

319110-02

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
농축산물안전유통소비기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003834-01

토마토 병해·예방 방제용 미생물제제
대량생산 및 현장적용 기술 개발

토마토 병해·예방 방제용 미생물제제 대량생산 및 현장적용 기술 개발

2021

2022. 01. 22.

주관연구기관 / (재)농축산용미생물산업육성지원센터
협동연구기관 / 전남대학교 산학협력단

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “토마토 병해 예방·방제용 미생물제제 대량생산 및 현장적용 기술 개발”(개발기간 : 2019. 09. 25. ~ 2021. 09. 24.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 01. 22.

주관연구기관명 : (재)농축산용미생물산업육성지원센터
협동연구기관명 : 전남대학교 산학협력단

김대혁 (인)
민정준 (인)



주관연구책임자 : 김 평 일
협동연구책임자 : 이 철 원

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서							보안등급 일반[√], 보안[]		
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	사업명		농축산물안전유통소비 기술개발사업		
전문기관명 (해당 시 작성)				내역사업명 (해당 시 작성)	내역사업명		역매칭시범사업		
공고번호	농축2019-316			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	총괄연구개발 식별번호				
				연구개발과제번호	연구개발과제번호		319110-02		
기술분류	국가과학기술 표준분류	LA0908	50%	LB0304	30%	LA0801	20%		
	농림식품과학기술분류	RA0305	50%	RA0303	30%	CA0105	20%		
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문								
	영문								
연구개발과제명	국문	토마토 병해 예방방제용 미생물제제 대량생산 및 현장적용 기술 개발							
	영문	Mass production of microbial agents and development of practical application techniques for biocontrol of tomato diseases							
주관연구개발기관	기관명	(재)농축산용미생물산업육성지원센터		사업자등록번호	624-82-00030				
	주소	(56212)전북 정읍시 첨단 과학로 241		법인등록번호	211222-0006871				
연구책임자	성명	김평일		직위	기획실장				
	연락처	직장전화	-		휴대전화	-			
		전자우편	-		국가연구자번호	-			
연구개발기간	전체	2019. 09. 25 - 2021. 09. 24(2년 개월)							
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2019. 09. 25 - 2021. 09. 24(2년 개월)						
		n단계	-						
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발비 외 지원금
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계	150,000					150,000		300,000	
1단계	1년차	75,000				75,000		150,000	
	2년차	75,000				75,000		150,000	
n단계	1년차								
	n년차								
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자		직위	휴대전화	전자우편	비고		
		역할		기관유형					
	공동연구개발기관	전남대학교 산학협력단		이철원	부교수	-	-	공동	대학
	위탁연구개발기관								
연구개발기관 외 기관									
연구개발담당자 실무담당자	성명	서선일		직위	연구원				
	연락처	직장전화	-		휴대전화	-			
		전자우편	-		국가연구자번호	-			

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

2022년 01월 22일

연구책임자: 김 평 일



주관연구개발기관의 장: (재)농축산용미생물산업육성지원센터장 (직인)

공동연구개발기관의 장: 전남대학교산학협력단장 (직인)



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		농축산물안전유통소비기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)		역매칭시범사업			연구개발과제번호		319110-02
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0908	50%	LB0304	30%	LA0801	20%
	농림식품 과학기술분류	RA0305	50%	RA0303	30%	CA0105	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		토마토 병해 예방방제용 미생물제제 대량생산 및 현장적용 기술 개발					
전체 연구개발기간		2019. 09. 25 - 2021. 09. 24(2년 0개월)					
총 연구개발비		총 300,000 천원 (정부지원연구개발비: 150,000 천원, 기관부담연구개발비 : 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금(농협역매칭): 150,000 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		<ul style="list-style-type: none"> ○ 토마토 병해(꽃마름병, 잿빛곰팡이병) 제어용 유용미생물 발굴·효능 검증 및 특성분석 ○ 대량배양·제형화 공정 개발 및 시제품의 효능 검증·안전성 분석 ○ 현장적용 사용 매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅 			
		전체 내용		<p>① 유용미생물 발굴 및 효능 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> - 토양, 식물 근권 등 자연계로부터 분리한 600점 이상의 기 확보된 미생물(<i>Bacillus</i>, <i>Paenibacillus</i>, <i>Pseudomonas</i> 등)의 토마토 병해(꽃마름병, 잿빛곰팡이병)에 대한 길항 능력 조사 - 길항 능력이 우수한 미생물들의 배양 상등액(대사산물)의 항균활성 확인 후 최종적으로 10종 이상(항세균 활성 5종 이상, 항진균 활성 5종 이상, 복합기능 2종 이상)의 유용미생물 선발 <p>② 유용미생물의 생물학적 특성 분석, 대량배양 공정·제형화 기술 개발 및 안전성 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - MTT assay, 용혈반응을 이용한 세포독성 평가로 선발된 유용미생물의 안전성 분석 - pH, NaCl, 온도 등 다양한 배양조건에서 유용미생물의 생육 특성분석 - HPLC, LC-MS 등 분석장비를 활용한 미생물 유래 활성 대사산물의 정성 분석 - 핵자기공명(NMR)과 LC-MS/MS를 이용한 기능성 대사산물의 분자구조 결정 - 인공 리포솜(liposome), 박테리아 세포막을 활용하여 활성 대사산물의 작용기작 구명 - 바이오 리액터와 반응표면분석법을 활용한 대량배양용 저비용·고효율의 최적 배지 개발(최적 탄소원·질소원·무기염류 성분 및 조성 확립) - 5~100L 발효기를 이용한 대량배양 최적 조건 정립, 2~10톤 규모 대용량 발효기의 대량배양 scale-up 및 배양 매뉴얼 확립 			

		<ul style="list-style-type: none"> - 재배 방식(토경, 양액) 및 처리 방법(관주, 엽면시비)에 적합한 제형(액상, 분상 수화제, 펠릿 등) 공정 및 최적의 배합조건을 갖춘 복합 제제(세균병 제어 미생물 + 곰팡이병 제어 미생물) 개발 <p>③ 시제품의 효능 검증 및 안전성 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시제품(단일·복합 미생물제제)의 실험실 조건에서 길항작용(항세균, 항진균 활성) 조사, pot assay를 통한 작물에 대한 병해 제어 기능 평가 및 현장적용 가능성 검증 - 현장적용 가능성이 검증된 시제품을 대상으로 지정 농가의 재배 방식, 처리 방법에 따라 농가 현장 활용 - 시제품의 작물에 대한 약해 검증 및 생태독성(어류, 물벼룩 등) 평가 및 안전성 분석기술정립 <p>④ 사용 매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅</p> <ul style="list-style-type: none"> - 수요자(농가)가 미생물제제를 쉽게 사용할 수 있도록 간편하고 체계적인 지침서를 제작·보급 - 미생물제제 보관 방법, 사용 방법, 처리 시기, 횟수, 주의사항 등이 기록된 사용 지침서 제작·보급 - 사용 지침서에는 기존 재배 환경에 미생물제제를 처리했을 경우 미생물제제의 잔류기간 및 점유율 등을 명시하여 기존 재배 환경에 미치는 영향을 기재하고 다음 살포시기를 예측할 수 있는 방법으로 사용
	1단계 (해당 시 작성)	<p>목표</p> <p>내용</p>
	n단계 (해당 시 작성)	<p>목표</p> <p>내용</p>

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 친환경, 고부가가치/선도형 농가를 위한 주요 토마토 병원균 방제 비용 및 부대비용 절감을 위한 방제 기술 보급 ○ 토마토 병원균(풋마름병, 잿빛곰팡이병) 방제 종합관리 매뉴얼 개발에 의한 농업 현장 애로사항 해결 ○ 친환경 미생물제제의 사용으로 포괄적이며 지속 가능한 농업으로 발전하기 위한 원천기술 확보 ○ 기능성 미생물제제의 방제 및 활성 기작 구명을 통한 효과적인 병원균 방제 방법 개발 ○ 대량배양 및 제형화 기술 개발을 통한 유용미생물제제의 실용화 시스템 개발 												
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 토마토 병해 제어용 유용미생물 자원 발굴·효능 검증 및 특성 분석(논문) ○ 미생물 유래 활성 대사산물 정성분석, 분자구조 및 작용기작 구명(특허, 논문) ○ 유용미생물의 대량배양 공정 및 제형화 기술 개발(특허, 논문) ○ 유용미생물제제의 기능성 미생물 농자재 산업화 공정 개발 및 현장적용(기술 실시) 												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화학물	신품종		
		2						생명 정보	생물 자원		정보	실물	
		2							2				
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호				
국문핵심어 (5개 이내)	미생물제제		대량생산		풋마름병균		잿빛곰팡이병균		현장적용기술				
영문핵심어 (5개 이내)	Microbial agent		Mass production		<i>Ralstonia solanaceum</i>		<i>Botrytis cinerea</i>		Practical technique				

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	6
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	12
4. 목표 미달 시 원인분석	50
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	51
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	51
7. 참고 문헌	52

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발의 개요

본 연구는 토마토 병해(풋마름병, 잿빛곰팡이병) 방제용 유용미생물 발굴, 효능 검증, 대량배양과 제형화 공정 정립 및 현장적용을 위한 사용 매뉴얼을 개발하고자 하는 것이다.

가. 풋마름병

풋마름병원균(*Ralstonia solanacearum*)은 그람음성의 간상세균이며 호기성이다. 풋마름병원균은 세균성 병해로서 지면의 온도가 25℃ 이상일 때 많이 발생하고, 병원균은 토양 속에서 약 4~5년간 생존하며 지중 30 cm 이내의 깊이까지 생존한다. 상처가 생긴 뿌리로 침입한 병원균은 도관을 통해 전신으로 확산되어 증식하고 목질부를 손상시켜 식물을 고사시킨다. 그리고 한번 풋마름병이 발병한 포장에서는 연작피해가 매우 심한 것으로 알려져 있다.



<그림 1. 토마토, 고추, 감자에 발병한 풋마름병>

나. 잿빛곰팡이병

잿빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*)은 진균계의 불완전균에 속하며, 분생자경, 분생포자, 균핵을 형성하며, 20℃ 전후의 저온과 다습한 조건에서 많이 발생한다. 병원균은 균핵이나 분생포자의 형태로 토양, 병든 식물체에 월동하여 1차 전염원이 되기도 하며, 기주작물의 병반에 형성된 분생포자가 비산하여 2차 전염을 일으킨다. 특히 잎, 엽병, 줄기 등에도 발병하나 주로 과실에 발병하며, 대표적으로 겨울철 저온 다습한 조건에서 재배되는 토마토가 병에 매우 취약한 것으로 알려져 있다.



<그림 2. 토마토, 고추, 딸기에 발병한 잿빛곰팡이병>

1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

풋마름병원균은 국내에서 경제적으로 매우 중요한 가지과 작물인 토마토, 감자, 고추 등의 작물에 주로 발생하는 토양 전염성 병원균이며, 재배 지역 및 작형에 무관하게 발생하고 기후변화로 겨울과 이른 봄 기온이 상승하여 계절에 무관하게 발생한다. 병해 예방을 위해 국내에서는 저항성 대목을 이용한 접목묘를 정식하여 재배하고 있으나, 재배 년수가 길어짐에 따라 병원균 밀도가 증가하여 병 발생이 증가하고 있으며 그 전염속도가 매우 빠르다. 또한, 균주 간 상동성이 매우 낮고 복잡해 토양살균이나 살균제 혹은 마이신계통의 농약을 주기적으로 관주하여도 방제에 어려움이 있다. 더 나아가 화학 농약을 지속적으로 사용하다보면 약제저항성이 발생할 수 있어 병원균 자체를 방제하는 방법이 요구되지만 현재까지 연구가 미흡한 실정이다. 잿빛곰팡이병원균은 매우 넓은 기주범위를 갖고, 토양에 있는 다른 유기물에서 부생적으로 생존 할 수 있으며, 대기전염성으로 작물에 도달한 포자가 발아하여 강우, 이슬, 안개 혹은 관개로부터 자유수가 식물표면에 존재할 때 감염된다. 국내에는 저항성 품종이 없으며 저온 다습한 온실에서 재배하는 작물에 발병되기 쉽고, 약제저항성이 쉽게 유발되기 때문에 단일 약제로는 방제가 어렵다. 현재 국내에 등록된 약제는 매우 제한적이며, 병원균 자체를 방제하는 효과적 방법 연구가 미흡한 실정이다.

토마토잿빛곰팡이병 방제 등록약제 (농촌진흥청)

적용약제	사용적기	안전사용기준	
		시기	횟수
보스칼리드수화제	발병초 7일 간격	수확 3일전까지	3회이내
폴리옥신비수화제	발병초 7일 간격	수확 3일전까지	3회이내
펜헥사미드	발병초 7일 간격, 중엽처리	수확 3일전까지	3회이내
테부코나졸수화제	발병초 7일 간격	수확 7일전까지	3회이내

○ 시장현황

최근 주요 글로벌 농화학 기업들의 대표 작물보호제 제품에 독성, 저항성문제가 있다는 지적이 잇따르고 있어, 대안으로 미생물제제와 같은 바이오 작물보호제가 대두되고 있다. 이러한 추세로 국내 미생물 시장 규모는 '18년 기준 약 7,700억 원에 달하며, 그 중 농업용 미생물제제(미생물 농약, 미생물비료) 시장 규모는 약 650억 원으로 8.4%를 차지하며, 국내에 등록된 농업용 미생물제제는 '14년을 기준으로 유기농자재 공시 등록 제품 1,290종과 비료용 300여 종이 등록, 시판 중이다. 바이오 작물보호제는 상대적으로 시장 예측 리스크가 적고 기간에 따른 기회 손실이 적어 투자 가치가 있고, 친환경농산물에 대한 소비 요구 증가로 시장이 점차 확대될 전망이지만 꾸준한 수요 증가에도 불구하고 기존 화학농약에 비해 포트폴리오가 크게 미흡한 실정이다.

○ 경쟁기관현황

국내 작물보호제 기업 수는 약 43개이며, 대표적인 기업으로는 팜한농(주), (주)농협케미컬, (주)경농, (주)동방아그로, 한국삼공(주) 등이 있다. 글로벌 작물보호제 기업들의 평균 영업이익률이 21% 인데 반해 국내 기업들은 과도한 원재 구입 비용에 의한 제조 원가 상승으로 5~6%의 낮은 영업이익률을 보이고 있으며, 연구개발비용 역시 매출액의 평균 2.3%로 글로벌 기업들의 평균 7.1%에 미치지 못한다. 한국화학연구원과 팜한농(주), (주)LG생명과학, (주)경농, (주)목우연구소 등의 기업이 자체투자 및 산업부의 산업핵심기술개발사업 등을 통해 신물질 개발 및 글로벌 사업화를 꾸준히 시도하고 있으나, 원천기술 개발을 위해 정부 차원에서 전주기적인 R&D 지원이 요구되며 작물보호제 소재 연구 기관 또한 부족한 실정이므로 종합적이고 체계적인 지원전략 수립이 필요하다.

화합물(상품명)	용도	개발자	현재상태
Pyribenzoxim(피안커)	제초제	(주)LG생명과학	글로벌 수출중
Ethaboxam(가디언)	살균제	(주)LG생명과학	일본 기술수출
Flucetosulfuron(플렉소)	제초제	(주)LG생명과학	일본 출시
Bistrifluron(하나로)	살충제	팜한농(주)	글로벌 출시
Metamfop(피제로)	제초제	팜한농(주)	글로벌 출시
Methiozoline(포아박사)	제초제	(주)목우연구소	국내 출시 및 글로벌 등록 진행
Tiafenacil(테라도)	제초제	팜한농(주)	독성 Phase II 진행
Stylostrobin	살균제	(주)경농	독성 Phase II 진행

○ 지식재산권현황

최근 5년간 작물보호제 관련 특허는 약 516건으로, 이 전 5년에 비해 약 3배가량 증가하였다. 그중에서, 풋마름병에 관련한 특허는 약 14건, 잣빛곰팡이병 관련한 특허의 경우 약 27건이며, 이 중 *Bacillus* 속 균주를 사용한 내용이 대부분을 차지한다. 작물보호제 관련 특허가 증가한 것에 비해 풋마름병 관련 특허는 매우 저조한 상황이며, 특허 내용 또한 후보 균주 선발과 미생물 배양액 효능 검증 분야에 치중되고 있다. 모든 포장 내에서도 방제 효과를 보이는 최적 제제화나, 효능 물질 및 대사산물의 대량배양 기법을 확립 하여 실제 현장적용을 위한 사용 매뉴얼 관련 특허가 미흡한 실정이다.

○ 표준화현황

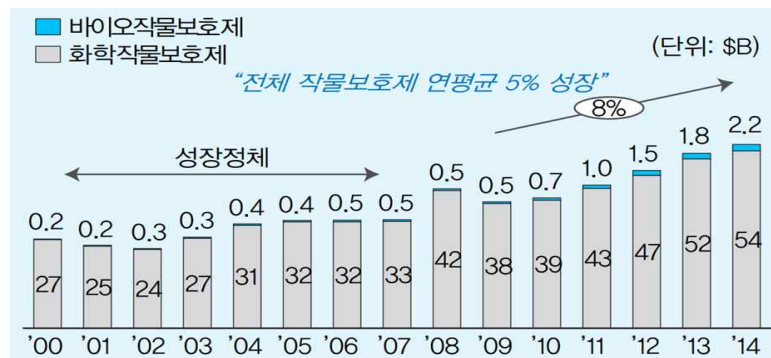
2001년도에 정부 차원의 육성정책이 도입되어 친환경농업 제1차 5개년 계획을 수립하고 저농약, 무농약, 전환기 유기농산물, 유기농산물 등 4종류의 친환경농산물 인증제가 시행되었다. 2004년도에 농업농촌 종합대책과 제2차 친환경농업육성 5개년 계획을 수립하여 토양관리, 친환경 농자재, 생산기반구축, 기술개발, 소비촉진, 유통구조개선, 인증제도 증장기 제도개선 방향 등 종합육성방안을 마련하였고, 2007년도에는 정부가 ‘친환경유기농자재 목록 공시제’를 시행하였다. 유기농자재는 유기농수산물을 생산, 제조, 가공 또는 취급하는 과정에서 사용할 수 있는 허용물질을 원료 또는 재료로 하여 만든 제품(농약, 비료, 가축사료 첨가제 등)이다. 이에 따른 농촌진흥청에서는 유기농자재가 허용물질을 사용하여 생산된 자재인지를 확인하여 그 자재의 명칭, 주성분명, 함량 및 사용방법 등에 관한 정보를 공시하고 있다. 유기농자재의 공시는 유기농산물의 생산을 위해 사용 가능 여부를 검토하기 위한 제도이며, 유기농자재의 공시 대상은 토양개량용 또는 작물생육용 유기농자재와 병해충 관리용 유기농자재로 나뉜다(농림축산식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙 제46조). 유기농자재 공시를 위해서는 ①현장기준, ②원료의 특성 등에 관한 자료, ③이화학(미생물 검정) 검사적성서, ④식물에 대한 시험성적서, ⑤독성에 대한 시험성적서, ⑥제조공정, 품질 관리 등에 대한 자료, ⑦포장지 표시사항에 관한 자료 등 7가지 인증기준을 준수해야 한다(친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 제37조 제3항, 농식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙 제47조 제1항 및 별표 13 제1호). 이 밖에 유기농자재를 생산하는데 사용 가능한 허용물질의 종류와 기준은 ‘농식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙’ 별표 1 제3호에 따른다(농식품부 소관 친환경농어업 육성 및 유기식품 등의 관리·지원에 관한 법률 시행규칙 제3조 제1항).

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

글로벌 시장의 작물보호제는 16개의 계열로 분류되어 있으며, Strobilurin 계열 21.2%, SBI(Sterol biosynthesis inhibitors)-Triazole 계열 22.4%, SBI-azole 계열 7.9%, SDHI(Succinate dehydrogenase inhibitors) 계열이 6.7%를 차지한다. 그러나 동일 계열의 작물보호제를 장기간 중복 사용하여, 기존 약제에 대해 저항성을 갖는 세균병이 점차 증가하는 문제를 해결하기 위해서는 작용 기전(mechanism of action)이 다른 약제를 번갈아 사용해야 하며, 다른 작용기전을 갖는 신규 약제 개발이 필요하다. 글로벌 시장은 신규 약제 소재 기원의 다양화를 위해 화학합성과 더불어 미생물 혹은 천연물 및 그 유도체로 범위를 확대하고 있으며, 신규 작용점 스크리닝 기술개발에 힘쓰고 있다.

○ 시장현황

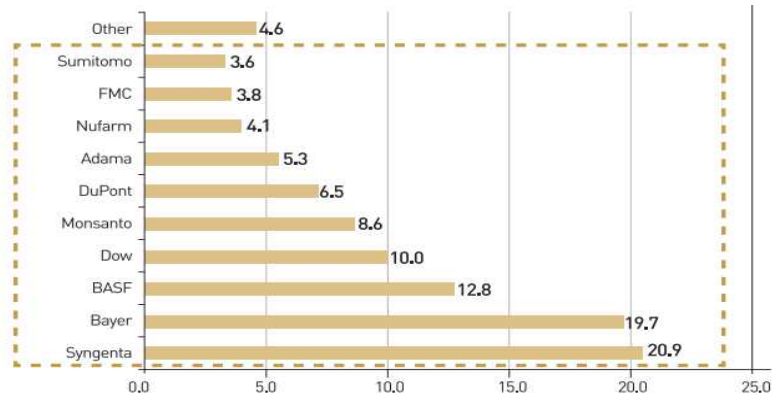


<그림 3. 작물보호제 시장규모 (자료: Syngenta Estimates, Dunham Trimmer, 2015)>

세계의 인구증가, 기후변화, 바이오 에너지 수요증가, 신흥 경제국 소득 증가에 따른 축산물 수요 증가 등의 요인으로 작물보호제 수요가 꾸준히 증가하고 있다. 기존 화학작물보호제가 소비되는 음식물 뿐만 아니라 생태계에도 잔류할 것이라는 우려가 커지면서 EU를 비롯한 선진국을 중심으로 관련 규제가 강화되고 있으며, 생물학적 방제를 활용한 종합적 방제(Integrated pest management)에 대한 관심이 급증하고 있다. 바이오작물보호제는 미생물 또는 자연 유래 추출물을 기반으로 한 살균제, 살충제, 제초제 등을 말하며, 일반적으로 독성 및 환경 잔류성이 낮고 사용자에게 안전하다는 장점이 있어 전체 작물보호제 시장에서 빠른 속도의 성장률을 보이고 있다. 지난 10년간 전체 작물 보호제 시장은 5~6%의 성장률을 보였으나, 바이오작물보호제 시장은 17% 이상의 성장률을 보이며 (LG경제연구원 보고서, 2018), 이는 고품질 작물 생산을 위한 수요증가, 브라질 등의 남미시장 확대, 작물의 재배면적 증가로 인해 더욱 확대될 전망이다.

