extract was filtered with filter paper and concentrated *in vacuo*. The concentrate was resuspended in methanol and then analyzed by HPLC.



□ : Iturin class □ : fengycin class □ : surfactin class

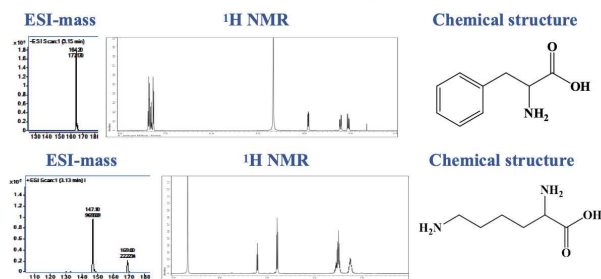
< Comparison of lipopeptide contents of W.T. and UV mutant BSM320 strain in HPLC >



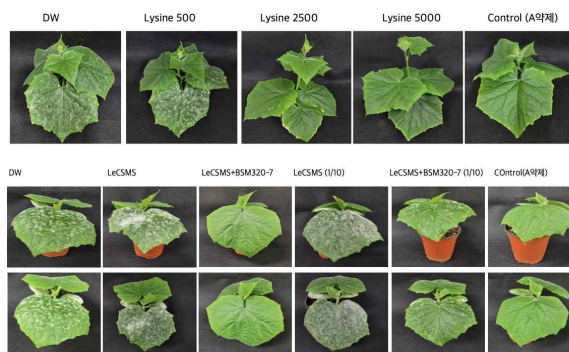
Isolation procedure of two active compounds from the culture broth of *B. subtilis* BSM320-7

Results

Mass and NMR spectra of two active compounds



Control effect to powdery mildew



Conclusions

- 본 연구는 흰가루병 방제 특허균주 *Bacillus subtilis* BS061 균주의 활성 향상을 위하여 UV-mutagenesis를 통한 균주개량을 수행한 연구임.
- 974 균주의 돌연변이 균주 중 활성이 우수하고 안정한 *B. subtilis* BSM320-7 균주를 최종 선발함.
- BSM320-7 균주는 모 균주와 유사한 정도의 lipopeptide 항생물질을 생성하나 흰가루병 방제효과는 보다 우수한 효능을 나타냄.
- 미생물체제의 효능 불안정성을 극복하고자 흰가루병 억제물질을 규명한 결과 phenylalanine과 lysine으로 밝히고, 이를 이용한 QC체계를 구축함.
- *B. subtilis* BSM320-7 균주로부터 분리한 유효성분의 작용기전을 규명한 결과, 이들 화합물이 식물의 병저항성을 유도하는 것을 밝힘.
- 본 연구는 흰가루병 방제에 사용되는 *B. subtilis*의 활성성분을 처음으로 규명한 연구로 흰가루병 방제제 개발의 새로운 패러다임을 제시함.

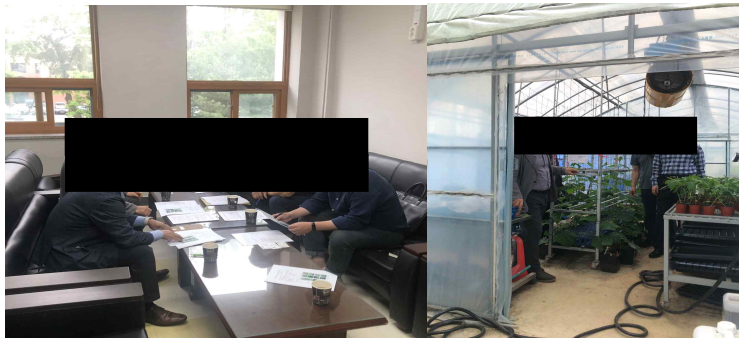
[위탁과제 : (사)한국농자재시험연구기관협회]

본 과제는 산업화의 경험이 많은 (사)한국농자재시험연구기관협회가 상용화 연구를 진행하는 2차년도와 3차년도에 위탁기관으로 참여하여 효능의 객관성을 보장하기 위한 소포장 시험 결과 분석 및 자문을 수행함. 또한, 포장실증 방법 등 기술적 협력을 수행하여 본 연구에서 개발한 제품이 안정된 효능을 갖는데 기여하고자 함.

<2022년 수행 결과>

▶ 과제 협의회 참석 및 생물검정법 지도 (2022. 5. 18)

- 과제 진행에 대한 로드맵 제시 및 정량적 목표 토의
- (사)농시험 : 방제효과 구명 및 포장실증 방법 등 기술적 협력
환경대측의 균주별 흰가루병 생물검정법 지도



▶ 기술자문 및 협력 (2022. 6. 15)

- 유용미생물의 오이 흰가루병 생물적 방제 실험 협력
: 페트리디쉬 활용한 leaf disc 활용 방법 제시
: 미생물 희석농도별 원액, 10, 20, 50배 희석액, 무처리

▶ 기술자문 및 협력 (2022. 8. 24)

- 후보균주의 오이 흰가루병 생물 검정 동시 수행
- 후보균주 및 돌연변이 균주의 유기농자재등록 대비 제제화 연구 공동 수행

▶ 참여기업인 (주)케이글로벌과 공동으로 포장 실험 수행 (2022. 9. 1-2022. 9. 29)

- 2022. 9. 1
: 미생물 균주처리는 40-50배 희석액으로 처리하고, 흰가루병 대조약제 플루티아닐 5% 500배 사용.
- 2022. 9. 20, 용인 케이글로벌
: 환경대 배양 미생물 균수조사 : 1.2×10^9 cfu/mL (환경대 균수조사)
: BS-302균주 배양액 40처리, 농약처리, 무처리로 10주씩하여 7일 간격 2회 처리하였음.
: 흰가루병 발생이 매우 저조한 상태이고, 오이잎이 질소질비료 부족함
: 트레이 연결포트에 종자 파종한 후 재배는 유묘가 웃자라서 생육이 부실하여 검정 좋지 않고, 지피포트에 오이유묘 재배하여 실험에 사용이 용이함
: 포장검정이 대형포트를 이용한 오이재배로 환기나 물관리 필요
: 외부와 차단하여 외부로부터의 전염원 유입이 곤란하고 바닥에 물기가 많아 일부 노균병 발생함.



