

보안 과제 ( ), 일반 과제 (O) / 공개(O), 비공개( ),발간등록번호 (O)

발간등록번호

11-1543000-002202-01

# 친환경 고추 병해 방제용 고온성 미생물 1종 개발 및 대량배양을 통한 현장 실용화 최종보고서

---

2018. 3. 30.

주관연구기관 / 전남대학교 산학협력단  
협동연구기관 / (주) 푸르네

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

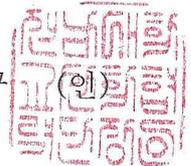
## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “친환경 고추 병해 방제용 고온성 미생물 1종 개발 및 대량배양을 통한 현장 실용화”(개발기간 : 2014. 12. ~ 2017. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 3. 23.

주관연구기관명 : 전남대학교 산학협력단 (대표자) 송 진 규



협동연구기관명 : (주) 푸르네

(대표자) 박 윤 석



주관연구책임자 : 김 영 철

세부연구책임자 : 김 길 용

협동연구책임자 : 박 윤 석

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	314084-3	해 당 단 계 연 구 기 간	최종 3년	단 계 구 분	(최종)/ (3단계)
연구사업명	중 사업명	농림수산식품 연구개발사업			
	세부 사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과제명	친환경 고추 병해 방제용 고온성 미생물 1종 개발 및 대량배양을 통한 현장 실용화			
	세부 과제명	제1세부: 자가배양 고온성 미생물제의 고추 병해 방제 방법 검증 및 현장 적용 제2세부: 자가배양 고온성 미생물제의 고추 생육 효과 검증 및 현장 적용 제1협동: 기능성 미생물제제 실용화 및 사업화			
연구책임자	김영철	해당단계 참여 연구원 수	총: 39명 내부: 24명 외부: 15명	해당단계 연구개발 비	정부: 200,000천원 민간: 66,700천원 계: 266,700천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 39명 내부: 24명 외부: 15명	총 연구개발 비	정부: 600,000천원 민간: 180,090천원 계: 800,100천원
연구기관명 및 소속부서 명	전남대학교 산학협력단			참여기업명 주식회사 푸르네	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
다양한 고온성 미생물을 분리하고 이들을 현장 배양할 수 있는 저가 배지와 현장 대량 방법을 개발하였고, 각 균주의 항균활성 및 작물생육관련 인자들의 규명을 통해 Cyclic lipopeptide와 biosurfactant가 주요 항균물질임				보고서 면수 174쪽	

을 증명하였다. 또한 이들 고온성의 포장 실증을 위해 미생물 대량 배양액과 다양한 병해충 유기농자재와의 혼합에 의한 병해충 방제 능력을 검증하였다. 또한 고온성 미생물을 선택적으로 농가현장에서 배양할 수 있는 방법과 최적 살포 시기 등을 확립하였다. 이들 개발 기술을 기반으로 노지와 온실 고추 재배 매뉴얼을 제작하였고, 개발된 제품과 방법을 10곳 이상의 현장에서 밴드와 현장 컨설팅을 통해 고추 재배 실증을 실시하였다. 또한 개발된 고온성 미생물은 유기 목록 자재 1건과 토양 미생물로 등록하였다. 이들 개발된 제품과 기술은 농가 현장과 상업화를 통해서 첫 해 113백만원의 매출을 기록하였다. 또한 이들 기술은 타 연구성과에 활용되어 타 작물에 적용 중이다.

#### 4. 국문 요약문

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<p>친환경 고추 생산에 가장 문제시 되는 화학농약 절감을 위해 병해 방제 효능을 지닌 고온성 미생물제를 개발하여 유기농자재로 등록하고, 등록된 미생물을 활용하여 생산현장에서 필요한 효율적으로 사용할 수 있는 방법을 개발하여 저가 고효율로 미생물을 활용할 수 있는 기술들을 패키징하여 현장에서 손쉽게 적용할 수 있는 제품과 방법을 수요자인 농업인에게 제공하는 것이 목표였다.</p> <p><input type="checkbox"/> 기 분리된 고온성 미생물의 고추 병해 방제 및 고추 생산성 최적 대량배양 조건을 확립하고 효능 검증을 수행하였다.</p> <p><input type="checkbox"/> 최적 조건하에서 고온성 미생물을 발효와 제형화 시설을 이용하여 멸균, 무균 배양에 의해 제품으로 등록하고, 고추 병해 방제 방법과 생산성 향상 조건 확립하였다.</p> <p><input type="checkbox"/> 개발된 시제품과 제품을 실내, 온실, 소면적, 포장 검정을 통해 이들 시제품의 효능을 검증하였다.</p> <p><input type="checkbox"/> 친환경 고추 생산현장인 광주와 전남 지역에 2개소를 대상으로 다양한 포장 검증을 통해 고추 병해 방제 뿐만 아니라 생산성 향상 요인 등을 분석하여 수요자인 친환경 고추 생산자가 사용할 수 있는 방법을 제시하고 경제성 분석을 통해서 비용 절감효능 등을 분석하였다.</p>				
연구개발성과	<p><input type="checkbox"/> <i>Bacillus amyloquelaciens</i> 균주와 <i>Paenibacillus elgii</i> 균주 등 고온성 미생물을 분리하고 이들을 현장 배양할 수 있는 배지를 개발하였다.</p> <p><input type="checkbox"/> 각 균주의 항균활성 및 작물생육관련 인자들의 규명을 통해 Cyclic lipopeptide와 biosurfactant가 주요 항균물질임을 증명하였다.</p> <p><input type="checkbox"/> 고온성 미생물 대량 배양액과 다양한 병해충 유기농자재와의 혼합에 의한 병해충 방제 능력을 검증하였다.</p> <p><input type="checkbox"/> 고온성 미생물의 현장 대량 배양 배지와 배양 방법을 확립하였다.</p> <p><input type="checkbox"/> 유기 목록 자재 2건을 등록하였다.</p> <p><input type="checkbox"/> 개발된 제품과 방법을 20곳 이상의 현장에서 실증을 통해 적용하였다.</p> <p><input type="checkbox"/> 현장 실증 시 밴드를 이용하여 적용 방법과 현장 실증 적용하였다.</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p><input type="checkbox"/> 참여기업인 유기농자재 제품으로 등록을 통한 상품화</p> <p><input type="checkbox"/> 개발 미생물의 최적효능 활성 구명 및 현장적용 방법을 확립하여 논문, 특허, 영농활용 자료로 사용</p> <p><input type="checkbox"/> 개발 미생물의 지자체 배양기와 농가 현장배양에 원제로 제공하여 활용하는 정책적인 방안 제시</p> <p><input type="checkbox"/> 개발 미생물의 참여업체인 푸르네에서 미생물비료와 병해충 방제제로 등록하여 상품화</p> <p><input type="checkbox"/> 개발된 제품과 방법은 수요자의 교육와 컨설팅에 사용되어 유기농 생산에 이용</p> <p><input type="checkbox"/> SNS(밴드) 등을 통한 산학연 네트워크 구성을 통한 현장 컨설팅 체계로 활용</p>				
중심어 (5개 이내)	고온미생물	미생물비료	미생물농약	친환경농업	

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>In order to reduce chemical pesticide, which is the most problematic issue in the production of environmentally friendly red pepper, we developed a thermophilic microorganism having the efficacy of controlling the disease and registered it as organic material and developed a method to use it efficiently in the production field by using registered microorganism. The goal was to package the technologies that can utilize the microorganisms with high efficiency and provide products and methods that can be easily applied in the field to the farmers.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Establishment of optimum mass culturing condition of pepper disease control and pepper productivity using selective cultivation of thermophilic microorganisms. The thermophilic microorganism is registered as a product using the fermentation and formulation facilities under the optimum conditions, and the method for controlling the disease and improvement of productivity is established.</li> <li><input type="checkbox"/> Verification of the effectiveness of these prototypes in the <i>in vitro</i>, greenhouse, small-area, and actual farmer' s fields.</li> <li><input type="checkbox"/> We analyzed the factors of productivity improvement as well as the prevention of red pepper disease by examining various red pepper production sites in Gwangju and Jeonnam regions. We proposed this developed method and products can be used by eco-friendly pepper producing farmers to reduce costs to cultivated red pepper.</li> </ul>		
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Various thermophilic bacterial isolates were selected and developed a culture medium for on-site culture of these thermophilic bacteria.</li> <li><input type="checkbox"/> Cyclic lipopeptide and biosurfactant were proved to be the major antimicrobial agents through identification of antimicrobial activity of each strain and factors related to crop growth and to control red pepper pathogens.</li> <li><input type="checkbox"/> Mixing bacterial cultures of thermophilic bacteria with various organic pesticide materials were proved to be effective to control red pepper diseases.</li> <li><input type="checkbox"/> Establishment of on-site mass culture medium and culture method of thermophilic microorganisms</li> </ul>		

	<input type="checkbox"/> Registered two organic list materials <input type="checkbox"/> Apply the developed products and methods through more than 20 field demonstrations <input type="checkbox"/> Applying method and field demonstration using bands during field demonstration.				
Expected Contribution	<input type="checkbox"/> Commercialization of the thermophilic bacteria through registration as an organic material product. <input type="checkbox"/> Establishment of the optimum activity of the developed microorganisms and application method in field, and use them as papers, patents, and farming materials <input type="checkbox"/> Provide policy proposal to utilize the developed microorganism as a product for the cultivation of the municipality and farmhouse site <input type="checkbox"/> Registered as a microbial fertilizer and pest control agent in Furne, a participant of developed microorganisms, <input type="checkbox"/> The products and methods developed are used for training and consulting of consumers and are used for organic production. <input type="checkbox"/> Using SNS (band) as an on-site consulting system through networking of industry-academia-research network				
Keywords	Thermophilic microorganism	Microbial fertilizer	Microbial pesticides	Environmentally friendly agriculture	

## 6. 영문목차

### Contents

1. Summary of Research .....	1
2. Present State of Technologies at Home and Abroad .....	7
3. Research Contents and Results .....	8
4. Degree of Accomplishment in Research and Contribution to Related Fields .....	154
5. Achievements of Research and Further Prospect .....	159
6. Information of Related Technologies Abroad .....	160
7. Security Level .....	160
8. Current Research Facilities and Equipments .....	161
9. Results of Laboratory Safety Management .....	161
10. Research Achievements .....	161
11. Other Matters .....	162
12. Reference .....	162

<Attachment> Self Evaluation Report

## 7. 본문목차

### < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	1
2. 국내외 기술개발 현황 .....	7
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	8
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	154
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	159
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	160
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	160
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	161
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	161
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	161
11. 기타사항 .....	162
12. 참고문헌 .....	162

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 1-1. 연구개발 목적

○친환경 고추 생산에 가장 문제시 되는 화학농약 절감을 위해 병해 방제 효능을 지닌 고온성 미생물제를 개발하여 유기농자재로 등록하고, 등록된 미생물을 활용하여 생산현장에서 필요한 효율적으로 사용할 수 있는 방법을 개발하여 저가 고효율로 미생물을 활용할 수 있는 기술들을 패키지로 하여 현장에서 손쉽게 적용할 수 있는 제품과 방법을 수요자인 농업인에게 제공하는 것이 목표임.

## 1-2. 연구개발의 필요성

○ 유기 농산물 시장 및 유기농산물 생산용 미생물제의 현황 및 전망

### □ 국내 친환경농업 시장 현황

- 친환경농산물 생산은 '01년도 이후 연평균 약 30% 정도 성장하여, 전체 농업 대비 10% 정도의 비중을 차지
- '10년 저농약 신규 인증 중단('16년 전면 폐지) 유기농·무농약 인증은 증가하는 추세지만, 부실인증 문제 발생 등으로 '13년은 감소
- 친환경농산물 시장 규모는 지속적으로 성장하여 '20년에는 7.5조원 규모에 이를 것으로 전망('13, KREI)

**< 인증별 친환경농산물 시장규모 전망 > (단위 : 억원)**

	2009	2011	2012	2013	2015	2016	2017	2020
유기농	2,426	3,000	4,081	4,575	6,510	7,891	9,346	14,296
무농약	13,178	16,420	17,175	19,322	27,444	33,369	39,521	60,453
저농약	18,514	12,257	9,552	7,476	4,779	-	-	-
전체	<b>34,117</b>	<b>31,677</b>	<b>30,809</b>	<b>31,373</b>	<b>38,732</b>	<b>41,259</b>	<b>48,867</b>	<b>74,749</b>

### □ 친환경 농산물 생산용 미생물제품의 국내외 현황 및 전망

○ 전세계 생물적 방제 시장은 2010년 현재 1,560 M US\$로 전체 작물보호제 시장의 약 5%를 점유하고 있음(Global Strategic Business Report-Biopesticides, 2011). 전체 생물적 방제 시장에서, 곤충 병원성 세균인 *Bacillus thuringiensis* (Bt)가 가장 높은 시장 점유율(40%)을 가지고 있으며, 다음으로 곤충 병원성 곰팡이 및 바이러스가 뒤를 따르고 있음

### □ 국내 친환경산물 생산용 미생물제 시장 현황

- 국내 유기농을 포함한 친환경 농산물 생산 농가수와 재배 면적은 증가하고 있고, 이와 비례하여 생물농약과 친환경유기농자재 중 작물병해충 방제 소재의 시장도 급속도로 증가하고 있음
- 아래 그림에서 보는 바와 같이 생물농약의 시장은 지속적으로 증가하고 있음. 하지만

전체 시장 규모는 2009년에 약50억 원 정도로 매우 미미한 실정임

- 친환경 농산물 재배 시 병해충 방제용 자재로는 생물농약 보다는 친환경유기농자재를 대부분 사용하고 있음. 그 이유는 1) 생물농약 등록 시 비용이 친환경유기농자재에 비하여 매우 많이 필요하며, 2) 친환경유기농자재의 경우 정부 및 지자체에서 지원이 있기 때문임
- 2011년 8월 현재 우리나라에 등록된 친환경 유기농자재의 수는 총 1296개 이며, 총 업체 수는 482개에 달함. 이 중 병해충 관리분야 유기농자재 수는 470개이며, 업체 수는 125개 업체임. 2011년 친환경유기농자재의 시장은 약6천억 원으로서 단순 비율로 산정할 때 병해충관리분야의 친환경유기농자재의 시장은 약 2천억 원으로 추정됨(표)
- 친환경농업의 가장 핵심 부분인 병해충 방제 방법에 사용될 소재와 제제가 미비하고, 효능이 검증되지 않은 자재가 난립하여 국가적인 문제로 대두되고 있음.

<표> 친환경유기농자재 등록현황(2011년 8월 현재)

용도		목록등록	업체수
토양개량 및 작물생육 분야	토양개량	26	24
	작물생육	372	217
	토양개량 및 작물생육	428	258
	소계	826	422
병해충관리 분야	병해관리	162	89
	충해관리	303	83
	병충해관리	5	4
	기타	0	-
	소계	470	125
계		1,296	482

□ 친환경 유기농용 미생물자재 시장 성장

- 기존의 친환경농업 인증 재배면적의 증가 추세와 사료용 생균제 시장의 성장 추세를 바탕으로 미생물제제의 국내 수요 규모를 종합적으로 전망하면 <표>에서 보는 바와 같음.
- 미생물농약, 미생물비료, 친환경유기농자재, 사료용 생균제의 수요 규모는 2008년에 약 910억 원에서 점차 증가하여 2011년에 약 1,398억 원, 2015년에 1,668억 원, 2020년에 약 1,793억 원에 이를 것으로 전망됨.

표. 미생물제제 수요 전망

단위: 억 원

	2008	2011	2015	2020
미생물 농약	17.8	28.4	34.4	40.0
미생물 비료	200.0	318.6	386.9	449.4
친환경유기농자재	101.9	162.3	197.1	228.9
사료용 생균제	590.0	888.6	1,049.9	1,074.8
<b>계</b>	<b>909.7</b>	<b>1,397.8</b>	<b>1,668.2</b>	<b>1,793.1</b>

□ 친환경 농업 미생물 사용량 국내 전망

- 현재 미생물제제별 사용량을 100으로 가정할 때, 2015년에 사료용 생균제에 대한 사용량이 현재보다 약 4.3배로 증가해 다른 미생물제제보다 긍정적일 것으로 전망하고 있음.
- 그러나 2020년에는 자가제조 유용미생물제를 제외한 미생물농약, 미생물비료(토양미생물제제), 친환경유기농자재의 사용량이 각각 3.9배, 3.4배, 3.8배 수준으로 모두 크게 증가할 것으로 전망하고 있음.

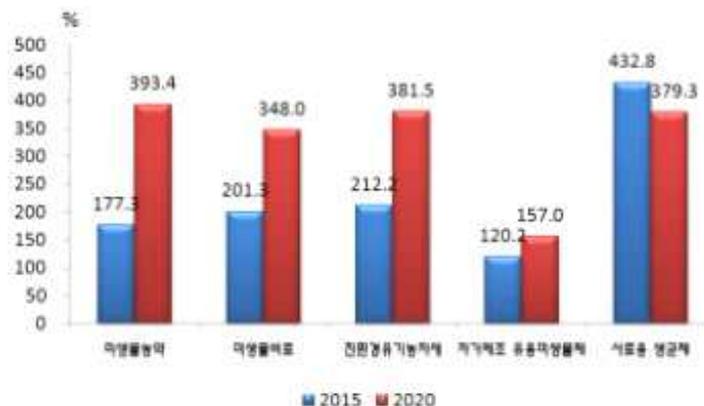


그림3. 미생물제제 종류별 사용량 전망.

## (2) 병해 방제용 고온성 미생물제의 필요성 및 차별성

### □ 사회적 필요성

- 농림축산식품부 친환경농업 육성방안에 따른 친환경농업 실천 확대, 화학비료 사용량 절감 및 토양지력 증진 추진.
- 고독성 농약 등록 취소 및 미생물, 천연추출물 등 친환경 생물농약 개발·사용 확대로 화학농약 사용 감축.
- 친환경 안전한 농산물에 대한 소비자의 요구 및 사회적 가치 상승에 따라 국내 친환경 농산물의 수요 및 유기농산물 시장규모 증가.
- 현재 국내 농약사용량을 매년 3%씩 감축하고, 유기농단지 50개를 2015년까지 신규로 조성할 예정이며, 무농약이상 농작물 재배면적을 전체 재배면적의 15%까지 육성할 계획임.

### □ 기술적 필요성

- 소단위 미생물 제품의 희석 살포에 따른 비료효능 및 병해 방제능이 미미함. 따라서 농민 자가 미생물배양 기술을 개발하여 보급할 필요가 있음.
- 국내 미생물제제 개발기술의 경우 미생물 발균 및 약효검정 기술, 작용기작과 활성물질 규명 등은 선진국 수준에 도달하였으나 농민이 미생물을 현장에서 배양하여 사용할 수 있는 기술은 미비하여 이에 대한 기술개발이 필요함.
- 현재 국내의 경우 여러 검증되지 않는 방법으로 농민 스스로 미생물을 배양하여 액비 등 미생물제를 만들어 사용하고 있음. 이는 병원균에 오염 및 효능을 입증 할 수 없음. 그러므로 비멸균상태에서 외부 잡균 및 병원균의 오염을 최소화하며 효능 또한 검증된 미생물 배양법 개발이 필요함.
- 미생물 제품에 함유된 유효성분의 농도가 낮고 활성균체수가 경시적으로 불안정성하며,

균체의 기질이나 기주 특이성이 취약하여 농가현장에 정착이 어려움. 그러므로 안정적인 생균체를 함유한 배양액을 제제로 활용하기 위한 현장 자가 배양 기술과 이를 위한 기질 및 생육 특이성 종균개발이 필요함.

- 현재 국내의 경우 현장 자가 배양 미생물제의 사용 방법이나 최적 저가 고효율 배양 방법, 살균이나 비료의 효능 등에 대한 연구가 되지 않고 있어 이에 대한 연구 개발이 시급함.

#### □ 관련연구 추진현황 및 동향

- 국내에 등록된 작물생육 관리용 미생물제제는 유기목록자재를 기준으로 약 200 여개가 있음(농진청, 2011, 11월 현재). 하지만 이들 미생물제제의 비료 성분 변화와 화학비료 대체 효과 및 병해충 방제 효능에 대한 정확한 조사 및 평가가 부족함.
- 현재 국내외 미생물제제의 개발에 있어서 농민이 직접 미생물제제를 배양할 수 있는 제품이 거의 전무한 상태.
- 미생물 배양액을 적절한 비율로 희석을 하여도 방제효과가 유지될 수 있는 배합기술이 필요
- 따라서, 본 연구팀에서는 이러한 배경을 고려하여 본 연구는 기질 및 생육 특이성을 활용하여 미생물을 농가현장에서 직접 배양하여 얻은 배양액을 작물재배 관리용 자재로 활용하기 위한 기술로서 미생물 균체를 제품 병에 담아 작물에 희석하여 살포하는 지금까지의 연구와 현저한 차별성이 있음.
- 미생물의 기질 및 생육 특이성을 이용한 농민 자가 배양 기술로써 자가 배양시 오염을 최소화 할 수 있는 기술에 관한 연구임

#### 1-3. 연구개발 범위

○본 연구의 최종 목표는

1. 유기목록 자재 1건이 상 등록
2. 개발 제품의 고추 적용방법 확립 및 활용
3. 품질 보증 QC용 마커 1건 이상 개발
4. 개발제품과 사용방법을 2개소 이상의 포장에서 실증을 통한 경제성 분석 및 활용 3건 이상
5. 개발 제품과 방법을 SNS와 onsite컨설팅을 통한 산학연 컨설팅 시스템 구축

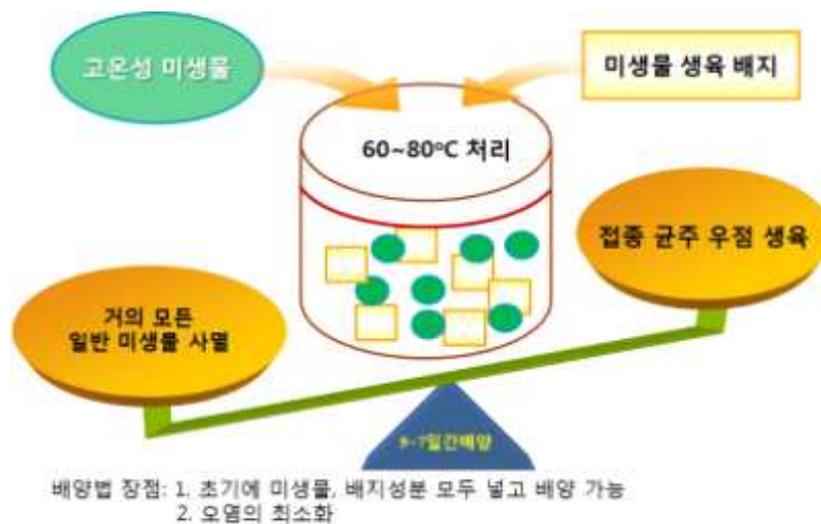
#### <연구개발 목표의 성격>

본 연구는 친환경 고추 생산에 가장 걸림돌이 되는 다양한 자재와 고가의 자재 사용 등의 문제점을 해결하기 위해 고추 주요 병해 방제용 미생물제품을 개발하고 이를 산업화하는데 그 최종목표가 있다. 즉, 본 연구는 기질 및 생육 특이성을 활용하여 미생물을 농가현장에서 직접 배양하여 얻은 배양액을 작물재배 관리용 자재로 활용하기 위한 기술로서 비멸균상태에서 외부 잡균 및 병원균의 오염을 최소화하며 효능 또한 검증된 미생물 배양법등의 개발이다. 또한 다양한 토양미생물제가 난립하고 있는 상황에서 멸균이 된 조건하에서 QC가 되는 미생물 제품을 제형화하여 이들을 활용한 유기농 생산에 있어서 수요자인 농민이 쉽게

쓸 수 있는 방제 매뉴얼을 개발하여 국내 유기농산물 생산의 경쟁을 높이고자 한다. 본 연구가 성공적으로 완료되면 현재 국내 농업기술센터와 지자체에서 미생물 배양기를 이용한 작물에 사용하는 미생물의 최적 사용 방법, 저가 고효율 배양 배지 및 방법, 사용 방법 등을 과학적으로 증명하고 사용방법을 확립하는 목표를 달성하기 위해 본 연구는 작물의 병원균에 특이적으로 항균활성이 높은 특허균주와 이를 활용하는 노하우를 지니고 있는 팀으로 구성되어 국내 미생물 배양 분야의 과학적인 실증과 전남대학교 친환경농업연구소의 기존 미생물 대량배양 방법을 업그레이드를 통해 개발된 기술을 패키지화하여 농민들에게 쉽게 사용하는 방법을 개발하여 다양한 산학연 네트워크를 활용하여 사용 방법을 교육하고 컨설팅에 의해 고추 친환경농산물 생산을 하고 이들 기술과 사업방법을 다양한 작물에 활용할 것이다.

- 미생물의 기질 특이섭식 및 특정 생육 온도 구배를 이용하여 고온 기능성 미생물을 제어되지 않은 농업환경에서 고가의 미생물 배양기를 사용하지 않고 선택적으로 배양하는 기술임.
- 미생물 배양시 특정 기질을 사용하여 화학비료를 대체할 수 있는 식물 성장 물질, 식물 흡수 양분 및 토양 미생물 활력 물질 등을 다량 생산하는 것임.
- 미생물 배양액의 병해 저해 능력을 극대화 하려는 조건과 사용 방법을 정립하여 농가에 활용하고자 함

□ 연구개발의 기술인 농민 자가 배양의 원리



- 미생물 배양온도를 60~80°C까지 올리면 그람음성균(Gram negative bacteria) 뿐만아니라, 대부분의 그람양성균(Gram positive bacteria)까지도 사멸 하게 됨.
- 즉, 60~80°C 처리 후 적절한 온도를 낮추어 미생물을 배양하면 비 멸균 상태에서 특정 미생물이 우점하게 되고 선택적 배양이 이루어지게 됨.
- 이러한 배양기술을 이용한다면 시중에서 쉽게 구입 할 수 있는 저렴한 플라스틱 배양통에 히터(heater) 및 기포기를 이용하여 매우 저렴한 가격에 가능함.
- 여기에 사용될 고온성 균주의 특징은 60~80°C에서 생육가능하며, 미생물 길항작용이 있어 배양

시 오염균들이 생육하지 못하게 하는 특성을 가져야함.

이러한 온도구배를 이용한 배양기술은 지금까지 알려져 온 미생물 배양기술과 차별화 된 것이고 독창적인 연구 내용이라 할 수 있음.

[1세부: 자가배양 고온성 미생물제의 고추 병해 방제 방법 검증 및 현장 적용]

- 고온성 미생물제의 농가 현장 적용시 발생될 수 있는 오염 및 유해성에 관한 평가는 유해균 선별 배지 및 PCR 등의 유전전 기법을 이용하여 추진 할 것임.
- 기 분리된 고온성 생물적 방제 미생물의 농민이 현장 배양했을 시 최적의 선택배양을 할 수 있도록 실험을 추진 .
- 포트 및 실내에서 고온성 생물 방제균의 고추 병해 방제효능 평가 다양한 농도와 처리 시기와 처리 간격 등을 전남대학교 부속농장의 유리온실에서 실시할 것임.
- 포장에서의 기 분리된 고온성 생물방제 고추 병해 방제 효능 평가는 광주광역시 농업기술센터 내의 실증용 포장이나 참여 농가에서 온실과 노지 조건하에서 역병, 탄저병, 흰가루병, 세균성 반점병이 발생 초에 개발된 제제와 유기농 자재를 활용하여 고추 병 방제 방법을 제시할 것임.

[2세부: 고온성 미생물의 농민 자가 대량배양 연구 전략]

- 기 분리된 미생물의 생태학적, 생물학적, 환경학적 특성을 파악하여 고온성 미생물제의 농가현장적용이 가능하도록 할 것임.
- 고온성 미생물제의 병해방제 기작 분석은 기존에 알려진 항균 물질등의 조사뿐만 아니라 아직 분리되지 않은 물질의 분리 및 동정으로 추진할 것임.
- 고온성 미생물제의 포장실증을 위해 본 연구진은 광주광역시 농업기술센터 내의 실증용 포장 또는 농가를 선정하여 미생물제의 병해방제, 작물 생육, 토양화학성 및 토양 미생물 영향 평가실험을 추진할 것임.

[1협동: 고온성 미생물제제의 실용화 및 사업화 전략]

- 고온성 미생물제제의 현장 실용화
  - 연구 결과를 바탕으로 고온성 미생물제가 농가 현장 대량 배양이 가능하고 효능을 극대화 할 수 있는 방안을 조사하여 농업 현장에 적합하고 사용이 용이한 방법을 모색 할 것임.
- 고온성 미생물제제의 사업화
  - 농가 보급 : 연구 수행 후 효과 입증을 통한 농가 보급 확대
  - 농협 : 농협은 농자재 유통의 50%이상을 점유하고 있으므로 시범포 농가를 포함한 농협을 공략하고 추후 농협 납품 사례를 적용하여 전남 및 전국 농협으로 확대 공략
  - 농업 유관기관 : 농업 기술센터와 시군에 사업계획서를 제출하여 농가에 보급 될 수 있게 하며 추후 전남 및 전국 농업 유관기관에 사업계획서를 보급하여 많은 농가에서 사용 될 수 있게 함
  - 국내외 전시회 및 교육 : 국내외 농업관련 전시회에 참석하여 개발된 자재를 홍보하고, 농가 교육을 통해 제품의 우수성을 알려 보다 많은 농민들이 사용케 함

- 국내 언론 홍보 및 광고 : 농가 성과를 바탕으로 농업 전문지에 홍보하여 기사화 하고, 광고를 게재하여 판매를 촉진함
- 해외 마케팅 : 현재 수출 거래 및 시험포 운영 중인 국가에 연구 성과 및 효능을 홍보하고 시제품을 보내어 해외 수출을 추진 함

## 2. 국내외 기술개발 현황

	코드번호	D-04
<p>○ <b>관련연구 추진현황 및 동향</b></p> <p>○ 국내에 등록된 작물생육 관리용 미생물제제는 유기목록자재를 기준으로 약 200 여개가 있음(농진청, 2011, 11월 현재). 하지만 이들 미생물제제의 비료 성분 변화와 화학비료 대체 효과 및 병해충 방제 효능에 대한 정확한 조사 및 평가가 부족함.</p> <p>○ 현재 국내외 미생물제제의 개발에 있어서 농민이 직접 미생물제제를 배양할 수 있는 제품이 거의 전무한 상태.</p> <p>○ 미생물 배양액을 적절한 비율로 희석을 하여도 방제효과가 유지될 수 있는 배합기술이 필요</p> <p>○ 따라서, 본 연구팀에서는 이러한 배경을 고려하여 본 연구는 기질 및 생육 특이성을 활용하여 미생물을 농가현장에서 직접 배양하여 얻은 배양액을 작물재배 관리용 자재로 활용하기 위한 기술로서 미생물 균체를 제품 병에 담아 작물에 희석하여 살포하는 지금까지의 연구와 현저한 차별성이 있음.</p> <p>○ 미생물의 기질 및 생육 특이성을 이용한 농민 자가 배양 기술로써 자가 배양시 오염을 최소화 할 수 있는 기술에 관한 연구임</p>		

### 3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

#### 1 세부: 자가배양 고온성 미생물제의 고추 병해 방제 방법 검증 및 현장 적용

##### 재료 및 방법

##### 1) 사용 균주의 유전적 분석

본 연구에서 사용하는 4개의 균주(표 1)가 다양한 유용형질을 보유하고 있는지를 각 유용형질을 암호화하고 있는 유전자들을 증폭할 수 있는 primer들을 조제하여 확인하였다 (Chen et al, 2007; Kim et al., 2010)). 다양한 생물적 방제균, *Bacillus velezensis*와 *Bacillus thuringiensis* 뿐만 아니라 식품 유해 미생물인 *Bacillus cereus*의 genomic DNA를 분리하여 주형으로 이용하였다. 본 연구에 사용된 증폭 primer sequence들은 표로 정리하였다(표 2).

표 1. 본 연구에 사용된 고온성 미생물

균주명	분리 출처
<i>Bacillus subtilis</i> QST713	Bayer Inc, Serenade Max, 대조구
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PPL	장수 풍덩이 유충 (1세부과제 균주)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y1	대두박 (2세부 과제 분리균주)
<i>Paenibacillus elgii</i> HOA71	고추 포장 (기 분리된 키틴분해 미생물)

표 2. 본 연구에 사용된 생물적 방제에 관련된 유용형질 증폭 primer sequences

Primer sequences	유전자 및 크기
<i>sfp</i> -F(5'-ATG AAG ATT TAC GGA ATT TA-3') <i>sfp</i> -R(5'-TTA TAA AAG CTC TTC GTA CG-3')	surfactin expected product length: 600bp
<i>ituD</i> -F(5'-ATG AAC AAT CTT GCC TTT TTA-3') <i>ituD</i> -R(5'-TTA TTT TAA AAT CCG CAA TT-3')	Iturin expected product length: 1,203bp
<i>lpa</i> -14F(5'-ATG AAA ATT TAC GGA GTA TA-3') <i>lpa</i> -14R(5'-TTA TAA CAG CTC TTC ATA CG-3')	Iturin expected product length: 675bp
<i>alsS</i> -F(5'-TGA GCT TTC CGC AGG ATG TT-3') <i>alsS</i> -R(5'-TGC GAA CCG ATA TCG CAA GT-3')	butanediol (acetolactate synthase) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> specific expected product length: 697bp
<i>alsS</i> -F(5'-TGA GCT TTC CGC AGG ATG TT-3') <i>alsS</i> -R(5'-GTA GCG GGA CAT CCA GAT CG-3')	butanediol (acetolactate synthase) <i>Bacillus</i> general expected product length: 719bp
<i>dfnA</i> -F(5'-GGA GCC GGA CTG TTT GAT GA-3') <i>dfnA</i> -R(5'-ATC AGA CGG CGT ATC GTG TC-3')	difficidin (dfnA) <i>Bacillus</i> general expected product length: 716bp
<i>dfnABa</i> -F(5'-GAC ATT TGC GTT GAA GCG GA-3') <i>dfnABa</i> -R(5'-TCA ATC AGC ATG GTC TGT CT-3')	difficidin(dfna) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> specific expected product length: 840bp
<i>dfnD</i> -F(5'-GCG CAA GGC TCT TTT CAA CA-3') <i>dfnD</i> -R(5'-ATT CCG CGG ACC TTT CCA TT-3')	difficidin (dfnD) <i>Bacillus</i> general expected product length: 704bp
<i>dfnDBa</i> -F(5'-CGG CTG AAA AGG TGC TAC GG-3') <i>dfnDBa</i> -R(5'-CAC CGT ATA CCC GGT CGT TT-3')	difficidin (dfnD) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> specific expected product length: 863bp

##### 2) 균주의 생화학적 분석

QST713, Y1, PPL 균주를 tryptic soy broth에서 배양한 후 세균세포를 원심분리로 회수하고, 배양여액을 0.2µm syringae filter를 통과시켜 세균을 완전히 제거하였다. 세균 free상등액에 biosurfactant활성을 간이로 검정하기 위해, pennzoil한 방울을 24 well microplate를 떨어뜨린 후, 배양배지와 생물적 방제활성을 가지고 있지만 biosurfactant를 주 물질로 생산하지

않는다고 알려진 2 종류의 그람 음성균의 배양액을 negative control로 이용하였다.

### 3) 균주의 항균 활성 측정

PPL균주의 배양 배지별 항균활성을 검증하기 전에 먼저 1/3 KB broth배지에서 3일간 배양한 다음 세균세포를 원심분리와 0.2 $\mu$ m의 filter를 이용하여 배양여액만을 회수한 다음 PDA배지에 다양한 농도가 되게 혼합하여 plate를 조제하였고, 동일한 양의 멸균 배지를 혼합한 것은 대조구로 하여 조제하였다. 조제된 plate에 주요 식물병원균인 *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*와 *Fusarium oxysporum*을 접종하여 생육억제 능력을 검정하였다.

PPL균주의 항균활성은 배양 배지에 따라 활성이 달라지는 지를 알아보기 위해 5가지 배지를 조제하여 검정하였다(표 3). 배지 조성표는 표 3에 나타난 조성 중에 5개의 배지(1/3 KB, M9, LB, OC, TF)를 이용하여 3일간 배양한 다음 생균수를 TF plate에 10배로 희석하여 생균수를 측정하였고, cell free 배양여액 10%을 PDA에 혼합하여 항균활성을 곰팡이의 생육억제 능력을 검정하였다.

표 3. 고온성 미생물의 최적항균활성 검정용 배지 및 조성

배지명	배지 조성(1L 기준)
1/3 KB	Proteose peptone #3 6.7 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5 g, MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 0.5g, Glycerol 5ml
M9	5X M9 minimal salt 200ml, 1M MgSO <sub>4</sub> 2ml, 20% sucrose 20ml, 1M CaCl <sub>2</sub> 0.1ml
LB	tryptone 10g, yeast extract 5g, sodium chloride 10g
Chitin medium	2세부과제 조성표 참조
OC	glucose 6g, yeast extract 8g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2.5g, NaCl 1.5g, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0.5g, MgSO <sub>4</sub> 1g
TF	Peptone 20g, Sucrose 25g, Yeast extract 4.5g
당밀 배지	당밀 20g, 요소 비료 3g, 천일염 1g
유박 배지	유박 40g, 당밀 20ml
설탕 배지	유박 7g, 설탕 12g, 천일염 0.2g

상기의 배지 중에 OC배지와 chitin배지에서 본 연구에서 이용된 4종류의 균주를 배양하면서 접종 후 1일, 3일, 5일, 10일, 14일 후에 생균수와 surface tension, 항균활성을 측정하였다. 표 3에 제시된 다양한 배양배지 조건하에서 고온성 미생물을 배양하고 배양액의 항균활성을 검정하였다. 추가로 사용한 배지는 실제로 농가에서 자가배양용 배지와 자연농법을 활용하시는 친환경농가에서 주로 사용하는 유박, 당밀, 설탕 배지를 추가하여 각 병원균에 항균활성을 측정하였다.

PPL균주를 OC, TF, Chitina기반 배지에 5일간 생육시킨 후 상기의 방법으로 cell free배양여액을 추출하여 다양한 식물병원세균, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Ralstonia solanacearum*, *Burkholderia glumae*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas euvesicatoria*균를 도말한 배지위에 20  $\mu$ l를 paper disk법을 이용하여 clear zone을 측정하여 항세균활성을 검정하였다.

#### 4) 균주의 세포의 효소의 활성 및 항균활성 측정

*P. elgi* 균주를 chitin이 첨가한 배지와 chitin을 첨가하지 않은 배지에서 7일 동안 생육시킨 후, 세균을 원심분리하여 제거한 다음, 배양액에 ammonium sulfate를 첨가하여 extracellular protein들을 회수하였다. 동량의 단백질을 two-dimensional PAGE에 전기영동하여 배지에 키틴 첨가 유무에 따른 발현이 다른 extracellular protein들을 동정하였다(Park et al., 2007; Kim et al., 2017b).

*P. elgi* 균주에서 클로닝된 *PeChiA* 유전자를 대장균에서 발현시키기 위해서 pET23b vector의 *NdeI*과 *Xhd* 부위에 클로닝한 다음 *E. coli* BL21 균주에 형질전환한 후 재조합 대장균 내에서 chitinase 발현 여부를 알아보기 위해 LB와 1/2LB에 chitin을 첨가한 다음 배양시기별 chitinase 활성을 측정하였다.

*P. elgi* 균주에서 클로닝된 bacillolysin 유전자를 대장균에서 발현시키기 위해서 pET23b vector의 *NdeI*과 *XhoI* 부위에 클로닝한 다음 *E. coli* BL21 균주에 형질전환한 후 재조합 대장균 내에서 과다 발현시킨 후, 재조합된 bacillolysin의 정제하기 위해 배지에 IPTG를 첨가하여 induction한 다음, affinity column을 이용하여 다양한 buffer를 이용하여 정제하였다. 약 5670kDa의 단일 bacillolysin 단백질이 2mg을 정제하여 추가 연구에 사용하였다.

#### 5) 대량 배양액의 작물병 방제 능력 검정

본 연구에서 사용된 균주 중에 PPL 균주와 HOA 균주들의 5일 동안 chitin이 함유된 제한 배지에 생육시킨 다음, 1:3으로 멸균수로 희석하여, 다양한 식물의 유묘에 살포하였다. 균주 배양액을 살포한 1일 후에 이들 미생물들의 식물병 방제 능력을 미생물농약으로 등록되어 있는 Serenade™(바스프)와 *Bacillus subtilis* QST713 균주 배양액을 1:3으로 희석한 배양액을 positive control로 이용하였으며, 배양한 균주의 배지를 멸균수로 1:3로 희석한 것을 negative control로 다양한 식물에 발생하는 주요 식물병에 방제능력을 측정하였다(Kim et al., 2001). 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 역병, 토마토 잿빛곰팡이병, 고추 탄저병, 보리 흰가루병, 밀 붉은녹병을 살포하여 각 식물병에 따라 서로 다른 조건에서 발병시킨 후, 3 - 7일 후에 각 식물병에 대한 방제가를 무처리구의 발병량을 기준으로 각 균주별 방제가를 다음의 방정식을 이용하여 측정하였다(표 4). 방제가(% control)=100 [(A-B)/A], A=대조구의 식물병 발생율(%), B=균주 처리구의 식물병 발생율(%).

표 4. 대상 채소병의 병원균 및 접종 방법

식물병	병원균	접종 농도
벼 도열병	<i>Magnaporthe grisea</i>	5×10 <sup>5</sup> 포자/ml
벼 잎집무늬마름병	<i>Rhizoctonia solani</i>	7일 고체배양체 마쇄액
토마토 역병	<i>Phytophthora infestans</i>	5×10 <sup>4</sup> sporangia/ml
토마토 잿빛곰팡이병	<i>Botrytis cinerea</i>	5×10 <sup>5</sup> spores/ml
고추 탄저병	<i>Colletotrichum coccodes</i>	10 <sup>6</sup> spores/ml
보리 흰가루병	<i>Erysiphe graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	병든 식물체에 형성된 포자의 dusting을 통한 접종
밀 붉은녹병	<i>Puccinia recondita</i>	0.67 mg spores/ml

## 6) 대량 배양액의 작물병 유도 저항성 검정

PPL균주를 이용하여 고온성 미생물이 식물병 저항성 유도 능력이 있는지를 고추 녹광 품종을 이용하여 검정하였다. 먼저 PPL균주를 NB broth에 3일간 생육시킨 후 원심분리를 이용하여 세균을 회수한 다음 멸균수로  $1 \times 10^8$  cfu/ml이 되게 재현탁하였다. 현탁한 PPL균주를 3주 동안 키운 고추 육묘에 토양 5ml씩 관주한 후 7일 후에 고추 역병 유주포자를 토양에 관주하여 처리하였고, 잿빛곰팡이는 7일 동안 PDA에서 키운 후 분생포자를 회수하여  $10^5$  spore/ml로 맞춘 후 경엽 살포하고 상온 상대습도 100%조건에 보관하면서 병 발생량을 비교하였다. Negative 대조구로서는 세균을 현탁한 멸균수를 토양관주하였고, positive control로는 식물병 저항성을 유도한다고 알려진 *Pseudomonas chlororaphis* O6균주를 토양관주하였다.

## 7) 대량 배양액의 작물 성장능력 검정

고온성 미생물들은 식물성장촉진 물질로 알려진 butanediol유전자를 가지고 있어 식물 성장촉진 능력을 검정하였다. 우선 생육배지별로 식물성장촉진 능력이 달라지는 지를 알아보기 위해 담배와 I plate를 이용하여 한 쪽 다양한 배지를 부어서 균주를 접종하고, 다른 한 쪽에는 담배 육묘를 옮겨 지하부와 지상부의 신성중을 측정하였다.

## 8) 고온성 균주와 식품오염균의 특이적인 마커 개발

본 연구에 의해 선별된 유용 미생물들의 빠른 동정 및 균주의 특이적인 마커를 개발하기 위해 먼저 각 균주 배양액을 boiling하여 genomic DNA를 추출한 다음, 16S rRNA universal primers(Forward 5' -AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' )와 reverse(5' -ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3' )를 이용하여 PCR를 통해 약 1.4 Kb PCR product를 증폭하고, 4 bp cutting 제한효소인 *MspI*, *HaeIII*, *HhaI*로 절단하여 2% agarose gel에 전기 영동하여 amplified ribosomal DNA restriction analysis(ARDRA)에 의한 genotype에 의해 분리된 각 균주들의 genotyping 마커로 이용하고자 하였다.

시제품에서 genomic DNA분리하여 식품 유해 미생물 검출여부를 조사하기 위해 식물유해 미생물의 특이 primer를 이용하여 조사하였다. 식품 유해 미생물의 특이적인 primer sequence는 기존에 보고된 primer를 이용하였다. *Staphylococcus aureus* 16S-Forward 5-GTG CAC ATC TTG ACG GTA CC-3, 16S reverse 5-CGA AGG GGA AGG CTC TAT C-3(565 bp); *Listeria monocytogenes hlyA*-F 5-CAA GTC CTA AGA CGC CAA TC-3, *hlyA*-R 5-ATA AAG TGT AGT GCC CCA GA-3(1,412 bp); *Escherichia coli* O157:H7 *eaeA*-F 5-AGG TCG TCG TGT CTG CTA-3, *eaeA*-R 5-CCG TGG TTG CTT GCG TTT G-3(225 bp); *Salmonella enteritidis invA*-F 5-TCC CTT TGC GAA TAA CAT CC-3, *invA*-R 5-ATT ACT TGT GCC GAA GAG CC-3(786 bp); *Shigella flexneri ipaH*-F 5-GGG AGA ACC AGT CCG TAA A-3, *ipaH*-R 5-CGC ATC TCT GAA ACA TCT TGA-3(1,088 bp).

## 9) 고온성 균주의 제형화

*Bacillus amyloliquefaciens*의 제형화를 위해 우선 최적 배양 조건을 확립하기 위해 최적 생육온도와 pH를 조사하였다. 균주를 액체배지에 접종한 다음, 15, 25, 35, 45도의 온도에서 배양하면서 내생포자의 수와 영양세포의 수를 측정하였다. 균주를 액체배지에 접종한 다

음, 다양한 pH로 배지를 조절한 다음 25도에서 생육시키면서 내생포자의 수와 영양세포의 수를 측정하였다.

곡성생물방제 센터의 대량 배양 시스템을 이용하였다. 우선 종균의 배양 조건으로는 표 5에 제시된 조건하에서 *P. elgii*종균을 배양하였으며, OC배지와 30도에서 배양하였다. 종균을 배양한 다음 500L fermentor에 본 배지에 1 - 2%가 되게 접종하였다. 배지의 조성은 비용이 싼 다양한 재료를 이용하여 배지를 조제하였다(표 6). 배양액을 수시로 채취하여 포자 형성율을 위상차 현미경으로 측정하면서 포자 형성율이 높을 때까지 배양하였다.

표 5. *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 종균 배양 조건

Culture condition		비 고
Temperature	30 ± 0.5°C	2차 접종시 접종량 (inoculum size) : 1~2%
Shaking speed	120 ~ 150 rpm	
1차 Culture time	12 시간	
2차 Culture time	12 시간	
Media	LBS 배지 이용	

표 6. *Bacillus amyloliquefaciens* Y1(500L)

원료명	함량(%)	비 고
포도당	0.6%	포자 형성 시까지 배양함
효모추출분말	0.8%	
염화나트륨	0.15%	
1인산칼륨	0.25%	
탄산칼슘 (경질 침강성)	0.05%	
황산마그네슘	0.01%	

### 가) 액상제(SM) 제형 제조

*Bacillus amyloliquefacien* PPL균주를 최적배지와 25도의 fermenter에서 150rpm조건하에서 3일간 배양한 다음, 저온안정성 확보를 위한 동결방지제 일부, 유효 성분의 층 분리 방지를 위해 증점제를 사용하였다. 증점제는 주로 Xanthan gum, KNP 등이 사용되었다. 이외에도 거품발생을 방지하기 위해 소포제 일부, 부패방지를 위한 방부제 일부 사용하여 조제하였다(표 7).

표 7. *Bacillus amyloliquefacien* 액상제 제형 조제 구성

Role	Composition	Input(%)	Form
원제	<i>B. amyloliquefaciens</i> 배양액	50%	
계면활성제	분산제	2.0	무색액상
보조제	보존제	2.0	연황색 분상
	부동제	5.0	무색액상
	증점제	0.2	황색분상
증량제	증량제	rest	무색 분상
Total		100	



## 나) WP 제형 제조

*Bacillus amyloliquefacien* 균주를 OC배지(glucose, 6g; yeast extract 8g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5g; NaCl, 1.5g, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.5g, MgSO<sub>4</sub>, 1g)배지에서 25도에서 2일 동안 배양한 다음, 1톤 fermenter에서 4일 동안 배양하였다. 배양액에서 필터링으로 살균한 lactose를 최종 20%가 되게 혼합한 다음 동결건조기를 이용하여 트랩온도 -80℃ 샘플온도 -40℃ 조건하에서 동결 건조하였다. 동결건조한 *Bacillus amyloliquefacien* 균주의 분말에 증량제로는 주로 광물(kaoline, 규조토)을 사용하며 kaolin은 가격이 저렴하고, 많이 사용되는 흡착제는 white carbon과 silicate를 사용하였고, 계면활성제를 첨가하여 WP제형을 조제하였다(표 8).

표 8. *Bacillus amyloliquefacien* PPL WP 제형 조제 구성

성분	함량(%)	조제(50g)
<i>B. amyloliquefaciens</i> 동결건조	20	10
습윤제	15	7.5
계면활성제	5	2.5
계면활성제	5	2.5
증량제	55	27.5



## 다) 제형화된 미생물제의 저장성 검정

SM제형과 WP제형의 저장성 유효 기간을 검정하기 위해 상온과 54도에서 보관하면서 생균수를 측정하였다.

## 10) 시제품의 고추 병해 방제 검정

본 연구에서 개발된 제형 자체가 고추 주요 병해에 대해 병해 방제 능력이 있는지를 고추 탄저병, 고추 세균성무늬병, 고추 *Cucumber mosaic virus*에 대해 병 방제 능력을 검정하였다. 또한 본 연구에서 분리한 균주가 특정기질을 이용한다는 것에 기초하여 SM제형을 100배가 되게 대량용량 배지에 접종하여 5일간 배양한 다음 배양액의 고추 병해 방제 능력을 검정하였다. SM제형과 WP제형은 100배와 250배로 희석하여 병원원균들을 고추 청양 유묘에 접종하기 1일 전에 경엽살포하였다. SM제형을 2세부과제에서 개발한 배지에 재접종한 다음 5일간 배양한 후 배양액을 5배로 희석하여 동일한 방법을 이용하여 고추 병에 대한 약효를 검정하였다.

최적 배양조건의 미생물제와 기 개발된 유기자재와의 혼용가부 시험을 통한 미생물의 영향과 항균활성 등을 *in vitro*에서 검정하고자 하였다. 먼저 균주를 25도, pH 7.0조건하에서 5일간 배양한 다음 세균을 회수하고 세포배양액은 filtering으로 배양여액을 추출하여 세균성반점병, 탄저병, 역병, 모잘록병, 시들음병균에 대한 항균활성을 측정하였다.

유기농자재로 등록된 무기물과 식물추출물의 고온성미생물의 균수와 효능을 분석하였다. 본 연구에 사용한 식물병해 방제용 유기농자재 사용 가능한 무기물의 종류와 희석농도(표 9)와 식물추출물(표 10)의 적정농도로 희석하여 고온성 미생물의 생균수와 항균활성을 측

정하였다. 무기물의 경우 모두 자가 조제하였고, 식물추출물은 시중에서 유기농자재 제품을 구입하여 사용하였다.

고온성 미생물의 배양배지에 다양한 농도의 황토유황과 아인산염을 0:10, 1:9, 5:5, 9:1, 10:0의 비율로 혼합하여 배양하면서 유기농자재의 희석비율별로 고온성균주의 생육에 미치는 영향, 고추 세균성점무늬병균에 대한 항 세균활성을 측정하였다.

고온성 미생물을 최적배지에서 5일간 배양한 다음, 유기농자재와 혼합하거나 유기농자재 단독 살포에 따른 고추 세균성점무늬병, 고추 탄저병, 고추 *cucumber mosaic virus*에 대한 방제 능력을 조사하였다(Kim et al., 2008; 2010; 2017a).

표 9. 식물병해 방제용 유기농자재 등록 무기물 종류와 희석농도

유효성분명	예방효과	치료효과
석회보르도액	100배	50배
석회유황합제	300배	100배
황토유황(pH8.5-9.0)	1000배	500배
난황유	0.3%	0.5%
아인산염	100ppm	500ppm

표 10. 식물병해충 방제용 유기농자재 등록 식물추출물과 희석농도

추출물	Ba LM11_TSB배지	처리
오배자추출물(500배)	10%	1. 풍시배양: 5일 배양 후 밀도, 항진균효과, pH 등 측정 2. 혼합살포: 살포농도 추출물 + 3일 배양 균주(10%) 혼합 후 밀도, 항진균효과 측정
고삼추출물(1000배)	10%	
넝추출물(1000배)	10%	

Plant Extract		
제품명	살포농도	유효성분
(주)비아지 바이미이신	500배	오배자(Gallnut) 추출물 30%+황벽피추출물 1%+에틸알콜 30%+기타 39%
(주)비아지 다이아	1000배	고삼(Sophora, 너삼씨앗) 추출물
(주)비아지 선초	1000배	넝(Neem) 추출물

### 11) 고온성 대량배양액을 이용한 잿빛곰팡이병 방제 검증

#### 가) 균주 및 배양 조건

고추에서 분리한 *Botrytis cinerea* 잿빛곰팡이병균은 potato dextrose agar(PDA, Difco, Detroit, MI)배지에서 25° C에서 생육하였다. PDA에서 10일간 배양한 배지에서 균총을 회수하여 멸균수로 현탁한 다음, cheese cloth로 균사를 제거한 다음 분생포자를 회수하였다.

분생포자의 농도는 heamacytometer를 이용하여  $10^4$  conidia/ml로 맞추어서 사용하였다. *P. elgii* HOA73 균주는 nutrient agar(NA, Difco, Ditroit, MI) 또는 nutrient broth(NA, Difco, Ditroit, MI) 배지를 이용하여 28도에서 배양하였다.

#### 나) 효소 및 chitin-oligomer 분석

HOA73균주의 균주 성장과 세포외 분비 효소를 분석하기 위해, NB배지에서 24시간동안 배양한 균주 100  $\mu$ l를 100 ml의 chitin-minimal(CM) broth medium[1.5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1.0g crude chitin /1 L 증류수] 배지에 접종한 다음 8도에서 180 rpm shaker에서 배양하였다. 균주 접종한 후 20일동안 매일 균주배양액(cell culture fluid, CCF) 10 ml를 이용하여 균의 밀도는 항생제 ampicillin, polymyxin B, vancomycin(50  $\mu$ g/ml)을 첨가한 NA배지에서 10배씩 희석하여 colony forming unit를 측정하였다.

균 배양액을 13,000rpm, 4도에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 0.2  $\mu$ m Minisart syringe filter를 통과시켜 균이 없는 배양상등액(CFS, cell-free supernatant)을 회수하여 -20도에 보관하고 효소활성 측정과 chitin oligomer 분석에 이용하였다. CFS에서의 단백질 정량은 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 bovine serum albumin을 standard로 측정하였다.

Chitinase 효소 활성은 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-N,N'-diacetylchitobioside [4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>]를 기질로 이용하여 측정하였다. 2.5  $\mu$ l의 CFS와 균을 접종하지 배지를 대조구로 97.5  $\mu$ l 0.5mM 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>와 혼합하여 96 well micro plate에서 37도에서 30분간 반응시켜 측정하였다. BioTek FLX-800(BioTek, USA)를 이용하여 excitation 360nm 과 emission 440nm에서 형광도를 측정하였다.

Protease 활성은 Pierce fluorescenet protease assay kit(Thermo Fisher Scientific Inc, USA)를 FTC-Casein 용액(10  $\mu$ g/ml)을 이용하여 측정하였다. 37도에서 30분간 반응시킨 용액을 Bio-Tek FLX-8000(BioTek, USA)를 이용하여 excitation 485nm과 emission 538nm에서 형광도를 측정하였다.

Lipase 활성은 Tween 20을 이용하여 turbidimetric assay 방법을 이용하였다. Siderophore 생성연구 여부는 CAS assay 방법을 이용하여 측정하였다.

Chitin-oligomer는 Thin-Layer Chromatography를 이용하였다. CFS와 5  $\mu$ g의 chitin-oligomers standardom mono- to hexa-saccharides(Qingdo BZ Oligo Biotech Co. Qingdo, China)들을 silicagel 60 F254 plate(Merck Co., Berlin, Germany)에 spotting하고 난 다음 1-butanol : methanol : 20% ammonium hydroxide:water(25:20:9:6, v/v)하에서 전개하였다. Chitin oligomer들은 TLC plate를 aniline/diphenylamine용액을 spray한 다음 130도 오븐에서 보관했다가 관찰하였다.

#### 다) 항균활성 검정

HOA균주를 배양한 다음, 균주 배양액, 무세균 배양상등액, 끓인 균주배양액, 세균현탁액 등으로 나누어서 잿빛곰팡이병균의 분생포자 발아 억제능력을 검정하다. 끓인 균주배양액은 균주 배양액을 끓은 물에 10분간 방치한 샘플이고, 세균현탁액은 균주배양액을 원심분리하고 회수된 세균은 멸균수로 약  $10^8$  cfu/ml이 되게 현탁하였다.

다양한 농도의 chitin과 chitin oligomer에 대해 잿빛곰팡이병균의 분생포자 발아억제능력을 검정하였다. 정제된 chitin oligomer는 dimer에서 hexamer까지 Qingdao BZ Oligo Biotech Co., Ltd(Qingdao, China)와 Seikagaku corporation(Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. 각 oligomer는 5 µg - 5 mg/ml까지 멸균수로 희석하여 사용하였다.

모든 chitin 용액 10 µl, 10 µl 분생포자액( $10^4$  conidia/ml)와 10µl PDB을 96 microplate에 넣고 25도에서 넣고 12시간 후에 분생포자 발아여부를 inverted microscope(Leica, Germany)에서 관찰하였다. 분생포자 발아율은 다음의 공식에 의하여 측정하였다; % Inhibition =  $100 \times (\text{대조구} - \text{처리구})/\text{대조구}$ .

#### 라) 온실 하에서 균주의 생존을 조사

균주 배양액( $10^8$ cfu/ml), 균주 현탁액( $10^8$ cfu/ml)과 멸균수를 토마토 포장에서 약액이 흐르도록 살포하였다. 2일 간격으로 서로 다른 5개의 식물체에서 5g의 잎을 회수하여 즉시 50 ml PB 완충액이 담긴 50 ml 멸균 falcon tube에 넣었다. 잎은 vortex를 이용해서 다시 현탁한 다음, 10배씩 멸균수로 희석한 다음 ampicillin, polymyxin B와 vancomycin(100 µg/ml)가 함유된 NA배지에 도말하였다. 콜로니는 28도에서 배양한 4일 후에 조사하여 log CFU/g of leaf으로 표시하였다. 본 연구는 3반복을 수행하였다.

#### 마) 온실 조건하에서 병 방제 효능 검정

전남 광양의 토마토 농장에서 수행하였다. 균주배양액은 fermenter(Heuksalim, Chungbuk, Korea)에서 준비하였다.; NB배지에서 24시간 배양한 500 ml HOA73균주를 500 L chitin minimal broth medium에 접종하여 28도에서 15일간 배양하였다. 대조 약제로는 화학농약 2000배 Fludioxonil(suspension concentrate, active ingredient 20%, Syngenta, Korea)를 대조구로 이용하였다. HOA73균주 배양액에서의 농도는  $10^8$ cfu/ml이었다. 2016년 2월 15일에 발병 초기에서 처음 살포하였고, 10일 간격으로 총 3회 살포하였다. 실험 포장은 45 m<sup>2</sup>/plot이었으며 각 처리구 당 5반복구로 complete randomized block으로 배치하였다. 최종 처리 후 10일이 지난 후 처리구 당 20개의 식물체로부터 발병 과일의 수를 조사하여 발병율을 측정하였다. 각 처리구의 방제가는 다음의 공식을 이용하여 측정하였다. 방제가 (%) =  $(\text{대조구의 발병율}(\%) - \text{처리구의 발병율}(\%))/\text{대조구의 발병율}(\%) \times 100$ .

균주 배양액과 Fludioxonil을 실제 포장에서의 감염된 줄기에 hand-pump sprayer로 처리한 다음 병 진전과 포자 형성율의 억제 능력을 비교하였다. 병반의 크기는 자를 이용하여 측정하였고, 2016년 3월 17일 처음 처리한 후부터 2일 간격으로 각 병반 1 cm<sup>2</sup>를 채취하였다. 채취한 샘플은 멸균수로 현탁하여 haemocytometer를 이용하여 측정하였다.

# 결 과

## 가. 기 분리된 고온성 균주의 최적 배양 조건 및 효능 분석

### 1. 고온성 미생물의 유용 형질 유전학적 및 생화학적 분석

#### 1) 공시 균주

본 연구에서 사용된 고온성 미생물은 기 분리된 균주들로서 positive control로서 *Bacillus subtilis* QST713 균주를 바스프에서 판매되고 있는 세레나데 맥스에서 분리하여 대조구로 이용하였다. 기존 연구에 의해 키틴분해 능력이 있고 다양한 식물병원균에 항균활성을 보이는 *Paenibacillus elgii* HOA71 균주를 이용하였다(Neung et al., 2014; Nguyen et al., 2013, 2015a, b). 장수풍뎅이 유충에서 cellulase와 다양한 식물병원성 곰팡이병균에 대해 항균활성이 높은 균주를 분리하여 동정하였다(Ha, 2013; Nam et al., 2016)). 전자현미경을 이용한 형태는 간균으로 주모균이었다. VITEK system을 이용한 생화학적 특성을 분석한 결과, *Bacillus amyloliquefaciens*와 90%상동성을 보였다. 특히적으로 PPL균주는 6.5% NaCl의 고염에서 생육이 가능하였고, polymixin B와 kanamycin항생제에 대해서 저항성을 보였다(그림 1). 또한 PPL 균주의 genomic DNA를 분리하여 16S rRNA를 증폭하여 sequencing을 통해 염기서열을 밝히고, *Bacillus*속의 type strain들의 16S rRNA와 phylogenic분석을 해 본 결과 *Bacillus amyloliquefaciens*균주로 동정되었다(그림 2).

