

발간등록번호

11-1543000-000099-01

차세대 생물농약 개발에 관한 연구
(A Study on the Development of Next-Generation
Biopesticides)

그린바이오연구조합

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “차세대 생물농약 개발에 관한 연구” 과제(핵심과제 1: 곤충 병원미생물을 이용한 차세대 미생물살충제 개발, 핵심과제 2: 길항 미생물을 이용한 식물병 방제용 차세대 미생물 소재 개발)의 보고서로 제출합니다.

2013년 6월 30일

주관연구기관명 : 그린바이오연구조합

주관연구책임자 : 정 영 룬

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

핵심연구책임자 : 박 호 용

연 구 원 : 손 광 희 외 22명

협동연구기관명 : (주)인섹트바이오텍

협동연구책임자 : 신 동 하

협동연구기관명 : (주)제일그린산업

핵심연구책임자 : 정 영 룬

연 구 원 : 정 유 진 외 18명

협동연구기관명 : (주)이코바이오

협동연구책임자 : 오 석 중

요 약 문

I. 제 목

차세대 생물농약 개발에 관한 연구 (핵심 1과제: 곤충 병원미생물을 이용한 차세대 미생물살충제 개발, 핵심 2과제: 길항 미생물을 이용한 식물병 방제용 차세대 미생물 소재 개발)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

<목적>

지난 20여 년 간 국내 대학 및 연구소에서 수행된 생물농약 관련 기초 및 응용연구 결과와 관련 산업체에서 제품화를 위하여 국내외에서 획득한 제품의 대량 생산 및 제제화 기술을 바탕으로 이를 더욱 더 발전시켜 천연식물보호제(생물농약) 제품 생산에 필요한 원천 공정 기술을 확보하고 동시에 세계적인 차세대 제품을 개발하고자 하였다.

<필요성>

국내외적으로 안전 농산물에 대한 소비자들의 관심이 높아지고 국가 간의 자유로운 교역(FTA)이 확대됨에 따라 우리 농산물의 국제 경쟁력 확보가 어느 때보다도 중요해지고 있다. 현재 정부에서는 안전한 농산물 생산을 통한 농업 경쟁력 제고를 위한 일환으로 제 3차 친환경농업육성 정책을 추진하고 있다. 따라서 2015년까지 현재의 화학농약 사용량을 15% 감소시킬 수 있는 대체 천연식물보호제의 개발과 보급이 필수적이다.

최근 바이오 벤처기업과 대학, 연구소를 중심으로 우수한 미생물 또는 신규 미생물 유래 활성물질이 확보 된 바 있으나 제품화에 필요한 대량생산 및 제형화 등의 기술 축적이 미흡하고 제품화를 위한 마케팅 능력 부족으로 세계적인 제품 개발에는 아직 성공하지 못하고 있다. 따라서 세계적인 천연식물보호제 개발과 보급을 위하여 산·학·연 연구 개발 주체 간에 기술 개발 노하우 및 세계 시장 진출에 대한 전략 공유와 역할 분담을 할 수 있는 긴밀한 협조 체계가 필요하다.

병·해충에 의한 국내의 작물 생산 피해는 평균 20-30% 정도로 살충제 및 살균제 시장의 약 60%가 방제가 어려운 흡즙 해충, 토양해충 및 역병, 탄저병 및 흰가루 병 등의 화학농약

이 차지하고 있으며, 주요 방제 대상 해충으로는 진딧물, 응애, 가루이, 굽벙이 등이 있다. 이들 해충과 병원균은 기존 화학약제에 대한 저항성 발현이 빠르고 세대주기가 짧아 방제가 제대로 이뤄지지 않아 종종 작물 생산에 심각한 영향을 미치고 있다. 더구나 이들의 친환경적인 방제에 사용되고 있는 국내 유통 제품들은 대부분의 원제가 중국산으로 국내 개발 및 사용에 어려움이 많다. 따라서 기존 제품보다 활성이 뛰어나고 적용 스펙트럼도 넓은 우수한 미생물 또는 미생물 유래 원제의 개발이 절실하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

<핵심 1과제: 곤충 병원미생물을 이용한 차세대 미생물살충제 개발>

- 곤충병원성 곰팡이 *Metarhizium*, HY-2, *Paecilomyces* HY-4속 균주의 배양특성 분석 및 대량 생산 조건 확립
- 곤충병원성 곰팡이의 경제적 대량배양 조건 및 균체 수확 기술 확립
- 방제효과 증진 및 을 위한 제품의 shelf-life 연장을 위한 제제법 개발
- 개발된 제형의 다양한 조건에서 살충력 및 제형 안정화
- 포장 약효/약해 평가 및 제품 QC 방법 확립
- 친환경유기농자재 등록을 위한 안전성, 효능 자료 및 관련 자료 확보
- 곤충병원성 곰팡이의 살충 기작 연구

<핵심 2과제: 길항 미생물을 이용한 식물병 방제용 차세대 미생물 소재 개발>

- 신규 세균의 대량 생산을 위한 배지 성분 및 조건 등 생산 공정 개발
- 세균의 안정성과 방제효과를 높이기 위한 최적 제형 개발
- 시제품의 병 방제 효과 조사(온실, 포장시험)
- 선발 세균의 살균 작용기작 연구
- 선발 세균이 생산하는 항균물질의 분리 및 구조 결정
- 항균물질 대량 생산 및 관련 유전자 분리 및 분석
- 미생물 및 천연소재 안정성과 방제효과 증대를 위한 Microencapsulation, Microsphere, Minigranule 제조
- 친환경 유기농자재등록을 위한 약효, 약해 시험 및 독성, 안전성 조사

IV. 연구개발 결과 및 성과

<핵심 1과제: 곤충 병원미생물을 이용한 차세대 미생물살충제 개발>

1. 곤충병원성 곰팡이의 대량 생산 공정 개발

미생물 원제인 특허 균주 메타리지움(*Metarhizium*)속 HY-2와 패실로마이세스(*Paecilomyces*) 속 HY-4 균주의 경제적 대량배양 공정을 개발하고 고농도 활성 포자의 생산 기술을 확보하였다.

가. 메타리지움 속 곰팡이의 대량 생산 방법(특허 출원: 10-2011-0028178)

본 발명은 메타리지움속 HY-2 곰팡이 및 이를 이용한 농업해충 방제용으로 활용하기 위한 산업적 대량생산에 관한 것으로, 메타리지움 곰팡이의 대량생산을 위한 배지 조성, 배양및 포자 생산 방법은 다양한 농업해충의 방제 등 산업적으로 유용하게 이용될 수 있음.

나. 패실로마이세스 속 곰팡이의 대량 생산 방법(특허 출원: 10-2011-0028179)

곤충병원성 곰팡이 패실로마이세스(*Paecilomyces*) 속 HY-4를 경제적으로 대량 배양 할 수 있는 배지조성, 배양방법 및 포자생산 방법 등으로 이는 농업해충을 친환경적으로 방제할 수 있는 미생물 살충제 등 생물농약 개발에 요긴하게 활용 가능함.

다. 패실로마이세스 속 균주를 이용한 생물농약 제조 방법 (특허 출원: 10-2013-0062878)

본 발명은 해충방제를 위한 패실로마이세스(*Paecilomyces*) 속 HY-4 균주를 포함하는 해충 방제용 미생물제제의 활성포자를 분산, 현탁, 혼합 등의 방법으로 사용하기 위한 비료, 친환경유기농자재, 또는 생물농약을 위한 조성물에 관한 것임.

2. 미생물 원제의 대량생산, 제형 개발 및 안전성 조사

위 대량생산 방법을 이용하여 배양 후 곰팡이 포자를 수확, 고농도의 시험원제를 확보 한 후 물리적, 화학적 안정성을 검토하였고, 시험 제형을 개발하였다. 개발한 시험 제형을 이용하여 친환경유기농자재 목록공시 신청을 위한 공인인증 기관을 통한 급성독성, 꿀벌독성 등 시험 분석을 실시하였다.

3. 시험 원제 및 제형의 살충력 검증

흡습성 난방제 해충인 점박이응애, 복숭아혹진딧물, 담배가루이를 목적 해충으로 설정하여 실험실내에서의 사육 체계를 확립하였으며, 선정된 3종의 흡습성 미소 해충에 대한 곰팡이의 적절한 처리 방법을 조사한 결과, 패실로마이세스(*Paecilomyces*) 속 HY-4 균주만이 점박이응애에 병원성이 있었다. 최종적으로 패실로마이세스(*Paecilomyces*) 속 HY-4 균주를

이용하여 제조된 패시포라의 다양한 제제를 이용하여 점박이응애에 방제 가능성을 확인하였다. 오이점박이응애에 대한 약효/약해 시험을 진행하였고, 5종 작물(금관고추, 만풍배추, 귀공자수박, 금관참외, 매향딸기)에 대한 비해 시험도 수행하였다.

4. 친환경 유기농자재 시제품 개발

상기의 결과를 바탕으로 관련 기술을 (주)인섹트바이오텍에 기술 이전하고, 시제품 ‘패시포라(PaeciPora)’를 개발하였다. 현재 곤충병원성 곰팡이를 이용한 친환경유기농자재로 등록 신청 중에 있다.

<핵심 2과제: 길항 미생물을 이용한 식물병 방제용 차세대 미생물 소재 개발>

1. 신규 내생 세균의 분리·동정 및 대량 생산 조건 확립

주요 식물병에 대하여 강한 병원균 억제효과, 기주식물의 병저항성 유도 및 식물생육촉진 효과를 갖는 다기능성 신규 세균 2종 *Martelella endophytica* YC6887, *Bacillus methylotrophicus* YC7007을 분리 동정하고, 대량 생산 조건을 확립하였다.

가. *Martelella endophytica* YC6887

이 균주는 염생식물 해당화 뿌리 내에서 분리 되었으며 *Phytophthora*, *Pythium* 외 여러 주요 식물병원균에 대한 억제 효과가 뛰어나며, 본 연구 결과 신종으로 확인되어 새로운 이름을 붙였고, 식물병의 생물학적 방제 효능 외에도 질소 고정 효능을 갖는 다기능성 미생물 임 (특허 출원: 10-2011-0069612).

나. *Bacillus methylotrophicus* YC7007

이 균주는 논외 식물 뿌리 내에서 분리된 내생세균으로 흰가루병균, 탄저병균, 벼키다리병균에 대하여 강한 억제효과를 보였으며, 동시에 벼의 식물생육촉진, 유도저항성 효과가 좋은 다기능성 미생물 임 (특허 출원: 10-2013-0046313)

2. 미생물 원제의 제형화 기술 개발

대량생산 된 선발 균주 및 천연항균물질의 고농도 미생물 원제를 확보하여 부제, 계면활성제 등을 첨가하고 상온 또는 분무건조 방식으로 입제 또는 수화제 형태의 포장 시험 사용에 필요한 제형을 개발하였다.

가. 미생물 안정성과 방제효과 증대를 위한 micro-encapsulation 제조

제제 시 키토산-sulfate complex 미세입자 크기는 키토산의 농도 및 분자량이 증가함에 따라 증가하였고 분자량이 14 kD에서 가장 높은 미세입자 형성 효율을 보였다. Attrition mill의 처리시간 60

분에서 평균 미세입자 크기는 0.73 um 이었으며, 미세입자 형성 효율은 키토산과 알긴산 농도가 1.5% 와 1.0%에서 극대화 되었고 알긴산을 이용한 minigranule은 미생물 보존력이 8.7×10^8 cfu/g 에서 3.9×10^7 cfu/g으로 나타났다.

3. 미생물 및 천연물질 시험 제형의 병 방제효과 조사

개발된 제형을 이용하여 식물 병 중 방제가 어려운 고추역병, 흰가루병(고추, 오이), 벼키다리병 방제효과를 포장 시험에서 확인한 결과 천연식물보호제 등록에 충분한 평균 60% 이상의 방제가를 얻었다. 각 제형의 5종 식물에 대한 약해 시험에서도 전혀 약해가 나타나지 않은 안전한 것으로 확인되었다. Micro-encapsulation 제제는 방제효과 외에도 상추, 배추의 엽장과 엽폭이 각각 6.22%과 10.04%의 생장 촉진 효과를 나타내었다.

4. 신규 내생세균의 병 억제 작용기작 연구

가. *M. endophytica* YC6887 생산 향균물질

배양여액에서 분리된 총 6종 화합물들의 향균활성을 조사한 결과 향균 활성이 있는 2종의 화합물은 각각 p-hydroxybenzaldehyde, phenylacetic acid 기지 물질로 확인되었다.

나. 식물 생육촉진 및 병저항성 유도 효과

M. endophytica YC6887 균주를 애기장대의 근권 처리 시 생장촉진 및 *Pseudomonas syringae* DC3000 병원균에 대한 기주 저항성 유도 효과가 있었으며, 관련 유전자인 *PR1*과 *PDF1.2*의 발현이 확인되었다. 식물생장 촉진은 이 균에 의하여 애기장대의 결뿌리털 생육 촉진에 의한 것으로 확인되었으며, 고추의 생장촉진 효과도 발견 되었다.

다. *M. endophytica* YC6887 균주의 추가 작용 기작 연구를 위하여 full genome sequencing 을 완료 하였으며, genome 크기는 4.8Mb, GC 함량은 62.14%, 총 ORF 수는 4663개 이었다.

5. 미생물 원제의 독성 및 환경 안전성 조사

대량생산 된 선발 균주 및 천연향균물질을 포함한 고농도 미생물 원제 및 시제품의 친환경 유기농자재 목록공시 및 천연식물보호제 등록 신청을 위한 급성독성, 어독성, 꿀벌독성 등 필요한 안전성 시험을 실시한 결과 등록에는 문제가 없는 것으로 확인되었다.

6. 친환경 유기농자재 시제품 개발 및 등록 신청

상기의 결과를 바탕으로 친환경유기농자재 품질인증 2건 신청(바이탄, 모비탄)과 1건 천연 식물보호제(세머루) 등록을 위한 준비를 진행 중에 있다.

V. 성과활용 계획

1. 친환경유기농자재 등록용 시제품 개발

가. 핵심 1과제의 기술 개발 결과로서 곤충병원성 곰팡이를 이용한 친환경유기농자재 ‘패시포라(PaeciPora)’를 개발하였다.

나. 핵심 2과제의 연구 개발 결과로서 신규 내생 세균을 이용한 천연식물보호제 후보인 ‘세머루’를 개발하였고, 천연 물질을 특수제형으로 제제화 한 ‘바이탄’, ‘모비탄’ 2건을 친환경유기농자재 등록 신청 중에 있다.

2. 개발 기술의 관련 업계 기술 이전

본 연구에서 개발된 ‘곤충병원성 곰팡이를 이용한 미생물살충제 제조’에 관한 기술을 본 과제의 참여기업인 (주)인섹트바이오텍으로 기술 이전 계약을 실시하였다. 해당 기술은 미생물 살충제의 원료가 되는 곤충병원성 곰팡이의 고농도 활성포자의 경제적 대량 생산에 관한 것으로 친환경 유기농자재 개발에 필요한 핵심기술이다. 신규 미생물 분리 탐색 및 micro 제제화 기술은 향후 관련 산업계와의 기술 공유를 통하여 천연식물보호제 기술 발전에 활용될 것이다.

3. 해외 마케팅 추진

가. BioUSA International Convention인 Bio2013 Chicago에서 개발한 시제품 ‘패시포라(PaeciPora)’를 홍보하였다. 친환경유기농제품 중에서 미생물 살충제 시장이 큰 브라질, 말레이시아 등의 국가와 관련 기술에서의 선진국인 현지 특허법인 등과의 기술 마케팅을 실시하였다.

나. 개발 중인 ‘세머루’는 동부팜한농과 협약을 맺고 향후 국내외 판매를 위한 포장 확인 시험을 진행 중에 있다. ‘바이탄’ ‘모비탄’은 국내 친환경 농자재 판매사(케이원바이오텍)와 제품 공급 MOU 체결을 했으며, 대만 및 중국 수출을 위한 대만 농업회사(MasterVet)과 판매 계약 추진중

SUMMARY

I. Title

A Study on the Development of Next-Generation Biopesticides

1. Development of biopesticide using insect pathogenic microorganisms
2. Development of next-generation biomaterials using antagonistic microorganisms

II. Purpose and Needs

<Purpose>

The goal of this project is a collection of basic data required for the list disclosure and registration of new eco-friendly organic materials and biopesticides using insect pathogenic fungi or antagonistic microorganisms and/or natural materials to plant pathogens as active ingredients. The final purpose is to develop two next-generation biopesticides hereafter based on the data obtained from this study. To secure the process, the large-scale production of microorganisms (insect pathogenic fungal strains and endophytic bacteria) and the evaluation of the prototype formulations was carried out.

<Needs>

- Social concern; Consumers have started to concern about production of safe agricultural crops without chemical pesticides and LOHAS (Life Of Health and Sustainability) trend is under discussion.
- Global competition; Through expanded trade that was triggered by FTA, international competition is becoming fierce. To be competitive in the market, the production of eco-friendly and safe agricultural crops was inevitable and the reduced use of chemical pesticides is being driven by government. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs has set up the plan "the 3rd Five-Year Plan fostering sustainable agriculture" to reduce the amount of chemical pesticides by 15% until 2015. It is, therefore, necessary to develop good and efficient next-generation biopesticides to reach at this goal.

III. Research scope and contents

1. Development of biopesticide using insect pathogenic microorganisms

- Analysis of cultivation characteristics and mass production of *Metarhizium*, HY-2 and

Paecilomyces HY-4

- Establishment of spore harvest system from mass produced *Metarhizium* sp. HY-2 and *Paecilomyces* sp. HY-4 strains
- Development of formulation techniques to increase the control efficacy and shelf-life of products
- Stabilization of the developed formulations for improvement of insecticidal activity under various conditions
- Field tests for efficacy and phytotoxicity of the products
- Development of QC method for a new product
- Toxicity and safety tests of the product for registration (eco-friendly organic agricultural materials)
- Studies on the insecticidal mechanism of insect pathogenic fungi (HY-2, HY-4)

2. Development of next-generation biomaterials using antagonistic microorganisms

- Establishment of mass production system of novel antibiotic endophytic bacteria
- Optimization of formulations to increase the control efficacy and shelf-life of products
- Development of microencapsulation, microsphere and minigranule producing techniques to enhance the bacterial stability and its control efficacy
- Investigation on the efficacy and phytotoxic effects of the products (greenhouse & field tests)
- Studies on the antagonistic mechanism of endophytic bacteria against plant pathogenic fungi & bacteria
- Structure determination of antibiotic compounds produced from novel bacteria
- Development of QC method for a new product
- Toxicity and safety tests of the product for registration (eco-friendly organic agricultural materials)

IV. Results

1. Development of a biopesticide using insect pathogenic fungi

- For the production of the *Metarhizium* sp. HY-2 and *Paecilomyces* sp. HY-4 conidia, a widely used biphasic process in which culture is started from liquid broth and

finished on a solid substrate was applied. Dried powder of silkworm pupa sped up the sporulation and enhanced spore yields and wheat bran made the softer mattress of strain colonies. Maximum spore yield of 5.1×10^9 conidia/g was obtained at 28°C.

- Solid state fermentation was used for mass production of *Paecilomyces* sp. HY-4 conidia, the highest spore yield of 2.8×10^{10} conidia/g was acquired from rice bran under the appropriate culture conditions
- Two types of formulations were prepared for further commercialization. Wettable powder (WP) type was mixing the purified conidia with several carriers to enhance the control efficiency and to extend the conidial shelf-life. Oil-based emulsifiable suspension (ES) type was prepared by adding the dry conidial powder to soybean oil including emulsifier, stabilizing agents, and suspending agents. The concentrations of conidia in two formulations were estimated using serial dilution and a hemocytometer to yield 8.5×10^9 conidia/g (WP) and 8.5×10^9 conidia/ml (ES).
- Bioassay of *Paecilomyces* sp. HY-4 against the cotton aphid, *Aphis gossypii* under laboratory conditions was conducted. The appropriate concentration of the entomopathogens to effectively control *A. gossypii* was evaluated to be ES (emulsifiable suspension) formulation of 1.0×10^7 conidia/ml, because the cotton aphids exposed at this concentration was almost dead after 3 days. The ES formulation had a LC_{50} of 1.14×10^6 conidia/ml at 6 days after spraying and the LT_{50} with 1.0×10^7 conidia/ml was 1.57 days. For the control of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, the accumulated mortality caused by HY-4 using SD-tower spray was about 73% at 6 days after inoculation.
- Baed on the toxicity data of the product 'PaeciPora', the product was found to be enough for registration as an eco-friendly organic agricultural material and is now under processing for registration.

2. Development of next-generation biomaterials using antagonistic microorganisms

- Identification and cultivation of two antagonistic endophytic bacteria, *Marteella endophytica* YC6887 and *Bacillus methylotrophicus* YC7007 were carried out. Data for the optimum culture conditions for two bacteria were investigated. *M. endophytica*

YC6887 had very good antifungal activity against important plant pathogens including *Phytophthora*, *Pythium* and other fungal pathogens. *B. methylotrophicus* YC7007 also showed strong suppressive activity against powdery mildew, rice bakane and anthracnose diseases.

- Formulations of bacterial strains for field tests were developed. The optimized concentration of bacteria in the dried wettable powder was in the range of 10^8 - 9×10^9 cfu/g. Another microencapsulation technique was developed to enhance the bacterial stability and its control efficacy against plant diseases. The average microsphere size according to the attrition mill operation time was 0.73 μ m at 60min. The attrition mill efficacy was maximized at the concentration of Chitosan and Alginate 1.5% and 1.0%, respectively. The sodium alginate microgranule showed the bacterial preservation efficacy from 8.7×10^8 cfu/g to 3.9×10^7 cfu/g. Chitosan-Sulfate Complex Microsphere size increased with increasing molecular weight of chitosan and the microsphere formation efficacy was maximized at the molecular weight of chitosan 14KDa.
- The efficacy test of bacterial formulations against pepper anthracnose, powdery mildew and rice bakane diseases showed high control activity with over average 60% control values in field tests. These formulations also had plant growth promoting activity of 6.2-10% compared to the control.
- The novel bacteria *M. endophytica* YC6887 was found to produce two antifungal biotics, p-hydroxybenzaldehyde and phenylacetic acid and induced systemic resistance against bacterial pathogen in *Arabidopsis* by expression of associated genes *PR1* and *PDF1.2*. This bacteria showed growth promotion of side root hair of *Arabidopsis*. For further elucidation of the bacterial inhibitory mechanism, the full sequencing of *M. endophytica* YC6887 was completed. Its genome size is 4.8Mb, GC content 62.14%, the number of ORF is 4663.
- Toxicity and safety of one bacteria-(Semeuru) and two natural materials- based (Bitan, Mobitan) products were investigated. Based on the obtained toxicity data of fish, honey bee, eye, acute and subacute toxicity, it was found that these three products are enough for registration as an eco-friendly organic agricultural materials and two products are now under processing.

CONTENTS

Chapter 1 Overview	15
Chapter 2 State of the Art Report (domestic and global)	20
Chapter 3 Results	29
1. Development of biopesticide using insect pathogenic microorganisms	
2. Development of next-generation biomaterials using antagonistic microorganisms	
Chapter 4 Achievement and Contribution	237
1. Development of biopesticide using insect pathogenic microorganisms	
2. Development of next-generation biomaterials using antagonistic microorganisms	
Chapter 5 Application Plan	240
1. Development of biopesticide using insect pathogenic microorganisms	
2. Development of next-generation biomaterials using antagonistic microorganisms	
Chapter 6 Related Informations	246
1. Development of biopesticide using insect pathogenic microorganisms	
2. Development of next-generation biomaterials using antagonistic microorganisms	
Chapter 7 References	248
1. Development of biopesticide using insect pathogenic microorganisms	
2. Development of next-generation biomaterials using antagonistic microorganisms	

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	15
제 1 절 연구개발의 목적.....	15
1. 최종 목표.....	16
2. 단계별 목표.....	16
제 2 절 연구개발의 필요성.....	16
제 3 절 연구개발이 범위.....	18
제 4 절 연구개발 기관 및 구성.....	19
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	20
제 1 절 국내외 생물농약 개발 현황.....	20
1. 국내외 생물농약 시장 규모.....	20
2. 국내의 기술개발 현황 및 개발 수준.....	22
3. 외국의 기술개발 현황 및 개발 수준.....	25
제 3 장 연구 개발수행 내용 및 결과.....	29
제 1 절 곤충 병원미생물을 이용한 차세대 미생물 살충제 개발.....	29
1. 곤충병원성 곰팡이 균주의 배양조건 검토.....	30
2. 포자원제의 경제적 대량생산을 산업용 배양 배지 조건의 최적화.....	40
3. <i>Paecilomyces</i> sp. HY-4 포자 원제의 안정성 검토.....	45
4. 고농도 활성포자를 이용한 제형화 및 시제품 개발.....	52
5. 해충령기에 따른 실내 살충력 검증.....	56
6. 친환경유기농자재 목록공시.....	71
7. 친환경유기농자재 시험제형을 이용한 포장시험 수행.....	75
8. ‘패시포라’의 독성시험.....	84
제 2 절 길항 미생물을 이용한 식물병 방제용 차세대 미생물 소재 개발.....	89
1. 신규 길항미생물을 이용한 식물병 방제용 차세대 미생물소재 개발.....	91
가. 신규 길항 내생세균의 분리·동정 및 특성 조사.....	109
나. 항균 활성물질의 순수 분리 및 구조 결정.....	121
다. 미생물 대량 배양 공정 확립 및 시제품 제형 개발.....	123
라. YC6887 균주의 제품 등록용 방제 효능 및 약해 평가.....	126
마. YC6887 균주의 작용기작 규명.....	129

바. YC6887 균주의 기주 병저항성 유도 경로.....	136
사. 논토양 근권 세균 YC7007 균주의 동정.....	138
아. YC7007 처리에 의한 작물병 방제 효과.....	140
자. YC7007 미생물 제제(세머루)의 독성 검사.....	148
2. 길항 미생물을 이용한 신규 식물병 방제제 개발.....	161
가. 미생물 안정성과 방제효과 증대를 위한 micro encapsulation 제조.....	171
나. 미생물 안정성과 방제효과 증대를 위한 micro encapsulation 제조.....	179
다. Micro encapsulation 제제의 효능실험.....	186
라. 유황함유 Micro encapsulation 제제의 흰가루병 방제 효능실험.....	189
마. 식물추출물함유 Micro encapsulation 제제의 진딧물 방제 효능실험.....	190
바. 친환경 유기농자재 제품 공시.....	195
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	237
제 1 절 연구개발목표의 달성도.....	237
제 2 절 연도별 목표 달성도.....	239
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	240
제 1 절 연구개발 성과.....	240
1. 연차별 연구 성과.....	240
2. 연구종료 후 연구결과 활용 목표.....	240
3. 논문게재 성과.....	241
4. 특허 성과.....	242
5. 실용화 및 산업화 계획.....	243
6. 홍보 및 기술 확산.....	244
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	246
제 7 장 참고문헌.....	248

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적

- 지난 20여 년 간 국내 대학 및 연구소에서 수행된 생물농약 관련 기초 및 응용연구 결과와 관련 산업체에서 제품화를 위하여 국내외에서 획득한 제품의 대량 생산 및 제제화 기술을 이용하여 세계적인 생물농약 제품을 개발하고 동시에 제품생산에 필요한 원천 공정 기술을 확보하고자 하였다.
- 이를 위하여 현재까지 세계적으로 생물농약 개발에 사용된 방법과는 다른 새로운 방법으로 첨단 미생물 살충제를 개발하고, 이미 제품으로 개발되어 사용되고 있는 미생물과는 전혀 다른 종류의 신규 미생물과 대사물질을 이용하여 새로운 형태의 유해 식물병원균 방제용 미생물 신소재를 개발하고자 하였다.
- 동시에 병해충을 효과적으로 억제하는 미생물 또는 대사물질의 생리·화학적 연구 분석을 통하여 생물농약 개발에 필요한 원천 제조기술을 확보하고자 하였다. 본 연구개발 사업을 통해 얻어진 세계적인 생물소재 및 새로운 원천 공정기술은 특허와 산업화를 통하여 국내 농·생명과학 및 농림바이오산업 기술 발전에 기여할 것이다.



<사업단 최종목표 및 과제>

1. 최종 목표

- 곤충병원성 미생물을 이용한 차세대 미생물 살충제 1종 개발
- 길항 미생물을 이용한 식물병 방제용 차세대 미생물 소재 1종 개발

2. 단계별 목표

과제 구분	1단계 (1-2년: 1차 스타제품 출시)	2단계 (3년 이후: 2차 제품 출시)
제 1 핵심과제 곤충 병원미생물을 이용한 차세대 미생물살충제 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 곤충 병원성곰팡이 후보균주 스크리닝 및 기 확보된 천연물질 및 곤충병원성 곰팡이를 이용한 생물농약의 생산 공정 개발 및 제형화 확립 (1~2년차) ○ 친환경유기농자재 목록공시제 및 생물농약 등록을 위한 포장약효시험, 독성평가(1~2년차) ○ 생물농약 등록 약효 시험완료 및 안전성 자료 확보(3년차) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제품판매를 위한 기반 확보 (3년차) ○ 생물농약 등록 및 신제품 출시(4, 5년차) ○ 해외평가(4년차) ○ 국내외 특허 등록
제 2 핵심과제 길항 미생물을 이용한 식물병 방제용 차세대 미생물 소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 길항 세균의 분리 동정, 제품화 제형 개발 및 효능 확인(1년차) ○ 길항 세균 대량생산 공정 확립 및 항균 활성 물질의 화학 구조 규명(1, 2년차) ○ 항균물질의 작용기작 규명 ○ 친환경유기농자재 목록공시제 및 생물농약 등록을 위한 포장시험, 안전성, 독성 조사(2년차) ○ 친환경유기농자재 목록 공시제 등록 추진 및 시제품 출시(3년차) ○ 특허 출원(2, 3년차) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생물농약 등록 효능시험 및 안전성 조사 시작(3년차) ○ 시제품 판매 확대 및 생물농약 등록을 위한 효능시험 및 안전성 조사 완료(4년차) ○ 국제특허 출원, 등록(4년차) ○ 해외 기업과 협약 및 기술 수출 추진(4년차) ○ 미생물 살균제 등록(4년차) ○ 국내외 특허 등록
제 3 핵심과제 사업단 연구개발 관리	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구개발 관리 지원 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구개발 관리 지원

제 2 절. 연구개발의 필요성

- 안전 농산물에 대한 소비자들의 관심 증대와 FTA에 대비한 국내 농산업의 경쟁력 확보를 위하여 친환경농업으로의 전환이 불가피 함
- 친환경 농산물 생산 10% 확대와 화학농약 사용량 15% 감소를 위하여 생물농약 개발 필수적
- 산·학·연의 제품 개발전략 및 노하우 공유 부재로 우수한 생물농약 개발 제품 미흡
- 세계적 생물농약 개발에 필요한 기술 및 마케팅 전략 공유를 위하여 공동 개발 사업이 필요

- 최근 안전한 농산물에 대한 소비자들의 관심은 웰빙(Well-Being)을 넘어 로하스(LOHAS, Life of Health and sustainability)라는 새로운 문화를 형성하고 있으며, 국가 간의 자유로운 교역(FTA)이 확대되고 있는 현 시점에서 소비자들의 요구에 맞추는 농산물 공급자 간의 경쟁으로 글로벌 시장에서의 생존 경쟁이 치열해 지고 있다.
- 우리 농산업의 국제 경쟁력 확보를 위하여 친환경 안전 농산물 생산은 피할 수 없게 되었다. 이를 위해 반드시 필요한 것이 화학농약을 대체할 수 있는 우수한 생물농약의 개발과 보급이며, 이것은 정부에서 추진하고 있는 3차 친환경농업육성 5개년 계획의 2015년까지 친환경농산물의 생산 비중 10% 확대와 화학농약 사용량의 15% 감소를 위하여 필수적이다.
- 지난 30여 년간 국내의 생물농약 개발 연구는 대학교 및 정부 연구기관 중심으로 꾸준히 진행되어 왔으나 거의 대부분이 초기 단계에 머물러 있고, 아직도 세계적인 제품 개발에 성공하지 못하고 있는데, 이것이 가장 큰 이유는 산·학·연의 제품 개발전략 및 노하우에 대한 공유 부재 때문으로 생각된다. 따라서 세계적인 생물농약 제품 개발과 보급을 위하여 각 연구 개발 주체의 긴밀한 협조와 체계적인 기술 개발이 필수적이다.
- 최근 바이오 벤처기업과 대학, 연구소를 중심으로 우수한 미생물 또는 신규 미생물 유래 활성물질이 확보 된 바 있으나 제품화에 필요한 대량생산 및 제형화 등의 기술 축적이 미흡하고 제품화를 위한 마케팅 능력 부족으로 제품화에 실패하고 있다. 따라서 산·학·연 개발기술의 공유와 이를 통한 효율적 산업화를 위하여 공동개발 연구가 필요하다.
- 친환경농업 육성책 추진 목표를 달성하기 위해서는 우수한 생물농약 제품과 동시에 개발된 제품을 농민에게 효율적으로 보급할 수 있어야 한다. 지금까지 대부분의 생물농약 개발 연구는 개발 기관이 주로 대학교나 연구기관으로 개발 주체 특성상 초기의 기술 개발 단계에 집중되어 왔으며, 제품화에 필요한 대량생산 및 제형화 등의 기술 축적은 상대적으로 소홀히 다루어져 왔다. 따라서 세계적으로 생물농약 개발이 본격화되는 현 시점에서 기술개발 능력과 노하우를 가진 연구기관과 개발 기술의 제품화 능력을 보유한 기업과의 상호 역할 보완이 필수적이다. 따라서 공동 목표 달성을 위한 생물농약 개발 사업이 필요하다.
- 병·해충에 의한 국내의 작물 생산 피해는 평균 20-30% 정도로 살충제 및 살균제 시장의 약 60%가 방제가 어려운 흡즙 해충, 토양해충 및 역병, 탄저병 및 흰가루 병 등의 화학농약이 차지하고 있으며, 주요 방제 대상 해충으로는 진딧물, 응애, 가루이, 굽벥이 등

이 있다. 이들 해충과 병원균은 기존 화학약제에 대한 저항성 발현이 빠르고 세대주기가 짧아 방제가 제대로 이뤄지지 않아 종종 작물 생산에 심각한 영향을 미치고 있다. 더구나 이들의 친환경적인 방제에 사용되고 있는 국내 유통 제품들은 대부분의 원제가 중국산으로 국내 개발 및 사용에 어려움이 많다. 따라서 기존 제품보다 활성이 뛰어나고 적용 스펙트럼도 넓은 우수한 미생물 원제의 개발이 절실하다.

제 3 절. 연구개발 범위

과제 구분	내용 세부과제	기술 개발 내용
제 1 핵심과제 곤충 병원미생물을 이용한 미생물 살충제 개발	제 1 세부과제 (곤충 병원성 곰팡이를 이용한 미생물 살충제 개발)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 확보된 곤충병원성 곰팡이 <i>Metarhizium, Paecilomyces</i> 속 균주의 대량 생산 및 균체 수확 조건 확립 ○ 방제효과 증진을 위한 제제화 방법 확립 ○ 포장 약효/약해 평가 및 제품 QC 방법 확립 ○ 친환경유기농자재 등록을 위한 안전성, 효능 자료 및 관련 자료 확보 ○ 제품의 shelf-life 연장을 위한 안정화 제제법 개발 ○ 곤충병원성 곰팡이의 살충 기작 연구
	제 2 세부과제 (유효곤충병원성 곰팡이의 대량생산 및 제형안정화 검정)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 곤충병원성 곰팡이 대량배양 및 제형 안정화 ○ 유효곤충병원성 곰팡이의 배양특성 분석 ○ 곤충병원성곰팡이의 시험용 대량 배양시설 운용 ○ 곤충병원미생물의 경제적 대량배양조건 확립 ○ 주관기관에서 개발된 제형의 안정성 강화 ○ 다양한 조건에서 살충력 및 제형 안정화 ○ 개발 제제의 등록 및 사업화
제 2 핵심과제 길항 미생물을 이용한 식물병 방제용 차세대 미생물 소재 개발	제 1 세부과제 (신규 길항 내생 세균을 이용한 새로운 살균 소재 개발)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선발된 신규 세균의 대량 생산을 위한 배지 성분 및 조건 등 생산 공정 개발 ○ 세균의 안정성과 방제효과를 높이기 위한 최적 제형 개발 ○ 시제품의 병 방제 효과 조사(온실, 포장 시험) ○ 시제품의 독성 및 안전성 조사 ○ 선발 균주의 살균 작용기작 연구 ○ 선발 세균이 생산하는 항균물질의 분리 및 구조 결정 ○ 항균물질 대량 생산 및 관련 유전자 분리 및 분석
	제 2 세부과제 (길항 미생물을 이용한 신규 식물병 방제제 개발)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물 안정성과 방제효과 증대를 위한 nano & micro encapsulation 제조 ○ 미생물 방제효과 증대를 위한 microsphere 제조 및 신 제형 시제품 효능 포장 실험 ○ 친환경 유기농자재공시를 위한 현장 실험 ○ 친환경 유기농 자재 제품공시를 위한 신청 ○ 제품 판매를 위한 마케팅
제 3 핵심과제 연구개발 관리		<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구개발 관련 행정 지원

제 4 절. 연구개발 기관 및 구성

과제 구분		연구 기관	연구 책임자	연구 제목
핵심 1	세부 1	한국생명공학연구원	박 호 용	곤충병원성 곰팡이를 이용한 토양 해충 방제용 미생물 살충제 개발
	위탁	충북대학교	우 수 동	곤충병원성 곰팡이 살충제의 생물 검정
	세부 2	(주)인섹트바이오텍	신 동 하	유효 곤충 병원성 곰팡이의 대량 생산 및 제형 안정화 검정
핵심 2	세부 1	(주)제일그린산업	정 영 룬	신규 길항 내생 세균을 이용한 새로운 살균소재 개발
	위탁	경상대학교 (1)	박 정 동	내생세균 생산 항균물질의 분리 정제, 화학구조 결정 및 작용기작 규명
		영남대학교 (2)	심 상 희	내생세균 생산 항균물질의 분리 정제 및 화학구조 결정
	세부 2	(주)이코바이오	오 석 중	길항 미생물을 이용한 신규 식물병 방제제 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내외 생물농약 개발 현황

- 현재 화학농약 시장의 5% 미만이나 향후 10% 이상으로 급속히 증가 예상
- 지난 20년 동안 초기 단계의 연구 결과를 바탕으로 한 제품 개발 기술의 축적
- 대학, 중소 산업체의 산발적인 기초 연구와 산업화 전략부재로 인한 제품화 성과 부족
- 세계적 제품 개발을 위하여 긴밀한 협력 연구 개발이 필수적

1. 국내외 생물농약 시장 규모

○ 전 세계 생물농약 시장은 2003년 468 million US\$, 2005년 672 million US\$, 2011년 1,320 million US\$로 연평균 약 10%의 성장을 나타내었으며, 2017년 까지 약 3,200 million US\$로 연평균 15%이상 성장할 것으로 예상되고 있다. 재배면적은 2001년 53 million ha(hectare)에 2011년 160 million ha로 지속적으로 확대되었다. 친환경 농산물의 급속한 수요확대를 기반으로 화학농약을 대체할 정도의 우수한 생물농약이 개발되면 시장은 더욱 더 확대될 것으로 생각된다.

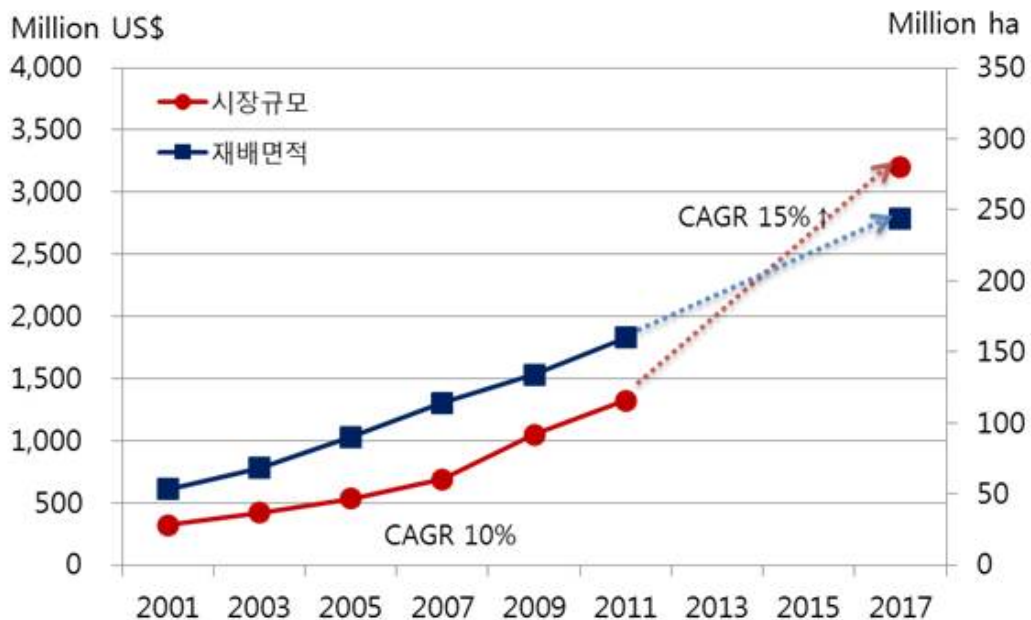


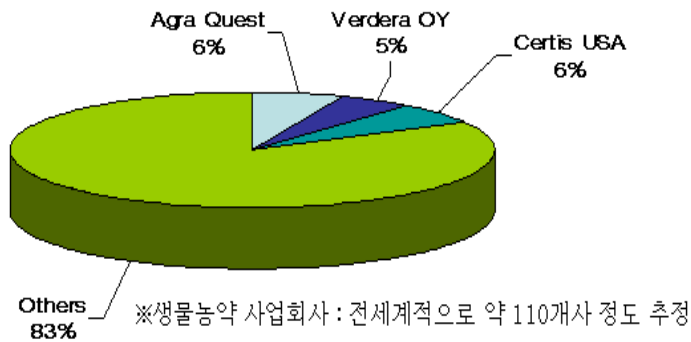
그림 1. 세계 생물농약 시장 현황
(Global Biopesticides Market, Trends & Forecasts)

표 1. 세계 생물농약 시장 현황(M US\$)

구분	2008	2009	2014	연성장율(%)
생물농약(A)	1,200	1,600	3,300	15.6
화학농약(B)	38,800	41,200	47,800	3.0
합계	40,000	42,800	51,100	3.6
A/B(%)	3.1	3.9	6.9	-

출처: Biopesticides: The Global Market (BCC Research, 2010)

- 전 세계 110여개 회사 중 3개 회사가 major player 역할을 하고 있으며, 소품목/특화제품 위주의 사업화를 통하여 major 업체별로 40M US\$의 시장을 형성하고 있다.
- 현재 국내 생물농약 시장은 약 800억 원의 시장을 형성하고 있으며, 친환경농산물 시장 규모는 2009년 3조7,355억 원으로 증가 하였고, 2013년에는 5조 955억 원으로 성장할 것으로 예상된다. 또한, 2010년부터 저농약 인증의 신규인증이 중단되고, 2015년 완전 폐지에 따라 생물농약에 대한 관심이 더욱 높아질 것으로 예상된다.



출처: The New Biopesticide Market (Business Communications Company, Inc., Jan. 2006)

그림 2. 세계 주요 생물농약 개발업체 현황



그림 3. 국내외 생물농약 시장 규모 (The new biopesticide market, Business Comm. Company, Inc., Jan. 2006)

2. 국내의 기술개발 현황 및 개발 수준

- 국내의 생물농약(미생물농약과 생화학농약을 포함)에 대한 연구는 1970년대 후반부터 대학교 및 정부 연구기관에서 산발적으로 시작되었으나 1990년대에 들면서부터 연구개발이 어느 정도 활성화되기 시작하였다. 이후 1997년도 친환경농업육성법이 제정되고 정부의 화학농약 사용량 감소를 위한 친환경농업에 대한 지원이 추진되면서 생물농약(미생물제제) 개발이 본격적으로 진행되었다.

표 2. 국내 생물농약 개발기술 현황

세 부 기 술	기술 수준(%)	
	선 진 국	국 내
미생물 탐색 기술	100	90
천적 탐색 기술	100	90
천연물 탐색 기술	100	60
약효 평가 기술	100	95
약해 평가 기술	100	95
방제력 확립기술	100	100
대량배양 기술 (액체, 고체배양)	100	50
대량사육 기술(곤충)	100	50
대량추출 기술(천연물)	100	60
안정화 제제 기술	100	60
효력증진 제제 기술	100	60
약해 경감 기술	100	60
작용기구 구명 기술	100	20
병원성 평가 기술	100	50

출처: 농업/식량 TRM (2003)

- 연구개발 초기에는 실내 실험 위주로 우수한 미생물 또는 신규 미생물 유래 활성물질의 확보에 중점을 두었으나, 최근 바이오벤처기업을 중심으로 제품화에 필요한 대량생산 및 제형화 기술 등이 축적되고 있다. 그러나 산·학·연의 개발전략 및 노하우에 대한 공유 부재로 아직도 초기 단계의 기술개발에만 머무르고 있으며, 이로 인하여 산업화와 밀접

하게 관련된 대량생산 및 제형화 기술은 세계적 제품을 만들기에는 미흡한 실정이다.

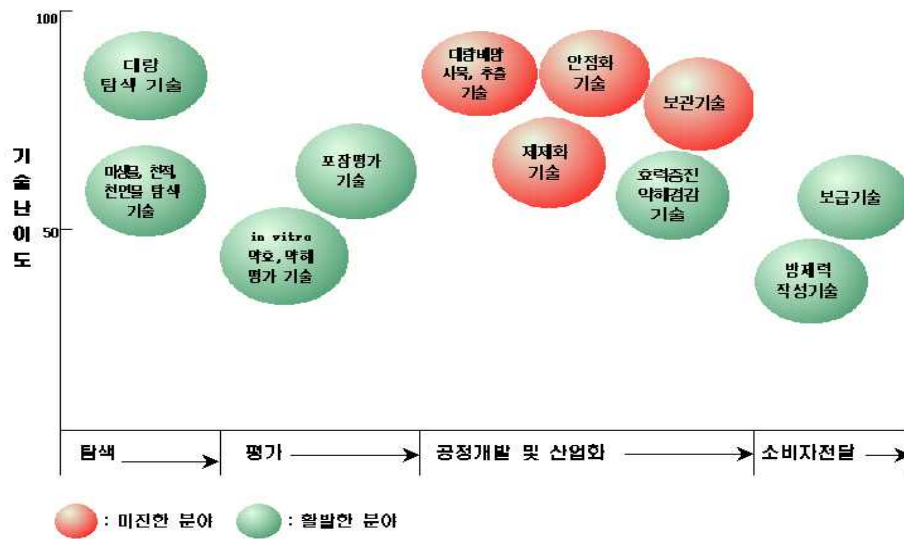


그림 3. 국내 생물농약 개발기술 분야별 연구 현황

- 또한 생물농약 개발기술에 대한 특허의 대부분이 정부출연기관 및 영세 벤처기업에 집중되어 있는 현실로 인하여 산업화를 위한 연결고리가 부족한 실정이며, 따라서 산/학/연의 개발기술의 공유를 통한 산업화를 위한 상호연계가 필요하다.

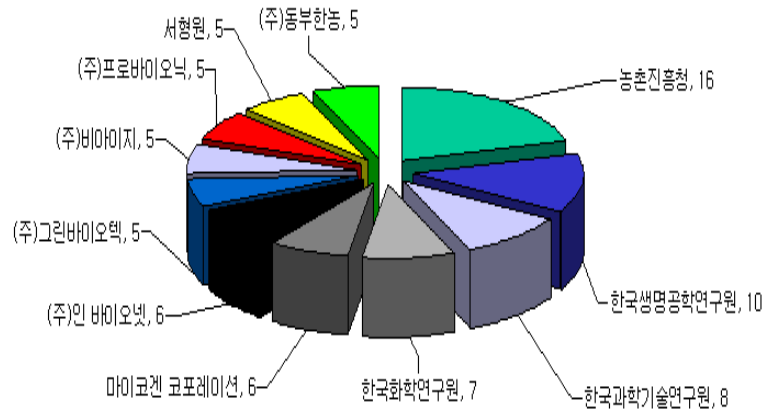


그림 4. 국내 기관별 생물농약 특허 보유 현황 (한국특허정보원, 2006)

- 현재 국내에 등록된 생물농약(천연식물보호제)은 2011년 12월 말 현재 살충제 13 품목, 살균제 21 품목, 제초제 1 품목 등 총 35 품목으로 살균제가 살충제보다 1.6배 정도 높은 개발 현황을 보이고 있다(표 3).

표 3. 국내 주요 친환경 생물농약 등록 현황 (농촌진흥청, 20011년 12말 현재)

연번	용도	제조 수입	취급 분야	품목명	등록규격(%)
1	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스디비비1501 수화제	1.0×10 ⁹ cfu/g
2	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스디비비1501 입제	1×10 ⁶ cfu/g
3	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스시제이-9 액상현탁제	1.0×10 ⁷ cfu/ml
4	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스엠비아이600 수화제	2×10 ¹¹ cfu/g
5	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스와이1336 수화제	1×10 ⁹ cfu/g
6	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스이더블유42-1 액상현탁제	1.0x10 ⁷ cfu/ml
7	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스제이케이케이238 액상제	5.0x10 ⁷ cfu/ml
8	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스지비365 수화제	3.0×10 ⁷ cfu/g
9	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스지비365 액상수화제	1.0×10 ⁷ cfu/ml
10	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스케이비401 유상현탁제	2.0x10 ⁷ cfu/ml
11	살균	제조	미생물	바실루스서브틸리스케이비시1010 수화제	1x10 ⁵ cfu/g
12	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스큐에스티713 수화제	5×10 ⁹ cfu/g
13	살균	수입	미생물	바실루스서브틸리스큐에스티713 액상수화제	1x10 ⁹ cfu/g
14	살균	제조	미생물	바실루스아밀로리퀴파시엔스케이비시1121 수화제	1×10 ⁶ cfu/g
15	살균	수입	미생물	바실루스푸밀루스큐에스티2808 액상수화제	1x10 ⁹ cfu/g
16	살균	제조	미생물	스트렙토마이세스고시킴시스터블유와이이324 액제	1×10 ⁵ cfu/ml
17	살균	제조	미생물	스트렙토마이세스콜롬비엔시스더블유와이이20 액제	1×10 ⁴ cfu/ml
18	살균	제조	미생물	암펠로마이세스퀴스칼리스에이큐94013 수화제	1.0×10 ⁷ cfu/g
19	살균	수입	미생물	트리코더마아트로비라이드에스케이티-1 수화제	1×10 ⁸ cfu/g
20	살균	제조	미생물	트리코더마하지아눔와이씨459 고상제	1×10 ⁸ cfu/g
21	살균	제조	미생물	패니바실루스폴리믹사에이시-1 액상수화제	5×10 ⁶ cfu/ml
22	살충	제조	미생물	모나크로스포르타우마습케이비시3017 고상제	1.0x10 ⁴ cfu/g
23	살충	수입	미생물	뷰베리아바시안나지에이치에이 유상현탁제	1.0×10 ⁸ cfu/ml
24	살충	수입	미생물	뷰베리아바시안나티비아이-1 액상제	1.0×10 ⁶ cfu/ml
25	살충	수입	미생물	비티아이자와이 액상수화제	8.5BIU/kg
26	살충	수입	미생물	비티아이자와이 입상수화제	35,000DBMU/mg
27	살충	제조	미생물	비티아이자와이엔티423 수화제	1×10 ⁹ cfu/g
28	살충	제조	미생물	비티아이자와이엔티423 액상수화제	1×10 ⁸ cfu/ml
29	살충	제조	미생물	비티아이자와이지비413 액상수화제	1×10 ⁷ cfu/ml
30	살충	제조	미생물	비티쿠르스타키 수화제	16BIU/kg
31	살충	수입	미생물	비티쿠르스타키 액상수화제	10%
32	살충	수입	미생물	비티쿠르스타키 입상수화제	64BIU/kg
33	살충	수입	생화학	아자디락틴 입제	0.15%
34	살충	제조	미생물	패실로마이세스푸모소로세우스디비비-2032 수화제	5.0×10 ⁷ cfu/g
35	제초	수입	생화학	펠라르곤산 유제	53%

○ 현재 국내 생물농약 살충제의 개발은 주로 BT제로 아직까지 그 기반이 미흡한 실정이며, 관련분야의 연구개발에 있어서 다양한 균주의 분리 및 확보와 제형 안정화 등의 연구개발이 절실하다. 현재 등록된 생물농약 살충제는 16 품목으로 대부분이 *Bacillus thuringiensis* 균주가 주 원료이며, 국내에서 판매되는 BT제 중 (주)동부팜한농의 토박이TM와 그린바이오텍의 솔빛채TM2 품목만이 국내 기술로 개발된 것이다. 토박이TM는 기존의 수입제품 BT제 시장의 80% 이상을 석권하면서 국내 제품 개발 기술의 산업적 우수성을 입증한 바 있다. 이 외의 다른 제품은 모두 원료를 수입하여 제제화 한 것으로 *Bt. aizawai*와 *Bt. kurstaki*로 분류되고 있다. 한편 제품 등록 상으로 확인되는 국내 살충성 생물농약의 곰팡이 제제는 *Beauveria* sp.와 *Paecilomyces* sp. 제제의 수입품이 시장을 구성하고 있다 (표 4).

표 4. 국내 판매중인 생물농약 살충제

구분	상표명	미생물 (학명)	적용 병해충	개발 회사
국내 개발	솔빛채	<i>Bacillus thuringiensis aizawai</i>	배추좀나방	그린바이오텍 (주)동부팜한농 (주)동부팜한농 (주)동부팜한농
	토박이 WP, SC	<i>B. thuringiensis aizawai</i> NT0423	배추좀나방	
	세레모니 SC	<i>B. bassiana</i> TBI-1	점박이응애	
	방시리 WP	<i>P. fumosoroseus</i> DBB2032	온실가루이	
해외 개발 후 국내 수입 및 등록	슈리사이드	<i>B. thuringiensis</i>	복숭아심식나방	외국 기업
	영일비리	<i>B. thuringiensis</i>	나방류	
	스콜피온	<i>B. thuringiensis aizawai</i>	나방류	
	비오칸	<i>B. thuringiensis</i>	배추좀나방	
	바이오비트	<i>B. thuringiensis</i>	나방류	
	튠업	<i>B. thuringiensis</i>	배추좀나방	
	그물망	<i>B. thuringiensis</i>	배추좀나방	
	임페릴	<i>B. thuringiensis aizawai</i>	배추좀나방	
	비걸	<i>B. thuringiensis</i>	파좀나방	
	삼공비티	<i>B. thuringiensis</i>	나방류	
	바이충	<i>B. thuringiensis</i>	나방류	
	미성살충탄	<i>B. thuringiensis aizawai</i>	나방류	

○ 현재 국내 생물농약 살균제로 등록 된 것은 총 21 품목으로 최근 3년간 그 수가 많이 증가 하였으며, 거의 대부분이 *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp. 등 세균이며 곰팡이는 *Trichoderma harzianum* 등 3 품목으로 되어 있다 (표 3).

3. 외국의 기술개발 현황 및 개발 수준

- 외국의 생물농약에 대한 연구는 1930년대의 해충의 병원성 미생물 및 식물병원균 길항 미생물에 대한 기초 연구 이후로 꾸준히 진행되어 왔으며, 1970년대 초부터 토양전염 식물병의 생물학적 방제 심포지엄을 기점으로 연구가 활발하게 진행되었다. 1980년도 중반 *Agrobacterium tumefaciens*에 의해 발병되는 포도 근두암증병의 방제를 위하여 *Agrobacterium radiobacter*를 이용한 최초의 생물농약 제품이 개발된 이후 현재까지 제품 개발이 지속적으로 진행되고 있다.
- 2005년 이후 세계적으로 등록된 생물농약이 370여 종으로 알려져 있는데, 이 중에서 살충제가 270여 종으로 전체의 약 75%를 차지하고 있으며, 생물농약의 개발은 비교적 소규모 회사들을 중심으로 이루어지고 있다는 점과 대부분 미생물에 근간한 미생물 농약 개발이 주요 특징이라 할 수 있다. 미생물 농약으로 등록되어 이용되는 미생물의 종류를 살펴보면 곰팡이와 세균이 가장 많고 그 다음으로 해충용으로 이용되는 바이러스이다. 미국 EPA에 등록된 1996년 이후의 생물농약(biopesticide) 중 곰팡이를 원제로 한 품목의 허가 현황은 아래 표와 같다 (미국 EPA 홈페이지). 허가 품목이 인터넷에 게시되는 시점에서 2년간은 공백이었으며, 1998년부터 다시 등록이 되어 2005년까지 꾸준히 증가하였다 (EPA 홈페이지 자체 조사).

표 5. 세계 생물농약 개발 동향 (출처 : The Biopesticide Manual, 영국 BCPC)

구 분	개발 종 수 (종)			주성분
	'98	'02	'05	
미생물농약 (Micro-organisms, Living Systems)	60	96	112	바이러스, 세균, 곰팡이, 원생동물, 선충 등
천연물질 (Natural Products)	30	51	58	항생물질, 식물 및 동물성 추출물 등
천적류 (Macro-organisms, Insect Predators)	40	54	127	기생성 및 포식성 곤충류
페로몬 (Semi-chemicals, Pheromones)	45	53	56	성교란, 유살 및 예찰 이용
유전자 (Genes)	13	19	20	병, 해충, 제초제 저항성 유전자
계	158	273	373	

- 선진국에서는 미생물 또는 동·식물유래 생리활성 물질의 분리 및 동정과 같은 대량자동화 시스템 확보를 발판으로 다양한 신규 천연 생물소재의 탐색과 이를 이용한 대량생산 및 제형화 기술 등 산업화 기술을 축적하고 있다. 특히 산업화가 용이한 미생물, 천연활성물질을 대상으로 화학적인 방법을 통한 신규 소재 확보, 생산, 제형화에 대한 연구성과 및 특허가 전체적으로 균형 있게 개발, 진행되고 있다.

- 세계적으로 생물농약에 대한 개발 기술은 대기업보다는 주로 벤처기업이나 중소기업들에 의해 주도적으로 진행되고 왔는데, 특히 미국의 AgraQuest, Certis USA, Central Glass 사 등이 각각 년 40 M\$ 이상의 시장을 형성하며 기술개발에 집중하고 있다. 그러나 최근 다국적 기업인 Bayer Crop Science가 AgraQuest를 인수 합병 하였고, BASF는 Becker Underwood를 인수하였으며, Syngenta도 Novozyme과 생물농약의 판매를 위한 협약을 체결하는 등 글로벌 다국적 기업들의 자체 기술개발 이 확산되고 있다.
- 해외에서 개발된 생물농약은 살충제 위주로 살균제에 비해 4.7배 정도의 높은 개발 현황을 보이고 있으며, 미생물 자체와 미생물 또는 식물에서 유래된 물질로 개발된 생화학 농약이 비슷한 비율로 개발되는 양상을 보이고 있다. 국내와 마찬가지로 방제대상 측면에서 시장의 요구에 부합되는 살균제 제품의 개발 및 시장형성은 저조한 실정이다.

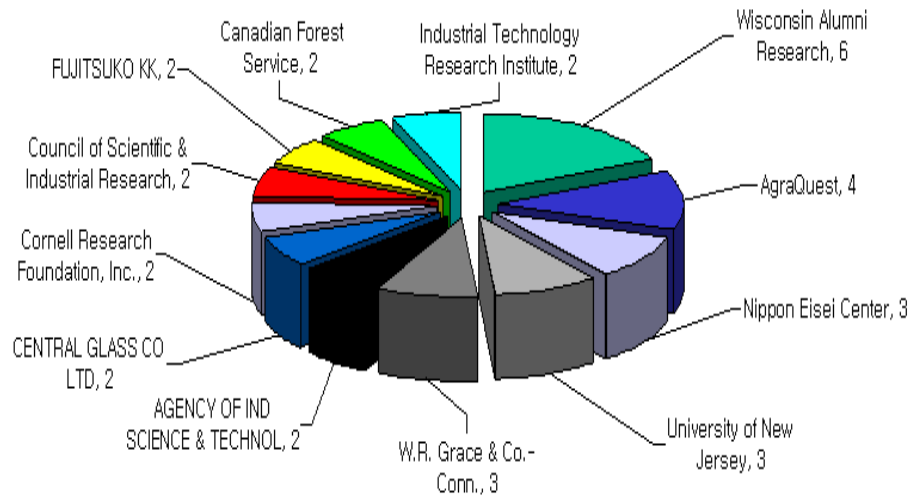


그림 5. 외국 생물농약 특허보유현황 (한국특허정보원, 2006)

표 6. 해외 생물농약 개발현황 (한국기술은행, 2006)

대상 생물	살충제	살균제	제초제	생장 조절제	기 타
등록 수	135	29	10	7	7

이용생물	미 생 물	페로몬/생화학	천 적	기 타
등록 수	60	45	40	43

- 전세계 생물농약 시장에서 살충제의 비율은 약 60% 이상으로 이 중에서 약 BT제와 기타 미생물제가 약 4:6의 시장비율을 차지하고 있고, 특히 Certis USA, Andermatt, Ecogen, Troybioscience 사 등이 전체 시장의 약 30% 이상을 점유하고 있다. 주력 제품군으로 Bt제와 곤충병원성 곰팡이 제품들 있고, 이 중에서 곤충 병원성 곰팡이 제품들의

주 원료는 *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*가 차지하고 있다(표 7). 그러나 이 제품들은 곰팡이 포자를 이용한 생균제 제품으로서 대부분 생산성, 안정성, 효과 측면에서 여러 한계를 지니고 있는 실정이다 (표 7, 8).

표 7. 미생물 생물농약의 종류별 매출액 (2010)

종류	매출액 (million US\$)					
	북미	유럽	아시아, 호주	남미	아프리카, 중동	전체
Total Bt	72.00	27.57	74.75	30.19	6.28	210.79
Other bacteria	23.94	6.30	14.05	4.56	0.40	49.25
Viruses	5.57	7.47	23.90	3.80	0.48	41.22
Fungi	15.85	5.64	18.85	35.96	0.78	77.08
Nematodes	9.40	7.50	0.95	0.16	0.13	18.14
Total	126.76	54.48	132.5	74.67	8.07	396.48

* 출처: *Trends Biotechnol.*, 2012 May)

표 8. 해외에서 개발 판매 중인 곤충병원성 곰팡이 살충제

상품명	병원균	대상 해충	생산 회사	생산국	특성
Naturalis	<i>B. bassiana</i> <i>B. bassiana</i>	boll weevil 온실가루이 메뚜기	Troy Bioscience Mycotech	미국 미국	곤충병원성 곰팡이 포자 (생균제)
Ostrinal	<i>B. bassiana</i>	European corn borer	Calliope	프랑스	
Engerlinspilz	<i>B. brogniartii</i>	떡갈잎풍뎅이	Andermatt	스위스	
Biopath	<i>M. anisopliae</i>	바퀴벌레	EcoScience	미국	
Biopath	<i>M. anisopliae</i>	흰개미	EcoScience	미국	
Biogreen	<i>M. anisopliae</i>	떡갈잎풍뎅이	BioCare	호주	
Per-97	<i>P. fumosrosseus</i>	온실가루이	Grace	미국	
Vertalec	<i>V. lecanii</i>	진딧물	Koppert	네덜란드	
Mycotal	<i>V. lecanii</i>	온실가루이	Koppert	네덜란드	
Betel	<i>B. brogniartii</i>	풍뎅이	Calliope	Reunion	

- 최근 들어 전 세계 생물농약 살균제 개발은 직접적인 병균억제 기작을 가진 *Bacillus subtilis* 위주의 시장에서 발전하여 기주 식물에서 병 저항성을 유도하고 성장을 촉진할 수 있는 식물 내생(endophytic) 미생물을 이용한 제품 개발로 전환되고 있다. 특히 이들 미생물이 생산하는 활성물질을 이용한 생화학 농약 개발도 다국적 기업을 중심으로 진행되고 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. 곤충 병원미생물을 이용한 차세대 미생물 살충제 개발 (제 1핵심 연구과제)

<연구 내용 및 방법>

과제 구분	과제 명	연구 내용 및 방법	
제1 핵심 1 세부	곤충 병원성 곰팡이를 이용한 미생물 살충제 개발	포자 생산을 위한 균주 배양 조건 검토	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Metarhizium</i> sp. HY-2 균주 배양 조건 최적화 • <i>Paecilomyces</i> sp. HY-4 균주 배양 조건 최적화
		활성포자 원제의 첨가 부제 및 화학 농약에 대한 안정성 검토	<ul style="list-style-type: none"> • 포자의 보관기간 및 조건에 따른 생존수 분석 • 식물성 오일에 대한 포자 안정성 분석 • 첨가 부제 유화제, 향산화제에 대한 포자 안정성 분석 • 화학 살충제, 살균제, 제초제에 대한 compatibility 분석
		포자원제를 이용한 시험 제형 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 활성포자의 wetting time 및 suspensibility 분석 • Emulsifiable suspension 용 유화제 조성 검토
		해충 령기에 따른 실내 살충력 검증	<ul style="list-style-type: none"> • 점박이용애, 복숭아진딧물, 담배가루이 등과 같은 난방제 해충에 대한 활성 분석 • SD spray tower를 이용한 분무 포자량 분석 • 3종 시험제형에 대한 활성포자의 농도 분석 • 시험제형의 살충효능 관찰을 위한 전자현미경 분석
		친환경유기농자재 목록 공시 등록을 위한 작물 비해 시험	<ul style="list-style-type: none"> • 5종 작물(금관고추, 만풍배추, 귀공자 수박, 금관참외, 매향딸기)에 대한 비해 시험 • 오이 점박이용애 약제방제 효과 및 약해 시험
		제형화 시료를 이용한 포장 시험	<ul style="list-style-type: none"> • 딸기 시설하우스에서의 친환경유기농자재 시험 제형을 이용한 포장시험 수행 • 시험제형별 살충효능 분석 • 곰팡이 감염사충의 전자현미경 분석

제1 핵심 2 세부	유효곤충병원성 곰팡이의 대량생산 및 제형안정화 검증	포자원제 생산을 위한 산업용 배양 배지 조건 최적화	<ul style="list-style-type: none"> • 생산수율 향상을 위한 영양원소 검토 • 곡물 부산물을 이용한 산업용 배지조성 검토 • 수분함량에 따른 생균수 검토 • <i>Metarhizium</i> sp. HY-2 포자 시험용 원제 생산 • <i>Paecilomyces</i> sp. HY-4 포자 시험용 원제 생산
		고농도 활성포자 생산을 위한 대량생산 공정 및 정제 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 배양공정 단계별 생산 수율 분석 • 활성 포자 harvest 수율 분석 • 고농도 활성포자 분급을 위한 분체 공정 개발
		활성포자를 이용한 제형화 및 시제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 친환경유기농자재 시험제형 3종 개발 (수화제, 유탁제, 오일제) • 시험제형별 활성포자의 생균수 분석
		친환경유기농자재 목록 공시	<ul style="list-style-type: none"> • 시험제형의 병원성미생물 공인기관 분석 • 시험제형의 환경독성 시험 의뢰- 꿀벌 급성접촉 시험 분석 • 5개 작물, 3회 이상 약해 시험성적 의뢰- 식물보호연구소 • 시험제형 별 살충효능 분석

<연구 결과>

1. 곤충병원성 곰팡이 균주의 배양조건 검토

가. 곤충병원성 곰팡이 *Metarhizium* sp. HY-2 포자 원제 생산/회수 배지 최적화

HY-2는 액체배지를 통한 종균배양과 평판배지를 통한 본 배양의 biphasic process(liquid seed culture and harvest from solid agar plate)로 진행하였다. 실험에 적용한 액체 배지의 조성은 포도당을 탄소원으로 하는 SDY(dextrose 40 g, peptone 10 g, yeast extract 10 g, H₂O 1 L)였고, 배양조건은 28℃에서 180 rpm의 속도로 교반된 진탕배양을 7일간 진행하였다(그림 1, 표 1~4). 본 배양은 액체배지 성분에 동물성 질소원인 번데기성분이 추가된 평판 고체배지를 사용하였다. 조성은 SDAY에 0.5%의 pupa powder와 0.5%의 wheat bran을 보강하

였다. 배양조건은 평판(plate size: 150×25 mm) 당 2 ml의 종균액을 도말하여 28±2℃에서 20일간 배양하였다. 초기 배양은 암조건, 균사 성장 후 후기 배양은 광조건으로 진행하였으며, 수분, 온도 및 광량 조절이 되는 대형 정치 배양기를 사용하였다. 특히 pupa 분말은 시중에서 구입한 pupa를 오븐 건조시킨 후 믹서로 갈아 60 mesh의 sieve로 입도를 조정하여 밀폐 유리 병에 보관하며 사용하였고, 첨가량은 조사결과, 0.5%가 최대 포자량(0.77~0.80 g-spore/plate)을 가져오는 최소 투입량으로 밝혀져서 실험에 적용하였다(표 5, 그림 2).

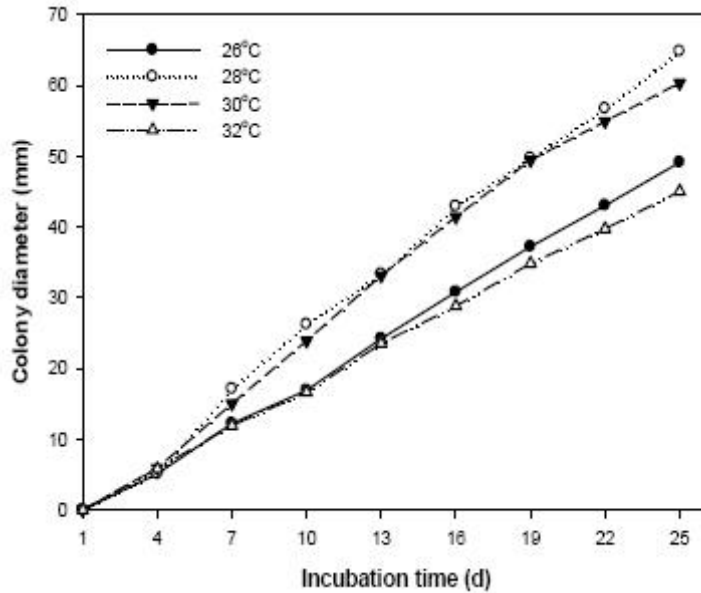


그림 1. *Metarhizium* sp. HY-2 균주의 배양조건에서 온도에 따른 영향

표 1. *Metarhizium* sp. HY-2 균주의 배양조건에서 pH에 따른 영향

pH	Mean growth rates (cm/day)	Degree of sporulation
10.0	0.2098 ± 0.0037	+
4.5	0.2275 ± 0.0035	+
9.0	0.2314 ± 0.0043	++
8.0	0.2427 ± 0.0044	++
5.0	0.2450 ± 0.0023	+
6.0	0.2528 ± 0.0033	++
7.0	0.2557 ± 0.0040	++

표 2. *Metarhizium* sp. HY-2 균주의 배양조건에서 탄소원에 따른 영향

Carbon source	Mean growth rates (cm/day)	Degree of sporulation
Mannitol	0.2085 ± 0.0030	++
None	0.2088 ± 0.0041	+
Lactose	0.2095 ± 0.0032	+++
Maltose	0.2195 ± 0.0037	+++
Sucrose	0.2199 ± 0.0025	+
Sorbitol	0.2227 ± 0.0045	++
Glucose	0.2394 ± 0.0048	+++

표 3. *Metarhizium* sp. HY-2 균주의 배양조건에서 질소원에 따른 영향

Nitrogen source	Mean growth rates (cm/day)	Degree of Sporulation
None	0.0743 ± 0.0030	-
NaNO ₃	0.0997 ± 0.0044	++
CO(NH ₂) ₂	0.1199 ± 0.0048	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1405 ± 0.0033	+
Corn meal	0.1767 ± 0.0041	+
Soybean meal	0.1883 ± 0.0059	+++
Yeast extract	0.2365 ± 0.0052	++
Peptone	0.2451 ± 0.0053 h	-
Tryptone	0.2608 ± 0.0046 i	+++
Pupa	0.2613 ± 0.0034 i	+++

표 4. *Metarhizium* sp. HY-2 균주의 배양조건에서 C/N ratio에 따른 영향

C/N ratio	Mean growth rates (cm/day)	Degree of sporulation
Control	0.0715 ± 0.0049	+
160:1	0.1600 ± 0.0073	+
80:1	0.1933 ± 0.0070	++
40:1	0.2199 ± 0.0061	+++
20:1	0.2588 ± 0.0032	+++
10:1	0.2605 ± 0.0052	+++
5:1	0.2639 ± 0.0061	+

표 5. Pupa의 배지량과 포자 수득률 최적화

Pupa (%)	0	0.1	0.3	0.5	0.6	0.8	1.0
Yield (g-spore/plate)	0.15	0.22	0.41	0.77	0.78	0.80	0.79

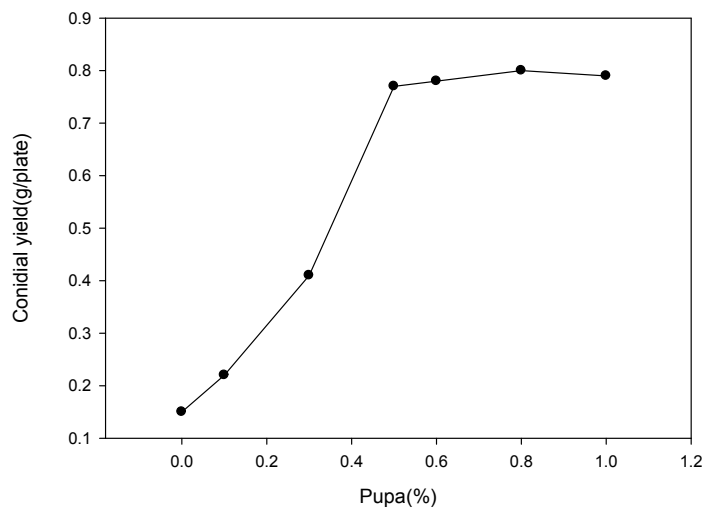


그림 2. 배지내에 pupa 함량에 따른 포자 수득률

한편, 평판 배지의 특성상 사용 배지의 최적화를 위해 평판 당 배지의 양에 따른 포자 수득률을 조사하여 30 ml의 배지량으로 생산조건을 결정 하였다. 또한, wheat bran은 HY-2 균사체 mat의 물성을 개선하는 효과가 있음을 실험적으로 확인하였다. 평판에 형성된 균사체로부터 포자를 회수할 때 wheat bran 첨가된 실험구의 포자가 훨씬 쉽게 긁어져서 wheat bran의 포자의 이탈 회수를 원활하게 하는 역할을 확인하여 전체 실험에 적용하였다.

표 6. 평판 배지량과 포자 수득률 최적화

Liquid substrate(ml)	Total dry mass(g/plate)	Conidial yield(g)
15.00	1.28	0.41
20.00	1.70	0.53
25.00	2.22	0.75
30.00	2.55	0.84
35.00	2.98	0.85

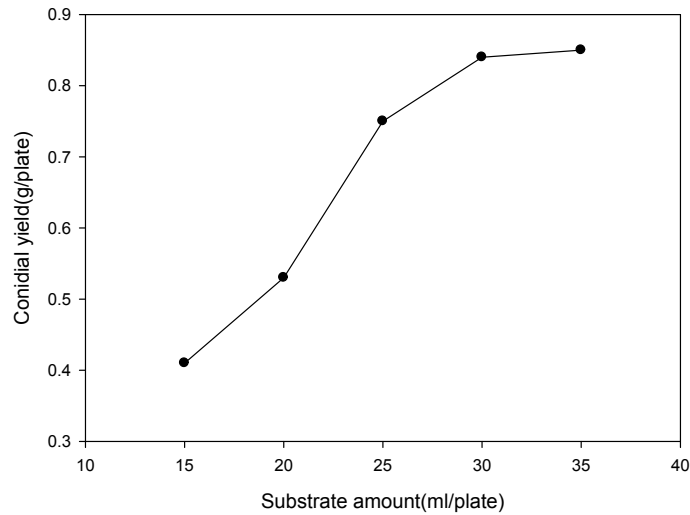


그림 3. 기질 함량에 따른 conidia 생산 수율

표 7. Wheat bran에 의한 포자 조작성 증가

Substrate	Plate yield (g/plate)	Yield (g·g ⁻¹ dry mass)	Conc. of conidia (conidia/g)	Viable counting (cfu/g)
SDAY	0.15	0.07	3.9×10 ⁹	4.5×10 ⁷
SDAY + 0.5% pupa	0.86	0.36	8.7×10 ⁹	2.3×10 ⁹
SDAY + 0.5% wheat bran	0.53	0.22	9.3×10 ⁹	3.1×10 ⁹
SDAY + 0.5% pupa + 0.5% wheat bran	0.88	0.35	1.0×10 ¹⁰	3.2×10 ⁹

나. 곤충병원성 곰팡이 *Paecilomyces* sp. HY-4 포자 원체 생산/회수 배지 최적화

HY-4는 액체배지를 통한 중간배양과 고체배지를 통한 본배양의 biphasic process(liquid seed

culture and harvest from solid agar plate)로 진행하였다. 실험에 적용한 액체 배지의 조성은 포도당을 주 탄소원으로 하는 PDB를 사용하거나, 혹은 Czapek-Dox broth를 이용하였으며, 포자생산을 위한 본 배양은 증기가압 살균된 쌀과 밀기울을 사용했다. 배지 구성은 Rice:H₂O(1:1)과 Wheat bran:H₂O(1:1)이었고, 28°C에서 15days일간 배양하고 팬을 이용한 건조과정 후 믹서를 이용해 분쇄 및 포자 수확을 하였다(그림 4, 표 8~11).

