

최 중
연구보고서

저항성 유도물질 및 항균물질 생산
미생물을 이용한 고추 탄저병의
환경친화적 방제제 개발

Development of Environment-friendly
Control Agents for Pepper Anthracnose
using Microorganisms which Produce
Antifungal or Resistance-Inducing
Substances

연구기관
충북대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “저항성 유도물질 및 항균물질 생산 미생물을 이용한 고추 탄저병의 환경친화적 방제제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 20 일

주관연구기관명: 충북대학교
총괄연구책임자: 차 병 진
세부연구책임자: 차 병 진
협동연구기관명: 대전대학교
협동연구책임자: 신 광 수
협동연구기관명: (주)흙살림
협동연구책임자: 이 태 근

요 약 문

I. 제 목

저항성 유도물질 및 항균물질 생산 미생물을 이용한 고추 탄저병의
환경친화적 방제제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리의 식생활에서 빼놓을 수 없는 고추는 우리나라 전체 채소 재배면적의 약 25%를 차지하는 주 경제작물로서 그 재배면적은 최근 몇 년간 해마다 조금씩 줄기는 하지만 2003년도에도 여전히 63,150 ha라는 넓은 재배면적으로 가지고 있다. 생산량 또한 매우 많아서 2003년 기준으로 풋고추는 218,163 ton에 달했고 건고추도 132,010 ton에 이르렀음에도 불구하고 해마다 많은 양을 중국 등 외국으로부터 수입해 들고 있는 실정이다. 우리 음식에는 어느 것에나 다 들어간다고 할 수 있으며, 소비 또한 엄청나서 많은 양을 수입하고 있음에도 불구하고 최근 재배면적이 다소나마 줄은 이유는 몇 가지 병 때문에 수확량을 보장받을 수 없다는 것도 중요한 이유 중의 하나라고 할 수 있다.

실제로 고추에는 역병, 탄저병, 흰가루병, 더듬이병 등 큰 피해를 주는 병들이 몇 가지 있는데, 그 중에서도 특히 역병과 탄저병은 고추의 재배를 위협하고 있다고 하여도 지나친 말은 아니다, 탄저병은 불완전균류의 *Colletotrichum* spp.에 의하여 나타나는 병으로, 쉽게 전염되고 전파되어 발병이 심한 해에는 고추의 수확량이 평년의 절반에도 미치지 못하는 등 고추재배에서는 가히 최대의 적이라고 일컬어진다.

탄저병과 역병을 방제하기 위하여 고추 농가들은 안정된 생산을 위하여 해마다 엄청난 양의 유기 합성 살균제를 사용하고 (현재 품목등록 되어있는 살

균제는 고추 탄저병에 약 30종임) 있는 실정으로서, 농가의 입장에서는 화학적 방제에 많은 비용이 지출되고 있으며, 현재 우리 나라에서 사용 중인 살균제는 거의 외국에서 원제를 수입하거나 로열티를 지불하는 것들로서, 해마다 막대한 양의 외화가 소비되어 국가적으로도 큰 손실요인이다. 또한, 합성살균제의 과다사용은 환경생태계에 나쁜 영향을 미치고 농가의 경제적 부담을 가중시킬 뿐만 아니라, 병원균의 저항성 균주 출현을 조장하여 기존 살균제의 효과가 갈수록 떨어지고 있으며, 그에 따라 병 방제가 해가 갈수록 더욱 어려워지고 있는 실정이다.

그러나, 정작 그것보다 더 큰 문제는 국민소득의 향상에 따라 환경에 대한 일반인들의 관심이 증가하고 있고, 깨끗하고 안전한 먹을거리에 대한 소비자들의 욕구 또한 날로 증가하고 있다는 사실이다. 고추 탄저병과 역병을 방제하기 위한 약제살포는 고품질 청결고추 생산에 큰 걸림돌이 되고 있으며, 실제로 청정 농산물을 선호하는 소비자들에게 농산물에 대한 불신을 심어주고 있는 실정이다. 그러므로, 소비자들의 신뢰를 얻을 수 있는 청결고추 생산을 위해서 가장 우선적으로 해결해야 하는 것이 바로 탄저병과 역병의 환경친화적 방제이다.

병의 환경친화적 방제를 위해서는 크게 두 가지를 생각할 수 있다. 첫째가 저항성 품종의 재배인데, 일부 작물에서는 저항성 또는 내병성 유전자를 이용한 병 저항성 작물이 개발되어 실용화하고 있는 예도 많으나, 불행하게도 고추에서는 아직까지 역병이나 탄저병 저항성 품종이 개발되지 않고 있는 실정이다. 최근에는 우리나라의 일부 연구진들이 고추에서 효과적인 형질전환 기술을 확립하였으나, 아직까지 탄저병에 대한 식물병 방어 유전자로 형질전환된 고추를 만들어 내지는 못하였다. 그 원인으로서 현재 고추 탄저병에 대한 저항성 유전자로 밝혀진 것이 거의 없다는 것을 들 수 있다. 따라서, 외래 유전자 도입을 통한 신품종 개발도 어려운 실정이다.

또 다른 대안이 될 수 있는 것은 미생물제제(생물농약)의 개발이다. 다양한 환경에서 분리한 항균물질 또는 저항성 유도물질 생산 미생물들을 이용한 병 방제는 인축에 대하여 안전하며 환경에 대한 부담이 거의 없고, 특히 저항성균주 출현가능성을 낮추기 때문에 고품질 청정고추 생산에 필수적이기도 하다. 또한, 환경친화적인 미생물제의 개발은 유기합성 살균제의 사용량을 줄여서 청

정 고추 생산에 큰 기여를 하고 외화를 절약할 뿐만 아니라, 개발된 제품을 국
외에 수출하여 외화획득 가능성도 기대할 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 고추 탄저병 등에 길항력을 보이는 미생물 또는 미생
물이 생산하는 기주식물의 저항성 유도물질 및 항균물질을 찾아내고 길항미생
물의 대량생산 체계를 확립함으로써 **고추 탄저병의 환경친화적 방제제를 개발하
고자하였다.**

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

고추 탄저병의 환경친화적 방제제를 개발하기 위하여 다음과 같은 연구를 수
행하였다.

고추 탄저병균 등에 대한 길항미생물의 특성 및 병 방제효과 조사

고추 탄저병과 역병 등에 길항력을 보이는 미생물을 동정하고 생태적 특
성을 파악하며, 다른 길항미생물 및 기타 농자재와의 상호작용을 조사하였
다. 또한 길항미생물의 토양 및 엽면 처리에 따른 정착능력과 병 방제효과
를 검정하고 개선하여 주요 고추 병의 환경친화적 방제제를 개발하고자 하
였다.

- 토양, 식물등 다양한 환경에서 길항균 추가분리
- 선발 길항균의 분류학적 특성 조사 및 역가 검정 (*in vivo*)
- 선발 길항균의 배양 최적 조건 및 배지 선발
- 길항미생물의 근권 또는 엽면 정착능력 확인
- 길항미생물 간의 길항효과 검정
- 길항미생물의 토양 및 엽면 처리에 의한 고추 병 방제효과 검정
- 길항효과 포장시험
- 길항미생물 조합처리에 따른 방제가 변화조사
- 길항미생물에 대한 기존 살균제와 환경친화적 농자재의 영향

길항미생물의 항균활성물질 및 저항성 유도물질 탐색과 생산성 향상

병 억제효과를 보이는 조추출물로부터 항균활성 물질 및 저항성 유도물질을 순화하고 동정하며 작용기작을 알아내었다. 또한, 길항미생물의 물질 최적 생산조건과 대량배양법을 확립하였다.

- 고추 배양세포의 확보, 병원균 추출물의 항균활성 화합물 유도 확인
- 길항미생물 배양체로부터 항균성 물질 및 저항성 유도물질 조추출
- 조추출물의 주요 고추병 억제효과 검정 (*in vitro*)
- 항균활성 물질 및 저항성 유도물질의 순화 및 동정
- 선발 길항미생물의 대량 배양 및 순화
- 물질 최적 처리조건 확립
- 길항미생물의 항균성 물질 및 저항성 유도물질 최적 생산조건 확립
- 항균성 물질의 고추병 방제효과 검정 (*in vivo*)

고추 탄저병의 환경친화적 미생물 농약 생산기술 확립

길항미생물의 성장특성 및 그에 영향을 미치는 요인들을 알아내고, 보호제를 찾아내어 저투입 대량생산체계를 확립하였다. 또한, 생균제, 추출물제 등 미생물제의 종류와 제형에 따른 처리법을 확립하고 방제효과를 조사하였다.

- 길항미생물의 탄소원 및 질소원 이용능력, 최적 pH 및 온도 조사
- 배지 구성에 따른 길항력의 차이 조사 (*in vitro*)
- 포자 형성 조건 탐색
- 스킴밀크, 지오라이트 등 미생물 보호제 선발
- 저가 탄소원 및 질소원 선발
- 제형개발 및 제형에 따른 길항력 차이 검정 (*in vitro*)
- 각 제형에 따른 시간대별 미생물 활성(제품 안정성)조사
- 제형별 포장적용 시험

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

1) 길항미생물의 특성 및 길항력

충북의 여러 지역으로부터 분리한 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides*의 군사생육을 억제하는 길항미생물로서 모두 3균주를 선발하였으며, 이들은 형태 및 생화학적 특성검정과 지방산 분석 등의 검정방법을 통하여 각각 *Streptomyces halstedii*, *S. violaceus-niger*, *Bacillus subtilis*로 동정되었다. 또한, 연구를 수행하여 가는 과정에서 길항균이 자라는 배지를 오염한 *Bacillus subtilis* 균주를 하나 더 선발하여 모두 4균주의 길항미생물이 선발되어 제형화를 최종목표로 하여 몇 가지 연구를 수행하였다.

이 길항미생물들은 *Colletotrichum gloeosporioides*의 군사생육과 포자발아를 약 70% 이상 억제하였는데, *C. gloeosporioides* 이외에 역병균인 *Phytophthora capsici*, 잿빛곰팡이병균인 *Botrytis cinerea*, 등 주요 식물병원균에 대해서도 높은 길항능력을 가지고 있었다.

2) 길항미생물의 대량배양

최적 생육조건 및 길항력 발현 조건은 각 균주의 특성에 따라서 조금씩 차이가 있기는 하였으나, 일반적으로 온도는 25-30℃, 그리고 pH는 6.5-7.5 정도였다. 이들은 모두 항진균성을 나타내는 물질을 생산하는 것으로 밝혀졌으며, 여러 종류의 배지에서 모두 잘 자라는 것을 확인하였다. 또한, 대량배양을 할 때는 둥근 공모양의 20 ℓ 짜리 bioreactor에서 잘 배양되었으며, 대개 약 5-7 일 정도 배양하면 균 밀도가 약 10^9 - 10^{10} cfu/ml 정도까지 이르게 할 수 있는 방법도 확립되었다.

3) 길항미생물의 식물체 정착력 및 병 방제력

길항미생물의 실용화 가능성을 알아보기 위한 방법의 하나로서 길항미생물의 근권 및 엽권에서의 정착률을 조사한 결과 식물체 표면에 처리하였을 때 대부분의 균들이 식물체 표면에 부착은 잘하는 것으로 밝혀졌으나, 일정 기간

뒤의 재분리율은 그리 높지 않았다. 균 밀도는 지상부에서보다 지하부에서 상대적으로 더 안정하게 유지되었다. 길항균과 계면활성제를 함께 처리하면 균의 식물체 표면 부착력이 높아져서 균 밀도 비교적 오랫동안 유지되는 것으로 나타났다.

이들을 고추에 처리하였을 때 온실과 포장 모두에서 일정 수준 이상의 방제력을 보이고 있었으며, 역시 배양액의 2배 희석 처리구에서 10배 희석 처리구보다 병 발생이 더 적었다. 온실실험에서는 모두 60% 이상의 방제가를 보였으며, BS238의 방제가가 가장 높았다. 반면에 포장실험에서는 모든 길항미생물이 45-60%의 방제가를 보이고 있어, 온실실험에서보다는 방제가들이 모두 줄어들었다. BA313의 방제가가 60% 정도로 가장 높았으며, 본 실험에서는 대조살균제인 프로피의 방제가도 60%에 못미쳤다.

한편, 현재 고추 탄저병 방제용으로 등록되어 있는 살균제들은 모두 길항균들의 생육에 영향을 미치지 않았으나, 다만 차세대는 모든 길항균들의 생육을 억제하였다. 또한, 대부분의 목초액과 키토산은 길항미생물의 생육을 약간 억제하고 있었다.

4) 탐색과 동정

본 연구에서 선발한 4 균주의 길항미생물 중 주로 BS238과 KS03에 대하여 연구를 수행하였다. 이 두 균주는 모두 고추 탄저병균 *C. gloeosporioides*의 생육을 억제하는 물질을 생산하고 있었는데, 길항미생물이 정지기 (stationary phase)에 들어서면서부터 항진균성 물질이 생산되는 것을 알았다. 항진균성 물질의 생산은 길항미생물이 사멸기 (death phase)에 도달했을 때 항진균성 물질의 생산이 최대가 되는 것으로 보인다.

이 물질들을 분리하여 FTIR과 MALDI MS/MS spectra 등의 방법으로 조사한 결과 주성분이 iturin A인 것으로 밝혀졌다.

5) 최적 생산조건 확립

BS238과 KS03의 최적 생육조건은 기내배양에서 찾은 조건들과 큰 차이가 없었으며, 탄소원으로는 glucose가 가장 좋은 효과를 보였으며, 그 다음이 fructose와 lactose였다. 질소원으로는 soytone 등 대부분의 유기질소원들이 좋은 효과를 보였으나, 그 중에서도 ammonium sulfate와 tryptone에서 가장 좋

은 효과를 보여 주었다. 저가의 산업용 배지에 배양하였을 때는 균 밀도 증가율도 매우 늦기만 했을 뿐만 아니라, 병원균 억제물질의 생산량도 많지 않아서 병 방제효과는 오히려 더 떨어지는 것으로 보인다. 따라서, 일단은 본 연구에서 선발한 배지에서 균을 배양하며, 한편으로는 저가의 산업용 배지에 대한 탐색도 같이 병행하여야 할 것이다.

6) 미생물 보호제의 선발

선행 연구에서 선발한 4 균주의 길항미생물 중 주로 BS238과 TH-04에 대하여 연구를 수행하였다. 부형제의 선발에서 일라이트 0.1% 첨가구에서는 30일, 60일 이후 각각 2.3×10^9 cfu/ml, 1.7×10^9 cfu/ml로 균밀도가 유지됨에 따라 부형제로써 일라이트가 가장 적당한 것으로 판단되었다. 또한, 균 배양액의 안정성을 높여줄 수 있는 보호제로서는 처리구 중 Mg^{++} 와 Ca^{++} 의 첨가구에서 무처리에 비하여 대체로 높은 균밀도가 유지되었으므로 Mg^{++} 를 선발하였다.

7) 미생물 대량배양 조건

제제화를 목적으로 길항미생물을 대량으로 생산하기 위한 조건들을 보면 탄소원으로는 glucose, 질소원으로는 yeast extract와 soybean meal을 선발하였으며, 배양온도는 약간 높아서 약 38°C 정도, pH 6.5, 그리고 공기주입량은 1 v/v/min 정도였다. 또한, 교반 속도가 증가할수록 균 밀도도 증가하였으므로 120 rpm으로 교반하여 주는 것이 가장 좋았다.

8) 미생물제의 제형 비교

액상과 분말상으로 미생물제를 제조하고자 하였는데, 액제는 길항미생물을 바이오리액터에서 배양한 원액을 사용하였으며, 분말제를 만드는 재료로는 펄라이트와 알지네이트를 선발하였다. 보호제로는 일라이트가 가장 좋았다. 하지만, BS238을 가지고 만든 액상수화제의 경우에는 방제가가 80% 가까이 나타났지만, 분말수화제의 경우에는 방제가가 45-60% 정도로서 기대에 못 미치는 수준이었다. 또한, 일라이트 등 광물질과 혼합 건조하여 제형화한 제제는 BS238 배양액 자체를 활용한 제제에 비하여 방제효과가 다소 낮아질 뿐만 아니라 처리 후 약혼이 남기 때문에 앞으로 광물질을 사용할 때는 이러한 점에 유의하여야 할 것이다.

9) 미생물제 제조

이상에서 얻은 결과를 토대로 본 연구의 협동연구기관인 (주)흙살림에서 BS238을 원 균주로 하여 미생물제 ‘잇살림 4’를 생산하는데 성공하였다<그림>. 잇살림 4는 농약으로는 아직까지 등록되지 않았으나, 등록을 목표로 꾸준히 개선해 가고 있으며, 현재 4종 비료로 등록을 마치고 몇 달 전부터 회원농가들에 한하여 판매를 시작한 액상미생물제제이다. 실제 농민들로부터 나오는 여러 가지 지적은 본 미생물제제를 개선해 가는데 많은 도움이 될 것으로 생각한다.



<그림> 본 연구에서 선발한 *Bacillus subtilis* BS238 균주를 사용하여 (주)흙살림이 만든 고추 탄저병 방제용 미생물제제

2. 활용에 대한 건의

본 연구의 목표는 고품질 청정고추의 생산을 위해 탄저병에 의한 피해를 줄일 수 있는 환경친화적 방제법의 일환으로 탄저병 방제용 미생물제제를 개발하고자 하는 것이었으며, 처음에 목표하여던 대로 미생물제를 생산하는데 성공하였다. 이 미생물제제는 협동연구기관으로 본 연구에 참여한 (주)흙살림에 의

하여 생산되어 (사)흙살림의 회원농가들에 공급되고 있다.

하지만, 이 제제는 고추 탄저병 방제용으로 개발되었음에도 불구하고 아직까지 미생물농약으로 등록을 하지 못하였기 때문에 현재 미생물비료(4종복합)으로 등록되어 유통되고 있다. 현행 규정에 의하면 최소한 2년 이상 걸리는 농약 등록시험을 거치지 않은 제품은 농약으로 등록할 수 없도록 금지되어 있다. 본 제품도 이러한 시험과정을 거치지 않았기 때문에 고추 탄저병 방제용으로 유통시키는 것은 법을 어기는 행위이다. 따라서, 현재까지는 본 제품을 생산하는 (주)흙살림의 협력기관인 (사)흙살림의 회원농가들에게만 제공하고 있다.

연구를 수행한 궁극적 목표는 효과적인 고추 탄저병 방제용 미생물제제를 개발하여 많은 농민들이 사용할 수 있도록 하는 것이었지만, 규정을 준수한다고 볼 때 본 연구기간 동안 미생물농약으로 등록까지 하는 것은 시간적으로 불가능한 일이었다. 다만, 누구나가 쉽게 사용할 수 있도록 하기 위해서는 하루 빨리 미생물농약으로 등록하는 것이 무엇보다 중요하다.

현재 많은 회원농가들이 본 제품을 사용하면서 평가를 해 주고 있다. (주)흙살림에서는 이러한 사용자들의 의견을 모두 수집하고 있으므로, 그 의견들을 분석하여 보완할 점을 보완하고 새롭게 개선한다면 조만간에 훨씬 더 나은 효능과 편리성을 갖춘 제품을 생산할 수 있을 것으로 기대한다. 그 이후 정식 등록 시험을 거쳐서 미생물농약으로 등록하고 일반 농민들에게도 제공할 수 있다면 청정고추의 생산에 조금이나마 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

SUMMARY

Among the microorganisms which are antagonistic to pepper anthracnose diseases caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, 3 isolates were selected finally by *in vitro* antagonistic activity assay. On the basis of morphology, biochemical characteristics, and fatty acid analyses (MIDI) assay, those were identified to be isolates of *Streptomyces halstedii*, *S. violaceus-niger*, *Bacillus subtilis*. Another antagonists which contaminated the culture and belongs to *Bacillus subtilis*, was included, too.

All of these antagonists (*S. halstedii* TH-04, *S. violaceus-niger* BA313, *B. subtilis* BS238, *B. subtilis* KS03) suppress more than 70% of mycelial growth and spore germination of the pathogen, *C. gloeosporioides*. Besides, these antagonists also showed antagonistic activity to other major plant pathogens such as *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*.

Optimum conditions for the growth of the antagonists were investigated to set up the method for large culture of the them. Even though each antagonist had its own characteristics, the optimum conditions for their growth and antagonism were as follows: temperature 25-30°C, pH 6.5-7.5. All the isolates seemed to produce antagonistic substances and they grew quite well on the general culture media for microbes. In large scale culture, bioreactor of bulbous flasks of 20 ℓ was the best for the culture of the antagonists and the density of the antagonists reached to 10⁹-10¹⁰ cfu/ml within 5-7 days.

When the antagonists had been sprayed to the surface of the plant, most of them attached to leaf or root surface very well. However, just a small number of the isolates had been re-isolated from the plant surfaces. Density of the antagonists were more stable under the ground than the plant surface. Density of the antagonists were maintained without much change by mixed application of antagonists. Both in greenhouse and field trials, all the antagonistic isolates suppress the disease to a certain extent

and showed the control rate higher than 60%. BS238 recorded the highest control rate. In field trial, on the other hand, the control rates was lower than their greenhouse experiments. However, propineb, the best fungicides for the control of pepper anthracnose, recorded as low control rate as less than 60%.

Almost all of the fungicides which had been registered to be a fungicide for anthracnose did not affect the growth of the antagonists. On the other hand, the fungicide 'ChaSeDae' suppressed the growth of all the isolates. Chitosan and wood vinegar affected the growth of the antagonists a little.

At least two antagonists, BS238 and KS03, produced the substances which inhibits the growth of *C. gloeosporioides*. This antifungal substances became to be produced from the stationary phase and the productivity of this substances record to its highest after the antagonists got into the death phase. The antifungal substance was isolated and identified to 'iturin A' through FTIR and MALDI MS/MS spectra methods.

At last, new microbial fungicides were tried to be developed with BS238 and TH-04. As an additive, ilite 0.1% was the best and the density of the antagonist reached to 2.3×10^9 and 1.7×10^9 cfu/ml 30 and 60 days after, respectively.

In the research for the development of microbial fungicide formulation, the best conditions for the mass production were as follows: glucose for carbon source, yeast extract and soybean meal for nitrogen source. The optimum temperature was 38°C and the optimum pH was 6.5. Shaking of 120 rpm was recommended that the density of the antagonists increased by the increase of shaking speed.

Antagonists were tried to be both powder (P) and soluble concentration (SC). Culture itself of the antagonist in the bioreactor was counted as a stock SC of the antagonist. The materials for the production of powder was perlite, alginate, and ilite. The SC of BS238 showed over

80% of control rate. However, other formulations such as a powder, the control rate for the disease was as low as 45-60%. Another disadvantages of the powder formulation was the fact that the wettable powder application leaves stains on the surface of a plant.

On the basis of these results, one factory of this research project, HeukSaLim Ltd. Co., developed a commercial microbial formulation, 'IpSaLim 4'. IpSaLim 4 is a SC and has not been enrolled as a fungicide. It is still renovating for the enrollment. At present, IpSaLim 4 is releasing to the members of HeukSaLim to pick up the problems.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	23
Chapter 2. Research background and current status	27
Section 1. Status and problem of domestic technology	27
Section 2. Status and problem of foreign technology	29
Chapter 3. Results and Discussion	31
Section 1. Characteristics and control effect of microbes antagonistic to pepper anthracnose	31
1. Selection of antagonists	31
2. Characteristics of antagonists	34
3. Development of mass culture system for antagonists	50
4. Disease suppression effects of antagonists	52
5. Effect of agricultural resources on the antagonism	67
Section 2. Research on the antagonistic and resistance-inducing substances and enhancement of productivity	75
1. Cell culture of pepper line	75
2. Search and identification of antifungal and resistance-inducing substances	75
3. Optimum condition for antagonistic substance production	89
Section 3. Development of environmentally friend microbial fungicides for pepper anthracnose	95
1. Optimization of antagonistic substance production process	95
2. Formulation of antagonists	97
3. Field trials of formulations of antagonists	117

Chapter 4. Achievement and devotion	127
1. Achievement of research objective	127
2. Devotion to related field	130
Chapter 5. Application plans of research results	133
1. Future plans for Industrialization	133
2. Application to other researches	133
3. Need for additional research	133
Chapter 6. Novel foreign informations collected	135
Chapter 7. Reference	139

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	23
제 2 장	국내외 기술개발 현황	27
	1. 국내 기술현황과 문제점	27
	2. 국외 기술현황과 문제점	29
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	31
제 1 절	고추 탄저병균 등에 대한 길항미생물의 특성 및 병 방제효과 조사	31
	1. 길항미생물 선발	31
	가. 병원균 확보 및 길항균 수집 및 분리	31
	1) 병원균 분리	31
	2) 길항균 분리 및 선발	32
	2. 길항미생물의 특징	34
	가. 분류학적 특성 조사	34
	1) TH-04	34
	2) MIDI를 이용한 동정	35
	3) BS238	36
	4) KS03	36
	나. 길항력 검정	36
	1) TH-04	39
	2) BA313	44
	3) BS238	46
	다. 배양 최적조건 확립	47
	1) TH-04	47
	2) BA313	49
	3) BS238	50
	3. 길항미생물의 대량배양 시스템 확립	50
	4. 길항미생물의 병 억제 효과	52

가. 근권 또는 엽권 정착능력	52
1) <i>Bacillus subtilis</i> BS238	52
2) <i>Streptomyces violaceus-niger</i> BA313	56
3) <i>Streptomyces halstedii</i> TH-04	59
나. 길항미생물 간의 상호작용	59
다. 길항효과 정량화 및 방제가 결정	61
1) <i>Bacillus subtilis</i> BS238 배양액 농도별 기내 항균활성 실험	61
2) 포트 재배 고추묘를 이용한 BS238 배양액 농도별 방제효과 검정	62
라. 병 방제 효과	63
1) 탄저병균과 길항균의 동시접종에 의한 방제효과	63
2) <i>In vivo</i> 접종실험(온실)	65
3) 포장 실험	67
5. 기타 농자재와의 상호관계	67
가. 길항미생물에 대한 기존 살균제의 영향	67
1) 프로피 수화제에 대한 BS238의 반응	68
나. 환경친화적 농자재가 길항미생물에 미치는 영향	71
1) 액배양	71
2) 고체배양	73
제 2 절 길항미생물의 항균활성물질 및 저항성 유도물질 탐색과 생산성 향상	75
1. 고추 배양세포 확보	75
2. 항균활성물질 및 저항성 유도물질의 탐색과 동정	75
가. 항균활성물질 및 저항성유도물질 조추출	75
나. 조추출물의 병 억제 효과 검정	76
다. 항균물질 및 저항성 유도 물질의 순화 및 구조 동정	79
3. 길항물질 최적 생산 조건의 확립	89
가. pH의 영향	89
나. 탄소원의 영향	89
다. 질소원의 영향	89
라. 각종 배지에서의 저해능	93
제 3 절 고추 탄저병의 환경친화적 미생물 농약 생산 기술 확립	95
1. 길항물질 생산공정 최적화	95

가. 길항미생물의 탄소원, 질소원 요구성 및 최적 pH와 온도	95
나. 배지 조성에 따른 길항력의 차이 조사 (<i>in vitro</i>)	96
다. 포자 형성 조건 탐색	96
2. 길항미생물의 제제화	97
가. 미생물 보호제 선발	97
1) 보호제 선발과 보호제 첨가량 및 보관 온도에 따른 밀도 변화 조사... 97	
2) 2가 이온을 활용한 보호제 선발	97
나. 저가 탄소원 및 질소원 선발	99
1) 저가 탄소원 선발	99
2) 저가 질소원 선발	101
3) 선발배지와 시판배지에서의 균밀도 비교	104
다. 배양 온도에 따른 균밀도 변화	106
라. pH에 따른 균밀도 변화	107
마. 공기 주입량에 따른 밀도 변화	107
바. 임펠러 회전 속도에 따른 밀도 변화 (Jar fermenter 수준)	109
사. Fermenter와 Jar fermenter를 이용한 최적 배지, 최적 조건에서의 균밀도 변화 비교	111
아. 제형에 따른 길항력 차이 <i>in vivo</i> 검정	111
1) 분말제 제조1	111
2) 분말제 제조2	112
3) 분말제 제조3	114
4) alginate를 이용한 제형화	115
5) 제형에 따른 길항력 실내검정	116
3. 길항미생물제제의 포장 적용시험	117
가. 제형별 미생물제 안정성	117
1) 부형제의 종류에 따른 제형	117
나. 제형에 따른 고추 탄저병 방제효과 검정	121
다. 단일 및 복수 제제 처리의 방제효과 검정	122
1) 2003년도 포장시험	122
2) 2004년도 포장시험	124

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	127
1.	연구개발 목표의 달성도	127
2.	관련분야에의 기여도	130
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	133
1.	기업화 추진방안	133
2.	타연구에의 응용	133
3.	추가연구의 필요성	133
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	135
제 7 장	참고문헌	139

제 1 장 연구개발과제의 개요

우리의 식생활에서 빼놓을 수 없는 채소의 하나인 고추를 *Colletotrichum* spp.에 의한 탄저병과 살균제 등 여러 가지 인공화합물의 위협으로부터 안정적으로 생산하기 위하여 고추 탄저병 등에 길항력을 보이는 미생물 또는 미생물이 생산하는 기주식물의 저항성 유도물질 및 항균물질을 찾아내고 길항미생물의 대량생산 체계를 확립함으로써 고추 탄저병 등의 환경친화적 방제제를 개발하는 것이 본 연구의 목적이다.

고추 (*capsicum annuum* L.)는 우리나라 전체 채소 재배면적의 약 25%를 차지하는 주 경제작물로서 비교적 높은 온도를 좋아하는 다년생 농작물이지만 우리나라에서는 기후 여건상 재배기간이 약 6-7개월로 한정되어 있다. 우리나라에 처음으로 도입된 것은 1614년 일본으로부터였으며, 1960년대 접어들면서 고추 수요의 증대와 신품종의 보급, 재배법 개선 등으로 현재의 재배 면적은 57,000ha정도이며 연간 소비량은 193,000톤 정도이다(47).

고추에는 탄저병, 역병, 더듬이병, 모자이크병 등을 비롯하여 28종의 병이 보고되어 있으며, 이 중에서 역병과 탄저병에 의한 감수 정도가 해마다 매우 심각하다. 특히 고추 탄저병은 *Collectotrichum gloeosporiodes*를 비롯하여 *C. coccodes*, *C. dematium*, *C. nigrum*, *C. graminicola*, *C. atramentarium*, *C. acutatum* 등에 의해서 발병되는데, *Colletotrichum* spp.는 쉽게 전염되고 전파되며 주로 열매를 감염하기 때문에 생산물의 품질이 떨어지고 수확량이 감소하여 농가의 피해가 크다. 고품질 청정 고추 생산에 있어서 가장 우선적으로 해결해야 하는 것이 바로 탄저병과 역병의 방제라는 것에는 누구든 이의를 제기할 여지가 없다.

화학적 방제법을 제외하고는 뚜렷한 방제법이 없기 때문에 탄저병의 방제는 주로 살균제의 사용에 의존하고 있는 형편이며, 현재 고추 탄저병 방제용으로 품목 등록 되어있는 살균제가 30종에 이른다는 사실로부터도 알 수 있듯이 고추 탄저병과 역병을 방제하기 위하여 해마다 엄청난 양의 유기합성 살균제를 사용하고 있다. 이러한 유기합성물질의 사용은 자연환경의 오염을 유발함은 물론 대부분의 경우에 있어서 저항성 병원균이 나타나거나 기존의 살균제 효과가 감소하는 경향이 있고 안전한 농산물을 선호하는 소비자들에게는 식품으로써 안전성을, 생산자

에게는 채소로서의 청정성을 떨어뜨리는 요인이 되고 있다.

탄저병을 효과적으로 방제하기 위해서는 저항성 품종의 육성과 보급을 시발점으로 하여 재배 방법과 화학적 방제법을 개선하는 것과 아울러 미생물을 이용한 생물학적 방제까지 전 범위에 걸쳐서 면밀한 검토를 하여야 할 것이다.

그러나, 고추는 아직까지 효과적인 형질전환 기술이 개발되어 있지 않으므로 식물병 방어 유전자등 외래 유전자 도입을 통한 신품종 개발은 어려운 실정이다.

또한 화학적 방제는 현재로서는 고추의 안정적 생산에 가장 큰 기여를 하고 있는 방법이지만 하나 현재 사용 중인 살균제는 거의 외국에서 원제를 수입하는 것들로서 해마다 막대한 양의 외화가 소비되고 있으며, 환경보호론자들의 지적에도 불구하고 유기합성 살균제의 사용량은 꾸준히 늘고 있고 또한 거기에 상대적으로 많은 방제비용의 지출되고 있는 형편이다. 이러한 현실은 국민소득 향상과 환경에 대한 관심의 증가에 따라 깨끗하고 안전한 먹을거리에 대한 욕구가 날로 증가하고 있는 소비자들의 기호와는 정면으로 대치되는 것이라는 점 또한 문제가 될 수 있다.

이러한 여러 가지 문제를 해결할 수 있는 방법 중 가장 가능성이 높은 것으로 생물적 방제법의 개발을 들 수 있으며, 생물적 방제법의 핵심은 미생물의 이용이라고 할 수 있다. 다양한 환경에서 분리한 항균물질 또는 저항성 유도물질 생산 미생물들을 이용한 병 방제는 인축에 대하여 안전하며 환경에 대한 부담이 거의 없다. 특히 저항성균주 출현가능성을 낮추어 고품질 청정고추 생산에 필수적임이 분명하다. 선진국에서는 20-30년 전부터 여러 종류의 미생물농약이 개발되어 실용화 되어 있으며, 이 중 일부는 국내에도 수입되어 유통되고 있는 것으로 알려져 있다. 환경친화적인 미생물제의 개발은 유기합성 살균제의 사용량을 줄여서 청정 고추 생산에 큰 기여를 하고 외화를 절약할 뿐만 아니라, 개발된 제품을 국외에 수출하여 외화획득 가능성도 기대할 수 있는데, 현재 우리나라의 미생물제 연구 및 생산기술은 선진국과 비교하여 큰 차이를 보이고 있지 않으므로 집중적인 연구개발을 통하여 미생물제 산업을 국제적으로 이끌어 갈 토대를 마련할 수 있을 것으로 생각한다.

또한, 환경친화적인 미생물제의 개발은 환경친화적으로서 고품질 청정 농산물을 찾는 소비자들을 끌어당기는 매력적인 요소가 될 것이며, 안정된 생산에 기여하여 고추 가격을 안정화시키며, 소비자에게 양질의 농산물을 공급할 수 있는 토

대가 마련될 것이다.

