

발간등록번호

11-1543000-003134-01

고구마 무병주 생산 보급체계 확립 및 생산품 이력 추적 관리시스템 개발 최종보고서

2020.07.

주관연구기관 / 서울시립대학교
협동연구기관 / 경북대학교, 고려대학교,
동국대학교, (주)바이오큐브시스템, (주)더비엔아이

농 립 축 산 식 품 부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “고구마 무병주 생산 보급체계 확립 및 생산품 이력 추적 관리시스템 개발” (개발기간 : 2017. 04. 21 ~ 2019. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019 . 12 . 17 .

주관연구기관명 : 서울시립대학교 (대표자) 김선형 (인)
협동연구기관명 : 경북대학교 (대표자) 이수현 (인)
협동연구기관명 : 고려대학교 (대표자) 김범석 (인)
협동연구기관명 : 동국대학교 (대표자) 이승주 (인)
참여기관명 : (주)바이오큐브시스템 (대표자) 신준성 (인)

주관연구책임자 : 김선형
협동연구책임자 : 이수현, 김범석, 이승주
참여기관책임자 : 신준성

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 일람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	117039-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017-04-21~ 2019-12-31	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	고구마 무병주 생산 보급체계 확립 및 생산품 이력 추적 관 리시스템 개발			
연구책임자	김선형	해당단계 참여연구원 수	총: 20명 내부: 5명 외부: 15명	해당단계 연구개발비	정부:275000천원 민간:91850천원 계:366850천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 34명 내부: 7명 외부: 27명	총 연구개발비	정부:823000천원 민간:274882천원 계:1097882천원
연구기관명 및 소속부서명	서울시립대학교			참여기업명 (주)바이오큐브시스템	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: (주)더비엔아이			연구책임자: 박종화	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요 약 정보	소프트 웨어	회합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기 탁 번호		10-2018- 0159605, 10-2018- 0159604, 10-2018- 0159603, 10-2018- 0159607, 10-2019- 0120901									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

1. 고구마 무병묘 사용 및 대량 생산방법을 통한 수확량 증대 및 건전성 유지를 확인하였고, 고구마의 품종별 유전자형 확보 및 품종 판별을 위한 SNPs마커 획득
2. 국내 고구마 생산지의 바이러스 발생 상황을 조사하였고, 기존 8종과 미보고된 8종의 특이적 프라이머 설계 및 개선을 통한 효율적인 바이러스 진단 확립
3. 국내 고구마의 곰팡이병에 대한 현황을 파악하였고, 고구마 덩굴쪼김병의 원인이 되는 *Fusarium* sp. 종에 대한 계통 분석 및 염기서열 분석
4. 고구마의 호흡 특성 분석 및 포장 조건에 따른 품질비교를 통하여 적합한 포장 기술 확립
5. 고구마 무병묘 생산을 위한 바이러스, 곰팡이에 대한 진단 키트를 개선
6. QR code 및 홈페이지 제작을 통한 생산 이력 추적 시스템 개발 및 농가 적용
본 연구 결과들을 기반으로 논문 2편 (추가로 1편이 revision, 3편이 2020년 상반기에 투고 준비중), 학술 발표 7건, 특허 출원 6건을 달성하였다.

보고서 면수
201

요 약 문

연구의 목적 및 내용

- **고구마 무병주 생산 보급체계 확립 및 생산품 이력 추적 관리 시스템 개발**
 - 고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 관리 기준 수립
 - 고구마 생과 이력 추적 스마트 관리 시스템 개발을 통한 품종단일화 촉진 및 효율적 스마트 유통망 구축

- **고구마 무병주 검증 표준화 관리 기준 수립**
 - 고구마 무병주에 대한 인식 제고 및 생산업체에 대한 중앙 집중식 관리 기준 도입
 - 고구마 무병주 생산방식의 매뉴얼화를 통한 체계적 관리 시스템 마련
 - 고구마 바이러스 관련 진단 및 검증 시스템 업그레이드
(現 5종 → 8종 이상)
 - 새로운 외래 품종 도입으로 예상되는 신규 바이러스 탐색

- **효과적 품종혼입화 방지를 위한 개발된 검증기술의 현장 적용 실시**
 - 실질적 고구마 재배농가와의 협력을 통한 일반품종 8종에 대한 판별 마커 개발

- **고구마 품종의 순도 및 감염여부 판단을 위한 관리 기준 수립**
 - 곰팡이 및 박테리아 병 등에 대응하기 위한 지속관리 표준화 관리 방안 구축

- **효율적 스마트 유통망 구축을 위한 고구마 생과 이력 추적 시스템 개발**
 - 묘 생산 및 유통과정의 추적 이력시스템 개발을 통해 소비자에게 정확한 정보제공
 - 개발된 관리 시스템의 대형마트 및 경매시장에서의 적용 가능성 분석
 - 추적 이력시스템 관련 앱 개발 및 보존력이 향상된 포장재 개발

- **중앙 고구마 무병주 및 스마트 유통관리 센터 운영을 통한 생산-소비단계 표준화**
 - 표준화된 고구마 무병주 생산모델 소개 및 저장성 증대를 위한 클린 포장 기법 도입
 - 센터 운영을 통해 고구마 생산 현장에서 실질적으로 요구되는 생산 기술 및 유통정보제공

<p>연구개발성과</p>	<p>□ 핵심 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 고구마 박테리아 병 및 곰팡이 병 진단 기술 개발 및 업그레이드 ○ 고구마 감염 바이러스 진단 시스템 개발 및 표준화 진단 시스템 확립 ○ 고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 시스템 제품 개발 ○ 고구마 포장재 개량 및 생산 이력 추적 시스템 개발 ○ 중앙 고구마 무병주 및 스마트 유통관리 센터 운영을 위한 프로토콜 개발 <p>□ 정량적 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ SCI급 논문 2편 (추가로 revision중인 논문1편과 2020년 상반기 투고 준비 중인 3편), 특허 등록 6건, 학술 발표 7회 ○ 고구마 신선도 유지 포장 기술 1건 ○ IT 기반 고구마 생산 이력 추적 시스템 1건 ○ 고구마 바이러스 진단 키트 및 패키지 제품 개발 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고구마 감염여부 진단기술 개발 및 품종 판별마커 개발을 통한 고구마 순도 확립에 기여 ○ 고구마 무병주 대량생산 시스템 확립을 통해 농가소득 확대 및 세계적 시장경쟁력 확보에 기여 ○ 생산 이력 추적 시스템 개발 및 포장재 개선을 통해 대국민 식품 안전성 확보에 기여 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>고구마</p>	<p>무병주</p>	<p>스마트 이력추적 시스템</p>	<p>포장재</p>	<p>진단키트</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p><i>Ipomoea batatas</i></p>	<p>Virus-free plant</p>	<p>Food traceability System</p>	<p>Packaging material</p>	<p>Diagnostic Kit</p>

본 문 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	7
제 1 절 연구개발 목적	7
제 2 절 연구개발의 필요성	8
제 3 절 연구개발의 범위	10
제 2 장 연구수행 내용 및 결과	12
제 1 절 연구개발수행 내용	12
제 2 절 연구개발 결과	22
제 3 절 연구개발 성과	182
제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	185
제 1 절 목표	185
제 2 절 목표 달성여부	187
제 3 절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책 (후속연구의 필요성 등)	195
제 4 장 연구결과의 활용 계획 등	196
붙임. 참고문헌	199

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

- 고구마는 세계 7대 작물 중 하나로, 단백질과 탄수화물이 풍부하게 함유되어 있는 양질의 영양원 이외에도 사료자원, 전분원료 등 다양한 원료물질로 이용
- 고구마는 대표적인 전분작물로서 최근 바이오에탄올 생산을 위한 중요한 에너지 작물로 주목 받고 있으며, NASA의 경우 미래의 우주식품으로 선정하여 연구를 진행
- 국내 고구마 시장은 2015년 기준 거래량이 3,500억 원 정도 수준이며, 2010년 이후 경제성장과 식생활의 고급화로 인해 식량에서 건강식품으로의 인식 전환에 부응하여 재배면적의 점진적 증가가 관찰됨

표 1. 고구마 생산면적 및 고구마 농업 생산액

년도	1995	2000	2005	2007	2015
재배면적 (천ha)	14	16	17	21	24
생산량 (천톤)	305	345	283	352	362
농업생산액 (억원)	1,248	1,306	1,525	3,008	3,502

- 고구마의 품질 및 수량감소의 원인인 곰팡이 및 박테리아 병의 감염에 의한 피해 경감을 위해 체계적 진단체계를 확립하고, 지속관리 표준화 대응 및 관리 방안 구축을 통해 1) 고품질 작물 생산, 2) 부가가치 향상, 3) 우리나라 농가 소득 증대, 그리고 4) 농업 발전에 기여하고자 함
- 국내 고구마 포장 및 유통은 타 작물에 비하여 열악한 현실이다. 늘어나는 고구마 소비 진작을 위하여 고구마의 품질을 유지할 수 있는 포장 기술 및 효과적으로 고구마 생산 이력을 추적할 수 있는 시스템 개발이 요구됨

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성 및 현재 대상작물이 가지고 있는 문제점

가. 고구마 병해에 의한 품질 저하

- (1) 고구마의 품질저하의 주요 원인은 병충해로 분석되며, 특히 바이러스병은 수량 및 품질저하에 심각한 부정적 영향을 야기
- (2) 곰팡이로 전염되는 덩굴 쪼김병은 고구마의 육묘상 또는 씨고구마 등을 통해 전달되는 과정에서 수량 및 품질 저하를 야기하며, 이와 관련한 체계적인 대응 관리 필요
- (3) 바이러스병에 의한 고구마 생산의 피해는 국내 고구마 주산지인 해남, 여주 등에서 빈번히 보고되며, 무병주 고구마 생산을 위한 바이러스병의 조기진단 및 체계적 진단 시스템의 개발 필요
- (4) 고구마묘는 일반적으로 대규모 재배농가의 전문저장고 또는 묘상을 이용한 자가 채종에 의해 생산 및 공급되며, 이러한 경우 심각한 퇴화 정도가 빈번히 관찰됨
- (5) 바이러스병에 의한 고구마의 수량 및 품질저하는 약 20-30% 정도로 관찰되며(복합 감염 시 추가적 피해 발생), 이와 관련한 효과적 대응을 위해 바이러스 무병주의 체계적 보급이 절실함



그림 1. 고구마 바이러스 병징 및 괴근에서의 상품성 저하

나. 고구마 혼입화 방지 및 무병묘 표준 관리시스템 확립을 위한 검증기술 개발

- (1) 고구마의 재배면적당 묘 소요량은 타 작물에 비해 높지만, 증식률은 10배(벼의 경우 100배) 수준으로 매우 낮기 때문에 무병묘 대량증식 시스템 필요
- (2) 특히 우리나라의 경우 계절적 특성(저온시기 존재)을 이유로 고구마의 한정적 재배가 일반적이기 때문에 무병묘 대량증식 시스템 개발은 무병묘 재배 보편화를 위한 필수 선행요소임
- (3) 현재 고구마 재배지에서 빈번히 관찰되는 품종 혼입화는 고구마 관련 상품의 단일화 및 규격화의 주요 걸림돌로 분석되며, 고구마 관련 산업화 촉진 및 신시장 개척을 위해서는 고구마의 효과적 품종판별을 위한 마커 개발이 필수적임
- (4) 일본은 JA를 통해 고구마 품종별 무병주를 인터넷으로 판매하는 등 고품질 고구마 생산에 체계적 노력을 기울이고 있는 것으로 분석
- (5) 따라서 고품질 고구마 생산 및 농가소득 증대를 위해서는 체계적인 고구마 무병주 대량생산 시스템 확립이 필수적이며, 앞으로 다가올 종자보호법을 대비하기 위해서도 각 품종별 마커 개발이 시급한 실정

다. 고구마 생과이력 추적 스마트 관리 시스템 개발 및 포장재 문제

- (1) 현재 가락동 농수산물 시장, 대형마트에서 유통되고 있는 고구마는 품종별 구분이 아닌 전분질 구조에 따라 밤고구마, 호박고구마 등으로 구분되며, 향후 품질의 균일화를 위해 묘 관리부터 생과까지 전반적 추적이 가능한 관리 시스템의 도입이 필요
- (2) 포장재 (비닐 및 종이박스)로 인한 유통기한의 문제 및 고구마 부패 문제 해결 시급
- (3) 고구마 품종의 혼입화는 소비자의 불만(식감 및 최종산물의 불균일화 등)의 주요 원인으로 분석
- (4) 고구마는 보관 중 호흡이 특히 왕성하여 부패 문제가 대두되고 있는데 이를 해결할 수 있는 포장 기술의 개발이 필요하며 이로 인한 유통기한의 연장이 시급함

라. 고구마 포장 문제 및 이력 추적 스마트 관리 시스템의 부재

- (1) 고구마는 보관 중 호흡이 특히 왕성하여 부패 문제가 대두되고 있는데 이를 해결할 수 있는 포장 기술의 개발이 필요하며 이로 인한 유통기한의 연장이 시급함
- (2) 현재 가락동 농수산물 시장, 대형마트에서 유통되고 있는 고구마는 품종별 구분이 아닌 전분질 구조에 따라 밤고구마, 호박고구마 등으로 구분되며, 향후 품질의 균일화를 위해 묘 관리부터 생과까지 전반적 추적이 가능한 관리 시스템의 도입이 필요
- (3) 고구마 품종의 혼입화는 소비자의 불만(식감 및 최종산물의 불균일화 등)의 주요 원인으로 분석

제 3 절 연구개발 범위

1. 고구마 건전묘 대량 생산 및 단가 절감을 위한 시스템 도입

- 가. 고구마 조직 배양기술과 무병묘를 이용한 효율적인 건전묘 대량 생산 시스템 개발
- 나. 재분화 식물체에서의 후대 검정을 통한 바이러스 무병주 생산체계확립
 - (1) RT-PCR 등을 이용한 바이러스 무병주 검정 (현재 바이러스 8종 대상) 및 증식 건전묘의 박테리아병 및 곰팡이병 검증 시스템 도입
 - (2) 대량번식에 적합한 양액관리, 배지조성 및 환경관리모델을 함께 구축
- 다. 무병묘부터 건전묘까지 생산 이력의 표준화를 위한 프로토콜 작성

2. 고구마 바이러스병 진단 시스템 개발

- 가. 현재 바이러스 검중에 이용되고 있는 주요 바이러스 8종의 예상되어지는 나머지 바이러스에 대한 진단시스템 확립을 위한 기초연구
- 나. 고구마 유전자원 및 전국 재배 묘상에서 시료를 수집하여 바이러스 발병 상황을 조사
- 다. 고구마에서 분리된 바이러스를 대상으로 외피단백질 영역을 증폭하여 염기서열을 결정한 후 계통 분석할 예정임
- 라. 고구마에 감염을 일으키는 바이러스의 전체 유전자 염기서열을 결정한 후 계통 분석함

3. 고구마 박테리아 및 곰팡이병 진단 시스템 개발

- 가. ① *Fusarium oxysporum*에 의한 덩굴쪄짐병, ② *Ceratocystis fimbriata*에 의한 검은 무늬병, 그리고 ③ *Streptomyces ipomoeae*에 의한 입고병 등과 같이 고구마에 발생하는 주요 곰팡이 및 박테리아 병에 대한 체계적 진단 시스템 확립을 위한 기초연구
- 나. 고구마 재배 묘상에서 시료를 수집하여 곰팡이 및 박테리아 병의 발병 상황 및 병원균 조사
- 다. 확보한 병원성 곰팡이 및 박테리아와 기존에 알려진 병원균의 염기서열 정보들을 기반으로 다양한 분자생물학적 기법들의 이용을 통한 체계적 진단 시스템 개발
- 라. 고구마에 병을 일으키는 곰팡이 및 박테리아의 쉽고 빠른 검출 및 동정을 위한 종 특이적 분자마커 개발

4. 고구마 포장의 개량 및 고구마 생산 이력 추적 시스템 개발

- 가. 고구마가 최상의 품질을 유지 할 수 있는 MA(Modified Atmosphere) 포장 개발
 - (1) 고구마의 호흡 특성 분석

- (2) 고구마가 최적의 품질을 유지할 수 있는 최적의 산소, 이산화탄소 농도 규명
- (3) 고구마 품질에 적합한 기체 조성을 유지하기 위한 최적의 포장재, 포장 용기 설계
- (4) 고구마 유통 환경에 따른 고구마 품질 예측 수리적 모델 개발

나. 고구마 생산 이력 추적 off-line / on-line 스마트 관리 시스템 개발

- (1) 추적 이력 시스템의 하드웨어 구축: QR코드 기반 시스템 (서버, 소비자 스마트폰), RFID 기반 시스템 (서버, RFID 리더, 시간-온도 데이터 로거, 소비자 스마트폰)
- (2) 추적 이력 시스템의 소프트웨어 구축: e-pedigree 체계 구축 (고구마 개체 ID, 품종 ID, 농가 ID, 수확시기 ID, 온도 데이터 로거 ID), 실시간 품질 연산 (고구마 개체 ID 별로 매칭된 시간-온도 이력으로부터 품질을 연산), 스마트 폰 앱 개발 (포장에 부착된 QR코드 또는 RFID로부터 개체별 품종, 농가정보, 수확시기, 연산된 저장기간 및 품질을 소비자가 스마트 폰으로 정보를 조회)

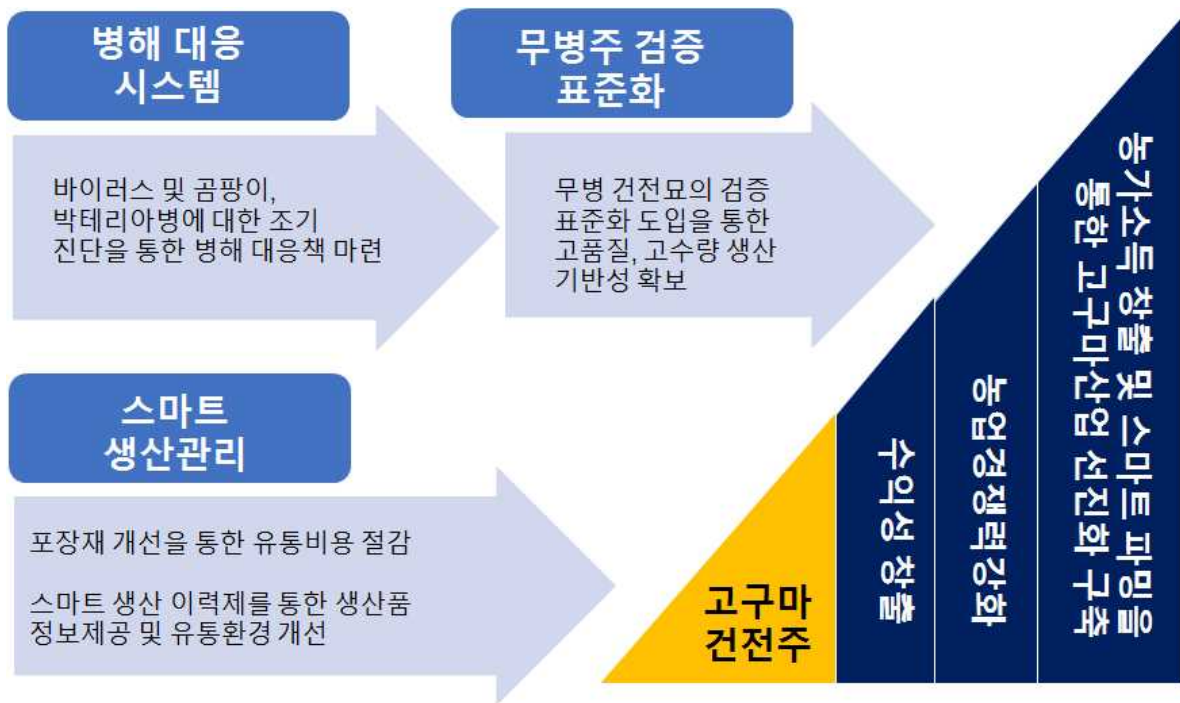


그림 2. 국내 SPCFV 분리주들의 유전자 전체 염기서열 계통 분석

제 2 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발수행 내용

1. 고구마 무병주 생산 보급체계 확립 및 생산품 이력 추적 관리시스템 개발

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용 (이론적, 실험적 접근방법)	연구결과
1차년도 (2017)	고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 관리 기준 수립	<ul style="list-style-type: none"> - 선행과제를 통해 개발된 고구마 무병묘 대량생산방법의 현장 적용을 위한 육묘법 개선 - 무병주를 이용하여 증식된 건전묘의 현장 적용 타당성 검증 및 실질적 증식시스템 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 무병묘의 효율적인 생산을 위한 토양유래 미생물의 사용을 통한 수확량 증대 및 건전성 유지 - 무병주 생산농가 (동오시드 / 무안 해야 농장)의 경제성 파악
	품종 혼입화 방지를 위해 개발된 검증 기술을 이용한 현장 적용	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 5대 주요 고구마 - 재배지(논산, 해남, 고창, 예산,여주)의 재배품종 확보를 통한 고구마 품종 혼입정도 파악 - 선행과제에서 개발된 마커를 기반으로 한 주요재배품종에 대한 이력확인 	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 5대 주요 고구마 재배지의 주요 재배 품종 확인 - 품종이 아닌 지역별 고구마 분류 (총 48계통 수집) - 국내 주요품종인 베니하루카 품종의 혼입률 RAPD를 통해 분류작업
2차년도 (2018)	국내외 16종의 고구마 품종의 무병건전묘 생산 보급가능성 검증	<ul style="list-style-type: none"> - 확보된 국내외 재배품종의 무병주 생산 보급 가능성 검증을 위한 무병주 증식시스템 도입 - 생산된 무병주의 생산성 및 품종별 특성 파악을 통한 보급용 품종의 선별 	<ul style="list-style-type: none"> - 개발 중인 증식시스템을 통한 확보된 16품종의 무병주 생산 - 생산된 무병주의 포장 정식 및 고구마 괴근 생산성 및 특성 파악
	품종 혼입화 방지를 위한 HRM 검증기술의 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 재배 품종 중 명명에 부합하지 않는 품종 및 해외 혼입 품종의 판별 	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 주요재배 16품종의 유전자원 확보 - 지역별 특성을 포함한 품종의 분류를 위한 고구마 품종 판별 HRM 마커 개발

3차년도 (2019)	고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 관리 기준 수립	- 기존 농가 및 타 육묘업체와의 경제성 비교분석 및 효율적 프로토콜 작성 및 제공	- 미생물 제재 / 조직배양 유래 건전묘등을 이용한 우수한 고구마 육묘 생산을 위한 프로토콜 작성 배포 (고창지역 적용)
	품종 혼입화 방지를 위해 개발된 검증기술을 이용한 현장 적용	- 신규품종 판별마커의 개발 및 현장 활용	- 국내 점유율이 높은 4종 (베니하루카, 안노베니, 호감미, 풍원미)의 SNPs 마커 개발 - 지역별 샘플 적용
	중앙 고구마 무병주 및 스마트 유통관리 센터 운영	- 중앙고구마 무병주 및 스마트 유통관리센터 운영을 통한 고구마 무병주 생산부터 소비까지의 표준화	- https://goguma.uscmcenter.com/register.php 사이트 운영을 통한 고구마 이력 추적 시스템 확보

2. 고구마 신규 바이러스 진단을 위한 기초연구

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용 (이론적, 실험적 접근방법)	연구결과
1차년도 (2017)	고구마 바이러스병의 발생상황 조사	- 새로운 외래 품종 도입 등 환경 변화에 따른 고구마 감염 바이러스병의 발생상황 조사	- 고창, 예산, 당진, 논산 4곳에서 고구마 45점을 채집함 - 주요 고구마 바이러스 RT-PCR 진단법을 확립하였음
	표준화된 고구마 바이러스 진단 시스템 확립	- 안정적이고, 효율적인 고구마 감염 바이러스 진단을 위한 표준 진단시스템 확립	- 고구마에서 발생하는 바이러스 8종에 대하여 RT-PCR 진단을 수행하였음
2차년도 (2018)	고구마 감염 바이러스 진단 시스템 개발 및 표준화된 진단 시스템 확립	- 고구마 신규 바이러스 진단을 위한 기초연구 수행	- 포항, 고창, 논산 3곳에서 고구마 204점을 채집함 - 고구마에서 발생하는 바이러스 8종에 대하여 RT-PCR 진단을 수행하였음

3차년도 (2019)	신규 고구마 감염 바이러스 등 진단 시스템 개발 및 표준화 진단 시스템 확립	- 국내 미보고 바이러스 등 신규 고구마 감염 바이러스 진단 시스템 개발	- 미보고된 8개 병원체를 위한 종특이적 프라이머 설계 - 기존의 프라이머보다 효율을 높인 1종의 프라이머(SPLCV)와 국내 미보고 바이러스 3종 확인 (SPCV, SPCSV, SPPV)
		- 미동정 바이러스 등 고구마 바이러스병 진단 시스템 확립	

