

116118-3

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

수출전략기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003022-01

PGPR균과 작물활성물질을 이용한 수출형 복합바이오피료 개발 및 제품화

최종보고서

2020.02.21.

PGPR균과작물활성물질을이용한수출형복합바이오피료개발및제품화

2019

주관연구기관 / (주)오더스
협동연구기관 / 고려대학교 산학협력단

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

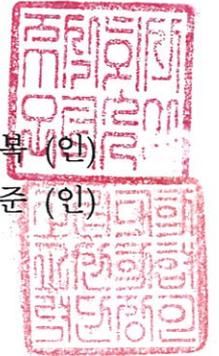
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “PGPR균과 작물활성물질을 이용한 수출형 복합바이오피료 개발 및 제품화”(개발기간 : 2016. 11. 29 ~ 2019. 11. 28)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 02. 21.

주관연구기관명 : (주)오더스 (대표자) 조 영 복 (인)

협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단 (대표자) 허 준 (인)



주관연구책임자 : 조 영 복
협동연구책임자 : 정 남 현
협동연구책임자 : 이 호 정

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	116118-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.11.29 ~ 2019.11.28	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	수출전략기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	PGPR균과 작물활성물질을 이용한 수출형 복합바이오피로 개발 및 제품화			
연구책임자	조영복	해당단계 참여연구원 수	총: 11명 내부: 11명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:159,000천원 민간: 53,000천원 계:212,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 32명 내부: 32명 외부: 명	총 연구개발비	정부:450,000천원 민간:151,000천원 계:601,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)오더스 기술연구소			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자: 조 영 복	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	4	1									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

- 바이오비료라는 목적에 맞는 최적의 우수 PGPR 균주를 얻기 위해 다양한 식물근권세균을 분리하여 Indole-3-acetic acid와 siderophore 생산능력 및 인산가용화 시험을 통해 스크리닝을 진행

- 선별된 근권세균의 암모니아 생성과 같은 식물생장촉진 특성 및 셀룰라아제와 프로테아제 활성을 포함한 항진균성 특성을 포함하는 생화학적 분석을 추가로 수행하여 분석하고 균을 동정하여 특성을 확인

- 최종 선택한 우수 PGPR 미생물로 담체고정화 기법을 개발하기 위해 최적화된 재료와 비율로 담체를 제조하였고, 미생물의 담체화 후 바이오비료로 제형화 시 생존을 확인을 위해 담체에 고정 후, 각기 다른 PGPR 균주 생존율을 장기간 확인

- Luciferase, Glucuronidase, 등 리포터 유전자를 적극 활용한 식물 생장 촉진 PGPR 신속 검정법 확립

- 애기장대 모델 식물, 상추, 밀 등의 작물에서 PGPR 효과를 검정하고 여러 종의 우수 PGPR을 선별 완료하고 식물 대상 생장 촉진 분자 기전을 규명

보고서 면수

102 page

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ PGPR 활착능 개선 원예작물 수출형 바이오비료 개발 ○ 원예작물 활착 우수 PGPR균 분리 및 담체화 기술개발 ○ 원예작물 활착 우수 PGPR균 식물성장 활성 검정 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ PGPR 활착능 개선 원예작물 수출형 바이오비료 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 배양 배지를 재검토한 결과 기존 YOD배지에 서 BM배지로 검토 확정함 - 동물성 아미노산을 혼합 실험하니 생균수 유지가 어려웠음 - 미생물 유지 및 제품화를 위해 단일 아미노산의 가능성이 검토됨 - 분상제 형태로 미생물 배지의 증량제 시험 결과 미생물의 밀도수가 유지되는 옥수수 추출물 등을 선정함 - 입제 및 액상제형을 위한 예비시험에서 미생물의 밀도 유지 및 작물 활성 효능 보조제로 휴믹산의 가능성을 확인함 ○ 원예작물 활착 우수 PGPR균 분리 및 담체화 기술개발 <ul style="list-style-type: none"> - 선별된 우수 PGPR균의 gDNA를 이용, 16s rRNA를 통해 균을 동정 및 유전체 지도 작성함. - 작물 생산이 우수한 토양샘플에서 PGPR균 약 250균 동정하여 균주 보관중 - 동정한 PGPR균의 IAA생산 능력을 시험하여 우수한 PGPR균의 동정법으로 동정하였음 ○ 원예작물 활착 우수 PGPR균 식물성장 활성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 많은 종류의 미생물을 효과적으로 스크리닝하였음. 현재 150 여종에 달하는 토양 미생물의 식물 성장 활성 검정을 완료하여 20 여개의 PGPR을 선발하였음. - 상추의 성장촉진 활성 검 정 및 촉진을 위한 생리 검정을 완료하고 3종의 조합 및 기타 성장 촉진 활성 성분 조합 비교를 완료하였음. 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농업용 수입 천연물, 기능성 제재의 수입 대체효과 및 수출 경쟁력 창출 가능 ○ 생명공학 기술이 도입된 기술 집약형 농산업 발전에 기여 ○ 국내 농산업 기업의 첨단 생명공학 기술 기반 제품의 생산과 해당 기업의 글로벌화를 통한 시장 확대를 촉진 ○ 농산업 분야의 생명공학 전문가 육성 기여 ○ 기술개발을 통한 고용창출 효과 및 신규인력 채용 계획 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>원예작물</p>	<p>작물성장촉진균</p>	<p>수출형 제품</p>	<p>작물활성물질</p>	<p>바이오비료</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>					

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
1-1. 연구개발 목적	6
1-2. 연구개발의 필요성	7
1-3. 연구개발 범위	21
2. 연구수행 내용 및 결과	25
2-1 원예작물 근권 PGPR균과 식물생장활성물질의 복합제제화 기술 개발	25
2-2 원예작물 근권 활착 우수 PGPR균 분리 및 담체화 기술 개발	41
2-3 원예작물 근권 활착 우수 PGPR균 작물생장 활성 검정	64
2-4 연구개발성과	92
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	94
3-1. 목표 및 수행내용	94
3-2. 평가의 착안점 및 기준에 따른 목표달성도	95
3-3. 관련분야 기여도	95
4. 연구결과의 활용 계획 등	97
4-1. 연구개발 결과의 활용방안	97
붙임. 참고문헌	98

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

(1) 최종목표

본 연구는 친환경 원예작물의 생육을 촉진시키는 근권 활착 우수 PGPR균과 작물활성물질을 이용한 수출형 복합바이오 비료 개발 및 제품화를 목표로 함.

(가) 원예작물 근권 PGPR균과 식물생장활성물질의 복합제제화 기술 개발

- 기능성 및 천연물 추출물과 선발된 PGPR균을 포함한 복합바이오비료 제제 및 현지 작물활성촉진 활성검정을 포함한 최종 제품화 기술개발

(나) 원예작물 근권 활착 우수 PGPR균 분리 및 담체화 기술 개발

- 우수 PGPR균의 분리선별과 기능성 검정 및 담체화 기술 개발

(다) 원예작물 근권 활착 우수 PGPR균 작물생장 활성 검정

- 우수 PGPR균의 분리선별과 기능성, 천연물 추출물 및 복합바이오비료 제제의 효과 검정

(2) 세부목표

(가) 원예작물 근권 PGPR균과 식물생장활성물질의 복합제제화 기술 개발

- ① 작물생장활성능을 가진 추출물로 원예작물 근권 PGPR균 활착능 개선을 위한 바이오비료 소재 스크리닝
- ② 기능성 및 천연물 추출물의 단계 후보물질 선별과 이들을 이용한 추출 및 혼합기술 개발
 - 국내외 자원을 활용하여 기능성 및 천연물 추출물 탐색선발
 - 기능성 및 천연물 종류 별로 대표유효성분의 고수율 추출공정개발
 - 안정성 검토하여 최적의 약효발현을 위한 혼합방법 검토
- ③ 선발된 PGPR균과 작물생장활성 추출물 포함 복합바이오비료 제형화
 - PGPR균 +작물생장활성 추출물의 복합제제에 대한 최적 약효발현 제제화 기술개발
- ④ 시제품의 최종 제품화 기술개발
 - PGPR균 +작물생장활성 추출물의 복합제제 시제품의 품질관리 기술개발
 - 최종제품 사용설명서 제작 및 제품라벨 포장기술
 - 개발 시제품에 대한 안전사용기준 설정: 희석배수, 사용량, 사용방법, 처리횟수, 살포 간격, 주의사항 등
 - 중간 및 최종 제품을 활용하여 현지 적용성 검토
 - 제품등록(3차년도) : 국내 유기농업자재 2종 제품등록

(나) 원예작물 근권 활착 우수 PGPR균 분리 및 담체화 기술 개발

- ① 근권 활착 우수 PGPR 미생물의 분리 및 선별
 - 우수한 미생물을 분리하기 위해서 토마토, 오이, 상추 등의 뿌리의 토양에서 연속적 희석법을 통하여 미생물을 순수분리
 - 선별된 균주를 universal primer 27F, 1492R을 이용하여 16s rRNA 염기서열을 얻어서 NCBI blastn를 이용하여 균을 동정하고, 동정한 균의 기능적인 특성을 확인함
- ② 근권 활착 우수 PGPR 미생물의 담체화 기술 개발

- 우수 PGPR미생물의 담체 고정화 기법 개발
 - 우수 PGPR 미생물의 담체화 후 바이오비료로 제형화 시 생존율 확인
 - 우수 PGPR미생물의 생균과 포자 담체의 바이오비료 제형화 전후의 기능성 검증
- (다) 원예작물 근권 활착 우수 PGPR균 작물생장 활성 검증
- ① 기능성과 천연물의 단일 추출물 및 이들의 복합제제의 작물생장촉진 활성검정
 - 여러 종류의 대상 물질(기능성과 천연물의 단일 추출물)을 제1 세부과제로부터 공급받아 이들이 작물생장에 미치는 효과를 다양하게 검정
 - 모델 식물의 종자를 기내에서 발아시키고 어린 유표 상태에서 대상물질의 처리
 - 복합바이오비료 제제의 배합농도 및 비율결정을 위한 스크리닝 시스템을 확립하여 단일 및 복합제제 중에서 최적의 식물생장촉진 활성을 가지는 조합을 선별
 - ② 선발된 PGPR균과 식물생장활성 추출물의 복합제제 효과 검정
 - 모델 식물 스크리닝 시스템을 활용하여 PGPR균과 식물생장활성 우수 추출물혼합 비율 선발
 - ③ 신규 우수 기능성과 천연물질의 식물복합제해 내성촉진 관련 반응검정
 - PGPR균 +작물생장활성 추출물의 복합제제에 대한 최적 약효발현 제제화 기술개발
 - ④ 신규 우수 기능성과 천연물질의 작물생장촉진 포장실증검정
 - 신규 우수 물질들의 실험실 내 및 포장재배 시 효과 검정

1-2. 연구개발의 필요성

(1) 연구개발 대상의 국내·외 현황

(가) 국내 기술 수준 및 시장 현황

① 국내 친환경 농자재 산업현황

- 아래 <표 1-1>에서와 같이 국내 친환경 농산물 시장은 증가 추세에 있음. 이를 지원하기 위한 친환경 유기농자재 개발이 기대됨

<표 1-1> 친환경 농산물 시장

	2007	2008	2009	2010	2013	2015	2020
유기	1,721	2,536	2,967	4,090	7,037	11,134	15,989
무농약	6,312	9,193	10,756	14,345	25,368	38,082	54,687
저농약	13,766	20,198	23,632	22,505	18,550	-	-
계	21,799	31,927	37,355	40,940	50,955	49,216	70,676

자료: 김창길 외(2009)

- 소비자의 안전농산물 선호현상 심화, 웰빙 무드 확산, 정부의 저탄소녹색성장 정책의 핵심 분야인 친환경농업 육성정책 의지 강화, 친환경농산물의 학교급식까지 확산될 경우 후방산업인 유기농자재 산업도 유기농식품산업에 비례 발전될 것으로 전망됨
→ 친환경 유기농자재 의존도가 높으나 값싼 고효율 유기자재가 부족하여, 천연물 등 유기농업자재 개발이 요구됨 <표 1-2>

<표 2> 유기농업자재 종류별 시장규모 (약 8,000 억원, 4,508 톤) ('14 농진청)

종류	유기질 (유박)	부산물 (퇴비)	천적	미생물 (토양농약)	식물 추출물	목초액 (목탄)	유기상토	토양개 량제	가능성 비료
시장규모 (천 톤)	1,614 (364)	3,239 (3,343)	150 (0.4)	125 (0.33)	300 (0.7)	244 (14.1)	956 (552)	881 (232)	500 (1.3)

- 유기농업자재 생산업체 숫자; ('10) 394 → ('13) 487 → ('14) 510 → ('15) 549로 증가하고 있으나 대부분 업체가 매출규모 9억원 수준의 영세업체로서, 10개미만의 제품을 생산 판매하고 있으며 생산량이 소량임 <표 1-3>
- 수출: 35여 개사 약 1,000만불(중간재 포함)을 수출, 수입은 원료를 연 30만 톤, 150~400억원으로 소규모임

<표 1-3> 연도별 유기농업자재 생산/판매량('14 농진청)

년도	생산량			판매량		
	합계	토양개량 작물생육용	병해충 관리용	합계	토양개량 작물생육용	병해충 관리용
2013	3,415천 톤	3,299천 톤	111천 톤	2,350천 톤	2,284천 톤	66천 톤
2014	2,098천 톤	2,083천 톤	15천 톤	1,521천 톤	1,507천 톤	14천 톤

② 식물성장촉진제 등 바이오 비료 시장규모

- 토양개량 및 작물생육용 자재 11,860억원(유기질비료 유박 1,300억원, 퇴비 7,400억원)
- 기능성 비료(천연광물, 키토산, 해조류, 부식산, 휴믹산, 풀빅산, 아미노산제제 등): 800억원
- 미량 요소 및 제4종 복비 1,060억원, 유기상토 200억원, 토양개량제(석회, 규산질) 880억원
- 바이오비료(토양미생물제, 토양개량 활성제, 균체비료 등) 220억원
- 기능성과 유기질시장은 매년 10% 정도 꾸준한 성장추세에 있음

(나) 국외 기술 수준 및 시장 현황

① 세계 및 국내 바이오비료 산업동향

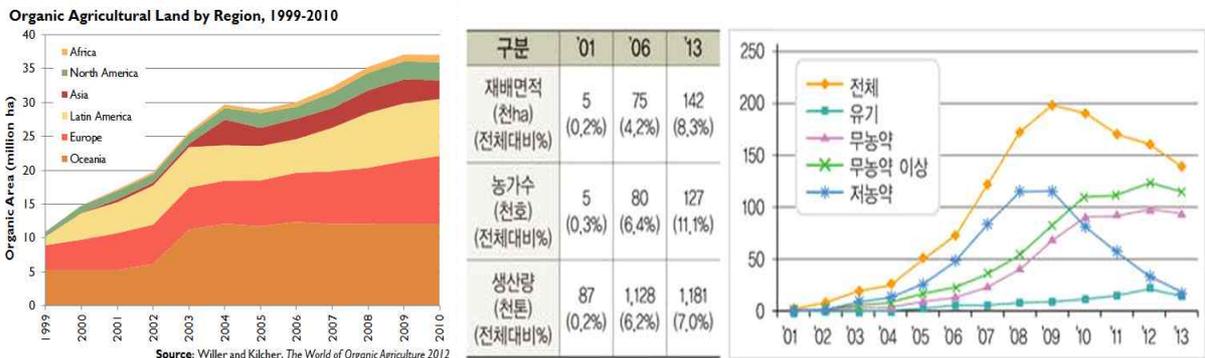
- 세계 바이오비료 시장규모는 미생물 11억\$ 등 60억\$로 추정됨. 완효성 비료가 연 7% 성장세임. 세계적으로 2012년 바이오비료 시장은 약 240 억\$, 16년 약 291억\$로 예측됨
- 국내 바이오비료 시장은 느리지만 꾸준히 성장하고 있음 <표 1-4>

<표 1-4> 국내외 바이오비료 및 바이오 농약 시장규모와 전망('13 중기청, 단위 억\$)

구분		2012	2013	2014	2015	2016
세계	바이오 농약	800	852	907	944	1,029
	바이오 비료	240	253	267	281	291
국내	바이오 농약	21.8	24.2	26.8	29.7	33.0
	바이오 비료	48.0	48.0	56.9	60.4	65.3

② 친환경농산업 현황과 문제점

- 세계 각국은 식품안전문제 등으로 유기농업 육성목표를 매년 크게 확대하는 추세로 재배면적은 4,310만 ha, 유기농식품시장은 720억\$ 규모에 달함 <그림 1> (2014 IFOAM Annual Report)
- 웰빙, 농식품 안전성문제로 유기농 육성목표의 경쟁적 확산이 지속되고 있으며 연 20% 성장추세로 보고되고 있음. 따라서 이를 적극 지원하여 세계 시장의 선점을 지원책이 필수임



<그림 1-1> 세계 유기농가 면적 <그림 1-2> 국내 친환경농산물 생산추이(친환경인증통계정보)

③ 개발 제품 주요 수출 대상국 수요 조사

가) 중국

㉠ 중국 비료시장 규모

<표 1-5> 중국 화학비료 및 기타 비료(HS Code 3105) (단위: 천 달러, %)

	2012	2013	2014(1~9월)
수입	878,752(43.0)	891,126(1.4)	589,210(-17.6)
수출	3,076,249(-34.7)	2,399,810(-22.0)	2,088,652(31.4)
무역수지	2,197,497	1,508,684	1,499,441

주: 누계치 자료원: KITA (한국무역협회)

- 비료시장을 구성하는 종목으로 비농사용이 전체의 58%를 차지하고 있으며 원예용 (과수 외) 32.3%, 가정원예용 7.3%, 녹화용 2.4%가 그 뒤를 따름.

㉡ 중국 비료시장 발전 토대

㉠ (환경측면) 중국의 도시화 및 토지오염

- 2013년 말, 중국의 도시화 진행률은 이미 53.73%로 농촌 노동력이 감소하고 토지 집중화가 일어나고 있어 농자재기계화가 보편화에 단계에 있음.

- 중국 현지 언론보도에 따르면 중국 내 중금속 오염이 된 농경지 면적은 2000만ha(3억 묘)로 전국 농경지의 약 1/6에 달해 심각한 사회문제로 대두
- 중국 환경감측본부(中國環境監測總站)에 따르면 특히 카드뮴, 수은, 납, 비소에 따른 중금속 오염이 가장 심각한 것으로 나타남.
- 상황이 악화되는 추세로 중금속 오염과 식품 안전문제가 사회적으로 큰 반향을 일으킴.
- 그 외에도 중국은 넓은 토지로 인해 지역별 자연재해, 병해충 등이 다양해 농산품 생산량 확보의 위협이 존재하므로 꾸준히 농약과 비료의 수요가 높아지는 추세
- 그 결과 중국은 국가 식품 안전을 위해 2014년 8월 1일부터 '식품 농약잔류 최대 허용량(食品中農藥最大殘留量)'을 실시, 농약과 비료시장에 변화의 필요성이 대두함.

<표 1-6> 기존 화학비료의 장단점

장점	작물 종류별로 필요한 성분을 공급하는 맞춤형의 조제가 가능 비료성분의 속효, 완효성을 조절 가능 작물 생산량의 조절과 품질 친환경 등 기타 비료와 비교 시 작물의 성장성이 돋보임.
단점	전문지식이 필요하며 역효과가 나타날 가능성도 있음. 국내생산원료 부족으로 수입에 의존. 국제가격의 폭등에 대책 미흡 친환경, 유기농업, 환경오염의 문제 다분 비료 사용량에 대해 과다할 경우만 환경오염 가격이 비싼 편

자료원: KOTRA 광저우 무역관 자체 제작

② (정책측면)

- 중국 비료시장 발전의 토대 마련
 - '2012년 5월 발전계획'에 따르면 친환경 농업발전을 위해 액상비료 등 다양한 비종의 개발, 배합비료인 복합비료와 특수비료의 발전 도모, 방출조절비료 개발, 배합비료 생산기술 장비·신포장재료·제제생산기술 중점개발 방침과 함께 비료기업의 통합 재편도 논의
 - “국민경제사회발전 제13차 5개년 계획강요”에서 농업분야 농업현대화를 위한 8대 중점 추진과제 제시하였으며, 그 중 “농산물 품질안전” 항목에서 농약과 화학비료 사용량 축소, 유기농산물 생산 확대 등을 추진하여 본 과제의 개발 제품과 같은 유기농업자재의 사용량이 증가할 것으로 유추됨.
 - 중국 재정부와 세무총국은 2008년 6월부터 바이오·유기질비료 제품에 대해 완전 면세 혜택을 제공하고 산둥성 등 지방정부는 이미 유기질비료사업에 대해 보조금을 지급 중
- 중국 정부의 농업 발전 장려
 - 중앙 정부의 효과적인 농업장려정책으로 산업 환경이 개선됨. 2014년 중앙 1호 문건에서도 양식가공업 지원, 농민 합작사를 통한 농산품가공유통 발전

- 지원 등 농산품 가공업 발전에 유리한 정책을 유지함.
- 개혁을 통해 산업 발전 동력을 제공, 토지, 호적, 보조금제도 개혁을 추진하고 공상 자본이 농업에 유치될 수 있도록 함.
- 중국 정부는 '무공해 식품 행동계획', '친환경 식품', '유기농'에 대한 인증 등 관련 정책시행으로 농산물 품질 안전규제를 강화하면서 시장 발전을 촉진함.
- 중국은 농업의 증산을 촉진하고 경작지를 엄격하게 보호하며 수리 기반시설과 재난 방지능력의 건설을 강화하는 등 농업지원정책도 중국의 화학비료산업 성장에 촉진제 역할

㉔ 중국 친환경비료시장 현황

- 중국 친환경비료시장은 크게 바이오·유기질비료, 복합미생물비료시장으로 고속성장세를 보임.
- 친환경비료('13)에 649억 위안, 바이오 농약에 18억 위안의 시장규모가 형성되어 있으며, 고효성 복합제, 기능성 액상 식물성장촉진제를 포함한 제품을 원함
- 한.중 FTA 발효로 금년부터 유기농업자재의 수출입 관세가 철폐되어 수출에 새로운 기회를 제공할 가능성이 높음
- 중국 경제의 향후 5년을 견인할 1유망업종('15.11 국무원)으로 고효율 영양제 비료 등을 선정함
- 미생물비료는 연 생산량 900만 톤, 생산규모 150억 위안으로 수출 품목과 수량이 매년 꾸준히 증가 추세
- 2013년 농약부 등록 미생물비료 제품은 1816개를 기록하고 종사 기업 수는 850여 개
- 중국 미생물 비료산업은 다른 나라에 비해 미생물균종자원이 풍부하고 미생물비료 제품 종류가 다양하며 응용범위가 광범위한 것이 특징
- 대부분 균종을 배합해 판매중이며 핵심기술, 균종 R &D 역량을 가진 기업이 적어 기술 투자가 이루어지지 못해 핵심기술은 부족한 상태

친환경 비료	현황 및 특징
유기질 비료	<ul style="list-style-type: none"> - 2012년 중국 유기질비료 생산업체는 약 500여 개로 추정되며 생산규모 2만 톤 미만인 기업이 66%를 차지하고 있고 5만 톤 이상인 기업은 4%로 전체 비료시장 중 점유율이 낮음. - 유기질비료 매출액 연평균 57% 증가세(2000년에서 10년간 중국의 유기질비료 매출액은 3억 위안에서 317억 위안으로 가파른 증가세를 보임)
바이오 비료	<ul style="list-style-type: none"> - 친환경 비료시장 중에서도 바이오비료 산업은 세계 각국의 바이오 에너지산업이 급성장함에 따라 급격히 상승할 수 있는 발판을 마련함. - 바이오산업은 현재 중국정부가 적극 추진하는 전략적 지원산업에 속해 정책적인 협력과 함께 큰 폭의 성장이 기대됨. - 바이오 유기비료는 가격이 비교적 높아 고부가가치 작물 재배에 적합

미생물 비료	미생물비료는 국가 식량안보, 식품안전과 생태 보호에 크게 기여해 정부의 산업정책에서 중요한 분야로 여겨지고, 이러한 정책적 지원으로 업계와 농민으로부터 크게 주목받음. 가격이 상대적으로 저렴해 미래 식량 증산을 위한 중요한 비료 종류가 될 것으로 전망
-----------	---

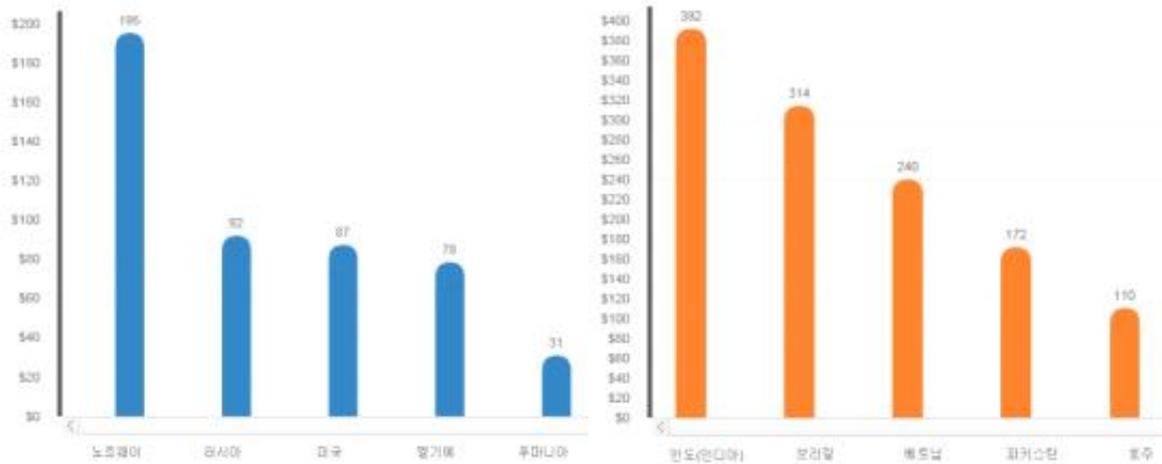
자료원: KOTRA 광주우 무역관 자체 제작

㉓ 친환경 비료시장 성공요인

미래 사회와의 연관성	향후 건강중시(웰빙) 경향, 고령화 사회, 일자리 감소
국가운영 전략 차원	세계적으로 육성중인 산업(바이오)으로, 새로운 국가성장 동력으로 인식, 정책면에서 지원방향이 큼.
현재 중국시장의 규모 브랜드 불명확	신기술에 대한 의존도가 높고, 일단 선점하면 독과점이 가능 기본적인 바이오 인프라(인력, 설비, 자금 등) 부족

㉔ 중국 내 비료시장 경쟁동향

(단위: 백만달러)



수출 주요 5개국

수입주요 5개국

자료원: 한국무역협회

<그림 1-2> 중국의 비료수입 및 수출 주요국가(HS Code 3105기준)

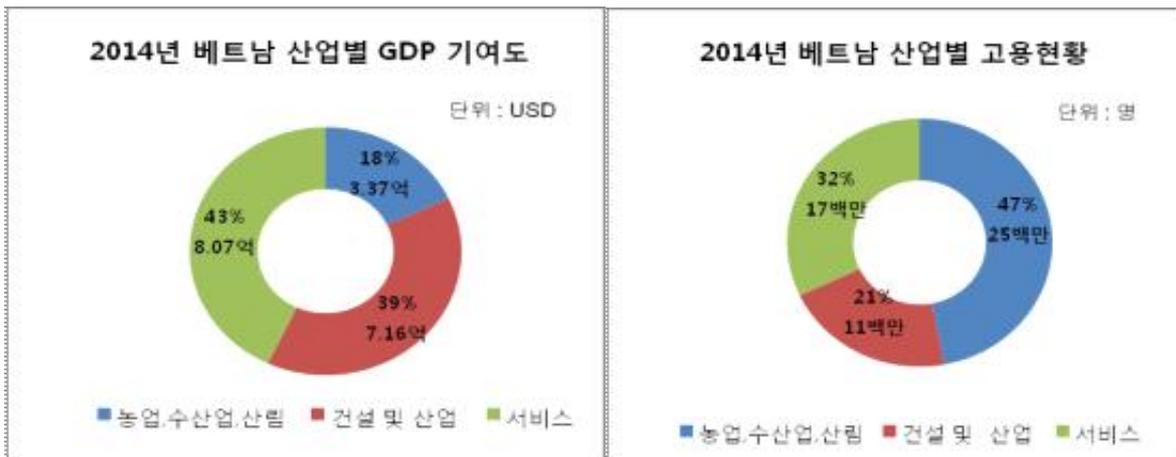
㉕ 시장 진출방안

- 현지 농가에 시범포를 운영함으로써 브랜드 친근감 확립하고 (주)오더스의 다양한 제품으로 작기에 적합한 제품홍보 및 컨설팅 진행
- 농업을 기반으로 발전하는 바이오비료시장은 제품 또한 홍보에 시간이 필요함.(상품별 상이한 제품의 수요 적기와 농산품별 주요 농산지에 따라 판매가격의 차이를 파악함이 중요)
- 한 상품으로 비료-농약의 효과를 동시에 볼 수 있는 비료-농약 혼합제 등 대상품목에 대한 적극적인 상품의 마케팅 다양화가 필요함.

- 수입제품은 수입 관련 수속이 복잡하고 농민에 대한 제품 인지도 제고 등의 문제로 입지를 다져놓은 현지 거래처와 합작판매 진행.
- 여러 거래처를 확보하여 유통경로의 다원화가 필요함.

㉠ 베트남

- 베트남은 현재 쌀 2~3위의 수출국으로 베트남 식품조합에 따르면 작년도 베트남의 쌀 수출량은 650만 톤임.
 - 과거 경제개혁정책 이전에는 쌀 수입국이었던 것을 감안하면(1985년 베트남의 쌀 수입량은 40만 톤), 1986년 도이머이(경제개혁) 정책 도입 후, 집단농장체제에서 자작농 체제로 이전을 통해 베트남 농업이 급격하게 발전 함.
- 2014년 기준 베트남 농수산업의 GDP 기여율은 18.12%이고, 전체 인구의 약 50%가 농업에 종사하고 있음. 고용 측면에서는 농업이 아직도 베트남 내 최대 산업임.
 - 베트남의 도시화율이 2014년 기준 33%에 머물러 있음을 감안할 때, 농촌 지역은 베트남 인구의 약 70%가 거주하는 지역 (자료원: 베트남 통계청, Viettrade)
 - 베트남의 농업은 1억에 가까운 베트남 인구에게 저가의 먹거리를 공급해 베트남 정치·사회체제의 안정에 크게 기여하고 있음. 또한 임금수준을 낮게 유지할 수 있는 여건을 제공함으로써 베트남의 해외투자 유치에 공헌하고 있으므로 사실상 베트남 정치 및 경제에 있어서 매우 중요한 역할을 수행하고 있음.



자료원: 베트남 통계청

- 베트남의 주요 경작지는 넓은 고원지대인 중부고원(전체 경작지 대비 17.1%)과 북부홍강(18.4%), 남부 메콩강 주변(27.2%)이 주요 경작지임. 쌀의 비중이 절대적으로 높아 전체 농업생산액의 50%를 차지하며, 그 외 주요 생산작물은 커피·차·땅콩임.
 - 최근 쌀의 재배면적은 감소하고 땅콩·고무·커피·차·카사바와 같은 부가가치 작물의 경작면적이 증가하는 추세이며, 전체 농산물 생산량과 수출이 증가세에 있음.
 - 쌀은 커피는 세계적으로 2~3위 수출국이며, 후추는 지난 14년 동안 1위를 차지하고 있는 등 주요 농산물 수출국으로 자리잡음.
 - 중국산 수입 농산물 스캔들 등으로 안전한 먹거리에 대한 관심이 증가할 뿐 아

나라, 소득증가에 따라 개인들의 다양한 기호가 발현돼 베트남 내수 식품시장이 양적·질적으로 성장하는 것도 베트남의 향후 농업개발에 유리한 상황임.

㉠ 베트남 농업의 최근 동향

- 베트남 농업의 높은 발전가능성과 중국이라는 거대시장에 인접해 있는 지리적 이점, 아세안 경제통합으로 인한 아세안 접근성 강화, TPP로 인한 미국, 일본 등 선진시장과의 통합이라는 호재 등이 겹쳐 최근 다양한 분야의 베트남 대기업들이 향후 고수익을 기대하고 농업분야에 대한 투자를 급격히 확대하고 있음.

기업명(기존 사업분야)	주요 투자분야
Duc Long Gia Lai Group(부동산)	옥수수, 사탕수수, 고무, 축산
Thanh Thanh Cong(부동산, 에너지, 금융)	Kobe 짓소, 사탕수수
TanTao Group(공업단지 인프라 개발)	재스민 쌀 생산 수출
Cam Nguyen Steel Co. (철강생산)	농산물 가공/저장
Nguyen Kim(가전제품 유통업체)	고품질 벼 재배
Hoa Phat Group(철강, 부동산)	가축 사육, 육류 가공, 가축 사료 생산
Vingroup(부동산, 소매업, 여행사 등)	과일 및 채소 재배

자료원: 베트남 신문(KOTRA 호치민 무역관 정리)

- 베트남 대기업들의 농업투자 확대는 해외 선진국가 및 기업과의 협력과 농업분야로의 FDI 확대를 촉진하고 있음.
 - 일본 기업들은 베트남 농업 직접투자를 위한 조사에도 착수함. 일본의 Always사와 Veggy사는 베트남 빈푹지방에 친환경 야채 재배를 위한 투자조사를 이미 시행(2014년 5월)했으며, 향후 이 지역에서 베트남 내 일본 식당 공급 및 일본 수출용(재배 첫해 백만 달러 규모) 친환경 야채를 재배할 계획임.
 - 이외에도 독일 기업인 바스프 역시, 베트남의 농약 및 비료 시장에 큰 관심을 표명함.
- 베트남 정부의 농업 개발을 위한 투자 지속 예상
 - 현재 베트남 정부는 농업 및 농촌개발에 매년 정부예산의 15~17%를 투입하고 있을 뿐 아니라 최근 농업투자에 대한 정부의 지원정책(시행령 No.210/2013/ND-CP, *첨부)을 수립해 시행할 예정임. 현재 각 지방성은 이 정책에 따라 지역에 부합하는 농업 세부정책을 수립하는 중임. 기업들은 2016년부터 농업부분 투자 시 상기 시행령의 인센티브를 수혜할 수 있음.
 - 시행령은 농업 및 수산업 투자시, 세금감면, 토지 임대료 감면, 인력교육에 따른 보조금 지급 등의 지원내용을 포함하고 있음.

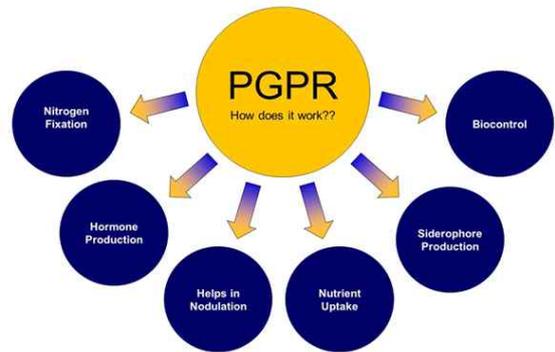
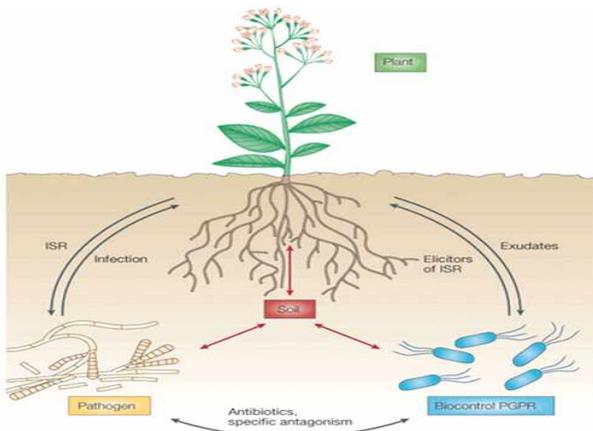
㉡ 시장 진출방안

- 베트남은 농업개발을 지속적으로 추진할 것이며, TPP와 아세안 통합 등의 무역환경 역시 베트남의 농업개발을 가속화할 것으로 예상함.
- 베트남 현지 거래처를 활용해 제품 판매시장을 확대하고 다양한 거래처를 확보하여 유통경로의 다원화가 필요함.
- 현지 농가에 시범포를 운영함으로써 브랜드 친근감 확립하고 (주)오더스의 다양한 제품으로 작기에 적합한 제품홍보 및 컨설팅 진행

(2) 연구개발의 중요성

(가) 친환경 농업지원을 위한 현장적용 가능 PGPR균 및 작물생장활성물질을 포함한 복합 바이오비료 제품개발 필요성

- 대부분의 PGPR균은 스크리닝의 문제로 식물의 생장활성호르몬으로 알려진 옥신 등을 생산하는 단일 균주의 분리에 개발연구가 초점을 맞추어 왔으며, PGPR균에 대한 연구가 많이 되어왔음에도 불구하고 효능이 미약하여 현장 농민들의 인정을 받지 못해 시중에서 활발하게 판매되고 있지는 않은 실정임
- 현장 적용율을 증진시키기 위해서는 작물생장에 초점을 맞춘 효율성이 높은 새로운 광범위 PGPR균의 스크리닝 방법이 필요하여 개발하였으며 본 과제에 적용하고자 함.
- PGPR균은 식물이 자라는 토양환경에서 다양한 기능으로 식물의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있음. 이는 질소 고정, 식물생장 호르몬 분비, 영양분 흡수능 증가, siderophore 생산 등 식물의 성장을 돕는 기능을 통하여 식물과 상리공생을 하는 것으로 알려져 있음. 따라서, 토양적성에 맞는 PGPR균을 분리하여 바이오비료화하는 것은 화학비료의 절감을 현저하게 피할 수 있는 대안으로 각광받고 있음.
- PGPR균은 그 종류가 매우 다양하고 작용하는 기능도 다양하기에 각종 과채류 작물의 생장에 맞춤형으로 작용할 수 있는 PGPR 및 식물생장촉진제의 배합은 농업 현장 적용율을 증진시킬 것으로 사료됨. 이를 위해서는 토양에서의 작물생장에 초점을 맞춘 효율성이 높은 새로운 광범위 PGPR균의 스크리닝 방법이 필요하여 이에 대한 연구를 본 과제에 적용하고자 함.
- 또한, 분리된 균주를 목표작물의 근권에서의 활착능을 개선시킬 천연물 유래 작물생장활성물질을 포함한 복합바이오비료의 개발은 기능성 유기복비 및 생물농약 이용기술 전반에 적용될 수 있는 핵심기술로써 농업 전반에 응용, 발전 및 고품질 청정농산물 생산에 이바지할 수 있는 분야임.
- 작물 근권 적응력이 우수한 광범위 작용 PGPR균의 분리 및 제품화는 국제 가격경쟁력이 있는 유기농자재를 개발함으로써, 한중 FTA 등 시장개방 확대에 대비하고 동시에 수출 경쟁력 있는 고품질 친환경 농식품의 생산 및 활용 가능하게 함 <그림 1-3>



<그림 1-3> 식물생장촉진 PGPR균 포함 복합바이오피료 제제의 효과

- 아래의 <그림 1-4, 1-5>에서 보는 바와 같이 천연물원료들은 식물생장에 탁월한 효과를 보이는 것으로 보고되고 있는데, 이는 다량의 식물생장활성 호르몬인 옥신과 사이토키닌이 함유되어 있는 것으로 나타났음
 - 식물의 성장에는 이러한 식물호르몬이 중요하고 탁월한 효과를 가지고 있으나, 식물호르몬을 식물에서 추출해 사용하기에는 고비용이 요구됨
 - 따라서, 이러한 식물호르몬을 다수 함유하고 있는 해조류와 같은 저렴한 자원의 활용은 식물생장활성제와 같은 유기농자재의 개발에 큰 역할을 담당할 수 있을 것으로 생각됨

<그림 14> 해조류에 존재하는 식물 호르몬의 종류

7% OFF Select Seed Starting Supplies + FREE 120 REFILL SPONGES when you buy 60-cell Bio Dome - Code: REFIL



The Best Secret for ALL Your Plants!



Customers Who Viewed This Also Purchased

Sea Magic Plant Growth Stimulant

This little pouch makes 250 quarts of solution!

Contains cytokinin and 17 amino acids to encourage stronger, lusher growth, more sugars production in fruiting crops, and increased blooms!

We've all been hearing great things about the use of seaweed as a plant growth stimulant, and we've looked lots of products to find out how they really measure up. Well, far and away the best - hands down, sailing home - is Sea Magic, a seaweed concentrate suitable for use on all your garden plants!

This dry seaweed is just amazing. It doesn't just encourage plants to grow - it speeds them up, increasing root production and strength so that they not only gain in size and thrust, but develop a healthy root system to maintain that increased growth all season long! They grow greener, lusher, and more resistant to pests and diseases. In combination with an all-purpose fertilizer, Sea Magic is unparalleled!

Entirely organic, this seaweed concentrate works wonders on flowering ornamentals.