따라서 본 연구에서는 고추 탄저병 방제용 미생물제제의 개발을 위하여 고추 탄저병균 등에 대한 길항미생물의 특성 및 병 방제효과를 조사하고, 길항미생물의 항균활성물질 및 저항성 유도물질을 탐색하여 그 생산성 향상시키며, 마지막으로 고추 탄저병의 환경친화적 미생물 농약 생산기술 확립하고자 하였다. 그 구체적인 내용으로 우선 고추 탄저병과 역병 등에 길항력을 보이는 미생물을 동정하고 생태적 특성을 파악하였으며, 길항미생물의 생장특성 및 그에 영향을 미치는 요인들을 파악하였다. 이들 미생물을 이용한 생균제, 추출물제 등 미생물제의 종류와 제형에 따른 토양 및 엽면 처리 등 처리법을 확립하고 방제효과를 조사하였으며, 보호제를 찾아내어 저투입 대량생산체계를 확립하고자 하였다. 한편, 병 억제효과를 보이는 길항미생물의 조추출물로부터 항균활성 물질 및 저항성 유도물질을 순화하고 동정하며 작용기작을 알아내었으며, 길항미생물의 물질 최적 생산조건과 식물체에의 길항미생물 처리조건을 확립하였다. 또한, 다른 길항미생물 및 기타 농자재와의 상호작용을 조사하여 본 연구에서 개발한 길항미생물들을 고추 재배에 사용하는 여러 가지 농자재들과 함께 사용할 수 있는지 확인하였다. 마지막으로 길항미생물의 대량배양법을 확립한 다음 제제화하여 온실 및 포장에서 실제로 고추 탄저병에 대한 방제효과를 조사함으로써 고추 탄저병의 환경친화적 방제제를 개발하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 기술현황과 문제점

여러 가지 식물 병에 대한 생물학적 방제에 대한 연구는 환경에 대한 스트레스의 절감과 인축에 대한 안정성 등의 장점 때문에 상당히 오래 전부터 시작되었으나 생물적 방제제의 개발에 대한 본격적인 연구는 최근 약 30년 정도에 집중적으로 이루어져 왔다.

국내에서의 연구는 80년대 후반부터 생물적 방제에 대한 연구가 태동하기 시작하여 90년대에 들어오면서 활발하게 진행되었으며, 그 결과 현재 상당수 미생물 균주가 병 방제용으로 특허등록 되어 있다. 초기에는 농촌진흥청의 현 농업과학기술원과 대학교를 중심으로 연구가 진행되었으나, 최근에는 (주)경기이노베이티브바이오킷롤, 그린바이오텍(주), (주)흙살림, 넬바이오(주) 등 여러 벤처기업이 이 분야 연구와 실용화에 참여하고 있다.

농업과학기술원에서는 *Bacillus subtilis*를 선발하여 그린바이오텍(주)와 공동으로 이를 이용한 미생물 농약 AC-1을 개발하여 미생물농약으로 품목등록 한 바 있으며, 또한 같은 기관의 분자유전과에서는 농과원에서 보관하고 있는 균주와 새로 분리한 균주 등 수백 균주를 대상으로 벼 도열병균(*Pyricularia oryzae*), 여러 식물의 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*) 등 몇 가지 주요 식물병원균에 대한 항균력을 조사한 결과, 강한 길항력을 보이는 균을 상당수 확보하고 있다고 알려져 있다. 특히, 이 균주들 가운데 일부에서 항균성을 보이는 내열성 polypeptide를 분리하였으며, 이 peptide를 생합성하는 유전자를 클로닝하여 발현시켰다는 보고도 있다.

그 밖에도 생명공학연구소 생물소재센터 등 연구기관을 비롯하여 (주)LG화학, 동부한농(주), (주)경농 등에서도 차세대의 주력산업으로 예상되고 있는 미생물농약에 많은 관심을 가지고 개발 중이거나 또는 개발을 계획 중이다.

대학에서는 고려대학교의 황병국 교수, 동아대학교의 문병주 교수, 경상대학교의 박창석 교수, 김희규 교수 등이 고추와 딸기, 오이 등 여러 작물을 대상으로 생물적 방제를 연구하여 좋은 결과를 얻고 있으며, 경상대학교의 정영륜 교수는 자신이 연구개발한 균주를 이용하여 잣빛곰팡이병을 방제하는 ‘토리’ 시리즈를 생산하여 일반 농가에 판매 보급하고 있다.

현재 우리나라에는 30여 업체에서 약 60종의 미생물제를 생산, 판매하고 있는 것으로 이야기되고 있으나 이들의 거의 대부분은 아직까지 미생물 농약으로 정식

등록되지는 않은 것들이며, 그 효과에 대한 검증이 정확하게 이루어진 바도 없었다. 또한, 외국, 주로 일본으로부터 공식적, 비공식적으로 수입되어 병 방제에 효과가 있다는 설명과 함께 팔리는 미생물제의 수도 국내에서 생산되는 이상인 것으로 추정되고 있으나 이들 제품에 대한 성분검사나 효능검사가 이루어진 경우도 없는 것으로 알고 있다. 그런 중에도 다행인 것은 국가적으로 몇 년 전에 미생물 농약등록 기준이 마련되어 미생물농약의 연구 개발 및 실용화에 박차를 가하는 계기가 마련된 것이며, 이에 힘입어 현재 몇 종의 미생물살균제가 모든 요건을 충족하고 정식으로 등록되어 있다.

그러나 정식 등록 여부에 관계없이 그리고 생산국에 관계없이 고추 탄저병 미생물제는 찾아보기 힘든 형편이다.

본 연구진에서도 본 연구를 시작하기 전부터 다양한 환경으로부터 많은 길항미생물들을 분리 동정하여 길항효과를 검정하여 왔으며, 이들 중 주요 식물 병원균에 대하여 길항력을 보이는 균주들을 확보하여 왔다. 이들 가운데 일부는 in vitro 시험에서 고추 탄저병균인 *Colletotrichum* spp.와 역병균인 *Phytophthora capsici*, 그리고 잣빛곰팡이병균 *Botrytis cinerea* 등에 대하여 길항력을 가지고 있음을 확인하였다. 이들은 대치배양에서 병원균의 생육 억제, 뚜렷한 저지대를 형성함으로써 생육억제물질 생산능력을 보여주었으며, 고추 열매에 처리하였을 때 무처리구와 비교하여 병발생이 현저하게 줄어드는 결과를 얻기도 하였다.

또한, 본 연구에 참여한 대전대학교의 신광수 교수팀은 항균성 물질의 분리 동정은 물론, 식물의 저항성을 유도하는 병원균 또는 비병원균 유래 물질 및 그 기작에 대하여 수년간 연구하여 온 결과 상당한 노하우를 축적하였으며, 이에 대해 다수의 논문을 발표하여 왔다. 대표적인 예를 들면, 고추 배양 세포에 jasmonic acid 100 μ M을 투여했을 때 배양액으로 capsidiol이 유리됨을 확인하였으며, biotic elicitor로 알려진 cellulase (3 μ g/ml), yeast extract (500 μ g/ml), arachidonic acid (2 mM)을 투여했을 때에도 배양액으로 capsidiol이 유리됨을 관찰하기도 하였다. 또한, 당근 배양 세포에 methyl jasmonate (MJ) 투여시 phytoalexin인 *p*-hydroxy benzoic acid (PHBA)가 배양액으로 유리됨을 확인하였고, 이러한 PHBA의 생성을 극대화할 수 있는 elicitor 선정을 위해 여러 종류의 elicitor를 현탁 배양세포에 elicitation시킨 결과 10 kDa 이상의 yeast extract가 최적임을 확인한 바 있다.

본 연구에 참여한 또 다른 연구팀은 친환경농자재를 생산 판매하고 있는 (주) 흙살림으로서, 약 10여년 동안 농업용 미생물자재를 생산하여 온 벤처기업이며 기능성 미생물의 산업화에 많은 노하우를 축적하고 있다.

이상의 선행 연구 결과에서 보듯이 병원균 길항미생물이나 식물 면역 활성제의

사용은 식물병의 환경친화적 방제에 많은 가능성을 보여주고 있다.

2. 국외 기술현황과 문제점

1920년대 말 방선균을 이용하여 감자 더듬이병을 방제하려 시도한 이래 지금까지 여러 나라에서 많은 연구가 이루어졌다. 현재 세계적으로 *Bacillus thuringiensis* 등 60여 균주가 병 방제효과를 가진 미생물로 등록되어 있는데, 가장 성공한 생물농약은 뿌리혹세균병을 방제하기 위한 *Agrobacterium radiobacter* 제제였으며, 그 이후 *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp. 등 세균 및 방선균과 *Gliocladium* spp., *Trichoderma* spp., 비병원성 *Fusarium* spp. 등 곰팡이가 생물농약으로 개발되어, 모잘록병, 뿌리썩음병, 시들음병, 저장병 등의 방제에 이용되고 있다.

오늘날 경제 작물의 병원 미생물에 대한 저항성 제고 연구는 이미 농업 선진국에서 활발히 추진되고 있으며 대사공학 등과 같은 유전자 조작을 통하여 내병, 내스트레스성 transgenic plant를 만들어 생산성을 증대시키려는 연구가 수행 중이다.

선진국의 경우 생물적 방제의 연구수준은 매우 앞서 있으나, 식물병 방제에서 국내 수준과 국제 수준과의 격차가 가장 적은 부분이 바로 생물적 방제라고 할 수 있다. 특히 길항균 탐색과 선발 분야에서는 우리나라의 수준이 선진외국에 비하여 결코 뒤떨어지지 않는 상황이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 고추 탄저병균 등에 대한 길항미생물의 특성 및 병 방제효과 조사

1. 길항미생물 선발

가. 병원균 확보 및 길항균 수집 및 분리

1) 병원균 분리

연구 개시 이후 충북 지역에서 수집한 병든 고추들을 표면소독한 뒤 PDA 상에서 병원균들을 분리하고, 문헌 및 분리균의 형태에 기초하여 균을 동정하였다. 순수분리된 균들은 현재 실험실 내에서 사면배지 및 살균수법으로 보관하고 있다.

충북 각 지역으로부터 고추 탄저병균을 200 여 균주 분리하여 이들을 포자의 형태와 문헌자료에 근거하여 *Colletotrichum gloeosporioides*로 동정하였으나, 그 이후 중합효소연쇄반응(PCR)에서 상당수의 균주들이 *Colletotrichum acutatum*을 타겟으로 하는 프라이머에 의하여 증폭됨으로써 모두를 *C. gloeosporioides*로 확인하는 것이 불가능해졌다. 특히, 본 실험실에서 분리하여 *C. gloeosporioides*로 동정, 보관 중인 균주 중 임의로 5균주를 선발하여 PCR로 검사한 결과 모두 *C. acutatum*으로 밝혀짐에 따라서, 우리나라 또는 적어도 충북지역 고추 탄저병균의 우점종은 *C. gloeosporioides*가 아니라 *C. acutatum*일 가능성도 배제할 수 없는 결과를 얻었다. 이 부분에 대해서는 앞으로 좀 더 조사할 필요가 있다고 하겠으나, 예전에는 효과가 좋던 탄저병방제약제들이 최근 몇 년 전부터 약효가 떨어지고 있다는 농민들의 말을 종합해 볼 때, 그리고 본 연구에서 이러한 사실을 밝힌 이후 수행한 충북대학교 농과대학 진균병학실험실의 연구에서도 대부분이 *C. acutatum*이라는 결과를 얻었기 때문에 그 가능성은 매우 높은 것으로 생각한다.

지금까지 알려진 바와 달리 우점종이 다른 이유는 두 가지로 추측할 수 있는데, 첫째는 우점종의 천이가 일어났을 것이라는 추측이고, 둘째는 예전의 우점종에 대한 동정이 잘못되었으리라는 것이다. 현재로서는 우점종의 천이가

가능성이 더 큰데, 그 이유는 실제로 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*은 특정 살균제들에 대한 반응성이 달라서, 일본에서는 이 둘을 구분하는 기준으로 이 살균제들에 대한 교차저항성을 이용하기도 하기 때문이다. 우리나라에서의 살균제 효과 변동은 바로 이 우점종의 천이 때문일 가능성이 높은 것으로 생각한다.

또한, 고추 탄저병균 외에도 고추 역병균 *Phytophthora capsici*를 4 균주 보관하고 있으며, 잣빛곰팡이병균 *Botrytis cinerea*도 3 균주를 확보하였으나, 본 연구의 목적이 고추 탄저병균의 방제제 개발이므로 병원균 수집에 있어서도 주로 탄저병균 확보에 주력하였다.

또한, 농업미생물균주보관센터로부터 *Colletotrichum* spp. 8종을 분양 받아 길항균 선발 시험에 사용 중이다.

2) 길항균 분리 및 선발

또한, 길항균 선발을 위하여 고추 밭 토양은 물론, 산림토양, 도서지방 토양, 갯벌, 식물조직 등 다양한 환경으로부터 균을 분리하여 각각의 균을 PDA 상에서 고추 탄저병균과 대치배양하여 두 균 사이에 생기는 저지대의 크기를 기준으로 길항균을 선발하였다. 선발된 길항균은 보관균주를 만들어 보관하며, 필요할 때마다 꺼내어 사용하고 있다.

길항균은 아래 <표1>에서 보는 바와 같이 충북지역을 중심으로 하여 우리나라 몇 지역의 토양으로부터 분리를 시도하였는데, 실제로 뛰어난 길항력을 보이는 균주는 많지 않았다. 아래 표 이외에도 약 500 여 균주를 분리하여 조사하였으나 역시 눈에 띄는 길항효과를 보이는 균을 찾기는 어려웠으며, 다행이도 *Trichoderma* sp.로 보이는 균주 하나가 우수한 길항력을 보였으며, 또한 곰팡이라는 특성 때문에 상당한 관심을 가지고 조사하였으나 결과는 그리 좋지 않았다. 그 밖에도 본 실험실에서 이미 확보하고 있던 방선균 1종 (*Streptomyces* sp. TH-04), 농업과학기술원으로부터 분양 받은 세균 1종 (*Bacillus subtilis* 238: BS238)도 함께 미생물제 후보균으로서 길항효과를 실험하였다.

아래 <표1>의 결과를 포함하여 약 1,000여 균주를 조사하였으나 본 실험실에서 이미 확보하고 있던 TH-04나 BS238보다 나은 균주를 찾을 수 없었으

며, 다만 부안의 갯벌에서 분리한 방선균 한 균주(BA313)만을 선발하였다. 또한, 실험을 수행하는 과정에서 배지를 오염하였던 균 중에서 매우 높은 길항 활성을 보이고 있는 한 균주(KS03)를 선발하여 여러 가지 다음 연구를 수행하였다. 즉, 본 실험에서 길항균으로 선발하여 사용한 균주는 TH-04, BA313, BS238, KS03 등 4균주였다.

〈표1〉 길항균 조사지역 및 균주 수

지역	분리원	분리균주	길항균 후보
충주	토양	20	-
제천	"	7	-
음성	"	48	1
보은	"	66	-
괴산	"	28	-
진천	"	9	-
기타	"	23	2
부안	"	80	-
김제	"	68	-
부안(갯벌)	"	10	1
옥천	식물체	56	6
옥천	토양	56	8
총계		471	17

이미 확보하고 있던 TH-04와 새로 선발한 BA313 균주가 고추 탄저병균에 대해 나타내는 길항력은 아래 <표2>와 같다.

<표2> 고추 탄저병균 군사생육 및 포자 발아 억제 시험

균주번호	억제효과(%)	
	군사 생육 억제효과	포자 발아
TH-04	66	78.4
BA313	50.8	100
6-13	49.6	-
EB-9	42	95.8

2. 길항미생물의 특징

가. 분류학적 특성 조사

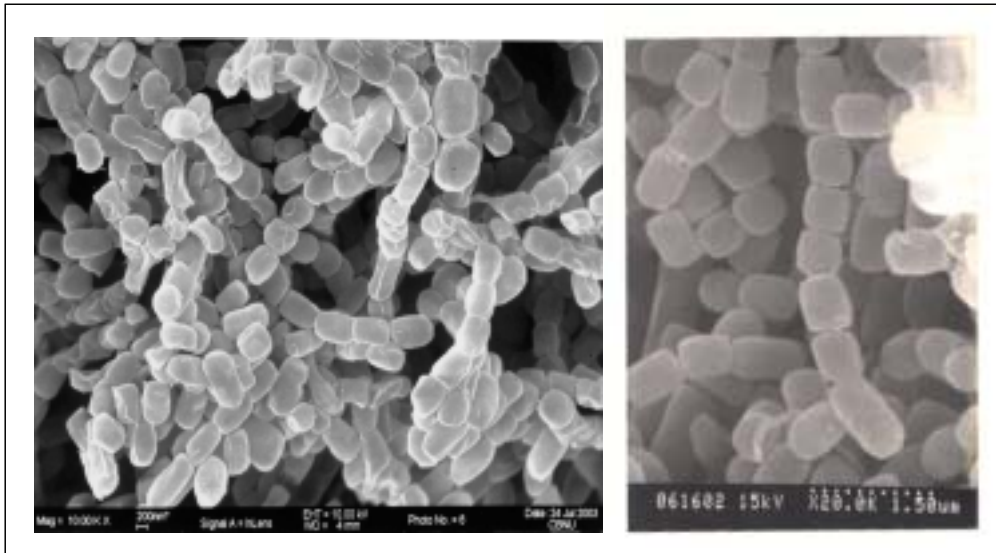
1) TH-04

선발한 길항균 중에서 가장 효과 좋은 TH-04 균주의 동정을 위하여 여러 가지 시험을 수행하였다. 우선 International Streptomyces Project(ISP)의 표준 배지인 ISP4 무기염류녹말배지(soluble starch 10 g, CaCO₃ 2 g, (NH₄)SO₄ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, NaCl 1 g, ZnSO₄·7H₂O 1 mg, FeSO₄·7H₂O 1 mg, MnCl₂·7H₂O 1 mg, agar 20 g, distilled water 1 L) 에 균주를 배양하여 주사전자현미경으로 포자사슬 모양을 관찰하였다. 또한, 녹말-카세인-질산 배지에서 3일간 배양 후 세포벽을 수확하여 원심분리하고 동결건조하여 세포의 당 성분을 박막크로마토그래피로 조사하였다.

그러나 TH-04의 경우 본 연구에서 수행한 생리시험을 토대로 동정 문헌과 비교한 결과가 다음에 나오는 MIDI 결과와 잘 들어맞지 않기 때문에 앞으로 확인 시험이 필요한 상태이며, 따라서 본 보고서에서는 계속 TH-04로 사용하

기로 한다.

TH-04와 다음에 나오는 BA313을 주사전자현미경(SEM)으로 관찰하였을 때 세포가 chain 상으로 연결되어 있음을 관찰할 수 있었다<그림1>.



<그림1> *Streptomyces halstedii* TH-04와 *S. violaceus-nigra* BA313의 주사전자현미경 사진

2) MIDI를 이용한 동정

TH-04를 비롯하여 탄저병균에 길항력을 보인 것으로서 본 실험실에서 보유하고 있는 몇 종의 균들을 trypticase soy broth(TSA)에서 배양하여 지방산분석(MIDI)법으로도 동정하였다. MIDI 동정 결과 TH-04는 *Streptomyces halstedii*로, 그리고 BA313은 *S. violaceus-niger*로 동정되었다. 그 밖에도 후보 균주 중 일부는 길항력을 지닌 미생물로 알려져 있는 *Bacillus subtilis*와 *Pseudomonas chlororapis*로 동정된 균주들도 있었으나 그 이후의 길항력검정

등에서 특출한 효과를 보이지 않아서 배제되었다. 길항력이 가장 뛰어났던 TH-04 균주는 *S. halstedii*로 동정되었다.

3) BS238

농업과학원으로부터 분양받은 *Bacillus subtilis* BS238 균주는 한국 전통 젓갈류로부터 분리되었으며, 식물 병원균에 대하여 방제 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 이 균주로부터 식물 병원균에 대하여 방제 활성을 갖는 항균 펩타이드를 분리하는 것으로 밝혀진 바 있으며, 이 항균 펩타이드는 100℃에서 30분간 처리하여도 그 항균 활성의 감소가 미미한 내열성을 가지며, proteinase K로 처리하여도 항균활성을 잃지 않는 것이 확인되었다[국유특허 제407074호-한국 전통 젓갈 유래 항균펩타이드 생산 미생물 균주].

4) KS03

오염균으로서 길항균으로 분리된 KS03을 동정하기 위한 몇 가지 실험을 수행하였다. 형태적 특징을 확인하기 위하여 이 균주를 Gram 염색하여 현미경 상에서 관찰한 결과 Gram 양성 간균 이었으며, 내생포자를 지니고 있는 것으로 나타났다. 또한, API 20 kit을 사용하여 각종 생화학적 특성을 조사한 결과 *Bacillus* 속에 속하는 것으로 나타났다 <표3>.

16S rDNA 분석을 통한 분자생물학적 동정을 위해서, 분리된 균주의 DNA를 주형으로 하여 세균의 공통적인 primer인 forward primer 27F와 reverse primer 1492R을 사용하여 PCR을 수행하였다. 생성된 PCR 산물을 정제하여 sequencing한 결과 *B. subtilis* group과 매우 높은 유사도를 보였으며, 특히 *B. subtilis* ATCC 21331과 98%의 유사성을 나타내었다<그림 2>.

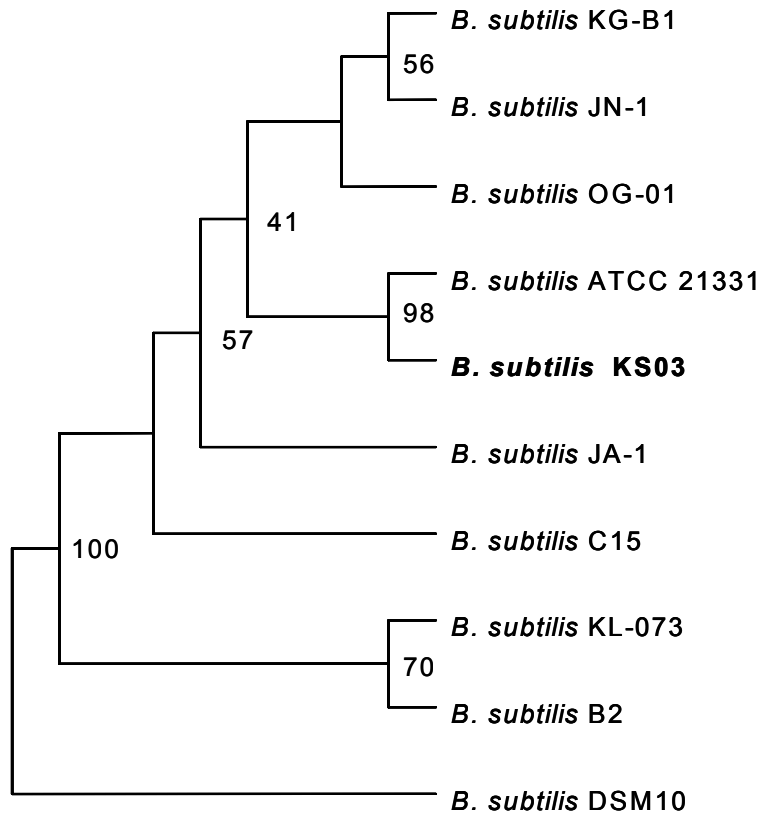
따라서 본 균주를 *Bacillus subtilis*로 동정하였고, *B. subtilis* KS03 (이하 KS03)이라 명명하였다.

나. 길항력 검정

선발한 길항균들은 같은 agar plate 상에서 병원균과 대치배양하며 둘 사이에 생기는 저지대의 크기를 가지고 역가를 검정하였으며, 병원균의 포자가 발아하는 것을 억제하는 능력의 검정도 연구에 포함하였다. 또한, 일부 균주에

〈표3〉 분리균주 KS03의 형태적 특성과 생화학적 특성

Characteristics	Properties
Gram staining	+
Spore formation	+
β -galactosidase	-
Arginine dihydrolase	+
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Citrate utilization	+
H ₂ S production	-
Urease	-
Tryptophane deaminase	-
Indole production	-
Acetoin production	-
Gelatinase	+
Utilization of	
Glucose	-
Mannitol	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Rhamnose	-
Sucrose	-
Melibiose	-
Amygdalin	-
Arabinose	-



<그림2> 16S rDNA sequence를 기본으로 한 분리균주 KS03을 포함한 *Bacillus subtilis* 몇 균주의 분류학적 유연관계 (100반복의 결과임).

대해서는 키틴 및 urea를 포함하는 배지에서 배양하여 chitinase 및 urease의 생산성에 대해서도 검정하였다.

하지만, *S. rochei*와 *P. chlororapis*는 역가 검정 시험 초기에는 우수한 길항력을 보였으나, 시간이 흐름에 따라서 길항력이 매우 불안정하게 변하는 현상을 보였으며, 그 원인은 아직까지 확실하게 밝혀지지 않았다.

1) TH-04

Streptomyces halstedii TH-04 균주는 고추 탄저병균 뿐 아니라 다른 병원균들에 대해서도 뛰어난 길항력을 보이고 있었다.

선발된 길항균의 포자발아 억제율을 조사하기 위하여 TH-04가 10^7 - 10^8 cells/ml 정도로 배양된 배양액과 해당 병원균의 포자현탁액을 1:1로 섞어서 24시간 동안 배양한 다음 일정량을 털어내어 현미경으로 병원균의 포자발아 여부를 관찰하였다. 현미경 하에서 한 시료 당 4 시야 이상을 관찰하여 그 합을 사용하였으며, 발아관이 포자 두께 이상으로 자라나온 것만을 발아한 것으로 간주하였다.

<표4> *Streptomyces halstedii* TH-04의 고추 병원균 포자발아 억제효과

병원균	총 포자 수 (개)	발아포자 수 (개)	발아율 (%)	발아억제율 (%)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	156	17	10.8	78.4
<i>Botrytis cinerea</i>	183	25	10.8	76.2
<i>Phytophthora capsici</i>	156	22	14.1	71.8

위 <표4>에 나타나 있듯이 관찰 결과 TH-04는 길항력을 조사하였던 고추 탄저병균과 역병균, 잿빛곰팡이병균에 대하여 아주 높은 억제율은 아니지만 모두 70% 대의 발아 억제율을 보여 이 균주가 생산하는 길항물질의 항균활성 범위가 매우 넓은 것을 알 수 있었다.

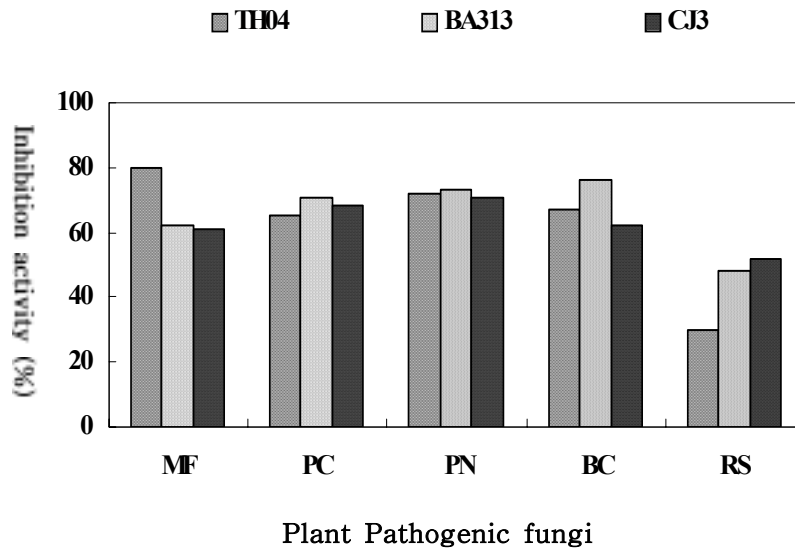
PDA에 길항균을 streak 접종하고 반대편에 병원균을 접종하여 약 4-7일간 대치배양한 결과를 보면 TH-04는 병원균의 포자발아억제 뿐만 아니라 균사생장을 억제하는 길항스펙트럼도 광범위한 것으로 보였다. 그 중에서도 특히 모잘록병, 역병, 잿빛곰팡이병에 대한 길항력이 컸고, 그 밖에 *Phomopsis* spp.나 *Cryphonectria parasitica* 등 일부 줄기마름병원균들에 대해서도 큰 길항력을 보여주었다<그림3>.



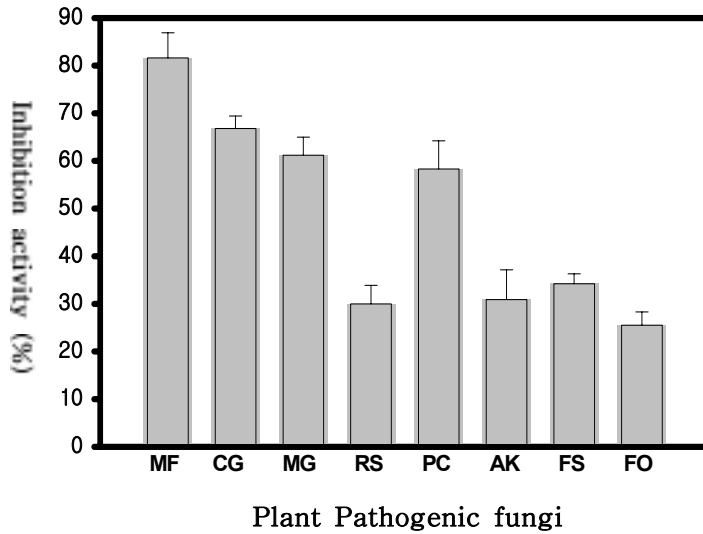
<그림3> TH-04에 의한 병원균의 생육 억제 (윗줄 왼쪽부터 시계방향으로 *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phomopsis* sp., *Cryphonectria parasitica*, and *Botrytis cinerea*).

그 밖에 주요 식물병원진균인 *Magnaporthe grisea* (벼 도열병균), *Phytophthora capsici* (고추 역병균), *Phytophthora nicotianae* (담배 역병균), *Botrytis cinerea* (갯빛곰팡이병균) 등의 균사생장을 억제하는 능력도 탁월하였다<그림4>. 다만, 모잘록병균인 *Rhizoctonia solani*를 억제하는 능력은 상대적으로 낮았다. 이러한 현상은 TH-04 이외에 다른 길항미생물들도 비슷한 경향을 보이고 있었다.

또한 TH-04의 배양액에서 균체를 모두 제거한 배양여액만을 처리하였을 때 도 고추 탄저병균을 비롯하여 고추 역병균, 벼 도열병균, 복숭아 갯빛무늬병균 등의 균사생장이 최소 60% 이상 억제되는 것으로 미루어 TH-04 균주는 곰팡이의 생육을 억제하는 강력한 길항물질을 생산하는 것으로 보인다<그림5>.



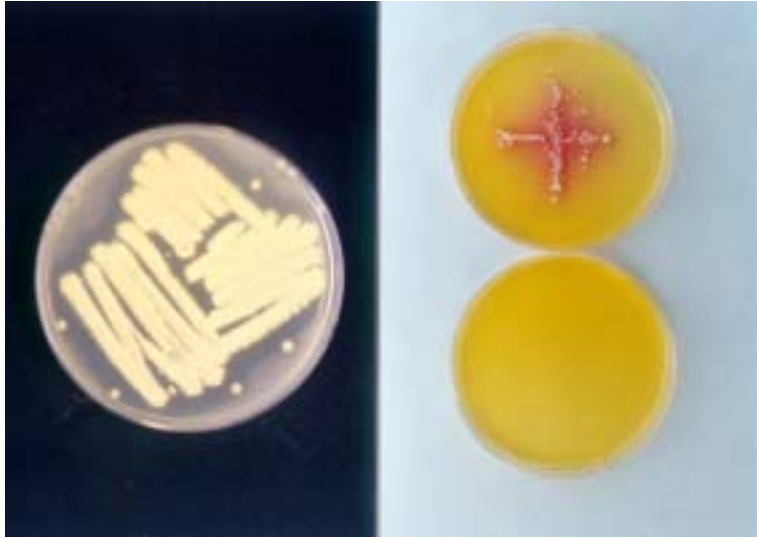
<그림4> PDA에 배양한 길항균의 식물병원균 균사생장 억제. (MF: *Monilinia fructicola*, PC: *Phytophthora capsici*, PN: *Phytophthora nicotianae*, BC: *Botrytis cinerea*, RS: *Rhizoctonia solani*)



<그림5> *Streptomyces halstedii* TH-04의 배양여액에 의한 식물병원균 균사생장 억제. (MF: *Monilinia fracticola*, CG: *Colletotrichum gloeosporioides*, MG: *Magnaporthe grysea*, RS: *Rhizoctonia solani*, PC: *Phytophthora capsici*, AK: *Alternaria kikuchiana*, FS: *Fusarium solani*, FO: *Fusarium oxysporium*).

또한, TH-04는 chitin을 함유한 배지에서도 자라면서 균총 주변에 clear zone을 형성하고, urea를 함유하는 배지에서 자라면서 균총 주변을 붉게 변화시키는 것으로 미루어 이 균이 chitinase와 urease를 생산하는 것을 알 수 있다<그림6>.

TH-04는 실제로 사과열매에 접종실험을 하였을 때도 뚜렷한 병 억제효과를 보여 주었다. 사과에 상처를 내고 *Colletotrichum gloeosporioides*와 TH-04를 접종하였을 때 탄저병균을 단독 접종한 사과에서는 병반이 크게 만들어졌으나 TH-04와 탄저병균을 같이 접종한 사과에 만들어진 병반의 크기는 매우 작았다<그림7>.



<그림6> TH-04에 의한 chitinase(왼쪽)와 urease(오른쪽) 생산.



<그림7> TH-04에 의한 탄저병 발병 억제. 왼쪽부터 *Colletotrichum gloeosporioides* 단독, C. 와 TH-04 동시접종, 접종크기의 상처만 낸 무처리.

