

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000160-01

활성물질 기반 광역스펙트럼 친환경 바이오농약 개발

Development of broad spectrum biopesticides based on  
antifungal substances

전 북 대 학 교

농 립 축 산 식 품 부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “활성물질 기반 광역스펙트럼 친환경 바이오농약 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 09월 25일

주관연구기관명 : 전 북 대 학 교

주관연구책임자 : 윤 봉 식

세부연구책임자 : 윤 봉 식

연 구 원 : 이 인 경

연 구 원 : 이 승 웅

연 구 원 : 김 영 숙

연 구 원 : 염 지 희

연 구 원 : 기 대 원

연 구 원 : 이 명 석

연 구 원 : 김 성 은

연 구 원 : 송 자 경

연 구 원 : 김 대 원

협동연구기관명 : 충 남 대 학 교

협동연구책임자 : 유 승 현

연 구 원 : 나라얀 찬드라 폴

연 구 원 : 등 건 신

연 구 원 : 지 승 현

연 구 원 : 이 지 혜

협동연구기관명 : 우 진 B&G (주)

협동연구책임자 : 하 상 우

연 구 원 : 이 재 관

연 구 원 : 박 현 민

연 구 원 : 김 태 환

# 요 약 문

## I. 제 목

“활성물질 기반 광역스펙트럼 친환경 바이오농약 개발”

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

최근 환경오염과 농산물의 안전성에 대한 소비자들의 인식이 변화되면서 먹거리에 대한 관심이 증대되어 유기농산물에 대한 수요가 증가하고 있으며, 안전한 농산물에 대한 소비자들의 관심은 웰빙(Well-Being)을 넘어 로하스(LOHAS, Life of Health and sustainability)라는 새로운 문화를 형성하고 있다. 또한, 국가 간 자유로운 교역(FTA)의 확대에 의한 농산물 공급자간의 치열한 글로벌 경쟁이 가속화되고 있는 실정이다. 최근 우리나라는 채소, 과일 및 화훼 등의 시설재배 면적이 증가하고 있으며, 대부분 소규모의 영세농으로 단기에 높은 가격 형성을 목표로 한 생산에 비중을 두고 있다. 그러나 고유가 시대에 겨울철 난방비 지출 제한으로 발생하는 시설 내 환기불량에 의한 다습조건, 기상이변으로 인한 일조량 부족에서 오는 작물의 생육 불량과 더불어 많은 병해가 발생되어 수량과 품질저하를 가져오고 있다. 이와 같이 식물에 발생한 병해는 작물에 피해를 가하여 세계적으로 약 200조원에 달할 만큼 경제적으로 엄청난 손실을 주고 있으며, 주요 병해로는 잿빛곰팡이병, 흰가루병, 역병, 시들음병 등이 보고되어 있다. 이를 방제하기 위하여 현재까지는 유기합성 농약을 기초로 한 화학방제 시스템이 주가 되어 왔으나 농약의 오남용, 독성, 환경오염 및 자연생태계에 미치는 악영향과 약제내성의 출현 등에 의한 약효감소 등의 부작용이 증가하고 있는 실정이다. 따라서 OECD에서는 합성농약 원제생산량을 2013년까지 2004년 기준으로 40% 축소할 것을 권고하고 있다. 우리나라도 친환경 농산물의 경쟁력을 확보하기 위하여 ‘친환경농업육성책’을 통해 화학농약과 화학비료의 사용량을 2013년까지 2005년 대비 30%로 감축하여 농약 사용량을 OECD 권고안 이하로 줄이려는 정책을 수립하고 있다. 따라서 화학농약을 대체할 수 있는 새로운 환경 친화적인 농자재의 개발이 절실히 요구되고 있는 추세이다.

한편, 바이오농약(biopesticides)은 자연환경으로부터 유래한 동물, 식물, 미생물 또는 그것들로부터 유래된 물질을 인위적인 합성 및 조작을 거치지 않고 농업용으로 이용할 수 있도록 제품화 한 것을 말한다. 화학농약의 대체를 위한 가장 효율적인 대안으로 주목을 받고 있어 정부의 지원하에 다수의 바이오농약이 개발되어 시판되고 있으나 검증되지 않은 미생물 살균제의 난립과 현장에서의 낮은 활성 및 불안정성, 합성농약에 비하여 현저히 높은 가격 등으로 인하여 소비자로부터 하여금 바이오농약의 불신과 기피를 야기하고 있는 실정이다. 따라서 정부의 친환경 육성정책에 따른 다양한 지원에도 불구하고 국내 친환경 작물 보호제 시장은 합성농약 대비 1% 미만의 낮은 시장 점유율을 나타내고 있다. 따라서 이같은 문제점을 개선하는 방법으

로 broad spectrum의 미생물소재를 탐색하고, 활성성분에 초점을 맞추어 생물학적 효능을 혁신적으로 개선하여, 활성이 우수하고 가격경쟁력을 갖춘 바이오농약의 개발이 절실히 필요하다. 따라서 본 과제에서는 광역 스펙트럼의 미생물소재를 탐색하고, 이들의 활성성분에 초점을 맞추어 완전한 quality control 체계를 갖추고, 활성성분 고생산을 위한 균주개량과 양산을 위한 배양조건 확립을 통하여 가격경쟁력을 갖춘 바이오농약 소재를 개발하여 궁극적으로 시장에서 난립하고 있는 미생물제제의 단점을 극복한 시장요구도 및 소비자 만족도가 높은 경쟁력을 갖춘 바이오농약 개발을 목표로 한다.

## 2. 연구개발의 필요성

농촌에서는 단위면적당 소득이 높은 시설재배를 이용한 채소 및 과일의 재배 면적이 점차 증가하고 있으나 많은 비닐하우스에서 잿빛곰팡이병 및 흰가루병이 심하게 발생하여 큰 경제적 손실을 일으키고 있다. 잿빛곰팡이병은 온도가 낮고 습도가 높을 때에 *Botrytis cinerea*에 의해 발생하는 병으로 기주범위가 광대하여 딸기, 토마토, 오이 등 채소류와 사과, 포도 등에 발생하는 주요 병해 중의 하나이다. 온도가 비교적 낮고, 높은 습도가 유지될 때 발생하며, 죽은 식물체나 노쇠한 부위로부터 발병되기 시작하여 일단 발병되고 나면 병원균의 발병온도가 아니더라도 병 진전은 계속된다. 병에 감염되면 잎은 가장자리로부터 진한 녹색으로 물러 괴사하는 점무늬가 생기고 차츰 커져서 갈색으로 마르게 되며, 잎자루나 꽃자루부위는 구근에 가까운 부분에 발생하여 물러지다가 갈색으로 변하며 오목하게 마르거나 잘록해지는 증상을 보이게 된다. 또한 수확된 과실을 보관하는 저온창고에서도 쉽게 발생하여 저장과실에 심각한 손실을 끼치고 있다. 잿빛곰팡이병의 방제는 저항성 품종을 이용하거나 재배환경 조절 및 병든 식물 제거에 의한 경종적 방제, 살균제를 이용한 화학적 방제 등이 이루어지고 있다. 그러나 저항성 품종과 경종적 방제는 거의 효과를 거두지 못하고 있는 실정이기 때문에 잿빛곰팡이병 방제는 주로 화학적 방제에 의존하고 있다. 잿빛곰팡이병 방제용 살균제는 프로시미돈, 이프로디온, 베노밀 등이 사용되고 있으나 이들 약제에 대해 저항성이 나타나기 시작하였고 방제효과가 크게 저하되고 있는 실정이다.

흰가루병은 시설재배 및 노지재배에서 가장 많이 발생하는 병으로 시설 내 난방시설을 갖추면서 건조한 환경과 낮은 습도 유지로 인하여 그 발병이 증가하는 추세이다. 화학약제로는 스테롤 생합성 저해제, 베타 튜블린 결합 억제제, 미토콘드리아의 전자전달계 중 시토크롬에서 전자전달 억제제 등이 방제를 위하여 사용되어왔다. 하지만 이 같은 살균제의 계속적인 사용은 약제저항성을 가져와 흰가루병에 대한 방제효과가 저하되어 어려움을 겪게 되었고, 화학농약의 지속적인 사용 및 남용으로 인해 인축에 대해 직접적인 독성 및 독성의 잔류 등의 문제에 봉착하게 됨에 따라 새로운 환경 친화적인 살균제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 또한 고추 탄저병은 고추역병과 더불어 고추의 최대 병해중의 하나로 잎, 줄기, 과실 등에 발병하며 매년 10% 이상이 수확시기에 감염되어 수량감소의 직접적인 원인이 되고 있다.

고추탄저병은 *Colletotrichum* 속의 식물병원성 균류에 의하여 야기되며, 열매탄저병과 유묘탄저병이 있다. 열매탄저병은 열매에만 병을 일으키며 탄저병 피해 중 95% 이상을 차지하고, 유묘탄저병은 초기에는 수침상의 반점이 커지면서 원형의 갈색 반점을 형성하며 줄기에 발생하



면 병환부가 구부러지며, 심한 경우는 잎이 낙엽지기도 한다. 유묘탄저병에는 *C. coccodes*가 관여하며, 열매탄저병에는 *C. acutatum* 또는 *C. gloeosporioides*가 관여하여 청과 및 적과 등의 열매에 탄저병을 유발한다. 이러한 고추탄저병의 방제방법으로는 일반적으로 이미다졸계 및 트리아졸계 화학농약을 이용하여 방제를 시도하고 있지만, 쉽게 방제가 되지 않으며, 화학농약 사용에 의한 환경오염이 심각한 문제를 야기하고 있다. 최근 탄저병 방제를 위하여 친환경 바이오농약의 개발에 관심이 증폭되고 있고, 그에 따라 수종의 바이오농약이 개발되었으나 불분명한 활성성분 및 낮은 방제역가 등으로 널리 활용되지 못하고 있는 실정이다.

농가에 많은 피해를 주고 있는 이들 식물병을 방제하기 위하여 많은 화학농약이 활용되고 있으나 약제에 대해 저항성이 나타나 방제효과가 크게 저하되기 시작하였고 또한 심각한 환경오염 문제를 야기하고 있는 실정이다. 따라서 화학농약의 대체를 위하여 가장 효율적인 대안으로 바이오농약이 주목받아 왔고, 정부의 지원하에 다수의 바이오농약이 개발되어 시판되고 있으나 검증되지 않은 미생물 살균제의 난립과 현장에서의 낮은 활성 및 불안정성, 합성농약에 비하여 현저히 높은 가격 등으로 인하여 소비자로서 하여금 바이오농약의 불신과 기피를 야기하고 있는 실정이다. 따라서 다양한 식물병을 동시에 방제할 수 있는 넓은 스펙트럼을 지닌 미생물소재를 발굴하고, 이들의 활성성분에 초점을 맞추어 quality control이 가능하고, 활성성분 고생산을 위한 균주개량과 양산을 위한 배양조건 확립을 통하여 가격경쟁력을 갖춘 친환경농자재 및 바이오농약 소재의 개발이 요원한 실정이다. 본 연구는 궁극적으로 시장에서 난립하고 있는 미생물제제의 단점을 극복하고 시장요구도 및 소비자 만족도가 높은 시장 경쟁력을 갖춘 친환경농자재 및 미생물농약 소재의 개발을 위한 것이다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 농가에 많은 피해를 주고 있는 잣빛곰팡이병, 흰가루병, 탄저병 등에 유효한 다범성 활성을 지닌 친환경농자재 및 미생물농약 소재를 개발하기 위하여 수행하였다. 이들 식물병을 방제하기 위하여 많은 화학농약이 활용되고 있으나 약제에 대한 저항성과 환경오염 문제를 야기하고 있어 이의 대체제로서 바이오농약이 주목을 받고 있다. 다양한 바이오농약이 개발되어 시판되고 있으나 검증되지 않은 미생물 살균제의 난립과 현장에서의 낮은 활성 및 불안정성, 합성농약에 비하여 현저히 높은 가격 등으로 소비자로서 하여금 불신과 기피를 야기하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 다양한 식물병을 동시에 방제할 수 있는 넓은 스펙트럼을 지닌 다범성 미생물소재를 발굴하고, 이들의 활성성분에 초점을 맞추어 quality control이 가능하며, 활성성분 고생산을 위한 균주개량과 양산을 위한 배양조건 확립을 통하여 가격경쟁력을 갖춘 친환경농자재 또는 미생물농약 소재를 개발하고자 하였다. 본 연구개발의 내용 및 범위는 다음과 같다.

#### 1. 다범성 항진균활성을 지닌 길항 미생물의 선발

토양 및 식물체로부터 다양한 미생물을 분리하여 배양한 후 실험실적 방법에 의하여 잣빛곰팡이병, 탄저병, 흰가루병 등을 포함한 다양한 식물병에 유효한 다범성 항진균물질을 생성하는 미생물을 스크리닝한다. 특히 포자발아를 억제하고 기형적 균사생장을 유도하는 미생물,

lytic enzyme 생성능, siderophore 생성능, 불용성 인산 가용능, indole-3-acetic acid 생성능 등이 우수하고 항진균 활성이 지속되며 형태적으로 특이하고 효과의 재현성과 안정성이 뛰어난 미생물을 선발한다.

## 2. 선발 미생물의 동정 및 특성 분석

16S rDNA의 염기서열 분석 및 배양적, 형태적, 생리적 특성을 바탕으로 분리한 미생물을 동정한다.

## 3. 항균 스펙트럼의 결정

인삼검무늬병균(*Alternaria panax*), 채소류젯빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 고추탄저병균(*Colletotrichum acutatum*), 고추시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 채소류균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*), 인삼뿌리썩음병균(*Cyrtodrocarpon destructans*) 등을 포함한 다수의 식물병원성 곰팡이를 대상으로 선발한 미생물의 항균 스펙트럼을 결정한다.

## 4. *In vivo* 및 포장에서의 생물 활성 검정

다양한 기주에서 발생한 흰가루병, 젯빛곰팡이병, 탄저병, 흰가루병, 역병 등에 대한 *in vivo* 생물활성 및 포장에서의 방제효과를 검정한다.

## 5. 항균활성물질의 분리 및 정제

BuOH, EtOAc, CHCl<sub>3</sub>, hexane 등 다양한 유기용매를 이용한 용매 분배에 의하여 활성 성분을 분배하고, silica gel, Diaion HP-20, Sephadex LH-20 등의 수지를 이용한 column chromatography, preparative TLC 및 HPLC를 수행하여 항균활성물질을 분리, 정제한다.

## 6. 항균활성물질의 화학구조 결정

ESI-mass 등을 측정하여 화합물의 분자량을 밝히고, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC 등의 NMR 측정을 통하여 화학구조를 해석한다.

## 7. 분리한 화합물의 신규성 여부 확인

SciFinder 등 각종 database를 이용하여 분리한 화합물의 신규성 여부를 확인한다.

## 8. 분리한 화합물의 최소저해농도 결정

최소저해농도는 배지에 활성물질을 적정농도로 부가한 후 5종의 식물병원균 *Botrytis cinerea*, *Cyrtodrocarpon destructans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Collectotricum gloeosporioides*의 균사생장이 억제되는 최소농도로 결정한다.

## 9. 약해, 독성 및 안전성 평가

약해의 규명은 콩과 옥수수 등에 배양액을 흙뻑 젖을 만큼 뿌려준 후 5일, 7일 경과 후 육안으로 관찰하고, 독성평가는 공인인증기관인 한국생물안전성연구소에 의뢰하여 급성경구독성 평가 및 안전성을 확인한다.

## 10. 선발 미생물의 배양 조건 확립

선발 미생물이 잘 생육하는 기본배지를 선발한 후 항균물질의 생성능을 지표로 배양 최적 조건을 조사하였다. 최적 초기 pH, 온도, 교반속도, 탄소원, 질소원 등을 달리하여 배양 최적 조건을 확립한다.

## 11. UV-mutagenesis를 통한 균주개량

항균활성물질의 생산 수율을 증가시키기 위하여 UV mutation을 수행한다. UV조사시간을 달리하여 UV-mutagenesis 조건을 확립한 후 1차 UV-mutagenesis에 의하여 우수한 변이주를 선발하고, 이를 이용하여 다시 1차 UV-mutagenesis를 수행한다.

## 12. 제제화 및 제형화

산업화를 위한 제형화 연구를 위하여 입제, 액제, 수화제의 형태로 제형화 한 후 장기 보존 시 활성의 지속성 여부를 확인한다. 또한 저장성과 안전성 향상을 위하여 계면활성제, 자외선차단제, 안정제, 결합제 등 다양한 첨가물을 이용하여 안정성 및 항균활성의 지속성 등을 조사한다.

## 13. 공장시스템에서의 산업화 배양

생산 process를 확립한 후 최적 배양조건을 이용하여 pilot plant 생산설비에서 산업화 배양을 수행한다. 배양 중 pH, D.O., 항균활성물질 함량을 2시간 단위로 샘플링하여 시간 경과에 따른 변화를 관찰한다.

## 14. Pilot plant 생산 배양액의 유해 중금속, 약해 및 안전성 검정

Pilot plant 생산 배양액의 유해중금속 및 약해 평가를 수행한다. 하였다. 유해 중금속 함유 여부는 농진청 공인기관인 관코리아 농업환경과학연구소에 의뢰하고, pilot plant 생산 배양액의 유해 미생물 함유 여부는 목원대학교 미생물생태자원연구소에 의뢰한다.

## 15. 친환경농자재로의 등록

상술한 일련의 연구과정을 통해 상품화 가능성이 있을 경우 친환경농업육성법에 의거하여 농진청 공인 시험기관에서 시험성적서를 발급받아 친환경농자재로의 공시를 진행한다.

#### IV. 연구개발결과

본 연구과제는 참여기업인 (주)우진B&G에서 개발 중인 탄저병, 흰가루병, 잿빛곰팡이병 등 다범성 항진균활성을 지닌 *Bacillus subtilis* GA-2005와 주관연구기관인 전북대학교에서 선발한 2종의 방선균 *Streptomyces* sp. BS062과 *Streptomyces* sp. A0375의 연구 개발을 수행한 것이다. 그 결과 *Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 연구개발을 수행하여 친환경농자재로 등록을 완료하였으며, 방선균 *Streptomyces* sp. BS062과 *Streptomyces* sp. A0375 균주의 기반연구를 완료하였으며 추후 산업화를 추진할 예정이다. 각 공시균주의 연구개발결과는 다음과 같다.

##### 1. 탄저병, 흰가루병 등 다범성 항진균활성을 지닌 *Bacillus subtilis* GA-2005의 연구 개발 가. *Bacillus subtilis* GA-2005의 발굴

주요병원균인 *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum coccodes*에 강한 항균력을 나타내었을 뿐만 아니라 *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Stemphylium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata* 등의 병원균에도 항균효과를 나타내어 고추탄저병, 오이흰가루병 등 다범성 바이오농약소재로의 가능성을 지닌 균주로 선발되어 (주)우진 B&G에서 친환경농자재 혹은 미생물농약으로 개발하고자 하는 균주이다.

##### 나. *Bacillus subtilis* GA-2005의 동정 및 특성 분석

분리한 균주 *B. subtilis* GA-2005는 16S rDNA의 염기서열 분석을 통하여 *Bacillus subtilis*로 동정되었으며 따라서 *Bacillus subtilis* GA-2005로 명명하였다.

##### 다. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 항균 스펙트럼

*B. subtilis* GA-2005 균주는 인삼점무늬병균(*Alternaria panax*), 채소류잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 고추탄저병균(*Colletotrichum acutatum*), 고추시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 채소류균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*) 등에 강한 항진균활성을 나타내었다.

##### 라. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 *in vivo* 생물 활성

*B. subtilis* GA-2005 균주의 *in vivo* 생물 활성을 평가한 결과, 고추탄저병 및 딸기탄저병, 오이흰가루병 등에 강한 방제효과를 나타내어 본 균주가 이들 병 방제를 위하여 화학농약을 대체할 수 있을 것으로 판단되었다.

##### 마. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주가 생산하는 항진균활성물질

다양한 column chromatography 및 HPLC 등을 이용하여 *B. subtilis* GA-2005균이 생산하는 4종의 항진균활성물질 WJ-1, WJ-2, WJ-3, WJ-4를 분리 정제하고, 각각 NMR 및 mass 분석을 통하여 이들 화합물의 화학구조를 규명한 결과 각각 iturin A2, iturin A3, iturin A4, C-16 fengycin A으로 동정하였다.

#### 바. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액의 약해, 독성 및 안전성 시험

*B. subtilis* GA-2005 균주의 약해를 규명하기 위하여 콩과 옥수수에 흙뻑 젖을 만큼 뿌려 준 후 5일, 7일 경과 후 육안으로 관찰하였으며 그 결과 모두 약해가 관찰되지 않았다. 또한 공인인증기관인 한국생물안전성연구소에 의뢰하여 급성경구독성을 확인한 결과, 시험동물 당 2.5 g/kg의 *B. subtilis* GA-2005 균주 배양액 투여군에서도 치사동물은 없었으며 일반중독증상 또한 관찰되지 않아 인축, 식물에 모두 안전한 것으로 나타났다.

#### 사. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 산업화 scale 배양 조건 확립

*B. subtilis* GA-2005 균주는 고추탄저병을 비롯하여 다범성 항균활성을 지닌 균주로 활성물질로서 lipopeptide 계열의 iturin과 fengycin을 생산함을 밝혔다. 이들 항균활성물질의 최적 생산조건을 바탕으로 산업화 scale 배양 조건을 확립하였다. 그 결과 탄소원은 potato starch, 질소원은 카제인펩톤, 무기질소원은  $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 을 첨가하였을 경우 가장 높은 항생물질 생산성을 나타내었다. 또한 최적 초기 pH, 온도, 교반속도 등을 확립한 후 최적배양조건에서 배양한 결과 배양 5일째에 가장 높은 항균물질 생산성을 나타내었다.

#### 아. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액의 제제화 및 제형화

산업화를 위한 제형화 연구를 위하여 입제, 액제, 수화제의 형태로 제제화 한 후 활성의 지속성 여부를 확인한 결과, 세 가지 제형 모두 장기 보존 시에도 길항력은 지속되었다. 그러나 수화제는 제조공정상 비용이 많이 들기 때문에 입제 형태로 제품화하는 것이 가장 효율적일 것으로 판단되었다. 또한 저장성과 안전성 향상을 위하여 계면활성제, 자외선차단제, 안정제, 결합제 등 다양한 첨가물을 이용하여 안정성 및 항균활성의 변화를 측정된 결과, 계면활성제인 사포닌을 첨가한 처리구에서 높은 안정성을 나타내었다.

#### 자. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 공장시스템에서의 산업화 배양

생산 process를 확립한 후 전문화된 최적 배지를 사용하여 pilot plant 생산설비를 이용하여 10톤의 배양을 진행하였다. 배양 중 pH, D.O., iturin 함량을 2시간 단위로 샘플링하여 측정하여 시간에 따른 변화를 관찰하였고, 그 결과 배양 42시간에 가장 많은 항균물질이 생산되었다.

#### 차. Pilot plant 생산 배양액의 유해 중금속, 약해 및 안전성 검증

Pilot plant 생산 배양액의 유해중금속 및 약해 평가를 수행하였다. 농진청 공인기관인 한국농업환경과학연구소에 의뢰하여 유해 중금속 여부를 확인하고, 약해가 발생하기 쉬운 작물(콩, 배추, 고추, 오이)에 뿌려 7일 후 약해여부를 확인한 결과, 유해 중금속은 적정량 이하였으며 약해도 검출되지 않았다. 또한 목원대학교 미생물생태자원연구소에 의뢰하여 유해미생물이 포함되었는지 여부를 확인한 결과, pilot plant 생산 배양액에서 유해 미생물은 검출되지 않았다.

### 카. 친환경농자재로의 등록

상술한 일련의 연구과정을 통해 상품화 가능성이 있다는 판단 하에 친환경농업육성법에 의거하여 친환경농자재로 공시하였다. 농진청 공인 시험기관에서 시험성적서를 발급받아 공시 번호 공시-4-1-011의 “토사랑“을 우선적으로 신규 등록하였고, 현재 바이오농약으로의 등록을 추진 중이다.

## 2. 항균활성물질 기반 잿빛곰팡이병 방제용 *Streptomyces* sp. BS062

### 가. *Streptomyces* sp. BS062의 발굴 및 연구 배경

3천여주의 방선균을 대상으로 잿빛곰팡이균에 특이적인 길항활성을 나타내는 미생물을 스크리닝하였으며, 잿빛곰팡이병균의 포자발아를 억제하고 기형적 균사생장을 유도하는 BS062균주를 선발하였다.

### 나. *Streptomyces* sp. BS062균주의 동정

16S rDNA의 염기서열 분석 결과 BS062 균주는 *Streptomyces hygroscopicus*와 99% 이상의 유사성을 나타내었다. 그러나 BS062균주는 회백색의 포자와 배지 내 보라색 색소를 생성하는 반면, *Streptomyces hygroscopicus*는 검은색의 포자를 형성하는 등 형태적, 생리적으로 매우 다른 차이를 나타내었다.

### 다. *Streptomyces* sp. BS062의 항균 스펙트럼

*Streptomyces* sp. BS062의 배양여액은 잿빛곰팡이병균, 벼도열병균, 토마토잎곰팡이병균, 푸른곰팡이병균에 대하여 강한 항균활성을 나타내었으며, 특히 잿빛곰팡이균에 대하여는 다른 병원균에서 관찰되지 않는 일반적인 포자 발아 억제에 의한 clear zone과는 다른 독특한 저지환을 형성하였다.

### 라. *Streptomyces* sp. BS062균의 잿빛곰팡이병 방제효과

오이, 인삼, 묘삼, 딸기 등에 발생하는 잿빛곰팡이병에 대하여 방제효과를 조사한 결과, 선발된 방선균 BS062 균주의 배양여액 처리 시 탁월한 잿빛곰팡이병 방제효과를 나타내었으며, 방제 기전으로는 BS062균주가 생산하는 항진균물질이 잿빛곰팡이병균의 포자 발아를 억제하는 것으로 추측되었다.

### 마. *Streptomyces* sp. BS062균의 항균 특성 규명

잿빛곰팡이균 포자현탁액을 도말한 검정균 plate에 BS062균을 처리한 경우, 다른 방선균 배양액 처리 시 관찰되는 clear zone과는 다른 turbid zone을 확인할 수 있었다. 이러한 현상은 BS062균주가 생산하는 항균물질이 두 종 이상의 서로 다른 기전의 화합물에 기인하는 것으로

나타났다. 즉 포자 발아를 억제하는 것으로 추측되는 clear zone 형성 화합물과 포자 발아는 억제할 수 없으나 균사 기형에 영향을 줌으로써 병원균의 증식을 억제하여 병 방제효과를 나타내는 것으로 유추되었다.

바. *Streptomyces* sp. BS062균이 생산하는 항균활성물질

다양한 column chromatography 및 HPLC 등을 이용하여 *Streptomyces* sp. BS062균이 생산하는 2종의 항균활성물질 HP-1(clear zone 형성 화합물)과 BM-1(turbid zone 형성 화합물)을 분리 정제하고, 각각 NMR 및 mass 분석을 통하여 이들 화합물의 화학구조를 규명한 결과 각각 분자식  $C_{36}H_{46}N_2O_{12}$ , 분자량 698의 isoneoantimycin과 분자식  $C_{43}H_{69}NO_{12}$ , 분자량 792의 FK520(ascomycin)으로 동정하였다.

사. *Streptomyces* sp. BS062균의 배양조건 검토

3종의 방선균 배양배지를 이용하여 BS062균의 배양조건을 검토한 결과, 본 균주에 적합한 배지를 선발하였으며, 또한 배양 6일, 교반 속도 120 rpm에서 항균물질 생성능이 가장 우수한 것을 확인하였다.

아. *Streptomyces* sp. BS062균의 UV-mutagenesis를 통한 균주개량

BS062균주가 생산하는 항균활성물질의 수율을 증가시키기 위하여 UV mutation을 실시하였다. UV-mutagenesis 조건을 확립한 후 1차 UV-mutagenesis에 의하여 항균활성이 원균주보다 약 25배 증가한 변이주 M17을 선발하였고, 다시 변이주 M17을 이용하여 2차 UV-mutagenesis를 수행한 결과 원균주보다 약 100배 증가한 변이주 MM14를 선발하였다. 또한 변이주 MM14의 배양조건을 검토하여 항생물질 최적 생산조건을 확립하고 배양기간을 단축하였다.

자. 개량균주 M17 및 MM14의 방제 효과 및 방제 스펙트럼

*Streptomyces* sp. BS062의 개량균주 M17 및 MM14 균주의 방제 효과 및 방제 스펙트럼을 결정하기 위하여 다양한 기주의 잣빛곰팡이병, 탄저병, 흰가루병, 역병 등을 대상으로 시험을 수행한 결과, 본 균주는 잣빛곰팡이병과 일부의 탄저병 방제에 효과적인 것으로 나타났다.

3. 항균활성물질 기반 잣빛곰팡이병 방제용 *Streptomyces* sp. A0375

가. 길항 방선균 *Streptomyces* sp. A0375 균주의 선발

근권에서 채취한 토양시료로부터 잣빛곰팡이균에 항균활성을 나타내는 방선균을 분리하고 이들을 대상으로 lytic enzyme 생성능, siderophore 생성능, 불용성 인산 가용능, indole-3-acetic acid(IAA) 생성능을 검정한 후 다범성 항진균 활성이 지속되며 형태적으로 특이하고 효과의 재현성과 안정성이 뛰어난 A0375 균주를 선발하였다.

#### 나. *Streptomyces* sp. A0375 균주의 동정

Gyrase A 유전자의 염기서열을 바탕으로 한 Neighbour-joining tree에서 A0375균은 *Streptomyces geldanamycininus*와 한 그룹에 속하며, *S. geldanamycininus*과 *S. hygroscopicus*의 종에 속하나 세부적인 특성이 달라 *Streptomyces* sp. A0375로 명명하였다.

#### 다. *Streptomyces* sp. A0375 균주의 생물활성

선발 방선균 A0375는 잣빛곰팡이균 및 인삼 뿌리썩음병균에 대해 강한 항진균 활성을 나타내었고 cellulase와 protease의 높은 생성능을 나타내었다.

#### 라. *Streptomyces* sp. A0375 균주의 잣빛곰팡이병 방제 효과

A0375균주 배양액을 딸기의 미성숙과와 성숙과에 처리하여 방제효과를 조사한 결과, 성숙과와 미성숙과 모두 높은 방제효과를 나타내었으며, 특히 미성숙과에 특이적으로 높은 방제활성을 나타내었다. 또한 인삼 저장시의 잣빛곰팡이병 방제활성을 검정한 결과 높은 방제효과를 나타내어 유효성을 확인하였으나, 토마토 잣빛곰팡이병 방제활성 결과로부터 본 균주는 치료 효과는 미약한 것으로 나타났다. 포장에서의 잣빛곰팡이병 방제 활성을 조사한 결과 성숙과 보다는 꽃이 개화되자마자 처리하면 잣빛곰팡이병 예방효과가 뛰어난 것으로 나타났다.

#### 마. *Streptomyces* sp. A0375 균주가 생산하는 항균활성물질

*Streptomyces* sp. A0375 균주가 생산하는 항균물질은 pH, 온도 및 UV 조사에 매우 안정하였다. 다양한 column chromatography 및 HPLC 등을 이용하여 *Streptomyces* sp. A0375균이 생산하는 항균활성물질 75-Y1을 분리 정제하고, NMR 및 mass 분석을 통하여 화학구조를 규명한 결과 분자식  $C_{59}H_{103}N_3O_{18}$ , 분자량 1142의 scopafungin으로 동정하였다.

#### 바. *Streptomyces* sp. A0375가 생산하는 항균활성물질 75-Y1의 최소저해농도

*Streptomyces* sp. A0375 균주가 생산하는 항균활성물질 75-Y1의 최소저해농도를 5종의 식물병원균 *Botrytis cinerea*, *Cyrodinocarpon destructans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Collectotricum gloeosporioides*을 대상으로 조사한 결과, *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*에 낮은 농도에서도 균사생장이 억제되는 것을 확인하였다.

#### 사. *Streptomyces* sp. A0375 균주의 배양조건 검토

A0375 균주의 배양 조건을 검토하기 위하여 3종의 방선균 배양배지를 이용하여 시험한 결과 본 균주에 적합한 배지를 선발하였으며, 생균수는 배양 3일째 최대가 되었다가 그 이후 점차 감소하였으며 pH는 배양시간이 경과함에 따라 서서히 증가하였다. 항균활성은 서서히 증가하다 배양 6일째 가장 높은 활성을 나타내었다. 배양 최적 온도는 20°C~ 25°C이었고, 최적 교반속도는 200 rpm, 생육에 가장 우수한 탄소원은 glycerol, 질소원은 soybean flour이었다.



## V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 미생물제제의 약점을 보완하여 국내 친환경농자재의 품질개선을 통한 불신 극복과 활성화 방안 도출에 활용될 수 있을 것이며 새로운 개념의 친환경 바이오농약 개발의 시발점을 제공할 것이다.
2. 본 과제는 시판되고 있는 친환경농자재 및 바이오농약 제품의 문제점을 극복한 환경친화형 바이오살균제의 개발을 제시한 것으로 화학 합성농약의 대체제 개발에 활용될 수 있을 것이다.
3. “친환경농업육성책”의 준수를 위한 식물병의 효과적인 방제수단의 도출 및 산업화에 활용될 것이다.
4. 화학농약이 아닌 환경 친화적 방법으로 식물병을 방제하여 청정농산물 생산에 활용할 수 있고, 이를 통하여 친환경 농산물 재배농가의 소득 증대 및 안정화에 기여할 수 있으며, 각종 농산물의 수입개방 압력이 거세지는 현시점에서 농가의 경쟁력확보에 활용될 것이다.
5. 바이오농약의 수입대체 및 수출을 통한 국내 바이오농약 산업의 활성화 및 경제적 이익 창출에 기여할 것이다.
6. 선진 외국으로부터 청정농산물 수입확대 경향에 발맞추어 환경친화적 청정농산물의 생산이 가능해짐으로써 농산물의 수출경쟁력 강화에 활용할 수 있다.
7. 본 연구에서 개발한 바이오농약은 친환경 및 지속가능한 농업을 위한 농업생태계 보호 및 환경오염 방지에 활용할 수 있다.
8. 본 연구에서 개발한 바이오농약의 사용에 따른 보다 안전한 농산물의 생산 및 공급과 이를 통한 국민 보건 향상에 기여할 것이다.
9. 신규 미생물 유래 살균제의 개발을 통한 국가 생물산업 분야 경쟁력 제고 및 우리나라 유용 미생물자원의 체계적 활용에 기여할 것이다.
10. UR, WTO 및 GR에 대비한 국내의 환경보존형 농업시스템 구축에 활용할 수 있다.
11. 지적재산권 확보, 논문 투고 및 원천기술 개발을 통한 국가 과학기술 경쟁력 제고에 기여할 것이다.
12. 새로운 미생물제제의 개발에 따른 지적재산권 확보 및 전문분야가 다른 연구팀간의 융합 연구에 따른 과학기술인 결속력 강화에 기여할 것이다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

Biological control, as the use of a microorganism or its secretion to prevent disease, offers an attractive alternative or supplement to fungicides for the management of plant disease, without any of the negative effects of chemical control. However, relatively few of these antagonistic microbes have been commercialized as biocontrol agents, due to problems such as inconsistent performance in the field, lack of broad-spectrum disease suppression activity, or slower or less complete suppression when compared to chemical alternatives. A number of Gram-positive and Gram-negative bacteria have been evaluated as biological control agents. Gram-negative bacteria, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, and *Serratia plymuthica*, were reported to be effective against a number of diseases of different fruits. Several strains, belonging to the genus *Bacillus*, and in particular to *B. subtilis* and the closely related *B. amyloliquefaciens* species, were reported to be effective for the biological control of multiple plant diseases. Antibiotic production by these bacteria plays a major role in disease suppression. Gram-positive bacteria, and especially strains of *Bacillus subtilis*, produce diverse antibacterial and antifungal antibiotics, such as zwittermicin-A, kanosamine, and lipopeptides of surfactin, iturin, and fengycin families. Iturins and fengycins display strong antifungal activities, and inhibit the growth of a wide range of plant pathogens.

On the other hand, both diseases of gray mold and powdery mildew are very common plant diseases throughout various geographical regions, and occur under a variety of growing conditions. Powdery mildew is one of the most serious plant diseases of all worldwide, causing large yield losses in a number of crops. The conventional chemical control of powdery mildew is through repeated foliar applications of combination of protectant and systemic fungicides. But the intensive use of fungicides worldwide has resulted in an increased frequency of powdery mildew pathogens with reduced sensitivity to chemical fungicides. Gray mold disease, caused by *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., is one of the most serious plant diseases affecting a vegetables, ornamentals and fruit crops produced in commercial greenhouse and fields all over the world. Control of *B. cinerea* is normally carried out by the application of fungicides. However, the growing demand of consumers worldwide for a reduction in the use of fungicides, as well as the appearance of pathogens resistant to chemicals has emphasized the need to find alternative methods for gray mold disease control.

In this study, we have searched for microorganisms with the potential to be used as microbial fungicides for the simultaneous control of various plant diseases including gray mold, anthracnose, and powdery mildew. As a results, one *Bacillus* strain, identified as *Bacillus subtilis*, and two *Streptomyces* strains were selected by their ability to antagonize

the growth of a wide variety of plant pathogenic fungi *in vitro* and field tests. These strains potently inhibited the mycelial growth of *Botrytis cinerea*, and treatment of their culture filtrate was effective to control the development of gray mold caused by *B.cinerea*. In addition to the activity against gray mold, these strains significantly reduced the disease incidence of anthracnose and powdery mildew in pepper, cucumber and strawberry. Optimal culture media for these microorganisms selected were selected, and optimal culture conditions, such as initial pH, optimal temperature, packed cell volume, aeration, agitation speed, carbon contents, and nitrogen contents, were established. To identify the active principle, their culture broths were separated by antifungal activity-guided fractionation. Consequently, seven antifungal compounds, four compounds WJ-1, WJ-2, WJ-3, and WJ-4 from *Bacillus subtilis* GA-2005, two compounds HP-1 and BM-1 from *Streptomyces* sp. BS062, and one compound 75-Y1 from *Streptomyces* sp. A0375, were purified by consecutive solvent partitioning, various column chromatographies using silica gel, Diaion HP-20, and Sephadex LH-20 resins, preparative TLC, and HPLC. Their chemical structures were determined as iturin A2, iturin A3, iturin A4, C-16 fengycin A, isoneoantimycin, FK520, and scopafungin, respectively, by mainly ESI-mass and NMR spectroscopic analyses. Harmful effect to the plants and acute toxicity of *Bacillus subtilis* GA-2005 were not observed. After formulation study, *Bacillus subtilis* GA-2005 was registered in Rural Development Administration as an eco-friendly agricultural material. The application of *Bacillus subtilis* GA-2005 may allow growers an opportunity to limit the use of chemical fungicide. Other microorganisms, *Streptomyces* sp. BS062 and *Streptomyces* sp. A0375, were suggested to be good biocontrol candidates and successful antagonists to control various plant diseases. Further study on *Streptomyces* sp. BS062 and *Streptomyces* sp. A0375 for registration as eco-friendly agricultural materials or biocontrol agents will be continued.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Chapter I. Introduction .....	21
Chapter II. Domestic and abroad current status .....	24
Section 1. Domestic current status .....	24
Section 2. Abroad current status .....	26
Chapter III. Research scope and results .....	28
Section 1. Materials and methods .....	28
1. Isolation and culture of microorganisms .....	28
2. Chemicals and instruments .....	28
3. Spectroscopic analysis .....	28
a. UV spectrum .....	28
b. Mass spectrum .....	28
c. NMR spectrum .....	29
4. Identification of microorganisms .....	29
a. Isolation and PCR amplification of DNA .....	29
b. Sequence and phylogenetic analysis .....	29
5. Evaluation of biological activity .....	30
a. Antifungal spectrum against plant pathogenic fungi .....	30
b. Production of lytic enzymes .....	30
c. Siderophore activity .....	30
d. Solubilization of insoluble phosphate .....	31
e. Production of indole-3-acetic acid(IAA) .....	31
6. Biological activity in <i>in vivo</i> and field .....	31
a. Control effect of gray mold .....	31
b. Control effect of anthracnose .....	33
c. Control effect of powdery mildew .....	33
d. Control effect of late blight .....	34
7. Establishment of optimal culture conditions .....	34
a. Time course production of antifungal substances .....	34
b. Contents of carbon and nitrogen sources .....	35

8. UV-mutagenesis for strain improvement .....	36
a. Establishment of UV-mutagenesis conditions .....	36
b. Selection of antibiotic-high production mutants .....	36
c. Comparison of antibiotic production of wild type and mutants .....	37
9. Identification of antifungal substances .....	37
a. Stability of antifungal antibiotics .....	37
b. Isolation and purification of antifungal antibiotics .....	37
c. Structure determination of antifungal antibiotics .....	38
10. Minimal inhibitory activity of antifungal antibiotics .....	39
Section 2. Research results and discussion .....	40
1. Studies on <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 effective to various plant diseases .....	40
a. Discovery and research background .....	40
b. Identification and characteristics of <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 .....	41
c. Antifungal spectrum .....	41
d. <i>In vivo</i> biological activity .....	41
e. Purification and structure determination of antifungal substances .....	46
f. Safety .....	54
g. Establishment of optimal culture conditions .....	56
h. Formulation .....	61
i. Industrial fermentation using pilot plant .....	63
j. harmfulness and safety of industrial fermentation broth .....	65
k. Registration as eco-friendly agricultural material .....	67
2. Studies on <i>Streptomyces</i> sp. BS062 effective to gray mold disease .....	70
a. Discovery and research background .....	70
b. Identification and characteristics of <i>Streptomyces</i> sp. BS062 .....	70
c. Antifungal spectrum .....	72
d. Biocontrol effect against gray mold disease .....	73
e. Antifungal mechanism .....	76
f. Purification and structure determination of antifungal substances .....	77
g. Establishment of optimal culture conditions .....	85
h. UV-mutagenesis for strain improvement .....	86
i. Biocontrol effect of the mutants M17 and MM14 .....	91

3. Studies on <i>Streptomyces</i> sp. A0375 effective to gray mold disease .....	99
a. Selection of <i>Streptomyces</i> sp. A0375 .....	99
b. Biological activity .....	99
c. Identification and characteristics of <i>Streptomyces</i> sp. A0375 .....	101
d. Biocontrol effect against gray mold disease .....	102
e. Establishment of optimal culture conditions .....	104
f. Purification and structure determination of antifungal substance .....	109
g. Minimal inhibitory activity of antifungal substance .....	114
Chapter IV. Research achievements and contribution .....	116
Section 1. Research achievements .....	116
Section 2. Contribution .....	120
Chapter V. Application of the study .....	121
Section 1. Plan for commercialization .....	121
Section 2. Instruction, guidance, promotion .....	121
Section 3. Patents, research articles, presentations .....	121
Section 4. Further research and application to different fields .....	125
Chapter VI. Information of foreign science and technology collected in research process .....	126
Chapter VI. Research facility and instruments .....	127
Chapter VIII. References .....	128

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	21
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	24
제 1 절	국내의 기술개발 현황 .....	24
제 2 절	국외의 기술개발 현황 .....	26
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	28
제 1 절	재료 및 방법 .....	28
1.	미생물의 분리 및 배양 .....	28
2.	시약 및 기기 .....	28
3.	분석기기 .....	28
가.	자외선 스펙트럼 (UV spectrum) .....	28
나.	질량분석 스펙트럼 (mass spectrum) .....	28
다.	핵자기공명 스펙트럼 (NMR spectrum) .....	29
4.	공시 미생물의 동정 .....	29
가.	DNA 분리 및 PCR 증폭 .....	29
나.	염기서열 분석 및 계통 분석 .....	29
5.	생물 활성 평가 .....	30
가.	식물병원균에 대한 항균 스펙트럼 조사 .....	30
나.	Lytic enzyme 생성능 조사 .....	30
다.	Siderophore 생성능 검정 .....	30
라.	불용성 인산 가용능 .....	31
마.	Indole-3-acetic acid(IAA) 생성능 조사 .....	31
6.	공시균주의 <i>in vivo</i> 및 포장에서의 방제 활성 .....	31
가.	잣빛곰팡이병 방제 활성 .....	31
나.	탄저병 방제 활성 .....	33
다.	오이 흰가루병 방제 활성 .....	33
라.	고추 역병 방제 활성 .....	34
7.	공시균주의 배양적 특성 조사 .....	34
가.	배양조건에 따른 항균 활성의 변화 .....	34
나.	탄소원·질소원에 따른 균 생육과 항균활성의 변화 .....	35

8. UV mutagenesis를 통한 균주 개량 .....	36
가. UV mutagenesis를 위한 조건 확립 .....	36
나. 1차 mutagenesis에 의한 균주 개량 .....	36
다. 원균주와 변이주의 항균활성 비교 .....	37
9. 항균활성물질의 규명 .....	37
가. 항균활성물질의 안정성 조사 .....	37
나. 항균활성물질의 분리 및 정제 .....	37
다. 항균활성물질의 화학구조 규명 .....	38
10. 항균활성물질의 최소저해농도(MIC) 조사 .....	39
제 2 절 연구 결과 및 고찰 .....	40
1. 탄저병, 흰가루병 등 다범성 항진균활성을 지닌 <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 .....	40
가. <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005의 발굴 및 연구 배경 .....	40
나. <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005의 동정 및 특성 분석 .....	41
다. <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 균주의 항균 스펙트럼 .....	41
라. <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 균주의 <i>in vivo</i> 생물 활성 .....	41
마. <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 균주가 생산하는 항균활성물질 .....	46
바. <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 균주 배양액의 약해, 독성 및 안전성 시험 .....	54
사. <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 균주의 산업화 scale 배양 조건 확립 .....	56
아. <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 균주 배양액의 제제화 및 제형화 .....	61
자. <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 균주의 공장시스템에서의 산업화 배양 .....	63
차. Pilot plant 생산 배양액의 유해 중금속, 약해 및 안전성 검정 .....	65
카. 친환경농자재로의 등록 .....	67
2. 항균활성물질 기반 잣빛곰팡이병 방제용 <i>Streptomyces</i> sp. BS062 .....	70
가. <i>Streptomyces</i> sp. BS062의 발굴 및 연구 배경 .....	70
나. <i>Streptomyces</i> sp. BS062균주의 동정 .....	70
다. <i>Streptomyces</i> sp. BS062의 항균 스펙트럼 .....	72
라. <i>Streptomyces</i> sp. BS062균의 잣빛곰팡이병 방제효과 .....	73
마. <i>Streptomyces</i> sp. BS062균의 항균 특성 규명 .....	76
바. <i>Streptomyces</i> sp. BS062균이 생산하는 항균활성물질 .....	77
사. <i>Streptomyces</i> sp. BS062균의 배양조건 검토 .....	85
아. <i>Streptomyces</i> sp. BS062균의 UV-mutagenesis를 통한 균주개량 .....	86
자. 개량균주 M17 및 MM14의 방제 효과 및 방제 스펙트럼 .....	91



3. 항균활성물질 기반 잿빛곰팡이병 방제용 <i>Streptomyces</i> sp. A0375 .....	99
가. 길항 방선균 <i>Streptomyces</i> sp. A0375 균주의 선발 .....	99
나. <i>Streptomyces</i> sp. A0375 균주의 생물활성 .....	99
다. <i>Streptomyces</i> sp. A0375 균주의 동정 .....	101
라. <i>Streptomyces</i> sp. A0375 균주의 잿빛곰팡이병 방제 효과 .....	102
마. <i>Streptomyces</i> sp. A0375 균주의 배양조건 검토 .....	104
바. <i>Streptomyces</i> sp. A0375 균주가 생산하는 항균활성물질 .....	109
사. <i>Streptomyces</i> sp. A0375가 생산하는 항균활성물질 75-Y1의 최소저해농도 .....	114
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	116
제 1 절 목표 달성도 .....	116
제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 .....	120
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	121
제 1 절 실용화·산업화 계획 .....	121
제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 .....	121
제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 .....	121
제 4 절 추가연구, 타 연구에의 활용 계획 .....	125
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	126
제 7 장 연구시설·장비 현황 .....	127
제 8 장 참고문헌 .....	128

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

최근 환경오염과 농산물의 안전성에 대한 소비자들의 인식이 변화되면서 먹거리에 대한 관심이 증대되어 유기농산물에 대한 수요가 증가하고 있으며, 안전한 농산물에 대한 소비자들의 관심은 웰빙(Well-Being)을 넘어 로하스(LOHAS, Life of Health and sustainability)라는 새로운 문화를 형성하고 있다. 또한, 국가 간 자유로운 교역(FTA)의 확대에 의한 농산물 공급자간의 치열한 글로벌 경쟁이 가속화되고 있는 실정이다. 최근 우리나라는 채소, 과일 및 화훼 등의 시설재배 면적이 증가하고 있으며, 대부분 소규모의 영세농으로 단기에 높은 가격 형성을 목표로 한 생산에 비중을 두고 있다. 그러나 고유가 시대에 겨울철 난방비 지출 제한으로 발생하는 시설 내 환기불량에 의한 다습조건, 기상이변으로 인한 일조량 부족에서 오는 작물의 생육 불량과 더불어 많은 병해가 발생되어 수량과 품질저하를 가져오고 있다. 이와 같이 식물에 발생한 병해는 작물에 피해를 가하여 세계적으로 약 200조원에 달할 만큼 경제적으로 엄청난 손실을 주고 있으며, 주요 병해로는 잣빛곰팡이병, 흰가루병, 역병, 시들음병 등이 보고되어 있다. 이를 방지하기 위하여 현재까지는 유기합성 농약을 기초로 한 화학방제 시스템이 주가 되어 왔으나 농약의 오남용, 독성, 환경오염 및 자연생태계에 미치는 악영향과 약제내성의 출현 등에 의한 약효감소 등의 부작용이 증가하고 있는 실정이다. 따라서 OECD에서는 합성농약 원제생산량을 2013년까지 2004년 기준으로 40% 축소할 것을 권고하고 있다. 우리나라도 친환경 농산물의 경쟁력을 확보하기 위하여 ‘친환경농업육성책’을 통해 2010년까지 친환경 농산물 생산비중을 10%까지 확대하고, 화학농약과 화학비료의 사용량을 2013년까지 2005년 대비 30%로 감축하여 농약 사용량을 OECD 권고안 이하로 줄이려는 정책을 수립하고 있다. 따라서 새로운 환경 친화적인 농자재의 개발이 절실히 요구되고 있는 추세이다.<sup>1,2</sup>

현재 농촌에서는 단위면적당 소득이 높은 시설재배를 이용한 채소 및 과일의 재배 면적이 점차 증가하고 있으나 많은 비닐하우스에서 잣빛곰팡이병 및 흰가루병이 심하게 발생하여 큰 경제적 손실을 일으키고 있다. 이 잣빛곰팡이병은 온도가 낮고 습도가 높을 때에 *Botrytis cinerea*에 의해 발생하는 병이다. 잣빛곰팡이병은 기주범위가 광대하여 딸기, 토마토, 오이 등 채소류와 사과, 포도 등에 주요 병해 중의 하나로 알려져 있다.<sup>3-5</sup> 이병은 온도가 비교적 낮고, 높은 습도가 유지될 때 발생하며, 죽은 식물체나 노쇠한 부위로부터 발병되기 시작하여 일단 발병되고 나면 병원균의 발병온도가 아니더라도 병 진전은 계속된다. 병에 감염되면 잎은 가장자리로부터 진한 녹색으로 물러 괴사하는 점무늬가 생기고 차츰 커져서 그 부분이 갈색으로 마르게 되며, 잎자루나 꽃자루부위는 구근에 가까운 부분에 발생하여 물러지다가 갈색으로 변하며 오목하게 마르거나 잘록해지는 증상을 보이게 된다. 또한 수확된 과실을 보관하는 저온창고에서도 쉽게 발생하고 *Penicillium*병과 함께 저장과실에 심각한 손실을 끼치고 있다.<sup>6-8</sup> 잣빛곰팡이병의 방제는 저항성 품종을 이용하거나 재배환경 조절 및 병든 식물 제거에 의한 경종적 방제, 살균제를 이용한 화학적 방제 등이 이루어지고 있다. 그러나 저항성 품종과 경종적 방제는 거의 효과를 거두지 못하고 있는 실정이기 때문에 잣빛곰팡이병 방제는 주로 화학적 방제에 의존하고 있다. 잣빛곰팡이병 방제용 살균제는 프로시미돈, 이프로디온, 베노밀 등이 사용되고 있으나 이들 약제에 대해 저항성이 나타나기 시작하였고 방제효과가 크게 저하되고 있는 실정이다.<sup>9-12</sup> 흰가루병은 시설재배 및 노지재배에서 가장 많이 발생하는 병으로 시설 내 난

방시설을 갖추면서 건조한 환경과 낮은 습도 유지로 인하여 그 발병이 증가하는 추세이다. 화학약제로는 스테롤 생합성 저해제, 베타 튜블린 결합 억제제, 미토콘드리아의 전자전달계 중 시토크롬에서 전자전달 억제제 등이 방제를 위하여 사용되어왔다. 하지만, 이 같은 살균제의 계속적인 사용은 약제저항성을 가져와 흰가루병에 대한 방제효과가 저하되어 어려움을 겪게 되었고, 화학농약의 지속적인 사용 및 남용으로 인해 인체에 대해 직접적인 독성 및 독성의 잔류 등의 문제에 봉착하게 됨에 따라 새로운 환경 친화적인 살균제의 개발이 절실히 요구되고 있다.<sup>13</sup> 고추는 우리나라의 식생활에 매우 중요한 작물이며, 생산면적에서도 전체 채소 재배면적의 22.5%를 차지하여 가장 많이 재배되고 있는 양념 채소작물이다. 소비에 있어서도 국민 1인당 소비량이 매년 7.1%씩 증가하는 고소득 작물이다. 그러나 고추는 연작에 의하여 토양 내에 높은 전염원이 조성되고, 여름철 장마에 쉽게 감염되어 고추병해의 피해가 늘어가고 있다. 특히 고추탄저병은 고추역병과 더불어 고추의 최대 병해중의 하나로 잎, 줄기, 과실 등에 발병하며 매년 10% 이상이 수확시기에 감염되어 수량감소의 직접적인 원인이 되고 있다. 고추탄저병은 *Colletotrichum* 속의 식물병원성 균류에 의하여 야기되며, 열매탄저병과 유묘탄저병이 있다. 열매탄저병은 열매에만 병을 일으키며 탄저병 피해 중 95% 이상을 차지하고, 유묘탄저병은 초기에는 수침상의 반점이 커지면서 원형의 갈색 반점을 형성하며 줄기에 발생하면 병환부가 구부러지며, 심한 경우는 잎이 낙엽지기도 한다. 유묘탄저병에는 *C. coccodes*가 관여하며, 열매탄저병에는 *C. acutatum* 또는 *C. gloeosporioides*가 관여하여 청과 및 적과 등의 열매에 탄저병을 유발한다. 이러한 고추탄저병의 방제방법으로는 일반적으로 이미다졸계 및 트리아졸계 화학농약을 이용하여 방제를 시도하고 있지만, 쉽게 방제가 되지 않으며, 화학농약 사용에 의한 환경오염이 심각한 문제를 야기하고 있다. 최근 탄저병 방제를 위하여 친환경 바이오농약의 개발에 관심이 증폭되고 있고, 그에 따라 수종의 바이오농약이 개발되었으나 불분명한 활성성분 및 낮은 방제역가 등으로 널리 활용되지 못하고 있는 실정이다.

