

국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질을
이용한 새로운 생물농약의 실용화

Industrialization of systematic acquired resistance
material originated from endemic *Erwinia* as novel
biopesticide

주식회사 파이오니아

농림수산식품자료실



0018189

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질을 이용한 새로운 생물
농약의 실용화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009년 04월 24일

주관연구기관명 : (주) 파이오니아

주관연구책임자 : 임 춘 근

연 구 원 : 조 준 모

연 구 원 : 민 용 원

연 구 원 : 구 준 학

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 허 장 현

위탁연구기관명 : 한국화학시험연구원

위탁연구책임자 : 성 하 정

요 약 문

I. 제 목

국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질을 이용한 새로운 생물농약의 실용화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근까지의 농업은 단위 면적당 생산량 제고를 위한 연구가 대부분이었으나, 앞으로는 생산량도 중요하겠지만, 소비자들이 요구하는 고품질, 기능성, 안정성 등에 대한 연구가 적극적으로 전개될 것으로 예상된다. 이러한 요구조건을 충족시키기 위해서는 외부환경요인을 적극적으로 개발하여 다수확 및 고품질의 농산물을 생산하여야 농업경쟁력에서 생존할 것이다. 또한 최근의 농업은 환경농업의 일환으로 환경과 먹거리의 안전성에 정부정책은 물론 소비자들의 요구가 강하게 대두되고 있는 현실에서 미생물제의 연구개발과 이용은 향후 농업에 급진적으로 발전할 것으로 기대된다. (주)파이오니아에서는 국내 최초로 전신저항성유도물질의 원천기술을 보유하고 있으며 이미 국내 및 국외 특허 출원·등록을 완료하였다. 전신저항성유도물질의 특성은 천연물질이며 무독성이며 유기 분자체이므로 자연에서 분해가 잘되며 잔류성이 없다. 또한 식물에 전신저항성을 유도하여 대부분의 병원균에 대하여 강한 저항성을 나타내고, 매우 넓은 작용범위(spectrum)를 가지고 있다. 병해충 방제뿐만 아니라 식물생육촉진 효과가 있어 고품질 농산물 생산에 적합하다. 본 연구의 목적은 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질의 생물학·생화학·독성학적 특성을 규명하여, 국내 최초로 전신저항성유도물질을 실용화하는 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

제 1세부과제(파이오니아) : 전신저항성유도물질의 생물학적·유전학적 특성 분석 및 산업화

1. 다양한 작물에 대한 생물활성 스펙트럼 조사 및 특성 분석

- 수도 작물에 대한 생물활성 스펙트럼 조사 분석
- 원예 작물에 대한 생물활성 스펙트럼 조사 분석
- 특용 작물에 대한 생물활성 스펙트럼 조사 분석

- 주요 과수에 대한 생물활성 스펙트럼 조사 연구
2. 전신저항성 유도물질의 작용기작 연구
 - 전신저항성유도물질의 분자생물학적 작용기작 연구
 - 전신저항성유도물질의 생화학적 작용기작 연구
 3. 산업화 수준의 대량배양기술개발
 - 5ton pilot scale 규모의 대량배양 기술개발
 - 5ton pilot scale 규모의 후공정 기술개발
 - 5ton pilot scale 규모에서의 전신저항성유도물질의 대량 생산
 4. 친환경 재배력 작성
 - 농가에서 사용 가능한 친환경 재배력 작성

협동과제(강원대학교) : 전신저항성유도 물질의 생화학적 특성 분석 및 타농자재와의 혼용안정성 분석

1. 전신저항성유도 물질의 분석 방법 개발
 - 정밀기기를 이용한 전신저항성유도물질의 분석법 개발
 - 정밀기기를 이용한 전신저항성유도물질의 화학적 분석법 개발
2. 전신저항성유도 물질의 다양한 작물에 대한 생화학적 특성 분석
 - 전신저항성유도물질이 작물(수도작, 원예작물)에 대한 생화학적 특성 분석
 - 전신저항성유도물질의 작물(특용작물, 화훼류)에 대한 생화학적 특성 분석
3. 타농자재의 혼용 안정성 분석
 - 화학농약과 혼용안정성 분석
 - 비료 및 영양제와 혼용 안정성 분석
 - 친환경농자재와 혼용 안정성 분석
4. 교육자료 제작
 - 총괄 결과를 database화하여 대농민 교육자료 제작

위탁과제(한국화학시험연구원) : 전신저항성유도물질의 독성학적 특성 분석

1. 전신저항성유도물질 원제의 인축에 대한 독성학 특성 구명

- 급성독성시험
- 경구독성시험
- 경피독성시험
- 안점막자극시험
- 피부자극시험
- 피부감작성시험

2. 전신저항성유도물질 원제의 환경 대한 독성학 특성 구명

- 90일 아급성경구독성
- 변이원성시험
- 조류(鳥類)에 대한 급성독성시험
- 담수어류에 대한 영향시험
- 담수무척추 동물에 대한 영향시험

3. 전신저항성유도물질 제품에 대한 인축 및 환경에 대한 독성학 특성 구명

- 급성경구독성시험
- 급성경피독성시험
- 안점막자극시험
- 피부자극시험
- 피부감작성시험

IV. 연구개발결과

제 1세부과제(파이오니아) : 전신저항성유도물질의 생물학적·유전학적 특성 분석 및 산업화

Section 1. 다양한 작물에 대한 전신저항성유도물질의 병 방제 스펙트럼 조사 및 분석

전신저항성유도물질의 병방제 스펙트럼 조사를 위하여 수도 작물과 원예 작물, 특용 작물, 과수 작물에 대하여 병을 일으키는 주요 식물 병원균을 조사하여 각각의 식물병에 대한 방제효과를 검정하여 생물 농약으로서의 실용화 가능성을 연구하였다.

1. 수도 작물에 대한 생물활성 검정

벼는 인간이 기르기 시작한 가장 오래된 식물들 중의 하나로서 우리나라의 농업에서는 매우 큰 비중을 차지하고 있다. 쌀은 밀·옥수수과 함께 세계 3대 곡물에 속하는데 이중 90% 이상이 동남아시아에서 재배되고 있고 우리 한국도 그 국가들 가운데 하나이다. 이와 같이 쌀

은 우리에게 없어서는 안 될 중요한 재산이기도 하다. 벼의 전 생육기간에 걸쳐 발생하는 벼도열병(*Pyricularia grisea*)은 전 세계의 모든 지역에서 발생하여 매우 심한 피해를 주는 식물병원균 중에 하나이다.

전신저항성유도물질의 처리에 의한 벼도열병에 방제효과검정을 위하여 강원도 춘천의 수도작 포장에서 효과 시험을 수행하였다. 그 결과 벼도열병에 대하여 각각 62.6%, 65%의 방제효과를 나타내었다. 이러한 결과는 전신저항성유도물질을 어린 묘판에 1회 처리함에 따라 작물이 건전하게 잘할 수 있는 환경을 제공하였고, 병발생을 위한 질소비료의 과비에 따른 처리에 영향은 없었던 것으로 판단된다. 따라서 수도작에서 주요 병해로 알려져 있는 벼도열병에 대하여 전신저항성유도물질은 발병억제의 예방 및 억제 효과가 있다고 판단되어 실용화의 기초자료로 충분하다고 판단된다.

2. 원예작물에 대한 생물활성 검정

주요 원예작물에서 다양하게 발생하고 있는 식물병원균을 대상으로 하여 전신저항성유도물질의 생물활성 검정을 수행하였다.

우리나라에서 고추에 피해를 주는 주요 병은 역병, 바이러스, 탄저병 및 세균성 점무늬 병 등으로서 저항성 품종 육성 및 효과적인 병방제를 위한 대책이 요구되고 있는 실정이다. 먼저 고추 역병에 대한 시험은 온실 내 포트에서 실시하였으며 무처리의 발병률은 82.3% 이었으며 전신저항성유도물질 처리구의 발병률은 39%로 무처리 대비 52.6%의 병 방제효과를 나타내었다.

고추 탄저병에 대한 전신저항성유도물질의 병방제효과 검정을 위하여 포장시험을 수행하였다. 노지 고추 포장에서의 고추 탄저병에 대한 방제효과는 4회 처리 시 방제 효과 51.5%로 전신저항성유도물질 처리 시 우수한 방제효과를 나타내었고, 전신저항성유도물질의 제형화 공정을 통한 시제품(Pi0802)을 이용한 시험에서는 56.2%의 방제효과를 나타내었다. 이상에 결과로 보아 전신저항성유도물질을 이용한 고추 탄저병에 대한 방제효과는 50~60%의 방제가를 보이고 있어 고추 열매에 직접적으로 발생하는 탄저병의 발생을 줄이고 고추 열매 수확량 증대에 기여할 수 있다고 판단된다.

전신저항성유도물질 처리 시 고추포장에서 발생하는 바이러스병(담배모자이크바이러스)에 대하여 효과를 검정하기 위하여 시설재배지에서 포장시험을 수행한 결과 61.6%의 방제효과를 나타내었고, 담배모자이크바이러스의 전형적인 증상인 괴저현상 및 위축현상이 발생된 반면 전신저항성유도물질 처리구에서는 상당히 예방되었음을 확인하였다.

오이 포장에서의 잿빛곰팡이병 억제효과 시험에서는 전신저항성유도물질 처리구가 59.7%의 방제효과를 나타내었고 화학대조 약제는 81.7% 효과를 나타내어 전신저항성유도물질 처리에 따른 이병과가 줄어들었음을 확인하였다. 이는 농가의 소득 증대와 직접적으로 연관될 것이다.

오이 포장에서의 흰가루병 억제효과 시험 결과 약 49.2%의 방제효과를 갖는 것으로 나타났고 전신저항성유도물질 처리구가 무처리구에 비하여 병 발생 지연 효과가 뚜렷하게 나타나는 것을 확인하였다. 그리고 전신저항성유도물질의 제형화 공정을 통한 시제품(Pi0802)을 이용한 포장시험에서는 각각 55.3%와 61.9%의 방제효과를 나타내었다. 또한 전신저항성유도물질과 화학대조구의 약효를 살포 횟수에 따라 검증한 결과 발병초기 방제가 이뤄져야하며 이는 전신저항성유도물질이 흰가루병에 대하여 면역력을 증가시키는 것으로 확인하였다.

오이노균병에 대한 포장시험에서는 전신저항성유도물질 처리에 따른 오이 노균병의 방제효과는 41.6%로 다소 낮게 나타났다. 이는 시험포장이 과다 습도에 의한 병진전이 급속도로 빨라지는 환경적 요인에 의한 것으로 판단되고, 추후 재실험이 요구된다.

배추는 재배역사, 재배면적 및 이용면에서 볼 때 우리나라는 가장 중요한 채소 중에 하나이다. 배추재배에 있어서 발생률이 높고 방제가 비교적 힘든 병해는 연부병(무름병), 바이러스병, 노균병, 근류병(무사마귀병) 등이 있다. 이 중 배추 노균병과 배추 무름병에 대하여 전신저항성유도물질의 처리 시 병방제효과를 검정하였다. 그 결과 배추 노균병에 대한 방제 효과를 확인한 결과 무처리 대비 55.2% 수준의 병 방제 효과를 나타내었고, 배추 무름병에서는 47.8%의 방제가를 나타내었다.

이밖에도 딸기 잿빛곰팡이병, 참외 노균병, 호박 흰가루병에 대한 전신저항성유도 물질 처리에 대한 효과는 각각 54.9%, 50%, 57.4%의 방제효과를 나타내었다.

3. 과수에 대한 생물활성 검정

제주도내 감귤 재배 포장에서의 병발생 상황은 궤양병과 더뎡이병 그리고 검은무늬병이 주로 발생하고 있다. 이에 준하여 본 연구에서는 감귤 궤양병에 대한 전신저항성유도물질의 병방제효과를 검정하기 위하여 온주밀감을 대상으로 시험을 수행하였다. 시험 결과 무처리구의 발병도는 12.7%이었으며 전신저항성유도물질 처리구의 발병도는 5.4%로 방제효과는 57.8%로 나타났다.

복숭아, 살구 등의 핵과류의 세균성구멍병은 고온 다습한 지역에서 많이 발생하는 세균병으로 과실에 발생하면 상품가치가 저하하여 경제적 피해가 매우 크다. 전신저항성유도물질에 대한 복숭아세균성구멍병에 대한 방제효과 검정을 위하여 포장시험을 수행하였다. 시험 결

과 전신저항성유도물질 처리구는 방제가 37.8%로 처리에 의한 방제효과를 볼 수 없었다. 그러나 화학대조 약제도 55.8%의 낮은 방제효과를 나타내어 약효의 지속성이 짧고 연용시 내성이 발생함을 알 수 있었다.

4. 특용작물에 대한 생물활성 검정

전신저항성유도물질 처리에 의한 인삼의 병 발생 억제 효과를 확인하기 위하여 인삼의 지상부 병에 대하여 처리 방법을 달리하여 잿빛곰팡이병에 대한 병방제효과를 점검하였다. 먼저 묘삼 분의처리에 의한 병방제효과에서는 전신저항성유도물질 처리에서 58.3~59.5%의 방제효과를 나타내었다. 그리고 묘삼 침지처리에 의한 인삼 잿빛곰팡이병의 방제효과에서는 전신저항성유도물질 처리에 의하여 55.2%의 방제효과를 나타내었다. 마지막으로 10일 간격 2회 관주 처리 한 처리구에서는 51.2%의 방제효과를 나타내었다. 이러한 결과는 전신저항성유도물질을 묘삼에 처리함에 따라 인삼에 발생하는 주요 지상부 병해를 예방하는 효과를 볼 수 있고 환경 친화적인 방법에 의하여 방제 할 수 있다고 판단된다.

5. 화훼류에 대한 생물활성 검정

꽃도라지 잿빛곰팡이병은 꽃도라지에서 최대의 병해로 저온·다습인 상태가 계속되면 잎, 줄기, 꽃대 및 꽃에 전반적으로 발생하며 수송 중에 출하상자 안에서 발생하는 경우도 있다. 꽃도라지 균핵병은 저온, 과습 상태가 계속되면 줄기나 잎에 발생한다. 전신저항성유도물질을 화훼류 작물에 적용하기 위하여 꽃도라지를 선발하여 처리에 따른 전신저항성유도물질의 병방제효과를 검정하였다. 시험 결과 전신저항성유도물질 처리에 따른 병방제효과는 잿빛곰팡이병과 균핵병 각각 43.8%, 48.3%로 기존의 원예작물에서의 병방제효과보다 다소 낮았다. 이러한 결과는 무처리구의 병발생율이 11~20%로 무처리 발병률이 다소 낮았고, 처리시기의 조정과 처리회석배수 검토를 통하여 추후 최적의 병방제효과를 나타낼 수 있는 연구 결과를 토출해 낼 필요가 있다고 판단된다.

Section 2. 전신저항성유도물질의 작용기작(mode of action) 구명

1. 전신저항성유도물질 처리에 의한 오이 잿빛곰팡이병의 발병억제 기작 연구

주요 원예작물 중 수량저하 및 품질저하의 주원인인 오이 잿빛곰팡이병을 선발하여 생육 중 전신저항성유도물질 처리에 의한 발병억제에 관하여 연구하였다. 시험 결과 무처리구는 4일 만에 병반이 형성되었으며 12.4%의 발병률을 나타내었고, 접종 후 14일 까지 발병이 점차적으로 증가하여 76.4%의 발병률을 나타내었다. 하지만 전신저항성유도물질 처리구는 무처리에 대비하여 시간이 경과함에 따라 발병률이 증가 되었지만 현저히 발병이 억제되는 효과를 나타내었다.

전신저항성유도물질 처리엽에서의 균사생장 억제 연구 결과 처리구에서는 무처리구에 대비하여 현저하게 잿빛곰팡이병원균의 밀도가 억제되었다. 이는 전신저항성유도물질이 병원성 곰팡이와의 직접적인 접촉으로 인한 방제효과 보다는 저항성을 발달 시켜 병원균을 억제하는 기작을 가지고 있음을 예상 할 수 있었다.

전신저항성유도물질 처리에 따른 효소활성 측정을 위하여 작물체내의 세포반응에 연 관되어 있는 peroxidase(POX) 효소와 작물세포를 보호한다고 알려져 있는 glutathione peroxidase(GPX) 효소의 활성을 측정하여 작물체의 다양한 방어기작에 대하여 연구하였다. 그 결과 전신저항성유도물질 처리구에서 오이의 유도저항성은 POX의 활성과 GPX의 활성이 증가 되는 것으로 나타났다.

2. 전신저항성유도물질의 분자생물학적 작용기작 연구

담배를 대상으로 SAR 관련 유전자인 PR1유전자의 발현량을 분석하여 식물병 저항성 유도체로서 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질의 기능을 검정하였다. 시험 결과 전신저항성유도물질을 처리한 담배엽에서 분리한 RNA에서는 처리 후 48시간 까지 PR1 유전자가 발현되는 것을 확인하였고 PR1 유전자의 발현량이 많아 강한 저항성 발현을 유도한다는 것을 알 수 있었다.

과민성반응 유도 유전자(HypersensitiveResponseandPathogenicity(Hrp) gene) 연구에서는 본 연구과제의 전신저항성유도물질은 5mg/ml의 저농도로 처리하여도 36h와 48h에서 과민성 반응을 나타냄으로서 기존의 대조구보다 우수함을 알 수 있었다.

전신저항성유도물질의 병저항성 작용 특성을 연구하기 위하여 담배식물을 모델로 형질전환식물을 만들어 조직별 및 기관 발달 단계에서 발현 양상을 파악하고 그 기능을 연구한 결과 전신저항성유도물질에 의해 형질 전환된 식물은 세포분열이 wild type보다 활발하게 많이 일어나고 있었고, SEM을 이용하여 잎을 관찰한 결과 전신저항성유도물질의 형질 전환된 식물의 세포크기가 식물세포의 수가 많게 나타났다. 이러한 결과는 전신저항성유도물질로 인하여 식물의 세포분열활동이 왕성하게 이루어지고 있음을 시사한다.

Section 3. 5톤 이상의 scale에서 대량 배양 및 후공정 기술 개발

전신저항성유도물질을 생산하는 공정에서 미생물 배양은 물론이고 미생물 자체에서 생산되는 기능성 전신저항성유도물질의 분리·정제의 효율성을 감안하여 최적화된 후공정 시스템의 확립이 필수적이다.

500L 발효공정과정에서 배양의 종료시간은 평균 16~17시간이고 이때 생성되는 전신저항성유도물질의 생성량은 약 2.4g/L 수준이었다.

5톤 규모의 발효 공정 개발의 주목적은 안정적인 공정을 통한 지속적인 전신저항성유도물질의 생산과 scale up을 통한 생산 단가의 절감이다. 이를 위하여 안정적인 공정 확보를 위한 다양한 요인들과 생산단가 절감법에 대하여 분석하였다. 미생물의 안정성과 전신저항성유도물질 생산최적화를 위하여 다양한 실험(중균배양부터 본배양까지의 공정 개선)을 수행한 결과 50L 배양 과정을 생략할 수 있었으며 이에 따라 전체 생산 공정 중 1일을 단축할 수 있었으며 이에 따른 배지, 기기사용료, 인건비의 감소가 예상되었다.

배지의 종류와 함량을 변화하여 최적의 배지조건을 확립하고 안정적인 균주의 전신저항성유도물질 생산과 효과적인 배양 시스템을 개발하려는 연구를 수행하였다. 이를 위하여 기존 배지 중 탄소원의 종류와 농도를 변형하고 이를 5톤 scale에서 배양하여 그 재현성을 확인한 결과 기존의 탄소원을 25% ~ 50%로 감소하고 새로운 탄소원을 전체대비 2 ~ 3% 추가하여 배양하였을 경우 기존 대비 이상으로 전신저항성유도물질이 생성되었다.

5톤 scale에서의 발효공정의 재현성 검정과 배양효율을 현장에 적용하였다. 발효 공정의 최적화를 통하여 5톤 배양 시 전신저항성유도물질의 생성량과 profile을 검토한 결과 기존의 500L 배양과 유사한 배양 profile을 나타내었으며 전신저항성유도물질의 생산은 약 2.51g/L로 나타났다.

전신저항성유도물질의 생산을 위한 다양한 후공정 기기를 시험 한 결과 최적의 시스템을 확립하여 전신저항성유도물질의 최종 product의 yield를 높일 수 있었다.

협동과제(강원대학교) : 전신저항성유도 물질의 생화학적 특성 분석 및 타농자재와의 혼용안정성 분석

Section 4. 전신저항성유도물질의 작물에 대한 생화학적 특성 분석

1. 수도작에 대한 전신저항성유도물질의 생화학적 특성 변화 영향 분석

전신저항성유도물질 처리에 의한 벼 종자의 발아촉진효과를 검정한 결과 발아율은 무처리구에 대비하여 평균 20% 증진되었고 초엽형성도 무처리에 비해 매우 향상되어 초기생육이 잘 발달되도록 생리적으로 작용하였다. 그리고 전신저항성유도물질 처리에 의한 벼 육묘기 성장촉진효과를 검정 결과 신장이 현저히 촉진되었을 뿐만 아니라 줄기가 건설하고 생중량이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 벼 수확량 증대 검정에서도 종자처리 및 생육 중 엽면처리의

방법을 병행하는 것이 가장 좋았다.

2. 원예작물에 대한 전신저항성유도물질의 생화학적 특성 변화 영향 분석

전신저항성유도물질 처리에 의한 오이 수확량 증대 검정한 결과 관행구보다 높은 수확량을 나타내었고 이를 수치로 표현했을 때 11.3%의 증수효과가 나타났다. 그리고 전신저항성유도물질 처리에 의한 발아 후 신장축진을 조사한 결과 무처리구에 비하여 신장이 촉진되었다. 출하시기를 조기에 맞출 수 있는 것을 의미하며 연료비의 절감 등 경제적인 이득이 실제 농가에 적용될 수 있는 부분이라고 생각된다. 오이에 대한 영양요구도 분석에서는 칼슘과 마그네슘 함량에 있어서 관행구에 비하여 전신저항성유도물질 처리구의 흡수축진 효과가 매우 우수하게 나타났다. 오이에 대한 생리 생화학 특성 변화 검정에서는 광합성, 기공전도도, 엽록소 함량 등의 조사 항목에서 본 과제의 전신저항성유도물질이 기존 개발된 물질보다 우수하였다.

고추의 수확량 시험에서는 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리구에서는 무처리와 미국 미생물 유래 전신저항성유도물질 처리구에 비해 총수량, 생중량 및 건중량이 증가되었고 고추묘의 신장이 촉진되는 것을 확인 할 수 있었다. 고추에 대한 영양요구도 분석 결과 칼슘 및 마그네슘의 흡수율은 무처리에 비해 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질이 월등히 우수하게 나타났으며, 또한 미국 미생물 유래 전신저항성유도물질 처리구보다 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리구에서 더 높은 흡수축진 효과가 인정되었다. 또한 광합성량, 기공전도도, 엽록소 함량, 당함량, 에서도 우수한 결과를 나타내었다.

딸기에 대한 생화학적 특성변화 시험을 위하여 농민을 대상으로 관행 대비 효과를 검정하였다. 화방수는 약 25% 증가하였으며 이러한 화방수의 증가로 인하여 수확량은 1회 수확 시 4kg 가량 수확량이 많았고 상품과율이 약 15% 증가하였으며 수확기간이 연장되었다. 또한 관행 대비하여 과중 및 경도 그리고 당함량이 상승되었다. 영양요구도 조사에서도 칼슘과 마그네슘의 흡수가 촉진 되었음을 알 수 있었다.

3. 특용작물에 대한 전신저항성유도물질의 생화학적 특성 변화 영향 분석

전신저항성유도물질 처리에 따른 인삼의 생육특성을 조사한 결과 모든 조사 항목에서 무처리 대비하여 매우 우수한 생육특성을 나타내었다. 특히 인삼의 품질을 결정하는 생중량에서는 전신저항성유도물질 처리구가 무처리 대비하여 약 20%의 효과상승을 보였다.

4. 화훼류에 대한 전신저항성유도물질의 생화학적 특성 변화 영향 분석

전신저항성유도단백질을 처리하여 백합의 생육특성을 알아보았다. 전신저항성유도물질 처리 시 길이 신장 및 줄기 생체중이 촉진되었으며 10ppm보다는 40ppm 처리 시 줄기의 길이

가 길었다. 또한 줄기 내 성분의 함량을 분석한 결과 칼슘과 마그네슘 함량이 무처리에 대비하여 증가하였으나 칼륨과 인의 조사에서는 처리에 따른 효과를 볼 수 없었다.

Section 5. 전신저항성유도물질 분석법 개발

전신저항성유도물질을 이용한 생화학작물보호제의 실용화를 위해서는 원분의 생산, 순도 결정, 제형의 개발, 인축독성시험 및 잔류분석 등의 다양한 시험 결과들이 필요하다. 이러한 시험을 수행하기 위해서는 생화학작물보호제의 정량적 개념 도입이 반드시 필요하다. 전신저항성유도물질의 정제를 통하여 표준품 제조를 하였고 추출정제법 개선을 통하여 최적화 된 전신저항성유도물질의 분석방법을 개발하였다. 정확한 전신저항성유도물질의 품질관리를 위해서는 SDS-PAGE, 이미지분석법을 통한 정량분석, HPLC와 HR-test를 통한 정성분석법이 병행하는 것 최적 조건이라 사료된다.

Section 6. 타농자재와의 혼용 안정성 분석

시중에 유통되고 있는 살균제와 살충제 혼용시 수용액상에서의 안정성을 검토 한 결과 수용액상에서의 잔류량은 80% 이상으로 전신저항성유도물질이 시험한 모든 살균제와 살충제의 안정성을 나타내어 그에 대한 살균제 혼용가부표를 작성하였다. 또한 총 12종의 비료 성분을 대상으로 혼용안정성을 검정한 결과 대부분의 비료 성분에 대하여 안정성이 확인되었다.

위탁과제(한국화학시험연구원) : 전신저항성유도물질의 독성학적 특성 분석

Section 7. 전신저항성유도물질 원제의 인축과 환경에 대한 독성학적 특성 분석

1. 전신저항성유도물질 원제의 인축과 환경에 대한 독성학적 특성 분석

가. 마우스에 대한 전신저항성유도 단백질의 급성경구독성시험

전신저항성유도 단백질의 경구 투여에 대한 LD50은 2,500 mg/kg B.W. 이상으로 사료된다.

나. 랫드에 대한 전신저항성유도 단백질의 급성경피독성시험

전신저항성유도 단백질의 단회투여(경피)독성시험에 대한 반수치사약량(LD50)치는 암.수 모두 2 000 mg/kg B.W.이상 인 것으로 사료 된다.

다. 기니픽에 대한 전신저항성유도단백질의 피부감작성시험

Hartley계 수컷 기니픽에 대한 전신저항성유도단백질을 Buehler 법으로 평가시 피부감작성이 매우 약한 물질로 판단된다.

라. 전신저항성유도 단백질의 토끼에 대한 안점막자극시험

전신저항성유도 단백질은 New Zealand White계 암컷 토끼의 안점막 적용시 급성안자극지수(AOI)가 “6.00”으로 안자극 판정표에 의해 자극성이 없는 물질로 판단된다.

마. 전신저항성유도 단백질의 토끼에 대한 피부자극시험

전신저항성유도 단백질 용출액은 New Zealand White계 토끼에 피부적용시 미약한 홍반 및 부종 등을 유발하였으나 [피부자극성 검토기준]에 의하여 본 시험물질은 피부 자극성이 없는 물질로 판단된다.

바. 전신저항성유도물질 원제에 대한 소핵시험

전신저항성유도물질 원제는 본 시험조건에서 마우스 골수세포에 대해 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

사. 전신저항성유도물질 원제에 대한 미생물복귀돌연변이시험

시험물질 전신저항성유도물질 원제는 본 시험 조건 하에 사용한 균주들에 대해 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

아. 담수무척추동물에 대한 전신저항성유도물질의 급성유영저해시험

전신저항성유도물질의 물벼룩에 대한 급성유영저해시험을 실시한 결과 24시간 및 48시간 EC₅₀은 100.0 mg/L 이상으로 나타났으며, 무영향농도는 100.0 mg/L이었다.

EC₅₀값의 표기는 설정농도로 실시하였다.

시험기간 중 결과에 영향을 미칠 수 있는 요인은 발생하지 않았다.

자. 전신저항성유도물질 원제에 대한 염색체이상시험

시험물질은 본 시험 조건 하에서 CHL세포에서 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

아. 잉어(Cyprinus carpio)에 대한 전신저항성유도물질의 급성어독성시험

전신저항성유도물질의 잉어에 대한 급성어독성시험을 지수식으로 실시한 결과 48시간 및 96시간 LC₅₀은 10.0 mg/L 이상이었으며, 무영향농도는 10.0 mg/L이었다.

LC₅₀값의 표기는 설정농도로 실시하였다.

시험기간 중 결과에 영향을 미칠 수 있는 요인은 발생하지 않았다.

1. 전신저항성유도물질 제품의 인축과 환경에 대한 독성학적 특성 분석

가. 기니픽에 대한 전신저항성유도물질 제품의 Buehler법을 이용한 피부감작성시험

Hartley계 수컷 기니픽에 있어서 전신저항성유도물질 제품의 감작지수와 빈도지수는 각각 “0”과 “0%”로 평가되어 피부감작성이 매우 약한 물질로 판단된다.

나. ICR 마우스에 대한 전신저항성유도물질 제품의 급성 경구투여 독성시험

전신저항성유도물질 제품의 투여량을 2,500 mg/kg B.W.로 설정하여 투여한 결과 사망 동물 및 이상소견 관찰 동물이 없었으며, 체중증감 및 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 전신저항성유도물질 제품에 대한 LD50은 암·수 모두 2,500 mg/kg B.W. 이상으로 사료된다.

다. SD 랫드에 대한 전신저항성유도물질 제품의 급성 경피투여 독성시험

전신저항성유도물질 제품의 투여량을 2,000 mg/kg B.W.로 설정하여 투여한 결과 체중 변화에 있어서는 유의성이 관찰되었지만, 사망동물 및 이상소견 관찰 동물이 없었으며, 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 전신저항성유도물질 제품에 대한 LD50은 암·수 모두 2,000 mg/kg B.W. 이상으로 사료된다.

라. New Zealand White 토끼에 대한 전신저항성유도물질 제품의 피부자극시험

New Zealand White계 토끼에 대하여 본 시험물질은 피부자극성이 없는 물질로 평가되었다.

마. New Zealand White 토끼에 대한 전신저항성유도물질 제품의 안점막자극시험

New Zealand White계 토끼의 안점막자극시험에서 시험물질은 안자극판정표에 의해 자극성이 없는 물질로 판단된다.

V. 연구개발 결과의 활용방안 및 기대성과

가. 연구개발결과의 활용방안

- 본 연구 결과물을 소비자 농민이 사용할 수 있도록 실용화
- 연구의 성과물은 영농 자료로 제작하여 보급
- 친환경 재배력을 작성하여 친환경 저투입 고효율 농산물 생산을 위한 농법으로 홍보·교육
- 전신저항성유도물질의 수출

나. 기대성과

(1) 기술적 측면

- 국내 최초로 토착 미생물 유래 전신저항성유도물질을 실용화
- 개발부터 실용화까지 모든 과정과 data을 순수 국내 기술 적용(Know-how)
- 친환경 재배력 및 적용확대를 염두에 둔 기술 개발을 통하여 소비자인 농민에게 종합적 서비스 제공 가능

(2) 경제적·산업적 측면

- 체계적인 연구를 통하여 농업 분야에 환경 친화적인 전신저항성유도 물질을 최초로 적용
- 유사 기능 물질의 산업화에 촉매 역할
- 수입산 생화학농약 대체 가능
- 화학농약 감소에 따른 수입량 감소 기대
- 무자료 불량 병해충 방제용 친환경 농자재에 의한 농가의 피해 감소

SUMMARY

Recently, organic farming and environmentally friendly agricultural products have been used for appropriate agriculture system. In order to fulfill the demand of consumers, the research on higher quality, productivity, safety etc. are being carried out. Specially, there is great interest in application of microbial compounds in agricultural field. Since there has been great interest on the application of microbial compounds, indiscreet development and products of unspecified microbial compound could not fulfill the need of farmers.

Control of plant diseases using microorganisms such as bacteria, actinomycetes, yeast, birds, fowls, etc. increases the agricultural products which could be maintained. The physiological properties and production of agricultural products could be also be adjusted. Especially, microorganisms recognizes their host crops and cause diseases whereas non-host plants induce defence mechanisms such as systemic acquired resistance (SAR), induced systemic resistance (ISR) and hypersensitive response (HR). Salicylic acid (SA) is a signal for systemic resistance and lipopolysaccharides (LPS) elicit induced systemic resistance (ISR). Such inducers can also have plant growth promoting effects (PGPR) (Dong et al. 1999). Shrestha et al. (2003) isolated and identified microorganism which produced such plant growth promoters. Such elicitors were sprayed at regular time intervals and were studied for their effects on physiological properties and productivity.

Pioneer co., Ltd. is one of the best industrial body which has been producing such growth promoting microbial compounds in Korea. Moreover, we have attained both domestic and foreign patent for such products.

The substances which has induced systemic resistance was extracted from *Erwinia*. This substance induce wide spectrum of resistance in plant against the pathogens and also showed PGPR effect. The main purpose of this research was to develop the eco-friendly systemic resistance inducer and plant growth promoter substances which helps in the production nutritious and healthy agricultural products. Ultimately, to provide a safe, healthy and better quality food to the consumers.

Section 1. Screening of biological spectrum of systemic resistance inducer substance against different plant pathogens.

Variety of crops like industrial crop, vegetable crop, floriculture crops, fruit crops and are susceptible to various kinds of diseases. The effect of this systemic resistance

inducer was screened against these major plant pathogenic disease. The spectrum of disease induction resistance was showed by the crops treated with this substances. Thus, the possibility to use it practically as a biological pesticides was studied.

About 90% of world agricultural product as rice, wheat, corn and grain comes from South asia. South korea is also one of the major country for the production of rice. Rice is one of the main crop here. This important crop is susceptible to rice blast caused by *Pyricularia grisea* which is one of the severe disease in many regions of the world. This disease causes severe damage to rice crop. The systemic resistance inducer substance was used to test its induction to the rice crop so as to see if it could resist this severe disease at chuncheon, Gangwon Province. It was post treated in the rice paddy filed infested with the blast provided with nitrogen fertilizers. The results showed that this substance was 62.2% and 65% effective in inducing resistance of rice crop against rice blast respectively in two set of experiments. Also, the preventive and suppressive effect of this substance was dramatically seemed to be high. This results encouraged in the development of this substance as a effective bio-fungicides.

Due to this reason the development of the biological preventive and suppressive substance is of utmost necessity.

The disease severity index and biological control effect of the systemic resistance inducer substance was performed under green house conditions in a pot. The results showed that the control effect for this substance against pepper Phytopthera blight was 52.6% while disease severity index was found to be 39% whereas the plants non-treatment showed 82.3% disease severity.

Furthermore, filed test was carried out to see its bio-control efficacy against the pepper anthranose. Field test result for the first year showed its bio-control efficacy to be 51.5% and this substance was further subjected to formulations and named as Pi0802 the field test result for this formulation showed 56.2% bio-control efficacy in the following year. Thus, the overall bio-control efficacy of Pi0802 was found to be 50~60%.

Tobacco mosaic virus(TMV) is worldwide in distribution and can readily be transmitted by physical contact. TMV is one of the most stable plant viruses, capable of surviving on dried plant debris and roots of tomato and probably pepper for many years which causes necrosis on pepper leaves. Field test of sytemic resistance inducer substance

against TMV showed the prevention and suppression of the disease symptoms on necrosis and atrophy to be 61.6%.

The bio-control efficacy of the inducer substance was also seen against gray mold disease caused in the cucumber plant. The efficacy of this substance against gray mold was found to be 59.7% in comparison with the chemicals which showed the effect upto 81.7%.

Similarly, powdery mildew disease was also suppressed due to the systemic resistance inducer substance. The field test results showed that this substance showed 49.2% bio-control efficacy against the pathogen. Moreover, the product Pi0802 showed about 55.3%– 61.9% of the control effect preventing cucumber plant to be vulnerable to pathogen.

Systemic resistance inducer substance also showed the bio-control efficacy of 41.6% against downy mildew caused in cucumber. However, the suppression of disease was quite low and unsatisfactory thus more field experiments are to be carried out in future to confirm its effect against the pathogen.

Chinese cabbage is one of the most important plant grown in this area with a well known cultivation history. The production of cabbage is damaged by soft rot, however the treatment with the systemic resistance inducer substance was able to show 47.8% reduction against soft rot and 55.2% reduction against downy mildew.

Similarly, the bio-control efficacy of this substance against gray mold caused in strawberry, downy mildew caused in sweet melon, powdery mildew caused in pumpkin was found to be 54.9%, 50%, and 57.4% respectively.

Citrus canker is one of the most feared of citrus diseases, affecting all types of important citrus crops. The disease causes extensive damage to citrus and severity of this infection varies with different species and varieties and the prevailing climatic conditions. The disease is endemic in India, Japan and other South– East Asian countries, from where it has spread to all other citrus producing continents except Europe. Jeju do in korea has wide orchards of the citrus fruit and prone to citrus canker. The bio control efficacy test of this substance against citrus canker was carried out in the orchards of citrus fruit

crops. The result showed disease severity of about 12.7% for non treated plant and 5.4% disease severity was observed in plants treated with this substance. Moreover, bio-control efficacy of this substance against citrus canker was found to be 57.8%.

Likewise the effect of this substance against the pathogen bacterial hole shot casing damage to fruits like peach, apricot, was found to be 37.8% in the field test. However, in the orchards of these fruits bio-control efficacy of chemicals was found to be 55.8% . In comparison chemical efficacy of substance was found to be less. this may be due pathogen resistance to chemical and substance.

The preventive and suppressive effect of the substance against gray mold pathogen damaging ginseng field was observed. The ginseng seedlings were treated in 3 different ways. 1 Powder treatment, 2 Dipping treatment, 3 Soil treatment. Bio control efficacy of the substance varied according to the treatment methods. Ginseng seedling subjected to powder treatment showed 58.3~59.5% effect while the seedlings subjected to dipping treatment showed 55.2% effect against the gray mold suppression. Soil treatment was done after 10 days of seedling plantation at interval of two time, these seedlings also showed 51.2% efficacy against gray mold. result showed that the systemic resistance inducer substance can be used in eco friendly way as a bio-control agent.

Eustoma grandiflorum is one of the mostly used decorative floricultural crop. It is susceptible to both gray mold and *Sclerotinia* rot. The systemic resistance inducer substance was able to show bio-control efficacy up to 43.8% and 48.3% against gray mold and *Sclerotinia* rot respectively. the disease severity index shown was very low 11–20%. Further experiments should be carried out by different experimental design so as to obtain the better results.

Section 2. Mode of action of systemic resistance inducer

The mode of action of disease severity of cucumber gray mold was observed after 4 days and 14 days of the inducer substances treatment . After 4 days of treatment disease severity observed was found to be 12.4% whereas after 14 days it was found to be 96.4% in non treated plants. Moreover the CFU of the pathogen was performed using the leaf disc of the diseased plant. When the enzyme content of the treated and nontreated plant was subjected to analysis. Enzymes as peroxidase(POX) and glutathione

peroxidase(GPX) concentration was higher in treated plants than in non treated plants.

2 Research on pathogenicity related gene of the inducer substance.

SAR observed in the tobacco plant was confirmed by the pathogenicity gene analysis of the treated plant. After the protein treatment the PR gene expression was observed after 48hr. The expression of PR gene was more in the plant treated with the inducer substance.

After 36 hr and 48 hr of leaf treatment by the inducer substance Hypersensitive Response observed on the leaf surface was of lower concentration. Both wild and transgenic tobacco plant was treated with the substances and the reaction was observed. The vascular tissue of the treated plants were seemed be more in number and seen under SEM.

Section 3. 5 ton scale up fermentation and post-operation technology development

Systemic inducer substance was subjected to mass production at 5 ton scale up fermenter. The production of the substance was carried out by fermentation step up process. earlier from 500L of the input the final product of the substance obtained was 2.4g/l. However, we developed the improved process of producing the substance which was quite economical and productive as the later technique we developed could produce 2.51g/L of the substance. This showed the later technique developed was economical and reliable.

Section 4. Biochemical characterization of systemic inducer substance in various crops

The systemic inducer substance showed 20% enhancement of rice seed germination. moreover, the PGRP and fresh weight of rice plant was found to be higher yielding a better harvest.

Treatment of systemic inducer substance in different horticulture crops was studied. Cucumber plant treated with this substance showed better crop harvest and PGRP effect by 11.3% was also better than the non treated plant. Moreover, inorganic ion content like N, P, K Mg and Ca level was also higher than the standard ATCC strain resulting in better photosynthesis rate, conductivity of ion and higher chlorophyll content.

Treatment of the systemic resistance substance on pepper plant also increase the pepper yield, better PGPR and increased the photosynthetic rate, stomatal conductivity and chlorophyll content in the pepper plant.

Similarly, strawberry plant showed higher sucrose contents beside all the above mentioned increments in the crop control. Moreover, it can be used as commercial product as a better yield in its coloration, inorganic ion content and healthy growth.

Characteristic survey of the ginseng on the systemic resistance inducer. The effect of the systemic resistance inducer on ginseng was also found to be better. It showed better PGPR and better harvest rate than the non treated plant.

Systemic induce resistance system and as growth promoter in lilies. Use of this substances at 10ppm and 40ppm helps in the growth of plant stem. It increased the length of plant. In addition biochemical analysis of stem showed the calcium, magnesium content increment in comparison to potassium and phosphorous.

Section 5. Development of quality control method for systemic resistance inducer

This substance quality was observed using both qualitative and quantitative method. The qualitative method used was SDS-PAGE analysis and quantitative method used were HPLC and HR- test.

Section 6. Stability analysis of mixed agricultural material and the systemic resistance inducer

Analysis of the stability of this substance together with the different fungicide and pesticide has been observed. This substances showed more than 80% of the disease resistance when used together with disinfectant and insecticide. In addition a total 12 different ingredients mixed fertilizer component also showed the reliability in its use.

Section 7. Characterization of toxicity of systemic resistance inducer

1. Characterization of toxic material of systemic inducer substance

- a. Acute oral toxicity of systemic inducer substance protein in mice
LD50 = 2,500 mg/kg B.W.
 - b. Acute dermal toxicity of systemic inducer substance protein in rat
LD50 = 2,000 mg/kg B.W.
 - c. Delayed hypersensitivity test of systemic inducer substance protein in guinea pig
Weak
 - d. Eye irritation test of systemic inducer substance protein in rabbit
AOI = "6.00", None
 - e. Skin irritation test of systemic inducer substance protein in rabbit
None
 - f. Micronucleus test of systemic inducer substance
Not-caused
 - g. Bacterial reverse mutation test of systemic inducer substance
Not-caused
 - h. Acute immobilization test of systemic inducer substance
24h, 48h EC₅₀ = 100.0 mg/L
 - i. Chromosome aberration test of systemic inducer substance
Not-caused
 - j. Acute fish toxicity test of systemic inducer substance
48h, 96h EC₅₀ = 10.0 mg/L
2. Characterization of toxic material of formulation product
- a. Delayed hypersensitivity test of formulation product in guinea pig using Buehler method
"0" and "0%", Weak

- b. Acute oral toxicity of formulation product in ICR mice
LD50 = 2,500 mg/kg B.W.

- c. Acute dermal toxicity of formulation product in SD rat
LD50 = 2,000 mg/kg B.W.

- d. Skin irritation test of formulation product in rabbit
None

- e. Eye irritation test of formulation product in rabbit
AOI = "6.00", None

CONTENTS

Summary	2
Chapter 1. Introduction	23
Section 1. Purpose and significance of the research	23
1. Background of the research	23
2. Requisite of the research	24
Section 2. Contents and scope of research	25
1. Aim of the proposed research	25
2. Contents of research	26
3. Expected effects on research	26
Chapter 2. Current situation and problems in domestic foreign technology	27
Section 1. Development of biological pesticides	27
Section 2. Development of technology in foreign–domestic level	30
Chapter 3. Research contents and results	34
Section 1. Genetic and biological characterization of systemic resistance inducer and its industrialization	34
1. Screening of biological spectrum of systemic resistance inducer substance against different plant pathogens	34
a. Rice crop	34
(1) Rice Blast	34
b. Horticultural crops	36
(1) Pepper	36
(a) Phytophthora blight	36
(b) Anthranose	37
(c) Virus (TMV)	40
(2) Cucumber	41
(a) Gray mold	42
(b) Powdery mildew	44
(c) Downy mildew	47

(3) Cabbage	48
(a) Downy mildew	49
(b) Soft rot	49
(4) Other horticultural crops	51
(a) Strawberry (Gray mold)	51
(b) Sweet melon (Downey mildew)	51
(c) Pumpkin (Powdery mildew)	52
c. Fruit crops	53
(1) Orange (citrus canker)	53
(2) Peach (bacterial shot hole)	54
d. Industrials crops	56
(1) Gingseng (Gray mold)	56
e. Floricultural crops	58
(1) Eustoma grandiflorum (Gray mold/Sclerotinia rot)	58
2. Mode of action on systemic resistance inducer	60
a. Disease suppression mechanism of cucumber gray mold	60
(1) Suppression of gray mold disease	60
(2) Induction of resistance in the suppression of growth	61
(3) Enzyme induction due to systemic resistance inducer	62
b. Research of biological molecules	64
(1) PR1 gene expression analysis	64
(2) Hypersensitive reaction	67
(3) Characterizations of systemic resistance inducer	69
3. 5 ton scale up fermentation and post-operation technology development	72
a. 50L ~ 500L scale fermenter techniques arrangement	72
b. Reliability and factor analysis	74
(1) Application of 5 ton scale fermenter	74
(2) Mass production of the systemic resistance inducer in the stable condition	76
c. Manufacturing costs	76
(1) Cost savings through the simplification process	76
(2) Unit cost savings through the improvement of the industrial media	77
d. Cultivation process efficiency	79

(1) Efficiency of processing 5 ton scale fermenter using improved process and media	79
(2) 5 ton scale of fermented reproducibility	80
e. Efficiency of post-operation equipment	80
(1) Centrifugation	81
(2) Sonicate cells and Extract	81
(3) Enrichment process	83
(4) Drying process	84

**Section 2. Biochemical characterization of systemic inducer substance
in various crops and Stability analysis
of mixed agriculture materials**

1. Biochemical characterization of the systemic resistance inducer	86
a. Rice crop	86
(1) Germination rate	86
(2) PGPR effect of rice seedling	87
(3) Harvest rate	88
b. Horticultural crops	88
(1) Test for change in biochemical characteristics cucumber	88
(2) Test for changes in biochemical characteristics pepper	92
(3) Test for changes in biochemical characteristics strawberry	99
c. Industrials crops	103
(1) Test for change in biochemical characteristics ginseng	103
d. Floricultural crops	104
(1) Test for the lilies of the growth characteristics	104
2. Analysis of systemic resistance inducer	106
a. Extraction and analysis of existing systemic resistance inducer	106
b. Monitoring of recovery rate	108
c. Improvement on the extraction	109
(1) Preprocessing	109
(2) Simplified of Ultra filtration	111
d. Development of quality control method	114
3. Stability analysis of mixed agriculture material	118
a. Combination of chemical pesticides stability analysis	118
(1) Stability analysis of mixed fungicides	118
(2) Guidelines of mixed fungicides	119

(3) Stability analysis of mixed pesticides	122
(4) Guidelines of mixed pesticides	122
b. Stability analysis of mixed fertilizer	123
c. Stability analysis of mixed eco-friendly materials	124
4. Manufacture eco-friendly cultivation manual and education material	125

Section 3. Characterization of toxicity of systemic resistance inducer 131

1. Characterization of toxic material of systemic inducer substance	131
a. Acute oral toxicity of systemic inducer substance protein in mice	134
b. Acute dermal toxicity of systemic inducer substance protein in rat	137
c. Delayed hypersensitivity test of systemic inducer substance protein in guinea pig	137
d. Eye irritation test of systemic inducer substance protein in rabbit	139
e. Skin irritation test of systemic inducer substance protein in rabbit	144
f. Micronucleus test of systemic inducer substance	147
g. Bacterial reverse mutation test of systemic inducer substance	157
h. Acute immobilization test of systemic inducer substance	163
i. Chromosome aberration test of systemic inducer substance	166
j. Acute fish toxicity test of systemic inducer substance	170
2. Characterization of toxic material of formulation product	174
a. Delayed hypersensitivity test of formulation product in guinea pig using Buehler method	174
b. Acute oral toxicity of formulation product in ICR mice	175
c. Acute dermal toxicity of formulation product in SD rat	175
d. Skin irritation test of formulation product in rabbit	176
e. Eye irritation test of formulation product in rabbit	176

Chapter 4. Attainability of research goal and contribution to related field	178
--	------------

Chapter 5. Application of research results	180
---	------------

Chapter 6. References	182
------------------------------------	------------

목 차

요 약 문	2
제 1 장 연구개발과제의 개요	23
제 1 절 연구개발의 목적과 필요성	23
1. 연구의 배경	23
2. 연구개발의 필요성	24
제 2 절 연구개발의 내용 및 범위	25
1. 최종연구목표	25
2. 연구개발의 내용	26
3. 연구개발에 따른 기대효과	26
제 2 장 국내외 기술개발 현황	27
제 1 절 생물농약의 기술개발 현황	27
제 2 절 연구개발 대상 기술의 국내·외 현황	30
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	34
제 1 절 전신저항유도 물질의 생물학적·유전학적 특성 분석 및 산업화	34
1. 다양한 작물에 대한 전신저항성유도물질의 병 방제 스펙트럼 조사 및 분석	34
가. 수도 작물에 대한 생물활성 검정	34
(1) 벼잎도열병	34
나. 원예 작물에 대한 생물활성 검정	36
(1) 고추에 대한 전신저항성유도물질 효과검정	36
(가) 고추 역병	36
(나) 고추 탄저병	37
(다) 고추 바이러스병	40
(2) 오이에 대한 전신저항성유도물질 효과검정	41
(가) 오이 잿빛곰팡이병	42
(나) 오이 흰가루병	44
(다) 오이 노균병	47
(3) 배추에 대한 전신저항성유도물질 효과검정	48
(가) 배추 노균병	49

(나) 배추 무름병	49
(4) 기타 원예작물에 대한 전신저항성유도물질 효과검정	51
(가) 딸기 잿빛곰팡이병에 대한 생물활성검정	51
(나) 참외노균병에 대한 생물활성검정	51
(다) 호박 흰가루병에 대한 생물활성검정	52
다. 과수에 대한 생물활성 검정	53
(1) 감귤궤양병에 대한 생물활성 검정	53
(2) 복숭아세균성구멍병에 대한 생물활성 검정	54
라. 특용작물에 대한 생물활성 검정	56
(1) 인삼에 대한 생물활성 스펙트럼 조사	56
마. 화훼류에 대한 생물활성 검정	58
(1) 꽃도라지에 대한 생물활성 검정	58
2. 전신저항성유도물질의 작용기작(mode of action) 구명	60
가. 전신저항성유도물질 처리에 의한 오이 잿빛곰팡이병의 발병억제 기작연구	60
(1) 잿빛곰팡이병에 대한 발병억제	60
(2) 전신저항성유도물질 처리업에서의 균사생장 억제 연구	61
(3) 전신저항성유도물질 처리에 따른 효소활성 측정	62
나. 전신저항성유도물질의 분자생물학적 작용기작 연구	64
(1) PR1 유전자 발현 분석	64
(2) 과민성반응 유도 유전자 연구	67
(3) 전신저항성유도물질의 병저항성 작용 특성 분석	69
3. 5톤 이상의 scale에서 대량 배양 및 후공정 기술 개발	72
가. 기존의 50L ~ 500L 수준의 배양 기술 정리	72
나. 안정성 확보를 위한 요인 분석	74
(1) 기존 배양법의 5톤 적용	74
(2) 미생물의 배양 체계 및 전신저항성유도물질의 안정적 생산	76
다. 생산단가 절감법	76
(1) 공정의 단순화를 통한 단가 절감	76
(2) 생산용 배지의 개선을 통한 단가 절감	77
라. 5톤 발효기를 이용한 배양 공정 효율성 점검	79
(1) 개선된 공정과 배지를 이용한 5톤 배양 공정의 효율	79
(2) 5톤 발효 공정 재현성 검정	80
마. 후공정 기기 사용 효율 검정	80
(1) 여액 분리	81

(2) 세포 파쇄·추출	81
(3) 농축공정	83
(4) 건조공정	84
제 2 절 전신저항성유도 물질의 생화학적 특성 분석	
및 타농자재와의 혼용안정성 분석	86
1. 전신저항성유도물질의 작물에 대한 생화학적 특성 분석	86
가. 수도작에 대한 전신저항성유도물질의 생화학적 특성 변화 영향 분석	86
(1) 벼의 발아율 점검	86
(2) 벼의 육묘 생육 촉진 효과	87
(3) 벼의 수확량	88
나. 원예작물에 대한 전신저항성유도물질의 생화학적 특성 변화 영향 분석	88
(1) 오이에 대한 생화학적 특성변화 시험	88
(2) 고추에 대한 생화학적 특성변화 시험	92
(3) 딸기에 대한 생화학적 특성변화 시험	99
다. 특용작물에 대한 전신저항성유도물질의 생화학적 특성 변화 영향 분석	103
(1) 인삼에 대한 생육특성 변화 시험	103
라. 화훼류에 대한 전신저항성유도물질의 생화학적 특성 변화 영향 분석	104
(1) 백합에 대한 생육특성 변화 시험	104
2. 전신저항성유도물질 분석법 개발	106
가. 기존의 추출 및 정제법 분석	106
나. 각 단계별 회수율 점검	108
다. 추출정제법의 개선	109
(1) 조추출물의 전처리 개선	109
(2) Ultra filtration의 단순화	111
라. 전신저항성유도물질의 분석방법 개발	114
3. 타농자재와의 혼용 안정성 분석	118
가. 화학농약 혼용 안정성 분석	118
(1) 살균제와 혼용시 수용액상에서의 안정성 검토	118
(2) 살균제와 혼용시 경시적·활성적 안정성 검토를 통한 혼용가부표 작성	119
(3) 살충제와 혼용시 수용액상에서의 안정성 검토	122
(4) 살충제와 혼용시 경시적·활성적 안정성 검토를 통한 혼용가부표 작성	122
나. 화학비료 혼용 안정성 분석	123
다. 친환경농자재 혼용 안정성 분석	124

4. 친환경 재배력 작성 및 교육자료 제작	125
제 3 절 전신저항성유도물질의 독성학적 특성 분석	131
1. 전신저항성유도물질 원제의 인축과 환경에 대한 독성학적 특성 분석	131
가. 마우스에 대한 전신저항성유도 단백질의 급성경구독성시험	131
나. 랫드에 대한 전신저항성유도 단백질의 급성경피독성시험	134
다. 기니픽에 대한 전신저항성유도단백질의 피부감작성시험	137
라. 전신저항성유도 단백질의 토끼에 대한 안점막자극시험	139
마. 전신저항성유도 단백질의 토끼에 대한 피부자극시험	144
바. 전신저항성유도물질 원제에 대한 소핵시험	147
사. 전신저항성유도물질 원제에 대한 미생물복귀돌연변이시험	157
아. 담수무척추동물에 대한 전신저항성유도물질의 급성유영저해시험	163
자. 전신저항성유도물질 원제에 대한 염색체이상시험	166
차. 잉어(Cyprinus carpio)에 대한 전신저항성유도물질의 급성어독성시험	170
2. 전신저항성유도물질 제품의 인축과 환경에 대한 독성학적 특성 분석	174
가. 기니픽에 대한 전신저항성유도물질 제품의 Buehler법을 이용한 피부감작성시험	174
나. ICR 마우스에 대한 전신저항성유도물질 제품의 급성 경구투여 독성시험	175
다. SD 랫드에 대한 전신저항성유도물질 제품의 급성 경피투여 독성시험	175
라. New Zealand White 토끼에 대한 전신저항성유도물질 제품의 피부자극시험	176
마. New Zealand White 토끼에 대한 전신저항성유도물질 제품의 안점막자극시험	176
 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	 178
 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	 180
 제 6 장 참고문헌	 182

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적과 필요성

1. 연구의 배경

우리 농업은 좁은 국토에서 많은 인구를 부양하기 위하여 그동안 화학비료와 농약을 많이 사용하는 고투입 농법에 의존해 왔다. 이로 인해 농경지의 염류집적, 인산카리함량 증가, 미생물 감소 등 토양양분 불균형과 유기물 함량감소 등 지력쇠퇴로 농작물의 병해충에 대한 저항성을 크게 약화시켰고, 병해충 방제를 위해 농약을 과다 사용하는 등 악순환이 반복되었다. 아울러 과다 투입된 농약 및 화학비료는 토양에 축적되거나 하천에 유입됨으로써 안전한 농산물을 생산하는데 저해요인이 될 뿐만 아니라 수질오염의 원인이 될 수 있다. 최근 우리 농업 전반으로 농약과 화학비료 사용량이 감소하고 있는 추세이기는 하나 그 감소폭은 완만한 상황이고, 생활의 질이 향상됨으로써 친환경농업의 확산과 아울러 화학농약 및 비료의 사용량 절감이 제시되고 있다. 합성농약은 약효성이 우수하고, 선택성이 탁월하여 농산물 재배에 없어서는 안 될 약으로 인식하여 왔으나 사용량, 사용방법 그리고 사용 시기 등을 적절하게 이용하지 못하여 환경오염 원인중의 하나로 일부지탄의 대상이 되고 있다. 따라서 작물 재배시에 오용이나 남용시에도 아무런 피해가 없는 환경 친화적이며 무해한 대체 약을 요구하고 있다.