★★★★★

Read All Reviews

\$7.95

Available in this

Accessories
Item # 00261

Quantity

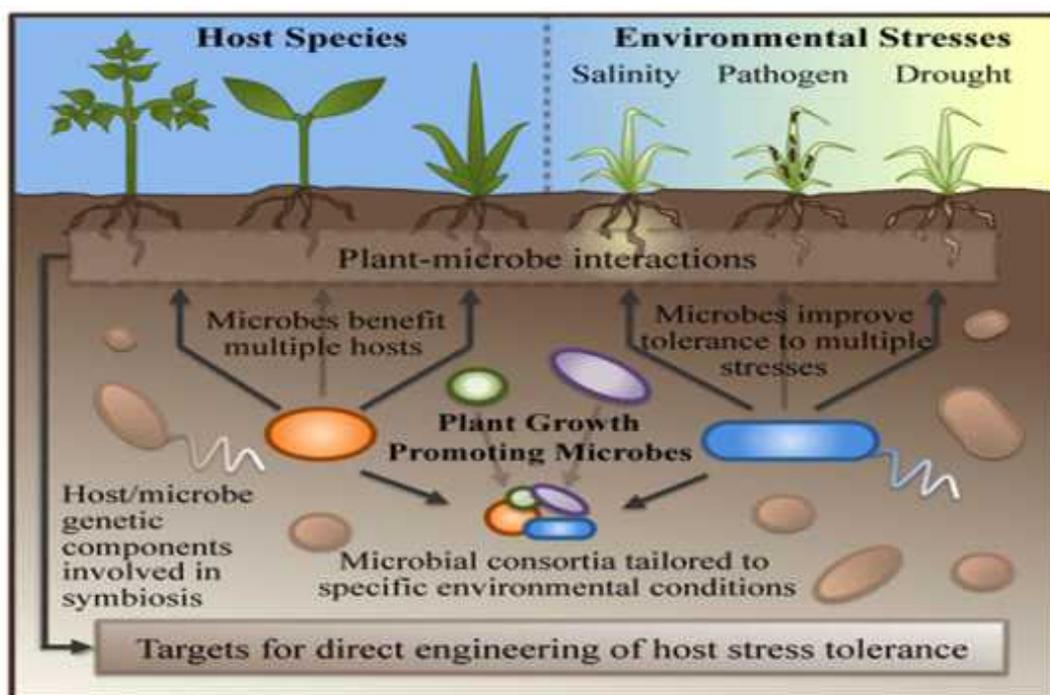


Add to Cart



<그림 1-5> 해조류 이용 식물 성장활성촉진제

- PGPR균은 작물의 성장촉진을 유도하는 기능 이외에도 최근의 연구에 따라 작물의 환경 및 비환경적 스트레스에 대한 내성을 촉진시키는 기능도 있는 것으로 보고되고 있음. 아래의 <그림 1-6>에서 보는 바와 같이 작물은 토양에서 자랄 경우 끊임없이 변화하는 환경에 노출되어 가뭄이나, 고염, 고온 스트레스에 의해 생산량이 감소하게 되는데 PGPR에 의해 이러한 환경 스트레스에 대한 내성이 증가하는 것으로 알려져 있음. 따라서, 본 과제에서 개발하게 될 복합바이오비료는 작물의 성장촉진 뿐만 아니라 이상기후에 따른 각종 환경스트레스에 대한 내성도 증진시켜 작물의 생산성 증대에 크게 기여할 것으로 추정됨.



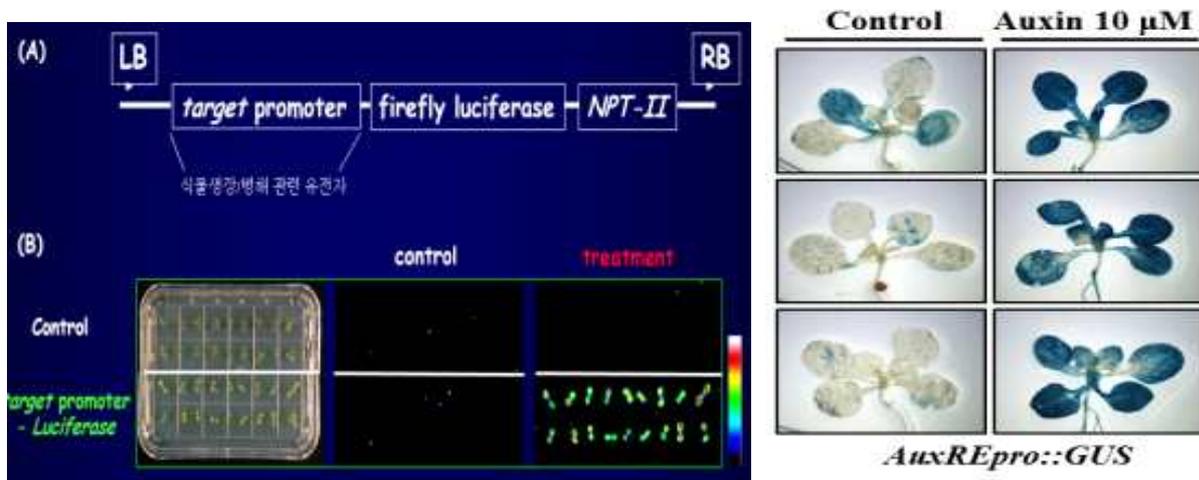
<그림 1-6> PGPR의 토양 내 환경스트레스 해소 기능

(3) 선행연구 내용 및 결과

(가) 선행연구 결과 및 애로사항

① 원예작물 성장활성물질과 PGPR균 스크리닝 시스템 확립

- 식물성장촉진을 효과적으로 검정 가능한 모델 식물을 이용한 성장활성 천연물 효과 스크리닝시스템을 아래와 같이 개발하였기에 보다 많은 종류의 미생물과 바이오비료 원료 물질을 효과적으로 스크리닝 할 수 있음 <그림 1-7>
- 아래 그림은 각각 식물이 생물학적 스트레스를 받았거나 혹은 근권에 옥신의 함량이 높을 때 발현하는 유전자의 프로모터를 GUS 리포터 유전자에 접합시킨 후 형질전환으로 제작한 마커식물의 사진임 → 이러한 시스템을 이용하여 식물반응에 직접 효과를 보이는 PGPR균과 각종 바이오비료 원료물질의 효과를 검정하는 것은 본 과제가 최초로 사용하는 방법임



<그림 1-7> 채소 성장활성촉진 PGPR균/바이오비료 후보 물질 스크리닝 시스템

② 사전연구를 통해 선발된 원예작물 성장활성 기능성 추출물 다량 보유

- 수십 종의 선발된 기능성 및 천연추출물의 산업화를 추진 중에 있음.
 - 본 과제에서는 추가로 탐색 선발된 돼지털 등 농수축산 부산물에서 성장활성촉진 아미노산 기능성 추출
 - 추가로 해조류 추출물 등의 천연추출물을 복합제제화 하여 실용화 등록을 추진할 계획임
- 기능성물질 유기농자재 개발하였고 이를 연구관련 제품에 적용하는 방법론 개발 중
 - 고삼추출물, 파라핀오일 등 기능성제품 단제 개발 출시 : 진디다운플러스, 트리텍 등
 - 칼슘제(그린내츄칼업, 파비오칼) 출시, 기능성 오일 단제 2종 선발 중
- 주요 천연추출물 신소재의 추출 정제방법 연구
 - 해조류 기능성성분 추출방법 확립하였고, 추가로 경제성 증진 방법 개발 중
 - 천연물제제 출시된 제조 방법 활용 : 해조추출물(해모수, 오델리켈프), 사포닌(네마큐)
- 작물활성물질의 종류 및 기능
 - 작물활성물질은 일반농약이나 비료와는 다른 개념인 식물, 종자, 토양 또는 다른 성장매체에 사용하는 영양물질인 작물활성제 즉, bio-stimulant로 작물의 능력을 향상시키고, 작물의 품질향상에 도움을 주는 물질임

Biostimulant의 종류		Biostimulant의 기능
ACIDS	Aminoacids & peptides • 90% animal (collagen, viscera) • fish (skin, heads, viscera) • plant (seeds, crop residues)	작물생육 촉진 단백질 합성 영양성분 흡수 증가 환경스트레스 해소
	Humic acids	토양환경 개선 영양성분 이용률 증가
EXTRACTS	Seaweed extracts	다양한 작물생리활성 촉진 환경스트레스 해소
	Plant extracts	병해충방제, 작물생육 촉진
VARIOUS	Microorganisms	발근효과, 작물생육촉진 물과 영양성분의 이용률 증가 병해충방제 토양환경 개선
	Chemicals (phosphites and others)	환경스트레스 해소 등

- 천연물 추출물 유기농자재 개발 현황
 - 해조류(제품명 : 해모수): 해조류(*Ascophyllum nodosum*, 아스코필럼 노도섬)로부터 추출하여 가공한 천연의 작물영양성분이 풍부한 친환경 작물생육활성제 <그림 1-8>.



<그림 1-8> 해조류: 원예작물 성장활성 바이오비료 물질의 성능실험

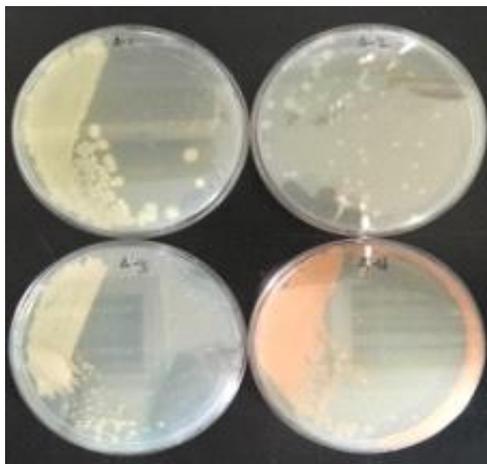
- 휴믹산(제품명 : 와이드샷골드): 부식산(humic acid)은 양분함량 낮고 부식함량이 높으며, 양이온(대부분의 양분은 양이온이다)을 짝 붙들어 두는 역할을 가진 물질로 염류장해를 해소시킬 수 있는 대표적인 물질임 <그림 1-9>.



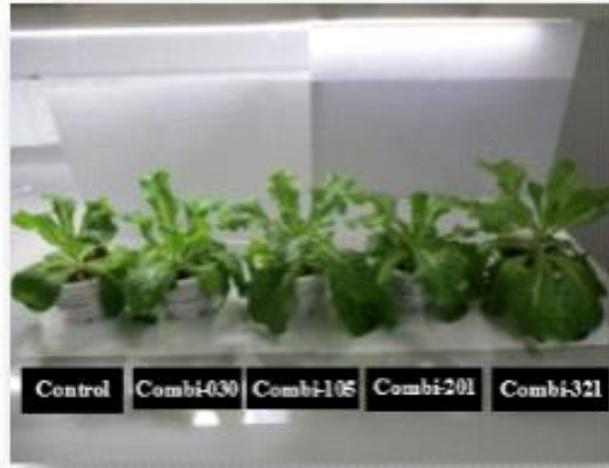
<그림 1-9> 휴믹산: 채소 성장활성촉진 바이오비료 물질의 효과

③ 원예작물 성장활성촉진 PGPR균 분리 시스템 확립과 성장활성능 확인 실험 중

- 아래의 방법에 따라서 PGPR균을 분리 중이며 현재 다수의 분리균으로 PGPR균 library를 가지고 있음
 - 근권 토양 0.1g을 멸균 증류수 0.9mL에 첨가한 후 10배 희석하여 영양아가배지에 0.1mL씩 평판 도말하여 증식하여 다수의 균을 분리하여 실험에 활용 중임 <그림 1-10>
 - 분리된 균을 16s rRNA sequencing과 NCBI database에서 blastn을 통해 균을 동정하고 다양한 균종을 확보함 : *Alcaligenes sp.* , *Arthrobacter sp.* , *Bacillus sp.* , *Microbacterium sp.*, *Myroides sp.* 등 다양한 성질의 미생물을 계속 분리 실험을 수행 중임.
 - 동정한 미생물의 다양한 조합의 원예작물성장활성을 비교하기 위해 <그림 1-11> 과 같은 *in vivo* 실험을 수행 중임



<그림 1-10> 채소성장촉진 PGPR균 분리



<그림 1-11> 분리된 균들의 조합에 작물성장능 비교

(나) 기존 연구 대비 본 연구의 차별성

- 기존 연구에서는 다양한 PGPR균의 분리에 초점이 맞춰진 연구가 대부분이며 국내 생산만을 목표로 연구가 진행되어 왔음. 그러나 본 연구에서는 기존의 연구 과제와 차별성을 두어 국내 과채류 생산 토양에서 다양한 기능성을 가진 PGPR 균을 자체적으로 분리하고 작물의 성장촉진능을 가진 원료 물질과 배합하여 새로운 개념의 복합 바이오비료를 개발하고자 함.
- 또한, 이 복합바이오비료를 국내에 출시하여 판매하는 것 외에도 해외 시장을 공략하여 수출 증진에 기여함을 목표로 하는 바가 타 과제와는 크게 차별성을 가지는 것으로 판단됨.
- 기존의 연구는 작물의 성장을 보는 형질 중점적 스크리닝을 위주로 연구가 진행되었으나 본 연구에서는 다양한 분자 표지 마커를 이용하여 PGPR의 스크리닝을 대량으로 할 수 있다는 점 또한 타 연구와 차별성을 가지는 것으로 나타남. 특히, 따로 시판되던 다양한 식물성장촉진능을 가진 원료 물질과 PGPR균의 배합은 식물의 성장을 촉진 할 뿐만 아니라 PGPR의 근권 활착에도 우수한 기능을 부여할 것으로 판단되며 이는 PGPR균과 식물성장촉진물질간의 시너지 효과를 창출하여 오래도록 PGPR의 효과가 토양에 남아 작물의 성장능을 활성화시킬 것으로 판단됨.
- PGPR의 효과를 오래 지속하기 위한 궁극의 방법으로 이들 균의 담체 고정화 조건의 최적화를 연구 또한 기존 연구와 차별성을 가짐. 이를 위하여 선별된 담체 및 보조제의 비율, 담체의 크기 조절, 부형제 선택등의 다양화를 통하여 복합바이오비료의 효용 기간을 늘이고자 함.

1-3. 연구개발 범위

(1) 원예작물 근권 PGPR균과 식물성장활성물질의 복합제제화 기술 개발

- 기능성 및 천연물 추출물과 선별된 PGPR균을 포함한 복합바이오비료 제제 및 현지 작물활성촉진 활성검정을 포함한 최종 제품화 기술개발

(가) 연구내용 및 방법

- ① 작물성장활성능을 가진 추출물로 원예작물 근권 PGPR균 활착능 개선을 위한 바이오비료 소재 스크리닝

- 국내부존 동식물성부산물을 활용한 기능성 및 천연물 추출물 탐색을 통한 제품화 대상 소재 선별 스크리닝 (닭털, 돼지털, 깃털 등 축산부산물에서 아미노산성분을 추출하여 식물성장촉진 기능성 추출물의 스크리닝)
 - 구아노, 부식산, 해조추출물, 천연광물, 골분, 혈분 등에서 천연물 추출물 스크리닝
 - 선별된 추출물의 활성을 측정하기 위해 제1, 2협동과제 책임자에게로 전달
- ② 기능성 및 천연물 추출물의 단제 후보물질 선별과 이들을 이용한 추출 및 혼합기술개발
- 국내외 자원을 활용하여 기능성 및 천연물 추출물 탐색선발
 - 기능성 및 천연물 종류 별 성분표준화
 - 기능성 및 천연물 종류 별로 대표유효성분의 고수율 추출공정개발
 - 용매추출법에 의한 용매 종류별 추출방법 선별
 - 안정성 검토하여 최적의 약효발현을 위한 혼합방법 검토
 - 추출물의 단제로써의 효능 최적농도 설정
 - 추출물의 최적농도 설정에 따른 혼합비율 설정 시험
 - 제형의 안정성 확인(온도, 습도 등)
 - 추출물간 성분배합비율을 고려한 혼합제 적정성 검토
 - 2종 또는 3종 복합제의 혼합 기술개발
- ③ 선별된 PGPR균과 작물생장활성 추출물 포함 복합바이오비료 제형화
- PGPR균 +작물생장활성 추출물의 복합제제에 대한 최적 약효발현 제제화 기술개발
 - 선별된 PGPR균의 대량배양 조건 검토
 - PGPR균 +작물생장활성 추출물의 복합제제 시제품 부자재 개발
 - Tween, BZA 계면활성제 등 유기농 허용 부자재 검토
 - 제오라이트, 목초액, 벤토나이트 등 증량제 검토
 - PGPR균+작물생장촉진 추출물 복합제제의 최적 제형화 검토 : 입제, 분제, 액제 등
- ④ 시제품의 최종 제품화 기술개발
- PGPR균 +작물생장활성 추출물의 복합제제 시제품의 품질관리 기술개발
 - 개발 시제품의 추출법 및 이화학분석법 확립: 등록요건 검토
 - 개발 시제품의 경시변화시험: 약효 유효기간 설정
 - 개발 시제품의 품질관리 기준설정
 - 최종제품 사용설명서 제작 및 제품라벨 포장기술
 - 개발 시제품에 대한 안전사용기준 설정: 희석배수, 사용량, 사용방법, 처리횟수, 살포 간격, 주의사항 등
 - 중간 및 최종 제품을 활용하여 현지 적용성 검토
 - 현지 작물활성촉진 활성검정
 - 중국, 베트남에서 고추, 토마토에 현지에서 현장 작물활성촉진의 활성검정
 - 제품등록(3차년도)
 - 국내 유기농업자재 제품등록 : 미생물동정/생균수, 오염미생물 검사, 약해시험 등

(2) 원예작물 근권 활착 우수 PGPR균 분리 및 담체화 기술 개발

- 우수 PGPR균의 분리선별과 기능성 검정 및 담체화 기술 개발

(가) 연구내용 및 방법

① 근권 활착 우수 PGPR 미생물의 분리 및 선별

- 우수한 미생물을 분리하기 위해서 토마토, 오이, 상추 등의 뿌리의 토양에서 연속적 희석법을 통하여 미생물을 순수분리
 - 콜로니 모양과 색깔 그리고 현미경에서 균 모양을 기준으로 선별 함
 - 분리된 균을 모델식물인 애기장대의 성장촉진능으로 1차선별 함 <그림 1-6>
 - 상추 등의 모종 성장촉진능으로 2차 선별하여 우수 근권활착 PGPR 미생물 library를 구축함
- 선별된 균주를 universal primer 27F, 1492R을 이용하여 16s rRNA 염기서열을 얻어서 NCBI blastn를 이용하여 균을 동정하고, 동정한 균의 기능적인 특성을 확인함
 - 분리된 균의 특성을 성장촉진능(옥신, 사이토카인), 인산가용화능, 질소고정능을 중심으로 조사하여 특성화
 - 특성을 비교하기 위해 표준 균주 3 종류를 활용 : *Pseudomonas fluorescens* KCTC42821 (성장촉진균), *Pantoea agglomerans* KCTC2564 (인산가용화균), *Derrxia gummosa* KTCT12784 (질소고정균)

② 근권 활착 우수 PGPR 미생물의 담체화 기술 개발

- 우수 PGPR미생물의 담체 고정화 기법 개발
 - 생균, 포자 고정화 조건의 최적화 : 담체 보조제의 비율 (규조토, 폴리우레탄, 실리카 젤 등), 담체의 크기 조절, pH, 담체화 용액 조성
 - 고정화된 박테리아의 생리적 특성 연구 : pH 적응도, 생존율, 경제적 조건 등
- 우수 PGPR 미생물의 담체화 후 바이오비료로 제형화 시 생존율 확인
 - 담체 고정화 조건의 최적화: 선별된 담체 및 보조제의 비율, 담체의 크기조절, 부형제, 복합바이오비료 종류 등의 영향
 - 고정화된 균의 생리적/물리적 특성 연구 : pH 적응도, 생존율, 생존 조건
 - 고정화된 포자의 발아 및 생존율 분석
- 우수 PGPR미생물의 생균과 포자 담체의 바이오비료 제형화 전후의 기능성 검정
 - 균의 담체화 후 바이오비료와 결합 전후에 토양에 처리하여 토양 내 성장촉진능, 인산가용화능, 질소고정능 조사
 - 특성 비교를 위해 표준균주 3종류를 활용하여 비교

(3) 원예작물 근권 활착 우수 PGPR균 작물생장 활성 검정

- 우수 PGPR균의 분리선별과 기능성, 천연물 추출물 및 복합바이오비료 제제의 효과검정

(가) 연구내용 및 방법

① 기능성과 천연물의 단일 추출물 및 이들의 복합제제의 작물생장촉진 활성검정

- 여러 종류의 대상 물질(기능성과 천연물의 단일 추출물)을 제1 세부과제로부터 공급받아 이들이 작물생장에 미치는 효과를 다양하게 검정
 - 작물의 생장 및 반응성은 생리학적 및 분자생물학적 방법을 이용하여 정량

- 초기의 많은 수의 물질을 스크리닝할 경우에 모델식물인 애기장대를 이용하여 물질의 활성 검정실험을 진행
 - 어린 유묘 상태에서 스트레스 물질의 효과를 검정하여 시간과 공간의 제약을 최소화
 - 모델 식물의 종자를 기내에서 발아시키고 어린 유묘 상태에서 대상물질의 처리
 - 식물의 성장 및 반응성을 뿌리 성장/광합성능/활성산소 발생능 측면에서 조사
 - 각 단계에서 관련 마커 유전자들의 발현을 qRT-PCR 방법을 이용하여 조사 및 정량화
 - 복합바이오비료 제제의 배합농도 및 비율결정을 위한 스크리닝 시스템<그림 1-6>을 확립하여 단일 및 복합제제 중에서 최적의 식물성장촉진 활성을 가지는 조합을 선별
- ② 선발된 PGPR균과 식물성장활성 추출물의 복합제제 효과 검정
- <그림 1-6>의 모델 식물 스크리닝 시스템을 활용하여 PGPR균과 식물성장활성 우수 추출물혼합 비율 선발
 - 효과를 재검정하기 위하여 다양한 마커 유전자의 발현을 식물성장 시기별 처리 차별화에 따라 조사
- ③ 신규 우수 기능성과 천연물질의 식물복합재해 내성촉진 관련 반응검정
- 신규 우수물질의 식물복합재해 내성 관련 반응의 조절여부 검정
 - 다양한 식물성장지표 활용을 통한 식물성장 전반 모니터링 및 분석
 - 식물 성장 및 보호 관련 분자 마커 및 관련 돌연변이 반응분석
 - 신규 우수물질의 생리활성 증진 및 응용에 필요한 기초원리를 규명
- ④ 신규 우수 기능성과 천연물질의 작물성장촉진 포장실증검정
- 신규 우수 물질들의 실험실 내 및 포장재배 시 효과 검정
 - 우수한 효과를 보이는 물질들의 배합비율을 달리하여 복합제 조제
 - 우수물질 효과를 포장에서 키운 원예작물을 대상으로 하여 기능성 검정
 - 농지 재배조건에 따른 맞춤형 PGPR균 및 작물성장촉진 제제 배합 효과검정
 - 얻어진 제제의 조건을 제1 세부과제에 제공하여 현지에서 현장 작물활성촉진의 활성검정의 근거 마련

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1 원예작물 근권 PGPR균과 식물생장활성물질의 복합제제화 기술 개발

- 작물활성물질(아미노산, 해조추출물 등)과 미생물 혼합 제품 개발

(1) 동물성아미노산에 미생물 배양 실험

(가) 연구내용 및 방법

- ① 시험 재료: 동물성아미노산, 미생물 배양액(*Bacillus velezensis*), 미생물(표 2-1), 배지(표 2-2)

표 2-1

No.	표기명	학명
1	AA-OD	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
2	PP-OD	<i>Peanibacillus polymyxa</i>
3	BS 17026	<i>Bacillus subtilis</i> (KACC17026)
4	BS 91501P	<i>Bacillus subtilis</i> (KACC 91501P)
5	P1	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>
6	P2	<i>Bacillus aquamaris</i>
7	P3	<i>Bacillus drentensis</i>
8	P4	<i>Bacillus</i> sp. 7B-230

표 2-2

No	목적	배지명	조성성분
1	대조구1	NB	Difco LB
2	대조구2	TSB	Difco TSB
3	실험구1	BM	Glucose 4.5g
			KH ₂ PO ₄ 1.125g
			(NH ₄)H ₂ PO ₄ 0.45g
			MgSO ₄ 0.09g
			Yeast extract 2.25g
			D.W 450ml
			Yeast extract 2.25g
4	실험구2	1/3 LB	Glucose 0.45g
			Sodium chloride 0.72g
			Di-Potassium 0.45g
			D.W 450ml
			Soy peptone 0.9g
			Yeast extrace 0.9g
			D.W 450ml
5	실험구3	YOD	Glucose 0.9g
			Di-Potassium 0.45g
			MnSO ₄ 0.0075g
			D.W 450ml
			D.W 450ml

② 시험 과정

- 동물성아미노산 30% 용액을 만든 후 Glucose 0.2%를 첨가하여 121C에서 멸균하였다. 멸균 후 상온에서 보관하여 식혀준 뒤 미생물 현탁액(*B.velezensis*(1X10⁸))을 400ul 접종한 뒤에 진탕배양을 실시하였다. 배양조건은 32C, 150rpm, 72h 광조

건으로 설정 하였다. 72h 배양 후 배양액을 희석 후 TSA배지에 도말하여 미생물의 생균수를 측정 하였다.

- 종균배양은 평판배지에서 자란 미생물의 단일 콜로니를 LB배지에 접종하여 150rpm, 30℃의 조건에서 약 24시간 배양한다. 시험배지 5개의 배지를 제작·멸균한 후 50ml tube 에 나누어 담는다. LB에서 약 24시간 배양한 미생물 배양액의 OD값을 측정 후 OD값을 0.1로 조정 하여 0.1% 접종한다. 150rpm, 30℃배양조건으로 약 2일 본배양 후 배양액의 OD값을 측정한다.

(나) 실험 결과

- 72h 배양된 동물성아미노산 30% 용액에서 미생물의 생균수를 측정한 결과 7.84×10^4 cfu/ml로 나타났다.

- 본배양 3일차 OD값 측정 : 이 연구의 분리균주인 P1균주의 경우 자체 시험에서 선정한 YOD와 더불어 BM배지에서 밀도 유지가 좋음을 알수가 있었다.

	AA-OD	PP-OD	17026	91501P	P1	P2	P3	P4
LB	0.730	0.577	0.677	0.581	0.392	0.653	1.136	0.854
TSB	1.144	0.910	0.656	0.920	0.663	1.027	1.340	0.961
BM	1.397	0.603	1.226	1.081	1.308	-	1.150	0.680
1/3LB	0.944	0.760	0.646	0.761	0.663	0.701	1.142	0.887
YOD	0.938	0.721	0.651	0.710	0.913	0.509	0.984	0.633

- 본배양 10일차 OD값 측정 : 배양 3일차 OD값과 비교해볼 때 비슷한 결과를 얻을 수 있었다

	AA-OD	PP-OD	17026	91501P	P1	P2	P3	P4
LB	0.582	0.465	0.557	0.569	0.653	0.893	1.409	1.104
TSB	0.703	0.947	0.555	0.728	0.690	1.057	1.502	1.064
BM	1.541	0.844	1.147	1.402	1.297	1.215	1.366	0.888
1/3LB	0.685	0.728	0.457	0.624	0.731	0.626	1.400	0.919
YOD	0.500	0.379	0.581	0.290	0.523	0.440	1.026	0.713

- 제형화 및 제품화를 위한 미생물 전용 배양 배지로 BM 배지를 선정하였다.

(다) 고찰

자체 개발한 미생물 배지인 YOD배지(Soy peptone 0.2%, Yeast extract 0.5%, Glucose 0.2%, Dipotassium Phosphate 0.1%)에 미생물 현탁액(*B.velezensis*(1×10^8))을 400ul 접종하여 배양조건 32C, 150rpm, 72h, 광조건으로 배양하여 생균수를 측정하면 5.00×10^8 cfu/ml의 밀도 이상으로 나타나지만 동물성아미노산 30% 용액에 미생물 현탁액을 동일한 조건으로 접종하였을 때 생균수 밀도가 7.84×10^4 cfu/ml로 나타난 것으로 보아 동물성아미노산 30% 용액에 미생물이 성장하기 어려운 조건이라고 판단된다.

(2) 동물성아미노산과 미생물 배양액 혼합 실험

(가) 연구내용 및 방법

- ① 시험 재료: 동물성아미노산, 미생물 배양액(*Bacillus velezensis*, *Pseudomonas nitroreducens*)

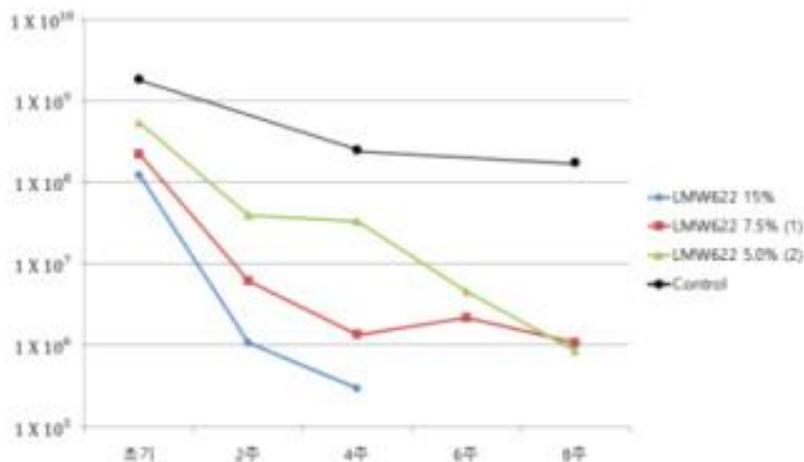
② 시험 과정

- YOD배지(Soy peptone 0.2%, Yeast extract 0.5%, Glucose 0.2%, Dipotassium Phosphate 0.1%)에 배양조건 32C, 150rpm, 72h 광조건으로 설정하여 배양 *B.velezensis*을 배양하였다. 미생물 배양액과 동물성아미노산을 함량별로 혼합하여 상온 및 40C에 보관하였다. 혼합액은 2주 간격으로 TSA배지에 도말하여 미생물의 생균수를 측정 하였다.
- 혼합, 보관 방법
 LMW622 15% + 미생물 배양액 (*B.velezensis*), 상온보관
 LMW622 7.5% + Glucose 0.4% + 미생물 배양액 (*B.velezensis*), 상온보관
 LMW622 5.0% + Yeast extract 0.5% + Glucose 0.4% 미생물 배양액 (*B.velezensis*), 40C 보관
- BM배지(Glucose 4.5g, KH₂PO₄ 1.125g, (NH₄)H₂PO₄ 0.45g, MgSO₄ 0.09g, Yeast extract 2.25g, D.W 450ml)에 배양조건 32℃, 150rpm, 72h 광 조건으로 설정하여 배양 *Pseudomonas nitroreducens*을 배양하였다. 미생물 배양액과 동물성아미노산을 함량별로 혼합하여 상온 및 40℃에 보관하였다. 혼합액은 2주 간격으로 TSA배지에 도말하여 미생물의 생균수를 측정하였다.

(나) 실험 결과

처리구	초기	2주	4주	6주	8주
LMW622 15%	1.25X10 ⁸	1.10X10 ⁶	3.00X10 ⁵	-	-
LMW622 7.5% (1)	2.24X10 ⁸	6.30X10 ⁶	1.37X10 ⁶	2.20X10 ⁶	1.10X10 ⁶
LMW622 5.0% (2)	5.43X10 ⁸	4.00X10 ⁷	3.36X10 ⁷	4.66X10 ⁶	8.66X10 ⁵
Control	1.87X10 ⁹	-	2.50X10 ⁸	-	1.78X10 ⁸

- LMW622 15% : 상온 보관
- LMW622 7.5% (1) : Glucose 0.4% 첨가, 상온보관
- LMW622 5.0% (2) : Yeast extract 0.5%, Glucose 0.4% 첨가, 40C 보관
- Control : YOD배지, 40C 보관



처리구	초기	2주	4주	6주	8주
LMW622 15%	1.25X10 ⁸	1.00X10 ⁶	2.50X10 ⁵	-	-
LMW622 7.5% (1)	2.20X10 ⁸	5.30X10 ⁶	1.27X10 ⁶	2.10X10 ⁶	1.10X10 ⁶
LMW622 5.0% (2)	3.42X10 ⁸	4.00X10 ⁷	3.36X10 ⁷	3.66X10 ⁶	6.26X10 ⁵
Control	1.87X10 ⁹	-	2.50X10 ⁸	-	1.78X10 ⁸

처리구 상세

- ▷ LMW622 15% : 상온보관 (미생물농약 경시변화 표준 온도)
- ▷ LMW622 7.5% (1) : 상온보관 (미생물농약 경시변화 표준 온도)
- ▷ LMW622 5.0% (2) : 40℃ 보관 (미생물농약 경시변화 학대 온도)
- ▷ Control : 40℃ 보관, BM배지 (미생물농약 경시변화 학대 온도)

(다) 고찰

미생물 배양액에 동물성아미노산을 혼합 후 Control과 비교하면 미생물의 낮은 생존율을 보인다. 하지만 동물성아미노산의 함량을 낮춰주거나 미생물의 생존에 필요한 영양분을 혼합해 준다면 어느 정도 미생물의 밀도가 유지되는 것으로 보인다. 하지만 동물성아미노산 5.0% (2)에 많은 미생물의 생존에 필요한 영양분을 혼합해 주어도 4주차부터 급격한 미생물 밀도 감소가 확인되었다. 추후 미생물의 밀도를 유지 시켜주는 성분을 탐색하는 실험이 필요할 것으로 보인다.

(3) Lysine, Threonine과 미생물 배양액 혼합 실험

(가) 연구내용 및 방법

- ① 시험 재료: 아미노산(Lysine, Threonine), 미생물 배양액(*Bacillus velezensis*, *Pseudomonas nitroreducens*)
- ② 시험 과정
 - YOD배지(Soy peptone 0.2%, Yeast extract 0.5%, Glucose 0.2%, Dipotassium Phosphate 0.1%)에 배양조건 32C, 150rpm, 72h 광조건으로 설정하여 배양 *B.velezensis*을 배양하였다. 미생물 배양액과 아미노산(Lysine, Threonine 혼합)을 함량별로 각각 Lysine 10%, Threonine 3% 와 Lysine 5%, Threonine 1.5% 으로 혼합하였다. 또한 혼합액에 Yeast extract 0.5%, Glucose 0.4% 첨가하였다. 혼합액은 2주 간격으로 TSA배지에 도말하여 미생물의 생균수를 측정 하였다.
 - BM배지(Glucose 4.5g, KH₂PO₄ 1.125g, (NH₄)H₂PO₄ 0.45g, MgSO₄ 0.09g, Yeast extract 2.25g, D.W 450ml)에 배양조건 32℃, 150rpm, 72h 광 조건으로 설정하여 배양 *Pseudomonas nitroreducens*을 배양하였다. 미생물 배양액과 단일 아미노산을 함량별로 혼합하여 상온 및 40℃에 보관하였다. 혼합액은 2주 간격으로 TSA배지에 도말하여 미생물의 생균수를 측정하였다.

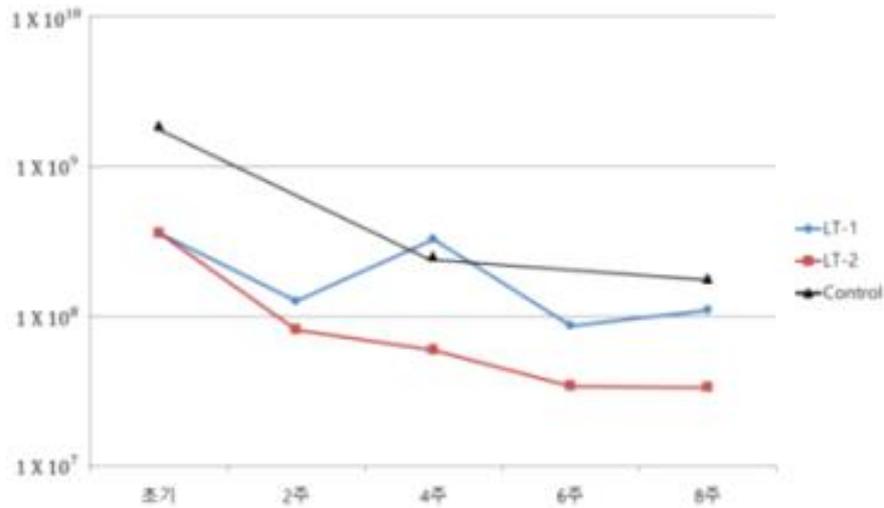
(나) 실험 결과

처리구	초기	2주	4주	6주	8주
LT-1	3.63×10^8	1.27×10^8	3.30×10^8	8.70×10^7	1.11×10^8
LT-2	3.63×10^8	8.20×10^7	6.00×10^7	3.43×10^7	3.36×10^7
Control	1.87×10^9	-	2.50×10^8	-	1.78×10^8

LT-1 : Lysine 10%, Threonine 3%

LT-2 : Lysine 5%, Threonine 1.5%

Control: YOD 배지



처리구	초기	2주	4주	6주	8주
Lysine 10%	3.63×10^8	1.27×10^8	3.30×10^8	8.70×10^7	1.11×10^8
Lysine 5%	3.63×10^8	8.20×10^7	6.00×10^7	3.43×10^7	3.36×10^7
Control (BM배지)	1.87×10^9	-	2.50×10^8	-	1.78×10^8

처리구	초기	2주	4주	6주	8주
Threonine 3%	3.63×10^8	1.5×10^8	2.20×10^8	2.10×10^7	1.00×10^7
Threonine 1.5%	3.63×10^8	5.20×10^7	4.50×10^7	3.43×10^7	3.40×10^7
Control (BM배지)	1.87×10^9	-	2.50×10^8	-	1.50×10^8

(다) 고찰

LT-1이 LT-2보다 미생물 밀도 유지가 높은 것으로 확인 되었다. 미생물 밀도 조사시 LT-1이 LT-2 보다 2배 이상 밀도가 유지 되었다. 아미노산 Lysine, Threonine 이 미생물 밀도 유지에 도움이 되는 것으로 생각 된다. 추후 Lysine, Threonine의 함량을 2~3%로 낮추고 해조추출물을 추가로 혼합하여 실험을 실시하여 아미노산, 해조추출물의 상승효과를 확인하는 실험을 실시할 것이다. 또한 Methionine, Tryptophan, Valine, Arginine 아미노산을 추가로 혼합하여 미생물 밀도 유지에 효과가 있는 아미노산 선발 실험이 필요할 것으로 보인다.

(4) 해조추출물에 미생물 배양실험 및 해조추출물과 미생물 배양액 혼합 실험

(가) 연구내용 및 방법

① 시험 재료: 해조추출물, 미생물 배양액(*Bacillus velezensis*)

② 시험 과정

- 해조추출물 30% 용액을 만든 후 Glucose 0.2%를 첨가하여 121C에서 멸균하였다. 멸균 후 상온에서 보관하여 식혀준 뒤 미생물 현탁액(*B.velezensis* (1×10^8))을 400ul 접종한 뒤에 진탕배양을 실시하였다. 배양조건은 32C, 150rpm, 72h 광조건으로 설정 하였다. 72h 배양 후 배양액을 희석 후 TSA배지에 도말하여 미생물의 생균수를 측정 하였다.
- 해조추출물 15%, 7.5% 용액을 만든 후 7.5% 용액에는 Yeast extract 0.5%, Glucose 0.4%를 추가 혼합하여 만들었다. YOD배지(Soy peptone 0.2%, Yeast extract 0.5%, Glucose 0.2%, Dipotassium Phosphate 0.1%)에 배양조건 32C, 150rpm, 72h 광조건으로 설정하여 배양 *B.velezensis*을 배양하였다. 미생물 배양액과 해조추출물을 함량별로 혼합하여 상온 및 40C에 보관하였다. 혼합액은 2주 간격으로 TSA배지에 도말하여 미생물의 생균수를 측정하였다.

(나) 실험 결과

• 해조추출물 미생물 배양실험

- 72h 배양된 해조추출물 30% 용액에서 미생물의 생균수를 측정한 결과 5.00×10^5 cfu/ml로 나타났다.

- 해조추출물과 미생물 배양액 혼합 실험

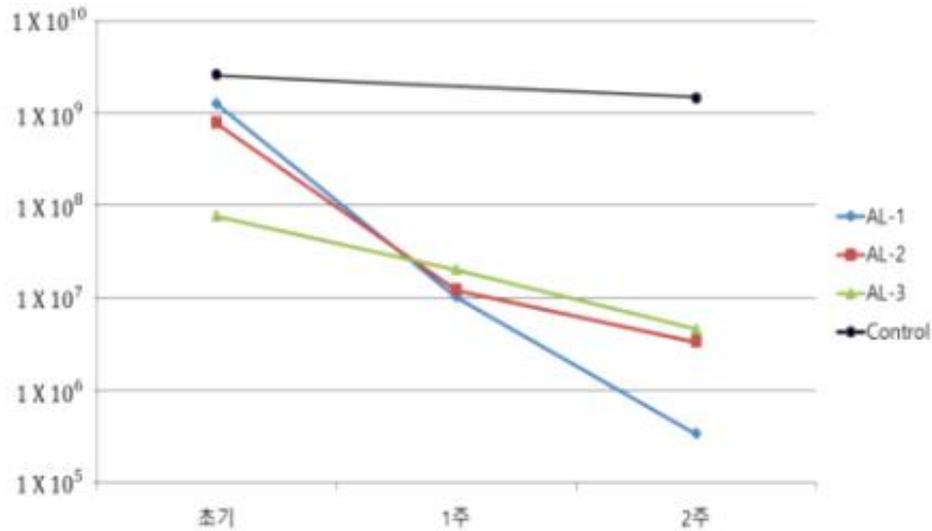
처리구	초기	1주	2주
AL-1	1.25×10^8	1.00×10^6	3.30×10^4
AL-2	7.70×10^7	1.20×10^6	3.30×10^5
AL-3	7.66×10^6	2.00×10^6	4.53×10^5
Control	2.58×10^8	-	1.43×10^8

AL-1 : 해조추출물 15%

AL-2 : 해조추출물 7.5%

AL-3 : 해조추출물 7.5% + Yeast extract 0.5%, Glucose 0.4%

Control : YOD 배지



(다) 고찰

해조추출물에서 미생물 유지가 어려운 것으로 보인다. 미생물의 영양성분인 Yeast extract 0.5%, Glucose 0.4%를 추가로 혼합하였지만 미생물 밀도 유지에 효과가 낮은 것으로 나타났다. 추후 미생물 영양성분을 배양으로 첨가하거나 해조추출물을 함량을 7.5% 이하로 하여 추가 실험이 필요할 것으로 보인다.