○ 경쟁기관현황

글로벌 작물보호제 시장을 주도하는 기업들은 화학, 바이오 기업들이 대부분이며, 상위 10개 기업의 매출액이 전체 시장 규모의 95.4%를 차지한다(그림 4). 세계 상위 6개 작물보호제 기업의 농업부분 R&D 투자액은 302억 달러로 전년 대비 9.3% 증가한 수치이며, 미생물, 천연물 및 케미컬뱅크로부터 선도물질 선발 및 이를 이용한 글로벌 작물보호제 개발연구를 지속적으로 수행하면서 친환경 신물질 파이프라인 구축을 강화하고 있다.



<그림 4. 작물보호제 글로벌 상위 10개 기업의 시장점유율(%)>

글로벌 선도기업의 농업부문 R&D 투자액 및 비중 (단위: 억 달러)

Company	Syngenta	Bayer	BASF	Dow	Monsanto	DuPont
매출액(2014)	118	111	72.3	56.9	49	36.9
R&D	8.8	7.6	6.8	3.5	0.55	3
R&D투자 비중	7.4%	6.8%	9.4%	6.2%	1.1%	8.1%
총 매출액('05~'14)	1,170	950	540	510	1,130	800
R&D투자('05~'14)	110	97	70	48	118	83
매출액/R&D투자비율	10.7	9.8	7.7	10.5	9.6	9.6

○ 지식재산권현황

최근 5년간 작물보호제 관련 특허는 약 15,962건으로, 이 전 5년에 비해 약 6.8배가량 증가하였으며, 미국이 1,360건으로 가장 많은 특허를 보유, 중국 1,530건, 유럽 901건 보유하고 있다. 풋마름병에 관련한 특허는 약 17건, 잣빛곰팡이병 관련한 특허의 경우 약 9건으로 작물보호제 관련 특허 증가율에 비해 풋마름병과 잣빛곰팡이병 관련 특허가 저조한 상황이며, 이 또한 후보 균주 선발과 미생물 배양액 효능 검증 분야에 치중된다. 따라서 모든 포장 내에서도 방제 효과를 보이는 최적 제제화나 효능 물질 및 대사산물의 대량배양 기법을 확립하여 실제 현장적용을 위한 사용 매뉴얼은 미흡한 실정이다.

○ 표준화현황

OECD 주요국가의 유기농 인증기준은 CODEX(국제식품규격위원회), IFOAM(국제 유기농 운동연맹) 원칙을 준용하여 자국 법령을 제정 운용하고 있다. CODEX는 유기농식품 관련 사항을 '유기적으로 생산된 식품의 생산, 가공, 표시 및 유통에 관한 가이드라인'에서 종합적으로 다루고 있으며, IFOAM은 유기농식품 관련 사항을 기본규정(Basic Standards for Organic Production and Processing)과 인증기관인 IFOAM의 인정기준 두 규범에 의해 관리하고 있다. 미국은 연방유기농식품생산법의 하위 규정인 국가유기농식품프로그램(NOP)을 통해 유기농식품의 생산 및 품질규격 기준을 제시하고 있으며, 일본은 유기 JAS(Japan Agriculture Standard)법에 의해 유기인증제도를 운영하고 있다. 호주는 '유기 및 바이오 다이내믹 제품에 대한 국가 규정'을 기준으로 하고 있으며, 유럽연합(EU)은 유기농식품 관련 사항을 EEC No. 2092/91에 의해, 인증기관의 인정과 관련해서는 EN45011(ISO 65)에 의해 관리하고 있다. 영국은 UKROFS 등 11개 민간인증기관이 있고, 독일의 경우 BSC 등 22개 민간 인증기관이 있다. 따라서 OECD 주요 국가는 자원의 효율적 이용과 환경오염을 최소화하는 녹색기술 육성에 국력을 집중하고 있다.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용

<주관기관 : (재)농축산용미생물산업육성지원센터>

① 유용미생물 발굴 및 효능 검증

자연계로부터 분리·확보한 600점 이상 미생물을 활용하여 토마토 병원성 곰팡이인 잣빛곰팡이병 (*Botrytis cinerea*)과 병원성 세균인 풋마름병(*Ralstonia solanacearum*)에 대한 길항 능력을 조사하였다. 잣빛곰팡이병에 대한 항진균 활성 검정은 잣빛곰팡이가 접종된 Potato dextrose agar (Potato 4.0g, Dextrose 20.0g, Agar 15.0g/L)에 균체 도말 후, 25°C에서 5~6일 동안 배양하여 균사체의 성장 억제 정도를 관찰하였다. 풋마름병에 대한 항균 활성 검정은 Agar diffusion method를 이용하여 풋마름병에 대한 길항 능력을 갖는 미생물을 분리하였다.

② 대량배양용 배지 및 발효조건 최적화

잣빛곰팡이병 방제용 유용미생물인 *Bacillus velezensis* GH1-13 균주의 대량생산을 위한 최적 배지 개발을 목적으로 탄소원과 질소원 선발을 수행하였다. *Bacillus velezensis* GH1-13 균주의 탄소원을 선발하기 위해 질소원으로 yeast extract 0.8%가 첨가된 기본배지(NaCl 0.15%, K₂HPO₄ 0.25%, Na₂CO₃ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, pH 7.5)에 각각 0.5% 농도의 Glucose, Fructose, Sucrose, Maltose, Corn starch를 첨가하여 37°C, 150RPM에서 48시간 진탕배양한 후 생균수와 내세포자 균수를 측정하였다. 최적 질소원 선발은 탄소원으로 0.5% Glucose가 포함된 위의 기본배지에 각각 0.8% Yeast extract, Peptone, Tryptone, Soytone, Soy bean flour를 대상으로 37°C, 150RPM, 48시간 동안 배양 후 전체 생균수와 내세포자 균를 측정하였다. 생균수와 내세포자(60°C, 1시간 열처리 후) 균수는 연속 희석법으로 TSA 고체배지에 도말하여 48시간 배양 후 colony 계수를 측정하였다. 최적배지 개발을 위한 대조군으로 TSB(Tryptone 1.7%, Soytone 0.3%, Glucose 0.25%, NaCl 0.5%, K₂HPO₄ 0.25%)를 사용하였다. 최적배지 개발은 생균수와 내세포자 형성 및 균체의 활성도를 목표로 수행하였다. 생균수와 내세포자 형성도 비교는 5 L jar fermenter와 100L 발효기를 기초로 하여 진행하였으며, 최적 배양 조건을 확립하기 위해 배양온도, 통기량, 교반속도, pH 등을 설정하였다.

또한, 잣빛곰팡이병과 풋마름병을 동시에 방제하는 유용미생물인 *Bacillus velezensis* JC-6, *Bacillus siamensis* JC-18 균주의 탄소원을 선발하기 위해 위와 같은 방법으로 기본배지(NaCl 0.15%, K₂HPO₄ 0.25%, Na₂CO₃ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, pH 7.5)에 탄소원(Glucose, Fructose, Sucrose, Maltose, Corn starch), 질소원(Yeast extract, Peptone, Tryptone, Soytone, Soy bean flour)를 적용하여 37°C, 150RPM, 48시간 동안 배양 후 전체 생균수와 내세포자 균수를 측정하였다. *Bacillus velezensis* GH1-13 균주와 같이 5 L jar fermenter와 100L 발효기를 기초로 하여 생균수, 내세포자 형성도 비교를 진행하였으며, 최적 배양 조건을 확립하기 위해 배양온도, 통기량, 교반속도, pH 등을 설정하였다.

③ 유용미생물 대량배양 scale-up, 제형화 및 시제품 제작

유용미생물의 대량배양을 위해 주관기관에서 보유한 1.5톤, 10톤 규모 대용량 발효기를 활용하여 대량배양 scale-up과 배양 매뉴얼을 정립하였다. 5 L jar fermenter와 100L 발효기를 기초로 확립한 대량생산용 최적배지와 상업용 배지인 TSB를 사용하여 1.5톤, 10톤 대용량 발효기 조건에서 30시간 이상 배양하면서 pH 변화, 총 생균수, 내세포자 균수, 용존산소량을 측정하여 대량생산 scale-up 공정을 진행하였다. 생균수와 내세포자(60°C, 1시간 열처리 후) 균수는 위와 같이 연속 희석법으로 TSA 고체배지에 도말하여 48시간 배양 후 colony 계수를 측정하였다.

④ 토마토 잿빛곰팡이병에 대한 약효·약해시험

Bacillus velezensis GH1-13 시제품의 토마토 잿빛곰팡이병에 대한 약효·약해를 조사하여 제품 효능을 검정하고자 (주)현농에 시험 분석을 의뢰하였다. 시험 방법으로는 농촌진흥청 고시 “농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법”에 준하였으며, 시험작물 품종은 방울토마토로 선택하였다. 시험약제로는 *Bacillus velezensis* GH1-13 시제품과 대조구인 농약 텔도, 그리고 무처리 포함하여 총 3가지 조건으로 하였으며, 기준량(250배 희석)과 배량(125배 희석)으로 엽면살포 1회 수행하여 시험하였다. 또한, *Bacillus velezensis* JC-6 시제품의 토마토 잿빛곰팡이병에 대한 약효를 조사하여 제품 효능을 검정하고자 시험 분석을 의뢰하였다. 시험작물로는 방울토마토의 TY노나리 품종을 사용하였으며, 시험약제로는 *Bacillus velezensis* JC-6 시제품과 무처리 조건으로 기준량(250배 희석)을 엽면살포 1회 수행하여 시험하였다.

⑤ 농가 현장적용 및 시설하우스 토마토 수량 조사

토마토 잿빛곰팡이 방제용 *Bacillus velezensis* GH1-13 시제품과 잿빛곰팡이 및 풋마름병 동시 방제용 *Bacillus velezensis* JC-6 시제품을 C지역 소재 토마토 농가 2곳(A농가 시설하우스 3동, B농가 시설하우스 2동)에 현장적용을 실시하였다. 대조구로는 C지역 농업기술센터에서 보급하는 *Bacillus subtilis* 시제품과 무처리구를 대조구로 사용하였다. 방울토마토 식재 후 각 시제품 원액을 200배 희석하여 1~2회/주 관주처리 하였으며, 2~3주 간격으로 토마토 과실, 잎 및 줄기 상태를 확인 하였다.

⑥ 사용 매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅

수요자(농가)가 토마토 잿빛곰팡이병과 풋마름병 방제를 위하여 미생물제제를 쉽게 사용할 수 있도록 간편하고 체계적인 지침서를 제작·보급하였다. 사용매뉴얼 내용으로는 토마토 병해 방제용 미생물제제의 보관 방법과 사용 방법(희석배수, 횟수 등), 그리고 처리 시기 등의 사용 지침을 전달하였다.

<협동기관 : 전남대학교>

1) 잿빛곰팡이병 제어용

① 유용미생물 발굴 및 효능 검증

국내의 토양 등 다양한 시료로부터 미생물을 분리하여 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)에 대한 균체의 항진균 활성을 조사하였다. 항 진균 활성 검정은 잿빛곰팡이가 접종된 potato dextrose agar (Potato 4.0g, Dextrose 20.0g, Agar 15.0g/L)에 접종원의 중심에서 2.5 cm 떨어진 곳에 약 2cm 균체 도말 후, 25°C에서 6일 동안 배양하여 균사체의 성장 억제 정도를 관찰하였다.

② 유용미생물의 동정 및 배양

선별된 JC-18 균주는 순수하게 분리하여 27F 및 1492R의 유니버설 프라이머 세트 (Universal primer set)를 사용하여 16S rRNA 염기서열을 분석하였다. 그 후, 16S rRNA 서열분석을 기초로 블라스트 프로그램 (Blast program)을 수행하여 JC-18 균주의 분자계통학적 위치를 확인하다.

Bacillus siamensis JC-18 균주는 완전배지인 Tryptic Soy (Soybean-Casein Digest Medium) (Tryptone 17.0g, Soytone 3.0g, Glucose 2.5g, Sodium chloride 5.0g, Dipotassium phosphate 2.5g/L)에서 30°C, 180RPM, 24시간 동안 종균배양 하였다. 본 배양은 동일 배지에 1% 접종하여 30°C에서 120RPM으로 48시간 배양하였다.

③ 유용미생물 배양상등액의 안전성 분석

확립된 배양조건으로 *Bacillus siamensis* JC-18 균주를 배양하여 적혈구 용혈반응 (Hemolysis) 평가를 통해 배양상등액의 안전성을 분석하였다. 용혈현상을 측정하기 위해 채취된 sheep blood를 PBS buffer로 3회 이상 세척하고, 2,000RPM에서 5분간 원심분리하여 혈장을 제거하였다. 채취된 적혈구는 micro-broth method를 이용하여 96-well plate에 시행하였고, 처리된 샘플은 37°C에서 60RPM으로 1시간동안 충분히 현탁시켰다. 배양상등액은 균체를 제거 후 10%부터 serial dilution 하였고, 양성지표물질로는 Triton X-100을 음성지표물질로는 PBS를 사용하였다. 550nm에서 흡광을 측정하였으며, 2반복하여 평균값을 구하였다.

④ 유용미생물의 특성 분석

Bacillus siamensis JC-18 균주의 항진균 활성 물질을 동정하기 위해 균체를 제거한 배양상등액 200 μ L에 1% 트리플루오로아세트산 (Trifluoroacetic acid, TFA)을 포함하고 있는 100% 아세토니트릴 (acetonitrile, ACN)을 동량 가해 pH 2.0으로 조절하였다. 이 중, 200 μ L를 취해 Spin-X centrifuge tube filter (Costar, 0.22 μ m pore CA membrane) 한 후 LC-MS 분석용 시료로 사용하였다.

⑤ 기능성 이차대사산물의 분리·정제

젯빛곰팡이병 제어용 후보 균주의 배양상등액에 존재하는 기능성 이차 대사산물을 수득하기 위해 유기용매를 이용한 추출, column chromatography를 이용한 분리·정제를 수행하였다. 먼저, 배양이 완료된 *Bacillus siamensis* JC-18 균주를 4,000RPM에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거한 배양상등액을 얻었고, 에틸아세테이트 (Ethyl acetate), 클로로포름 (Chloroform)을 각각 1:1(v/v) 비율로 첨가하여 추출을 수행하였다. 추출물은 감압 농축하여 100% 메탄올 (Methanol)에 용해 시킨 후 분석용 시료로 사용하였다. 다음으로, 사이클릭 리포펩타이드 소수성 (Hydrophobicity)을 이용한 산 침전을 위해 얻어진 배양상등액에 최종 TFA를 1% 첨가한 후 1시간 이상 4°C에서 충분히 교반하여 원심분리를 통한 침전물을 획득하였다. 추가적으로, 산 침전 후 원심분리하여 얻은 상등액을 에틸아세테이트와 클로로포름으로 추출하여 분석하였다. 마지막으로, C₁₈이 packing 된 Sep-Pak SPE cartridge (Waters, 820mg Sorbent per cartridge, 55-105 μ m)에 얻어진 배양상등액 500 mL를 loading 한 후 0%, 5%, 40%, 100% 아세토니트릴 농도구배를 주어 각각 20 mL 씩 용리하였다. 용리액은 -80°C에 보관 후 동결 건조하였고, 모든 샘플은 LC-MS를 이용하여 분석하였다. *Bacillus velezensis* GH1-13 및 *Bacillus velezensis* JC-6 균주는 Sep-Pak SPE cartridge를 이용한 분리·정제를 수행하였고, 위와 동일한 방법으로 수행되 용리액은 다음과 같았다. (*Bacillus velezensis* JC-6 : 0%, 5%, 40%, 100% 아세토니트릴 / *Bacillus velezensis* GH1-13 : 0%, 30%, 60%, 90% 아세토니트릴)

⑥ 기능성 이차대사산물의 in vitro 효능 검증

Agar diffusion method와 최저저해농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 평가를 이용해 분리·정제된 기능성 이차 대사산물의 젯빛곰팡이병원균 제어 능력을 검증하였다. *Bacillus siamensis* JC-18 균주의 경우, 이투린, 펜기신, 서펙틴을 모두 포함하고 있는 산 침전물 분획의 항진균 활성 평가를 먼저 진행하였다. 서펙틴은 순수한 물에 용해되지 않기 때문에 100% 메탄올에 용해하여 agar diffusion method를 이용하여 평가하였다. 용해 시킨 분획을 paper disc (ADVANTEC, Japan, 8mm)에 100 μ L 적하하고 완전 건조 시킨 후 젯빛곰팡이 (*B. cinerea* KACC40574)가 접종된 PDA 배지에 접종원의 중심에서 2.5 cm 떨어진 곳에 올려놓고 25°C에서 10일간 배양하여 방제 효과를 측정하였다. 다음으로, SPE cartridge를 이용하여 획득한 40% 아세토니트릴 분획의 항진균 활성 평가를 진행하였고, 이투린을 다량 포함하고 있는 이 분획은

물에 쉽게 용해되기 때문에 100% 물에 용해 시킨 후 시험에 사용하였다. Micro-broth method를 이용해 96-well microtiter plate에 진균의 성장을 저해하는 최저저해농도를 평가하였고, 샘플 처리농도는 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 계단희석 (Serial dilution)하여 사용하였으며, 25°C에서 3일간 배양 후에 성장을 저해하는 최소농도를 설정하였다. 마지막으로, 순수하게 분리·정제된 기능성 이차 대사산물의 항진균 활성은 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 계단희석하여 사용하였고, 25°C에서 3일간 배양 후 성장을 저해하는 최소농도를 설정하였다. *Bacillus velezensis* JC-6 균주의 경우, 위와 동일한 agar diffusion method로 40% 아세토니트릴과 100% 아세토니트릴 분획의 활성을 평가하였다.

⑦ 기능성 이차대사산물의 분자 구조 분석

잣빛곰팡이병 제어용 기능성 이차 대사산물의 분자 구조를 분석하기 위해 2D Nuclear magnetic resonance (NMR) 스펙트럼을 이용하였다. 분석 이차 대사산물은 방제 대상인 잣빛곰팡이에 대해 강한 항진균 활성을 나타낸 iturin C15이며, 순수하게 분리·정제된 iturin C15 1.9 mg을 DMSO- d_6 600 μl 에 용해 (약 3 mM)하였다. VARIAN 600 MHz 장비를 이용하여 298 K에서 측정하였으며, Double Quantum Filter-correlation spectroscopy (DQF-COSY), Rotating frame Overhause Effect Spectroscopy (ROESY), Total Correlation Spectroscopy (TOCSY), Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC), Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) 총 5개의 스펙트럼 얻었다.

⑧ 기능성 이차대사산물의 작용기작 구명

구조 분석이 완료된 iturin A C15의 항진균 활성 작용기작 구명을 위해 살아있는 세포 세포막을 통과하지 못하는 DNA 결합 Propidium iodide (PI), SYTOX Green 형광 dye를 이용한 실험을 수행하였다. PDA 배지에 10일간 배양한 잣빛곰팡이병원균 (KACC40574)에 iturin A C15를 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 후 25°C에서 3일간 배양하였다. PI, SYTOX Green 형광 dye를 최종 1 μM 처리하여 암실에서 10분간 배양한 후, 현미경으로 관찰하였다.

⑨ 미생물제제(시제품)의 안전성 분석

물벼룩을 이용한 미생물제제(시제품)의 생태독성을 평가하고자 하였다. 기능성 이차 대사산물의 효능까지 평가를 완료한 바실러스 시아멘시스 JC-18 균주를 시제품으로 활용하기 위한 안전성 분석으로 물벼룩을 이용한 생태독성시험을 시도하고자 하였고, 이에 앞서 TS배지에 대한 생태독성 시험을 수행하였다. 12-well plate에 TSB 배지를 100%부터 6.25%까지 물벼룩 배양액 (KCl 8mg, MgSO₄ 120mg, NaHCO₃ 192mg/L)으로 계단희석한 후, 각 well 마다 5마리의 물벼룩을 첨가하였다. 상온에서 24시간 경과 후 물벼룩의 survival을 관찰하였다.

2) 풋마름병 제어용

① 유용미생물 발굴 및 효능 검증

Agar diffusion method를 이용하여 국내의 토양 등 다양한 시료로부터 풋마름병 (*Ralstonia solanacearum*)에 대한 길항 능력을 갖는 미생물을 분리하였다.

② 유용미생물의 동정 및 배양

선별된 균주는 순수하게 분리하여 27F 및 1492R의 유니버설 프라이머 세트 (Universal primer set)를 사용하여 16S rRNA 염기서열 분석을 수행하여 블라스트 프로그램 (Blast program)을 통해 선별 균주의 분자계통학적 위치를 확인하였다.

배지 성분, 배양온도, 배양시간 등의 배양조건 탐색을 통해 선별 균주의 최종 배양조건 확립을 시도

하였다. 우선 *Brevibacillus laterosponus* TSA31-5 균주를 완전배지인 Tryptic Soy (Soybean-Casein Digest Medium) (Tryptone 17.0g, Soytone 3.0g, Glucose 2.5g, Sodium chloride 5.0g, Dipotassium phosphate 2.5g/L)에서 37°C, 180RPM, 24시간 동안 종균배양 하였다. 이를 다시 동일 배지에 1% 접종하여 37°C에서 120RPM으로 48시간 계대배양 후 균체를 제거하고 배양상등액의 항균 활성을 확인하였다.

③ 유용미생물 배양상등액의 안전성 분석

확립된 배양조건으로 선별 균주 배양하여 sheep blood 적혈구를 이용한 용혈반응 (Hemolysis) 평가를 통해 배양상등액의 안전성을 분석하였다. 용혈현상을 측정하기 위해 채취된 sheep blood를 PBS buffer로 3회 이상 세척하고, 2,000RPM에서 5분간 원심분리하여 혈장을 제거하였다. 채취된 적혈구는 micro-broth method를 이용하여 96-well plate에 시행하였고, 처리된 샘플은 37°C에서 60RPM으로 1시간동안 충분히 현탁시켰다. 배양상등액은 배양이 완료된 *Brevibacillus laterosponus* TSA31-5를 4,000RPM에서 30분간 원심분리 후 균체를 제거하여 2.5%부터 serial dilution 하였고, 양성지표물질로는 Triton X-100을 음성지표물질로는 PBS를 사용하였다. 550nm에서 흡광을 측정하였으며, 2반복하여 평균값을 구하였다.