한편, 바이오농약(biopesticides)은 자연환경으로부터 유래한 동물, 식물, 미생물 또는 그것들로부터 유래된 물질을 인위적인 합성 및 조작을 거치지 않고 농업용으로 이용할 수 있도록 제품화 한 것을 말한다. 바이오농약은 미생물농약(microbial biopesticide) 및 생화학농약(biochemical biopesticide) 등으로 구분되며, 생화학농약은 작물보호 활성을 가지면서 거의 독성이 없는 식물, 미생물, 동물 및 조류(algae) 등으로부터 얻어진 페로몬, 호르몬, 천연식물 조정제 및 효소 등을 이용한 생물 농약을 말한다.<sup>2</sup> 현재는 세균, 곰팡이, 바이러스 등의 미생물로부터 생산된 항균물질을 이용하여 병원균에 대한 길항성, 병원균과의 양분 및 공간경쟁, 효소 작용, 물리적 장벽, 면역력을 높여 병에 대한 저항성 유도, 인산가용화, 질소고정, 식물생장 촉진 호르몬(auxin, cytokinin, gibberelin, IAA)의 생산, 에틸렌 조절등의 작용기작 연구를 통하여 개발된 미생물 농약이 주로 이용되고 있다. 이런 미생물 농약은 병해충의 발병 시기에 예방적으로 사용하면 더욱 효과적이며, 농약의 약효가 지속적으로 유지되는 특징을 가지고 있다. 또한, 토양이나 작물에 잔류하지 않고, 병해충에 선택적으로 작용하여 주변 유용생물에 영향을 미치지 않으며, 화학잔류물질이 거의 없어 생태계에 영향을 미치지 않는 것으로 다양한 연구를 통하여 증명되고 있다. 이와 같은 특징을 가지는 미생물 농약은 친환경 농업 생산과 차별화된 고품질의 안전한 농산물 생산의 기초가 된다.<sup>2,14,15</sup> 미생물을 이용한 생물학적 방제에 관한 연구는 1900년대 초부터 세균과 곰팡이를 이용하여 식물병원균을 억제하려는 연구가 이루어져 왔다. 미생물을 이용하여 식물병원성을 방제하는 생물방제 기작은 크게 5가지로 구분되는데, 식

물병원성 진균의 세포벽을 분해하는 용균작용, *Bacillus* 속,<sup>15,16</sup> *Penicillium* 속,<sup>17</sup> *Pseudomonas* 속,<sup>18</sup> *Streptomyces* 속<sup>19,20</sup> 등이 생산하는 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해하는 항생작용, 식물병원균에 기생하면서 식물에 대한 진균의 병원성을 억제하는 기생작용,<sup>21</sup> 생육공간에서 영양분과 같은 생육에 필요한 인자를 경쟁함으로써 병원균의 생육 및 증식을 억제하는 경쟁적 길항작용,<sup>22-25</sup> 그리고 미생물이 생산하는 exopolysaccharide (EPS), lipopolysaccharide (LPS), salicylic acid (SA), hydrogen cyanide (HCN), 2,3-butanediol 등의 물질들에 의해서 식물의 면역기능을 활성화하여 병에 대한 저항성을 유도하는 유도저항성 작용<sup>26-28</sup> 등을 들 수 있다. 또한 미생물에 의한 식물생장 촉진 기작으로는 인산가용화, 질소고정, 식물생장 촉진 호르몬(auxin, cytokinin, gibberelin, IAA)의 생산, 에틸렌 조절 등이 알려져 있다. 잣빛곰팡이병에 대한 바이오농약으로 사용되는 미생물로는 *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. 등의 세균류<sup>29-31</sup>와 *Streptomyces* sp. 등의 방선균<sup>32,33</sup> 그리고 *Gliocladium virens*, *Trichoderma* spp. 등의 곰팡이<sup>34,35</sup> 등이 있으며, 이들을 특성에 따라 분류해 보면 항균물질, 휘발성 물질 또는 독소와 같은 저해물질을 생성하는 미생물을 이용하는 방제와 *Trichoderma* 속, *Gliocladium* 속과 같이 잣빛곰팡이병균에 기생하는 중복기생균(hyperparasite)을 이용하는 방제가 있다. 기생 또는 포식 작용에 의한 길항 작용은 최근 들어 활발하게 연구되고 있는데 길항균들이 분비하는 진균의 세포벽 분해 효소인 chitinase, glucanase, cellulase 등에 의한 병원균의 용해작용이 주된 작용기작으로 알려져 있다. 또한 근권미생물 처리 시 유도 저항성 및 생육 촉진 효과에 의한 면역력 증가로 병을 방제하는 연구가 보고되어 있다.

바이오농약을 이용하여 잣빛곰팡이병을 방제하고자하는 노력은 천연물, 미생물 등을 이용한 방법들이 제시되었으며 최근 세계적으로 10종 이상의 미생물제제가 상품화되었는데 특히 바실러스속(*Bacillus* sp.), 트라이코더마속 (*Trichoderma* sp.), 이스트(yeast) 등을 활용한 미생물농약들이 세계적으로 개발되어 등록되고 있다.<sup>36-40</sup> 외국 의 경우 슈도모나스 시린지(*Pseudomonas syringae*)를 제제화한 상품명 바이오-세이브 텐(Bio-save 10)을 실용화 하여 사용 중이며, 일본의 경우 바실러스 속의 균(*Bacillus* sp.)을 2003년에 잣빛곰팡이병과 흰가루병 방제제로 상품화하였다.<sup>41,42</sup> 국내에서는 1970년대 초반부터 인삼뿌리썩음병의 생물학적 방제 연구를 시작으로 잣빛곰팡이 병의 생물학적 방제에 관한 연구가 계속 수행되어 왔으며, 최근 잣빛곰팡이병균의 균사생장 및 포자발아를 억제 하는 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) N1 균주를 이용한 잣빛곰팡이병 방제에 관한 연구가 보고되었다.<sup>43</sup> 또한, 방선균인 스트렙토마이세스 파다누스(*Streptomyces padanus*), 스트렙토마이세스 야텐시스(*Streptomyces yatensis*)을 이용한 연구들이 진행 중에 있다.<sup>44</sup> 그러나 이러한 연구들은 실험실 내에서의 항균 활성에 국한되어 있으며 실제 포장에서나 대상 작물에서의 방제 효과 등이 미흡한 실정이다. 이처럼 많은 연구 사례에도 불구하고 효과가 우수하고 저렴하며 안전한 잣빛곰팡이병 방제용 생물 농약은 아직까지 정착되어있지 않은 실정이다.

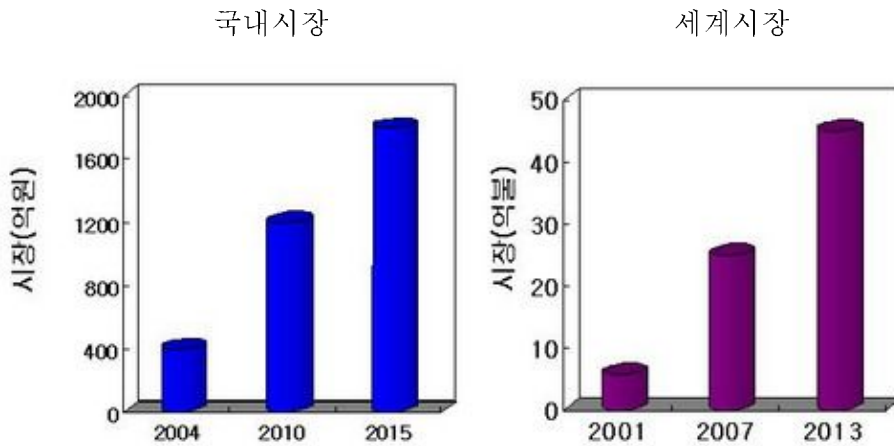
본 연구는 우리나라 작물생산에 큰 피해를 주는 잣빛곰팡이병, 탄저병 등의 방제에 유용한 미생물소재를 탐색한 것이다. 특히 광역 스펙트럼의 미생물 유래 활성성분에 초점을 맞추어 quality control 체계를 갖춘 바이오농약, 활성성분 고생산을 위한 균주개량과 배양조건 확립을 통하여 가격경쟁력을 갖춘 바이오농약을 개발하여 시장에서 난립하고 있는 미생물제제의 단점을 극복할 수 있는 바이오농약 소재의 개발을 목표로 하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내의 기술개발 현황

세계적으로 미생물을 이용한 생물학적 방제에 관한 연구는 1900년대 초부터 세균과 곰팡이를 이용하여 식물병원균을 억제하려는 연구가 대학교, 국가 연구기관 및 기업체 등에서 수행되어 왔다. 우리나라의 경우 미생물농약과 생화학농약에 대한 연구는 1980년대에 태동하여 1987년에는 인삼 뿌리썩음병 방제용 바이코나의 개발을 시작으로 지금까지 몇 가지 미생물농약이 개발되어 왔으나 본격적인 생물농약 연구개발은 1990년대 후반부터 이루어졌다. 아직까지 바이오농약 개발 분야에 대한 연구는 성장 초기 단계로서 대부분의 기술들은 한국화학연구원, (주)동부하이텍, (주)경농, (주)그린바이오텍, (주)효살림, (주)비아이지 등의 연구기관과 중소기업 또는 벤처기업을 중심으로 선진국 대비 70%정도 갖추고 있는 실정이나, 대량 발효 공정 기술 및 제제/제형화 기술 등은 선진국 수준에 비하여 크게 부족한 실정이다. 국내에서는 *Bacillus* 속을 이용한 오이 흰가루병방제용 탐시드엑상수화제(*Bacillus polymixa* AC-1, (주)그린바이오텍)와 배추좁나방 방제를 위한 솔빛채액 상수화제(*Bacillus thuringiensis*, 그린바이오텍) 등이 최초의 미생물농약으로 등록되었다. 또한 (주)동부하이텍은 국내 최초로 농작물의 흰가루병, 잘록병, 고추병에 효과가 있는 살균제 “AC-1”과 “바이오박”을 개발하였고, ‘엑스텐’제품을 출시하였으며, (주)경농은 솔잎혹파리 방제용 곰팡이(백강균)를 바이오농약으로 실용화하였고, 또한 최근 항바이러스 제품의 개발에 성공하여 출시를 앞두고 있다. 그 외에도 국내 바이오벤처기업에서 환경친화적 바이오농약 개발이 활발히 진행되고 있으며 선두주자로는 (주)그린바이오텍에서 수종의 미생물 제제를, (주)고려바이오에서는 식물추출물 제제를 바이오농약으로 출시하고 있음. 2010년 12월까지 29종의 미생물농약과 2종의 생화학농약을 포함하여 31종의 생물농약이 등록 시판되고 있으며, 나비목해충을 죽이는 세균인 바실러스 썬린젠시스(*Bacillus thuringiensis*)를 이용한 비티(BT) 제품이 생물농약으로 가장 널리 알려져 있다.<sup>45,46</sup> 내에서 등록된 중요한 바이오농약에는 Bt제와 더불어 미생물에서 유래한 살균제로 polyoxin, streptomycin, oxytetracyclin, blasticidin-S, validamycin, kasugamycin이, 미생물에서 유래한 살충제로 spinosad와 avermectin, 식물에서 유래한 식물생장조절제에는 CA(gibberellic acid), IAA(indole-3-acetic acid), IBA, 6-BA 등이 있으나 국내에서 사용하는 전체 농약에서 바이오농약이 차지하는 비중은 매우 낮다. 미생물농약으로 살균제 5종과 살충제 14종 등 총 19개 품목이 등록되어 시판되고 있으나, 이중 12종의 살충제는 수입 제품이며, 생화학농약의 경우 2005년에 등록 규정이 마련되었음에도 불구하고 현재까지 등록된 생화학농약은 없는 실정이다. 살충, 살균 효과가 있다고 알려져 있는 친환경농자재는 1,000여종을 상회하나 기술력 부족 등으로 체계화된 개발과정 없이 퇴비 생산 업체를 포함 200여개가 넘는 업체에서 제품들이 출시되어 유통되고 있다. 따라서 생물학적인 효능이 불명확하여 많은 불신을 야기하고 있다. 현재 국내에서 판매되고 있는 제품들은 품목당 매출액이 수천만원에서 3억원 내외 정도이나, 시장의 팽창과 우수한 바이오농약의 등록이 활발하게 진행된다면 시장성은 충분하며 스타 제품의 출현으로 품목당 수십억원대 이상의 제품 및 수출품목등이 등장할 것으로 예측되고 있다. 정부의 체계적인 지원 하에 산·학·연이 상호 협력하는 종합적인 연구를 진행할 경우 국내 바이오농

약개발 기술이 선진국 수준으로 발전하고 또한 수출 가능한 고부가가치 바이오농약 제품이 개발되어 급성장하고 있는 세계 바이오농약 시장에 국내 제품이 진입할 수 있을 것이다.



<바이오농약의 국내시장 및 세계시장 전망>

<국내 바이오농약관련 주요연구기관>

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
한국생명공학연구원	살균제, 살충제 및 제초제, PGPR	살균제, 솔잎혹파리방제기술 등.
국립농업과학원	살충제, 살균제 및 토양병해 방제 연구	특허 및 기술이전
한국화학연구원	살균제, 제초제 등	특허 및 기술이전
서울대학교	식물병원균 방제제 개발 토양병 및 선충방제	병 예찰모델개발
경상대학교	식물병 방제제 등	토리 등
(주)동부하이텍	살충제, 제초제, 살균제 등	비스트리플루론, 메타미포프, 토박이, 엑스텐, 세레모니 등.
(주)고려바이오	살충제	응삼이, 응칠이, 킴캣
(주)비아이지	살충제	선초 등
(주)흙살림	토양개량	미생물제
(주)그린바이오텍	살충제, 살균제, 토양개량 등	탐시드, 쉐러스, 큐펙트, 솔빛체, 강토

### <국내 미생물농약 개발현황>

구 분	이용미생물	방제대상 병해	실용화 현황
세 균	<i>Bacillus polymyxa</i> AC-1	고추역병 등	뉴훤나리
	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i> EXTN-1	오이탄저병 등	산청배추
	<i>Bacillus subtilis</i>	감귤저장병	바이코나
	<i>Bacillus</i> sp.	배추무사귀병	만석균
	<i>Bacillus</i> 등 5종 미생물	인삼뿌리썩음병	
	<i>Pseudomonas cepacia</i> PC-2	참깨잘록병	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	양파저장병	
곰팡이	<i>Ampelomyces quisqualis</i> AQ94013	오이흰가루병	그린올QA 등
	<i>Fusarium oxysporum</i>	외류덩굴썩김병	
	<i>Trichoderma</i> sp.	토마토젓빛곰팡이병	

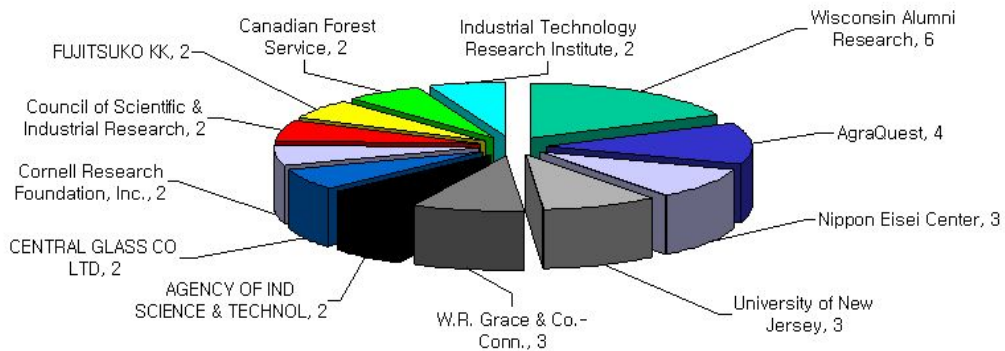
## 제 2 절 국외의 기술 개발 현황

세계 바이오농약의 시장은 성장 초기단계로서 세계적으로 친환경정책 및 안전한 농산물에 대한 관심이 증가함에 따라 폭발적으로 시장이 성장하리라 기대되며, Santander Investment에 의하면 매년 약 20% 씩 성장할 것으로 추정하고 있다. 대기업보다는 주로 벤처나 중소기업들이 시장을 선도하고 있으며, 연간 500억원 이상 매출의 비교적 큰 규모의 회사로는 Valent BioSciences, Certis USA, Koppert 등이 있으며, 규모는 작으나 성공적인 회사로 평가받고 있는 AgraQuest 및 BioWorks 등이 있다. 또한 독자적이며 혁신적인 기술을 확보하고 있는 Pasteuria BioSciences, Exosect 등이 주목을 받고 있다. 선진국에서는 친환경농업정책의 일환으로 정부로부터 정책적 후원을 받으면서, 독자적으로 미생물과 천연물을 선발하거나 대학 및 연구소로부터 아웃소싱을 통하여 우수한 후보물질을 확보하여 생화학농약 등으로 개발하고 있는 추세이다. 외국의 제품개발 성공사례를 보면 미국의 Harpin(미생물 추출 단백질, Eden bioscience사, 2001년), Serenade(바실러스 미생물, Agraquest사, 2003년) 그리고 네덜란드의 Triatum (곰팡이미생물, Koppert사) 등이 대표적 star 바이오농약 제품으로 개발되었다. 이들 중 Serenade는 License를 통하여 다국적기업인 BASF를 통하여 전 세계 25개국에서 판매 중이며 매출도 급증하고 있다.<sup>47,48</sup> 1965년 방선균의 일종인 *Streptomyces kasugaensis*로부터 분리된 항생제 kasugamycin은 벼 도열병 전문 방제제인 생화학농약으로 개발되었으며, 인축 및 어독성이 매우 낮아 개발된 이래 지금까지 사용 중에 있다. 또한, blasticidin-S(*S. griseochromogenes*, 1959년) 벼도열병 약제로 현재까지 쓰이고 있으며 항암 및 항바이러스 효과도 보고 된 바 있다. 그리고 병원균의 세포벽 키틴질 합성을 저해하는 것으로 알려진 polyoxin는 *S. cacaoi* var. *asoensis*로부터 분리된 물질로 다양한 식물병원균에 억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 그 외 validamycin, mildiomicin, natamycin, oxytetracyclin 및 streptomycin 등의 미생물 기원 천연물질들이 개발되어 식물병 방제용으로 사용되거나 개발 중에 있다.<sup>49</sup> 미국의 경우 EPA에 76개의 미생물농약과 113개의 생화학농약(biochemical pesticides)이 등록되어 있고 유럽의 경우 미생물농약이 112개가 등록되어 시판되고 있으며, 천연물농약은 58개가 등록되어 있다. 또한 반합성화합물(semi-chemicals) 농약이 56개가 등록되

어 있다. 미국의 경우 천적이 생물농약에 포함되어 있지 않으며, 선진 3개국(미국, 영국, 일본)의 생물농약 중에서 미생물농약과 생화학농약의 비율은 각각 46%와 36%로서 전체의 82%를 차지하고 있다. Global Industry Analysis Inc.의 2006년 Biopesticides 보고서에 의하면 세계 화학농약 시장은 점차적으로 감소할 것으로 예상한 반면, 바이오농약 시장은 계속적으로 성장할 것으로 예측한 바 있다.

<국외 바이오농약 관련 주요 연구기관>

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Valent BioSciences	PGPR, 살충제, 선충방제제	MaxCel, Promalin, Dipel, Xentari, DiTera 등.
Certis USA	미생물 살균제	SoilGard 12G 등.
AgarQuest	미생물 살균제	Serenade, Sonata
BioWorks	식물생장촉진제 및 살균제	T-22 Planter Box, T-22 HC 등
Pasteuria BioSciences	선충 방제제	Pasteuria penetrans
Exosect	살충제	Exosex, Exolure 등.



<해외 바이오농약 특허보유현황 (한국특허정보원, 2006)>

자연환경에 다양한 형태로 존재하며 생물농약으로 유용한 미생물은 식물과 공생 혹은 영양적 종속관계에 있는 경우가 대부분으로 미생물은 항생물질생산, 효소생산, 식물생장 촉진, 유도저항성 등 많은 새로운 유용 기능들이 밝혀지고 있다. 미생물을 이용한 바이오농약은 생태계에 미치는 영향이 거의 없으며 화학농약과는 반대로 계속 사용하더라도 약효가 감소하지 않고 기존 화학농약개발비의 1/10 수준의 적은비용으로 개발이 가능하다. 특히 생물 농약은 환경오염이 심각한 지금 환경 친화적이고 토양이나 작물에 축적되지 않고 수확기까지 사용할 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서 미생물은 생물농약뿐만 아니라 미생물을 이용한 신물질, 신 농약개발 등 새로운 부가가치산업의 원동력이 될 수 있다. 따라서 국내외적으로 친환경 바이오농약 소재 및 새로운 기능성 미생물을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있는 추세이다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 재료 및 방법

#### 1. 미생물의 분리 및 배양

본 연구에서 사용한 방선균은 토양으로부터 임의로 분리한 것으로, 채취한 토양 시료는 60°C에서 3시간 건조 후 멸균 증류수로 희석한 후 200  $\mu$ l를 취하여 방선균 분리용 배지(Difco™ Actinomycete Isolation Agar)에 도말하고 28°C의 배양기에 배양하면서 전형적인 방선균의 균총을 형성하는 균을 분리하였다. 분리 방선균은 백금이를 이용하여 modified bennett's agar(MBA) 평판배지에 도말한 후 27°C에서 5일간 배양하였다. 분리된 방선균의 생물활성을 조사하기 위하여 방선균 콜로니를 GSS(glucose 20 g, soluble starch 10 g, meat extract 1 g, yeast extract 4 g, sodium chloride 2 g, dipotassium hydrogen phosphate 0.05 g, soybean flour 25 g/L, pH 7) 배지에 접종한 후 27°C에서 7일간 배양한 다음 8000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체와 배양여액으로 나눈 후 생물활성 검정에 사용하였다.

#### 2. 시약 및 기기

활성물질을 분리하기 위하여 사용한 각종 수지 및 유기용매는 다음과 같다. 각 정제 과정 및 column chromatography에서 사용된 hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol 등의 용매는 대정화금(Korea) 제품을 사용하였고, HPLC 용매는 Baxter(Burdick & Jackson, USA) 제품을 사용하였다. 물질 분리 정제를 위하여 순상 TLC(Merck, Kieselgel 60F, 70~2230 mesh, USA) 및 역상 TLC (Merck, RP-18, F<sub>254</sub>, USA) plate, silica gel(Merck, 70~230 mesh), Sephadex LH-20(Pharmacia, bead size 25-100  $\mu$ m, Sweden), ODS sep-pak cartridge(Alltech, RP-18, USA) 등을 사용하였다. HPLC(high performance liquid chromatography)는 분취용으로 Hitachi사(Hitachi L-2400 UV detector, L-2130 HPLC pump, D-2000 Elite)와 분석용으로 Hitachi사(Hitachi L-2455 diode array detector, L-2130 HPLC pump, EZchrom elite data system)의 기기를 사용하였다. HPLC column은 분석용  $\phi$  4.6  $\times$  150 mm와 분취용  $\phi$  20  $\times$  150 mm(Cosmosil, RP-18, Japan)를 사용하였다. 또한 시료를 농축하기 위한 감압농축기는 Butch사(Vacuum pump V-700, Heating bath B-491, Sibata coolmanpan C-320) 제품을 사용하였다.

#### 3. 분석기기

##### 가. 자외선 스펙트럼(UV spectrum)

UV/Vis spectrum은 UVIKON spectrophotometer 930 (Kontron instruments)에 의해 측정되었고 최대 흡광 피크에 대한 몰흡광계수(log  $\epsilon$ )를 Beer-Lambert 법칙에 의해 산출하였다.

##### 나. 질량분석 스펙트럼(mass spectrum)

ESI-mass는 AppliedBiosystems(USA)사의 QTRAP-3200 mass spectrometer를 사용하여

측정하였고, high resolution ESI-mass 측정은 ABI Mariner mass spectrometer(Perseptive Biosystem, USA), FAB(Fast atom bombardment)-mass 측정은 JEOL JMS-HX 110A/HX 110A spectrometer를 사용하여 측정하였다. Mass 측정시 matrix로는 glycerol 혹은 *m*-nitrobenzyl alcohol을 사용하였다.

#### 다. 핵자기공명 스펙트럼(NMR spectrum)

핵자기공명 스펙트럼은 JEOL사(Japan)의 JNM-ECA600 600MHz FT-NMR spectrometer를 사용하여 측정하였으며, 내부표준물질로는 TMS (tetramethylsilane)를 사용하였다. 용매는 CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, DMSO-*d*<sub>6</sub> 혹은 이들 용매의 혼합용매를 사용하였으며 chemical shift는 ppm ( $\delta$ )으로 나타내었다. NMR spectrum은 <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, DEPT 등의 1차원 NMR spectrum을 비롯하여 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC 등의 2차원 NMR spectrum을 측정하였다.

### 4. 공시 미생물의 동정

#### 가. DNA 분리 및 PCR 증폭

DNA를 추출하기 위해 공시미생물을 배양한 후 배양균체를 Eppendorf tube에 넣고 100  $\mu$ l의 STES buffer[200 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl(pH 7.6), 10 mM EDTA, 1% SDS]와 0.1 mm 유리구슬(TOMY, Seiko, Japan)을 첨가한 후 5분간 vortexing한 다음, phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1)로 추출하고 원심분리하여 얻은 상등액에 3 M sodium acetate와 냉각시킨 95% ethanol(0.1:2, v/v)를 첨가하여 침전시켜 DNA를 얻었다. TE buffer[10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA(pH 8.0)]에 DNA를 녹이고 RNase를 첨가한 뒤 정량하여 -20°C에서 보관하면서 사용하였다.

PCR 증폭은 i-cycler(BIO-RAD, USA)을 이용하여 10 pmol의 p-gyrA-f 와 p-gyrA-r primer,<sup>50</sup> 250 M dNTP, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2U의 Taq-(NA polymerase (Bioneer, Korea)) 및 100 ng의 template DNA를 첨가하여 최종 volume 을 5 ml로 조정하였다. DNA증폭은 initia denaturation을 94°C에서 3분간 실시하고 denaturation 40초(94°C), annealing 40초(55°C), extension 1분(72°C)으로 30 cycle을 실시한 뒤 마지막으로 72°C에서 15분간 실시하였다.

#### 나. 염기서열 분석 및 계통 분석

PCR 산물은 Wizard PCR prep kit(Promega, Madison, WI, USA)으로 정제하고, sequencing 반응은 BioDye terminator cycle sequencing kits(Applied Biosystems, Forster City, CA, U.S.A)를 이용, template 40 ng, primer 3.2 pmol 농도가 되도록 물을 첨가하여 20  $\mu$ l로 조절한 뒤 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분으로 25 cycle 의 PCR 반응을 수행하였다. 반응에는 각각의 PCR 반응 하에서 사용한 동일한 primer를 사용하였다. 염기서열 분석은 ABI Prism 310 Genetic analyzer(PE Applied Biosystem)을 이용하였다.

염기서열은 CLUST X<sup>51</sup>와 PHYDT program version 3.0을 이용하여 정렬하였고, Neighbor-joining tree는 PHYLIP 3.57c package를 사용하여 Kimura's 2-parameter distance

model에 의해 작성되었다. Tree의 topology를 조사하기 위하여 1,000반복의 bootstrap 분석을 실시하였다.

## 5. 생물 활성 평가

### 가. 식물병원균에 대한 항균 스펙트럼 조사

식물병원균에 대한 항균 스펙트럼은 대치배양법과 paper disk법에 의하여 조사하였다. 먼저 스크리닝 단계에서의 길항력 검정은 식물병원성 곰팡이와의 대치배양을 통하여 항균활성을 검정하였다. 이때 사용한 식물병원균은 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 고추역병균(*Phytophthora capsici*), 인삼점무늬병균(*Alternaria panax*), 찰록병균(*Rhizoctonia solani*), 시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*)인삼뿌리썩음병균(*Cyrtodrocarpon destructans*), 고추탄저병균(*Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*) 등으로 이들 병원균을 PDA(potato dextrose agar)배지에 접종하고 *B. cinerea*, *R. solani*, *C. destructans*는 20°C, 다른 병원균은 25°C에서 7일간 배양하였다. 병원균의 균사 선단부를 13 mm cork borer를 이용하여 떼어낸 뒤, 병원균과 A0375를 5 cm 간격으로 PDA에 접종하였다. 이들을 배양기에서 병원균의 생장속도에 따라 5~7일간 배양한 뒤 식물병원균의 균사생장억제 여부를 조사하였다.

또한 본 연구에서 공시한 *B. subtilis* GA-2005, *Streptomyces* sp. BS062, *Streptomyces* sp. A0375 균주가 생산하는 활성물질의 항균활성 검정에는 이들 균의 배양여액 및 배양 추출물을 이용하여 paper disk법으로 조사하였다. 식물 병원균은 homogenizer를 이용하여 균질화하고 PDA배지를 첨가하여 중층배지를 제작하였다. 공시 미생물의 배양여액은 syringe filter를 이용하여 균체를 완전히 제거한 후 사용하였으며, 50  $\mu$ l씩 혹은 정량의 무게를 paper disk(8 mm)에 점적하여 풍건한 후 각각의 검정균 plate에 치상하여 배양하면서 형성되는 생육저지환 직경(inhibition zone diameter)를 측정하였다.

### 나. Lytic enzyme 생성능 조사

선발된 균주들의 lytic enzyme 생산을 확인하기 위해 각각의 lytic enzyme 측정용 배지를 사용하였다. 먼저 cellulase 생산능은 Nutrient agar 배지에 1% carboxymethyl-cellulose(CMC)를 함유한 CMC agar 배지를 제조한 후 여기에 각 선발 균주를 멸균한 이쑤시게로 점적 접종하여 2일간 30°C에서 배양한 후 Congo red plate 방법<sup>52</sup>으로 cellulase의 생산을 확인하였다. 또한, 다른 식물병원성 진균 세포성분 분해 효소인 protease의 활성은 표준방법<sup>53</sup>에 의하여 분석하였다.

### 다. Siderophore 생성능 검정

Siderophore 생산균주를 Schwyn과 Neilands의 siderophore 검출 방법인 Chrome Azurol Sulfonate(CAS, Sigma) assay로 선발하였다. 증류수 50 ml에 CAS 60.5 mg을 넣고 천천히 저으면서 72.9 mg의 HDTMA (hexadecyltrimethylammonium bromide)를 증류수 40 ml에 녹인 용액을 첨가시켜 고압 멸균하여 진한 청색염료 용액을 준비한 다음 H<sub>2</sub>O 750 ml, 10× MM9

salt 100 ml, agar 15 g, Pipes 30.24 g, 10% casamino acid 용액 30 ml, carbon source와 vitamin 등을 혼합한 용액(pH 6.8)을 고압 멸균하여 50°C로 식힌 후 준비해 둔 CAS 염료용액을 거품이 나지 않도록 첨가하여 plate에 분주하여 제조한 CAS 평판배지에 배양액 20 µl를 점적하고 30°C에서 2일간 배양한 후 주위에 orange halo zone의 생성을 확인하였다. 또한 탈철화 배지인 King's B 배지에서 배양한 후 형광성 여부를 확인하였다.

#### 라. 불용성 인산 가용능

불용성 인산 가용능은 NBRIP agar plate(glucose 1%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.01%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025%,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5%, KCl 0.02% 및 불용성 인산원으로  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  0.5%, pH 7.0)를 사용한 plate assay method로 확인하였다.<sup>54</sup> 순수 분리된 방선균을 NBRIP agar plate에 희석도말한 후, 27°C에서 일정시간 배양하면서 콜로니 주위에 투명대를 생성하는 것을 불용성 인산 가용능이 있는 것으로 결정하였다. 투명대는 길항균에 의해 불용성 인산이 가용화되었음을 나타내는 지표이다.<sup>55</sup>

#### 마. Indole-3-acetic acid(IAA) 생성능 조사

대표적인 식물생장 호르몬인 indole-3-acetic acid(IAA)의 생성능은 Tang과 Bonner의 방법<sup>56</sup>에 의하여 확인하였다. 순수 분리된 방선균을 King's B medium(proteose peptone No.3 2%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.15%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15%, glycerol 1.5%, pH 7.0)에 접종한 후, 27°C, 140 rpm에서 5일간 배양하였다. 균체를 제거한 배양 상등액을 Salkowsky reagent와 혼합하여 30분간 반응시킨 후, 반응액의 색상이 분홍색으로 전환된 것을 IAA 생성능이 있는 것으로 결정하였다.

### 6. 공시균주의 *in vivo* 및 포장에서의 방제 활성

#### 가. 잿빛곰팡이병 방제 활성

##### 1) 잿빛곰팡이병균 포자현탁액 제조

공시균주의 잿빛곰팡이병 방제 활성을 알아보기 위한 실험에 사용한 병원균은 딸기, 인삼, 오이, 상추, 토마토, 장미 등에 각각 발생한 잿빛곰팡이 포자를 분리하여 2~3번의 계대를 통하여 순수 분리한 것으로 포자현탁액을 15% glycerol 용액에 넣어 4°C냉장고에 보관하면서 사용하였다. 보관중인 병원균은 PDA 평판배지에 계대하여 20°C로 배양하면서 포자 형성을 유도한 후 20% V-8 juice가 첨가된 잿빛곰팡이 포자현탁액을 만들어 병 발생을 위한 접종원으로 사용하였다.

##### 2) *In vivo*에서 잿빛곰팡이병 방제 활성

###### 가) 딸기 잿빛곰팡이병 방제 활성

딸기 유묘에서의 병 발생 및 약해 검정을 위하여 균 배양여액을 분무 살포하고 풍건한 후 동일한 방법으로 병원균을 접종하였다. 딸기 유묘는 성장상(24°C, 90% 상대습도)에서 7일간 배

양하면서 꽃대, 미성숙과 및 성숙과에서의 병 발생 정도 및 약해 여부를 조사하였다. 실험은 3 반복으로 수행하였다.

#### 나) 인삼 잿빛곰팡이병 방제 활성화

인삼 저장 중 발생하는 잿빛곰팡이병 방제 효과 검정을 위해 충청남도 금산에서 판매하는 묘삼을 구매하여 사용하였다. 선발균의 배양여액 희석액에 묘삼을 1분간 침지 처리하여 풍건한 후 4°C 냉장고에 보관하면서 병 발생에 의한 묘삼의 뿌리 썩음 증상을 조사하였다. 실험은 3 반복으로 수행하였으며 3개월 및 6개월 저장 후 조사하였다.

#### 다) 오이 잿빛곰팡이병 방제 활성화

오이 잿빛곰팡이병에 대한 방제 효과를 조사하였으며, 공시균주 배양액을 적정농도로 희석한 후 오이 유묘(백다다기, 본엽 2~3 엽기)의 잎을 일정 크기로 절단, 5분간 침지 후 3~4시간 자연 건조하여 접종시험에 사용하였다. 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*) 접종은 균총접종법(치료효과 검정)과 포자접종법(예방효과 검정)으로 나누어 실시하였다. 균총접종법은 잿빛곰팡이병균을 PDA배지에서 5일 배양 후 균총 끝부분을 떼어(8 mm) 오이 잎에 접종하였고, 포자접종법은 포자현탁액( $5 \times 10^5$  spores/ml)을 20  $\mu$ l씩 점적 접종하였다.

#### 라) 상추 잿빛곰팡이병 방제 활성화

상추 잿빛곰팡이병에 대한 방제 효과는 공시균주 배양액을 적정농도로 희석하여 상추(청치마 품종)에 분무살포한 후 주(포기)당 5잎씩 20주의 이병엽을 조사하였다.

#### 마) 토마토 잎곰팡이병

공시균주 배양여액의 토마토 잎곰팡이병에 대한 방제효과를 알아보기 위해 토마토(리피토 품종: 일반토마토)에 공시균 배양여액 100, 200배 희석액을 각각 살포한 후 주(포기)당 5잎씩 20주의 발병율을 조사하였다.

#### 바) 장미 잿빛곰팡이병

공시균주 배양여액의 장미 잿빛곰팡이병에 대한 방제효과를 알아보기 위해 장미(슈프레드 품종) 꽃잎에 공시균 배양여액의 적정농도를 살포한 후 24시간 경과 후에 잿빛곰팡이병균인 *Botrytis cinerea* 분생포자 현탁액  $5 \times 10^5$ /ml을 분무접종하고 24시간 습실에 둔 후 꺼내어 실온에 두고 4일 후에 발병상태(이병꽃잎율)를 조사하였다.

### 3) 포장에서의 잿빛곰팡이병 방제 효과

공시 세균을 위한 딸기 잿빛곰팡이병 포장 방제 시험은 충남 논산 딸기시험장의 시험포에서 실시하였으며 공시 균주의 배양액을 300배, 500배로 희석하여 발병 초 5일 간격으로 4회 살

포한 후 5일 후에 잿빛곰팡이병의 이병과율을 조사하였다. 처리구당 150-200개의 열매를 3반복으로 조사하였다. 대조약제로 시판중인 미생물제 “에코스마트”를 공시하여 비교하였다. 치료효과를 조사하기 위해서는 건전주의 꽃과 어린 열매에 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 포자 현탁액( $1 \times 10^5$  spores/ml)을 접종하여 감염시킨 후 (24시간 후)에 공시균주 배양액을 살포하고 5일 후에 이병과율을 조사하였다.

공시 방선균을 위한 딸기 잿빛곰팡이병 또한 충남 논산 딸기시험장의 시험포에서 실시하였으며 잿빛곰팡이병이 많이 발생하는 설향 품종을 이용하여 3반복으로 실시하였다. 공시균주 배양여액을 적정농도로 희석한 희석액 및 대조약제 희석액을 사용하였으며, 작물에 1주일 간격으로 3회 살포하였다. 최종 살포 7일 경과 후 병 발생정도를 조사하였고 방제 효과는 발병과율을 조사한 후 방제가를 산출하였다.

$$\text{발병율 (\%)} = (\text{처리구의 이병과수} / \text{처리구의 총과수}) \times 100$$

$$\text{방제가 (\%)} = [(A-B) / B] \times 100$$

<A: 처리구의 발병율, B: 무처리구의 발병율>

#### 나. 탄저병 방제 활성화

##### 1) 공시균주의 고추 탄저병 방제 활성화

공시 세균 및 방선균을 위한 고추 탄저병에 대한 방제효과는 시중에서 구입한 푸른고추 (청양고추)를 대상으로 실내검정을 실시하였다. 구입한 푸른고추는 NaOCl 1%액에 3-5분 표면 소독한 후 살균수로 씻어내고 음건한 고추 열매의 표면에 상처를 주고 공시균주의 배양액을 처리하였다. 배양액(10배, 50배, 100배) 처리 5시간 후에 상처부위에 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*)의 포자현탁액  $1 \times 10^6$  spores/ml을 점적 접종시키고 5일 후에 병반의 진전정도를 조사하였다. 처리구당 10개의 고추를 사용하였으며 3반복으로 2회 수행하였다.

##### 2) 공시균주의 인삼 탄저병 방제 활성화

공시균주의 인삼 탄저병에 대한 방제효과는 충남대학교 인삼포장에서 수행하였다. 공시균주의 배양 희석액을 7일 간격으로 4회 옆면 살포하고, 최종살포 7일 후에 이병엽율을 조사하였다.

#### 다. 오이 흰가루병 방제 활성화

공시 균주의 배양 희석액을 온실에서 재배하고 있는 오이에 직접 분무 살포한 후 발생하는 흰가루병균(*Sphaerotheca fusca*)에 대한 방제활성을 조사하였다. 흰가루병균(*Sphaerotheca fusca*)의 접종은 자연감염(순환물기생균)에 의해 이루어졌다. 실험은 처리구당 10주 오이를 난피법 3반복으로 수행하였다. 희석한 배양액을 7일 간격으로 3회 살포한 후, 최종 살포 일주일 후에 오이 잎에 발생한 흰가루병의 병반 면적율을 조사하여 발병도를 산출하였다.

발병지수, 0: 발병 없음, 1: 병반면적율 1-5%, 2: 병반면적율 5.1-20%,

3: 병반면적율 20.1-40%, 4: 병반면적율 40.1% 이상

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

라. 고추 역병 방제 활성화

공시 균주의 배양 희석액을 4엽기의 고추 유묘 포트에 관주하고 1일 후에 고추역병균의 포자낭 현탁액(농도:  $3 \times 10^3$  포자낭/ml)을 관주하였다. 고추역병균을 접종한 4일차부터 16일 동안 나타나는 증상을 조사하여 발병도를 산출하였다. 실험은 처리구당 10주 고추 유묘를 대상으로 2반복으로 수행하였다.

0: 발병 없음, 1: 지제부 줄기 갈변, 2: 30-50% 시들음 증상 나타남

3: 51-70% 시들음 증상 나타남, 4: 71-90% 시들음 증상 나타남, 5: 식물체 고사

발병도:  $\Sigma(\text{발병지수} \times \text{계수}) / 5N \times 100$

7. 공시균주의 배양적 특성 조사

가. 배양조건에 따른 항균 활성의 변화

1) 배지선정

공시한 공시균의 항균활성물질 생성에 적합한 배지를 선택하기 위해 일반적으로 사용하는 방선균 배양용 액체배지를 사용하여 배양하면서 항균활성을 조사하였다. 본 연구에서 사용한 본 배양은 기본배지에서 활성이 우수한 배지를 선택하여 사용하였으며 접종원으로는 공시균을 GSS 배지 100 ml에 48시간 배양한 것을 사용하였으며, 각 본 배양 배지에 5%(v/v)가 되도록 접종하였다. 공시세균을 위한 배양 또한 상기와 유사한 방법으로 수행하였으며 배지 조성은 표 1과 같다.

표 1. 배양 조건 검토를 위하여 사용한 기본배지 조성표

배지 종류	배지 조성
기본배지 1 (세균)	Sucrose 3%, soytone 1%, yeast extract 0.5%, $K_2HPO_4$ 0.05%, $MgSO_4$ 0.05%, $MnCl_2$ 0.00004%, $CaCl_2$ 0.0005%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0025%
기본배지 2 (세균)	Glucose 1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%, NaCl 0.5%, $KH_2PO_4$ 0.0135%, $MgSO_4$ 0.01%, $CaCl_2$ 0.005%, $FeCl_3$ 0.000125%
기본배지 3 (세균)	Sucrose 1%, yeast extract 0.8%, $KH_2PO_4$ 0.5%, $MgSO_4$ 0.1%, $CaCl_2$ 0.05%, NaCl 0.3%
C4 배지 (방선균)	Glucose 2%, soluble starch 1%, soybean meal 2.5%, yeast ext. 0.4%, NaCl 0.2%, $K_2HPO_4$ 0.005%
GSS 배지 (방선균)	Glucose 2%, soluble starch 1%, soybean meal 2.5%, yeast ext. 0.4%, NaCl 0.2%, $K_2HPO_4$ 0.025%
M 배지 (방선균)	Soluble starch 7%, soybean meal 0.5%, yeast ext. 1.7%, CSL 0.5ml, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $CaCO_3$ 0.1%

## 2) 배양 기간

선정된 배지에 공시균을 접종하고 진탕배양하면서 1일 후부터 10일째까지 매일 배양액 시료를 취하여 항균활성의 변화를 조사하였다. 항균활성은 배양액을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 syringe filter(0.45  $\mu$ m)로 여과하여 균을 완전히 제거한 후 *B. cinerea* 중층배지에 paper disk법으로 조사하였다. 또한 각 배양액의 pH 변화와 생육정도를 측정하여 균 생육과 활성의 연관성을 조사하였다. 배양 미생물의 생육은 packed mycelium volume(PMV)을 측정하였다.<sup>57</sup>

## 3) 배양 온도

공시균 생육 시 최적 배양 온도를 알아보기 위하여 GSS 배지 및 기본배지에 본 접종하고 15°C에서 40°C까지 5°C 간격으로 구분하여 10일간 140 rpm에서 진탕 배양하면서 항균활성의 변화를 조사하였다.

## 4) 교반 속도

500 ml 진탕배양 삼각 flask에 GSS 배지 및 기본배지 3에 100 ml을 넣은 후 공시균을 본 접종하고 100 rpm에서 250 rpm까지 50 rpm 간격으로 조정된 진탕기에서 30°C로 10일간 배양하면서 배양일별 항균활성을 조사하였다.

## 5) *Bacillus subtilis* GA-2005균의 배양 시 교반속도, 온도 및 pH의 영향

*Bacillus subtilis* GA-2005균의 배양 시 교반속도 및 온도, 초기 pH 등이 항균물질생산에 미치는 영향을 조사하였다. GA-2005균주의 액체배양 시 성장속도 및 항균물질의 함유량을 확인하기 위하여 상기의 기본배지3을 이용하여 실험하였다. 모든 시험은 500 ml 삼각플라스크에 100 ml의 기본배지3을 멸균한 후 미리 준비된 GA-2005 배양액 1%를 접종하여 수행하였다.

## 나. 탄소원 · 질소원에 따른 균 생육과 항균활성의 변화

### 1) 탄소원

탄소원의 종류에 따른 방선균의 생육과 활성물질 생산의 변화를 알아보기 위해 기본 배지 (yeast extract. 0.4%, NaCl 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.025%) 100 ml에 탄소원으로 glucose, glycerol, starch, sucrose, dextrin을 각각 1.5% (w/v)가 되도록 첨가한 후 6일간 배양하였다. 세균을 위하여는 각 배양액의 최종 pH값과 생균수를 측정하였으며 균을 완전히 제거한 배양여액을 이용하여 항균활성을 조사하였다. 또한 탄소원의 종류에 따른 세균의 생육과 활성물질 생산의 변화를 알아보기 위해 기본 배지(yeast extract. 0.4%, NaCl 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.025%) 100 ml에 탄소원으로 glucose, glycerol, starch, sucrose, dextrin을 각각 1.5% (w/v)가 되도록 첨가한 후 6일간 배양하였다. 각 배양액의 최종 pH값과 생균수를 측정하였으며 균을 완전히 제거한 배양여액을 이용하여 항균활성을 조사하였다. *Bacillus subtilis* GA-2005균의 배양 시 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 기본배지3을 이용하여 나머지 영양분은 변화를 주지 않고 탄소원만 변화



를 주어 *B. subtilis* GA-2005의 배양과정에서 탄소원의 영향을 조사하였다. 모든 탄소원은 기본배지의 탄소량과 같은 1%를 첨가하였으며, 37°C, 200 rpm의 조건으로 앞선 시험에서 가장 좋은 길항력을 보인 5일째의 길항력을 비교하였다. 세균배양의 탄소원으로는 potato starch, corn starch, dextrose, soluble starch, 프락토 올리고당, 당밀, sucrose, glycerin, glucose, maltose 등을 사용하였다.

## 2) 질소원

공시 방선균의 생육과 활성물질 생산의 변화에 질소원이 미치는 영향을 알아보기 위하여 1.5% glycerol을 탄소원으로 기본 배지(yeast extract. 0.4%, NaCl 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.025%)에 유기태와 무기태질소원 1.5%(w/v)를 첨가하여 탄소원과 동일한 방법으로 균 생육과 항균활성을 조사하였다. 질소원은 유기태 질소원으로 yeast extract, beef extract, malt extract, tryptone, bacto peptone, soytone, corn steep liquor, soybean flour을 사용하였으며, 무기태질소원으로 ammonium sulfate, sodium nitrate를 사용하였다. 세균의 경우 기본배지3의 sucrose 1%를 사용하였으며, 질소원은 기본배지3에서 사용된 0.7%로 고정한 후 다양한 질소원을 첨가하여 시험하였다. 질소원은 유기질소원과 무기질소원으로 나누어 시험하였으며, 유기질소원으로는 카제인 펩톤, 펩톤, beef extract, yeast extract, soy bean powder, soy bean meal, tryptone, corn steep liquor, bacto peptone을 1%로 첨가하였으며, 무기질소원으로는 (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HSO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, KNO<sub>2</sub>, NaNO<sub>2</sub> 등을 0.1%로 첨가하였다.

## 8. UV-mutagenesis를 통한 균주 개량

### 가. UV-mutagenesis를 위한 조건 확립

UV-mutagenesis를 위하여 균층을 benett's agar(MBA) plate에 접종하고 27°C에서 15일간 배양한 후 형성된 방선균 포자에 30% glycerol 용액을 첨가한 뒤 멸균된 거즈로 여과하여 균체를 제거한 포자 현탁액을 제조하였다. 포자현탁액은 -70°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다. UV-mutagenesis를 위한 조건 확립을 위하여 먼저 보관중인 포자현탁액 100 µl를 포자농도 1x10<sup>5</sup> conidia/ml가 되도록 멸균증류수를 이용하여 희석하였다. 희석된 포자현탁액은 100 µl씩 한천배지에 도말하고 15 cm 높이에서 254 nm의 UV를 일정시간 조사하여 균 생존율이 1%인 적정 시간을 조사하였다.

### 나. 1차 mutagenesis에 의한 균주 개량

항균활성물질의 수율증가를 위하여 UV-mutagenesis를 실시하였으며, 먼저 선발균의 포자현탁액(1x10<sup>5</sup>/ml) 100 µl를 MBA 배지에 도말한 후 plate를 암 조건하에서 1분 30초간 UV(254 nm)를 조사하였다. plate는 호일로 감싸 빛을 차단한 후 27°C 배양기에서 3일간 배양한 후 형성된 colony는 MBA agar를 100 µl씩 분주한 96 well plate에 계대하여 배양한 후 잿빛곰팡이 검정균 plate에서 agar plug법에 의하여 항균활성을 조사하고 원균주에 비하여 항균활성이 증가한 colony를 선발하였다. 활성이 증가된 mutant colony 들은 GSS 배지에 접종하여 배양한

후 배양여액에서의 항균활성 증가여부를 확인하였다.