(5) 복합바이오피료 분상 제형화 시험

(가) 연구내용

- ① 시험 재료 : 증량제(Corn starch, Tapioca starch, ZEO300, kaolin), 미생물 배양액(*Pseudomonas nitroreducens*)
- ② 시험 방법 : 평판배지에서 자란 미생물의 단일 콜로니를 LB배지에 접종하여 150rpm, 30℃의 조건에서 약 24시간 배양한다. LB에서 자란 종균의 OD값을 측정 후 본배양 배지 BM배지에 약0.1% 접종한 후 150rpm, 30℃의 조건에서 배양한다. 약 1~3일 본배양 후 배양액의 OD값 및 밀도를 측정한다. 증량제와 배양액을 1:1로 혼합 후 50℃의 dry oven에서 건조한다. 건조된 미생물의 밀도 및 오염 여부를 확인한다.

(나) 시험 결과

- 일차별 본배양액 OD값 및 밀도 측정

<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1일차	2일차	3일차
	2.1X10 ⁶ cfu/ml	1.1X10 ⁶ cfu/ml	1.0X10 ⁶ cfu/ml

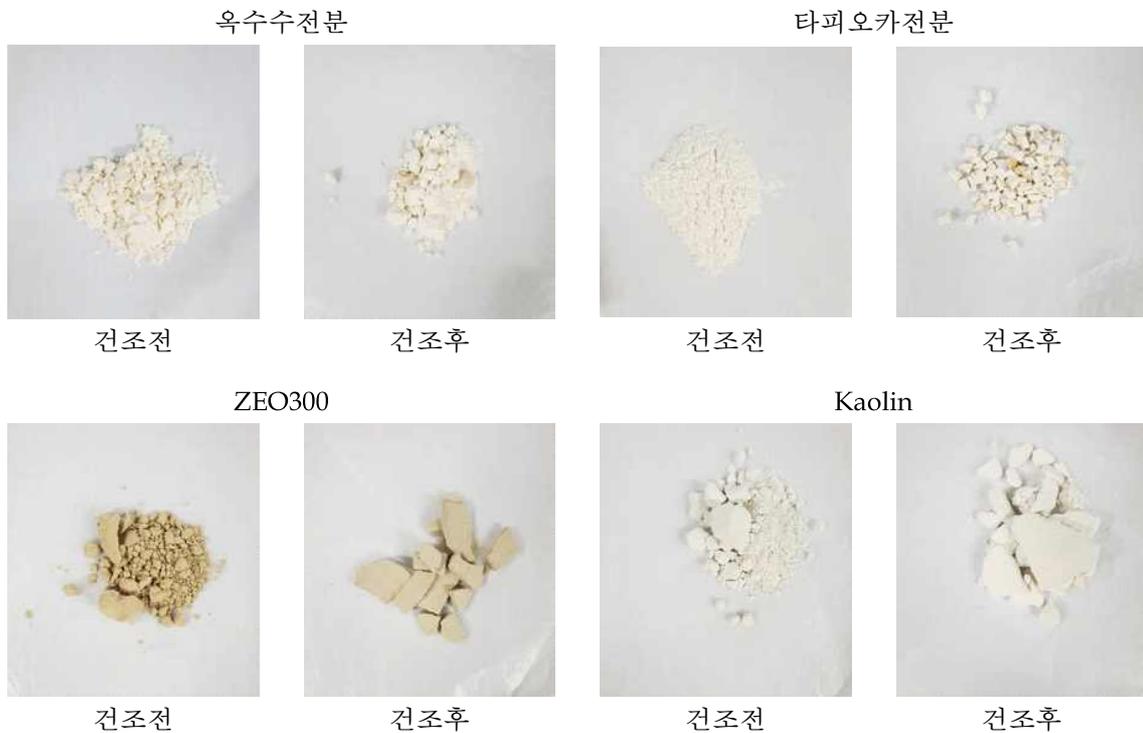
- 50℃에서 완전 건조까지 걸린 시간

배양액	증량제	Day
<i>Pseudomonas nitroreducens</i> 배양액	Corn starch	18
	Tapioca starch	18
	ZEO300	27
	kaolin	24

• 건조 미생물의 밀도 측정

	증량제	밀도(cfu/ml)
<i>Pseudomonas nitroreducens</i> 배양액	Corn starch	3.0×10^8 cfu/ml
	Tapioca starch	3.2×10^6 cfu/ml
	ZEO300	1.0×10^8 cfu/ml
	kaolin	-

- 옥수수 전분에 건조시 미생물 밀도가 높아졌고, 건조기간도 가장 빠른 것을 확인할 수 있었다. 옥수수전분과 타피오카 전분 같이 전분류에 미생물을 혼합시 문제점은 전분의 점도 때문에 혼합이 어려운 것에 있다. 미생물을 건조 배양한 결과 액상배양보다는 미생물 밀도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 미생물 밀도가 높지 않고, 건조 과정에서 다른 미생물의 오염이 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 차후 실험에서는 초기 분배양시 미생물의 밀도를 최대한 높여 배양하는 방법을 찾아야 하고, 미생물 건조시 오염을 최대한 차단하여 목표로 하는 미생물의 밀도가 얼마나 증가하는지를 확인하여야 할 것이다.



- ZEO300이나 Kaolin의 경우 건조기간도 문제지만 건조 과정 후 분말 입자가 큰 문제도 있었다. 그렇기 때문에 별도의 분쇄 과정이 필요할 것이다. 옥수수 전분이나 타피오카 전분의 경우 건조 후에도 ZEO300이나 Kaolin의 분말 입자 크기에 비해 작아 작물활성제와의 혼합과정만으로도 충분히 가능할 것으로 본다.

(6) 복합바이오비료 입제 및 액상 제형화 예비시험

(가) 연구내용

- ① 시험 재료 : 작물활성보조제(Humic acid 0.1%(체코)
미생물 배양액 (*Pseudomonas nitroreducens*) BM배지
- ② 시험 방법 : 평판배지에서 자란 미생물의 단일 콜로니를 LB배지에 접종하여 150rpm, 30℃의 조건에서 약 24시간 배양한다. LB에서 자란 종균의 OD값을 측정 후 본배양 배지 BM배지에 약0.1% 접종한 후 150rpm, 30℃의 조건에서 배양한다. 약 1~3일 본배양 후 배양액의 밀도를 측정한다. 작물활성보조제 Humic acid 0.1%액과 배양액을 1:1로 혼합 후 30℃ 온도에서 보관 후 24시간, 48시간 배양액의 밀도수를 확인한다.

(나) 시험 결과

- 일차별 본배양액 OD값 및 밀도 측정

	작물활성보조제	밀도(cfu/ml)		
		혼합일	24h 후	48h 후
<i>Pseudomonas nitroreducens</i> 배양액 (BM배지)	Humic acid (체코)	3.0X10 ⁶ cfu/ml	4.4X10 ⁷ cfu/ml	6.2X10 ⁷ cfu/ml

- 토양개량 효과 및 유기질 시비를 위해 사용하는 Humic acid를 통하여 밀도수의 유지를 확인했다. 그결과 밀도수를 유지하고 있어 입제 및 액상 제형화 본 시험 진행에 있어 좋은 자료로 활용이 될것으로 사료된다. 본 시험에서는 폴빅산, 질소구아노 등의 유기질 등과의 혼합시 미생물 밀도 유지 및 작물생육 활성에 도움이 되는지에 대한 시험이 진행중이다.

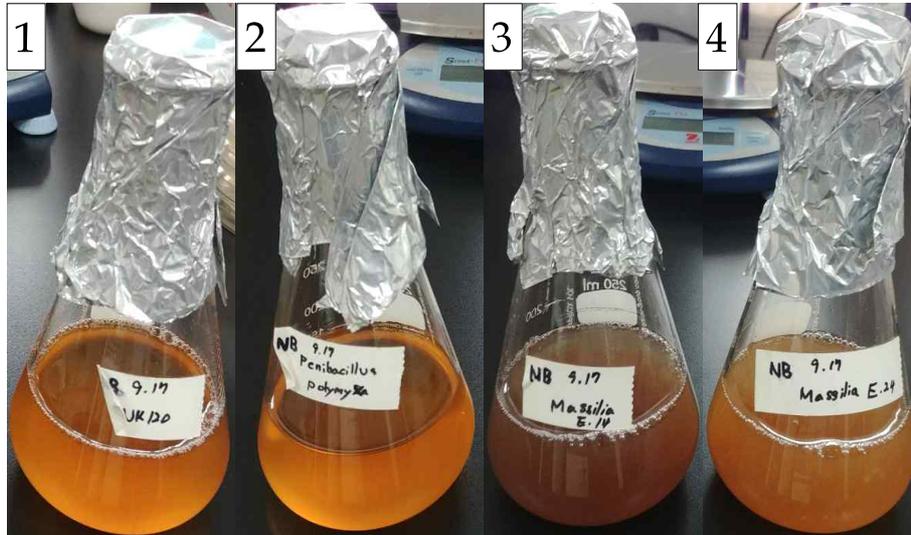
(7) 추가 균주 선발

(가) 연구내용

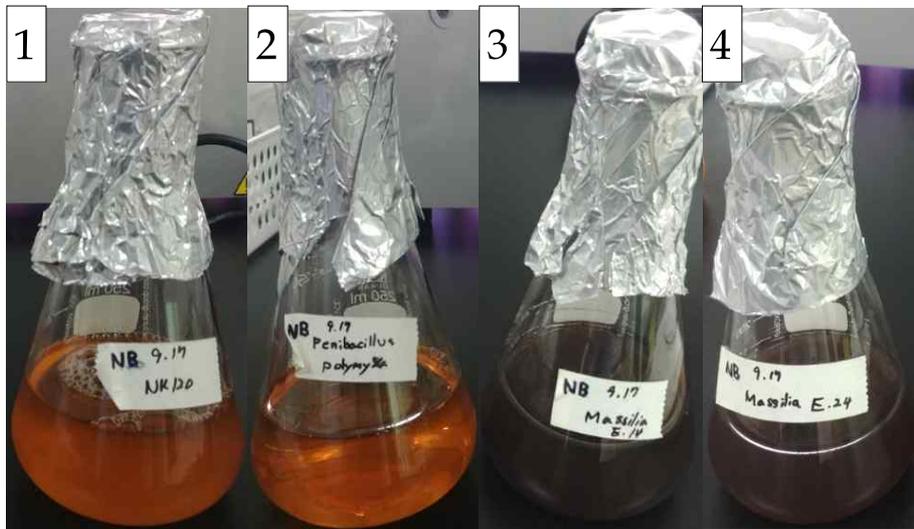
- ① 시험 재료 : NA(Nutrient Agar - Beef extract 3g, Peptone 5g, Agar 15g)
- ② 시험 과정 : 추가로 4개의 균주를 선발하였다.

균주	분양처	균주번호	비고
<i>Massilia</i> sp. EP15214	국립농업과학원	KACC 91871P	
<i>Massilia</i> sp. EP15224	국립농업과학원	KACC 91872P	
<i>Paenibacillus polymyxa</i> ES-17	국립농업과학원	KACC92000P	신규 분양
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>			신규 분리

- 선발한 4개의 균주는 NB(Nutrient Broth - Beef extract 3g, Peptone 5g) 150ml 액체배지에 접종하여 26℃ 100rpm으로 배양하였다. 배양 2일 후에 액체배지가 탁해진 것을 육안으로 확인할 수 있었고, 3일 후에 *Massilia* sp. EP 15214에서 색소가 나타나기 시작하여 10일에는 색이 완전히 변화한 것을 확인하였다.



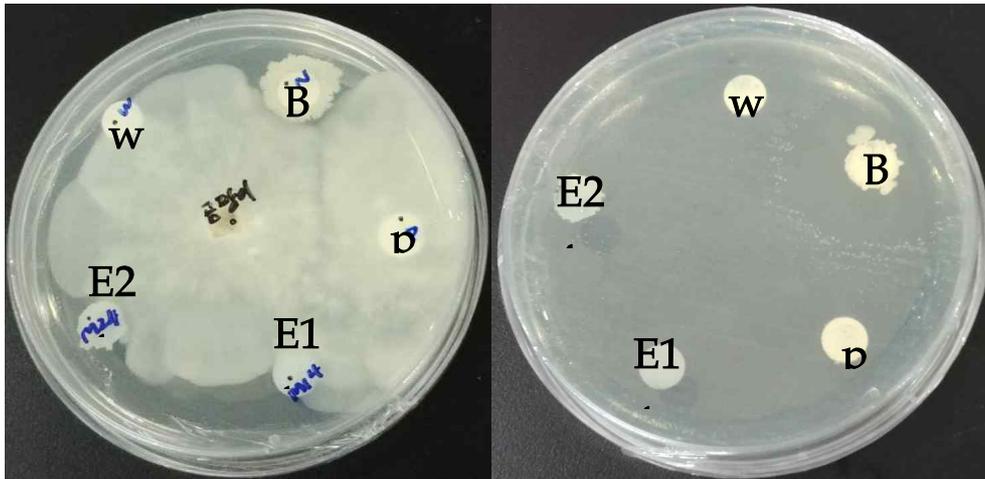
배양 3일 1. *Bacillus subtilis*, 2. *Paenibacillus polymyxa*, 3. *Massilia* EP15214, 4. *Massilia* EP15224



배양 10일 1. *Bacillus subtilis*, 2. *Paenibacillus polymyxa*, 3. *Massilia* EP15214, 4. *Massilia* EP15224

- 이후 배양액을 이용하여 고추에서 분리한 부생균(*Rhizopus microsporus*)과 세균에서 항균활성을 확인하였다.
- 실험 전에 부생균은 고체배지에, 세균은 액체배지에 배양하여 준비하였다. 선발한 균주의 확실한 반응을 보기 위해서 미생물 배양액을 Paper disc에 $33\mu\text{l}$ 를 loading한 후 건조, 이를 3회 반복하여 총 $100\mu\text{l}$ 를 loading하였고, 건조한 Paper disc를 세균을 도말한 NA배지와 가운데 부생균을 올린 PDA(Potato Dextrose Agar - potato starch 4g, dextrose 20g, agar 15g)배지에 올리고 26°C 배양하며 결과를 관찰하였다.

(나) 시험결과



W. Water B. *Bacillus subtilis*, P. *Paenibacillus polymyxa*, E14. *Massilia* EP15214, E24. *Massilia* EP15224

- 곰팡이와 세균에서 항균활성 확인결과 곰팡이에서는 항균활성을 확인할 수 없었지만, 세균에서는 *Bacillus subtilis*에서 항균활성을 확인할 수 있었다.

(다) 고찰

- 육안으로 확인한 액체배양에서는 *Bacillus subtilis*가 가장 빠른 성장속도를 보여주었으며, 고체배양에서도 가장 안정적으로 성장하는 것을 확인 할 수 있었다. *Paenibacillus polymyxa*는 성장속도가 *Bacillus*보다 늦었다. *Massilia*의 경우 성장하여 색소를 생성하는데 긴 시간이 걸렸고, 배양하는데 색소를 생성하지 않거나, 배양이 안정되지 않아 자라지 않는 경우도 많았다.
- 육안으로 지켜본 미생물의 성장과 위의 항균활성 결과를 토대로 *Bacillus subtilis*를 선발하여 이후 실험을 진행하였다.

(8) 식물병원성 미생물 항균활성 확인

(가) 연구내용

- 여러 종류의 식물병원성 미생물을 대상으로 위에서 선발한 *Bacillus subtilis*의 항균활성을 시험하였다. 식물병원성 미생물들은 50ml NB배지에 접종하여 26℃ 100rpm으로 배양하였고, 분광광도계(GENESYS30, Thermo scientific)를 사용하여 OD600=0.1±0.2로 조절하여 도말하여 사용하였다.

균주	균주번호	기주-병명
<i>Xanthomonas campestris</i>	KACC 10377	배추, 양배추-검은썩은 흑부병
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Syringae</i>	KACC 10604	사과-세균성갈색점무늬병, 가지마름입고병 양과-가지마름지고병
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	KACC 17004	세균성무름병-비모란, 시클라멘

- *Bacillus subtilis*는 NB 50ml 액체배지에 접종하여 26℃ 100rpm으로 배양하

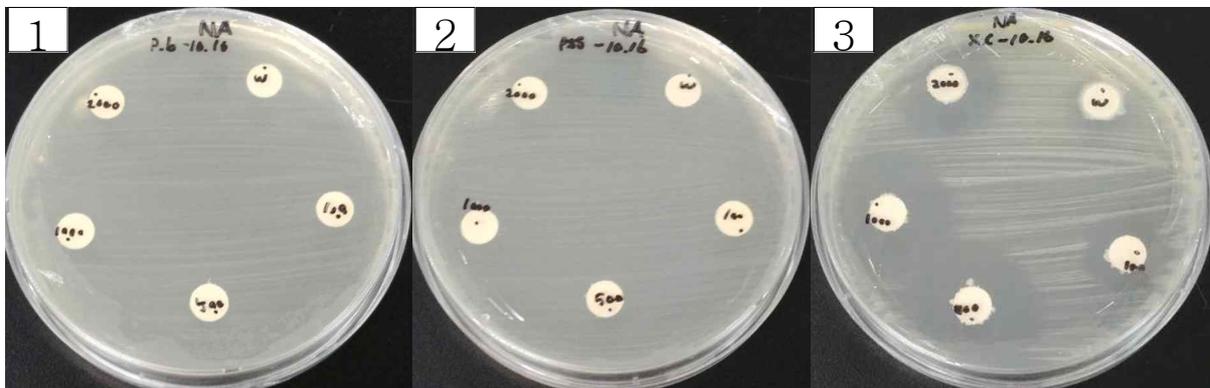
였고, 배양액을 멸균수로 희석하여 Paper disc에 33 μ l를 loading한 후 건조, 이를 3회 반복하여 총 100 μ l를 loading하였고, 건조한 Paper disc를 세균을 도말한 NA배지 올려 26 $^{\circ}$ C에서 2일간 배양하였다. 또 농축산용미생물산업육성지원센터에 병원성 진균의 항균활성 검증을 의뢰하였다.

균주	균주번호	기주-병명
<i>Alternaria alternata</i>	KACC 45440	다래 검정썩음병
<i>Botrytis cinerea</i>	KACC 47009	갯빛곰팡이병
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KACC 45481	키위썩음병
<i>Colletotrichum acutatum</i>	KACC 40042	고추 탄저병
<i>Fusarium fujikuroi</i>	KACC 44002	벼 키다리병
<i>Fusarium graminearum</i>	KACC 41040	보리 붉은곰팡이병
<i>Fusarium graminearum</i>	KACC 41044	옥수수 붉은곰팡이병
<i>Fusarium graminearum</i>	KACC 46434	벼 붉은곰팡이병
<i>Fusarium oxysporum</i>	KACC 41088	호접난 썩음병
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1	KACC 40101	벼 잎집무늬마름병

- 항균활성을 검증한 후 미생물의 농도에 따른 항균활성도 검증하였다. *Bacillus subtilis*는 NB 50ml 액체배지에 접종하여 30 $^{\circ}$ C 100rpm으로 배양하였고, 분광광도계를 사용하여 OD600=0.127로 조절한 후 NB배지를 사용하여 10⁻⁵까지 희석하였다. 희석액은 NA배지에 100 μ l를 도말하여 30 $^{\circ}$ C에서 2일간 배양 후 생균수를 측정하였고, 항균활성은 가스가민(Kasugamycin 2.3% 동방아그로)를 10배, 100배로 희석하여 대조구로 사용하였고, 배양 희석액과 가스가민 희석액은 Paper disc에 33 μ l를 loading한 후 건조, 이를 3회 반복하여 총 100 μ l를 loading한 후 세균을 도말한 NA배지 올려 30 $^{\circ}$ C에서 2일간 배양하였다.

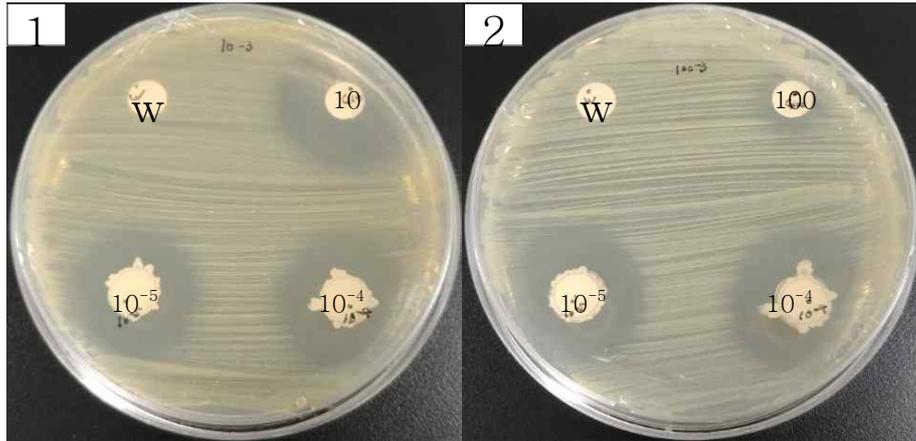
(나) 시험결과

- 식물병원성 세균 3균주를 사용한 항균활성 실험에서는 *Xanthomonas campestris*에서 만 항균활성을 확인할 수 있었고, 배양액을 2000배로 희석하여도 항균활성이 나타난 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 농축산용미생물산업육성지원센터에 의뢰하였던 병원성 진균에 대해서는 항균활성이 나타나지 않은 것을 확인되었다.



Bacillus subtilis 배양액 항균활성, 도말한 균 1. *Pectobacterium carotovorum* 2. *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* 3. *Xanthomonas campestris*

- 이후 *Bacillus subtilis*의 배양액을 희석하여 생균수와 *Xanthomonas campestris*에서의 항균활성을 측정하였다. 생균수는 10^{-3} ~ 10^{-5} 까지는 직접 카운트하였고, 10^{-2} 은 1/4을 카운트하여 대략적인 수치를 구하였다. 10^{-1} 과 OD=0.127은 앞에서 카운트한 생균수의 평균을 구하여 작성하였다.



w: water, 10: 가스가민 10배 희석, 100: 가스가민 100배 희석, 배양액 희석액: 10^{-4} , 10^{-4} (cfu/ml)

	OD=0.127	배양액 10^{-1}	배양액 10^{-2}	배양액 10^{-3}	배양액 10^{-4}	배양액 10^{-5}
생균수	3.1×10^7	3.1×10^6	6.2×10^4	1.9×10^4	4.7×10^3	5.1×10^2

Clear Zone크기(cm)

	가스가민 10배	가스가민 100배	배양액 OD=0.1 27	배양액 10^{-1}	배양액 10^{-2}	배양액 10^{-3}	배양액 10^{-4}	배양액 10^{-5}
1	2.8	1.3	3.1	2.9	2.9	2.7	2.6	2.1
2	2.8	1.2	3.2	2.9	2.8	2.6	2.7	2.3
3	2.7	1.1	3.4	3	2.8	2.7	2.7	2.7

- 동방아그로의 가스가민 10배 희석액과 1.9×10^4 ~ 6.2×10^4 cfu/ml에서의 clear zone의 크기가 유사한 수치인 것을 확인하였고, 가스가민 100배 희석액 보다 10^5 까지 희석한 배양액의 항균활성이 더 높은 것을 확인할 수 있었다.

(다) 고찰

- Bacillus subtilis*는 *Xanthomonas campestris*에 항균활성을 보였다는 것을 확인할 수 있었고, 생균수가 높지 않아도 그 효과는 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. 추후 미생물제제를 적용할 작물에 따라 다른 식물병원성 미생물에서의 항균활성 여부는 실험이 필요하다고 생각된다.

(9) 시제품의 효과 확인

(가) 연구내용

- 임의로 제작한 시제품을 이용하여 *Xanthomonas campestris*에서의 항균활성을

측정하였다. *X. campestris*의 도말은 NB 50ml 액체배지에 접종하여 30℃ 100rpm으로 배양하였고, 분광광도계를 사용하여 OD600=0.174로 조절 후 도말하였다. 시제품은 1g을 멸균수를 사용한 십진희석법으로 희석하여 Paper disc에 33 μ l를 loading한 후 건조, 이를 3회 반복하여 총 100 μ l를 loading하였고, 건조한 Paper disc를 세균을 도말한 NA배지 올려 30℃에서 2일간 배양하였다.

- 잔디에서 효과 확인은 서양 잔디(크리핑벤트 그라스, *Agrostis stolonifera* L. 다농)를 상토를 사용하여 포트에 심어 싹이 난 이후 시제품을 500배, 1000배 희석하여 분무하였다. 대조구로는 물을 사용하여 분무하였고, 분무 후 20~26℃ 16시간 빛 조건으로 생장을 관찰하였다. 생장 7일, 14일 후 뿌리와 상초부분의 생장을 측정하였고 상토에서 균을 분리하여 육안으로 분리된 균을 확인하였다.

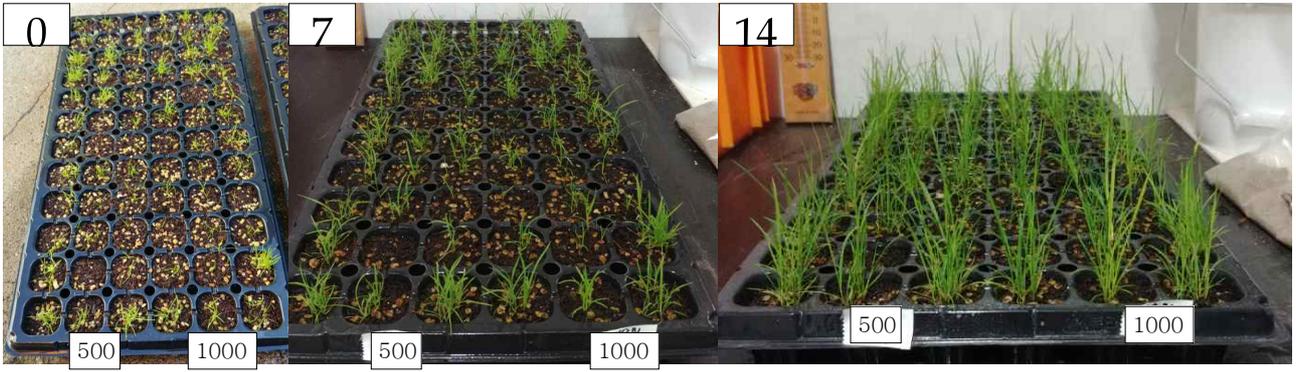
(나) 시험결과

	water	가스가민 (10 ³ 배 희석)	희석액 100배	희석액 500배	희석액 1000배	희석액 2000배	희석액 3000배
ppm	0	23	10000	2000	1000	500	333
Clear Zone(cm)	0	0	2	2.3	2.2	2.1	1.5

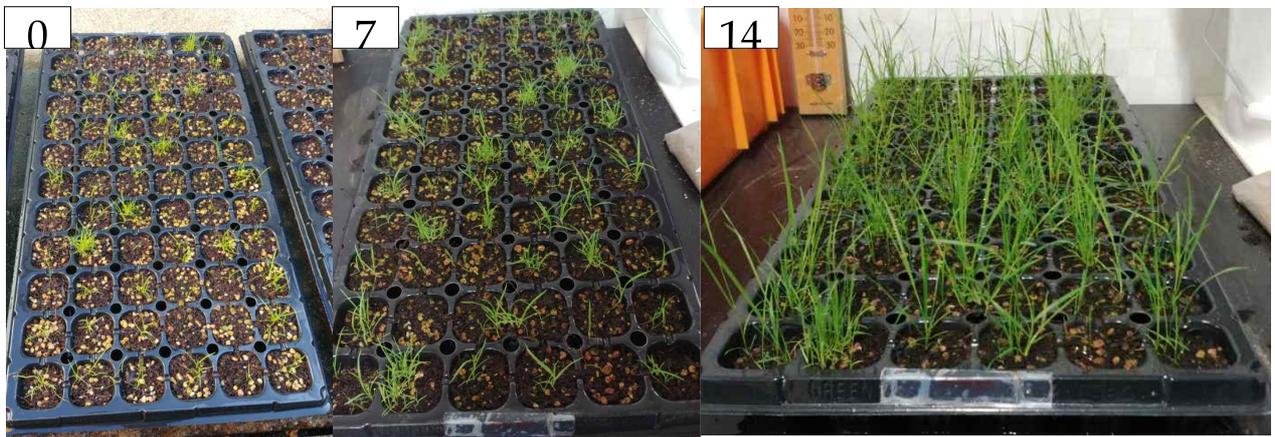


w: water, k: 가스가민 1000배 희석액, 1: 100배 희석액, 5: 500배 희석액, 10: 1000배 희석액, 20: 2000배 희석액, 30: 3000배 희석액

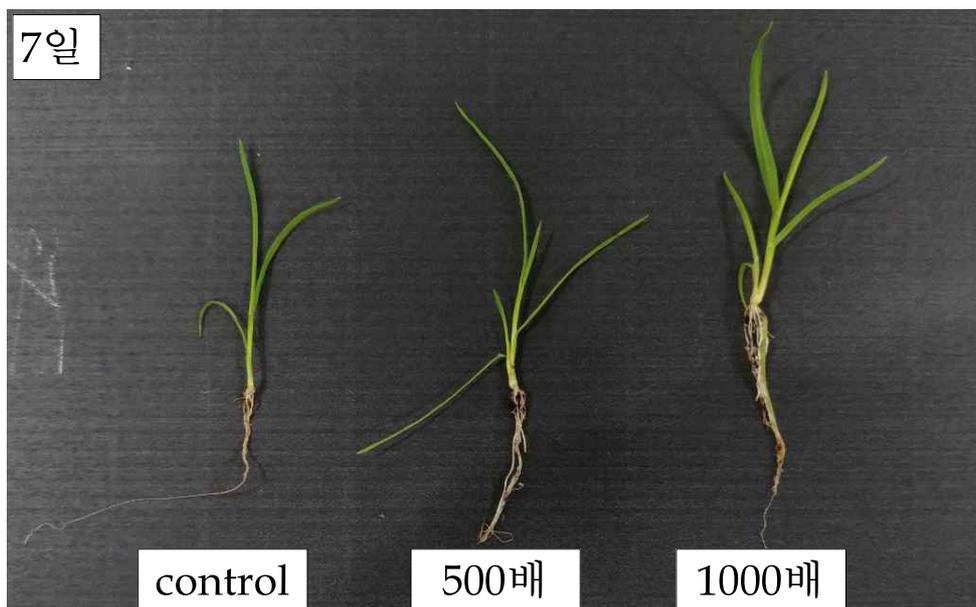
- 시제품의 항균활성은 희석배율이 높을수록 작아지는 경향을 보이고 있으며, 낮은 농도에서도 이전 실험한 가스가민 100배 희석액과 유사한 결과를 얻을 수 있었다.
- 시제품과 물을 잔디에 분무 후 7일과 14일 관찰한 결과 양쪽 모두 눈에 띄게 성장하였다. 포트 상에서 육안으로는 비교할 수 없을 정도로 유사하였기 때문에 임의로 잔디를 골라 길이를 측정하여 평균치를 구하였다.



시제품 분무: 500은 500배 희석액, 1000은 1000배 희석액을 분무



Control: 물을 분무



분무 7일 후 control:물, 시제품 희석액: 500배, 1000배

14



분무 14일 후 control:물, 시제품 희석액: 500배, 1000배

- 잔디의 각각의 길이를 측정하고 평균을 구한 결과 분무 후 7일 차에는 대조구로 사용한 물이 500배 희석액을 분무한 쪽보다 성장이 좋은 것을 확인 할 수 있었다. 이후 14일 차에는 500배 희석액이 물보다 더 성장한 것을 확인할 수 있었다.



상토 1g에서 균 분리 (cfu/1g)

	7일	14일
500배	9.7×10^5	1.3×10^6
1000배	1.5×10^6	1.0×10^6

- 또 상토에서 미생물을 분리하여 육안으로 확인한 결과 7일 차 500배 희석액을 분무한 상토에서 미생물 생균수가 1000배 보다 낮은 것을 확인 할 수 있었다.

(다) 고찰

- 시제품은 희석배수가 높아질수록 항균활성이 조금 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 실제 사용 시에는 1000배 희석하여 사용하므로 큰 문제는 아니라고 생각 된다. 그리고 잔디에 분무한 시제품은 일정 농도이하의 생균수는 잔디 성장에 영향을 미치는 것이 적다고 생각된다. 7일차에서 500배 희석액을 분무한 흙에서 생균수가 적었고, 대조구보다 성장이 나뉘지만, 이후 14일 차에서는 1000배 희석액과 비슷한 정도의 생균수를 확인할 수 있었고, 500배를 분무한 잔디도 대조구보다 더 성장한 것을 확인 할 수 있었다.

2-2 원예작물 근권 활착 우수 PGPR균 분리 및 담체화 기술 개발

(1) 근권 토양에서 PGPR균 분리

(가) 시험 목적: 식물 근권 토양에서 식물생장에 도움을 주는 균 분리

(나) 연구내용 및 결과

- 토양 샘플은 2017년 4월 한 달 동안 한국의 식물 근권 지역에서 수집되었다. 토양 샘플은 운송을 위해 아이스박스로 즉시 옮겨졌으며 그 후 각 샘플의 일부는 4℃에 보관되었다. 근권 토양 1 g을 멸균 증류수 9 mL에 첨가 후 충분히 볼텍싱한 후 10배 희석하여 nutrient broth (NB) (쇠고기 추출물 0.3%, 펩톤 0.5%, 아가 1.5%) 아가 배지에 연속 희석법 (10^{-3} , 10^{-4} 및 10^{-5})으로 0.1 mL씩 평판 도말하여 37℃ 에서 24-48h 동안 배양하였다 (그림 2-1). 배양 후 각각의 토양에서 형성되는 콜로니의 표현형 (크기, 색상, 형태) 별로 선상도말법을 이용하여 단일 콜로니를 다시 분리하고 이 과정을 3번 반복 후 3 mL NB에 다시 접종하여 30℃에서 24h 동안 진탕배양 후에 다른 특성을 가진 균주를 80% glycerol stock 형태로 -80 ℃ 에 보관하였다. 이 과정을 통해 총 72종의 토양 샘플에서 총 465 여종의 토양 근권 미생물을 확보하였다 (표 2-3).



그림 2-1. PGPR균 분리

표 2-3. 분리된 PGPR의 근권 토양 샘플 정보

식물 종류	분리된 미생물 수
멜론	13
콩	12
복숭아	1
상추	7
토마토	182
오이	39
대추방울토마토	6
애호박	4
시금치	3
파	13
콜라비	15
딸기	11
배추	5
양파	12
호박	10
고추	38
양배추	9
감자	4
가지	7
깻잎	20
고구마	2
토양정보없음	52
합계	465

(2) 기능성 테스트

- 기능성 시험을 위한 균 현탁액은 80% glycerol stock 형태로 -80 °C 에 보관되어 있는 균을 3mL의 NB에 접종하여 균 성장의 대수기까지 140 rpm에서 진탕하면서 30 °C에서 NB에서 사전 배양되었다. 그 중 1 mL의 현탁액을 취하여 50 mL의 NB에 재접종하고 오비탈 웨이커에서 배양하였다. 세포 농도는 분광 광도계로 박테리아 현탁액의 광학 밀도 (OD 600 nm)를 측정하여 측정되었다. 이때 0.2-1 범위의 흡광도 범위 내에서 희석을 수행하였다.

(가) 식물 생육 촉진 작용

- 토양에서 채집한 미생물에 대해 IAA 생산능, 질소고정능력 및 인산가용화능력을 검정 후 뛰어난 능력을 가진 미생물을 선별한다.

① Indole-3-acetic acid (IAA) 생산 유무 및 정량

㉠ 시험 목적 : 식물성장 호르몬인 Auxin의 한 종류인 IAA 생산능력 시험

㉡ 시험 방법

- IAA의 정량화는 IAA의 전구체 L-tryptophan (100 µg/ mL)을 첨가한 3 mL의 Luria-Bertani (LB) broth (염화나트륨 1%, 효모추출물 0.5%, 트립톤

- 1%, 한천 1.5%)에 균을 접종한 후, 진탕배양 하였다 (28°C/ 120rpm/ 24h).
- 그 중 1 mL의 배양물을 취하여 1.5 mL의 마이크로 튜브에 옮긴 뒤 2분간 9,500 ×g 로 원심분리하여 균은 침강시키고, 상등액을 Salkowski's reagent [1mL of 0.5M FeCl₃ in 49 mL 35% HClO₄]를 1:2의 비율로 섞은 후 암실에서 30분간 실온에서 반응시킨 후 핑크색이 발현되면 530nm에서 흡광도를 3번 반복하여 측정하였다.
 - 핑크색 또는 붉은색의 발달은 IAA의 생산을 나타내며, 표준물질로는 시판되는 식물생장촉진호르몬인 IAA를 사용하여 순수 표준곡선을 산출한 다음 미생물 배양 결과 얻어진 OD 값을 산출식에 대입하여 IAA 생성량을 비교 및 측정하였다.



그림 2-2. Salkowski's reagent를 이용한 IAA 정량법

㉔ 결과 및 고찰

- 토양에서 분리된 균 450개중 IAA생성능을 가진 균은 68개이다. 생성된 IAA의 농도는 5-96 µg/ mL 범위였다.
- IAA 생성능이 10 µg/ mL 이상인 균은 29개이고 그 중 30 µg/mL 이상인 균은 17개이다. 이 rhizosphere 박테리아의 옥신 생성 능력은 IAA가 식물의 식물 발달, 뿌리 신장 및 세포 분화에 필수적인 식물 호르몬이기 때문에 식물 성장 및 생산 능력을 증진시키는 데 가치가 높은 것으로 여겨진다.
- 대부분의 분리된 균주의 IAA 생산 능력은 1-10 µg / mL 범위이거나 IAA 생성능력이 없었다. 따라서 다른 균주보다 IAA 생산 능력이 더 높은 균주를 선택하기 위해 기준을 30 µg / mL로 설정하였다.
- 대조균으로 사용된 3가지 균주, *Pseudomonas fluorescens* KCTC42821 (생장촉진균), *Pantoea agglomerans* KCTC2564 (인산가용화균) 및 *Derxia gummosa* KTCT12784 (질소고정균) 와 비교하였을 때 비교적 높은 수치의 IAA 를 생산하는 것을 볼 수 있었다.

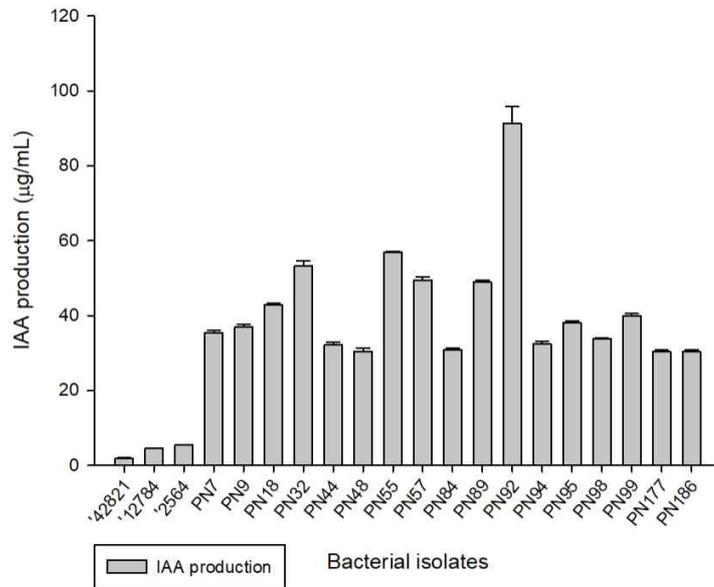


그림 2-3. 식물 근권 토양에서 분리한 균주의 IAA 생산능

② 인산가용화 균 선발

㉠ 시험 목적 : 토양에서 사용하기 어려운 난용성 인을 분해할 수 있는 인산 가용화능이 있는 균 탐색

㉡ 시험 방법

- Tricalcium phosphate를 포함하는 Pikovaskaya's medium [Glucose 10.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, KCl 0.2 g, MgSO_4 0.1 g, MnSO_4 0.002 g, FeSO_4 0.002 g, Yeast extract 0.5 g, Tricalcium phosphate(Calcium phosphate tribasic, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 5.0 g, 증류수 1000 mL, Agar 20 g]을 플레이트에 10 mL씩 분주하여 균한 후 플레이트 정 중앙에 paper disc를 치상하고 그 위에 미생물 현탁액을 40 µl씩 접종하였다.
- 28 °C에서 5일간 배양한 후 균체 주위에 투명환 (Clear zone)의 형성여부를 측정하였다(그림 2-4).



그림 2-4. 인산가용능을 확인하기 위해 사용한 Pikovaskaya's (PVK) media

㉔ 결과 및 고찰

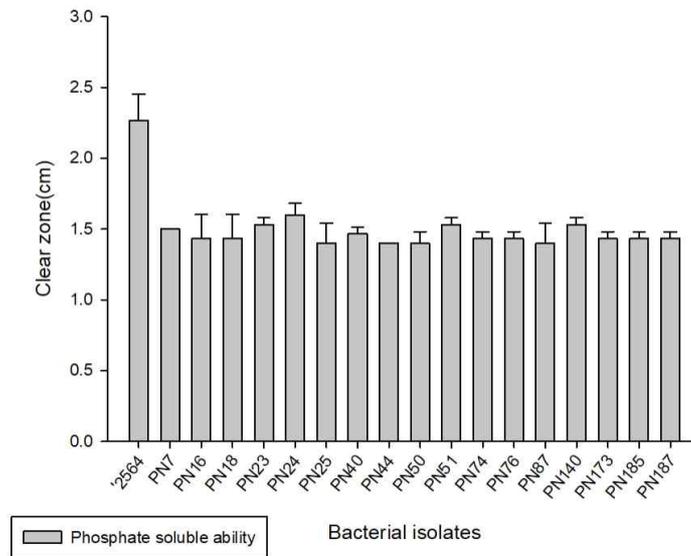


그림 2-5. 분리된 균주의 인산가용화능

- 인(P)은 식물이 성장을 위해 요구하는 두 번째로 중요한 영양소이지만 토양에서 불용성 인산으로 존재한다.
- 인산가용화 능력을 보유한 균은 토양에 존재하는 불용성 인산염을 식물이 식물 뿌리 수준에서 흡수할 수 있게끔 가용성 P 이온으로 변환시킬 수 있다.
- 따라서 박테리아 콜로니 주변에 명확한 투명환을 생성할 수 있다는 것은 그들이 식물근권의 P를 용해시킬 수 있다는 것을 의미한다 (그림 2-4).
- 인산가용화 시험을 거친 결과 투명환의 크기를 살펴보았을 때 지름이 1.4 cm 이상인 균주는 17개였으며 그 외 분리된 PGPR 중 인산가용화능이 있는 균주는 거의 없다고 볼 수 있었다 (그림 2-5).
- 분리된 균주와 인산가용화 대조균으로 사용한 *Pantoea agglomerans* KCTC2564 과 비교해 보았을 때 인산가용화 능력은 현저히 떨어지는 것을 볼 수 있었다.
- 또한 IAA의 생산능과 인산가용화능은 상관관계가 아닌 것을 알 수 있었다.