④ 유용미생물의 특성 분석

선별 균주의 이차대사산물 탐색을 위해 균체를 제거한 배양상등액에 1% 트리플루오로아세트산 (Trifluoroacetic acid, TFA)을 포함하고 있는 100% 아세토니트릴(acetonitrile, ACN)을 동량 가해 pH 2.0으로 조절하고 Spin-X centrifuge tube filter(Costar, 0.22 µm pore CA membrane) 한 후 LC-MS를 이용해 분석하였다. LC-MS의 분석조건은 하기 표에 나타내었으며, mass는 positive mode에서 측정하였다.

⑤ 기능성 이차대사산물의 분리·정제

선별 균주의 배양상등액에 존재하는 기능성 이차대사산물을 수득하기 위해 유기용매를 이용한 추출을 시도하였다. 배양 완료된 *Brevibacillus laterosponus* TSA31-5 균주를 4,000RPM에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거한 후, 배양상등액에 에틸아세테이트와 클로로포름을 각각 1:1 (v/v) 비율로 첨가하여 추출한 추출물을 감압 농축하여 100% 증류수와 메탄올에 각각 용해 시킨 후, 항균 효능을 평가하였다. 기존의 방제 대상이었던 식물병원성 박테리아인 풋마름병원균 (*R. solanacearum*)에 대한 활성을 평가해야 하나, 본 균주는 생화학무기금지법에 따라 특별 관리되는 미생물로 분양 및 취급이 어려웠다. 따라서, 그람음성균인 풋마름병원균 (*R. solanacearum*)을 대체하여 취급 가능한 대장균 (*Escherichia coli*)으로 효능을 평가하였고, 항균 활성의 선택성을 확인하기 위해 그람양성균인 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)에 대한 효능 또한 평가하였다. 상기에 기술한 에틸아세테이트와 클로로포름 추출물은 시험 균주에 대해 항균 활성이 없음을 확인하였다. 이어서, 고상추출법을 이용하여 기능성 이차대사산물의 추출을 시도하였다. C₁₈이 packing된 Sep-Pak SPE cartridge (Waters, 820 mg Sorbent per cartridge, 55-105 µm)에 배양상등액 500mL를 loading 한 후 0%, 30%, 60%, 100% 아세토니트릴까지 농도구배를 주어 각각 20mL 용리하였다. 용리액은 -60°C에 보관 후 동결건조하였고, 다시 멸균수에 10,000 µg/mL 농도로 용해한 뒤 agar diffusion method를 이용하여 항균 활성을 확인하였다. 시험 균주가 평판도말 (Spreading)된 배지에 용해된 분획을 paper disc에 20µg/mL, direct 10µg/mL 적하한 후 건조시켜 18시간 37°C에서 배양하였다.

⑥ 기능성 이차대사산물의 in vitro 효능 검증

분리·정제된 기능성 이차대사산물의 풋마름병원균 제어 능력 효능을 검증을 위해 Agar diffusion method와 최저저해농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 평가를 시도하였다. 최저저해 농도는 Micro-broth method를 이용해 96-well microtiter plate에 균의 성장을 저해하는 최저저해농도를 평가하였다. 처리농도는 128 µg/mL부터 계단희석하여 사용하였으며, 37 °C에서 18시간 배양 후 시험균의 성장을 저해하는 최소농도를 설정하였다.

⑦ 기능성 이차대사산물의 분자 구조 분석

그람음성균에 강한 항균 활성을 나타내는 compound A의 분자 구조를 규명하기 위해 ESI-MS/MS와 2D Nuclear magnetic resonance (NMR) NMR 스펙트럼을 측정하였다. ESI-MS/MS는 compound A 1.0mg을 증류수 1mL에 용해하여 (1000µg/mL) 100µg/mL의 농도가 되도록 희석시킨 후, API 3200 Q TRAP 장비를 이용하여 tandem mass spectrometry를 500°C에서 100-1600 Da의 range로 5분간 측정하였다. 2D NMR은 compound A 3.0mg을 DMSO-*d*₆ 658.4µL에 용해하여 (약 3mM) VARIAN 600 MHz 장비를 이용, 298 K에서 측정하였으며 Total Correlation Spectroscopy (TOCSY), Double Quantum Filter-correlation spectroscopy (DQF-COSY), Nuclear overhauser enhancement spectroscopy (NOESY), Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC), Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) 5개 스펙트럼을 얻었고, 현재 분자 구조 분석을 진행하였다.

⑧ 기능성 이차대사산물의 작용기작 구명 및 안전성 분석

기능성 이차 대사산물의 항균 작용기작 구명을 위해 fluorescent dye를 이용한 실험을 진행하였다. 우선 세포막에 대한 영향을 연구하기 위해 막탈분극 (Membrane depolarization)을 이용한 형광 실험을 진행하였다. 시험균으로 그람음성균인 *E. coli*와 그람양성균인 *S. aureus*를 사용하였고, 대조균으로 세포막을 파괴하는 멜리틴 (Melittin) 펩타이드를 사용하였다. 대조균 펩타이드의 경우, 최저저해농도의 2배를 처리하였을 때 두 균에서 모두 세포막이 파괴되어 형광 세기가 증가하는 것을 확인하였다. 하지만 Compound A의 경우에는 그람음성균인 *E. coli*에 대해 최저저해농도 1x, 2x, 4x 농도를 처리하여도 막탈분극이 일어나지 않는 것으로 보아 세포막에 직접적인 영향을 주지 않는다는 것을 확인하였다. 그람양성균인 *S. aureus*에 대해 *E. coli* 처리농도 중 가장 높은 농도인 4µg/mL를 처리하였고, 형광의 세기가 증가하지 않는 것으로 보아 세포막에 영향을 주지 않음을 확인하였다.

⑨ 기능성 이차대사산물의 안전성 분석

순수하게 분리·정제된 compound A의 안전성을 sheep blood 적혈구의 용혈현상 이용해 분석하였다. 용혈현상을 측정하기 위해 채취된 sheep blood를 PBS buffer로 3회 이상 세척하고, 2,000RPM에서 5분간 원심분리하여 혈장을 제거하였다. 채취된 적혈구는 micro-broth method를 이용하여 96-well plate에 시행하였고, 처리된 샘플은 37°C에서 60RPM으로 1시간 동안 충분히 현탁시켰다. Compound A는 동결건조된 powder를 멸균수에 용해한 후 512µg/mL 부터 계단희석하여 사용하였으며 양성지표물질로는 Triton X-100을 음성지표물질로는 PBS를 사용하였다. 550nm에서 흡광을 측정하였으며, 2반복하여 평균값을 구하였다.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

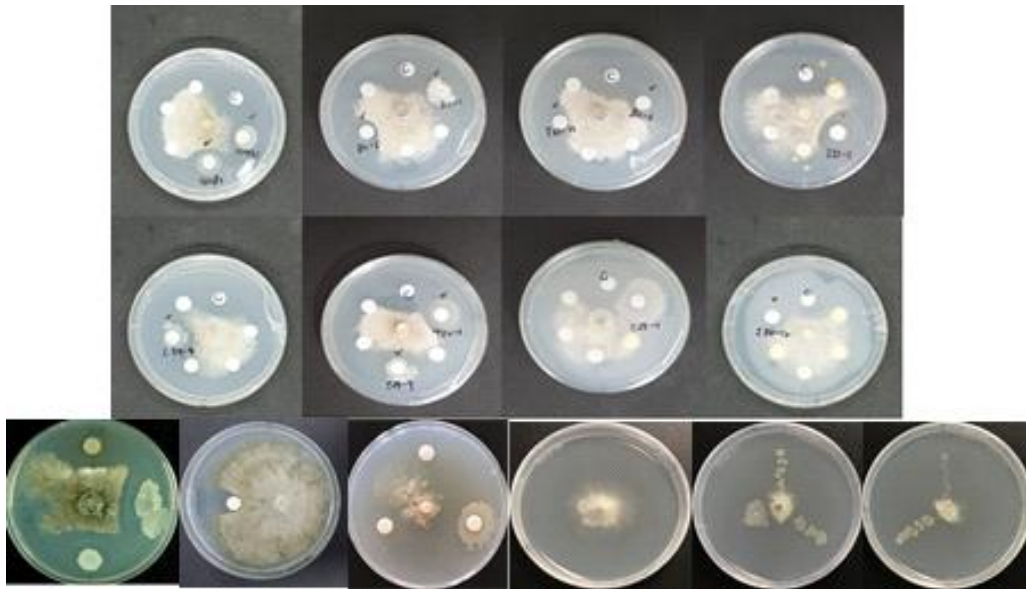
1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

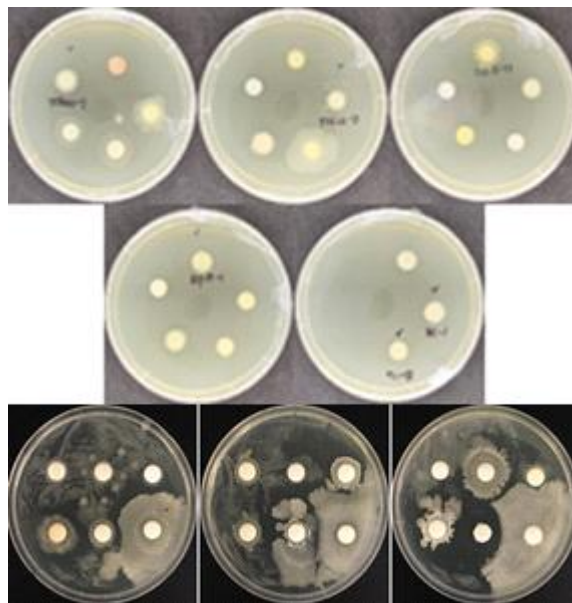
<주관기관 : (재)농축산용미생물산업육성지원센터>

① 유용미생물 발굴 및 효능 검증

자연계로부터 분리·확보한 600점 이상 미생물을 활용하여 토마토 병해 중 잣빛곰팡이병, 풋마름병에 대한 항균 활성을 수행하여 상대적으로 잣빛곰팡이병에 대한 항균활성이 우수한 16종과 풋마름병에 대한 항균활성이 우수한 10종 균주를 선발 및 확보 하였다.



<그림 5. 잣빛곰팡이병 방제용 16종 선발>



<그림 6. 풋마름병 방제용 10종 선발·확보>

잣빛곰팡이병 항균활성이 상대적으로 우수한 균주 중 최대 활성 우수 균주 5종을 선발하여 (주)마크로젠에 16s rRNA sequencing을 의뢰하여 동정한 결과 *Bacillus velezensis* GH1-13, *Bacillus siamensis* JC-18, *Bacillus velezensis* JC-6, *Bacillus siamensis* BC-6, *Bacillus*

velezensis TSA34-9 균주로 확인되었다. 풋마름병 항균활성이 상대적으로 우수한 균주 중 최대 활성 우수 균주 5종을 선발하여 (주)마크로젠에 16s rRNA sequencing을 의뢰하여 동정한 결과 *Bacillus siamensis* JC-18, *Bacillus siamensis* JC-20, *Brevibacillus laterosponus* TSA31-5, *Bacillus velezensis* JC-6, *Bacillus velezensis* TSA34-9 균주로 확인되었다.

[젓빛곰팡이병 방제용 균주 목록]

연번	균주	분리원	연번	균주	분리원
1	GH1-13	논토양	9	ISP34-12	황토
2	BC-1	논토양	10	ISP34-9	황토
3	BC-6	논토양	11	ISP35-1	황토
4	TSA34-9	황토	12	JC-6	잡초 근권
5	TSA32-1	황토	13	JC-14	잡초 근권
6	SSI-1	논토양	14	JC-15	잡초 근권
7	SSI-5	논토양	15	JC-18	잡초 근권
8	TSA31-11	황토	16	JC-25	잡초 근권

[젓빛곰팡이병 방제용 우수 균주 목록]

연번	균주명	분리원
1	<i>Bacillus velezensis</i> GH1-13	논토양
2	<i>Bacillus siamensis</i> JC-18	잡초 근권
3	<i>Bacillus velezensis</i> JC-6	잡초 근권
4	<i>Bacillus siamensis</i> BC-6	논토양
5	<i>Bacillus velezensis</i> TSA34-9	황토

[풋마름병 방제용 균주 목록]

연번	균주	분리원	연번	균주	분리원
1	BC-1	논토양	6	TSA34-9	논토양
2	SSI-1	논토양	7	JC-6	잡초 근권
3	ISP35-1	황토	8	JC-18	잡초 근권
4	TSA16-19	황토	9	JC-20	잡초 근권
5	TSA26-3	황토	10	TSA31-5	황토

[풋마름병 방제용 우수 균주 목록]

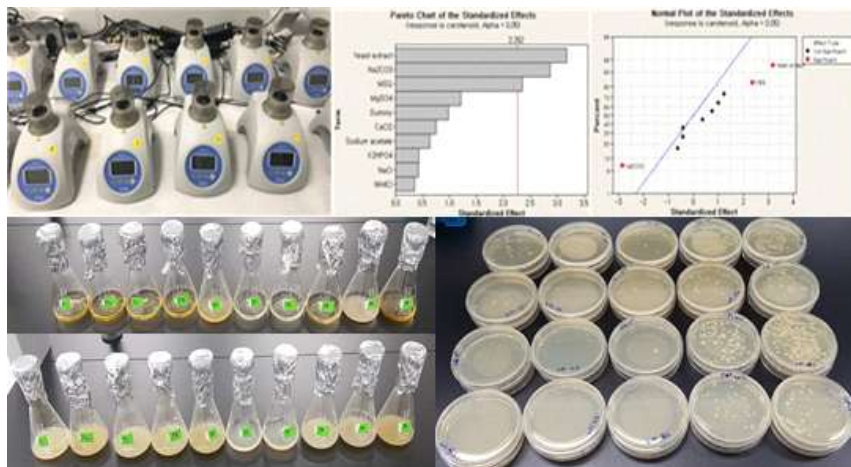
연번	균주명	분리원
1	<i>Bacillus siamensis</i> JC-18	잡초 근권
2	<i>Bacillus siamensis</i> JC-20	잡초 근권
3	<i>Brevibacillus laterosponus</i> TSA31-5	황토
4	<i>Bacillus velezensis</i> JC-6	잡초 근권
5	<i>Bacillus velezensis</i> TSA34-9	황토

이 중 잣빛곰팡이병 방제용 유용미생물 중 최고의 항균활성을 보인 *Bacillus velezensis* GH1-13와 *Bacillus velezensis* JC-6 균주를 선발하였고, 풋마름병 방제용 유용미생물 중 최고의 항균활성을 보인 *Bacillus siamensis* JC-18와 *Bacillus velezensis* JC-6 균주를 선발하였다. *Bacillus siamensis* JC-18와 *Bacillus velezensis* JC-6 균주의 경우에는 풋마름병 방제와 더불어 잣빛곰팡이병에도 탁월한 방제 효과가 보이는 것으로 확인되었다.

향후 16S rRNA 유전자 염기서열 뿐만 아니라 전체적인 Genome 분석을 통한 동정 자료를 보완할 필요가 있다고 판단된다.

② 대량배양용 배지 및 발효조건 최적화

잣빛곰팡이병 방제용 유용미생물 *Bacillus velezensis* GH1-13 균주의 대량배양용 배지 및 발효 조건을 최적화하기 위해 아래와 같은 연구를 수행하였다. 먼저 *Bacillus velezensis* GH1-13 균주의 대량배양용 저비용·고효율의 최적 배지 개발을 위해 바이오리액터 및 반응표면분석법(RSM)을 이용하였다.



<그림 7. 잣빛곰팡이병 방제용 미생물 배지 최적화>

Bacillus velezensis GH1-13 균주의 대량생산을 위한 최적배지 개발을 목적으로 탄소원과 질소원 선별을 수행하였다. 최적 질소원 선별은 탄소원으로 0.5% Glucose가 포함된 기본배지에 5종류 (Yeast extract, Peptone, Tryptone, Soytone, Soy bean flour)의 질소원을 각각 0.8% 첨가하여 48시간 배양 후 최종 질소원을 선별하였고, 최적 탄소원 선별은 질소원으로 0.8% Yeast extract가 포함된 기본배지에 5종류(Glucose, Fructose, Sucrose, Maltose, Corn starch)의 탄소원을 각각 0.5% 첨가하여 48시간 배양 후 최종 탄소원을 선별하였다.

탄소원	질소원
Glucose	Yeast extract
Fructose	Peptone
Sucrose	Tryptone
Maltose	Soytone
Corn starch	Soy bean flour

바이오리액터와 반응표면분석법을 활용하여 생균수 및 내생포자 형성률을 비교한 결과 *Bacillus velezensis* GH1-13 균주의 최적 질소원은 Soy bean flour로 선발하였고, 최적 탄소원은 Maltose가 생균수와 내생포자 형성률에서 가장 높게 나타났으나, 대량생산 측면에서 비용과

균수 생산성을 고려하였을 때 Glucose를 최적 탄소원으로 선발하였다. *Bacillus velezensis* GH1-13 최적 배지 조성은 다음과 같다.

[*Bacillus velezensis* GH1-13의 탄소원, 질소원에 따른 총 생균수, 내생포자 수 및 형성 비율]

탄소원	총 생균수(cfu/ml)	내생포자 생균수(cfu/ml)	내생포자 형성률(%)
Glucose	3.9×10⁸	3.2×10⁸	81.4
Fructose	1.8×10 ⁸	2.3×10 ⁶	1.3
Sucrose	4.2×10 ⁸	1×10 ⁷	2.4
Maltose	6.8×10⁸	5.6×10⁸	82.4
Corn starch	2.4×10 ⁸	1.9×10 ⁷	7.6
질소원	총 생균수(cfu/ml)	내생포자 생균수(cfu/ml)	내생포자 형성률(%)
Yeast extract	3.9×10⁸	3.2×10⁸	81.4
Peptone	4.5×10 ⁷	2.6×10 ⁷	57.8
Tryptone	4.0×10 ⁷	9.0×10 ⁶	22.5
Soytone	2.5×10 ⁸	2.0×10 ⁸	80.0
Soy bean flour	9.0×10⁸	8.1×10⁸	90.0

[*Bacillus velezensis* GH1-13 균주의 최적 배지 조성 확립]

조 성	%	g/L
Soy bean flour	0.8	8
Glucose	0.5	5
NaCl	0.15	1.5
K ₂ HPO ₄	0.25	2.5
Na ₂ CO ₃	0.05	0.5
MgSO ₄	0.1	1

Bacillus velezensis GH1-13 균주의 저비용·고효율 최적 배지를 기반으로 주관기관에서 보유한 5 L jar fermenter와 100L 발효기를 활용하여 생균수, 내생포자 형성도를 비교하였다. 그리고 최적 배양 조건을 확립하기 위해 배양온도, 통기량, 교반속도, pH 등을 설정하였다.

5 L jar fermenter와 100L 발효기를 활용하여 최적 배양 조건을 탐색한 결과 배양온도 37°C, 통기량 0.4vvm, 교반속도 120RPM, 내부압력 0.4kg/cm², pH 7.0~8.0, 접종량 1%로 최적 배양조건을 확립하였다.

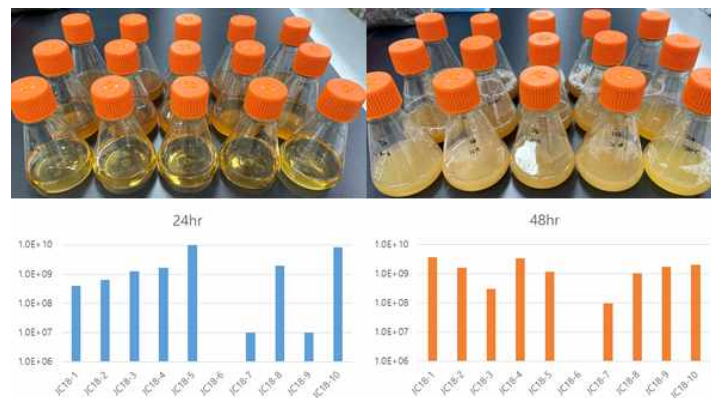


<그림 8. 5~100L 발효기를 이용한 대량배양 조건 탐색>

[*Bacillus velezensis* GH1-13 균주의 5L, 100L 발효기를 이용한 최적 배지 조성 확립]

균 주	배양 조건
<i>Bacillus velezensis</i> GH1-13	배양온도 37℃
	교반속도 120RPM
	통기량 0.4vvm
	내부압력 0.4kg/cm ²
	pH 7.0~8.0
	접종량 1%

젓빛곰팡이병 및 풋마름병 동시 방제용 유용미생물인 *Bacillus velezensis* JC-6, *Bacillus siamensis* JC-18 균주의 대량배양용 배지 및 발효조건을 최적화하기 위해 아래와 같은 연구를 수행하였다. 먼저 *Bacillus velezensis* JC-6, *Bacillus siamensis* JC-18 균주의 대량배양용 저비용·고효율의 최적 배지 개발을 위해 바이오리액터 및 반응표면분석법(RSM)을 이용하였다.



<그림 9. 젓빛곰팡이병, 풋마름병 동시 방제용 미생물 배지 최적화>

Bacillus velezensis JC-6, *Bacillus siamensis* JC-18 균주의 대량생산을 위한 최적배지 개발을 목적으로 탄소원과 질소원 선별을 수행하였다. 최적 질소원 선별은 탄소원으로 0.5% Glucose가 포함된 기본배지에 5종류(Yeast extract, Peptone, Tryptone, Soytone, Soy bean flour)의 질소원을 각각 0.8% 첨가하여 48시간 배양 후 최종 질소원을 선별하였고, 최적 탄소원 선별은 질소원으로 0.8% Yeast extract가 포함된 기본배지에 5종류(Glucose, Fructose, Sucrose, Maltose, Corn starch)의 탄소원을 각각 0.5% 첨가하여 48시간 배양 후 최종 탄소원을 선별하였다. 바이오리액터와 반응표면분석법을 활용하여 생균수 및 내생포자 형성률을 비교한 결과 *Bacillus velezensis* JC-6, *Bacillus siamensis* JC-18 균주의 최적 탄소원은 Glucose, 질소원은 Yeast extract로 선별하였다.