#### 다. 원균주와 변이주의 항균활성 비교

UV-mutagenesis에 의하여 선발된 변이주의 항균활성 증가율을 알아보기 위하여 원균주와 선발 mutants를 GSS 배지에 접종하여 배양하고 각각의 배양여액을 일정 비율로 희석한 후 paper disk 법에 의하여 항균활성을 조사하였으며 형성된 저지환의 크기를 비교하여 원균주와 mutants의 항균활성물질 생산량의 증가여부를 측정하였다.

### 9. 항균활성물질의 규명

#### 가. 항균활성물질의 안정성 조사

##### 1) 온도에 대한 안정성

활성물질의 온도에 대한 안정성을 조사하기 위해 배양여액을 80°C, 100°C, 121°C에서 20분 처리한 후 항균활성을 조사하였다. 대조구로는 27°C에서 24시간 보관한 배양여액을 사용하였으며 항균활성을 *B. cinerea* 중층배지를 이용하여 paper disk법에 의해 실시하였다. 실험은 3반복으로 수행하였다.

##### 2) pH에 대한 안정성

pH에 따른 활성물질의 안정성을 조사하기 위하여 배양여액의 pH를 각각 2, 4, 6, 8, 10, 12으로 조절한 후 4°C에서 24시간 동안 방치하였다. 이를 pH 7로 재조정하여 중화한 후 항균활성을 조사하였다. 실험은 3반복 수행하였다.

##### 3) UV에 대한 안정성

UV에 대한 안정성을 조사하기 위하여 paper disk에 배양여액을 50 µl 점적한 후 256 또는 365 nm의 UV light를 10 cm 거리에서 30분간 조사하였다. 대조구는 paper disk에 배양여액을 50 µl 점적한 후 실내에서 30분간 방치한 것을 사용하였다. 처리구와 대조구는 자연 건조한 뒤 *B. cinerea* 중층배지에 치상하고 배양하면서 형성되는 저지환에 의해 항균활성을 조사하였다. 실험은 3반복 수행하였다.

#### 나. 항균활성물질의 분리 및 정제

##### 1) *Bacillus subtilis* GA-2005 균주가 생산하는 항균활성물질의 분리 및 정제

*Bacillus subtilis* GA-2005균이 생산하는 항균활성물질의 정제를 위하여 대량 배양한 균 배양액을 6000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 균체와 배양여액을 나누었다. 배양여액은 Diaion HP-20 resin에 흡착 시킨 후 50% 함수 메탄올부터 아세톤에 이르기까지 순차적으로 용출하였다. 활성분획은 감압 농축하고 HCl를 첨가하여 pH 2로 조절한 후 12시간 냉장 보관하였다. 이때 침전된 활성물질은 원심분리를 통해 회수하고 증류수에 현탁하여 40→100%

methanol gradient 용매를 이용하여 reversed-phase column chromatography를 수행한 후 50% methanol을 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였다. 활성분획은 acetonitrile (ACN) 10→100%를 gradient로 이용한 용매 조건으로 수행한 HPLC 분석에서 두 개 그룹에서 나뉘었다. 활성 그룹 1은 0.04% trifluoroacetic acid를 첨가한 35% ACN의 용매조건에서 HPLC로 분석한 결과, 세 개의 활성물질 WJ-1, WJ-2, WJ-3이 관찰되었으며, 따라서 preparative HPLC를 수행하여 각각의 화합물을 분리, 정제하였다. 그룹 2는 HPLC (10→100% ACN gradient, 1ml/min) 분석 시 한 개의 활성물질 WJ-4가 관찰되었으며, 따라서 preparative HPLC를 수행하여 이를 분리, 정제하였다.

### 2) *Streptomyces* sp. BS062균이 생산하는 항균물질의 분리 및 정제

*Streptomyces* sp. BS062균을 방선균용 배지인 GSS 배지에 접종하고 28°C에서 7일간 진탕 배양한 후 배양액을 6,000 rpm으로 40분간 원심 분리하여 배양여액과 균체로 나누었다. 배양여액의 경우 Diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 활성물질을 분획하였다. 또한 균체의 경우 아세톤으로 추출하여 감압 농축한 후 ethyl acetate를 이용하여 분획 추출하였다. 배양여액의 메탄올 분획과 균체 추출물의 ethyl acetate 추출물을 합한 후 60 → 80% methanol을 용출용매로 이용하여 reversed-phase(ODS) column chromatography를 수행하였다. 활성을 나타낸 80% methanol 용출물을 감압농축한 후 CHCl<sub>3</sub>:MeOH(50:1→5:1)을 이용한 silica gel column chromatography를 수행하였다. CHCl<sub>3</sub>:MeOH(30:1) 분획물을 농축한 후 100%, 70%, 50% methanol을 용출용매로 하여 각각 세 차례의 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행한 후 preparative HPLC를 수행하여 활성물질 BM-1을 정제하였다. CHCl<sub>3</sub>:MeOH (10:1) 분획물은 70% aqueous methanol을 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행한 후 preparative HPLC를 수행하여 활성물질 HP-1을 정제하였다.

### 3) *Streptomyces* sp. BS062균이 생산하는 항균물질의 분리 및 정제

*Streptomyces* sp. BS062 균주를 GSS배지에 접종하고 27°C에서 6일간 진탕 배양한 후 배양액 3.5 L를 8,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 배양여액과 균체를 나누었다. 배양여액은 pH 조절 없이 Diaion HP-20 resin에 흡착시킨 후 3 L의 물, 50% methanol, 70% methanol, methanol 순으로 극성을 낮추며 용출하였다. 활성을 나타낸 methanol 분획을 감압 농축하여 얻어진 추출물을 극성에 따라 분리하기 위해 C18 Sep-pak cartridge에 적용한 후 40→100% methanol gradient로 용출하였다. 활성분획을 모아 감압농축한 뒤 분자의 크기에 따라 분리하기 위해 methanol 용매를 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였다. 항균활성분획은 감압농축 후 최종적으로 85% methanol을 전개용매로 ODS thin layer chromatography에 전개하여 활성을 나타내는 밴드를 수거한 후 methanol로 용출하여 항균활성물질 75-Y1 30.5 mg을 정제하였다.

#### 다. 항균활성물질의 화학구조 규명

항균활성물질의 화학구조를 규명하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하여 화합물의

분자량을 밝히었으며,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT 등의 1차원 NMR spectrum과  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC, HMBC 등의 2차원 NMR spectrum을 측정, 해석하여 화학구조를 규명하였다.

#### 10. 항균활성물질의 최소저해농도(MIC) 조사

최소저해농도(MIC, minimum inhibitory concentration)는 정제된 물질을 PDA배지와 섞어 100, 50, 25, 12.5, 6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되도록 만들어 24 well plate에 처리한 후 병원성 진균 5종의 균사 선단부를 4 mm cork borer를 이용하여 떼어낸 뒤 plate에 접종한 다음 균사의 신장을 저해하는 최소 농도를 조사하였다. 대조구로는 MeOH을 PDA와 섞은 plate을 사용하였으며, 실험은 3반복으로 수행하였다.

## 제 2 절 연구 결과 및 고찰

### 1. 탄저병, 흰가루병 등 다범성 항진균활성을 지닌 *Bacillus subtilis* GA-2005

#### 가. *Bacillus subtilis* GA-2005의 발굴 및 연구 배경

*Bacillus subtilis* GA-2005 균주는 분리한 세균을 대상으로 다양한 식물병원균에 대한 항균 활성을 평가하여 스크리닝을 수행한 선행 연구 결과, 식물병원균에 대한 항진균활성이 우수하여 국제기탁기관인 한국미생물보존센터 (Korea Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 균주를 기탁(기탁번호 KCCM-10882P)하고, 고추탄저병 방제용 바이오농약 제제로의 활용 가능성이 높아 특허를 출원하고 등록한 균주이다.

*Bacillus subtilis* GA-2005 균주는 고추탄저병의 주요병원균인 *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum coccodes*에 강한 항균력을 나타내었을 뿐만 아니라 *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Stemphylium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata* 등의 병원균에도 항균효과를 나타내어 고추탄저병, 오이흰가루병 등을 포함한 다범성 바이오농약소재로의 가능성을 지닌 균주이다(그림 1).

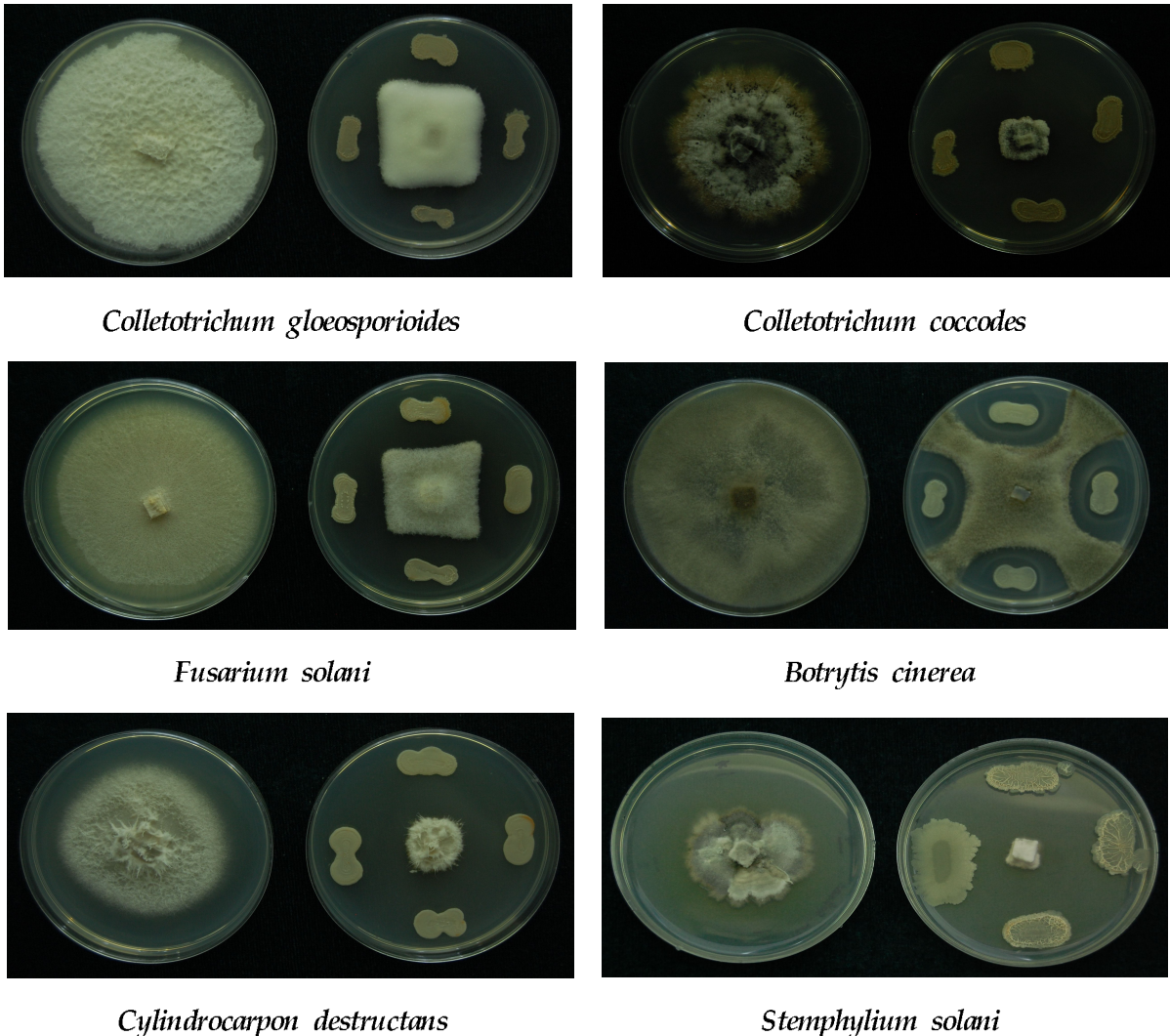


그림 1. 식물병원균에 대한 *Bacillus subtilis* GA-2005의 항진균활성.

#### 나. *Bacillus subtilis* GA-2005의 동정 및 특성 분석

분리한 균주 *B. subtilis* GA-2005의 생리학적 특성은 API kit(API 50 CHB)를 이용하여 당 이용성을 통하여 확인하였고, 더욱 정확한 동정을 위해 상기 균주의 게놈 DNA 중 미생물의 동정에 유효한 것으로 알려진 16S rDNA의 염기서열을 자동 염기서열 결정기로 결정하여, 분리균 GA-2005의 유전학적 위치를 동정한 결과, 상기 분리균 GA-2005는 *Bacillus subtilis*로 동정되었다(그림 2).

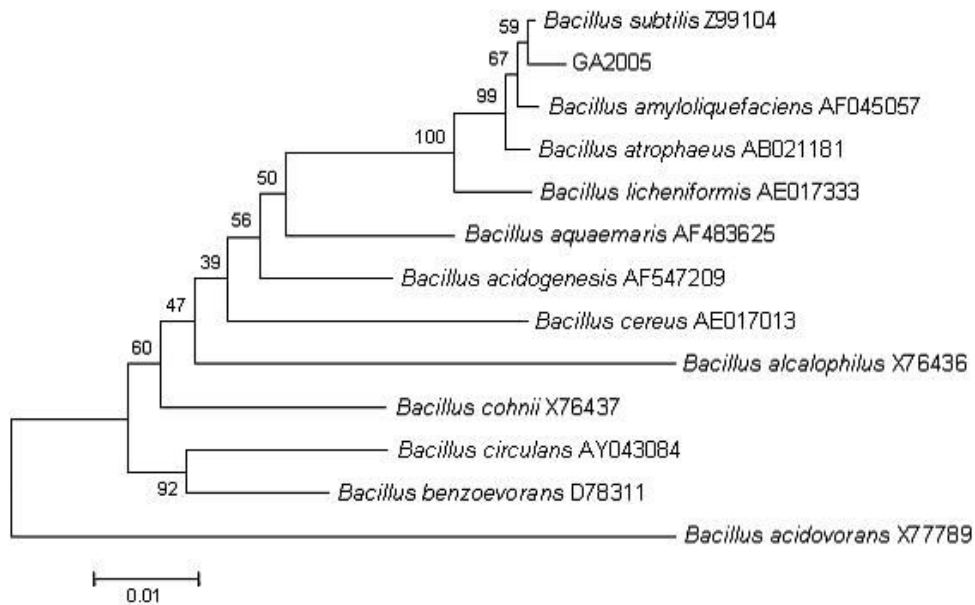


그림 2. *Bacillus subtilis* GA-2005에 대한 16S rDNA의 염기서열 분석

#### 다. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 항균 스펙트럼

*Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 다범성 바이오농약소재로의 가능성을 평가하기 위하여 *in vitro*에서의 항균스펙트럼을 조사하였다. 공시균주 *B. subtilis* GA-2005의 *in vitro* 항균활성을 인삼점무늬병균(*Alternaria panax*), 채소류젯빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 고추탄저병균(*Colletotrichum acutatum*), 고추시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 고추역병균(*Phytophthora capsici*), 채소류균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum*)을 대상으로 조사하였다. PDA배지에 공시균주와 식물병원균을 25°C에서 5일 대치배양한 후 생육 억제대의 길이를 측정하였다. 그 결과, *A. panax* (10 mm), *B. cinerea* (9 mm), *C. acutatum* (11 mm), *F. oxysporum* (8.5 mm) 및 *S. sclerotiorum* (9 mm)에 강한 항균활성을 나타내었으나, *P. capsici* (1.5 mm)에는 낮은 항균활성을 나타내었다.

#### 라. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 *in vivo* 생물 활성

*Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 다범성 바이오농약소재로의 가능성을 평가하기 위하여 오이흰가루병에 대한 방제효과, 딸기젯빛곰팡이병에 대한 방제효과, 고추탄저병 방제효과 및 딸기탄저병 방제효과를 *in vivo*에서 평가하였다.

1) 오이흰가루병에 대한 방제효과

공시균주 *B. subtilis* GA-2005를 대량배양한 배양액을 이용하여, 온실에서 재배하고 있는 오이에 발생하는 흰가루병에 대한 방제활성을 조사하였다. 실험은 처리구당 5주의 오이를 난피법 3반복으로 수행하였다. 흰가루병균(*Sphaerotheca fusca*)은 순환물기생균임으로 발병은 자연감염에 의해 이루어졌다. 처리는 공시배양액 150배, 300배, 500배 희석액을 각각 5일(4회), 7일(3회), 10일(2회) 간격으로 살포하고, 최종살포 7일 후에 오이 성체의 각엽에 발생한 흰가루병 반을 조사하였다. 오이 한 주당 10엽씩 다음과 같은 발병지수에 따라 병반면적율을 조사하였고, 다음 공식에 의하여 발병도를 산출하였다.

0: 발병 없음, 1: 병반면적율 1-5%, 2: 병반면적율 5.1-20%, 3: 병반면적율 20.1-40%,  
4: 병반면적율 40.1% 이상

발병도:  $\Sigma(\text{발병지수} \times \text{계수}) / 4N \times 100$

표 2. *Bacillus subtilis* GA2005 균주 배양액의 오이흰가루병 방제 효과

처리농도	처리방법	발병도(%)	방제가(%)
150배	5일간격 4회	14.2	79.3
	7일간격 3회	45.5	33.6
	10일간격 2회	52.5	23.4
300배	5일간격 4회	15.0	78.1
	7일간격 3회	45.0	34.3
	10일간격 2회	55.4	19.1
500배	5일간격 4회	13.5	80.3
	7일간격 3회	48.5	29.2
	10일간격 2회	53.0	22.6
무처리		68.5	

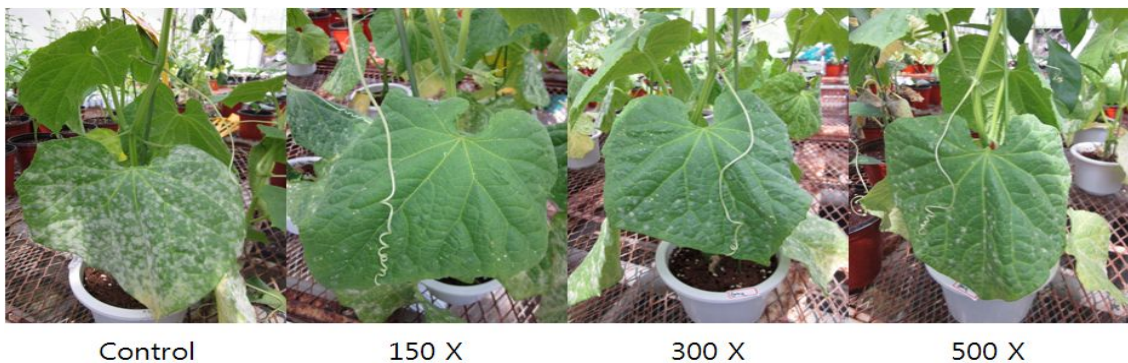


그림 3. *Bacillus subtilis* GA2005 균주의 오이흰가루병 방제효과 5 일 간격 처리구.



그 결과 처리농도(150배, 300배, 500배)에 관계없이 5일 간격으로 살포할 경우 78-80%의 높은 방제 효과를 나타내었으나, 7일 간격, 10일 간격으로 살포할 경우 처리농도에 관계없이 방제효과가 매우 낮았다(표 2 및 그림 3). 이는 *B. subtilis* GA2005 균주의 오이흰가루병에 대한 *in vivo* 효능을 확인한 것으로, 본 결과는 약효의 지속성을 연장시킬 수 있는 제형화 연구의 필요성을 제시하였다.

## 2) 딸기잰빛곰팡이병 방제 효과

충남 논산의 온실에서 재배되고 있는 딸기(육보)를 대상으로 *Botrytis cinerea*에 의하여 유발된 잰빛곰팡이병에 대한 방제효과 시험을 수행하였다. 공시 균주 *B. subtilis* GA-2005의 배양액을 300배, 500배로 희석하여 발병 초 5일 간격으로 4회 살포한 후 5일 후에 잰빛곰팡이병의 이병과율을 조사하였다. 처리구당 150-200개의 열매를 3반복으로 조사하였다. 대조약제로 시판중인 미생물제 “에코스마트”를 공시하여 비교하였다. 치료효과를 조사하기 위해서는 건전주의 꽃과 어린 열매에 잰빛곰팡이병균의 포자 현탁액( $1 \times 10^5$  spores/ml)을 접종하여 감염시킨 후 24시간 후에 공시균주 배양액을 살포하고 5일 후에 이병과율을 조사하였다. 그 결과 처리농도에 따라 방제효과에 차이를 나타내었으며 300배 희석액 처리구에서는 방제가 63%로 대조약제인 에코스마트(51.8 %)에 비하여 좋은 방제효과를 나타내었다. 그러나 500배 희석구에서는 방제가 42%로 대조약제에 비하여 낮은 방제효과를 나타내었다(표 3 및 그림 4). 또한 공시균주 배양액의 치료효과를 조사한 결과, 처리농도에 관계없이 대조미생물제인 에코스마트에 비하여 낮은 방제효과를 나타내었다(표 4).

표 3. *Bacillus subtilis* GA2005 균주 배양액의 딸기잰빛곰팡이병 방제효과

처리균주	농도	이병과율(%)	방제효과(%)
GA-2005	300배	19.2	63.0
GA-2005	500배	30.0	42.2
에코스마트 (대조)	500배	25.0	51.8
무처리		51.9	



<무처리>

<GA2005 300>

<에코스마트 500>

그림 4. *Bacillus subtilis* GA2005 균주 배양액의 딸기 잰빛곰팡이병 방제효과.



표 4. *Bacillus subtilis* GA2005 균주 배양액의 딸기잰빛곰팡이병 치료효과

처리군주	농도	이병과율(%)	방제가(%)
GA-2005	300배	8.0	46.7
GA-2005	500배	8.0	46.7
에코스마트 (대조)	500배	4.5	70.0
무처리		15.0	

### 3) 고추탄저병 억제 효과

#### 가) 푸른 고추를 이용한 고추탄저병 억제 효과

*B. subtilis* GA-2005균의 고추탄저병 억제 효과 검정은 시중에서 구입한 푸른 고추(풋고추)를 대상으로 수행하였다. 구입한 푸른 고추를 NaOCl 1%액에 3-5분 표면소독한 후 살균수로 씻어내고 음건한 고추 열매의 표면에 상처를 주고 GA-2005 균주의 배양액을 처리하였다. 배양액(150배, 300배, 500배) 처리 6시간 후에 상처부위에 탄저병균 (*Colletotrichum acutatum*) 포자현탁액  $1 \times 10^6$  spores/ml을 인공 감염시키고 5일 후에 병반의 진전정도를 조사하였다. 처리구당 10개의 고추를 공시하였으며 3반복으로 2회 수행하였다. 그 결과 배양액 처리에 의하여 고추 열매의 병반 억제효과가 확인되었으나 배양액처리가 병반 형성을 완전히 억제하지는 못하였고 처리농도에 관계없이 유사한 억제효과를 나타내었다(표 5).

표 5. *Bacillus subtilis* GA2005 배양액의 고추탄저병 억제 효과

처리농도	병반직경 <sup>a)</sup>		
	1차	2차	평균
150배	10.4	7.8	9.1
300배	9.9	6.5	8.2
500배	10.6	7.3	9.0
무처리	17.6	14.1	15.9



<sup>a)</sup> 푸른 고추(풋고추) 열매의 병반 직경

#### 나) 포장에서 *Bacillus subtilis* GA-2005의 고추 수확량에 미치는 영향

고추를 대상으로 포장실험을 실시하여 *Bacillus subtilis* GA-2005 처리에 의한 고추의 수확량을 조사하였으며, 그 결과 *Bacillus subtilis* GA-2005를 처리한 포장에서 고추의 수확량이 대조군에 비해 대략 두 배 정도 높았으며, 고추에 유해한 영향을 미치지 않고 과실의 생육을 촉진시키는 것을 확인하였다(표 6).

표 6. 포장실험에서 *Bacillus subtilis* GA-2005 처리에 의한 고추의 수확량

	7월 5일 (생산량/평)	7월 12일 (생산량/평)	8월 2일 (생산량/평)	9월 5일 (생산량/평)	생산량 / 평
대조군	0.22 kg	0.53 kg	0.81 kg	0.41 kg	1.97 kg
실험군	0.38 kg	1.00 kg	1.13 kg	0.88 kg	3.39 kg

다) 포장에서 *Bacillus subtilis* GA-2005의 고추탄저병 방제 효과

고추를 대상으로 포장실험을 실시하여 *Bacillus subtilis* GA-2005 처리에 의한 고추탄저병 방제 효과를 조사하였다. 그 결과 *Bacillus subtilis* GA-2005를 처리한 포장에서 고추탄저병의 방제효과가 무처리군에 비하여 약 10배 정도 높았다(표 7 및 그림 5). 이는 본 균주가 탄저병 방제에 유효함을 나타내는 것이다.

표 7. 포장실험에서 *Bacillus subtilis* GA-2005 처리에 의한 고추탄저병의 방제효과

	묘목수(개)	감염된 묘목(개)	발생율(%)
무처리군	3,360	840	25.0
실험군	1,200	35	2.9



그림 5. 포장실험에서 *Bacillus subtilis* GA-2005 처리에 의한 고추탄저병의 방제 효과

4) 딸기탄저병 방제효과

*B. subtilis* GA-2005균의 딸기 탄저병 방제효과 검정은 논산딸기시험장에서 탄저병에 감수성인 장희 품종을 이용하여 실시하였다. 먼저 균 배양액 300배 희석액을 15일 간격으로 살포 처리하면서 자연적으로 발생하는 탄저병의 발병율을 조사하였다. 그 결과 최초 살포 처리 후 두 달여간 병 발생이 전혀 관찰되지 않았으나 두 달 이후부터 탄저병 발생이 급격히 진행되어 최종 조사 시 무처리구 발병율이 74.6%이었다. 대조구로 사용한 Carbendazim-Difenoconazole 약제는 탄저병에 많이 사용되고 있는 화학농약으로 14.9%의 발병율을 보여 무처리구 대비

80%의 방제효과를 보였다. GA2005균 배양액을 처리한 경우에도 19.4%의 병 발생을 보여 화학농약을 살포한 대조구와 유사한 방제효과(74.6%)를 나타내었다(그림 6). 또한, *B. subtilis* GA2005균 배양액 처리구의 경우 비록 대조약제에 비해 방제 효과가 근소하게 떨어지나 발병 속도가 매우 느리게 진행되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 딸기 탄저병 방제를 위하여 본 공시균 GA2005균 배양액이 화학농약을 대체할 수 있을 것으로 기대되었다.

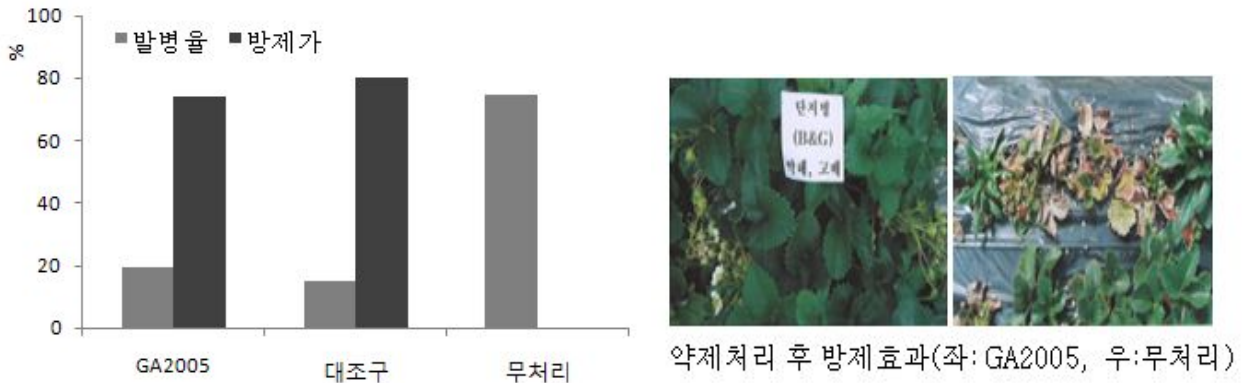


그림 6. *Bacillus subtilis* GA-2005균의 딸기탄저병 방제 효과.

마. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주가 생산하는 항균활성물질

1) *Bacillus subtilis* GA-2005 균주가 생산하는 항균활성물질의 분리 및 정제

*B. subtilis* GA-2005균이 생산하는 항균활성물질의 분리, 정제는 그림 7에 도시한 바와 같이 실시하였다. 먼저 활성물질의 정제를 위하여 대량 배양한 균 배양액을 6000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 균체와 배양여액을 분리하였다. 배양여액은 흡착에 의한 활성물질의 분리를 위하여 Diaion HP-20 resin에 흡착 시킨 후 50% 함수 메탄올부터 아세톤에 이르기까지 순차적으로 용출하였다. 각 분획별 항균 활성은 딸기탄저균을 도말한 검정균 plate에 paper disk 법을 이용하여 조사하였다. 활성분획은 감압 농축하고 HCl를 첨가하여 pH 2로 조절한 후 12시간 냉장 보관하였다. 이때 침전된 활성물질은 원심분리를 통해 회수하고 증류수에 현탁하여 reversed-phase column chromatography와 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였다. 활성분획은 acetonitrile (ACN) 10→100%를 gradient로 이용한 용매 조건으로 수행한 HPLC 분석에서 두 개 그룹에서 항균활성이 확인되었다. 활성 그룹 1은 HPLC 분석 시 iturin 계 화합물이 주로 용출되는 retention time이었으며, UV 흡수 파장대 또한 iturin 계 화합물과 잘 일치하였다. 그룹 2는 fengycin이 주로 용출되는 retention time 영역이었다. 먼저 활성 그룹 1은 0.04% trifluoroacetic acid를 첨가한 35% ACN의 용매조건에서 HPLC로 분석한 결과, 세 개의 활성물질 WJ-1, WJ-2, WJ-3이 관찰되었으며, 따라서 preparative HPLC를 수행하여 각각의 화합물을 분리, 정제하였다. 그룹 2는 HPLC (10→100% ACN gradient, 1ml/min) 분석 시 40분 이후에 용출되는 항균활성물질로 iturin 계열과 UV 흡수 spectrum은 유사하나 용해도에서 차이를 나타내는 것으로 확인되었다. 그룹 2의 경우 활성물질의 양은 매우 적었으나 항균활성은 매우 강하게 나타났다. 그룹 2의 활성성분의 경우 화학구조를 규명하기에는 매우 미량이어서 추가적으로 4리터를 공급받아 동일한 방법으로 분리 정제를 수행한 후 최종적으로 HPLC를 이용하여 분취한 결과 WJ-4를 정제하였다.

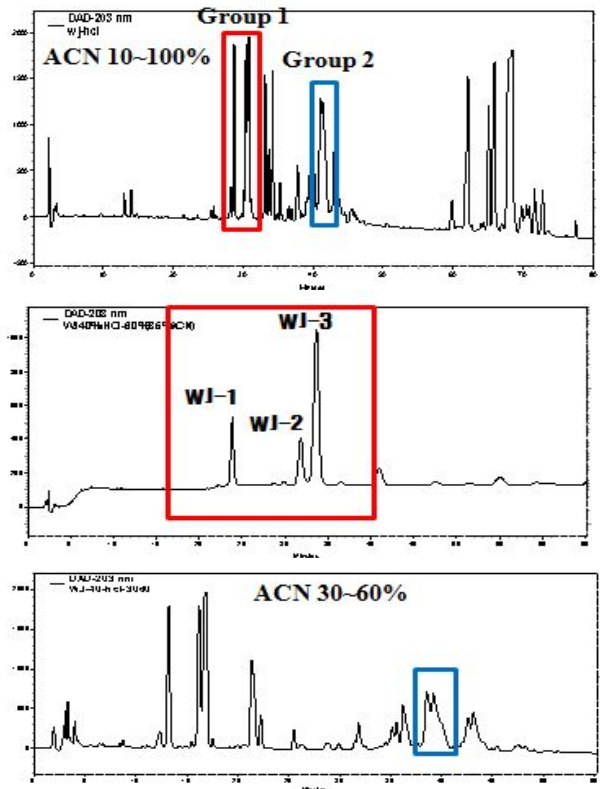
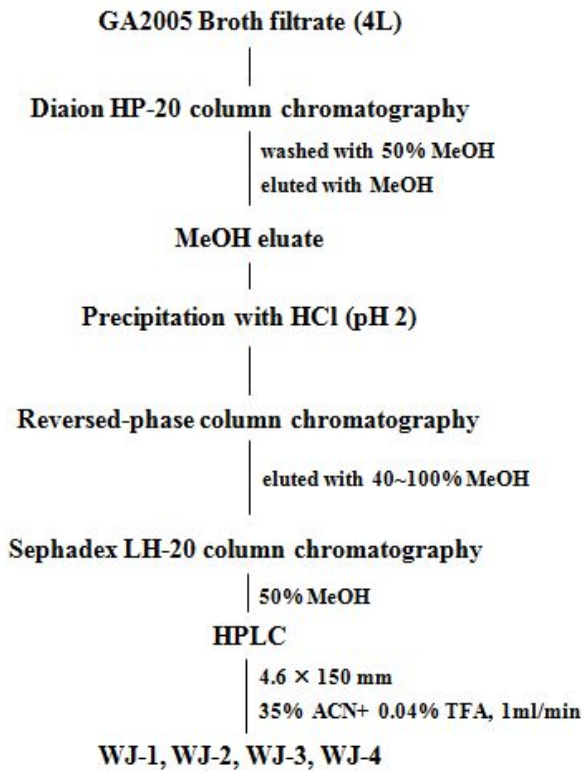


그림 7. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액으로부터 항균활성물질의 분리 및 정제 과정.

2) *Bacillus subtilis* GA-2005 균주가 생산하는 항균활성물질의 화학구조

가) 활성물질 WJ-1의 화학구조

활성그룹 1의 항균활성물질 WJ-1을 DMSO- $d_6$ 에 용해하여  $^1\text{H}$  NMR spectrum(그림 8),  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum(그림 9) 및 mass spectrum(그림 10)을 측정하여 화학구조를 규명하였다.  $^1\text{H}$  NMR spectrum을 해석한 결과, 7.1 및 6.7 ppm에서 tyrosine에 기인하는 1,4-disubstituted benzene proton이 관찰되었으며, 3 - 5 ppm 사이에서 다수의 peptide의  $\alpha$ -proton 및 1.3 ppm에서 alkyl chain에 기인하는 signal들이 나타났다.

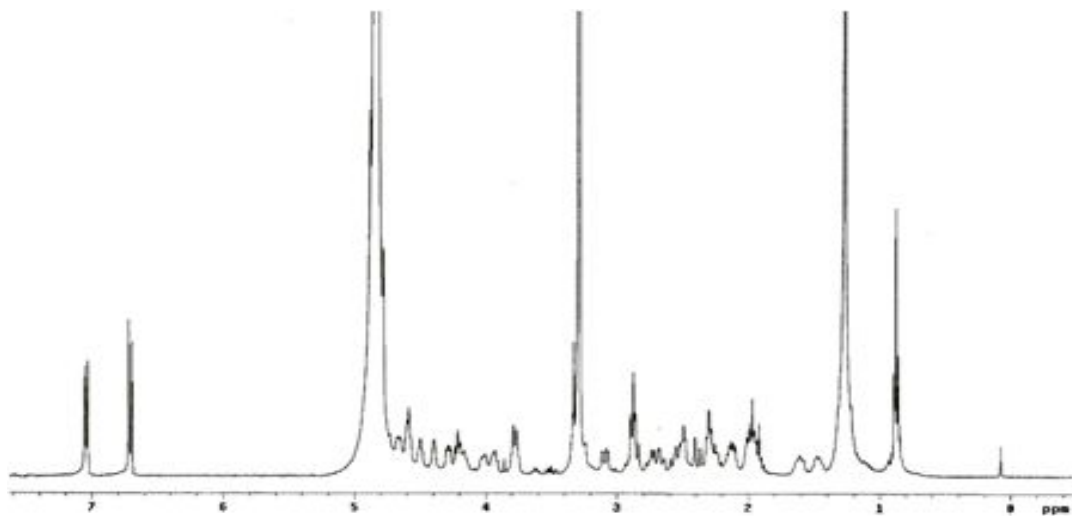


그림 8. 항균활성물질 WJ-1의  $^1\text{H}$  NMR spectrum.



또한 아미노산을 구명하기 위하여  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum을 측정, 해석한 결과, 한 개의 glutamine, 세 개의 asparagine, 한 개의 serine, 한 개의 tyrosine 및 alkyl group으로 구성된 것으로 추정되었으며 덧붙여 한 개의  $\beta$ -아미노산 등을 포함한 부분구조를 규명할 수 있었다. 따라서 본 활성물질 WJ-1은 iturin 계 화합물로 판명되었다. 최종적으로 negative mode에서 ESI-mass spectrum을 측정하여 분석한 결과,  $m/z$  1042에서  $[\text{M}-\text{H}]^-$ 가 관찰되어 분자량이 1043으로 밝혀졌다. 이상의 NMR과 mass 분석 결과를 토대로 활성 화합물 WJ-1은 iturin A2로 동정되었다.

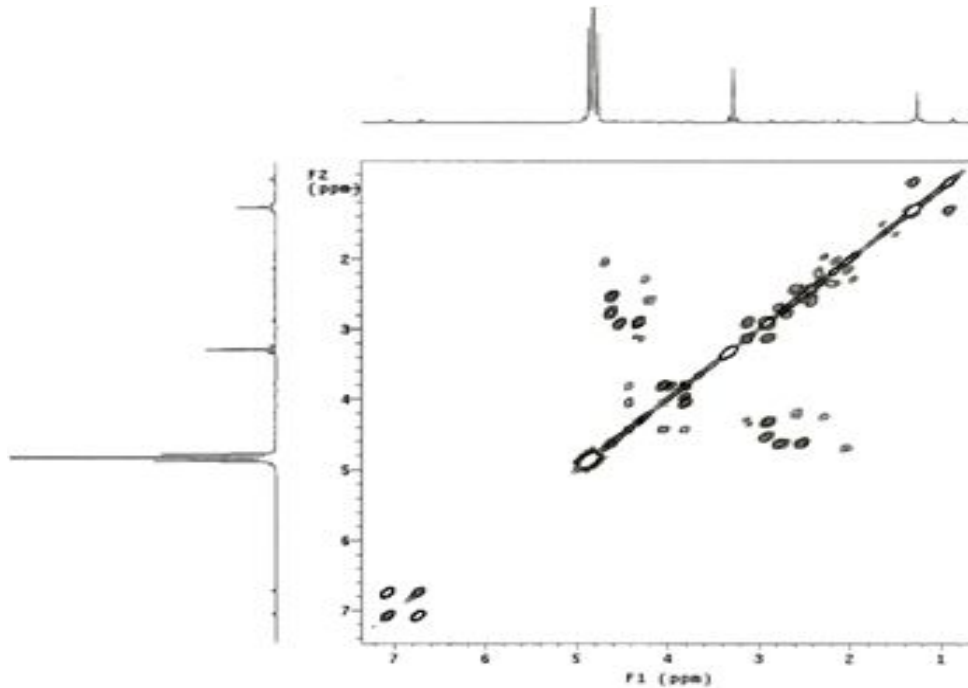


그림 9. 항균활성물질 WJ-1의  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum.

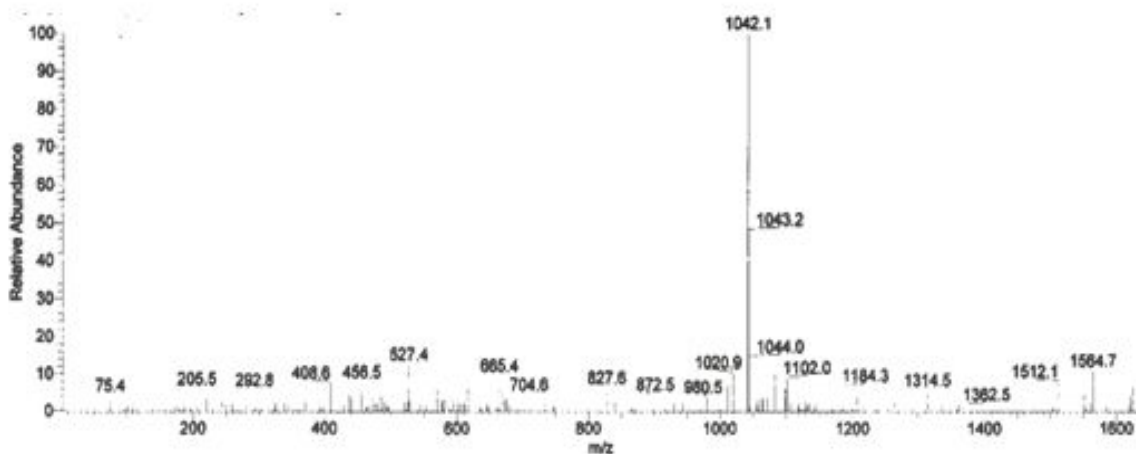


그림 10. 항균활성물질 WJ-1의 ESI-mass spectrum (negative mode).

나) 활성물질 WJ-2의 화학구조

항균활성물질 WJ-2의  $^1\text{H}$  NMR spectrum(그림 11)을 측정된 결과, 7.1 및 6.7 ppm에서 tyrosine에 기인하는 1,4-disubstituted benzene이 관찰되었으며, 3 - 5 ppm 사이에서 다수의 peptide의  $\alpha$ -proton 및 1.2 - 1.5 ppm 사이에서 lipopeptide 계 항생물질에 존재하는 alkyl chain에 유래하는 signal들이 관찰되었다. 본  $^1\text{H}$  NMR spectrum을 iturin A2로 동정된 WJ-1의  $^1\text{H}$  NMR spectrum과 비교한 결과, cyclic 부분에 유래하는 signal은 동일한 것으로 나타났다. 그러나 0.9 ppm에서 관찰된 두 개의 methyl group이 WJ-1의 경우 triplet인 것에 반하여 WJ-2는 doublet, triplet의 겹침으로 관찰되었다. 이는 본 화합물이 iturin A3과 동일함을 나타내고 있다.

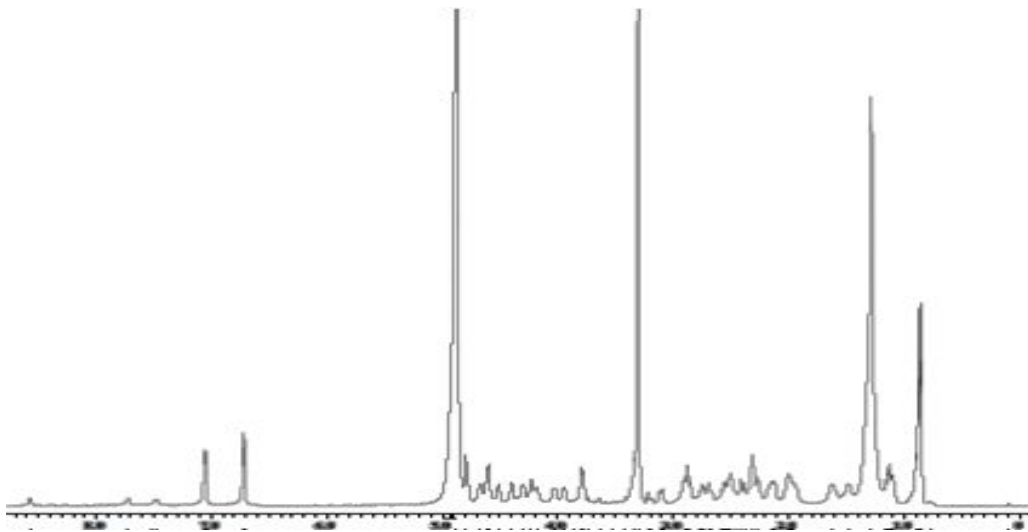


그림 11. 항균활성물질 WJ-2의  $^1\text{H}$  NMR spectrum.

따라서, 본 활성물질 WJ-2의 동정을 위하여 positive mode에서 ESI-mass spectrum(그림 12)을 측정하였다. 그 결과,  $m/z$  1080에서  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  peak가 관찰되어 분자량이 1057로 유추되었으나 intensity가 매우 낮아 명료한 mass peak를 관찰할 수 없었다. 따라서 표준품과 HPLC retention time을 비교하였으며, 그 결과 retention time이 잘 일치하였다. 이상의 NMR spectrum과 mass 분석 및 HPLC retention time의 비교 결과로부터 본 활성 화합물 WJ-2를 iturin A3으로 동정하였다.

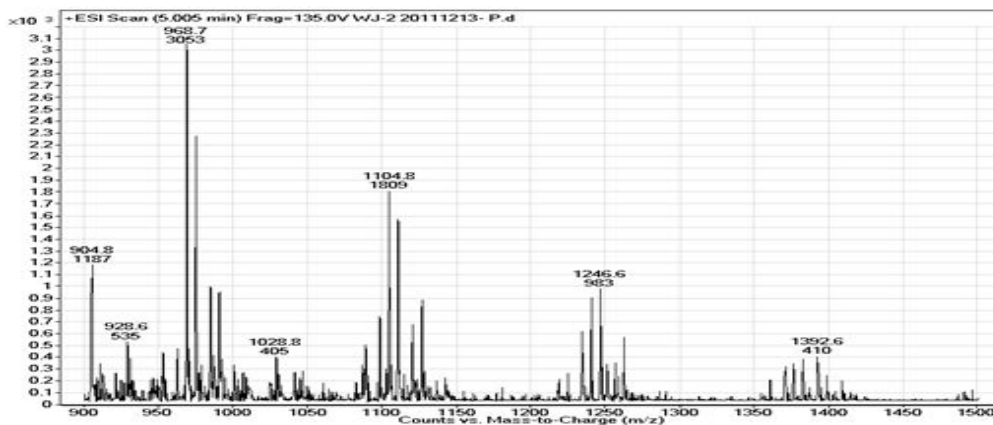


그림 12. 항균활성물질 WJ-2의 ESI-mass spectrum (positive mode).

다) 활성물질 WJ-3의 화학구조

항균활성물질 WJ-3 또한 상기와 유사한 방법으로 동정하였다. WJ-3의  $^1\text{H}$  NMR spectrum(그림 13)을 측정된 결과, 7.0 및 6.6 ppm에서 tyrosine에 기인하는 1,4-disubstituted benzene proton이 관찰되었으며, 3 - 5 ppm 사이에서 다수의  $\alpha$ -proton 및 1.2 - 1.4 ppm 사이에서 alkyl chain에 기인하는 signal들이 관찰되었다. 본  $^1\text{H}$  NMR spectrum을 WJ-2의  $^1\text{H}$  NMR spectrum과 비교한 결과 매우 유사한 것으로 나타났으며, 따라서 본 화합물 또한 iturin 계열임을 알 수 있었다. 그러나 0.8 ppm 부근에서 관찰된 두 개의 doublet methyl proton과 더불어 ESI-mass spectrum(그림 14) 측정에서  $m/z$  1057.0에서  $[\text{M}+\text{H}]^+$  peak가,  $m/z$  1079.0에서  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  peak가 관찰되어 분자량이 1056으로 밝혀져 본 활성 화합물 WJ-3은 iturin A4로 동정되었다. 화합물 WJ-1, WJ-2, WJ-3의 화학구조를 그림 15에 도시하였다.

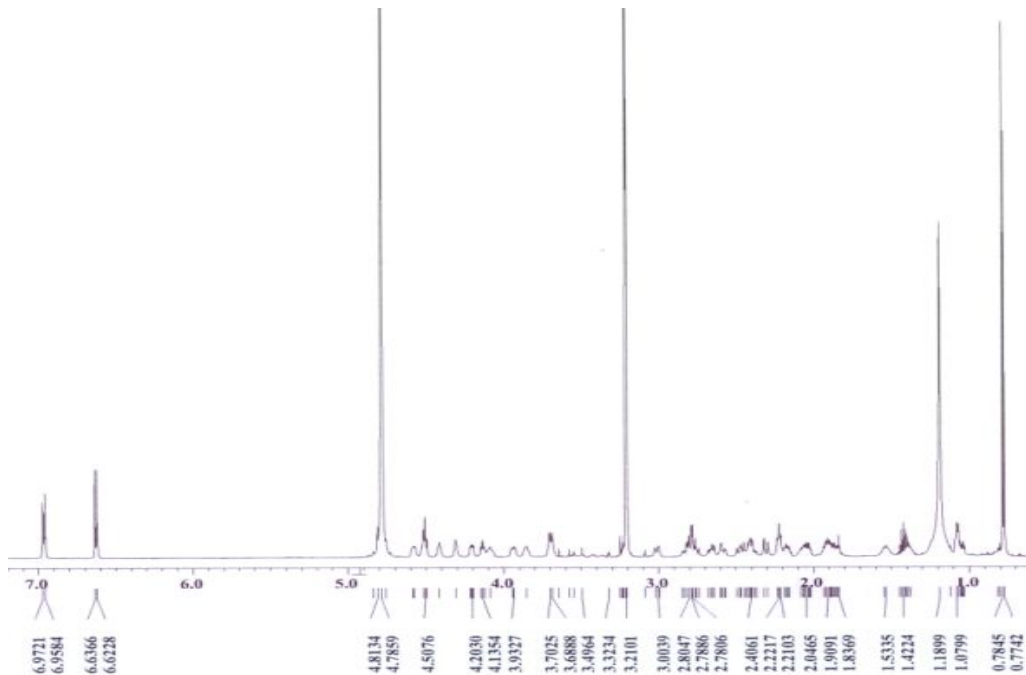


그림 13. 항균활성물질 WJ-3의  $^1\text{H}$  NMR spectrum.

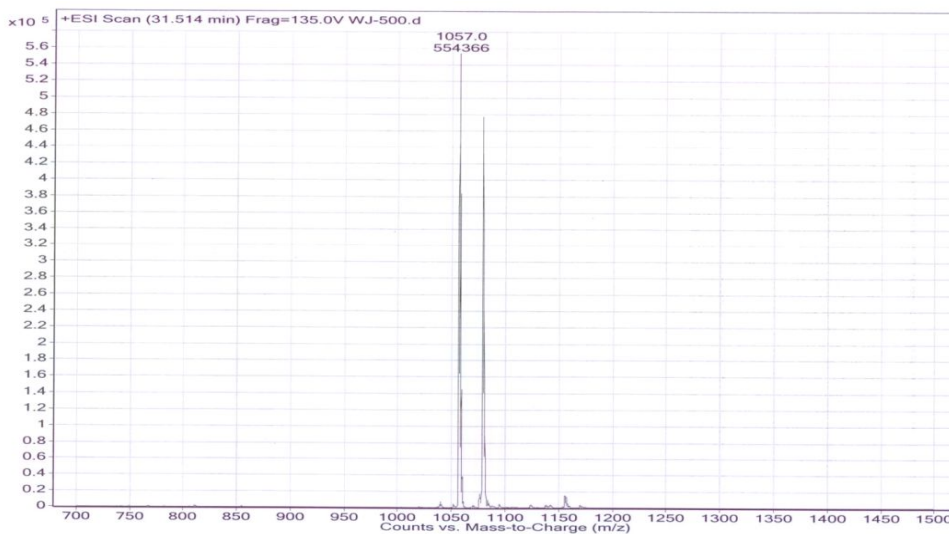
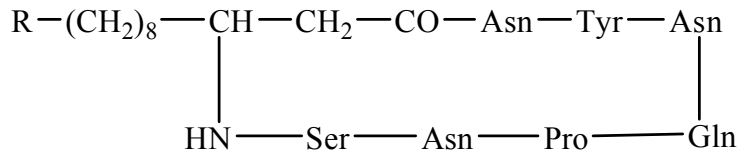


그림 14. 항균활성물질 WJ-3의 ESI-mass spectrum(positive mode).



- WJ-1 (= iturin A<sub>2</sub>) R = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>  
WJ-2 (= iturin A<sub>3</sub>) R = -CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>  
WJ-3 (= iturin A<sub>4</sub>) R = -CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

그림 15. 항균물질 WJ-1, WJ-2 및 WJ-3의 화학구조

라) 활성물질 WJ-4의 화학구조

*Bacillus subtilis* GA-2005 균주가 생산하는 항균활성물질은 HPLC (10→100% ACN gradient, 1 ml/min) 분석 시 두 개의 그룹으로 나뉘어 분리되며, 그 중 활성그룹 2의 활성물질 WJ-4는 HPLC 분석 시 40분 이후에 용출되는 항균활성물질로 iturin 계열과 UV 흡수 spectrum은 유사하나 용해도에서 큰 차이를 나타내었다. 활성물질 WJ-4의 구조를 규명하기 위하여 MeOH-*d*<sub>4</sub>에 용해하여 <sup>1</sup>H NMR과 <sup>13</sup>C NMR 등의 1차원 NMR spectrum과 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC 등의 2차원 NMR spectrum을 측정하여 해석하였다.