현재 일반적으로 사용하고 있는 화학비료나 농약은 국, 내외적으로 절대빈곤시대를 효과적으로 극복할 수 있었던 성공 요인 중 하나였으며, 토양 및 종자소독으로부터 작물의 발아와 성장 및 결실에 이르는 긴 과정을 통하여 병해충 및 잡초에 의한 피해를 방지하며, 수확물 저장 중에도 이들로부터 입는 손실을 막아주는 중요한 기능을 수행해오고 있다. 그러나 최근 우리 생활 속에 깊숙이 자리 잡고 있는 웰빙과 환경문제에 대한 관심이 높아지고 있는 가운데, 농업분야에서도 친환경농업을 추천 장려하고 있으며, 비료나 농약의 과다사용이 사람에게 미치는 영향에 대한 우려와 동시에 농약살포에 의한 환경 영향이 문제가 되어 환경을 배려한 친환경 농약 개발에 대한 관심이 매우 높은 실정이다.

국내 농업시장은 국내의 경우 만해도 2조원, 세계적으로 볼 때는 천문학적 수준의 시장성으로 의약개발과 함께 가장 확실한 수익이 보장된 분야 중의 하나라고 할 수 있다. 그러나 신농약 및 첨단 친환경자재를 산업화하기 위해서는 국제적으로 경쟁력을 지닌 물질의 개발을 비롯하여 충분한 연구비, 장기간의 연구 및 등록기간과 시대적 상황을 모두 충족시켜야 하기에 국내의 주요 회사조차도 개발자체보다는 외국에서 이미 개발된 농약을 고가의 royalty를 지불한 원제의 형태로 수입하여 판매를 하고 있다. 이러한 '자체기술개발보다는 개발된 원제의 수입 및 판매'라는 국내 농약시장의 유통구조는 그 동안 국내 경제논리에 잘 부합되어 농약회사와 자재관련 무역회사가 큰 수익을 올릴 수 있었다. 하지만, WTO등의 출범으로 세계화가 시작하면서 한국에 원자재를 공급하였던 외국회사들이 이제는 직접 한국으로 진출한 후 자체 판

매망을 통하여 판매를 시작하는 시기를 맞고 있다. 이러한 시대적 변화로 인하여 앞으로는 새로운 바이오 자재를 개발하여 자기회사의 고유제품을 생산하지 못할 경우에는 국내 시장에서의 생존권을 위협받을 것이 분명하다. 한편, 친환경농업의 육성과 저탄소 녹색 산업의 육성으로 통하여 2013년까지는 화학농약과 화학비료 사용량을 40%이상 줄이는 것이 의무화되고 있고 소비자 역시 청정농산물을 선호하는 것이 시대적 상황이다. 따라서 차세대에는 환경 친화적 특성을 지닌 농약-즉 안정성이 보장되면서도 우수한 농작물을 생산하는데 도움을 줄 수 있는 농업 바이오자재를 개발하는 회사들만이 치열한 경쟁사회에서 생존할 수 있다고 생각된다.

2. 연구 개발의 필요성

- 국제농업기구 (FAO)에서는 “농약의 유통과 사용에 관한 국제행동규범”명으로 농약수출 가이드라인을 마련하여 화학 농약의 부작용을 줄이고자 노력하고 있음
- 전 세계적으로 각 국가는 유기 합성 화학 농약의 사용량을 감축하고 안전한 농산물을 생산하기 위하여 친환경적인 농약의 개발과 생산에 지원을 아끼지 않고 있음
- 우리나라 역시 친환경농업육성책의 발표를 통하여 정책적으로 화학농약의 사용량을 40% 감축하고 전체농산물 생산량 대비 친환경농산물 비중을 대폭 확대 추세
- 화학 농약의 오남용 및 잔류 독성, 인축독성에 대한 시민단체의 감시는 지속적으로 강화되고 있으며, 유기농산물이나 친환경 농산물에 대한 국민들의 관심과 요구가 증가
- 소비자 역시 환경의식이 높아지고 있으며 먹을거리에 대한 공급의 안정성보다는 먹을거리 자체의 전성에 더 많은 관심을 나타내고 있고 친환경 농산물의 수요도 점차 증가 추세
- 특히, 잘 먹고 잘 살자는 well-being 시대에 따라 소비자의 기호도 변하여 먹을거리를 선택하는 기준도 양(Quantity)에서 질(Quality)적인 측면을 강조
- 한편 경작자들도 농약을 사용한 자신들의 경작 방법에서 소비자의 심리와 국가 정책 방향에 따라 화학적 농법에서 친환경적인 농법으로의 전환에 대하여 그 필요성을 인식하나 안정한 생산량의 확보를 이유로 쉽게 시도하지 못하고 있는 실정임
- 농민들은 저가의 친환경농자재를 검증 없이 사용하고 있으며, 일부 불량 무자료 농자재에 의하여 약해나 피해와 같은 치명적인 피해를 받는 사례 증가

- 기존의 친환경농자재의 경우 일정한 관리법이 존재하지 않아 방제효과와 부수적인 효과에 대하여 신뢰성이 낮고 오용과 남용에 의한 피해 농민이 다수 발생
- 약효적인 측면과 독성적인 측면에서 안정성과 안전성이 보장되면서도 우수한 농작물을 생산하는데 기여할 수 있는 환경 친화적인 신규 농약의 생산과 보급이 절실한 상황임
- 이는 병해충 방제와 관련한 무자료 농자재의 유통을 합리적으로 법의 테두리 안에서 관리하여 농민의 피해를 줄이고 하는 정부의 노력을 보여주고 있음
- 합성 농약으로 식물의 유도저항성을 발생하는 비온[®]의 경우, 만코제브[®]와 혼합 시, 만코제브의 투여량을 75% 경감에 성공(신젠타: 비온-엠[®])
- (주)파이오니아에서는 국내 최초로 전신저항성유도물질의 원천기술을 보유하고 있으며 이미 국내 및 국외 특허 출원·등록 완료
- 따라서 (주)파이오니아, 강원대 그리고 한국화학시험연구원은 본 과제를 통하여 국내 최초로 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질의 생물 활성적, 생화학적, 독성학적 특성을 분석하여 실용화하고 생물 농약 등록을 위한 자료로 사용하고자함

전신저항성유도물질의 특성

- 전신저항성유도 물질은 천연물질이며 무독성임
- 유기 분자체이므로 자연에서 분해가 잘되며 잔류성이 없음
- 식물에 전신저항성을 유도하여 대부분의 병원균에 대하여 강한 저항성을 나타내는, 매우 넓은 작용범위(spectrum)를 가지고 있음
- 병해충 방제뿐만이 아니라 식물생육촉진 효과, 수확기 단축, 고품질 농산물 생산 등을 유도하는 성장촉진효과가 매우 우수
- 간접적 작용 특성을 갖고 있으므로 오용이나 남용에 의한 저항성 및 내성 발달에 문제점이 전혀 없어 지속적 반복 사용 가능

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

1. 최종연구목표

본 사업의 목적은 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질의 생물학·생화학적·

독성학적 특성을 규명하여, 국내 최초로 전신저항성유도물질을 실용화하는 것이다.

2. 연구개발의 내용

◎ 제 1세부과제 (파이오니아)

- 다양한 작물에 대한 전신저항성유도물질의 병방제 스펙트럼 조사(수도, 인삼, 원예작물 및 과수, 화훼) 및 분석

- 전신저항성 유도물질의 생화학 및 유전학적 작용기작(mode of action) 구명

- 산업화 수준의 대량 배양 완료(5톤-10톤) 및 후공정 기술 개발

◎ 협동과제 (강원대학교)

- 전신저항성유도물질의 작물(벼, 인삼, 원예작물, 및 과수, 화훼)에 대한 생화학적 특성 분석

- 전신저항성유도물질 분석법 개발

- 전신저항성유도물질과 타농자재(농약, 비료 및 친환경농자재)와의 혼용 안정성 분석

◎ 위탁과제 (화학시험연구원)

- 전신저항성유도물질 원제의 인축과 환경에 대한 독성학적 특성 분석

- 전신저항성유도물질 제품의 인축과 환경에 대한 독성학적 특성 분석

3. 연구개발에 따른 기대효과

○ 국내 최초로 토착 미생물 유래 전신저항성유도 물질의 상용화

○ 전신저항성유도물질 제품의 보호 및 선점시장 확보

○ 친환경 농자재로 사용가능하여 국내 유기 및 친환경농산물 생산에 활용

○ 수출을 통한 해외시장 개척

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 생물농약의 기술개발 현황

1. 기술개요

지난 100년간 급격한 세계인구 증가로 인하여 지구상의 전 인류는 식량 확보라는 문제에 직면하게 되었고, 이를 해결하기 위한 방법으로 병충해, 잡초 방제기술 개발, 품종개량, 토양비옥도 증진 등을 이용하여 꾸준히 식량의 증산을 이루어 왔다. 그 중에서도 화학 합성농약을 이용한 병충해 및 잡초 방제는 농업생산 증대에 없어서는 안 될 중요한 요소로 인식되어 왔으며, 국내외 사용량은 계속 증가되고 있다. 그러나 지속적인 화학 농약 사용과 오남용으로 인한 농업환경 오염, 인체에 대한 독성과 약제 저항성 병균, 해충의 발생으로 인한 방제효과 감소 등 여러 가지 문제점이 계속 제기되고 있으며, 이러한 화학 농약사용의 문제점을 줄이기 위해 생물학적 방제법이 대안으로 제안되어져 왔다.

이러한 생물학적 방제법의 가장 많은 연구와 사업화가 되어 있는 것이 생물농약 시장이라 할 수 있다. 생물농약이란 세균, 곰팡이, 바이러스 및 원생동물 등의 살아있는 미생물을 인위적인 합성, 조작 등을 거치지 않은 상태로 제품화하여 농작물(수목 및 농·임산물)을 해하는 곤충·응애·선충·균·바이러스·잡초 등 동·식물의 방제에 사용하거나 농작물의 생리기능을 증진·억제하는데 사용하는 약제를 말한다. 다시 말하여 미생물로부터 생산된 항균물질이 병원균의 생육을 억제하거나 식물에 기생하여 병을 일으키는 식물병원균에 미생물이 기생하여 병원균을 괴사하는 작용기작 등이 있다. 또한 식물의 면역력을 높이는 저항성 유도등의 방법이 있다.

생물농약은 기존에 사용되었던 화학농약에 비해 안전성이 확보된 미생물을 원료로 하여 인체 및 환경에 대한 독성이 없거나 그 수준이 매우 낮으며, 연용 사용 시에도 잔류성이나 내성발생, 약해가 거의 없어 지속적인 친환경 농업의 실천에 매우 적합한 자재로 평가받고 있다. 또한 다른 방제원간의 혼용이 가능하며 식물이 받는 스트레스가 거의 없는 특징이 있다.

2. 국내기술동향

미생물 자체를 이용하거나 미생물이 생산하는 생리활성물질에 대한 국내의 연구 및 개발은 외국에 비해 30~50년 뒤늦은 1980년대에 기초적 연구가 수행되어 왔으며 최근에 체계적인 연구실과 전문가들에 의해 꾸준한 노력에 따라 연구역사에 비해 연구수준은 많이 향상되어 좋은 결과가 이루어지고 있다. 미생물자체를 이용하여 병해방제용으로 연구된 것으로는 1985년부터 국가연구기관 및 대학의 병리학자를 주축으로 담배의 모자이크병(TMV), 세균성마름병(Bacterial wilt), 오이의 시들음병(Fusarium wilt), 고추의 역병(Phytophthora blight), 딸기의 시들음병, 눈마름병(Rhizoctonia bud rot), 사탕무우의 잘록병(Damping-off), 벼의 도열병, 문고

병 방제등에 관한 연구가 보고되어 있다(표 1).

표 1. 국내에서 미생물에 의한 각종 작물병해 방제 연구

작 물	대 상 병	미생물 종류	보고년도
Tobacco	TMV	Virulence virus	'85
	Bacterial wilt	Non pathogenic <i>P. solanacearum</i>	'85
Cucumber	Fusarium wilt	Rhizosphere antagonists	'87
		<i>Pseudomonas gladioli</i>	'92
		Non pathogenic strain of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	'93
		<i>Gliocladium virens</i> <i>Pseudomonas putida</i>	'95
Red pepper	Phytophthora blight	<i>Bacillus</i> sp.(AC-1)	'86
		<i>Pseudomonas cepacia</i>	'88
		<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Enterobacter agglomerans</i>	'89
		Non pathogenic strain of <i>Phytophthora capsici</i>	'92
Strawberry	Fusarium wilt	<i>Trichoderma</i> sp.	'88
		<i>T. harzianum</i>	'95
		<i>Pseudomonas gladioli</i>	'90
	Rhizoctonia bud rot	Antagonistic microorganisms	'94
Sugar beet	Damping-off	<i>Pseudomonas</i> sp.	'88
Rice	Blast, sheath blight	<i>Pseudomonas</i> sp.	'90

(병해의 생물적방제와 생물농약, 농업과학기술원 병리과 최용철)

현재 정식 등록된 생물농약의 경우 미생물 살균제가 13종, 미생물 살충제(Bt제 제외)가 4종으로 미생물 살균제에 주로 치중되어 있는 경향이 있으며 미생물 살충제의 경우 대부분이 *Bacillus thuringiensis* 균주 제품이다. 또한 2004년 이후 기존에 화학농약으로 분류되었던 Bt제가 미생물농약에 포함됨으로써 국내 생물농약시장은 크게 미생물 살균제 시장과 Bt제 중심의 미생물 살충제 시장으로 양분되는 경향을 보이고 있다. 미생물 살균제는 주로 세균을 원제로 사용한 제품이 많으며 농업과학기술원의 특허균주인 흰가루병 중복기생균을 이용한 제품인 '큐팩트' 등 곰팡이 원제의 살균제가 소수 상용화되어 있다.

세균 원제의 제품은 현재 가장 활발히 개발·등록되고 있으며 잔디 라지벳취에 높은 효

능을 보이는 *Bacillus subtilis* CJ-9균주((주)그린바이오텍), 토마토폏마름병에 약효가 있는 *Bacillus amyloliquifaciens* KBC1121 균주((주)한국바이오케미칼), 고추 흰가루병에 약효가 있는 *Bacillus subtilis* DBB1501 균주(동부하이텍(주)) 외에 다수가 등록 중에 있다.

곰팡이 원제의 미생물 살균제는 미국이나 유럽처럼 다양한 제품이 개발되어 있지는 않으나 현재 많은 연구기관에서 시험을 진행하고 있으며 수년 내에 다양한 제품이 등록될 것으로 전망된다. (주)그린바이오텍에서는 잣빛곰팡이병에 우수한 항균효과를 보이는 곰팡이인 *Acremonium strictum* BCP균주를 한국화학연구원과 공동연구를 통해 상용화 진행하고 있으며 동부하이텍(주)에서는 오이 흰가루병에 항균효과를 보이는 곰팡이인 *Trichoderma virens*- 13-DBB2007 균주를 상용화 진행 중에 있다.

미생물살충제는 기존에 화학농약으로 등록되었다가 최근 생물농약으로 등록 변경된 Bt제가 대다수를 차지하고 있다. 이들 Bt제의 경우 기존에는 대부분 원제를 수입하여 판매하고 있었으나, ‘솔빛채’(*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* GB413,(주)그린바이오텍)및 토박이(*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* YNT423, 동부하이텍(주))의 경우 순수 국내에서 분리한 균주를 이용하여 국내 기술로 제조한 제품으로, 해외 제품과 비등한 효능을 보이고 있다. 현재 Bt제 외에도 (주)KIBC 등에서 세균 원제의 신규한 미생물 살충제를 개발 중이다.

곰팡이 기반의 미생물 살충제는 외국의 경우 *Verticillium* sp. 등이 매우 광범위하게 사용되고 있으나 국내 실정상 널리 보급되지는 못하고 있다. 현재 몇몇 기업에서 곰팡이를 원제로 한 미생물 살충제를 개발하고 있으며 친환경 농업시장이 성장함에 따라 시장 규모도 확대될 것으로 기대된다.

미생물 제초제는 아직까지 낮은 실용성으로 인해 농약으로 등록된 예는 없다. 그러나 최근 작물과학원 영남농업연구소에서 잔디밭의 주요 잡초인 클로버에 대한 미생물 제초제를 세계 최초로 개발하여 현재 상용화 단계에 있다. 또한 *Epicoccosorus* 균주를 이용하여 올방개를 방제할 수 있는 미생물 제초제 개발 및 기타 다양한연구가 활발히 진행되고 있다.

3. 해외기술동향

현재 전세계적으로 등록된 생물농약이 188여종으로 알려져 있는데 이중에서 살충제가 135종(75%), 살균제가 29종, 제초제가 10종, 식물생장조절제와 기타가 각각 7종을 차지하고 있다. 생물농약의 개발은 비교적 소규모 회사들을 중심으로 이루어지고 있고, 미생물 생균을 이용하거나 미생물에서 유래한 물질을 이용한 개발이 주요 특징이라 할 수 있다.

미생물을 이용한 병해 방제시도 연구는 1927년 미국에서 감자 더뎡이병 방제용으로 방선균을 이용한 것이 최초이며, 1960년 이후부터 농약의 형태로 실용화되기 시작하였고, 일본에서는 1962년에 담배 허리마름병에 *Trichoderma* 생균 제제를 시초로 이후에 많은 제품이 미국에서 개발되었으며 대부분의 실용화 제품이 육묘중 발생하는 묘갈록병 방제용으로 개발되었음이 주목된다(표 2).

병해 방제용 생물농약 중 가장 획기적인 성공 제품으로는 각종 작물 특히 다년생 목본류

의 뿌리에 발생되고 있는 뿌리혹 세균병(Crown gall)에 길항미생물인 *Agrobacterium radiacter* strain 84 및 K1026균주를 이용한 Galltrol, Dygall, Nogall, Bakuterozu 제품이 있다. 현재의 유기합성농약이 모든 세균병에 효과가 저조하나 특히 뿌리혹 세균병은 유기합성농약 효과를 전혀 볼 수 없는데 비해, 이 생물농약은 확실한 효과를 나타내어 우수한 방제제로 이용되고 있다.

표 2. 병해방제용 미생물 살균제 실용화 생물농약

미생물	이 용 균 주	대 상 병 해	상 품 명	등록국(년)
세 균	<i>Agrobacterium radiobacter</i> strain 84	Crown gall	Galltrol Bakuterozu Dygall	USA('79) Japan('89) Canada
	<i>A. radiobacter</i> K1026	Crown gall	Nogall	Australi
	<i>Bacillus subtilis</i>	Seedling root diseases Infection seed-born	Quantum 4000 GUS 2000	USA USA
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Seedling root	Blue circle	USA
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> EG-1053	Damping-off	Dagger G	USA('88)
	<i>Streptomyces griseovirides</i>	Damping-off(Fusarium, Alternaria etc.)	Mycostop	USA
곰팡이	<i>Gliocladium virens</i> GL-21	Dampint-off (Rhizoctonia, Pythium)	WRC-GL-21-WRC- AP-1	USA('90)
	<i>Pythium ligandam</i>	Sugar beet disease	Polygandron	Czechoslovakia
	<i>T.harzianum</i> Rifaistrain KRL-AG 2	Damping-off (Pythium)	F-Stop	USA
	<i>T. harzianum</i> /polysporum	Wood-decaying fungus	Binab™ T	USA
	<i>T. lignorum</i>	Southern blight Sore shin(Tobacco)	Trichoderma (spore)	Japan('62)
	<i>Trichoderma viridae</i>	Verticillium in mushroom Plum silver leaf disease	BINAB T SEPPIC BINAB	France UK

(병해의 생물적방제와 생물농약, 농업과학기술원 병리과 최용철)

제 2 절 연구개발 대상 기술의 국내·외 현황

1. 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	●	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

- 세계 각국은 환경에 대한 악영향을 최소화하기 위하여 저투입·고효율의 화학 농약 또는 환경 및 인축에 무해한 생물 농약의 신규 개발 촉진
- 최근 북미 및 유럽, 일본 등 선진국에서는 미생물, 천적, 페로몬, 및 베칼로바이러스 천연물 기원 2차 대사산물 등을 이용한 생물 농약 개발이 본격적으로 진행 중임
- 미국 EPA는 2000년부터 생물 농약에 대한 개념을 재정립하여 카테고리의 분류와 등록을 위한 모든 기준과 절차, 시험방법 고시를 완료
- 유럽은 EU 가이드라인 중 생물 농약에 대한 필요성을 강조하며 내부적으로 개발과 등록에 대한 작업이 진행 중임
- 새로운 세계 농약 시장을 선도하는 국제적인 기업인 Syngenta, Bayer, BASF 및 Dupont 등의 global 기업들은 친환경 특성의 생물 농약을 집중적으로 개발하고 있음
- Syngenta는 저항성유도 화학물질인 "비온"을 개발하여 화학 농약으로 상품화하였으며, 이를 화학제인 Mancozeb 혼합제를 만들어 "비온-M"이라는 상품으로 개발하여 판매중임
- 한편 미국 edenbio science 사는 미국의 코넬대학교 공동연구를 통하여 전신저항성유도물질인 하핀 Ea를 미국 EPA에 생물 농약으로 등록하였으며(회사는 현재 미국 NASDAQ에 상장), 2001년에는 『Presidential Green Chemistry Chalange Award』 수상
- 미국의 edenbio science사는 2000년 9월부터 미국 일부지역에서 판매를 개시하여 첫 3개월 동안 약 \$103만(수익: \$62만), 2001년 1-9월까지 9개월 간 \$536만(수익: \$350만)의 매출 발생
- Edenbio science 사는 2001년부터, 남미 Ecuador에서 전 작물에 대하여 등록을 완료하였으며, 현재 독일과 스페인과 같은 유럽에 각각 진입하여 사업을 진행하고 있고 현재 전 세계시장을 개척하기 위하여 여러 나라(아시아는 동남아 및 중국)에서 활발한 등록시험을 진행 중임
- 특히 미국의 edenbio science사는 대한민국에서 판매를 하기위하여 2005년에 생물농약로서 등록시험신청을 한 상태로서, 조만간에 국내시장을 장악할 가능성이 매우 높음
- 따라서 (주)파이오니아는 국내시장에서 전신저항성물질을 실용화하고자하는 목표외에, 국내시장은 국내기업에서 보호해야한다는 국가적 사명의식을 지니고 있음

2. 국내의 수준

○ 국내기업 현황

개념정립 단계	●	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

○ (주)파이오니아 현황

개념정립 단계		기업화 단계	●	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

○ 국내 대부분의 농약회사는 국외로 부터 화학 농약 원제 또는 중간체를 수입하여 국내에서 합성·제형화(대량 생산 과정)한 후 시장 판매하고 있음.

○ 미생물농약의 경우 (주)동부 한농, (주)경농과 같은 대기업과 및 (주)그린바이오텍과 같은 중소기업 등을 중심으로 활발한 연구가 진행되어 현재 다수의 제품 들이 등록·시판되었으나, 약효 및 안정성이 뛰어난 생물 농약에 대한 국내 연구와 개발은 매우 미진한 실정임.

○ 국내에서는 전신저항성유도 물질에 대한 연구의 필요성은 인식하지만 실용적인 산업화 기술에 대한 연구 실적은 전무한 상태임.

○ 현재 국내 기술로는 (주)파이오니아가 전신저항성유도물질을 실용화하는 것이 최초임.

○ 주식회사 파이오니아사는 세계에서 2번째, 국내 최초로 전신저항성유도물질을 이용한 생물 농약에 대한 원천기술 보유(관련 특허 2종 국내 등록, 1종에 대하여 3개국 해외 특허 등록, 8 개 특허 출원).

○ 파이오니아가 보유한 전신저항성유도 물질은 미국에서 개발한 messenger 보다 저약량에서 효과가 더 우수한 것으로 판명되었으며, 이에 대한 기술력을 인정받아 산업자원부 산하 청정생산기술연구소 주관 과제를 통하여, 500L 수준의 파일럿 생산 및 제형화 기술을 개발하였으며, 이미 회사자체의 막대한 연구비를 투입하여 국제특허 등의 원천기술 확보.

○ 한편, 전신유도저항성물질을 실용화하기 위해서는 국가적 차원에서의 연구비지원이 절실한 상황임.

○ 따라서 파이오니아사는 본 과제를 통하여 그 동안 축적된 기술을 바탕으로 강원대학교 및 한국화학시험연구원과 공동으로 전신저항성유도물질의 생물 활성적, 생화학적, 독성학적 특성 분석 위한 연구를 수행하고, 최종적으로 유통 가능한 제품으로 실용화하는 것을 목표로 함.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 전신저항유도 물질의 생물학적·유전학적 특성 분석 및 산업화

1. 다양한 작물에 대한 전신저항성유도물질의 병 방제 스펙트럼 조사 및 분석

가. 수도 작물에 대한 생물활성 검정

(1) 벼잎도열병

벼잎도열병은 *Magnaporthe grisea*에 의해 벼의 전생육기간에 걸쳐 발생하는데 병에 걸린 벼잎에는 방추형의 병반이 형성되며 심하면 식물전체가 고사하기도 한다. 이병은 우리나라 뿐만 아니라 벼를 재배하고 있는 세계의 모든 지역에서 발생하여 심한 피해를 주고 있기 때문에 세계적으로 미곡 생산의 가장 큰 장애요인의 하나로 알려져 있다(Ou, 1973). 우리나라에 있어서 1964년 이후 현재까지 벼 병해에 의한 감수 중에서 약40%가 도열병에 의한 것으로 추정되고 있으며(Lee, 1979), 근년에 와서는 도열병 피해가 미미한 수준으로 전국 평균 잎도열병 병반면적율은 각각 0.09~0.13%이나 발병필지율은 20.5~32.4로 발병되고 있는 실정이다(명, 2005). 벼잎도열병의 방제방법으로는 저항성품종의 이용과 시비 등의 재배법 개선을 통한 경종적방법, 살균제 산포에 의존하는 화학적 방제 방법으로 크게 유별 될 수 있다(Crill, 1979). 지금까지 우리나라나 일본과 같은 온대지역에서의 벼잎도열병 방제는 다수확을 위한 다비밀식 재배나 미질 우선의 품종과 같은 벼잎도열병 발생을 조장하는 요인 때문에 화학적 방제에 크게 의존하고 있다(Lee, 1983, Mogi, 1979). 최근에는 친환경농업의 발전과 더불어 친환경 수도작의 재배가 활발히 이루어지고 있는 실정으로 본 연구에서는 전신저항성유도물질의 수도 작물에 대한 생물활성을 조사하기 위하여 벼잎도열병에 대한 생물활성을 조사하였다.

(가) 전신저항유도물질의 벼잎도열병에 대한 방제 효과 검정(강원도 춘천시)

전신저항성유도물질에 대한 벼잎도열병의 방제효과 검정을 위하여 강원도 춘천시 임대포장에서 수행하였다. 먼저 전신저항성유도물질을 정식 전 유묘기에 1회 처리하였고, 정식 29, 36일 후 경엽처리하였다. 최종 약제처리 69일 후 농약등록시험에 준하여 발병도로 방제효과를 검정하였다. 시험 중 벼 재배는 농가관행에 따라 재배하였으며 시험은 난괴법 3반복에 따라 수행하였다.

그 결과, 전신저항성유도물질이 처리된 구의 벼잎도열병에 대한 방제효과는 무처리에 대비하여 65%로 조사되었다. 본 전신저항성유도물질은 효과적으로 벼잎도열병을 방제하는 것으로 나타났다(표 3, 그림 1).

표 3. 벼잎도열병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과 검정(강원도 춘천시)

처리	발 병 도 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질	10.5	13.0	12.0	11.8	65.0
무처리	38.0	26.0	37.0	33.7	-



그림 1. 벼잎도열병에 대한 전신저항성유도물질의 방제 효과 사진(강원도 춘천시).

(나) 전신저항성유도물질의 벼잎도열병에 대한 방제 효과 검정(강원대학교 부속농장)

강원대학교 부속농장의 수도포장에서의 전신저항성유도물질 병방제효과를 검정하였다. 공시벼 품종은 일품을 사용하였고, 잎도열병 발병유도를 위하여 질소비료를 약 50% 증시하였다. 이앙일은 2008년 5월 15일이었으며 농가관행에 따라 재배하되 살균제는 살포하지 않았다. 시험구 배치는 난괴법 3반복에 준하였으며 처리구는 전신저항성유도물질과 화학대조구(트리사이클라졸 수화제), 무처리로 나누어 병방제효과를 검정하였다. 전신저항성유도물질의 처리방법은 위의 연구와 동일하였으며 화학대조구는 발생초기 1회 경엽처리하였다. 조사방법은 최종약제처리 7일 후 구당 30주에 대한 병반면적율을 조사하였으며 무처리 대비하여 각각의 방제효과를 산출하였다.

시험 결과 무처리구의 병반면적율이 3.28로 약효를 평가하기에 충분히 발생하였고, 무처리구에 대비하여 화학대조구는 89.5%, 전신저항성유도물질은 처리에 따른 방제효과가 62.6%를 나타내었다(표 4, 그림 2). 이는 전신저항성유도물질을 어린 묘판에 1회 처리함에 따라 작물이 건전하게 잘할 수 있는 환경을 제공하였고, 병발생을 위한 질소비료의 과비에 따른 처리구의 영향은 없었던 것으로 판단된다. 따라서 수도작에서 주요 병해로 알려져 있는 벼잎도열병에 대하여 전신저항성유도물질은 발병억제의 예방 및 억제 효과가 있다고 판단되어 실용화의 기초 자료로 충분하다고 판단된다.

표 4. 벼잎도열병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과 검정(강원대학교 부속농장)

처리	병반면적율 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질	1.20	1.15	1.33	1.23	62.6
트리사이클라졸 수화제(대조)	0.35	0.30	0.38	0.34	89.5
무처리	3.08	3.54	3.22	3.28	-



그림 2. 벼잎도열병에 대한 전신저항성유도물질의 방제 효과 사진(강원대학교 부속농장).

나. 원예 작물에 대한 생물활성 검정

(1) 고추에 대한 전신저항성유도물질 효과검정

고추는 지난 10여 년간 재배면적이 채소 전체의 약 25~30% 정도로서 농업과 고추관련 가공 산업 및 소비자 물가에 크게 영향을 미치는 주요 채소작물의 하나이다. 그러나 고추의 생산량은 해에 따라 변동이 심한데, 그 주요인은 병에 의한 수량 감소이다. 우리나라에서 고추에 피해를 주는 주요 병은 역병, 바이러스, 탄저병 및 세균성 점무늬병 등으로서 저항성 품종 육성 및 효과적인 병방제를 위한 대책이 요구되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 고추에서 주로 발생하는 주요 병에 대하여 전신저항성 유도물질의 처리시 병방제 효과를 검정하고자 하였다.

(가) 고추 역병

역병은 고추 생산의 가장 큰 제한요인이 되는 병해이며 생육기간중의 강우량이나 강우 빈도에 따라 발병주율이 20% 이상의 병해다. 역병을 일으키는 병원균은 *Phytophthora capsici*

로 조균류에 속하는 곰팡이의 일종으로 발아초기의 육묘 상에서부터 전 생육기에 걸쳐 발생한다. 본 시험은 온실 내 포트에서 실시하였으며 처리농도 20 μ g/ml로 경엽처리 하였으며, 장마기간 이후 10일 간격 4회 처리하였다. 역병의 방제효과는 무처리구 대비 발병률로 계산하였다.

시험 결과, 무처리의 발병률은 82.3% 이었으며 전신저항성유도물질 처리구의 발병률은 39%로 무처리 대비 52.6%의 병 방제효과를 나타내었다(표 5, 그림 3).

표 5. 고추 역병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과 검정

처리	발 병 도 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질	35.0	37.2	44.8	39.0	52.6
무처리	82.1	79.8	85.0	82.3	-

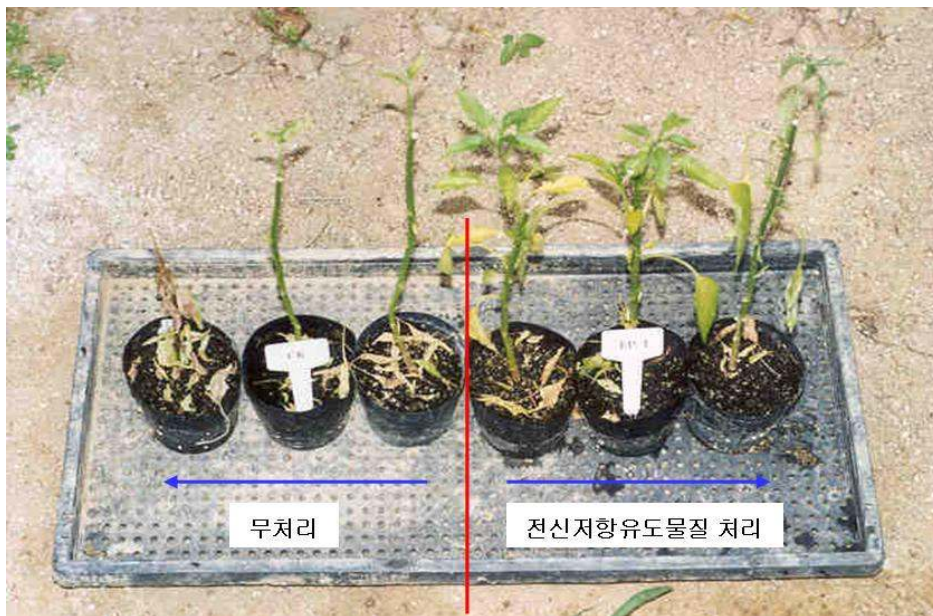


그림 3. 고추 역병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과 검정.

(나) 고추 탄저병(노지 고추)

고추 탄저병은 고추의 주요 식물병의 하나이며 주로 과실을 침해하여 썩히므로 직접적인 수량감수의 원인이 된다. 탄저병은 온도가 높고 비가 많은 해에 발생이 특히 심하다. 탄저병원균은 *Colletotrichum gloeosporioides*로 자낭균류에 속하는 곰팡이의 일종으로 생육온도는 4~35 $^{\circ}$ C이며 최적온도는 28~32 $^{\circ}$ C로 고온에서 활동이 많다. 전신저항성유도물질이 실제로 얼마만큼의 병방제효과를 보이는지 알아보기 위하여 실험실내에서 고추열매에 전신저항성유도물질 처리 후 *C. gloeosporioides*의 분생포자를 접종하여 결과를 관찰하였으며 실제 고추포장에서의

병방제가 검정실험을 수행하였다.

① *in-vitro*에서의 탄저병균에 대한 방제효과

고추 열매의 표피에 불꽃 멸균한 바늘로 상처를 내고 전신저항성유도물질 20 μ g/ml을 처리한 후 충분히 건조하였다. 건조 후 *C. gloeosporioides*의 병원균 포자현탁액(10⁴ conidia/ml)을 접종한 후 플라스틱 밀폐용기에 습실 처리하여 25 $^{\circ}$ C 압조건 에서 7일간 배양한 뒤 병반면적을 조사하였다.

고추 열매에 만들어진 병반을 조사한 결과 전신저항성유도물질 처리에 따른 병반형성이 감소되었음을 확인하였다. 그림 4와 같이 무처리구에서는 병반이 생성된 반면 처리구에서는 무처리구에 비교하여 뚜렷한 차이를 보여 실제로 포장 식물에 처리하였을 경우 방제에 도움이 될 것으로 판단된다.



그림 4. 고추열매에서의 전신저항성유도물질 처리에 따른 병반형성 유무 관찰 결과.

② 고추 탄저병에 대한 포장시험(노지고추)

고추를 실제 포장에서 재배하며 전신저항성유도물질의 병 방제효과를 조사하였다. 고추(녹광) 플러그묘를 구입하여 정식하였으며 노지 고추에서 실시하였다. 전신저항성유도물질의 처리농도는 20 μ g/ml로 경엽처리 하였으며 최초 처리는 병 발생 초기인 8월 초순이었으며, 자연 발병에 의한 처리효과를 검정하였다. 처리 횟수는 10일 간격 4회 처리하였고 발병도 조사방법은 정식 3개월 후 붉게 착색되는 고추를 수확하면서 이병과를 선별하여 이병과율로 표기하였다.

시험 결과 고추 탄저병에 대한 방제효과는 4회 처리시 방제 효과 51.5%로 전신저항성유도물질 처리시 우수한 방제효과를 나타내었다(표 6, 그림 5).

표 6. 고추 탄저병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과 검정

처리	발 병 도 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질	33.3	25.0	37.5	31.9	51.5
무처리	62.5	75.0	60.0	65.8	-



그림 5. 고추 탄저병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과 검정.

③ 고추 탄저병에 대한 포장시험(시설고추)

전신저항성유도물질의 제형화 공정을 통한 시제품(Pi0802)을 이용하여 고추 탄저병에 대하여 포장시험을 실시하였다. 처리방법은 1차년도 연구방법과 동일하게 하였으며, 병반 발생을 위하여 *C. gloeosporioides*의 병원균 포자현탁액($10^4 \sim 10^5$ conidia/ml)을 인공 접종하여 포장시험을 수행하였다. 대조구는 농약등록 시험 기준에 의하여 프로피 수화제(70%)를 처리하였다.

시험 결과 전신저항성유도물질 처리구는 56.2%의 방제효과를 나타내어 1차년도 시험과 대등하거나 다소 상승한 방제효과를 나타내었다(표 7). 이는 제형화 과정에서 부제 첨가에 따른 전신저항성유도물질의 엽면 활착이 더욱 좋아짐에 따라 병발생에 지연효과가 있었다고 판단된다. 대조구로 공시된 프로피 수화제 역시 약 80%의 방제효과를 나타내어 약효를 판단하기에 충분하였다고 사료된다.

이상에 결과로 보아 전신저항성유도물질을 이용한 고추 탄저병에 대한 방제효과는 50~60%의 방제가를 보이고 있어 고추 열매에 직접적으로 발생하는 탄저병의 발생을 줄이고 고추 열매 수확량 증대에 기여할 수 있다고 판단된다(그림 6). 또한 전신저항성유도물질을 이용한 생화학 작물보호제로서의 개발 가치가 충분히 있음을 알 수 있다.

표 7. 고추 탄저병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과 검정

처리	발 병 도 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질	21.5	23.8	26.4	23.9	56.2
프로피 수화제(대조)	10.6	9.7	11.0	10.4	80.9
무처리	58.6	42.8	62.4	54.6	-



그림 6. 전신저항성유도물질 처리에 따른 고추 탄저병 방제효과 검정.

(다) 고추 바이러스병

고추 바이러스병은 세계적으로 53종이 알려져 있고, 국내는 6종의 바이러스가 발생하는 것으로 최근 확인되었으며 오이모자이크바이러스(CMV), 고추모틀바이러스, 고추약한모틀바이러스, 잠두두괴사바이러스, 담배모자이크바이러스, 담배연녹모자이크바이러스 순으로 심하게 발생되고 있다. 그리고 2004년에는 토마토반점시들음바이러스의 발생이 확인되었다. 이들 바이러스는 고추에 단독 또는 복합 감염되어 품종과 감염시기에 따라 10~60%의 수량 감소와 품질 저하를 초래한다. 바이러스에 감염된 고추 잎은 얼룩덜룩한 모자이크 증상, 고추식물체 선단부 위 고사 및 위축이 나타나며 과실은 기형과 괴사 반점을 형성한다.

본 연구에서는 전신저항성유도물질 처리시 고추포장에서 발생하는 바이러스병(담배모자이크바이러스)에 대하여 효과를 검정하기 위하여 시설재배지에서 포장시험을 수행하였다. 전신저항성유도물질의 처리농도는 20 μ g/ml로 경엽처리 하였으며, 정식 15일 후 2주 간격 4회 처리하고 수확기에 바이러스에 대한 방제효과를 산출하였다.

시험 결과 고추에서의 담배모자이크바이러스병에 대한 무처리구의 발병률은 24.8% 이었으며 전신저항성유도물질의 발병률은 9.5%로 그 방제효과가 61.6%로 나타났다(표 8). 무처리구에서는 그림 7과 같이 담배모자이크바이러스의 전형적인 증상인 괴저현상 및 위축현상이 발생된 반면 전신저항성유도물질 처리구에서는 상당히 예방되었음을 확인하였다(그림 7). 이는 바이러스병에 대한 면역을 강화시키고 전체적으로 생육을 골고루 강화시키는 효과로 수확량 증대로 이어질 가능성을 시사 하여준다.

표 8. 고추 담배모자이크바이러스병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과 검정

처리	이병주수	발병률(%)	방제가(%)
전신저항성유도물질	10/105	9.5	61.6
무처리	26/101	24.8	-



그림 7. 고추 담배모자이크바이러스병에 대한 국전신저항성유도물질의 방제효과 검정(담배모자이크바이러스병의 전형적인 병발생현상)

(2) 오이에 대한 전신저항성유도물질 효과검정

국민 소비수준이 높아져 연중 신선한 채소와 과일이 요구됨에 따라 시설자재를 이용한 축성재배와 억제재배 면적이 늘어가고 있다. 최근 경지면적의 제한성을 해결하고 노동력의 집

약적 투입에 의한 생산수입을 높일 목적으로 시설 내에서 특정작물이 주년 재배되고 있다. 특히 오이는 시설재배 면적이 전체 오이재배면적의 70% 이상을 차지할 만큼 대부분 시설하우스에서 생산하여 연중 소비자에게 공급하고 있다. 그러나 시설재배는 일반노지 재배와는 달리 높은 온도와 습도를 유지하고 있다. 이런 조건하에서는 병해충이 발생할 가능성이 높으며 오이에 대하여 약 15종류의 병해가 발생하고 있다. 그 중 노균병, 잿빛곰팡이병, 흰가루병, 역병, 균핵병 등 습도에 민감한 병해의 발생이 많다. 따라서 재배 작형, 시기 및 환경이 변화되어 병해의 발생양상이 다양화되고 있으며, 그에 적절한 대응책 마련의 필요성도 점차 높아지고 있다.

본 연구에서는 오이 시설재배시 문제가 되는 병해를 선발하여 전신저항성유도물질 처리에 따른 병방제효과를 검정하고자 수행하였다.

(가) 오이 잿빛곰팡이병

① 오이 유묘에서의 생물검정

전신저항성유도물질의 오이 잿빛곰팡이병에 대한 방제효과검정을 위하여 in-vitro 상에서 오이 유묘 검정을 실시하였다. 오이(백다다기) 육묘는 원예용 상토를 이용하여 종자를 파종하였고, 온실 유지 후 본엽 2~3엽기에 전신저항성유도물질 20 μ g/ml를 분무처리한 뒤 4~5시간 후 잿빛곰팡이균의 포자현탁액(1 \times 10⁶cfu/ml)를 오이 유묘에 접종하여 20 $^{\circ}$ C, 100% 습도로 조절된 dew chamber에 넣은 후 3~4일 후 병반면적율을 조사하였다.

시험 결과 전신저항성유도물질 처리에 따른 오이잿빛곰팡이병의 방제효과는 73.7%로 실용성이 있는 것으로 판단되었다. 대조구로 사용한 디크론 수화제는 94.7%의 방제효과를 나타내어 약효를 판단하기에 충분하였다. 또한 같은 방법으로 유묘에서의 반복 검정 결과 전신저항성유도물질의 처리에 따른 방제효과는 오이 잿빛곰팡이에 대하여 60~80%의 방제효과를 나타내었다(표 9). 실내에서의 검정 결과 방제효과 80% 수준의 결과는 생화학작물보호제로서 포장 시험에서도 효과적인 예방 및 억제 효과를 낼 수 있다고 판단된다(그림 8).

표 9. 오이 유묘에서의 잿빛곰팡이병에 대한 생물검정

처리	병반면적율 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III반복	평균	
전신저항성유도물질	5	10	10	8.3	73.7
디크론 수화제(대조)	0	5	0	1.7	94.7
무처리	30	35	30	31.7	-

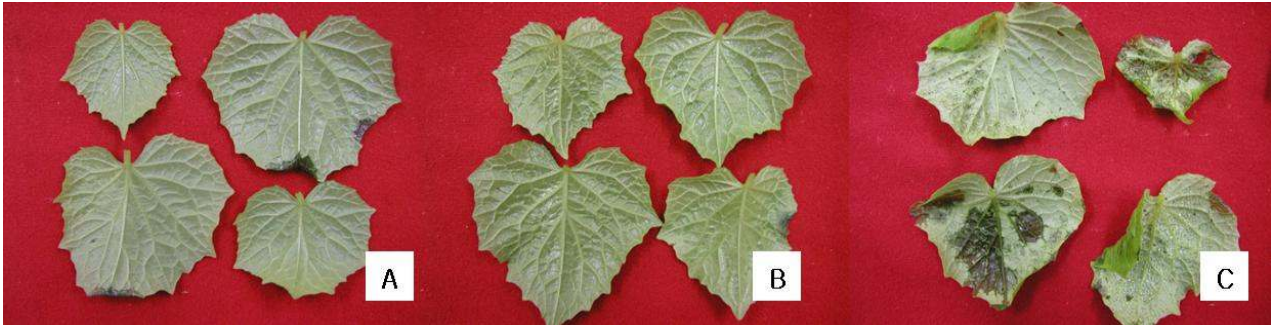


그림 8. 오이 유묘에서의 잿빛곰팡이병에 대한 생물검정(A; 전신저항성유도물질 처리, B; 디크론 수화제(대조), C; 무처리)

② 오이 포장에서의 잿빛곰팡이병 억제효과 시험

강원도 춘천시 서면 지역의 시설재배지에서 취정오이에 전신저항성유도물질 20 μ g/ml의 농도로 난괴법 3반복으로 시험하였다. 반복당 30주씩 분무 처리하였고, 대조약제는 디크론 수화제 600배액을 처리하였다. 전신저항성유도물질 및 대조약제는 7일 간격 3회 처리하였고, 억제효과조사는 최종약제 처리 7일 후에 이병과율을 조사하였다.

춘천 서면 포장에서의 시험 결과에서 전신저항성유도물질 처리구가 59.7%를 억제하였으며, 대조 약제인 디크론 수화제는 81.7% 효과를 나타내었다(표 10). 그림 9는 각 처리구에 대한 이병과를 수집한 사진으로 전신저항성유도물질 처리에 따른 이병과가 줄어들었음을 확인하였고, 이는 농가의 소득 증대와 직접적으로 연관됨을 확인하였다. 또한 실내에서의 오이 유묘에 대한 방제가 보다 다소 낮은 결과를 나타내었지만 이는 외부 포장에서의 환경적인 요인이 작용하였을 거라 판단되어 실용성이 있는 것으로 판단된다.

표 10. 오이 포장에서의 잿빛곰팡이병 억제효과 검정

처리	이병과율 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III반복	평균	
전신저항성유도물질	12.8	13.9	18.4	15.0	59.7
디크론 수화제(대조)	6.0	4.8	9.7	6.8	81.7
무처리	40.5	32.8	38.5	37.3	-



그림 9. 춘천시 서면 포장시험에서의 처리구별 이병과 조사 결과(A; 전신저항성유도물질 처리, B; 디크론 수화제(대조), C; 무처리)

(나) 오이 흰가루병

① 오이 포장에서의 흰가루병 억제효과 시험(강원도 춘천시)

오이를 실제 포장에서 재배하며 전신저항성유도물질의 병 방제효과를 조사하였다. 오이(백다다기) 플리그묘를 구입하여 정식하였으며 강원도 춘천시 시설재배지에서 실시하였다. 전신저항성유도물질의 처리농도는 20 μ g/ml로 경엽처리 하였으며 활착이 이루어지는 10~20일 후부터 14일 간격 3회 경엽처리하여 구당 20주, 약 100엽의 발병도를 조사하였다. 모든 시험수행은 임의배치 3반복으로 수행되어졌으며 무처리구를 대조구로 판단하여 비교하였다.

시험 결과 오이 흰가루병에 대하여 약 49.2%의 방제효과를 갖는 것으로 확인되었다. 또한 전신저항성유도물질 처리구가 무처리구에 비하여 병 발생 지연 효과가 뚜렷하게 나타나는 것을 확인하였다(표 11, 그림 10).

표 11. 오이 흰가루병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과 검정

처리	발 병 도 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III반복	평균	
전신저항성유도물질	32.9	26.7	26.4	28.7	49.2
무처리	52.9	56.0	61.0	56.3	-

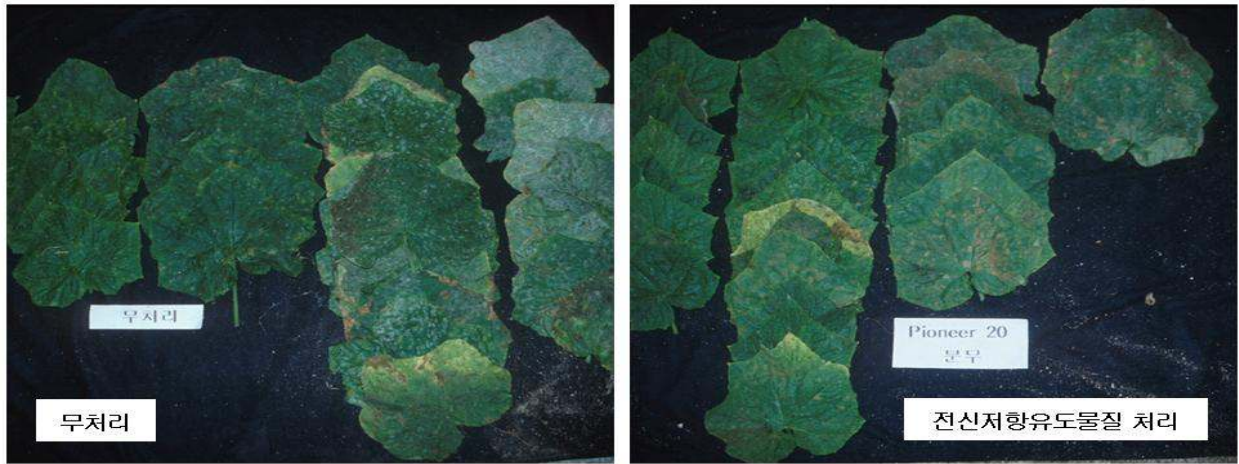


그림 10. 춘천시 포장시험에서의 처리구별 이병엽 조사 결과

② 오이 포장에서의 흰가루병 억제효과 시험(강원도 홍천군 내면)

1차년도 연구 결과 전신저항성유도물질은 오이 흰가루병에 대하여 42.9%의 방제효과와 병발생지연 효과를 나타내었다. 본 연구에서는 강원도 홍천군 내면 시설재배 농가를 임대하여 전신저항성유도물질을 포함한 시제품 Pi0802에 대하여 약효평가를 실시하였다. 시험 방법은 일반 농가관행 재배법에 준하여 재배하였고 시험구는 난괴법에 따른 3반복으로 발병초 10일 간격으로 3회 경엽처리하였다. 조사는 처리구당 100엽 이상의 발병도를 조사하였고, 마지막 처리 7일 후 약효 및 약해를 평가하였다.

시험 결과 전신저항성유도물질 기준량인 1,000배 희석 처리구와 배량인 500배 희석 처리구에서 각각 55.3%와 61.9%의 방제효과를 나타내었다(표 12). 1,000배 희석액 보다는 500배 희석액에서 보다 높은 방제효과를 나타내었지만 두 처리구간에는 유의성을 인정할 수 없었다. 기존 화학 대조구의 방제효과보다는 감소하였지만 화학농약 사용이 불가능한 수확직전까지 꾸준히 사용할 수 있는 장점을 살린다면 보다 효율적인 제품으로서의 개발가능성이 높다고 하겠다(그림 11). 또한 외관상 나타나는 약해 유무를 조사한 결과 기준량과 배량 모두 약해는 관찰되지 않았다.