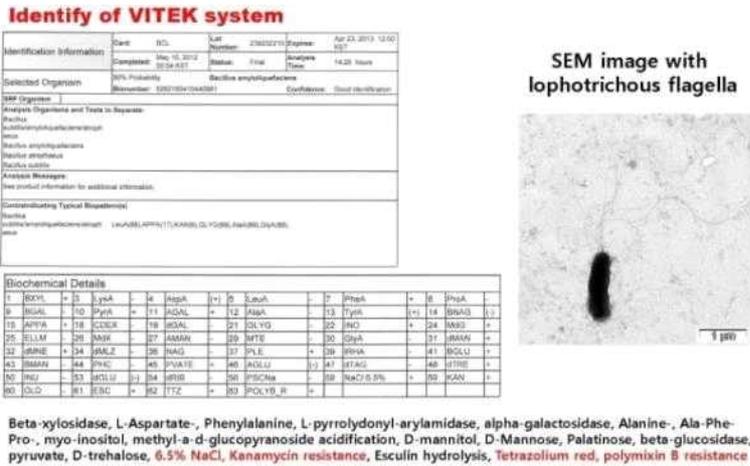


그림 1. 장수풍뎅이 유충 서식 PPL균주의 전자현미경 분석과 VITEK을 생화학적 분석

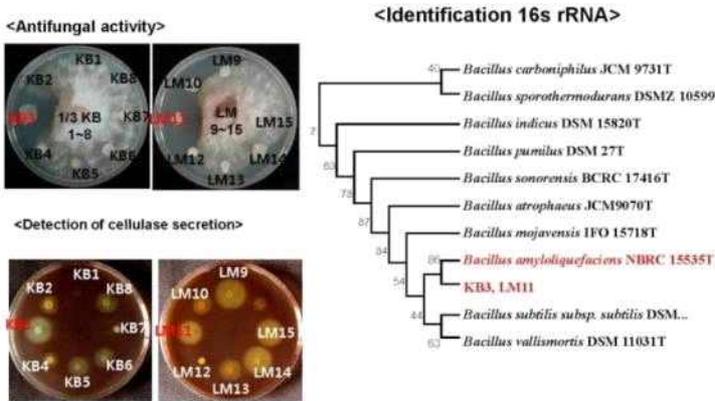


그림 2. PPL균주의 식물병원성곰팡이병균에 대한 항균활성, cellulase, 및 16S rRNA phylogenic 분석.

## 2) 균주의 유용형질의 유전적인 분석

PCR product를 전기영동하여 본 연구에서 제작한 primer sequences에 의해 증폭여부를 확인해 본 결과, 본 연구에서 사용한 4개의 균주는 항 곰팡이 활성이 뛰어난 biosurfactant인 surfactin과 iturin 생합성 유전자와 항세균활성이 있는 difficidin을 암호화한 유전자가 존재하였다(Ongena and Jacques, 2008; Ongena et al., 2007). 부가적으로 식물생장과 병 저항성을 유도하는 butanediol유전자도 존재함을 확인하였다. 생물적 방제균인 *Bacillus velezensis* 균주와 *Bacillus vallismortis*균주들도 본 연구에서 이용한 모든 유용형질 유전자들을 보유하고 있음을 확인하였다(그림 3). 하지만 살충활성을 가진 *B. thuringensis* 균주와 본 연구에서 사용된 *P. elgii* HOA71균주에서 본 연구에서 사용된 primer에 의해서는 모든 유용형질을 암호화하고 있는 유전자들이 증폭이 되지 않았다. 또한 식품 유해 미생물인 *B. cereus*균주와 유산균 *Lactobacillus*균주에서도 본 연구에서 사용된 primer들에 의해 유전자들이 증폭되지 않았다(그림 3).

본 연구에서 제작한 유용형질 증폭 primer들은 *B. subtilis*와 상동성이 높은 그룹의 *Bacillus*균주(*amyloliquefaciens*, *velezensis*, *vallismortis*)들의 검증에 특이적으로 활용이 가능하고, 다른 그룹의 *Bacillus*그룹과의 구분하기 위한 특이적인 primer로 활용이 가능할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 사용될 균주 중에 *P. elgii* HOA71균주를 제외한 2개의 균주는 *B. subtilis* QST713균주에서 보고된 모든 유용형질을 보유하고 있음을 확인하였다.

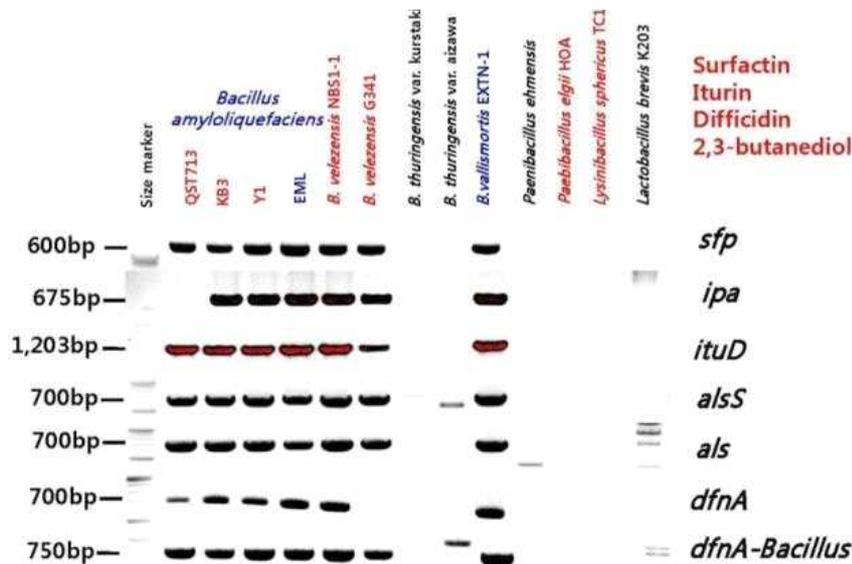


그림 3. 작물관련 *Bacillus*균주들의 surfactin, iturin, difficidin, butanediol유전자 보유 PCR 분석

## 3) PPL 균주의 항균활성 생화학적 분석

QST713균주, Y1, PPL균주의 배양여액을 떨어뜨린 oil drop은 biosurfactant가 존재하여 5분 이내에 collapse가 되어 이들 고온성 미생물들은 biosurfactant물질들이 배양여액에 생산됨을 확인하였다(그림 4).

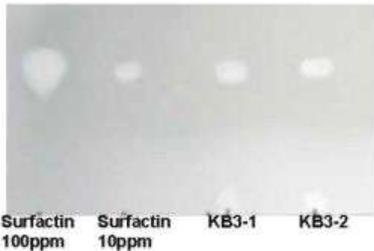
PPL균주의 배양여액에서 유기용매로 추출하여 HPLC와 TLC를 이용하여 standard 물질로서 surfactin과 iturin의 생산량과 여부를 분석하였다. TLC분석 결과 surfactin이 주 항균물

질로 관찰되었고, 약 10ppm의 양이 배양여액에 존재함을 확인하였다(그림 4). 또한 유기용매로 부분 정제한 샘플의 HPLC profile과 standard surfactin (25.2, 26.3, 28과 29.1분)과 iturin (4.1, 4.9와 6.5분대)의 profile은 동일한 시간대에 피크가 확인되어 PPL균주의 배양여액에서 surfactin과 iturin이 주 항균 biosurfactant로 확인하였다. 피크의 면적을 이용하여 정량해 본 결과 iturind은 약 1,064 $\mu$ g/ml, surfactin은 약 3,779 $\mu$ g/ml 이었다(그림 5).

### Drop collapse assay(Biosurfactant detection assay)



### TLC



1. Control(water)
2. *Lysobacter antibioticus* HS124  
(no biosurfactant producer)
3. *Pseudomonas* sp. NJ134  
(no biosurfactant producer)
4. *Bacillus amyloliquefaciens* KB3
5. *Bacillus amyloliquefaciens* LM11
6. *Bacillus subtilis* QST-713

그림 4. 생물적 방제균 배양여액의 drop collapse assay와 TLC 분석

### HPLC-Surfactin, iturinA

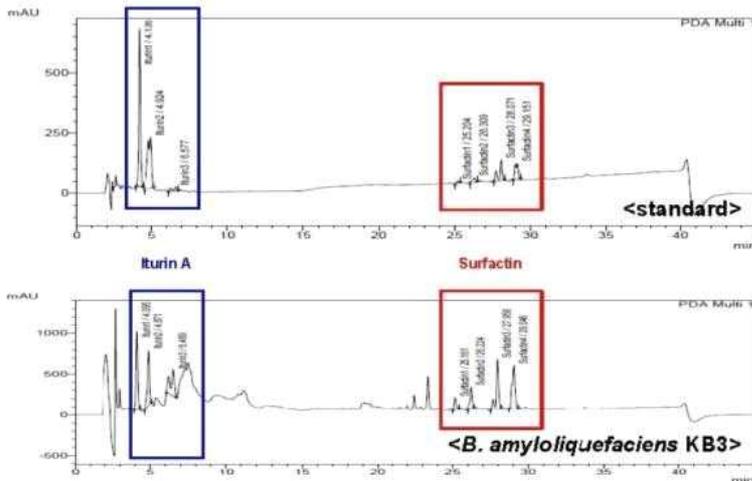


그림 5. PPL균주의 배양 유기용매 추출물질의 HPLC분석. Standard biosurfactant로 surfactin과 iturin를 이용하여 정량하였음

## 2. 배양 배지별 항균활성 생균수와 활성 상관분석

### 1) PPL균주의 배양여액의 항균활성 검정

PPL 배양여액 첨가 농도가 높아질수록 항균활성 능력도 증가하는 정의 상관관계가 있음을 확인하였고, 특히 50%배양여액을 첨가한 PDA에서는 80%이상의 곰팡이 균사

생육억제 능력이 보였다(그림 6).

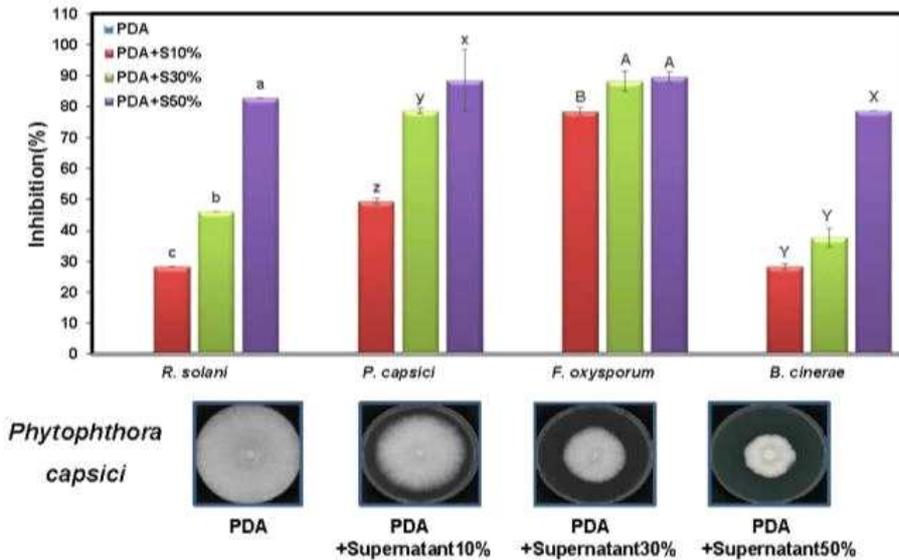


그림 6. PPL균주의 세균 free배양여액의 농도별 식물병원성곰팡이병균의 생육억제 능력

### 2) PPL균주의 배양 배지별 항균활성 검정

항균활성은 저 영양분 함유 배지인 1/3 KB와 M9배지에서는 항균활성이 낮은 반면에, 고영양 배지인 LB, OC, TF배지에서 배양한 여액은 모든 병원균의 생육억제 능력이 유의성이 있게 높았다. 그 중에서 TF배지는 가장 우수한 항균활성을 보였다. 저영양배지에서의 항균활성이 낮은 이유는 아마도 PPL균주의 생육이 낮은 이유 때문일 것으로 사료된다. 1/3 KB에서의 생균수는 약  $10^7$ cfu/ml이었고, M9배지에서  $3 \times 10^5$  cfu/ml로 낮았지만, 고영양배지에서는  $10^8$ cfu/ml의 생균수가 검출되었다(그림 7).

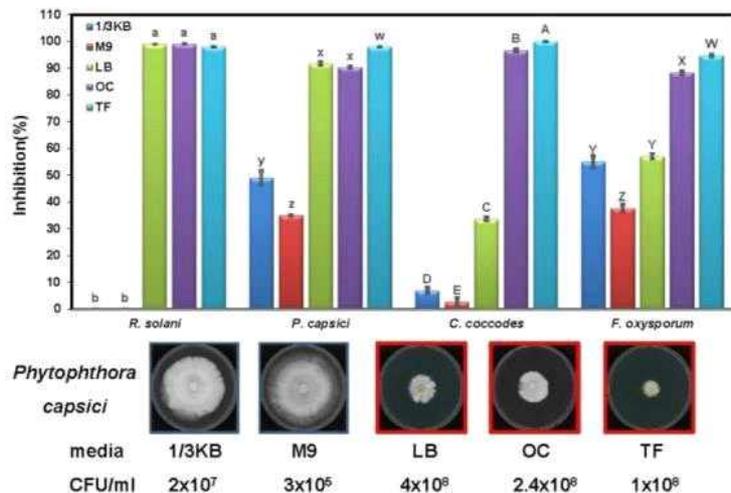


그림 7. 배양배지별 PPL균주의 항균활성과 생균수 검정

### 3) 고온성 미생물의 배지별, 배양시간별 항균활성과 surface tension 및 생균수 측정

각 균주마다 약간의 차이는 관찰되었지만, *P. capsici*와 *C. coccodes*의 경우 10일정도 배양한 배양여액이 100% 항균활성이 10%나 30%배양여액을 첨가한 PDA배지에서

확인되었고, 사용한 OC배지와 CM배지에서는 큰 차이는 보이지 않았다. 공시한 4가지 균주는 특히 *Botrytis cinerea* 균주에 대해 뚜렷한 항균활성을 보였고, OC배지에서는 3종의 *Bacillus* 균주가 배양 후 3일 이후부터 항균활성이 100%에 도달하였지만 HOA균주의 경우는 CM배지에서 항균활성이 OC배지에서 생육한 배양여액보다 높았다(그림 8). 이러한 항균활성은 배양여액의 surface tension의 수치(그림 9)와 상관관계가 있었다. 배양여액의 surface tension은 배양기간이 길어질수록 증가하였고, OC배지에서는 배양 후 5-10일 후에 biosurfactant활성이 확인되었지만, HOA균주의 경우는 surface tension값이 높아 biosurfactant이외 다른 항균물질이 관여할 것으로 추정되었다(그림 9).

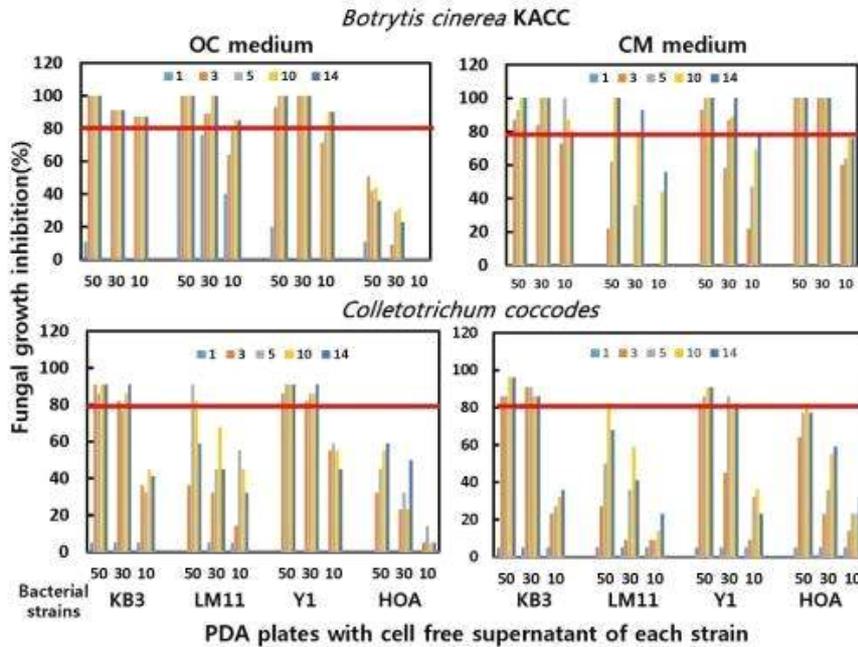


그림 8. 고온성 미생물의 OC배지와 CM배지에서 배양 기간별 항균활성 검증

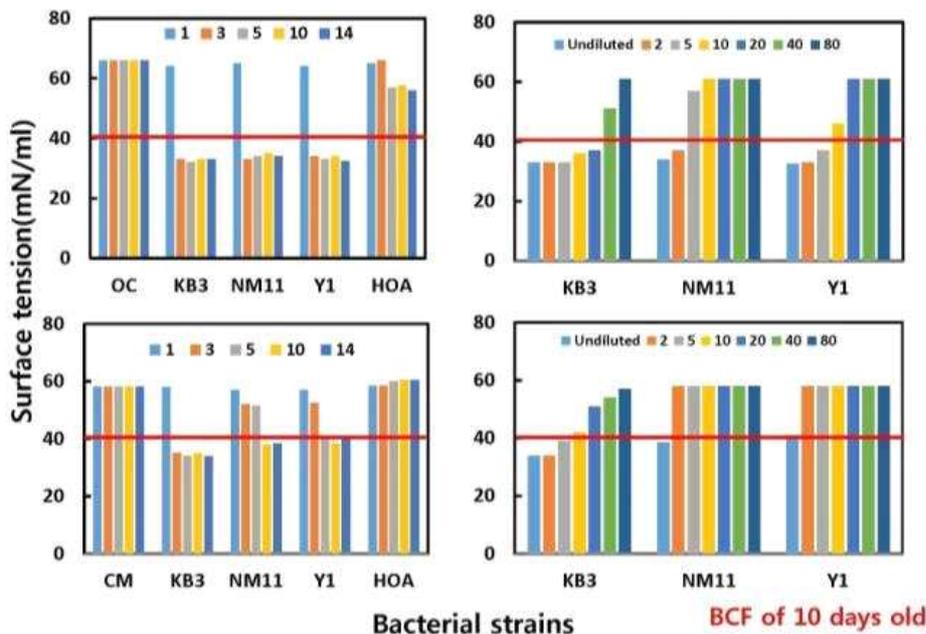


그림 9. 고온성 미생물의 OC배지와 CM배지에서 배양 기간별 surface tension

#### 4) 고온성 미생물의 최적 배양배지 및 배양 기간 결정

배양여액의 50%를 첨가한 배지에서는 항균활성에 큰 차이를 보이지 않을 정도로 항균활성이 뚜렷하여, 항균활성의 차이를 보이는 10% 배양여액을 첨가한 배지에서의 항균활성만을 결과로 나타내었다. 또한 사용한 식물병원곰팡이별로 항균활성을 측정하여 가장 효능이 좋은 배지와 배양 방법을 확립하고자 하였다. 또한 항균활성과 고온성 미생물의 생육과의 연관관계를 알아보기 위해서 생균수를 측정하였다. 추가로 2세부과제에서 선발하고 사용하는 Chitin배지도 추가로 활용하여 배지별 효능을 분석하였다(그림 10).

*Bacillus* 균주들은 전체적으로 TF배지와 OC배지에서 *C. coccodes*, *R. solani*, *F. oxysporum* 및 *B. cinerea*에 대해 항균활성이 높았으며, 설탕 유박 당밀 배지는 균주의 생육은 높은 편이었지만, 배양여액의 항균활성이 높지 않았다. 키틴분해미생물인 HOA71균주도 TF배지와 OC배지에서 항균활성을 나타내었지만, 영양분이 많은 모든 공시배지보다는 키틴을 함유하고 있는 chitin 기반 배지에서 항균활성이 높았다(그림 10). 이는 HOA균주를 이용할 때는 키틴기반 배지를 활용하는 것이 다른 고영양배지를 활용하는 것보다는 효율적일 것으로 사료된다.

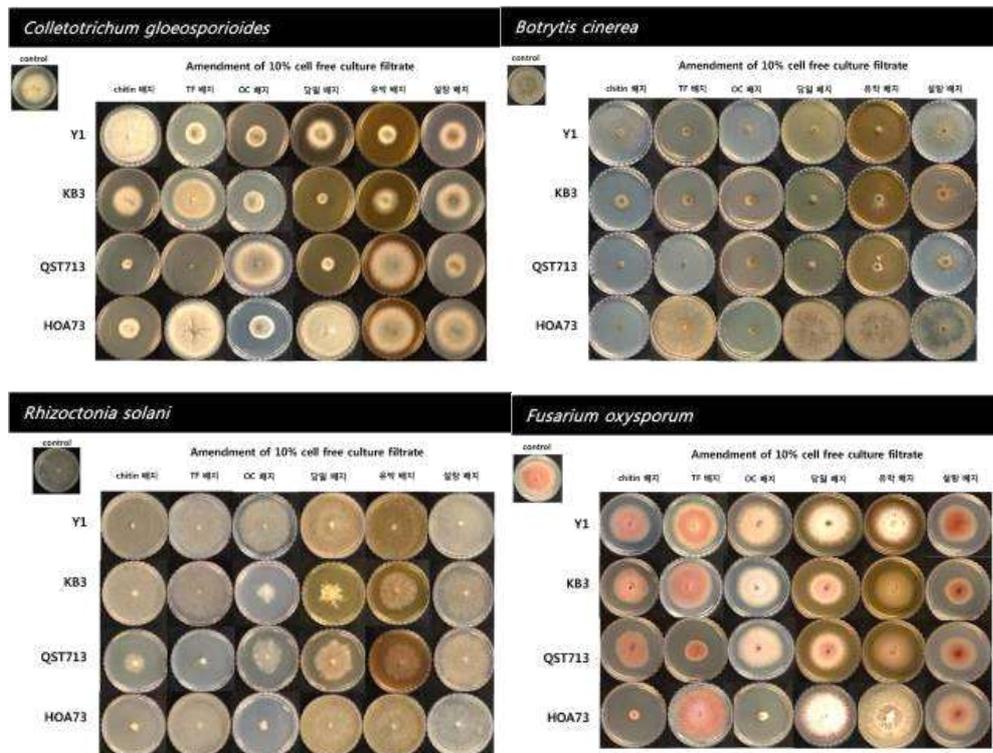


그림 10. 고온성 미생물들(Y1, PPL, QST713, HOA)의 배양 배지별 배양여액의 항균활성 비교

이러한 배양배지별 고온성 균주들의 항균활성이 배지별로 생육량과 차이나 나는지를 생균수를 측정하였다. Y1균주와 PPL균주에서는 배양 배지에 따라 생균수의 차이가 관찰되지 않았지만, QST713균주의 경우는 유박이나 설탕 배지에서 생균수가 적게 검출되었고, 유박배지에서는 가장 높은 생균수를 나타냈다(그림 11).

QST713균주가 TF, OC, 유박배지에서 항균활성이 높게 나타난 결과와 일치하는 경향이 있었다(그림 10과 그림 12). 키틴분해 미생물인 HOA균주의 경우는 OC배지와 chitin기반 배지를

제외한 모든 공시된 배지에서 생육량이 현저히 낮았다(그림 11과 그림 13). HOA균주의 배양 여액의 항균활성이 chitin기반 배지에서 가장 높은 그림 10의 결과가 HOA균주가 키틴 기반 배지에서 잘 생육하여 항균활성이 높다는 것을 추정할 수 있었다. HOA균주가 OC배지에서 생육이 잘되었는데, 이 배지의 배양여액도 항균활성이 높은 결과와 일치하였다. 흥미롭게도 다른 *Bacillus*고온성 균주들 모두 chitin기반 배지에서 잘 생육하여 차후의 연구는 chitin배지에서 모든 균주들을 생육시켜 이들 배지를 활용하였다. 가장 큰 이유는 chitin기반 배지 (1협동)의 경제성을 분석한 결과 다른 배지보다 단가도 낮고, 다양한 고온성 *Bacillus*균주와 키틴 분해 미생물을 생육시킬 수 있는 최적 배지 조건임을 본 연구에서 밝혔다.

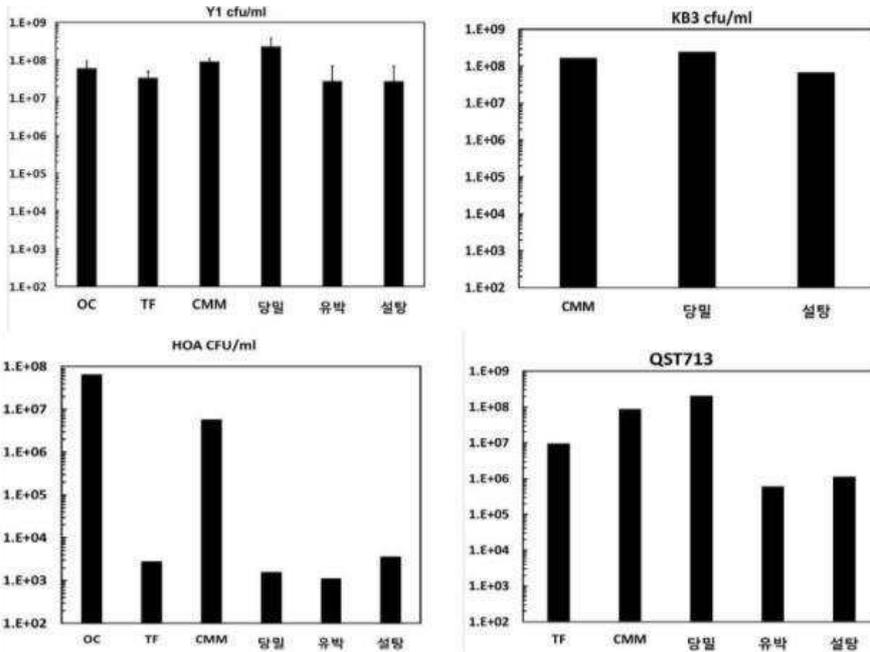


그림 11. 고온성 미생물들(Y1, PPL, QST713, HOA)의 배양 배지별 생장을

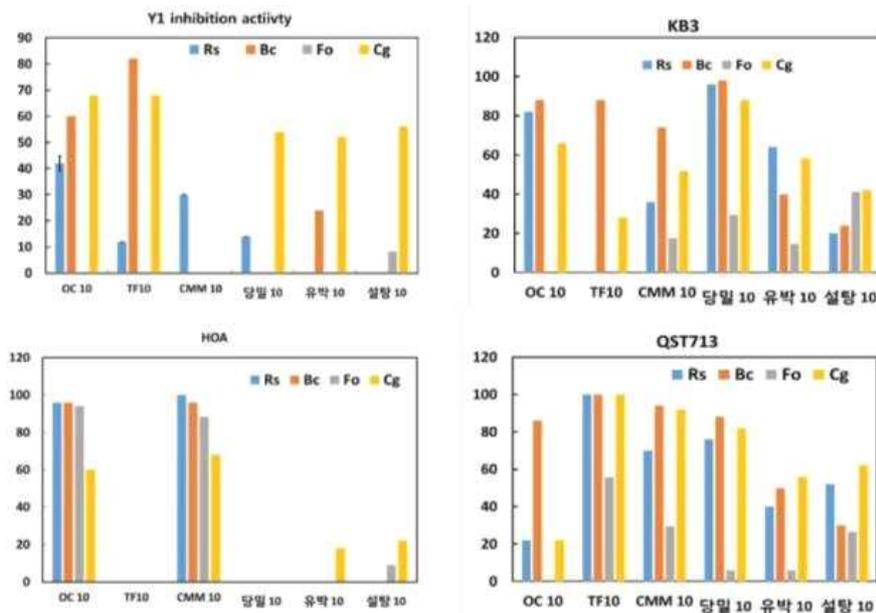


그림 12. 고온성 미생물들(Y1, PPL, QST713, HOA)의 배양 배지별 항균활성

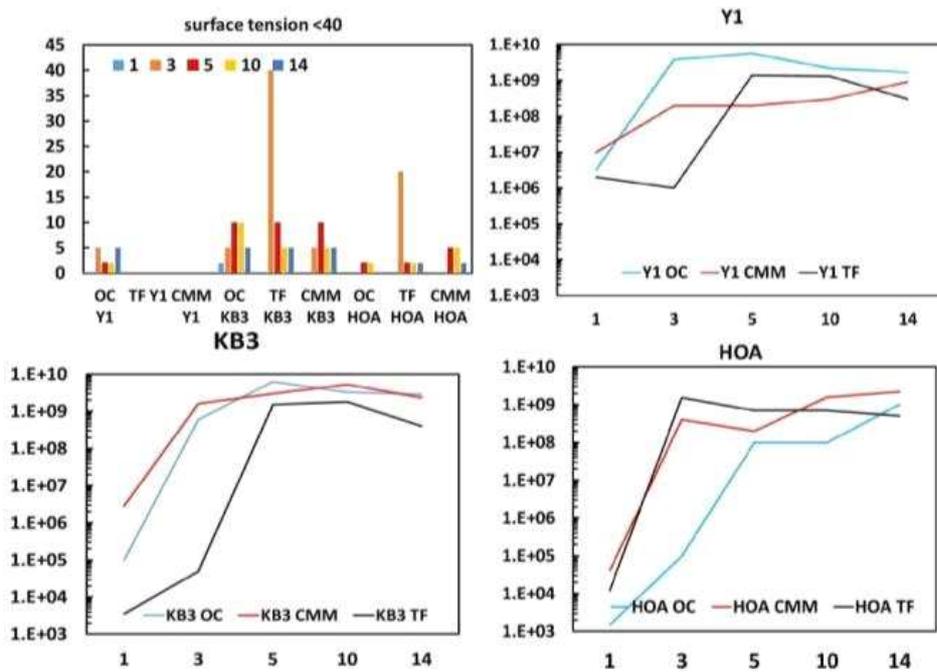


그림 13. 고온성 미생물들의 배양 배지별 배양기간별 생균수와 surface tension.

#### 5) PPL균주의 식물병원세균에 대한 항균활성 검증

대부분의 식물병원세균에는 뚜렷한 항세균활성을 보이지 않았지만, 특이하게 *Xanthomonas*속 병원균인 *X. oryzae*와 *X. euvesicatoria*에 대해 강한 항균활성을 나타냈고, 특히 TF배양 여액에서 가장 큰 항세균활성을 나타냈다(그림 14).

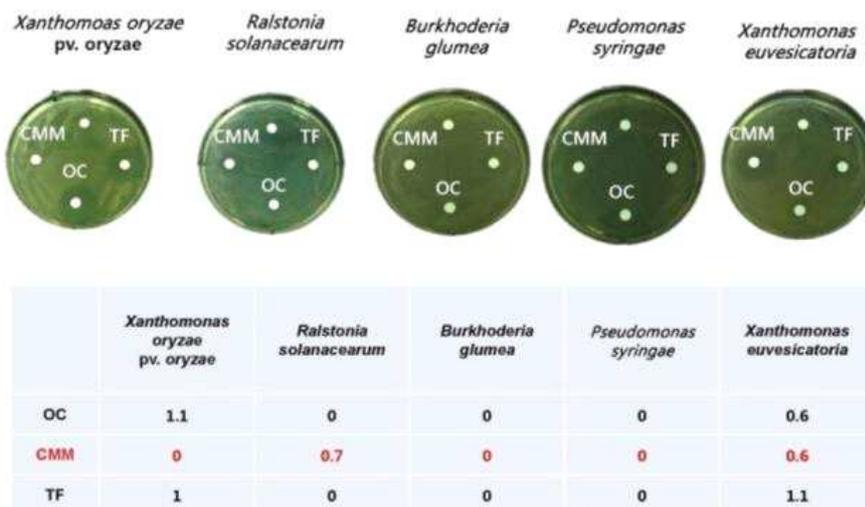


그림 14. 고온성 미생물 PPL의 배양 배지별 항세균활성

○ 상기의 결과는 SCI 저널인 Plant Pathology Journal에 2016년도에 발표하였다.

1. Nam, H. S., Yang, H. J., Oh, B. J., Anderson, A. J. and Kim, Y. C. 2016. Biological control potential of *Bacillus amyloliquefaciens* PPL isolated from the feces of *Allomyrina dichotoma* larvae. Plant Pathology Journal. 32(3), 273-280. 국내, SCI저널 (IF 1.255).

### 3. *P. elgii* HOA균주 세포의 항균활성 효소와 항균활성 측정

#### 1) HOA균주의 배양여액내에서의 주요 단백질 동정 및 활성 측정

키틴을 첨가한 배지에서 키운 *P. elgii*의 상등액에는 18-28 protein spot들이 발현된 반면, chitin을 첨가하지 않은 배지에서는 60개 이상의 단백질이 chitin을 첨가한 배지에서 키운 배양액보다 더 많이 발현되었다(그림 15).

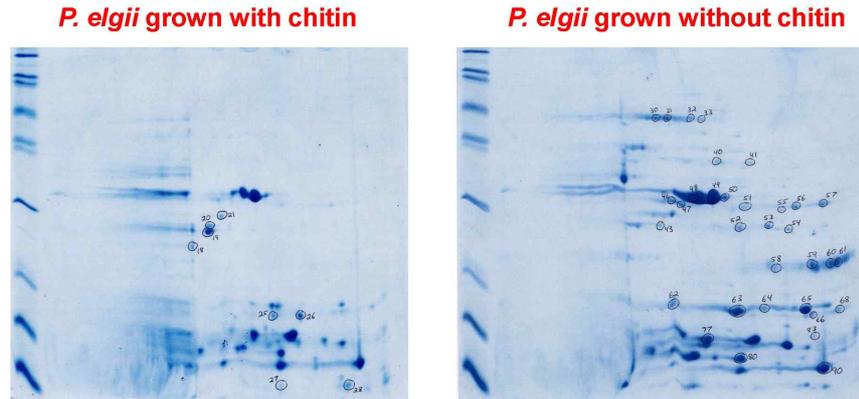


그림 15. *Paenibacillus elgii* 키틴 유무 생육 배지에서 two-dimensional PAGE에 의한 extracellular proteomic 분석

Chitin을 첨가한 배지에서 발현되는 18개의 단백질 spot들을 분리하여 각 spot의 동정을 위해 MALDI-TOF MS분석에 의해 각 extracellular protein spot을 분석하여 동정하였다(표 11). 대부분의 spot spot들은 bacillolysin으로 동정이 되었고, 일부 단백질은 subtilisin-like serine protease로 동정이 되었다(표 11). 이러한 결과는 chitin첨가에 의해 neutral protease인 bacillolysin생성이 증가됨을 알 수 있었다.

표 11. *Paenibacillus elgii* 생육 시 배지에 chitin존재할 때 증가하는 extracellular proteins

Spot #	Protein ID	MOWSE or Protein Score	Peptides Matched/Sequences	% Cov.	pI E/T	Mr E/T	MS-Fit NCBI nr: Acc.#
18	Bacillolysin ( <i>Paenibacillus elgii</i> B69)	186	6/5	8	5.90/6.12	25,000/56,197	gi 357012635
19	Bacillolysin ( <i>Paenibacillus elgii</i> B69)	196	5/4	7	5.90/6.12	30,000/56,197	gi 357012635
20	Bacillolysin ( <i>Paenibacillus elgii</i> B69)	119	2/2	4	6.20/6.12	30,000/56,197	gi 357012635
21	Flagellin domain- containing protein ( <i>Paenibacillus elgii</i> B69)	132	6/3	12	6.50/6.32	31,000/28,970	gi 357013201
25	Bacillolysin ( <i>Paenibacillus elgii</i> B69)	130	4/3	5	7.40/6.12	20,000/56,197	gi 357012635
26	Bacillolysin ( <i>Paenibacillus elgii</i> B69)	220	6/4	7	8.10/6.12	20,000/56,197	gi 357012635
27	Subtilisin-like serine protease ( <i>Paenibacillus elgii</i> B69)	122	4/3	1	7.80/5.36	8,000/191,540	gi 357008170
28a	Bacillolysin ( <i>Paenibacillus elgii</i> B69)	102	1/1	4	9.00/6.12	8,000/56,197	gi 357012635
28b	Subtilisin-like serine protease ( <i>Paenibacillus elgii</i> B69)	98	2/2	1	9.00/5.36	8,000/191,540	gi 357008170



Subfamily A	Length	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	Insert	Id (%)					
ChiA1(M57601)	699	45	KIVGYVPSWA	HINVAFADI	KTLLS	EGNTW	DSDLDNEY	LLTASGA	DWINIMTYD	KLVLS	VPFYGR (88)	GAMTEVLSG 438 69				
ChiC (P94289)	491	47	KIIAMVAGWA	HINYSALD	KVLLS	EGNGA	DSDLDNEY	LLTASGA	DWINIMTYD	KLVLS	VPFYGR (78)	GIMFVEYSND 365 39				
ChiA(GI:729133)	563	159	VVGSYFVEWG	HLLYGEIPI	KILPS	EGMTL	DSDLDNEY	ELTSAISA	DHIFLMSYD	KVVV	STAMYGR (88)	GLFSVEIDA 544 33				
ChiB(GI:116336)	499	6	AVIGYVFPT	HINFSLEDE	RIMFS	EGMY	DSDLDNEY	QLTASAG	DYINIMTYD	KIVM	VPFYGR (103)	GVMFHLGD 408 31				
PeChi (this study)	675	271	KIVTYPAWA	HINVAFADI	KTLLS	EGNSW	DSDLDNEY	LLTASGA	DWINIMTYD	KLVLS	VPYCK (88)	GAMTEVTD 660 -				
Subfamily B																
Chi36(AF275724)	360	35	LIVGWNFN	VINVS	EGT	KVLS	EGQNG	DSDLDNE	L	LLSM	PET TYIHVQHN	QVM	SLPAPA (42)	GLMS	SINWD 338 19	
Chi01(Q05638.1)	597	305	ALVGYLHAF	VIDLAGEP	KVLS	EGQNG	DSDLDNE	EG	VLTMAPET	LLHVQDN	QVAL	MPATTN (37)	ALMT	SINWD 581 18		
ChiC(Q9WXD3)	480	26	IIMGFWHNA	WVAVAKG	AVLIS	EGADA	DSDLDNE	D	IISM	PEP DRIAPQHN	KFVLS	PSNND (28)	GLMT	SINWD 305 20		
ChiD(P27050)	524	191	WLGWVNFN	VINVS	EGP	KVLS	EGANG	N	SD	EG	VLTMAPET	LLHVQHN	QIAL	SVASQQ (41)	GIMT	SINWD 496 17

그림 18. *Paenibacillus elgii*의 PeChi의 catalytic domain와 GH18\_chitinase와 아미노산 서열

## 2) HOA균주의 배양여액내에서의 extracellular chitinase 특성 규명

Chitin이 첨가되지 않은 LB배지에서도 chitinase가 검출되었지만, Chitin을 첨가한 배지에서는 훨씬 더 높은 chitinase활성을 보였다(그림 19). 재조합된 PeChiA1의 정제하기 위해 배지에 IPTG를 첨가하여 induction한 다음, affinity column을 이용하여 다양한 buffer를 이용하여 정제하였다. 약 70kDa의 단일 PeChiA1단백질이 2mg을 정제하여 추가 연구에 사용하였다(그림 20).

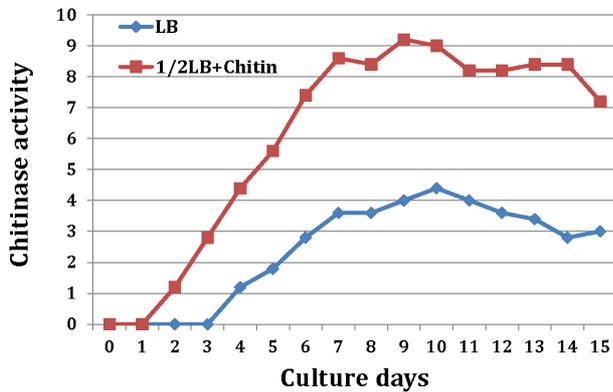


그림 19. PeChi 유전자 재조합 대장균의 chitin 함유 유무에 따른 chitinase활성

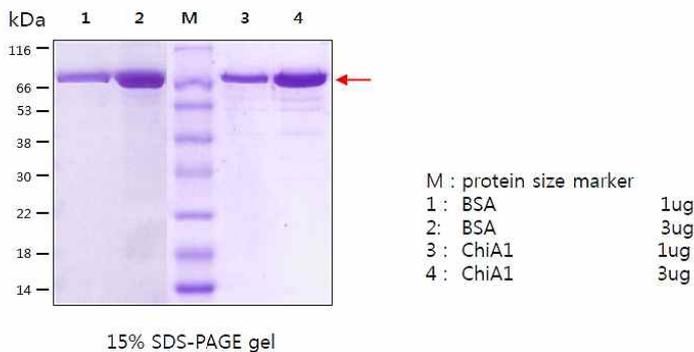


그림 20. PeChiA1의 대장균에서 분리 정제

*P. elgii* 세포배양여액에서 분리 정제한 단백질과 재조합 대장균에서 정제한 chitinase를 SDS-PAGE에서 전기영동하여 비교 분석하여 본 결과 동일 크기의 단일밴드의 chitinase가 관찰되었다(그림 21). 정제된 chitinase는 다양한 기질을 이용하여 활성을 검정해 본 결과 2당을 절단하는 exo-chitinase임을 추정할 수 있었다(그림 21와 표 12).

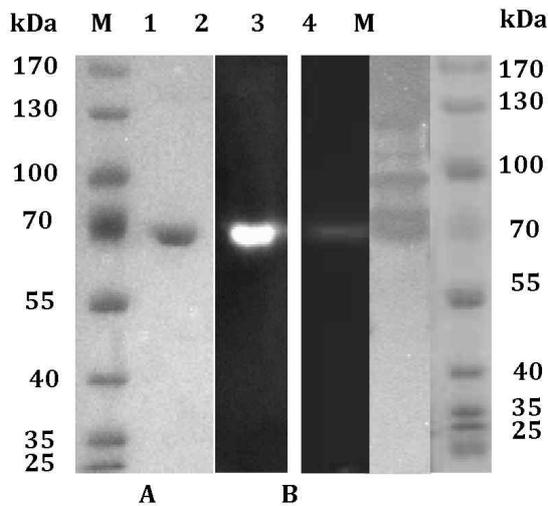


그림 21. PeChiA1의 대장균에서 분리 정제. M, molecular markers; 1, 재조합 대장균 정제 PeChi의 silver stained proteins; 2, 3, chitinolytic band 4-MU-(GlcNAc) 재조합 대장균 정제 및 *P. elgii* 정제 단백질; 4; chitinolytic bands with glycol chitin.

표 12. 대장균 재조합 PeChi단백질의 기질 특이적 chitinase활성 검정

Substrate	Specific activity (uM/ug) b/	Relative activity (%)
4-MU-(GlcNAc) (G-M)	0	0
4-MU-(GlcNAc) <sub>2</sub> (G-G-M)	12.4 ± 0.58	100.0
4-MU-(GlcNAc) <sub>3</sub> (G-G-G-M)	0.9 ± 0.33	7.3
4-MU-(GlcNAc) <sub>4</sub> (G-G-G-G-M)	7.5 ± 0.26	60.5

a/ The chitinase activity of mixtures containing 1ug of purified chitinase and 25uM of each substrate in pH 7 buffer was determined after incubation at 37C for 60min.

b/ Values represent the micromoles of liberated 4-methylumbelliferone per 1ug of purified chitinase for 1 minute at 37C

재조합 대장균에서 정제한 chitinase는 50°C 에서 활성을 유지하였지만, 60°C 에서는 활성을 잃었다(그림 22). 흥미롭게도 상온보다는 40-50°C 의 고온에서 chitinase활성이 높았다(그림 22). PeChi효소 활성은 pH7에서 가장 높은 활성을 보였으며, 알칼리 조건하에서는 활성이 현저히 감소하여 알칼리 조건에서 약한 활성을 나타내었다(그림 22). 하지만 pH 5와 6인 약산성에서는 비교적 높은 활성을 유지하였다. 이러한 결과는 배양배지의 pH변화가 extracellular chitinase의 활성에 중요한 영향을 미칠 것으로 사료되며 차후 배양배지의 선발이나 배양 후 pH변화가 적은 배양조건을 확립하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

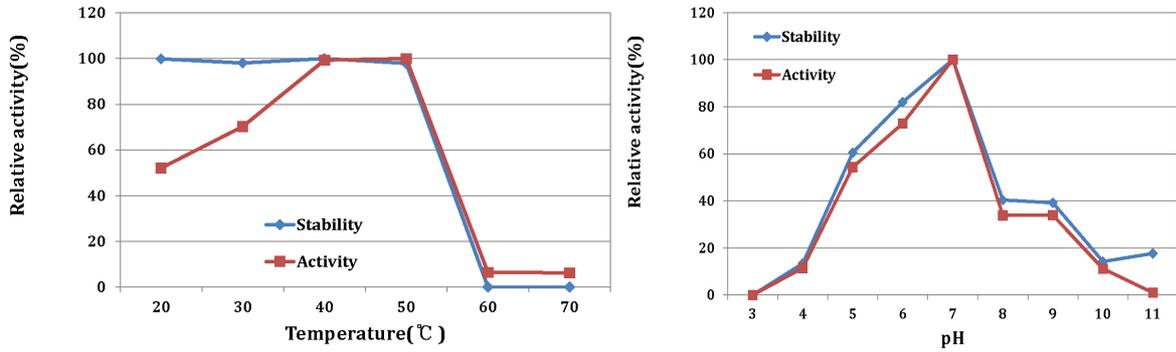


그림 22. PeChiA1의 온도별 pH별 효소 활성

재조합 대장균에서 정제한 chitinase는 다양한 화학물질의 chitinase활성에 미치는 영향을 조사해 본 결과 일부 HgCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub>물질의 첨가는 불활성화시켰으면 CoCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>등도 큰 영향을 미쳤다. 하지만, 전착제로 활용이 가능한 Tween이나 Triton등은 큰 영향을 없애 차후 전착제를 이용할 때는 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다(표 13). 정제된 chitinase의 항균활성을 알아보기 위해 *Botrytis cinerea*포자현탁액과 혼합하여 포자 발아능력을 검정해 본 결과, 0.1mg/ml이하의 농도에서는 포자 발아억제 능력을 보이지 않았다(그림 23).

표 13. 정제된 재조합 PeChi에 대한 다양한 화학물질 첨가의 영향

Chemical reagent	Concentration (mM)	Specific activity (uM/ug) b/	Relative activity (%)
None	0	11.8 ± 0.62	100.0
FeSO <sub>4</sub>	5	12.3 ± 0.53	104.2
ZnSO <sub>4</sub>	5	7.6 ± 0.58	64.4
CuSO <sub>4</sub>	5	3.5 ± 0.58	29.7
CaCl <sub>2</sub>	5	9.7 ± 1.38	82.2
MgSO <sub>4</sub>	5	11.2 ± 0.65	94.9
MnSO <sub>4</sub>	5	10.6 ± 0.87	89.8
CoCl <sub>2</sub>	5	0.3 ± 0.07	2.5
CoSO <sub>4</sub>	5	5.1 ± 0.53	43.2
HgCl <sub>2</sub>	5	0	0
AgNO <sub>3</sub>	5	0	0
KCl	5	11.4 ± 0.76	96.6
LiCl	5	11.6 ± 0.48	98.3
2-Me	5	11.3 ± 1.07	95.8
EDTA	5	10.0 ± 0.61	84.7
SDS	5	5.1 ± 0.71	43.2
Tween 20	5	10.8 ± 1.09	91.5
Tween 80	5	10.5 ± 0.94	89.0
Triton X-100	5	10.3 ± 0.68	87.3



그림 23. PeChiA1의 잿빛곰팡이병균 포자발아 억제. 1, 0.5mg/ml; 2, 0.1mg/ml; 3, 대조구

○ 상기의 결과는 SCI 저널인 Plant Pathology Journal에 2017년도에 발표하였다.

2. Kim, Y. H., Park, S. K., Hur, J. Y. and Kim, Y. C. 2017. Purification and characterization of a major extracellular chitinase from a biocontrol bacterium, *Paenibacillus elgii* HOA73. Plant Pathology Journal. 33(3), 318-328. 국내 SCI저널

### 3) HOA균주의 배양여액내에서의 bacillolysin 특성 규명

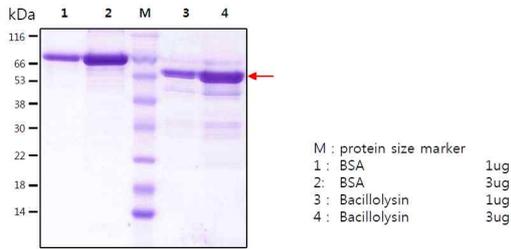


그림 26. *Paenibacillus elgii* HOA균주의 extracellular bacillolysin의 대장균에서 분리 정제

분리정제된 bacillolysin(그림 26)과 chitinase의 항균활성을 알아보기 위해 다양한 농도의 분리 정제된 단백질을 식물병원곰팡이병원 *B. cinerea*와 *C. gloeosporoides*의 포자 발아능력을 비교하였다. 두 병원균 중에서 특히 *B. cinerea*가 낮은 농도의 두 효소에 대해서 감수성이 높았지만, *C. gloeosporoides*의 경우는 고 농도의 효소에 의해서도 정상적으로 발아하였다(표 14). Chitinase와 bacillolysin을 비교하였을 경우, chitinase보다는 bacillolysin가 병원균의 포자 발아에 낮은 농도에서도 억제 능력이 높았다. Bacillolysin의 10µg/ml의 농도에서도 *B. cinerea*의 포자 발아능력이 현저히 감소한 반면, chitinase의 경우는 100µg/ml의 농도 이상에서만 *B. cinerea*의 포자 발아능력이 감소하였다. 두 효소를 혼합하였을 경우에는 synergic효과는 전혀 보이지 않아, bacillolysin이 포자의 발아억제능력에 역할을 하는 것으로 추정된다.

Bacillolysin과 chitinase의 살선충활성을 알아보기 위해 다양한 농도의 분리 정제된 단백질을 고구마뿌리선충에 대한 살선충 효능을 비교하였다(Ha et al., 2014). Chitinase와 bacillolysin을 비교하였을 경우, chitinase보다는 bacillolysin가 뿌리혹선충의 살선충에 낮은 농도에서도 높았다. Bacillolysin의 25µg/ml의 농도에서도 살선충능력이 높았지만, chitinase의 경우는 500µg/ml의 농도 이상에서만 살선충능력을 보였다(표 15). 두 효소를 혼합하였을 경우에는 synergic효과는 전혀 보이지 않아, bacillolysin이 세포외로 생성되어 포자의 발아억제능력과 살선충에 중요한 하는 것으로 추정된다.

표 14. 정제한 chitinase와 bacillolysin의 포자 발아능력 검정

Protein	Concentration (µg/ml)	<i>B. cinerea</i>	<i>C. gloeosporiois</i>
Chitinase	500	-	+++
	100	+	+++
	50	+++	+++
Bacillolycin	100	-	-
	50	-	+
	10	+	+++
	5	+++	+++
Chiti+Bacil	50+50	-	-
	25+25	+	++
	5+ 5	+++	+++

- - ; conidia do not permanently germinate
- + ; conidia germinate but germ tubes are inhibited.
- ++ ; germ tubes are less inhibited than those of (+)
- +++ ; conidial germination and length of germ tubes are similar to those of non-treatment(control)

표 15. 정제된 chitinase와 bacillolysin의 뿌리혹선충 살선충 효능

Treatment	Concentrations (µg/ml)	Mortality(%) of juveniles upon incubation days						
		1	2	3	4	5	6	7
Bacillolycin	500	100						
	100	100						
	50	50	50	65	75	75	90	90
	25	46	46	57	69	69	83	87
	10	0	0	20	20	20	20	20
Chitinase	500	29	43	43	87	100		
Bacillolycin+ Chitinase	50+500	43	57	78	95	100		
Control	0	0	0	0	13	13	25	25

나. 미생물의 주요 작물병해와 고추 병해 방제 효능 검증

1. 주요 고추 병해에 대한 실내 및 온실 검정

처리구에서 PPL 배양균주 상등액은 QST713균주와 비슷한 토마토 잿빛 곰팡이병에 대해서는 약간 병 방제능력이 약했지만, 모든 식물병에 대해서 넓은 방제효과를 보였다. HOA 균주이 상등액은 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병, 밀 녹병, 고추 탄저병 등에 대해 대조구로 이용한 *B. subtilis* QST713균주와 비슷한 정도의 병 방제 능력을 보였다(표 16).

표 16. 고온성 미생물 배양액의 식물병 방제 효능 분석

Treatment	Dilution	Control value (%)						
		Rice sheath blight	Rice blast	Tomato gray mold	Tomato leaf blight	Wheat leaf rust	Barley powdery mildew	Pepper anthracnose
Serenade™	500 fold	69	15	33	58	83	42	8
<i>B. subtilis</i> Q713	3 fold	91	84	75	86	100	93	88
<i>P. ehimensis</i>	3 fold	8	48	75	84	67	58	84
<i>P. elgii</i>	3 fold	17	31	75	95	67	58	84
<i>B. amy</i> KB3	3 fold	94	89	65	71	87	58	88

식물병원 곰팡이 억제 능력이 높았던 HOA균주를 chitin기반 배지에서 키운 후 배양액 희석배수별로 식물병 방제 효능을 분석하였다. 대조구로서는 QST713균주를 고영양배지인 nutrient broth 배지에 배양한 다음 동일 희석배수로 처리하여 병 방제 능력을 분석하였다. 두 균주 모두 배양 원액을 살포한 처리구에서는 높은 식물병 방제효과가 보였지만, 10배로 희석한 살포액을 처리한 식물체에서는 식물병에 대한 방제효과가 현저히 감소하였다(표 17). 100배 이상으로 살포한 처리구에서는 식물병 방제 효능이 상실되었다. 이러한 결과는 차후 고온성 미생물 배양액을 이용하는 포장 검정에서 정확한 희석배수가 식물병 방제능력과 밀접한 관계가 있을 것으로 사료된다.

표 17. 고온성 미생물의 배양액 희석배수에 따른 식물병 방제 효능 분석

Treatment	Dilution	Control value (%)						
		Rice sheath blight	Rice blast	Tomato gray mold	Tomato leaf blight	Wheat leaf rust	Barley powdery mildew	Pepper anthracnose
Serenade™	500 fold	69	15	33	58	83	42	8
<i>B. subtilis</i> QST713	undiluted	19	70	100	100	100	86	85
<i>B. subtilis</i> QST713	10 fold	31	40	38	38	87	22	65
<i>B. subtilis</i> QST713	100 fold	13	7	10	10	51	0	8
<i>B. subtilis</i> QST713	200 fold	13	3	0	5	24	0	0
<i>B. subtilis</i> QST713	500 fold	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paenibacillus elgii</i>	undiluted	31	83	95	100	76	6	92
<i>P. elgii</i>	10 fold	13	17	29	94	40	0	69
<i>P. elgii</i>	100 fold	13	7	0	5	9	0	0
<i>P. elgii</i>	200 fold	0	7	0	5	0	0	0
<i>P. elgii</i>	500 fold	0	0	0	0	0	0	0

*B. subtilis* grown in NB ( $5.8 \times 10^8$  cfu/ml), *P. elgii* grown in CMM;  $6 \times 10^7$  cfu/ml)

## 2. PPL균주의 병 저항성 유도 능력 검정

역병처리구에서는 O6균주를 처리한 고추 유묘는 약 60%의 방제가를 보였고, PPL처리구는 약 40 - 50%의 방제가를 보였다(그림 18). 잿빛곰팡이 처리구에서는 O6균주를 토양관주한 처리구는 발병지수가 1정도로 낮았고, PPL관주한 고추는 2.5정도의 발병지수를 보인 반면, 대조구는 약 3.5이상의 발병지수를 보여 식물병 저항성 유도 능력도 있음을 확인하였다(그림 18).

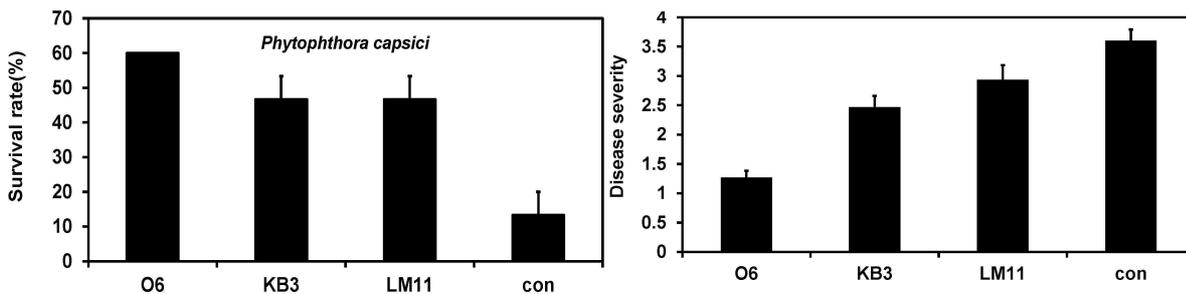


그림 18. PPL 토양 관주에 의한 고추 역병과 잿빛곰팡이병에 대한 유도 저항성 능력 검정

## 3. PPL균주의 식물생장촉진 능력 검정

고영양배지인 NB와 TF배지에서 생육한 PPL는 대조구에 비해 현저히 생육억제 능력을 보였고, 1/3KB와 OC배지에 접종된 PPL균주는 대조구에 비해 3배 이상의 식물생장촉진 능력을 보였다(그림 19).

배양된 PPL균주를 희수하여 멸균수로 재현탁하여 농도별로 오이 유묘에 관주하여 유묘 성장촉진 효능을 검정하여본 결과, 고농도 OD600 1.0균주를 관주한 오이의 생장이 가장 좋았으며, 다른 농도의 처리구도 대조구에 비해 식물생장촉진능력을 보였다(그림 19). 이러한 결과는 이들 고온성 미생물이 토양에 관주되었을 때 식물의 성장을 촉진을 유도한다는 것을 증명한 결과이다.

배양된 PPL균주를 cell free 배양여액, 세균현탁액, biosurfactant로 분리하여 어떤 분획이 식물생장촉진에 관여하는 지를 검정하였다. 고추 유묘에 3가지 분획을 토양에 관주한 다음 1달 이후에 고추의 생장을 검정한 결과, 세균 자체보다는 cell free배양여액이 고추의 생장에 중요한 인자로 작용함을 밝혔다(그림 20). 또한 PPL 생성하는 biosurfactant들은 항균활성이외에 식물생장촉진에는 큰 영향을 미치지 않았다.

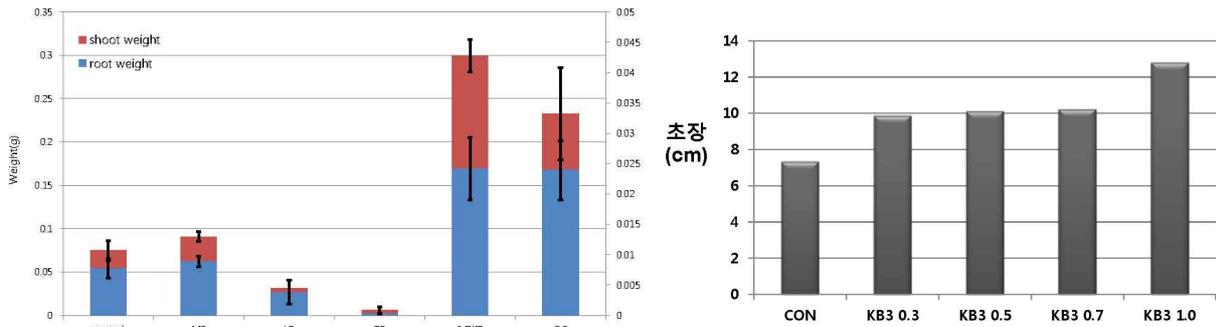


그림 19. PPL의 배양 배지와 토양 관주에 따른 식물생장촉진 능력

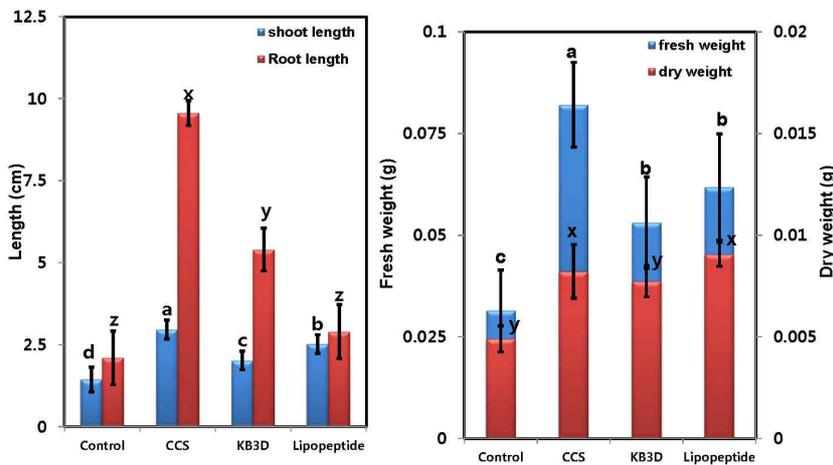


그림 20. PPL의 세균(PPLD), cell-free배양여액, lipopeptide의 토양관주에 따른 고추 성장촉진 효능

## 다. 선발된 균주들의 genotyping 및 database화

### 1. 선발된 미생물들의 genotyping

본 연구에 사용된 생물적 방제균 *Bacillus* 균주들은 모두 동일한 패턴의 ARDRA패턴을 보였지만, *Paenibacillus*균주는 기존에 보고된 다양한 생물적 *Bacillus* 균주 (*B. subtilis*와 *B. amyloliquefaciens*)와 유해 *Bacillus*균주인 *B. cereus*균주와도 다른 밴드 패턴을 보였다(그림 21). 생물적 방제 *Bacillus*균주들은 동일한 패턴을 보였지만, 살충 *B. thuringensis*나 식품유해 미생물 *B. cereus*와는 다른 패턴을 보였다.