[*Bacillus velezensis* JC-6의 탄소원, 질소원에 따른 총 생균수, 내생포자 수 및 형성 비율]

탄소원	총 생균수(cfu/ml)	내생포자 생균수(cfu/ml)	내생포자 형성률(%)
Glucose	4.6×10 ⁹	3.8×10 ⁹	82.6
Fructose	3.8×10 ⁹	1.9×10 ⁹	5.1
Sucrose	2.7×10 ⁹	1.4×10 ⁹	5.2
Maltose	3.0×10 ⁸	2.6×10 ⁸	86.7
Corn starch	1.0×10 ⁹	1.1×10 ⁸	11.0

질소원	총 생균수 (cfu/ml)	내생포자 생균수(cfu/ml)	내생포자 형성률(%)
Yeast extract	4.6×10⁹	3.8×10⁹	82.6
Peptone	1.5×10 ⁷	2.8×10 ⁷	18.7
Tryptone	9.5×10 ⁷	1.3×10 ⁷	13.7
Soytone	6.4×10 ⁹	4.4×10 ⁹	70.9
Soy bean flour	8.8×10⁸	7.1×10⁸	80.7

[*Bacillus siamensis* JC-18의 탄소원, 질소원에 따른 총 생균수, 내생포자 수 및 형성 비율]

탄소원	총 생균수(cfu/ml)	내생포자 생균수(cfu/ml)	내생포자 형성률(%)
Glucose	3.7×10⁹	3.0×10⁹	81.1
Fructose	1.6×10 ⁹	1.8×10 ⁸	11.3
Sucrose	3.0×10 ⁸	2.9×10 ⁷	9.7
Maltose	3.5×10⁹	2.8×10⁹	81.2
Corn starch	1.2×10 ⁹	1.7×10 ⁸	14.8

질소원	총 생균수 (cfu/ml)	내생포자 생균수(cfu/ml)	내생포자 형성률(%)
Yeast extract	3.7×10⁹	3.0×10⁹	81.1
Peptone	-	-	
Tryptone	9.0×10 ⁷	1.5×10 ⁷	15.8
Soytone	1.1×10⁹	8.2×10⁸	74.5
Soy bean flour	1.8×10 ⁹	9.7×10 ⁸	53.9

[*Bacillus velezensis* JC-6, *Bacillus siamensis* JC-18 균주의 최적 배지 조성 확립]

조 성	%	g/L
Yeast extract	0.8	8
Glucose	0.5	5
NaCl	0.15	1.5
K ₂ HPO ₄	0.25	2.5
Na ₂ CO ₃	0.05	0.5
MgSO ₄	0.1	1

Bacillus velezensis JC-6, *Bacillus siamensis* JC-18 균주의 저비용-고효율 최적 배지를 기반으로 5L jar fermenter와 100L 발효기를 활용하여 생균수, 내생포자 형성도를 비교하였다. 그리고 최적 배양 조건을 확립하기 위해 배양온도, 통기량, 교반속도, pH 등을 설정하였다. 5 L jar fermenter와 100L 발효기를 활용하여 최적 배양 조건을 탐색한 결과 배양온도 37℃, 통기량 0.3wvm, 교반속도 120RPM, 내부압력 0.4kg/cm², pH 6.8~8.0, 접종량 1%로 최적 배양조건을 확립하였다.

[*B. velezensis* JC-6, *B. siamensis* JC-18 균주의 5L, 100L 발효기를 이용한 최적 배지 조성 확립]

균 주	배양 조건
<i>Bacillus velezensis</i> JC-6 <i>Bacillus siamensis</i> JC-18	배양온도 37℃
	교반속도 120RPM
	통기량 0.3wvm
	내부압력 0.4kg/cm ²
	pH 6.8~8.0
	종균 접종량 1%

③ 유용미생물 대량배양 scale-up, 제형화 및 시제품 제작

젓빛곰팡이병과 풋마름병 방제용 유용미생물의 대량배양 scale-up 및 배양 매뉴얼 정립을 위해 주관기관에서 보유한 1.5톤, 10톤 규모 대용량 발효기를 이용하였다.



<그림 10. 1.5톤(좌), 10톤(우) 대용량 발효기를 이용한 유용미생물 대량생산>

Bacillus velezensis GH1-13, *Bacillus velezensis* JC-6, *Bacillus siamensis* JC-18 균주의 5 L jar fermenter와 100L 발효기를 활용하여 최적 배양 조건을 바탕으로 1.5톤, 10톤 규모 대용량 발효기의 대량배양 scale-up 최적 배양 조건을 탐색한 결과, *Bacillus velezensis* GH1-13 균주는 배양온도 35℃, 배양시간 38시간, 교반속도 100RPM, 통기량 0.3vvm, 내부압력 0.4kg/cm², pH 7.0~8.0, 접종량 1%로 최적 배양조건을 확립하였고, *Bacillus velezensis* JC-6, *Bacillus siamensis* JC-18 균주의 경우 배양온도 30℃, 배양시간 36시간, 교반속도 100RPM, 통기량 0.3vvm, 내부압력 0.4kg/cm², pH 6.8~8.0, 접종량 1%로 최적 배양조건을 확립하였다.

Bacillus velezensis GH1-13, *Bacillus velezensis* JC-6, *Bacillus siamensis* JC-18 균주의 1.5톤 대용량 발효기로 배양하여 생균수와 내생포자 형성률을 확인한 결과, 모두 1×10⁹ 이상의 생균수와 90% 이상의 내생포자 형성률을 확인하였다.

[*B. velezensis* JC-6, *B. siamensis* JC-18 균주의 1.5톤, 10톤 발효기를 이용한 최적 배지 조성 확립]

균주명	배양 조건	균주명	배양 조건
<i>Bacillus velezensis</i> GH1-13	온도 35℃	<i>Bacillus velezensis</i> JC-6 <i>Bacillus siamensis</i> JC-18	온도 30℃
	배양시간 38시간		배양시간 36시간
	교반속도 100 RPM		교반속도 100 RPM
	통기량 0.3 vvm		통기량 0.3 vvm
	내부압력 0.4 kg/cm ²		내부압력 0.4 kg/cm ²
	pH 7.0~8.0		pH 6.8~8.0
	종균 접종량 1%		종균 접종량 1%

④ 토마토 젓빛곰팡이병에 대한 약효·약해시험

Bacillus velezensis GH1-13 시제품의 토마토 젓빛곰팡이병에 대한 약효·약해를 조사하여 제품 효능을 검정하고자 (주)현농에 시험 분석을 의뢰한 결과, 무처리구의 이병주율이 90%로 토마토 젓빛곰팡이병의 약효를 조사하기에 충분하였으며, *Bacillus velezensis* GH1-13은

무처리 대비 66.8%의 방제 효과를 보였으며 대조구로 사용한 농약(텔도)의 방제가 (85.3%) 보다는 다소 낮으나 토마토 잣빛곰팡이병에 대한 약효는 뚜렷이 확인되었다. 경엽의 반점 및 반문의 유무, 황변 또는 엽소여부, 경엽의 위조여부, 경엽의 고사여부, 낙엽 여부 등을 최종 약제 처리 후 7일간 육안으로 달관 조사 결과 해당 약해사항이 없는 것으로 조사되었다.

[처리내용]

시험약제료 (주성분 함량)	기준량	배량	처리시기 및 방법
<i>Bacillus velezensis</i> GH1-13 (1×10 ⁸ cfu/ml)	250배	125배	엽면살포 1회
대조구, 텔도(펜헥사미드, 50%)	1,000배	-	-
무처리	-	-	-

[조사방법]

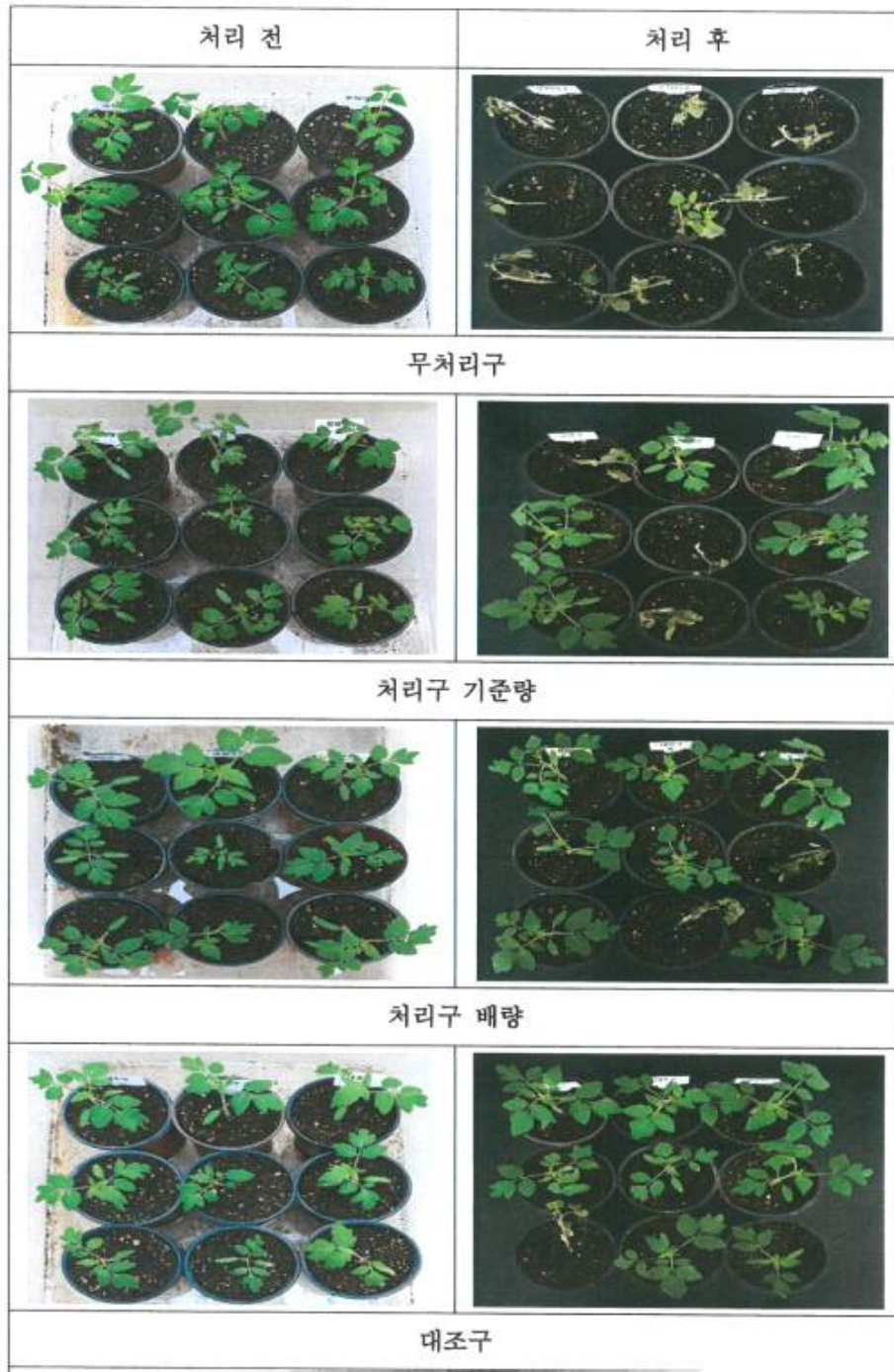
구분	조사항목	조사횟수	조사방법
약효	이병주율	1	약제처리 7일 후 구당 이병주율 조사
약해	외관상 약해유무	3	약제처리 3,5,7일 후 경엽의 외관상 약해 유무 달관조사

[약효시험 성적]

시험약제	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제율 (%)
	1반복	2반복	3반복	평균		
<i>Bacillus velezensis</i> GH1-13 기준량	25.0	35.0	30.0	30.0±2.89	b	66.8
<i>Bacillus velezensis</i> GH1-13 배량	25.0	20.0	15.0	20.0±2.89	c	77.6
대조구(텔도)	10.0	15.0	15.0	13.3±1.67	d	85.3
무처리	85.0	95.0	90.0	90.0±2.89	a	-

[약해시험 성적]

시험약제	조사일자	약해정도(0~5)		비고
		기준량	배량	
<i>Bacillus velezensis</i> GH1-13	약제처리 3일 후	0	0	-
	약제처리 5일 후	0	0	-
	약제처리 7일 후	0	0	-



<그림 11. *Bacillus velezensis* GH1-13의 토마토 잿빛곰팡이병에 대한 약효·약해 검정>

또한, *Bacillus velezensis* JC-6 시제품 의 토마토 잣빛곰팡이병에 대한 약효를 조사하여 제품 효능을 검정하고자 시험 분석을 의뢰한 결과, 무처리구의 이병엽율이 53.3%로 잣빛곰팡이의 약효를 조사하기에 충분하였으며, *Bacillus velezensis* JC-6은 무처리 대비 66.6%의 방제 효과를 확인하였다.

[처리내용]

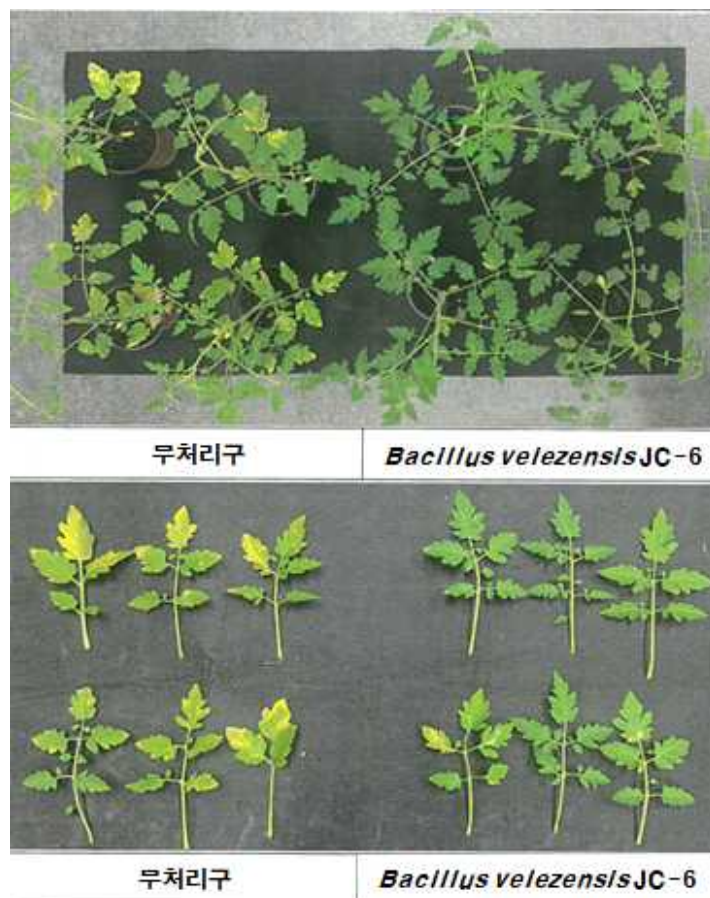
시험약제 (주성분 함량)	기준량	처리시기 및 방법
<i>Bacillus velezensis</i> JC-6 (1×10 ⁹ cfu/ml)	250배	분무 접종
무처리	-	-

[조사방법]

구분	조사항목	조사횟수	조사방법
약효	이병주율	1	병원균 접종 5일 후 구당 이병을 조사

[약효시험 성적]

시험약제	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	1반복	2반복	3반복	평균		
<i>Bacillus velezensis</i> JC-6	16.7	16.7	20.0	17.8	b	66.6
무처리	50	56.7	53.3	53.3	a	-



<그림 12. 토마토 잣빛곰팡이병 접종 후 처리구별 사진>

⑤ 농가 현장적용 및 시설하우스 토마토 수량 조사

토마토 잿빛곰팡이 방제용 *Bacillus velezensis* GH1-13 시제품과 잿빛곰팡이 및 풋마름병 동시방제용 *Bacillus velezensis* JC-6 시제품을 C지역 소재 토마토 농가 2곳에 현장적용을 실시하였다. *Bacillus velezensis* GH1-13 경우 4번에 걸쳐 총 4톤을 공급하였으며, *Bacillus velezensis* JC-6 시제품의 경우 2번에 걸쳐 총 2톤을 현장적용 농가에 공급하였다. 추가로 주관기관에서 보유한 작물생육촉진용 광합성세균 *Rhodobacter sphaeroides* 액상 1톤을 생산하여 2농가에 추가적으로 공급하여 연구기간동안 총 7톤의 유용미생물제를 C지역 소재 현장적용 농가에 공급하였다.

일자	현장적용 A농가 (총 4.2톤)	현장적용 B농가 (총 2.8톤)
2020. 06. 09.	GH1-13(20L×30통)	GH1-13(20L×20통)
2020. 07. 09.	광합성세균(20L×30통)	광합성세균(20L×20통)
2020. 09. 15.	GH1-13(20L×30통)	GH1-13(20L×20통)
2021. 03. 18.	GH1-13(20L×30통), JC-6(20L×30통)	GH1-13(20L×30통), JC-6(20L×30통)
2021. 08. 19.	GH1-13(20L×30통), JC-6(20L×30통)	GH1-13(20L×30통), JC-6(20L×30통)

현장적용 농가 공급



2020. 06. 09.



2020. 07. 09



2020. 09. 15.



2021. 03. 18.



2021. 08. 19

현장적용 토마토 농가 수량 조사를 위해 2021년 7월 30일경 방울토마토 식재를 기준으로 성장조사를 실시하였다. *Bacillus velezensis* GH1-13 시제품과 *Bacillus velezensis* JC-6 시제품을 해당 농가 2곳에 관주처리 하였고, 20일 간격으로 줄기, 잎, 과실 등 전반적인 상태를 조사하였다. 조사 결과, A농가에 경우 식재 초기부터 무처리구 대비 *Bacillus velezensis* GH1-13, *Bacillus velezensis* JC-6 시제품을 적용한 처리구에서 육안으로도 생장의 차이를 확인할 수 있었다.

B농가에 경우에도 무처리구 대비 *Bacillus velezensis* GH1-13, *Bacillus velezensis* JC-6 시제품을 적용한 처리구에서 약간의 생장의 차이를 확인할 수 있었다.

농가 현장적용 사진(A농가)

무처리구

처리구(농축산용미생물센터)



2021. 08. 19.



2021. 09. 09.



2021. 10. 28.

농가 현장적용 사진(A농가)

무처리구

처리구(농축산용미생물센터)



2021. 08. 19.



2021. 09. 09.



2021. 10. 28.

농가 현장적용 사진(B농가)

무처리구

처리구(농축산용미생물센터)



2021. 08. 19.



2021. 09. 09.



2021. 10. 28.

농가 현장적용 사진(B농가)

무처리구

처리구(농축산용미생물센터)



2021. 08. 19.



2021. 09. 09.



2021. 10. 28.

현장적용 시설하우스의 방울토마토 수량을 조사하기 위해 방울토마토 하단부(밑→위) 4단을 기준으로 실시하였으며 토마토 10주당 1주의 과실을 개수하여 시설하우스내 전체적인 수량을 계산하였다. A농가에 경우 무처리구에서 1주당 75.8개, C지역 농업기술센터에서 보급한 미생물제 처리구에는 1주당 86.2개, 농축산용미생물센터에서 보급한 시제품에서는 1주당 128.0개로 조사되었으며, 현장적용 시설하우스 1동 전체 방울토마토를 계산한 결과, 무처리구 36,384개, C지역 농업기술센터에서 보급한 미생물제 처리구는 41,376개, 농축산용미생물센터에서 보급한 시제품은 61,440개로 무처리구 대비 약 41%, C지역 농업기술센터 보급 미생물제 대비 약 33%의 생산량이 증가함을 확인하였다. B농가에 경우 무처리구에서 1주당 90.8개, 농축산용미생물센터에서 보급한 시제품에서는 1주당 100.4개로 조사되었으며, 현장적용 시설하우스 1동 전체 방울토마토를 계산한 결과, 무처리구 94,432개, 농축산용미생물센터에서 보급한 시제품은 104,416개로 무처리구 대비 약 10%의 생산량이 증가함을 확인하였다.

[시설하우스 내 1주당 방울토마토 개수(하단부 4단기준)]

A농가		
무처리	C지역 농업기술센터 보급	농축산용미생물센터 보급
75.8±16.5	86.2±20.1	128.0±23.6
B농가		
무처리	농축산용미생물센터 보급	
90.8±24.1	100.4±31.2	

[시설하우스 동별 방울토마토 개수(하단부 4단기준)]

A농가 (480주)		
무처리	C지역 농업기술센터 보급	농축산용미생물센터 보급
36,384	41,376	61,440
B농가 (1,040주)		
무처리	농축산용미생물센터 보급	
94,432	104,416	

Bacillus velezensis GH1-13, *Bacillus velezensis* JC-6 시제품 처리에 따른 현장적용 농가 시설하우스내 미생물 분석을 실시한 결과, A, B농가 모두 농축산용미생물센터 시제품 처리구에서 *Bacillus velezensis* 균주가 우점하고 있음을 확인하였다.

토양시료		균주명
A농가	무처리	<i>Bacillus stratosphericus</i> <i>Bacillus</i> sp.
	농축산용미생물센터	<i>Bacillus velezensis</i> (≥10 ⁷) <i>Bacillus circulans</i>
	C지역 농업기술센터	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i> <i>Bacillus altitudinis</i>
B농가	무처리	<i>Bacillus</i> sp. <i>A. ureafaciens</i> 16S
	농축산용미생물센터	<i>Bacillus velezensis</i> (≥10 ⁷) <i>Bacillus simplex</i>

⑥ 사용 매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅

수요자(농가)가 토마토 잿빛곰팡이병과 풋마름병 방제를 위하여 미생물제제를 쉽게 사용할 수 있도록 간편하고 체계적인 지침서를 아래와 같이 제작·보급하였다. 유용미생물 사용법은 관주 처리와, 엽면 처리로 구분하였으며, 미생물제제 액상 원액을 각각 200배, 100배 희석하여 1~2회/주 이른 아침 또는 해질녘 사용을 권장하여 매뉴얼을 보급하였다.

또한, 교육 및 컨설팅의 경우 2년 동안 총 9회를 실시하였으며, 균주 보급 및 중간 점검을 통해 농가 현장적용에 대한 애로사항을 청취하고 이에 따른 문제점들을 해결하였다.