표 12. 오이 흰가루병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과 검정

처리	발병도 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질 Pi0802 (500배)	18.4	19.7	21.2	19.8	61.9
전신저항성유도물질 Pi0802 (1000배)	25.8	22.3	21.5	23.2	55.3
훼나리(대조)	5.8	6.4	4.3	5.5	89.4
무처리	55.5	51.2	48.9	51.9	-

$$\text{발병도} = \frac{\sum\{(\text{발병수} \times \text{개체수})/4N\}}{4N} \times 100$$

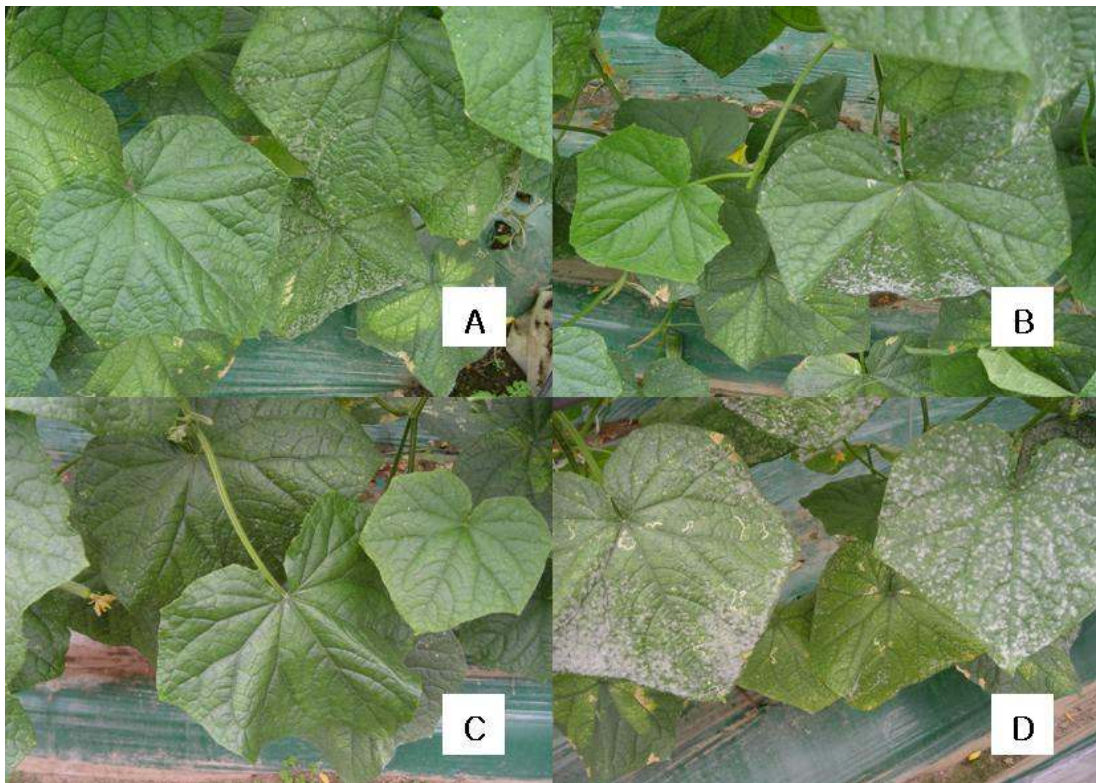


그림 11. 오이 흰가루병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과 검정(A; 전신저항성유도물질 Pi0802 500배 처리, B; 전신저항성유도물질 Pi0802 1,000배 처리, C; 훼나리(대조), D; 무처리 구)

전신저항성유도물질과 화학대조구(훼나리)의 약효를 살포 횟수에 따라 검증한 결과 3회 처리했을 경우 방제 효과가 유사한 것으로 나타났다(그림 12). 단, 흰가루병 발병 초기에 처리했을 경우이며 병해 발병도가 증기 또는 말기인 시점에 처리했을 경우는 화학대조구에 비해 상대적으로 약효가 약 1/2 정도로 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 전신저항성유도물질을 처리하기 위해서는 발병초기 방제가 이뤄져야하며 이는 전신저항성유도물질이 흰가루병에 대하

여 면역력을 증가시킴을 암시한다.

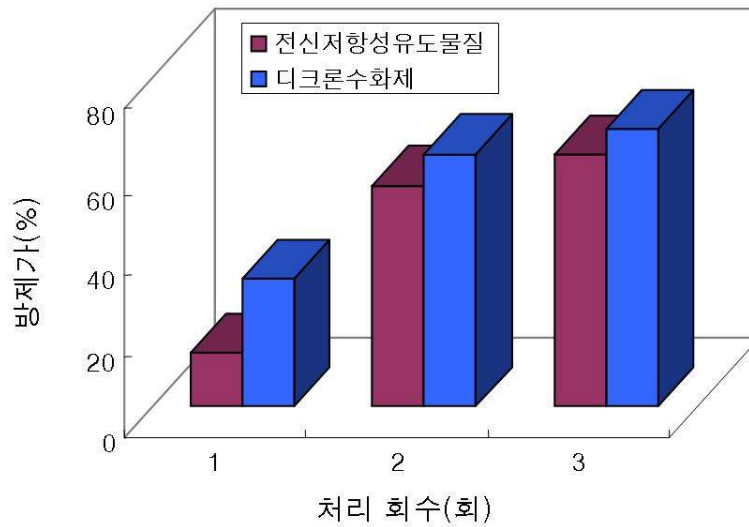


그림 12. 살포 횟수에 따른 오이 흰가루병 방제효과 검정

(다) 오이 노균병

전신저항성유도물질 처리에 따른 오이 노균병의 방제효과 검정을 위하여 강원도 춘천시 소재 비닐하우스를 임대하여 전신저항성유도물질을 포함한 시제품 Pi0802에 대하여 약효평가를 실시하였다. 시험 방법은 일반 농가관행 재배법에 준하여 재배하였고 시험구는 처리구와 무처리구로 나누어 발병 초 10일 간격으로 3회 경엽처리 하였다. 조사는 처리구당 50엽 이상의 발병도를 조사하였고, 마지막 처리 7일 후 약효를 평가하였다.

시험 결과 전신저항성유도물질 처리에 따른 오이 노균병의 방제효과는 41.6%로 다소 낮게 나타났다(표 13). 이는 오이 노균병의 분생포자가 잎 뒷면의 기공을 통하여 침입하는 특성에 따라서 눈으로 보이는 노균병의 병징 발현이 늦는 것과 다량의 잠복하여 있는 병원균이 과다 습도에 의한 병진전이 급속도로 빨라졌다고 사료된다. 실제로 그림 13의 비닐하우스 포장은 밀식재배와 하우스 천정이 낮은 단점으로 인하여 하우스내 습도가 높았음을 확인할 수 있었다. 따라서 오이 노균병에 대한 정확한 전신저항성유도물질의 병방제효과는 차후 보다 나은 환경에서 수행되어야 한다고 사료된다.

표 13. 오이 노균병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과 검정

처리	발병도 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질 Pi0802 (1000배)	33.8	30.9	28.0	30.9	41.6
무처리	60.2	45.9	52.6	52.9	-

$$\text{발병도} = \frac{\sum\{(\text{발병수} \times \text{개체수})/4N\}}{4N} \times 100$$



그림 13. 오이 노균병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과 검정

(3) 배추에 대한 전신저항성유도물질 효과검정

배추는 재배역사, 재배면적 및 이용면에서 볼 때 우리나라는 가장 중요한 채소 중에 하나이다. 배추는 김치의 주원료로서 우리나라에서 가장 많이 이용되는 채소이며 이제 완전히 주년생산체계가 확립되었다. 배추는 여러 작형에 따라 1년 내내 파종하여 수확되고 있다. 이러한 주년 생산체계가 확립된 것은 불과 지난 15~20년 동안에 이루어진 것으로 짧은 기간 동안에 실로 놀랄만한 발전을 했다고 할 수 있다. 그러나 아직은 작형마다 생산이 병해충과 주위환경 요인에 의하여 불안정하여 해에 따라 풍년이 되기도 하고 흉년이 들기도 하며 생산성의 차이가 크다. 따라서 앞으로의 과제는 어느 작형에서든지 안정생산이 이루어질 수 있는 재배기술의 확립이라 할 수 있겠다. 배추재배에 있어서 발생율이 높고 방제가 비교적 힘든 병해는 연부병(무름병), 바이러스병, 노균병, 근류병(무사마귀병) 등이 있다. 본 연구에서는 배추에서 많이 발생할 수 있는 배추 노균병과 배추 무름병에 대하여 전신저항성유도물질의 처리시 병방제효과를 검정하고자 하였다.

(가) 배추 노균병

배추 노균병에 대한 전신저항성유도물질의 생물활성을 조사하기 위하여 노지 배추에서 노균병(*Peronospora brassica*)을 대상으로 수행하였다. 처리방법은 전신저항성유도물질을 정식 전 유묘를 1회 침지 후 정식하였고, 정식 후 활착이 이루어지는 10~20일 후부터 14일 간격 3회 경엽처리하여 농약등록시험법에 준하여 방제효과를 판단하였다.

시험 결과 배추 노균병에 대한 방제 효과를 확인한 결과 무처리 대비 55.2% 수준의 병 방제 효과를 나타내었다(표 14, 그림 14).

표 14. 배추 노균병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과

처리	발병도 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질	22.5	25.7	27.5	25.2	55.2
무처리	52.9	56.0	61.0	56.3	-

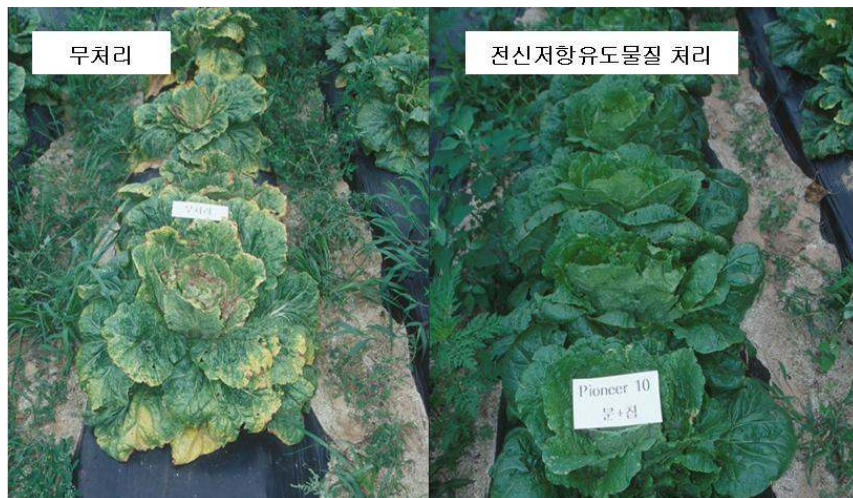


그림 14. 배추 노균병에 대한 전신저항성유도물질의 방제 효과 사진.

(나) 배추 무름병

고랭지배추는 주로 강원도 산간지역에 대단위로 재배되어지고 있으며 농가 주 소득원으로 자리 잡고 있으나, 여름철 고온기에 배추 무름병이 만연하여 농가소득 향상에 많은 어려움이 대두되고 있다. 배추 무름병은 세균병으로 장마 후 수분과 강한 태양열에 의한 지온상승으로 짧은 기간 내에 확산되는 병으로 매년 130여 ha가 발생하여 농가소득에 막대한 피해를 주고 있는 병이다. 그러나 지금까지의 방제기술이나 약제로는 완전방제가 이루어지지 않고 대부분 항생물질을 원료로 한 화학농약살포가 주를 이루고 있어 농약잔류에 대한 소비자들의 우려로 이를 대체할 수 있는 새로운 방제기술개발이 요구되고 있는 시급한 실정에 있다.

본 연구에서는 위와 같이 고랭지배추에서 문제가 되고 있는 배추 무름병에 대하여 전신저항성유도물질 처리시 방제효과 유무를 관찰하기 위하여 수행하였다. 시험포장은 강원도 강릉시 대기리의 강릉대학교 고랭지 부속농장에서 수행하였고, 전신저항성유도물질 처리구외에 화학대조구로 스트렙토마이신 수화제를 이용하여 난피법 3반복으로 비교 검정하였다. 재배방식은 일반관행농법에 준하였고 약제시험기간 중 다른 살균제는 처리하지 않았다. 처리 방법은 발병 직전 7일 간격으로 4회 경엽처리하였으며, 최종약제 처리 7일 후 이병주를 조사하여 방제가를 산출하였다.

시험 결과 전신저항성유도물질의 처리구는 47.8%의 방제가를 나타내었고, 화학대조구인 스트렙토마이신 수화제는 74.6%의 방제효과를 나타내었다(표 15, 그림 15). 전신저항성유도물질 처리에 따른 방제효과는 다소 낮게 나왔지만 이는 배추 무름병이 농약 등록 관리 기준에 난방제 세균병으로 등록 되어있고, 기존의 화학대조구에 대비하여 생화학작물보호제로서의 실용화가 가능할 것으로 판단된다. 하지만 포장생물활성에서 단점으로 지적되고 있는 외부 환경 요인과 병발생정도에 따른 포장간 방제효과의 차이를 알 수 있었다.

표 15. 배추 무름병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과

처리	이병주율 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III반복	평균	
전신저항성유도물질	31.4	24.5	26.2	27.4	47.8
스트렙토마이신 수화제 (대조)	10.5	13.6	15.9	13.3	74.6
무처리	53.2	59.6	44.5	52.4	-



그림 15. 배추 무름병에 대한 전신저항성유도물질의 방제 효과 사진.

(4) 기타 원예작물에 대한 전신저항성유도물질 효과검정

(가) 딸기잰빛곰팡이병에 대한 생물활성검정

전신저항성유도물질의 딸기잰빛곰팡이병 적용시 처리시기를 검토하고자 포장활성을 조사하였다. 처리 시기는 딸기 주생산시기 1개월 전 14일 간격 4회 처리하였고 무처리구와 처리구로 구분하여 수행하였다.

그 결과 전신저항성유도물질 처리에 의한 딸기잰빛곰팡이병에 대한 방제효과는 휴면기부터 처리한 처리구나 발병초에 처리구보다 주생산시기 1개월 전부터 14일 간격으로 4회 처리한 구에서 가장 우수한 방제효과 54.9%를 나타내었다(표 16, 그림 16). 이는 딸기잰빛곰팡이병이 주로 과에 발생하여 피해를 주는 병해로 착과부터 착색되어 수확기까지 약 3주일의 기간이 소요되는 만큼 개화단계 또는 초기착과단계에서 전신저항성유도물질 처리에 의한 전신유도저항성이 원활히 잘 이루어진 것으로 사료된다.

표 16. 딸기잰빛곰팡이병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과

처리	이병주율 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질	22.3	18.8	20.8	20.6	54.9
무처리	54.7	48.0	34.5	45.7	-



그림 16. 딸기잰빛곰팡이병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과

(나) 참외노균병에 대한 생물활성검정

본 연구에서는 참외노균병에 대한 전신저항성유도물질 처리에 따른 방제효과를 알아보기 위하여 참외를 대상으로 하였다. 처리방법은 전신저항성유도물질을 작물 정식 후 활착이 이루어

어지는 약 10일~20일 후부터 14일 간격으로 3회 경엽처리 하여 농약등록시험법에 준하여 방제효과를 판단하였다.

시험 결과 참외노균병에 대해서는 약 50% 수준의 방제효과를 나타내었으며 생육촉진효과(입면적 증가 및 마그네슘 축진 강화로 엽록소 증가)가 확인되었다(표 17, 그림 17).

표 17. 참외노균병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과

처리	이병주율 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질	22.6	24.7	20.5	22.6	49.9
무처리	40.4	42.4	52.4	45.1	-



그림 17. 참외노균병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과.

(다) 호박흰가루병에 대한 생물활성검정

전신저항성유도물질 처리에 따른 호박흰가루병의 방제효과 검정을 위하여 강원도 홍천군 소재 농가(애호박; 주키니)를 임대하여 전신저항성유도물질을 포함한 시제품 Pi0802에 대하여 약효평가를 실시하였다. 시험 방법은 일반 농가관행 재배법에 준하여 재배하였고 시험구는 처리구와 무처리구로 나누어 발병 초 10일 간격으로 3회 경엽처리하였다. 조사는 처리구당 100엽 이상의 발병도를 조사하였고, 마지막 처리 7일 후 약효를 평가하였다.

시험 결과 전신저항성유도물질을 포함한 시제품 Pi0802의 1,000배 희석액은 호박 흰가루병에 대하여 57.4%의 방제효과를 나타내었다(표 18, 그림 18).이러한 결과는 앞선 연구 결과와 대등한 방제효과를 나타내어 원예작물에 대한 다양한 병방제 스펙트럼을 확인할 수 있었다.

표 18. 호박흰가루병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과

처리	발병도 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III반복	평균	
전신저항성유도물질 Pi0802 (1000배)	15.2	22.6	18.4	18.7	57.4
플루실라졸 크레속심(대조)	3.5	7.1	6.4	5.7	87.1
무처리	35.2	44.9	51.8	44.0	-



그림 18. 호박흰가루병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과

다. 과수에 대한 생물활성 검정

(1) 감귤궤양병에 대한 생물활성 검정

감귤은 생산량으로 볼 때 우리나라 제1의 과수로 부상하였을 뿐만 아니라 제주지역의 경제를 좌지우지 할 수 있는 산업으로 발전하였다. 이러한 감귤도 재배 초창기인 60년대 후반으로부터 90년대 중반까지는 감귤생산이 질보다는 증산위주로 추진되었고 그러다보니 감귤생산성 향상에 가장 큰 저해요인의 하나인 병해충방제를 위한 수단으로 많은 유기합성 농약의 투입이 되었고, 이에 따른 환경 문제를 인식하게 되었다. 소비자의 농산물 인식에 대한 변화로 인하여 과수 작물에도 친환경 농업이 발달하고 있는 실정이다.

제주도내 감귤 재배 포장에서의 병발생 상황은 궤양병과 더덩이병 그리고 검은무늬병이 주로 발생하고 있다. 이에 준하여 본 연구에서는 감귤 궤양병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과를 검정하기 위하여 온주밀감을 대상으로 시험을 수행하였다. 목본류의 특성상 발아초기부터 14일 간격으로 8월까지 경엽처리한 후, 최종 처리 10일 후 이병엽율로 전신저항성유도물질의 감귤 궤양병에 대한 활성을 조사하였다.

시험 결과 무처리구의 발병도는 12.7%이었으며 전신저항성유도물질 처리구의 발병도는 5.4%로 방제효과는 57.8%로 나타났다(표 19, 그림 19).

표 19. 감귤 궤양병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과

처리	발병도 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질	3.0	6.7	6.5	5.4	57.8
무처리	9.0	9.5	19.6	12.7	-

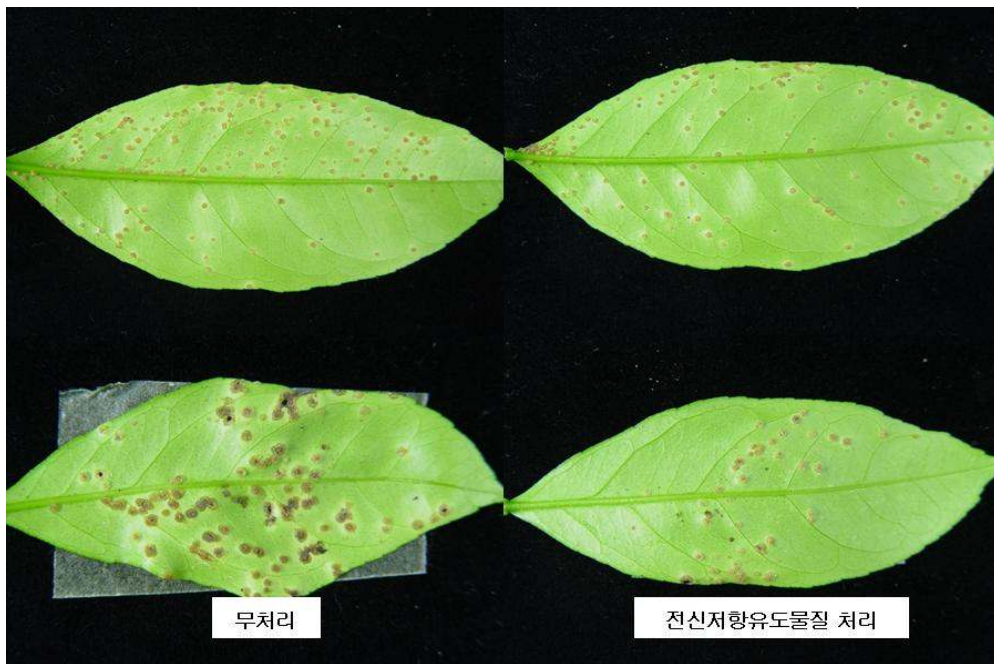


그림 19. 감귤 궤양병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과

(2) 복숭아세균성구멍병에 대한 생물활성 검정

복숭아, 살구 등의 핵과류의 세균성구멍병은 고온 다습한 지역에서 많이 발생하는 세균병으로 과실에 발생하면 상품가치가 저하하여 경제적 피해가 매우 크다. 본 병은 병세의 진전이 빠르고 발병시기와 발병정도는 연차간 또는 지역 간에 차이가 심할 뿐만 아니라 효과적인 방제제가 없기 때문에 오래전부터 방제하기 어려운 병해증의 하나로 알려져 있다. 우리나라 핵과류의 세균성구멍병은 *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*에 의한 복숭아 세균성구멍병(그림 20)과 살구나무, 앵두나무, 자두나무에서도 세균성구멍병이 보고되었다(한국식물병명록, 1998).



그림 20. 춘천 복숭아 재배단지에서 발생한 복숭아세균성구멍병.

본 연구에서는 전신저항성유도물질에 대한 복숭아세균성구멍병에 대한 방제효과 검정을 위하여 수행하였다. 처리방법은 농약등록시험에 기준에 준하여 발병직전 7일 간격으로 3회 경엽살포하였다. 대조구는 농용신 수화제를 공시하였고, 최종처리 7일 후 처리구당 200엽의 이병엽율을 조사하였다.

시험 결과 전신저항성유도물질 처리구는 방제가 37.8%로 처리에 의한 방제효과를 볼 수 없었다. 그러나 대조 약제인 농용신 수화제도 55.8%의 낮은 방제효과를 나타내어 약효의 지속성이 짧고 연용시 내성이 발생함을 알 수 있었다(표 20, 그림 21). 따라서 본 실험 결과의 실용화를 위해서는 전신저항성유도물질의 처리시기를 병발생 직전이 아닌 생장 초기부터 처리를 함으로서 유묘기부터 병에 대한 저항성을 확립하고 처리농도와 처리 간격을 조절하는 등의 시험을 확대 수행해야 할 필요가 있다고 사료된다.

표 20. 복숭아세균성구멍병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과

처리	이병엽율 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질 Pi0802 (1000배)	35.1	38.7	33.9	35.9	37.8
농용신 수화제(대조)	22.7	25.4	28.4	25.5	55.8
무처리	49.6	66.2	57.4	57.7	-



그림 21. 복숭아세균성구멍병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과

라. 특용작물에 대한 생물활성 검정

(1) 인삼에 대한 생물활성 스펙트럼 조사

인삼은 식물체내에 함유되어 있는 사포닌 때문에 여러 가지의 뛰어난 약리적 효능이 있으며, 항암작용 또한 탁월한 것으로 알려져 있다. 인삼은 1996년까지는 재배면적과 생산량이 계속적으로 하락하여, 면적이 8,940 ha, 생산량은 10,147 M/T으로 저조하였지만, 1996년 이후 증가하기 시작하여 2006년의 재배면적은 약 16,400 ha, 생산량은 19,900M/T까지 증가하였다. 국내에서 인삼의 지상부와 지하부를 침입하는 병해로 총 19종의 병해가 알려져 있다(한국식물병리학회, 2004). 인삼은 저온다습한 동일한 지역에서 다년간 재배되고, 재배기간 중에 병이 발생하기 쉬운 조건에 노출되어, 포장에서의 병해 관리에 주의하여야 한다. 인삼병을 방제하기 위해서 윤작, 저항성 품종의 재배 등은 가능성이 낮은 방법들이다. 오래 전부터 생물적 방제를 통하여 병해 관리를 시도하고 있지만, 살균제를 사용하는 화학적 방제만큼 정확하고 효과적인 방법은 없다. 그러나 매년 반복되는 식물병의 방제를 위해서 동일한 기작을 갖는 살균제가 다년간 사용될 경우, 포장에서 살균제에 저항성인 병원균이 출현하여 문제가 될 가능성이 많기 때문에 효과적이면서도 저항성 발현 문제가 없는 살균제 처리 체계의 확립이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 전신저항성유도물질 처리에 의한 인삼의 병 발생 억제 효과를 확인하고자 하였다. 이에 충남 금산군 일대에서 재배농가 포장을 임대하여 처리 방법에 따라 잿빛곰팡이병에 대한 예방효과에 대한 시험을 수행하였다.

전신저항성유도물질을 이용하여 인삼의 지상부 병의 효율적인 방제를 위하여 처리 방법을 달리하여 잿빛곰팡이병에 대한 병방제효과를 점검하였다. 처리 방법은 묘삼 분의처리, 묘삼 침지처리 그리고 정식 후 관주에 의한 처리로 나누어 대조 화학제 및 무처리와의 방제효과 검정을 실시하였다.

먼저 묘삼 분의처리에 의한 병방제효과에서는 전신저항성유도물질의 분의처리 후 잿빛곰팡이병의 발생시기에 조사하였다. 그 결과 전신저항성유도물질 처리에서는 58.3~59.5%의 방제효과를 나타내었고, 대조 화학제인 깨끄탄 수화제는 80.4%의 방제효과를 나타내어 분의처리에 의한 병방제효과를 볼 수 있었다(표 21). 전신저항성유도물질 사용량에 따른 잿빛곰팡이병 억제효과는 유의성이 있어 묘삼 100g에 전신저항성유도물질 5g 처리를 하여도 방제효과가 있음을 알 수 있었다.

표 21. 묘삼 분의처리에 의한 인삼 잿빛곰팡이병 방제효과 검정

처리	희석배수 및 사용량	이병주율 (%)				방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질	5g/묘삼100g	8.0	10.6	12.6	10.4	59.5
전신저항성유도물질	10g/묘삼100g	13.9	8.2	10	10.7	58.3
깨끄탄 수화제(대조)	1,000배	5.0	5.7	4.4	5.0	80.4
무처리	-	23.4	28.5	25.1	25.7	-

묘삼 침지처리에 의한 인삼 잿빛곰팡이병의 방제효과에서는 전신저항성유도물질 처리에 의하여 55.2%의 방제효과를 나타내었다(표 22).

표 22. 묘삼 침지처리에 의한 인삼 잿빛곰팡이병 방제효과 검정

처리	희석배수 및 사용량	이병주율 (%)				방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질	1,000배	12.3	10.8	11.4	11.5	55.2
깨끄탄 수화제(대조)	1,000배	5.0	5.7	4.4	5.0	80.4
무처리	-	23.4	28.5	25.1	25.7	-

마지막으로 정식 후 10일 간격 2회 관주처리 한 처리구에서는 51.2%의 방제효과를 나타내었다. 앞서 실시 한 묘삼 처리 보다는 다소 낮은 방제효과를 나타내었지만 추후 처리방법의 개선 및 적절한 희석배수 시험이 추가된다면 생화학작용보호제로서의 개발 가능성은 충분히 있다고 사료된다. 현재까지의 시험 결과로는 전신저항성유도물질의 처리 방법은 정식 후 보다

는 묘삼에 처리하는 방법이 효과적이었다고 판단되며 묘삼처리에 따른 잣빛곰팡이병의 방제 가능성을 보여준다(표 23).

표 23. 정식 후 관주 처리에 의한 인삼 잣빛곰팡이병 방제효과 검정

처리	희석배수 및 사용량	이병주율 (%)				방제가 (%)
		I 반복	II 반복	III 반복	평균	
전신저항성유도물질	1,000배	11.5	13.4	12.7	12.5	51.2
깨뜨탄 수화제(대조)	1,000배	5.0	5.7	4.4	5.0	80.4
무처리	-	23.4	28.5	25.1	25.7	-

인삼에서 발생하고 있는 잣빛곰팡이병은 주로 봄에 새순이 올라오는 뇌두 부위를 병원균이 가해하거나 병원균이 포장에 방치되어 있는 고사된 줄기에서 증식하여 건전주를 감염을 한다. 그러나 여름 장마기에 저온·다습한 날씨가 지속된다면 뇌두와 줄기뿐만 아니라 잎에도 상당한 피해를 주고 있으며 비슷한 시기에 발생하는 점무늬병이나 탄저병의 발생도 용이하게 해 준다고 판단된다. 따라서 전신저항성유도물질을 묘삼에 처리함에 따라 인삼에 발생하는 주요 지상부 병해를 예방하는 효과를 볼 수 있고 환경친화적인 방법에 의하여 방제 할 수 있다고 판단된다.

마. 화훼류에 대한 생물활성 검정

(1) 꽃도라지에 대한 생물활성 검정

꽃도라지 잣빛곰팡이병은 꽃도라지에서 최대의 병해로 저온·다습인 상태가 계속되면 잎, 줄기, 꽃대 및 꽃에 전반적으로 발생하며 수송 중에 출하상자 안에서 발생하는 경우도 있다. 잎에서는 갈색의 둥근 무늬를 만들고 잣빛곰팡이가 생긴다. 꽃대와 잎에서는 먼저 물먹은 모양으로 갈변부패하고 그 후 병반위에 잣빛곰팡이가 생기며 수술에도 발생한다. 줄기에서는 먼저 회갈색이 되고 점차 회색으로 변하여 병반위에 잣빛곰팡이가 생기며 피해부분부터 시들어간다.

꽃도라지 균핵병은 저온, 과습 상태가 계속되면 줄기나 잎에 발생한다. 회백색 병반이 생기고 습도가 높으면 백색균사가병반부에 생긴다. 고사한 주변이나 줄기 속에는 쥐똥모양의 검은색 균핵이 형성된다. 병원균은 슬러로티니아(*Sclerotinia*)로 발병적온은 15~0℃이며 전염원은 피해 주에 생긴 균핵으로 토양 속에 오래 잔존한다.

본 연구에서는 전신저항성유도물질을 화훼류 작물에 적용하기 위하여 강원도 평창군 횡계리 화훼 재배농가에서 꽃도라지를 선발하여 처리에 따른 전신저항성유도물질의 병방제효과

를 검정하였다. 시험은 병발생초기 7일 간격 3~4회 엽면 살포 하였으며 잣빛곰팡이병과 균핵병이 발생한 농가를 섭외하여 수행하였다.

시험 결과 전신저항성유도물질 처리에 따른 병방제효과는 잣빛곰팡이병과 균핵병 각각 43.8%, 48.3%로 기존의 원예작물에서의 병방제효과보다 다소 낮았다(표 24, 표 25, 그림 22). 이러한 결과는 무처리구의 병발생율이 11~20%로 무처리 발병률이 다소 낮았고, 처리시기의 조정과 처리희석배수 검토를 통하여 추후 최적의 병방제효과를 나타낼 수 있는 연구 결과를 토출해 낼 필요가 있다고 판단된다.

표 24. 꽃도라지 잣빛곰팡이병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과

처리	이병주율 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III반복	평균	
전신저항성유도물질	6.9	5.3	7.4	6.5	43.8
무처리	13.4	11.8	9.7	11.6	

표 25. 꽃도라지 균핵병에 대한 전신저항성유도물질의 방제효과

처리	이병주율 (%)				방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III반복	평균	
전신저항성유도물질	5.6	8.1	5.6	6.4	48.3
무처리	11.4	12	13.9	12.4	

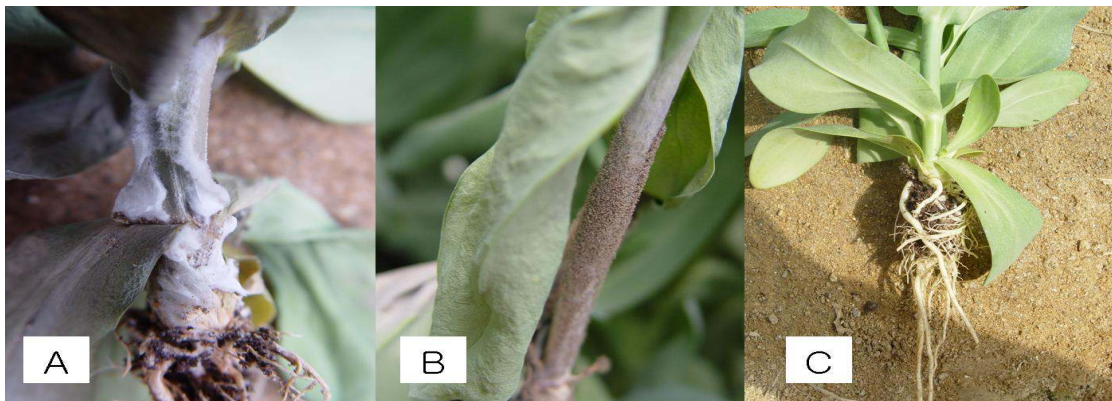


그림 22. 꽃도라지에 대한 전신저항성유도물질 생물활성 점검(A; 균핵병 이병주, B; 잣빛곰팡이병 이병주, C; 전신저항성유도물질 처리에 따른 건전주)

전신저항성유도물질의 처리에 의한 생물활성 스펙트럼 조사를 실시하였다. 다양한 작목에 대하여 처리에 의한 효과를 볼 수 있었으며 친환경적인 방법에 의하여 방제가 될 수 있다고 판단된다. 이상의 병 방제 효과는 사업계획서 제시된 논문(*J. Gen Plant Pathol.* (2005) 71:211-220)에 의거하여 볼 때 미국에서 개발된 전신저항성유도물질보다 효과가 우수할 것으로 사료된다(그림 23).

BACTERIAL AND PHYTOPLASMA DISEASES

Rosemary Shrestha · Kenichi Tsuchiya · Su Jin Baek
Hu Nam Bae · Ingyu Hwang · Jang Hyun Hur
Chun Keun Lim

Identification of *dspEF*, *hrpW*, and *hrpN* loci and characterization of the *hrpN_{Ep}* gene in *Erwinia pyrifoliae*

217

Table 3. HR plant assay performed for HrpN_{Ep} and HrpN_{Ea} of *Erwinia pyrifoliae* and *E. amylovora*, respectively, at various concentrations

Concentration (µg/ml)	HR at various times									
	14h		18h		24h		36h		48h	
	HrpN _{Ep} ^a	HrpN _{Ea} ^b	HrpN _{Ep} ^a	HrpN _{Ea} ^b	HrpN _{Ep} ^a	HrpN _{Ea} ^b	HrpN _{Ep} ^a	HrpN _{Ea} ^b	HrpN _{Ep} ^a	HrpN _{Ea} ^b
5	-	-	+	-	+	-	+	+	++	+
10	+	-	+	+	++	+	++	+	++	+
20	+	+	++	++	+++	++	++++	++++	++++	++++
30	++	++	+++	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++
MES buffer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, 25% collapse of tissues of tobacco leaves by HR; ++, 50% collapse of tissues of tobacco leaves by HR; +++, 75% collapse of tissues of tobacco leaves by HR; +++++, >75% collapse of tissues of tobacco leaves by HR; -, negative reaction, no HR symptoms

^aPurified HR elicitor protein of *E. pyrifoliae*, expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS under the T7 promoter of the pET-15b vector

^bPurified HR elicitor protein of *E. amylovora*, expressed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS under the T7 promoter of the pET-15b vector

그림 23. 전신저항성유도물질에 대한 기존 제품과의 분석

2. 전신저항성유도물질의 작용기작(mode of action) 구명

가. 전신저항성유도물질 처리에 의한 오이 잿빛곰팡이병의 발병억제 기작 연구

(1) 잿빛곰팡이병에 대한 발병억제

작물은 성장하는 동안 일정 범위내에서 활발한 방어기작을 가지고 있어 병원균의 침입에 대하여 저항성으로 작용한다. 병저항성 유도물질은 사전에 처리한 부분뿐만 아니라 멀리 떨어진 부위에 이르기까지 병원균에 침입에 대하여 저항성을 증대시킬 수 있다. 이러한 유도 물질 처리에 의한 저항성을 systemic acquired resistance(SAR)이라 칭하며 바이러스, 세균, 곰팡이 등 식물병원균에 효과적으로 작용하는 것으로 알려져 있다(Ryals 등, 1996).

본 연구에서는 주요 원예작물 중 수량저하 및 품질저하의 주원인인 오이 잿빛곰팡이병을 선발하여 생육 중 전신저항성유도물질 처리에 의한 발병억제에 관하여 연구하였다.

오이(품종: 백다다기)는 온도 25℃, 습도 60% 이상인 온실에서 재배하였고 전신저항성유도물질 20 μ g/ml의 농도로 오이 유묘에 분무 처리하였다. 처리 후 유묘를 온실 내에서 생장 시켰고, 전신저항성유도물질 처리의 최적 시간대를 측정하기 위하여 1, 2, 3, 4일 후에 잿빛곰팡이 병원균을 접종하여 관찰하였다. 잿빛곰팡이병에 대한 방제 효과는 병발생율에 따라 접종 후 4, 7, 11, 14일에 조사하였다.

시험 결과 무처리구는 4일만에 병반이 형성되었으며 12.4%의 발병율을 나타내었고, 접종 후 14일 까지 발병이 점차적으로 증가하여 76.4%의 발병율을 나타내었다. 하지만 전신저항성유도물질 처리구는 무처리에 대비하여 시간이 경과함에 따라 발병율이 증가 되었지만 현저히 발병이 억제되는 효과를 나타내었다. 또한 전신저항성유도물질 처리 3일 후 접종한 처리구에서 가장 높은 방제효과를 나타내었다. 관찰 11일에 전신저항성유도물질 3일전 처리 유묘는 무처리에 대비하여 77.5%의 방제효과로 가장 우수하게 나타났다(그림 24). 시험 기간이 지나서는 잿빛곰팡이병의 발병억제효과는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 전신저항성유도물질 처리에 의하여 병원균의 발병을 억제시킬 수 있고 추후 사업화에 처리 후 14일까지의 약효 및 예방 효과가 있음을 확인하였다.

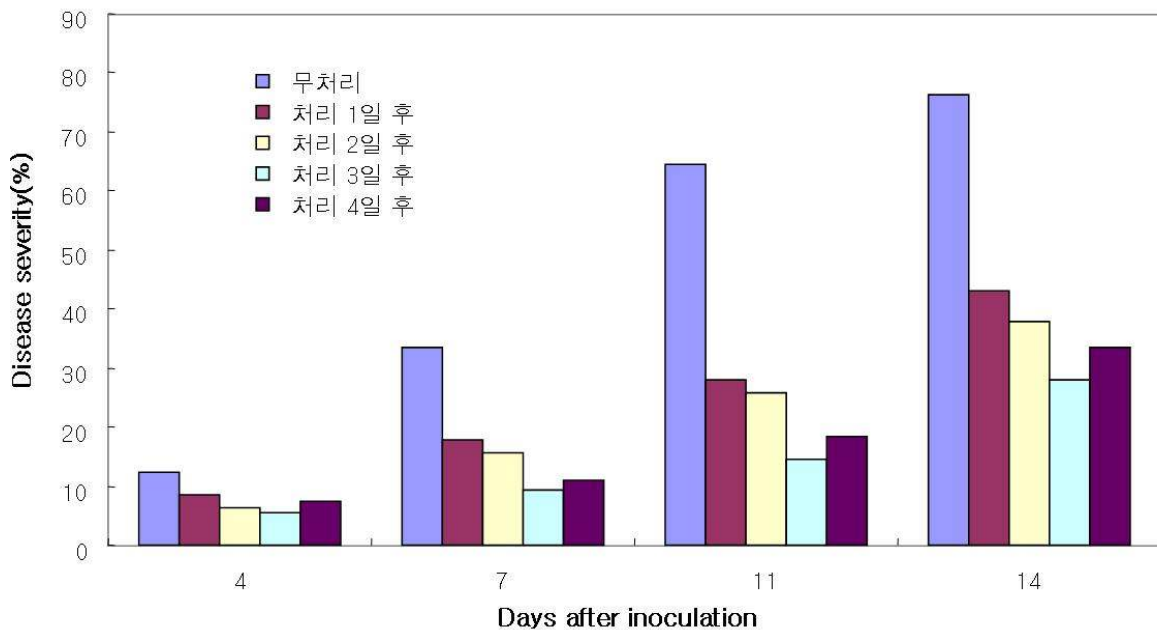


그림 24. 전신저항성유도물질 처리에 의한 시간별 잿빛곰팡이병 병제효과 검정.

(2) 전신저항성유도물질 처리업에서의 균사생장 억제 연구

전신저항성유도물질 20 μ g/ml의 농도로 처리 후 3일이 경과한 시점에서 잿빛곰팡이병원균을 인공접종 하였다. 접종 48시간 후 각 처리구의 엽을 5mm 크기의 디스크로 절단하여 살균한 뒤 마쇄하였다. 마쇄후 PDA 배지에 평판회석법에 의하여 배지상에 형성된 콜로니 수를 관

찰하였다.

시험 결과 전신저항성유도물질 처리구에서는 무처리구에 대비하여 현저하게 잿빛곰팡이 병원균의 밀도가 억제되었다(그림 25). 이러한 억제 효과는 관찰 4일과 7일에 가장 높게 나타났다. 이상의 결과로 보아 전신저항성유도물질이 병원성 곰팡이와의 직접적인 접촉으로 인한 방제효과 보다는 저항성을 발달 시켜 병원균을 억제하는 기작을 가지고 있음을 예상 할 수 있었다.

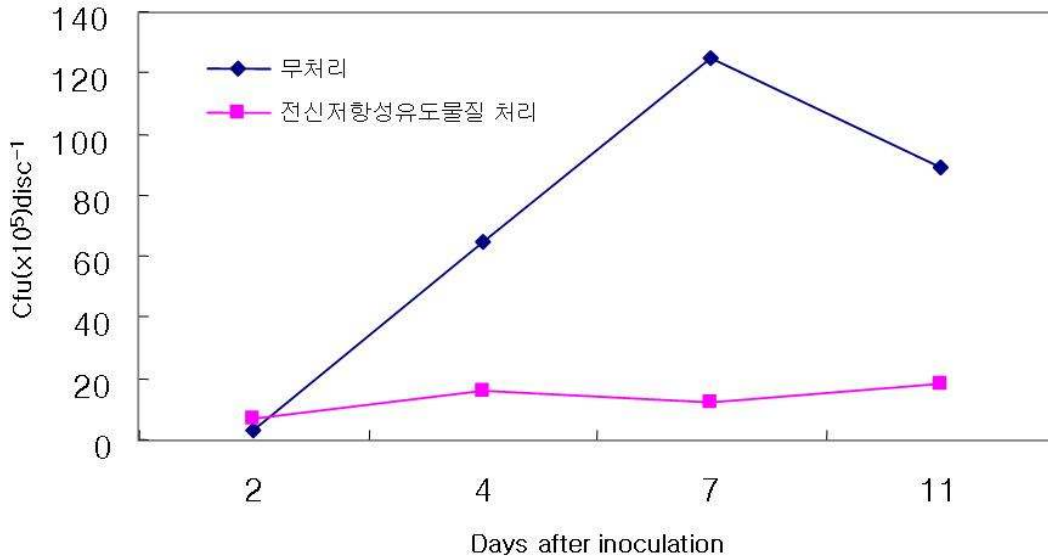


그림 25. 전신저항성유도물질 처리에 의한 오이 잿빛곰팡이균의 처리엽의 균밀도 검정.

(3) 전신저항성유도물질 처리에 따른 효소활성 측정

작물체 내에서 SAR 유도는 다양한 세포 방어기작들과 밀접하게 연관되어 있으며 이러한 작용은 pathogenesis-related 단백질 합성, 파이토알렉신, active oxygen species(AOS)의 축적, 병원균에 대한 세포벽 내에서의 신속한 대응 그리고 다양한 방어기작과 관련된 효소들과 연관이 깊다.

본 연구에서는 작물체내의 세포반응에 연관되어 있는 peroxidase(POX) 효소와 작물세포를 보호한다고 알려져 있는 glutathione peroxidase(GPX) 효소에 대하여 전신저항성유도물질 처리에 의한 효소활성을 측정하여 작물체의 다양한 방어기작에 대하여 연구하였다.

작물체내의 효소 추출을 위하여 처리구는 오이 유묘에 전신저항성유도물질을 분무처리하고 잿빛곰팡이병원균을 3일 후에 접종하였다(처리구 1). 대조구는 전신저항성유도물질만을 처리한 구(처리구 2), 유묘에 물을 살포하고 3일 후에 접종한 처리구(처리구 3), 물만을 처리한 구(처리구 4)로 구분하였다. 효소추출을 위한 시료는 각각 처리 3, 5, 7일 후에 채취하여 효소를 추출하였다. 단백질 함량은 표준으로 BSA를 사용한 Bradford의 방법으로 측정하였다.

① POX의 효소 활성 변화

흡광도 측정은 UV spectrophotometer에서 측정하였고, POX의 효소 활성 변화 측정은 Maehly과 Chane(1954)의 시험과 같이 기질은 guaiacol를 사용하였다. 효소활성은 흡광도 (OD₄₈₀)의 변화로 계산하였으며 분당 생산하는 단백질 함량을 mg 단위로 나타내었다.

그 결과 전신저항성유도물질 처리구에서 오이의 유도저항성은 POX의 활성 증가와 관련이 있었다. 전신저항성유도물질 처리 후 잣빛곰팡이병을 접종한 처리구 1에서는 관찰한 3일 후부터 높아졌고, 5일 후 가장 높은 결과를 나타내었다. 하지만 7일 후는 감소하는 경향을 나타내었다. 전신저항성유도물질만을 처리한 처리구 2에서는 처리구 1과 같은 POX 활성을 나타냈으나 높지는 않았다. 잣빛곰팡이병원균만을 처리한 처리구 3은 활성이 나타나지 않았다(그림 26).

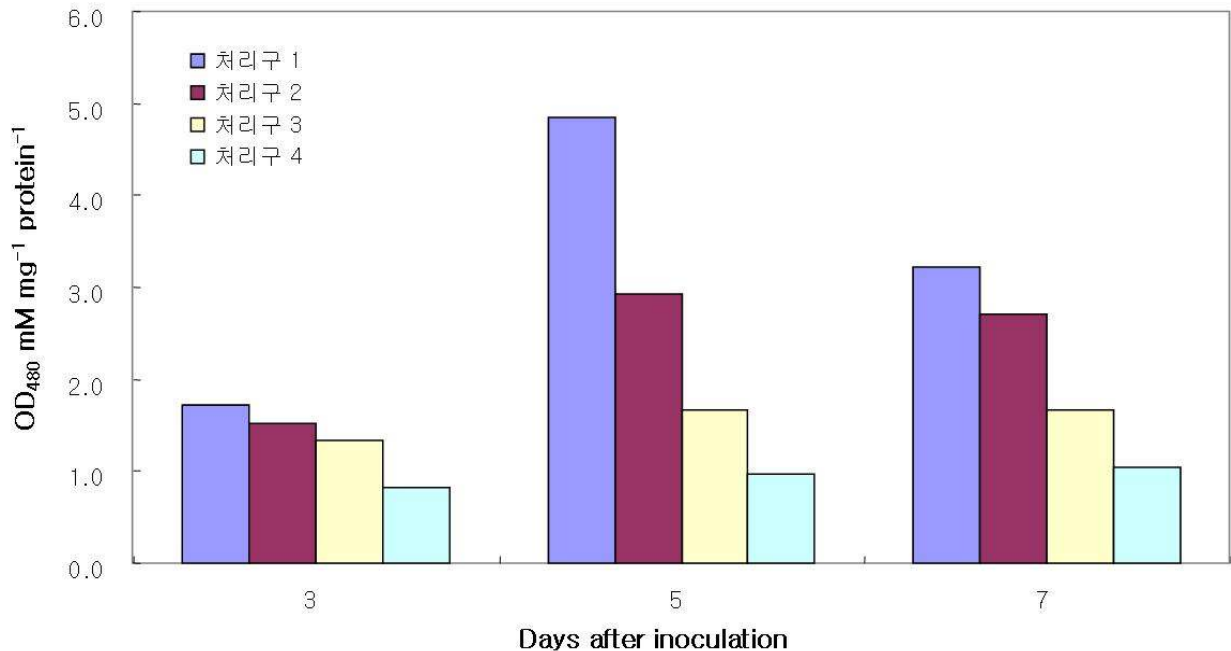


그림 26. 오이엽에서의 전신저항성유도물질 처리에 의한 POX의 효소 활성 변화.

② GPX의 효소 활성 변화

GPX 활성측정은 Kampranis 등(2000)의 방법에 따라 OD₃₄₀에서 흡광도를 측정하였고, 단백질의 GPX 함량(mg)을 측정하였다.

그 결과 전신저항성유도물질 처리구에서 오이의 유도저항성은 GPX의 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 전신저항성유도물질 처리 후 잣빛곰팡이병을 접종한 처리구 1에서는 관찰 3, 5일 후 모두 다른 처리구에 비하여 GPX 활성이 높게 나타났다. 하지만 7일 후에는 활성이 나타나지 않아 7일까지는 유지되는 모습은 관찰 할 수 없었다. 전신저항성유도물질만을 처리한 처리구 2에서는 관찰 5일 후에 다소 높은 활성을 나타내었지만 처리구 1에 대비하여서는 높지 않았지만 처리구 3과 4보다는 높았다. 처리구 1과 같은 POX 활성을 나타냈으나 높지는 않았

다. 잿빛곰팡이병원균만을 처리한 처리구 3은 활성이 나타나지 않았고 무처리구인 처리구 4에서도 POX 활성은 관찰할 수 없었다(그림 27).

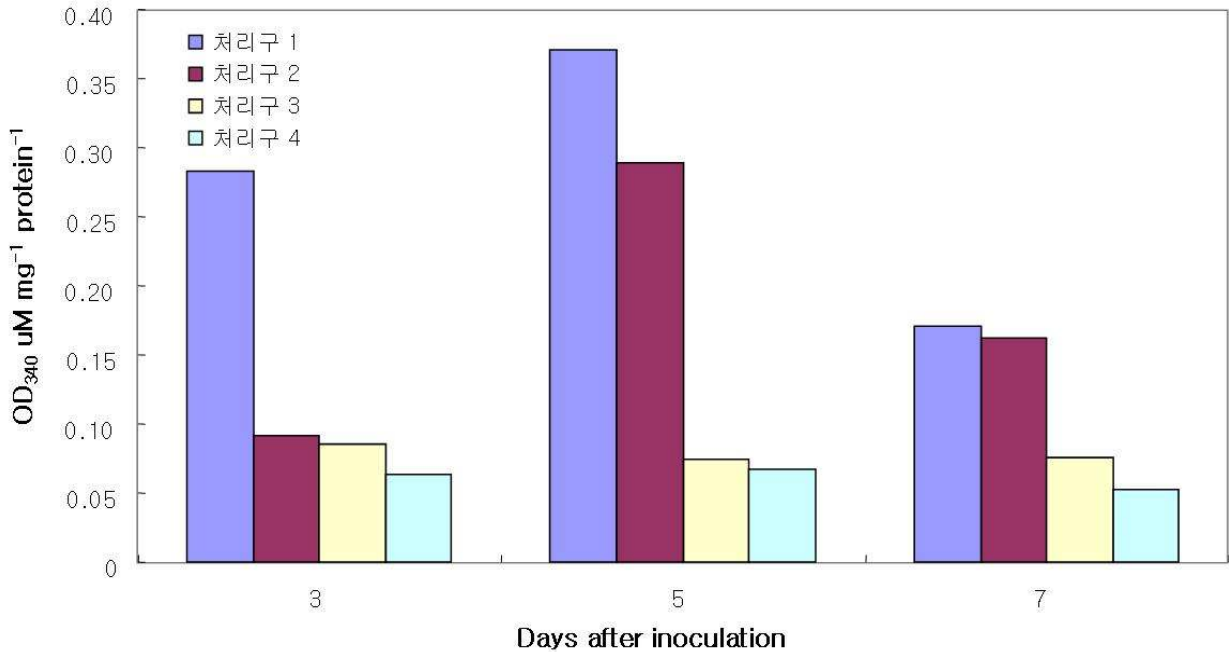


그림 27. 오이엽에서의 전신저항성유도물질 처리에 의한 GPX의 효소 활성 변화

위와 같은 결과는 전신저항성유도물질이 처리된 오이 유묘의 조직 세포내에서는 각종 효소활성이 증가하였는데, 병원균을 접종하지 않은 처리구보다 접종한 처리구에서 활성이 높음을 관찰하였다. 그러나 대조구로 사용한 물 처리구에서는 효소활성이 나타나지 않았다. 따라서, 전신저항성유도물질을 작물에 처리 하였을 때 병원균의 발병억제 기작은 식물체 조직 내의 세포의 방어시스템의 활성 증가로 인한 것으로 판단된다.

나. 전신저항성유도물질의 분자생물학적 작용기작 연구

(1) PR1 유전자 발현 분석

전신저항성유도물질이 식물체에 처리되어졌을 때 salicylic acid, ethylene 및 jasmonic acid와 같은 중간 전구체에 의해 식물병 저항성 유전자들이 발현되어 결국에는 유도저항성(SAR)이 발현된다는 가설이 현재까지 일반적인 유도저항성의 기작이다. 이에 SAR 관련 유전자를 조사한 결과 PR1, PR-2, PR-5, PDF-1.2, Thi2.1이 있다는 것이 확인되었다.

따라서 본 연구에서는 담배를 대상으로 SAR 관련 유전자인 PR1유전자의 발현량을 분석하여 식물병 저항성 유도체로서 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질의 기능을 검증하고자 하였다. 또한 대조구로 미국 화상병원세균 유래 전신저항성유도단백질을 사용하여 PR1 유전자의 발현차이를 확인하였다.

PR1 유전자의 발현을 유도하기 위하여 그림 28과 같이 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질인 담배(*Nicotiana Tabaccum* var. Xanti-nc)에 처리하였고 total RNA를 추출하여 RNA 추출 및 northern hybridization을 수행하였다. 대조구로는 물만을 처리한 담배를 사용하였다.