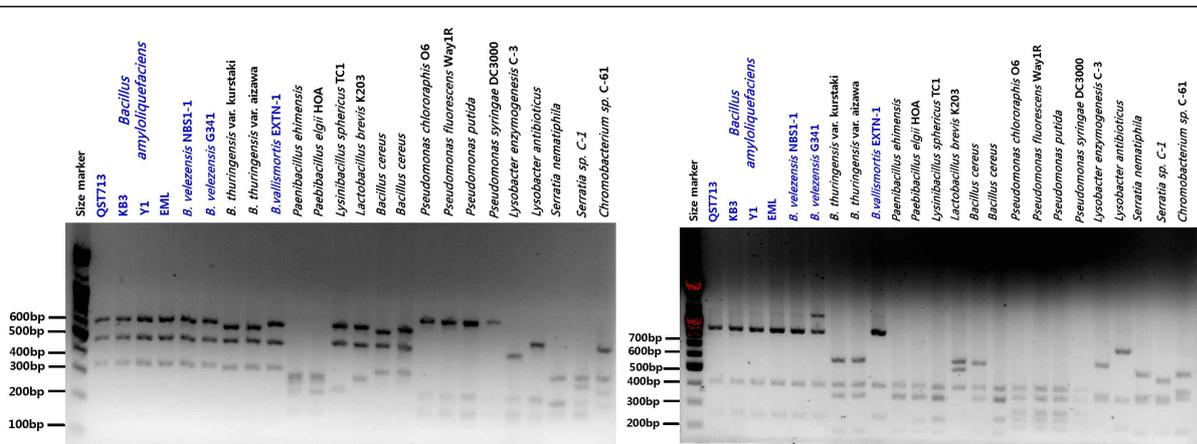


그림 21. 균주들의 ARDRA분석 (*MspI* 패턴과 *HphI* 패턴)

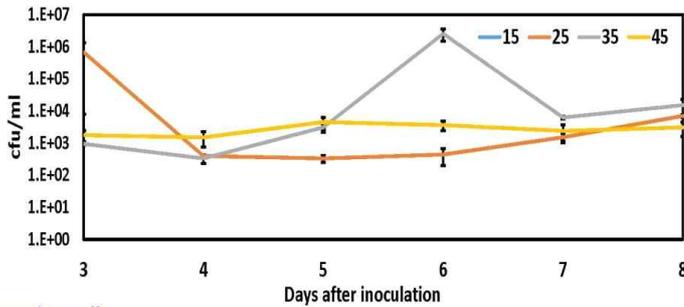
## 라. 고온성 미생물의 제형화 및 방제 효능 검증

### 1. 고온성 미생물제의 최적배양 조건 확립

#### 1) 균주의 최적 배양 온도 및 pH 확립

15도를 제외하고 25-45도의 온도에서 배양하였을 때 영양세포의 수가  $10^8$  이상을 유지한 반면, 접종 후 3일 후에 25도에서 배양한 균은  $10^6$  이상의 내생포자를 형성하였고, 35도에서는 6일 후에  $10^6$  이상이 형성되었다(그림 22).

#### Endospore



#### Vegetative cell

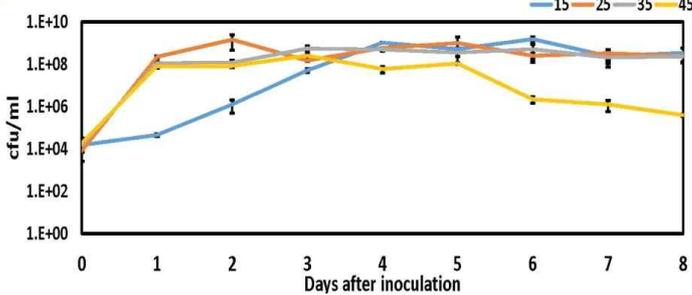
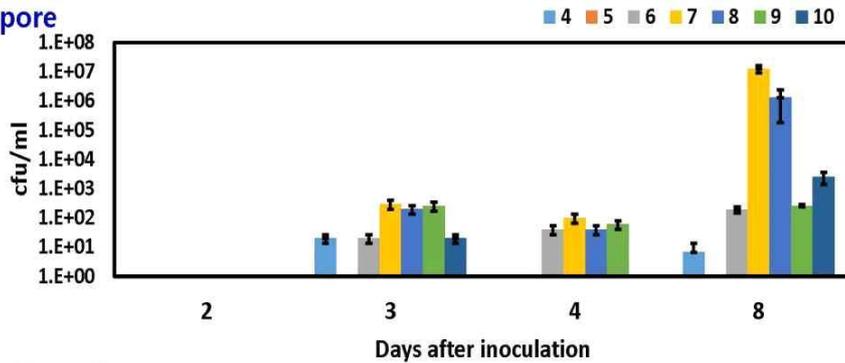


그림 22. *Bacillus amyloliquefaciens*의 생육온도별 영양세포와 내생포자 형성

### Endospore



### Vegetative cell

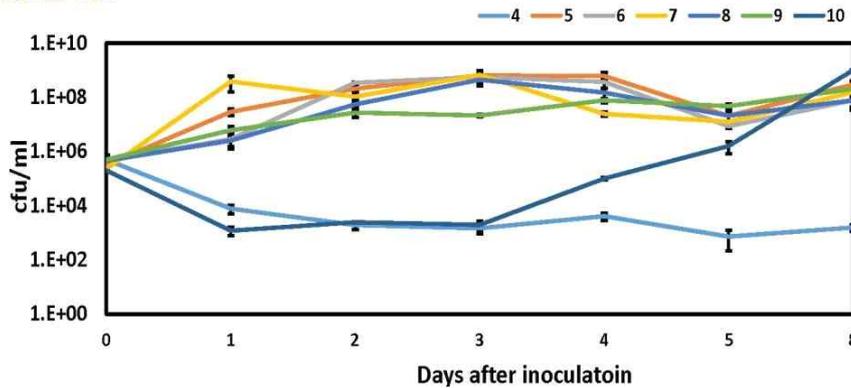


그림 23. *Bacillus amyloliquefaciens*의 생육배지의 pH별 영양세포와 내생포자 형성

pH5-9에서 균주를 배양하였을 때 영양세포의 수가  $10^8$  이상을 유지한 반면, pH 7과 8에서만 접종 후 8일 후에  $10^6$  이상의 내생포자를 형성하였다(그림 23). 이러한 결과는 *B. amyloliquefaciens* 균주는 pH 7 - 8의 범위에서 온도 25도에서 배양했을 때 가장 생육량이 높았지만, 45도와 pH 5나 9이 범위에서도 생육하여 선택적으로 배양할 때 이러한 극한 온도와 pH를 활용할 수 있을 것이다.

## 2. 대량 배양조건하에서의 유해 오염 미생물 검정

시제품에는 전혀 PCR 밴드들이 보이지 않아 식품유해 미생물이 존재하지 않음을 확인하였다. 이들 primer 들은 농가에서 고온성 미생물의 대량배양에서도 이들 병원성 미생물의 유무를 검정하는데 사용되었다.

## 3. 고온성 미생물의 대량배양 및 시제품 제작

### 1) *Bacillus amyloliquefaciens* Y1의 제형화

미생물 제제는 대상 병해의 특성, 재배 기간 동안의 강수량, 기온, 습도, 재배 규모 등 다양한 재배 환경에 따라 적용 방법을 다르게 해야 할 필요가 있다. 이에 따라 미생물 제제의 제형도 액상수화제 (Suspension Concentrate), 수화제 (Wettable Powder), 과립수화제 (Water Dispersible Granule), 입제 (Granule) 등 다양한 형태로 제작되어 진다. 본 연구 과제에서는 미생물 제제의 산업화를 위해 경제성 및 안정성을 우선으로 하여 미생물의 균수가 장기간 보관이

가능하고 오염이 되지 않은 형태의 수화제(WP, 분상으로서 물에 희석하였을 때 수화되는 제형)를 조제하여 대량 배양하는 종균의 안정적인 공급에 초점을 맞추었다.

본 배양 조건도 온도는 1톤 발효조에서 30도, DO값을 보면서 rpm과 vvm을 표 14에 제시된 범위에 맞게 조정하였고, LS소포제를 3배로 희석되게 첨가하였고, 배양액의 pH도 6.0이상이 되게 셋팅하여 포자가 형성될 때까지 배양하였다(표 18).

다량의 포자가 형성이 된 것을 위상차 현미경으로 확인한 후, 배양액을 tubular 원심분리기에서 15,000 rpm에서 세포를 회수한 다음, 건조 부형제로 20% lactose를 첨가하여 20°C ~ 20°C 온도로 점차 조절하여 80시간동안 동결건조하였다. 동결 건조된 균주는 cut grinder로 분쇄하여 최종 시제품을 조제하였다(표 19).

총 시제품은 2 kg을 확보하였으며, 유효균수는  $1.9 \times 10^{10}$  cfu/g 시제품였다. 제형화된 시제품을 1협동과제에서 안정성과 경시변화에 따른 생균수를 측정하였다. 이들 시제품은 1협동과제에서 약효, 유효미생물 동정, 약효 시험, 독성 검사의 시제품으로 활용하였다.

표 18. *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 본 배양 조건

Culture condition		비 고
Temperature	30 ± 0.5°C	접종 시 접종량 (inoculum size) : 1~2 %
Agitation speed	80 ~ 120 rpm DO	
Aeration rate	0.5 ~ 0.6 vvm DO	
Inner pressure	0.4 kg/cm2	
소포제	LS 소포제 3배 희석 사용	
pH 조절	배양 중 pH 6.0 이상 유지 조절할 것	

표 19. *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 제형화 조건

Process		Condition
Cell separation	Tubular centrifugation	15,000 rpm, 1,000ml/min
Drying	Freeze dryer	-20°C ~ 20°C, 건조 부형제 Lactose 20%, 80시간
Pulverization	Cut grinder	실험실 고정 Rpm 사용

## 2) *Bacillus amyloliquefacien* PPL의 제형화

*Bacillus amyloliquefacien* PPL균주를 최적온도와 pH조건하에서 배양한 배양액을 제형화하기 위해 액상제 1종 (Suspension Microbial, SM)과 분상제 1종 (Watable Powder, WP)로 제형화하였다.

조제한 SP와 WP제형의 생균수는  $2 \sim 8 \times 10^8$  cfu/g과 ml의 농도였다. SM제형은 54도에서 6주를 보관하였을 때도  $10^8$  cfu/ml이상의 고농도가 유지되었으나, WP제형은 6주 후에  $10^6$  cfu/g의 농도를 유지하였다(표 20). 이러한 결과는 제형화된 시제품이 3년 이상의 장기간 보관하에서도 SM제형의 경우는  $10^8$  cfu/ml의 고농도를 유지하였으며, WP제형도 유기농자재 등록 기준이상의 고농도를 2년까지는 유지될 것이다.

표 20. *Bacillus amyloliquefacien* WP와 SM 제형 제품의 온도별 장기간 보관에 따른 생균수

제형별 저장온도	Colony forming units/g or ml			
	0	2주	4주	6주
SM제형 25°C	8.0×10 <sup>8</sup>	8.0×10 <sup>8</sup>	4.0×10 <sup>8</sup>	3.0×10 <sup>8</sup>
SM제형 54°C	3.0×10 <sup>8</sup>	3.0×10 <sup>8</sup>	2.0×10 <sup>8</sup>	2.0×10 <sup>8</sup>
WP제형 25°C	2.0×10 <sup>8</sup>	7.0×10 <sup>7</sup>	7.0×10 <sup>7</sup>	7.0×10 <sup>7</sup>
WP제형 54°C	2.0×10 <sup>8</sup>	6.0×10 <sup>7</sup>	5.0×10 <sup>7</sup>	7.0×10 <sup>6</sup>

### 3) *Bacillus amyloliquefacien*의 제형화 제품과 대량배양 후 미생물의 약효평가 시험

#### 가) 고추 탄저병 병해 방제

액상제와 수화제 모두 탄저병에 대해 대조구에 비해 탄저병에 대해 약 40%의 방제가를 100배와 250배 희석 살포액에 대해서 보였다. 제형화된 제품은 균주를 배양하여 살포한 것은 대조구와 비슷한 탄저병 발생량을 보였다. 하지만 균주를 본 연구에서 선발한 최적 배지 (Coy-LM)에서 생육한 배양액을 살포한 경우는 액상제와 수화제와 비슷한 병 방제 능력을 보였다(그림 24).

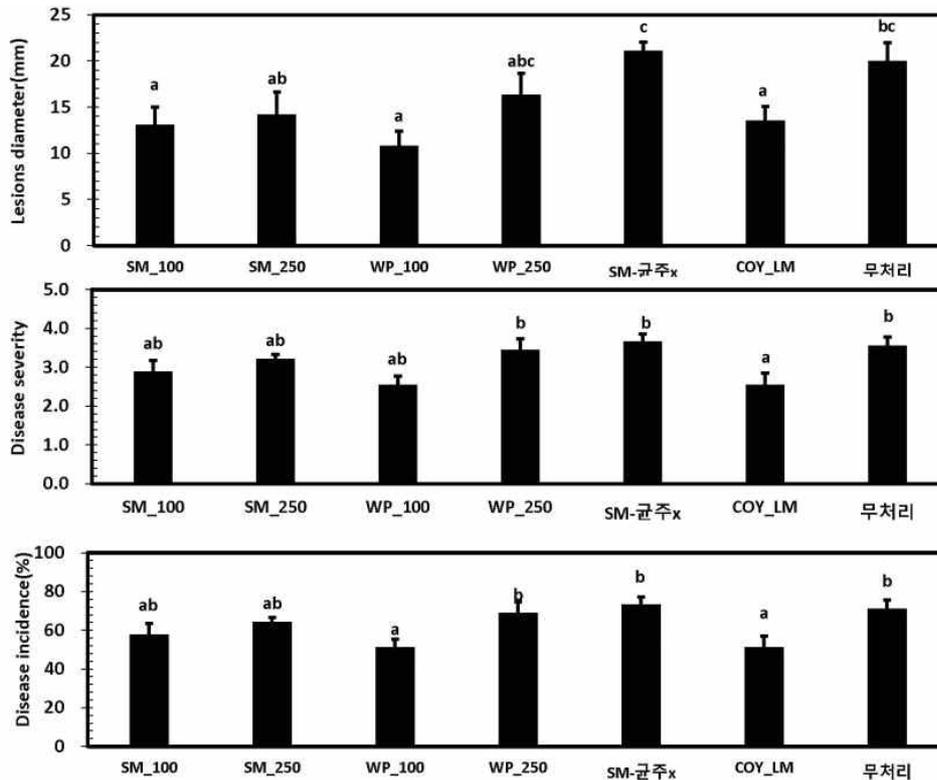


그림 24. SM제형과 WP제형의 고추 탄저병 방제 약효

나) 고추 세균성반점병 방제 능력 검정

액상제 250배 희석액 살포하였을 때 무처리에 비해 고추 세균성반점병에 대한 효과가 뛰어났다. 하지만 수화제 250배 살포와 TSB에서 배양한 균주의 10배 살포액은 물처리 대조구와 유의성이 없어 방제능력이 떨어졌다. 하지만 본 연구에서 개발한 최적배지인 난황배지에서 배양한 균주는 액상제 250배 처리구와 비슷한 수준의 고추 세균성반점병에 대해 현저한 병 방제 능력을 보였다(그림 25).

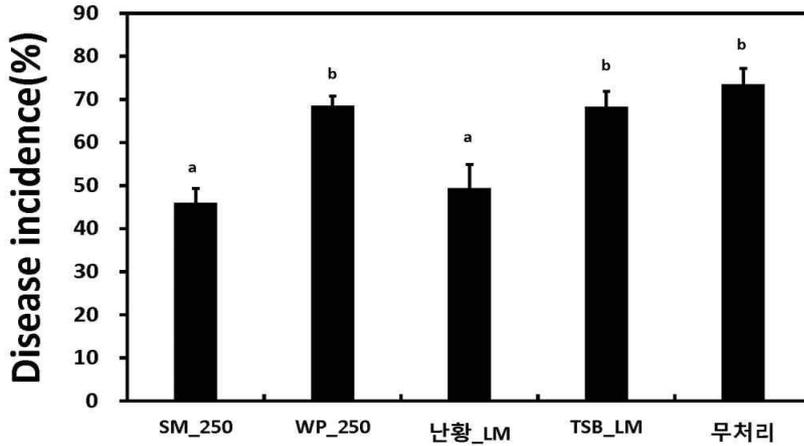


그림 25. SM제형과 WP제형의 고추 세균성반점병 방제 약효

다) 고추 *Cucumber mosaic virus* 방제 능력 검정

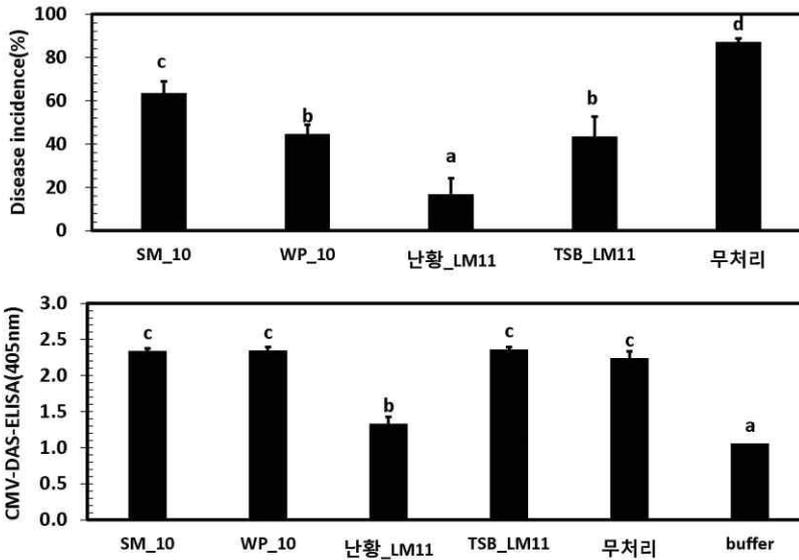


그림 26. SM제형과 WP제형의 고추 *Cucumber mosaic virus* 방제 효능

수화제 100배와 TSB 균주 배양액 살포 처리구에서는 대조구에 비해 CMV바이러스 방제능력이 현저히 감소하였지만, CMV-DAS-ELISA에서는 대조구와 차이는 보이지 않았지만, 최적배지 난황-LM11처리구에서는 CMV병 발생양과 ELISA assay에서 모두 현저하게 CMV발생량이 감소하였다(그림 26).

라) *Bacillus*균주 배양액의 다양한 주요 병해에 대한 방제능력

본 연구에서 도출한 최적배지에서 배양한 다양한 *Bacillus*균주의 다양한 주요 작물 병해에 대한 효능을 분석해 본 결과 벼 도열병, 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토잎역병, 밀 녹병, 고추 탄저병에 대해 *B. amyloliquefaciens*가 60%이상의 방제가를 보였고, Serenade제품의 핵심균주인 *B. subtilis*도 공시한 모든 식물병에 대해 70%이상의 방제가를 보였다(표 21).

표 21. 최적배지에서 배양한 *Bacillus*균주들의 식물병 방제 효능

Treatment	Dilution	Control value (%)						
		Rice sheath blight	Rice blast	Tomato gray mold	Tomato leaf blight	Wheat leaf rust	Barley powdery mildew	Pepper anthracnose
Serenade™	500 fold	69	15	33	58	83	42	8
<i>B. subtilis</i> Q713	3 fold	91	84	75	86	100	93	88
<i>P. ehimensis</i>	3 fold	8	48	75	84	67	58	84
<i>P. elgii</i>	3 fold	17	31	75	95	67	58	84
<i>B. amy</i> KB3	3 fold	94	89	65	71	87	58	88

이상의 결과는 본 과제에서 제형화한 액상제와 수화제는 모두 고추에 발생하는 주요 병해인 탄저병, 세균성반점병, CMV에 대해 병 방제능력을 보였다. 하지만 액상제와 수화제는 제형에 따라 병해에 대해 병 방제능력에 대해 차이를 보였다. 액상제는 탄저병과 세균성반점병에 대해 병 방제능력이 탁월한 반면에 수화제는 탄저병과 CMV에 대해 병 방제능력이 탁월하였다. 하지만 가장 효능이 좋은 조합은 본 연구에서 개발된 배지에서 액상제를 접종하여 5일된 균주 배양액을 살포한 경우 본 연구에서 공시한 모든 고추 병해에 대해 가장 좋은 병 방제능력을 보였다. 이러한 결과는 본 과제에서 도출한 *B. amyloliquefaciens*균주를 배양하는 배지를 활용하여 농가에서 고온성 미생물을 배양하는 방법이 고추 병해 방제에 가장 효과적인 방법임을 증명하였다.

○ 상기의 결과는 2017년에 국내 특허 출원을 하였다

4. 발명자; 김영철, 강범용, 출원인 명칭; 전남대학교 산학협력단.

출원년도; 2017년

특허명; 식물 병해 방제 조성물 및 방법

출원인; 전남대학교 산학협력단

출원국; 대한민국

출원번호; 10-2017-0056291.

## 마. 복합기능성 미생물제제의 병해충 방제효능 증진(협력)제 연구

### 1. 고온성미생물 배양액의 고추 세균성반점병에 대한 항균활성

최적배지에서 생육시킨 균주를 다양한 농도로 희석하여 항세균활성을 측정해 본 결과, 4배 희석한 배양여액 처리 시 고추 세균성반점병균의 생장을 완전히 억제하였지만, 5배 이상을 희석한 배양여액 처리 시에는 더 이상의 항세균활성을 보이지 않았다(그림 27). 이러한 결과는 고온성 미생물을 현장배양한 배양액을 살포할 경우, 5배 이상은 병 방제능력을 기대할 수 없음을 밝혔다.

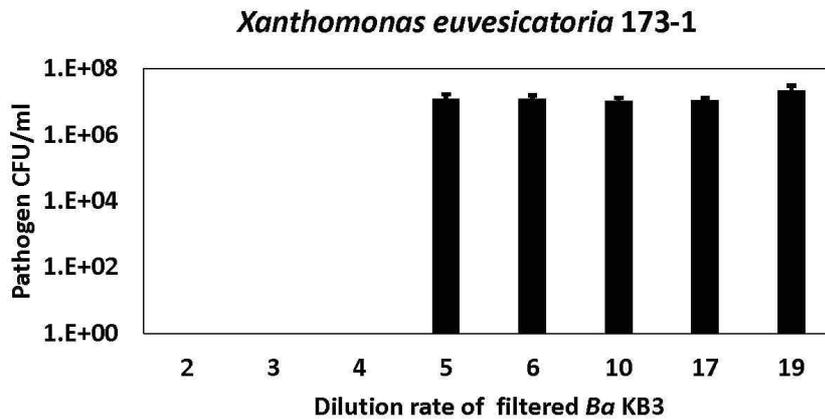


그림 27. *Bacillus* 배양액 희석에 따른 고추 세균성반점병균의 항세균활성

### 2. 고온성미생물 배양액의 다양한 곰팡이에 대한 항균활성

최적배지에서 생육시킨 균주를 다양한 농도로 희석하여 주요 작물병원성 곰팡이병원균인 *C. gleosporoides*, *P. capsici*, *F. oxysporum*, *R. solani*에 대한 항균활성을 검정하였다. 배양여액 5배 희석한 처리구는 고추 역병원균을 제외한 모든 식물병원곰팡이균에 대한 강한 항균활성을 보였지만, 고추 역병원균의 경우는 현저히 항균활성이 감소하였다(그림 28). 모 잘록병원균과 탄저병원균의 경우에는 6-7배 희석한 배양여액 처리구에서도 현저한 항균활성을 보였다. 고온성 미생물의 주요 병원균 항균물질로 biosurfactant가 관여한다고 밝혀서 배양여액의 surface tension을 측정하여본 결과, 5배 희석한 경우, 약 35 mN/m을 보여 surface tension과 항균활성과 상관관계가 있을 것으로 추정하였다(그림 28).

그림 28의 결과를 바탕으로 항균활성과 surface tension과의 상관관계를 분석해 본 결과, 공시한 모든 식물병원 곰팡이병원균에 대한 고온성미생물의 항균활성은 고도의 상관관계(0.7-0.9) 상관관계를 보였다. 따라서 배양여액의 surface tension을 측정하여 곰팡이병원균에 대한 상관관계를 예측하는데 지표로 활용할 수 있을 것으로 생각된다(그림 29).

이러한 결과를 기초로 농가에서 현장 대량배양 시 오일의 drop collapse를 이용하여 최적 살포시기를 도출하고자 하였다. 배양액의 surface tension이 35범위내에 있어야 항균활성이 있어, 현장에서 배양액 살포시기를 결정하는 현장키트를 위해 oil drop collapse되는 시간을 결정한 결과, 약 5분 후 oil drop이 collapse되었을 때 항균활성이 있는 배양액의 surface tension과 동일하고 현장에서 활용할 수 있다(그림 30).

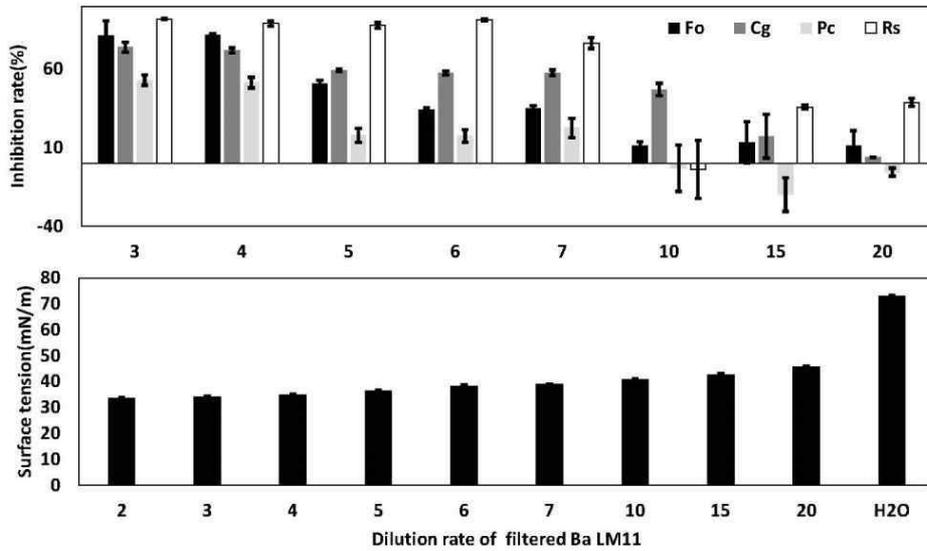


그림 28. *Bacillus* 배양액 희석에 따른 식물병원 곰팡이병균에 대한 항균활성과 surface tension.

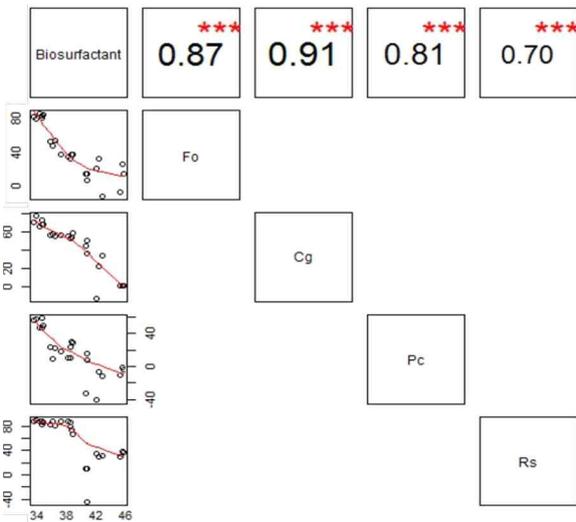


그림 29. *Bacillus* 배양액의 항균활성과 surface tension의 상관관계 분석



그림 30. Oil drop collapse에 의한 최적 대량배양액의 살포시기 결정 간이 진단법

○ 상기의 결과는 2017년에 국내 특허 출원과 국내 학술지(비SCI)에 발표하였다.

5. 발명자; 김영철, 강범용, 출원인 명칭; 전남대학교 산학협력단.

출원년도; 2017년

특허명; 균주 배양액의 항균 활성 예측을 위한 정보 제공 방법 및 균주 배양액을 포함하는 항균용 조성물

출원인; 전남대학교 산학협력단

출원국; 대한민국

출원번호; 10-2017-0062901

6. 강범용, 김용환, 남효승, 김영철. 2017. 생물적 방제균 *Bacillus amyloliquefaciens* LM11의 유래 생물계면활성물질과 항균활성과의 상관관계. 식물병연구 23(2), 177-185. 국내 비 SCI 저널 (학술진흥재단 등재 학술지).

### 3. 유기품목으로 등록된 무기물, 식물추출물, 미생물제 혼용에 따른 효능 분석

#### 1) 선발 유기농자재의 고온성 미생물의 성장과 균수에 미치는 영향

황토유향의 경우, 500ppm과 100ppm모두에서 균의 성장에 영향을 미치지 않았지만, 아인산 처리구에서는 9:1희석한 경우에는 생존을 하지 않았다(그림 31). 황토유향의 경우는 1:9로 희석한 경우는 처리하지 않은 구와 동일한 수준의 생존율을 보였지만, 5:5와 9:1처리구에서는 약 10배정도 생균수가 감소하였다.

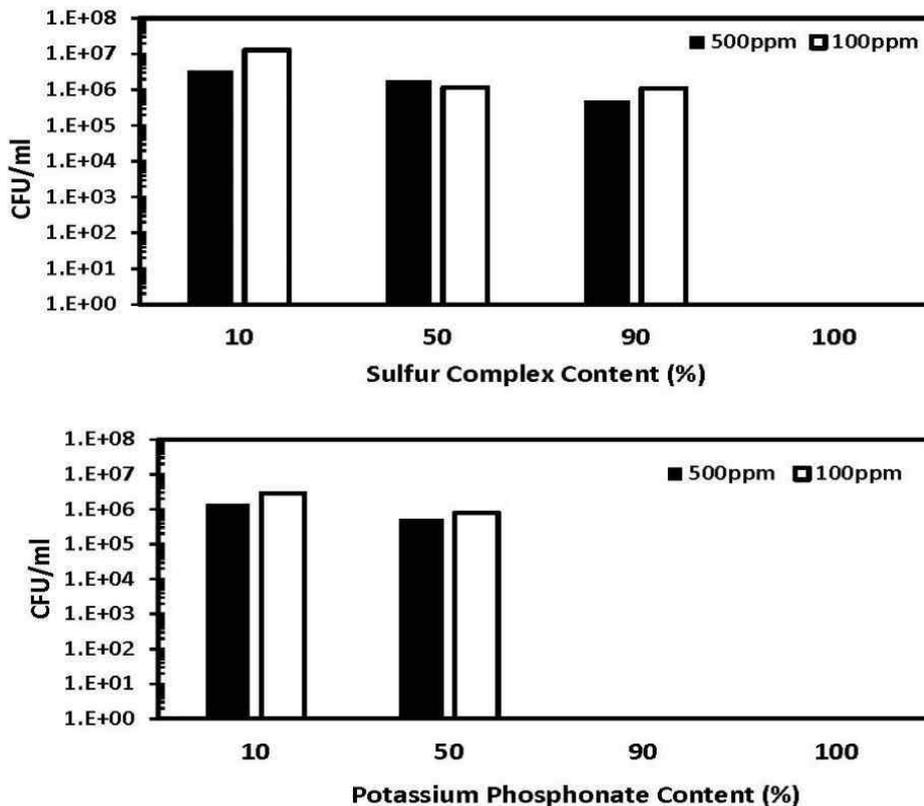


그림 31. 유기농자재 황토유향과 아인산염의 고온성미생물의 성장에 미치는 영향

다양한 유기농자재 무기물을 고온성 미생물에 접종하여 5일 후에 생균수를 측정하여 무기물 혼합이 고온성미생물의 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 거의 대부분의 식물병방제용 무기물 자재는 고온성 미생물의 생장에 영향을 미치지 않았다. 난황유, 아인산염, 석회유황합제 등은 무기물을 처리하지 않은 배지만에 배양한 미생물의 균수와 동일하였다. 황토유황의 처리구에서는 약 100배 정도 낮은 농도의 고온성 미생물만이 검출되어 생장에 영향을 미쳤고, 보르도액의 경우는 균의 생장에 현저하게 영향을 미쳐, 영양세포와 내세포자의 숫자가 동일하게 검출되었다(그림 32).

이러한 결과는 유기농자재 중에 일부 살세균활성을 가지는 강 알칼리성 제형인 보르도액이나 황토유황의 경우 고온성 미생물의 배양액과 동시에 혼합하여 살포할 때는 미생물배양액의 생균수와 항균활성 물질의 안정성에 문제를 일으켜 식물병방제능력이 현저하게 감소하는 결과를 초래할 것으로 생각된다.

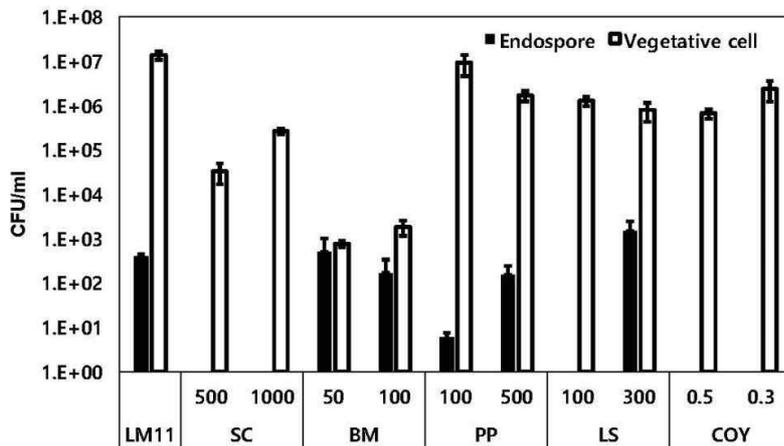


그림 32. 유기농자재 무기물제제의 고온성미생물의 생장에 미치는 영향

유기농자재 식물추출물 중 살균제로 등록되어 있는 오배자추출물은 현저하게 고온성미생물의 생육을 억제하였지만, 살충제로 등록되어 있는 님추출물과 고삼추출물 제품은 고온성 미생물의 생장에 큰 영향을 미치지 않았다(그림 33).

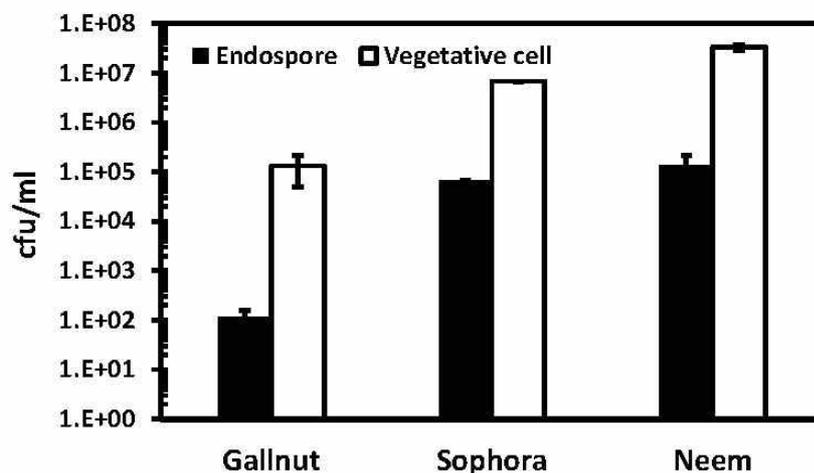


그림 33. 유기농자재 식물추출물의 고온성미생물의 생장에 미치는 영향

## 2) 선발 유기농자재의 고온성 미생물 항균활성에 미치는 영향.

황토유황과 아인산염의 10%나 50%가 되게 첨가한 배양액에서는 항균활성이 첨가하지 않은 것과 동일하게 나타났지만, 90%이상을 첨가한 배지에서는 항 세균활성이 관찰되지 않았다(그림 34). 이러한 무기물의 첨가는 고추 세균성반점병균에 대한 항균활성에 대해 부가적인 항균활성이 관찰되지 않았다. 이와 더불어 고농도의 무기물 식물병방제제를 혼용하였을 때는 고온성미생물의 항세균활성이 감소하는 결과를 초래하였다.

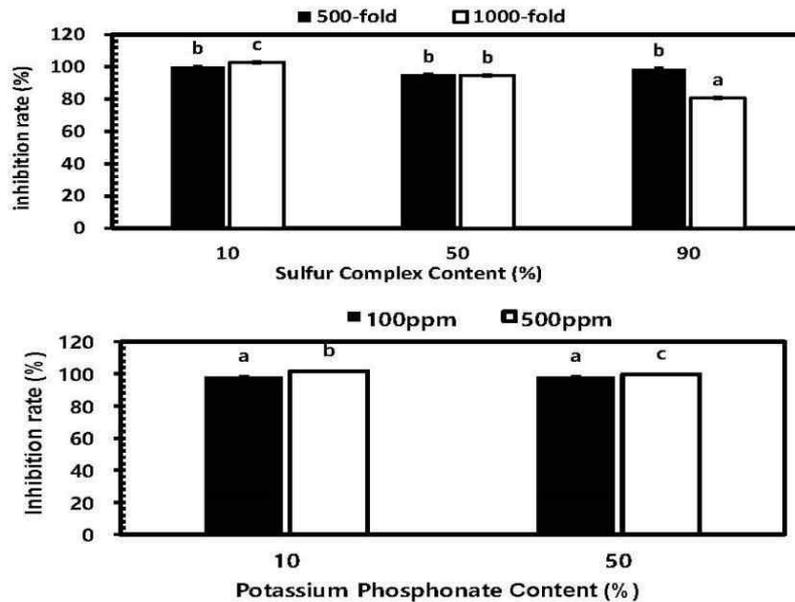


그림 34. 유기농자재 황토유황과 아인산염의 고온성미생물의 항세균활성에 미치는 영향

본 연구에서 사용한 무기물 식물병방제제 중에서 난황유와 석회유황합제의 경우는 항 세균활성을 증진하였지만, 보르도액의 경우는 현저하게 고온성 미생물 배양액의 항 세균활성이 감소하였다 (그림 35). 아인산염과 황토유황의 경우에는 항 세균활성에는 큰 영향이 없었다. 이러한 결과는 보르도액의 강 알칼리성 때문에 고온성 미생물의 생장이 현저히 감소한 결과와 동일하였다. 하지만 난황유와 혼합하였을 때는 고온성 미생물의 항세균활성이 증가된 실제 포장에서 난황유를 활용할 수 있는 중요한 결과를 도출하였다.

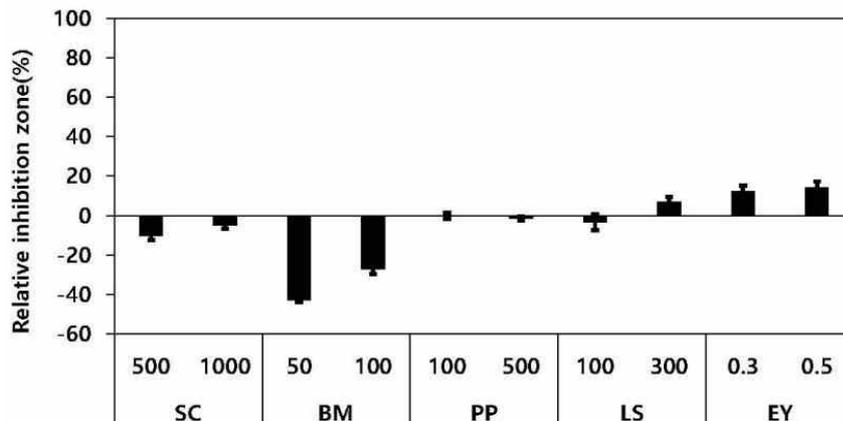


그림 35. 유기농자재 혼합이 고온성미생물의 항세균활성에 미치는 영향

### 가) 유기농자재와 고온성미생물의 혼합에 따른 항균활성 검정

황토유황만을 처리한 구는 배양 여액에 비해 공시한 모든 병원균에 대해 항균활성이 현저하게 낮았고, 거의 항균활성이 관찰되지 않았다(그림 36). 거의 대부분의 병원성 곰팡이에 대해 황토유황을 10%와 50%를 첨가한 균주의 배양액은 대조구와 비슷한 군사생육 억제 효과를 보였지만, 90% 황토유황 함양 배지는 현저하게 항균활성이 감소하였다.

아인산염만을 처리한 구는 배양 여액에 비해 공시한 모든 병원균에 대해 항균활성이 현저하게 낮았고, 거의 항균활성이 관찰되지 않았다(그림 37). 거의 대부분의 병원성 곰팡이에 대해 황토유황을 10%, 50%, 90%를 첨가한 균주의 배양액은 대조구와 비슷한 군사생육 억제 효과를 보였다. 아인산염의 첨가는 시들음병균과 탄저병균에 대해 유의적인 항균활성이 증가하였다(그림 37).

보르도액만을 처리한 구는 배양 여액에 비해 공시한 모든 병원균에 대해 항균활성이 현저하게 낮았고, 거의 항균활성이 관찰되지 않았다(그림 37). 거의 대부분의 병원성 곰팡이에 대해 보르도액을 10%, 50%, 90%를 첨가한 균주의 배양액은 거의 대부분의 병원균에 대해 유의적인 항균활성이 증가하였다(그림 38).

석회유황합제만을 처리한 구는 배양 여액에 비해 공시한 모든 병원균에 대해 항균활성이 현저하게 낮았고, 거의 항균활성이 관찰되지 않았다(그림 37). 거의 대부분의 병원성 곰팡이에 대해 석회유황합제를 혼합한 균주의 배양액은 대조구와 비해 현저하게 항균활성이 감소하였다(그림 39).

난황유염만을 처리한 구는 배양 여액에 비해 공시한 모든 병원균에 대해 항균활성이 현저하게 낮았고, 거의 항균활성이 관찰되지 않았다(그림 40). 거의 대부분의 병원성 곰팡이에 대해 난황유를 10%, 50%, 첨가한 균주의 배양액은 대조구와 비슷한 군사생육 억제 효과를 보였다(그림 41).

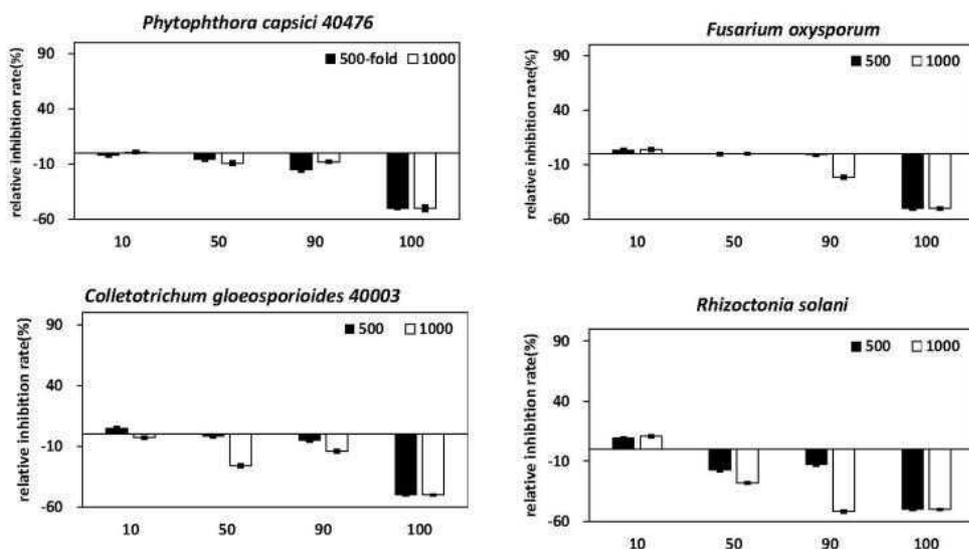


그림 37. 유기농자재 황토유황 첨가한 고온성미생물 배양액의 항균활성

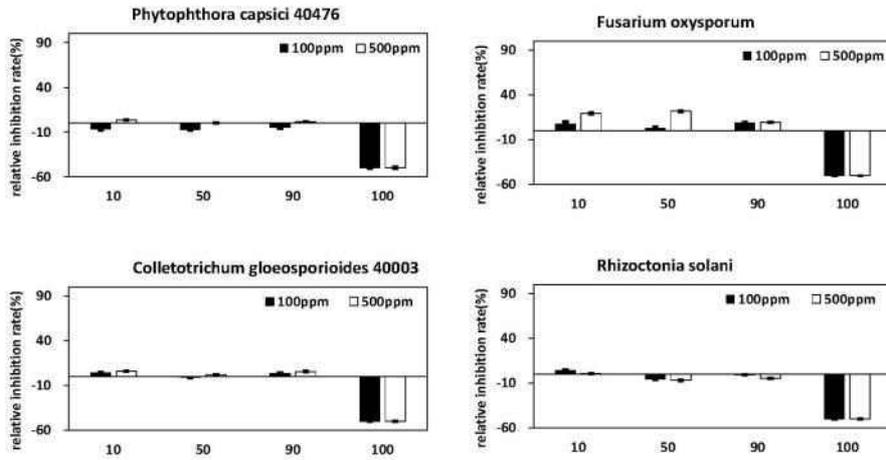


그림 38. 유기농자재 아인산염 첨가한 고온성미생물 배양액의 항균활성

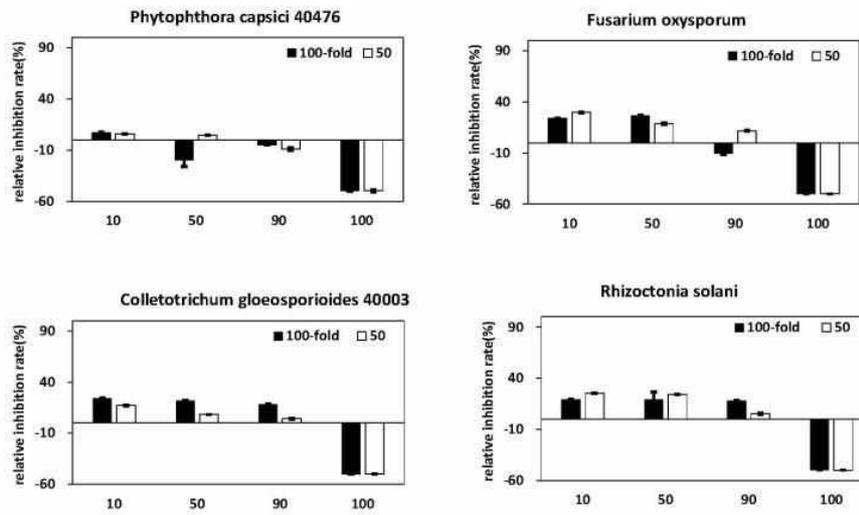


그림 39. 유기농자재 보르도액 첨가에 따른 고온성미생물 배양액의 항균활성

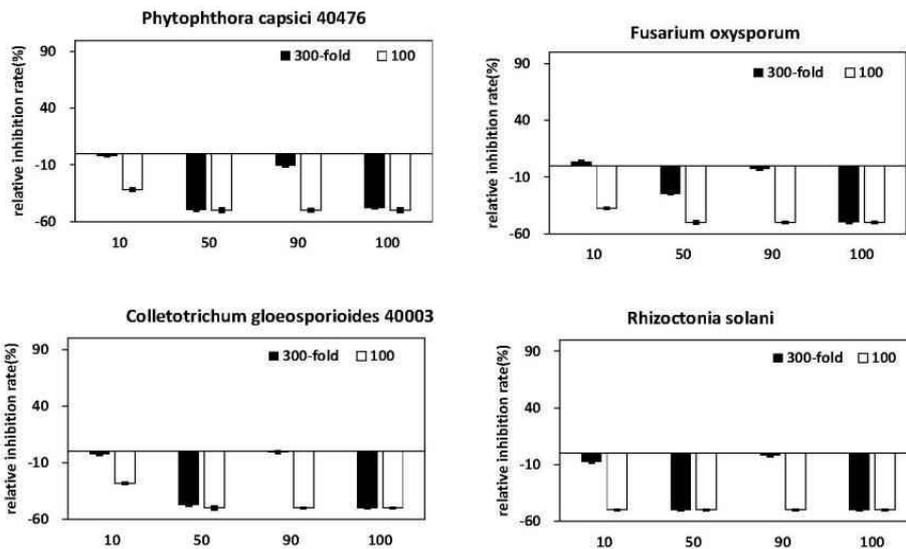


그림 40. 유기농자재 석회유황합제 첨가에 따른 고온성미생물 배양액의 항균활성

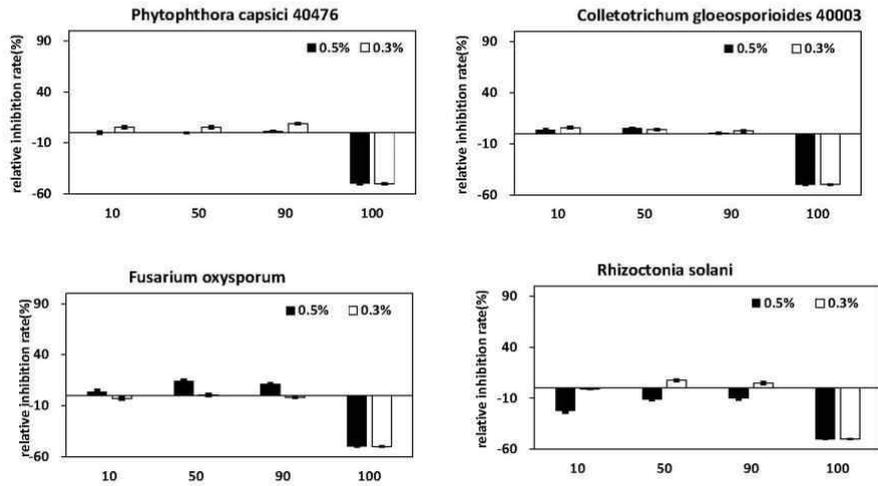


그림 41. 유기농자재 난황유 첨가에 따른 고온성미생물 배양액의 항균활성

본 연구에서 개발된 최적배지에서 5일간 배양한 고온성 미생물의 배양여액이 다양한 식물병원성 곰팡이의 생육을 억제하는데 가장 좋은 활성을 보였다. 또한 무기물 유기농자재와의 혼합하여 항균활성은 보르도액을 첨가하였을 때 배양액의 항균활성을 증진되었다. 또한 난황유도 일부 배양액의 항균활성이 증진하였다. 하지만 석회유황합제는 균주 배양액의 항균활성이 현저하게 감소하였다. 황토유황이나 아인산염의 첨가는 고온성미생물의 배양액의 항균활성에는 유의적인 영향을 미치지 않았다.

자가 배양한 고온성미생물을 포장에 적용할 때 석회유황합제는 배양액과 혼합하여 살포하는 것은 배양액의 효능을 감소시킴으로 자제해야 할 것이지만, 보르도액이나 난황유는 배양액의 효능을 증진하는데 도움이 될 것으로 된다. 황토유황이나 아인산염의 첨가한 경우에는 배양액의 효능에는 큰 영향을 미치지 않음으로 포장에서 활용할 때는 황토유황이나 아인산염을 이용한 식물병 방제에 동시에 활용할 수 있다.

#### 나) 고온성 미생물의 배지에 유기농자재 첨가에 따른 항균활성 검정

모든 공시 유기농자재를 균주의 배지에 첨가하여 배양한 다음 배양여액의 항균활성 증진에는 효능이 없었다(그림 42, 43)

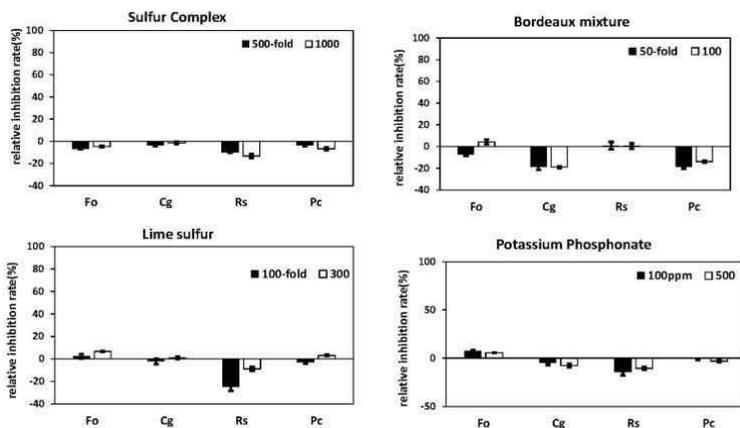


그림 42. 유기농자재 첨가한 배지에 생육한 고온성미생물 배양액의 항균활성

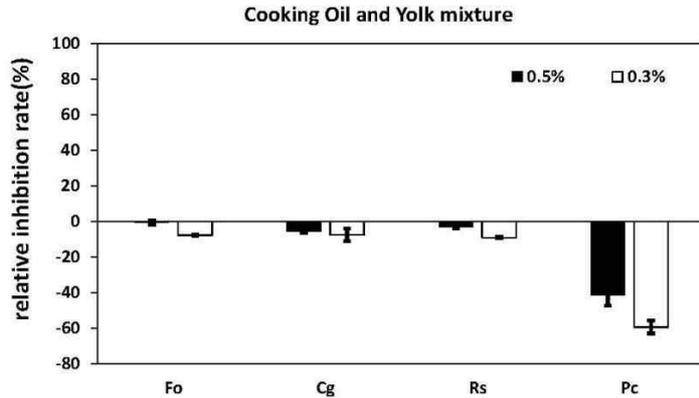


그림 43. 유기농자재 난황유 첨가 배지에 생육한 고온성미생물 배양액의 항균활성

다양한 유기농자재를 첨가한 배지에서 고온성미생물을 접종하여 5일간 배양한 다음 배양액의 pH와 surface tension을 측정하였다. 배지의 pH는 황토유황의 경우는 pH 6였지만, 첨가하지 않은 배지의 배양액의 pH는 8이었고, 보르도액은 9 이상을 보였다. 보르도액의 surface tension은 유의성이 있게 감소하였지만, 하지만 아인산염과 석회유황합제를 첨가한 배지에서 생육시킨 균주의 surface tension은 첨가하지 않은 배지의 surface tension과 비슷한 수준을 보였다 (그림 44).

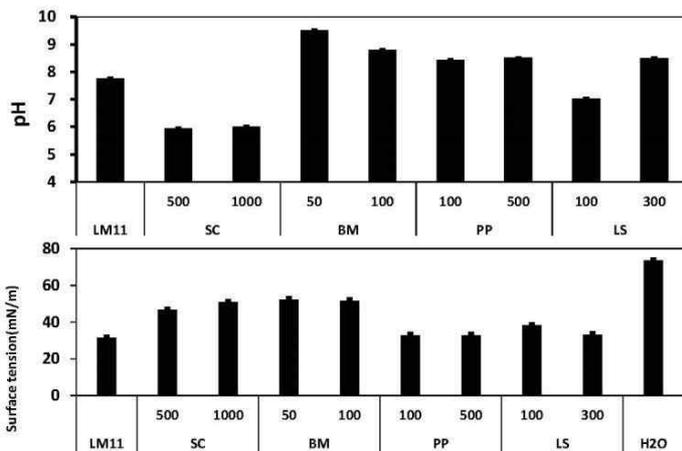


그림 44. 유기농자재 첨가한 배지에서 생육한 고온성미생물 배양액의 pH와 surface tension

모든 공시 유기농자재를 균주의 배지에 첨가하여 배양한 다음 배양액의 항균활성 증진에는 효능이 없었다(그림 45). 이러한 추출물을 첨가한 배지에서 배양한 균주의 배양액의 pH나 surface tension에도 큰 영향이 없었다(그림 46). 단지 오배자 추출물을 첨가한 배지에서 생육한 균주 배양액의 항균활성이 *R. solani*에 대해서 약간 감소하는 경향이 있었다 (그림 45).

식물추출물의 경우는 고온성 미생물을 배양할 때 첨가하여도 균주의 생장이나 항균활성에 대해 영향이 없을 것으로 생각되지만, 이러한 추출물 첨가에 의한 항균활성 증진효과는 없을 것으로 생각된다. 배양액의 살충효능은 알 수가 없지만, 배양액과 혼합하여 사용하면 효율적일 것으로 생각된다.

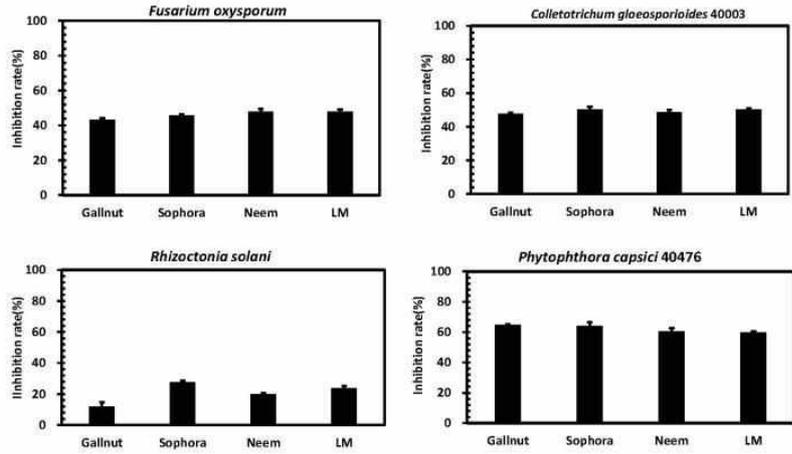


그림 45. 유기농자재 식물추출 첨가 배지에 생육한 고온성미생물 배양액의 항균활성

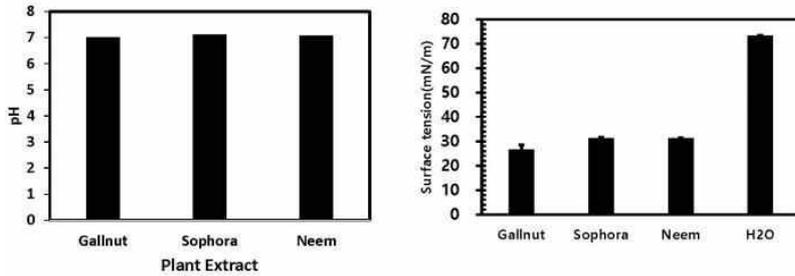


그림 46. 유기농자재 식물추출 첨가 배지에 생육한 고온성미생물 배양액의 pH와 surface tension

## 바. 고온성 미생물제제의 방제 매뉴얼 연구

미생물 배양액과 고추 병해 방제용 유기농 자재와의 다양한 혼용에 따른 고온성 미생물의 식물병 방제 능력을 고추를 이용하여 생물검정하여 고추 병해 방제를 위해 혼용할 수 있는 유기농 자재선발하고, 고온성 미생물의 배양액과 최적 유기농자재와의 증진제의 고추 병해 최적 사용방법 검증을 하였다.

### 1. 고온성 미생물과 유기농자재 혼용에 따른 고추 병해 방제 능력

보르도액을 제외한 모든 유기농자재에서 고온성미생물 배양액과 혼합한 처리구에서 병 발생량이 감소하였다. 황토유황, 아인산염, 난황유에서는 단독처리구보다 고온성미생물 배양액과 혼합한 처리구에서 탄저병 발생율이 감소하였다. 하지만, 석회유황합제의 경우는 단독이나 혼합액 처리구에서 유의성이 없었다(그림 47). 보르도액의 경우는 고온성미생물 배양액과 혼합할 때 식물병발생량이 단독처리구보다 증가하였다.

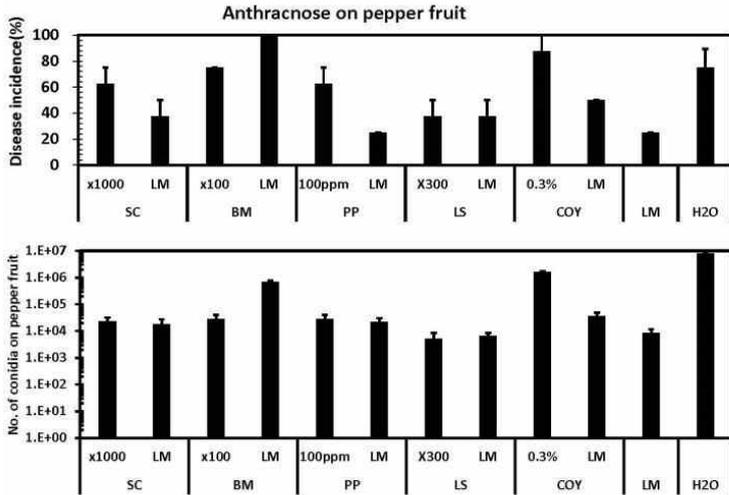


그림 47. 유기농자재와 고온성 미생물배양과의 혼용에 따른 고추 탄저병 방제 효능

난황유와 균주를 혼합한 처리구에서 바이러스 발생량이 현저히 감소하였다. 하지만 다른 유기농자재는 바이러스 방제 효능이 없었다. 하지만 고온성 미생물 배양액만을 살포한 처리구에서도 바이러스병 방제효능이 높았다. 난황유 단독 처리구에서도 바이러스병 방제능력이 높았다. 균주와 난황유를 혼합하였을 때는 배양액과 난황유가 바이러스병 방제능력이 두 처리구의 증진작용일 것으로 생각된다(그림 48).