사용 매뉴얼 보급

유용미생물 사용법

1. 관주 처리

1) 병 발생 전

- ① 원액 20L 말동
- ② 200배 희석 (고초균 20L 말동 + 물 4톤)
- ③ 4,000평 사용
- ④ 1~2회/주 관주
- ⑤ 농약과 교호 사용 시 ⇒ 2주 간격으로 고초균 처리
- ⑥ 이른 아침 또는 해질녘 사용 권장

2. 엽면 처리

1) 병 발생 시

- ① 원액 20L 말동
- ② 100배 희석 (고초균 40L 말동 + 물 4톤)
- ③ 4,000평 사용
- ④ 1회/1주 엽면 처리 (전착제 혼용 가능)
- ⑤ 농약과 교호 사용 시 ⇒ 2주 간격으로 고초균 처리
- ⑥ 이른 아침 또는 해질녘 사용 권장

1. 관주 처리

m ² (평)	희석배수	처리량
100m ² (30평)	200배	고초균 150mL + 물 30L
200m ² (60평)	200배	고초균 300mL + 물 60L
300m ² (90평)	200배	고초균 450mL + 물 90L
400m ² (120평)	200배	고초균 600mL + 물 120L
500m ² (150평)	200배	고초균 750mL + 물 150L
1000m ² (300평)	200배	고초균 1.5L + 물 300L

2. 엽면 처리

m ²	희석배수	처리량
100m ² (30평)	100배	고초균 300mL + 물 30L
200m ² (60평)	100배	고초균 600mL + 물 60L
300m ² (90평)	100배	고초균 900mL + 물 90L
400m ² (120평)	100배	고초균 1.2L + 물 120L
500m ² (150평)	100배	고초균 1.5L + 물 150L
1000m ² (300평)	100배	고초균 3.0L + 물 300L

농가 현장 교육 및 컨설팅



2020. 05. 12.



2020. 09. 03.



2020.11.19



2021. 05. 12.

위의 결과를 바탕으로 「바실러스 벨레젠시스 JC-6 균주, 이를 유효성분으로 하는 식물병 방제용 조성물 및 이의 제조방법」으로 특허 출원 하였다.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2021.09.06
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P210027KR)
출원번호 10-2021-0118614 (접수번호 1-1-2021-1030954-10)
(DAS접근코드977A)
출원인명칭 재단법인 농축산용미생물산업육성지원센터(1-2018-054922-7) 외 1명
대리인성명 강현욱(9-2014-001358-6)
발명자성명 김평일 서선일 이철원 김주은 김정은
발명의명칭 바실러스 벨레젠시스 JC-6 균주, 이를 유효성분으로 하는 식물병 방제용 조성물 및 이의 제조방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정, 정정신고서)를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

<협동기관 : 전남대학교>

1) 잿빛곰팡이병 제어용

① 유용미생물 발굴 및 효능 검증

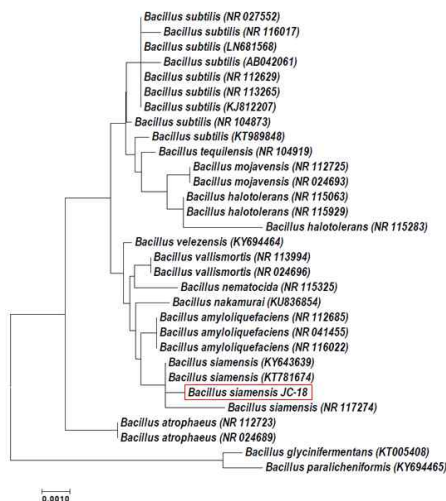
국내 토양 등의 다양한 시료로부터 미생물을 분리하여 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)에 대한 균체의 항진균 활성을 조사한 결과, 잿빛곰팡이병에 우수한 길항 능력을 나타내는 16종 ((재)농축산용미생물산업육성지원센터 11종, 전남대학교 5종)을 선별하였고, 그중에서 JC-6, JC-18, GH1-13 균주를 잿빛곰팡이병 제어용 후보 균주로 선별하였다.



<그림 13. 선행연구를 통해 선별된 JC-18 균주>

② 유용미생물의 동정

선별된 잿빛곰팡이병 제어용 후보 균주는 순수하게 분리하여 27F 및 1492R의 유니버설 프라이머 세트 (Universal primer set)를 사용하여 16S rRNA 염기서열을 분석하여 16S rRNA 서열분석을 기초로 블라스트 프로그램 수행하여 분자계통학적 위치를 확인한 결과, JC-18 균주는 기존 *Bacillus siamensis* 종과 99% 상동성을 나타내었고, JC-6 및 GH1-13 균주는 *Bacillus velezensis* 종과 99% 상동성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이렇게 동정된 각각의 균주를 바실러스 시아멘시스 (*Bacillus siamensis*) JC-18, 바실러스 벨레젠시스 (*Bacillus velezensis*) JC-6, 바실러스 벨레젠시스 (*Bacillus velezensis*) GH1-13로 명명하고 기관에 기탁하였다.



<그림 14. 16S rRNA 서열분석을 통한 최종 선별 균주 계통도의 예>

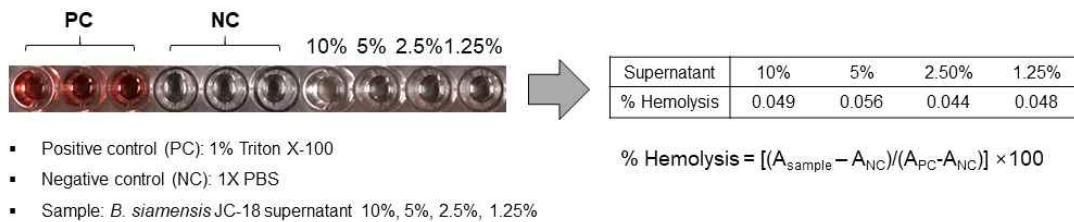
③ 유용미생물의 배양

모든 잿빛곰팡이병 제어용 후보 균주는 완전배지인 Tryptic Soy (Soybean-Casein Digest Medium) (Tryptone 17.0g, Soytone 3.0g, Glucose 2.5g, Sodium chloride 5.0g, Dipotassium phosphate 2.5g/L)에서 30°C, 180RPM, 24시간 동안 종균배양하여 동일 배지에 1% 접종하였고, 30°C에서 120RPM으로 48시간 본배양하였다.

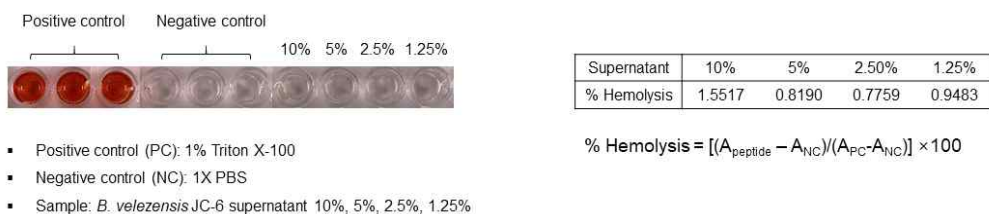
④ 유용미생물 배양상등액의 안전성 분석

확립한 배양조건으로 각각의 잿빛곰팡이병 제어용 후보 균주를 배양하고, 적혈구의 용혈반응 (Hemolysis) 평가를 통해 배양상등액의 안전성 분석 결과, 용혈반응을 이용한 *Bacillus siamensis* JC-18, *Bacillus velezensis* JC-6 균주 배양상등액의 안전성 평가 결과 처리 최대 농도인 10% 배양상등액을 처리하여도 각각 음성지표물질과 유사한 0.049%, 1.5517%의 용혈현상을 나타내 독성이 거의 없음을 확인할 수 있었다.

[*Bacillus siamensis* JC-18 균주 용혈활성]



[*Bacillus velezensis* JC-6 균주 용혈활성]

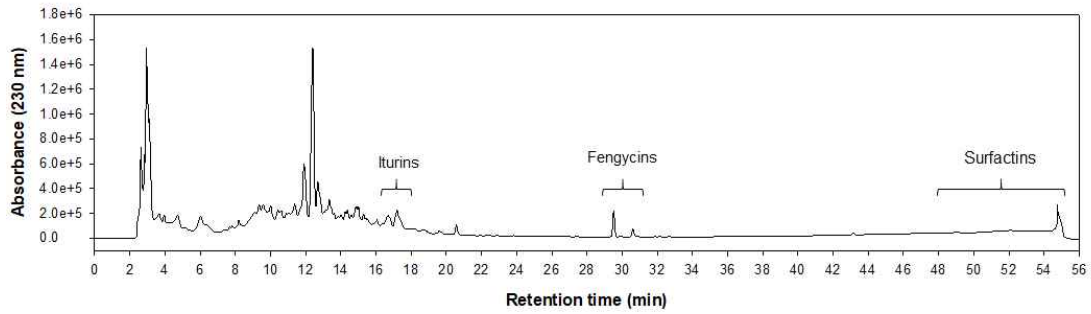


<그림 15. 용혈반응을 이용한 선별 균주 배양상등액의 안전성 분석>

⑤ 유용미생물의 특성 분석

LC-MS를 이용한 *Bacillus siamensis* JC-18 배양상등액의 정성분석 결과, 항진균 활성 물질인 사이클릭 리포펩타이드 (Cyclic lipopeptide) 이투린 (Iturin), 펜기신 (Fengycin), 서펙틴 (Surfactin)이 기능성 이차 대사산물로 생성됨을 확인할 수 있었다. 또한, *Bacillus velezensis* JC-6 및 *Bacillus velezensis* GH1-13 균주의 경우, 바실로마이신 D (Bacillomycin D), 서펙틴 등이 기능성 이차 대사산물로 생성됨을 확인할 수 있었다.

Operating condition	
LC-MS system	Shimadzu 10AD/AB Sciex API 2000
Column	Sunfire C ₁₈ (4.6 × 250mm)
Solvent	A:100% H ₂ O containing 0.05% TFA B:100% ACN containing 0.05% TFA
Method	5-95% for 45min
Detector	UV _{230 nm}
Flow rate	1mL/min



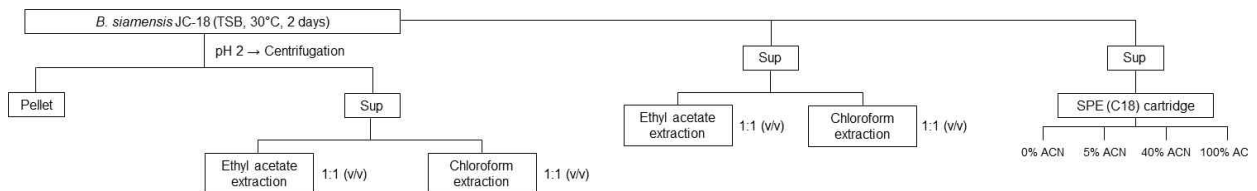
<그림 16. 바실러스 시아멘시스 JC-18 배양상등액의 LC-MS 분석 결과>

⑥ 기능성 이차대사산물의 분리·정제

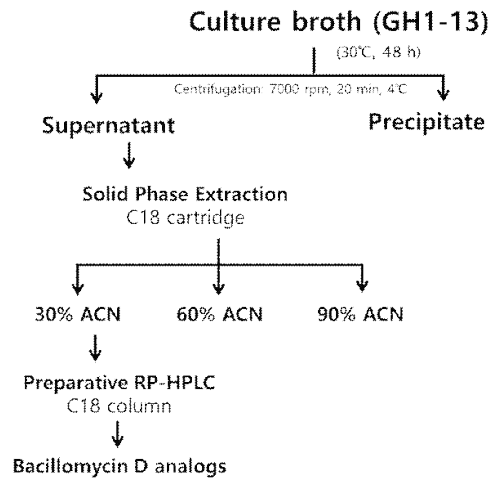
LC-MS로 분석 결과, 바실러스 시아멘시스 JC-18 균주의 경우 유기용매를 이용하여 얻은 추출물에서는 기능성 이차 대사산물의 분자량이 검출되지 않는 것을 확인하였고, 산 침전 후 원심분리하여 얻어진 상등액을 유기용매로 추출한 추출물 또한 기능성 이차대사산물의 분자량은 검출되지 않는 것을 확인하였다. 하지만, 산 침전 후 원심분리하여 얻은 침전물에서 머무름 시간 (Retention time) 순으로 1043.6, 1057.6 m/z 의 이투린과 1464.5, 1479.3, 1491.9 m/z 의 펜기신과 1009.0, 1023.1, 1037.3, 1045.5 m/z 서펙틴의 분자량이 검출되는 것을 확인할 수 있었고, 마지막으로 Sep-Pak SPE cartridge에서 40% 아세토니트릴 용리액에 이투린이, 100% 아세토니트릴 용리액에 펜기신과 서펙틴이 다량 함유됨을 확인할 수 있었다. 또한, 바실러스 벨레젠시스 JC-6 균주는 40% 아세토니트릴 용리액에 바실로마이신 D, 100% 아세토니트릴 용리액에 서펙틴이 다량 함유됨을 확인할 수 있었다.

먼저, 산 침전을 이용하여 획득한 분획에서 기능성 이차 대사산물의 순수 분리·정제를 시도하였다. 고성능 액체크로마토그래피 (High-performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 단일 물질로 분리·정제를 시도하였고, 본 분획에서는 fengycin C16 $[M+H]^+$ 1464.5, fengycin C17 $[M+H]^+$ 1477.9, fengycin C18 $[M+H]^+$ 1492.0 등의 펜기신계가 다량 포함되어 있었으며, 분획물로부터 총 2종의 펜기신을 약 10mg 이상 순수하게 분리·정제하였다. 다음으로, Sep-Pak SPE cartridge를 이용하여 획득한 40% 아세토니트릴 분획에서는 iturin C14 $[M+H]^+$ 1043.6, iturin C15 $[M+H]^+$ 1057.8의 이투린계가 다량 포함되어 있었으며, 총 2종의 이투린을 약 10mg 이상 순수하게 분리·정제하였고, 모든 분리·정제는 하기 표의 조건에 따라 수행되었다.

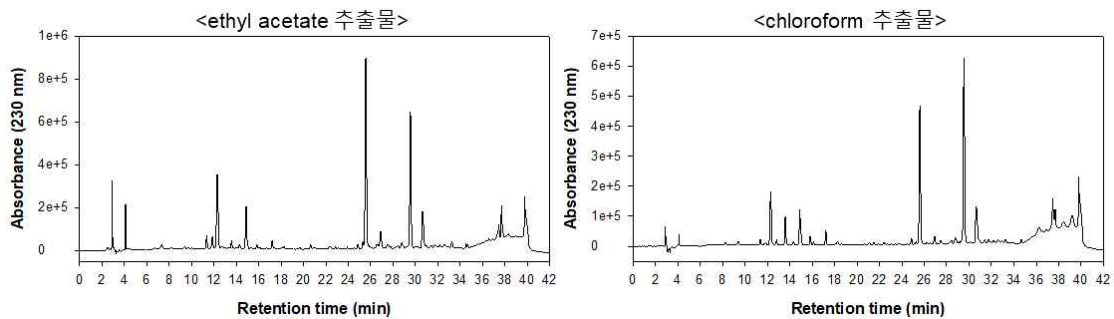
[바실러스 시아멘시스 JC-18 균주의 이차 대사산물 분리정제 scheme]



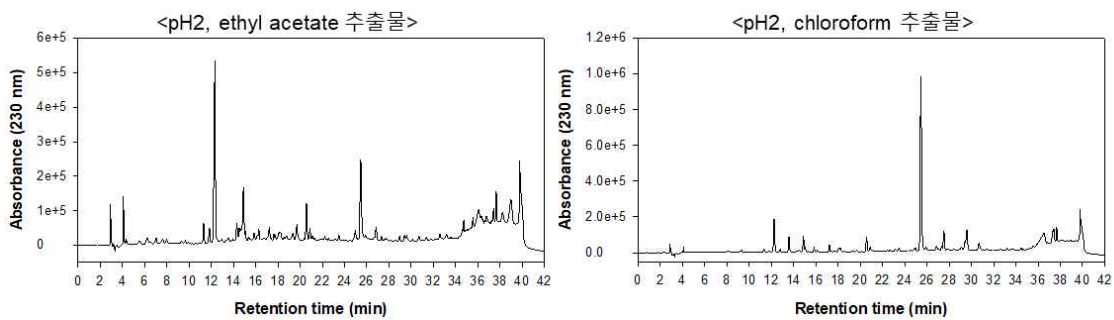
[바실러스 벨레젠시스 GH1-13 균주의 이차 대사산물 분리정제 scheme]



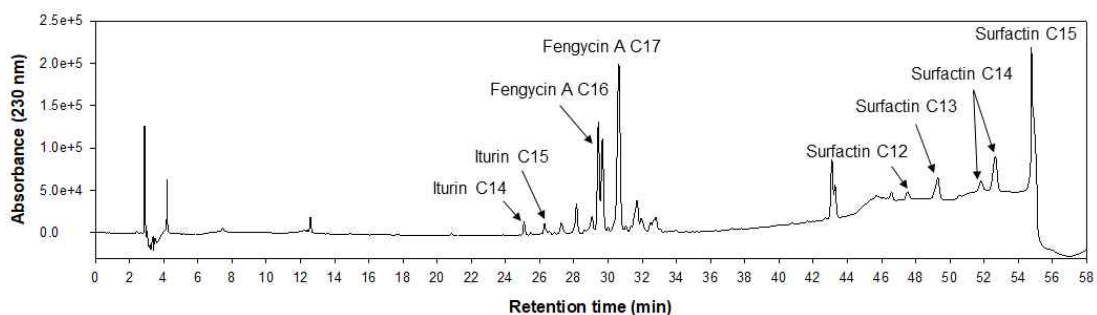
<그림 17. 잿빛곰팡이병 제어용 기능성 이차 대사산물의 분리·정제를 위한 Scheme>



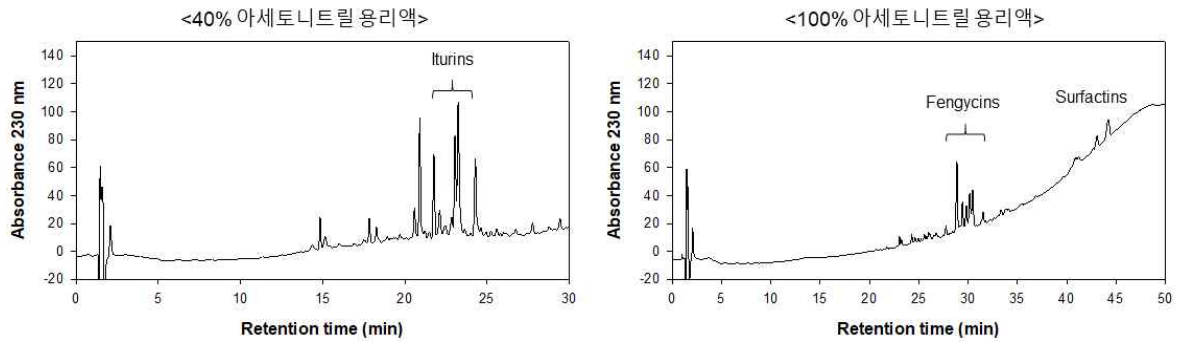
<그림 18. JC-18 균주의 유기용매 추출물 HPLC chromatogram>



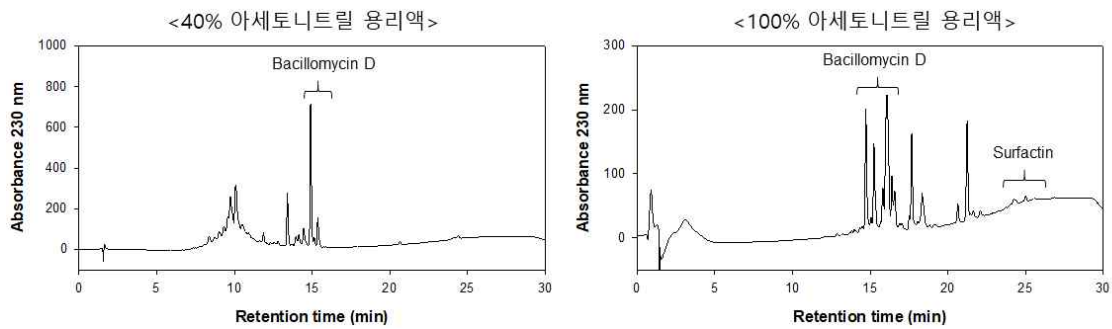
<그림 19. JC-18 균주의 산 침전 후 유기용매 추출물 HPLC chromatogram>



<그림 20. JC-18 균주의 산 침전물의 기능성 이차 대사산물 HPLC chromatogram>

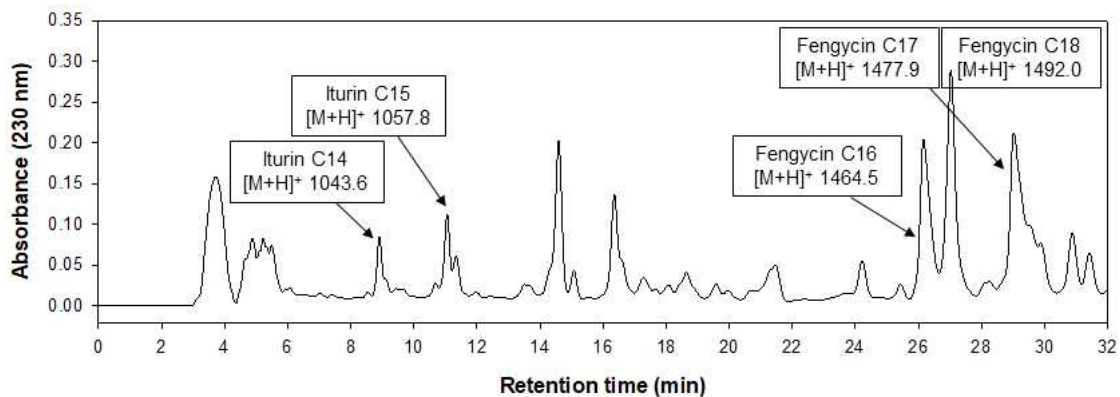


<그림 21. JC-18 균주의 SPE cartridge를 이용하여 획득한 기능성 이차 대사산물 HPLC chromatogram>

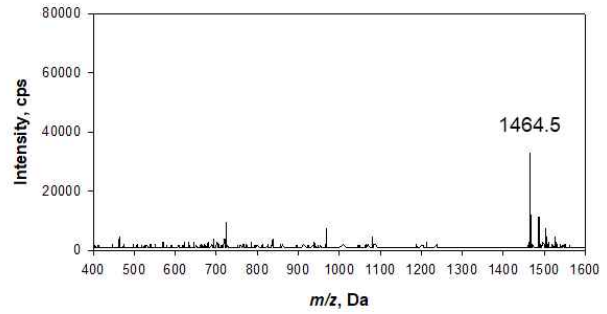
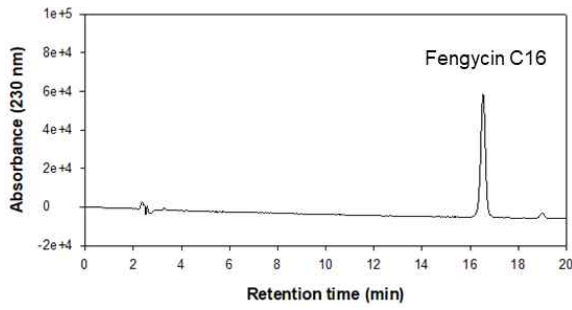