배지조성 및 배양 조건에 따른 포자생산 최적화는 아래의 결과에 나타내었다(표 12~13).

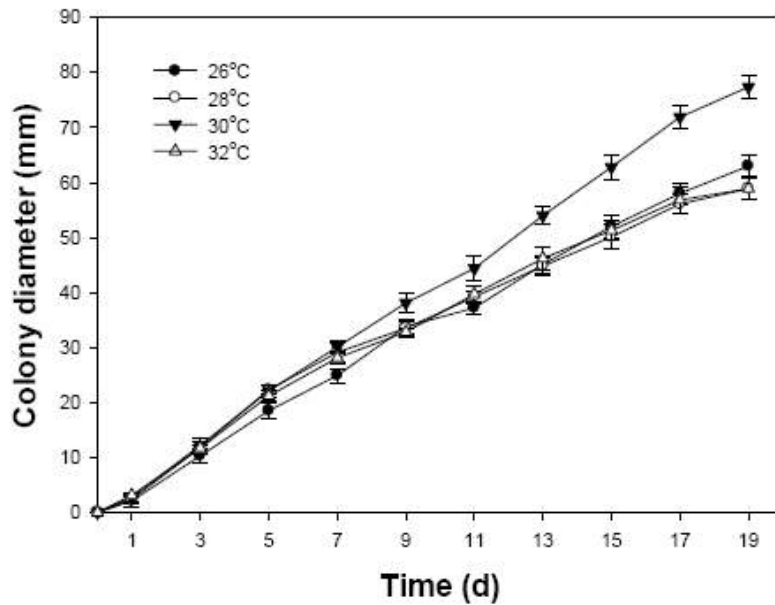


그림 4. *Paecilomyces* sp. HY-4 균주의 배양조건에서 온도에 따른 영향

표 8. *Paecilomyces* sp. HY-4 균주의 배양조건에서 pH에 따른 영향

pH values	Mean growth rates (cm/day)	Degree of sporulation
4.5	0.2340 ± 0.0079	++
5.0	0.3169 ± 0.0083	++
7.0	0.3747 ± 0.0053	++
6.0	0.3824 ± 0.0080	++
9.0	0.3998 ± 0.0050	+++
10.0	0.4084 ± 0.0048	+++
8.0	0.4289 ± 0.0091	+++

표 9. *Paecilomyces* sp. HY-4 균주의 배양조건에서 탄소원에 따른 영향

Carbon sources	Mean growth rates (cm/day)	Degree of sporulation
CK	0.4724 ± 0.0045	-
Glucose	0.4982 ± 0.0042	++
Maltose	0.5148 ± 0.0050	+++
Sucrose	0.5155 ± 0.0040	+++
Lactose	0.5279 ± 0.0038	+
Mannitol	0.5285 ± 0.0043	+
Sorbitol	0.5406 ± 0.0077	++

표 10. *Paecilomyces* sp. HY-4 균주의 배양조건에서 질소원에 따른 영향

Nitrogen sources	Mean growth rates (cm/day)	Degree of sporulation
NaNO ₃	0.3233 ± 0.0080	++
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3586 ± 0.0033	+
CO(NH ₂) ₂	0.3610 ± 0.0074	++
Yeast extract	0.3757 ± 0.0033	+
Soybean meal	0.4007 ± 0.0026	+++
CK	0.4283 ± 0.0102	-
Corn meal	0.4362 ± 0.0053	+
Pupa	0.4414 ± 0.0047	+++
Peptone	0.4952 ± 0.0051	+
Tryptone	0.5303 ± 0.0029	+++

표 11. *Paecilomyces* sp. HY-4 균주의 배양조건에서 C/N ratio에 따른 영향

C/N ratios	Mean growth rates (cm/day)	Degree of sporulation
N=0	0.2838 ± 0.0055	-
160:1	0.4277 ± 0.0046	+
10:1	0.4441 ± 0.0025	+
80:1	0.4449 ± 0.0047	+
5:1	0.4459 ± 0.0050	-
40:1	0.5023 ± 0.0074	+++
20:1	0.5218 ± 0.0047	++

표 12. 비교 실험에 의한 최적 조건 확인

Condition for HY-4	Optimal	Unfavorable
Relative Humidity	>75%	<70%
Granularity	1-5mm	0.1-0.5mm
Petri dish	plastic	glass(gap)
Sealing with parafilm	unsealed	sealed
Temperature	27-31 °C	<25 °C
Grinding granularity	20-150 μm	>500 μm
Capacity	30-35g/plate	-
Liquid seed	PDB/Czapek 5ml	-

표 13. HY-4 포자 생산을 위한 배지 최적화

Substrate	Yield (g/plate)	Yield (g·g ⁻¹ drymass)	Conidial conc. (conidia/g)	Viable counting (cfu/g)
Czapek	0.03	0.02	3.2×10 ¹⁰	6.6×10 ⁹
Czapek+pupa	0.12	0.07	5.7×10 ¹⁰	1.2×10 ¹⁰
Rice	50-60	-	4.0×10 ⁹	8.3×10 ⁸
Wheat bran	25-30	-		8.6×10 ⁹

다. 곤충병원성 곰팡이 포자 원제의 생산 및 보관

포자의 회수는 후드 내에서 fan에 의해 건조시킨 후, 자외선 및 알코올 살균이 된 무균 상자 안에서 scraper로 긁어서 진행하였다. HY-2는 누적 포자무게 기준 2.0 kg, HY-4는 누적 포자무게 기준 14.0 kg의 생산량을 확보하여 제형화를 위한 원제 생산을 진행하였다. 회수된 포자는 밀폐 유리병에 건조제(실리카겔 팩)와 함께 넣어 냉장상태 어두운 조건으로 보관하였다 (표 14, 15).

표 14. 배지조건별 포자원제 생산량

Strain	Medium	Harvested
<i>Metarhizium anisopliae</i> HY-2	SDAY agar	c.a. 2 Kg
<i>Paecilomyces lilacinus</i> HY-4	Cooked rice	c.a. 4 Kg
	Wheat bran only	c.a. 10 Kg

표 15. 배지조건별 포자원제 생균수

Strain	Concentration Min (conidia/g)	Viability (germination rate)	Viable counting Min (cfu/g)
HY-2	5.1×10^9	>95%	1.0×10^9
HY-4	3.0×10^9	>95%	5.0×10^8
	2.5×10^{10}	>95%	8.6×10^9

HY-2의 포자의 회수 시점부터 6개월간의 경시 변화는 표와 같으며, 저장온도, 빛 차단조건과 아울러 건조상태 등이 보관성에 영향을 주었다.

표 16. *Metarhizium* sp. HY-2 균주의 생균수 안정성 검토

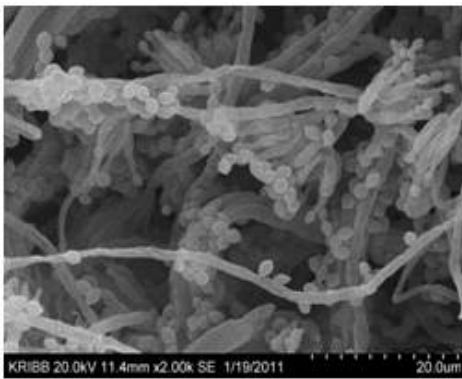
Storage Temp	HY-2, Harvest	1 month	...	6 months
Ambient	1.5×10^9	6.4×10^8	...	$6.4 \times 10^6 - 4.1 \times 10^8$
4°C		1.2×10^9	...	8.4×10^8

HY-4의 포자는 곡물 및 부산물 고체배지로부터 회수되어 배지류의 혼입으로 인해 회수시점의 포자농도가 일정치 않았지만, 실온에서의 보관성이 매우 높았고 105일 후의 발아율도 90% 이상으로 유지되었다. 전자현미경 사진에 의하면, 평판배지에 비해 고체 배지에서 생산된

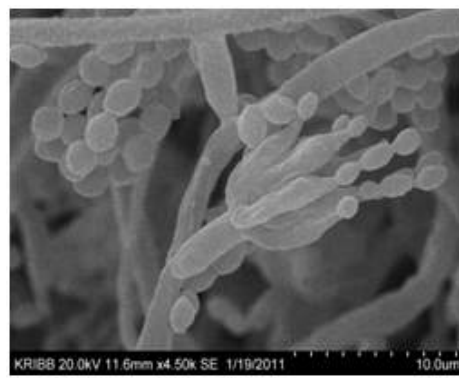
HY-4 포자의 형태에도 차이를 보여 자연상태의 배양조건이 포자 생존률에 긍정적임을 알 수 있었다.

표 17. *Paecilomyces* sp. HY-4 균주의 생균수 안정성 검토

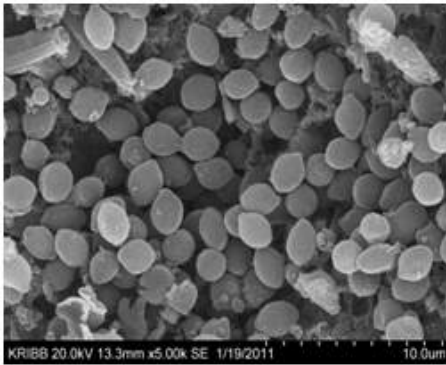
Substrate	HY-4, Harvest	1 month	3 months	...
Wheat bran	8.6×10^9	7.5×10^9	9.0×10^9	...
Rice	7.8×10^8	7.4×10^8	4.5×10^8	...



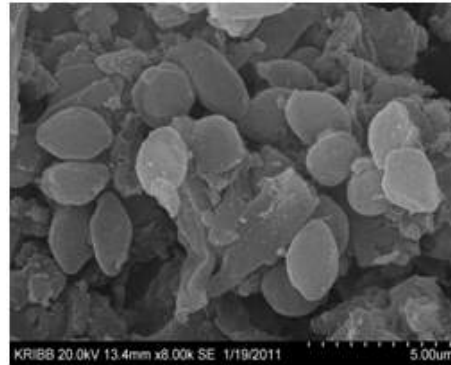
HY-4 from agar plate



HY-4 conidiophore and conidia



HY-4 from wheat bran



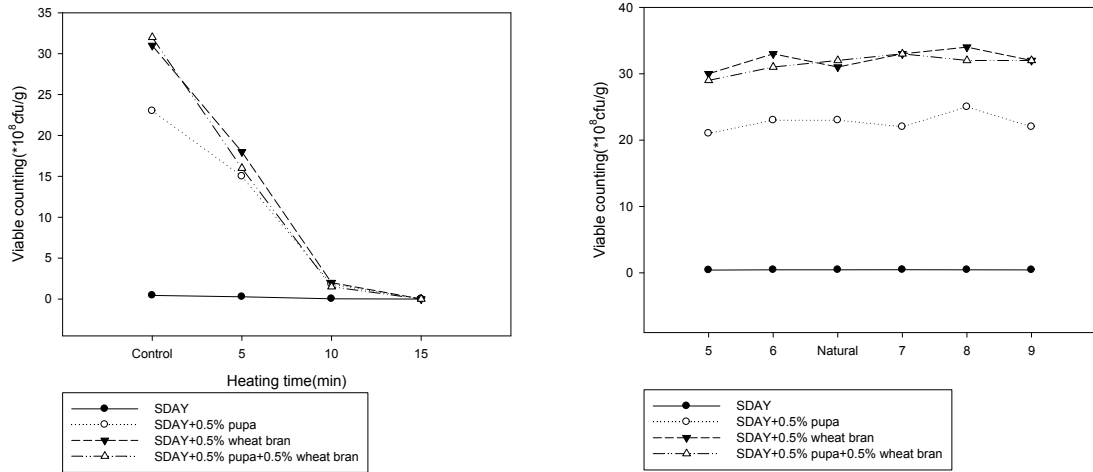
HY-4 from cooked rice

그림 5. 배지 종류별 *Paecilomyces* sp. HY-4 균주의 전자현미경 사진

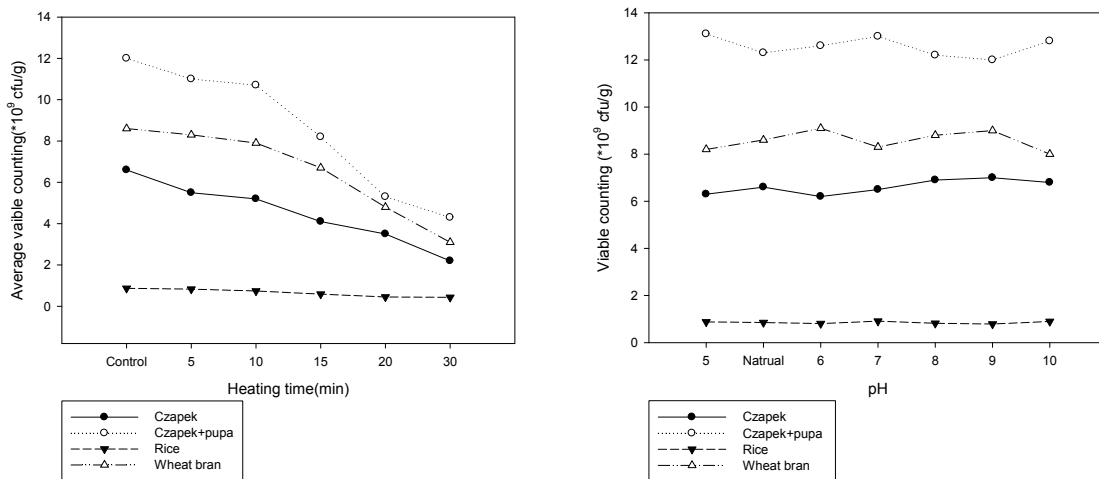
라. 포자원체의 온도 및 pH 조건에서의 발아율

HY-2 포자원체는 배양배지에 따라 발아율의 열안정성에 차이를 보였다. 평판배지에 pupa 및 wheat bran을 첨가시 초기 포자농도뿐 아니라 열안정성도 높아서 노출온도에 따른 경시변화가 심했지만, pH의 경우 포자의 안정성에 큰 영향이 없었다. (Conidial powder of HY-2 from different substrates was transferred into test tubes (0.1-0.2 g/tube), samples were kept in the oven at 60°C, 70°C and 80°C for various time (0, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min), then diluted to 1.0×10^4 conidia/0.1% Tween 80, 200 µl suspension was spread on agar plate

(SDAY) to test the viability. The average germination percent of control-test maintained 98%. More than 70% conidia of 60°C-20min could germinate and almost no germination of the 80°C-5min treatment was found, the germination percent of 70°C-5min was about 80% and 70°C-10min decreased to 10%. It indicated HY-2 was sensitive to high temperature.)



한편, HY-4 포자원체는, 70도에서 15분 처리한 포자의 90%이상이 발아하여 열안정성이 높은 것으로 해석되었으며, 이는 점박이 응애의 포장시험 결과와도 일치하고 있었다. 아래의 그림은 80도에서의 안정성 및 pH의 영향을 도표로 표시하였다.



2. 포자원체의 경제적 대량생산을 산업용 배양 배지 조건의 최적화

가. *Paecilomyces* sp. HY-4 균주의 활성포자 생산을 위한 산업용 배지 최적화

대량생산을 위한 *Paecilomyces* sp. HY-4는 액체배지를 통한 종균배양과 고체배지를 통한 본 배양의 biphasic process(liquid seed culture and harvest from solid agar plate)로 진행하였

다. 실험에 적용한 액체 배지의 조성은 포도당을 주 탄소원으로 하는 PDB를 사용하거나, 혹은 Czapek-Dox broth를 이용하였다. 고상발효를 위한 산업용 배지는 밀기울, 쌀겨 및 피 등을 이용하여 각각의 원료에 대한 생균수를 검토함. 포자생산을 위한 본 배양은 증기가압 살균된 쌀과 밀기울을 사용하였다. 배지 구성은 Rice:H₂O(1:1)과 Wheat bran:H₂O(1:1)이었고, 28°C에서 15일 간 배양하고 팬을 이용한 건조과정 후 믹서를 이용해 분쇄 및 포자를 수확하였다. 각각의 원료에 대한 visible 및 viable cell count를 수행한 결과 밀기울과 쌀겨의 생산성이 매우 높게 나타났으며, 피를 이용한 부분에서도 밀과 쌀 두 가지를 동시에 활용하였을 경우에도 유의적으로 높은 결과를 나타내었다. 이는 한가지의 원료가 아닌 다양한 곡물 부산물을 이용하여 대량생산을 할 수 있음을 의미하며, 각각의 원료의 가격 상승에 대비하여 혼합원료를 사용하는 것도 가격상승에 대한 완충작용을 할 수 있을 것으로 기대한다. 각각의 원료는 입도에 따른 생산성 검토에 있어서, 미세 분말 보다는 거친 분말을 이용하였을 경우 균사의 증식에 도움을 주어 높은 생균수의 포자 원제를 확보할 수 있었으며, 기질과 수분의 혼합 비율을 검토 한 결과 원료:수분의 비율이 4:3일 경우 가장 높은 생균수의 포자를 확보할 수 있었다(표 24, 25, 26).

표 18. 대량생산을 위한 산업용 배지 조성 검토

Spore yield	Wheat bran	Rice bran	Cooked rice	Mixed hulls	Wheat hull	Rice hull	Agar plate
Visible count (×10 ¹⁰ conidia/g)	2.5	2.8	0.3	2.8	0.6	0.2	5.7
Viable count (×10 ¹⁰ cfu/g)	0.75	0.77	0.08	0.70	0.15	0.05	1.2

표 19. 기질의 입자 크기에 따른 생균수 비교

Spore yield	Granularity		
	≥20mesh(sieved)	<20mesh(passed)	Mixed
Visible count (conidia/g)	2.8×10 ¹⁰	0.86×10 ¹⁰	1.8×10 ¹⁰

표 20. 기질의 수분 함량에 따른 생균수 비교

Spore yield	Water content (Rice bran : H ₂ O)		
	2:1	4:3	1:1
Visible count (conidia/g)	2.0×10 ¹⁰	2.7×10 ¹⁰	1.8×10 ¹⁰

나. 포자원제 생산을 위한 산업용 배양 배지 조건의 최적화

이와 같은 결과를 바탕으로 각각의 공정단계별 투입 원료 및 수분의 무게를 측정하고 생산되는 포자원제의 최종 수득율을 계산함. 최초 투입된 쌀겨의 무게를 100% 기준으로 하여 기질 대비 물의 비율을 4:3으로 첨가하여 멸균한 배지의 수분함량은 43.6%로 확인되었고, 5% 종균 (v/w)을 접종하여 측정 한 결과 139%로 증가하였고, 배양 종료 후 건조한 배양물의 무게는 70.3%로 확인함. Spore harvest 전 단계인 milling & sieving 공정을 거친 후 최종 32.0%의 건조 배양물을 확보하였다. 최종 확보한 viable conidia의 농도는 평균 2.0×10^{10} cfu/g 생균수를 나타냄. 이렇게 확보한 원제는 spore harvest를 이용한 분급공정(classification process)를 통하여 고농도의 활성 conidia를 확보할 것으로 판단함. 하지만, 생물체제의 가벼운 무게와 작은 크기는 기존의 광물질 분급에 이용한 harvest를 이용하였을 경우 수율이 떨어지기 때문에 분급공정에서의 최적화된 조건을 검토할 필요가 있었다.

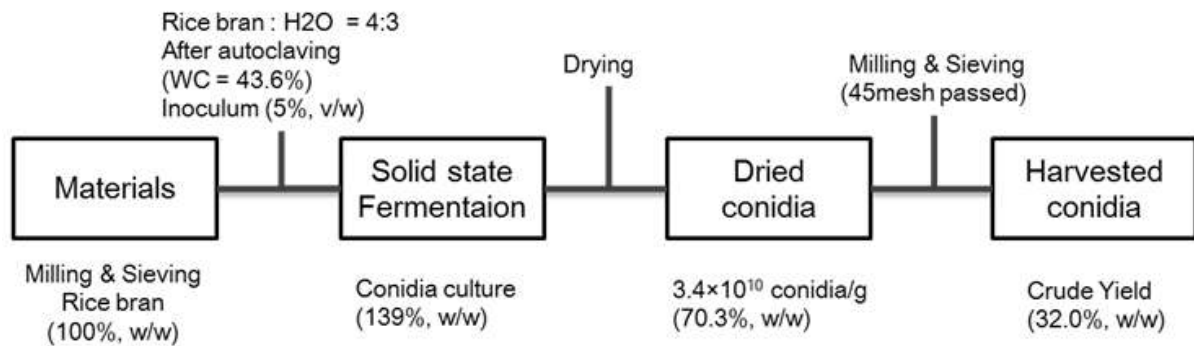


그림 6. 산업화 배지를 이용한 생산 공정 단계별 수율 검토

다. 고농도 활성포자 회수를 위한 분급공정 개발

농업에 사용가능한 고농도의 활성포자를 회수하기 위하여 325 mesh(입도 45 μ m) 이하의 입도를 가지는 활성포자의 분급 공정을 검토하였다. 100 μ m 이하의 입도를 가지는 미세 분말은 정전기 발생으로 인하여 분체의 표면 또는 옆면에 부착되어 원료의 손실을 가져오게 된다. 특히 포자와 같은 가벼운 물질들은 더욱 수율이 떨어지는 단점이 있다. 본 연구에서는 이러한 단점을 개선하기 위하여 분체의 사이즈를 조절하고, 회수율을 향상시키기 위하여 구체(beads)를 이용해서 생산성을 향상시켰다. 기존에 공정에 사용되는 분체기기들 중에서는 이러한 문제를 해결하기 위하여 초음파 진동체도 사용하고 있지만, 가벼운 소재의 경우에는 그 효율이 좋지 않다.

패실로마이세스 속 HY-4 균주의 활성 포자는 크기가 매우 작은 것으로 20, 40, 60, 100, 325 mesh 등 다양한 크기의 분체망을 사용하였고, 또한 이를 단일 또는 이중으로 처리하여 그 수율을 향상시킬 수 있었다. 325 mesh의 단일 분체망을 이용하였을 경우, 포자 회수율은 13.48% 였고, 40, 325 mesh 이중 분체공정에서 17.75%의 포자를 회수할 수 있었다(표 21).

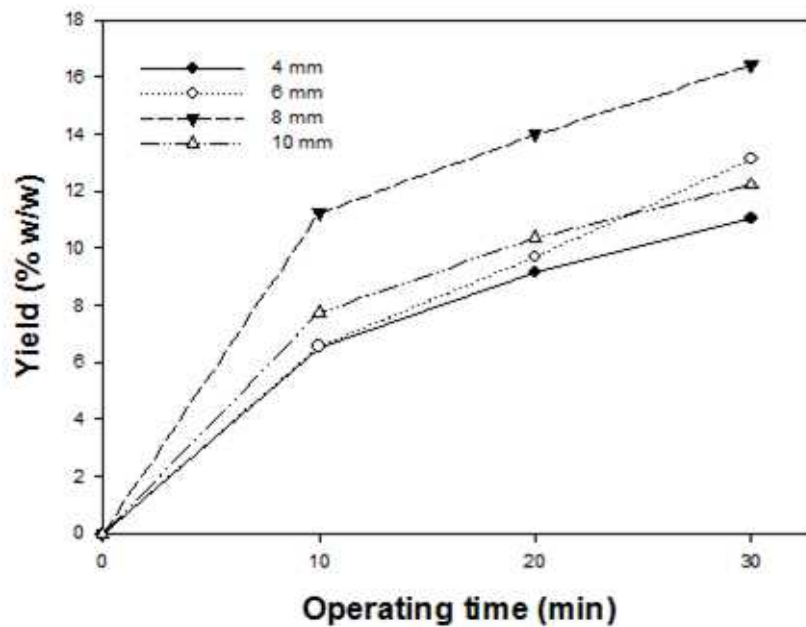
분체 수율을 향상시키기 위한 구체(beads)의 크기는 각각 4~10 mm로 서로 다른 사이즈를 이용하여 25 g glass beads/50 g conidia의 무게비로 수율을 측정 한 결과, 8 mm 사이즈의 구체

가 가장 높은 수율을 나타내었다. 또한, 분체 공정 시간대비 구체의 사용량을 비교한 결과 1:1 비율(구체:conidia)에서 보다 짧은 시간에 높은 수율을 얻을 수 있었다.

분체공정을 통하여 2.0×10^{10} conidia/g 이상의 활성 포자를 8.0×10^{10} conidia/g 이상의 고농도 활성포자 미세분말을 확보할 수 있었고, 각각의 분말의 입도와 현탁성을 확인한 결과 제형화를 위하여 미세분말이 적합함을 알 수 있었다(그림 7, 8).

표 21. 사이즈별 단일 또는 이중 분체망을 이용한 포자의 분급 수율

	Sieve	Yield (% w/w)
50g conidia 50g glass beads Time: 60 min	325mesh single	13.48
	20+325 double	17.82
	40+325 double	17.75
	60+325 double	15.13
	100+325 double	15.57
	40+100+325 triple	14.92



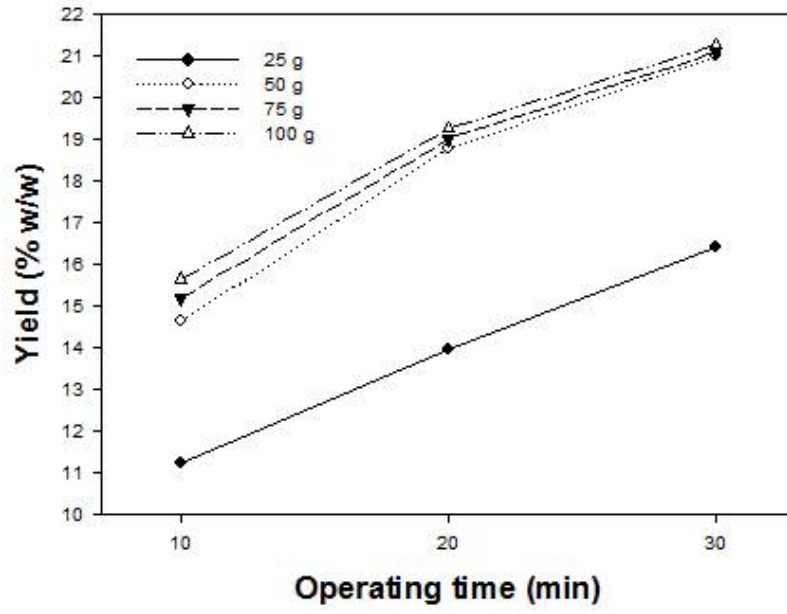
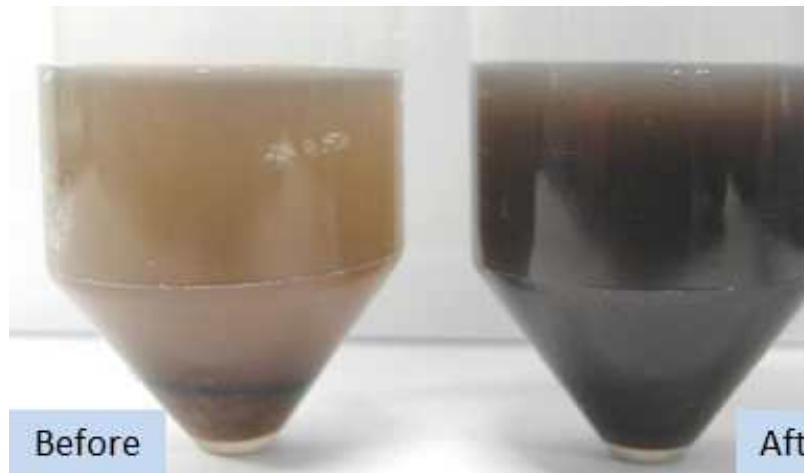


그림 7. 분체공정에서의 구체의 크기와 사용량에 따른 수율 분석

활성포자
분말



활성포자
현탁액



활성포자
생균수
검토

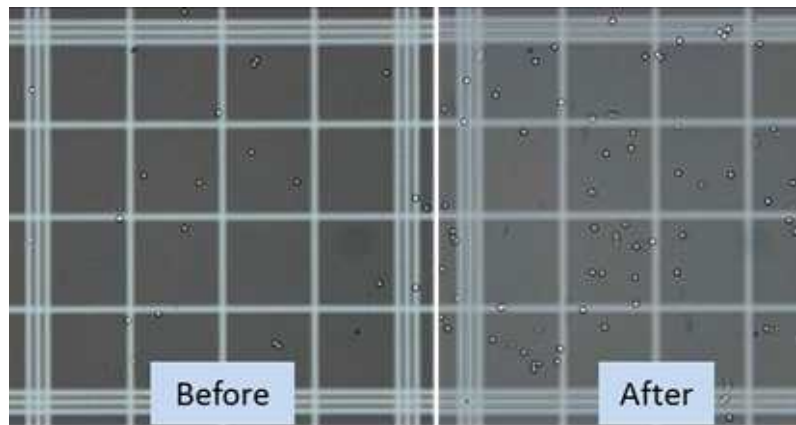


그림 8. 활성포자의 harvest 전후의 입도 및 현탁성

3. *Paecilomyces* sp. HY-4 포자 원제의 안정성 검토

가. 건조 포자원제의 보관기간별 생균수 검토

Paecilomyces sp. HY-4 건조 포자 원제의 보존기간별 생균수의 변화양상을 검토하였다. 건조 포자원제를 실온(Ambient)과 4℃의 조건에서 각각 보관하면서 시료의 생균수를 비교하였

다. *Paecilomyces* sp. HY-4 균주는 4°C에서는 1년 이상의 기간 동안 매우 안정한 상태를 유지하였고, 실온 보관의 경우에도 7개월 동안 50% 이상의 생균수를 유지하고 있음을 확인하였다. 향후 실제 유기농자재 개발에 있어서 포자의 안정성은 제품의 품질 유지에 필요한 부분으로 향후 제형화를 통하여 보존성을 극대화 할 필요가 있다. 또한, 제품의 포장에 산소흡수제와 수분흡수제를 첨가함으로써 제품의 안정성을 높일 수 있을 것으로 판단된다(그림 9, 표 22).

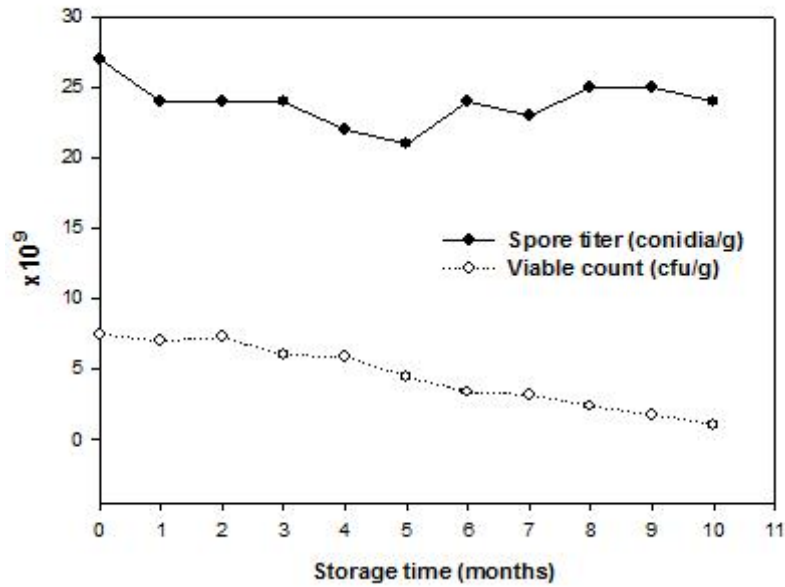


그림 9. *Paecilomyces* sp. HY-4 포자 원제의 보관기간별 생균수 분석

표 22. 보관 조건별 *Paecilomyces* sp. HY-4 포자의 shelf lives 분석

Time (d)	Purified conidia*		Conidia with substrate
	4°C	Ambient temperature	
0	>90	>90	>90
30	>90	>90	>90
60	>90	>90	>90
90	>90	>90	>90
120	>90	>90	>90
150	>90	78.8	>90
180	>90	53.5	>90
210	>90	50.2	85.3
240	>90	35.7	77.8

* Purified conidia: The air-drying SSF product (MC=7.4%) was milled and sieved to purify aerial conidia from substrate

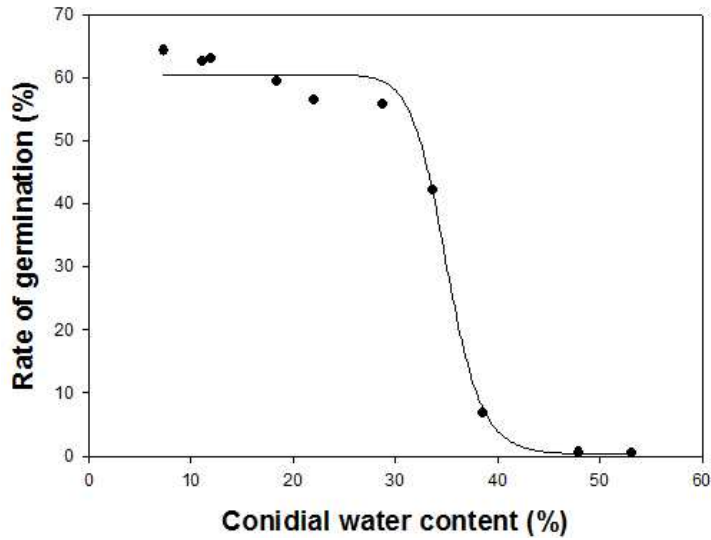


그림 10. 다양한 수분 함량에 따른 *Paecilomyces* sp. HY-4 포자의 온도 저항성

나. Oil 혼합 포자원제의 보존기간별 생균수 검사

Oil 혼합 포자원제는 향후 유제의 개발에 필요한 부분으로 각각의 oil 종류에 따른 포자의 안정성을 비교하였다. oil의 종류는 시중에서 향후 벌크 포장으로 구입 가능한 corn oil, soybean oil, grape seed oil, canola oil, 그리고 olive oil을 이용하여 10% dry conidia를 함유하는 oil 혼합제를 조성하였다. 각각의 혼합제는 상온의 암소에 보관하면서 월별로 각각의 생균수를 비교 검토하였다. 또한, 다양한 항산화제에 대한 안정성을 분석하였다.

HY-4 균주는 각각의 oil에 대한 피해를 받지 않았으며, 3개월 이상 안정한 생균수를 유지하였다(그림 11, 12).

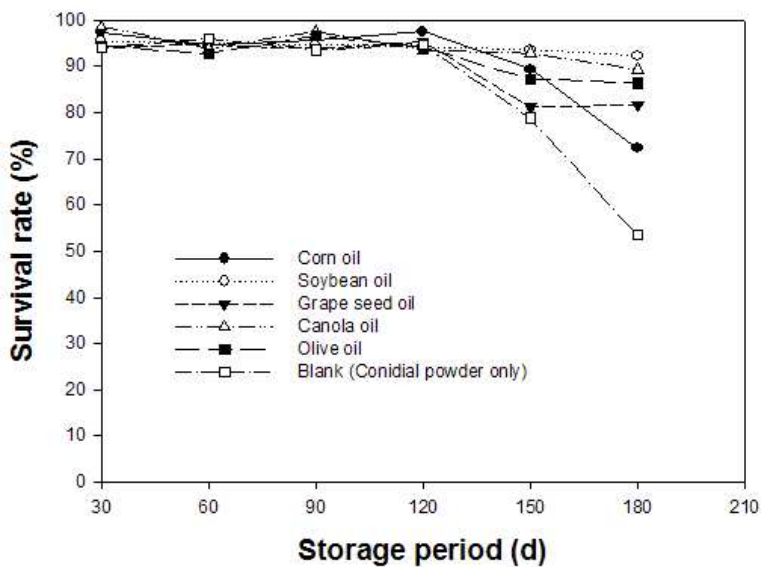


그림 11. *Paecilomyces* sp. HY-4 포자 oil mixture의 보관기간별 생균수 조사

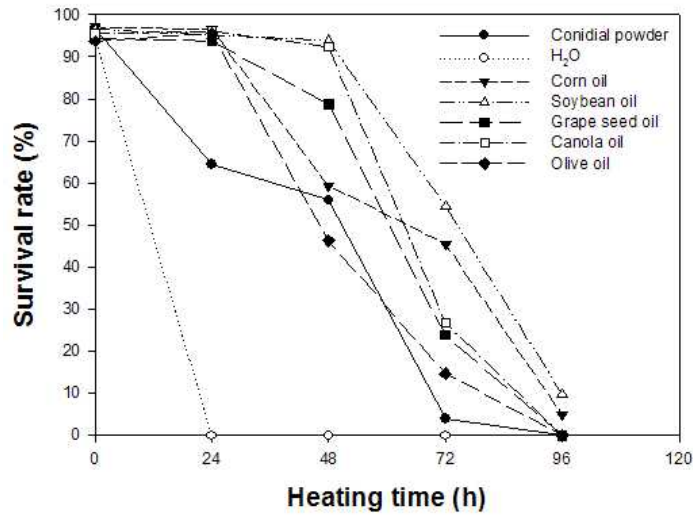


그림 12. *Paecilomyces* sp. HY-4 포자의 열안정성에 있어서의 oil coating 효과

표 23. 대두유에 코팅된 *Paecilomyces* sp. HY-4 포자의 항산화제 첨가 효과

Antioxidants*	Survival rates (%)				
	30 d	120 d	150 d	180 d	210 d
Conidial powder	94.3	91.8	79.6	58.4	50.6
AO blank	93.5	94.7	90.8	86.8	71.5
TBHQ	92.7	91.5	88.0	85.1	55.9
PG	95.6	93.6	91.7	92.0	84.6
BHT	94.7	95.5	94.1	92.1	88.2
BHA	98.3	93.6	93.0	90.2	69.9
Vitamin C	93.8	92.7	91.4	81.1	63.6
Vitamin E	96.1	94.4	88.5	76.3	56.0
Lecithin	97.0	93.3	92.1	75.6	51.9
Fe2O3	94.6	95.0	89.4	85.7	73.3

*AO blank- oil formulation of conidia without antioxidant.

TBHQ- tertiary butylhydroquinone;

PG- propyl gallate; BHT- butylated hydroxytoluene;

BHA- butylated hydroxyanisole.

0.02% (w/v) of single antioxidant was added in the soybean oil formulation of *P. lilacinus* HY-4, the conidial viabilities were determined monthly. After 210 d of storage at ambient temperature, BHT was found to be the most efficient in maintaining the viability.

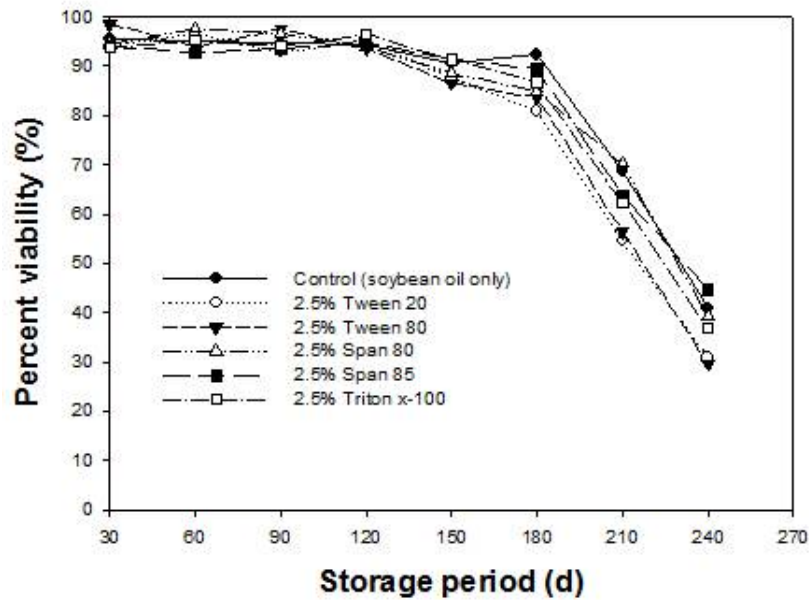


그림 13. *Paecilomyces* sp. HY-4 포자의 안정성에 있어서의 다양한 유화제의 영향

다. *Paecilomyces* sp. HY-4 포자의 화학농약에 대한 compatibility 검토

생균제제인 곤충병원성 곰팡이 *Paecilomyces* sp. HY-4 포자의 다양한 화학농약에 대한 compatibility를 검토하였다. 화학농약은 살충제, 살진균제, 그리고 제초제로 구분하여 실시하였다. 살충제는 시판되고 있는 대표농약들을 비교하였다. 화학농약은 1X(lethal/fatal dose), 0.2X(subfatal dose), 0.1X(low subfatal dose)로 구분하여 *Paecilomyces* sp. HY-4 포자와 현탁한 다음, 평판배지 상에서 포자의 발아, 생육도를 측정하였다.

화학살충제의 lethal dose에서는 벼농사의 진딧물 방제에 주로 쓰이는 chlorpyrifos에 의하여 50%의 발아저해를 가졌으나, 나머지 대표 화학살충에 혼용이 가능하고, 0.2X 이하의 subfatal dose에서는 모두 안정하였다(표 24).

살진균제에 대해서는 대부분의 진균제에 저해를 받았으나, 잿빛 곰팡이병에 사용되는 polyoxin B에 대해서는 저해를 받지 않았다(표 25).

또한, 독성이 강한 다양한 제초제에 대한 영향은 glyphosate를 제외한 나머지 균에서는 높은 저해를 나타내었다(표 26).

이상의 결과를 바탕으로 향후, *Paecilomyces* sp. HY-4 포자를 이용한 미생물제제의 적용시에는 현장에서 사용되는 화학제와의 혼용가능성에 대한 부분을 검토하고, 사용 환경에서의 관리를 통하여 활성유지를 위한 약제의 구분이 필요할 것이다.

표 24. *Paecilomyces* sp. HY-4 포자에 대한 chemical insecticide의 compatibility

Active ingredient	Chemical class	RC (ppm) 1	Inhibition rate ² (%)			Germination rate (%)			Sporulation ³		
			RC	0.2× RC	0.1× RC	RC	0.2× RC	0.1× RC	RC	0.2× RC	0.1× RC
Abamectin	Glycoside	6	18.8	0	0	>95	>95	>95	++	++	++
Chlorfenapyr	Pyrrrole	50	3.1	0	0	>95	>95	>95	++	++	++
Chlorpyrifos	Organophosphate	288	51.6	7.8	1.6	85.2	>95	>95	++	++	++
Dinotefuran	Neonicotinoid	100	28.1	4.7	1.1	82.4	>95	>95	++	++	++
Etofenprox	Pyrethroid	100	9.5	1.5	0	>95	>95	>95	++	++	++
Imidacloprid	Neonicotinoid	50	9.8	3.1	0	>95	>95	>95	++	++	++
Indoxacarb	Oxadiazine	50	25.0	1.7	0	>95	>95	>95	++	++	++
Methoxyfenozide	Diacylhydrazine	105	14.1	0.9	0	>95	>95	>95	+	++	++
Spinosad	Spinosyn	50	29.7	1.4	0.6	>95	>95	>95	++	++	++

1 RC- recommended concentration (field recommended ppm of technical grade).

2 Inhibitory rate=[(colony diameter of control - colony diameter of treated group)/(colony diameter of control)] ×100%

3 Sporulation: (++) , normal sporulation: (+) , poor sporulation.

4 EC- emulsifiable concentrate; SC- suspension concentrate; WG- water dispersible granule; WP- wettable powder; EW- emulsion in water

표 25. *Paecilomyces* sp. HY-4 포자에 대한 chemical fungicide의 compatibility

Active ingredient	Chemical class	RC (ppm) ¹	Inhibition rate ² (%)			Germination rate (%)			Sporulation ³		
			RC	0.2× RC	0.1× RC	RC	0.2× RC	0.1× RC	RC	0.2× RC	0.1× RC
Benomyl	Benzimidazole	350	100.0	100.0	100.0	0	0	29.1	-	-	-
Chlorothalonil	Chloronitrile	1275	100.0	100.0	100.0	0	0	0	-	-	-
Dimethomorph	Cinnamic Acid Amide	250	45.3	15.6	4.7	81.6	>95	>95	++	++	++
Fenarimol	Pyrimidine	41	90.6	82.8	57.8	9.4	24.2	84.7	-	-	-
Fludioxonil	Phenylpyrrole	40	67.2	60.9	59.4	22.5	27.1	32.7	-	-	-
Hymexazol	Isoxazole	300	56.3	56.3	60.7	>95	>95	>95	+	+	+
Mancozeb	Ethylene bisdithiocarbamate	1275	100.0	70.3	18.8	0	24.5	81.4	-	+	+
Polyoxin B	Polyoxin	100	0	0	0	>95	>95	>95	+	++	++
Tebuconazole	Triazole	125	100.0	100.0	93.8	0	0	0	-	-	-
Tetraconazole	Triazole	60	89.1	82.8	53.1	54.7	62.1	75.5	-	-	+
Thiophanate-methyl	Carbamate	700	100.0	100.0	100.0	0	0	0	-	-	-

1 RC- recommended concentration (field recommended ppm of technical grade).

2 Inhibitory rate=[(colony diameter of control - colony diameter of treated group)/(colony diameter of control)] ×100%

3 Sporulation: (++) , normal sporulation; (+) , poor sporulation; (-) , no sporulation.

4 WP- wettable powder; EC- emulsifiable concentrate; FU- fumigant; SL- soluble concentrate; SP- water soluble powder

표 26. *Paecilomyces* sp. HY-4 포자에 대한 chemical herbicide의 compatibility

Active ingredient	Chemical class	RC (ppm) ¹	Inhibition rate ² (%)			Germination rate (%)			Sporulation ³		
			RC	0.2× RC	0.1× RC	RC	0.2× RC	0.1× RC	RC	0.2× RC	0.1× RC
Alachlor	Acetanilide	1093	82.8	76.6	51.6	35.9	36.8	80.7	-	++	++
Butachlor	Chloroacetamide	1470	78.1	48.4	37.5	58.6	>95	>95	++	++	++
Glyphosate	Glycine	2050	29.7	12.5	9.4	>95	>95	>95	++	++	++
Napropamide	Acetamide	1250	100.0	87.5	60.9	0	15.2	77.5	-	+	++
S-metolachlor	Chloroacetamide	750	78.1	51.6	31.3	24.3	67.5	82.2	+	++	++

1 RC- recommended concentration (field recommended ppm of technical grade).
 2 Inhibitory rate=[(colony diameter of control - colony diameter of treated group)/(colony diameter of control)] ×100%
 3 Sporulation: (++) , normal sporulation; (+) , poor sporulation; (-) , no sporulation.
 4 EC- emulsifiable concentrate; SL- soluble concentrate; WP- wettable powder

4. 고농도 활성포자를 이용한 제형화 및 시제품 개발

가. *Paecilomyces* sp. HY-4 포자의 제형화를 위한 wetting time 및 suspensibility 검토
 수화제의 경우 180초 이내에 물에 현탁이 되어야 하며, 친유성의 원료는 유화제와 같은 화학제를 소량 첨가하여 그 물성을 계량하여야 한다. 또한, 포자와 같은 가벼운 물질은 용매에 잘 현탁될 수 있도록 그 제형을 설계해야 그 활성을 유지 또는 균질하게 사용할 수 있다.

Paecilomyces sp. HY-4 활성포자의 안정성 검토 결과 다양한 다당체와 광물질에서 안정하였고, 이러한 부형제를 이용하여 wetting time을 향상시키기 위하여 그 농도를 분석하였다. 대표적으로 사용되는 광물질인 bentonite와 kaolin, 그리고 corn starch를 이용하여 포자의 농도 대비 wetting time을 측정하였고, 10%(w/w)의 포자농도에서 corn starch에 대한 bentonite와 corn starch에 대한 kaolin의 비율에 따른 wetting time 과 suspensibility를 측정하였다.

포자 농도에 대한 광물질의 함량은 2:8의 비율에서 wetting time이 감소하였고, corn starch에 대한 bentonite는 2:7, corn starch에 대한 kaolin은 1:8~2:7에서 wetting time 대비 높은 suspensibility를 나타내었다.

이상의 결과로 bentonite : kaolin : cor starch : HY-4 spore의 비율을 35 : 35 : 20 : 10 으로 하여 wetting time은 164초, suspensibility는 70.2%로 추정되었다(그림 18~20).

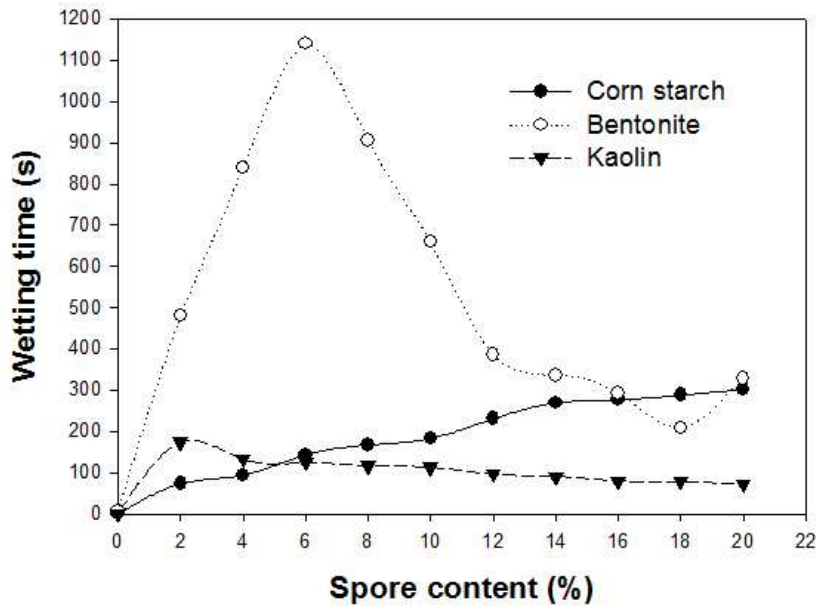


그림 14. *Paecilomyces* sp. HY-4 활성포자 농도별 wetting time 분석

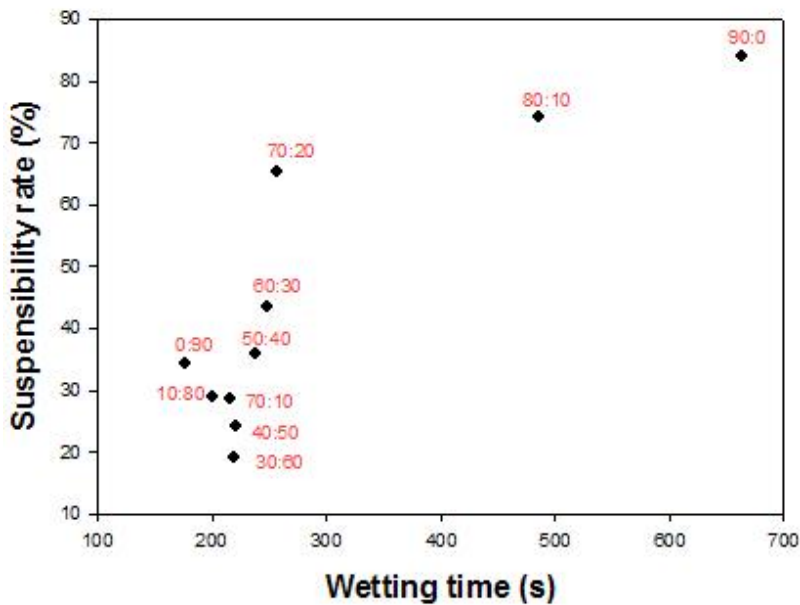


그림 15. Corn starch와 bentonite의 비율에 따른 wetting time과 suspensibility

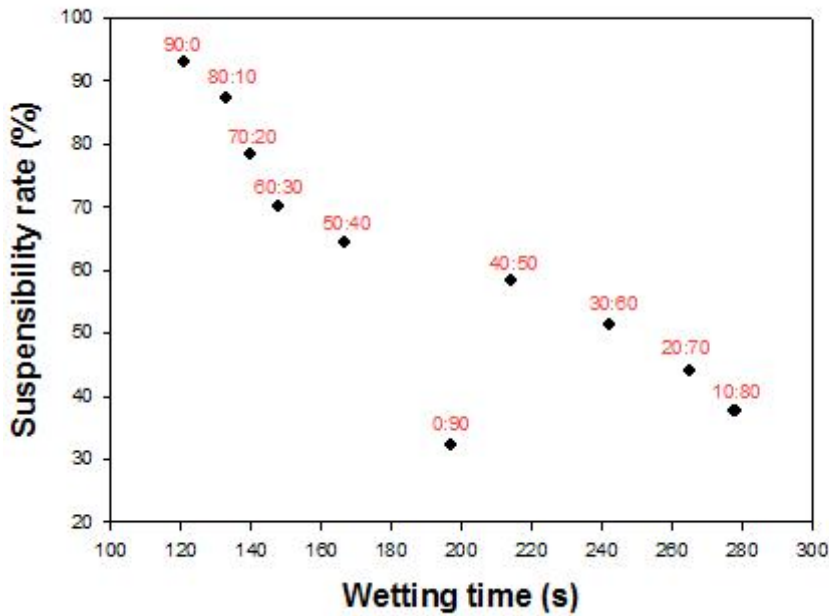


그림 16. Corn starch와 kaolin의 비율에 따른 wetting time과 suspensibility

나. *Paecilomyces* sp. HY-4 포자의 Emulsifiable suspension 제형을 위한 유화제 검토
 유탁제 또는 오일제 개발을 위한 유화제를 이용한 계면활성 효과를 검토하였다. 농업용으로 널리 이용되고 있는 유화제는 tween 20, tween 80, span 80, span 85, triton X-100 등의 서로 다른 hydrophilic lipophilic balance(친수성 친유성 평형)를 가지고 있다. 따라서, 이를 이용한 emulsion을 위하여 HLB에 따른 함량비를 서로 달리할 수 있다.

Paecilomyces sp. HY-4 포자는 hydrophobic 성질의 것으로 최종 단계에서 물에 현탁하는 제형을 개발하기 위해서는 유화제의 함량을 조절하여 emulsion 시킬 수 있다. 각종 유화제에 대한 안정성은 앞에서 언급하였고, 본 실험에서는 high shear emulsifier mixer를 이용하여 유화제의 적정농도에서 처리 시간에 따른 emulsification ability를 측정하였다.

Paecilomyces sp. HY-4 포자를 이용한 emulsion을 위한 HLB 레벨은 HLB 11.0으로 조정하여 유화제 혼합물을 구성하였고, 10%(w/w) 포자농도에서 2.3%(w/w) 유화제 혼합물을 5,000rpm에서 각각의 시간별로 emulsification ability를 측정한 결과 9분 이상에서 90% 이상의 emulsifiable suspension 조성물을 확인 할 수 있었다(표 27, 그림 17).

표 27. Emulsifiable suspension 제형을 위한 유화제의 HLB 비교

Surfactant	EA (%)	HLB	APP.	Remark
Span 85	43.7	1.8	W/O	<div style="text-align: center;"> <p>Oil + water</p> <p>Oil-in-water emulsion (O/W) Water-in-oil emulsion (W/O)</p> $HLB_{mix} = HLB_A \times A\% (w/w) + HLB_B \times B\% (w/w)$ </div>
Span 80	0	4.3		
Triton	61.3	13.0	O/W	
Tween 80	24.0	15.0		
Tween 20	30.8	16.7		

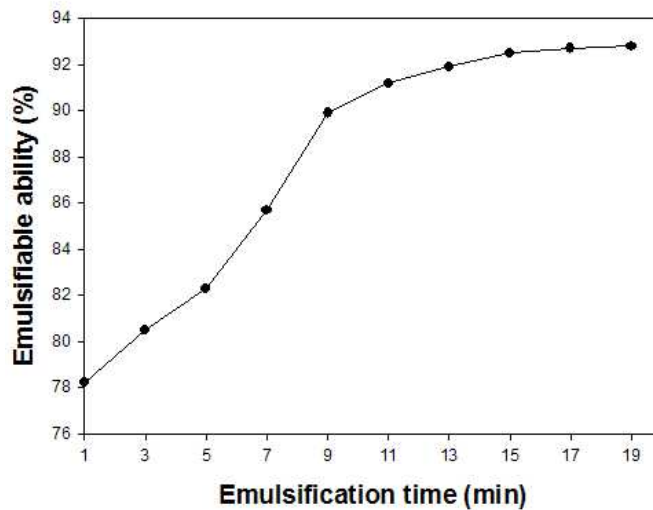


그림 17. High shear emulsifier mixer를 이용한 시간별 emulsification ability

다. *Paecilomyces* sp. HY-4 포자를 이용한 수화제, 유탁제 그리고 오일제 제형
 상기의 연구결과를 토대로 곤충병원성 곰팡이 *Paecilomyces* sp. HY-4 활성 포자를 물 또는 유기용매에 쉽게 분산, 현탁, 혼합 등이 용이하도록 하는 친환경유기농자재의 수화제, 유탁제, 오일제 제형을 개발하였다. 다음의 제형을 이용하여 실험실내의 살충효능, 친환경유기농자재 목록공시에 필요한 작물 비해, 약해 시험, 효능 시험 등에 활용하였고, 제품명은 ‘패시포라 (PaeciPora)’로 명명하였다(표 28).

표 28. *Paecilomyces* sp. HY-4 포자를 이용한 친환경유기농자재 시험제형

Dosage form	Visible count	Viable count	Ingredient	Content %
WP (Wettable powder)	4.0×10 ⁹ conidia/g	1.5×10 ⁹ cfu/g	Spores	5~10
			Corn starch	5~10
			Bentonite	30~50
			Dextrin	30~50
EC/ES (Emulsifiable concentrate /suspension)	3.8×10 ⁹ conidia/ml	1.8×10 ⁹ cfu/ml	Spores	5~10
			Vegitable oil	50~60
			Emulsifier	2~5
			H2O	30~40
OL (Oil miscible Liquid)	5.2×10 ⁹ conidia/ml	1.0×10 ⁹ cfu/ml	Spores	5~10
			Soybean oil	91.2
			Emulsifier	2.3

5. 해충령기에 따른 실내 살충력 검증

가. 목적 난방제 해충의 선정 및 실내 사육

농업에서 문제시 되고 있는 여러 가지 해충 중 점박이용애, 복숭아혹진딧물, 담배가루이의 흡즙성 미소해충들을 방제 대상으로 선정 후 그 실내 사육 체계를 수립하였다.

(1) 점박이용애(*Tetranychus urticae*, two-spotted spider mite)

- 연 10~11회 발생하는 빠른 세대수로 인하여 점박이용애는 화학 살비제에 대하여 빠른 저항성 획득과 모든 절화류 및 관엽류에 큰 피해를 주는 난방제 해충이다.
- 기주범위가 넓어 기주를 구하기 쉬우며 대표적인 사육기주로 사용되는 강낭콩은 다른 기주들 보다 잎면적이 넓어서 사육하는데 용이하였다.
- 25℃상대습도 70%, 12L:12D 조건으로 실내 사육하였다(그림 18A).

(2) 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*, green peach aphid)

- 복숭아혹진딧물은 세계적으로 분포되어 여름, 겨울기주로 전환하면서 배추, 고추, 복숭아, 꿀나무 등 66과 300여 종의 작물에 피해를 입히는 중요한 해충이다.
- 복숭아혹진딧물 사육은 대체적으로 사용되는 기주인 배추의 공급만 원활하면 사육에 큰 어

려움이 없었다.

- 배추 기주, 25℃상대습도 70%, 16L:8D 조건으로 실내 사육하였다(그림 18B).

(3) 담배가루이(*Bemisia tabaci*, sweet-potato whitefly)

- 담배가루이가 시설 하우스에서 번식을 시작하면 작업이 불편할 정도로 큰 피해를 입히는 세계 전 지역의 온실에서 문제가 되고 있으며 빠른 세대증식으로 인해 저항성이 문제되는 심각한 해충이다.

- 담배가루이는 적정 사육온도인 24℃~27℃에서 기주 식물인 토마토를 이용하여 사육시 원활하게 사육이 가능하였다(그림 18).

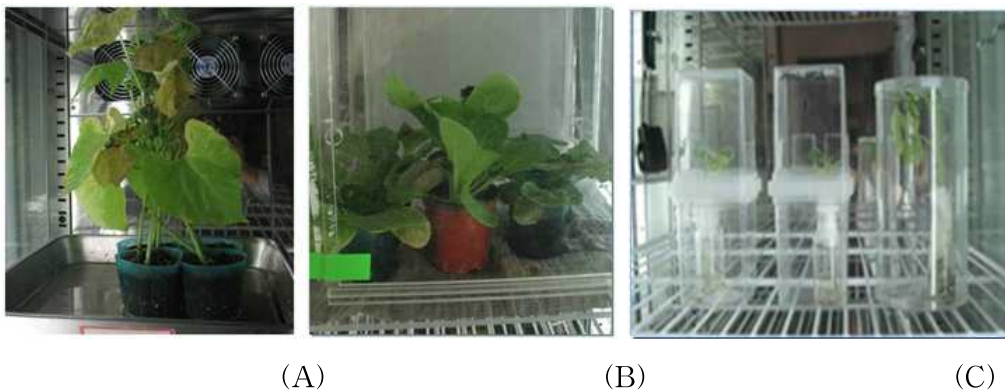


그림 18. 점박이응애(A), 복숭아혹진딧물(B), 담배가루이(C)의 사육 모습

선정된 3종의 난방제 해충들은 모두 빠른 세대수와 화학 농약에 대한 빠른 저항성 획득으로 전 세계적으로 문제시 되는 해충인 만큼 다른 난방류 해충들에 비해 먹이식물과 온도만 적정 수준으로 유지해주면 쉽게 계대사육이 가능함으로써 실험해충으로 이용하는데 어려움이 없었다.

가. 난방제 해충별 최적의 곰팡이 처리 방법 결정

(1) 문헌의 조사 및 처리 방법 결정

- 침지법 : 곰팡이 포자현탁액에 곤충자체를 침지시키는 방법
- 분무법 : 곰팡이 포자현탁액을 대상 곤충 위에서 분무하는 방법으로 주로 미소 곤충을 시험하는데 이용됨

본 연구에서 설정된 해충은 미소해충이기 때문에 침지 그 자체로 인한 사충이 많이 생겨나 본 실험에는 부적합한 것으로 판단되었다. 그에 비해 분무법은 미소해충에 대한 곤충병원성 곰팡이의 생물검정에 이미 많은 연구자들에 의해 사용되고 있는 것으로 조사되었으며 또한 실제 제제 개발시 침지법 보다는 분무법이 현실적인 방법으로 판단됨으로써 본 실험에서는

분무를 이용한 생물검정 방법을 병원성 곰팡이의 생물검정방법으로 결정하였다 (Shan & Feng, 2010; Shapiro-Ilan 등, 2008; Shi 등 2008).

(2) 곰팡이 분무를 위한 간이 tower sprayer 의 제작 및 평가

실제 곰팡이제제의 분무법에 이용되는 분무기는 온실 및 야외환경에서 대량의 시료에 대한 처리방법으로써 실내 생물검정법에 이용하기에는 부적합한 것으로 판단되었다. 이를 대신하기 위하여 많은 연구자들이 수동형 소형 간이 스프레이방법을 이용하고 있으나 이 방법의 경우 모든 시료에 대한 정량의 분무가 어렵고 그에 따라 실험오차가 많이 발생하는 문제점이 있다. 이를 해결하기 위하여 일반적으로 미소 해충에 대한 병원성 곰팡이의 생물검정에 자주 이용되는 potter tower sprayer가 이용되고 있으나 고가의 장비로 인해 많은 연구자들이 이용하기에는 부적합한 문제점이 있었다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 potter tower spray를 모방하여 저가의 에어브러쉬와 콤푸레샤로 구성된 간이 장비(에어브러쉬 (노즐: 0.2 mm), 소형 콤푸레샤(분사압력: 15 psi), 원통 케이지)를 자체 제작하고 SD tower sprayer 라 명하고 그 성능을 조사하였다 (그림19).

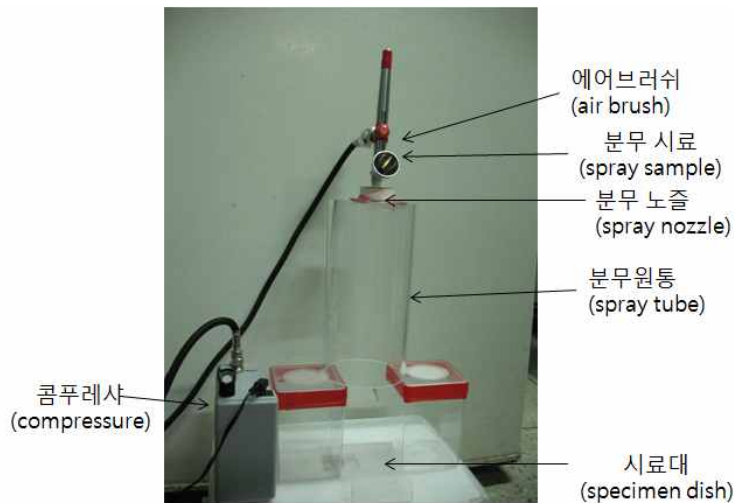


그림 19. 제작된 SD spray tower 모습

제작된 SD tower sprayer 밑에 hemocytometer를 놓고 1ml(1×10^8 conidia/ml) 포자 현탁액을 스프레이한 후 면적당 떨어지는 포자량을 계산하고, 기 보고된 potter tower sprayer 이용한 포자량과 비교하였다(Shan & Feng, 2010). 그 결과, 제작된 SD tower sprayer 는 상용화된 potter tower sprayer 에 비해 오히려 포자 손실률이 적게 나왔으며(표 29) 또한 이를 이용하여 직접 점박이응애에 스프레이 했을 시 24시간 동안 사충이 관찰되지 않음으로써 분무된 용액의 수용성 및 물리적 충격으로 인하여 피해가 없는 것으로 확인되어 곰팡이의 처리에 적합한 것으로 판단되었다.

표 29. SD spray tower와 Potter spray tower의 면적당 떨어지는 포자량 비교

사용된 타워	사용된 포자량	cm ² 당 떨어진 포자량	손실률 (%)
SD tower sprayer	1×10 ⁸ conidia	5.8±1.4×10 ⁵ conidia	99.4
potter spray tower	1×10 ⁸ conidia	1.1±0.4×10 ⁴ conidia	99.9

나. 곰팡이의 배양액 및 제형에 따른 살충력 비교

주관과제에서 개발한 여러 가지 배양액을 이용하여 배양된 곰팡이 배양액 및 제제를 공급받아 3가지 목적 해충에 대한 곰팡이의 살충력을 비교 평가하였다.

(1) 곰팡이 제제의 포자 활성 검정

제제화된 곰팡이(표 30) 포자들의 활성을 확인하기 위해서 각각의 제형들을 0.05% tween80을 이용하여 현탁액을 만들었으며, 만들어진 현탁액을 10배, 100배 희석하여 PDA 배지에 도말하여 생성되는 균총의 수로 활성포자의 수를 확인하였다. 활성 포자 확인에 있어 희석에 의한 오차와 오류를 줄이기 위해서 각각의 현탁액의 포자농도를 hemocytometer를 이용하여 확인하였으며 각기 실험을 3반복 실험하였다(그림 20).

표 30. 생물검정에 사용된 균주 및 제제 상태

균주	표기명	포자농도
<i>Metarhizium anisopliae</i> HY-2	original	5 × 10 ⁹ conidia/g
<i>M. anisopliae</i> HY-2	10% WG-1	1.7 × 10 ⁹ conidia/g
<i>M. anisopliae</i> HY-2	10% WG-2	1.6 × 10 ⁹ conidia/g
<i>M. anisopliae</i> HY-2	10% WP	1.1 × 10 ⁹ conidia/g
<i>Paecilomyces lilacinus</i> HY-4	substrate: rice	3 × 10 ⁹ conidia/g
<i>P. lilacinus</i> HY-4	substrate: wheat bran	2.5 × 10 ¹⁰ conidia/g

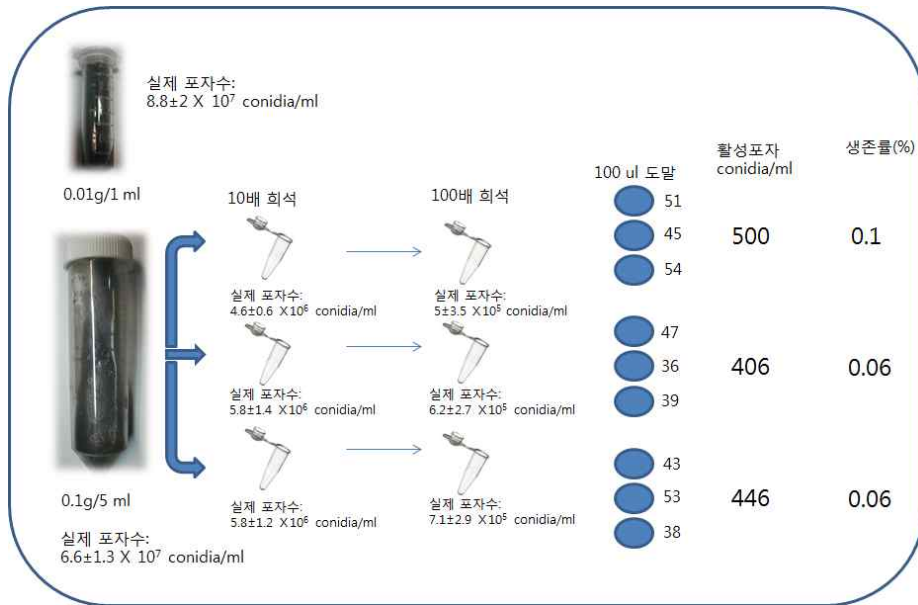


그림 20. 각각의 제형에 따른 활성포자를 확인하기 위한 모식도 및 *Metarhizium anisopliae* HY-2 original 의 활성포자 농도

그 결과, 활성포자 확인을 위한 포자현탁액의 희석에 있어서 포자농도는 희석배수에 맞게 희석된 것을 현미경적으로 확인하였으며, PDA 배지를 이용한 각각의 균주 및 제형들의 활성포자율은 0.025%~12.14%로 실제 포자수에 비해 매우 낮게 나타났다(표 31).

표 31. 각 제형에 따른 포자 생존률

균주	표기명	포자생존률(%)
<i>Metarhizium anisopliae</i> HY-2	original	13.63
<i>M. anisopliae</i> HY-2	10% WG-1	-
<i>M. anisopliae</i> HY-2	10% WG-2	0.24
<i>M. anisopliae</i> HY-2	10% WP	-
<i>Paecilomyces lilacinus</i> HY-4	substrate: rice	14.22
<i>P. lilacinus</i> HY-4	substrate: wheat bran	40.74

이러한 결과는 두 균주 모두 안정성이 매우 낮은 곰팡이 균주임을 보여주는 결과였으며, 제형화 과정을 거칠 경우 그 생존율은 현저히 낮아짐을 지적하는 결과였다. 일반적으로 곤충 병원성 곰팡이의 포자는 안정성이 높지 않은 것으로 나타나며, 이를 보완하기 위해서 제형 개발시

여러 가지 첨가제 의한 보완이 필수적이므로, 현재의 제형에 대해서는 가능한 범위내에서 개선이 필요함을 지적해주었다.

(2) 점박이응애에 대한 살충력 검정

90 mm dish에 과습된 탈지면을 깔고 그 위에 지름 20 mm 원형의 강낭콩 잎을 놓은 후 점박이응애 성충 15마리를 옮겨 놓았다. 그 후 각기 다른 배양로 배양된 균주들의 포자현탁액 1 ml (1×10^7 conidia)을 SD spray tower를 이용하여 스프레이하여 생물검정 하였다(3반복). 그 결과, *Paecilomyces lilacinus* HY-4 균주에서 70% 이상의 살비률이 나타났으며 사충도 전형적인 곰팡이병 증상을 보였다(그림 21). 또한 *Metarhizium anisopliae* HY-2 균주를 이용한 배양액에서는 약 80% 살비률을 보인 10% WP를 제외하고 다른 배양액에서는 무처리구와 비슷한 살비률이 나타났다(그림 22). 그러나 10% WP에서 사멸한 점박이응애에서는 곰팡이병증상을 발견할 수 없어 곰팡이에 의한 사멸인지 배양액 성분에 의한 사멸인지 확인은 할 수 없었다.

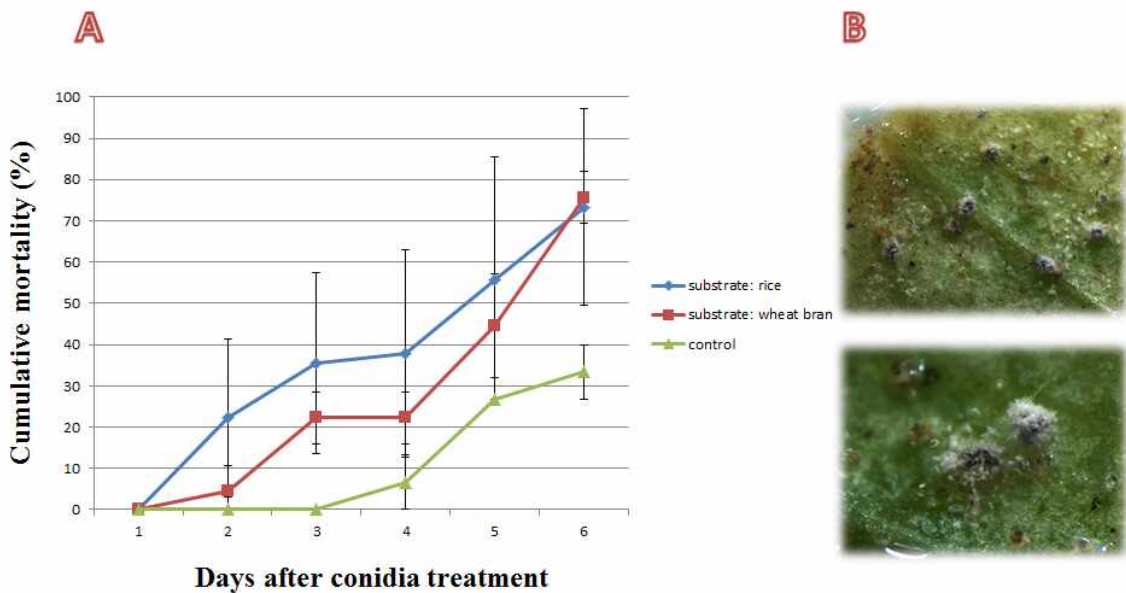


그림 21. *Paecilomyces lilacinus* HY-4 배지별 포자현탁액 처리에 따른 점박이응애 살비률 (A)과 곰팡이병증상으로 사멸한 점박이응애(B)

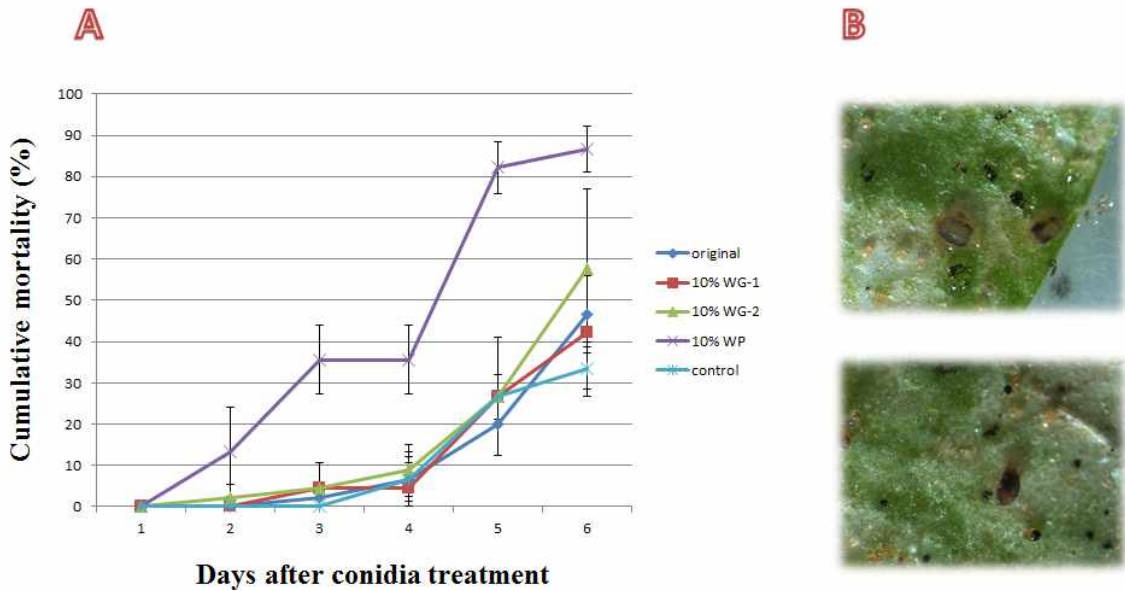


그림 22. *Metarhizium anisopliae* HY-2 배지별 포자현탁액 처리에 따른 점박이응애 살비를 (A)과 사멸한 점박이응애 (B)

(3) 복숭아혹진딧물에 대한 살충력 검정

1.5% agar가 포함된 90 mm petri dish에 60 mm로 잘린 배추 잎을 놓고, 그 위에 복숭아혹진딧물 성충 20마리를 조심스럽게 올려놓았다. 그 후 각 배양액에서 배양된 각 균주들의 포자현탁액 1 ml(1×10^7 conidia)을 SD spray tower를 이용하여 스프레이하여 생물검정하였다(3반복). 그 결과, 두 곤충병원성 곰팡이 모두 대조구와 유사한 살충력을 보임으로써 복숭아혹진딧물에 대한 살충력은 확인할 수 없었다(자료 미 제시).