3. 세균, 곰팡이 병의 조기진단 및 키트 상용화를 위한 기초연구

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용 (이론적, 실험적 접근방법)	연구결과
1차년도 (2017)	고구마 재배 묘상에서 곰팡이 및 박테리아병의 발생 상황 조사	- 고창, 논산, 정읍, 예산, 덕소, 김천, 옥천의 고구마 농장에서 발생한 곰팡이 및 세균 병의 발생 상황 및 병원균 조사	- 경기도, 전라도, 충청도, 경상도 지역 고구마 농장에서 곰팡이 35종, 세균 11종을 분리 및 확보
		- 확보한 곰팡이 및 세균의 DNA 추출	- 곰팡이 35종, 세균 11종의 DNA를 추출
	- 수집된 곰팡이 및 세균의 - 균학적 특성 조사	- 균학적 특성 조사를 통해 <i>Fusarium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Mucor</i> , <i>Colletotrichum</i> , - <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> 등 곰팡이 및 세균을 동정	
	분자생물학적 기법을 이용한 곰팡이 및 박테리아 병 진단 시스템 개발	- 고구마에 병을 일으키는 주요 식물병원균에 대한 염기서열 및 분자표지마커 개발 가능 유전자에 대한 정보 조사	- 분리한 곰팡이 균주 중 국내 고구마 주요병해 중 하나인 덩굴쪄김병을 일으키는 <i>Fusarium</i> 속 21종의 균주의 DNA 추출 - IGS 부분의 염기서열 비교 분석

2차년도 (2018)	고구마 재배 묘상에서 분리된 곰팡이 병원성 검정	- 고창, 논산, 정읍, 예산, 덕 소, 김천, 옥천, 강화의 고구 마 농장에서 분리된 곰팡이 병원성 검정 실험	- 분리된 <i>Fusarium</i> sp. 28종의 병원성 검정을 통해 덩굴썩짐병을 일으키는 병원성 균주 확보
	분자생물학적 기법을 이용한 곰팡이 병 진단 시스템 개발	- 확보한 병원성 곰팡이와 기 존에 알려진 병원균의 염기 서열 정보들을 토대로 종 특이적 분자 마커 개발	- 병원성 검정을 통해 확보된 균주와 비병원성 균주 및 기존에 알려진 병원균의 ITS 부분내 특이적 PCR 검출을 위한 특이적 Primer 제작
	고구마 재배 묘상에서 곰팡이 병의 발생 상황 조사	- 조사된 66종의 품종에서 발 생한 곰팡이 발생 상황 및 병원균 조사	- 조사된 66종의 품종에서 발생한 곰팡이 33종을 분리 및 확보
		- 확보한 곰팡이 DNA 추출	- 곰팡이 33종을 DNA 추출
		- 수집된 곰팡이 균학적 특성 조사	- 균학적 특성 조사를 통해 국내 고구마 주요 병해 중 하나인 덩굴썩짐병을 일으킬수 있는 <i>Fusarium</i> sp. 21종을 동정
3차년도 (2019)	고구마 재배 묘상에서 분리된 곰팡이 병원성 검정	- 조사된 66종의 고구마 품종에서 분리된 곰팡이 병원성 검정 실험	- 분리된 <i>Fusarium</i> sp. 21종의 병원성 검정을 통해 덩굴썩짐병을 일으키는 병원성 균주 확인
		- 확보된 병원성 균주를 통해 다양한 품종에 대한 병원성 검정	- 확보한 병원성 균주의 17종의 고구마 품종에 대한 병원성 유무 검정 완료
		- 수집된 곰팡이 균학적 특성 조사	- 1,2 차년도에서 분리된 덩굴썩짐병을 일으킬수 있는 <i>Fusarium</i> sp. 42종의 ITS 및 IGS 염기서열 분석 완료

4. 고구마 유통기한 연장 및 신선도 유지를 위한 포장재 개발 / 추적이력제 시스템 개발

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용 (이론적, 실험적 접근방법)	연구결과
1차년도 (2017)	고구마의 호흡 특성 분석	- 고구마의 산소 소비 모델링	<ul style="list-style-type: none"> - 세 가지 품종 (베니하루카, 호감미, 호박)에 대한 산소 소비 모델링 - 산소 소비 모델링에 필요한 Vm, Km, Ki 값을 결정
		- 고구마의 이산화탄소 배출 모델링	<ul style="list-style-type: none"> - 세 가지 품종 (베니하루카, 호감미, 호박)에 대한 산소 소비 모델링을 실시 - 이산화탄소 소비 모델링에 필요한 Vm, Km, Ki 값을 결정
		<ul style="list-style-type: none"> - 포장 내 최적의 산소, - 이산화탄소 농도 조건 규명 	<ul style="list-style-type: none"> - MA 포장 설계에 사용하기 위해 고구마가 최적의 품질을 유지할 수 있는 산소, 이산화탄소 농도를 탐색 - 고구마의 최적 품질을 알기 위한 지표로 건조 중량감소율, 중량감소율, AIS(Alcohol insoluble solids)함량 등을 측정하였고 실험에서 각각의 기체조성에서 차이점이 발견되었음 - 실험을 위해 산소와 이산화탄소 농도를 일정하게 유지할 수 있는 자동 기체 제어 장치를 개발함 - 실험결과, 산소 3%, 이산화탄소 5%에서 고구마가 최적의 품질을 유지하는 것으로 나타남

2차년도 (2018)	고구마의 MA 포장 설계	- 포장 내 대기 조성(산소, 이산화탄소 농도) 모델링	- 고구마 포장 필름에 천공을 뚫어 MA 포장 조건 설립 - 포장 필름의 산소 및 이산화탄소 농도 측정 후 포장 필름의 가스 투과도 도출 - 필름의 천공 개수에 따른 가스 투과도 모델링
		- 포장 내 대기 조성에 따른 고구마 품질 모델링	- MAP 내 공기조성변화 모델링 식에 최적 기체 조성 조건을 대입하여 최적 기체 조성을 유지할 때의 기체 투과도 산출 - 천공 개수에 따른 가스 투과도 모델링에 투과도 대입하여 최적 기체 조성을 유지하게 하는 MA 조건인 천공 개수 도출
		- 최적의 포장재, 용기를 확립	- 도출된 천공 개수가 뚫린 포장지를 적용하여 실제 고구마를 포장 - 고구마 MA 포장 후 포장 용기 내 기체 조성 분석한 결과, 베니하루카는 산소 4.5%, 이산화탄소 15.4%에서, 호박은 산소 4%, 이산화탄소 16%에서, 호감미는 산소 3.7% 이산화탄소 16.5%에서 평형 이룸 - 이는 앞서 규명한 MA 포장 시 최적의 기체 조성이므로 본 연구에서 설립한 모델링이 실제 적용 가능성이 입증되었음
		- QR code 사용 관리 시스템 구축	- 농가현장 방문 후 구축 시나리오 설계 - 시스템 아키텍처 설계 및 개발 스펙 확인 - 소비자용 스마트 웹 시스템 개발 - 시스템 현장 적용 및 납품 예정

3차년도 (2019)	시간 온도 이력에 따른 포장 내 고구마 품질 모델링	- MA 포장 고구마의 품질 분석	- 산출된 투과도를 이용하여 천공 개수를 정한 MA 포장된 고구마와 control의 품질을 등은 조건에서 비교 해봄으로써 입증 실험. 경도, 중량감소율, 곰팡이 생성률을 통해 control보다 실험군이 더 우수한 품질을 확인함
		- MH 포장 고구마의 품질 분석 (MH 포장은 추가된 성과)	- 증산작용이 활발한 고구마의 경우 MAP포장이 사실상 어려움. 따라서 습도만 제어하는 MHP포장을 설계하였음 - 산출된 투과도를 이용하여 천공 개수를 정한 MH 포장된 고구마와 control의 품질을 등은 및 변온 저장 조건에서 비교 해봄으로써 입증 실험. 경도, 중량감소율, 곰팡이 생성률을 통해 control보다 실험군이 더 우수한 품질을 확인함
	고구마 이력 추적 off-line 스마트 관리 시스템 개발	- 고구마 이력 추적 시스템의 현장적용 및 수정보완	- 이력추적시스템 개발로 인한 홈페이지 개설 - 소비자들이 유통과정을 봄으로써 고구마에 대한 품질 정보 확인 - QR코드 생성 후, 고구마 포장에 붙임으로써 소비자들에게 고구마에 대한 정보 제공함

5. 고구마 바이러스, 세균, 곰팡이 병진단 키트 상용화

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용 (이론적, 실험적 접근방법)	연구결과
1차년도 (2017)	고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 키트 시제품 개발	- 진단키트 개발용 시료 및 균주 수집 및 유지	- 식량원 바이오에너지 작물연구소, 농가(전남, 충남), 시장(재래시장, 마트)에서 고구마 감염 시료 확보 및 유지
		- 선행 진단 프라이머를 이용 한 진단 키트 제작 조건 확 립	- 국립농업과학원 바이러스실로부터 고구마 - 진단 프라이머 기술이전 받음 - 준비한 시료로 테스트 진행
		- 진단 키트에 적합한 주형 (DNA/RNA) 준비법 확립	- RNA추출 키트를 이용한 주형 준비법 개발
		- 시제품 제작(5종 이상) 및 활용성 조사	- SPLCV, SPFMV, SPVC, SPV2, SPSMV-1 시제품 제작 후 자체평가 후 개선점 파악함
2차년도 (2018)	고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 키트 시제품 개발	- 진단 키트 개발용 시료 및 균주 수집 및 유지 - 시제품 성능 개선 및 제품화 - 추가 병원균 진단용 키트 시제품의 제작 조건 확립	- 1차 연도 수집한 감염된 시료를 선별하여 증식 유지하여 확보함 - 멀티 가능한 조합을 선발하고 3종, 4종 멀티 각각 7종, 2종 제작조건 확립함
	개발된 검증기술을 이용한 현장 적용	- 키트 시제품을 이용한 고구마 바이러스 세분 진단 조건 확립(품종별) - 시제품의 현장 활용성 자체 평가	- 시제품을 이용하여 고구마 주요 20품종에 대한 조사를 수행함 - 시판 중인 묘에 시제품 적용하여 활용성 조사함
3차년도 (2019)	개발된 검증기술을 이용한 현장 적용	- 개발된 검사시스템을 활용하기 위한 효율적 매뉴얼 작성 및 보완 - 신규 진단키트 시제품 개발 및 현장 활용	- 시판 중인 고구마 80점을 이용하여 시제품의 테스트 실시 - 협동기관 경북대학교로부터 제공받은 SPVC, SPGV, SPV2의 새로운 프라이머와 신규 바이러스에 대한 프라이머의 확인
	고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 키트 사업화	- 고구마 무병주 생산의 표준 화를 위한 진단시스템 제품 상용화	- 곰팡이 병 진단을 위한 매뉴얼 확립 및 진단 키트 개발

6. 고구마 건전묘 제품 상용화 전략 수립을 위한 기반 환경 분석

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용 (이론적, 실험적 접근방법)	연구결과
1차년도 (2017)	농산물 상용화 관련 국내외 법·제도 현황	- 국내 국립 농산물 품질 관리원의 관련 법률 및 제도 조사·분석	- 농산물이력추적관리제도 - 국내 지리적표시제 - 품종보호제도
		- 국외 주요 선진시장 관련 법률 및 제도 조사·분석	- 농산물이력추적관리 제도 - 지리적표시제도 - 국제품종보호제도
	농산물 상용화 관련 국내외 선행특허 분석	- 바이러스 무병주 생산 관련 특허 분석	- 바이러스 무병주 관련 국내외 특허 동향 및 주요 핵심특허를 분석함으로써 특허 선행기술의 존재여부를 검토
		- 대량번식 시스템관련 특허 분석	- 고구마 대량번식 시스템 개발 관련 국내외 특허 동향 및 주요 핵심특허를 분석함으로써 특허 선행기술의 존재여부를 검토
		- 바이러스 진단시스템 관련 특허 분석	- 고구마 바이러스병 진단 시스템 개발 관련 국내외 특허 동향 및 주요 핵심특허를 분석함으로써 특허 선행기술의 존재여부를 검토
		- 품종판별 특허 분석	- 고구마 품종판별 기술 관련 국내외 특허 동향 및 주요 핵심특허를 분석함으로써 특허 선행기술의 존재여부를 검토 - 식물개체의 품종을 판별하는 기술자체에 집중하여 기술의 대상을 고구마에서 식물체로 범위를 넓혀 식물체의 품종판별 기술에 대한 특허 조사 진행

2차년도 (2018)	해당기술의 핵심가치	- 기술의 차별성	- 무병건전묘 생산을 위한 식물 성장촉진 박테리아 확인
		- 기술의 독창성	- 무병건전묘 생산을 위한 식물 성장촉진 박테리아 활용 결과
		- 기술의 혁신성	- 무병묘 보급을 위한 농가 시험적용 결과
	선행기술개발 동향 등의 기술성 분석	- 기술성 분석	- 바이러스 무병주 생산 관련 특허 분석 - 대량번식 시스템관련 특허 분석 - 바이러스 진단시스템 관련 특허 분석 - 품종판별 특허 분석
	관련 시장 현황분석	- 국내외 시장	- 세계 고구마 시장 현황 - 국내 고구마 시장 현황
- 타겟시장 현황분석		- 국내 고구마 가격 동향 - 생산지 유통실태 - 소비지 유통실태	
연구개발 성과의 상용화 전략 수립	- 단계별 상용화 전략	- 타겟 시장 및 개발제품 도출 단계(~2018년) - 제품 상용화 단계(2019년-2020년) - 시장 진입 단계(2021년-2022년) - 시장 확대 단계(2022년 이후)	
3차년도 (2019)	비즈니스 모델 (B/M) 수립	- 개발 제품의 사업모델 수립 (주요 제품군, 고객군, 이해 관계자별 주요 Activity 등) 및 사업 프로세스 구축	
		- 제품 상용화를 위한 핵심기 술의 가치, 파급시장 분석, 서플라이 체인, 전후방 연관 산업 등의 기반 분석	
		- B/M 수립을 위한 핵심 파트 너, 핵심활동, 핵심지원, 가 치제안, 고객관계, 마케팅 채널, 고객세분화, 비용구 조, 수익흐름 등의 분석	

제 2 절 연구개발 결과

1. 고구마 무병주 생산 보급체계 확립 및 생산품 이력 추적 관리시스템 개발

가. 고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 관리 기준 수립 및 생산 보급 가능성 검증

(1) 무병건전묘 생산을 위한 식물생장촉진 박테리아 적용

최근 근권에서 식물의 성장을 촉진하는 많은 유익한 박테리아들이 보고되고 있으며 식물생장촉진 박테리아의 장점을 이용하여 다양한 작물에 대한 적용시험이 이어지고 있다. 본 연구에서도 고구마 무병주 생산에 있어서 건강한 묘 생산을 위해 시립대학교에서 분리 동정한 식물생장촉진 박테리아 *Bacillus subtilis* strain JS를 종저에 처리하여 종순의 생육을 비교시험 하였다(그림 3). *Bacillus subtilis* strain JS균주를 108 농도로 배양하여 종저가 파종된 육묘장(13일)에 각각 100, 50배 희석액을 2주간에 걸쳐 두차례 분무하였다. *Bacillus subtilis* strain JS균주의 처리는 전반적으로 종순의 생육을 증진시키는 것으로 나타났다(그림 3).



4주간 4회 살포

공시식물: 고구마 (품종: 안노베리)

Bacillus subtilis JS. 처리: 1회/주 → 1×10^8 colony-forming units (CFU)

처리구당 면적 : 37m² (30개 처리구)

JS 1/100 처리구 (1)	JS 1/100 처리구 (2)	무처리구	JS 1/500 처리구 (1)	JS 1/500 처리구 (2)
---------------------	---------------------	------	---------------------	---------------------

해당 제재를 제외 한 엽면시비 살균.살충제 및 엽면 시비 자재는 동일 하게 처리

그림 3. JS 처리 포장 및 생산 묘

Bacillus subtilis strain JS의 처리는 전반적으로 종순(묘)의 성장을 촉진하는 모습을 사진에서 관찰할 수 있었으며, 지상부의 길이에 대한 생체중의 비율을 봐도 높게 나타나는 것으로 보아 다른 처리구에 비해 건강한 우량묘 생산에 효과적임을 알 수 있었다 (그림 3).

논산 동오 시드에서 운영하고 있는 무병묘 증식시설에서 무병묘를 이용한 정식용 순 증식 시 B. subtilis strain JS의 처리가 고구마 순 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 각 처리구의 면적은 37m², B. subtilis strain JS 1주에 1회 처리하였으며, 해당 미생물을 제외한 관수, 시비, 살균살충제 및 기타 자재의 처리는 모두 동일하였다. 그 결과 미생물을 사용하지 않은 대조구에 비해 미생물 1/100배 희석 처리구 및 1/50희석 처리구 모두 대조구 보다 많은 생산량을 보였다(표 2). 누적생산량을 살펴본 결과, 같은 기간 대조구에 비해 1/100S 및 1/50S 처리구에서 각각 10, 12단 (50본/단)이 증가해, 37m² 당 500~700본 정도 수량이 증가하는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 고구마 순 1단의 중량 역시 대조구의 1087g에서 1163g과 1251g으로 증가하여, 생산량은 물론 보다 강건한 고구마 순 생산이 가능하였다.

이와 같이 고구마 무병주 생산에 있어서 건강한 묘 생산을 위해 본 연구팀이 개발한 B. subtilis strain JS 처리는 지상부 길이 및 생체중의 증가, 지상부 길이 당 무게비의 증가, 우량묘 생산비율이 월등히 증가한 것으로 나타나 고구마 종순을 이용한 묘 생산에 있어서 식물생장촉진 박테리아 Bacillus subtilis strain JS의 적극적인 활용이 필요하다고 판단된다.

표 2. JS 처리를 통한 고구마 채묘량 결과

처리에 따른 채묘량(50본/단, 단위: 단)			
채묘일 \ JS처리	1/100 S	Control	1/50 S
04월 25일	22.5±3.9	17	21.5±2.1
05월 10일	13.5±3.2	13	14±3.7
05월 15일	15±1.8	15	17±2.3
05월 22일	25±3.8	21	26±1.2
합 계	76	66	78.5

(2) 무병묘 보급을 위한 농가 시험적용

무병묘를 이용하여 농가에 시험적용하고, 무병묘의 농가적용에 보완점 등을 파악하였다. 먼저 생장점배양을 통한 조직배양묘의 잎 등을 이용하여 바이러스 검정을 통해 무병묘로 판단된 기내 배양체를 본 연구결과에서 기술한 바와 같이 액체배지를 이용한 계대배양을 통해 증식시켰다. 증식시킨 무병묘를 트레이묘판에 정식하여 생육시킨 후 약 8마디 정도가 되면 채묘하여 본밭에 정식하여 재배하였다. 전북 정읍 시 포장 50평에 무병묘는 1000주를 시험 재배하여 조사한 결과, 무병주 이용의 경우 고구마 괴근의 피색이 선명하고, 표면이 보다 깨끗하게 나타났다. 한편 전체적으로 시장에서 요구하는 것 보다 괴근의 크기가 크게 형성되는 것으로 관찰되었다.

(3) 무병주 고구마 보급체계 확립을 위한 품종 특성 검증

국내 재배 품종 중 해외 유입품종의 혼입이 정량적으로 검증이 불가능하여 대량생산을 위한 검증 표준화의 난점이다. 이점에 착안하여 국내 주요 고구마 재배지(논산, 해남, 고창, 예산, 여주)를 비롯하여 해외 품종들을 수집하여 분류·검정을 통한 검증 표준화 관리 기준을 제시하고자 한다. 수집된 품종 중 16개의 품종을 개발된 무병묘 대량생산법을 통하여 건전무병주로 생산하였다(표 3, 그림 4,5).

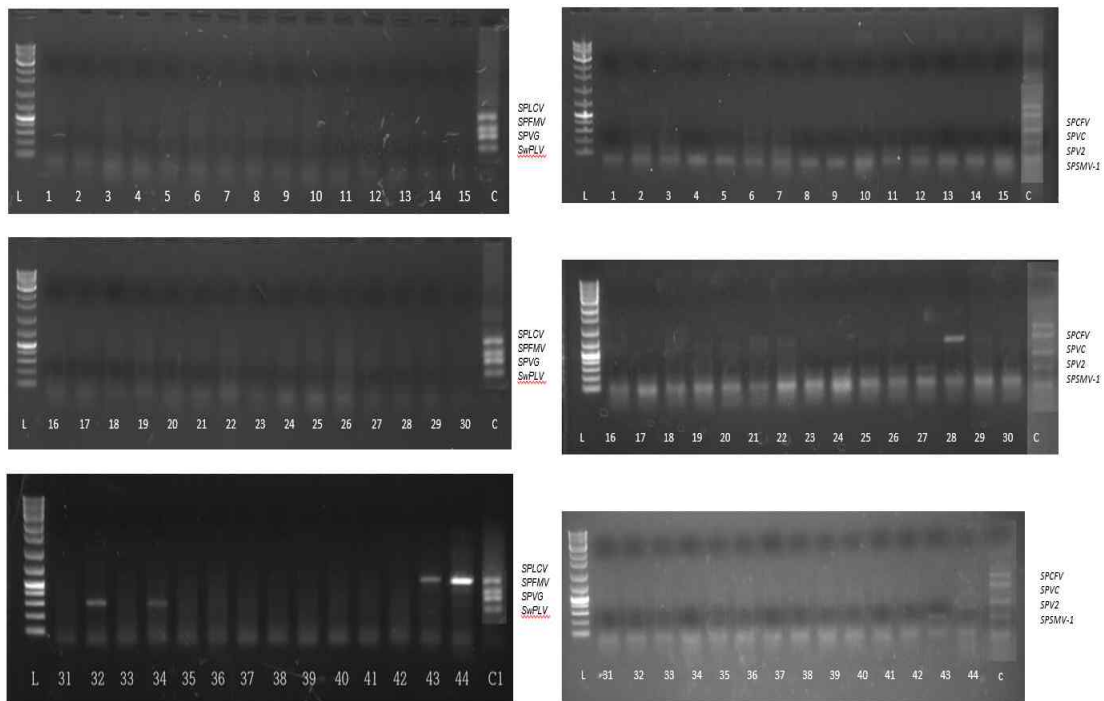


그림 4. 생산된 16품종 무병묘의 바이러스 검정(set A 검정 위 1,2,3: SPLCV, SPFMV, SPVG, SwPLV 4종 L: Size Marker C1, C2: Virus Marker, set B 위 4,5,6: SPCFV, SPVC, SPV2, SPSMV-1 4종 L: Size Marker C1, C2: Virus Marker)

표 3. 고구마 무병주 생산을 위한 품종 16종(채집 지역, 품종 명명)

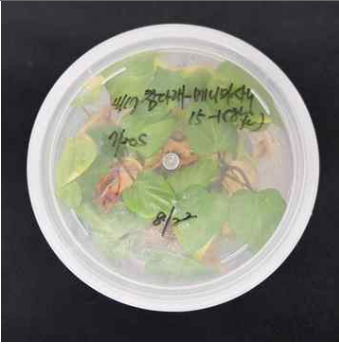




보유 품종	채집지역
베니마사리	익산, korea
맛젤	정읍, korea
백고구마	웅진, korea
베니하루카	논산, korea
안노베니	2013 실험실
황금	2013 실험실
베니사쓰마	고창, korea
울미	RDA, korea
연자미	RDA, korea
풍원미	RDA, korea
신건미	RDA, korea
단자미	RDA, korea
신자미	RDA, korea
주황미	RDA, korea
호감미	RDA, korea
진율미	RDA, korea





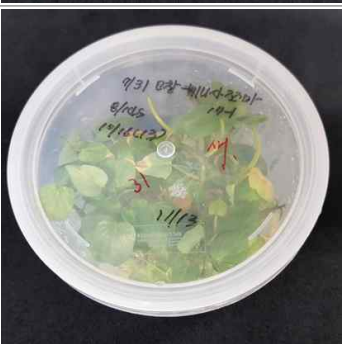

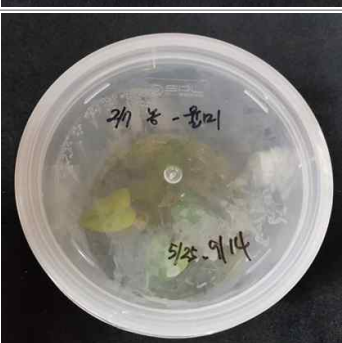








그림 5. 채집 종순을 통한 무병묘 생산 (연자미, 신자미)

생산된 무병주는 생산성과 품종별 특성이 대량생산시스템을 통한 보급체계에 적합성을 판별하기 위해 포장에 5월 정식하였다. 정식된 고구마 종순은 5개월간 포장상태에서 생육하여 10월 생산성과 품종별 특성 조사하기 위해 품종에 따라 종순 당 괴근의 수, 무게를 측정하였으며 괴근의 무게에 따라 대, 중, 소로 나누어 조사하였다. (표 4~5, 그림 6).