(나) 식물병원균 억제

① Siderophore 생성 조사

㉔ 시험 목적 : Iron chelator인 siderophore 생산능력 평가

㉔ 시험 방법

- Siderophore 활성을 알아보기 위해 간단하게 변형된 Chrome Azurol Sulfonate (CAS) assay를 사용하였다. Ferric iron과 결합하여 푸른색을 띠는 CAS 염료용액은 증류수 50 ml에 CAS 60.5 mg을 녹이고, 72.9 mg의 HDTMA를 증류수 40 ml에 녹여 빛이 들어가지 않도록 하였다.
- 그리고 LB agar 35 g을 증류수 900 ml에 녹여 세 가지 용액을 혼합하고 고압 멸균하였다. 이 후에 pH 6.8로 조정하기 위 한 HCl 용액(10 mM) 10 ml에 1 mM FeCl₃ · 6H₂O를 녹여 따로 고압 멸균하였다.
- 고압 멸균된 두 용액을 50°C로 식힌 후 천천히 거품이 나지 않도록 섞어주고 petri dish에 분주하여 CAS 평판배지를 만들었다.

- 플레이트 정 중앙에 paper disc를 치상하고 그 위에 미생물 현탁액을 40 μ l씩 접종하였다. 28°C에서 5일간 배양한 후 orange halo zone 생성 유무를 측정하여 siderophore 생산 여부를 판단하였다.

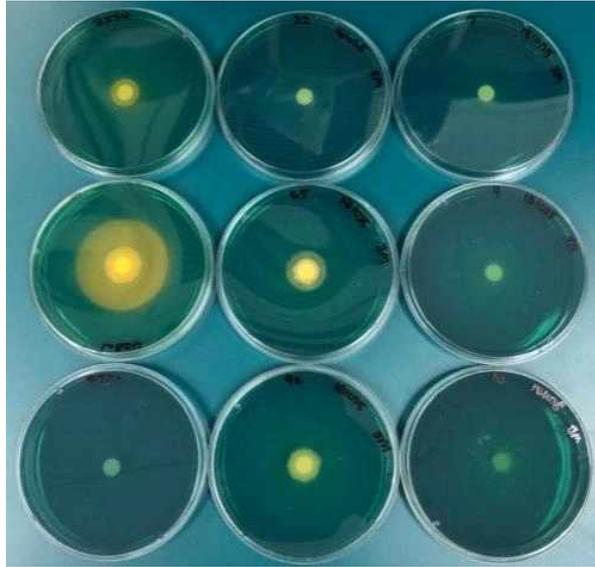


그림 2-6. 식물병원균 억제력을 확인하기 위해 사용한 CAS media

㉔ 결과 및 고찰

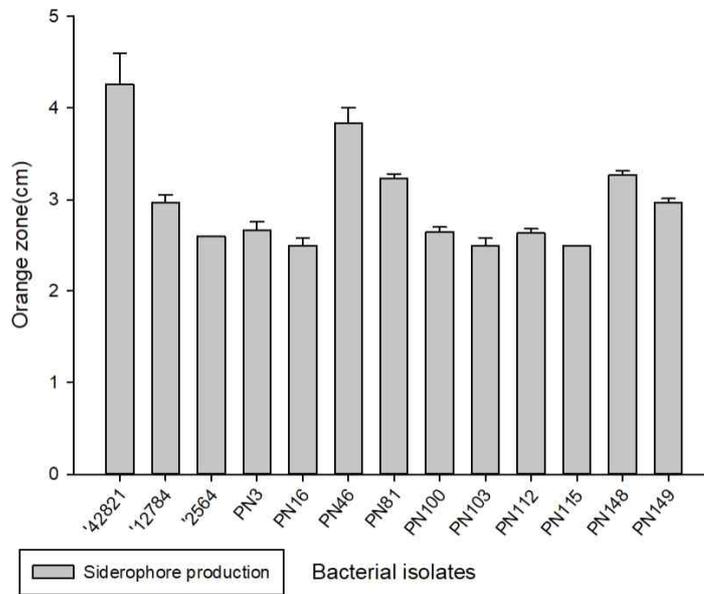


그림 2-7. 분리된 균주의 siderophore 생산능

- Siderophore는 iron chelator로서 주변 Fe^{3+} 를 식물병원균보다 먼저 chelate화 하여 식물체가 용이하게 이용할 수 있게 하며 식물의 성장과 생산성에 도움을 주고 식물 근권에 미량으로 존재하는 Fe^{3+} 를 선취하여 Fe(III)-Siderophore 복합체를 만들어 식물 병원성 미생물 생육을 억제한다.
- Siderophore 생산능 시험을 거친 결과 orange zone의 크기를 살펴보았을

때 지름이 2.5 cm 이상인 균주는 약 10개 였고 대조군과 비교해보았을 때 그 성능이 비슷한 것을 볼 수 있었다.

- 또한 IAA 생산능 및 인산가용화능은 siderophore 생산능의 양과 상관관계가 아닌 것으로 보여진다.

(다) 기능성 시험을 통한 우수 균주 선정

① 시험 목적: 바이오 비료에 사용될 우수 균주 선별

- 1, 2차 연도에서 IAA 생산능, 인산 가용화 및 siderophore 생산능 등을 통해 비교분석을 한 결과 세가지 스크리닝 방법은 상관관계를 나타내지 않았으며 그 범위가 너무 광범위하여 그중 식물의 발달, 뿌리 성장 등 식물 성장 능력에 확실하게 도움을 주며 이미 널리 연구가 진행된 IAA 생성 균주 가운데 다양한 식물 성장촉진 효과를 가진 우수 균주를 선발하고자 하였다.
- IAA 생성능이 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상인 PGPR 균주 중 인산 가용화 능력, 단백질 분해 효소 활성, siderophore, 셀룰라아제, HCN 및 암모니아 생성능력을 포함한 추가적인 PGP 특성에 대해 추가로 조사하였다 (그림 2-8, 표 2-4).

② 시험 방법

- 1% 카복시 메틸셀룰로스 (CMC), 1% 탈지유, Chrome azurol S (CAS) 및 Pikovskaya (PVK) agar plate를 각각 사용하여 프로테아제, 셀룰라아제, 사이드로포어 생산 및 인산가용화에 대한 테스트를 수행했다 (그림 2-8).
- 또한, HCN 생성능력을 확인하기 위하여 4.4 g glycine/L로 수정된 NB agar plate에서 선상 도말 되었다. 0.5 % picric acid 용액 중 2% 탄산나트륨에 침지시킨 Whatman 필터페이퍼 1번을 플레이트 위에 부착한 후 각 플레이트를 파라필름으로 밀봉하고 28 $^{\circ}\text{C}$ 에서 나흘 동안 배양하였다.
- 여과지의 주황색에서 적갈색으로의 색상 변화는 HCN 생산의 지표로 간주하였다. 암모니아 생산을 관찰하기 위하여 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간 동안 10mL 펩톤수에서 균을 집종하여 진탕 배양하였다.
- 원심 분리 후, 박테리아 상층액을 Nessler's reagent와 혼합 시 노란색에서 부터 갈색으로의 색 변화는 암모니아 생산의 존재를 나타낸다 (그림 2-8).



그림 2-8. Nessler's reagent를 이용한 암모니아 생산능력 검정

③ 결과 및 고찰

- IAA 생산능력이 높은 균주 중에서 광범위한 PGP 특성이 있다는 사실에 근거하여 총 6개의 균주가 결과적으로 선정되었다 (표 2-4, 그림 2-9).
- 선택된 모든 균주의 암모니아 생성능력을 보유하고 있다 (표 2-4). 암모니아 생산은 식물 성장을 간접적으로 촉진하는 PGPR의 중요한 특성이다. 이들은 주로 펩티드 결합의 가수 분해에 관여하는 미생물의 2차 대사산물인 protease 생성능력을 나타내었으며 또한 이들은 사이안화수소 (HCN) 생산 활성화에 대해 시험에서 모두 양성을 나타내었는데 근권세균에 의한 HCN 생산은 병원체의 생물학적 제어에 중요한 역할을 한다 (표 2-4, 그림 2-9). 결과적으로 선별한 IAA 생산 우수 균주들이 식물 성장을 촉진하는 능력을 보유하고 있으며, 근권의 병원체로부터 식물에 대한 내성을 유도하는 능력을 갖추고 있음을 나타낸다.
- 추가로 6개의 선택한 근권 세균들의 미생물학적 특성을 결정하기 위해 형태학적 관찰이 이루어졌다. 모든 분리 균주들은 막대형이고, 그람 양성균이며, 내생 포자 형성이 가능하다. 또한, 카탈라아제를 생산하며 젤라틴과 전분 가수 분해를 할 수 있는 능력을 갖춘다 (표 2-4).

표 2-4. 식물 성장 촉진 (PGP) 특성에 의해 선택된 박테리아 균주의 특성

균주명	Biochemical analysis						
	IAA production ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Siderophore Production	Phosphate Solubilization	Protease production	HCN production	Ammonia production	Cellulase production
PN 32	53.24 \pm 3.42	+	+	++	+	++	+
PN 89	48.88 \pm 0.48	+++	+	+++	+	++	++
PN 92	91.26 \pm 4.50	++	+	++	+	+	+
PN 94	32.25 \pm 0.87	++	+	++	+	++	+
PN 95	38.03 \pm 0.44	++	+	++	+	++	+
PN 99	39.94 \pm 0.57	+	+	++	+	++	+

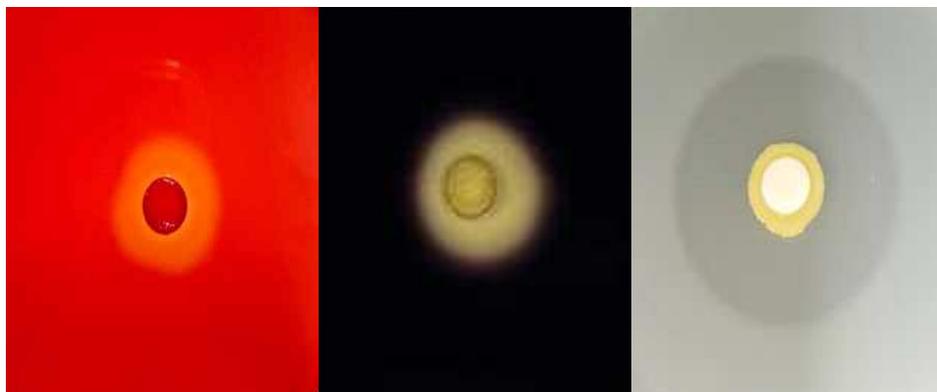


그림 2-9. CMC 한천배지, 전분 한천배지, 탈지유 한천배지를 이용한 셀룰라아제 생성, 전분 가수분해 및 프로티아제 생산 능력 검정

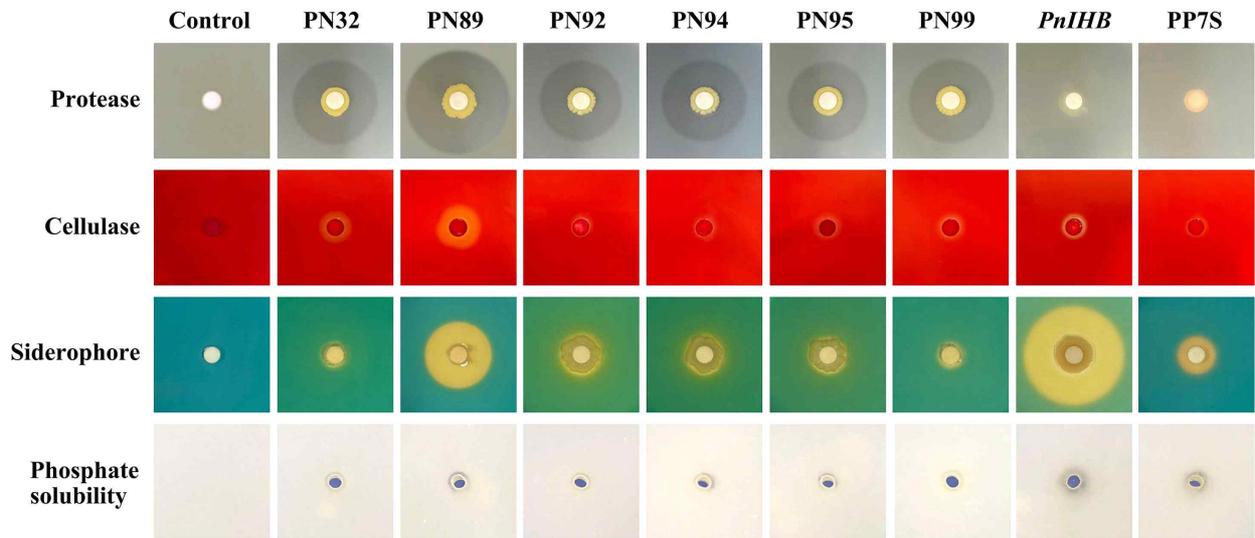


그림 2-10. 다양한 식물 성장 촉진 (PGP) 특성에 대한 선택된 박테리아 균주의 사진

표 2-5. 선별한 6 개의 PGPR 분리주에 대한 미생물학적 특성

균주명	Bacterial characterization					
	Colony Morphology	Gram nature	Sporulation	Catalase	Gelatin Hydrolysis	Starch Hydrolysis
PN 32	Yellowish, round, elevated	Gram-positive, rod	+	+	+	+
PN 89	Yellowish, round, elevated	Gram-positive, rod	+	+	+	+
PN 92	Yellowish, round, elevated	Gram-positive, rod	+	+	+	+
PN 94	Yellowish, round, elevated	Gram-positive, rod	+	+	+	+
PN 95	Yellowish, round, elevated	Gram-positive, rod	+	+	+	+
PN 99	Whitish, round, elevated	Gram-positive, rod	+	+	+	+

(3) 선별된 우수 균주 동정

(가) 시험 목적 : 선별된 우수 PGPR 균주의 동정

(나) 시험 방법

- 그 중 선별된 우수한 균주를 16s rRNA universal primer 27F (5'-AGAGTT TGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3')을 이용하여 16s rRNA 염기서열정보를 얻은 후 NCBI database에서 BLAST 검색을 통해 균을 동정하고 계통분석 지도를 작성하였다 (그림 2-11).

(나) 결과 및 고찰

- 선택된 PGPR은 대부분의 경우 *Bacillus* 속으로 확인되었다 (그림 2-11).

- 바실러스 균은 토양 미생물 군집의 상당 부분을 대표하며 식물 성장을 촉진하고 식물 병원체로부터 보호하기 위해 농업에서 주로 사용된다.
- *Bacillus* 속은 혹독한 환경 조건에서 토양에서 견딜 수 있는 내생 포자를 생성한다.
- 특히 *Bacillus megaterium*과 *Bacillus aryabhatai* 균주는 토양의 P를 가용화하고 질소 고정을 강화하며 성장을 촉진하고 병원체의 성장을 억제하는 siderophore를 생성할 수 있는 근권세균을 대표하는 것으로 알려졌다.
- 이전에 선택한 6개의 균주는 BLAST 검색결과와 99%의 유사도를 나타냈다 (표 2-6).

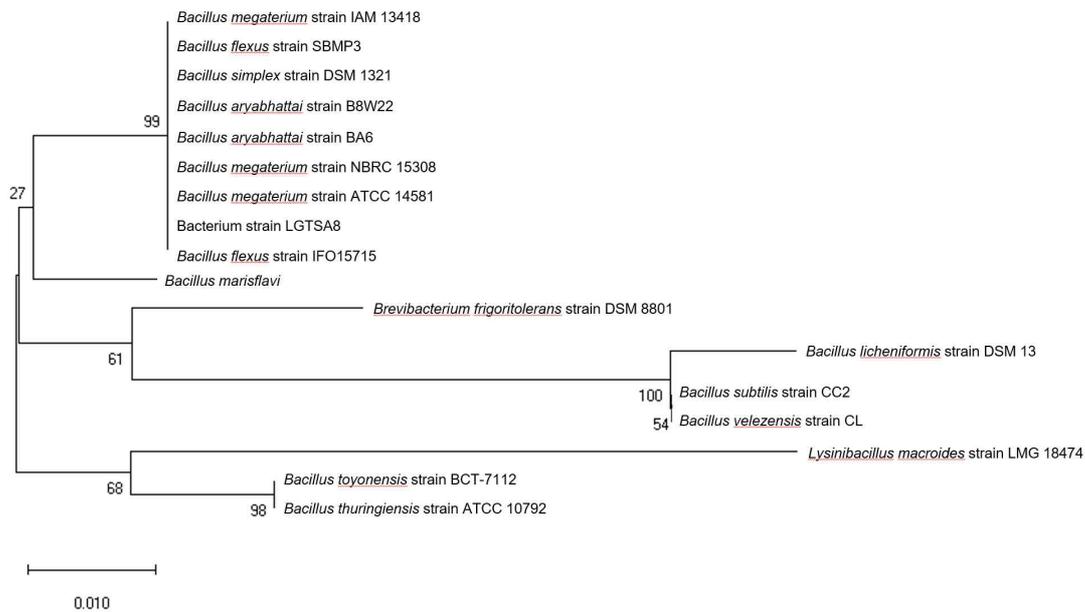


그림 2-11. 선별한 균주들의 phylogenetic tree

표 2-6. 16S rDNA 시퀀싱을 통한 우수균주의 동정

미생물 실험실명	동정된 균주명	유사도 (%)
PN 32	<i>Lysinibacillus macroides</i>	99
PN 89	<i>Bacillus megaterium</i> strain NBRC 15308	99
PN 92	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain B8W22	99
PN 94	<i>Bacillus simplex</i> strain DSM 1321	99
PN 95	<i>Bacillus megaterium</i> strain IAM 13418	99
PN 99	<i>Bacillus flexus</i> strain IFO15715	99

(4) 식물에 대한 성장촉진능 *in vivo* 검증

- 선별한 우수 PGPR 균들을 흔히 쓰이는 작물인 밀(*Triticum aestivum*)에 적용해 식물 성장 촉진능을 확인 및 비교 분석한다.
- 선별한 균주와 공동 배양에 사용하기 위한 추가적인 박테리아 균주는

Paenibacillus pabuli strain P7S (이하 PP7S) (GenBank: KF010780.1) 및 *Pseudomonas nitroreducens* strain IHB B 13561 (이하 PnIHB) (GenBank: KJ767371.1; Accession number: KCCM1133P by Korean Culture Center of Microorganism). 이 균주의 세부 사항은 이전 연구에 설명되었다.

(가) *Triticum aestivum* 종자 준비 및 접종

- *T. aestivum* 종자를 락스로 20분 동안 표면 살균한 다음, 멸균된 물로 5회 행구었다.
- 밀 종자를 멸균 증류수가 들어있는 50 mL conical tube에 침지하고 4°C에서 3일 동안 보관하였다.
- 균주를 종자와 공동 배양하기 1일 전에 LB broth에 접종하여 진탕 배양기에서 37°C에서 18시간 동안 배양한다. 공동 배양 실험을 위해, 박테리아 현탁액을 UV 분광 광도계를 이용해 OD값 (600 nm)을 사용하여 1×10^7 CFU/ mL로 조정하였다.
- 접종 농도는 0.4 McFarland Standard (약 5×10^7 CFU/ mL)의 탁도를 사용하여 보정되었다.
- 그 후 종자를 실온에서 2시간 동안 50 mL 플라스크에서 박테리아 현탁액과 함께 140rpm으로 교반하였다.

(나) 종자 초기 발아 시험

① 시험 목적: PGPR 접종물이 밀의 초기 성장에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

② 시험 방법

- 종자를 균 현탁액으로부터 분리하고 화염 멸균한 포셉으로 10 mL의 멸균 증류수로 적신 멸균 여과지 (Whatman no. 1)의 두 장 위에 종자를 위치하였다.
- 종자 개수는 petri dish (90 mm × 15 mm) 하나당 종자 15개로 설정하였다. 균이 접종된 종자가 있는 플레이트를 23°C의 빛이 차단된 식물 성장 챔버에 두었다.
- 발아율 (GP), 발아율 지수 (GRI)는 120시간 후에 조사되었다. 발아 백분율은 다음식에 의해 계산된다 : $GP(\%) = (\text{발아 종자 수} / \text{총 종자 수}) \times 100$.
- Germination Rate Index (GRI)는 다음식에 의해 계산된다. $GRI = G1/1 + G2/2 + \dots + Gx/x$.
- 발아 종자를 5일 동안 24시간마다 계수하고, 최소 2mm의 반경을 갖는 종자를 발아가 된 것으로 간주한다.
- 또한, 최종 유효 길이와 무게도 측정 및 비교하였다. 발아율 및 뿌리 길이 테이터를 사용하여 종자 활력 지수 (Vigor Index; VI)를 계산하였다.
- 건조 중량 측정을 위해 일정한 중량에 도달할 때까지 인큐베이터에서 60°C에서 48시간 동안 줄기와 뿌리를 건조한다.
- 종자 초기 발아 시험은 3 반복으로 수행되었으며 국제 종자 시험 협회 (ISTA) 규정에 따라 수행되었다.

③ 결과 및 고찰

- 6개의 선택된 각각의 *Bacillus* sp. 균주들이 *T. aestivum*의 초기 종자 발아 성장에 미치는 효과를 조사하기 위해 paper towel method를 수행하였다.

- 결과는 PN89가 종자 발아율에서 가장 두드러지는 결과를 나타내었으며 다른 5개의 바실러스 균주들에 비해 가장 높은 활력 지수를 갖는 것으로 나타난다 (그림 2-12).
- 또한, PN89 균주로 처리된 *T. aestivum*의 종자는 최종 싹 및 뿌리 길이에서 가장 긴 길이를 보였으며, 싹 및 뿌리 건조 중량이 두 번째로 높았다 (그림 2-13).
- PN94 균주의 처리는 건조 중량에서 PN89 균주보다 큰 값을 가졌지만, PN89 균주는 건조 중량을 제외하고는 모든 균주보다 우수한 결과를 나타내었다 (그림 2-12, 그림 2-13).
- PN32, PN95 및 PN99 균주의 처리는 발아율, 최종길이, 건조 중량에서 상대적으로 낮은 값을 나타낸다 (그림 2-12, 그림 2-13).
- 따라서, 이러한 모든 결과는 PN89가 선택된 균주 중에서 식물 초기 성장 및 발아에 가장 우수하다는 것을 시사한다.

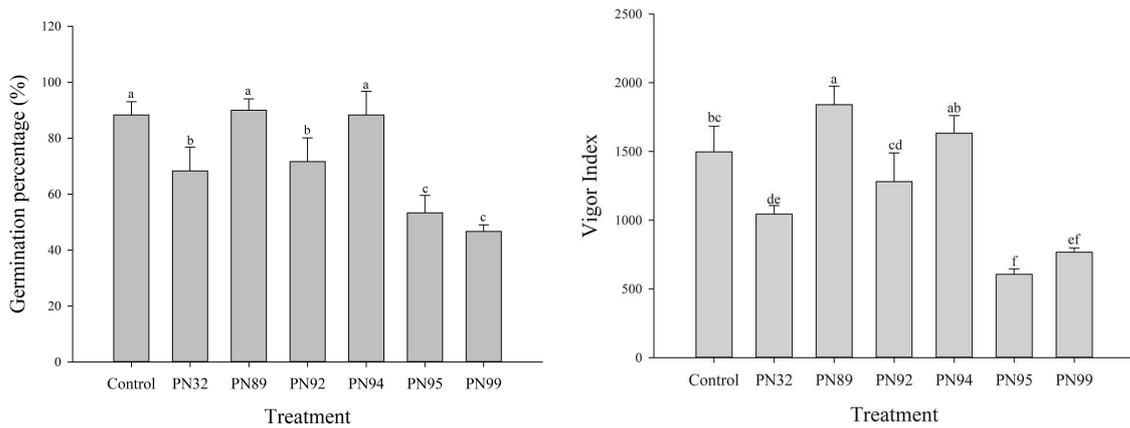


그림 2-12. PGPR 균주와 공동접종한 *T. aestivum* 종자의 발아율 및 활력지수

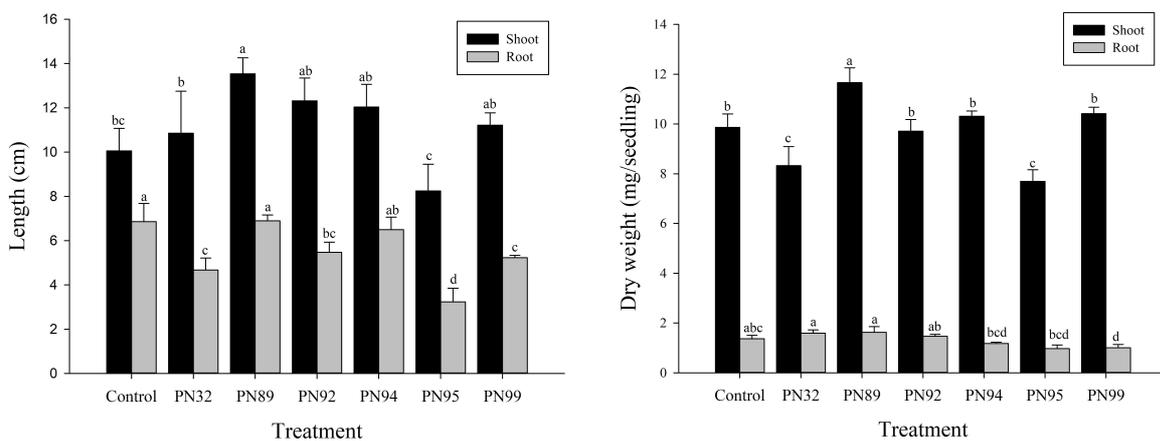


그림 2-13. PGPR 균주의 공동접종이 *T. aestivum* 종자의 초기 성장에 미치는 영향

(다) 비생물학적 스트레스 하에서 종자 초기 발아실험

① 시험 목적

- 단일 혹은 복합 PGPR 접종물이 비생물학적 스트레스인 염 스트레스 하에서

의 밀의 초기 성장에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

- 현재 지구온난화로 인한 급격한 환경 변화로 식물 환경 스트레스의 강도가 날로 늘어가고 있다.
- 염, 온도, 건조 등의 비생물적 스트레스 중 이번 시험에서는 급격한 기후 변화와 화학 비료의 축적으로 인한 영향으로 토양에 존재할 수 있는 염 농도 조건에서 PGPR을 단독 혹은 복합 처리하여 염 조건을 개선하고 작물의 생육 증대와 생물학적 방제의 역할을 가지는 근권세균을 선발하고자 하였다.
- 이전의 많은 연구는 식물 종자가 발아하는 염분의 정도가 뿌리 줄기 균주의 존재에 영향을 받을 수 있음을 보여 주었다.
- 따라서, 염 스트레스가 존재하지 않을 때와 염 스트레스 하 둘 다에서 종자 발아의 다양한 특성을 관찰하기 위해 PN89가 식물 초기 성장에 유리하다는 전제하에 이전 연구에서 각기 다른 메커니즘으로 식물 성장을 향상하는 것으로 알려진 두 가지 균주도 PN89와 함께 테스트를 진행하였다.
- 이전 연구에서 PP7S는 안토시아닌 축적에 기여하는 균주이며 PnIHB 균주는 질산염의 흡수를 향상하는 균주로 이전 연구에서 밝혀진 바 있다.

② 시험 방법

- PP7S 및 PnIHB의 두 가지 추가 균주와 공동 배양하면서 *T. aestivum*의 종자 발아율과 초기성장 매개 변수를 자세히 관찰한다.
- 이 실험에는 총 8 가지의 다른 처리가 사용되었다; 대조군 (비접종), PN89, PnIHB, PP7S, M1 (PN89 + PnIHB), M2 (PN89 + PP7S), M3 (PnIHB + PP7S) 및 Mix (PN89 + PnIB + PP7S).
- 염스트레스가 존재하지 않을 때와 세가지 다른 염 농도(100, 150, 200 mM NaCl)에 대한 밀의 발아 및 초기 묘목 성장 반응을 paper towel method를 사용하여 평가하였다.
- 각각 10 mL의 0, 100, 150, 200 mM의 고압 멸균한 NaCl 용액을 두 층의 여과지 (Whatman No. 1)로 위에 붓고 각 petri dish마다 15 개의 균이 접종된 종자를 올려놓는다.
- 그 후 petri dish를 식물 성장 챔버에서 암실 조건으로 23°C에서 위치한 후 총 유효 길이 및 중량은 120시간 후에 확인하였다.
- 발아 종자의 수는 24시간마다 기록되었다. 실험은 총 3회 수행하였다.

③ 결과 및 고찰

- Paper towel method를 수행하여 발아 백분율 (GP), 발아율 지수 (GRI), 유효 길이의 길이와 무게를 측정했다 (그림 2-14, 15, 16).
- GP 값이 높을수록 종자 개체군의 발아가 더 잘된다는 것을 나타낸다.
- 각기 다른 식물성장촉진 능력을 갖는 박테리아의 조합은 0 mM 및 100 mM의 염 농도에서 종자 발아 백분율에서 뛰어나게 유의한 변화를 나타내지 않았으나 150mM의 염 농도에서 유의하게 나타났다 (그림 2-14).
- 접종되지 않은 대조군은 염 농도가 증가함에 따라 GP 값의 비례적으로 감소한데 비해 150 mM NaCl 스트레스 하에서의 PN89 처리구는 대조군과 비교했을 때 밀의 초기 발아율과 발아 속도가 증가했다.

- 또한, M1 및 M2 처리구는 200 mM NaCl 조건에서 대조군에 비해 GP 값이 더 높았다.
- 다른 처리는 염 농도가 증가함에 따라 대조군과 유사한 패턴을 나타냈다 (그림 2-14).

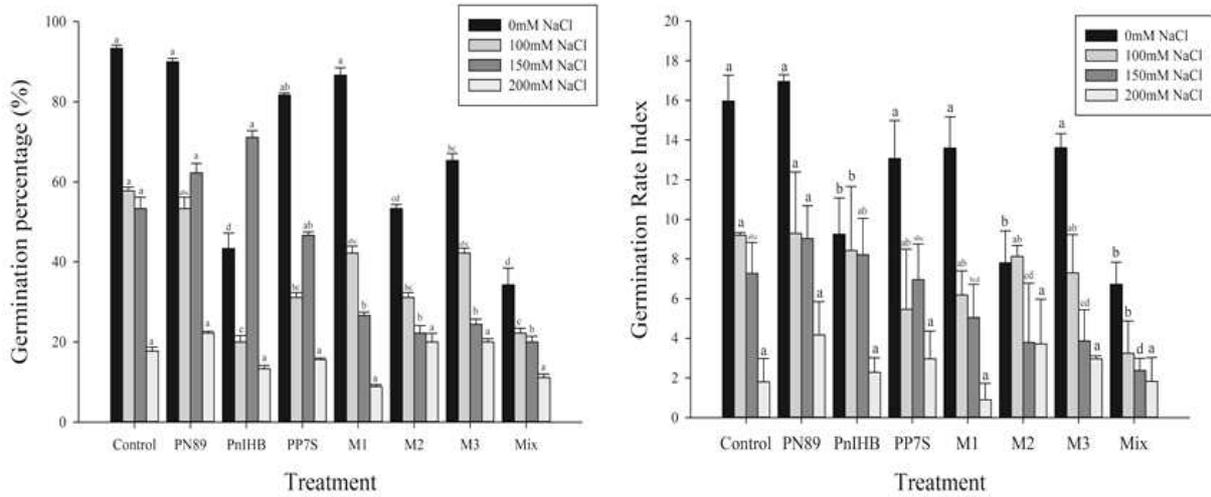


그림 2-14. PGPR 단독 혹은 복합 처리시 염 스트레스 하에서 밀의 초기 발아백분율과 발아율 지수

- PN89의 처리구는 염 스트레스 하에서 밀 유묘의 총 길이 신장에 도움을 주었다.
- 무처리구인 대조군의 싹 길이는 0 mM 과 100 mM NaCl 농도에서 가장 높은 값을 가졌다.
- 그러나 150 mM NaCl 농도에서, PN89 및 PP7S의 처리는 대조군과 비교하여 싹 길이가 뚜렷하게 증가하였다.
- PN89의 처리구는 200mM의 높은 염 농도에서 집중되지 않은 대조군과 비교하여 싹 길이에서 비교적 증가 된 값을 가졌으나, 200 mM NaCl에서, 처리에 대한 모든 뿌리 길이의 값은 대조군의 것보다 낮았다 (그림 2-15).

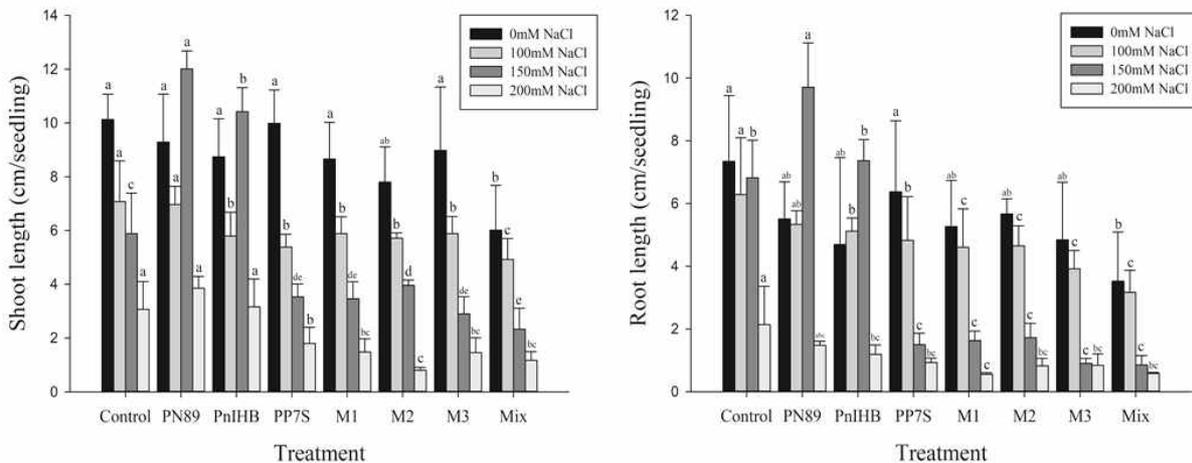


그림 2-15. PGPR 단독 혹은 복합 처리시 염 스트레스 하에서 밀 유묘의 길이에 미치는 영향

- PN89는 염분 스트레스 하에서 공동 재배 된 밀 묘목의 총 건조 질량을 증가 하였다 (그림 2-16).
- PN89 및 PnIHB를 처리 그룹은 150mM NaCl 조건 하에서의 대조군과 비교 하여 더 높은 싹 FW 값을 각각 41% 및 27% 증가시켰다.
- 200mM NaCl에서, PN89 및 PnIHB의 처리는 대조군에 비해 더 높은 DW 값을 보였다.
- 이 결과는 염분이 작물의 발아 및 성장에 악영향을 미친다는 것을 보여주며 PGPR 균주를 처리했을 시 PGPR 처리구는 염 스트레스를 완화하며 염스트레스 조건에서 밀의 바이오매스의 증가에 중요한 영향을 미친다는 것을 나타낸다. (그림 2-16).

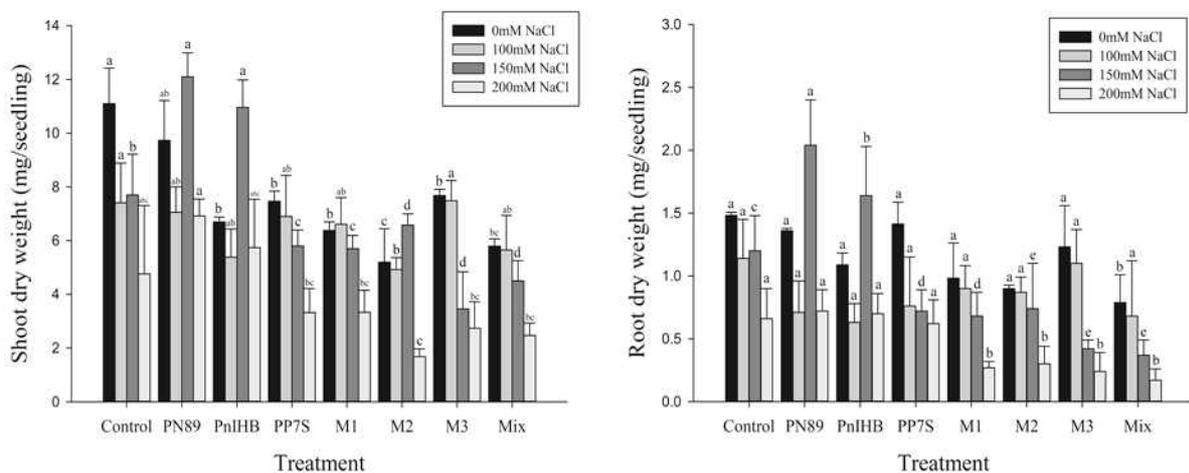


그림 16. PGPR 단독 혹은 복합 처리시 염 스트레스 하에서 밀 유묘의 건조증량에 미치는 영향

(라) Pot test를 통한 PGPR 접종물의 실제 작물 적용

① 시험 목적: PGPR 처리구가 실제 작물에 미치는 영향을 관찰

② 시험 방법

- 밀 종자를 락스로 20 분간 표면 살균 한 다음 멸균된 물로 5회 헹구었다.
- 4°C에서 3일간 물에 침지시킨 후, 23 °C, 16/8 h light/dark photoperiod 및 60% 상대 습도로 설정된 배양 챔버에서 Murashige and Skoog (MS) 2% 배지에서 수평으로 발아시킨다.
- 배양 4일 후, 모종을 Sun Gro Horticulture Sunshine® Mix #4가 담겨있는 소규모 pot으로 옮겼다.
- Pot 당 비슷한 크기로 발아된 밀 유묘를 5개씩 이식하고 각각 무처리 대조군, 균주 현탁액 접종군으로 나눠 준비한다.
- 접종 실험군의 접종량은 1×10^8 CFU, 3 반복으로 진행한다. 옮겨 심은지 20일 후 소규모 pot test의 대조군과 실험군 밀의 지상부 길이, 뿌리 길이, 습윤 중량 그리고 건조 중량 같은 상이한 성장 파라미터를 측정 후 비교 분석한다.



그림 2-17. 밀 소규모 pot test

③ 결과 및 고찰

- PGPR의 접종이 특히 M1 및 M2의 처리에 대해 대조군과 비교하여 건조중량을 유의하게 증가시켰음을 나타내었다 (그림 2-18).
- M1 처리는 대조군보다 밀 뿌리의 습윤 중량 건조 중량을 증가시켰다 (그림 2-18).
- M3 처리는 무처리 그룹에 비해 습윤 및 건조 뿌리 중량을 개선시켰다.
- M3 처리 군은 또한 대조군과 비교하여 줄기의 습윤 및 건조 중량을 증가하였다 (그림 2-18).
- 일반적으로, 다양한 혼합물의 PGPR 접종은 다른 단일 처리군에 비해 줄기 길이가 증가하였다 (그림 2-19).
- 무처리 대조군과 비교하여 PN89 및 M3의 처리로 줄기 신장이 향상되었으며 뿌리 신장은 대조군과 비교하여 M2의 처리로 유의하게 증가되었다 (그림 2-19).
- 전반적으로, 밀의 모든 처리구는 줄기와 뿌리 바이오매스를 증가하였다.