(4) 담배가루이에 대한 병원성 검정

증류수로 적신 거즈가 얇게 깔린 90 mm petri dish에 담배가루이 2령 약충 20마리가 고착되어 있는 토마토 잎을 올려놓은 후, 각 배양액에서 배양된 각 균주들의 포자현탁액 1 ml(1×10^7 conidia)을 SD spray tower를 이용하여 스프레이하여 생물검정하였다(3반복). 그 결과, 두 곤충병원성 곰팡이 모두 대조구와 유사한 살충력을 보임으로써 담배가루이에 대해서도 병원성을 확인할 수 없었다(자료 미 제시).

(5) SD tower sprayer 효능 평가

배양액 및 균주에 따라 각기 다른 살충력이 확인됨에 따라 실험에 이용된 곰팡이 배양액의 실제 옆면 포자 낙하량을 비교 검정하였다.

- SD tower sprayer를 이용하여 서로 다른 배양액에서 배양된 각 균주의 활성포자를 생물검정에 이용된 동일한 양인 1 ml(1×10^7 conidia)로 스프레이 했을 시 면적당 떨어지는 활성포자량은 표 28와 같았다.

표 32. 각 배양액 및 균주의 활성포자수에 따른 면적(cm²)당 낙하 활성포자량

균주	표기명	활성포자수/cm ²
<i>Metarhizium anisopliae</i> HY-2	original	754
<i>M. anisopliae</i> HY-2	10% WG-1	-
<i>M. anisopliae</i> HY-2	10% WG-2	145
<i>M. anisopliae</i> HY-2	10% WP	-
<i>Paecilomyces lilacinus</i> HY-4	substrate: rice	870
<i>P. lilacinus</i> HY-4	substrate: wheat bran	2320

두 가지 곤충병원성 곰팡이 *M. anisopliae* HY-2와 *P. lilacinus* HY-4을 이용하여 3종의 해충에 생물검정한 결과, *M. anisopliae* HY-2 균주를 처리한 점박이용애 처리구는 무처리구와 비슷한 살비율을 보였으며, 곰팡이병증상으로 사멸한 점박이용애를 발견할 수 없어 *M. anisopliae* HY-2는 점박이용애에 대해 살충성이 낮을 것으로 판단되어졌다. 그리고 *P. lilacinus* HY-4 균주를 처리한 점박이용애 처리구는 실제 처리된 활성포자수가 낮음에도 불구하고 무처리구에 비해 높은 살비율을 보였으며, 사멸한 점박이용애 대다수가 곰팡이병증상을 나타냄에 따라서 *P. lilacinus* HY-4는 점박이용애를 생물학적으로 방제하는데 큰 도움이 될 것이라고 생각되어 더 자세한 제제화 실험에 이용 하였다.

다. 미생물 제제 패시포라의 활성 검정

(1) 곰팡이 제제의 포자 활성 검정

미생물제제 패시포라(Paecipora)(그림 23)의 활성포자량을 확인하기 위해서 제제 0.1 g을 0.05% tween-80 10 ml에 희석하여 현탁액을 만들고, 만들어진 현탁액의 포자량을 hemocytometer로 개수하여 포자의 함량을 계산하였다. 활성포자 확인은 현탁액을 희석하여 SDA 배지에 도말하여 생성되는 균총의 수로 활성포자의 수를 확인하였다.

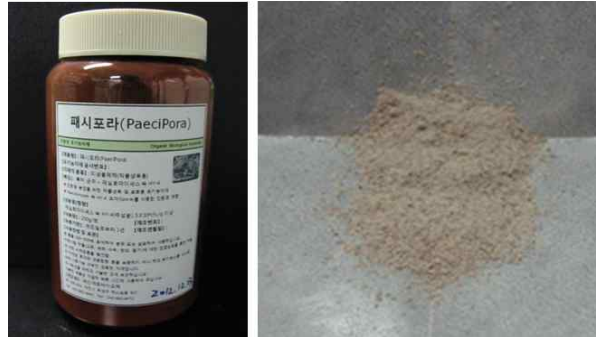


그림 23. 패시포라 (Paecipora) 제제

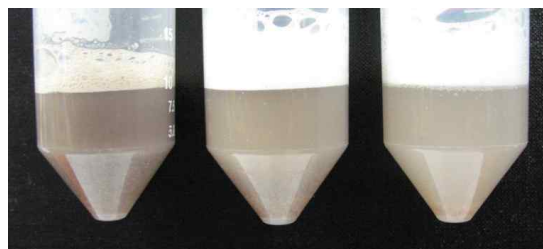
표 33. 시험제형의 활성 포자량

제제	균주	활성포자량
패시포라(Paecipora)	<i>Paecilomyces lilacinus</i> HY-4	$9 \pm 0.7 \times 10^8$ cfu/g

그 결과, 미생물제제 패시포라(Paecipora)의 활성포자량은 $9 \pm 0.7 \times 10^8$ cfu/g으로 기 제시된 농도(5×10^8 cfu/g이상)를 상회 하는 것으로 확인되었고(표 34), 생물검정에 앞서 미생물제제 패시포라(Paecipora)의 희석방법, 희석액의 예상되는 활성포자 농도 및 제제상태를 관찰하였다 (표 34, 그림 24, 그림 25).

표 34. 생물검정에 사용된 희석방법 및 희석액의 활성포자 농도

배수	사용된 제제 무게 (g)	사용된 0.05% tween 80 양(ml)	활성포자농도 (conidia/ml)
10배	1	10	9×10^7
50배	0.2	10	4.5×10^7
100배	10배 희석액을 10배 희석하여 사용함		9×10^6



(A) (B) (C)

그림 24. 미생물제제 패시포라(Paecipora)를 0.05% tween80에 10배(A) 50배(B) 100배(C) 희석하여 5분간 vortexing 한 상태

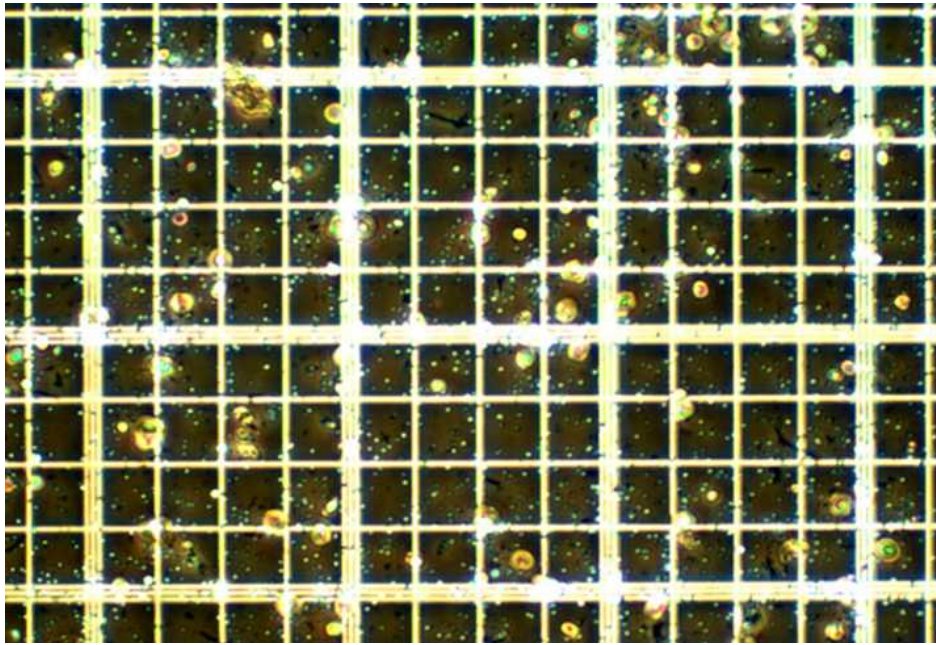


그림 25. 미생물제제 패시포라(Paecipora) 100배 희석액을 관찰한 결과

그 결과, 미생물제제 패시포라(Paecipora)는 0.05% tween 80에 쉽게 현탁되며(그림 5), 현미경 관찰 결과, 제제의 구성된 여러 물질들이 *P. lilacinus* HY-4 포자에 골고루 분포되어 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 25).

(2) 점박이용애 성충에 대한 병원력 검증

강낭콩 잎의 빠른 건조를 막기 위해 1.5% agar가 포함된 90 mm petri dish에 45 mm로 잘린 강낭콩 잎을 놓고, 그 위에 점박이용애 성충을 15~20 마리를 조심스럽게 올려놓고, 미생물제제 패시포라(Paecipora)(0.05% tween 80에 희석된 50배, 100배 희석액) 1 ml 을 SD tower sprayer를 이용하여 스프레이하여 생물검정하였다(3반복).

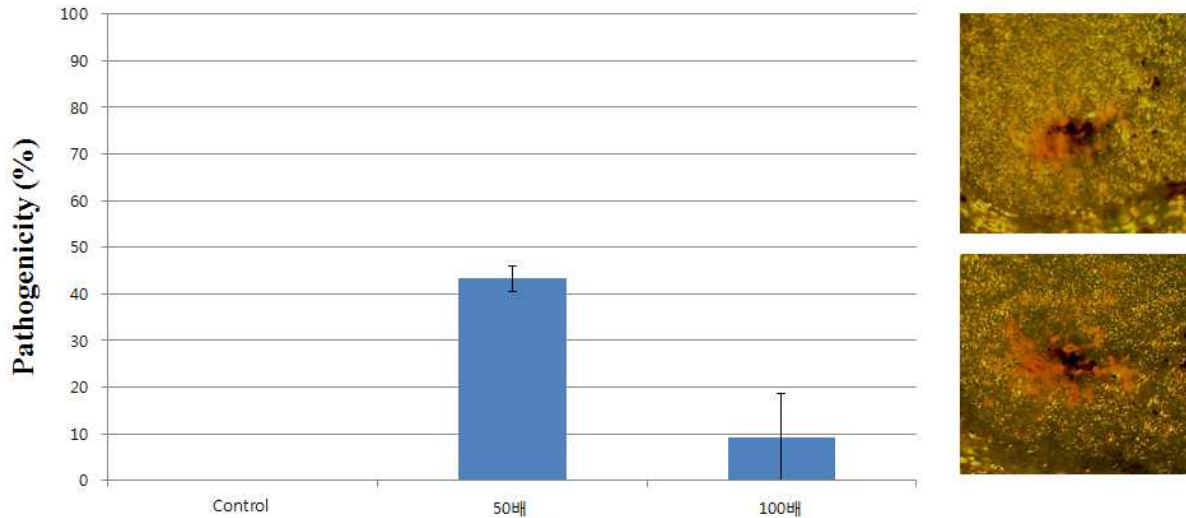


그림 26. 미생물제제 패시포라(Paecipora) 희석배율에 따른 점박응애에 살비률과 곰팡이병 증상으로 죽은 점박이응애

그 결과, 미생물제제 패시포라(Paecipora)는 control 대비 50배 처리구에서 약 40% 정도의 살비률을 보였다(그림 26).

(3) 점박이응애 알에 대한 병원력 검정

점박이응애 알에 대한 병원력 검정은 과습된 탈지면이 포함된 55 mm dish에 12 mm로 잘린 강낭콩 잎을 놓고, 그 위에 점박이응애 성충을 15~20 마리를 조심스럽게 접종하고 약 4시간 동안 산란을 유도 후 성충을 제거하였다. (한 처리구당 알의 숫자는 약 30개). 그 후, 미생물제제 패시포라(Paecipora) (0.05% tween 80에 희석된 50배, 100배 희석액) 1 ml 을 SD tower sprayer를 이용하여 스프레이하고 (3반복), 5일 뒤 부화된 유충 수를 관찰하였다. 그 결과, 미생물제제 패시포라(Paecipora) 처리구는 control 과 같이 약 90% 이상 부화율을 보였고, 부화되지 않은 알에서도 진균병 증상을 확인할 수 없었다. 결과적으로, 패시포라 제제는 점박이응애 알에 대해선 병원성이 없는 것으로 확인되었다.

(4) 미생물제제 패시포라의 해충에 대한 부착능

P. lilacinus HY-4 균주의 해충에 대한 살충성을 유추하기 위한 간접적인 방법으로 *P. lilacinus* HY-4의 원제를 목적 해충에 spray 후 포자의 해충에 대한 부착 여부를 주사전자현미경으로 관찰하였다. 1 ml(1.5×10^6 conidia)의 *P. lilacinus* HY-4 포자를 점박이응애와 복숭아혹진딧물 성충에 SD tower sprayer 를 이용하여 spray한 후 이를 fume hood에서 30분간 말렸다. 전자현미경 관찰을 위한 시료의 전처리는 2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde 가 포함된 용액으로 24시간 고정한 후, 유기용매 치환법으로 10, 20, 30, 50, 70, 90 및 100%의 ethanol로 차례로 30분간씩 통과시켜 탈수하였고, 탈수가 끝난 시료는 air dry 후 금으로 코팅하고 주사전자현미경(Carl Zeiss LEO-1530)으로 관찰하였다(Asensio 등, 2005).

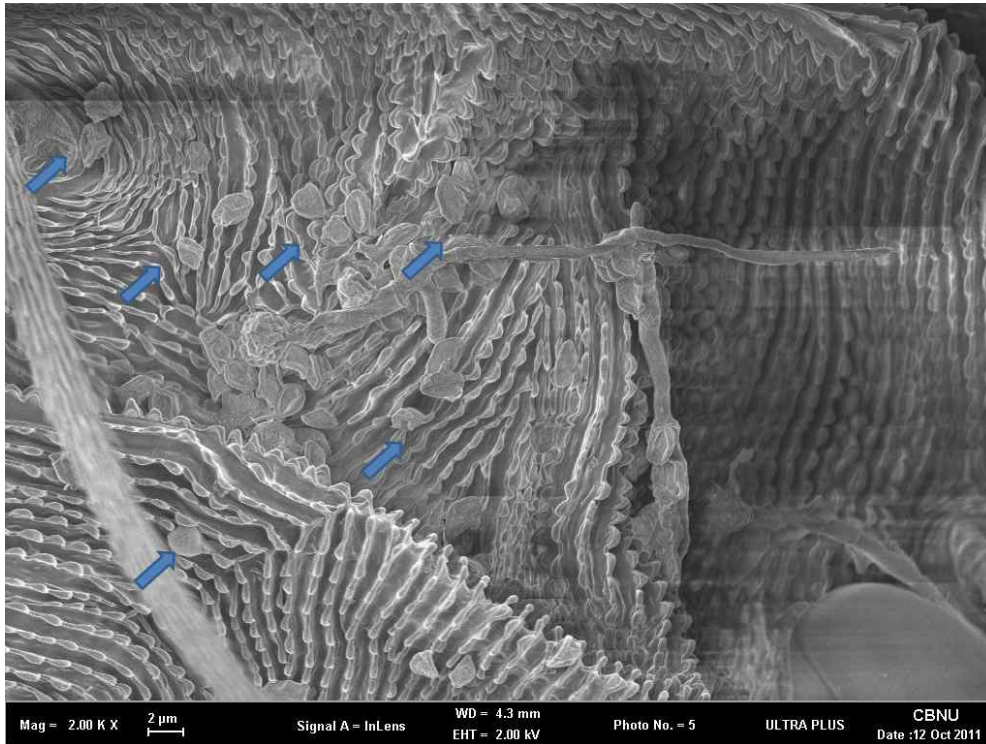


그림 27. *P. lilacinus* HY-4 균주 포자가 점박이응애 성충에 부착되어 있는 모습(화살표)을 주사전자현미경으로 관찰한 모습

그 결과, *P. lilacinus* HY-4 균주의 포자가 점박이응애 성충에 부착한 것을 확인할 수 있었고 (그림 27), 복숭아혹진딧물에서는 점박이응애와 같이 *P. lilacinus* HY-4 균주의 포자가 부착되어 있는 것을 확인할 수 없었다(자료미제시). 이러한 결과는 미생물제제 패시포라(Paecipora)가 복숭아혹진딧물에 병원성을 나타내지 못한 원인중의 하나로써 포자가 진딧물에 부착되지 못한 것이 원인일 가능성을 제시하는 것으로 여겨진다. 따라서, 목적 해충에 대한 부착능력을 향상시킬 수 있는 제형개발에 더욱 중점을 두고 진행하여야 할 것으로 판단된다.

라. 패시포라 제형에 따른 살충력 비교 검정

(1) 점박이응애에 대한 살충력 검정

주관과제에서 패시포라를 수화제, 유제 및 오일제 형태로 각각 제형화한 시료(그림 28)를 이용하여 제제를 50배, 100배, 200배 및 500배로 각각 희석하여 점박이응애에 대한 생물검정을 실시하였다.



그림 28. 패시포라 제제 (수화제, 유제, 오일제)

점박이 응애 생물검정은 강낭콩 잎의 빠른 건조를 막기 위해 증류수로 적신 탈지면을 깔고, 90 mm petri dish에 60 mm로 잘린 강낭콩 잎을 놓은 뒤, 그 위에 점박이응애 성충 10~15 마리를 조심스럽게 올려놓았다. 그 후 패시포라 각 제제를 희석배수에 맞춘 뒤(표 35), 1 ml 씩 SD tower sprayer 를 이용하여 스프레이 방법으로 생물검정하였다(3반복)(그림 29).

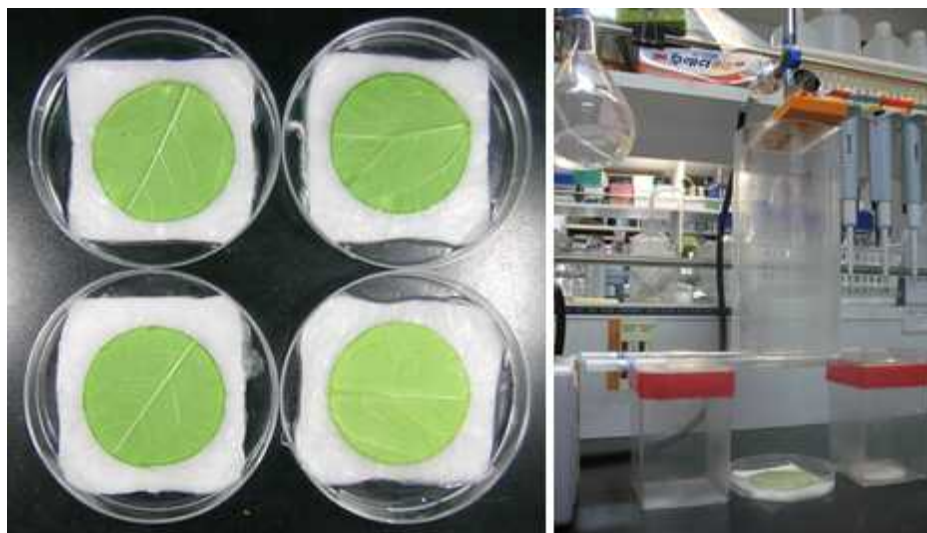


그림 29. 생물검정에 사용한 leaf disk와 SD tower sprayer 을 사용하여 접종하는 모습

표 35. 생물검정에 사용된 희석방법

제제 유형	배수	사용된 제제 양 (g or ul)	사용된 증류수 양 (ml)
수화제	50배	0.2	10
	100배	0.1	10
	200배	100배 희석액을 2배 희석하여 사용함	
	500배	50배 희석액을 10배 희석하여 사용함	
유제	50배	200 ul	9
	100배	100 ul	9
	200배	100배 희석액을 2배 희석하여 사용함	
	500배	50배 희석액을 10배 희석하여 사용함	
오일제	50배	200 ul	9
	100배	100 ul	9
	200배	100배 희석액을 2배 희석하여 사용함	
	500배	50배 희석액을 10배 희석하여 사용함	

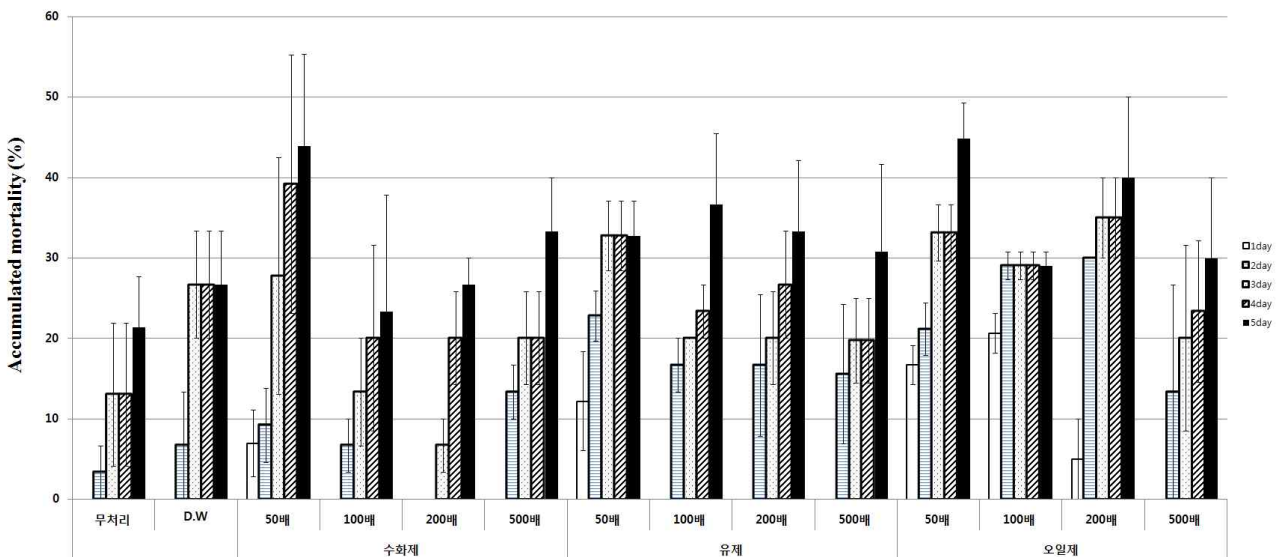


그림 30. 패시포라 각 제형에 대한 생물검정 결과

그 결과, *P. lilacinus* HY-4의 3가지 제제 중에서 오일제가 가장 좋은 살비성을 보였고(그림 30), 그 후 처리구 사충으로부터 2차 감염이 가능한 포자가 생성되는지를 확인하기 위해 습실 처리하여 25°C 암조건에 보관 후 관찰하였다.

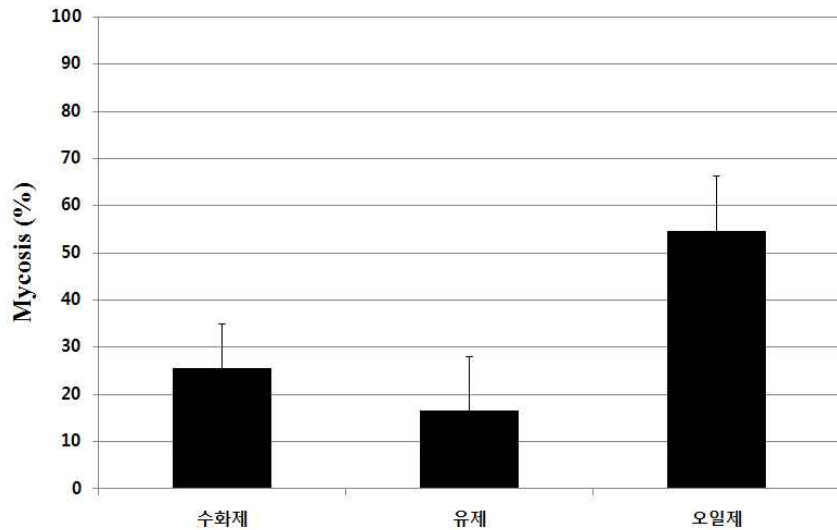


그림 31. 패시포라 각 제형에 대한 mycosis 발생률



그림 32. 패시포라에 의해 사멸한 점박이응애

그 결과, 각각의 제제에서의 진균병 발생율은 실제 살비율과 동일하게 오일제에서 높게 나타났으며(그림 31), 사충의 모습도 전형적인 곰팡이 사충의 모습을 보이는 것을 관찰할 수 있었다(그림 32).

이상의 결과로, *P. lilacinus* HY-4를 이용한 패시포라의 수화제, 유제, 오일제 3가지 제형을 이용한 점박이응애 방제는 오일제가 살비율이 가장 높게 나타났으며, 2차 감염이 가능한 진균병정도 오일제에서 가장 높게 나타남에 따라, 점박이응애 방제를 위한 패시포라의 제형은 오일제가 가장 효율적으로 판단되었다. 이러한 곤충병원성 곰팡이를 이용한 제제는 현재 전 세계적으로 약 171개의 상품이 다양한 균주를 이용하여 생산되어 이용되고 있으며, 균주의 특성과 목적 해충의 특성에 맞게 수화제, 유제, 오일제 등으로 제조되고 있다(de Faria & Wraight, 2007). 비록 본 실험에서 점박이응애에 대해 약 50%의 살비율을 보였지만 이는 제제 1 ml을 사용한 결과이며, 실제 농가에서 사용시 약량이 높게 처리되기 때문에 패시포라 *P. lilacinus* HY-4의 제형은 실제 점박이응애 방제에 큰 효과를 줄 것으로 기대된다. 또한 본

연구에서 다양한 제제로 개발된 *P. lilacinus* 균주는 *Beauveria bassiana* 와 *Metarhizium anisopliae* 균주와 마찬가지로 해충 방제에 널리 이용되는 곤충병원성 곰팡이이며, 곤충이외에 선충류, 응애류, 진딧물 등 다양한 무척추동물에 대하여 넓은 기주 범위를 가진다고 알려져 있다(Fiedler & Sosnowska, 2007). 따라서 현재 본 연구에 사용된 *P. lilacinus* HY-4 균주는 점박이응애만을 대상으로 친환경방제제로서의 연구를 진행하였지만, 다른 다양한 해충에 적용시켜 그 기주 범위를 확인한다면 점박이응애 뿐만 아니라 동시에 여러가지 해충 방제에 이용할 수 있을 것으로 기대되어진다.

6. 친환경유기농자재 목록공시

가. 시험 제형의 포장 비해 시험

Paecilomyces sp. HY-4 균주를 이용한 시험제형 ‘패시포라’의 친환경유기농자재 목록공시를 위하여 5종 이상의 작물에 대한 비해 시험을 수행함. 시험작물은 고추(금관고추), 배추(만풍배추), 수박(귀공자수박), 참외(금관참외), 그리고 딸기(매향)로 선정하였고, 희석배수는 추천량(100배)과 배량(50배)의 농도로 희석하여 유모기 경엽살포 방법에 따라 5반복 수행하였다. 비해 시험은 4회에 걸쳐 비해 유무를 판단 조사하였고, 해당 시험은 공인인증기관인 식물보호연구소(경기도 김포 소재)에 의뢰하여 진행하였다(표 36, 37).

표 36. 비해 시험 처리 조건

제제명	유효성분 함량	처리시기 및 방법	희석배수	
			추천량	배량
<i>패실로마이세스</i> 리라시누스 HY-4 수화제 (패시포라)	5.0×10^8 cfu/g	유모기 경엽살포	100배	50배

표 37. 비해 시험 판정 결과

작물	품종	비해정도 (0~9)		비해판정
		추천량	배량	
고추	금관고추	0	0	비해없음
배추	만풍배추	0	0	비해없음
수박	귀공자수박	0	0	비해없음
참외	금관참외	0	0	비해없음
딸기	매향	0	0	비해없음



시험현장



금관고추



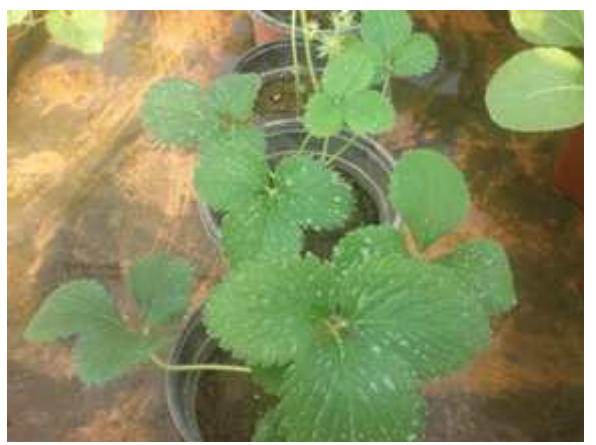
만풍배추



귀공자 수박



금관 참외



매향 딸기

그림 33. 패시포라(Paecipora)의 작물 비해서험 현장

상기의 비해 시험 결과를 바탕으로 패실로마이세스 리라시누스 HY-4 수화제(패시포라)의 친환경유기농자재 목록공시를 신청하였으며, 약제방제 효능 평가 및 추가 제형의 안정화를 통한 유기농자재 등록을 추진하였다.

가. 오이 점박이응애 억제방제 효과시험

생물학적 제제를 이용한 유기농자재의 억제효능에 대한 품질인증을 받기 위해서는 제형의 안정화와 타 작물에 대한 비해 시험, 억제효능 시험 등의 많은 자료를 요구하고 있다. 또한, 농업환경에서의 효능을 안정적으로 유지하기 위해서는 많은 현장평가가 필요함. 실험실규모에서의 살충효과를 현장에서 그대로 나타내기 위해서는 다양한 제형에 대한 검토가 필요하고, 약효 및 약해시험을 통한 안정한 제형을 찾아내기 위해서 억제방제 시험 (주)한국식물환경연구소에 의뢰하여 수행하였다.

1차 시험제형을 점박이응애(*Tetranychus urticae*)에 대한 효능을 검토하기 위하여, 오이(백다다기)를 작물로 하여 평가를 수행함. *Paecilomyces* sp. HY-4 균주를 이용한 시험제형 ‘패시포라’를 표 38의 방법에 따라 약효 및 약해 시험을 수행하였으며, 경종방법에 있어서는 표.와 같이 수행하였고, 약효 및 약해 3반복으로 각각 진행함. 약효시험은 3회에 걸쳐 억제처리 전 및 억제처리 3, 7일 후 구당 50엽에 대한 생충수를 조사하였고, 약해시험은 3회에 걸쳐 억제처리 3, 5, 7일 후 경엽에 대한 약해유무를 조사하였다 (표 39).

표 38. 패시포라(Paecipora)의 약효 및 약해시험 처리조건

시험약제 (상표명)	주성분 함량 (%)	약효시험		약해시험	
		희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법	기준량	배량
패실로마이세스 리라시누스 HY-4 (패시포라)		100배	한 잎당 2~3마리 발생시 경엽처리 (6.15)	100배 (6.15)	50배 (6.15)
아조사이클로틴 수화제 (대조)	25	1,500배	”	-	-
무처리	-	-	-	-	-

표 39. 대상 작물의 경종 방법

재배방법	설치시설	정식시기	이랑폭 (cm)	재식거리 (cm)
시설재배	양액관수	3월 15일	120	15×15

농약등록시험 기준과 방법에 의거, 오이 점박이응애 억제방제 효과시험의 억제처리 후 무처리구 생충수 50개체 이상의 기준에 따라 공시약제에 대한 실용성을 평가했으며, 본 시험에서 억제처리 7일 후 무처리구 평균 발생밀도가 278.3 개체로 약제를 평가하기에 충분한 조건이다. 본 시험을 종합한 결과, 시험약제인 패실로마이세스 리라시누스 HY-4(상표명: 패시포라)의

오이 점박이응애에 대한 방제효과가 약제처리 3일 후 56.0%, 7일 후 53.6%로 나타났으며, 기준량 및 배량에서 약해가 나타나지 않았다. 따라서 시험약제인 패시포라(상표명)는 오이 점박이응애에 대해 작물충해관리용 친환경유기농자재로써 실용성이 있다고 판단된다(표 40, 41, 42, 그림 34).

표 40. 오이 점박이응애에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 3일차)

시험약제	약제처리전 밀도 (마리/구)	생충률(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
패실로마이세스 리라시누스 HY-4 (패시포라)	263.3	43.5	37.7	61.6	47.6	b	56.0
아조사이클로틴 수화제 (대조)	272.0	8.2	8.5	9.8	8.8	a	91.9
무처리	247.0	105.7	102.7	116.2	108.2	c	-

표 41. 오이 점박이응애에 대한 약제방제 효과(약제처리 후 7일차)

시험약제	약제처리전 밀도 (마리/구)	생충률(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균		
패실로마이세스 리라시누스 HY-4 (패시포라)	263.3	54.9	44.7	57.9	52.5	b	53.6
아조사이클로틴 수화제 (대조)	272.0	11.3	4.4	7.5	7.7	a	93.2
무처리	247.0	108.4	108.9	122.1	113.1	c	-

표 42. 오이에 대한 약해시험(약제처리 후 3, 5, 7일차 조사)

시험약제	시험작물	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
패실로마이세스 리라시누스 HY-4 (패시포라)	오이(백다다기)	0	0	약해없음



시험포장 전경



약제처리 7일 후 무처리구



약제처리 7일 후 공시약제 처리구



약제처리 7일 후 대조약제 처리구

그림 34. 패시포라(Paecipora)의 오이 점박이응애 시험 현장

7. 친환경유기농자재 시험제형을 이용한 포장시험 수행

패실로마이세스 속 HY-4 균주를 이용한 시험제형(패시포라)의 딸기 점박이응애, 진딧물 등에 대한 효능을 검토하기 위하여 충남 논산시 부적면에 위치한 시설하우스를 임차하여 2013년 2월 4일부터 4월 30일까지 12주 동안 포장 시험을 수행하였다.

논산 지역에서 재배되는 품종은 장희(아끼히메)를 모본으로 하고 육보(레드필)을 부분으로 1998년에 육성하여 농가실증 결과 세력이 우수, 다수 및 대과성 등의 우수성이 인정되어 2005년 12월 품종심의회 의하여 설향(雪香, Seolhyang)으로 명명되었다.

해당 품종은 축성재배에 적합하고, 뿌리 발달이 좋으며, 저온 신장성이 우수한 특징을 가지며, 흰가루병에 매우 강하며 친환경재배에 매우 적합하여 논산농업기술센터의 지도를 통하여 논산 지역에 주로 재배되고 있다(그림 35).



[논산 딸기농장 사진 1]



[논산 딸기농장 사진 2]



[설향 1]



[설향 2]

그림 35. 논산 시설하우스 포장 시험 현장

시험제형은 수화제(WP, wettable powder), 유탁제(ES, emulsifiable suspension)-1, 2 세가지를 사용하였고 활성 포자수는 $1.0 \times 10^9 \sim 2.0 \times 10^9$ cfu/ml로 하여 200배 희석하여 주 1회, 경엽처리하였고, 대조구는 무처리구(p-control)와 물(n-control)로 나누어서 처리하였다 (표 43, 그림 36).

표 43. 패시포라의 포장 시험을 위한 시험 제형의 처리방법

시험제형	주성분 함량(%)	활성포자수 (cfu/ml 이상)	희석배수	처리시기 및 방법	비고
WP (Wettable powder)	10.0	2.0×10^9	200 배	주 1회, 경엽처리	
ES-1 (Emulsifiable suspension-1)	5.0	1.0×10^9	200 배	주 1회, 경엽처리	
ES-2 (Emulsifiable suspension-1)	5.0	1.0×10^9	200 배	주 1회, 경엽처리	

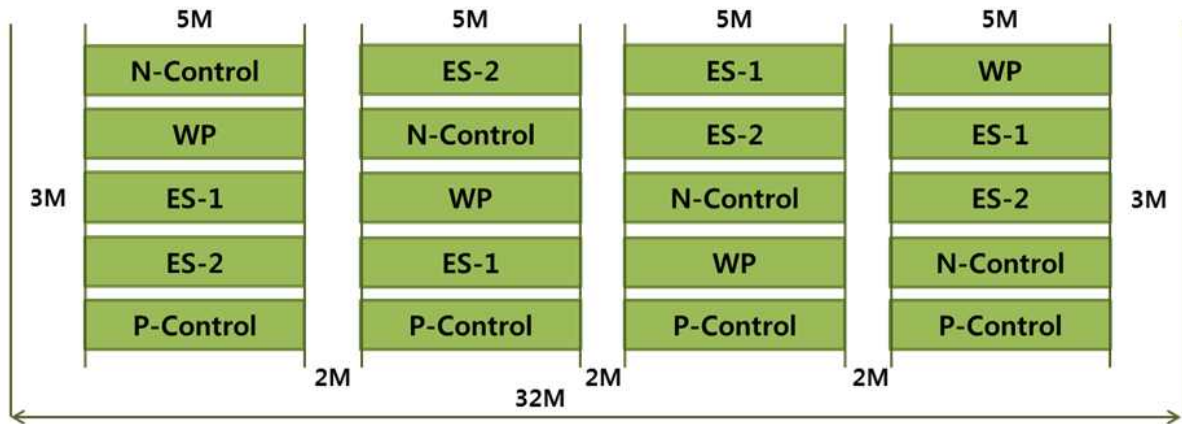


그림 36. 포장 시험을 위한 시험구의 배치 및 난괴법(4반복)

시설하우스를 이용한 현장평가는 각각의 주차별로 작물의 비해시험을 위하여 개화수와 열매 수를 측정하였고, 진딧물과 응애 등의 해충발생 현황을 표본조사하였다. 현장의 온도는 20°C로 조절되고 있었으나, 실제 현장에서 측정한 결과 주간 최대 온도는 18~34°C로 큰 차이를 나타내었고, 습도역시 35~65% 내외로 측정되었다.

실험 3주차부터 해충이 발생하기 시작하였고, 초기 온도는 18°C내외 습도 65%를 유지하였으나, 3월 이후에는 최대 34°C, 습도 35% 내외로 일조량에 따른 해충 발생에 적합한 환경이었다. 해충은 잎 뒷면의 해충개수를 직접 표본조사하는 방식으로 진행하였고, 결과는 ANOVA 분석(SPSS) 시스템을 이용하여 효능을 분석하였고 신뢰수준은 $P < 0.05$ 이하 (Sig. =0.001)의 결과를 나타내었다(그림 37, 38, 표 44, 그림 39).

각각의 제형별 효능에 있어서는 대조구 대비 수화제는 유의적인 차이를 나타내지 못하였으나, 유탁제의 경우는 우수한 효능을 확인할 수 있었다. 수화제는 온도 및 습도 환경이 열악한 환경에서 제형의 안정성이 떨어지는 것을 확인하였고, 유탁제는 제형의 안정화로 인하여 고온과 저습의 열악한 환경에서도 우수한 살충효능을 나타내었다. 이와 같은 결과는 미생물제제의 특

성상 제형의 안정화가 제품의 품질과 효능에 중요한 요소임을 확인하게 하였고, 이번 유탁제의 제형 안정성을 입증하는 것으로 판단된다.

1주차



3주차



그림 37. 주차별 시설하우스 포장 시험 현장(1~3주차)

5 주차



7 주차



9 주차



11 주차



무처리구

유타제 처리구

그림 38. 주차별 시설하우스 포장 시험 현장(5~11주차)

표 44. 시험제형별 해충발생 빈도표

	Time (weeks)	Control	WP	ES-1	ES-2
BLOCK 1	3	0	0	0	0
	7	0	3	0	0
	9	15	3	0	7
BLOCK 2	3	0	0	3	1
	7	7	6	9	15
	9	48	54	11	27
BLOCK 3	3	9	0	0	0
	7	60	37	18	32
	9	60	60	18	24
BLOCK 4	3	13	42	7	18
	7	60	60	7	38
	9	60	60	17	27

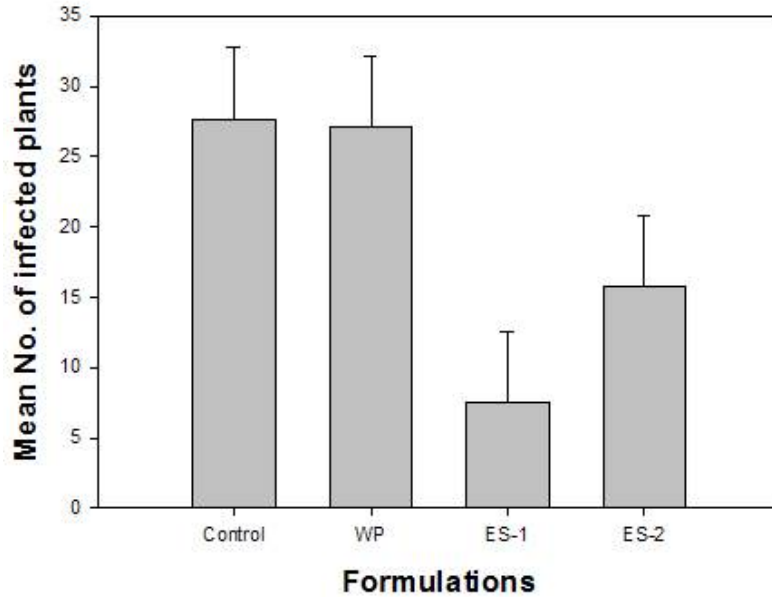


그림 39. 시험제형별 효능 분석 결과(ANOVA analysis)

가. 실험실내에서의 살충효능 분석

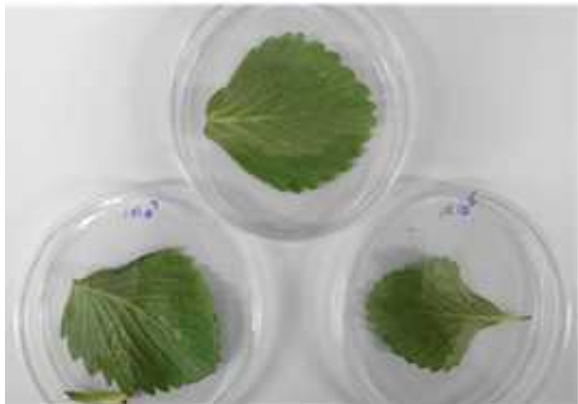
시설하우스에서 확보한 해충에 감염된 딸기 잎을 이용하여 실험실 내에서 해충에 대한 살충력을 분석하였다. 감염된 잎에서 분리한 진딧물 유충을 각각의 실험군에 102개가 되도록 점적한 다음, 수화제와 유탁제 각각의 활성포자 농도에 따라 분무하였다. 시험제형의 처리후, 대조구와 실험 20℃, 65%의 습도에서 매일 사충의 개수를 측정하였다 (그림 40).



A. 시설하우스의 감염된 딸기 잎
(Infected strawberry leaves from greenhouse)



B. 진딧물 유충 선별
Aphid larvae of the same age were selected.



C. 유기농자재 농도별 분무
(Different concentration of PaeciPora)



D. 분무 6일후 사충 효과
(Infection pictures after 6 days)

그림 40. 실험실내에서의 각각의 제형별 사충효능 분석

각각의 제형별, 농도별 사충활성은 활성포자 그 자체로 분무하였을 경우보다, 제형화를 통한 안정화 시료가 높은 효능을 나타내었고, 특히 유탁제의 효능이 우수한 것을 확인하였다. 활성포자만을 분무한 경우 6일 동안 최대 37마리의 진딧물이 죽었고, 수화제는 1.0×10^7 cfu/plate 이상의 농도에서 4일부터 50% 이상의 살충효능을 나타내었다. 유탁제는 1.0×10^6 cfu/plate의 농도에서 4일만에 50% 이상, 1.0×10^7 cfu/plate의 농도에서는 2일만에 50% 이상, 4일만에 100% 살충효능을 나타내었고, 1.0×10^8 cfu/plate의 농도에서는 1일만에 50%, 3일만에 100% 살충효능을 나타내었다 (그림 41, 표 45).

진딧물이나 응애의 경우에는 농장에서 발병후 급속도로 확산되는 특징을 가지고 있으며, 약제

에 대한 내성도 강하기 때문에, 화학제를 처리하는 경우에도 농도와 종류를 달리하여 집중방제하여야 하는 난방제 해충이다. 따라서, 유약제의 높은 활성은 해충발병시에 집중처리하여 그 살충효능을 극대화할 수 있을 것으로 판단된다.



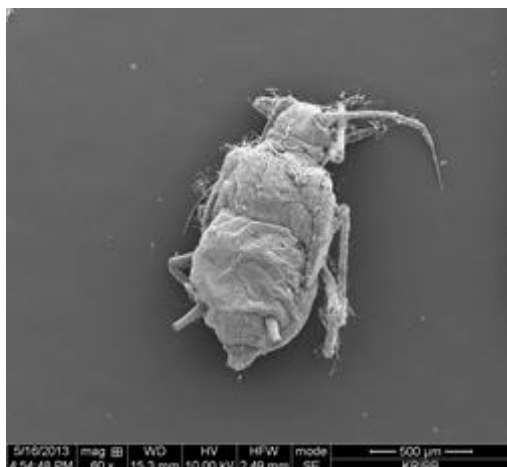
그림 41. 패실로마이세스 속 HY-4 균주에 감염된 진딧물

표 45. 각각의 제형의 활성포자의 농도별 사충효능

Formulation	Concentration (cfu)	Number of death (102 aphids/treatment)					
		1d	2d	3d	4d	5d	6d
Control	H ₂ O	0	0	2	4	5	5
ES (Emulsifiable suspension)	1.0×10 ⁸	58	89	102	102	102	102
	1.0×10 ⁷	38	51	84	102	102	102
	1.0×10 ⁶	14	25	38	57	67	72
WP (Wettable powder)	1.0×10 ⁸	17	24	42	61	65	68
	1.0×10 ⁷	11	13	25	53	54	57
	1.0×10 ⁶	7	8	15	24	33	37
Aerial conidia	1.0×10 ⁸	16	16	23	28	36	37
	1.0×10 ⁷	12	12	15	22	33	35
	1.0×10 ⁶	5	5	6	7	15	31

시험제형을 이용하여 살충효능을 분석하고 사충 시료를 이용하여 곰팡이 감염유무를 전자현미경으로 관찰하였다. 분리한 사충시료를 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde(4℃, phosphate buffer, pH 7.2) 고정액에서 2시간 전고정하고, 완충액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)으로 10분씩 3회 세척한 후, 1% OsO₄(25℃, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)에서 2시간 동안 후고정하였다. 고정이 끝난 재료는 동일 완충용액으로 수회 세척한 후, ethanol 농도 상승순으로 탈수시켜 isoamyl acetate로 치환하고 critical point dryer로 건조시킨 후, SC502 sputter coater를 이용하여 20 nm 두께로 도금한 후, 한국생명공학연구원내에 설치되어있는 FEI Quanta 250 FEG(FEI, USA) 주사전자현미경으로 10 kV에서 관찰하였다.

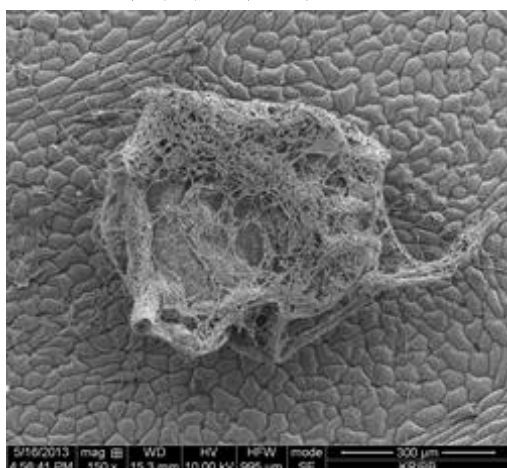
사진 관독 결과, 감염초기(1~2일) 사충은 표면에 균주의 군사가 자라고 있는 것을 확인 할 수 있었고, 감염 4일 이후의 시료는 사충 표면 전체를 군사가 뒤덮고 있는 것을 확인할 수 있었다 (그림 42).



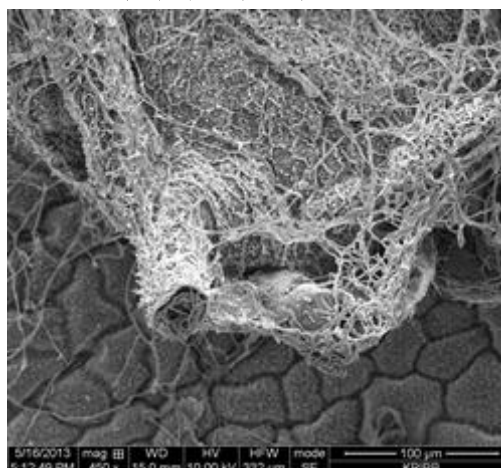
곰팡이 감염 사충사진 1 (60X)



곰팡이 감염 사충사진 2 (150X)



곰팡이 감염 사충사진 3 (150X)



곰팡이 감염 사충사진 4 (450X)

그림 42. 패실로마이세스 속 HY-4 균주가 감염된 진딧물 사충의 전자현미경 사진

곰팡이 감염 사충사진 1과 2는 사충의 분리 사진, 곰팡이 감염 사충사진 3과 4는 딸기 앞에서 사충사진

8. ‘패시포라’의 독성시험

친환경유기농자재 시험제형을 이용하여 ‘농촌진흥청고시 제 2010-29호(2010. 10. 13)’에 준하여 독성시험을 실시하였다.

가. 마우스 급성독성시험

(1) 마우스 급성경구독성 시험

공인기관인 한국생물안전성연구소에 의뢰하여 급성경구독성시험을 위하여 ICR 계통의 마우스를 공시하여 1회 경구투여한 후 14일 동안 관찰하였다. 기초시험의 투여약량 수준인 2,500 mg/Kg에서 치사동물은 없었다. 또한 일반중독증상은 관찰되지 않았고, 부검소견에서도 특이한 증상이 없었다. 분석결과, 암·수 모두에 대하여 LD₅₀ 값은 2,500 mg/Kg 이상으로 농약관리

법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되었다.



공인기관인 한국생물안전성연구소에 의뢰하여 급성경피독성시험을 위하여 S.D. 계통의 마우스를 공시하여 1회 약제 처리후 14일 동안 관찰하였다. 기초시험의 투여약량 수준인 2,000 mg/Kg에서 암수 각 한 마리의 치사가 있었다. 또한 일반중독증상은 관찰되지 않았고, 부검소견에서도 특이한 증상이 없었다. 분석결과, 암·수 모두에 대하여 LD₅₀ 값은 2,500 mg/Kg 이상으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되었다.

제 출 문

시험물질 : 패시포라
시험제목 : 패시포라에 대한 급성경피독성시험



상기 독성시험을 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제 2010-29호, 2010. 10. 13)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

1. 요약 (Summary)

패시포라에 대한 급성경피독성을 헥스(S.D,계통)를 공시하여 1회 약제 처리후 14일동안 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 기초시험의 처리약량수준인 2,000 mg/kg에서 양수 각 한 마리의 치사가 있었다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 양수 모두에서 3일째까지 감소를 보였으나 7일째부터는 회복되어 증가추세를 보였다.
- 부검소견은 처리약량 2,000 mg/kg에서 특이한 증상은 없었다.

이상의 시험결과, 본시험에서 각 장기에 미치는 영향은 없는 것으로 사료되었으며 수컷과 암컷 모두에 대한 LD₅₀값은 2,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)에 해당되었다.

2011년 06월 29일
 (주) 한국생물안전성연구소 
 운영책임자 이 

나. 잉어 급성 어독성시험

(1) 잉어 급성 어독성시험

‘패시포라(PaeciPora®)’의 잉어(*Cyprinus Carpio*)에 대한 급성어독성시험을 공인기관인 한국생물안전성연구소에서 실시하였다. 96시간 동산 치사수와 일반중독증상을 조사한 결과, 특이증상은 관찰되지 않았다. 따라서, 본 시험물질의 48시간 및 96시간 반수치사농도(LC₅₀)는 모두 10 mg/l 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 III급으로 분류되었다.

제 출 문

시험물질 : 패시포라
 시험제목 : 패시포라의 잉어에 대한 급성어독성시험

상기 독성시험을 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제 2010-29호, 2010. 10. 13)에 준하여 실시하고 그 결과를 다음과 같이 제출합니다.

2011년 06월 28일
 (주) 한국생물안전성연구소 독성연구부
 운영책임자 이혜영

요 약 (Summary)

패시포라의 잉어(*Cyprinus Carpio*)에 대한 급성어독성시험을 96시간 동안 실시하여 치사수와 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 건강을 조사한 결과는 다음과 같다.

농도 (mg/l)	잉어수 (마리)	누적치사수(마리)			
		24h	48h	72h	96h
10.0	10	0	0	0	0
용량대조구		0	0	0	0

- * 일반중독증상 및 다른 특이증상은 관찰되지 않았다.
- * 체중은 평균 2.01 ± 0.10 g, 경장은 평균 4.96 ± 0.15 cm 이었다.
- * pH는 평균 6.99(최저 6.61 - 최고 7.36), DO는 평균 6.90 mg/l(최저 5.8 - 최고 7.9) 이었다.
- * 시험기간의 평균 수온은 22.2 ± 0.12 °C(최저 22.1°C - 최고 22.4°C)이었다.

이상의 시험결과, 본 시험물질의 잉어에 대한 48시간 및 96시간 반수치사농도(LD₅₀)는 모두 10 mg/l 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 III급으로 분류되었다.

다. 꿀벌 급성접촉독성시험

(1) 꿀벌 급성접촉독성시험

‘패시포라(PaeciPora®)’의 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험을 공인기관인 한국화학융합시험연구원에서 실시하였다. 48시간 동안 약량당 노출꿀벌 30마리에 대한 치사수 및 일반중독증상을 관찰, 조사하였다. 시험약량은 유효성분기준으로 100 μ g.i./bee의 설정약량(normal dosage)로 하여 시험을 실시한 결과 일반중독증상 및 특이증상은 관찰되지 않았다. 따라서, 본 시험물질의 48시간 반수치사농도(LD₅₀)는 10 mg/l 이상으로 확인되었다.



최종보고서

TBH-0810

패시포라

패시포라의 꿀벌 (*Apis mellifera*) 급성접촉독성시험

한국화학융합시험연구원



1. 요약 (Summary)

패시포라의 꿀벌 (*Apis mellifera*) 급성접촉독성시험을 48시간 동안 실시하였다. 약량당 노출공법 30마리에 대한 처사수 및 일반중독증상을 관찰, 조사한 결과는 다음과 같다.

- 본 시험은 농촌진흥청 고시 제2012-13 호 (2012-02-07) 농약 및 원제의 등록기준, [별표13] 환경생물 독성 시험기준과 방법, 13-1-4-1. 급성접촉독성시험에 따라 수행되었다.
- 시험약량은 유효성분기준으로 100 $\mu\text{g a.i./bee}$ 의 설정약량 (nominal dosage)로 하여 시험을 실시하였다.
- 시험약량에 대한 별도의 분석은 시행하지 않았다.
- 시험의 결과는 아래와 같다.

Observation time	LD ₅₀ ¹⁾ ($\mu\text{g a.i./bee}$)	95 % confidence interval ($\mu\text{g a.i./bee}$)
24 h	>100	-
48 h	>100	-

1) Median lethal dosage, based on nominal dosage of active ingredient.

- 시험기간 중 음성대조군 및 약제저리군에서 일반중독증상 및 특이증상은 관찰되지 않았다.
- 실온은 평균 25.0 $^{\circ}\text{C}$ (23.3 $^{\circ}\text{C}$ - 27.4 $^{\circ}\text{C}$)로 측정되었다.
- 상대습도는 평균 73.0 % (51 % - 88 %)로 측정되었다.

이상의 시험결과 본 시험물질의 48시간-LD₅₀값은 100 $\mu\text{g a.i./bee}$ 이상으로 확인되었다.

제 2 절. 길항 미생물을 이용한 식물병 방제용 차세대 미생물 소재 개발 (제 2핵심 연구과제)

<연구 내용 및 방법>

과제 구분	과제 명	연구 내용 및 방법	
제2 핵심 1 세부	신규 길항 내생 세균을 이용한 새로운 살균 소재 개발	신규 세균의 대량 생산을 위한 배지 성분 및 조건 등 생산 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 분리된 후보 미생물 중 신규 세균 및 우수 활성 세균 선정 • 길항 미생물 조합의 배양기내 대사물질 효능 확인 • 내구성을 증진하는 포자 및 균체의 대량 생산을 위하여 배지 성분 및 배양 조건 결정
		세균의 안정성과 방제효과를 높이기 위한 최적 제형 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 미생물에 적합한 처리 방법 별 제형 소재 선별 • 미생물의 안정성을 높이기 위한 최적 제형 개발 • 제형내 미생물 생존율 조사
		시제품의 병 방제 효과 조사(온실, 포장 시험)	<ul style="list-style-type: none"> • 최소 3개 지역 포장에서 대상 식물병(역병, 흰가루병, 탄저병)에 대한 약효, 약해 조사 • 토양병에 대한 포장 방제효과 조사
		시제품의 독성 및 안전성 조사	<ul style="list-style-type: none"> • 생물농약 등록시 필요한 독성 시험(급성 경구, 경피, 안점막, 어독성, 꿀벌 독성 등) • 제품, 원제의 이화학성, 유해물질 분석 • 미생물의 경시변화 조사 • 농촌진흥청 지정 시험기관에서 수행
		미생물의 살균 작용기작 연구	<ul style="list-style-type: none"> • 미생물의 살균 활성, 유도저항성 및 기타 활성 여부 조사 • 미생물의 물질 생산 관련 유전자 분석 • 미생물의 생육촉진 효과 조사
		선발 미생물이 생산하는 향균물질의 분리 및 구조 결정	<ul style="list-style-type: none"> • 순수 분리 및 spectroscopy 이용 화학구조 결정 • 관련 유전자 분리 및 분석

과제 구분	과제 명	연구 내용 및 방법	
제2 핵심 2 세부	길항 미생물을 이 용한 신규 식물병 방제제 개발	미생물 안정성과 방제효 과 증대를 위한 nano & micro encapsulation 제조 (제품화 제형 개발)	<ul style="list-style-type: none"> • 안정성과 방제효과 증대를 위한 microencapsulation 제형 개발 • 분자량 조절을 통한 나노 및 마이크로 입자 조절 • Outer shell & Inner shell material 선별 • 미생물 Encapsulation efficacy 및 adsorption rate 결정 • Encapsulation 방법에 따른 microorganism stability 측정
		미생물 방제효과 증대를 위한 microsphere 제조 및 신 제형 시제품 효능 포장 실험	<ul style="list-style-type: none"> • Attrition mill을 이용한 chitosan, alginate microsphere 제조 • 미생물 안정성 증대를 위한 미생물 함유 minigranule 제조 • Minigranule 함유 완제품 제형의 미생물 안정성 검증 • Attrition mill에 의한 microsphere 시제품 작물 성장 평가 시험
		친환경 유기농자재 제품 공시를 위한 현장실험	<ul style="list-style-type: none"> • 흰가루병 및 진딧물등 살충제제의 효능 검증을 위한 30개 농가에서 오이, 딸기, 토마토등 다양한 작물에 적용시험
		친환경 유기농 자재 제품공시를 위한 신청	<ul style="list-style-type: none"> • 2품목(병충해 제품) 신청서 제출 • 2품목의 공인 독성시험 완료(한국 생물 안정성 센터) • 2품목에 대한 작물 약해시험 완료(전남대학교 농과대학)
		제품 판매를 위한 마케팅	<ul style="list-style-type: none"> • 국내 친환경 농자재 판매사 (케이원바이오텍)와 제품 공급 MOU 체결 • 대만 및 중국 수출을 위한 대만 농업회사(MasterVet)과 판매 계약 추진중

<연구 결과>

1. 신규 길항미생물을 이용한 식물병 방제용 차세대 미생물소재 개발

<재료 및 방법>

가. 염생식물에서 신규 길항 내생세균의 분리·동정 및 특성 조사

(1) 식물 내생세균의 분리

식물병원균인 난균류 *Phytophthora capsici*와 *Pythium ultimum*에 길항적인 내생세균을 분리하기 위하여 남해섬 개펄에서 자라는 6가지 종류의 염생식물 *Rosa rugosa*, *Vitex rotundifolia*, *Suaresx scabrifolia*, *Glehnia littoralis*, *Elymus mollis*의 뿌리를 채취하였다. 채취한 뿌리를 수돗물에 세척한 후 뿌리를 작은 조각으로 절단하여 조각부분을 1% NaOCl에 10분간 담구었다가 건져서 다시 살균수로 씻어 표면 살균하였다. 표면 살균이 제대로 되었는지 확인하기 위하여 살균된 조각을 1/10 TSA배지에 올려 3일간 오염세균의 성장 유무를 확인하였다. 세균이 전혀 성장하지 않는 뿌리 부분의 1.0 g을 취하여 고압멸균 처리된 여과된 바닷물(AFS) 9.0 ml에 넣고 살균된 주발과 절구로 갈았다. 이 마쇄된 액 0.1 ml를 취하여 살균된 바닷물 0.9 ml에 넣어 10^{-3} ~ 10^{-5} 까지 10배씩 희석한 후 여과된 바닷물(FS)을 사용한 1/10 R2A 배지에 도말하였다. 다른 곰팡이의 오염을 줄이기 위해 배지 분주 전에 cycloheximide 50 µg/ml를 첨가하였다. 배양기를 28°C에서 2-3주 동안 배양한 후 단일 균총을 분리하였고, 분리한 균주들은 15%(v/v) glycerol을 포함한 FS를 사용한 1/10 R2A 배지에 현탁하여 -70°C에 저장하여 사용하였다.

(2) 내생세균의 병원균에 대한 길항력 조사

내생세균들의 항균활성은 난균류 병원균인 고추 역병균(*P. capsici*)과 모잘록병원균(*Py. ultimum*)에 대한 대치배양법으로 균사생장 억제 정도를 조사하여 확인하였다. *P. capsici*와 *Py. ultimum* 배양은 각각 V8 juice agar(V8 juice 100 ml, agar 17.0 g, CaCO₃ 1.0 g, D.W. 1 L, pH 6)와 potato dextrose agar(PDA; Difco)에서 배양하였다. 분리 균주들의 길항력 확인은 PDA 와 V8 배지[여과한 바닷물(FS) 1 L에(half-strength (1/2) PDA 와 half-strength (1/2) R2A (yeast extract 0.25 g, proteose peptone No.3(Difco) 0.25 g, casamino acid 0.25 g, dextrose 0.25 g, soluble starch 0.25 g, sodium pyruvate 0.15 g, K₂HPO₄ 0.15 g, MgSO₄ 0.03 g)를 보충한 V8 juice agar]에서 필터페이퍼 평판디스크를 이용하여 균사생장 억제능력을 시험하였다. 종이 디스크는 배양기의 똑같은 거리(가장자리로부터 1 cm)에 놓았고 배양 균주의 희석현탁액 100 µl를 종이 디스크에 충분히 스며들게 하였다. 그리고 PDA배지(*Py. ultimum*)와 V8 주스 한천배지(*P. capsici*)에서 4일 동안 자란 병원균 균사의 6 mm 디스크를 앞의 배양기 가운데 놓고 28°C에서 4-6일간 배양하였다. 길항력은 세균 균총 주위의 병원균 균사의 생장억제 범위를 측정하여 평가하였다.

(3) 내생세균의 동정

분리된 세균들의 동정을 위하여 16S rDNA의 염기서열 분석 및 생리생화학적 특성을 조사하였다. 염기서열 결정을 위해 genomic DNA extraction kit (Intron Biotech, Seoul, Korea)를 이용하여 각 균주들의 genomic DNA를 추출하였다. 약 1.5 kb의 16S rDNA 조각을 증폭하기 위해 세균 동정에 사용되는 universal primer set 27F/1492R (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'/5'-GGTACCTGTTACGACTT-3')을 사용하였다. 반응조건은 94°C 5분 후, denaturation, annealing, extension은 각각 94°C 1분, 58°C 50초, 72°C 1분간의 반응을 30회 반복한 후 72°C에서 10분간 반응시켜 16S rDNA를 증폭시켰다. 이렇게 얻은 PCR product는 PCR purification kit (Intron Biotech)를 이용하여 순수분리하여 전기영동을 통해 증폭유무 및 크기를 확인하여 sequencing 하였다(GenoTech, Daejeon). Data 검색은 NCBI network service의 BLAST program 및 EzTaxon server (<http://www.eztaxon.org/>)를 이용하여 수행하였다. 계통학적 분석은 분리된 세균의 16S rDNA 염기서열 결과를 Genebank Data base를 사용하여 이들 염기서열과 유사한 균주와 다중 정렬하여 유사도(similarity)를 얻었으며, 염기서열을 이용하여 계통수를 작성하였다. 분석을 위해 PHYLIP package를 사용하였고, unrooted tree 모양은 neighbor-joining 방법에 의한 연산을 기준으로 bootstrap 분석법으로 작성하였다. 생리·생화학적 특성 조사는 Smiber & Krieg가 제안한 방법에 따라 oxidase, catalase, urease, casein, starch hydrolysis 방법 등을 시행하였다. 그 외 중요한 생리·생화학적 특성을 조사하기 위하여 API (Analytic Profile Index) ID 32E, 20E, 20NE kit 및 API ZYM kit (bioMérieux, Marcy-I'Etoile, France)를 사용하였다.

(4) 내생세균의 곰팡이 세포벽 분해효소의 생산 조사

분리된 내생세균의 길항작용을 알기 위하여 곰팡이의 세포벽을 분해하는 것으로 보고된 효소들의 생산여부를 조사하였다. Cellulase 활성은 분리한 균주들을 0.5%의 carboxymethyl cellulose가 첨가된 배지에 배양한 후 Congo Red (1%) 용액으로 염색하고 1 M NaCl 용액으로 탈색하여 균총 주변에 생성된 투명환의 크기를 조사하여 각 균주의 분해활성을 측정하였다. Chitinase 활성은 0.5%(w/v) colloidal chitin을 포함한 1/2 R2A 배지에 각 균주들을 28°C에서 7일간 배양한 후 균총 주변의 투명환의 크기로활성 정도를 확인하였다. Protease 활성은 0.5%(w/v) skim milk가 포함된 1/2 R2A배지에서 28°C, 5일간 배양한 후 균총 주변의 투명환의 생성을 통해 확인하였다. β -1,3-glucanase의 생산은 0.2%(w/v) pachyman과 0.005%(w/v) aniline blue를 포함하는 1/2 R2A배지에서 배양한 후 균총 주변에 투명환의 생성여부로 효소 분비 여부를 판단하였다.

(5) 내생세균의 식물생장촉진 특성 조사

인산분해 촉진 활성(phosphate solubilization activity)은 inorganic tricalcium phosphate를 포

함하는 배지(agar 15 g, glucose 10 g, NH₄Cl 5 g, NaCl 1 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, Ca₃(HPO₄)₂ 0.8 g, yeast extract 0.5 g, pH7.2)에서 phosphate를 용해하는 내생세균을 확인하기 위해 사용하였다. 균주는 28°C에서 10-12일간 배양하면서 균층 주변에 투명환 생성 여부를 통해 무기인산 용해를 조사하였다. 대조구로 인산을 포함하는 배지에 균주를 접종하지 않고 비교하였으며, 모든 실험은 3 반복으로 수행하였다. 내생세균들이 siderophore를 생성하는지 여부를 조사하기 위해 Perez-Miranda 등이 제안한 O-CAS assay를 수행하였다. CAS agar plates에 순수하게 분리된 균주를 28°C에서 2-3일간 배양 후 영양분이 없는 CAS medium 10 ml을 배양된 균주위에 부어준다. 최대 30-50분 이후에 siderophore 생성 균주의 경우, 위에 부어준 배지에서 색깔변화를 통해 생성유무를 관찰하였다. Indole-3-acetic acid(IAA) 생성여부는 Gordon and Weber's colorimetric assay를 통해 확인하였다. 균주를 2% tryptic soy broth(TSB)에서 28°C에서 130 rpm으로 48 시간동안 암상태에서 배양하여 이 배양액 5%(v/v)를 tryptophan (200 μM)이 포함된 같은 배지에 접종하여 30°C에서 72시간 동안 진탕배양 하였다. 배양 후 9,000 g, 4°C에서 10분 동안 원심분리한 후 그 상등액(1 ml)에 Salkowsky's reagent (2 ml of 0.5 M FeCl₃ with 49 ml of 35% [v/v] HClO₄) 1 ml을 첨가한 후 상온에서 30분간 반응시킨다. IAA 생성은 분홍색으로 변하는지 확인하여 결정하였다. 균주의 nitrate 환원능력을 결정하기 위해 Smibert & Krieg가 제안한 nitrate reduction 배지를 사용하였다. 식물의 생장촉진 활성은 *Arabidopsis thaliana*(Col-0) 종자를 사용하였는데, 종자를 70% ethanol 1분, 1% NaOCl 3분 동안 표면살균한 뒤 살균 증류수에 여러 번 세척하였다. 종자를 4°C에서 2일간 둔 뒤, MS 배지를 포함하는 배양기에 심고 21°C 배양 상에서 12시간 간격으로 빛과 어둠을 주면서 배양하였다. 두 가지 균주 YC6887, YC6898은 Marine broth(Difco)에 30°C에서 밤새 키운 뒤, 9,000 g로 10분간 원심분리하여 세포를 10 mM MgSO₄ 용액에 현탁하여 세포농도를 10⁷ colony forming units(cfu)/ml로 맞추었다. 2주 배양된 *Arabidopsis*를 살균토양 1 kg과 균주 현탁액 100 ml을 섞어 만든 배양토가 들어 있는 포트에 옮겨 심었다. 대조구는 같은 양의 10 mM MgSO₄ 용액만 첨가하였다. 세균 접종 2주 후에 동일한 방법으로 두 번째 세균 현탁액을 처리하여 *Arabidopsis* 근권이 흙백 젖게 하였다. 각각 처리는 3반복으로 하고 반복당 20주의 식물이 사용되었고 모든 실험은 두 번씩 조사하였다.

(6) 내생세균에 의한 병원균 균사의 주사전자현미경 관찰

내생세균 YC6887 균주에 의한 *P. capsici*의 균사 집적효과를 조사하기 위하여, V8 juice agar를 포함하는 배양기에서 6일 자란 6 mm 직경의 균사 덩어리를 내 직경이 3 cm인 페트리디쉬로 옮겼다. 이 균사 덩어리에 YC6887 균주의 현탁액(10⁴ cfu/ml) 2 ml를 가하고 균사와 상호작용 하도록 12시간 동안 놓아두었다. 이 균사 덩어리를 살균되고 이온화하지 않은 물로 부드럽게 세 번 씻고 2% glutaraldehyde를 포함하는 인산 완충액에 3시간 동안 고정시킨 후 전자현미경으로 전처리 후 관찰하였다.

(7) 내생세균의 식물내 집락형성 확인

내생세균 YC6887 균주의 식물체 내생 특성을 확인하기 위하여 형광유전자(plasmid pRK415-GFP)를 YC6887 균주에 전이시켜 담배식물 내에 접종 후 집락형성을 조사하였다. YC6927 균주의 competent 세포를 준비하여 Unge 등이 제안한 방법으로 electroporate하였다. 형광유전자를 지닌 변형체는 tetracycline 50 μ g을 포함하는 Luria-Bertani(LB) agar 배지상에서 선발하였고 배양한 담배식물에 접종하여 집락형성을 기간별로 확인하였다.

(8) 내생세균에 의한 유도저항성(induced systemic resistance, ISR) 조사

내생세균 YC6887 균주가 식물 내에서 저항성을 유도하는지 확인하기 위하여 유전자 *avrRpt2*를 포함하는 plasmid를 지닌 병원성이 없는 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 균주를 병원균 접종원으로 시험에 사용하였다. 이 균주는 King's B 액체배지에서 28°C로 하루 밤 동안 배양하였고, 병원성이 없는 DC3000 병원균 plasmid를 선발하기 위하여 King's B 액체배지에 tetracycline 20 mg/L를 첨가하였다. YC6887 균주는 Trypic soy broth(TSB)에서 28°C로 24시간 배양하였다. 9,000 g에서 10분 동안 원심분리 한 후 계면활성제인 Silwet L-77(van Meeuwen Chemicals BV, Weesp, The Netherlands) 0.01%를 함유하는 10 mM MgSO₄ 용액에 최종 농도가 10⁷ cfu/ml(OD₆₀₀=0.4)이 되도록 재현탁 하여 *A. thaliana* 식물 잎에 가압 침투시켰다. *A. thaliana*의 종자는 표면살균 한 후 위에 기술한 대로 재배하였다. Swanson 등이 제안한대로 바늘이 없는 1 ml 주사기를 이용하여 10 mM MgSO₄ 용액에 10⁷ cfu/ml 농도의 *avrRpt2*를 지닌 병원성이 없는 *P. syringae* pv. *tomato* 병원균을 각 식물의 3엽 이하 잎에 가압 침투로 접종하기 전에 전신획득저항성(systemic acquired resistance, SAR)을 3일 동안 유도하였다. Pieterse 등에 의해 제안한 대로, 식물 묘를 심기 바로 직전 토양에 YC6887 세균의 농도가 최종 10⁷ cfu/g이 되도록 현탁액을 혼합 처리하였다. 유도저항성을 평가하기 위하여, 계면활성제를 함유하는 10 mM MgSO₄용액에 최종 농도가 10⁷ cfu/ml인 병원성이 있는 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000용액을 제조하여 5주 지난 식물 잎을 2초 동안 잠기게 했다. 병원균 접종 하루 전에 식물을 100% 상대습도가 유지되는 습실 상에 두었다. 병원균 접종 4일 후에 각 발병된 식물의 잎 면적 비율을 정함으로 발병도를 평가하였는데 괴저 현상이나 탈색주위가 무른 부위가 보이면 발병으로 기록하였다. 발병된 잎과 건전한 잎의 수를 기초로 Swanson 등이 기록한 대로 각 식물(20반복)의 발병지수를 계산하였다.

(9) 식물병 저항성 관련 유전자 조사

저항성 유전자 조사는 RT-PCR 분석을 이용하여 수행하였다. 전체 RNA 추출을 위하여 처리와 무처리구의 *A. thaliana* 잎을 채취하여 액체질소 하에서 동결시키고 0.5 g의 동결된 잎을 살균된 주발과 절구를 이용하여 균일하게 마쇄하였다. 이 시료 분말을 polypropylene관에 옮겨서 미리 50°C가 되게 가온한 TriZol 시약(Life Technologies, Rockville, MD) 5 ml를 넣고 vortex로 30초 동안 진탕하여 균질화 후 4°C에서 10분 동안 원심분리(10,000 g) 하였다. 이 상

등액에 chloroform- isoamylalcohol(24:1) 2 ml를 가하고 혼합한 후 4°C에서 10분 동안 원심분리 하였다. 여기에 0.6배 분량의 isopropanol을 넣은 수용성 상태에서 4°C로 10분 동안 다시 원심분리(10,000 g) 하여 전체 RNA의 침전물을 얻었다. 이 침전물을 70% ethanol로 씻고 말린 다음 diethyl pyrocarbonate를 처리한 증류수의 적당한 양에 녹였고, 회사에서 제공된 지침에 따라, oligo(dt)₁₅, M-MLV reverse transcriptase(Promega)를 이용하여 RNA 2 µg에서 cDNA가 전사되었다. Taq DNA polymerase 1 µl가 존재하는 상태에서 전체 4 µl의 cDNA가 PCR 증폭에 사용되었다. PCR 증폭 조건은 94°C(5분), 94°C(1분), 68°C(1분) 30회 반복, 72°C(1분), 최종 72°C(5분) 이었다. Negative control로 GAPDH(58°C, 25반복)이 수행되었다. 사용된 유전자-specific primer PDF1.2와 PR-5 이었고, 증폭된 PCR 산물은 1.2% agarose gel로 분석하였다.

(10) 내생세균의 최적 배양 조건 조사

내생세균의 생장과 향균물질의 대량 생산에 필요한 최적 조건을 알기 위하여 YCS 배지를 포함한 10가지의 세균 배양용 배지를 선발하여 세균을 배양하면서 시간별로 세균밀도 및 배양액의 향균 활성을 조사하였다. 우선 향균물질 생산은 세균이 바닷물 속에 사는 식물의 뿌리 조직에서 분리되었으므로 R2A 바닷물 복합배지를 이용하였다. 여러 다른 배지를 이용하여 시험한 결과 YCS 배지(yeast extract 8.0, Casein 2.0, 콩가루 5.0, Dextrose 10, MgSO₄ 4.0, MgCl₂ 2.0 g/증류수 1 L)를 기본배지로 선정하였다. 최적 생산조건은 이 배지를 이용하되 다른 모든 요소는 고정하고 한번에 한 요소만 변경하는 방식으로 실험을 수행하였다. 배지에서 향균물질 생산에 관여하는 조성 성분의 효과는 생산배지의 조성 성분을 하나씩 제거하는 시험을 통하여 수행하면서 향균효과를 조사하였다. 그리고 영양분에 의한 향균 활성증가와 억제 효과를 알아보기 위하여 여러 가지 탄소와 질소원을 생산배지에 각각 1.0%와 0.1%씩 보충하면서 실험하였다. 온도별 배양조건은 20-40°C의 범위에서 검정하였다. 배양 시간별 밀도 변화와 향균 물질의 생산은 YCS배지에서 28°C, 120 rpm으로 진탕배양기에서 96시간 배양하면서 측정하였다.