- 2022. 9. 27

- : 미생물 선발 균주 40배 희석액 7일 간격 3회 처리 5일후, 단구제 실험하였고, 앞으로 난과법 3반복으로 실험 실시, 흰가루병이 발생하고 있지만 무처리 발생이 적고, 미생물처리구가 무처리 보다 좋지만 방제효과 미흡
- : 선발균주 배양하여 저온저장기간이 오래되어 방제효과가 저조할 수 있어 처리시마다 바로 배양하여 사용이 바람직할 것으로 판단됨

- 2022. 9. 29

- : 강대선 오이흰가루병 조사 결과에 대하여 무처리 12%, BS302균주 40배액 38.3% 방제효과, 대조약제 클립캡 4,000배는 80%의 방제 효과를 나타냄
- : 전북대 배양조건 다시 점검하여 배양일수 및 pH 확인, 균주 배양 후 냉장고 오래 보관의 영향인 것으로 판단됨. 따라서 신선한 배양액을 사용해야 제대로 효과를 볼 수 있을 것으로 판단됨

- 2022. 10. 25

- : 선발미생물 동정 및 균수 : 강원대 친환경농산물안전성센터에 의뢰 결과 BSM-320 균주의 케이바이오팀 *Bacillus subtilis* 1.1×10^5 cfu/mL
- : 케이바이오(원료) 5.0×10^7 cfu/mL
- : 대량배양은 겨울철에 해결해야할 문제로 발효조 이용한 조건을 구명해야함.
- : 플라스크 이용한 28℃, 48시간 배양에서 10^{8-9} cfu/mL, 발효조 이용 시에는 10^{10-11} cfu/mL 균수 생산
- : 제형은 액체제형 및 파우더 제형을 생각하면서 친환경전착제를 선발하기로 함
- : 내년 5월까지 포장시험을 완료하여 친환경유기농자재 등록 신청하기로 함

※ 포장관찰

- : 간이시설재배포장에서 10월 최저온도가 5도로 오이 생육에 지장을 주고 있음
- : 저온으로 오이생육이 불량하여 선발 미생물에 대한 생물 검정을 못함
- : 가온 재배 시설에서 실험 필요 : 10월부터 4월까지 수행하기로 함
- : 농가의 시설재배에서 채취하여 오이잎을 이용한 선발균주의 생물검정을 수행하기로 함



▶ **대량배양 과제 협의 (2022. 11. 17)**

- 미생물 배양 관련 대량배양 시험 및 제형화 테스트 공동 실시
- 미생물 대량배양 : 정읍 (재)농축산용 미생물산업육성지원센터 활용
- 제형화는 분말과 액체형태로 구분하여 진행하기로 협의
- 포장 효과 검정 의뢰하여 방제효과 구명한 후 친환경유기농자재목록 공시 신청하기로 협의

<2023년 수행 결과>

▶ **2023년도 시제품의 오이흰가루병 방제 효과 검정 (2023. 2. 13)**

- 2023년도 시제품의 오이흰가루병 방제 효과 검정 방법 제시
- 시설 내에서 오이 종자를 지피포트에 파종하여 본엽 2~3엽기에 흰가루병반이 하나라도 발견 시에 시제품 또는 원액에 대하여 희석배수별 스프레이 7일간격 3회 처리 7일후에 흰가루병의 발병면적을 조사하여 방제가를 구함

▶ **기술자문 및 협력 (2023. 4. 11)**

- 오이 흰가루병균의 특성에 대한 자료 송부
- 작물보호제의 생물시험 방법 자료를 활용한 토의(농업과학기술원)

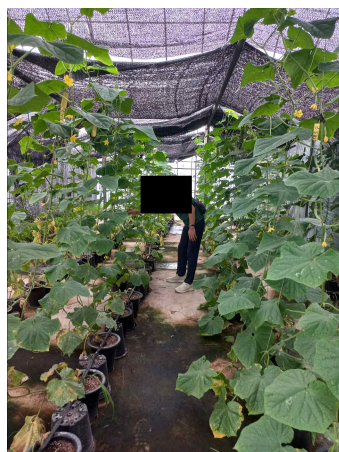
▶ **한경대 실험 자문 (2023. 7. 26)**

- 오이 흰가루병 발병율이 낮아 대책 협의: 흰가루병이 발생한 온실에서 오이를 같이 재배하면 흰가루병균이 비산되어 오이 작물에 감염되도록 유도하기로 함. 박과작물이 없는 곳에서 무처리 대상 오이를 재배하는 것이 바람직

▶ **케이글로벌과 공동으로 방제효과 검증 (2023. 6. 8-2023. 6. 20)**

- 흰가루병 생물적 방제 미생물처리 방제 효과 검증 및 문제점 파악
 - : 미생물제 처리 효과
 - : 미생물 수화제 타입 제형의 100 배 희석액 처리 : 5월 30일
 - : 처리 2일후 약해와 약흔이 6월 8일에도 확인됨
 - : 제형은 보조제 해조추출물분말, 화이트카본, 카오린을 사용함
 - : 오이 흰가루병 진전이 매우 미미하였음. 단, 하엽에 1~2개의 흰가루병 병징만 있음
- 제의내용
 - : 약해 발생은 보조제로 사용한 해조추출물, 화이트카본, 카울린과 배양액과 조합하여 오이 잎에 분무 처리하여 약해 발생을 파악해야 원인 규명할 수 있음
 - : 오이 흰가루병 발생이 없고, 노균병 발생이 심하여 바닥의 물을 제거하고, 질소질비료 추가 시비로 흰가루병 발생 유도가 필요
 - : 오이 육묘 2.5엽기에 약해 검증이 좋으며, 유묘기에 흰가루병 방제효과로 예방 및 방제 효과 검증이 필요함
- 미생물제 제형
 - : 제형은 설계서대로 수화제타입과 액상타입으로 실험하고, 친환경 유기농자재 등록은 액상 타입이 용이하여 6월에 등록 신청할 계획이고, 8월 정도에 등록 가능할 것으로 판단
 - : 미생물제 등록후에 시판에는 제형의 흰가루병 방제효과 데이터가 있어야 하여 이를 시험하고자 계획함

- 미생물제 오이흰가루병 방제효과 검정
 - : 선발 미생물 시제품 처리 효과 시험 준비
 - : 기존 재배 오이식물 하엽의 흰가루병 발생이 시작하여 전염원으로 사용하기로 함
 - : 일단 지피포트에 오이 종자 파종하여 2~3엽기에 시제품 처리하자고 협의함
 - : 최종적으로 오이 흰가루병 방제효과 검증은 오이 식물체가 제대로 자란 작물에서 수행하기로 함