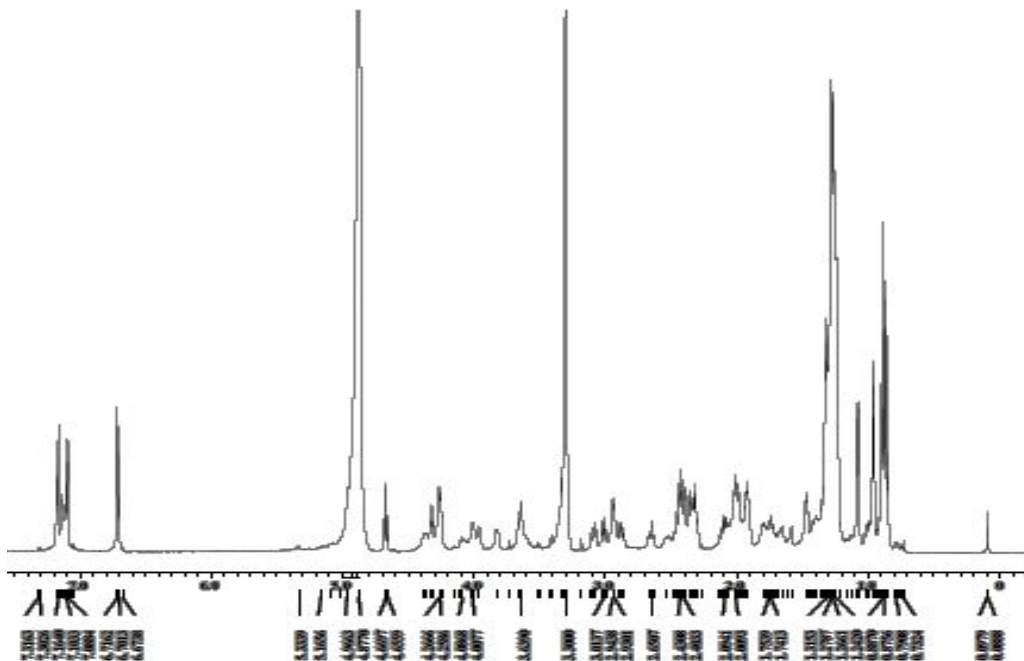


그림 16. 항균활성물질 WJ-4의 <sup>1</sup>H NMR spectrum.

<sup>1</sup>H NMR spectrum(그림 16)을 해석한 결과, 6.7 - 7.2 ppm 사이에서 두 개의 1,4-disubstituted benzene ring에 기인하는 proton들이 관찰되었으며, 3.5 - 4.7 ppm 사이에서 peptide의 α-proton에 기인하는 다수의 proton, 1.6 - 3.1 ppm 사이에서 아미노산의 alkyl group에 기인하는 proton, 1.2 - 1.4 ppm 사이에서 alkyl chain에 기인하는 proton, 0.8 - 1.1 ppm 사이에서 약 8개의 methyl proton peak가 관찰되었다. 또한 <sup>13</sup>C NMR spectrum(그림 17)을 측정하여 분석한 결과, 170~180 ppm사이에서 amide carbonyl carbon들이 관찰되었고, 115



- 160 ppm 사이에서 8개의 aromatic carbon, 54 - 65 ppm 사이에서 다수의  $\alpha$ -carbon 및 10 - 45 ppm 사이에서 alkyl group에 기인하는 carbon들이 관찰되었다.

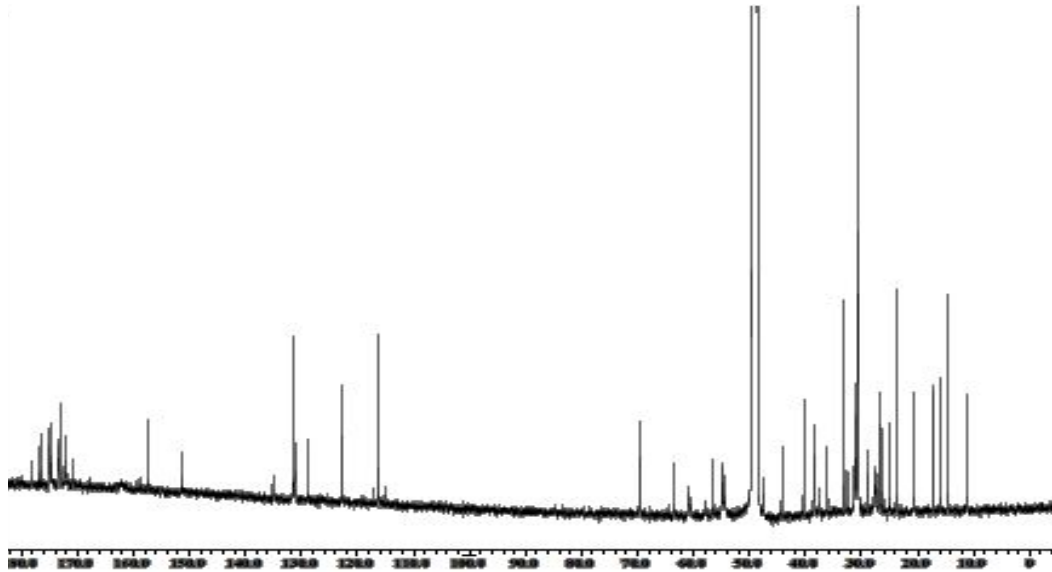


그림 17. 항균활성물질 WJ-4의  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum.

구성 아미노산을 규명하기 위하여  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum(그림 18)과 HMQC(그림 19) 및 HMBC(그림 20) spectrum을 측정하여 해석하였으며, 그 결과 두 개의 glutamic acid, 두 개의 tyrosine moiety, 각 한 개의 alanine, isoleucine, glutamine, ornithine, threonine, proline 등의 아미노산과 alkyl group으로 구성된 peptide 화합물임을 확인할 수 있었다. 이같은 구성 아미노산과 부분구조로부터 활성물질 WJ-4는 lipopeptide계 항균활성물질인 fengycin계열에 매우 유사함을 알 수 있었다. 이의 확인을 위하여 ESI-mass spectrum(그림 21)을 측정하였으며, 그 결과  $m/z$  1464.1에서  $[\text{M}+\text{H}]^+$  peak가 관찰되어 분자량이 1463으로 확인되었다. 이같은 결과로부터 본 화합물을 C-16 fengycin A로 동정하였다. 그림 22에 항균활성물질 WJ-4의 화학 구조를 나타내었다.

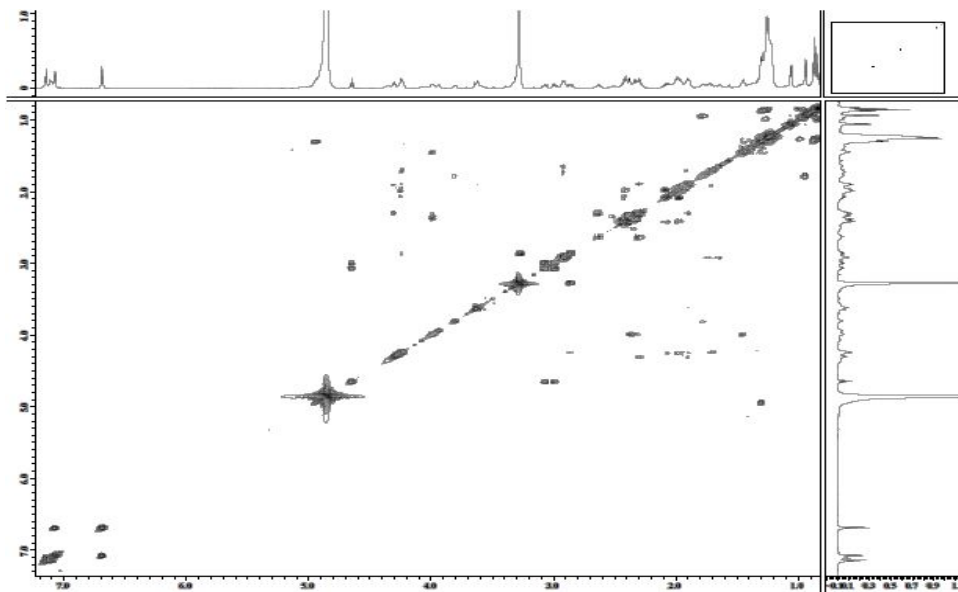


그림 18. 항균활성물질 WJ-4의  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum.

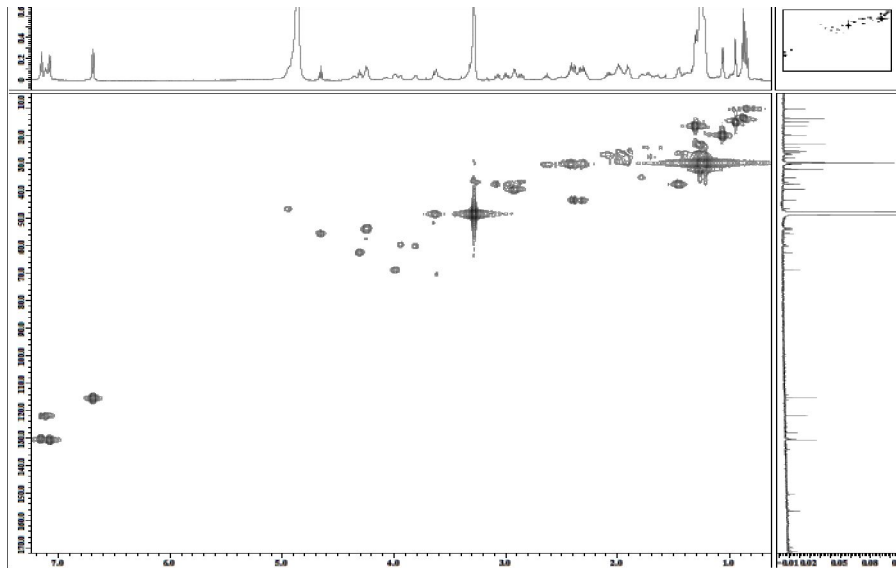


그림 19. 항균활성물질 WJ-4의 HMQC spectrum.

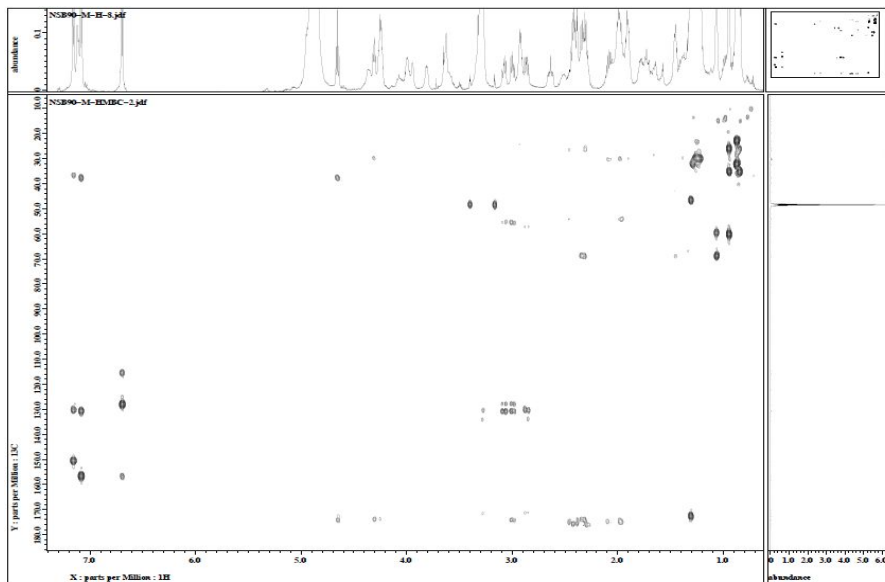


그림 20. 항균활성물질 WJ-4의 HMBC spectrum.



그림 21. 항균활성물질 WJ-4의 ESI-mass spectrum.

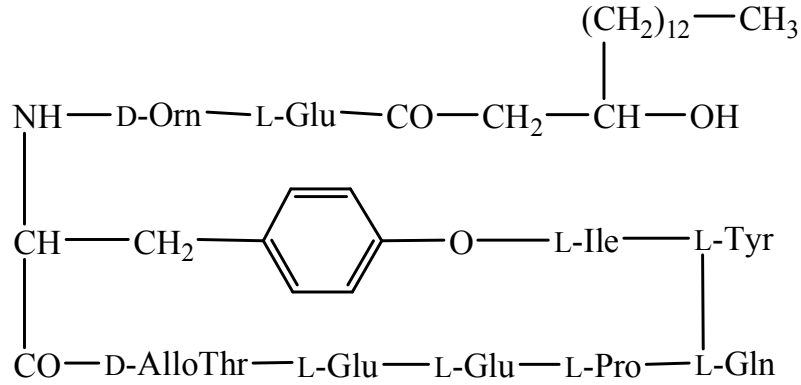


그림 22. 항균물질 WJ-4의 화학구조.

바. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액의 약해, 독성 및 안전성 시험

1) *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액의 약해 시험

선발된 균주의 산업화를 위해 우선적으로 식물과 인축에 해를 끼치는지 확인하기 위하여 약해가 발생하기 쉬운 작물인 콩과 옥수수에 *B. subtilis* GA-2005 균주를 TSB(tryptic soy broth)배지에 1일간 배양하여 본엽이 2~3엽이 나왔을 때 콩잎이 흠뻑 젖을 만큼 뿌려준 후 5일, 7일 경과 후 육안으로 관찰하였다. 무처리구와 GA-2005균주 처리구 모두 약해는 관찰되지 않았다(그림 23 및 그림 24). 이 결과를 토대로 *B. subtilis* GA-2005 균주 배양물이 식물에 안전하다는 것을 확인하였다.

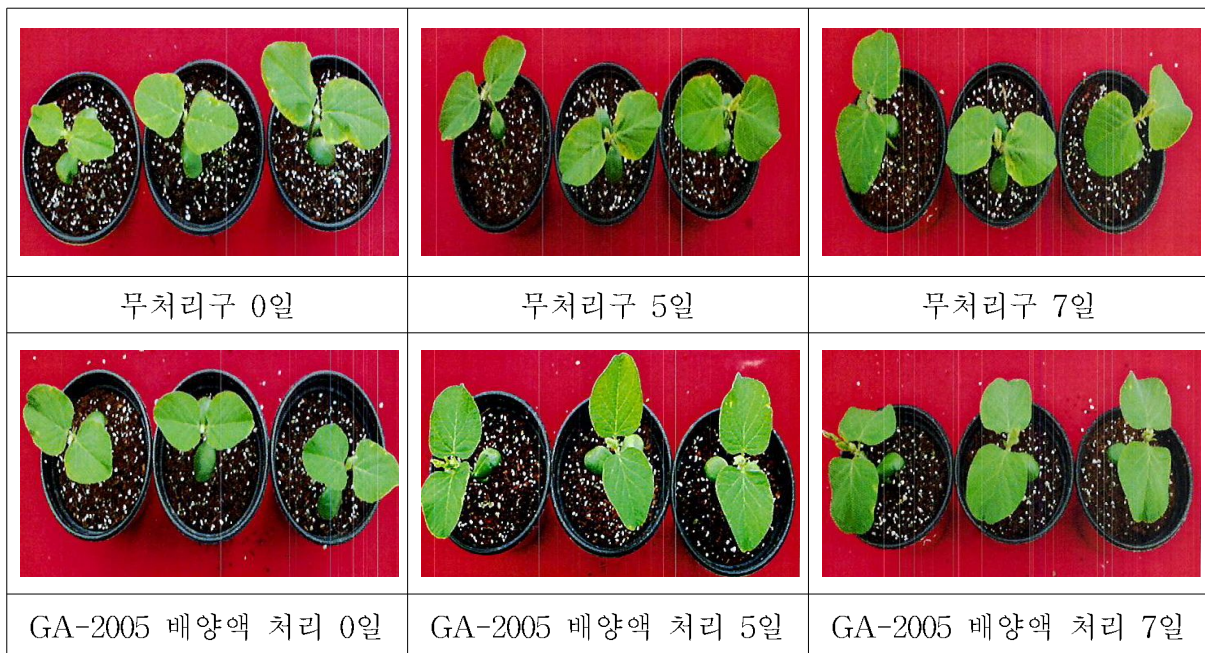


그림 23. 콩에서의 *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액의 약해 시험.

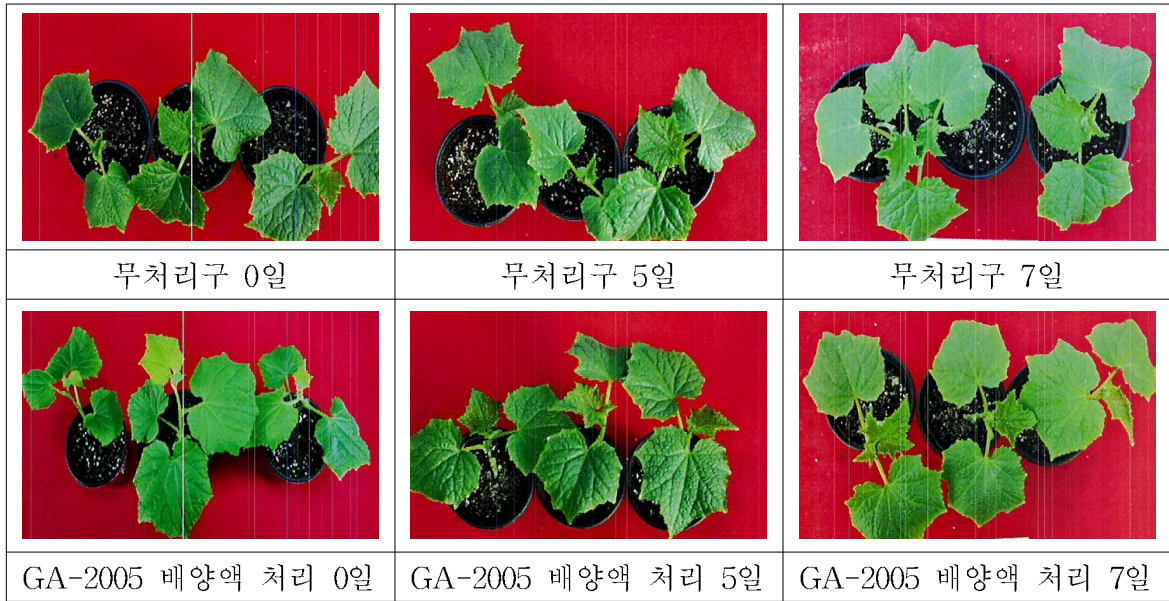


그림 24. 오이에서의 *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액의 약해 시험.

2) *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액의 급성경구 독성 시험

*Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액이 인축에 해를 끼치는지 확인하기 위하여 공인인증 기관인 한국생물안전성연구소에 의뢰하여 급성경구독성을 확인하였다. 2011년 12월 19일부터 2012년 1월 2일 까지 마우스(ICR계통)를 공시하여 1회 경구투여한 후 14일 동안 치사수 및 체중변화 등을 관찰, 조사하였다. 각 시험동물 당 2,500 mg/kg로 *B. subtilis* GA-2005 균주 배양액을 투여한 결과 치사동물은 없었으며, 일반증독증상 또한 관찰되지 않았다. 약제투여 후 경과일수에 따라 암수 모두 체중이 증가하는 추세를 보였으며, 부검결과 2,500 mg/kg의 투여에서 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 따라서 수컷과 암컷 모두에 대한 LD<sub>50</sub> 값은 2,500 mg/kg 이상으로 나타났다. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액이 식물 및 시험동물에 약해 및 독성을 나타내지 않아 인축, 식물에 모두 안전한 것을 알 수 있었다(그림 25).

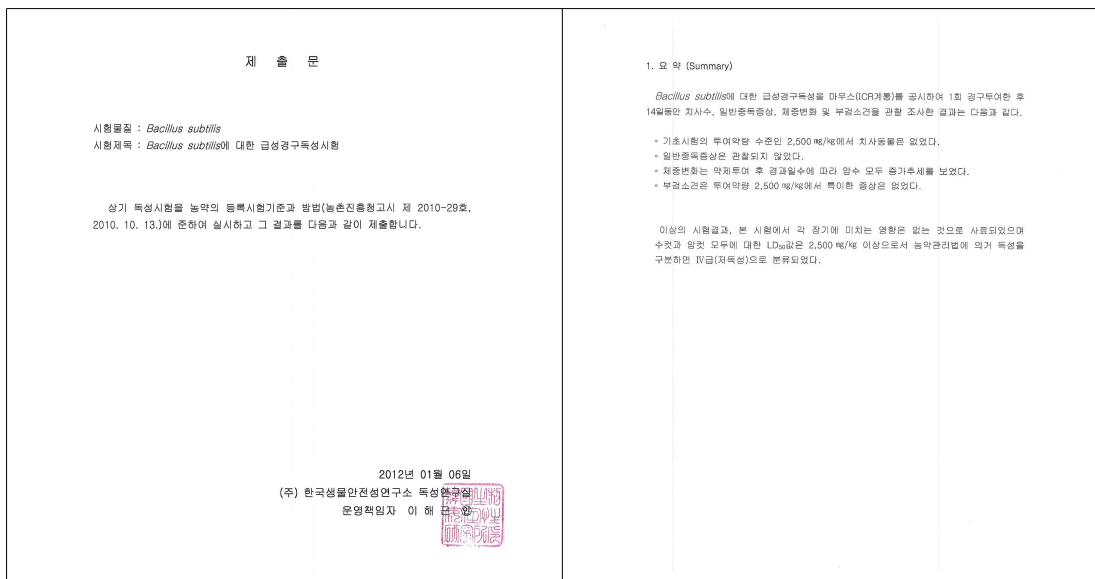


그림 25. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액의 급성경구독성 시험결과서.

사. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 산업화 scale 배양 조건 확립

*Bacillus subtilis* GA-2005 균주는 고추탄저병 및 다범성 항균활성을 지닌 균주로서 배양 중에 생산하는 lipopeptide 계열의 iturin과 fengycin이 항균활성을 나타내는 주요한 성분이라는 것을 규명하였다. 본 균주를 산업화하기 위한 연구의 일환으로 대량배양조건의 확립이 필요하며 이를 위하여 최적배양조건을 조사하고, 탄저병에 대해 항균활성물질의 생산성을 조사하였다.

1) *Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 항균활성물질에 따른 standard curve 조사

가) 탄저병균에서의 iturin A 농도에 따른 standard curve 조사

*Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 항균활성물질을 정량적으로 분석하기 위하여 Sigma사에서 판매하는 iturin A 표준품을 이용하였다. 항균활성 조사를 위한 감수성 균주로는 식물 병원성 균주인 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*)를 사용하였다. 하지만 bioassay 방법을 사용하는 경우에 감수성 균주의 성장저해환의 크기는 고농도일수록 직경의 차이가 미미해지기 때문에 직경의 차이가 완만해지는 경향이 보이기전까지의 농도로 standard curve를 작성하였다. Standard curve 작성을 위한 시험 방법은 다음과 같다. 감수성 식물병원균인 탄저병균은 500 ml 삼각플라스크에 100 ml의 PDB(patato dextrose broth)배지를 넣어 121°C, 25분간 멸균한 후, 미리 배양된 PDA plate의 탄저병균 포자를 접종하여 30°C, 100 rpm의 조건으로 5일간 배양하였다. 배양된 탄저병균은  $1 \times 10^7$  spores/ml로 PDA plate에 도말하여 2~3 시간 음건한 후, 멸균된 paper disk를 배지위에 올려놓고 다양한 농도의 iturin A 표준품을 각 20 ul 씩 적용하였다.

나) Iturin A 농도에 따른 standard curve 작성

Iturin A의 농도가 600 mg/ml 이상부터 항균활성을 보이기 시작했으며, 1800 mg/ml 이상부터는 항균활성의 차이가 거의 나타나지 않았다. 따라서 600 ~ 1800 mg/ml의 iturin A 농도에서 standard curve를 작성하여 최적배양조건 조사에 이용하였다(표 8 및 그림 26).

표 8. Iturin A 농도에 따른 항균활성

Iturin A 농도(mg/ml)	항균 활성 <sup>a</sup> (mm)
300	0
600	10
900	13
1100	16
1350	29
1500	21
1800	25
<sup>a</sup> Paper disk method	



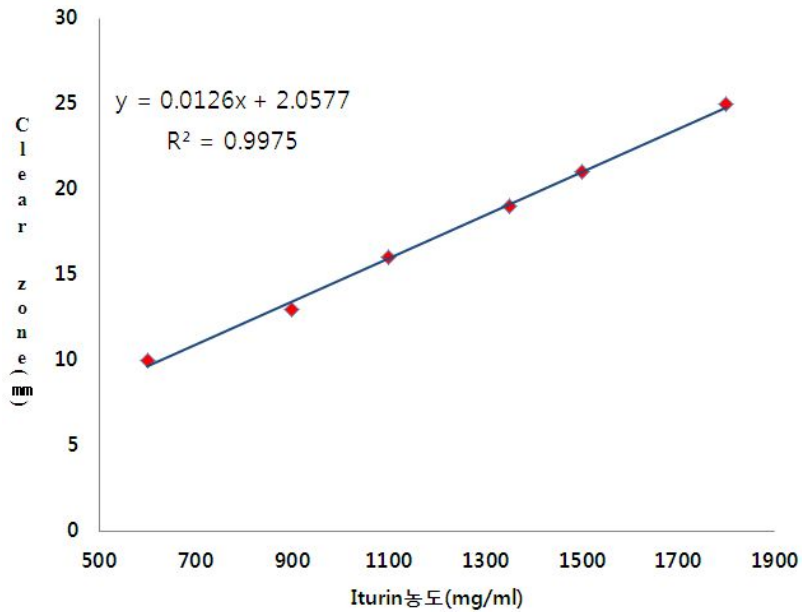


그림 26. Iturin A의 농도에 따른 탄저병균에 대한 항균활성 standard curve.

## 2) *Bacillus subtilis* GA-2005의 최적 배양배지 조사

### 가) *Bacillus subtilis* GA-2005균의 배지별 항균물질 생산능력

*Bacillus subtilis* GA-2005균의 액체배양을 위한 최적배양배지를 조사하기 위하여 논문 및 특허 등에서 바실러스 배양에 주로 사용되고 있는 기본배지(표 9)에서의 생육 및 항균활성을 조사하였다. TSA plate에서 1일간 배양된 colony를 TSB 배지에 6 시간 배양한 후, 각 기본 배지(100 ml/500 ml)에 1% 접종하고 37°C, 120 rpm 조건으로 3 ~ 7일간 배양한 후 iturin A standard curve를 이용해 항균활성을 비교하였다. 그 결과, 3종의 기본배지 모두 5일째 항균물질을 가장 많이 포함하고 있는 것으로 조사되었으며, 특히 기본배지3에서 가장 높은 항균물질이 생성되었고, 이는 나머지 두 종류의 배지보다 항균물질을 더 지속적으로 유지하고 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 27). 이를 바탕으로 기본배지 3을 이용하여 배양최적화 작업을 진행하였다.

표 9. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양조건 검토를 위한 기본배지

배지 종류	배지 조성
기본배지 1	Sucrose 3%, soytone 1%, yeast extract 0.5%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.05%, MgSO <sub>4</sub> 0.05%, MnCl <sub>2</sub> 0.00004%, CaCl <sub>2</sub> 0.0005%, FeSo <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 0.0025%
기본배지 2	Glucose 1%, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.2%, NaCl 0.5%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.0135%, MgSO <sub>4</sub> 0.01%, CaCl <sub>2</sub> 0.005%, FeCl <sub>3</sub> 0.000125%
기본배지 3	Sucrose 1%, yeast extract 0.8%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5%, MgSO <sub>4</sub> 0.1%, CaCl <sub>2</sub> 0.05%, NaCl 0.3%

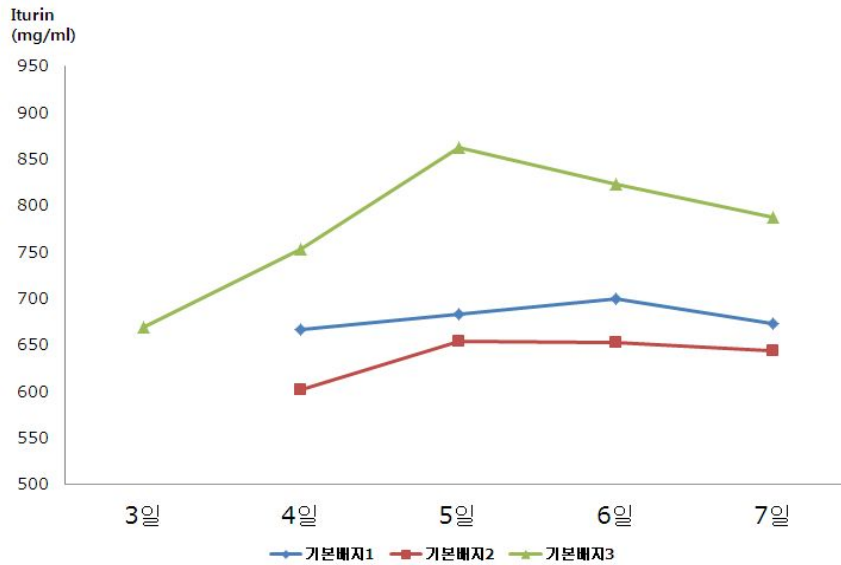


그림 27. 배양시간에 따른 기본배지에서의 항균물질 생산능.

#### 나) *Bacillus subtilis* GA-2005균의 배양 시 교반속도, 온도 및 pH의 영향

일반적으로 항균물질은 미생물의 대수증식기부터 생성되기 때문에 액체배양 시 미생물의 생장에 영향을 주는 교반속도 및 온도, 초기 pH 등은 미생물의 항균물질생산에도 중요한 역할을 한다. 따라서 GA-2005균주의 액체배양 시 성장속도 및 항균물질의 함유량을 확인하기 위해서 기본배지3을 통해 시험하였다. 모든 시험은 500 ml 삼각플라스크에 100 ml의 기본배지3을 멸균한 후 미리 준비된 GA-2005배양액 1%를 접종하여 시험하였다. 시험결과 교반속도는 200 rpm에서 항균물질의 생산량이 가장 높았으며, 온도 37°C, 초기 pH는 7에서 가장 높은 항균물질을 생성하는 것으로 나타났다(그림 28). 따라서 영양원 선택 및 길항력시험에서의 배양 조건은 위의 결과를 기초로 시험을 수행하였다.

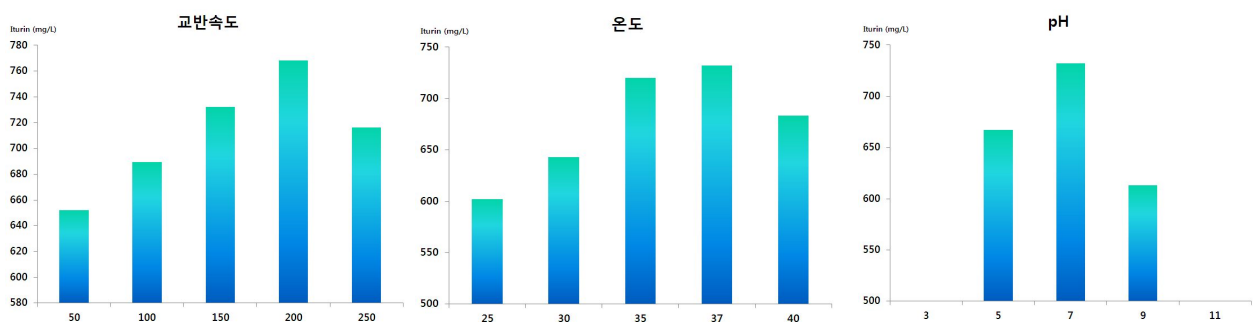


그림 28. 교반속도, 온도 및 초기 pH에 따른 항균물질 생산능.

#### 다) *Bacillus subtilis* GA-2005균의 배양 시 탄소원의 영향

기본배지3을 이용하여 나머지 영양분은 변화를 주지 않고 탄소원만 변화를 주어 *B. subtilis* GA-2005의 배양과정에서 탄소원의 영향을 조사하였다. 모든 탄소원은 기본배지의 탄소량과 같은 1%를 첨가하였으며, 37°C, 200 rpm의 조건으로 앞선 시험에서 가장 좋은 길항력을 보인 5일째의 길항력을 비교하였다. 탄소원의 변화에 따른 iturin의 함량 변화를 조사한 결

과, 다당류인 starch 계열에서 iturin의 함량이 높은 것을 확인할 수 있었다(표 10). 위의 결과를 바탕으로 *B. subtilis* GA-2005 균주의 배양 시에 탄소원은 potato starch로 선정하였다.

표 10. 탄소원에 따른 항균물질 생산비교

탄소원(0.8%)	Iturin 함량(mg/L)
potato starch	1302
corn starch	1207
Dextrose	1046
Soluble starch	968
프락토 올리고당	943
당밀	857
sucrose	832
Glycerin	750
Glucose	702
Maltose	-
무첨가*	-

\* 기본배지 3에서 탄소원 없이 배양

라) *Bacillus subtilis* GA-2005균의 배양 시 유기질소원의 영향

기본배지3을 이용하여 배양과정에서 질소원의 영향을 조사하였다. 탄소원은 기본배지3의 sucrose 1%를 사용하였으며, 질소원은 기본배지3에서 사용된 0.8%로 고정한 후 다양한 질소원을 시험하였다. 배양조건은 탄소원 시험과 동일하게 수행하였다. 카제인 펩톤을 사용할 때 기본배지3인 Yeast extract를 사용할 때보다 거의 두 배에 가까운 iturin을 생성하는 것으로 조사되었다(표 11). 이같은 결과를 바탕으로 *B. subtilis* GA-2005 균주의 배양 시에 질소원으로 카제인펩톤을 선정하였다.

표 11. 유기질소원에 따른 항균물질 생산 비교

유기질소원(1%)	Iturin 함량(mg/L)
카제인 펩톤	1205
펩톤	889
Beef extract	884
Yeast extract	832
Soy bean powder	702
Soy bean meal	683
Tryptone	-
Corn steep liquor	-
bacto peptone	-
무첨가*	-

\* 기본배지 3에서 유기질소원 없이 배양



마) *Bacillus subtilis* GA-2005균의 배양 시 무기질소원의 영향

일반적으로 미생물은 유기질소원과 무기질소원을 함께 사용한다. 이에 *B. subtilis* GA-2005 균주의 배양과정에서 무기질소원의 영향을 조사하였다. 기본배지3에서는 무기질소원을 사용하지 않았기 때문에 여러 종류의 무기질소원을 0.1% 함유하여 시험을 진행하였으며, 배양조건은 위 시험과 동일하게 수행하였다. 무기질소원의 사용결과, *B. subtilis* GA-2005 균주는 대부분의 무기질소원을 이용하지 못하였으며(표 12), 무기질소원을 사용한 경우에도 iturin의 함량변화에 큰 영향을 나타내지는 못하였다. 위 시험을 통해 가장 우수한 무기질소원으로  $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 을 선정하였다.

표 12. 무기질소원에 따른 항균물질 생산 비교

무기질소원(0.1%)	Iturin 함량(mg/L)
$(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	992
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	902
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	856
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	843
Control	832
$(\text{NH}_4)_2\text{HSO}_4$	-
$\text{NaNO}_3$	-
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	-
$\text{NH}_4\text{Cl}$	-
$\text{KNO}_2$	-
$\text{NaNO}_2$	-

바) 최적 배양배지에서의 *Bacillus subtilis* GA-2005균의 항균물질 생성능

앞선 시험을 통해 결정된 기본배지3에 각 중요 영양분인 탄소원, 유기질소원, 무기질소원, 초기 pH, 온도, 교반속도 등을 최적조건으로 하여 3 ~ 7일간 배양하며 샘플링하여 항균력을 조사하였다. 시험결과 5일째 가장 높은 항균물질 함유량을 보였으며, 5일 이후 항균물질의 양이 조금씩 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(그림 29).

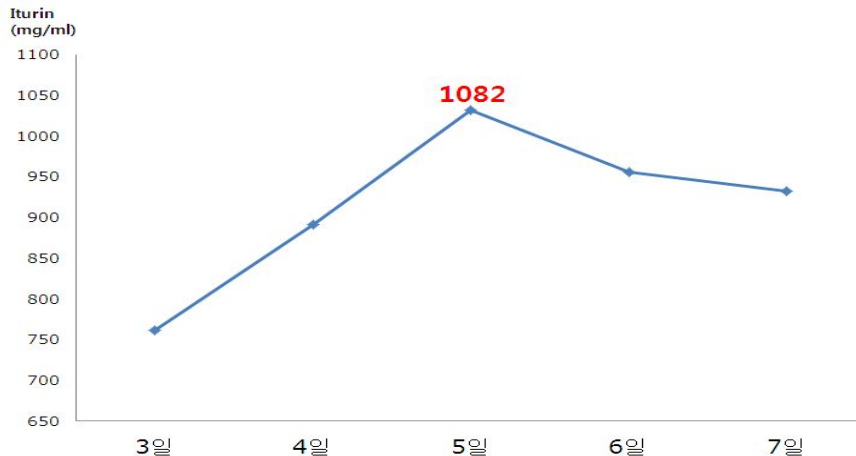


그림 29. 최적 배양배지에서의 배양일수에 따른 항균물질 생성능

아. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액의 제제화 및 제형화

1) *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액의 제제화

사용목적에 따라 GA-2005 배양액을 다양한 형태의 제형으로 만들었다. 토양과 혼화처리하기 위한 입제와 사용하기 편리한 액제, 미생물배양액 특유의 냄새를 제거하기 위해 수화제로 만들어 다양한 형태의 제제화를 시도하였다(그림 30). 입제는 *B. subtilis* GA-2005의 항균물질 및 균주가 잘 유지될 수 있도록 제올라이트를 이용하였는데 이는 내부에 있는 나노크기의 세공 속에 물 분자들을 채울 수 있고 결정 구조적으로는 각 원자의 결합이 느슨하고 그 사이를 채우고 있는 수분을 고열로 방출시켜도 골격은 그대로 유지되므로 다른 미립무질을 흡착할 수 있으며 보구성과 보비력을 갖춰 제제화 하기 적합한 자재이다. 액제는 배양액에 증량제로 증류수를 이용하였고, 수화제는 부형제로 스킨밀크를 이용하여 동결건조하여 제형을 제조하였다. 각 제형은 특성에 맞게 균수를 조절하였다.

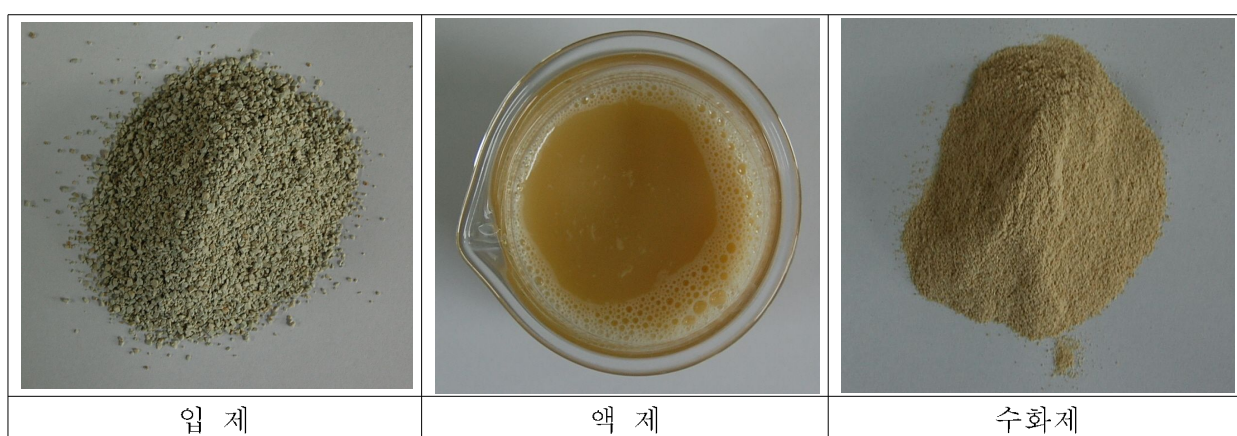


그림 30. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액의 제제화.

2) 제제화된 *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액의 길항여부 확인

*Bacillus subtilis* GA-2005 배양액의 제제의 변화에도 길항능력을 유지하는지를 확인하였다. 제제에 따라 함유하고 있는 균수가 다르며 제조 시 함유되는 배양액의 양도 다르기 때문에 제제마다 항균물질의 양이 다를 것으로 예상되었다. 이에 따라 각 제형 모두 같은 균수로 희석하여 길항력을 관찰하였다. 세가지 제형 모두 길항력을 확인하였으며 길항력의 차이는 없었다. 또한 제제의 변화로 인해 변화가 나타날 수 있는 길항력의 지속여부를 관찰하기 위해 3개월마다 길항력을 확인하였다(표 13). *B. subtilis* GA-2005 균주의 경우 입제와 수화제에서는 시간이 지나도 균수의 변화가 크지 않았지만 액제의 경우 미생물 특유의 발효취가 지속적으로 증가하였으며, 균수도 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 세 가지 제형 모두 길항력은 지속하는 것을 확인하였다. 수화제는 제조공정상 비용이 많이 들기 때문에 입제 형태로 제품화하는 것이 가장 효율적일 것으로 판단되었다.

표 13. 시간 경과에 따른 제품의 안정성 및 길항력 비교

날 짜	입 제	수화제	액 제	길항유무
2011. 12. 08.	$3.2 \times 10^7$	$2.6 \times 10^{10}$	$3.1 \times 10^9$	유
2012. 03. 08.	$3.2 \times 10^7$	$2.7 \times 10^{10}$	$3.0 \times 10^9$	유
2012. 06. 08.	$3.2 \times 10^7$	$2.6 \times 10^{10}$	$3.0 \times 10^9$	유
2012. 09. 08.	$3.1 \times 10^7$	$2.4 \times 10^{10}$	$2.3 \times 10^9$	유
2012. 12. 08.	$3.1 \times 10^7$	$2.3 \times 10^{10}$	$2.1 \times 10^9$	유
2013. 03. 08.	$3.1 \times 10^7$	$2.3 \times 10^{10}$	$1.8 \times 10^9$	유
2013. 06. 08.	$3.1 \times 10^7$	$2.2 \times 10^{10}$	$9.8 \times 10^8$	유

### 3) *Bacillus subtilis* GA-2005 균주 배양액의 저장성 및 안정성 향상

*B. subtilis* GA-2005 배양액의 길항력을 향상시키기 위해 계면활성제, 자외선차단제, 안정제, 결합제 등 다양한 첨가물을 이용하여 안정성 및 항균활성의 변화를 측정하였다. 계면활성제는 계면활성이 큰 물질로서 분자 중에 친수성기 및 친유성기를 모두 포함하는 양친매성 물질이고, 세정력, 분산력, 유화력, 가용화력, 습윤력, 살균력, 기포력 및 침투력 등이 우수하다. 계면활성제 중에서 천연 계면활성제 중 하나인 사포닌을 사용하였다. 자외선차단제는 제조가 완성된 조성물의 운반, 저장 및 조성물의 살포 등에서 광선에 포함된 자외선을 차단하여 농약 조성물내의 활성 성분인 미생물 균주의 안정성을 유지하도록 하는 역할을 한다. 자외선차단제로는 천연 자외선차단제인 면실유를 사용하였다. 안정제는 조성물의 안정성을 향상시키기 위하여 첨가되는 성분으로서 대두유를 사용하였고, 결합제는 농약 조성물을 구성하는 각 성분들을 긴밀하게 결합 또는 수용하도록 하는 역할을 하며 수용성 전분을 사용하였다. 각각의 첨가물들은 선택배지로 *B. subtilis* GA-2005를 배양한 후 3%씩 첨가하여 시간에 따른 균수 및 항균물질의 변화를 2개월 간격으로 균수의 안정성 및 항균활성의 변화를 측정하였다. 계면활성제를 제외한 안정제, 결합제, 자외선차단제를 처리한 실험구에서는 앞서 제제화 실험에서 진행한 실험과 비슷하게 균수와 항균성이 떨어지는 현상이 관찰 되었지만 천연 계면활성제인 사포닌을 첨가한 처리구에서는 균수 및 항균물질이 일정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다(그림 31). 이같은 결과는 계면활성제가 *B. subtilis* GA-2005 배양액의 저장성 및 안정성 유지에 매우 유용한 것으로 나타났다.

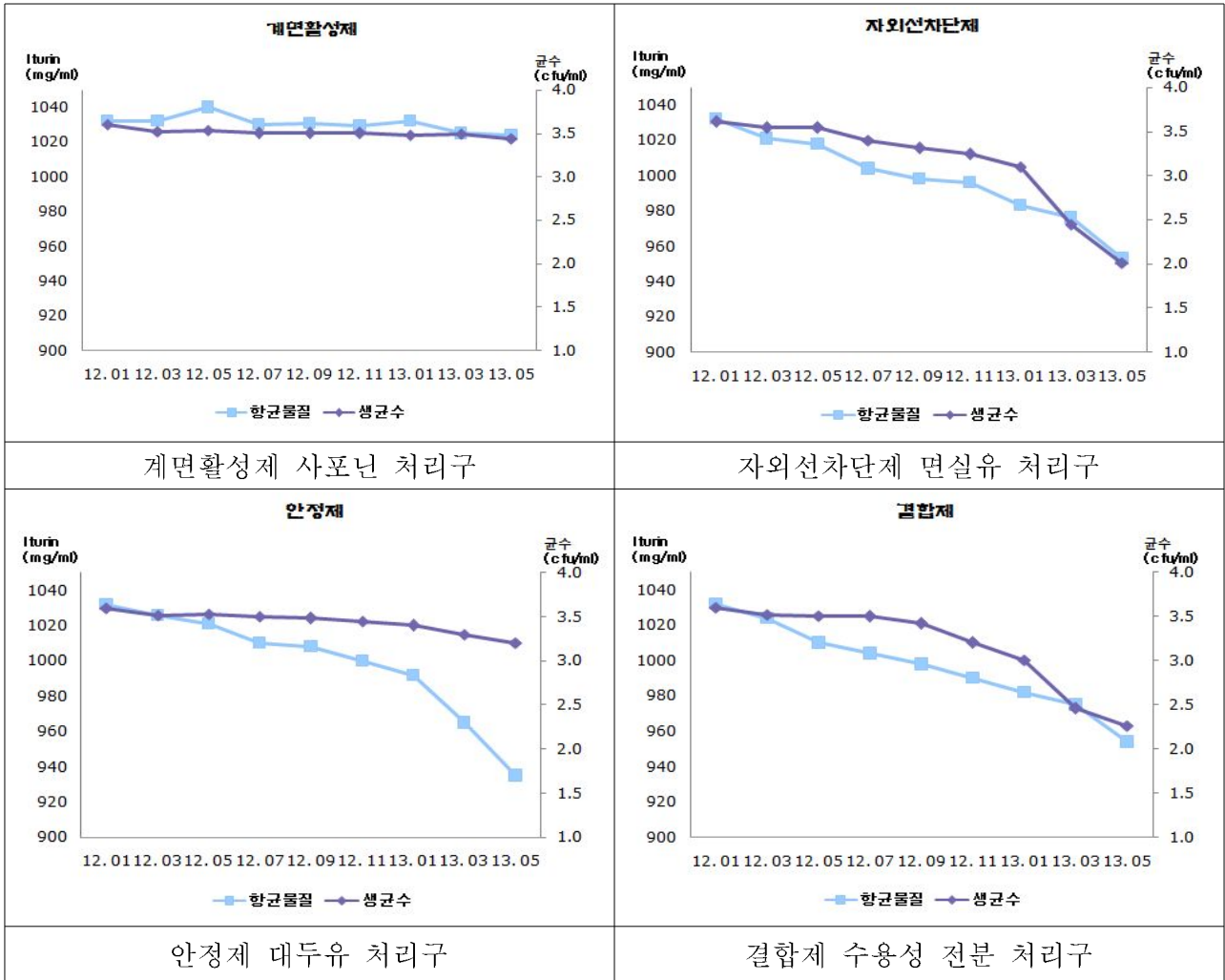


그림 31. *Bacillus subtilis* GA-2005 배양액의 저장성 및 안정성 향상을 위한 보조제 처리.

자. *Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 공장시스템에서의 산업화 배양

1) Pilot plant 생산 process의 확립

전술한 최적배양조건을 *B. subtilis* GA-2005의 pilot plant 생산 시 second 배지 및 main 배지로 사용하였다. Scale up은 앰플 -> 50 ml -> 5 L -> 500 L -> 10 ton의 단계로 진행되었으며 seed 량은 0.5 ~ 1.0%로 하였다. 종균 *B. subtilis* GA-2005는 skim milk를 이용하여 동결건조하여 보관한 앰플을 사용하였다. 50 ml, 5 L의 배양에는 TSB(tryptic soy broth) 배지를 사용하였으며, 500 L, 10 ton은 전술한 최적 배지를 사용하였다(표 14).

표 14. 각 공정별 배양 조건

Process	배양 volume	배양조건	집종량	배양시간(h.)
A unit		-80°C		
B unit	50 ml	37°C, 120 rpm	앰플 1개	6
C unit	5 L	37°C, 80 rpm	50 ml	8
Second	500 L	37°C, 100 rpm	5 L	6
Main	10,000 L	37°C, 100 rpm	500 L	48

## 2) Pilot plant 생산

생산 process를 확립한 후 이를 바탕으로 pilot plant 생산 배양을 진행하였다. B unit은 미리 만들어 놓은 TSB 배지 50 ml에 앰플 1개를 접종하여 진탕배양기에서 배양을 진행하였다. 배양 6시간 후 C unit TSB 배지 5 L에 B unit 50 ml를 접종하였으며, 8시간 후 2 ton 발효조에 500 L의 배지를 멸균하여 C unit 5 L를 접종하였다. Second 배양은 pH가 6.0이 되었을 때 main 배지의 종균으로 사용하였다. Main 배양은 현미경 검경을 통해 포자의 lysis가 완료되었을 때 종료하였다(그림 32). 배양 중 2시간 간격으로 샘플을 취해 균수 및 iturin의 양을 측정하였다. 모든 배지는 121°C에서 30분간 멸균을 진행하였으며, 접종은 무균실에서 진행되었고, 발효기로의 접종은 line 멸균 및 이송도구 멸균을 진행하여 무균상태로 진행되었다. 배양 중 pH, D.O., iturin 함량을 2시간 단위로 샘플링하여 측정하여 시간에 따른 변화를 관찰하였다. pH와 D.O.는 mettler toledo 기계를 사용하여 측정하였고, iturin 함량은 진술한 iturin 표준품을 이용한 항균물질 측정방법을 사용하여 측정하였다. 그 결과 배양 42 시간에 가장 많은 항균물질이 생산되었다(표 15).

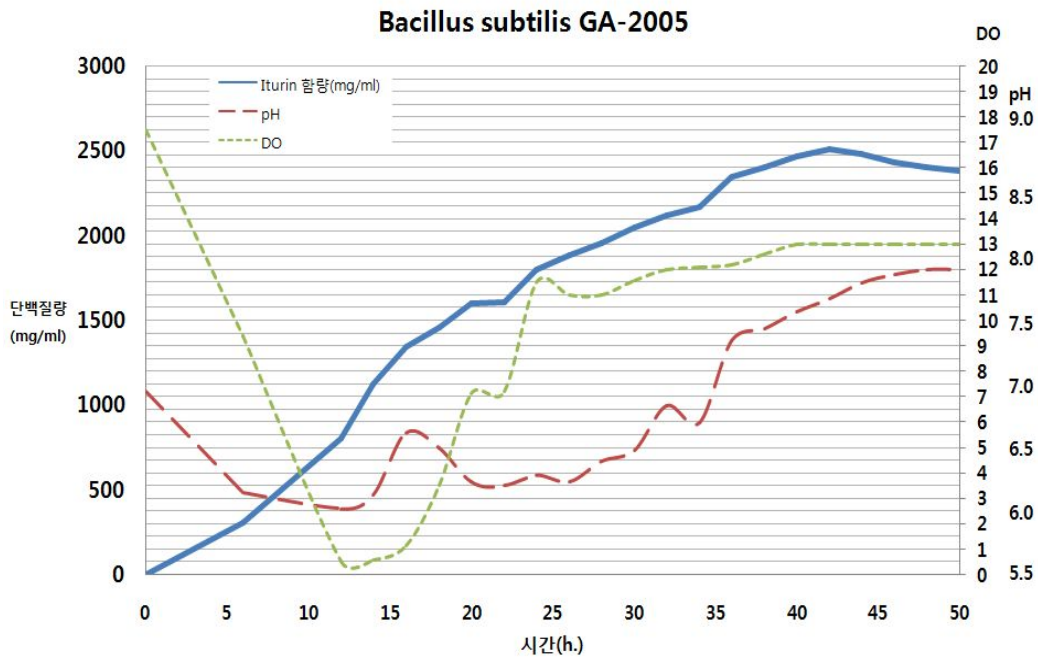


그림 32. *Bacillus subtilis* GA-2005의 대량 배양 공정.