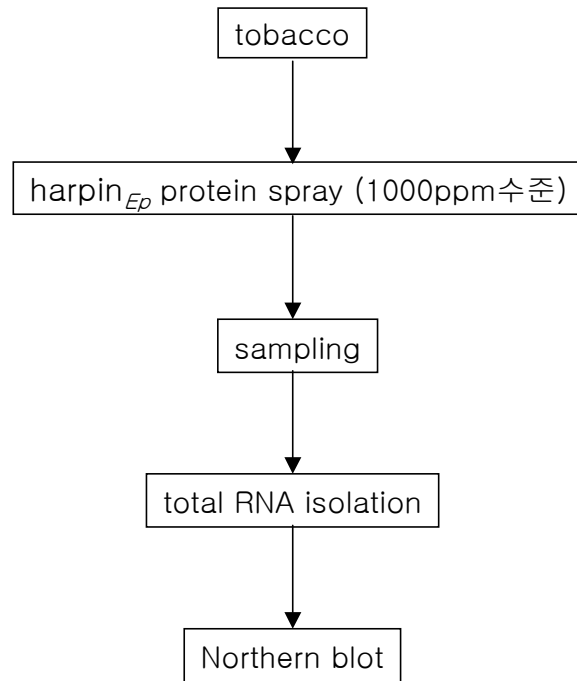


그림 28. 담배를 이용한 PR1 유전자 발현 분석 모식도.

시험 결과 전신저항성유도물질을 처리한 담배엽에서 분리한 RNA에서는 그림 28과 같이 처리 후 48시간 까지 PR1 유전자가 발현되는 것을 확인할 수 있었다(그림 29). 반면 처리하지 않은 대조구에서는 PR1 유전자 발현을 관찰 할 수 없었다.

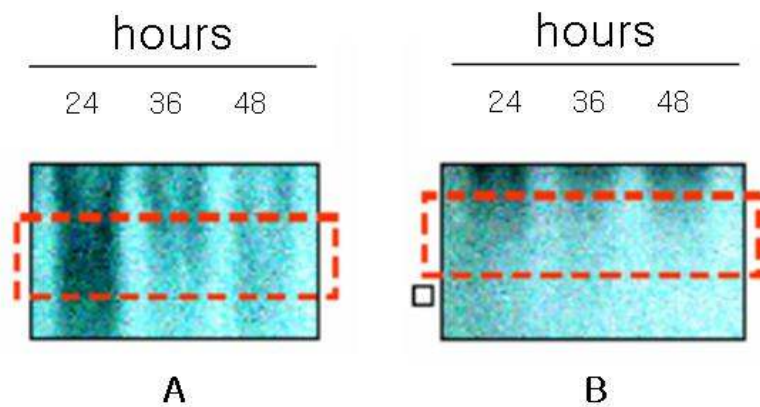


그림 29. 전신저항성 유전자 처리에 의한 PR1 유전자 발현 유무 검정.

또한 추출된 RNA 중, mRNA의 양을 검정하기 위하여 그림 30과 같이 실시하였다.

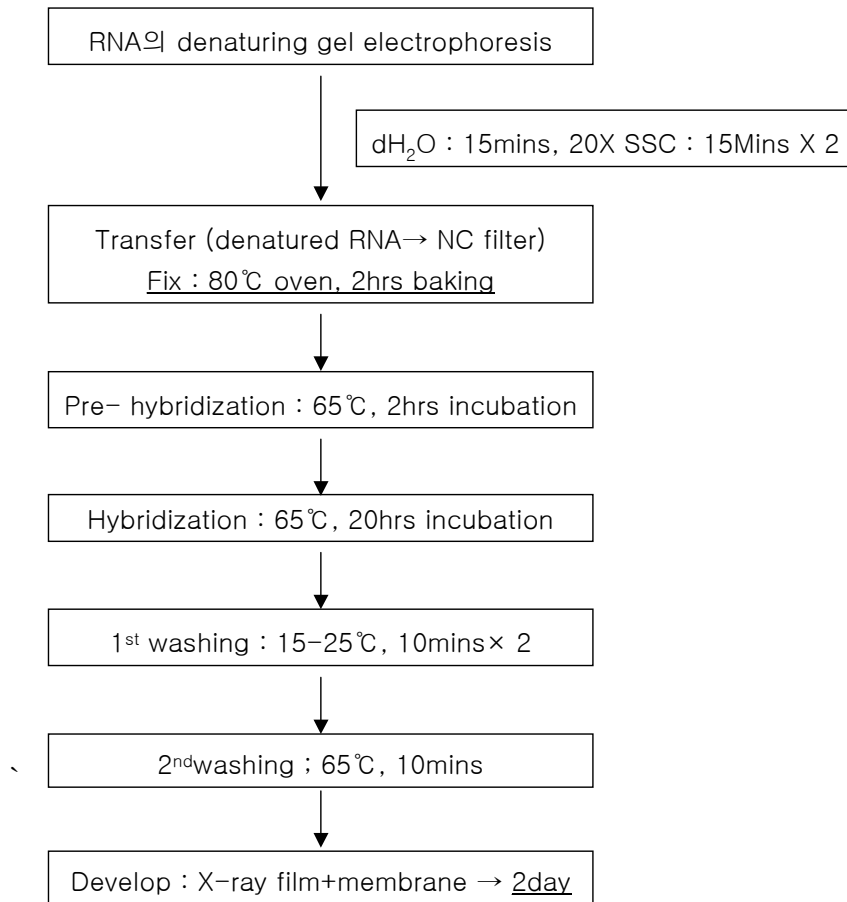


그림 30. 전신저항성유도물질 처리에 의해 유도되는 PR1 유전자의 mRNA를 분석하기 위한 northern blotting 모식도.

시험 결과 아래의 그림 29와 같이 전체적인 반응 결과, 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질이 대조구보다 PR1 유전자의 발현량이 많아 강한 저항성 발현을 유도한다는 것을 알 수 있었다. 특히 반응 2일째에 밴드 intensity를 조사한 결과 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리구는 4.174인 반면, 대조구에서는 2.601로서 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질이 37.7% 우수하게 전신저항성을 유도하는 것으로 판명되었다 (그림 31).

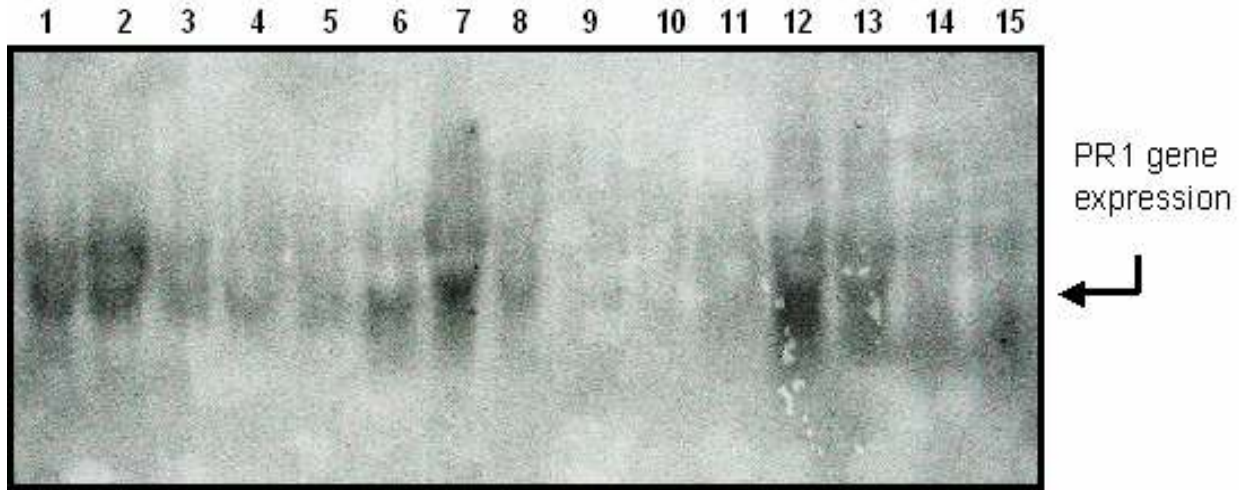


그림 31. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리에 의한 PR1 유전자의 발현 (Lane 1-5 : 무처리, 6-10 : 대조구(경쟁), Lane 11-15 : 전신저항성유도물질; 1, 6, 11 : 처리 1일 후; 2, 7, 12 : 처리 2일 후; 3, 8, 13 : 처리 3일 후; 4, 9, 14 : 처리 5일 후; 5, 10, 15 : 처리 7일 후).

(2) 과민성반응 유도 유전자(HypersensitiveResponseandPathogenicity(Hrp) gene) 연구

전신저항성유도물질의 식물 과민성 반응은 식물의 중요한 방어기작이며 식물병원균의 침입을 받은 부위의 식물세포가 급격하게 괴사하는 현상으로 식물세포의 괴사에 의해 세균의 이동과 확산을 스스로 억제하는 것이다. 이러한 병원균과 식물체간의 친화적 비친화적 관계를 이용하여 식물에서 세균의 발병능력 유무를 결정하기도 한다. 세균을 식물에 접종했을 때 과민성 반응을 유도하거나 병을 유도하는데 병은 비교적 느리게 진전되지만 과민성 반응은 대부분 24 시간 이내에 결정된다. 병원체가 기주를 어떻게 인식하는지 그리고 기주가 병원체를 어떻게 인식하는지 아직 알려져 있지 않지만 병원체와 기주 세포가 접촉하면, 초기반응으로써 병원체의 생장을 허락하여 병의 발생을 방지할 것인지 병원체의 생장을 억제하여 병의 발생을 방해할 것인지를 결정하는 즉각적인 반응이 가동된다.

기주가 병원체를 인식하는 과정은 기주식물의 큐틴을 분해하는 cutinase 생산을 활성화하는 지방산, 곰팡이나 세균으로 하여금 펙틴분해 효소를 분비하도록 자극하는 펙틴의 galacturonan 분자, 일부 병원체 변식체의 활성화 및 발아를 촉진하는 페놀성 화합물, 식물의 상처로부터 유래되어 병원체의 감염과 관련된 유전자를 활성화시키는 페놀물질 및 당류 등의 병원체를 활성화하는 신호전달체계의 물질에 의해서 이루어진다. 반면, 병원체가 기주를 인식하는 과정은 기주인지물질, 기주인지구조 혹은 특별한 병원체 유도체 분자에 의해서이다. 본 연구에서 개발하고자하는 전신저항성유도물질은 식물의 과민성 반응에 관여하는 유전자로 보고되어 있다.

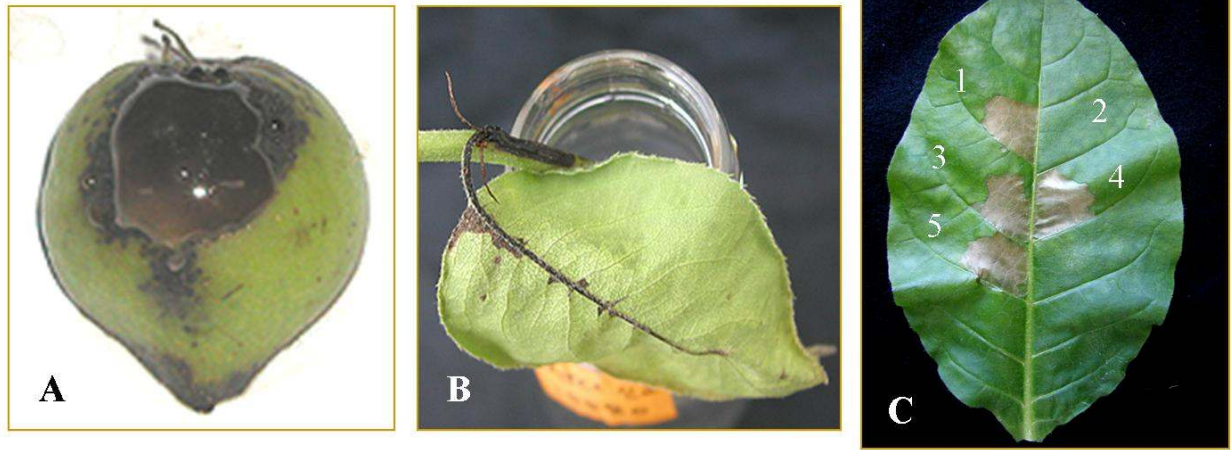


그림 32. *Erwinia* sp. 균주의 과민성반응 유도(Hypersensitive Response and Pathogenicity(Hrp) gene)에 의한 과민성 반응(A, B; 기주식물에서의 병원성 발현, C; 비기주식물에서의 과민성 반응 발현)

본 연구에서는 기존에 개발되었던 전신저항성유도물질과 본 연구과제의 물질과 활성 비교를 하기 위하여 과민성 반응을 기초로 하여 실내 실험을 수행하였다. 처리농도에 따라서 과민성유도단백질의 발현유무를 판단하여 실용화를 위한 기초 자료를 만들고자 하였다.

시험 결과 본 연구과제의 전신저항성유도물질은 5mg/ml의 저농도로 처리하여도 36h와 48h에서 과민성 반응을 나타냄으로서 기존의 대조구보다 우수함을 알 수 있었다(표 26, 그림 33).

표 26. 전신저항성유도물질의 처리농도에 따른 과민성 반응 검정

처리농도 (mg/ml)	HR(과민성 반응) 발현									
	14h		18h		24h		36h		48h	
	Pioneer	경쟁	Pioneer	경쟁	Pioneer	경쟁	Pioneer	경쟁	Pioneer	경쟁
5	-	-	+	-	+	-	+	+	++	+
10	+	-	+	+	++	+	++	+	++	+
20	+	+	++	++	+++	++	++++	++++	++++	++++
30	++	++	+++	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++
MES buffer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

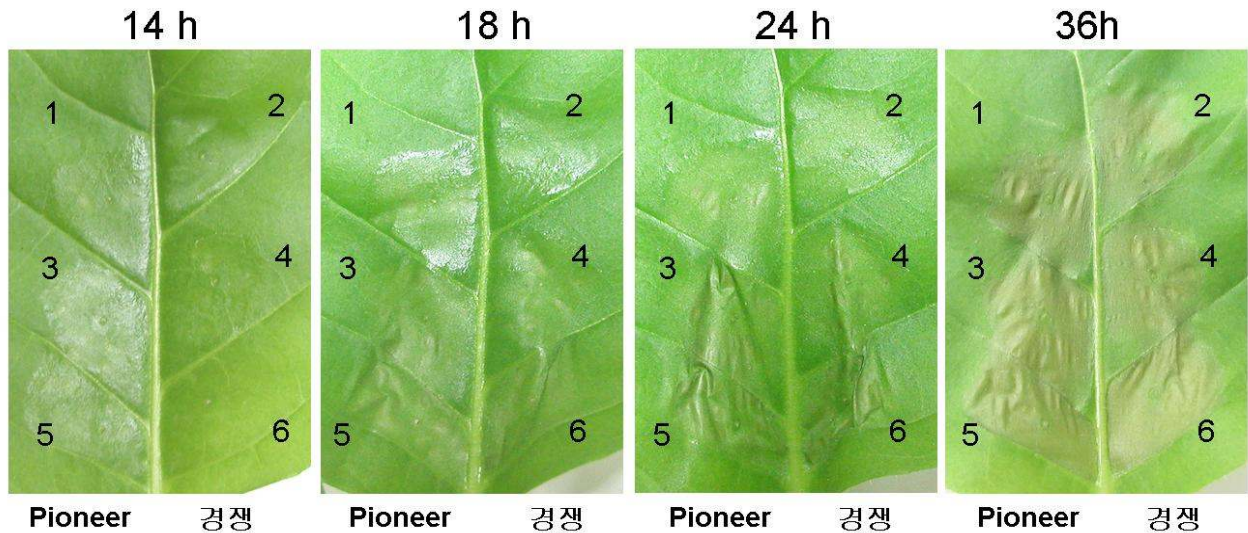


그림 33. 전신저항성유도물질의 처리농도에 따른 과민성 반응 검정

(3) 전신저항성유도물질의 병저항성 작용 특성 분석

본 연구에서는 전신저항성유도물질의 병저항성 작용 특성을 연구하기 위하여 담배식물을 모델로 형질전환식물을 만들어 조직별 및 기관 발달 단계에서 발현 양상을 파악하고 그 기능을 연구하고자 하였다. 형질전환에 사용한 담배는 *Nicotiana tabacum* cv. 'Havana SRI'이고 Horsch(1985)의 방법에 따라 형질전환 하였다. Agrobacterium은 배양하여 원심분리 한 후 배양한 액체배지의 1/10의 MSO 액체배지에 다시 현학시켰다. 기내에서 무균 배양한 담배의 잎을 filter paper로 물기를 제거한 후 MSO 고체배지에 치상하여 2-3일간 암배양 하였다. 암배양 후 MSO 액체배지로 3회 세척 후 callus와 shoot 유도배지(MSO, sucrose 30g/L, ticarcillin 500mg/L, cefotaxim 200mg/L, BA 1mg/L, NAA 0.1mg/L, PPT 4mg/L, Phyto agar 8g/L, pH 5.7)로 옮겼다. 일주일 배양한 후 각각의 절편을 다시 절반으로 잘라서 shoot 유도배지에서 재배양 하였다. 재분화된 shoot를 root 유도배지(MSO, sucrose 30g/L, ticarcillin 500mg/L, cefotaxim 200mg/L, IBA 1mg/L, PPT 4mg/L, Phyto agar 8g/L, pH 5.7)로 옮긴 후 뿌리가 유도되면 바로 MSO 배지로 옮겨주었다.

전신저항성유도물질의 형질전환 식물체의 특성을 분석하기 위해서 Flow cytometry system(FCS)를 사용하여 세포 분열 각 단계의 DNA 함량을 비교하였다. 마지막으로 Scanning Electron Microscope(SEM)을 통해 잎 표면 및 줄기의 세포를 관찰하였다.

우선 FCS 결과 그림 34에서 보는 바와 같이 wild type식물이 형질 전환된 식물보다 M phase의 DNA 함량이 많았다. 즉 전신저항성유도물질에 의해 형질 전환된 식물은 세포분열이 wild type보다 활발하게 많이 일어나고 있음을 알 수 있다.

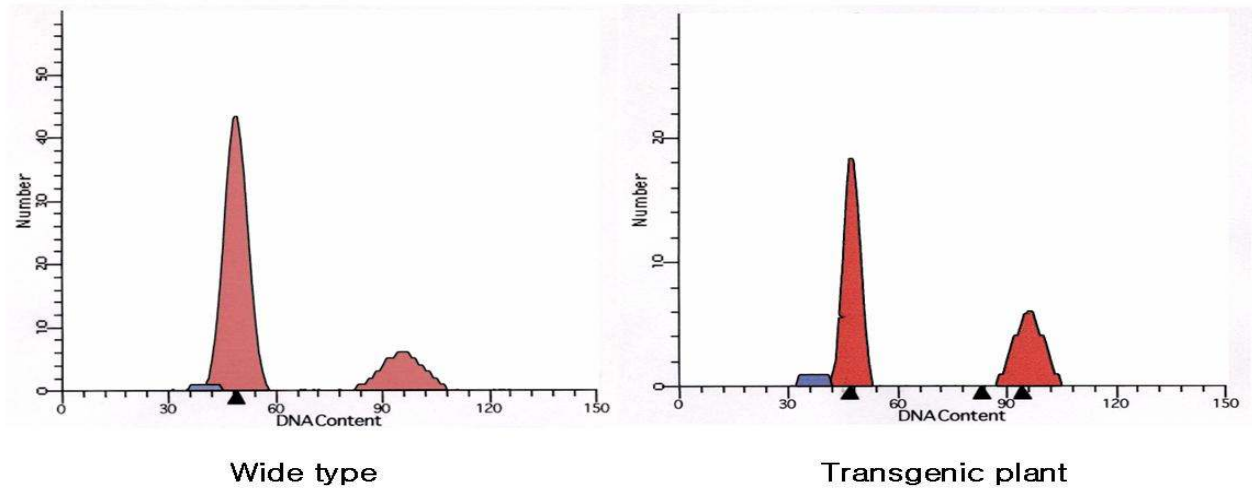
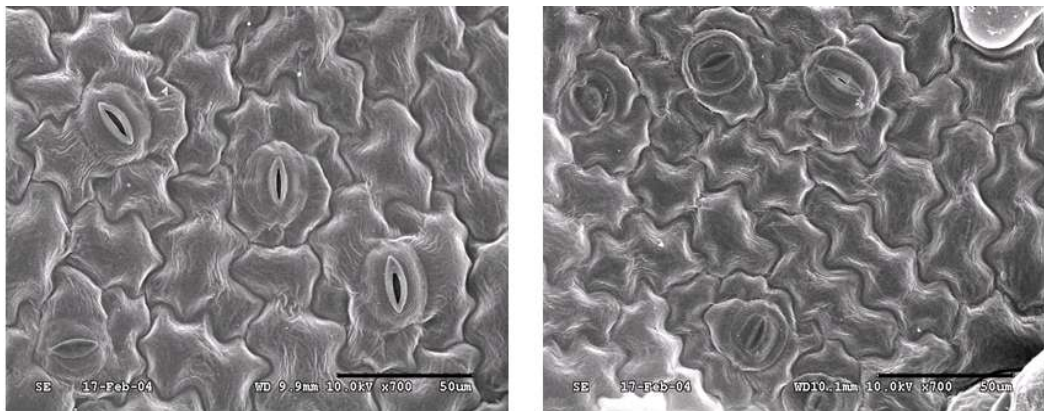


그림 34. Wild type 담배와 전신저항성유도물질 형질전환 담배의 DNA 함량

SEM을 이용하여 잎을 관찰한 결과를 그림 33, 34에 나타내었다. 그림 35은 잎 표면의 세포를 관찰한 것으로 전신저항성유도물질의 형질 전환된 식물의 세포크기가 식물세포의 수가 많게 나타났다. 이러한 결과는 전신저항성유도물질로 인하여 식물의 세포분열활동이 왕성하게 이루어지고 있음을 시사한다.

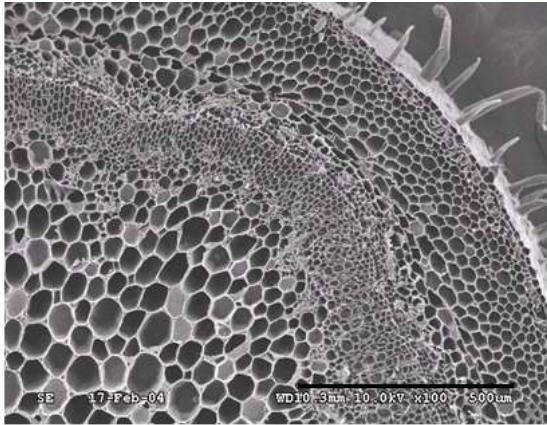


Wild type

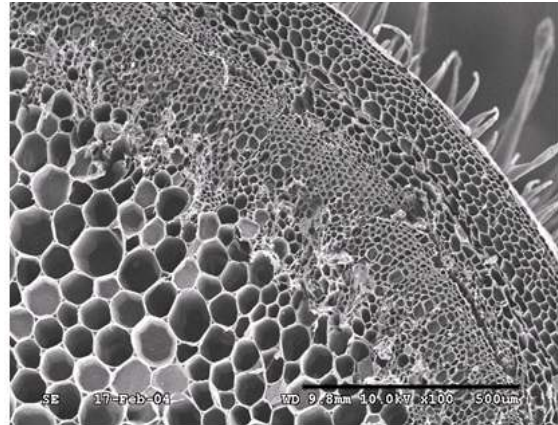
Transgenic plant

그림 35. Wild type 담배와 전신저항성유도물질 형질전환 담배의 엽표면 세포(Bar = 50µm)

그림 36는 담배 줄기의 횡단면을 관찰한 사진이다. 전신저항성유도물질 형질전환 담배의 경우 입표면의 세포를 비롯하여 식물체 줄기를 구성하는 세포들의 크기가 작고 밀도 있게 구성되어 있음을 확인할 수 있었다.



Wild type



Transgenic plant

그림 36. Wild type 담배와 전신저항성유도물질 형질전환 담배의 줄기 횡단면(Bar = 500 μ m)

그림 37은 위와 같은 전신저항성유도물질의 작용기작에 대하여 SCI 논문에 발표한 내용이다. 전신저항성유도물질을 생산하는 신규한 *Erwinia* sp. 세균의 병저항성 관련하여 논문에 게재하였다. 이는 추후 제품 실용화를 위한 기초 자료로 활용되기에 충분하다고 사료된다.

Mol. Cells, Vol. 25, No. 1, pp. 30-42

**Molecules
and
Cells**
©KSMCB 2008

Genetic Organization of the *hrp* Genes Cluster in *Erwinia pyrifoliae* and Characterization of HR Active Domains in HrpN_{Ep} Protein by Mutational Analysis

Rosemary Shrestha^{1,†}, Duck Hwan Park², Jun Mo Cho³, Saeyoull Cho⁴, Calum Wilson⁵, Ingyu Hwang⁶, Jang Hyun Hur⁷, and Chun Keun Lim^{1,*}

¹ Laboratory of Bacterial Genetics and Biotechnology, Division of Bio-Resources Technology, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea;

² Department of Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA;

³ Pioneer Co. Ltd., Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea;

⁴ Division of Bio-resources Technology, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea;

⁵ Department of Agricultural Sciences, School of Agricultural Sciences, University of Tasmania, Hobart TAS 7001, Australia;

⁶ School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea;

⁷ Department of Biological Environment, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

(Received March 30, 2007; Accepted July 23, 2007)

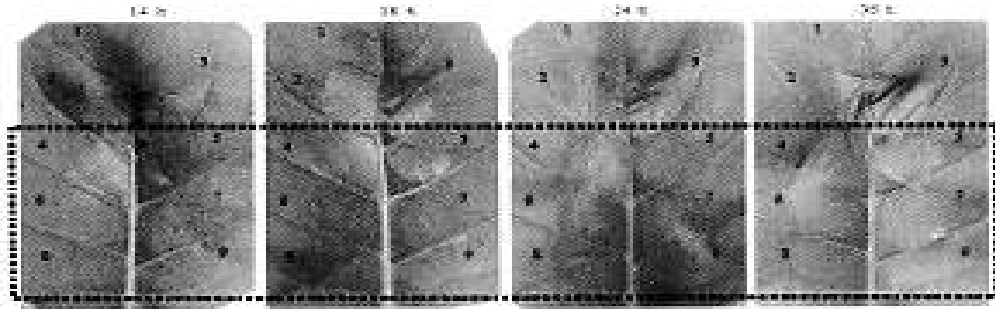


Fig. 5. Comparative HR analysis by infiltration of HrpN_{EP} and HrpN_{EP} mutant proteins (10 µg/ml) obtained by deletion of internal amino acids and site-directed mutagenesis at different time intervals. 1, Negative control (protein isolated from pET21-a vector); 2, HNΔC187 (D1AIR); 3, HNΔC187 (D2AIR); 4, HrpN_{EP}; 5, HrpN_{EP}; 6, HNΔC187 (D3AIR); 7, HNΔC187 (3LM); 8, HNΔC187 (5LM) and 9, HNΔC187 (DM41).

Acknowledgment This study was supported by a grant from the Ministry of Agriculture-Forestry, (506036-03-2-(G000), Republic of Korea).

Transgenic Tobacco Expressing the *hrpN_{EP}* Gene from *Erwinia pyrifoliae* Triggers Defense Responses Against *Botrytis cinerea*

Soo-In Sohn¹, Yul-Ho Kim, Byung-Ryun Kim², Sang-Yeob Lee³, Chun Keun Lim⁴, Jang Hyun Hur⁴, and Jang-Yong Lee*

National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 441-857, Korea;

¹National Institute of Agricultural Biotechnology, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea;

²Chungcheongnam-Do Agricultural Research and Extension Services, Yesan 340-861, Korea;

³National Institute of Agricultural Science and Technology, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea;

⁴College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

그림 37. 전신저항성유도물질에 대한 작용기작 연구에 관한 논문 게재

3. 5톤 이상의 scale에서 대량 배양 및 후공정 기술 개발

전신저항성유도물질은 수도작 및 원예작물 그리고 과수 및 화훼류에 대하여 문제가 되고 있는 주요 병원성 병해에 대하여 예방 및 억제 효과를 나타내었으며 실질적인 포장시험에서도 생화학작물보호제로서의 등록 가능한 수준의 병방제효과를 나타내었다(제 1 절 수행 결과). 전

신저항성유도물질을 이용한 새로운 생물농약의 실용화를 위한 대량배양기술 개발 연구를 시행하였다. 기존의 500L pilot scale에서의 공정을 재확인하고 5,000L 대량배양 기술을 확립하고자 하였다. 경제성 있는 탄소원, 질소원을 선발하여 전신저항성유도물질 생산에 안정성을 확립하고 여러 가지 조건에 따른 미생물 성장속도와 전신저항성유도물질의 생산량을 점검하였다. 더불어 미생물에서 생성되는 기능성 물질의 추출을 위한 최적의 후공정 시스템을 확립하여 대량 생산 기술을 확립하고자 한다.

가. 기존의 50L ~ 500L 수준의 배양 기술 정리

기존의 전신저항성유도물질을 생산하는 공정의 경우 미생물 작물보호제의 공정과는 달리 기능성 물질만을 순수 분리·정제하여 유효성분만을 얻기 위한 생산 과정이 포함되었다(그림 38). 이는 미생물만을 생산하는 생균제와는 달리 발효공정 중 미생물 배양은 물론이고 미생물 자체에서 생산되는 기능성 전신저항성유도물질의 분리·정제의 효율성을 감안하여 최적화된 후공정 시스템의 확립이 필수적이라 사료된다.

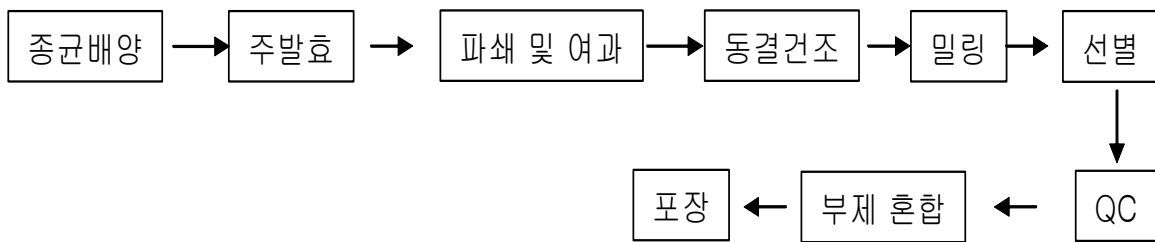


그림 38 기존의 분상형 전신저항성유도물질의 분리·정제 생산 공정 모식도.

위와 같은 생산 공정은 500L 발효공정과정을 포함하고 있으며 배양의 종료시간은 평균 16~17시간이고 이때 생성되는 전신저항성유도물질의 생성량은 약 2.4g/L 수준이었다(표 27). 500L 발효공정에서의 배양 profile은 그림 36과 같다. 배양 6시간 후 용존산소량(Dissolved Oxygen) 급격히 줄어들어 세균의 증식 속도가 빨라짐을 알 수 있었다. pH는 적정 pH를 배양 중 보정·유지하여 발효하였다(그림 39).

표 27. 기존의 500L pilot scale 배양 결과

Time(hr)	OD _{600nm}	전신저항성유도물질 생성량(g/L)
14	46	1.43
15	49	1.92
16	52	2.24
17	68	2.42

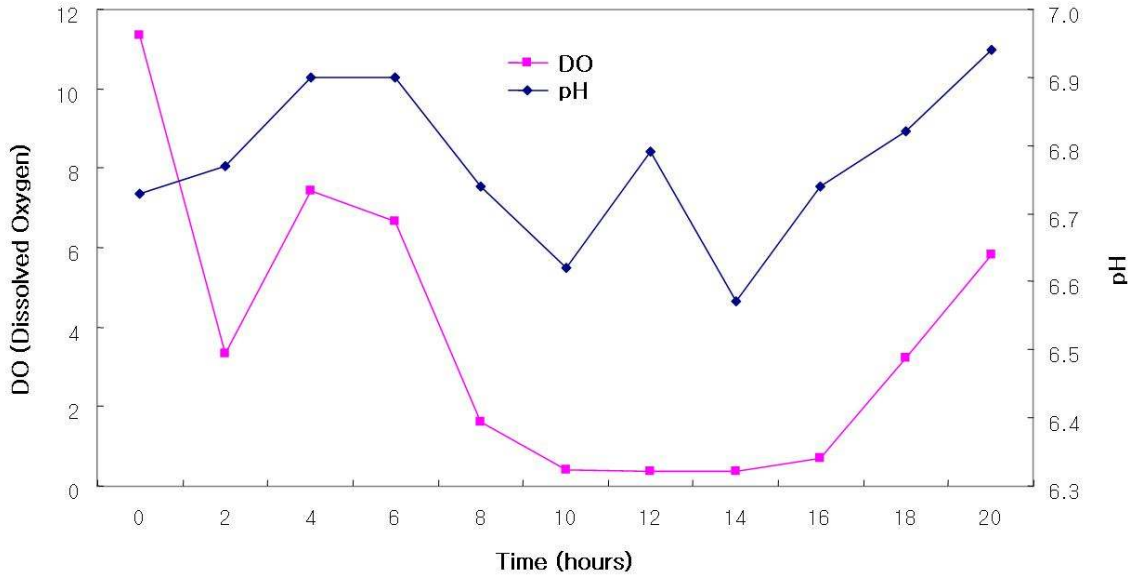


그림 39. 기존의 500L pilot scale 배양 profile.

나. 안정성 확보를 위한 요인 분석

5톤 규모의 발효 공정 개발의 주목적은 안정적인 공정을 통한 지속적인 전신저항성유도물질의 생산과 scale up을 통한 생산 단가의 절감이다. 이를 위하여 안정적인 공정 확보를 위한 다양한 요인들과 생산단가 절감법에 대하여 분석을 실시하였다.

(1) 기존 배양법의 5톤 적용

일반적으로 5톤 배양을 위해서는 작업시간의 단축과 효율성의 강화를 위하여 종균배양에서부터 5L → 50L → 500L → 5톤 순의 차례로 scale up을 한다. 각 단계별로 접종원의 농도를 10%로 고정을 한 후 배양 scale별로 seed 접종원이 되어 최종 5톤 배양의 최적화를 선별할 예정이다. 따라서 기존의 500L 발효 공정 과정에 의하여 5톤 대량배양을 실시하였다. 5톤 대량 배양의 발효 조건은 다음과 같다. 배지는 (주)파이오니아 자체 생산배지인 PiM03-2를 사용하였으며 통기량 0.5~1.0vvm, 내압 0.25kgf/cm² 그리고 교반속도는 50~100rpm으로 발효를 실시하였다.

시험배양을 실시한 결과 최적 배양 시간은 500L와 유사한 18시간이었으며 시간별 sampling을 통하여 전신저항성유도물질 생성량을 추적하였다. 기존의 방식과 동일한 배양에서 전신저항성유도물질의 생성은 500L 배양과는 조금 다른 패턴을 나타내었다(표 28). 다시 말해 미생물의 OD 값은 증가하나 미생물 내에서 생성되는 전신저항성유도물질의 양은 14시간을 전후하여 급속히 감소됨을 확인할 수 있었다.

표 28. 기존 방식을 적용한 5톤 scale 배양

Time(hr)	OD _{600nm}	전신저항성유도물질 생성량(g/L)
13	60	2.20
14	68	2.37
15	75	2.30
16	80	2.13
17	88	1.81
18	92	1.50

이에 5톤 수준에서 동일한 방법으로 배양을 실시하고 미생물 체내 뿐만 아니라 미생물체 내에서 용출되어 배양액 중에 존재하는 전신저항성유도물질의 양을 분석하였다.

그 결과 표 26과 같이 OD값이 증가함에 따라 미생물 체내 전신저항성유도물질생성량은 14 15시간에 최대가 되었으며, 배양액 중 전신저항성유도물질의 잔존량은 16시간을 전후로 증가되었다가 급속히 감소되었다(표 29).

표 29. 기존 방식을 적용한 5톤 scale 배양 중 배양액 중 전신저항성 유도물질의 잔존량

Time(hr)	OD _{600nm}	미생물 체내 전신저항성유도물질 생성량(g/L)	배양액 중 전신저항성유도물질 잔존량(g/L)
13	58	2.02	0.1
14	68	2.22	0.12
15	76	2.33	0.13
16	82	2.20	0.3
17	88	1.80	0.1
18	91	1.17	0.04

이러한 결과는 미생물 계대 수가 증가함에 따라 미생물 수는 증가하지만 노화되어 사멸된 미생물도 다량 발생한다. 사멸된 미생물은 세포막이 파쇄 되어 내부에 포함된 전신저항성유도물질이 배양액으로 용출되는 것으로 판단된다. 배양액 중에 노출된 전신저항성물질은 살아있는 미생물의 에너지원으로 사용되거나 불안정성에 기인하여 그 잔존량이 감소하는 것으로 사료된다. 한편 OD 값은 새롭게 생겨난 미생물과 사멸된 미생물을 모두 기록하므로 그 수치가

증가하는 것이라 판단된다.

따라서 미생물의 계대수를 조정하여 항상 일정한 시간 후 전신저항성유도물질이 최대로 생성될 수 있도록 배양공정의 조건을 최적화해야만 한다.

(2) 미생물의 배양 체계 및 전신저항성유도물질의 안정적 생산

기존의 미생물 배양공정 중 종균배양과 본 배양을 세분화하여 최적 미생물 계대 조건을 확립하였으며 이를 5톤 배양에 적용하였다. 배양 scale이 증가함에 따라 미생물 계대수가 증가하여 최종 배양에서 노화된 세포수의 증가로 인하여 전신저항성유도물질 생산이 감소되는 단점을 확인하였다. 이를 위해서 종균배양 후 50L를 생략하고 500L를 거친 후 본 배양인 5톤 배양을 실시하였다.

그 결과 기존의 500L 배양 경향과 동일하게 17시간 전후로 최적 배양 시간을 나타내었다. 또한 배양액 중 전신저항성유도물질의 잔존량도 최소화되었음을 확인하였다. 본 과정을 통하여 생성된 전신저항성유도물질의 효율은 L당 $2.3 \pm 0.1g$ 이었다(표 30).

표 30. 새로운 방식을 작용한 5톤 scale 배양 중 배양액 중 전신저항성 유도물질의 잔존량

Time(hr)	OD _{600nm}	미생물 체내 전신저항성유도물질 생성량(g/L)	배양액 중 전신저항성유도물질 잔존량(g/L)
13	44	1.27	-
14	48	1.55	-
15	50	1.93	-
16	54	2.20	-
17	60	2.35	0.04
18	63	2.41	0.07
19	69	2.43	0.1

다. 생산단가 절감법

(1) 공정의 단순화를 통한 단가 절감

미생물의 안정성과 전신저항성유도물질 생산최적화를 위하여 다양한 실험(종균배양부터 본 배양까지의 공정 개선)을 수행한 결과 50L 배양 과정을 생략할 수 있었으며 이에 따라 전체 생산 공정 중 1일을 단축할 수 있었으며 이에 따른 배지, 기기사용료, 인건비의 감소가 예상되었다. 이를 경제적 가치로 분석할 경우 총 배양 공정 일정이 4일에서 3일로 감소함에 따라

투입 인건비의 25%를 감소할 수 있으며 50L 공정의 생략으로 직접투입비의 약 2% 감소 효과를 나타내었고 이를 전체 금액으로 판단할 경우 약 5% 수준의 단가 절감효과를 나타내었다.

(2) 생산용 배지의 개선을 통한 단가 절감

배지의 종류와 함량을 변화하여 최적의 배지조건을 확립하고 안정적인 균주의 전신저항성유도물질 생산과 효과적인 배양 시스템을 개발하려는 연구를 수행하였다. 이를 위하여 기존 배지 중 탄소원의 종류와 농도를 변형하고 이를 5톤 scale에서 배양하여 그 재현성을 확인하였다. 이러한 생산용 배지의 개선을 통한 생산성 효율증대는 배양 공정시 전신저항성유도물질의 생산량을 증가시켜 생산량 대비 생산가 절감할 수 있는 방법이다.

(가) 탄소원 종류 및 농도에 따른 생산량과 배양시간 비교

먼저 생산용 배지 중 전체탄소원의 농도를 고정시키고 기존의 탄소원의 농도를 변화시킨 만큼 새로운 산업용 질소원을 첨가한 후 5L jar fermenter에서 배양을 실시하였다.

그 결과 기존의 탄소원을 25% ~ 50%로 감소하고 새로운 탄소원을 전체대비 2 ~ 3% 추가하여 배양하였을 경우 기존 대비 이상으로 전신저항성유도물질이 생성되었다(표 31).

표 31. 탄소원 종류 및 농도 변화에 따른 전신저항성유도물질의 생성량과 배양시간 비교

탄소원과 비율	전신저항성유도물질 생성량(g/L)	최적 배양 시간(hr)
OM ^a 4%	2.31	17
OM 2% + NM ^b 3%	2.24	18
OM 1% + NM 2%	1.46	18
OM 3% + NM 2%	2.54	17
OM 1.5% + NM 1.5%	1.21	19
OM 2% + NM 1%	1.94	19
NM 3%	0.83	14

a OM : Old Material(기존의 탄소원)

b NM : New Material(새로운 탄소원)

(나) 타사 탄소원에 대한 영향 검토

생산용 배지 성분은 단가가 저렴한 반면 그 성분량과 source가 각 회사마다 조금씩 다르다. 이러한 차이는 외관상 또는 성분상으로는 유사하나 특정 물질의 생산에 대해서는 핵심적인 역할을 하므로 원료를 공급하는 업체별 동일 상품을 비교하여 그 보편성을 점검해야만 한다. 따

라서 생산용 배지의 탄소원을 다른 업체로부터 구입하여 전신저항성유도물질의 생성량을 조사하였다.

생산용 배지로 선발된 PiM03-2 배지 성분 중 탄소원에 대하여 제조업체를 달리한 후 그 효율을 평가한 결과 기존의 탄소원을 25% ~ 50%로 감소하고 새로운 탄소원을 전체대비 2 ~ 3% 추가하여 배양하였을 경우 제조사와 상관없이 유사한 발현량을 나타내었다(표 32).

표 32. 서로 다른 제품사 탄소원이 전신저항성유도물질 생성에 미치는 영향

Time(hr)	OD _{600nm}	전신저항성유도물질 생성량(g/L)
0	12	0
14	53	1.21
16	55	2.25
17	70	2.48

이러한 결과는 새롭게 선발한 질소원의 경우 제조사와 상관없이 저렴한 가격에 쉽게 구입할 있으며 추후 산업용 배지의 성분으로 사용할 경우 원활한 원료 공급을 가능하다는 것을 시사한다.

(다) 접종원 농도에 따른 영향분석

500L 발효기를 이용하여 배양을 할 경우 접종원의 농도를 5~10%를 사용하므로 seed의 양이 상당히 많이 필요하다. 따라서 1차 seed는 flask로 배양 후 2차 seed 배양조로 접종하여 배양 후 접종원으로 사용된다. 본 연구에서는 500L 발효기를 이용하여 생산 단가와 최적의 발현량을 보이는 개선된 생산용 배지에 접종원의 농도에 따른 최적 배양 시스템을 확립하고자 하였다. 2차 seed 배양조는 50L 발효조에 배양된 배양액을 접종원 농도에 따라서 500L 발효조에 접종하고 배양 후 전신저항성유도물질의 생산량을 확인하여 최적의 접종원의 농도로 활용하고자 하였다.

시험 결과 각각의 접종원에 따른 최종 전신저항성유도물질의 생산량은 접종원 5%를 제외한 모든 처리구에서 정상적인 생육과 생산량을 나타내었다(표 33). 따라서 전신저항성유도물질 생산을 위한 seed 접종원의 농도는 10%로 선발하였다.

표 33. 접종원 농도에 따른 전신저항성유도물질 생산량 분석

접종원 농도(%)	OD _{600nm}	전신저항성유도물질 생성량(g/L)
5	40.8	1.59
10	50.4	2.27
15	52.1	2.31

(라) 500L Pilot plant 적용

선발된 과민성반응유도단백질 균주를 이용하여 pilot scale에서 적용하여 flask와 5L, 50L 종균 배양을 실시하였고 접종원을 10%로 보정한 후 이를 500L 생산용 배지를 사용하여 배양 profile을 확인하였다. 그 결과 기존의 배양 패턴과 일치하면서 그 효율을 12.6% 증가하였음을 확인할 수 있었다(표 34). 이는 기존의 공정 결과보다 보다 효율적인 공정 개선으로 이를 바탕으로 5톤 scale up에 응용하기로 하였다.

표 34. 탄소원이 개선된 배지를 이용한 500L 배양과 전신저항성유도물질 생성량

Time(hr)	OD _{600nm}	전신저항성유도물질 생성량(g/L)
13	42	1.01
14	56	1.23
15	62	1.71
16	65	2.30
17	72	2.59

라. 5톤 발효기를 이용한 배양 공정 효율성 점검

(1) 개선된 공정과 배지를 이용한 5톤 배양 공정의 효율

생산 단가와 최적의 발현량을 보이는 개선된 생산용 배지를 이용하여 5톤 배양 시 전신 저항성유도물질의 생성량과 profile을 검토하였다. 배양조건으로 통기량 0.5~1.0vvm, 내압 0.25kgf/cm² 그리고 교반속도는 50~100rpm으로 발효를 실시하였다.

앞선 연구 결과에 의하여 개선된 공정과 배지를 이용한 5톤 배양을 실시한 결과 500L 배양과 유사하게 전신저항성유도물질의 생산은 약 2.5±0.1g/L로 기존 배지에 비하여 10% 상승되

었다(표 35).

표 35. 개선된 공정과 배지를 이용한 5톤 scale 배양

Time(hr)	OD _{600nm}	전신저항성유도물질 생성량(g/L)
14	44	1.41
15	48	1.90
16	53	2.31
17	67	2.52

(2) 5톤 발효 공정 재현성 검정

5톤 scale에서의 발효공정의 재현성 검정과 배양효율을 현장에 적용하였다. 발효 공정의 최적화를 통하여 5톤 배양 시 전신저항성유도물질의 생성량과 profile을 검토한 결과 기존의 500L 배양과 유사한 배양 profile을 나타내었으며 전신저항성유도물질의 생산은 약 2.51g/L로 나타났다(표 36). 이러한 결과는 5톤 수준의 배양조건의 확립과 더불어 안정적인 배양공정을 재현함으로써 친환경적인 전신저항성유도물질의 대량생산이 가능함을 시사해 준다.

표 36. 전신저항성유도물질의 5톤 scale 배양

반복수	배양시간	OD _{600nm}	전신저항성유도물질 생성량(g/L)
1	17	67	2.52
2	18	76	2.36
3	18	82	2.67
4	16	69	2.50
5	17	72	2.48
평균			2.51

마. 후공정 기기 사용 효율 검정

5톤 발효조에서 배양된 전신저항성유도물질 배양액을 이용하여 배양 후공정을 개발을 실시하였다. 전신저항성유도물질의 회수율을 최대화하기 위해서 원심분리, 세포파쇄, 농축, 건조용 생산 기기에 대한 점검을 실시하였다.

(1) 여액 분리

배양액으로부터 전신저항성유도물질이 포함된 세포만 얻기 위하여 3종의 생산기기(연속 원심분리 type인 Tomoe와 Alfa laval, 막여과 type인 Pall. sep)를 대상으로 그 효율을 점검하였다(그림 40). 5톤 배양액을 각 1톤으로 나눈 후 각 공정기기를 가동하여 세포를 얻은 후 세포의 회수율을 측정하였으며 기기의 장단점을 분석하였다.



그림 40. 여액 분리를 위한 후공정 기기(A; Tubular Centrifuge, B; Pall. sep., C; Alfa laval)

3종의 기기를 분석한 결과 Pall. sep.을 실제 생산기기로 선택하였다(표 37). Pall.sep은 생산 회수율이 높을 뿐만 아니라 공정상 발생할 수 있는 오염 문제를 사전에 방지할 수 있으며 살균 세척이 용이하여 생산 공정에 적합하리라 사료된다.

표 37. 전신저항성유도물질 배양액의 여액 분리를 위한 후공정 기기의 회수율과 장단점

	Tubular Centrifuge	Pall. sep	Alfa laval
평균 세포 회수율	80%	95%	83%
장점	<ul style="list-style-type: none"> - 작업시간이 짧음 - 기기 사용가격이 저렴 - Small scale에 적합 	<ul style="list-style-type: none"> - 작업시간이 짧음 - 정제 효율이 높음 - 살균 세척이 용이 	<ul style="list-style-type: none"> - 유지 보수비가 적다 - 범용적으로 사용가능
단점	<ul style="list-style-type: none"> - 외부 오염 노출 - 일부 수동 작업 - 미세 입자 분리 	<ul style="list-style-type: none"> - 여과막이 소모성임 - 별도의 sub tank 필요 	<ul style="list-style-type: none"> - 전력소모가 크다 - 작업시간이 길다

(2) 세포 파쇄·추출

회수한 전신저항성유도물질 함유 세포를 파쇄 하여 전신저항성유도물질을 추출하기 위하

여 세포파쇄기 3종을 대상으로 그 효율을 측정하였다. 시험에 사용한 생산용 세포파쇄·추출 기기는 french fressure와 high speedmill, dynamill이었다(그림 41).

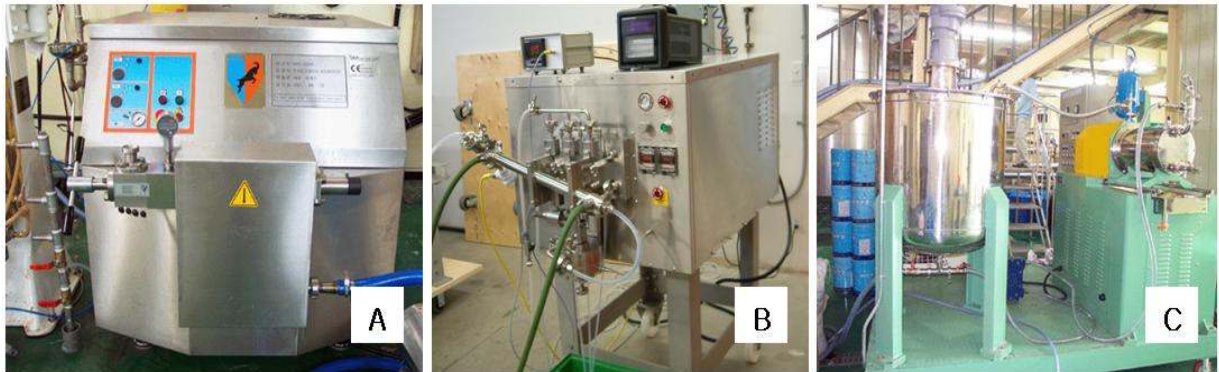


그림 41. 세포 파쇄·추출용 후공정 기기(A; french fressure, B; high speed mill, C; dynamill)

표 38. 전신저항성유도물질 세포 파쇄·추출용 후공정 기기의 회수율과 특징

장비	특징	평균 세포회수율
french fressure	<ul style="list-style-type: none"> - 세포내의 단백질을 분리 전용 기기 - 세포막 깨기 때문에 내부 물질 안정 - 처리 용량 120 l/h - 최대 작동 압력 1,500 bar - 작업시간이 짧음 - 경제적임 	85%
high speedmill	<ul style="list-style-type: none"> - High pressure homogenizer - 작업 및 살균 세척이 용이 - 처리 용량 160 l/h 160L - 연속 파쇄 가능 - SIP/ CIP 가 가능 - 최대 작동 압력 2,070 bar 	80%
dynamill	<ul style="list-style-type: none"> - 효모 파쇄기 - 유지 보수비가 적다 - 기기 사용가격이 저렴 - Small scale에 적합 - 300L/일 	60%

3종 세포 파쇄·추출용 후공정 기기를 분석한 결과, french fressure을 실제 생산기기로 선택하였다(표 39). French fressure은 전신저항성유도물질 회수율이 높을 뿐만 아니라 전신저항성유도물질의 안정성 및 경제성에서 다른 기기보다 우수할 것으로 예측되었다.

(3) 농축공정

전신저항성유도물질 추출물을 건조하기 위해서는 반드시 부피를 줄여야 한다. 따라서 추출된 전신저항성유도물질 농축하기 위하여 농축기 2종을 대상으로 그 효율을 측정하였다. 시험에 사용한 생산용 농축기기는 한외여과시스템(ultra filtration system)과 감압농축시스템(그림 42). 한외여과기의 카세트의 MWCO(molecular weight cut off)은 일반적으로 사용되는 10,000을 사용하여 분자량 5,000 이하의 물질, cell debris들은 waste로 빠져나가 정제효과를 동반할 수 있으며, 전신저항성유도물질과 같은 고분자 물질은 계속 농축된다. 감압농축시스템은 배양액을 추출기에서 흡입한 후 60℃ 전후의 온도로 열을 가하면서 압력과 진공을 걸어 주면 물의 끓는점이 낮아져 물이 증발되고 전체적인 액량을 줄이는 농축법이다.



그림 42. 농축용 후공정 기기(A; 한외여과시스템, B; 감압농축시스템)

2종 농축용 후공정 기기를 분석한 결과, 한외여과시스템을 실제 생산기기로 선택하였다(표 39). 한외여과시스템은 전신저항성유도물질 회수율이 높을 뿐만 아니라 작업속도가 짧아 전신저항성유도물질의 안정성 확보 및 오염가능성을 최소화 시키는 장비로 평가되었다.

표 39. 전신저항성유도물질 농축용 후공정 기기의 회수율과 특징

장비	특징	평균 세포회수율
한외여과시스템	<ul style="list-style-type: none"> - 시간당 5,000L 이상 농축 가능 - 정제효과가 뛰어남 - 소모성 카세트 사용 - 작업 속도가 빠름 	97%
감압농축시스템	<ul style="list-style-type: none"> - 대용량 작업을 한번에 가능 - 작업 및 살균 세척이 용이 - 가격이 저렴함 	83%

(4) 건조공정

전신저항성유도물질을 건조하기 위하여 일반적으로 산업 현장에서 많이 사용하고 있는 동결건조법과 Spray dryer에 대한 최적의 건조방법을 연구하였다(그림 43). 세포의 분리와 세포파쇄 및 농축의 공정과정을 거친 각각 300L의 농축액에 대하여 건조시간 및 최종 전신저항성유도물질 회수율을 점검하여 각각의 장·단점을 확인하였다.