표 4. 16품종의 고구마 무병묘 생산 및 괴근 수확

명명	무병묘 생산	괴근 수확
베니마사리		
맛젤		
백고구마		
베니하루카		

안노베니		
황금		
베니사쯔마		
을미		
연자미		

<p>풍원미</p>		
<p>신견미</p>		
<p>단자미</p>		
<p>신자미</p>		
<p>주황미</p>		





호감미		
진율미		

표 5. 16품종의 고구마 생산량 및 종순 당 생산량

보유 품종	원산지	주당 괴근 수	주당 평균 무게(kg)	괴근 평균 무게(kg)	대 (200g 이상)	중	소 (100g 이하)
베니마사리	참다래	3.83	0.95	0.25	45	18	25
맛젤	정읍	4.53	0.87	0.19	18	14	36
백고구마	웅진	4.78	0.44	0.09	16	27	67
베니하루카	논산	3.40	0.46	0.13	9	13	12
안노베니	2013	2.63	0.38	0.14	9	16	17
황금	2013	1.25	0.10	0.08	3	1	16
베니사쓰마	고창	2.52	0.45	0.18	18	19	26
율미	농진청	2.25	0.14	0.06	0	2	25
연자미	농진청	2.44	0.39	0.16	16	19	26
풍원미	농진청	2.79	0.69	0.25	25	14	14
신건미	농진청	1.61	0.56	0.35	14	5	10
단자미	농진청	7.55	0.61	0.08	14	20	49
신자미	농진청	2.69	0.52	0.19	18	9	16
주황미	농진청	2.36	0.39	0.17	21	15	23
호감미	농진청	1.46	0.30	0.20	5	5	9
진율미	농진청	4.16	1.28	0.31	40	19	20



그림 6. 16개 품종의 재배 포장

베니마사리 품종은 총 23주를 정식하여서 88개의 괴근을 수확할 수 있었다. 그 중 200g 이상 되는 대과의 비율이 50% 정도로 많은 것을 확인할 수 있었다. 주당 괴근 수는 약 4개 정도였고, 주당 평균 무게는 약 1kg 이었다. 맛젤 품종은 총 15주를 정

식하여서 68개의 괴근을 수확할 수 있었다. 그 중 100g에 못 미치는 소과의 비율이 50% 정도인 것을 확인할 수 있었다. 주당 괴근 수는 베니마사리보다 높았지만 주당 평균 무게는 베니마사리에 조금 미치지 못하였다. 백고구마 품종은 총 23주를 정식하여서 110개의 괴근을 수확하였다. 그러나 그 중 60%이상이 100g 미만의 소과에 집중되었다. 주당 괴근 수는 가장 높았으나 주당 평균무게는 500g에도 미치지 못하였다. 베니하루카 품종은 10주를 정식하여서 34개의 괴근을 수확하였다. 괴근의 무게가 골고루 분포하는 것을 확인할 수 있었다. 주당 괴근 수는 약 3개였고 주당 평균 무게는 500g 정도였다. 안노베니 품종은 16주를 정식하여서 총 42개의 괴근을 수확하였다. 괴근들의 3분의 2 정도는 200g 미만의 중, 소과에 분포되었다. 주당 괴근 수는 2.6개였고 주당 평균무게는 400g 정도였다. 황금 품종은 16주를 정식하여서 총 20개의 괴근을 수확하였다. 수확한 과들도 대부분 100g 미만의 소과에 집중되어 16품종 중 주당 괴근 수와 주당 평균 무게 모두에서 가장 낮은 수치를 보여주었다. 베니사즈마 품종은 25주를 정식하여서 총 63개의 괴근을 수확하였다. 수확된 과들의 크기가 고르게 분포되었으며 주당 괴근 수는 2.5개 주당 평균무게는 450g 정도였다. 울미 품종은 12주를 정식하였으며 총 27개의 괴근을 수확하였다. 수확한 고구마는 대부분 소과에 집중되었으며 그로 인해 주당 평균무게가 150g 정도였고 주당 괴근 수는 2개였다. 연자미 품종은 25주를 정식하였으며 총 61개의 괴근을 수확하였다. 괴근의 크기는 소과에 조금 편중되는 경향이 있었지만 비교적 고르게 분포하였다. 주당 괴근 수는 2.4개였고 주당 평균무게는 400g 정도였다. 풍원미 품종은 19주를 정식하였고 총 53개의 괴근을 수확하였다. 과의 크기가 200g 이상인 대과에 조금 편중되었지만 중과와 소과에도 분포하였다. 주당 괴근수는 2.6개였고 주당 평균 무게는 700g 정도였다. 신건미는 18주를 정식하여서 총 29개의 괴근을 수확하였다. 과실의 크기는 대과에 소과에 집중되었고, 주당 괴근 수는 1.8개, 주당평균무게는 500g 정도였다. 단자미는 11주를 정식하여서 총 83개의 괴근을 수확하였다. 과실의 크기는 50%이상이 100g 미만의 소과에 분포하였다. 주당 괴근 수는 8개 정도로 가장 많았으며, 주당 평균무게는 600g 정도였다. 신자미는 16주를 정식하여서 총 43개의 괴근을 수확하였다. 과의 크기는 대과와 소과에 집중되었으며 주당 괴근 수는 2.7개 주당평균무게는 500g 이었다. 주황미는 25주를 정식하였으며 총 59개의 괴근을 수확하였다. 과실의 크기는 고르게 분포하였으며, 주당 괴근 수는 2.4개 이고, 주당 평균무게는 400g 정도였다. 호감미는 13주를 정식하여서 총 19개의 괴근을 수확하였다. 소과에 50%정도가 집중되었고 주당 괴근 수는 1.5개 주당평균무게는 300g 이었다. 진울미는 19주를 정식하여서 79개의 괴근을 수확하였다. 50%정도가 대과에 집중되는 것을 확인할 수 있었고, 주당 괴근 수는 4개 주당 평균무게는 1.3kg으로 가장 무거웠다.

위의 조사결과를 바탕으로 고구마 무병주 대량생산시스템을 통한 적합한 품종을 조사하였으며, 수확한 품종의 괴근들은 모두 동결마쇄하여 카르테노이드, 플라보노이드, 안토시아닌 함량과 더불어 전분, 포도당, 과당, 아밀로펙틴의 조성을 분석중에 있다. 이를 통하여 농가의 수요 품종과 비교 검증을 통한 보급 체계 확립을 위한 자료로 활용예정이다.

나. 품종 혼입화 방지를 위해 개발된 검증 기술을 이용한 현장 적용 및 tetra-primer ARMS-PCR검증 기술의 개발

(1) 각 지역별 고구마 유전자원의 채집현황 및 베니하루카 품종의 RAPD 기법을 이용한 품종 판별

현재 우리나라 고구마 농가의 재배 상황에서 품종의 혼입은 시장에서의 고구마 품질의 균일성을 저해하고 있다. 우선 품종의 유전적 분석을 위하여 각 지역별 품종 명칭대로 유전자원을 채집하였다. 채집한 유전자원은 다음의 표로 나타내었다.

표 6. 고구마 주요 산지 수집 품종

채집 지역	품종 명칭	비고
강화	호박 고구마	
논산	베니하루카, 호박 고구마	
무안	풍원미, 호감미, 연황미, 건풍미, 고건미, 모닝퍼플, 모닝화이트, 스이오우, 신건미, 바이오미, 신자미, 안노베니, 베니사쯔마, 울미, 주황미, 황금, 건황미, 진울미, 진홍미, 연자미, 신울미, 대유미, 증미, 단자미, 하얀미, 다호미	
용진	백고구마	
익산	베니마사리, 마샬	
정읍	맛젤, 안노베니, 아랑2호, 신자미	
해남	다호미, 주황미, 울미, 호박 고구마, 찰고구마	

표2-5를 보면 다른 지역임에도 불구하고 같은 품종 명칭을 붙이고 있는 고구마들을 확인할 수 있었다. 채집한 유전자원은 유전적 분석을 위하여 DNA를 추출하였으며 차후 분석에 이용할 것이다.

또한 현재 강화, 논산 등 9개 지역에서 가장 많이 재배되어지고 있는 베니하루카 품종을 RAPD 방법을 이용하여 검증한 결과, 베니하루카 품종이 아닌 기타 품종이 재배되어져 있고, 정확한 품종 검증 확인이 필요하다고 판단되어진다 (그림 7).

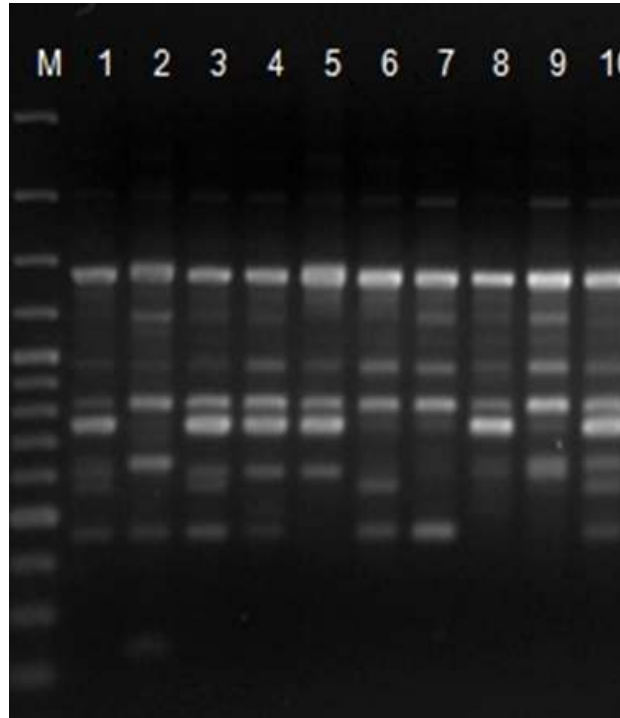


그림 7. RAPD 기법을 이용한 각 지역 베니하루카 품종 판별 1. 대조구 (표준품종 : 일본 도입), 2. 논산, 3. 강화, 4. 김제, 5. 정읍, 6. 고창, 7. 무안, 8. 해남, 9. 여주, 10. 용진

(2) 국내 재배 품종 및 근연관계 품종들의 GBS 분석을 통한 검증 시스템

국내 혼입화된 품종의 검증과 해외 모종들의 유전적 근연관계를 파악하여 원종을 구분해내고 이를 통한 보급체계에 맞는 품종을 검증해내어 활용하기 위한 방법으로 GBS(genotyping by sequencing)을 사용하여 총 66개 품종에 대한 유전자를 비교, 분석하였다.

① 재료 및 방법

① - 1. Sequence pre-processing

Barcode sequence를 이용하여 demultiplexing을 수행하고, adapter sequence 제거 및 sequence quality trimming을 수행하였다. adapter trimming은 cutadapt (version 1.8.3) 프로그램을 사용하고, sequence quality trimming은 SolexaQA (v.1.13) package 의 DynamicTrim과 LengthSort 프로그램을 사용하였다. DynamicTrim은 phred score에 따라 short read의 양쪽 끝의 bad quality base를 잘라내고 양질의 cleaned read로 정제하는 과정을 수행하며, LengthSort는 DynamicTrim에서 너무 많은 base가 잘린 read를 제거하는 과정을 수행하였다. DynamicTrim의 phred score ≥ 25 by 사용하였다.

① - 2. Alignment to reference genome

전처리 과정을 통과한 cleaned reads를 BWA (0.6.1-r104) 프로그램을 사용하여 표준유전체에 mapping을 수행하였다. mapping은 표준유전체와 시퀀싱한 샘플 간의 raw SNP (In/Del)을 detection하기 위한 선행 과정으로서 BAM format의 파일을 생성하며, 기본 값을 사용하였다.

① - 3. Raw SNP detection 및 consensus sequence 추출

Clena reads를 표준유전체에 mapping하여 생성된 BAM format의 파일을 SAMtools (0.1.16) 프로그램을 사용하여 raw SNP (In/Del)을 detection하고, consensus sequence를 추출하였다. 이때, SNP detection하는 과정 전에 in-house script를 사용하여 SNP validation을 거친 후, raw SNP (In/Del) detection을 수행하였다. 기본 값을 사용하였다.

① - 4. Generate SNP matrix

분석대상 간의 SNP 비교분석을 수행하기 위해 샘플간 통합 SNP matrix를 작성하였다. 각 샘플을 표준유전체와 비교하여 얻은 raw SNP position을 후보로 하여 합집합의 리스트를 구축하고, 이 때, 빈 영역(non-SNP loci)은 샘플의 consensus sequence로부터 채워 넣는 filling 과정을 거쳐 matrix를 작성하였다. 이후 샘플 간의 SNP 비교를 통해 mis-calling된 SNP(In/Del)좌를 필터하여 final SNP matrix를 작성하였다. 해당 좌를 기반으로 SNP(In/Del)을 유형 구분 기준에 따라 분류하였다.

② 표준유전체 정보

Reference information

- Sweetpotato scientific name : Ipomoea trifida(v3)
- Data source : Sweetpotato Genomics Resource

표 7. Summary of reference genome

Chr. #	Chromosome length (bp)	No. of Gene	Gene length (bp)	No. of mRNA	mRNA length (bp)	CDS length(bp)
Chr01	32,247,286	3,641	10,545,099	4,668	6,777,486	5,369,145
Chr02	27,613,708	2,901	8,014,352	3,781	5,738,037	4,513,213
Chr03	28,619,729	3,148	8,726,912	4,137	6,247,315	4,960,900
Chr04	32,512,527	3,455	9,842,269	4,420	6,525,754	5,203,477
Chr05	26,165,527	2,780	7,734,183	3,583	5,155,972	4,096,865
Chr06	26,089,173	2,718	7,563,066	3,554	5,265,657	4,115,721
Chr07	23,888,326	2,401	6,858,153	3,022	4,382,929	3,532,424
Chr08	19,656,612	1,921	5,434,394	2,499	3,697,218	2,929,151
Chr09	23,347,646	2,727	7,584,945	3,656	5,611,478	4,341,303
Chr10	24,884,449	2,589	7,437,164	3,175	4,508,018	3,683,398
Chr11	19,221,892	2,190	6,324,142	2,933	4,439,210	3,456,135
Chr12	24,193,007	2,802	7,768,634	3,690	5,525,040	4,261,826
Chr13	22,914,374	2,291	6,396,881	2,846	3,985,043	3,192,416
Chr14	19,195,807	2,036	6,063,313	2,731	4,078,063	3,173,633
Chr15	23,338,737	2,421	7,124,658	3,214	4,836,578	3,774,542
Chr00	32,247,286	7,986	8,162,602	8,207	4,629,344	4,257,200
Total	460,135,231	48,007	121,580,767	60,116	81,403,142	64,861,349

③ 분석결과

③ - 1. GBS 라이브러리 구축

③ - 2. GBS 라이브러리 구축 흐름도

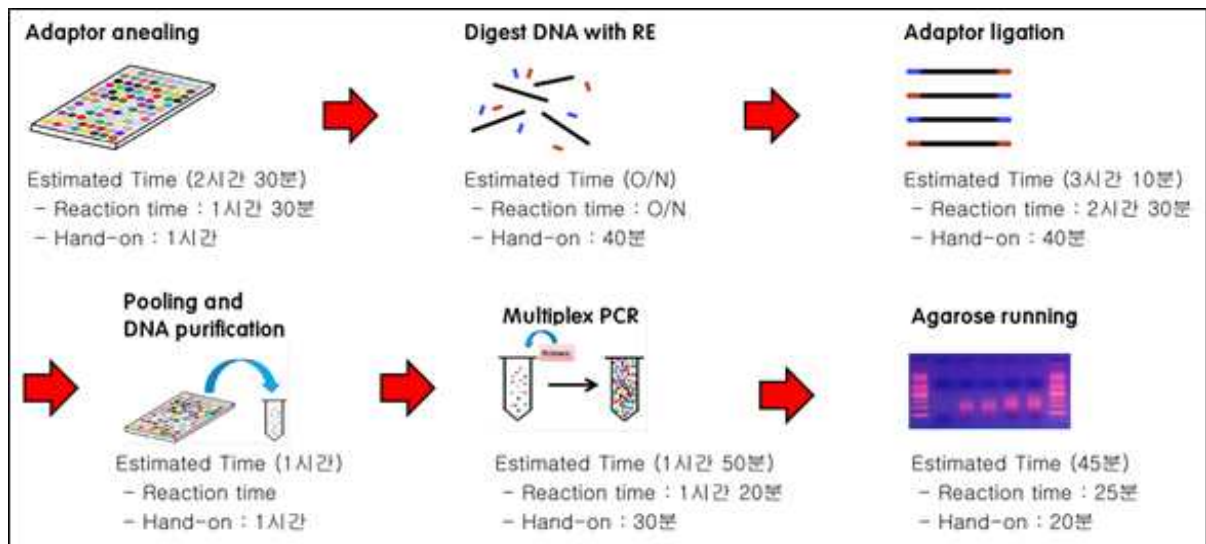


그림 8. work flow for GBS library construction

③ - 3. 샘플 정보

- 샘플 수량 : 66개
- 샘플 종류 : gDNA

표 8. GBS library - gDNA sample 66

번호	품종	생산지	번호	품종	생산지
1	베니마사리	찰다래	34	Uos-c-1	캄보디아
2	마살	찰다래	35	Uos-p-1	필리핀
3	다호미	센터	36	Uos-p-2	필리핀
4	주황미	센터	37	Uos-p-3	필리핀
5	울미	센터	38	Uos-p-5	필리핀
6	신자미	센터	39	Uos-CH-1	중국
7	풍원미	농진청	40	Uos-CH-2	중국
8	맛젤	정읍	41	Uos-CH-3	중국
9	안노베니	정읍	42	Uos-CH-4	중국
10	아랑2호	정읍	43	Uos-CH-5	중국
11	신자미	정읍	44	신울미	농진청
12	호박 고구마	강화군	45	울미	농진청
13	호감미	농진청	46	연자미	농진청
14	백고구마	웅진	47	진홍미	농진청
15	베니하루까	논산	48	풍원미	농진청
16	호박 고구마	논산	49	대유미	농진청
17	연황미	2013	50	증미	농진청
18	건풍미	2013	51	신건미	농진청
19	고건미	2013	52	단자미	농진청
20	모닝퍼플	2013	53	신자미	농진청
21	모닝화이트	2013	54	건황미	농진청
22	스이오우	2013	55	주황미	농진청
23	신건미	2013	56	하얀미	농진청
24	신자미	2013	57	호감미	농진청
25	안노베니	2013	58	연황미	농진청
26	바이오미	2013	59	다호미	농진청
27	베니사프마	2013	60	전미	농진청
28	울미	2013	61	진울미	농진청
29	주황미	2013	62	호박고구마	해아 농장
30	황금	2013	63	신홍 3호	김천
31	베니사프마	고창	64	KOKEI 14	일본
32	Uos-a-1	미국	65	Ipomoea Maragarit a	일본
33	Uos-a-2	미국	66	シルクスイート (시루쿠수이토)	일본

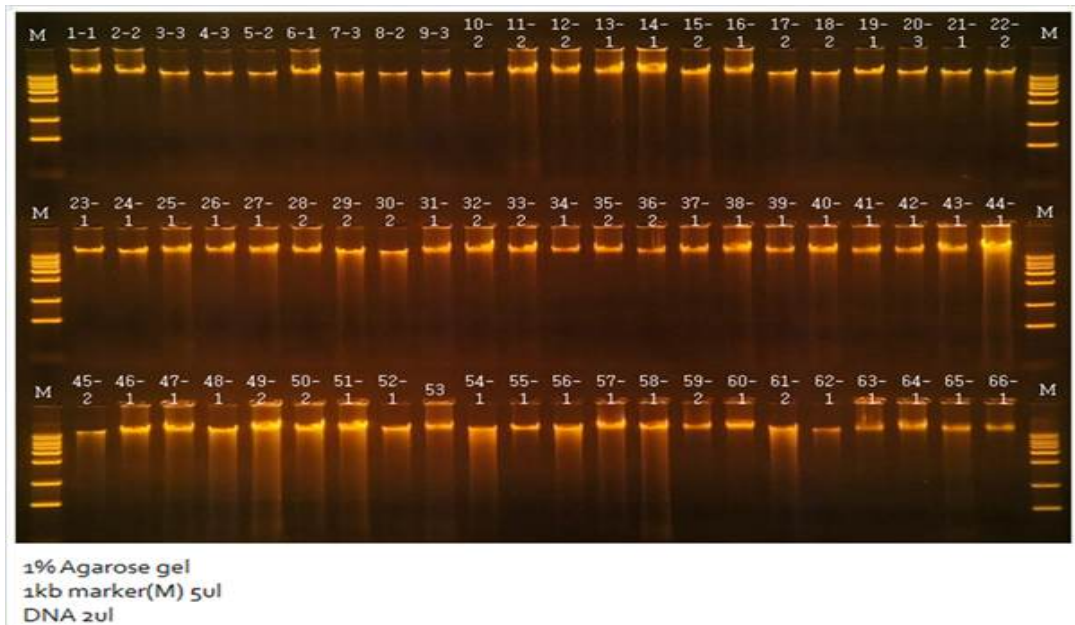


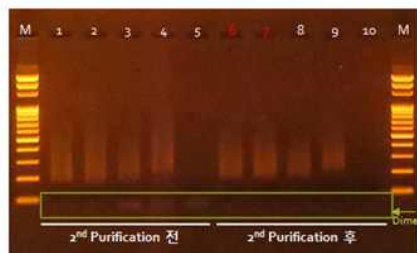
그림 9. GBS library - gDNA sample 66개 quality check

샘플 중 GBS library 제작에 적합하다고 판단되는 샘플을 선정하여 전기영동을 진행하였다. 전기영동 결과, GBS library를 제작하기에 적합하다고 판단하였다.

③ - 4. GBS library - Purification

실험과정

- Adaptor annealing → Digest DNA with *ApeK1* → Adaptor ligation → Pooling → 1st Purification
 → PCR → 2nd Purification



Lane	Sample	Lane	Sample	1st purification
1	고구마 GBS library -1	6	고구마 GBS library -1	O
2	고구마 GBS library -2	7	고구마 GBS library -2	O
3	고구마 Pooling	8	고구마 Pooling	X
4	Positive control	9	Positive control	O
5	Negative control	10	Negative control	X

그림 10. GBS library - Purification 결과 확인

전기영동 결과, 150-500bp에서 smear하게 library가 잘 형성되고, 200-250bp에서 농도가 높게 나타났다. 또한 purification 후, 하단의 primer dimer 등이 잘 제거되었다. 최종 pooling은 lane 6, 7 번을 사용하였다.

③ - 5. GBS library - QC report

Detailed result

NO.	Delivery name	Theragen name	Tape Concentration (ng/ul)	Volume (ul)	Tape Quantity (ng)	Main peak Size (bp)	Result
1	SG80228-1	TN1803L0001	5.56	16	88.96	233	Hold
2	SG80228-2	TN1803L0002	5.76	14	80.64	240	Hold

We check library quality using Agilent Tapestation4200 with High sensitivity D1000 Tape.

Tapestation image

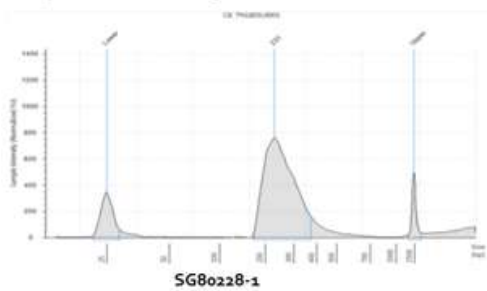


그림 11. GBS library - QC report 결과 확인

시퀀싱은 SG80228-1로 Hiseq2500 장비를 이용, Illumina FC 1 lane 시퀀싱 진행하였다.

③ - 6. GBS sequencing data

③ - 6 - 1. sequencing raw data

sequencing platform : Illumina HiSeq 2500 paired-end read for GBS sequencing

표 9. Summary of Sequencing raw data

Short read file	No. of barcode	No. of sample	No. of reads	Avg. length (bp)	Total length (bp)	No. of demultiplexed reads (%)
TN1803L0001_1.fq	66	66	261,761,248	101	26,437,886,048	505,458,628 (96.55%)
TN1803L0001_2.fq			261,761,248	101	26,437,886,048	
Total	66	66	523,522,496		52,875,772,096	

GBS sequencing 데이터는 이후 분석을 수행하기에 앞서 barcode sequence를 이용하여 샘플 별로 서열을 분리하는 demultiplexing 과정을 거쳤다.

③ - 6 - 2. sequence pre-processing

Barcode sequence를 이용하여 demultiplexing 과정을 거쳐 얻은 샘플 별 raw data 통계치 정보는 엑셀에 정리된 결과 일부를 캡처한 것으로 대신하였다.