- ▶ **친환경유기농자재 제품 등록친환경 유기농자재 등록 문제 (2023. 8. 23)**
 - : 선발미생물의 물질에 대한 친환경유기농자재 등록은 순천대와 강원대에서 분석 불가능으로 물질 이용 어려움
 - : 우리나라 미생물제 등록비용은 3900만원(부가가세별도)
 - : 친환경유기농자재 등록기관의 미생물 생성물질을 검출할 수 없어 등록이 불가능한 상태임
 - : 미생물제 등록 비용이 시험비에 미계상되어 (주)케이글로벌측에서 지불하기로 함
 - : 8월 말에 분석기관에 의뢰하여 연구종료 내에 등록하기로 협의
- 미생물제 제형
 - : 미생물제 등록은 액상타입으로 할 계획임
 - : 설계서에는 수화제 타입으로 되어 있지만 시제품으로 수화제와 액상타입 제조하기로 함
- 오이 흰가루병에 대한 방제 효과 검정
 - : 폭염과 폭우로 오이 생육이 불량하고, 굴파리 피해가 발생하였으며, 흰가루병은 전혀 발생되지 않고 있음
 - : 9월 중하순경에 흰가루병 방제 효과를 한경대 포장에서 실험하기로 협의
- ▶ **선발균주의 친환경 유기농자재 등록 협의 (2023. 8. 31)**
 - 선발 미생물 바실러스 서브틸리스 액상제품의 유기농자재 등록 : 강원대
 - 강원대 : 균주 동정 및 제품의 경시변화
 - 독성 검사 의뢰
 - 한국생물안전성연구소 연구소장 김진박사 사전 농시험 접촉하여 저비용 협조
 - 2023년 친환경유기농자재 신청등록 완료 목표
- ▶ **시제품의 오이 흰가루병에 대한 방제 효과 검정 협의**
 - 오이 3엽기 식물체를 화분에 정식함
 - 잦은 강우로 식물체가 도장되었으며, 하엽에 일부 노균병이 발생하였음
 - 흰가루병 발생 초기에 선발균주 시제품 처리 예정 협의
 - 남사지역의 오이재배농가가 흰가루병 발생은 없고, 노균병이 주로 발생함
- ▶ **시제품의 오이 흰가루병에 대한 방제 효과 검정**
 - 오이 5엽기 식물체를 화분에 정식함
 - 남사지역의 오이재배농가가 흰가루병 발생이 없어 한경대에서 진행



- ▶ **선발균주 BSM320-7의 친환경 유기농자재 등록 협의 (2023. 9. 22)**
 - 선발미생물 바실러스 서브틸리스 액상제품의 유기농자재 등록 : 강원대 의뢰 완료
 - 강원대 : 균주 동정 및 10^6 cfu로 제품의 경시변화는 유효기간 1년으로함
 - 독성 검사 의뢰 : 한국생물 안전성연구소 독성팀
 - 독성검사 결과를 11월 하순 수령할 예정

- ▶ **선발균주의 친환경 유기농자재 등록 관계 (2023. 10. 24)**
 - 선발미생물 바실러스 서브틸리스 액상의 유기농자재신청은 독성 결과 후 강원대의뢰 예정
 - 2023년 친환경유기농자재 등록 완료 목표이지만 심의회로 내년 2월 등록될 예정임

- ▶ **전시 및 홍보 협조**
 - 2023년 한국농약과학회 추계학술대회 부스 예약 : 11월 2~3, 변산소노벨
 - 학회 사무장 김영순에게 부스 사용 사전 농시험 협의
 - 포스터 부착, 시제품 액상 및 수화제 타입 등 전시

- ▶ **선발균주의 친환경 유기농자재 시제품의 홍보 및 전시 협조(케이글로벌)**
 - 2023년 한국농약과학회 추계학술대회, 11월 2~3, 변산소노벨
 - 포스터 부착, 시제품 액상 및 수화제 타입 등 전시



- ▶ **선발균주 BSM320-7의 친환경 유기농자재 등록 (2023. 11. 28)**
 - 선발미생물 바실러스 서브틸리스 액상의 유기농자재신청은 독성 결과 후 강원대의뢰 예정
 - 독성 검사 의뢰 : 한국생물 안전성연구소 독성팀 결과 11월 하순 예정
 - 친환경유기농자재 등록은 내년 2월에 등록 될 수도 있음

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- **활성 증진을 위한 *Bacillus* sp. BS061 균주의 UV-mutagenesis**
 - UV-mutagenesis 조건을 확립: 포자수, UV 조사 시간 등을 확립함
 - UV-mutant의 선발: 총 974균주 확보 및 glycerol stock에 보존함
 - UV-mutant의 활성 검정: 흰가루병균은 순환물기생균으로 활성평가에 어려움이 있어 *R. solani*와 *Diaporthe*를 이용, 대치배양법으로 전균주 항균활성을 검정함
 - 우수 균주의 선발: 생육상태, 항균활성 등을 토대로 BSM-189, BSM-216, BSM-320, BSM-398 등 4종을 1차적으로 선발함
- **모균주 *Bacillus* sp. BS061과 선발된 4종 돌연변이 균주의 lipopeptide 생성 분석**
 - HPLC 분석을 통한 lipopeptide 계 화합물 iturin, fengycin을 확인함
 - LC-ESI-Mass 분석을 통한 Iturin A1, Iturin A2, Iturin C3, Iturin A3/A4/A5, Iturin C2와 Fengycin C15, Fengycin C19의 생성을 확인함
 - 선발한 4종 돌연변이 균주는 모두 fengycin과 surfactin을 생성함
 - 돌연변이 균주 중 BSM-189를 제외하고는 모두 iturin을 생성하는 것으로 확인함
- **모균주 및 돌연변이 균주로부터 흰가루병 방제물질의 분리, 정제 및 화학구조 분석**
 - Diaion HP-20, Dowex-50, Cellulose, Sephadex LH-20 등을 이용한 column chromatography와 MPLC를 활용하여 흰가루병 방제물질 3종을 분리, 정제함
 - NMR 및 ESI-mass 분석을 수행하여 흰가루병 방제물질 3종의 화학구조를 phenylalanine, tryptophan, lysine으로 규명하고, 주 효능성분이 lysine임을 밝힘
- **모균주 *Bacillus* sp. BS061과 선발된 돌연변이 균주의 흰가루병 억제활성 검정**
 - 원균주의 경우 87%의 흰가루병 방제가를 나타내었으나 선발한 BSM-320 균주는 90%, BSM-398 균주는 84%의 방제가를 나타냄
 - 흰가루병 방제가 및 추가 mutation을 통하여 최종 산업화 균주 BSM320-7 선발
- **최종 선발 돌연변이 균주 BSM320-7를 이용한 활성성분의 분석 방법 확립**
 - 산업화 균주 BSM320-7의 배양액으로부터 활성성분 lysine의 분석 방법 확립
 - 검량선 작성 및 활성성분 정량 분석과 이를 통한 시험법 확립 및 검증
- ***Bacillus* sp. BS061 균주 및 BSM-320 균주의 특성 구명 및 항균활성 검정**
 - *Bacillus* sp. BS061 균주의 유전학적 특성 구명: 16S rDNA 분석에 의한 원균주 *Bacillus* sp. BS061의 분류 및 동정을 수행함
 - 주요 식물병원성 곰팡이 고추역병, 고추탄저병, 시드름병, 인삼잘록병균에 대한 항균효과를 구명함
 - 최적 항균 활성을 나타내는 배지 조건 구명함
 - 다양한 배양배지와 버섯 수확 후 배지 등의 활용에 따른 항균 효과를 구명함
- **흰가루병 포자 발아 조건 확립 및 포자 저해물질 신속검정시스템개발**
 - *In vitro* 오이 흰가루병 접종 및 발병조건을 확립함
 - 오이 흰가루병 포자 발아 조건을 확립함
 - 흰가루병 포자 발아 저해물질 신속검정시스템을 개발함
- **표고 수확 후 배지 퇴비(LeCSMS) 물 추출물의 활용 및 특성 구명**
 - 표고 수확 후 배지 퇴비(LeCSMS) 물 추출물을 이용한 *Bacillus* sp. BS061 균주 배양 검토: 단가측면에서 저렴하고 높은 활성을 확인함
 - 표고 수확 후 배지 퇴비(LeCSMS) 물 추출물의 이화학적 특성을 구명함
- **모균주 BS061과 개량균주 BSM-320의 오이 흰가루병 방제 효과**
 - Pot test를 통한 오이 흰가루병 방제효과를 검정한 결과 표고 수확 후 배지 퇴비 추출물에 배양하여 처리한 결과 65%(대조 농약 75%)의 방제효과를 나타냄
 - 후보균주 *Bacillus* sp. BS061의 1차 및 2차 활성도 평가: 오이 흰가루병의 만연과 강우량으로 인하여 정확한 결과를 확보하지 못함
 - Leaf disk를 이용한 방제효과를 구명한 결과 BSM-320 균주는 약 10%의 발병도를 나타내어 방제가가 우수한 것으로 나타남
- **표고버섯 수확 후 배지 퇴비 추출물을 이용한 BSM-320 균주의 배양 및 흰가루병 억제 효과 구명**
 - 표고버섯 수확 후 배지 퇴비 추출물에 다양한 탄소원을 첨가하며 BSM-320 균주를 배양한 결과 당밀과