(11) 향균물질의 대량생산

향균물질의 대량생산을 위한 배양은 YCS배지를 사용하여 bench scale 발효기에서 최적 발효조건을 미리 조사하여 그 조건으로 실시하였다. 본 배양은 500 L의 발효기에 200 L 배양액을 넣고 수행하였으며, 배양 동안의 가동 조건은 온도 28°C, 교반 속도 110 rpm, 환기 속도 0.6 VVM, 그리고 pH는 6.8-7.2로 유지하였다. 배양기에 넘쳐 흐르는 거품을 포집하는 배기 가스관을 설치하였고, 60시간 후 액체배지를 원심분리 하여 상층액을 모았다.

나. 향균 활성물질의 순수 분리 및 구조 결정

(1) 향균 활성물질의 순수 분리

위 조건으로 500 L 발효기에서 배양된 세균(YC6258) 배양액 300 L를 원심분리하여 세균 세포를 제거한 후 상등액을 동량의 ethyl acetate로 두 번 추출하고 감압 증류하여 활성물질 농축액 4.9g을 얻었다. 이 추출물을 CHCl₃/EtOAc의 용매로 open column chromatography를 실시하여 총 23개의 분획 (ME1~ME23)을 얻었다. 이 분획 중 가장 활성이 좋은 분획 ME22 (2.2 g)을 EtOAc/MeOH 용매로 open column chromatography를 실시하여 전부 21개의 소분획을 얻었고, 그 중 활성이 좋은 소분획 ME22-19에 대하여 semi-preparative HPLC를 실시하여 화합물 1 (활성이 가장 좋은 물질) 6.2 mg을 분리하였다. 다른 활성을 나타내지 않는 소분획들에 대하여도 open column chromatography 및 HPLC를 실시하여 전부 6종의 화합물을 분리하였다(그림 1). 다른 균주(YC6887)가 생산하는 항균 물질의 대량생산을 위한 배양은 1차년도 bench scale 발효기 실험에서 확립된 배지(proteose peptone no.3 12 g, yeast extract 2 g, glucose 10 g, MgSO₄ 4 g, MgCl₂ 2 g, NaCl 5 g, K₂HPO₄ 1 g, sucrose 10 g)를 사용하여 최적 발효조건으로 실시하였다. 본 배양은 500 L의 발효기에 200 L 배양액을 넣고 수행하였으며, 배양 동안의 가동 조건은 온도 28℃, 교반 속도 110 rpm, 환기 속도 0.6 VVM, 그리고 pH는 6.8-7.2로 유지하였다. 배양기에 넘치는 거품을 포집하는 배기 가스관을 설치하였고, 60시간 후 액체배지를 원심분리 하여 상등액을 모았다. 항균 물질의 순수 분리를 위하여 상등액을 동일한 부피의 ethyl acetate로 2번 추출한 후 진공감압농축기를 이용하여 농축하였다. 농축된 추출물 7.8 g에 대하여 Hexane/EtOAc의 용매로 Silica gel open column chromatography를 시행하여 총 27개의 분획(Fr. 1~Fr. 27)을 얻었다. 그 중 fraction 11(47.4 mg)을 물과 메탄올을 사용하여 C18 open column chromatography를 진행하여 10개의 소분획 (Fr. 11-1~Fr. 11-10)을 얻었다. Fr. 11-2 (6.3 mg)을 Luna 5u C18 100A column(250×10.0 mm, 5 μM, Phenomenex)를 사용하여 물 및 ACN gradient 용매 조건으로 HPLC를 실시하여 Compound 1(2 mg)을 분리하였다. Fr. 14 (127 mg)에 대해 물, 메탄올 조성으로 C18 open column chromatography를 진행하였고, 그 결과 얻어진 5개의 subfraction 중 14-3을 재결정의 방법으로 Compound 2 (2 mg)를 분리하였다. 또한 Fr. 15(124 mg)에 대하여 methylene chloride 및 Ethyl acetate 조성으로 silica gel open column chromatography를 시행하여 총 14개의 subfraction을 얻었고, subfraction 15-4(21.2 mg)와 15-5(7.5 mg)에 대해서 Luna 5u C18 100A column (250×10.0 mm, 5 μM, Phenomenex)를 사용하여 물 및 ACN gradient 용매 조건으로 각각 HPLC를 실시하여 각각 Compound 3(11 mg) 및 Compound 4(1.2 mg)를 분리하였다. Fr. 16(599.3 mg)에 대해서도 chloroform 및 methanol 조성으로 silica gel column chromatography를 시행하여 총 23개의 소분획을 얻었고 그 중 subfraction 20을 Luna 5u C18 100A column(250×10.0 mm, 5 μM, Phenomenex)를 사용하여 물 및 ACN gradient 용매 조건으로 HPLC를 실시하여 Compound 5(4.7 mg)를 분리하였다. Fr. 25는 MeOH 용매로 재결정을 실시하여 Compound 6(3 mg)을 얻었다(그림 2).

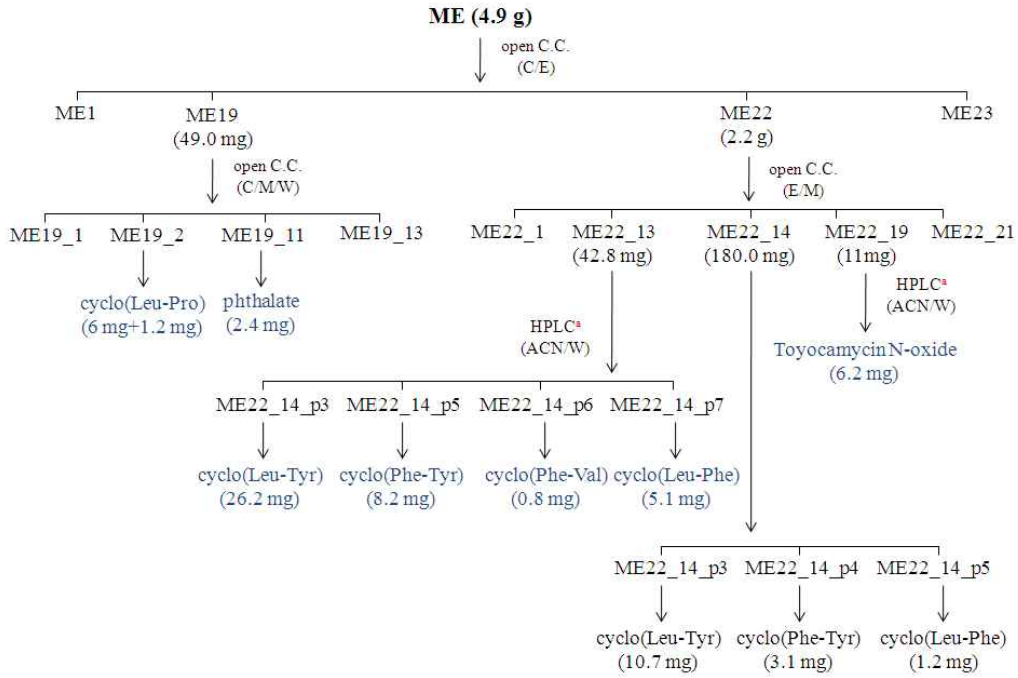


그림 1. YC6258 균주로부터 활성물질 분리 과정

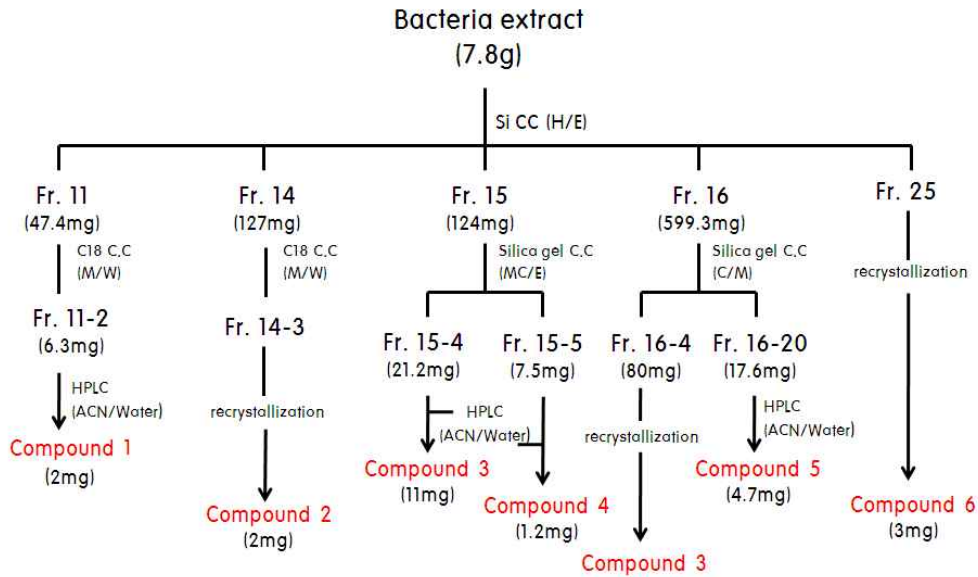


그림 2. YC6887 균주로부터 활성물질 분리 과정

(2) 분리된 화합물의 구조 결정

분리과정에서 화합물들의 활성 검정을 통하여 활성물질로 확인된 단리된 화합물의 구조는 NMR, MS 등의 spectroscopic data를 해석함으로써 이루어졌다.

다. 미생물 대량 배양 공정 확립 및 시제품 제형 개발

(1) 사용 균주 및 대량 배양 공정

제형 개발에 사용된 균주는 1차 년도에 분리되어 방제 효과가 좋았던 신규 내생세균 *Martellea endophytica* YC6887 및 형광단백질(GFP)이 표지된 YC6887 균주였다. 균 대량 배양을 위하여 여러 종류의 배지 조성 별 균배양을 실시한 결과 가장 배지 가격이 저렴하고 세균 밀도가 높게 나오는 적정한 M10 배지(Yeast extract 10 g, MgSO₄ 4 g, MgCl₂ 2 g, NaCl 5 g, sucrose 10 g, K₂HPO₄ 1 g/ 1 L 증류수)를 개발하였으며, 이 배지 5 ml 에서 seed culture(28°C, 120 rpm, 24 hr) 한 뒤 250 ml의 M10 배지에 종균 1 ml를 접종하여 shaking incubator에서 60시간 배양(28°C, 120 rpm) 하였다. 대량배양을 위하여 50 L 용량의 fermentor에 30 L의 배지를 채운 뒤 antifoam 30 ml를 넣고 멸균하고(121°C, 20 min) 60시간 배양한 YC6887 종균 배양액 250 ml를 접종한 후 60 시간 동안 배양(28°C, 120 rpm, pH 7.0, 0.6 vvm, ps 0.4) 하였다. pH는 1 M HCl 용액과 3 M NaOH 용액으로 조절 하였다. 배양 후 균체 수확을 위하여 배양액을 원심분리 장치를 이용하여 균체만을 수확 후 시제품 제제화에 사용하였다.

(2) 내생세균의 액제형 제제화

제제화는 액제형과 고상형 제제로 구분하여 제조하였는데, 세균의 보존 기간을 길게 하기 위하여 액제형 제제에는 trehalose를 0%, 5%, 10%(무게/부피) 섞어 넣었다. 멸균된 M10 배지에서 배양된 YC6887 균체 및 GFP-YC6887 균체 100 ml와 10 mM MgSO₄ 용액 150 ml를 각각 혼합하여 총 부피가 250 ml이 되게 해주었다. 이 액형 제제를 실온에서 보관하면서 0, 1, 2, 4, 8, 16주에 단계별로 회석하여 세균 세포 밀도(cfu/ml)를 측정하였다. YC6887 균주는 최초 분리 장소가 갯벌 식물의 뿌리 이므로 바닷물을 이용한 액체 제제화를 시도하였다. 배양액 으로부터 확보된 균체 100 ml를 멸균(121°C, 15 min)시킨 바닷물 100 ml와 섞어 실온에 보관 하며 0, 2, 5, 11주에 단계별 회석하여 생균수(cfu/ml)를 측정하였다. 처리는 바닷물 대신 MgSO₄ buffer, M523 배지, marine broth를 이용하거나 바닷물에 5% trehalose(g/v)를 첨가하여 생균수를 측정 비교하였다.

(3) 내생세균의 고상형 제제화

YC6887의 고상형 제제화 실험을 위해 rice husk와 peat를 유리 배양기에 100 ml씩 갈아주고 멸균 한 뒤 균체를 각각 200 ml씩 섞어 주었다. 균체를 실온에 보관하면서 0, 1, 4, 8주 째 건중량 5 g을 멸균 증류수 45 ml에 넣고 100 rpm에서 10분간 진탕 한 뒤 단계별로 회석하여 생균수(cfu/g)를 측정 하였다. 다른 처리로 균체 생존력을 높이기 위하여 동결 건조를 이용하였는데, 균체 10 L에 72°C dry oven에서 1시간 열처리 한 탈지분유 1 kg(10%, g/v), 멸균 처리(121°C, 15 min) 한 trehalose 500 g(5%, g/v)을 넣어준 뒤 흔들어 잘 섞어주고 멸균 처리한 동결건조 tray에 부어 -70°C에서 하룻밤 동안 동결시켰다. 동결된 균체를 대용량 동결 건

조기에 넣고 3일간 동결 건조 하였다. 동결 건조된 균체를 부드럽게 분쇄 후 보관 비닐 백에 나눠 담은 뒤 실온에 보관하면서 0, 1, 4, 8주 별로 희석하여 생균수(cfu/g) 변화를 측정하였다.

라. YC6887 균주의 방제 효능 및 약해 평가

(1) YC6887 처리에 의한 고추 역병 방제 효과 및 생육, 수확량 조사

YC6887 균주의 고추 역병 방제 효과 및 생육, 수확량 증가 효과를 알아보기 위하여 2011년 4월 21일부터 국립경상대학교 실험 농장(진주시 대곡면)에서 포장실험을 수행하였다. 시험 처리구는 무처리, YC6887 균주처리, 화학농약 처리구로 나누어서 완전임의배치법으로 4반복으로 설정하였다. 고추 모종 식재는 4월 21일 농가에서 구입한 모종(cv. 금수강산)을 주 당 거리 45 cm, 처리구 당 10주, 골 당 폭 50 cm 간격으로 심어주었다. YC6887 균주는 균체 액제를 500배 희석하여 8×10^5 cfu/ml 농도로 주 당 125 ml 씩 4월 21일, 5월 6일 2회 관주 처리하였다. 실험 기간 중 기타 약제 처리는 표 1과 같이 시행하였다.

표 1. YC6887 균주의 고추 재배 포장실험 처리 내용.

Date	Treatment			
	Control(1)	YC6887(2)	YC6258/TORY(3)	Chemicals(4)
2011. 4. 21	Water (125ml/plant)	8×10^5 cfu/ml (125ml/plant)	2.28×10^4 cfu/ml (125ml/plant)	Water (125ml/plant)
2011. 5. 6	Water (125ml/plant)	8×10^5 cfu/ml (125ml/plant)	1.4×10^4 cfu/ml (125ml/plant)	Water (125ml/plant)
2011. 5. 23	Water	Water	<i>T. harzianum</i> (450ml/plant) 5×10^4 cfu/ml	Insecticide (Konido 10g/20L)
2011. 6. 21	-	<i>T. harzianum</i> 1×10^5 cfu/ml	<i>T. harzianum</i> 1×10^5 cfu/ml	-
2011. 6. 29	-	Fungicide (Casting 20g/20L)	Fungicide (Casting 20g/20L)	Fungicide (Casting 20g/20L)
2011. 7. 18	-	<i>T. harzianum</i> 1×10^5 cfu/ml	<i>T. harzianum</i> 1×10^5 cfu/ml	Fungicide (Casting 20g/20L)
2011. 8. 4	-	<i>T. harzianum</i> 1×10^5 cfu/ml Insecticide (Nabangen 20ml/20L)	<i>T. harzianum</i> 1×10^5 cfu/ml Insecticide (Nabangen 20ml/20L)	Fungicide (Casting 20g/20L) Insecticide (Nabangen 20ml/20L)

고추 역병 발병률 조사를 위해 각 처리구 당 감염된 고추 주수를 세어 발병률을 계산 하였다 (이병주 수*100/총 주 수). 병 조사는 2011년 7월 4일, 7월 14일, 8월 4일, 8월 14일 총 4회, 4

반복으로 실시하였다. 고추 생육 조사는 식부 91일 후인 2011년 7월 21일에 각 처리구 당 임의로 5주를 선택하여 초장(cm, 땅 표면에서 가장 높은 곳까지 길이), 경태(cm, 땅 위 5cm 줄기의 직경), 주경장(cm, 땅 표면에서 1차 분지점까지 길이)을 측정하였고, 모든 조사는 4반복으로 실시하였다. YC6887 처리에 따른 고추 수확량 증가 효과를 알기 위하여 각 처리구 10주 중에서 5주를 임의 선택하여 표시한 뒤 선택한 5주의 홍고추를 수차례 모두 수확 합산하였다. 고추 수확은 동일한 방법으로 식부 100일 후인 2011년 7월 30일, 8월 9일, 8월 18일 총 3회에 걸쳐 실시하였으며, 모든 조사는 4반복으로 실시하였다. 수확한 홍고추는 실험실에서 생과중을 측정하여 생과중(g)/주수로 계산 표시 하였다.

(2) YC6887 처리에 의한 콩 생육 촉진 효과

YC6887 균주 처리에 의한 콩 생육 효과를 조사하기 위하여 2011년 7월 5일 처리구와 무처리구로 나누고(완전임의배치법) 각 처리구 당 콩 종자(*Glycine max*) 30개씩을 파종한 후 동결 건조된 YC6887 균체를 500배 희석하여(2×10^6 cfu/ml) 주 당 300 ml씩 관주하였다. 2주 후에 1차와 동일한 방법으로 균체 희석액을 다시 300 ml씩 관주하였다. 무처리구에는 동결 건조에 사용된 분산매의 영향을 고려하여 사용된 분산매인 탈지분유의 동일한 양을 500배 희석하여 300 ml씩 관주하였다. 실험 후 초장, 분지수, 경중, 협수, 입수, 입중, 수량지수, 백립중을 조사하였다. 실험은 국립경상대학교 가좌동 캠퍼스농장에서 실시되었으며 6반복으로 실시하였다.

(3) YC6887 처리에 의한 작물병 방제 효과(포트 실험)

YC6887 균주의 병 방제 스펙트럼 확인을 위하여 한국화학연구원에 의뢰하여 7종의 주요 작물병에 대한 방제 효과를 조사하였다. 대상 식물병은 벼도열병(병원균: *Magnaporthe oryzae*), 벼잎집무늬마름병(병원균: *Rhizoctonia solani*), 토마토잿빛곰팡이병(병원균: *Botrytis cinerea*), 토마토역병(병원균: *Phytophthora infestans*), 밀붉은녹병(병원균: *Puccinia recondita*), 보리흰가루병(병원균: *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) 및 고추탄저병(병원균: *Colletotrichum coccodes*)이었다. 처리 방법은 엽면 살포 및 관주 처리 두 가지 방법으로 실시하였다. 시료 접종 1일 전에 식물병 당 식물 2포트씩을 회전판 위에서 회전시키면서 spray gun(압력: 1 kg/cm^2)으로 식물체 전체에 골고루 약제가 부착되도록 살포하였다. 관주 처리는 의뢰한 시료를 접종 7일 전에 식물병 당 식물 3포트에 약제 용액을 포트 당 5 ml씩 관주 후 온실에서 1주일 동안 수분을 공급하면서 재배하였다. 각 병원균의 접종 및 발병 조건은 한국화학연구원에서 이미 확립되어 있는 다음 조건 이용하였다.

벼도열병(RCB)은 병원균인 *Magnaporthe grisea* KJ201 균주를 잘려 한천배지에 접종하여 25°C 배양기에서 2주간 배양하여 형성된 포자를 살균증류수로 수확하여 일정농도의 포자현탁액 (3×10^5 spores/ml)을 준비하였다. 이를 약제 처리된 낙동 벼 (본엽 3~4엽기)에 흘러내릴 정도로 충분히 분무하였다. 접종된 벼는 습실상에서 암상태로 24시간 배양한 뒤에 상대습도 80% 이상이며 온도가 26°C인 항온항습실에서 4일간 발병시킨 후 병반면적율을 조사하였다.

벼잎집무늬마름병(RSB)은 적당한 양의 밀기울을 1 L 배양병에 넣고 멸균한 후 병원균인 *Rhizoctonia solani* AG1 균주를 접종한 후 25°C 배양기에서 7일간 배양하였다. 병 접종은 배양된 균사덩어리를 적당하게 잘게 마쇄하여 약제 처리된 4~5엽기의 낙동 벼가 자란 포트에 고르게 접종하여 습실상(25°C)에서 7일간 배양하여 발병을 시킨 후 병 조사는 잎집(sheath)에 형성된 병반면적율을 조사하였다. 토마토잰빛곰팡이병(TGM)은 병원균인 *Botrytis cinerea*를 감자한천배지에 접종하여 25°C 항온기에서 배양하여 형성된 포자를 접종원으로 사용하였다. 병 접종은 포자를 수확하여 혈구계를 사용하여 포자농도를 3×10^5 spores/ml로 만든 후 약제 처리된 토마토 유묘(2~3엽기)에 분무접종 하였다. 접종된 토마토 유묘는 20°C 습실상 (상대습도 95% 이상)에 넣어 3일간 발병을 유도시킨 후 병반면적율을 조사하였다. 토마토 역병(TLB)은 병원균인 *Phytophthora infestans* 균주를オート밀 배지에 접종하여 20°C 배양기에서 배양하여 유주자낭을 형성시켰다. 병원균 접종은 형성된 유주자낭을 살균증류수를 첨가하여 수확하고 포자농도가 3×10^4 sporangia/ml인 포자현탁액을 만들었다. 이들을 냉장고에 넣어 저온처리하여 유주자를 유출시켜 유주자 현탁액을 준비하였다. 이를 약제 처리된 토마토 유묘(2~3엽기)에 분무접종 하였다. 병원균을 접종한 토마토 유묘는 20°C 습실상에서 2일간 습실처리 하고 항온항습실에서 발병시켜 접종 3일 후에 잎에 발생한 병반면적율을 조사하였다. 밀붉은녹병(WLR)은 병원균인 *Puccinia recondita*는 활물기생균이므로, 실험실에서 식물체에 직접 계대배양하면서 밀 유묘에 형성된 하포자(urediniospores)를 접종원으로 사용하였다. 균주의 약효조사를 위하여 일회용 포트(직경: 4.5 cm)에 5립 씩 밀 종자(품종: 은파)를 파종하여 온실에서 8일간 재배한 1엽기 유묘에 약제를 처리하고 1일 후에 접종원 (포자 0.11 g/L)을 분무접종 하였다. 접종된 밀 유묘는 20°C의 습실상에서 1일간 습실처리한 후에 상대습도가 70%인 20°C의 항온항습실로 옮겨서 발병을 유도하고 접종한지 7일 후에 병반면적율을 조사하였다. 보리흰가루병(BPM)은 병원균인 *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*는 활물기생균이므로, 실험실에서 보리 유묘로 계대배양하면서 보리에 형성된 포자를 접종원으로 사용하였다. 약효 조사는 일회용 포트 (직경: 4.5 cm)에 5립씩의 보리 종자 (품종: 동보리)를 파종하여 온실에서 8일간 재배한 1엽기 유묘에 약제를 살포하고 온실에서 풍건시킨 후 약제 처리된 보리에 흰가루병 포자를 털어 접종하였다. 접종된 보리 유묘는 20~23°C, 상대습도 60% 정도의 항온항습실에 두어 7일간 발병시킨 후 병반면적율을 조사하였다. 고추 탄저병(RPA)은 병원균인 *Colletotrichum coccodes*를オート밀 배지에 접종하고 25°C에서 10일 동안 배양하여 형성된 포자를 수확하고, 포자 농도를 ml 당 2×10^5 spores가 되도록 조정하여 포자현탁액을 준비하였다. 약제를 처리한 고추 유묘(3~4엽기)에 준비한 포자현탁액을 분무접종하고 이를 습실상(25°C)에 넣고 2일 동안 습실처리한 후에 항온항습실(25°C, 75% RH)에서 발병시켰다. 접종 3일 후에 고추 잎에 형성된 병반의 면적율을 조사하였다. 병 조사로부터 얻은 병반 면적율은 다음과 같은 계산식에 따라 계산하여 방제가를 산출하였다.

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

마. YC6887 균주의 작용기작 규명

(1) 항균 물질의 구조 결정 및 활성 조사

순수 분리된 물질의 화학 구조 결정은 C13 NMR, Proton NMR, M/S 등 분석적인 방법을 이용하였다. 분리 물질의 항균 활성은 식물 병원균 *Colletotrichum acutatum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Burkholderia glumae*에 대한 대치배양 검정(confrontation bioassay)으로 균 성장 억제정도를 조사하였다. *C. acutatum*과 *P. ultimum*은 potato dextrose agar (PDA; Difco)에서 배양하였고 *P. capsici*와 *B. glumae*는 각각 V8 juice agar(V8 juice 100 ml, agar 17.0 g, CaCO₃ 1.0 g, D.W. 1 L, pH 6)와 half-strength tryptic soy agar(TSA; Difco)에서 종이디스크 측정법(paper disc method)을 이용하여 성장 억제를 조사하였다. 순수 분리된 화합물 Compound 1, 2와 Compound 6은 각각 methanol과 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 녹인 후 농도를 1000 ppm($\mu\text{g/ml}$)으로 조절하여 200 μl 씩을 종이 디스크에 충분히 스며들게 한 후 완전히 말렸다. 대조로는 methanol과 DMSO 200 μl 만을 종이 디스크에 스며들게 하여 사용하였다. 그리고 PDA배지(*P. ultimum*)와 V8 주스 한천배지(*P. capsici*)에서 4일 동안 자란 균류 병원균 균사의 각 6 mm 디스크를 배지 가운데 놓고 28°C에서 4-6일간 배양하였다. *B. glumae*는 half-strength tryptic soy broth(1/2TSB)에서 30°C에서 130 rpm으로 14 시간 동안 암상태에서 배양시킨 균액을 흡광측정기로 600 nm에서 흡광도 0.5가 되도록 희석시켰다. 이어서 희석된 균액 50 μl 를 1/2TSB 한천 배지에 spreading 후 순수 분리된 물질을 스며들게 한 종이 디스크를 그 위에 올렸다. 이 배양기를 30°C에서 14 시간 배양 후 종이 디스크 주위에 생성된 억제 투명한 크기를 조사하여 억제 활성을 평가하였다.

(2) YC6887 균주의 작용 기작 규명

YC6887 균주가 식물성장촉진(plant growth promotion)과 유도저항성(induced systemic resistance, ISR) 효과가 있는지 알기 위하여 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)를 이용하여 실험하였다. 먼저 애기장대 종자를 70% ethanol과 1.2% NaOCl에 각각 1분간 표면살균한 후 살균 증류수로 여러 번 세척한 후 MS(Murashige and Skoog medium) 배지가 들어 있는 배양기에 심고 22-24°C의 식물 생육상에서 (16시간 빛, 8시간 암조건) 배양하였다. YC6887 균주는 28°C에서 36-48시간 진탕 배양 후 배양액을 원심분리 하여 세포를 10 mM MgSO₄로 재현탁 하고 그 농도를 10⁶, 10⁷과 10⁸ cfu/ml로 각각 조절하였다. 파종 후 2주 된 애기장대를 각 농도의 현탁액이 포함된 토양에 옮겨 심었다. 2주 후에 다시 식물뿌리에 YC6887 세균 현탁액을 관주하였다. 애기장대는 2주 후에 수확하였고 식물의 biometrical parameters를 조사하였다.

유도저항성 조사는 4주간 재배한 애기장대(Col-o)를 병저항성 검정을 위해 사용하였다. 이 실험은 *M. endophytica* YC6887, *Martellela mediterranea*, BTH(benzothiadiazole), 대조구(무처리)와 대조구(water-control)로 5개의 처리로 하였다. 미생물을 처리한 식물은 10⁶ cfu/ml로 세포농도를 조절하여 각 균주 현탁액 10 ml씩을 토양에 관주하였다. BTH를 처리한 식물은 1.2 mM BTH(sigma aldrich)를 분무 하였고, 대조군으로 같은 양의 물과 10 mM MgSO₄를

사용하였다. 모든 식물은 5일 후에 잎에 물방울이 생성될 때까지 10^8 cfu/ml 농도의 *Pseudomonas syringae* DC 3000을 접종하였다. 모든 식물에 병원균을 처리한 후에 배양기의 뚜껑을 덮고 식물생육상에 3일간 두었다. 병원균 처리 5일 후에 발병률은 식물 당 증상이 있는 잎과 증상이 없는 잎의 비율을 측정함으로써 비교하였다.

RT-PCR을 사용한 유전자 발현분석은 애기장대에 병원균인 *Pseudomonas syringae* DC 3000을 접종하고 0, 6, 12, 24, 48 과 72시간 뒤 YC6887 균주를 처리한 애기장대를 채취하였다. Total RNA는 RNA extraction kit(Qiagen RNeasy: plant minikit)를 사용하여 YC6887을 처리한 샘플과 처리하지 않은 샘플에서 추출하였다. Complementary DNA는 *PRI*과 *PDF1.2* 유전자 발현을 분석하기 위해 $1 \mu\text{g}$ 의 RNA를 사용하여 만들었다.

YC6887에 의한 애기장대의 결뿌리(lateral root)의 발달 관찰은 애기장대(Col-0)의 종자를 표면살균 후 MS배지를 포함하는 배양기에 파종하고 $22-24^\circ\text{C}$ 의 식물생육상에서 빛 16시간, 암 6시간 조건으로 배양하였다. 6일 배양한 애기장대를 YC6887 접종지점에서 5 cm 간격으로 MS 배지에서 한 면과 가까이 일렬로 줄 세웠다. 그 후, 이 배양기 식물 생육상에서 8일간 더 배양한 뒤 결가지 발달 정도와 생중량(fresh weight)을 측정하였다.

YC6887에 의한 고추의 성장촉진활성을 알기 위하여 고추종자를 70% ethanol로 표면살균하고 28°C 의 식물생육상에서 위와 같은 조건으로 배양하였다. 세균은 28°C 에서 36-48시간 동안 진탕배양한 후 원심 분리하여 균체를 모아 10 mM MgSO_4 용액에 현탁하여 농도를 10^8 cfu/ml로 조절하여 포트에 혼합하였다. 그리고 세균이 접종된 토양(10^8 cfu/g soil)에 2주 지난 고추 모를 옮겨 심었다. 2주 재배 후 고추 근권에 세균 현탁액을 2회에 걸쳐 접종하였다. 생육 2주 후 식물을 수확하였고 biometrical parameters를 기록하였다.

애기장대 잎에 병원균인 *P. syringae* DC3000의 개체수 밀도를 계산하기 위하여 먼저 YC6887 처리 5일후 DC3000을 접종하였다. 접종 0, 1, 2, 3, 4, 5 일 후에 잎을 1 g씩 모은 뒤, 70% 에탄올에 30초간 표면 살균하고 멸균 증류수에 30초간 담궈 두었다. 샘플들은 막자사발과 막자를 이용하여 10 mM MgSO_4 로 잘 갈았다. 그 후 연속적으로 10배씩 희석하여 rifampicin을 함유하고 있는 kings B배지에 접종한 뒤, 28°C 에서 48시간 배양하였다. 배양 후, 콜로니의 수는 잎의 생중량 g당 CFU로 측정하였다.

YC6887 균주에 의한 기주저항성 유도 경로를 더 자세히 알기 위해 애기장대의 변이체 *jar1*, JA/ET가 결여된 *etr1-3*와 SA가 결여된 NahG 변이체(transgenic line)를 테스트 하였다. 애기장대의 종자들 Col-0, NahG유전자를 발현하는 Col-0와 변이체(signaling mutant) *npr1*, *etr1*, *jar1*의 종자들은 표면살균한 후 MS 배지에서 키웠다. 2주간 키운 후 멸균된 토양(autoclaved soil)을 포함하는 포트에 옮겨 심은 뒤 23°C 에서 16시간 명기, 8시간 암기로 growth chamber에서 배양하였다. 세균과 화학처리를 위해 4주간 키운 식물을 사용하였다. 접종 5일 후에 DC3000을 처리한 후, mock 처리군 식물과 YC6887 균주 처리군 식물, 애기장대 Col-0와 변이체들 NahG, NahG, *npr1*, *Jar1*와 *etr1-3*의 발병율을 조사하였다. 병원균의 개체군 농도는 잎 생중량의 g당 CFU로 계산하였다. 각 처리를 위해 24개의 식물들이 사용되었고, 수치는

standard error로 평균을 냈다. 앞서 순수 분리된 YC6887의 6종의 화합물중 compound 2(phenylacetic acid)를 이용하여 배양기내 항세균 활성항균활성을 조사하였다. *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Alternia panax*와 *Pyricularia grisea*의 균사디스크를 compound 2를 0, 10, 100, 500 ppm 포함하는 PDA배지의 중앙에 둔다. 곰팡이의 생장 억제는 다음 식[1-(처리된 배지plate에서 균사생장 지름/ 처리하지 않은 대조구 배지에서 균사생장의 지름)] x 100으로 계산하여 표현하였다. 배지는 28°C에 두었고 곰팡이의 생장은 5일에서 7일까지 분석하였다.

(3) YC6887 균주의 full genome sequencing

M. endophytica YC6887 균주가 갖고 있는 항균활성 물질 생산, 식물생육촉진, 병저항성 유도 기작 등 작용의 정확한 파악을 위하여 전체 유전자 염기서열 결정을 실시하였다. Wizard Genomic DNA purification Kit(Promega)를 사용하여 total genomic DNA를 추출하였고, DNA의 정량은 Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit(P-11496, Invitrogen)을 이용하여 TBS-380 Mini- Fluorometer(Turner BioSystems)로 실시하였다. 전체 분석은 서울대학교 내 (주)Chunlab Inc.에서 수행하였다. DNA를 이용하여 paired-end library를 구축하여 Illumina GAIIX 와 Roche 454 Titanium을 이용하여 sequencing을 수행하여 염기서열 정보를 획득하였고, 획득한 whole genome을 assembly 한 후 남아있는 contig 및 scaffold 등 gap을 sanger sequencing 프로세스를 통해 complete whole genome sequence를 확보하였다. RAST server 와 GLIMMER3 프로그램을 활용하여 tRNA와 rRNA prediction, SEED, COG를 통한 functional annotation 수행하였다. 방대한 생물정보 데이터베이스 및 알고리즘을 기반으로 하는 genomics 분석 프로그램인 CLgenomics software를 이용하여 그 결과를 분석하였다.

바. 논토양 식물 근권에서 길항 내생세균 YC7007 균주의 분리 동정 및 방제 효과 조사

(1) YC7007 균주의 분리 및 동정

YC7007 균주는 진주시 경상대학교 시험포장의 논토양에서 자라는 식물 뿌리 내부조직에서 분리되었다. 식물 내생세균을 분리하기 위하여 뿌리 절단 조각의 표면을 1% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액에 10분간 담귀 표면을 살균하였다. 이 조각들을 1/10TSA 배지(Tryptic Soy Broth 3 g, 한천 16 g/ 증류수 1 L)에 올려놓고 2-3일 정도 배양하면서 표면에서 세균 생장 여부를 관찰하면서 표면 살균여부를 확인하였다. 조각의 표면 살균이 확인 된 뿌리 조각 1.0 g을 취하여 고압멸균기에서 살균된 증류수 9.0 ml를 넣어 살균된 주발과 절구로 갈았다. 이 마쇄된 액 0.1 ml를 취하여 살균된 증류수 0.9 ml에 넣어 10배씩 희석하였고(10^{-3} , 10^{-4} 와 10^{-5}) 희석액을 1/10TSA 배지에 고르게 3차 까는 방법으로 놓았다. 이 배양기를 28°C에서 2-3주 동안 배양하고 생육된 단일집락을 순수하게 분리, 배양하였다. 분리된 내생세균 균주들의 병원균에 대한 길항 효과는 가 (1), (2)와 같이 수행하였다. 분리된 YC7007 균주의 동정을 위하여 16S rRNA 증폭 및 염기서열 결정을 위한 primer들은 universal primer set 27F/1492R

(가, (3))을 사용하였다. PCR 조건은 initial denaturation이 94°C에서 5분, 30회 반복되는 과정인 denaturation, annealing, extension은 각각 94°C 1분, 58°C 50초, 72°C 1분, 마지막으로 final extension은 72°C 10분간 반응시켜 증폭시켰다. 증폭 후 PCR 산물은 PCR purification kit (Intron Biotech)를 사용하여 얻었다. 이렇게 얻은 PCR 산물은 1% LE agarose gel (Seakem)을 이용하여 증폭유무 및 크기를 관찰하였고, PCR 산물을 Geno Tech Inc. (Daejeon)에 보내어서 automatic sequencer를 통하여 16S rRNA gene 염기서열 분석을 실시하였다. Database 검색은 EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)를 이용하였다. 계통학적 분석은 분리된 세균의 16S rDNA 염기서열 결과를 Genebank Data base를 사용하여 이들 염기서열과 유사한 균주와 다중 정렬하여 유사도(similarity)를 얻었으며, 염기서열을 이용하여 계통수를 작성하였다. 분석을 위해 PHYLIP package를 사용하였고, unrooted tree 모양은 neighbor-joining방법에 의한 연산을 기준으로 bootstrap 분석법으로 작성하였다.

(2) YC7007 균주의 토양 전염병(벼 키다리병) 방제 효과 조사

벼의 키다리병 발생을 위한 키다리병균(*Gibberella fujikuroi*)의 토양 접종량을 결정하기 위해 상토 kg당 병원균 접종량을 각각 0, 5, 8, 10, 15, 20 g을 섞어 병발생 지수를 조사하였다. 멸균한 토양(autoclaved soil)과 멸균하지 않은 토양에서 YC7007 균주에 의한 생물학적 방제는 식물을 키운 지 14일 후 접종 3일 전에 YC7007 균주의 세포현탁액을 흡광도 600 nm에서 OD값을 제어 농도를 조절하였다. OD값이 각각 0.03일 때 5.65×10^5 , 0.07일 때 3.63×10^6 , 0.1일 때 2×10^7 cfu/ml였다. 세포 현탁액 15 ml (10% v/w basis)을 멸균한 흙과 하지 않은 흙 각각 150 g에 뿌렸다. 세포현탁액은 10 mM MgSO₄로 현탁하였다. 발병 지수(severity index)는 접종 10일 후에 disease rating scale을 사용하여 0-5까지 측정하였다. 병 방제가(%Disease reduction)는 대조구 식물(Mock/+ plants)과 비교하여 계산하였다. 대조구 처리의 식물들은 YC7007 균주의 처리 없이 10 mM MgSO₄를 처리한 것이다. 처리당 10개의 식물들을 3반복으로 사용하였다.

YC7007 균주의 처리에 의한 키다리병 방제 효과는 병균을 접종 한 뒤, YC7007 균주를 각각 10^5 , 10^6 , 10^7 cfu/ml 농도로 처리하고 10일, 20일, 30일 후 발병 지수를 조사하였다. YC7007 균주의 처리 농도별 벼의 chlorophyll양 비교는 YC7007 균주를 각각 10^6 , 10^7 cfu/ml 농도로 조절하여 처리했을 때 각각 처리구별로 잎의 g당 chlorophyll의 mg을 측정하였다. Chlorophyll의 양은 Lichtenthaler에 의해 보고된 식을 사용하여 계산된다. Total chlorophyll = $(7.15 * A_{663.2} + 18.71 * A_{646.8}) / 1000 / (\text{fresh weight of leaves})$; 계산된 값은 생중량 g당 chlorophyll의 mg을 나타낸다. 그림에 나타난 수치 \pm Se는 SPSS statistical software에 의한 Duncan's multiple Range Test에 의해 유의하게 다르다($P < 0.05$). 바 그래프는 Sigma Plot version 12를 사용하여 그렸다. '+'는 kg당 *G. fujikuroi*를 10 g 접종한 것을 의미하고 Mock은 접종하지 않은 것을 의미한다. 각 처리 당 10개의 잎을 사용하여 3반복 수행하였다. 잎은 접종한 후 20일이 지난 후에 모아서 실험을 진행하였다.

벼 절단 잎에서의 YC7007균주의 세포현탁액과 배양여액방제 효과 조사를 위하여 벼 절단 잎의 1cm까지 낮은 부위를 YC7007균주의 세포현탁액(2×10^7 cfu/ml, $A_{600}=0.1$)에 30초간 담귀 둔 뒤, 28°C 에서 24시간 유지하였다. 60시간 배양한 YC7007 균주의 배양여액을 10 mM $MgSO_4$ 을 이용하여 1:10 비율로 희석한 뒤, 잎에 분무하고 28°C 에서 5일간 유지하였다. 그 후 잎당 2개의 곰팡이 disk를 접종하고, 다시 28°C 에서 5일간 유지시켰다. 발병율은 병원균 접종 7일 후에 병 발생지수(0-5)를 사용하여 측정하였다. Mock 처리군은 한천만을 접종하여 유지시켰다. 20개의 잎을 사용하여 3반복 수행하였다. 벼 유묘의 토양, 뿌리, 지상부 부분에서 병원균 농도 조사는 *G. fujikuroi*를 위한 선택 배지(2.5 ppm Malachite green+1% PDB+ 1.5% 한천)를 이용하였으며, YC7007 균주를 각각 10^6 , 10^7 cfu/ml 농도로 처리 후 20일이 지나서 유묘의 토양, 뿌리, 지상부 부분에서의 병원균 개체수를 측정하였다.

사. YC7007 균주의 대량 배양 및 제제화

YC7007 균주의 대량배양을 위해 배지조성과 배양시간을 달리하여 배양한 결과 건조 전후의 생균수 변화가 가장 적은 배지(glucose 0.25 g, NaCl 0.5 g, Pancreatic digest of Casein 1.7 g, K_2HPO_4 0.25 g, Peptic Digest of Soybean Meal 3.0 g, 1 L 증류수)를 개발하였다. 개발한 배지 50 ml에 28°C, 120 rpm 조건으로 24시간 동안 초기배양을 한 뒤 50 L fermenter에 30 L의 배지를 멸균하고 접종하였다. 배양 조건은 28°C, pH7.0, 120 rpm, 0.5 vvm, ps 0.5으로 72시간 동안 배양하였다(F26). 대량배양을 위해 500 L fermenter에 200 L 배지를 멸균하고 24시간 배양한 배양액 20 L를 접종한 후 72시간 배양(28°C, pH7.0, 70 rpm, 200 vvm, ps 0.5)하였다(F27). 제제화를 위해 배양액과 혼합물질배합과 실온건조, 분무건조의 조건을 최적화 하기 위해 여러 번의 시험을 시도한 결과 72시간 배양된 배양액에 계면활성제와 부자재를 혼합하여 분무건조한 후 이 원제와 광물질을 함께 혼합하였을 때 가장 최적화 되었다(표2).

표 2. 대량 배양과 제제화를 위한 세균 밀도 분석

No.	총배양액 (L/No.)	배양시간(H)	방 법	결 과
F1-F9	30	68	분무건조. 실온건조	건조실패, 오염
F10-F13	1	48	광물질과 부재 혼합 후 실온건조	용해도가 떨어짐
F14	2	48	광물질과 부재 혼합비율 조절 후 실온건조	용해도 양호함
F15-F20	2	67	실온건조	밀도가 균일하지 않음
F21	2	62	F11-F15 재실험	field test에 사용함
F22	3	55	분무건조	실내효과 실험
F23-F24	3	54	분무건조와 실온 건조시 광물질과 계면활성제 첨가 비교	계면활성제의 첨가시 용해성 높음 균밀도 : 4.0×10^8 cfu/g
F25	30	72	광물질과 계면활성제 첨가 분무건조	균밀도 : 4.4×10^8 cfu/g
F26	30	72	부재와 계면활성제 첨가 분무건조 후 광물질 혼합	균밀도 : 2.6×10^8 cfu/g
F27	200	72	부재와 계면활성제 첨가 분무건조 후 광물질 혼합	균밀도 : 9.2×10^9 cfu/g

아. YC7007 처리에 의한 작물병 방제 효과

(1) 방제 효과 및 스펙트럼 조사 (포트 실험)

YC7007 균주의 병 방제 스펙트럼 확인을 위하여 한국화학연구원에 의뢰하여 7종의 주요 작물병에 대한 방제 효과를 조사하였다. 대상 식물병은 벼도열병(병원균: *Magnaporthe oryzae*), 벼잎집무늬마름병(병원균: *Rhizoctonia solani*), 토마토잿빛곰팡이병(병원균: *Botrytis cinerea*), 토마토역병(병원균: *Phytophthora infestans*), 밀붉은녹병(병원균: *Puccinia recondita*), 보리흰가루병(병원균: *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) 및 고추탄저병(병원균: *Colletotrichum coccodes*)이었다. 처리 방법은 엽면 살포 및 관주 처리 두 가지 방법으로 실시하였다. 시료 접종 1일 전에 식물병 당 식물 2포트씩을 회전판 위에서 회전시키면서 spray gun(압력: $1\text{kg}/\text{cm}^2$)으로 식물체 전체에 골고루 약제가 부착되도록 살포하였다. 관주 처리는 의뢰한 시료를 접종 7일 전에 식물병 당 식물 3포트에 약제 용액을 포트 당 5 ml씩 관주 후 온실에서 1주일 동안 수분을 공급하면서 재배하였다. 각 병원균의 접종 및 발병 조건은 한국화학연구원에서 이미 확립되어 있는 다음 조건 이용하였다.

벼도열병(RCB)은 병원균인 *Magnaporthe grisea* KJ201 균주를 쌀겨 한천배지에 접종하여 25°C 배양기에서 2주간 배양하여 형성된 포자를 살균증류수로 수확하여 일정농도의 포자현탁액(3×10^5 spores/ml)을 준비하였다. 이를 약제 처리된 낙동 벼(본엽 3~4엽기)에 흘리내릴 정도로 충분히 분무하였다. 접종된 벼는 습실상에서 암상태로 24시간 배양한 뒤에 상대습도 80% 이상이며 온도가 26°C인 항온항습실에서 4일간 발병시킨 후 병반면적율을 조사하였다. 벼잎집무늬마름병(RSB)은 적당한 양의 밀기울을 1 L 배양병에 넣고 멸균한 후 병원균인 *Rhizoctonia solani* AG1 균주를 접종한 후 25°C 배양기에서 7일간 배양하였다. 병 접종은 배양된 군사덩어리를 적당하게 잘게 마쇄하여 약제 처리된 4~5엽기의 낙동 벼가 자란 포트에 고르게 접종하여 습실상(25°C)에서 7일간 배양하여 발병을 시킨 후 병 조사는 잎집(sheath)에 형성된 병반면적율을 조사하였다. 토마토갯빛곰팡이병(TGM)은 병원균인 *Botrytis cinerea*를 감자한천배지에 접종하여 25°C 항온기에서 배양하여 형성된 포자를 접종원으로 사용하였다. 병 접종은 포자를 수확하여 혈구계를 사용하여 포자농도를 3×10^5 spores/ml로 만든 후 약제 처리된 토마토 유묘(2~3엽기)에 분무접종 하였다. 접종된 토마토 유묘는 20°C 습실상(상대습도 95% 이상)에 넣어 3일간 발병을 유도시킨 후 병반면적율을 조사하였다. 토마토 역병(TLB)은 병원균인 *Phytophthora infestans* 균주를 오토밀 배지에 접종하여 20°C 배양기에서 배양하여 유주자낭을 형성시켰다. 병원균 접종은 형성된 유주자낭을 살균증류수를 첨가하여 수확하고 포자농도가 3×10^4 sporangia/ml인 포자현탁액을 만들었다. 이들을 냉장고에 넣어 저온처리하여 유주자를 유출시켜 유주자 현탁액을 준비하였다. 이를 약제 처리된 토마토 유묘(2~3엽기)에 분무접종 하였다. 병원균을 접종한 토마토 유묘는 20°C 습실상에서 2일간 습실처리 하고 항온항습실에서 발병시켜 접종 3일 후에 잎에 발생한 병반면적율을 조사하였다. 밀붉은녹병(WLR)은 병원균인 *Puccinia recondita*는 활물기생균이므로, 실험실에서 식물체에 직접 계대배양하면서 밀 유묘에 형성된 하포자(urediniospores)를 접종원으로 사용하였다. 균주의 약효조사를 위하여 일회용 포트(직경: 4.5 cm)에 5립 씩 밀 종자(품종: 은파)를 파종하여 온실에서 8일간 재배한 1엽기 유묘에 약제를 처리하고 1일 후에 접종원(포자 0.11 g/L)을 분무접종 하였다. 접종된 밀 유묘는 20°C의 습실상에서 1일간 습실처리한 후에 상대습도가 70%인 20°C의 항온항습실로 옮겨서 발병을 유도하고 접종한지 7일 후에 병반면적율을 조사하였다. 보리흰가루병(BPM)은 병원균인 *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*는 활물기생균이므로, 실험실에서 보리 유묘로 계대배양하면서 보리에 형성된 포자를 접종원으로 사용하였다. 약효 조사는 일회용 포트(직경: 4.5 cm)에 5립씩의 보리 종자(품종: 동보리)를 파종하여 온실에서 8일간 재배한 1엽기 유묘에 약제를 살포하고 온실에서 풍건시킨 후 약제 처리된 보리에 흰가루병 포자를 털어 접종하였다. 접종된 보리 유묘는 20~23°C, 상대습도 60% 정도의 항온항습실에 두어 7일간 발병시킨 후 병반면적율을 조사하였다. 고추 탄저병(RPA)은 병원균인 *Colletotrichum coccodes*를 오토밀 배지에 접종하고 25°C에서 10일 동안 배양하여 형성된 포자를 수확하고, 포자 농도를 ml 당 2×10^5 spores가 되도록 조정하여 포자현탁액을 준비하였다. 약제를 처리한 고추 유묘(3~4엽기)에 준비한 포자현탁액을 분무접종하고 이를 습실상

(25°C)에 넣고 2일 동안 습실처리한 후에 항온항습실(25°C, 75% RH)에서 발병시켰다. 접종 3일 후에 고추 잎에 형성된 병반의 면적율을 조사하였다. 병 조사로부터 얻은 병반 면적율은 다음과 같은 계산식에 따라 계산하여 방제가를 산출하였다.

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

(2) 딸기 흰가루병 약효, 약해 시험 (포장시험)

YC7007 균주의 딸기 흰가루병 효능 및 방제 효과를 알아보기 위하여 국립경상대학교 실험 농장 하우스 (진주시 대곡면)와 경북 경주시 내남면 하우스 2곳의 포장에서 실험을 수행하였다. 대곡면에서 실시한 시험은 3월 22일부터 4월 12일까지 실시하였으며, 딸기의 품종은 매향이다. 대곡면의 시험 처리구는 무처리, YC7007 균주 처리구로 나누어서 난괴법으로 3반복으로 설정하였다. 약효 시험의 경우 총 구수는 6구, 구당 면적 5 m², 소요면적은 30 m²였고, 약해 시험의 경우 총 구수는 6구, 구당 면적은 1 m², 소요면적은 6 m²이었다. YC7007 균주는 균체 액체를 500배 희석하여 1x10⁸ cfu/g 농도로 발병 초 7일 간격으로 3월 22일, 3월 29일, 4월 5일 3회 경엽 처리하였다. 딸기 흰가루병 발병률 조사를 위해 각 처리구 당 발병된 딸기 개수를 세어 발병률을 계산하였다(이병과일 수*100/총 조사 과일 수). 약해조사는 약해 유무를 달관조사 하였다. 약효 조사는 2013년 3월 29일, 4월 5일, 4월 12일 총3회 3반복으로 실시하였으며, 약해 조사는 3월 25일, 3월 27일, 3월 29일 총 3회 3반복으로 실시하였다. 내남면에서 실시한 시험은 4월 4일부터 4월 25일까지 실시하였으며, 딸기의 품종은 장희이다. 내남면의 시험 처리구는 무처리구, YC7007 균주 처리구, 트리플루미졸 수화제 처리구로 나누어서 난괴법으로 3반복으로 설정하였다. 약효 시험의 경우 총 구수는 12구, 구당 면적 10 m², 소요면적은 120 m²였고, 약해 시험의 경우 총 구수는 15구, 구당 면적은 2 m², 소요면적은 30 m²였다. YC7007 균주는 균체 액체를 250배, 500배 희석하여 1x10⁸ cfu/g 농도로 발병 초 7일 간격으로 4월 4일, 4월 11일, 4월 18일 총 3회 경엽 처리하였다. 대조구인 트리플루미졸 수화제는 주성분 함량 30%로 4000배 희석하여 사용하였다. 약효 조사는 2013년 4월 24일 3반복으로 실시하였으며, 약해 조사는 4월 7일, 4월 9일, 4월 11일 총 3회 3반복으로 실시하였다.

<실험 결과>

가. 신규 길항 내생세균의 분리·동정 및 특성 조사

(1) 난균류에 길항적인 내생세균의 분리

남해개펄에서 자라는 6종류의 염생식물의 뿌리에서 각기 다른 균총 모양을 가진 256종의 내생세균을 분리하였다. 모든 분리한 세균은 필터로 멸균여과된 바닷물을 이용한 1/10 R2A배지에서 배양하였으며, 균총의 크기가 아주 작은 미생물은 2-3주간 배양하였다. 순수 배양 후 *P. ultimum*과 *P. capsici*와의 대치 배양을 통해 억제력이 좋은 24종의 내생세균을 선발하였다(표 3).

(2) 분리된 내생세균의 항균력 조사

선발된 내생세균들 중에서 YC6890, YC6891, YC6892, YC6904는 *P. ultimum* 과 *P. capsici*에 대해 4-5 mm의 균사 생장억제 효과가 있었으며, YC6888, YC6889, YC6893, YC6900, YC6901, YC6902, YC6905, YC6907, YC6909, YC6911는 3 mm 이하의 약한 억제효과를 보였다. 또, YC6894, YC6895, YC6896, YC6897, YC6898, YC6906와 YC6910 균주는 한 종류 병원균에 대해 강한 억제효과를 보였지만, 다른 한 가지 병원균에 대해서는 약한 억제효과를 나타냈다. 가장 억제효과가 우수한 균주는 YC6258, YC6887, YC6897 균주로 6-7 mm의 강한 억제효과가 있었다.

(3) 길항력을 가진 내생세균의 16S rDNA 염기서열 분석

선발된 24종 내생세균의 16S rDNA 유전자 염기서열을 결정한 결과, *Bacillus* species가 총 8종으로 가장 많았으며, 그 다음으로 *Pseudomonas*(3종), *Stenotrophomonas*(3종), *Staphylococcus*(2종), *Microbacterium*(2종) species로 나타났다. 길항력이 가장 좋았던 YC6887과 YC6897 균주는 각각 *Martellella mediterranea* MACL11^T, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC13637^T와 98.3%, 98.8%의 유사도를 보였다. 또 YC6258 균주는 *Saccharosporium impatiens*와 91.2%의 낮은 유사도를 보였다. 또 길항력을 가지면서 유사도가 낮은 균주는 YC6898로 *Hoeflea alexandrii* AM1V30^T와 95.9%의 유사도를 나타냈다.

(4) 세포벽 분해효소의 생성 조사

24종의 내생세균이 생산하는 곰팡이의 세포벽 분해 효소인 cellulase, chitinase, protease, β-1, 3 glucanase의 생성여부를 조사하였다. phylum *Firmicutes*에 속하는 길항 세균 YC6889, YC6893, YC6894, YC6902, YC6905, YC6906은 상대적으로 높은 cellulase 활성을 보였다. YC6897 균주는 강한 길항력 뿐 아니라 강한 cellulase 활성도 보였다. 또한 YC6258 균주도 *P. ultimum*, *P. capsici*에 6-7 mm의 억제효과를 나타냈을 뿐 아니라 강한 cellulase 활성을 보였다. *Actinomycetes*에 속하는 균주들 YC6895, YC6896, YC6901는 chitinolytic 활성을 보였고, 단백질 분해활성은 *Firmicutes*, *Actinomycetes*, *γ-Proteobacteria*에 속하는 그람양성 내생세균들인 YC6889, YC6894, YC6896, YC6897, YC6901, YC6810에서만 나타났다. β-1,3 glucanase 활성은 하나의 그룹에 집중되지 않고 다른 여러 종류의 균주들에서 나타났다.

표 3. 남해개펄에 서식하는 염생식물에서 분리한 내생세균의 계통분류 유사도, 길항력 및 세포벽 분해효소 생산 여부

Origin/ Strains number			Antagonistic activity against ^a		Enzyme production ^b			
	Closely related type strains	% identity	<i>P.</i> <i>ultimum</i>	<i>P.</i> <i>capsici</i>	Cellulase	Chitinase	Protease	β-1,3 glucanase ^e
<i>Rosa rugosa</i>								
YC6887	<i>Martellella mediterranea</i> MACL11 ^T	98.3	+++	++	++	-	-	+
	<i>Pseudomonas koreensis</i>							

YC6888	Ps 9-14 ^T	99.1	+	+	-	-	-	+
YC6889	<i>Bacillus gibsonii</i> DSM 8722 ^T	99.5	+	+	+	-	+	-
YC6890	<i>Pseudomonas brenneri</i> CFML 97-391 ^T	99.4	++	++	-	+	-	-
YC6891	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 ^T	98.8	++	++	+	-	-	+
<i>Vitex rotundifolia</i>								
YC6892	<i>Bacillus stratosphericus</i> 41KF2a ^T	100	++	++	-	-	-	+
YC6893	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> GTC 843 ^T	98.2	+	+	+	-	-	-
YC6894	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 ^T	99.8	++	+	+	+	+	-
YC6895	<i>Micrococcus endophyticus</i> YIM 56238 ^T	99.2	++	+	-	+	++	-
YC6896	<i>Microbacterium arborescens</i> DSM 20754 ^T	100	++	+	-	+	+	+
YC6897	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637 ^T	98.8	+++	+	+++	-	+	-
<i>Suaeda maritima</i>								
YC6898	<i>Hoeflea alexandrii</i> AM1V30 ^T	95.9	++	+	+	-	-	+
YC6900	<i>Paenibacillus barcinonensis</i> BP-23 ^T	98.8	+	+	-	-	-	+
YC6901	<i>Microbacterium laevaniiformans</i> IFO 15234 ^T	99.6	+	+	-	+	-	+
YC6902	<i>Mycobacterium frederiksbergense</i> DSM 44346 ^T	99.2	+	+	+	-	-	+
<i>Carex scabriifolia</i>								
YC6258	<i>Saccharosporillum impatiens</i> EL-105 ^T	91.2	+++	+++	+++	-	-	-
YC6904	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T	100	++	++	-	-	+	+
YC6905	<i>Bacillus aerius</i> 24K ^T	100	+	+	+	-	-	-
<i>Glehnia littoralis</i>								
YC6906	<i>Bacillus gibsonii</i> DSM 8722 ^T	99.7	++	+	++	-	-	-
YC6907	<i>Bacillus thio-parans</i> BMP-1 ^T	99.8	+	+	-	-	-	+
YC6908	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 ^T	99.3	+	+	+	-	-	-
YC6909	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637 ^T	99.1	+	+	+	-	-	-
<i>Elymus mollis</i>								
YC6910	<i>Bacillus stratosphericus</i> 41KF2a ^T	100	++	+	-	++	-	-
YC6911	<i>Bacillus pumilus</i> DSM 27 ^T	99.8	+	+	-	-	++	-

^a세균의 길항력은 28°C에서 4-6일간 배양 후 균사생장 억제 정도를 측정하였다: +, <3 mm; ++, 4-5 mm; +++, 6-7 mm.

^b효소활성은 내생세균 균총 주변의 투명환의 크기를 측정하여 조사하였다: -, Negative; +, <3 mm; ++, 4-5 mm; +++, 6-7 mm.

(5) 식물생장촉진 특성 조사

16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 새로운 종으로 확인된 YC6887, YC6898 균주를 식물생장 촉진에 관여하는 인자들인 인산용해, IAA 및 siderophore 생산, 질산환원과 같은 조사를 위해 선발하였다. 선발된 2 균주는 *α-Proteobacteria* 그룹에 속하여 각각 남해개펄에 서식하는 염생 식물인 *R. rugosa*, *S. maritima*에서 분리되었다(표4). 식물생장촉진조사에서 2균주 모두 tricalcium phosphate를 용해하였고, IAA를 생산하는 것으로 나타났다. Siderophore 생산은 YC6898 균주에서만 확인되었고 nitrate reduction 능력은 YC6887에서만 관찰되었다(표 4). 또한, YC6887균주는 *A. thaliana*의 배양 4주 뒤 대조구에 비해 뿌리와 줄기의 생장이 촉진되는 것을 확인하였다.

표 4. 남해 개펄에 서식하는 염생식물에서 분리한 내생세균의 식물생장 촉진 요소

Strain no	Closely related type strain	Growth promotion characteristics				
		Phosphate solubilization	IAA production	Siderophore production	Nitrate reduction	Growth promotion
YC6887	<i>Martelella mediterranea</i>	++	+	-	+	+
YC6898	<i>Hoeflea alexandrii</i>	+	+	+	-	-

(6) YC6887 균주의 동정

YC6887 균주는 Gram 음성이었고 운동성이 없었으며, 세포는 막대형(넓이 0.8 μm, 길이 1.2-2.3 μm)이었고 포자는 형성하지 않았다. 혐기성 조건에서는 성장하지 않았다. YC6887 균주의 생리학적 그리고 생화학적 특성들은 종 기술과, 연관형태의 종들과 선택특성의 비교표에 요약하였다(표 5). 주 지방산은 C_{18:1ω7c}(57.1%), C_{19:0ω8c} cyclo(7.6%)으로 *Martelella* 속의 형태종의 지방산 구성과 유사하였다. 그러나 YC6887 균주는 iso- C_{17:0}3-OH, C_{16:0} 그리고 C_{18:0}의 비율이 달라서 *Martelella* 속의 형태종의 지방산과 구분되었다(표 6). 그리고, 이 균주가 다른 유사한 종들과 다른 점은 aesculin, β-1,3 glucanase, casein, CMC의 가수분해와 탄소원으로 caproate와 adipate를 이용하는 것이다. YC6887 균주의 주 호흡 quinone은 Q-10 이었고, 16S rDNA 서열의 비교분석 결과 *Martelella mediterranea* MACL11^T와의 유사도가 98.3%로 *Martelella*속에 속하였으며, *Rhizobium* 속의 종들과는 91.6-93.6%, *Aurantimonas coralicida* DSM14790^T과는 92.1%, *Brucella* 속의 종들과는 92.4% 이었다. 근연 계통발생 가계도(그림 3)에서 높은 bootstrap value(100%)를 나타낸 것을 볼 때, YC6887 균주는 *Martelella mediterranea* MACL11^T와 가장 가까운 집단을 형성했다. 이와 같이 16S rDNA 서열의 유사성, 계통발생학적 분석과 지방산분석 결과로 볼 때 YC6887 균은 *Martelella*속에 속하는 것으로 나타났다. YC6887 균은 *Martelella* 속과 여러개의 표현형 특징이 있는 다른 가까운 속들

과 구별되었다(표 5). 그러므로 이 다양한 분류학적 실험을 근거로 볼 때, YC6887 균주는 *Martelella*속의 새로운 종이 분명하므로 이 균의 이름을 *Martelella endophytica* sp. nov.로 제안하였다.

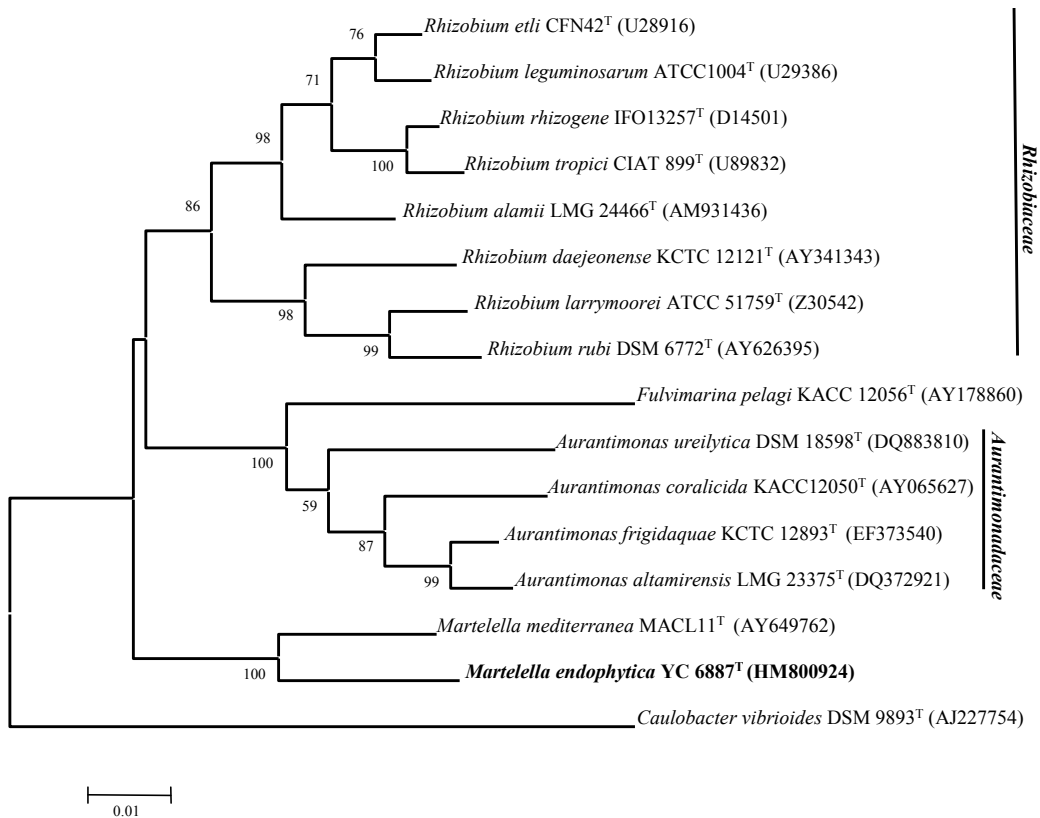


그림 3. YC6887 균주의 다른 근연종들 사이의 연관을 나타내는 16S rDNA 서열로 만든 계통수. 교점 숫자는 1000반복에서 나온 bootstrap value를 나타낸다(50%이상의 수치가 근연집단에 주어진다). 괄호 안에 있는 숫자는 GenBank/EMBL/DDBJ 접근 수치다. 가로줄, nucleotide 위치 당 0.01 치환.

표 5. YC6887 균주의 근연종과 구별되는 특성.

균종: 1, YC6887^T; 2, *M. mediterranea* DSMZ 17316^T; 3, *F. ulvimarina pelagi* KACC 2056^T; 4, *Aurantimonas coralicida* KACC 12050^T.

Characteristic	1	2	3	4
Isolation source	Halophyte	Lakewater	Seawater	Coral
Growth without NaCl	+	+	-	+
Salt range(%)	0-9	0-6	1-8	0-10
Temperature range (°C)	4-40°C	4-37°C	4-37°C	4-40°C
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Production of pigment	-	-	+	+
Nitrate reduction	+	+	-	-
Hydrolysis of:				
Aesculin	+	+	-	-
β -1,3 glucanase	+	-	-	-
Casein	+	-	-	-
CMC	+	-	-	-
Acid from carbohydrate				
Glucose	+	+	+	+
Rhamnose	+	-	+	-
Melibiose	+	-	+	+
Mannose	-	-	-	+
Sucrose	+	-	-	-
Amygdalin	+	-	-	-
Arabinose	+	-	-	+
Utilization of carbon source				
Glucose	+	+	+	+
Arabinose	+	-	+	+
Mannose	+	-	+	+
Gluconate	-	+	+	-
Malate	-	+	+	-
Mannitol	+	+	-	+
Maltose	+	+	-	+
Caproate	-	-	-	-
Adipate	-	-	-	+

표 6. YC6887 균주의 다른 근연종들과 구별되는 세포질의 지방산 함량.

균종 : 1, YC6887; 2, *M. mediterranea* DSMZ 17316^T; 3, *Fulvimarina pelagi* KACC 2056^T; 4, *Aurantimonas coralicida* KACC 12050^T. 자료는 합계 지방산의 백분율로 표시하였다. tr, 1.0%이하 ; -, 검출되지 않았음.

Fatty acid	1	2	3	4
C _{12:0}	tr	-	-	-
C _{16:0}	2.4	12	2.6	6.7
C _{17:0}	-	tr	-	tr
C _{18:0}	2.2	tr	8.2	1.5
C _{16:1} ω7c	-	tr	-	1.3
C _{18:1} ω7c	57.1	21.6	82.9	76.9
C _{16:0} 3-OH	tr	tr	-	-
C _{18:1} 2-OH	-	tr	tr	2
C _{18:0} 3-OH	1.7	tr	tr	
iso-C _{17:0} 3-OH	7.4	tr	-	-
C _{19:0} ω8c cyclo	7.6	41.4	2.6	10.5
C _{19:0} 10-methyl	2.6	tr	-	-
C _{18:1} ω7c 11-methyl	tr	8.8	-	-
Summed feature 2	5	7.6	-	-
Summed feature 3	1.3	tr	-	-
Summed feature 7	tr	-	-	-

Martelella endophytica YC6887 sp. nov.에 대한 개요:

Martelella endophytica (en.do.phy'ti.ca.그리스 접두어 endo- 안에; 그리스 중성명사 *phyton*- 식물; 새 라틴어 형용사 *endophytica* - 식물안에 있는, 원래 식물 조직에서 분리한 것과 관련). 세포는 Gram 음성, 포자는 형성하지 않는 막대형(0.5-0.8 μm × 1.2-2.3 μm). Marine agar 2216에서의 개체는 불투명하고, 둥글고, 가장자리가 매끄럽고, 가운데가 볼록하고 매끄럽다. 대사는 임의 호기성이고 Oxidase와 catalase는 양성이다. 생장에 NaCl은 필수적이지는 않으나 NaCl 농도 9%(w/v)까지 성장한다. Indole 생산, arginine deaminase 활성, aesculin 가수분해는 양성이고 반면에 gelatin 가수분해와 ONPG 반응은 음성이다. Voges-Proskauer 반응은 양성이다. 이 균은 단일 탄소원으로 glucose, arabinose, mannose, mannitol 그리고 maltose를 이용한다. 지배적인 지방산은 C_{18:1}ω7c(57.1 %), C_{19:0}ω8ccyclo(7.6 %)이다. 주 호흡 quinone은 Q-10이다. YC6887 균주는 대한민국 남해섬 해안가에서 자라는 *Rosa rugosa* Thunb. ex

Murray 의 뿌리 내부 조직에서 분리하였다.

(7) YC6887 균주의 병원균 억제 효과(in vitro, in vivo 활성)

YC6887 균주의 고추 모잘록병균(*P. ultimum*)과 역병균(*P. capsici*)의 균사생장 억제효과를 배양기내에서 검정한 결과 역병균 보다는 모잘록 병균에 대한 억제효과가 더 좋았다. YC6887의 역병 방제효과를 고추모종을 이용하여 온실에서 조사하였는데, 고추 묘를 세균 현탁액에 담근 후 포트에 이식하고 역병균의 유주자를 접종한 후 병 발생 정도를 평가하였다. 그 결과 역병균 만을 접종한 대조구에서는 접종 후 일주일 내에 암색 갈반 병반이 줄기에 나타났고 27일이 되면서 그 병반은 급속히 확대되어 잎들이 시들고 떨어지며 줄기가 꺾이면서 식물의 다른 부분으로 전파되었다. 내생 길항 균주인 YC6887을 처리한 고추에서는 병 발생이 70% 정도로 대조구에 비하여 유의성 있게 낮았다(그림 4). 그러나 병원균 접종 농도를 5.0×10^4 유주자/ml 정도로 높이면 억제효과가 감소하였다(그림 5a). 동시에 길항 내생 세균 YC6887은 고추의 성장촉진 효과도 있어 세균이 처리된 고추의 주경장, 엽장 및 뿌리의 길이는 무처리의 고추보다도 길었다(그림 5b)

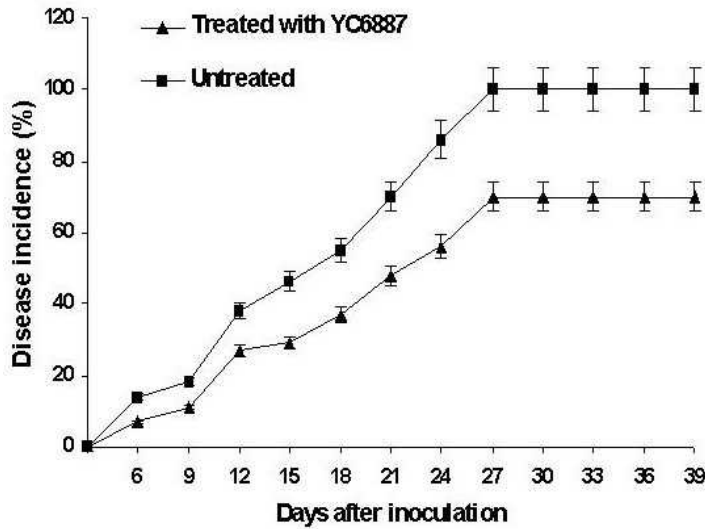


그림 4. YC6887 균주의 고추 역병 방제효과

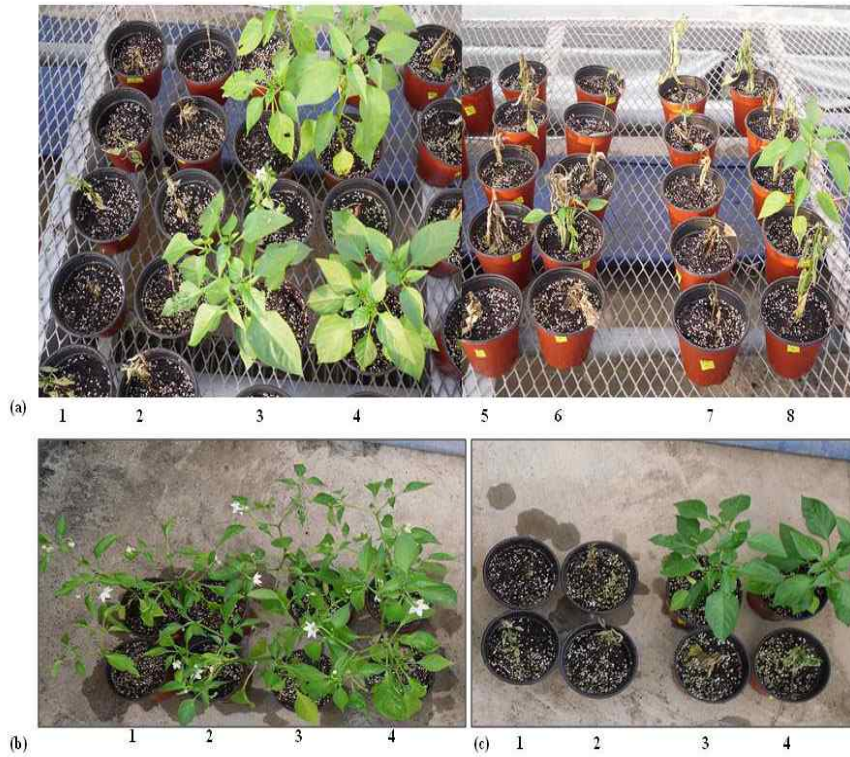


그림 5. YC6887 균주 처리에 의한 고추 역병의 방제 효과. (a) YC6887 균주의 처리와 병원균의 5.0×10^4 유주자/ml 접종: 1-2, 역병균만 접종; 3-8, 역병균+YC6887. (b); 1-2, 대조구; 3-4, YC6887 세균처리. (c); 1-2, 역병균 처리; 3-4, 역병균+YC6887).

(8) YC6887 균주의 역병균 성장 억제 및 균사 형태 변형

고추 역병균의 균사에 YC6887이 유도한 형태 변형을 조사하기 위하여 SEM을 사용하였다. 이 분석의 결과, 영향 받은 균사는 정상적인 균사와는 달리 공통적으로 균사 주위에 많은 소낭들이 돌출하고 불규칙적인 부풀림과 기형이 확인되었다(그림 6). 동시에 시간이 더 경과될 수록 세포질 분출과 멀리 떨어진 균사에서 피저가 관찰되었다.

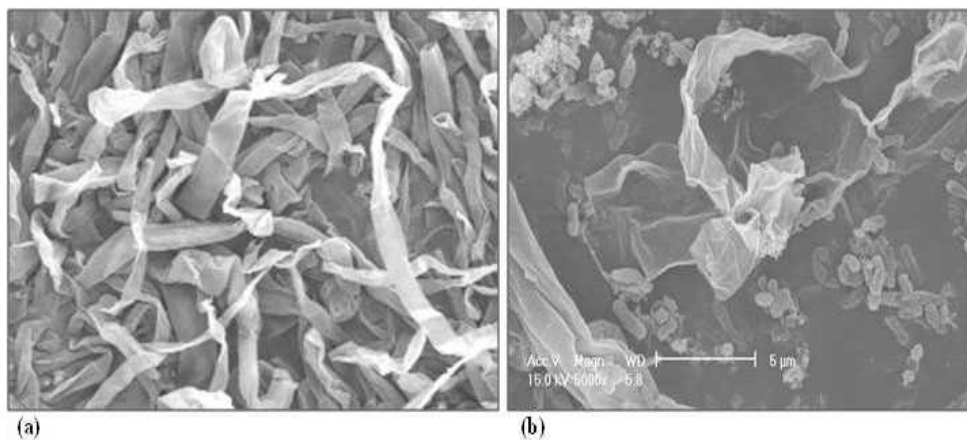


그림 6. 고추 역병 균사의 주사전자현미경 사진(a)과 YC6887균 처리 12시간 후(b).