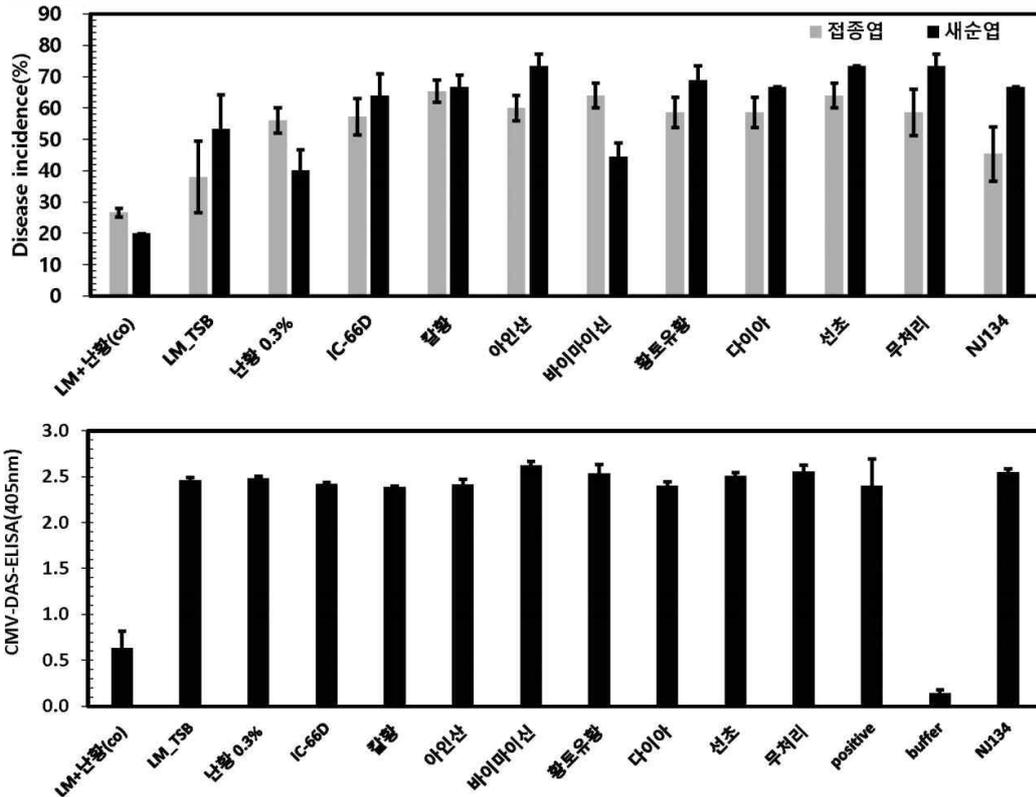


그림 48. 유기농자재와 고온성 미생물배양과의 혼용에 따른 고추 *cucumber mosaic virus* 방제 효능

## 2. 고온성 미생물 배양액과 유기농자재에 혼용에 따른 고추 병해 방제 능력

### 1) 고추 세균성점무늬병균 방제 효능

세균성점무늬병균에 대해서는 난황유와 고온성미생물 배양액 살포구에서 가장 높은 방제효능을 보였다. 또한 배양한 고온성 미생물 배양액 10배 살포액보다는 난황유를 같이 살포한 구에서 방제 효능이 높았다. 또한 난황, 난각칼슘과 고온성 미생물배양액을 혼합한 처리구에서도 배양액만을 살포한 처리부보다 높은 방제 능력을 보였다(그림 49).

난황유와 배양액 고온성미생물 배양액을 혼합한 처리구는 쿠퍼 처리구보다 조광대신 품종에서는 높은 방제능력을 보였고, 청양에서는 비슷한 수준의 세균성점무늬병 방제능력을 보였다(그림 50).

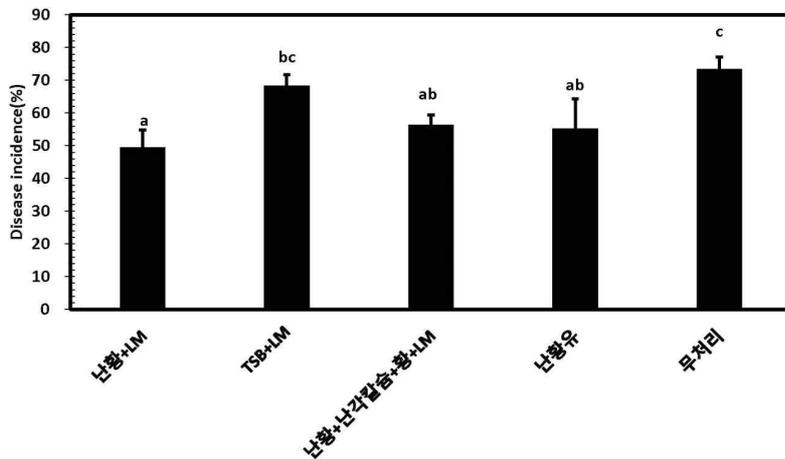


그림 49. 고온성 미생물배양과 난황유 혼용에 따른 고추 세균성점무늬병 방제 효능

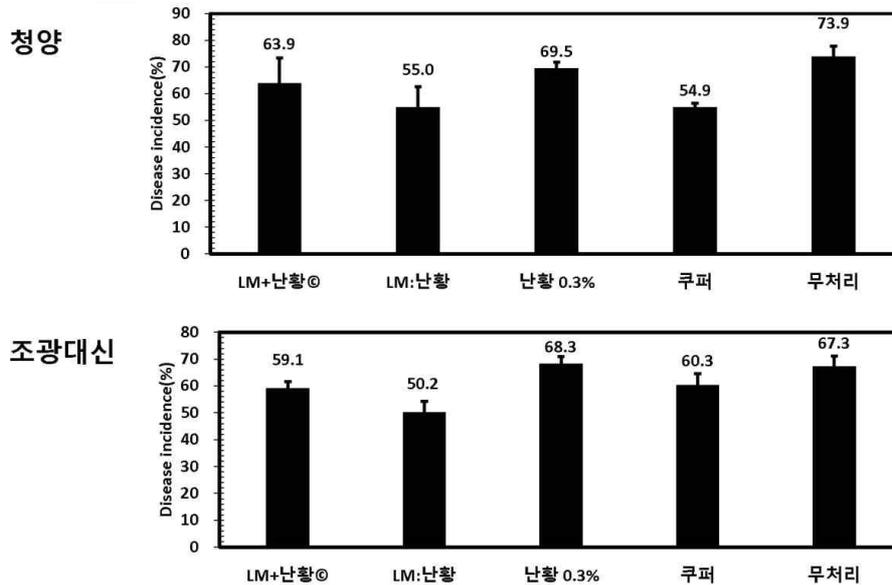


그림 50. 고온성 미생물배양과 난황유 혼용처리구와 쿠퍼 살포에 따른 고추 세균성점무늬병 방제 효능

## 2) 고추 역병 방제 효능

난황유와 배양액 고온성미생물 배양액을 혼합한 처리구는 고추역병에 대해서는 방제효능을 보이지 않았다(그림 51). 고온성 배양액을 활용해서는 고추 역병의 방제효능에는 제약이 있을 것으로 사료되며, 아인산염 등 타 약제를 활용하여 병 방제에 활용해야 할 것이다.

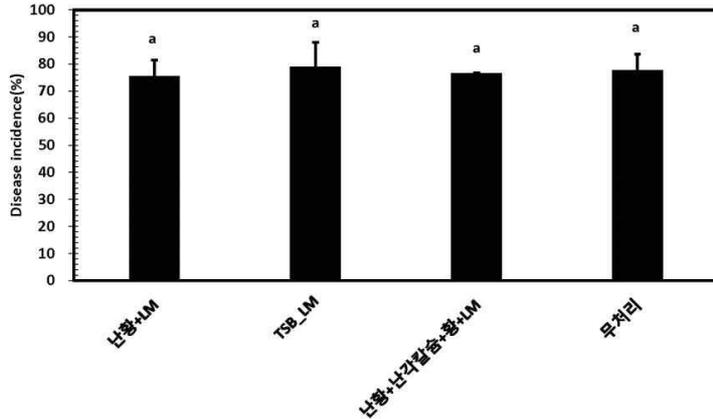


그림 51. 고온성 미생물배양과 난황유 혼용처리구 따른 고추 세균성점무늬병 방제 효능

## 3) 고추 *Cucumber mosaic virus* 방제 효능

난황유 자체는 방제 효능이 없었지만, 고온성 미생물 배양액과 난황을 혼합하거나 난각칼슘을 혼용하여 살포하였을 경우 바이러스 방제 능력이 현저하게 증가하였다(그림 52). ELISA 검증 결과 난황과 혼용하였을 때 현저하게 낮은 바이러스가 검출되어 바이러스 방제 능력이 효과적으로 증진되었다.

## 4) 고추 탄저병 방제 효능

난황유 자체는 방제 효능이 없었지만, 고온성 미생물 배양액과 난황을 혼합하거나 난각칼슘을 혼용하여 살포하였을 경우 탄저병 방제 능력이 현저하게 증가하였다(그림 53). 배양액 단독살포에서도 병 방제능력이 크게 높지 않았지만, 난황유와 혼용하였을 때는 방제능력이 현저하게 높았다.

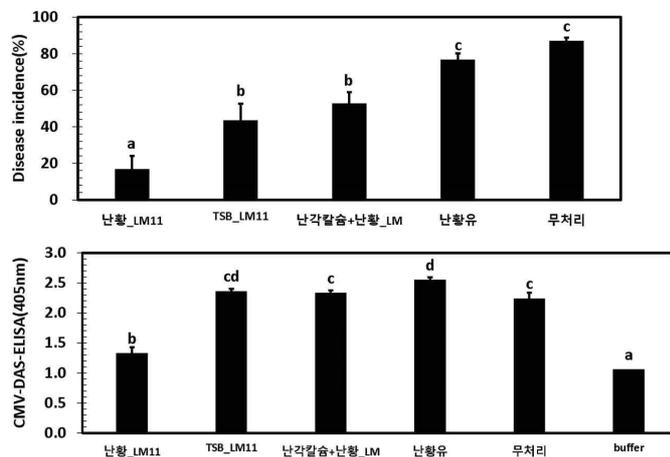


그림 52. 고온성 미생물배양과 난황유 혼용살포에 따른 고추 *Cucumber mosaic virus* 방제

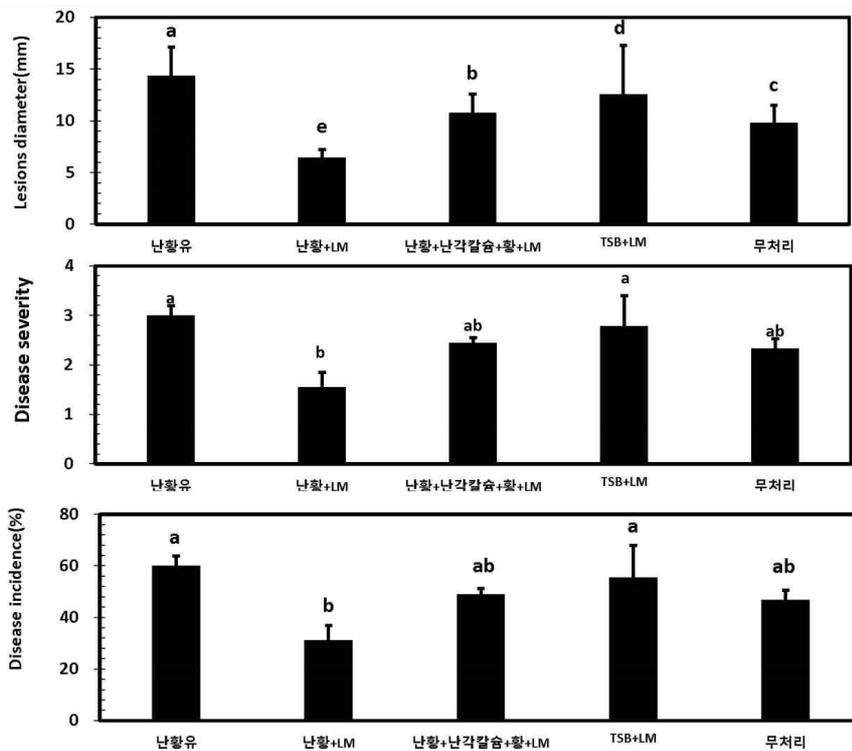


그림 53. 고온성 미생물배양과 난황유 혼용살포에 따른 고추 탄저병 방제

### 3. 고온성 미생물 배양액과 유기농자재에 혼용에 따른 고추 탄저병 방제 효능 포장 검증

난황유와 고온성미생물을 혼합하여 처리한 구에서만 방제능력이 현저하게 높았다(그림 54). 하지만 황, 석회유황합제 살포구에서는 탄저병 방제 능력이 높지 않았다. 미생물배양액을 살포한 구는 다른 난황유를 제외한 다른 유기농자재와의 혼합보다 높은 방제가를 보였다.

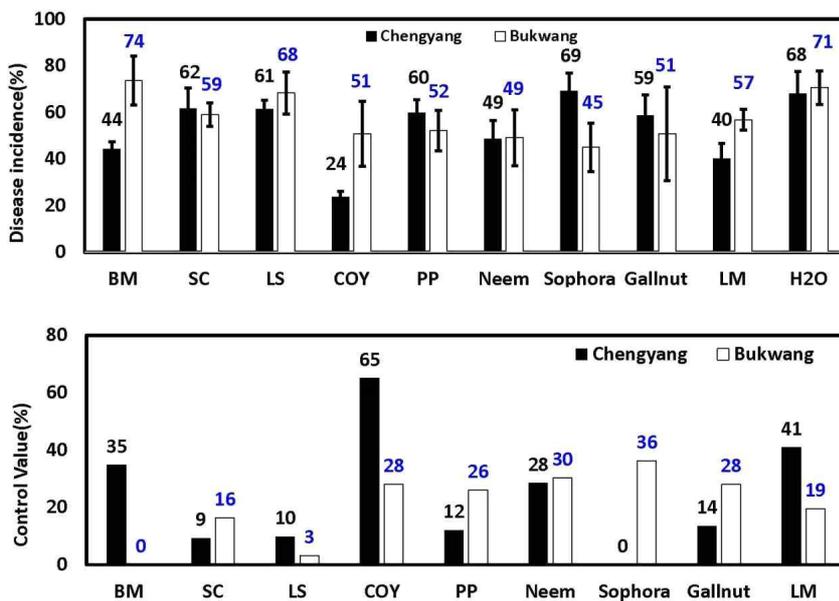


그림 54. 고온성 미생물배양과 난황유 혼용살포에 따른 고추 탄저병 방제 포장 검증

#### 4. 고온성 미생물의 대량배양액을 이용한 잿빛곰팡이 방제

HOA73세균은 접종 후 2일안에 최대 생균수를 보였고, 정체기에 접어들었으면 생균수의 농도는 접종 후 20일까지  $10^8$ cfu/ml의 농도를 유지하였다(그림 55). 총 단백질양은 접종 8일 후에 최대에 도달하였다. 균주 접종 후 5일부터 8일 후에 chitinase, protease, lipase 와 siderophore의 활성이 최대에 도달한 후에 점차 감소하였다(그림 55).

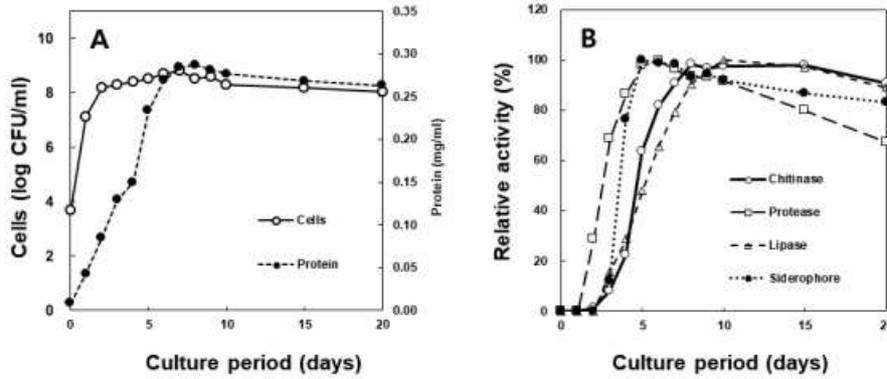


그림 55. *Paenibacillus elgii* HOA73 생육과 다양한 세포외 분비 효소 생성량. (A) HOA73의 생균수와 총 단백질 농도 (mg/ml), (B) 각 효소, lipase, protease, chitinase와 siderophore의 생성량을 최대 생성량의 상대적인 활성 (%)으로 표시하였다.

균주 배양액에서 crude chitin은 균주 접종 후에 점차 감소하였지만, 접종 20일 후에도 검출되었다. 균주배양액의 TLC분석 결과 monomers (GlcNAc)는 발견되지 않았지만, dimer보다 큰 chitin-oligomer들은 지속적으로 생산되었다(그림56).

균주 배양액의 잿빛곰팡이병균의 분생포자 발아억제율은 균주의 배양기간이 길어질수록 증가하였으며, 균주 배양액의 경우 25배로 희석하였을 때도 약 80%정도의 발아억제율을 보인 반면에, 균주 배양 상등액은 약 7.5배로 희석했을 때, 끓인 균주 배양액의 경우는 2.5배로 희석한 용액에서 비슷한 분생포자 발아억제율을 보였다(그림 57). 이러한 결과는 일부 열에 약한 효소와 같은 물질들이 분생포자 발아억제에 작용한 결과로 추론된다.

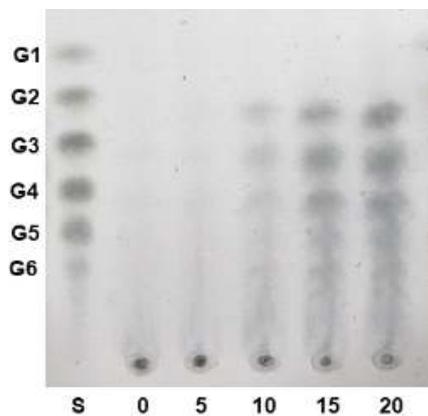


그림 56. *Paenibacillus elgii* HOA73가 chitin 최소배지에서 생산하는 chitin oligomers의 TLC 검출. Lane 0 ~ 20, 균주 접종 후 0일부터 20일 동안 0.5ml 의 균주 배양 상등액으로부터 chitin oligomer생성.

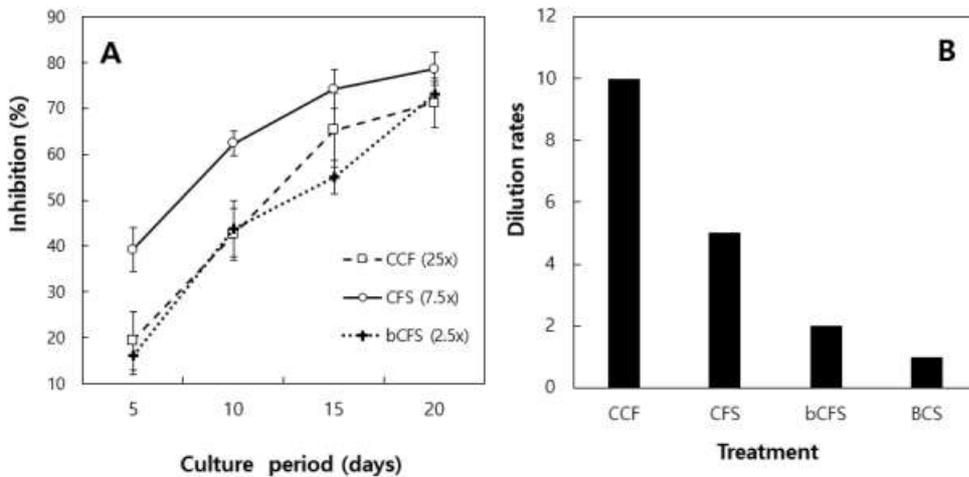


그림 57. *Paenibacillus elgii* HOA73 균주 배양액과 균주의 잿빛곰팡이병균의 분생포자 발아율에 미치는 영향. (A) 균주 접종 후 시간 경과별 25배 희석한 chitin-culture fluid (CCF), 7.5배 희석한 cell-free supernatant (CFS) 및 2.5배 희석한 끓인 CFS (bCFS) 용액의 분생포자 발아 억제율. (B) 100 % 분생포자 발아억제율을 보인 각 용액의 희석 배율.

Chitin oligomer의 잿빛곰팡이 발아억제율은 chitin oligomer의 크기가 클수록 분생포자 발아율이 증가하였다. Di와 Tri chitin은 잿빛곰팡이병균의 분생포자발아억제율이 현저히 낮았으며, Hexa와 Penta chitin의 경우는 분생포자의 발아율을 50 ug/ml의 농도에서 100% 억제하였다(그림 58).

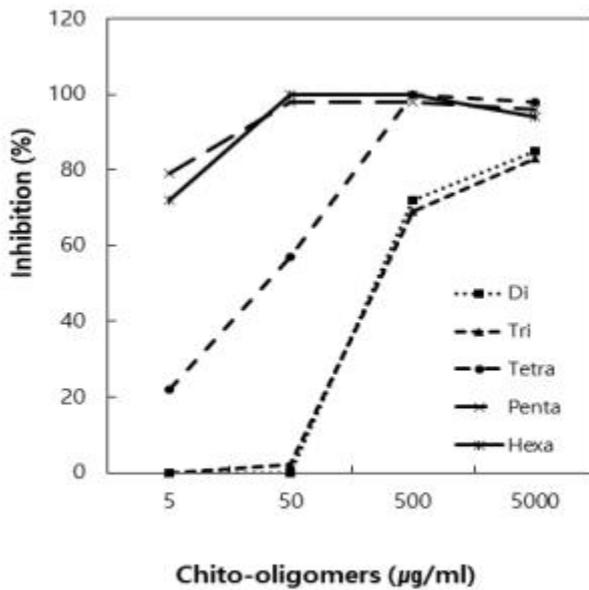


그림 58. Chitin과 chitin oligomer의 잿빛곰팡이병균의 분생포자 발아율 억제 능력.

표 22. 세균배양액 (CCF), 균 현탁액 (BCS) 및 화학농약 (CFC)의 토마토 재배 농가에서 토마토 잣빛곰팡이 방제 효능 분석

Treatment a	Diseased fruit (%) b	Control value (%)
CCF	1.9 ± 0.24 a	84.3
BCS	7.9 ± 0.54 b	34.7
CFC	0.7 ± 0.21 a	94.2
Control	12.1 ± 1.40 c	-

a 10일 간격으로 3회 처리함. CCF (10<sup>8</sup>CFU/ml 균 배양액, BCS(10<sup>8</sup>CFU/ml phosphate buffer), 2,000x희석 Fludioxinol (CFC)와 멸균수 (Control).

b 발병율은 최종 살포 후 10일 후에 측정함. 다른 문자는 던컨의 검정 (P=0.05)에서 통계적으로 유의함.

세균 배양액을 발병 초기에 10일 간격으로 3회 살포 했을 때, 화학농약 살포 처리구와 통계적으로 유의한 잣빛곰팡이병 방제 효능을 보였다. 화학농약 살포 처리구에서 94%의 방제가를 보였고, 균주배양액 살포 처리구에서 84% 방제가를 보인 반면에, 균주 현탁액 살포구에서 35% 정도의 방제가를 보여 현저히 방제능력이 떨어짐을 알 수 있었다(표 22).

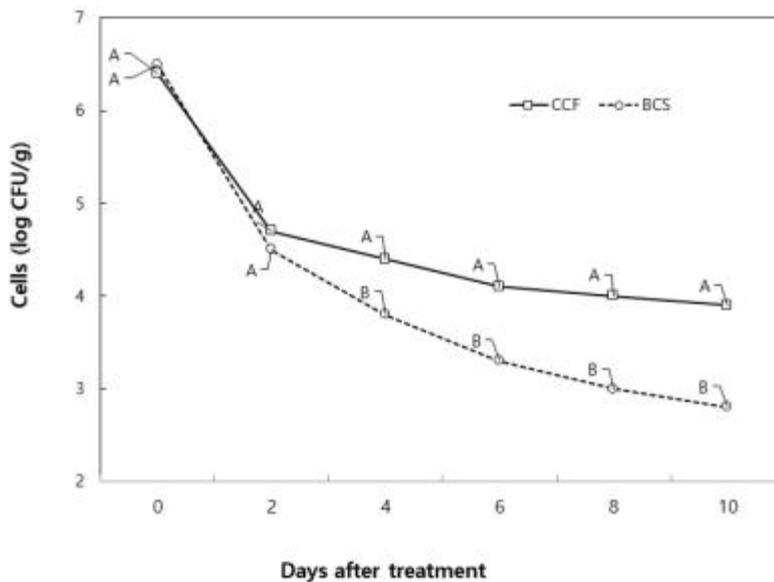


그림 59. *Paenibacillus elgii* HOA73 의 토마토 잎에 처리 후 시간 경과별 균 생존율. 희석하지 않은 균 배양액 (CCF, 10<sup>8</sup> CFU/ml)과 균주 현탁액 (BCS, 10<sup>8</sup> CFU/ml phosphate buffer)을 토마토 포장에 살포 후 2일 간격으로 생균수를 측정하였다. 다른 문자는 CCF와 BCS 처리구 간의 균주 처리 후 생균수의 Student's T test (P=0.05)의 통계적인 유의성을 나타낸다.

균주 배양액을 살포한 처리구와 균주 현탁액을 처리한 구에서는 생균수는 처리 후 2일에 현저히 감소하였으나, 두 처리구 사이에는 생균수 차이가 없었다. 하지만 처리 후 4일이 지난 후부터 두 처리구 사이에 통계적으로 유의하게 차이가 났다. 균주 배양액을 처리한 구에서는 처리 후 10일 후에도 약  $10^4$ cfu/g을 유지한 반면에 균주현탁액을 살포한 처리구에서는 처리 후 10일 후에 약  $10^3$ cfu/g 이하로 생균수가 감소하였다(그림 59).

화학농약을 처리한 토마토 잎에서는 처리한 후 잿빛곰팡이균의 포자 수가 처리 후 10일까지 감소하여  $10^3$ cfu/cm<sup>2</sup>까지 감소한 반면 균주 배양액을 처리한 구에서는 포자의 숫자에 큰 변화없이  $10^4$ cfu/cm<sup>2</sup>를 유지하였다(Lee et al., 2017). 하지만 물을 처리한 대조구에서는 현저하게 포자수가 증가하여 처리 후 4일 후부터 급격하게 증가하여 처리 후 10일 후에는 약  $10^7$ cfu/cm<sup>2</sup>의 농도로 증가하였다. 이러한 잿빛곰팡이병균의 포자 증가는 병반면적을 증가와 일치하는 결과를 보였다(그림 60).

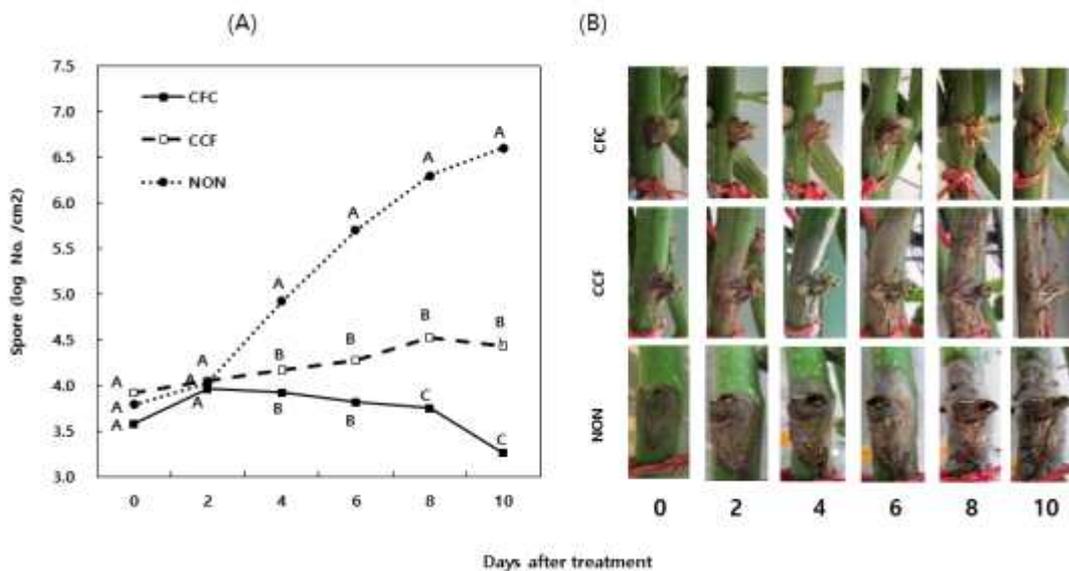


그림 60. 균주 배양액 (CCF)과 화학농약 Fludioxinol (CFC) 처리가 포장에서 토마토 잿빛곰팡이병균 분생포자 형성 (A)과 병반 확대 (B)에 미치는 영향. 균주배양액과 화학농약을 처리한 후 2일간격으로 분생포자 수와 병반면적을 측정하였다. 대조구로는 물(NON)을 처리하였다. 다른 문자들은 던컨 검정 ( $P=0.05$ )에 의해 통계적으로 유의함을 의미함.

## 제 2 세부연구: 자가배양 고온성 미생물제의 고추 생육 효과 검증 및 현장 적용

### 1. 고온 기능성 미생물 특성 연구

#### 1-1. 선발된 고온·기능성 미생물 분리 및 동정

##### 1) 고온·기능성 미생물 분리 및 동정

대두박에서 분리한 미생물은 60°C 에서 1시간 동안 열처리 후 생존한 미생물(그림1) 중 고추병을 발생시키는 병원성곰팡이(*Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora capsici*)에 대해 항균활성이 있는 균(그림2)을 최종 선택하였다.

#### 1-2. 분리된 미생물의 2차 대사산물 생산 활성 조사

##### 1) Plate 실험

###### - Siderophore 생산

*B. amyloliquefaciens* Y1균주 배양액 100  $\mu$  l 를 TSB media에 접종하여 3일간 40°C 에서 배양하고, 배양 된 Y1을 TSA배지에 도말하였다. 도말 후 TSA배지에서 단일콜로니를 cutting 하여 CAS blue배지에 접종하였다. CAS 배지에 30°C 4일 간 배양 한 후 Y1균주 주위에 주황색으로 변색하는 것을 관찰하였다 (그림 5).

###### - 인가용화 생산 측정

*B. amyloliquefaciens* Y1균주를 TSB media에 100ul 접종하여 3일 간 40°C 에서 배양하였다. 배양 된 Y1균주를 Phosphorus solubilization 활성고체배지에 Streaking하고 30°C 에서 4일 간 배양 한 후, Phosphorus solubilization 활성고체배지의 Y1 주위에 Clean zone이 생성되는지 관찰하였다(그림 6).

#### < Phosphorus solubilization 활성고체배지 조성 (1L기준) >

glucose 10g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.4g, NaCl 1g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.2g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.5g, KCl 0.2g, yeast extract 0.5g, hydroxyapatite(HY1~Ca<sub>10</sub>(OH)<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> 4g, agar 20g, pH 7

###### - HCN 생산 측정

Plate에 TSA배지를 깔고 응고되면 TSA반원을 잘라내고, 3일 간 40°C 에서 배양된 *B. amyloliquefaciens* Y1균주를 도말하였다. 그 후, alkalinepicrate용액을 적신 여과지를 TSA배지 반대편 Plate 천장에 붙이고 parafilm으로 밀봉하여 30°C 에서 4일 동안 여과지의 색 변화(노랑->주황, 갈색)를 관찰하였다.

#### < alkalinepicrate용액 조성(100ml 기준) >

alkalinepicrate용액 (2.5g sodium carbonate, 0.5g picricacid,)

##### 2) 배양액 실험

###### - 배양액 내 Siderophore 측정

Modified Fiss Minimal Medium 1L에 *B.amyloliquefaciens* Y1균주 도말된 TSA배지에서 단일콜로니 10 CFU 접종하여 15일간 배양하고 배양액을 샘플링하여 day마다 Cell growth(그림8)와 Siderophore값(그림 9)을 측정하였다. Cell growth는 2일에 가장 높았고, 3일부터 급격히 감소하고 15일까지 서서히 감소되었다.

### 1-3. 병해 방제 효과조사

#### 1) 고온성 *amyloliquefaciens* Y1) BB media(표2) 항균활성 측정

- 병원성곰팡이 대치배양

PC (Potato Dextrose broth + colloidal chitin +agar)배지(표3)에 5가지 병원성곰팡이 *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*와 *B. amyloliquefaciens* Y1균주를 대치배양(그림10)하여 Inhibition(표1)을 조사하였다.

- *B. amyloliquefaciens* Y1 배양액 농도별 항균활성 검정

BB (Blue+ brown)배지에 10, 15일 간 40°C에서 배양한 *B. amyloliquefaciens* Y1 배양상등액을 0, 0.2, 1, 10, 30, 50% 농도별로 PDA배지와 혼합한 후 5가지 병원성 곰팡이(*Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*)를 혼합된 배지 중앙에 접종(그림 11)하여 고온성미생물 Y1의 1,2차 대사산물이 병원성 곰팡이에 대한 항균활성정도를 비교 확인 해 보았다.

- *B. amyloliquefaciens* Y1 조추출물질의 항균활성 검정

*B. amyloliquefaciens* Y1 배양 상등액에 4가지 유기용매(Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Butanol)와 Aqua를 이용하여 조 항균활성 물질을 추출(그림 16)하고, 이 후 유기용매 추출물을 농축하여 3가지 병원성 곰팡이(*Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora capsici*)에 대하여 항균활성을 확인하였다.

#### 2) 고온성미생물(*B. amyloliquefaciens* Y1) LB media 항균활성 측정.

- *B. amyloliquefaciens* Y1 배양액 농도별 항균활성 검정

LB배지에 8일 간 40°C에서 배양한 Y1 배양상등액을 0, 10, 30, 50% 농도별로 PDA배지와 혼합한 후 5가지 병원성 곰팡이(*Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*)를 중앙에 접종(그림 23)하고 고온성미생물 *B. amyloliquefaciens* Y1의 1,2차 대사산물이 병원성 곰팡이에 대한 항균활성정도를 비교 확인(그림 24) 하였다.

- *B. amyloliquefaciens* Y1 조추출물질의 항균활성 검정

*B. amyloliquefaciens* Y1 배양 상등액에 유기용매(Butanol)를 이용하여 조 항균활성 물질을 추출(그림 25)하고, 이 후 유기용매 추출물을 농축하여 5가지 병원성 곰팡이(*Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis*

*cinera*)에 대하여 항균활성(그림 26)을 확인하였다.

## 2. 소규모 비 멸균조건 대량배양 연구

### 2-1. 기질 및 온도 특성을 이용한 미생물 특이적 배양

#### 1) 기질 및 온도 특성을 이용한 미생물 특이적 배양

본 연구팀은 *B. amyloliquefaciens* Y1 균주가 Chitinase,  $\beta$ -1,3-Glucanase, Protease 효소를 생산하는 것을 확인하고, 특이기질로 Crab shell powder와 Gelatin powder를 사용하여 배지(그림 40)를 조성(표4)하였으며 Y1 균주를 분리할 때 60°C에서 생존한 고온성 미생물인 것을 확인하였고, 배양 할 시 오염을 줄이고자 온도조건을 40~60°C로 조절하여 배양실험을 하였다.

- BB 배지의 비멸균 조건 배양 최적 온도 배양 조건 조사.

Blue media 1ml, Brown media 0.4ml가 포함 된 수돗물 100ml에 *B. amyloliquefaciens* 싱글콜로니1CFU를 접종하고, 3일 동안 각 온도별로 항온배양기에서 배양 한 후 cell growth를 확인하였다.

- 비멸균 배지에 특이적 기질 및 미생물을 접종한 후 오염 없는 최적 배양조건 조사.

Blue media 1ml, Brown media 0.4ml가 포함 된 BBmedia 100ml에 *B. amyloliquefaciens* Y1 100 $\mu$ l를 접종하고 1시간 동안 각 온도별로 열처리 후 3일간 40°C (30°C는 예외) 항온배양기에서 배양하였다.

- 비멸균 조건 배양(CFU 접종).

blue media 1ml, brown media 0.4ml가 포함 된 BB media 100ml에 *B. amyloliquefaciens* 싱글콜로니 1유닛을 접종하고, 3일간 40°C 항온배양기에서 배양 한 후 cell growth를 확인하였다.

## 3. 포트에서 미생물 처리를 통한 작물 특성 조사

### 3-1. 고추 식물체 생육 조사

1) 포트에 고추씨를 정식하여 40~80일 동안 지상부 생초장, 생체중량, 건조중량 및 지하부 생체 및 건조중량 측정

- 지상하부 생초장, 생체중량, 건조중량, Chlorophyll 측정값

물, 비료(1/2, 1/1), 미생물배양액(1/2, 2/3, 1/1)을 처리 한 고추식물체를 40, 50, 60, 80일에 각각주를 Sampling 하여 지상하부 생초장, 생체중량, 건조중량, Chlorophyll을 측정하였다 (그림 48, 49, 50) Y1미생물 배양액은 7일 동안 40°C에서 배양 한 후 5차례(10, 20, 30, 40,

50day) 관주하였다.

### 3-2. 생산량 조사

#### 1) 고추식물체의 개화수

80일 간 고추 식물체를 재배하고 식물체의 개화수를 측정하였다. 봉오리 1개당 생산량 1로 표기하였다.

### 3-3. 토양화학성 변화 측정

#### 1) 고추 정식 전, 후 pH, EC, OM, 총 질소 및 유효인산 측정.

고추식물체 토양을 정식 전과 80일 재배 후에 sampling 하여 측정하였다. 전기 전도도 (EC)를 1:5로(토양: 물) 측정 하였다. 수분 함량은 중량법으로, 수분 추정을 사용하여 측정하였다 (표 6).

### 3-4. 토양 미생물 균집 확인

0.5% colloidal chitin이 포함된 CL(Chitin+ LB) (표7)agar배지에 투명한 생성 세균을 계수(그림 53, 54)하고 60℃에 1시간 처리 한 뒤 평판희석법에 의해 CL agar배지에 투명한 생성 세균을 계수(그림 55, 56)하였다. 각 토양10g을 40, 50, 60, 80일에 sampling 하고 멸균수 100ml과 혼합하여 100ul를 CL agar배지에 도말하고 투명한 생성 세균을 계수하였다.

### 3-5. 토양미생물 활력도 조사

#### 1) Chitinase 활성 측정

토양시료에 colloidal chitin 기질을 넣고 37℃에서 2시간 동안 배양했다. 그리고 schales reagent 1ml넣고 420nm에서 흡광도를 측정했다.

#### 2) Dehydrogenase 활성 측정

토양시료에 triphenyltetrazoliumchlorid를 첨가하고 37℃ 24시간 배양하였다. 그리고 485nm에서 흡광도를 측정하여 1, 3, 5 triphenylformazan 생산량을 측정하였다.

## 4. 대규모 비 멸균조건 대량배양 연구

### 4-1. 기질 및 온도 특성을 이용한 미생물 특이적 배양 (2016년도)

#### 1) BB media (Blue, Brown) 대량 생산

본 연구에서는 고온성 미생물 Y1의 특성을 이용하여 Crab shell powder와 Gelatin powder을 사용하여 배양배지를 조성하였다(그림 59). 기존의 미생물 배양배지 (고급배지)보다 가격이 저렴하면서 고성능의 배지를 만들고자 배지조성을 아래와 같이 조성하였고(표 8), 미생물의 몸체를 구성하는 질소원 성분이 함유 된 비료와 에너지원으로 쓰이는 탄소원인 설탕과 인원, 칼륨원, 물 등을 사용하였다.

## 2) BB media 오염여부 실험

본 연구에서는 멸균기(Autoclave)를 사용하지 않고 배양하기 위해 기존의 비멸균배양법의 문제점을 해결하고자 배양액의 오염정도를 확인하였고, 그 결과 수많은 미생물(오염)이 배양액에 존재하였고, 살균력을 가진 여러 살균제 중 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 배양액을 생산하였다(그림 60).

## 3) Field에서의 비 멸균 대량배양

본 연구에서 실험한 결과를 바탕으로 현장(교내 야외실험장, 광주기술센터, 대촌농가)에서 500L비율로 대량배양을 실시하였다. 배양과정은 600L 통에 물을 500L 담은 후 히터와 수중모터를 넣고 히터만 43°C로 설정하여 작동하였다. 다음날 40°C 이상이 된 온도를 확인 후 BB배지와 함께 *Bacillus amyloliquefaciens* Y1균을 접종하고 7~15일 간 배양하여 Streaking과 평판도말법을 이용하여 오염정도와 CFU(Colony Forming Unit)를 조사하였다.

## 4-2. 기질 및 온도 특성을 이용한 미생물 특이적 배양 (2017년도)

### 1) Field에서의 비 멸균 대량배양

본 연구에서 실험한 결과를 바탕으로 교내 야외 실험장에서 대량배양을 실시하였다. 배양과정은 600L/1000L 통에 물을 500L 담은 후 히터와 수중모터를 넣고 온도를 43°C로 설정하여 작동하였다. 다음날 40°C 이상의 온도를 확인 후 BB배지와 함께 *Bacillus amyloliquefaciens* Y1균을 접종하고 7일 간 배양하여 평판도말법을 이용하여 CFU(Colony Forming Unit)를 조사하였다.

## 5. 병해 방제 물질 탐색

### 1) 향균물질 정제 및 동정 (바실로마이신D)

향균 물질 분리 및 동정 고온 기능성 미생물을 최적 배지에서 30°C에서 5일간 배양한 후, 원심분리하여 균체와 배양여액으로 분리하고, 배양 여액을 유기용매에 가하여 물 층과 유기용매 층으로 분획하고 농축하였다. 농축된 Crude향생물질을 Silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column, chromatography, C18 column을 이용하여 chromatography를 거쳐 정제 후 각각 향 곰팡이 활성을 측정하여 향 곰팡이 활성이 강한 분획은 HPLC (LC-10AVP, SHIMADZU corporation, Japan)를 이용하여 단일 물질로 정제 및 농축하여 NMR, LC-MS, GC-MS 등을 이용해 구조 분석을 실시하였다(그림 66). 최종 정제 및 구조분석이 완료된 시료를 이용하여 향 곰팡이 활성을 검정하였다.

### 2) 향균물질 정제 및 동정 {cyclo(D-Pro-L-Val)}

향균 물질 분리 및 동정 고온 기능성 *Bacillus amyloliquefaciens* Y1을 Luria-Bertani(LB) 배지에 접종하고 30°C, 140 rpm으로 10일 간 배양하였다. 배양 후 원심분

리하여 균체와 배양여액으로 분리하고, 배양 여액을 유기용매에 가하여 물 층과 유기용매 층으로 분획하고 농축하였다. 농축된 Crude항생물질을 Silica gel adsorption column chromatography을 이용하여 chromatography를 거쳐 정제 후 각각 항 곰팡이 활성을 측정하여 항 곰팡이 활성이 강한 분획은 HPLC (LC-10AVP, SHIMADZU corporation, Japan)를 이용하여 단일 물질로 정제 및 농축하여 NMR을 이용해 구조 분석을 실시하였다.

### 3) 항균물질 정제 및 동정 {cyclo(L-Pro-D-Tyr)}

항균 물질 분리 및 동정 고온 기능성 *Bacillus amyloliquefaciens* Y1을 Luria-Bertani(LB) 배지에 접종하고 30°C, 140 rpm으로 10일 간 배양하였다. 배양 후 원심분리하여 균체와 배양여액으로 분리하고, 배양 여액을 유기용매에 가하여 물 층과 유기용매 층으로 분획하고 농축하였다. 농축된 Crude항생물질을 Silica gel adsorption column chromatography을 이용하여 chromatography를 거쳐 정제 후 각각 항 곰팡이 활성을 측정하여 항 곰팡이 활성이 강한 분획은 HPLC (LC-10AVP, SHIMADZU corporation, Japan)를 이용하여 단일 물질로 정제 및 농축하여 NMR을 이용해 구조 분석을 실시하였다. *Bacillus amyloliquefaciens* Y1은 다양한 병원성곰팡이에 대하여 강한 항균활성을 보이는 길항균주이다.

## 6. 시제품이용 농가현장에서 고추 생육 실증

### 1) BB media 에서의 대치배양 실험.

본 연구에서는 BB배지를 사용하였기 때문에 기존의 미생물 배양배지{고급배지 ex) TSA, LB }가 아닌 BB배지에서의 항균활성효과를 확인하였다.

### 2) 친환경제재 황토유황 사용실험

본 연구에서는 고추를 친환경으로 재배 할 목적으로 친환경제재인 황토유황을 희석한 아가배지를 만들어 병원성곰팡이를 배양해보았고, 또 상등액과 황토유황을 같이 섞어 아가배지를 만들어 병원성 곰팡이를 배양하였다.

## 7. 현장조사 (생육, 수확량, 토양화학적, 토양활력도, 미생물활력도)

### 1) 현장조사 (2016년도)

본 연구실은 2016.07.15.일에 미생물처리노지고추 생육 중간확인을 위해 고추 이하의 내용을 조사하였으며 과육과 잎을 sampling 하였다.

### 2) 현장조사 (2017년도)

본 연구실은 2017.09.19.일에 미생물처리 노지고추 생육확인을 위해 이하의 내용을 조사하였으며 고추과육과 잎을 sampling 하였다.

- 고추 식물체 생육 조사 (하우스)

본 연구실은 2017.06.20.일에 미생물처리 하우스고추 생육확인을 위해 이하의 내용을 조사하였으며 고추과육과 잎을 sampling 하여 확인하였다 (표 11).

**3) 수확량 조사 (노지)**

노지의 경우 고추를 수확하여 건고추로 판매하기 때문에 수확량을 건고추로 측정하였다. 올해의 경우 육묘장에서 병이 든 모종을 정식하여 실험구 뿐만 아니라 마을 전체적으로 병피해로 인해 많은 수확을 하지 못하였다.

**4) 수확량 조사 (하우스)**

봄 작기의 경우 6월 말~7월 초까지 수확한 상품의 수확량을 기록하였다. 하우스 고추는 봄 작기엔 수확기간이 짧아 (5월말-7월초) 수확량이 적다. 대부분 가을작기에 많이 수확한다.

**5, 6) 토양화학성 변화 측정 (2016-2017년도)**

실험처리구의 작기 전과 작기 후의 토양화학성을 알아보기 위해 아래와 같이 9가지 토양화학성을 확인하였다. 실험구 토양을 랜덤으로 10곳을 떠 건조 후 0.2mm 체로 쳐 고운 흙을 실용화재단에 의뢰하여 분석하였다.

**7, 8) 토양 미생물 균집 확인 (2016-2017년도)**

각 농가의 토양에 일반(30℃), 고온성(60℃), 곰팡이(PDA), 키틴(키틴) 미생물균집도를 작기 시작 전과 시작 후로 조사하였고, 각 미생물 균집도 변화를 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 고온 기능성 미생물 특성 연구.

#### 1-1. 선발된 고온·기능성 미생물 분리 및 동정

1) 고온·기능성 미생물 분리 및 동정

선택한 균은 16S rRNA의 염기서열(그림3)을 바탕으로 한 미생물의 동정 결과 *Bacillus amyloliquefaciens*와 99%이상 일치하여 *Bacillus amyloliquefaciens* Y1(NCBI accession number : KP967704)로 명명하였다(그림 4).



그림 1. 대두박에서 60°C 1시간 열처리 후 생존 미생물.

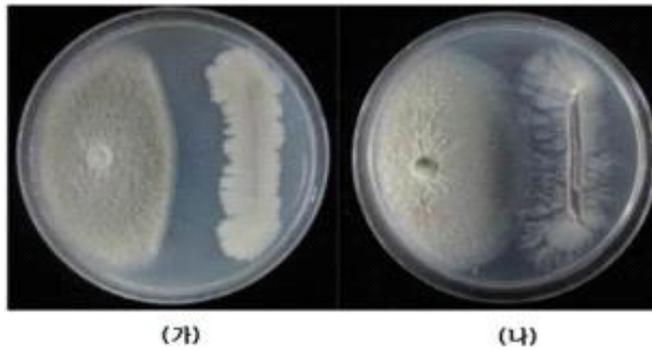


그림 2. 선택 미생물 (가) *B. amyloliquefaciens* Y1 및 (나) 미확인 균주 의 대치배양. 항균활성 확인 ; 병원성곰팡이: *Colletotrichum gloeosporioides*

```

CAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGAT
GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCCGATGGTTCAGACATAAAAAGTGCCCTTCGGCTACCACTTAC
AGATGGACCCCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAGGCGACGATGCGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCGACTCCTACGGGAAGCAGCAGTAAGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAAGGTTTTCCGGATCGTAAA
GCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGGC
GTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAAGCCCCCGCTCAACCGGGAGGGTCAATTG
GAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
GTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGG
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCC
GCCCTTAGTGCTGCAAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAGACTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTT
ACCAGGTCTTGACATCCTTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCTTCCGGGGCAGAGTGACAGGTGG
TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATC
TTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAG
CGAAAACCGGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT
GCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCACCATGCCGCGGGTGGAAATCCGTTCCCGGGGCTTG
TACACACCGCCGTCACACCACGAAGAGTTTGTAAACCCGAAAGTCCGGTGAGGTAAACCTTTTTAGGAG
CCAGCCGCGGAAAGGTGGGACAGATGATTGGGGGTGA
  
```

그림 3. *Bacillus amyloliquefaciens* Y1의 16S rRAN sequence.

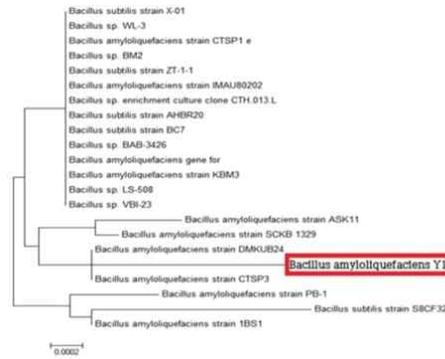


그림 4. Y1 계통도 : 16S rRAN sequence; *Bacillus amyloqueliciens* Y1

○ 상기의 결과는 2016년에 국내 특허 출원과 미생물을 기탁하였다.

1. 발명자; 김길용, 이용성, 전현덕, 출원인 명칭; 전남대학교 산학협력단.

출원년도; 2016년

특허명; 식물병원성 곰팡이에 대한 방제 활성을 갖는 신규 바실러스 아미로리퀴파시엔스 Y1

출원인; 전남대학교 산학협력단

출원국; 대한민국

출원번호; 10-2016-0140583

2. 2016. 8. 4. 생명자원 기탁 : *Bacillus amyloqueliciens* Y1, Korean Collection for Type Cultures, 기탁번호; KCTC13071BP

### 1-2. 분리 된 미생물의 2차 대사산물 생산 활성 조사

Siderophore 생산 측정 결과 대조구 *Paenibacillus elgii*의 경우 균주 주위의 주황색zone의 반경이 좁은 것으로 보아 Siderophore 생산량이 적다는 것을 확인하였다. 따라서, 실험구 Y1의 주황색 zone의 크기가 *Paenibacillus elgii*균주보다 상대적으로 넓은 것으로 보아 Siderophore 생산량이 많다는 것을 확인하였다.

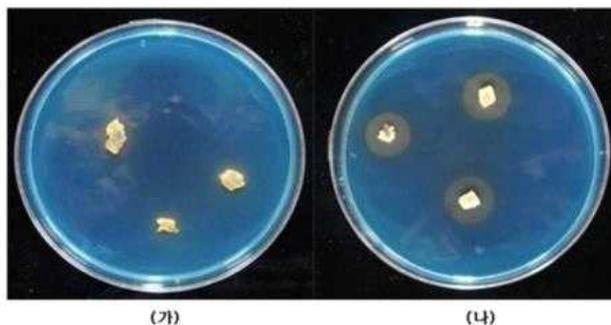


그림 5. CAS blue배지에서의 Sideropore 생산확인. (가) *Paenibacillus elgii* (나) *B. amyloqueliciens* Y1

b) 인 가용화 생산 측정

인 가용화 생산 측정 결과 대조구 *Paenibacillus elgii*와 *pseudomonas*에서는 Clean zone 형성이 적어 인가용화 생산량이 적은 것을 확인하였다, 반대로 실험구 *B.amyloliquefaciens* Y1의 경우 대조구보다 Clean zone 형성이 넓어 인 가용화 생산이 상대적으로 많은 것을 확인할 수 있었다.

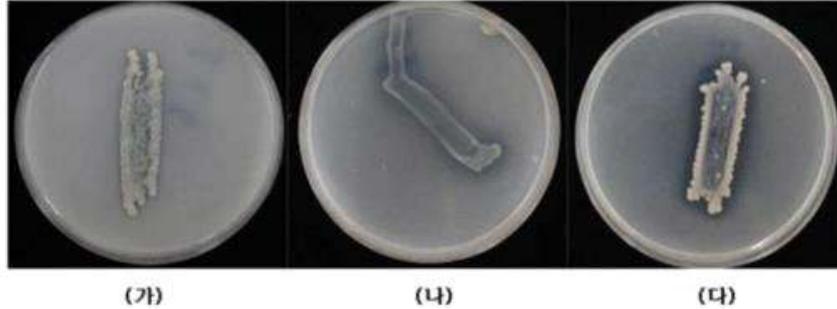


그림 6. Phosphorus solubilization 활성고체배지에서의 인가용화 생산 확인 : (가) *Paenibacillus elgii* (나) *Pseudomonas* (다) *B. amyloliquefaciens* Y1

c) HCN 생산 측정

대조구인 CON, *Paenibacillus elgii*균주와 *pseudomonas*균주, 실험구인 *B. amyloliquefaciens* Y1 중 CON, *Paenibacillus elgii*균주, *B. amyloliquefaciens* Y1균주에서는 여과지의 색변화가 없었으므로 HCN 생산을 하지 않는 것을 확인 할 수 있었다. 대조구인 *pseudomonas*는 여과지의 색이 갈색으로 변색하여 실험구 Y1의 HCN생산을 비교 확인하였다 (그림 7).

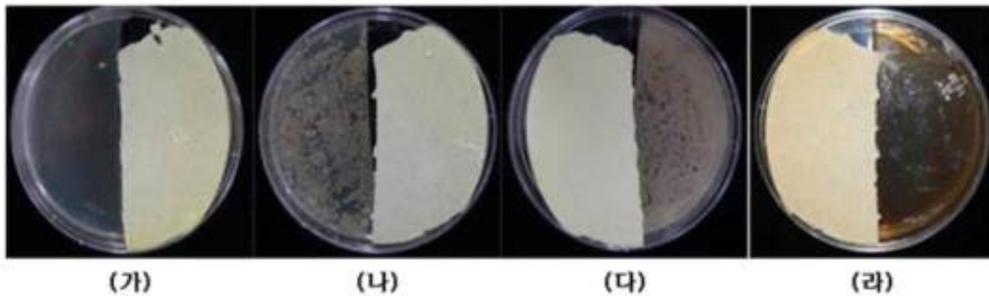


그림 7. HCN 생산 측정 : (가) CON (나) *Paenibacillus elgii* (다) *B. amyloliquefaciens* Y1 (라) *Pseudomonas*

2) 배양액 실험

a) Siderophore 측정

Siderophore units은 Modified Fiss Minimal Medium 배양액과 CAS assay solution을 1:1 비율로 첨가하고, 20분 간 반응 시킨 후 630nm에서 측정하였다. 1일차부터 급격히 증가하고 3일 차부터 감소하여 일정하게 유지되었다.

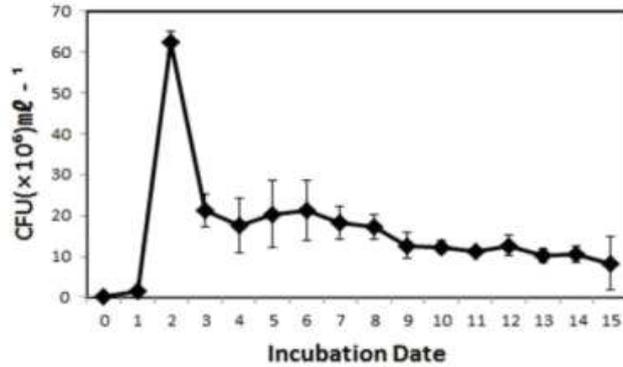


그림 8. Modified Fiss Minimal Medium Cell growth ; *Bacillus amyloliquifaciens* Y1.

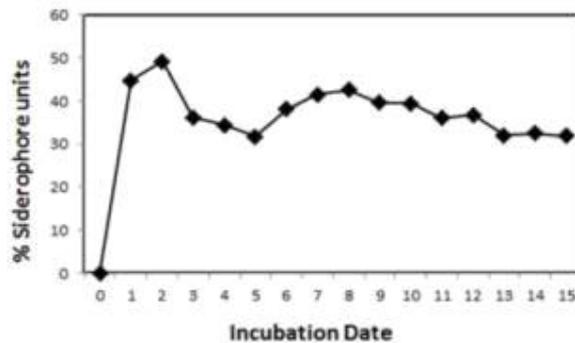


그림 9. *B. amyloliquifaciens* Y1균주의 배양시간에 따른 Siderophore units 생산량 측정.

### 1-3. 병해 방제 효과조사

1) 고온성 *B. amyloliquifaciens* Y1 BB media(표2) 항균활성 측정

a) 병원성곰팡이 대치배양

고온성미생물 Y1균주가 5가지 병원성 곰팡이에 대해 항균활성을 가진다는 것을 확인하였고, 특히 고추 곰팡이병인 *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora capsici*에도 강한 항균활성을 나타내었다.

표 1. 고온성미생물 *B. amyloliquifaciens* Y1와 병원성곰팡이 대치배양 항균활성 억제 거리.

Pathogen	Inhibition length (cm)	Antifungal activity
<i>Rhizoctonia solani</i> KACC 40111	1.6	++
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1.5	++
<i>Botrytis cinerea</i> KACC 40854	2.2	+++
<i>Phytophthora capsici</i> KACC 40483	1.1	++
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40032	0.9	+

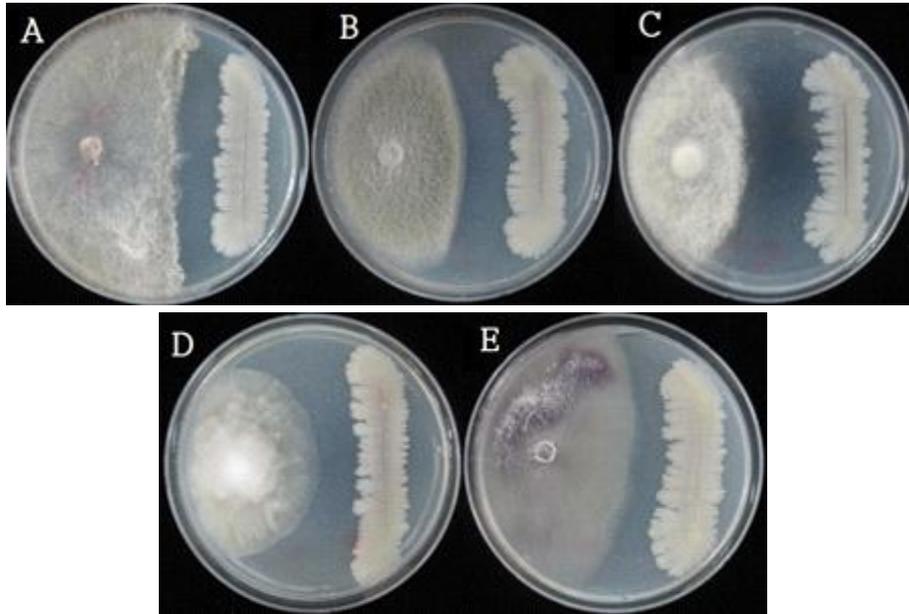


그림 10. 고온성미생물 *B. amyloliquefaciens* Y1과 병원성곰팡이 대치배양. A: *Rhizoctonia solani* B: *Colletotrichum gloeosporioides* C: *Botrytis cinerea* D: *Phytophthora capsici* E: *Fusarium oxysporum*

표 2. BB media

브라운 배지		블루 배지	
요소	-	요소	-
수돗물	1 ml	몽밴드(20-20-20-2)	4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0-52-34)	0.08 g	황산칼륨(K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0.1 g
KCl(0-0-60)	0.02 g	염화칼슘(CaCl <sub>2</sub> )	0.1 g
키틴분말	0.5 g	설탕	4 g
젤라틴	0.025 g	효모	0.1 g
파워키틴	2.66 ml	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	0.246 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	0.246 ml	-	-

표 3. PC (Potato Dextrose broth +colloidal chitin +agar) 1L 기준 조성표.

PC(Potato Dextrose broth +colloidal chitin +agar) 1L 기준 조성표.			
PDA		colloidal chitin media	
PDB	12g	colloidal chitin	100ml
Agar	10g	Yeast extract	0.5g
Distilled water	500ml	Distilled water	400ml
		Agar	10g

b) *B. amyloliquefaciens* Y1 배양액 농도별 항균활성 검정

배양액 농도별 항균활성 실험 결과 본 연구팀에서는 10일 간 배양한 상등액 농도별 항균활성(그림12, 13)은 15일 간 배양한 상등액 농도별 항균활성(그림14, 15)에 비해 항균활성 능력이 낮았으며, 특히 *C. gloeosporioides*균주와 *P. capsici*균주에 항균활성 효과가 현저히 떨어졌다. 또 이 결과로 인해 미생물 배양액의 농도가 희석 되었을 때에 항균활성 능력이 현저히 떨어지는 것을 확인 할 수 있었고, 실제 필드(실험포장)에서 많은 작물들에 항균능력이 있는 적정농도의 미생물배양액을 관주, 엽면시비를 하기 위해선 미생물배양액의 양이 많아야 된다고 사료된다.



그림 11. *B. amyloliquefaciens* Y1 배양 상등액 농도별 항균활성 검정.

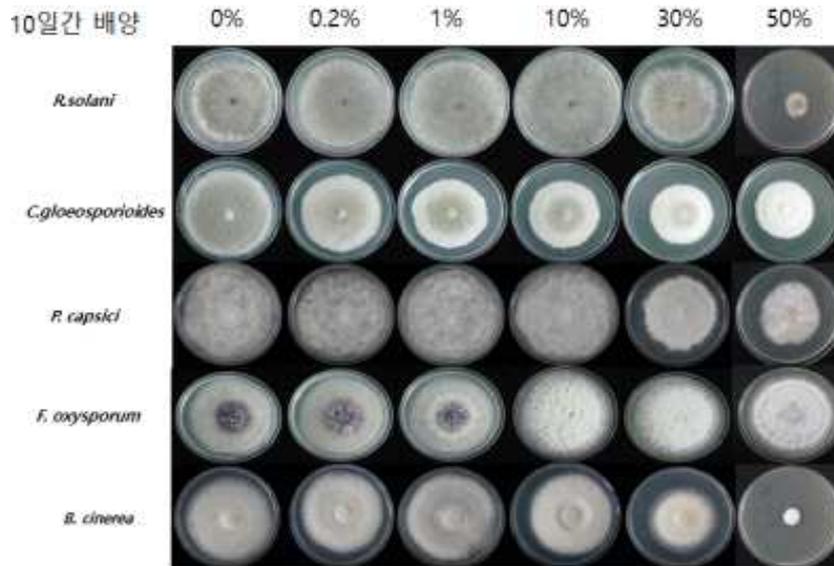


그림 12. *B. amyloliquefaciens* Y1 BBmedia에서 10일 간 배양 상등액 농도별 Agar diffusion assays 항균활성검정.