표 15. *Bacillus subtilis* GA-2005의 대량배양 공정 중 iturin 및 배양 수치 변화

	0	6	12	18	24	30	36	42	48
Iturin	0	304	804	1456	1804	2046	2346	2512	2402
D.O.	17.5	9.4	0.51	3.5	11.5	11.6	12.2	13	13
pH	6.94	6.15	6.02	6.5	6.28	6.48	7.34	7.67	7.9


차. Pilot plant 생산 배양액의 유해 중금속, 약해 및 안전성 검증

1) Pilot plant 생산 배양액의 유해중금속 및 약해 평가

멸균공정은 고온과 고압을 이용하기 때문에 여러 가지 배지성분들이 들어갔을 때 예상치 못한 화합물을 만들 수 있다. 이로 인해 성분의 변화가 발생할 수 있으며 bulk type의 원료를 쓰기 때문에 원료를 제조하는 공정상 시약만큼 안전하지 않을 수 있다. 이러한 부분을 확인하기 위해 농진청에서 인정하는 시험기관인 판코리아 농업환경과학연구소에 의뢰하여 유해 중금속 여부를 확인하였으며(그림 33), 또한 자사의 식물배양실에서 약해가 발행하기 쉬운 작물(콩, 배추, 고추, 오이)에 뿌려 7일 후 약해여부를 확인하였다(그림 34). 그 결과 유해 중금속은 적정량 이하였으며, 약해 또한 검출되지 않았다.



관리번호 제 2011-840(1)호

검 사 성 적 서				
위탁자	사업자번호	124-81-14283		
	업체명	우진비엔지(주)	성명	강석진
	주소	경기도 화성시 양감면 송산리 528-5		
공시품명	토사랑			
분석기간	2011. 12. 20 ~ 2011. 12. 26			
용도	관공서제출용			
검 사 성 적				
명칭	항목		성적	비고
토사랑	유해 성분	비소(mg/kg)	0.14	
		카드뮴(mg/kg)	흔적	
		수은(mg/kg)	흔적	
		납(mg/kg)	9.68	
		크롬(mg/kg)	흔적	
		구리(mg/kg)	16.84	
		니켈(mg/kg)	흔적	
		아연(mg/kg)	31.13	
*비고: 흔적(정량한계 이하)				
농촌진흥청시험·분석 및 검정의뢰규칙 제8조의 규정에 의하여 2011년 12월 20일자로 의뢰한 시료에 대한 분석결과를 위와 같이 통지합니다.				
『이 성적은 위탁자가 입의로 제출한 시료의 분석치로서 소송 및 기타 구속력이 있는 자료로 사용하는 데는 적합하지 않으며, 관공서제출용으로 사용이 가능합니다.』				
2011. 12. 26				
<b>분 석 기 관 : (주)판코리아 농업환경과학연구소장 (직인)</b> 				

농촌진흥청 지정 비료 시험연구기관 (제 2008-01호) : 이화학분석·재배시험·비해시험 TEL : 042)824-6734

그림 33. Pilot plant 생산 배양액의 유해 중금속 여부 확인.











콩		배추	
			
Control 7일차	약해 7일차(배양)	Control 7일차	약해 7일차(배양)
Control	<i>B. subtilis</i> GA-2005	Control	<i>B. subtilis</i> GA-2005
고추		오이	
			
Control 7일차	약해 7일차(배양)	Control 7일차	약해 7일차(배양)
Control	<i>B. subtilis</i> GA-2005	Control	<i>B. subtilis</i> GA-2005

그림 34. Pilot plant 생산 배양액의 약해 시험.

## 2) Pilot plant 생산 배양액의 안전성 평가

*Bacillus subtilis* GA-2005의 안전성은 앞의 경구독성실험을 통해 확인하였기 때문에 pilot plant 생산 배양액의 독성부분에 대해서는 별도의 실험을 진행하지 않았다. 그러나 산업화 배양에 사용되는 원료는 시약급으로 사용하면 너무 비싸기 때문에 원료의 질감을 위해 bulk를 사용하고 있다. 이로 인해 원료를 통해 유해미생물(병원성 대장균, 병원성 살모넬라, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*)이 혼입이 될 가능성이 있으며, 발효기가 크기 때문에 멸균공정상 멸균이 제대로 되지 않는 부분이 발생할 가능성이 있기 때문에 목원대학교 미생물생태자원연구소에 의뢰하여 유해미생물이 포함되었는지 여부를 확인하였다. 그 결과 pilot plant 생산 배양액에 유해 미생물이 함유되지 않았음을 확인하였다(그림 35).

검 사 성 적 서				
신 청 인	성 명	강 석 진	업 체 명	우진비엔지 (주)
	주 소	경기도 화성시 양감면 송산리 528-5		
	전 화	031-352-0185	FAX	031-352-1488
공 시 품	명 칭	토사랑		
	형 태	미생물제제		
검 사 방 법	√ 병원성미생물 선택배지를 이용한 추정시험 √ 16S rRNA 유전자 염기서열 해석에 의한 확정시험			
용 도	관공서 제출용			
분 석 결 과				
병원성미생물 검사		검 출 여 부		
병원성 대장균( <i>Escherichia coli</i> )		불 검 출		
병원성 살모넬라( <i>Salmonella sp.</i> )		불 검 출		
<i>Staphylococcus aureus</i>		불 검 출		
<i>Bacillus cereus</i>		불 검 출		
<i>Listeria monocytogenes</i>		불 검 출		
2012 년 1 월 6 일  농촌진흥청지정 비료 시험연구기관 농촌진흥청지정 농약품목등록 시험연구기관  <b>목원대학교 미생물생태자원연구소장</b>  <small>※ 본 결과성적서의 내용은 신청인이 의뢰한 시료에 대한 분석 결과로서 용도이외의 목적으로                      사용함에 따라 발생하는 모든 사항에 대해서, 본 연구소는 그 어떠한 법적책임을 지지 않습니다.</small>				

그림 35. *Bacillus subtilis* GA-2005의 pilot plant 생산 배양액의 유해미생물 오염여부 확인.

카. 친환경농자재로의 등록

전술한 바와 같이 대량생산 process를 확립하고 *Bacillus subtilis* GA-2005 배양액이 작물에 안전한 것을 확인하였다. 앞선 과정을 통해 상품화 가능성이 있다는 판단 하에 친환경농업 육성법에 의거하여 친환경농자재로 공시를 진행하였다. 공시를 진행하기 위해 미리 scale up하기 전에 sample를 제작하여 농진청에서 인정하는 시험기관에 성적서 발급을 요청하였으며, 서류 등을 완비하여 공시-4-1-011의 공시번호를 갖는 “토사랑“을 신규 등록하게 되었다(그림 36). 제형은 상업적인 측면과 사용의 용이함을 토대로 제올라이트를 이용한 입제로 제제하였으며, 보증균수는  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml로 하여 기존의 농자재들 보다 효능이 뛰어난 제품을 제조할 수 있었다(그림 37). 본 연구에서는 우선적으로 친환경농자재로의 등록을 추진하였지만, 현재 바이오농약으로의 등록을 준비하고 있다.



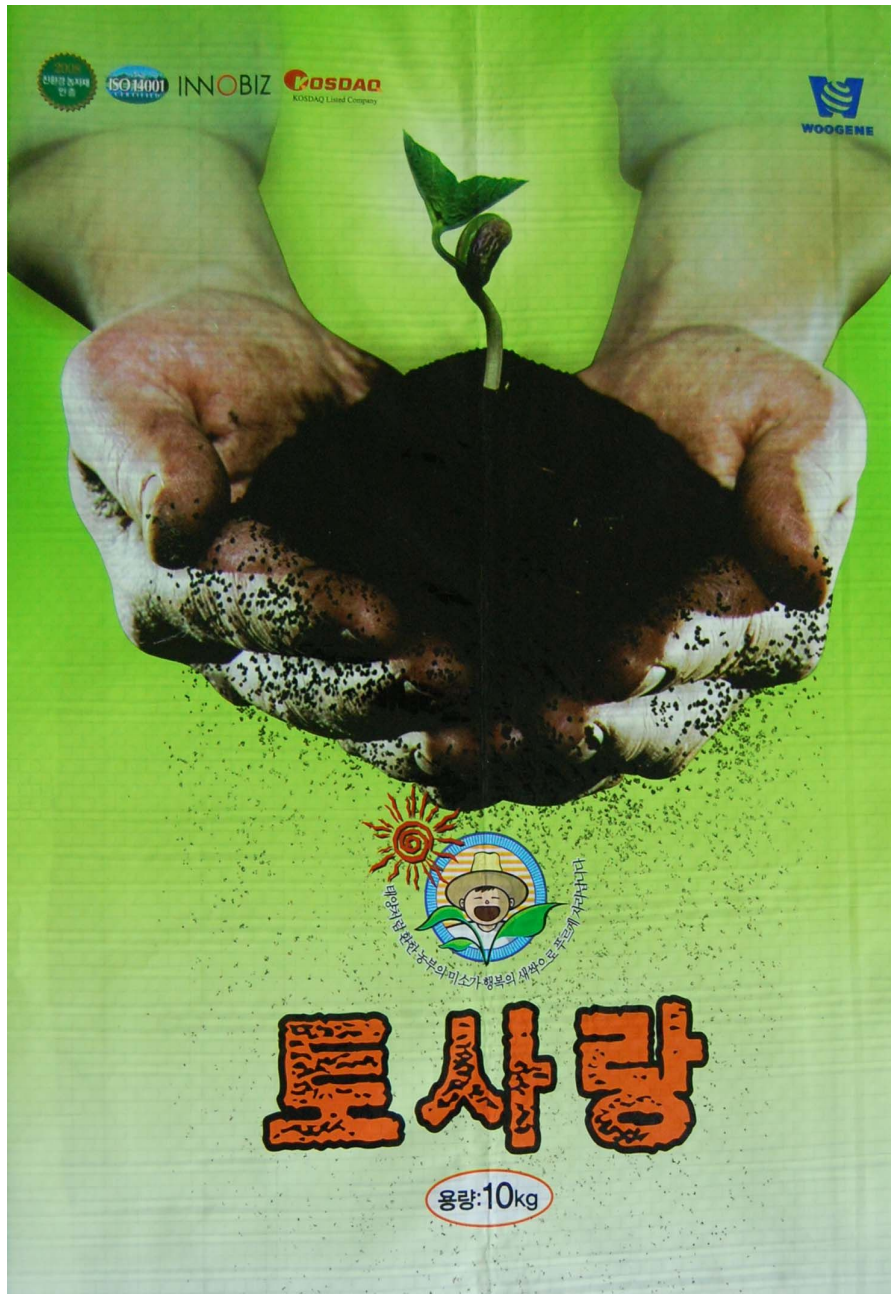


그림 36. *Bacillus subtilis* GA-2005를 주원료로 친환경농자재로 공시한 제품 “토사랑” 사진.

**친환경유기농자재 제품** [■] **공시서**  
[ ] **품질인증서**

공시번호 : 공시-4-1-011

제품명 (상표명)	토사랑	자재종류	토양개량 및 작물생육용 자재
업체명	우진비앤지(주)	대표자	강석진
주소	경기도 화성시 양감면 정문송산로 240		
제조장 소재지	경기도 화성시 양감면 정문송산로 240		
적용대상 농작물	상추, 오이, 콩, 배추, 고추		
적용대상 병해충	해당없음		
유효기간	2012.04.27 ~ 2015.04.26		
보증성분량	해당없음		

「친환경농업육성법 시행규칙」 제33조에 따라 위와 같이  
친환경유기농자재 공시 제품임을 증명합니다.

2012년 4월 27일

농 촌 진 흥 청 장



그림 37. *Bacillus subtilis* GA-2005의 친환경농자재 등록증.

## 2. 항균활성물질 기반 잣빛곰팡이병 방제용 *Streptomyces* sp. BS062

### 가. *Streptomyces* sp. BS062의 발굴 및 연구 배경

3천여주의 방선균을 대상으로 잣빛곰팡이균에 특이적인 길항활성을 나타내는 미생물을 스크리닝하였으며, 그 결과 BS062 균주가 잣빛곰팡이병균의 포자발아를 억제하고 기형적 균사생장을 유도하는 것을 발견하여 BS062균주를 실험균주로 선발하였다(그림 38).

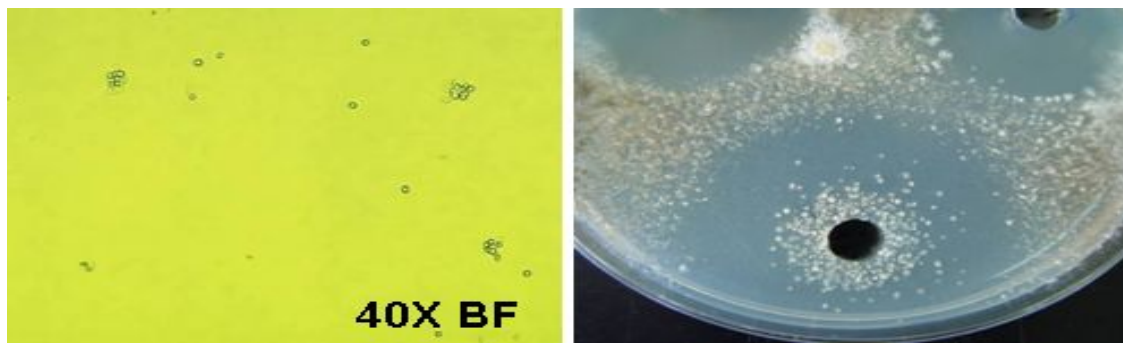


그림 38. BS062균에 의한 잣빛곰팡이병균의 포자발아억제(왼쪽)와 균사기형(오른쪽).

### 나. *Streptomyces* sp. BS062균주의 동정

선발균 BS062의 형태학적 동정을 위하여 GSS배지(Glucose 20 g, Soluble starch 10 g, Meat extract 1 g, Yeast extract 4 g, Sodium chloride 2 g, Dipotassium hydrogen phosphate 0.05 g, Soybean flour 25 g, agar 18 g/L, pH 7)에 접종하고 28°C에서 7일간 배양한 후 관찰한 결과, 회백색의 포자를 풍부하게 생성하며, 배지내에 보라색의 색소를 생산하였다. 본 선발균의 분자생물학적 동정을 위하여 Hopwood 등에서 제시한 방법에 따라 BS062균주의 DNA를 분리하고, 16s-rDNA의 증폭은 Bacteria의 특이적 16s rDNA 증폭용 primers를 사용하여 PCR법을 사용하여 수행하였으며, PCR product는 QIAEXII gel extraction kit를 사용하여 정제하여 직접 PCR product로부터 염기서열을 분석하였다. 선발 방선균 BS062의 16s rDNA 염기서열:

```
AGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGG
ATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGA
AACGGGGTCTAATACCGGATATGACCACCGACCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGT
GCAGGATGAGCCC GCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGG
TAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATG
ACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAA
GAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAA
TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAAC
CCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT
AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATA
CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGTTGGGAAGTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCGAGCTAACGCATTAAG
TTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
```

GCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACC  
 GGAAACATCCAGAGATGGGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTTCGTCAG  
 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGC  
 ATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACTGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGA  
 CGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAT  
 GAGCTGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCT  
 GCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATA  
 CGTCCCAGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAA

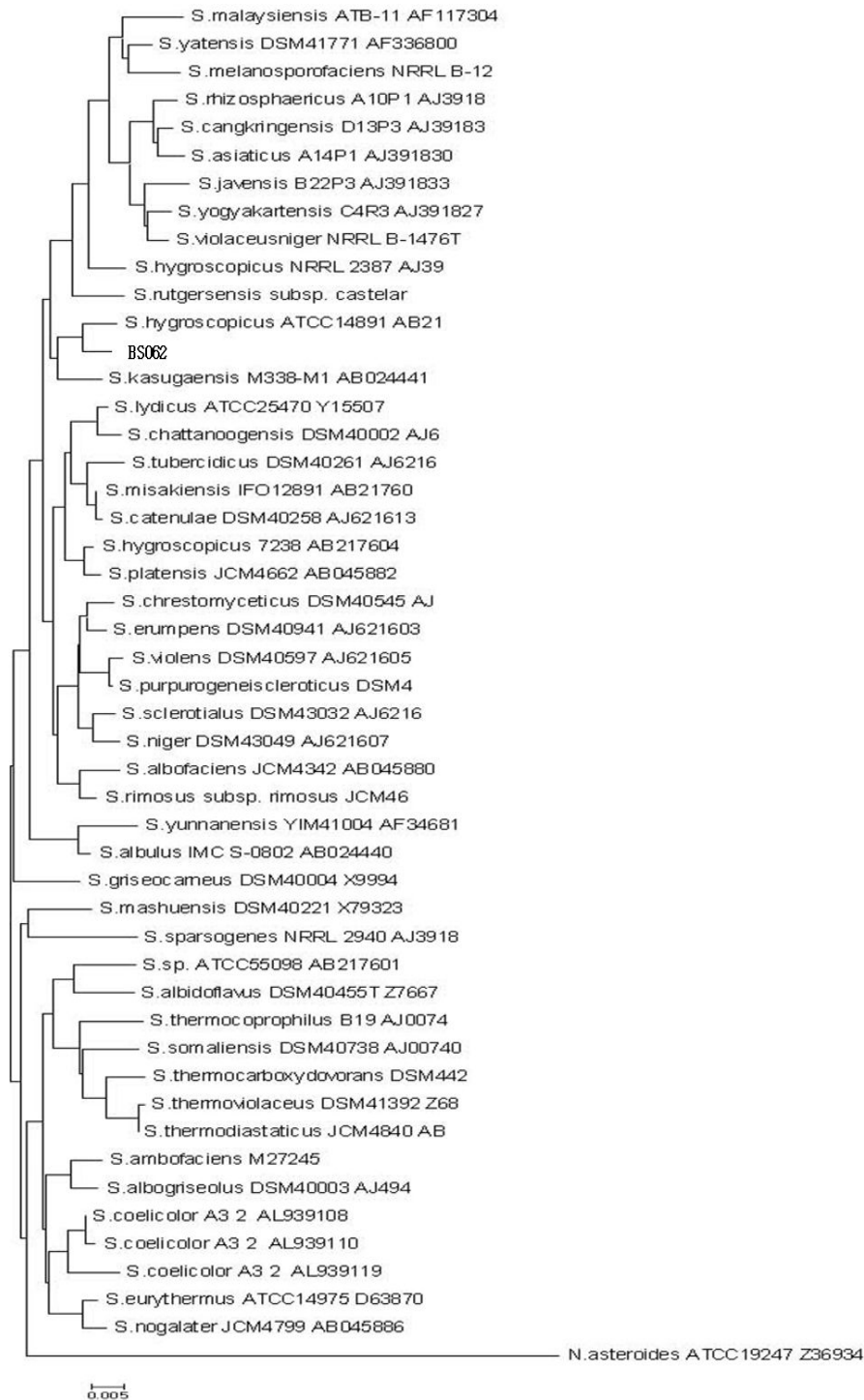


그림 39. *Streptomyces* sp. BS062의 계통도(phylogenetic tree).

분석된 16S rDNA 염기서열 정보는 NCBI의 GeneBank에 등재하였으며 이 서열을 이용하여 Maximum-parsimony algorithm으로 다양한 방선균의 16S rDNA 서열정보와 비교분석하였다. Muruamatsu 등의 연구와 같이 BS062 균주 또한 방선균속 중에서 tricycliccompounds의 생산종으로 널리 알려진 *Streptomyces hygroscopicus*와 99% 이상의 유사도를 지니고 있었다(그림 39). 그러나 BS062균주는 회백색의 포자와 배지 내 보라색 색소를 생성하는 반면, *Streptomyces hygroscopicus* 는 검은색의 포자를 형성하는 등 형태적, 생리적으로 매우 다른 차이를 나타내었다. 따라서 *Streptomyces* sp. BS062로 명명하였다.

다. *Streptomyces* sp. BS062의 항균 스펙트럼

젯빛곰팡이병 억제활성을 갖는 *Streptomyces* sp. BS062의 항균 스펙트럼을 조사하기 위하여 다음과 같은 방법으로 배양을 수행하였다. *Streptomyces* sp. BS062 균주를 전배양 배지 (Soluble starch 10 g, Glycerol 7 g, Bacto peptone 3 g, Soytone peptone 5 g, Yeast extract 3 g, Anti-form 0.5 ml)에 접종한 후, 28°C, 150 rpm으로 2일간 교반 배양하여 접종원으로 사용하였다. 본 배양은 전배양과 동일한 GSS 액체배지를 1 L 삼각플라스크에 200 ml씩 분주하고 1.5 기압 121°C로 20분간 고압 살균하여 제조하였다. 제조된 배지에 전배양한 BS062균 배양액을 플라스크 당 3%(v/v)의 양으로 접종한 후 28°C에서 200 rpm으로 7일간 진탕 배양하였다. 배양 후 원심분리하여 균체와 배양여액으로 나누고, 균체를 80% 아세톤용액으로 추출하여 감압농축한 후, 배양여액과 균체 추출물 각각을 paper disk에 50 µl씩 점적하고 풍건하였다. 이 페이퍼 디스크를 미리 제작한 병원균 검정용 플레이트에 치상하여 2~3일 배양한 후 생성된 저지환의 크기를 조사하였다(표 16).

표 16. *Streptomyces* sp. BS062 균주의 항균 스펙트럼

병원균	항균 활성 <sup>a</sup> (mm)
<i>Bacillus subtilis</i>	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0
<i>Candida albicans</i>	0
<i>Botrytis cinerea</i>	31
<i>Magnaporthe grisea</i>	38
<i>Fusarium oxysporum</i>	10
<i>Fulvia fulva</i>	32
<i>Aspergillus niger</i>	0
<i>Alternaria porri</i>	0
<i>Alternaria mali</i>	0
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	12
<i>Alternaria panax</i>	0
<i>Pythium</i> sp.	0
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	10
<i>Rhizoctonia solani</i>	0
<i>Trichoderma</i> sp.	30
<sup>a</sup> Paper disk method	



그 결과 *Streptomyces* sp. BS062의 배양여액은 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 벼도열병균(*Magnaphorthe grisea*), 토마토잎곰팡이병균(*Fulvia fulva*), 푸른곰팡이병균(*Trichoderma* sp.)에 대하여 강한 항균활성을 나타내었으며, 특히 잣빛곰팡이균에 대하여는 다른 병원균 plate에서 보이는 포자 발아 억제에 의한 clear zone과는 다른 독특한 저지환을 형성하였다.

라. *Streptomyces* sp. BS062균의 잣빛곰팡이병 방제효과

1) 오이 leaf disk를 이용한 감염 억제효과 조사

오이 유묘의 잎에 선발된 방선균 BS062 균주의 배양여액을 병원균 접종 1일 전·후에 분무 처리하고, 풍건 한 후 각 잎으로부터 직경 2.5 cm의 원판을 10~12개씩 잘라내었다. 각각의 leaf disk에 잣빛곰팡이병균 포자현탁액( $1 \times 10^6$  spore/ml)을 25  $\mu$ l씩 점적 접종하여 20°C 항온기에서 배양하면서 잣빛곰팡이병균에 의해 괴사된 오이잎의 병반면적율을 조사하였다. 배양여액 살포 1일 후 병원균 포자현탁액을 처리한 경우, 배양 6일째 무처리구의 오이잎은 완전히 괴사한 반면 BS062균주 배양액 처리구에서는 100%의 병 방제효과를 나타내었다(그림 40). 이는 BS062균주가 생산하는 항진균물질이 잣빛곰팡이병균의 포자 발아를 억제함으로써 병 발생을 억제하는 것으로 사료되었다.

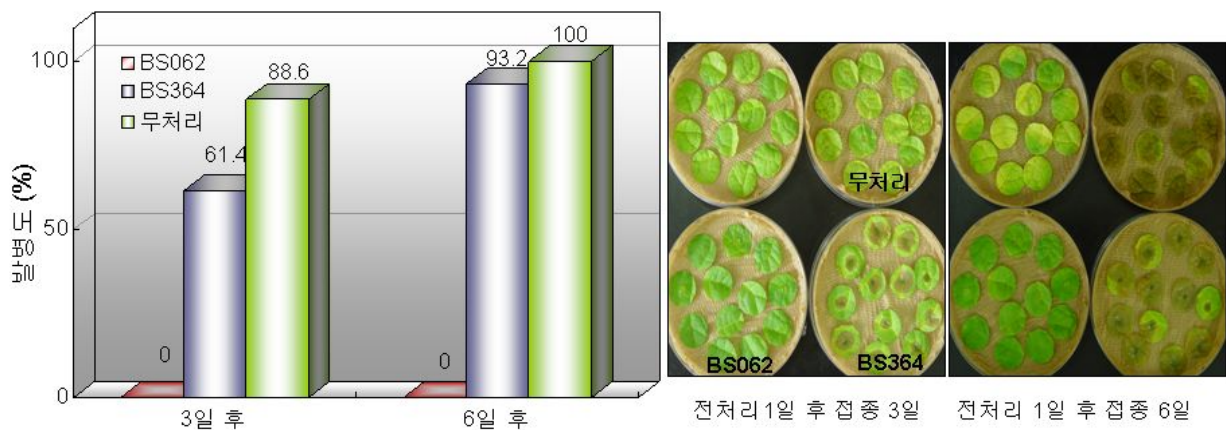
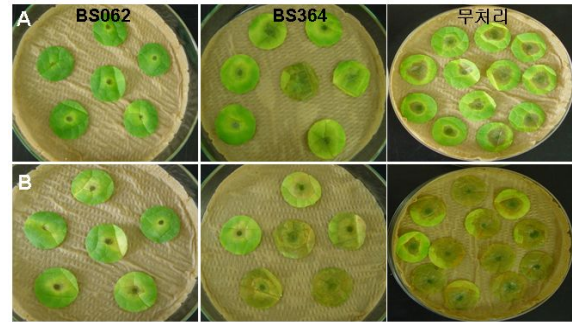


그림 40. BS062균주의 배양여액 전처리 시 잣빛곰팡이병 방제 효과.

또한 후처리 시의 방제효과를 조사하였다. 즉 BS062 균주의 배양여액을 병원균 접종 1일 후 분무처리하고 풍건한 후 항온기에서 배양하면서 잣빛곰팡이병균에 의해 괴사된 오이 잎의 병반면적율을 조사하였다. 그 결과 후처리 시에도 접종 3일 후까지 100%의 병 방제 효과를 보였으며, 접종 7일 후에도 무처리 대비 87.5%의 높은 병 억제 효과를 나타내었다(표 17). 또한 BS062 균주를 처리한 잎의 경우, 점적 접종한 부분에만 병 발생에 의한 괴사현상이 나타났으나 그 이상의 병 진전은 일어나지 않았다. 이상의 결과로부터 BS062 균주 배양여액 처리 시, 병원균의 포자발아가 억제되어 병을 유발할 수 없으며, 이미 병이 유발된 곳의 처리 시에도 BS062 균주가 생산하는 활성물질에 의하여 병원균의 균사 생장이 완전하게 억제되어 병 진전이 억제되는 것을 유추할 수 있었다.

표 17. BS062균주의 배양여액 후 처리 시 잿빛곰팡이병 방제 효과

접종 후 경과일 수	발 병 도 (%)		
	BS062	BS364	무처리
2일	0	7.14	12.5
3일	0	35.7	57.1
6일	4.17	79.2	92.8
7일	12.5	100	100



A: 접종 1일 후 처리, 3일째; B: 접종 1일 후 처리, 6일째

2) 인삼 저장 시 잿빛곰팡이병 방제 효과

인삼 잿빛곰팡이병 방제효과를 알아보기 위하여 먼저 묘삼을 각 시료에 1분간 침지 처리한 후 잿빛곰팡이 포자현탁액 ( $1 \times 10^5$  conidia/ml)을 분무 살포하였다. 풍건한 묘삼은 냉장 보관하면서 병 발생 정도를 조사하였다. 그 결과 *Streptomyces* sp. BS062 균의 인삼 저장 시 잿빛곰팡이병 방제 효과는 80.7%로 나타났으며, 이는 화학농약인 깨끄탄(87.4%)에 견줄만한 활성으로 평가되었다(표 18). 또한 다수의 경우 잿빛곰팡이병이 발생하는 뇌두부위에서 정상적으로 출아가 이루어진 것을 확인 할 수 있었다(그림 41).

표 18. *Streptomyces* sp. BS062균의 인삼 저장 시 잿빛곰팡이병 방제 효과(금산인삼약초시험장)

처리내용	건건율 (%)	부패율(%)		출아후 줄기 길이(cm)	방제가 (%)
		뇌두+표피	표피		
BS062	77.9	10.3	11.8	3.7	80.7
농약(깨끄탄)	80.0	6.7	13.3	3.5	87.4
무처리	13.3	53.3	33.3	-	-



<BS062> <Bacillus 제품> <깨끄탄(농약)> <무처리>




그림 41. BS062 균주 배양여액의 인삼잿빛곰팡이병 억제 효과.

3) 묘삼 침지 후 식재 시 잿빛곰팡이병 방제 효과

묘삼 식재 시 잿빛곰팡이병 방제 및 출아율을 조사하기 위하여, 묘삼을 각 시료에 침지처리 한 후 포장에 식재하였다. 각 처리구의 출아율 및 생육 상태는 식재 처리 30일 후 조사하였으며, 그 결과 BS062 처리구의 경우 무처리에 비해 출아율이 월등히 좋지는 않았으나 출아 시점의 생육 상태가 매우 양호하였다(표 19).

표 19. 묘삼 침지 후 식재 시 인삼 잿빛곰팡이병 방제 효과(금산인삼약초시험장)

처리내용	출아율 (%)
BS062	78.8
농약(깨끄탄)	93.8
무처리	73.8

BS062
깨끄탄(농약)
무처리

4) 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과

가) *In vivo* 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과

딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과는 *in vivo* 실험을 통하여 조사하였다. 균 배양액 20배 희석액, 대조약제(에코스마트 500배액) 그리고 무처리구로서 물을 딸기유묘에 분무 살포하고 풍건한 후 병원균 포자현탁액 ( $1 \times 10^5$  conidia/ml)을 분무 살포하였다. 각 시료를 처리한 딸기 유묘는 습실 처리하여 25°C 항온기에서 일정시간 유지한 후 꽃대, 미성숙과 및 성숙과에서의 병 발생 정도를 조사하였다. 그 결과 접종 4일 후 BS062 처리구의 경우, 미성숙과에서 병 발생이 전혀 없었으며 성숙과 또한 현저히 낮은 이병율을 보였다(그림 42).

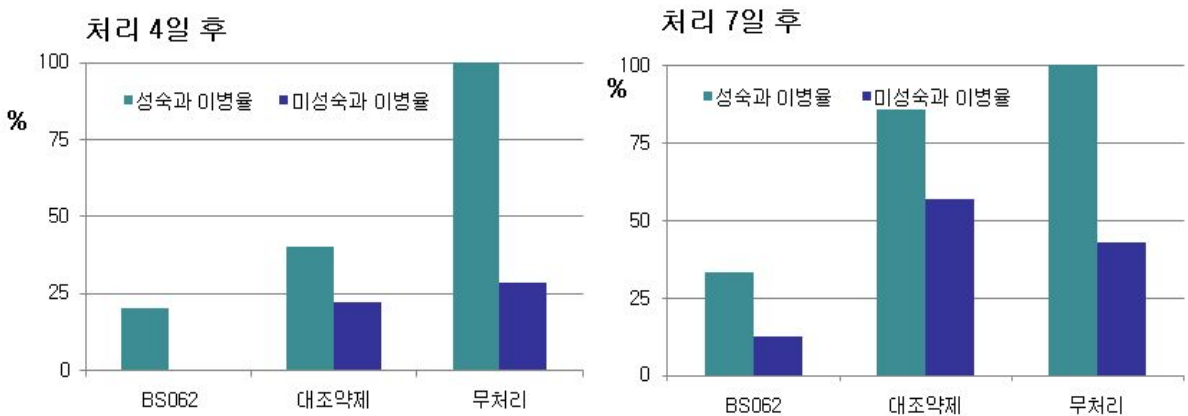


그림 42. *Streptomyces* sp. BS062균의 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과.



또한 접종 7일 후에서도 무처리구나 대조약제 처리구와 비교하여 미성숙과와 성숙과 모두에서 현저히 발병을 억제하였다. 대부분의 약제가 꽃과 미성숙 열매의 잿빛곰팡이병 방제에는 우수하나 성숙과의 병 예방에는 효과가 많이 떨어지는 것에 비하여 본 균주 배양액은 미성숙과 뿐만 아니라 성숙과에서도 병 억제 활성이 매우 우수하였다.

나) 포장에서의 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과

*Streptomyces* sp. BS062 균의 포장에서의 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과를 평가하였다. 시험은 논산 딸기시험장에서 설향 품종을 이용하여 수행하였으며 3반복 실시하였다. 먼저 균 배양 여액 20배 희석액을 7일 간격으로 2회 살포한 후 최종살포 7일 후 병 발생 정도를 조사하였다. 그 결과 꽃과 꽃대 및 미성숙과에서의 병반 형성이 무처리구나 대조약제와 비교하였을 때 현저히 낮았으며, 성숙과에서도 85%의 높은 병 방제 효과를 나타내었다(그림 43). 이는 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 방제효과가 포장에서도 재현됨을 나타내는 것이다.

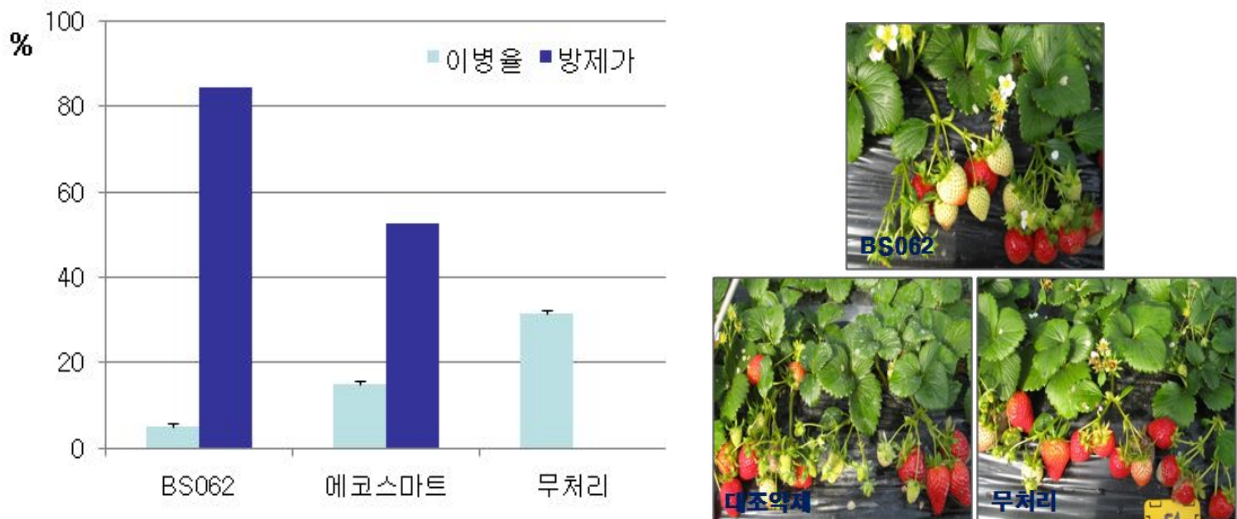


그림 43. BS062균 배양여액 처리에 의한 포장에서의 딸기 잿빛곰팡이병 방제 효과.

마. *Streptomyces* sp. BS062균의 항균 특성 규명

잿빛곰팡이균 포자현탁액을 도말한 검정균 plate에 BS062균을 처리한 경우, 다른 방선균 배양액 처리 시 관찰되는 clear zone과는 다른 turbid zone을 확인할 수 있었다. 이러한 현상은 BS062균주가 생산하는 항균물질이 포자 발아를 억제할 수 없으나 균사 기형에 영향을 줌으로써 병원균의 증식을 억제하여 병 방제효과를 나타내는 것으로 유추되었다. 따라서 본 균주가 유발하는 균사 기형이 병원성을 유지하는지를 알아보기 위하여 아래 그림 44에서와 같이 정상 균사와 활성물질에 의한 비정상 균사 조각을 PDA plate에 계대하여 균사 생육을 확인하였으며, 또한 이들을 오이 leaf disk에 접종하여 잎 괴사 여부를 조사하였다. 그 결과 BS062균 처리에 의해 변형된 균사의 경우 더 이상의 균사생장이나 오이 잎에서의 발병 현상이 관찰되지 않았다. 이는 본 선발균이 생산하는 활성물질은 잿빛곰팡이균의 균사생장을 변화시킴으로써 병원균의 병원성을 소실시킴을 알 수 있었다.

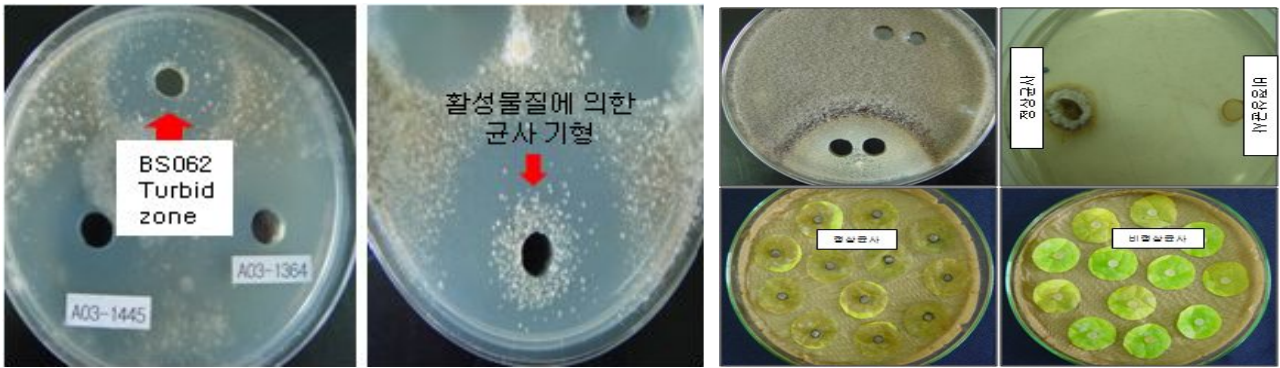


그림 44. *Streptomyces* sp. BS062 균주 배양액에 의한 젓빛곰팡이균의 균사 기형 유발.

따라서 이같은 특이적인 작용기전을 나타내는 활성화합물을 규명하기 위하여 *Streptomyces* sp. BS062 균주의 배양물로부터 활성물질의 분리, 정제 및 화학구조 규명을 수행하였다.

바. *Streptomyces* sp. BS062균이 생산하는 항균활성물질

1) *Streptomyces* sp. BS062균이 생산하는 항균물질의 분리 및 정제

전술한 바와 같이 *Streptomyces* sp. BS062 균주는 특이한 기전으로 젓빛곰팡이균에 강력한 항균활성을 나타내었다. 따라서 본 균주의 활성성분을 지표로 한 quality control 체계를 구축하고 세부적인 활성기전을 유추하고자 항균활성성분의 분리 및 정제를 수행하였다. 그림 45에 항균활성성분의 분리 및 정제 과정을 도시하였다. 각 단계마다 젓빛곰팡이균에 대한 항균활성을 통하여 활성물질을 정제하였다. 먼저 항균물질의 생산을 위하여 BS062 균주를 방선균용 배지인 GSS 배지에 접종하고 28°C에서 7일간 진탕 배양한 후 배양액을 6,000 rpm으로 40분간 원심 분리하여 배양여액과 균체로 나누었다. BS062 균주가 생산하는 항균물질은 배양여액과 균체 모두에 존재하였으며 배양여액의 경우 Diaion HP-20 column chromatography를 실시하여 활성물질을 분획하였다. 또한 균체의 경우 아세톤으로 추출하여 감압 농축한 후 ethyl acetate를 이용하여 분획 추출하였다. 젓빛곰팡이균에 활성을 보인 배양여액의 메탄올 분획과 균체 추출물의 ethyl acetate 추출물을 합한 후 60 → 80% methanol을 용출용매로 이용하여 reversed-phase(ODS) column chromatography를 수행하였다. 활성을 나타낸 80% methanol 용출물을 감압농축한 후 CHCl<sub>3</sub>:MeOH(50:1→5:1)을 이용한 silica gel column chromatography를 수행하였다. 그 결과 CHCl<sub>3</sub>:MeOH(30:1) 분획물과 CHCl<sub>3</sub>:MeOH(10:1) 분획물에서 강한 항균활성이 나타났다. CHCl<sub>3</sub>:MeOH(30:1) 분획물은 methanol의 함량을 달리한 세 차례의 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행한 후 preparative HPLC를 수행하여 활성물질 BM-1을 정제하였다. CHCl<sub>3</sub>:MeOH(10:1) 분획물은 70% aqueous methanol을 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행한 후 preparative HPLC를 수행하여 활성물질 HP-1을 정제하였다. *Streptomyces* sp. BS062 균주는 두 종류의 항균 활성물질을 생산하였으며, HP-1 화합물은 젓빛곰팡이균에 대하여 clear zone을 형성하였으며, BM-1 화합물은 turbid zone을 형성하였다. 이들 각각의 화합물은 항균 활성 패턴이 달라 서로 다른 기전에 의하여 활성을 나타내는 것으로 유추되었다.

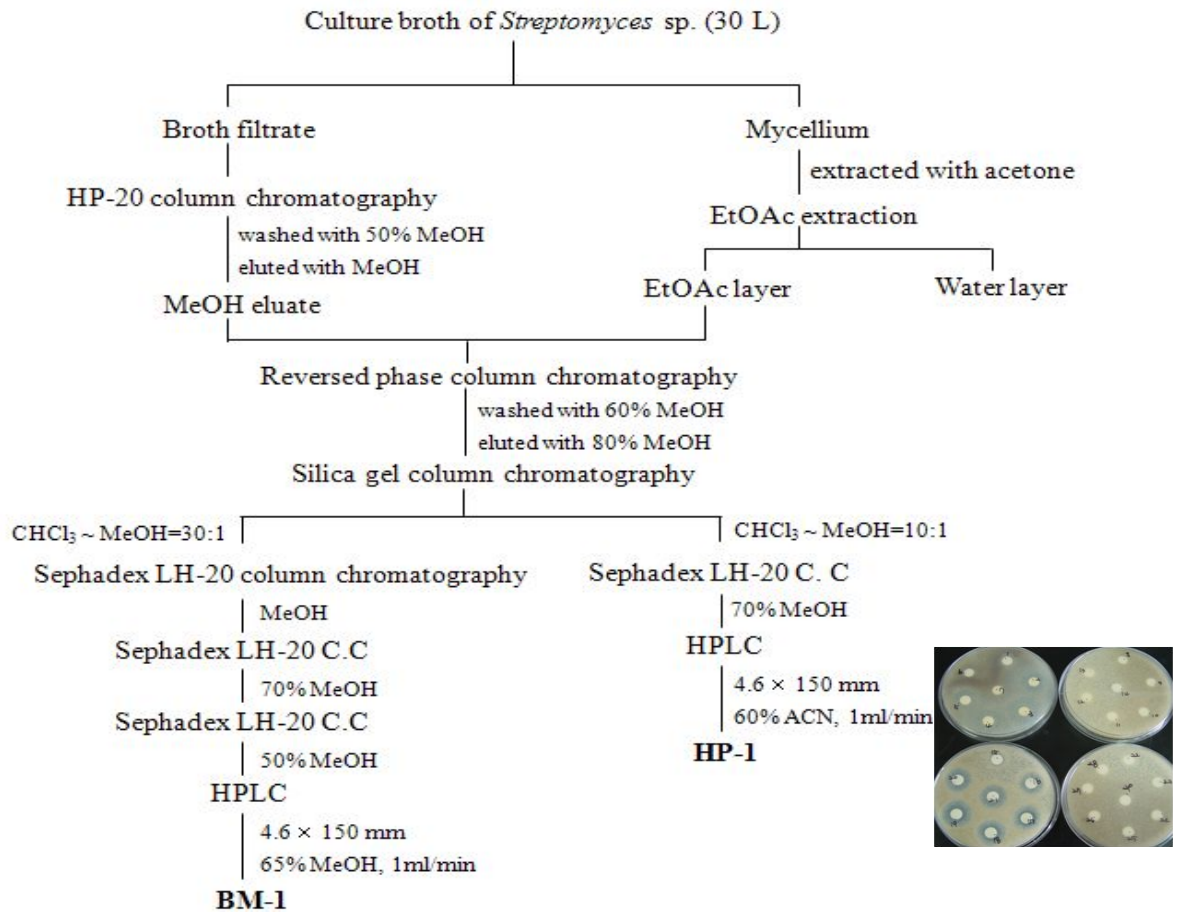


그림 45. *Streptomyces* sp. BS062 균주가 생산하는 항진균물질의 분리 및 정제.

2) *Streptomyces* sp. BS062균이 생산하는 항균물질의 화학구조 구명

가) Clear zone을 형성하는 화합물 HP-1의 화학구조

젯빛곰팡이병균에 대하여 항균 clear zone을 형성하는 화합물 HP-1의 화학구조를 결정하기 위하여 CD<sub>3</sub>OD에 녹여 <sup>1</sup>H NMR(그림 46), <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY(그림 47), HMBC spectrum(그림 48)을 측정하여 해석하였다. <sup>1</sup>H NMR spectrum을 측정한 결과, 8.2 ppm 부근에서 amide aldehyde proton, 6.7 - 8.2 ppm 사이에서 다수의 aromatic proton, 4.9 - 5.6 ppm 사이에서 다섯 개의 oxygenated proton, 0.8 - 1.3 ppm 사이에서 7 개의 methyl proton이 관찰되었다.

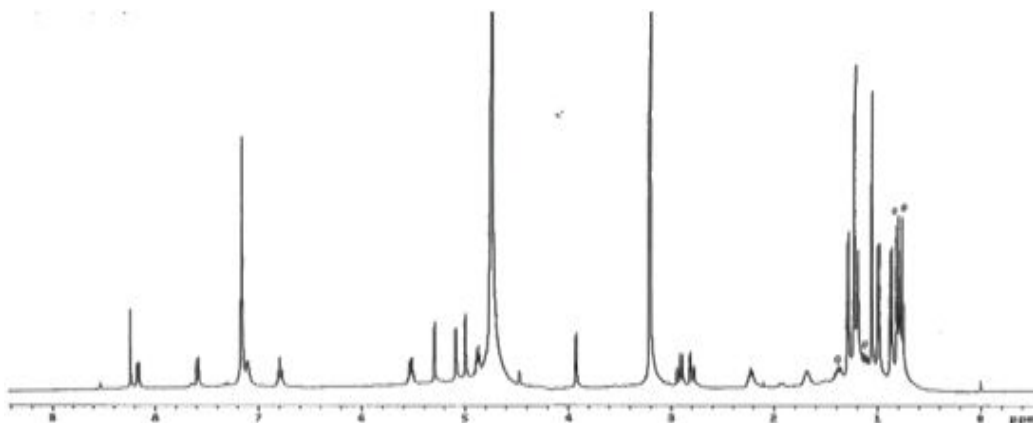


그림 46. 항균활성 화합물 HP-1의 <sup>1</sup>H NMR spectrum.

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum의 측정 결과, 화합물 HP-1을 구성하는 다섯 개의 부분구조가 규명되었다. 최종적으로 HMBC spectrum의 측정 및 해석에 의하여 화합물 HP-1의 화학구조를 그림 49와 같이 결정하였다. 그 결과 본 화합물은 분자식  $\text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{12}$ , 분자량 698의 isoneoantimycin으로 규명되었다.

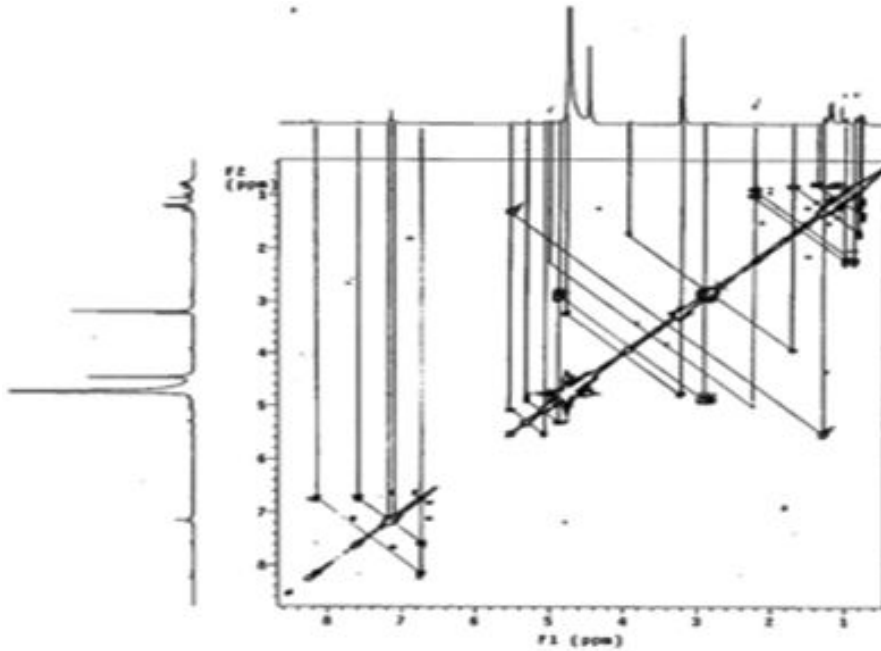


그림 47. 항균활성 화합물 HP-1의  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum.

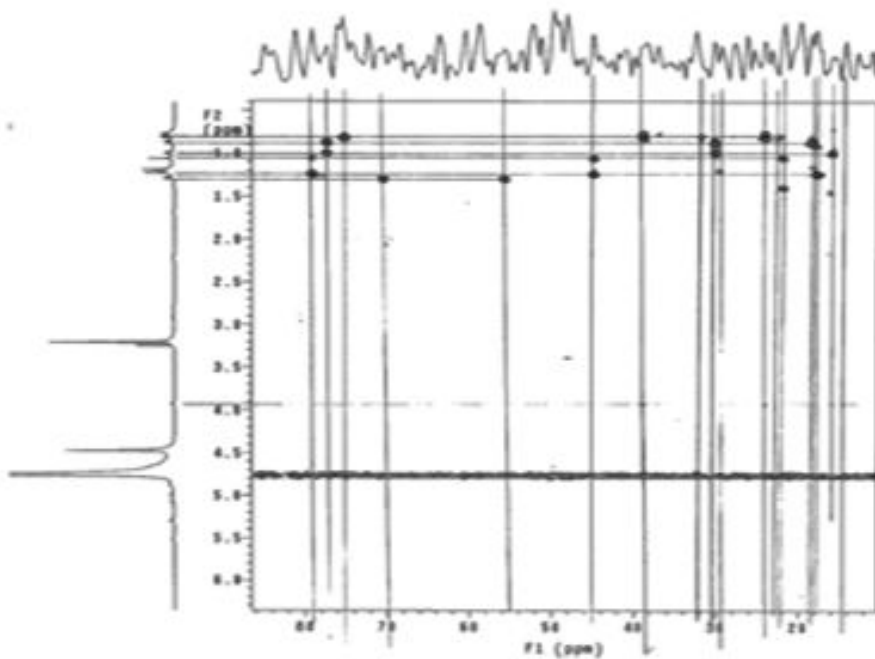


그림 48. 항균활성 화합물 HP-1의 HMBC spectrum.

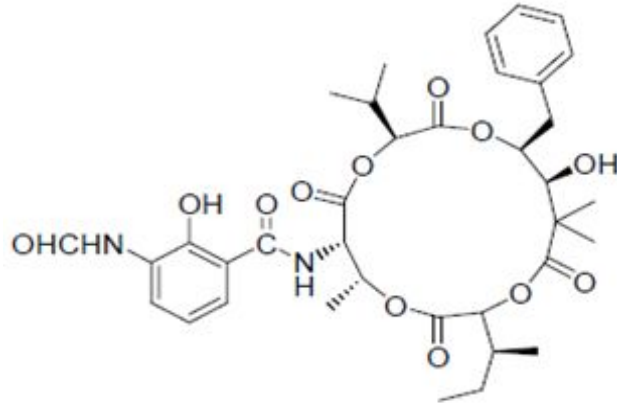


그림 49. 항균활성 물질 HP-1의 화학구조.

나) Turbid zone을 형성하는 화합물 BM-1의 화학구조

Turbid zone을 형성하는 활성물질 BM-1은  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (30:1)을 용매로 silica gel column chromatography와 60% 함수 메탄올을 이용한 HPLC (retention time 18~26, 그림 50)를 수행하여 정제하였다. 잣빛곰팡이균의 균사 기형을 일으킴으로써 병원성 소실을 야기하는 항균물질 BM-1의 화학구조를 규명하기 위하여  $\text{CD}_3\text{OD}$ 에 녹여  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT,  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY, HMQC 및 HMBC spectrum을 측정하여 해석하였다.