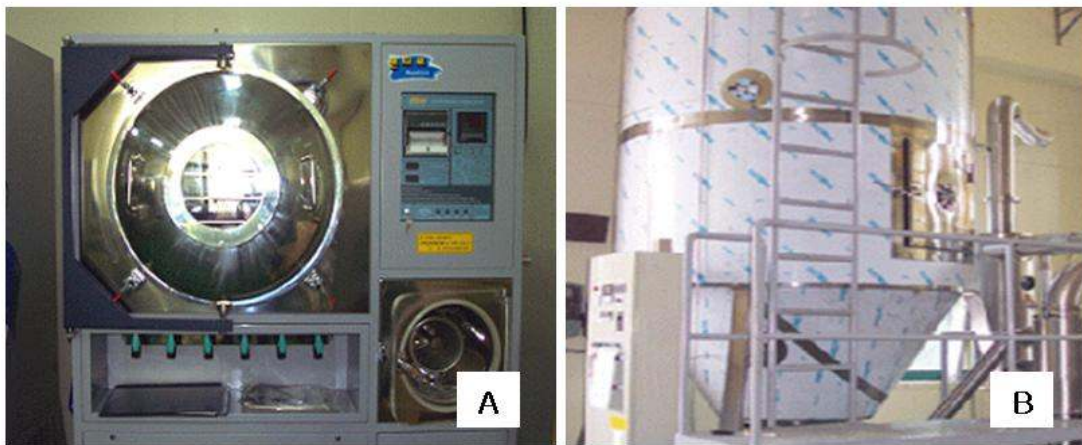


그림 43. 전신저항성유도물질의 건조용 산업용 후공정 기기.

시험 결과 최종 전신저항성유도물질 생산 여액을 동결건조 할 경우 건조 시간은 3~4일이 소요 되었고 회수율은 97%로 양호 하였다. 또한, Spray dryer할 경우 건조 시간은 1~2일로 비교적 단축되는 장점을 나타내었다. 그러나 최종 건조물 회수율은 전체적으로 약 10% ~ 15% 감소되는 것으로 나타났다(표 40).

표 40. 건조방법에 따른 최종 단백질 회수율 점검.

건조법	300L 건조시간	회수율	비고
동결건조	3~4일	97%	- 별도의 분쇄과정이 필요함 - 고가의 장비 사용료
Spray dryer	1~2일	82%	- 일정수준의 고형물함량을 유지하기 위하여 별도의 증량제 추가 - 단백질 회수율이 상대적으로 낮음

이상의 결과를 바탕으로 볼 때 건조법을 Spray dryer로 적용하기 위해서는 여액 중 고형물 농도를 조절하기 위한 다른 공정이 필요하며 실제 적용 시 부피를 최소화하여 빠른 시간에 건조 할 수 있는 공정의 개발이 필요하다. Spray dryer의 장점은 건조시간이 동결건조에 비하여 짧지만 이는 원액 대비 여액의 부피가 적어야만 한다. 최종 건조 할 부피를 줄이기 위해서는 농축시스템이 필요하며 농축 시간을 최소화하여 전신저항성유도물질의 안정성을 유지하기 위한 공정 개발이 추가적으로 진행해야할 것으로 사료된다.

제 2 절 전신저항성유도 물질의 생화학적 특성 분석 및 타농자재와의 혼용안정성 분석

1. 전신저항성유도물질의 작물에 대한 생화학적 특성 분석

최근 농산물 생산은 유기농업 및 미생물을 이용한 친환경 농업으로 전환되는 추세이고, 소비자의 요구를 충족시켜 주기 위하여 고품질, 기능성, 안전성 등에 대한 연구가 적극적으로 전개되고 있다(Kim과 Kim, 1998; Kobayashi 등, 1974; Matsuguchi, 1986). 그러나 농업현장에서 미생물제 적용성에 대한 관심이 높아지면서 미생물제의 무분별한 생산과 판매가 이루어져 농업인들을 혼란시키고 있다.

미생물의 활용은 미생물 군으로 분류되는 세균, 방선균, 사상균, 효모 및 조류의 특성을 이용하여 식물병 방제를 통한 식량생산 증가와 작물 자체의 생리적 활성 증대에 초점이 맞춰지고 있다. Dong 등(1999)은 식물자체의 식물병 저항성 기작을 유도하는 물질 중 많은 것이 식물생장촉진효과(PGP : plant growth prompting)를 동시에 나타낸다고 보고하였다. Shrestha 등(2003)은 식물생장촉진효과를 유도할 수 있는 물질을 생산하는 세균을 국내에서 자체적으로 분리·동정하였다. 이러한 물질을 농산물 생산에 적용하기 위해서는 보다 체계적인 연구가 수행되어 검증된 자료를 이용하는 것이 바람직하다고 생각되나 이에 대한 연구와 체계가 부족한 실정이다.

본 연구에서는 전신저항성유도물질을 작물에 처리 하였을 때 식물생장촉진 효과 및 생화학적 특성분석을 통하여 친환경적인 농산물 생산에 적용하는 기초 자료로 쓰고자 연구를 수행하였다. 먼저 수도작에 대하여 발아율, 생육촉진 효과 그리고 수확량 점검을 하였고, 주요 원예작물에 대한 기초적인 생장 테스트와 생리·생화학적 특성분석을 실시하였다. 특용작물에 대하여는 작물의 전반적인 생육특성을 조사하여 전신저항성유도물질의 처리에 따른 작물특성을 분석하여 최적 처리 기술의 개발과 실용화를 위한 방법을 개발하기 위한 연구를 수행하였다.

가. 수도작에 대한 전신저항성유도물질의 생화학적 특성 변화 영향 분석

(1) 벼의 발아율 점검

전신저항성유도물질 처리에 의한 벼 종자의 발아촉진효과를 검정하기 위하여, 진부벼와 일품벼의 종자에 전신저항성유도물질 현탁액을 24시간 침지 처리한 후 습실상에서 암조건으로 5일간 배양하여 발아력을 관찰하였다.

시험 결과 전신저항성유도물질의 침조 처리에 의한 발아율은 무처리구에 대비하여 평균 20% 증진되었음을 확인하였다(표 41). 이는 전신저항성유도물질 처리 시 기존의 발아시간보다 2~3일 가량 단축됨을 의미한다. 또한 초엽형성(화살표)도 무처리에 비해 매우 향상되었음을 확인하였다(그림 44). 이는 종자에 전신저항성유도물질을 처리하면 작물의 초기생육이 잘 발달

되도록 생리적으로 작용한다는 것을 의미한다.

표 41. 전신저항성유도물질의 침종처리에 의한 발아율 점검

품종	발아율(%)	
	전신저항성유도물질 침종	무처리
일품	92.8	73.4
진부	91.2	75.7

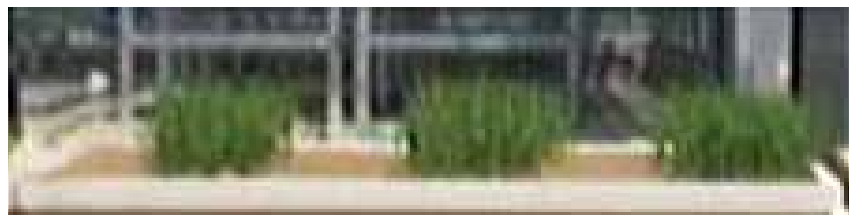


그림 44. 전신저항성유도물질 처리에 의한 벼씨의 발아율 점검.

(2) 벼의 육묘 생육 촉진 효과

전신저항성유도물질 처리에 의한 벼 육묘기 생장촉진효과를 검증하기 위하여, 일품벼를 모판에 파종하여 본엽 1~2엽기부터 전신저항성유도물질을 5일 간격으로 3회 처리하여 생육을 관찰하였다.

그 결과, 전신저항성유도물질은 최종처리 7일 후 그림 2와 같이 신장이 현저히 촉진되었을 뿐만 아니라 줄기가 견실하고 생중량이 증가하는 것으로 나타났다(그림 45). 이는 기계이앙 전 모판에서의 육묘의 생장을 촉진시킬 뿐만 아니라 견실하게 생육하는데 도움이 될 거라 판단된다.



무처리 전신저항성물질 처리

그림 45. 전신저항성유도물질 처리에 의한 벼 육묘의 생장촉진.

(3) 벼의 수확량

전신저항성유도물질 처리에 의한 벼 수확량 증대 검정을 위해 실내수준에서 벼를 재배하였다(품종: 일품). 처리구는 종자에 전신저항성유도물질을 침종하여 재배한 침지구, 생육기간 중 엽면처리구, 종자침지 후 생육기간 중 엽면처리구 및 무처리구(관행구) 나누어 시험을 수행한 후 최종 수확량은 그 무게로 평가하였다.

그 결과 종자침지와 엽면처리를 병행할 경우 가장 효과가 좋았으며 약 10%의 증수효과를 확인하였다(그림 46). 단독처리구인 엽면처리구와 종자처리구는 관행에 대비하여 수량증가를 확인하였지만 그 수준이 미비한 수준이었다. 따라서 벼에서의 전신저항성유도물질 처리시 생육에 도움이 되는 처리방법은 종자처리 및 생육중 엽면처리의 방법을 병행하는 것이 가장 좋다고 판단된다.

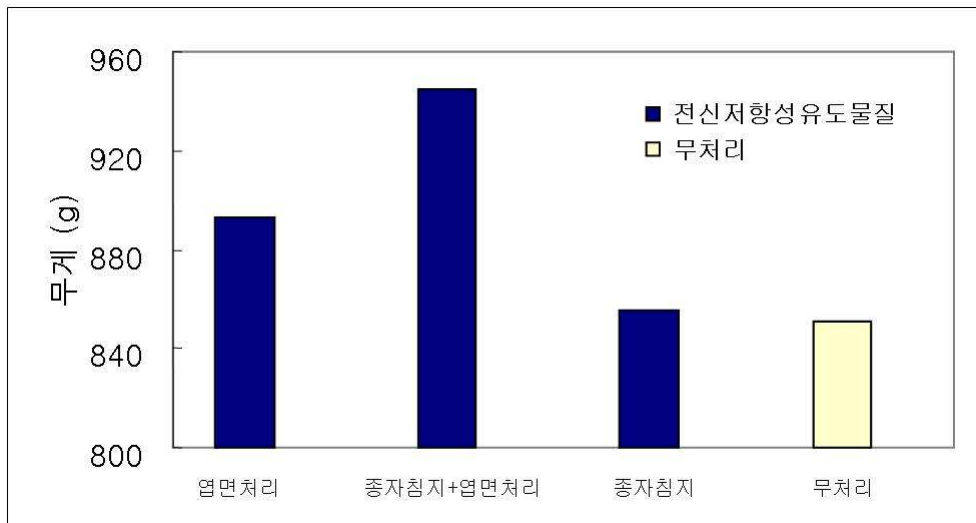


그림 46. 전신저항성유도물질 처리에 의한 쌀 수확량 처리.

나. 원예작물에 대한 전신저항성유도물질의 생화학적 특성 변화 영향 분석

(1) 오이에 대한 생화학적 특성변화 시험

(가) 수확량

전신저항성유도물질 처리에 의한 오이 수확량 증대 검정을 위해 비가림재배 방식으로 오이를 재배하였다(품종: 은침백다다기). 처리 시기는 정식 7일 전 오이 플러그 묘에 1회 처리한 후 정식하였고, 정식 7일 후 및 그 후 14일 간격으로 총 5회에 걸쳐 경엽 처리 하였다. 조사 시기는 정식 1달 후부터 수확적기 크기에 해당하는 과실의 총수를 계산하였다.

총 14회 걸쳐 수확한 오이의 총 수확량은 표 42와 같이 전신저항성유도물질을 처리한 구에서 관행구보다 높은 수확량을 나타내었고 이를 수치로 표현했을 때 11.3%의 증수효과가 나

타났다.

표 42. 전신저항성유도물질 처리에 의한 오이의 수확량 증대효과

조사일 처리 내용	1차	2차	3차	4차	5차	6차	7차	8차	9차	10차	11차	12차	13차	14차	계	주수에 따른 평균 (주수)	무처리 대비 증수율
	전신저항성 유도물질			4	12	38	23	12	27	24	13	27	17	33	30		
관행구	1		3	9	25	18	15	23	9	13	20	19	20	20	195	9.29 (21)	-

(나) 발아시 신장축진 검정

전신저항성유도물질 처리에 의한 발아 후 신장축진을 조사하였다. 처리방법으로는 각 처리약제 현탁액에 오이 종자를 12시간동안 침종 처리하여 9일 후 축진결과를 조사하였다.

그 결과 발아 후 오이의 경우 모두 무처리구에 비하여 신장이 축진되는 것을 확인 할 수 있었다(표 43). 즉 이는 출하시기를 조기에 맞출 수 있는 것을 의미하며 연료비의 절감 등 경제적인 이득이 실제 농가에 적용될 수 있는 부분이라고 생각된다.

표 43. 전신저항성유도물질 처리에 의한 오이 발아 신장축진효과

처리	평균신장 (cm)	평균 생중량 (g)	평균 건중량 (g)
전신저항성유도물질 처리	4.24	0.23	0.019
관행구	2.58	0.185	0.020

(다) 영양요구도 분석

전신저항성유도물질 처리에 의한 오이의 total 인, 질소, 칼륨, 칼슘 및 마그네슘의 성분을 분석하였다. 먼저 오이는 정식 7일 전, 7일 후 그리고 14일 간격으로 총 5회 경엽처리 후 최종 약제처리 7일 후에 수집된 엽을 분석하였다.

그 결과, 비료의 3요소인 인산, 질소 및 칼륨의 함량은 약제간 유사하게 나타난 반면, 총 칼슘과 마그네슘 함량에 있어서 관행구에 비하여 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리구의 흡수축진 효과가 매우 우수하게 나타났다(표 44). 즉 이는 식물체의 생리적 활성도에 많은 영향을 미칠 것으로 사료되는 바, 특히 마그네슘은 엽록소 함량의 유지에 유리

하게 작용할 것으로 생각되므로 전신저항성유도물질 처리에 의한 매우 중요한 효과라 생각된다.

국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질은 세포조직을 강건하게 해주는 칼슘 및 엽록소 중심성분이면서 노화를 억제시키는 마그네슘의 함량이 높게 나타난다는 것은 본 유도물질 처리에 의해 식물체 생장에 중요한 역할을 담당할 수 있으며, 더불어 수확 후 저장성에도 많은 이득이 있을 것으로 사료된다.

표 44. 전신저항성유도물질 처리에 의한 오이의 영양요구도 분석

처리약제	T-P	T-N	T-K	T-Ca	T-Mg
전신저항성유도물질	1.37 (1.35)	4.32	1.75	1.98	1.12
관행구	0.52 (1.36)	4.71	3.00	0.45	0.79

(라) 생리·생화학적 특성 변화 검증

① 광합성

전신저항성유도물질 처리에 의한 오이의 광합성량 변화에 따른 생리적 특성을 분석하고자, 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질(가칭 "Pioneer") 및 국제 표준 세균(가칭 "ATCC")을 10, 20, 40 μ g/ml 농도로 14일 간격 경엽처리 한 후, 휴대용 광합성 측정기(model : LCA-4 system, ADC BioScientific LTD, Co., UNK)를 이용하여 광합성량을 측정하였다. 오이의 측정일 및 엽위는 정식 28일 후 5절위 엽, 36일 후 8절위 엽 및 50일 후는 11절위 엽을 대상으로 측정하였다.

약제 처리 농도별 광합성량은 정식 28일에 측정한 결과 무처리에서 17.2 CO₂ μ mol.m⁻².s⁻¹로 나타났고, ATCC 처리구의 10 μ g/mL에서 17.8 CO₂ μ mol.m⁻².s⁻¹, 20 μ g/mL에서 18.7 CO₂ μ mol.m⁻².s⁻¹, 40 μ g/mL에서 19.5 CO₂ μ mol.m⁻².s⁻¹로 나타났다. 반면 Pioneer 전신저항성유도물질 처리구의 10 μ g/mL에서 19.8 CO₂ μ mol.m⁻².s⁻¹, 20 μ g/mL에서 20.7 CO₂ μ mol.m⁻².s⁻¹, 40 μ g/mL에서 21.5 CO₂ μ mol.m⁻².s⁻¹로 관행구보다 높게 나타났고, 처리농도가 높아짐에 따라 증가하는 경향을 보였다(그림 47).

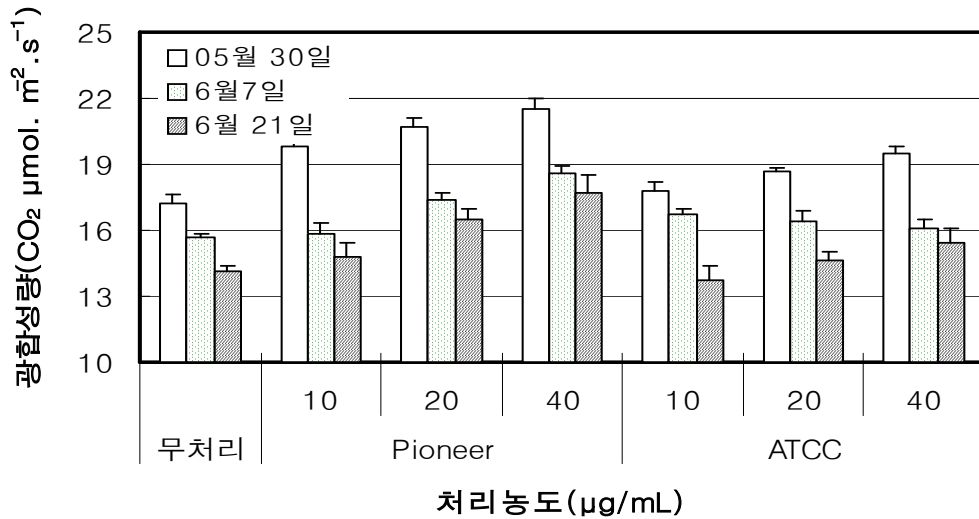


그림 47. 전신저항성유도물질의 오이에 대한 광합성율에 미치는 영향 분석.

② 기공전도도

약제 처리에 따른 기공전도도를 측정하기 위해 위 광합성량과 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과, 정식 후 28일에 측정한 결과 무처리구에서 $0.66 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 로 나타났고, ATCC 처리구의 $10\mu\text{g/mL}$ 에서 $0.82 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $20\mu\text{g/mL}$ 에서 $0.79 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $40\mu\text{g/mL}$ 에서 $0.87 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 그리고 Pioneer 전신저항성유도물질 처리구의 $10\mu\text{g/mL}$ 에서 $0.73 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $20\mu\text{g/mL}$ 에서 $0.81 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $40\mu\text{g/mL}$ 에서 $0.81 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 로 처리농도가 높아짐에 따라 약간 증가하는 것으로 나타났다(그림 48).

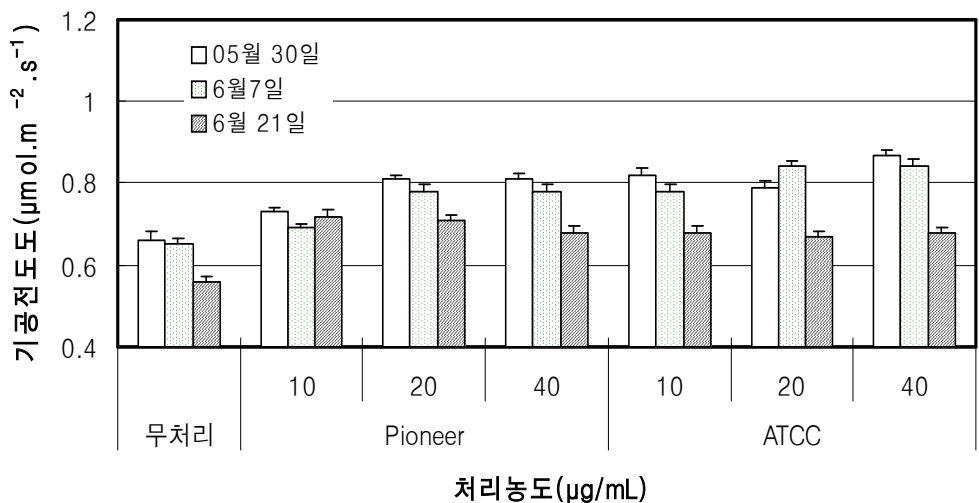


그림 48. 전신저항성유도물질의 오이에 대한 기공전도도에 미치는 영향 분석.

③ 엽록소 함량

위 실험과 동일하게 처리된 오이의 엽록소 함량은 정식 후 28일에 측정한 결과 무처리에

서 49.5(SPAD-502 unit, 이하동일)로 나타났고, ATCC 처리구의 10 μ g/mL에서 50.6, 20 μ g/mL에서 52.7로 나타난 반면 40 μ g/mL에서는 50.4로 오히려 감소하는 경향을 나타냈다. Pioneer 전신저항성유도물질 처리구의 10 μ g/mL에서 51.6, 20 μ g/mL에서 52.3, 40 μ g/mL에서 52.2로 나타났다(그림 49). 특히 무처리 및 미국 화상병원균 유래 전신저항성유도물질 보다는 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리구에서 수확후기까지 높은 함량을 유지하는 것으로 나타나 오이생육에 있어서 전신저항성유도물질 처리 효과가 인정되었다.

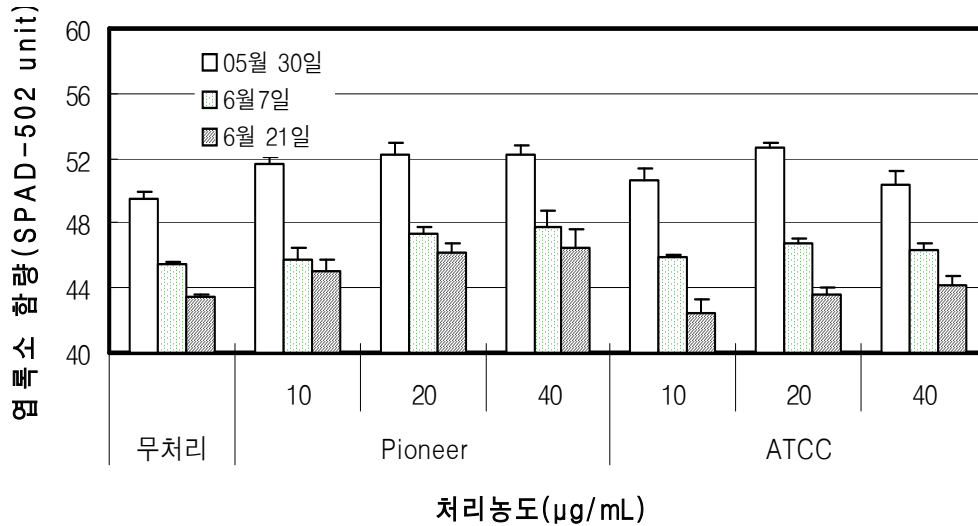


그림 49. 전신저항성유도물질의 오이에 대한 엽록소함량에 미치는 영향 분석.

(2) 고추에 대한 생화학적 특성변화 시험

(가) 수확량 증대

국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리에 의한 고추 수확량 증대 검정은 수확된 건전과실의 총수를 계산하였다. 처리방법은 20 μ g/mL 수준으로 엽면 처리하였으며 조사 시기는 농가관행재배의 수확시기와 동일하게 수확하여 조사하였다.

그 결과, 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리구에서는 무처리와 미국 미생물 유래 전신저항성유도물질 처리구에 비해 총수량, 생중량 및 건중량이 증가되었다(표 45). 따라서 고추의 경우도 식물생장 증진 및 촉진제로서의 활용성이 높다고 사료된다.

표 45. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리에 의한 고추 수확량 증대효과

조사일 처리 내용	조사일					생중량 (g)	주수에 따른 평균 (주수)	무처리대비 증수율	건중량 (g)
	1차	2차	3차	4차	5차				
국내토착 전신저항성유도물질	212	151	358	1,496	2,544	44,330	43.65 (120)	34.1%	8,285
미국 미생물 유래 전신저항성유도물질	175	171	312	1,428	2,394	42,735	37.02 (121)	13.8%	7,830
무처리	170	161	265	1,189	1,300	36,075	32.54 (120)	-	5,680

(나) 발아시 신장촉진 검정

국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리에 의한 발아 후 신장촉진을 조사하였다. 먼저 처리약제는 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 및 미국 미생물 유래 전신저항성유도물질을 처리하여 무처리구와 비교하였다. 처리방법으로는 각 처리약제 현탁액에 고추종자를 12시간 동안 침중 처리하여 9일 후 촉진결과를 조사하였다.

발아 후 고추의 경우 모두 무처리구에 비하여 처리구 고추묘의 신장이 촉진되는 것을 확인할 수 있었다(표 46). 즉 이는 출하시기를 조기에 맞출 수 있는 것을 의미하며 연료비의 절감 등 경제적인 이득이 실제 농가에 적용될 수 있는 부분이라고 생각된다.

표 46. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리에 의한 고추 발아 신장촉진효과

처리약제	평균신장 (cm)	생중량(g)	건중량(g)
국내토착 전신저항성유도물질	1.89	0.77	0.07
미국 미생물 유래 전신저항성유도물질	1.81	0.63	0.09
Control	1.81	0.25	0.06

(다) 영양요구도 분석

동일한 처리간격과 동일시기에 수집된 고추엽으로부터 흡수촉진 효과를 조사하였다. 표 47과 같이, 인산, 질소, 칼륨의 흡수율은 약제처리간 유사한 경향을 나타내었다. 그러나 칼슘 및 마그네슘의 흡수율은 무처리에 비해 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질이 월등히 우수하게 나타났으며, 또한 미국 미생물 유래 전신저항성유도물질 처리구보다 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리구에서 더 높은 흡수촉진 효과가 인정되었다.

상기와 같이 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질은 세포조직을 강건하게 해주는 칼슘 및 엽록소 중심성분이면서 노화를 억제시키는 마그네슘의 함량이 높게 나타난다는 것은 본 유도물질 처리에 의해 식물체 생장에 중요한 역할을 담당할 수 있으며, 더불어 수확 후 저장성에도 많은 이득이 있을 것으로 사료된다.

표 47. 전신저항성유도물질에 처리에 의한 고추의 영양요구도 분석

처리약제	T-P	T-N	T-K	T-Ca	T-Mg
국내토착 전신저항성유도물질	1.95 (0.52)	4.10	10.42	1.43	0.90
미국 미생물 유래 전신저항성유도물질	0.60 (0.62)	4.14	8.68	1.35	0.74
무처리	0.02 (0.56)	4.23	8.55	1.12	0.66

(라) 생리·생화학적 특성 변화 검정

국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리에 의한 고추의 광합성량 변화에 따른 생리적 특성을 분석하고자, 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질(가칭 "Pioneer") 및 미국 미생물 유래 전신저항성유도물질 (가칭 "ATCC")을 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 14일 간격 경엽처리 한 후, 광합성량, 기공전도도, 엽록소함량, 비타민 C 함량, 당함량, Capsaicinoids 함량 검정을 측정하였다. 고추는 부강고추를 사용하였으며 재배형태는 시설재배 환경이었다.

① 광합성량 검정

국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리에 의한 고추의 광합성량 변화에 따른 생리적 특성을 분석하고자, 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질(가칭 "Pioneer") 및 미국 미생물 유래 전신저항성유도물질 (가칭 "ATCC")을 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 14일 간격 경엽처리 한 후, 휴대용 광합성 측정기(model : LCA-4 system, ADC BioScientific LTD, Co., UNK)를 이용하여 광합성량을 측정하였다. 측정일은 정식 후 24일 및 32일에는 8절 위 엽, 정식 46일 후에는 9절위 엽을 측정하였다.

약제 농도별 처리에서 광합성량은 정식 후 24일에 측정한 결과 무처리에서 14.7 $\text{CO}_2\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 로 나타났고, 미국 미생물 유래 전신저항성유도물질(가칭 "ATCC")처리구의 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 14.9 $\text{CO}_2\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ 에서 15.8 $\text{CO}_2\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 그리고 40 $\mu\text{g/mL}$ 에서 15.5 $\text{CO}_2\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 으로 농도간 차이는 근소하였다. 그러나 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질(가칭 "pioneer") 처리구의 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 16.4 $\text{CO}_2\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ 에서 16.1 $\text{CO}_2\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 그리고 40 $\mu\text{g/mL}$ 에서 16.8 $\text{CO}_2\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 으로 농도가 높아짐에 따라 광합성

량도 현저하게 증가하는 경향을 나타냈다(그림 50).

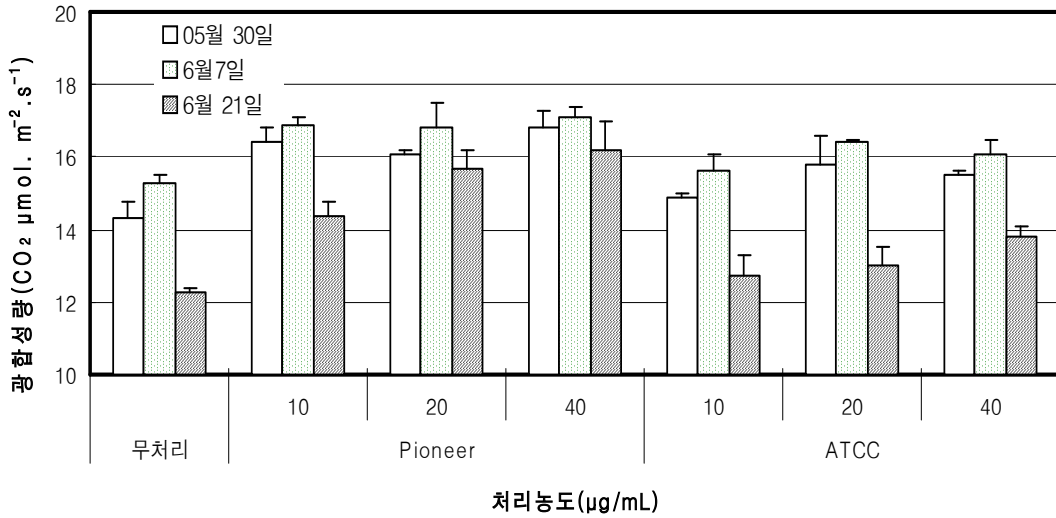


그림 50. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 고추엽의 광합성량 변화.

② 기공전도도 검정

고추의 기공전도도의 경우 정식 후 24일에 측정한 결과 무처리구에서 $0.33 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ATCC 처리구의 $10\mu\text{g/mL}$ 에서 $0.37 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $20\mu\text{g/mL}$ 에서 $0.40 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 그리고 $40\mu\text{g/mL}$ 에서 $0.42 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ 로 각각 나타났다. 그리고 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성 유도물질(가칭 “pioneer”) 처리구의 $10\mu\text{g/mL}$ 에서 $0.42 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $20\mu\text{g/mL}$ 에서 $0.48 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $40\mu\text{g/mL}$ 에서 $0.45 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ 로 무처리구 및 ATCC 처리구 보다는 비교적 높은 값을 나타냈다(그림 51). 즉 기공전도도 값이 높다는 것은 광합성 및 엽록소 함량의 결과를 종합하여 볼 때 식물체의 성장과정에서 활성도가 높게 유지된 결과라고 생각된다.

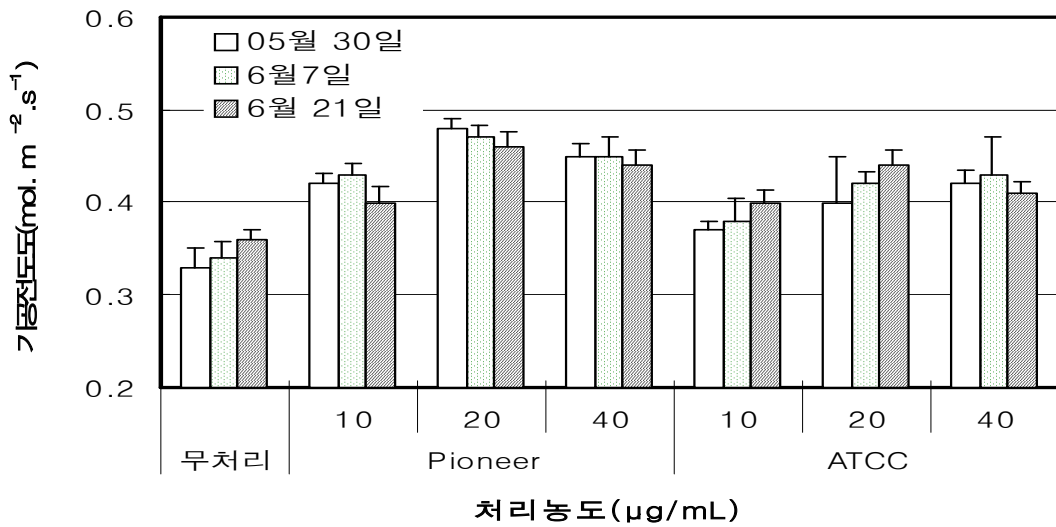


그림 51. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 고추엽의 기공전도도 변화.

③ 엽록소 함량 검정

엽록소 함량은 정식 후 24일에 측정한 결과 무처리구에서 57.2 (SPAD-502unit, 이하동일)로 나타났고, ATCC 처리구의 10µg/mL에서 60.5, 20µg/mL에서 58.4 그리고 40µg/mL에서 60.4로 농도간 차이는 없는 것으로 나타났다. 그러나 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성 유도물질(가칭 “pioneer”) 처리구의 10µg/mL에서 59.5, 20µg/mL에서 60.5 그리고 40µg/mL에서 62.9로 농도간 차이 현저하게 높게 나타났다(그림 52).

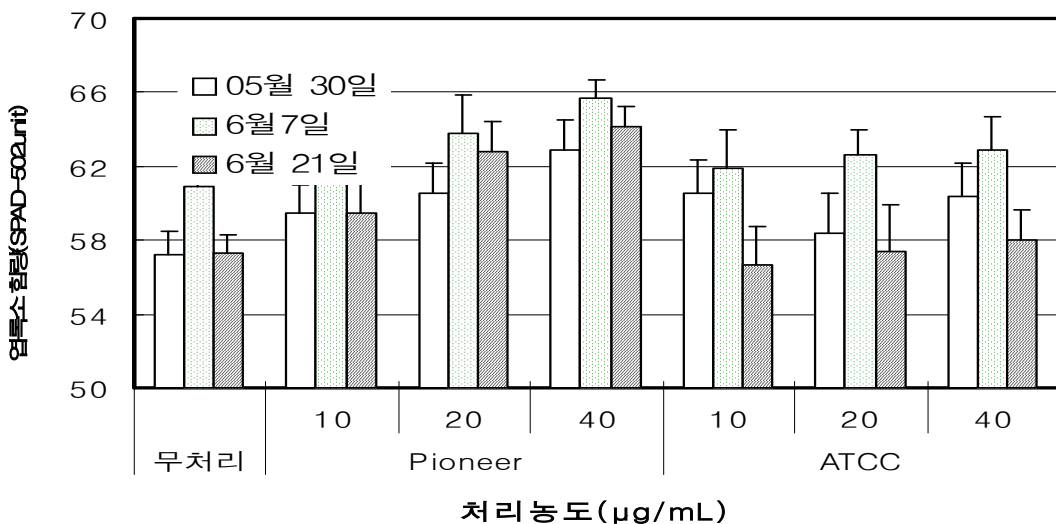


그림 52. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 고추엽의 엽록소함량 변화.

④ 당 함량 검정

당 함량 측정은 과실중양부위를 착즙하여 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 0.45µm membrane filter로 여과 후 10µL씩 주입하여 high performance liquid chromatography (HPLC)로 분석하였다. 당 분석은 HPLC (model : RID-10A, Shimadzu, Japan)의 RI detector, column은 Shim-pack SCR-101N(7.9mmØ×30cm)로 환원당 및 비환원당을 분석하였다.

그 결과 총 당 함량은 무처리구에서 5.29%, ATCC 처리구의 10µg/mL에서 5.42%, 20µg/mL에서 5.87%, 40µg/mL에서 5.98%로 나타났고, 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성 유도물질(가칭 “pioneer”) 처리구의 10µg/mL에서 5.96%, 20µg/mL에서 6.19%, 40µg/mL에서 6.26%로 무처리 및 미국 미생물 유래 전신저항성유도물질 처리구 보다 높게 나타났다. 그리고 당류에서는 fructose 및 glucose 함량에서는 커다란 차이는 없었지만, sucrose 함량은 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질 처리구가 높은 수준으로 검출되어 총 당 함량에 영향을 미친 것으로 나타났다(그림 53).

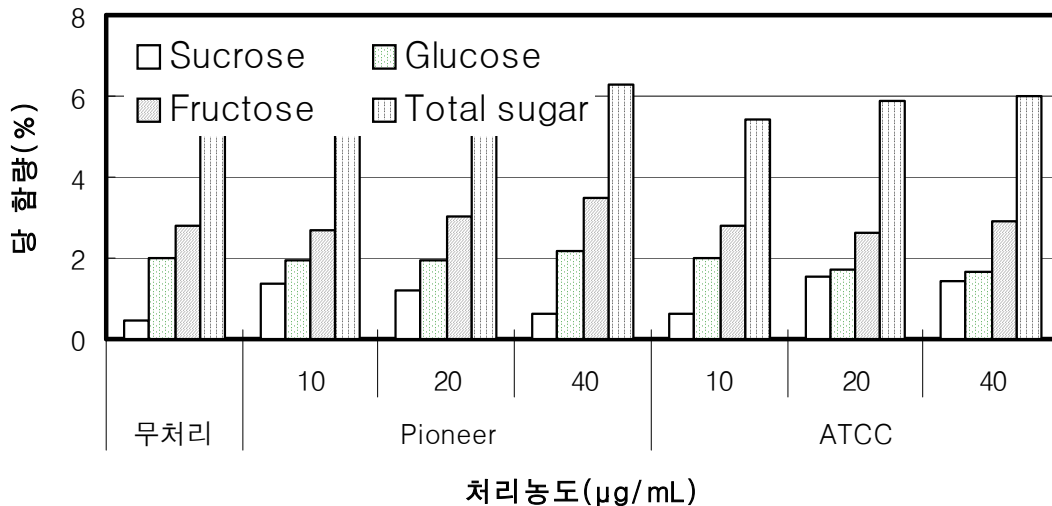


그림 53. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 당 함량의 변화

⑤ 비타민 C 함량 검정

비타민 C 분석은 당 분석용과 동일한 시료를 이용하여 총 20g을 6% HPO₃ 200mL와 함께 균질기(10,000rpm)로 10분간 마쇄 후 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 0.45µm membrane filter로 여과하여 10µL씩 2회 반복 주입하여 HPLC로 분석하였다. HPLC (model: SPD-10AV)의 조건은 UV-detector 254nm로 하였고, column은 µBondapakTMC₁₈ (3.9mmØ×30cm)으로 분석하였다.

그 결과, 비타민 C 함량은 무처리구에서 226.1mg/ 100gFW로 나타났고, 미국 미생물 유래 전신저항성유도물질 처리구의 10µg/mL에서 227.0mg/ 100gFW, 20µg/mL에서 228.8mg/ 100gFW, 40µg/mL에서 228.5mg/ 100gFW로 나타났고, 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질(가칭 “pioneer”) 처리구의 10µg/mL에서 227.2mg/ 100gFW, 20µg/mL에서 229.3mg/

100gFW, 40 μ g/mL에서 229.5mg/ 100gFW로 타 처리구에 비해 약간 높게 나타났으나 처리농도간 차이는 적었다(그림 54).

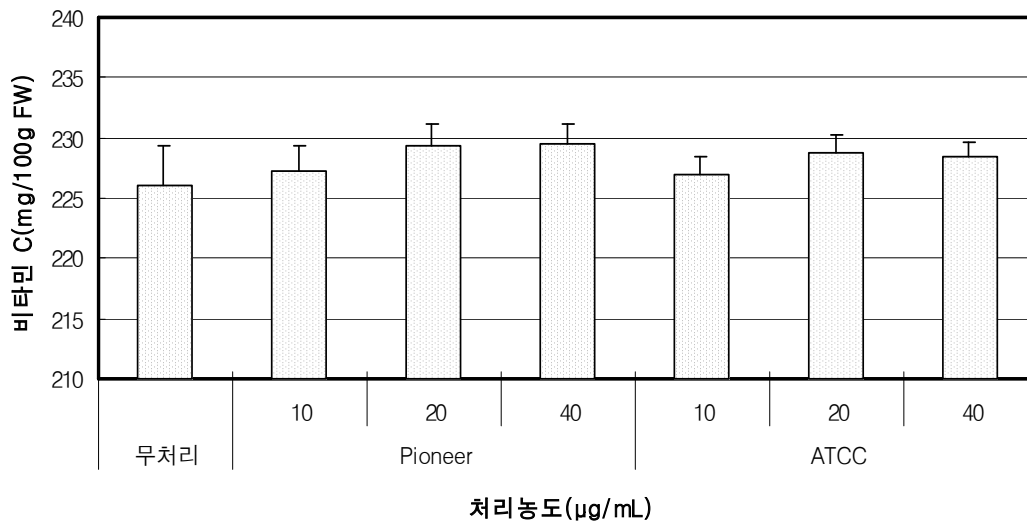


그림 54. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 고추의 비타민 C 함량의 변화.

⑥ Capsaicinoids 함량 검정

Capsaicinoids 함량은 적숙과의 중앙부위를 5개의 과실을 동결건조하여 분쇄 후 400mg의 분말을 acetone 20mL와 함께 삼각 플라스크에 넣고 약 16시간 동안 진탕하였다. 측정은 UV-분광기(U-3210, spectrophotometer, Hitachi, Japan) 246nm에서 측정하였다.

그 결과, capsaicinoids 함량은 무처리에서 0.14%DW로 나타났고, ATCC 처리구의 10 μ g/mL에서 0.14%DW, 20 μ g/mL에서 0.15%DW, 40 μ g/mL에서 0.15%DW, 그리고 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질(가칭 "pioneer") 처리구의 10 μ g/mL에서 0.15%DW, 20 μ g/mL에서 0.15, 40 μ g/mL에서 0.15%DW로 각각 나타났다(그림 55).

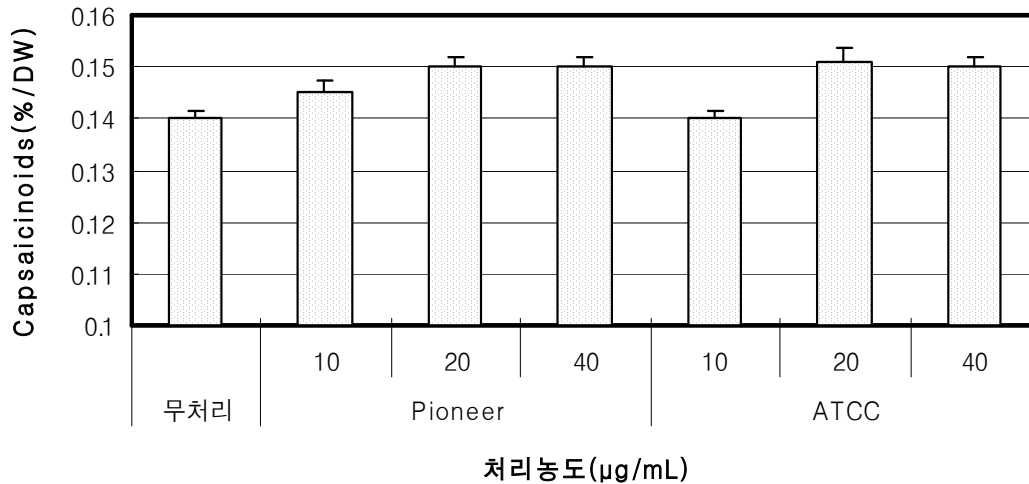


그림 55. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 고추의 Capsaicinoids 함량의 변화.

(3) 딸기에 대한 생화학적 특성변화 시험

전신저항성유도물질의 딸기의 생육에 미치는 생리생화학적 특성을 분석하기 위하여 농가 실증사업을 수행하였다. 딸기는 장희(축성재배)를 사용하였으며 전신저항성유도물질을 20µg/mL 수준으로 딸기 정식 후 4회 살포하였다. 시험은 농가에서 직접 잎의 형태, 연작으로 인한 염류장애 피해, 수확량, 상품과율을 조사하였으며 딸기 시료에 대하여 당도, 경도, 과중 등을 조사하였다.

(가) 딸기 형태

그림 56에 나타난 바와 같이 무처리구의 딸기 엽은 하위, 상위엽과 상관없이 그 크기가 불균일하였으나 전신저항성물질 처리구의 딸기엽은 균일하여 상하위엽이 모두 햇빛을 받을 수 있는 형태로 나타났다. 표 48에서는 각 처리구의 식물체 전폭, 엽록소 함량을 측정한 결과 크기와 전신저항성유도물질 처리구가 대조구보다 우수하였다.

표 48. 내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 딸기 형태

처리	Plant height (cm)	Plant width (∅mm)	엽록소함량 (SPAD unit)
대조구	30.4	43.1	38.8
전신저항성유도물질	32.0	46.0	41.0



그림 56. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 딸기 엽 크기의 균일도 조사.

(나) 엽류장애 피해 빈도 조사

대부분의 딸기 농가들은 한 장소에서 수년간 딸기만 연작하는 특징을 갖는다. 따라서 딸기 재배의 가장 중요한 포인트가 싱싱한 딸기 잎의 유지를 통한 고품질의 과실을 수확하는 것이다. 농가 실증시험을 통하여 각 처리구의 연작피해 딸기 주수를 비교하였다. 비교결과 전신저항성유도물질의 처리구의 경우 피해주수의 비율이 5%인 반면 무처리구의 피해주수는 약 24% 수준이었다(그림 57).



그림 57. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 딸기 엽의 엽류 장애 조사.

(다) 수확량, 상품과율, 및 수확기간

농민을 대상으로 전신저항성유도물질 처리를 통한 관행대비 효과를 조사하였다. 그 결과 화방수는 약 25% 증가하였으며 이러한 화방수의 증가로 인하여 수확량은 1회 수확시 4kg 가량 수확량이 많다고 설명하였다(표 49). 특히 계분형과와 같은 기형과가 감소하여 상품과율이 약 15% 증가하였으며 수확기간이 연장되어 전체적인 수확량이 증가한 것으로 판단된다.

표 49. 전신저항성유도물질에 처리에 의한 딸기 수확량, 상품과율, 및 수확기간 조사

항목	화방수	수확량	상품과율	수확기간연장
관행	8개	-	70%	수확후반부에 엽이 급격히 노화되며 수확량이 급감
전신저항성유도물질	11개	1회수확시 평균 4kg 증가	85%	수확후반부까지 수확량이 꾸준히 유지



그림 58. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 화방수 차이.



그림 59. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 딸기과의 계분형 기형과 비교 조사.



그림 60. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 딸기 엽의 노화 진전 조사.

(라) 과중, 경도, 당함량

딸기의 생체중 증가에 미치는 식물활성제의 영향 비교에서 관행구 대비 21%가 증가하였으며, 경도는 약 18% 증가하였다. 전신저항성유도물질 처리시 무게가 증가한 점을 감안하여 관행구와 비교하여 우수한 경도를 보이는 것은 상대적으로 조직이 단단해 진 것으로 판단된다. 딸기의 sucrose 함량은 $8.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 이었으며 전신저항성유도물질 처리시 그 함량이 관행 대비 43% 가량 증가하였고, fructose, glucose, 그리고 sucrose를 더한 가용성 당의 함량은 관행구(약 $45\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$)와 비교하여 15% 증가하였다(그림 61).

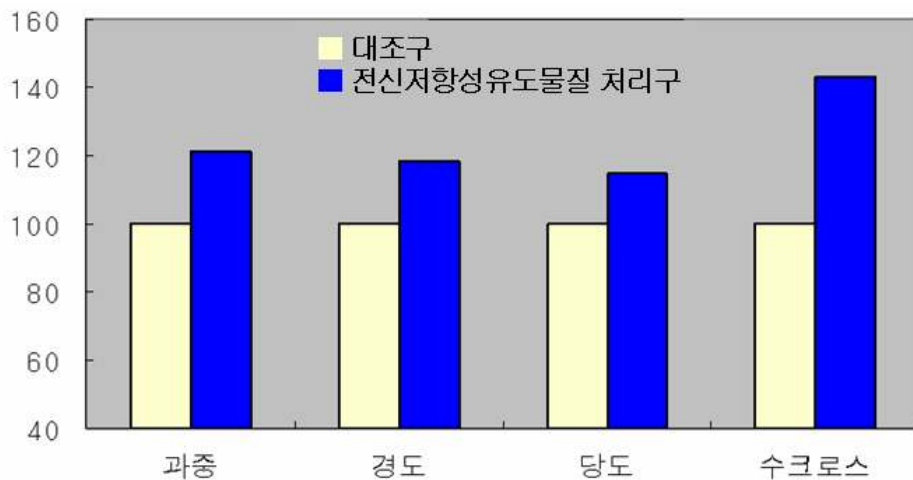


그림 61. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 딸기 과의 과중, 경도, 당함량 조사.

(마) 영양요구도

딸기 내 무기이온 중 칼슘의 함량은 전신저항성유도물질 처리시 28% 증가하였다(그림 62). 무처리구의 딸기와 비교하여 전신저항성유도물질 처리시 경도의 증가와 부피의 증가에도 불구하고 경도의 유지는 일반적으로 경도 유지에 도움을 주는 칼슘의 역할과 상호 연관이 있을 것으로 판단된다. 딸기에 있는 마그네슘 함량은 5% 증가하였는데 이는 엽록소의 함량 증가와 관련된 것으로 사료된다. 칼륨과 인의 함량은 전신저항성유도물질 처리에 큰 영향을 받지 않았다. 이러한 결과는 칼슘 흡수 증가에 따른 길항작용인지 아니면 양액의 불균형과 부적절한 순환에 의한 재배환경 및 재배조건에 의한 것인지는 분명하지 않다.

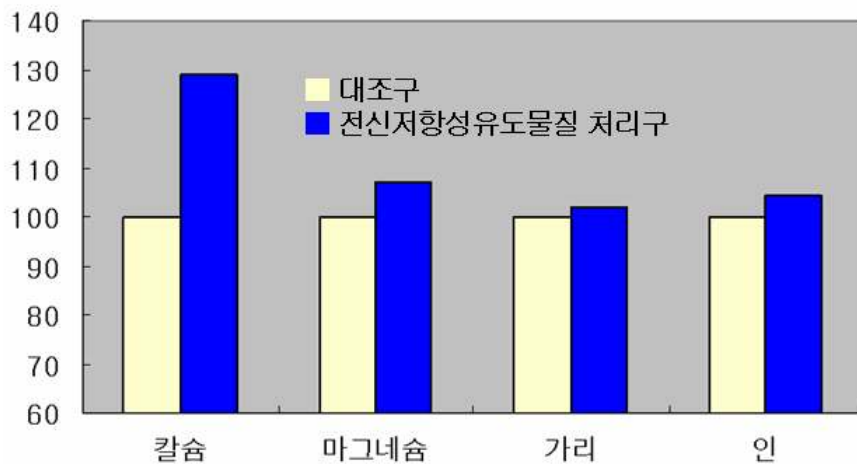


그림 62. 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래 전신저항성유도물질에 처리에 의한 딸기 과의 무기이온 영양요구도 조사.

다. 특용작물에 대한 전신저항성유도물질의 생화학적 특성 변화 영향 분석

(1) 인삼에 대한 생육특성 변화 시험

전신저항성유도물질 처리에 따른 인삼의 생육특성을 조사하기 위하여 자경종 3년근에서 처리에 따른 효과를 분석하였다. 이랑을 만든 후 재래종(자경종) 인삼의 1년생 묘삼을 재식밀도 54주/3.3m² (6행 9열)로 하여 2007년 4월 3일에 정식하였다. 포장에 인삼을 이식한 후 인삼상토 상면을 벚짚으로 덮어 잡초 및 수분의 증발을 방지하는 벚짚피복 방법으로 재배하였고, 관수, 추비 및 기타 일반관리는 표준인삼경작방법에 준하여 재배하였다. 시험작물의 생육조사는 3년근의 지상부와 지하부를 칸 당 20주를 3반복으로 조사하였다. 지상부는 2008년 8월에 조사하였고, 경장은 너두 윗부분에서 엽병아래 부분까지의 길이를 측정하였으며, 경직경은 줄기의 가장 굵은 부위의 굵기를 버니어캘리퍼스로 측정하였다. 지하부는 2008년 10월에 근장, 근경, 동체장생체중을 측정하였는데, 생체중은 박피하지 않은 수삼을 수세한 후, 흡습지로 수분을 제거한 후 조사하였다.

시험 결과 전신저항성유도물질 처리구에서는 모든 조사 항목에서 무처리 대비하여 매우

우수한 생육특성을 나타내었다. 특히 인삼의 품질을 결정하는 생중량에서는 전신저항성유도물질 처리구가 무처리 대비하여 약 20%의 효과상승을 보였다(표 50). 지하부 조사항목에서는 근장, 근직경, 동체장, 생근중 모든 항목에서 무처리 대비하여 25-35%의 효과 상승을 나타내었다(표 51). 이러한 결과는 인삼 잿빛곰팡이병에 대하여 병방제효과가 인정되는 전신저항성유도물질이 작물의 생육에도 좋은 영향을 미치는 것으로 보아 친환경 농자재로서의 실용성이 매우 좋은 것으로 판단된다.

표 50. 전신저항성유도물질 처리에 따른 지상부 생육특성 조사

처리구	경장 (cm)	경직경 (mm)	생중량 (g/plant)		
			줄기	엽	합계
전신저항성유도물질	26.4	4.1	4.1	6.3	10.4
무처리	20.7	3.5	3.1	5.0	8.1

표 51. 전신저항성유도물질 처리에 따른 지하부 생육특성 조사

처리구	근장 (cm)	근직경 (mm)	동체장 (cm)	생근중 (g/plant)
전신저항성유도물질	31.7	16.5	11.2	23.0
무처리	23.8	13.4	8.3	19.1

라. 화훼류에 대한 전신저항성유도물질의 생화학적 특성 변화 영향 분석

(1) 백합에 대한 생육특성 변화 시험

본 연구는 전신저항성유도단백질을 처리하여 백합의 생육특성을 알아보기 위해 수행하였다. 본 실험에 이용된 종구는 네덜란드에서 직수입한 Oriental계 'Siberia' 품종으로 백합 재배는 비가림 하우스에서 무처리구는 관행재배법에 따라 농촌진흥청 백합 양액재배 표준시비량에 준하여 점적관수로 시비하였다. 전신저항성유도물질은 10ppm과 40ppm의 농도로 7일 간격 4회 엽면처리 하였으며 각각의 처리에 따른 생육상태는 백합의 초장 길이, 지상부 줄기 생체중, 줄기 지름 그리고 물성분석기(EZ-tester, Shimdzu)를 이용하여 경도를 조사하여 비교하였다. 또한 줄기 내 미네랄은 원소흡수분광광도계(Atomic absorption spectrometer, Hewlett Packard)로 칼슘, 마그네슘, 칼륨, 그리고 분광분석기(Spectrophotometer, Shimadzu)로 인을 측정하였다.