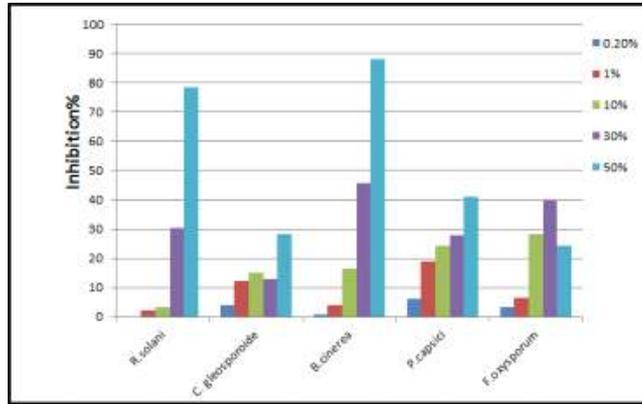


그림 13. *B. amyloliquefaciens* Y1 BB media에서 10일 간 배양 상등액 농도별 Agar diffusion assays 항균활성검정.

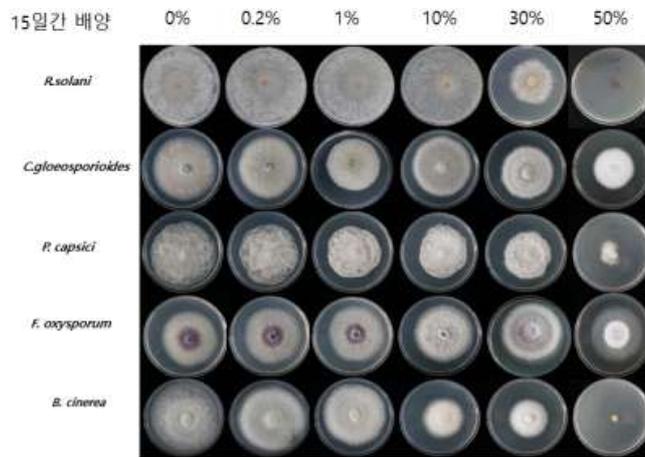


그림 14. *B. amyloliquefaciens* Y1 BB media에서 15일 간 배양 상등액 농도별 Agar diffusion assays 항균활성검정.

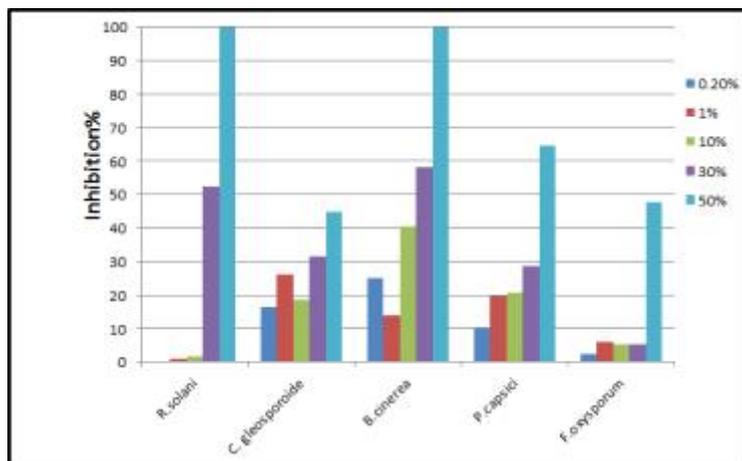


그림 15. *B. amyloliquefaciens* Y1 BB media에서 15일 간 배양 상등액 농도별 Agar diffusion assays 항균활성검정.

c) *B. amyloliquefaciens* Y1 조추출물질의 항균활성 검정

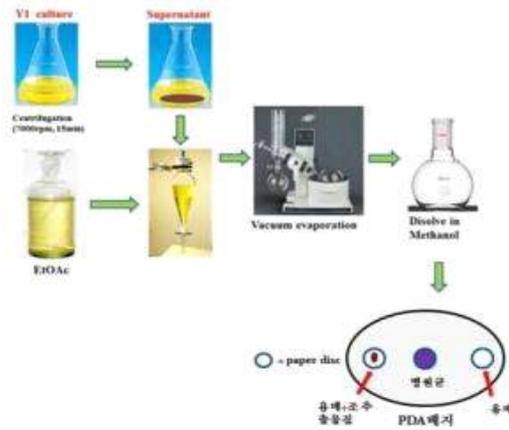


그림 16. *B. amyloliquefaciens* Y1 배양 상등액에 유기용매 농축하여 조 항균활성물질 추출

(1) *Rhizoctonia solani*

4가지 유기용매(Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Butanol)와 Aqua를 이용하여 추출한 조 추출물질 4mg을 paper disk에 분주하고, *Rhizoctonia solani* 곰팡이 균주를 paper disk 가운데 접종(그림 17) 한 결과(그림 18)를 확인하였다.

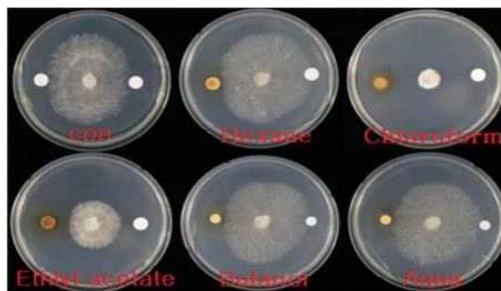


그림 17. 4가지 유기용매(Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Butanol)와 Aqua 조 추출물질이 *Rhizoctonia solani* 곰팡이 균주에 대한 항균활성 확인.

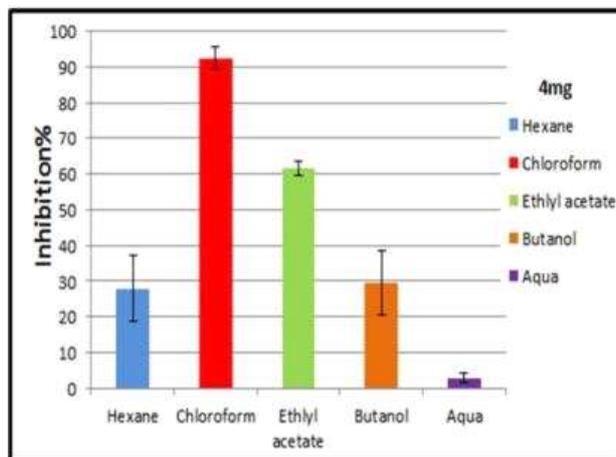


그림 18. 4가지 유기용매(Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Butanol)와 Aqua 조추출물질이 *Rhizoctonia solani* 곰팡이 균주에 대한 항균활성 확인.

2) *Colletotrichum gloeosporioides*

2가지 유기용매(Chloroform, Ethyl acetate)를 이용하여 추출한 조 추출물질 0, 1, 2, 4mg을 paper disk에 분주하고, 병원성 곰팡이 *Colletotrichum gloeosporioides* 균주를 paper disk 가운데 접종(그림 19) 한 뒤 항균활성 결과(그림 20)를 확인하였다.



그림 19. 2가지 유기용매(Chloroform, Ethyl acetate)를 이용하여 추출한 조 추출물질(1, 2, 4mg)이 *Colletotrichum gloeosporioides* 곰팡이균주에 대한 항균활성.

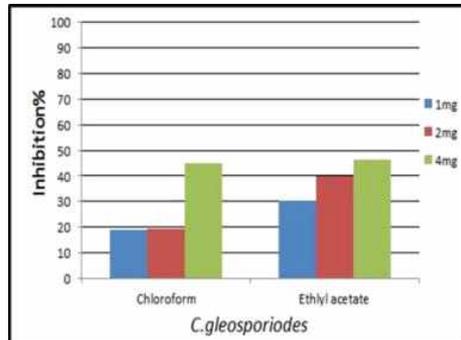


그림 20. 2가지 유기용매(Chloroform, Ethyl acetate)를 이용하여 추출한 조추출물질(1, 2, 4mg)이 *Colletotrichum gloeosporioides* 곰팡이균주에 대한 항균활성 확인.

(3) *Phytophthora capsici*

2가지 유기용매(Chloroform, Ethyl acetate)를 이용하여 추출한 조 추출물질 0, 1, 2, 4mg을 paper disk에 분주하고, 병원성 곰팡이 *Phytophthora capsici* 균주를 paper disk 가운데 접종(그림 21) 한 뒤 항균활성 결과를(그림 22) 확인하였다.

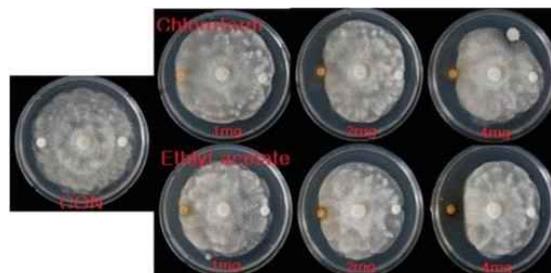


그림 21. 2가지 유기용매(Chloroform, Ethyl acetate)를 이용하여 추출한 조 추출물질 (1, 2, 4mg)이 *Phytophthora capsici* 곰팡이균주에 대한 항균활성.

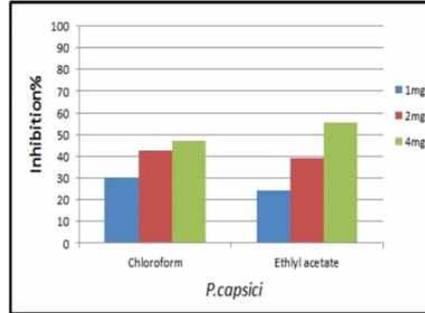


그림 22. 2가지 유기용매(Chloroform, Ethyl acetate)를 이용하여 추출한 조 추출물질(1, 2, 4mg)이 *Phytophthora capsici* 곰팡이균주에 대한 항균활성 확인

2) 고온성미생물(*B. amyloliquefaciens* Y1) LB media 항균활성 측정.

a) *B. amyloliquefaciens* Y1 배양액 농도별 항균활성 검정.

LB 고급배지를 사용한 배양액이 본 연구실에서 개발한 BB배지보다 배양 기간이 짧고 항균활성이 더 강한 것으로 보였으나 배지의 가격이 90배 더 비싸 효과대비 경제적 측면으로 보았을 때 BBmedia가 더 실용적이라고 사료된다 (1협동 결과참고).

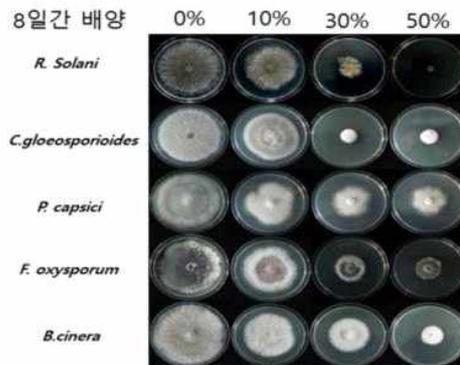


그림 23. *B. amyloliquefaciens* Y1 LBmedia에서 8일 간 배양 상등액 농도별 Agar diffusion assays 항균활성검정

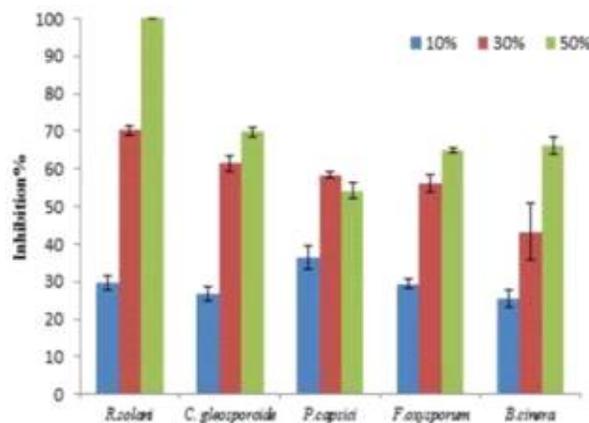


그림 24. *B. amyloliquefaciens* Y1 LBmedia에서 8일 간 배양 상등액 농도별 Agar diffusion assays 항균활성검정.

○ 상기의 결과는 2015년에 국내 비 SCI저널인 한국토양비료학회지에 발표하였다.

3. Qaiser Jamal, Yong Seong Lee, Hyeon Deok Jeon, Yun Suk Park, and Kil Yong Kim. 2015. Isolation and biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 against fungal plant pathogens. 한국토양비료학회지 45, 485-491. 국내 비 SCI저널 (학술진흥재단 등재 학술지).

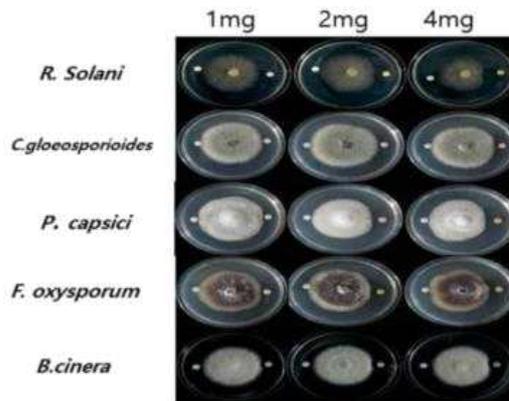


그림 25. 유기용매(Butanol)를 이용하여 추출한 조 추출물질(1, 2, 4mg)이 5가지 곰팡이 균주에 대한 항균활성

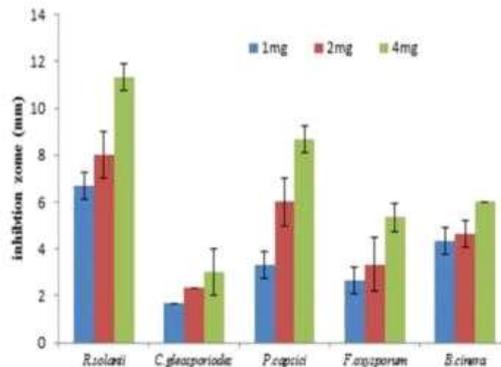


그림 26. 유기용매(Butanol)를 이용하여 추출한 조 추출물질(1, 2, 4mg)이 5가지 곰팡이 균주에 대한 항균활성

### 1-4 배양액 양분 변화 조사

본 연구팀이 토양으로부터 분리한 미생물 (*B. amyloliquefaciens* Y1)의 여러 가지 양분 변화와 효소생성을 조사하였다. 이 미생물은 특정 기질을 사용한 한천배지에 접종 했을 때 Chitinase,  $\beta$ -1,3- Glucanase, Protease 효소를 생산하였고, 그 외 casein분해효소 등을 생산하는 것을 확인하였다.

또 (무기태, 유기태)질소, 유기물함량, 인산, 칼리, 마그네슘, 칼슘 의 변화를 측정하였다. 모든 Y1 배양액은 BB media 1L에 지름 0.8cm의 Y1 콜로니 10개를 접종하고, 140RPM, 40°C, 13일 간 배양하였다.

a) OD 600nm

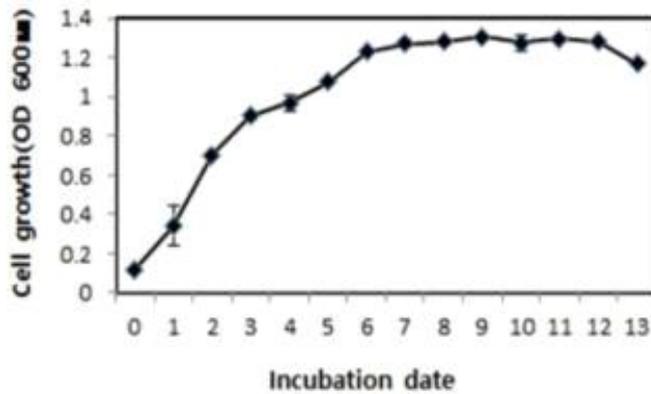


그림 27. 배양일수에 따른 Y1 배양액 Cell growth (OD 600nm) 활성.

Y1 배양액 Cell growth(OD 600nm)곡선 조사 결과 1~2일 사이에 가장 급격히 증가하였고 6일째부터 변화폭이 유지되었다(그림 27).

b) CFU

Y1 배양액 Cell growth (CFU)곡선 조사 결과 3일째에 가장 높았고 급격히 증가하다 4일째부터 서서히 감소하였다(그림 28).

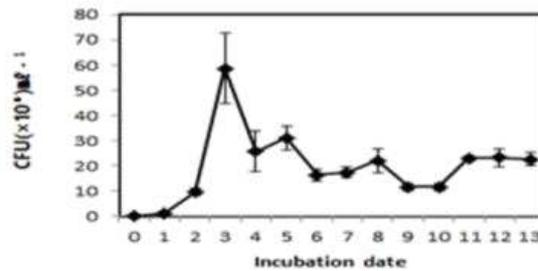


그림 28. 배양일수에 따른 Y1 배양액 Cell growth (CFU) 활성

2) pH

Y1배양액의 pH 측정값은 1일 째에 급격히 증가하고, pH 8.2에서 유지되었다(그림 29).

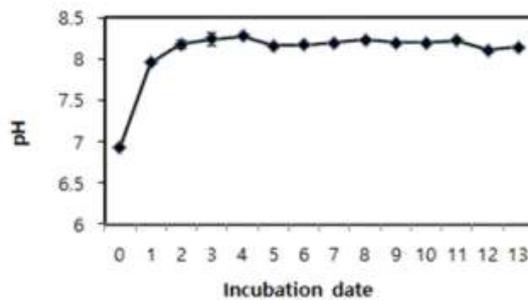


그림 29. 배양일수에 따른 Y1 배양액 pH 변화.

3) EC

Y1 배양액의 EC 측정값은 2~4.5 $\mu$ S/cm 사이에서 큰 변화 없이 유지되었다(그림 30).

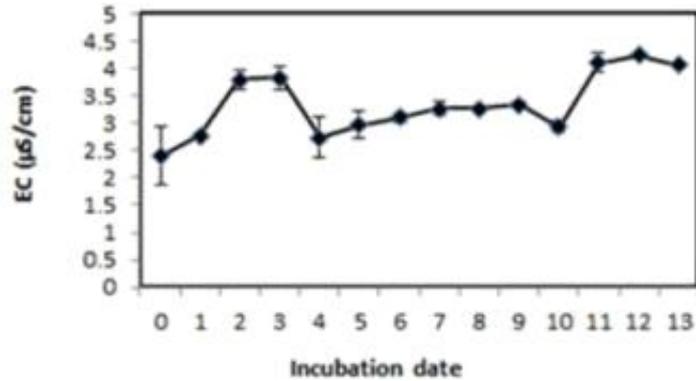


그림 30. 배양일수에 따른 Y1 배양액 EC 변화.

4) Biosurfactant

Y1 배양액의 Biosurfactant값은 1일 째 이후로 급격히 감소하다가 3~4일째 정체기를 갖고 또 한 번 급격히 감소하다 변화폭이 줄어들며 일정하게 유지되었다(그림 31).

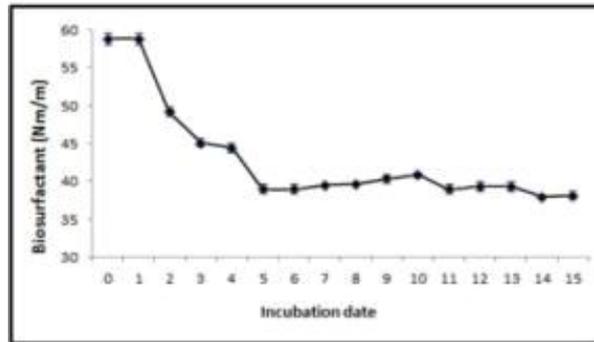


그림 31. 배양일수에 따른 Y1 배양액 Biosurfactant활성 변화

5) Chitinase activity

Y1 배양액의 Chitinase효소를 조사한 결과 효소활성은 3일째 까지 증가하다 4일째 이후부터 감소하고 7일째부터 활성이 유지되었다(그림 32).

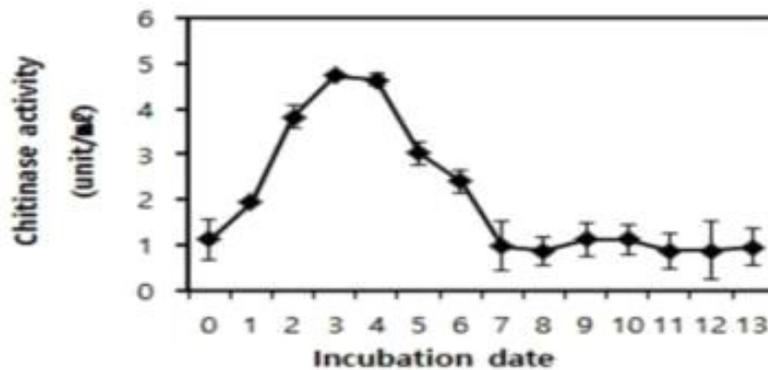


그림 32. 배양일수에 따른 Y1 배양액 Chitinase activity 활성 변화.

6)  $\beta$ -1,3- Glucanase Activity

Y1 배양액의  $\beta$ -1,3- Glucanase activity 변화 측정 결과 1일째 매우 급격히 대폭 증가하다가 2일째 급격히 감소하고 이후로 서서히 감소하였다(그림 33).

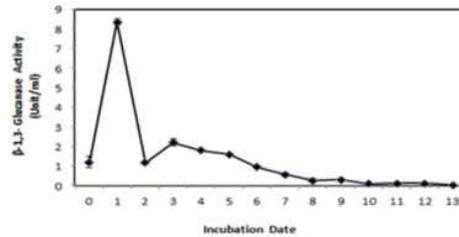


그림 33. 배양일수에 따른 Y1 배양액  $\beta$ -1,3- Glucanase activity 활성 변화.

7) Protease

Y1 배양액의 Protease 변화 측정 결과 5일째에 최고의 활성을 나타내고 점진적으로 감소하다가 9~12일째 까지 한차례 더 증가하다 감소하였다(그림 34).

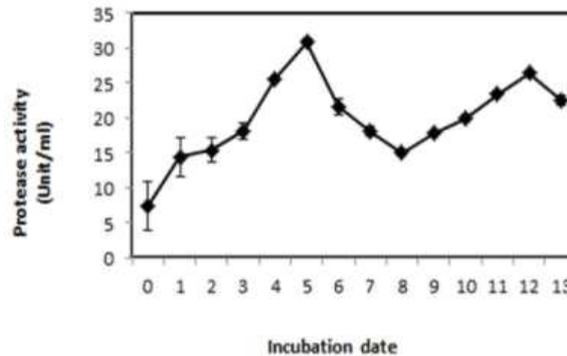


그림 34. 배양일수에 따른 Y1 배양액 Protease 활성 변화.

8) Casein분해효소

Skim milk, Plate count agar(PCA), Trichloroacetic acid(TCA)을 첨가한 agar배지에 3일간 배양한 Y1 culture를 루프로 streaking하고(그림 35a, 35b) 또 다른 방법으로 배양액을 50ul 접종(그림 c)하였고, 30°C 배양기에서 10시간 배양하였다(그림 35). 배지의 clean zone 형성이 짧은 시간 내에 넓게 형성한 것으로 보아 Casein 분해효소를 많이 생성한다는 것을 간접적으로 확인하였다.

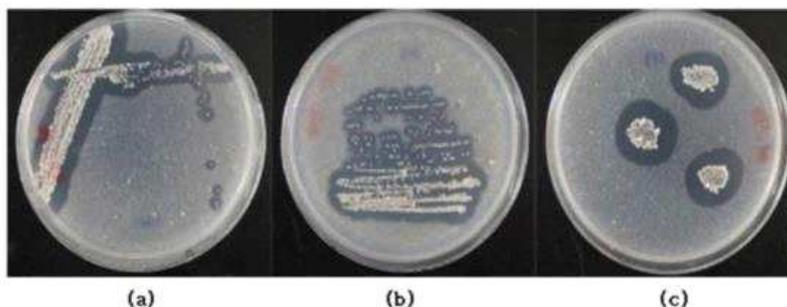


그림 35. Y1배양액의 Casein분해효소 확인.; (a),(b) : Streaking, (c) : Inoculation

9) (무기태, 유기태)질소, 유기물함량, 인산, 칼리, 마그네슘, 칼슘 변화 측정.

a) 전질소 (질산태질소, 암모니아태질소)

무기태, 유기태 질소를 질산태질소와 암모니아태질소를 측정하여 확인하였다(그림 36). 암모니아태 질소는 2일까지 증가하다 유기되었고 질산태질소는 그와 반대로 2일까지 감소하다 유지되었다.

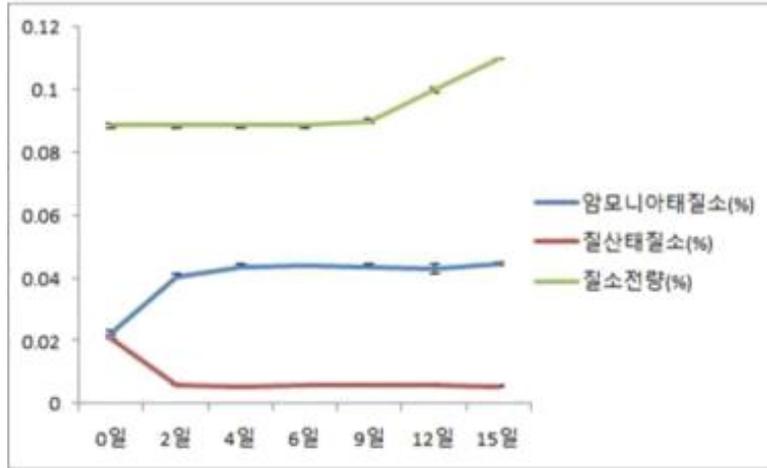


그림 36. 배양 기간에 따른 전질소 (질산태질소, 암모니아태질소) 측정.

b) 인산전량, 가용성인산

인산 전량과 가용성인산을 측정함으로 인해 불용성인산도 확인하였고, 가용성인산이 4일차와 9일차에서 소폭 증가하였다(그림 37).

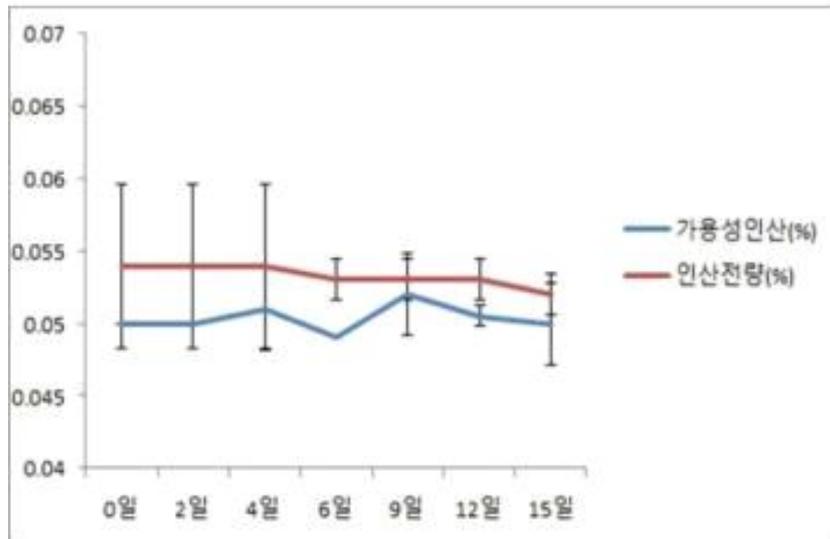


그림 37. 배양 기간에 따른 인산전량, 가용성인산 측정.

c) 고토, 석회, 칼리 전량.

고토와 석회 칼리 전량을 확인하였다(그림38).

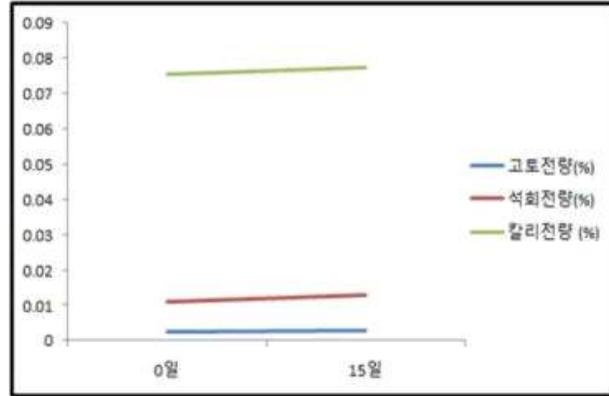


그림 38. 배양 기간에 따른 고토, 석회, 칼리 전량 측정.

d) 유기물 함량.

유기물 함량을 배양일 마다 확인하였다. 유기물은 2일 째 까지 급속히 감소하였고, 2일 째부터 일정하게 유지되었다. 유기물이 줄어들었다는 것을 확인하여 배양액 속의 유기물인 계껍질을 미생물이 분해하였다고 간접적으로 알 수 있다 (그림 39.)

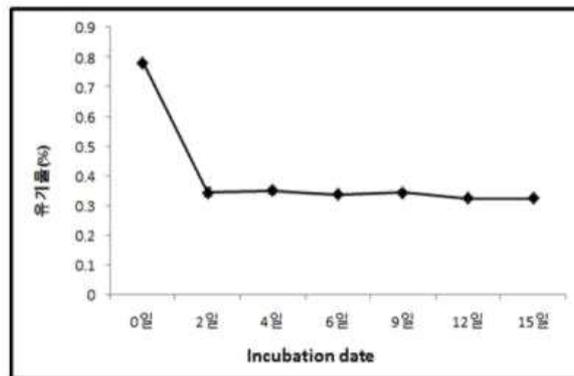


그림 39. 배양 기간에 따른 유기물함량측정.

## 2. 소규모 비 멸균조건 대량배양 연구

### 2-1. 기질 및 온도 특성을 이용한 미생물 특이적 배양.

1)기질 및 온도 특성을 이용한 미생물 특이적 배양.



그림 40. BB media (좌: brown, 우: blue).

표4. BBmedia 조성.(좌: brown, 우: blue).

비료의 종류.	1L기준	비료의 종류.	1L기준
수돗물	1ml	몽밴드 (20-20-20-2)	4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0-52-34)	0.08g	황산칼륨(K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0.1g
KCl(0-0-60)	0.02g	염화칼슘(CaCl <sub>2</sub> )	0.1g
키틴분말	0.5g	설탕	4g
젤라틴	0.025	yeast	0.1g
파워키틴	2.66ml	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	0.246ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	0.246ml		

a) BB 배지의 비멸균 조건 배양 최적 온도 배양 조건 조사.

40°C 에서 1~2일에 점진적으로 증가하다가 3일 째 가장 높은 CFU가 측정되었으며, 50°C 와 60°C 에서는 1~3일 동안 점차적으로 CFU가 감소(그림 41)하였다. 그 결과 Y1의 기본배양조건을 40°C 로 선택하였다.

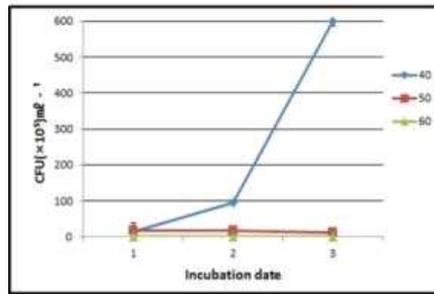


그림 41. 40°C, 50°C, 60°C 온도에서 3일 간 배양 후 Cell growth 측정.

b) 비멸균 배지에 특이적 기질 및 미생물을 접종한 후 오염 없는 최적 배양조건 조사.

cell growth를 확인한 결과, 30°C 에서 배양 한 배양액에 CFU 수가 가장 높았으나 배양 과정 중 오염되는 경우가 있어 관리가 어려운 필드에서 배양 할 경우 항상 오염 될 것으로 간주되어진다. 오염이 일어나지 않으면서 CFU 수가 기준치에 적합한 40°C ~60°C 를 최적온도로 선정하였다. 1시간 열처리 하였을 때 배양기간이 길어질 경우 50°C, 60°C 온도에서는 Y1 균주의 CFU 수가 줄어들었다. 따라서 최적온도는 40°C 로 선정하였다 (그림 42, 43).

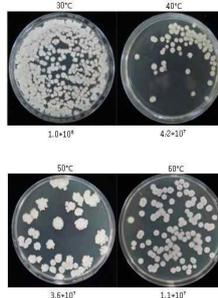


그림 42. *B. amyloliquefaciens* 각 온도별 1h 열처리 후 40°C 3일간 배양 후 도말.

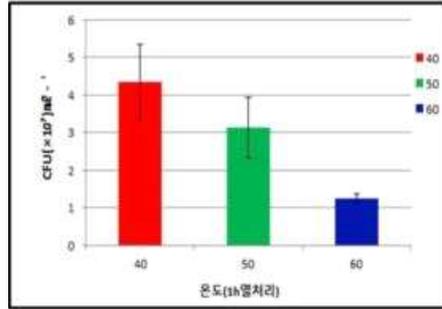


그림 43. *B. amyloliquefaciens* 각 온도별 1h 열처리 후 40°C 3일 간 배양 후 CFU 측정.

c) 비멸균 조건 배양(CFU 접종)

BB media와 증류수 대신 수돗물을 사용하였으며 BB media, 수돗물 모두 Autoclave를 사용하지 않고 배양하였고 Y1균주 외에 오염균은 없었다(그림 44).



그림 44. 비멸균 조건 *B. amyloliquefaciens* Y1 40°C 배양 ( $3.8 \times 10^7$ ).

2-2. 미생물 배지 배양조건하에서 고추 육묘 상태에서 최적 생육 조건 확립.

1) 고온성 미생물을 최적 배양조건에서 배양한 후에 배지 성분(표5) 또는 비료성분량을 조절 (그림45, 46, 47)하여 고추 육묘의 최적 생육조건을 확립.

모든 미생물 처리구에서 결과 값이 높았으며 특히 미생물 2/3 처리구가 가장 높은 결과 값을 나타내었다.

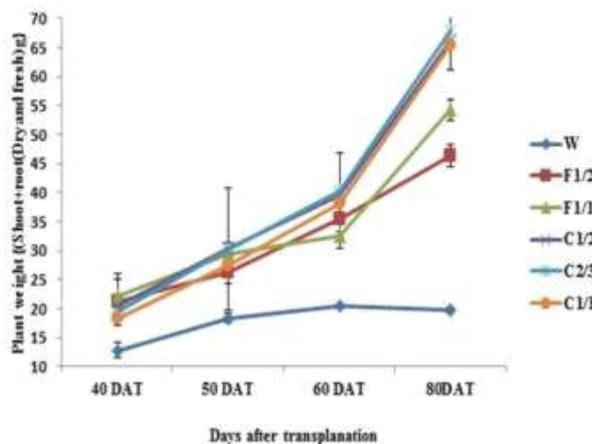


그림 45. 비료성분량 조절 한 고추식물체 지(상,하)부 생체중량, 건조중량

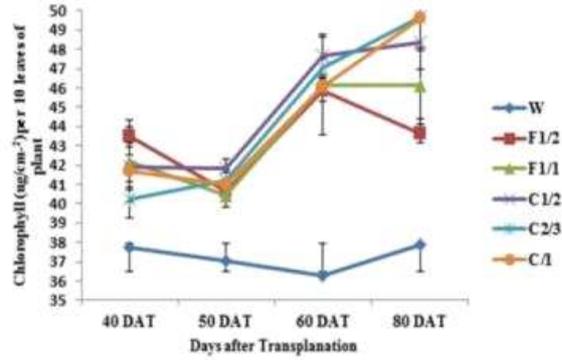


그림 46. 비료성분량 조절한 고추식물체 Chlorophyll

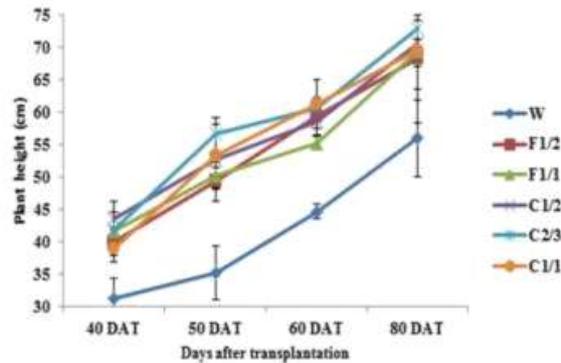


그림 47. 비료성분량 조절한 고추식물체 생초장.

표 5. Treatments 조성 비

비료의 종류.	1L기준	비료의 종류.	1L기준
수돗물	1ml	몽밴드 (20-20-20-2)	4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0-52-34)	0.08g	황산칼륨(K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0.1g
KCl(0-0-60)	0.02g	염화칼슘(CaCl <sub>2</sub> )	0.1g
키틴분말	0.5g	설탕	4g
젤라틴	0.025	yeast	0.1g
과워키틴	2.66ml	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	0.246ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	0.246ml		

W= Water F= Fertilizer C= culture (Fertilizer+B. amyloliquefaciens Y1)

W= Water, F1/2= Fertilizer (25ml), F1/1= Fertilizer (50ml), C1/2= Culture (25ml), C2/3= Culture (33ml), C1/1= Culture (50ml)

### 3. 포트에서 미생물 처리를 통한 작물 특성 조사

#### 3-1. 고추 식물체 생육 조사

1) 포트에 고추씨를 정식하여 40~80일 동안 지상부 생초장, 생체중량, 건조중량 및 지하부

생체 및 건조중량 측정.

a) 지상하부 생초장, 생체중량, 건조중량, Chlorophyll 측정값

미생물배양액 처리구가 비료처리구보다 생초장, 생체중량, 건조중량, Chlorophyll 모든 부분에서 값이 높게 나왔다. 또 고추식물체 전체적인 작황을 고려하였을 때엔 미생물 배양액 1/2나 2/3 처리구가 가장 결과가 좋았으나 수확량(개화수)으로 보았을 때엔 1/1 처리구가 가장 좋았다.

DAT	Treatment	FSW(g)	DSW(g)	FRW (g)	DRW (g)	CC(µg cm-2)	Plant height (cm)
40	W	9.33 ± 1.18	0.99 ± 0.08	3.47 ± 0.05	0.34 ± 0.06	37.0 ± 1.2	31.33 ± 3.21
	F1/2	19.33 ± 1.15	1.70 ± 0.35	1.80 ± 0.2	0.13 ± 0.05	40.63 ± 0.49	40 ± 2
	F1/1	20.6 ± 1.15	3.21 ± 0.14	1.47 ± 0.41	0.14 ± 0.01	40.43 ± 1.70	43.6 ± 0.58
	C1/2	19.33 ± 1.15	1.77 ± 0.25	1.18 ± 0.31	0.12 ± 0.03	41.6 ± 4.37	43 ± 2.65
	C2/3	18 ± 2	1.55 ± 0.3	1.58 ± 0.16	0.14 ± 0.03	41.2 ± 2.72	42 ± 2.65
	C1/1	17.33 ± 2.31	1.62 ± 0.27	1.03 ± 0.43	0.11 ± 0.04	40.96 ± 1.5	39 ± 2.0
50	W	15.33 ± 3.06	1.8 ± 0.03	2.99 ± 0.94	0.34 ± 0.11	37.7 ± 3.13	44.67 ± 1.15
	F1/2	24 ± 1.65	2.42 ± 0.25	2.29 ± 0.32	0.24 ± 0.03	43.47 ± 0.53	49.3 ± 3.06
	F1/1	27.5 ± 1.91	2.57 ± 0.23	1.87 ± 0.32	0.19 ± 0.03	42.2 ± 2.11	50.33 ± 2.08
	C1/2	28 ± 1.63	2.80 ± 0.13	2.3 ± 0.27	0.35 ± 0.04	41.92 ± 1.23	52.67 ± 1.15
	C2/3	28 ± 1.63	2.77 ± 0.27	2.10 ± 0.37	0.21 ± 0.02	40.22 ± 0.94	56.67 ± 2.62
	C1/1	26 ± 2	2.48 ± 0.8	1.52 ± 0.2	0.16 ± 0.03	41.7 ± 0.83	53.33 ± 4.93
60	W	18 ± 2	1.2 ± 0.44	2.37 ± 0.2	0.41 ± 0.0	36.27 ± 1.96	35 ± 5
	F1/2	32.67 ± 4.6	4.01 ± 0.36	2.8 ± 0.39	0.4 ± 0.09	45.83 ± 1.76	59.33 ± 3.06
	F1/1	36.6 ± 6.1	5.34 ± 0.26	2 ± 0.57	0.19 ± 0.04	46.17 ± 1.27	55.33 ± 1.15
	C1/2	36 ± 0.66	4.25 ± 0.06	3.67 ± 0.1	0.48 ± 0.03	47.67 ± 0.28	58.67 ± 1.1
	C2/3	38.6 ± 0.94	4.35 ± 0.26	1.65 ± 0.06	0.23 ± 0.04	47.03 ± 0.53	60.67 ± 0.47
	C1/1	36 ± 1.63	4.05 ± 0.63	2.06 ± 0.34	0.27 ± 0.07	46.07 ± 1.04	61.33 ± 3.7
80	W	15 ± 1.41	1.87 ± 0.02	4.75 ± 0.52	0.34 ± 0.15	37.85 ± 3.32	56 ± 6
	F1/2	38.33 ± 7.23	5.66 ± 0.329	7.98 ± 3.29	0.97 ± 0.18	43.63 ± 0.53	68.33 ± 0.86
	F1/1	46 ± 4	6.76 ± 3.22	8.7 ± 3.22	0.90 ± 0.38	46.16 ± 0.9	69.33 ± 6.68
	C1/2	56.33 ± 3.21	8.47 ± 1.85	9.9 ± 1.85	1.09 ± 0.32	48.36 ± 2.36	70.66 ± 3.51
	C2/3	59 ± 0.81	8.36 ± 1.39	8.9 ± 0.59	0.96 ± 0.13	49.66 ± 1.51	73 ± 2.84
	C1/1	59.33 ± 3.77	8.34 ± 1.02	6.93 ± 1.02	0.86 ± 0.17	49.6 ± 1.08	69.66 ± 1.82

그림 48. 지상하부 생초장, 생체중량, 건조중량, Chlorophyll .

b) 지상하부 생체중량, 건조중량 평균 값.

지상하부 생체중량, 건조중량 평균 값은 미생물 처리구 1/2, 2/3에서 가장 높았다.

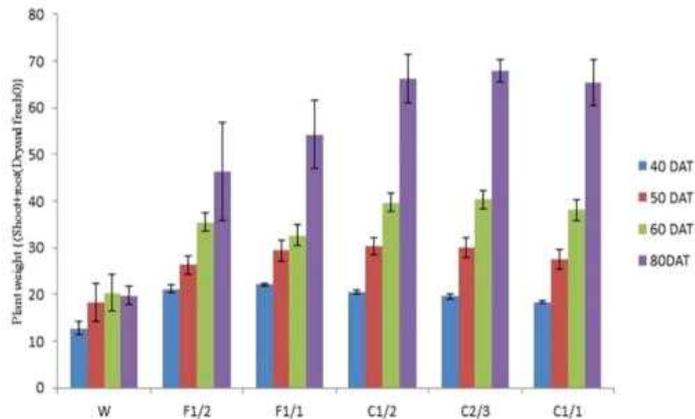


그림 49. 지상하부 생체중량, 건조중량 평균.

c) 40, 50, 60, 80일 Chlorophyll 평균 측정값.

40, 50, 60, 80일 Chlorophyll 평균 측정값은 미생물 처리구 1/2에서 가장 높았고 1/1, 2/3 순으로 값이 높았다.

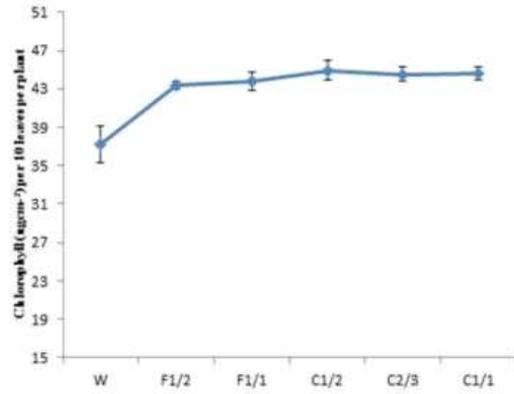


그림 50. 40, 50, 60, 80일 Chlorophyll 평균

### 3-2. 생산량 조사.

#### 1) 고추식물체의 개화수

개화수 결과 미생물 처리구 1/1에서 가장 많이 개화되었다 (그림 51, 52).

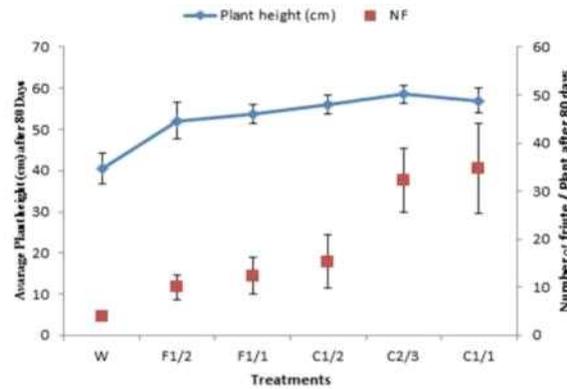


그림 51. 고추식물체 생초장, 개화수

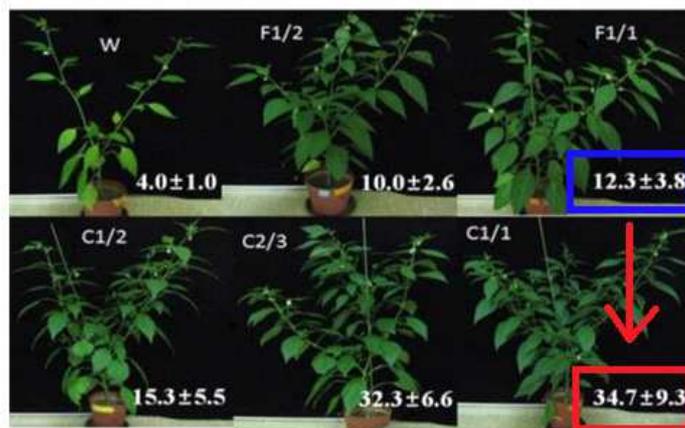


그림 52. 고추식물체 개화수

### 3-3. 토양화학성 변화 측정.

1)고추 정식 전, 후 pH, EC, OM, 총 질소 및 유효인산 측정.

표 6. 추 정식 전, 후 pH, EC, OM, 총 질소 및 유효인산 등 측정.

Sample	pH (1:5)	EC (dS/m)	MC (%)	CEC (Cmol+/Kg)	OM (%)	TN ( mg/kg)	P (mg/kg)	K (Cmol+/kg)	Ca (Cmol+/kg)	Mg (Cmol+/kg)
BT	5.13	0.57	7.28	8.80	0.5	5	424	0.09	6.73	5.05
W	6.20	0.21	29	9.24	1.38	36.53	93.83	0.05	13.54	2.87
F1/2	6.06	0.60	29	9.24	1.30	16.54	125.46	0.04	11.70	2.44
F 1/1	5.98	1.06	21	9.02	1.13	20.15	160.17	0.02	10.06	2.64
C1/2	5.21	1.27	18.5	8.58	1.07	26.92	188.36	0.04	10.26	2.49
C2/3	5.27	1.77	19	8.36	1.02	21.05	177.36	0.04	10.69	2.71
C1/1	5.13	2.27	16	8.8	1.57	43.38	206.92	0.05	9.50	3.34

EC= Electrical Conductivity, MC= Moisture Content, CEC= Cation exchange capacity OM= Organic Matter, TN= Total Nitrogen, BT= Before Transplantation, W= Water, F1/2= Fertilizer (25ml), F1/1= Fertilizer (50ml), C1/2= Culture (25ml), C2/3= Culture (33ml), C1/1= Culture (50ml)

### 3-4. 토양 미생물 군집 확인

미생물 처리구에서 Chitin분해 미생물 수가 많았고, 60°C 에 열 처리구도 비료 처리구에 비해 Chitin분해 미생물 수가 많은 것을 확인하였다.

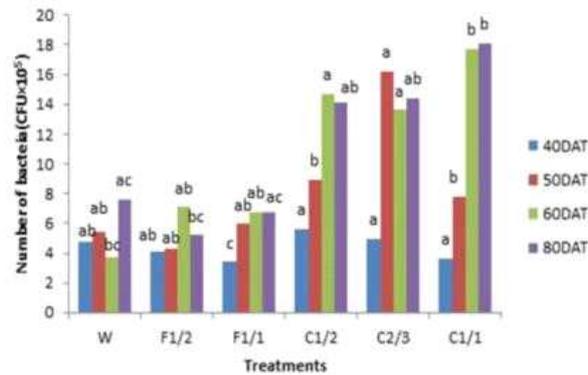


그림 53. CL배지에 도말 투명한 생성 세균 계수.

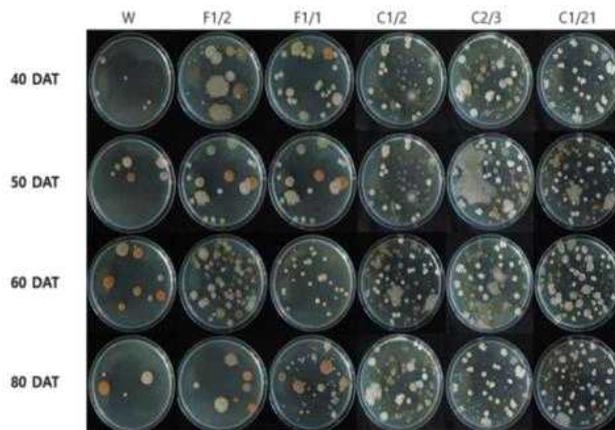


그림 54. CL배지에 도말 투명한 생성 세균.

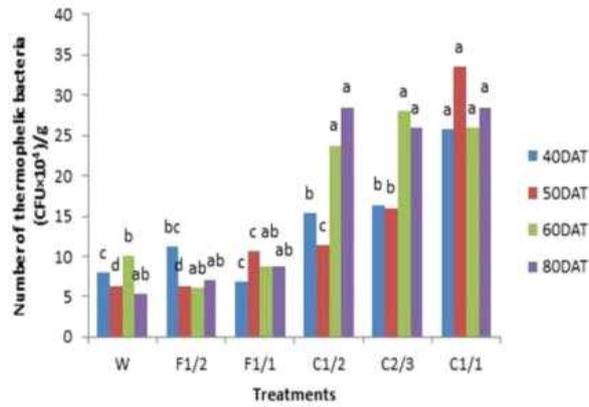


그림 55. 60°C 에 1시간 열처리 후 CL배지에 도말 투명환 생성 세균 계수.

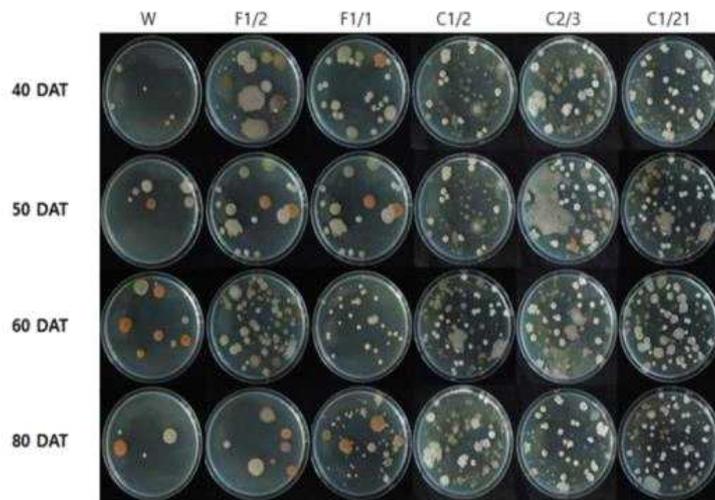


그림 56. 60°C에 1시간 열처리 후 CL배지에 도말 투명환 생성 세균.

표 7. CL(Chitin + LB) agar배지 조성표

CL(Chitin+ LB) agar배지 조성 1L.			
colloidal chitin	100ml	LB	12g
Yeast extract	0.5g	Distilled water	500ml
Distilled water	400ml	Agar	10g
Agar	10g		

### 3-5. 토양미생물 활력도 조사.

#### 1) Chitinase 활성 측정.

토양 속 Chitinase 분해 미생물이 미생물 처리구에서 가장 높게 나타 난 것을 확인하였다(그림 57).

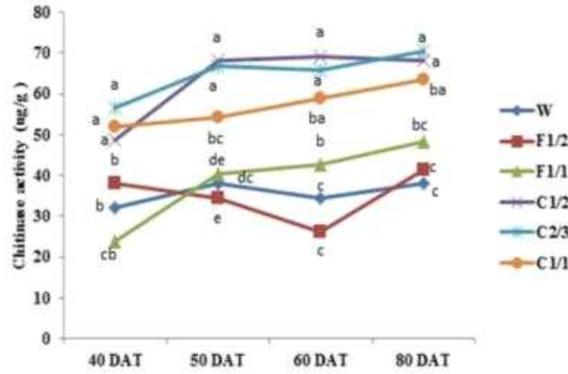


그림 57. 토양 속 Chitinase activity 측정.

2) Dehydrogenase 활성 측정.

Y1균주가 많은 Dehydrogenase를 생산하여 고추식물체가 성장하는데 영향을 미쳤다고 사료된다(그림 58).

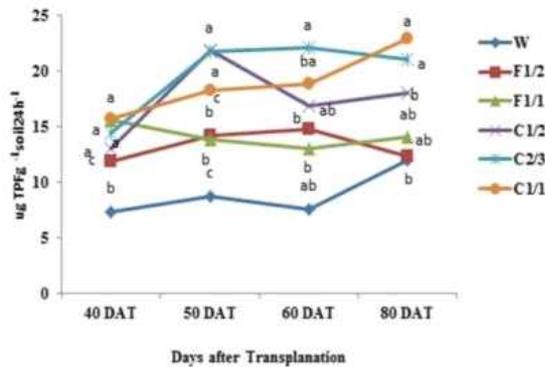


그림 58. 토양 속 Dehydrogenase 측정.

포트실험을 통해 고추 식물체 생육, 생산량 및 토양환경에 대한 조사결과 미생물 처리구 (C1/2, C2/3)에서 가장 양호한 생육과 높은 생산량 등의 결과값을 얻었다. 이는 본래 비료의 양보다 적은 1/2, 2/3 비료량을 이용하여 미생물을 배양한 처리구가 F1/1처리구나 F1/2처리 구에 비해 더 좋은 생육과 생산량을 얻었음을 나타내며, 결과적으로 비료사용량은 절감하면서 식물체의 생육 및 생산량이 증가시키고, 토양환경 또한 개선할 수 있을 것으로 사료된다.

○ 상기의 결과는 SCI논문인 Crop Protection Science 저널에 게재 승인되었고, 2017년 국제 원예학술발표회에 포스터로 발표하였다.

4. Qaiser Jamal, Yong Seong Lee, Hyeon Deok Jeon, and Kil Yong Kim. 2018. Effect of plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 on soil properties, pepper seedling growth, rhizosphere bacterial flora and soil enzymes Crop Protection Sciences, 게재승인, SCI논문
5. 2017, 미국원예학회 학술발표회, 일시 : 2017. 9. 21, 하와이. 전현덕, 이용성, 김길용. Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 on autoclaved and H2O2 treated medium.

#### 4. 대규모 비 멸균조건 대량배양 연구.

##### 4-1. 기질 및 온도 특성을 이용한 미생물 특이적 배양 (2016년도)

1) BB media (Blue, Brown) 대량 생산

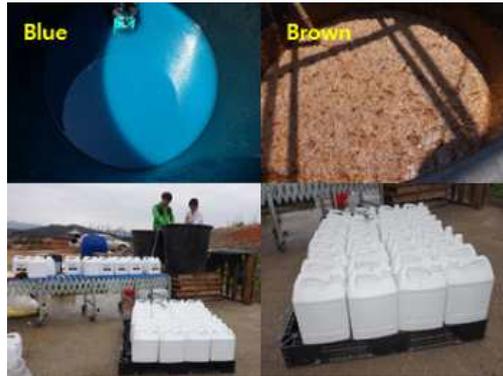


그림 59. BB media(Blue, Brown) 대량 생산현장(왼쪽위: Blue배지, 오른쪽위: Brown배지).

표 8. BB media (Blue, Brown) 조성.

블루 배지	배양액 500L당 (kg)	브라운 배지	배양액 500L당 (kg)
몽벤드 (20-20-20-2)	2	수돗물	0.5L
황산칼륨(K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0.05	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0-52-34)	0.04
염화칼슘(CaCl <sub>2</sub> )	0.05	KCl(0-0-60)	0.01
설탕	2	키틴분말	0.25
효모	0.05	젤라틴	0.0125
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	0.33L	파워키틴	1.33L
-	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	0.33L

2) BB media 오염여부 실험

2%이상의 농도로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하였을 경우 오염이 전혀 일어나지 않는 것을 확인하였다. 또한, 미생물의 배양배지를 제조하는데 이용되는 물은 멸균된 상태이나, 본 연구에서는 멸균되지 않은 수돗물 또는 지하수를 이용하여 제조하는 특징을 갖는다.

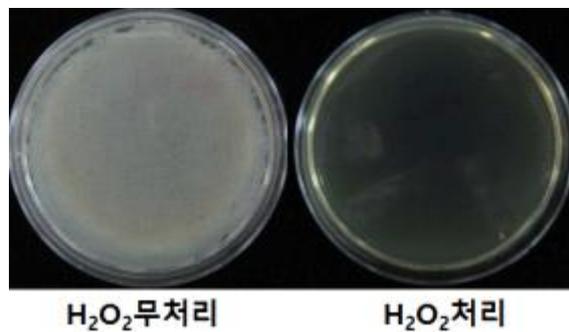


그림 60. BB media (Blue, Brown)에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 오염여부 확인.

### 3) Field에서의 비 멸균 대량배양

본 실험에서는 교내, 광주기술센터, 대촌농가 3곳 모두 환경에 따라 배양도구의 차이가 약간 있었다. 그 결과, 교내에서는 배양이 깨끗이 되었고 CFU는  $4.9 \times 10^5$ 을 확인하였고(그림 61), 농가에서는 약간의 오염이 보였으나 Y1균주의 우점이 확실시하였고, CFU는 교내와 마찬가지로  $10^5$ 을 확인하였다(그림 62). 광주기술센터의 경우 배양기가 15t규모이며 교반의 기능을 갖춘 수중펌프를 대신하여 배양기 속에 큰 프로펠러가 있어 교반이 잘 되어 CFU가  $10^7$ 의 높은 결과가 나타났다(그림 63). 따라서 본 연구자는 배양통을 조금만 보완한다면 현장에서의 비 멸균대량배양이 좀 더 완벽하게 가능할 것으로 생각된다.

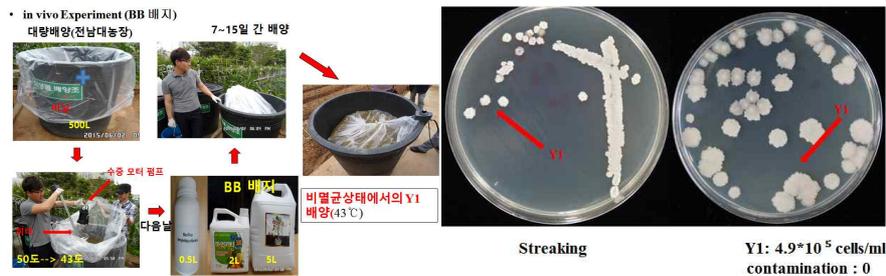


그림 61. Field에서의 500L 비멸균 대량배양 (실험실)



그림 62. Field에서의 500L 비멸균 대량배양 (광주기술센터)



그림 63. Field에서의 500L 비멸균 대량배양 (대촌농가)

## 4-2. 기질 및 온도 특성을 이용한 미생물 특이적 배양 (2017년도)

### 1) Field에서의 비 멸균 대량배양

600L통의 최종 CFU는  $1.0 \times 10^5$ 을 확인하였고(그림 64), 1000L통의 최종 CFU는  $1.5 \times 10^5$ 로 확인되었다(그림 65). 각 통의 부피에 대한 CFU의 차이는 크게 차이 나지 않았으나 600L의 통이 1000L의 통보다 대수기가 빠른 시일에 나타난 것을 확인하였다.

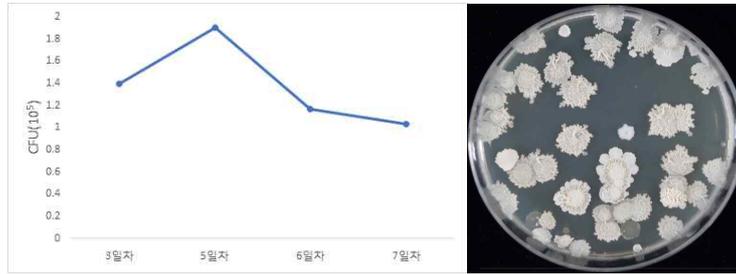


그림 64. 기간에 따른 600L통에서의 배양 된 미생물 CFU 조사

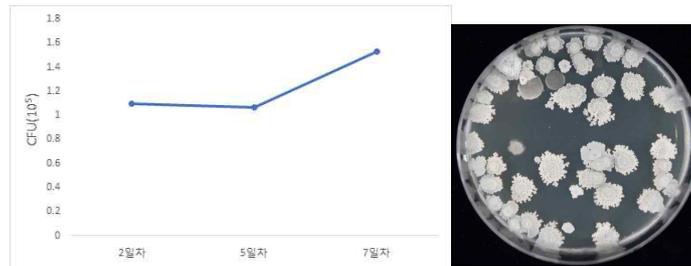


그림 65. 기간에 따른 1000L통에서의 배양 된 미생물 CFU 조사

## 5. 병해 방제 물질 탐색

### 1) 항균물질 정제 및 동정 (바실로마이신D)

*Bacillus amyloliquefaciens* Y1은 다양한 병원성곰팡이에 대하여 강한 항균활성을 보이는 길항균주 이다. 현재 본 연구에서, 항균물질은 Y1배양액으로부터 에틸아세테이트 추출과 크로마토그래피 기술에 의해 순수분리되었다. 조 추출물을 Silica column chromatography에 로딩한 후, 활성은 30% 클로로포름 분획에서 관찰되었고, 물질을 LH-20 컬럼에서 한번 더 분획하였다. SI-1 실리카 컬럼을 통해 분획 한 후, 활성은 80% 클로로포름 분획에서 확인되었다. 마지막 C18컬럼 크로마토그래피에서, 순수분리된 물질은 40% 물 분획에서 발견되었다. 또 C18 역상컬럼을 사용한 HPLC에서 깨끗한 단일피크가 확인되었다.