- Glucose 첨가 시 균 밀도가 가장 우수함
- 이들 배양액의 흰가루병 방제효과를 구명한 결과 1% glucose 첨가 시 5%의 발병도를 나타내었으나 당밀 첨가 시에는 방제효과가 낮음
- BSM-320 균주의 흰가루병균 포자발아 억제 효과 구명
 - 표고버섯 수확 후 배지 퇴비 추출물을 이용하여 배양한 BSM-320 균주의 오이 흰가루병 포자발아 억제율을 조사한 결과 포자 발아율이 26%로 현저히 감소함
 - 오이 흰가루병의 포자발아를 억제하여 항균활성을 나타냄을 확인함
- 돌연변이 균주 BSM-320 배양체의 병 저항성 유전자 발현 연구
 - BABA 처리 시 오이 감염 잎과 정상 잎의 병 저항성 유전자 발현량을 qRT-PCR로 분석한 결과 *PAL*, *PR3*, *PR1*, *LOX1*, *LOX23*, *LecRK6.1*, *WRKY20* 및 *Cupi4*가 각각 2.7, 53.1, 25, 2.7, 2.8, 4.4, 0.6 및 21.6 배의 전사량이 증가함
 - BABA 처리 시 salicylic acid 함량을 LC-mass 분석법을 사용하여 측정한 결과, 2000과 5000 mg/L 농도에서 각각 3.84 ng/mL과 14.1 ng/mL로 증가함.
 - BSM-320 배양액 처리 시 오이 잎에서 *CsLOX1*, *CsLOX23* 유전자 발현이 각 13.3배와 3.6배 증가되고, *LecRK6.1*은 8.01배, *WRKY20*은 7.07배 증가됨
 - BSM-320 배양액에 오이 병 저항성 유전자 발현을 유도하는 유효물질 존재 확인
- 표고버섯 수확 후 배지 추출물 배양 BSM-320의 항균활성 및 식물 성장촉진 효과
 - 표고버섯 수확 후 배지에서 *R. solani*, *C. coccodes*, *B. cinerea*, *P. capsici*, *F. oxysporum* 균사체 성장율이 각 95.8%, 93.2%, 96.4%, 54.6%, 93.7% 억제함
 - BSM-320 배양액 처리는 식물성장 촉진효과가 있음을 확인함
 - 식물성장촉진은 영양성분 및 성장촉진 성분이 배양액에 존재하는 것으로 판단
 - 결론적으로 BSM-320은 오이 흰가루병 방제효과와 식물생육 촉진효과를 갖는 복합기능성 생물방제제로 활용 가능함을 확인함
- 돌연변이 균주 BSM-320의 배양
 - 돌연변이 균주 BSM-320의 pilot 배양을 검토하기 위하여 참여기업인 케이글로벌에서 제작한 배양기에 배양함
 - Pilot 배양액을 유기농자재 분석기관에 의뢰하여 유전자 염기서열 상동성 검색을 통하여 균주를 재확인함
- 돌연변이 균주 BSM-320을 이용한 제형개발
 - 버섯 수확 후 배지 추출액으로 배양된 BSM-320을 수화제 제형으로 제형화를 시도함. 수용성이 빠르고 잔유물이 남지 않고 좋은 결과를 나타냄
- 시제품 제작 및 병해관리용 유기농업자재 공시신청
 - 시제품의 제조 및 생산계획 확립
 - 유기농업자재 원료의 특성 및 제조 조성비 확립
 - 제품공정도 및 작업표준서 연구 및 정립
 - 작업표준서 제작
 - 시제품의 검사성적서 발행 및 유기농업자재 공시서 확보

(2) 정량적 연구개발성과

- 특허출원: 1건
 - 흰가루병에 방제 효과를 갖는 바실러스 서브틸리스 BSM320-7 균주, 이를 포함하는 흰가루병 방제용 조성물 및 이를 이용한 흰가루병을 방제하는 방법. 출원번호: 10-2023-0128317
- 기술이전: 1건
 - (주)케이글로벌에 특허 "흰가루병에 방제 효과를 갖는 바실러스 서브틸리스 BSM320-7 균주, 이를 포함하는 흰가루병 방제용 조성물 및 이를 이용한 흰가루병을 방제하는 방법"의 양도
- 제품화: 1건
 - (주)케이글로벌: 오이 흰가루병방제제 (상품명: "케이바이오") 제품화
- 고용창출: 2건
 - 고용창출 2명(주)케이글로벌: 정기현, 김태경)
- 인력양성: 7건
 - 최대철 (본 사업을 통하여 학사학위 취득 후 석박사통합과정에 진학)
 - 서원기 (본 사업을 통하여 학사학위 취득 후 석사과정에 진학)
 - 문채영 (본 사업을 통하여 학사학위 취득)
 - 김채원 (본 사업을 통하여 학사학위 취득 후 석사과정에 진학)
 - 권문경 (본 사업을 통하여 학사학위 취득 후 석사과정에 진학)