우선 화뢰를 포함한 백합 'Siberia' 품종의 지상부 줄기 길이는 관행재배인 무처리구에서

63.4cm 이었다. 하지만 전신저항성유도물질 처리시 길이 신장이 촉진되었으며 10ppm보다는 40ppm 처리시 줄기의 길이가 길었다. 길이는 길수록 고품질로 인정되는 백합에 있어서 무처리구의 백합보다 전신저항성유도물질 처리시 10% 정도 줄기의 신장이 촉진되었음을 확인하였다. 또한 개화하기 전 꽃과 잎을 포함한 백합 절화의 지상부 줄기 생체중은 무처리구의 70.3g에 비하여 전신저항성유도물질 40ppm 처리구의 백합 절화가 생육이 촉진되어 무게가 증가하였다. 줄기저름 역시 전신저항성유도물질 처리에 의한 효과를 볼 수 있었다. 하지만 줄기의 단단함을 알아보기 위한 절단력(경도)은 무처리구의 백합 절화는 46N이었으며 전신저항성유도물질 40ppm 처리구에서 경도가 조금 증가하였다(표 52).

표 52. 전신저항성유도물질 처리에 의한 백합의 외형적 특성 변화 조사

처리구	처리농도	지상부줄기 길이 (cm)	지상부줄기 생체중 (g)	경도 (N)	줄기저름 (Ø mm)
전신저항성유도물질	10 ppm	65.5	73.9	42.7	6.50
전신저항성유도물질	40 ppm	69.7	79.0	47.8	6.64
무처리	-	63.4	70.3	46.0	6.25

전신저항성유도물질 처리가 무기이온과 인의 흡수에 미치는 영향을 알아보기 위해 줄기 내 성분의 함량을 분석한 결과는 표 53와 같다. 칼슘 함량은 무처리구의 $478.8\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW에서 처리에 의하여 증가하였다. 줄기 내 마그네슘 함량은 무처리구의 $112.1\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW 에서 10ppm과 40ppm 전신저항성유도물질 처리구는 증가한 것으로 조사되었다. 하지만 칼륨과 인의 조사에서는 처리에 따른 효과를 볼 수 없었다. 이러한 결과는 선행 연구에서 도출하였듯이 칼슘과 마그네슘의 영양분을 흡수하여 세포의 원활한 활성을 유지시켜주고 광합성에 작용이 활발히 이루어지므로 작물생육에 좋은 영향을 주었던 결과와 일치한다.

표 53. 전신저항성유도물질 처리에 의한 백합 줄기 내 생화학적 특성 변화 조사.

처리구	처리 농도 (ppm)	Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	Mg ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	K ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	P ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)
전신저항성유도물질	10	528.6	140.8	2.77	0.64
전신저항성유도물질	40	524.5	179.8	2.85	0.59
무처리	-	478.8	112.1	2.92	0.62

2. 전신저항성유도물질 분석법 개발

최근 환경친화적인 농업이 강조되고 있고 특히 미생물과 미생물제제의 농업현장에서 사용에 대한 관심사는 매우 고조되어 있는 상황이나 유효 성분이 검증되지 않은 미생물 관련 제품의 무분별한 개발과 생산이 이루어지고 있어 농업인들을 혼란시키고 있다. 전신저항성유도물질을 이용한 생화학작물보호제의 실용화를 위해서는 원분의 생산, 순도 결정, 제형의 개발, 인축독성시험 및 잔류분석 등의 다양한 시험 결과들이 필요하다. 이러한 시험을 수행하기 위해서는 생화학작물보호제의 정량적 개념 도입이 반드시 필요하다. 따라서 본 연구에서는 전신저항성유도물질의 정량법을 확립하기 위하여 수행하였다.

가. 기존의 추출 및 정제법 분석

우선 분석법을 개발하기 위해서는 순수한 표준품을 얻어야만 한다. 전신저항성유도물질 조추출물을 세포를 파쇄한 후 추출하는 공정이 포함되어있기에 배양액 중 불순물을 포함하여 세포 성분이 다량 함유되어있다. 이러한 물질들은 chromatography를 통한 정제과정에서 그 효율을 감소시키는 원인이 된다. 따라서 이러한 불순물들을 효과적으로 제거하기 위하여 정제법을 filtration과 chromatography 및 lyophilized step으로 구성하였다.

먼저 전신저항성유도물질 조추출물을 3차 증류수에 녹인 후 원심분리하였다. 이후 상층액을 취하고 membrane filter(MF)를 통과시켜 cell debris를 제거하였다. MF 후 여액을 ultra filtration 하였다. 우선 cut off M.W. 10,000에서 1차 filtering 후 남은 액을 다시 cut off M.W. 100,000에서 2차 filtration하였다. 통과된 용액을 모은 후 다시 cut off M.W. 10,000에서 3차 filtration 및 농축하였다. 농축된 여액의 기포를 제거하기 위하여 원심분리한 후 chromatography를 이용하여 조추출물 중 전신저항성유도물질을 분리하였다. 시료 loading 후 용출액을 각각 분취한 후 전신저항성유도물질의 존재 유무를 확인하기 위하여 전기영동 분석하였다. 확인된 fraction을 모두 모아 ultra filtration cut off M.W. 5,000을 이용하여 용액의 desalting과 농축과정을 각각 진행하였다. 농축액은 -72°C 에서 시간 동결한 후 동결건조기에서

24시간 동안 건조하였다. 전체적인 효율은 densitometer를 이용하여 image 분석을 실시하였다.

그 결과 전신저항성유도물질의 정제효과를 일부 확인할 수 있었으나 전신저항성유도물질의 손실도 확인되었다. 정제 효과는 ion exchange chromatography 후 fraction 선발 기준에 따라 최고 80% 수준까지 가능하리라 판단된다. 그러나 회수율의 개념에서 정제된 total 전신저항성유도물질의 양은 조추출물 원액 대비 약 60% 수준이었다(그림 63).

이러한 회수율 감소 결과는 전체적인 정제과정이 복잡하여 각 단계에서 발생하는 손실률이 누적되어 최종 회수율에 반영된 것으로 판단된다. 따라서 정제법을 개선하기 위하여 전체적인 과정을 단순화시키기 위한 시험을 수행하였다.

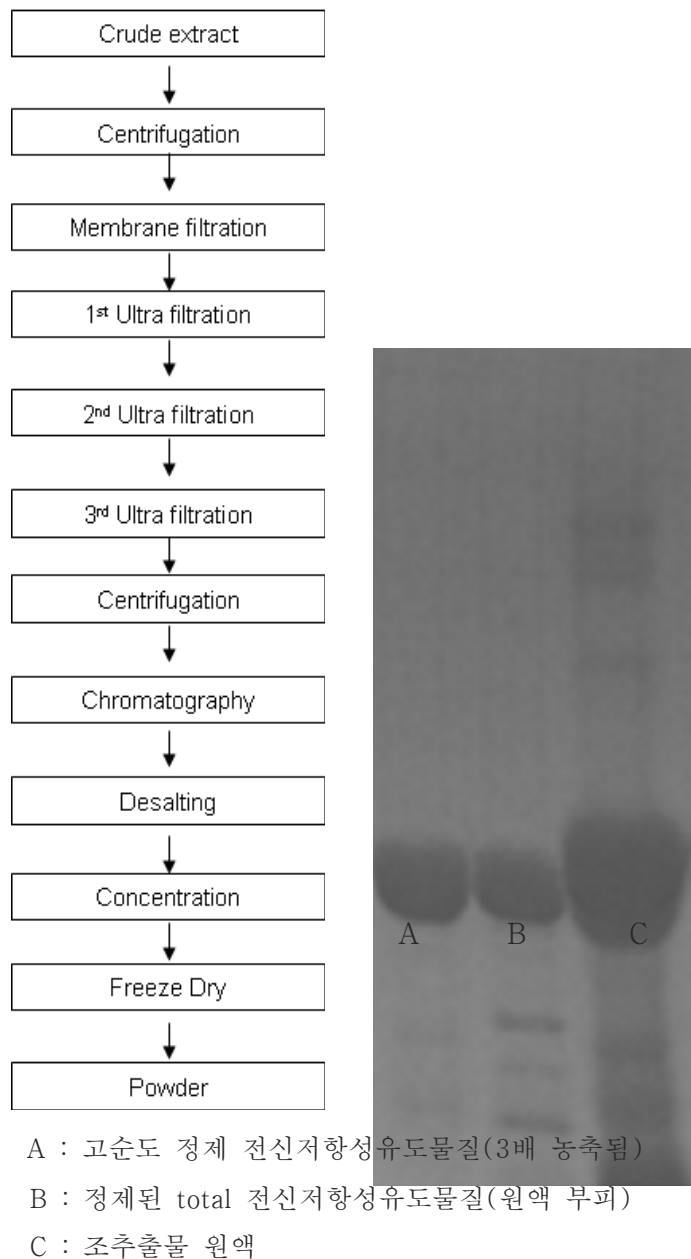


그림 63. 전신저항성유도물질의 정제 과정 및 결과

나. 각 단계별 회수율 점검

전신저항성유도물질의 정제 과정에서 단계별 회수율을 분석하였다. 그 결과 첫 번째 원심 분리 과정과 2번째 고분자물질을 제거하기 위한 ultra filtration 과정을 약 30%의 손실률을 나타내었다(표 54).

첫 번째 원심분리과정에서 손실은 원심분리의 조건 뿐 만 아니라 기존의 조추출물에 대한 전처리 없이 실시하였을 경우 전신저항성물질의 특성상 배지성분, 당단백, 당, 지방 등 분자량이 큰 물질들과 aggregation되어 cell down 될 확률이 높은 것으로 판단된다. 따라서 이를 극복하기 위해서는 조추출물에 대한 전처리를 변형하는 시험이 필요하였다.

두 번째 ultra filtration 과정은 고분자물질을 제거하기 위한 과정으로 chromatography의 효율을 증가시키기 위한 전처리다. 본 과정에서 발생된 손실은 여액으로 permeate되어야 할 전신저항성물질이 membrane을 통과하지 못한 것으로 나타났다. 따라서 기존의 ultra filtration 과정을 재점검하고 그 과정을 최소화할 수 있는 방안을 모색하였다

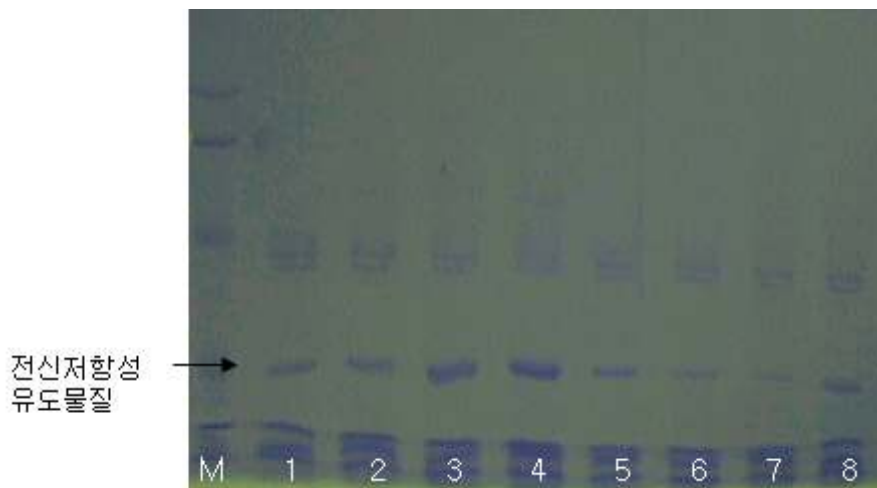
표 54. 전신저항성유도물질의 정제 단계별 평균 회수율

단 계	평균 회수율	목적
조추출물 원액	100 %	sonication 이용하여 세포를 파쇄한 시료 시험기간 중 냉장보관
Centrifugation	90 %	세포 구성 성분의 제거 상층액사용
Membrane filtration	89 %	세포 구성 성분의 제거
1 st Ultra filtration	87 %	저분자물질 제거
2 nd Ultra filtration	70 %	고분자물질 제거
3 rd Ultra filtration	70 %	농축
Centrifugation	70 %	기포제거
Chromatography	65 %	물질분리
Desalting & Concentration	60 %	탈염 및 농축
Freezy Dry	60 %	건조

다. 추출정제법의 개선

(1) 조추출물의 전처리 개선

일반적으로 세포내 대사산물을 손상 없이 파쇄 하여 추출하는 방법으로는 homogenize법과 sonication 법이 있다. 세포내에서 전신저항성유도물질은 추출하는 방법으로는 sonication법이 사용되며 그 파쇄 액을 조추출물 원액으로 사용하고 있다. 먼저 sonication법을 최적화하기 위하여 배양 후 cell 상태에 따른 시간별 안정성을 검토하였다.



M: Marker

1 : Control (pellet 상태에서 바로 sonication)

2 : 원심분리 후 pellet 상태로 3hr 후 sonication

3 : " 2hr 후 sonication

4 : " 1hr 후 sonication

5 : 배양액 상태로 3hr 후 원심분리

6 : 2hr 후 원심분리

7 : 1hr 후 원심분리

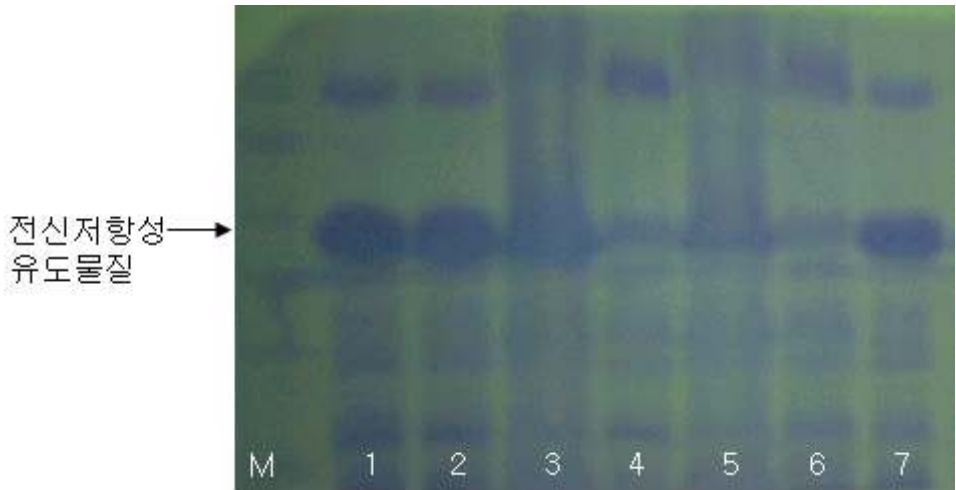
8 : Control (pellet 상태에서 바로 sonication)

그림 64. Sonication하기 전 cell상태(pellet, 배양액)와 시간에 따른 안정성 실험

시험 결과, 원심분리 전 배양액 상태로 1h 이상 동안 실온에 방치하는 것은 전신저항성유도물질의 분해를 촉진하는 요인이었다(그림 64). 또한 안정성을 최대한 유지하기 위해서는 배양액을 바로 원심분리하여 pellet을 취한 후 2시간 이내 sonication하는 것이 추출에 가장 효과적이었다. 다음은 sonication 된 조추출물을 열처리하였다. 전신저항성유도물질은 열에 매우 안정한 특성을 갖는다. 따라서 조추출물을 열처리하여 열에 약한 단백질, 당단백, 당류를 고형화시키고 원심분리를 통하여 최대한 상층액으로부터 제거시키고자 하였다. 또한 열처리로 인하여

세포가 파쇄 되므로 sonication과 병행할 경우 추출효과에는 어한 영향을 미치는지 sonication과 열 처리법을 이용한 최적 조합을 분석하였다.

시험 결과 sonication한 후 열처리할 경우 전신저항성유도물질은 매우 안정하였다. 그러나 열처리 한 후 sonication 할 경우 모든 처리구에서 전신저항성의 양이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 세포 자체를 sonication 하지 않고 열처리하는 것만으로도 세포내 전신저항성 유도물질을 충분히 추출할 수 있었다(그림 65).



M: Marker

1 : sonication 처리(control)

2 : sonication 후 열처리

3 : 열처리 직후 sonication

4 : 열처리 직후 sonication하고 다시 열처리

5 : 열처리 1 시간후 sonication

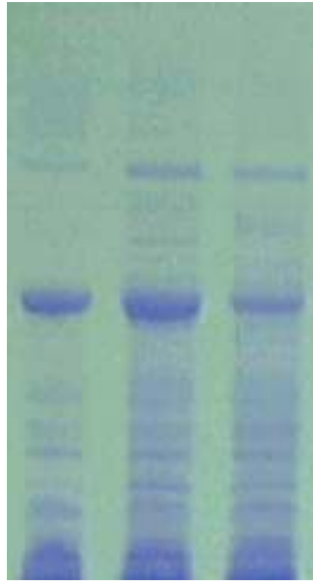
6 : 열처리 1 시간후 sonication하고 다시 열처리

7 : 열처리만 함

그림 65. Sonication과 열처리를 이용한 전신저항성물질 추출 효과 분석

따라서 본 시험을 통하여 추출정제법 개선을 위한 방법으로 세포 파쇄법 및 정제효과가 예상되는 열처리법을 최종 추가하였다.

이상의 시험결과를 바탕으로 개선된 추출 방법에 준하여 조제된 조추출물을 원심분리한 결과 이전의 방법인 sonication 법보다 회수율이 향상되었다. 또한 고분자물질의 상당량이 감소 되었음을 확인할 수 있었다(그림 66).



A B C

A : 열처리 조출물의 원심분리 상층액

B : 열처리한 조추출물 원액

C : sonication 조출물의 원심분리 상층액

그림 66. 조추출물처리방법에 따른 원심분리 상층액의 전신저항성유도물질의 분포

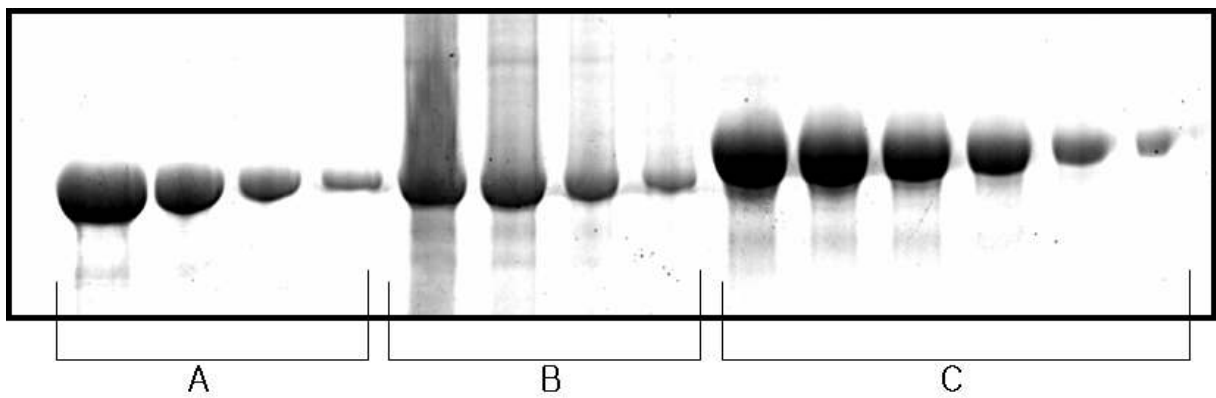
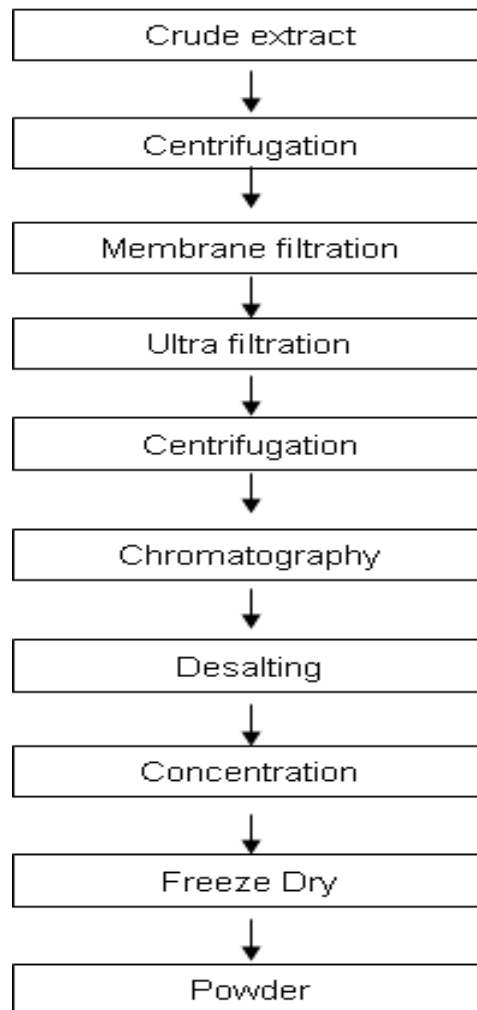
(2) Ultra filtration의 단순화

조추출물의 조제법 중 열처리법의 도입으로 고분자물질이 원심분리시 상당량 제거되었으므로 두 번째 ultra filtration의 과정을 생략할 수 있었으며 첫 번째 ultra filtration과정과 세 번째 ultra filtration를 통하여 저분자물질을 제거하고 chromatography 효율을 높일 수 있도록 농축과정을 병행하였다. 이를 바탕으로 전신저항성유도물질 정제시 그 효율을 측정하였다.

그 결과 전신저항성유도물질의 수율이 30% 향상되었다(표 55). 또한 표준품으로 사용할 수 있는 물질도 시판되어 마커로 사용되는 표준 단백질 수준의 순도를 확보할 수 있었다(그림 67).

표 55. 개선된 정제법을 적용한 전신저항성유도단백질의 회수율

단 계	평균 회수율	목적
조추출물 원액	100 %	열처리를 이용하여 세포를 파쇄한 시료 시험기간 중 냉장보관
Centrifugation	96 %	세포 구성 성분의 제거 상층액사용
Membrane filtration	95 %	세포 구성 성분의 제거
Ultra filtration	95 %	저분자물질 제거 및 농축
Centrifugation	93 %	기포제거
Chromatography	82 %	물질분리
Desalting& Concentration	80 %	탈염 및 농축
Freezy Dry	80 %	건조

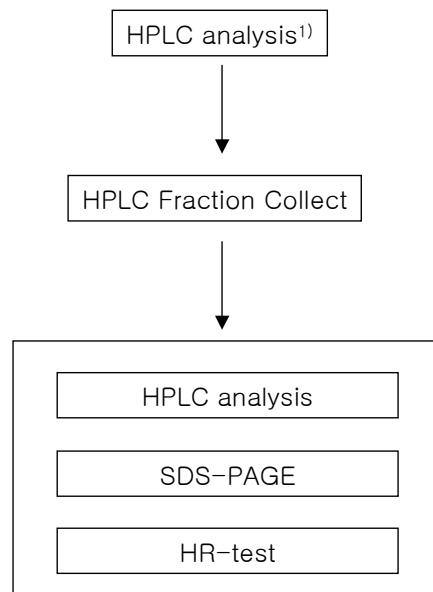


- A : 정제된 전신저항성유도물질
- B : 전신저항성유도물질 조추출물
- C : 시판되는 Ovalbumin 표준품

그림 67. 개선된 정제법과 정제된 전신저항성유도물질

라. 전신저항성유도물질의 분석방법 개발

먼저 1차년도 전신저항성유도물질 정제법에 의하여 정제된 물질에 대한 평가를 실시하였다. 시험방법은 HPLC와 생물활성시험을 품질관리법으로 선택하였다. HPLC 분석법에서는 HPLC를 이용하여 정제물을 단일물질로 재정제한 후 다시 HPLC, SDS-PAGE, HR-test를 통하여 정제물의 특성을 조사하였다(그림 68, 표 56).



HPLC 분석

Instrument : HPLC 10A system, Shimazu, (Japan)

Column : Symmetry 300 series reverse phase (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m, 300A) Watters, Co. (U.S.A.)

Mobile phase A : 0.1% TFA in H₂O

Mobile phase B : 0.1% TFA in Acetonitrile

Flow rate: 1 ml / min

Wave length : 210 nm, 280 nm (Dual lamp)

Sample loading volume : 10 μ l

Retention time : 21.7mins

그림 68. HPLC를 이용한 전신저항성유도물질 정성분석

표 56. 전신저항성유도물질의 HR-test 법

항목	내용
시험기주식물	· <i>Nicotiana tabacum cv. xanthi, nc</i>
식물생육조건	· D/N = 16:8 (growth chamber) · 광도 : 15,000 LUX · 온도 : 27°C
기주식물의 사용조건	· 본엽 8 ~ 10장(높이17cm±2cm) 발생시 제 3엽 사용 · 제 3엽의 크기는 길이 10~12cm, 폭 7~9cm
처리 방법	· 25 gauge 주사기를 이용하여 담배 엽맥사이에 주입 · 오전 10시 이전, 오후 3시 이후 실시
접종 후 관찰	· 20°C ~ 36°C 온도에 24시간 보관 및 관찰

전신저항성유도물질을 HPLC로 분석한 결과 그림 12에 나타난 것과 같이 21.7분에서 단일 peak가 관찰되었다. 해당 시간대에서 유출된 fraction을 collection하고 용매교환-농축 과정을 수행한 후 HPLC, SDS-PAGE, HR-test를 한 결과 전신저항성유도물질 성분이 확인되었다 (그림 69, 70, 71).



그림 69. 전신저항성유도물질의 chromatography.

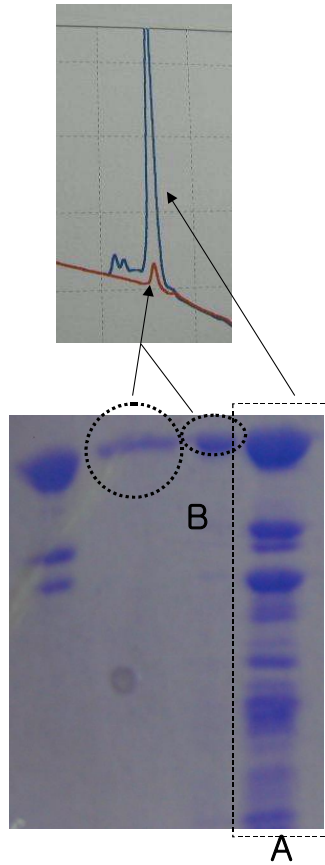


그림 70. 전신저항성유도물질 원분(A)과 HPLC 정제된 전신저항성유도물질 주성분(B)의 SDS-PAGE와 chromatography.

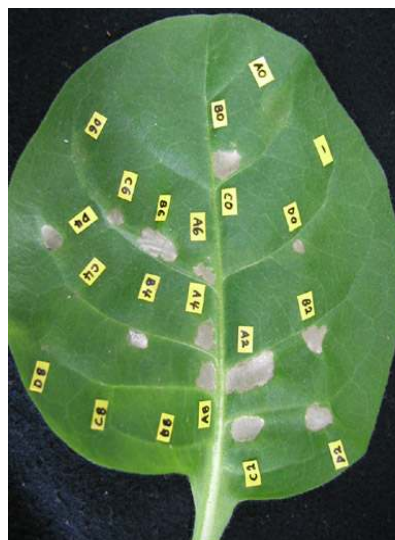


그림 71. 전신저항성유도물질 원제 및 정제물의 HR 반응.

전신저항성유도물질의 분석법을 확립하기 위해서는 농도를 알고 있는 표준품과 정확한 정량 분석법이 필요하다. 전신저항성유도물질이 단백질인 특성을 이용하여 그 분석법으로는

SDS-PAGE를 적용하였다. 우선 최종 정제물의 농도는 spectrophotometer를 이용한 total protein determination(표준품 : BSA)과 이미지 분석법인 densitometer 분석을 통하여 결정하였다. Total protein determination은 생산된 원제 중 단백질의 총량을 분석하기 위하여 수행하였으며 SDS-PAGE densitometer 분석은 단백질 중 전신저항성유도물질을 분석하기 위하여 수행하였다(그림 72).

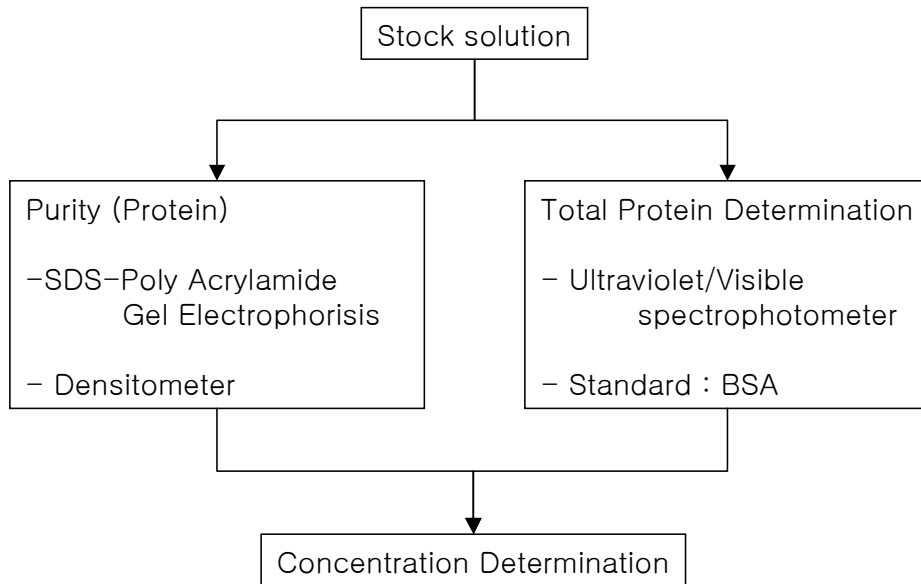


그림 72. 전신저항성유도물질의 총단백질함량 측정 및 이미지 분석법

우선 표준 표준품을 조제하기 위하여 제제효율이 가장 높은 시료를 위한다. 이후 시료의 Total protein determination을 측정하였다. 이때 표준품은 BSA로 사용하고 spectrophotometer로 그 값을 결정한다. 이후 전신저항성유도물질이 포함된 시료를 SDS-PAGE로 각 단백질을 Gel 상에 전개한 후 densitometer를 이용하여 각각의 단백질의 상대적 함량을 산출한다. 이 중 전신저항성유도물질의 상대적 함량이 총 단백질 대비 순도로 정의되며 이 값에 Total protein determination 값을 곱해주면 전신저항성 유도물질 표준품의 농도가 된다.

전신저항성 유도물질의 정량분석의 경우 전신저항성유도물질 표준품 대비 시료 중 전신저항성유도물질의 함량을 Densitometer로 분석하여 얻을 수 있다(그림 73).

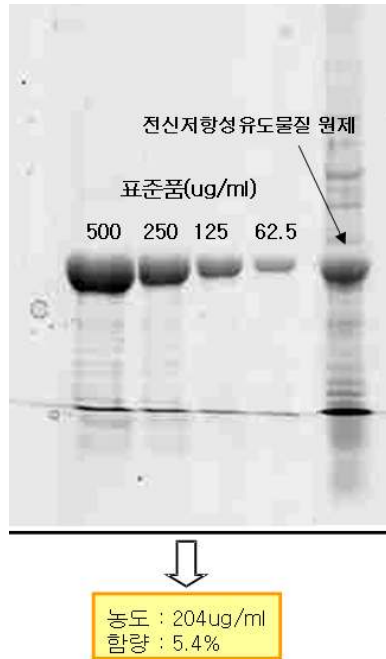


그림 73. 전신저항성유도물질의 정량분석

이상의 결과를 통하여 전신저항성유도물질의 품질관리를 위해서는 SDS-PAGE, 이미지분석법을 통한 정량분석, HPLC와 HR-test를 통한 정성분석법이 병행하는 것 최적 조건이라 사료된다.

3. 타농자재와의 혼용 안정성 분석

가. 화학농약 혼용 안정성 분석

지금까지의 연구 결과에서 전신저항성유도물질은 여러 가지 적용 작물에 대하여 효과적인 병방제효과를 나타내었다. 이는 생화학작물보호제로서의 방제효과는 인정되지만 일반적으로 합성유기농약을 사용하는 농민들에게는 병방제효과가 미비한 수준으로 인식이 될 것이다. 하지만 식물병에 대한 저항성 출현이나 한시적으로라도 병방제효과를 극대화시키기 위한 방법으로 각종 병해에 대한 살균제를 혼용을 하는 경우와 노동력을 줄이기 위하여 여러 가지 제품들을 혼용하여 처리하는 것이 대부분이다. 따라서 본 연구에서는 시중에 시판되고 있는 여러 가지 살균제와 혼용 시 전신저항성유도물질의 유효성분의 안정성을 점검하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

(1) 살균제와 혼용시 수용액상에서의 안정성 검토

전신저항성유도물질의 안정성 점검을 위하여 시중에서 판매되고 있는 다코닐 외 7종의 살균제에 대하여 수용액상에서의 안정성 점검을 수행하였다. 전신저항성유도물질 1,000배 희석

액과 살균제의 안전사용기준의 희석액을 혼합하여 수용액상으로 실온에서 48시간 유지 후 전신저항성유도물질의 잔류량을 점검하였다.

그 결과 모든 살균제와의 수용액상에서의 잔류량은 80% 이상으로 전신저항성유도물질이 시험한 모든 살균제와의 안정성을 나타내었다(그림 74, 표 57).

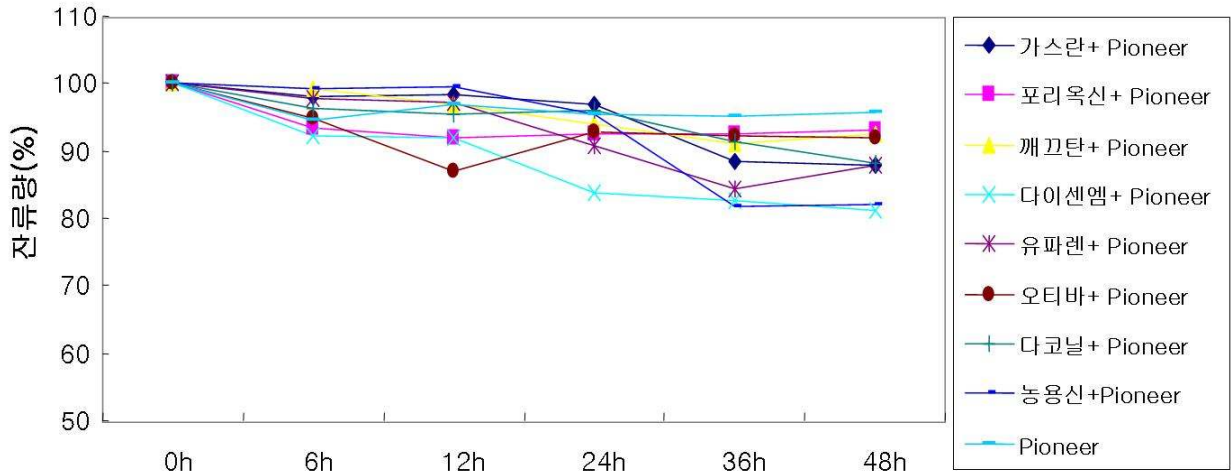


그림 74. 타살균제와 혼용시 수용액상에서의 안정성 검토.

표 57. 타살균제와 혼용시 수용액상에서의 전신저항성유도물질의 잔류량

	가스란	포리옥신	깨끄탄	다이센엠	유파렌	오티바	다코닐	농용신	Pioneer
0h	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6h	98.2	93.5	99.2	92.2	97.8	94.9	96.4	99.1	94.6
12h	98.4	92.0	96.9	91.8	97.2	87.0	95.5	99.4	96.9
24h	97.0	92.4	94.0	83.9	90.8	92.8	95.9	95.5	95.5
36h	88.5	92.6	91.1	82.6	84.3	92.1	91.3	81.7	95.1
48h	87.8	93.2	92.5	81.2	87.8	91.8	88.3	82.0	95.6

(2) 살균제와 혼용시 경시적·활성적 안정성 검토를 통한 혼용가부표 작성

전신저항성유도물질에 대하여 시중에 시판되고 있는 살균제와 혼용하였을 경우 그 안정성이 유지되는지 확인하였다. 시험은 정량적인 측면과 활성적인 측면을 모두 검토한 후 최종 혼용가부표를 작성하였다. 총 22종의 살균제를 대상으로 혼용안정성을 검정한 결과 대부분의 살균제에 대하여 안정성이 확인되었다. 미리카트, 몬세론 지오판, 벨쿠트, 다모아의 경우 혼용 후 즉시 살포할 경우 안정하게 사용할 수 있다(표 58).

표 58. 전신저항성유도물질의 살균제에 대한 혼용가부표

제품명	원제명	대상병해	특성	혼용 가부	비고
깨끄탄	diethofencarb + carbendazim	갯빛곰팡이병	·카바마이트계+벤지미다졸계 ·침투이행성 및 잔효성으로 균사침입, 진진 억제 ·예방 및 치료	◎	
시스텐	myclobutanil	흰가루병	·트리아졸계 ·침투이행성 ·예방 및 치료	◎	
미리카트	cyaxofamid	노균병, 역병	·시아노피리미다졸계 ·예방 및 치료	△	혼합 후 즉시 사용
늘존	mepanipyrim + carbendazim	갯빛곰팡이병	·아닐리노피리미딘계+ 카바메이트계 ·예방 및 치료	◎	
푸르겐	difenoconazole	광범위	·트리아졸계 ·침투이행성 ·예방 및 치료	◎	
몬세렌	pencycuron	잎집무늬마름병	·요소계 ·예방 및 치료	△	혼합 후 즉시 사용
빔	tricyclazole	도열병	·트리아졸계 ·침투이행성 ·예방 및 치료	◎	
리도밀	methlaxyl	노균병, 역병	·아실아라닌계 ·침투이행성 ·예방 및 치료	◎	
농용신	streptomycin	세균병	·항생제 ·예방 및 치료	◎	
가스란	kasugamycin + copper oxychloride	퀘양병, 탄저병, 노균병	·항생제+동제 ·침투이행성, 단백질 합성, ·포자형성,균 ·사신장 억제 ·예방 및 치료	◎	
방과제	bizertanol	광범위	·트리아졸계 ·침투이행성 ·예방 및 치료	◎	

약제명	원제명	대상병해	특성	혼용 가부	비고
포리옥신	polyoxin B	광범위	·항생제 ·예방 및 치료	◎	
지오판	thiophanate- methyl	광범위	·카바메이트계+ 벤지미다졸계 ·예방 및 치료	△	혼합 후 즉시 사용
오티바	azoxystrobin	노균, 탄저, 흰가루, 역병	·스트로빌루린계 ·침투이행성 ·예방 및 치료	◎	
벨쿠트	Iminatadine tris (albesilate)	흰가루, 탄저, 갯빛곰팡이병	·구아니린계 ·지질생합성, 포자발아 ·발아관신장, 부착기형성 ·침입균사 억제 ·예방 및 치료	△	혼합 후 즉시 사용
유과렌	Dichlofluanid	갯빛곰팡이병	·트리할로메칠치오계 ·침투이행성 ·분상포자발아억제 ·예방 및 치료	◎	
다코닐	Chlorothalonil	광범위	·유기염소계 ·예방 및 치료	◎	
비온엠	Acibenzolar-s- methyl + Mancozeb	탄저병	·벤조티아디아졸계+ ·유기유황계 ·예방 및 치료	◎	
다이센엠	mancozeb	광범위	·유기유황계 ·예방 및 치료	◎	
센다닐	Cymoxanil + Chlorothalonil	노균병	·싸이아노세이트아마이드계 + 유기염소계 ·예방 및 치료	◎	
다모아	Chlorothalonil + Myclobutanil	노균, 탄저병	·유기염소계+트리아졸계 ·예방 및 치료	△	혼합 후 즉시 사용 가능
일품	Oxolinic acid	세균병	·퀴놀리온계 ·침투이행성 ·세포분열억제 ·예방 및 치료	◎	

(3) 살충제와 혼용시 수용액상에서의 안정성 검토

전신저항성유도물질의 안정성 점검을 위하여 시중에서 판매되고 있는 코니도 외 2종의 살충제에 대하여 수용액상에서의 안정성 점검을 수행하였다. 전신저항성유도물질 1,000배 희석액과 살충제의 안전사용기준의 희석액을 혼합하여 수용액상으로 실온에서 48시간 유지 후 전신저항성유도물질의 잔류량을 점검하였다.

그 결과 모든 살충제와의 수용액상에서의 잔류량은 80% 이상으로 전신저항성유도물질이 시험한 모든 살충제와의 안정성을 나타내었다(그림 75).

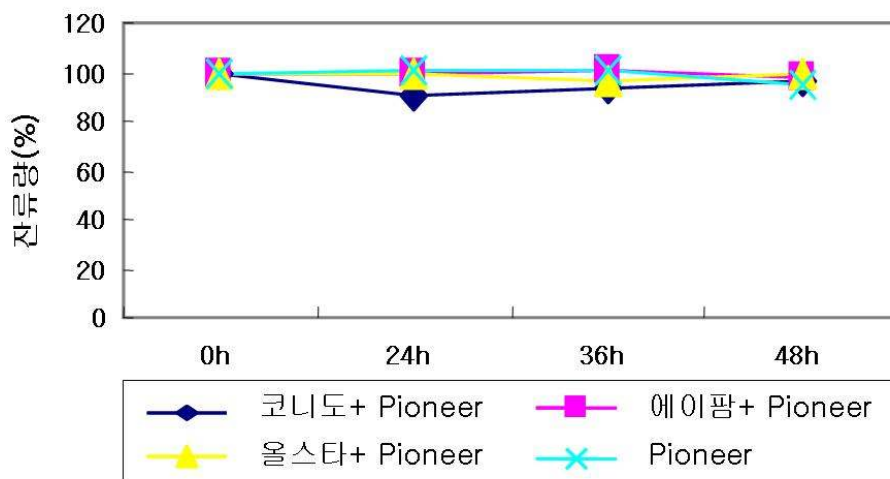


그림 75. 타살충제와 혼용시 수용액상에서의 안정성 검토.

(4) 살충제와 혼용시 경시적·활성적 안정성 검토를 통한 혼용가부표 작성

전신저항성유도물질에 대하여 시중에 시판되고 있는 살충제와 혼용하였을 경우 그 안정성이 유지되는지 확인하였다. 시험은 정량적인 측면과 활성적인 측면을 모두 검토한 후 최종 혼용가부표를 작성하였다. 총 13종의 살충제를 대상으로 혼용안정성을 검정한 결과 대부분의 살충제에 대하여 안정성이 확인되었다. 유기인계인 수프라사이드, 항생제계통인 올스타, 합성피레스로이드계인 데시스, 세베로, 글로로니코티닐계인 모스피란에서는 전신저항성물질이 안정된 활성을 보여 혼용사용이 가능하다고 판단된다. 또한, 나프토크논계인 가네마이트, 합성글로로니코티닐계인 만장일치, 벤조일하이드라진계 미믹의 경우 혼용 후 즉시 살포할 경우 안정하게 사용할 수 있다(표 59).

표 59. 전신저항성유도물질의 살충제에 대한 혼용가부표

살충제	혼용가부	비고	살충제	혼용가부	비고
가네마이트	△	혼합 후 즉시 사용가능	세베로	◎	
테시스	◎		수프라사이드	◎	
디디브이피	◎		암메이트	◎	
만장일치	△	혼합 후 즉시 사용가능	에이팜	◎	
모스피란	◎		울스타	◎	
미믹	△	혼합 후 즉시 사용가능	코니도	◎	
부메랑	◎				

나. 화학비료 혼용 안정성 분석

전신저항성유도물질에 대하여 시중에 시판되고 있는 비료성분과 혼용하였을 경우 그 안정성이 유지되는지 확인하였다. 시험은 정량적인 측면과 활성적인 측면을 모두 검토한 후 최종 혼용가부표를 작성하였다. 총 12종의 비료 성분을 대상으로 혼용안정성을 검정한 결과 대부분의 비료 성분에 대하여 안정성이 확인되었다(그림 76, 표 60).

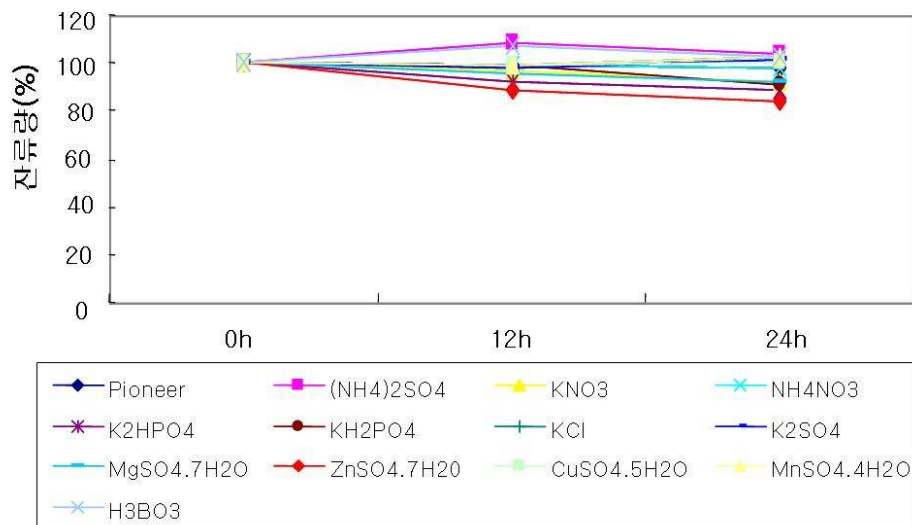


그림 76. 비료제와 혼용시 수용액상에서의 안정성 검토.

표 60. 전신저항성유도물질의 비료 성분에 대한 혼용가부표

성분	(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	NH ₄ NO ₃	MgSO ₄ ·7H ₂ O	MnSO ₄ ·4H ₂ O
혼용가부	◎	◎	◎	◎	◎
성분	KCl	K ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	CuSO ₄ ·5H ₂ O
혼용가부	◎	◎	◎	◎	◎
성분	K ₂ HPO ₄	H ₃ BO ₃			
혼용가부	◎	◎			

다. 친환경농자재 혼용 안정성 분석

정부의 적극적인 친환경농업 육성정책에 따라 친환경농업의 발전과 더불어 미생물 생균제 및 식물추출물 등의 천연물질들이 많이 이용되고 있기 때문에 전신저항성유도물질을 실용화하는데 있어서 이 둘의 관계를 점검하는 것이 매우 중요하다고 사료된다. 따라서 본 연구에서는 현재 유기농가 및 친환경 농가에서 작물의 병해충 방제를 위한 자재로 많이 사용되고 있는 솔빛채(미생물 생균제), 고삼추출물, 키토산 및 현미식초를 선발하였고, 작물생육용 자재로 많이 이용되는 해조추출물과 휴믹산 등 총 6가지의 친환경 농자재와의 혼용안정성 점검을 실시하였다.

그 결과 모든 친환경 농자재와의 혼용 시 전신저항성유도물질은 수용액 상에서 48시간 까지 잔류량 85% 이상을 나타내었다(표 61, 그림 77). 이러한 결과는 전신저항성유도물질의 실용화를 위한 필수요건이 갖추어졌음을 시사한다. 또한 추후 사업화를 위한 제형의 개발 시 친환경 농자재와의 혼합 제형이 가능하여 병방제효과와 식물면역력 작용 그리고 성장촉진 효과의 복합적인 농자재로서의 개발이 가능하다고 판단된다.

표 61. 친환경농자재와 혼용시 수용액상에서의 전신저항성유도물질의 잔류량

	잔류량(%)		
	0h	24h	48h
Pioneer	100	95	95
솔빛채 + Pioneer	100	93	101
고삼추출물 + Pioneer	100	86	92
키토산 + Pioneer	100	88	94
현미식초 + Pioneer	100	103	87
해조추출물 + Pioneer	100	90	90
휴믹산 + Pioneer	100	90	93

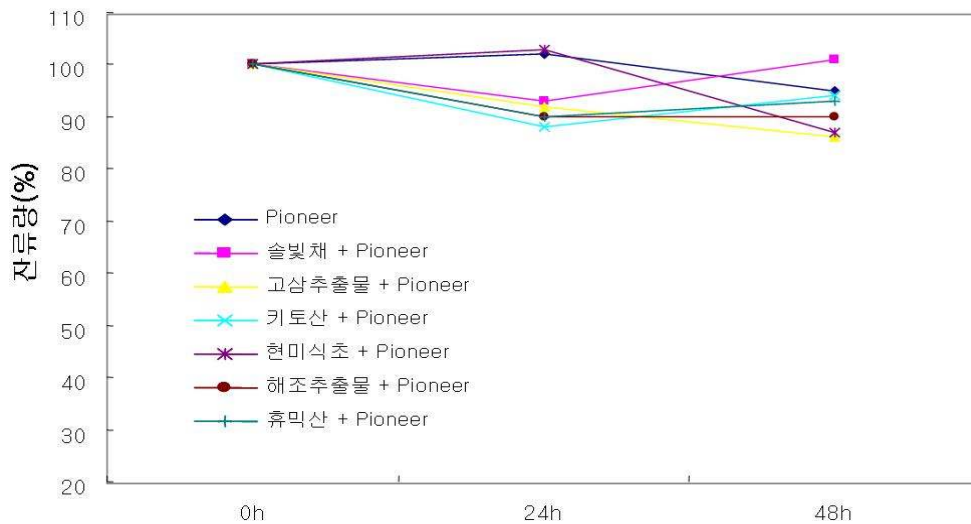


그림 77. 친환경농자재와 혼용시 수용액상에서의 안정성 검토.

4. 친환경 재배력 작성 및 교육자료 제작

본 연구 과제를 통하여 다양한 작물에 대한 전신저항성유도물질의 병방제 스펙트럼을 조사하였다. 수도작과 주요 원예작물, 과수 및 화훼작물 그리고 특용작물에 대하여 문제가 되고 있는 주요 식물병원균을 선발하여 온실 및 포장 수준에서의 병방제효과를 점검하였다. 생물학적 스펙트럼 조사 결과는 표 62와 같이 다양한 작목과 작물에 발생하는 식물병원균에 대하여 넓은 스펙트럼을 가지고 있었다. 기존의 화학농약과는 다르게 대상 작물과 식물병에 대하여 넓은 스펙트럼을 가지고 있고, 독성이나 약해가 없는 장점을 가지고 있었다. 이러한 작용은 식물병에 대하여 직접적 살균 작용이 아닌 간접적인 작용으로서 대상 작물의 전신저항성을 유도하

여 식물이 병해에 대하여 강하게 견디게 하고 병해의 진행 또는 생육을 효과적으로 저지한다고 판단된다. 따라서 기존의 화학농약을 대체할 수 있는 농업용 자재로 개발이 가능하며 화학농약의 사용량을 줄일 수 있는 혼합제 개발도 가능하리라 판단된다. 그러나 표 62에서는 제시하지 않았지만 과수나 화훼류의 병방제효과를 점검하였지만 다른 작물에 비하여 방제효과가 낮게 나타났다. 이는 전신저항성유도물질의 최적의 처리시기나 방법, 그리고 희석배수에 대한 재실험이 이뤄진다면 과수나 화훼류에 대한 적용확대가 가능할 것이라고 판단된다.

표 62. 전신저항성유도물질 처리에 의한 스펙트럼 조사

작목	작물	적용병해	처리시기 및 방법	방제효과
수도작물	벼	잎도열병	발생 초기 1-2회 경엽 처리	약 65%
원예작물	고추	역병	장마 이후 10일 간격 경엽 4회 처리	52.6%
		탄저병	"	51.5-56.2%
		바이러스병	"	61.6%
	오이	갯빛곰팡이병	발생 초기 10일 간격 경엽 3회 처리	59.7%
		흰가루병	"	49.2-61.9%
		노균병	"	41.6%
	배추	노균병	"	55.2%
	딸기	갯빛곰팡이병	장마 이후 10일 간격 경엽 4회 처리	54.9%
	참외	노균병	"	49.9%
	호박	흰가루병	"	57.4%
과수작물	감귤	궤양병	발아 초기 14일 간격 5-6회 경엽 처리	57.8%
특용작물	인삼	갯빛곰팡이병	묘삼 분의처리 묘삼 침지 처리 생육기중 10일 간격 관주 처리	51.2-59.5%

또한 전신저항성유도물질은 앞선 연구 결과에 의하여 식물 고유의 생육을 최상의 상태로 유지시키는데 도움을 주는 PGP 효과를 나타내고 있어 작물 생육 전 단계에서 사용이 가능 할 것으로 사료된다. 기존의 화학 비료제는 처리한 시기에서 비료의 효과가 눈에 띄게 나타난다. 하지만 수확기에 접어들면서 다른 특정한 용도의 다른 영양제를 선택하여야 함으로 생육기에서는 작물의 활력 및 불균형한 영양분으로 인해 수확기가 줄어드는 단점이 있었다. 하지만 전신저항성유도물질은 초기 생육기에 꾸준히 처리한다면 작물의 면역력 및 생리 활성 물질(Ca과

Mg의 흡수 촉진)이 우수하게 나타나 광합성이나 작물 내 세포활동을 왕성하게 도움을 주므로 수확기 연장에 도움을 줄 수 있다. 그림 78은 전신저항성유도물질의 전 생육과정에서의 적용가능성을 그림으로 나타내었다. 각각의 생육단계에서 전신저항성유도물질이 단계별 특성에 맞게 적용이 되며 이는 수확량 증대와 농가소득의 증대로 이어질 것이라 사료된다.






	파종 전 종자	침종	발아 및 기초 생리대사작용 촉진
	발아기	침종 또는 관주	뿌리 발근력 및 입모을 향상
	육묘기	경엽처리 또는 관주	생장 촉진 및 뿌리 발달
	결실기	경엽처리	기형과 감소로 인한 상품과율 증가, 순맛이 현상 및 질감 감소, 수확기 연장
	수확기	경엽처리	과색, 당도 및 경도 상승, 저장성 향상

그림 78. 친환경적 전신저항성유도물질의 생육과정에서의 적용

본 과제의 연구에서 도출된 결과를 바탕으로 작물에 대한 친환경 재배력을 작성하였다. 전신저항성유도물질의 처리에 의하여 생화학작물보호제로서의 등록 가능성을 본 시험 작물에 대하여 친환경 재배력을 작성하였고 부수적으로 작물 생육에 도움이 되는 생육 초기관리에 대한 매뉴얼을 제시하여 농민을 대상으로 한 교육자료로 활용이 가능 할 것이다.