단일 밴드는 TLC플레이트에서 관찰되었고, *R.solani* AG1 IA에 대해 항균활성을 보였다 (그림 66). LC-MS 분석에서, ESI(역상)스펙트럼의 1029.6[M-H]-에서 pseudomolecular 이온피크와 ESI (정상)스펙트럼의 1031.4 [M+H]+은 순수분리된 항균물질의 분자량이 1030.5라는 것을 가리키는 것이 또한 관찰되었다. 순수분리된 항균물질의 LC-MS분석은 이전에 보고된것과 같은 바실로마이신D의 것들과 일관되었다 (그림 67). 순수분리된 물질의 HR-MS분석은 분자식: C<sub>48</sub>H<sub>74</sub>N<sub>10</sub>O<sub>15</sub>을 산출했다. 순수분리된 물질의 1H- 와 13C-NMR 스펙트럼은 바실로마이신D의 구조를 보여줬다 (그림 68, 69). 이 결과들은 Y1의 에틸아세테이트 추출에서 순수분리된 물질이 문서에 묘사된것과 같은 구조의 바실로마이신D 라는 것을 가리켰다. 그러므로 이 물질은 바실로마이신D라고 판별되었다 (그림 70).

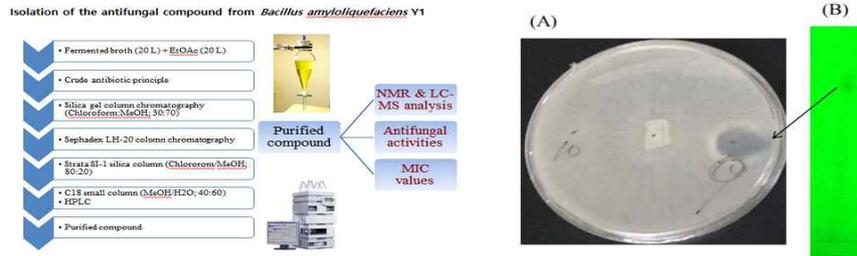


그림 66. *Bacillus amyloliquefaciens* Y1의 물질분리방법 및 배양 상등액으로부터 순수분리된 물질의 병원성곰팡이 억제활성. (A): 순수분리된 물질에 의한 *R. solani* AG-1 IA의 성장 억제 (B): 단일 밴드의 순수분리된 물질의 TLC플레이트

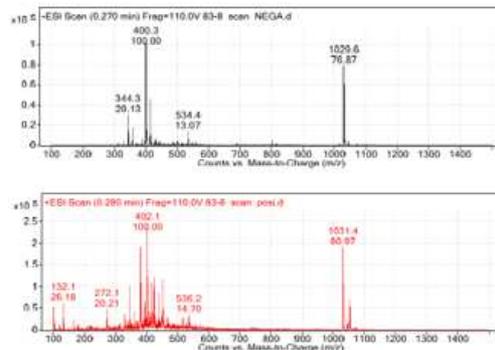


그림 67. 순수분리된 물질의 액체 크로마토그래피 질량 분석(LC-MS)

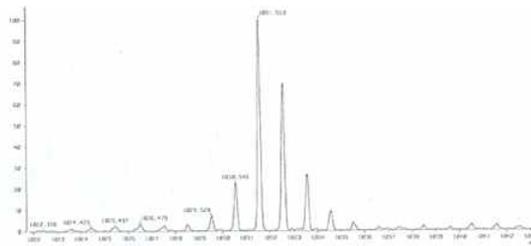


그림 68. 순수분리된 물질의 고화질 질량 분석(HR-MS) 스펙트럼

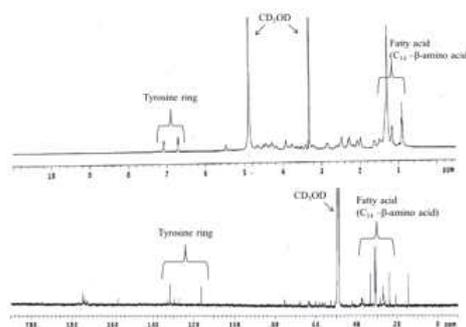


그림 69. 500MHz에 측정된 중수소메탄올( $CD_3OD-d_4$ )에서 순수분리된 물질의 핵자기공명(NMR) 분광  $^1H$  (A) 와  $^{13}C$  (B)의 스펙트럼.



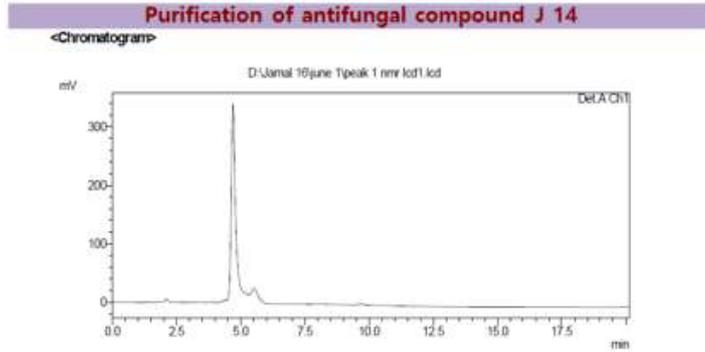


그림 71. High performance liquid chromatography

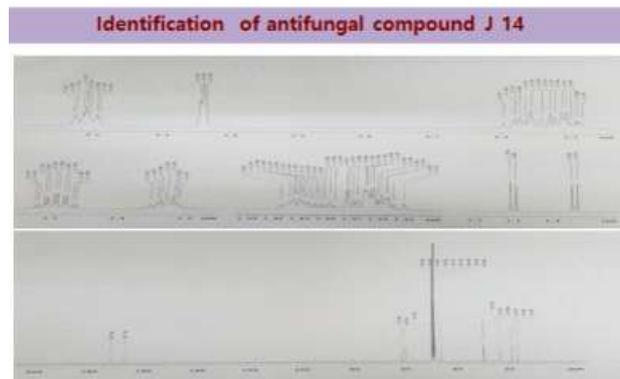


그림 72. <sup>1</sup>H nuclear (A) and C 13 (B) magnetic resonance (NMR) spectra of the purified antifungal compound from *B. amyloliquefaciens* Y1

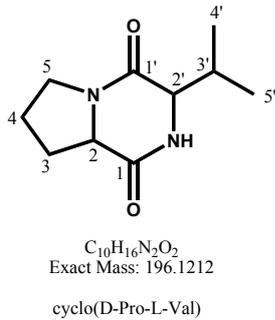


그림 73. Proposed structure of spectrum of the purified antifungal compound from *B. amyloliquefaciens* Y1.

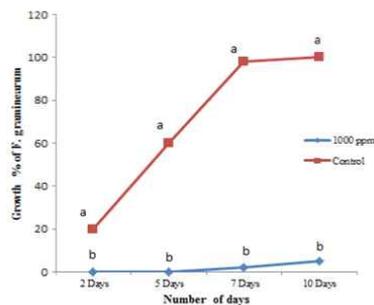


그림 73-1. 식물병원균 *F. graminearum*에 대한 정제물질 cyclo(D-Pro-L-Val)의 항균검정

### 3) 향균물질 정제 및 동정 {cyclo(L-Pro-D-Tyr)}

향균물질은 Y1배양액으로부터 n-부탄올 추출과 크로마토그래피 기술에 의해 순수 분리되었다. 조 추출물을 Silica column chromatography에 로딩한 후, 활성은 90% 클로로포름 분획에서 관찰되었고, 활성분획을 Prep HT C18컬럼(7x300nm, 10 $\mu$ m)을 사용하여 한번 더 분획하였다. 분리 후 HPLC에서 깨끗한 단일피크가 확인되었다(그림74). 각각의 피크는 아세트 니트릴과 물의(35:65) 이동상으로 하여 2ml/min의 유속으로 별도로 수집하여 활성물질의 구조 분석하는데 사용하였다. 정제 된 화합물의 구조는 1H 및 13C 핵 자기 공명 (NMR)을 사용하여 결정하였다(그림 75).

정제된 향진균 화합물 (약12mg)을 0.6mL의 메탄올 -d4(CD3OD)에 용해시킨 다음 스펙트럼 분석을 수행하였다. NMR 스펙트럼은 상온에서 1H 동안 500 MHz 및 13C에서 125 MHz에서 작동하는 DRX 500 NMR 장비(Bruker, Rheinstetten, Germany)에서 기록되었다. 유기 추출 및 상이한 크로마토그래피 기술을 통해, 균주 Y1의 배양액으로부터 12mg의 정제된 향진균 화합물을 정제하였다. 정제된 향진균성 화합물은 4.3 분의 retention time을 갖는 단일 피크를 나타내었다. 최종 정제물질은 cyclo(L-Pro-D-Tyr)로 확인되었다(그림 76).

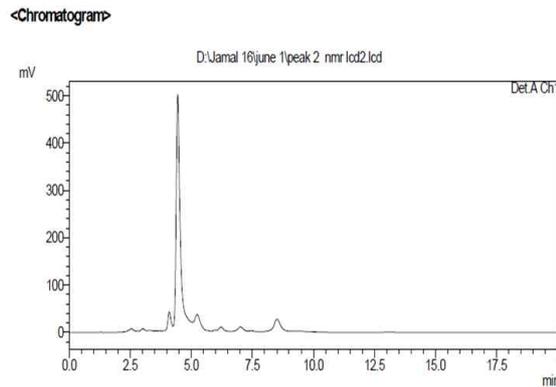


그림 74. Y1균주 부탄올층 조추출물 HPLC 단일피크 확인.

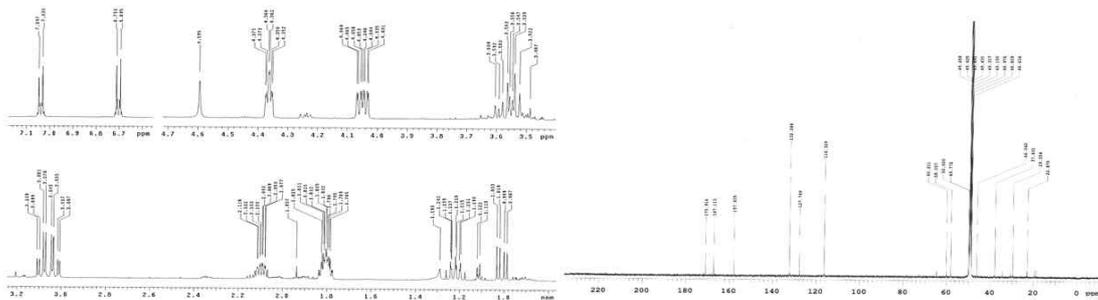


그림 75. 500MHz에 측정된 중수소메탄올(CD<sub>3</sub>OD-d<sub>4</sub>)에서 순수분리된 물질의 핵자기공명(NMR)분광 <sup>1</sup>H (상) 와 <sup>13</sup>C (하)의 스펙트럼.

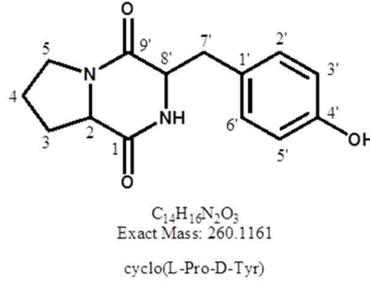


그림 76. cyclo(L-Pro-D-Tyr) 구조

○ 상기의 결과는 비 SCI논문인 Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 저널에 발표.

6. Kaiser Jamal, Jeong-Yong Cho, Jae-Hak Moon, and Kil Yong Kim. 2017. Purification and antifungal characterization of cyclo(D-Pro-L-Val) from *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 against *Fusarium graminearum* to control head blight in wheat. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 10, 141-147. 비 SCI 저널

## 6. 시제품이용 농가현장에서 고추 생육 실증

1) BB media 에서의 대치배양 실험.

BBA배지와 BBPA 모두 *Colletotrichum gloeosporioides* 에 강한 항균활성을 나타내었고 *Phytophthora capsici* 의 경우 C.g 보다는 다소 활성이 약하지만 항균활성을 확인하였다 (그림 77).

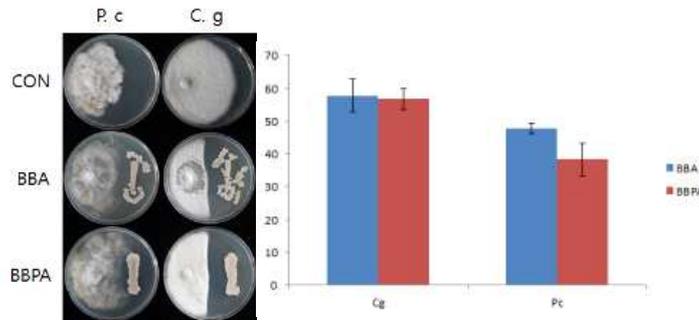


그림 77. BBA, BBPA media 에서의 병원성곰팡이 대치배양

※ BBA: BB배지+ Agar ※ BBPA: BB배지+ PDA+ Agar

※ C.g: *Colletotrichum gloeosporioides* ※ P.c: *Phytophthora capsici*

2) 친환경제재 황토유황 사용실험

황토유황희석배지는 500배 처리 시 *Colletotrichum gloeosporioides* 에 강한 항균활성이 확인되었고, *Phytophthora capsici* 의 경우 2000배에서도 강한 항균활성이 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 78). 또한, 상등액과 황토유황을 혼합한 배지에서는 *Colletotrichum gloeosporioides* 와 *Phytophthora capsici* 에 시비 시 황토유황 1000배 이 상등액 30% 이상으로 작물생육에 따라 시비 시 가장 효과적이다(그림 78).

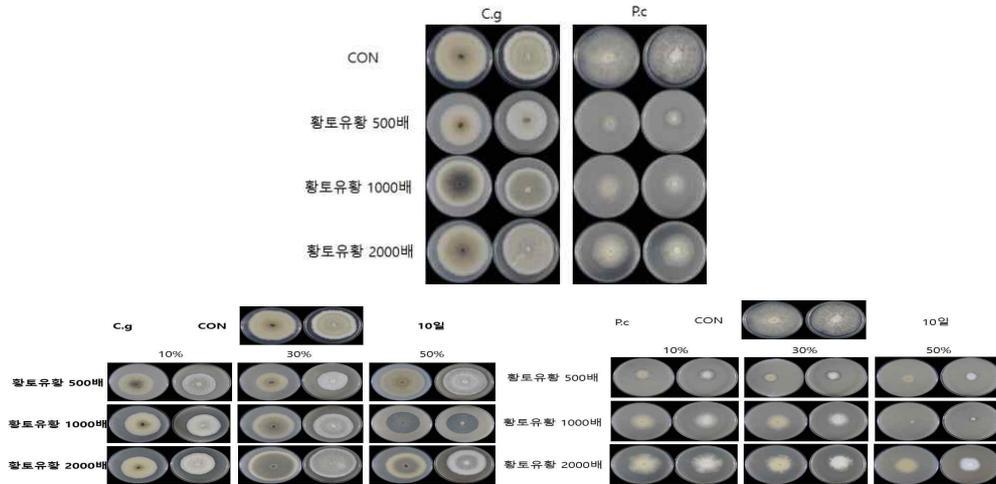


그림 78. 황토유황, 황토유황+상등액 배지에 병원성곰팡이 항균활성 검정.  
 (상단) 황토유황 희석배지, (하단) 좌; 황토유황+상등액+C.g 우; 황토유황+상등액+Pc

## 7. 현장조사 (생육, 수확량, 토양화학성, 토양활력도, 미생물활력도)

### 1) 현장조사 (2016년도)

고추평균무게는 22.8g으로 관행평균보다 높았고, 고추평균길이 또한 13.5cm로 관행의 (대)에 속하였다. 클로로필의 경우  $66.9\mu\text{g}^{-2}$  이며 잎은 9.6cm 지상부 길이는 117.1cm 줄기마디 수는 8.2개로 확인되었다(표 9).

#### a) 고추 식물체 생육 조사 (노지)

표 9. 노지고추 식물체 생육 조사

고추샘플링카운트도표10반복 (강천숙)

No.1	고추무게(g)	고추길이(cm)	고추잎길이(cm)	클로로필	지상부길이(cm)	줄기마디 개수	고추잎10개무 개(g)
평균	28.4	14.2	9.7	65.4	109.9	8.4	6.6
표준편차	7.0	2.3	2.0	7.0	9.2	1.3	1.3

고추샘플링카운트도표10반복 (김남순)

No.1	고추무게(g)	고추길이(cm)	고추잎길이(cm)	클로로필	지상부길이(cm)	줄기마디 개수	고추잎10개무 개(g)
평균	23.4	14.6	10.8	53.9	139.6	8.8	8.2
표준편차	7.5	2.3	2.4	15.1	7.8	1.8	3.5

고추샘플링카운트도표10반복 (김정홍)

No.1	고추무게(g)	고추길이(cm)	고추잎길이(cm)	클로로필	지상부길이(cm)	줄기마디 개수	고추잎10개무 개(g)
평균	22.2	13.5	9.7	70.5	119.7	9.9	10.5
표준편차	7.3	2.1	2.1	5.8	9.6	0.7	4.2

고추생플링카운트도표10반복 (박봉규)

No.1	고추무게(g)	고추길이(cm)	고추잎길이(cm)	클로로필	지상부길이(cm)	줄기마디 개수	고추잎10개무 계(g)
평균	17.7	11.9	8.8	67.7	100.4	6.2	11.4
표준편차	6.9	2.8	1.4	6.8	11.1	1.0	17.9

고추생플링카운트도표10반복 (문옥순)

No.1	고추무게(g)	고추길이(cm)	고추잎길이(cm)	클로로필	지상부길이(cm)	줄기마디 개수	고추잎10개무 계(g)
평균	19.0	14.0	9.1	73.1	113.7	8.6	6.2
표준편차	5.3	2.5	1.6	6.2	9.3	1.4	1.4

고추생플링카운트도표10반복 (형일식)

No.1	고추무게(g)	고추길이(cm)	고추잎길이(cm)	클로로필	지상부길이(cm)	줄기마디 개수	고추잎10개무 계(g)
평균	22.2	11.4	8.8	70.9	133.6	9.6	5.3
표준편차	6.9	2.6	1.6	7.8	9.2	1.6	1.0

고추생플링카운트도표10반복 (이영기)

No.1	고추무게(g)	고추길이(cm)	고추잎길이(cm)	클로로필	지상부길이(cm)	줄기마디 개수	고추잎10개무 계(g)
평균	23.1	13.6	9.5	65.0	110.8	7.9	7.4
표준편차	7.4	2.6	1.9	6.9	14.3	1.4	2.0

고추생플링카운트도표10반복 (최노숙)

No.1	고추무게(g)	고추길이(cm)	고추잎길이(cm)	클로로필	지상부길이(cm)	줄기마디 개수	고추잎10개무 계(g)
평균	23.0	14.0	10.2	67.3	128.6	6.1	7.3
표준편차	10.5	3.2	2.1	5.5	13.3	0.9	2.0

고추생플링카운트도표10반복 (형영애)

No.1	고추무게(g)	고추길이(cm)	고추잎길이(cm)	클로로필	지상부길이(cm)	줄기마디 개수	고추잎10개무 계(g)
평균	26.5	14.3	9.4	68.4	97.5	8.2	7.6
표준편차	6.0	1.7	1.9	8.9	9.0	1.5	1.9

## 2) 현장조사 (2017년도)

고추평균무게는 27.9g으로 관행평균보다 높았고, 고추평균길이 또한 14.5cm로 관행의 (대)에 속하였다. 평균 클로로필의 경우  $65.2\mu\text{g}^{-2}$  이며 잎은 9.9cm 지상부 길이는 109.9cm 줄기마디 수는 8.8개로 확인되었다(표 10).

### a) 고추 식물체 생육 조사 (노지)

표 10. 노지고추 식물체 생육 조사

고추 샘플링 카운트 도표 10 반복 (형영애)							
No.1	고추무게 (g)	고추 길이 (cm)	고추잎 길이 (cm)	클로로필	지상부 길이 (cm)	줄기마디 개수	고추잎 10개 무게 (g)
평균	27.4	14.5	9.9	64.5	109.3	8.9	6.4
표준편차	5.2	2.2	1.6	5.9	4.0	0.7	0.6

고추 샘플링 카운트 도표 10 반복 (강천숙)							
No.2	고추무게 (g)	고추 길이 (cm)	고추잎 길이 (cm)	클로로필	지상부 길이 (cm)	줄기마디 개수	고추잎 10개 무게 (g)
평균	30.1	14.8	10.2	66.0	108.4	9.0	6.5
표준편차	4.4	2.6	1.6	6.9	5.0	0.9	0.9

고추 샘플링 카운트 도표 10 반복 (최노숙)							
No.3	고추무게 (g)	고추 길이 (cm)	고추잎 길이 (cm)	클로로필	지상부 길이 (cm)	줄기마디 개수	고추잎 10개 무게 (g)
평균	26.2	14.3	9.8	65.2	112.2	8.7	6.4
표준편차	5.3	2.0	1.6	5.9	6.0	1.1	0.8

b) 고추 식물체 생육 조사 (하우스)

필드에서의 수확량이 결정되는 조사항목 무게, 길이, 줄기마디 개수 중 청양고추의 경우 무게는 23.7g, 길이 11.7cm, 줄기마디 개수 9.8개로 관행농보다 우수하였다. 피망의 경우 무게 131.7g 길이 11.2cm로 확인되었으며 오이고추의 경우 무게 34.9g 길이 16cm로 확인되었다(표 11).

표 11. 하우스 고추 식물체 생육 조사

고추 샘플링 카운트 도표 10 반복 (노선동-청양)							
No.1	고추무게 (g)	고추 길이 (cm)	고추잎길이 (cm)	클로로필	지상부 길이 (cm)	줄기마디 개수	고추잎 10개 무게 (g)
평균	23.7	11.7	10.5	66.7	119.7	9.8	5.8
표준편차	6.0	2.5	9.8	6.4	4.4	0.8	0.5

고추 샘플링 카운트 도표 10 반복 (손성곤-피망)							
No.1	고추무게 (g)	고추 길이 (cm)	고추잎길이 (cm)	클로로필	지상부 길이 (cm)	줄기마디 개수	고추잎 10개 무게 (g)
평균	131.7	11.2	16.5	69.3	102.9	9.2	16.9
표준편차	15.2	13.3	2.6	8.0	5.8	1.1	0.8

고추 샘플링 카운트 도표 10 반복 (최정호-오이고추)							
No.1	고추무게 (g)	고추 길이 (cm)	고추잎길이 (cm)	클로로필	지상부 길이 (cm)	줄기마디 개수	고추잎 10개 무게 (g)
평균	34.9	16.0	10.4	65.5	168.8	14.4	6.4
표준편차	4.7	3.5	1.1	6.5	8.5	1.5	0.4

3) 수확량 조사 (노지)

심한 곳은 수확을 전혀 하지 못한 곳도 있다 (관행농가). 실험구 농민들은 고추가 많이 달려 병 방제만 제대로 된다면 다수확을 기대 할 수 있을 것 이라고 말하였다. 작년에 비해 적게는 70근 많게는 120근 가량 감소하였다 (표 12).

표 12. 노지재배 건고추 수확량 (400평기준)

광주 건고추 수확량 400평 기준

성명	형영애	강현숙	최노숙
2015년 (GCM)	700근 420kg	550근 330kg	80근 48kg
2016년 (고운성미생물)	770근 462kg	570근 342kg	220근 132kg
2017년 (고운성미생물)	500근 300kg	490근 294kg	100근 60kg

4) 수확량 조사 (하우스)

하우스미생물처리재배 봄작기 고추 수확량 결과 관행재배(4000kg)보다 많이 수확한 것을 확인할 수 있었다 (표 13). 오이고추의 경우 8000~8300kg, 피망의 경우 4000~5000kg, 청양고추의 경우 5500~6200kg를 수확하였으며 필드에서 가장 재배가 잘 되었다고 생각한 노선동 농가에서 청양고추 6200kg를 수확하여 가장 많은 수확량을 확인하였다. 또한 2015년도부터 꾸준히 청양고추를 정식한 노선동 농가와 이종희 농가 그리고 피망을 3년째 정식한 반길환 농가에서 꾸준히 토양의 상태와 작물상태 및 수확량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(표 11, 표 13, 표 14, 표 15).

표 13. 하우스재배 봄작기 고추 수확량 (400평기준)

설명	대촌 고추 수확량						
	노양근	노선동	반길환	손성근	이종희	최정호	최정호
2015년 봄작기 (GCM)	청양 5000kg	청양 5400kg	피망 4000kg	청양 4800kg	청양 5000kg	청양 2100kg	청양 2000kg
2016년 봄작기 (고온성미생물)	청양 5500kg	청양 6360kg	피망 5050kg	청양 6800kg	청양 5000kg 가지 2300kg	파리고추 3690kg	파리고추 3000kg
2017년 봄작기 (고온성미생물)	오이고추 8000kg	청양 6200kg	피망 4000kg	피망 5000kg	청양 5800kg	청양 5500kg	오이고추 8300kg

5) 토양화학성 변화 측정 (2016년도)

노지의 경우 작기가 끝나고 pH 수치가 올라간 것을 확인할 수 있었고, Y1균의 경우 배양액 변화 실험결과 균이 배양될수록 산도가 올라갔다. 그 외의 토양화학성은 전체적으로 대부분 감소하였다. 하우스 또한 pH는 증가하였고, 나머지 토양화학성의 경우 큰 변화는 없었다(표 14).

표 14. 노지, 하우스 토양화학성 변화 조사

작기 전 (노지)

경작자	작물	년생	면적 (m <sup>2</sup> )	산도 (pH)	유기물 (%)	유효인산 (mg/kg)	치 환 성(Cmol+/kg)			CEC (Cmol+/kg)	유효규산 (mg/kg)	EC (dS/m)	질산태질소 (mg/kg)
							칼리	칼슘	마그네슘				
형영애				5.18	5.86	688.83	0.47	17.34	4.60	15.84	564.93	9.13	174.45
강천숙				5.87	3.09	604.70	1.00	15.37	3.91	13.48	485.44	8.29	64.46
최노숙				5.83	3.09	730.76	0.98	21.17	3.02	14.42	795.62	5.03	241.90

작기 후 (노지)

경작자	작물	년생	면적 (m <sup>2</sup> )	산도 (pH)	유기물 (%)	유효인산 (mg/kg)	치 환 성(Cmol+/kg)			CEC (Cmol+/kg)	유효규산 (mg/kg)	EC (dS/m)	질산태질소 (mg/kg)
							칼리	칼슘	마그네슘				
형영애				6.08	4.13	529.57	0.97	19.94	3.74	13.27	594.66	14.61	196.51
강천숙				6.54	5.83	670.38	0.68	12.15	2.49	17.60	730.50	0.71	0.00
최노숙				6.20	2.72	703.04	0.86	19.84	3.53	15.28	585.00	10.03	141.41

작기 전 (하우스)

경작자	작물	년생	면적 (m <sup>2</sup> )	산도 (pH)	유기물 (%)	유효인산 (mg/kg)	치 환 성(Cmol+/kg)			CEC (Cmol+/kg)	유효규산 (mg/kg)	EC (dS/m)	질산태질소 (mg/kg)
							칼리	칼슘	마그네슘				
노선동				5.5	5.9	764.2	1.2	26.9	4.4	12.8	939.9	13.1	358.7
손성근				5.8	2.3	389.9	0.8	7.6	2.6	11.1	333.3	5.1	103.4
최정호				6.0	2.6	580.9	0.8	19.5	3.7	15.6	1114.6	11.3	401.2

작기 후 (하우스)

경작자	작물	년생	면적 (m <sup>2</sup> )	산도 (pH)	유기물 (%)	유효인산 (mg/kg)	치 환 성(Cmol+/kg)			CEC (Cmol+/kg)	유효규산 (mg/kg)	EC (dS/m)	질산태질소 (mg/kg)
							칼리	칼슘	마그네슘				
노선동				6.3	5.0	600.0	0.8	16.0	3.1	15.4	662.6	7.7	98.3
손성근				6.0	3.7	589.1	1.2	15.9	4.0	13.3	530.7	25.1	256.3
최정호				6.1	2.7	674.4	1.1	17.6	4.8	15.9	771.4	4.8	29.2

6) 토양화학성 변화 측정 (2017년도)

노지의 경우 작기가 끝나고 강천숙, 최노숙, 손성곤, 최정호 농가의 pH 수치가 올라간 것을 확인 할 수 있었고, 이는 균이 배양될수록 pH가 중성 또는 염기성으로 변화하는 성질이 있기 때문에 pH가 올라간 것으로 추측한다. 또한 유기물의 함량은 증가하였고, 현장에서 직접 관찰 결과 토양이 딱딱하지 않고 부슬부슬한 것을 확인 할 수 있었다. 하우스의 경우 질산태 질소가 작기 전보다 작기 후 증가한 것을 확인 할 수 있었으며, 그 외의 토양화학성은 전체적으로 유의하지 않았다(표 15).

표 15. 노지, 하우스 토양화학성 변화 조사

작기 전 (노지)

경작자	작물	년생	면적 (m <sup>2</sup> )	산도 (1:5 )	유기물 (%)	유효인산 (mg/kg)	칼리	치 환 성 (Cmol+/kg)	칼슘	마그네슘	CEC (Cmol+/kg)	유효규산 (mg/kg)	EC (dS/m)	질산태질소 (mg/kg)
형영애				6.45	8	175	0.72	5.7	2.9	16.7			10.3	45.5
강천숙				5	8	318	0.57	3.3	2.1	19			9.3	73.4
최노숙				6.59	17	271	0.32	8	3.1	16.8			5.53	35.4

작기 후 (노지)

경작자	작물	년생	면적 (m <sup>2</sup> )	산도 (1:5 )	유기물 (%)	유효인산 (mg/kg)	칼리	치 환 성 (Cmol+/kg)	칼슘	마그네슘	CEC (Cmol+/kg)	유효규산 (mg/kg)	EC (dS/m)	질산태질소 (mg/kg)
형영애				6.3	11	54.3	0.46	5.17	1.7				0.5	
강천숙				7.0	27.0	391.7	1.2	8.0	2.8				0.9	
최노숙				7.3	45.7	1833.0	3.0	13.2	5.8				4.2	

작기 전 (하우스)

경작자	작물	년생	면적 (m <sup>2</sup> )	산도 (1:5 )	유기물 (%)	유효인산 (mg/kg)	칼리	치 환 성 (Cmol+/kg)	칼슘	마그네슘	CEC (Cmol+/kg)	유효규산 (mg/kg)	EC (dS/m)	질산태질소 (mg/kg)
노선동				5.97	28	2078	1.8	9.8	4.1	19.3			10.31	365.7
손성곤				5.95	39	2610	3.11	21.3	6.6	20.7			3.76	577
최정호				6.25	28	1265	0.47	5.6	2.1	23.1			3.73	51.2

작기 후 (하우스)

경작자	작물	년생	면적 (m <sup>2</sup> )	산도 (1:5 )	유기물 (%)	유효인산 (mg/kg)	칼리	치 환 성 (Cmol+/kg)	칼슘	마그네슘	CEC (Cmol+/kg)	유효규산 (mg/kg)	EC (dS/m)	질산태질소 (mg/kg)
노선동				5.84	30	2619	4.1	13	4.1	28.4			30.1	525.5
손성곤				6.07	33	2579	2.94	19.1	5.7	20.8			1.87	562.8
최정호				6.4	29	5979	5.36	22.5	16	22.7			6.05	600.4

7) 토양 미생물 균집 확인 (2016년도)

전체적으로 작기가 끝난 후 토양에는 작기 전보다 미생물 수가 증가하였다 (그림 79).

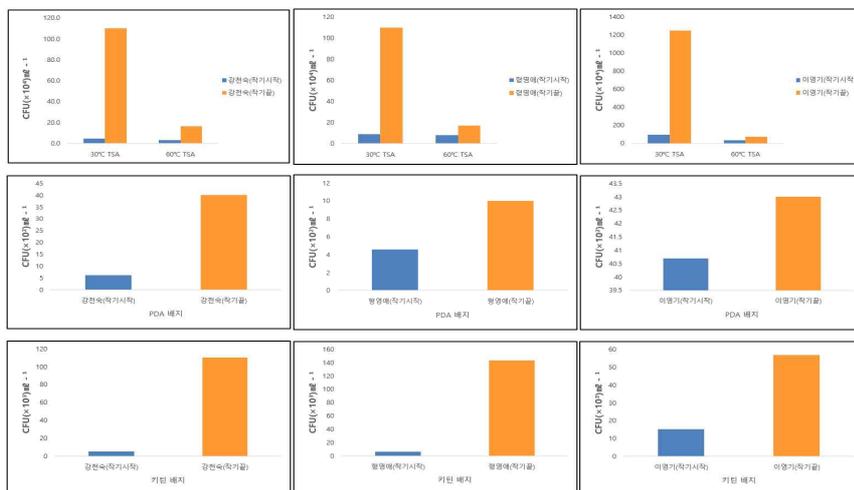


그림 79. 토양 미생물 균집변화

8) 토양 미생물 군집 확인 (2017년도)

광주농가의 경우 60°C TSA처리구, Chitin처리구의 최노숙 농가와 PDA의 형영애 농가를 제외한 모든 곳에서 작기 후에 미생물 계체수가 더 많이 나타났다(그림80). 대촌농가의 경우 60°C TSA처리구, Chitin처리구의 최정호 농가와 PDA의 노선동 농가를 제외한 모든 곳에서 작기 후에 미생물 계체수가 더 많이 나타났다(그림81). 필드의 특성상 데이터의 표준오차값이 높긴 하지만 현장에서 느낀 것은 Chitin 분해 미생물의 CFU가 높은 농가가 병원성곰팡이 피해가 적었으며 전체적으로 고추농사가 잘 되었다 (표 13). 노지의 경우 강천숙 32.3\*10<sup>4</sup>, 형영애 23\*10<sup>4</sup>, 최노숙 1.3\*10<sup>4</sup> 순으로 높았으며, 하우스의 경우 노선동 45.6\*10<sup>4</sup>, 손성근 37.6\*10<sup>4</sup>, 최정호 6.2\*10<sup>4</sup> 순으로 확인되었다.

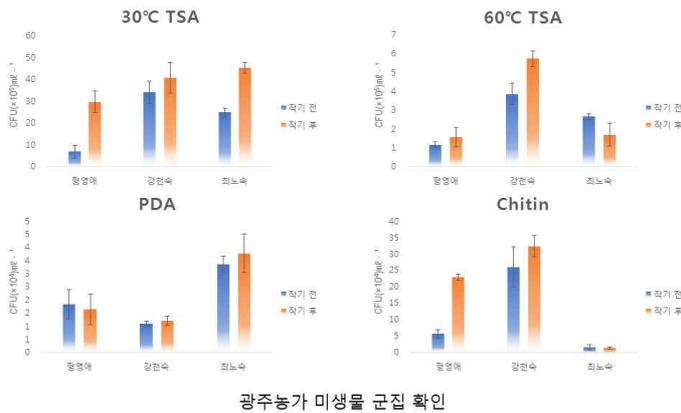


그림 80. 토양 미생물 군집변화 (노지)

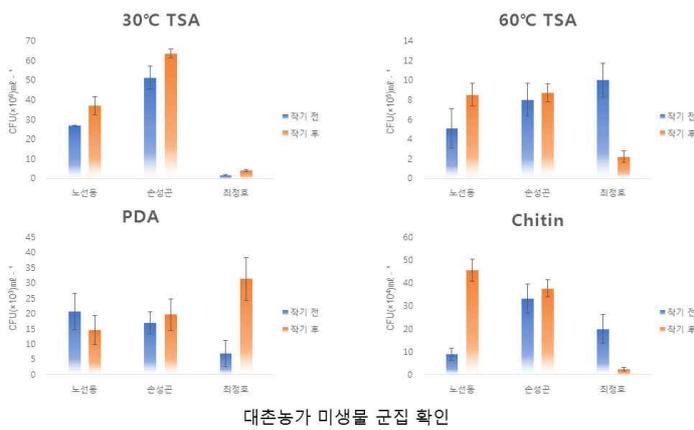


그림 81. 토양 미생물 군집변화 (하우스)

9) 토양미생물 활력도 조사 (2016)

a) Dehydrogenase

실험구 포장지의 토양미생물 활력도를 조사하기 위해 Dehydrogenase를 측정하였다 (그림 82). Dehydrogenase은 강천숙 농가에서 49.4 unite/g로 가장 높게 나타났다.

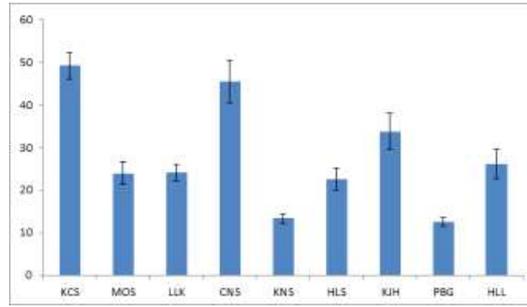


그림 82. 토양 활력도 Dehydrogenase

※ KCS-강천숙 MOS-문옥순 LLK-이영기 CNS-최노숙 KNS-김남순 HLS-현일식 KJH-김정홍 PBG-박봉규 HLL-형영애

10) 토양미생물 활력도 조사 (2017)

실험구 포장지의 토양미생물 활력도를 조사하기 위해 Dehydrogenase와 Chitinase를 측정하였다. 노지와 하우스 처리구 모두 Dehydrogenase가 작기 전보다 작기 후에 증가하였고 (그림 83), Chitinase의 경우 최노숙, 최정호 농가를 제외한 나머지 농가에서 작기 전보다 작기 후에 증가하였다 (그림 84). Dehydrogenase의 경우 노지에서는 강천숙 27.8 unite/g 하우스에서는 최정호 농가가 26.5 unite/g 가장 높게 나타났다. Chitinase는 노지에서 강천숙 74.7 unite/g 하우스에서는 손성곤농가가 113.3 unite/g 가장 높게 나타났다.

a) Dehydrogenase

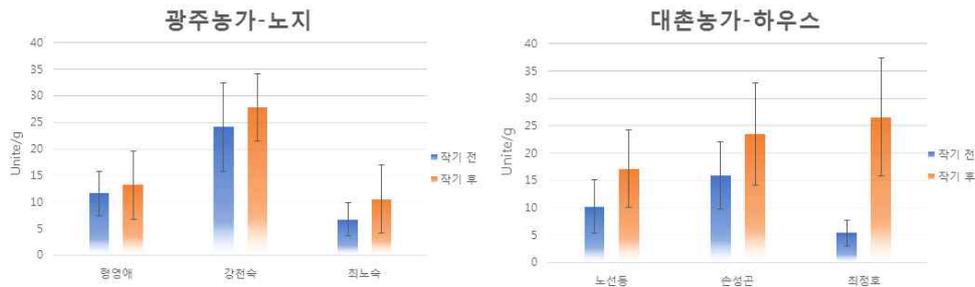


그림 83. 노지, 하우스 토양미생물 활력도 Dehydrogenase

b) Chitinase

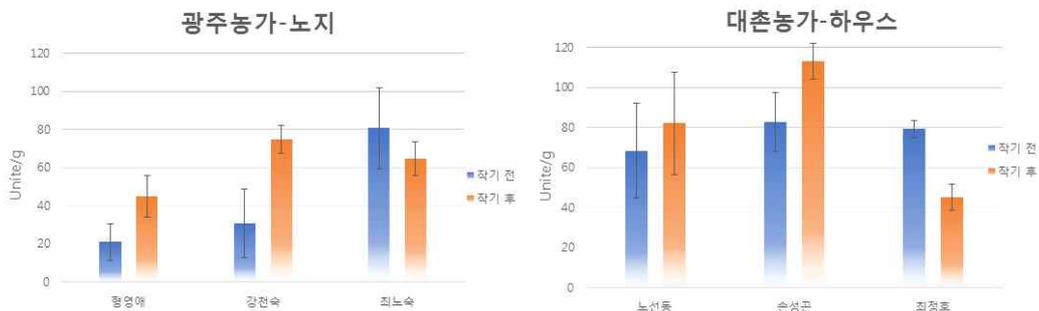


그림 84. 노지, 하우스 토양미생물 활력도 Chitinase

## 8. 최종 재배일지 작성(메뉴얼).

노지재배 강천숙 농가와 하우스재배 노선동 농가(봄작기)의 미생물농법 매뉴얼을 작성하였다.

간단한 재배일지와 밑거름, 정식날짜, 미생물처리 기간, 처리량, 희석배율, 농약사용횟수, 농약종류 등 재배비용을 작성하였다. 강천숙 농가의 경우 2,029,000원의 재배비용이 사용되어졌고(표 16), 노선동 농가의 경우 2,735,500원의 재배비용이 사용되었다(표 17).

노지 농가의 경우 이번 모종에서부터 병이 온 것을 정식하여 농약살포 횟수가 많았다. 또한 농약사용횟수를 줄이고자 하지만 농민들의 걱정과 농약을 안하면 농사가 안된다는 고정관념을 깨기가 어려운 것으로 생각된다. 하우스 농가의 경우 약 12~15회의 농약을 사용하였지만 미생물을 사용한 후 무농약 재배까지 가능하였다. 하지만 농민의 의견으로는 무농약으로 재배를 하였을 때 수많은 장점도 있긴 하지만 무농약농산물을 판매할 수 있는 판로가 없어 농약을 사용하여 쉽게 농사를 지으며 판매하는 것이 경제성만 봤을 때 더 낫다고 말하였다. 친환경 농법을 지속적으로 진행하기 위해서는 농산물 판로 또한 중요하다고 생각된다.

표 16. 노지 강천숙 농가 재배 매뉴얼

강천숙 농가 고추 GCM 농법 매뉴얼 (400평)											
날짜	작업내용	총 중량(㉸)	GCM 배양액(㉸)	물(㉸)	황(㉸)	유화제(㉸)	E1(m)	E2(m)	살균제(㉸)	비용	비고
01월 13일	밑거름	50kg 40kg								60,000 44,000	단형비 비료18-7-9 고추진용비료10-11-9
		1,000kg								150,000	우분퇴비
	미생물 관주	1000L	1000L							100,000	고온성미생물 살포
04월 02일	정식	2000주								600,000	터널재배(이른 고추 정식)
04월 20일	미생물 관주	500L	250L	250L						25,000	
04월 30일	미생물 관주	500L	250L	250L						25,000	
05월 10일	미생물 관주	500L	250L	250L						25,000	
05월 21일	미생물 관주	1000L	500L	500L	1L					50,000	
05월 24일	농약시비	50kg								50,000	N-K비료
05월 29일	미생물 관주	800L	400L	400L						50,000	
05월 29일	엽면시비	500L	100L	400L	0.5L			0.5L		55,000	마이킹 - 0.5L 살충제 - 0.2L 살균제 - 0.2L
06월 07일	미생물 관주	800L	400L	400L						50,000	병,해충등이 작물상태 양호
06월 07일	엽면시비	500L	100L	400L	0.5L	0.5L		0.5L		60,000	마이킹 - 0.5L 살충제 - 0.25L 살균제 - 0.25L
06월 15일	농약시비	500L								10,000	살충제 - 0.25L 살균제 - 0.25L
06월 21일	미생물 관주	800L	400L	400L						50,000	
	엽면시비	500L	100L	400L				0.5L		55,000	마이킹 - 0.5L 살충제 - 0.25L 살균제 - 0.25L
06월 29일	미생물 관주	800L	400L	400L						50,000	
	엽면시비	500L	100L	400L	0.5L	0.5L		0.5L		60,000	마이킹 - 0.5L 살충제 - 0.25L 살균제 - 0.25L
07월 03일	농약시비	500L								10,000	살충제 - 0.25L 살균제 - 0.25L
07월 10일	미생물 관주	800L	400L	400L						50,000	7월 초여름 비가 많아서 과실 낙과(과실) 일이 늘게 관찰
07월 10일	엽면시비	500L	100L	400L				0.5L		35,000	살충제 - 0.25L 살균제 - 0.25L
07월 12일	1차수확										
07월 14일	농약시비	500L								10,000	살충제 - 0.25L 살균제 - 0.25L
07월 19일	미생물 관주	800L	400L	400L						50,000	
07월 19일	엽면시비	500L	100L	400L						10,000	살충제 - 0.25L 살균제 - 0.25L
07월 22일	2차수확										
07월 25일	농약시비	500L								10,000	살충제 - 0.5L 살균제 - 0.5L
07월 27일	미생물 관주	800L	400L	400L						50,000	
07월 27일	엽면시비	500L	100L	400L						10,000	살충제 - 0.5L 살균제 - 0.5L
07월 30일	3차수확										
08월 05일	미생물 관주	800L	400L	400L						50,000	병,해충등이 작물상태 양호
08월 05일	엽면시비	500L	100L	400L				0.5L		35,000	살충제 - 0.5L 살균제 - 0.5L
08월 06일	4차수확										
08월 13일	미생물 관주	800L	400L	400L						50,000	고온과 가을이 겹쳐서 수확량 이 조금 떨어졌는데 다른농가보다는 양호함
08월 13일	엽면시비	500L	100L	400L				0.5L		35,000	살충제 - 0.5L 살균제 - 0.5L
08월 17일	5차수확										
08월 18일	농약시비	500L								10,000	살충제 - 0.5L 살균제 - 0.5L
08월 24일	농약시비	500L								10,000	살충제 - 0.5L 살균제 - 0.5L
08월 29일	6차수확										
09월 01일	농약시비	500L						0.5L		35,000	살충제 - 0.5L 살균제 - 0.5L
09월 10일	7차수확										
09월 23일	8차수확										고온성 미생물은 병,해충에도 강하고 과실이 크고 수확량도 증가.
09월 25일	결과								계	2,029,000	

표 17. 하우스 노선동 농가 재배 메뉴얼

노선동 농가 고추 GCM 농법 매뉴얼 (600평)											
날짜	작업내용	총 중량(t)	GCM 배양액(t)	물(t)	황(t)	유화제(t)	E1(m <sup>2</sup> )	E2(m <sup>2</sup> )	칼슘제(t)	비용	비고
01월 10일	토양소독	120L								120,000	과산화수소 35%
01월 13일	밀거름	60kg								45,000	복합 21-17-17
		2kg								8,000	봉사
		5,000kg								650,000	축분퇴비
		1,000L								100,000	바실러스
		설탕 6kg, 종균2통								50,000	1036미생물(불용성인산분해 미생물)
02.01~05	로타리작업 2회										
02월10일	점적호수깔기										
02월 17일	정식	2600주								780,000	정양
03월 17일	고추가지뫼기										
03월 28일	관주	2000L	500L	1500L						50,000	
04월 02일	칼슘,미량요소 시비	100g		150L						500	착과 및 생장억제를 하기위해 사용
04월 08일	관주	2000L	500L	1500L						50,000	
04월 16일	관주	2000L	500L	1500L						11,000	15-5-35 복비 +10kg and 요소 2~3kg 추가
	엽면시비		10L	90L							
04월 17일	칼슘,미량요소 시비	100g		150L						500	착과 및 생장억제를 하기위해 사용
04월 20일	1차수확										100박스(10kg)
04월 24일	관주	2000L	500L	1500L						11,000	15-5-35 복비 +10kg and 요소 2~3kg 추가
05월 02일	칼슘,미량요소 시비	100g		150L						500	착과 및 생장억제를 하기위해 사용
05월 02일	관주	2000L	500L	1500L						11,000	15-5-35 복비 +10kg and 요소 2~3kg 추가
05월 05일	2차수확										130박스(10kg)
05월 13일	관주	2000L	500L	1500L						11,000	15-5-35 복비 +10kg and 요소 2~3kg 추가
	엽면시비		10L	90L							
05월 16일	3차수확										150박스(10kg)
05월 17일	칼슘,미량요소 시비	100g		150L						500	착과 및 생장억제를 하기위해 사용
05월 19일	엽면시비		20L	180L							
05월 21일	관주	2000L	500L	1500L						11,000	15-5-35 복비 +10kg and 요소 2~3kg 추가
05월 29일	관주	2000L	500L	1500L						11,000	15-5-35 복비 +10kg and 요소 2~3kg 추가
06월 03일	4차수확										170박스(10kg)
06월 04일	칼슘,미량요소 시비	100g		150L						500	착과 및 생장억제를 하기위해 사용
06월 06일	관주	2000L	500L	1500L						11,000	15-5-35 복비 +10kg and 요소 2~3kg 추가
	엽면시비		20L	180L							
06월 08일	5차 수확										180박스(10kg)
06월 15일	관주	2000L	500L	1500L						11,000	15-5-35 복비 +10kg and 요소 2~3kg 추가
06월 24일	6차수확										180박스(10kg)
06월 28일	철거										
									계	2,735,500	

## 9. Band(밴드) 등을 이용한 농가와 네트워크 구성.

- 실증농가 대상 “한국형 친환경 표준 재배기술 개발 연구단” 밴드 개설(2016.03.17. ~ 현재)
- 주소 : <https://band.us/band/60570954>, <https://band.us/band/54016032>,  
<https://band.us/band/52714182>

 <p>전남대&amp;대촌 포장실험</p>	<p><b>반길환</b> 8월 30일</p> <p>정양7월5일정식고온성미생물특염으로낙화심함 두번째정양7월15일정식키틴젤라틴배양특염으로낙화심함 세번째피망7월25일정식고온성배양특염으로생육부진</p>  <p>표정0 댓글0</p>	<p><b>이종희</b> 님에 10월 28일</p> <p>10월26일 애호박 정식 모종(농협 진안) 재식거리(50cm) 모종주수(1700)</p> 
<p><b>이종희</b> 님에 9월 26일</p> 	<p><b>손성근</b> 9월 24일</p> <p>지씨연 5회 관주</p> 	<p><b>최정호</b> 9월 20일</p> <p>오이고추 1430주 정식</p> 
<p><b>전원덕</b> 3월 29일</p>  <p>댓글 3</p>	<p><b>전원덕</b> 3월 19일</p> <p>장적 보수 재 활용하기- 참고 핸드메이드 류중순 밴드님 미생물농법을 하는 관행농가 과산화 수소 3% 염소 5알 소다 1K 물 100L 1. 버킷스에 염소가 잠길 만큼만 과산화 수소 넣고 녹인다. Tip 과산화 수소를 처음부터 많이 부으면 곰이 납니다. 그래서 염소가 잠길 만 ...더보기</p>  	<p><b>손성근</b> 8월 19일</p> 
<p><b>반길환</b> 8월 30일</p> <p>정양7월5일정식고온성미생물특염으로낙화심함 두번째정양7월15일정식키틴젤라틴배양특염으로낙화심함 세번째피망7월25일정식고온성배양특염으로생육부진</p>  <p>댓글 5</p>	<p><b>반길환</b> 7월 25일</p> <p>피망침지작업중</p>  <p>댓글 3</p>	<p><b>반길환</b> 7월 7일</p>  <p>댓글 4</p>

그림 85. 밴드를 이용한 농가와의 네트워크 구성

## 제 1 협동과제: 기능성 미생물제제 실용화 및 사업화

### 재료 및 방법

#### 1) 미생물제의 조제

액상미생물제제의 경제적이고 효율적인 배지 조건을 찾기 위해 표1과 표2와 같이 배지종류에 따른 배지조성 및 단가를 선정하였다. 각 조건별로 균주(*Bacillus amyloliquefacien* Y1)를 각 각 0.1%, 0.2%씩 접종한 후 30℃에서 5일 간 배양하여 평판희석법을 이용해 미생물 개체수를 측정하였다.

추가적으로 대량배양 시 더 경제적이고 효율적인 배지 조건을 찾기 위해 표3과같이 배지 종류(OC, BB)를 달리 하여 접종농도 0.1%로 위와 같은 방법으로 미생물 개체수를 측정하였다.

#### 2) 미생물제의 최적 포자 형성을 조사

선발된 균주 *Bacillus amyloliquefaciens* Y1의 배양에 있어 가장 일반적인 기준배지 OC Broth (표 4)에 OD600nm=1인 *B. amyloliquefaciens* Y1현탁액을 0.1%, 1%씩 접종하고 150rpm으로 온도별 (25℃, 35℃, 45℃)로 7일 간 배양 시 생균수 변화와 100℃에서 15분간 처리 후 생균수 변화를 측정하여 포자 형성을 조사하였다.

#### 3) 미생물 시제품의 포자 형성을 및 안정성 및 저온 안정성 검정

분말 제형화한 분말 미생물제제 시제품을 직접 농가에서 배양했을 시 접종농도에 따른 균 활성 시간과 생균수 변화를 조사하기 위해 최적배지조건인 BB배지에 분말 시제품 *Bacillus amyloliquefaci* Y1를 각 각 0.1%, 0.5% 접종한 후 150RPM으로 35℃에서 배양하면서 시간별 (2, 4, 6, 8, 10시간)/일별 (2, 4, 6, 8일) 생균수 변화와 내생포자형성을 측정하였다. 생균수 측정은 미생물 배양액을 0.1 ml 취하여 멸균수를 이용하여  $10^1$ - $10^6$ 까지 희석하여 선택배지에 도말하여 미생물 개체수를 측정했다. 내생포자 형성률을 측정하기 위한 생균수 변화는 배양액을 100도에서 15분간 처리한 후 이 배양액을 위와 같은 평판희석법을 사용하여 미생물 개체수를 측정했다.

표 1과 같은 액상미생물제제를 조건별로 150ml씩 제조한 배지에 균주(*Bacillus amyloliquefaciens* Y1)를 접종한 후 Shaking Incubator(30℃)에서 5일간 배양하여 8ml씩 분주, 각 각 가열안정성시험과 저온안정성 시험의 조건별로 시료를 보관, 채취하고 평판희석법으로 고체배지에 도말하여 콜로니 수를 계수하여 개체수를 측정하였다.

저온 안정성시험은 각 미생물제제를  $0 \pm 2$  °C에서 7일 간 보관 후 일정시간에 샘플을 채취하여 미생물의 개체수를 측정하여 시간이 경과함에 따라 물리, 화학적으로 변화되는 주성분을 분석하는 방식으로 시험하였다. <농촌진흥청 고시 제2008-13호에 의함>

#### 4) 미생물 제품의 약효보증 기간 검증 및 약해 시험

앞선 가열안정성 시험에서 가장 안정성이 높았던 분말 제형화 된 시제품을 상온에서

약효보증기간동안 시간이 경과함에 따라 물리적·화학적으로 주성분을 잘 유지하는 지 분석하기 위해 12개월 간 매월 샘플을 채취한 후 Tryptic soy agar(TSA) 배지에 도말하여 미생물개체수를 측정하였다.

마사토:원예용상토=1:1 로 준비한 공시토양을 포트(57cm×18cm)에 채우고 분말 미생물 제제 시제품을 희석배수를 조절하여 다음과 같은 방법으로 약해시험을 실시하였다 (표 12).

- ① 유묘 이식: 준비된 공시토양에 고추유묘를 처리구별로 3주씩 3반복으로 이식 (그림 26)
- ② 약제 처리: 이식된 고추유묘에 시제품을 기준량과 배량으로 조제하여 식물체에 엽면 살포
- ③ 달관 조사: 시제품 처리 후 3일, 5일, 7일째 3회에 걸쳐 고추유묘 생육양상을 3회 달관 조사

### 5) 미생물 제품의 현장 대량 효율 배양 조건 확립

현장 대량 배양 시 경제적이고 효율적인 배양 조건을 모색하기 위해 미생물 접종량 (1/2배, 기준량, 배량)과 배지조절량 (1/2배, 기준량, 2배)에 따른 미생물 개체수를 측정하고 이 결과를 바탕으로 대량배양에 적용하고자 실내 실험을 실시하였다. *Bacillus amyloliquefaciens* Y1의 배지조성은 표 3의 BB배지를 사용했으면 미생물 접종량은 1리터 기준 Y1 콜로니 각 각5개,10개,20개를 접종하고 40℃,140RPM으로 3일 간 배양 후 Tryptic soy agar(TSA)배지에 평판희석도말법을 이용하여 미생물 개체수를 측정했다. 배지조절량에 따른 실험은 표3의 BB배지 기준량을 각 각 1/2배, 2배로 조절한 후 Y1 콜로니를 10개 씩 접종하여 동일 조건으로 실험을 진행하였다.

실내 실험 결과를 바탕으로 미생물 접종량 (1/2배, 기준량, 배량)과 배지 조절량 (1/2 배, 기준량, 2배) 등의 배양 조건을 달리하여 현장 대량 매뉴얼에 따른 500 L 현장 대량 배양을 그림 37과 같이 실시하였다. 접종 미생물을 TSB (tryptic soy broth)배지에 *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 단 콜로니를 접종한 배양액을 Tryptic soy agar(TSA)에 스프레이 처리한 150 x 20 mm petri dish를 사용하였고, 접종 미생물량은 150 x 20 mm petri dish 1개, 2개, 4개를 접종하였다. 배지량 조절실험의 배지 조성은 표3의 BB배지를 두 가지 제형으로 분리하여 500L배양 기준 2L,5L으로 만들어 기준량으로 정했고 각 각 배지량을 1/2배, 2배로 조절하여 매뉴얼에 따른 대량 배양을 실시하였다. 대량 배양 시 미생물 배양 용제는 수돗물을 사용하였다.

### 6) 미생물 제품의 현장 대량 효율 배양액의 특성 조사

현장대량배양(500L) 시 시간 경과에 따른 미생물 배양액의 특성을 조사하기 위해 실외에서 배양하는 조건과 유사하게 비멸균 조건하에서 실내실험을 실시하였다. 배양 조성은 BB배지를 사용했으며 미생물 접종량은 1리터 기준 Y1 콜로니 10개를 접종하고 40℃,140RPM으로 미생물을 배양하면서 시간대별(1일, 3일, 5일, 7일)로 일정한 시간에 샘플링 후 Tryptic soy agar(TSA)배지에 평판희석도말법을 이용하여 미생물 개체수와 pH, EC를 측정하였다.

실내 실험 결과를 바탕으로 실외 배양용 배양기를 통해 현장 대량배양(500L)을 실시하고 자 시제품 배지세트 (BB배지)에 *Bacillus amyloliquefaciens* Y1을 스프레이 처리한 접종미생물 150×20mm Petri Dish 2개를 접종하고 배양 매뉴얼에 따라 배양 후 시간 경과에 따른 미생물 배양액의 특성조사를 위해 미생물 개체수, pH, EC를 측정하였다.

대량 배양 시 배양 환경에 따른 미생물배양액의 특성 변화를 조사하기 위해 농가 3곳을 선정하여 7일 간 대량배양(500L) 후 미생물 배양액의 샘플을 채취하여 각 각 미생물 개체수, pH, EC를 측정하였다.

위의 연구 내용을 바탕으로 한 실험 결과를 통해 현장에서 미생물 배양 시 배양 상태를 자체적으로 체크할 수 있는 Marker로 활용하고 자 미생물 배양 7일차의 pH와 EC 측정치를 종합적으로 분석하였다.

## 결 과

### 가. 시제품의 대량 생산을 위한 경제적 제조 실험

#### (1) 액상미생물제제의 배지 단가 및 비율 선정

측정 결과 접종농도를 0.1%로 했을 시 각 배지조건에서 미생물개체수가 보증균수 ( $1 \times 10^6$  cfu/ml) 이하로 측정되었고 접종농도 0.2% 접종 시 미생물 개체수가 가장 높은 배지 종류는 TSB, LB, NB배지 순으로 나타났다. 배지조성비율의 차이는 배지별로 상이하게 나타났으며 TSB배지 상에서는 정량, 1/10, 1/2 순으로 미생물 개체수가 높게 검출되었으나 경제적인 단가 대비 효율적인 측면에서 TSB1/10이 배지조건으로 가장 적합하다고 판단되었다 (표 1, 표 2, 그림 1, 그림 2).

표 1. 배지종류 (TSB, LB, NB)에 따른 배지 조성 비율

배지종류	배지 조성 (g/L)			비 고
	정량	1/2	1/10	
TSB	30	15	3	LABM사
LB	2	12.5	2.5	LABM사
NB	8	4	0.8	Difco, BD사

표 2. 배지종류 (TSB, LB, NB) 및 배지 조성 비율에 따른 단가표

배지종류	공급가 (원/g)	단가 (원/L)		
		정량	1/2	1/10
TSB	90	2,700원	1,350원	270원
LB	106	2,650원	1,325원	265원
NB	274	2,192원	1,096원	219원

배지 종류	배지 조성(g/L)			비고
	정량	1/2	1/10	
TSB				CFU/ml
	$2.3 \times 10^7$	$6.3 \times 10^6$	$1.3 \times 10^7$	
LB				CFU/ml
	$4.1 \times 10^7$	$4.7 \times 10^6$	$6.2 \times 10^6$	
NB				CFU/ml
	$2.2 \times 10^7$	$7.1 \times 10^6$	$4.2 \times 10^6$	

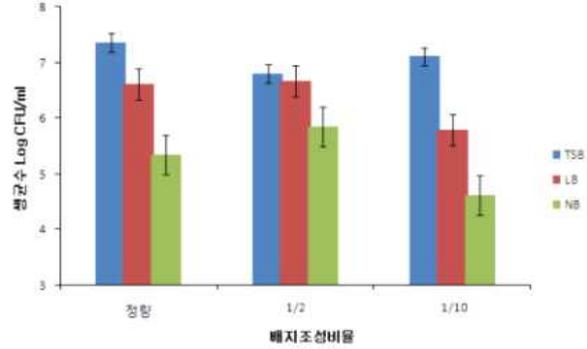


그림 1, 2. 배지 종류(TSB, LB, NB) 및 배지조성 (정량, 1/2, 1/10)에 따른 미생물 개체수 (균주)

그림3에서 보는바와 같이 앞선 TSB1/10 배지조건보다 BB, OC배지에서 접종농도 0.1%에서도 생균수가 높게 측정되었으며 단가 측면에서도 BB배지 기준 9~90배 정도 경제성이 높았다. 종합적으로 고려해 볼 때 가장 효율적이고 경제적인 배지 조건은 BB배지로 판단되었다.