(9) YC6887 균주의 식물생장촉진 작용의 특성 및 기주 식물내의 집락 형성

YC6887 균주는 질산염 환원작용을 가지고 있고 siderophore는 생산되지 않았으며, IAA를 생산하고 인산염을 용해할 수 있었다. YC6887 균주를 고추 뿌리에 처리하였을 경우 고추 뿌리와 줄기 길이의 신장을 보였고(그림 7a와 b), *A. thaliana*의 경우에는 무처리에 비해 엽면적을 증가시켰다(그림 7c와 d). 이 균주의 식물 조직 내에서의 집락 형성 관찰을 위하여 형광유전자 삽입된 균주 YC6887(pRK415-GFP)를 담배 잎에 침투시키고 접종 3일 후 잎의 절단부위를 관찰하였다. 식물 세포의 형광을 형광현미경으로 관찰한 결과 담배 잎의 내부조직에서 작은 집락의 형성이 관찰되었다(그림 8). 이는 이 균주의 식물체 내의 생존을 확인하는 것이다.



그림 7. YC6887 균주의 고추(a, b)와 *A. thaliana* (c, d)에 대한 식물생장촉진효과

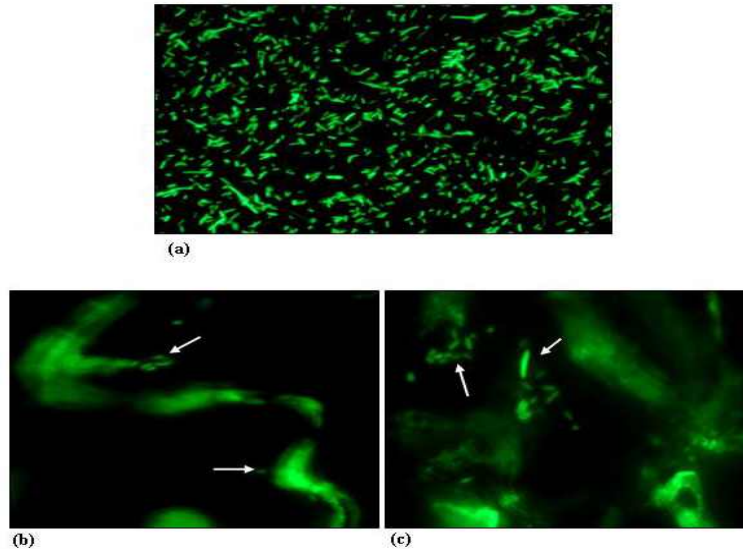


그림 8. 담배 잎의 표면형광현미경 하에서의 YC6887 균주 집락. 화살은 gfp가 붙어 있는 YC6887 균주의 위치를 나타낸다.

(10) YC6887 균주에 의한 Arabidopsis에서의 전신 저항성 유도

YC6887 균주를 Arabidopsis에 처리할 경우 유도되는 저항성 경로가 Jasmonate/ethylene 경로인지 혹은 salicylic acid 경로인지를 조사하기 위하여 Arabidopsis 묘를 YC6887 균을 처리한 토양에 심었다. 이식 후 5주 된 묘에 병원성이 있는 균주와 병원성이 없는 *P. syringae* pv. *tomato* 균주를 접종하였다. 대조구로 병원균을 접종하기 4일, 7일 전에 10 mM MgSO₄ 용액을 식물에 토양관주 처리하였다. 4일 후 YC6887 균주를 처리한 토양에서 자란 식물이 무처리 그리고 병원성과 비병원성균을 처리한 식물보다 약간 컸다(그림 9a-d). *P. syringae* 병원성균을 처리한 식물의 잎은 광범위하게 퍼지는 탈색현상에 둘러 싸여 괴저병해가 나타난 반면 YC6887을 미리 처리 했거나 비병원성 균을 처리한 식물에서는 현저히 적은 증상을 보였다(그림 9c-d). 무처리인 대조구 식물은 아무런 증상이 없었다. 전신 저항성의 다른 경로의 활성이 각 경로에 대한 유전자 표지를 이용하여 확인되었다. 저항성 유도 처리 후 서로 다른 시점에서 수확한 유도된 식물과 유도되지 않은 식물의 잎에서 PR 유전자 발현을 조사하였다. RT-PCR 분석 결과 *P. syringae* 균의 침윤 접종 2일 후 PR-5 transcript 축적을 알 수 있었다(그림 10a). 이에 비해 YC6887로 침윤된 잎에서는 PR mRNA의 국부 축적은 관찰되지 않았다. YC6887 처리가 알려진 jasmonate 혹은 ethylene 유도 반응인지를 조사하기 위하여, jasmonate 유도 유전자인 항 진균 단백질을 입힌 식물 방어 유전자 *PDF1.2*를 조사하였고 MeJA 와 ACC 모두 앞에서 *PDF1.2* transcript 축적을 유도하였다. YC6887을 처리한 식물의 잎에서는 *PDF1.2* 의 transcript 수준이 증가하는 것이 관찰되었는데(그림 10b), 이는 YC6887의 균주 처리에 의한 유도저항성 발현이 jasmonate와 ethylene 반응의 결과임을 알 수 있었다.

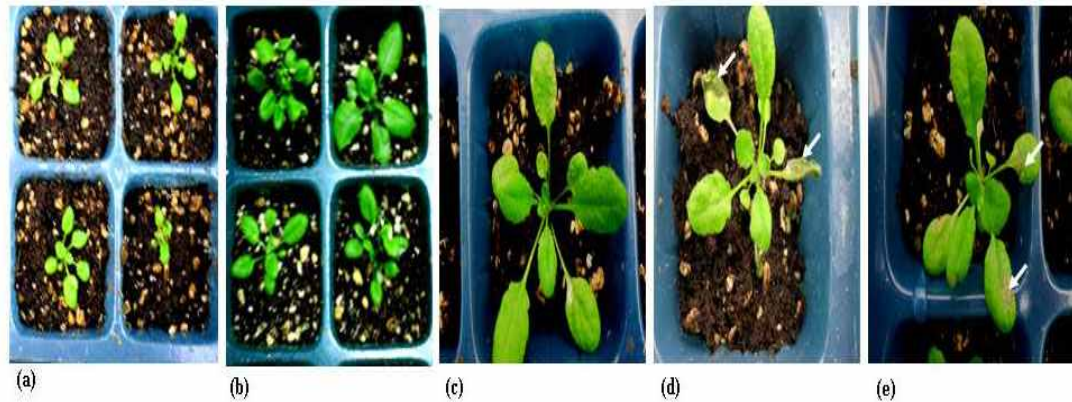


그림 9. *A. thaliana*의 반응. (a)무처리, (b)YC6887 균주 처리, (c) 비병원성 *P. syringae* pv. *tomato*(*Pst*) 처리, (d) 병원성 *Pst* 처리, 발병심도가 화살표로 표시됨, (e) YC6887 균주의 전처리 후 병원성 *Pst*균을 접종한 것은 화살표로 표시된 무처리 식물보다 *Pst*균 발병정도가 적었다.

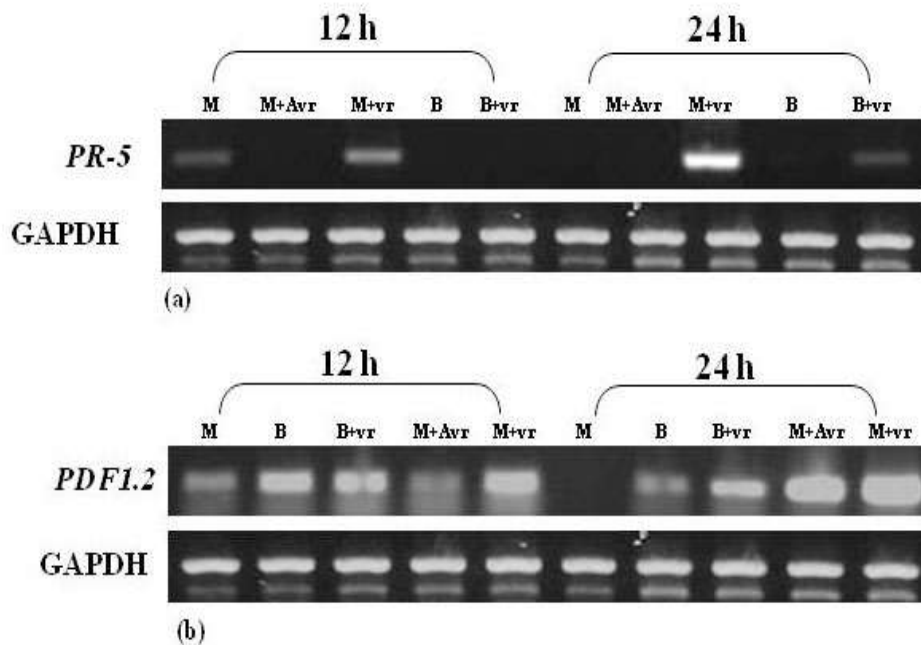


그림 10. YC6887 균주 처리에 의한 *A. thaliana* 식물의 방어 관련 유전자의 발현. 표지 유전자의 transcript 수준 (a) *PR-5*와 (b) *PDF1.2*는 각 유전자에 맞는 prime를 사용한 RT-PCR로 분석하였다. 구조적으로 발현된 GAPDH를 RT-PCR분석의 대조로 사용하였다. M, 무처리; Avr, 비병원성균 처리; B, YC6887 균주 처리; Vr, 병원성균 처리. 나. 신규 길항 내생세균의 최적 배양 조건 조사 및 항균물질의 대량생산

나. 항균 활성물질의 순수 분리 및 구조 결정

(1) 내생세균의 항균물질 생산 최적 배양 조건 조사

항균 물질의 생산을 위하여 서로 다른 여러 배지에서 시험한 결과 바닷물을 이용한 R2A 배지 조성을 수정한 배지에서 좋은 효과가 있었다. 바닷물이 없는 상태에서 항균 물질 생산을 확인하기 위하여 여러 다른 배지들을 시험하였고, 최종적으로 *P. capsici*, *P. ultimum*을 잘 억제하는 한 개의 배지를 선정하였다. 최종 선정된 배지를 최적화 하기 위하여, 다른 탄소원, 질소원과 염분 등의 다른 농도로 시험을 실시하였다. 탄소원으로는 dextrose를 사용하였을 때 가장 높은 효율이 관찰되었으나 전분과 설탕을 사용할 경우에는 생산 효율이 가장 낮았다. 복합 질소원 사이에서는 peptone과 효모 추출물이 항균 물질의 생산을 높이는 반면 casein 또는 tryptone은 생산을 저하시켰다. 그리고 초기 배지의 pH를 6.8로 하였을 때 높은 항균 물질 생산이 관찰되었다. 결과적으로 대량으로 항균 물질 생산 할 때의 최적 온도는 28°C, 배양 시간은 60시간으로 나타났다. 다른 탄소원과 질소원들을 지닌 시험 배지 중에서 수정된 YCS 배지에서 YC6887 균주를 배양하여 추출한 물질이 고추 역병균과 모잘록병원균 억제에 가장 효과가 높게 나타났다(그림 11). YC6887 균주의 배양 여과액(50 L)으로부터 여러 chromatography의 과정을 거쳐 분획된 것을 ethyl acetate로 추출하였다. 농축된 ethyl acetate 추출물은 C18 reversed-phase flash chromatography를 이용하여 단계적인 수용성 메탄올로 정제하여 24개 활성분액을 회수하였다. 이 분액들을 CH₂Cl₂에 녹여서 고추 모잘록병원균을 사용하여 대치배양법에 의하여 생물검정한 결과 2개의 분획만이 disk 주위에 저지원을 형성하였다. 현재 이 두 분획을 정제하여 구조를 밝히기 위한 실험을 진행 중에 있다.

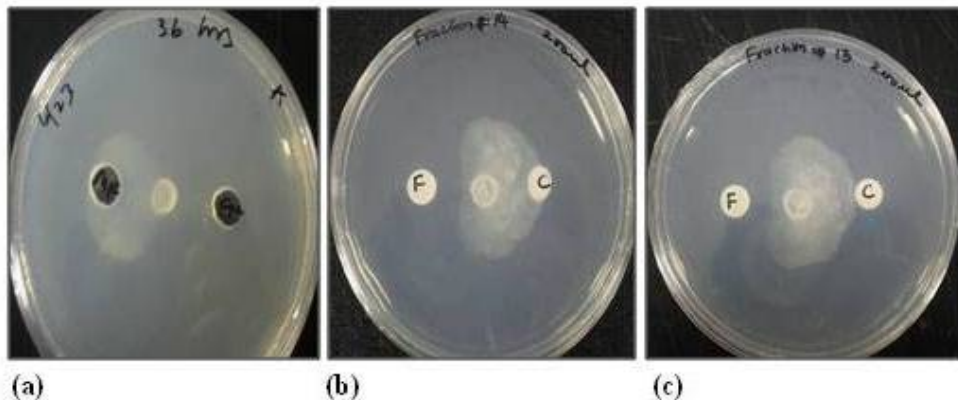


그림 11. YC6887 균주의 배양 여과액에 의한 고추 모잘록병원균의 억제. (a) YCS 배지균배양 여과액, (b) Silica gel column으로 분획된 13분획과 (c) 14분획.

(2) YC6258 균주로부터의 활성물질 구조 결정

YC6258 균주의 배양액에서 활성검정을 거쳐 최종 분리된 화합물 1의 경우, ¹H-NMR spectrum에서 δ 3.53 ~ 6.02의 영역에서 ribose의 특징적인 signal들이 나타났다. 또한 δ 8.08 및 8.11에서 aromatic sp² proton signal들이 나타나 이 화합물이 헥산 유도체임을 추정할 수

있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서, 12개의 탄소를 확인할 수 있었으며, δ 125.6 및 152.7에서 aromatic sp^2 carbon을 확인할 수 있었다. HMBC spectrum에서, δ_{H} 8.13이 ribose의 anomeric carbon과 correlation 하는 것을 확인하였고, cyan group의 carbon과도 correlation하는 것을 확인하여 ribose 및 cyanyl group과 이웃함을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 문헌과 비교하여 이 화합물을 4-amino-5-cyano-7-(β -D-ribofuranosyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-3-N-oxide (Toyocamycin-3-N-oxide)로 확인하였다(그림 12). Toyocamycin은 항바이러스, 항암 효과가 좋은 물질로 방선균에서 분리 보고된 바는 있으나, Toyocamycin-3-N-oxide의 경우 합성된 경우는 있으나 천연에서 분리, 보고된 바는 없다.

Toyocamycin-3-N-oxide; 흰색 무정형 분말. ^1H -NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ : 8.11 (1H, s, H-2), 8.08 (1H, s, H-2), 6.03 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-1'), 5.38 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, OH), 5.13 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, OH), 5.10 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, OH), 4.35 (1H, q, $J = 6.0$ Hz, H-2'), 4.10 (1H, q, $J = 4.2$ Hz, H-3'), 3.92 (1H, q, $J = 4.2$ Hz, H-4'), 3.65, 3.56 (each 1H, dt, $J = 4.2, 12$ Hz, H-5'); ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ : 166.3 (C-6), 158.0 (C-4), 152.7 (C-2), 150.8 (C-5), 125.6 (C-8), 110.9 (C-10), 87.2 (C-1'), 85.2 (C-4'), 73.8 (C-2'), 70.5 (C-3'), 61.8 (C-5').

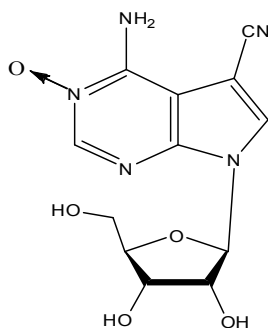


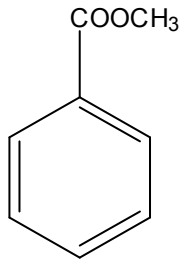
그림 12. YC6258 균주 생산 항균활성 물질의 구조(Toyocamycin-N-oxide)

(3) YC6887 균주로부터의 활성물질 구조 결정

YC6887 균주의 배양액에서 활성검정을 거쳐 최종 분리된 화합물 6종 중 2종의 화합물의 구조가 결정되었고, 나머지 화합물들은 구조 결정 중에 있다. 화합물 1의 경우, ^1H -NMR spectrum에서, δ 9.86에서 aldehyde의 특징적인 signal을 확인할 수 있었고, δ 6.95 및 7.80에서 A_2B_2 system의 aromatic ring의 proton signal을 확인할 수 있었다. 화합물 2의 경우, ^1H -NMR spectrum에서 δ 7.30 영역에서 benzenoid proton들을 확인할 수 있었고, δ 3.67에서 methoxy기를 확인할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서, δ 177의 에스터 carbon을 포함하여 8개의 탄소를 확인하고 문헌과 비교하여 이 화합물은 methyl benzoate로 확인하였다. 2종의

화합물은 식품 또는 화장품 등에 사용되는 일반적인 향균물질로는 알려져 있으나 아직 농업 용으로는 알려진 바가 없다.

- **Compound 1** 연한 갈색분말, $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, CDCl_3); δ 6.95 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.80 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 9.86 (1H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (600MHz, CDCl_3); δ 115.92, 130.13, 132.39, 161.15, 190.87
- **Compound 2** 무색 고체, $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3); δ 3.67 (3H, s, H-8), 7.30 (5H, m, H-2 ~ H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3); δ 40.90 (C-8), 127.35 (C-4), 128.65 (C-3 and C-5), 129.35 (C-2 and C-6), 133.23 (C-1), 177.04 (C-7); EI-MS m/z 136 $[\text{M}]^+$



Compound 2

그림 13. YC6887 균주 생산 향균활성 물질의 구조

다. 미생물 대량 배양 공정 확립 및 시제품 제형 개발

(1) YC6887 균주의 액제형 제제화

M10 배지에서 YC6887 wild strain은 생균수가 상온에서 초기 1×10^8 cfu/ml을 유지하다가 2주 후에는 2×10^4 cfu/ml으로 감소하였다. 반면에 표지로 형광단백질 GFP이 첨부된 GFP-YC6887의 밀도는 접종 초기에 1×10^8 cfu/ml에서 4주 후에 1×10^9 cfu/ml으로 상승하였다가, 16주 후에 3×10^5 cfu/ml로 감소하였다(그림 14). MgSO_4 buffer에서 생균수 측정치는 접종시 2×10^8 cfu/ml을 유지하였으나 trehalose를 5%, 10% 첨가한 완충용액에서는 4주 후 각각 1×10^7 cfu/ml, 6×10^6 cfu/ml 까지 감소하였다가 8주후에는 균총 형성을 관찰할 수 없었다. M10 broth와 trehalose를 포함하지 않은 MgSO_4 완충용액에 보관 하였을 때도 8주 후 각각 8×10^5 cfu/ml, 1×10^5 cfu/ml 까지 감소하였다(그림 15). 이 결과로 볼 때 이 균주의 액제형 제제는 실용화를 위하여 최소한 보존 기간인 약 6개월 동안 균 밀도 유지가 어려워 적절하지 못한 것으로 생각된다.

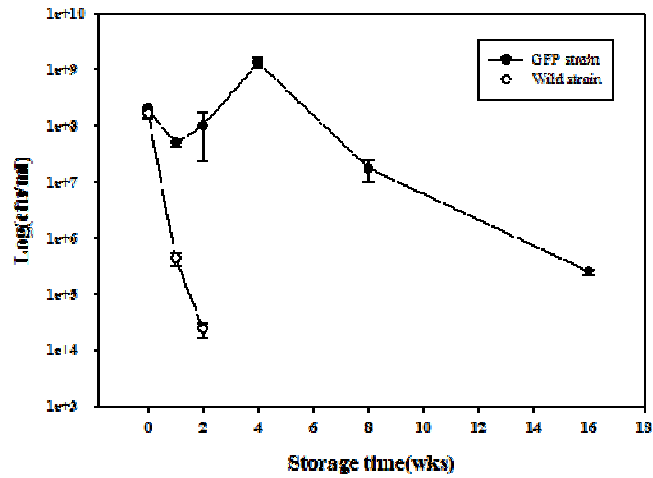


그림 14. YC6887 균주 wild strain 및 형광단백질 표지 strain의 액제형 제제 중 균밀도 변화.

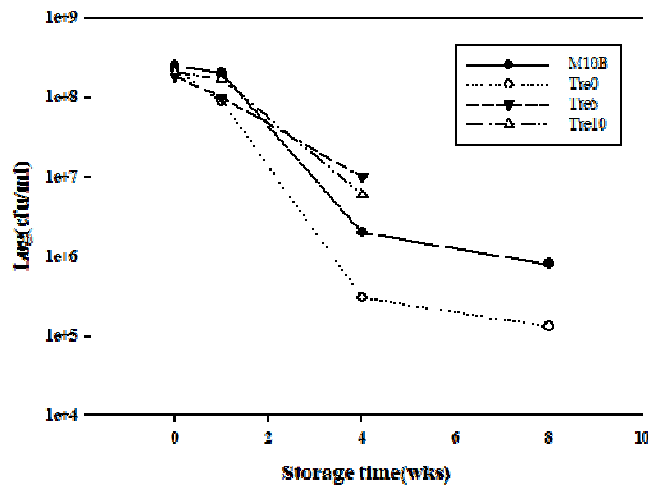


그림 15. 액제형 제제 중 trehalose 첨가가 YC6887 균주 밀도에 미치는 영향.

(2) YC6887 균주의 바닷물 처리 제제화

멸균시킨 바닷물에 보관한 균주의 경우 접종 시 2×10^8 cfu/ml, 2주 후 1×10^8 cfu/ml, 5주 후 8×10^7 cfu/ml, 11주 후 1×10^7 cfu/ml까지 큰 변화 없이 유지되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 균체가 뭉치지 않고 흔들어 주었을 때도 액체 중에 잘 분산 되었다. Trehalose를 5%(g/v) 포함한 바닷물과 $MgSO_4$ 완충용액에서는 2주 후 급격한 밀도 감소를 보였다. 반복 실험에서도 바닷물에서 YC6258 균체를 보관 하였을 때, 접종시, 1주, 2주 후에 각각 3×10^8 , 9×10^6 , 2×10^6 cfu/ml 정도로 밀도가 유지되었으나 M523 배지에 보관된 처리는 균총 형성이 관찰되지 않았다(그림 16). 이 결과로 보아 본 균주의 액제형 제제에는 바닷물 성분을 이용한 제제화가 안

정적인 생균수 유지에 적절한 것으로 생각된다.

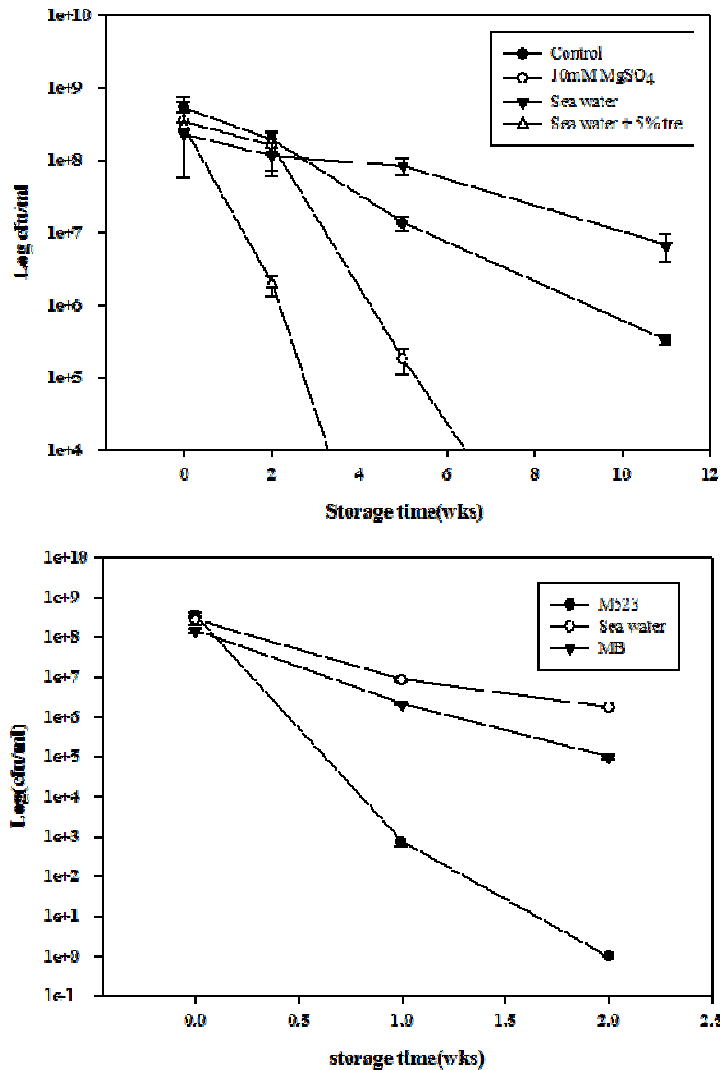


그림 16. 바닷물 이용 액제형 제제 중 YC6887 균주의 밀도 변화.

(3) YC6887 균주의 고상형 제제화

Peat와 왕겨를 이용한 제제에서는 접종 초기 각각 2×10^8 cfu/ml, 9×10^7 cfu/ml 밀도가 4주 후에는 균총이 발견되지 않았다. 동결건조 처리한 YC6887 균주는 초기 1×10^9 cfu/ml에서 1주 후 8×10^7 cfu/ml 을 유지하고 8주까지 2×10^7 cfu/ml 밀도가 유지되었다(그림 17). 고상형 제제 중 균체를 동결 건조 시켜 제제화 한 것이 가장 높은 생존을 보였으나, 실용화를 위해서는 동결 건조 시 경제적인 부분의 최적화가 필요하다.

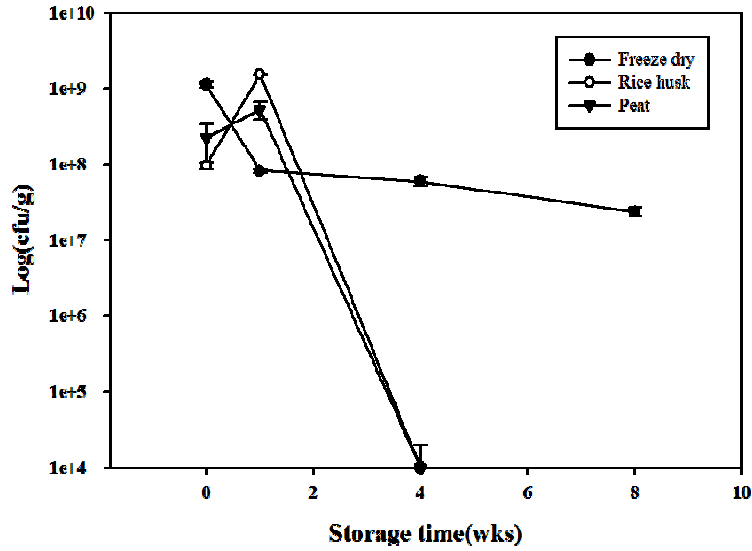


그림 17. 고상형 제제 중 YC6887 균주의 밀도 변화.

라. YC6887 균주의 제품 등록용 방제 효능 및 약해 평가

(1) YC6887 처리에 의한 고추 역병 방제 효과

경상대학교 대곡농장에서 실시한 포장시험 결과 고추 역병 발생률은 2011년 7월 4일 조사에서 무처리구 25%, YC6887 처리구 7.75%, 화학농약 처리구 13%의 발생률을 보였고, 7월 18일 조사에서는 무처리구 30%, YC6887 처리구 8%, 화학농약 처리구 16%를 보였으며, 2011년 8월 4일 조사에서는 무처리구 35%, YC6887 처리구 18%, 화학농약 처리구 16%의 발생을 나타내었다. 3회 조사 결과 무처리구에 비하여 미생물제 처리는 화학농약 처리구와 유의적인 차이가 없이 유사한 방제 효과를 보였다. 오히려 7월 중에는 화학농약보다도 방제 효과가 더 좋은 경향을 보였다. 그러나 8월 초순경부터 계속적인 폭우가 쏟아져 8월 초순까지는 미생물제 처리나 화학농약 처리구가 무처리에 비하여 병 방제 효과가 유지되었으나 8월 14일 조사에서는 무처리구 68%, YC6887 처리구 72%, 화학농약 처리구 59%의 발생율을 보여 모든 처리구에서 방제효과를 인정할 수 없었다(그림 18).

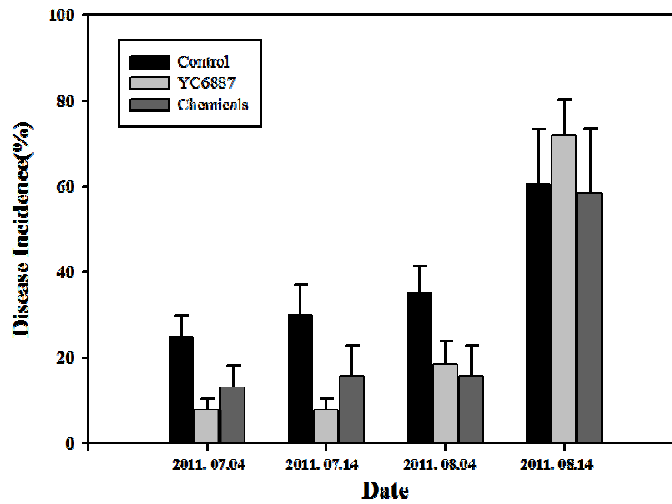


그림 18. YC6887 균주 처리에 의한 고추 역병 방제 효과.

(2) YC6887 처리에 의한 고추 생육 및 수확량 조사

처리구별 고추 생육은 무처리구는 초장 98.55 cm, 경태 1.07 cm, 주경장 23.45 cm, YC6887 처리구 초장 100.35 cm, 경태 1.13 cm, 주경장 24.45 cm, 화학농약 처리구 초장 96.35 cm, 경태 1.20 cm, 주경장 24.00 cm를 보였으며, 각 처리별로 유의적인 차이는 인정할 수 없었다(표 7). 수확량은 2011년 7월 30일 조사에서는 무처리구 421.9 g, YC6887 처리구 487.5 g, 화학농약 처리구 501.9 g, 2011년 8월 9일 조사에서는 무처리구 567.5 g, YC6887 827.5 g, 화학농약 처리구 672.5 g, 2011년 8월 18일 조사에서는 무처리구 1142.5 g, YC6887 처리구 1142.5 g, 화학농약 처리구 1520 g를 보였으며, 3번 수확 평균값은 무처리구 710.6 g, YC6887 처리구 912.5 g, 화학농약 처리구 898.1 g를 보였다. 전체적으로 YC6887 처리는 8월 초기까지는 무처리구에 비하여 화학농약 처리구와 유사한 정도의 수확량을 가져왔으나 폭우가 계속적으로 온 8월 중순 이후에는 무처리구와 큰 차이가 없었다(그림 19). 이 결과로 볼 때 생육 초·중기까지는 미생물제 처리로써 역병 방제가 가능하지만 폭우가 지속되는 중기 이후에는 농약처리를 1회 정도 추가하면 전체적으로 화학농약 사용량을 반 이상 줄이는 것이 가능할 것으로 생각된다.

표 7. YC6887 균주 처리가 고추 생육에 미치는 영향.

Treatment	Plant height (cm)	Stem diameter (cm)	Main stem length (cm)
Control	98.55a	1.07a	23.45a
YC6887	100.35a	1.13a	24.45a
YC6258 / TORY	96.90a	1.08a	23.60a
Chemicals	96.35a	1.20a	24.00a

* Means with the same letter are not significantly different (p=0.05).

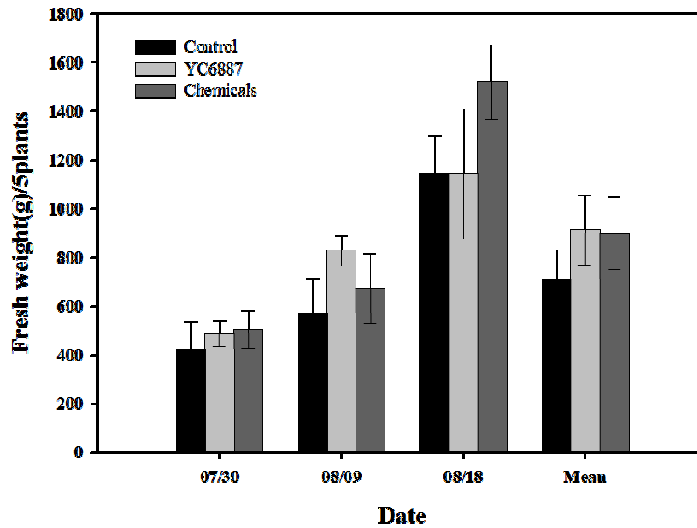


그림 19. YC6887 균주 처리가 고추 수확량에 미치는 영향.

(3) YC6887 처리에 의한 콩 생육 촉진 효과

YC6887을 처리한 콩의 생육은 초장 52.7 cm, 분지수 6.7개, 경중 116.4 g, 협수 69.6개, 입수 62.7개, 입중 16.5 g, 수량지수 244 kg, 백립중 26.3 g 이었으며 무처리구의 생육은 초장 62.3 cm, 분지수 5.5개, 경중 74 g, 협수 62.3개, 입수 62.3개, 입중 15.4 g 수량지수 228 kg, 백립중 26.1 g 이었다. 조사된 생육지표 중 경중과 수량지수에서 유의적인 차이를 나타 내었으며, 수량지수의 경우 미생물 처리구가 무처리구에 비해 7% 더 높게 조사되었다(표 8).

표 8. YC6887 균주 처리가 콩 생육에 미치는 영향.

	초장 (cm)	분지수 (개/주)	경중 (g/주)	협수 (개/주)	입수 (개/주)	입중 (g/주)	수량지수 (kg/10a)	백립중 (g)
무처리	62.3	5.5	74.0	62.3	62.3	15.4	228(100%)	26.1
YC6887	52.7	6.7	116.4	69.6	62.7	16.5	244(107%)	26.3
LSD _{.05}	3.8	0.6	19.3	9.1	ns	ns		

* 경상대학교 가좌동 농장 (2011, 6-10. 농학과 심상인 교수 실험)

(4) YC6887 처리에 의한 작물병 방제 효과(팟트 실험)

YC6887 균주 제제의 병 방제 스펙트럼 확인을 위하여 국내외적으로 중요한 식물병원균 7종에 대한 방제효과를 2가지 처리 방법으로 실험하였다. 엽면 살포는 액제형 제제를 500배 희석시켜 병균 접종 1일 전에 처리하여 방제가를 조사하였다(표 9). 미생물 제제의 방제가는 벼잎집무늬마름병 12%, 토마토잰빛곰팡이병 31%, 토마토역병 8%, 고추탄저병 72%의 효과를 나

타내어 탄저병에 좋은 효과가 있음이 확인되었다. 100배 희석 처리에서도 유사한 경향으로 벼 잎집무늬마름병 18%, 토마토잰빛곰팡이병 50%, 토마토역병 8%, 밀붉은녹병 20%, 보리흰가루병 50%, 고추탄저병 81%의 방제가를 보였다. 관주 실험구에서는 100배 희석액을 처리하였는데 조사 식물 병원균에 대해 벼 도열병 4%, 토마토잰빛곰팡이병 7%, 토마토역병 19%의 낮은 방제가를 보였다. 앞의 포장 실험에서 고추역병 결과와 다르게 나온 것은 아마도 포트 실험은 미생물 처리 후 경과 기간이 짧아 식물체가 면역반응을 나타 내지 못하여 그런 것이 아닌가 생각된다.

표 9. YC6887 균주 처리의 주요 식물병 방제 효과.

Treatment	Dilution Factor	RCB ^a	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM	RPA
Spray	x500	0 ^b	12	31	8	0	0	72
Spray	x100	0	18	50	8	20	50	81
Drench (5ml/pot)	x100	4	0	7	19	0	0	0

^aRCB: 벼도열병, RSB: 벼잎집무늬마름병, TGM: 토마토잰빛곰팡이병, TLB: 토마토역병, WLR: 밀붉은녹병, BPM: 보리흰가루병, RPA: 고추탄저병, ^b방제가, %

마. YC6887 균주의 작용기작 규명

(1) YC6887 균주로부터의 활성물질 구조 결정

YC6887 균주 배양여액에서 분리된 화합물들의 항균활성을 조사한 결과 화합물 #1은 항진균 활성은 없었으며, 벼알마름병균인 *Burkholderia glumae*를 배양한 배지상에서 4 mm 이상의 생장 억제가 관찰되었다. #2는 *P. capsici*와 *B. glumae*의 생장을 동시에 억제하였으며, #3은 *P. capsici*와의 대치배양에서 4 mm 이상의 억제 저지대를 관찰하였다(그림 20).

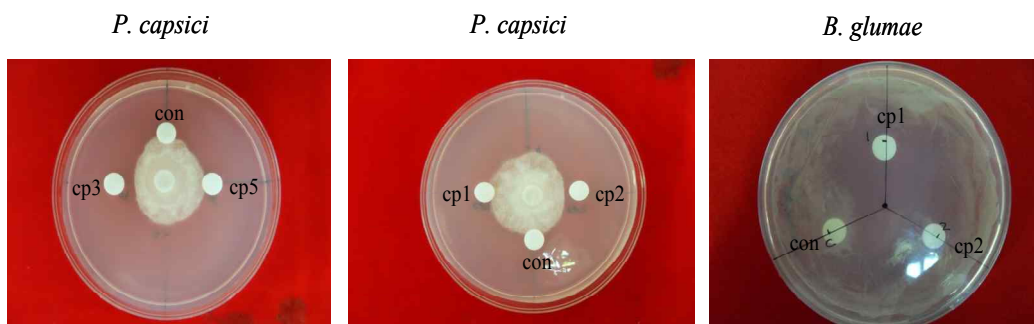


그림 20. YC6887 균주 생산 항균활성 물질의 병원균 생장 억제.

분리된 총 6종의 화합물의 구조를 NMR, MS 등의 분광학적 자료를 분석하여 결정 하였는데, 그 중 항

균 활성이 있는 2종의 화합물 #1, #2은 각각 p-hydroxybenzaldehyde, phenylacetic acid로 확인되었으며, 활성이 없는 #4, #6은 각각 vanillic acid, 5-methyluracil로 결정되었다(그림 21).

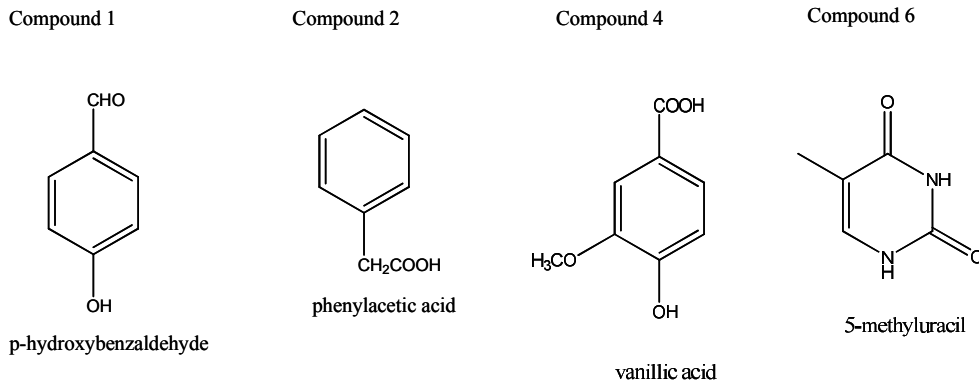


그림 21. YC6887 균주 생산 항균활성 물질의 구조

(2) YC6887 균주의 작용기작

M. endophytica YC6887 균주가 식물생장촉진 활성을 나타내어 이를 효과적으로 확인할 수 있도록 각각 다른 세포농도에서 애기장대의 성장을 비교하였다. 세포 농도를 10^6 cfu/ml으로 조절하여 처리하였을 때 총장(plant height), 생중량, silique(장각과)의 수가 대조군과 다른 농도보다도 유의성 있게 증가하였다(표 10, 그림 22).

표 10. YC6887 균주의 애기장대 성장에 미치는 효과

Characteristics	Concentration (cfu/ml)				
	control	2×10^6	4.6×10^7	7.5×10^7	4.5×10^8
Fresh weight (g)	1.27 ± 0.4	1.56 ± 0.34	1.43 ± 0.23	1.09 ± 0.27	0.84 ± 0.35
Plant height (cm)	21.23 ± 2.5	24.01 ± 2.4	20.8 ± 2.7	19.58 ± 5.2	16.16 ± 8.7
No of silique	15.13 ± 7.6	22.53 ± 10.52	14.26 ± 11.22	13.8 ± 10.57	10.2 ± 7.9

* Values are the means of five replicates. Means ± standard deviation within columns followed by different letters are significantly difference test at $P < 0.05$.



그림 22. YC6887 균주 농도별 애기장대 생장에 미치는 효과

Arabidopsis(Col-0)에서 *P. syringae* DC3000에 대한 YC6887 균주의 유도저항성을 평가하였다. BTH(benzothiadiazole)는 전신 획득 저항성(systemic acquired resistance, SAR)을 유발하는 양성 대조군(positive control)으로 사용하였고 *P. syringae* DC3000 처리 5일 후에 발병률을 조사하였다. YC6887 균주를 토양에 처리한 식물들은 무처리군과 *M. mediterranea* 처리군과 비교하여 발병률이 유의적으로 감소한 것으로 나타났다(그림 23).

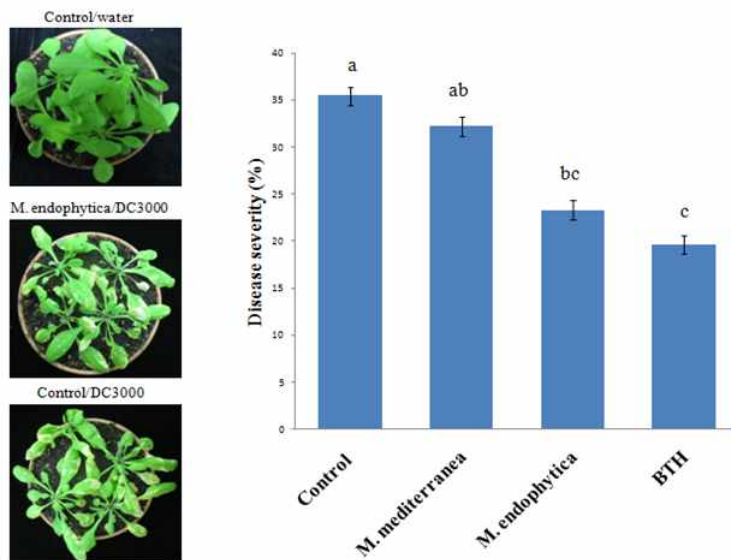


그림 23. YC6887 균주 처리에 의한 *Arabidopsis*(Col-0)의 세균병균(*P. syringae* DC3000)에 대한 저항성 유도 효과. 무처리는 10 mM MgSO₄, *M. mediterranea* (5×10⁶ cfu/ml)와 *M. endophytica* YC6887(10⁶ cfu/ml) 처리구와 1.2 mM의 BTH를 처리하였다. 처리 5일 후 잎에 DC3000 세포현탁액(3×10⁸ cfu/ml)을 분무하였다. Different letters indicate statistically significant differences between treatments (LSD p≤0.05).

RT-PCR을 사용한 유도 저항성 관련 유전자 발현분석: YC6887 균주를 단독 처리한

Arabidopsis(Col-0)에서 defense관련 유전자인 *PR1*과 *PDF1.2*의 발현을 Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통하여 분석하였다. 이들 유전자들의 전사체(transcripts)는 처리 0, 6, 12, 24, 48 과 72 시간 후의 잎에서 측정되었다. 두 개 유전자의 발현은 Mock 처리군 식물체와 비교하여 24와 48 시간에서 높았다(그림 24A). DC3000을 단독 접종한 *Arabidopsis*(Col-0)와 YC6887, DC3000을 함께 처리한 식물에서 이 유전자들의 발현을 분석하였다. *PR1* 유전자는 DC3000을 48, 72시간 후에 단독 접종한 식물에서 발현된 반면 YC6887과 DC3000을 함께 처리한 식물에서는 12, 24, 48과 72시간 후 샘플에서 발현되었다(그림 24B). *PDF1.2*의 발현은 DC3000만을 처리한 식물에서 6시간 샘플에서만 확인된 반면 YC6887과 DC3000을 함께 처리한 식물에서는 6, 24시간 샘플들에서 발현을 확인하였다(그림 24B). 이 결과로 볼 때 YC6887이 식물의 방어시스템을 전형적인 방법으로 활성화 시킨다고 볼 수 있다.

YC6887 균주의 애기장대 뿌리구조(root system architecture, RSA)에 미치는 효과: 세균 농도를 2×10^6 cfu/ml로 조절하여 식물에 20, 50, 100 과 150 μ l 접종하였고 배양 8일 이후에 생중량, 주요 뿌리 길이 와 곁뿌리의 수를 조사 하였다(그림 25A-D). 대조군과 다른 접종원에 비교하여 50 μ l의 세균 현탁액을 처리한 애기장대의 생중량과 곁가지 수가 증가되는 것을 확인 하였다(그림 25B, C). 그러나 모든 처리에서 주 뿌리 길이는 별 차이가 없었다(그림 25D).

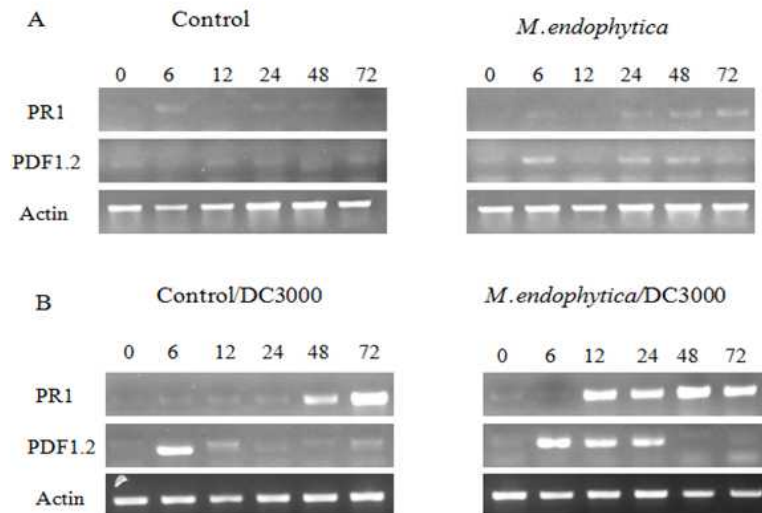


그림 24. YC6887 단독 처리 및 DC3000과 함께 처리 접종 시 *Arabidopsis* (Col-0)에서의 *PR1*과 *PDF1.2* 유전자의 발현. A, YC6887 단독 처리와 대조구 잎에서의 두 유전자 발현. B, YC6887과 DC3000을 함께 처리한 *Arabidopsis*(Col-0)의 잎에서의 두 유전자 발현.

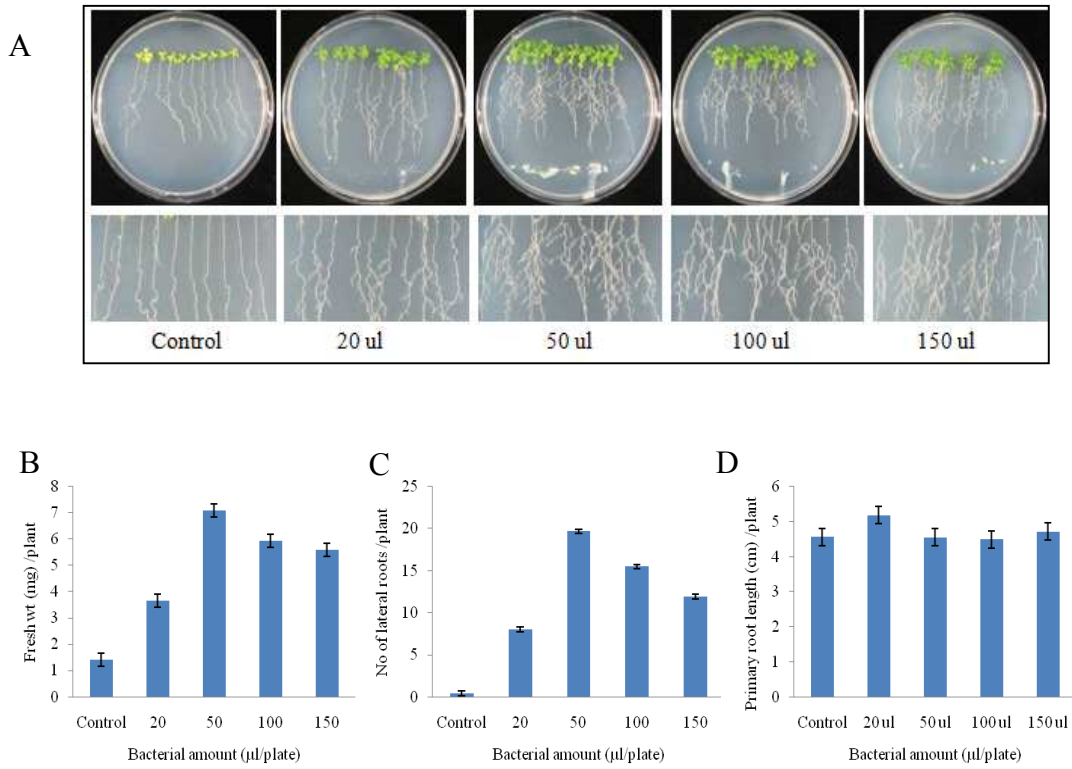
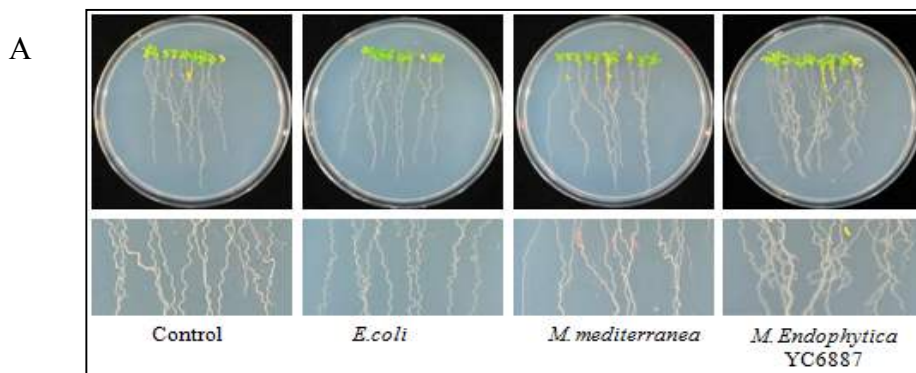


그림 25. YC6887 처리가 애기장대의 뿌리구조에 미치는 영향. A, *Arabidopsis* 묘와 YC6887의 공동배양. B, 묘의 생중량에 미치는 공동배양의 효과. C, 곁뿌리의 수. D, 주요 뿌리 길이.

YC6887 균주와 다른 균주가 애기장대 뿌리구조에 미치는 효과 비교: 이 균주와 16S rRNA 유전자 염기서열이 가장 유사한 *M. mediterranea*, 또 다른 대조군으로 *E. coli*를 이용하여 뿌리구조에 미치는 효과를 비교 조사하였다. YC6887을 처리했을 때는 식물체의 생중량과 곁가지 수가 증가되었으나 다른 균주는 그러한 효과를 보이지 않았다(그림 26). 이 결과로 보아 YC6887 균주만이 *Martelella* 속의 세균에서는 유일하게 식물생장을 촉진시킴을 알 수 있다.



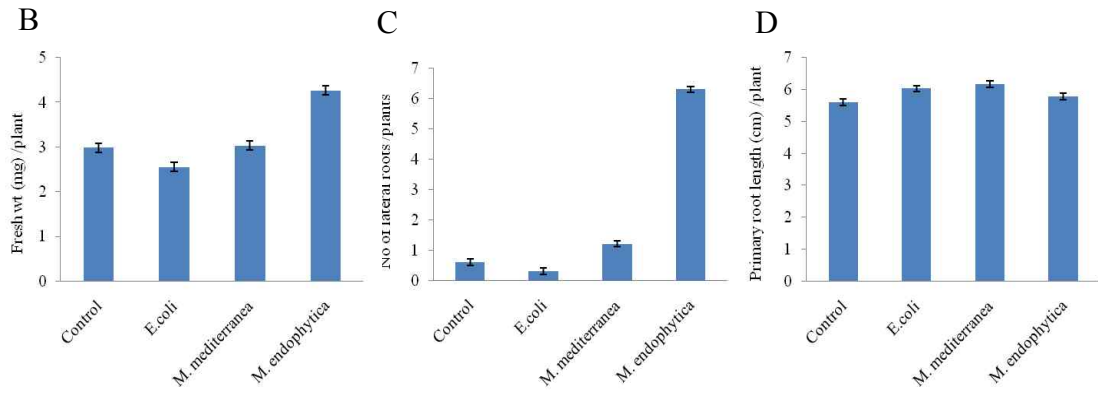


그림 26. YC6887 처리가 애기장대의 뿌리구조에 미치는 영향. A, 애기장대 묘와 YC6887의 공동배양. B, 애기장대 묘의 생중량에 미치는 공동배양의 효과. C, 결뿌리 수. D, 주 뿌리 길이.

YC6887 균주의 고추 성장촉진 효과: 균주를 처리한 고추는 처리하지 않은 고추와 비교하여 생중량과 총장이 모두 증가 되었는데, 생중량과 총장은 각각 35.53 g 과 55.44 cm 이었다(그림 27, 표 11).

표 11. YC6887의 고추 생장에 미치는 효과

Treatment	Plant height (cm)	Fresh weight (g/plant)
Control	52.92 ± 5.94	32.15 ± 3.42
YC6887	55.44 ± 5.90	35.53 ± 5.38



그림 27. YC6887 처리가 고추 생육에 미치는 영향

(3) YC6887 균주의 full genome sequencing

본 연구 분석을 통해 complete whole genome sequencing 및 gap finishing을 통하여 YC6887 균주의 full genome map을 얻었다. 이 균주의 총 genome 크기는 4,817,335 bp, G+C ratio는 62.14% 이었으며, 총 open reading frame의 수는 4,663개 이었다(표 12). 유전자를 완전 해독하여 기능적인 분류가 가능하였다(그림 28, 표13). 현재 본 연구의 목적인 항균활성 생산 관련 및 병 저항성유도, 생육촉진 관련 유전자 분석을 진행하고 있다.

표 12. YC6887 균주의 full genome sequencing 결과 요약

Name	YC6887
Genome size	4,817,335 bp
GC ratio	62.14%
Number of contigs	1
Number of Scaffold	0
Number of rRNA genes	9
Number of tRNA genes	51
Number of ORFs	4663

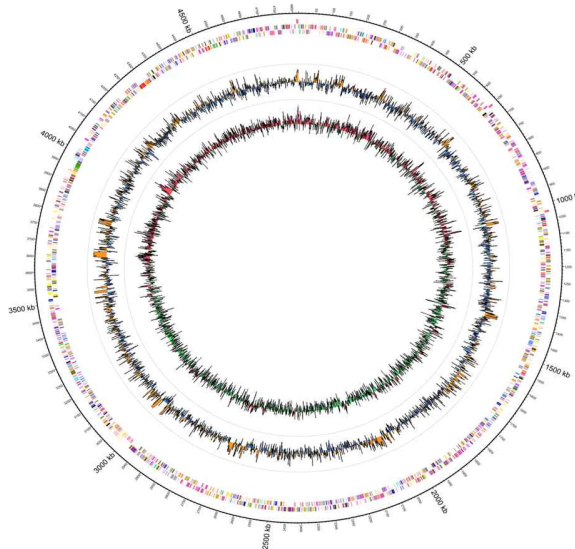


그림 28. YC6887 균주의 full genome map

표 13. YC6887 균주의 COG에 기초한 기능적 분류

COG	Description	Count	%
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	164	4.39%
K	Transcription	353	9.45%
L	Replication, recombination and repair	153	4.10%
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	19	0.51%
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	133	3.56%
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	181	4.85%
N	Cell motility	5	0.13%
P	Inorganic ion transport and metabolism	236	6.32%
T	Signal transduction mechanisms	123	3.29%
C	Energy production and conversion	222	5.95%
G	Carbohydrate transport and metabolism	474	12.69%
E	Amino acid transport and metabolism	476	12.75%
F	Nucleotide transport and metabolism	97	2.60%
H	Coenzyme transport and metabolism	108	2.89%
I	Lipid transport and metabolism	118	3.16%
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	33	0.88%
R	General function prediction only	428	11.46%
S	Function unknown	411	11.01%
Total		3734	100%

바. YC6887 균주의 기주 병저항성 유도 경로

(1) YC6887 균주의 저항성 유도 기작 규명

병원균 *P. syringae* DC3000 접종 후 애기장대 잎에 남아있는 시간별 개체수 측정: YC6887 균주 처리군 식물과 mock처리군 식물들 앞에서 DC3000의 개체수의 변화를 5일간 관찰하였다. *M. endophytica* YC6887 균주 처리군 식물은 mock처리군 식물과 비교하여 DC3000의 생장을 억제하는 것을 확인하였다 (그림 29).

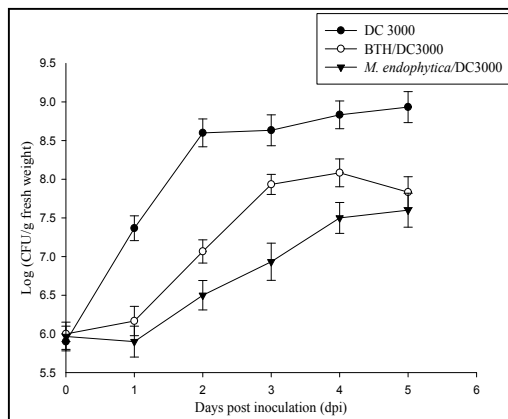


그림 29. YC6887 처리에 의한 병원균 접종 후 시간별 애기장대 잎에 남아있는 DC3000의 개체수 측정. 수치는 생중량 g당 CFU로 나타낸다.

YC6887 균주에 의해 병저항성 유도 경로를 자세히 알기 위해 애기장대의 변이체 *jar1*, JA/ET가 결여된 *etr1-3*와 SA가 결여된 NahG 변이체(transgenic line)를 테스트하였다. 변이체 *jar1*, *etr1-3*에서 발병된 것을 관찰하였고, 변이체 NahG는 YC6887 균주 처리군 식물에서는 병의 확산이 mock처리한 대조군의 식물과 비교하여 유의하게 낮아진 것을 확인하였다. 그러나, *npr1*변이체의 경우는 병의 확산(proliferation)이 YC6887 균주 처리군 식물과 mock 처리군 식물에서 유의하게 같았다(그림 30, A). 부가적으로 접종 5일후에 DC3000의 개체군의 농도를 모든 변이체에서 결정하였다. 모든 변이체의 개체군 농도는 대조군보다 YC6887 균주를 처리한 식물의 잎에서 유의하게 낮은 것을 확인하였다. 그러나 변이체 *npr1*에서 개체군 농도는 대조군과 비교할 때 유의하게 같은 수준으로 관찰하였다(그림 30, B). YC6887 균주를 먼저 처리한 애기장대의 잎에 관찰된 DC3000의 개체군은 Col-0, *etr1-3*, *jar1*와 NahG에서는 각각 잎의 생중량 g당 3×10^6 CFU/g, 3×10^7 CFU/g, 6×10^7 CFU/g, 4×10^7 CFU/g였다. 그러나, 변이체 *npr1*은 8×10^8 CFU/g로 mock을 처리한 *npr1*과 개체수가 유의하게 같은 수준이었다.

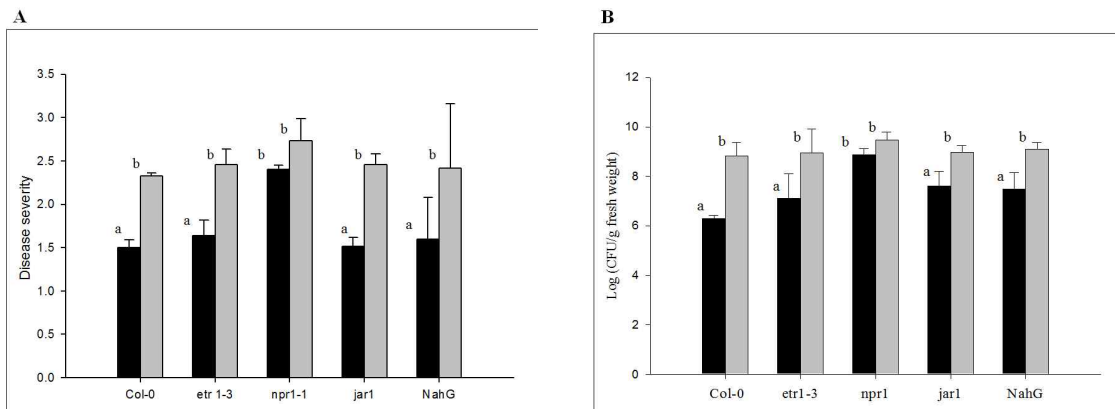


그림 30. 접종 5일 후에 DC3000을 처리한 후, mock 처리군 식물과 YC6887 균주 처리군 식물 애기장대 Col-0와 변이체들 NahG, NahG, *npr1*, *Jar 1* 와 *etr1-3*의 반응. A, 애기장대 변이체에서 병 감소. B, 병원균을 처리한 5일 후에 YC6887 균주와 mock 처리군 식물의 변이체 잎에서 병원균의 개체군 농도. 병원균의 개체군 농도는 잎 생중량의 g당 CFU로 계산하였다. 회색 막대는 mock을 처리한 식물군을 나타내고, 검정색 막대는 YC6887 균주 처리군 식물을 가리킨다. 각 처리를 위해 24개의 식물들이 사용되었고, 수치는 standard error로 평균을 냈다. Different letters indicate statistically significant differences between treatments (LSD $p \leq 0.05$).

YC6887 균주의 항균활성물질의 하나인 phenylacetic acid를 사용하여 다른 곰팡이에 대해 억제 테스트를 하였다. Compound 2(phenylacetic acid)를 10, 100, 500 ppm을 포함하는 PDA 배지에 곰팡이 성장을 관찰한 결과, 테스트한 모든 곰팡이를 50%까지 억제하였다(그림 31,

A&B).

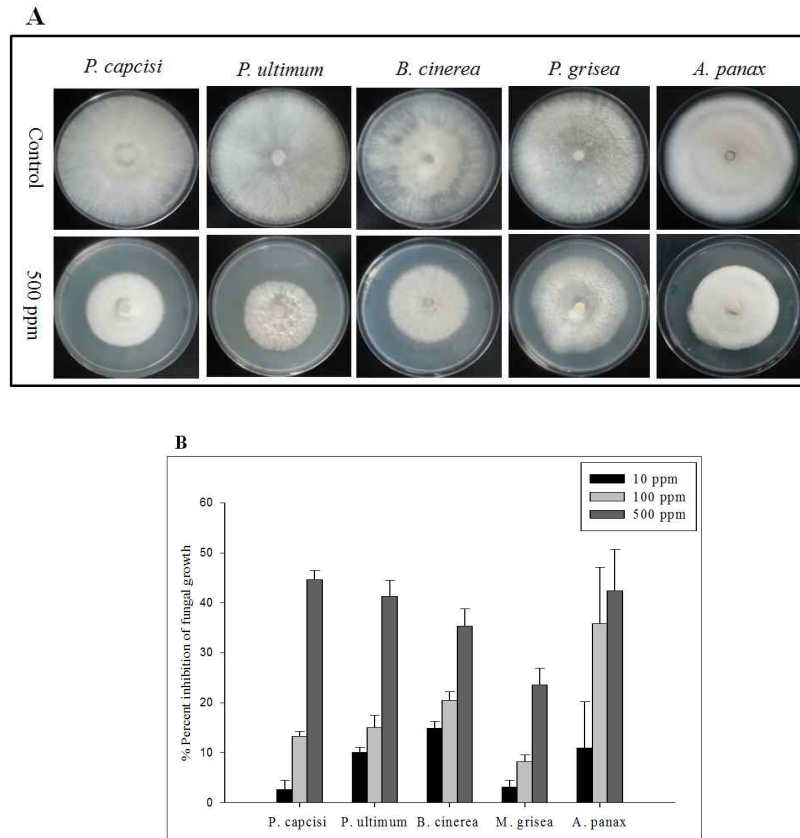


그림 31. 다른 곰팡이들에 다른 농도로 사용된 활성분획의 배양기내 활성.

A, 500 ppm에서 다른 곰팡이의 성장을 억제하는 대표적인 사진들. B, 다른 농도의 활성분획을 포함하는 PDA에서 곰팡이로 완전히 덮힌 대조군의 PDA 배지와 비교하여 성장을 측정하였다. 수치는 곰팡이 성장의 억제율을 표시하였다.

사. 논토양 근권 세균 YC7007 균주의 동정

YC7007 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 EzTaxon-e에서 검색한 결과, YC7007 균주는 *Bacillus methyloptrophicus* CBMB205^T와 99.65%의 유사도를 보였다. YC7007 균주는 *Bacillus siamensis* KCTC13613^T, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *platarum* FZB42^T, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB3610^T 각각 99.4%, 99.3%, 99.4% 유사도를 보였다. 최종적으로 YC7007균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 *B. methyloptrophicus*와 가장 유사한 것으로 확인되었으나, 여러 가지 생리·화학적 특성을 비교한 결과 이 균주와는 상당한 차이가 보여 추가 실험을 통하여 새로운 균주 여부를 확인할 필요가 있다(그림 32).

TGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGA
GCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG

GTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACTGGATGGTT
GTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGAC
CCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCC
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTT
AAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCT
CGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATT
GGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTG
ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG
CATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA
CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAG
TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA
CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTA
AGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA
AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT
TGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAAC
CTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACACGT
AACCGTA

그림 32. YC7007균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석

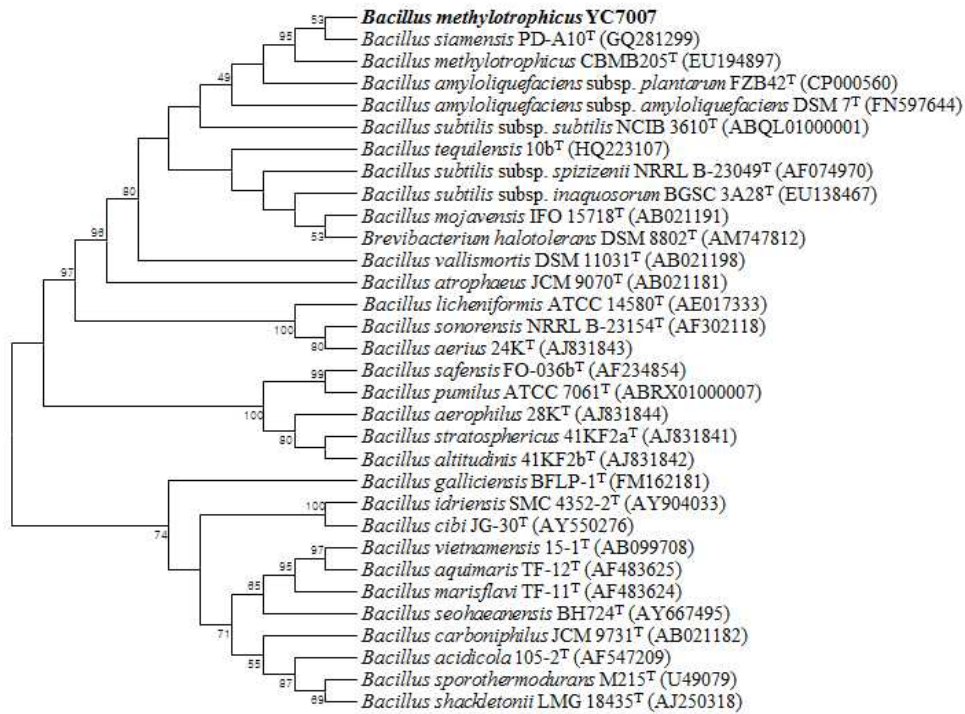


그림 33. YC7007균주의 다른 근연종들 사이의 연관을 나타내는 16S rDNA 서열로 만든 계통수. 교점 숫자는 1000반복에서 나온 bootstrap value를 나타낸다(50%이상의 수치가 근연집단에 주어진다). 괄호 안에 있는 숫자는 GenBank/EMBL/DDBJ 접근 수치다. 가로줄, nucleotide 위치 당 0.01 치환.

아. YC7007 처리에 의한 작물병 방제 효과

(1) YC7007 균주의 벼 키다리병 방제 효과

벼의 키다리병 발생을 위한 키다리병균의 토양 접종량 결정을 위하여 병원균의 토양 접종원을 상토의 kg당 soil inocula를 각각 0, 5, 8, 10, 15, 20 g을 섞어 병발생 지수를 조사하였다. Soil inocula의 접종량이 많아질수록 병발생 지수가 증가하는 것을 확인하였다(그림 34).

A



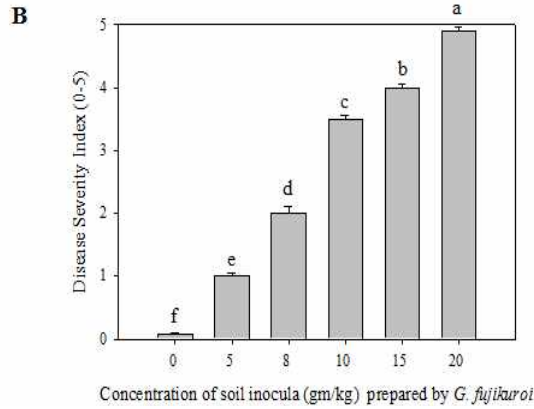


그림34. 벼의 키다리병 발생을 위한 토양 접종량 결정

평균한 토양과 평균하지 않은 토양에서 *B. methylotrophicus* YC7007균주에 의한 생물학적 방제: YC7007 균주를 각각 10^5 , 10^6 , 10^7 cfu/ml 농도로 조절하여 평균한 토양과 평균하지 않은 토양에서 키다리병에 대한 방제율을 조사하였다. YC7007의 접종농도가 10^5 , 10^6 , 10^7 cfu/ml로 높아질수록 평균된 토양에서는 방제율이 각각 51, 74, 78%였고, 평균되지 않은 토양에서는 22, 34, 46%로 높아지는 것을 확인하였다(표14). 또한 YC7007을 처리했을 때 평균된 토양에서 평균되지 않은 토양보다 방제율이 높았다.

표14. 평균한 토양과 평균하지 않은 토양에서 *B. methylotrophicus* YC7007에 의한 생물학적 방제

처리구 ^a	발병율 ^b		%방제율 ^c	
	평균 토양	평균하지 않은 토양	평균 토양	평균하지 않은 토양
Mock /-	0.07 ± 0.03 d	0.73 ± 0.03 e	-	-
Mock /+	3.5 ± 0.06 a	2.93 ± 0.12 a	0	0
YC7007 10^5 /+	1.7 ± 0.06 b	2.3 ± 0.06 b	51	22
YC7007 10^6 /+	0.9 ± 0.12 c	1.93 ± 0.07 c	74	34
YC7007 10^7 /+	0.77 ± 0.12 c	1.57 ± 0.19 d	78	46

^a식물을 키운지 14일 후 접종 3일전에 *B. methylotrophicus* YC7007의 세포현탁액을 흡광도 600 nm에서 OD값을 제어 농도를 조절하였다. OD값은 각각 0.03일 때 5.65×10^5 , 0.07일 때 3.63×10^6 , 0.1일 때 2×10^7 cfu/ml였다. 세포 현탁액 15 ml (10% v/w basis)을 각각 평균한 흙과 하지 않은 흙 150 g에 뿌렸다. 세포현탁액은 10 mM MgSO₄로 현탁하였다. ^b병지수(severity index)는 접종 10일 후에 disease rating scale을 사용하여 0-5까지 측정하였다. ^c 병방제율(%Disease reduction)는 mock 처리군 식물(Mock/+ plants)과 비교하여 계산하였다. '+'는 *G. fujikuroi*를 접종한 것을 의미하고, '-'는 접종하지 않은 것을 가리킨다. Mock 처리군 식물들은 YC7007 균주의 처리없이 10 mM MgSO₄를 처리한 것이다. Different letters indicate values that are significantly different (P < 0.05) by Duncan's multiple Range Test by the student's T test. 처리당 10개의 식물들을 3반복으로 사용하였다.

키다리병균 접종 후 시간 별 *B. methylotrophicus* YC7007의 처리에 의한 키다리병 방제 효과는 병균을 접종 한 뒤, 10일, 20일, 30일 후 YC7007의 농도별 처리 시 20일 후에 가장 병 발생이 심했으며 YC7007 균주의 처리농도가 각각 10^5 , 10^6 , 10^7 cfu/ml 높아질수록 병 발생이 감소하는 것을 확인하였다(그림 35).

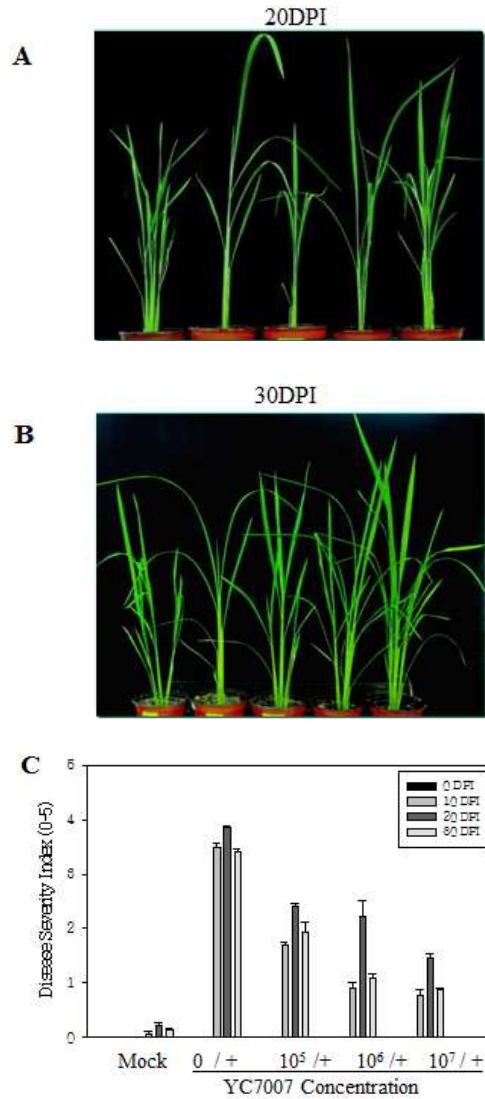


그림 35. 접종 후 시간 별 YC7007의 처리에 의한 키다리병 방제

YC7007 균주의 처리 농도별 chlorophyll 양 비교: chlorophyll과 chlorosis를 위한 대표적인 증상 그림을 나타낸다(그림 36, A). YC7007 균주를 각각 10^6 , 10^7 cfu/ml 농도로 조절하여 처리했을 때 각각 처리구별로 잎의 g당 chlorophyll의 mg을 측정하였다. 10^6 , 10^7 cfu/ml 농도로 처리했을 때 모두 Mock처리구의 chlorophyll의 양과 유의한 차이가 없었던 반면 YC7007 균주를 처리하지 않았을 때는 chlorophyll의 양이 0.05 mg이하로 최저임을 확인할 수 있다(그림 36).

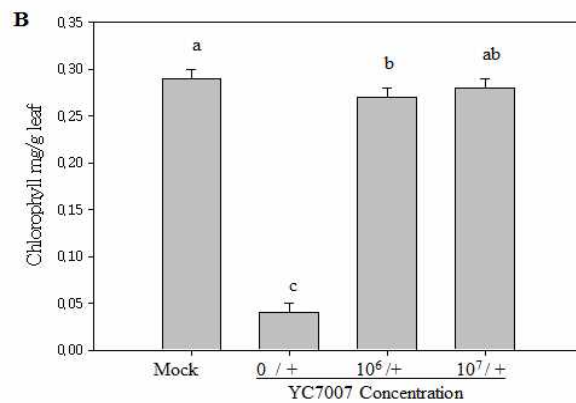
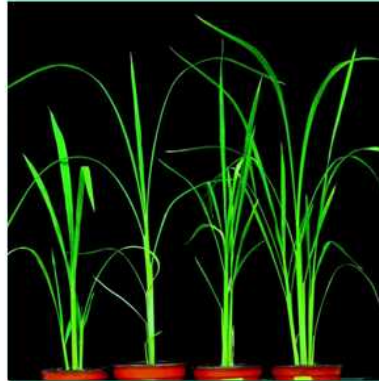
A

그림 36. YC7007의 처리농도별 chlorophyll 양 비교

YC7007의 벼 절단 잎 처리에 의한 키다리병균(*G. fujijuroi*)의 억제: *G. fujijuroi* 접종 전에 YC7007 균주의 세포 현탁액과 세포 여액을 처리했을 때 병 발생 비율은 병발생지수가 4에 해당되는 식물의 수가 더 감소하고 3에 해당되는 식물의 수가 더 증가한 것을 확인하였다. 또한, YC7007 균주의 세포 현탁액보다 세포 여액을 처리했을 때 방제 효과가 더 좋았다(그림 37, A). 벼의 잎을 이용한 detached bioassay에서는 YC7007의 세포 현탁액과 세포 여액을 처리했을 때 60% 정도의 방제가를 보였으며 처리구 사이에는 유의한 차이가 없었다(그림 37, B). 처리한 벼 잎의 샘플을 triphan blue로 염색을 한 뒤, 현미경으로 관찰하였다. YC7007 균주를 처리했을 때 *G. fujikuroi*균사가 YC7007을 처리하지 않은 대조구에 비해 균사 pegging에 의해 얇아진 것을 관찰할 수 있었다(그림 37, C).