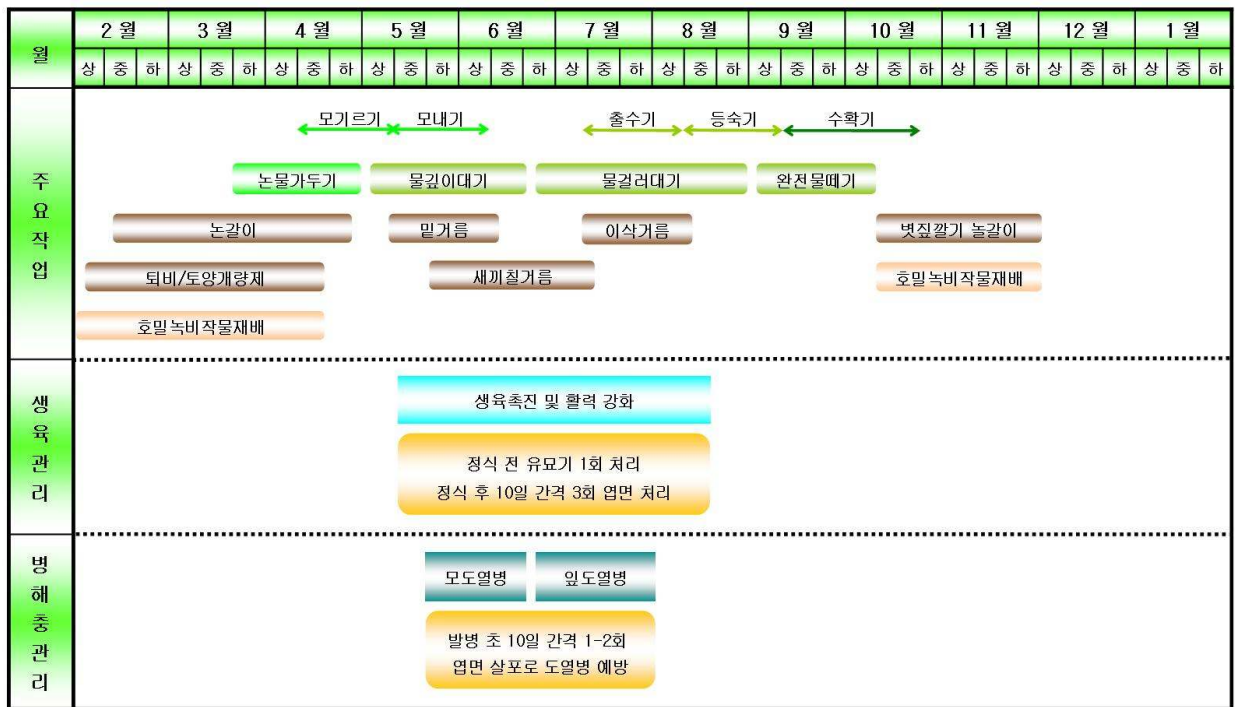


그림 79. 수도작에 대한 친환경 재배력(전신저항성유도물질 적용).

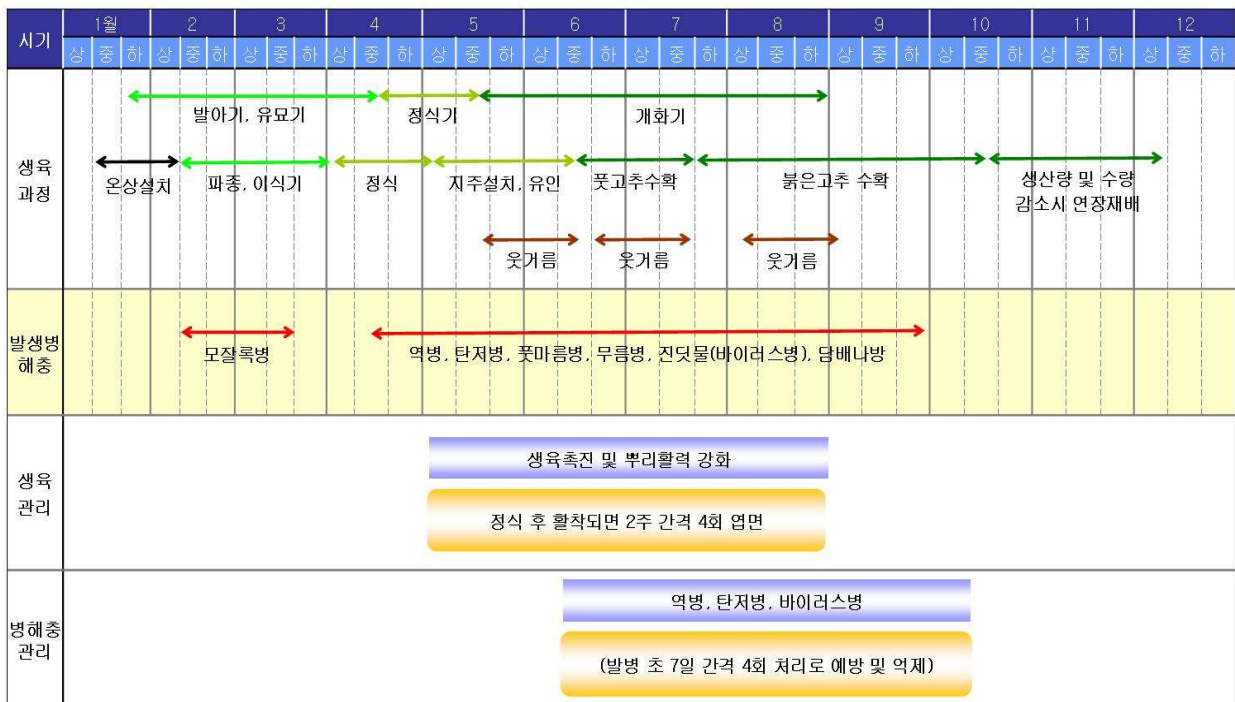


그림 80. 고추에 대한 친환경 재배력(전신저항성유도물질 적용).

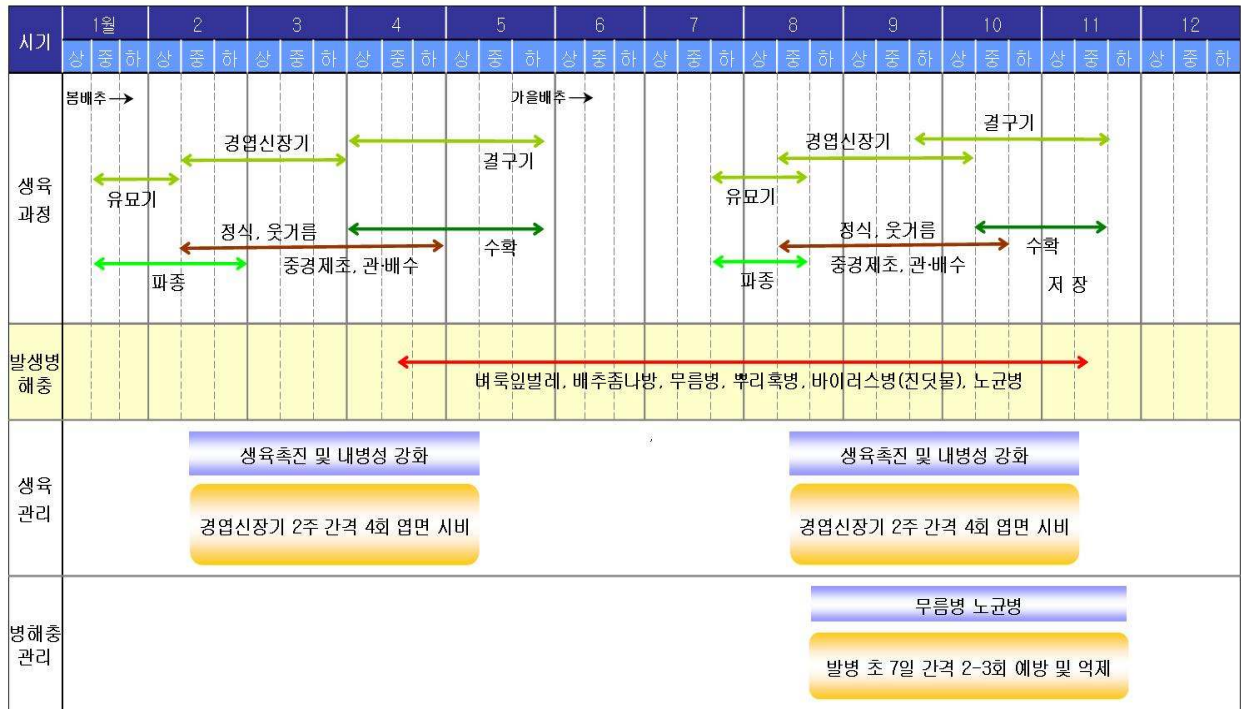


그림 81. 배추에 대한 친환경 재배력(전신저항성유도물질 적용).

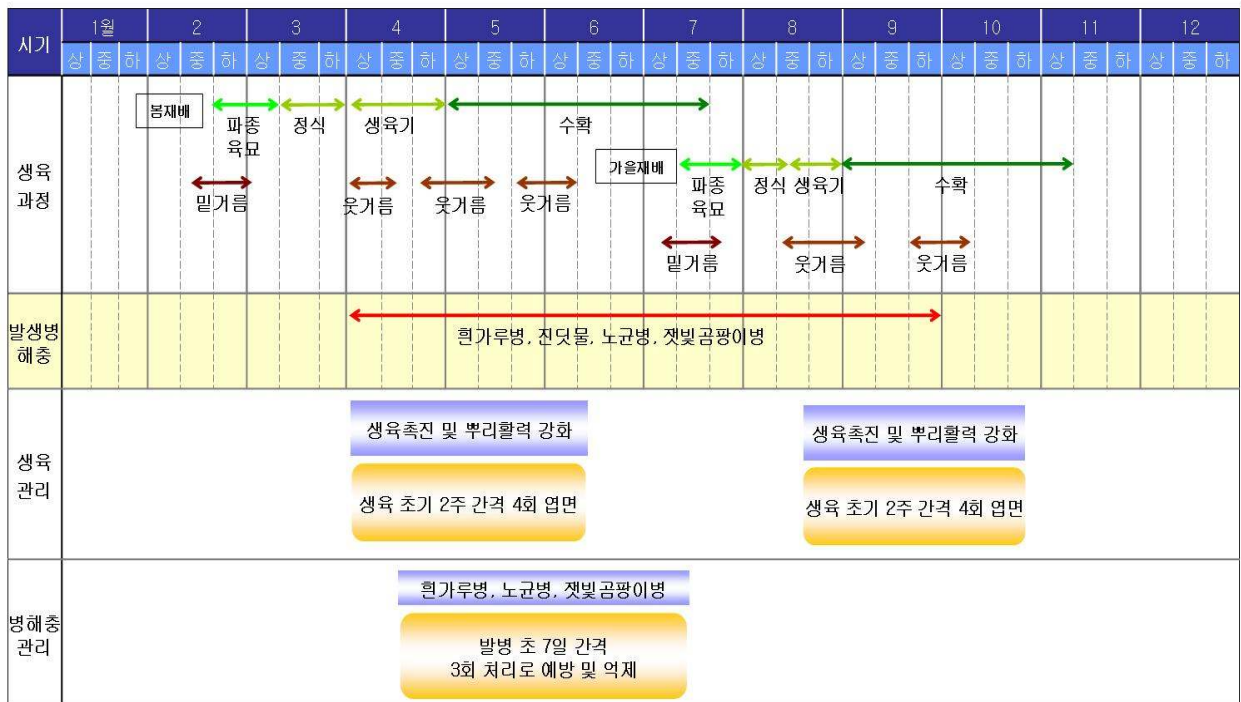


그림 82. 오이에 대한 친환경 재배력(전신저항성유도물질 적용).

시기	1월		2월		3월		4월		5월		6월		7월		8월		9월		10월		11월		12월					
	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하				
생육 과정	묘 냉장저장						모주정식				자묘증식										묘 냉장저장							
발생병 해충	잣빛 곰팡이병						육묘				정식				수확										시들음병, 잎선충, 응애, 흰가루병			
생육 관리	생육촉진, 비대 촉진, 활력 강화 및 수확기 연장																											
병해충 관리	잣빛곰팡이병 발병 초 7일 간격 3회 예방 및 억제																								흰가루병 발병 초 7일 간격 3회 예방 및 억제			

그림 83. 딸기에 대한 친환경 재배력(전신저항성유도물질 적용).

시기	1월		2월		3월		4월		5월		6월		7월		8월		9월		10월		11월		12월	
	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하	상	중	하
생육 과정	묘 포		발아, 육묘						추비, 가도						근비대						파종			
본 포																								
발생병 해충	모잘록병, 풍랭이류, 달랭이류, 줄기무름병, 풍랭이류, 예정지 선충, 곰팡이 점무늬(줄기, 잎)병 역병, 잣빛곰팡이병, 탄저병																							
생육 관리	묘 포		조기활착증진, 발근촉진						생육 초기 10일 간격 2-3회 엽면 시비						잣빛곰팡이병									
본 포	묘삼 1회 분의 처리. 묘삼 1회 첨지 처리로 잣빛곰팡이병 예방																							

그림 84. 인삼에 대한 친환경 재배력(전신저항성유도물질 적용).

제 3 절 전신저항성유도물질의 독성학적 특성 분석

1. 전신저항성유도물질 원제의 인축과 환경에 대한 독성학적 특성 분석

가. 마우스에 대한 전신저항성유도 단백질의 급성경구독성시험

1. 요약

마우스에 대한 전신저항성유도 단백질의 급성경구독성시험을 “생물농약의 등록시험방법 및 등록신청 서류 검토기준 (농촌진흥청 고시 제 2006-19호, 2006.10.16)에 따라 ICR계 마우스를 사용하여 시험물질의 기초시험 투여용량인 2 500 mg/kg B.W.를 암.수 각각에 대해 1회 경구 투여한후 2주간 치사 수, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

(1) 시험기간 중 시험물질 적용과 관련된 사망동물은 관찰되지 않았다.

(2) 일반증상 관찰결과 모든 시험물질 투여 동물에서 투여 후 생기저하(Inanimation)가 관찰되었으나 48시간 이내에 회복되었다.

(3) 체중측정 결과 시험물질 적용과 관련된 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

(4) 부검소견 결과 암.수 각각 모든 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

2. 결 과

(1) 일반증상 및 사망률(Table 1,2)

기초시험 결과 투여용량인 2 500 mg/kg B.W.의 수컷에서 1마리가 사망하여 LD50 치는 2 500 mg/kg B.W.로 계산되었다. 일반증상 관찰결과 생존한 시험물질 투여 동물에서는 투여 후 생기저하(Inanimation)가 관찰되었으나 48시간 이내에 회복되었으며 그 외의 시험물질과 연관된 일반증상은 관찰되지 않았다. 사망도울의 경우 투여 후 호흡곤란(dyspnea)증세가 관찰되었으며 투여 후 1시간 이내에 사망하였다.

(2) 체중변화 (Table 3)

시험기간 중 생존동물에 대한 체중변화는 암컷의 경우 투여 후 1주째에 시험물질 투여군이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였으나 투여 후 2주째에는 유의성이 관찰되지 않았고, 수컷의 경우 대조군에 비해 유의성 있는 체중 변화는 관찰되지 않았으므로 시험물질에 의한 영향으로 판단되지 않는다.

(3) 부검결과 (Table 4)

생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취하여 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한, 암.수 모든 동물에서 투여에 기인된 특이할 만한 소견은 관찰되지 않았다. 사망동물의

경우 외관 관찰 결과 비강 주변에서 분비물이 관찰되었고, 부검 결과 기도와 흉강내에서 포말이 관찰되어 시험물질에 의한 영향이 아닌 시험물질 투여시의 실수로 판단된다.

3. 고찰 및 결론

전신저항성유도 단백질에 대한 단회투여(경구) 독성시험을 ICR계 마우스를 사용하여 기초시험으로 2 500 mg/kg B.W.의 투여군과 용매 대조군을 두어 1회 경구 투여한 후 2주간 치사 수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과 다음과 같다.

본 시험물질 2 500 mg/kg B.W.를 암.수 각각 5마리로 하여 용량 수준단 10마리를 사용하여 기초시험을 실시한 결과 수컷 1마리가 사망하였다. 사망동물의 경우 시험물질 투여 후 호흡곤란(dyspnea)증세가 관찰되었으며, 사망 후 외관관찰 결과 비강 주변에서 분비물이 관찰되었고, 부검 결과 기도와 흉강내에서 포말이 관찰되어 시험물질에 의한 영향이 아닌 시험물질 투여시의 실수로 판단되며, 시험물질 적용에 기인된 사망동물은 관찰되지 않았다. 모든 시험물질 투여군에서 생기저하(Inanimation)가 관찰되었으나 4~48시간 이내에 모두 정상으로 회복되었다. 시험기간 중 생존동물에 대한 체중변화에 있어서는 시험물질 적용과 관련된 유의성 있는 변화는 인정되지 않았으며, 생존동물의 부검결과 시험물질 투여와 관련된 어떠한 이상 소견도 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 마우스에 대한 전신저항성유도 단백질의 경구 투여에 대한 LD50은 2 500 mg/kg B.W. 이상으로 사료된다.

9. Tables (Group summary)

Table 1. Mortality

Group	Dose (mg/kg)	Mortality (%)	
		Male	Female
G1	0	0% (0 / 5) ^a	0% (0 / 5)
G2	2 500	20% (1 / 5)	0% (0 / 5)

^a : No. of dead animals/No. of tested animals

Table 2. Clinical signs

Group	Dose (mg/kg)	Sex	Number of animal	Clinical Signs
G1	0	Male	5	No Abnormality Detected
		Female	5	No Abnormality Detected
G2	2 500	Male	5	Inanimation
		Female	5	Inanimation

Table 3. Changes of the mean body weights

Group	Dose (mg/kg)	Sex	Number of animal	Day(s) after treatment		
				0	7	14
G1	0	Male	5	25.95 ±0.86	31.11 ±1.62	33.99 ±1.38
		Female	5	22.25 ±0.80	26.22 ±1.51	27.32 ±1.34
G2	2 500	Male	5	26.04 ±0.85	30.38 ±1.08	33.00 ±0.89
		Female	5	22.20 ±0.85	24.34* ±0.78	27.40 ±1.10

*, significantly different from values of control group at $P < 0.05$ with Student t-test.

Table 4. Necropsy findings

Findings	No. of Examined	G1 (0 mg/kg)		G2 (2 500 mg/kg)	
		Male	Female	Male	Female
No Gross Findings	20	5	5	5	5

나. 랫드에 대한 전신저항성유도 단백질의 급성경피독성시험

1. 요약

랫드에 대한 전신저항성유도 단백질의 급성경피독성시험을 “생물농약의 등록시험방법 및 등록 신청 서류 검토기준 (농촌진흥청 고시 제 2006-19호, 2006.10.16)에 따라 랫드를 사용하여 시험물질의 기초시험 투여용량인 2 000 mg/kg B.W.를 암.수 각각에 대해 1회 경피 투여한 후 2주간 치사 수, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

(1) 시험기간 중 시험물질 적용과 관련된 사망동물은 관찰되지 않았다.

(2) 일반증상 관찰시 시험물질의 적용과 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.

(3) 체중측정 결과, 대조군과 시험군(투여군)간의 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.

(4) 부검소견 경로가, 암.수 각각 모든 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

모든 시험동물에 전신저항성유도 단백질의 투여시 사망동물이 관찰되지 않았고, 부검소견 결과 이상소견이 관찰되지 않았다. 따라서 전신저항성유도 단백질에 대한 LD50은 암.수 모두 2 000 mg/kg B.W. 이상인 것으로 사료된다.

2. 결 과

(1) 일반증상 및 사망률 (Table 1,2)

기초시험 결과 암.수 모두 최고 투여 용량인 2 000 mg/kg B.W.에서 시험물질의 적용과 관련된 이상소견 및 사망동물이 관찰되지 않았다.

(2) 체중변화 (Table 3)

시험기간 중 생존동물에 대한 체중변화에 있어서는 대조군에 비해 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

(3) 부검결과 (Table 4)

생존동물의 부검은 시험종료 후 에테르로 마취하여 각 주요장기에 대한 육안적 관찰을 실시한 결과, 암.수 모든 동물에서 투여에 기인된 특이할 만한 소견은 관찰되지 않았다.

3. 고찰 및 결론 (Discussion & Conclusion)

전신저항성유도 단백질의에 대한 단회투여(경피) 독성시험을 조사하기 위하여 SD계 랫

드를 사용하여 투여용량인 2 000 mg/kg B.W.를 1회 경피 투여한 후 2시간 치사 동물 수, 일반중독증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 또한 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 검사하였다.

본 시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았고, 시험물질 투여와 관련된 일반증상은 관찰되지 않았으며, 체중변화에 있어서 대조군에 비해 유의성 있는 변화는 없다. 또한 생존 동물의 부검결과 시험물질 투여와 기인된 어떠한 이상 이상소견도 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 전신저항유도 단백질의 단회투여(경피)독성시험에 대한 반수치사약량(LD50)치는 암.수 모두 2 000 mg/kg B.W.이상 인 것으로 사료 된다.

9. Tables (Group summary)

Table 1. Mortality

Group	Dose (mg/kg)	Mortality (%)	
		Male	Female
G1	0	0% (0 / 5) ^a	0% (0 / 5)
G2	2 000	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)

^a : No. of dead animals/No. of tested animals

Table 2. Clinical signs

Group	Dose (mg/kg)	Sex	Number of animal	Clinical Signs
G1	0	Male	5	No Abnormality Detected
		Female	5	No Abnormality Detected
G2	2 000	Male	5	No Abnormality Detected
		Female	5	No Abnormality Detected

Table 3. Changes of the mean body weights

Group	Dose (mg/kg)	Sex	Number of animal	Day(s) after treatment		
				0	7	14
G1	0	Male	5	217.5 ±5.4	270.4 ±8.0	317.1 ±15.9
		Female	5	161.6 ±6.1	185.6 ±8.1	206.8 ±8.6
G2	2 000	Male	5	219.0 ±4.2	274.0 ±8.3	324.9 ±9.5
		Female	5	161.0 ±6.0	193.5 ±9.1	217.6 ±15.4

Table 4. Necropsy findings

Findings	No. of Examined	G1 (0 mg/kg)		G2 (2 000 mg/kg)	
		Male	Female	Male	Female
No Gross Findings	20	5	5	5	5

다. 기니픽에 대한 전신저항성유도단백질의 피부감작성시험

1. 요약

Hartley계 수컷 기니픽에 대한 전신저항성유도단백질의 피부감작성을 Buehler 방법으로 평가하였으며, 시험기간 동안 시험동물의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 야기 후 피부 반응을 조사한 결과는 다음과 같다.

- (1) 시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.
- (2) 시험물질 적용에 기인한 특이한 이상증상은 관찰되지 않았다.
- (3) 모든 시험동물에서 정상적인 체중증가를 보였다.

(4) 시험물질의 1차 및 2차 야기종료 후 24시간 및 48시간의 피부반응을 평가한 결과, 양성대조군에서는 1차 야기 감작지수가 “1.9” 및 “1.8”로 평가되었고, 2차 야기 감작지수는 “2.0” 및 “1.8”로 평가되었으며, 빈도지수는 1차 및 2차 야기시 모두 100%로 산출되었다. 음성대조군 및 시험군에서는 감작지수 및 빈도지수가 각각 “0”과 “0%”로 산출되었다.

이상의 결과로 Hartley계 수컷 기니픽에 있어서 전신저항성유도단백질의 감작지수와 빈도지수는 각각 “0”과 “0%”로 평가되어 피부감작성이 매우 약한 물질로 판단된다.

2. 결과

(1) 일반증상 및 사망률 (Table 1)

전 시험기간 동안 대조군과 비교했을 때 어떠한 일반증상이나 빈사 및 폐사 동물은 관찰되지 않았다.

(2) 체중측정 (Table 2)

시험기간 동안 대조군과 비교했을 때 유의성있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

(3) 적용부위의 관찰 (Table 3)

시험물질의 야기종료 후 24시간 및 48시간의 피부반응을 평가한 결과, 양성대조군에서는 감작지수가 1차 야기시 “1.9” 및 “1.8”로 평가되었고, 2차야기시 “2.0” 및 “1.8”으로 평가되었으며, 빈도지수는 1차 및 2차 야기 시 모두 100%로 산출되었다. 음성대조군 및 시험군에서는 홍반 및 부종 등의 피부반응을 유발하지 않았으며, 감작지수 및 빈도지수가 1차 및 2차 야기시에 각각 “0”과 “0%”로 산출되었다.

3. 고찰 및 결론

Hartley계 수컷 기니픽에 대한 전신저항성유도단백질의 피부감작성을 Buehler 방법으로 평가하였으며, 시험기간 동안 시험동물의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 피부반응을 관찰 조사하였다.

모든 시험군의 동물은 시험기간 중 사망동물 및 이상증상은 관찰되지 않았고, 체중측정결과에 있어서도 정상적인 체중증가를 보였다. 야기 종료 후 24시간과 48시간에 피부반응을 관찰한 결과에서도 양성대조군을 제외한 모든 시험군에서 홍반 및 부종 등의 피부반응이 관찰되지 않아 감작지수와 빈도지수가 각각 “0”과 “0%”로 산출되었다.

이상의 결과로 Hartley계 수컷 기니픽에 대한 전신저항성유도단백질을 Buehler 법으로 평가시 피부감작성이 매우 약한 물질로 판단된다.

10. Tables (Group Summary)

Table 1. Mortality and clinical signs

Group	Sex	No. of Animal	Induction phase	Challenge phase	Mortality (deaths/total)	Clinical Signs
G1	Male	20	Test Material	Test Material	0 % (0/20)	No Abnormality Detected
G2	Male	10	Distilled water	Test Material	0 % (0/10)	No Abnormality Detected
G3	Male	10	0.1 % DNCB in 80 % EtOH	0.1 % DNCB in Acetone	0 % (0/10)	No Abnormality Detected

Table 2. Change of body weights

Group		Weeks					
		0	1	2	3	4	5
G1	Mean	329.6	370.9	401.6	426.4	440.5	467.8
	S.D.	15.2	18.7	24.0	25.1	25.8	29.0
	N	20	20	20	20	20	20
G2	Mean	330.0	364.8	387.7	408.8	421.7	439.7
	S.D.	18.7	21.1	23.8	24.1	22.9	20.7
	N	10	10	10	10	10	10
G3	Mean	329.3	374.2	401.4	428.8	435.1	466.9
	S.D.	7.0	11.2	20.9	22.5	23.1	24.1
	N	10	10	10	10	10	10

N = No. of Animal

Table 3. Evaluation of skin response

Group	No. of Animal	Time of observation	Score of skin response				Mean Score	Sensitization Rate (%)
			0	1	2	3		
First Challenge	G1	24	20	0	0	0	0	0
		48	20	0	0	0	0	0
	G2	24	10	0	0	0	0	0
		48	10	0	0	0	0	0
	G3	24	0	1	9	0	1.9	100
		48	0	2	8	0	1.8	100
Rechallenge	G1	24	20	0	0	0	0	0
		48	20	0	0	0	0	0
	G2	24	10	0	0	0	0	0
		48	10	0	0	0	0	0
	G3	24	0	0	10	0	2.0	100
		48	0	2	8	0	1.8	100

라. 전신저항성유도 단백질의 토끼에 대한 안점막자극시험

1. 요약

전신저항성유도 단백질의 토끼에 대한 안점막자극성을 조사하기 위하여 6마리의 New Zealand White계 암컷 토끼에게 시험물질을 적용한 후 1, 24, 48 및 72시간째에 각막, 홍채, 결막의 안자극 반응이 평가, 일반증상 및 체중을 평가하였다.

이와 같이 시험한 결과는 다음과 같다.

(1) 시험기간 중 시험물질 적용으로 인한 사망동물은 관찰되지 않았다.

(2) 모든 시험동물에서 특이할 만한 일반증상은 관찰되지 않았다.

(3) 모든 시험동물에서 시험물질 적용으로 인한 비정상적인 체중변화는 나타나지 않았다.

(4) 안점막자극성은 시험물질 적용 후 1, 24, 48 및 72시간째에 관찰한 결과, 시험물질 적용 후 1, 24, 48 및 72시간째에 관찰한 결과, 1시간째에 결막의 발적과 부종이 6례 관찰되었고, 24시간에는 발적이 6례, 부종이 2례 관찰되었다. 48시간에는 결막의 발적과 부종이 각각 1례씩 관찰되었으나, 72시간 이내에 결막은 정상으로 회복되었다. 결막을 제외한 각막과 홍채에서는 모든 관찰시간에 이상소견이 관찰되지 않았다.

(5) 평균안점막자극지수 (MOI, mean ocular irritation index)는 1, 24, 48 및 72시간에 각각 6.00, 3.33, 0.67 및 0.00으로 산출되었고, 급성안자극지수 (AOI, acute ocular irritation index)는 시험물질 적용 후 1시간째의 평균안자극지수인 “6.00”으로 평가되었다.

이상의 결과에 따라 New Zealand White계 토끼의 안점막자극시험에서 전신저항성유도 단백질은 급성안자극지수(AOI)가 6.00FH 안점막 판정표에 의해 자극성이 없는 물질로 판단된다.

2. 결과

(1) 일반증상 및 사망률(Table 1)

모든 처치동물에 있어서 어떠한 임상증상이나 빈사 및 폐사 동물은 관찰되지 않았다.

(2) 체중변화(Table 2)

시험물질 적용직전, 적용 후 24시간과 72시간째에 개체별 체중을 측정된 결과, 특이할 만한 체중의 변화는 관찰되지 않았다.

(3) 적용부위 관찰(Table 3)

시험물질 적용 후 1, 24, 48 및 72시간째에 관찰한 결과, 1시간째에 결막의 발적과 부종이 6례 관찰되었고, 24시간에는 발적이 6례, 부종이 2례 관찰되었다. 48시간에는 결막의 발적

과 부종이 각각 1례씩 관찰되었으나, 72시간 이내 결막은 정상으로 회복되었다. 결막을 제외한 각막과 홍채에서는 모든 관찰시간에 이상소견이 관찰되지 않았다.

3. 결과 및 고찰

전신저항성유도 단백질에 대한 안점막자극성을 평가하기 위하여 6마리의 New Zealand White계 암컷 토끼에게 시험물질을 결막낭 내에 0.1g을 1회 처치한 후 72시간 동안의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 안점막자극성을 평가하였다.

시험기간 중 일반증상 및 체중변화에서 시험물질의 적용에 의한 이상소견 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 시험물질 적용 후 1, 24, 48 및 72hrsWo에 관찰한 결과, 1시간째에 결막의 발적과 부종이 6례 관찰되었고, 24시간에는 발적이 6례, 부종이 2례 관찰되었다. 48시간에는 결막의 발적과 부종이 각각 1례씩 관찰되었으나, 72시간 이내에 결막은 정상으로 회복되었다. 결막을 제외한 홍채에서는 모든 관찰시간에 이상소견이 관찰되지 않았다. 평균안자극지수(MOI, mean ocular irritation index)는 각각 6.00, 3.33, 0.67 및 0.00으로 산출되었고, 급성안자극지수(AOI, acute ocular irritation index)는 “6.00”으로 평가되었다.

결론적으로 전신저항성유도 단백질은 New Zealand White계 암컷 토끼의 안점막 적용 시 급성안자극지수(AOI)가 “6.00”으로 안자극 판정표에 의해 자극성이 없는 물질로 판단된다.

9. Tables

Table 1. Mortality and clinical signs

Animal No.	Day after treatment				Mortality
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	
1	-	-	-	-	0/6 ^a
2	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	

-: None

^a: No. of dead animals/No. of total animals

Table 2. Body weights changes

Animal No.	Day after application(g)		
	Day 0	Day 1	Day 3
1	2315.1	2302.5	2306.8
2	2385.3	2331.4	2413.2
3	2314.5	2299.0	2372.3
4	2340.7	2306.8	2440.2
5	2352.4	2452.7	2525.0
6	2287.9	2322.3	2483.3
Mean	2334.0	2351.1	2419.0
S.D.	39.7	60.2	55.1

Table 3. Evaluation of eye irritation

Group			T1 (No eye washing)					
Animal. No.			T1-1	T1-2	T1-3	T1-4	T1-5	T1-6
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
		72 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
		72 hr	0	0	0	0	0	0
Iris (C)		1 hr	0	0	0	0	0	
		24 hr	0	0	0	0	0	
		48 hr	0	0	0	0	0	
		72 hr	0	0	0	0	0	
Conjunctiva	Redness (D)	1 hr	2	2	2	2	2	2
		24 hr	2	1	2	1	1	1
		48 hr	1	0	0	0	0	0
		72 hr	0	0	0	0	0	0
	Edema (E)	1 hr	1	1	1	1	1	1
		24 hr	0	0	1	1	0	0
		48 hr	0	0	1	0	0	0
		72 hr	0	0	0	0	0	0
Lacrima (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	
	72 hr	0	0	0	0	0	0	
IOI		1 hr	6	6	6	6	6	
		24 hr	4	2	6	4	2	
		48 hr	2	0	2	0	0	
		72 hr	0	0	0	0	0	
MOI		1 hr	6.00 ³⁾					
		24 hr	3.33					
		48 hr	0.67					
		72 hr	0.0					

IOI (individual ocular irritation index) = (A × B × 5)+(C × 5)+(D + E + F) × 2

MOI (mean ocular irritation index)

³⁾ AOI (acute ocular irritation index) = the maximum value of MOI

마. 전신저항성유도 단백질의 토끼에 대한 피부자극시험

1. 요약

New Zealand White계 암컷토끼에 대한 전신저항성유도 단백질의 피부자극성을 조사하기 위하여 본 검체를 멸균증류수에 0.5 g/mL의 농도로 현탁하여 조제한 시험물질을 이용하여 수행하였다. 시험물질을 각각 4시간동안 도포 적용한 후 72시간 동안의 사망률, 일반증상, 체중 변화 및 피부자극성을 평가한 결과는 다음과 같다.

(1) 일반증상 관찰 시 특이한 임상증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다.

(2) 시험물질 적용직전, 적용 후 24 및 72시간째에 개체별 체중 측정에서 특이한 변화는 관찰되지 않았다.

(3) 시험물질 투여 적용부위의 찰과 및 피부자극성을 관찰한 결과 적용 후 1시간째에 3개체의 시험물질 적용부위의 찰과 및 비찰과부위에서 미약한 홍반 및 부종이 관찰되었고, 24시간째에 3개체의 시험물질 적용부위에서 미약한 홍반이 관찰되어 일차피부자극지수는 0.25로 산출되었다.

이상의 결과 New Zealand White계 토끼에 전신저항성유도 단백질의 피부적용시 [피부자극성 검토기준]에 의해 본 시험물질은 자극성이 없는 물질로 판단된다.

2. 결과

(1) 일반증상 및 사망률(Table 1)

모든 처치동물에 있어서 어떠한 임상증상이나 빈사 및 폐사 동물은 관찰되지 않았다

(2) 체중변화(Table 2)

시험물질 적용직전, 적용 후 24시간과 72시간째에 개체별 체중을 측정한 결과, 특이한 만한 체중의 변화는 관찰되지 않았다.

(3) 적용부위 관찰(Table 3)

시험물질 적용 후 1시간째에 3개체의 시험물질 처치부위에서 미약한 홍반과 부종이 관찰되었고 24시간째에는 3개체의 시험물질 처치부위에서 미약한 홍반이 관찰되었으나 48시간 이후에는 모두 정상으로 회복되었다.

3. 고찰 및 결론

New Zealand White계 암컷토끼에 대한 전신저항성유도 단백질의 피부자극성을 조사

하기 위하여 본 시험물질을 멸균증류수에 0.5 g/mL의 농도로 현탁 조제하여 찰과 및 비찰과 부위에 각각 0.5 g/mL씩을 적용하였다. 시험물질을 각각 4시간동안 도포 적용한 후 72시간 동안의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 피부자극성을 평가하였다.

본 시험기간 중 일반증상 및 체중변화를 관찰한 결과 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 시험물질 노출 종료 후 1시간째 3개체의 시험물질 적용부위에서 미약한 홍반이 관찰되어 일차피부자극지수는 0.25로 산출되었다.

이상의 결과 진신저항성유도 단백질 용출액은 New Zealand White계 토끼에 피부적용 시 미약한 홍반 및 부종 등을 유발하였으나 [피부자극성 검토기준]에 의하여 본 시험물질은 피부 자극성이 없는 물질로 판단된다.

9. Tables

Table 1. Mortality and clinical signs

Animal No.	Day after treatment				Mortality
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	
1	-	-	-	-	0/6 *
2	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	

- : Normal

* : No. of dead animals/No. of total animals

Table 2. Body weights changes

Animal No.	Day after application(g)		
	Day 0	Day 1	Day 3
1	2313.1	2302.5	2386.8
2	2365.2	2331.4	2415.2
3	2304.5	2299.0	2372.3
4	2340.7	2369.8	2440.2
5	2392.4	2482.7	2520.0
6	2287.9	2322.3	2383.3
Mean	2334.0	2351.3	2419.6
S.D.	39.7	69.2	55.1

Table 3. Evaluation of skin irritation

Sites	Control Sites															
Change	Erythema & Eschar								Oedema							
Phases ¹	Left				Right				Left				Abraded			
Animal No.	1h ¹	24h	48h	72h	1h	24h	48h	72h	1h	24h	48h	72h	1h	24h	48h	72h
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sum of means	0.00															
P.I.I. ²	0.00															

Sites	Test Sites															
Change	Erythema & Eschar								Oedema							
Phases ¹	Left				Right				Left				Abraded			
Animal No.	1h ¹	24h	48h	72h	1h	24h	48h	72h	1h	24h	48h	72h	1h	24h	48h	72h
1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
6	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Total	3	3	0	0	3	3	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0
Mean	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0	0	0.5	0	0	0	0.5	0	0	0
Sum of means at 24 and 72hr	1.00															
P.I.I. ²	0.25															

¹: Time after removal of test article

²: P.I.I.(Primary Irritation Index) =Sum of means of scores marked at 24 and 72 hr./4

바. 전신저항성유도물질 원제에 대한 소핵시험

1. 요약

시험물질 전신저항성유도물질 원제의 유전독성을 평가하기 위하여 암.수 마우스(ICR) 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 투여한 최고농도는 예비시험을 토대로 하여 시험물질의 가능한 높은 용량으로 설정하였으며, 암.수 모두 2000 mg/kg B.W.으로 정하였다.

6주령의 마우스를 일주간 순화시킨 후 시험물질을 암.수 모두 0, 500, 1000 및 2000 mg/kg B.W.의 농도로 각각의 농도에 대하여 6마리에 단회 경구 투여하였으며, 투여 후 약 24 시간에 골수세포를 수집하여 소핵유박과 세포독성을 평가하였다.

개체당 2000개의 다염색 적혈구 (Polychromatic Erythrocyte, PCE)중에 나타나는 소핵을 가진 다염색 적혈구 (Micronucleated Polychromatic Erythrocyte, MNPCE)수를 계수한 결과 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았으며, 전체 적혈구 중 다염색 적혈구의 비율도 시험물질을 투여한 모든 군에서 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

따라서 시험물질 전신저항성유도물질 원제는 마우스이 골수세포에서 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

2. 결과

(1) 예비시험 결과

농도결정시험 결과 시험물질 투여 후 최고농도 2000 mg/kg B.W. 투여군에서 사망 동물이 관찰되지 않았다(Appendix 5).

농도결정시험 결과를 토대로 하여 본시험에서 투여농도는 0.005, 1000, 2000 mg/kg B.W.으로 설정하였다.

(2) 시험물질의 투여

전신저항성유도물질 원제는 멸균증류수에 조제하여 체중 kg당 10 mL을 투여량으로 하였다.

(3) 본시험 동물의 사육관리

7일간의 검역 및 순화를 행하고 건강한 동물 35마리에 대해 군구성을 실시하였다. 군구성 시군구성에 의해 구성된 각 군의 평균체중은 표와 같았다.

성	군 번호	투여군	사용동물수	평균체중 (mean ±S.D., g)
Male	GM 1	용매대조군	6 마리	33.78 ± 1.52
	GM 2	500 mg/kg B.W.	6 마리	33.75 ± 1.58
	GM 3	1000 mg/kg B.W.	6 마리	33.46 ± 1.50
	GM 4	2000 mg/kg B.W.	6 마리	33.26 ± 1.42
	GM 5	양성대조군 (CPA 70 mg/kg B.W.)	6 마리	33.82 ± 1.43
Female	GF 1	용매대조군	6 마리	25.83 ± 1.67
	GF 2	500 mg/kg B.W.	6 마리	25.60 ± 1.67
	GF 3	1000 mg/kg B.W.	6 마리	25.73 ± 1.78
	GF 4	2000 mg/kg B.W.	6 마리	25.89 ± 1.68
	GF 5	양성대조군 (CPA 70 mg/kg B.W.)	6 마리	25.36 ± 1.87

(4) 본시험 결과

예비시험결과를 토대로 하여 2000 mg/kg b.w.을 투여 최고 농도로 공비 1/2의 3단계 투여 농도군, 음성대조군, 양성대조군을 설정, 24시간을 투여기간으로 하여 본시험을 실시한 결과는 표(Table 1, Appendix 1, Appendix 2)와 같았다. 본시험의 시험군 중 사망동물 및 어떠한 일반 증상도 관찰되지 않았으며(Table 2, Appendix 3, Appendix 4), 투여시와 부검시의 체중을 비교한 결과 어느 투여군에서도 음성대조군에 비해 통계학적인 유의성은 없었다(Table 3, Appendix 5, Appendix 6).

부검 후 개체당 2000개의 다염성적혈구를 관찰 결과 수컷의 경우 용매대조군의 다염성적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 $0.13 \pm 0.04(\%)$ 이었으며, 500 mg/kg b.w. 투여군의 소핵출현빈도는 $0.12 \pm 0.03(\%)$, 1000 mg/kg b.w. 투여군의 빈도는 $0.12 \pm 0.05(\%)$ 이었으며, 500 mg/kg b.w. 투여군의 소핵출현빈도는 $0.12 \pm 0.05(\%)$, 1000 mg/kg b.w. 투여군의 빈도는 $0.13 \pm 0.04(\%)$, 2000 mg/kg 투여군의 빈도는 $0.14 \pm 0.04(\%)$, 양성대조군의 빈도는 $6.31 \pm 0.67(\%)$ 의 빈도를 나타내었다.

즉 시험물질을 투여한 암수 모든 군에 있어서 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 용매대조군에 비해 모든 투여군에서 소핵출현빈도는 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 한편 양성대조군에서는 소핵 빈도에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났다($P < 0.01$).

세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 위와 같은 순서로 수컷은 평균 51.20, 50.92, 50.96, 51.21 및 49.10이었고 암컷은 평균 50.57, 50.59, 51.39, 50.58, 49.11이었다. 모든 투여군에서도 음성대조군에 비해 통계학적인 차이는 없었다.

3. 고찰 및 결론

시험물질 전신저항성유도물질 원제의 투여군에 있어서 다염성 적혈구중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도를 용매대조군에 비교하여 볼 때, 통계적으로 유의하게 증가하는 투여 농도군은 확인되지 않았다.

따라서 전신저항성유도물질 원제는 본 시험조건에서 마우스 골수세포에 대해 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

10. Tables

Table 1. Micronucleus test in ICR mice (group summary)

Sex	Chemical Treated	Dose (mg/kg)	No. of Animal	MNPCE/1000PCEs (Mean±S.D., %)	PCE/(PCE+NCE) (Mean±S.D., %)
Male	Vehicle	0	6	0.13 ± 0.04	51.20 ± 1.11
	Test items	500	6	0.12 ± 0.03	50.92 ± 1.47
	Test items	1000	6	0.12 ± 0.04	50.96 ± 0.92
	Test items	2000	6	0.14 ± 0.04	51.21 ± 1.00
	CPA	70	6	6.15 ± 0.76 *	49.10 ± 1.04
Female	Vehicle	0	6	0.12 ± 0.05	50.57 ± 0.71
	Test items	500	6	0.12 ± 0.05	50.59 ± 0.59
	Test items	1000	6	0.13 ± 0.04	51.39 ± 0.46
	Test items	2000	5	0.14 ± 0.04	50.58 ± 1.00
	CPA	70	6	6.31 ± 0.67 *	49.11 ± 1.07

* $P < 0.01$

Vehicle : distilled water

MNPCE : PCE with one or more micronuclei

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

CPA : Cyclophosphamide (positive control)

Table 2. Clinical signs and mortalities (group summary)

Group	Chemical Treated	Dose (mg/kg)	Clinical signs	Mortality (dead / total)
GM1	Vehicle	0	N	0 % (0 / 5) ^a
GM2	Test Item	500	N	0 % (0 / 5)
GM3	Test Item	1000	N	0 % (0 / 5)
GM4	Test Item	2000	N	0 % (0 / 5)
GM5	CPA (Positive control)	70	N	0 % (0 / 5)

N : Normal, ^a : No. of dead animals/No. of tested animals

Vehicle : Corn oil, CPA : Cyclophosphamide monohydrate

Table 3. Body weights of animals (group summary)

Sex	Chemical Treated	Dose (mg/kg)	Body weights (mean±S.D. g) at the time of			
			Administration(No. of animal)		Sacrifice(No. of animal)	
Male	Vehicle	0	33.78 ± 1.16	(6)	33.62 ± 1.13	(6)
	Test item	500	33.75 ± 1.08	(6)	33.30 ± 1.28	(6)
	Test item	1000	33.46 ± 1.20	(6)	32.94 ± 1.38	(6)
	Test item	2000	33.26 ± 1.18	(6)	32.28 ± 1.43	(6)
	CPA	70	33.82 ± 1.08	(6)	33.06 ± 1.13	(6)
Female	Vehicle	0	25.84 ± 1.22	(6)	25.64 ± 1.04	(6)
	Test item	500	25.60 ± 1.21	(6)	25.13 ± 0.46	(6)
	Test item	1000	25.73 ± 1.38	(6)	25.57 ± 0.91	(6)
	Test item	2000	25.89 ± 1.30	(6)	25.31 ± 1.09	(6)
	CPA	70	25.36 ± 1.54	(6)	25.59 ± 0.47	(6)

CPA : Cyclophosphamide (positive control)

11. Appendices

Appendix 1. Micronucleus test in ICR mice (individual data, male)

chemical Treated	Dose (mg/kg)	Animal No.	PCE%	MNPCE	MNPCE 수 빈도(%)	No. of PCE/NCE	PCE/ (PCE+NCE)
Vehicle	0	1101	2012	2	0.10	153 / 142	51.86
		1102	2055	2	0.10	142 / 143	49.82
		1103	2051	3	0.15	148 / 144	50.68
		1104	2088	4	0.19	141 / 140	50.18
		1105	2057	3	0.15	152 / 138	52.41
		1106	2050	2	0.10	152 / 139	52.23
Test item	500	1201	2012	3	0.15	151 / 137	52.43
		1202	2107	2	0.09	153 / 142	51.86
		1203	2053	3	0.15	146 / 142	50.69
		1204	2046	2	0.10	150 / 138	52.08
		1205	2065	2	0.10	143 / 145	49.65
		1206	2079	3	0.14	140 / 147	48.78
Test item	1000	1301	2080	2	0.10	145 / 145	50.00
		1302	2098	4	0.19	147 / 142	50.87
		1303	2065	2	0.10	145 / 143	50.35
		1304	2011	3	0.15	152 / 140	52.05
		1305	2091	2	0.10	142 / 140	50.35
		1306	2079	2	0.10	148 / 136	52.11
Test item	2000	1401	2041	3	0.15	143 / 136	51.25
		1402	2093	4	0.19	153 / 136	52.94
		1403	2105	2	0.10	152 / 142	51.70
		1404	2040	2	0.10	141 / 137	50.72
		1405	2069	3	0.14	150 / 148	50.34
		1406	2079	3	0.14	149 / 147	50.34
CPA	70	1501	2010	147	7.31	131 / 147	47.12
		1502	2094	106	5.06	136 / 137	49.82
		1503	2062	118	5.72	135 / 139	49.27
		1504	2050	126	6.15	135 / 135	50.00
		1505	2036	134	6.58	133 / 139	48.90
		1506	2048	124	6.05	142 / 145	49.48

Vehicle : distilled water

MNPCE : PCE with one or more micronuclei

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

CPA : Cyclophosphamide (positive control)

Appendix 3. Clinical signs and mortalities (individual data, male)

Group	Chemical Treated	Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical signs
GM1	Vehicle	0	1101	Normal
			1102	Normal
			1103	Normal
			1104	Normal
			1105	Normal
			1106	Normal
GM2	Test Item	500	1201	Normal
			1202	Normal
			1203	Normal
			1204	Normal
			1205	Normal
			1206	Normal
GM3	Test Item	1000	1301	Normal
			1302	Normal
			1303	Normal
			1304	Normal
			1305	Normal
			1306	Normal
GM4	Test Item	2000	1401	Normal
			1402	Normal
			1403	Normal
			1404	Normal
			1405	Normal
			1406	Normal
GM5	CPA (Positive control)	70	1501	Normal
			1502	Normal
			1503	Normal
			1504	Normal
			1505	Normal
			1506	Normal

Vehicle : Corn oil, CPA : Cyclophosphamide monohydrate

Appendix 3. Clinical signs and mortalities (individual data, male)

Group	Chemical Treated	Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical signs
GM1	Vehicle	0	1101	Normal
			1102	Normal
			1103	Normal
			1104	Normal
			1105	Normal
			1106	Normal
GM2	Test Item	500	1201	Normal
			1202	Normal
			1203	Normal
			1204	Normal
			1205	Normal
			1206	Normal
GM3	Test Item	1000	1301	Normal
			1302	Normal
			1303	Normal
			1304	Normal
			1305	Normal
			1306	Normal
GM4	Test Item	2000	1401	Normal
			1402	Normal
			1403	Normal
			1404	Normal
			1405	Normal
			1406	Normal
GM5	CPA (Positive control)	70	1501	Normal
			1502	Normal
			1503	Normal
			1504	Normal
			1505	Normal
			1506	Normal

Vehicle : Corn oil, CPA : Cyclophosphamide monohydrate

Appendix 3. Clinical signs and mortalities (individual data, female)

Group	Chemical Treated	Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical signs
GM1	Vehicle	0	2101	Normal
			2102	Normal
			2103	Normal
			2104	Normal
			2105	Normal
			2106	Normal
GM2	Test Item	500	2201	Normal
			2202	Normal
			2203	Normal
			2204	Normal
			2205	Normal
			2206	Normal
GM3	Test Item	1000	2301	Normal
			2302	Normal
			2303	Normal
			2304	Normal
			2305	Normal
			2306	Normal
GM4	Test Item	2000	2401	Normal
			2402	Normal
			2403	Normal
			2404	Normal
			2405	Normal
			2406	Normal
GM5	CPA (Positive control)	70	2501	Normal
			2502	Normal
			2503	Normal
			2504	Normal
			2505	Normal
			2506	Normal

Vehicle : Corn oil, CPA : Cyclophosphamide monohydrate

Appendix 5. Body weights of animals (individual data, male)

Chemical Treated	Dose (mg/kg)	Animal No.	Body weights (g) at the time of	
			Administration	Sacrifice
Vehicle	0	1101	35.89	35.73
		1102	31.53	31.26
		1103	34.67	34.42
		1104	34.24	33.55
		1105	32.76	34.08
		1106	33.58	32.65
Test item	500	1201	30.8	30.50
		1202	35.36	34.99
		1203	34.55	34.37
		1204	34.32	34.31
		1205	34.01	33.34
		1206	33.44	32.26
Test item	1000	1301	35.9	36.02
		1302	32.02	30.81
		1303	32.16	31.68
		1304	32.60	32.20
		1305	34.21	33.34
		1306	33.87	33.60
Test item	2000	1401	31.32	31.13
		1402	31.65	31.37
		1403	34.51	33.97
		1404	34.36	30.04
		1405	34.23	34.14
		1406	33.46	33.02
CPA	70	1501	31.32	30.57
		1502	35.19	34.51
		1503	34.96	33.85
		1504	34.32	33.89
		1505	34.05	33.37
		1506	33.1	32.14

CPA : Cyclophosphamide (positive control)

Appendix 6. Body weights of animals (individual data, female)

Chemical Treated	Dose (mg/kg)	Animal No.	Body weights (g) at the time of	
			Administration	Sacrifice
Vehicle	0	2101	23.04	24.42
		2102	27.65	26.05
		2103	27.16	27.09
		2104	26.32	24.90
		2105	24.96	24.46
		2106	25.88	26.89
Test item	500	2201	22.67	25.34
		2202	27.43	26.01
		2203	26.72	24.47
		2204	26.28	25.39
		2205	25.05	24.62
		2206	25.46	24.92
Test item	1000	2301	22.73	25.32
		2302	27.47	27.45
		2303	27.18	26.41
		2304	26.70	25.18
		2305	24.96	23.92
		2306	25.36	25.13
Test item	2000	2401	23.15	23.23
		2402	27.74	25.92
		2403	27.25	26.29
		2404	26.56	26.06
		2405	24.97	24.11
		2406	25.66	26.22
CPA	70	2501	22.80	25.03
		2502	23.31	25.97
		2503	27.40	26.44
		2504	26.62	25.65
		2505	26.24	24.72
		2506	25.80	25.70

CPA : Cyclophosphamide (positive control)

Appendix 7. Mortality of preliminary test

Group	Dose (mg/kg)	Mortality (dead / total)	
		male	female
GM1	0	0 % (0 / 3) ^a	0 % (0 / 3)
GM2	500	0 % (0 / 3)	0 % (0 / 3)
GM3	1000	0 % (0 / 3)	0 % (0 / 3)
GM4	2000	0 % (0 / 3)	0 % (0 / 3)

^a : No. of dead animals/No. of tested animals

사. 전신저항성유도물질 원제에 대한 미생물복귀돌연변이시험

1. 요약

시험물질 전신저항성유도물질 원제의 미생물 복귀돌연변이 시험을 통한 돌연변이 유발성의 유무를 검색하기 위해 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주인 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4개의 균주와 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 제2 uvrA를 이용하여 시험을 실시하였다.

시험물질은 증류수에 용해하여 처리하였고, 5000 ug/plate를 최고농도로 하여 1000, 500, 100 및 50 ug/plate로 단계 희석하여 실시한 농도결정시험을 토대로 하여, 본시험에서는 대사활성화법미적용 (S9-) 및 적용(S9+)모두 음성 대조군과 비교하여 각 농도별 시험물질 처리군에서의 집락 수는 증가 양상을 나타내지 않았다.

이상의 결과를 종합하여볼 때, 시험물질 전신저항성유도물질 원제는 본 시험 조건하에 사용한 균주들에 대하여 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것 (음성)으로 사료된다.

2. 결과

조제한 시험물질 및 S9 Mix에 대한 무균시험결과, 균의 오염은 관찰되지 않았다.

농도설정시험 중 모든 균주에서 5000 ug/plate에서 생육 저해가 관찰되지 않았으며, 시

험에 사용된 모든 균주에서 음성대조군과 비슷한 콜로니수를 나타내었다.