2) BA313

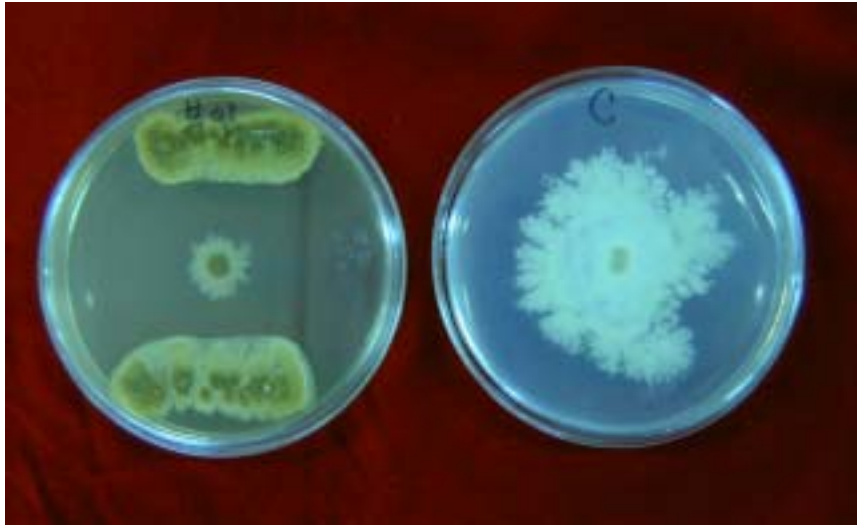
Streptomyces violaceus-niger BA313 균주 역시 고추 탄저병균 뿐 아니라 잣빛곰팡이병, 역병 등 고추의 다른 주요병원균들에 대해서도 뛰어난 길항력을 보이고 있었다.

BA313의 병원균 포자발아 억제도 위 TH-04와 같은 방법으로 수행하였는데, 결과는 아래 <표5>에 나타나 있듯이 고추 탄저병균에 대한 포자발아억제는 90% 이상으로서 매우 높은 억제율을 보였으며 잣빛곰팡이병균에 대해서는 약 70% 정도였던 반면, 고추 역병균의 포자발아를 억제하는 능력은 약 45% 정도로 상대적으로 낮은 수치였다.

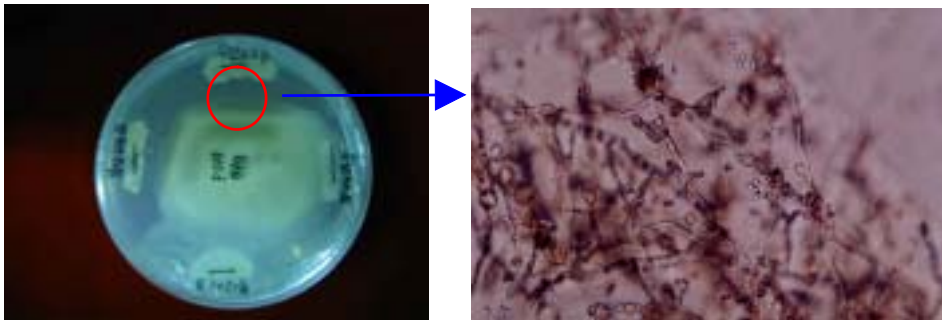
균사생장억제 검정도 TH-04에서 사용한 것과 같은 방법으로 수행하였는데, BA313 역시 아래 <그림8>에서 볼 수 있듯이 주요 고추 병원균들의 균사생육을 억제하였다. 특히 *C. gloeosporioides*의 생육도 뚜렷이 억제하였는데, BA313과 대치하고 있는 부분에서는 *C. gloeosporioides*의 균사가 더 자라나 가지 못하고 괴저를 일으키는 것을 볼 수 있었는데, 이 부분을 현미경으로 관찰하여 보면 균사의 용해가 일어나고 있음을 알 수 있었다<그림9>.

<표5> *Streptomyces violaceus-niger* BA313의 고추 병원균 포자발아 억제효과

병원균	총 포자 수 (개)	발아포자 수 (개)	발아율 (%)	발아억제율 (%)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	150	6	4.0	92.0
<i>Botrytis cinerea</i>	156	28	17.9	69.1
<i>Phytophthora capsici</i>	133	36	27.1	45.8



<그림8> *Streptomyces violaceus-nigra* BA313의 고추 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides* 균사생장 억제. 오른쪽은 무처리 대조구.



<그림9> *Streptomyces violaceus-nigra* BA313의 고추 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides* 균사생장 억제(빨간 원)와 그 부분의 광학현미경 관찰 (x100).

3) BS238

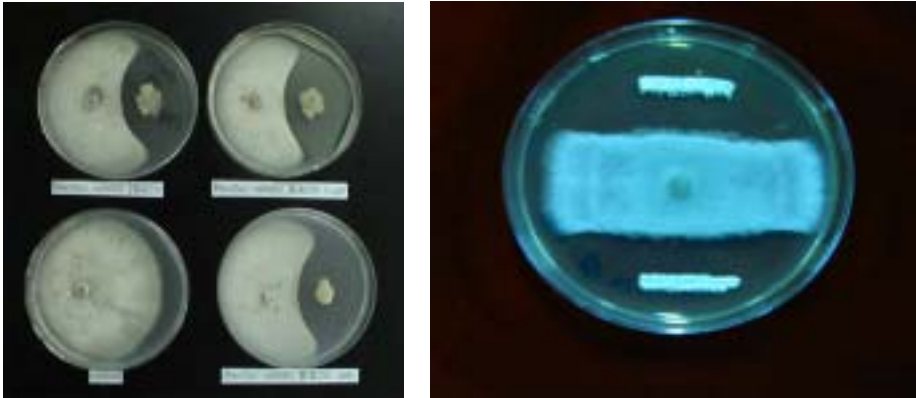
벼도열병균(*Pyricularia oryzae*), 포도 및 딸기 잿빛 곰팡이병균(*Botrytis cinera*), 과채류의 저장병균(*Penicillium* sp.), 토마토의 시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 고추와 가지의 탄저병균(*Collectotrichum cocodes*), 담배의 역병균(*Phytophthora crytogea*) 및 무 갈록병균(*Rhizoctonia solani*) 등 여러 가지 식물병원성 곰팡이에 대해 *Bacillus subtilis* BS238 배양액과 배양여액의 항균 활성을 알아보았다. 우선 배양액 또는 배양여액 40 μ l를 paper disk에 흡수시킨 후 PDA 상에서 대치배양한 결과 <표6>과 <그림10>에서 보는 바와 같이 배양액의 경우 고추 탄저병균에 대해 억제효과가 가장 우수하였으며, 그 외 식물병원균에 대해서도 균사 성장을 억제하는 효과가 있었다.

그러나 배양액을 여과한 배양여액에서는 균사 성장을 억제하는 현상이 나타나지 않았으며, 따라서 BS238이 분비하는 항균성 펩타이드는 세균여과기 (millipore filter: 0.2 μ m)를 통과하지 못하는 것으로 생각된다.

<표6> *Bacillus subtilis* BS238 배양액 및 배양여액에 의한 병원균 균사생장 저지대의 거리(단위 cm)

<i>B. subtilis</i> BS238	Rs	Pc	Bc	Cg	Pi
배양액	0.9	0.6	0.5	1.5	1.2
배양여액	0	0	0	0	0

Rs: *Rhizoctonia solani*, Pc: *Phytophthora crytogea*, **Bc**: *Botrytis cinera*
 Cg: *Collectotrichum gloeosporioides*, Pi: *Pyricularia oryzae*



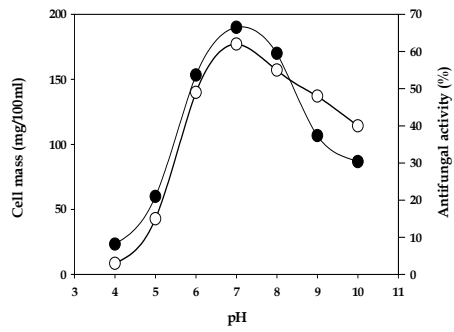
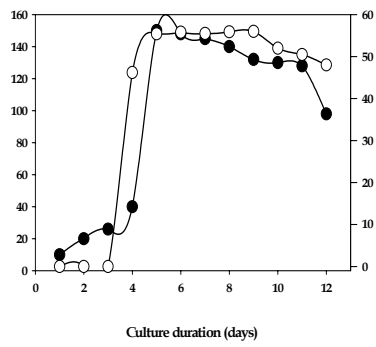
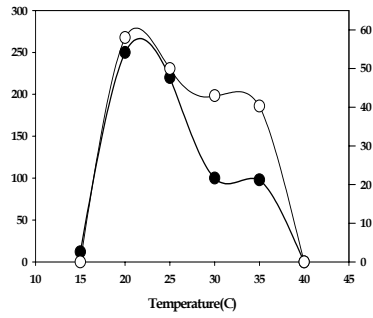
<그림10> *Bacillus subtilis* BS238 균주의 고추 병원균 길항 효과

다. 배양 최적조건 확립

배양최적조건으로는 온도, pH, 보관성 등을 조사하였다. 온도는 15℃에서 40℃까지 5도 간격으로 항온기에서 조사하였으며, pH는 HCl 또는 NaOH를 사용하여 배지의 pH를 4부터 10까지 1 간격으로 조정하였다. 그리고 보관성은 12일까지 조사하였다.

1) TH-04

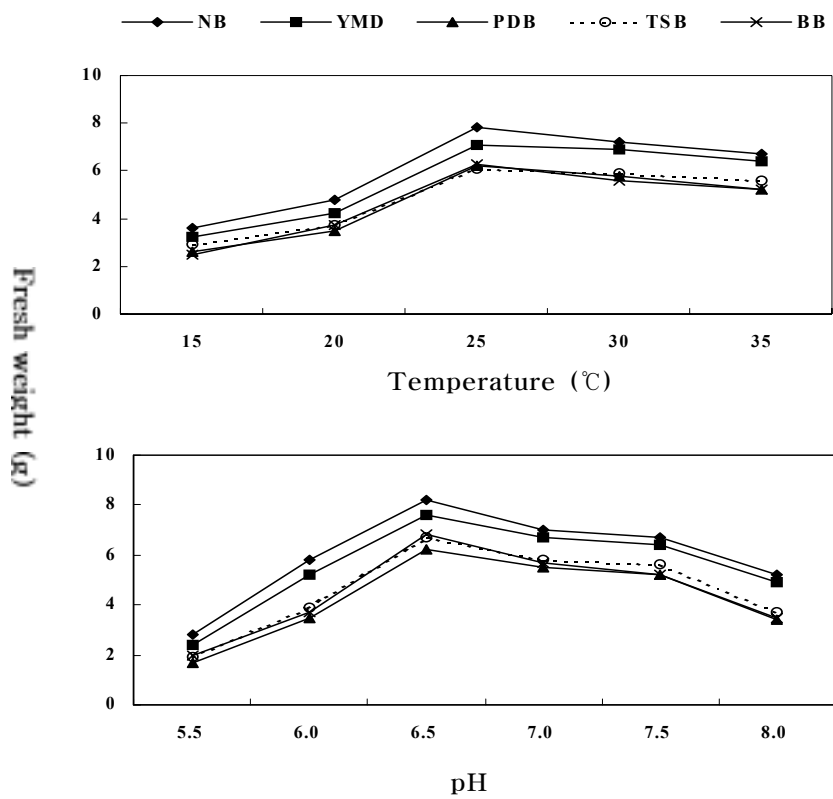
다음 <그림11>에서 보는 바와 같이 TH-04의 배양 최적온은 20-25℃로 일반적인 방선균들에 비해서는 약간 낮은 편이었으며, 최적 pH는 6-8로 중성 근처에서 잘 자랐다. 또한, 균체량은 배양 4일 이후에 최대가 되었으나, 10일이 지나면서부터는 사멸기에 들어가 균밀도가 줄어들었다. 배양여액의 항균성은 모든 조사항목에서 일반적으로 TH-04의 균체량과 비례하였으나, 온도에서 25℃ 이상에서는 균밀도의 감소율보다 다소 완만하게 감소하였다. 따라서, TH-04의 배양 최적 조건은 배지 pH 7.0에 20-25℃에서 5-9일간 배양하는 것이라고 할 수 있다.



<그림11> 온도, 시간, 배지의 pH가 TH-04의 생육(검은점)과 항균성(하얀점)에 미치는 영향

2) BA313

BA313의 생육은 균을 해당 조건에서 배양한 뒤 배양액을 세균여과기 (millipore filter, 지름 $0.2\mu\text{m}$)로 걸러서 균체를 수집한 다음 그 무게를 재는 방법으로 측정하였다. 그 결과 BA313의 성장적온은 25-30 $^{\circ}\text{C}$ 로 TH-04보다 약간 높았으며, 25 $^{\circ}\text{C}$ 이상에서는 40 $^{\circ}\text{C}$ 까지 비교적 잘 자라는 것으로 나타났다<그림 12>.



<그림 12> 온도(위)와 배지의 pH(아래) 및 배지의 종류가 BA313의 생육에 미치는 영향

최적 pH는 6.5였으며 6에서 8까지 비교적 큰 차이 없이 자라는 것으로 보인다<그림12>. 또한, 몇 가지 배지에서의 생육을 비교한 결과 NB, YMD, PDB, TSB, BB 등 본 연구에서 사용한 모든 배지가 다 사용 가능하였으나, 그 중에서도 NB와 YMD에서의 생육이 상대적으로 좋았으며, PDB에서는 생육이 상대적으로 떨어지는 것으로 나타났다.

3) BS238

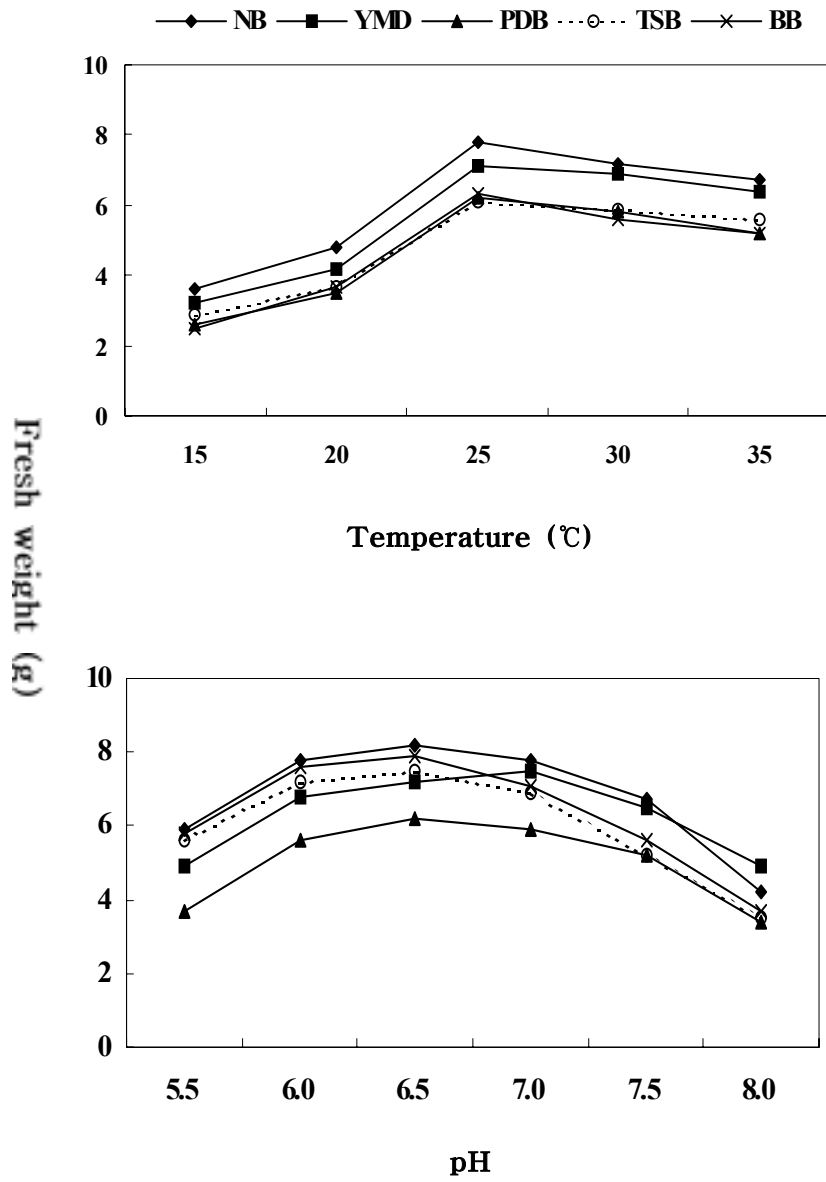
BS238 역시 BA313과 같은 방법으로 생육을 조사하였는데, 균 생육에 대한 온도의 영향은 BA313과 거의 같아 25°C가 생육 최적온이었으며, 25°C부터 35°C 까지 큰 무리없이 자라는 것으로 나타났다<그림13>.

최적 pH는 6.0에서 7.0까지였는데, 이 구간에서는 pH의 변화와 거의 무관하게 자라는 것으로 보인다<그림13>. 한편, pH가 이 범위를 벗어나면 균 생육의 감소율이 비교적 빠르게 감소하는 것으로 볼 때, 이 균은 환경의 pH를 중성으로 맞추어 주는 것이 중요하다고 생각한다. 배지의 종류도 크게 영향을 미치지 않는 것으로 보았으나 BA313과 마찬가지로 그 중에서도 NB와 YMD의 효과가 우수하였다.

3. 길항미생물의 대량배양 시스템 확립

병 억제효과를 검증하기 위해서는 많은 양의 길항미생물이 필요하므로 대량 배양법을 개발하는 것이 필수적이다. 따라서, 본 연구에서 선발한 TH-04, BA313, 및 BS238을 대량으로 배양할 수 있는 방법을 확립하기 위하여 대용량 유리 플라스크를 사용하여 균의 생육을 조사하였다.

배지의 종류와 온도 및 pH는 앞서 연구에서 밝혀진 내용을 그대로 사용하였으며, 본 연구에서는 배양용기의 종류 및 공기공급에 대하여 몇 가지 실험을 수행하였다. 용기는 20 ℓ 짜리 유리 플라스크를 사용하였는데 바닥이 비교적 평편한 flat type과 하반부가 비교적 잘쭈한 conical type, 그리고 전체적으로 둥근 공모양을 하고 있는 bulbous type 등 3가지를 점검하였고, 기타 환경요인으로는 공기 주입량 및 빛의 효과를 조사하였다.



<그림13> 온도(위)와 배지의 pH(아래) 및 종류가 BS238의 생육에 미치는 영향

세 종류의 플라스크 중 길항미생물의 생육은 균주의 종류에 관계없이 bulbous type의 둥근 플라스크에서 가장 좋았다. Flat type에서는 바닥의 모서리 부분에서는 공기순환 및 배양액 순환이 제대로 일어나지를 않아 그 부분에 대부분이 균체인 양금이 가라앉는 경우가 자주 생겼으며, 그 때문인지 균체의 밀도도 bulbous type에 비하여 10배 이상 낮았다. Conical type에서는 하반부에서의 공기순환 속도와 상반부에서의 순환속도가 많은 차이를 보였으며 거품이 생기는 것이 단점이었다. 공기는 disc type milipore filter(0.2 μ m)를 사용하여 배양기의 하단부로부터 compressor를 사용하여 밀어 넣어 주었는데, 본 실험실에서 보유하고 있는 소형 컴프레서를 사용하였을 경우 2단계가 적당한 것으로 나타났다. 빛의 영향은 없었다.

따라서, 본 연구에서는 아래 <그림14>와 같이 둥근플라스크를 사용하였으며, 배양기간 내내 여기에 여과한 공기를 주입하여 주었다. 배양이 끝난 길항미생물들은 서로 다른 색과 탁도를 나타내어 TH-04가 가장 밝은 색을 보였고 BS238이 가장 어두운 색을 보였다. 탁도에서는 BA313이 가장 탁하고 BS238이 셋 중에서는 가장 맑은 편이었다<그림14>.

4. 길항미생물의 병 억제 효과

가. 근권 또는 엽권 정착능력

선발한 길항미생물들을 식물체에 처리하였을 때 이들이 식물체 표면 및 주변에 정착하여 증식할 수 있는지를 알아보기 위하여 처리한 식물로부터 시료를 채취하여 길항미생물의 존재를 확인하였다.

1) *Bacillus subtilis* BS238

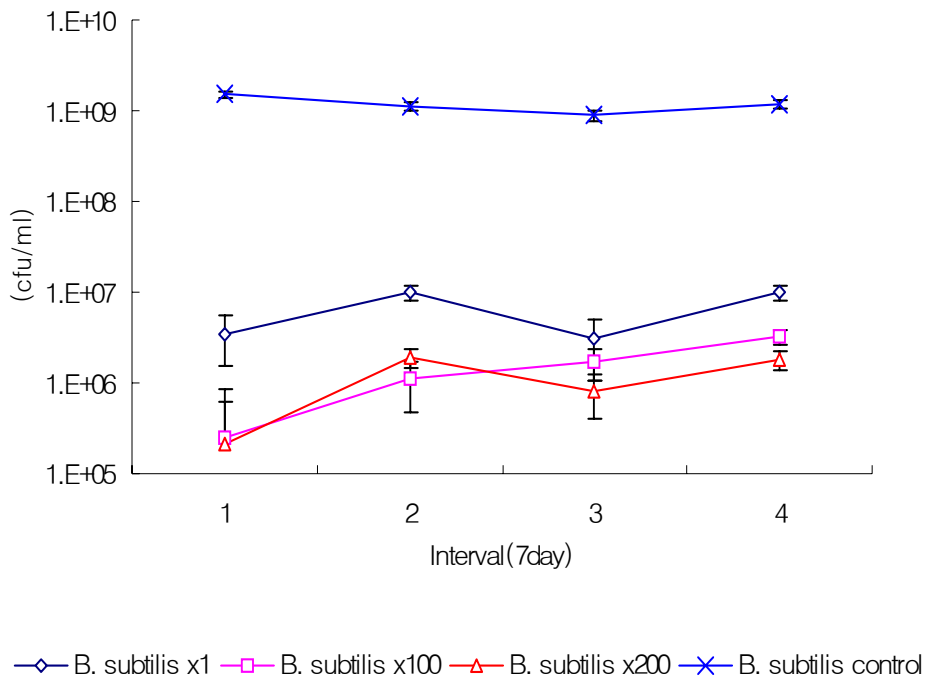
BS238 (*B. subtilis*)의 엽권 및 근권에서의 밀도 유지를 통해 외부 환경 조건에 대한 안정성을 알아보려고 본 실험을 수행하였다. 우선 BS238을 Difco Bacto™ Trypticase soy broth (TSB)에 2일간 배양하여 멸균토양이 담긴 포트에서 자라고 있는 고추에 원액, 100배 희석액, 200배 희석액 등 3수준의 농도로 관주 처리(50 ml/포트) 또는 엽면시비(100 ml/주)하였다. 처리 직전의 길항균 배양원액의 경우 균 밀도는 $10^8 - 10^9$ cells/ml 이었다. 길항미생물은 7일간격으로 4회 처리하였으며, 매 처리 7일 후 토양 1 g과 가로, 세로 1 cm × 1

cm 크기로 고추잎을 채취하여 이들을 멸균수에 잘 희석한 다음 희석평판법으로 균의 밀도를 조사하였다. 대조구로는 처리한 길항미생물 배양액 원액을 배양조건에서 보관하며 시기별로 균밀도를 측정하였다.



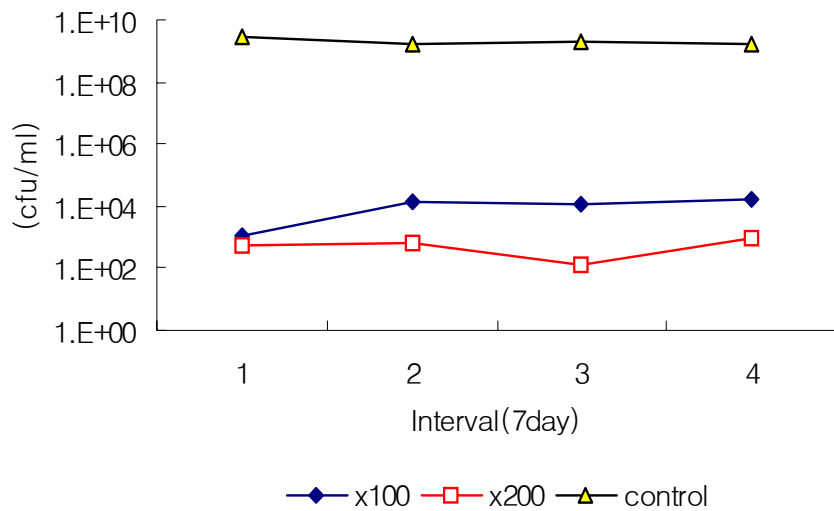
<그림14> Bulbous type 생물반응기에서의 *Streptomyces halstedii* TH-04 (위), *Streptomyces violaceus-niger* BA313 (아래 왼쪽), *Bacillus subtilis* BS238 (아래 오른쪽)의 배양

포트 토양 관주의 경우 원액 처리구에서는 4회의 조사 기간 동안 10^6 cfu/cm³ 이상의 밀도를 나타냄으로써 토양 내에서 밀도가 비교적 안정적으로 유지되는 것을 알 수 있었다. 100배와 200배 희석 관주 처리구에서는 균밀도가 10^5 cfu/cm³ 정도로 유지되었는데, 이는 처리한 미생물의 농도가 $10^6 - 10^8$ cells/ml 이었다는 것을 감안하면 그리 낮은 수치는 아니라고 할 수 있다<그림15>.



<그림15> 토양 관주 후 경과시간에 따른 *B. subtilis* BS238 밀도 변화

그러나, 길항미생물을 고추의 엽면에 시비하였을 경우에는 100배와 200배 엽면 살포구 모두 비교적 낮은 균밀도를 나타어 10^2cfu/cm^2 내외의 밀도를 유지하였으며, 최종 4회 처리 7일 후 100배 희석 처리구에서는 $4\times 10^2\text{cfu/cm}^2$, 200배 희석 처리구에서는 $1\times 10^2\text{cfu/cm}^2$ 의 밀도를 나타냄으로써 근권에서 보다 낮은 균밀도를 보였다<그림16>.



<그림16> 엽면살포 후 경과시간에 따른 *B. subtilis* BS238 밀도 변화

이러한 결과는 BS238이 지상부의 엽권에 살포될 경우 토양 관주처리에 비하여 생존율이 매우 낮아짐을 의미하는 것으로, 엽면살포 할 때는 처리 기간을 단축하거나 또는 균의 생존기간을 연장시킬 수 있는 방안을 개발하여야 이 길항미생물이 고추 탄저병 방제에 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

또한, 길항미생물이 엽권에 잘 부착하고 잘 정착하여 효과가 증진될 수 있도록 계면활성제를 첨가하였을 때의 길항균의 엽면 정착력도 조사하였다.

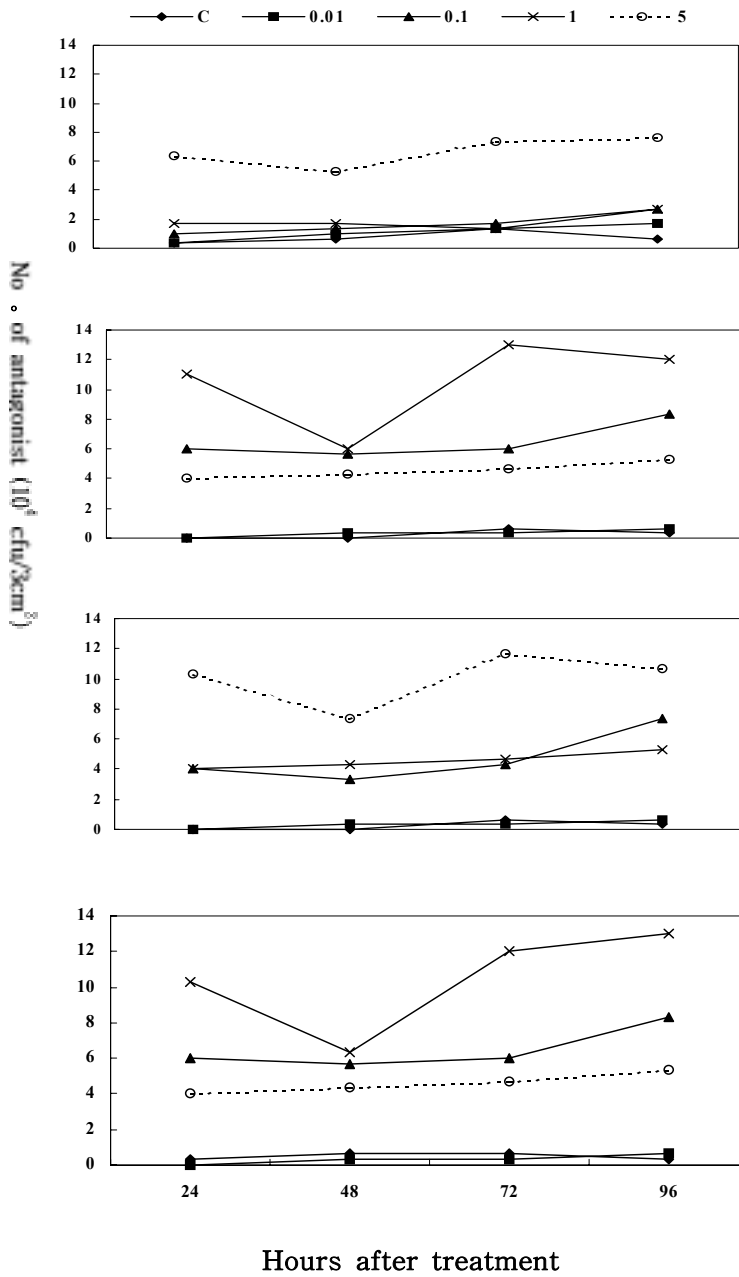
계면활성제의 종류로는 glycerol, tergitol-NP9, tergitol-NP10, 그리고 농업용으로 생산되는 carba의 효과를 검정하였다. 계면활성제는 길항미생물을 배양하여 식물체 또는 토양에 처리하기 직전에 처리제에 첨가하여 사용하였으며 첨가농도는 0.01, 0.1, 1.0, 그리고 5.0% 등 4 수준으로 하였다.

조사 결과, 계면활성제의 사용은 일반적으로 무처리에 비하여 길항미생물의 엽면정착율을 상당히 증진시키는 것으로 나타났다. Glycerol과 tergitol-NP10의 경우에는 5%로 첨가하였을 때 가장 많은 수의 균이 정착하였던 반면, tergitol-NP9과 carba의 경우에는 1%로 첨가하였을 때 가장 많은 수의 균을 재분리할 수 있었다<그림17>. 한가지 특이했던 것은 밀도향상률이 가장 높았던 5%나 1%의 경우 glycerol을 제외하고는 48시간에서의 재분리율이 오히려 24시간 때보다 떨어졌으며, 그 이후 72시간 때부터 다시 증가하였다는 것이다. 나머지 농도의 경우에는 재분리율의 등락 편차가 크지 않은 채로 비교적 일정한 경향으로 증가 또는 유지되었다.

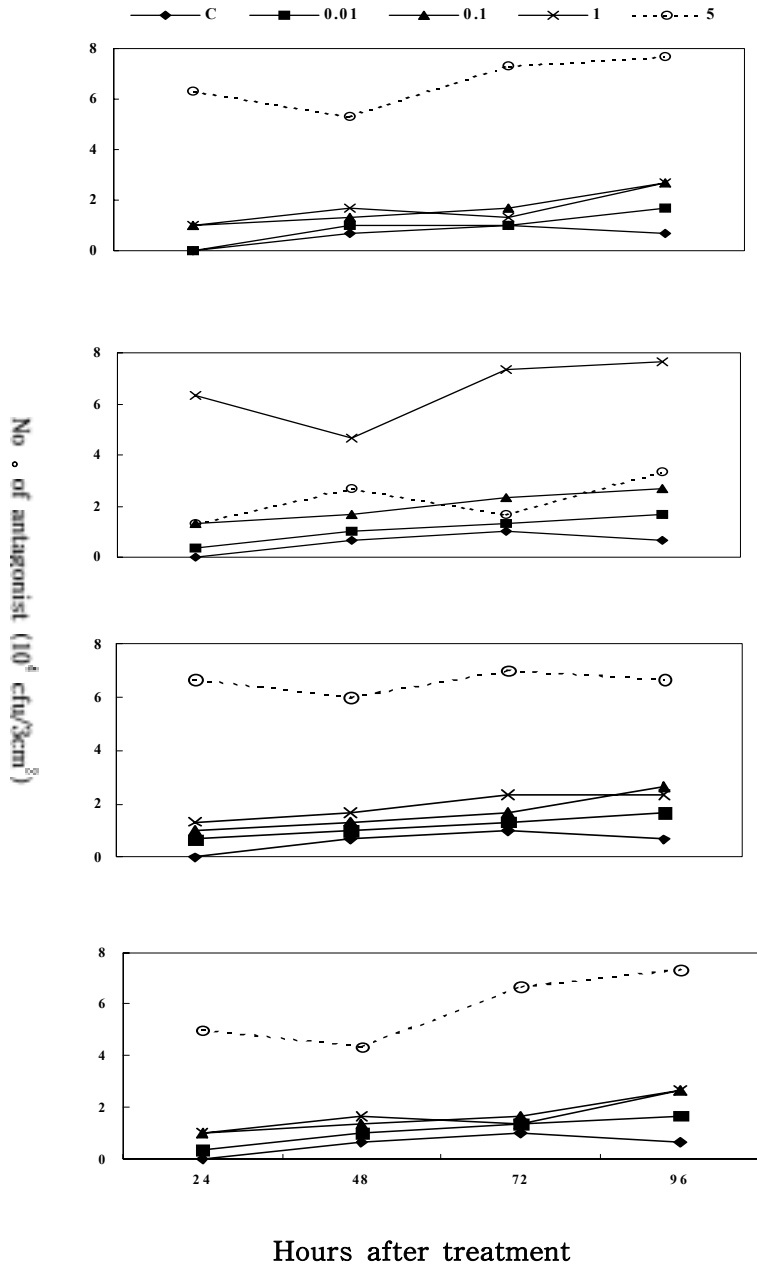
2) *Streptomyces violaceus-niger* BA313

기본적으로는 BS238에서와 비슷한 방법으로 BA313의 엽면에서의 밀도변화를 조사하였다. BA313에서도 glycerol, tergitol-NP9, tergitol-NP10, 그리고 농업용으로 생산되는 carba의 효과를 검정하였으며, 처리 수준도 마찬가지로 0.01, 0.1, 1.0, 5.0%였다. 토양관주도 BS238과 같은 방법으로 수행하여 근면에서의 정착력도 확인하고자 하였으나, 토양으로부터 해당 길항균만을 재분리하는데 실패하여 그 부분에 대한 성적은 얻지 못하였다.