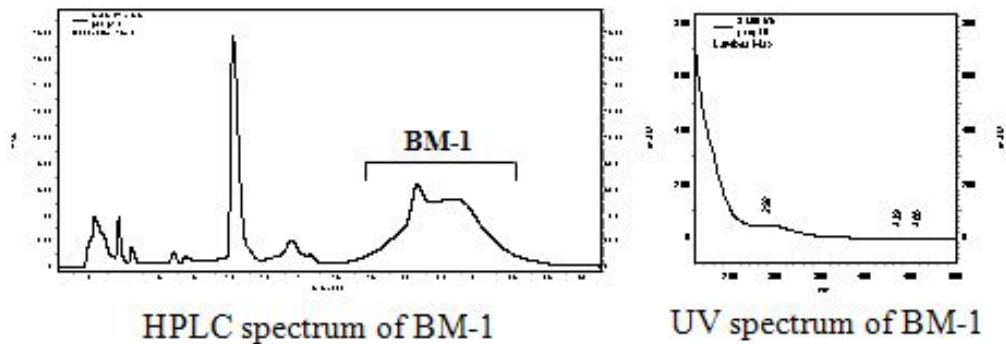


그림 50. 항균활성물질 BM-1의 HPLC profile 및 UV spectrum.

$^1\text{H}$  NMR spectrum(그림 51)을 측정한 결과, 5.2 ppm에서 두 개의 olefinic methine proton, 3.4 - 4.7 ppm 사이에서 다수의 oxygenated methine proton, 3.3 - 3.4 ppm 사이에서 세 개의 methoxymethyl proton, 1.1 - 3.1 ppm 사이에서 다수의 methine 및 methylene proton, 0.8 - 1.8 ppm 사이에 6개의 methyl proton이 관찰되었다.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum(그림 52)을 측정한 결과, 세 개의 ketone carbonyl, ester carbonyl, amide carbonyl 탄소, 두 개의 이중결합에 기인하는 네 개의  $\text{sp}^2$  탄소, 100 ppm 근처에서 anomeric carbon, 70 - 85 ppm 사이에서 다수의 oxygenated carbon, 57 ppm 부근에서 methoxyl carbon, 10 - 45 ppm 사이에서  $\text{sp}^3$  methine, methylene, methyl 탄소가 관찰되었다.

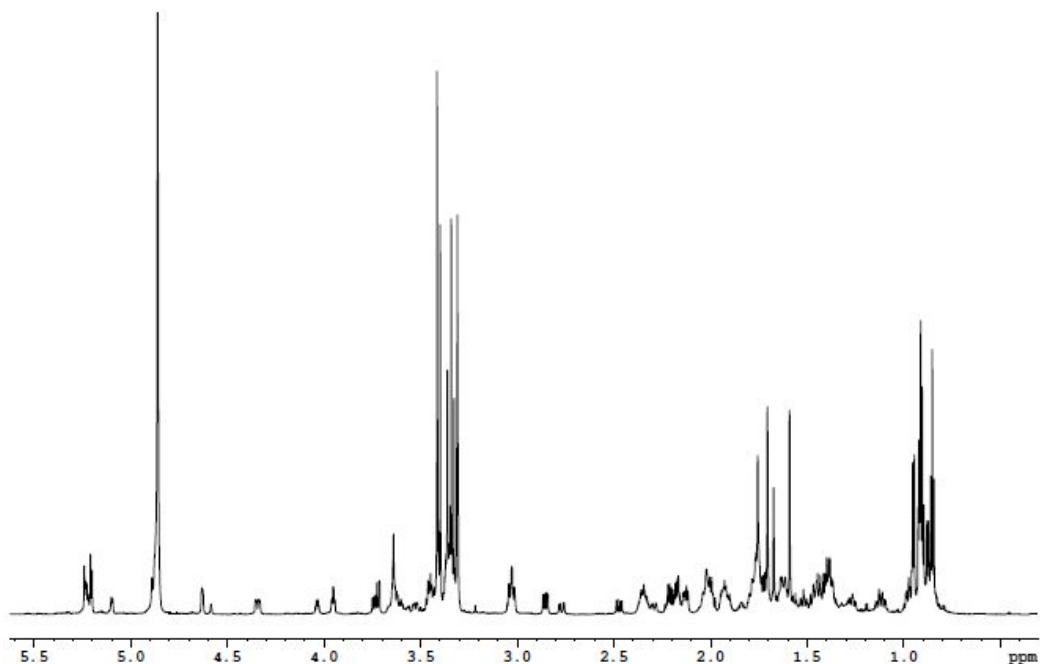


그림 51. 화합물 BM-1의  $^1\text{H}$  NMR spectrum.

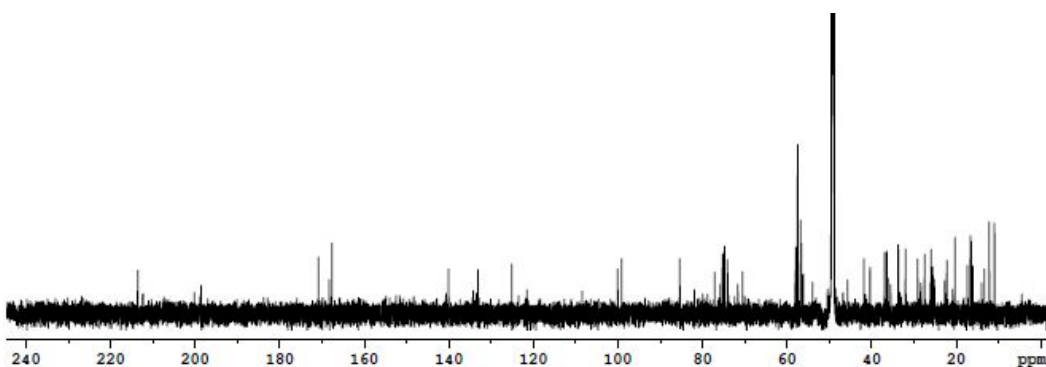


그림 52. 화합물 BM-1의  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum.

DEPT spectrum(그림 53)의 측정 및 해석으로부터 BM-1을 구성하는  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$  및 사급탄소를 규명하였고,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum(그림 54)을 측정하여 수소-수소간의 상관관계를 밝혀 BM-1을 구성하는 부분구조를 밝혔다. 또한 HMQC spectrum(그림 55)을 측정, 해석하여 proton-bearing carbon을 규명하였으며, HMBC spectrum(그림 56)으로부터 관찰된  $^2J_{\text{CH}}$  및  $^3J_{\text{CH}}$ 의 상관관계를 규명하여 항균활성물질 BM-1의 화학구조를 규명하였다. NMR study로부터 규명한 화합물 BM-1의 화학구조를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum(그림 57)을 측정, 해석하였다. Positive mode에서 ESI-mass를 측정한 결과,  $m/z$  831에서  $[\text{M}+\text{K}]^+$  피크가,  $m/z$  815에서  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  피크가 관찰되었으며, negative mode에서 측정한 결과,  $m/z$  791에서  $[\text{M}-\text{H}]^-$  피크가 관찰되어 본 화합물의 분자량이 792임을 알 수 있었다. 이는 NMR 측정으로부터 해석된 화학구조와 정확히 일치하는 것이다. 이상의 결과를 근거로 database를 검색한 결과, 본 화합물을 FK520(그림 58)으로 동정할 수 있었다.



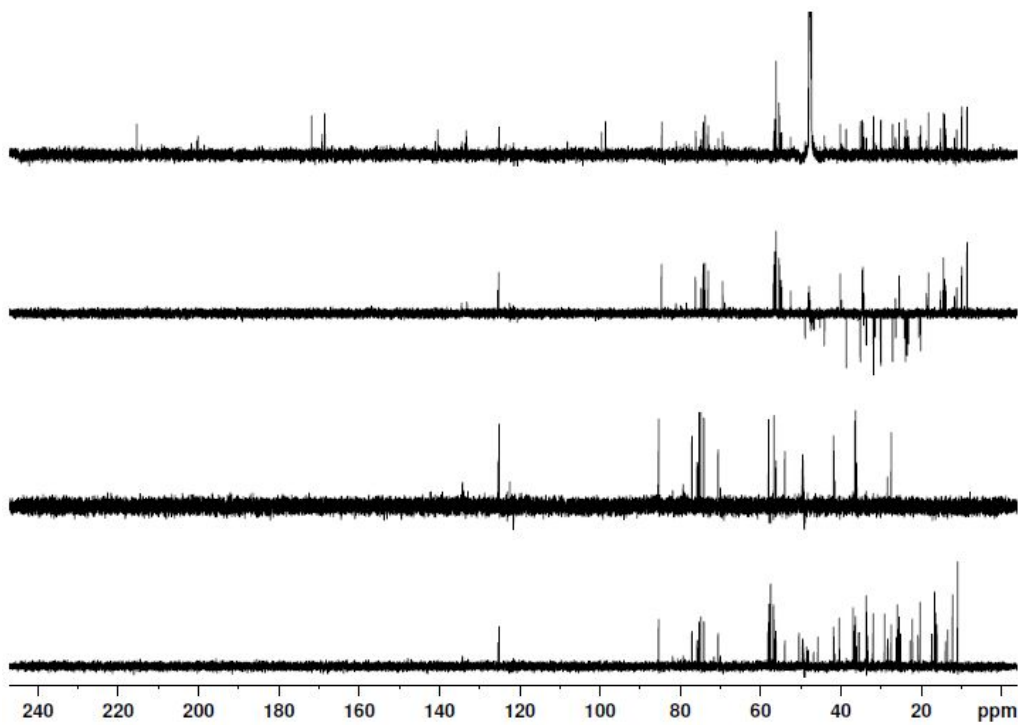


그림 53. 화합물 BM-1의 DEPT spectrum.

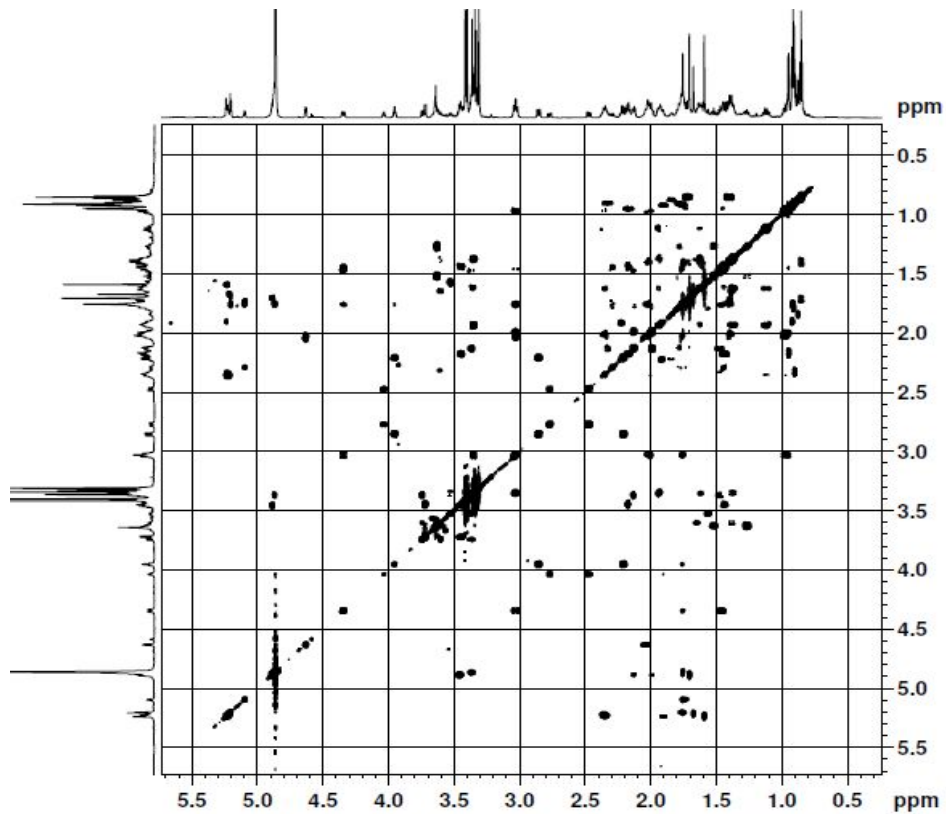


그림 54. 화합물 BM-1의  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum.

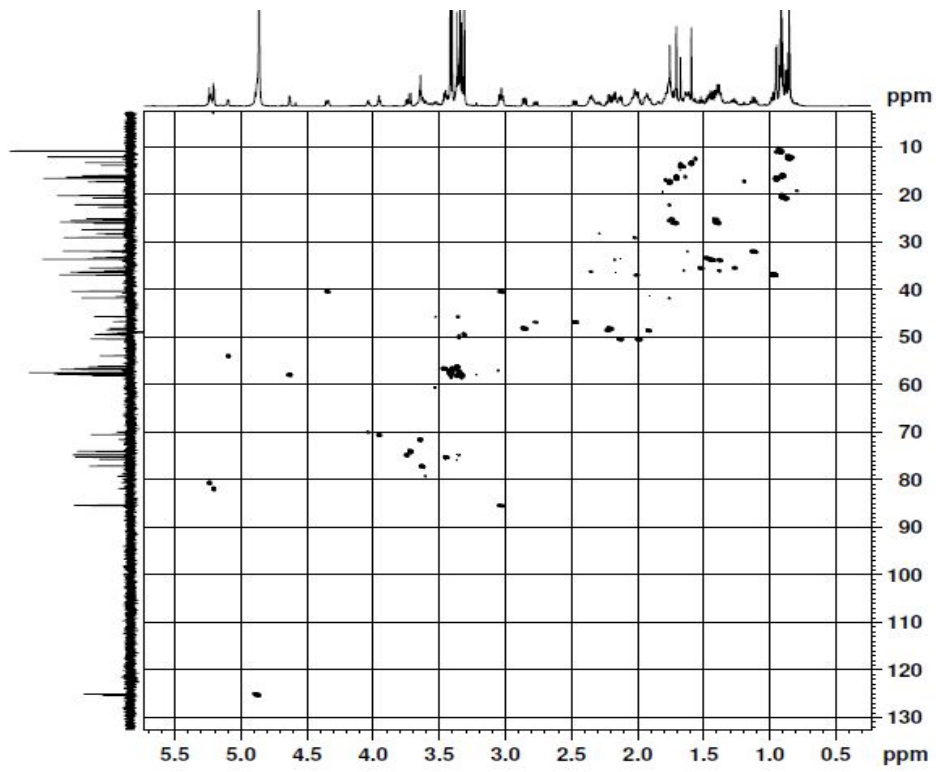


그림 55. 화합물 BM-1의 HMQC spectrum.

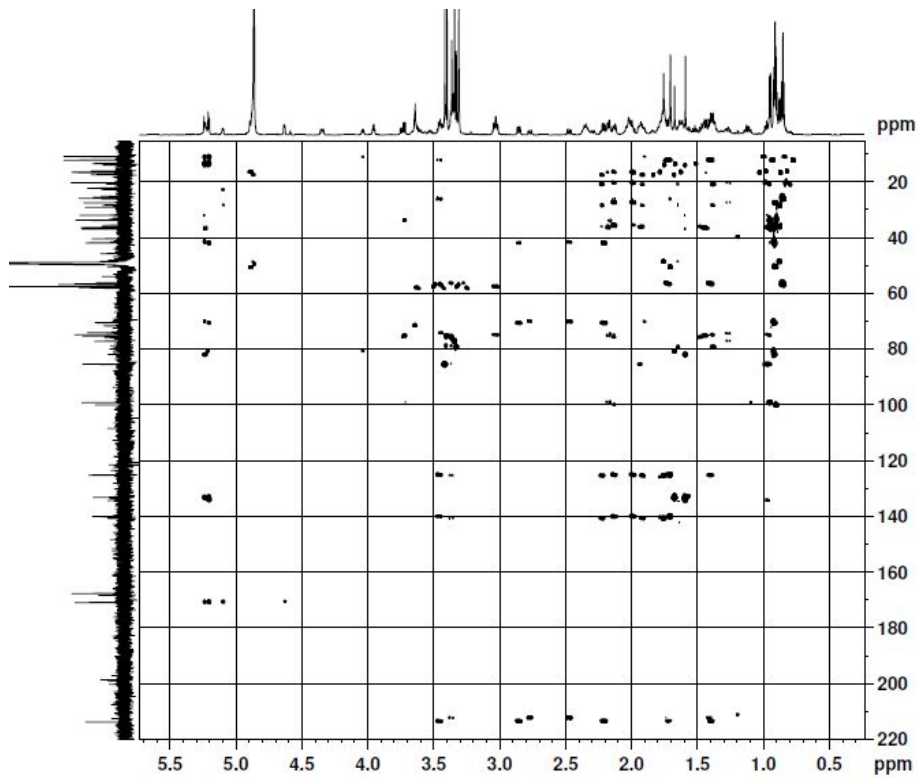


그림 56. 화합물 BM-1의 HMBC spectrum.



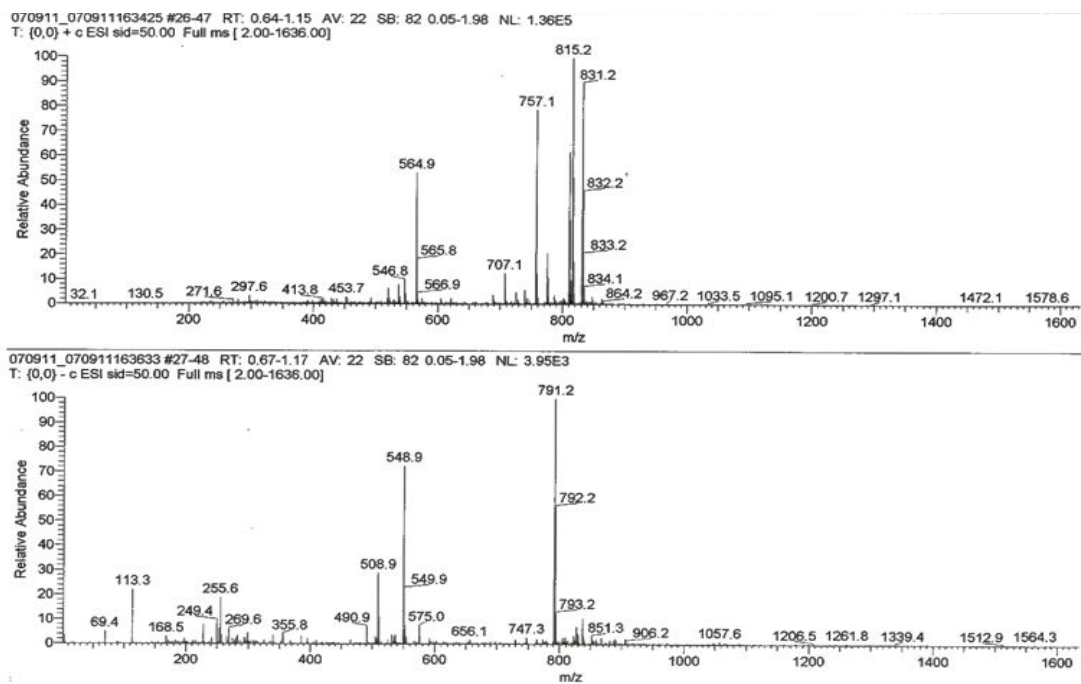


그림 57. 항균활성물질 BM-1의 ESI-mass spectrum.

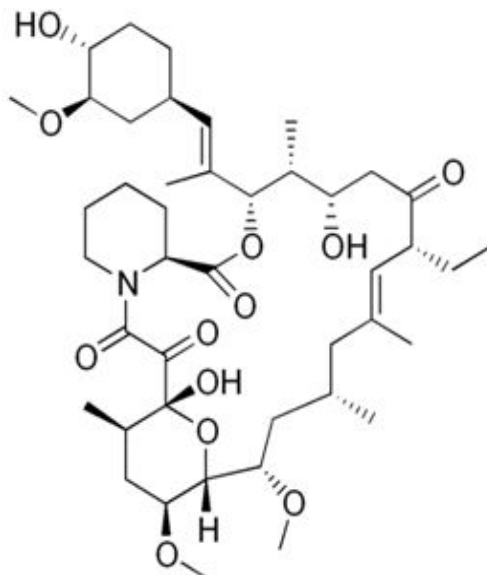


그림 58. 화합물 BM-1의 화학구조.

사. *Streptomyces* sp. BS062균의 배양조건 검토

1) *Streptomyces* sp. BS062균의 배지별 항균물질의 생산능

BS062균의 액체배양을 위한 최적 배양배지를 선발하기 위하여 일반적으로 방선균 배양에 사용되고 있는 액체배지(표 20)에서의 생육 및 항균활성을 조사하였다. BS062 균은 benett's agar plate에서 5일간 배양한 후 균총 9개를 각 액체배지 (200 ml/1000 ml baffled 삼각 플라스크)에 접종하고 27°C, 140 rpm 조건으로 배양하면서 잿빛곰팡이균에 대한 항균활성을 조사하였다. 그 결과, M 배지에서 배양한 경우 항균활성이 가장 높았으며 활성물질의 지속력도 우수하였다(그림 59). 또한 각 배지 모두 배양 기간에 따라 항균활성이 서서히 증가하다가 배양 6일을 기준으로 활성이 감소함을 알 수 있었다. 따라서 BS062균의 이후 실험에서는 M배지에서 6일간 배양하여 사용하였다.

표 20. 배양조건 검토를 위하여 사용한 기본배지 조성표

배지 종류	배지 조성
C4 배지	glucose 2%, soluble starch 1%, soybean meal 2.5%, yeast ext. 0.4%, NaCl 0.2%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.005%
GSS 배지	glucose 2%, soluble starch 1%, soybean meal 2.5%, yeast ext. 0.4%, NaCl 0.2%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.025%
M 배지	soluble starch 7%, soybean meal 0.5%, yeast ext. 1.7%, CSL 0.5ml, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1%, CaCO <sub>3</sub> 0.1%

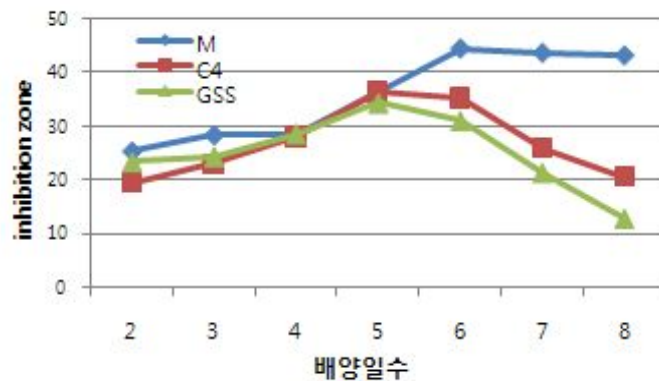


그림 59. 배양기간에 따른 항균활성 비교.

2) 교반속도의 영향

일반적으로 교반 속도의 영향은 직접적으로 균 배양 시 물성에 변화를 주고 균의 증식형태에도 영향을 미치게 되며 배양시간에 따라 미생물의 반응도 변하게 한다. 따라서 BS062균의 항균물질 생산에서 교반속도의 영향을 알아보기 위하여 M배지를 1000 ml 삼각플라스크에 200 ml씩 분주하고 2일간 전배양한 배양액 5 ml를 접종하였다. 각 플라스크는 각각의 교반 속도로 6일간 배양한 후 항균활성을 조사하였다. 교반속도에 따라 항균 물질 생산 시간 및 활성에서

약간의 차이를 보였는데 일반적으로 배양 6일째에서 활성이 우수하였으며, 120 rpm의 교반 속도로 배양 시 항균물질 생성능이 가장 우수하였다(그림 60).

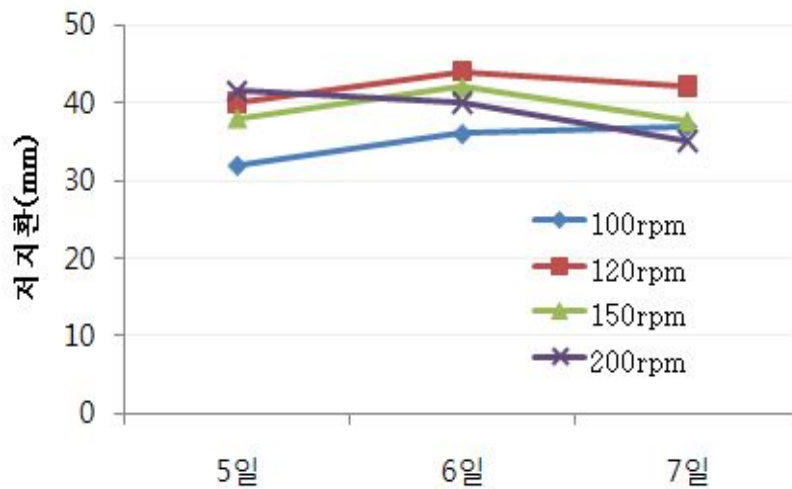


그림 60. 교반속도에 따른 항균활성 비교.

아. *Streptomyces* sp. BS062균의 UV-mutagenesis를 통한 균주개량

1) UV-mutagenesis 조건 확립

UV-mutagenesis를 위하여 균총을 Benett's agar에 접종하고 27°C에서 15일간 배양한 후 형성된 방선균 포자에 30% glycerol 용액을 첨가한 뒤 멸균된 거즈로 filtering하여 균체를 제거한 포자 현탁액을 제조하였다. 포자현탁액은 -70°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다. BS062균의 UV-mutagenesis를 위한 조건 확립을 위하여 보관 중인 포자현탁액 100 µl의 포자 농도가  $1 \times 10^5$  spore/ml이 되도록 멸균증류수를 이용하여 희석하였다. 희석된 포자현탁액은 100 µl씩 한천배지에 도말하고 15 cm 높이에서 254 nm의 UV를 일정시간 조사하여 균 생존율이 1%인 적정 시간을 결정하였다(표 21).

표 21. UV 조사 시간에 따른 균주 생존율

UV 조사 시간 (min)	형성된 colony 수	Survival rate (%)
0	1504.3 ± 81.0	-
1.0	827.5 ± 48.4	54.98
1.5	16.8 ± 2.3	1.11
2.0	5.6 ± 1.8	0.37
2.5	0	0

2) UV-mutagenesis에 의한 균주 개량 결과

가) 1차 UV-mutagenesis에 의한 균주 개량 : mutant M17의 선발

BS062균주가 생산하는 항균활성물질의 수율 증가를 위하여 UV mutation을 실시하였다. 먼저 선발균의 포자현탁액( $1 \times 10^5$ /ml) 100  $\mu$ l를 benett's agar plate에 도말한 뒤 plate를 암 조건하에서 1분 30초간 254 nm의 UV를 조사하였다. Agar plate에서 형성된 BS062균의 생존 colony 들은 benett's agar 100  $\mu$ l를 넣은 96 well plate에 계대하여 배양한 후 잿빛곰팡이 검정균 plate에서 항균활성을 조사하였다. Agar plug법을 통해 6,190개의 생존균 중 항균활성이 증가한 120개의 mutant를 선발하였으며, 이들 120개의 mutant를 GSS 액체배지에 접종하여 배양여액에서의 항균활성 증가여부를 재조사하였다. 그 결과 120개의 mutant 중 잿빛곰팡이균에 대한 저지환의 크기가 가장 크고 활성이 오래 지속되는 M17을 최종 선발하였다(표 22). 동일한 조건에서 배양한 균 배양액을 희석하여 항균활성을 비교한 결과, mutant M17은 wild type BS062균 배양여액에 비해 항균활성이 약 25배 증가함을 알 수 있었다(그림 61).

표 22. UV처리에 의한 BS062균주의 1차 mutation 결과

	활성증가 colony 수/ UV mutant 수
Agar plug 법	120/6190
액체배지	20/120 (M17 선발)

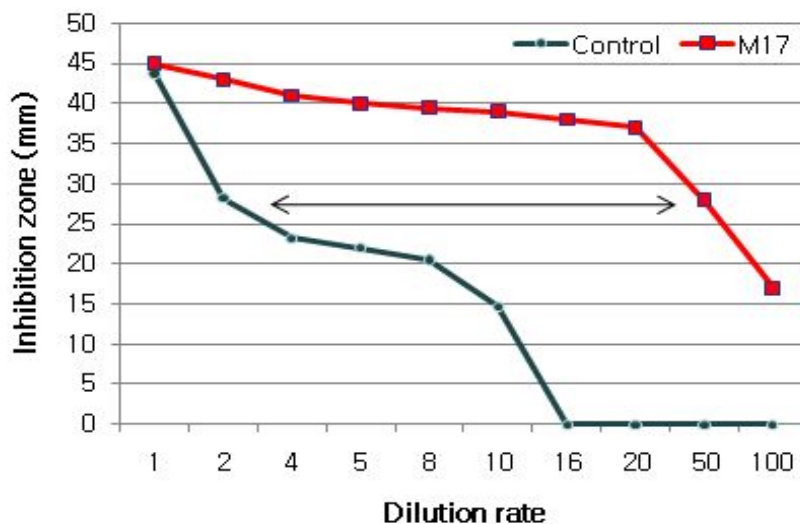
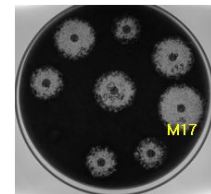


그림 61. Mutant M17과 wild type BS062균의 항균활성 비교

나) 2차 UV-mutagenesis에 의한 mutant MM14의 선발

선발된 mutant M17은 더 높은 활성물질의 수율증대를 위하여 위와 동일한 방법으로 mutant M17을 모균주로 하여 다시 돌연변이를 유도하였다. 그 결과 mutant M17보다 활성이 증가한 2차 돌연변이주를 선발하였으며 이들 중 활성이 지속적으로 유지되는 7개의 mutant를 선발하였다(그림 62). 2차 mutant 중 계대 및 액체 배양 중 증가된 항균활성이 지속적으로 유

지되는 MM14를 최종 mutant 균주로 선발하였다.

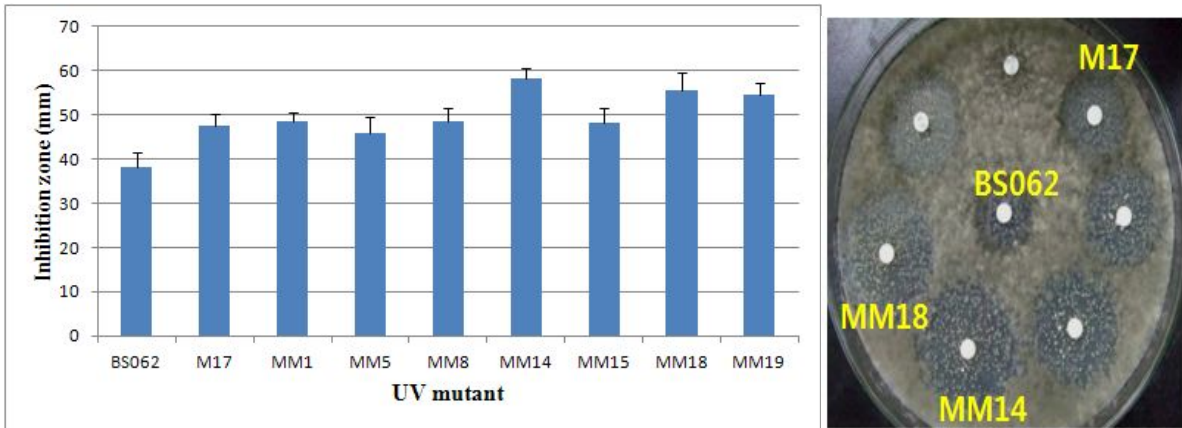


그림 62. 선발된 mutant M17을 이용한 2차 UV-mutagenesis.

다) Mutant M17과 MM14의 배양일별 항균활성 비교

2차 선발된 mutant MM14는 액체배양 후 wild type BS062 균주 및 1차 돌연변이주인 M17과 활성 비교를 위하여 본 배양 배지에 접종한 후 27°C에서 150 rpm으로 배양하면서 배양일별 항균활성을 조사하였다. 그 결과, mutant MM14의 경우 최대 항균활성은 mutant M17에 비해 약간 증가된 경향을 보였으나, 배양 시간에 있어서는 매우 단축된 것을 알 수 있었다 (그림 63).

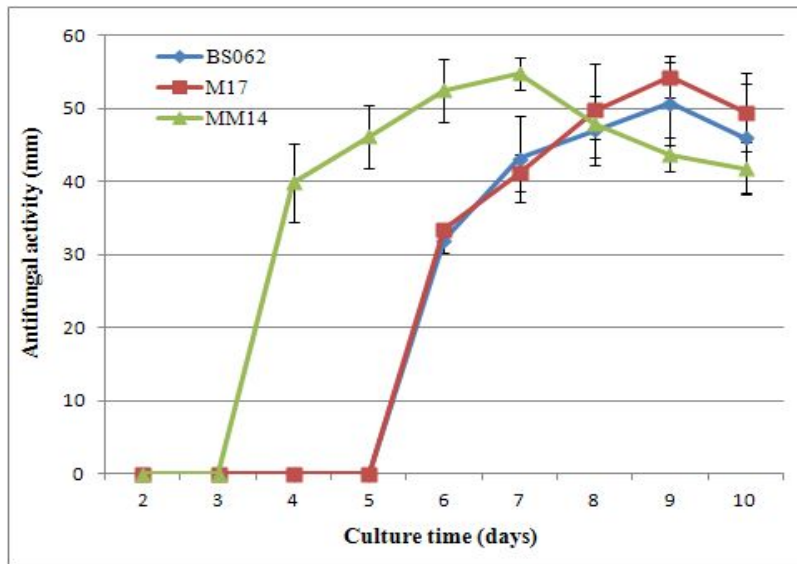


그림 63. Wild type BS062와 mutant 균주의 항균활성비교

또한 UV mutagenesis에 의한 활성물질의 수율 증대를 확인하기 위하여 원균주 BS062 및 mutant M17과 MM14균 배양액을 일정 비율로 희석한 후 항균활성을 조사하였다. 배양액을

동일한 희석배수로 희석하여 잿빛곰팡이균의 생육을 억제하는 저지환의 크기를 비교한 결과, 최종 선발된 mutant MM14균주는 배양여액 200배 희석 시 저지환의 크기가 mutant M17의 50배 희석액 처리 시 형성된 저지환의 크기와 동일한 것으로 나타났다(그림 64). 따라서 원균주보다 항균활성이 25배 향상되었던 mutant M17을 2차 mutation하여 얻은 MM14균주는 원균주 대비 약 100배의 항균활성이 증가한 것으로 나타났다.

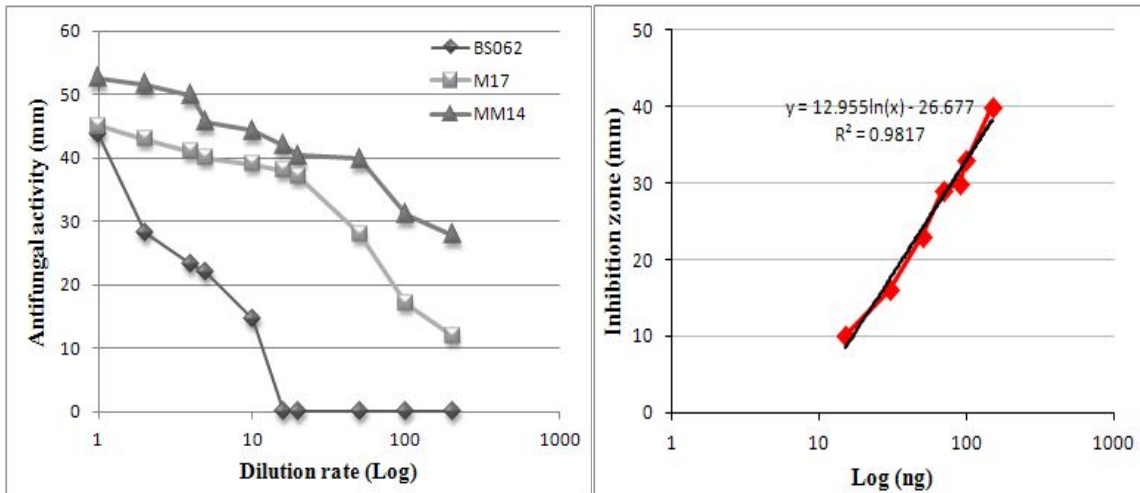


그림 64. 원균주 BS062와 mutant의 활성비교와 활성물질의 항균활성 standard curve.

### 3) 개량 균주 MM14의 산업화 배양조건 검토

개량 균주 MM14의 산업화 배양조건을 3 L 및 100 L jar fermentor를 이용하여 검토하였다. 앞의 모균주인 BS062의 배양 최적화 조건을 이용하여 3 L jar fermentor를 이용하여 개량 균주 MM14를 배양한 결과 114 시간 이후부터 항생물질이 생성되어 저지환이 나타나기 시작하였다(그림 65). 이는 앞의 배양조건 검토 시 플라스크를 이용한 것으로 미루어 산소 및 기질의 양이 항생물질 생성에 큰 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

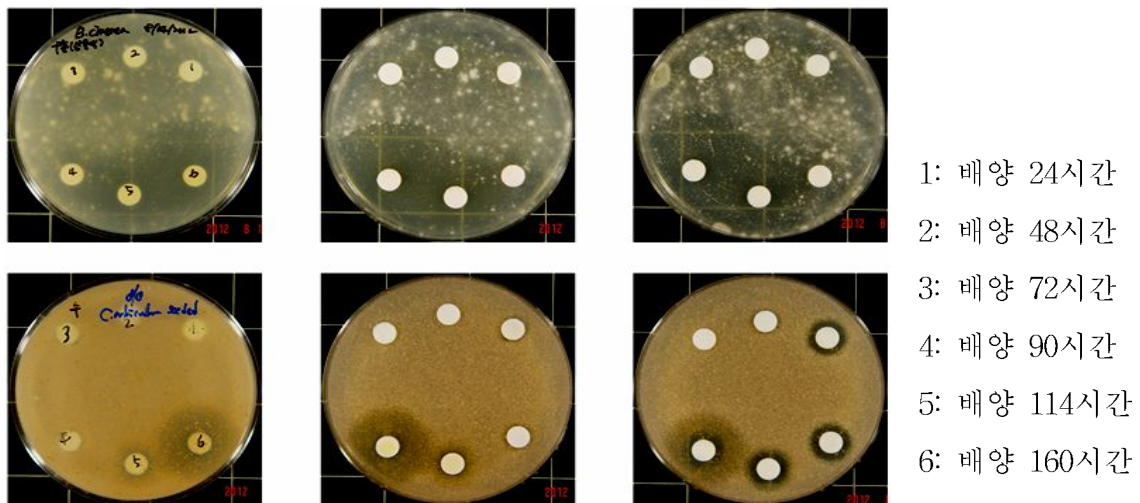


그림 65. 3 L fermentor를 이용한 개량 균주 MM14의 배양.



이는 배지의 기질 량이 많아 이를 소진하기 까지 시간이 오래 걸리는 것으로 판단되어 전체적으로 배지의 양을 반으로 줄이고 산의 양을 증가시켜 재배양을 시도한 결과, 배양 24시간에도 저지환이 검출되었다(그림 66). 이는 산소가 부족할 경우 항균물질의 생합성 pathway보다 다른 pathway가 활성화 되는 것으로 추정되며 또한 항생물질의 생성에 산소가 필요한 대사과정이 관여하고 있는 것으로 유추되었다.

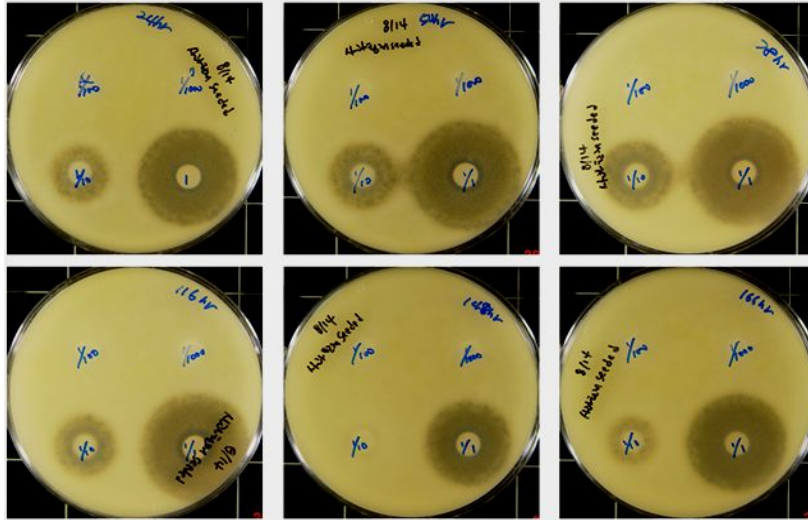


그림 66. 3 L fermentor를 이용한 개량 균주 MM14의 배양 (Aeration 및 배지의 양의 변화에 의한 활성의 증가)

배지의 기질 량의 변화와 더불어 yeast 및 starch가 활성물질의 생성에 많은 영향을 미쳤다. 따라서 yeast의 함량을 달리하여 배양조건을 검토한 결과 0.7% yeast의 첨가조건에서 가장 높은 항균활성이 나타났다. 또한 starch의 함량을 조사한 결과 starch의 함량이 높으면 항생물질의 생성이 늦추어지는 것으로 나타나 starch의 함량을 0.5% 미만으로 유지하는 것이 활성물질 생산에 유리한 것으로 나타났다. 이상의 배양조건을 토대로 100 L jar fermentor를 이용하여 배양을 수행한 결과, 항균활성물질이 배양 24시간 이내에 생성되기 시작하여 배양 2일과 3일에서 최고조에 도달하였고 그 이후는 서서히 분해되는 것으로 나타났다(그림 67). 따라서 생물효능 평가는 배양 3일의 배양액을 활용하여 수행하였다.

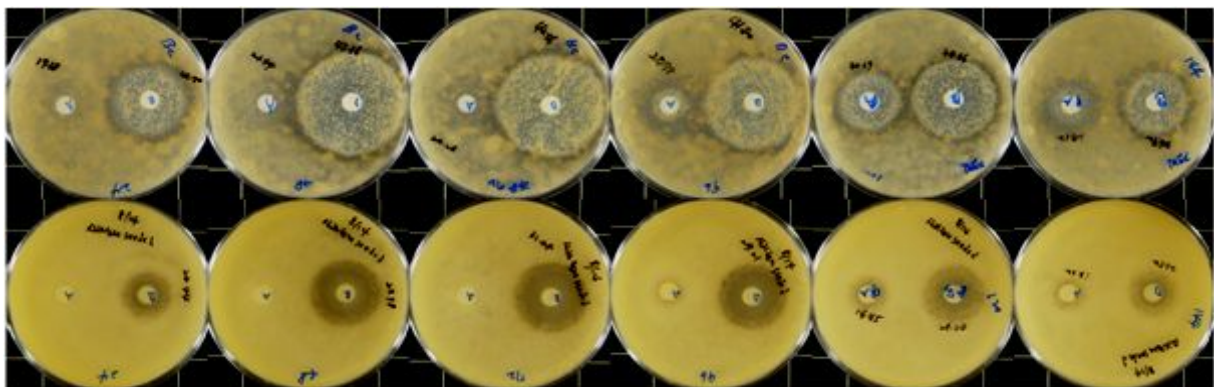


그림 67. 100 L jar fermentor를 이용한 개량 균주 MM14의 배양 및 항균활성 생성능.

자. 개량균주 M17 및 MM14의 방제 효과 및 방제 스펙트럼

본 연구는 *Streptomyces* sp. BS062의 개량균주 M17 및 MM14 균주의 방제 효과 및 방제 스펙트럼을 조사하기 위하여 다양한 기주의 잿빛곰팡이병, 토마토 잎곰팡이병, 고추 탄저병, 인삼 탄저병, 오이 흰가루병, 고추 역병 등에 대한 방제 효과를 조사한 것이다.

1) 개량균주 M17 및 MM14의 잿빛곰팡이병 방제 효과

가) BS062 균주 및 개량균주 M17의 오이 잿빛곰팡이병에 대한 방제 효과

BS062 균주 및 개량균주 M17의 오이 잿빛곰팡이병에 대한 항균 활성을 실내검정(오이잎 검정법)으로 수행하였다. BS062 및 M17 균주 배양액의 10배, 50배, 100배 희석액에 오이 유묘(백다다기, 본엽 2~3엽기)의 잎을 일정 크기로 절단, 5분간 침지 후 3~4시간 자연 건조하여 접종시험에 사용하였다. 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*) 접종은 포자접종법으로 수행하였다. 포자접종법은 잿빛곰팡이병균을 PDA배지에서 5일 배양 후 포자를 모아 포자현탁액( $5 \times 10^5$  spores/ml)을 제조한 후 20  $\mu$ l씩 점적 접종하였다. 그 결과 10배, 50배, 100배 처리구 모두에서 높은 방제가를 나타내어 병원균의 포자 발아 억제 능력이 매우 우수함을 알 수 있었다(표 23 및 그림 68).

표 23. 오이잎 검정법에 의한 배양액의 잿빛곰팡이병 방제효과

	병반직경(mm)			방제가(%)		
	BS062	M17	금모리*	BS062	M17	금모리*
10배 희석액	0.0	0.0	-	100.0	100.0	-
50배 희석액	0.0	0.0	-	100.0	100.0	-
100배 희석액	0.0	0.0	-	100.0	100.0	-
1000배 희석액	-	-	0.0	-	-	100.0
무처리	25.0	25.0	25.0			

\* 대조약제



<무처리>

<금모리>

<타미생물제제>

<BS062>

<M17>

그림 68. 균주 배양액(100배 희석액)의 오이 잿빛곰팡이병 방제효과.



나) 개량균주 MM14의 오이 잿빛곰팡이병에 대한 방제 효과

UV mutagenesis를 통한 균주개량으로 최종 선발된 MM14 균주의 오이 잿빛곰팡이병에 대한 방제 효과를 조사하였다. MM14 균주 배양액의 100배, 300배, 500배, 1000배 희석액에 오이 유묘(백다다기, 본엽 2~3엽기)의 잎을 일정 크기로 절단, 5분간 침지 후 3~4시간 자연건조하여 접종시험에 사용하였다. 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*) 접종은 균총 접종법(치료효과 검정)과 포자접종법(예방효과 검정)으로 나누어 실시하였다. 균총접종법은 잿빛곰팡이병균을 PDA배지에서 5일 배양 후 균총 끝부분을 떼어(8 mm) 오이 잎에 접종하였고, 포자접종법은 포자현탁액( $5 \times 10^5$  spores/ml)을 20  $\mu$ l씩 점적 접종하였다. 2차 개량 균주(MM14)는 병원균의 포자현탁액 접종 시(예방효과 검정)에서 뿐만 아니라 균총 접종시(치료효과 검정)에서도 300배 희석액 처리 시에도 100%의 방제효과를 나타내어 1차 개량 균주인 M17균주에 비하여 매우 우수한 방제효과를 나타냈다(표 24 및 표 25). 이상의 실내실험 결과 MM14 균주는 잿빛곰팡이병 방제효과(예방효과 및 치료효과)가 우수하여 이 균주의 배양액을 제형화할 경우 화학농약을 대체할 수 있을 것으로 판단되었다.

표 24. 2차 개량 균주 MM14 균주의 오이 잿빛곰팡이병 방제효과(균총 접종구)

처리농도	병반직경 (mm)	평균 (mm)	방제가 (%)
100배 희석액	0.0	0.0	100.0
300배 희석액	0.0	0.0	100.0
500배 희석액	10-18	14.0	30.0
1000배 희석액	13-20	17.2	14.0
무처리	20	20	

표 25. 2차 개량 균주 MM14균주의 오이 잿빛곰팡이병 방제효과(포자현탁액 접종구)

처리농도	병반직경 (mm)	평균 (mm)	방제가 (%)
100배 희석액	0.0	0.0	100.0
300배 희석액	0.0	0.0	100.0
500배 희석액	0.0	0.0	100.0
1000배 희석액	0.0	0.0	100.0
무처리	20	20	

다) 개량균주 MM14의 상추 잿빛곰팡이병에 대한 방제 효과

UV mutagenesis를 통한 균주개량으로 최종 선발된 MM14 균주의 상추 잿빛곰팡이병에 대한 방제 효과를 조사하였다. MM14 균주 배양액의 100배, 200배, 500배 희석액을 상추(청치마 품종)에 살포한 후 주(포기)당 5잎씩 20주의 이병엽을 조사하였다. 그 결과, MM14 배양

액 100배, 200배 희석액의 방제가 각각 85%, 81%로 대조 농약의 방제가(84%)와 유사하였다 (표 26 및 그림 69). 또한 MM14 배양액 500배 희석액의 방제가도 73%로 미생물 농약로서의 실용성이 인정되었다.

표 26. 개량균주 MM14의 상추 잿빛곰팡이병 방제 효과

	이병엽율(%)				방제가(%)
	1반복	2반복	3반복	평균	
MM14 100배 희석액	5.0	6.0	5.8	5.6	85.4
MM14 200배 희석액	8.0	7.5	6.5	7.3	80.9
MM14 500배 희석액	11.5	10.5	9.0	10.3	73.1
폴리옥신비(수) 2000배 희석액	7.0	5.5	6.2	6.2	83.8
무처리(대조구)	35.5	46.5	33.0	38.3	



그림 69. 개량균주 MM14의 상추 잿빛곰팡이병 방제 효과 사진.

라) 개량균주 MM14의 장미 잿빛곰팡이병에 대한 방제 효과

최종 선발된 MM14 균주의 장미 잿빛곰팡이병에 대한 방제 효과를 조사하였다. MM14 균주 배양액의 25배, 50배, 100배, 200배, 500배 희석액 및 대조약제인 프로피네브수화제)를 장미(슈프레드 품종) 꽃잎에 살포한 후 24시간 경과 후에 잿빛곰팡이병균인 *Botrytis cinerea* 분생 포자 현탁액  $5 \times 10^5$ /ml을 분무접종하고 24시간 습실에 둔 후 꺼내어 실온에 두고 4일 후에 발

병상태(이병꽃잎율)를 조사하였다. 구당 10화의 꽃잎을 조사하였다. 그 결과, MM14 배양액 50배 희석액까지는 대조 농약과 같은 높은 방제가(90% 이상)를 나타내었고, 100배-500배 희석액에서도 77-56%의 방제가를 나타내어 바이오농약으로서의 실용성이 인정되었다(표 27 및 그림 70).

표 27. 개량균주 MM14의 장미 잿빛곰팡이병 방제 효과

	이병꽃잎율(%)				방제가(%)
	1반복	2반복	3반복	평균	
MM14 25배 희석액	8.7	12.5	5.0	8.7	91.0
MM14 50배 희석액	11.0	9.1	8.3	9.5	90.1
MM14 100배 희석액	25.0	22.7	18.2	22.0	77.2
MM14 200배 희석액	38.7	36.3	33.4	36.7	61.9
MM14 500배 희석액	48.3	40.0	37.5	41.9	56.5
펜핵사미드(수) 1000배 희석액	4.8	9.1	15.0	9.6	90.0
무처리(대조구)	94.4	94.7	100	96.4	



표 70. 개량균주 MM14의 장미 잿빛곰팡이병 방제 효과

## 2) 개량균주 MM14의 토마토 잎곰팡이병에 대한 방제 효과

최종 선발된 MM14 균주의 토마토 잎곰팡이병에 대한 방제 효과를 조사하였다. MM14 균주 배양액의 100배, 200배 희석액을 토마토(리피토 품종: 일반토마토)에 살포한 후 주(포기)당 5일씩 20주의 발병율을 조사하였다. 그 결과, MM14 배양액 100배, 200배 희석액의 방제가 61-62%로서 대조 농약 이미녹타딘트리스의 방제가 69%와 유사하였다(표 28 및 그림 71). 따라서 미생물제제로의 실용성이 인정되었다.