- 서원기 (본 사업을 통하여 석사학위 취득 후 취업)
- 김자운 (본 사업을 통하여 박사학위 취득 후 취업 예정됨)
- 논문발표: 4건
 - 강희완 등. β -Aminobutyric Acid and Powdery Mildew Infection Enhanced the Activation of Defense-Related Genes and Salicylic Acid in Cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Genes*. 2023년
 - 윤봉식 등. Formanilides from the culture broth of *Perenniporia fraxinea*, *The Journal of Antibiotics*. 2023년
 - 윤봉식 등. Pullusurfactins A-C, new biosurfactants produced by *Aureobasidium pullulans* A11231-1-58 from *Chrysanthemum boreale* Makino. *The Journal of Antibiotics*. 2023년
 - 강희완 등. 표고수확후배지 퇴비 물 추출물에서 *Bacillus subtilis* BSM 320의 고밀도 배양 및 표고 푸른곰팡이병의 생물학적 방제. *한국버섯학회지*. 2023년
- 학술발표: 6건
 - 2021년 한국버섯학회 추계학술대회
 - Won-Gi Seo, Dae-Won Ki, Dae-Cheol Choi, Chae-Won Kim, In-Kyoung Lee, and Bong-Sik Yun. Antimicrobial activities of the fungal strains of mushroom origin. *Proceedings of 2021 fall Meeting of The Korean Society of Mushroom Science*, October 15, 2021, Hankyong National University, Anseong, Korea.
 - 2022년 한국응용생명화학회 춘계학술대회
 - Dae-Cheol Choi, Won-Gi Seo, Mungyeong Gwon, Dae-Won Ki, Young-Hee Kim, Chae-Won Kim, In-Kyoung Lee and Bong-Sik Yun. UV-mutagenesis of *Bacillus* sp. BS061. *Proceedings of 2022 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC*, June 28, 2022, Bareumi Hotel Inter-Burgo Daegu, Daegu, Korea.
 - 2022년 한국식물병리학회 춘계학술대회
 - Hee-Wan Kang, Ja-Yoon Kim, Da-Bin Kim, Sung-Joon Park. High density culture of *Bacillus subtilis* BS061 using water extract from the composted spent mushroom substrate of *Lentinula edodes* and its protective effect against cucumber powdery mildew disease. *Proceedings of The 2022 KSPP Spring Conference*, April 21, 2022, Byeonsan Sono Belle, Byeonsan, Korea.
 - 2022년 한국버섯학회 추계학술대회
 - Ja-Yoon Kim, Song Min Su, Hee-Wan Kang. 표고버섯 수확후 배지 퇴비 추출물을 이용한 *Bacillus* spp. 배양 및 식물병의 생물학적 방제. 2022년 한국버섯학회 추계학술대회초록집, 2022년 10월 27일, 조선대학교, 광주, Korea.
 - 2023년 한국응용생명화학회 춘계학술대회
 - Dae-Cheol Choi, Dae-Won Ki, Young-Hee Kim, Won-Gi Seo, Mungyeong Gwon, Chae-Won Kim, In-Kyoung Lee and Bong-Sik Yun. Biological properties of the mutant *Bacillus* sp. BSM-320, *Proceedings of 2023 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC*, June 18-20, 2023, ICC JEJU, Jeju, Korea.
 - 2023년 한국버섯학회 추계학술대회
 - Ja Yoon Kim, Ye-Rin Baek, Ju-Hyeong Hwang Bo, Hee Wan Kang. Biological control of cucumber powdery mildew by *Bacillus subtilis* BSM320 cultured in water extract from the composted spent mushroom substrate of *Lentinula edodes* (LeCSMS WE) and expression induction of cucumber defense-related genes. 2023년 한국버섯학회 추계학술대회초록집, 2023년 10월 26일, 탄금호 국제조정경기장 그랜드 스탠드 미디어센터.
- 전시회: 1건
 - 2023년 농약과학회 홍보전시회
 - 친환경 오이흰가루병 방제제 전시 및 홍보
- 유기농업자재 공시서 신청 및 확보: 1건
 - 유기농업자재 공시서 취득
 - 업체: (주)케이글로벌
 - 미생물
 - 병해 관리용
 - 상표명: 케이바이오

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계 (2021~2022)	2단계 (2023~2023)	계	가중치 (%)
지식재산권	특허등록	목표(단계별)		1	1	10
		실적(누적)				
	특허출원	목표(단계별)				
		실적(누적)		1	1	
기술실시	건수	목표(단계별)		1	1	20
		실적(누적)		1	1	
사업화	제품화	목표(단계별)		1	1	20
		실적(누적)		1	1	
	고용창출	목표(단계별)	1		1	15
		실적(누적)	2		2	
학술성과	SCI논문	목표(단계별)	1	1	2	-
		실적(누적)		3	3	
	학술발표	목표(단계별)	1	1	2	10
		실적(누적)	4	2	6	
인력양성	명	목표(단계별)	2	2	4	5
		실적(누적)	5	2	7	
정책활용·홍보	홍보전시	목표(단계별)		1	1	5
		실적(누적)		1	1	
기타(유기농자재 공시서)	건수	목표(단계별)		1	1	15
		실적(누적)		1	1	
계		목표(단계별)	5	9	14	100
		실적(누적)	11	12	23	90

(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	β-Aminobutyric Acid and Powdery Mildew Infection Enhanced the Activation of Defense-Related Genes and Salicylic Acid in Cucumber (Cucumis sativus L.)	Genes	강희완	14	스페인	MDPI	SCIE	2023.11.17	2073-4425	40
2	Formanilides from the culture broth of Perenniporia fraxinea	The Journal of Antibiotics	윤봉식	76	일본	Springer Nature	SCIE	2023.11.27	0021-8820	40
3	Pullusurfactins A-C, new biosurfactants produced by Aureobasidium pullulans A11231-1-58 from Chrysanthemum boreale Makino	The Journal of Antibiotics	윤봉식	76	일본	Springer Nature	SCIE	2023.11.27	0021-8820	10
4	표고수확후배지 퇴비 물 추출물에서 Bacillus subtilis BSM 320의 고밀도 배양 및 표고 푸른곰팡이병의 생물학적 방제	한국버섯학회지	강희완	21	대한민국	한국버섯학회	비SCIE	2023.10.31	1738-0294	10

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021년 한국버섯학회 추계학술대회	서원기, 기대원, 최대철, 김채원, 이인경, 윤봉식	2021년 10월 15일	한 경 대 학 교 (Zoom)	대한민국
2	2022년 한국응용생명화학회 춘계학술대회	최대철, 서원기, 권문경, 기대원, 김영희, 김채원, 이인경, 윤봉식	2022년 6월 28일	인 터 불 고 호 텔 대구	국제 학술대회
3	2022년 한국식물병리학회 춘계학술대회	Hee-Wan Kang, Ja-Yoon Kim, Da-Bin Kim, Sung-Joon Park	2022년 4월 21일	변산 Sono Belle	대한민국
4	2022년 한국버섯학회 추계학술대회	Ja-Yoon Kim, Song Min Su, Hee-Wan Kang	2022년 10월 27일	조선대학교	대한민국
5	2023년 한국응용생명화학회 춘계학술대회	최대철, 기대원, 김영희, 서원기, 권문경, 김채원, 이인경, 윤봉식	2023년 6월 19일	제주 ICC JEJU	대한민국
6	2023년 한국버섯학회 추계학술대회	Ja Yoon Kim, Ye-Rin Baek, Ju-Hyeong Hwang Bo, Hee Wan Kang	2023년 10월 26일	탐금호 국제조정경기장 그랜드 스탠드 미디어센터	대한민국