표 3. 배지종류(OC, BB)에 따른 배지 조성 및 단가

배지 종류	성분	배지 조성(g/L)	단가 (원/L)
OC 배지	Glucose	6	180원
	Yeast extract	8	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5	
	NaCl	1.5	
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.5	
BB 배지	MgSO <sub>4</sub>	1	30원
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.08	
	KCl	0.02	
	게겍질	0.49	
	젤라틴	0.02	
	몽밴드	3.92	
	설탕	3.92	
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1	
	파워키틴	3.2	
YEAST	0.1		
	과산화수소	0.77	

배지 종류	생균수 CFU/ml
OC 배지	
	$3.1 \times 10^7$
BB 배지	
	$1.1 \times 10^8$

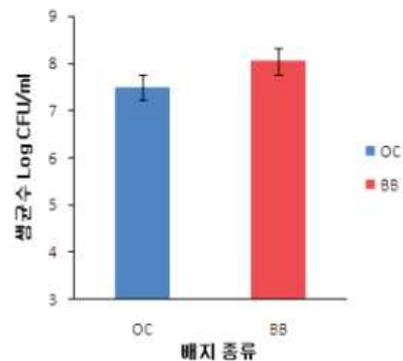


그림 3. 배지 종류(OC, BB)에 따른 미생물 개체수(균주 접종 농도: 0.1%)

(2) 분말 미생물제제 제형화를 위한 *Bacillus amyloliquefacien* Y1의 최적 성장 조건과 내생 포자 형성

내생포자는 어려운환경이 될 때 어려운 시기를 버티기 위한 생존수단으로 만들어지며 현재까지 알려진 어떤 생물체보다도 열, 건조 등을 잘 견디는 성질을 가지고 있다. *Bacillus* 가 내생포자를 만들 수 있는 미생물임을 착안하여 균주 *Bacillus amyloliquefacien* Y1이 내생포자를 만드는 최적의 성장조건을 찾아 분말로 제형화하여 액상미생물제제의 보관 안정성에 따른 어려움을 분말미생물제제로 대처하기 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다.

표 4. OC배지 조성표

배지 종류	성분	배지 조성(g/L)
OC Broth	Glucose	6
	Yeast extract	8
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5
	NaCl	1.5
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.5
	MgSO <sub>4</sub>	1

온도(25°C, 35°C, 45°C) 및 접종농도(0.1%, 1%)에 따른 시간별 생균수 변화는 전체적으로 일정하게 증가 후 일정 시점을 기준으로 다시 감소하는 추이를 나타내었으며 25°C, 35°C에서 1~3일 사이 생균수 증가율이 가장 크게 나타났다. 결과적으로 접종 농도별 생균수 차이는 현저하게 나타나지 않았고(그림 4, 5), 접종농도에 비례하여 생균수가 증가하지 않았다.

포자형성률을 조사하기 위해 100°C에서 15분 동안 처리한 배양액의 온도(25°C, 35°C, 45°C) 및 접종농도(0.1%, 1%)에 따른 시간별 생균수 변화는 온도별로 상이하게 나타났으며 35°C에서 생균수가 가장 높게 측정되었다(그림 6, 7). 온도조건 중 35°C에서만 유일하게 5~7일 기점으로 포자형성률이 90%이상 나타났으며 포자형성률이 높은 최적의 성장 온도는 35°C임이 조사되었다(표 8). 농도별 포자형성률의 차이는 접종농도 1%였을 때 포자형성률이 90%이상 되는 시점이 1~2일 정도 빨랐지만 일정 시점이 지났을 때는 접종농도가 0.1%였을 때 포자형성률 증가폭이 더 높게 나타났다. 접종농도별 차이는 현저하게 나타나지 않았다.

표 5. 접종농도0.1%에서 시간(일)에 따른 생균수 변화

배양 조건	일수	균주 0.1%					
		25도		35도		45도	
		OD (600nm)	생균수 (CFU/ml)	OD (600nm)	생균수 (CFU/ml)	OD (600nm)	생균수 (CFU/ml)
OC Broth	0일	0.680	6.5 × 10 <sup>4</sup>	0.677	3.4 × 10 <sup>4</sup>	0.649	7.4 × 10 <sup>4</sup>
	1일	0.915	6.5 × 10 <sup>9</sup>	1.585	1.1 × 10 <sup>9</sup>	0.902	9.9 × 10 <sup>9</sup>
	3일	1.555	1.5 × 10 <sup>7</sup>	1.711	6.8 × 10 <sup>7</sup>	0.650	1.9 × 10 <sup>9</sup>
	5일	1.683	5.3 × 10 <sup>7</sup>	1.874	1.7 × 10 <sup>7</sup>	0.568	1.4 × 10 <sup>9</sup>
	7일	1.906	4.1 × 10 <sup>7</sup>	1.839	1.1 × 10 <sup>7</sup>	0.519	8.5 × 10 <sup>9</sup>
OC Broth 100도 15분	0일	0.723	1.1 × 10 <sup>4</sup>	0.770	-	0.669	3.0 × 10 <sup>2</sup>
	1일	0.925	2.2 × 10 <sup>2</sup>	1.649	-	0.931	-
	3일	1.652	6.7 × 10 <sup>2</sup>	1.904	4.8 × 10 <sup>9</sup>	0.900	1.5 × 10 <sup>2</sup>
	5일	1.749	1.0 × 10 <sup>9</sup>	1.854	7.5 × 10 <sup>9</sup>	0.762	3.5 × 10 <sup>4</sup>
	7일	1.895	7.5 × 10 <sup>9</sup>	1.858	3.3 × 10 <sup>7</sup>	0.842	-

표 6. 접종농도 1%에서 시간(일)에 따른 생균수 변화

배양 조건	일수	균주 1%					
		25도		35도		45도	
		OD (600nm)	생균수 (CFU/ml)	OD (600nm)	생균수 (CFU/ml)	OD (600nm)	생균수 (CFU/ml)
OC Broth	0일	0.669	$1.3 \times 10^9$	0.516	$7.7 \times 10^9$	0.592	$9.8 \times 10^9$
	1일	1.569	$1.2 \times 10^9$	1.649	$5.4 \times 10^9$	1.466	$5.5 \times 10^9$
	3일	1.719	$2.1 \times 10^7$	1.371	$3.9 \times 10^7$	0.631	$2.0 \times 10^7$
	5일	1.844	$6.2 \times 10^7$	1.543	$8.7 \times 10^9$	0.614	$2.1 \times 10^9$
	7일	1.962	$1.8 \times 10^7$	1.169	$2.4 \times 10^9$	0.556	$1.3 \times 10^9$
OC Broth 100도 15분	0일	0.708	$4.8 \times 10^2$	0.674	-	0.644	$1.5 \times 10^3$
	1일	1.789	$6.0 \times 10^3$	1.748	-	1.436	-
	3일	1.792	$9.3 \times 10^2$	1.429	$1.6 \times 10^5$	0.871	$1.0 \times 10^3$
	5일	1.843	$6.5 \times 10^5$	1.502	$8.0 \times 10^6$	0.804	$2.5 \times 10^4$
	7일	1.853	$2.1 \times 10^2$	1.891	$2.7 \times 10^7$	0.927	$3.4 \times 10^3$

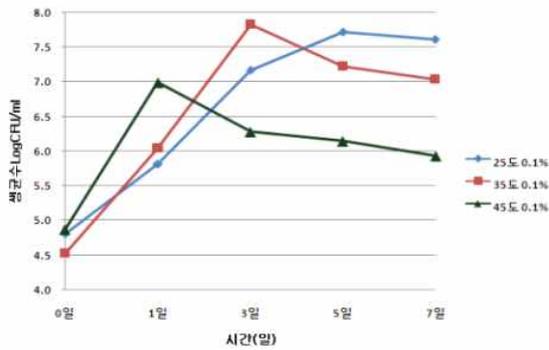


그림 4. 온도 및 균주 접종 농도(0.1%)에 따른 시간별 생균수 변화

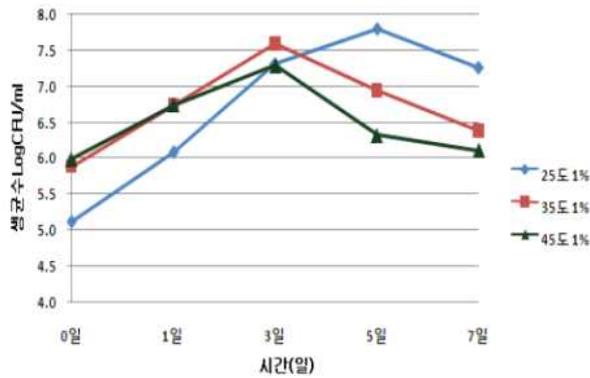


그림 5. 온도 및 접종 농도 (1%)에 따른 시간별 생균수 변화

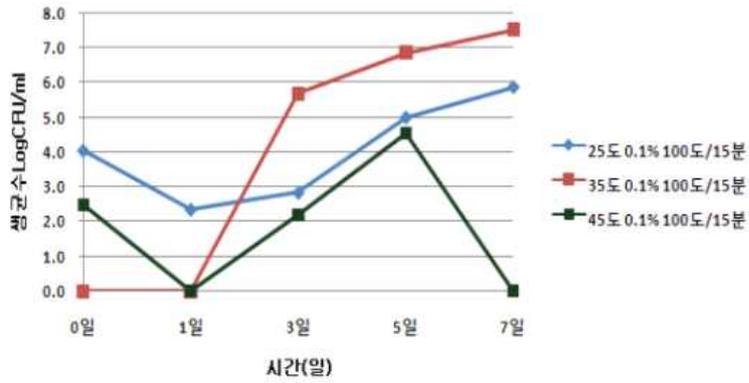


그림 6. 온도 및 접종 농도 (0.1%) 따른 시간별 생균수 변화 (100도/15분 처리)

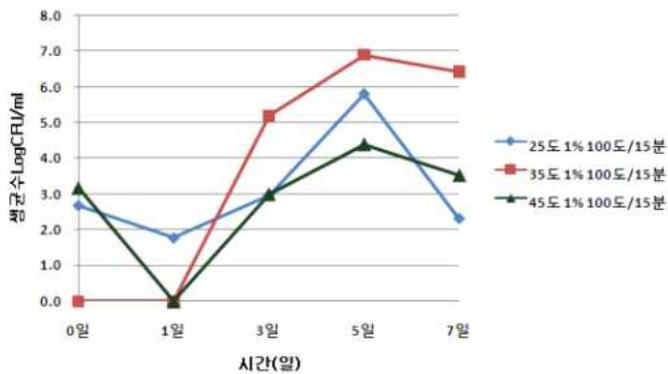


그림 7. 온도 및 접종 농도 (1%)에 따른 시간별 생균수 변화 (100도/15분 처리)

표 7. 온도 (25°C)에서 시간에 따른 내생포자 형성률 변화

배양 조건	배양 일수	균주 접종량	배양액(OC)		배양액(OC):100도 15분		포자 형성률 (%)	
			OD값 (600nm)	생균수 (CFU/ml)	OD값 (600nm)	생균수 (CFU/ml)		
사용 배지	OC	0일	1.0%	0.669	$1.3 \times 10^5$	0.708	$4.8 \times 10^2$	0.37
			0.1%	0.68	$6.5 \times 10^4$	0.723	$1.1 \times 10^4$	16.92
온도	25°C	1일	1.0%	1.569	$1.2 \times 10^6$	1.789	$6.0 \times 10$	0.005
			0.1%	0.915	$6.5 \times 10^5$	0.925	$2.2 \times 10^2$	0.03
		3일	1.0%	1.719	$2.1 \times 10^7$	1.792	$9.3 \times 10^2$	0.004
			0.1%	1.555	$1.5 \times 10^7$	1.652	$6.7 \times 10^2$	0.004
RPM	150	5일	1.0%	1.844	$6.2 \times 10^7$	1.843	$6.5 \times 10^5$	1.05
			0.1%	1.683	$5.3 \times 10^7$	1.749	$1.0 \times 10^5$	0.19
		7일	1.0%	1.962	$1.8 \times 10^7$	1.853	$2.1 \times 10^2$	0.001
			0.1%	1.906	$4.1 \times 10^7$	1.895	$7.5 \times 10^5$	1.83

표 8. 온도 (35°C)에서 시간에 따른 내생포자 형성률 변화

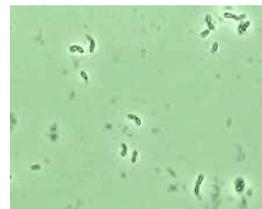
배양 조건		배양 일수	균주 접종량	배양액(OC)		배양액(OC):100도 15분		포자 형성률 (%)
				OD값 (600nm)	생균수 (CFU/ml)	OD값 (600nm)	생균수 (CFU/ml)	
사용 배지	OC	0일	1.0%	0.516	$7.7 \times 10^3$	0.674	-	-
			0.1%	0.677	$3.4 \times 10^4$	0.77	-	-
			1.0%	1.649	$5.4 \times 10^0$	1.748	-	-
온도	35°C	1일	0.1%	1.585	$1.1 \times 10^6$	1.649	-	-
			0.1%	1.371	$3.9 \times 10^4$	1.429	$1.6 \times 10^0$	0.41
		3일	0.1%	1.711	$6.8 \times 10^4$	1.904	$4.8 \times 10^0$	0.71
			1.0%	1.543	$8.7 \times 10^0$	1.502	$8.0 \times 10^0$	<b>91.95</b>
		5일	0.1%	1.874	$1.7 \times 10^4$	1.854	$7.5 \times 10^0$	44.12
			1.0%	1.169	$2.4 \times 10^0$	1.891	$2.7 \times 10^0$	<b>112.50</b>
RPM	150	7일	0.1%	1.839	$1.1 \times 10^4$	1.858	$3.3 \times 10^4$	<b>295.45</b>

표 9. 온도 (45°C)에서 시간에 따른 내생포자 형성률 변화

배양 조건		배양 일수	균주 접종량	배양액(OC)		배양액(OC):100도 15분		포자 형성률 (%)
				OD값 (600nm)	생균수 (CFU/ml)	OD값 (600nm)	생균수 (CFU/ml)	
사용 배지	OC	0일	1.0%	0.592	$9.8 \times 10^3$	0.644	$1.5 \times 10^3$	0.15
			0.1%	0.649	$7.4 \times 10^4$	0.669	$3.0 \times 10^4$	0.41
			1.0%	1.466	$5.5 \times 10^0$	1.436	-	-
온도	45°C	1일	0.1%	0.902	$9.9 \times 10^0$	0.931	-	-
			1.0%	0.631	$2.0 \times 10^4$	0.871	$1.0 \times 10^3$	0.005
		3일	0.1%	0.65	$1.9 \times 10^0$	0.9	$1.5 \times 10^4$	0.01
			1.0%	0.614	$2.1 \times 10^0$	0.804	$2.5 \times 10^4$	1.19
		5일	0.1%	0.568	$1.4 \times 10^0$	0.762	$3.5 \times 10^4$	2.50
			1.0%	0.556	$1.3 \times 10^0$	0.927	$3.4 \times 10^3$	0.26
RPM	150	7일	0.1%	0.519	$8.5 \times 10^3$	0.842	-	-



100°C/15분 처리 전



100°C/15분 처리 후

그림 8. 100°C/15분 처리에 따른 내생포자형성 전 후 위상차 현미경 사진 (IPONACOLOGY CCD/JAPAN)

### (3) 분말미생물제제의 접종 농도별 균 활성화 시간

시간별 균 활성화에 따른 생균수 변화는 보증균수  $1 \times 10^6$  기준으로 볼 때 0.1% 는 10시간부터 0.5%의 경우 6시간부터 균 활성화가 나타났으며 함량이 더 높은 0.5%가 4시간 정도 빠르게 균 활성화가 나타났다(그림 10, 그림 11). 일별 균 활성화에 따른 생균수 변화는 0.1%의 경우 2일까지 급격히 증가한 후 4일을 기준으로 감소하는 경향을 나타냈으며 0.5%의 경우 2일까지는 급격히 증가한 후 2일 이후로 차츰 감소하였다. 포자형성률을 측정하기 위해 100도에서 15분 처리 후 미생물 개체수를 측정한 결과는 0.1%, 0.5% 모두 4일까지 꾸준히 증가한

후 4일 이후로 감소하는 경향을 나타내었다(그림 12, 그림 13). 포자형성률은 0.1%의 경우 4일 후 포자형성률이 100%이상 꾸준히 증가하였으며 0.5%는 4~6일 이후로 포자형성률이 100%이상을 나타내었다 (표 10). 결과적으로 접종농도에 비례하여 미생물 개체수와 내생포자형성률이 증가하는 것은 아니라는 것을 알 수 있었으며 분말미생물제제에 있어 경제적이고 효율적인 접종 농도는 0.1%라는 것을 알 수 있었다.



그림 9. 분말 제형화된 *Bacillus amyloliquefaciens* Y1

배지 종류	접종 농도	균 활성 시간(h)				
		2h	4h	6h	8h	10h
BB	0.1%					
	OD (600nm)	0.080	0.082	0.082	0.083	0.095
	생균수 (CFU/ml)	$1.6 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$
	0.5%					
	OD (600nm)	0.109	0.117	0.121	0.125	0.131
생균수 (CFU/ml)	$3.5 \times 10^5$	$3.7 \times 10^5$	$1.5 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$	$2.7 \times 10^6$	

그림 10. 분말미생물제제의 접종농도 및 균 활성시간(h)에 따른 미생물 개체수 변화

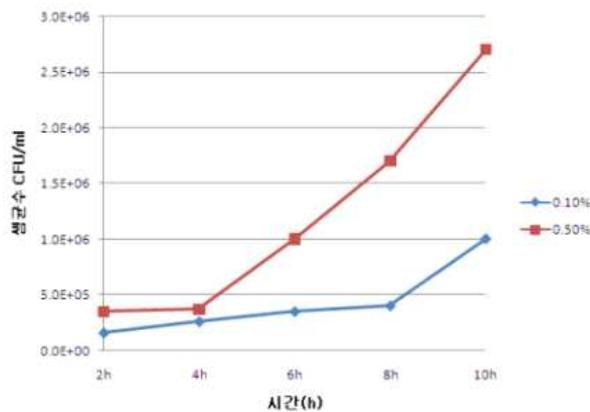


그림 11. 분말미생물제제의 접종 농도 및 균 활성 시간(h)에 따른 생균수

배지 종류	접종 농도	균활성 시간(일)			
		2일	4일	6일	8일
BB	0.1%				
	OD (600nm)	1.128	1.562	1.794	1.849
	생균수 (CFU/ml)	$8.2 \times 10^7$	$4.9 \times 10^7$	$3.6 \times 10^7$	$2.7 \times 10^7$
BB 100도 15분	0.1%				
	OD (600nm)	0.955	1.483	1.856	1.805
	생균수 (CFU/ml)	$1.1 \times 10^7$	$5.4 \times 10^7$	$4.5 \times 10^7$	$3.7 \times 10^7$
BB	0.5%				
	OD (600nm)	1.372	1.843	1.888	1.803
	생균수 (CFU/ml)	$8.5 \times 10^7$	$1.1 \times 10^8$	$2.8 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$
BB 100도 15분	0.5%				
	OD (600nm)	1.308	1.815	1.818	1.778
	생균수 (CFU/ml)	$1.9 \times 10^7$	$5.1 \times 10^7$	$4.3 \times 10^7$	$2.8 \times 10^7$

그림 12. 분말미생물제제의 접종농도 및 균 활성시간(일)에 따른 미생물 개체수 변화

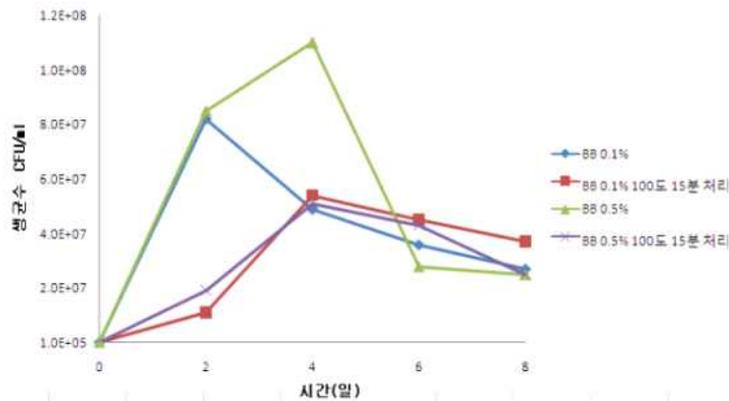


그림 13. 분말 미생물제제의 접종 농도 및 시간(일별)에 따른 생균수 및 포자 형성률에 따른 생균수 변화

표 10. 분말 미생물제제의 접종 농도 및 시간(일별)에 따른 포자형성률(%)

배양 일수	균주 접종량	배양액(OC)		배양액(OC):100도 15분		포자 형성률 (%)
		OD값 (600nm)	생균수 (CFU/ml)	OD값 (600nm)	생균수 (CFU/ml)	
2일	0.1%	1.128	$8.20E+07$	0.955	$1.10E+07$	13.41
	0.5%	1.372	$8.50E+07$	1.309	$1.90E+07$	22.35
4일	0.1%	1.562	$4.90E+07$	1.483	$5.40E+07$	<b>110.20</b>
	0.5%	1.843	$1.10E+08$	1.815	$5.10E+07$	46.36
6일	0.1%	1.794	$3.60E+07$	1.856	$4.50E+07$	<b>125.00</b>
	0.5%	1.888	$2.80E+07$	1.818	$4.30E+07$	<b>153.57</b>
8일	0.1%	1.849	$2.7E+07$	1.805	$3.7E+07$	<b>137.04</b>
	0.5%	1.803	$2.5E+07$	1.778	$2.8E+07$	<b>112.00</b>

## 나. 제품의 유통기한 시험



그림 14. 액상미생물제제의 배양 및 분주

### (1) 가열안정성 시험

가열안정성시험은 액제의 경우 유리관으로 완전히 밀봉된 앰플 상태로 분말의 경우 소포장 상태에  $54 \pm 2^\circ\text{C}$  보관하고 2주, 4주, 6주를 총 3회 샘플을 채취하여 미생물의 개체수를 측정하여 시간이 경과함에 따라 물리, 화학적으로 변화되는 주성분을 분석하는 방식으로 시험 하였고 다음과 같은 기준에 의한 성적으로 약효보증기간을 설정했다.<농촌진흥청 고시 제2008-13호 기준에 의함 >

약효보증기간 1년 설정약제는  $54 \pm 2^\circ\text{C}$  에서 2주일 이상 시험한 성적

약효보증기간 2년 설정약제는  $54 \pm 2^\circ\text{C}$  에서 4주일 이상 시험한 성적

약효보증기간 3년 설정약제는  $54 \pm 2^\circ\text{C}$  에서 6주일 이상 시험한 성적

각 2주, 4주, 6주 후 미생물 개체수를 측정한 결과 액상미생물제제의 경우 TSB1/10의 배지 조건만이 고온에서 2주 경과 시 보증균수  $1 \times 10^6$  이상을 유지하였고 고온 4주 경과 시에는 모든 배지 조건이 보증 균수에 미달되었다. 분말미생물제제의 경우는 6주까지 보증균수 이상을 유지하였다. 결론적으로 액상미생물제제에서는 TSB1/10 배지조건만이 약효보증기간 1년 설정으로 가능하고 분말미생물제제는 약효보증기간 3년 설정이 가능했다. 액상제제보다는 분말제제가 보관 안정성이 뛰어난 걸 알 수 있었다(그림 15, 16, 17).

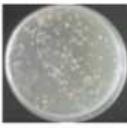
온도/ 시간	제제 종류	배지 조성(g/L)			비 고
		정량	1/2	1/10	
고온 $54 \pm 2^\circ\text{C}$	액상 TSB				CFU/ml
		$3.5 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	$3.3 \times 10^5$	
2주	액상 LB				CFU/ml
		$1.5 \times 10^5$	$3 \times 10^4$	$3.8 \times 10^5$	

그림 15. 고온 보관 2주 경과 시 액상미생물제제의 미생물 개체수 변화

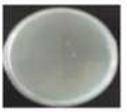
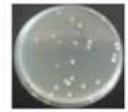
온도/ 시간	제제 종류	배지 조성(g/L)			비 고
		정량	1/2	1/10	
고온 54±2℃	액상 TSB				CFU/ml
		$1.5 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$2.4 \times 10^5$	
4주	액상 LB				CFU/ml
		$3 \times 10^2$	$2 \times 10^4$	$2.9 \times 10^5$	

그림 16. 고온 보관 4주 경과 시 액상미생물제제의 미생물 개체수 변화

온도	제제 종류	시간(주)			비 고
		2주	4주	6주	
고온 54±2℃	분말				CFU/ml
		$1.9 \times 10^{10}$	$4.5 \times 10^9$	$3.5 \times 10^9$	

그림 17. 고온 보관 6주 경과 시 분말미생물제제의 미생물 개체수 변화

## (2) 저온 안정성 시험

액상미생물제제의 경우 저온에서 일정시간이 지남에 따라 생균수는 점차 감소하는 추이를 나타냈으며 보증균수( $1 \times 10^6$ 이상)를 기준으로 7일간 저온보관 시 가장 안정성이 높은 시험군은 TSB 1/10 처리군임을 알 수 있었다(그림 18 ~ 22). 또한 7일간 보관한 액상미생물제제의 caking, 침전상태의 유무를 확인결과 TSB배지(정량, 1/2, 1/10), LB배지(정량, 1/2, 1/10) 모두 caking과 침전물은 관찰되지 않았다(그림 23).

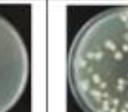
온도/ 시간	제제 종류	배지 조성(g/L)			비 고
		정량	1/2	1/10	
저온 0±2℃	액상 TSB				CFU/ml
		$7.9 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$5.8 \times 10^5$	
1일	액상 LB				CFU/ml
		$2.9 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$	$6 \times 10^5$	

그림 18. 저온 보관 1일 경과 시 액상미생물제제의 미생물 개체수 변화

온도/ 시간	제제 종류	배지 조성(g/L)			비 고	
		정량	1/2	1/10		
저온 0±2℃	액상 TSB				CFU/ml	
		$3.8 \times 10^6$	$4 \times 10^6$	$3.2 \times 10^6$		
		3일	액상 LB			
	$9.2 \times 10^6$			$9.5 \times 10^6$	$4.9 \times 10^6$	

그림 19. 저온 보관 3일 경과 시 액상미생물제제의 미생물 개체수 변화

온도/ 시간	제제 종류	배지 조성(g/L)			비 고	
		정량	1/2	1/10		
저온 0±2℃	액상 TSB				CFU/ml	
		$6 \times 10^4$	$3.6 \times 10^5$	$3.1 \times 10^5$		
		5일	액상 LB			
	$6.5 \times 10^5$			$3.5 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	

그림 20. 저온 보관 5일 경과 시 액상미생물제제의 미생물 개체수 변화

온도/ 시간	제제 종류	배지 조성(g/L)			비 고	
		정량	1/2	1/10		
저온 0±2℃	액상 TSB				CFU/ml	
		$3.2 \times 10^3$	$1.1 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$		
		7일	액상 TSB			
	$6 \times 10^5$			$3.1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	

그림 21. 저온 보관 7일 경과 시 액상미생물제제의 미생물 개체수 변화

표 11. 저온에서 액상미생물제제의 시간에 따른 생균수 변화(Log10 CFU/ml)

		TSB정량	TSB1/2	TSB1/10	LB정량	LB1/2	LB1/10
		Log10 CFU/ml					
보관 일수	0일	7.36	6.80	<b>7.11</b>	6.61	6.67	5.79
	1일	6.90	6.15	<b>6.76</b>	6.46	6.11	5.79
	3일	6.58	5.60	<b>6.51</b>	5.96	5.98	5.69
	5일	4.78	5.54	<b>6.49</b>	5.81	5.54	5.54
	7일	3.51	5.04	<b>6.45</b>	5.78	5.49	5.00

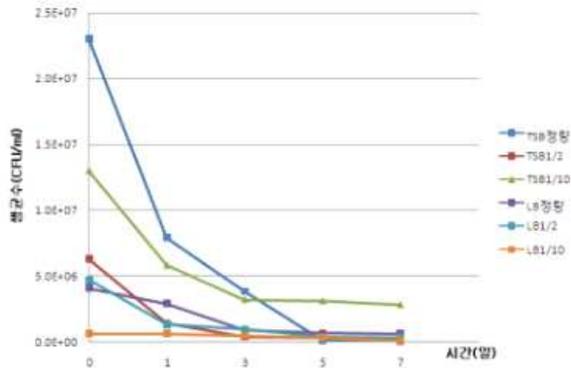


그림 22. 저온 보관 시 액상미생물제제의 시간에 따른 생균수 변화

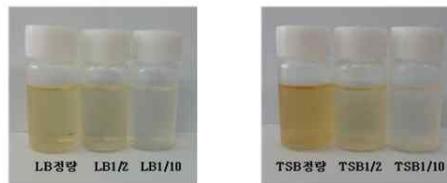


그림 23. 저온 안정성 시험 중 액상미생물제제의 물리성 검사(7일 경과) : caking과 침전물 유무 확인

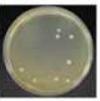
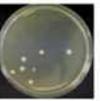
분말미생물제제의 경우 저온에서 30일까지 보관 시에도 보증균수 이상으로 일정하게 생균수를 유지했으며 물리적인 변화 또한 관찰되지 않았다. 액상 제제보다 분말제제가 저온 보관 시에도 안정성이 뛰어난 걸 알 수 있었다(그림 24).

온도	제제 종류	시간(일)		비 고
		7일	30일	
저온 0±2℃	분말			CFU/ml
		2.3 X 10 <sup>10</sup>	1.8 X 10 <sup>10</sup>	

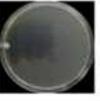
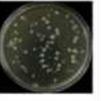
그림 24. 저온 보관 시 분말미생물제제의 미생물 개체수 변화

### (3) 경시변화 시험

시간이 지남에 따라 미생물 개체수는 점차적으로 감소하는 추이를 나타냈지만 12개월 동안 보증균수 ( $1 \times 10^6$  cfu/g)이상의 유효한 미생물 밀도를 유지하였다.

경과기간	0개월	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>						
생균수 CFU/g	$1.8 \times 10^{10}$	$1 \times 10^{10}$	$6.5 \times 10^9$	$7.3 \times 10^9$	$6.1 \times 10^9$	$4.2 \times 10^9$

경과기간	6개월	7개월	8개월	9개월	10개월	11개월
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>						
생균수 CFU/g	$1.5 \times 10^9$	$9.4 \times 10^8$	$9.7 \times 10^8$	$1.2 \times 10^9$	$9.5 \times 10^8$	$1.3 \times 10^9$

경과기간	12개월
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	
생균수 CFU/g	$1.1 \times 10^9$

그림 25. 분말미생물제제의 시간(0~12개월)에 따른 미생물 개체수 변화

#### 다. 자체 약해 시험

표 12. 처리구에 따른 처리 방법

구분	처리구	처리 방법	비고
1	무처리	-	
2	기준량	1000배액으로 희석하여 엽면살포	
3	배량	500배액으로 희석하여 엽면살포	

엽면 살포량 : 잎에 젖도록 흥건히 처리

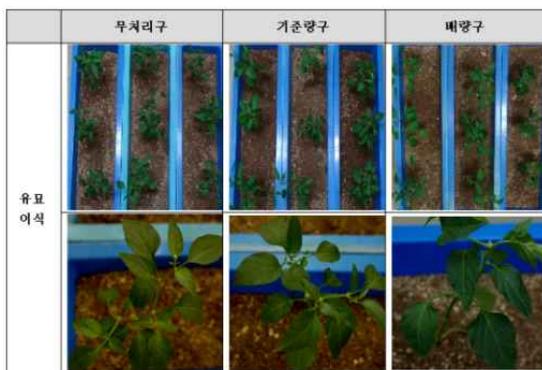


그림 26. 고추 유묘 이식

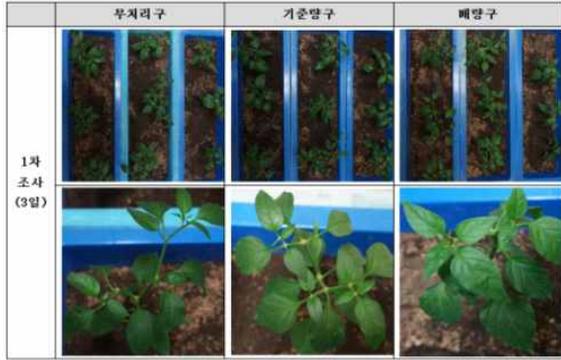


그림 27. 공시약제 처리 후 고추 유식물체 1차 생육 모습 (3일 경과 후 달관조사)



그림 28. 공시약제 처리 후 고추 유식물체 2차 생육 모습 (5일 경과 후 달관조사)

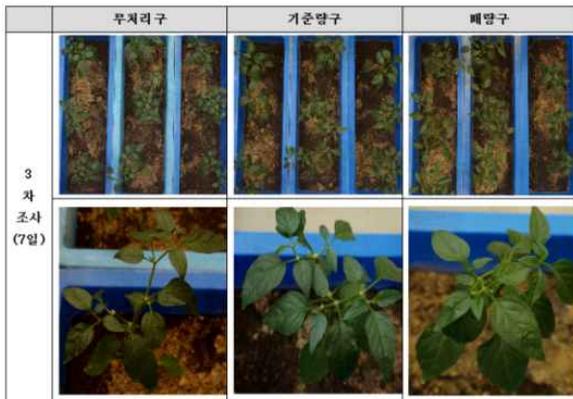
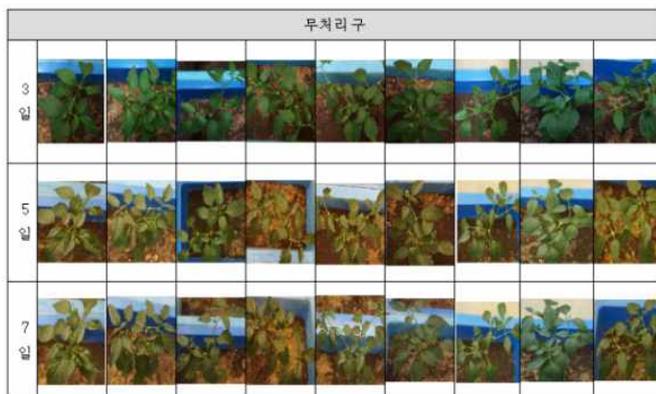
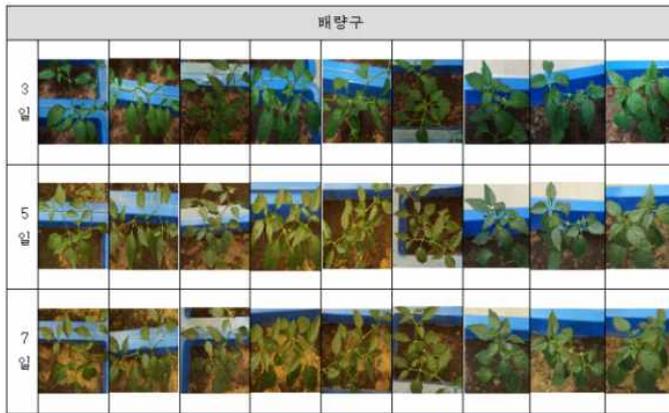
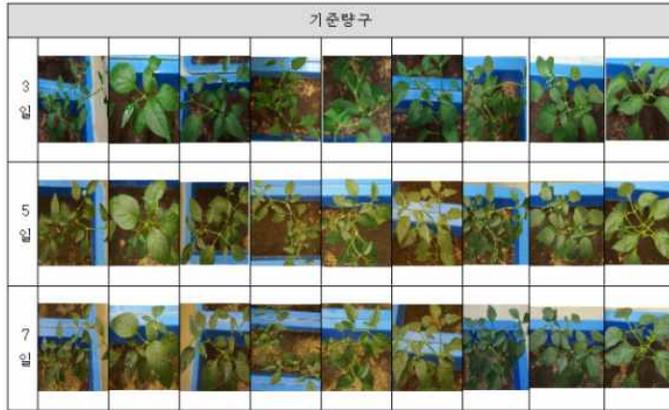


그림 29. 공시약제 처리 후 고추 유식물체 3차 생육 모습 (7일 경과 후 달관조사)





분말미생물제제 시제품의 약해시험을 위해 고추유묘를 3주씩 3반복으로 이식하고 시제품을 기준량과 배량으로 엽면 처리하여 3, 5, 7일에 생육양상을 3회 달관 조사한 결과 기준량구, 배량구 모두에서 이상 증상(황화, 위축, 오갈 등)을 보이지 않아 고추 유식물체 약해는 없는 것으로 최종 평가되었다(표 13)

표 13. 시제품 처리 후 고추 유식물체 달관조사 처리 결과

처리구		공시약제 처리 후 조사 일수		
		3일	5일	7일
무처리구	I	0	0	0
	II	0	0	0
	III	0	0	0
기준량구	I	0	0	0
	II	0	0	0
	III	0	0	0
배량구	I	0	0	0
	II	0	0	0
	III	0	0	0

< 농촌진흥청 고시 비료의 품질검사방법 및 시료채취기준의 비해판정기준에 의함 >

라. 시제품의 등록을 위한 안전성 검사

○ 공인기관 시험 의뢰

① 유효성분검사

- 가. 시험년도 : 2016년
- 나. 시험기관 : 농업기술실용화재단
- 다. 시험결과 : 지씨엠-P(푸르네)중의 우점 세균수 측정을 3반복으로 실험한 결과  $10^{-7}$  희석액 희석배수에서 콜로니가 검출되었으며, 우점 바실러스 콜로니를 분리하여 16S rDNA 유전자를 분석한 결과 *Bacillus amyloliquefaciens*로 확인되었다.

구분	시험 년도	시험기관	시험항목 (속. 증명)	시험결과
동정	2016	농업기술 실용화재단	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	동정 : <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 밀도 : $8.5 \times 10^8$ CFU/g

② 유해성분검사

- 병원성미생물과 잔류농약 검사 시 ‘불검출’ 결과가 나왔음.

<병원성미생물검사>

구분	시험년월	시험기관	시험항목 (속. 증명)	시험결과
오염미생물	2016.12	농업기술실용화 재단	병원성대장균 ( <i>E.coli</i> 0157:H7)	불검출
			살모넬라( <i>Salmonella</i> spp.)	불검출
			황색포도상구균 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	불검출
			리스테리아 모노사이토제네스 ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	불검출
			바실러스 세레우스 ( <i>Bacillus cereus</i> .)	불검출

<잔류농약검사>

구분	시험 년월	시험 기관	시험항목	시험결과
지씨엠-P	2016.09	전라남도 생물방제센터	잔류농약 336성분	불검출

③ 독성 검사

- 인축독성 및 환경독성 시험 결과 중독 증상 및 치사가 나타나지 않았으며 유기농업자재 등록 기준에 적합한 것으로 판단 됨.

<인축독성시험>

시험년도	시험기관	시험항목	시험결과
2016	(주)한국생명 안전성 연구소	급성경구	LD50=1.0 × 10 <sup>8</sup> cfu/개체
		급성경피	LD50=1.0 × 10 <sup>8</sup> cfu/개체
		안점막자극성	급성안자극지수(A.O.I)=2.7
		피부자극성	피부자극지수(P.I.I)=0.0

<환경독성시험>

시험년도	시험기관	시험항목	시험결과
2016	(주)한국생명 안전성 연구소	어류독성	LC <sub>50</sub> > 2.0 × 10 <sup>5</sup> cfu/mL
		꿀벌영향	NOEC <sup>C</sup> = 100 <sup>b</sup>

④ 약해 시험

- 약해시험 결과 ‘약해 없음의 결과가 나왔음.’

<유식물체 달관조사>

시험년도	시험기관	시험결과	작물	처리시기 및 방법	사용량
2016	목원대학교 미생물생태자원 연구소	약해 없음	케일 토마토 상추 오이 고추	관주 및 경엽 처리	기준량 (1000배) 배량 (500배)



그림 30. *Bacillus amyloliquefaciens* 시제품에 관한 유효, 약해 시험 성적서



그림 31. *Bacillus amyloliquefaciens* 시제품에 관한 독성 시험 성적서

**마. 시제품의 등록**

미생물제제(지씨엠-P)의 유기농업자재 등록을 위해 연구 성과 및 시험 결과를 토대로 순천대학교 친환경농업센터에 유기농업자재 등록을 완료하였으며 미생물 종균을 대량으로 배양하기 위한 미생물(지씨엠-P)과 미생물배양 배지(그로스-A, 그로스-B)를 구성으로 한 시제품을 제품화하였다.

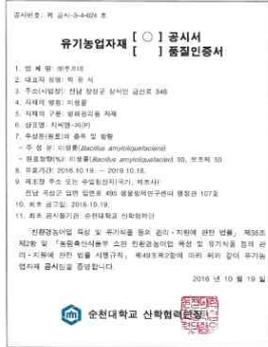


그림 32. *Bacillus amyloliquefaciens* 시제품(지씨엠-P)의 유기농업자재 공시서



액상미생물제를 미생물비료(토양미생물제제)로 등록 완료



번호	비료명	비료성분	비료성분	그외사항	비료 특성
2003048	중량비료용액	인산칼슘, 질소, 칼륨 1.5, 2.5, 2.5%	중량	중량	인산칼슘, 질소, 칼륨 1.5, 2.5, 2.5%
2010201	중량비료용액	인산칼슘, 질소, 칼륨 1.5, 2.5, 2.5%	중량	중량	인산칼슘, 질소, 칼륨 1.5, 2.5, 2.5%
2010112	액상미생물비료	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y1	액상	액상	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y1

*Bacillus amyloliquefaciens* Y1에 대한 토양미생물제제 등록 현황

## 바. 농가현장 배양 시 최적환경조사

### (1) 현장대량배양 시 배양 조건에 따른 미생물 개체수 측정

실내에서 실시한 배양조건별 실험 결과는 그림(33 ~ 36)과 같으며 미생물 접종량이 증가할수록 미생물 개체수도 일정하게 증가했으며 배지 조절량에 따른 미생물 개체수 변화는 일정하게 증가하다 증가폭이 감소하였다.

배지종류	배양 조건 (미생물 접종량)		
	1/2 배	기준량	2배
BB			
CFU/ml	$8.5 \times 10^6$	$8.8 \times 10^7$	$1.8 \times 10^8$

그림 33. 실내실험 시 미생물접종량 변화에 따른 미생물 개체수 변화

배지종류	배양 조건 (배지 조절량)		
	1/2 배	기준량	2배
BB			
CFU/ml	$3.1 \times 10^7$	$1.1 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8$

그림 34. 실내실험 시 배지 조절량 변화에 따른 미생물 개체수 변화

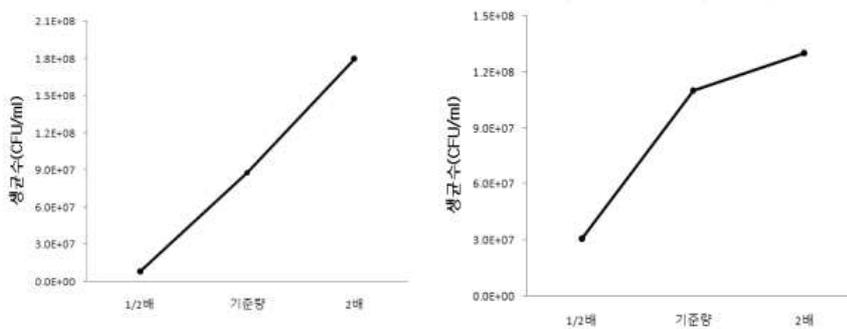


그림 35. 실내실험 시 미생물접종량 변화에 따른 미생물 개체수 (좌)

그림 36. 실내실험 시 배지조절량 변화에 따른 미생물 개체수 (우)



그림 37. 현장대량 배양 과정

실외에서 3일 간 배양 후 각 조건별 배양액을 샘플링하여 Tryptic soy agar (TSA)배지에 평판희석도말법을 이용하여 미생물 개체수를 측정했다. 측정 결과 그림 38 ~ 41과 같았으며 미생물 접종량이 증가할수록 미생물 개체수도 꾸준히 증가하였고 배지 조절량에 따른 미생물 개체수 변화는 일정하게 증가하다 증가폭이 감소하였다. 하지만 대량 배양인 만큼 실내 실험 결과와 비교하여 미생물 개체수는 감소하였다. 대량배양 조건에서 교반 속도 및 교반 시간, 주변 온도 등 외부적인 다양한 변수가 이런 결과에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다. 미생물 개체수 변화와 함께 대량 배양 전 후 미생물배양액의 이화학적 특성을 알아보기 위해 배양 전 후 pH와 전기전도도(EC)를 측정하였다. 표 14, 표 15에서 보는 바와 같이 배양 전 후 pH와 전기전도도(EC)는 모두 증가한 것을 볼 수 있으며 가장 증가폭이 큰 것은 배지량을 2배로 처리한 처리구였다.

미생물 제형	배지	미생물 투입 비율			비 고
		1/2배	기준량	2배	
Petri Disth	BB				CFU/ml
		$4.5 \times 10^4$	$9.5 \times 10^4$	$1.7 \times 10^5$	

그림 38. 현장대량배양 시 미생물 접종량에 따른 미생물 개체수

표14. 현장대량배양 시 미생물접종량에 따른 pH, EC 측정값

배지 조건	배양 일수	미생물 투입비율	측정값 (3회 평균값)			비 고
			pH	EC (mS/cm)	미생물 개체수 (CFU/mL)	
BB 배지	0일	대조군	6.01	3.16	-	
	3일	1/2배	6.53	4.36	$4.5 \times 10^4$	
		기준량	6.45	4.44	$9.5 \times 10^4$	
		2배	6.48	4.49	$1.7 \times 10^5$	

미생물 제형	배지	배지 투입 비율			비고
		1/2배	기준량	2배	
Petri Disth	BB				CFU/ml
		$2 \times 10^3$	$2.3 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$	

그림 39. 현장대량배양 시 배지 접종량에 따른 미생물 개체수

표 15. 현장대량배양 시 배지접종량에 따른 pH, EC 측정값

배지 조건	배양 일수	배지 투입비율	측정값 (3회 평균값)			비고
			pH	EC (mS/cm)	미생물 개체수 (CFU/mL)	
BB 배지	0일	1/2배	6.13	1.94	-	
		기준량	6.04	3.22	-	
		2배	5.87	5.47	-	
	3일	1/2배	6.25	2.08	$2 \times 10^3$	
		기준량	6.56	4.02	$2.3 \times 10^4$	
		2배	7.13	8.06	$2.9 \times 10^4$	

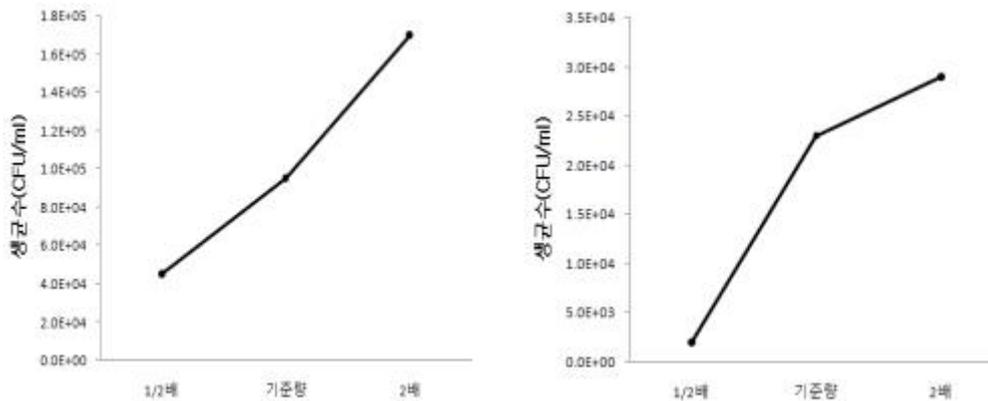


그림 40과 41. 현장대량배양 시 미생물접종량 변화 (좌)와 배지조질량 변화 (우)에 따른 미생물 개체수 변화

## (2) 현장대량배양 시 배양 장비 및 배양방법 매뉴얼 작성

미생물 대량 배양에 있어서 정확한 배양 조건 및 배양 방법이 미생물 대량배양의 성공 변수로 작용함에 있어 좀 더 쉽고 정확하게 농가들에게 배양 방식을 알리고 자 현장대량매뉴얼을 작성하였다.

### ▶ 현장대량배양 매뉴얼

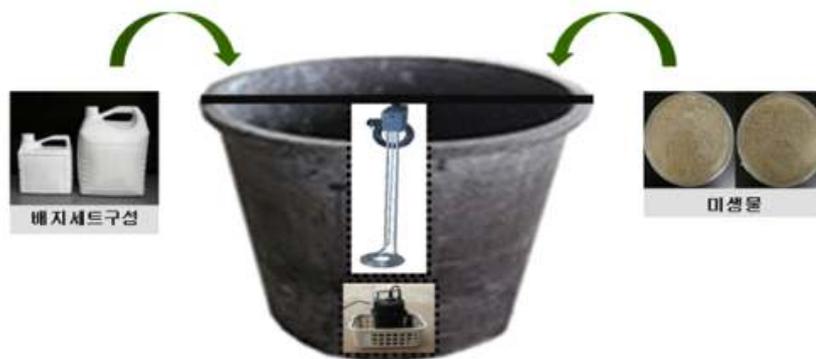
#### □ 배양 준비 자재



1. 배양통 및 기타자재들을 물로깨끗이세척한다
2. Hydrogen peroxide 2~5% 용액을 이용해 500L 배양통, 히터, 수중펌프 등을 소독해 준다
3. 배양통에 물을 500L정도 채운다. (비닐 사용 시 비닐을 씻은 후 물을 채운다.)
4. 배양 시 수중펌프를 케이스에 고정시킨 후 출을 연결하여 배양통 중앙에넣어준다.
5. 자동타이머를 수중펌프에 연결 한 후 45분 off 15분 on으로셋팅 한다.
6. 히터를 배양통에 고정 하고 자동온도조절기를 연결 후 온도설정을 40~41도로 셋팅한다.



7. 배양통의 물의 온도가 40~41도로 예열 되면 배지를 넣고 균을 접종한다.
8. 외부와의 접촉을 최소화시켜 잘 밀봉 하여 뚜껑을 덮는다.
9. 온도를 잘 유지하면서 3~7일 간 배양한다.



#### 배양 시 유의 사항

- ▶ 오염 방지를 위한 적정 온도 (40~41도) 유지
- ▶ 오염 최소화 : Hydrogen peroxide 2~5% 용액을 이용해 배양 시 접촉 자재들을 모두 소독
- ▶ 모든 작업 시 장갑 착용 및 소독 의무화

## 사. 현장 배양 시 조건별 특성 조사

### (1) 현장 배양 시 시간대별 조사

실내에서 실시한 미생물배양액의 시간대별 조사 결과 생균수변화는 3일차에서 가장 높게 측정되었고 시간 경과에 따라 감소하였으며 배양일수별 pH와 EC의 변화는 pH는 5~7, EC는 6~9mS/cm 범위로 시간 경과에 따른 큰 차이는 나타나지 않았다.

배지 종류	측정지	시간대별(배양 일수)에 따른 변화			
		1일	3일	5일	7일
BB	1차				
	생균수 (CFU/ml)	2.2×10 <sup>6</sup>	3.5×10 <sup>6</sup>	1.4×10 <sup>6</sup>	1.1×10 <sup>6</sup>
	2차				
	생균수 (CFU/ml)	3.7×10 <sup>6</sup>	7×10 <sup>6</sup>	4.5×10 <sup>6</sup>	3.2×10 <sup>6</sup>

그림 42. 시간대별(배양 일수)별 생균수 변화(실내 실험)

표 16. 시간대별(배양 일수)별 pH, EC 측정치 변화(실내 실험)

배지 종류	측정지	시간대별(배양 일수)에 따른 변화					
		0일	1일	3일	5일	7일	
BB	1차	pH	5.94	6.61	6.75	6.87	6.95
		EC(ms/cm)	6.6	6.82	7.27	8.63	8.71
	2차	pH	5.92	6.32	6.52	6.63	6.84
		EC(ms/cm)	6.71	6.87	7.92	8.16	7.48

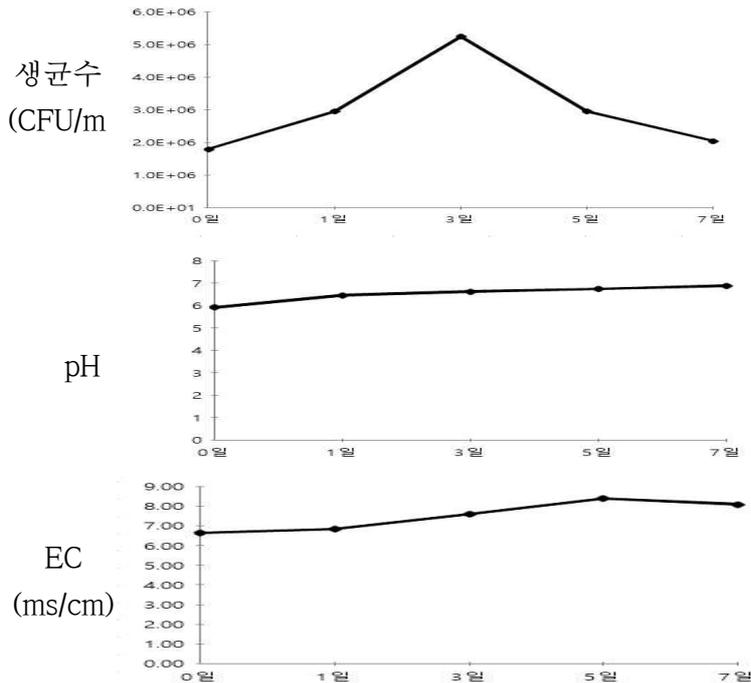


그림 43. 실내실험을 통한 시간대별(배양 일수) 생균수, pH, EC 변화 그래프(평균값)

배양일수별 생균수 변화는 배양 3일차에 미생물 개체수가 가장 높게 측정되었으며 3일 이후 시간 경과에 따라 감소하였다. 배양일수에 따른 pH와 EC 범위는 각 각 5~6, 5~6.5mS/cm로 배양일수에 따른 큰 차이는 나타나지 않았다.

배지 종류	측정지	시간대별(배양 일수)에 따른 변화			
		1일	3일	5일	7일
BB	1차				
	생균수 (CFU/ml)	$5.1 \times 10^2$	$2.5 \times 10^4$	$3.4 \times 10^4$	$5.3 \times 10^4$
	2차				
	생균수 (CFU/ml)	$2.8 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$6.3 \times 10^4$

그림 44. 시간대별(배양일수)에 따른 생균수 변화(실외 대량 배양)

표 17. 시간대별(배양일수)에 따른 pH, EC측정치(실외 대량 배양)

배지 종류	측정지	시간대별(배양 일수)에 따른 변화					
		0일	1일	3일	5일	7일	
BB	1차	pH	5.82	5.01	5.87	5.91	5.85
		EC(ms/cm)	6.01	5.24	5.57	5.51	6.19
	2차	pH	6.02	5.01	6.09	5.96	5.78
		EC(ms/cm)	5.99	5.87	6.50	6.19	6.29

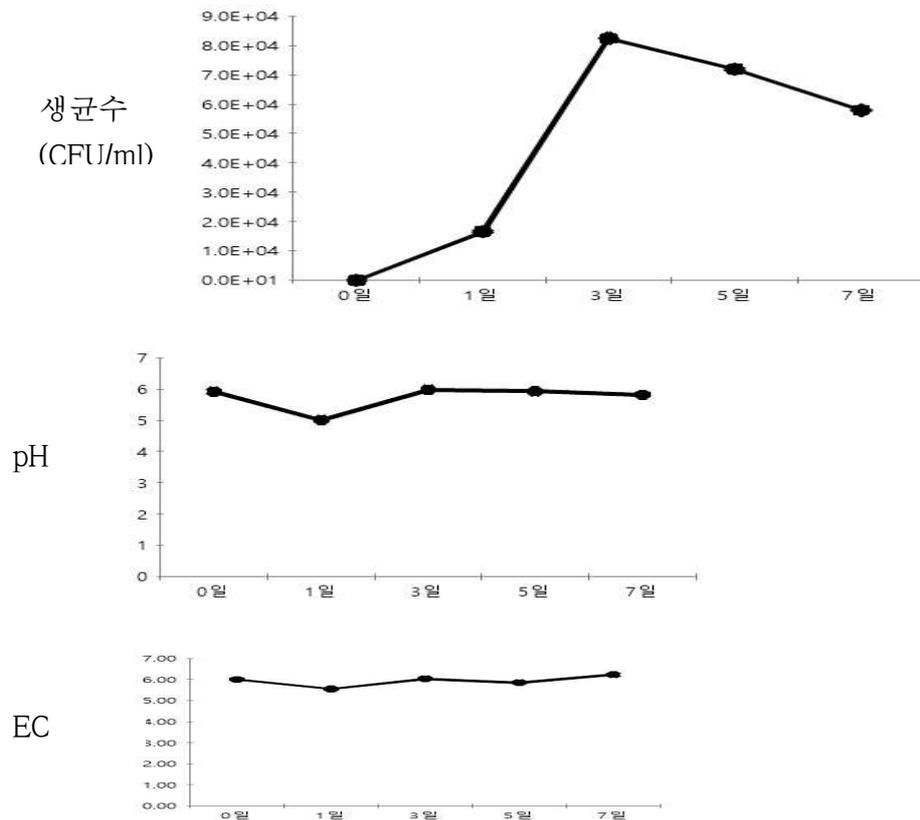


그림 45. 현장대량배양을 통한 시간대별(배양 일수) 생균수, pH, EC 변화 그래프(평균값)



그림 46. 미생물 대량 배양을 위한 제작 배양기(좌)와 미생물 배양기(우)

그림 46과 같이 *Bacillus amyloliquefaciens* Y1을 실외에서 효과적으로 배양하기 위하여 미생물 배양기를 제작(실험용)하였고, 기존의 미생물 배양기에 비해 설치비용이 약 25배 (1,000L 배양기가격 : 제작 배양기 약 400만원, 미생물 배양기 약 1억원) 저렴한 가격으로 농가에 설치가 가능하다.

추가적으로 실외에서 대량으로 배양한 미생물 배양액을 샘플링하여 공인인증기관에 유해미생물 2항목(*E.coli* 0157, *Staphylococcus aureus*)에 관한 분석을 의뢰하였고 ‘불검출’ 이란 검사 결과를 얻었다.

분석 성적서		
발주처	(주)부희네	사업자등록번호 412-81-30000
주소	07237 전라남도 장성군 삼서면 강안로 348	
대상 물품명	소	
시험 재료	2항목용, col1 0157/07, Staphylococcus aureus(정장)	
용도	자체 보관용	
③ 분석(시험) 상세 :		
항목	양적(단위)	비고
<i>E. coli</i> 0157/07	불검출	
<i>Staphylococcus aureus</i> (정장)	불검출	이외 이격
*농업기술진흥위원회 분석요청 비례 및 처리요율, 제4호의 규정에 의하여 2017년 06월 14일 제1회 처리한 시료에 대한 분석(시험) 성적입니다.		
2017년 06월 28일		
농업기술진흥위원회 이사		

분석 성적서		
발주처	(주)부희네	사업자등록번호 412-81-30000
주소	07237 전라남도 장성군 삼서면 강안로 348	
대상 물품명	소	
시험 재료	2항목용, col1 0157/07, Staphylococcus aureus(정장)	
용도	자체 보관용	
③ 분석(시험) 상세 :		
항목	양적(단위)	비고
<i>E. coli</i> 0157/07	불검출	
<i>Staphylococcus aureus</i> (정장)	불검출	이외 이격
*농업기술진흥위원회 분석요청 비례 및 처리요율, 제4호의 규정에 의하여 2017년 06월 14일 제1회 처리한 시료에 대한 분석(시험) 성적입니다.		
2017년 06월 28일		
농업기술진흥위원회 이사		

그림 47. 유해미생물 2항목(*E.coli* 0157, *Staphylococcus aureus*)에 관한 분석 성적서 결과

## (2) 현장 배양 시 환경별 조사

오염균 발생 건수를 제외 시 배양 환경별 *Bacillus amyloliquefaciens* Y1의 미생물 개체 수는  $1 \times 10^3$  CFU/mL 이상 측정되었으며 배양일 7일 기준 pH와 EC의 범위는 각각 4~6, 3.5~7 mS/cm로 측정되었다.

표 18. 환경별 시험 장소 선정

	성명	주소	비고
1	반길환	광주광역시 남구 월성동	
2	노선동	광주광역시 남구 신장동	
3	전남대학교 도시텃밭	광주광역시 북구 용봉동	

		배양 환경별 측정		
		반길환	노선동	전남대학교 도시텃밭
생균수 (CFU/ml)	1차			
		$2.3 \times 10^5$	$2.9 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$
	2차			
		-	-	$3.5 \times 10^4$
	3차			
		$1.0 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$

그림 48. 배양 환경별 생균수 변화

표 19. 배양환경별 pH, EC 측정

			배양 환경별 측정		
			반길환	노선동	전남대 도시 텃밭
pH	1차	0일	6.09	6.17	5.93
		7일	4.73	4.5	4.69
	2차	0일	6.12	5.67	6.01
		7일	7.25	6.67	4.23
	3차	0일	5.79	5.37	5.89
		7일	4.42	7.58	5.01
EC (ms/cm)	1차	0일	4.38	4.45	5.15
		7일	4.25	3.7	6.09
	2차	0일	4.85	5.15	5.09
		7일	7.75	8.94	6.41
	3차	0일	6.07	7.37	5.14
		7일	6.16	7.86	5.42



노선동 농가 배양 현장 사진



반길환 농가 배양 현장 사진



전남대학교 도시 텃밭 내 배양 사진

### (3) 현장 배양 시 사용 될 Marker 연구

실외 배양 시 pH는 4~7, EC는 2~6.5mS/cm 의 측정범위를 보였으며 현장 대량 배양 시 pH, EC값은 전반적으로 배양 환경별로 차이가 상이하게 나타났다. 이는 배양 장소(실내/실외), 농가 환경, 배양 용제(수돗물, 지하수), 주변 배양 온도, 배양 날씨, 교반 속도 등의 배양 조건 차이에서 발생하는 변수로 사료되며 이런 주변 환경 변화에 따른 조건 실험이 더 필요할 것으로 보이며 지속적으로 보완 실험을 병행해 나갈 예정이다.