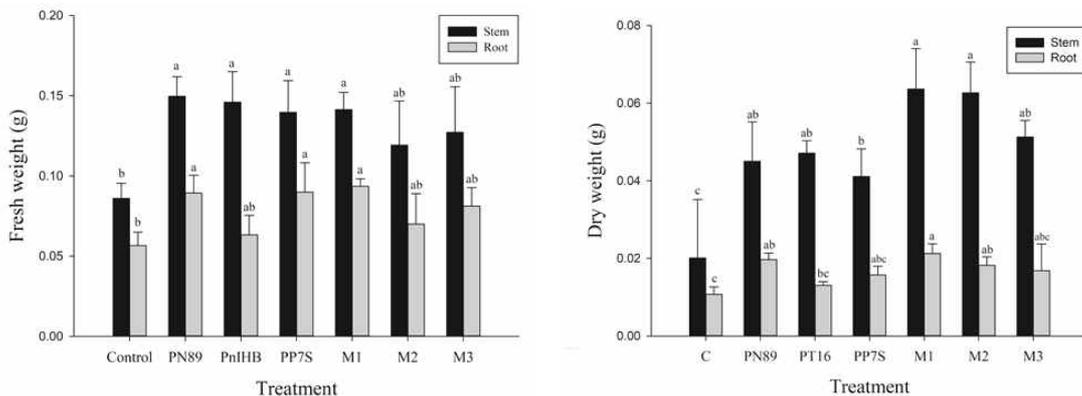


그림 2-18. PGPR의 단독 및 혼합 처리 시 pot test에서의 밀의 습윤 중량과 건조 중량

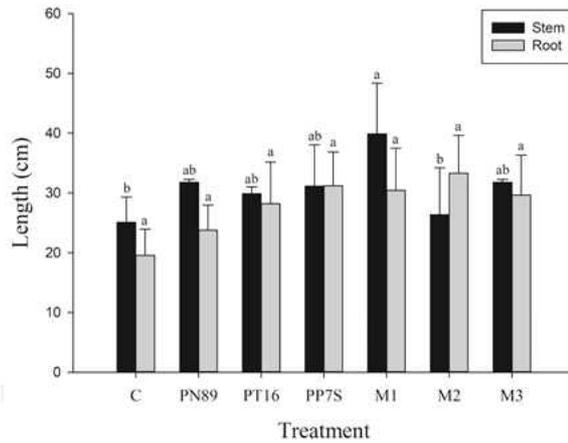


그림 2-19. PGPR의 단독 및 혼합 처리 시 pot test에서의 밀의 뿌리 및 줄기 길이

(마) 염 스트레스 하에서 Pot test를 통한 PGPR 접종물의 실제 작물 적용

① 시험 목적: 염 스트레스 하에서 PGPR 처리구가 실제 작물에 미치는 영향을 관찰

② 시험 방법

- 대조군과 PGPR 처리를 한 20일 된 seedling에 150mM 농도의 NaCl 용액을 pot에 처리한다.
- 2일 후, 4일 후, 6일 후에 각각 다시 150mM NaCl 용액을 처리 후 10일 후에 대조군과 실험군 밀의 phenotype과 지상부 길이, 뿌리 길이, 습윤 중량, 건조 중량 그리고 chlorophyll과 carotenoid 함량 같은 성장 파라미터와 엽록소 함량을 측정 후 비교 분석한다.

③ 결과 및 고찰

- 염 스트레스 하에서, 대조군 및 PGPR 접종물이 처리된 묘종 모두 감소된 바이오매스를 나타냈다 (그림 2-18, 19, 20, 21).
- 그러나, PGPR 처리는 염 스트레스 하에서 무처리 대조군보다 밀의 줄기 성장, 뿌리 신장, 및 증가 된 줄기 성장에 더 나은 효과를 보였다 (그림 2-20, 21).
- 염 스트레스 하에서, 밀의 줄기 습윤 중량은 대조군과 비교하여 M1 처리에서 증가하였고 뿌리 습윤 중량 또한 증가하였다 (그림 2-20).
- 또한, 밀의 줄기 및 뿌리의 건조 중량은 M2 및 M3의 처리 시 유의미하게 증가하였다 (그림 2-20).
- 줄기 길이 및 뿌리 신장은 대조군과 비교하여 M1 처리 시에 각각 14% 및 18%의 더 높은 성장률을 보였다 (그림 2-21).
- 고염도 스트레스를 처리하여 phenotype을 관찰하였을 때, 가뭄 스트레스처럼 확실히 시들지 않고 서서히 색이 변하면서 죽어갔기 때문에 확연한 차이를 관찰하기 힘든 부분이 있었다.
- 이를 보완하기 위해 추가로 chlorophyll과 carotenoid 함량을 측정하였다.
- 150 mM NaCl 용액을 총 3회 처리하고 phenotype을 마지막으로 관찰한 날의 30일 된 식물에서 잎을 sampling 하여 실험을 수행하였다.

- 밀에서의 PN89 처리 그룹 및 M1 처리 그룹은 광합성에 관여하는 색소 함량을 상당 부분 개선했으며, 이는 PGPR 접종물이 염 스트레스 하에서 광합성 능력 향상의 긍정적인 효과를 의미한다 (그림 2-21).

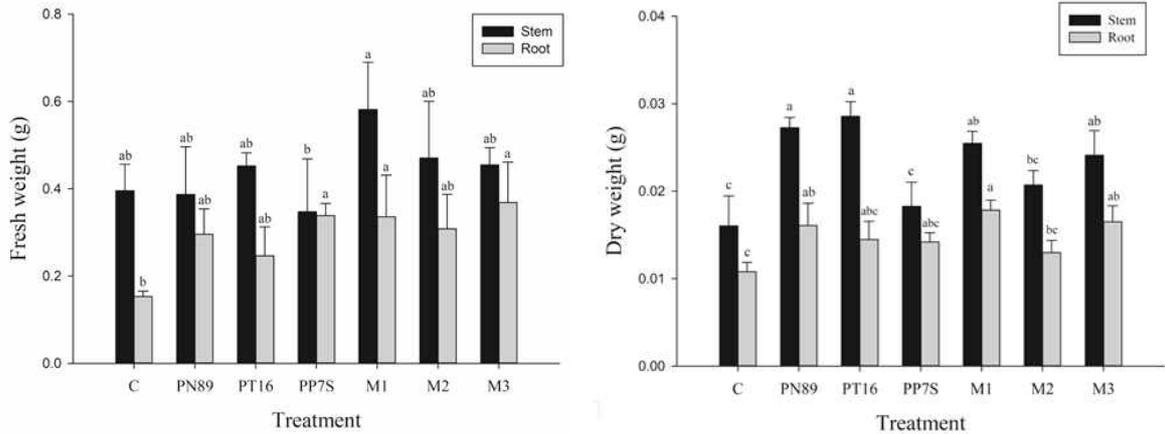


그림 2-20. 염 스트레스 하에서 PGPR의 단독 및 혼합 처리 시 pot test에서의 밀의 습윤 중량과 건조 중량

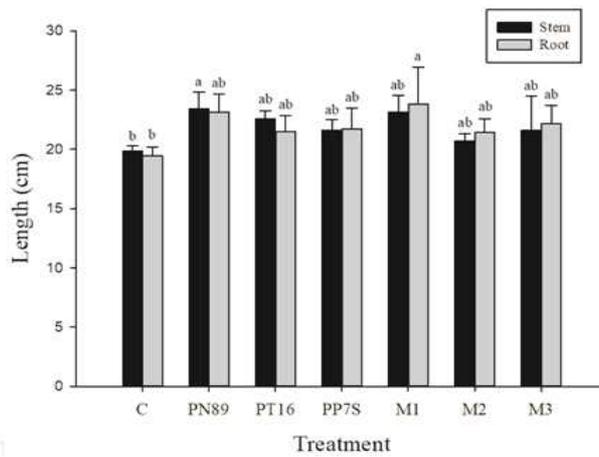


그림 2-21. 염 스트레스 하에서 PGPR의 단독 및 혼합 처리 시 pot test에서의 밀의 뿌리 및 줄기 길이

- 이것은 PN89로 처리된 밀이 높은 염 스트레스에 더 강하고 많은 엽록소 함량을 유지했음을 알 수 있다.
- 엽록소 수준이 높은 식물은 광합성을 극복하고 광합성을 보다 실용적으로 하여 식물 생존율을 높일 수 있기 때문이다.
- 또한, PN89 및 M1을 높은 염 스트레스 하에서 처리한 경우, 카로티노이드 함량이 증가하였다 (그림 2-22).
- 즉, 이러한 결과는 PN89 및 M2로 처리된 밀이 높은 염 스트레스에 더욱 저항적임을 나타낸다.

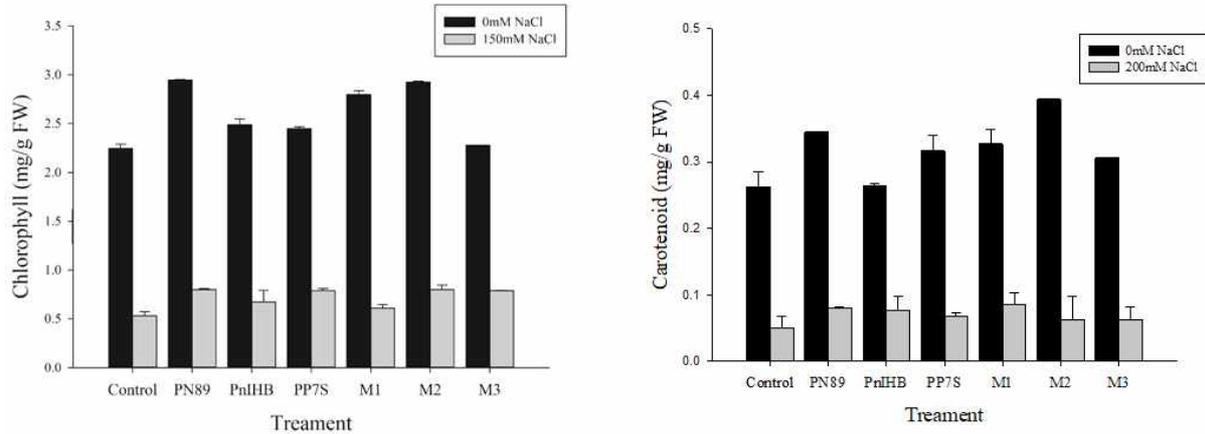


그림 2-22. 염 스트레스 하에서 PGPR의 단독 및 혼합 처리 시 pot test에서의 밀의 chlorophyll 및 carotenoid 함량

(5) 담체를 이용한 PGPR 균 고정화 기술 개발 및 기능성 검정

- 규조토, 제올라이트, 펄라이트 등 예비 실험을 통하여 최적의 담체 종류 및 물성 등을 고려하여 반죽 비율을 결정함 (그림 2-23). 담체 형태는 펠릿 형태로 균을 고정화하기로 함.



그림 2-23. 예비실험을 통한 담체 최적화 비율 검정 과정

(가) 우수 PGPR 균의 담체 고정화 기법 개발

① 시험 목적: PGPR 균 접종물의 담체 고정 최적화

② 시험 방법

- 고압 멸균한 스텐리스 식용 압출기를 이용해 5×10^8 CFU/ mL로 희석한 균 접종물과 담체 고체파우더인 렉셈사의 제올라이트 (ZEO300)를 고르게 섞어 반죽 제형으로 만든 후 압출기에 넣고 지름이 약 2 mm인 긴 펠릿 형태로 만든다.
- 이때 추가물질을 넣지 않은 펠릿과 추가물질로 전분과 젤라틴을 각 1%씩 넣어 총 세 종류의 펠릿을 제조하였다 (그림 2-24).
- 무균 조건에서 35°C에 수분이 없어질 때까지 건조한 후 완성된 펠릿은 15mL conical tube에 소량으로 나눠 담은 후 실온과 4°C 두 온도로 나누어

무균 조건으로 보관하였다.



그림 2-24. 균주 고정화

③ 결과 및 고찰

- 제올라이트는 실리콘(Si)과 알루미늄(Al)으로 이루어진 규산염 광물이며 미세한 세공으로 양이온, 물, 가스 등을 흡착할 수 있는 고기능성 소재이며 산, 알칼리, 열 등에 쉽게 분해되지 않는 천연 광물이다.
- 제올라이트는 자연계에서는 보기 드물게 전체 부피의 50% 이상이 빈 공간일 정도로 다공성 구조를 이루고 있어 비표면적 및 양이온 교환용량이 높은 것이 특징이다.
- 제올라이트 내에 형성된 10-1000 nm 크기의 초미립세공들은 마치 균일 용액 중에서 한 두 개의 분자를 내포하고 있는 고체 용매 바구니로 이용되어 제올라이트 세공 속에서 다양한 전하 및 전자이동 반응, 미생물 생육공간을 수행할 수 있다.
- 따라서 농약용 캐리어 혹은 미생물 흡착제로서 적합하다. 수용액 안에서 풀어진 정도를 고려하여 알맞은 비율의 접종물과 담체 파우더를 고려하였으며 환 모양으로 반죽하였을 시 수용액 안에서 풀어지지 않아 표면적이 넓으며 수용액에 넣자마자 풀어지게끔 반죽 비율로 제조한 펠렛 형태로 최종선택을 하였다.



그림 2-25. 제올라이트의 구조 및 형상

(나) 우수 PGPR 미생물의 담체화 후 바이오비료로 제형화 시 생존율 확인

① 시험 목적: 담체화 후 고정 균 수의 변화 관찰

② 시험 방법

- 펠렛 1 g을 9 mL의 0.85% 멸균 생리식염수에 넣은 후 parafilm으로 밀봉하고 vortexing한다(그림 2-26).
- 그 후 균 현탁액을 실온에서 6시간 동안 laboratory rocker를 이용하여 골고루 풀어준다.
- 연속 희석법으로 균 현탁액을 희석한 후 LB agar plate에 평판도말법으로 희석액을 3반복으로 도말하고 30°C에 배양한다.
- 약 24시간 후 50에서 200 집락 사이의 생균 수를 눈으로 계수한다.

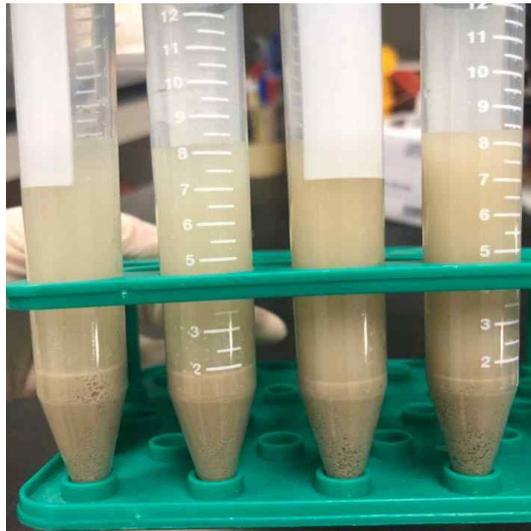


그림 2-26 담체에 고정된 생균 수 측정 과정

③ 결과 및 고찰

- 토양에서 분리한 균주 중 하나인 *Bacillus subtilis* Y16 (이하 BsY16)를 LB broth에 접종 후 평판도말법으로 생균 수를 측정한 결과 전분 1%와 젤라틴 1%를 추가적으로 첨가한 배지에서 생균 수가 아무 것도 첨가하지 않은 배지보다 더 증가한 것으로 나타났다(그림 2-27).
- 이는 균주가 전분 혹은 젤라틴을 분해하여 더 빠른 균 성장을 보이는 것으로 사료된다.

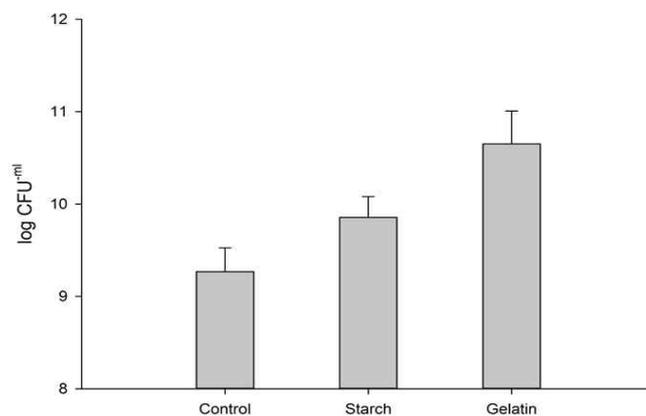


그림 2-27 첨가제에 따른 생균 수 변화

- PN89, BsY16, PnIHB, PP7S 총 4 종류의 각기 다른 균을 고정화하여 제조한 담체의 시간에 따른 생균 수 변화를 관찰하였다.
- PnIHB와 PP7S 균주는 고정화 후 생균 수 유지가 어려워 담체 고정화 균 선정에서 제외되었다.
- BsY16 및 PN89는 포자 변환이 가능하여 가혹한 환경 조건에서도 오래 살아남을 수 있기 때문에 최종적으로 두 균주를 고정화할 균주로 선정하였다.
- 담체는 제조 후 즉시 두 가지 다른 온도에서 보관하였기 때문에 생균 수 측정을 따로 진행하였다.
- 그 결과, 5개월 후 최종 생균 수의 수는 실온 보관한 담체보다 4°C에서 냉장 보관한 담체 내 생균 수가 더 높았다 (그림 2-28).
- 또한, 전반적으로 첨가하지 않고 제조한 담체보다 전분과 젤라틴을 넣어 제조한 담체 내 생균 수가 꾸준히 유지되었으며 그중에서도 전분보다 젤라틴을 넣어 많은 담체의 생균 수가 가장 높았다 (그림 2-28).

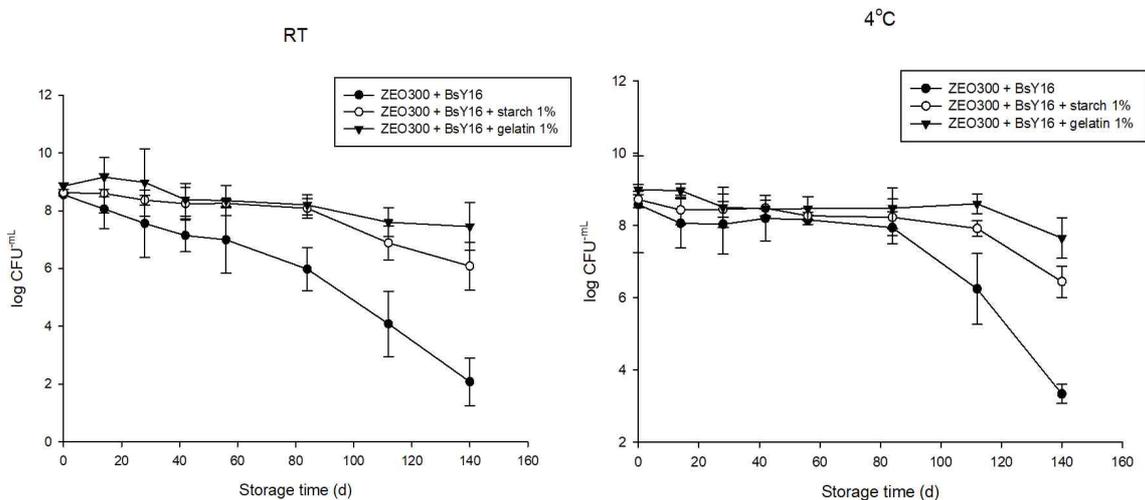


그림 2-28. 저장온도에 따른 담체 내 BsY16의 생균 수 변화

(다) 담체화 후의 기능성 검증

① 시험 목적: 담체화 후 작물에 실제 적용시 식물생장에 미치는 효과 조사

② 시험 방법 및 결과, 고찰

- 소규모 pot test를 통해 밀의 미치는 영향을 알아보았다. 그림 2-29에서 실험군은 총 7가지이며 다음과 같다.
- Con1 (수돗물 처리구), Con2 (균주 없이 ZEO300 단독 처리구), P1 (PN89+ ZEO300), P2 (PN89+ ZEO300+ starch 1%), P3(PN89+ ZEO300 + gelatin 1%), B1 (BsY16+ ZEO300), B2 (BsY16+ ZEO300+ starch 1%), B3(BsY16+ ZEO300+ gelatin 1%).
- 담체에 균을 고정화한 후 실제 작물에 적용하였을 때 수돗물만 처리한 대조구 1와 ZEO300만 처리한 대조구 2는 비슷한 결과를 보였다.
- PN89와 BsY16을 고정화한 담체를 흙에 처리했을 경우 균이 없는 대조구보

다 높은 습윤 및 건조 중량에서 눈에 띄게 차이를 보였다 (그림 2-29).

- 또한, 첨가물질에 관계없이 균 단독으로만 고정화된 담체 처리구가 더 큰 줄기의 건조중량을 나타냈다 (그림 2-29).
- 이는 균이 담체에 고정이 되어 흙에 위치하였을 때 균들이 다시 활성이 띄어 식물 성장과 발달에 도움을 줄 수 있다는 가능성을 제시한다.
- 담체를 흙에 처리했을 때 수돗물만 처리한 대조구 1과 담체 재료인 ZEO300만 처리한 대조구 2가 균이 고정화된 담체 처리구보다 눈에 띄는 밀의 줄기 및 뿌리 길이 변화는 없었다 (그림 2-30).
- 또한 균이 고정화된 담체 처리구는 전분, 젤라틴 같은 첨가제의 유무와 관계없이 서로 비슷한 결과를 나타내었다 (그림 2-30).
- 즉, 이러한 결과는 신장길이 역시 첨가제의 유무와 관계없이 밀 생육에 PGPR 두 균주가 도움을 주며 작물 생육과 신장 길이에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

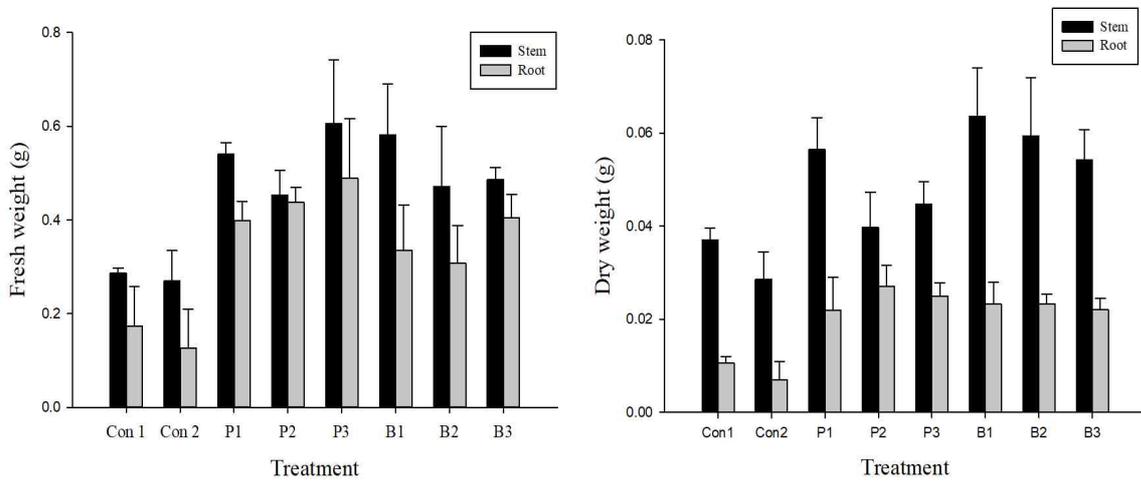


그림 2-29 균 고정화 담체 처리 시 밀의 습윤 중량 및 건조 중량

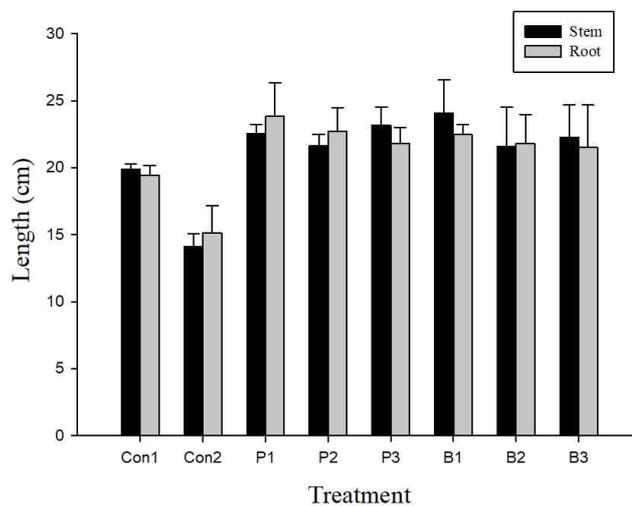


그림 2-30. 균 고정화 담체 처리 시 밀의 줄기 및 뿌리 길이

(6) 미생물 균주 추가 동정

- 식물 근권 토양에서 추가로 분리한 미생물 균주 동정을 16s rRNA 시퀀싱 분석을 통해 아래와 같이 실시하였다 (표 2-7).

표 2-7. 16S rDNA 시퀀싱을 통한 우수균주의 추가 동정

미생물 실험실명	동정된 균주명
PS1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> CR318
PS2	<i>Burkholderia</i> sp. DOP-Ma3
PS3	<i>Burkholderia</i> sp. GR 3-04
PS4	<i>Enterobacteriaceae</i> bacterium X2/SB29
PS5	<i>Pseudomonas umsongensis</i> strain Kt3-26
PS6	<i>Pseudomonas putida</i> strain NBFPFAT_RAS127
PS7	<i>Pseudomonas</i> sp. 4039
PS8	<i>Pseudomonas putida</i> strain GX8

2-3 원예작물 근권 활착 우수 PGPR균 작물생장 활성 검정

(1) 농지 토양 샘플에서 확보한 다양한 PGPR균 식물생장촉진 활성 검정법 확립

(가) 식물 생장 촉진 PGPR 확보 및 보관법

- 제 1 협동기관에서 분리한 다양한 식물 재배 토양 미생물을 대상으로 식물에서의 생장을 검정하고 그 생장촉진 활성기전을 규명하였음.
- 각각의 토양에서 분리된 미생물을 별도로 배양 후 각각의 토양에서 형성되는 콜로니의 표현형 (크기, 색상, 형태) 별로 single colony를 분리하고 다시 접종하여 30℃에서 24 시간 동안 진탕 배양 후에 각 균주를 80% glycerol stock 형태로 -80℃에 보관하였음. 총 72종의 토양 샘플에서 분리된 465 여종의 토양 근권 미생물들을 본 연구과제에서 확립한 방법을 통하여 활성 검정을 실시하였음(아래 표).

미생물 분리 식물종	검증 미생물 수
멜론	13
콩	12
상추	7
토마토	182
오이	39
고추 등	212

(나) 식물 생장 촉진 PGPR 검정법

- 100여종 이상 확보된 토양 미생물의 효과적이고 신속한 검정을 위하여 우리는 기내 검정법을 먼저 이용하였음.
- 토양 조건을 직접 이용할 경우 다양한 미생물이 혼재하여 특정 미생물의 활성을 정확하게 검정을 할 수 없음.
- 아래 그림과 같이 멸균된 배지를 이용하여 대상 미생물이 플레이트 하단에 접종된 상태에서 모델 식물을 수직으로 키워 생장촉진 활성을 조사하였음.

- 이에는 약 10일 정도의 짧은 기간이 소요되어 수백 종의 미생물 활성 검정을 용이하게 조사 가능하였음.
- 이렇게 선별된 미생물들의 분자적 기능 검정을 위하여 식물 생장에 관여하는 것으로 알려진 다양한 유전자의 프로모터가 결합된 리포터 식물을 다음 단계에서 이용하였음.

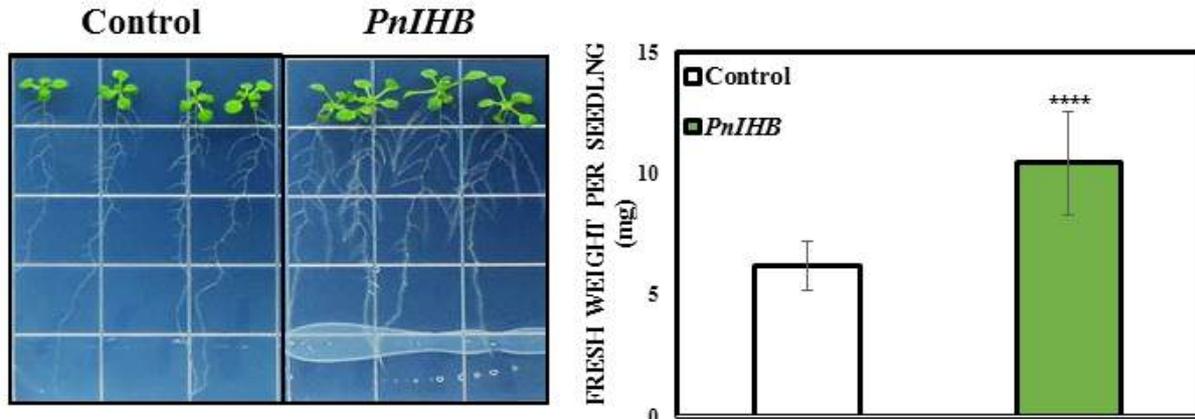


그림. PGPR 및 식물 공동 배양법

(다) 리포터 유전자를 활용한 PGPR의 식물 성장 촉진 PGPR 선별법 확립

- 아래 그림과 같이 다양한 종류의 리포터 유전자를 이용하여 토양에서 분리된 PGPR의 식물성장촉진 활성을 신속하고 효율적으로 검정할 수 있는 시스템을 확립하였음.

① 식물 스트레스 반응성 유전자의 프로모터와 결합된 Luciferase 리포터 유전자 시스템

- 식물은 외부 환경에 끊임없이 노출되어 항상 어느 정도의 환경스트레스 관련 유전자가 발현하는 것으로 알려져 있음. 이에 우리는 환경스트레스 마커 유전자인 RD29A 유전자의 프로모터와 Luciferase 리포터 유전자를 결합하여 제작한 transgenic plant를 PGPR 검정 식물로 사용하게 되었음.



그림. Luciferase 리포터 유전자 구성도

- 아래 그림과 같이 모델식물인 애기장대를 대상으로 하여 이 리포터 유전자의 활성을 검정한 결과 어떤 스트레스 없이도 일정 소량의 유전자 발현이 존재함을 알게 되었음. 따라서, 이 luciferase 검정법에는 항상 콘트롤 조건을 대상으로 하여 PGPR의 활성을 검정하였음.

LB control

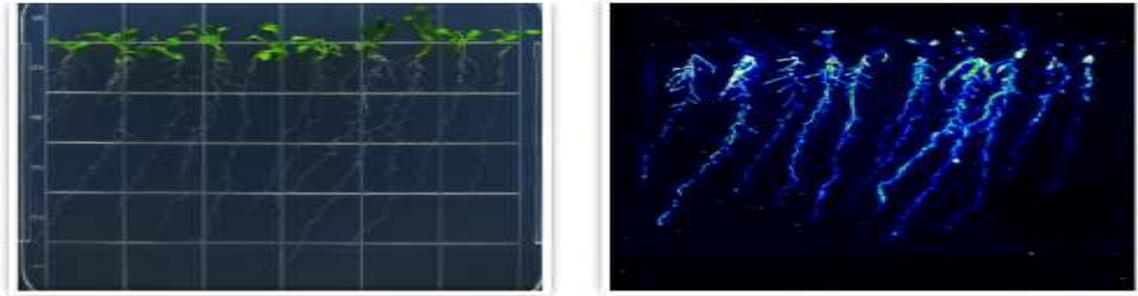


그림. Luciferase 리포터 유전자 반응성

- Luciferase 검정법을 이용하여 아래와 같이 대표적인 PGPR 몇 개의 반응을 조사한 결과임. 실험 세팅의 유효성을 조사하기 위하여 콘트롤 대비 고염 스트레스를 조사한 결과 리포터 유전자의 발현이 정상적으로 활성화됨을 확인하였음. 다음으로 콘트롤 조건과 대비하여 PnIHB는 뿌리가 짧아지는 현상과 함께 Luciferase 활성이 소폭 증가하는 것으로 나타났으나, BsY16의 경우 그 발현이 훨씬 줄어드는 것을 발견하였음. 이는 각종 미생물과 식물의 상호작용으로 식물이 내재하고 있는 스트레스 시그널링이 다르게 운용되고 있음을 반영하는 결과임.

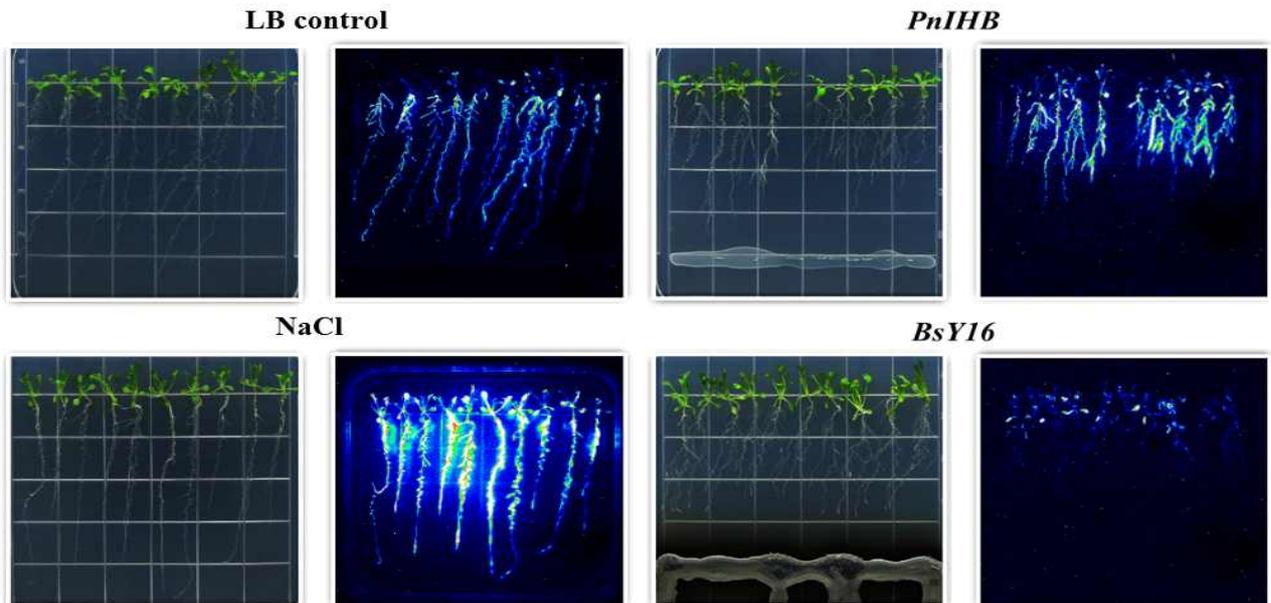


그림. PGPR 공동배양에 대한 모델 식물의 Luciferase 리포터 유전자 반응성

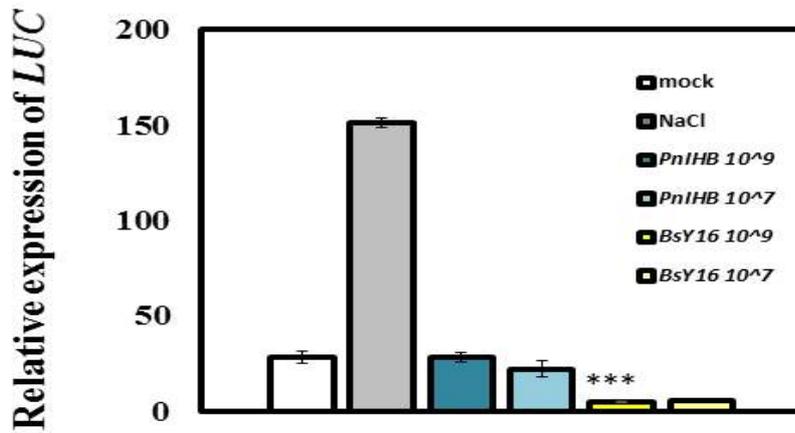


그림. PGPR 공동배양에 대한 모델 식물의 Luciferase 리포터 유전자 반응성 정량화

- Luciferase 리포터 유전자만을 이용하기에는 검정법에 한계가 있으므로, 옥신 반응성 DR5 프로모터와 사이토키닌 반응성 CYCB1 유전자의 프로모터에 β -glucuronidase (GUS) 리포터 유전자가 결합된 식물을 사용하여 추가 검정을 실시하였음.

② 식물 호르몬 반응성 프로모터와 결합된 GUS 리포터 유전자 시스템

- 식물 호르몬 옥신, 사이토키닌은 뿌리에 아주 소량 존재하기 때문에 모델 식물에서 매년 그 함량을 측정하기는 비용적인 면에서 용이하지 않음. 그러나, 옥신과 사이토키닌 등의 호르몬은 식물 생장에 필수적인 호르몬으로 PGPR의 활성을 검정할 때는 꼭 그 함량을 조사해보아야 함. 이를 위하여 우리는 이들 호르몬 함량을 직접 조사하는 대신 그보다 더 중요한 PGPR에 대한 식물의 호르몬 반응성을 리포터 유전자 시스템으로 조사하는 방법을 확립하였음.
- 아래 그림과 같이 어떤 PGPR 은 옥신에 대한 반응성이 증가한 반면, 어떤 미생물은 사이토키닌에 대한 반응성이 증가하는 양상을 보였음. 이들 리포터 유전자들에 대한 반응성은 다음 단계로 특정 PGPR의 식물 성장 촉진 반응 규명에 대한 정보를 제공함. 이 결과에 근거하여 어떤 마커 유전자들을 대상으로 조사를 진행할 수 있는 정보를 제공해주었음.

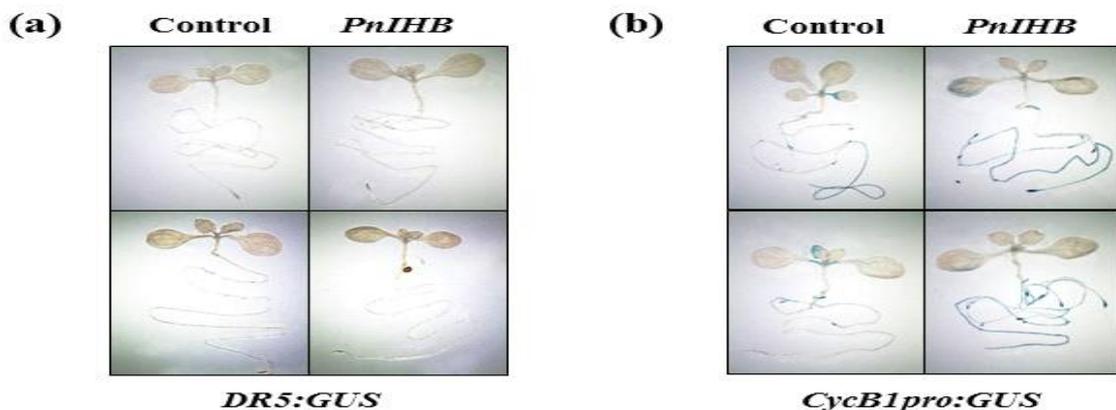


그림. PGPR 공동배양에 대한 모델 식물의 GUS 리포터 유전자 반응성

- 각종 리포터 검정을 이용하여 식물의 뿌리 성장 및 리포터 유전자들의 발현에 차별화를 보이는 토양 미생물들만을 선별적으로 수합하여 각각 균주 동정을 실시하였음. 이에는 흔히 사용되는 16rRNA 시퀀싱법을 이용하였음.

(2) 미생물 균주 동정

- 각 미생물의 식물 성장촉진 관련 활성을 확인한 다음 이러한 균주를 따로 선별하여 미생물 균주 동정을 아래와 실시하였고 동정 방법은 16rRNA를 이용한 염기서열 확인 검정법을 적용하였음.

미생물 실험실명	동정된 균주명
PT2	<i>Klebsiella sp. A16-KP12</i>
PT7	<i>Bacillus drentensis strain MER_TA_64</i>
PT11	<i>Bacillus sp. SinR4</i>
PT13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
PT16	<i>Pseudomonas nitroreducens strain IHB Bi3561</i>
PN2	<i>Bacillus aquimaris strain BF4</i>
PN4	<i>Bacillus megaterium strain IARI-SWC6</i>
PN8	<i>Lysini Bacillus</i>
PN11	<i>Bacillus vietnamesis</i>
PN12	<i>Bacillus sp. B12 (20156)</i>
PN21	<i>Bacillus sp. 7B-230</i>
PN29	<i>Paenibacillus pabuli strain P14s</i>
PN34	<i>Bacillus sp.LZJ-6</i>
PN35	<i>Lysini Bacillus fusiformis strain R2</i>
PN39	<i>Bacillus sp. L33</i>
PN43	<i>Brevibacillus choshinesis strain NBRC 15518</i>
PN50	<i>Bacillus sp.B12 (same with PN12)</i>
PN60	<i>Bacillus sp. SGb238</i>

(3) 식물 성장촉진 기능 검정: 대표 PGPR 3종 검정 및 성장촉진 분자 기전 연구 방법

- 식물 성장 촉진 뿌리 박테리아 (PGPRs)는 수많은 메커니즘을 통해 식물 성장을 촉진시키는 유익한 박테리아 그룹이다.
- 이러한 메커니즘에는 비 생물 적 스트레스 내성의 향상 (i) 병원균의 조절 (ii), 성장 관련 식물 호르몬의 생산 (iii), 식물에 의한 영양 섭취 촉진 (iv) 및 (v) 시드로 포어 및 기타 유익한 유기 화합물 생산 등이 기여한다.
- 숙주 식물과의 상호 작용을 기반으로 하는 PGPR의 작용은 직접 또는 간접적일 수 있다.
- 직접적인 성장 향상 효과에는 싹, 뿌리, 잎 및 과일 성장의 자극 (i), 영양 섭취의 증가 (ii) 및 다양한 스트레스에 대한 방어력 강화가 포함된다.
- 이러한 직접적인 효과는 주로 rhizobacteria에 의해 직접 분비되는 유용한 화합물 및 효소를 통해 발생하는 것으로 알려져 있다.

- PGPR의 간접적인 효과는 주로 식물 주변의 환경 변화를 통해 (i) 성장을 감소시키고 (ii) 식물 성장 기능의 전반적인 개선, 환경 병원균의 (iii) 통제, (iv) 영양소의 섭취를 용이하게 만드는 (v) 유도 식물 체계 반응 (ISR) 등이 포함된다.
- 이러한 알려진 기전들을 바탕으로 우리는 분리한 토양 미생물의 식물 성장 촉진능을 조사하고자 하였다.

① 리포터 유전자를 이용한 식물의 호르몬 반응성 유무 검정 및 식물 성장 검정

- 발아 후 4일째 *A. thaliana* 유묘를 토양 미생물이 접종된 (10^9 CFU mL⁻¹) MS 한천 고체 배지로 옮겨 배양을 계속하였음. 토양 미생물이 없는 미생물 배양 용액 (LB)dl 콘트롤 실험에 사용되었음. *Arabidopsis thaliana* 식물은 23 ° C, 16 : 8 h 광 / 암 및 60 % 상대 습도에서 식물 성장 챔버에서 8일 (GUS 염색의 경우 4일) 동안 수직으로 재배하였고, 성장능 결과는 배양 시작 후 8일째에 측정되었음. 모든 유묘의 무게를 측정하였음.
- 루시퍼레이스 활성은 Luminometer (CCD camera 장착)를 이용하여 살아있는 식물체를 이용하여 조사하였음. PGPR 처리 및 조건은 뿌리 성장 조사와 동일하게 진행하였음. Bioluminescence 조사 후 프로그램을 이용하여 발광 정도를 정량화하였음.