엽면에서의 정착률을 보면 종류에 상관없이 계면활성제의 사용은 일반적으로 무처리에 비하여 길항미생물의 엽면정착율을 큰 폭으로 개선하는 것으로 나타났다. 가장 높은 폭으로 향상시킨 계면활성제의 농도는 BS238의 경우와는 조금 달라서 Glycerol과 tergitol-NP10, 그리고 carba의 경우에는 5%로 첨가하였을 때였으며, tergitol-NP9의 경우에만 1% 첨가에서 가장 많은 수의 균을 재분리할 수 있었다<그림18>. 여기서도 밀도향상률이 가장 높았던 농도에서는 일단 균 밀도가 감소하였다가 48시간 이후 다시 증가하며, 나머지 농도에서는 비슷한 경향으로 증가하는 현상이 여전히 관찰되었다. 다만, tergitol-NP9의 경우 균 밀도가 가장 높은 농도가 아니었음에도 처리 72시간 후에 비교적 큰



<그림 17> 엽면살포 후 경과시간과 계면활성제에 따른 *Bacillus subtilis* BS238의 엽면 밀도 변화 (A: glycerol, B: tergitol-NP9, C: tergitol-NP10, D: carba).



<그림 18> 엽면살포 후 경과시간과 계면활성제에 따른 *Streptomyces violaceusniger* BA313 밀도 변화 (A: glycerol, B: tergitol-NP9, C: tergitol-NP10, D: carba)

폭으로 감소하였다가 다시 증가하는 현상이 나타났다.

3) *Streptomyces halstedii* TH-04

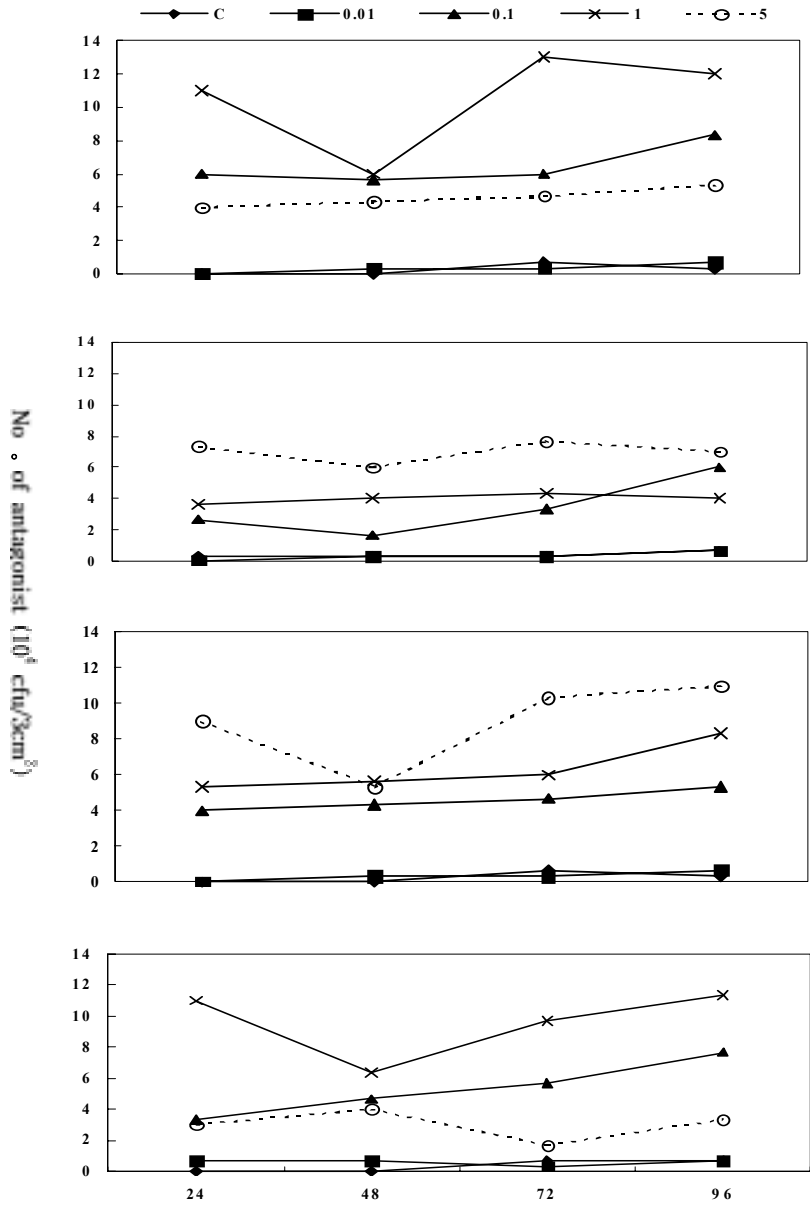
TH-04는 BA313과 똑같은 방법으로 엽권에서의 밀도변화를 조사하였다. 즉, glycerol, tergitol-NP9, tergitol-NP10, 그리고 농업용으로 생산되는 carba의 효과를 검정하였으며, 처리 수준도 마찬가지로 0.01, 0.1, 1.0, 5.0%였다. 토양관주 역시 같은 방법으로 수행하였으나, TH-04의 경우에도 길항균만을 재분리하는데 실패하여 그 부분에 대한 성적은 얻지 못하였다.

TH-04의 경우에도 종류에 상관없이 계면활성제의 사용에 따라 엽권에서의 길항미생물 정착률이 일반적으로 무처리에 비하여 큰 폭으로 개선되는 것으로 나타났다. 그러나, 가장 높은 폭으로 향상시킨 계면활성제의 농도는 BS238이나 BA313의 경우와는 조금 달라서 Glycerol과 carba의 경우에는 1%로 첨가하였을 때 가장 높은 균 밀도를 보였으며, tergitol-NP9과 tergitol-NP10의 경우에는 5% 첨가에서 가장 많은 수의 균이 재분리되었다<그림19>. 밀도향상률이 가장 높았던 농도에서는 일단 균 밀도가 감소하였다가 다시 증가하고, 나머지 농도에서는 비슷한 경향으로 증가하는 현상이 여기서도 여전히 관찰되었다. 한가지 특기할 사항은 계면활성제의 농도가 0.1%인 경우 tergitol-NP9과 carba에서 눈에 띄는 향상률을 보였다는 것이다<그림19>.

나. 길항미생물 간의 상호작용

TH-04, BA313, BS238 등 본 연구에서 선발한 길항미생물들을 혼용할 수 있는지 알아보기 위하여 혼합배양 및 혼합처리 등 두 가지 실험을 수행하였다. 본 연구에서 선발한 길항미생물 중 KS04는 비교적 연구 후기에 선발되었기 때문에 본 실험에 포함하지는 않았다.

혼합배양은 세 균주를 두 균주씩 동일한 배양기 안에 접종하고 두 균주의 공통된 생육최적조건에서 3-4일간 배양한 뒤 일정량을 덜어내어 NA에 도달하는 방법으로 각 균주의 밀도를 측정하여 상호간의 영향을 검정하였다. 대조구로는 각각 독립배지에서 배양한 해당 길항균을 사용하였다.



Hours after treatment

<그림19> 엽면살포 후 경과시간과 계면활성제에 따른 *Streptomyces halstedii* TH-04의 밀도 변화 (A: glycerol, B: tergitol-NP9, C: tergitol-NP10, D: carba)

혼합처리효과를 알아보기 위해서는 우선 두 균주를 동량으로 혼합한 뒤 혼합액을 고추 열매에 접종하였다. 접종한 부위가 바람에 마르면 탄저병균을 길항균 처리부분에 다시 접종하여 25℃에서 배양하면서 발현된 병징의 크기를 측정하는 방법으로 조사하였다. 대개 병원균 접종 후 약 5-7일 정도가 지나서 병반 크기를 조사하였다. 대조구로는 각 길항균을 독립적으로 접종한 뒤 병원균을 접종한 고추에 만들어진 병반을 사용하였다.

본 보고서에 수치가 제시되어 있지는 않으나, 본 실험의 결과 TH-04, BA313, BS238은 모두 서로에게 특별한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 혼합배양에서 각 균주의 생장률은 각 균주들을 독립적으로 배양했을 때의 생장률과 차이가 없이 모두 잘 자랐으며, 혼합접종에서도 두 길항균을 함께 처리하였을 때의 병 억제율이 각각 독립적으로 처리하였을 때의 병 억제율의 합과 거의 같은 수준이었다.

따라서, 본 연구에서 선발한 *Streptomyces halstedii* TH-04, *S. violaceus-niger* BA313, *Bacillus subtilis* BS238은 서로의 생육이나 병 억제 능력에서 서로간에 간섭작용 없이 독립적으로 작용하는 것으로 판단하였다. 그리고, 이 결과를 토대로 본 길항균주들은 혼합제로 만들 필요가 없으며, 모두를 실용화하였을 경우 각 제제를 혼합해서 사용하여도 같은 효과를 얻을 것으로 결론지었다.

다. 길항효과 정량화 및 방제가 결정

1) *Bacillus subtilis* BS238 배양액 농도별 기내 항균활성 실험

BS238의 농도별 항균활성을 알아보기 위해 배양원액, 100배 희석액, 200배 희석액을 이용하여 실험을 수행하였다. 기내 검정을 실시하기 위해 습실 처리용 용기(가로 30 cm, 세로 25 cm, 높이 15 cm)에 고추 열매를 각각 20개씩 4개의 용기에 담고, 고추 탄저병 포자현탁액 (4×10^5 cfu/ml)을 처리하였다. 고추 열매 표면의 물기가 마른 다음 BS238의 농도별 희석액을 각각 spray하여 밀폐하고, 25℃ 항온기에서 7일간 보관한 다음 꺼내어 병반이 나타난 열매의 수를 세어 방제가를 산출하였다.

기내 시험 결과 BS238 배양액 농도별 방제 효과는 <표7>에서 보는바와 같

이 200배 희석액 처리구에서는 방제가가 8%대로서 고추 탄저병 방제효과가 거의 없는 것으로 나타났으나, 100배 희석액 처리구에서는 66.7%의 방제가를 나타냄으로써 미생물 살균제로서의 가능성을 나타냈다. 대조살균제 Propi 처리구에서의 방제가는 약 92%로서, BS238 100배 희석액 처리구의 방제가를 살균제대조구와 비교하였을 경우의 방제가는 약 73%였다.

<표7> *Bacillus subtilis* BS238 배양액 농도별 고추 탄저병 방제효과 (기내)

Treatment	Dilution	Disease rate (%)	Control value (%)
BS238	×100	20	66.7
	×200	55	8.3
Propineb 70%	×500	5	91.7
Control		60	-

2) 포트 재배 고추묘를 이용한 BS238 배양액 농도별 방제효과 검정

온실에서 포트에 재배하고 있는 고추에 각각 100배, 200배로 희석한 BS238 배양액을 10일 간격으로 3회 처리하였다. 1차 약제 처리 1일 전에 고추 탄저병균 포자현탁액 (10^6 cfu/ml 이상)을 접종하였으나, 병이 발생하지 않아 2차, 3차 약제 처리 1일 전 고추 탄저병균 포자현탁액 (10^6 cfu/ml 이상)을 다시 살포하고, 습도를 조절하여 병을 유발시켰다. 결과는 약제 최종처리 10일 후에를 조사하였다.

기내검정에서 포트 수준으로 확대하여 방제효과를 조사한 결과 <표8>에서 보는 바와 같이 기내 실험에 비하여 방제 효과가 다소 낮기는 하였으나 기내

실험과 비슷한 경향을 나타냄을 확인하였다. BS238 100배 희석액 처리구에서의 방제는 51.5%로 미생물 살균제로서의 가능성을 보였다. 200배 희석액 처리구의 경우 방제가가 34.7%로 기내 실험에서보다 높은 방제 효과를 나타냈으나 여전히 실용적이지는 못한 처리로 판단된다. 앞으로 제형 개선 등을 통해 방제효과를 향상시킬 수 있는 가능성은 있는 것으로 보인다.

〈표8〉 *Bacillus subtilis* BS238 배양액 농도별 고추 탄저병 방제효과 (포트)

Treatment	Dilution	Disease rate (%)	Control value (%)
BS238	×100	29.9	51.5
	×200	40.3	34.7
Propineb 70%	×500	5.6	90.9
Control	-	61.7	-

라. 병 방제 효과

선발된 길항균들이 실제로 얼마만큼의 병 방제효과를 보이는지 알아보기 위하여 실험실 내에서 고추 열매에 *C. gloeosporioides*의 분생포자와 길항균을 동시접종하여 결과를 관찰하였으며, 온실에서의 in vivo 접종실험과 실제 고추 포장에서의 병 방제가 검증실험을 수행하였다.

1) 탄저병균과 길항균의 동시접종에 의한 방제효과

고추 열매의 표피에 불꽃멸균한 바늘로 상처를 내고 병원균 포자현탁액 (10^4 conidia/ml)과 길항미생물 TH-04 현탁액 (10^5 cfu/ml) $100\mu\text{l}$ 씩을 바로 연

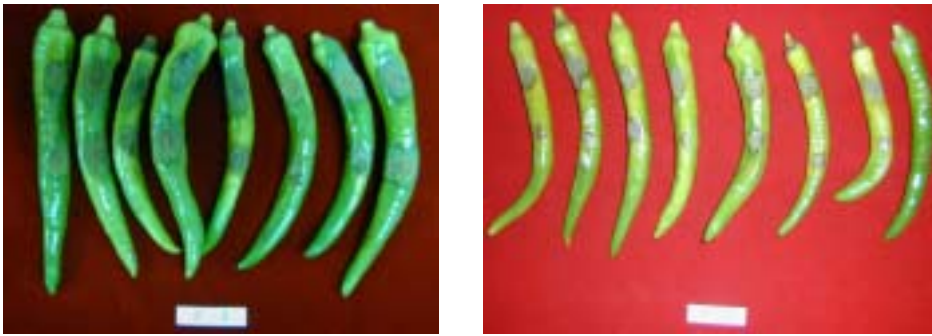
이어 접종한 후 플라스틱 밀폐용기에 습식처리하여 25℃ 암조건에서 7일간 배양한 뒤 병반 면적을 조사하였다. TH-04 현탁액 이외에도 TH-04 배양액을 원심분리한 상징액과 배양액을 세균여과기 (milipore filter, pore size 0.2 μ m)로 거른 배양여액 등을 앞에 설명한 것과 같은 방법으로 접종하고 배양하여 조사하였다. 대조구로는 길항미생물 대신에 탄저병 병원균과 멸균수를 접종하였으며 나머지는 같은 방법으로 수행하였다.

열매에 만들어진 병반의 면적을 측정된 결과, 모든 처리에서 대조구의 병반보다 작은 병반이 형성됨을 관찰하였다. 처리 중에서 배양액 원심분리 상징액을 동시접종하였을 때의 병반 면적이 가장 작았던 반면 길항균을 같이 처리한 처리구에서의 병반면적은 대조구와 비교하여 뚜렷한 차이를 보이지 않아, 방제가는 배양액 원심분리 상징액이 약 60%, 배양여액이 약 30%, 그리고 생균액이 약 10% 수준이었다<표9><그림20>.

앞에서 이미 설명하였듯이 TH-04는 배양여액의 길항효과도 확인된 바 있으므로 본 실험의 결과가 예상치 못한 일은 아니었으나, 다만, 생균액의 경우에 방제가가 예상 외로 낮았는데, 현재로서는 그 이유에 대해 확실한 해석이 불가능한 상태이며, 다만, 동시접종이 아니라 실제로 식물에 처리하는 경우에는 길항균이 식물체에 존재하는 것이 방제에도 여러 모로 도움이 될 것이므로 다음의 온실 및 포장 실험에 모두 포함하였다.

<표9> 고추 탄저병원균과 길항균의 동시접종에 의한 병 억제효과

Treatment	Lesion size (cm ²)	Control Effect (%)
Pathogen only	18.0±3.5	-
Pathogen + Antagonist	16.1±8.3	11
Pathogen + Supernatant	9.8±7.3	60
Pathogen + Culture filtrate	12.5±6.9	31



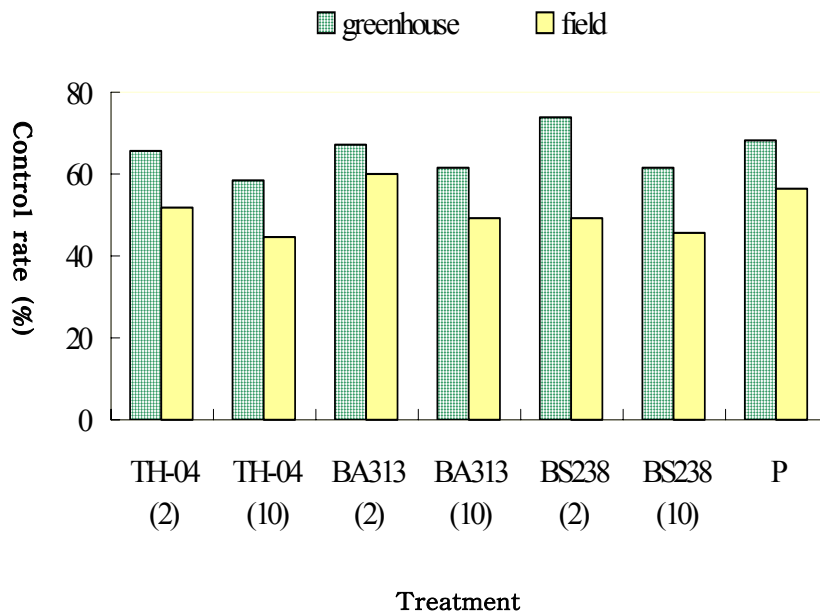
<그림20> *Colletotrichum gloeosporioides*와 *Streptomyces halstedii* TH-04(오른쪽)를 동시에 접종한 고추 열매에 만들어진 탄저병 병반. 왼쪽은 *C. gloeosporioides*만을 접종한 대조구.

2) *In vivo* 접종실험(온실)

온실실험에서는 포트에 고추를 재배하며 고추가 약 7-8엽기에 이르렀을 때부터 길항균 처리를 시작하였다. 배양원액의 길항균의 밀도는 10^9 cfu/ml 이었으며 이 배양원액을 2배 또는 10배로 희석하여 처리하였다. 희석액은 7일 간격으로 4회 고추의 지상부에 분무처리하였고, 각 처리할 때마다 처리량은 고추의 표면에서 길항균배양액이 흘러내리기 직전까지 충분량을 처리하였다. 병원균은 길항균의 4회째 처리가 끝난 다음날 탄저병균 포자현탁액을 역시 잎에 분무접종하였으며, 현탁액 밀도는 10^4 - 10^5 conidia/ml 이었다. 병 발생 조사는 병원균 접종이 끝나고 7일 후에 감염된 열매의 수를 세어 이병과율로 구하였다. 대조구로는 길항균 처리 없이 병원균 포자현탁액만을 접종한 고추를 사용하였으며, 살균제처리 대조구로는 프로피 1000배액을 7일 간격 4회 처리한 이후 탄저병균 포자현탁액을 접종한 고추를 사용하였다.

길항균 무처리구에서의 발병률을 100으로 보았을 때 길항미생물 처리구에서의 발병률, 즉 방제가는 세 길항균주 모두 60% 이상으로 낮지 않은 결과를 나

타냈다<그림21>. 각 균주 모두 예상했던 바와 같이 10배 희석액보다는 2배 희석액에서의 방제가가 더 높았으며, 균주 중에서는 BS238 2배 희석액이 70%를 조금 넘는 방제가를 보였다. 농약처리 대조구에서의 방제가는 약 68% 정도로 평상시의 방제가에 비해서는 낮은 편이었다.



<그림21> *Streptomyces halstedii* (TH-04), *S. violaceus-niger* (BA3113), *Bacillus subtilis* (BS238)의 고추 엽면분무처리에 의한 탄저병균의 방제효과 (각 길항미생물 원액의 농도는 10^9 cfu/ml이었으며, 괄호 안의 숫자는 희석배수이고, P는 대조살균제 Pripin임)

2) 포장 실험

고추를 실제 포장에 재배하며 길항균을 처리하여 포장에서의 방제가를 조사하였다. 길이 약 30 cm 정도인 고추(품종: 다보탑) 플러그묘를 약 40 cm 간격으로 포장에 정식하였으며, 위 in vitro 실험에서와 같은 길항균 희석액을 같은 방법으로 고추에 처리하였다. 처리 횟수와 간격도 모두 in vitro 실험과 같았으나 발병은 병원균 포자현탁액 접종 대신 자연발병에 의존하였다. 길항균 최초 처리는 8월 초순이었으며, 병 발생 조사는 길항균 처리가 끝나고 약 2주 뒤였다. 병방제효과는 각 식물체 당 전체 고추 중에서 병반이 나타난 고추의 비율로 조사하였다.

그 결과 포장에서의 탄저병 방제효과는 온실에서의 방제효과에 비하여 약 10% 이상씩 떨어지는 결과를 관찰하였다. 방제가가 가장 높은 것은 BA313 2배 희석액으로서 60%에 육박하고 있었으며, 모든 처리구에서 50-60%의 방제가를 보이고 있어 그리 높은 방제가라고는 할 수 없었다<그림21>. 그러나, 대조살균제인 Propi의 방제기도 60%에 못 미쳤음을 감안한다면 길항미생물의 방제기도 낮은 수준이라고 하기는 무리라고 생각한다.

본 실험에서 대조살균제를 포함하여 모든 처리에서의 방제가가 낮게 나타난 것은 발병을 자연발병에 의존하였는데 실제로 무처리 대조구에서의 발병도가 거의 70%에 이르도록 병이 지나치게 많이 발생하였기 때문인 것으로 생각하며, 이렇게 심하게 발병한 상황에서도 방제가가 50%를 넘는다는 것은 본 길항균들이 고추 탄저병을 방제하기 위한 미생물제제로서 개발할 가치가 충분히 있음을 암시하는 증거라고 생각한다.

5. 기타 농자재와의 상호관계

가. 길항미생물에 대한 기존 살균제의 영향

길항미생물을 고추 탄저병 방제에 사용하였을 때 한시적으로라도 방제의 효과를 높이기 위하여 합성살균제를 같이 사용하는 경우에 대비하여 현재 고추 탄저병 방제용으로 등록되어 있는 살균제들이 길항미생물에 미치는 영향에 대하여 알아보았다.

길항미생물들이 모두 다 잘 자라는 PDA에 안트라콜, 후론사이드 등 각 살

균체들을 권장량의 1/5 농도가 되도록 계산한 양만큼 첨가한 다음 *Bacillus subtilis* BS238, *Streptomyces violaceus-niger* BA313, *Streptomyces halstedii* TH-04 길항미생물들을 streak하여 25°C 암조건에서 72시간 배양한 다음 생장 여부를 조사하였다. 대조구로는 살균제를 전혀 첨가하지 않는 PDA에서 자라는 길항미생물을 사용하였다.

BS238, BA313, TH-04 등 모든 길항균주는 대부분의 탄저병 방제용 살균제에 영향을 받지 않고 잘 자라는 편이었다. 그러나 시험에 사용한 살균제 중 ‘차세대’(포리옥신디·가벤다 수화제)는 세 길항균주 모두의 생육을 완전히 억제하였으며, ‘스포르곤’(프로라츠망간 수화제)은 BS238과 BA313의 생육을 억제하였다. 균주별로 보면 BS238이 ‘스포르곤’과 ‘차세대’에 의하여 생육이 저지되었고, BA313은 ‘리도밀큐’(메타실·디치 수화제), ‘스포르곤’, ‘차세대’에 의하여, 그리고 TH-04는 ‘균타임’(지오판·리프졸 수화제), ‘다코레이트’(베노밀·크로로타로닐 수화제), 그리고 ‘차세대’에 의하여 생육이 저지되었다.

1) 프로피 수화제에 대한 BS238의 반응

권장량의 1/5이라는 일정 농도 수준의 합성살균제에 의한 영향을 확인한 다음 단계로서, 길항미생물 중에서 BS238을 선정하고 살균제 중에서는 현재 고추 탄저병 방제용으로 가장 널리 사용되는 합성살균제인 프로피 수화제를 선정하여 살균제 농도와 접촉 시간에 따른 살균제의 영향을 알아보고자 다음과 같은 실험을 수행하였다.

프로피 수화제를 PDB 1 ℓ 당 2g(500배), 1g(1000배), 0.5g(2000배)씩 각각 첨가한 배지를 준비하고, 여기에 초기 균 밀도를 10^7 cfu/ml로 조절한 BS238 배양액을 배지당 10 ml 씩 접종하였다. 접종한 배지는 실온에 보관하면서 일정기간별로 시료를 채취하여 밀도를 조사함으로써 안트라콜(프로피 수화제)에 대한 BS238의 안정성을 확인하였다.

프로피 수화제는 앞서의 실험에서 BS238의 생육에 별다른 영향을 주지 않는 것으로 나타난 합성살균제이다. 그러나, 본 실험에서는 BS238의 생육이 농도에 따라 심하게 영향을 받아 프로피 수화제의 농도와 BS238의 밀도 사이에는 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌다. 살균제 배지에 BS238을 배양하면서 시간 경과에 따라 BS238의 밀도를 조사하였을 때 <표11>에서 보는 바와 같이

<표10> 고추 탄저병 방제용 살균제들이 길항미생물 *Bacillus subtilis* BS238, *Streptomyces violaceus-niger* BA313, *Streptomyces halstedii* TH-04의 생육에 미치는 영향

살균제	길항미생물 균주		
	BS238	BA313	TH04
Control	+	+	+
안트라콜	+	+	+
후론사이드	+	+	+
엄지	+	+	+
오비타	+	+	+
비온-엠	+	+	+
포름디	+	+	+
리도밀큐	+	-	+
스포르곤	-	-	+
굳타임	+	+	-
다코레이트	+	+	-
고추탄	+	+	+
차세대	-	-	-
새빈나	+	+	+
참조네	+	+	+

+: growth, -: non growth

〈표11〉 프로피 수화제 배지에서의 균 밀도(단위: 10^3 cfu/ml)의 경시적 변화

Dilution	Time (days)			
	1	5	15	25
Chemical ×5000	2	1.2	1	2
Chemical ×1000	3.5	2	2.7	5
Chemical ×2000	2	28	1	5
Control	200	2,300	1,200	360

프로피 수화제의 농도가 낮아질수록 BS238의 농도는 다소 높아지는 경향을 보였다. 프로피 수화제를 첨가하지 않은 대조구에서는 배양기간이 길어질수록 균밀도가 증가하는 것으로 보아 화학약제가 BS238의 생육에 어느 정도 유해한 것으로 생각된다. 특히 조사 초기(1일 뒤)부터 균밀도에 있어서 대조구와 프로피 수화제 처리구의 균 밀도 간에는 60-100배의 차이가 나고 있다는 것은 이 정도 농도에서는 길항균의 생육이 영향을 받을 가능성이 매우 높다는 것을 암시한다고 하겠다.

앞의 실험에서 살균제 권장량의 1/5로 처리하였을 때에는 길항균의 생육에 별다른 영향을 미치지 않았으나, 본 실험에서는 살균제의 농도가 높아짐에 따라서 길항균의 생육이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과들만을 가지고 판단한다면 살균제의 사용이 길항미생물제제의 효과에 큰 걸림돌이 된다고 할 수 있다 그러나, 본 연구에서는 길항미생물이 자라야 하는 환경이 바로 살균제가 해당 농도만큼 존재하는 배지 내부였다는 사실을 감안한다면, 실제 고추를 재배하는 환경에서는 또 다른 결과를 얻을 수도 있을 것이다. 실제 재배 환경에서는 살균제를 처리한 이후 시간이 지남에 따라서 그 환경, 적어도 식

물체의 표면 또는 토양에 존재하는 살균제의 양이 급격하게 줄어든다는 사실을 생각한다면, 이 실험의 결과보다는 권장농도의 1/5을 사용한 실험의 결과가 더 현실적이라고 할 수도 있다. 하지만, 어쨌든 합성살균제는 농도가 높아짐에 따라서 길항미생물의 생육을 저지하는 효과가 있음이 확인되었으므로, 가능하다면 이 길항미생물들과 합성살균제를 혼용하는 것은 피하는 것이 효율적인 병 방제에 도움이 될 것으로 생각한다.

나. 환경친화적 농자재가 길항미생물에 미치는 영향

합성 살균제 이외에 현재 유기농업 또는 친환경농업에서 매우 빈번히 사용되고 있는 이른바 환경친화적 농자재와 길항미생물과의 관계를 점검하는 것도 길항미생물제를 실용화하는데 있어서 매우 중요한 일 중의 하나이다. 따라서, 본 연구에서는 현재 유기농가 및 친환경농가에서 작물의 병을 방제하기 위한 목적으로 가장 많이 사용하고 있는 키토산과 목초액, 그리고 식초가 이들 길항미생물에 미치는 영향에 대하여 알아보려고 하였다.

키토산, 목초액, 식초 등 모두 배지에 혼합하고 거기에 길항미생물을 키우는 방법으로 조사하였는데, 이들을 배지에 섞고 멸균을 하기 위해 가압증기살균한다면 성분의 변화가 일어나 정확한 효과를 얻기 힘들 가능성도 있기 때문에 모든 친환경 자재는 가압증기살균하지 않고 배지에 혼합하기 전에 반드시 미생물여과필터(milipore, 지름 0.2 μm)로 여과하여 사용하였다.

친환경농자재들은 모두 시중에서 구입하여 사용하였는데, 우선 키토산으로는 '흡살림키토산'과 '슈퍼키토산'을 사용하였으며, 목초액으로는 '차코리치목초액', '슈퍼골드키토산목초액', '목초액골드'를 사용하였고, 마지막으로 식초는 시중 시장에서 판매하고 있는 '현미식초'를 사용하였다.

1) 액배양

희석배수는 각각 사용설명서에 나와 있는 대로 따랐으며 자세한 희석배수는 아래 <표12>에 나타나 있고, 역시 기본 배지로는 PDB를 사용하였다. 길항미생물은 밀도가 108 cfu/ml이었으며, 각 시험처리 당 200 μl 씩을 접종하였다. 길항미생물을 접종한 배지는 25°C에서 150 rpm으로 4일간 배양한 뒤 각각의 흡광도를 측정하여 밀도를 구하였다.

아무 것도 첨가하지 않은 대조구에서의 밀도는 TH-04가 10^{10} , BA313이 10^7 , BS238이 10^9 cfu/ml인 반면 키토산에서는 TH-04가 10^8 , BA313이 10^5 - 10^7 , BS238이 10^6 - 10^7 cfu/ml로 나타나 친환경농자재인 키토산이 모든 길항미생물의 생육을 약간 저해하는 것으로 밝혀졌다<표12>.

<표12> 환경친화적 농자재가 액체배지에서 *Streptomyces halstedii* TH-04, *Streptomyces violaceus-niger* BA313, *Bacillus subtilis* BS238의 생육에 미치는 영향

친환경자재	제품	희석배수	밀도 (log, cfu/ml)		
			TH-04	BA313	BS238
키토산	흙살림	300	8	5	6
	슈퍼	400	8	7	7
	차코리치	1,500	10	8	7
목초액	슈퍼골드키티	600	8	9	6
	목초액골드	500	10	9	7
식초	현미식초	1,000	10	8	8
대조구	-	-	10	7	9

목초액은 대부분 TH-04의 생육에 별다른 영향을 미치지 않았던 반면 BA313의 생육은 대조구(10^7 cfu/ml)에 비하여 오히려 증가(10^8 - 10^9 cfu/ml)하였고, BS238의 생육은 대조구(10^9 cfu/ml)에 비하여 저해(10^6 - 10^7 cfu/ml)하였다. 식초는 BA313의 생육을 약간 증가시키고 BS238의 생육을 약간 저해하였으나 TH-04는 식초의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

한편 BA313의 경우에는 키토산과 일부 목초액에서 방선균들이 영기는 현상이 관찰되었다.

2) 고체배양

각 길항균마다 최적 고체배지가 달랐기 때문에 BA313과 BS238의 경우에는 NA배지를 사용하였으며, TH-04의 경우에는 YMA배지를 사용하였다. NA와 YMA를 test tube 마다 15 ml씩 넣은 다음 키토산과 식초, 목초액을 최저 농도로 첨가한다. 여기에 각 길항미생물의 왕성한 colony를 cork borer로 떼어낸 조각 2개를 치상하고 25°C 압조건에서 4일간 배양한 뒤 각각의 배지에서 자라고 있는 균총의 크기를 측정하였다.

고체배양에서는 액체배양에서와는 다른 양상이 나타났다. 고체배양에서는 친환경농자재의 종류에 관계없이 대부분의 경우에 균의 생장이 줄어들었다 <표13>. TH-04는 목초액이나 키토산에서는 생장이 줄어들거나 또는 약간 증가하였으나 식초 처리구에서는 생장이 큰 폭으로 줄어들어 식초를 사용하는 농가에서 TH-04를 함께 사용하는 것은 무리가 있다고 생각한다. BS238은 어떤 처리구에서든 생장이 상당히 줄어들었는데, TH-04와는 달리 식초 처리구에서는 대조구에서의 생장과 비슷하여 오히려 다른 처리구에서보다 성장감소율이 더 적었다. BA313은 모든 처리구에서 대조구에서의 생육보다 조금씩 줄어들었다.

그런데, TH-04와 BS238에 비하여 BA313은 고체배지에서의 생육이 매우 낮은 것으로 나타났다. BA313은 다른 길항미생물 생장의 약 40% 정도에 머무르고 있었다.

〈표13〉 환경친화적 농자재가 고체배지에서 *Streptomyces halstedii* TH-04, *Streptomyces violaceus-niger* BA313, *Bacillus subtilis* BS238의 생육에 미치는 영향

친환경자재	제품	희석배수	균총의 크기 (지름, mm)		
			TH-04	BA313	BS238
키토산	흙살림	300	20.6	8.8	15.8
	슈퍼	400	29.5	9.8	24.1
목초액	차코리치	1,500	23.6	8.1	12.5
	슈퍼골드키티탄	600	27.6	8.2	20.9
	목초액골드	500	19.0	9.0	17.7
식초	현미식초	1,000	15.2	8.0	26.9
대조구	-	-	25.2	9.4	27.8

제 2 절 길항미생물의 항균활성물질 및 저항성 유도 물질 탐색과 생산성 향상

1. 고추 배양세포 확보

국내에서 시판되고 있는 고추(*Capsicum annuum*) 중에서 풍촌, 부촌, 금관, 다보탑 등 4종의 씨앗을 구입하여 sodium hypochlorite 3% 용액에서 10분 동안 표면을 멸균한 후 멸균증류수로 세척하고 멸균된 여과지로 물기를 제거한 후 Murashige-Skoog (MS) 배지에 접종하여 무균발아시켰다. 24~26°C에서 약 15일 후 5 cm 정도 자란 고추 싹의 줄기와 잎 부분을 각각 2,4-D (0.5 mg/ℓ), sucrose (30 g/ℓ), agar (8 g/ℓ)를 함유한 MS 고체배지에 배양하며 callus를 유기시켰다. 유기된 callus는 역시 2,4-D (0.5 mg/ℓ)를 함유한 MS 액체배지에서 진탕배양하였는데, 배양조건은 회전속도 100 rpm, 16/8의 명암 시간을 유지하도록 조절하였다.