표 10. Demultiplexing을 통한 샘플 별 raw data 통계치

A	B	C	D
AVG		7,658,464	773,504,870
SUM		505,458,628	51,051,321,428
1.BarCode	2.Sample name	3.Sum of raw reads	4.Total length of raw reads
CTCC	1-1	4,814,292	486,243,492
TGCA	2-2	6,245,312	630,776,512
ACTA	3-3	7,192,650	726,457,650
CAGA	4-3	4,401,936	444,595,536
AACT	5-2	5,115,192	516,634,392
GCGT	6-1	6,207,896	626,997,496
CGAT	7-3	5,218,060	527,024,060
GTAA	8-2	3,780,076	381,787,676
AGGC	9-3	5,454,754	550,930,154
GATC	10-2	3,802,232	384,025,432
TCAC	11-2	3,322,576	335,580,176
TGCGA	12-3	3,903,524	394,255,924
CGCTT	13-1	3,756,290	379,385,290
TCACC	14-1	8,586,368	867,223,168
CTAGC	15-2	8,741,812	882,923,012
ACAAA	16-1	5,873,204	593,193,604
TTCTC	17-2	9,014,442	910,458,642
AGCCC	18-2	5,465,954	552,061,354
GTATT	19-1	12,514,930	1,264,007,930
CTGTA	20-3	5,945,520	600,497,520
ACCGT	21-1	8,652,556	873,908,156
GCTTA	22-2	7,361,492	743,510,692
GGTGT	23-1	10,011,606	1,011,172,206
AGGAT	24-1	7,162,052	723,367,252
ATTGA	25-1	3,756,404	379,396,804
CATCT	26-1	7,005,090	707,514,090

GBS 데이터의 demultiplexing 과정을 통해 생산된 샘플 별 서열 파일은 barcode 및 adapter sequence를 제거하고, sequence quality trimming을 수행하였다 (결과 통계치는 엑셀에 정리된 결과 일부를 캡처한 것으로 대신하였다).

표 11. Demultiplexing을 통한 샘플 별 trimmed data 통계치

A		B		E		F		G		H	
AVG				6,782,153		536,714,971		79.27		88.61%	
SUM				447,622,120		35,423,188,100					
1.BarCode	2.Sample name	5.Sum of trimmed reads		6.Total length of trimmed reads (bp)		7.Avg. length of trimmed reads (bp)		8.Trimmed/Raw (%)			
CTCC	1-1	4,256,420		340,376,183		79.97		88.41%			
TGCA	2-2	5,508,954		441,167,052		80.08		88.21%			
ACTA	3-3	6,339,066		505,462,006		79.74		88.13%			
CAGA	4-3	3,917,506		312,463,427		79.76		89.00%			
AACT	5-2	4,548,682		363,605,610		79.94		88.92%			
GCGT	6-1	5,511,320		442,201,711		80.24		88.78%			
CGAT	7-3	4,616,676		365,762,310		79.23		88.47%			
GTAA	8-2	3,348,826		266,984,273		79.72		88.59%			
AGGC	9-3	4,880,154		388,466,295		79.60		89.47%			
GATC	10-2	3,388,104		269,710,183		79.61		89.11%			
TCAC	11-2	2,944,086		235,530,657		80.00		88.61%			
TGCGA	12-3	3,459,456		275,906,996		79.75		88.62%			
CGCTT	13-1	3,305,266		262,391,621		79.39		87.99%			
TCACC	14-1	7,585,146		606,799,168		80.00		88.34%			
CTAGC	15-2	7,738,392		614,676,615		79.43		88.52%			
ACAAA	16-1	5,233,148		420,853,939		80.42		89.10%			
TTCTC	17-2	7,890,244		622,098,283		78.84		87.53%			
AGCCC	18-2	4,842,414		382,280,931		78.94		88.59%			
GTATT	19-1	11,107,722		886,123,295		79.78		88.76%			
CTGTA	20-3	5,255,792		416,736,539		79.29		88.40%			
ACCGT	21-1	7,665,136		608,618,622		79.40		88.59%			
GCTTA	22-2	6,495,288		516,210,955		79.47		88.23%			
GGTGT	23-1	8,893,466		712,071,299		80.07		88.83%			
AGGAT	24-1	6,439,314		514,941,356		79.97		89.91%			
ATTGA	25-1	3,349,744		267,024,467		79.71		89.17%			
CATCT	26-1	6,220,654		495,435,355		79.64		88.80%			

③ - 7. Alignment to reference genome

③ - 7 - 1. Mapping 통계치

Demultiplexing과 sequence quality trimming을 통해 확보된 각 샘플의 clena reads를 reference genome에 mapping하고, 통계치를 추출하였다.

A	B	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
AVG		6,782,153	4,920,538	72.98%	60,734	35.17	13.41	9,678,366	159.58	1.9652%
SUM		447,622,120	324,755,352		4,008,439			638,641,482		
1.BarCode	2.Sample name	9.Sum of trimmed reads	10.No. of mapped reads	11.Percent of mapped reads (%)	12.No. of mapped region	13.Avg. depth of mapped region (#)	14.medain depth of mapped region (#)	15.Total length of mapped region (bp)	16.Avg. length of mapped region (bp)	17.Reference Genome coverage (%)
CTCC	1-1	4,296,430	3,171,790	74.52%	54,757	26.36	11.73	8,867,463	161.94	1.8009%
TGCA	2-2	1,508,954	1,947,004	71.66%	59,685	29.50	12.45	9,785,302	163.95	1.9873%
ACTA	3-3	6,339,066	4,651,946	73.39%	61,259	33.73	13.28	9,970,322	162.76	2.0249%
CAGA	4-3	1,917,506	2,889,639	73.76%	52,454	25.02	11.24	8,476,049	161.59	1.7214%
AACT	5-2	4,548,682	3,343,413	73.50%	55,692	25.70	11.03	9,272,495	166.50	1.8832%
GCGT	6-1	5,311,320	4,098,442	74.36%	64,230	27.70	11.83	10,791,607	168.02	2.1917%
CGAT	7-3	4,616,878	3,388,120	73.39%	53,002	29.88	12.71	8,501,725	160.40	1.7267%
GTAA	8-2	3,348,826	2,459,501	72.95%	47,451	22.83	10.58	7,683,316	161.92	1.5604%
AGGC	9-3	4,886,154	3,587,955	73.52%	55,101	29.42	12.19	8,800,202	159.71	1.7873%
GATC	10-2	1,388,104	2,479,511	71.18%	50,381	22.39	10.83	8,216,883	163.09	1.6688%
TCAC	11-2	2,944,036	2,177,048	73.95%	54,178	17.87	9.34	9,086,029	167.71	1.9453%
TGCGA	12-3	1,458,456	2,466,102	71.29%	54,449	20.32	9.67	8,835,954	162.28	1.7943%
CGCTT	13-1	1,305,266	2,438,330	73.77%	53,717	19.57	9.49	8,593,760	167.43	1.8266%
TCACC	14-3	7,585,146	5,533,938	72.96%	65,803	36.54	13.78	10,762,345	163.55	2.1858%
CTAGC	15-2	7,738,392	5,732,692	74.08%	63,947	40.49	14.70	10,259,514	160.44	2.0836%
ACAAA	16-1	5,233,148	1,889,772	74.33%	61,758	27.34	11.56	10,187,212	166.57	2.0803%
TTCTC	17-2	7,890,244	5,861,866	74.29%	66,220	40.58	14.50	10,510,528	158.70	2.1346%
AGCCC	18-2	4,842,434	3,603,379	74.41%	55,194	30.48	13.08	8,813,216	159.68	1.7899%
GTATT	19-1	11,107,722	8,255,199	74.32%	71,201	52.42	17.73	11,311,210	158.86	2.2972%
CTGTA	20-3	5,255,792	3,915,820	74.50%	55,349	34.03	14.12	8,672,871	156.89	1.7614%
ACCGT	21-1	7,665,138	5,610,205	73.19%	63,483	40.48	14.76	10,064,351	158.59	2.0440%
GCTTA	22-2	6,495,288	4,772,577	73.48%	60,241	37.25	14.54	9,510,006	157.87	1.9314%
GGTGT	23-1	8,893,466	6,257,931	70.37%	67,183	40.66	14.51	10,831,302	161.22	2.1998%
AGGAT	24-1	4,438,314	4,709,804	73.14%	60,630	35.53	14.01	9,613,247	158.56	1.9524%
ATTGA	25-1	3,349,744	2,487,183	74.25%	52,608	21.07	10.31	8,594,691	163.37	1.7455%
CATCT	26-1	6,220,654	4,425,474	71.14%	59,441	32.60	13.06	9,725,487	163.62	1.9752%

그림 12. 샘플 별 mapping 통계치

③ - 7 - 2. Distribution of mapping reads

Trimming 과정을 거쳐 확보된 clena reads를 reference genome에 mapping을 수행하였다. GBS로 생산된 read들이 reference genome에 균일하게 분포하는지를 확인하기 위해 임의로 두 샘플을 선정하여 분포도를 확인하였다. 아래 정리된 분포도는 샘플 3(ACTA), 37(TAGGAA)에 대한 결과이다.

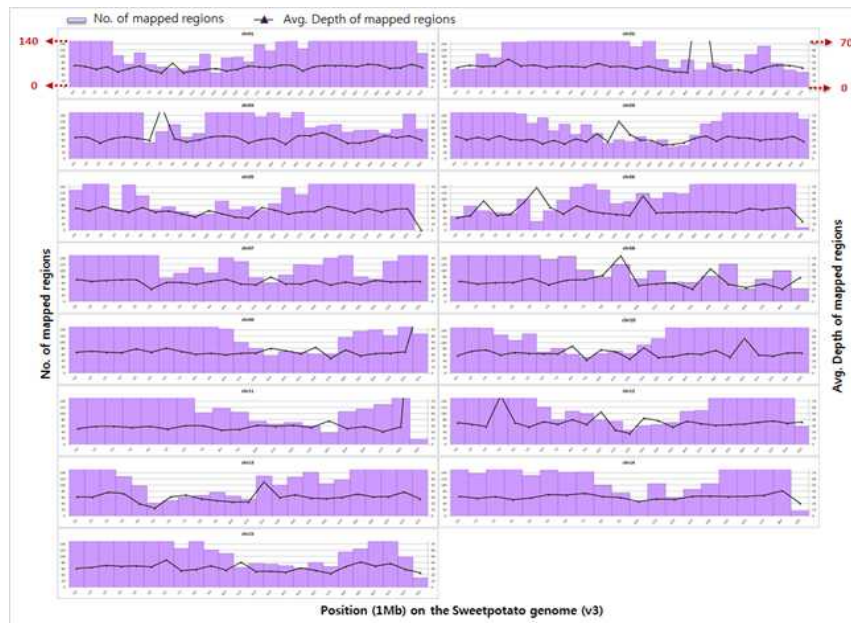


그림 13. Mapped read distribution of 3 (ACTA)

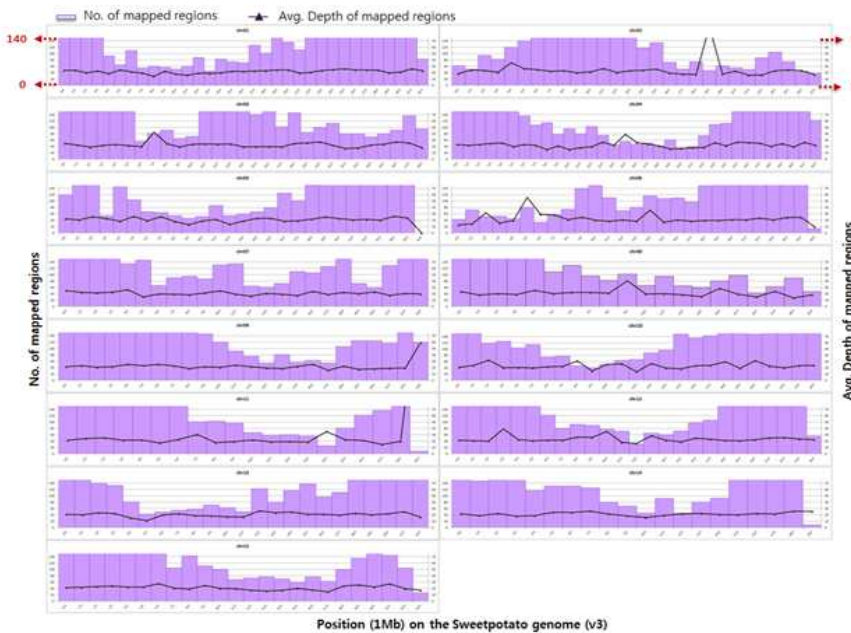


그림 14. Mapped read distribution of 37 (TAGGAA)

위의 과정을 통하여 66개체 내에서 얻을 수 있었던 SNPs는 총 376,395개였고, 그 중 효율적인 SNPs 선발을 위하여 MAF (minor allele frequency) > 5% 와 Missing data < 30%의 기준으로 필터링하여 39,424개의 SNPs (single nucleotide polymorphism)를 확인할 수 있었다 (표 12).

표 12. Summary of SNP filter process

Filter step	Filter item	SNP matrix loci
1	66 individual total SNP matrix	376,395
2	MAF (minor allele frequency) > 5%	120,608
3	Missing data < 30%	39,424

무병주 생산 보급체계에 난점으로 꼽히는 품종 혼입화는 현재까지 개발된 마커를 비롯하여 다양한 방법으로 검증, 판별되고 있으나 이미 국내에 유입된 다량의 품종들로 인하여 품종 분류에 많은 비용과 어려움이 따르고 있다. 이에 따라 GBS기반의 SNPs 마커를 이용하여 국내 높은 생산 점유율을 나타내는 4종의 품종 (베니하루카, 안노베니, 호감미, 풍원미)을 판별하고자 tetra-primer Amplification Refractory Mutation System PCR (ARMS-PCR)를 실시하였다.

(3) GBS기반의 SNPs를 이용한 4품종의 구분 마커

SNPs는 Genome서열 간의 단일염기서열의 차이를 나타내는 것으로, 품종간의 서열 차이를 이용하여 품종 내 혼입화를 판별하는 마커로서 사용할 수 있다 (Park et al., 2006; Jeong et al., 2010; Kim et al., 2012). SNPs 마커는 주로 PCR과 전기영동을 이용하는 방법이므로 다량의 샘플수를 이용하는 경우에는 간단하고 경제적인 방법이기 때문에, 품종 판별에 적합한 수단이다 (Ye et al., 2001).

실험에 사용된 품종 4가지 (베니하루카, 안노베니, 풍원미, 호감미)는 국내에서 시장점유율이 높은 품종이다 (그림 15). 또한, tetra-primer ARMS-PCR는 앞서 시행한 GBS에서의 후보 SNPs 중에서 발현율이 높으며 4품종 간에 차이가 나타나는 2개의 SNPs (04-27457768, 03-16195623)을 선택하여 실시하였다. 사용된 프라이머는 효과적인 이용을 위하여 타겟이 되는 말단서열과 말단에서 3번째 서열을 변경하여 작성하였고, 프라이머의 효율향상을 위해 최적의 annealing temperature를 찾고자 하였다 (표 13).

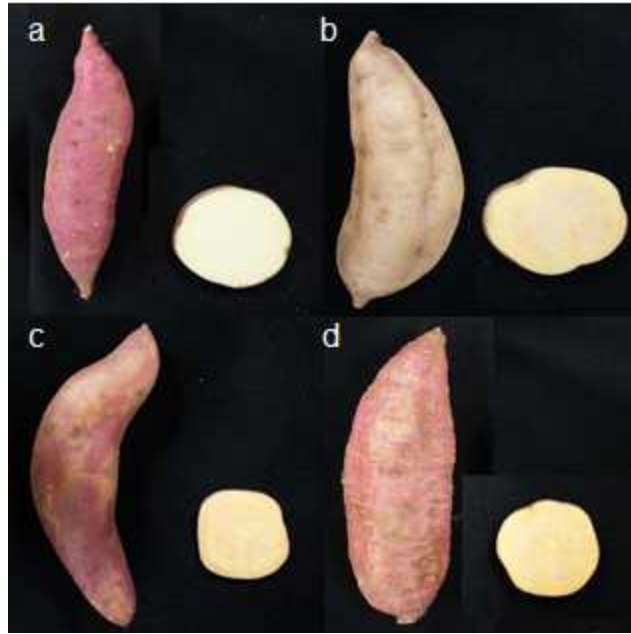


그림 15. Four varieties of sweet potato. a Beniharuka. b Annobenii. c Pungwonmi. d Hogammi. Each box represents a cross section of four varieties

표 13. 고구마의 4품종 구분을 위한 프라이머 설계

SNP	System	Primer sequence (5' →3')*	Allele	T _m (°C)	Amplicon (bp)
04-2 7457 768	Forward inner primer	CTTTTGCTGTGGAAATGTAAATAAGAG	G	52.7	164
	Reverse inner primer	AATCTTCAGTGCTAGCTCATTGTAATG	C	55.4	
	Forward outer primer	CCTCCTAAACTTTTGCAGCTAAGAGTATT		56.9	349
	Reverse outer primer	TCCAGAGTATATAACAAACCTTTGTGG		54.7	
03-1 6195 623	Forward inner primer	CTTCCAACGCTCTGACCGTGTAACCTATCC	C	63.2	205
	Reverse inner primer	TTGACGGACGAAGTGGTGCTAGCCATA	T	64.6	292
	Forward outer primer	AAACCGAGCAGACTCTTTCCAGTTTCC		63.5	440
	Reverse outer primer	CTAGTTTGGCTATGGTGGGCAAGCTTTG		62.9	

T_m : Temperature of melting

* : The mismatches of the allele-specific primers are emphasized in bold

선택한 SNPs와 그에 맞게 작성된 프라이머를 이용하여 tetra-primer ARMS-PCR를 시행한 결과, 아래와 같이 2개의 SNPs (04-27457768, 03-16195623)에서 4품종이 구분되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 16, 17). SNP 04-27457768에서는 안노베니 (2)와 호감미 (4)에서는 heterozygote를 나타내며 2개의 밴드를 나타내었다. 반면, 베니하루카 (1)와 풍원미 (3)에서는 각각의 설정된 밴드 사이를 나타내었으며, 그 크기는 164bp와 241bp이었다. SNP 03-16195623에서는 안노베니 (2)를 제외한 나머지 3가지 품종에서 heterozygote를 나타내며 2개의 밴드가 형성되었다. 반면 안노베니 (2)에서는 설정된 사이즈인 292 bp를 나타내었다. 그러므로 2개의 SNPs를 이용하여 국내 생산 점유율이 높은 4가지 품종의 구분이 가능하게 되었다.

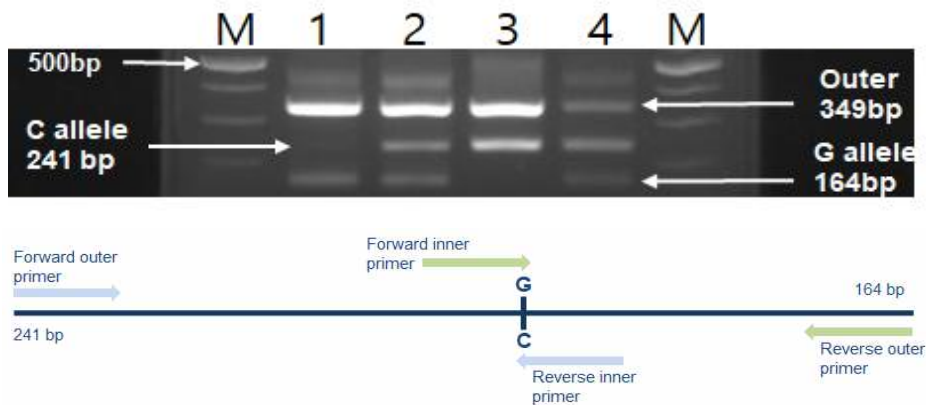


그림 16. The production of Tetra-primer ARMS-PCR using primers for SNP 04-27457768. M,100-bp DNA ladder; 1, Beniharuka; 2, Annobeni; 3, Pungwonmi; 4, Hogammi

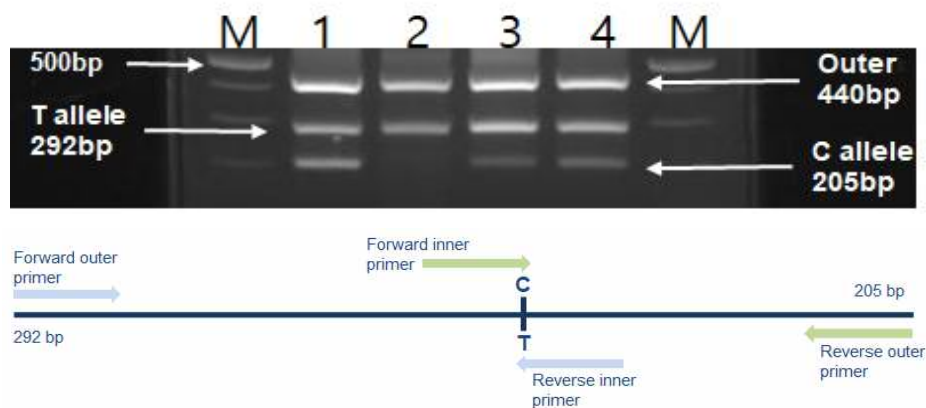


그림 17. The production of tetra-primer ARMS-PCR using primers for SNP 03-16195623. M,100-bp DNA ladder; 1, Beniharuka; 2, Annobeni; 3, Pungwonmi; 4, Hogammi

또한, 전기영동에서 3개의 밴드가 형성된 품종의 실제 염기 서열을 확인해보고자, DNA sequencing을 실시하였다 (그림 18). DNA sequencing은 GBS 분석의 결

과와 비교하기 위해 함께 나타내었으며, 각 품종별 서열은 Forward와 Reverse 방향에서 실시하여서 나타내었다. 그림 18에서는 SNP loci에서 대표적인 염기 하나만을 나타내므로, 그 유전자 자리에서 나타난 모든 염기들을 확인하기 위하여, 그림 19에서 더욱 자세히 알아보았다. 각 SNP에서 3개의 밴드를 나타낸 품종에서는 실제로 hetero형태로 존재하고 있는 것을 확인하였고, 전기영동의 결과와 일치하는 것을 나타내었다. 고구마가 6배체이며 이형접합체인 복잡한 염기구조를 갖고 있는 식물체이므로 이와 같이 SNPs에서 3개의 밴드가 나올 수 있다는 것을 확인하였다

(Kou et al.,2017; Wu et al., 2018; Yang et al., 2018).

a. SNP 04-27457768



그림 18. DNA sequences of 4 varieties and GBS data annotated from *I. trifida* in a SNP 04-27457768 and b SNP 03-16195623 loci. Red arrows indicate outer primers and blue arrow indicate specific inner primers sites, respectively. Yellow boxes indicate the SNP sites

b. SNP 03-16195623



그림 18. (계속)

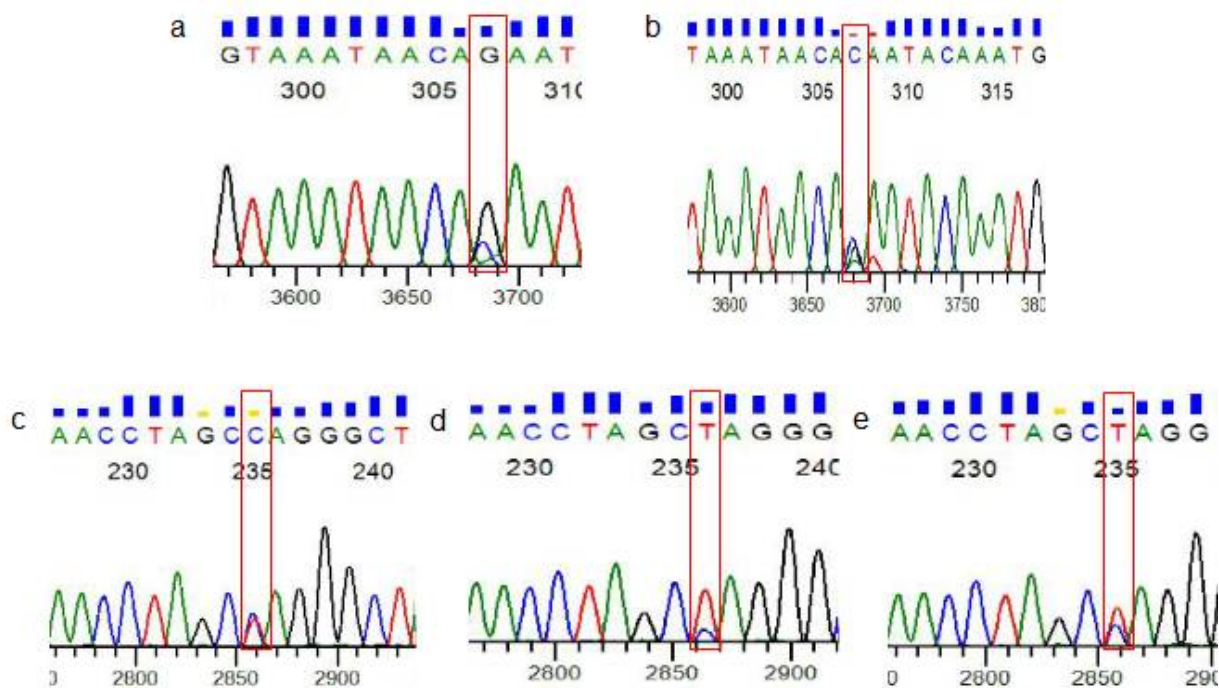
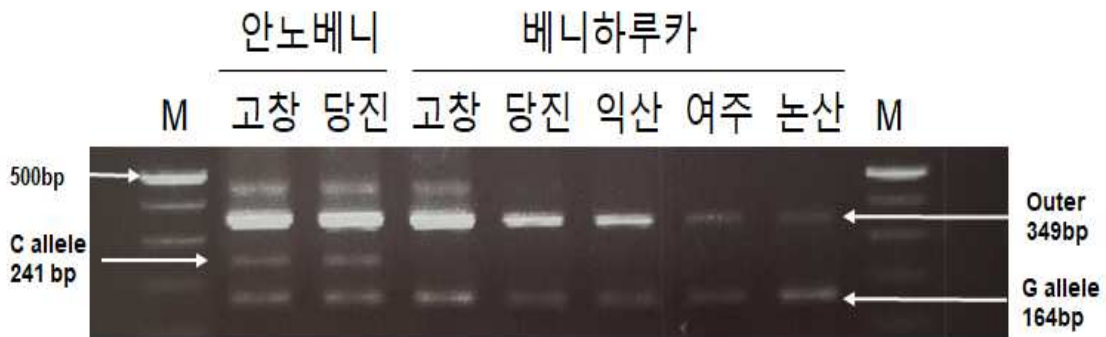