농도 설정 시험을 토대로 본시험의 시험물질 농도는 5000 ug/plate를 최고 농도로하여 2500, 1250, 625 및 312.5 ug/plate 5단계의 농도군과 음성 및 양성대조군과 함께 대사활성화법 적용(S9+) 및 미적용 (S9-)으로 시험을 실시하였다. 본시험결과 시험에 사용된 균주 TA98, TA100M TA1535, TA1537 침 WP2uvrA에 시험물질을 처리한 모든 농도단계에서 콜로니수는 음성 대조군에 비해 증가 양상을 나타내지 않았다.

한편 모든 양성 대조군에서는 집락 수가 음성대조군에 비해 현저한 증가를 나타내었다 (Table 1~2참조).

3. 고찰 및 결론

시험물질 전신저항성유도물질 운제의 세균에 있어서의 돌연변이 유발성 여부를 검색하기 위하여 *Salmonella rypthimurium*의 히스티딘 요구성 균주인 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주와 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA 균주를 이용하여 복귀돌연변이시험을 실시하였다.

시험물질은 증류수에 용해하여 처리하였으며, 시험물질의 처리 시 특이한 점은 관찰되지 않았다

본시험은 대사활성계 미적용(S9-) 및 적용 (S9+)하에 312.5, 625, 1250, 2500 및 5000 ug/plate의 농도군과 음성 및 양성 대조군으로 시험군을 구성해 본시험을 실시하였다. 시험물질 용액 및 S9Mix의 무균성을 확인하기 위한 무균시험에서 플레이트에 미생물의 오염에 의한 콜로니는 나타나지 않았다. 시험에 사용한 5개 균주의 생균수는 단계희석법을 통하여 측정된 결과 $1.1\sim 5.0\times 10^9$ CFU/mL로 적정수준이었다.

시험결과 시험물질을 처리한 모든 균주에서 용매 대조군에 비해 집락 생성수의 재현성 있는 증가는 관찰되지 않았다. 양성 대조군에서는 각 균주에 대해 용매 대조군보다 복귀돌연변이 집락수가 현격히 증가되는 것이 관찰되었으므로 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있다.

이상의 시험결과를 통해서 종합할 때, 시험물질 전신저항성유도물질 원제는 본 시험 조건 하에 사용한 균주들에 대해 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

19. Tables (Group summary)

Table 1. Result of preliminary range-finding test (group summary)

Tester Strain	Chemical Treated	Dose (μ g/plate)	Colonies/plate (Mean \pm S.D.) [Factor] ^{a)}	
			Without S-9 mix	With S-9 mix
TA98	Test	0	24 \pm 3	26 \pm 4
	Article	50	27 \pm 5 [1.1]	31 \pm 9 [1.2]
		100	28 \pm 4 [1.2]	24 \pm 4 [0.9]
		500	29 \pm 6 [1.2]	22 \pm 2 [0.9]
		1000	27 \pm 8 [1.1]	31 \pm 4 [1.2]
		5000	28 \pm 5 [1.2]	30 \pm 3 [1.2]
TA100	Test	0	95 \pm 9	94 \pm 10
	Article	50	90 \pm 5 [0.9]	96 \pm 11 [1.0]
		100	92 \pm 7 [1.0]	90 \pm 1 [1.0]
		500	96 \pm 6 [1.0]	99 \pm 5 [1.0]
		1000	96 \pm 11 [1.0]	95 \pm 9 [1.0]
		5000	85 \pm 5 [0.9]	85 \pm 8 [0.9]
TA1535	Test	0	12 \pm 4	11 \pm 4
	Article	50	10 \pm 4 [0.9]	10 \pm 3 [0.9]
		100	9 \pm 2 [0.8]	11 \pm 3 [1.0]
		500	9 \pm 1 [0.8]	7 \pm 2 [0.7]
		1000	10 \pm 0 [0.9]	8 \pm 2 [0.8]
		5000	12 \pm 2 [1.0]	12 \pm 1 [1.1]
TA1537	Test	0	13 \pm 4	10 \pm 3
	Article	50	17 \pm 4 [1.3]	11 \pm 2 [1.1]
		100	12 \pm 1 [0.9]	11 \pm 4 [1.1]
		500	12 \pm 2 [0.9]	13 \pm 3 [1.2]
		1000	11 \pm 4 [0.8]	13 \pm 2 [1.3]
		5000	13 \pm 4 [1.0]	10 \pm 3 [1.0]
WP2uvrA	Test	0	34 \pm 6	41 \pm 2
	Article	50	33 \pm 3 [1.0]	36 \pm 4 [0.9]
		100	33 \pm 3 [1.0]	37 \pm 8 [0.9]
		500	32 \pm 2 [0.9]	35 \pm 5 [0.9]
		1000	36 \pm 5 [1.1]	31 \pm 7 [0.8]
		5000	35 \pm 7 [1.0]	34 \pm 4 [0.8]
Positive controls				
TA98	AF-2	0.1	399 \pm 38 [16.4]	
TA100	AF-2	0.01	514 \pm 17 [5.4]	
TA1535	NaN ₃	0.5	190 \pm 15 [16.3]	
TA1537	9-AA	80.0	890 \pm 14 [68.4]	
WP2uvrA	AF-2	0.01	291 \pm 13 [8.7]	
TA98	2-AA	0.5		350 \pm 22 [13.5]
TA100	2-AA	1.0		490 \pm 39 [5.2]
TA1535	2-AA	2.0		219 \pm 25 [19.9]
TA1537	2-AA	2.0		274 \pm 15 [26.5]
WP2uvrA	2-AA	10.0		236 \pm 10 [5.8]

a) No. colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate

NaN₃ : Sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminonaphthalene

Table 2. Result of bacterial reverse mutation assay (group summary)

Tester Strain	Chemical Treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate (Mean \pm S.D.) [Factor] ^{a)}			
			Without S-9 mix		With S-9 mix	
TA98	Test	0	15 \pm 4			25 \pm 1
	Article	312.5	19 \pm 2	[1.2]		28 \pm 3 [1.1]
		625	15 \pm 4	[1.0]		26 \pm 2 [1.1]
		1250	18 \pm 4	[1.2]		26 \pm 4 [1.0]
		2500	15 \pm 2	[1.0]		29 \pm 5 [1.2]
		5000	20 \pm 2	[1.3]		27 \pm 5 [1.1]
TA100	Test	0	90 \pm 5			105 \pm 13
	Article	312.5	91 \pm 6	[1.0]		108 \pm 3 [1.0]
		625	79 \pm 4	[0.9]		94 \pm 9 [0.9]
		1250	95 \pm 6	[1.1]		98 \pm 5 [0.9]
		2500	96 \pm 2	[1.1]		104 \pm 4 [1.0]
		5000	86 \pm 16	[1.0]		113 \pm 5 [1.1]
TA1535	Test	0	11 \pm 4			11 \pm 4
	Article	312.5	13 \pm 2	[1.2]		11 \pm 1 [1.0]
		625	8 \pm 2	[0.8]		13 \pm 2 [1.2]
		1250	13 \pm 2	[1.2]		11 \pm 3 [1.0]
		2500	15 \pm 2	[1.3]		12 \pm 2 [1.1]
		5000	11 \pm 4	[1.0]		13 \pm 4 [1.2]
TA1537	Test	0	5 \pm 1			9 \pm 2
	Article	312.5	6 \pm 1	[1.2]		9 \pm 1 [1.0]
		625	5 \pm 2	[0.9]		10 \pm 3 [1.2]
		1250	6 \pm 1	[1.1]		7 \pm 2 [0.8]
		2500	5 \pm 2	[0.9]		6 \pm 1 [0.7]
		5000	5 \pm 1	[0.9]		7 \pm 2 [0.8]
WP2uvrA	Test	0	38 \pm 2			56 \pm 4
	Article	312.5	36 \pm 3	[1.0]		49 \pm 8 [0.9]
		625	45 \pm 3	[1.2]		51 \pm 1 [0.9]
		1250	39 \pm 6	[1.0]		47 \pm 6 [0.9]
		2500	42 \pm 6	[1.1]		41 \pm 8 [0.7]
		5000	41 \pm 3	[1.1]		44 \pm 2 [0.8]
Positive controls						
TA98	AF-2	0.1	400 \pm 23	[26.1]		
TA100	AF-2	0.01	509 \pm 33	[5.6]		
TA1535	NaN3	0.5	196 \pm 9	[17.8]		
TA1537	9-AA	80.0	818 \pm 28	[153.3]		
WP2uvrA	AF-2	0.01	295 \pm 16	[7.8]		
TA98	2-AA	0.5			379 \pm 19	[15.4]
TA100	2-AA	1.0			518 \pm 21	[4.9]
TA1535	2-AA	2.0			195 \pm 20	[17.8]
TA1537	2-AA	2.0			287 \pm 21	[33.1]
WP2uvrA	2-AA	10.0			297 \pm 11	[5.3]

a) No. colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate

NaN3 : Sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene

11. Appendix

Appendix 1. Result of preliminary range-finding test (individual data)

Tester Strain	Chemical Treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate(Plate A, B and C)					
			Without S-9 mix			With S-9 mix		
TA98	Test	0	22	28	23	26	22	30
	Article	50	22	32	28	39	21	33
		100	26	33	25	19	27	25
		500	35	24	29	20	24	23
		1000	32	18	30	35	31	28
		5000	33	27	24	33	27	30
TA100	Test	0	85	99	101	98	102	83
	Article	50	95	89	86	85	107	97
		100	100	88	89	89	91	90
		500	91	103	93	93	101	103
		1000	105	99	83	85	103	98
		5000	80	89	85	94	79	83
TA1535	Test	0	13	7	15	7	11	15
	Article	50	7	14	10	7	10	12
		100	8	8	12	14	9	11
		500	10	9	9	6	7	9
		1000	10	10	10	10	7	8
		5000	10	14	11	11	13	12
TA1537	Test	0	10	17	12	13	10	8
	Article	50	14	21	15	12	13	9
		100	11	13	13	15	7	12
		500	14	10	11	16	11	11
		1000	8	15	9	13	12	15
		5000	17	11	10	14	8	9
WP2uvrA	Test	0	33	40	28	39	43	40
	Article	50	36	30	33	31	39	38
		100	33	35	30	46	30	36
		500	30	33	32	31	40	33
		1000	40	31	38	34	23	35
		5000	43	31	32	29	37	36
Positive controls								
TA98	AF-2	0.1	438	363	397			
TA100	AF-2	0.01	531	512	498			
TA1535	NaN ₃	0.5	193	174	203			
TA1537	9-AA	80.0	893	902	874			
WP2uvrA	AF-2	0.01	296	277	301			
TA98	2-AA	0.5				348	330	373
TA100	2-AA	1.0				487	453	530
TA1535	2-AA	2.0				191	240	227
TA1537	2-AA	2.0				259	289	274
WP2uvrA	2-AA	10.0				225	240	244

NaN₃ : Sodium azide

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

9-AA : 9-Aminoacridine

2-AA : 2-Aminoanthracene

Appendix 2. Result of bacterial reverse mutation assay (individual data)

Tester Strain	Chemical Treated	Dose (μ g/plate)	Colonies/plate(Plate A, B and C)					
			Without S-9 mix			With S-9 mix		
TA98	Test	0	12	14	20	24	25	25
	Article	312.5	17	20	20	26	32	27
		625	18	10	16	25	25	28
		1250	22	14	18	30	22	25
		2500	13	14	17	23	33	30
		5000	18	20	21	22	31	28
TA100	Test	0	90	86	95	101	120	94
	Article	312.5	95	84	93	104	109	110
		625	74	80	82	86	103	92
		1250	102	92	92	100	92	102
		2500	94	98	96	100	107	105
		5000	104	74	80	108	117	113
TA1535	Test	0	8	10	15	12	7	14
	Article	312.5	11	14	13	12	11	10
		625	8	7	10	11	15	12
		1250	11	15	12	14	9	11
		2500	13	17	14	14	13	10
		5000	14	7	13	17	10	12
TA1537	Test	0	5	5	6	10	7	9
	Article	312.5	7	7	5	9	8	9
		625	3	7	4	11	12	7
		1250	7	5	6	6	9	6
		2500	6	5	3	5	6	6
		5000	6	4	4	5	7	8
WP2uvrA	Test	0	36	40	38	54	60	53
	Article	312.5	39	37	33	40	54	53
		625	46	48	42	50	51	52
		1250	33	44	40	41	53	48
		2500	48	36	42	31	45	46
		5000	37	43	42	46	44	43
Positive controls								
TA98	AF-2	0.1	426	391	384			
TA100	AF-2	0.01	519	472	536			
TA1535	NaN3	0.5	186	204	198			
TA1537	9-AA	80.0	813	848	792			
WP2uvrA	AF-2	0.01	284	314	288			
TA98	2-AA	0.5				400	364	373
TA100	2-AA	1.0				496	538	521
TA1535	2-AA	2.0				192	217	177
TA1537	2-AA	2.0				311	276	273
WP2uvrA	2-AA	10.0				296	287	308

NaN3 : Sodium azide

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

9-AA : 9-Aminoacridine

2-AA : 2-Aminoanthracene

Appendix 3. Historical background data

(2002-2005)

	TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537	
Solvent Control										
S9 Mix	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Mean Colony	152	152	18	20	34	34	27	35	10	11
SD	25	21	6	6	7	7	7	11	3	2
Minimum	106	114	5	8	21	25	11	21	3	5
Maximum	198	196	31	32	44	51	41	60	14	14
Positive Control										
	AF-2	2-AA	NaN3	2-AA	AF-2	2-AA	AF-2	2-AA	9-AA	2-AA
S9 Mix	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Mean Colony	581	577	296	250	245	425	487	340	418	248
SD	86	106	94	86	62	165	103	120	166	122
Minimum	408	388	102	128	137	184	283	176	73	115
Maximum	788	789	452	406	364	708	664	568	681	459

(update June 03, 2005)

Solvent control (distilled water, saline, DMSO or vehicle supplied by sponsor)

NaN3 : Sodium azide (0.5µg/plate)

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
(0.1µg/plate for TA98, 0.01µg/plate for TA100 and E. coli WP2uvrA)

9-AA : 9-Aminoacridine (80µg/plate)

2-AA : 2-Aminoanthracene
(0.5µg/plate for TA98, 1.0µg/plate for TA100, 2.0µg/plate for TA1535 and TA1537, 10.0µg/plate for E. coli WP2uvrA)

아. 담수무척추동물에 대한 전신저항성유도물질의 급성유영저해시험

1. 요약

전신저항성유도물질의 물벼룩(Daphnia magna)에 대한 급성유영저해 시험을 48시간 동안 반지수식으로 실시하여 일반증상 및 유영저해율을 관찰, 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 본 시험은 템 OPPT 850.1010, A범삭 invertebrate acute toxicity test, Freshwater daphnids(April, 1996)에 따라 수행되었다.

(2) 시험농도는 100.0 mg/L(nominal concentration)로 한계시험(limit test)을 실시하였으며, 시험농도에 대한 별도의 분석은 시행하지 않았다.

(3) 예비시험기간 중 48시간 경과시 용존사소량이 포화용존산소량의 60 % 이하로 관찰되므로 시험조건은 24시간 간격으로 시험용수를 교체하는 반지수식으로 설정하였다.

(4) 시험의 결과는 아래와 같으며, 측정 농도에 의해 표기하였다

Observation time	EC50 ¹	95 % confidence limits (mg/L)	NOEC ² (mg/L)
24 hour	> 100.0	—	100.0
48 hour	> 100.0	—	100.0

1. Based on measured concentration
2. No observed effect concentration

(5) 시험기간 중 처리군 및 대조군에서 일반중독증상 및 특이증상은 관찰되지 않았다.

(6) 시험기간 중 pH는 평균 7.84(최소 7.57 ~ 최대 8.25)이었다.

(7) 시험기간 중 DO는 평균 7.48 mg/L(최소 5.40 mg/L ~ 최대 8.29 mg/L) 으로 포화용존산소량의 평균 84.6%(최소 63.1% ~ 최대 93.2 %)이었다.

(8) 시험기간 중 시험용수의 평균온도는 20.7 °C ± 0.3 °C(최소 19.9 °C ~ 최대 21.2 °C)이었다.

2. 결과

(1) 일반증상 및 유영저해율

예비시험결과에 따라 100.0 mg/L의 시험농도(설정농도)에서 한계시험(limit test)을 실시한 결과 48시간 경과시까지 유영저해개체가 관찰되지 않았다.(Table 1)

(2) 경시적 수질변화

시험기간 중 pH는 평균 7.84(최소 7.57 ~ 최대 8.25)이었고, DO는 평균 7.48 mg/L(최소 5.40 mg/L ~ 최대 8.29 mg/L)으로 포화용존산소량의 평균 84.6%(최소 63.1 % ~ 최대 93.2 %)이었다. (Table 3,5)

(3) 시험용수의 수온은 평균 20.7 °C ± 0.3 °C(최소 19.9 °C ~ 최대 21.2 °C)이었다.(Table 4)

4) 시험에 사용한 시험용수의 경도는 DaDO₃로써 172.0 mg/L 이었고, 알칼리도는 55.3 mg/L이었다.

3. 결론

진신저항성유도물질의 물벼룩에 대한 급성유영저해시험을 실시한 결과 24시간 및 48시간 EC₅₀은 100.0 mg/L 이상으로 나타났으며, 무영향농도는 100.0 mg/L이었다.

EC₅₀값의 표기는 설정농도로 실시하였다.

시험기간 중 결과에 영향을 미칠 수 있는 요인은 발생하지 않았다.

9. Tables (Group summary)

Table 1. Cumulative immobility of *Daphnia magna*

Nominal concentration (mg/L)*	Number of daphnia	Number of immobilized daphnia		Immobility(%)	
		24 hours	48 hours	24 hours	48 hours
Control	20	0	0	0	0
100.0	20	0	0	0	0

* Active ingredient

Table 2. Abnormal response

Nominal concentration (mg/L)*	Abnormal response	
	24 hours	48 hours
Control	NOR	NOR
100.0	NOR	NOR

* Active ingredient

Abbreviation of observable symptoms of intoxication

NOR : Normal

Table 4. Changes of pH

Nominal concentration (mg/L)*	0 hour					48 hours				
	R-1	R-2	R-3	R-4	Mean	R-1	R-2	R-3	R-4	Mean
Control	8.11	8.22	8.20	8.25	8.20	7.82	7.88	7.91	7.85	7.87
100.0	7.57	7.61	7.64	7.68	7.63	7.69	7.70	7.60	7.64	7.66

* Active ingredient

Table 5. Changes of water temperature

(Unit : °C)

Nominal concentration (mg/L)*	0 hour					24 hours	48 hours				
	R-1	R-2	R-3	R-4	Mean		R-1	R-2	R-3	R-4	Mean
Control	20.8	20.6	20.7	20.9	20.8	20.2	20.3	20.5	20.9	20.7	20.6
100.0	21.0	20.9	21.0	20.7	20.9	19.9	20.5	21.2	20.7	20.3	20.7

* Active ingredient

Table 6. Changes of DO

(Unit : mg/L)

Nominal concentration (mg/L)*	0 hour					
	R-1	R-2	R-3	R-4	Mean	%**
Control	8.22	8.18	8.25	8.29	8.24	93.2
100.0	8.08	8.14	8.21	8.15	8.15	92.1

(Unit : mg/L)

Nominal concentration (mg/L)*	48 hours					
	R-1	R-2	R-3	R-4	Mean	%**
Control	8.07	7.90	7.89	7.92	7.95	89.9
100.0	5.63	5.72	5.40	5.57	5.58	63.1

* Active ingredient

** Percent of the air saturation value

자. 전신저항성유도물질 원제에 대한 염색체이상시험

1. 요 약

시험물질 전신저항성유도물질 원제의염색체이상을 평가하기 위하여 Chinese hamster 유래의 Lung Cell(CHL)을 이용하여 직접법 (-S9 Mix) 과 대사활성화법 (+S9 Mix) 의 염색체 이상 시험을 실시하였다. 시험물질은 멸균증류수에 희석하여 사용하였다.

시험물질의 투여농도는 세포 증식의 약 50 % 억제를 기준으로 결정하였으며, 시험물질의 최대 농도는 직접법과 대사활성화법의 경우 모두 5 mg/mL을 최고농도로 하여 시험하였다. 즉 본시험과 확인시험에서 사용한 시험물질의 농도는 1.25, 2.5 및 5mg/mL의 3단계 시험농도와 음성 및 양성대조시험을 포함하여 총 5군의 시험군에 대해 염색체이상을 직접법과 대사활성화법에서 관찰 계수하였다.

시험결과, 시험물질을 처리한 모든 군에서 염색체이상을 가진 중기상의 출현빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다.

따라서 시험물질 전신저항성유도물질 원제는 본 시험조건 하에서 CHL 세포의 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

2. 결 과

(1) 직접법(-S9 Mix, Table 1, Table 3)

6시간 시험물질처리에서의 염색체이상빈도는 음성대조군, 1250, 2500 및 5000 ug/mL의 처리 농도에서 각각 1.0 %, .5 %, 1.0 % 및 0.5 %의 빈도를 나타내었다.

24시간시험물질처리 후의 염색체이상빈도는 음성대조군, 1250, 2500 및 5000 ug/mL의 처리 농도에서 각각 1.0 %, 0.5 %, 0.5 % 및 1.5 %의 빈도를 보였다.

시험물질을 처리한 모든 군에서 염색체이상 빈도는 판정피로 볼 때 모두 5 %미만이였다.

(2) 대사활성화법(+S9 Mix, Table 2)

대사활성화법에서의 염색체이상 빈도는 음성대조군, 1250, 2500 및 5000 ug/mL의 처리 농도에서 각각 0.5 %, 1.0 %, 0.5% 및 0.5 %로 판정치와 비교하여 볼 때 EO 시험물질 투여군은 모두 5 % 미만의 염색체이상이 빈도를 나타내었다.

3. 고찰 및 결론

시험물질의 염색체이상을 검색하기 위해 최(Chinese hamster lung)를 이용하여 대사활성화법(+S9 Mix)과 직접법(-S9 Mix)하에 염색체이상시험을 수행한 결과, 대사활성화법과 직접법에서 시험물질을 처리한 모든 군에서의 염색체이상빈도는 5 % 미만의 빈도를 나타내었으며, 용량의 이성도 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합할 때 본 시험물질은 본 시험 조건 하에서 CHL세포에서 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

9. Tables

Table 1. Result of Chromosome aberration test - Without Metabolic Activation(-S9, 6 hours)

Treatment	Treatment Time (h)	Concentration (µg/mL)	Observed Cells	Numbers and percents (%) of cells showing polyploid	Judgement	Numbers and percent(%) of cells showing structural aberration								Judgement	
						Gap	Chromatid type			Chromosome type		Others	Total		
							g	ctb	cte	csb	cse		-g		+g
Negative Control	6	0	100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2		
			100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-	
			200	0 (0.0)	-	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	4 (2.0)		
Test item	6	625	100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1		
			100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-	
			200	0 (0.0)	-	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	3 (1.5)		
		1250	100	0	-	1	2	0	0	0	0	2	3		
			100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-	
			200	0 (0.0)	-	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	4 (2.0)		
2500	100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1				
	100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-			
	200	0 (0.0)	-	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	2 (1.0)				
Positive Control (MMC)	6	0.5	100	1	-	4	18	41	0	0	0	59	63		
			100	0	-	5	18	34	0	0	0	52	57	+	
			200	1 (0.5)	-	9 (4.5)	36 (18.0)	75 (37.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	111 (55.5) *	120 (60.0)		

g, gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; MMC, mitomycin C; (), Average

Table 2. Result of Chromosome aberration test - With Metabolic Activation(+S9, 6 hours)

Treatment	Treatment Time (h)	Concentration (µg/mL)	Observed Cells	Numbers and percents (%) of cells showing polyploid	Judgement	Numbers and percent(%) of cells showing structural aberration								Judgement	
						Gap	Chromatid type			Chromosome type		Others	Total		
							g	ctb	cte	csb	cse		-g		+g
Negative Control	6	0	100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1		
			100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-	
			200	0 (0.0)	-	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	3 (1.5)		
Test item	6	1250	100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2		
			100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-	
			200	0 (0.0)	-	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	3 (1.5)		
		2500	100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2		
			100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-	
			200	0 (0.0)	-	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	3 (1.5)		
5000	100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2				
	100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-			
	200	0 (0.0)	-	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	3 (1.5)				
Positive Control (CPA)	6	10	100	0	-	3	16	29	0	0	0	45	48		
			100	1	-	3	20	34	0	0	0	54	57	+	
			200	1 (0.5)	-	6 (3.0)	36 (18.0)	63 (31.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	99 (49.5) *	105 (52.5)		

g, gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; CPA, cyclophosphamide; (), Average

Table 3. Result of Chromosome aberration test - Without Metabolic Activation(-S9, 24 hours)

Treatment	Treatment Time (h)	Concentration (µg/mL)	Observed Cells	Numbers and percents (%) of cells showing polyploid	Judgement	Numbers and percent(%) of cells showing structural aberration								Judgement	
						Gap	Chromatid type			Chromosome type		Others	Total		
							g	ctb	cte	csb	cse		-g		+g
Negative Control	24	0	100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-	
			100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2		
			200	0 (0.0)	-	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	4 (2.0)		
			100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1		-
			100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1		
			200	0 (0.0)	-	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	2 (1.0)		
Test item	24	2500	100	0	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-	
			100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1		
			200	0 (0.0)	-	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	3 (1.5)		
			100	0	-	1	2	0	0	0	0	2	3		-
			100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1		
			200	0 (0.0)	-	1 (0.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	4 (2.0)		
Positive Control (MMC)	24	0.05	100	0	-	3	18	34	0	0	0	52	55	+	
			100	1	-	5	19	33	0	0	0	52	57		
			200	1 (0.5)	-	8 (4.0)	37 (18.5)	67 (33.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	104 (52.0) *	112 (56.0)		

g, gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange; CPA, cyclophosphamide; (), Average

10. Appendix

Appendix 1. Result of preliminary range-finding test

Concentration of Test item (µg/mL)	S9 Mix	Treatment Times(h)	OD 490 nm		Mean	Relative Cell Counts(%)
			Dish A	Dish B		
Blank	-	-	0.046	0.05	0.0480	0
0	-	6	0.753	0.756	0.7545	100
312.5	-	6	0.575	0.580	0.5775	75
625	-	6	0.568	0.563	0.5655	73
1250	-	6	0.613	0.617	0.6150	80
2500	-	6	0.572	0.574	0.5730	74
5000	-	6	0.545	0.557	0.5510	71
0	+	6	0.434	0.434	0.4340	100
312.5	+	6	0.386	0.394	0.3900	89
625	+	6	0.418	0.418	0.4180	96
1250	+	6	0.415	0.419	0.4170	96
2500	+	6	0.445	0.441	0.4430	102
5000	+	6	0.481	0.483	0.4820	112
0	-	24	0.677	0.676	0.6765	100
312.5	-	24	0.537	0.538	0.5375	78
625	-	24	0.564	0.557	0.5605	82
1250	-	24	0.515	0.517	0.5160	74
2500	-	24	0.530	0.530	0.5300	77
5000	-	24	0.353	0.361	0.3570	49

차. 잉어(Cyprinus carpio)에 대한 전신저항성유도물질의 급성어독성시험

1. 요약

전신저항성유도물질의 잉어(Cyprinus carpio)에 대한 전신저항성유도물질의 급성어독성 시험을 96시간 동안 지수식으로 실시하여 일반증상 및 치사율을 관찰, 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 본 시험은 농촌진흥청 고시 제2006-19호, 생물농약의 등록시험방법 및 등록신청서류 검토기준, 별표4, Ⅱ. 생화학농약, 2. 담수어류에 대한 영향시험 (2006년 10월 16일)에 따라 수행되었다.

(2) 시험농도는 10.00 mg/L(nominal concentration)로 하여 한계시험(limit test)을 실시하였으며, 시험농도에 대한 별도의 분석은 시행하지 않았다.

(3) 시험의 결과는 아래와 같으며, 설정 농도에 의해 표기하였다.

Observation time	LC ₅₀ ¹ (mg/L)	95 % confidence limits (mg/L)	NOEC ² (mg/L)
48 hour	> 10.0	-	10.0
96 hour	> 10.0	-	10.0

1. Based on nominal concentration

2. No observed effect concentration

(4) 시험기간 중 처리군 및 대조군에서 일반중독증상 및 특이증상은 관찰되지 않았다.

(5) 전장은 평균 4.70 cm ± 0.08 cm, 체중은 평균 1.11 g ± 0.10 g이었다.

(6) 시험기간 중 pH는 평균 8.48(최소 8.16 ~ 최대 8.64)이었다.

(7) 시험기간 중 DO는 평균 7.38 mg/L(최소 6.32mg/L ~ 최대 8.29 mg/L)으로 포화용존 산소량의 평균 88.0 %(최소 75.3 % ~ 최대 98.8 %)이었다.

(8) 시험기간 중 시험용수의 평균온도는 23.2 °C ± 0.5 °C(최소 22.7 °C ~ 최대 24.0 °C)이었다.

이상의 시험결과 본 시험물질의 48시간-LC₅₀값은 10.0 mg/L 이상으로 어독성 III급으로 확인되었다.

2. 결과

(1) 일반증상 및 지사율

예비시험결과에 따라 10.0 mg/L의 시험농도(설정농도)에서 본시험을 실시한 결과 48시간 경과시 및 96시간 경과시 치사가 관찰되지 않았다.

대조군에서 96시간 경과시까지 치사개체가 관찰되지 않았다. (Table 1)

시험기간 중 처리군 및 대조군에서 일반중독증상 및 특이증상은 관찰되지 않았다.(Table 2)

(2) 경시적 수질변화

시험기간 중 pH는 평균 8.48(최소 8.16 ~ 최대 8.64)이었고, DO는 평균 7.38 mg/L(최소 6.32 mg/L ~ 최대 8.29 mg/L)으로 포화용존산소량의 평균 88.0 %(최소 75.3 % ~ 최대 98.8 %)이었다. (Table 3, 5)

예비시험 48시간 경과시 DO 측정결과 포화용존산소량의 60 % 이하로 관찰되었으므로 본시험시 24시간 경과시부터 24시간 간격으로 약 1시간 씩 공기를 공급하였다.

시험용수의 수온은 평균 23.2 °C ± 0.5 °C (최소 22.7 °C ~ 최대 24.0 °C) 이었다.(Table

4) 시험에 사용한 시험용수의 경도는 CaCO₃ 로써 94.5 mg/L 이었고, 알칼리도는 70.4 mg/L 이었다.

3. 결론

전신저항성유도물질의 잉어에 대한 급성어독성시험을 지수식으로 실시한 결과 48시간 및 96시간 LC₅₀은 10.0 mg/L 이상이었으며, 무영향농도는 10.0 mg/L이었다.

LC₅₀값의 표기는 설정농도로 실시하였다.

시험기간 중 결과에 영향을 미칠 수 있는 요인은 발생하지 않았다.

9. Tables (Group summary)

Table 1. Cumulative mortality of *Cyprinus carpio*

Nominal concentration (mg/L)*	Number of fish	Number of dead fish				Mortality(%)	
		24 hours	48 hours	72 hours	96 hours	48 hours	96 hours
Control	10	0	0	0	0	0	0
10.0	10	0	0	0	0	0	0

* Active ingredient, nominal concentration

Table 2. Abnormal response

Nominal concentration (mg/L)*	Abnormal response			
	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	NOR	NOR	NOR	NOR
10.0	NOR	NOR	NOR	NOR

* Active ingredient, nominal concentration

Abbreviation of observable symptoms of intoxication

NOR : Normal

Table 3. Changes of pH

Nominal concentration (mg/L)*	0 hour	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	8.55	8.26	8.48	8.54	8.60
8.03	8.49	8.52	8.16	8.53	8.64

* Active ingredient, nominal concentration

Table 4. Changes of water temperature

(Unit : °C)

Nominal concentration (mg/L)*	0 hour	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	24.0	23.9	22.9	23.5	22.9
8.03	23.4	22.8	22.7	23.1	22.8

* Active ingredient, nominal concentration

Table 5. Changes of DO

(Unit : mg/L)

Nominal concentration (mg/L)*	0 hour		24 hours		48 hours		72 hours		96 hours	
	mg/L	%**	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%
Control	8.29	98.8	6.32	75.3	7.54	89.9	6.89	82.1	7.07	84.3
8.03	8.20	97.7	7.73	92.1	7.79	92.8	7.11	84.7	6.85	81.6

* Active ingredient, nominal concentration

** Percent of the air saturation value

Table 6. LC₅₀ values, body weight and total length of *Cyprinus carpio* at the end of the test

Test substance	LC ₅₀ (mg/L)		Body Weight (g)	Total length (cm)
	48 hours	96 hours		
Control	-	-	1.12 ± 0.19***	4.68 ± 0.12
PCP-Na*	0.130 (0.108 ~ 0.159)**	0.109 (0.092 ~ 0.128)	0.40 ± 0.13	3.57 ± 0.29
전신저항성유도물질	>10.0	>10.0	1.11 ± 0.10	4.70 ± 0.08

* Test duration of positive control : 2008. 06. 30 ~ 2008. 07. 04

** 95 % confidence limits

*** Mean ± Standard deviation

2. 전신저항성유도물질 제품의 인축과 환경에 대한 독성학적 특성 분석

가. 기니픽에 대한 전신저항성유도물질 제품의 Buehler법을 이용한 피부감작성시험

(1) 요약

Hartley계 수컷 기니픽에 대한 전신저항성유도물질 제품의 피부감작성을 Buehler 방법으로 평가하였으며, 시험기간 동안 시험동물의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 야기 후 피부 반응을 조사한 결과는 다음과 같다.

가. 시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.

나. 시험물질 적용에 기인한 특이한 이상증상은 관찰되지 않았다.

다. 모든 시험동물에서 정상적인 체중증가를 보였다.

라. 시험물질의 야기종료 후 24시간 및 48시간의 피부반응을 평가한 결과 시험군 및 음성 대조군에서는 감작지수 및 빈도지수가 각각 “0”과 “0%”로 산출되었다.

이상의 결과로 Hartley계 수컷 기니픽에 있어서 전신저항성유도물질 제품의 감작지수와 빈도지수는 각각 “0”과 “0%”로 평가되어 피부감작성이 매우 약한 물질로 판단된다.

나. ICR 마우스에 대한 전신저항성유도물질 제품의 급성 경구투여 독성시험

(1) 요약

전신저항성유도물질 제품에 대한 급성경구투여 독성시험을 농약의 등록시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2009-1호)에 따라 ICR 마우스를 사용하여 시험물질의 투여량을 2,500 mg/kg B.W. 로 설정하여 암·수 각각에 대해 1회 경구 투여 한 후 2주간 사망율, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 가. 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 나. 일반증상 관찰결과 모든 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 다. 생존동물에 대한 체중측정 결과 대조군과 시험군(투여군)간의 체중 증체량의 유의적인 차이는 인정되지 않았다.
- 라. 생존동물의 부검 소견 결과 모든 투여군에서 특이할 만한 이상 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 전신저항성유도물질 제품의 투여량을 2,500 mg/kg B.W.로 설정하여 투여한 결과 사망동물 및 이상소견 관찰 동물이 없었으며, 체중증감 및 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 전신저항성유도물질 제품에 대한 LD50은 암·수 모두 2,500 mg/kg B.W. 이상으로 사료된다.

다. SD 랫드에 대한 전신저항성유도물질 제품의 급성 경피투여 독성시험

(1) 요약

전신저항성유도물질 제품에 대한 급성 경피투여 독성시험을 농약의 등록시험 기준과 방법 (농촌진흥청 고시 제 2009-1호)에 따라 SD 랫드를 사용하여 시험물질의 투여량을 2,000 mg/kg B.W. 로 설정하여 암·수 각각에 대해 1회 경피 투여 한 후 2주간 사망율, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 가. 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 나. 일반증상 관찰결과 모든 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 다. 시험기간 중 생존동물에 대한 체중변화에 있어서는 암컷 시험군에서 14일차 체중 증체량이 대조군과 비교하여 유의적으로($P < 0.05$) 감소하였다.
- 라. 생존동물의 부검 소견 결과 모든 투여군에서 특이할 만한 이상 소견은 관찰되지

않았다.

이상의 결과로부터 전신저항성유도물질 제품의 투여량을 2,000 mg/kg B.W.로 설정하여 투여한 결과 체중변화에 있어서는 유의성이 관찰되었지만, 사망동물 및 이상소견 관찰 동물이 없었으며, 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 전신저항성유도물질 제품에 대한 LD50은 암·수 모두 2,000 mg/kg B.W. 이상으로 사료된다.

라. New Zealand White 토끼에 대한 전신저항성유도물질 제품의 피부자극시험

(1) 요약

New Zealand White계 암컷 토끼에 대한 전신저항성유도물질 제품(이하 “시험물질”이라 함)의 피부자극성을 조사하기 위하여 시험물질을 토끼 등부위의 찰과 및 비찰과 부위에 적용하였다. 시험물질은 토끼 등부위에 4시간동안 도포 적용하였으며 적용종료 후 72시간 동안의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 피부자극성을 평가한 결과는 다음과 같았다.

- 가. 일반증상 관찰 시 특이한 임상증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 나. 시험물질의 적용직전, 적용 후 24 및 72시간째에 개체별 체중 측정에서 특이한 변화는 관찰되지 않았다.
- 다. 시험물질의 투여 종료 후 적용부의 국소자극성을 관찰한 결과 일부 개체의 시험물질 적용부위에서 미약한 홍반(erythema)이 관찰되어 일차피부자극지수(P.I.I)는 “0.13”으로 산출되었다.
- 라. 관찰된 자극성은 시험물질 적용 종료 후 72시간 이내에 모두 정상으로 회복되었다.

이상의 결과로 New Zealand White계 토끼에 대하여 본 시험물질은 피부자극성이 없는 물질로 평가되었다.

마. New Zealand White 토끼에 대한 전신저항성유도물질 제품의 안점막자극시험

(1) 요약

전신저항성유도물질 제품 (이하 “시험물질”이라 함)에 대한 안점막 자극성을 조사하기 위하여 9마리의 New Zealand White계 암컷 토끼에게 시험물질을 적용한 후 7일 동안의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 안자극성을 평가한 결과는 다음과 같다.

- 가. 시험기간 중 시험물질 적용으로 인한 사망동물은 관찰되지 않았다.

나. 모든 시험동물에서 특이할 만한 일반증상은 관찰되지 않았다.

다. 세척군 및 비세척군에서 시험물질 적용으로 인한 비정상적인 체중변화는 나타나지 않았다. 시험물질 적용 후 1, 24, 48 및 72시간째의 안점막자극성을 관찰한 결과 비세척군과 세척군에서 발적, 부종 및 배출물이 관찰되어 급성안자극지수(AOI, acute ocular irritation index)는 비세척군과 세척군 모두 5.33으로 산출되었다.

라. 시험물질 적용 후 관찰된 자극성 반응의 가역성을 평가한 결과 비세척군의 경우 시험물질 적용 후 6일 이내, 세척군의 경우 시험물질 적용 후 72시간 이내에 자극성 반응이 모두 정상으로 회복되었다.

이상의 결과에서 New Zealand White계 토끼의 안점막자극시험에서 시험물질은 안자극판정표에 의해 자극성이 없는 물질로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 연구개발목표와 내용 및 달성도

과제명	주요개발내용 및 범위	달성도 (%)
전신저항성유도물질의 생물학적·유전학적 특성 분석 및 산업화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수도 작물에 대한 생물활성 스펙트럼 조사 분석 ○ 원예 작물에 대한 생물활성 스펙트럼 조사 분석 ○ 특용 작물에 대한 생물활성 스펙트럼 조사 분석 ○ 주요 과수에 대한 생물활성 스펙트럼 조사 연구 ○ 전신저항성유도물질의 분자생물학적 작용기작 연구 ○ 전신저항성유도물질의 생화학적 작용기작 연구 ○ 5ton pilot scale 규모의 대량배양 기술개발 ○ 5ton pilot scale 규모의 후공정 기술개발 ○ 5ton pilot scale 규모에서의 전신저항성유도물질의 대량 생산 ○ 농가에서 사용 가능한 친환경 재배력 작성 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>
전신저항성유도물질의 생화학적 특성 분석 및 타농자재와의 혼용안정성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 정밀기기를 이용한 전신저항성유도물질의 분석법 개발 ○ 정밀기기를 이용한 전신저항성유도물질의 화학적 분석법 개발 ○ 작물(수도작, 원예작물)에 대한 생화학적 특성 분석 ○ 작물(특용작물, 화훼류)에 대한 생화학적 특성 분석 ○ 화학농약과 혼용안정성 분석 ○ 비료 및 영양제와 혼용 안정성 분석 ○ 친환경농자재와 혼용 안정성 분석 ○ 총괄 결과를 database화하여 대농민 교육자료 제작 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>
전신저항성유도물질의 독성학적 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 급성독성시험 ○ 경구독성시험 ○ 경피독성시험 ○ 안점막자극시험 ○ 피부자극시험 ○ 피부감작성시험 ○ 90일 아급성경구독성 ○ 변이원성시험 ○ 조류(鳥類)에 대한 급성독성시험 ○ 담수어류에 대한 영향시험 ○ 담수무척추 동물에 대한 영향시험 ○ 급성경구독성시험 ○ 급성경피독성시험 ○ 안점막자극시험 ○ 피부자극시험 ○ 피부감작성시험 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>

2. 관련분야에의 기여도

친환경농법에 대한 관심이 커지고 있는 가운데 미생물 자체를 이용한 미생물 농약의 개발이 발전되고 있다. 정부는 친환경 농산물 재배에 사용이 가능한 자재를 친환경유기농자재 목록공시로 합법화하면서 대기업은 물론 일반 대학에서도 미생물을 이용한 농업용 자재의 개발과 연구가 꾸준히 수행되고 있다. 세계 생물 작물보호제 시장은 2001년도에 약 2.5억불로서 전체 작물보호제 시장의 1% 정도를 유지하고 있었지만 10년이 지나는 2010년에는 5억불로 전체농약시장의 1.7%까지 신장 될 것이라고 보고 있다. 미약한 시장이었지만 정책적, 환경적 요소 등에 의하여 성장가능성이 매우 높아 졌음을 알 수 있다. 생물 작물보호제중에서는 BT제가 52%로 제일 큰 비중을 차지하고 있고 미생물제가 32% 기타가 나머지를 차지하고 있다. 이는 미생물 자체를 이용하는 생균제로서 유통기한이 짧은 단점을 앓고 있다.

미생물 생균제 이외에 친환경 농업에서 사용하는 미생물 유래 천연 물질은 현재 대부분 국외에서 수입하여 시중에 유통되고 있기 때문에 가격 경쟁력에서 떨어지는 단점을 가지고 있다.

따라서 본 연구과제의 기술은 미생물에서 유래한 천연물질로서 미생물 생균제와는 달리 미생물 배양 후 후공정 단계가 추가되어 고함량·고순도의 전신저항성유도물질을 얻을 수 있고, 국내에서는 이러한 연구가 극히 미약하며 현재까지 실용화 단계까지 이르지 못한 국내 최초의 기술력이다. 국내의 기술로 생산하는 미생물 추출물인 전신저항성유도물질은 본 연구과제를 통하여 다양한 작물에 대하여 병방제 스펙트럼을 나타내었고, 작물 생육에 좋은 영양분 흡수 및 생육촉진에 도움이 된다는 결과를 도출하였다. 전신저항성유도물질이 다양한 작물에 적용이 됨으로서 생산자는 유기합성농약의 사용을 줄일 수 있고, 소비자는 무공해 생산품을 이용할 수 있는 환경 친화적인 기술 개발이라 할 수 있다.

국내에서 생산된 전신저항성유도물질의 사업화는 농자재 수입에 따른 막대한 외화 손실도 절감 될 것으로 판단되며, 수입산 생화학농약의 대체가 가능하다. 또한 국내에 공급함으로써 환경 친화적인 미생물 추출물 제품을 저렴한 가격에 공급하여 농가소득에 기여할 것으로 생각된다.

본 연구 과제를 통하여 얻어진 결과물들은 실제 농민들의 교육용 데이터로 사용 될 것이고 친환경 농자재에 대한 올바르게 인식 할 수 있게 될 것이다. 또한 친환경 재배력 및 적용 확대를 염두에 둔 기술 개발을 통하여 소비자인 농민에게 종합적 서비스 제공 가능하다.

마지막으로 체계적인 연구를 통하여 농업 분야에 환경 친화적인 전신저항성유도 물질을 최초로 적용이 가능하며, 유사 기능성 물질의 산업화에 촉매 역할이 될 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 국내 토착 *Erwinia* 세균 유래의 전신저항성유도물질은 다양한 작물에 대한 넓은 병방제 스펙트럼을 가지고 있고, 일반 미생물 생균제의 짧은 유통기한을 보완할 수 새로운 선도 물질로서 개발 가능성이 매우 높다고 할 수 있다.

- 국내 작물보호제 업계는 대부분 화학 작물보호제 원제 또는 중간체를 수입하여 국내에서 합성·제형화(대량 생산 과정)한 후 시장 판매하고 있는 실정이므로 농업용 자재의 가격이 국내 경제 상황에 의하여 크게 좌우 될 수 있는 단점이 있다. 또한 초기부터 개발하여 상품화하는 과정은 초기 투자비용이 매우 크고 개발 가능성도 낮기 때문에 국내 기술을 이용한 작물 보호제의 개발은 시장성과 연관하여 필수 과제임에 틀림없다.

- 국내 기술로 개발된 전신저항성유도물질은 다양한 작물에 적용하여 식물의 면역력과 병저항성을 키워 여러 가지 병원균에 대하여 예방 및 억제 효능을 가지고 있을 뿐만 아니라 작물의 생육에 도움이 되는 영양분의 흡수를 촉진시켜 작물이 튼튼하게 자랄 수 있는 여건을 마련해 주었다.

- 특히 국내 생산 전신저항성유도물질은 병원균에 직접적으로 작용하는 기작 보다는 식물체에 저항성을 유도(SAR)하는 기작에 의한 것으로서 다양한 작물과 병해에 적용이 가능할 것이다.

- 본 연구에서 전신저항성유도물질의 포장시험으로 생화학작물보호제로서의 개발 가능성이 확인된바 국내 최초로 토착 미생물 유래 전신저항성유도물질의 상용화가 가능하겠다.

- 국가의 정책으로 친환경유기농자재 목록공시제도가 활발히 이루어지고 있기 때문에 전신저항성유도물질은 친환경유기농자재로 사용이 가능하며 국내 유기 및 친환경농산물 생산에 적합한 자재로 등록이 가능할 것이다.

- 또한 화학농약에 대한 저항성 출현과 화학농약의 사용량을 감소하기 위한 전신저항성유도물질과의 혼합제 개발을 통하여 환경오염의 피해를 줄이면서 방제의 극대화를 추구할 수 있을 것이다.

- 국내의 기술을 이용하여 대량생산이 가능해 졌고 전신저항성유도물질의 고순도·고함량의 분리·정제의 기술로 대량 배양 및 제제화 공정에 대한 국·내외 특허 출원이 가능할 것이다.

○ 국내에서 생산된 전신저항성유도물질 제품의 보호 및 선점시장을 확보하여 기존에 개발된 동일 물질 보다 우수함을 입증한 데이터를 토대로 수출을 통한 해외 시장을 개척 할 수 있다.

○ 본 연구 결과인 다양한 작물에서의 병방제 스펙트럼 및 작물생육촉진 효과를 가지고 있는 전신저항성유도물질의 개발을 통하여 고부가가치의 청정 농산물 생산으로 농가 소득 향상에 이바지 할 것이다.

제 6 장 참고문헌

- Bakker, P., Ran, L., Pieterse, C. and Van Loon, L. 2003. Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Can. J. Plant Pathol.* 25 : 5-9
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M. and Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manage. Sci.* 58: 649-662.
- Cho, I.H., Y.H. Woo, E.H. Lee, and H.J. Kim. 1997. Changes in cuticular transpiration and calcium content of tomato fruits and prevention of blossom-end rot through environmental control. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 38:98-102.
- Davidse, L. C. 1973. Antimitotic activity of methylbenzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*. *Pesticide Biochem. Physiol.* 3: 317-325.
- Dong, H.S., T.P. Delaney, D. W. Bauer, and S. V. Beer. 1999. Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIMI* gene. *Plant J.* 20:207-215.
- Elad, Y., Shabi, E. and Katan, T. 1988. Negative cross resistance between benzimidazole and N-phenylcarbamate fungicides and control of *Botrytis cinerea* on grapes. *Plant Pathology* 37:141-147.
- Elad, Y., Yunis, H. and Katan, T. 1991. Multiple resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathol.* 41: 41-46.
- Fravel, D. R., Connick, W. J. J., and Lewis, J. A. 1996. Formulation of microorganism to control plant diseases. In: *Formation of Microbial Biopesticides, Beneficial Microorganisms and Nematodes* (H. D. Burges, ed.). Chapman and Hall, London.
- Gueldner, R.C., Reilly, C.C., Pusey, P.L., Costello, C.E., Arrendale, R.F., Cox, R.H., Himmelsbach, D.S., Crumley, F.G. and Cutler, H.G. (1988) Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus*

- subtilis. J. Agric. Food Chem. 36, 366–370.
- Hong, S. K. and Kim, H. G. 1992. Stimulative effects of various carbon and nitrogen sources on infection of *Botrytis cinerea* on the cucumber leaves. Korean J. Plant Pathol. 8(2): 107–111.
- Isogai, A., Takayama, S., Murakoshi, S. and Suzuki, A. (1982) Structure of β -amino acids in antibiotics iturin A. Tetrahedron Lett. 23, 3065–3068.
- Janisiewicz, W. J. and Jeffers, N. 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. Crop Protection 16: 629–633.
- Kim DS, CY Bae, JJ Jeon, SJ Chun, HW Oh, SG Hong, KS Back, EY Moon and KS Bae. 2004. *Paenibacillus* sp. nov., with broad antimicrobial activity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 : 2031–2035
- Kim, K.J. and S.K. Kim. 1998. Effect of soil microbial fertilizers on yield of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). Kor. J. Hort. Sci. & Tech. 16:341–343.
- Kim, K.Y., T.C. Seo, and Y.S. Kim. 1999. Effects of the milliequivalent ratio of K to Ca in the nutrient solution on the growth, yield and blossom end rot of tomatoes grown by perlite culture in hot season. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 40:652–656.
- Kobayashi, T., M. Ashitatsu, and K. Nakajou. 1974. Effect of organic fertilizer treatment on quality of fruits. Soil Sci. Plant Nut. 45: 93–98.
- Kwak, K.W., S.M. Park, and C.S. Jeong. 2003. Effects of NaCl addition on physiological characteristics and quality of muskmelon in hydroponics. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 44(4):470–474.
- Lee, E. C. 1979, Rice blast and its control in Korea, In Lecture Meeting on Rice Blast Disease, ASPAC/FFTC and ORD, Suwon, Korea. pp 5–39.
- Lee, S. C. 1983. Chemical control of rice blast in Korea, Tropical Agricultural Research series, Tropical Agricultural Research Center, Tsukuba, Japan, 16 :113–123.

- Madden, L. V., Ellis, M. A., Lalancette, N., Hughes, G. and Wilson, L. L. 2000. Evaluation of a disease warning system for downy mildew of grapes. *Plant Dis.* 84: 549–554.
- Matsuguchi, T. 1986. The functions of microorganism in rooting zone and plant's growth and development. *Japan. J. Agric. Technol.* 41:313–317.
- Mogi, S. 1979. Chemical control of blast disease in Japan. In *Lecture meeting on Rice blast Disease*, ASPAC/FFTC and ORD, Suwon, Korea. pp 317–348.
- Ou, S. H. 1973. *Breeding plants for disease resistance concepts and application*, ed. R. R. Nelson, Pennsylvania State Uni. Press, University Park and London. pp. 91–109.
- Park, E. W., Seem, R. C., Pearson, R.C. and Gadoury, D. M. 1984. DMCAST : A forecasting model for grape downy mildew development. In: *P roc. 1st Int. W ork shop on Grapevine Downy Mildew M odeling*, ed. by D.M. Agric. Exp. Stn. Special Rept r. 68
- Park, S.W. and S.K. Lee. 1987. Softening of Tomato ('Master 2') fruit and effects of Ca treatment. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 5:42–45.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. and Hunt, M. D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant cell* 8:1809–1819
- Rhee, H.C., B.Y. Lee, and Y.H. Choi. 2001. Effects of concentration and treatment time of KCl or NaCl on the growth and fruit quality of 2nd truss-limited tomatoes in perlite nutrient culture. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 42:21–24.
- Shrestha, R., J.H. Koo, D.H. Park, I.G. Hwang, J.H. Hur, and C.K. Lim. 2003. *Erwinia pyrifoliae*, a casual endemic pathogen of shoot blight of asian pear tree in Korea. *Plant Pathol. J.* 19:294–300.
- Son, J. H., LEE, J. P., Kim, C. S., Lim, E. K., Song, J. H., Kim, H. J., Park, H. C. and Moon, B. J. 2001. Effects of tomato juice and potassium phosphate on the infection of *Botrytis cinerea* LVF12 on the tomato leaves. *Res. Plant Dis.* 7(3):134–139.
- 금광식, 이재평, 김용웅, 이영환, 김영일. 1993. *Bacillus subtilis* 접종이 배추 및 참깨의 생장과 토양 미생물상에 미치는 영향. *한토비지.* 26(4) : 271–277.

국립농업자재검사고. 1986.비료검사요령

김광식. 김용웅. 박흥재. 1991. 원예작물 생육에 미치는 미생물 제제 이용연구. 농업산학협동. 5 : 129-140.

농림부. 1997. 비료공정규격

농업과학기술원. 1996. 비료의 품질검사방법 및 시료 채취 기준

농촌진흥청. 1988. 토양화학분석법

명인식 박경석 박진우 심홍식 이영기 이상엽 이승돈 이수현 최홍수 최효원 허성기 신동범 나동수 예완해 조원대 2005. 2004년주요농작물병해발생개황 식물병연구11(2) : 89-92.

이주삼, 장기운, 조성현, 오진걸. 1996. 유기농산물 생산을 위한 퇴비시용시 무의 품질과 토양의 이화학성에 미치는 영향. 한토비지. 29(2) : 145-149.

이주삼, 장기운, 조성현, 오진걸. 1996. 유기농산물 생산을 위한 퇴비시용시 배추의 수량과 무기 성분 및 토양의 이화학성에 미치는 영향. 한토비지. 29(4) : 365-370.

임수길. 이규하. 1992. 무·배추의 수종의 유기질 비료 시용 효과. 한토비지. 25(1) : 52-56.

황선웅. 김유섭. 연병렬. 이용재. 박영대. 1993. 몇가지 제염 방법에 의한 비닐하우스내 토양의 염류제거 효과. 한토비지. 35(1) : 276-280.

환경부. 1998. 토양오염공정시험방법

한국식물병리학회. 2004. 한국식물병명목록(제4판). 한국식물병리학회. 779 pp.