그 결과 부촌과 다보탑 등 2종에서만 callus가 잘 유기되어 이를 실험의 재료로 사용하고자 계대배양을 하였다. 나머지 품종들은 callus가 잘 유기되지 않았으나 부촌과 다보탑의 cell line을 확보하였으므로 더 이상의 시도를 하지 않았다. 부촌과 다보탑 배양주들은 3주 간격으로 계대배양하여 cell line을 유지하였다.

2. 항균활성물질 및 저항성 유도물질의 탐색과 동정

가. 항균활성물질 및 저항성유도물질 조추출

‘길항미생물 특성 및 병방제효과 조사’ 세부과제로부터 분양받은 고추의 병원균과 길항 미생물을 PDA 등 적절한 1배지에서 10일 동안 배양하였다. PDB 100 ml 당 적당량의 균을 접종하고 25°C 암실에서 120 rpm으로 10일 동안 진탕배양하였다. 이미 확보된 고추 배양세포에 역병원균의 배양액 및 추출액을 처리하여 ethylacetate로 extraction함으로서 고추 역병원균 (*C. gloeosporioides*)에 대한 저항성 유도 물질의 조추출물을 확보하였다. 이러한 방법으로 고추 탄저병원균 등과 그들에 대한 길항미생물로부터 항균물질 및 저항성유도물질을 추출하여, 이들 추출액이 고추 탄저병 등의 발생과 진전을 억제하는 효과를 in

vitro 상태에서 검정하였다.

그 결과 높은 병 억제효과를 보이는 항균물질 및 저항성 유도물질만을 방제 후보물질로 간주하고 추출액을 다양한 크로마토그래피 기법을 이용하여 단일 물질을 분리하였으며, 순수하게 분리한 물질을 IR, MS, NMR 등의 분광학적 분석기법을 이용하여 그 구조를 동정하였다.

역병균의 배양액은 PDA배지에서 배양한 역병균을 제거한 배양여액을 동결 건조하여 제조하였으며, 추출액은 역병균체를 blender로 갈아 원심분리하여 상등액을 동결건조하여 제조하였다. 제 1 과제로부터 분양 받은 *Bacillus subtilis* BS238을 Nutrient Broth (NB) 배지에 배양한 후 배양 여액을 일정량 취하여 고추 탄저병균에 처리하여 항균효과를 검정하였다.

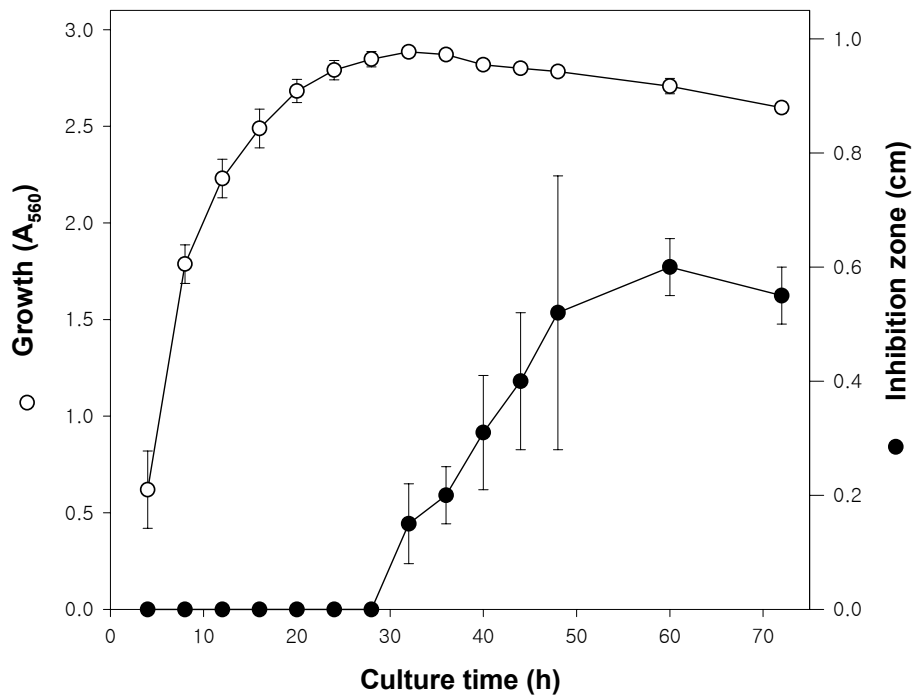
상기 균주를 LB배지에서 72시간 동안 배양하면서 4시간 간격으로 배양액을 취하여 560 nm에서 세포의 성장을 측정하였고, 원심분리하여 세포를 제거한 후 상등액의 항진균 활성을 측정하였다. 그 결과 길항미생물이 정지기 (stationary phase)에 들어서면서부터 항진균성 물질이 생산되는 것을 알았고, 길항미생물이 사멸기 (death phase)에 도달했을 때 항진균성 물질의 생산이 최대가 되는 것을 알 수 있었다 <그림22>.

나. 조추출물의 병 억제 효과 검정

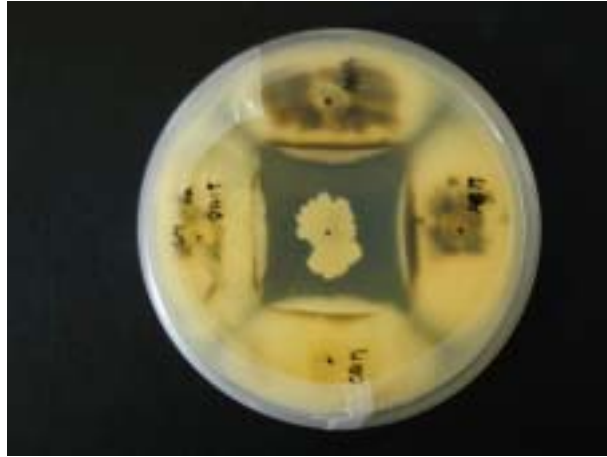
수 종의 병원균을 일정한 간격으로 접종한 후, 한 가운데에 멸균된 paper disk를 놓고 그 위에 조추출액을 넣어 일정시간 배양하여 만들어지는 저지대의 크기를 측정하여 간접적으로 병원균의 성장억제 효과를 관찰하는 방법으로 BS238 등 몇 가지 길항균의 배양액 및 저항성 유도 물질 조추출물에 의한 고추 탄저병의 억제 효과를 조사하였다.

그 결과, *B. subtilis* BS238 (BS238) 배양액에서 어느 정도의 억제효과가 관찰되었다. <그림23>에서 보는 바와 같이 BS238은 억제효과를 실험한 4종의 탄저병균 모두에 대해 항균효과를 나타내었으며 이는 BS238이 자라면서 항균 활성을 가진 물질을 생산하고 체외로 분비함에 따라서 배양 여액에 항균활성을 나타내는 물질이 존재하고 있음을 나타내는 결과였다.

또한, *Bacillus subtilis* KS03의 배양여액 역시 위와 같은 방법으로 항균활성을 조사하였을 때, 고추 탄저병균인 *C. gloeosporioides*의 성장을 저해하여



<그림22> *Bacillus subtilis* BS238의 밀도(하얀점)와 *Colletotrichum gloeosporioides*에 대한 항균물질(검은점) 생산과의 관계.



<그림23> *Bacillus subtilis* BS238(가운데)에 의한 *Colletotrichum gloeosporioides* 균주들의 생육 저지.



<그림24> *Bacillus subtilis* KS03 배양여액(가운데)의 고추 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides* 생장억제효과.

뚜렷한 생장저지대를 만들었으며, 저지대에 인접한 균사에는 피사의 흔적이 나타났다 <그림24>.

다. 향균물질 및 저항성 유도 물질의 순화 및 구조 동정

고추 배양세포에 병원균 균주를 투여하고 18-24 시간 후 배지를 수거하여 ethylacetate, *n*-butanol, methylene chloride, hexane으로 추출하여 각각의 가용분획과 증류수 분획을 감압 농축하여 향진균 활성을 측정한 결과 *n*-butanol 가용분획에서만 활성이 나타났다<표14>.

<표14> *Bacillus subtilis* KS03 배양여액을 여러 용매로 추출한 물질의 향진균활성

Solvent	Antifungal activity
Culture filtrate	+
<i>n</i> -Butanol	+
Ethyl acetate	-
Methylene chloride	-
Hexane	-

+ : inhibition zone present,

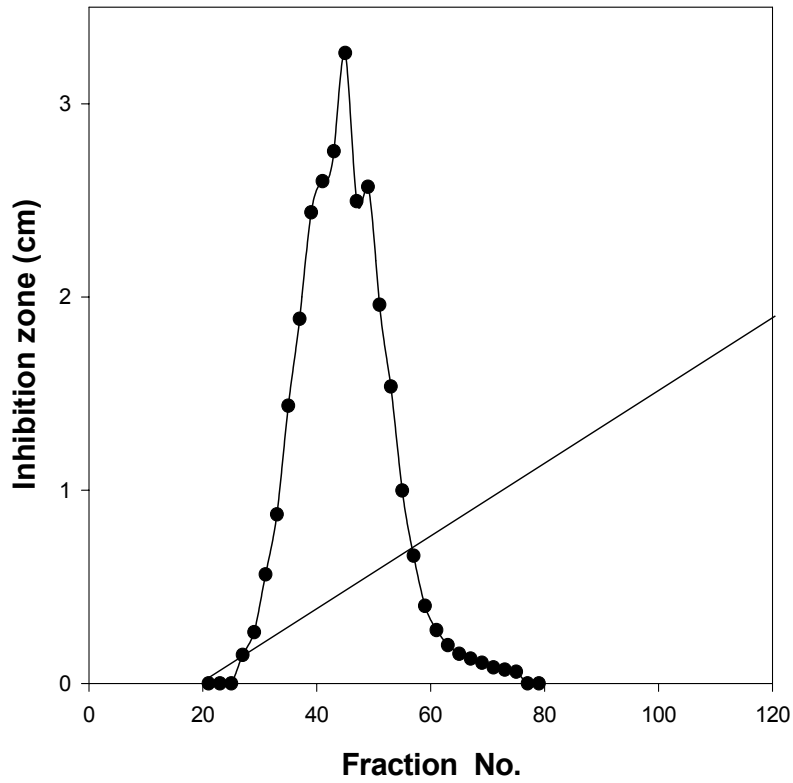
- : no inhibition zone

DEAE sepharose CL-6B를 행하여 항진균 활성을 측정된 결과 115개의 분획 중 33번부터 55번의 분획에서 항진균 활성을 나타냈다. 즉, 항진균 물질이 NaCl 농도로 0.6 M에서 1.0 M 사이에서 용출되었는데<그림25>, 이 활성 분획을 모아 *n*-butanol로 추출하고, 감압 농축하여 Sephadex G-50을 행하여 항진균 활성을 측정된 결과 80개의 분획 중 16번부터 23번의 분획에서 항진균 활성을 나타냈다 <그림26>. 이 활성 분획을 모아 *n*-butanol로 추출한 후 감압 농축하여 preparative TLC를 하여 활성을 나타내는 물질의 위치를 결정하고 <그림27>, 활성 부분을 모아 다음 실험에 사용하였다.

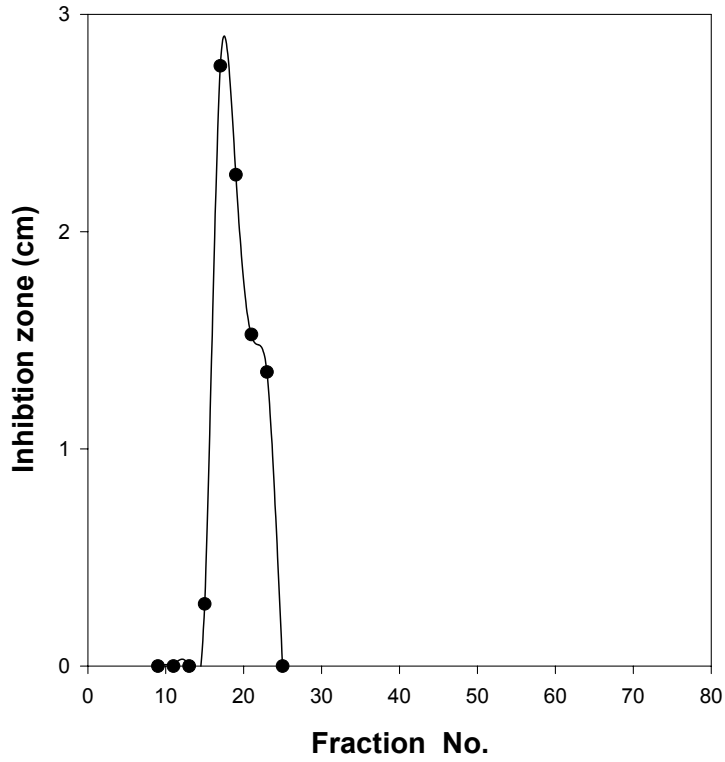
순수 분리된 물질의 FTIR spectrum을 측정된 결과 3300 cm^{-1} 주변으로 broad한 band를 나타냈는데 이것은 NH group이 존재하는 것을 의미한다. 또 1647 과 1510 cm^{-1} 각각에서 amide I 과 II 결합을 보이는 band를 나타냈다 <그림28>.

MALDI mass spectra 분석을 통해 m/z 1043, 1057과 1071에서 3개의 분자를 포함하는 cluster를 관찰하였다. 분자량이 14 Da 차이가 나는 것은 동일한 아미노산 기본 구조에 탄소수가 다른 fatty acid chain이 존재할 것으로 생각된다. 주된 molecular ion peak $[M+H]^+$ 은 시판되고 있는 iturin A와 똑같은 위치인 m/z 1043에서 관찰되었다 <그림29>.

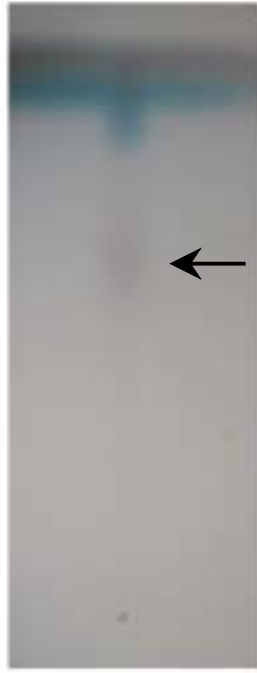
MS/MS spectra의 저분자량 부분에서는 Ser (m/z 60), Pro (m/z 70), Gln (m/z 84), Asn (m/z 87) 그리고 Try (m/z 136)의 immonium ion ($H_2N^+=CH-R$)에 일치되는 peak를 나타냈다. β -amino acid 또한 m/z 184에서 하나의 immonium ion ($H_2N^+=CH-C_{11}H_{23}$)을 갖는 것을 알 수 있었다. 시판되고 있는 iturin A를 표준 시료로 하여 Collision induced dissociation (CID) spectra에서 나타나는 b-type과 y-type ion을 분석하여 순수분리 된 iturin의 amino acid 서열을 Pro-Asn-Ser- β AA-Asn-Tyr-Asn-Gln (β AA= β -amino acid)으로 결정하였다 <그림29>.



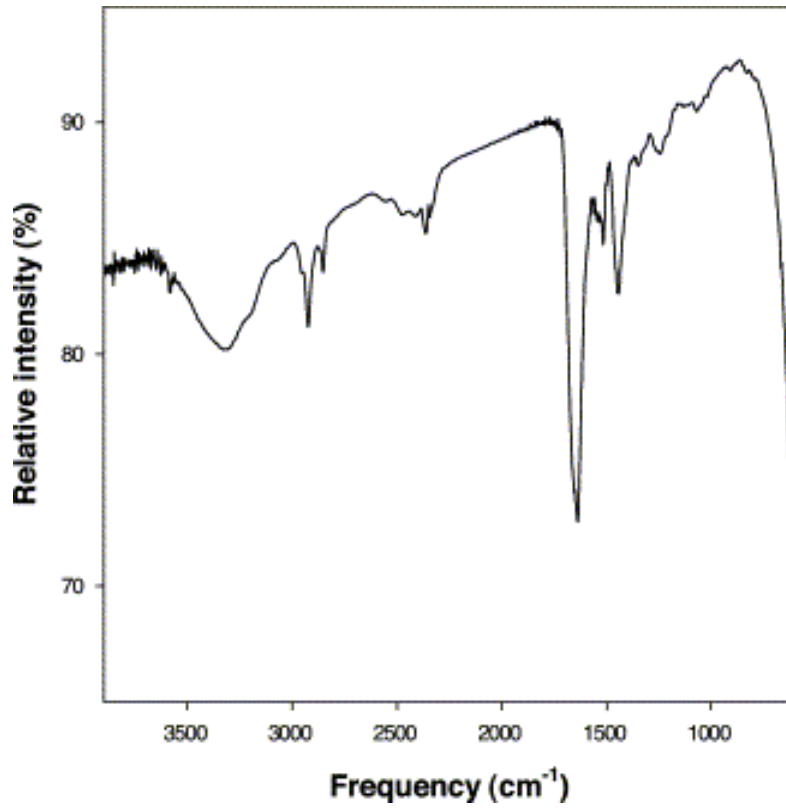
<그림25> DEAE sepharose CL-6B column chromatography. The antifungal compound was eluted with a linear gradient of NaCl (0.0–2.0 M) at a flow rate of 30 ml/h. The volume of each fraction was 5 ml.



<그림26> Sephadex G-50 column chromatography. The antifungal compound was eluted with DW at a flow rate of 30 ml/h. The volume of each fraction was 2.5 ml.



<그림27> *Bacillus subtilis* KS030이 생산하는 향진균 물질의 TLC analysis. 화살표가 가리키는 것이 향진균 물질.



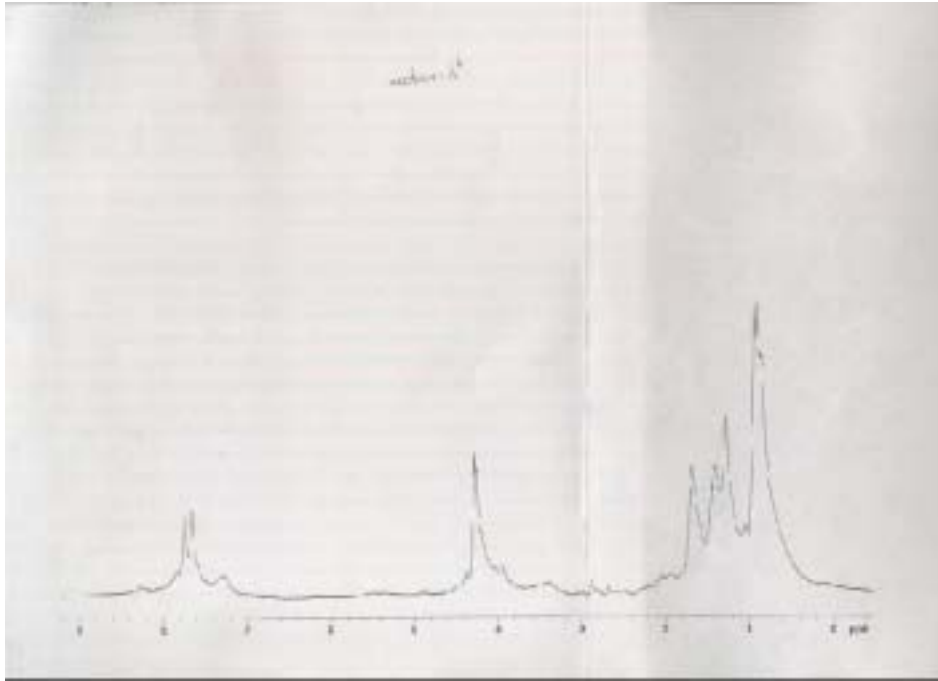
<그림28> *Bacillus subtilis* KS03으로부터 순수분리해 낸
향진균화합물의 FTIR spectrum.

Iturin은 다른 구조의 fatty acid side chain을 갖고 있어서 각각의 iturin에서 isomer가 존재하는데, 이중 Iturin A는 β -AA-Asn-Tyr-Asn-Gln-Pro-Asn-Ser의 서열을 갖고 있으며 A₁부터 A₈까지 8개의 isomer가 존재한다 (Isogai 등, 1982). 본 연구에서 분리된 고추탄저병균 생장저해 물질은 iturin A₂와 분자량과 서열이 같은 물질이었다.

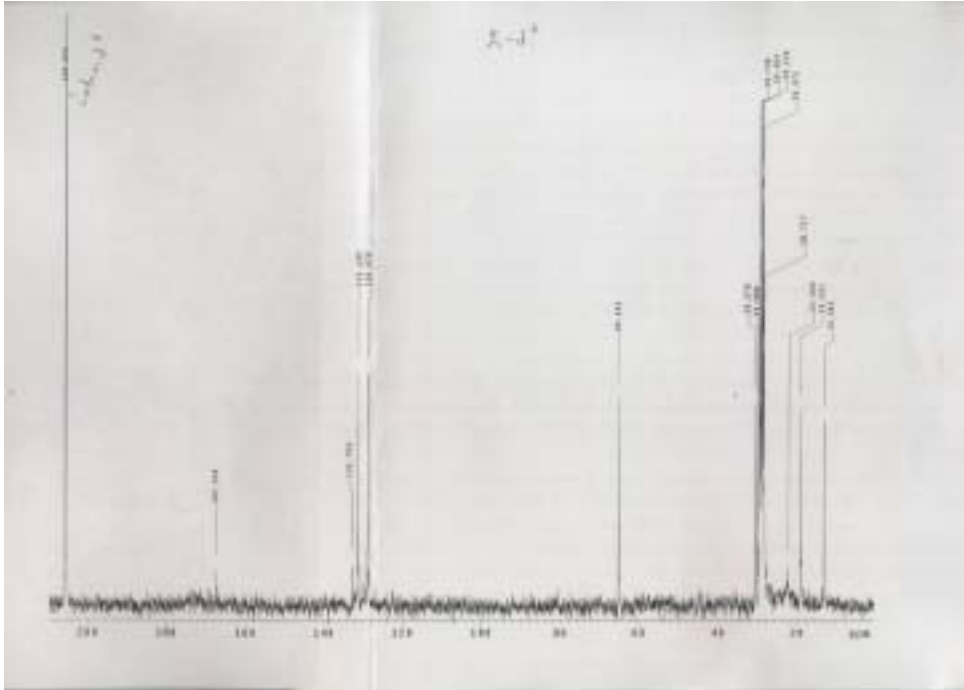
한편, iturin은 여러 종류의 식물병원균, 예컨대 *Monilinia fructicola* (Gueldner 등, 1988), *Ophiostoma ulmi* (Schreiber 등, 1988), *Aspergillus flavus* (Klich 등, 1994) 및 *Rhizoctonia solani* (Yu 등, 2002)과 같은 식물병원균의 효율적인 생물방제제로 보고되어 있다.

추출물을 감압건조하여 TLC로 화합물의 존재여부 및 증감변화를 확인한 후, 대량배양으로 media 추출물을 모은 후 이로부터 silica gel column chromatography, Sephadex LH-20, HPLC 등을 통하여 물질을 분리하고 IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR등으로 구조를 알아낸다.

배양 여액을 ethyl acetate로 추출하여 추출물속에 들어 있는 물질의 성상을 알아보려고 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 분석을 시행하였다. ¹H-NMR의 경우, <그림30>에서 보는 바와 같이 0에서 2 ppm에 걸쳐 CH₂ 및 CH₃의 peak이 나타났고, 7.6 ppm 부근에서 aromatic peak이 관찰되었으며, 이는 비교적 간단한 구조의 aromatic compound가 존재함을 알 수 있었다. ¹³C-NMR의 경우에서도 20 ppm 부근의 CH₂ 및 CH₃ peak과 128에서 132 ppm에 걸쳐 aromatic peak가 관찰되었다<그림31>. Hamasaki 등 (1993)은 *Bacillus*는 배양시 다량의 phenylamine를 합성하여 배지로 분비한다고 보고하였으며, 본 균주도 이와 유사한 물질을 생산하고 있음을 알 수 있었다. 차후의 실험에서는 상기 물질 및 기타 다른 분획에서의 향균 물질의 존재를 검정하고 순화할 계획이다.



<그림30> *Bacillus subtilis* KS03 ethyl acetate 조추출물의 ^1H -NMR pattern.



<그림31> *Bacillus subtilis* KS03 ethyl acetate 조추출물의 ^{13}C -NMR pattern.

3. 길항물질 최적 생산 조건의 확립

가. pH의 영향

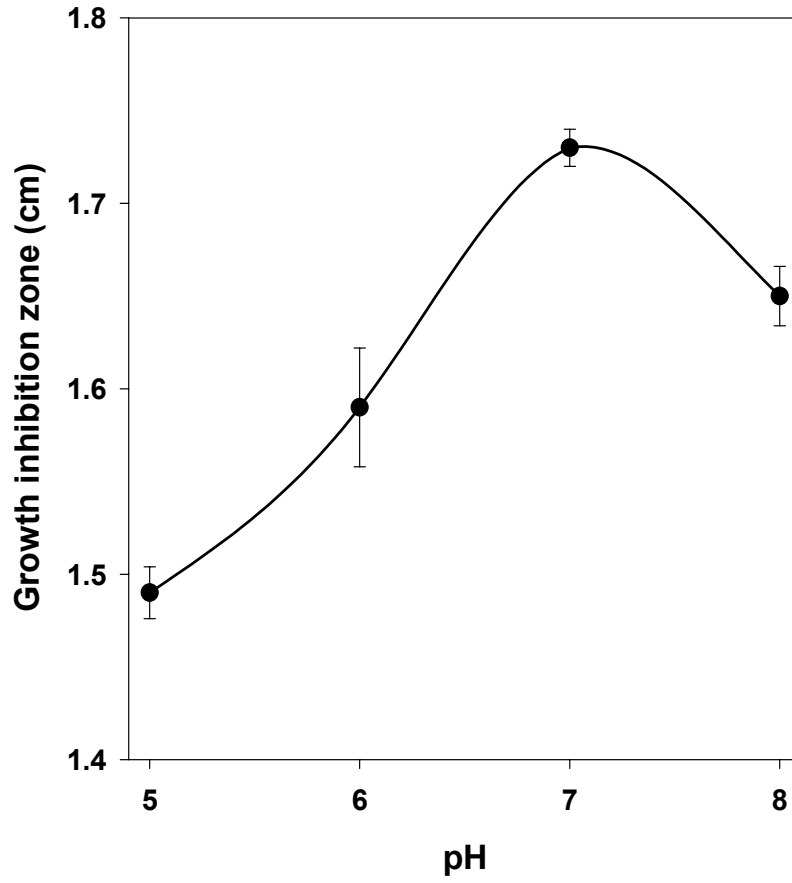
배지의 초기 pH를 각각 5.0, 6.0, 7.0 및 8.0으로 조절하여 *B. subtilis*를 배양한 후, 60, 90 및 120 시간 후에 배양액을 취하여 병원균의 성장 저해능을 측정한 결과 <그림32>, pH 7.0에서 제일 높은 활성을 보여 저해환의 직경이 1.7 cm 정도였다. 본인 등의 결과에 의하면 상기 균주를 LB (Luria Bertani) 배지에서 배양하였을 경우 길항세균의 성장곡선이 사멸기에 도달한 시기인 60 시간 이후에 성장 저해능이 높게 나타났으며 (Cho *et al.*, 2003), 배지의 초기pH는 중성에 가까웠다. 따라서 이후의 실험은 배지의 pH를 7.0으로 조절하였고, 배양액의 추출시기도 60 시간 이후로 하여 실험을 행하였다.

나. 탄소원의 영향

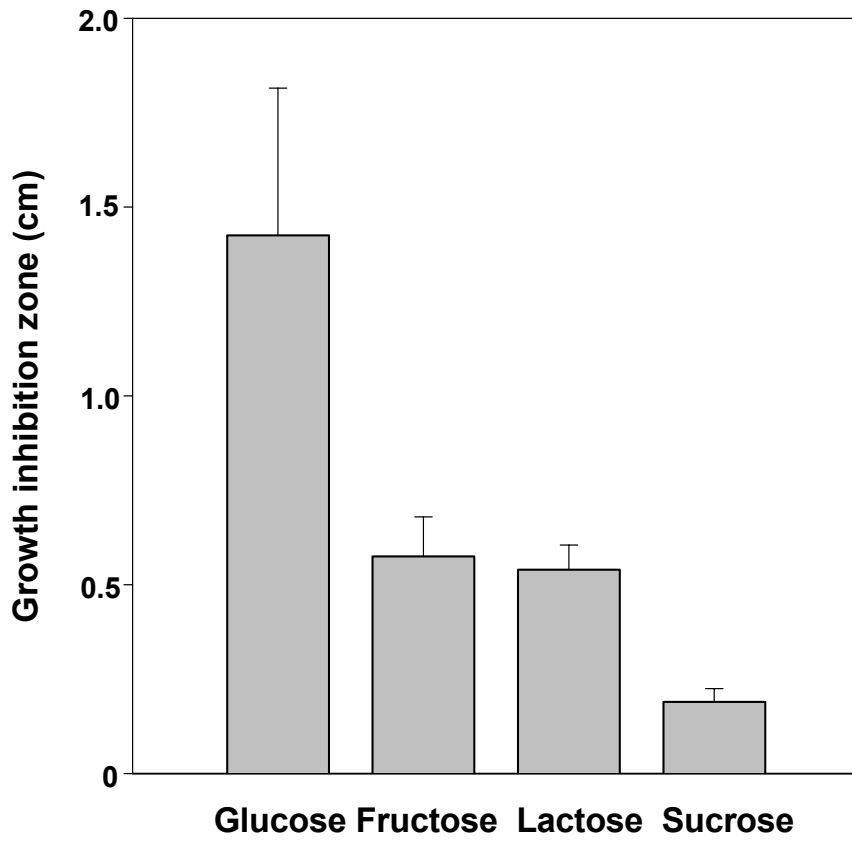
질소원은 ammonium sulfate로 고정하고, 탄소원으로 glucose, fructose, lactose, sucrose, maltose 및 starch를 처리하여 배양한 후, 배양액을 추출하여 병원균의 성장 저해활성을 조사하였다. <그림33>에서 보는 바와 같이 glucose를 탄소원으로 처리하였을 경우에서 가장 높은 저해환을 보였으며, fructose와 lactose를 탄소원으로 처리한 배양액에 비해 2배 이상의 저해능을 보였다. Maltose와 starch의 경우에는 저해활성이 전혀 관찰되지 않았다.

다. 질소원의 영향

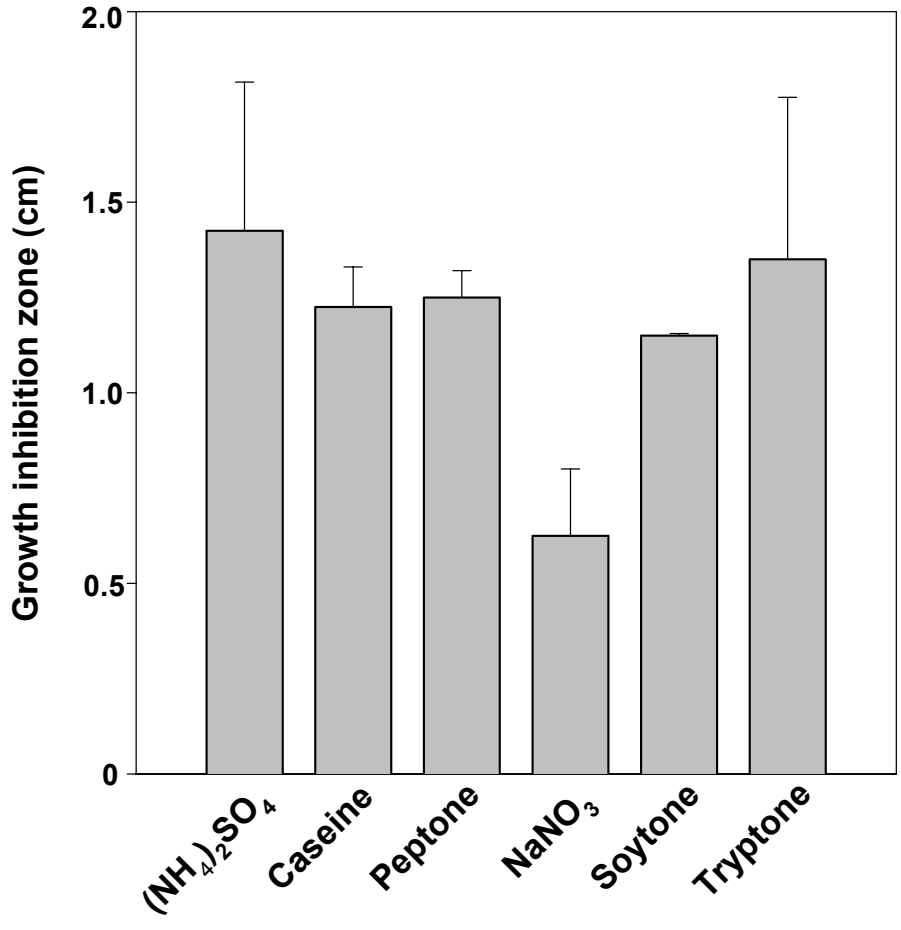
탄소원을 glucose로 하고, 질소원을 달리하여 실험한 결과, ammonium sulfate와 tryptone에서 높은 활성이 나타났으며, sodium nitrate를 제외한 casein, peptone 및 soytone과 같은 유기 질소원에서도 비교적 높은 활성을 나타내었다 <그림34>.



〈그림32〉 배지의 초기 pH가 *Bacillus subtilis* KS03의 *Colletotrichum gloeosporioides* 생장억제물질 생산에 미치는 영향.