그림 19. Mixed sequence content following a heterozygote in (a-b) SNP 04-27457768 and (c-e) SNP 03-16195623. Boxes indicate SNP sites showing two wavelengths of each allele. a SNP 04-27457768 loci in Annobeneni. b SNP 04-27457768 loci in Hogammi. c SNP 03-16195623 loci in Beniharuka. d SNP 03-16195623 loci in Pungwonmi. e SNP 03-16195623 in Hogammi

(4) 품종 혼입화 방지를 위해 개발된 검증기술을 이용한 현장 적용

2차년도에 개발된 고구마 품종 판별 마커 (SNP 04-27457768, SNP 03-16195623)를 이용하여, 실질적으로 다양한 지역 농가의 안노베니 (고창, 당진)와 베니하루카 (고창, 당진, 익산, 여주, 논산)에 적용하였다. 실험 방법은 앞서 설정한 프라이머 및 적정 온도를 이용하여 tetra-primer ARMS-PCR를 실시하였으며, 타겟으로 설정된 SNP에서 어느 특정한 염기서열을 갖고 있을 경우에는 2개의 밴드 (Outer band, 타겟 염기 중 하나의 Inner band)를 나타냈고, 타겟의 SNP에서 두 염기를 모두 나타내는 hetero인 경우에는 3개의 밴드 (Outer band, 타겟 염기의 두 개의 Inner band)를 나타냈다. 두 개의 SNPs에서 품종에 따라 다른 염기서열을 나타냈으며, 같은 품종끼리는 같은 밴드를 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (그림 20).

a. SNP 04-27457768



b. SNP 03-16195623

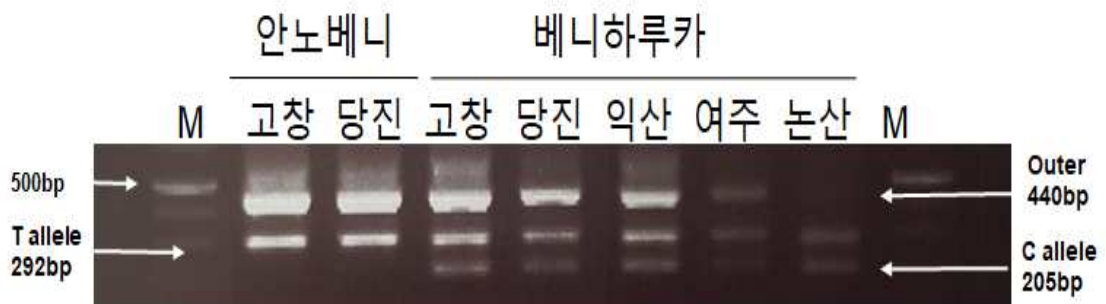


그림 20. The production of tetra-primer ARMS-PCR using primers for a SNP 04-27457768 and b SNP 03-16195623 loci. M,100-bp DNA ladder

2. 고구마 신규 바이러스 진단을 위한 기초연구

가. 고구마 바이러스병의 발생상황 조사

2017년부터 2018년까지 고구마 주산지인 포항, 고창, 예산, 당진, 논산에서 다양한 이상증상을 보이는 고구마를 품종별로 잎, 줄기, 괴근을 채집함. 바이러스 발생현황을 조사하기 위하여 분석을 위하여 총 245점의 시료를 채집 및 확보하였으며, 모두 초저온 냉동고에 보관중에 있음(표 14,15, 그림 21~30).

표 14. 지역별 고구마 품종 및 채집시료 수^{1, 2}

채집지역	품종명	채집시료 수	잎/줄기	괴근
고창(A농가)	베니하루카	9	7	2
예산(B농가)	베니하루카	10	10	-
	호박고구마	6	6	
당진(C농가)	(미확인)	6	3	3
논산(D농가)	베니하루카	10	10	
		41	36	5
포항(E농가)	호박고구마	10	10	-
	베니하루카	10	10	-
고창(F농가)	47품종	103	63	40
고창(G농가)	베니하루카	20	20	
고창(H농가)	베니하루카	21	20	1
논산(I농가)	호박고구마	14	14	-
	베니하루카	26	26	-
		245	199	46

¹. 전국 고구마 주산지에서 잎 시료를 주로 채집하였으며, 이상증상을 보이는 괴근을 추가로 확보함. 고창 F농가에서 채집한 괴근의 경우, 47개 품종 중 20개 품종을 서울시립대를 통해 분양받음.

². 2018년 F농가에서 채집한 잎/줄기 시료의 경우, 같은 자리에서 서로 다른 잎/줄기를 총 3점씩 채집했으며, RT-PCR 진단결과를 종합함.

표 15. 채집한 고구마 품종별 시료 수^{1, 2, 3}

번호	품종명	2017년		2018년		번호	품종명	2017년		2018년	
		있	괴근	있	괴근			있	괴근	있	괴근
1	건풍미	-	-	1	-	25	연황미	-	-	2	-
2	건황미	-	-	1	-	26	율미	-	-	3	2
3	고건미	-	-	1	-	27	전미	-	-	1	-
4	다호미	-	-	2	-	28	주황미	-	-	3	2
5	단자미	-	-	1	2	29	중미	-	-	1	-
6	대유미	-	-	1	-	30	진홍미	-	-	1	-
7	마라가리파	-	-	1	-	31	풍원미	-	-	2	2
8	마샬	-	-	1	-	32	호감미	-	-	2	2
9	맛젤	-	-	1	-	33	호박고구마	27	-	12	2
10	모닝퍼플	-	-	1	-	34	화이트스킨	-	-	1	-
11	모닝화이트	-	-	1	-	35	황금	-	-	1	-
12	베니하루카	43	2	51	3	36	Kokei 14	-	-	1	-
13	베니마사라	-	-	1	-	37	UOS-A-1	-	-	1	-
14	베니사쯔마	-	-	2	-	38	UOS-C-1	-	-	1	-
15	비오미	-	-	1	-	39	UOS-CH-1	-	-	1	-
16	스이오	-	-	1	-	40	UOS-CH-2	-	-	1	-
17	신건미	-	-	2	-	41	UOS-CH-3	-	-	1	-
18	신자미	-	-	4	-	42	UOS-CH-4	-	-	1	-
19	신율미	-	-	2	-	43	UOS-CH-5	-	-	1	-
20	실크스윗	-	-	1	-	44	UOS-P-1	-	-	1	-
21	신홍 3호	-	-	1	-	45	UOS-P-2	-	-	1	-
22	아랑 2호	-	-	1	-	46	UOS-P-3	-	-	1	-
23	안노베니	-	-	2	-	47	UOS-P-5	-	-	1	-
24	연자미	-	-	1	-	48	미확인	3	3	-	-

¹ : 잎의 경우, 잎과 줄기를 같이 채집함.

² : 채집 및 확보한 시료는 초저온냉동고에 보관중임.

³ : 없음.

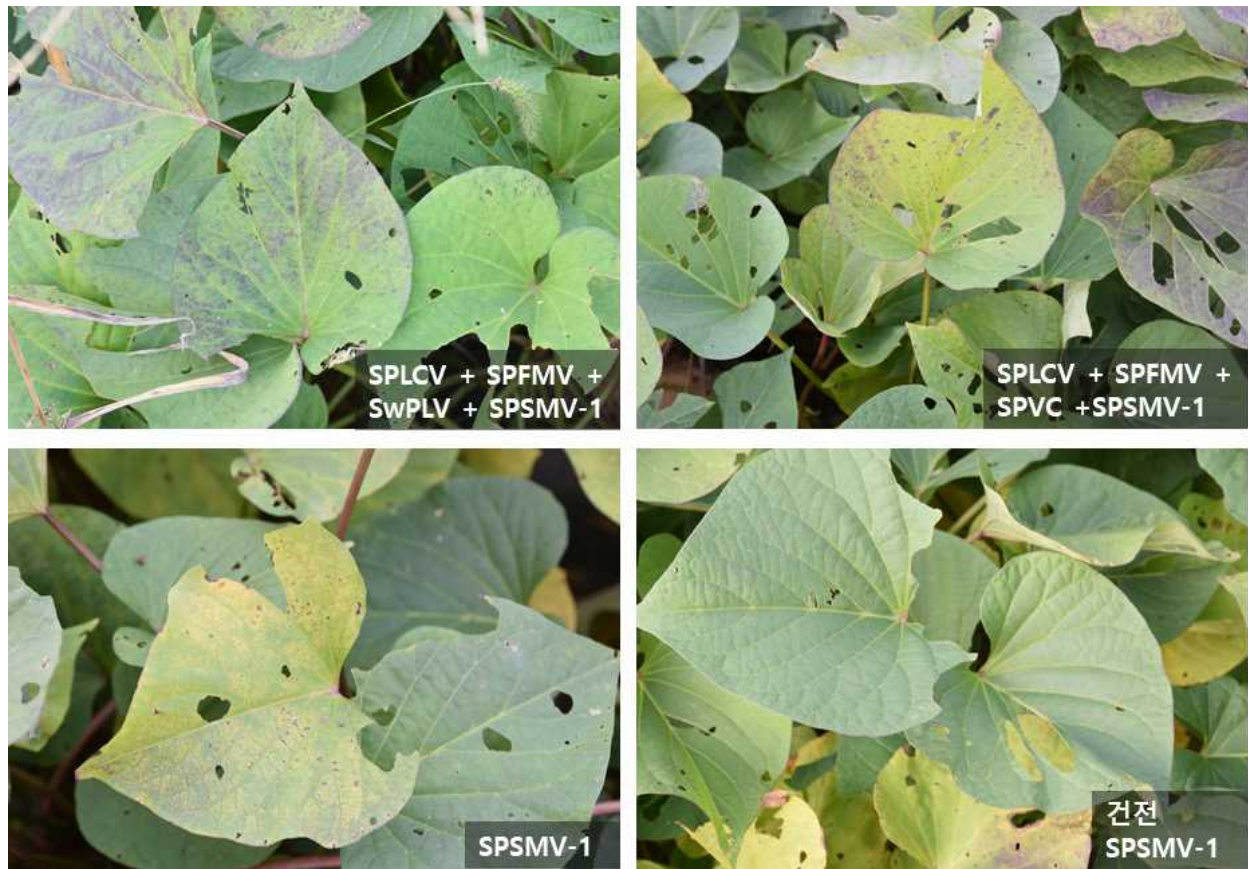


그림 21. 2017년 채집한 고구마 잎에서 보이는 이상증상. 위 시료는 고창에 위치한 A농가에서 채집한 베니하루카 품종임. 주로 황화증상이 많이 보였으며, 이상증상을 보이지 않는 시료를 채집하여 비교함. RT-PCR 진단결과를 같이 표기함.



그림 22. 2017년 채집한 고구마 잎에서 보이는 이상증상. 위 시료는 고창에 위치한 B농가에서 채집한 베니하루카 품종임. 수확하는 과정에서 이상피근을 발견하였으며, 이를 채집함. RT-PCR 진단결과를 같이 표기함.

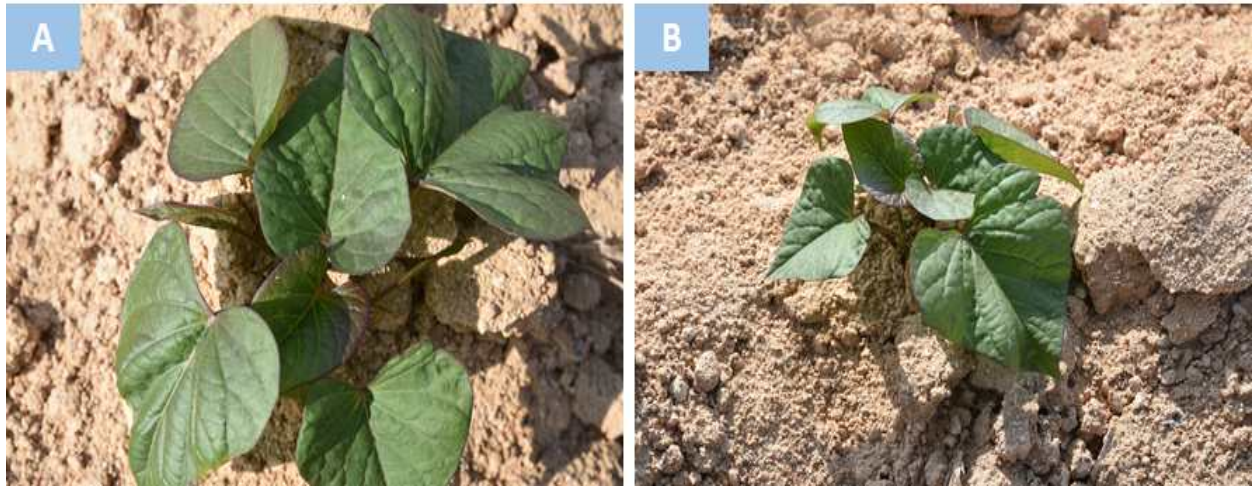


그림 23. 2017년 채집한 고구마 잎에서 보이는 이상증상. 위 시료는 예산에서 채집하였으며, 품종은 베니하루카임. 베니하루카 줄기 16점을 채집하였으며, 경북대학교 내 시험포장에 심어 잎을 키운 후 RT-PCR 진단함.



그림 24. 2017년 채집한 고구마 잎에서 보이는 이상증상. 위 시료는 당진에 위치한 C농가에서 확보한 고구마 괴근이며, 품종을 확인하지 못함. 수확 후 이상괴근 3점을 분양받았으며, RT-PCR 진단결과를 같이 표기함.



그림 25. 2017년 채집한 고구마 잎에서 보이는 이상증상. 위 시료는 논산에 위치한 D농가에서 채집하였으며, 품종은 베니하루카임. 고구마 잎에서 보이는 다양한 이상증상을 채집하였으며, RT-PCR 진단결과를 같이 표기함.



그림 26. 2018년 고창에서 채집한 고구마 농가 전경 및 앞에서 보이는 이상증상. 48개 품종이 일렬로 식재되어 있었으며, 팻말로 구별함. 팻말로 식별이 가능한 품종에서 잎/줄기 3점씩 총 63개 고구마에서 183점을 채집하였음. RT-PCR 진단하여 고구마 품종별 바이러스의 발생현황을 조사함.



그림 27. 2018년 채집한 고구마 괴근에서 보이는 이상증상. 위 시료는 고창에 위치한 F 농가에서 유래하였으며, 서울시립대를 통해 20개 품종에서 괴근을 2개씩 총 40점을 분양받음. RT-PCR 진단하여 고구마 품종별 바이러스의 발생현황과 동일품종에서의 잎/줄기와 괴근에서 검출되는 바이러스의 차이가 있는지 조사함.



그림 28. 2018년 채집한 고구마 잎에서 보이는 이상증상. 위 시료는 논산에 위치한 G농가에서 채집하였으며, 품종은 베니하루카임. 이 농가는 일반토양에서 고구마를 식재하였음. 고구마 잎에서 보이는 다양한 이상증상을 채집하였으며, RT-PCR 진단결과를 같이 표기함

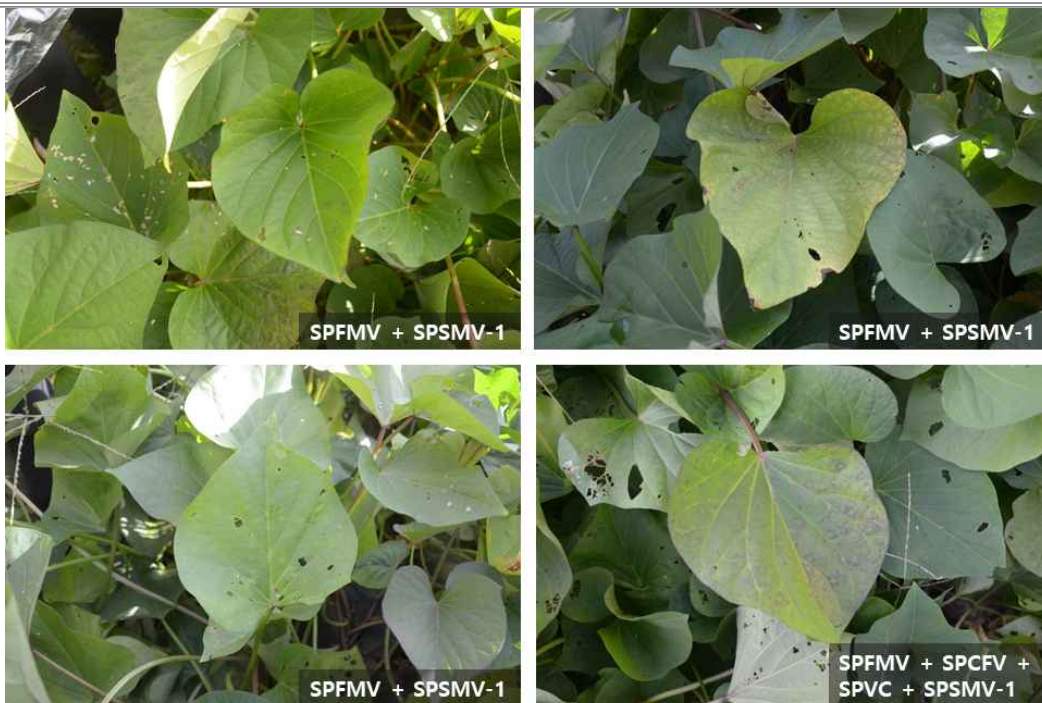


그림 29. 2018년 채집한 고구마 잎에서 보이는 이상증상. 위 시료는 고창에 위치한 H농가에서 채집하였으며, 품종은 베니하루카임. 이 농가는 마사토에 고구마를 식재하였음. 고구마 잎에서 보이는 다양한 이상증상을 채집하였으며, RT-PCR 진단결과를 같이 표기함.



그림 30. 2018년 논산에서 채집한 고구마 농가 전경. 품종은 호박과 베니하루카이이며, 고구마 묘목을 무균실에서 배양하여 식재함. 고구마 잎에서 보이는 다양한 이상증상을 채집하였음.

나. 표준화된 고구마 바이러스 진단시스템 확립

국내 고구마에서 주로 발생하는 바이러스인 Sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV), Sweet potato feathery mosaic virus (SPFMV), Sweet potato latent virus (SwPLV), Sweet potato leaf curl virus (SPLCV), Sweet potato symptomless virus-1 (SPSMV-1), Sweet potato virus C (SPVC), Sweet potato virus G (SPGV), Sweet potato virus 2 (SPV2) 8종을 문헌에 기재되어있는 프라이머 서열을 사용하여 RT-PCR 진단을 실시함(표 3; Kwak et al., 2006; Kwak et al., 2014).

표 16. 고구마에 발생하는 주요 바이러스 8종을 RT-PCR 진단하기 위한 프라이머의 서열정보¹

바이러스	프라이머	염기서열 (5' →3')	길이 (bp)
SPLCV*	Forward	GGA CCC TTT GCA GAA CCC ACT AC	574
	Reverse	TCT GTC ACG AAT CAA CCA ATA C	
SPFMV*	Forward	GGA CCA AGC CCC ATA CAA T	347
	Reverse	GGA ATG GTT GCG GGT TGC	
SPGV*	Forward	TGG CGC ATC AAG GAA AAG	313
	Reverse	ACC TGG TGG TAA TGG TCC	
SPLV*	Forward	GGG TGA TGA TGG ACG GAG ACA	298
	Reverse	CCG ATG ATG TGT ATT TGT GAG C	
SPCFV**	Forward	AGC TGC TCA AAC AAG CAA GAG G	579
	Reverse	GCT CAA AAG TAC TTT AAA ACA TGC	
SPVC**	Forward	ATT CTT GAA TGG GAT AGA TCA CAT G	447
	Reverse	AGC TTC ACG AAG CGC AGC	
SPV2**	Forward	ATG TGT TGA ACC ATC AGC TGA A	369
	Reverse	GTA ACT TGC CTT GGG CTA CG	
SPSMV-1**	Forward	ACC GTG TAT TTG ATG ACG ATG TAC	230
	Reverse	GGG AAG TTC TGG TAG AAC GTA TC	

¹ Sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV), Sweet potato feathery mosaic virus (SPFMV), Sweet potato latent virus (SwPLV), Sweet potato leaf curl virus (SPLCV), Sweet potato symptomless virus-1 (SPSMV-1), Sweet potato virus C (SPVC), Sweet potato virus G (SPGV), Sweet potato virus 2 (SPV2)

* Kwak et al. 2006. The Plant Pathology Journal 22(3): 239-247.

**Kwak et al. 2014. The Plant Pathology Journal 30(4): 416-424.

2019년 국내 보고된 고구마 바이러스 8종의 진단용 프라이머의 민감도 향상 및 국내 미보고 병원체 탐색을 위하여 16종에 대하여 종 특이적 프라이머를 설계함. NCBI에 보고된 고구마 병원체의 염기서열에서 공통영역을 선별했으며, 특히 염기서열의 변이가 적게 나타나는 바이러스의 외피단백질 서열을 주로 참고하였음(표 18; 그림 31~45). 또한, 고구마에 보고된 바이러스 17종 중 6종이 Potyvirus 속에 속하여, Potyvirus 속 내에서 종 구별이 뚜렷하게 나타나는 염기서열을 선별하여 종 특이적 프라이머를 설계함.

표 17. 고구마에 보고된 바이러스 17종 목록

번호	과명	속명	종명	약어
1	Betaflexiviridae	Carlavirus	Sweet potato C6 virus	SPC6V
2*	Betaflexiviridae	Carlavirus	Sweet potato chlorotic fleck virus	SPCFV
3	Caulimoviridae	Badnavirus	Sweet potato pakakuyvirus	SPPV
4	Caulimoviridae	Cavemovirus	Sweet potato collusive virus	SPCV
5	Caulimoviridae	Solendovirus	Sweet potato vein clearing virus	SPVCV
6	Closteriviridae	Crinivirus	Sweet potato chlorotic stunt virus	SPCSV
7	Cucumoviridae	Cucumovirus	Cucumber mosaic virus	CMV
8*	Geminiviridae	Begomovirus	Sweet potato leaf curl virus	SPLCV
9*	Geminiviridae	Mastrevirus	Sweet potato symptomless virus 1	SPSMV-1
10	Luteoviridae	Unassigned	Sweet potato leaf speckling virus	SPLSV
11	Potyviridae	Ipomovirus	Sweet potato mild mottle virus	SPMMV
12*	Potyviridae	Potyvirus	Sweet potato feathery mottle virus	SPFMV
13*	Potyviridae	Potyvirus	Sweet potato latent virus	SwPLV
14	Potyviridae	Potyvirus	Sweet potato mild speckling virus	SPMSV
15*	Potyviridae	Potyvirus	Sweet potato virus 2	SPV2
16*	Potyviridae	Potyvirus	Sweet potato virus C	SPVC
17*	Potyviridae	Potyvirus	Sweet potato virus G	SPVG

*: 국내 기보고된 고구마 바이러스 8종.