[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	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	흰가루병에 방제 효과를 갖는 바실러스 서브틸리스 BSM320-7 균주, 이를 포함하는 흰가루병 방제용 조성물 및 이를 이용한 흰가루병을 방제하는 방법	대한민국	전북대학교 산학협력단	2023.09.25	10-2023-0128317						

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	케이바이오	2023.9.	케이글로벌	케이글로벌	병해관리용 유기농업자재		강원대학교 산학협력단	2024. 3월예정

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	양도	특허 “흰가루병에 방제 효과를 갖는 바실러스 서브틸리스 BSM320-7 균주, 이를 포함하는 흰가루병 방제용 조성물 및 이를 이용한 흰가루병을 방제하는 방법” 기술이전	(주)케이글로벌	2023.12.15	12,000,000원	

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	기술이전	오이 흰가루병방제제 (상품명: "케이바이오") 제품화	국내	오이 흰가루병방제제 "케이바이오" 제품화	오이 흰가루병방제제 (상품명: "케이바이오") 제품화	(주)케이글로벌	-	-	-	-

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

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2021년	2022년	
1	작물바이러스및 병해충대응 산업화 기술개발사업	(주)케이글로벌	2	0	2
합계			2	0	2

[사회적 성과]

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2021			3		2	1	1			2	
2		2022	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
					2			2				2	
3		2023	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			1	1			1	1	1			1	

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	전시회 부스설치	(주)케이글로벌	농약과학회 홍보전시회	2023.11.02-03

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 활성 증진을 위한 <i>Bacillus</i> sp. BS061 균주의 UV-mutagenesis	<ul style="list-style-type: none"> ○ UV-mutagenesis 조건을 확립: 포자수, UV 조사 시간 등을 확립함 ○ UV-mutant의 선발: 총 974균주 확보 및 glycerol stock에 보존함 ○ UV-mutant의 활성 검정: 흰가루병균은 순환물기생균으로 활성평가에 어려움이 있어 <i>R. solani</i>와 <i>Diaporthe</i>를 이용, 대치배양법으로 전균주 항균활성을 검정함 ○ 우수 균주의 선발: 생육상태, 항균활성 등을 토대로 BSM-189, BSM-216, BSM-320, BSM-398 등 4종을 1차적으로 선발함 	100
○ 모균주 <i>Bacillus</i> sp. BS061 과 선발된 4종 돌연변이 균주의 lipopeptide 생성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ HPLC 분석을 통한 lipopeptide 계 화합물 iturin, fengycin을 확인함 ○ LC-ESI-Mass 분석을 통한 Iturin A1, Iturin A2, Iturin C3, Iturin A3/A4/A5, Iturin C2와 Fengycin C15, Fengycin C19의 생성을 확인함 ○ 선발한 4종 돌연변이 균주는 모두 fengycin과 surfactin을 생성함 ○ 돌연변이 균주 중 BSM-189를 제외하고는 모두 iturin을 생성하는 것으로 확인함 	100
○ 모균주 및 돌연변이 균주로부터 흰가루병 방제물질의 분리, 정제 및 화학구조 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ Diaion HP-20, Dowex-50, Cellulose, Sephadex LH-20 등을 이용한 column chromatography와 MPLC를 활용하여 흰가루병 방제물질 3종을 분리, 정제함 ○ NMR 및 ESI-mass 분석을 수행하여 흰가루병 방제물질 3종의 화학구조를 phenylalanine, tryptophan, lysine으로 규명하고, 주 효능성분이 lysine임을 밝힘 	100
○ 모균주 <i>Bacillus</i> sp. BS061 과 선발된 돌연변이 균주의 흰가루병 억제활성 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 원균주의 경우 87%의 흰가루병 방제가를 나타내었으나 선발한 BSM-320 균주는 90%, BSM-398 균주는 84%의 방제가를 나타냄 ○ 흰가루병 방제가 및 추가 mutation을 통하여 최종 산업화 균주 BSM320-7 선발 	100
○ 최종 선발 돌연변이 균주 BSM320-7를 이용한 활성성분의 분석 방법 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산업화 균주 BSM320-7의 배양액으로부터 활성성분 lysine의 분석 방법 확립 ○ 검량선 작성 및 활성성분 정량 분석과 이를 통한 시험법 확립 및 검증 	100
○ <i>Bacillus</i> sp. BS061 균주 및 BSM-320 균주의 특성 구명 및 항균활성 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Bacillus</i> sp. BS061 균주의 유전학적 특성 구명: 16S rDNA 분석에 의한 원균주 <i>Bacillus</i> sp. BS061의 분류 및 동정을 수행함 ○ 주요 식물병원성 곰팡이 고추역병, 고추탄저병, 시드름병, 인삼잘록병균에 대한 항균효과를 구명함 ○ 최적 항균 활성을 나타내는 배지 조건 구명함 ○ 다양한 배양배지와 버섯 수확 후 배지 등의 활용에 따른 항균 효과를 구명함 	100