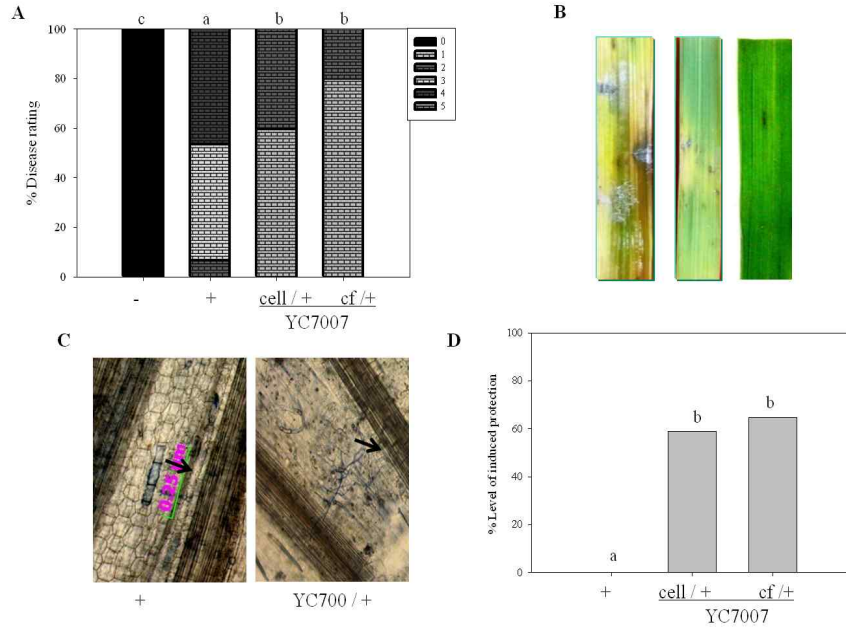


그림 37. Detached bioassay에 의한 YC7007의 *G. fujikuroi* 의 억제

벼 유묘의 토양, 뿌리, 지상부 부분에서 *G. fujikuroi*의 농도 측정: YC7007 균주를 각각 10^6 , 10^7 cfu/ml 농도로 조절하여 처리했으며 접종 20일이 지난 후 유묘의 토양, 뿌리, 지상부 부분에서의 *G. fujikuroi*의 개체수를 측정하였다. 대조군에 비하여 YC7007을 처리했을 때 *G. fujikuroi*의 농도가 유묘의 토양, 뿌리, 지상부 부분 전부에서 감소한 것을 확인하였다(그림 38).

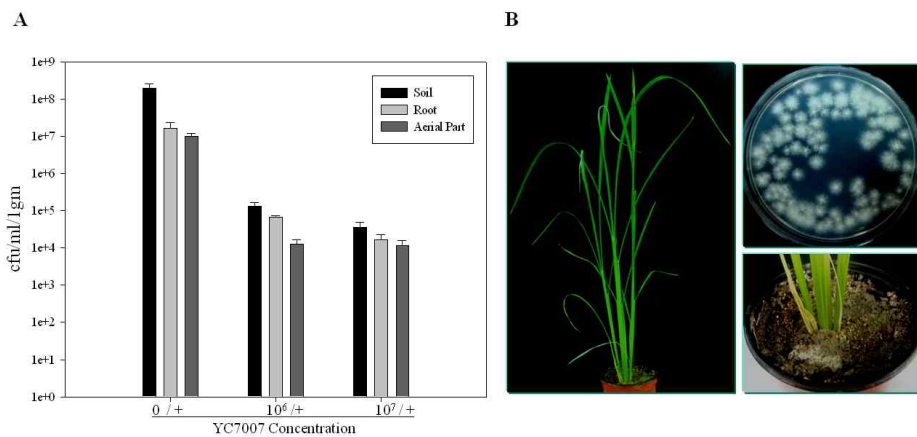


그림 38. YC7007을 처리했을 때 벼 유묘의 토양, 뿌리, 지상부 부분에서 *G. fujikuroi*의 개체수 측정

(4) YC7007 균주의 배양 기간 중 및 제제의 세균 밀도변화

F26은 초기 접종액을 접종한 후 개체수가 1.4×10^7 cfu/ml로 측정되었고 24시간, 48시간, 72시

간 배양 후에 각각 1.2×10^8 cfu/ml, 8.5×10^8 cfu/ml, 3.4×10^8 cfu/ml의 개체수를 확인하였다(그림 39). F27에서는 20 L 배양시 초기 접종후 개체수가 2.0×10^7 cfu/ml로 측정되었고 24시간 후에 5.9×10^8 cfu/ml까지 증가하였다. 200 L 대량배양시에는 배양 24시간 후에는 4.6×10^8 cfu/ml, 48시간 후에는 7.7×10^8 cfu/ml, 72시간 후에는 2.6×10^9 cfu/ml의 개체수를 확인하였다(그림 39). 표2의 방법으로 제제화 된 F26과 F27의 밀도는 각각 2.6×10^8 cfu/g과 9.2×10^9 cfu/g이었고 매달마다 밀도를 측정했을 때 3개월 간 밀도변화가 없었다.

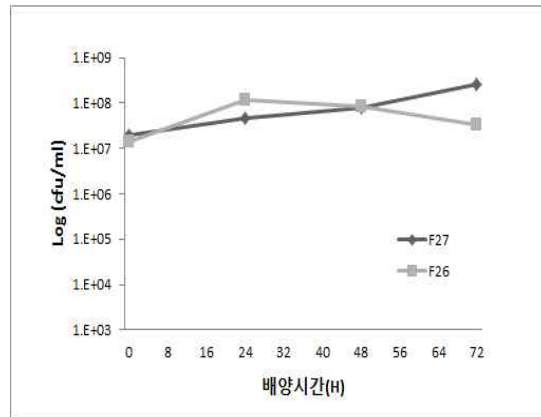


그림 39. YC7007 균주의 대량 배양 중 균 밀도 변화.

(5) YC7007 처리에 의한 작물병 방제 효과(팟트 실험)

YC7007 균주 제제의 병 방제 스펙트럼 확인을 위하여 국내외적으로 중요한 식물병원균 7종에 대한 방제효과를 2가지 처리 방법으로 실험하였다. 엽면 살포는 액제형 제제를 100배, 250배 희석시켜 병균 접종 1일 전에 처리하여 방제효과를 조사하였다(표 15). 미생물 제제를 250배 희석했을 때 보다 100배 희석했을 때 방제효과가 더 좋았다. 100배 희석했을 때 미생물 제제의 방제효과는 벼도열병 69%, 벼잎집무늬마름병 6%, 토마토잿빛곰팡이병 36%, 토마토역병 31%, 밀붉은녹병 83%, 보리 흰가루병 72%, 고추탄저병 71%의 효과를 나타냈다. 250배 희석 처리는 벼도열병 13%, 벼잎집무늬마름병 6%, 토마토역병 8%, 밀붉은녹병 67%, 보리흰가루병 72%, 고추탄저병 58%의 방제효과를 보였다. 관주 실험구에서는 100배 희석액을 처리하였는데 조사 식물 병원균에 대해 벼도열병에만 29%의 방제효과를 보였다.

표 15. YC7007 균주 처리의 7가지 식물병 방제 효과

Treatment	Dilution Factor	RCB ^a	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM	RPA
Spray	x250	13 ^b	6	0	8	67	72	58
Spray	x100	69	6	36	31	83	72	71
Drench (5ml/pot)	x100	29	0	0	0	0	0	0

^aRCB: 벼도열병, RSB: 벼잎집무늬마름병, TGM: 토마토켓빛곰팡이병, TLB: 토마토역병, WLR: 밀붉은녹병,
BPM: 보리흰가루병, RPA: 고추탄저병, ^b방제가, %

(6) YC7007 미생물 제제 처리에 의한 딸기 흰가루병 방제 효과 (포장 실험)

딸기 포장시험에서 흰가루병의 병징을 관찰하였다(그림 40, E&F). *B. methylotrophicus* YC7007 미생물 제제 처리시, 무처리시 발병한 딸기의 개수를 세어 발병과율을 측정하였다(그림 40, A&C). 진주시 대곡면의 딸기 포장시험에서 *B. methylotrophicus* YC7007 미생물 제제를 500배 희석하여 딸기 흰가루병에 대한 방제효과를 조사하였을 때 3회 처리 7일 후 66.2%의 방제효과를 나타냈다(표 16). 경주 내남면의 포장시험에서 500배와 250배 희석 처리했을 때 딸기흰가루병에 대하여 각각 90.1%, 94.8%의 방제효과를 나타냈다(표 16). 이는 화학약제를 사용한 대조구인 트리플루미졸 수화제의 방제가의 95.8%에 준하는 효과로 딸기 흰가루병 방제 제제로 실용성이 있다고 판단된다. 두 지역모두 기준량, 배량에서 약해증상은 나타나지 않았다.

표16. YC7007 미생물 제제 처리에 의한 딸기 흰가루병 방제 효과

시험 장소	시험약제	발병과율 (%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
진주시 대곡면	YC7007 (500배)	2.3	13.3	16.2	10.6	b	66.2
	무처리	18.1	32.9	42.9	31.3	a	-
경주시 내남면	YC7007 (500배)	2.0	2.5	1.8	2.1	a	90.1
	YC7007 (250배)	1.6	1.3	0.4	1.1	a	94.8
	트리플루미 졸 수화제 (대조)	1.8	0.4	0.6	0.9	a	95.8
	무처리	24.1	21.7	18.0	21.3	b	-



그림 40. 진주 대곡면의 YC7007 미생물 제제 처리, 무처리 비교 사진
(진주시 대곡면 포장시험)

자. YC7007 미생물 제제(세머루)의 독성 검사

(1) YC7007 미생물 제제(세머루)를 이용한 급성 경구투여 독성/병원성 시험

시험보고서
세머루의 냇드를 이용한
급성 경구투여 독성/ 병원성 시험

한국화학연구원 부설
안전성평가연구소
경남환경독성본부

진술서

시험제목 : 세머루(*Bacillus methylotrophicus* YC7007, 5.0 x 10⁷/g)의 냇드를 이용한 급성 경구투여 독성/ 병원성 시험

상기 시험은 아래에 명시된 독성시험기준에 준하여 실시하였다.

농촌진흥청고시 제2012-37호 (2012년 07월 12일) '농약 및 원제의 등록기준'

본 시험은 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였고, 신뢰성을 저해할 만한 상황이 발생하지 않았으므로 상기시험의 모든자료는 정당성이 확인되었다.

2013년 05월 02일
경남환경독성본부 독성스크리닝센터
연구원 황 광 현

2013년 05월 02일
경남환경독성본부 독성스크리닝센터
책임연구원 Yasuo Tarumoto

2013년 05월
경남환경독성본부 독성스크리닝센터
센터장 이 연



시험제목 : 세머루의 냇드를 이용한 급성 경구투여 독성/ 병원성 시험

시험목적
냇드에 있어서 세머루의 급성 경구투여에 의한 급성독성/병원성을 조사하기 위하여 실시하였다.

시험방법
농촌진흥청고시 제2012-37호 (2012년 07월 12일) '농약 및 원제의 등록기준'에 준하여 실시하였다.

시험일정

1) 동물입수일(실린개시일)	: 2013년 03월 06일
2) 검역 - 순화기간	: 2013년 03월 06일 ~ 2013년 03월 13일
3) 부여기간	: 2013년 03월 13일
4) 부검일	: 2013년 03월 16일 2013년 03월 20일 2013년 03월 27일 2013년 04월 03일
5) 시험보고서 제출일	: 2013년 05월 02일

시험의뢰자
명 칭 : 주식회사 제일그린산업
소 재 지 : 635-806 경상남도 창원군 창녕읍 직교리 369
연 락 처 : Tel; (055) 533-4762, Fax; (055) 533-8589

시험기관
명 칭 : 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성본부
소 재 지 : 660-844 경남 진주시 문산읍 삼곡리 854
연 락 처 : Tel; (055) 750-3868, Fax; (055) 750-3879

- 2 -

목 차

1. 요 약	4
2. 시험목적 및 부형제	5
(1) 시험물질	5
(2) 부형제	5
3. 재료 및 방법	5
(1) 시험제	5
(2) 사용환경	6
(3) 부여량 설정 및 시험군의 구성	6
(4) 시험물질의 부여	7
(5) 관찰 및 검사항목	7
(6) 통계학적 방법	8
4. 결 과	8
(1) 사망률 및 지사량	8
(2) 일반증상	8
(3) 체중변화	8
(4) 부검소견	9
5. 고찰 및 결론	9
6. 참고문헌	9
7. 표 (Tables)	
Table 1. Mortality	10
Table 2. Clinical Signs	10
Table 3. Body Weights Changes	11
Table 4. Gross Findings	13
Table 5. Number of Bacterial colony in feces	14
Table 6. Number of Microorganism in organs	15

- 3 -

1. 요약

세미투의 단위 경구투여에 의한 급성독성/병원성을 조사하기 위하여 SD 계통의 랫드에 암수 각각 20마리씩 5.0 x 10⁸ cfu/g의 용량으로 경구투여한 후 21 일간의 사망률, 일반증상, 체중변화, 부검소견 및 병원성을 관찰하여 시험한 결과를 요약하면 다음과 같다.

- (1) 시험물질의 투여로 인한 사망동물은 암수 모든 투여군에서 시험기간 동안 관찰되지 않았다.
- (2) 체중변화의 경우 암수 모든 투여군에서 정상적인 체중증가를 나타내었다.
- (3) 부검결과 암수 모든 투여군에서 어떠한 육안적 이상소견도 관찰되지 않았다.
- (4) 대변에서의 미생물 배출상황은 1, 3, 7일에는 관찰되었지만 14일에는 관찰되지 않았다.
- (5) 장기에서의 미생물 감염은 관찰되지 않았다.

이상의 결과, 암수 랫드에 있어서 5.0 x 10⁸ cfu/g 용량으로 시험물질을 단위 경구 투여시, 병원성, 사망률, 체중의 변화 및 부검소견에 있어 어떠한 독성소견도 관찰되지 않았다. 따라서 암수 랫드에 있어서 경구투여에 의한 세미투의 급성독성은 없었고, 개타의 치사량은 암수 모두 5.0 x 10⁸ cfu/g 이상이었다.

2. 시험물질 및 부형제

- (1) 시험물질
 - 1) 명 칭 : 세미투
 - 2) 외관 및性状 : 분말형태
 - 3) 보관조건 : 실온
 - 4) 공급처 : 주식회사 제일그린산업
- (2) 부형제
 - 1) 명 칭 : 멸균 중류수
 - 2) 보관조건 : 실온
 - 3) 공급처 : 대한약품공업(주)

3. 재료 및 방법

- (1) 시험계
 - 1) 종 및 계통 : 특정병원세균(SPF) SD 랫드
 - 2) 공급원 : SAMTACO
 - 3) 시험계의 선택이유 : 랫드는 독성시험에 가장 널리 사용되고 있는 실험동물 중의 하나이다. 본 계통의 랫드는 풍부한 시험기조료가 축적되어 있을 뿐만 아니라 시험결과를 해석하는데 용이하다.
 - 4) 주령 및 세중범위
 - ▶ 수컷
 - 입수시 주령 : 5 주령
 - 입수시 동물수 : 20 수
 - 투여개시시 주령 : 6 주령
 - 투여개시시 동물수 : 20 수
 - ▶ 암컷
 - 입수시 주령 : 5 주령
 - 입수시 동물수 : 20 수
 - 투여개시시 주령 : 6 주령
 - 투여개시시 동물수 : 20 수

5) 검역 및 순화

동물을 입수할 때에 외관을 육안적으로 검사한 후 7일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키면서 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.

(2) 사육환경

- 1) 환경조건

본 시험은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수 10~20회/시간, 조명시간 12시간(08:00 점등~20:00 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 바이오21센터 성장번지기업지원동 302호에서 실시하였다. 본 시험은 한국과학기술원 부설 안전성평가연구소 건강환경독성본부의 동물실험윤리위원회(IACUC)에 의해 검토되었다.
- 2) 사육상자, 사육밀도 및 사육상자의 식별

동물은 Individually Ventilated Cage system (IVC)에 순화 및 검역기간에는 사육상자당 5마리 이하로 수용하였고, 투여 및 관찰기간중에는 사육상자당 3마리의 수용하였으며, 사육상자에는 및 동물번호, 그룹명을 기입한 케이지 카드를 부착하였다.
- 3) 사료 및 물
 - ㉠ 사료 및 물의 급여방법

사료는 실험동물용 고품사료, 물은 상수도를 가유성취시켰다.

(3) 투여량 설정 및 시험군의 구성

- 1) 투여량 설정

세미투 5.0 x 10⁸ cfu/g /ml/animal 투여군을 설정하였다.

군	성별	동물수	동물 (마리) 번호	투여액량 (mL/animal)	투여량 (cfu/animal)
N.C. (비투여대조군)	Male	8	1-8	0	0
	Female	8	21-28	0	0
T (중간부검군투여 후 3일)	Male	3	9-11	1	5.0 x 10 ⁸
	Female	3	29-31		

M7 (중간부검군투여 후 7일)	Male	3	12-14	1	5.0 x 10 ⁸
	Female	3	32-34		
M14 (중간부검군투여 후 14일)	Male	3	15-17	1	5.0 x 10 ⁸
	Female	3	35-37		
F (최종부검군)	Male	3	18-20	1	5.0 x 10 ⁸
	Female	3 <th>38-40</th> <td></td> <td></td>	38-40		

* 용량의 독성이 알려지지 않은 경우를 제외하고는 용매대조군을 별도로 투여하지 않으며 비투여대조군을 설정하였다.

3) 균분리 및 동물식별

동물의 균분리는 다음과 같이 실시하였다. 우선, 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정 후 무작위분류법으로 분배하였다. 동물의 개체식별은 순화기간은 청색메지에 의한 미부표식법, 투여 및 관찰기간에는 검정색메지에 의한 미부표식법, 그리고 사육상자별 케이지 카드로 실시하였다.

(4) 시험물질의 투여

- 1) 투여액의 조제법

투여당일, 시험물질 세미투 5.0 x 10⁸ cfu/g /ml/animal 투여하였다.
- 2) 투여방법

경구투여용 콘대를 장착한 주사기를 이용하여 시험물질 및 부형제를 각각 강제 경구투여하였다.
- 3) 투여횟수 및 투여기간

투여당일에 개체별로 1회 투여하였다.
- 4) 투여액량 계산

투여액량은 ml/animal 로 계산하였다.
- 5) 조제시험물질의 함량시험

조제시험물질에 대한 함량분석은 실시하지 않았다.

(5) 관찰 및 검사항목

- 1) 일반증상 및 사망동물의 관찰

투여당일에는 투여 전 1회 및 투여 후 1, 2, 3, 4 및 6시간에 관찰하였으며 또한 투여 2일부터 투여 후 21일까지는 매일 1회 이상씩 일반증

- 상의 변화, 독성증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.
- 2) 체중측정
모든 동물에 대하여 체중을 부여당일 부여 전, 그리고 부여 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19 및 21일에 측정하였다.
- 3) 부검조건
부여 3, 7, 14, 21일에 동물을 CO₂ 마취 하에서 개복한 후에 복대동맥과 복대정맥을 절단하여 방혈치사시킨 후 육안적으로 모든 내부장기의 이상유무를 관찰하였다.
- 4) 미생물 배출
부여 1, 3, 7, 14일에 동물의 대변을 받아 미생물 배출을 측정하였다.
- 3) 감염성 검사
부여 3, 7, 14, 21일에 동물을 CO₂ 마취 하에서 개복한 후에 장기를 적출하고 분쇄하여 미생물에 의한 감염성을 확인하였다.

(6) 통계학적 방법
얻어진 자료에 대하여 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소의 표준작업수순서에 따라 Path/Tox System을 이용하여 실시하였다.

4. 결 과

(1) 사망률 및 치사량 (Table 1)
시험기간 동안 사망동물은 암수 모든 투여군에서 관찰되지 않았다. 따라서 랫드에 대한 본 시험물질의 개략의 치사량은 암수 모두 5.0 x 10⁶ cfu/g 이상이다.

(2) 일반증상 (Table 2)
시험기간 동안 부형제대조군을 포함한 모든 군에서 이상 증상이 관찰되지 않았다.

(3) 체중변화 (Table 3)
체중변화의 경우 암수 모든 투여군에서 정상적인 체중증가를 나타냈다.

(4) 부검조건 (Table 4)
부검조건에서도 암수 모든 투여군에서 육안적으로 이상이 있는 조건은 관찰되지 않았다.

(5) 미생물 배출 (Table 5)
대변에서의 미생물배출에서는 암수 모두 1, 3, 7일에는 미생물이 관찰되었으나 14일에는 관찰되지 않았다.

(6) 감염성 검사 (Table 6)
장기에서 미생물의 감염의 경우 암수 모든 투여군에서 미생물이 관찰되지 않았다.

5. 고찰 및 결론

시험물질 세머루의 랫드에 있어서 경구투여에 의한 급성독성/병원성을 조사하기 위하여 SD 계통의 랫드에 암수 각각 5.0 x 10⁶ cfu/g의 용량으로 단회 경구투여한 후 1, 3, 7, 14일에는 대변에서의 미생물 배출을 관찰했고, 3, 7, 14, 21일에는 장기의 감염성여부를 관찰했다. 그 결과 1, 3, 7일에는 대변에서 미생물이 배출되었지만 14일에는 배출되지 않았고, 장기에서는 미생물이 관찰되지 않았다. 또한 본 시험에서 시험물질 투여와 관련된 사망률, 체중의 변화 및 부검조건은 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 암수 랫드에 있어서 5.0 x 10⁶ cfu/g 용량으로 시험물질을 단회 경구 투여시, 병원성, 사망률, 체중의 변화 및 부검조건에 있어 어떠한 독성 조건도 관찰되지 않았다. 따라서 암수 랫드에 있어서 경구투여에 의한 세머루의 감염성은 없었고, 개략의 치사량은 암수 모두 5.0 x 10⁶ cfu/g 이상이였다.

6. 참고문헌

(1) 농촌진흥청 (2012); 농촌진흥청고시 제2012-37호(2012년 7월 12일) "농약 및 원재의 등록기준"

Table 1. Mortality

Group	Sex	Dose (cfu/animal)	Volume (ml/animal)	Mortality (%)
N.C.		5.0 x 10 ⁶	1	0/8 (0%)
T	Male	5.0 x 10 ⁶	1	0/12 (0%)
N.C.		5.0 x 10 ⁶	1	0/8 (0%)
T	Female	5.0 x 10 ⁶	1	0/12 (0%)

Table 2. Clinical signs

	N.C.	Observed sign	T	Observed sign
Male	1	No change	9	No change
	2	No change	10	No change
	3	No change	11	No change
	4	No change	12	No change
	5	No change	13	No change
	6	No change	14	No change
	7	No change	15	No change
	8	No change	16	No change
Female	9	No change	17	No change
	10	No change	18	No change
	11	No change	19	No change
	12	No change	20	No change
	13	No change	21	No change
	14	No change	22	No change
	15	No change	23	No change
	16	No change	24	No change
	17	No change	25	No change
	18	No change	26	No change
	19	No change	27	No change
	20	No change	28	No change

Table 3. Body Weight Changes (g) (Male)

Male	-1	0	1	3	5	7	10	12	14	17	19	21	
NC	1	186.4	165.2	182.4	207.6	-	-	-	-	-	-	-	
	2	187.5	164.5	188.3	212.9	-	-	-	-	-	-	-	
	3	188.1	170.8	187.5	209.2	219.0	235.4	-	-	-	-	-	
	4	195.2	176.8	196.6	220.0	236.8	259.0	-	-	-	-	-	
	5	196.9	179.4	197.5	220.2	233.4	252.7	276.3	287.3	300.1	-	-	
	6	197.7	178.6	195.8	218.2	230.7	252.7	272.1	289.9	308.3	-	-	
	7	198.3	177.2	199.0	221.5	235.3	257.5	272.6	286.5	305.9	312.7	328.7	348.8
	8	207.3	186.9	210.3	234.4	251.9	276.7	300.7	319.6	337.9	357.5	371.3	394.4
mean	194.7	174.9	194.7	218.0	234.8	258.6	280.4	298.8	313.1	335.1	350.0	371.6	
S.D.	7.08	7.61	8.61	8.47	10.63	13.30	13.63	15.90	16.91	31.64	30.09	32.24	

Male	-1	0	1	3	5	7	10	12	14	17	19	21	
M-3	9	188.1	173.4	194.2	215.5	-	-	-	-	-	-	-	
	10	194.5	175.7	193.1	217.1	-	-	-	-	-	-	-	
	11	199.8	180.4	199.9	227.4	-	-	-	-	-	-	-	
M-7	12	189.3	169.7	187.0	211.1	227.9	249.7	-	-	-	-	-	
	13	194.0	178.4	190.3	212	221.2	241.1	-	-	-	-	-	
	14	200.6	181.5	200.1	221.2	233.9	255.9	-	-	-	-	-	
M-14	15	190.4	172.9	190.3	220.8	232.8	254.6	274.9	286.2	307.6	-	-	
	16	193.8	174.3	194.8	219.8	232.6	255.7	273.8	294.2	313.5	-	-	
	17	201.1	177.6	204.6	226.8	240.5	264.2	288.3	303.2	324.7	-	-	
F	18	191.0	171.3	187.2	208.5	215.3	234.7	253.5	266.5	281.1	292.7	310.7	321.3
	19	193.0	172.1	192.7	217.5	227.3	247.3	261.6	272.4	291.3	302.0	312.2	331.0
	20	201.9	181.1	202.6	230.6	243.9	271.1	293.2	307.7	330.6	340.1	354.2	377.1
	mean	194.8	175.7	194.7	219.0	230.6	252.7	274.2	288.3	308.1	311.6	325.7	343.1
S.D.	4.89	4.04	5.86	6.84	8.91	11.13	15.15	16.52	19.12	25.14	24.68	29.81	

Table 3. Body Weight Changes (g) (Female)

Female	-1	0	1	3	5	7	10	12	14	17	19	21
21	153.8	136.9	151.0	165.1	-	-	-	-	-	-	-	-
22	154.2	140.5	155.3	170.2	-	-	-	-	-	-	-	-
23	155.0	138.7	155.5	168.2	172.6	183.4	-	-	-	-	-	-
24	160.4	148.8	161.9	172.1	173.2	188.3	-	-	-	-	-	-
25	161.2	144.1	158.7	172.5	177.8	188.2	199.4	207.0	220.3	-	-	-
26	163.1	148.2	161.5	178.3	179.3	196.0	202.6	211.1	224.9	-	-	-
27	163.3	146.3	156.1	177.0	180.3	192.5	204.5	211.4	226.8	242.4	248.7	267.4
28	169.5	151.4	165.1	178.0	184.5	196.2	201.4	214.7	217.9	225.8	233.3	244.2
mean	160.0	144.4	158.1	172.7	178.0	190.8	202.0	211.0	222.5	234.1	241.0	258.8
S.D.	5.49	5.22	4.54	4.82	4.50	5.03	2.16	3.16	4.08	11.77	10.90	16.40

Female	-1	0	1	3	5	7	10	12	14	17	19	21
29	155.2	138.7	152.4	164.9	-	-	-	-	-	-	-	-
30	160.1	142.2	157.3	166.7	-	-	-	-	-	-	-	-
31	163.3	146.2	160.7	167.2	-	-	-	-	-	-	-	-
32	155.8	139.9	151.6	170.2	175.1	189.7	-	-	-	-	-	-
33	160.0	146.9	160.7	165.1	175.1	176.2	-	-	-	-	-	-
34	163.5	147.1	159.6	178.6	177.5	186.6	-	-	-	-	-	-
35	156.4	136.9	150.6	168.5	166.0	178.6	183.2	183.8	202.8	-	-	-
36	159.7	145.9	157.0	172.3	166.5	182.9	187.3	193.4	201.3	-	-	-
37	164.9	146.6	160.8	174.4	181.5	193.2	200.6	211.6	220.1	-	-	-
38	156.5	139.8	153.9	167.9	162.2	180.6	183.2	193.0	193.2	206.4	208.4	223.8
39	159.5	146.7	158.2	169.1	174.6	182.8	195.5	199.3	212.1	214.6	225.4	231.2
40	166.3	150.6	161.5	170.1	179.9	179.8	193.2	200.4	211.5	214.6	218.3	229.3
mean	160.1	144.0	157.0	169.6	173.2	183.4	190.5	196.9	206.8	211.9	217.3	228.1
S.D.	3.72	4.27	3.95	3.96	6.70	5.50	7.06	9.30	9.57	4.69	8.83	3.84

- 12 -

Table 4. Gross Findings

	N.C.	Gross Findings	T	Gross Findings
	1	No change	9	No change
2	No change	10	No change	
3	No change	11	No change	
4	No change	12	No change	
5	No change	13	No change	
6	No change	14	No change	
7	No change	15	No change	
8	No change	16	No change	
9	No change	17	No change	
10	No change	18	No change	
11	No change	19	No change	
12	No change	20	No change	
13	No change	21	No change	
14	No change	22	No change	
15	No change	23	No change	
16	No change	24	No change	
17	No change	25	No change	
18	No change	26	No change	
19	No change	27	No change	
20	No change	28	No change	
21	No change	29	No change	
22	No change	30	No change	
23	No change	31	No change	
24	No change	32	No change	
25	No change	33	No change	
26	No change	34	No change	
27	No change	35	No change	
28	No change	36	No change	
29	No change	37	No change	
30	No change	38	No change	
31	No change	39	No change	
32	No change	40	No change	

- 13 -

Table 5. Number of Bacterial colony in feces*

Sex	Days After Treatment													
	Dose (N.C.) (0 cfu/animal)							Dose (T) (5.0 x 10 ⁶ cfu/animal)						
	No.	1	3	7	14	No.	1	3	7	14				
Male	1	N.D.	N.D.	-	-	9	61x10	88x10	-	-				
	2	N.D.	N.D.	-	-	10	65x10	85x10	-	-				
	3	N.D.	N.D.	-	-	11	92x10	50x10	-	-				
	4	N.D.	N.D.	-	-	12	8x10	105x10	37x10	-				
	5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	13	44x10	42x10	13x10	-				
	6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	14	42x10	101x10	57x10	-				
	7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15	52x10	102x10	49x10	N.D.				
	8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	16	92x10	97x10	12x10	N.D.				
						17	40x10	78x10	14x10	N.D.				
					18	14x10	65x10	4x10	N.D.					
					19	81x10	57x10	15x10	N.D.					
					20	46x10	109x10	23x10	1					
	mean	0	0	0	0	mean	521	815	250	0				
	S.D.	0	0	0	0	S.D.	242	222	186	0				
Female	21	N.D.	N.D.	-	-	29	58x10	114x10	-	-				
	22	N.D.	N.D.	-	-	30	90x10	101x10	-	-				
	23	N.D.	N.D.	N.D.	-	31	71x10	105x10	-	-				
	24	N.D.	N.D.	N.D.	-	32	24x10	43x10	20x10	-				
	25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	33	94x10	19x10	4x10	-				
	26	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	34	112x10	28x10	10x10	-				
	27	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	35	76x10	105x10	75x10	N.D.				
	28	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	36	23x10	19x10	4x10	N.D.				
						37	56x10	54x10	32x10	N.D.				
						38	86x10	37x10	6x10	N.D.				
						39	82x10	38x10	5x10	N.D.				
					40	130x10	30x10	2x10	1					
	mean	0	0	0	0	mean	744	577	101	0				
	S.D.	0	0	0	0	S.D.	308	356	92	0				

N.D. : Not Detected
*회색배수 : 10⁴

- 14 -

Table 6. Number of microorganism in organs (Male)

Dose (cfu/animal)	Days After Treatment	Organs								
		No.	Kidney	Brain	Liver	Lung	Spleen	Stomach	Bladder	Lymph node
0	3	1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	7	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	14	5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5.0x10 ⁶	3	9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
		10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	7	11	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
		12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	14	13	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
		14	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
		15	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
		16	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
21	17	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		
	18	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		
	19	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		
	20	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		

N.D. : Not Detected
*회색배수 : 10⁴

- 15 -

Table 6. Number of microorganism in organs (Female)*

Dose (cfu/animal)	Days after treatment	Organs								
		No.	Kidney	Brain	Liver	Lung	Spleen	Stomach	Heart	Lymph node
0	3	21	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		22	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	7	23	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		24	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	14	25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		26	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	21	27	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		28	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5.0x10 ⁸	3	29	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		30	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	7	31	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		32	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	14	33	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		34	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	21	35	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		36	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	40	7	37	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
			38	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		21	39	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
			40	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. : Not Detected
*회색배수 : 10⁶

(2) YC7007 미생물 제제(세머루)를 이용한 급성 경피독성 시험

시험보고서

세머루의 랫드를 이용한 급성 경피독성 시험

한국화학연구원 부설
안전성평가연구소
경남환경독성분부

진 술 서

시험제목 : 세머루(*Bacillus methylotrophicus* YC7007, 5.0 x 10⁸/g)의 랫드를 이용한 급성 경피독성 시험

상기 시험은 아래에 명시된 독성시험기준에 준하여 실시하였다.


농촌진흥청고시 제2012-37호(2012년 7월 12일) “농약 및 원제의 등록기준”

본 시험은 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였고, 신뢰성을 지해할 만한 상황이 발생하지 않았으므로 상기시험의 모든 자료는 정당성이 확인되었다.

2013년 05월 02일
경남환경독성분부 독성스크리닝센터
연구원 황 광 현

2013년 05월 02일
경남환경독성분부 독성스크리닝센터
책임연구원 Yasuo Tarumoto (인)

2013년 05월 02일
경남환경독성분부 독성
센터장 이 현



시험제목 : 세머루의 랫드를 이용한 경피독성 시험

시험목적

세머루의 랫드에 있어서 단위 경피부에 의한 급성 독성을 조사하기 위하여 실시하였다.

시험방법

농촌진흥청고시 제2012-37호(2012년 7월 12일) "농약 및 원제의 등록기준"의 [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법'에 준하여 실시하였다.

시험일정

- 1) 동물입수일(실험개시일) : 2013년 03월 06일
- 2) 검역·순화기간 : 2013년 03월 06일 - 2013년 03월 13일
- 3) 투여기간 : 2013년 03월 13일
- 4) 부검일 : 2013년 03월 27일
- 5) 시험보고서 제출일 : 2013년 05월 02일

시험의뢰자

명 칭 : 주식회사 제일그린산업
 소재지 : 635-806 경상남도 창원군 창녕읍 직교리 369
 연락처 : Tel; (055) 533-4762, Fax; (055) 533-8589

시험기관

명 칭 : 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성본부
 소재지 : 660-844 경남 진주시 문산읍 삼곡리 854
 연락처 : Tel; (055) 750-3867, Fax; (055) 750-3879

목 차

- 1. 요 약 1
- 2. 시험목적 1
- 3. 재료 및 방법 1
 - (1) 시험계 1
 - (2) 사육환경 및 관리 2
 - (3) 시험군의 구성 3
 - (4) 시험물질의 조제 및 투여 3
 - (5) 관찰 및 검사항목 3
- 4. 결 과 3
 - (1) 일반증상 및 사망률 3
 - (2) 적용부의 관찰 4
- 5. 고찰 및 결론 4
- 6. 참고문헌 4
- 7. 표 (Tables)
 - Table 1. Mortality and Clinical Signs (male) 4
 - Table 2. Mortality and Clinical Signs (female) 4
- 8. 그림 (Figure)
 - Figure 1. Results of Skin Reaction 5

1. 요 약

시험물질 세머루의 급성 경피독성을 조사하기 위하여 암수 각각 5마리의 SD rat에 시험물질을 피부에 각각 24시간동안 적용 후 14일 까지의 사망률, 일반 증상을 평가하였다.

이와 같이 시험한 결과는 다음과 같다.

- (1) 시험기간 중 시험물질의 적용에 기인된 사망동물은 관찰되지 않았다.
- (2) 일반증상 관찰시 시험물질의 적용에 기인된 이상소견은 관찰되지 않았다.
- (3) 시험물질 도포종료 후 적용부의 자극성을 관찰한 결과, 시험물질의 적용에 의한 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 SD계 암수 랫드에 있어서 세머루의 급성 경피독성은 어떠한 독성도 유발하지 않는 것으로 사료된다.

2. 시험물질

- (1) 시험물질
 - 1) 명 칭 : 세머루 (Bacillus methylotrophicus YC7007, 5.0 x 10⁷/g)
 - 2) 외관 및 색상 : 분말형태
 - 3) 보관조건 : 실온
 - 4) 공급처 : 주식회사 제일그린산업
- (2) 부형제
 - 1) 명 칭 : 밀균증류수
 - 2) 보관조건 : 실온
 - 3) 공급처 : 대한약품공업(주)

3. 재료 및 방법

- (1) 시험계
 - 1) 종 및 계통 : 특정병원체부재(SPF) 랫드
 - 2) 공급원 : (주)셀타코 (경기도 오산시 서방동 77-1)

3) 시험계의 선택이유

농촌진흥청고시 제2012-37호(2012년 7월 12일) "농약 및 원제의 등록 기준"의 [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법'에 따라 SPF 랫드를 사용을 원칙으로 하며, SD rat은 독성시험에 적절한 실험동물로서 풍부한 시험기초 자료가 있으므로 시험결과 해석에 이를 이용할 수 있다.

4) 시험 및 측정항목

- ▶수컷 . 입수시 주령 : 약 5주령
 . 입수시 동물수 : 5 마리
 . 투여개시시 주령 : 약 6주령
 . 투여개시시 동물수 : 5 마리
- ▶암컷 . 입수시 주령 : 약 5주령
 . 입수시 동물수 : 5 마리
 . 투여개시시 주령 : 약 6주령
 . 투여개시시 동물수 : 5 마리

5) 검역 및 순화

입수 후 7일간 (순화기간) 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 선발한 후 경태부를 제거하여 피부에 이상이 없는 동물만을 시험에 사용하였다.

(2) 사육환경

- 1) 사육환경

본 시험은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수 10~20회/시간, 조명시간 12시간(08:00 정동-20:00 소동) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 바이오21센터 성장번치기억지원동 307호에서 실시하였다. 본 시험은 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성본부의 동물실험윤리위원회(IACUC)에 의해 검토되었다.
- 2) 사육상자, 사육밀도

순화, 검역 및 투여, 관찰기간 동안 랫드용 스테인레스제 사육상자 (225W x 41L x 20Hmm)에 개체별로 수용하였다.
- 3) 사료 및 물
 - 사료는 실험동물용 고품사료를 자유섭취시켰다.

㉔ 물은 상수도를 사용하여 사용하였다.

(3) 시험군의 구성
건강한 암수 동물 각각 5마리를 이용하여 시험하였다.

(4) 시험물질의 부여

1) 조제법

투여 당일, 시험물질투여군에 맞게 시험물질을 칭량하여 멸균 증류수에 용해 및 현탁하여 조제하였으며, 시험물질의 함량 및 균질성 분석은 실시하지 않았다.

2) 투여경로 : 경피투여

3) 투여방법

투여 24시간 전에 케표의 10%정도 (6cm x 8cm) 털을 제거하고 시험물질은 피부와 잘 접촉되도록 다공성 기즈 (5cm x 7cm)와 비저극성 테이프로 덮는다. 노출 24시간 후 증류수로 시험물질을 세척해 주었다.

4) 투여량 : 1ml/animal

5) 투여용량 : 투여농도는 개체당 5.0×10^6 cfu/g/animal에 해당하는 미생물농도를 투여한다.

(5) 관찰 및 검사항목

1) 일반증상 관찰

시험물질 적용 후 14일간 매일 일반증상의 변화, 증독증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

2) 적용부의 관찰

시험물질 적용 후 14일간 매일 피부 홍반, 부종 등의 증상 유무를 관찰하였다.

4. 결 과

(1) 일반증상 및 사망률 (Table 1, Table 2)

모든 동물에 있어서 시험물질 적용에 관련된 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았으며, 사망동물도 발견되지 않았다.

지 않았으며, 사망동물도 발견되지 않았다.

(2) 적용부의 관찰 (Figure 1)

시험물질 적용 후 매일 14일간 적용부의 자극성을 관찰한 결과, 시험물질의 적용에 의한 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다.

5. 고찰 및 결론

본 시험은 SD계 암수 랫드에 있어서 세버루에 대한 급성 경피독성을 조사하기 위하여 시험물질을 피부에 24시간동안 적용하였고, 14일간 사망률, 일반증상 및 독성을 평가하였다.

시험기간중 시험물질의 적용에 의한 사망동물 및 이상소견은 관찰되지 않았다. 또한, 시험물질의 적용에 따른 어떠한 독성도 관찰되지 않았다.

결론적으로 SD계 암수 랫드에 있어서 세버루 급성경피독성은 어떠한 독성도 유발하지 않는 것으로 사료된다.

6. 참고문헌

(1) 농촌진흥청 (2012): 농촌진흥청고시 제2012-37호(2012년 7월 12일) "농약 및 원재의 등록기준"

Table 1. Mortality and Clinical Signs

sex : male		
No. of rat	Mortality	Clinical sign
5	0/5	Normal

Table 2. Mortality and Clinical Signs

sex : female		
No. of rat	Mortality	Clinical sign
5	0/5	Normal



Figure 1. Results of Skin Reaction

(3) YC7007 미생물 제제(세머루)의 토끼를 이용한 안점막 자극시험

시험보고서

세머루의 토끼를 이용한 안점막자극시험

한국화학연구원 부설
안전성평가연구소
경남환경독성본부

진 술 서

시험제목 : 세머루(*Bacillus methylotrophicus* YC7007, 5.0 x 10⁷/g)의 토끼를 이용한 안점막자극시험

상기 시험은 아래에 명시된 독성시험기준에 준하여 실시하였다.

농촌진흥청고시 제2012-37호(2012년 7월 12일) "농약 및 원제의 등록기준"의 [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법

본 시험은 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였고, 신뢰성을 지어할 만한 상황이 발생하지 않았으므로 상기시험의 모든 자료는 정당성이 확인되었다.

2013년 05월 02일

경남환경독성본부 독성스크리닝센터
연구원 황 광 원

2013년 05월 02일

경남환경독성본부 독성스크리닝센터
책임연구원 Yasuo Tsurumoto (인)

2013년 05월 02일

경남환경독성본부 독성
센터장 이 현

시험제목 : 세머루의 토끼를 이용한 안점막자극시험

시험목적
토끼를 이용한 세머루의 안점막 적용에 의한 안점막자극성 정보를 얻기 위하여 실시하였다.

시험방법
농촌진흥청고시 제2012-37호(2012년 7월 12일) "농약 및 원제의 등록기준"의 [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법에 준하여 실시한다.

시험일정
1) 동물일수일(실험개시일) : 2013년 02월 27일
2) 검역·순화기간 : 2013년 02월 27일 ~ 2013년 03월 06일
3) 투여기간 : 2013년 03월 06일
4) 시험보고서 제출일 : 2013년 05월 02일

시험의뢰자
명 칭 : 주식회사 세일그린산업
소 재 지 : 경상남도 창원군 창녕읍 직교리 369
연 락 처 : Tel: (055) 533-4762, Fax: (055) 533-8589

시험기관
명 칭 : 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성본부
소 재 지 : 660-844 경남 진주시 문산읍 삼곡리 854
연 락 처 : Tel: (055) 750-3867, Fax: (055) 750-3879

목 차

1. 요 약 1

2. 시험물질 1

3. 재도 및 방법 1

 (1) 시험계 1

 (2) 사육환경 및 관리 2

 (3) 시험군의 구성 3

 (4) 시험물질의 부여 3

 (5) 관찰 및 검사항목 3

 (6) 안점막반응의 평가 및 자극성의 판정 3

4. 결 과 5

 (1) 일반증상 및 사망률 5

 (2) 각막부의 관찰 5

5. 고찰 및 결론 6

6. 참고문헌 6

7. 표 (Tables) 6

 Table 1. Mortality and Clinical Signs 6

 Table 2. Acute Ocular Irritation 8

7. 그림 (Figure) 7

 Figure 1. Results of Mucosal Reaction 7

1. 요 약

시험물질 세머루의 안점막자극성을 조사하기 위하여 6마리의 New Zealand white계 수컷토끼에 시험물질을 안점막에 적용 후 7일까지의 사망률, 일반증상, 안점막 자극성을 평가하였다.

이와 같이 시험한 결과는 다음과 같다.

- (1) 시험기간 중 시험물질의 적용에 기인한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- (2) 일반증상 관찰시 시험물질의 적용에 기인한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- (3) 시험물질 적용후 1시간, 1일, 2일, 3일 및 7일째에 적용부위의 안점막자극성을 관찰한 결과 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 New Zealand white계 수컷 토끼에 있어서 세머루의 안점막적용은 어떠한 자극성도 유발하지 않는 것으로 판단되며, 본 시험물질은 무자극성 물질인 것으로 사료된다.

2. 시험물질 및 부형제

- (1) 시험물질
 - 1) 명 칭 : 세머루 (*Bacillus methylotrophicus* YC7007, $5.0 \times 10^6/g$)
 - 2) 외관 및 색상 : 분말형태
 - 3) 보관조건 : 실온
 - 4) 공 급 원 : 주식회사 케일그린산업

(2) 부형제

- 1) 명 칭 : 멸균 증류수
- 2) 보관조건 : 실온보관
- 3) 공 급 처 : 대한약품공업(주)

3. 재료 및 방법

(1) 시험계

1) 종 및 계통

특정병원체부재(SPF) 토끼(Sam/NZW)

2) 공급원 : (주) 셀타코

3) 시험계의 선택이유

토끼는 독성시험에 가장 널리 사용되고 있는 실험동물 중의 하나이다. 본 계통의 토끼는 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있을 뿐만 아니라 시험결과를 해석하는데 용이하다.

4) 연령 및 동물수

- 수컷 : 입수시 월령 : 약 2-4개월령
- : 입수시 동물수 : 6 마리
- : 부여개시시 월령 : 약 2-4개월령
- : 부여개시시 동물수 : 6 마리

5) 검역 및 순화

입수 후 7일간(순화기간 중) 일반증상을 관찰하고 실험개시 24시간 전에 안점사를 실시하여 각막손상 등 안구의 손상이 없는 건강한 동물만을 시험에 사용한다.

(2) 사육환경

1) 사육환경

본 시험은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수 10~20회/시간, 조명시간 12시간(08:00 정동-20:00 소동) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 바이오21센터 성장벤치기밀저온동 307호에서 실시하였다. 본 시험은 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성분부의 동물실험윤리위원회(LACUC)에 의해 검토되었다.

2) 사육상자, 사육밀도

순화, 검역 및 부여, 관찰기간 동안 토끼용 스테인레스계 사육상자(590W x 460L x 360Hmm)에 개체별로 수용하였다.

3) 사료 및 물

- ⊙ 사료는 토끼용 고형사료를 자유섭취시켰다.
- ⊙ 물은 상수도수를 자유섭취시켰다.

(3) 시험군의 구성

건강한 수컷동물 6마리를 이용하여 시험하였으며 좌안은 시험물질을 처리하였고, 우안은 대조표(control) 하여 무처리하였다.

(4) 시험물질의 부여

- (1) 부여방법 및 부여량 : 시험개시전 24시간 이내에 시험동물의 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용한다. 약제처리하는 한쪽 눈의 하안검(下眼瞼)을 가볍게 잡아당기고 그 결막낭내에 농약을 한방울 떨어뜨린다. 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검(兩眼瞼)을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지한다. 처리하지 않은 다른 한쪽 눈은 대조로 한다. 필요시 부여 24시간 후 미온수로 세척한다.
- (2) 부여량 : 0.1 ml 또는 0.1g을 초과하지 않는 범위내에서 처리한다.
- (3) 부여용량 : 부여농도는 개체당 5.0×10^7 cfu/g/animal에 해당하는 미생물농량을 부여한다.

(5) 관찰 및 검사항목

- 1) 일반증상관찰
 - 시험물질 적용 후 7일까지 매일 일반증상의 변화, 증득증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.
- 2) 적용부의 관찰
 - 시험물질 적용 후 1시간, 1일, 2일, 3일 및 7 일째에 각막과 홍채부의 결막 등의 자극성 유무를 관찰하였다.

(6) 안점막반응의 평가 및 자극성의 판정

각 동물의 안반응의 평가, 일반증상, 체중 및 사망률 등의 결과는 표, 그림 등을 이용하여 요약, 정리한다. 통계처리는 실시하지 않는다.

안구병변의 등급

(1) 각막

- (A) 혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)

좌안이나 혼탁이 없음	0
혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나(양상적인 부위상이 약간 관찰된 것과는 다름)혼탁의 일단이 명확히 관찰됨	1
반투명한 부분이 쉽게 관측되나, 홍채의 일단이 약간 불명확함	2
전투막을 나타내고 홍채의 일단이 관찰되지 않으며 혼탁의 크기가 기가스로 관측됨	3
각막이 불투명하고 혼탁 때문에 홍채가 관찰 안됨	4

(B) 혼탁된 각막의 범위

1/4 이하(그러나 0은 아니다)	1
1/4 이상 1/2 미만	2
1/2 이상 3/4 미만	3
3/4 이상 1 까지	4
A x B x 5	최대치 = 80

(2) 홍채

(A) 반응지

정상	0
염색된 홍채의 형성, 종횡, 종횡, 각막 주위에 중증도의 중첩이 반복 혹은 혼합되어 나타나고 홍채는 빛에 대해 반응함(둔한 반응은 양성)	1
빛에 대해 반응 없으며, 출혈되고 대부분 파괴됨 (이성과 같은 중상의 일부 혹은 전부)	2
A x 5	최대치 = 10

(3) 결막

(A) 발적(안검결막 및 안구결막에 한함)

혈관은 정상	0
평범한 발적의 중첩	1
높은 심층색, 각막의 혈관은 쉽게 관찰안됨	2
없는 심층색	3

(B) 결막부종

부종이 없음	0
정상보다 약간 중첩(순박 포함)	1
안검의 대부분의 외연을 동반한 일정한 중첩	2
눈이 반을 감길 정도의 안검의 중첩	3
눈이 반 이상 감길 정도의 안검의 중첩	4

(C) 배출물

배출물 없음	0
안검의 배출물(정상 동물의 대부 눈고리에서 관찰되는 작은 양)	1
속눈썹의 눈꺼풀을 적시는 배출물	2
눈 주위의 상당 부위와 속눈썹과 눈꺼풀을 적시는 배출물	3
점수(A+B+C) x 2	최대치 = 20

안정막 자극평가

관찰결과와 안정은 각각의 판정일 각 마리 총점 [0-110 범위, The Individual Index of Ocular Irritation (I.O.I.)의 합을 마리수로 나눈 평균값인 Mean Index of Ocular Irritation (M.I.O.I.)와 관찰기간 중 M.I.O.I.의 최대값인 The Index of Acute Ocular Irritation (I.A.O.I.)를 구하여 아래의 기준에 따라 판정한다.

평가구분	평가치		
	I.A.O.I.	M.I.O.I.	Day - 7 I.O.I.
무자극물	0~5	0(48시간후)	
경도자극물	5~15	≤5(48시간후)	
자극물	15~30	≤5(4일후)	
중등도자극물	30~60	≤20(7일후)	≤30(6마리 토끼 전부) ≤10(6마리 중 4마리 이상)
중강도자극물	60~80	≤40(7일후)	≤50(6마리 토끼 전부) ≤20(6마리 중 4마리 이상)
강도 자극물	80~110		

4. 결과

(1) 일반증상 및 사망률 (Table 1)

모든 동물에 있어서 시험물질 적용에 관련된 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았으며, 사망동물도 발견되지 않았다.

(2) 적용부의 관찰 (Figure 1, Table 2)

시험물질 적용 후 1시간, 1일, 2일, 3일 및 7 일째에 적용부의 자극성을 관찰한 결과, 각 마리와 종재에서는 전혀 이상소견이 관찰되지 않았다. 이상과 같은 일반증상의 결과를 평가하기 위해 급성안자극지수(AOI)를 산출한 결과 "0.0"으로 매우 낮게 평가되었다.

5. 고찰 및 결론

본 시험은 New Zealand white계 수컷 토끼에 있어서 세머푸에 대한 안정막 자극성을 조사하기 위하여 시험물질을 안정막에 직접 적용하였고, 7일까지의 사망률, 일반증상 및 안정막자극성을 평가하였다.

시험기간중 시험물질의 적용에 의한 사망동물 및 이상소견은 관찰되지 않았다. 또한, 시험물질의 적용에 따른 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.

결론적으로 New Zealand white계 수컷토끼에 있어서 세머푸 안정막적용은 어떠한 이상소견도 나타내지 않으며, 이를 안정막자극 분류에 따라 구분할 때 본 시험물질은 무자극성 물질 (non irritant)인 것으로 판단된다.

6. 참고문헌

- (1) 농촌진흥청고시 제2012-37호(2012년 7월 12일) "농약 및 원제의 등록기준" 의 [별표 12] 인축 독성 시험기준과 방법

Table 1. Mortality and Clinical Signs

No. of rabbit	Mortality	sex : male
		Clinical sign
6	0/6	Normal

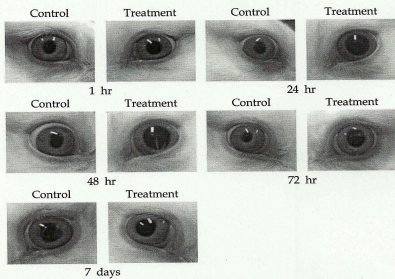


Figure 1. Results of eye irritation for experimental periods

Table 2. Acute Ocular Irritation

	Animal No.	1 2 3 4 5 6						
		1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	7 day		
Cornea	Degree of opacity (A)	1 hr	0	0	0	0	0	0
		24 hr	0	0	0	0	0	0
		48 hr	0	0	0	0	0	0
	Diffuse areas of opacity (B)	1 hr	0	0	0	0	0	0
		24 hr	0	0	0	0	0	0
		48 hr	0	0	0	0	0	0
Iris (C)	1 hr	0	0	0	0	0	0	
	24 hr	0	0	0	0	0	0	
	48 hr	0	0	0	0	0	0	
	72 hr	0	0	0	0	0	0	
	7 day	0	0	0	0	0	0	
	7 day	0	0	0	0	0	0	
Conjunctiva	Redness (D)	1 hr	0	0	0	0	0	0
		24 hr	0	0	0	0	0	0
		48 hr	0	0	0	0	0	0
	Edema (E)	1 hr	0	0	0	0	0	0
		24 hr	0	0	0	0	0	0
		48 hr	0	0	0	0	0	0
	Secreta (F)	1 hr	0	0	0	0	0	0
		24 hr	0	0	0	0	0	0
		48 hr	0	0	0	0	0	0
	IOI	1 hr	0	0	0	0	0	0
		24 hr	0	0	0	0	0	0
		48 hr	0	0	0	0	0	0
72 hr		0	0	0	0	0	0	
7 day		0	0	0	0	0	0	
7 day		0	0	0	0	0	0	
MOI	1 hr	0	0	0	0	0	0	
	24 hr	0	0	0	0	0	0	
	48 hr	0	0	0	0	0	0	
	72 hr	0	0	0	0	0	0	
	7 day	0	0	0	0	0	0	
	7 day	0	0	0	0	0	0	

IOI (individual ocular irritation index) = (A x B x 5) + (C x 5) + (D + E + F) x 2
 MOI (mean ocular irritation index) = ΣIOI/Number of animals
 AOI (acute ocular irritation index) = the maximum value of MOI

(4) YC7007 미생물 제제(세머루)의 토끼를 이용한 피부자극시험

시험보고서

세머루의 토끼를 이용한 피부자극시험

한국화학연구원 부설
안전성평가연구소
경남환경독성본부

진 술 서

시험제목 : 세머루(*Bacillus methylotrophicus* YC7007, 5.0 x 10⁸/g)의 토끼를 이용한 피부자극시험

상기 시험은 아래에 명시된 독성시험기준에 준하여 실시하였다.


농촌진흥청고시 제2012-37호(2012년 7월 12일) "농약 및 원제의 등록기준"

본 시험은 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였고, 신뢰성을 지체할 만한 사항이 발생하지 않았으므로 상기시험의 모든 자료는 정당성이 확인되었다.

2013년 05월 02일
경남환경독성본부 독성스크리닝센터 연구원 황 광 현

2013년 05월 02일
경남환경독성본부 독성스크리닝센터 책임연구원 Yasuo Tarumoto

2013년 05월
경남환경독성본부 독성스크리닝센터장 이 현



시험제목 : 세머루의 토끼를 이용한 피부자극시험

시험목적
토끼를 이용한 세머루의 피부적용에 의한 피부자극성 정보를 얻기 위하여 실시하였다.

시험방법
농촌진흥청고시 제2012-37호(2012년 7월 12일) "농약 및 원제의 등록기준"에 준하여 실시하였다.

시험일정
1) 동물입수일(실험개시일) : 2013년 02월 27일
2) 검역 - 순화기간 : 2013년 02월 27일 ~ 2013년 03월 06일
3) 부여기간 : 2013년 03월 20일
4) 시험보고서 제출일 : 2013년 05월 02일

시험의뢰자
명 칭 : 주식회사 제일그린산업
소 계 지 : 635-806 경상남도 창원군 창녕읍 적교리 369
연 락 처 : Tel: (055) 533-4762, Fax: (055) 533-8589

시험기관
명 칭 : 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성본부
소 계 지 : 660-844 경남 진주시 문산읍 삼곡리 854
연 락 처 : Tel: (055) 750-3867, Fax: (055) 750-3879

목 차

1. 요 약 1
2. 시험물질 1
3. 재료 및 방법 1
 (1) 시험개 1
 (2) 사육환경 및 관리 2
 (3) 시험군의 구성 3
 (4) 시험물질의 조제 및 부여 3
 (5) 관찰 및 검사항목 4
 (6) 피부반응의 평가 및 자극성의 판정 4
4. 결 과 4
 (1) 일반증상 및 사망률 4
 (2) 적용부의 관찰 4
5. 고찰 및 결론 5
6. 참고문헌 5
7. 표 (Tables)
 Table 1. Mortality and Clinical Signs 5
 Table 2. Primary Irritation Index 7
8. 그림 (Figure)
 Figure 1. Results of Skin Reaction on Abraded Skin 6
 Figure 2. Results of Skin Reaction on Intact Skin 7

1. 요약

시험물질 새머무의 피부자극성을 조사하기 위하여 6마리의 New Zealand white계 수컷토끼에 시험물질을 피부에 각각 4시간동안 적용 후 72시간까지의 사망률, 일반증상, 국소 자극성을 평가하였다.

이와 같이 시험한 결과는 다음과 같다.

- (1) 시험기간 중 시험물질의 적용에 기인된 사망동물은 관찰되지 않았다.
- (2) 일반증상 관찰시 시험물질의 적용에 기인된 이상소견은 관찰되지 않았다.
- (3) 시험물질 도포종료 후 적용부의 자극성을 관찰한 결과, 시험물질의 적용에 의한 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 1차 자극지수(Primary irritation index)는 "0"으로서 무자극성 물질로 평가되었다.

이상의 결과로 보아 New Zealand white계 수컷 토끼에 있어서 새머무의 피부 적용은 어떠한 자극성도 유발하지 않는 것으로 판단되며, 본 시험물질은 무자극성 물질인 것으로 사료된다.

2. 시험물질

(1) 시험물질

- 1) 명 칭 : 새머무 (Bacillus methylotrophicus YC7007, 5.0 x 10⁸/g)
- 2) 외관 및 색상 : 분말형태
- 3) 보관조건 : 실온
- 4) 공급처 : 주식회사 제일그린산업

(2) 부형제

- 1) 명 칭 : 멸균중류수
- 2) 보관조건 : 실온
- 3) 공급처 : 대한약품공업(주)

3. 재료 및 방법

(1) 시험계

1) 종 및 계통

특정병원체부재(SPF) 토끼(Sam/NZW)

2) 공급원 : (주)생타코 (경기도 오산시 서량동 77-1)

3) 시험계의 선택이유

토끼는 독성시험에 가장 널리 사용되고 있는 실험동물 중의 하나이다. 본 계통의 토끼는 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있을 뿐만 아니라 시험결과를 해석하는데 용이하다.

4) 월령 및 체중범위

- ▶ 수컷 : 입수시 월령 : 약 3-4개월령
 . 입수시 동물수 : 6 마리
 . 투여개시시 월령 : 약 3-4개월령
 . 투여개시시 동물수 : 6 마리

5) 검역 및 순화

입수 후 7일간(순화기간 중) 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 선별한 후 경태부를 제거하여 피부에 이상이 없는 동물만을 시험에 사용하였다.

(2) 사육환경

1) 사육환경

본 시험은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수 10~20회/시간, 조명시간 12시간(08:00 점등~20:00 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 바이오21센터 성장번치기억지원동 307호에서 실시하였다. 본 시험은 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경관환경독성분부의 동물실험윤리위원회(IACUC)에 의해 검토되었다.

2) 사육상자, 사육밀도

순화, 검역 및 투여, 관찰기간 동안 토끼용 스테리레스제 사육상자 (590W x 460L x 360Hmm)에 개체별로 수용하였다.

(3) 사료 및 물

- ㉠ 사료는 토끼용 고행사료를 자유섭취시켰다.
- ㉡ 물은 상수도를 자유섭취시켰다.

(3) 시험군의 구성

건강한 수컷동물 6마리를 이용하여 시험하였다.

(4) 시험물질의 투여

1) 조제법

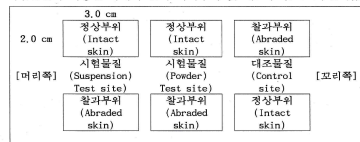
투여 당일, 시험물질투여구에 맞게 시험물질을 칭량하여 멸균 중류수에 용해 및 현탁하여 조제하였으며, 시험물질의 함량 및 균질성 분석은 실시하지 않았다.

2) 투여경로 : 경피투여

3) 투여방법

시험개시 약 24시간 전에 전기 삭발기 등을 이용하여 토끼 등부위의 털을 약 15cm x 15cm의 넓이로 깎는다. 이때 등부위의 피부가 손상되지 않도록 각별히 주의해야 한다. 토끼의 척추를 중심으로 좌우에 대각선 방향으로 18G 주사침을 이용하여 피부에 2cm x 3cm 넓이의 [시험 찰과상을 입힌다. 이때 전피에 손상을 입히거나 출혈을 일으키지 않게 각질층만을 파괴하도록 주의한다. 처리는 척추를 중심으로 좌우 1개소씩 모두 2개소에 처리하고 1개소는 반드시 찰과상을 입힌 부위에 처리한다. 시험물질을 처리한 후 거즈로 덮고 비자극성 테이프로 고정시킨다. 노출시간은 4시간이며, 노출시간 종료시 남아 있는 시험물질은 상수도를 이용하여 제거한다.

시험물질의 적용은 아래와 같이 처치구획 및 대조구획으로 구분하였다.



4) 투여량 : 0.5 ml/site

5) 투여용량 : 투여농도는 개체당 5.0 x 10⁸ cfu/g/animal에 해당하는 미생물농량을 투여한다.

(5) 관찰 및 검사항목

1) 일반증상관찰

시험물질 적용 후 72시간까지 매일 일반증상의 변화, 증폭증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

2) 적용부의 관찰

시험물질 적용 후 1시간, 24시간, 48시간 및 72시간에 흉반과 가피 형성 및 부종 등의 자극성 유무를 관찰하였다.

(6) 피부반응의 평가 및 자극성의 판정

피부반응의 평가는 식품의약품안전청고시 제 2009-116호 "의약품등독성 시험기준"에 표시된 피부반응의 평가기준에 따라 실시하였다. 또한 결과에 대한 자극성의 정도판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize의 1차자극지수(PIL, primary irritation index)의 산출방법에 따랐다.

피부 자극 평가	
1차 자극 지수	자극 구분
0.0 - 0.5	비 자극성
0.6 - 2.0	약한 자극성
2.1 - 5.0	중등도 자극성
5.1 - 8.0	강한 자극성

4. 결 과

(1) 일반증상 및 사망률 (Table 1)

모든 동물에 있어서 시험물질 적용에 관련된 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았으며, 사망동물도 발견되지 않았다.

(2) 적용부의 관찰 (Figure 1, Figure 2, Table 2)

시험물질 적용 후 1시간, 24시간, 48시간 및 72시간에 적용부의 자극성을 관찰한 결과, 시험물질의 적용에 의한 어떠한 이상소견도 관찰되지 않

았다. 따라서 Draize의 산출방법에 따른 일차자극지수는 "0"으로 평가되었다.

5. 고찰 및 결론

본 시험은 New Zealand white계 수컷 표기에 있어서 세머루에 대한 피부자극성을 조사하기 위하여 시험물질용 피부에 4시간동안 적용하였고, 72시간까지의 사망률, 일반증상 및 극소자극성을 평가하였다. 시험기간중 시험물질의 적용에 의한 사망동물 및 이상소견은 관찰되지 않았다. 또한, 시험물질의 적용에 따른 어떠한 자극성도 관찰되지 않았다.

결론적으로 New Zealand white계 수컷표기에 있어서 세머루 피부적용은 어떠한 자극성도 유발하지 않는 것으로 보아 본 시험물질은 무자극성인 것으로 사료된다.

6. 참고문헌

- (1) 농촌진흥청 (2012): 농촌진흥청고시 제2012-37호(2012년 7월 12일) "농약 및 원제의 등록기준"
- (2) 식품의약품안전청 (2009): 식품의약품안전청고시 제2009-116호 (2009년 08월 24일) '의약품등의독성시험기준'.

Table 1. Mortality and Clinical Signs

No. of rabbit	Mortality	Clinical sign
6	0/6	Normal

sex : male

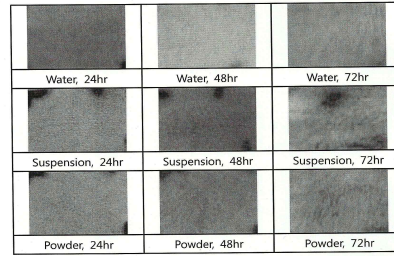


Figure 1. Results of Skin Reaction on Abraded Skin

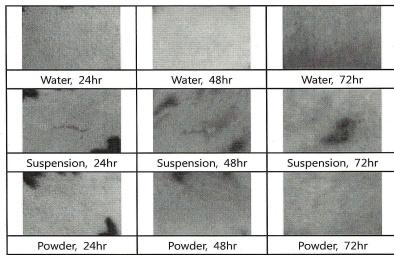


Figure 2. Results of Skin Reaction on Intact Skin

Table 2. Primary Irritation Index

피부자극지수	Animal No.	1	2	3	4	5	6
	1 hr	0	0	0	0	0	0
24 hr	0	0	0	0	0	0	0
48 hr	0	0	0	0	0	0	0
72 hr	0	0	0	0	0	0	0
Mean	1 hr	0					
	24 hr	0					
	48 hr	0					
	72 hr	0					
자극구분	1 hr	비자극성					
	24 hr	비자극성					
	48 hr	비자극성					
	72 hr	비자극성					

2. 길항 미생물을 이용한 신규 식물병 방제제 개발

<재료 및 방법>

가. 미생물 안정성과 방제효과 증대를 위한 micro encapsulation 제조.

(1) Chitosan coated Liposome Microsphere 제조

① Liposome 제조방법

Liposome 제조를 위한 lipid는 cholesterol과 레시틴을 사용하였다. Cholesterol 50 mg과 chloroform 50 mg을 용기에 넣어 완전 혼합이 되도록 믹싱을 하였다. 회전농축기(rotary evaporator)에 혼합 용액이 들어있는 용기를 장착하고, 진공펌프를 이용하여 진공상태를 만들어 주었다. 진공상태에서 chloroform이 완전히 제거되면 thin film이 형성되고, 2-4시간 정도 진공상태에서 계속 건조를 시키면 잔여 chloroform이 제거된다. 회전농축기로부터 용기를 제거하고, thin film이 있는 용기에 thin film과 증류수의 비율이 1:10정도로 증류수를 첨가하여 hydration을 시킨다. 이러한 hydration과정을 통해 구형 Liposome이 형성된다. 구형 Liposome을 향온 초음파 세척기에 1/3 정도 잠기도록 넣은 후, 40°C에서 20 분간 초음파 환경에 노출시켜 소형 unilamella liposome을 형성한다.

만들어진 초기 리포솜 용액은 200 nm 기공 크기를 갖고 있는 필터(Satorius)를 통과시켜, 리포솜의 크기를 균일하게 하였다.

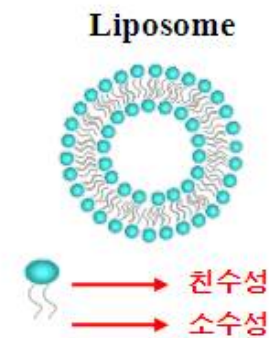


그림 1. 리포솜 형태

② Chitosan coated Liposome microsphere 제조방법

키토산 용액은 10 g의 키토산(와이비바이오, 한국)을 500 mL 증류수에 첨가, 그리고 acetic acid 5 mL을 첨가하여 키토산을 완전히 용해시킨다. 분자량 조절을 위해 chitosanase를 상기 키토산용액에 소량첨가한 후 온도를 40°C 유지한 채 가수분해를 진행한다. 가수분해의 종료는 키토산용액의 온도를 90°C에 유지하여 chitosanase의 활성을 중지 시킨다. 키토산 용액 냉각 후 5 um MF를 이용하여 불순물을 제거한다. Chitosan 분자량의 liposome microparticles coating 영향을 보기 위해 다양한 분자량을 지닌 chitosan을 사용하였다.

Chitosan-coated liposomes은 50 mL 균질화된 liposome에 상기 키토산용액에 50 mL첨가하여

10°C에서 2시간 항온조건을 유지하여 제조한다. 필요시 미생물균체는 liposome에 먼저 봉입한 후 키토산용액을 첨가한다.

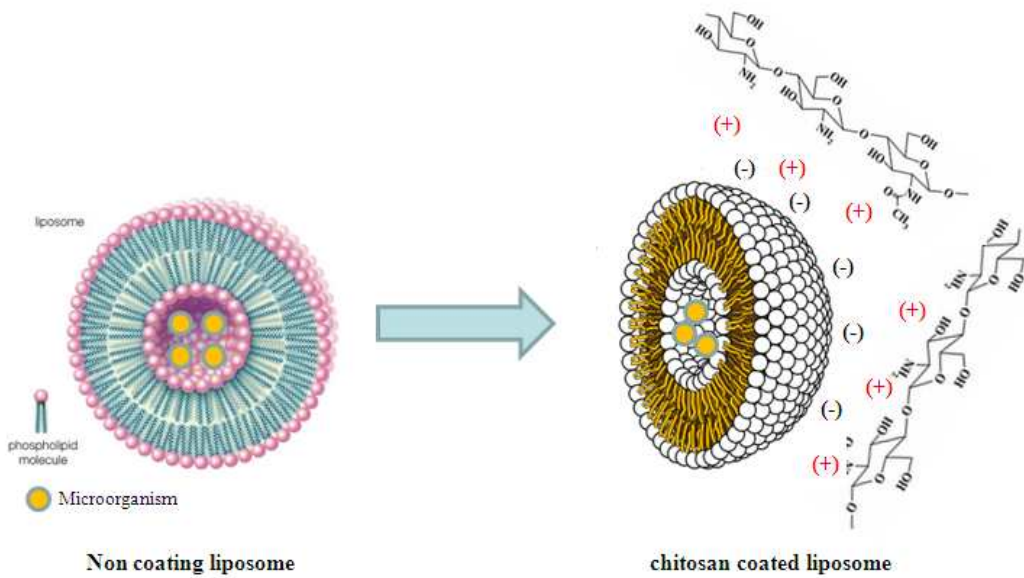


그림. 2. 키토산 코팅 리포솜 microsphere 제조

(2) Chitosan coated Silica Microsphere 제조

Silica Microsphere에 미생물균체를 봉입하기 위해 1% SiO₂ microparticles을 0.5 M NaCl용액에 현탁시킨 후 미생물균체를 첨가하여 4시간 보관한다. SiO₂ microparticles을 3회 수세한 후 잉여 미생물 균체를 제거하기 위해 원심분리를 하여 상등액을 제거한다.

SiO₂ microparticle를 0.2 M acetate buffer (pH 3.5)에 재현탁한 후 0.5% chitosan 용액 혼합한 후 교반을 한다. Chitosan 분자량의 SiO₂ microparticles coating 영향을 보기 위해 다양한 분자량을 지닌 chitosan을 사용하였다. 8시간 후 잉여 chitosan용액은 원심분리후 상등액을 통해 제거된다. SiO₂ microparticle은 0.002 M acetate buffer (pH 3.8)로 수세하고 증류수로 3회 수세를 한다. SiO₂-coated chitosan microsphere는 실온에서 4시간 동안 2.5% glutaraldehyde (pH 4)에 의해 cross-linked되어진다. 잉여 glutaraldehyde는 증류수로 SiO₂-coated chitosan microsphere를 수세하여 제거한다.

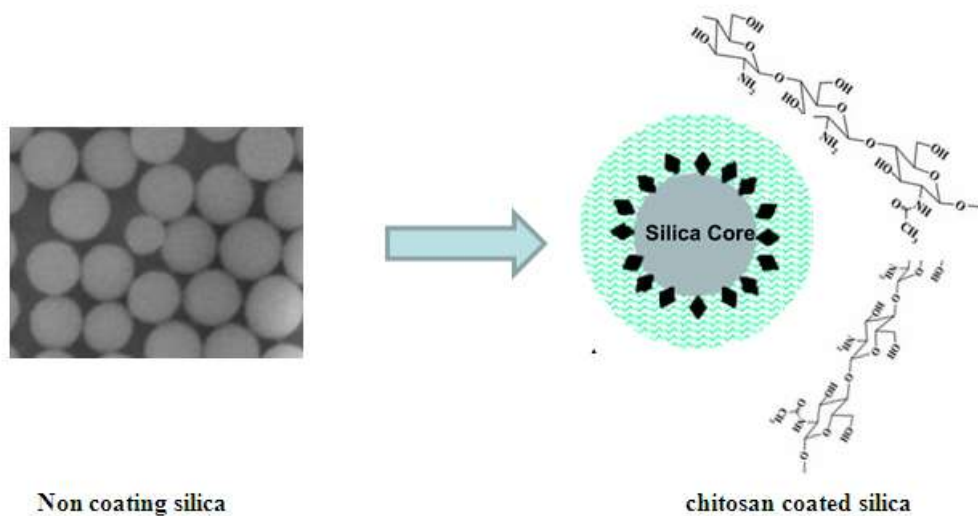


그림 3. 키토산 코팅 실리카 microsphere 제조

(3) Chitosan-Sulfate Complex Microsphere 제조

1% chitosan solution에 다양한 비율의 sodium sulfate 용액을 첨가한 후 격렬한 교반을 1시간 진행하여 Chitosan-Sulfate Complex Microsphere을 형성한다. 그리고 균질기를 사용하여 microsphere의 사이즈를 균질화 시킨다. 필요시 미생물균체는 sodium sulfate 첨가 전 chitosan용액에 첨가한다. 형성된 microsphere는 원심분리를 통해 분리된다.

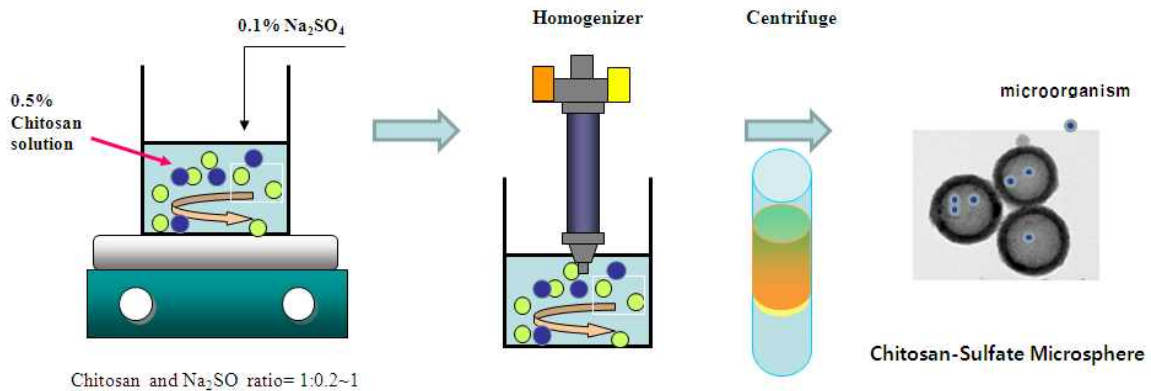


그림. 4. 키토산-Sulfate Complex Microsphere 제조

나. 미생물 안정성과 방제효과 증대를 위한 micro encapsulation 제조

(1) Attrition Mill을 이용한 Microsphere 제조

나노 또는 마이크로 단위 bead 제조시 attrition mill을 널리 사용한다. 그림 5와 같이 stirred-ball attrition mill[KMD-3BS, KMDC]시스템을 사용하였다. 시스템은 attrition mill 몸

체, stainless steel에 테프론이 코팅된 분쇄실(grinding tank)가 분쇄실에 수직으로 위치한 5핀의 임펠러, 슬러리를 순환시키는 순환펌프, 모터 그리고 온도를 조절하기 위한 냉각 순환기로 구성되어 있다. 분쇄실의 부피는 10L이고 온도를 조절하기 위하여 더블자켓을 이용하여 물을 순환시켰다. 지르코니아 볼을 분쇄 실용량의 50% 투입하고, 볼은 임펠러를 회전시키면서 투입하였다. 임펠러의 회전속도는 0-800rpm 범위까지 가능하나, 효율적인 분쇄가 가능한 650rpm을 사용하였다. 투입한 용액은 0.5~2%키토산과 0.5%~2% 알긴산을 사용하였다.