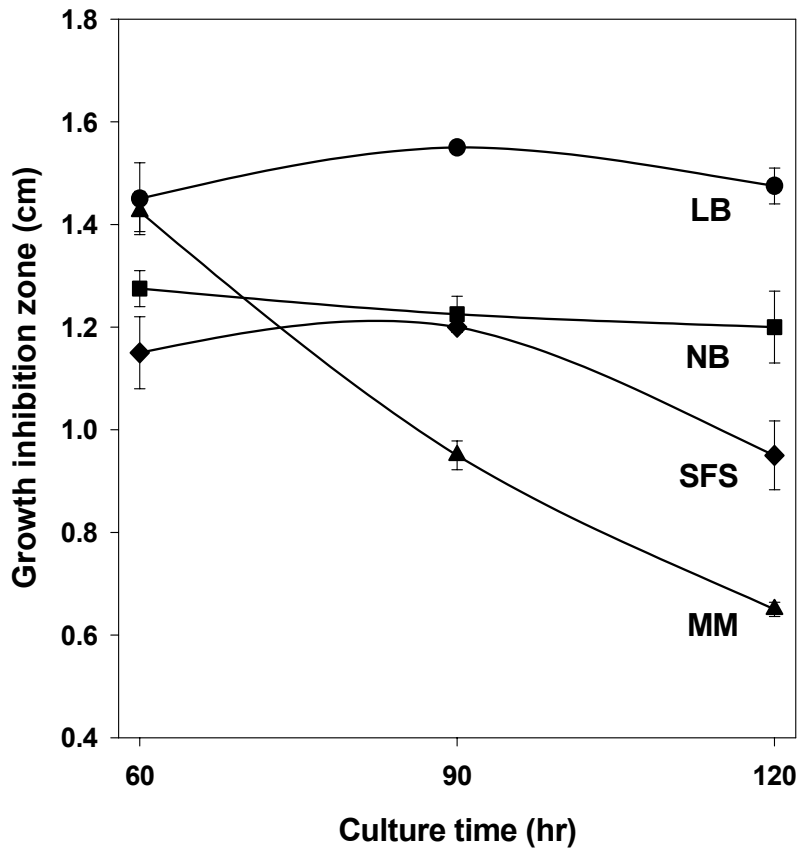
〈그림33〉 여러 종류의 탄소원이 *Bacillus subtilis* KS03의 *Colletotrichum gloeosporioides* 생장억제물질 생산에 미치는 영향.



<그림34> 여러 가지 질소원이 *Bacillus subtilis* KS03의 *Colletotrichum gloeosporioides* 생장억제물질 생산에 미치는 영향.

라. 각종 배지에서의 저해능

상기의 조건에서 최적으로 정해진 탄소원으로 glucose, 질소원으로 ammonium sulfate를 첨가한 최소배지와 시판되고 있는 세균 배양 배지인NB (nutrient broth), LB 및 콩가루 (1%)와 sucrose (3%)를 첨가한 SFS (soybean flour-sucrose) 배지에 *B. subtilis*를 배양하면서 일정시간 간격으로 저해능을 조사하였다 <그림35>. 가장 높은 저해활성은 LB 배지에서 90 시간 배양한 배양액에서 나타났으며, 타 배지에서도 비슷한 시기에 최대의 활성이 나타났다. 그러나 값싼 배지를 개발하고자 시도된 SFS 배지에서의 활성이 비교적 낮게 나타나, 산업화를 위해서는 질소원 등 다른 배양조건의 탐색과 더불어 최적 배양조건이 확립되어야 할 것으로 생각된다.



<그림35> 배지의 종류가 *Bacillus subtilis* KS03의 *Colletotrichum gloeosporioides* 생장억제물질 생산에 미치는 영향. LB; Luria Bertani medium, NB; nutrient broth medium, SFS; soybean flour-starch medium, MM; minimal medium.

제 3 절 고추 탄저병의 환경친화적 미생물 농약 생산 기술 확립

1. 길항물질 생산공정 최적화

가. 길항미생물의 탄소원, 질소원 요구성 및 최적 pH와 온도

제 1세부과제로부터 분양받은 길항균 *Streptomyces halstedii* TH-04와 *Bacillus subtilis* BS238을 PDA, AIA (Actinomyces Isolation Agar), LB 등에서 배양하며 이들의 영양요구성을 조사하였다. 또한, 대량배양을 위하여 물 한 달(20 L) 당 corn starch 또는 glucose 250 g 내외, 탈지대두분(soymeal) 150 g 내외, yeast extract 20 g, CaCO₃ 20, 40, 또는 80 g을 넣은 액체배지에서의 생육을 조사하였다. 각 배양액의 pH와 배양온도는 제 1세부과제에서의 결과에 따라서 pH 7.0, 23℃로 고정하여 시험을 수행하였다.

TH-04와 BS238은 모두 PDA에서 잘 자랐으며, TH-04는 AIA에서, 그리고 BS238은 LB와 NA에서도 잘 자랐다. 따라서, 두 길항균 모두 PDA에 배양하여 보관하면서 다음 시험들을 수행하였다.

배지의 조성에서 탄소원으로 사용하였던 corn starch나 glucose 모두 길항균의 생육에는 이상이 없었으나, corn starch의 경우에는 배양 중에 배양액을 교반함에 따라 거품을 많이 만들어 내는 성질이 있어서 본 길항균의 배양에는 부적합하였으므로 상대적으로 더 비싸기는 하여도 glucose를 사용하는 것이 고품질 길항균을 생산하기에 더 나은 방법인 것으로 판단되었다.

질소원으로 사용한 탈지대두분과 yeast extract는 모두 별 문제를 일으키지 않으면서 길항균의 생장을 돕는 것으로 나타났다. 특히 이들은 함께 넣었을 때가 둘 중에 하나만을 넣었을 때보다 생육을 더 증진하였다. Yeast extract는 값이 비싸기는 하지만, 첨가하는 양이 상대적으로 적어 경제적으로 큰 부담을 주지는 않을 수도 있으므로 길항균 배양 시 yeast extract와 탈지대두분을 함께 사용하는 것이 바람직할 것으로 생각한다. CaCO₃는 40 g을 첨가하였을 때 TH-04와 BS238의 생육이 가장 좋았다.

따라서, 본 시험의 결과 **길항균의 최적 배지로는 탄소원으로서 glucose를 2.5%, 질소원으로 탈지대두분 1.5%, yeast extract 0.2%를 사용하며, 여기**

에 CaCO_3 를 0.4% 첨가하는 것이라 할 수 있다.

나. 배지 조성에 따른 길항력의 차이 조사 (*in vitro*)

길항균이 자라는 배지의 영양조건에 따른 길항력의 차이를 검증하기 위하여, 위 배지 선발 시험에서 선발된 배지를 기본으로 하여 조성물의 비율을 초과 및 부족으로 조정한 3종의 배지(glucose:탈지대두분:yeast extract = 2.5:1.5:0.2(기본), 3.0:2.0:0.4(초과), 2.0:1.0:0.2(부족))에 TH-04와 BS238을 3일간 배양하였다. 길항균 배양이 끝나면 세균여과기(milipore filter, 0.2 μm)를 이용하여 배양액으로부터 균을 걸러내고, 배양여액을 PDB로 30배 희석한 다음, 거기에 고추 탄저병균 *Colletorichum gloeosporioides*의 포자현탁액을 접종하여 성장정도를 조사하였다.

그 결과 항균성은 초과배지, 기본배지, 부족배지의 순서로 높았으나 초과배지와 기본 배지 사이에 통계적인 유의차는 없었으며, 부족 배지에서는 기본이나 초과에 비하여 항균력이 떨어져 병원균의 생육이 상대적으로 왕성한 것으로 나타났다. 따라서, 생산비 등을 고려할 때 초과배지보다는 기본배지가 경쟁력이 더 나은 것으로 판단되었다.

다. 포자 형성 조건 탐색

위에서 선발한 배양배지에 TH-04와 BS238을 배양하며 배양액의 pH와 온도 등에 변화를 주며 포자형성정도를 조사하였다.

TH-04와 BS238은 모두 생육적온 및 최적 pH를 벗어나면서 전체 포자 수가 줄어들었는데, 이는 포자형성에 부적당한 조건이라기 보다는 균의 생육 자체가 억제되었기 때문인 것으로 보인다. 결론적으로 본 시험에서는 포자형성을 가장 많이 시킬 수 있는 확실한 조건을 아직까지 찾지 못하였기 때문에 이 부분은 계속 시험 중이다.

또한, 쌀겨, 곡물, 폐톱밥배지(폐기팽이배지) 등 고체배지에서의 포자 형성도 조사하였는데, 이 경우 오염이 자주 발생하여 길항균의 포자생산에 적당치 않은 조건으로 판단하고 더 이상의 실험을 중지하였다.

2. 길항미생물의 제제화

가. 미생물 보호제 선발

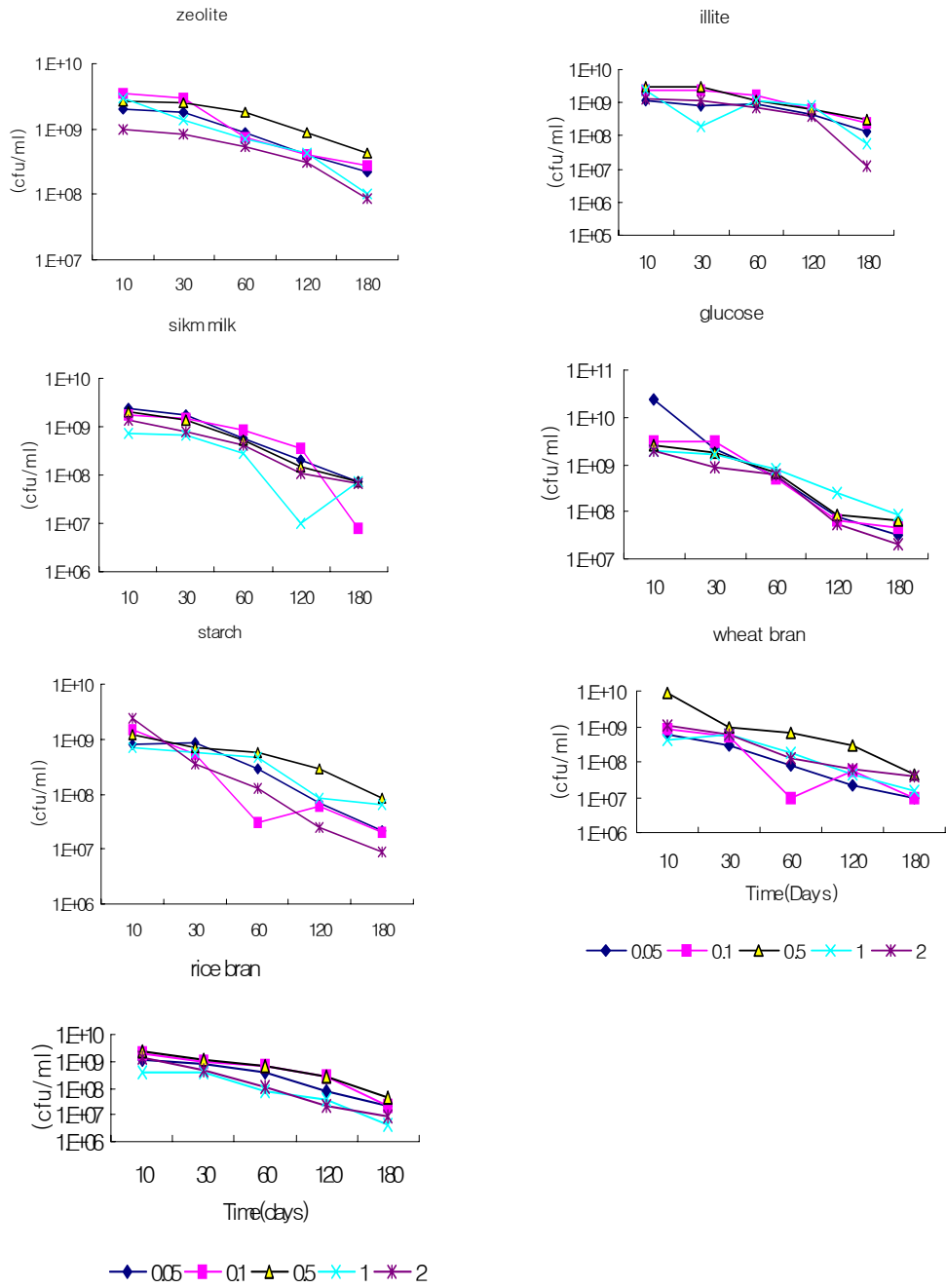
1) 보호제 선발과 보호제 첨가량 및 보관 온도에 따른 밀도 변화 조사

길항미생물을 제형화함에 있어서 제제의 안정성을 높여 줄 수 있는 보호제를 선발하기 위하여 *Bacillus subtilis* BS238을 Jar-fermentor로 액상 배양하여 실험에 사용하였으며, 초기 균밀도는 2.9×10^9 cfu/ml 이었다. 길항미생물의 밀도를 안정화시키기 위하여 쌀겨, 밀기울, 전분, 지오라이트(zeolite), 일라이트(ilite), 포도당, 스킴밀크(skim milk) 등을 보호제로 사용하였다. 보호제 선발을 위하여 미생물 배양액에 대하여 이들을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0%를 첨가하였으며, 대조구는 순수한 배양액 자체로 하였다. 이때 각각의 보호제는 멸균 후 다시 멸균수에 희석하여 농도를 조절한 다음 사용하였다. 보호제가 첨가된 미생물 배양액은 상온(18°C)에 보관하면서 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180일 경과 후 균밀도 변화를 조사하였다.

그 결과 <그림36>에서 보는 바와 같이 보호제 선발에서 BS238의 경우 glucose 0.1% 첨가구에서 30일 경과 후 3.1×10^9 cfu/ml으로 초기에 비해 균밀도가 상승되는 듯하였으나, 60일 이후 1.2×10^8 cfu/ml로 다시 낮아지는 경향을 나타냈다. 그러나 일라이트 0.1% 첨가구에서는 30일, 60일 이후 각각 2.3×10^9 cfu/ml, 1.7×10^9 cfu/ml로 균밀도가 유지됨에 따라 보호제로써 일라이트가 가장 적당한 것으로 판단되며, 1% 일라이트 첨가구에서 180일 경과하였을때 균밀도가 가장 높아 5.6×10^8 cfu/ml로 조사되었다. 보호제 무첨가구의 밀도인 1.6×10^6 cfu/ml에 비하여 일라이트 첨가구의 균밀도는 10^2 cfu/ml 이상의 차이를 보였다. 따라서 보호제 선발 결과 일라이트 1%가 보호제로써 가장 적당한 것으로 선발되었다.

2) 2가 이온을 활용한 보호제 선발

미생물 배양에 사용되는 2가 이온 가운데 Zn, Fe, Mg, Ca 등을 활용하여 BS238의 보존제 선발을 실시하였다. BS238 배양액의 초기 밀도는 4.5×10^9 cfu/ml으로 하였다. 선발한 2가 이온을 BS238 배양액에 1.0, 0.1, 0.01, 0.001%로 조절하여 첨가하고, 6개월 후 밀도를 조사함으로써 BS238의 보존성 여부를 파악하였다.



<그림36> 보호제첨가량과 보존기간에 따른 *Bacillus subtilis* BS238 밀도안정성.

<그림37>에서 보는 바와 같이 다양한 종류의 2가 이온(Zn, Fe, Mg, Ca)을 BS238 배양액에 첨가했을 때 1%의 Zn⁺⁺과 Fe⁺⁺ 첨가구의 경우 BS238이 전혀 검출되지 않음으로써 보존제로 적당하지 않은 것으로 나타났다. Mg⁺⁺와 Ca⁺⁺의 첨가구에서는 무처리에 비하여 대체로 높은 균밀도가 유지되었으며, 특히 0.001% Mg⁺⁺ 첨가구의 경우 모든 보존제 첨가구에 비하여 가장 균밀도가 높아 1.1×10^9 cfu/ml로 조사되었다. 이때 대조구(무첨가구)는 3.1×10^6 cfu/ml이었다. 따라서 저농도(0.001%)의 Mg⁺⁺을 첨가하는 것이 BS238의 밀도 보존에 적당할 것으로 판단되며, 향후 앞서 선발된 두 보존제를 활용함으로써 보다 안정된 미생물 살균제를 개발할 수 있을 것으로 기대한다.

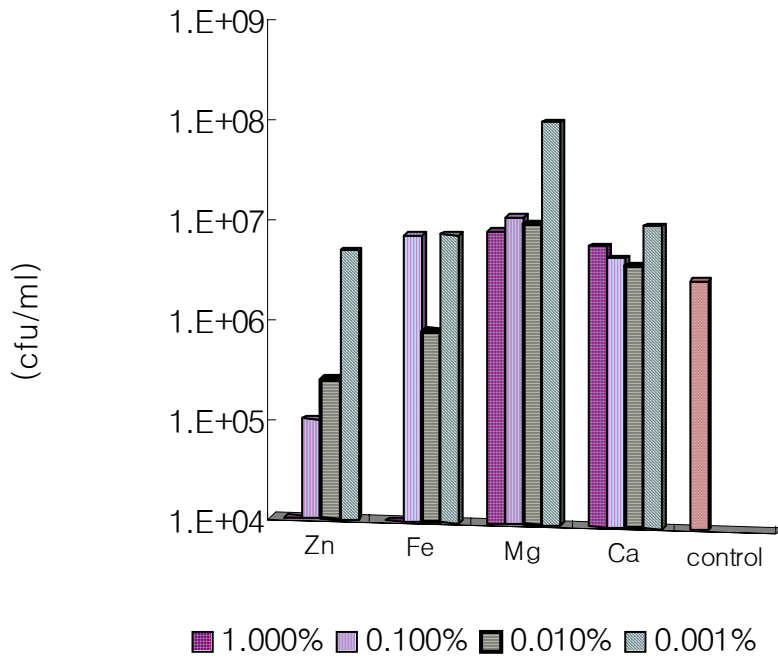
나. 저가 탄소원 및 질소원 선발

1) 저가 탄소원 선발

길항미생물을 대량 배양하기 위하여 DIFCO Bacto™ Trypticase soy broth (TSB)의 배지 성분 함량을 기초로 탄소원을 대체하여 배지를 조제한 다음 실험에 사용하였다. Trypticase soy broth (TSB) formula 가운데 탄소원으로 이용되는 Dextrose를 포도당, 당밀, 옥침수, 쌀겨, 밀기울 등으로 대체하여 1차로 배지를 제조하였으며, 탄소원으로 Dextrose를 첨가하여 제조한 TSB를 standard로 하였다. 이때 각각의 대체 탄소원 첨가량은 TSB 30 g에 함유된 Dextrose 2.5 g과 동일하게 사용하였으며, 30℃, 120 rpm, 1 v/v/m 3일간 배양 후 균밀도가 가장 높았던 탄소원 첨가구를 1차로 선발하였다.

실험 결과 앞의 <표15>에서와 같이 TSB 배지에서 탄소원을 대체하여 *Bacillus subtilis* BS238을 배양하였을 때 포도당과 당밀에서 균밀도가 가장 높아 4.0×10^9 cfu/ml, 3.2×10^9 cfu/ml로 조사되었고, 그 외 탄소원 첨가구에서는 10^8 cfu/ml 이하로 나타났다. 이때 standard TSB에서 배양된 BS238의 밀도는 1.8×10^9 cfu/ml이었다.

탄소원의 첨가량은 1차 선발된 탄소원의 양을 2.5g을 기준으로하여 1.5 g, 2 g, 2.5 g, 3 g, 3.5 g으로 조절하여 30℃ 120 rpm 1 v/v/m으로 3일간 배양하면서 균밀도가 가장 높게 나타난 첨가구를 선발하여 최적의 탄소원과 첨가량으로 결정하였다.



<그림37> 2가 이온에 따른 *Bacillus subtilis* BS238 밀도 보전성.

<표15> 탄소원에 따른 *Bacillus subtilis* BS238의 생육

Carbon source	Population (cfu/ml)
glucose	4.0×10^9
malt extract	7.2×10^8
molasses	3.2×10^9
starch	8.2×10^8
sucrose	5.8×10^8
Standard	1.8×10^9

따라서 BS238의 밀도가 가장 높게 나타난 포도당의 첨가량을 조절하여 배지를 제조한 다음 배양한 결과 포도당의 첨가량이 많을수록 미생물의 밀도가 높아지는 경향을 나타냈다<표16>. 특히 포도당 3.5 g을 첨가한 배지에서 자란 BS238은 4.4×10^9 cfu/ml로 높은 균밀도를 나타냈다. 따라서 BS238의 탄소원을 포도당으로 하였으며, 첨가량은 3.5 g으로 최종 결정하였다.

<표16> Glucose 양에 따른 *Bacillus subtilis* BS238의 생육

Glucose (g)	Population (cfu/ml)
1.5	2.8×10^9
2.0	3.6×10^9
2.5	4.0×10^9
3.0	3.8×10^9
3.5	4.4×10^9

2) 저가 질소원 선발

탄소원 선발에서와 같이 Trypticase soy broth (TSB)의 성분 가운데 Casein을 Peptone, Yeast extract, 어분, 혈분 등으로 대체하여 1차로 질소원 대체 배지를 제조하였으며, 질소원으로써 Casein을 첨가하여 제조한 TSB를 standard로 하였다. 이때 각각의 대체 질소원 첨가량은 TSB 30 g에 함유된

Casein 17.0 g과 동일하게 사용하였으며, 30℃ 120 rpm 1 v/v/m 3일간 배양 후 균밀도가 가장 높았던 질소원 첨가구를 1차로 선발하였다.

질소원 선발 결과 BS238은 Yeast extract 첨가구에서 밀도가 가장 높아 4.3×10^9 cfu/ml로 조사되었으며, peptone 첨가구에서는 1.4×10^8 cfu/ml이었고, 혈분과 골분에서는 10^8 cfu/ml 이하로 조사되었다<표17>. 같은 질소원이라고 하더라도 yeast extract 배지에서 균 밀도가 가장 높은 반면, 혈분 또는 골분 첨가배지의 균 밀도가 비교적 낮게 유지되는 것은 혈분과 골분에는 이들 성분이외에 함유된 물질이 많기 때문이 아닌가 생각하다. Standard TSB에서 배양된 *Bacillus subtilis*의 밀도는 2.6×10^9 cfu/ml이었다.

<표17> 질소원에 따른 *Bacillus subtilis* BS238의 생육

N source	Population(cfu/ml)
Peptone	1.4×10^9
Yeast extract	4.3×10^9
혈분	8.4×10^7
어분	1.2×10^9
골분	4.8×10^7
<i>Standard(Casein)</i>	<i>2.6×10^9</i>

질소원의 첨가량은 1차 선발된 질소원 첨가량 17.0 g을 기준으로하여 13, 15, 17, 19 g으로 조절하여 30℃ 120 rpm 1 v/v/m으로 3일간 배양하면서 균밀도가 가장 높게 나타난 첨가구를 선발하여 대체 질소원의 종류와 첨가량을 결정하였다.

따라서 선발배지에 첨가할 질소원을 Yeast extract로 결정하였으며, 선발된 Yeast extract의 함량을 조절하여 BS238을 배양하였다. 그 결과 함량별 모든 첨가구에서 4.5×10^9 cfu/ml 내외로 나타났다<표18>. 따라서 Yeast extract의 최저 함량인 13 g을 첨가하는 것이 가장 경제적인 것으로 판단하였다.

<표18> Yeast extract 첨가량에 따른 *Bacillus subtilis* BS238의 생육

Yeast extract (g)	Population (cfu/ml)
13	4.3×10^9
14	4.6×10^9
15	4.0×10^9
16	4.5×10^7
17	4.3×10^9

선발된 대체 질소원의 첨가량을 고정시키고, TSB formula 가운데 Casein 이외에 질소원으로 이용되는 soybean meal의 양을 1, 3, 5, 7 g으로 조절하여 30℃ 120 rpm 1 v/v/m으로 3일간 배양하여 균밀도가 가장 높게 나타난 soybean meal 첨가구를 선발하였다.

선발된 Yeast extract 13 g을 고정 시키고, 질소원으로써 이용되는 soybean meal의 첨가량을 조절하여 BS238을 배양한 결과 soybean meal의 첨가량이 증가할수록 미생물의 밀도가 대체로 증가하는 것으로 조사되었으며, <표19>에 서와 같이 soybean meal의 첨가량이 가장 많은 7 g 첨가구에서 5.1×10^9

cfu/ml로 조사됨에 따라 BS238의 질소원으로 Yeast extract 13 g, soybean meal 7 g이 가장 적당한 것으로 판단되며, 향후 대량 배양에 따른 생산 단가의 절감과 길항미생물의 배양 밀도를 높이기 위해 두 질소원의 비율을 효율적으로 조절할 계획이다.

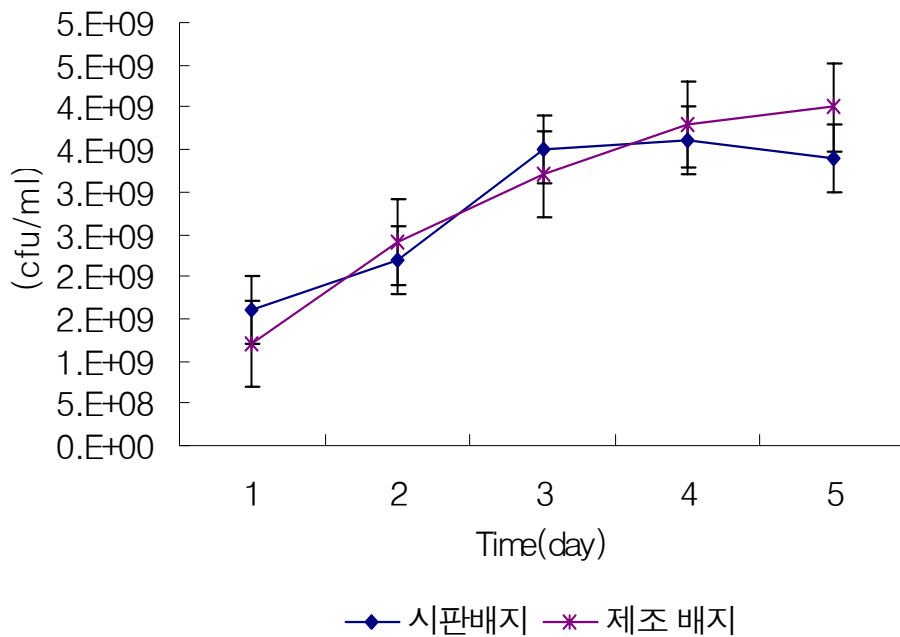
〈표19〉 Soybean meal 첨가량에 따른 *Bacillus subtilis* BS238의 생육

Soybean meal (g)	Population(cfu/ml)
5.5	4.6×10^9
6.0	4.4×10^9
6.5	4.8×10^9
7.0	5.1×10^9

3) 선발배지와 시판배지에서의 균밀도 비교

본 연구에서 확인한 탄소 및 질소 수준 등에 따라 선발한 배지인 modified TSB와 시판되고 있는 배지인 DIFCO Bacto™ TSB에서 균 밀도가 차이 날 것인지를 비교하기 위하여, 무기양분인 NaCl과 K₂HPO₄는 고정 시키고, 선발된 탄소원과 질소원을 조합하여 만든 액상 배지(Glucose 3.5g, Yeast extract 13g, soybean meal 7g/L)와 시판 중인 DIFCO Bacto™ TSB에 *Bacillus subtilis*를 접종하여 30℃, 120rpm, 1v/v/m으로 5일간 배양하면서 배지에 따른 균밀도 변화를 비교하였다.

위의 배지들에 *Bacillus subtilis* BS238을 접종하여 Jar-fermentor로 배양한 결과 BS238의 초기 밀도는 시판 배지(DIFCO TSB)에서 더 높았으나, 3일 후 시판배지와 선발배지(modified TSB)에서 각각 3.5×10^9 cfu/ml, 3.2×10^9 cfu/ml로 나타난 둘 사이에 큰 차이는 없는 것으로 조사되었다<그림38>. 따라서 본 실험에서 제조된 배지인 modified TSB가 경제적인 측면에서 시판되고 있는 배지보다 저렴하면서 높은 균밀도의 길항균을 생산할 수 있는 산업용 배지로써 활용가치가 클 것으로 기대한다.

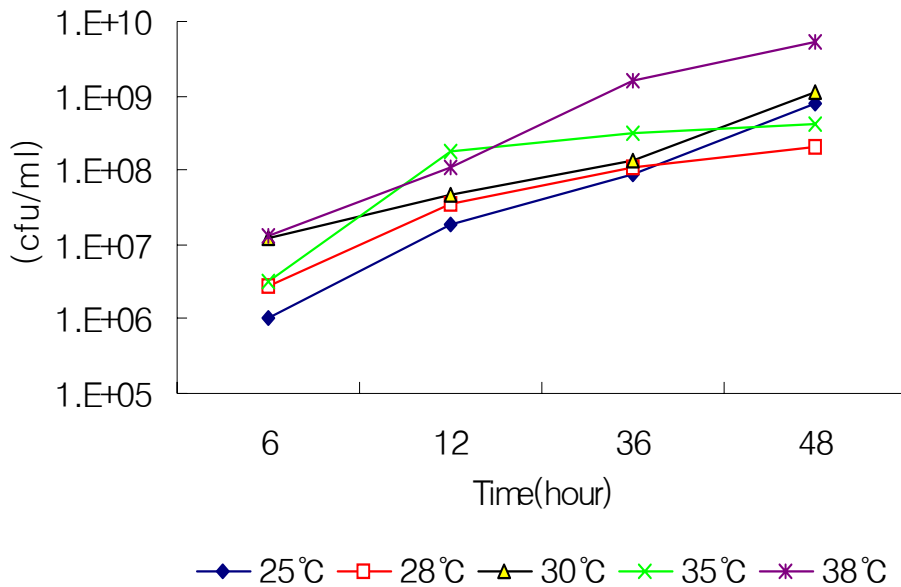


<그림38> 제조배지인 Modified Trypticase soy broth (TSB)와 시판배지인 Difco TSB에서의 *Bacillus subtilis* BS238 밀도 변화

다. 배양 온도에 따른 균밀도 변화

길항미생물의 생장에 가장 좋은 온도를 알아보기 위하여 선발배지 3ℓ에 BS238 균주를 1% 접종하고, 진탕배양기의 온도를 25, 28, 30, 38℃로 조절하였다. 진탕배양기의 회전속도를 120 rpm으로 하여 48시간 배양하면서 일정 간격으로 sampling하여 배양 온도에 따른 균밀도 변화를 조사하였다.

다양한 온도 조건에서 BS238을 배양한 결과 <그림39>에서 보는 바와 같이 대체로 배양 온도가 높을수록 균밀도가 높아지는 경향을 나타냈으며, 밀도 변화 폭 또한 가장 높은 배양 온도인 38℃에서 가장 큰 것으로 나타났다. 최종 배양 48시간 후 균밀도 조사에서 38℃에서 배양된 BS238의 밀도가 가장 높아 5.3×10^9 cfu/ml을 나타냈다. 따라서 BS238의 배양 적온은 비교적 높은 온도인 38℃가 적당한 것으로 판단하였다.



<그림39> 온도 조건에 따른 *Bacillus subtilis* BS238 밀도의 경시적 변화

라. pH에 따른 균밀도 변화

배양 최적 pH를 알아보기 위하여 선발배지의 pH를 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0으로 조절하여 BS238 균주를 접종하고, 진탕배양기에 48시간 배양하면서 일정 간격으로 배지의 pH에 따른 균밀도 변화를 조사하였다. 이때 배양 조건은 30℃, 120 rpm이었다.

초기 배지 pH를 다양하게 하여 BS238을 배양하였을 때 pH 6.5와 7.0에서 비교적 높은 균밀도와 안정적인 밀도 상승을 나타냈다. <그림40>에서 보는 바와 같이 pH 5.0에서 6.0의 경우 배양 24시간 경과 후부터 균밀도 증가가 이루어졌으나, pH 6.5와 7.0에서는 초기부터 지속적인 증가를 나타냈다. 특히 pH 6.5에서는 꾸준히 밀도 증가가 이루어져 최종 밀도가 5.5×10^9 cfu/ml을 나타냄으로써 가장 높은 밀도를 보였으며, pH7.5 이상에서는 36시간 경과 후 밀도 감소 추세를 나타냈다.

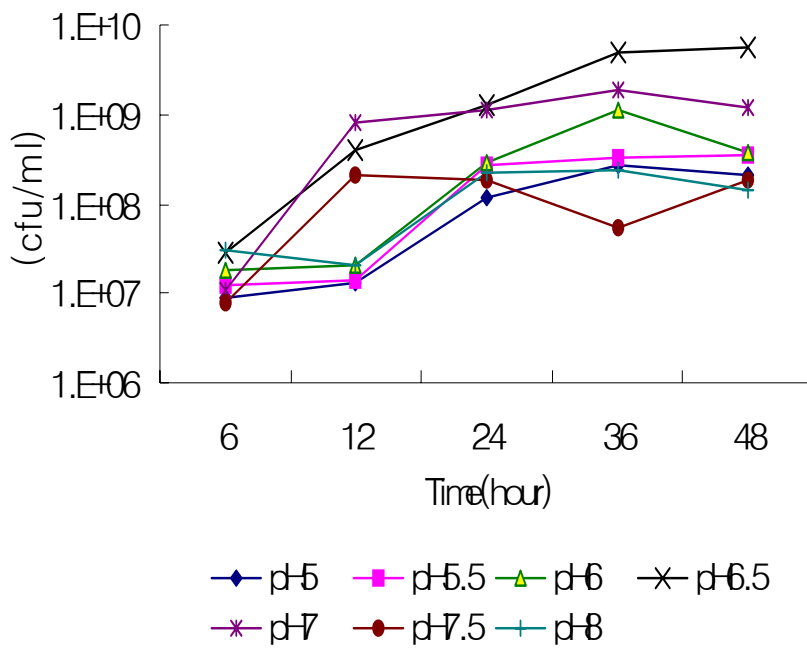
이상의 결과들을 종합해 볼 때, BS238의 초기 pH 조절이 배양의 중요한 조건 가운데 하나로 판단되며, 본 길항미생물 BS238의 경우 pH6.5가 적당할 것으로 판단된다.