추진목표	달성내용	달성도(%)
○ 흰가루병 포자 발아 조건 확립 및 포자 저해물질 신속검정시스템개발	○ <i>In vitro</i> 오이 흰가루병 접종 및 발병조건을 확립함 ○ 오이 흰가루병 포자 발아 조건을 확립함 ○ 흰가루병 포자 발아 저해물질 신속검정시스템을 개발함	100
○ 표고 수확 후 배지 퇴비(LeCSMS) 물 추출물의 활용 및 특성 구명	○ 표고 수확 후 배지 퇴비(LeCSMS) 물 추출물을 이용한 <i>Bacillus</i> sp. BS061 균주 배양 검토: 단가측면에서 저렴하고 높은 활성을 확인함 ○ 표고 수확 후 배지 퇴비 물 추출물의 이화학적 특성을 구명함	100
○ 모균주 BS061과 개량균주 BSM-320의 오이 흰가루병 방제 효과	○ Pot test를 통한 오이 흰가루병 방제효과를 검정한 결과 표고 수확 후 배지 퇴비 추출물에 배양하여 처리한 결과 65%(대조 농약 75%)의 방제효과를 나타냄 ○ 후보균주 <i>Bacillus</i> sp. BS061의 1차 및 2차 활성도 평가: 오이 흰가루병의 만연과 강우량으로 인하여 정확한 결과를 확보하지 못함 ○ Leaf disk를 이용한 방제효과를 구명한 결과 BSM-320 균주는 약 10%의 발병도를 나타내어 방제가가 우수한 것으로 나타남	100
○ 표고버섯 수확 후 배지 퇴비 추출물을 이용한 BSM-320 균주의 배양 및 흰가루병 억제 효과 구명	○ 표고버섯 수확 후 배지 퇴비 추출물에 다양한 탄소원을 첨가하며 BSM-320 균주를 배양한 결과 당밀과 Glucose 첨가 시 균 밀도가 가장 우수함 ○ 이들 배양액의 흰가루병 방제효과를 구명한 결과 1% glucose 첨가 시 5%의 발병도를 나타내었으나 당밀 첨가 시에는 방제효과가 낮음	100
○ BSM-320 균주의 흰가루병균 포자발아 억제 효과 구명	○ 표고버섯 수확 후 배지 퇴비 추출물을 이용하여 배양한 BSM-320 균주의 오이 흰가루병 포자발아 억제를 조사한 결과 포자 발아율이 26%로 현저히 감소함 ○ 오이 흰가루병의 포자발아를 억제하여 항균활성을 나타냄을 확인함	100
○ 돌연변이 균주 BSM-320 배양체의 병 저항성 유전자 발현 연구	○ BABA 처리 시 오이 감염 잎과 정상 잎의 병 저항성 유전자 발현량을 qRT-PCR로 분석한 결과 <i>PAL</i> , <i>PR3</i> , <i>PR1</i> , <i>LOX1</i> , <i>LOX23</i> , <i>LecRK6.1</i> , <i>WRKY20</i> 및 <i>Cupi4</i> 가 각각 2.7, 53.1, 25, 2.7, 2.8, 4.4, 0.6 및 21.6 배의 전사량이 증가함 ○ BABA 처리 시 salicylic acid 함량을 LC-mass 분석법을 사용하여 측정한 결과, 2000과 5000 mg/L 농도에서 각각 3.84 ng/mL과 14.1 ng/mL으로 증가함. ○ BSM-320 배양액 처리 시 오이 잎에서 <i>CsLOX1</i> , <i>CsLOX23</i> 유전자 발현이 각 13.3배와 3.6배 증가되고, <i>LecRK6.1</i> 은 8.01배, <i>WRKY20</i> 은 7.07배 증가됨 ○ BSM-320 배양액에 오이 병 저항성 유전자 발현을 유도하는 유효물질 존재 확인	100

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 표고버섯 수확 후 배지 추출물 배양 BSM-320의 항균활성 및 식물 성장촉진 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 표고버섯 수확 후 배지에서 <i>R. solani</i>, <i>C. coccodes</i>, <i>B. cinerea</i>, <i>P. capsici</i>, <i>F. oxysporum</i> 균사체 성장율이 각 95.8%, 93.2%, 96.4%, 54.6%, 93.7% 억제함 ○ BSM-320 배양액 처리는 식물성장 촉진효과가 있음을 확인함 ○ 식물성장촉진은 영양성분 및 성장촉진 성분이 배양액에 존재하는 것으로 판단 ○ 결론적으로 BSM-320는 오이 흰가루병 방제효과와 식물생육 촉진효과를 갖는 복합기능성 생물방제제로 활용 가능성을 확인함 	100
○ 돌연변이 균주 BSM-320의 배양	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돌연변이 균주 BSM-320의 pilot 배양을 검토하기 위하여 참여기업인 케이글로벌에서 제작한 배양기에 배양함 ○ Pilot 배양액을 유기농자재 분석기관에 의뢰하여 유전자 염기서열 상동성 검색을 통하여 균주를 재확인함 	100
○ 돌연변이 균주 BSM-320을 이용한 제형개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 버섯 수확 후 배지 추출액으로 배양된 BSM-320을 수화제 제형으로 제형화를 시도함. ○ 수용성이 빠르고 잔유물이 남지 않고 좋은 결과를 나타냄 	100
○ 시제품 제작 및 병해관리용 유기농업자재 공시신청	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시제품의 제조 및 생산계획 확립 ○ 유기농업자재 원료의 특성 및 제조 조성비 확립 ○ 제품공정도 및 작업표준서 연구 및 정립 ○ 작업표준서 제작 ○ 시제품의 검사성적서 발행 및 유기농업자재 공시서 확보 	100

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 정성적 성과는 모두 달성됨
 - 정량적 성과에서 특허등록 1건이 미달되었으나 당초 4년 과제로 공고되어 4년차에 등록을 추진하였으나 3년으로 축소되어 특허출원 상태에서 등록까지는 마치지 못함. 현재 출원 상태임
-

2) 자체 보완활동

- 본 연구과제는 기 확보한 바실러스 균주를 개량한 후 버섯수확 후 배지 추출물에 배양하여 오이 흰가루병 방제에 탁월한 효과를 지니는 복합기능의 흰가루병 방제제를 개발한 연구로 과제의 성격상 연구대외비로 분류되는 과제는 아님. 따라서 보안과제는 아니나 국익의 차원에서 보안이 요구되는 주요 정보자료, 연구 성과, 데이터의 유출 등에 대한 보안사항을 점검하여 무단으로 유출되지 않도록 각 연구원에 대한 보안조치를 취함
 - 또한, 본 연구책임자는 연구과제 수행과 관련하여 보안이 요구되는 연구내용 및 성과물의 대외 발표 시에는 적절한 보안조치를 취함
 - 연구원들에 대한 연구보안관리 기본 교육을 수강하도록 함
-

3) 연구개발 과정의 성실성

- 본 연구의 수행에 있어 공동연구팀과의 유기적인 협력체계를 구축하고 연구의 문제점 개선 및 우수연구결과 도출을 위하여 노력함.
 - 또한, 본 연구과제 수행 중 연구책임자 및 참여연구원들의 주기적인 연구미팅을 통한 연구 진행 상황을 공유함
 - 각 연구팀의 전문성을 활용하여 주관연구팀에서는 활성성분의 분석 연구와 QC 체계 구축을 위한 분석법 확립을 수행하고, 제1공동연구팀에서는 활성 및 효능 구명과 기전분석을 주로 수행함. 참여기업에서는 시제품 제작, 제품화 연구 및 유기농업자재 신청 및 공시서 확보를 수행하고, 위탁연구기관은 2차, 3차년도에 과제에 참여하여 흰가루병 방제제 개발 경험을 바탕으로 효능 평가 및 유기농업자재 공시서 확보를 위한 자문 등을 수행함. 그 결과 시간상 특허출원 건이 등록되지 못한 것을 제외하고는 목표 대비 100%를 초과하는 정량적, 정성적 목표를 달성함
-

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명	기관명	유형	총 연구개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술기여도	
								산정 근거	비율
국내 토양 미생물 기반 내성 가루병 대사체 환제제 개발	활성성분의 규명 및 QC 체계 확립	전북대학교 산학협력단	대학 (비영리)	325	325	1.000	신규 기술개발	해당 없음	-
	유용 미생물의 제효능 및 기전 분석	전북대학교 산학협력단	대학 (비영리)	210	210	1.000	신규 기술개발	해당 없음	-
	흰가루병 방제 유 및 기동자제 등록 산업화 연구	(주)케이글로벌	중소기업 (영리)	230.3	180	78.159	신규 기술개발	1]-①	78.159
계				765.3	715	-	-	-	-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2023	2024	2025	2026	2027
국외논문	SCIE	3				
	비SCIE					
국내논문	SCIE					
	비SCIE	1				
특허출원	국내	1				
	국외					
특허등록	국내		1			
	국외					
인력양성	학사					
	석사	1	2			
	박사	1	1			
사업화	시제품개발	1				
	상품출시		1			
	기술이전	1				
	공정개발		1			
	매출액(단위 : 천원)		5,000	10,000	30,000	50,000
	기술료(단위 : 천원)	5,000	7,000			
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보		1				
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용		기술이전 시제품개발 농자재공시				