첫 번째 키토산 microsphere제조는 0.5%~2% 키토산 용액을 분쇄실에 넣기 전에 NaSO_4 을 일정비율로 혼합하여 슬러리 상태로 만들고, 20분동안 강력하게 교반하였다. 분쇄시간은 1시간으로 고정시킨 다음 10분마다 실린지를 사용하여 분쇄된 키토산시료를 채취하였다. 채취한 시료는 입자크기 분포를 측정하였다.

두 번째 알긴산 microsphere제조는 0.5%~2% 알긴산 용액을 분쇄실에 넣기 전에 CaCl_2 을 일정비율로 혼합하여 슬러리 상태로 만들고, 20분 동안 강력하게 교반하였다. 분쇄시간은 1시간으로 고정시킨 다음 10분마다 실린지를 사용하여 분쇄된 알긴산시료를 채취하였다. 채취한 시료는 입자크기 분포를 측정하였다.



그림 5. Attrition Mill 모형

(2) 미세 입상조립기(Minigranulator)을 이용한 Minigranule 제조

① 미세 입상조립기(Minigranulator)을 이용한 Minigranule 제조방법

입상 조립기는 맨 처음 비료공업과 제약에서 시작되어 powder의 입상 또는 정제화에 활용되었다. 본 실험에 사용된 조립기는 압출(extrusion)에 의한 방법으로 그림 6에 나타나 있다. 사용된 압출 Dome die 공극은 0.5 mm을 사용하였다. 이때 extrusion screw rpm은 40으로 하였다. 조립시 사용된 formula는 다음과 같다. 각 formula에서 균체를 포집하기 위한 다당류의 종류만 달리하였다.

다당류 선택한 이유는 실리카등의 무기물인 경우는 입자 강도가 강해 extrusion시 마찰력에 의해 균체에 손상을 주어 균체수가 감소하는 경향을 보았다. 그래서 입자 강도가 약하면서 입자내 공극이 많은 식물성 다당류를 선택하였다. 다당류중 chitosan등은 항균력을 가지고 있어 제외시켰으며 경제성

을 고려하여 음이온 다당류(sodium alginate, Carboxyl methyl cellulose)와 중성다당류(Guar gum)을 선택하였다. Minigranule이 함유된 완제품에 대한 제품 stability을 확인하기 위해 첨가량 및 부형제, 포장방법을 선정하여 균체 보존성을 살펴보았다. 최종제품은 각각 formula에 의해 만들어진 minigranule 10%에 무수포도당(anhydrous dextrous) 90%을 첨가하여 완전 혼합 후 진공 포장한다. 실험에 사용된 미생물 균체는 PSB균인 *Rodobacter sphaeroide*를 사용하였다.

표 1. Minigraulation 성분 구성표

(A)

성분명	함 량 (%)
Sodium Alginate	85%
미생물 균체	10%
글리세린	5%

(B)

성분명	함 량 (%)
Carboxyl Methyl Cellulose	85%
미생물 균체	10%
글리세린	5%

(C)

성분명	함 량 (%)
Guar Gum	85%
미생물 균체	10%
글리세린	5%



그림 6. Migranulator와 minigranule 형태

② Minigranule을 이용한 미생물 안정성 실험

미생물균체를 minigranule내에 포집한 후 실온과 40℃에서 장기간 보관하면서 미생물 균체수 변화를 살펴보았다. 그리고 미생물 균체 포함 minigranule을 무수포도당에 혼합하여 진공포장한 제품 역시 실온과 40℃에서 장기간 보관하면서 미생물 균체수 변화를 살펴보았다.

다. Micro encapsulation 제제의 효능실험

(1) Micro encapsulation 제제 포장 실험

① Attrition Mill에 의한 microsphere 제제 효능 실험 (상추재배시험)

- 시험장소

실증 포장 : 전남 곡성군 입면 창전리 272 곡성 생물방제 센터 실험포장 (비닐하우스)

- 공시작물 : 상추

- 공시제제 : 미생물 함유 microsphere 제제

- 시험구분

㉠ 포장 시험 : 상추의 최종 수확량 및 생육 조사

- 엽장 및 엽폭 조사

- 건물중 및 생체중 분석

㉡ 약해 시험 : 공시 시료의 농도별 약해 발생 유무 분석

- 처리구별 살포농도 및 면적

* 무처리구 : 물처리

* 공시시료 추천구 : 200배 희석액

* 공시시료 배량구 : 100배 희석액

* 처리구 면적 : 가로 1.2 m × 세로 10 m = 12 m²

- 실험 방법

㉠ 상추 종자 파종

○ 종자 소독 : 상추 종자를 70% 에탄올과 2% NaOCl을 이용하여 종자 소독 한 후 멸균수를 이용하여 충분히 wash 하였다.

○ 종자 파종 : 멸균된 상추 종자를 멸균된 MS 배지에 파종 한 후 최아된 종자를 12well plate에 옮겨 1차 파종을 실시하였다.

○ 생육 환경 : 종자 발아 및 1차 생육은 무균 조직배양실에서 실시하였으며 생육온도는 25℃를 유지하였다.

㉡ 상추 정식 및 공시시료 처리

○ 1차 포트 이식 : 12well plate에서 본 엽이 나온 어린 묘를 1차 소형 pot에 이식하였다. 이식 토양은 상토와 버뮤쿨라이트 및 펄라이트를 5:1:1로 혼합한 토양을 사용하였다.

○ 2차 토양 정식 : 소형 포트에서 활착을 완료한 모종 중 생육이 균일한 모종을 선발

하여 온실내 본토양 (처리구당 12 m²)으로 이식한 후 생장률 분석을 실시하였다.

㉔ 생육 조사

- 조사 방법 : 종자 파종 후 3회에 걸쳐 공시시료를 처리하고 65일째 되는 날 수확하여 배추잎의 길이(엽장)와 지름(엽폭)을 측정하였으며 엽록소 함량 및 생체중과 건물중을 측정하였다.
- 조사 항목
 - 엽장 조사 : 각 처리구당 Random sampling을 통하여 배추 외부 잎의 전체 길이를 측정하여 유의성 분석을 실시하였다.
 - 엽폭 조사 : 엽장 조사를 위해 sampling된 잎의 가장 넓은 부위를 대상으로 지름을 측정하여 유의성 분석을 실시하였다.
 - 생체중 조사 : 각 처리구당 식재한 배추를 모두 수확하여 각 배추 개체 하나당 생체중을 측정하고 유의성 분석을 실시하였다.
 - 건물중 조사 : 생체중을 측정한 배추를 60°C Dry oven에 3일간 건조한 후 건물중을 조사하고 유의성 분석을 실시하였다.

② Attrition Mill에 의한 microsphere 제제 효능 실험 (배추재배시험)

- 시험장소

실증 포장 : 광주 북구 용봉동 300 전남대학교 농업과학대학 실험포장 (비닐하우스)

- 공시작물 : 배추

- 공시제제 : 미생물 함유 microsphere 제제

- 시험구분

㉔ 포장 시험 : 배추의 최종 수확량 및 생육 조사

- 엽장 및 엽폭 조사
- 건물중 및 생체중 분석

㉔ 약해 시험 : 공시 시료의 농도별 약해 발생 유무 분석

- 처리구별 살포농도 및 면적

- * 무처리구 : 물처리
- * 공시시료 추천구 : 200배 희석액
- * 공시시료 배량구 : 100배 희석액
- * 처리구 면적 : 가로 1.2m × 세로 10m = 12m²

- 실험 방법

㉔ 배추 종자 파종

- 종자 소독 : 배추 종자를 70% 에탄올과 2% NaOCl을 이용하여 종자 소독 한 후 멸균

수를 이용하여 충분히 wash 하였다.

- 종자 파종 : 멸균된 배추 종자를 멸균된 MS 배지에 파종 한 후 최아된 종자를 12well plate에 옮겨 1차 파종을 실시하였다.
- 생육 환경 : 종자 발아 및 1차 생육은 무균 조직배양실에서 실시하였으며 생육온도는 25℃를 유지하였다.

㉞ 배추 정식 및 공시시료 처리

- 1차 포트 이식 : 12well plate에서 본 엽이 나온 어린 묘를 1차 소형 pot에 이식하였다. 이식 토양은 상토와 버뮤클라이트 및 펄라이트를 5:1:1로 혼합한 토양을 사용하였다.
- 2차 토양 정식 : 소형 포트에서 활착을 완료한 모종 중 생육이 균일한 모종을 선발하여 온실내 본토양 (처리구당 12m²)으로 이식한 후 생장률 분석을 실시하였다.

㉟ 생육 조사

- 조사 방법 : 종자 파종 후 3회에 걸쳐 공시시료를 처리하고 65일째 되는 날 수확하여 배추잎의 길이(엽장)와 지름(엽폭)을 측정하였으며 엽록소 함량 및 생체중과 건물중을 측정하였다.
- 조사 항목
 - 엽장 조사 : 각 처리구당 Random sampling을 통하여 배추 외부 잎의 전체 길이를 측정하여 유의성 분석을 실시하였다.
 - 엽폭 조사 : 엽장 조사를 위해 sampling된 잎의 가장 넓은 부위를 대상으로 지름을 측정하여 유의성 분석을 실시하였다.
 - 생체중 조사 : 각 처리구당 식재한 배추를 모두 수확하여 각 배추 개체 하나당 생체중을 측정하고 유의성 분석을 실시하였다.
 - 건물중 조사 : 생체중을 측정한 배추를 60℃ Dry oven에 3일간 건조한 후 건물중을 조사하고 유의성 분석을 실시하였다.

라. 유황함유 Micro encapsulation 제제의 흰가루병 방제 효능 실험

(1) 유황 함유 Micro encapsulation 제제의 흰가루병 방제 포장 실험

(가) 유황함유 Micro encapsulation 제제 (바이탄) 제조

- 유황분말을 NaOH 20%용액에 30% 유황농도가 되게 녹인다.
- 용해된 액상유황에 식이유황인 MSM을 녹인다.
- 습윤제와 전착제로서 계면활성제를 첨가하여 최종 제품인 바이탄을 제조한다.

(나) 바이탄 제제

유황: 5%

식이유황: 10%

계면활성제: 5%

키토산 microsphere: 15%



③ 농도별 오이 흰가루병 발병 억제 효과 검정

전남 나주시 노안면 소재의 오이 시설하우스에서 난괴법으로 실험하였으며, 처리구의 모든 반복에서 25주의 이를 사용하였다. 시험에 사용한 유황 제제(바이탄)는 발생초기인 2012년 9월 10일부터 500배, 1,000배, 2,000배로 희석하여 10일 간격으로 총 3회 처리하였으며, 발병 조사는 마지막으로 유황 제제를 처리하고 10일 후에 최상위엽에서 부터 총 10개의 오이 잎에 발생한 흰가루병의 발병 지수를 조사하였다. 발병 지수는 흰가루병이 발병하지 않았을 때 0, 엽당 병반면 적률이 1에서 5%의 발병 지수를 1로 하고, 병반면적률이 5.1에서 25% 정도일 때의 발병지수를 2, 25.1에서 50%일 경우를 3, 50% 이상일 때를 4로 결정하였다. 조사한 오이 한 주의 발병도는 아래 식을 이용하여 구하고 무처리구의 발병도와 비교하여 방제가를 계산하였다.

$$\text{발병도 (\%)} = \frac{\sum(\text{발병지수} \times \text{계수})}{4N} \times 100$$

- 발병지수 0: 발병무
- 1: 엽당 병반면적률 1 - 5%
 - 2: 엽당 병반면적률 5.1 - 25%
 - 3: 엽당 병반면적률 25.1 - 50%
 - 4: 엽당 병반면적률 50.1% 이상
 - N: 병반면적률을 조사한 잎 수

$$\text{방제가(\%)} = \left(1 - \frac{\text{유황제제 처리구의 발병도}}{\text{무처리구의 발병도}}\right) \times 100$$



전남 나주시 노안면 소재의 오이 시설하우스

④ 처리시기에 따른 오이 흰가루병 발병 억제 효과 검정

전남 담양군 월산면 소재의 오이 시설하우스에서 난괴법으로 실험하였으며, 모든 처리구의 반복에는 30주의 오이를 사용하였다. 유황 제제(바이탄)는 병 발생의 시기를 달리하여 처리 하였는데, 포장에서 병 발생 정도가 1% 미만이 되는 발생 초기와, 5%에서 10% 사이의 발병도를 보이는 발병 중기, 그리고 25%의 발병도를 보이는 발병 후기로 임의로 구별하여, 각각의 시기에 오이의 잎에 충분히 묻도록 유황 제제를 총 4회 살포하였다. 각각의 발병 시기에 유황 제제를 처리할 때에는 처리 간격을 5일, 7일, 10일 간격으로 조정하여 처리하였으며, 발병 조사는 각 처리구마다 마지막 처리를 하고 10일 후에 위와 같은 방법으로 잎에서의 발병도를 조사하여 방제가를 계산하였다.

마. 식물추출물함유 Micro encapsulation 제제의 진딧물 방제 효능실험

(1) 식물추출물함유 Micro encapsulation 제제의 진딧물 방제 효능실험

① 식물추출물 Micro encapsulation 제제 (모비탄) 제조

고삼추출물: 3%

넝추출물: 7%

파라핀 오일: 5%

계면활성제: 5%

알긴산 microsphere: 15%



② 식물추출물함유 Micro encapsulation 제제의 진딧물 살충 효과검증

식물추출물(모비탄)을 500배, 1000배 희석하여 leaf disk법을 사용하여 복숭아혹 진딧물에 대한 살충율을 조사하였다. Petri dish(90x15 mm)에 젖은 흡습지를 깔고 5x5 cm의 배춧잎을 그위에 얹은 후 복숭아혹진딧물 약충 10씩 옮겨 놓은 후 준비된 식물추출물을 30 cm 거리에서 spray로 5초간 분사하여 포화습도를 유지시킨 상태에서 1일, 2일 후에 살충율(mortality)을 계산하였다. 생사 판별은 해부 현미경하에서 붓으로 충체를 접촉하여 몸 길이 정도를 이동하지 못하는 개체는 죽은 것으로 간주하였다.

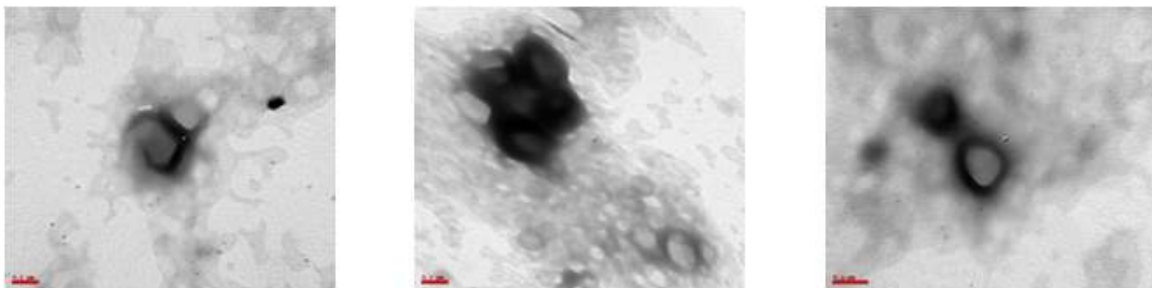
<연구 결과>

가. 미생물 안정성과 방제효과 증대를 위한 micro encapsulation 제조

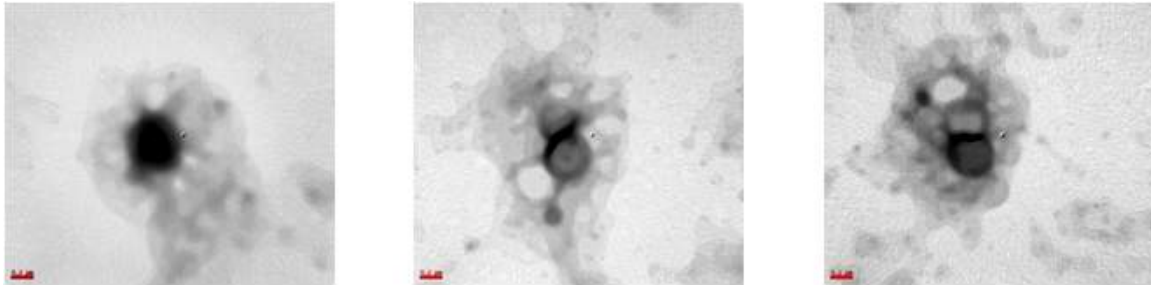
(1) Chitosan coated Liposome Microsphere 제조

① Liposome Formation

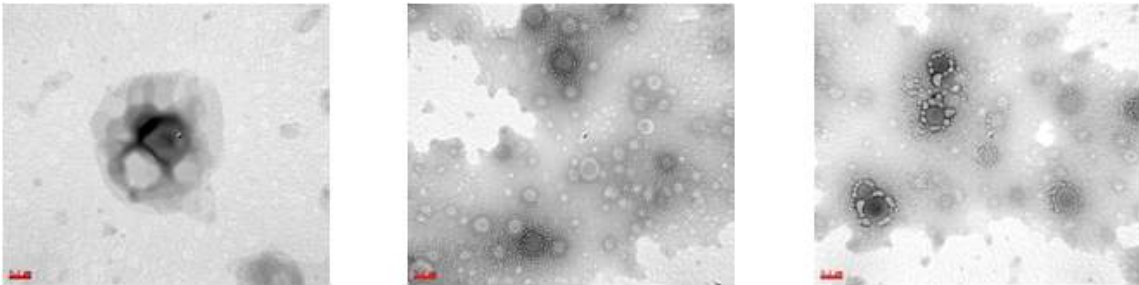
Cholesterol과 레시틴을 사용하여 liposome을 제조하였다. TEM으로 liposome의 형성의 유무를 측정하였다. 그림 7과 같이 lipid의 종류에 따라 큰 변화는 없었고 가운데 검은색 부분의 기공이 형성된 것으로 liposome 형성된 것으로 확인되었다.



(a) Liposome made with cholesterol



(b) Liposome made with lecitin



(c) Liposome made with mixture of cholesterol and lecitin

그림 7. 리포솜 형태(TEM)

② Chitosan coated Liposome microspher 제조

그림 8은 chitosan이 liposome에 coating 되므로써 liposome의 surface가 검게 나오는 것으로 chitosan coated liposome이 형성되었음을 확인 할 수 있었다.

표 2은 chitosan의 분자량에 따른 liposome size 및 surface charge의 영향을 나타낸다. 표 2과 같이 chitosan이 coating됨에 따라 liposome의 size는 증가하지만 분자량의 크기와는 관계가 없는 것으로 확인되었으며 surface charge를 나타내는 zeta potential은 chitosan 분자량이 증가함에 따라 zeta potential이 negative에서 positive로 증가하는 것으로 확인되었다. 이것은 chitosan이 positive charge를 가지고 있어 negative charge인 liposome의 표면을 coating함으로써 surface charge가 변했음을 알 수 있다.

표 3는 chitosan의 농도에 따른 liposome size 및 surface charge의 영향을 나타낸다. 표 3과 같이 chitosan의 농도가 증가됨에 따라 liposome의 size는 증가하지만 농도 증가폭에 비해 liposome의 size 증가폭은 미미한 것으로 확인되었으며 zeta potential은 chitosan 농도가 증가함에 따라 zeta potential 역시 positive로 증가하는 것으로 확인되었다. 이것은 고농도의 chitosan이 liposome의 표면을 coating함으로써 surface charge가 더욱 더 positive로 변함을 알 수 있다.

표 4은 chitosan의 분자량에 따른 liposome의 미생물 균체 entrapment의 영향을 나타낸다. 표 4과 같이 chitosan이 coating됨에 따라 liposome의 entrapment는 감소하였으며 분자량이 커지면 entrapment가 증가함이 확인되었으나 chitosan이 coating되지 않은 liposome entrapment 효율보다는 작음을 확인하였다.

표 5는 chitosan의 농도에 따른 liposome의 미생물 균체 entrapment의 영향을 나타낸다. 표 5와 같이 chitosan의 농도가 0.2%, 0.3%에서 liposome의 미생물 균체 entrapment 효율이 최대로 되나 0.4%, 0.5%에서는 liposome의 미생물 균체 entrapment효율이 급격히 감소함을 확인 하였다.

이상의 결과로 liposome의 미생물 균체 entrapment를 위한 chitosan의 규격은 분자량은 120kDa그리고

농도는 0.2%가 가장 적절함을 알 수 있었다. 이와 같은 chitosan의 조건으로 미생물균체가 chitosan coated Liposome microsphere에서 release 되는 profile을 구하였다. 이때 사용한 미생물 균체는 PSB균인 *Rodobacter sphaeroide*를 사용하였다. 그림. 9와 같이 chitosan coated Liposome microsphere에 encapsulation된 미생물균체는 50시간 이후 초기 균체수 3.5×10^6 cfu/g에서 1.5×10^6 cfu/g가 release되어 chitosan uncoated Liposome microsphere의 3.0×10^6 cfu/g보다 훨씬 적은량이 release되는 것을 확인하여 chitosan coated Liposome microsphere가 미생물균체의 좋은 encapsulation 소재임을 확인하였다. 그러나 liposome은 미생물 오염에 아주 취약하여 target 미생물 균체를 봉입할 시 잡균에 의해 아주 쉽게 오염이 됨을 확인하였다. 이를 해결하기 위해서는 방부제를 첨가해야 하나 첨가된 방부제가 target 미생물 균체에 손상을 주기에 chitosan coated liposome microsphere는 미생물 균체를 encapsulation하는 것에는 실제 공정에는 적절하지 않음을 알 수 있었다.

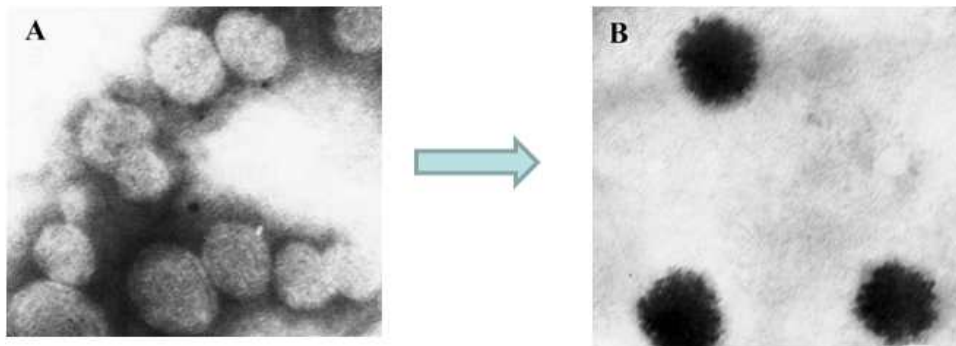


그림 8. 리포솜의 Transmission electron microscopy 사진
(A) 코팅되지 않은 리포솜 (B) 키토산 코팅 리포솜

표 2. 키토산 분자량이 리포솜의 크기와 제타포텐셜에 미치는 영향

Mw	Zeta potential/mV	Size/um
Uncoated	-2.9	10.2
6kDa	4.9	26.2
14kDa	5.0	23.0
56kDa	5.5	19.7
120kDa	6.7	23.4

표 3. 키토산 농도가 리포솜의 크기와 제타포텐셜에 미치는 영향

Concentration	Zeta potential/mV	Size/um
0.1% Ch120 kDa	6.2	18.1
0.2% Ch120 kDa	6.7	22.4
0.3% Ch120 kDa	7.3	22.1
0.4% Ch120 kDa	10.5	23.2
0.5% Ch120 kDa	17.0	24.3

표 4. 키토산 분자량에 따라 코팅된 리포솜의 봉입효과

Mw	Entrapment efficiency/%
Uncoated	81.6±2.4
6kDa	69.7±5.1
14kDa	71.2±3.6
56kDa	75.8±4.3
120kDa	75.9±4.9

표 5. 키토산 농도에 따라 코팅된 리포솜의 봉입효과

Concentration	Entrapment efficiency/%
0.1%Ch120kDa	58.5±3.4
0.2%Ch120kDa	75.9±4.9
0.3%Ch120kDa	74.6±4.7
0.4%Ch120kDa	59.3±3.1
0.5%Ch120kDa	56.2±2.6

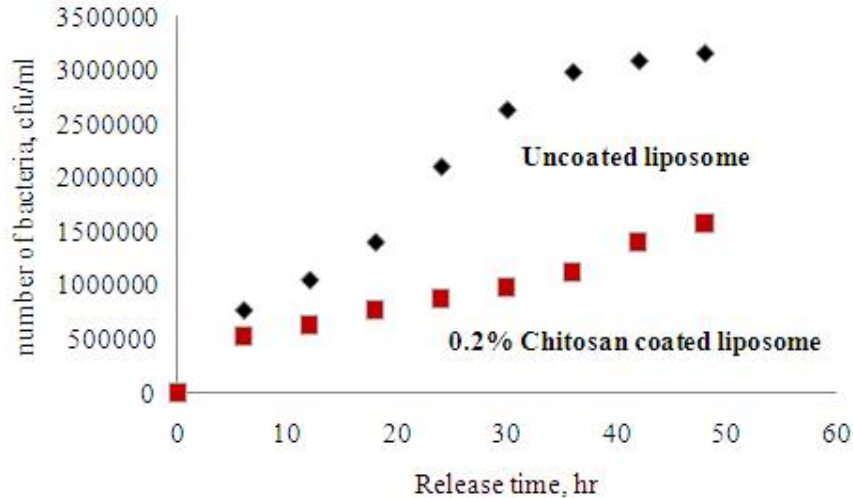


그림 9. 키토산 코팅 리포솜에 봉입된 세균의 분출 경향

(2) Chitosan coated Silica Microsphere 제조

그림 10과 11에서 보는 것과 같이 SiO₂ microparticle에 chitosan을 coating했을 경우 SiO₂ microparticle의 surface에 chitosan coating layer가 형성되는 것을 TEM과 SEM으로 확인 할 수 있었다.

표 6는 chitosan의 분자량에 따른 SiO₂ microparticle size 및 surface charge의 영향을 나타낸다. 표 6와 같이 chitosan이 coating됨에 따라 SiO₂ microparticle의 size는 분자량의 크기따라 2배 이상 증가하는 것이 확인되었으며 surface charge를 나타내는 zeta potential은 chitosan 분자량이 증가함에 따라 zeta potential이 negative에서 positive로 증가하지만 14 kDa이상은 zeta potential의 큰 증가는 보이지 않았다. 이것 역시 chitosan이 positive charge를 가지고 있어 negative charge인 SiO₂ microparticle의 표면을 coating함으로써 surface charge가 변했음을 알 수 있다.

표 7는 chitosan의 농도에 따른 SiO₂ microparticle size 및 surface charge의 영향을 나타낸다. 표 7과 같이 chitosan의 농도가 증가됨에 따라 SiO₂ microparticle의 size는 증가하지만 농도 증가폭에 비해 liposome의 size 증가폭은 크지 않은 것으로 확인되었으며 zeta potential은 chitosan 농도가 증가함에 따라 zeta potential 역시 positive로 증가하는 것으로 확인되었지만 농도 증가폭에 비해 zeta potential의 증가폭 역시 크지 않은 것으로 확인되었다.

표 8은 chitosan의 분자량에 따른 SiO₂ microparticle의 미생물 균체 entrapment의 영향을 나타낸다. 표 8과 같이 chitosan이 coating됨에 따라 liposome의 entrapment는 급격히 감소하였으며 분자량이 커지면 entrapment가 더욱 더 감소됨을 확인되었다. 이것은 chitosan이 SiO₂ microparticle surface를 coating을 하지만 상당량이 SiO₂ microparticle pore로 유입되어 미생물 균체를 pore에서 밀어내는 영향을 주는 것으로 사료된다.

이상의 결과로 SiO₂ microparticle의 미생물 균체 entrapment를 위한 chitosan의 규격은 분자량은 6kDa그리고 농도는 0.03%가 가장 적절함을 알 수 있었다. 이와 같은 chitosan의 조건으로 미생물균체가

chitosan coated silica microsphere에서 release 되는 profile을 구하였다. 이때 사용한 미생물 균체는 PSB균인 *Rodobacter sphaeroide*를 사용하였다. 그림. 12와 같이 chitosan coated silica microsphere에 encapsulation된 미생물균체는 50시간 이후 초기 균체수 5.5×10^6 cfu/g에서 1.5×10^6 cfu/g가 release되어 chitosan uncoated Liposome microsphere의 5.1×10^6 cfu/g보다 훨씬 적은량이 release되는 것을 확인하였다. 그러나 표 8의 결과와 같이 chitosan이 coating됨으로써 entrapment 효율이 최대 32% 밖에 되지 않아 효율면에서 chitosan coated silica microsphere는 미생물균체의 좋은 encapsulation 소재로서 적용하기 위해서는 entrapment의 효율을 증대시키는 것이 필요함이 사료된다.

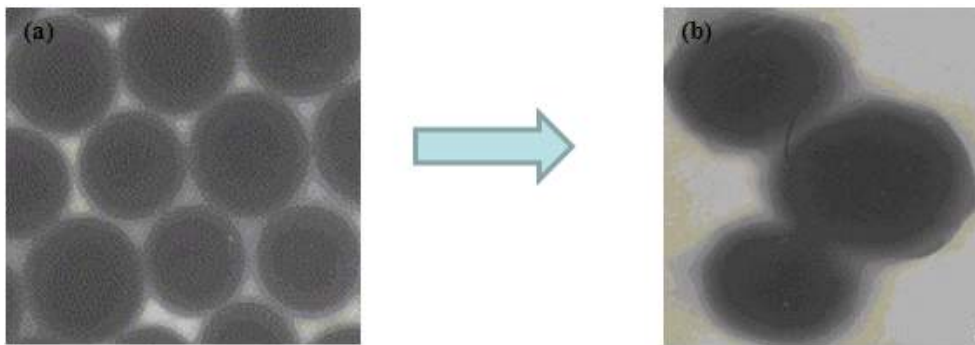


그림. 10. SiO₂의 Transmission electron microscopy(TEM) 사진
(a) 무코팅 SiO₂ (b) SiO₂코팅 키토산 입자



그림. 11. SiO₂의 Scanning Electron Microscope(SEM) 사진 (a) 무코팅 SiO₂
(b) SiO₂코팅 키토산 입자. (cross-linking agent: glutaraldehyde)

표 6. 키토산 분자량이 실리카의 크기와 제타포텐셜에 미치는 영향

Mw	Zeta potential/mV	Median Size/um
Uncoated	-8.5	21
6kDa	2.5	24
14kDa	6.8	35
56kDa	7.1	41
120kDa	7.2	48

표 7. 키토산 농도가 실리카의 크기와 제타포텐셜에 미치는 영향

Concentration	Zeta potential/mV	Size/um
0.01% Ch120 kDa	6.5	18.1
0.02% Ch120 kDa	6.7	42
0.03% Ch120 kDa	7.3	45
0.04% Ch120 kDa	7.2	48
0.05% Ch120 kDa	7.5	51

표 8. 키토산 분자량에 따라 코팅된 실리카의 봉입효과

Mw	Entrapment efficiency/%
Uncoated	75.6±4.5
6kDa	32.7±4.2
14kDa	26.8±5.6
56kDa	25.8±4.2
120kDa	22.3±3.6

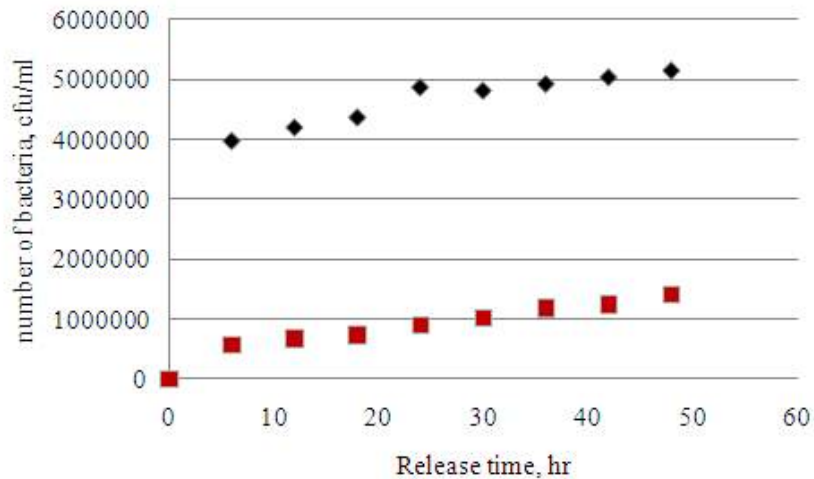


그림. 12. 키토산 코팅 실리카에 봉입된 세균의 분출 경향

(3) Chitosan-Sulfate Complex Microsphere 제조

그림. 13은 Chitosan-Sulfate Complex Microsphere의 Scanning Electron Microscope(SEM) analysis이다. SEM 사진과 같이 원형의 그리고 표면에 porosity가 많은 Chitosan-Sulfate

Complex Microsphere이 형성되었음을 알 수 있다.

표 9은 chitosan의 분자량에 따른 Chitosan-Sulfate Complex Microsphere size 및 microsphere formation efficacy의 영향을 나타낸다. 표 8과 같이 chitosan의 분자량이 6 KDa와 같이 작을 때는 microsphere formation efficacy가 72%이지만 14 KDa는 96%로 가장 높게 나왔다. 그러나 분자량이 120 KDa 처럼 아주 커질 경우 microsphere formation efficacy가 낮아 짐을 볼 수 있었다. Microsphere size는 분자량이 증가함에 따라 급격히 증가하는 것을 볼 수 있다.

표 10는 chitosan과 NaSO₄ ratio에 따른 Chitosan-Sulfate Complex Microsphere size 와 microsphere formation efficacy의 영향을 나타낸다. 표 10와 같이 chitosan과 NaSO₄ ratio가 증가하여 1:1이 될 경우 가장 높은 microsphere formation efficacy를 얻을 수 있었다. 그러나 chitosan과 NaSO₄ ratio가 Chitosan-Sulfate Complex Microsphere size에 미치는 영향은 미미하였다. 표 11은 chitosan의 분자량에 따른 chitosan-sulfate microsphere의 미생물 담체에 대한 entrapment efficiencies의 영향을 나타낸다. 표 11과 같이 chitosan의 분자량이 아주 작거나 아주 크면 entrapment efficiencies가 감소하고 chitosan의 분자량이 14 KDa와 같이 low molecule인 경우 entrapment efficiencies가 90% 이상으로 높게 나왔다. 이상의 실험결과로 chitosan-sulfate microsphere에 의한 미생물 담체 encapsulation은 chitosan과 NaSO₄ ratio가 1:1, chitosan의 분자량은 14 KDa이 가장 좋은 조건임을 알 수 있었다.

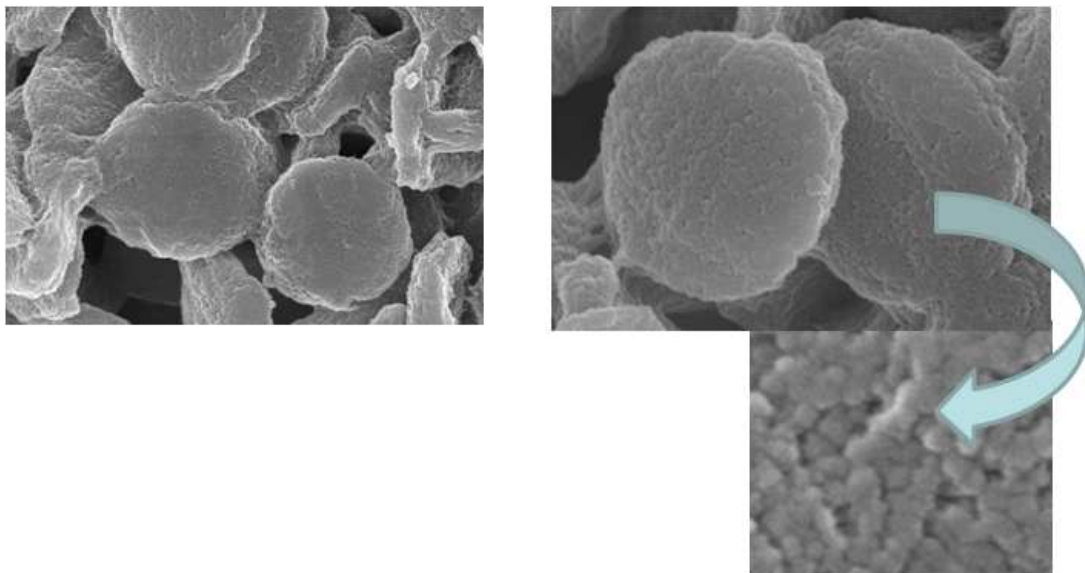


그림. 13. 키토산-sulfate 입자의 Scanning Electron Microscope(SEM) 사진

표 9. 키토산 분자량에 따른 키토산-sulfate 입자 크기와 생성효율,
Chitosan/NaSO₄ ratio (1:1)

Mw	Chitosan-Sulfate microsphere Formation Efficacy/%	Median Size/um
6 kDa	72	10
14 kDa	96	15
56 kDa	92	49
120 kDa	74	89

표. 9. 키토산/NaSO₄ 비율에 따른 키토산-sulfate 입자 크기와 생성효율,
키토산 분자량(14 KDa)

Chitosan/NaSO ₄ ratio	Chitosan-Sulfate microsphere Formation Efficacy/%	Size/um
1:0.2	68	10
1:0.4	78	12
1:0.6	84	14
1:0.8	91	15
1:1	96	15

표 11. 키토산 분자량에 따른 키토산-sulfate 입자의 봉입 효율.
Chitosan/NaSO₄ ratio (1:1)

Mw	Entrapment efficiency/%
6 kDa	58
14 kDa	94
56 kDa	86
120 kDa	75

나. 미생물 안정성과 방제효과 증대를 위한 micro encapsulation 제조

(1) Attrition Mill을 이용한 Microsphere 제조

① 분쇄시간에 따른 입자크기 변화

분쇄시간에 따른 키토산 및 알긴산 microsphere의 평균입자크기 변화는 표 12과 13에 나타내었다. 키토산과 알긴산 microsphere 모두의 크기는 10분후 급격히 줄어들었으나 30분 후 부터는 서서히 감소되고

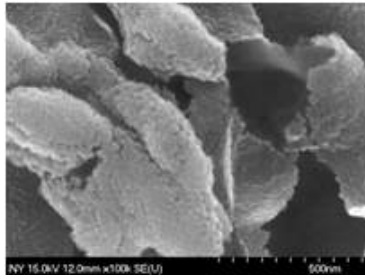
50분 이후부터는 거의 감소되지 않음을 확인하였다. 이와 같은 변화는 두 가지로 해석할 수 있다. 하나는 분쇄된 키토산과 알긴산 microsphere의 입자가 너무 작기 때문에 이 시스템에서 사용한 지르코니아 볼과 사용한 분쇄조건으로는 더 이상 입자크기를 줄일 수 없으며, 다른 하나는 attrition mill로 분쇄하는 동안 키토산과 알긴산 microsphere가 재 응집 할 수 있을 것으로 해석 할 수 있다. 그림 14은 키토산 microsphere의 attrition mill 분쇄 전후 입자 모양을 SEM으로 관찰하였다. 분쇄에 의해 키토산 microsphere pore가 선명하고 아주 작아졌음을 확인 할 수 있었다. 그림 15는 키토산 microsphere의 attrition mill 분쇄 전후 용액의 사진이다. 사진과 같이 분쇄 후 입자가 나노 입자화되어 수용액에서 suspension된 것을 볼 수 있었다.

표 12. 분쇄시간에 따른 키토산 입자의 평균크기

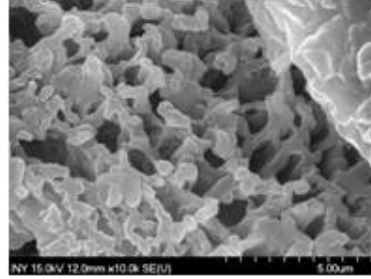
Grinding Time (min)	Mean Particle Size (μm)
0	51.9
10	15.4
20	6.5
30	3.5
40	1.2
50	0.75
60	0.73

표 13. 분쇄시간에 따른 알긴산 입자의 평균크기

Grinding Time (min)	Mean Particle Size (μm)
0	85.3
10	12.5
20	8.5
30	2.9
40	0.95
50	0.85
60	0.84



(A)



(B)

그림 14. 키토산 입자 Scanning Electron Microscope(SEM) 사진

(A) attrition mill 처리 전, (B) attrition mill 처리 후



(A)



(B)

그림 15. 키토산 microsphere 용액

(A) attrition mill 처리 전, (B) attrition mill 처리 후

② Chitosan 및 Alginate 농도에 따른 분쇄효율

Chitosan 및 Alginate 농도가 분쇄효율에 미치는 영향을 그림 16와 17에 나타내었다. Chitosan 및 Alginate 농도가 낮을 경우에는 분쇄효율이 우수하지만 Chitosan 및 Alginate 농도가 증가할수록 분쇄효율이 떨어지는 것을 확인 할 수 있었다. Chitosan 농도가 2%, Alginate 농도가 1.5%이상 되면 슬러리의 농도가 너무 높아 일부분은 분쇄실 벽과 임펠러 부분에 달라붙어 분쇄효율이 감소됨을 확인 하였으나 Chitosan 농도가 1.5%, Alginate 농도가 1.0%이하일 때 대부분 불과 슬러리는 소용돌이 흐름을 나타내어 분쇄효율이 우수함을 알 수 있었다.

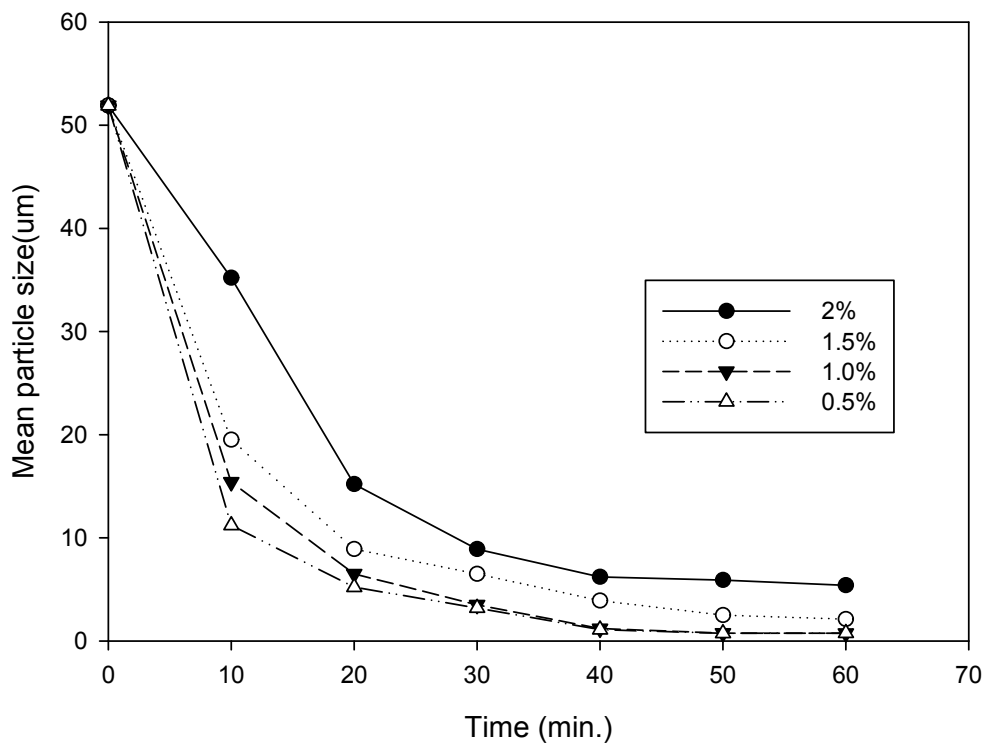


그림 16. 키토산 농도에 따른 평균입자크기

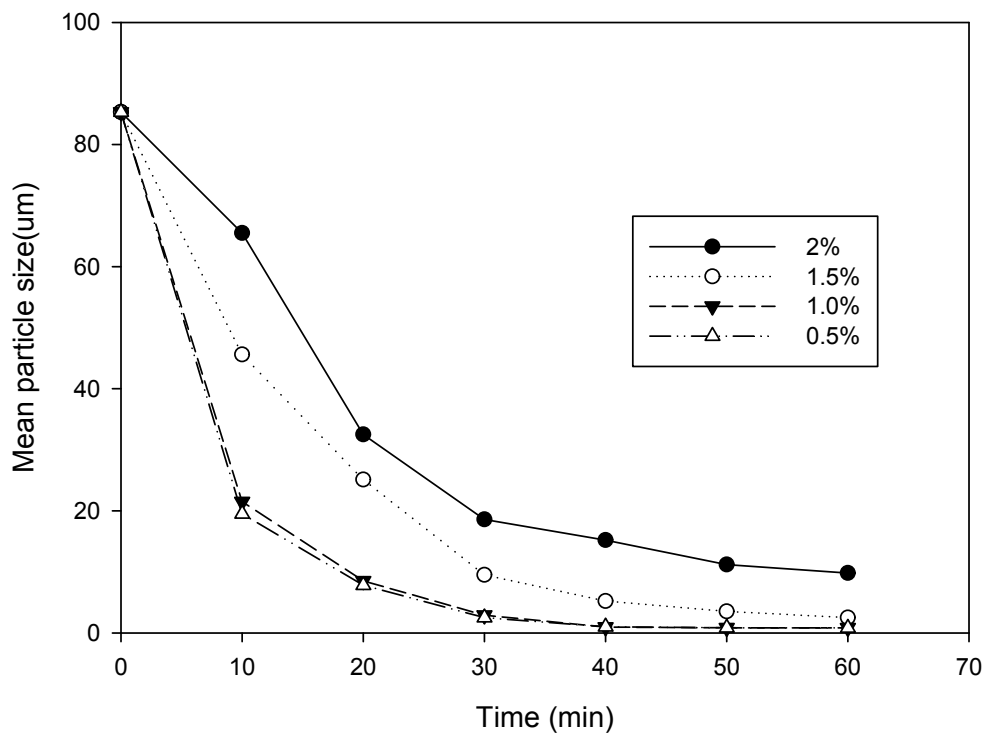


그림 17. 알긴산 농도에 따른 평균입자크기

③ 장시간 보관에 따른 입자크기의 변화

Attrition mill에서 분쇄한 키토산과 알긴산 microsphere의 제형 안정성을 확인하였다. 장시간 보관에 따른 키토산과 알긴산 microsphere의 입자크기 변화를 확인하였으나 결과는 그림 18에 나타나있다. 16주 동안 40℃ 항온기에서 보관하여도 키토산과 알긴산 microsphere 입자크기 변화는 없어 제형 안정성이 아주 우수함을 확인하였다. 그림 19은 16주 후 키토산 microsphere용액이 여전히 suspension되어 있는 것을 보여주고 있으며, 온도에 따른 갈변화에 따라 키토산 microsphere의 색상이 약간 갈색으로 변화된 것을 볼 수 있다.

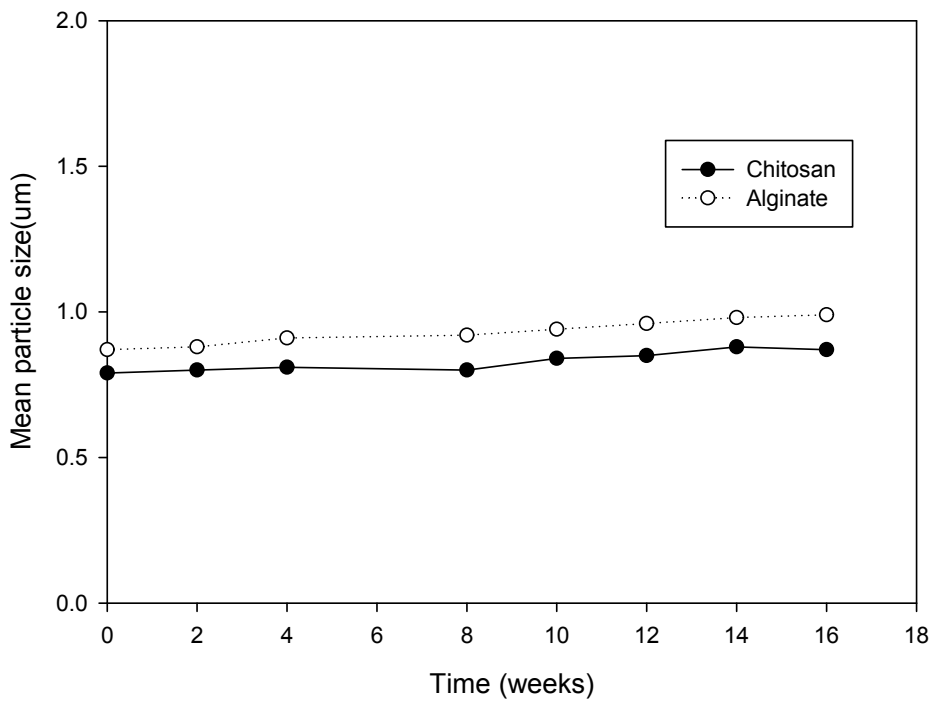


그림 18. 장기간 보관에 따른 평균입자크기 변화

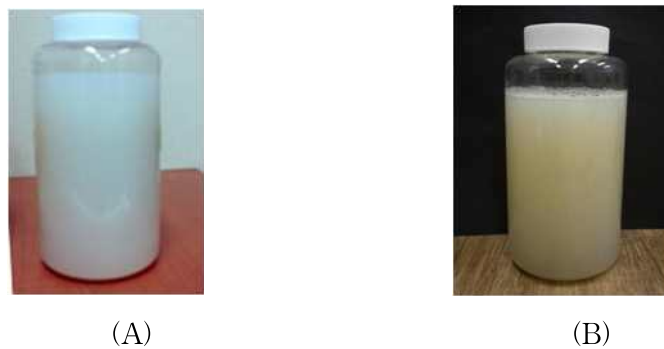


그림 19. 장기간 보관 키토산 microsphere 용액
(A) 저장 전, (B) 16주 저장 후

(2) 미세 입상조립기(Minigranulator)을 이용한 Minigranule 제조

① Minigranule을 이용한 미생물 안정성 실험

그림20은 실온에서 16주간 각각 formula에 따른 minigranule내 포집되어 있는 미생물 균체수의 변화를 나타내었다. 그림20과 같이 음성 다당류인 sodium alginate minigranule은 초기 균체수가 8.7×10^8 cfu/g에서 3.9×10^7 cfu/g로 감소하여 minigranule이 균체 보존에 효과가 있음을 확인하였다. 반면에 carboxyl methyl cellulose과 guar gum minigranule은 초기 균체수 8.1×10^8 cfu/g에서 각각 1.5×10^5 cfu/g, 8.7×10^6 cfu/g로 감소하여 minigranule이 균체 보존에 효과가 크지않음을 확인하였다.

그림21은 고온(40°C)에서 8주간 다당류 종류에 따른 minigranule내 포집되어 있는 미생물 균체수의 변화를 나타내었다. Sodium alginate minigranule은 초기 균체수가 8.37×10^8 cfu/g에서 1.1×10^8 cfu/g로 감소하여 minigranule이 균체 손실이 미미하여 실온 실험결과와 같이 균체 보존에 효과가 있음을 확인하였다. 반면에 carboxyl methyl cellulose과 guar gum minigranule은 초기 균체수 8.2×10^8 cfu/g에서 각각 1.8×10^3 cfu/g, 1.2×10^2 cfu/g로 급격히 감소하여 실온 실험결과와 같이 minigranule이 균체 보존에 효과가 크지 않음을 확인하였다.

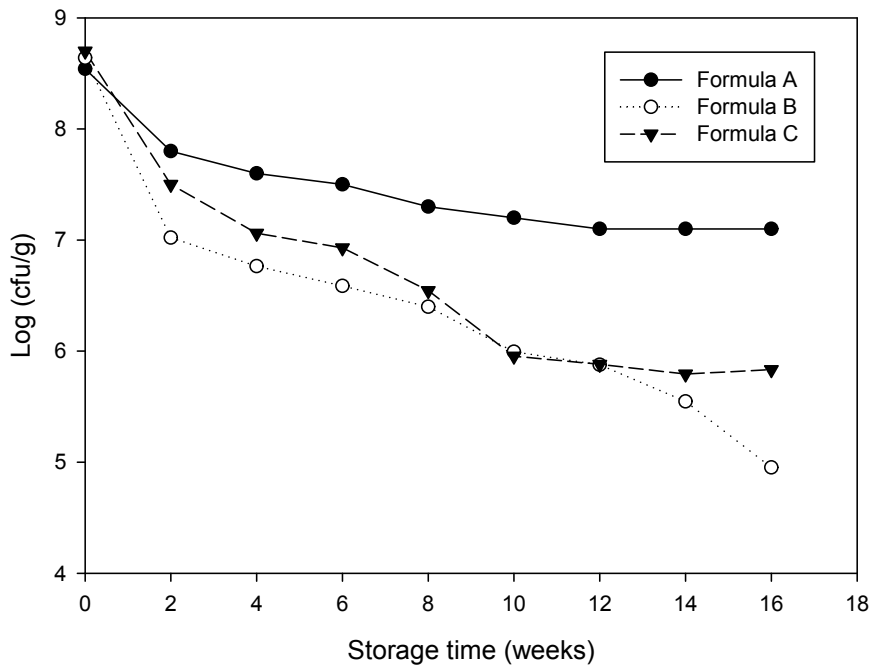


그림 20. 실온에서 장기간 보관 후 minigranule내 미생물의 생존율 시험

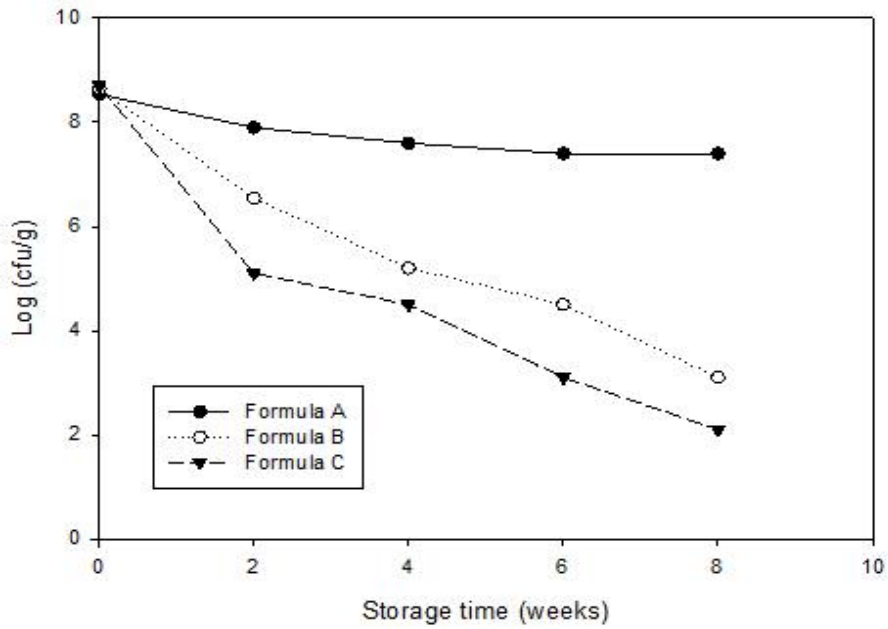


그림 21. 40°C에서 장기간 보관 후 minigranule내 미생물의 생존율 시험

② 완제품의 미생물 안정성 실험

그림22는 sodium alginate minigranule이 함유된 완제품에 대한 실온과 40°C에서 12주 및 8주간 minigranule내 포집되어 있는 미생물 균체수의 변화를 나타내었다. 그림22과 같이 sodium alginate minigranule은 실온에서는 초기 균체수가 8.3×10^7 cfu/g에서 1.3×10^2 cfu/g로 급격히 감소하였으며 40°C에서도 minigranule내 균체 수가 1.8×10^1 cfu/g로 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 현재의 부형제 및 포장방법에 있어서 균체 보존에 효과가 없음을 확인하였고 향후 이 부분에 있어서 부형제 및 포장방법에 대한 추가적인 실험이 이루어져야 한다.

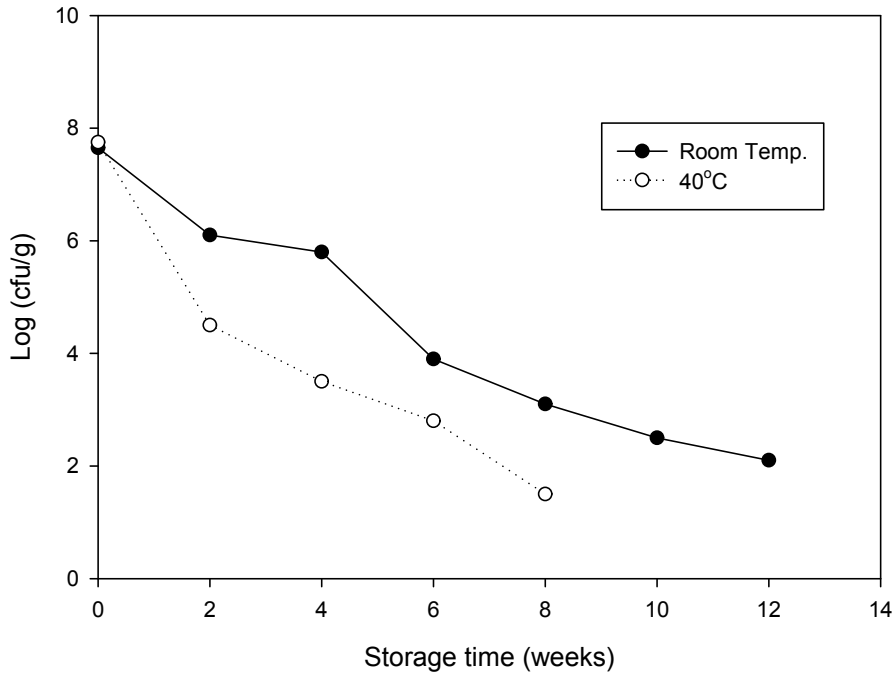


그림 22. 40°C에서 장기간 보관 후 minigranule내 미생물의 생존을 시험

다. Micro encapsulation 제제의 효능실험

(1) Micro encapsulation 제제 포장 실험

(가) Attrition Mill에 의한 microsphere 제제 효능 실험 (상추재배시험)

① 상추 수확 후 생육 조사

표14, 15와 같이 재배시험 기간 중 공시시료를 처리한 추천구와 배량구에서는 무처리구와 비교해서 엽장은 약 6.93%, 6.88%의 길이 증대 효과를 나타내었으며 엽폭 측정에서도 약 11.30%, 12.29%의 엽면적 확대 효과를 나타내었다. 최종 수확량에 있어서는 생체중 조사를 통해 공시시료 처리구는 무처리구에 비해 약 5.65%, 4.80%의 수확량 증대 효과를 보여 주었으며, 건물 무게에서도 6.22%, 10.04%의 차이를 나타내었다.

표14. Microsphere 제형의 상추 성장에 미치는 영향

처리구	엽장		엽폭	
	길이(cm)	지수(%)	길이(cm)	지수(%)
대조구	20.05 ^a	100	10.09 ^a	100
추천구	21.44 ^b	106.93	11.23 ^b	111.30
배량구	21.43 ^b	106.88	11.33 ^b	112.29

*DMRT at 5% level

표15. Microsphere 제형의 상추 성장에 미치는 영향

처리구	생체중		건물중	
	생체량(g)	지수(%)	건물량(g)	지수(%)
대조구	35.42 ^a	100	1.93 ^a	100
추천구	37.42 ^b	105.65	2.05 ^b	106.22
배량구	37.12 ^b	104.80	2.13 ^b	110.04

*DMRT at 5% level

② 공시시료의 작물에 대한 약해 조사

공시시료의 처리에 의한 약해 발생 유무를 조사하기 위하여 공시시료를 추천량 및 배량으로 나누어 공시작물인 상추를 대상으로 작물 약해 실험을 실시하였다. 표16과 같이 각각의 농도를 살포한 처리구에서 생육장해 및 피해 증상을 달관조사를 통하여 분석하였으나 어떠한 처리구에서도 약해가 발생하지 않음을 확인하였다

표. 16 Microsphere 제형의 작물약해 결과

시험약제	시험작물	약해정도 (0 - 5)			비고
		무처리구	추천량	배량	
공시시료	상추	0	0	0	약해 없음

(나) Attrition Mill에 의한 microsphere 제제 효능 실험 (배추재배시험)

① 배추 수확 후 생육 조사

표 17, 18과 같이 재배시험 기간 중 공시시료를 처리한 추천구와 배량구에서는 무처리구와 비교해서 엽장은 약 9.41%, 11.50%의 길이 증대 효과를 나타내었으며 엽폭 측정에서도 약 9.36%, 9.41%의 엽면적 확대 효과를 나타내었다. 최종 수확량에 있어서는 생체중 조사를 통해 공시시료 처리구는 무처리구에 비해 약 6.68%, 9.79%의 수확량 증대효과를 보여주었으며, 건물 무게에서도 11.54%, 15.81%의 차이를 나타내었다.

표17. Microsphere 제형의 배추 성장에 미치는 영향

처리구	엽장		엽폭	
	길이(cm)	지수(%)	길이(cm)	지수(%)
대조구	23.48 ^a	100	13.14 ^a	100
추천구	25.69 ^b	109.41	14.37 ^b	109.36
배량구	26.18 ^b	111.50	14.42 ^b	109.41

*DMRT at 5% level

표. 18 Microsphere 제형의 배추 성장에 미치는 영향

처리구	생체중		건물중	
	생체량(g)	지수(%)	건물량(g)	지수(%)
대조구	68.54 ^a	100	2.34 ^a	100
추천구	73.12 ^b	106.68	2.61 ^b	111.54
배량구	75.25 ^b	109.79	2.71 ^c	115.81

*DMRT at 5% level

② 공시시료의 작물에 대한 약해 조사

공시시료의 처리에 의한 약해 발생 유무를 조사하기 위하여 공시시료를 추천량 및 배량으로 나누어 공시작물인 배추를 대상으로 작물 약해 실험을 실시하였다. 표 19와 같이 각각의 농도를 살포한 처리구에서 생육장해 및 피해 증상을 달관조사를 통하여 분석하였으나 어떠한 처리구에서도 약해가 발생하지 않음을 확인하였다

표. 19 Microsphere 제형의 작물약해 결과

시험약제	시험작물	약해정도 (0 - 5)			비고
		무처리구	추천량	배량	
공시시료	배추	0	0	0	약해 없음

라. 유황함유 Micro encapsulation 제제의 흰가루병 방제 효능실험

(1) 유황 함유 Micro encapsulation 제제의 흰가루병 방제 포장 실험

(가) 농도별 오이 흰가루병 발병 억제 효과 검정

최종적으로 유황제제(바이탄)을 처리하고 10일 후에 조사한 무처리구에서의 흰가루병 발병도는 그림 23과 같이 52.5%로, 시험에 사용한 시료의 효과를 판단하기에 충분한 발병도를 보였다. 유황제제를 농도별로 엽면시비 처리한 처리구에서의 발병도와 방제가를 보면, 500배로 희석하여 처리한 경우 발병도는 2.5%이었으며 이에 따라 방제가는 95.2%로 나타났다. 1,000배와 2,000배로 희석하여 유황 제제를 처리한 처리구에서도 발병도와 방제가가 3.4%와 93.5%, 그리고 15.4%와 70.6%로 나타났다. 세 가지의 처리 농도에서 2,000배로 희석하여 처리하였을때의 방제 효과는 다른 두 처리 농도에 비하여 현저히 낮았으며 500배와 1,000배 희석 처리구의 결과에서는 유의성 있는 차이가 나타났기 때문에 농가에서 직접 사용하는 경우 경제성을 고려하여 1,000배의 희석 농도가 적합할 것으로 사료된다.

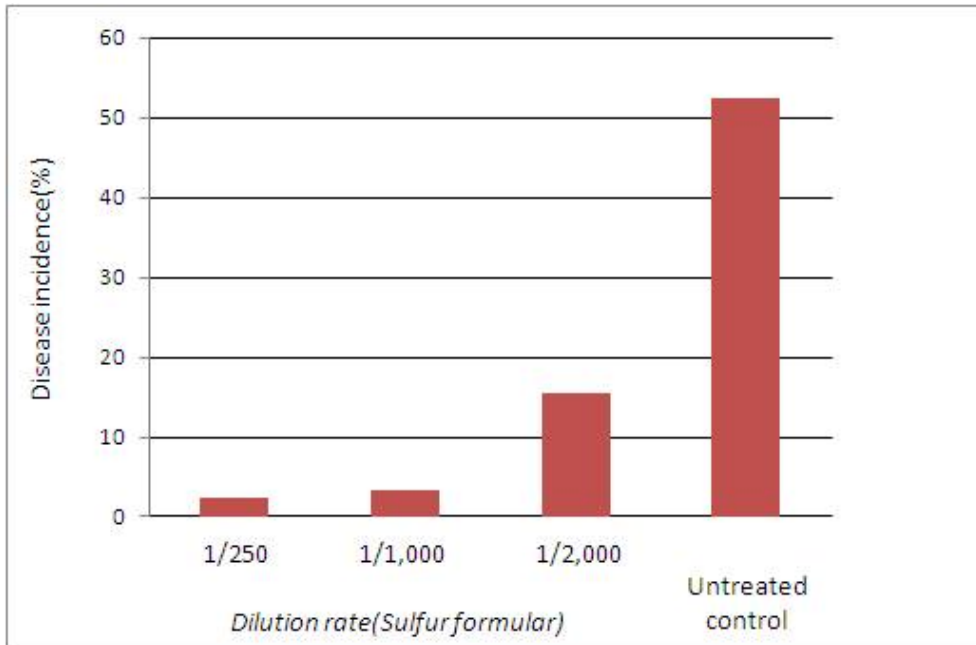


그림 23. 유황제제 농도에 따른 오이 흰가루병 발병 억제 효과

(나) 처리시기에 따른 오이 흰가루병 발병 억제 효과 검정

표 20과 같이 무처리구에서 오이 흰가루병의 발병도는 62.1%로 유황제제(바이탄)의 효과를 판단하기에 충분하였다. 유황 제제를 흰가루병이 발생하기 시작한 초기에 처리한 경우에 방제 효과가 94.4%에서 92.3%로 나타났다. 하지만 유황 제제를 처리하는 시기가 늦어질수록 방제가 역시 감소하였으며, 포장에 이미 흰가루병이 발생하여 발병도가 30% 이상일 경우에는 유황 제제의 방제가가 63.8%에서 57.3%로 나타났다. 병 발생 시기별로 유황 제제를 5일, 7일, 10일간으로 처리 간격을 다르게 하여 처리하였을 때, 유황제제의 흰가루병에 대한 방제 효과는 5일간격이 10일간격 보다는 높게 나왔지만 흰가루병에 대한 방제 효과간에는 유의성은 없

었다. 이 결과는 포장에서 유황제제를 사용하여 오이 흰가루병을 방제하기 위해서는 처리하는 간격보다는 포장에서 흰가루병이 발생하기 직전에 예방 처리를 하거나, 또는 병이 발생하기 시작하는 초기에 처리하는 것이 방제에 성공할 수 있는 방법이라는 것을 보여주고 있다.

표 20. 유황제제의 처리시기에 따른 오이 흰가루병 발병 억제 효과

Treatment	Disease-developing stage	Period (days)	Disease incidence(%)	Control efficacy(%)
Sulfur formular	the early stage	5	3.5	94.4
		7	3.7	94.0
		10	4.8	92.3
	the middle stage	5	15.2	75.6
		7	16.5	73.4
		10	17.5	71.8
	the latter stage	5	22.5	63.8
		7	22.8	63.2
		10	26.5	57.3
control	-	-	62.1	-

마. 식물추출물함유 Micro encapsulation 제제의 진딧물 방제 효능실험

(1) 식물추출물함유 Micro encapsulation 제제의 진딧물 방제 효능실험

(가) 식물추출물 제제(모비탄)의 진딧물 살충 효과검증

식물추출물 (모비탄)제제의 복숭아혹 진딧물에 대한 살충력을 시험하여 그 결과를 그림24에 나타내었다. 살충력은 희석배수가 낮은 250배에서 가장 우수하였으며 희석배수가 높은 1,000배에서 가장 낮게 나왔다. 대부분 시험 3일째부터 100%의 살충력을 보였다. 다만 희석 배수 1,000배에서는 4일 이후에도 살충력이 87%로 나타났다.

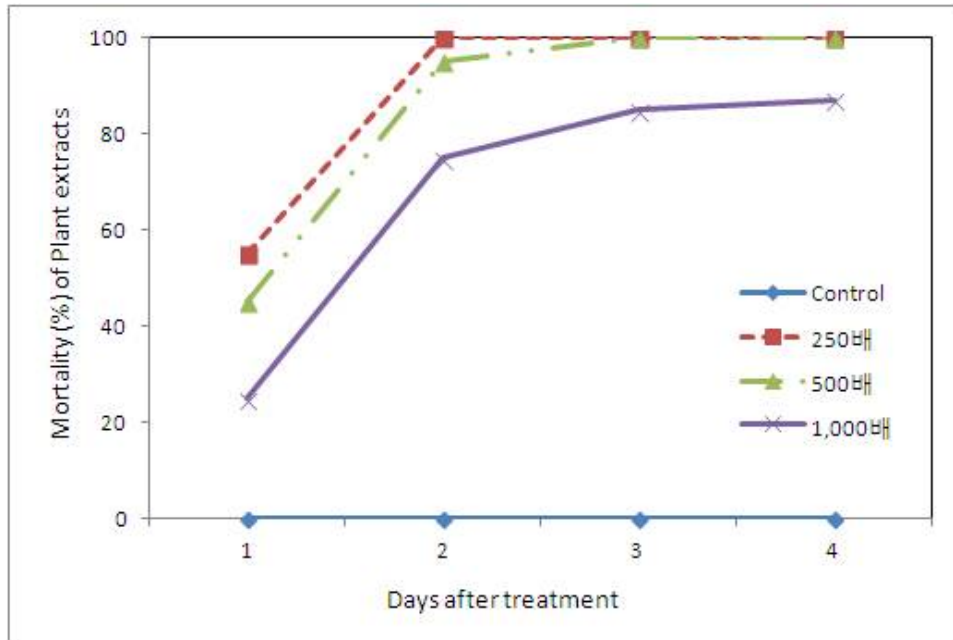
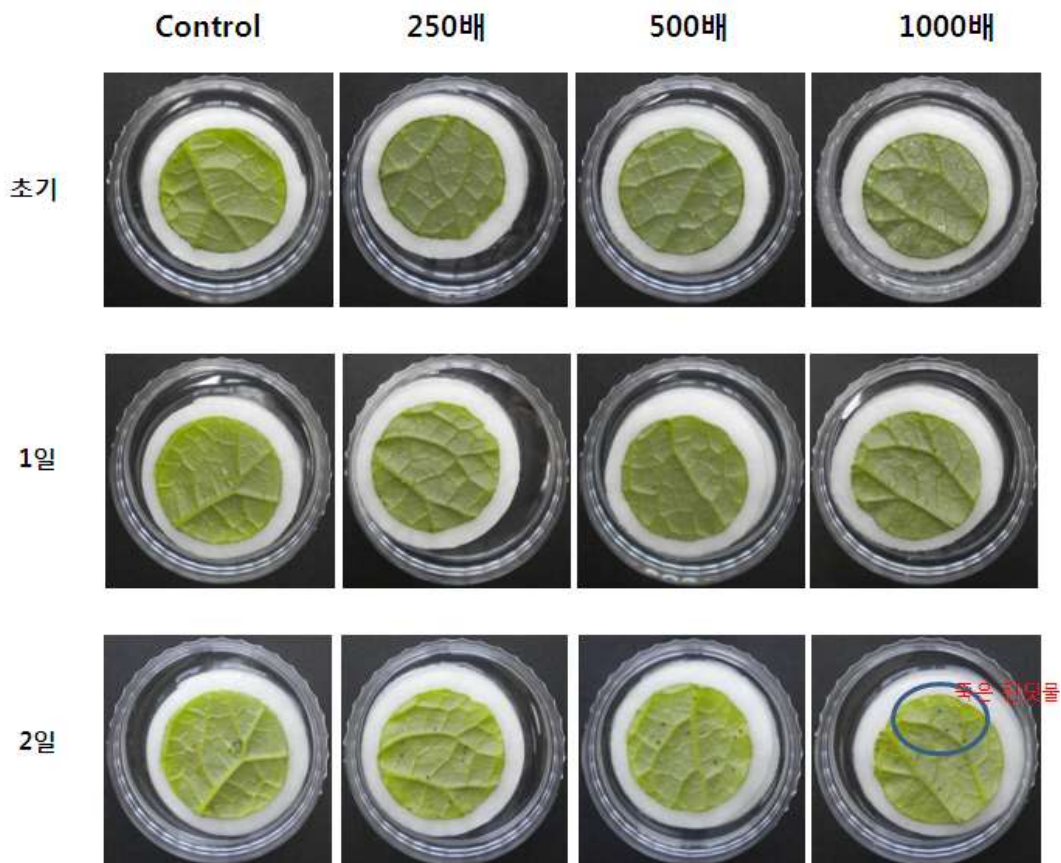


그림 24. 식물추출물 제제(모비탄)의 진딧물 살충 효과검증(Leaf disk법)



(나) 농가 검증 시험(흰가루병, 진딧물 방제)

이상의 현장 검증 및 시험실 실험을 통하여 검증된 두 가지 제품(바이탄, 모비탄)에 대한 지속적인 농가실험을 실시하고 있다. 시기별, 작목별, 지역별 등을 고려하여 현재 30여 농가에서 흰가루병 방제

및 살충 효과를 검증하여 제품의 완성도 및 적용점을 극대화 시키고 있다. 표 21은 현재 진행중인 농가들의 상황을 기록한 것이며 그에 따른 시험현황 및 사진을 첨부하였다.

표 21. 현재 진행중인 농가 적용실험 현황

연번	농가구분	작물명	농가 위치	재배형태	살포방식	기타사항	요구사항 (시험실험 수확을 위한)	관심도 (★★★★기준)	현재상황
1	담양-딸기-1	딸기	전남 담양	친환경	연진식	종 아주머니		★★★★	봄작기에 싹들 적용함.
2	담양-딸기-2	딸기	전남 담양	친환경	연진식	낙시 아저씨		★★★★	봄작기에 싹들 적용함.
3	담양-딸기-3	딸기	전남 담양	친환경	연진식	양역재배	유기자재 인증	★★	저농약재배에 의지하고 있음.
4	담양-딸기-4	딸기	전남 담양	친환경	연진식	포도재배병행		★★★★	싹들적용 후 내년도 반응 긍정적임.
5	담양-딸기-5	딸기	전남 담양	친환경	연진식	대항 재배	유기자재 인증	★	노출적인 싹들요구.
6	담양-딸기-6	딸기	전남 담양	친환경	연진식	젊은 사장님	유기자재 인증	★★	기존 자재 변경에 부정적임.
7	장성-애호박-1	애호박	전남 장성	일반	연진식	정미소 앞		★★★★	봄작기에 싹들 적용함.
8	장성-애호박-2	애호박	전남 장성	일반	고압식	애호박 장기 재배	유기자재 인증	★★	농약 사용에서 벗어나지 못함.
9	장성-애호박-3	애호박	전남 장성	친환경	연진식	평산방향 2차선 좌측		★★★★	싹들적용 후 내년도 반응 긍정적임.
10	장성-애호박-4	애호박	전남 장성	친환경	연진식	학교입구 검정무쓰		★★	저농약재배에 의지하고 있음.
11	장성-애호박-5	애호박	전남 장성	일반	고압식	완숙토마토 이웃 농가		★★	농약 사용에서 벗어나지 못함.
12	장성-딸기-1	딸기	전남 장성	친환경	연진식	양역재배		★★	기존 자재 변경에 부정적임.
13	장성-딸기-2	딸기	전남 장성	친환경	연진식	육보(종자종류) 재배		★★	저농약재배에 의지하고 있음.
14	장성-딸기-3	딸기	전남 장성	친환경	연진식		유기자재 인증	★★	자체 노하우로 작물 재배중임.
15	장성-토마토-1	토마토	전남 장성	일반	연진식	방울토마토, 흰스타라스		★★★★	봄작기에 싹들 적용함.
16	장성-토마토-2	토마토	전남 장성	일반	연진식	완숙토마토		★★★★	봄작기에 싹들 적용함.
17	장성-토마토-3	토마토	전남 장성	일반	고압식	방울토마토, 흰타블캡종고		★★★★	가을작기에 싹들 적용함.
18	광산-고추	고추	광주 광산	친환경	연진식	하반기 작기 준비중	유기자재 인증	★★	저농약재배에 의지하고 있음.
19	광산-딸기	딸기	광주 광산	친환경	연진식		유기자재 인증	★	저농약재배에 의지하고 있음.
20	나주 오이-1	오이	전남 나주	일반	고압식	장기간 오이재배,아주머니		★★★★	개발 초기부터 수시로 적용중임.
21	나주 오이-2	오이	전남 나주	일반	고압식	잘도 아저씨	유기자재 인증	★★	농약 사용에서 벗어나지 못함.
22	담양-메론-1	메론	전남 담양	친환경	연진식	종국수 아저씨		★★★★	여름작기에 싹들 적용함.
23	담양-고추-1	고추	전남 담양	친환경	연진식	웃자람		★★	저농약재배에 의지하고 있음.
24	나주-토마토-1	토마토	전남 나주	일반	고압식	대주토마토 무정아종마		★★★★	봄작기에 싹들 적용함.
25	담양-딸기-7	딸기	전남 담양	일반	연진식	광주출퇴근		★★★★	싹들적용중임. 내년 작기 반응 긍정적.
26	나주 오이-3	오이	전남 나주	친환경	연진식	선글라스, 산타페 아저씨		★★★★	싹들적용 후 구매, 추후 반응 긍정적.
27	나주 토마토-2	토마토	전남 나주	친환경	연진식	잘로마토	유기자재 인증	★★	소극적 싹들적용, 인증조건부 긍정적.