마. 공기 주입량에 따른 밀도 변화

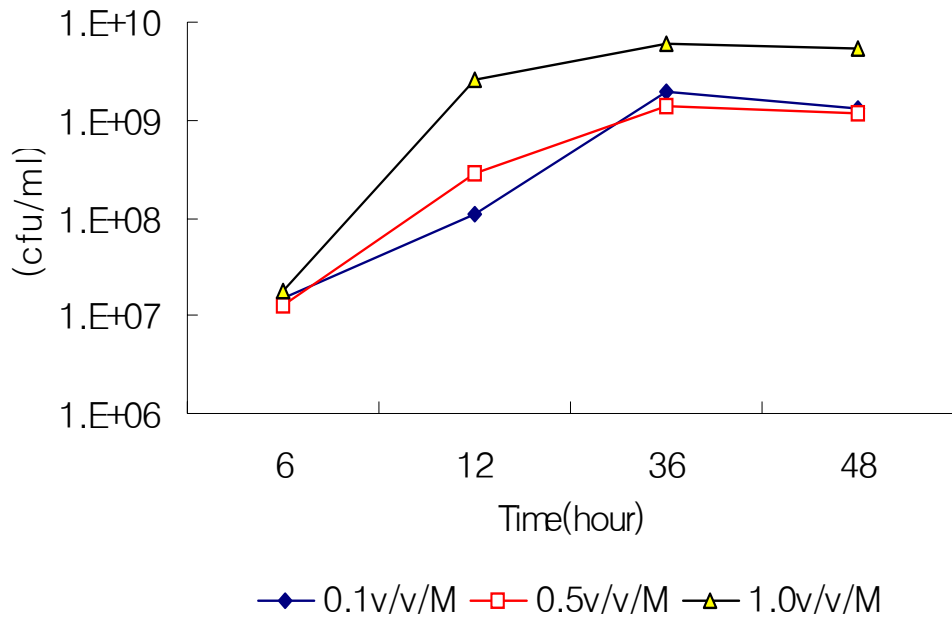
배양 최적 공기 주입량을 알아보기 위하여 Jar fermenter의 공기 주입량을 0.1 v/v/m, 0.5 v/v/m, 1 v/v/m로 조절하여 BS238 균주를 접종하고, Jar-fermenter에서 48 시간 배양하면서 일정 간격으로 균밀도 변화를 조사하였다. 이때 배양 온도는 30℃, 120 rpm으로 하였다.

Bacillus subtilis BS238은 호기성세균으로서 공기 주입량에 따라 밀도 증가 폭이 다소 차이가 있었다. 배양 초기에는 대체로 공기 주입량에 따른 큰 차이가 없었으나, 12시간 경과 후부터 밀도 증가 폭이 차이가 발생하였다. 배양기 내부에 form 발생은 배양 24 시간 경과 후부터 발생하였으며, 이는 공기 주입량 및 미생물 배양량과 밀접한 관계를 가지고 있다. 공기 주입량이 1 v/v/m 이상일 경우 균밀도는 그에 상응하여 증가할 수 있으나, 과도한 거품이 발생하면서 미생물 생산량에 영향을 미침에 따라 최대 1 v/v/m으로 하였다. <그림41>에서 보는 바와 같이 균밀도 증가 폭은 1 v/v/m에서 가장 높았으며, 배

양 48 시간 후 5.5×10^9 cfu/ml을 나타냄으로써 비교적 높은 균밀도를 나타냈다. 따라서 미생물 배양량과 배양후 밀도를 고려할 때 1 v/v/m의 공기 주입량이 최적일 것으로 판단된다.



<그림 40> pH 조건에 따른 *Bacillus subtilis* BS238 밀도의 경시적 변화



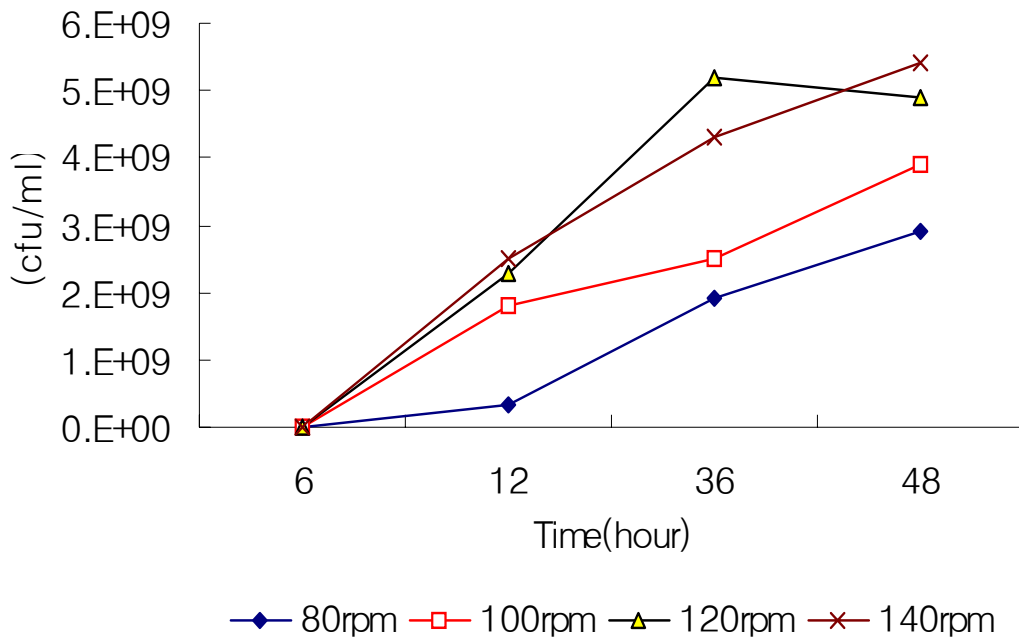
<그림41> 공기주입량에 따른 *Bacillus subtilis* BS238 밀도의 경시적 변화

바. 임펠러 회전 속도에 따른 밀도 변화 (Jar fermenter 수준)

교반 속도가 균밀도 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 BS238 균주를 접종하고, Jar-fermenter의 임펠러 속도를 80, 100, 120, 140 rpm으로 조절하여 48 시간 배양하면서 일정 간격으로 균밀도 변화를 조사하였다. 이때 배양 온도는 30°C, pH6.5로 하였다.

교반속도에 따른 BS238의 밀도 변화는 공기 주입량에 따른 밀도 증가와 같이 교반속도가 증가할 수 록 균밀도가 증가하는 양상을 나타냈다<그림42>.

또한 배양기 내부의 foam 발생의 문제로 120 rpm 이상에서 BS238을 배양할 경우 배양액의 손실을 초래하기 때문에 경제적 손실량과 균밀도의 관계를 고려해야 할 것으로 생각된다. 그림 6에서와 같이 48 시간 후 4.9×10^9 cfu/ml의 밀도를 나타내었으며, Antifoam을 사용하여 foam 발생을 제어한 결과 경제적 손실을 줄이고 높은 균밀도를 얻어 낼 수 있는 120 rpm의 교반 속도가 가장 타당한 것으로 생각한다.



<그림42> 임펠러 회전속도에 따른 *Bacillus subtilis* BS238 밀도의 경시적 변화

사. Fermenter와 Jar fermenter를 이용한 최적 배지, 최적 조건에서의

균밀도 변화 비교

BS238 균주를 대량 배양용 Fermenter (1.2t)와 Jar fermenter (5L) 수준에서 선발배지를 이용하여 38℃, 120 rpm, air 1 v/v/m 조건으로 48 시간 배양하면서 일정 간격으로 균밀도와 pH 변화를 조사하여 비교하였다.

<표20>에서 보는 바와 같이 선발 배지를 이용하여 최적조건에서 BS238을 배양한 결과 pH 변화는 두 배양기 모두 6.5에서 약산 쪽으로 낮아졌다가 다시 원상태로 진행되어 안정화 되었고, 균밀도에 있어서는 Jar fermenter 배양의 경우 12시간 경과 후부터 10^9 cfu/ml 이상의 밀도를 나타냈으나, Fermenter에서는 36시간 경과 후부터 10^9 cfu/ml 이상의 밀도를 나타냈다. 배양 48시간 경과 후 밀도 조사에서 2.4×10^9 cfu/ml을 나타내어 Jar fermenter 배양 밀도에 비하여 약 1/2 가량 낮은 밀도를 나타냈다. 이러한 현상은 Scale up 과정에서 발생하는 문제로 온도, pH, 공기 주입량, 임펠러 회전 속도 등의 배양 조건을 다소 조절해야할 것으로 판단되며, 본 연구 결과를 활용하여 대량 배양을 반복해 봄으로써 Jar fermenter 수준의 밀도를 얻어낼 수 있을 것으로 기대된다.

아. 제형에 따른 길항력 차이 in vivo 검정

길항미생물들을 보관하기 쉽고 사용하기 쉽게 하기 위하여 TH-04, BA313, BS238 등 3종의 미생물을 펄라이트(perlite)와 알지네이트(alginate)를 주 재료로 하고 여기에 soy bean powder, glucose, CaCO_3 , yeast, K_2HPO_4 등을 적절히 첨가하여 가며 제제화를 시도하였다.

1) 분말제 제조1

길항미생물들을 분말로 만들기 위하여 BA313을 250 ml의 NB에, 그리고 TH-04를 역시 250 ml의 YMB에 각각 4일간 배양한다. TH-04와 BA313의 밀도가 10^9 cfu/ml 정도에 이를 무렵 펄라이트를 autoclave하여 멸균한다. 또한, 제제화를 위한 액체배지를 제조하여 역시 멸균한다. 액체배지의 조성은 다음과 같다.

[Soy bean powder 15 g, glucose 20 g, CaCO_3 4 g, yeast extract 3 g, K_2HPO_4 0.5 g, 2차 증류수 625.5 ml].

<표20> Jar fermenter(5L)와 Fermenter (1.2t) 수준에서의 *Bacillus subtilis* BS238 밀도의 경시적 변화

Time (hour)	Population (10^9 cfu/ml)		pH	
	Jar fermenter	Fermenter	Jar fermenter	Fermenter
6	0.3	0.2	6.2	6.5
12	1.5	0.3	5.8	6.1
36	2.1	1.0	6.1	6.3
24	3.4	1.9	6.3	6.2
48	4.9	2.4	6.5	6.7

멸균이 끝난 펄라이트 1 kg을 625.5 ml의 액배지에 잘 섞어 준다. 액체배지와 펄라이트를 균일하게 섞어 만든 고체배지를 역시 멸균한 버섯재배 병에 50 g씩 담는다. 여기에 BA313과 TH-04를 8 ml 씩 접종한다. 접종이 끝난 고체배지를 25℃에서 4일간 배양한다. 배양이 끝난 고체배지는 30℃에서 3일간 잘 건조시킨다. 완전히 건조된 배지는 입자의 크기 180 μ m 이하가 되도록 분쇄기로 분쇄한다. 분말제로 만들어진 길항미생물제제는 상온에 보관하면서 열흘에 한 번씩 배지에 도말하여 생균 수를 측정하였다.

2) 분말제 제조2

BA313은 위의 방법을 조금 더 간단하게 개선하기 위하여 방법을 조금 변형하여 실험을 수행하였다. 우선 BA313을 667 ml의 NB에, TH-04를 667 ml의 YMB 배지에 각각 4일간 배양한다. BA313과 TH-04의 밀도가 10^9 cfu/ml 정도에 이를 무렵에 펄라이트 2 kg을 멸균한다. 멸균이 끝난 펄라이트 1 kg에

각각 배양된 균을 넣고 20℃에서 4일간 배양한다. 배양이 끝나면 균이 자란 펠라이트를 30℃에서 3일간 건조하고, 다시 입자크기 180 μm 이하가 되도록 분쇄기로 분쇄한다. 분말제로 만들어진 길항미생물제제는 상온에 보관하면서 열흘에 한 번씩 배지에 도말하여 생균 수를 측정하였다.

분말제의 생균 수 측정 결과를 보면 BA313이나 TH-04는 버섯재배통 안의 펠라이트 배지에 배양한 다음 분말로 만든 것에서 가장 잘 생존하고 있었으며, TH-04보다는 BA313의 생존률이 조금 더 좋았다. BA313은 20℃에서는 잘 생존하고 있었으나 25℃에서의 생존률은 매우 낮은 편이었으며, 25℃에서는 펠라이트보다 알지네이트로 분말화하였을 때의 생존률이 높았다<표21>.

<표21> *Streptomyces violaceus-niger* BA313과 *S. halstedii* TH-04 분말제형의 시기별 생균 분리 수

제 제	균 밀도 (x10 ⁷ cfu/ml)*			
	1차 (4/9)	2차 (4/19)	3차 (4/29)	4차 (5/8)
BA313 20℃ 버섯재배통	80	80	60	30
BA313 25℃ 버섯재배통	7	7	2	4
BA313 25℃	10	20	20	10
BA313 25℃ + Alginate 1.5%	20	30	10	20
TH-04 20℃ 버섯재배통	60	40	20	10
TH-04 25℃ 버섯재배통	70	50	30	20
TH-04 25℃	10	20	10	10
TH-04 25℃ + Alginate1.5%	10	30	20	20

*: 매 10일 간격의 시기별 조사 (월/일)

반면에 TH-04의 경우 25℃에서의 생존률이 가장 높았으며, 20℃에서는 25℃보다는 조금 낮았지만 그래도 10일 뒤 60%의 생존률을 보였다. 그러나, 펄라이트 배지 이외의 배지에서 배양하여 분말화하였을 때의 생존률은 매우 낮은 편이었다<표21>.

그러나, 두 길항균 모두 어떤 처리에서건 40일이 지나면 균의 생존율이 10-30% 정도에 불과한 것이 문제점으로 드러났다.

3) 분말제 제조3

Streptomyces spp.인 BA313과 TH-04는 분말제로 제조하였던 반면, *Bacillus subtilis*인 BS238은 액제로 제조를 시도하였다. 우선 BS238을 250 ml의 NB배지에 접종하여 25℃에서 4일간 배양한다. BS238의 밀도가 10^8 cfu/ml 정도에 이르면 배지를 원심분리한 후 상정액은 버리고, 바닥에 남은 양균(균체)를 동결건조한다.

또 한 가지 방법은 BS238을 500 ml의 NB배지에 접종하여 25℃에서 4일간 배양하며, 그 동안 alginate를 증류수에 1.5%가 되도록 녹여 Stock 용액을 만든다. 이 stock 용액으로 각각 0, 0.5, 1.0, 1.5% alginate 용액을 만든다. Alginate 용액을 펄라이트에 수분함량 40%가 되도록 첨가한다. 배양이 끝난 BS238은 앞서 준비한 0.5 - 1.5%의 alginate 용액에 첨가하여 5일간 30℃에서 바람에 잘 말린다. 다 마른 펄라이트는 위와 같은 방법으로 마쇄하여 보관한다. 그리고, 균 밀도를 측정 한 후 날짜별 밀도 변이를 비교하여 alginate의 균 보존성을 관찰한다.

BS238은 0.5%의 알지네이트를 사용하였을 때 균의 생존률이 가장 좋았다. 이 경우 40일 뒤에도 3×10^7 cfu/ml 정도의 균이 살아있음이 확인되었다<표 22>. 반면 1.5%의 알지네이트를 사용하여 분말화하였을 때는 균 생존율이 매우 낮아졌으며, 1% 알지네이트를 사용하거나 또는 직접 동결건조하였을 때의 생존률은 0.5% 알지네이트 사용 때보다 조금 떨어지는 수준이었다. 따라서, 알지네이트를 사용할 경우에는 0.5%를 사용하는 것이 가장 바람직할 것으로 보인다.

<표22> *Bacillus subtilis* BS238 alginate제형의 시기별 생균 분리 수

	균 밀도 ($\times 10^7$ cfu/ml)*			
	1차 4/3	2차 4/13	3차 4/23	4차 5/2
BS238	3	2	1	2
BS238 + Alginate 0.5%	3	5	4	3
BS238 + Alginate 1%	2	3	1	2
BS238 + Alginate 1.5%	0.01	0.02	0.01	0.03

*: 매 10일 간격의 시기별 조사 (월/일)

4) alginate를 이용한 제형화

펠라이트 대신에 alginate를 주 재료로 하여 제형을 만들었을 때의 안정성 및 보존성을 펠라이트제형과 비교하기 위하여 우선, TH-04, BA313, BS238을 각각 최적배지에 25℃에서 150 rpm으로 4일간 배양하여 각 길항균의 밀도가 10^9 cfu/ml 정도가 되도록 한다. 균 배양액에 alginate를 농도가 5%가 될 때까지 넣어 준다. Alginate를 첨가하고 나서도 25℃에서 150 rpm으로 2일간 잘 섞어주어야 한다. 2일간의 배양이 끝나면 alginate를 첨가한 균배양액을 peristaltic pump를 사용해서 0.25 mol CaCl₂ 용액에 에 떨어뜨린다. 이 때 CaCl₂ 용액을 자력교반기로 교반시켜야 alginate 입자가 잘 만들어진다. 입자의 크기는 지름이 약 8-10 mm 정도 되도록 peristltic pump를 조정한다. 만들어진 입자는 꺼내어서 25℃ incubater 안에서 4일간 건조시킨다. 다 건조된 입자들은 밀폐용기에 보관하면서 40일이 지난 뒤 일부 시료를 덜어내어 균 밀도를 측정하였다.

그 결과 이전 실험들에 비하여 균의 생존률이 매우 향상되어 TH-04의 경우 30-60%의 균이 생존하고 있었으며, BA313은 20-30%, 그리고 BS238은 40-50%의 균이 생존하고 있음이 확인되었다<표23>.

따라서, 균의 배양방법 및 제제화 때의 환경을 조금 더 조절한다면 길항균의 생존률을 많이 향상시킬 수 있을 것으로 생각한다.

<표23> *Bacillus subtilis* BS238, *Streptomyces violaceus-niger* BA313, *S. halstedii* TH-04의 alginate 제형의 생균 분리 수

Trial	균 밀도 ($\times 10^7$ cfu/ml)		
	BS238	BA313	TH-04
1	50	20	60
2	40	30	30

5) 제형에 따른 길항력 실내검정

Bacillus subtilis BS238의 경우 균의 밀도가 109 cfu/ml이 되도록 배양한 배양원액을 celite, ilite, zeolite, bentonite 등에 섞어서 건조하는 방법으로 분말수화제 4종을 만들었으며, 또한 배양원액 자체는 액상수화제 상태로 사용하였다(3. 길항미생물제제의 포장적용시험 중 ‘가.’ 1) 부형제의 종류에 따른 제형’ 참조). 이들 제제를 각각 100배와 200배로 희석하여 고추에 처리한 후 병 발생상황을 점검함으로써 각 제형에 따른 길항력의 차이를 조사하였으며, 대조약제로는 프로피 수화제를 사용하였다. 실험에 사용한 고추는 길이가 10 cm

이상이 되는 것으로 포장에서 화학농약을 살포하지 않고 직접 재배한 것을 사용하였다. 길항력 검정을 위하여 30 × 30 × 5 cm Tray에 고추를 50개씩 담아 무처리구 포함 6개의 Ttray를 만들고, 1차 약제처리 2일 후 2×10⁶ cfu/ml 병원균 현탁액을 고추에 살포하여 습실 처리하였다. 처리된 Tray는 습실처리한 상태로 25℃ 항온기에 보관하면서 무처리구에 탄저병의 병징이 나타나기 시작하여 15% 이상이 되었을 때 모든 처리구를 조사하여 각 제형별 방제가를 계산하였다.

몇 가지 제형 중에서 가장 좋은 방제가를 보인 것은 배양원액을 그대로 희석하여 사용한 것이었다<그림43>. BS238의 배양원액을 100배 희석하여 사용하였을 때는 방제가가 거의 80%에 이르러 합성살균제에 버금가는 수준이었다. 그러나, 배양원액도 200배로 희석하였을 때는 방제가가 50% 정도에 그쳐 100배와 200배 희석 사이에 방제가가 급격하게 줄어드는 임계점이 있는 것으로 보이며, 이를 실제로 사용한다면 100배 이상 희석하는 것은 무리가 있다고 생각한다.

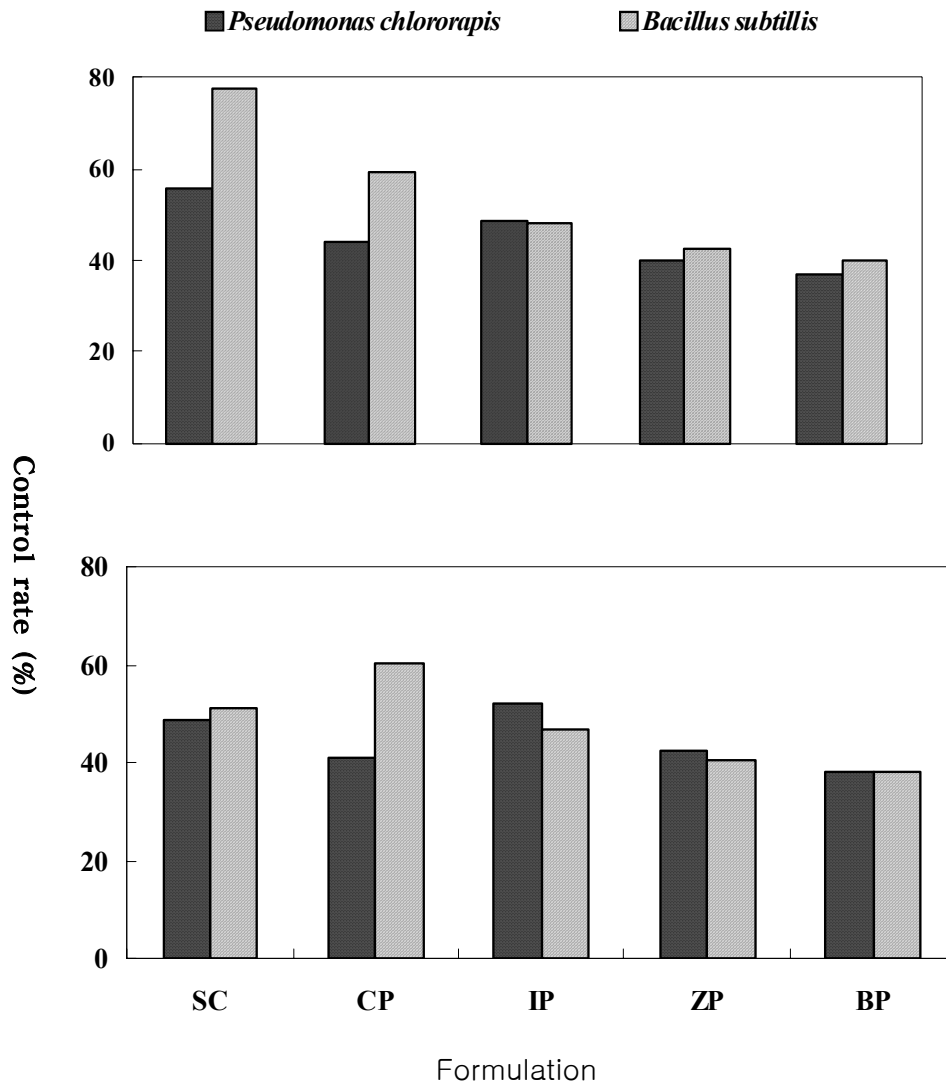
분말수화제로 만들었을 경우의 방제가는 셀라이트분말수화제나 일라이트분말수화제의 경우에는 50%를 넘었을 뿐 제오라이트분말수화제와 벤토나이트분말수화제는 낮은 방제가를 보여 본 길항미생물의 제제화에 사용하기 위한 부형제로서는 부적당한 것으로 나타났다<그림43>. 특히 셀라이트분말수화제와 일라이트분말수화제는 200배로 희석하여 사용하였을 때도 100배로 희석하여 사용하였을 때와 방제가에 있어서 큰 차이를 보이지 않았기 때문에 길항미생물을 보전하는 효과가 매우 안정적임을 알 수 있었다.

3. 길항미생물제제의 포장 적용시험

가. 제형별 미생물제 안정성

1) 부형제의 종류에 따른 제형

선발된 길항미생물 중 가장 다루기 쉽고 여러 가지 면에서 장점을 가지고 있던 BS238을 가지고 고추에 엽면살포할 수 있는 제형을 개발하고자 하였다.



<그림43> 제형에 따른 *Bacillus subtilis* BS238 100배 희석액(A)과 200배 희석액(B)의 고추 탄저병 방제가. *P. chlororapis*는 추후 실험에서 탈락하였음. (SC: soluble concentrate, CP: celite powder, IP: ilite powder, ZP: zeolite powder, BP: bentonite powder).

탄저병균은 고추의 열매와 잎에 병반을 형성함에 따라 방제 약제의 제형을 액상(SC: Soluble Concentrate)과 분말 수화제(WP: Wettable Powder)로 구분하여 엽면시비용으로 제조하였다. 액상제제의 경우 길항미생물 BS238 배양액 (1×10^{10} cfu/ml)을 원제로하여 앞서의 실험에서 이미 선발된 보호제를 첨가하여 제조하였다. 분말 수화제의 경우 325 mesh 이상의 셀라이트(Celite), 벤토나이트(Bentonite), 지오라이트(Zeolite), 일라이트(Elite) 등 4가지 광물질과 액상 배양한 BS238을중량 대 중량으로 혼합하여 조제하였다. 혼합비율은 광물질과 길항미생물 배양액을 4 : 1의 비율로 하였으며, 수분에 의한 다른 미생물의 증식을 억제하기 위하여 35℃에서 2일간 건조하여 수분함량을 10% 이하로 조절한 다음 파쇄기(헵머밀)로 미분쇄하여 500 g 단위로 밀봉하고, 저온(4℃)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

제형 제조 후 각 제제의 균밀도를 조사하여 길항균 배양 원액의 밀도와 비교하였다. 제조한 제제의 이름은 첨가한 부형제의 첫 글자와 길항균 *Bacillus subtilis* BS238의 첫글자를 인용하여 CB, BB, ZB, IB 등으로 명명하거나 또는 제형에 따라서 분제의 powder를 인용하여 CP, BP, ZP, IP 등으로 하였다. 액상으로 만든 것은 그냥 SC로 표기하였다.

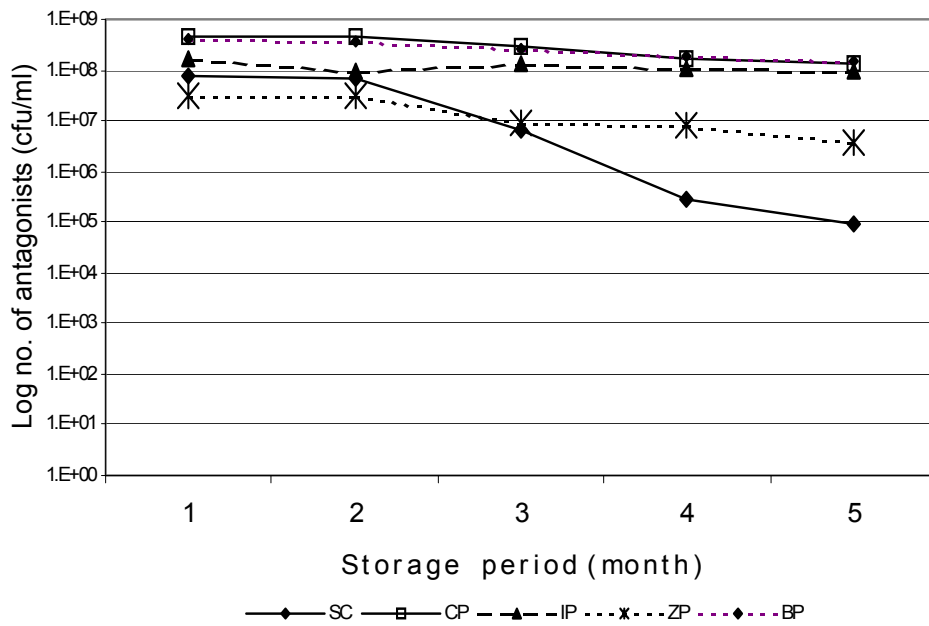
결과적으로 *Bacillus subtilis* BS238에 대하여 액상 수화제 1종(SC)과 분말 수화제 4종(CP, BP, ZP, IP) 등 총 5종의 제형을 제조하였는데, 제형화 직후에 각 제형에서의 균 밀도를 조사하였을 때 SC를 제외하고는 모든 처리구에서 균 밀도가 1/10 내외로 줄어들어 있음을 알 수 있었다<표24>. 이것은 아마도 제제를 만들 때 사용한 부형제 입자의 깊은 곳에 흡착된 입자들이 제대로 재분리되지 않았기 때문인 것으로 생각한다.

제제를 만든 뒤 약 30일 뒤에 균밀도를 분석한 결과 부형제가 첨가된 분말 수화제의 경우 3.0×10^7 - 4.7×10^8 cfu/ml로 제제화 초기 밀도 보다 다소 저하되기는 하였으나 비교적 일정한 수준을 유지하고 있었던 것에 비하여, 액상수화제의 경우 초기 밀도보다 조금 더 떨어져 7.8×10^7 cfu/ml로 유지되고 있었다<그림44>. 그러나 이 이후 더 오랜 시간의 조사에서 분말수화제들의 균 밀도는 아주 완만한 속도로 줄어들고 있었으나 액상수화제의 경우에는 그 감소 폭이 커서 6개월 뒤에는 분말수화제가 3.9×10^6 - 1.5×10^8 cfu/ml였던 데 비해, 액상수화제는 5.2×10^3 - 5.9×10^5 cfu/ml 정도였다.

<표24> *Bacillus subtilis* BS238 제제에 첨가한 부형제 종류별 생균 분리 수

Formulation*	Population (cfu/ml)
CB	3.1×10^9
IB	2.8×10^9
ZB	1.0×10^8
BB	2.6×10^7
SC	3.1×10^9

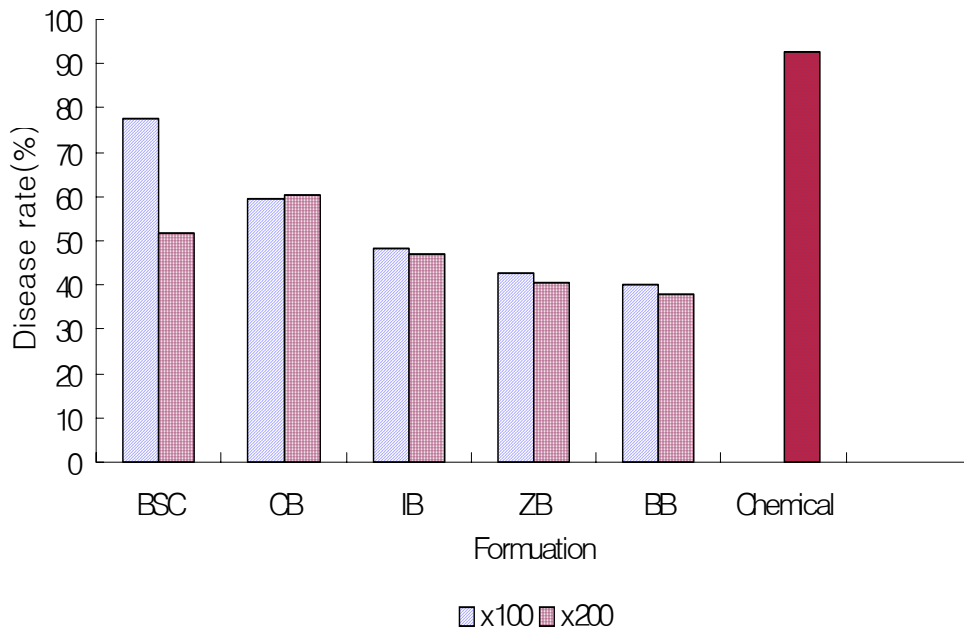
CB: celite, IB: ilite, ZB: zeolite, BB: bentonite, SC: soluble concentrate



<그림44> 제형에 따른 *Bacillus subtilis* BS238의 생육 차이. (SC: soluble concentrate, CP: celite powder, IP: ilite powder, ZP: zeolite powder, BP: bentonite powder).

나. 제형에 따른 고추 탄저병 방제효과 검증

<그림45>에서 보는 바와 같이 제형에 따른 길항력 검증 결과 *Bacillus subtilis* BS238 배양액(SC) 100배 희석 처리구의 방제가 화학농약 처리구를 제외한 모든 처리구에 비하여 77.8%로 방제효과가 가장 높게 나타났고, Celite와 BS238로 혼합된 CB 100배 희석 처리구에서는 59.3%의 방제효과를 나타냄으로써 광물질을 혼합하여 제형화한 제제가 배양액 자체 보다 방제효과가 낮아짐을 알 수 있었다.



<그림45> *Bacillus subtilis* BS238의 제형에 따른 고추 탄저병 방제효과 (BSC: soluble concentrate of BS238, CB: celite+BS238, IB: ilite+BS238, ZB: zeolite+BS238, BB: bentonite+BS238). Chemical은 propi 1000배액임.

또한 BS238 배양액(SC) 200배 희석 처리구에서는 51.9%로 100배 희석 처리구에 비하여 방제가가 다소 낮아지는 경향을 나타냈다.

전체적으로 볼때 광물질과 혼합 건조하여 제형화한 제제는 BS238 배양액 자체를 활용한 제제에 비하여 방제효과가 다소 낮아질 뿐만 아니라 처리 후 약혼이 남아 앞으로 광물질 이외의 수용성 자체를 선별하여 개선해가야 할 필요가 있다고 생각한다.

다. 단일 및 복수 제제 처리의 방제효과 검증

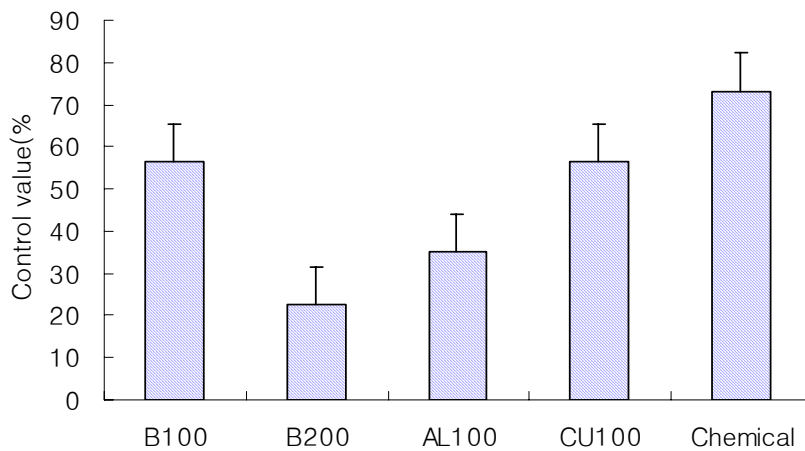
1) 2003년도 포장시험

Bacillus subtilis BS238 및 입자가속기를 통과시켜 이 균주에 인위적으로 변이를 준 개량 균주(CU30', AL60')를 앞서의 연구에서 선별한 배지에 액배양하여 원액을 확보하고, <표25>에서 보는 바와 같이 길항미생물별로 희석 배수를 달리하여 실제 포장의 고추에 7일 간격으로 4회 살포하였으며, 최종 처리 7일 후 이병과를 조사하여 이병과율로 방제가를 계산하였다. 고추 포장은 충북 괴산의 농가포장을 임차하여 실험에 사용하였으며, 재배되는 고추의 품종은 청풍명월이었고 탄저병 방제를 제외한 나머지 경종법은 모두 일반 농가의 관행에 따랐다. 탄저병 발병은 자연발병에 의존하였으며, 길항미생물제의 첫 처리는 8월 19일 이었고, 마지막 처리는 9월 9일, 그리고 결과 조사는 9월 16일에 실시하였다.