표 28. 개량균주 MM14의 토마토 잎곰팡이병 방제 효과

	발병율(%)				방제가(%)
	1반복	2반복	3반복	평균	
MM14 100배 희석액	10	11	13	11.3	62
MM14 200배 희석액	12	13	10	11.7	61
Iminoctadine tris(40%) 2000배 희석액	9	11	8	9.3	69
무처리(대조구)	37	25	27	29.7	



<무처리구>



<MM14 처리구>

그림 71. 개량균주 MM14의 토마토 잎곰팡이병 방제 효과

### 3) BS062 균주 및 개량균주 M17의 고추 탄저병에 대한 방제효과

BS062 균주 및 개량균주 M17의 탄저병에 대한 방제효과는 시중에서 구입한 푸른고추(청양고추)를 대상으로 실내검정을 실시하였다. 구입한 푸른고추는 NaOCl 1%액에 3-5분 표면소독한 후 살균수로 씻어내고 음건한 고추 열매의 표면에 상처를 주고 공시균주의 배양액을 처리하였다. 배양액(10배, 50배, 100배) 처리 5시간 후에 상처부위에 탄저병균 (*Colletotrichum acutatum*)의 포자현탁액  $1 \times 10^6$  spores/ml을 점적 접종시키고 5일 후에 병반의 진전정도를 조사하였다. 처리구당 10개의 고추를 사용하였으며 3반복으로 2회 수행하였다. 고추 열매를 이용한 실내검정에서 공시 균주 중 A0375 균주는 10배 처리구에서는 100%, 50배 처리구에서는 78%의 방제가를 나타내어 다른 균주에 비하여 방제효과가 높았다. BS062균주는 탄저병에 대한 방제가(10배 희석액 처리구에서 27%)가 매우 낮았으나, 개량균주인 M17 균주의 방제가(69.6%)는 매우 높아졌음을 확인하였다(표 29 및 그림 72).

표 29. BS062 및 개량균주 M17 균주의 고추 탄저병에 대한 방제효과

희석배수	병반직경(mm)		방제가(%)	
	BS062	M17	BS062	M17
10배	7.8-13.5 (av. 10.8)	0-10.7 (av. 4.5)	27.0	69.6
50배	6.6-14.7 (av.10.4)	6.2-14.0 (av. 9.5)	29.7	35.8
100배	12.4-19.19 (av. 15.4)	10.8-16.7 (av. 12.7)	-4.1	14.2
무처리	10.0-16.9 (av. 14.8)	10.0-16.9 (av. 14.8)		



<무처리>

<A0375>

<BS062>

<M17>

그림 72. 고추탄저병에 대한 방제효과(10배 희석액).

#### 4) BS062 균주의 인삼 탄저병에 대한 방제효과

충남대학교 인삼포장에서 BS062균주의 인삼탄저병 방제효과 실험을 실시하였다. BS062 균주의 20배 희석액을 7일 간격으로 4회 엽면 살포하였고 최종살포 7일 후에 이병엽율을 조사하였다. 인삼 탄저병의 이병엽율을 조사한 결과, BS062 균주 처리 시 315엽 중에서 113엽이 감염되었다. 무처리구에서는 240엽 중에서 139엽이 감염되어 약 30% 정도의 낮은 방제효과를 나타내었다(표 30 및 그림 73). BS062균주의 처리구에서 방제가 낮아 본 균주가 탄저병에는 효과적이지 않은 것을 알 수 있었다.

표 30. 인삼 탄저병 방제효과

	희석배수	이병엽율(%)	방제가(%)
BS062	20배	35.8	38.2
무처리		57.9	



<무처리>

<A0375>

<BS062>

그림 73. BS062 균주의 인삼 탄저병균에 대한 방제효과.

5) BS062 및 개량균주 M17의 오이 흰가루병에 대한 방제효과

BS062 및 M17 균주를 이용하여 온실에서 재배하고 있는 오이에 발생하는 흰가루병균 (*Sphaerotheca fusca*)에 대한 방제활성을 조사하였다. BS062 및 M17 균주를 각각 20배, 50배 희석한 후 처리구당 오이 10주를 사용하여 3반복으로 수행하였다. 희석한 배양액은 7일 간격 3회 살포하였고, 최종 살포 일주일 후에 오이 잎에 발생한 흰가루병의 병반 면적율을 조사하여 발병도를 산출하였다.

발병지수, 0: 발병 없음, 1: 병반면적율 1-5%, 2: 병반면적율 5.1-20%,

3: 병반면적율 20.1-40%, 4: 병반면적율 40.1% 이상

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

그 결과, BS062 균주와 개량균주 M17 배양액 20배, 50배 처리구에서 모두 낮은 방제효과를 나타내어 본 균주가 탄저병에는 효과적이지 않음을 알 수 있었다(표 31).

표 31. BS062 및 M17 균주의 오이 흰가루병에 대한 방제효과

처리구	처리농도	발병도(%)	방제가(%)
BS062	20배	48.4	32.6
	50배	68.8	4.3
M17	20배	53.1	26.1
	50배	59.4	17.4
무처리		71.9	

6) BS062 균주의 고추 역병에 대한 방제효과

BS062균주의 고추역병균(*Phytophthora capsici*)에 대한 방제 활성을 알아보기 위하여 10배, 50배 희석액을 4엽기의 고추 유묘 포트에 관주하고 1일 후에 고추역병균의 포자낭 현탁액 (농도:  $3 \times 10^3$  포자낭/ml)을 관주하였다. 고추역병균을 접종한 4일차부터 16일 동안 나타나는 증상을 조사하여 발병도를 산출하였다. 실험은 처리구당 10주 고추 유묘를 대상으로 2반복으로 수행하였다.

0: 발병 없음, 1: 지제부 줄기 갈변, 2: 30-50% 시들음 증상 나타남

3: 51-70% 시들음 증상 나타남, 4: 71-90% 시들음 증상 나타남, 5: 식물체 고사

발병도:  $\frac{\sum(\text{발병지수} \times \text{계수})}{5N} \times 100$

그 결과, 균주 간 방제 효과의 차이는 있었으나, 역병에 대한 방제효과가 매우 낮아 역병 방제제로는 활용될 수 없을 것으로 판단되었다(그림 74 및 그림 75).



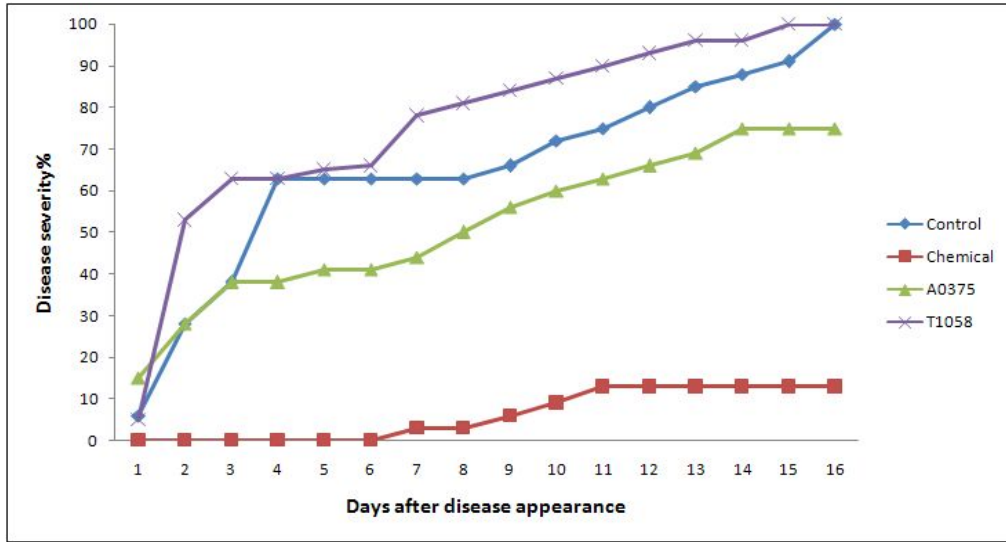


그림 74. BS062(1058) 균주의 처리시간에 따른 역병 발병도(10 배 희석액).

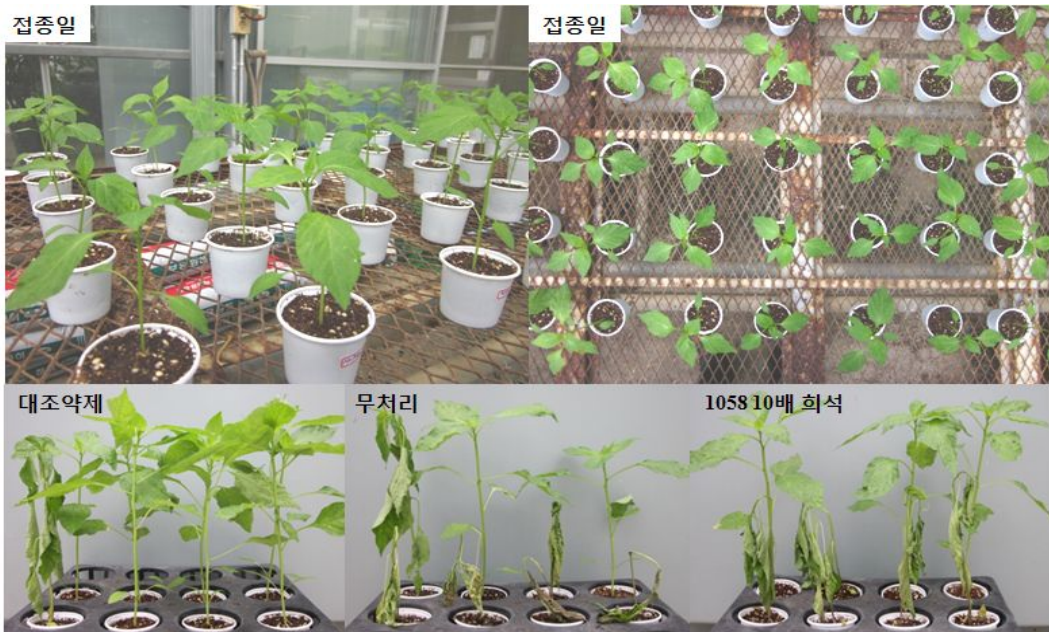


그림 75. BS062(1058) 균주 처리 시 고추 유묘의 상태, 접종 8 일 뒤 병의 진 전 상태.

### 3. 항균활성물질 기반 잣빛곰팡이병 방제용 *Streptomyces* sp. A0375

#### 가. 길항 방선균 *Streptomyces* sp. A0375 균주의 선발

다양한 근권에서 채취한 토양시료로부터 잣빛곰팡이(*Botrytis cinerea*)균에 항균활성을 나타내며 콜로니 형태 및 균층의 색이 상이한 93여주의 방선균 균주를 분리하였다. 분리된 방선균은 각각 배양한 후 원심분리하여 상등액과 균체로 나누어 항진균 활성을 확인한 후 lytic enzyme 생성능, siderophore 생성능과 같은 생물적 방제 활성과 불용성 인산 가용능, IAA(indole-3-acetic acid) 생성능과 같은 생물비료 활성을 조사하였다(표 32). 그 결과 많은 균주에서 cellulase와 protease 활성이 관찰되었으며, 이들 균주 중 일부에서  $\beta$ -1,3-glucanase 활성이 확인되었으나 많은 균주가  $\beta$ -1,3-glucanase를 생성하지 않는 것을 알 수 있었다. 또한 이들 분리 방선균을 이용하여 항진균 활성 및 siderophore 생성능을 조사한 결과, 일부 균주들이 이들 활성을 동시에 나타내었으나 대부분의 균주들은 항진균활성과 siderophore 생성능 모두를 나타내지는 않았다. 또한 분리 방선균의 IAA 생성능, 토양의 불용성 형태로 다량 축적되어 있는 인산염의 가용화 능력을 조사하였다. 이상의 결과를 토대로 잣빛곰팡이에 항균활성을 나타내는 분리 방선균 93종 중 생물방제활성 및 생물 비료 활성을 동시에 갖는 방선균 8종을 선발하였다. 이들 8종의 방선균 중 다범성(broad spectrum)의 항진균 활성이 지속적으로 유지되며 형태적으로 특이하고 효과의 재현성과 안정성이 뛰어난 A0375 균주를 최종적으로 선발하였다.

표 32. 분리한 93균주의 생물활성 검정

생물활성	Cellulase 생성능	Protease 생성능	Chitinase 생성능	$\beta$ -1,3- Glucanase	Siderophore 생성능	IAA 생성능	불용성인산 가용능
균주 수	43	41	-	9	15	33	5

Glucanase:  $\beta$ -1,3-glucanase, IAA: indole-3-acetic acid

#### 나. *Streptomyces* sp. A0375 균주의 생물활성

##### 1) *Streptomyces* sp. A0375 균주의 생물활성

선발 방선균 A0375는 Table 4에서 보는 바와 같이 paper disk법으로 확인한 항균활성에서 *Botrytis cinerea*와 *Cylindrocarpon destructans*에 대해 강한 항진균 활성을 나타내었다(표 33). 또한 A0375균의 siderophore 생성여부를 확인한 결과, 균체를 처리한 경우엔 siderophore 활성이 확인 되었으나 배양여액을 처리한 경우엔 CAS 배지의 색 변화가 거의 없는 것으로 보아 배양여액으로 분비하는 siderophore의 양이 매우 미미한 것으로 생각되었다. 선발균 A0375는 높은 cellulase와 protease 생성능을 나타내었다(그림 76). 일반 방선균들은 항생물질 이외에도 cellulase, protease 등의 여러 가지 효소들을 생성하며 이들에 의하여 특정 식물병원성 곰팡이의 성장을 저해할 수 있는 것으로 알려져 있다. 인삼 뿌리썩음병의 한 원인균인 *C. destructans*의 경우 세포벽이 cellulose와  $\beta$ -glucan 등으로 구성되어 있어 선발한 A0375균이 생산하는 cellulase의 작용으로 세포벽의 용균작용이 일어날 수 있을 것으로 생각되었다.



표 33. 분리한 *Streptomyces* sp. A0375 균주의 생물활성

항균활성(mm) <sup>a</sup>		Enzyme 생성능(mm)	
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Cellulase	Protease
22.4	25.6	41.1	32.9

<sup>a</sup> Inhibition zone diameter

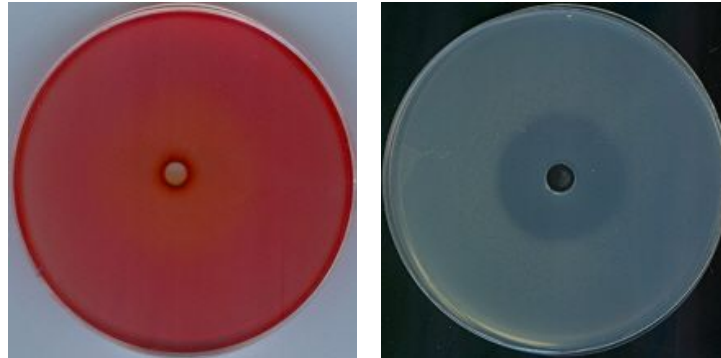


그림 76. *Streptomyces* sp. A0375 균주의 cellulase(좌)와 protease(우) 생성능.

## 2) *Streptomyces* sp. A0375 균주의 항균 스펙트럼

식물병원균에 대한 A0375의 항균활성을 대치배양법을 통해 검정하였다. A0375 균주는 *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Rhizoctonia solani* 등에 강한 항균활성을 나타내었고, 정도의 차이는 있었으나 대부분의 식물 병원균에 대하여 항균활성을 나타내었다(표 34).

표 34. *Streptomyces* sp. A0375 균주의 항균활성

Microorganisms	항균활성(diameter: mm)
<i>Botrytis cinerea</i>	25.6
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	22.3
<i>Fusarium oxysporum</i>	18.2
<i>Alternaria panax</i>	17.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	25.4
<i>Alternaria porri</i>	13.0
<i>Collectotricum gloeosporioides</i>	18.4
<i>Phytophthora capsici</i>	14.0
<i>Magnaporthe grisea</i>	13.8
<i>Aspergillus niger</i>	11.0
<i>Bacillus subtilis</i>	17.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	15.3
<i>Escherichia coli</i>	9.20

다. *Streptomyces* sp. A0375 균주의 동정

Gyrase A 유전자의 염기서열을 바탕으로 한 Neighbour-joining tree에서 A0375균은 *Streptomyces geldanamycininus*와 한 그룹에 속하였으며(그림 77), *S. hygrosopicus* 및 *S. geldanamycininus*의 종에 속하나 이들과 구별되는 다른 종으로써 이 균을 *Streptomyces* sp. A0375로 명명하였다.

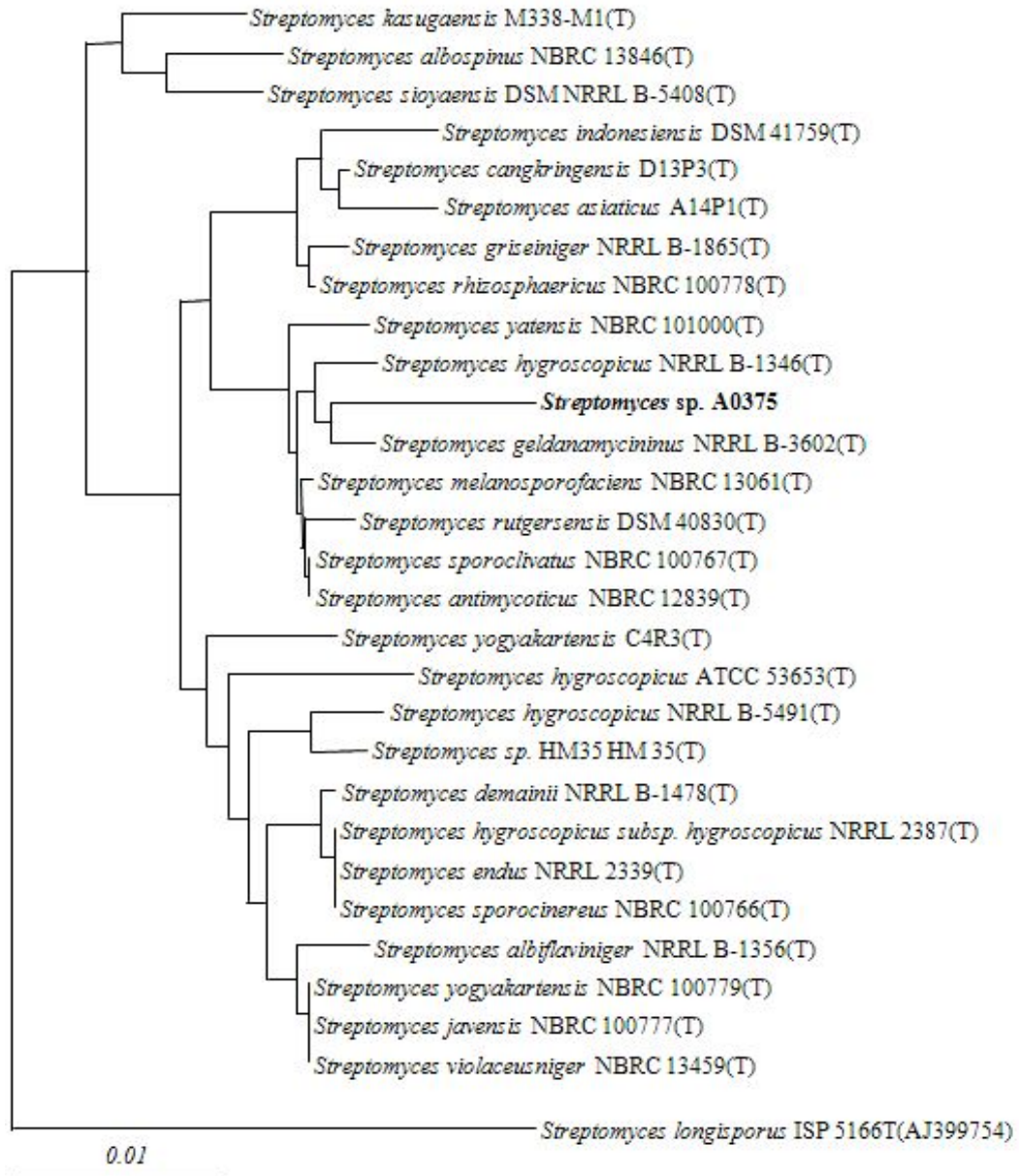


그림 77. 16S rDNA gene sequence 분석을 토대로 한 A0375 균주의 phylogenetic tree (neighbour-joining method).

라. *Streptomyces* sp. A0375 균주의 잣빛곰팡이병 방제 효과

1) *In vivo*에서 잣빛곰팡이병 방제 활성

가) 딸기 잣빛곰팡이병 방제 활성

A0375균주의 10배 희석액을 딸기의 미성숙과와 성숙과에 처리하여 방제효과를 조사하였다. 그 결과 성숙과와 미성숙과 모두 대조약제 500배 희석액 보다 높은 방제효과를 나타내었으며, 특히 미성숙과의 방제가는 100%일 정도로 높은 방제활성을 나타내었다(표 35 및 그림 78).

표 35. *Streptomyces* sp. A0375 균주 배양액의 딸기 잣빛곰팡이병 방제 활성

희석배수	발병율(%)		방제가(%)	
	성숙과	미성숙과	성숙과	미성숙과
Broth filtrate 10배	50	0	50	100
대조약제 BP 500배	46	57	54	0
무처리	100	43		

\*BP: wettable powder. 발병율은 단회 시료처리 7일 후에 조사됨.



<A0375 10배 희석액>

<대조약제>

<무처리>

그림 78. *Streptomyces* sp. A0375 균주 배양액의 딸기 잣빛곰팡이병 방제 활성.

나) 토마토 잣빛곰팡이병 방제 활성

잣빛곰팡이병균의 접종 24시간 전후로 A0375균주 배양여액을 처리하여 처리 시간에 따른 방제 효과를 조사한 결과는 표 36과 같다. 전처리 시 배양여액 10배 희석액에서 89%, 20배 희석액에서 46%의 병 방제효과를 보였으나 후처리 시에는 방제 효과가 현저히 감소함을 알 수 있었다. 따라서 선발균 A0375균이 생산하는 활성물질은 잣빛곰팡이병의 치료 효과는 미약한 것으로 생각되었다.

표 36. *Streptomyces* sp. A0375 균주 배양액의 토마토 잿빛곰팡이병 방제 활성

희석배수	발병율(%)		방제가(%)	
	1일 전 처리	1일후 처리	1일 전 처리	1일후 처리
Broth filtrate 10배	10	44	89	40
Broth filtrate 20배	52	60	46	18
무처리	95	73		

각 25개의 토마토를 3반복으로 처리함

다) 인삼 저장시의 잿빛곰팡이병 방제활성

배양여액의 인삼 저장시의 잿빛곰팡이병 방제활성을 검증하기 위해 실험을 수행한 결과, 10배 희석액 처리구에서 80% 이상 잿빛곰팡이병이 방제되었음을 확인할 수 있었으며 20배 희석액 처리구에서도 60% 이상 방제효과를 나타내는 것을 알 수 있었다(표 37 및 그림 79). 비록 대조약제보다 조금 낮은 방제효과를 나타내었지만 A0375 배양여액이 인삼 잿빛곰팡이병 방제에 유효함을 확인할 수 있었다.

표 37. *Streptomyces* sp. A0375 균주 배양액의 인삼 저장시의 잿빛곰팡이병 방제활성

희석배수	발병율(%)		방제가(%)
	저장 3개월 후	저장 6개월 후	
Broth filtrate 10배	12	16	84
Broth filtrate 20배	24	36	64
Diethofencarb 500배	4	7	93
무처리	68	76	



그림 79. 인삼 저장 시 잿빛곰팡이병 방제활성(A:10X, B: 20X, C: 대조약제, D: 무처리).



## 2) 포장에서의 잿빛곰팡이병 방제 활성

*Streptomyces* sp. A0375 균주 배양여액의 딸기 잿빛곰팡이병에 대한 방제효과를 포장에서 조사한 결과를 표 38에 나타내었다. 배양여액 10배 희석액 처리 시 81%의 높은 방제효과를 보였으며, 이는 대조구의 방제가인 53%보다 높은 효과를 보였다. 배양여액 처리 시 이병을 보인 것은 성숙과에서 더 많은 걸 볼 수 있었고, 미성숙과와 꽃에서는 병발생이 거의 관찰되지 않았다(그림 80). 이 결과로부터 A0375 배양여액을 꽃이 개화되자마자 처리하면 잿빛곰팡이병에 대한 효과적인 예방을 기대할 수 있을 것으로 사료되었다.

표 38. *Streptomyces* sp. A0375 균주의 포장에서의 딸기 잿빛곰팡이병 방제 활성

희석배수	발병율(%)	방제가(%)
Broth filtrate 10배	6.1	81
대조약제 BP 500배	14.9	53
무처리	31.3	

7일 간격으로 3회 처리 후 조사함



<A0375 10배 희석액>

<대조약제 500배 희석액>

<무처리>

그림 80. A0375 균주 배양액의 포장에서의 딸기 잿빛곰팡이병 방제 활성.

## 마. *Streptomyces* sp. A0375 균주의 배양조건 검토

### 1) 배양 배지에 따른 항균활성물질 생성능

A0375 균주의 액체배양을 위한 최적 배양배지를 선별하기 위하여 일반적으로 방선균 배양에 사용되고 있는 액체배지(표 39)에서의 생육 및 항균활성을 조사하였다. A0375 균을 benett's agar plate에서 5일간 배양한 후 균총 9개를 각 액체배지 (200 ml/1000 ml baffled 삼각 플라스크)에 접종하고 27°C, 140 rpm 조건으로 배양하면서 잿빛곰팡이균에 대한 항균활성을 조사하였다. 그 결과, GSS 배지에서 배양한 경우 항균활성이 가장 높았다(표 40).

표 39. 배양 조건 검토를 위하여 사용한 기본배지 조성표

배지 종류	배지 조성
C4 배지	glucose 2%, soluble starch 1%, soybean meal 2.5%, yeast ext. 0.4%, NaCl 0.2%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.005%
GSS 배지	glucose 2%, soluble starch 1%, soybean meal 2.5%, yeast ext. 0.4%, NaCl 0.2%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.025%
M 배지	soluble starch 7%, soybean meal 0.5%, yeast ext. 1.7%, CSL 0.5ml, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1%, CaCO <sub>3</sub> 0.1%

표 40. *Streptomyces* sp. A0375 균주의 배양배지에 따른 항균활성

배지 종류	균사생장 <sup>a</sup>	항균활성 <sup>b</sup>
GSS	+++	+++
C4	+	+
M	+	+

<sup>a</sup>균사생장은 packed mycelium volume 으로 측정하였으며 +++ (excellent growth), ++ (moderate), + (poor)로 나타냄.

<sup>b</sup>항균활성은 paper disk method로 조사하여 - (0 mm), + (≤ 10 mm), ++ (≤ 20 mm), +++ (> 30 mm) 이상으로 나타냄.

## 2) 배양 기간에 따른 항균활성물질 생성능

상기의 GSS 배지에 A0375균을 배양하면서 24시간 간격으로 10일 동안 배양액 시료(5 ml)를 취하여 생균수, pH 및 항균활성의 변화를 조사하였다. 그 결과 생균수는 배양 3일째 최대가 되었다가 그 이후 점차 감소하였으며 배양여액의 pH는 배양시간이 경과함에 따라 서서히 증가하였다. 한편 배양여액의 항균활성은 시간경과에 따라 서서히 증가하다 6일째 가장 높은 항균활성을 나타내었고 그 후로는 항균활성이 점차 감소함을 확인할 수 있었다(표 41).

표 41. *Streptomyces* sp. A0375 균주의 time-course growth curve

배양일	균사생장 <sup>a</sup>	pH	항균활성(diameter: mm)
1	++	6.52	-
2	+++	6.98	9.2
3	+++	7.23	12.2
4	+++	7.48	15.5
5	++	7.56	16.6
6	++	7.64	24.0
7	++	7.40	23.1
8	++	8.10	20.0
9	++	8.57	19.5
10	+	8.73	19.0

### 3) 배양 온도에 따른 항균활성물질 생성능

배양 온도에 따른 항균활성의 차이를 알아보기 위해 15~40°C까지 5°C 간격으로 구분하여 배양 후 항균활성을 조사하였다. 그 결과 그림 81에서와 같이 배양 온도 30°C 조건에서 빠른 시간에 높은 항균활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 20°C와 25°C 조건에서도 비교적 높은 항균활성을 나타내었고 35°C 이상의 배양조건에서는 항균활성물질이 현저히 감소하는 것으로 나타났다.

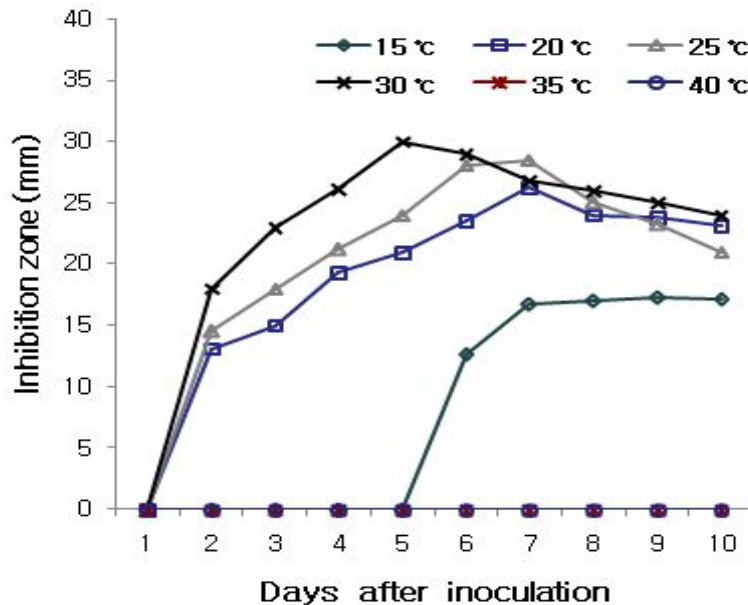


그림 81. A0375 균주의 배양 온도에 따른 항균활성물질 생성능.

### 4) 교반 속도에 따른 항균활성물질 생성능

교반 속도에 따른 항균활성물질의 생성 차이를 알아보기 위해 100~200 rpm까지 50 rpm 간격으로 교반 속도를 달리 배양하여 항균활성 차이를 비교해 본 결과, 정지배양 했을 시 항균활성은 전혀 나타나지 않는 것으로 확인할 수 있었으며, 전반적으로 교반속도가 증가함에 따라 항균활성이 증가되는 것을 알 수 있었다(그림 82). 항균활성이 가장 우수한 최적의 교반속도는 200 rpm이었다.



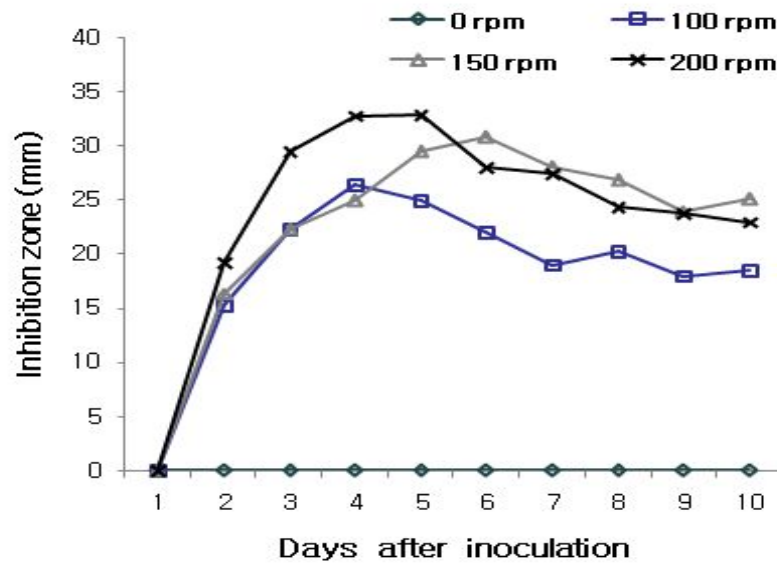


그림 82. A0375 균주의 교반 속도에 따른 항균활성물질 생성능.

5) 탄소원 · 질소원에 따른 균의 생육 및 항균 활성의 변화

가) 탄소원

*Streptomyces* sp. A0375 균주를 배양하는데 탄소원이 항균활성과 균 생육에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위해 GSS배지의 탄소원의 조성을 변화하며 조사하였다. 조사를 위해 GSS배지 100 ml에 각각의 탄소원을 1.5%(w/v)가 되도록 첨가한 후 6일간 배양하였다. 균 생육 정도와 항균활성 모두 배양 6일 후 조사하였다. A0375균의 생육에 가장 우수한 탄소원은 glycerol이었으며 glucose를 첨가한 배지에서도 균 생육이 비교적 우수하였다(표 42).

표 42. 탄소원에 따른 균의 생육 및 항균 활성의 변화

탄소원	균사생육	Final pH	항균활성(diameter: mm)
Glucose	+++	7.53	29.7
Glycerol	+++	8.13	31.5
Starch	++	9.02	16.9
Sucrose	++	9.05	17.5
Dextrin	++	6.93	30.0
GSS	++	7.80	24.1
Control	+	5.53	10.9

그러나 starch, sucrose, dextrin 등의 탄소원을 첨가한 경우에는 생육이 좋지 않았다. 또한 항균활성도 glycerol이 가장 우수하였으며 glucose와 dextrin 또한 비교적 우수하였다. 반면에 dextrin를 첨가한 경우 균 생육은 다른 탄소원에 비하여 떨어졌으나 활성은 높게 나타나 균 생육과 활성물질 생산에 비례관계가 성립하지는 않았다.

나) 질소원

질소원 이용성은 1.5% glycerol을 탄소원으로 하는 GSS배지에 무기태질소원 2종류, 유기태 질소원 8종류를 각각 첨가하여 탄소원과 동일한 방법으로 균 생육과 활성을 조사하였다. 그 결과 균생육은 tryptone, beef extract를 첨가한 배지에서 우수하였고 항균활성은 soybean flour를 첨가 시 가장 우수하였다(표 43). 균사 생육이 저조한 malt extract, ammonium sulfate, sodium nitrate의 경우는 항균 활성도 전혀 나타나지 않았다. 질소원에 있어서도 탄소원에서와 마찬가지로 균 생육정도와 항균활성의 비례관계는 성립되지 않았으나 항균활성을 보이기 위해서는 일정수준의 균 생육이 필요한 것으로 확인되었다.

표 43. 질소원에 따른 균의 생육 및 항균 활성의 변화

질소원	균사생육	Final pH	항균활성(diameter: mm)
Soybean flour	++	8.20	37.3
Corn steep liquor	++	7.50	34.8
Soytone	++	8.56	31.5
Peptone	++	8.50	26.4
Tryptone	+++	8.32	24.7
Malt extract	-	4.72	-
Beef extract	+++	8.54	31.6
Yeast extract	++	8.57	31.1
Ammonium sulfate	-	5.79	-
Sodium nitrate	++	7.17	-
GSS	++	7.50	25.7
Control	+	5.73	11.0

바. *Streptomyces* sp. A0375 균주가 생산하는 항균활성물질

1) 항균활성물질의 안정성

*Streptomyces* sp. A0375 균주가 생산하는 항균활성 물질의 안정성을 조사한 결과를 표 44에 나타내었다. 먼저 배양여액을 pH 2, pH 4, pH 6, pH 8, pH 10, pH 12로 각각 조정하고 4°C에서 24시간 방치한 후 이를 다시 pH 7로 중화한 다음 항균활성을 조사하였다. 그 결과 대부분의 pH 조건에서 대조구와 비슷한 항균활성을 나타내었으며 알칼리 조건에서도 매우 안정적인 것으로 나타났다. 또한 pH 2에서 항균활성이 감소하였으나 활성 감소율이 12%로 A0375 균이 생산하는 항균물질은 산조건에서도 비교적 안정한 것으로 나타났다. 열 안정성을 조사하기 위하여 80°C, 100°C, 121°C에서 20분간 열처리하면서 열에 의한 항균활성의 변화를 조사한 결과 80°C와 100°C로 끓인 경우 활성의 변화가 거의 없었으나 121°C로 고압 멸균한 경우 활성이 현저히 감소하는 것으로 확인되었다. 또한 UV light에 대한 항균활성물질의 안정성을 검정하기 위해 30분간 254 nm와 365 nm의 UV를 조사한 후 항균활성을 검정한 결과 항균활성의 변화가 크지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 선발균 A0375가 생산하는 항균활성물질은 산과 알칼리 조건 및 UV처리 시에도 매우 안정적이며 고압 멸균을 제외한 열처리에도 매우 안정한 구조의 화합물임을 추정할 수 있었다.

표 44. pH, 온도 및 UV 조사에 대한 항균물질의 안정성

처리 방법	항균활성(diameter: mm) <sup>a</sup>	항균활성 감소율(%)	
배양액	29.3 ± 1.1		
pH	2	25.7 ± 2.8	12
	4	28.5 ± 3.9	3
	6	29.3 ± 2.0	0
	8	27.7 ± 1.2	5
	10	28.3 ± 3.5	3
	12	27.0 ± 2.3	8
온도(°C)	80	29.4 ± 0.7	0
	100	27.0 ± 1.4	8
	121	16.5 ± 1.2	44
UV(nm)	254	28.0 ± 2.8	4
	365	27.2 ± 2.5	7

<sup>a</sup> *Botrytis cinerea*에 대한 항균활성(paper disk method)

## 2) *Streptomyces* sp. A0375 균주가 생산하는 항균활성물질의 분리 및 정제

*Streptomyces* sp. A0375 균이 생산하는 항균물질은 주로 배양여액 중에 존재하며 용매에 따른 분획을 실시한 결과 부탄올 층에서 강한 항균활성을 나타내었다. 항균활성의 분리 및 정제는 그림 83에 도시한 바와 같이 수행하였으며, 각 단계마다 잿빛곰팡이균에 대한 항균활성을 확인하였다. 먼저 항균물질의 생산을 위하여 A0375 균주를 GSS배지에 접종하고 27°C에서 6일간 진탕 배양한 후 배양액 3.5 L를 8,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 배양여액과 균체를 나누었다. 배양여액은 pH 조절 없이 Diaion HP-20 resin에 흡착시킨 후 3 L의 물, 50% methanol, 70% methanol, methanol순으로 극성을 낮추며 용출하였다. 활성을 나타낸 methanol 분획을 감압 농축하여 얻어진 추출물을 극성에 따라 분리하기 위해 C18 Sep-pak cartridge에 적용한 후 40→100% methanol gradient로 용출하였다. 활성분획을 모아 감압농축한 뒤 분자의 크기에 따라 분리하기 위해 methanol 용매를 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였다. 항균활성분획은 감압농축 후 최종적으로 85% methanol을 전개 용매로 ODS thin layer chromatography에 전개하여 활성을 나타내는 밴드를 수거한 후 methanol로 용출하여 항균활성물질 75-Y1 30.5 mg을 정제하였다.

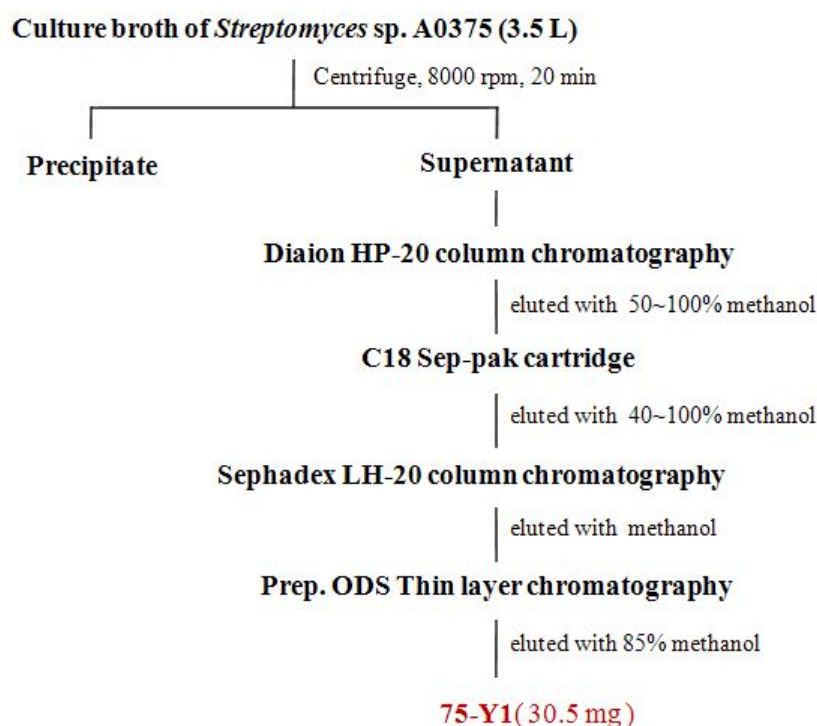


그림 83. 항균활성물질의 분리 및 정제 과정.

## 3) *Streptomyces* sp. A0375 균주가 생산하는 항균활성물질의 화학구조 규명

잿빛곰팡이병균에 대하여 항균활성을 나타내는 활성성분 75-Y1의 화학구조를 규명하기 위하여 CD<sub>3</sub>OD에 녹여 <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC 및 HMBC spectrum을 측정하여 해석하였다. <sup>1</sup>H NMR spectrum(그림 84)을 해석한 결과, 5.46~6.15 ppm에서 8개의 =CH- proton. 3.5~4.7 ppm에서 산소가 붙은 proton, 2.83 ppm에서 N-CH<sub>3</sub>(3H, s) proton. 0.7~2.5 ppm에서 32개의 CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> proton을 확인할 수 있었다.

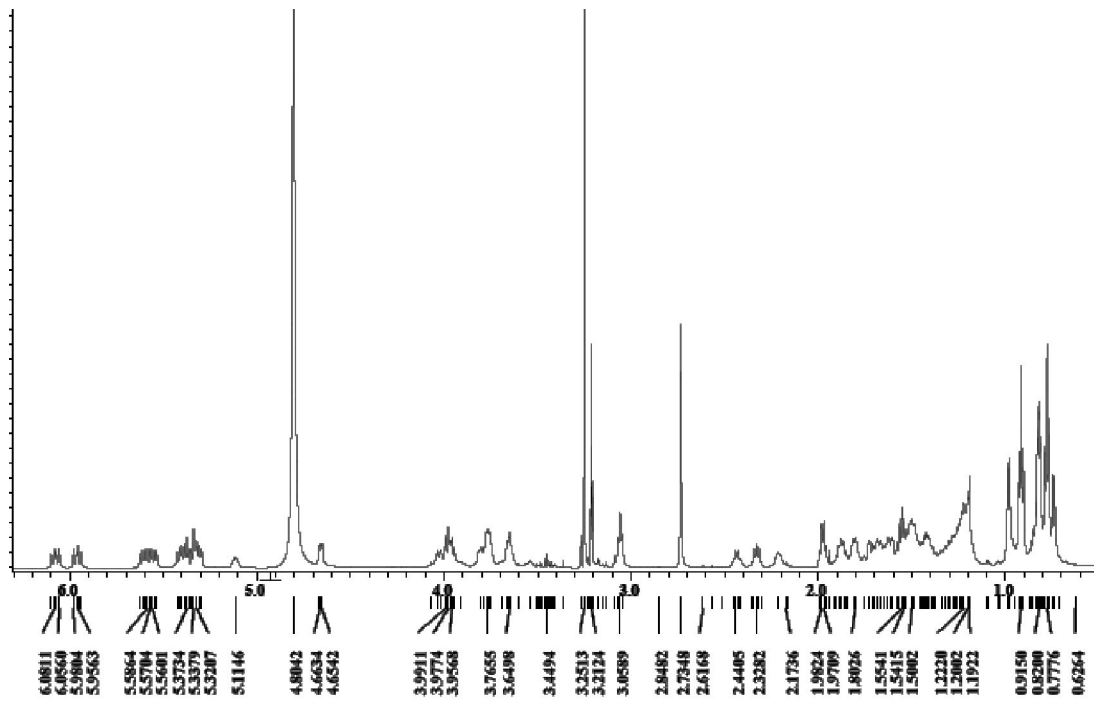


그림 84. 항균활성물질 75-Y1의  $^1\text{H}$  NMR spectrum.

또한  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum(그림 85)에서 관찰된 157.9 ppm의 탄소로부터 guanido group이 존재함을 유추할 수 있었다. 또한 171.4~176 ppm에서 3개의 carbonyl carbon, 129.8~136.8 ppm에서 8개의  $-\text{CH}=\text{}$  carbon, 100 ppm에서 hemiacetal carbon, 65.6~79.7 ppm에서 12개의 oxygenated carbon 및 10~50 ppm에서  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  carbon이 관찰되었다.

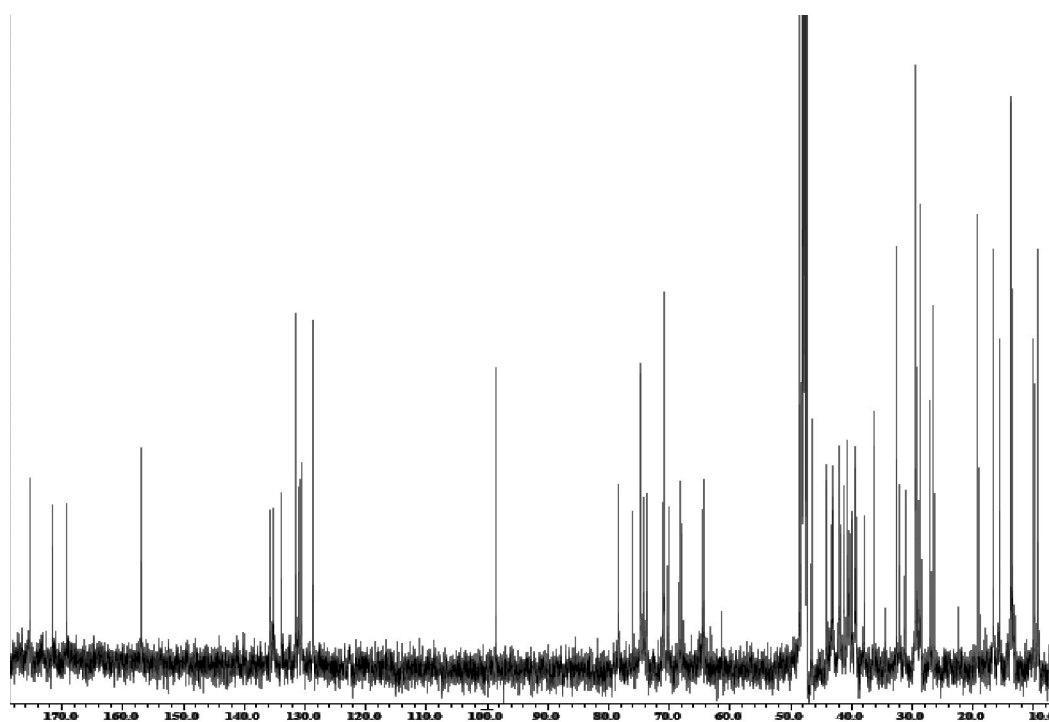


그림 85. 항균활성물질 75-Y1의  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum.

위의 1차원 NMR의 해석으로부터 본 활성화합물은 guanido group을 지닌 macrolide계 화합물로 유추되었다. 따라서  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY(그림 86), HMQC(그림 87) 및 HMBC(그림 88) spectrum 등의 2차원 NMR을 측정하여 해석하였으며 그 결과 화합물 75-Y1이 scopafungin 화합물과 일치함을 확인하였다. 이의 확인을 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였으며, 그 결과(그림 89)  $m/z$  1142.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 에서 mass peak가 관찰되어 본 활성화합물이 scopafungin 과 동일함을 알 수 있었다. 따라서 활성화합물 75-Y1의 화학구조를 scopafungin으로 동정하였으며 이의 화학구조를 그림 90에 나타내었다.

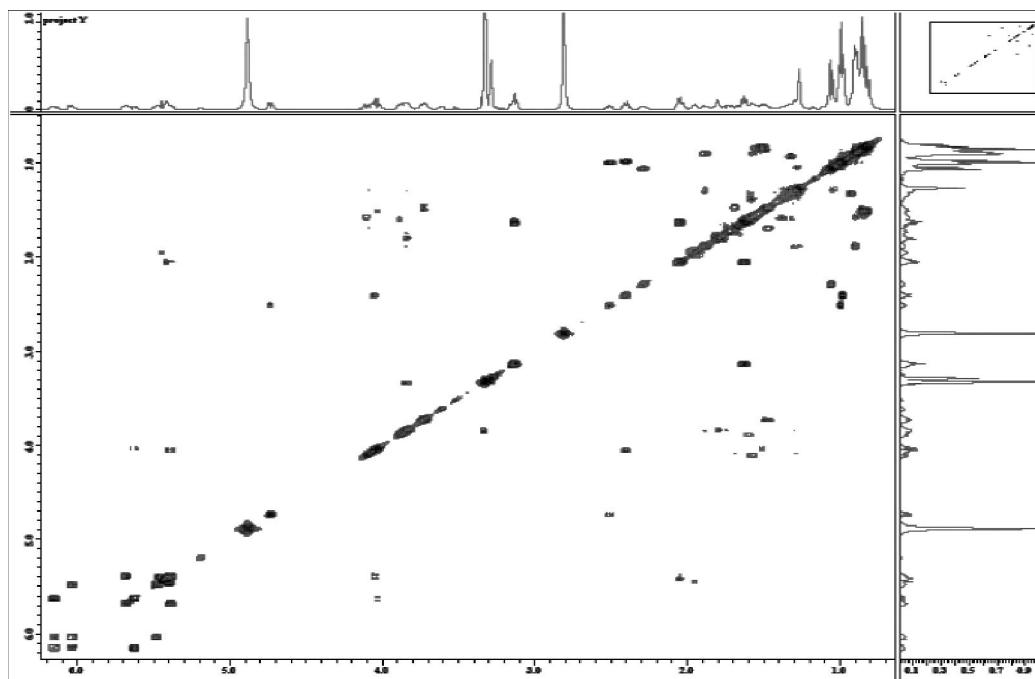


그림 86. 항균활성물질 75-Y1의  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum.

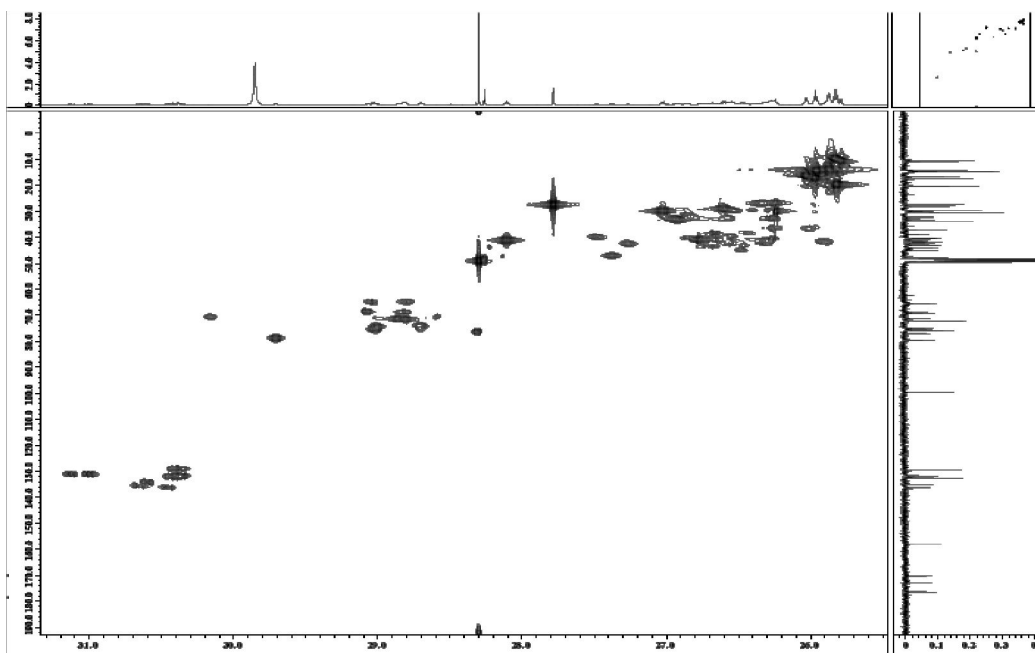


그림 87. 항균활성물질 75-Y1의 HMQC spectrum.