<참고문헌>

- Arruda, P., & Barreto, P. (2020). Lysine catabolism through the saccharopine pathway: enzymes and intermediates involved in plant responses to abiotic and biotic stress. *Frontiers in plant science*, 11, 587.
- Boubakri, H., Wahab, M. A., Chong, J., Gertz, C., Gandoura, S., Mliki, A., Soustre-Gacougnolle, I. (2013). Methionine elicits H₂O₂ generation and defense gene expression in grapevine and reduces *Plasmopara viticola* infection. *Journal of plant physiology*, 170(18), 1561–1568.
- Crouzet, J., Arguelles-Arias, A., Dhondt-Cordelier, S., Cordelier, S., Pršić, J., Hoff, G., Dorey, S. (2020). Biosurfactants in plant protection against diseases: Rhamnolipids and lipopeptides case study. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1014.
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 185–209.
- Elsharkawy, M. M., Elsayy, M. M., Ismail, I. A. (2022). Mechanism of resistance to Cucumber mosaic virus elicited by inoculation with *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. *Pest Management Science*, 78(1), 86–94.
- Galili, G., Tang, G., Zhu, X., Gakiere, B. (2001). Lysine catabolism: a stress and development super-regulated metabolic pathway. *Current opinion in plant biology*, 4(3), 261–266.
- Hasabi, V., Askari, H., Alavi, S. M., Zamanizadeh, H. (2014). Effect of amino acid application on induced resistance against citrus canker diseases. *Journal of Plant Protection Research*, 54(2).
- Hashemi, L.; Golparvar, A.R.; Nasr-Esfahani, M.; Golabadi, M. (2020) Expression analysis of defense-related genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) against *Phytophthora melonis*. *Mol. Biol. Rep.* 47, 4933–4944
- Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Métraux, J. P., Mauch-Mani, B. (2001). β -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of plant pathology*, 107, 29–37.
- Kishor, P. K., Suravajhala, R., Rajasheker, G., Marka, N., Shridhar, K. K., Dhulala, D., Polavarapu, R. (2020). Lysine, lysine-rich, serine, and serine-rich proteins: link between metabolism, development, and abiotic stress tolerance and the role of ncRNAs in their regulation. *Frontiers in Plant Science*, 11, 546213.
- Kuo, C. C., Huang, Y. C., Deng, W. L. (2023). Evaluating the Efficacy of the Fermentation Formula of *Bacillus velezensis* Strain Tcb43 in Controlling Cucumber Powdery Mildew. *Agriculture*, 13(8), 1558.
- Liu, Y., Li, Y., Bi, Y., Jiang, Q., Mao, R., Liu, Z., Prusky, D. B. (2021). Induction of defense response against *Alternaria* rot in Zaosu pear fruit by exogenous L-lysine through regulating ROS metabolism and activating defense-related proteins. *Postharvest Biology and Technology*, 179, 111567.
- Liu, G., Ji, Y., Bhuiyan, N. H., Pilot, G., Selvaraj, G., Zou, J., Wei, Y. (2010). Amino acid homeostasis modulates salicylic acid-associated redox status and defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(11), 3845–3863.
- Liu, C., Sheng, J., Chen, L., Zheng, Y., Lee, D. Y. W., Yang, Y., Shen, L. (2015). Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* isolated from *Agaricus bisporus* mushroom compost against pathogenic fungi. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(26), 6009–6018.
- Liu, H. X., Li, S. M., Luo, Y. M., Luo, L. X., Li, J. Q., Guo, J. H. (2014). Biological

control of Ralstonia wilt, Phytophthora blight, Meloidogyne root-knot on bell pepper by the combination of Bacillus subtilis AR12, Bacillus subtilis SM21 and Chryseobacterium sp. R89. *European journal of plant pathology*, 139, 107–116.

Okrent, R. A., Brooks, M. D., Wildermuth, M. C. (2009). Arabidopsis GH3. 12 (PBS3) conjugates amino acids to 4-substituted benzoates and is inhibited by salicylate. *Journal of Biological Chemistry*, 284(15), 9742–9754.

Pajot, E., Le Corre, D., Silue, D. (2001). Phytogard® and DL-β-amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (Bremia lactucae) in lettuce (Lactuca sativa L). *European Journal of Plant Pathology*, 107(9), 861–869.

Pu, X., Xie, B., Li, P., Mao, Z., Ling, J., Shen, H., Lin, B. (2014). Analysis of the defence-related mechanism in cucumber seedlings in relation to root colonization by nonpathogenic Fusarium oxysporum CS-20. *FEMS Microbiology Letters*, 355(2), 142–151.

Ruangwong, O. U., Chang, C. I., Lamine, S. A., Liang, W. J. (2012). Identification of antifungal compound produced by Bacillus subtilis LB5 with ability to control anthracnose disease caused by Colletotrichum gloeosporioides. *African Journal of Microbiology Research*, 6(16), 3732–3738.

Siddiqui, Z. A. (2006). PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. *PGPR: biocontrol and biofertilization*, 111–142.

Tendulkar, S. R., Saikumari, Y. K., Patel, V., Raghotama, S., Munshi, T. K., Balaram, P., Chattoo, B. B. (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by Bacillus licheniformis BC98, and its effect on phytopathogen Magnaporthe grisea. *Journal of applied microbiology*, 103(6), 2331–2339.

Arroyave-Toro, J. J., Mosquera, S., Villegas-Escobar, V. (2017). Biocontrol activity of Bacillus subtilis EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biological control*, 114, 195–200.

Wen, F., Wu, X., Li, T., Jia, M., Liao, L. (2022). Characterization of the WRKY gene family in Akebia trifoliata and their response to Colletotrichum acutatum. *BMC Plant Biology*, 22(1), 1–16.

Yang, H., & Ludewig, U. (2014). Lysine catabolism, amino acid transport, and systemic acquired resistance: what is the link. *Plant signaling behavior*, 9(7), e28933.

Yang, Q., Zhao, D., Liu, Q. (2020). Connections between amino acid metabolisms in plants: lysine as an example. *Frontiers in Plant Science*, 11, 928.

Yun, C. S., Motoyama, T., Osada, H. (2015). Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS-PKS hybrid enzyme. *Nature communications*, 6(1), 8758.

Zeighaminejad, R., Sharifi-Sirchi, G. R., Mohammadi, H., Aminai, M. M. (2016). Induction of resistance against powdery mildew by Beta aminobutyric acid in squash. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 작물 바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 작물 바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.