② PGPR 처리 시 식물의 성장촉진능 조사

- 위에서 확보된 다양한 PGPR 자원을 처리한 식물 샘플을 확보한 다음 각각 합성된 cDNA를 이용하여 다양한 식물 성장 촉진 관련 유전자들의 발현을 qRT-PCR을 이용하여 조사함.
- 위에서 기술한 방법으로 찾아낸 발현 조절된 유전자들의 관련성을 연구함. 이들 PGPR이 항산화능 합성 조절에 관여하는 지를 조사함. 기능의 구체적 연구를 위하여 모델 식물을 이용하여 관련 유전자들의 모델 식물 knock-out 라인을 확보하여 이들 PGPR이 이들 돌연변이에 미치는 영향을 조사함.

③ 스트레스 조건 반응 특이적 돌연변이 유전자를 활용한 PGPR 기능성 구명

- 기기분석을 이용하여 항산화 활성 검정 연구를 수행함. 항산화 성분 분리를 위한 실험방법 에서는 기존 문헌을 검토함으로써 주요 항산화 성분에 대한 추출 방법 등을 이용하였음.
- 항산화 관련 연구를 위하여 자유라디칼 분석 (DPPH, ABTS 및 NO) 및 환원력 테스트를 통하여 항산화 성분들의 항산화 활성을 검정함. 항산화 활성 검정은 용매, 온도, 배양시간, pH 및 자유라디칼 소스 등의 여러 실험조건에 따라 달라지므로 위에 분석방법을 모두 이용하여 실행함.

④ PGPR 분자 신호전달 체계 연구

- 내재해성 관련 DNA marker들은 F2 population을 이용하여 genotyping을 실시함으로 확보함. 양친의 대립인자 범위 내에서 동일하게 homo와 hetero type으로

분리되는 좌위를 탐색하고 근접한 STS marker들을 확보하여 관련 유전자들과 물리적으로 근접한 gene based marker들로 활용성이 높은 것들을 확보함.

- 이들 분자 marker에 의해 성공적으로 genotyping 된 것들 중 ANOVA 분석을 이용해 F2 개체들의 phenotyping 결과와의 연관분석에 이용하고 가장 높은 F value를 나타낸 것들의 염색체 내 영역을 탐색함. 이를 이용하여 돌연변이 유전자를 결정함.

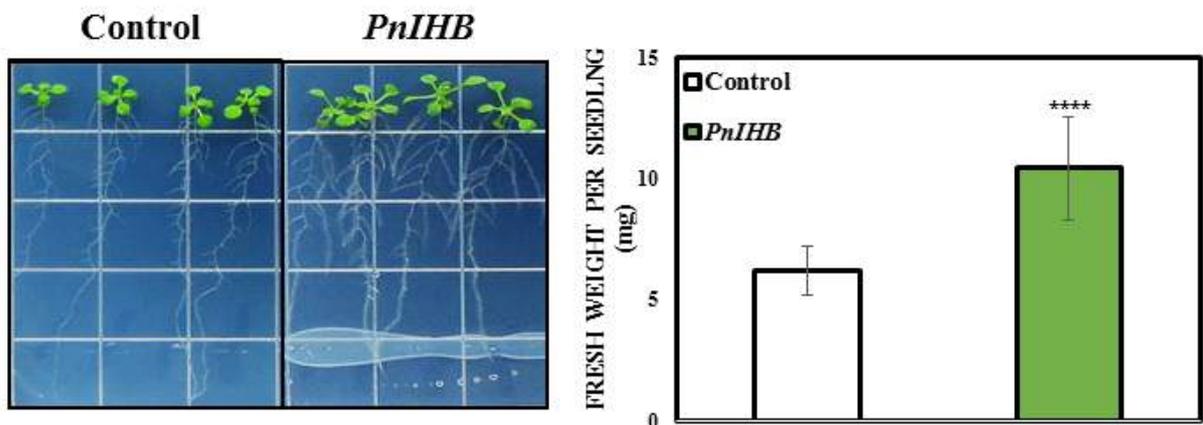
⑤ 기능성 원료 물질 및 복합제제의 작물 질소 흡수능 개선 활성검정

- 여러 종류의 대상 물질(기능성과 천연물의 단일 추출물)을 제1 세부과제로부터 공급받아 이들이 식물 생장에 미치는 효과를 다양하게 검정하였음.
- 식물의 질소 흡수능은 생리학적 및 분자생물학적 방법을 이용하여 정량함. 초기의 많은 수의 물질을 스크리닝할 경우에 모델식물인 애기장대를 이용하여 물질의 활성 검정실험을 진행하고 어린 유묘 상태에서 스트레스 물질의 효과를 검정하여 시간과 공간의 제약을 최소화함.
- 모델 식물의 종자를 기내에서 발아시키고 어린 유묘 상태에서 대상물질을 처리함. 식물의 성장 및 반응성을 뿌리 성장/광합성능/활성산소 발생능 측면에서 조사함.
- 각 단계에서 관련 마커 유전자들의 발현을 qRT-PCR 방법을 이용하여 조사 및 정량화함. 원료 물질 제제의 배합농도 및 비율결정을 위한 스크리닝 시스템을 확립하여 단일 및 복합제제 중에서 최적의 식물성장촉진 활성을 가지는 조합을 선별하고 재배 실증 과정을 거침.

(4) 식물 성장촉진 PGPR 기능성 연구 결과 및 고찰

(가) *Pseudomonas nitroreducens* strain IHB Bi3561 (PnIHB)

- 4일간 키운 애기장대 유묘 뿌리 아래 PnIHB를 200 μ L의 세균 서스펜션(109 CFU mL⁻¹)으로 접종하였음(Wintermans et al. 2016). 컨트롤로 LB만 200 μ L을 함유한 판을 대조군으로 사용하였음. 애기장대 식물은 23 °C의 성장 챔버에서 8 d (4 d for GUS staining)를 위해 PnIHB와 함께 수직으로 배양하였고, 16 h 광/8 h의 어두운 광주기와 60% 상대 습도를 유지하였음. 8일 후 성장 정도를 측정하였음.



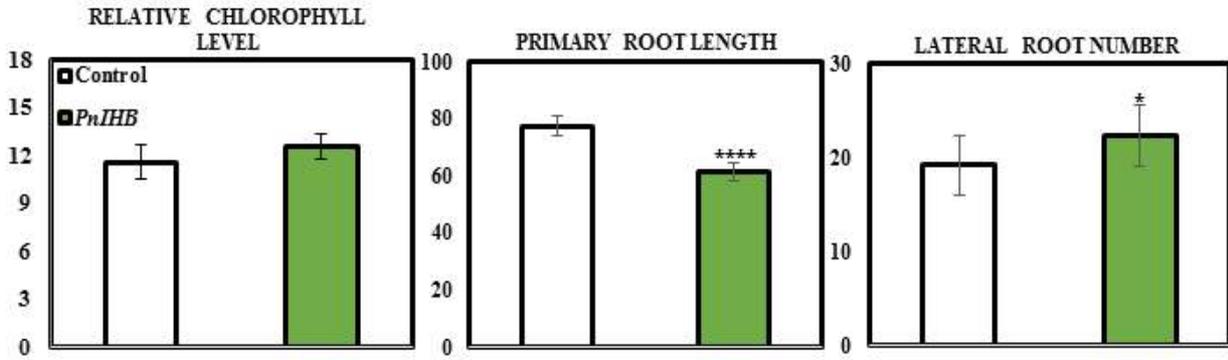


그림. PGPR *PnIHB* 공동배양에 대한 모델 식물의 성장 활성조사

- PGPR 균주는 다양한 경로를 통해 식물의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있음. 토양에 의해 유발된 미생물로부터 PGPR을 선별하는 과정을 가속화하기 위해 리포터 유전자 분석 방법을 이용하였음.
- 외부 옥신(DR5:GUS) 또는 세포분열 촉진 신호(*CycB1pro*:GUS)에 반응하는 DR5:GUS 또는 *CycB1pro*:GUS 식물에 미생물을 접종하였음.

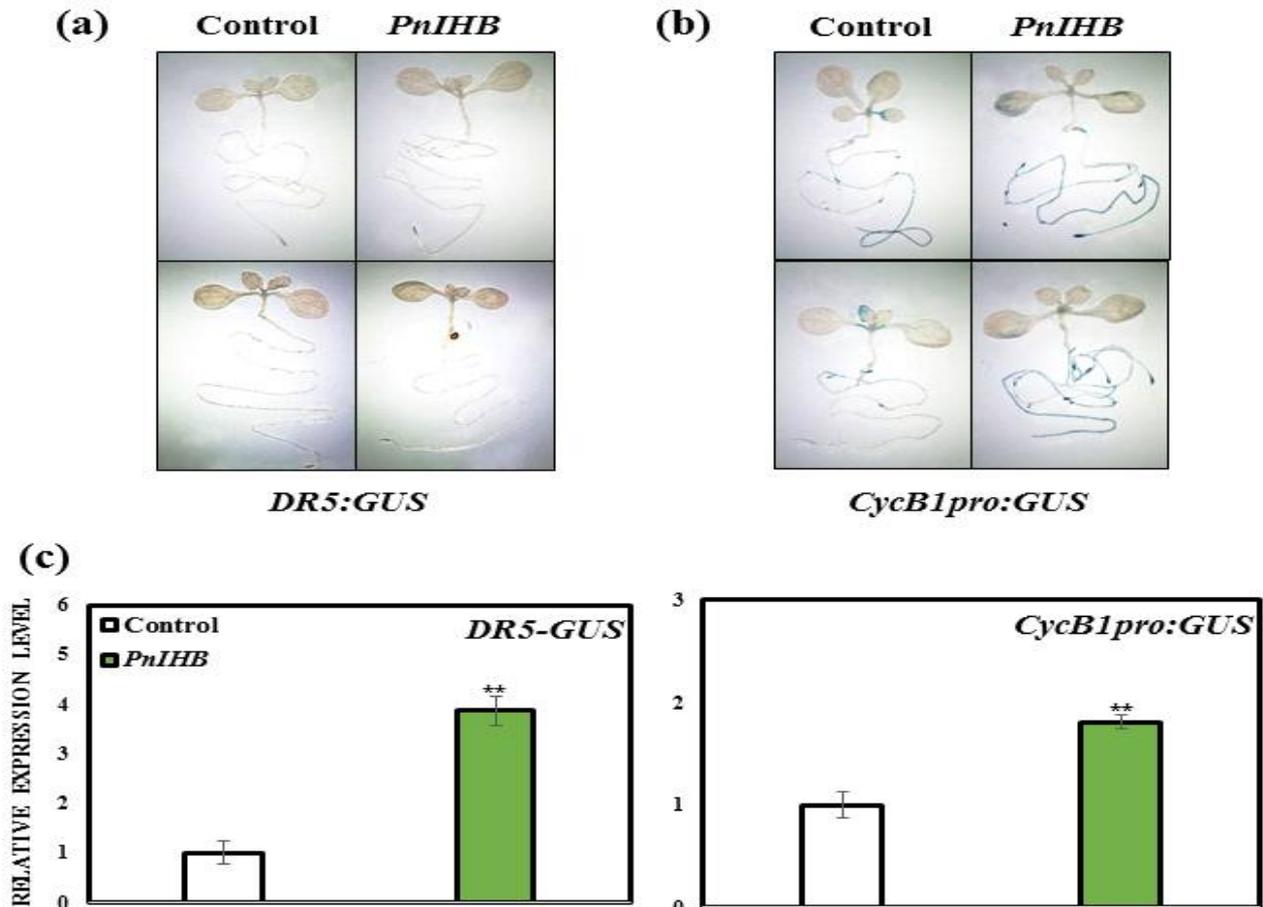


그림. PGPR *PnIHB* 공동배양에 대한 모델 식물의 옥신 및 사이토키닌 함량 간접 측정

- 4일 후 GUS 염색 (그림 **)을 통해 리포터 유전자의 활성을 평가하였음. DR5:GUS의 경우, PnIHB를 접종한 묘목의 뿌리 끝에서 매우 작은 GUS 염색이 관찰되었지만, GUS 전사 축적은 대조군에 비해 PnIHB를 접종한 묘목에서 유의하게 높았음(그림 1c).
- 마찬가지로, CycB1pro:GUS 리포터 유전자의 GUS 활성은 PnIHB 처리된 식물에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며 (그림 1b), CycB1 프로모터에 의해 유도된 GUS 전사의 수준 증가는 대조군에 비해 PnIHB 처리된 식물에서 훨씬 더 높았음(그림 1b). 1c).
- 이 결과는 PnIHB는 식물의 세포분열과 옥신 생성의 증진을 통해 그 성장 촉진 가능성을 발현하는 것으로 추측됨.
- PnIHB의 식물 성장 촉진 활성을 분자 수준에서 더 자세히 알아보기 위해, NRT1.1, NRT1.2, NRT2.1, NRT2.5, NRT2.6 유전자의 전사체 수준을 분석하여 PnIHB 접종에 의한 다양한 표적 유전자 (그림 3a 및 그림 S1)의 발현에 미치는 영향을 조사하였음.
- 질산염 수송 시스템(Mantelin et al. 2006); 질산염 반응에 관여하는 NIR1, NLP6 및 NLP7; EIN1 및 ERF1은 에틸렌 반응 경로에서 역할을 한다. ARF19, ARF7 및 AXR4는 옥신 신호 경로에 관여하는 것으로 알려져 있음.
- 암모니아 수송 시스템에서 중요한 기능을 하는 AMT1.1, AMT1.2 및 AMT2. NRT2.1, NRT2.2, NRT2.6의 매우 높은 발현 수준과 NRT2.5의 상향 조절은 PnIHB 배양된 묘목에서 관찰되었으며, 가장 주목할 만한 것은 NRT2.1 유전자가 뿌리에 의한 질산염 흡수를 담당하는 유도성 HATS의 중요한 구성 요소로 알려져 있다는 것임. 이러한 결과는 PnIHB의 성장 촉진 효과가 아라비도시스의 뿌리 질산염 수송 및 흡수 관련 유전자의 자극과 밀접하게 연관되어 있음을 암시함. 그러나 질산염 분석 결과, PnIHB 처리 식물에서는 대조군보다 N-content가 낮은 것으로 조사되었음. PnIHB는 세포분열과 관련이 있는데, 세포분열 속도의 증가는 더 많은 질소를 필요로 하고 더 빠른 질산염 대사를 유도하기 때문에 식물 전체 질산염 함량이 감소된 것을 충분히 설명할 수 있음.
- 내부 N 상태는 차례로 고 친화성 nitrite 수송체 NRT2 유전자의 전사를 유발하여 향상된 nitrite 섭취로 이어질 수 있음. 옥신 관련 경로의 경우, PnIHB가 DR5:GUS의 GUS 활성을 유도했지만, 옥신 신호 전달 경로에 관여하는 유전자의 발현 수준이 PnIHB의 존재 하에서 변화되어 옥신 신호 전달 경로가 이 미생물의 성장 촉진 효과에 중요하지 않다는 것으로 결론지었음. 따라서 우리는 PnIHB가 질산염 수송과 흡수에 미치는 영향을 조사하는 데 초점을 옮겨 연구를 더 진행하였음.

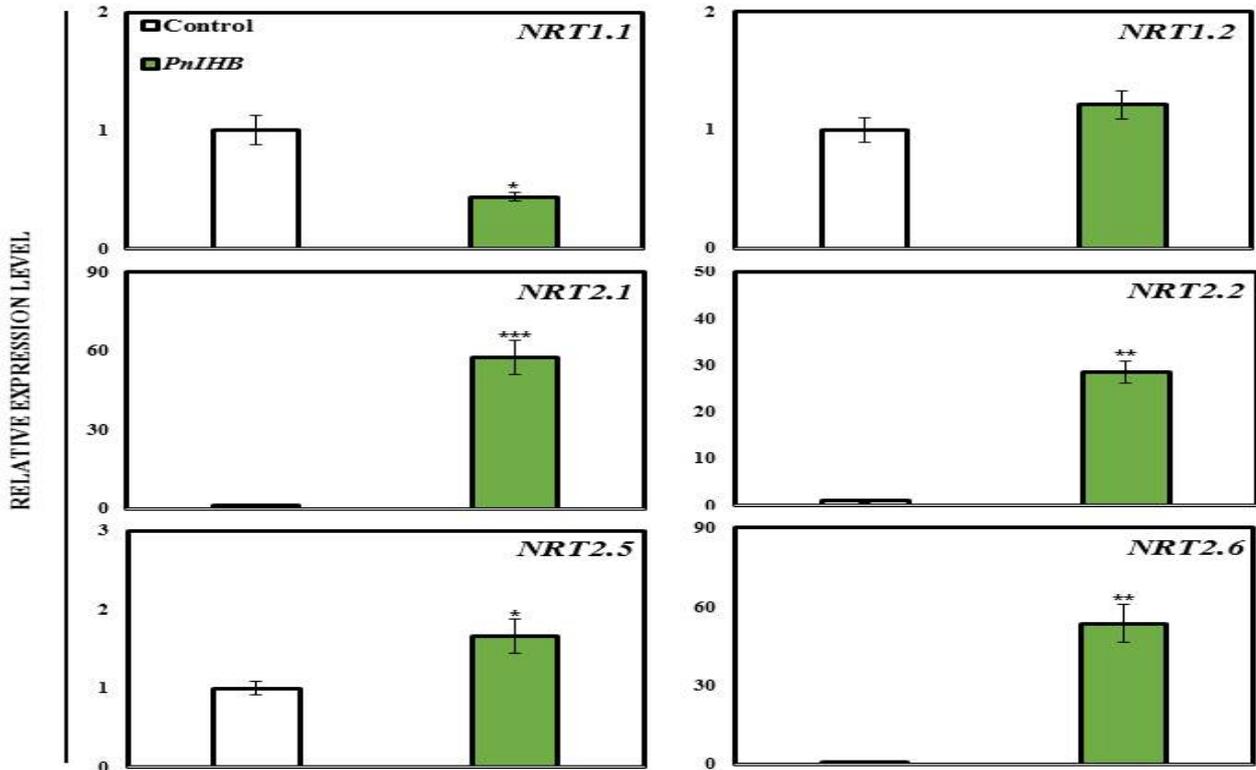


그림. PGPR *PniHB* 공동배양에 대한 질산염 관련 유전자 발현 조사

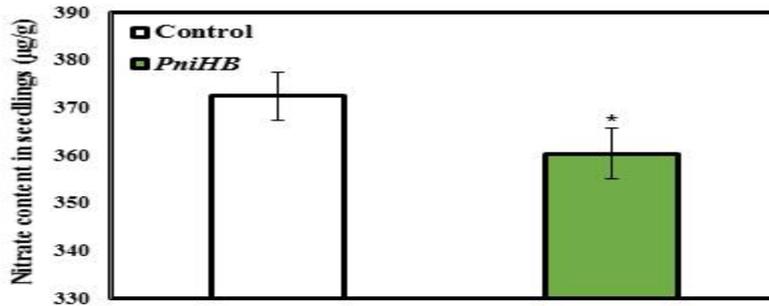


그림. PGPR *PniHB* 공동배양에 대한 질산염 축적량 조사

- 4일간 균일하게 받아시킨 *L. sativa* 유묘를 이용하였음. 균 접종을 위해, PniHB-LB 현탁액의 1 mL을 여러 농도(101, 103, 105 CFU mL⁻¹)에서 뿌리에 직접 접종하였음. 식물 뿌리에 박테리아를 1 mL씩 도포한 토양 용기가 대조군으로 사용하였음. *L. sativa*와 PniHB는 23 ° C의 성장 챔버에서 배양되었으며, 16-h 광/8-h의 어두운 광주기와 60% 상대 습도를 유지하였음. 성장 정도는 0-10 일간 배양 과정에서 매일 측정하였음. 10일째에, 유묘의 무게를 측정하였음.
- 아래 그림은 0 d, 3 d, 5 d, 7 d, 9 d 및 10 d에서 촬영된 사진으로 표현형 개선이 관찰되었음. 또한, PniHB 접종된 유묘에서 잎의 발달이 훨씬 빠른 속도로 진행되었으며, 제 4 잎은 단지 7 d 후에 대조구보다 모든 접종 유묘에서 더 큰 것으로 나타났음.
- 본엽의 엽록소 함량은 10 d 이후 모든 잎(코틸론 제외)에서 측정하여 대조구와

접종구 사이의 본엽의 상대적인 엽록소 함량을 측정하였음. PnIHB는 잎의 엽록소 상태에 영향을 미치지 않았기 때문에 (그림 4c) 잎의 상대적인 엽록소 함량의 증가는 잎의 크기 증가와 잎의 발달 속도가 더 높아진 것에서 기인한 것으로 보임. PnIHB 자극에 반응하는 미분화 유묘에서, 싹과 건조 중량은 한천 판에 PnIHB와 공동 배양된 애기장대 유묘에서 관찰된 것과 매우 유사한 표현형 개선인 10 d(그림 4b)에서 모든 접종 조건에서 PnIHB 접종 유묘에서 모두 높았음(~25-40%). 전반적으로 PnIHB는 MS 한천판과 자연 토양 환경에서 모두 발아된 유묘에서 *A. thaliana*와 *L. sativa* 모두에서 성장을 촉진시켰음.

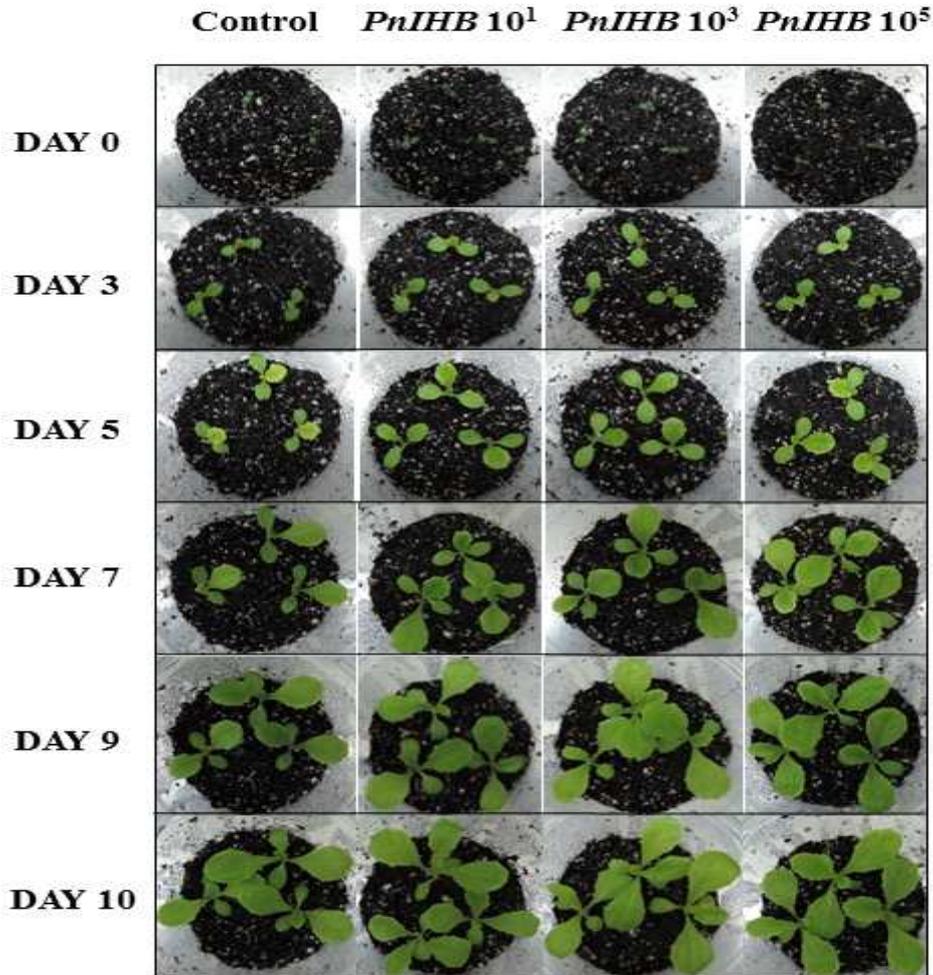


그림. PGPR *PnIHB* 공동배양에 대한 상추 성장 조사

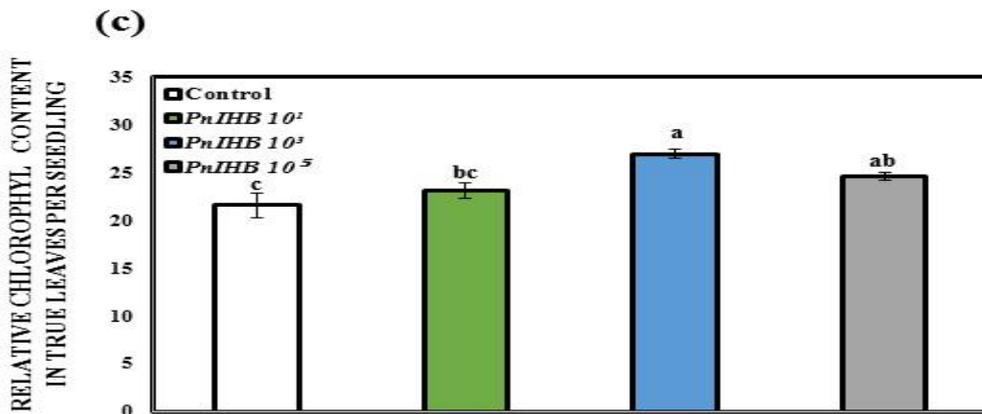
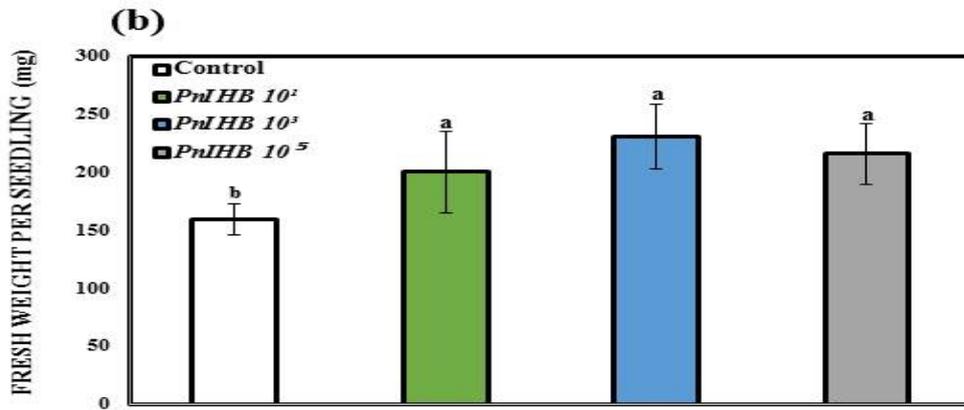


그림. PGPR *PnIHB* 공동배양에 대한 생체량 및 엽록소 함량 조사

- *PnIHB*에 의한 *L. sativa* 성장 촉진 기전을 조사하기 위해 qRT-PCR 분석을 수행했음. 상추 잎과 뿌리에 auxin response gene *IsIAA4* (atIAA 4-like), *IsCyclinB1*, cytokinin receptor gene *IsCytokinin*, nitrate transporter 유전자 *IsNRT1*, *IsNRT2*, nitrate/nitrite transporter 유전자 *IsNRT2.5*의 전사 수준을 각각 조사하였음. *CyclinB*와 *IsNRT2.5* 유전자 발현이 증가하였음을 확인하였음 (그림 5a).

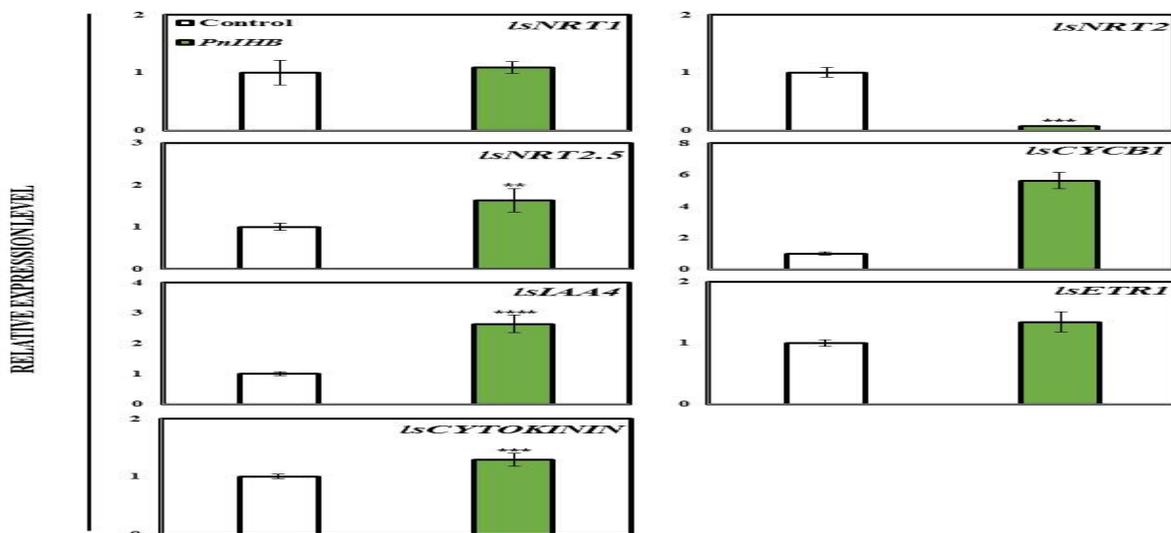


그림. PGPR *PnIHB* 공동배양에 대한 옥신, 에틸렌, 사이토키닌 마커 유전자 발현 조사

- Cyclin B의 발현 증가는 앞에서 PGPR의 세포주기 촉진 효과를 나타내었고, PnIHB에 의해 유발된 성장촉진과 관련이 있었음. 또한, NRT2.5의 발현이 증가된 것은 애기장대에서도 동○리한 결과가 관찰되었으며, 이는 PnIHB가 세포주기와 질산염 수송 개선과 관련된 유사한 기전으로 상추와 애기장대의 성장을 촉진시켰음을 시사함. 상추 뿌리의 전사 수준을 분석한 결과, PnIHB 처리구에서 *IsNRT2*와 *IsIAA4*의 발현 수준이 대조군에 비해 높은 것으로 나타났음(그림 5b).

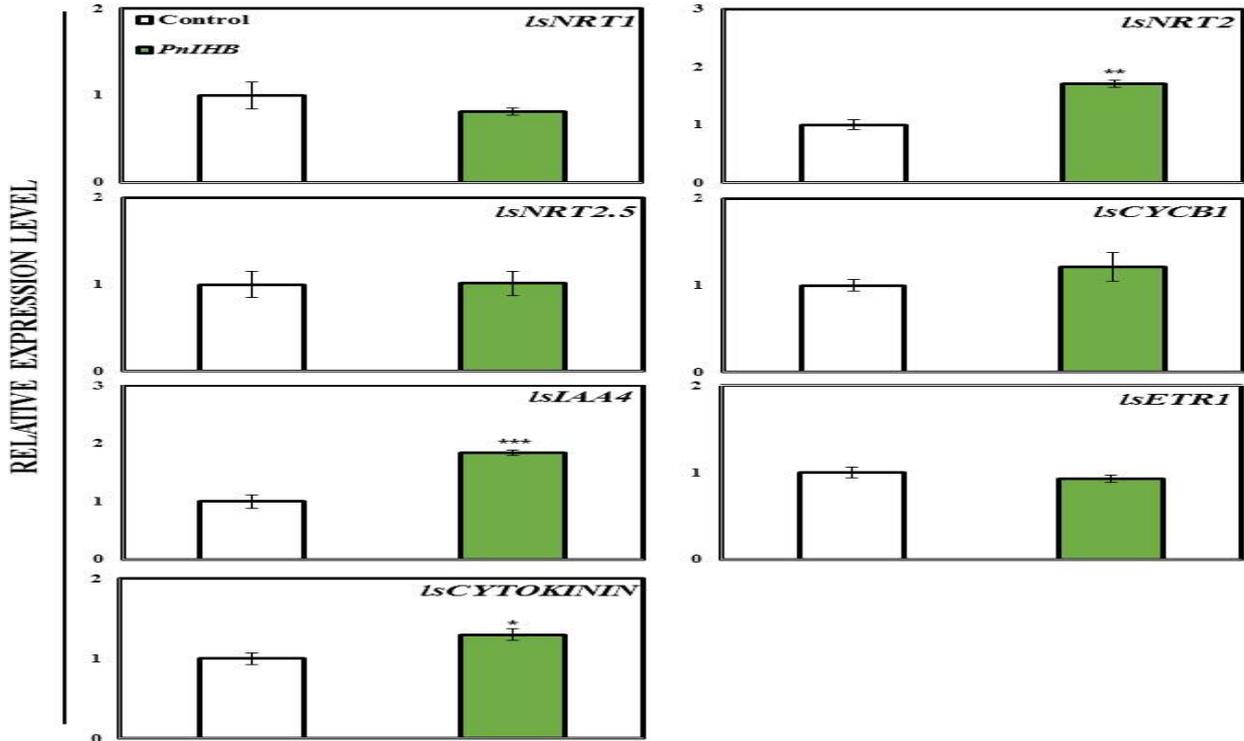


그림. PGPR *PnIHB* 공동배양에 대한 옥신, 에틸렌, 사이토키닌 마커 유전자 발현 조사

- *IsNRT2* 유전자 서열과 *atNRT2.1* (발현; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 유사성을 고려할 때, *IsNRT2*의 상향 조절은 동시 배양된 *NRT2.1*의 높은 발현 수준과 유사하다고 간주 될 수 있음. 예상대로, *L. sativa*(그림 6a, b)의 싹과 잎, 뿌리, 그리고 전체 묘목의 질산염 분석은 애기장대에서 관찰된 것과 유사한 결과를 보였음. 상추 잎의 질산염 함량은 총 유묘 질산염 함량의 60%를 차지함. PnIHB 접종식물 뿌리의 질산염 함량은 약간 증가하였으나, shoot의 질산염 함량은 다소 감소하였는데 이 패턴은 애기장대에서 관찰된 것과 유사함.

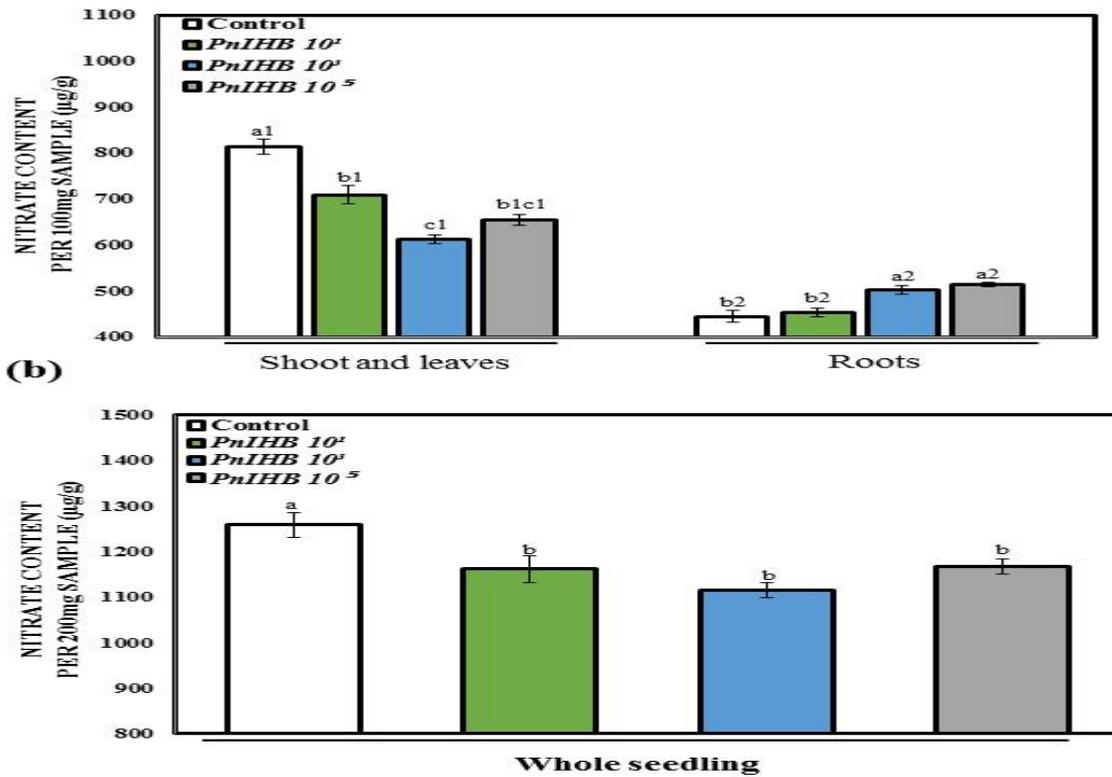


그림. PGPR *PnIHB* 공동배양에 대한 질산염 함량 조사

- NRT 유전자의 발현이 증가할수록 질산염 흡수율이 높아짐에 따라, 질산염의 함량은 현저히 감소하였음. 또한 *PnIHB*는 상추에서의 질산염 대사 경로 촉진으로 세포 발달이 증진되었음. 차례로 고 친화성 질산염 수송체의 발현을 상향 조절했음. 따라서, *L. sativa*와 *A. thaliana*의 유전적, 생리학적 차이에도 불구하고, *PnIHB*는 두 종 모두에서 유사한 성장 촉진을 나타내는 것으로 결론지을 수 있음.
- 이외에도 질산염의 공급 농도를 달리하여 *PnIHB*의 성장촉진 효과를 조사하였으나 아래 그림에서와 같이 비교군 간에 큰 차이는 나타나지 않는 것으로 관찰되었음.