표 18. 고구마에 보고된 16종 바이러스의 진단을 위해 설계한 프라이머 정보^{1, 2, 3}

번호	프라이머 이름	서열	위치
1	SPFMV-F1	GCA TCA TCA AAG GGT GCG AGG	9,862-9,882
	SPFMV-R1	GTC ACT TGC TCA TCA CCA TCC	10,197-10,217
2	SPFMV-F2	CAC CAC AAG ATG GTG CGT	1,312-1,329
	SPFMV-R2	CCA TGC CCC AAC CTT G	1,905-1,920
3	SPGV-F1	GCT GGT ACG GTT GGA ACT TTC	9,881-9,901
	SPGV-R1	GAT GTT CCA TTC TCG ATG CAC C	10,128-10,149
4	SPGV-F2	GGG CTG TCA TCT GAA GCC	322-339
	SPGV-R2	GGT AGT TCC ACC AAG GCG	894-911
5	SPGV-F3	GAA GTT AGC TGG GGA AAC T	7,843-7,861
	SPGV-R3	CTA ATT GTG CTG GGC AGC	8,006-8,023
6	SwPLV-F1	CTG GAG CTG CAT TGA ACT TGG	9,262-9,282
	SwPLV-R1	GTA TGG TTG CTC TGC ATT GCG C	9,599-9,620
7	SwPLV-F2	CAG AGG TAG CGC TGC GG	8,881-8,897
	SwPLV-R2	CTC GGT GTT TTC CTC AGT G	9,803-9,821
8	SwPLV-F2	CAG AGG TAG CGC TGC GG	8,881-8,897
	SwPLV-R3	TGT GTG TAT GTT CCG GTC C	9,842-9,860
9	SPLCV-F1	GCA GAA CCC ACT ACC AGA TAC	149-169
	SPLCV-R1	GTC TCG AAG TTC AGC CTC CG	354-373
10	SPLCV-F2	GAA GAA ATA CGA GCC AGG	1,933-1,950
	SPLCV-R2	CAG CAA TTG GGA CAG CAT	2,110-2,127
11	SPMSV-F1	GAG TAT GGA GCA GAT GAT GAG G	349-370
	SPMSV-R1	CAT CCC CAA CAA TGT GTG TAG	826-846
12	SPMSV-F2	CTA GAT GCT GGT GCC AAC	28-45
	SPMSV-R2	CCA ATT GCT AAA CTG CGA G	312-330
13	SPMSV-F2	CTA GAT GCT GGT GCC AAC	28-45
	SPMSV-R3	CAT AAG ATC ACC TCC GCC	985-1,002
14	SPMMV-F1	CTG TGG TTC AGA GGG AAA CAC AG	9,672-9,694
	SPMMV-R1	GAC GCA ACC ATT TTT TGG TAC CC	10,736-10,758
15	SPMMV-F2	GCT CAA CCA ACT TTG AGG C	10,157-10,175
	SPMMV-R2	GTT GAG CTC CTC TCA GAC	10,485-10,502

16	SPCSV-F1	TGG GAA GAA GAG ACA TGG AG	4,585-4,604
	SPCSV-R1	CAA CAG TGA AGA CCA GTA CCG	5,207-5,227

번호	프라이머 이름	서열	위치
17	SPCSV-F2	GGG TTG GTG AGA TCA TGA	7,709-7,726
	SPCSV-R2	CTA GGT TTT CCA AGG TCC	8,188-8,205
18	SPCSV-F3	CTT CCC TGA GGA AGT GCA A	7,797-7,815
	SPCSV-R2	CTA GGT TTT CCA AGG TCC	8,188-8,205
19	SPCV-F1	CCA TAT TGG ATA CTC CCC	764-781
	SPCV-R1	GTT ATA GAC ATA CTT TGT GCC C	1,514-1,535
20	SPCV-F2	GGA GAT GCA GGA GAT TAT CC	187-206
	SPCV-R2	CGT ATC TAA TAA TTC TTC CGT C	444-465
21	SPV2-F	CGT AGG GGT TTC AAA GGA TG	3,338-3,357
	SPV2-R	CTC CAT CAC CAA TTG TGC CC	4,514-4,533
22	SPVC-F1	GGC AGA GTC GAC GCA TCC TA	4,103-4,122
	SPVC-R1	GAG AGT TGC TCA TCC CCT TG	4,734-4,753
23	SPVC-F1	GGC AGA GTC GAC GCA TCC TA	4,103-4,122
	SPVC-R2	GTT TGA GAG TTG CTC ATC CCC	4,763-4,783
24	SPSMV-1-F1	CTT GCC GTA TTT GGG GTT GAC TG	1,342-1,364
	SPSMV-1-R1	GAT CTT GCT AGG AAC CCA GTG	1,571-1,601
25	SPSMV-1-F2	CTA TGC GAG TTG TGG CAT G	622-640
	SPSMV-1-R2	TAT GTC ACC GGT ACT GCT G	919-937
26	SPCFV-F1	CTC AGG GGT AGA TTG TAC TC	7,510-7,529
	SPCFV-R1	GTT TGA GCA GCT ATG TAT TCC	8,517-8,537
27	SPCFV-F2	GGA AAA CTA CAG ACC TTC TG	7,938-7,959
	SPCFV-R2	TAT CCA GAA TGG CTG TCC T	8,180-8,198
28	SPVCV-F1	CGT ACC TCA GGG ATT CTA TGA	5,969-5,989
	SPVCV-R1	GGT TCT GCA TTT TGA CAC CAC	6,247-6,267
29	SPVCV-F2	CCC AGG AGG GGC AGT AAT	456-473
	SPVCV-R2	CGT AAA TCA GTA TTC AAC GGC	839-859
30	SPPV-F	CCT ACG CTT AGC CAG TTA GCC	747-767
	SPPV-R	CGT CAG AAA CCC CGG CCA AG	1,231-1,250
31	SPC6V-F1	GAG TGA GGA AAT GAC GCA GC	7,464-7,483
	SPC6V-R1	CAT CTG GGC AGA CGA GC	7,787-7,808
32	SPC6V-F2	GTG TCA TGC AAC AGC TTG AG	2,938-2,957
	SPC6V-R2	GTT TCT GGC TAA GCC ACC	3,417-3,434
33	SPLSV-F1	CCA GAG GCG CTC TAC AAG A	60-78
	SPLSV-R1	GAA TCG TGC CAT TCC AGC CCG	486-506
34	SPLSV-F1	CCA GAG GCG CTC TAC AAG A	60-78
	SPLSV-R2	TCC GGC GAT GTC ATT GCC G	546-564

¹ NCBI 등록된 서열을 바탕으로 프라이머를 설계함.

² SPFMV: Sweet potato feathery mottle virus; SPGV: Sweet potato virus G; SwPLV: Sweet potato latent virus; SPLCV: Sweet potato leaf curl virus; SPMSV: Sweet potato mild speckling virus; SPMV: Sweet potato mild

mottle virus; SPCSV: Sweet potato chlorotic stunt virus; SPCV: Sweet potato collusive virus; SPV2: Sweet potato virus 2; SPVC: Sweet potato virus C; SPSMV-1: Sweet potato symptomless virus 1; SPCFV: Sweet potato chlorotic fleck virus; SPVCV: Sweet potato vein clearing virus; SPC6V: Sweet potato C6 virus; SPLSV: Sweet potato leaf speckling virus.

³ Cucumber mosaic virus의 경우, 기보유중인 프라이머가 존재하므로 설계하지 않음.

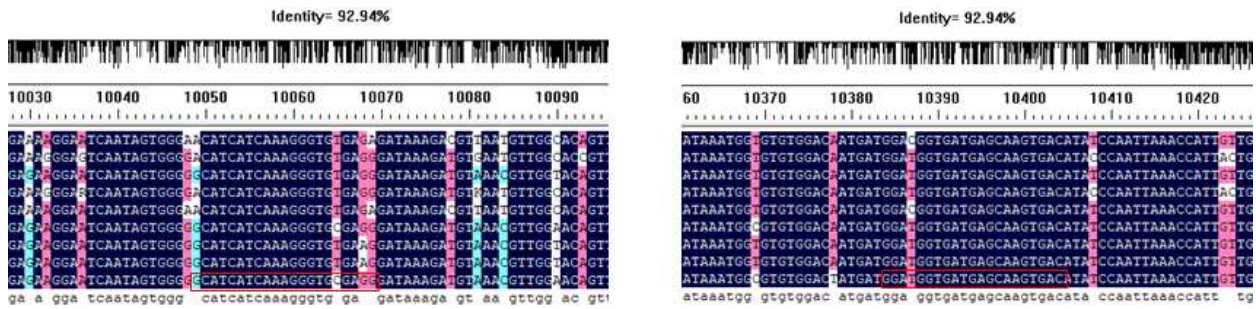


그림 31. Sweet potato feathery mottle virus의 종 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 외피단백질 서열에서 공통영역을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계함. 오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

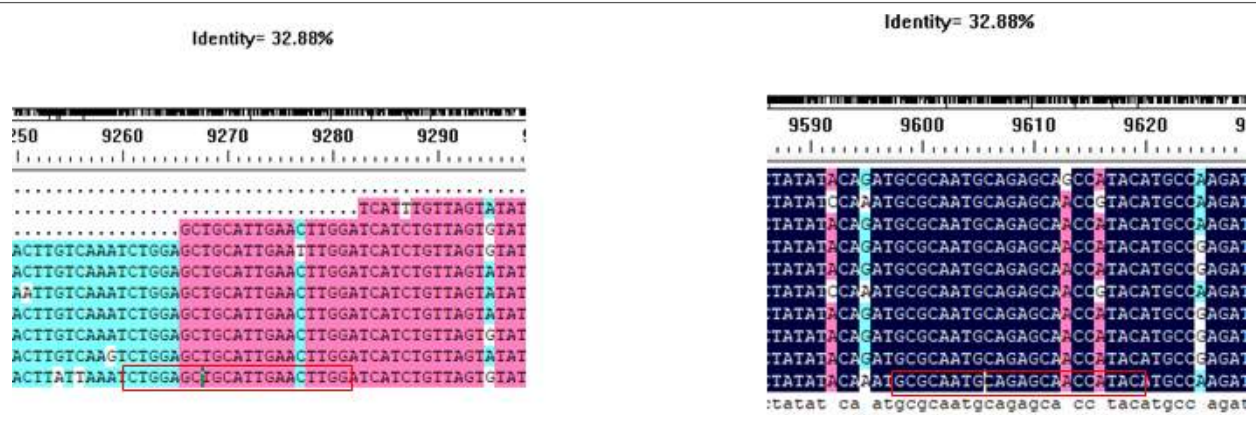


그림 32. Sweet potato latent virus 종 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 이 바이러스의 부분 염기서열이 상대적으로 많이 보고되어 있었으며, 최대한 전체염기서열 기준, 외피단백질 서열을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계함. 오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

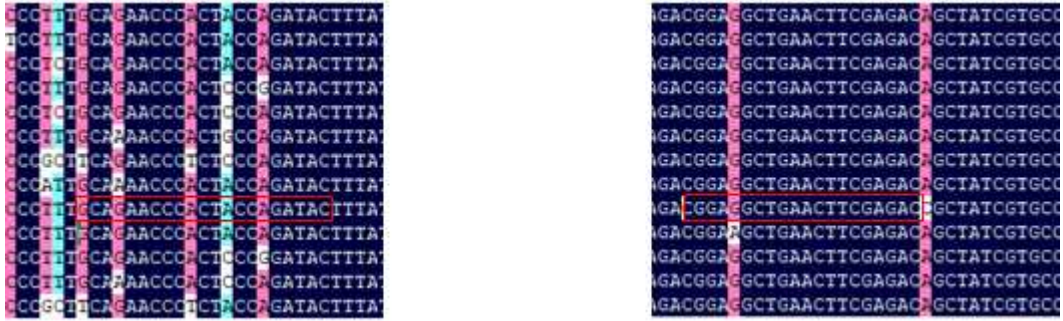


그림 33. Sweet potato leaf curl virus 종 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 외피단백질 서열에서 공통영역을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계함. 오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보



그림 34. Sweet potato mild speckling virus 중 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 이 바이러스는 현재 NCBI에 1종이 보고되어 있으며, 기보고된 서열을 기준으로 외피단백질 서열에서 공통영역을 이용하여 중 특이적 프라이머를 설계함. 오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

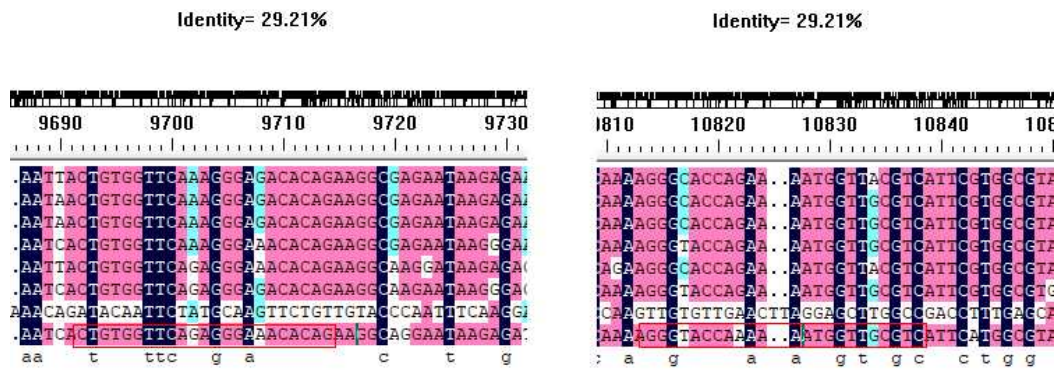


그림 35. Sweet potato mild mottle virus 중 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 이 바이러스는 부분 염기서열이 상대적으로 많이 보고되어 있으며, 기보고된 서열을 기준으로 외피단백질 서열에서 공통영역을 이용하여 중 특이적 프라이머를 설계함. 오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

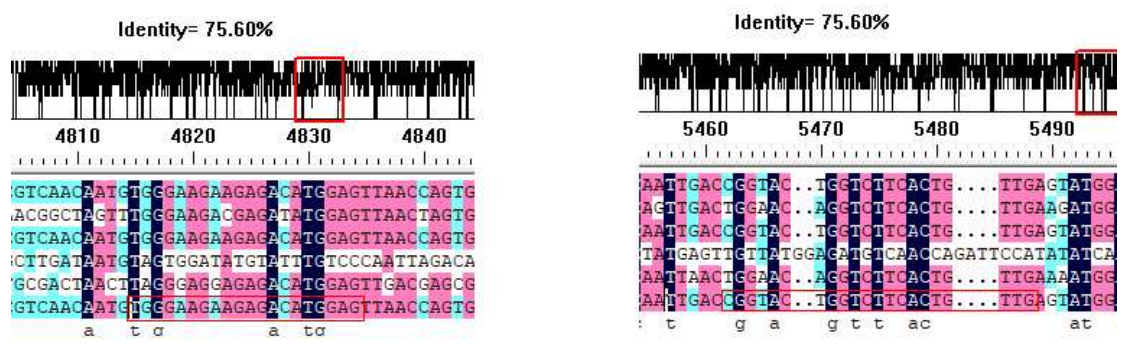


그림 36. Sweet potato chlorotic stunt virus 중 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 이 바이러스는 부분 염기서열이 상대적으로 많이 보고되어 있으며, 기보고된 서열을 기준으로 외피단백질 서열에서 공통영역을 이용하여 중 특이적 프라이머를 설계함. 오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

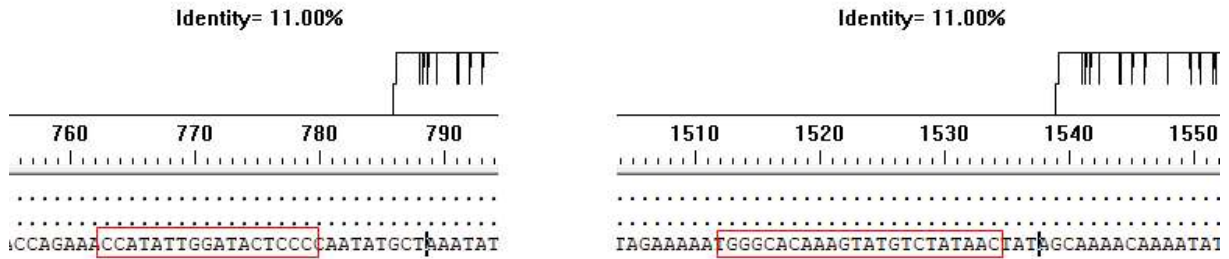


그림 37. Sweet potato collusive virus 종 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 이 바이러스는 전체염기서열이 보고되어 있지만, 그에 대한 정보가 부족함. 기보고된 서열을 기준으로 외피단백질 서열에서 공통영역을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계함.
오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

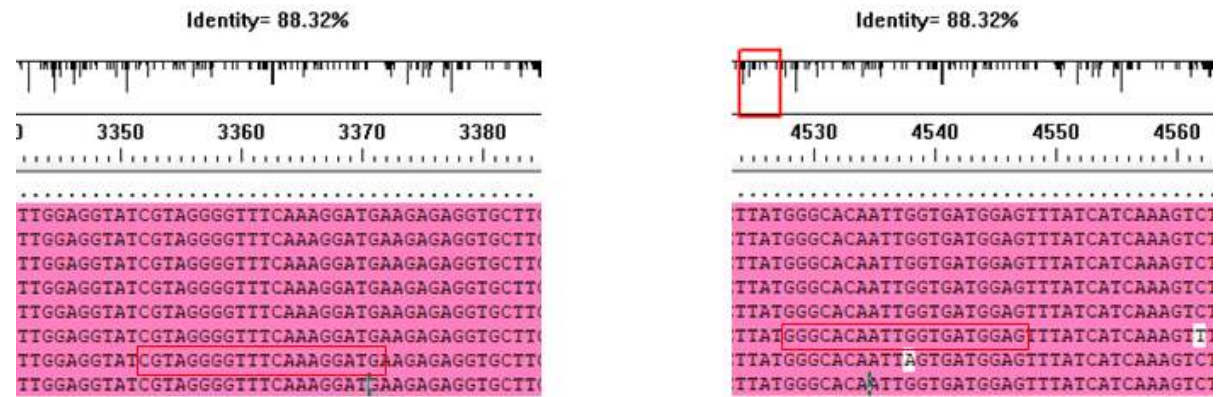


그림 38. Sweet potato virus 2 종 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 기보고된 서열을 기준으로 외피단백질 서열에서 공통영역을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계함.
오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

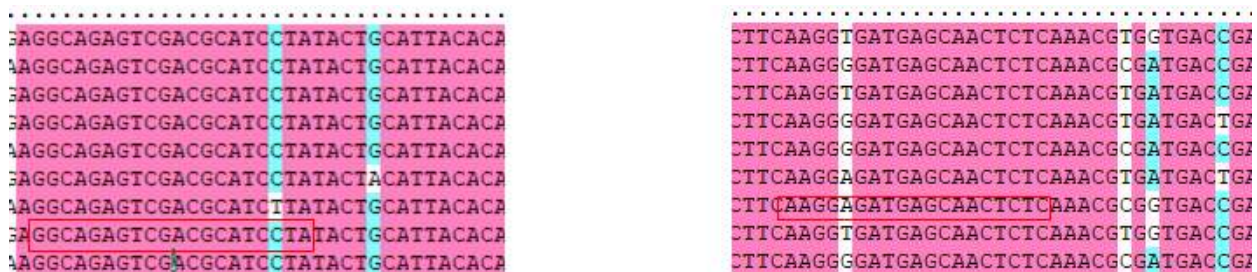


그림 39. Sweet potato virus C 종 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 기보고된 서열을 기준으로 외피단백질 서열에서 공통영역을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계함.
오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

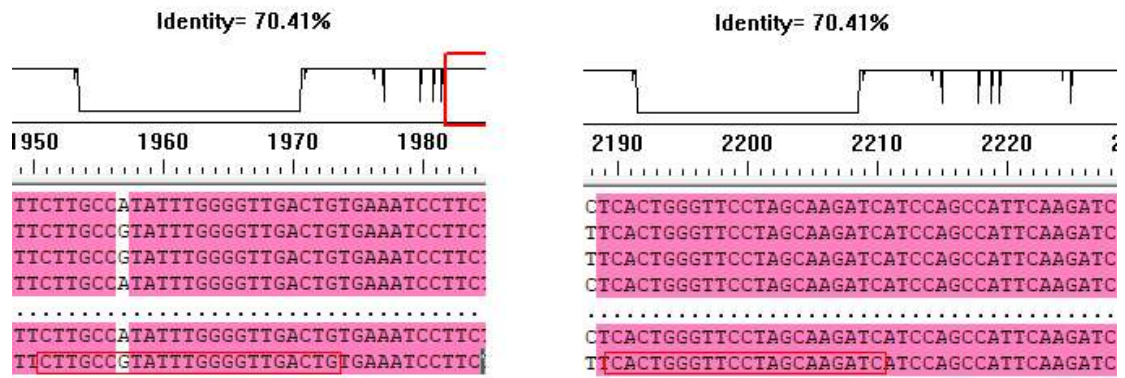


그림 40. Sweet potato symptomless virus 1 종 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 기보고된 서열을 기준으로 외피단백질 서열에서 공통영역을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계함. 오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

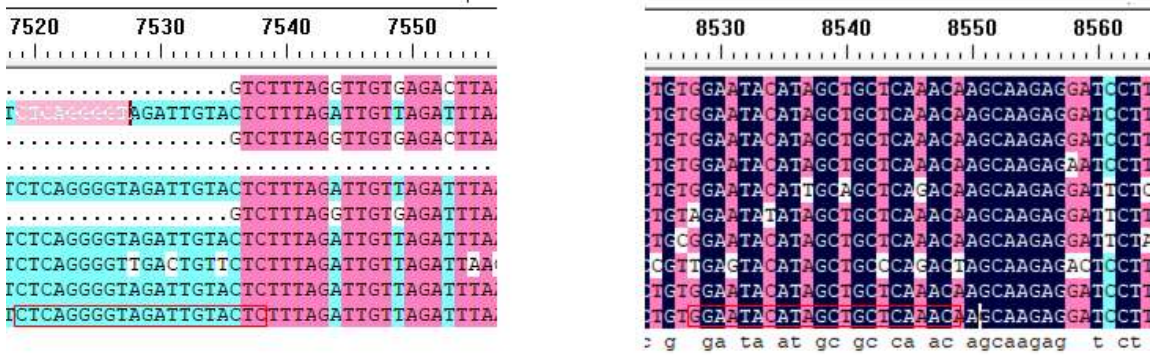


그림 41. Sweet potato chlorotic fleck virus 종 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 기보고된 서열을 기준으로 외피단백질 서열에서 공통영역을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계함. 오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

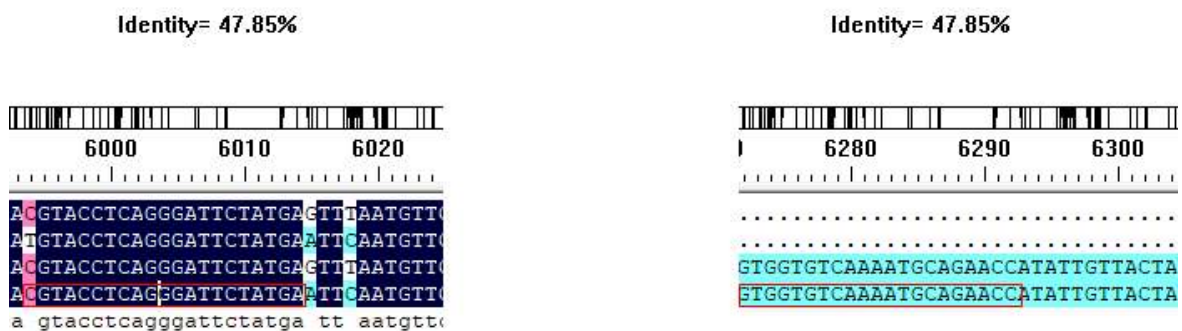


그림 42. Sweet potato vein clearing virus 종 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 이 바이러스는 부분 염기서열이 상대적으로 보고되어 있으며, 기보고된 전체염기서열을 기준으로 외피단백질 서열에서 공통영역을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계함. 오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

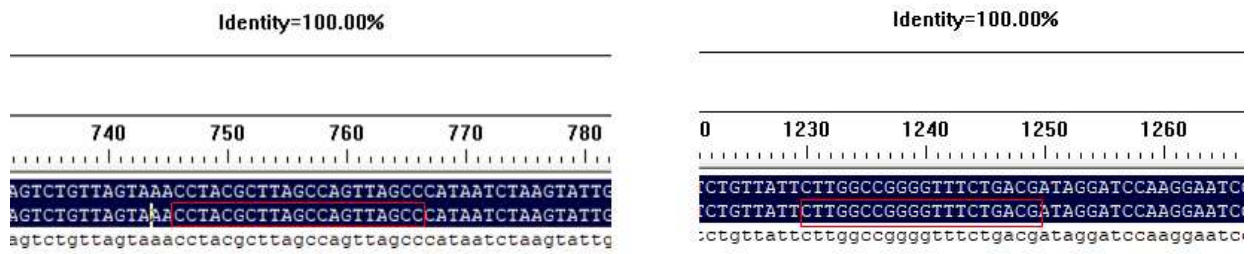


그림 43. Sweet potato pakakuy virus 종 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 이 바이러스는 보고된 전체염기서열이 2점으로, 기보고된 서열을 기준으로 외피단백질 서열에서 공통영역을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계함.
오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

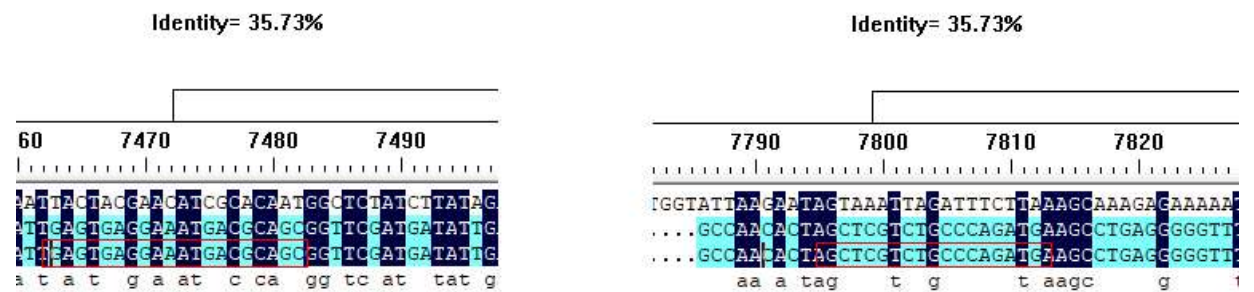


그림 44. Sweet potato C6 virus 종 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 기보고된 서열을 기준으로 외피단백질 서열에서 공통영역을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계함.
오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

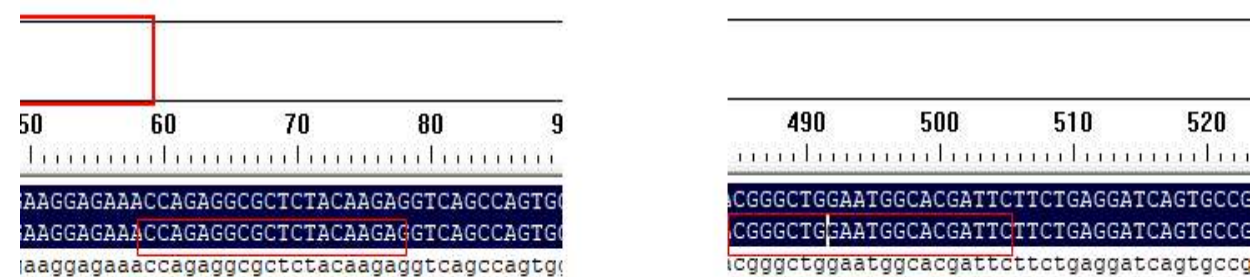


그림 45. Sweet potato C6 virus 종 특이적 프라이머를 설계하기 위한 염기서열 비교분석. 이 바이러스는 부분 염기서열만 보고되었으며, 기보고된 서열을 기준으로 종 특이적 프라이머를 설계함.
오른쪽 빨간색 박스: Forward primer 서열정보, 왼쪽 빨간색 박스: Reverse primer 서열정보.