표 20. 실외배양에 따른 pH, EC 종합 측정치

	배양 환경	측정 항목		비고
		pH	EC	
1	현장 대량 배양 (실외)	6.53	4.36	
2		6.45	4.44	
3		6.48	4.49	
4		6.56	4.02	
5		4.73	4.25	
6		4.81	5.09	
7		5.7	2.3	
8		4.72	5.6	
9		4.63	4.83	
10		4.5	3.7	
11		4.42	6.16	
12		4.69	6.09	
13		4.23	6.41	
14		5.01	5.42	
15		5.85	6.19	

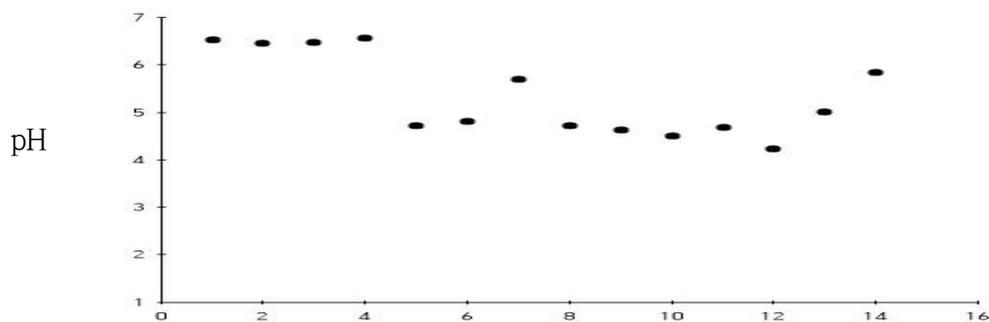


그림 49. 실외배양에 따른 pH 측정 분포도

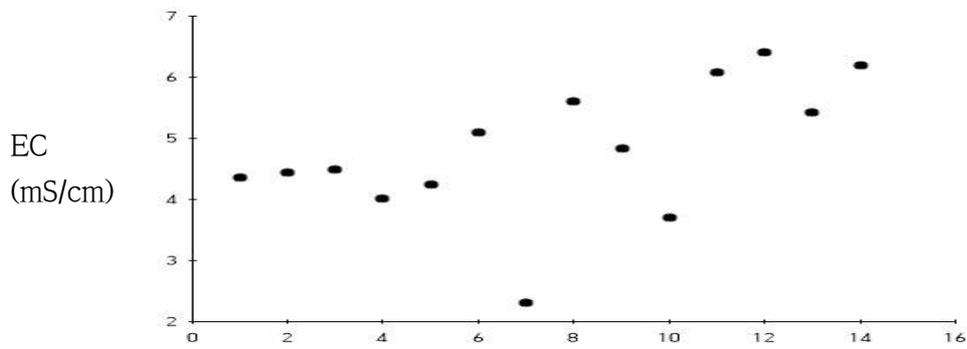


그림 50. 실외배양에 따른 EC 측정 분포도

### <현장 대량 배양 시 품질관리>

- 배양 시작 전 사용 자재 및 설비를 깨끗이 소독 후 사용할 것
- 지하수 및 하천수 사용 시 소독약을 이용하여 살균 후 배양할 것
- 배양 시작온도를 41℃로 하고 배양온도를 유지 하여 3~7일 배양 할 것
- 타 미생물이 환경으로부터 유입되지 않도록 할 것
- 배양 시 교반펌프는 1/3마력 이상을 사용해야 하며, 최고 15분마다 가동하게 할 것.
- 배양 완료 후 바로 사용하는 것이 좋으며, 보관 시 잘 밀봉하여 저온에 보관 할 것

### 아. 시제품의 마케팅

#### (1) 시험농가 운영

시험 농가를 지정하여 직접 시제품의 대량배양방법을 교육, 시현하고 정확한 배양 조건 및 배양 방법을 농가들에게 홍보하고 자 농가대량배양을 실시하였다.

표 16. 대량배양 지정시험농가

	시험농가	주 소	작물	용제	환경 조건	pH	EC (mS/cm)
1	이종희	나주시 산포면 내기리	고추	지하수	실내(하우스)	4.81	5.09
2	김주홍	전남 화순군 도곡면 신덕리	토마토	지하수	실내(하우스)	5.7	2.3
3	최재승	광주시 남구 신장동	고추	지하수	실외	4.72	5.6
4	노선동	광주시 남구 월성동	고추	지하수	실외	4.63	4.83

시험농가별 대량배양에 따른 미생물개체수는 그림42와 같으며 배양 조건별 차이로는 실내(하우스)에서 배양한 농가는 *B. amyloliquefaciens*Y1의 단일콜로니 형태를 띤 반면에 실외에서 배양한 농가의 경우 *B. amyloliquefaciens*Y1의 콜로니 외에도 다른 콜로니 형태가

관찰되었다. 현장대량배양의 경우 지하수 사용이나 농가 주변의 배양 환경이 대량 배양 성공여부에 크게 영향을 미칠수 있다는 점을 확인할 수 있었다. 또한 농가별 배양액의 이화학적 특성 조사를 위해 pH와 전기전도도(EC)를 측정하였으며 pH와 전기전도도 (EC)측정 범위는 각 각 4~6, 2~5mS/cm 로 측정 되었다.

	이종희	김주홍	최재승	노선동
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>				
생균수 CFU/ml	$5.5 \times 10^3$	$2.2 \times 10^4$	$4 \times 10^3$	$1 \times 10^4$

그림 51. 지정시험농가별 현장대량배양에 따른 미생물개체수



그림 52. 농가 대량배양 현장

## (2) 농민 및 농민 단체 교육 및 홍보

시험 농가를 선정하여 시제품 처리에 따른 영향 및 작물의 생육 상태를 관찰 하고 이러한 재배 작물의 모니터링을 통해 농민에게 교육 및 홍보 활동을 실행 하였다.

	시험 농가	주소	작물	정식 날짜	총 배포횟수	총 배포량(L)	비고
1	김남순	광주광역시 북구 운정동	고추	2016.4.11	11회	5500	
2	문옥순	광주광역시 북구 운정동	고추	2016.4.28	6회	3000	
3	안삼주	광주광역시 북구 금곡동	고추	2016.4.14	3회	1500	
4	현일식	광주광역시 북구 충효동	고추	2016.4.20	4회	2000	
5	김정홍	광주광역시 북구 운정동	고추	2016.5.4	13회	6500	
6	박봉규	광주광역시 북구 청풍동	고추	2016.4.7	7회	2700	친환경
7	이영기	전남 담양군 대덕면 장산리	고추	2016.5.3	9회	4500	친환경



광주 광역시 북구 운정동 김남순 농가



광주 광역시 북구 운정동 문옥순 농가



광주 광역시 북구 금곡동 안삼주 농가



광주 광역시 북구 충효동 현일식 농가



광주 광역시 북구 운정동 김정홍 농가

농가 및 농민단체를 중심으로 현장 방문을 통해 농가 실정 공유 및 미생물 대량 배양에 관한 교육과 제품 홍보를 실시하였다.



<서창 농협 관련 농가 방문 및 교육>



<블루베리 농가 방문 및 교육>

**(3) 농협 및 유관기관 홍보**

시제품의 연구 성과 및 효능을 바탕으로 지역 농협 및 농업기술센터에 홍보하였다.

	기관명	주소	전화번호	비고
1	광주농협	광주시 북구 동문대로 161	062-250-5000	
2	비아농협	광주시 광산구 장신로 153	062-953-9085	
3	동곡농협	광주시 광산구 동곡로 161-21	062-943-3019	
4	새남해농협	경남 남해군 고현면 탑동로 40	055-863-2545	
5	대촌농협	광주시 남구 포충로 581	062-374-6021	
6	서광주농협	광주시 서구 죽봉대로 107	062-362-8400	
7	평동농협	광주시 광산구 평동로 800절길 16	062-943-4063	
8	송정농협	광주시 광산구 내상로 3	062-942-1452	
9	남평농협	전남 나주시 남평읍 남평1로 36	061-331-2007	
10	공산농협	전남 나주시 공산면 공산로 130	061-335-3007	
11	다시농협	전라남도 나주시 다시면 다시로 177	061-335-4007	
12	득량농협	전남 보성군 득량면 역전길 48	061-853-5531	
13	대전농협	전라남도 담양군 대전면 추성1로 208	061-383-6791	
14	황룡농협	전라남도 장성군 황룡면 뱃나드리로 165	061-393-2517	
15	몽탄농협	전라남도 무안군 몽탄면 몽탄로 828	061-452-3601	
16	서창농협	광주 서구 금화로 92 서창농협	062-373-6970	
16	북광주농협	광주 북구 하서로 52	062-571-0481	
17	화순농협	전남 화순군 화순읍 칠총로 118	061-374-2356	
18	광주농업기술센터	광주 광산구 평동로 639-22	062-944-1611	
19	영광농업기술센터	전남 영광군 군서면 백수로 1481	061-350-5572	
20	장성군농업기술센터	전남 장성군 장성읍 단풍로220	061-390-7551	
21	함평군농업기술센터	전남 함평군 학교면 학교화산길 90	061-320-2500	
22	무안농업기술센터	전남 무안군 무안읍 무안로 339	061-450-4013	
23	고성농업기술센터	강원 고성군 간성읍 간성북로 87	033-680-3520	
24	진안홍삼연구소	전북 진안군 진안읍 홍삼한방로 41	063-432-0913	



<지역 농협 홍보 활동>



<고성농업기술센터 시제품 시생산 및 홍보 활동>

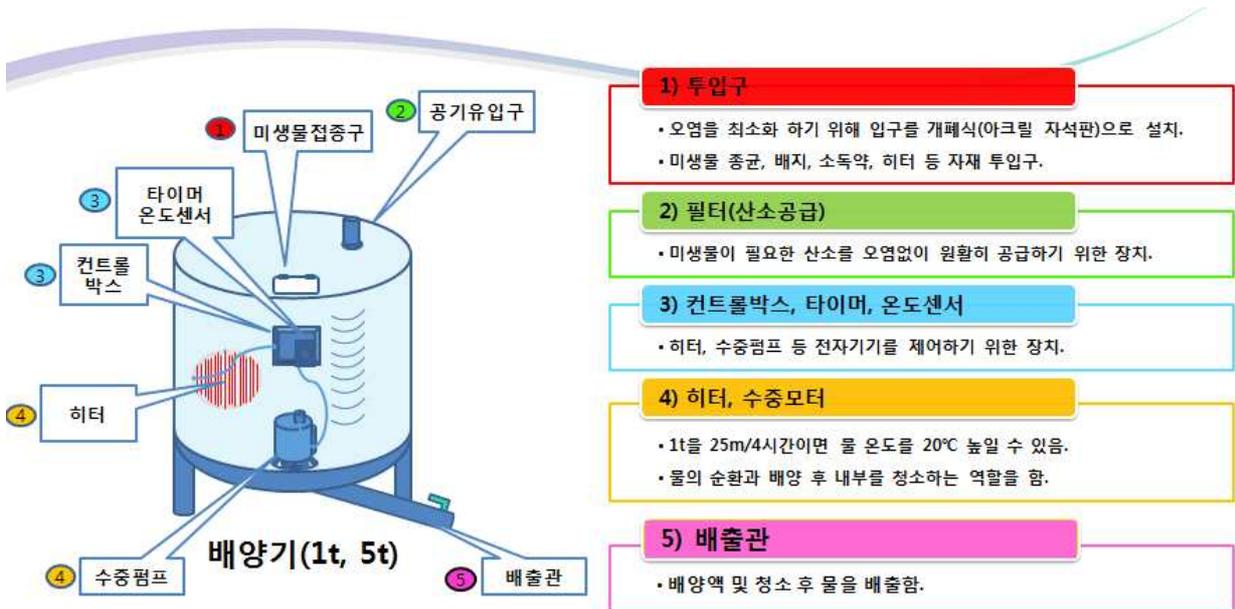


<순천농업기술센터 시제품 시생산>



<진안홍삼연구소 시제품 생산>

오염되지 않기 위해 배양기 밀폐를 위한 접종구 및 벤트에 목화솜을 필터로 사용 할 예정이며, 수중 펌프의 경우 내부 교반기 역할과 배양기 밖의 경우 자동펌프를 이용하여 자동으로 점적을 통한 관주를 할 수 있도록 설치 할 계획이다.



<미생물 배양기 기 도면>

미생물제제의 해외 시장 진출 활성화를 위해 중국 업체인 IDE Biotech사와 업무협약을 체결하였다.



〈(주)푸르네와 IDE Biotech사 간 MOU체결〉

**(4) 언론기관에 성과 홍보 및 광고**

연구성과를 활용하여 언론기관에 홍보를 하고 제품의 광고를 통해 마케팅 효과를 촉진시키고자 하였다



〈인터넷 신문 기사를 통한 홍보〉    〈인터넷 카페를 통한 정보 교류 및 홍보〉

**(5) 전국적인 유통망 구축 및 관리**

현재 구축된 전국 지사를 통해 정기적인 교육을 실시하고 정보교류를 통해 지속적인 관리를 도모하고자 한다.



<푸르네 전국 지사 분포>

표 21. (주)푸르네 지역별 지사 현황

	지사 구분	지역별 현황	분포
1	경기도	김포, 안성, 이천, 양주 등	16곳
2	충청북도	음성, 영동, 청주, 충주 등	12곳
3	충청남도	계룡, 금산, 논산, 부여 등	13곳
4	경상북도	경주, 경산, 고령, 군위 등	20곳
5	경상남도	거창, 김해, 김천, 고성 등	17곳
6	전라남도	구례, 담양, 여수, 장성 등	6곳
7	전라북도	김제, 군산, 남원, 무주 등	8곳
8	강원도	춘천, 인제, 횡성, 평창 등	9곳
9	광역시	대전, 대구, 울산 등	3곳
10	특별자치도	제주	



<지사 교육 사진>

○ 연구개발 성과

□ 논문(국내외 전문학술지) 게재

-총 10편의 논문을 게재 및 게재 예정을 발표하였음

-SCI논문 6편과 4편의 비 SCI논문

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일
1	Biological control potential of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KB3 isolated from the feces of <i>Allomyrina dichotoma</i> larvae	The Plant Pathology Journal	남효송, 김영철	32: 273 - 280	대한민국	한국식물병리학회	SCI	2016. 05
2	Isolation and antifungal activity of methyl 2,3- dihydroxybenzoate from <i>Paenibacillus elgii</i> HOA73	Microbial Pathogenesis	이용성, 김길용	106: 139 - 145	영국	Elsevier	SCI	2017. 05
3	Purification and characterization of a major extracellular chitinase from a biocontrol bacterium, <i>Paenibacillus elgii</i> HOA73	The Plant Pathology Journal	박서기, 김영철	33: 318 - 328	대한민국	한국식물병리학회	SCI	2017. 05
4	Quorum sensing is a key regulator for the antifungal and biocontrol activity of chitinase-producing <i>Chrorobacterium</i> sp. C61	Molecular Plant Pathology	김인선, 양시영, 박서기, 김영철	18: 134 - 140	영국	BSPP	SCI	2017. 01
5	Effect of plant growth-promoting bacteria <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y1 on soil properties, pepper seedling growth, rhizosphere bacterial flora and soil enzymes	Plant Protection Sciences	자말, 김길용		체코	Czech Academy of Agricultural Sciences	SCI	
6	Biopesticides produced by plant-probiotic <i>Pseudomonas chlororaphis</i> isolates	Crop Protection	앤더슨, 김영철	105: 62 - 69	네델란드	Interantional Association for the Plant Protection Sciences	SCI	2018. 03
7	Isolation and biocontrol potential of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y1 against fungal plant pathogens	Korean Journal of Soil Science and Fertilizer	자말, 김길용	48: 485-491	대한민국	한국토양비료학회	비SCI	2015. 09
8	Correlation between biosurfactants and antifungal activity of a biocontrol bacterium, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LM11	Research in Plant Disease	강범용, 김영철	23: 1-10	대한민국	한국식물병리학회	비SCI	2017. 06
9	Purification and antifungal characterization of cyclo (D-Pro-L-Val) from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y1 against <i>Fusarium graminearum</i> to control head blight in wheat	Biocatalysis and Agricultural Biotechnology	자말, 김길용	10: 141 - 147	대만	International society of Biocarlaylsis and Agricultural Biotechnology	비SCI	2017. 04
10	Effect of a bacterial grass culture on the plant growth and disease control in tomato	Research in Plant Disease	이용성, 김길용	23: 295-305	대한민국	한국식물병리학회	비SCI	2017. 12

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

-총 19건의 국내외 학술발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2015 한국식물병리학회 춘계 학술발표회 포스터 발표 "Biological control activities of an insect endo-symbiotic bacterium <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KB3"	김영철	2015.04.23.	충북대	대한민국
2	2015 한국식물병리학회 춘계 학술발표회 포스터 발표 "Role of a major extracellular chitinase produced by a biocontrol bacterium <i>Paenibacillus elgii</i> HOA71"	김영철	2015.04.23.	충북대	대한민국
3	2015 한국식물병리학회 국제 심포지엄 "Biological potentials of a <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KB3 isolated from feces of <i>Allomyrina dichotoma</i> "	김영철	2015.10.21	거제도	대한민국

4	2015 한국식물병리학회 국제 심포지엄 "A neutral extracellular protease produced by a biocontrol bacterium <i>Paenibacillus elgii</i> HOA71 is another biocontrol factor"	김영철	2015.10.21	거제도	대한민국
5	2015 한국식물병리학회 국제 심포지엄 "Biocontrol potentials of a biocontrol bacterium <i>Paenibacillus elgii</i> HOA73"	김영철	2015.10.21	거제도	대한민국
6	3th International Symposium on Biodiversity; 10-14 2015 at Tay Nguyen University Buon Ma Thuot Vietnam	김길용	2015.08.14	Tay Nguyen university	베트남
7	International Conference on Inventions and Innovations for Sustainable Agriculture "Isolation of bacillomycin D from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y1 and investigation of its onsite mass cultivation potential"	김길용	2016.07.08	Silpakornuniversity	태국
8	International Conference on Inventions and Innovations for Sustainable Agriculture "Effect of plant growth promoting bacteria <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y1 on pepper seedling growth, rhizosphere bacterial flora and soil enzymes"	전현덕	2016.07.08	Silpakornuniversity	태국
9	International Conference on Inventions and Innovations for Sustainable Agriculture "Biocontrol determinants of a chitinase producing <i>Paenibacillus elgii</i> HOA73"	김영철	2016.07.08	Silpakornuniversity	태국
10	2016 한국식물병리학회 춘계 학술발표회 포스터 발표 "Screening of resistance of pepper cultivars to bacterial spot caused by <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> 173-1"	김영철	2016.04.22	전주, 농진청	대한민국
11	2016 한국식물병리학회 춘계 학술발표회 포스터 발표 "Biological control activities of an insect endo-symbiotic bacterium <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KB3"	김영철	2016.04.22	전주, 농진청	대한민국
12	2016 한국식물병리학회 추계 국제학술발표 포스터 발표 "Insights into antifungal and biocontrol activity of a chitinase producing bacterium <i>Paenibacillus elgii</i> HOA73 against <i>Botrytis cinerea</i> "	김영철	2016.10.20	서울대 평창캠퍼스	대한민국
13	2016 한국식물병리학회 추계 국제학술발표 포스터 발표 "Cloning, experssion and characterization of a major extracellular chitinase from a biocontrol bacterium <i>Paenibacillus elgii</i> HOA73"	김영철	2016.10.20	서울대 평창캠퍼스	대한민국
14	2016 한국식물병리학회 추계 국제학술발표 포스터 발표 "Biochemical characteristics of a major extracellular chitinases from a chitin-degrading biocontrol bacterium, <i>Paenibacillus elgii</i> HOA73"	김영철	2016.10.20	서울대 평창캠퍼스	대한민국
15	2016 한국식물병리학회 추계 국제학술발표 포스터 발표 "Plant growth promoting activities of an insect symbiotic <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KB in tomato and pepper seedlings"	김영철	2016.10.20	서울대 평창캠퍼스	대한민국
16	2017 한국식물병리학회 춘계 학술발표 구두발표 "An effective and practical approach for control of plant pests using mass-cultivation of biocontrol bacteria"	김영철	2017.4.28	한국과학기술연합회	대한민국
17	2017 아시아 국제 식물병리학회 포스터 발표 "Purification and characterization of a major extracellular chitinase from a biocontrol bacterium, <i>Paenibacillus elgii</i> HOA73"	김영철	2017.09.14	제주컨벤션센터	대한민국
18	2017 아시아 국제 식물병리학회 포스터 발표 "Correlation between biosurfactants and antifungal activity of a biocontrol bacterium, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LM11"	김영철	2017.09.14	제주컨벤션센터	대한민국
19	2017 미국원예학회 포스터 발표 (2017 ASHS Annual conference "Characterization of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y1 on autoclaved and H2O2 treated medium"	전현덕, 이용성, 김길용	2017.9. 21	하와이 와이코로아	미국

□ 생명자원(생물자원)/화합물

- 3건의 미생물 자원을 등록함.

		코드번호		E-05	
No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기 탁번호	등록/기탁기관		발생년도
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y1	KCTC 13071BP	Korean Collection for Type Cultures		2016.08.04
2	<i>Paenibacillus elgii</i> HOA73	KACC 19018	Korean Agricultural Type Culture Collection Center		2016
3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PPL	KACC 92167P	Korean Agricultural Type Culture Collection Center		2017

□ 지식재산권

- 3건의 특허를 출원함

		코드번호		E-06					
No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	식물병원성 곰팡이에 대한 방제활성을 갖는 신규 바실러스 아미로리퀴파시엔스 Y1	대한민국	전남대 산학협력단 김길용 이용성 전현덕	2016.11.10	10-2016-0140583				100%
2	식물병해 방제 조성물 및 방법	대한민국	전남대 산학협력단 김영철 강범용	2017. 05. 02	10-2017-0056291				100%
3	균주 배양액의 항균활성 예측율을 위한 정보 제공 방법 및 균주 배양액을 포함하는 항균용 조성물	대한민국	전남대 산학협력단 김영철 강범용	2017. 05. 02	10-2017-0062901				100%

□ 기술 및 제품 인증

- 제품 등록 2건

		코드번호		E-09		
No	인증분야	인증기관	인증내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증번호		
1	제품등록	순천대학교 산학협력단	유기농업자재	공시-3-4-024	2016.10.19	대한민국
2	제품등록	장성군청	토양미생물제제	전남 장성20-가-20301	2016.11.25	대한민국

□ 기술이전

- 유상 기술이전 1건

		코드번호		E-12		
No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	유상 노하우기술이전	특정기질 및 온도를 이용한 기능성 미생물분리, 동정 노하우	주식회사 푸르네	2016.10.10	5,500,000원 (부가세 포함)	

□ 산업지원(기술지도)

- 농민강의 49건

		코드번호		E-19	
No	내용	기간	참석대상	장소	인원
1	2015년 고추 마이스터 대학	2015년 고추 마이스터 병해충 기초반	고추 병의 종류와 특성.	2015.02.25.	25
2	2015년 고추 마이스터 대학	2015년 고추 마이스터 병해충 기초반	주요 고추 바이러스별 방제법 및 적용	2015.03.18.	25
3	2015년 고추 마이스터 대학	2015년 고추 마이스터 병해충 기초반	생물살균제 사용법 및 친환경적 방제법 및 적용	2015.03.25.	25

4	2015년 제주대 친환경과수 마이스터 대학.	2015년 제주대 친환경과수 마이스터 대학	농업미생물의 생장 및 생육에 미치는 요인	2015.08.05.	25
5	2015년 제주대 친환경과수 마이스터 대학.	2015년 제주대 친환경과수 마이스터 대학	토양미생물의 종류 및 식물 생장에 미치는 영향	2015.08.26.	25
6	2015년 전남농업마이스터 멜론반 전공 강의	2015년 전남농업마이스터 멜론반 전공	친환경농업의 이해	2015.02.24.	25
7	농업과학원 도시락 포럼	파워포인트 자료	그람음성균을 이용한 작물환경스트레스 예방 및 병해충 방제 연구	2015.10.02.	150
8	2015 고추 마이스터 대학	2015년 고추 마이스터 병해충 기초반	고추의 세계 추세 현황	2015.02.04	25
9	전북 사관	파워포인트 자료	고온성미생물이 병해충 방제와 작물성장에 미치는 영향	2015.02.26	120
10	2015 고추 마이스터 대학	2015년 고추마이스터 병해충 기초반	고추재배 시 필요한 영양 물질, 미생물과의 연관관계	2015.04.29	25
11	함평 기술센터	파워포인트 자료	고온성미생물 대량배양 방법	2015.05.04	100
12	농협대학교	파워포인트 자료	고온성미생물의 병해충방제 및 작물성장	2015.06.30	120
13	나주 농림부	파워포인트 자료	미생물 농법에 대한 기초 정의	2015.07.20	40
14	2015년 제주대 제주 친환경감귤마이스터	2015년 제주대 제주친환경감귤마이스터	미생물 농법에 대한 기초 정의	2015.08.25	25
15	2015년 제주대 제주 친환경감귤마이스터	2015년 제주대 제주친환경감귤마이스터	고온성미생물의 병해충 방제 및 작물성장	2015.09.23	25
16	고성군농업기술센터	파워포인트 자료	기능성 미생물이 작물의 성장 및 병해충 방제에 미치는 영향.	2016.02.18.	100
17	동송농협	파워포인트 자료	젤라틴 키틴 분해 미생물 활용한 고추친환경농업강의	2016.02.17	100
18	포천시농업기술센터	파워포인트 자료	친환경 농업 실천을 위한 미생물 농법의 이해	2016.02.17	100
19	광주광역시농업기술센터	파워포인트 자료	미생물이해 및 활용	2016.03.31	100
20	광주광역시농업기술센터	파워포인트 자료	고온성 미생물이 식물성장과 병해충 방제에 미치는 영향	2016.04.07	100
21	전라북도농식품인력개발원	파워포인트 자료	친환경농업의 이해	2016.03.24	100
22	순천농협	파워포인트 자료	미생물을 이용한 친환경 농법	2016.03.23	100
23	광주광역시농업기술센터	파워포인트 자료	미생물이해 및 고온성 미생물이 식물 성장과 병해충 방제에 미치는 영향	2016.04.15	120
24	농협중앙회	파워포인트 자료	미생물과 퇴비	2016.04.22	150
25	제주농업마이스터대학	파워포인트 자료	유용미생물의 농업적활용	2016.05.20	25
26	완도군농업기술센터	파워포인트 자료	기능성 미생물이 작물의 성장과 병해충 방제에 미치는 영향	2016.08.12	150
27	제주농업마이스터 친환경과수	파워포인트 자료	유기농자재 활용기술 탐색 및 활용	2016.03.23	25
28	제주농업마이스터 친환경과수	파워포인트 자료	병해충 자재의 조제 및 활용	2016.04.06	25
29	화순농협1기 친환경농업대학	파워포인트 자료	식물병 방제용 유기농자재	2016.02.24	85
30	전남대 유기농전문가 과정	파워포인트 자료	병해충방제 농자재 조제 및 사용실습	2016.04.27	40
31	전남대 유기농전문가 과정	파워포인트 자료	미생물활용 병해 방제 원리	2016.07.13	40
32	전남대 유기농전문가 과정	파워포인트 자료	작물병해방제용 농자재 제조 및 실습	2016.08.17	40
33	전남대 유기농전문가 과정	파워포인트 자료	식물병 발생원리 및 병원균 종류	2016.08.31	40
34	고추 마이스터 대학 고추반	파워포인트 자료	유기농자재 실습	2016.10.14	25
35	제주농업마이스터 친환경과수	파워포인트 자료	미생물활용 병해 방제 원리	2016.08.29	25
36	제주농업마이스터 친환경과수	파워포인트 자료	미생물활용 병해 방제 원리	2016.08.30	25
37	찾아가는 유기농 전문기술 보급사업	파워포인트 자료	작물보호기술 고추	2016.06.23	200
38	친환경농업육성과정, 농식품공무원연수원 1기	파워포인트 자료	친환경병해충방제기법	2016.06.27	45
39	친환경농업육성과정, 농식품공무원연수원 2기	파워포인트 자료	친환경병해충방제기법	2016.10.18	45
40	제주농업마이스터 대학 감귤 1 전공	파워포인트 자료	유기농자재 활용	2016.11.21	23
41	화순농협 2기 친환경농업대학	파워포인트 자료	작물병해 진단법 및 활용	2016.12.08	86

42	화순농협 2기 친환경농업대학	과워포인트 자료	식물병의 원인과 발생원리	2017.1.11	86
43	화순농협 2기 친환경농업대학	과워포인트 자료	PGPR	2017.1.18	86
44	전남농업마이스터 대학 병해충 방제학 기초	과워포인트	고추병의 종류와 특성	2017.2.10	23
45	전남농업마이스터 대학 병해충 방제학 기초	과워포인트	고추 병 방제 전략	2017.3.15	23
46	전남농업마이스터 대학 병해충 방제학 기초	과워포인트	고추 병 친환경 방제 전략	2017.4.5	23
47	전남농업마이스터 대학 병해충 방제학 기초	과워포인트	미생물활용 고추병 방제 전략	2017.6.21	23
48	제주농업마이스터 친환경과수	과워포인트	미생물활용 과수 병해 방제	217.7.24	23
49	농식품공무원 교육원	과워포인트	친환경병해충방제기법	2017.4.3	35

전문연구 인력양성

- 박사후연구원 1명, 박사 1명, 석사 1명, 학사 1명

		코드번호		E-23									
No	분류	기준년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	학,석사, 박사	2017	2	1	1		3					4	

타 연구개발사업에의 활용

- 농림부 과제에 주 제품으로 활용하고 있는 중임.

		코드번호		E-25	
No	과제발주처	사업명	과제명	책임자	연구비
1	농림부	농생명산업기술개발사업	한국형 친환경 표준 재배기술 및 유기농 식품 첨가물 생산기술개발	정우진	800,000천원/년, 5년

사업화성과 및 매출실적

사업화 현황

- 기술이전으로 제품 2건 등록

(단위 : 명, 년)

		코드번호		E-14						
No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	기술이전	신제품개발	국내	기능,고온성 미생물 대량배양제품의 상용화	제품화	(주)푸르네	45		2016	5
2	기술이전	신제품개발	국내	기능,고온성 미생물 대량배양제품의 상용화	제품화	(주)푸르네	71		2017	5

□ 매출실적(누적)

- 총 누적 매출 113백만원-지씨엠-3 제품

(단위 : 백만원)

		코드번호		E-15	
구분	발생년도	매출액		합계	산정방법
		국내	국외		
사업화명	2016년	42백만원	천\$	42백만원	제품 판매처의 전자세금계산서 합계액
	2017년	71백만원	천\$	71백만원	제품 판매처의 전자세금계산서 합계액
	합계	113백만원	천\$	113백만원	

□ 고용창출

- 박사후 연구원 1명, 회사 연구원 4명

			코드번호				E-16	
No	사업화명	사업화업체	2014년	2015년	2016년	2017년	○○○○년	합계
1	고온성미생물 제제의 실용화 및 사업화	(주)푸르네	1명	0명	3명	0명	명	4명
2	친환경 고추 미생물 개발	전남대 친환경농업 연구소	명	명	1명	1명	명	1명
합계			1명	0명	4명	0명	명	5명

□ 경제적 파급효과

(단위 : 백만원/년)

		코드번호				E-18	
구분	사업화명	수입대체	수출증대	매출증대	생산성향상	고용창출 (인력양성 수)	그 외
당해 연도	고온성미생물제제의 실용화 및 사업화			117		4	

□ 홍보실적

- 신문 뉴스매체 7건, 전시회 4건
- 포상 2건

				코드번호	E-28
No	홍보유형	매체명	제목	일자	
1	신문	농민신문	수량·품질 높이는 ‘젤라틴·키틴분해 미생물농법’ 소개 대량 자가배양…생산비 절감 지역농협·해외 적용사례…억대 부농의 경험담 담아	2015.03.10	
2	신문	아시아경제, 광남일보, 파인뉴스	“키틴분해미생물을 활용한 친환경 농법”	2015.05.19	
3	뉴스	KBS광주	친환경 고추 병해 방제용 고온성 미생물 1종 개발 및 대량배양을 통한 현장 실용화	2016.01.14	
4	신문	광남일보, 농민신문, 무등일보, 뉴시스, KNS뉴스통신	미생물 활용 친환경 고추 재배 효과 ‘톡톡’	2016.01.14	
5	뉴스	YTN	친환경 미생물 농법으로 고추 생산량 2배 증가	2016-01-24	
6	신문	환경일보	고성군, 친환경 농업을 위한 미생물 농법 교육 추진	2016.02.18	
7	전시회	전남대학교 우수농산물테크페어	미생물배양 세트 등	2016.07.01	
8	전시회	친환경 표준 재배기술개발 심포지엄	미생물배양 세트 등	2016.8.31	
9	전시회	전남 친환경농업인 한마음대회	미생물배양 세트 등	2016.11.29	
10	잡지	신동아	밥상 살리는 미생물… 농가 소득도 경춘! 친환경 비료 겸 농약 전문기업 ‘푸르네’	2017.10월호	
11	전시회	대전국제농업기술전	미생물배양 세트 등	2017.11.01	

□ 포상 및 수상실적

				코드번호	E-29	
No	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일자	포상기관
1	표창장	공로상	연구과제 결과를 광주광역시 농가에 보급한 공로	전현덕 연구원	2017년 12월 20일	광주광역시장
2	우수 포스터상	우수 포스터 3위	연구과제 결과를 ICISA 2016 학술발표함	전현덕 연구원	2016년 7월 8일	태국 실바콘대학

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	1.6 억원	
			향후 3년간 매출	5 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 2 % 국외 : 0.2 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 6 % 국외 : 0.6 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		2015 ~ 2020		
	소요예산(백만원)		800		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			1.6	5	10
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	2	6	10
국외		0.2	0.6	1	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		<ul style="list-style-type: none"> <li>● 고온성미생물의 배양이 가능한 최적의 고가, 저가 대량배양기 개발</li> <li>● 고온에서 강력한 단일증식 능력을 가진 미생물 종균 개발</li> </ul>			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	3	10	20	
	수 출		1	5	

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호                      D-06

##### 4-1. 목표달성도

##### 1. 년차별 연구개발 목표달성도 및 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2015)	[제1세부] 고온성 미생물의 고추 병해 방제 실내 효능 분석 및 최적 조건 확립	기 분리된 고온성 균주의 최적 배양 조건 및 효능 분석	100	- <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Paenibacillus elgii</i> 고추 병원균 항균활성 검정을 통해 항균활 성 최적배지 도출함
		최적 조건배양 미생 물의 주요 고추 병 해 방제 효능 검증	100	- 고온성 미생물 배양액을 이용하여 다양한 고추 병해에 대해 방제 능력을 예방 및 치료로 나누어 서 검정함.
		미생물 특이 마커 개발 및 QC	100	- 고온성 미생물의 생물계면활성 능력과 항균활 성과의 상관관계 분석하여 생물계면활성이 중요 한 QC마커로 활용될 수 있음을 밝힘
	[제2세부] 소규모 조건에서 비 멸균조건 대량배양 연구 및 포트에서 작물 생육 효과 조사	고온 기능성 미생물 특성 연구	100	- 고온성 미생물의 항균활성 물질 동정하여 다 양한 물질을 동정함 - 고온성 미생물 배양액 양분 변화 pH, EC 변 화, 무기태질소, 유기태 질소, 유기물 함량 등을 검정함
		소규모 비 멸균조건 대량배양 연구	100	- 키턴과 고온을 이용하여 고온성 미생물을 선 택적으로 대량 배양 방법을 확립함
		미생물 처리를 통한 작물 특성 조사	100	- 고온성 미생물 배양액을 토양에 관주하여 고 추의 수량이 증가함을 밝힘 - 미생물 배양액을 토양에 관주하여 토양화학성 변화 측정함 ; pH, EC, OM, 총질소, 유효인산 - 미생물 배양액을 토양에 관주하여 토양에 고 온성 미생물의 존재를 확인함 - 고온성 미생물의 토양미생물 활력도 조사; Chitinase 및 dehydrogenase
		포트에서 미생물 처리를 통한 비료사용량 절감 효과 연구	100	- 다양한 농도로 미생물 처리에 의해 비료의 사 용량을 1/2정도 감소됨을 확인함
	[제1협동] 시제품의 제작 및 등록	시제품의 대량 생산을 위한 경제적 제조 실험	100	- 시제품 대량 생산 시 미생물 접종 및 배지 양 조절을 통한 최적의 조성을 조사함.
		시제품의 유통기한 실험 및 QC	100	- 가열 안정성 시험함. - 저온 안정성 시험함. - 경시 변화 시험함(1차 년도).
		자체 약해 시험	100	- 포트에서 약해 시험함(고추).
		시제품 등록을 위한 안전성 검사	100	- 공인기관 시험 의뢰(독성 및 안전성, 약해)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2016)	[제1세부] 고온성 미생물의 고추 병해 방제 실내 효능 분석 및 최적 조건 확립	개발 미생물의 제형 화	100	- 고온성 미생물의 액상 및 건조 제형화 조제함 - 제형화된 미생물 시제품의 고추 병해 효능 검 정을 통해 건조 제형이 효능이 있음을 확인함 - 제형화된 제품을 자가 대량 배양 후 고추 병해 효능 검정하여 1:5로 희석한 배양액이 80%이상 의 방제가를 보임
		현장 배양액과 기 개발된 병해충 방제 제와의 효능 증진	100	- 미생물 배양액과 고추 병해 방제용 유기농 자 재와 혼용하여 혼용가부를 확인함. - 유기농자재 중 강산성이나 강알칼리성 유기농 자재는 미생물 배양액의 효능을 현저히 감소시킴 을 밝힘 - 특정 미생물 배양 혼합액은 고추 CMV를 방제 하는 능력이 있음을 밝힘
		개발 미생물의 약효 약해 검증	100	- 대량배양 미생물은 고추와 토마토의 생육을 증 진함을 밝힘 - 다른 농약이나 식물추출물의 혼합에 의한 약효 유지함을 밝힘 - 미생물 배양액의 예방 살포 시 다양한 병해에 대해 80% 이상의 효능을 보임
	[제2세부] 소규모 조건에서 비 멸균조건 대량배양 연구 및 포트에서 작물 생육 효과 조사	대규모 비 멸균조건 대량배양 연구	100	- 키틴, 개발된 저가 미생물 배지, 및 고온을 이 용하여 대규모 미생물 배양 방법 확립함
		병해 방제 물질 탐 색	100	- 다양한 항균활성 물질이 고온성 미생물 배양액 에 분비됨을 확인함 (cyclic dipeptide 등)
		미생물 처리를 통한 작물 특성 조사	100	- 고온성 미생물 배양액을 관주하여 고추의 수량 이 증가함을 확인함
		토양화학성 변화 측 정	100	- 미생물 배양액을 토양에 관주하여 토양화학성 변화 측정함 ; pH, EC, OM, 총질소, 유효인산
		토양 미생물 군집 확인	100	- 미생물 배양액을 토양에 관주하여 토양에 고온 성 미생물의 존재를 확인함
		토양미생물 활력도 조사	100	- 고온성 미생물의 토양미생물 활력도 조사; Chitinase 및 dehydrogenase
	[제1협동] 시제품의 제작 및 등록	시제품의 유통기한 실험 및 QC	100	- 경시 변화 시험함(2차 년도).
		시제품의 등록을 위한 안전성 검사	100	- 공인기관 시험 의뢰함(독성 및 안전성).
		시제품의 등록	100	- 공인기관에 제품등록 신청 및 서류를 제출함.
		농가 현장 배양 시 최적 환경조사	100	- 현장 대량 배양 시 미생물 접종량 및 배지를 조절하여 미생물 개체수를 측정함. - 현장 대량 배양 시 배양 장비 및 배양방법 매뉴얼을 작성함.
		시제품의 마케팅	100	- 시험농가를 선정하여 시험포를 운영함. - 농민 및 농민 단체 교육 및 홍보함. - 연구 성과를 바탕으로 농협 및 유관기관 에 홍보함.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2017)	[제1세부] 고온성 미생물의 고추 병해 방제 실내 효능 분석 및 최적 조건 확립	개발 제품과 사용 방법의 포장 실증	100	- 개발 제품과 대량 고온성 미생물 배양액을 살포하여 다양한 병해 방제 능력을 확인함 (역병, CMV, 탄저병) - 개발 제품과 대량 고온성 미생물 배양액을 이용하여 CMV방제 효능이 50배 희석액에서도 확인함
		개발 미생물의 고추 병해 방제용 농가 이용 방법 개발	100	- 다양한 유기농 자재와 식물 추출물과의 혼용을 검정하여 대부분의 유기농자재와 식물추출물과 혼용이 가능함을 확인함 - 적용 병해충 별 대량배양액과 유기농자재와의 혼용 가부에 따라 병해충 방제 방법 개발함 - 고온성 미생물 배양액의 pH와 surface tension을 이용하여 병해 방제 시기 결정을 확립함
	[제2세부] 소규모 조건에서 비 멸균조건 대량배양 연구 및 포트에서 작물 생육 효과 조사	병해 방제 능력 조사	100	- 2차년도에 계속하여 다양한 미생물 배양액내에서의 항균활성 물질을 동정함
		대규모 비 멸균조건 대량배양 연구	100	- 키틴, 개발된 저가 미생물 배지, 및 고온을 이용하여 대규모 미생물 배양 방법 확립함
		미생물 처리를 통한 작물 특성 조사	100	- 고온성 미생물 배양액을 관주하여 고추의 수량이 증가함을 확인함
		토양화학성 변화 측정	100	- 미생물 배양액을 토양에 관주하여 토양화학성 변화 측정함 ; pH, EC, OM, 총질소, 유효인산
		토양 미생물 군집 확인	100	- 미생물 배양액을 토양에 관주하여 토양에 고온성 미생물의 존재를 확인함
		토양미생물 활력도 조사	100	- 고온성 미생물의 토양미생물 활력도 조사; Chitinase 및 dehydrogenase
		Band(밴드) 등을 이용한 농가와 네트워크 구성	100	- 고추 밴드와 농가 교육을 통해서 개발된 제품과 매뉴얼을 농가현장에서 실증함 (10곳 이상)
	[제1협동] 시제품의 제작 및 등록	시제품의 대량 생산을 위한 경제적 제조 실험	100	- 시제품 대량 생산 시 미생물 접종 및 배지 양 조절을 통한 최적의 조성을 조사함.
		시제품의 유통기한 실험 및 QC	100	- 가열 안정성 시험함. - 저온 안정성 시험함. - 경시 변화 시험함(1차 년도).
		자체 약해 시험	100	- 포트에서 약해 시험함(고추).
		시제품 등록을 위한 안전성 검사	100	- 공인기관 시험 의뢰(독성 및 안전성, 약해)

2. 평가의 착안점과 수행성과

구분	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준 (●) 과 수행성과 (◆)
제1 세부	농가현장에서 자가 배양된 미생물의 선택배양은 되었는가?	10	●배양액 중 접종 미생물 균체 수 $10^6$ 이상 확보 ◆고온성 미생물을 제품화하여 $10^9$ 이상 유지함
	현장에서 배양된 미생물과 유기농자재와의 효능이 검증되었는가?	10	●병해방제 실내효능 80% 이상 ◆고추병해 방제 CMV, 탄저병 등을 80% 이상 방제
	현장배양 미생물의 quality control (QC)이 가능한가?	10	●배양액에 병원성 미생물 무검출 ●해당 미생물의 선택적 분석 ◆병원성 미생물 불검출되었으며, 고온과 살균방법으로 선택적으로 배양에 성공함
제2 세부	개발된 제제의 효능이 농가포장을 대상으로 시험되었는가?	15	●농가포장 200평 규모 1개 이상 ●2농가 이상 대상 시험 ◆10군데 이상의 농가에서 현장에서 시험함
	제품이 농가에 활용될 수 있는가?	15	●사용 매뉴얼 1건 이상 ◆2건(노지, 온실)의 사용 매뉴얼을 제작함
제1 협동	제품의 병원성 여부는 없는가?	5	●유기농자재등록 기준에 합당 ●독성 및 안전성 시험 통과 ◆유기농자재로 등록함
	제품의 미생물 균체수가 일정하게 유지되는가?	5	●6개월 이상 $10^6 \sim 10^8$ ◆고체분말로 2년 이상 농도를 유지함
	제품의 약효가 6개월 이상 지속하는가?	10	●6개월 이상 ◆농자재 등록하여 2년 이상 약효 지속함
	미생물제제가 농가포장 효능 검증에서 유기농자재등록기준에 적절한가?	10	●대상병해충 방제효능 50% 이상 ◆고추 대상 병해충 방제효능 50%이상으로 유기농자재로 등록함.
	개발 미생물제의 보급체계가 구축되었는가?	10	●농협 및 농가 단위 ◆농협과 농가 단위로 푸르네에서 보급체계를 갖추어 매출을 달성함
합계		100	

## 4-2. 관련분야 기여도

### 1. 고온성 미생물 현장 대량 배양 관련 기여도

다양한 미생물의 배양을 통한 농가에 보급하는 시스템이 농촌진흥청과 시도 농업기술센터에서 진행되고 있으나, 고가의 배지와 정확한 병해충 방제에 대한 정확한 정보가 제공되지 못하고 있는 실정이다. 본 연구에서는 고온성 미생물을 선택적으로 저가로 배양할 수 있는 기술을 창의적으로 개발하였고, 본 연구를 수행한 결과 고온성 미생물 배양액을 작물에 관주함으로써 화학비료의 사용량을 감소시킬 뿐만 아니라, 1:5의 비율로 희석하여 사용할 경우에는 고추 뿐만 아니라 다양한 병해충을 감소시킬 수 있는 방법을 개발하여 고온성 미생물을 농가 현장에서 사용 가능성을 제시하였다. 이러한 기술은 순창군, 광주광역시 등 시군 기술센터와 진안 홍삼연구소에서 현재 활용하여 많은 농가들이 사용하고 있는 있다. 이들 기술을 더 많은 작물과 시군 기술센터에 활용하여 앞으로 미생물을 활용하여 친환경 작물재배에 크게 기여할 것이다.

### 2. 작물 미생물 제품 시장 관련 기여도

전 세계적으로 생물과 환경에서 미생물의 중요성에 대한 연구와 산업화가 활성화가 되고 있음(미국 오바마 정부의 2016년 1억 2천만 달러 Microbiome initiative project(NASA, NIH, Energy, NSF, 미농무부), Bill과 Melinda Gates Foundation, 1억 달러 Microbiome research 지원하고 있는 실정이다. 작물의 성장에서 필수 성분 중의 하나로 미생물로 인식이 되고 있다. 미생물은 작물의 영양분 흡수(질소고정균, 인산가용균, 균근), 작물병해충 및 환경스트레스(가뭄, 고염, 고온 등)에 대한 면역 및 저항성 유도, 정상적인 작물 성장(미생물의 작물생장 혹은 병원균 생장억제 대사물질)와 작물의 flavor향상(딸기, *Methylobacterium extorquens* furanones) 등에 기여하고 있다.

세계 농(미생물비료 및 농약)축산용(사료첨가제, 생균제 등) 미생물산업 시장(한국생명공학연구원/미생물 제품 시장, 2011년)은 농업용: 2010년 2.2조원 → 2011년 5.1조원 → 2020년 16.2조원, 축산용은 2010년 1.8조원 → 2011년 1.9조원 → 2020년 3.4조원이 될 것으로 예상되고 있다. 하지만 국내 농(미생물비료 및 농약)축산용(사료첨가제, 생균제 등) 미생물산업 시장(한국생명공학연구원/미생물 제품 시장, 2011년)은 농업용: 2010년 359.3억원 → 2011년 509.2억원 → 2020년 678.3억원(미생물비료 약 400억원 이상)과 축산용: 2010년 1,368억원 → 2011년 1,588억원 → 2020년 4,285억원으로 예상되고 있다. 국내 미생물 비료와 농약 시장이 열악한 가장 큰 이유는 국내 지자체 생산 농축산용 미생물을 보급하고 있기 때문이다. 2013년 총 미생물 생산량 26,309톤(농업용 15,665톤, 축산용 10,164톤 공급), 지자체 공급 25,829톤, 자가 생산 13,089톤, 기업공급 70,155톤이었다.

이들 농업용 미생물의 효율적인 활용과 시장 활성화를 위해서는 정확한 병해충 방제 타겟이나 이들 미생물들의 효율적인 활용을 위해서 다양한 유기농자재와의 혼합 등 본 연구에서도 출한 연구 결과를 활용하고 작물에 미생물의 대량배양을 이용하여 작물의 생산성 향상과 병해충 방제에 효율적으로 활용하는 실증연구와 농가보급 기술이 개발하여 이 분야에 크게 기여할 것으로 생각된다. 또한 개발된 저가 미생물 대량배양을 현재 국내 수경 및 양액 재배에 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 이들 저가 양액배지 및 방법 개발을 통해서 딸기 및 토마토에 적용하면 농가 소득 증가에도 기여할 것으로 생각된다. 예상 소득 증가 금액은 (조수입 3.9배 증가, 2,000농가

x 3.9 x 5,000만원 = 3천 9백억원)에 기여할 것으로 사료된다.

### 3. 친환경 농산물 시장 기여도

전 세계적으로 인구 증가와 농경지 면적 감소로 인한 식량 자급화에 대한 요구가 증가하고 있다 (2050년 90억 인구 예상, 농산물 생산량 증가가 약 70-100%가 필요한 상황, UN WFP 자료). 또한 전 세계적으로 안전한 농산물의 수요에 따른 친환경 유기농산물의 수요가 증가하고 있다. 세계유기식품시장은 지속적으로 증가 추세(2002년 231억불 -> 2008년 502억불 -> 2012년 640억불(농림축산식품부 연간 보고서)이지만, 이와 반대로 국내 친환경농산물출하량은 감소하고 있는 실정이다 (2012년 101만톤 -> 2014년 58만톤 -> 2015년 46만톤 (국립농산물품질관리원). 또한 친환경농산물 재배면적은 정부의 지속적인 노력에도 감소하고 있는 실정이다 (농민신문 2016). 유기농 재배면적: 2010년 94.5천ha -> 2012년 101.7천ha -> 2015년 57.0천ha으로 감소하고 있으며, 무농약 재배면적: 2010년 15.5천ha -> 2012년 25.5천ha -> 2015년 18.1천ha으로 감소하고 있는 실정이다. 가장 큰 이유는 친환경적인 병해충 방제가 가장 큰 원인이다. 따라서 본 연구에서 개발된 저가 효율적인 병해충 방제 방법이 국내 친환경농산물 재배 면적과 시장에 크게 기여할 것으로 사료된다.

### 4. 작물 미생물 제품 수출 관련 기여도

국내의 농업 미생물 제품의 수출은 전무한 상태이고, 국내 시장도 20억 미만으로 열악한 편이다. 따라서 국내에서 개발된 다양한 창의적인 미생물 관련 기술을 수출을 통해 활로를 찾는 것도 한 가지 방법이다. 본 연구에서 개발된 저가 미생물 대량배양을 접목한 양액배지로도 활용이 가능하고 병해충 방제로도 가능한 방법이다. 미생물 대량배양 및 개발된 양액배지 및 방법의 수출을 국부 창출에 기여할 것으로 기대된다. 국내 대부분의 양액재배에 활용되고 있는 양액은 수입에 의존하고 있어 수입 대체 효과에도 기여할 거스를 기대된다 (양액 수입 569억 대체 효과 x 50 % = 284억원, 수량 증대 1.5배 이상). 또한 미생물 비료로도 개발이 가능하여 국부와 수출을 달성하는데도 기여할 것이다 (미생물 비료 5조 x 10 % = 5,000억원 국부 창출, 수출 5억불 달성 목표). 현지 미국 회사와 미국내에서 본 연구에서 개발된 기술을 현지에 적용하는 시도가 이루어 지고 있다.

## 5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
1. 고온성 미생물의 대량 배양 체계 확립 및 그 활용		
<p>현재 대부분의 작물 관련 미생물들은 병해충 관리제품과 토양 관리 제품이 주류를 이루고 있다. 이들 미생물 제품의 시장은 아직까지 20억 미만의 시장을 형성하고 있는데, 가장 큰 이유는 미생물을 국내 농업기술센터에서 배양하여 농민들에게 무료로 제공하는 것이 가장 큰 이유이다. 하지만 이들 농업기술센터에서 제공하는 미생물의 정확한 특성과 희석 배율에 대한 교육과 지식이 미비하여 실제 수요자인 농민들의 실제 활용도는 낮은 편이다. 본 연구에서 도출된 값이 싸고 선택적으로 고온성 미생물을 오염없이 배양할 수 있는 방법들은 추후 이들 작물 관련 미생물들을 활용하는데 도움을 줄 것으로 생각된다. 또한 많은 농민들이 미생물과 병해충 방제로 이용하고 있는 다양한 유기농 자재와의 혼용에</p>		

대한 정보도 제공하여 미생물의 활용도를 높일 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 도출된 다양한 결과들은 2015년부터 50회가 넘는 다양한 친환경농민 교육과 다양한 유기농 전문가 교육, 마이스터 대학에서 강의를 통해서 농민들의 미생물의 활용과 유기농자재와의 활용에 대한 교육을 통해서 친환경농업에서 미생물의 활용과 유기농자재의 활용을 통해 친환경농업 활성화에 기여하고 있다.

## 2. 고온성 미생물제품의 타 작물로 활용

본 연구에서 도출된 고온성 미생물의 대량배양 방법은 본 연구진이 주관기관으로 수주한 2016년 농기평 농산물 생명산업 기술개발과제 “한국형 친환경 표준 재배기술 및 유기가공 식품 첨가물 생산기술 개발”에서 활용되고 있는 방법이다. 본 연구에서는 고추에 한정되어 연구를 수행하였지만, 현재 딸기, 밀, 콩, 참외, 등 10개의 작물에 적용하여 친환경표준 기술 개발에 활용되고 있다. 또한 이들 작물에도 본 연구에서 도출된 유기농 자재와의 혼합한 다양한 방법 등을 활용하여 실제 농가 포장에서 성공적으로 활용되고 있다.

## 3. 고온성 미생물 대량 배양방법 수출 제품으로 활용

국내의 작물 미생물 시장은 여러 가지 이유로 20억원에 한정되어 있어서, 본 연구에서 도출된 연구결과 및 제품을 미국을 비롯한 다양한 나라에 수출하여 수출에 활용하고자 한다. 현재 주관과제 책임자가 2017년 9월부터 미국의 RedoxAG회사와 접촉하여 세부과제 책임자인 김길용 교수와 12월 20일에 Redox회사 본사에서 미팅을 통해 제품과 현장 대량 배양기술을 활용하여 제품을 미국에서 여러 작물에 활용하고자 동의하였다. 현재 RedoxAG회사에서 현장 대량 배양용 배양기를 제작하였으며, 현재 미생물들을 대량배양하고 있으며 2018년 3월에 아이다호, 캘리포니아, 플로리다의 딸기, 토마토, 감자 포장에 현장 실증을 통해서 미국에서도 활용을 진행 중이다. 따라서 이들 제품을 미국에 수출하여 기업의 매출이 증가될 수 있을 것이라 사료된다.

## 4. 고온성 미생물 배양을 통한 병해충 방제 방법으로서의 활용

본 연구에서 도출된 고온성 미생물을 대량 배양을 통해 곰팡이, 세균, 바이러스병 뿐만 아니라 해충 방제 방법 등도 본 연구진이 참여하고 있는 농기평 기획과제 “한국형 친환경 표준재배 기술에 활용하고 있으며, 또한 RedoxAG회사에서도 이들 병해충 동시 방제 방법을 미국 내에 다양한 작물에 적용하여 성공할 경우, 본 연구진에서 특허 출원한 기술을 미국에 기술이 전하기로 하였다. 따라서 이들 기술들은 미국내에서 성공할 경우, 기술이전과 제품의 수출을 통해서 상용화에 활용할 예정이다.

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○ 해당사항 없음		

## 7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
○ 해당 사항 없음	

### 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)		

### 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
○	

### 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일		
1	논문	Biological control potential of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PPL isolated from the feces of <i>Allomyrina dichotoma</i> larvae	전남대학교	주저자 교신저 자	The Plant Pathology Journal	1.255	2016.06.01	단독	SCI/7회 인용
2	논문	Purification and characterization of a major extracellular chitinase from a biocontrol bacterium, <i>Paenibacillus elgii</i> HOA73	전남대학교	주저자 교신저 자	The Plant Pathology Journal	1.255	2017.06.01	단독	SCI
3	논문	Isolation and antifungal activity of methyl 2,3-dihydroxybenzoate from <i>Paenibacillus elgii</i> HOA73	전남대학교	주저자 교신저 자	Microbial pathogenesis	2.009	2017.05.01	단독	SCI/2회 인용
4	논문	Purification and antifungal characterization of cyclo(D-Pro-L-Val) from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y1 against <i>Fusarium graminearum</i> to control head blight in wheat	전남대학교	주저자 교신저 자	Biocatalysis and Agricultural Biotechnology	RG 1.96	2017.04.01	단독	비SCI/2회 인용
5		Quorum sensing is a key regulator for the antifungal and biocontrol activities of chitinase-producing <i>Chromobacterium</i> sp. C61	전남대학교	주저자 교신저 자	Molecular Plant Pathology	4.697	2017.01.01	단독	SCI/상위 10% 저널/ 3회 인용

## 11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당 사항 없음		

## 12. 참고문헌

	코드번호	D-14
<b>1 세부과제 인용문헌</b>		
<p>Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P. R., Vater, J., Sussmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G. and Borriss, R. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequences of the plant growth-promoting bacterium <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42. <i>Nature Biotech.</i> 25: 1007-1014.</p> <p>Ha, B. D. 2013. Isolation of antagonistic microorganism against plant pathogen from feces of <i>Allomyrina dichotoma</i> larva and large scale fermentation of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KB3. Chonam National University MS thesis.</p> <p>Ha, W. J., Kim, Y. C. and Park, H. J. K. 2014. Control of the root-knot nematode (<i>Meloidogyne</i> spp.) on cucumber by a liquid bio-formulation containing chitinolytic bacteria, chitin and their products. <i>Res. Plant Dis.</i> 20: 112-118.</p> <p>Kim, J. C., Choi, G. J., Park, J. H., Kim, H. T. and Cho, K. Y. 2001. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from <i>Nigrespora sphaerica</i>. <i>Pest. Manag. Sci.</i> 57: 554-559.</p> <p>Kim, P. I., Ryu, J., Kim, Y. H. and Chi, Y. T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from <i>Bacillus subtilis</i> CMB32 for control of <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>. <i>J. Microbiol. Biotechnol.</i> 20:138-145.</p> <p>Kim, Y. C., Jung, H., Kim, K. Y. and Park, S. K. 2008. An effective biocontrol bioformulations against <i>Phytophthora</i> blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. <i>Eur. J. Plant Pathol.</i> 120:373-382.</p> <p>Kim, Y. C., Lee, J. H., Bae, Y.-S., Sohn, B.-K. and Park, S. K. 2010. Development of effective environmentally-friendly approaches to control <i>Alternaria</i> blight and anthracnose diseases of Korean ginseng. <i>Eur. J. Plant Pathol.</i> 127:443-450.</p> <p>Kim, Y. C., Kang, B. R., Kim, Y. H. and Park, S. K. 2017a. An effective and practical strategy for biocontrol of plant diseases using on-site mass cultivation of chitin-degrading bacteria. <i>Res. Plant Dis.</i> 23: 19-34.</p> <p>Kim, Y. H., Park, S. K., Hur, J. Y. and Kim, Y. C. 2017b. Purification and characterization of a major extracellular chitinase from a biocontrol bacterium, <i>Paenibacillus elgii</i></p>		

HOA73. The Plant Pathology Journal 33: 318-328.

- Lee, Y. S., Nguyen, X. H., Cho, J. Y., Moon, J. H. and Kim, K. Y. 2017. Isolation and antifungal activity of methyl 2,3-dihydroxybenzoate from *Paenibacillus elgii* HOA73. Microbial Pathogenesis 106: 139-145.
- Nam, H. S., Yang, H. J., Oh, B. J., Anderson, A. J. and Kim, Y. C. 2016. Biological control potential of *Bacillus amyloliquefaciens* KB3 isolated from the feces of *Allomyrina dichotoma* larvae. Plant Pathol. J. 32:273-280.
- Neung, S., Nguyen, X. H., Naing, K. W., Lee, Y. S. and Kim, K. Y. 2014. Insecticidal potential of *Paenibacillus elgii* HOA73 and its combination with organic sulfur pesticide on diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 57:181-186.
- Nguyen, X. H., Naing, K. W., Lee, Y. S. and Kim, K. Y. 2015a. Isolation of butyl 2,3-dihydroxybenzoate from *Paenibacillus elgii* HOA73 against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Journal of Phytopathology 163: 342-352.
- Nguyen, X. H., Naing, K. W., Lee, Y. S., Jung, W. J., Anees, M. and Kim, K. Y. 2013. Antagonistic potential of HOA73 against the root-knot nematode. Nematology 15: 991-1000.
- Nguyen, X. H., Naing, K. W., Lee, Y. S., Moon, J. H., Lee, J. H. and Kim, K. Y. 2015b. Isolation and characteristics of protocatechuic acid from *Paenibacillus elgii* HOA73 against *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. Journal of Basic Microbiology 55: 625-634.
- Ongena, M. and Jacques, P. 2008. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16:115-125.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J. L. and Thonart, P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ. Microbiol. 9:1084-1090.
- Park, S. K., Kim, C. W., Kim, H., Jung, J. S. and Harman, G. E. 2007. Cloning and high-level production of a chitinase from *Chromobacterium* sp. and the role of conserved or nonconserved residues on its catalytic activity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74:791-804.

## 제 1협동과제 인용문헌

- Sullivan, R. F., Holtman, M. A., Zylstra, G. J., White, J. F., Kobayashi, D. Y. 2003. Taxonomic positioning of two biological control agents for plant diseases as *Lysobacter enzymogenes* based on phylogenetic analysis of 16S rDNA, fatty acid composition and phenotypic characteristics. J. Appl. Microbiol. 94: 1079-1086.
- Soon, Y. M. 2011. Industry of fertilizer and eco-friendly fertilizer trend. KIC News

4:41-42

Yoon, G. Y., Lee, Y. S., Lee, S. Y., Park, R. D., Hyun, H. N., Nam, Y., Kim, K. Y. 2012. Effects on *Meloidogyne incognita* of chitinase, glucanase and a secondary metabolite from *Streptomyces cacaoi* GY525. *Nematology* 14:175-184.

김슬기. 2010. 디젤오일 분해 미생물 *Pseudomonas* sp.SG-3에 의한 복숭아혹진딧물. 전남대학교 석사학위 논문

하병덕. 2013. 장수풍뎅이 분변에서 식물병원균에 대한 길항미생물의 선발 및 *Bacillus amyloliquefaciens* KB3의 대량배양 조건. 전남대학교 석사학위논문

전현덕. 2017. *Bacillus amyloliquefaciens* Y1의 특성규명 및 현장대량배양 연구. 전남대 석사학위 논문

정용재, 이규식, 한성희 강대일, 이명희. 2001. 오향 성분의 살균 및 살충효과. 보존과학회지 10:21-30

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.