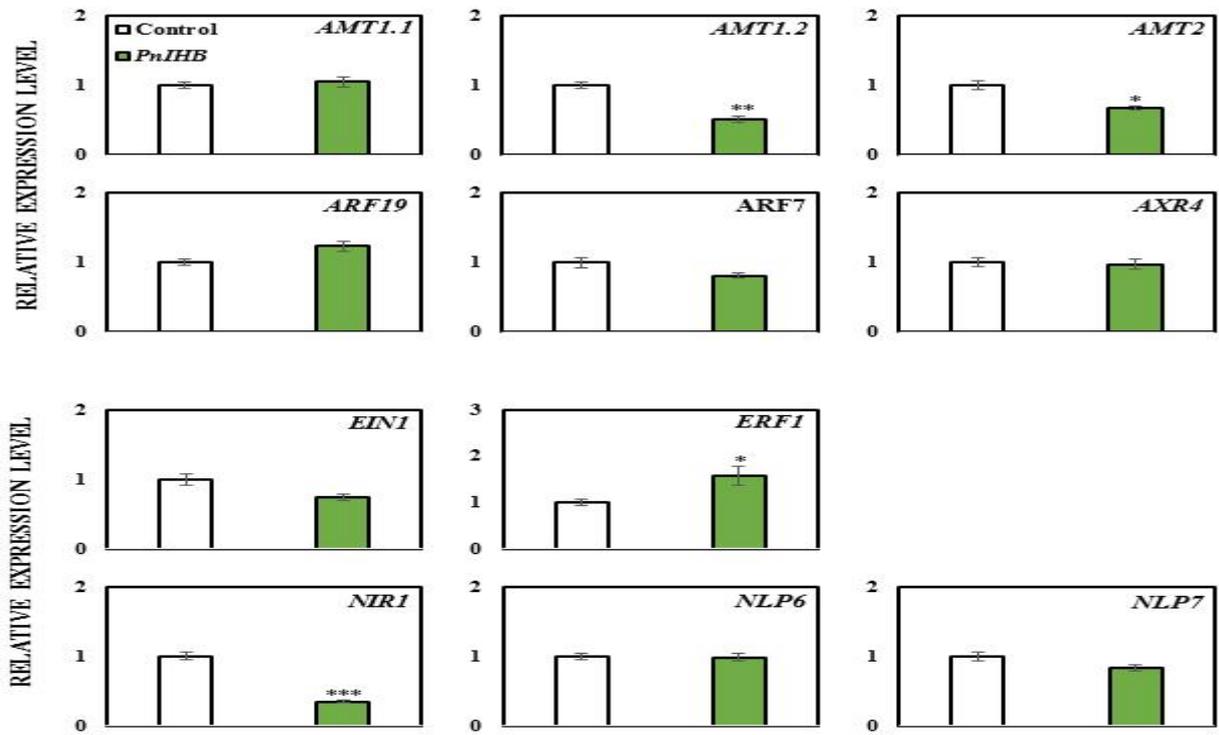
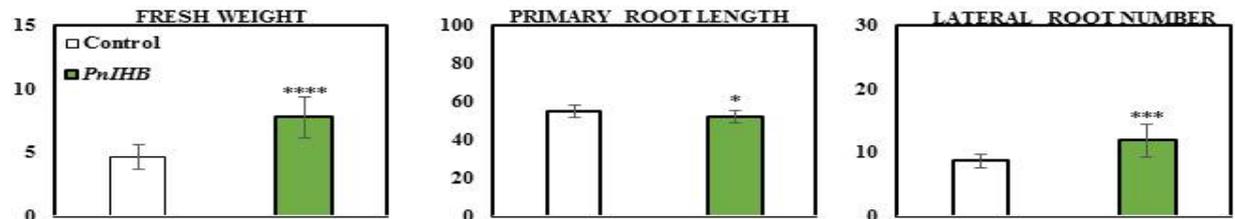


그림. PGPR *PnIHB* 공동배양에 대한 암모늄 수송 유전자 및 질소 관련 유전자 발현 조사

(b)



(c)

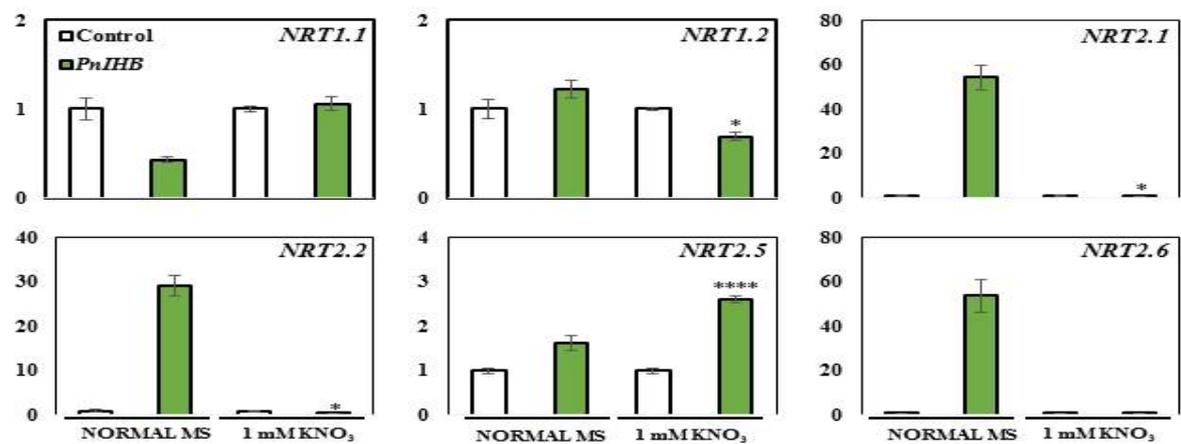


그림. PGPR *PnIHB* 공동배양에 대한 암모늄 수송 유전자 및 질소 관련 유전자 발현 조사

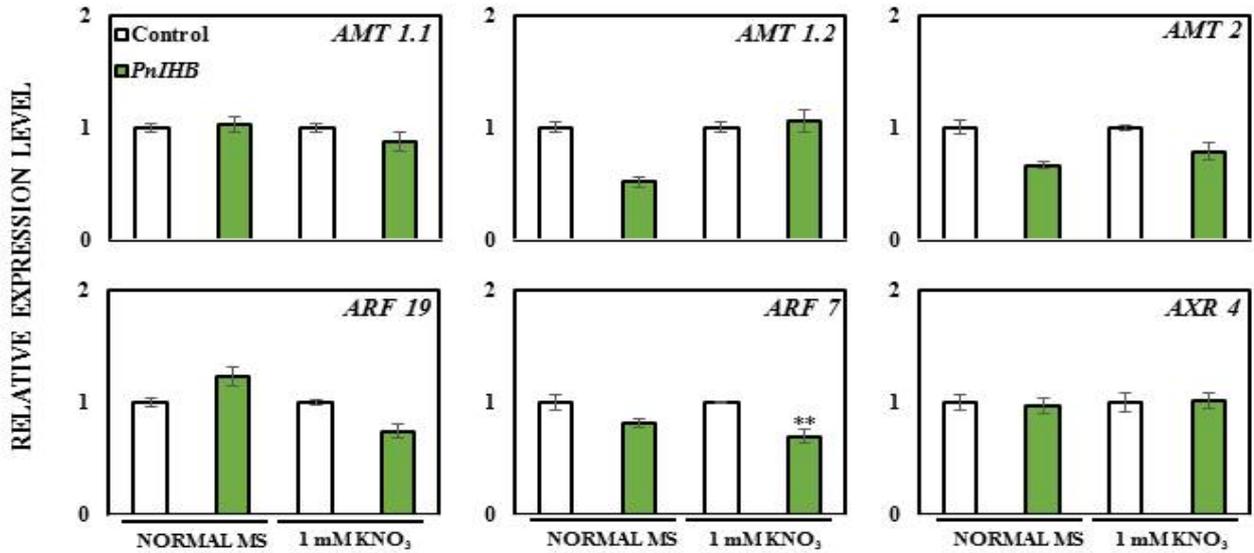


그림. PGPR *PnIHB* 공동배양에 대한 옥신 관련 유전자 발현 조사(질소 조건)

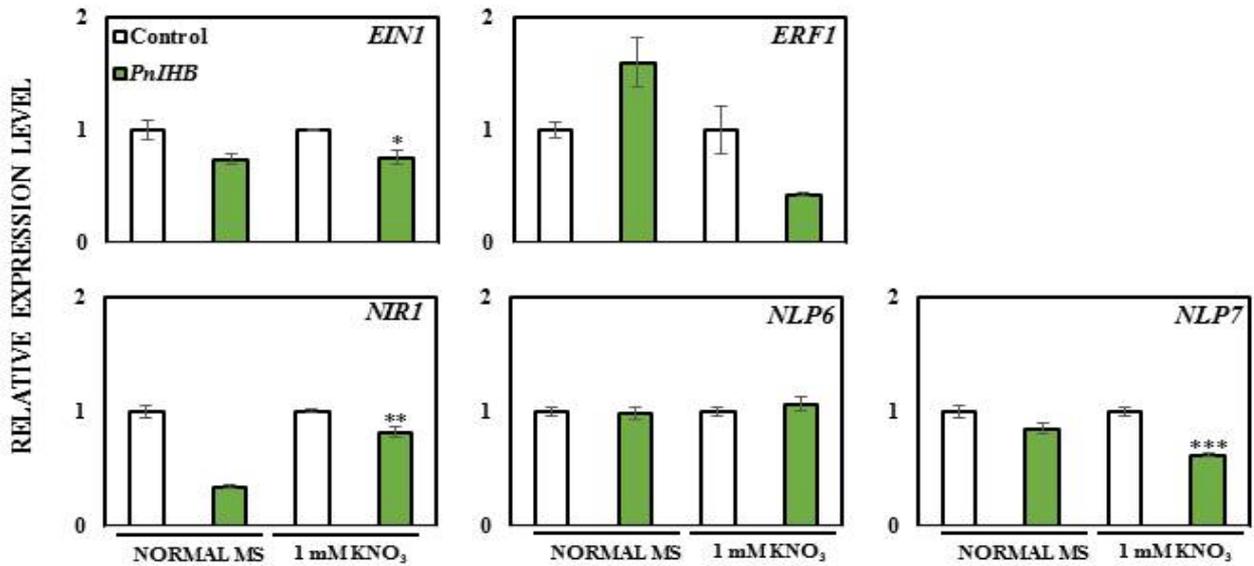


그림. PGPR *PnIHB* 공동배양에 대한 에틸렌 및 질소 관련 유전자 발현 조사 (질소 조건)

- *L.sativa*의 경우 상추 게놈 데이터베이스의 한계로 인해 CyclinB와 3개의 질산 수송체 유전자, 즉 *lsNRT1*, *lsNRT2*, *lsNRT2.5* (*atNRT2.5-like*)의 유전자 발현 분석만 수행하였으나, *lsNRT1*과 *lsNRT2*의 발현은 상추에서 질산 섭취율이 높은 것과 연관이 있었음(Poitout et al. 2017). 따라서 *PnIHB* 접종은 상추에서 *lsNRT2*의 전사를 증가시켜 질산염 흡수율을 높이는 기전을 초래하는 것으로 보임.
- 이외에도 *L. sativa*와 *A. thaliana*는 근연종이 아님에도 불구하고, *PnIHB*는 동일한 분자 경로를 통해 두 식물 종에서 성장을 촉진하여 세포 발달을 향상시키고 질산염 흡수 속도를 증가 시킨다고 결론지을 수 있음. 흡수된 질산염은 액포에 저장되거나 암모니아로 환원 될 것이기 때문에 (Crawford 1995; Tischner, 2000) 우리는 *PnIHB* 처리된 식물에서 높은 세포 성장 속도가 필수 단백질 및 기타 필요한 물질을 합성하는 암모니아 소비량이 더 높다고 추측하였음 (Howwit and

Udvardi 2000; Pratelli et al. 2014).

(나) *Paenibacillus pabuli* strain P14s (PP7S)

- 발아 후 4 일째 Arabidopsis 유묘를 2 % 자당으로 보충된 MS 한천 배지로 옮겼고 이 때 PP7S가 들어있는 배지와 그렇지 않은 배지를 컨트롤로 하여 함께 12일 동안 배양하였음. 이후 유묘의 무게를 측정하였는데, 결과는 컨트롤과 비교할 때 PP7S 처리된 Col-0 유묘에서 성장 촉진이 뚜렷하게 발견되었음(그림 1).
- 측뿌리의 길이 또한 증가했지만, 1차 뿌리 길이는 대조군(그림 1)과 비교할 때 짧을 것으로 나타났음. PP7S 처리 유묘의 무게는 대조군(그림 2)보다 훨씬 높았음. PP7S 처리 유묘의 엽록소 함량 또한 대조군보다 훨씬 높게 나타났음. 이의 분자기전을 알아보기 위하여 *CyclinB1* promoter와 융합된 GUS 리포터 유전자를 가진 형질전환체 *CyclinB1pro-GUS* 식물을 이용하였음.
- 그림 2에서 보는 바와 같이 세포 분열 촉진 신호가 더 강하게 PP7S 처리 유묘에서 나타나는 것을 확인할 수 있었음. 또한, 처리된 *Cycb1pro-GUS* 유묘의 GUS 프라이머 qRT-PCR 분석은 PP7S(그림 2)에 반응하는 GUS 유전자의 발현이 현저히 증가함을 나타냄. 이러한 결과는 PP7S의 식물 성장 촉진능이 세포분열 촉진을 자극하여 발생한 것임을 추측 가능하게 함.

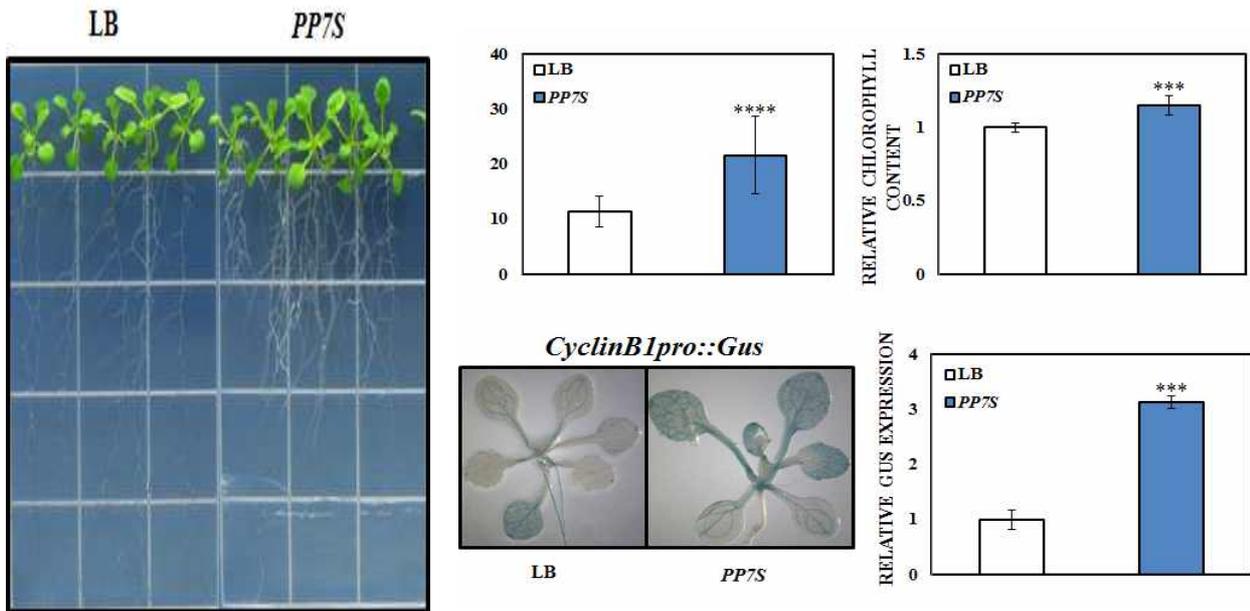


그림. PGPR PP7S 공동배양에 대한 식물 성장 조사

- PP7S는 Col-0 식물의 총 안토시아닌 함량을 크게 증가시키는 것으로 나타났다(그림 3). PP7S이 유묘의 경우 상대적 총 안토시아닌 함량은 대조군과 비교했을 때 두 배 정도 차이를 나타냈음. 안토시아닌 증가의 이유를 이해하기 위하여 플라보노이드 및 안토시아닌 생합성 경로의 구조 유전자에 대한 qRT-PCR 분석을 수행하였다. 이 유전자에는 찰콘 합성효소 (CHS), 찰콘 이성질체(CHI), 플라본 3-

히드록실라제 (F3H), 플라본 3'-히드록실라제 (F3'H), 디하이드로플라보놀 4-환원 효소 (DFR), 류코안토시아시아닌 등의 유전자를 조사하였음.

- PP7S 처리 유묘는 PAP1, LDOX, DFR 및 F3'H의 전사 수준을 크게 유도하는 것으로 조사되었음. CHS와 F3H의 높은 전사 수준도 함께 관찰되었음. 그러나 FLS1의 전사 수준은 억제되었음. DFR, LDOX 및 PAP1 유전자의 상향 조절은 PP7S 처리가 특히 안토시아닌 생합성을 향상시키고 식물에서 안토시아닌의 농도를 증가시킨다는 것을 암시함. 플라보노이드의 일군인 안토시아닌은 주요 식물 2차 대사 산물 그룹 중 하나이며 식물과 인간 모두에게 유익한 영향을 미치는 것으로 알려져 있음(Gracia-Seco et al., 2015; Lee et al., 2016). 식물에서 플라보노이드는 비생물적 스트레스와 생물적 스트레스에 모두 적응하는데 크게 기여하는데 플라보노이드는 병원균, 곤충 공격, 자외선 조사에 대한 방어 메커니즘에 중요한 역할을 함(Dixon et al., 2005; Santos-Buelga and Scalbert, 2000). 특히, 안토시아닌은 강력한 항산화 효과로 잘 알려져 있어 다양한 비생물적 스트레스에 반응하여 생산되는 활성산소 중으로부터 식물을 보호함(Lee et al., 2016; Camille et al., 2010; Kahkonen et al., 2003).

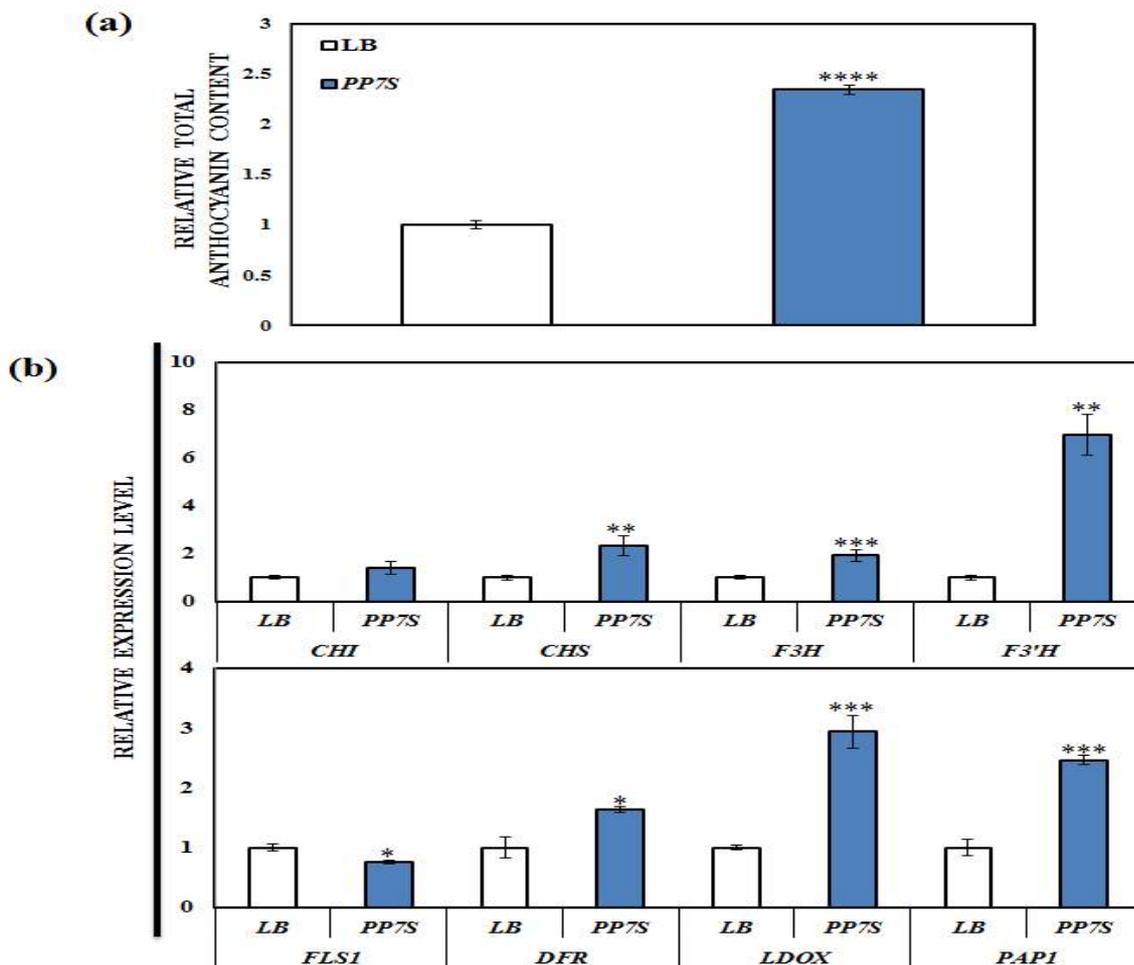


그림. PGPR *PP7S* 공동배양에 대한 안토시아닌 생합성 유전자 발현 조사

- 애기장대와 PP7S 사이의 상호작용을 더 잘 이해하기 위해 박테리아에 대한 식물 방어 반응에 관련된 유전자의 전사 수준을 조사했음(그림 4). NPR1, MPK1, MPK3, MPK4, WRKY3(Gracia-Seco et al., 2015), PP7S는 미생물 관련 분자 패턴 유전자들(MAMP) 중에서 NPR1, WRKY3, MPK3의 전사를 선택적으로 증가시키는 것으로 확인되었음(그림 4). 또한 PP7S는 PR1, PR2, PR2, PR3 및 PR4 등의 PR 단백질 유전자 발현을 모두 상향 조절했다. 이러한 결과는 PP7S가 anthocyanin의 농도를 증가시키고 식물의 성장을 향상시키는 애기장대에서 유도된 전신 반응 동안 특정 신호를 유발한다는 것을 나타냄. 이러한 특성들의 결과로 PP7S가 식물의 성장을 보다 더 효과적으로 촉진했을 것으로 판단됨.

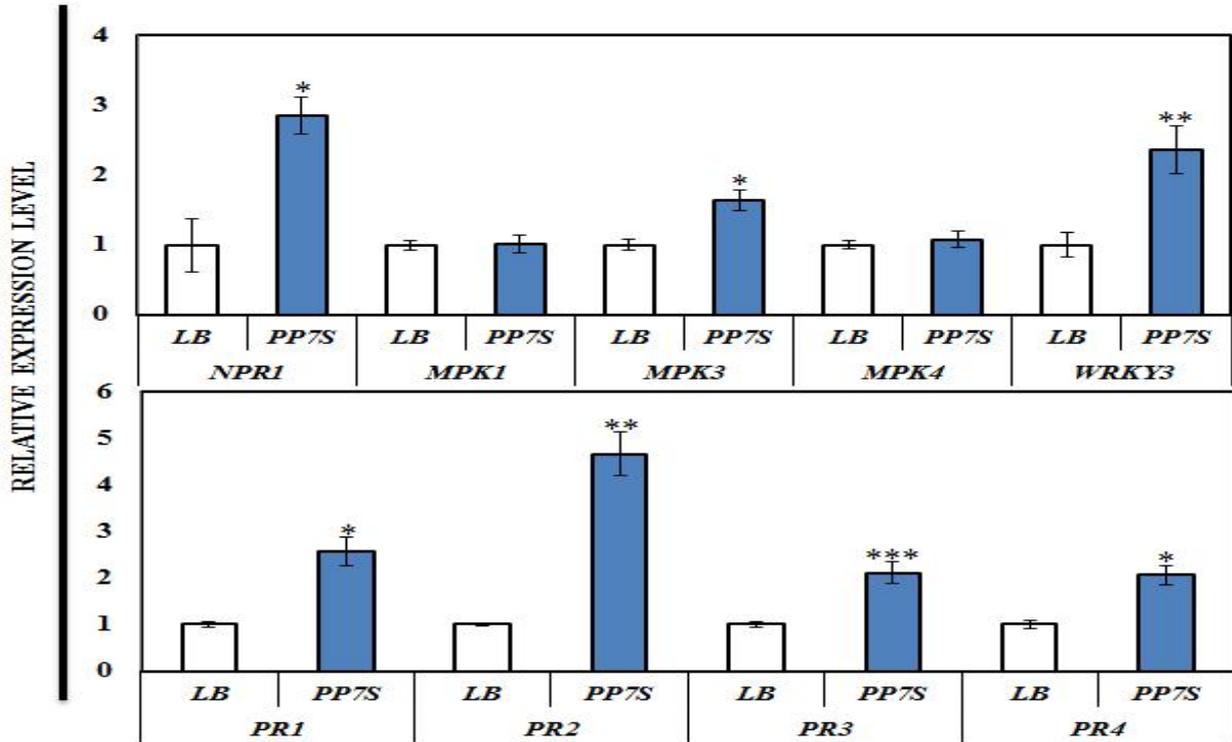


그림. PGPR PP7S 공동배양에 대한 생물적 스트레스 관련 유전자 발현 조사

- PP7S에 의해 자극된 애기장대에서 안토시아닌의 생성이 증가하면 비생물적 스트레스에 대한 저항성이 증가할 수 있는지를 확인하기 위해 애기장대 식물과 PP7S를 공동 배양하였음. 미생물에 의해 유도된 스트레스 내성을 평가하기 위해 가뭄과 염 스트레스를 선택하였음. 그러나 PP7S는 높은 만니톨 조건에서는 성장 촉진 효과를 보이지 않았으며(데이터 미표시). 염 스트레스 조건에서, 대조군과 PGPR 처리된 유묘 모두 감소된 생체량을 보였음. 공동 배양묘 역시 대조군에 비해 생체량이 증가하지 않았음. 그럼에도 불구하고 PP7S는 여전히 고염 조건에서 안토시아닌 축적을 증가시켰음. 또한, MDA와 DPPH assay를 통해 높은 anthocyanin 함량이 높은 염 함량에 의해 야기되는 산화 스트레스를 완화시키는 효과를 조사하였음. lipidperoxidation assay 결과 PP7S는 세포막 손상을 감소시키는데 긍정적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났음. 그러나, PGPR은 처리된 식물에서 ROS 소거 활성을 유의하게 향상시켰음(그림 6c).

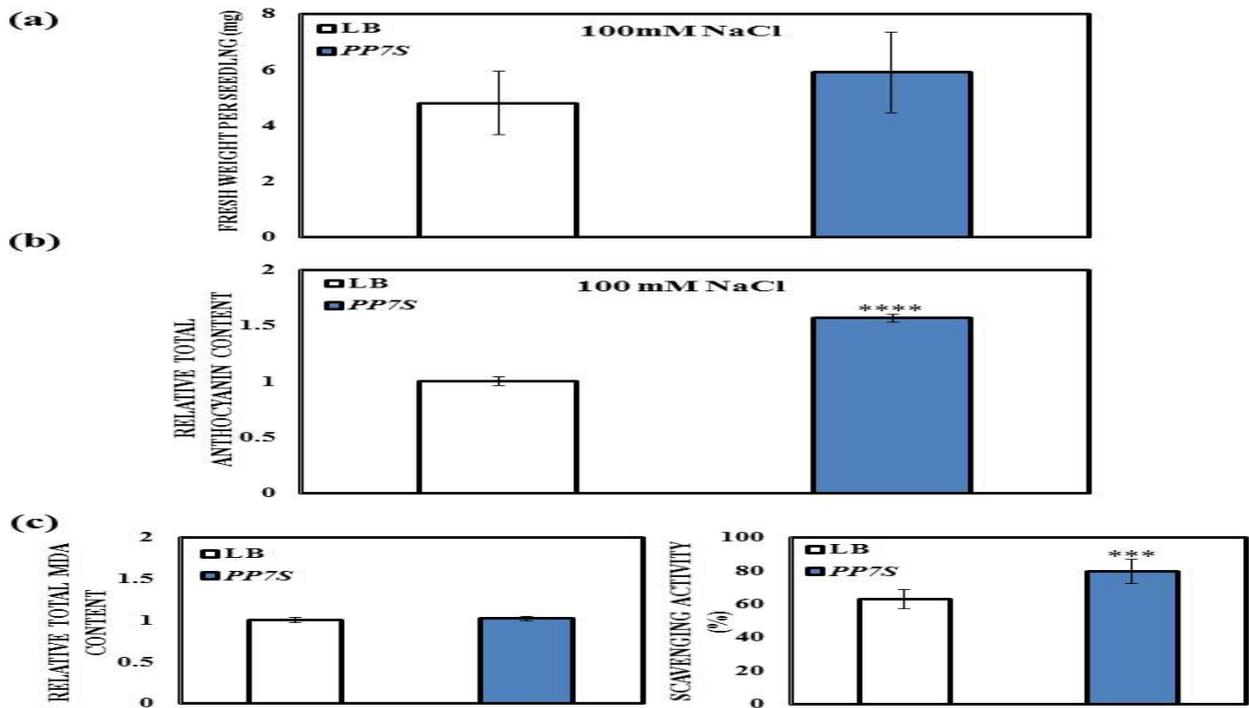


그림. PGPR *PP7S* 공동배양에 대한 안토시아닌 함량 및 산화능 조사 (고염 조건)

- 더 많은 이해를 얻기 위해 *PP7S*는 *PAP1D/fls1ko*와 *ttg1*과 함께 anthocyanin-related mutants를 조사하였음. *PAP1D/fls1ko* 돌연변이체는 *fls1* knock-out 식물을 이용하여 식물을 발현하는 과정에서 *PAP1D*를 교차시킴으로써 획득한 이중 돌연변이체로서, 안토시아닌의 고농도 축적이 보고되고 삼투압 스트레스에 대한 내성이 높은 것으로 알려져 있음(Lee et al., 2016). *ttg1* knock-out 돌연변이체는 안토시아닌의 생합성을 조절하는 주요 전사인자 *TTG1*이 부족하기 때문에 안토시아닌 축적을 억제하는 것으로 알려져 있음(Zhang et al., 2003).
- *PP7*을 이용한 2개의 형질전환 식물체의 공동배양은 식물 생체량을 유의적으로 증가시켰음 (그림 4 a). *PP7S*와 공동 배양한 2개의 형질전환체 중 *PAP1D/fls1ko* 돌연변이체만이 높은 수준의 안토시아닌을 축적하는 반면 *ttg1*에서는 그 함량이 변하지 않았음. 이는 *PP7S*의 식물생장 촉진능이 애기장대에서 안토시아닌 축적을 증가시키는 것과 무관하다는 것을 나타냄.

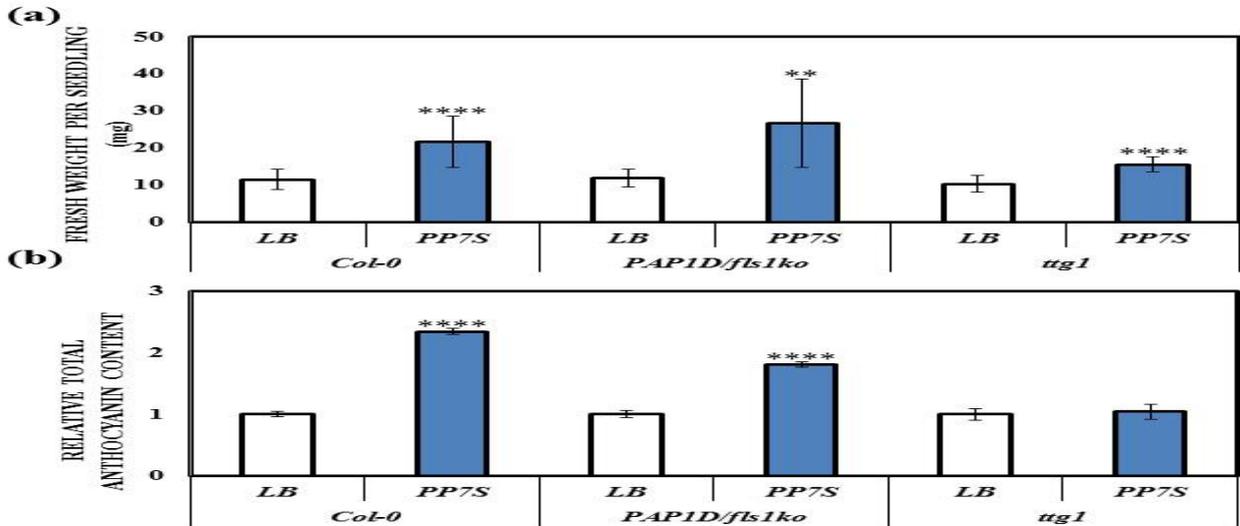


그림. PGPR *PP7S* 공동배양에 대한 안토시아닌 생합성 관련 돌연변이 반응성 조사

- 공동배양된 *PAP1D/fls1ko* 돌연변이체의 플라보노이드 생합성에 관여하는 구조유전자의 qRT-PCR 분석은 F3'H, DFR, LDOX, PAP1 (그림 5, 그림 2b)의 발현 증가와 함께 공동배양된 *Col-0*과 유사한 패턴을 보였음. *ttg1* 돌연변이체에서는, 실험된 유전자의 전사수준이 변화하지 않았음(그림 S1). 이러한 결과는 2개의 돌연변이체에서 안토시아닌 함량과 더 확증되어 *PP7S*의 PGPR 효과를 입증하는 것으로 보임.
- 안토시아닌이 생물 및 비생물적 스트레스에 의해 야기되는 산화적 문제를 완화시킬 수 있다는 것은 잘 알려져 있음(Rowan et al., 2009; Catala et al., 2011; Koops et al., 2011; Lei et al., 2011; Tohge et al., 2013; Nakabayashi et al., 2014). 본 연구는 *PP7S*가 anthocyanin 과다 축적 돌연변이주인 *PAP1D/fls1ko*에서도 anthocyanin 생합성과 축적을 유의하게 유도함을 밝혀냈음.

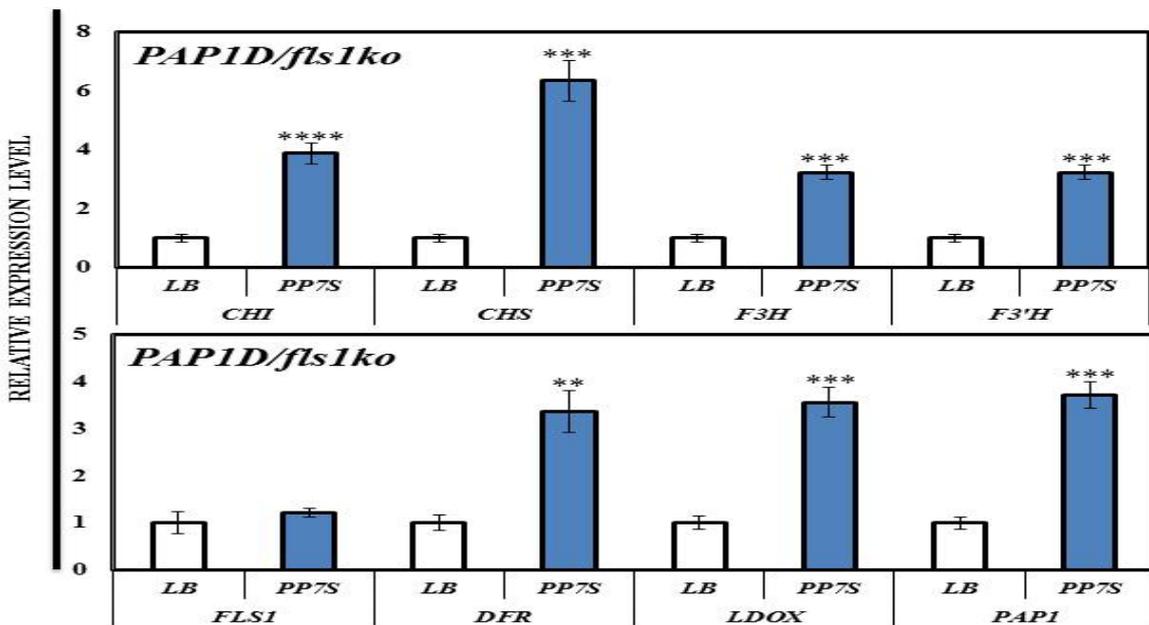


그림. PGPR *PP7S* 공동배양에 대한 안토시아닌 생합성 관련 돌연변이 유전자 발현 조사

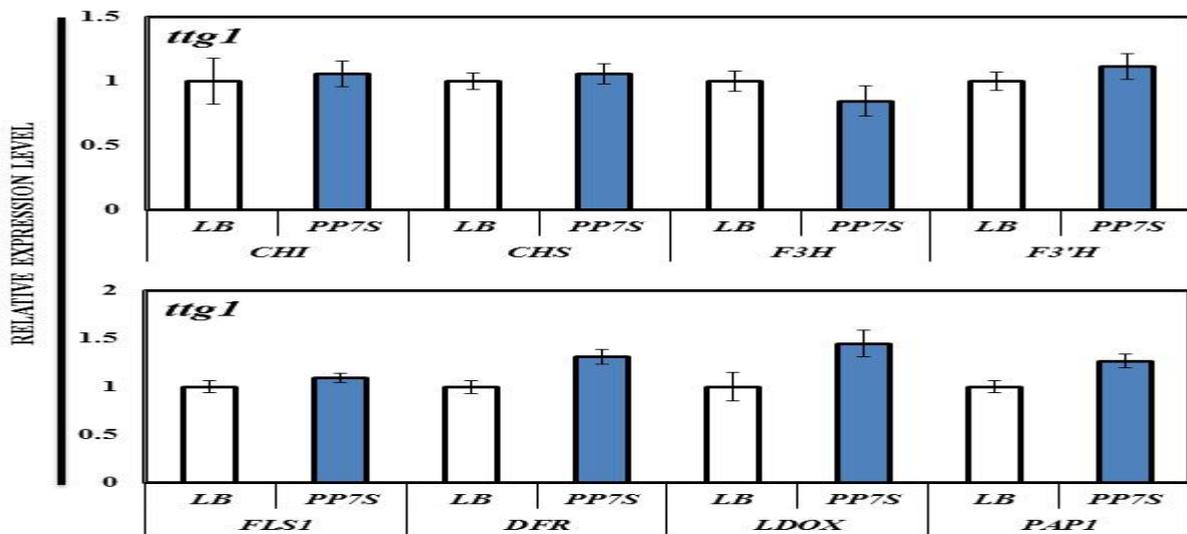


그림. PGPR *PP7S* 공동배양에 대한 안토시아닌 생합성 관련 돌연변이 유전자 발현 조사

- *PP7S*에 의한 애기장대의 발달을 촉진하는 생물학적 기전을 더 연구하기 위해 많은 성장 관련 유전자 (그림 S2)의 전사를 분석하였음. *PP7S*에 반응하여 *ERF1*가 과발현되는 것을 확인하였고, 이는 에틸렌 신호전달과 반응 경로가 성장 촉진의 기전에 관여할 수 있음을 시사함. *PP7S*를 처리한 묘목은 에틸렌 효과의 증상을 보였지만 *PP7S*에 의해 에틸렌 센서 유전자 *EIN1* (Hall et al., 2012; Hung et al., 2016)의 전사는 변화되지 않았음을 확인하였음.
- 이는 PGPR이 애기장대에서 *ERF1*의 다른 비에틸렌 관련 기능에 특이적으로 영향을 미치기 때문일 수 있음. *ERF1*은 수많은 에틸렌/재스모네이트 신호전달체계를 양성적으로 조절하며, 미생물 및 초식동물에 대한 식물 방어기작의 활성화를 촉진시키는 것으로 알려져 있음(Lorenzo et al., 2003; 2013; Xu et al., 2014). *ERF1*의 이러한 상향 조절은 미생물에 대한 식물의 전신 반응에 기인할 수 있는데, 본 연구에서는 식물-미생물 상호작용에 관여하는 유전자의 발현을 조사하여 *PP7S*에 반응하는 식물의 주제 메커니즘을 더 탐구하였음. MRRs를 통한 MAMP의 인식은 미생물의 침입에 대한 식물 방어 메커니즘의 첫 번째 단계임(Jones and Dangl, 2006; Newman et al., 2013; Vetter et al., 2016). 그 후, MAMP는 일련의 복잡한 ISR을 유발하고 MAMP-triggered 면역(MTI)을 유도하는 것으로 알려져 있음(Newman et al., 2013). 방어반응은 ROS 생성, 반응성 질소종 생성, 세포벽 개질, 항균성 화합물 분비, 병원체 관련 단백질 생합성(Newman et al., 2013)을 포함하는데, *PP7S*의 발현이 증가된 유전자는 *NPR1*, *MPK3*, *WRKY3* (Garcia-Seco et al., 2015)이었고, 그 다음 모든 PR 유전자 (그림 3)의 발현이 증가한 것은 *PP7S*의 전신 유도가 애기장대에서 ISR의 전달 경로를 따라 진행되었음을 의미함..
- ROS가 *Arabidopsis*에서 안토시아닌 생산을 유도한다는 것을 고려할 때 (Kim et al., 2017; Xu et al., 2017) *PP7S*에 의해 유도된 MTI는 공동 배양된 Col-0 식물에서 안토시아닌의 생합성과 축적을 강화시킴. *PR1*, *PR2*, *PR3* 및 *PR4* 유전자는

PP7S에 반응하여 상향 조절되었으며, 이는 식물이 PGPR을 잠재적 위협으로 인식한다는 것을 나타냄(Park et al., 2000; Ramamoorthy et al., 2002; Schilir et al., 2012; Garcia-Seco et al., 2015). 그러나 PP7S 처리가 Col-0 식물에 미치는 부정적인 영향은 유의하지 않았음. 따라서 PR 유전자의 유도는 PP7S와 유사한 MTI를 유발하는 유해균에 대한 식물의 병원체 획득 저항성을 향상시킬 수 있음(Sudisha et al., 2012). 또한, PR 단백질은 바이러스의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다(Sudisha et al., 2012). 따라서 식물에서 PP7S는 생물 스트레스에 대한 저항성을 유도하는 데 사용될 수 있음.

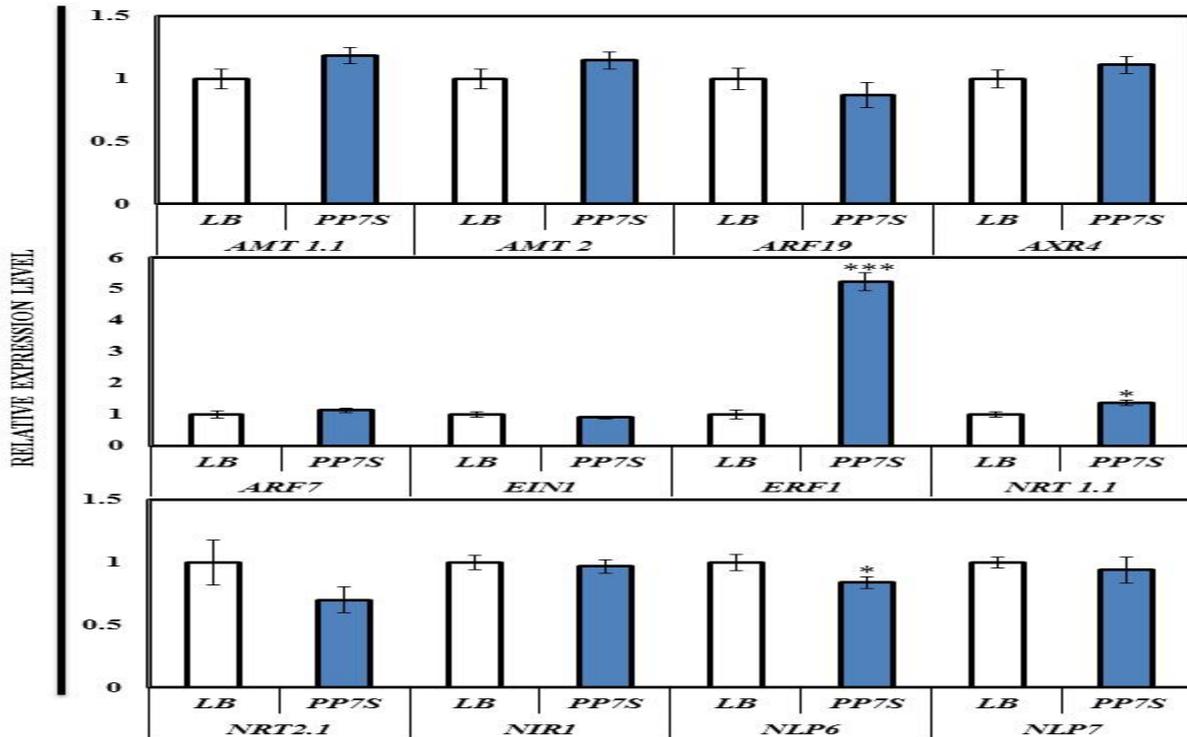


그림. PGPR *PP7S* 공동배양에 대한 암모늄 수송 및 질산염 관련 유전자 발현 조사

(다) *Bacillus subtilis* Y16

- 발아 후 4일째 *A. thaliana* 유묘를 토양 미생물이 접종된 (10^9 CFU mL⁻¹) MS 한천 고체 배지로 옮겨 배양을 계속하였다. 토양 미생물이 없는 미생물 배양 용액 (LB)을 컨트롤 실험에 사용되었음. *Arabidopsis thaliana* 식물은 23 ° C, 16 : 8 h 광 / 암 및 60 % 상대 습도에서 식물 성장 챔버에서 8일 (GUS 염색의 경우 4일) 동안 수직으로 재배하였음. 옥신 축적 정도는 옥신이 존재할 때 파란 색으로 염색되는 형질전환체 식물을 이용하여 다양한 토양 미생물을 스크리닝하였음.