<그림 22. JC-6 균주의 SPE cartridge를 이용하여 획득한 기능성 이차 대사산물 HPLC chromatogram>

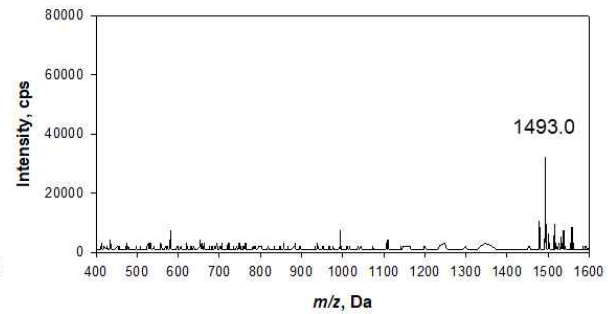
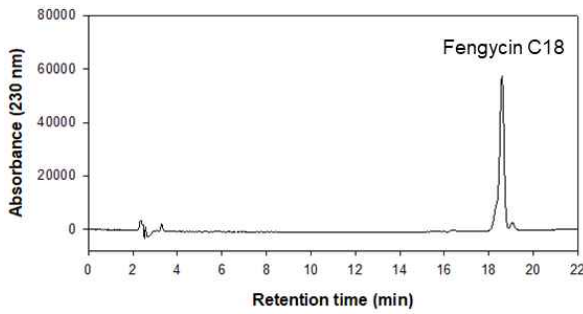
Operating condition	
HPLC system	Waters HPLC
Column	X-bridge C18 OBD™ (19 × 250mm, 5μm)
Solvent	A:95% H ₂ O, 5% ACN containing 0.05% TFA
	B:95% ACN, 5% H ₂ O containing 0.05% TFA
Method	43-68% for 30min
Detector	UV ₂₃₀ NM
Flow rate	10mL/min



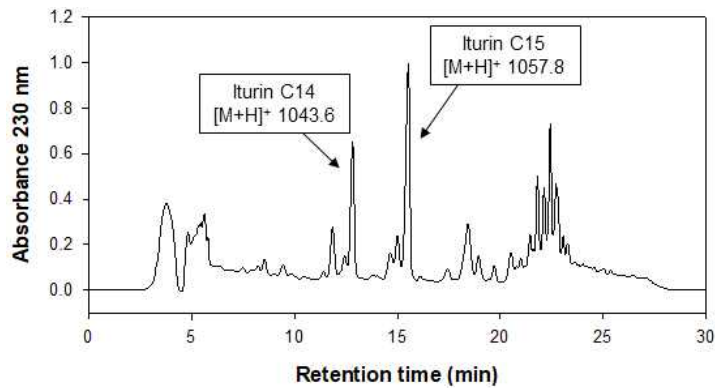
<그림 23. 산 침전을 이용하여 획득한 기능성 이차대사산물의 순수 분리·정제 HPLC chromatogram>



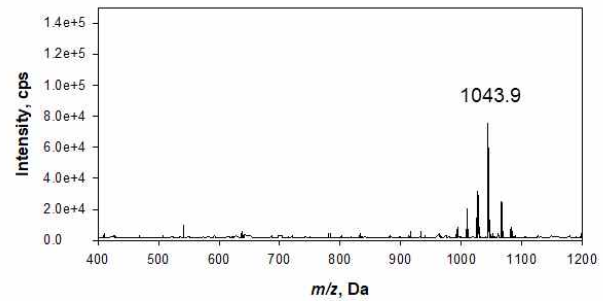
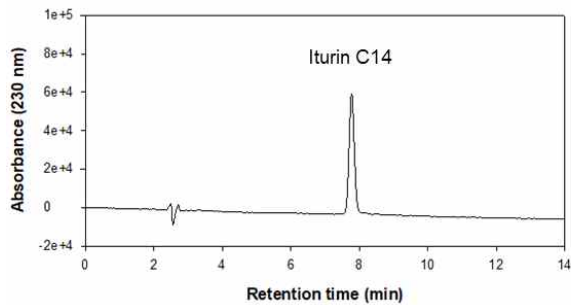
<그림 24. 순수하게 분리·정제된 사이클릭 리포펩타이드 fengycin C16>



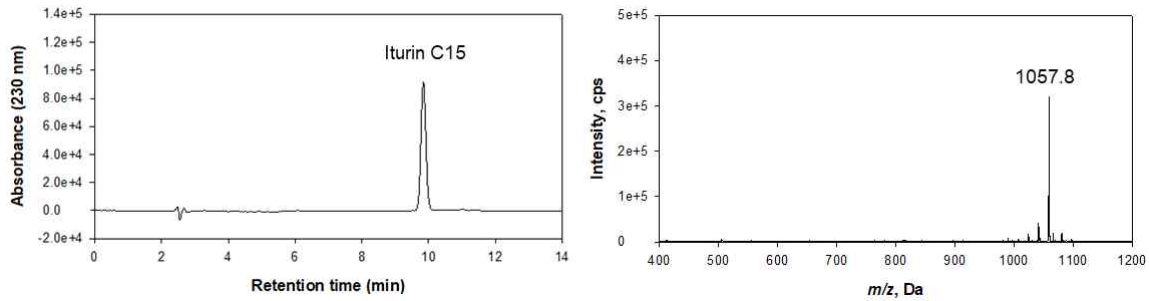
<그림 25. 순수하게 분리·정제된 사이클릭 리포펩타이드 fengycin C18>



<그림 26. Cartridge를 이용하여 획득한 기능성 이차대사산물의 순수 분리·정제 HPLC chromatogram>



<그림 27. 순수하게 분리·정제된 사이클릭 리포펩타이드 iturin C14>



<그림 28. 순수하게 분리·정제된 사이클릭 리포펩타이드 iturin C15>

⑦ 기능성 이차대사산물의 in vitro 효능 검증

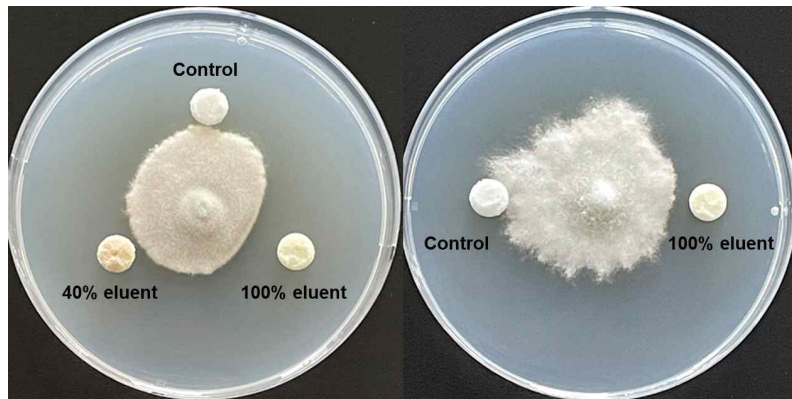
항진균 활성 평가 결과, 다양한 사이클릭 리포펩타이드를 포함하고 있는 JC-18 균주의 산 침전물은 잣빛곰팡이의 생육을 강하게 억제하는 것을 확인하였다. 다음으로, 이투린을 포함하고 있는 40% 아세토니트릴 분획 또한 매우 강력한 최저저해농도 (32µg/mL)를 가지는 것을 확인하였고, 이투린을 포함하고 있는 40% 아세토니트릴 분획은 잣빛곰팡이 외 다양한 식물성 병원균에 대해서도 강한 항진균 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 마지막으로, 순수하게 분리·정제된 이차 대사산물인 iturin C15는 방제 대상인 잣빛곰팡이에 대해 8µg/mL의 매우 강한 최저저해농도를 나타냈으며, 40% 아세토니트릴 분획 활성에 비해 4배 증가된 활성을 확인할 수 있었다. JC-6 균주의 경우, 바실로마이신 D를 포함하는 40% 아세토니트릴 분획보다 서펙틴을 포함하고 있는 100% 아세토니트릴 분획에서 더 강한 항진균 활성이 나타남을 확인할 수 있었다.



<그림 29. 잣빛곰팡이에 대한 JC-18 균주 생성 사이클릭 리포펩타이드의 항진균 활성>

Fungi	MIC (µg/mL) Crude substances
<i>Botrytis cinerea</i> (KACC 40574)	32
<i>Fusarium solani</i> (KACC 44891)	64
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> (KACC 40031)	128
<i>Phytophthora capsici</i> (KACC 40483)	>256
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (KACC 40690)	64

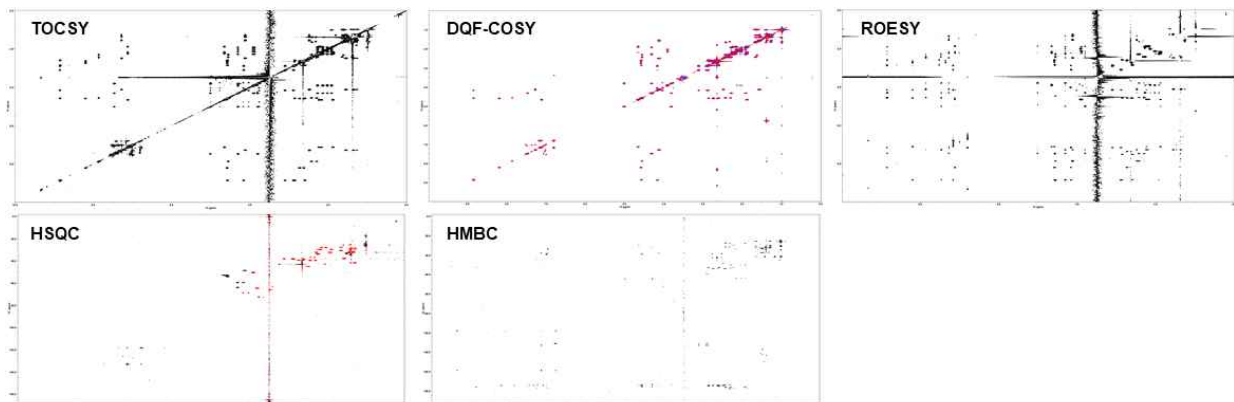
Fungi	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	Crude substances	Iturin C15
<i>Botrytis cinerea</i> (KACC 40574)	32	8
<i>Fusarium solani</i> (KACC 44891)	64	16
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> (KACC 40031)	128	32
<i>Phytophthora capsici</i> (KACC 40483)	>256	–
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (KACC 40690)	64	16



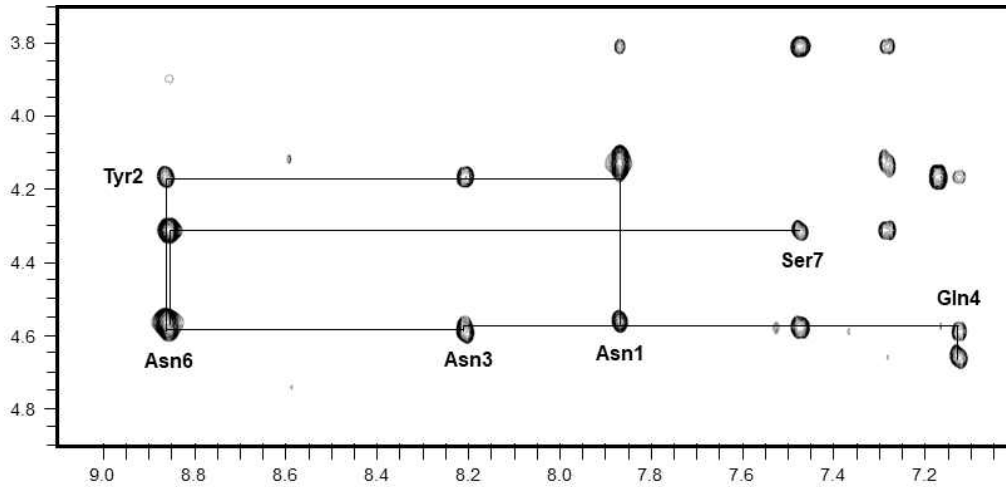
<그림 30. 잣빛곰팡이에 대한 JC-6 균주 생성 사이클릭 리포펩타이드의 항진균 활성>

⑧ 기능성 이차대사산물의 분자 구조 분석

잣빛곰팡이병 제어용 기능성 이차 대사산물의 분자 구조를 분석하기 위해 2D Nuclear magnetic resonance (NMR) 스펙트럼을 이용하였다. 분석 이차 대사산물은 방제 대상인 잣빛곰팡이에 대해 강한 항진균 활성을 나타낸 iturin C15이며, 순수하게 분리·정제된 iturin C15 1.9 mg을 DMSO- d_6 600 μl 에 용해 (약 3 mM)하였다. VARIAN 600 MHz 장비를 이용하여 298 K에서 측정하였으며, Double Quantum Filter-correlation spectroscopy (DQF-COSY), Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy (ROESY), Total Correlation Spectroscopy (TOCSY), Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC), Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) 총 5개의 스펙트럼 얻었다.

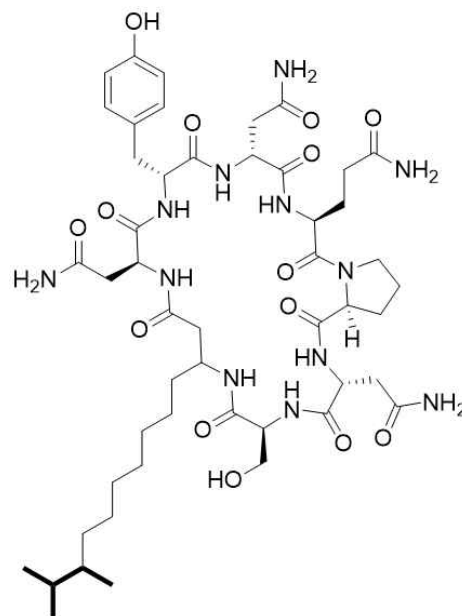


<그림 31. 측정된 iturin C15의 2D NMR 스펙트럼>



<그림 32. ^1H - ^1H ROESY 스펙트럼을 이용한 정제된 iturin A C15의 sequence-specific assignment>

얻어진 ^1H - ^1H TOCSY와 ^1H - ^1H DQF-COSY 스펙트럼을 통해 모든 proton의 chemical shift를 확인하였고, ^1H - ^1H ROESY 스펙트럼을 통해 sequence-specific assignment를 진행하였다. 정제된 iturin은 Ans1-Tyr2-Ans3-Gln4-Pro5-Asn6-Ser7-fatty acid 다음 아미노산 서열을 갖는 iturin A type의 사이클릭 리포펩타이드이며, fatty acid는 saturated carbon 15개를 갖는 것으로 확인되었다. 다음으로, ^1H - ^{13}C HSQC 스펙트럼을 통해 모든 carbon의 chemical shift를 확인하였고, ^1H - ^{13}C HMBC 스펙트럼을 통해 carbonyl group 및 fatty acid 형태를 확인하였다. 정제된 iturin C15는 기존에 보고된 iturin A type의 아미노산 서열을 갖지만, 현재까지 밝혀지지 않은 fatty acid 형태 (하기 그림 Bold 표시)를 가지는 것으로 확인되었다. Gln4의 carbonyl group을 제외한 모든 carbon의 chemical shift assignment 완료하였고, 2D NMR 분석을 통한 iturin A C15의 chemical shift는 하기 표에 나타내었다. (ND, not detected)

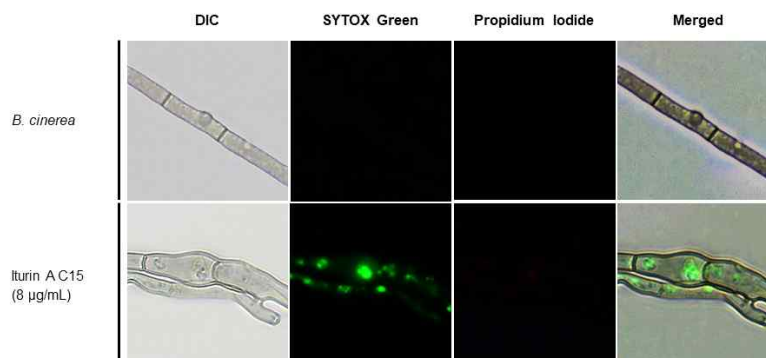


<그림 33. 새로운 fatty acid 형태를 갖는 iturin A C15의 구조>

Sequence	Position	δ_H	δ_C	Sequence	Position	δ_H	δ_C
Asn 1	NH	7.87		Asn 6	NH	8.85	
	1	4.56	53.9		28	4.58	52.9
	2	2.30, 2.43	39.6		29	2.61, 2.87	38.3
	3		174.2		30		177.2
Tyr 2	4		174.1	31		176.1	
	NH ₂	7.07, 7.48		NH ₂	7.01, 7.53		
	5	4.17	59.6	Ser 7	NH	7.47	
	6	2.90, 3.11	38.3		32	4.31	64.1
	7		133.0		33	3.81	64.6
	8	7.17	133.0		34		173.4
	9	6.81	118.3	Lipid	OH	5.02	
	10		131.1		NH	7.28	
	11	6.81	118.3		35	4.13	48.6
	12	7.17	133.0		36	2.49	45.0
13		174.5	37			174.5	
OH	ND		38		1.56	38.0	
Asn 3	NH	8.20			39	1.37	32.4
	14	4.59	54.0		40	1.37	32.4
	15	2.64, 2.73	39.3		41	1.37	32.4
	16		174.5		42	1.37	32.4
	17		174.2	43	1.37	32.4	
Gln 4	NH ₂	7.03, 7.37		44	1.40	27.1	
	18	4.66	52.9	45	1.28, 1.38	28.7	
	19	1.89	29.7	46	1.63	30.8	
	20	2.18, 2.24	33.7	47	0.99	25.8	
	21		ND	48	0.99	25.8	
	22		177.2	49	0.99	26.8	
Pro 5	NH ₂	7.01, 7.28					
	23	4.31	59.5				
	24	2.28, 1.92	32.4				
	25	2.15, 2.03	28.0				
	26	3.90, 3.92	50.6				
	27		176.1				

⑨ 기능성 이차대사산물의 작용기작 구명

구조 분석이 완료된 iturin A C15의 항진균 활성 작용기작 구명을 위해 현미경으로 관찰한 결과, 펩타이드를 처리하지 않은 경우, 균일한 형태의 균사가 관찰되며 세포막 손상으로 인한 형광은 관찰되지 않았다. Iturin A C15를 처리한 경우, 세포벽이 손상되어 부푼 형태가 관찰되었으며, 세포막의 손상에 의한 형광이 강하게 관찰되었다. 따라서, iturin A C15는 잣빛곰팡이 병원균의 세포벽 손상과 세포막 파괴를 일으키는 기작으로 항진균 활성을 나타내는 것으로 추정되었다.

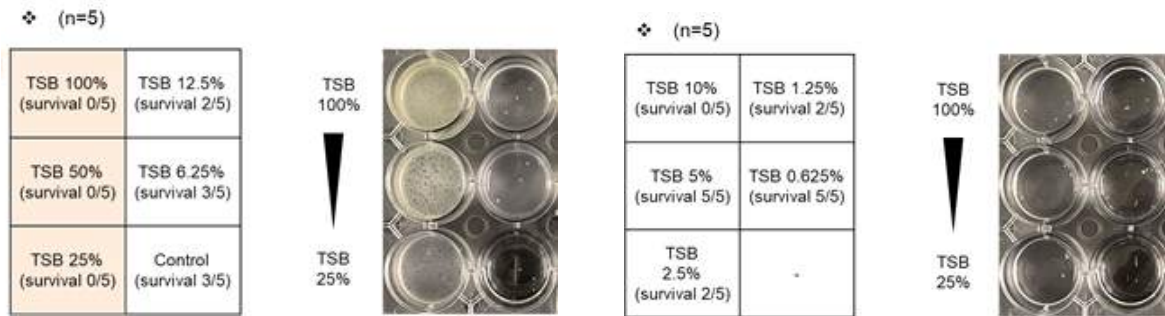


<그림 34. 잣빛곰팡이병원균에 대한 iturin A C15의 작용기작 구명>

⑩ 미생물제제(시제품)의 안전성 분석

물벼룩을 이용한 미생물제제(시제품)의 생태독성을 평가하고자 기능성 이차 대사산물의 효능까지 평가를 완료한 *Bacillus siamensis* JC-18 균주를 시제품으로 활용하기 위한 안전성 분석으로 물벼룩을 이용한 생태독성시험을 시도한 결과, TSB 25%까지 물벼룩이 생존할 수 없음을 확인하였고, 배지의 농도를 10%부터 0.625%까지 물벼룩 배양액으로 계단희석하여 생태독성을 재평가하였다.

재시험 결과 TSB 5%부터 물벼룩의 생존이 가능함을 확인하였지만, *Bacillus siamensis* JC-18 균주를 배양하는 TSB 배지에 대한 독성이 높아 해당 균주에 대한 선택적인 생태독성 확인 및 평가에 어려움이 있음을 확인하였다.