다. 국내 고구마 바이러스 RT-PCR 진단결과

2017년 채집한 고구마에서 RT-PCR 진단한 결과(표19), 채집한 41점 모두 바이러스가 검출되었음. SPSMV-1의 경우 지역을 불문하고 모든 시료에서 검출되었음. 감염율은 SPSMV-1 (100%), SPFMV (51.2%), SPLCV (39%), SPVC (31.7%), SPV2 (26.8%), SPCFV (9.7%), SPGV(7.3%) 순으로 나타났음.

표 19. 2017년 채집한 고구마 지역별 검출된 바이러스 시료 수¹

검출된 바이러스	고창	예산	당진	논산	계
SPCFV	4	0	0	0	4
SPFMV	4	14	3	0	21
SwPLV	1	4	1	0	6
SPLCV	6	3	0	7	16
SPSMV-1	9	14	6	10	41
SPVC	4	7	2	0	13
SPGV	0	0	3	0	3
SPV2	0	7	4	0	11
검출된 시료 수/전체 시료 수	9/9	16/16	6/6	10/10	41/41

¹ Sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV), Sweet potato feathery mosaic virus (SPFMV), Sweet potato latent virus (SwPLV), Sweet potato leaf curl virus (SPLCV), Sweet potato symptomless virus-1 (SPSMV-1), Sweet potato virus C (SPVC), Sweet potato virus G (SPGV), Sweet potato virus 2 (SPV2)

- 2017년 채집한 고구마에서 RT-PCR 진단한 결과(표 20), 채집한 204점중 192점에서 바이러스가 검출되었음. 특히 고창 F농가에서 채집한 모닝화이트, 연황미, 신율미, 실크스윗 품종에서는 모든 부위에서 RT-PCR 진단한 결과 바이러스가 검출되지 않았음. 감염율은 SPSMV-1 (77.5%), SPFMV (50.5%), SPGV(17.2%), SPV2 (14.2%), SPLCV (10.8%), SPVC (8.8%), SPCFV (6.4%) 순으로 나타났음.

표 20. 2018년 채집한 고구마 지역별 검출된 바이러스 시료 수¹

검출된 바이러스	포항	고창	논산	계
SPCFV	0	11	2	13
SPFMV	11	91	1	103
SwPLV	0	14	0	14
SPLCV	0	5	17	22
SPSMV-1	9	109	40	158
SPVC	6	11	1	18
SPGV	19	16	0	35
SPV2	5	14	0	29
검출된 시료 수/전체 시료 수	20/20	132/144	40/40	192/204

¹ Sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV), Sweet potato feathery mosaic virus (SPFMV), Sweet potato latent virus (SwPLV), Sweet potato leaf curl virus (SPLCV), Sweet potato symptomless virus-1 (SPSMV-1), Sweet potato virus C (SPVC), Sweet potato virus G (SPGV), Sweet potato virus 2 (SPV2).

- 특히 고창 F농가에서 품종별로 채집한 고구마의 바이러스 RT-PCR 진단결과를 아래에 표기함(표 21).

표 21. 2018년 고창 (F농가)에서 채집한 고구마 47개 품종별 RT-PCR 진단으로 검출된 바이러스 목록¹

품종	채집 시료 수	RT-PCR 진단결과								검출된 시료 수
		SPLCV	SPGV	SPFMV	SwPLV	SPCFV	SPVC	SPV2	SPSMV-1	
건풍미	1	-	-	1	-	-	-	1	-	1
건황미	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1
고건미	1	-	-	1	-	-	-	-	1	1
다호미	2	-	-	2	-	-	-	1	1	2
단자미	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1
대유미	1	-	-	1	-	-	-	-	1	1
마샬	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1
맛젤	1	1	-	1	-	-	-	-	-	1
모닝과플	1	-	-	1	-	1	-	1	1	1
모닝화이트	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
백고구마	1	-	-	1	-	-	-	1	1	1
베니마사라	1	-	-	1	-	-	-	-	1	1
베니사쓰마	2	1	-	1	-	-	-	-	-	2
베니하루카	1	-	-	-	-	-	-	1	1	1
비오미	1	1	-	1	-	-	-	-	-	1
스이오	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1
신건미	2	-	-	1	-	-	-	-	2	2
신올미	2	-	-	1	-	-	-	-	1	1
신자미	4	-	-	3	-	-	-	-	4	4
신홍3호	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1
아랑2호	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1
안노베니	2	-	-	1	-	-	-	-	2	2
연자미	1	-	-	1	-	-	-	-	1	1
연황미	2	-	-	1	-	-	-	1	-	1
올미	3	1	-	2	-	-	-	-	1	3
전미	1	1	-	1	-	-	1	-	1	1
주황미	3	-	-	1	-	-	-	-	3	3
중미	1	-	-	1	-	-	-	1	1	1
진홍미	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1
풍원미	2	-	-	1	-	-	-	1	2	2
호감미	2	-	-	2	-	-	-	1	2	2
호박고구마	2	-	1	1	-	-	-	-	2	2
황금	1	-	-	-	-	1	-	-	1	1
마라가리따*	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1
실크스윗*	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kokei 14*	1	-	-	1	-	-	-	-	1	1
UOS-A-1*	1	-	1	1	-	-	-	-	1	1
UOS-C-1*	1	-	1	1	1	-	-	1	1	1
UOS-CH-1*	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1
UOS-CH-2*	1	-	1	1	1	-	-	1	-	1
UOS-CH-3*	1	-	-	1	1	-	-	-	1	1
UOS-CH-4*	1	-	1	1	1	-	-	1	1	1
UOS-CH-5*	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1
UOS-P-1*	1	-	-	1	1	-	-	-	1	1
UOS-P-2*	1	-	-	1	1	-	-	-	-	1
UOS-P-3*	1	-	1	1	1	-	-	1	1	1
UOS-P-5*	1	-	-	1	-	-	-	-	1	1
계	63	7	7	44	8	4	1	14	43	59

¹ Sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV), Sweet potato feathery mosaic virus (SPFMV), Sweet potato latent

virus (SwPLV), Sweet potato leaf curl virus (SPLCV), Sweet potato symptomless virus-1 (SPSMV-1), Sweet potato virus C (SPVC), Sweet potato virus G (SPGV), Sweet potato virus 2 (SPV2).

* 일본(마라가리파, 실크스윗, Kokei 14), 미국(UOS-A-1), 캄보디아(UOS-C-1), 중국(UOS-CH-1~5), 필리핀(UOS-P-1~5)에서 재배하는 품종이며, 이외의 품종은 국내에서 재배하는 품종임.

- 2017년, 2018년 채집한 고구마에서 검출된 바이러스 감염양상의 경우(표 22), 단독 감염보다 2개 이상의 바이러스에 의한 복합감염이 높게 나타나는 것을 알 수 있음.

표 22. 채집한 고구마에서 검출된 바이러스의 감염양상*

채집연도		2017년	2018년
미검출		0	12
단독감염	SPFMV	0	14
	SPLCV	0	1
	SPSMV-1	8	46
	SPGV	0	2
소계		8	63
2중	SPCFV+SPSMV-1	1	2
복합감염	SPFMV+SwPLV	0	1
	SPFMV+SPLCV	0	2
	SPFMV+SPSMV-1	4	46
	SPFMV+SPGV	0	1
	SPFMV+SPV2	0	2
	SwPLV+SPSMV-1	0	1
	SPLCV+SPSMV-1	7	15
	SPSMV-1+SPVC	0	3
	SPSMV-1+SPGV	0	13
	SPSMV-1+SPV2	1	2
소계		13	88
3중	SPCFV+SPLCV+SPSMV-1	1	2
복합감염	SPCFV+SPFMV+SPSMV-1	0	3
	SPFMV+SPLCV+SPSMV-1	2	1
	SPFMV+SwPLV+SPSMV-1	0	2

	SPFMV+SPSMV-1+SPVC	1	3
	SPFMV+SPSMV-1+SPGV	0	7
	SPFMV+SPSMV-1+SPV2	2	4
	SwPLV+SPSMV-1+SPVC	0	1
	SPLCV+SPSMV-1+SPVC	1	0
	SPSMV-1+SPGV+SPV2	1	0
소계		8	23
4중	SPCFV+SPFMV+SwPLV+SPSMV-1	0	1
복합감염	SPCFV+SPFMV+SPSMV-1+SPVC	0	1
	SPCFV+SPFMV+SPSMV-1+SPV2	0	1
	SPCFV+SwPLV+SPSMV-1+SPVC	0	1
	SPFMV+SPLCV+SPSMV-1+SPVC	1	0
	SPFMV+SwPLV+SPLCV+SPSMV-1	1	0
	SPFMV+SwPLV+SPSMV-1+SPVC	0	1
	SPFMV+SwPLV+SPVC+SPV2	2	0
	SPFMV+SwPLV+SPGV+SPV2	0	1
	SPFMV+SPSMV-1+SPVC+SPGV	0	3
	SPFMV+SPSMV-1+SPVC+SPV2	1	0
	SwPLV+SPLCV+SPSMV-1+SPVC	0	1
소계		5	10
5중	SPCFV+SPFMV+SPLCV+SPSMV-1+SPVC	2	0
복합감염	SPFMV+SwPLV+SPSMV-1+SPVC+SPV2	2	0
	SPFMV+SwPLV+SPSMV-1+SPGV+SPV2	0	3
	SPFMV+SPLCV+SPSMV-1+SPVC+SPV2	1	0
	SPFMV+SPSMV-1+SPVC+SPGV+SPV2	1	4
소계		6	7
6중	SPCFV+SPFMV+SwPLV+SPSMV-1+SPGV+SPV2	0	1
복합감염	SPFMV+SwPLV+SPSMV-1+SPVC+SPGV+SPV2	1	0

소계	1	1
바이러스가 검출된 시료 수	41	192

* Sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV), Sweet potato feathery mosaic virus (SPFMV), Sweet potato latent virus (SwPLV), Sweet potato leaf curl virus (SPLCV), Sweet potato symptomless virus-1 (SPSMV-1), Sweet potato virus C (SPVC), Sweet potato virus G (SPGV), Sweet potato virus 2 (SPV2)

신규 설계한 고구마 바이러스 진단용 프라이머를 이용하여 RT-PCR 진단한 결과, SPCV, SPCSV가 새롭게 검출되었으며, SPLCV가 추가로 검출되었음(표 23). SPCV, SPCSV의 경우, 2018년 채집한 시료를 농가별로 풀링한 Total RNA를 이용하여 RT-PCR 진단한 결과, SPCV, SPCSV가 검출되었으며, 이를 토대로 개별시료를 대상으로 RT-PCR 진단한 결과, SPCV는 베니사쯔마, 황금, UOS-A-1 품종에서, SPCSV는 베니사쯔마 품종에서 검출됨(표 24). SPLCV의 경우, 기존 고창 농가 1곳에서만 검출되었지만, 새롭게 설계한 프라이머를 사용하여 RT-PCR 진단한 결과, 고창 농가 3곳 모두 검출되었음(표 25).

표 23. 신규 설계한 고구마 바이러스 진단용 프라이머와 기존 프라이머 간 RT-PCR 진단결과 비교 (1)^{1, 2, 3}

추가 검출된 바이러스	기존 프라이머 사용	신규 설계 프라이머 사용
<i>Sweet potato collusive virus</i> (SPCV)	진단대상 미포함	○
<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i> (SPCSV)	진단대상 미포함	○
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> (SPLCV)	○	○

¹ 2018년 포항, 고창, 논산 시료를 농가별로 풀링한 Total RNA를 이용하여 RT-PCR 진단함.

² SPCV, SPCSV는 고구마 8종 병원체 진단대상에 포함되어 있지 않아 RT-PCR 진단결과가 존재하지 않음. 본 연구과제를 통해 신규 설계한 프라이머를 사용하여 진단결과, 위 바이러스가 새롭게 검출됨.

³ 신규 설계한 SPLCV 진단용 프라이머를 사용하여 RT-PCR 진단한 결과, 기존 프라이머에서 검출되지 않은 2개 농가에서 추가로 검출됨.

표 24. 신규 설계한 고구마 바이러스 진단용 프라이머를 이용하여 RT-PCR 진단결과^{1, 2}

추가 검출된 바이러스	진단결과
<i>Sweet potato collusive virus</i> (SPCV)	3/204
<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i> (SPCSV)	1/204

¹ 농가별로 풀링한 Total RNA를 이용하여 RT-PCR 진단한 결과를 토대로 검출된 풀링시료의 개별 Total RNA시료를 이용하여 RT-PCR 진단함.

² 진단결과, SPCV는 베니사쯔마, 황금, UOS-A-1 품종에서 검출되었으며, SPCSV는 베니사쯔마 품종에서 검출됨.

표 25. 신규 설계한 고구마 바이러스 진단용 프라이머와 기존 프라이머 간 RT-PCR 진단결과 비교 (2)^{1, 2}

추가 검출된 바이러스	농가명	기존 프라이머 사용	신규 설계 프라이머 사용
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> (SPLCV)	F 농가	○	○
	G 농가	X	○
	H 농가	X	○

¹ 2018년 고창에서 채집한 시료를 농가별로 풀링한 Total RNA를 이용하여 RT-PCR 진단함.

² 기존 진단된 F농가를 포함하여 G, H농가에서 추가로 SPLCV가 검출되었으며, 시퀀싱 분석한 결과 SPLCV로 확인됨.

신규설계한 고구마 바이러스 진단용 프라이머를 이용하여 바이오큐브에서 채집 및 확보한 시료를 대상으로 RT-PCR 진단한 결과, Sweet potato pakakuy virus (SPPV)를 검출하였음. BLAST결과, 기보고된 SPPV와 98.65%의 상동성을 보임(그림 46).

Sweet potato pakakuy virus Query cover: 100%, Identity: 98.65%

```

ACGATAACCTCCACACAAAGGTCCTTTTAAAAAGGTGTTATACCTTAGAAGATAAATATGAAGAGCAGTCTCTTCTG
ATTAAAAAATTAGAAAAAGACTTAGAAGCCTTAACTGAGGAGTTCCCTTTCCTCAAGACCTCTTACCGCCAAACAAGTA
AAAGAATTGGTTGTGGAATAGCAGAGCAGCCAAAGCTGGTGGAACAGGAAGCACTTAAGCTTACTGAGGAGCCTTAAG
GGGAAACTCGATAAGGTTGAAGGCCTTATCAGGGATCTCAAGGAGTTCATCACCGGATGAACTACAGGGAAGTCCAGG
ATCTTCCTGGATTTAAAAGGGCGTTAACCGGAACAGCGTCTTGGGAGCAGAAGGCTTTAATCAGCCTTCAGGAAAA
CACAAATCCAGCCTTGATACACTCATAAGGCAGAATAACACTCTGTTATTCTTGG

```

그림 46. RT-PCR 진단으로 검출된 국내 고구마 미보고 바이러스인 Sweet potato pakakuy virus 의 NCBI BLAST 분석결과. 분석결과, 444 bp의 RT-PCR 산물이 검출되었으며, 기보고된 염기서열(FJ560943)과 Query cover 100%, Identity 98.65%로 확인됨.

라. 결과요약

- 고구마에 발생하는 바이러스를 탐색하기 위하여 잎, 줄기, 괴근 시료를 245점 채집함. 이후 실험을 위해 개별시료는 모두 초저온냉동고에 보관하였음.
- 국내 고구마에서 주로 발생하는 병원체 8종 진단용 프라이머를(Kwak et al. 2006, Kwak et al. 2014) 이용하여 개별시료를 대상으로 RT-PCR 진단을 수행함. 진단결과 전체 245점 중 233점에서 바이러스가 검출되었음(감염율 95.1%). 감염율이 높은 바이러스는 SPSMV-1 (81.22%)이며, SPFMV (50.61%), SPV2 (16.33%), SPLCV (15.51%), SPGV (15.51%), SPVC (12.65%), SwPLV (8.16%), SPCFV (6.94%) 순으로 나타남.
- 고구마 품종별 발생하는 바이러스를 진단한 결과, 국내에서 재배하는 품종(건풍미, 건황미, 고건미, 다호미, 단자미, 대유미, 마샬, 맛젤, 모닝퍼플, 모닝화이트, 비오미, 베니마사라, 베니사즈마, 베니하루카, 스이오, 신건미, 신올미, 신자미, 신흥3호, 아랑2호, 안노베니, 연자미, 연황미, 율미, 전미, 주황미, 중미, 진홍미, 풍원미, 호감미, 호박, 화이트스킨, 황금)에서는 SPSMV-1 (67.35%), SPFMV (65.31%), SPV2 (18.37%), SPLCV (8.16%), SPGV (8.16%), SPCFV (6.12%), SPVC (2.04%), SwPLV (0%) 순으로 나타냈으며, 유전자원으로 외국에서 도입한 품종(마라가리따, 실크스윗, kokei 14, UOS-A-1, UOS-C-1, UOS-CH-1, UOS-CH-2, UOS-CH-3, UOS-CH-4, UOS-CH-5, UOS-P-1, UOS-P-2, UOS-P-3, UOS-P-5)에서는 SPFMV (85.71%), SPSMV-1 (64.29%), SwPLV (57.14%), SPGV (42.86%), SPV2 (35.71%), SPCFV (7.14%), SPLCV (0%), SPVC (0%) 순으로 나타남.
- 국내 보고된 8종 병원체의 진단 효율을 높이고, 미보고된 9종 병원체를 탐색하기 위하여 종 특이적 프라이머를 새롭게 설계함. 이를 이용하여 RT-PCR 진단한 결과 SPCV 3점, SPCSV 1점이 새롭게 검출되었음. SPLCV는 기존 RT-PCR에서 검출되지 않은 고창 농가 시료에서 추가로 검출되어 기존 보고된 프라이머를 대체할 수 있을 것으로 보임. 바이오큐브에서 확보한 시료를 대상으로 새롭게 설계한 종 특이적 프라이머를 이용하여 RT-PCR 진단한 결과, SPPV가 검출되었으며, 시퀀싱 분석 및 NCBI BLAST한 결과, SPPV인 것으로 확인함.

3. 세균, 곰팡이 병의 조기진단 및 키트 상용화를 위한 기초연구

가. 고구마 재배 묘상에서 곰팡이 및 세균 병의 발생 상황 조사

(1) 지역별 병 발생 상황 조사

1차년도 (2017년) 고구마 농장에서 발생한 곰팡이 및 세균 병의 발생 상황 및 병원균 조사를 위해, 경기도 (덕소, 강화), 경상도 (김천), 전라도 (고창, 정읍), 충청도 (논산, 예산, 옥천) 지역의 병든 고구마 잎, 줄기, 뿌리와 흙을 샘플링 하고 세척하여 항생제 (Nalidixic acid)를 첨가한 PDA배지에 치상하여 3~5일 배양 후 곰팡이를 분리 하였으며, 과쇄하여 0.3% TSA에 spreading 하여 1~3일 배양 후 세균을 분리 하였음.

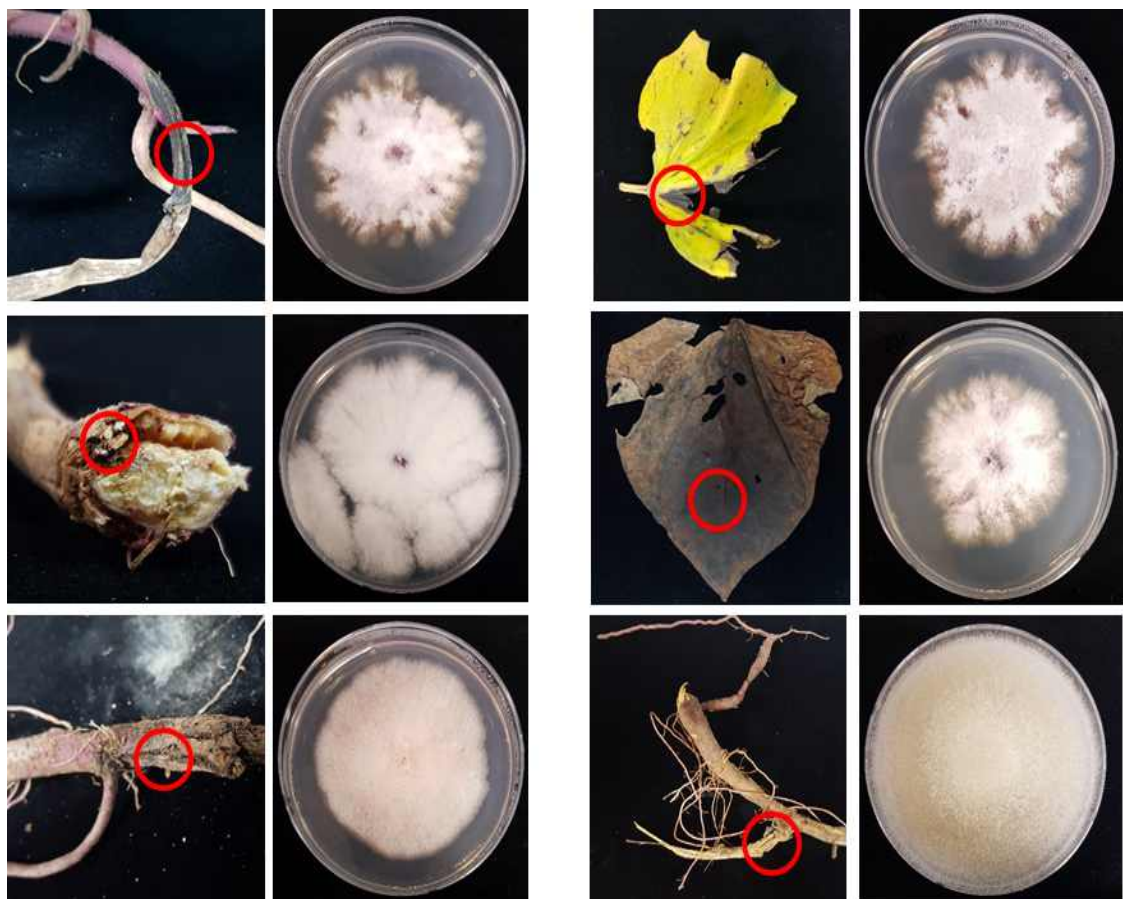


그림 47. 전라북도 고창지역 고구마 농장에서 분리한 곰팡이

전라북도 고창지역 고구마 농장에서 수집된 병든 잎, 줄기, 뿌리에서 곰팡이 및 세균을 분리한 결과, 총 14종을 잎에서 곰팡이 3종, 세균 3종, 줄기에서 곰팡이 5종, 세균 2종을 분리, 또한 뿌리에서 세균 1종을 분리함 (그림 47).