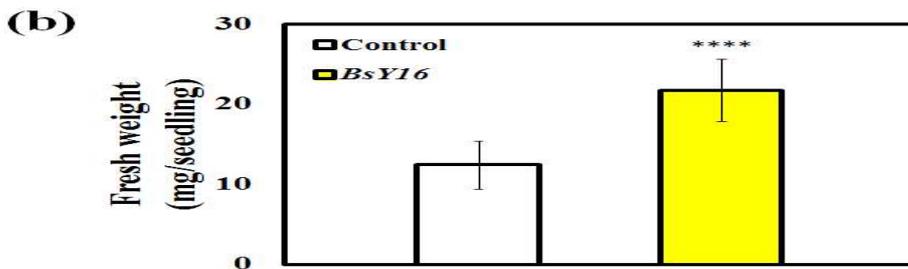
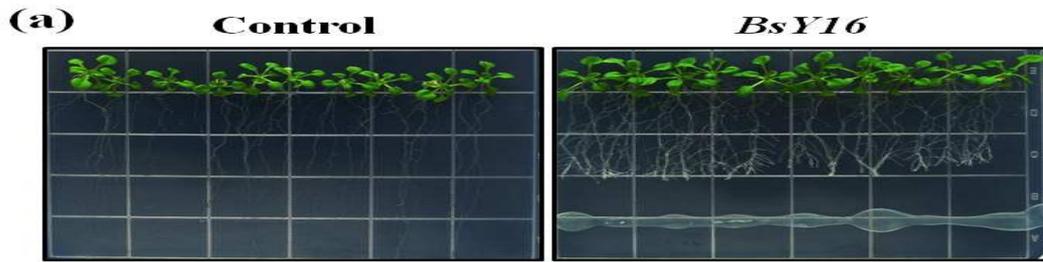


그림. PGPR BsY16 공동배양에 식물 성장 조사

- 아래 그림에서 볼 수 있듯이, 우리는 토양에서 분리한 *Bacillus subtilis* Y16(BsY16)을 선별해 발아 후 4 일째 애기장대 유묘를 2 % 자당으로 보충된 MS 한천 배지로 옮겼고 이 때 BsY16가 접종된 배지와 그렇지 않은 배지를 대조군으로 하여 함께 12일 동안 배양하였음. 이후 유묘의 무게를 측정하였는데, 결과는 콘트롤과 비교할 때 BsY16이 접종된 Col-0 유묘에서 성장 촉진이 뚜렷하게 발견되었음.
- 측뿌리의 길이 또한 증가했지만, 1차 뿌리 길이는 대조군(그림 5)과 비교할 때 짧을 것으로 나타났음. 대신 우리는 뿌리털이 BsY16 처리 유묘에서 훨씬 더 많이 자라고 있는 것을 확인하였음(그림 5). BsY16 처리 유묘의 경우 분자기전을 조사하기 위하여 *Cyclinb1* promoter와 융합된 GUS 리포터 유전자를 가진 형질전환체 *CyclinB1pro-GUS* 식물을 이용하였음. 그림에서 보는 바와 같이 세포 분열 촉진 신호가 더 강하게 BsY16 처리 유묘에서 나타는 것을 확인할 수 있었음.

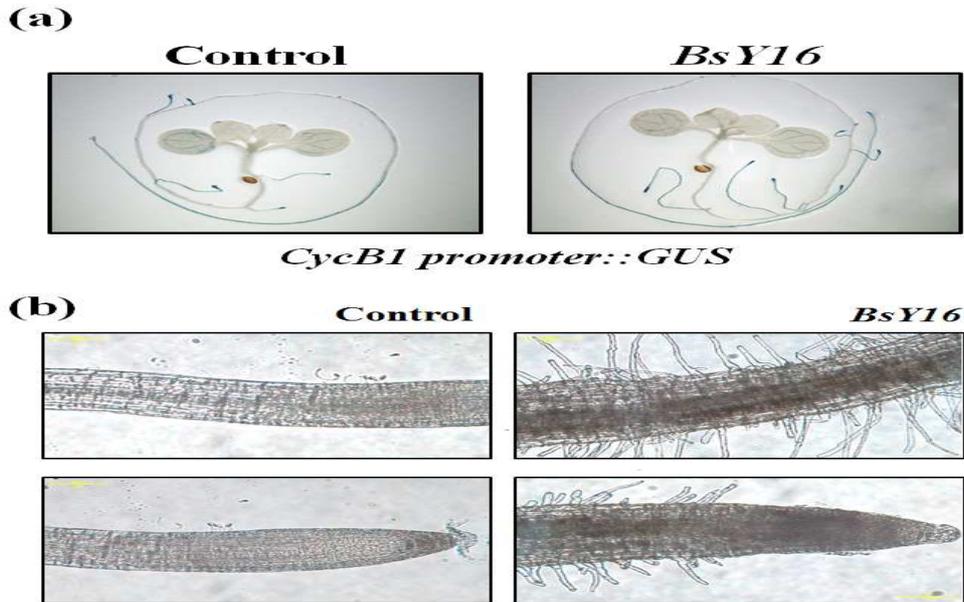


그림. BsY16의 식물 세포 분열 촉진 기능성

- 그림 7에서 보는 바와 같이 뿌리의 옥신 축적 능력이 더 강하게 BsY16 처리 유묘에서 나타는 것을 확인할 수 있었음. 다음으로, 옥신이 PGPR로 인한 성장 차이에 관여하는지 확인하기 위해 우리는 옥신에 대한 반응으로 GUS 활동이 향상된 DR5:GUS 식물을 사용하여 조사하였음.
- 그림에 표시된 대로 우리는 BsY16으로 처리된 식물의 뿌리 끝이 통제 식물보다 훨씬 더 많은 GUS 활성을 보임을 확인하였음. 그러나 뿌리 끝을 제외한 잎이나 줄기와 같은 다른 조직에서 BsY16의 존재 또는 부재에 따라 GUS 활성에 차이는 없었음(그림 7A). 식물 성장을 촉진하는 PGPR의 특징 중 하나는 식물 호르몬을 직접 생산하거나 식물의 항상성을 조절하는 것임(Lugtenberg and Kamilova, 2009). 사실, 식물 호르몬을 생산하는 다양한 박테리아 균주의 영향이 알려져 있음. rhizobium의 경우, 박테리아의 약 80 %가 인돌 아세트산 (IAA) (Ahmed and Hasnain, 2014; Duca et al., 2014)을 생산하는 것으로 보고되었음.
- 따라서 BsY16은 식물 성장을 위해 옥신을 합성하는 미생물로 간주될 수도 있음. 따라서 BsY16 처리균이 대조군보다 더 많은 옥신 신호전달 경로를 활성화시키는 지 여부를 결정하기 위해 qRT-PCR을 사용하여 ARF19, ARF7 및 AXR4와 같은 옥신 신호 유전자의 mRNA 발현 수준을 결정하였음. 예상했던 것과는 달리, 이러한 유전자는 대조군과 BsY16 처리 된 식물 사이의 전사 수준에 큰 차이를 보이지 않았음(그림 7B). 그리고 암모니아 관련 유전자의 발현을 조사했는데, 그 차이는 크지 않았으나, 일부 유전자에서는 BsY16 치료 식물의 일부 유전자의 전사 수준이 감소했음을 확인했다(그림 74B).

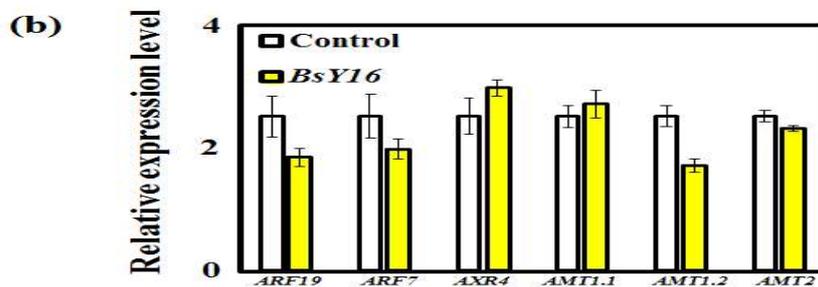
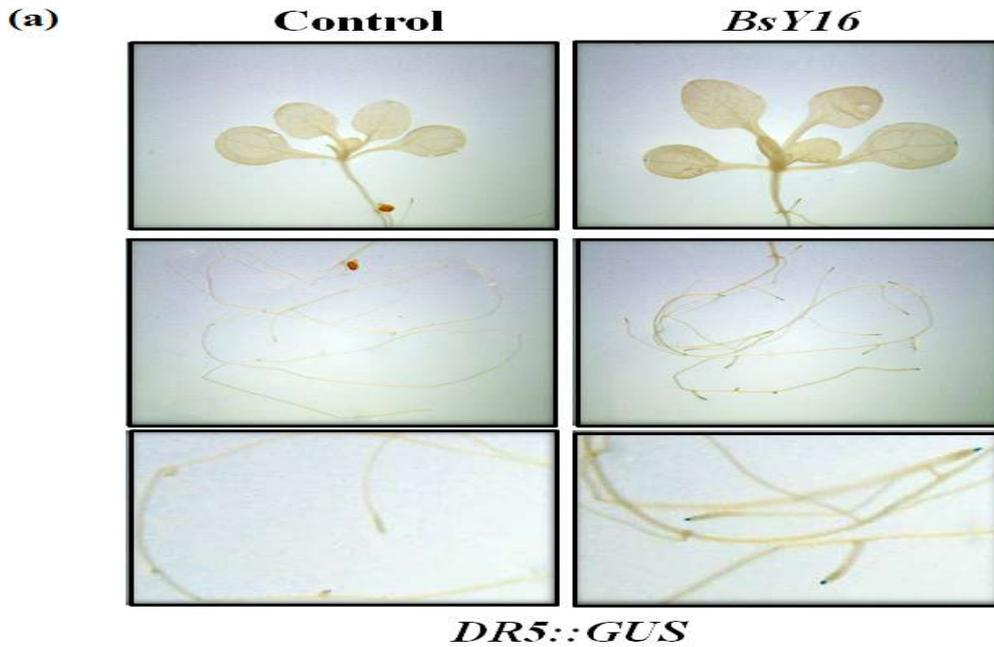
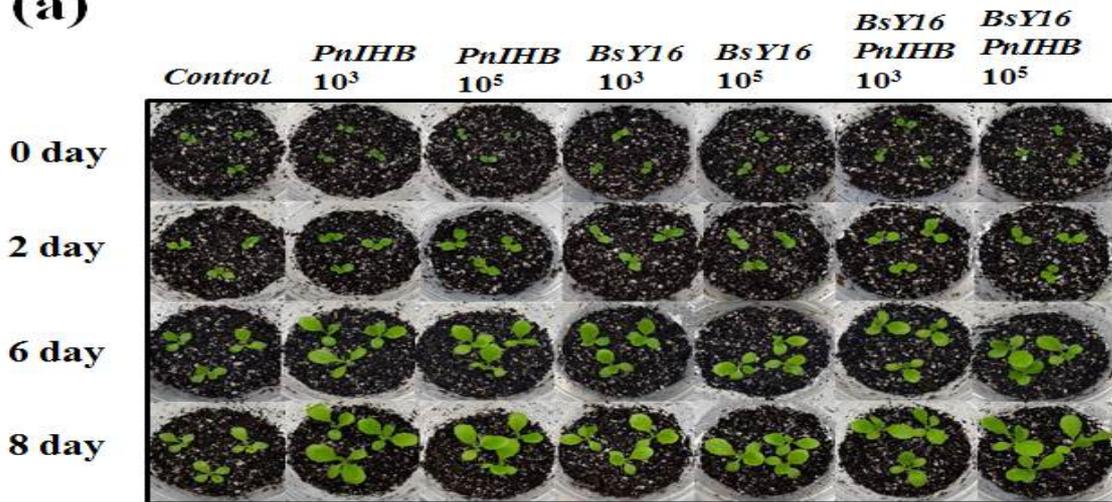


그림. BsY16의 식물 뿌리 옥신 축적능 증진 기능성

- 아래 그림에서 보듯이, 우리는 토양 매개 미생물 선별 후 획득한 BsY16을 분리하여 MS 배지 대신 멸균 토양에서 상추의 성장을 조사하였음(Trinh et al. 2018). BsY16의 16S rDNA의 부분 서열은 Bs Y16의 16S rDNA 서열과 99% 이상의 유사성을 보였음(Khanet al., 2017).
- 식물의 성장 촉진이 Pn IHB와 BsY16의 차이를 관찰하기 위해 Pn IHB, BsY16 또는 둘 다 5일 된 상추의 살균 배지를 접종하였음. 그림에서 보듯이, Pn IHB와 BsY16은 접종 후 6 일째 뚜렷한 성장 촉진 효과를 보였음. Pn IHB와 BsY16이 공동 접종되면 식물 생장이 가속화되지 않을까 생각했지만 결과는 그렇지 않았다(그림. 1A). 뿌리와 싹 무게를 결정했을 때, Pn IHB와 BsY16에 의해 생장이 유사하게 촉진되는 것으로 나타났음. 이는 이러한 PGPR이 식물 전체의 바이오매스 증가에 기여했음을 나타냄. 애기장대의 생체량 증가 또한 동일하게 유도하는 것으로 보였음(그림 1B). 또한, BsY16의 성장 촉진효과는 밀(*T. aestivum*) (그림)에서도 뚜렷하게 나타났음. 아마도 이 두 가지 PGPR을 동시에 접종할 경우 생체량 증가에 시너지가 나타나지 않은 것은 충분한 양의 PGPR 박테리아에 의해 이미 생장이 최대화되어 더 이상 성장 촉진을 일으키지 않는 유사한 경로를 통해 작동할 가능성을 생각해볼 수 있음.

(a)



(b)

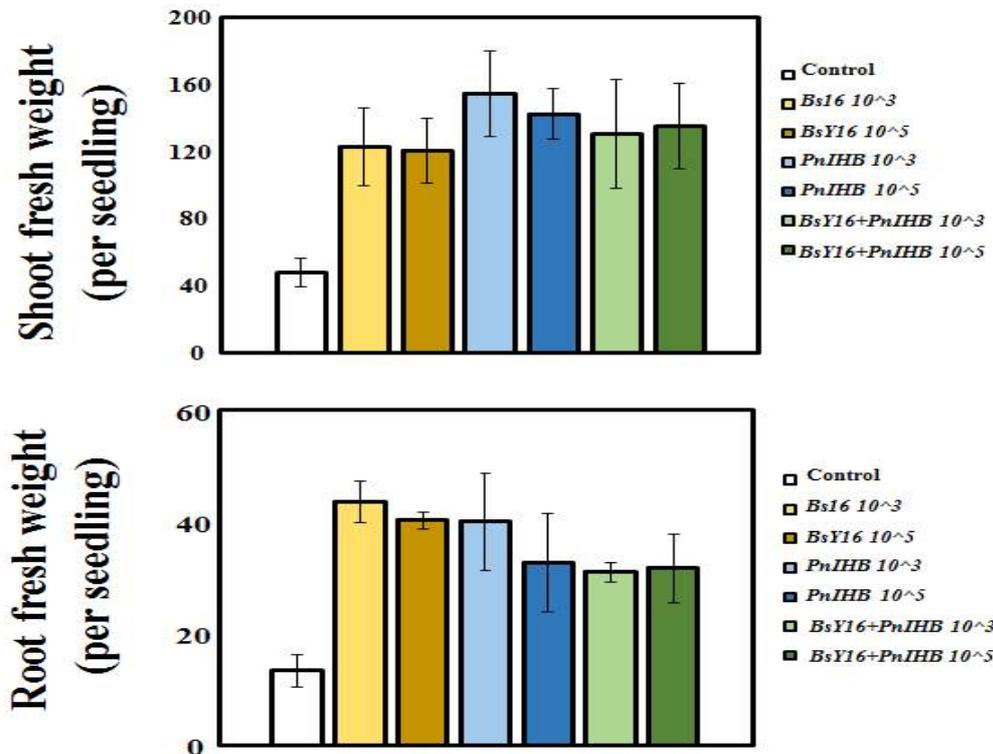


그림. BsY16의 상추 성장 촉진 기능성

- 질소는 식물의 성장에 매우 중요한 요소이다. 따라서 우리는 질소 수송 단백질 유전자의 발현을 측정하였음. NRT1과 NRT2 단백질은 질소 수송에 중요한 역할을 함. BsL1은 NRT1.1의 발현에는 거의 영향을 미치지 않았지만, NRT2.1,2.2, 2.5, 2.6 (그림)을 포함한 NRT2 유전자의 발현은 증가하였음. Arabidopsis NRT1.1은 CHL1과 NPF6.3으로 알려져 있으며, 가장 많이 연구된 질소 수송 유전자 중 하나이다. 1993년, 1993년 NRT1.1이 발견된 이후, 많은 연구들이 식물에서 질소 흡수와 수송 메커니즘의 원리를 밝혀냈음(Wang et al. 2012).

- 대부분의 HATS 활동은 NRT2.1 (Miller et al. 2007)에 의해 수행되는 것으로 보이는데, 실제로 NRT2.1null 돌연변이체는 HATSactivity의 상당 부분(최대 75%)을 잃는 것으로 나타났음(Cerezo et al. 2001; Filleur et al. 2001; Li et al. NRT2의 발현이 NRT2의 발현을 증가시켜 BsY16 처리 식물에서 NRT2의 발현이 증가하였으며, BsY16 처리 식물뿐만 아니라 대조군의 질산염 함량도 증가하였음. BsY16 처리구의 대사가 더 효율적으로 이루어졌는지 확인하기 위해, 우리는 식물에서 NR의 활성을 조사했음. 그림에서 보듯이, BsY16 처리구에서 NR의 활성은 대조군보다 약 4배 정도 높았음. BsY16 반응하여 질산염을 감소시키는 효소 활성이 증가되었지만 질산 환원효소(NIA1, NIA2)를 암호화하는 유전자의 발현 수준은 감소되었음(Fig.5D). 질산염 환원 효소 활성은 식물 적응에 매우 중요하며, NR 활성은 엄격하게 조절되므로 Bs L1이 NR 활성을 증가 시키므로 음성 조절에 의해 전사 수준은 없어질 수 있음. Bs L1 처리된 식물에서 NR의 높은 활성을 감안할 때, 우리는 이러한 식물이 낮은 질산염 조건에서 더 잘 자랄 수 있다고 추측 가능함.

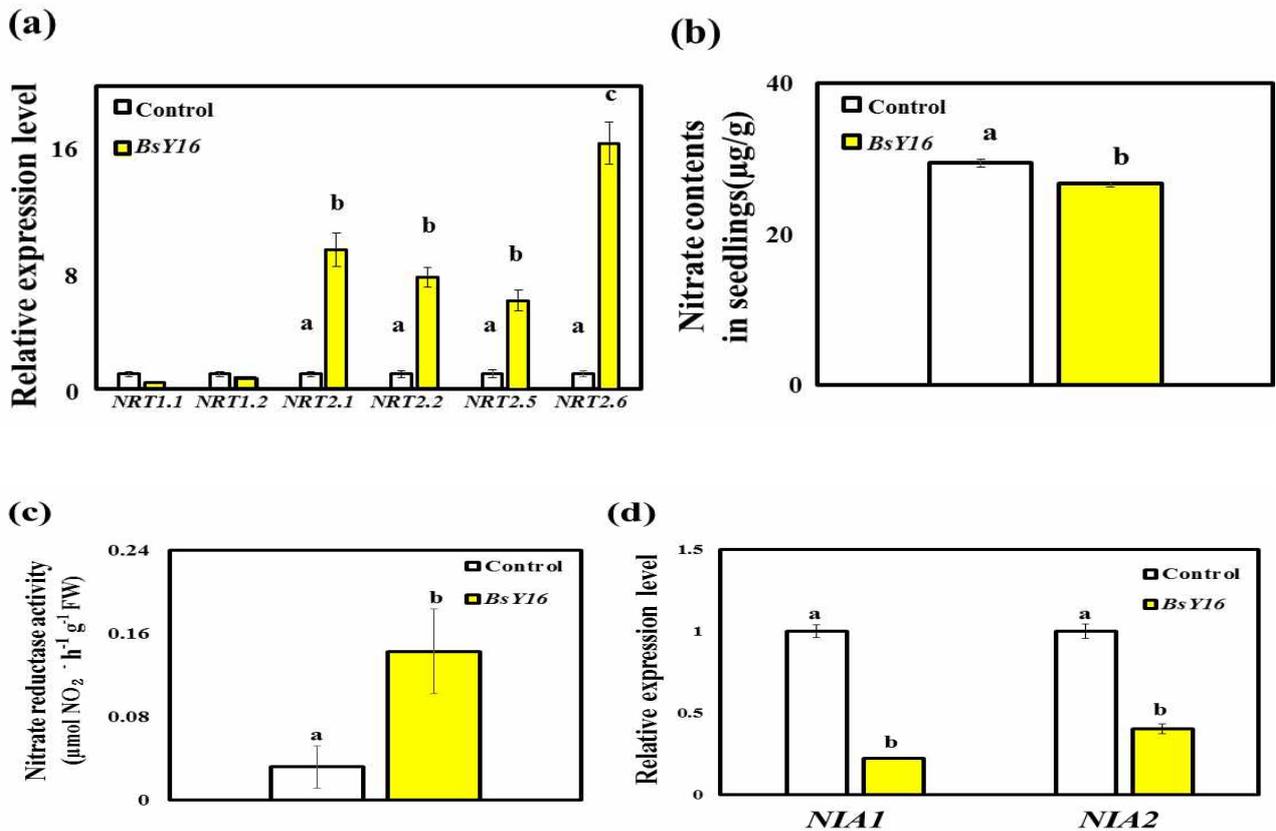


그림. PGPR BsY16 공동배양에 대한 질산염 관련 반응 조사

- 결론적으로, BsY1은 식물의 질소 신호 전달 경로의 활성화를 통해 식물의 성장을 촉진하는 것으로 판명되었음. 향후 BsY16의 식물성장 촉진 기작을 규명하기 위한 연구가 더 필요한 것으로 보임. 질소는 식물의 성장을 위해 없어서는 안 될 물질임. 그러나 불행하게도 작물은 적절한 양의 질소가 부족한 토양에서 재

배되는 경우가 많음. 그 결과 매년 많은 양의 질소 비료가 사용되며, 작물의 질소 사용 효율이 낮기 때문에 상당한 양의 비료가 환경에 유출되어 심각한 환경 피해를 일으키는 것으로 알려져 있음(Diaz et al., 2008;Robertson et al., 2009). 따라서 식물에서 질소대사효소의 활성을 증가시킬 수 있는 PGPR의 적용은 농업에서 질소비료 사용을 감소시키고 비료 관련 환경오염을 해결하는데 도움을 줄 것임.

2-4 연구개발성과

(1) 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	High accumulation of anthocyanins via the ectopic expression of AtDFR confers significant salt stress tolerance in <i>Brassica napus</i> L.	Plant cell reports	이호정	36	미국	Springer	SCI	2017.04	
2	Evaluation of the plant growth-promoting activity of <i>Pseudomonas nitroreducens</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>Lactuca sativa</i>	Plant cell reports	이호정	37	미국	Springer	SCI	2018.03	
3	Paenibacillus pabuli strain P7S promotes plant growth and induces anthocyanin accumulation in <i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant Physiology and Biochemistry	이호정	129	미국	Elsevier	SCI	2018.06	
4	AtMybL-O modulates abscisic acid biosynthesis to optimize plant growth and ABA signaling in response to drought stress	Applied Biological Chemistry	이호정	61	한국	한국응용생물화학회	비SCI	2018.06	

(2) 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국응용생명화학회	김주희	2017.01.18	용평리조트	대한민국
2	한국분자세포생물학회	김주희	2017.06.15	부산해운대그랜드호텔	대한민국
3	한국분자세포생물학회	이지민	2018.01.18	용평비발디파크	대한민국
4	한국응용생명화학회	Cao Son	2018.06.18	ICC, JEJU	대한민국
5	한국응용생명화학회	이지민	2018.06.19	제주 컨벤션센터	대한민국
6	한국분자세포생물학회	이지민	2019.01.16	용평리조트	대한민국
7	한국응용생명화학회	이지민	2019.06.20	부산해운대그랜드호텔	대한민국
8	한국응용생명화학회	이나현	2019.06.20	부산해운대그랜드호텔	대한민국

(3) 지식재산권

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	슈도모나스 나이트로리듀센스 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 식물성장 촉진용 미생물 제제	대한민국	고려대학 교 산학협력 단	2017.07. 28	10-2017-00 96057				100

(4) 연구인력양성

No	분류	기준 년도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	취업	2017		1			1		1					
2	진학	2017		1			1		1					
3	취업	2017		1			1		1					

(5) 전시회 참가

No	유형	행사명칭	전시품목	장소	활용년도
1	전시회	중국 상해 CAC 전시회	미생물제품 홍보	중국 상해 신 국제박람센터	2017
2	전시회	중국 상해 CAC 전시회	미생물제품 홍보	중국 상해 신 국제박람센터	2018
3	전시회	2018 태국 농자재 박람회	미생물제품 홍보	BITEC 방콕	2018

(6) 수출계약

No	수출명	수출내용	계약일	수출액(원)
1	ADNGARD PGPR-Fertiliser	PGPR 미생물(Bacillus subtilis) 함유한 복합제제 시제품 수출 및 샘플 공급	2019.10.02	15,005,300

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표 및 수행내용

세부연구목표	연구개발 수행내용
원예작물 PGPR 근권 활착 개선 원료 선별 및 제형화	- 작물생장활성능을 가진 추출물로 원예작물 근권 PGPR균 활착능 개선을 위한 바이오비료 소재 스크리닝 및 선별
기능성 및 천연물 추출물의 단제 후보물질 선별과 이들을 이용한 추출 및 혼합기술개발	- 작물활성물질을 이용한 미생물 배양시험 및 미생물 배양액 혼합 조건 시험
원예작물 농가 유래 우수 PGPR균 선별 및 분리	- 원예작물 농가의 근권 미생물을 동정하여 확보하여 기능성 스크리닝
우수 PGPR균 선별을 위한 효율적 마커 식물 스크리닝 시스템 확립	- 식물생장촉진을 효과적으로 검정하기 위하여 다양한 리포터 유전자 시스템을 개발하였음. - 리포터 유전자를 내재한 모델식물을 이용하여 150 여종의 토양 미생물의 식물 성장활성을 검정하였음.
1차 선별된 우수 PGPR균을 대상으로 상추 모종에서의 성장 활성능 검정	- 모델식물에서 선별한 PGPR을 대상으로 실제 농작물인 상추의 성장활성을 2차로 검정하였음.
기능성 및 천연물의 단일 추출물을 이용한 복합제제의 식물활성촉진 검정	- 작물 성장활성능을 가진 추출물과 원예작물 근권 PGPR균의 생균수 유지 조건 확립
작물활성 후보물질 선별과 이들을 이용한 혼합기술 개발	- 작물활성물질(아미노산, 해조추출물 등)과 원예 근권 PGPR균 혼합의 제품화를 위한 제형화 검토
선별된 우수 PGPR균의 식물생장촉진 능력 검정	- 선별된 우수 PGPR균의 IAA생산 능력 외에 인산가용화, Sidropore, 질소 고정화능을 개별 확인
선별된 우수한 PGPR 균의 특성 검정	- 선별된 우수 PGPR 균주의 계통 분석 지도를 작성
PGPR 바이오비료 원예작물 성장 검정	- 식물생장촉진을 효과적으로 검정 가능한 리포터 유전자 시스템을 이용하여 150여종의 국내 채소 재배지 토양 유래 우수 PGPR 균의 스크리닝을 완료하였음. - 이들 중 3종을 엄선하여 상추를 대상으로 한 성장 및 특성 검정을 완료하고 복합 활성 성분 스크리닝을 완료하였음. - 선별한 PGPR 3종의 조합 및 기타 성장 촉진 활성 성분 조합 비교를 완료하였음.

3-2. 평가의 착안점 및 기준에 따른 목표달성도

평가항목	비중(%)	연구결과	달성도(%)
가능성 및 천연물의 단일 추출물을 이용한 복합제제의 식물활성촉진 검정	10	- 미생물 배양 배지를 재검토한 결과 기존 YOD배지에 서 BM배지로 검토 확정 - 미생물 유지 및 제품화를 위해 단일 아미노산의 가능성이 검토	100
작물활성 후보물질 선별과 이들을 이용한 혼합기술 개발	10	- 분상제 형태로 미생물 배지의 증량제 시험 결과 미생물의 밀도수가 유지되는 옥수수 추출물 등을 선정 - 입제 및 액상제형을 위한 예비시험에서 미생물의 밀도 유지 및 작물활성 효능 보조제로 휴믹산의 가능성을 확인	100
시제품의 최종 제품화 기술개발	60	- PGPR 미생물(Bacillus subtilis) 함유한 아미노산/칼슘/아연의 복합제제의 시제품 수출 및 PGPR 미생물(Bacillus subtilis) 함유한 granule fertiliser 의 샘플 공급	100
선별된 우수한 PGPR 균의 특성 검정	10	- 선별된 우수 PGPR균의 gDNA를 이용, 16s rRNA를 통해 균을 동정 및 유전체 지도 작성	100
PGPR 바이오비료 원예작물 생장 검정	10	- 상추의 성장촉진 활성 검정 및 촉진을 위한 생리 검정을 완료하고 3종의 조합 및 기타 생장 촉진 활성 성분 조합 비교를 완료 - 관련 PGPR의 특허 출원	100
합 계	100		

3-3. 관련분야 기여도

가. 기술적 측면

○ 기존의 연구는 작물의 생장을 보는 형질 중점적 스크리닝을 위주로 연구가 진행되었으나 본 연구에서는 다양한 분자 표지 마커를 이용하여 PGPR의 스크리닝을 대량으로 할 수 있다는 점 또한 타 연구와 차별성을 가지는 것으로 나타남. 특히, 따로 시판되던 다양한 식물성장촉진능을 가진 원료 물질과 PGPR균의 배합은 식물의 생장을 촉진 할 뿐만 아니라 PGPR의 근권 활착에도 우수한 기능을 부여할 것으로 판단되며, 이는 PGPR균과 식물성장촉진물질간의 시너지 효과를 창출하여 오래도록 PGPR의 효과가 토양에 남아 작물의 성장능을 활성화시킬 것으로 판단됨

○ PGPR균은 작물의 성장촉진을 유도하는 기능 이외에도 최근의 연구에 따라 작물의

환경 및 비환경적 스트레스에 대한 내성을 촉진시키는 기능도 있는 것으로 보고되고 있음. 작물은 토양에서 자랄 경우 끊임없이 변화하는 환경에 노출되어 가뭄이나, 고염, 고온 스트레스에 의해 생산량이 감소하게 되는데 PGPR에 의해 이러한 환경 스트레스에 대한 내성이 증가하는 것으로 알려져 있음. 따라서, 본 과제에서 개발하게 될 복합바이오비료는 작물의 성장촉진 뿐만 아니라 이상기후에 따른 각종 환경 스트레스에 대한 내성도 증진시켜 작물의 생산성 증대에 크게 기여할 것으로 추정됨

- PGPR의 효과를 오래 지속하기 위한 궁극의 방법으로 이들 균의 담체 고정화 조건의 최적화를 연구 또한 기존 연구와 차별성을 가짐. 이를 위하여 선별된 담체 및 보조제의 비율, 담체의 크기 조절, 부형제 선택등의 다양화를 통하여 복합바이오비료의 효용 기간을 늘이고자 함
- 선진국 농산업 분야는 최근 소재 중심의 산업으로 재편되고 있음. 이는 소재의 발굴, 개량, 상용화, 공급과 관련한 산업군이 농산업 분야 대부분의 가치를 창출할 것으로 보기 때문임. 따라서, 본 연구의 개발결과는 선진국 농산업의 소재중심 분야와 맞물려 수출 증진에도 크게 기여할 것으로 예상됨
- 특히 생물자원은 에너지 자원과 함께 미래 자원경쟁의 핵심 대상으로 보고 있음. 현재 본 연구진의 구성은 세계적인 수준으로의 도약 가능성이 높은 3개 농산업 소재 관련 전공으로 구성되어 있어 새로운 유전자원 및 천연물자원 확보와 더불어 기반 기술로서의 프리미엄을 창출할 가능성이 높음

나. 경제적·산업적 측면

- 국내 유기농업자재는 해외 원료의 의존도가 70% 이상으로 기업의 자체 개발제품을 찾아보기 힘든 현실이며, 이에 연구과제를 통해 뛰어난 기능을 갖는 자체 제품화 기술을 보유하여 홍보함으로써 국내뿐만 아니라 해외수출에 기여 가능함
- 현재까지 PGPR균을 포함한 국내외 제품들은 PGPR균에 중점을 두었고, 바이오비료와의 결합을 통한 복합바이오비료 형태의 제품은 국내는 물론 해외에서도 시도된 경우가 없음. 따라서 본 과제의 결과가 국내 및 해외에서 판매될 새로운 제품이 될 것임
- FTA 및 GR 대비 국제 경쟁력 갖춘 복합다기능성 바이오 천연 식물성장촉진제 개발로 농업용 수입 천연물, 기능성 제재의 수입 대체효과 및 수출 경제력 창출 가능
- 무역자유화에 따른 농업산물의 국제 유통망 확대, 즉 다자간 FTA를 통한 중국 농업산물 도입으로 인한 국내 농산물의 가격 경쟁력 감소에 대한 우려는, 역으로 중국내 고급 농산물에 대한 수요 증가에 따른, 고급 농산물의 시장 확대에 기여 가능성을 높이는 계기로 작용
- 농산물의 고급화는 생명공학 기술이 집적될 수밖에 없음. 기존의 수량 확대와 경제성

을 이유로 사용되었던, 농산업 분야의 소재들 (유기합성기반 살균제, 살충제, 제초제, 비료)등은 친환경 고품질 안전한 농산물이라는 패러다임에 맞지 않음. 따라서 농산업의 생명공학 기술이 도입된 기술 집약형 농산업 발전에 기여 가능함

- 외국 글로벌 기업에 의해 중속적인 국내 농산업 분야의 질적 변화가 필요와 동시에, 본 과제에서 제품 개발에 대한 패러다임 변화는 국내 농산업 기업의 첨단 생명공학 기술 기반 제품의 생산과 해당 기업의 글로벌화를 통한 시장 확대를 촉진 할 것으로 기대되어 이 분야를 주도할 농산업 분야의 생명공학 전문가 육성에 기여 가능함

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 연구개발 결과의 활용방안

가. 친환경 농자재 개발 활용방안

- 원예작물 뿌리 활착 우수 PGPR균과 식물추출물, 동식물성 부산물 등의 국내외에서 기능성, 천연물 토종자원을 이용하여 작물생육활성촉진을 위한 혼합 복합제를 개발하고, 대량생산 및 실용화를 위한 과정에서 얻은 기술을 추가 제품 개발에 활용할 계획임
- 이를 통하여 환경 친화적 기능성 유기농업자재로 제품화함으로써 손쉽게 친환경 유기농업을 실천토록 하는 한편, 한중 FTA 등에 대비 고효율 저비용의 국제경쟁력을 갖춰 수입대체 효과는 물론 중국, 베트남을 비롯한 적극적인 유기농자재 해외수출추진의 원동력으로 활용할 계획임
- PGPR균 + 농수축산 부산물 추출, 천연물 추출물, 아미노산 복합 유기농자재 개발 기술을 추가로 활성을 가지는 추출물과 제품화에 연결할 계획임
- 친환경 작물생육촉진 복합바이오피료 제재로 유기농자재 등록 3종 이상을 목표로 하고 과제 종료 후 추가 제품개발을 할 계획임
- 3종의 친환경제품 출시 5년 후(종료 5차년도) 내수 4천만원, 수출 300만 불 목표로 하는 원동력으로 과제 결과와 경험을 활용함

나. PGPR균 뿌리 활착능 촉진제 개발을 위한 농수축산 부산물 이용한 발효공법 적용 및 아미노산 추출하는 기술개발 등과 관련된 시설구축을 통해 추가 제품개발에 활용할 계획임

- 생산시설장비 : 당사 기 보유 생산시설은 미생물 입제, 분제, 액제, 유제 등 모든 제형시설과, 저장조 5, 발효조 2, 혼합조 5, 펠릿성형기 3, 자동화 포장시설 5조, 품질관리 실험연구동 1동 등을 충분히 보유하고 있어 현 제형별 연평균 가동률이 50% 정도 이므로 신제품이 어떤 형태로 개발되더라도 충분히 양산이 가능한 수준임
- 신제품 3종이 개발될 경우 제품-공정 매트릭스를 작성하고 총괄생산계획에 의거 원자재 소요계획 및 생산일정을 수립 계획 생산할 경우 양산에 문제가 없을 것이나 2~3년 후 개발 신제품의 내수판매와 수출이 급증할 경우 기존 공장부지가 충분히 넓어 추가 시설 장비를 갖추거나 생물농약 및 유기농자재 전용 제2의 생산 공장을 확충할 계획임

붙임. 참고문헌

- Bowen-Forbes CS, Zhang Y, Nair MG. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010, 23: 554-560.
- Davenport S, Lay PL, Sanchez-Tamburrino JP. Nitrate metabolism in tobacco leaves overexpressing *Arabidopsis* nitrite reductase. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2015, 97: 96-107
- Galland M, Gamet L, Varoquaux F, Touraine B, Touraine B, Desbrosses G. The ethylene pathway contributes to root hair elongation induced by the beneficial bacteria *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. *Plant Science*. 2012, 190:74-81.
- García-Seco D, Zhang Y, Gutierrez-Mañero FJ, Martín C, Ramos-Solano B. Application of *Pseudomonas fluorescens* to blackberry under field conditions improves fruit quality by modifying flavonoid metabolism. *PLoS One*. 2015, 10: e0142639.
- Guan P. Dancing with Hormones: A Current Perspective of Nitrate Signaling and Regulation in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. 2017, 8: 1697.
- Hung YL, Jiang I, Lee YZ, Wen CK, Sue SC. NMR Study reveals the receiver domain of *Arabidopsis* ETHYLENE RESPONSE1 ethylene receptor as an atypical type response regulator. *PLoS One*. 2016, 11: e0160598.
- Jonathan DGJ, Jeffery LD. The plant immune system. *Nature*. 2006, 444: 323-329.
- Lampugnani ER, Kilinc A, Smyth DR. Auxin controls petal initiation in *Arabidopsis*. *Development*. 2013, 140: 185-194.
- Lee CK, Jang MY, Park HR, Choo GC, Cho HS, Park SB, Oh KC, An JB, Kim BG. Cloning and characterization of xylanase in cellulolytic *Bacillus* sp. strain JMY1 isolated from forest soil. *Applied Biological Chemistry*. 2016, 59: 415-423.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*. 2003, 15:165-178.
- Mantelin S, Debrosses G, Larcher M, Tranbarger TJ, Cleyet-Marel JC, Touraine B. Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp. *Planta*. 2006, 223: 591-603.
- Mao JL, Miao ZQ, Wang Z, Yu LH, Cai XT, Xiang CB. Correction: *Arabidopsis* ERF1 mediates cross-talk between ethylene and auxin biosynthesis during primary root elongation by regulating ASA1 expression. *PLoS Genetics*. 2016, 12: e1006076.
- Newman MA, Sundelin T, Nielsen JT, Erbs G. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*. 2013, 4:139.
- Oh JE, Kwon Y, Kim JH, Noh H, Hong SW, Lee H. A dual role for MYB60 in stomatal regulation and root growth of *Arabidopsis thaliana* under drought stress. *Plant Molecular Biology*. 2011b, 77: 91-103.

- Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, Theologis A, Tasaka M. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2007, 19: 118–130.
- Park KS, Kloepper JW. Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. tabaci. *Biological Control*. 2000, 18: 2–9.
- Ramamoorthy V, Raguchander T, Samiyappan R. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Plant Soil*. 2002, 239: 55–68.
- Ramos-Solano B, Algar E, García-Villaraco A, García-Cristóbal J, Lucas García JA, Gutierrez-Mañero FJ. Biotic elicitation of isoflavone metabolism with plant growth promoting rhizobacteria in early stages of development in *Glycine max* var. Osumi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 58:1484–1492.
- Rowan DD1, Cao M, Lin-Wang K, Cooney JM, Jensen DJ, Austin PT, Hunt MB, Norling C, Hellens RP, Schaffer RJ, Allan AC. Environmental regulation of leaf colour in red 35S:PAP1 *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 2009, 182:102–115.
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*. 2001, 4: 447–456
- Sudisha J, Sharathchandra RG, Amruthesh KN, Arun Kumar, Shekar Shetty H. Pathogenesis related proteins in plant defense response. *Plant Defence: Biological Control*. 2012, 12: 379–403
- Truong HA, Jeong CY, Lee WJ, Lee BC, Chung N, Kang CS, Cheong YK, Hong SW, Lee H. Evaluation of a rapid method for screening heat stress tolerance using three Korean wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, 65: 5589–5597.
- Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Boyce AN. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability–A review. *Molecules*. 2016, 21: pii: E573.
- Vetter M, Karasov TL, Bergelson J. Differentiation between MAMP triggered defenses in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*. 2016, 12: e1006068.
- Wang F, Wang L, Qiao L, Chen J, Pappa MB, Pei H, Zhang T, Chang C, Dong CH. *Arabidopsis* CPR5 regulates ethylene signaling via molecular association with the ETR1 receptor. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2017, 59: 810–824
- Weselowski B, Nathoo N, Eastman AW, MacDonald J, Yuan ZC. Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. *BMC Microbiology*. 2016, 16: 244.

- Wintermans PC, Bakker PA, Pieterse CM. Natural genetic variation in *Arabidopsis* for responsiveness to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Molecular Biology*. 2016, 90: 623–634.
- Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne CT, Lloyd A. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development*. 2003, 130: 4859–4869.
- Zhou C, Gou J, Zhu L, Xiao X, Xie Y, Zhu J, Ma Z, Wang J. *Paenibacillus polymyxa* BFKC01 enhances plant iron absorption via improved root systems and activated acquisition mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2016, 105: 162–173.

주 의

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