<그림 35. 물벼룩을 이용한 배양 배지의 생태독성 시험>

위의 결과들은 「바실러스 시아멘시스 JC-18 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 식물병 방제용 조성물」로 특허 출원 하였으며, (주)마이크로자임과 기술이전(통상실시권, 기술료 30백만원)을 실시 하였다.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2020.04.03
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2020-0040685 (접수번호 1-1-2020-0348214-19)
 출원인명칭 전남대학교산학협력단(2-2004-036577-5) 외 1명
 대리인성명 윤대웅(9-2012-000100-1)
 발명자성명 이철원 김주은 김평일
 발명의명칭 바실러스 시아멘시스 JC-18 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 식물병 방제용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자직교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

기술실시 보고서			
(단위 : 원)			
사업명	농축산물안전생산유통관리기술개발 연구과제번호	319110-02	
연구과제명	표마로 병의 예방 방제용 미생물제제 대량생산 및 현장적용 기술 개발		
연구개발과제 현황	(재)농축산용미생물 산업육성지원센터 연구책임자	김형일	참여기업명
연구협약일	2019.09.25	연구기간	2019.09.25. - 2021.09.24. (24개월)
연구개발비	정부지원연구개발비	기관부담연구개발비	기타(역매칭-농협) 계
	150,000,000	-	150,000,000 300,000,000
계약(활동)명	식물병(꽃마름병, 풋마름병) 방제용 조성물		
계약(활동)일	2021.07.30.	실시(활동)기간	2021.07.30.-2026.07.29.(5년)
지재권 종류	특허출원	실시권 유형	통상실시권
기술실시계약 및 성과활용 현황	명칭	바실러스 시아멘시스 JC-18 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 식물병 방제용 조성물	
· 지재권이 특허(출원 등)인 경우	번호	10-2020-0040685	일자
			2020.04.03.
	기관명	㈜마이크로자임	기관유형
			중소기업
	주소	전라남도 담양군 담양읍 태봉로 97, 2층	대표자
			심영근
	사업자번호	409-86-19995	전화번호
			061-363-0607
	부사(담당자)	기업부실연구소(오재준)	e-mail
			info@microzyme.co.kr
기술료	징액기술료	경상기술료	기타 조건
징수(예정)일	징수(예정)금액	징수(예정)일	징수(예정)금액
2021.08.05.	30,000,000	매출에 따른 기술료	징수(예정)일
계		징수(예정)일	징수(예정)금액
			매출액의 3%
기타특기사항	<p>「농림축산식품 연구개발사업 관리기준」 제35조제3항에 따라 위와 같이 기술실시 내용을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기프린트 기술이전서).</p> <p>2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증명자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기프린트 기술이전서).</p> <p>3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시서).</p> <p>2021년 08월 03일</p> <p>주관연구개발기관 재단법인 농축산용미생물산업육성지원센터의 대표이사 김희민</p> <p>농림식품기술기획평가원장 귀하</p>		

기술이전계약서

■ 계약명: "바실러스 시아멘시스 JC-18 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 식물병 방제용 조성물"
(출원번호: 10-2020-0040685 출원일: 2020. 04. 03.)

2021년 7월 30일

계약당사자

'기술제공자'

'실시권자'

재단법인 농축산용미생물산업육성지원센터 주소: 전라남도 담양군 담양읍 태봉로 97, 2층
주 소: 전라북도 정읍시 철단과학로 241(신경동) 상호: ㈜마이크로자임
사업자등록번호: 624-82-00030 대표: 심영근
대표: 권태강 김대혁 사업자등록번호: 409-86-19995
기술발명책임자: 기희은영실 담당자: 오재준
실장 김령일 연락처: info@microzyme.co.kr
061-363-0607

담당자: 서선일
연락처: siseo@cialm.or.kr
063-536-6715

전남대학교 산학협력단

주소: 광주광역시 북구 용봉로 7
사업자등록번호: 409-82-11942
대표: 단장 민경준
기술발명책임자: 전남대학교 자연과학대학 권학과
교수 이철원

담당자: 정희근, 김경범
연락처: hkjung@jnu.ac.kr
062-530-5124

2) 풋마름병 제어용

① 유용미생물 발굴 및 효능 검증

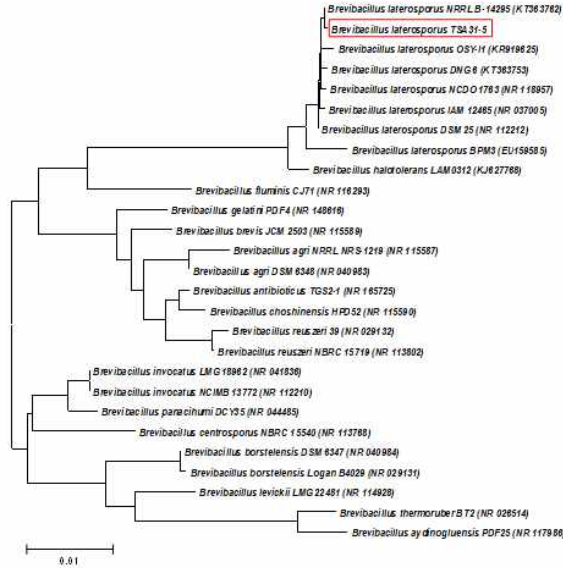
분리한 미생물 중 풋마름병 (*Ralstonia solanacearum*)에 활성이 있는 9종((재)농축산용미생물산업육성지원센터 6종, 전남대학교 3종)을 우선 선발하였고, 풋마름병원균에 활성이 가장 뛰어난 TSA31-5 균주를 최종 선발하였다.



<그림 36. 선행연구를 통해 선별된 풋마름병 제어용 TSA31-5 균주>

② 유용미생물의 동정

선별된 균주는 순수하게 분리하여 27F 및 1492R의 유니버설 프라이머 세트 (Universal primer set)를 사용하여 16S rRNA 염기서열 분석을 수행하였으며 분석된 결과를 기초로 블라스트 프로그램 (Blast program)을 통해 선별 균주의 분자계통학적 위치를 확인한 결과, 최종적으로 선별된 균주는 *Brevibacillus laterosponus* 종과 99%의 상동성을 나타냈다.

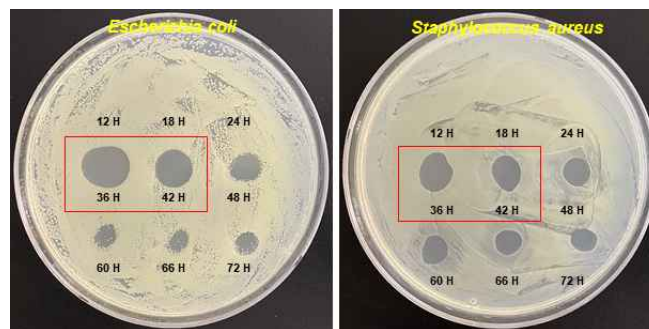


<그림 37. 16S rRNA 서열분석을 통한 최종 선별 균주의 계통도>

③ 유용미생물의 배양

배지 성분, 배양온도, 배양시간 등의 배양조건 탐색을 통해 선별된 균주의 배양상등액 항균 활성을 확인한 결과, 기능성 이차 대사산물의 발현 재현성이 매우 낮은 것을 확인하였다. 이에 배양온도를 30°C로 재설정하고, optical density (OD, 600 nm) 1.0 균주를 1% 접종하여 최대 96 시간까지 기능성 이차 대사산물의 발현 여부를 스크리닝한 결과 배양상등액의 pH가 약 7 (Foam 생성)일 때, 기능성 이차대사산물의 발현 정도가 최대이며 pH 증가에 따라 점차적으로 항균력이 감소하는 것을 확인하였다.

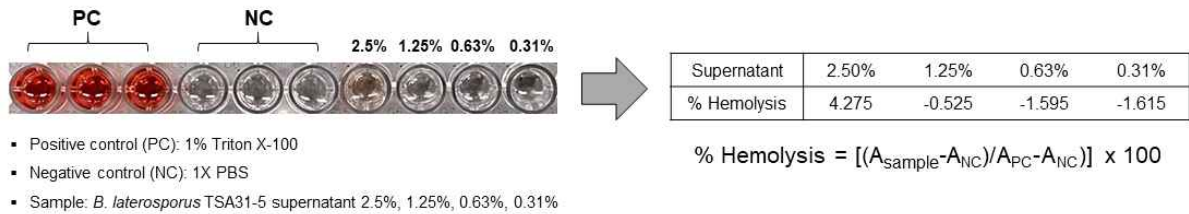
최종적으로, *Brevibacillus laterosponus* TSA31-5 균주를 TS배지 30°C에서 180RPM으로 24시간 종균배양하고, O.D.(600 nm) 1.0으로 맞춰 동일 배지에 1% 접종한 후 30°C에서 120RPM으로 40시간 분 배양하였다.



<그림 38. 기능성 이차대사산물의 발현 여부 스크리닝 결과>

④ 유용미생물 배양상등액의 안전성 분석

확립된 배양조건으로 선별 균주 배양하여 sheep blood 적혈구를 이용한 용혈반응 (Hemolysis) 평가를 통해 배양상등액의 안전성을 분석한 결과, 용혈반응을 이용한 *Brevibacillus laterosponus* TSA31-5 균주의 안전성 평가 결과 2.5%의 배양상등액을 처리하여도 용혈현상이 거의 일어나지 않아 독성이 낮다고 판단하였다.

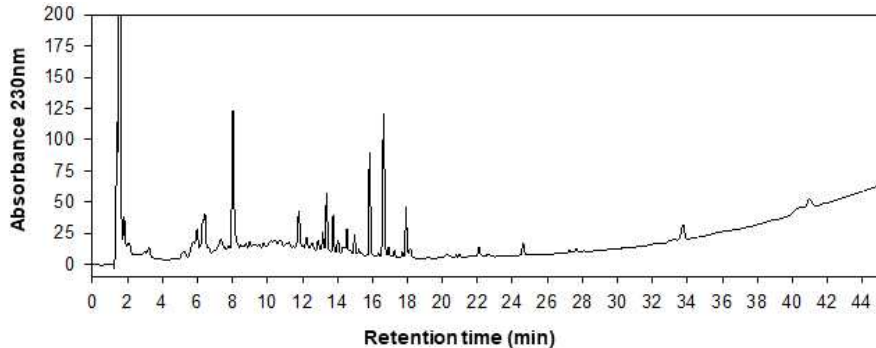


<그림 39. 용혈반응을 이용한 유용미생물 배양상등액의 안전성 분석>

⑤ 유용미생물의 특성 분석

LC-MS의 분석조건은 하기 표에 나타내었으며, mass는 positive mode에서 측정한 결과, LC-MS를 이용한 정성분석 결과, 기존 보고된 항균 활성 물질의 특정 분자량이 검출되지 않았다.

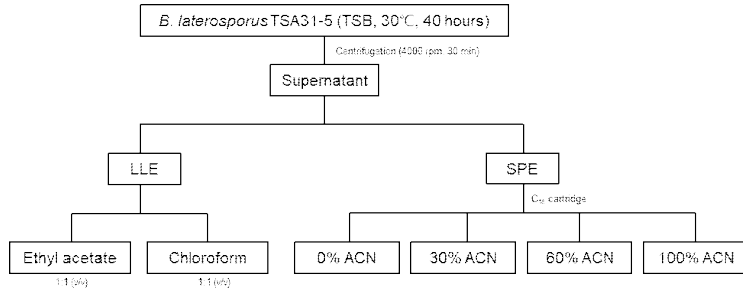
Operating condition	
LC-MS system	Agilent 1100 series/API 3200 Q TRAP
Column	XBridge C ₁₈ (2.1 x 100mm, 3.5μm)
Solvent	A:100% H ₂ O containing 0.05% TFA B:100% ACN containing 0.05% TFA
Method	5-95% for 40 min
Detector	UV _{230 nm}
Flow rate	0.2mL/min



<그림 40. *Brevibacillus laterosporus* TSA31-5 배양상등액의 LC-MS 분석 결과>

⑥ 기능성 이차대사산물의 분리·정제

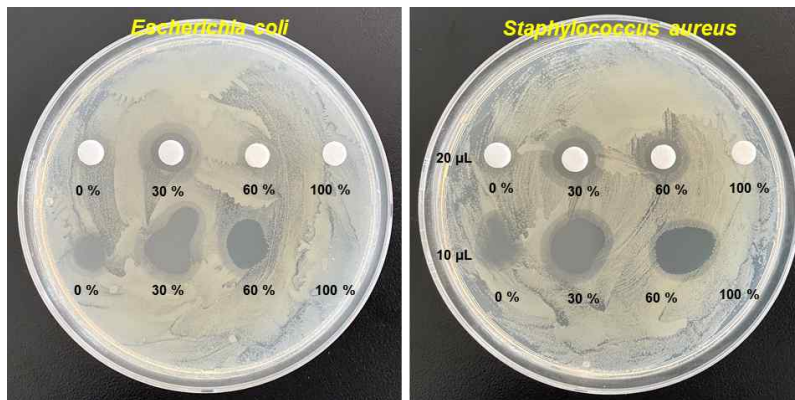
시험균주에 대해 0, 30, 60% 아세토니트릴 용리액에서 항균 활성이 관찰되었고, 특히 30, 60% 용리액이 강한 clear zone을 생성하는 것을 확인하였다. 해당 분획을 LC-MS로 분석한 결과 230 nm에서 강한 흡광을 보이는 피크를 확인하였고, 이를 기능성 이차대사산물 후보 물질로 설정하였다. 선정된 기능성 이차대사산물 후보 물질(30, 60% 용리액)을 단일물질로 분리·정제하기 위해 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC)를 이용하였고 operating 조건은 하기 표에 나타내었다. 각 분획은 동결건조 후 멸균수에 용해시켜 그람음성균인 *꽃마름병원균* 대체균주로 *E. coli*와 그람양성균인 *S. aureus*에 대해 항균 활성을 확인한 결과 4, 6, 8, 9 분획이 기능성 이차대사산물을 확인하였으며 4, 6번 분획은 *E. coli*에, 8, 9번 분획은 *S. aureus*에 선택적인 항균 활성을 나타내었다. *꽃마름병원균*과 동일한 그람음성균에 가장 강한 활성을 나타내는 분획인 6번을 compound A, 그람양성균에 선택적 활성을 나타내는 8번을 compound B로 설정하고 분리·정제를 시도하였고, 이를 위한 HPLC 조건은 하기 표에 나타내었다.



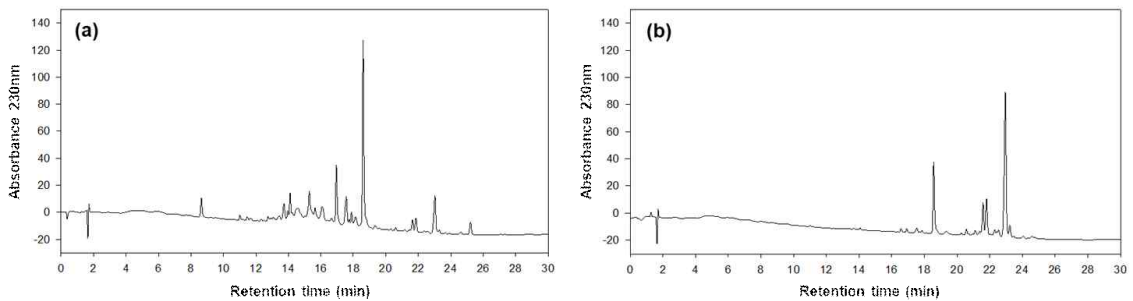
<그림 41. 꽃마름병 제어용 기능성 이차대사산물의 분리·정제를 위한 Scheme>



<그림 42. 유기용매를 이용해 추출한 추출물의 항균활성 평가>

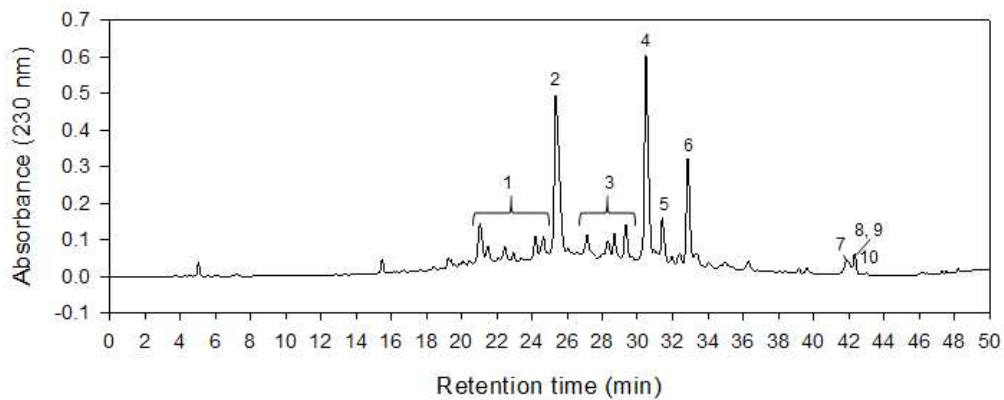


<그림 43. SPE cartridge 용리액의 항균활성 평가>

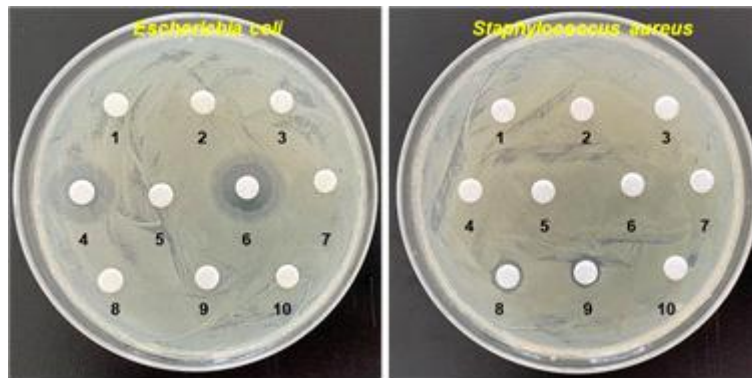


<그림 44. SPE cartridge를 이용하여 획득한 (a) 30%, (b) 60% 아세토니트릴 용리액의 HPLC chromatogram>

Operating condition	
HPLC system	Waters HPLC
Column	X-bridge C18 OBD™ (19 × 250mm, 5μm)
Solvent	A:95% H ₂ O, 5% ACN containing 0.05% TFA B:95% ACN, 5% H ₂ O containing 0.05% TFA
Method	5-45% for 40min
Detector	UV _{230nm}
Flow rate	10mL/min

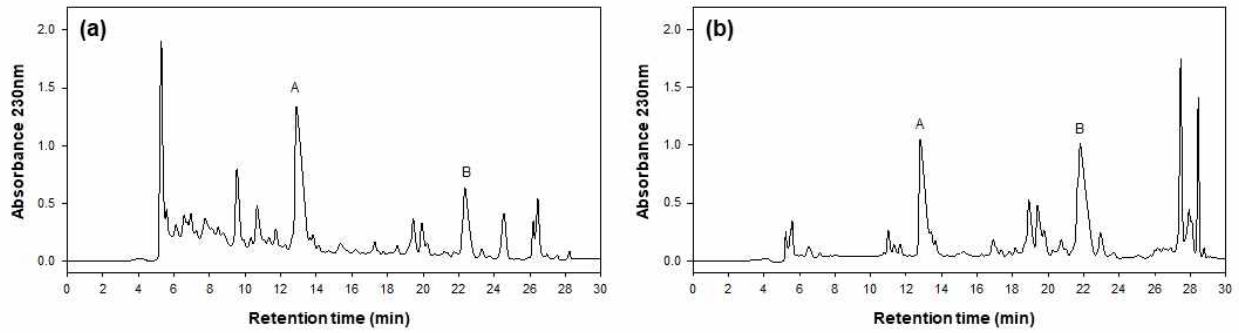


<그림 45. 30% 아세토니트릴 용리액의 HPLC chromatogram>

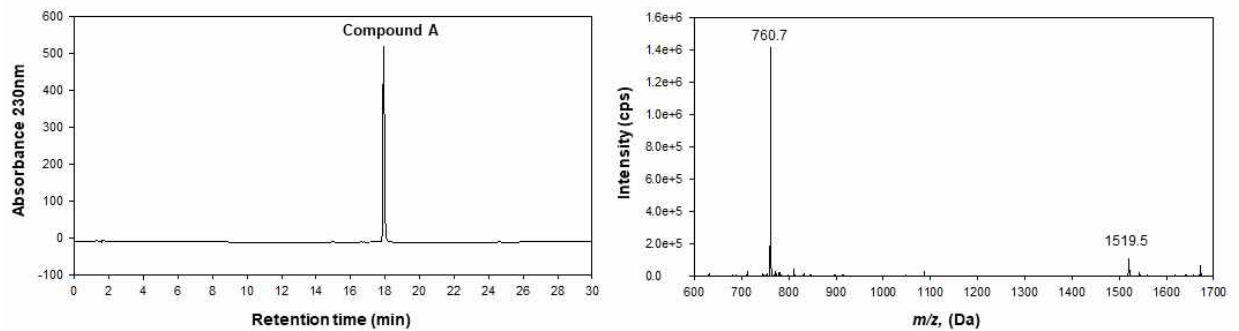


<그림 46. 30% 아세토니트릴 용리액의 HPLC chromatogram>

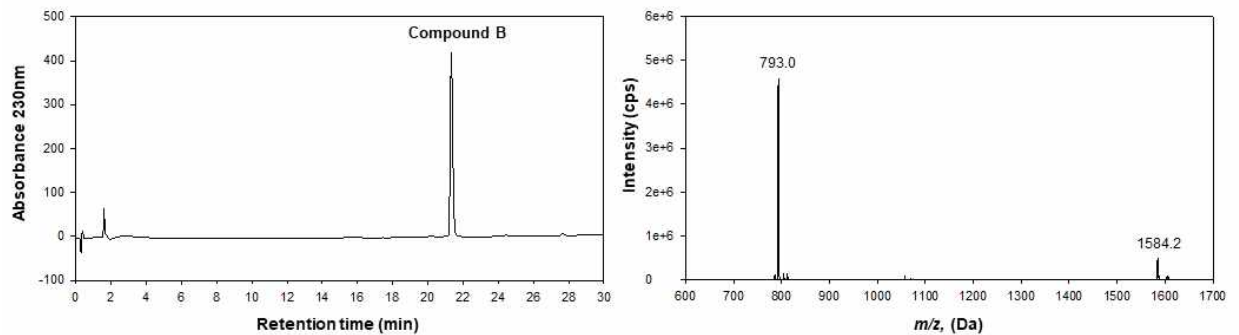
Operating condition	
HPLC system	Waters HPLC
Column	X-bridge C18 OBD™ (19 × 250mm, 5μm)
Solvent	A:95% H ₂ O, 5% ACN containing 0.05% TFA B:95% ACN, 5% H ₂ O containing 0.05% TFA
Method	25-45% for 20min
Detector	UV _{230nm}
Flow rate	10mL/min



<그림 47. 순수 분리·정제를 위한 HPLC chromatogram (a) 30%, (b) 60% 아세토니트릴 용리액>



<그림 48. 순수하게 분리·정제된 compound A의 LC-MS chromatogram>



<그림 49. 순수하게 분리·정제된 compound B의 LC-MS chromatogram>

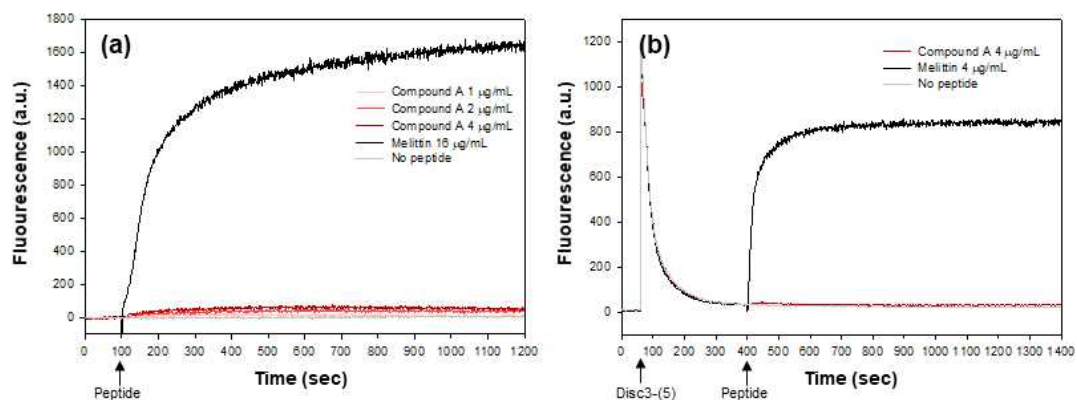
⑦ 기능성 이차대사산물의 in vitro 효능 검증

분리·정제된 기능성 이차대사산물의 풋마름병원균 제어 능력 효능을 검증을 위해 Agar diffusion method와 최저저해농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 평가를 시도한 결과, 그람음성균인 풋마름병원균 대체 시험균 *E. coli*에서 compound A의 최저저해농도가 1 μ g/mL으로 매우 강한 활성을 나타냈으며, compound B는 그람양성균에서 2 μ g/mL의 최저저해농도를 가지는 것을 확인하여 각각의 compound는 강한 항균 활성과 뛰어난 선택성이 있다고 판단하였다. 차후 구조 분석 및 작용기작 실험은 그람음성균인 풋마름병원균 대체 시험균 *E. coli*에 강력한 활성을 나타내는 compound A에 대해 진행하였다.

Strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	A	B	Melittin
Bacteria (Gram-negative)			
<i>Escherichia coli</i> (KCTC 1682)	1	8	8
<i>Escherichia coli</i> (ML 35)	1	8	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KCTC 1637)	1	64	16
Bacteria (Gram-positive)			
<i>Bacillus subtilis</i> (KCTC 3068)	16	2	4
<i>Staphylococcus aureus</i> (KCTC 1621)	>128	2	4

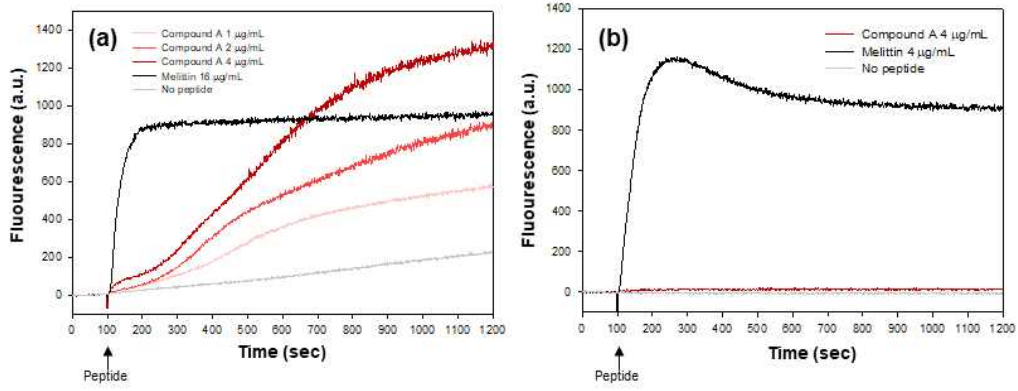
⑧ 기능성 이차대사산물의 작용기작 구명 및 안전성 분석

기능성 이차 대사산물의 항균 작용기작 구명을 위해 fluorescent dye를 이용한 실험을 진행한 결과, Compound A는 세포막에 영향을 미치지 않았기 때문에, DNA binding 여부를 판단하기 위해 SYTOX green uptake assay를 추가적으로 진행하였다. 시험균으로는 그람 음성균인 *E. coli*와 그람 양성균인 *S. aureus*를 사용하였고, 대조군으로 세포막을 파괴하는 멜리틴 펩타이드를 사용하였다. 대조군 펩타이드의 경우, 최저저해농도의 2배를 처리하였을 때 핵산과 빠르게 결합하여 형광의 세기가 증가하는 것을 확인하였다. 또한, Compound A를 *E. coli*에 대해 최저저해농도 1x, 2x, 4x 농도로 처리 시 농도 dependent 경향성을 보이며 형광 세기가 증가하는 것을 확인하였다.



<그림 50. Compound A의 (a) *E. coli* (b) *S. aureus*에 대한 membrane depolarization assay>

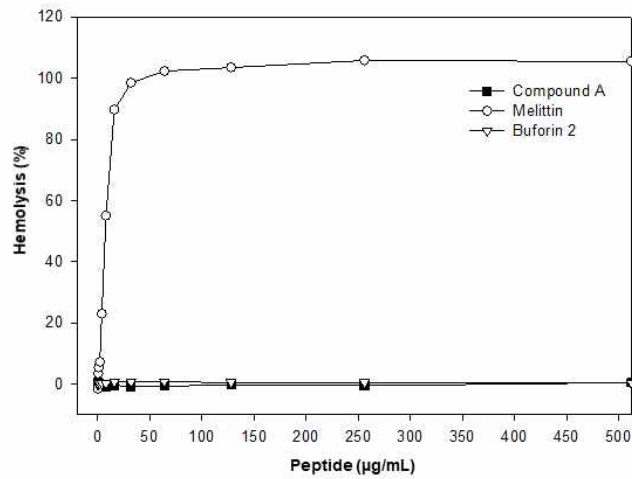
Operating condition	
Instrument	HITACHI F-4500 FL spectrophotometer
Cuvette	Hellma. 101. 650QG
Buffer	1xPBS
Dye	0.1 μM SYTOX green nucleic acid stain



<그림 49. Compound A의 (a) *E. coli* (b) *S. aureus*에 대한 SYTOX green uptake assay>

⑨ 기능성 이차대사산물의 안전성 분석

순수하게 분리·정제된 compound A의 안전성을 sheep blood 적혈구의 용혈현상 이용해 분석한 결과, Compound A의 안전성 평가 결과 512 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 처리하여도 용혈현상이 일어나지 않아 세포독성이 없음을 확인하였다.



<그림 51. 용혈반응을 이용한 compound A의 안전성 분석>

(2) 정량적 연구개발성과

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		2019~2021	계	가중치 (%)
	연구개발과제 특성 반영 지표	특허출원	목표(단계별)	2	2
실적(누적)			2	2	20
특허등록		목표(단계별)	1	1	20
		실적(누적)	0	0	0
기술이전		목표(단계별)	1	1	30
		실적(누적)	1	1	30
기술료		목표(단계별)	-	-	-
		실적(누적)	30,000천원	30,000천원	-
학술발표		목표(단계별)	4	4	10
		실적(누적)	4	4	10
인력양성		목표(단계별)	2	2	10
		실적(누적)	2	2	10
홍보전시		목표(단계별)	1	1	10
		실적(누적)	1	1	10
계	목표(단계별)	11	11	100	
	실적(누적)	11	10	80	

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2020 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지엄	서선일	2020.06.25	수원컨벤션센터 (e-컨퍼런스)	대한민국
2	2020 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지엄	김주은	2020.06.25	수원컨벤션센터 (e-컨퍼런스)	대한민국
3	제48회 한국미생물생명공학회	서선일	2021.06.23	부산 BEXCO	대한민국
4	제48회 한국미생물생명공학회	김정은	2021.06.23	부산 BEXCO	대한민국

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Bacillus siamensis</i> JC-18	KCTC14159BP	한국생명공학연구원	2020
2	<i>Bacillus velezensis</i> JC-6	KACC92358P	국립농업과학원	2021

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	특허출원	대한민국	이철원 김주은 김평일 서선일	2020. 04.03	10-2020- 0040685	-	-	-	-	100	-
2	특허출원	대한민국	김평일 서선일 이철원 김주은 김정은	2021. 09.06	10-2021- 0118614	-	-	-	-	100	-

[경제적 성과]

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상실시권	바실러스 시아멘시스 JC-18 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 식물병 방제용 조성물	(주)마이크로자임	2021.07.30.	30,000,000원	-

[사회적 성과]

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	김주은	2020	1					1				1	
2	김예지	2020		1				1				1	

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	지방일간지	광주타임즈	(재)농축산용미생물센터-전남대, 바실러스 시아멘시스 JC-18 균주 최초 분리	2021.09.07.

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항 - 해당사항 없음

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 유용미생물 발굴·효능검증	○ 잣빛곰팡이 및 풋마름 병해 제어용 각각 5종 이상, 복합제어용 2종 이상	100%
○ 유용미생물 안전성 및 특성 분석	○ 시제품의 병해 제어 효능 및 약해·독성 검증	100%
○ 대량배양용 배지 및 발효조건 최적화	○ 바이오리액터를 이용한 최적배지 개발 및 5L, 100L 발효기를 이용한 대량배양 조건 확립	100%
○ 유용미생물 대량배양, 제형화 및 농가 현장적용	○ 1.5톤, 10톤 대용량 발효기를 활용한 대량배양 scale-up 및 춘천 소재 토마토 농가 현장적용	100%
○ 사용매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅	○ 희석배수, 처리 시기·방법·횟수, 보관방법 등 미생물 제제 사용 매뉴얼 보급 및 교육·컨설팅	100%

4. 목표 미달 시 원인분석

- 정량적 성과 중 2차년도 특허등록 1건(바실러스 시아멘시스 JC-18 균주 이의 배양액을 포함하는 식물병 방제용 조성물)이 특허청 등록을 위한 최종 심사가 지체되어 연구기간 내 등록 불가, 연구종료후 성과로 등록할 예정

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 친환경, 고부가가치/선도형 농가를 위한 주요 토마토 병원균 방제 비용 및 부대비용 절감을 위한 방제 기술 보급
- 토마토 병원균(꽃머름병, 잿빛곰팡이병) 방제 종합관리 매뉴얼 개발에 의한 농업 현장 애로사항 해결
- 친환경 미생물제제의 사용으로 포괄적이며 지속 가능한 농업으로 발전하기 위한 원천기술 확보
- 기능성 미생물제제의 방제 및 활성 기작 구명을 통한 효과적인 병원균 방제 방법 개발
- 대량배양 및 제형화 기술 개발을 통한 유용미생물제제의 실용화 시스템 개발

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	1	
	국외		
	계	1	
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전	1	
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

7. 참고 문헌

1. Kim, S. Y., M. K. Sang, H-Y Weon, Y-A Jeon, J. H. Ryoo, and J. Song. 2016. Characterization of multifunctional *Bacillus* sp. GH1-13. *Korean J. Pestic. Sci.* 20: 189-196.
2. Lim, S. M., M-Y Yoon, G. J. Choi, Y. H. Choi, K. S. Jang, T. S. Shin, H. W. Park, N. H. Yu, Y. H. Kim and J-C Kim. 2017. Diffusible and Volatile Antifungal Compounds Produced by an Antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against Various Phytopathogenic Fungi. *Plant Pathol. J.* 33(5): 488-498.
3. Chung, S. H., H. M. Lim and S. D. Kim. 2007. Formulation of stable *Bacillus subtilis* AH18 against temperature fluctuation with highly heat-resistant endospores and micropore inorganic carriers. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 217-224.
4. Glick, B. R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. 2012: 1-15.
5. Bernal, G., A. Illanes, and L. Ciampi. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Electron. J. Biotechnol.* 5: 12-20.
6. Lamsal Kabir, Kabir Lamsal, S. W. Kim, Y. S. Kim, and Y. S. Youn, 2013, Biocontrol of Late Blight and Plant Growth Promotion in Tomato Using Rhizobacterial Isolates *J. Microbiol. Biotechnol.* 23(7): 897-904.
7. Cai, X.-C., Liu, C.-H., Wang, B.-T. and Xue, Y.-R. 2017. Genomic and metabolic traits endow *Bacillus velezensis* CC09 with a potential biocontrol agent in control of wheat powdery mildew disease. *Microbiol. Res.* 196: 89-94.
8. M.A.A. Seleim, F.A. Saeed, K.M.H. Abd-El-Moneem and K.A.M. Abo-ELyousr. 2011. Biological control of bacterial wilt of tomato by plant growth promoting rhizobacteria plant *Plant Pathol. J.* 10(4): 146-153.
9. Mondol, M. A. M., H. J. Shin, and M. T. Islam. 2013. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* Species: Chemistry and biological activity. *Mar. Drugs.* 11: 2846-2872.
10. Nam, M. H., M. S. Park, H. G. Kim and S. J. Yoo. 2009. Biological control of strawberry *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 Formulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19(5): 520-524.
11. Nam, H. S. 2011. Environmentally-friendly agriculture & biotic pesticide. *KIC News* 14: 12-18
12. Velivelli, S. L. S., P. De Vos, P. Kromann, S. Declerck, and B. D. Prestwich. 2014. Biological control agents: From field to market, problems, and challenges. *Trends Biotechnol.* 32: 493-496.
13. Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, and W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *64*: 655-671.
14. Ongena, M, and Jacques, P. 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16: 115-125.
15. Aleti, G, Sessitsch, A, and Brader, G. 2015. Genome mining: prediction of lipopeptides and polyketides from and related Firmicutes. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13:

192-203.

16. Mendes, R, Garbeva, P, and Raaijmakers, JM. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS Microbiol. Rev. 37: 634-663.
17. Stein, T. 2005. Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol. Microbiol. 56: 845-857.
18. 송재경, 원향연, 김다연, 안재형, 전영아, 김완규, 2016. 신규미생물 바실러스 메틸로트로피쿠스 GH1-13과 이를 함유하는 미생물제제 및 미생물농약. 특허 제10-1667541호
19. 박준경, 서선일, 한귀환, 김공민, 김대혁, 송재경, 김평일. 2018. 복합기능미생물 Bacillus velezensis GH1-13을 이용한 미생물제형 개발 및 생물학적 특성. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal. 33(4): 237-246.
20. 박준경, 김주은, 이철원, 송재경, 서선일, 봉기문, 김대혁, 김평일. 2019. 복합기능성 Bacillus velezensis GH1-13 균주의 대량배양 최적화 및 특성. Korean J. Org. Agric. 27

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	319110-2		
사업구분					
연구분야				과제구분	단위
사업명	농축산물안전유통소비기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	토마토 병해 예방·방제용 미생물제제 대량생산 및 현장적용 기술 개발			과제유형	개발
연구개발기관	2019.09.25.~2021.09.24			연구책임자	김평일
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2019.09.25.~ 2020.09.24.	75,000	75,000	150,000
	2차년도	2020.09.25.~ 2021.09.24.	75,000	75,000	150,000
	계		150,000	150,000	300,000
참여기업	-				
상대국	-	상대국연구개발기관	-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021. 11. 19.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(재)농축산용미생물산업육성지원센터	기획실장	김평일

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 토마토 병해(잿빛곰팡이병, 풋마름병) 방제를 위한 기능성 미생물제제 개발 및 현장적용을 통해 친환경 농업의 저변 확대, 신뢰도 제고 및 농가 소득증대에 기여할 괄목할 만한 성과를 도출함
- 또한 개발한 연구성과의 기술이전으로 관련 분야 기업체의 매출 증대에도 기여할 것으로 판단됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 토마토 잿빛곰팡이 및 풋마름병 방제를 유용미생물의 선발, 효능검증, 성분 및 구조분석, 기작 구명 등 학술적 가치가 매우 큼
- 기능성 미생물에 대한 지식소유권 확보, 기술이전 및 향후 제품등록을 통한 매출 증대로 관련 분야 산업체의 매출 증대에 기여할 것으로 예상됨
- 화학농약 대체제로서 기능성 미생물제제의 활용을 통한 친환경 농업 발전에 기여함으로써 사회적 측면에 부합됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 기능성 미생물에 대한 학술적 가치를 통한 교육 활용자료, 지식재산권 획득 및 기술이전을 통한 제품등록으로 산업체의 매출 증대에 기여, 토마토 병해(잿빛곰팡이병/풋마름병) 동시 방제를 통한 농가의 비용 절감 및 소득증대 기여함

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 토마토 병해 방제용 기능성 미생물 선발, 효능검증, 대량배양 최적화, 시제품 제작 및 현장 적용 등 본 연구의 당초 계획대로 성실히 수행하였음
- 또한 본 연구의 계획서에 제시한 정성·정량적 성과목표를 달성하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지식소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 본 연구를 통해 특허출원 2건, 등록 예정 1건, 논문 게재 예정 1건, 기술이전 1건(정액기술료 30,000천원) 등 우수한 성과를 도출함.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
유용미생물 발굴·효능검증	15	100	- 기능성 미생물 10종 이상 발굴·효능 검증 - 풋마름병 및 잿빛곰팡이 제어용 각각 5종 이상, 복합 제어용 2종 이상
유용미생물 안전성 및 특성 분석	20	100	- 생육 특성 및 대사산물 분석 - 시제품의 병해 제어 효능 및 약해·독성 검증
대량배양용 배지 및 발효조건 최적화	20	100	- 바이오 리액터와 반응표면분석법 이용 저비용·고효율 최적배지 개발 - 5~100L 발효기 활용 대량배양 조건 최적화
유용미생물 대량배양, 제형화 및 농가 현장적용	30	100	- 2~10톤 발효기 활용 대량배양 scale-up 및 최적화 - 최적 제형(액상, 분상 수화제 등) 개발 - 시제품 제작 3건 이상(세균병 제어, 곰팡이병 제어, 복합기능 각각 1건 이상)
사용매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅	10	100	- 유용미생물제제 사용 매뉴얼 1권 - 희석 배수, 처리 시기·방법·횟수, 보관 방법 등
합계	100점	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 연구를 통한 토마토 병해 방제용 미생물(잿빛곰팡이 대상 5종, 풋마름병 대상 5종, 복합기능 2종) 선발, 선발된 주요 미생물의 대사물질(유효성분) 분석 및 안전성 검증, 기작 구명, 구조분석 등 학술적 가치를 달성함
- 주요 선발 미생물에 대한 대량생산용 최적 배지 및 발효공정 확립, 시제품 3종(잿빛곰팡이 방제용, 풋마름병 방제용, 생육촉진용) 개발을 통한 농가 현장적용을 통한 토마토 생산량(수확량) 증대 기여함
- 특허출원 2건, 등록 예정 1건, 기술이전 1건(정액기술료 30,000천원) 등 연구 성과물을 기반으로 향후 산업체의 제품등록 및 매출 신장에 기여할 것으로 판단됨
- 또한 미생물제제를 활용한 토마토 병해 방제 등 친환경 농업 저변 확대, 비용 절감, 농가 소득증대 등 경제적/사회적 측면에서 크게 기여할 것임

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 기능성 미생물제제를 활용한 생물학적 방제로 토마토 병해 및 타 작물로의 스펙트럼 확대
- 지식재산권의 통상실시로 관련 분야 다수의 산업체에 기술이전 및 맞춤형 제형개발을 통해 다양한 제품개발 및 매출증대에 기여할 것임

IV. 보안성 검토 - 해당사항 없음

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	토마토 병해 예방·방제용 미생물제제 대량생산 및 현장적용 기술 개발			
주관연구개발기관	(재)농축산용미생물산업육성지원센터	주관연구책임자	김평일	
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타(농협-역매칭)	총연구개발비
	150,000,000원	-	150,000,000원	300,000,000원
연구개발기간	2019. 09. 25 - 2021. 09. 24 (24개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 유용미생물 발굴·효능검증	- 잿빛곰팡이병 제어용 16종, 풋마름병 제어용 10종, 복합제어용 2종 선발
② 유용미생물 안전성 및 특성 분석	- 생육 특성 및 대사산물 분석 - 시제품의 병해 제어 효능 및 약해·독성 검증
③ 대량배양용 배지 및 발효조건 최적화	- 바이오 리액터를 이용한 저비용·고효율 최적배지 개발 - 최적 탄소원, 질소원 및 배양조건 확립 - 5L, 100L 발효기 활용 대량배양 조건 최적화
④ 유용미생물 대량배양, 제형화 및 농가 현장적용	- 1.5톤, 10톤 대용량 발효기를 활용한 대량배양 scale-up - 최적 제형(액상) 개발 - 시제품 제작 3건 이상(세균병 제어, 곰팡이병 제어, 복합기능 각각 1건 이상) - 춘천 소재 토마토 농가 현장적용
⑤ 사용매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅	- 희석 배수, 처리 시기·방법·횟수, 보관 방법 등 미생물 제제 사용매뉴얼 제작·보급 및 교육·컨설팅

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용액) (이전)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	평 균 1 건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	20	20			30	-								10		10		10		
최종 목표	2	1			1									4		2		1		
당해 년도	목표	2	1		1									4		2		1		
	실적	2	-		1	30								4		2		1		
달성률 (%)	100	-			100									100		100		100		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	
②	
③	

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술										
②의 기술										
③의 기술										

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	
②의 기술	
③의 기술	

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용액) (이)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	평 균 건 수	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치	20	20			30									10	10	10				
최종목표	2	2			2									4	2	1				
연구기간내 달성실적	2	-			1									4	2	1				
연구종료후 성과창출 계획	-	2			1									-	-	-				

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	바실러스 시아멘시스 JC-18 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 식물병 방제용 조성물		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농축산물안전생산유통관리기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농축산물안전생산유통관리기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.