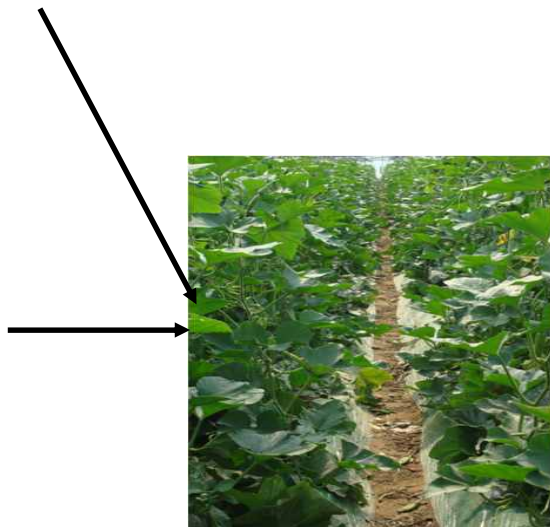
■ 시험내역

- 작물: 딸기 (전남 담양군, 친환경 농법 농가)
- 희색배수: 1,000배
- 처리 횟수: 15일 간격 3회
- 목적: 흰가루병 예방 (흰가루병 발병 전에 바이탄 처리)
- 결과: 70일 경과후에도 흰가루병 발병하지 않음



■ 시험내역

- 작물: 애호박 (전남 장성군, 친환경 농법 농가)
- 희색배수: 500배
- 처리 횟수: 흰가루병 발병 직후 2회 (5일간격) 처리
- 목적: 흰가루병 치료
- 결과: 흰가루병 방제 성공

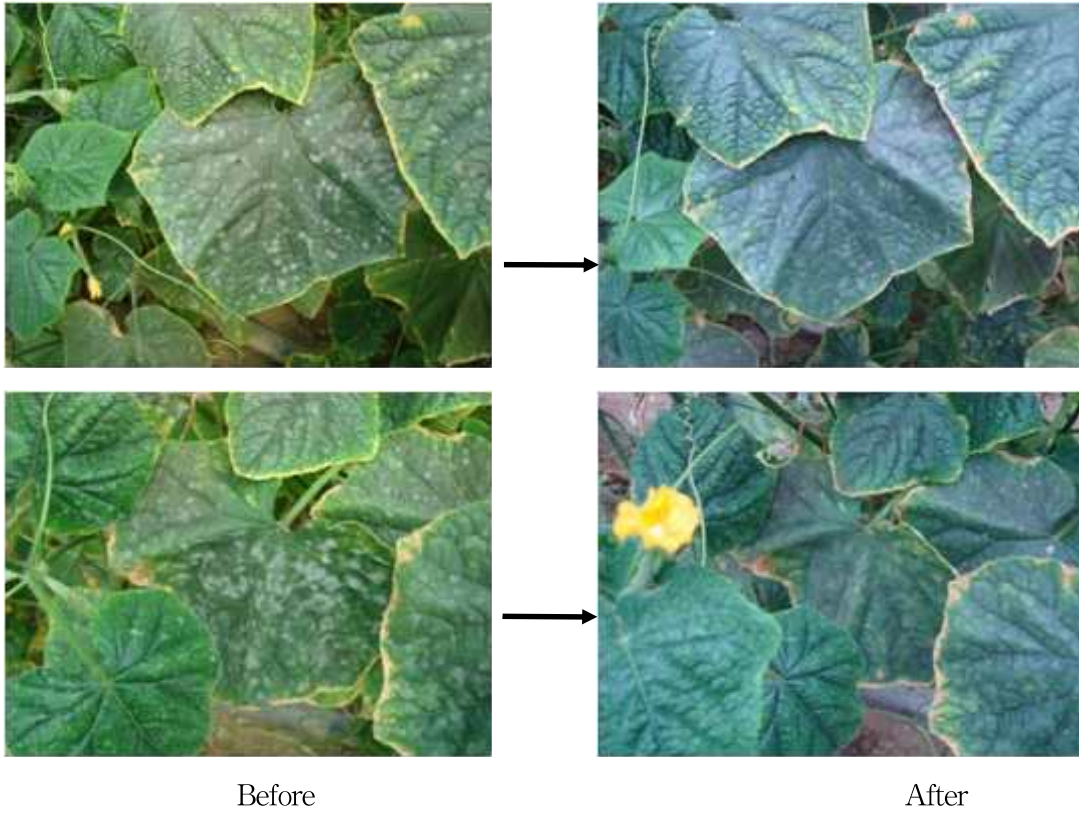


방제後

■ 시험내역

- 작물: 오이 (전남 나주시, 친환경 농법 농가)
- 희색배수: 500배

- 처리 횟수: 흰가루병 발병 직후 2회 (5일간격) 처리
- 목적: 흰가루병 치료
- 결과: 흰가루병 방제 성공



■ 시험내역

- 작물: 호박
- 희색배수: 500배
- 처리 횟수: 진딧물 기주에 옮긴 후 1회 처리
- 목적: 진딧물 치료
- 결과: 진딧물 살충 95% 이상 (진딧물의 색상이 검게 변하고 움직임이 없을시 사멸로 간주)



처리전

처리후 1일

처리후 2일

바. 친환경 유기농자재 제품 공시

(1) 친환경 유기농자재 제품 공시 신청서

(가) 바이탄

친환경유기농자재 제품 [<input checked="" type="checkbox"/>]공시 [<input type="checkbox"/>]품질인증 신청서			
접수번호	접수일자	처리기간 90일	
신청인	①업체명 (주)이코바이오	② 법인등록번호 또는 사업자등록번호 409-81-43675	
	③대표자 성명 김 광 윤	④ 생년월일 1961년 09월 15일	
	⑤소재지	본 사 광주광역시 북구 용봉로 77 전남대학교 창업보육센터 804호	전화번호 062) 530-0749
		제조장 및 보관창고 광주광역시 광산구 비아동 664-2	전화번호 062) 952-5218
신청내 용	⑥생산 구분	[<input checked="" type="checkbox"/>]국내	
		수입국	
		제조회사명	
		제조장소재지	
		수입상표명	
	⑦주원료	원료명	유황
		조성비	유황 5%, 식이유황 10%
		보증성분	황(S) 4.66%
	⑧상표명	바이탄	
	⑨ 자재 의 종류	[<input type="checkbox"/>]토양개량 및 작물생육용 자재	
[<input checked="" type="checkbox"/>]작물병해충 관리용 자재			
⑩ 세부 내역	별첨		

「친환경농업육성법」 제20조의6제1항 및 같은 법 시행규칙 제30조제1항에 따라 친환경 유기농자재 제품의 공시(또는 품질인증)를 위와 같이 신청합니다.

2013 년 05 월 02 일

신청인

김 광 윤 (서명 또는 인)

**농촌진흥청장 또는 공시 및
품질인증기관의 장**

귀하

[√]공시
친환경유기농자재 제품 []품질인증 생산계획서

1. 신청업체명: (주)이코바이오 (서명 또는 인)

2. 신청 제품명: 바이탄

3. 제품별 생산시설(m²): 49.50m²

4. 제품별 생산설비: 교반기, 충전기, 포장기, 저장조

5. 제품별 생산 계획량(kg/연): 10,000kg/년

6. 원료 수급계획: 수시

7. 원료 품질관리 계획:
 - 가. 품질검사 항목 : 유황
 - 나. 시험기관 : 농업기술실용화재단
 - 다. 횟수 : 년 1회

8. 제품별 제조공정
: 유황을 가성소다를 이용하여 녹인 다음, 식이유황(MSM)과 NP-8을 첨가하여 유화시킨다.

9. 품질관리 인력·시설·장비 등 확보 계획
: 자사 부설연구소에서 관리.

10. 품질관리 주기 및 방법 계획:
 - 가. 품질검사 항목 : Sulfur
 - 나. 시험기관 : 농업기술실용화재단
 - 다. 횟수 : 년 1회

(나) 모비탄

친환경유기농자재 제품 공시 품질인증 신청서

접수번호	접수일자	처리기간 90일	
신청인	①업체명 (주)이코바이오	② 법인등록번호 또는 사업자등록번호 409-81-43675	
	③대표자 성명 김 광 윤	④ 생년월일 1961년 09월 15일	
	⑤소재지	본 사 광주광역시 북구 용봉로 77 전남대학교 창업보육센터 804호	전화번호 062) 530-0749
		제조장 및 보관창고 광주광역시 광산구 비아동 664-2	전화번호 062) 952-5218
신청내 용	⑥생산 구분	<input checked="" type="checkbox"/> 국내	
		<input type="checkbox"/> 수입	
		수입국	
		제조회사명	
		제조장소재지	
	수입상표명		
	인증기관		
⑦주원료	원료명	고삼 추출물, 님 추출물	
	조성비	고삼 추출물 3%, 님 추출물 7%	
	보증성분	Matrine 0.047%, Azadirachtin 0.025%	
⑧상표명	모비탄		
⑨ 자재 의 종류	<input type="checkbox"/> 토양개량 및 작물생육용 자재		
	<input checked="" type="checkbox"/> 작물병해충 관리용 자재		
⑩ 세부 내역	별첨		

「친환경농업육성법」 제20조의6제1항 및 같은 법 시행규칙 제30조제1항에 따라 친환경유기농자재 제품의 공시(또는 품질인증)를 위와 같이 신청합니다.

2013 년 05 월 02 일

신청인

김 광 윤 (서명 또는 인)

**농촌진흥청장 또는 공시 및
품질인증기관의 장**

귀하

[√]공시
친환경유기농자재 제품 []품질인증 생산계획서

1. 신청업체명: (주)이코바이오 (서명 또는 인)

2. 신청 제품명: 모비탄

3. 제품별 생산시설(m²): 49.50m²

4. 제품별 생산설비: 호모믹서, 교반기, 충전기, 포장기, 저장조

5. 제품별 생산 계획량(kg/년): 15,000kg/년

6. 원료 수급계획: 수시

7. 원료 품질관리 계획:
 - 가. 품질검사 항목 : 고삼추출물, 님추출물
 - 나. 시험기관 : 농업기술실용화재단
 - 다. 횟수 : 년 1회

8. 제품별 제조공정
: 정제수에 고삼, 님 및 Tween 80을 교반시키면서 유동파라핀을 첨가하여 제조한다.

9. 품질관리 인력·시설·장비 등 확보 계획
: 자사 부설연구소에서 관리.

10. 품질관리 주기 및 방법 계획:
 - 가. 품질검사 항목 : Matrine, Azadirachtin
 - 나. 시험기관 : 농업기술실용화재단
 - 다. 횟수 : 년 1회

(2) 친환경 유기농자재 제품 공시를 위한 독성실험

(가) 바이탄

바이탄의
급성경구독성시험 결과보고서

시험번호 : ET0-1216

ORIGINAL COPY 1/2

1. 요약

친환경유기농자재 바이탄에 대한 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 사용하여 1회 경구 투여한 후 14일 동안 치사수, 일반중독증상 및 체중변화를 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 한계시험의 투여약량 수준인 5,000 mg/kg에서 치사동물은 없었다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 암수 모두 증가추세를 보였다.

이상의 시험결과, 친환경유기농자재 바이탄의 수컷과 암컷 모두에 대한 LD₅₀은 5,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되었다.

4. 시험결과

가. 치사동물 및 LD₅₀ 값

한계투여약량 5,000 mg/kg에서 치사개체는 관찰되지 않았으며, 암·수간의 차이는 나타나지 않았다.

이상의 시험결과, 친환경유기농자재 바이탄의 ICR계 마우스에 경구투여에 대한 LD₅₀은 5,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되었다.

나. 일반중독증상

친환경유기농자재 바이탄을 경구투여한 결과, 특이한 일반중독 증상은 관찰되지 않았다.


다. 체중변화

시험동물에 대하여 암·수 모두 약제 처리 후 생존한 동물에 대한 체중변화 관찰 시 경과일수에 따라 암·수 모두 증가추세를 보였다.

바이탄의
급성경피독성시험 결과보고서

시험번호 : ETP-1217

ORIGINAL COPY 1/2

 **KBSI** (주) 한국생물안전성연구소
KOREA BIO-SAFETY INSTITUTE

1. 요약

친환경유기농자재 바이탄에 대한 급성경피독성을 랫드(S.D.계통)를 사용하여 1회 경피투여 후 14일동안 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 한계시험의 투여약량수준인 4,000 mg/kg에서 치사동물은 없었다.
- 일반중독증상은 흥반과 가피가 관찰되었다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 정상적인 증가추세를 보였다.
- 부검결과 시험물질 투여와 관련된 특이한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 시험결과, 친환경유기농자재 바이탄의 수컷과 암컷 모두에 대한 LD₅₀은 4,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)에 해당되었다.

4. 시험결과

가. 치사동물 및 LD₅₀ 값

한계투여약량 4,000 mg/kg에서 치사개체는 관찰되지 않았으며, 암·수간의 차이는 나타나지 않았다. 이상의 시험결과, 친환경유기농자재 바이탄을 S.D.계 랫드에 경피 투여에 대한 LD₅₀은 4,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되었다.

나. 일반중독증상

친환경유기농자재 바이탄을 경피투여한 결과, 일반중독 증상은 흥반과 가피가 관찰되었다.

다. 체중변화


시험동물에 대하여 암수 모두 약제 처리 후 생존한 동물에 대한 체중변화 관찰 시 경과일수에 따라 암수 모두 증가추세를 보였다.

이상의 시험결과, 친환경유기농자재 바이탄의 수컷과 암컷 모두에 대한 LD₅₀은 4,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)에 해당되었다.

바이탄의
피부자극성시험 결과보고서

시험번호 : ETD-1293

ORIGINAL COPY 1/2

 **KBSI** (주) 한국생물안전성연구소
KOREA BIO-SAFETY INSTITUTE

1. 요약

친환경유기농자재 바이탄에 대한 피부자극성시험을 토끼(New Zealand White계)를 사용하여 피부에 1회 노출시킨 후 1, 24, 48, 72시간째에 피부반응 정도를 관찰하고 치사수, 체중변화 및 일반중독증상을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.5 mL 을 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 치사동물은 관찰되지 않았다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 시험물질로 기인된 특이한 체중변화는 없었다.
- 시험물질 제거 후 적용부의 국소자극성을 관찰한 결과, 홍반 및 부종 등의 피부자극이 관찰되지 않아 1차 자극지수(P.I.I.)는 “0.0”으로 산출되었다.

이상의 결과로부터 New Zealand White계 토끼에 대한 시험물질의 피부 적용은 [피부 1차 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질인 것으로 판단되었다.

4. 시험결과

가. 일반중독증상 및 치사동물수

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반중독도 관찰되지 않았으며, 사망동물 또한 발견되지 않았다.

나. 체중변화

시험물질 적용직전, 적용 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정된 결과, 시험물질로 기인한 특이한 체중변화는 없었다.

다. 피부반응의 평가

시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48 및 72시간에 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질 적용 후 홍반 및 부종 등의 피부반응이 관찰되지 않아 1차 피부자극지수(Primary Irritation Index, P.I.I.)는 “0.0”으로 산출되었다.

이상의 결과로부터 친환경유기농자재 바이탄은 New Zealand White계 토끼의 피부에 적용시 [피부 1차 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질인 것으로 판단되었다.

바이탄의
안점막자극성시험 결과보고서

시험번호 : ETE-12112

ORIGINAL COPY 1/2

1. 요약

친환경유기농자재 바이탄에 대한 안정막자극성시험을 토끼(New Zealand White계)를 사용하여 결막낭내에 1회 처리 후 1, 24, 48 및 72시간째에 일반중독증상, 치사수, 체중 변화 및 안정막자극증상을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.1 mL을 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 치사동물은 관찰되지 않았다.
- 개체별 체중을 측정한 결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.
- 시험물질 적용 후 적용부의 국소자극성을 관찰한 결과, 비세척군에서 결막의 부종에 대한 자극증상이 관찰되어 급성안자극지수(A.O.I.)는 “1.3”으로 산출되었다. 관찰된 안정막자극성의 반응은 24시간째 관찰시 소실되어 모든 시험동물이 정상으로 회복되었다.

이상의 결과에 따라 친환경유기농자재 바이탄은 New Zealand White계 토끼의 안정막에 적용시 [안정막 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질로 확인되었다.

4. 시험결과

가. 일반중독증상 및 치사동물수

모든 동물에서 시험물질 처리 후 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았으며 치사된 동물도 없었다.

나. 안정막반응의 평가

시험물질 처리 후 1, 24, 48 및 72시간째에 안정막자극성을 조사한 결과 1시간째에 결막의 부종에 대한 자극증상이 2마리의 개체에서 관찰되었다. 안정막자극성은 24시간째 관찰시 소실되어 모든 시험 동물이 정상으로 회복되었다.

이러한 결과로부터 평균안자극지수(M.O.I.)는 1.3, 0.0, 0.0 및 0.0 으로 각각 산출되었고, 급성안자극지수(A.O.I.)는 “1.3” 으로 확인되었다.

이상의 결과에 따라 친환경유기농자재 바이탄은 New Zealand White계 토끼의 안정막에 적용시 [안정막 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질로 확인되었다.

바이탄의 잉어에 대한
급성어독성시험 결과보고서

시험번호 : ETF-1225

ORIGINAL COPY 1 / 2

1. 요약

친환경유기농자재 바이탄의 잉어(*Cyprinus Carpio*)에 대한 급성어독성시험을 96시간 동안 실시하여 생사수와 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사한 결과는 다음과 같다.

농도 (mg/L)	잉어수 (마리)	누적치사수(마리)			
		24h	48h	72h	96h
2.00		0	0	0	0
2.99		0	0	1	1
4.47	10	2	4	5	5
6.69		6	8	9	9
10.00		10	10	10	10
Control		0	0	0	0

- 일반중독증상으로 평형상실(LOE)이 관찰되었다.
- 전장은 평균 4.40 ± 0.23 cm, 체중은 평균 1.36 ± 0.25 g 이었다.
- pH는 평균 7.41(7.15 ~ 7.77), DO는 평균 88.6 %_{sat}(82.5 ~ 99.1)이었다.
- 시험기간의 평균 수온은 21.0 °C(20.7 ~ 21.3°C)이었다.

이상의 시험결과, 친환경유기농자재 바이탄의 잉어에 대한 48시간 반수치사농도(LC₅₀)는 5.072 mg/L(95%신뢰한계 : 4.252 ~ 6.050), 96시간 반수치사농도(LC₅₀)는 4.471 mg/L(95%신뢰한계 : 3.723 ~ 5.371)으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 Ⅲ급으로 분류되었다.

4. 시험결과

가. 시험물질처리 후 경과시간별 치사수

농도 (mg/L)	잉어수 (마리)	누적치사수(마리)				치사율(%)	
		24h	48h	72h	96h	48h	96h
2.00		0	0	0	0	0	0
2.99		0	0	1	1	0	10
4.47	10	2	4	5	5	40	50
6.69		6	8	9	9	80	90
10.00		10	10	10	10	100	100

나. 시험물질의 LC₅₀ 및 중독증상

구 분	LC ₅₀ (mg/L)		중독증상	전장(cm)	체중(g)
	48hr	96hr			
음성대조군 (20121020)	-	-	NOR	4.30±0.25 ³⁾	1.22±0.22
바이탄	5.072 (4.252~6.050)	4.471 (3.723~5.371)	LOE	4.40±0.23	1.36±0.25
양성대조군 (KTF-1202) ¹⁾	0.131 (0.114~0.152) ²⁾	0.115 (0.098~0.135)	SUR LOE	4.35±0.24	1.29±0.25

※ 중독증상 : NOR(Normal), SUR(Fish mainly at the surface), LOE(Loss of equilibrium)

¹⁾양성대조구 시험기간 : 2012. 10. 08 ~ 2012. 10. 12

²⁾95% 신뢰한계

³⁾평균 ± 표준편차

다. 시험결과

친환경유기농자재 바이탄의 잉어에 대한 급성어독성시험결과, 48시간 및 96시간 반수치사농도(LC₅₀)는 각각 5.072 mg/L(95%신뢰한계 : 4.252 ~ 6.050)와 4.471 mg/L(95%신뢰한계 : 3.723 ~ 5.371)로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 Ⅲ급으로 분류되었다. 이상증상으로는 평형상실이 관찰되었고 음성대조군에서 특이한 증상은 관찰되지 않았다.

최종보고서(안)

바이탄의 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험

시험번호 : ETBC-1345

요 약 (Summary)

바이탄의 꿀벌에 대한 급성접촉독성시험을 수행한 결과 치사수(Table 1.)와 이상증상은 다음과 같다.

- 주요 이상증상은 관찰되지 않았다.
- 시험기간 중 평균온도는 25.5℃(20.5 ~ 28.9)이었다.
- 시험기간 중 평균상대습도는 69.1 %(27.0 ~ 90.0)이었다.

Table 1. 바이탄의 급성접촉독성시험 결과

처리농도(µg/bee)	생물수	누적 치사수		
		4 hr	24 hr	48 hr
100.0	30	0	0	6
음성대조군	30	0	0	0
용매대조군(acetone)	30	0	0	0

이상의 시험결과 바이탄의 꿀벌에 대한 24시간 및 48시간 반수치사약량(LD₅₀)은 주원료의 투입비율기준으로 100.0 µg/bee 이상 이었다.

5. 시험결과

5.1. 시험환경 조건

시험기간 동안 꿀벌실험실의 실내온도는 평균 25.5℃(20.5 ~ 28.9) 그리고 상대습도는 평균 59.1%(27.0 ~ 90.0) 이었다. 시험실내환경이 일부시간대에서 시험가이드라인의 범위(온도 ; 23 ~ 27℃, 습도 ; 50 ~ 70%)를 이탈하였으나 그 시간이 길지 않고 음성대조군에 미치는 영향이 없는 것으로 보아 시험물질 처리군에 대한 영향은 적은 것으로 판단된다.

5.2. 관찰 및 급성접촉독성결과

관찰시 48시간 동안 시험군과 음성대조군 모두에게서 어떠한 중독증상이 관찰되지 않았다.

이상의 시험결과 바이탄의 꿀벌에 대한 24시간 및 48시간 반수치사약량(LD₅₀)은 주원료투입비율(10%)기준으로 100.0 µg/bee 이상 이었다.

(나) 모비탄

모비탄의
급성경구독성시험 결과보고서

시험번호 : ET0-1215

ORIGINAL COPY 1/2



(주) 한국생물안전성연구소

1. 요약

친환경유기농자재 모비탄에 대한 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 사용하여 1회 경구 투여한 후 14일 동안 치사수, 일반중독증상 및 체중변화를 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 한계시험의 투여약량 수준인 5,000 mg/kg에서 치사동물은 없었다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 암수 모두 증가추세를 보였다.

이상의 시험결과, 친환경유기농자재 모비탄의 수컷과 암컷 모두에 대한 LD₅₀값은 5,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되었다.

4. 시험결과

가. 치사동물 및 LD₅₀ 값

한계투여약량 5,000 mg/kg에서 치사개체는 관찰되지 않았으며, 암·수간의 차이는 나타나지 않았다.

이상의 시험결과, 친환경유기농자재 모비탄의 ICR계 마우스에 경구투여에 대한 LD₅₀ 값은 5,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되었다.

나. 일반중독증상

친환경유기농자재 모비탄을 경구투여한 결과, 특이한 일반중독 증상은 관찰되지 않았다.

다. 체중변화

시험동물에 대하여 암·수 모두 약제 처리 후 생존한 동물에 대한 체중변화 관찰 시 경과일수에 따라 암·수 모두 증가추세를 보였다.

모비탄의
급성경피독성시험 결과보고서

시험번호 : ETP-1216

ORIGINAL COPY 1/2

1. 요약

친환경유기농자재 모비탄에 대한 급성경피독성을 랫드(S.D.계통)를 사용하여 1회 경피투여 한 후 14일동안 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 한계시험의 투여약량수준인 4,000 mg/kg에서 치사동물은 없었다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 정상적인 증가추세를 보였다.
- 부검결과 시험물질 투여와 관련된 특이한 병리학적 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 시험결과, 친환경유기농자재 모비탄의 수컷과 암컷 모두에 대한 LD₅₀은 4,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)에 해당되었다.

4. 시험결과

가. 치사동물 및 LD₅₀ 값

한계투여약량 4,000 mg/kg에서 치사개체는 관찰되지 않았으며, 암·수간의 차이는 나타나지 않았다. 이상의 시험결과, 친환경유기농자재 모비탄을 S.D.계 랫드에 경피 투여에 대한 LD₅₀값은 4,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되었다.

나. 일반중독증상

친환경유기농자재 모비탄을 경피투여한 결과, 특이한 일반중독 증상은 관찰되지 않았다.

다. 체중변화

시험동물에 대하여 암수 모두 약제 처리 후 생존한 동물에 대한 체중변화 관찰 시 경과일수에 따라 암수 모두 증가추세를 보였다.

이상의 시험결과, 친환경유기농자재 모비탄의 수컷과 암컷 모두에 대한 LD₅₀은 4,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)에 해당되었다.

모비탄의
피부자극성시험 결과보고서

시험번호 : ETD-1291

ORIGINAL COPY 1/2

1. 요약

친환경유기농자재 모비탄에 대한 피부자극성시험을 토끼(New Zealand White계)를 사용하여 피부에 1회 노출시킨 후 1, 24, 48, 72시간째에 피부반응 정도를 관찰하고 치사수, 체중변화 및 일반중독증상을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.5 mL 을 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 치사동물은 관찰되지 않았다.
- 일반중독증상은 관찰되지 않았다.
- 시험물질로 기인된 특이한 체중변화는 없었다.
- 시험물질 제거 후 적용부의 국소자극성을 관찰한 결과, 홍반 및 부종 등의 피부자극이 관찰되지 않아 1차 자극지수(P.I.I.)는 “0.0”으로 산출되었다.

이상의 결과로부터 New Zealand White계 토끼에 대한 시험물질의 피부 적용은 [피부 1차 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질인 것으로 판단되었다.

4. 시험결과

가. 일반중독증상 및 치사동물수

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았으며, 사망동물 또한 발견되지 않았다.

나. 체중변화

시험물질 적용직전, 적용 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정한 결과, 시험물질로 기인한 특이한 체중변화는 없었다.

다. 피부반응의 평가

시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48 및 72시간에 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질 적용 후 홍반 및 부종 등의 피부반응이 관찰되지 않아 1차 피부자극지수(Primary Irritation Index, P.I.I.)는 “0.0”으로 산출되었다.

이상의 결과로부터 친환경유기농자재 모비탄은 New Zealand White계 토끼의 피부에 적용시 [피부 1차 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질인 것으로 판단되었다.

모비탄의
안점막자극성시험 결과보고서

시험번호 : ETE-12107

ORIGINAL COPY 1/2



(주) 한국생물안전성연구소

1. 요약

친환경유기농자재 모비탄에 대한 안정막자극성시험을 토끼(New Zealand White계)를 사용하여 결막낭내에 1회 처리 후 1, 24, 48 및 72시간째에 일반중독증상, 치사수, 체중 변화 및 안정막자극증상을 관찰·조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질 0.1 mL을 New Zealand White계 토끼에 투여한 결과 시험기간 중 치사동물은 관찰되지 않았다.
- 개체별 체중을 측정한 결과, 시간이 경과함에 따라 증가추세를 보였다.
- 시험물질 적용 후 적용부의 국소자극성을 관찰한 결과, 비세척군에서 결막의 부종에 대한 자극증상이 관찰되어 급성안자극지수(A.O.I.)는 “2.0”으로 산출되었다. 관찰된 안정막자극성의 반응은 24시간째 관찰시 소실되어 모든 시험동물이 정상으로 회복되었다.

이상의 결과에 따라 친환경유기농자재 모비탄은 New Zealand White계 토끼의 안정막에 적용시 [안정막 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질로 확인되었다.

4. 시험결과

가. 일반중독증상 및 치사동물수

모든 동물에서 시험물질 처리 후 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았으며 치사된 동물도 없었다.

나. 안정막반응의 평가

시험물질 처리 후 1, 24, 48 및 72시간째에 안정막자극성을 조사한 결과 1시간째에 결막의 부종에 대한 자극증상이 관찰되었다. 안정막자극성은 24시간째 관찰시 소실되어 모든 시험 동물이 정상으로 회복되었다.

이러한 결과로부터 평균안자극지수(M.O.I.)는 2.0, 0.0, 0.0 및 0.0 으로 각각 산출되었고, 급성안자극지수(A.O.I.)는 “2.0” 으로 확인되었다.

이상의 결과에 따라 친환경유기농자재 모비탄은 New Zealand White계 토끼의 안정막에 적용시 [안정막 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질로 확인되었다.

최종보고서(안)

친환경유기농자재 모비탄의
담수어류 (잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 급성독성시험

시험번호 : ETF-1329



요약 (Summary)

친환경유기농자재 모비탄의 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어 독성시험을 96시간 동안 실시하여 치사수(Table 1)와 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사한 결과는 다음과 같다.

- 일반중독증상 및 다른 특이증상은 관찰되지 않았다.
- 전장은 평균 4.27±0.35 cm, 체중은 평균 0.92±0.20 g 이었다.
- pH는 평균 7.37(7.32 ~ 7.43) 이었고, DO는 평균 90.0 %_{sat}(85.7 ~ 97.3) 이었다.
- 시험기간의 평균 수온은 23.5 °C(23.2 ~ 23.6) 이었다.

Table 1. 모비탄의 잉어에 대한 급성독성시험결과

농도 (mg/L)	잉어수 (마리)	누적치사수(마리)				
		3 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
10.0	10	0	0	0	0	0
음성대조군		0	0	0	0	0

이상의 시험결과, 친환경유기농자재 모비탄의 잉어에 대한 48시간 및 96시간 반수치사농도(LC₅₀)는 모두 10.0 mg/L 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 III급으로 분류되었다.

3. 시험결과

모비탄의 잉어에 대한 급성어독성시험결과, 48시간 및 96시간 반수치사농도(LC₅₀)는 모두 10.0 mg/L 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 III급으로 분류되었다. 이상증상 관찰은 시험농도인 10.0 mg/L에서 중독증상이 관찰되지 않았으며 음성대조군에서도 특이한 증상은 관찰되지 않았다.

Table 2. 시험물질처리 후 경과시간별 치사수

농도 (mg/L)	잉어수 (마리)	누적치사수(마리)				치사율(%)	
		24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	48 hr	96 hr
10.0	10	0	0	0	0	0	0

Table 3. 시험물질의 LC₅₀ 및 증독증상

구 분	LC ₅₀ (mg/L)		증독증상	전장(cm)	체중(g)
	48 hr	96 hr			
음성대조군 (20130502)	-	-	NOR	4.04±0.19 ³⁾	0.75±0.14
모비탄	> 10.0	> 10.0	NOR	4.27±0.35	0.92±0.20
양성대조군 (KTF-1301) ¹⁾	0.131 (0.114~0.152) ₂₎	0.108 (0.093~0.124)	SUR LOE	4.58±0.15	1.27±0.14

※ 증독증상 : NOR(Normal), SUR(Fish mainly at the surface), LOE(Loss of equilibrium)

¹⁾양성대조군 시험기간 : 2013. 01. 07 ~ 2013. 01. 11

²⁾95% 신뢰한계

³⁾평균 ± 표준편차

최종보고서(안)

모비탄의 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 급성접촉독성시험

시험번호 : ETBC-1339



(주) 한국생물안전성연구소

요 약 (Summary)

모비탄의 꿀벌에 대한 급성접촉독성시험을 수행한 결과 치사수(Table 1.)와 이상증상은 다음과 같다.

- 주요 이상증상은 관찰되지 않았다.
- 시험기간 중 평균온도는 25.5℃(20.5 ~ 28.9)이었다.
- 시험기간 중 평균상대습도는 69.1 %(27.0 ~ 90.0)이었다.

Table 1. 모비탄의 급성접촉독성시험 결과

처리농도 (µg/bee)	생물수	누적 치사수		
		4 hr	24 hr	48 hr
100.0	30	0	0	0
음성대조군	30	0	0	0

이상의 시험결과 모비탄의 꿀벌에 대한 24시간 및 48시간 반수치사약량(LD₅₀)은 주원료의 투입비율기준으로 100.0 µg/bee 이상 이었다.

5. 시험결과

5.1. 시험환경 조건

시험기간 동안 꿀벌실험실의 실내온도는 평균 25.5℃(20.5 ~ 28.9) 그리고 상대습도는 평균 69.1%(27.0 ~ 90.0) 이었다. 시험실내환경이 일부시간대에서 시험가이드라인의 범위(온도 ; 23 ~ 27℃, 습도 ; 50 ~ 70%)를 이탈하였으나 그 시간이 길지 않고 음성대조군에 미치는 영향이 없는 것으로 보아 시험물질 처리군에 대한 영향은 적은 것으로 판단된다.

5.2. 관찰 및 급성접촉독성결과

관찰시 48시간 동안 시험군과 음성대조군 모두에게서 어떠한 중독증상이 관찰되지 않았다.

이상의 시험결과 모비탄의 꿀벌에 대한 24시간 및 48시간 반수치사약량(LD₅₀)은 주원료투입비율(10%)기준으로 100.0 µg/bee 이상 이었다.

(3) 친환경 유기농자재 제품 공시를 위한 식물 약해 실험

(가) 바이탄

바이탄에 대한 약해 효과 검정 시험에서 시험작물(토마토, 고추, 상추, 배추, 오이)의 약해 증상을 관찰하였다. 바이탄 제제 처리시, 무처리시 경영의 외관상 약해 유무 달관조사를 하였다. 전남대학교 식물병리학실험실 온실에서 바이탄 제제 기준량, 배량을 작물 정식 10일 후 엽면 살포 하였으며, 7일간 3회 조사하였을 때 약해증상은 나타나지 않았다(표22). 이는 시험약제 “바이탄”이 기준량, 배량에서 무처리구 대비 약해증상이 없다고 판단되며, 약해시험 성적서 원본을 아래에 첨부한다.

표22. 바이탄 제제 처리에 대한 약해시험

시험장소	시험약제	시험작물 (품 종)	조사방법	조사회수	약해정도 (0-5)		비 고
					바이탄	배량	
전남대학교 식물병리학 실험실	바이탄	고추 (부강) 상추 (청치마) 배추 (휘모리) 오이 (백록 다다기) 토마토 (뽕또)	경영의 외관상 약해 유무 달관조사	3	0	0	기준량, 배량 약해 없음

약해시험성적서

공시시료의 약해시험

2013년 02월 28일

시험기관 : 전남대학교 생물공학연구소

약해 시험 성적서

연구과제명 : ㈜이코바이오 제품 바이탄에 대한 약해 효과 검증

시험기관 : 전남대학교 생물공학연구소 시험연도 : 2012. 12. 15 ~ 2013. 01. 28

담당자 : 김 영 철 시험장소 : 전남대학교 식물병리학실험실 온실

시험입지조건 (토성) : 온 실 (양질토)

1. 시험목적 : 약해를 조사하여 친환경유기농자재 목록공시제 등록자료로 활용하고자 함.

2. 시험방법

가. 대상시험 : 약해 유무 조사

나. 시험작물 : 토마토(뽕또, 농우바이오), 고추(부강,홍농씨앗), 상추(청치마, 아시아종묘),
배추(휘모리, 아시아종묘), 오이(백록다다기, 아시아종묘)

다. 처리내용

처리구	시험약제	처리시기 및 방법	약 해		의뢰회사
			기준량 (처리일자)	배량 (처리일자)	
공시시료 처리구	바이탄	작물 정식 10일 후 엽면 살포	160kg/300평 (2013. 01. 15)	320kg/300평 (2013. 01. 15)	이코바이오
무처리	무처리		-	-	

라. 시험구 배치 및 면적 : 난괴법 3반복

구 분	시험 작물수	처리구	반복수	총구수	구당면적	총소요면적
약 해	5	3	3	45	2.16 m ²	97.2 m ²

마. 약제살포 전후 기상상황 : 비닐하우스에서 시험을 진행하였기 때문에 기상의 영향을 받지 않았으며, 약해판정에 영향을 줄만한 큰 기상변화는 없었음.

3. 재배방법

시험작물 (품 종)	재배방법	과중일시	정식일시
고추 (부강)	온실내 대형포트	12월20일	1월5일
상추 (청치마)	온실내 대형포트	12월20일	1월5일
배추 (휘모리)	온실내 대형포트	12월20일	1월5일
오이 (백록 다다기)	온실내 대형포트	12월20일	1월5일
토마토 (뽕또)	온실내 대형포트	12월20일	1월5일

4. 조사방법

구 분	조 사 항 목	조사회수	조 사 일 자	조 사 방 법
약 해	외관상 약해유무	3	1/18, 1/20, 1/22	경엽의 외관상 약해 유무 달관조사

5. 시험성적

가. 약해시험 (시험약제 처리 후)

시 험 약 제	시험작물 (품 종)	약 해 정 도 (0-5)		비 고
		기준량	배량	
바이탄	고추 (부강) 상추 (청치마) 배추 (휘모리) 오이 (백록 다다기) 토마토 (뽕또)	0	0	기준량, 배량 약해 없음

6. 결과요약

가. 약해 : 시험약제 “바이탄”은 기준량, 배량에서 무처리구 대비 약해증상이 없었음.

7. 시험담당자 의견 : 시험약제 “바이탄”은 기준량, 배량에서 약해 증상 없었음.

2013년 2월

전남대학교 생물공학연구소

첨부사진
고추



상추



배추



오이



토마토



(나) 모비탄

모비탄에 대한 약해 효과 검정 시험에서 시험작물(토마토, 고추, 상추, 배추, 오이)의 약해 증상을 관찰하였다. 모비탄 제제 처리시, 무처리시 경엽의 외관상 약해 유무 달관조사를 하였다. 전남대학교 식물병리학실험실 온실에서 모비탄 제제 기준량, 배량을 작물 정식 10일 후 엽면 살포 하였으며, 7일간 3회 조사하였을 때 약해증상은 나타나지 않았다(표2). 이는 시험약제 “모비탄”이 기준량, 배량에서 무처리구 대비 약해증상이 없다고 판단되며, 약해시험 성적서 원본을 아래에 첨부한다.

표23. 모비탄 제제 처리에 대한 약해시험

시험장소	시험약제	시험작물 (품 종)	조사방법	조사회수	약해정도 (0-5)		비 고
					바이탄	배량	
전남대학교 식물병리학 실험실	모비탄	고추 (부강) 상추 (청치마) 배추 (휘모리) 오이 (백록 다다기) 토마토 (뽕또)	경엽의 외관상 약해 유무 달관조사	3	0	0	기준량, 배량 약해 없음

약해시험성적서

공시시료의 약해시험

2013년 02월 28일

시험기관 : 전남대학교 생물공학연구소

약해 시험 성적서

연구과제명 : ㈜이코바이오 제품 모비탄에 대한 약해 효과 검증

시험기관 : 전남대학교 생물공학연구소 시험연도 : 2012. 12. 15 ~ 2013. 01. 28

담당자 : 김 영 철 시험장소 : 전남대학교 식물병리학실험실 온실

시험입지조건 (토성) : 온 실 (양질토)

1. 시험목적 : 약해를 조사하여 친환경유기농자재 목록공시제 등록자료로 활용하고자 함.

2. 시험방법

가. 대상시험 : 약해 유무 조사

나. 시험작물 : 토마토(뽕또, 농우바이오), 고추(부강,홍농씨앗), 상추(청치마, 아시아종묘),
배추(휘모리, 아시아종묘), 오이(백록다다기, 아시아종묘)

다. 처리내용

처리구	시험약제	처리시기 및 방법	약 해		의뢰회사
			기준량 (처리일자)	배량 (처리일자)	
공시시료 처리구	모비탄	작물 정식 10일 후 엽면 살포	160kg/300평 (2013. 01. 15)	320kg/300평 (2013. 01. 15)	이코바이오
무처리	무처리		-	-	

라. 시험구 배치 및 면적 : 난괴법 3반복

구 분	시험 작물수	처리구	반복수	총구수	구당면적	총소요면적
약 해	5	3	3	45	2.16 m ²	97.2 m ²

마. 약제살포 전후 기상상황 : 비닐하우스에서 시험을 진행하였기 때문에 기상의 영향을 받지 않았으며, 약해판정에 영향을 줄만한 큰 기상변화는 없었음.

3. 재배방법

시험작물 (품 종)	재배방법	과중일시	정식일시
고추 (부강)	온실내 대형포트	12월20일	1월5일
상추 (청치마)	온실내 대형포트	12월20일	1월5일
배추 (휘모리)	온실내 대형포트	12월20일	1월5일
오이 (백록 다다기)	온실내 대형포트	12월20일	1월5일
토마토 (뽕또)	온실내 대형포트	12월20일	1월5일

4. 조사방법

구 분	조 사 항 목	조사회수	조 사 일 자	조 사 방 법
약 해	외관상 약해유무	3	1/18, 1/20, 1/22	경엽의 외관상 약해 유무 달관조사

5. 시험성적

가. 약해시험 (시험약제 처리 후)

시 험 약 제	시험작물 (품 종)	약 해 정 도 (0-5)		비 고
		기준량	배량	
모비탄	고추 (부강) 상추 (청치마) 배추 (휘모리) 오이 (백록 다다기) 토마토 (뽕또)	0	0	기준량, 배량 약해 없음

6. 결과요약

가. 약해 : 시험약제 “모비탄”은 기준량, 배량에서 무처리구 대비 약해증상이 없었음.

7. 시험담당자 의견 : 시험약제 “모비탄”은 기준량, 배량에서 약해 증상 없었음.

2013년 2월

전남대학교 생물공학연구소

첨부사진
고추



상추



배추



오이



토마토



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절. 연구개발 목표의 달성도

과제구분	핵심연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제1핵심 1세부	다양한 시험제형에 대한 활성 포자 검토 및 효능 분석	100	- 제형성상(WP, EU, OL)에 따른 생균수 안정성 분석 - 시험제형의 살충력 극대화를 위한 안정성 개선 제형 개발
	화학농약과 혼합사용 등 생물학적, 화학적 안정성 분석	100	- 살충제, 항곰팡이제, 제초제 등 화학제와의 compatibility 검토
	시험제형의 실내 살충력 검증 및 효능 분석	100	- 시험제형의 실내 살충력 스펙트럼 확인 - 점박이 응애, 온실가루이, 복숭아진딧물 등 대상 해충에 대한 실내 살충력 검증
	친환경유기농자재 개발 제형을 활용한 약해, 약효 분석	100	- 친환경유기농자재 목록공시를 위한 오이 점박이응애를 이용한 약해, 약효 시험 - 딸기, 참외, 수박 등 시설재배 작물을 이용한 시험제형의 비제 시험 수행
제1핵심 2세부	대량 생산을 위한 산업용 배지조건 확립 및 생산 수율 검토	100	- 산업적 포자 원제 확보를 위한 산업용 배지 조성 실험 및 배양 공정 최적화 실험 - 다양한 산업용 배지 및 공정별 수율 분석 - 산업용 배지 조성, 배양 환경 및 공정에 대한 경제성 분석을 통해 최적의 배지조성 및 공정 확립
	고농도 활성 포자의 회수 및 포자 원제 생산 공정 개발	100	- 고농도 포자 원제 확보를 위한 공정 개발. - 고농도 세포배양에 대한 원제 안정성 향상 공정 개발
	시험제형의 안정성 검토 및 시험제형 개발	100	- 원제, 시험제형의 생균수 검토 및 보관 기간별 균주 안정성 검토
	친환경유기농자재 목록공시를 위한 독성분석	100	- 친환경 자재의 환경에 대한 마우스 독성, 잉어독성, 꿀벌 등에 대한 독성 자료 확보 - 중금속, 생균수 등에 대한 공인 국가기관 및 시험 방법을 통한 공인시험성적서 확보

과제구분	핵심연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
제2핵심 1세부	길항 세균의 분리 동정, 대량생산 공정 확립 및 제품화 제형 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 분리된 신규 2 균주(YC6887, YC7007)의 동정, 배양 최적 조건 조사 - 각 균주의 대량 배양 용 배지 조성 및 생산 공정 확립 - 제품화를 위한 입제, 수화제 조성 용 첨가부제 확정 후 제형화
	항균 활성 물질의 화학 구조 및 길항 미생물의 작용기작 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> - 길항 내생 세균 YC6887이 생산하는 항균물질 2종 p-hydroxybenzaldehyde, phenyl acetic acid 구조 결정 - YC6887 균주의 병 저항성 유도 관련 유전자 발현 확인 및 full genome sequencing 완료 - 애기장대 돌연변이주를 이용하여 균주의 식물생육촉진 작용기작을 규명
	친환경유기농자재 목록 공시제, 생물농약 등록을 위한 포장 효과 시험	100	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품의 친환경유기농자재 목록 공시 등록을 위하여 딸기 흰가루병 포장 시험 완료 - 향후 생물농약 등록을 위하여 고추탄저병, 벼 키다리병 등 포장 시험 진행 중
	생물농약, 친환경유기농자재 목록 공시제 (생물농약) 등록 용 안전성, 독성 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품의 친환경유기농자재 등록용 급성, 아급성, 안점막 자극성, 어독성 등 안전성 자료 확보 - 유해 미생물 분석 공인시험성적서 확보
제2핵심 2세부	미생물소재의 효능 증대를 위한 신 제형 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 방제 효능 증대를 위한 Attrision mill을 이용한 chitosan, alginate microsphere 제조 및 대량 생산 공정 체계 확립
	친환경 유기농자재 제품 공시를 위한 포장 시험	100	<ul style="list-style-type: none"> - 흰가루병 및 진딧물등 친환경 소재의 효능 검증을 위한 30개 농가에서 오이, 딸기, 토마토 등 다양한 작물에 적용 시험 - 2품목에 대한 작물 약해 시험 완료(전남대학교 농과대학)
	친환경 유기농 자재 제품 공시를 위한 신청	100	<ul style="list-style-type: none"> - 2품목의 독성시험 완료(한국 생물안전성 센터) 후 제품공시를 위한 신청서 제출
	제품 판매를 위한 마케팅 추진	100	<ul style="list-style-type: none"> - 친환경 농자재 판매사 (케이원바이오텍)와 제품 공급 MOU 체결 - 중국 수출을 위하여 대만 농업회사 (MasterVet)과 판매 계약 추진 중

제2절. 연도별 목표 달성도

과제구분	개발 기술	목표(수준, 성능, 품질)		
		1차년도 (2010)	2차년도 (2011)	3차년도 (2012)
제1핵심 1세부	<ul style="list-style-type: none"> ○ 친환경유기농자재 3종(WP, ES, OL)의 시험 제형 개발 ○ Top spray법을 이용한 실내 살충력 검증 기술 ○ 시설하우스 현장 시험을 통한 친환경유기농자재의 효능 분석 	수화제(WP) 시험 제형 개발	유타제, 오일제(ES, OL) 시험 제형 개발	
제1핵심 2세부	<ul style="list-style-type: none"> ○ 곤충병원성 곰팡이의 산업적 대량 배양 생산 기술 확보 ○ 고농도 활성 포자의 생산 공정 개발 ○ 친환경유기농자재 목록공시 신청 (1차 작물보호제로 신청, 2차 병해충관리제로 변경 신청) 		작물보호제 목록 공시 신청('패시포라, PaeciPora [®])	병해충관리제 목록 공시 신청, 진행 중
제2핵심 1세부	<ul style="list-style-type: none"> ○ 길항 세균의 분리, 대량 생산 공정 확립 및 제품화 제형 개발 ○ 항균 활성 물질의 화학 구조 및 길항 미생물의 작용기작 규명 ○ 친환경유기농자재 목록 공시제, 생물농약 등록을 위한 포장 효과 시험 ○ 생물농약, 친환경유기농 자재 목록 공시제 (생물농약) 등록 용 안전성, 독성 조사 	<p>신규 세균 분리 동정, 대량 배양 조건 확립</p> <p>기주의 병 저항성 유도 기작 확인</p>	<p>입제, 수화제 제형 개발 및 포장 시험</p> <p>항균물질 구조 결정 결과 기지 물질로 확인</p>	<p>시제품의 수화제 독성 조사 결과 안전성 판명</p> <p>병해충관리제 목록 공시 ('세머루' Semeuru[®]) 신청 준비 중</p>
제2핵심 2세부	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물소재의 효능 증대를 위한 신 제형 개발 ○ 친환경 유기농자재 제품 공시를 위한 포장 시험 ○ 친환경 유기농자재 목록공시 신청 (2종 병해충관리제) 	chitosan, alginate microsphere 제조	천연물질의 신규 제형을 이용한 포장 시험	병해충관리제 목록 공시 ('바이탄' Vitan [®] :살균제, '모비탄' Mobitan [®] :충제) 신청 중

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연차별 연구 성과

(단위 : 건수)

과제 구분	구분	특허		신품종				유 전자 원 등록	논문	
		출원	등록	품 명 명칭 등록	품 수 중 입 신 고	품 중 보 호			SCI	비SCI
						출원	등록			
제1 핵심	1차 년도	목표	1	0					0	1
		달성	2	0					0	1
	2차 년도	목표	2	0					0	1
		달성	0	0					0	0
	3차 년도	목표	2	1				1	1	2
		달성	1	0				0	0	1
제2 핵심	1차 년도	목표	2	0					1	3
		달성	2	0					2	0
	2차 년도	목표	2	0				3	3	3
		달성	0	0				4	2	0
	3차 년도	목표	2	2				3	3	3
		달성	3	0				3	5	0
계	목표	11	3				7	7	13	
	달성	8	0				7	9	2	

2. 연구종료 후 연구결과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	0	2				
	달성	1	3				

* 기술명: 곤충병원성 곰팡이를 이용한 미생물살충제 제조 (실시기간: 2011.11.10-2031.11.10(20년))

실시기업: (주)인섹트바이오텍

* 상품명: 친환경유기농자재 병해충 관리제 ('패시포라, PaeciPora®' 등록 후 제품 판매)

실시기업: (주)인섹트바이오텍

* 상품명: 친환경유기농자재 병해충 관리제 ('바이탄' Vitan®: 살균제, '모비탄' Mobitan®: 살충제, 등록 후 제품 판매), 실시기업: (주)이코바이오

* 상품명: 친환경유기농자재 병해충 관리제 ('세머루' Semeuru®, 등록 후 제품 판매), 실시기업: (주)제일그린산업

3. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Preliminary Evaluation of <i>Paecilomyces lilacinus</i> HY-4 to Control <i>Tetranychus urticae</i>	신태영	우수동	박호용, 손광희	International Journal of Industrial Entomology	22 (1)	국내	비SCI
2011	<i>Sphingomonas oryzae</i> sp. nov. and <i>Sphingomonas jinjuensis</i> sp. nov. isolated from rhizosphere soil of rice (<i>Oryza sativa</i> L.).	정유진	정영륜	5	International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology	61(10)	국외	SCI
2012	Diversity and Characterization of Endophytic Bacteria Associated with Tidal Flat Plants Antagonistic..	페미다 비비	정영륜	4	Plant Pathology Journal	28(1)	국내	SCIE
2012	<i>Chitinophaga oryzae</i> sp. nov., isolated from the rhizosphere soil of rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	정유진	정영륜	4	International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology	62(12)	국외	SCI
2013	온실가루이 병원성 곰팡이의 특성 및 살충제 개발을 위한 평가	윤휘진	우수동	6	Korean Journal of Microbiology	49(1)	국내	비SCI
2013	<i>Mucilaginibacter jinjuensis</i> sp. nov., with xylan degrading activity	하지칸	정영륜	5	International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology	63(4)	국외	SCI
2013	<i>Hoeflea suaedae</i> sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the root of a halophyte, <i>Suaeda maritima</i>	정유진	정영륜	6	International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology	63(6)	국외	SCI
2013	<i>Martellella endophytica</i> sp. nov., an antifungal bacterium associated with a halophyte	페미다 비비	정영륜	5	International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology	2013 Jan 25.	국외	SCI
2013	<i>Mucilaginibacter gynuensis</i> sp. nov., isolated from rotten-wood	하지칸	정영륜	4	International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology	2013 Mar 8.	국외	SCI
2013	<i>Amorphus suaedae</i> sp. nov., a novel bacterium isolated from the root of a tidal flat plant	황정문, 정유진	정영륜	6	International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology	2013 May 17	국외	SCI

4. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011	식물병의 생물학적 방제 효능 및 질소 고정 효능을 갖는 마르테렐라 엔도파이티카 Y C 6887 균주를 함유하는 다기능성 미생물 제제	제일그린 산업·경상대	대한민국	10-2011-0069612					
2011	식물병의 생물학적 방제 효능 및 질소 고정 효능을 갖는 다기능성 미생물 제제 (상동)	제일그린 산업·경상대	PCT	PCT/KR2011/006300					
2011	HY-2의 대량생산을 위한 신규한 배양방법	한국생명공학연구원	대한민국	제2011-0028178호					
2011	HY-4의 대량생산을 위한 신규한 배양방법	한국생명공학연구원	대한민국	제2011-0028179호					
2013	패실로마이세스 속 균주를 이용한 생물농약 제조방법	한국생명공학연구원	대한민국	제2013-0062878호					
2013	식물 내생세균 바실러스 메칠로트로피쿠스 YC7007 균주 및 이를 이용한 다기능 생물농약 및 미생물비료 개발	제일그린 산업·경상대	대한민국	10-2013-0046313					
2013	식물 내생세균 바실러스 메칠로트로피쿠스 YC7007 균주 및 이를 이용한 다기능 생물농약 및 미생물비료 개발	제일그린 산업·경상대	PCT	PCT/KR2013/004012					
2013	액상유황 함유 작물 보호제 제조방법	(주)이코 바이오	대한민국	제2013-0089470호					

5. 실용화 및 산업화 계획

가. 기술이전

(1) 기술명 : 곤충병원성 곰팡이를 이용한 미생물살충제 제조 기술

- 실시기업 : (주)인섹트바이오텍
- 계약일 : 2011년 11월 10일
- 선급실시료 : 32,200,000원
- 경상실시료 : 순 매출액의 3%

나. 산업화 계획

(1) 제품 정보

<2013년 하반기 제품 출시>

- (주)인섹트바이오텍 : 친환경유기농자재 목록공시 병해충 관리제/ 패시포라(PaeciPora[®])
- (주)이코바이오 : 친환경유기농자재 목록공시 병해충 관리제/ 바이탄(Vitan[®]), 모비탄(Mobitan[®])

<2014년 전반기 제품 출시>

- (주)제일그린산업 : 친환경유기농자재 목록공시 병해충 관리제/ 세머루 (Semeuru[®])
1단계 등록 후 제품 판매)

<2015년 하반기 제품 출시>

- (주)제일그린산업 : 천연식물보호제/ 세머루 (Semeuru[®]) 등록 추진

(2) 사업화 추진 상황

- 궁극적으로 다양한 제형화 기술을 바탕으로 현장에 적합한 제품을 출시하여 화학농약 대체 가능한 친환경식물보호제로 등록 사업화
- 국내 시장 진입 후 외국 수출 전략: 국내 시장은 약 800억 원 이상의 규모로 추정(2011년 기준). 전 세계 생물농약 시장은 1,320 million US\$ 규모
- 과제 종료 5년 후 국내 150억 원, 해외 50억 원 매출을 목표 함
- 국내 2012년 6월 이후 친환경유기농자재 목록공시 관련 규정의 수정으로 인하여 제품의 품질인증 기간 지연

다. 추가 연구개발 계획

(1) 개발한 시험제형의 고도화

- 효능이 차별화된 시험제형에 대한 메커니즘 연구
- 제형 연구는 향후 관련 연구 분야의 기초자료로 활용 가능함
- 미생물제제의 안정성 향상을 통한 다양한 미생물 제제에 적용 가능함

(2) 친환경유기농자재 품질 인증

- 개정된 친환경유기농자재법 시행 규칙에 따라 1차적으로 품질인증을 거쳐 궁극적으로는 천

연식물보호제로 등록: 추가 독성 및 포장 시험 평가 계획

(3) 시장(판매자)/환경(소비자)에 적합한 제품 개발

- 친환경유기농자재는 환경적 특성을 고려할 필요가 있음
- 제품의 적용 시기, 작물, 환경 특성에 적합한 다양한 제품화

(4) 해외 마케팅을 위한 다국적 기업과의 협력

- 해외 제품 진출을 위하여 국내외 대기업, 다국적 기업과의 공동 마케팅 전략 추진

6. 홍보 및 기술 확산

가. 국제전시 및 기술 마케팅

(1) Bio2013 International Convension & Exhibition (2013년 4월 22일 ~ 26일, 미국 시카고)

- Bio2013 행사기간 동안 기술마케팅 실시하였음
- 브라질, 말레이시아, 미국 등 현지 특허 법인 및 해외 바이어 상담



(2) 2012 생명산업과학기술대전 참가

- 농림수산식품부 주관 (2012년 9월 20~23일 양재동 AT 센터)
- 기술사업화지원사업 성과발표회
- 생명자원관 전시부스 운영



제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

- 세계 천연작물보호제시장은 OECD국가를 중심으로 한 친환경농업정책으로 2013년에는 전체 농약시장의 약 15%인 45억 달러에 달할 것으로 추정되며 (Santander Investment), 이웃 중국에서는 2013년 국가적 차원으로 친환경농업과 식품 안전 문제를 선택하였으며, 미생물 기반 천연물농약의 급속한 시장 확대가 예상된다.
- 최근 들어 OECD 국가를 중심으로 한 친환경농업정책 추진으로 다국적기업인 Bayer Crop Science, Novartis, Syngenta 사 등이 천연작물보호제 개발에 적극 나서고 있으며, Bayer Crop Science사의 경우 2012년도 7월에 미국의 벤처기업 Agraquest사(2009년도 1억 달러 매출 달성)를 4.5억불에 인수하여 개발 기술 확보하였다.
- 미국의 경우 천연작물보호제 개발은 최근 새로운 개념의 세균에 의한 기주식물 전신저항성 유도(Induced Systemic Resistance, ISR) 결정인자에 대한 연구에 주력 하고 있으며, 현재까지 유도저항성을 기반으로 상품화된 미생물 유래 제품은 미국 Bayer에서 개발한 Yield Shield가 유일하게 출시되어 있어 앞으로 기술 경쟁이 치열할 것으로 예상된다.
- 유럽은 세계 다른 지역보다 천연작물보호제 개발에 더 많은 시간과 비용이 소요되는 지역으로 최근 들어 독성자료 제출의 요구 수준이 높아지고 있다. 다국적 기업인 Novartis (현 Syngenta)는 유도저항성 연구 결과 salicylic acid의 다양한 유도체를 합성하여 BTH (acibenzolar-S-methyl)를 선발, 개발하여 유럽, 미국 등에서 시판 하였으나 포장에서 사용 시 작물 성장과 수확량이 감소되는 문제가 발생되어 제품 확대가 주춤한 상황이다.
- 종합적으로 현재 등록된 제품에 뒤이어 2017년까지 전 세계적으로 미생물/생화학 중심의 천연작물보호제 연구 및 이를 이용한 제품 개발이 급속히 늘어 날것으로 예상된다. 특히 최근 문제시 되고 있는 꿀벌의 집단 폐사와 관련하여 많은 연구가 진행되고 있다. 2012년 4월 이탈리아 연구진은 Neonicotinoids 계열의 농약이 꿀벌의 집단폐사를 유발한다는 연구를 Environmental Science & Technology 연구지에 발표하였고, 2012년 말, 영국의 스텔링 대학 연구진도 Science 지에 Neonicotinoid 계열의 살충제인 imidacloprid가 꿀벌의 군집에 negative effect를 주었고, 여왕벌의 생산에 영향을 주었다고 발표하였다.
- EU 식품안전청(European Food Safety Authority, EFSA)은 2012년 4월 EU 집행위로부터 clothianidin, imidacloprid와 thiamethoxan의 영향에 대하여 조사요청을 받았고, 2013년 1월에 Neonicotinoids의 사용이 90년대 초부터 전 세계의 농업에 막대한 영향을 준 꿀벌 폐사의 주요 요인이며, 꿀벌에 대한 강한 급독성 영향을 끼치고 있다고 조사결과를 발표하였다. 따라서, EU 집행위는 Neonicotinoids를 단계적으로 사용을 금지할 것을 강력히 권고하였다. 따라서, 전 세계적으로 화학농약을 천연물 또는 미생물을 이용한 친환경유기농자재 또는 생물농약으로 서서히 전환하여 그 비중이 축소될 것으로 예상된다.

EFSA identifies risks to bees from neonicotinoids

Press Release
16 January 2013

EFSA scientists have identified a number of risks posed to bees by three neonicotinoid insecticides (1). The Authority was asked by the European Commission to assess the risks associated with the use of clothianidin, imidacloprid and thiamethoxam as seed treatment or as granules, with particular regard to their acute and chronic effects on bee colony survival and development, their effects on bee larvae and bee behaviour, and the risks posed by sub-lethal doses(2) of the three substances. In some cases EFSA was unable to finalise the assessments due to shortcomings in the available data.

The risk assessments focused on three main routes of exposure: exposure from residues in nectar and pollen in the flowers of treated plants; exposure from dust produced during the sowing of treated seeds or application of granules; and exposure from residues in guttation fluid(3) produced by treated plants.

Where the risk assessments could be completed, EFSA, in cooperation with scientific experts from EU Member States, concluded the following for all three substances:

- **Exposure from pollen and nectar.** Only uses on crops not attractive to honey bees were considered acceptable.
- **Exposure from dust.** A risk to honey bees was indicated or could not be excluded, with some exceptions, such as use on sugar beet and crops planted in glasshouses, and for the use of some granules.
- **Exposure from guttation.** The only risk assessment that could be completed was for maize treated with thiamethoxam. In this case, field studies show an acute effect on honey bees exposed to the substance through guttation fluid.

EFSA's conclusions contain tables listing all authorised uses for seed treatment and as granules of the three substances in the EU and indicating for each route of exposure where a risk has been identified, where a low risk has been identified, or where an assessment could not be finalised because of a lack of data.

In reaching their conclusions, EFSA's scientists evaluated data previously submitted for the approval of the active substances at EU level and in support of product authorisations at Member State level, as well as relevant literature and monitoring data. They also considered new developments in the assessment of risks to pollinators from plant protection products, in particular recommendations contained in the EFSA Scientific Opinion on the science behind the development of a guidance document on the risk assessment of plant protection products on bees, which was published in May 2012.

See also
• Bee health homepage
• Pesticides homepage
• Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR)

Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production

Prentice E. Whitham,¹ Joseph O'Connell,¹ Felix L. Wacker,² Dawn Godwin^{1*}

Growing evidence for declines in bee populations has caused great concern because of the valuable ecosystem services they provide. Neonicotinoid insecticides have been implicated in these declines because they occur at high levels in the nectar and pollen of crop plants. We exposed colonies of the bumble bee *Bombus terrestris* in the laboratory to field-realistic levels of the neonicotinoid imidacloprid, then allowed them to develop naturally under field conditions. Treated colonies had a significantly reduced growth rate and suffered an 85% reduction in production of new queens compared with control colonies. Given the scale of use of neonicotinoids, we suggest that they may be having a considerable negative impact on wild bumble bee populations across the developed world.

Bees in agroecosystems survive by feeding on wildflowers growing in field margins and patches of semi-natural habitat, supplemented by the floral nectar of crops provided by mass flowering crops such as oilseed rape and sunflower (1, 2). Many crops are now routinely treated with neonicotinoid insecticides as a soil-drenching, these compounds are systemic, migrating in the sap to all parts of the plant and providing protection against insect herbivores. The most widely used of these compounds is imidacloprid, which is routinely used on most major crops, including corn, soybean, cotton, cauliflower and sugar beets (3). Being systemic, imidacloprid

REPORTS

has shown some evidence that neonicotinoids reduce forager success under field conditions, but studies have examined their impacts on colonies foraging outdoors. In the field, bees are present in experiments using 10 bumble colonies, designed to simulate the likely effect of exposure to a wild-flower, but colony to neonicotinoid presence on the flowers of nearby crop. The colonies were randomly assigned to one of three treatments. Control colonies received soil drench and 100 pollen and sugar water over a period of 14 days in the laboratory. Over the same period, colonies in the "low" treatment were fed pollen and sugar water containing 0.1 µg kg⁻¹ and 0.7 µg kg⁻¹ imidacloprid, respectively, approximating the levels found in real-world crops (10). The "high" treatment colonies received double these doses, all cases in the field-realistic range. After 2 weeks, all colonies were then placed in the field, where they were left to forage independently for a period of 6 weeks while their performance was monitored.

All colonies experienced initial weight gain followed by a decline as they switched from their growth phase to producing new reproductive. Colonies in both low and high treatments gained less weight over the course of the experiment compared with the control colonies (Fig. 1) [linear mixed-effect model; $F(2, 60) = 4.0$ before the number of queens; we indicate the degree of freedom, $P < 0.05$ and $F(2, 60) = 5.2$, $P < 0.005$, respectively]. By the end of the experiment, the low- and high-treatment colonies were on average 8 and 12% smaller, respectively, than the control colonies. The weight change in the high-treatment colonies was not significantly different from that of the low-treatment colonies ($F(1, 31) = 0.001$, $P = 0.96$). Linear mixed-effect models ($F(2, 60) = 1.4$, $P = 0.15$). The rate of colony growth was also dependent on the number of workers present

Fig. 1. Mean observed colony weight for control (short-dash line), low (solid line), and high (long-dash line) treatments of newly founded colonies. The change in weight over time was significantly smaller ($P < 0.005$) in low- and high-treatment colonies compared with control colonies. The number of colonies per treatment was 20 in weeks 0 to 3, in the following weeks, the numbers of colonies in the control, low, and high treatments, respectively, were as follows: week 4 (22, 24, and 20), week 5 (22, 24, and 20), week 6 (22, 24, and 20), week 7 (22, 24, and 20), week 8 (20, 24, and 20), week 9 (20, 24, and 20). Points represent cumulative weight increase since week 0 and their standard error-weight (shaded). All accumulated biological material (bees, brood, food stores, and so forth) was

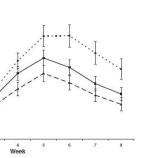


그림. EFSA 가 발표한 neonicotinoids의 위험성에 대한 공지.

제 7 장 참고문헌

(제 1핵심)

1. Arzumanov, T. et al. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Proc. Biochem.* 2005, 40: 1037-1042.
2. Asensio, L., Lopez-Llorca, L.V., López-Jiménez, J.A., 2005. Use of light, scanning electron microscopy and bioassays to evaluate parasitism by entomopathogenic fungi of the red scale insect of palms (*Phoenicococcus marlatti* Ckll., 1899). *Micron.* 36(2):169-175.
3. Barbosa, N.M. et al. Production and purification of chitinase by *Metarhizium anisopliae* isolated from soil. *J. Biotechnol.* 2010, 150: 189-190.
4. Bhanu, G.V.S et al. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 2008, 99: 1530-1537.
5. Breukelen, FR, et al. Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the malaria mosquito control agent *Metarhizium anisopliae*. *Proc. Biochem.* 2011, 46: 751-757.
6. Carvalho, R.O. et al. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. *Vet. Parasitol.* 2010, 169: 123-127.
7. de Faria, M.R., Wraight, S.P., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control.* 43:237-256.
8. Dhar, P. et al. Effects of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzyme from *Metarhizium anisopliae* isolates. *Ann. Microbiol.* 2009, 59: 545-551.
9. Fang, W. et al. A laccase exclusively expressed by *Metarhizium anisopliae* during isotropic growth is involved in pigmentation, tolerance to abiotic stresses and virulence. *Fungal Genet. Biol.* 2010, 47: 602-607.
10. Faria, M. et al. Debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and mycopesticide quality assessments. *J. Invertebr. Pathol.* 2010, 105: 74-83.
11. Fiedler, Ž., Sosnowska, D., 2007. Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. *Biocontrol.* 52(4):547-558.
12. Frank, R. et al. Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the

- malaria mosquito control agent *Metarhizium anisopliae*. *Proc. Biochem.* 2011, 46: 751–757.
13. Gao, L. et al. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycol. Res.* 2007, 111: 87–92.
 14. Hajek, A.E. et al. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. *BioControl.* 2010, 55: 147–158.
 15. Khan, A. et al. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. *Protein Expres. Purif.* 2003, 32: 210–220.
 16. Kiewnick, S. et al. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biol. Control.* 2006, 38: 179–187.
 17. Lopes, M.A. et al. Use of response surface methodology to examine chitinase regulation in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*. *Mycol. Res.* 2008, 112: 399–406.
 18. Lopes, R.B. et al. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. *J. Invertebr. Pathol.* 2013, 112:236–242.
 19. Ment, D. et al. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. *Fungal Biol.* 2010, 114: 49–56.
 20. Migiro, L.N. et al. Effect of infection by *Metarhizium anisopliae* on the feeding and oviposition of the pea leafminer *Liriomyza huidobrensis* on different host plants. *Biol. Control.* 2011, 56: 179–183.
 21. Ormond, E.L. et al. Avoidance of a generalist entomopathogenic fungus by the ladybird, *Coccinella septempunctata*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011, 77: 229–237.
 22. Rangel, D.E. et al. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *J. Invertebr. Pathol.* 2006, 93: 127–134.
 23. Rangel, D.E. et al. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *J. Invertebr. Pathol.* 2005, 88: 116–125.
 24. Ravensberg, W.J. Mass production and product development of a microbial pest control agent. *Prog. Biol. Control.* 2011, 10: 59–127.
 25. Schrank, A. et al. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon.* 2010, 56: 1267–1274.
 26. Shan, L. T., Feng, M. G., 2010. Evaluation of the biocontrol potential of various *Metarhizium* isolates against green peach aphid *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Pest. Manag. Sci.* 66(6):669–675.
 27. Shapiro-Ilan, D. I., Cottrell, T. E., Jackson, M. A., Wood, B. W., 2008. Virulence of Hypocreales fungi to pecan aphids (Hemiptera: Aphididae) in the laboratory. *J Invertebr Pathol.* 99:312–317.

28. Shi, W. B., Feng, M. G., Liu, S. S., 2008. Sprays of emulsifiable *Beauveria bassiana* formulation are ovicidal towards *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) at various regimes of temperature and humidity. *Exp Appl Acarol.* 46:247–257.
29. Shipp, L. et al. Effect of bee-vectored *Beauveria bassiana* on greenhouse beneficials under greenhouse cage conditions. *Biol. Control.* 2012, 63:135–142.
30. Siddiqui, Z.A. et al. Culture of *Paecilomyces lilacinus* on leaf extracts and leaf residues for nematode control. *Bioresour. Technol.* 1994, 49: 187–189.
31. Toegel, S. et al. Preservation of aerial conidia and biomasses from entomopathogenic fungi *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* during lyophilization. *J. Invertebr. Pathol.* 2010, 105: 16–23.
32. Vega, F.E. et al. Fungal entomopathogens: new insights on the ecology. *Fungal Ecol.* 2009, 2:149–159.

(제 2핵심)

1. Agrios, G. N. 2005. Disease caused by oomycetes. Pages 409–428 in: *Plant Pathology*. 5thed. Academic Press, New York.
2. Al-Mallah, M. K., Davey, M. R. and Cooking, E. C. 1987. Enzymatic treatment of clover root hairs removes a barrier to *Rhizobium* host specificity. *Biotechnology* 5:1319–1322.
3. Araujo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W, Jr., Van Elsas, J. D., Van Vuurde, J. W. L. and Azevedo, J. L. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4906–4914.
4. Barbieri, E., Gioacchini, A. M., Zambonelli, A., Bertini, L. and Stocchi, V. 2005. Determination of microbial volatile organic compounds from *Staphylococcus pasteurii* against *Tuber borchii* using solid-phase microextraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 3411–3415.
5. Berg, G. and Hallmann, J. 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. Pages 53–69 in: *Microbial root endophytes*. B. Schulz, C. Boyle, and T. N. Sieber, eds. Springer-Verlag, Berlin.
6. Chert, C., Bauske, E. M., Musson, G., Rodriguez-Kabana, R. and Kloepper, J. W. 1995. Biological control of *Fusarium* wilt of cotton by use of endophytic bacteria. *Biol. Cont.* 5:10–16.
7. Chung, B. S., Aslam, Z., Kim, S. W., Kim G. G., Kang, H. S., Ahn, J. W. and Chung, Y. R. 2008. A bacterial endophyte, *Pseudomonas brassicacearum* YC5480 isolated from the root of *Artemisia* sp. producing antifungal and phytotoxic compounds. *Plant Pathol.*

- J. 24:461–468.
8. Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clement, C. and Ait Barka, E. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1685–1693.
 9. Conn, V. M., Walker, A. R. and Franco, C. M. M. 2008. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:208–218.
 10. Coombs, J. T. and Franco, C. M. M. 2003. Isolation and identification of actinobacteria isolated from surface-sterilized wheat roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5303–5308.
 11. Coombs, J. T., Michelsen, P. P. and Franco, C. M. M. 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biol. Control* 29:359–366.
 12. Domenech, J., Ramos, S. B., Probanza, A., Lucas, G. J. A. and Gutierrez, M. F. J. 2007. Elicitation of systemic resistance and growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by PGPRs from *Nicotiana glauca*: a study of the putative induction pathway. *Plant Soil.* 290:43–50.
 13. Dong, J., Hong, Y., Shao, Z. and Liu, Z. 2010. Molecular cloning, purification, and characterization of a novel, acidic, pH-stable endoglucanase from *Martelella mediterranea*. *J. Microbiol.* 48: 393–398.
 14. Hallmann, J. and Berg, G. 2006. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. Pages 15–31 in: *Microbial Root Endophytes*. B. Schulz, C. Boyle, and T. N. Sieber, eds. Springer-Verlag, Berlin.
 15. Handelsman, J., Raffel, S., Mester, E. H., Wunderlich, L. and Grau, C. R. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:713–718.
 16. Kloepper, J. W., Ryu, C. M. and Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259–1266.
 17. Kloepper, J. W. and Ryu, C. M. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. Pages 33–52 in: *Microbial root endophytes*. B. Schulz, C. Boyle, and T. N. Sieber, eds. Springer-Verlag, Berlin.
 19. Kobayashi, D. Y. and Palumbo, J. D. 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. Pages 199–233 in: *Microbial Endophyte*. C.W. James, and J. F. White, eds. Marcel Dekker Inc, NewYork.
 20. Leclère, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J. S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M. and Jacques, P. 2005. Mycosubtilin overproduction by

- Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Appl. Environ. Microbiol. 71:4577-4584.
21. Manjula, K., Singh, S. D. and Kishore, K. G. 2002. Role of endophytic bacteria in biological control of plant diseases. Ann. Rev. Plant Pathol. 1:231-252.
 22. McSpadden-Gardener, B. B., Gutierrez, L. J., Joshi, R., Edema, R. and Lutton, E. 2005. Distribution and biocontrol potential of *phlD* (+) pseudomonads in corn and soybean fields. Phytopathology 95:715-724.
 23. Nathan, A. M., Jessica, M. K., Valerie, B., Martin, D. and David, H. S. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. Appl. Environ. Microbiol.70: 7520-7529.
 24. Palacios, L., Arahal, D., Reguera, B. and Marin, I. 2006. *Hoeflea alexandrii* sp. nov., isolated from the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* AL1V. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:1991-1995.
 26. Rosenblueth, M. and Martínez-Romero, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Mol. Plant-Microbe Interact. 19:827-837.
 27. Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Pare, P. W. and Kloepper, J. W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:4927-4932.
 28. Schulz, B. and Boyle, C. 2006. What are endophytes? Pages 1-13 in: Microbial Root Endophytes. B. Schulz, C. Boyle, and T. N. Sieber, eds. Springer-Verlag, Berlin.
 29. Singh, P. P., Shin, Y. C., Park, C. S. and Chung, Y. R. 1999. Biological controls of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathology 92: 92-99.
 30. Sgroy, V., Cassán, F., Masciarelli, O., Florencia Del Papa, M., Lagares, A. and Luna, V. (2009). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85:371-381.
 31. Shin, D. S., Park, M. S., Jung, S., Lee, M. S., Lee, K. H., Bae, K. S. and Kim, S. B. 2007. Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of coastal sand dune plants. J. Microbiol. Biotechnol. 17:1361-1368.
 32. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol 24:1596-1599.
 33. Wagner-Dobler, I., Rheims, H., Felske, A., El-Ghezal, A., Flade-Schröder, D., Laatsch, H., Lang, S., Pukall, R. and Tindall, B. J. 2004. *Oceanibulbus indolifex* gen. nov., sp. nov., a NorthSea *α*-proteobacterium that produces bioactive metabolites. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1177-1184.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.