<표25> *Bacillus subtilis* BS238 및 변이 균주의 처리 내용

Tritment	Dilution
<i>B. subtilis</i> BS238	×100
<i>B. subtilis</i> BS238	×200
<i>B. subtilis</i> BS238 Cu30'	×100
<i>B. subtilis</i> BS238 AL60'	×100
Propi	×1000
Control (water)	-

본 실험은 고추 탄저병이 이미 발생하여 감염된 것이 확실히 눈에 보이는 열매만 해도 포장 전체의 5% 이상인 시기에 길항미생물제의 첫 처리가 시작되었다. 따라서, 길항미생물을 처리하기 전부터 이미 포장 내의 병원균 밀도가 어느 정도 높은 상태였기 때문에 길항미생물제는 물론, 합성살균제의 방제기도 80%를 넘지 못하였다. 그럼에도 불구하고, <그림46>에서와 같이 BS238 100배와 Cu30' 100배 희석 처리구에서는 고추 탄저병에 대한 방제가가 약 56%로 비교적 높게 나타났다. 반면, BS238 200배처리구와 AL60' 100배 처리구에서는 방제가가 다소 저조하게 나타났다. 특히 BS238의 경우 고추 탄저병 방제가 실내검정에서도 100배 희석액 처리구의 방제가는 비교적 높았던 것에 비해 200배 희석액에서의 방제가는 매우 낮아졌던 것을 감안하면 본 포장실험에서의 결과도 신뢰성이 있는 것이라 할 수 있다.



<그림46> *Bacillus subtilis* BS238 및 변이균을 처리한 고추 포장에서의 탄저병 방제효과 (B100: BS238 100배 희석, B200: BS238 200배 희석, AL100: BS238 변이균주 AL 100배 희석, CU100: BS238 변이균주 CU 100배 희석). Chemical은 propi 1000배 희석임.

식물병, 특히 탄저병 등의 방제는 발병 직전부터 처리를 시작하는 적기방제가 매우 중요하며, 시기를 놓치면 병 방제효과가 떨어질 수밖에 없다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 본 연구에서 병이 이미 어느 정도 발생한 다음에 길항미생물 처리를 시작하였던 것을 감안한다면 여기서 얻은 방제가가 결코 낮은 것은 아니라고 하겠다. 실제로 대개의 경우 방제가 80%를 넘는 합성살균제도 본 실험에서는 방제가가 70%를 약간 넘었을 뿐이다. 무처리구에서의 이 병과율은 평균 56%로서 육안으로 관찰하기에 대부분의 열매가 감염된 듯이 보였다<그림47>.

따라서, 병이 발생하기 직전부터 방제를 시작한다면 본 길항미생물 BS238의 탄저병 방제가는 더 상승할 것으로 기대한다.

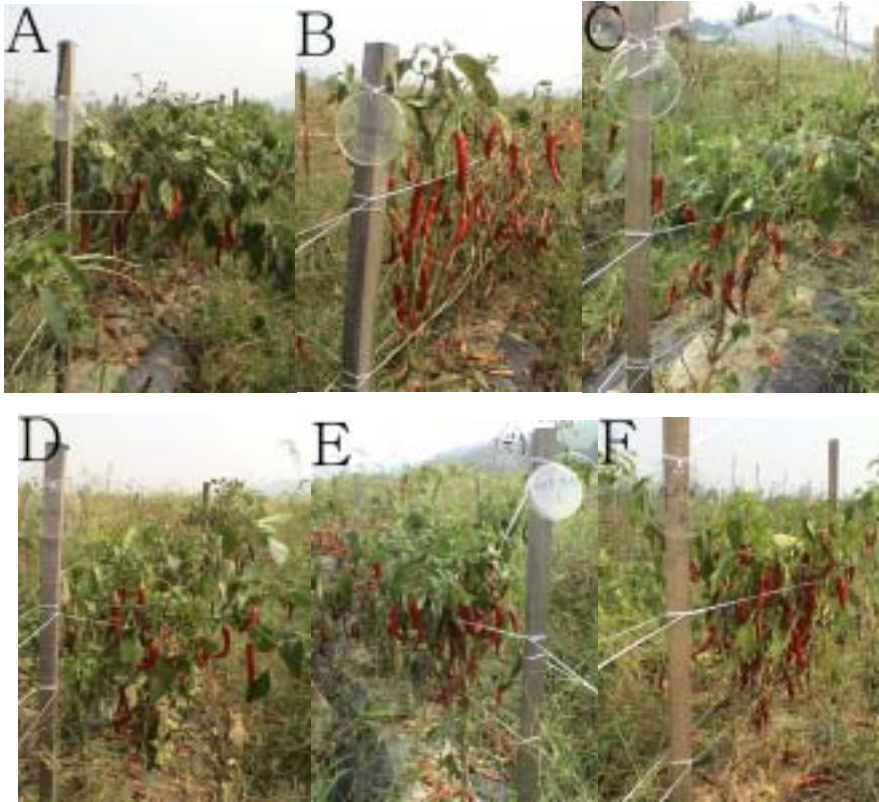
2) 2004년도 포장시험

2004년 포장시험에서는 2003년의 포장시험에서 상당한 가능성을 보여 준 *Bacillus subtilis* BS238을 포함하여 그 동안 본 연구에서 선발한 *Streptomyces halstedii* TH-04, *S. violaceus-niger* BA313, *B. subtilis* KS03 등 4종의 길항미생물을 액상 또는 분말제로 만들어 처리하였다. 제형은 길항균 모두 앞서의 실험들에서 가장 효과가 좋았던 액상수화제(배양원액) 및 필라이트 분말수화제였으며, 희석배수는 액상이 2배와 10배, 그리고 분말이 10배였다.

처리 장소는 충북대학교 농과대학의 고추 포장으로서 품종은 청풍명월이며, 살균제의 처리량을 최소로 줄이고, 특히 탄저병 방제용 살균제는 전혀 사용하지 않는 것을 제외하고는 식재, 비배 등에 있어서 일반 농가와 똑같은 방법으로 재배하는 중이다.

처리 내용은 아래 <표26>에 자세하게 나와 있듯이 무처리 대조구와 살균제 처리 대조구를 포함하여 14처리에 3반복이며, 대조약제로는 프로피 수화제를 사용하였다. 2003년의 실험에서 처리시기가 늦었던 관계로 방제가가 기대에 미치지 못하였던 경험이 있으므로 본 실험에서는 장마가 끝난 뒤인 7월 20일 경부터 7일 간격으로 길항미생물제를 처리하여 8월 말 현재 모든 처리를 종료하였으며 지금은 병 발생상황을 지켜보고 있다. 이 포장은 최근 4년 동안 계속 고추를 재배하여 온 곳으로서 해마다 탄저병이 많이 발생하였었기 때문에

병원균 접종은 따로 하지 않고 자연발병에 의존하고 있으며, 현재 탄저병이 한창 발생하고 있는 중이다.



<그림47> *Bacillus subtilis* BS238 및 변이균주를 처리한 고추 포장의 탄저병 발생 (A: BS238 100배 희석, B: BS238 200배 희석, C: BS238 변이균주 AL 100배 희석, D: BS238 변이균주 CU 100배 희석, E: propi 1000배 희석, F: 무처리 대조구).

<표26> 2004년 고추 탄저병 길항미생물제제 포장검정시험 처리 내용

고랑번호	처 리 내 용		내 용 설 명
1	C 1	BS 2-1	C : control
2	TH 2-1	BA 2-1	
3	P 1	KS 2-1	
4	BA 펼-1	BS 10-1	
5	KS 펼-1	TH 10-1	
6	C 2		BA 2 : BA313 2배 희석, BA10 : BA313 10배희석, BA펼: BA313 펄라이트 10배 희석
7	BS 펼-1		
8	BA 2-2	TH 10-2	
9	KS 펼-2	BS 10-2	
10	BA 펼-2	P 2	
11	TH 펼-1		BS 2 : BS238 2배 희석, BS10 : BS238 10배희석, BS펼 : BS238 펄라이트 10배 희석
12	BA 10-1		
13	BS 펼-1	KS 10-1	
14	TH 2-2	BA 10-2	
15	KS 펼-3	BS 펼-2	
16	C 3		TH 2 : TH-04 2배 희석, TH10 : TH-04 10배희석 TH펼 : TH-04 펄라이트 10배희석
17	BA 2-3		
18	TH 2-3		
19	KS 2-2		
20	BA 펼-3		
21	KS 10-3		KS 2 : KS03 2배희석, KS10 : KS03 10배희석 KS펼 : KS03 펄라이트 10배희석
22	P 3		
23	BA 10-3		
24	TH 펼-2		
25	BS 2-2		
26	TH 10-3		P : 프로피수화제,
27	KS 2-3		
28	BS 2-3		
29	TH 펼-3		
30	BS 10-3		
31	KS 10-3		

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발목표의 달성도

<연구개발목표>

고추 탄저병 등에 길항력을 보이는 미생물 또는 미생물이 생산하는 기주식물의 저항성 유도물질 및 항균물질을 찾아내고 길항미생물의 대량생산 체계를 확립함으로써 **고추 탄저병등의 환경친화적 방제제를 개발한다.**

- **고추 탄저병균 등에 대한 길항미생물의 특성 및 병 방제효과 조사:** 고추 탄저병과 역병 등에 길항력을 보이는 미생물을 동정하고 생태적 특성을 파악하며, 다른 길항미생물 및 기타 농자재와의 상호작용을 조사한다. 또한 길항미생물의 토양 및 엽면 처리에 따른 정착능력과 병 방제효과를 검정하고 개선하여 주요 고추 병의 환경친화적 방제제를 개발한다.

- **길항미생물의 항균활성물질 및 저항성 유도물질 탐색과 생산성 향상:** 병 억제효과를 보이는 조추출물로부터 항균활성 물질 및 저항성 유도물질을 순화하고 동정하며 작용기작을 알아낸다. 또한, 길항미생물의 물질 최적 생산조건과 식물체에의 길항미생물 처리조건을 확립한다.

- **고추 탄저병의 환경친화적 미생물 농약 생산기술 확립:** 길항미생물의 성장 특성 및 그에 영향을 미치는 요인들을 알아내고, 보호제를 찾아내어 저투입 대량생산체계를 확립한다. 또한, 생균제, 추출물제 등 미생물제의 종류와 제형에 따른 처리법을 확립하고 방제효과를 조사한다.

<연차별 연구개발목표와내용>

연구개발목표	연구개발내용 및 범위	달성도
<p>고추 탄저병균 길항미생물의 특성 및 병 방제효과조사</p>	<p>주요고추병원균의길항미생물선발및특성조사</p> <ul style="list-style-type: none"> - 길항미생물의 탐색 및 선발 - 선발 길항균의 분류학적 특성조사 - 선발 길항균의 역가 검정 (<i>in vivo</i>) - 선발 길항균의 배양 최적 조건 및 배지 선발 	100
	<p>길항미생물의병억제효과검정및방제가향상</p> <ul style="list-style-type: none"> - 길항미생물의 근권 또는 엽권 정착능력 확인 - 길항미생물 간의 길항효과 검정 - 길항미생물의 토양 및 엽면 처리에 의한 고추 병 방제효과 검정 - 길항효과 정량화 및 방제가 결정 	100
	<p>길항미생물과기타농자재와의상호관계규명</p> <ul style="list-style-type: none"> - 길항미생물 조합처리에 따른 방제가 변화조사 - 길항미생물에 대한 기존 살균제의 영향 - 키토산, 목초액 등 환경친화적 농자재가 길항 미생물에 미치는 영향 	100
<p>길항미생물의항균활성물질 및저항성유도물질 탐색과 생산성향상</p>	<p>길항미생물이생산하는항균성물질및저항성유도물질의탐색및순화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고추 배양세포의 확보,고추 병원균 추출물의 항균활성 화합물 유도 확인 - 조추출물의 주요 병 억제효과 검정 (<i>in vitro</i>) - 항균활성 및 저항성 유도물질의 순화 및 동정 	100
	<p>항균활성물질과저항성유도물질동정및작용기작분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 선발 길항미생물의 대량 배양 및 순화 - 처리시 병원체 및 기주에서의 변화 조사 - 물질 최적 처리조건 확립 	100
	<p>항균활성물질및저항성유도물질의대량생산법확립및방제효과검정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 항균활성물질 생합성 관련 신호전달체계 연구 - 길항미생물의 항균성 물질 및 저항성 유도물질 최적 생산조건 확립 - 항균성 물질의 고추병 방제효과 검정 (<i>in vivo</i>) 	100

연구개발목표	연구개발내용 및 범위	달성도
고추 탄저병의 환경친화적미생물 농약 생산기술 확립	길항미생물생산공정최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 길항미생물의 탄소원 및 질소원 이용능력, 최적 pH 및 온도 조사 - 배지조성에 따른 길항력 차이 조사 (<i>in vitro</i>) - 포자 형성 조건 탐색 	100
	길항미생물의제제화 <ul style="list-style-type: none"> - 스킴밀크, 지오라이트 등 미생물 보호제 선발 - 저가 탄소원 및 질소원 선발 - 분제, 액제, 토양첨가제 등 제형에 따른 길항력 차이 검정 (<i>in vitro</i>) 	100
	길항미생물제제의포장적용시험 <ul style="list-style-type: none"> - 각 제형에 따른 시간대별 미생물 활성(제품 안정성)조사 - 제형별 포장적용 시기, 횟수, 및 농도 선정 - 단일 및 복수 제제 처리의 방제효과 검정 	100

본 연구개발과제에서 고추 탄저병에 길항력을 가지고 있는 미생물을 선발하여 그들의 특성을 알아내고 제형화를 통하여 달성하고자 하였던 것은 고추 탄저병을 환경친화적으로 방제할 수 있는 기틀을 마련하고자 하는 것이었는데, 본 연구를 종료한 현 시점에서 소기의 목적을 달성하였다고 생각한다. 고추 탄저병은 지금까지 거의 전적으로 합성살균제를 사용하는 화학적 방제에 의존하여 왔기 때문에 환경을 생각하는 소비자들의 지적의 대상이 되어 왔다. 또한, 20세기 후반부터 많은 식물병리학자들의 관심을 끌어 온 미생물을 이용한 생물적 방제는 뿌리혹병, 모잘록병 등 대부분이 토양에 존재하는 병원균을 대상으로 한 것이었으며, 일부 지상부 기생균에 의한 병을 생물적으로 방제하는 미생물제제가 개발되기도 하였으나 주로 잣빛곰팡이병에 대한 것일 뿐, 탄저병,

더군다나 고추의 탄저병을 방제하기 위한 미생물제의 개발은 없는 것으로 알려져 있기 때문에 본 연구의 결과는 더욱 의미를 갖는다고 할 수 있다.

본 연구에서 선발된 4종의 미생물들은 모두 고추 탄저병 방제를 위한 길항 미생물제제로 개발되기 위한 상당한 가능성을 보이고 있었으며, 이들 중 한 균주는 최근 본 연구의 협동연구기관 중의 하나인 (주)흙살림에 의해서 제제화되어 (사)흙살림의 회원농가들에 보급되고 있다. 미생물제제는 실제 포장환경에서의 효과가 불안정한 경우가 많으며, 예기치 못했던 문제들이 발생할 가능성도 배제할 수 없으므로, 본 제제를 생산하고 판매하는 (주)흙살림과 본 연구의 총괄기관인 충북대학교 농과대학 식물위학과 실험실에서는 그 결과를 주의 깊게 관찰하고 있다. 이 제제를 사용함에 있어서 앞으로 1-2년 동안 다른 문제들이 발생하지 않는다면 고추 탄저병 방제용 미생물농약으로 진전시키는데 있어서 문제가 없을 것으로 기대한다.

또한, 제 1협동과제에서도 새로운 균주와 함께 그 균주가 생산하는 항균성 물질 분리 및 동정에 성공하여 국제 SCI 학회지에 그 결과를 보고하였으며 그 길항균을 특허출원하였다.

따라서, 시기적으로 부적당하여 아직까지 성적조사를 하지 않은 '길항미생물제제의 포장 방제효과 검정시험'의 결과를 제외하고는 전반적으로 본 연구를 시작하면서 세웠던 계획의 모든 부분을 완수하였다고 할 수 있다.

2. 관련분야에의 기여도

본 연구는 길항미생물의 선발과 특성조사, 병 방제 활성물질 및 저항성 유도 물질의 탐색, 그리고 미생물농약으로 개발하기 위한 제제화 및 포장 방제효과 검정시험 등 크게 3부분으로 구분할 수 있다.

길항미생물을 선발하고 특성을 조사하는 것은 생물적 방제에 대해 연구하는 사람들에게는 매우 친숙한 일 중의 하나이며 사실 특별한 방법을 사용하는 경우는 매우 드물다. 본 연구에서도 일반적으로 사용하는 방법과 기술 이외에 특별한 방법을 사용하지는 않았다. 그러나, 길항미생물을 분리하기 위한 탐색원으로 일반적으로 사용하는 토양이나 식물 조직을 벗어나 미생물과 밀접한 관련이 있는 식품에 까지 그 범위를 확대하였다는 점에는 의미를 부여할 만하다고 생각한다. 실제로 본 연구에서 선발하여 가장 처음 제품화한 *Bacillus*

subtilis BS238은 짓갈류로부터 분리하 것이었다. 지금까지 길항균 분리를 위해 탐색해 온 대상 범위를 넓혔을 때 더 강력한 길항균을 선발할 수 있는 가능성도 높아진다는 것을 의미한다고 하겠다.

일반적인 발효조 대신에 바이오리액터를 이용한 길항균 대량배양법을 본 실험에 적용한 것은 단기간에 많은 양의 미생물을 얻고자 할 때 유용하게 사용할 수 있는 방법이며, 또 ton 단위의 대형 배양기를 운전하고자 할 때도 배양 조건을 찾는 과정을 단축시킬 수 있는 매우 유용한 방법으로 생각한다.

그 밖에도 제형화를 하기 위한 안정제와 부형제 등의 종류를 다양화하였던 점과 항진균활성물질의 구조를 동정하여 합성 가능성을 보여준 것도 본 연구가 관련 분야에 미칠 수 있는 영향이라 하겠다.

본 제제가 완전한 상품으로 개발되어 판매된다면 그 제품을 사용하는 농민이나 소비자 모두에게 매우 반가운 일이 될 것이다. 현재 고추 탄저병을 방제하기 위한 농약은 약 20 여 종이 등록되어 있으나, 대부분의 살균제들의 방제 효과가 점점 낮아지고 있어서 문제가 된다. 그 이유는 여러 가지가 있을 수 있으나, 약 10여년 전부터 고추 탄저병을 연구해 온 본 연구진에서는 탄저병균의 살균제 저항성 획득 또는 균주의 천이를 가장 중요한 원인으로 꼽고 있다. 이러한 문제들은 미생물제를 사용한다면 상당 부분이 해소될 수 있는 것으로서 고추 생산자들은 좀 더 고품질의 고추를 생산할 수 있을 것이다.

또한, 본 연구의 결과를 국외 저명학술지에 이미 한 편을 발표하였으며 현재 또 한 편을 준비 중에 있고, 학술회의에서 2회 발표하는 등 학술적인 면에서도 기여를 하였다. 그리고 균주의 특허출원과 제제의 상품화 진행 등은 관련 미생물제 생산업에도 영향을 미칠 것으로 생각한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 기업화 추진방안

본 연구에서 선발한 4 종의 균주 중 한 균주만이 일단은 제품화 되었으며, 나머지 균주들에 대해서도 제품화 타당성을 검토 중이다. 본 과제의 연구팀에는 미생물제 전문생산업체인 (주)흙살림이 협동과제로 참여해 왔기 때문에 타당성 검토만 잘 통과하면 제품화하는 것에는 무리가 없을 것으로 생각한다. 현재는 대부분의 미생물제들이 4종 비료로 등록되어 있는 실정이지만, 본 연구에서 선발한 길항균들이 포장에서도 확실한 효과를 보일 경우에는 비료가 아닌 정식 미생물농약으로의 등록을 추진할 예정이다.

2. 타연구에의 응용

일반적으로 길항미생물이 항균력을 나타내는 범위는 그렇게 좁지는 않은 것으로 알려져 있기 때문에 본 연구에서 선발된 4종의 길항균은 물론, 분리는 되었으나 선발되지 않은 채 보관균주로 남아있는 균주 등 모든 균주를 대상으로 하여 고추 역병균, 잿빛곰팡이병균, 흰가루병균 등 주요 작물의 주요 병원균에 대하여 길항력을 검정하고 길항력을 보이는 경우 본 연구에서와 같은 과정을 거쳐서 길항미생물제로의 개발을 시도한다. 아울러, 고염도의 젓갈 등 열악한 환경에서 살아가는 미생물들에 대한 추가 탐색을 시도하여 좀 더 나은 길항력을 가지고 있는 균주를 꾸준히 탐색한다.

3. 추가연구의 필요성

제품으로 개발된 *Bacillus subtilis* BS238 제제의 제형은 액상수화제로서 배양원액에 가까운 제품이라고 할 수 있다. 이 경우 배양된 상태로 그대로 사용하는 것이기 때문에 균의 활성이라든지 밀도 등 여러 가지 면에서 다른 제형보다는 장점이 많지만, 문제가 되는 것은 바로 보관기간으로서 액상으로는 보관기간이 길어질수록 균의 밀도와 활성 감소량이 매우 커진다는 사실이다. 본 연구에서도 액상수화제의 경우가 가장 높은 방제가를 보였으며, 그 이외에 펠라이트 분말제라든지 알지네이트 분말제 등은 액상수화제보다는 낮은 방제가

를 사용하였다. 보관이나 유통 중에 발생할 수 있는 문제점을 줄이기 위해서는 제형을 액상보다는 분말제로 바꿀 필요가 있다고 생각하는데 분말제로 만들 경우 만든 이후에 보관하면서 균 밀도가 줄어드는 것은 그리 크지 않으나, 처음에 제형화할 때 균 밀도의 저하가 매우 크다. 따라서, 분말화하였을 때 높은 밀도를 유지할 수 있도록 하기 위하여 배양시의 밀도를 상승시킬 수 있는 방안을 강구하거나 또는 제형화 직전 농축 등의 작업을 통하여 균 밀도를 높이는 방법을 찾아야 할 것으로 보인다. 현재로서는 배양 중 균 밀도를 상승시키는 것보다는 배양이 끝난 뒤에 원심분리 등의 방법을 통하여 균을 농축시키고, 그것을 분말화하기 위한 미생물원으로 사용하는 것이 더 현실적인 것으로 생각한다. 또한, 제형화 작업 중 또는 직후에 계면활성제를 첨가하여 실제로 식물체에 처리하였을 때 길항미생물들이 고추의 표면에 고르게 잘 퍼지고 또 잘 부착될 수 있도록 하는 것도 매우 중요한 일이라고 생각한다.

따라서, 앞으로 배양이 끝난 뒤의 원심분리 방법과 계면활성제의 첨가방법 등에 대한 연구를 수행하여 보완한다면 본 연구에서 선발한 길항미생물들을 완전 산업화할 수 있을 것으로 생각한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- *Rhizoctonia solani*를 억제하는 *Bacillus amyloliquefaciens* 가 생산하는 iturin (Soil Biolo. & Biochem., 2002)

Fast atom bombardment mass spectrometry/mass spectrometry (FAB MS/MS) collision induced dissociation (CID) analysis를 사용하여 *Rhizoctonia solani*를 비롯한 식물병원균들을 억제하는 *Bacillus amyloliquefaciens* strain B94가 생산하는 항진균성 물질이 cyclic lipopeptide 항생물질인 iturin 이성체들이라는 것을 밝혔으며, FAB MS/MS와 CID가 iturin 계열의 물질들을 동정하는데 매우 유용한 방법이라는 것을 밝혔다.

- *Bacillus subtilis* RB14-C와 flutolanil을 이용한 *Rhizoctonia solani*에 의한 모잘록병의 종합적 방제 (J. of Biosci. & Bioeng., 2001)

Bacillus subtilis RB14-C와 합성살균제 flutolanil을 동시에 사용하여 모잘록병을 방제하는 시도를 하였다. RB14-C는 flutolanil의 영향을 받지 않고 잘 자랐으며, RB14-C의 모잘록병 억제효과는 iturin A에 의한 것임을 밝혔다.

- *Bacillus subtilis* NB22를 고체배양하였을 때 항진균성 항생물질이 얼마나 잘 생산되는지를 확인하였음. (J. of Fermentation and Bioengineering, 1993)

콩깍지로 만든 고체배지 상태에서 배지의 양, 통기성, 온도 수분함량 등을 조절하여 가면서 iturin A의 생성을 조사하였다.

- *Bacillus subtilis* NB22를 액배양할 때 온도와 통기성의 변화가 항생물질 생산에 미치는 영향 (J. of Fermentation and Bioengineering 75: 463-465).

Bacillus subtilis NB22가 생산하는 항균물질의 생산에 온도와 공기 공급이 어떠한 영향을 미치는지 알아 보았다. Iturin의 생산율은 환경에 따라서 매우 달랐지만, 특히 균의 생장이 떨어지기 시작하였을 때 iturin의 효능과 생산량은 많아졌다.

- *Streptomyces* isolates를 한천배지와 액배양에서 언제나 동일한 항생제 활성을 나타내도록 하는 방법 (J. of Ferment. & Bioeng. 76: 89-93)
 - 자연 2차대사산물을 스크리닝할 때 actinomycete의 경우 한천배지에서는 역가가 있으나 액체배지에서는 역가를 보이지 않는 문제를 연구하여 사상균 모양의 균주들이 항생제의 역가에서 안정성을 보임을 확인하였다.

- Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria 제형에 따른 기장 노균병의 증가와 억제 (Crop Protection, 2003)
 - 5종의 식물생장촉진세균(plant growth promoting rhizobacteria) 제형을 만들어 온실과 포장에서 실험하였다. 종자처리, 토양처리, 종자와 토양처리 등을 하였는데, 처리방법에 관계없이 모든 제형에서 대조구보다 생육이 촉진되었다. 개화기 역시 대조구보다 빨랐으며, 노균병의 발생은 뚜렷이 억제하였다. 그 정도는 제형에 따라 매우 차이가 커, LS256과 LS257 제형이 가장 좋은 효과를 보였다. 그러나 대조 살균제인 메타실의 효과에는 미치지 못했다.

- 저온저장 중 사과 blue mold와 gray mold를 방제하기 위한 두 종의 미생물살균제의 효율 (Crop Protection, 1997)
 - Pseudomonas syringae* 로 만든 미생물제 Bio-Save 11 (10% 수화제)의 효과를 thiabendazole의 효과와 비교하였다. ESC-10 WP는 병 발생을 현저히 줄였으나, 때로는 ESC-11 WP의 효과보다도 못한 경우가 있었다. 이 두가지 제형은 균의 활동에 관계없이 좋은 관계가 이루어지고 있었다.

- *Bacillus subtilis* RB14에 의한 토마토 damping-off의 생물학적 방제 (Appl. Environ. Microbiol., 1996)

- *Bacillus subtilis* ATCC663의 mycosubtilin synthetase의 특성 (PNAS, 1999)

- Iturin 유사 항균물질을 생산하는 *Paenibacillus koreensis* 신종 (I. J. System. Evol. Microbiol., 2000)

- Iturin A의 aggregational behavior (Peptides, 2001)
- Iturin A operon의 cloning, sequencing 및 characterization (J. Bacteriol., 2001)
- *Bacillus amyloliquefaciens*가 생산하는 iturin A에 의한 *Rhizoctonia solani*의 suppression (Soil Biol. Biochem., 2002)
- 서로 다른 환경에서 분리한 *Bacillus subtilis*의 유전적 다양성 및 항생물질 생산 (Res. Microbiol., 2002)

제 7 장 참고문헌

- 김용기, 최용철, 유갑희, 이경휘. 1989. 길항미생물 AC-1(*Bacillus* sp.) 처리시 고추역병방제효과 및 토양미생물에 의한 영향, 농사시험연구논문집(작물보호편) 1:13-18.
- 김창진, 유익동, 이인경, 윤봉식. 1991. 과채류 병해방제용 유용항생물질 탐색에 관한 연구(I), 과학기술처 연구보고서. Pp. 1-66.
- 김창진. 이인경. 윤봉식. 유익동. *Streptomyces neyagawaensis* 38D10균주가 생산하는 concanamycin B의 향고추역병 활성. 한국식물병리학회지. 21(4): 322-328.
- 문병주. 정후섭. 박현철. 1995. 딸기 시들음병균에 대한 *Trichoderma*속 균의 길항작용에 관한 연구. V. 중복기생균 *Trichoderma harzianum*에 대한 딸기 시들음병의 생물학적 방제. 한국식물병리학회지. 11(4): 298-303.
- 박보희. 김희규. 1989. 고추역병에 대한 우수 길항균 *Trichoderma harzianum*과 *Entrobacter agglomerans*의 선발 및 고추묘의 길항균 처리 방법에 따른 병방제효과. 한국식물병리학회지. 5(1): 1-12.
- 배영석. 심영기, 박창석. 김희규. 1995. 오이 덩굴조김병 억제에 관한 근권정착능력이 있는 *Gliocladium virens*와 *Pseudomonas putida*의 협력효과. 한국식물병리학회. 11(4): 287-291.
- 신동범. 小林紀彦, 이준탁. 1994. 길항미생물에 의한 시설재배 딸기 눈마름병의 생물학적 방제. 한국식물병리학회지. 19(4): 112-118.

- 이영근, 김정화, 박원목. 1985. 비병원성 *Pseudomonas solanacearum*을 이용한 담배 세균성 마름병의 방제. 한국식물병리학회지. 1(1): 17-21.
- 이인경, 김창진, 김신덕, 유익동. 1990. *Streptomyces parvullus*균주가 생산하는 항고추역병성 항생물질. 한국산업미생물학회지 18:142-147.
- 임태현, 이정목, 장태현, 차병진. 2000. 복숭아 미이라과로부터 분리한 방선균의 항균활성 및 동정. 한국산업미생물학회지 28:161-166.
- 조광연. 1998. 살균제의 현황 및 전망. *Proceedings of International Symposium on Recent Technology of Chemical Control of Plant Diseases*. Pp. 120-142.
- 조종택, 손석련, 문명주. 1992. 길항세균 *Pseudomonas gladioli*와 유기물 첨가에 의한 오이 덩굴조김병의 억제효과. 한국식물병리학회지 8(1) : 8-13.
- 최용철, 이재국, 배영석. 1992. 고추역병방제용 길항미생물 AC-1 균주의 농가생산 방법. 농업과학논문집. 36(2C.P) : 337-342.
- Campbell, R. 1989. *Biological Control of Microbial Plant Pathogens*, Pp.41-64. Cambridge Press, Cambridge.
- Cho, S. J., Lee, S. K., Cha, B. J., Kim, Y. H. and Shin, K. S. 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. FEMS Microbiol. Lett. **223**: 47-51.
- Choi, Y. C. 1994. Control of Fungal Diseases with Antagonistic Bacteria, *Bacillus* sp. AC-1, *Proceedings of International Symposium on Biological*

Control of Plant Diseases. 50-61.

Fravel, D. R., Marois, J. J., Lumdsen, R. D., and Connick, Jr. W. J. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay mixture. *Phytopathol.* 75:774-777.

Fravel, D. R., Connick, W. J. J., and Lewis, J. A. 1996. Formulation of microorganism to control plant diseases. In: *Formation of Microbial Biopesticides, Beneficial Microorganisms and Nematodes*(H. D. Burges, ed.). Chapman and Hall, London.

Gueldner, R.C., Reilly, C.C., Pusey, P.L., Costello, C.E., Arrendale, R.F., Cox, R.H., Himmelsbach, D.S., Crumley, F.G. and Cutler, H.G. (1988) Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Food Chem.* 36, 366-370.

Isogai, A., Takayama, S., Murakoshi, S. and Suzuki, A. (1982) Structure of β -amino acids in antibiotics iturin A. *Tetrahedron Lett.* 23, 3065-3068.

Janisiewicz, W. J. and Jeffers, N. 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection* 16: 629-633.

Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D. and Defago, G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescence* CHAO : Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:4-13.

Kerr, A. 1980. Biological control of crown gall through producing agrocin 84. *Plant Dis.* 64:25-30.

- Kim, Y. S., Son, J. K., Moon, D. C., and Kim S. D. 1997. Isolation and structure determination of antifungal antibiotics from *B. subtilis* YB-70, a powerful biocontrol agent. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 62-67.
- Klich, M.A., Arthur, K.S., Lax, A.R. and Bland, J.M. (1994) Iturin A: a potential new fungicide for stored grains. *Mycopathol.* 127, 123-127.
- Kondoh, M., Hirai, M., and Shoda, M. 2001. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil. *J. of Biosci. and Bioeng.* 91: 173-177.
- Niranjan Raj, S., Deepak, S. A., Basavaraju, P., and Shetty, H. S. 2003. Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria in growth promotion and suppression of downy mildew in pearl millet. *Crop Protection* 22:579-588.
- Ohno, A., Takahashi, A., and Shoda, M. 1993. Effect of temperature change and aeration on the production of the antifungal peptide antibiotic iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in liquid cultivation. *J. of Fermentation & Bioengineering* 75: 463-465.
- Ohno, A., Takashi, A., and Shoda, M. 1993. Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation . *J. of Fermentation and Bioengineering* 75: 23-27.
- Pickup^a, K. M., Nolan, R. D., and Bushell M. E. 1993. A method for increasing the success rate of duplicating antibiotic activity in agar and liquid cultures of *Streptomyces* isolates in new antibiotic screens. *J. of Fermen. & Bioeng.* 76: 89-93
- Pusey, P. L. 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organism as

biofungicides. *Pesticide Science*. 27:133-140.

Thomashow, L. S. and Weller, D. W. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* Pp. 2-79. in biological control of *Gaeumannomyces var. tritici*. *J. Bactriol.* 170: 3499-3508.

Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., and Bertagnolli, B. L. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biolo. & Biochem.* 34:955-963

Schreiber, L.R., Gregory, G.F., Krause, C.R. and Ichida, J.M. (1988) Production, partial purification, and antimicrobial activity of novel antibiotic produced by a *Bacillus subtilis* isolate from *Ulmus americana*. *Can. J. Bot.* 66, 2338-2346.

Sabaratnam, S. and Traquair, J. A. 2002. Formulation of a Streptomyces Biocontrol Agent for the Suppression of Rhizoctonia Damping-off in Tomato Transplants. *Biological Control* 23: 245-253.

주 의

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