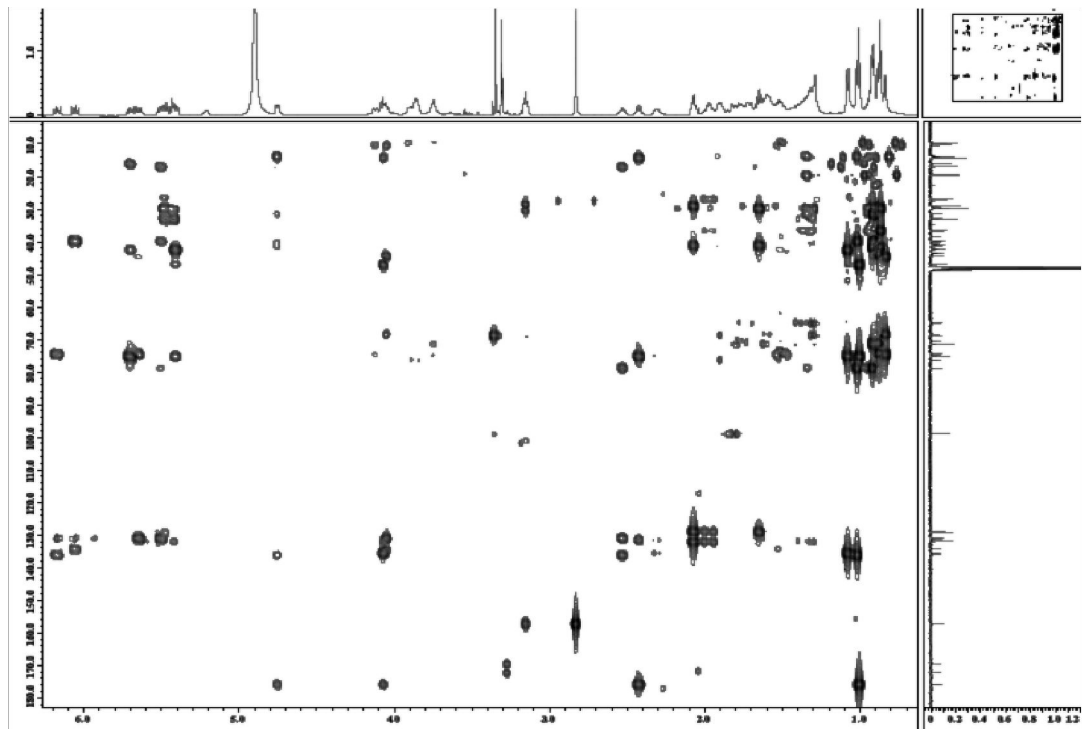


그림 88. 항균활성물질 75-Y1의 HMBC spectrum.

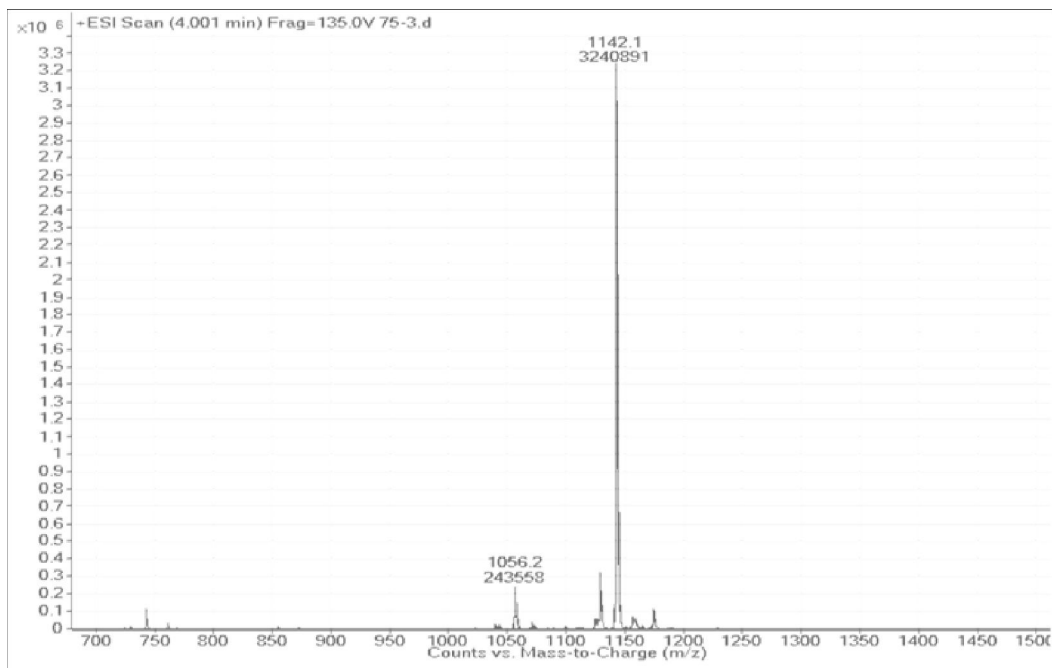


그림 89. 항균활성물질 75-Y1의 ESI-mass spectrum.



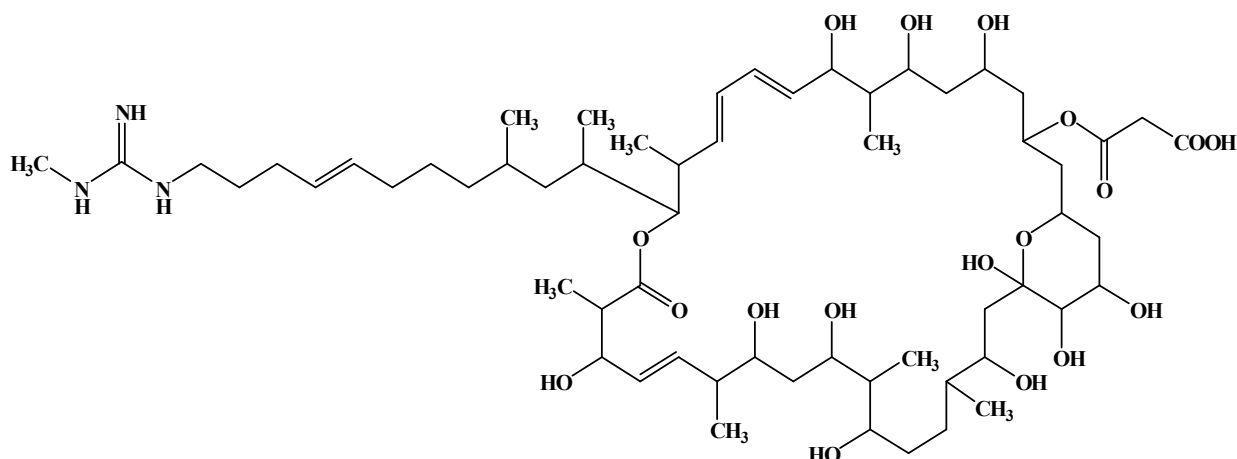


그림 90. 항균활성물질 75-Y1의 화학구조.

사. *Streptomyces* sp. A0375가 생산하는 항균활성물질 75-Y1의 최소저해농도

*Streptomyces* sp. A0375 균주가 생산하는 항균활성물질 75-Y1의 최소저해농도(MIC; minimum inhibitory concentration)를 5종의 식물병원균 *Botrytis cinerea*, *Cyrrindrocarpon destructans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Collectotricum gloeosporioides* 등을 대상으로 조사하였다. 그 결과 표 45에 나타낸 바와 같이 화합물 75-Y1은 전반적으로 낮은 농도에서도 식물병원균의 생장을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 *B. cinerea*의 경우에는 12.5 ppm의 낮은 농도에서도 균사의 생장이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, *C. gloeosporioides*도 비교적 낮은 농도에서 균사생장이 억제되는 것을 확인하였다(그림 91).

표 45. 항균활성물질 75-Y1의 최소저해농도

식물병원균	최소저해농도(MIC, µg/ml)
<i>Botrytis cinerea</i>	12.5
<i>Cyrrindrocarpon destructans</i>	50.0
<i>Rhizoctonia solani</i>	100.0
<i>Fusarium oxysporum</i>	50.0
<i>Collectotricum gloeosporioides</i>	25.0

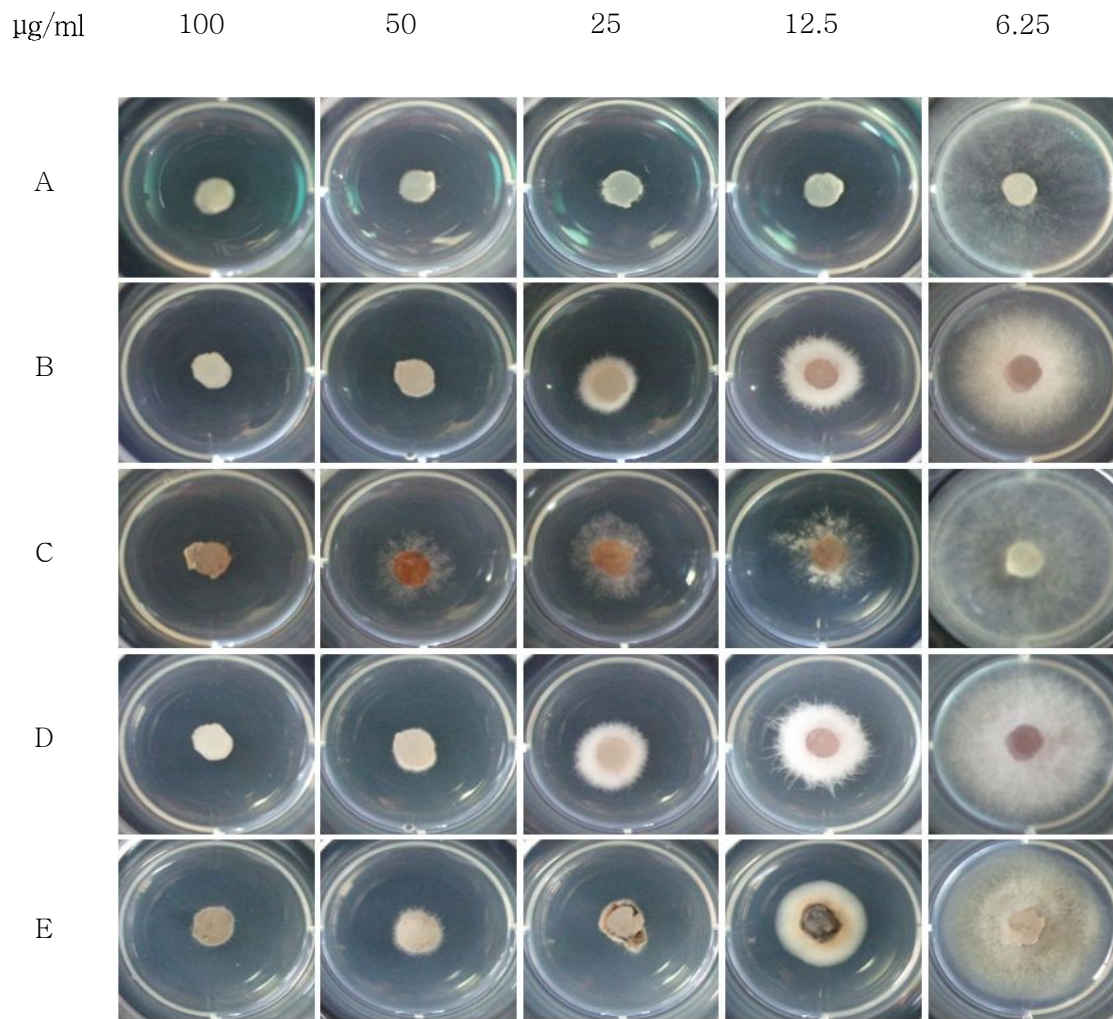


그림 91. 항균활성물질 75-Y1의 최소저해농도 사진. A: *Botrytis cinerea*, B: *Cyrindrocarpon destructans*, C: *Rhizoctonia solani*, D: *Fusarium oxysporum*, E: *Collectotricum gloeosporioides*.

# 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에 의 기여도

## 제 1 절 목표 달성도

본 연구는 농가에 많은 피해를 주고 있는 잣빛곰팡이병, 흰가루병, 탄저병 등에 유효한 다범성 활성을 지닌 친환경농자재 및 미생물농약 소재를 개발하기 위하여 수행한 것이다. 이들 식물병을 방제하기 위하여 많은 화학농약이 활용되고 있으나 약제에 대한 저항성과 환경오염 문제를 야기하고 있어 이의 대체제로서 바이오농약이 주목을 받고 있다. 다양한 바이오농약이 개발되어 시판되고 있으나 검증되지 않은 미생물 살균제의 난립과 현장에서의 낮은 활성 및 불안정성, 합성농약에 비하여 현저히 높은 가격 등으로 소비자로 하여금 불신과 기피를 야기하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 다양한 식물병을 동시에 방제할 수 있는 넓은 스펙트럼의 다범성 미생물소재를 발굴하고, 이들의 활성성분에 초점을 맞추어 quality control이 가능하며, 활성성분 고생산을 위한 균주개량과 양산을 위한 배양조건 확립을 통하여 가격경쟁력을 갖춘 친환경농자재 또는 미생물농약 소재를 개발하고자 하였다. 본 연구는 궁극적으로 시장에서 난립하고 있는 미생물제제의 단점을 극복하고 시장요구도 및 소비자 만족도가 높은 시장 경쟁력을 갖춘 친환경농자재 및 미생물농약 소재를 개발하여 친환경 농산물 재배농가의 소득 증대 및 안정화에 기여하고, WTO 체제 및 FTA 체결로 인한 국제화, 개방화에 의한 농산물의 수입개방 압력에 따른 농업의 국제경쟁력 제고에 기여하고자 하였다. 각 세부 항목별 연구목표 대비 달성도는 100%이며, 그 결과는 아래와 같다.

### <연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도>

연구 목표	목표 대비 결과	달성도(%)
- 다범성 항진균활성을 지닌 길항 미생물의 선발  (연구기간: 2010년) (착안점: 2종 이상 유용 미생물의 선발)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 고추탄저병, 오이흰가루병, 잣빛곰팡이병 등 다범성 바이오농약소재로의 가능성을 지닌 균주 GA-2005을 발견하고 선발함</li> <li>◆ 3천여주의 방선균을 대상으로 잣빛곰팡이균에 특이적인 길항활성을 나타내는 미생물을 스크리닝하여 BS062균주를 선발함</li> <li>◆ 근권에서 채취한 토양시료로부터 잣빛곰팡이균에 항진균활성을 나타내는 방선균을 분리하고 이들을 대상으로 lytic enzyme 생성능, siderophore 생성능, 불용성 인산 가용능, indole-3-acetic acid(IAA) 생성능을 검정하여 재현성과 안정성이 뛰어난 A0375 균주를 선발함</li> </ul>	100

연구 목표	목표 대비 결과	달성도(%)
<p>- 선발 미생물의 동정 및 특성 분석</p> <p>(연구기간: 2010-2011년) (착안점: 2종 이상 선발 미생물의 분류 동정)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 16S rDNA의 염기서열 분석을 통하여 GA-2005 균주를 <i>Bacillus subtilis</i>로 동정함</li> <li>◆ 16S rDNA의 염기서열 분석 결과, BS062 균주는 <i>Streptomyces hygroscopicus</i>와 높은 유사성을 지님. 그러나 포자의 색과 배지에서의 색소 생성 등 형태적, 생리적으로 차이를 나타냄</li> <li>◆ Gyrase A 유전자 염기서열을 바탕으로 한 Neighbour-joining tree에서 A0375균은 <i>Streptomyces geldanamycininus</i>과 <i>S. hygroscopicus</i>의 종에 속하나 세부적인 특성에서 차이를 나타냄</li> </ul>	100
<p>- 항균 스펙트럼의 결정</p> <p>(연구기간: 2010-2011년) (착안점: 2종 이상 선발 미생물의 항균 스펙트럼 결정)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 균주는 인삼점무늬병균(<i>Alternaria panax</i>), 채소류갯빛곰팡이병균(<i>Botrytis cinerea</i>), 고추탄저병균(<i>Colletotrichum acutatum</i>), 고추시들음병균(<i>Fusarium oxysporum</i>), 채소류균핵병균(<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) 등에 강한 항균활성을 나타냄</li> <li>◆ <i>Streptomyces</i> sp. BS062 균주는 갯빛곰팡이병균, 벼도열병균, 토마토잎곰팡이병균, 푸른곰팡이병균에 대하여 강한 항균활성을 나타냄. 특히 갯빛곰팡이균에 대하여는 다른 병원균에서 관찰되지 않는 일반적인 포자 발아 억제에 의한 clear zone과는 다른 특성의 저지환을 형성함</li> <li>◆ <i>Streptomyces</i> sp. A0375는 갯빛곰팡이균 및 인삼뿌리썩음병균에 대해 강한 항진균 활성을 나타냄</li> </ul>	100
<p>- <i>In vivo</i> 및 포장에서의 생물 활성 검정</p> <p>(연구기간: 2011-2012년) (착안점: 2종 이상 선발 미생물의 <i>in vivo</i> 및 포장에서의 생물 활성 검정)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 균주는 고추탄저병 및 딸기탄저병, 오이흰가루병 등에 강한 방제효과를 나타내어 이들 병 방제를 위하여 화학농약을 대체할 수 있을 것으로 판단함</li> <li>◆ <i>Streptomyces</i> sp. BS062 균주는 오이, 인삼, 묘삼, 딸기 등에 발생하는 갯빛곰팡이병에 탁월한 방제효과를 나타냄</li> <li>◆ <i>Streptomyces</i> sp. BS062 A0375 균주 배양액을 딸기의 미성숙과와 성숙과에 처리하여 방제효과를 조사한 결과, 성숙과와 미성숙과 모두 높은 방제효과를 나타내며, 미성숙과에 특이적으로 높은 방제활성을 나타냄. 개화기에 처리하면 뛰어난 예방효과가 기대됨</li> <li>◆ 인삼 저장시의 갯빛곰팡이병 방제활성을 검정한 결과 높은 방제효과를 나타내어 유효성을 확인함</li> </ul>	100

연구 목표	목표 대비 결과	달성도(%)
<p>- 항균활성물질의 분리 및 정제</p> <p>(연구기간: 2011-2012년) (착안점: 선발 미생물로부터 항균활성물질의 분리 및 정제 완료 여부)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 배양액으로부터 다양한 column chromatography 및 HPLC 등을 이용하여 4종의 항균활성물질 WJ-1, WJ-2, WJ-3, WJ-4를 분리, 정제함</li> <li>◆ <i>Streptomyces</i> sp. BS062 배양액으로부터 다양한 column chromatography 및 HPLC 등을 이용하여 clear zone 형성 화합물 HP-1과 turbid zone 형성 화합물 BM-1을 분리, 정제함</li> <li>◆ <i>Streptomyces</i> sp. A0375 균주가 생산하는 항균물질은 pH, 온도 및 UV 조사에 매우 안정함. 다양한 column chromatography 및 HPLC 등을 이용하여 항균활성물질 75-Y1을 분리, 정제함</li> </ul>	100
<p>- 항균활성물질의 화학구조 결정</p> <p>(연구기간: 2011-2012년) (착안점: 선발 미생물로부터 분리한 항균활성물질의 화학구조 결정 완료 여부)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005 유래 항균활성물질 WJ-1, WJ-2, WJ-3, WJ-4의 화학구조를 NMR 및 mass 분석을 통하여 각각 iturin A2, iturin A3, iturin A4, C-16 fengycin A으로 결정함</li> <li>◆ <i>Streptomyces</i> sp. BS062 유래 항균활성물질 HP-1과 BM-1의 화학구조를 NMR 및 mass 분석을 통하여 각각 분자식 <math>C_{36}H_{46}N_2O_{12}</math>, 분자량 698의 isoneoantimycin과 분자식 <math>C_{43}H_{69}NO_{12}</math>, 분자량 792의 FK520(ascomycin)으로 결정함</li> <li>◆ <i>Streptomyces</i> sp. A0375 유래 항균활성물질 75-Y1의 화학구조를 NMR 및 mass 분석을 통하여 분자식 <math>C_{59}H_{103}N_3O_{18}</math>, 분자량 1142의 scopafungin으로 동정함</li> </ul>	100
<p>- 분리한 화합물의 신규성 및 정보 검색</p> <p>(연구기간: 2011-2012년) (착안점: 선발 미생물로부터 분리한 항균활성물질의 신규성 및 정보 검색 완료)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ <i>Bacillus subtilis</i> GA-2005가 생산하는 화합물은 모두 <i>Bacillus</i>에 의하여 분리, 보고된 화합물임</li> <li>◆ <i>Streptomyces</i> sp. BS062로부터 분리한 화합물 isoneoantimycin과 FK520은 방선균에 의하여 생성되는 것으로 보고된 바 있으나 농용으로 활용된 바 없음</li> <li>◆ <i>Streptomyces</i> sp. BS062로부터 분리한 화합물 scopafungin은 방선균에 의하여 생성되는 것으로 보고된 바 있으나 농용으로 활용된 바 없음</li> </ul>	100
<p>- UV-mutagenesis를 통한 균주개량 및 개량균주의 식물병 방제 효과</p> <p>(연구기간: 2011-2013년) (착안점: UV-mutagenesis를 통한 균주개량 및 개량균주의 식물병 방제 효과 검정 여부)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ <i>Streptomyces</i> sp. BS062의 항균물질 수율 증대를 위하여 UV-mutagenesis 조건을 확립한 후 1차 및 2차 UV-mutagenesis을 수행하여 원균주보다 약 25배 활성증가 변이주 M17과 약 100배 활성증가 변이주 MM14를 선발하고, 최적 배양조건을 검토함</li> <li>◆ <i>Streptomyces</i> sp. BS062의 개량균주 M17 및 MM14 균주의 방제 효과 및 방제 스펙트럼을 조사한 결과, 잣빛곰팡이병과 일부의 탄저병 방제에 효과적인 것으로 나타남</li> </ul>	100

연구 목표	목표 대비 결과	달성도(%)
<p>- 선발 미생물의 배양 조건 확립</p> <p>(연구기간: 2011-2012년) (착안점: 선발 미생물의 최적 배양조건 확립 여부)</p>	<p>◆ <i>B. subtilis</i> GA-2005 균주의 최적 배양조건을 조사한 결과, 탄소원은 potato starch, 질소원은 카제인펩톤, 무기질소원은 (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 첨가 시 항생물질 생산성이 가장 우수함. 최적 초기 pH, 온도, 교반 속도 등을 조사한 후 최적배양조건을 확립함</p> <p>◆ <i>Streptomyces</i> sp. BS062의 최적 배양 배지를 선발하고 배양조건을 검토한 결과, 배양 6일, 교반 속도 120 rpm에서 항균물질 생성능이 가장 우수함</p> <p>◆ <i>Streptomyces</i> sp. A0375 균주의 최적 배양 배지를 선발하고 배양조건을 검토한 결과, 배양 최적 온도는 20°C~ 25°C, 최적 교반속도는 200 rpm, 최적 탄소원은 glycerol, 질소원은 soybean flour로 나타남. 항균활성은 배양 6일째 가장 높음</p>	100
<p>- 약해, 독성 및 안전성 평가</p> <p>(연구기간: 2011-2013년) (착안점: 산업화 균주 1종 이상의 약해, 독성 및 안전성 평가)</p>	<p>◆ <i>B. subtilis</i> GA-2005의 등록을 위해 약해 검정을 수행한 결과, 감수성작물인 콩과 옥수수에 모두 약해가 관찰되지 않음. 또한 공인인증기관인 한국생물안전성연구소에 의뢰하여 급성경구독성을 확인한 결과 독성이 관찰되지 않았으며 인축, 식물에 모두 안전한 것으로 확인됨</p>	100
<p>- 제제화 및 제형화</p> <p>(연구기간: 2012-2013년) (착안점: 산업화 균주 1종 이상의 제형화 연구)</p>	<p>◆ <i>B. subtilis</i> GA-2005 균주의 산업화를 위하여 입제, 액제, 수화제의 형태로 제제화 한 후 활성의 지속성 여부를 확인한 결과, 세 가지 제형 모두 장기 보존 시에도 길항력이 지속됨. 비용을 고려하여 입제 형태의 제품화가 가장 효율적일 것으로 판단됨. 또한 저장성과 안전성 향상을 위하여 계면활성제, 자외선차단제, 안정제, 결합제 등을 첨가하여 실험한 경우 계면활성제인 사포닌을 첨가한 처리구에서 높은 안정성을 나타냄</p>	100
<p>- 공장시스템에서의 산업화 배양</p> <p>(연구기간: 2012-2013년) (착안점: 산업화 균주 1종 이상의 pilot plant 배양)</p>	<p>◆ <i>B. subtilis</i> GA-2005 균주의 생산 process를 확립한 후 전술한 최적 배지를 사용하여 pilot plant 생산설비를 이용하여 10톤의 배양을 진행하고, 배양 중 pH, D.O., iturin 함량을 2시간 단위로 측정하여 시간에 따른 경시적 변화를 관찰함</p>	100
<p>- Pilot plant 생산 배양액의 유해 중금속, 약해 및 안전성 검정</p> <p>(연구기간: 2012-2013년) (착안점: Pilot plant 생산 배양액의 유해 중금속, 약해 및 안전성 검정 여부)</p>	<p>◆ 농진청 공인기관인 판코리아 농업환경과학연구소에 의뢰하여 <i>B. subtilis</i> GA-2005 균주의 pilot plant 생산 배양액의 유해 중금속 여부를 확인한 결과 적정량 이하였으며, 감수성 콩, 배추, 고추, 오이를 이용하여 약해여부를 확인한 결과 약해도 검출되지 않음. 또한 목원대학교 미생물생태자원연구소에 의뢰하여 유해미생물 함유 여부를 확인한 결과, 유해 미생물은 검출되지 않음</p>	100

연구 목표	목표 대비 결과	달성도(%)
- 등록 (연구기간: 2012-2013년) (착안점: 1종 등록 여부)	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 친환경농업육성법에 의거하여 농진청 공인 시험기관에서 <i>B. subtilis</i> GA-2005 균주의 시험성적서를 발급받아 공시번호 “공시-4-1-011”의 ‘토사랑’을 신규 친환경농자재로 등록함</li> <li>◆ <i>B. subtilis</i> GA-2005 균주는 우선적으로 친환경농자재로 등록하였으나, 본 연구를 통하여 우수한 방제효과가 입증되어 현재 바이오농약으로의 등록이 추진 중임</li> </ul>	100

## 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 본 연구는 미생물제제의 약점을 보완하여 국내 친환경농자재의 품질개선을 통한 불신 극복과 활성화 방안의 도출에 크게 기여할 것이며, 추후 미생물제제의 개발에 새로운 개념의 연구개발 방향의 시발점을 제공할 것이다.
2. 시판되고 있는 친환경농자재 및 바이오농약 제품의 문제점을 극복한 새로운 환경친화형 미생물제제의 개발을 제시한 것으로 화학 합성농약의 대체제 개발 연구자들에게 새로운 연구방법 및 방향을 제공할 것이다.
3. 의약분야에서 활용되고 있는 UV-mutagenesis를 통한 활성물질 생산성 증대 방법을 처음으로 친환경농자재 및 바이오농약 제품의 개발 기술에 적용한 것으로 앞으로 많은 연구자들에 의하여 이같은 기술이 활용될 수 있을 것이다.
4. 화학농약이 아닌 환경 친화적 방법으로 식물병을 방제하여 청정농산물 생산에 활용할 수 있고, 이를 통하여 친환경 농산물 재배농가의 소득 증대 및 안정화에 기여할 수 있으며, 각종 농산물의 수입개방 압력이 거세지는 현시점에서 농가의 경쟁력확보에 기여할 것이다.
5. 새로운 친환경농자재 및 바이오농약 소재를 개발한 것으로 외국으로부터의 수입을 대체하고 수출을 통한 국내 바이오농약 산업의 활성화 및 경제적 이익 창출에 기여할 것이다.
6. 본 연구에서 개발한 친환경농자재 및 바이오농약 소재는 친환경 및 지속가능한 농업을 위한 농업생태계 보호 및 환경오염 방지에 기여할 것이다.
7. 신규 미생물 유래 살균제의 개발을 통한 국가 생물산업 분야 경쟁력 제고 및 우리나라 유용 미생물자원의 체계적 활용에 기여할 것이다.
8. 새로운 친환경농자재 및 바이오농약 소재 개발과정에서 도출한 지적재산권, 논문 투고 및 원천기술 개발은 국가 과학기술 경쟁력 제고에 기여할 것이다.
9. 새로운 친환경농자재 및 바이오농약 소재 개발을 통하여 전문분야가 다른 연구팀간의 융합 연구에 따른 과학기술인 결속력 강화에 기여할 것이다.



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 실용화·산업화 계획

본 연구는 우수한 길항력을 지닌 3종의 미생물 *Bacillus subtilis* GA-2005, *Streptomyces* sp. BS062, *Streptomyces* sp. A0375를 친환경농자재 혹은 미생물농약 소재로 개발하기 위하여 수행한 것이다. 특히 참여기업인 (주)우진B&G에서 개발 중인 탄저병, 흰가루병, 잣빛곰팡이병 등 다병성 항진균활성을 지닌 *Bacillus subtilis* GA-2005와 주관연구기관인 전북대학교에서 선발한 2종의 방선균 *Streptomyces* sp. BS062과 *Streptomyces* sp. A0375의 개발 연구를 수행한 것으로, 그 결과 *Bacillus subtilis* GA-2005를 친환경농자재로 등록을 완료하였으며, 방선균 *Streptomyces* sp. BS062과 *Streptomyces* sp. A0375의 기반연구를 완료하여 산업화 연구를 계속적으로 진행할 예정이다.

본 연구과제를 통하여 친환경농자재로 등록한 *Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 경우 (주)우진B&G에서 바이오농약으로의 등록을 위하여 지속적인 연구를 수행할 예정이고, 기반연구를 완료하여 효능의 우수성을 입증한 *Streptomyces* sp. BS062과 *Streptomyces* sp. A0375 균주의 경우 기업에 기술이전을 추진하고, 기업과의 공동연구를 계속적으로 추진하여 친환경농자재 혹은 미생물농약으로의 등록을 위한 산업화 연구를 진행할 예정이다.

### 제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획

본 연구과제를 통하여 친환경농자재로 등록한 *Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 경우 (주)우진B&G에서 농가를 대상으로 홍보 및 활용 방법을 위한 교육을 실시할 것이며, 지속적으로 기술개발을 수행하여 기술 확산에 노력할 것이다. 또한, 잣빛곰팡이병에 특이적으로 강한 활성을 나타내는 *Streptomyces* sp. BS062과 *Streptomyces* sp. A0375 균주의 경우 사업화 연구를 지속적으로 수행하여 기술이전 및 기술확산에 노력할 것이다.

### 제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

본 연구과제는 주로 산업화연구에 초점을 맞추었으며, 그 결과 우선적으로 친환경농자재 1건을 등록하였다. 현재 바이오농약으로의 등록을 추진 중이다 또한 4건의 특허가 출원 혹은 등록되었으며, 특허출원을 위하여 3종의 특허미생물을 기탁한 바 있다. 학술논문은 1편의 SCI급 논문과 2편의 국내등재지 논문을 게재하였으며, 현재 추가적으로 2편의 SCI급 논문이 작성중이다. 또한 6건의 국제학술대회 및 4건의 국내학술대회를 비롯하여 총10건의 국내외 학술대회에서 발표하는 성과를 거두었다. 정량적인 연구성과를 아래의 도표에 나타내었다.

1. 특허 출원 및 등록

국내외 구분	출원인	제목	국가 및 출원/등록 구분	출원/등록번호 (일자)
국내	윤봉식, 이인경, 김영숙, 염지희 (전북대학교산단)	신규 방선균 스트렙토마이세스 속 A0375균주, 이로부터 생산된 항균활성물질, 및 상기 항균활성물질을 유효성분으로 하는 잣빛곰팡이병 방제용 조성물	한국 특허출원	2012-0009168 (2012. 01. 30)
국내	윤봉식, 김영숙, 이인경 (전북대학교산단)	항균활성을 가지는 신규의 바실러스 속 BS061 균주 및 이를 이용한 식물병 방제용 조성물	한국 특허등록	10-1152671 (2012. 05. 29)
국내	윤봉식, 김영숙, 이인경 (전북대학교산단)	신규한 스트렙토마이세스 젤다나마이시너스 BS3283 및 이를 이용한 식물병 방제방법	한국 특허등록	10-1224485 (2013. 01. 15)
국내	윤봉식, 이인경, 송자경 (전북대학교산단)	스트렙토마이세스 에스피 BS063 및 이를 이용한 식물병 방제	한국 특허출원	2013-0073161 (2013. 06. 25)

<특허미생물 수탁: 3건>

1. 미생물의 명칭: *Streptomyces* sp. A0375, 미생물 수탁 번호: KACC91697P
2. 미생물의 명칭: *Streptomyces* sp. M17, 미생물 수탁 번호: KACC91698P
3. 미생물의 명칭: *Streptomyces* sp. BS063, 미생물 수탁 번호: KACC91715P

특허미생물 수탁증


2012년 01월 20일

윤봉식 귀하

2011년 12월 23일 제 P11-113호로 귀하가 기탁 신청한 미생물에 대하여 이를 수탁하고 다음과 같이 미생물 수탁번호를 통지합니다.

- 다 음 -

1. 미생물의 명칭 : *Streptomyces* sp. A0375  
2. 미생물 수탁 번호 : KACC91697P

국립농업과학원 농업유전자원센터소장 

특허미생물 수탁증


2012년 01월 20일

윤봉식 귀하

2011년 12월 23일 제 P11-114호로 귀하가 기탁 신청한 미생물에 대하여 이를 수탁하고 다음과 같이 미생물 수탁번호를 통지합니다.

- 다 음 -

1. 미생물의 명칭 : *Streptomyces* sp. M17  
2. 미생물 수탁 번호 : KACC91698P

국립농업과학원 농업유전자원센터소장 

특허미생물 수탁증


2012년 04월 10일

윤봉식 귀하

2012년 03월 02일 제 P12-023호로 귀하가 기탁 신청한 미생물에 대하여 이를 수탁하고 다음과 같이 미생물 수탁번호를 통지합니다.

- 다 음 -

1. 미생물의 명칭 : *Streptomyces* sp. BS063  
2. 미생물 수탁 번호 : KACC91715P

국립농업과학원 농업유전자원센터소장 

## 2. 전문학술지 논문 게재

구분	저자명	논문제목	게재 학술지명	권 및 쪽수 (년도)
국내 등재지	Young-Sook Kim, Myeong-Seok Lee, Ji-Hee Yeom, Ja-Gyeong Song, In-Kyoung Lee and Bong-Sik Yun	Screening of multifunctional bacteria with biocontrol and biofertilizing effects	Kor. J. Mycol.	39: 126-130 (2011)
국내 등재지	Young-Sook Kim, Myeong-Seok Lee, Ji-Hee Yeom, Ja-Gyeong Song, In-Kyoung Lee, Woon Hyung Yeo and Bong-Sik Yun	Screening of antagonistic bacteria for biological control of ginseng root rot	Kor. J. Mycol.	40: 44-48 (2012)
SCI급	Young-Sook Kim, Ja-Gyeong Song, In-Kyoung Lee, Woon Hyung Yeo and Bong-Sik Yun	<i>Bacillus</i> sp. BS061 suppresses powdery mildew and gray mold	Mycobiology	41: 108-111 (2013)
SCI급	Kim, Young-Sook, Ja-Gyeong Song, In-Kyoung Lee, Woon Hyung Yeo and Bong-Sik Yun	<i>Bacillus</i> sp. BS061 suppresses gray mold and powdery mildew through the secretion of different bioactive substances	Mycobiology	In press (2013)
SCI급	Seung Woong Lee, Ji-Hee Yeom, In-Kyuoung Lee and Bong-Sik Yun	A <i>Streptomyces</i> sp. A0375 suppresses gray mold disease by producing an antifungal substance	Journal of Agricultural & Food chemistry	In preparation
SCI급	Young-Sook Kim, In-Kyoung Lee, Woon-Hyung Yeo and Bong-Sik Yun	Biocontrol effects of <i>Streptomyces</i> sp. BS062 on gray mold disease and its bioactive substances	Journal of Agricultural & Food chemistry	In preparation

## 3. 학술발표

구분	저자명	발표제목	학술대회 명칭	개최기간 및 장소	발표 형태
국제	Myeong-Seok Lee, Young-Sook Kim, Ji-Hee Yeom, In-Kyoung Lee, Ja-Gyeong Song and Bong-Sik Yun	Development of multifunctional Microbial inoculants with biocontrol and biofertilizing activities	한국 식물 병리학회 국제 학술대회	2010. 10. 27-30, 전주, 전북대학교	포스터

구분	저자명	발표제목	학술대회 명칭	개최기간 및 장소	발표 형태
국제	Ji-Hee Yeom, Young-Sook Kim, Myeong-Seok Lee, In-Kyoung Lee and Bong-Sik Yun	Production of lytic enzymes and siderophore and biocontrol of ginseng root rots by <i>Streptomyces</i> species	한국 식물 병리학 회 국제 학술 대회	2010. 10. 27-30, 진주, 전북대학교	포스터
국내	Young-Sook Kim, Ji-Hee Yeom, In-Kyoung Lee, Dong-Jin Park, Chang-Jin Kim, Woon Hyung Yeo and Bong-Sik Yun	<i>Streptomyces geldanamycininus</i> BS3283 suppresses gray mold disease through antibiotic and hydrolytic enzyme production	한국 식물 병리학 회 학술대회	2011. 4. 21-23, 경북대학교	포스터
국내	Young-Sook Kim, Ja-Geong Song, In-Kyoung Lee and Bong-Sik Yun	Biological control effect of <i>Streptomyces hygrosopicus</i> BS062 and its mutagenesis	한국 식물 병리학 회 학술대회	2011. 4. 21-23, 경북대학교	포스터
국제	Ji-Hee Yeom, Young-Sook Kim, Ja-Gyeong Song, In-Kyoung Lee and Bong-Sik Yun	Biological control effects of <i>Streptomyces</i> sp. A0375 antagonistic to <i>Botrytis cinerea</i>	The Asian Mycological Congress	2011. 8. 7-11, 인천대학교	포스터
국제	Ja-Gyeong Song, Young-Sook Kim, In-Kyoung Lee and Bong-Sik Yun	UV-mutagenesis of <i>Streptomyces</i> sp. BS062 antagonistic to <i>Botrytis cinerea</i>	The Asian Mycological Congress	2011. 8. 7-11, 인천대학교	포스터
국제	Ji-Hee Yeom, Young-Sook Kim, In-Kyoung Lee and Bong-Sik Yun	Optimal culture conditions of <i>Streptomyces sporoclivatus</i> A375 for the antifungal substance production	한국 응용 생명 화학 회 국제 학술대회	2011. 10. 20-22, 제주ICC	포스터
국내	Ji-Hee Yeom, Young-Sook Kim, In-Kyoung Lee and Bong-Sik Yun	Biological Effects of gray mold in strawberry and ginseng using <i>Streptomyces</i> sp. A0375	한국 균 학 회 학술대회	2012. 4. 26-27, 변산대명리조트	포스터
국내	Ja-Gyeong Song, Seong-Eun Kim, Myeong-Seok Lee, In-Kyoung Lee and Bong-Sik Yun	Strain improvement of the wild-type <i>Streptomyces hygrosopicus</i> BS062 by UV-mutagenesis	한국 균 학 회 학술대회	2013. 5. 23-24, 배재대학교	포스터

구분	저자명	발표제목	학술대회 명칭	개최기간 및 장소	발표 형태
국제	Ja-Gyeong Song, Seong-Eun Kim, Myeong-Seok Lee, In-Kyoung Lee and Bong-Sik Yun	Increase effect of antifungal activity of wild-type <i>Streptomyces hygrosopicus</i> BS062 by UV-mutagenesis	한국응용생명화학학회 국제학술대회	2013. 6. 27-29, 부산해운대그랜드호텔	포스터

## 제 4 절 추가연구, 타 연구에의 활용 계획

본 연구는 참여기업인 ㈜우진B&G에서 발굴한 탄저병, 흰가루병, 잣빛곰팡이병 등에 다범성 항진균활성을 나타내는 *Bacillus subtilis* GA-2005와 주관연구기관인 전북대학교에서 선발한 2종의 방선균 *Streptomyces* sp. BS062과 *Streptomyces* sp. A0375의 개발 연구를 수행한 것이다. 그 결과 *Bacillus subtilis* GA-2005 균주는 친환경농자재로 등록을 완료하였으며, 방선균 *Streptomyces* sp. BS062과 *Streptomyces* sp. A0375 균주는 기반연구를 완료한 상태이다. 친환경농자재로 등록한 *Bacillus subtilis* GA-2005 균주의 경우 ㈜우진B&G에서 생물농약으로의 등록을 위하여 지속적인 연구를 수행할 예정이고, 기반연구를 완료하여 효능의 우수성을 입증한 *Streptomyces* sp. BS062과 *Streptomyces* sp. A0375 균주의 경우 기업에 기술이전을 추진한 후 공동연구를 계속적으로 수행하여 친환경농자재 혹은 미생물농약으로의 등록을 진행할 예정이다.

본 연구는 미생물제제의 약점을 보완하여 국내 친환경농자재의 품질개선을 통한 불신 극복과 활성화 방안의 도출에 활용될 수 있을 것이다. 특히 의약분야에서 미생물의 생산성을 증가시키기 위하여 활용하고 있는 UV-mutagenesis 기술을 친환경농자재 및 생물농약 제품의 활성물질 생산성 증대를 위하여 처음으로 적용한 것으로 앞으로 친환경농자재 및 생물농약 제품을 개발하는 많은 연구자들에 의하여 본 기술이 활용될 것으로 기대된다. 특히 UV-mutagenesis는 다른 GMO체들의 제조와는 달리 안정성이 인정되는 돌연변이체 유발 방법으로 활용성이 매우 높다. 이는 추후 미생물제제의 개발에 새로운 개념의 연구개발 방향의 시발점을 제공할 것으로 본다. 또한 본 연구는 이미 시판되고 있는 친환경농자재 및 생물농약 제품의 활성증진을 위하여도 활용될 수 있을 것이다. 시판되고 있는 많은 제품들이 낮은 방제가로 소비자들의 불신이 팽배하고 있으나 UV-mutagenesis 방법을 이용하여 활성을 증가시켜 이를 극복할 수 있고, 그럴 경우 높은 방제가는 물론 희석배수의 증가로 인하여 가격 경쟁력도 지닐 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서 개발한 미생물제품은 화학농약이 아닌 환경 친화적 방법으로 식물병을 방제하여 청정농산물 생산에 활용할 수 있고, 이를 통하여 친환경 농산물 재배농가의 소득 증대 및 안정화에 기여할 수 있으며, 각종 농산물의 수입 개방 압력이 거세지는 현시점에서 농가의 경쟁력확보에 기여할 것이다. 또한 새로운 친환경농자재 및 생물농약 개발과정에서 활용한 유효성분의 분석기술 즉 분리·정제 기술, 화학구조 결정기술, database 활용 기술 등은 생리활성물질 분석기술 향상에 크게 기여할 뿐만 아니라 미생물산업의 국가 경쟁력 향상 및 연구개발 국제경쟁력 향상에도 기여할 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구개발과정 동안 해외과학기술 추세가 변화된 것은 아니나, 외국의 생물농약의 개발은 비교적 소규모 회사들을 중심으로 이루어지고 있다는 점과 대부분 미생물에 근간한 미생물농약과 미생물이 생산하는 활성물질에 근간한 생화학농약 개발에 주력하는 특징이 있다. 그럼에도 불구하고 환경친화적, 저독성, 고약효의 신농약의 개발을 위해 연구를 집중하고 있고, 최근에는 다국적 기업간 인수 합병으로 경쟁력을 확보함과 동시에 생물농약 개발의 효율성을 증대하기 위하여 유전체학(genomics), 단백질체학(proteomics)과 같은 생물유전정보 해석기술, 컴퓨터 정보처리 기술, 나노기술, 자동화기술 등을 통한 고효율 대량스크리닝 체제를 구축하고 있는 등 기술의 질과 양적인 측면에서 혁신적인 변화를 추구하고 있다. 세계 농약시장 전망에서도 앞으로 생물농약과 유전자 변형작물은 급격히 증가하여 시장이 확대될 것으로 추정하고 있고, 또한 자연계에는 아직도 탐색되지 않은 다양한 생물자원이 존재하고 있음을 감안할 때 생물농약 개발은 새로운 고부가 자원을 발굴하여 산업화하는 전략으로도 매우 중요한 가치를 지니고 있다. 바이오농약 중 가장 큰 부분을 차지하는 미생물 농약은 최근에 병이나 해충의 피해를 막는 것뿐만 아니라 작물의 생장을 현저하게 촉진시키거나 토양을 복원하는 방법으로 개발이 이루어지고 있다. 특히 외국에서는 화학농약의 사용에 어려움이 있는 작물을 대상으로 효과가 우수하고, 약효 발현기간이 빠르며, 사용하기 편리하고, 저장성이 우수한 제품개발에 박차를 가하고 있는 추세이다.

## 제 7 장 연구시설 · 장비 현황

본 연구개발과정 동안 도입하거나 개발한 연구시설 및 장비는 없으며, 따라서 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 장비도 없다.



## 제 8 장 참고문헌

1. RDA. 2011. The concept of environment-friendly agriculture and its farming technologies.
2. Park K. Development of biopesticide and role of *Bacillus* spp. KIC news 2011, 14, 1-11.
3. Droby A., Lichter A. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., eds), 2004, pp. 349 - 367. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.
4. Brian W., Bettina T., Paul T., Jan A.L.V.K. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 2007, 8, 561 - 580.
5. Agrios G. N. *Plant Pathology*, Academic press: New York, 1997; pp 606.
6. Barnes S.E., Shaw, M. W. Factors affecting symptom production by latent *Botrytis cinerea* in *Primula x polyantha*. *Plant Pathol.* 2002, 51, 746 - 754.
7. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen, N. Eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2004, pp 1-6.
8. Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., van Kan J. A. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 2007, 8, 561 - 680.
9. Elad Y., Stewart A. Microbial control of *Botrytis* spp. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N., eds), Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, 2004, pp. 223 - 241.
10. Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M., Chapeland F. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manage. Sci.* 2002, 58, 876 - 888.
11. Elad Y., Yunis H., Katan J. Multiple resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathol.* 1992, 41, 41 - 46.
12. Dennis C., Davis R.P. Tolerance of *Botrytis cinerea* to iprodione and vinclozolin. *Plant Pathol.* 1979, 28, 131 - 133.
13. Kiss L. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Manage Sci.* 2003, 59, 475 - 483.
14. Ongena M., Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* 2008, 16, 115-125.

15. Woo S. M., Woo J. U., Kim, S. D. Purification and characterization of the siderophore from *Bacillus licheniformis* K11, a multi-functional plant growth promoting rhizobacterium. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 35, 128-134.
16. Kim K.Y., Kim S.D. Biological control of *Pyricularia aryzae* blast spot with the antibiotic substances produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997, 25, 396-402.
17. Imamura N., Lshikawa T., Ohtsuka T., Yamamoto K., Dekura M., Fukami H., Nishida R. An antibiotic from *Penicillium* sp. covering the cocoon of the leaf-rolling moth, *dactyloglyphatona*. *Biosci. Biotech. Bioch.* 2000, 64, 2216-2217.
18. Jun H.K., Kim S.D. Selection and antagonistic mechanism of *Pseudomonas fluorescens* 4059 against phytophthora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 32, 312-316.
19. Jeong D.H., Pard K.D., Kim S.H., Kim K.R., Choi S.W., Kim J.T., Choi K.H., Kim J.H. Identification of *Streptomyces* sp. producing antibiotics against phytopathogenic fungi, and its structure. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 14, 212-215.
20. Lee I.K., Kim C.J., Kim S.D., Yoo I.D. Antifungal antibiotic against fruit rot disease of red pepper from *Streptomyces parvullus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990, 18, 142-147.
21. Lee S.Y., Lee S.B., Kim T.K., Kim H.G. Effect of agrochemicals on mycelial growth and spore germination of a hyperparasite, *Ampelomyces quisqualis* 94013 for controlling cucumber powdery mildew. *Kor. J. Pesti. Sci.* 2004, 8, 71-78.
22. Jung H.K., Kim J.R., Woo S.M., Kim S.D. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-Producing biocontrol activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 34, 94-100.
23. Neilands J.B. Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiol. Sci.* 1984, 1, 9-14.
24. Paulitz T.C., Loper J.E. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Phythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathology* 1991, 81, 930-935.
25. Scher F.M., Baker R. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium wilt* pathogens. *Phytopathology* 1982, 72, 1567-1573.
26. Lee M.W. Root colonization by beneficial *Pseudomonas* spp. and bioassay of suppression of *Fusarium wilt* of adish. *The Kor. J. Mycol.* 1997, 25, 10-20.
27. Liu L., Kloepper J.W., Tuzun S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant

- growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 1995, 85, 1064-1068.
28. Ping L., Boland W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Pla. Sci.* 2004, 9, 263-266.
  29. Blakeman J.P., Broie I.D.S. Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surfaces. In: *Microbiology of Aerial plant surface* (Ed. by Dickinson C.H., Preece T.F.). Academic press, London. 1976, 529-557.
  30. Edward S.G., Seddon B. *Bacillus brevis* as biocontrol agents against *Botrytis cinerea* on protected chinese cabbage. In: *Recent advances in Botrytis Reserch.* (Ed. by K. Verhoeff, N. E. Malathrakis and B. Williamson). Pudoc, Wageningen 1992, 267-271.
  31. Walker R., Innes C.M.J., Allan E.J. The potential biocontrol gent *Pseudomonas antimicrobica* inhibits germination of conidia and outgrowth of *Botrytis cinerea*. *Letters in Applied Microbiology* 2001, 32, 346-348.
  32. Newhook F.J. Microbiological control of *Botrytis cinerea* pers. II. Antagonism by fungi and actinomycetes. *Ann. Biol.* 1951, 35, 185-202.
  33. White J.G., Linfield C.A., Lahdenpera M.S., Voti J. Mycostop a novel biofungicide based on *Streptomyces griseoviridis*. Brighton Crop Prot. Conf. Pests. Diseases 1990, pp 221-226.
  34. Beloanger RR., Dik A.J., Menzies J.M. Powdery mildews recent Advances toward integrated control. In: *Plant-microbe Interaction and Biological Control* (Ed. Boland, G. J. and Kuykendall, D. L.). Marcel dekker, NewYork. 1998.
  35. Nelson M.E., Powelson K.L. Biological control of gray mold of snap beans by fungi and actinomycetes. *Amm. Biol.* 1988, 35, 185-202.
  36. Wardlow L. R., O'Neill T. M. Management strategies for controlling pests and diseases in glasshouse crops. *Pestic. Sci.* 1992, 36, 341 - 347.
  37. Shin D., Park M.S., Jung S., Lee M.S., Lee K.H., Bae K.S., Kim S.B. Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of coastal sand dune plants. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 17, 1361 - 1368.
  38. Jacobsen B.J., Zidack N.K., Larson B.J. The role of Bacillus-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. *Phytopathology* 2004, 94, 1272 - 1275.
  39. Raupach G.S., Kloepper J.W. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 1998, 88, 1158 - 1164.
  40. Santos A., Sánchez A., Marquina D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis*

*cinerea*. *Microbiol. Res.* 2004, 159, 331 - 338.

41. Janisiewicz W.J., Jeffers S.N. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Prot.* 1997, 16, 629 - 633.
42. Cazorla F.M., Romero D., Pérez-García A., Lugtenberg B.J.J., de Vicente A., Bloemberg G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J. Appl. Microbiol.* 2007, 103, 1950 - 1959.
43. Kim H.J., Lee S.H., Kim C.S., Lim E.K., Choi K.H., Kong H.G., Kim D.W., Lee S.W., Moon B.J. Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 17, 438 - 444.
44. Park C.N., Lee J.M., Lee D., Kim B.S. Antifungal activity of valinomycin, a peptide antibiotic produced by *Streptomyces* sp. Strain M10 antagonistic to *Botrytis cinerea*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 18, 880 - 884.
45. 환경보존과 농약 사용법 19, <http://refarm14.blog.me/140023858828>
46. McSpadden Gardener B.B. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* 2004, 94, 1252-1258.
47. Mommaerts V, Sterk G, Hoffmann L, Smagghe G. A laboratory evaluation to determine the compatibility of microbiological control agents with the pollinator *Bombus terrestris*. *Pest Manag Sci.* 2009, 65(9), 949-955.
48. BASF general information on Serenade [www.agro.basf.com](http://www.agro.basf.com).
49. 식품 미생물학, 김창환, 백현동, 윤원호, 조좌형, 유한문화사, 2004.
50. Roberts M.S., Namura L.K., Cohan F.M. *Bacillus mojavensis* sp. nov. distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994. 44, 256-264.
51. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* 1997. 24, 4876-4882
52. Teather, R., Wood, P.J. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, 43, 777-780.
53. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R., Phillips, G.B. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, 1981. Washington, D. C.

54. Ryu, J.H., Madhaiyan, M., Poonhuzhali, S., Yim, W.J., Indiragandhi, P., Kim, K.A., Anandham, R., Yun, J.C., Kim, K.H., Sa, T. M. Plant growth substances produced by *Methylobacterium* spp. and their effect on Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and red pepper (*Capsium annuum* L.) growth. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 16, 1622-1628.
55. Gupta, R., Singal R., Shankar A., Chander R., Saxena R.K. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1994. 40, 255-260.
56. Tang, Y.W., Bonner J. The enzymatic inactivation of indole acetic acid I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. *Arch Biochem.* 1947, 13, 14-25.
57. Posten, C.H., Cooney, C. L. Growth of microorganisms, spp. 113-162. *In* Rehm, H. -J. and Reed, G. *Biotechnology*, Vol. 1, Biological Fundamentals. VCH, 1993, Weinheim.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.