그림 48. 전라북도 정읍지역 고구마 농장에서 분리한 곰팡이

전라북도 정읍지역 고구마 농장에서 수집된 병든 잎, 줄기, 뿌리에서 곰팡이 및 세균을 분리한 결과, 총 6종을 줄기에서 곰팡이 1종, 세균 4종, 뿌리에서 곰팡이 1종을 분리함 (그림 48).



그림 49. 충청남도 예산지역 고구마 (베니하루카) 농장에서 분리한 곰팡이

충청남도 예산지역 고구마 (베니하루카) 농장에서 수집된 병든 잎, 줄기, 뿌리에서 곰팡이 및 세균을 분리한 결과, 총 3종을 줄기에서 곰팡이 1종, 뿌리에서 곰팡이 1종, 세균 1종을 분리함 (그림 49).

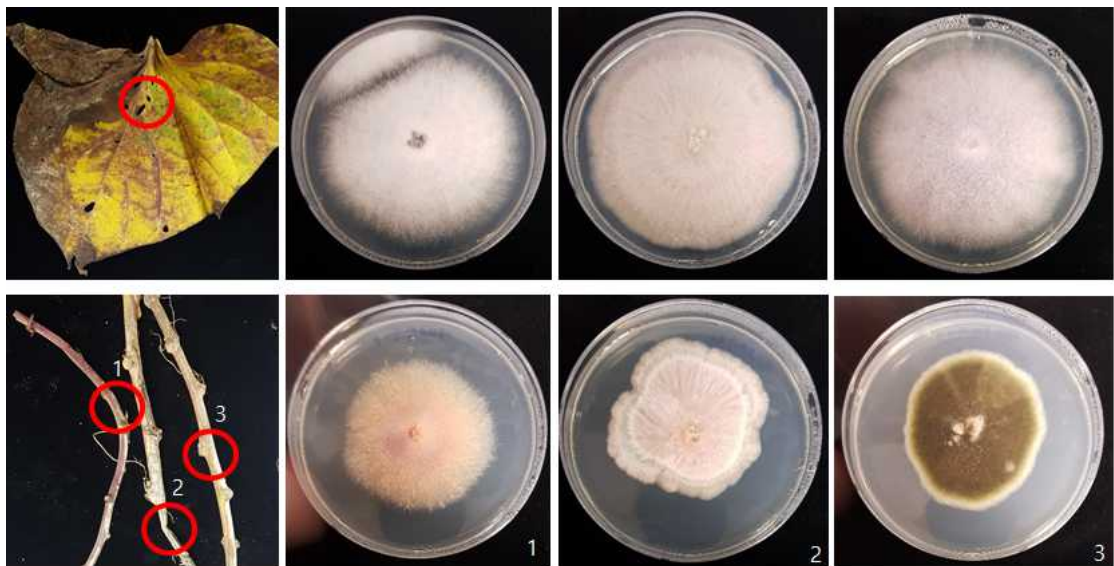


그림 50. 충청남도 예산지역 고구마 (호박) 농장에서 분리한 곰팡이



그림 51. 충청남도 예산지역 고구마 (호박) 농장 흙에서 분리한 곰팡이
 충청남도 예산지역 고구마 (호박) 농장에서 수집된 병든 잎, 줄기, 뿌리, 흙에서 곰팡이 및 세균을 분리한 결과, 총 11종을 잎, 줄기, 흙에서 각 곰팡이 3종, 3종, 5종을 분리함 (그림 50, 51).



그림 52. 충청남도 논산지역 고구마 농장에서 분리한 곰팡이
 충청남도 논산지역 고구마 농장에서 수집된 잎, 줄기, 뿌리에서 곰팡이 및 세균을 분리한 결과, 총 3종을 잎에서 곰팡이 2종, 뿌리에서 곰팡이 1종을 분리함 (그림 52).



그림 53 전라북도 정읍지역 고구마 농장에서 분리한 곰팡이
 경기도 덕소지역 고구마 농장에서 수집된 병든 잎, 줄기, 뿌리에서 곰팡이 및 세균을 분리한 결과, 총 6종을 잎에서 곰팡이 2종, 줄기에서 곰팡이 2종, 뿌리에서 곰팡이 2종을 분리함 (그림 53).

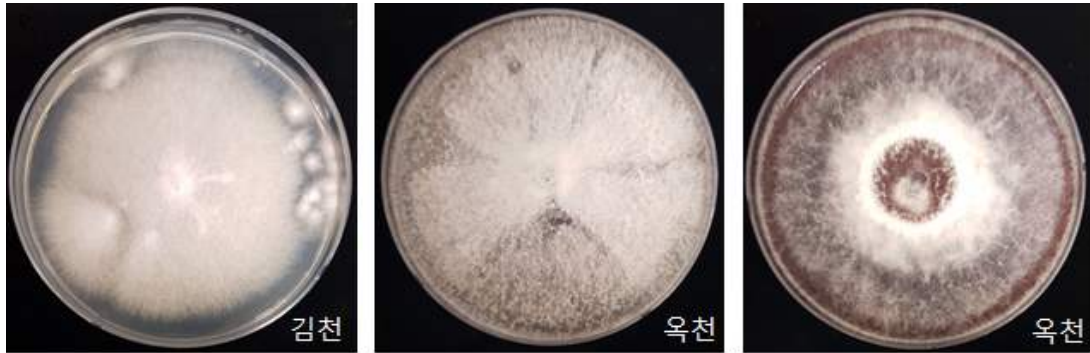


그림 54. 경상북도 김천지역과 충청북도 옥천지역 고구마 농장 흙에서 분리한 곰팡이
경상북도 김천지역과 충청북도 옥천지역 고구마 농장에서 수집된 흙에서 곰팡이
및 세균을 분리한 결과, 총 3종의 곰팡이를 분리하였음 (그림 54).

(2) 품종별 병 발생 상황 조사

2차년도 (2018년)에 66개 품종에서 발생한 곰팡이 병의 발생 상황 및 병원균 조사를 위해, 전라도 고창지역의 병든 고구마 잎, 줄기, 괴경을 샘플링 하고 세척하여 항생제 (Nalidixic acid와 Streptomycin)를 첨가한 PDA배지에 치상하여 3~5일 배양 후 곰팡이를 분리한 뒤 3번 계대하여 확보.

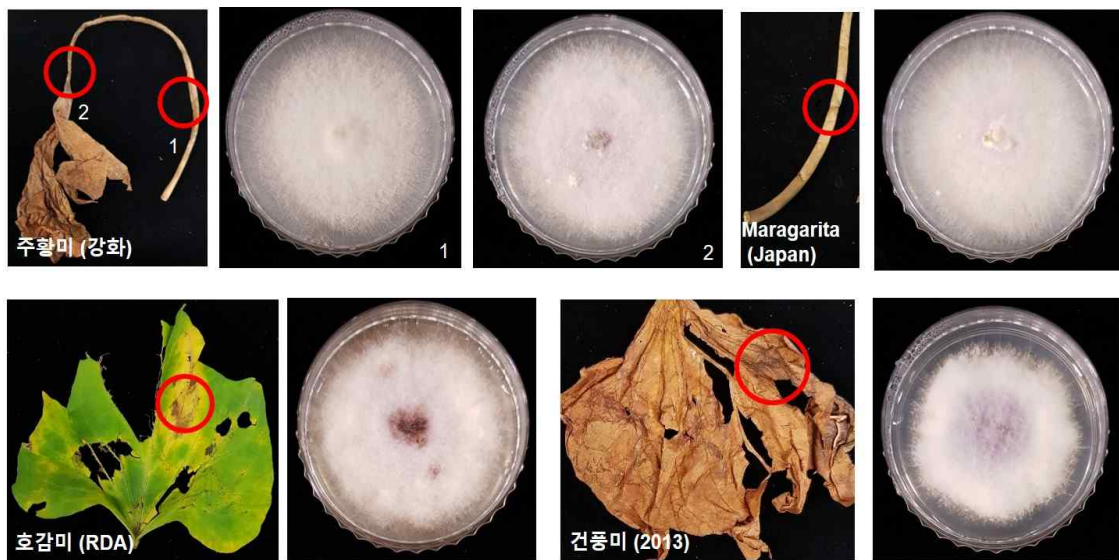


그림 55. 고구마 품종별 곰팡이 분리

병이 발생한 주황미 (강화), Maragarita (Japan) 줄기에서 곰팡이 3종, 호감미 (RDA), 건풍미 (2013) 잎에서 2종을 분리함 (그림 55).



그림 56. 고구마 품종별 곰팡이 분리

병이 발생한 고건미 (2013), 호감미 (RDA), 안노베니 (정읍) 줄기에서 곰팡이 3종, 안노베니 (2013) 앞에서 곰팡이 1종을 분리함 (그림 56).

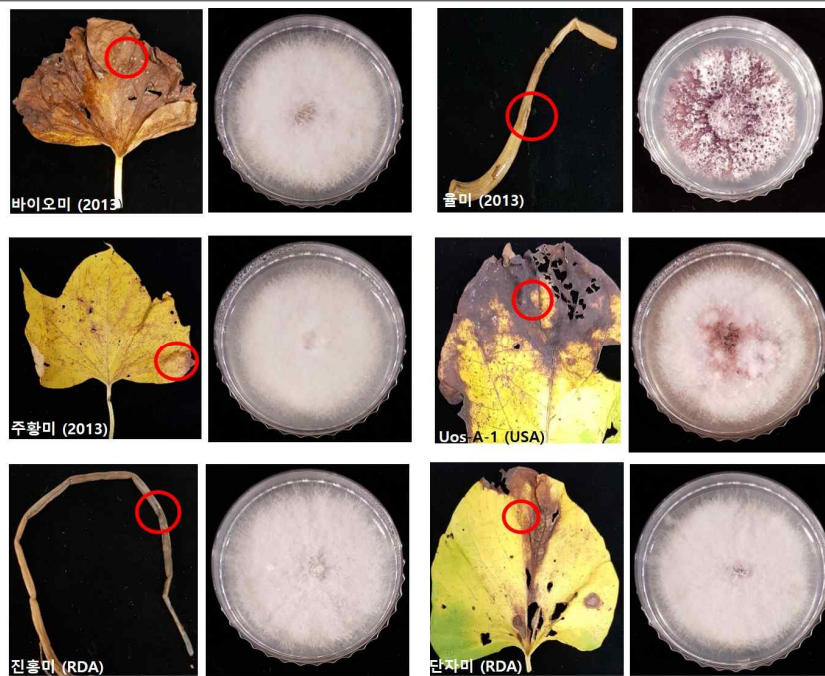


그림 57. 고구마 품종별 곰팡이 분리

병이 발생한 울미 (2013), 진홍미 (RDA) 줄기에서 곰팡이 2종, 바이오미 (2013), 주황미 (2013), Uos-A-1 (USA), 단자미 (RDA) 앞에서 곰팡이 4종을 분리함 (그림 57).

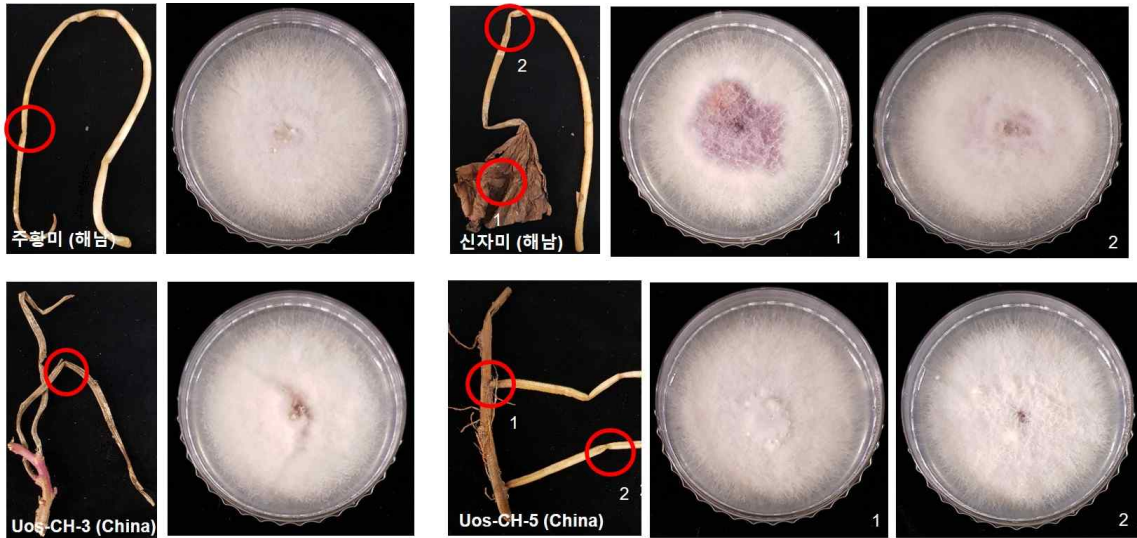


그림 58. 고구마 품종별 곰팡이 분리

병이 발생한 주황미 (해남), Uos-Ch-3 (China), Uos-CH-5 (China) 줄기에서 곰팡이 4종, 신자미 (해남) 잎에서 곰팡이 2종을 분리함 (그림 58).

총 66 품종에서 병이 발생한 17 품종을 수집하였고, 줄기에서 곰팡이 12 종, 잎에서 9종, 총 21종을 분리함.

나. 확보된 곰팡이 및 세균의 DNA 추출과 균학적 특성 조사

1차년도 (2017년)에서 분리된 곰팡이 및 세균을 각 PDA (7~10일), 0.3% TSA (1~3일)에 배양 후, 곰팡이의 균사와 세균의 single colony를 확보하여 lysing matrix와 boiling method를 사용하여 35종 곰팡이와 11종 세균의 DNA를 추출함.

2차년도 (2018년)에서 분리된 곰팡이를 위와 같은 방법을 사용하여 21종의 곰팡이의 DNA를 추출함.

ITS1_F (5' -CTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')와 TW13 (5' -GGTCCGTGTTTCAAGACG-3') 및 NS1 (5' -GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')와 FR1 (5' -AICCATTCAATCGGTAIT-3') primer를 사용하여 곰팡이의 Internal transcribed spacer (ITS)와 18S region의 염기서열을 확보하였으며, FD1 (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 rP2 (5' -ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 세균의 16S region의 염기서열을 확보하여 NCBI를 통해 분석함

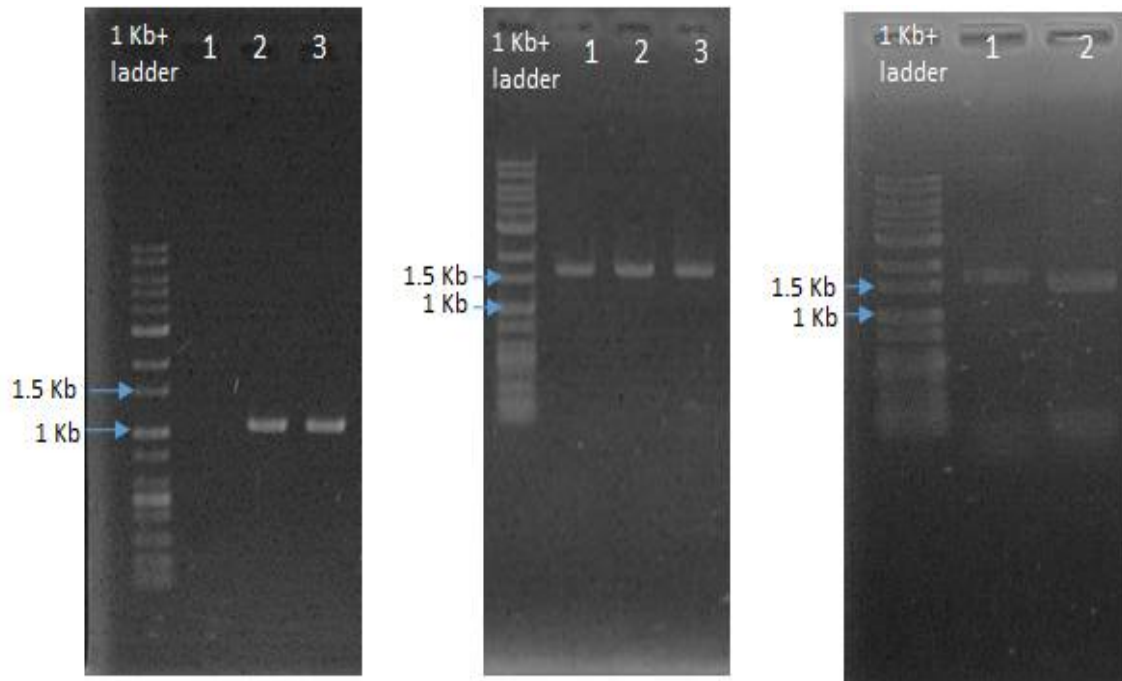


그림 59. 곰팡이 ITS (왼쪽), 18S region (중앙) 및 세균 16S region (오른쪽) PCR band

1차년도 8개 지역으로부터 분리된 곰팡이 총 35종은 DNA 추출을 하였으며, 위에 나열된 primer를 이용하여 약 1Kb size의 ITS region과 약 1.5Kb size의 18S region을 PCR 증폭을 통해 산물을 획득함 (그림 59).

2차년도 66 품종에서 병이 발생한 17 품종에서 분리한 곰팡이 총 21종은 DNA 추출을 하였으며 약 1Kb size의 ITS region을 PCR 증폭을 통해 산물 획득함.

1차년도 8개 지역으로부터 분리된 세균 총 11종은 DNA 추출을 하였으며, 위에 나열된 primer를 이용하여 약 1.5Kb size의 16S region을 PCR 증폭을 통해 산물을 획득함.

획득한 PCR 산물을 통해 ITS region, 18S region, 16S region의 염기서열을 확보하여 NCBI를 통해 곰팡이 및 세균의 균학적 특성 조사 결과, Fusarium, Paecilomyces, Chaetosphaeria, Mucor, Talaromyces, Colletotrichum, Alternaria (곰팡이) 및 Bacillus, Curtobacterium, Sphingomonas, Streptomyces, Rhizobium, Microbacterium (세균)이 확인됨. 이 중 고구마 덩굴 썩음병을 일으킬 수 있는 Fusarium sp. 42종을 선별함 (표 26 및 27).

표 26. 1차년도 (2017년) 8개 지역 *Fusarium* 분리 균주 및 NCBI 등록된 균주

Isolate	Species	Origin
1	<i>Fusarium</i> sp. strain ok1	옥천 흙
2	<i>Fusarium</i> sp. strain ok2	옥천 흙
6	<i>Fusarium</i> sp. strain ko6	고창 줄기
7	<i>Fusarium</i> sp. strain ko7	고창 줄기
8	<i>Fusarium</i> sp. strain ko8	고창 잎
9	<i>Fusarium</i> sp. strain ko9	고창 잎
10	<i>Fusarium</i> sp. strain do10	덕소 줄기
11	<i>Fusarium</i> sp. strain do11	덕소 줄기
13	<i>Fusarium</i> sp. strain do13	덕소 잎
14	<i>Fusarium</i> sp. strain do14	덕소 잎
17	<i>Fusarium</i> sp. strain no17	논산 잎
19	<i>Fusarium</i> sp. strain ko19	고창 잎
22	<i>Fusarium</i> sp. strain ko22	고창 줄기
24	<i>Fusarium</i> sp. strain ye24	예산 호박고구마 줄기
26	<i>Fusarium</i> sp. strain ye26	예산 잎
28	<i>Fusarium</i> sp. strain ye28	예산 호박고구마 잎
29	<i>Fusarium</i> sp. strain ye29	예산 호박고구마 줄기
35	<i>Fusarium</i> sp. strain ye35	예산 호박고구마 흙
36	<i>Fusarium</i> sp. strain ye36	예산 호박고구마 흙
37	<i>Fusarium</i> sp. strain ju37	정읍 줄기
39	<i>Fusarium</i> sp. strain ye39	김천 흙
41	<i>Fusarium</i> sp. strain ye41	강화 괴경
42	<i>Fusarium</i> sp. strain ye42	강화 괴경
43	<i>Fusarium</i> sp. strain ye43	강화 괴경
44	<i>Fusarium</i> sp. strain ye44	강화 괴경
45	<i>Fusarium</i> sp. strain ye45	강화 괴경
46	<i>Fusarium</i> sp. strain ye46	강화 괴경
47	<i>Fusarium</i> sp. strain ye47	강화 괴경
FOB	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>batatas</i>	미국 괴경
FOP	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	미국 콩
GR-126	<i>Fusarium oxysporum</i>	한국 양파
NRRL22402	<i>Fusarium solaini</i> f.sp. <i>batatas</i>	미국 괴경
NRRL22400	<i>Fusarium solaini</i> f.sp. <i>batatas</i>	미국 괴경
KF255997	<i>Fusarium solaini</i>	중국 괴경
SPL16098	<i>Fusarium solaini</i>	한국 괴경
SPL16128	<i>Fusarium solaini</i>	한국 괴경

표 27. 2차년도 (2018년) 17 품종 Fusarium 분리 균주

Isolate	Species	Origin
48	<i>Fusarium</i> sp. strain ju48	Juhwangmi(해남)
49	<i>Fusarium</i> sp. strain si49	Sinjami(해남)
50	<i>Fusarium</i> sp. strain si50	Sinjami(해남)
51	<i>Fusarium</i> sp. strain an51	Anno Beny(정읍)
52	<i>Fusarium</i> sp. strain or52	Original Orange(강화)
53	<i>Fusarium</i> sp. strain or53	Original Orange(강화)
54	<i>Fusarium</i> sp. strain ge54	Gennpungmi(2013)
55	<i>Fusarium</i> sp. strain go55	Gogeonmi(2013)
56	<i>Fusarium</i> sp. strain an56	Anno Beny(2013)
57	<i>Fusarium</i> sp. strain bi57	Biomi(2013)
58	<i>Fusarium</i> sp. strain yu58	Yulmi(2013)
59	<i>Fusarium</i> sp. strain ju59	Juhwangmi(2013)
60	<i>Fusarium</i> sp. strain uos60	Uos-a-1(USA)
61	<i>Fusarium</i> sp. strain uos61	Uos-ch-3(China)
62	<i>Fusarium</i> sp. strain uos62	Uos-ch-5(China)
63	<i>Fusarium</i> sp. strain uos63	Uos-ch-5(China)
64	<i>Fusarium</i> sp. strain ji64	Jinhongmi(RDA, Korea)
65	<i>Fusarium</i> sp. strain da65	Danjami(RDA, Korea)
66	<i>Fusarium</i> sp. strain ho66	Hogamm(iRDA, Korea)
67	<i>Fusarium</i> sp. strain ho67	Hogamm(iRDA, Korea)
68	<i>Fusarium</i> sp. strain ma68	Maragarita(Japan)

다. 확보된 *Fusarium* sp. 유전자 염기서열분석을 이용한 계통 분석

확보된 고구마 덩굴 쪼김병을 일으킬 수 있는 *Fusarium* sp. 42종의 계통 분석을 위해 ITS와 28S와 18S 사이에 존재하는 intergenic spacer (IGS) 염기서열을 비교 분석함. IGS의 염기서열 다양성을 토대로 종 내 병원성/비병원성 균주를 구분할 수 있는 특정 서열이 연구된 논문을 기반으로 실험함 (D.J Appel and T. R. Gordon, 1996) (그림 60).

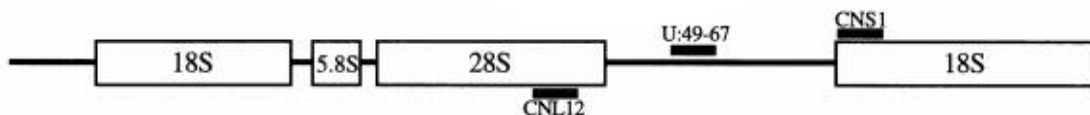


그림 60. Ribosomal DNA repeat unit과 intergenic spacer

논문을 토대로 선정된 병원균 분자지표 후보 중 하나인 CNL12 (5' -CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3'), U49-67R (5' -AATACAAGCACGCCGACAC-3'), U49-67F (5' -GTTGCGCGTGCTTGATT-3'), CNS1 (5' -GAGACAAGCATATGACTACTG-3') 프라이머로 얻은 PCR 산물을 CLUSTAL W를 이용하여 multiple align 후 MEGA 7 프로그램을 이용 neighbor-joining법 (Bootstrap 방법, 1000반복, Tajima-Nei 모델)으로 분자계통수를 생성하여 분석함.

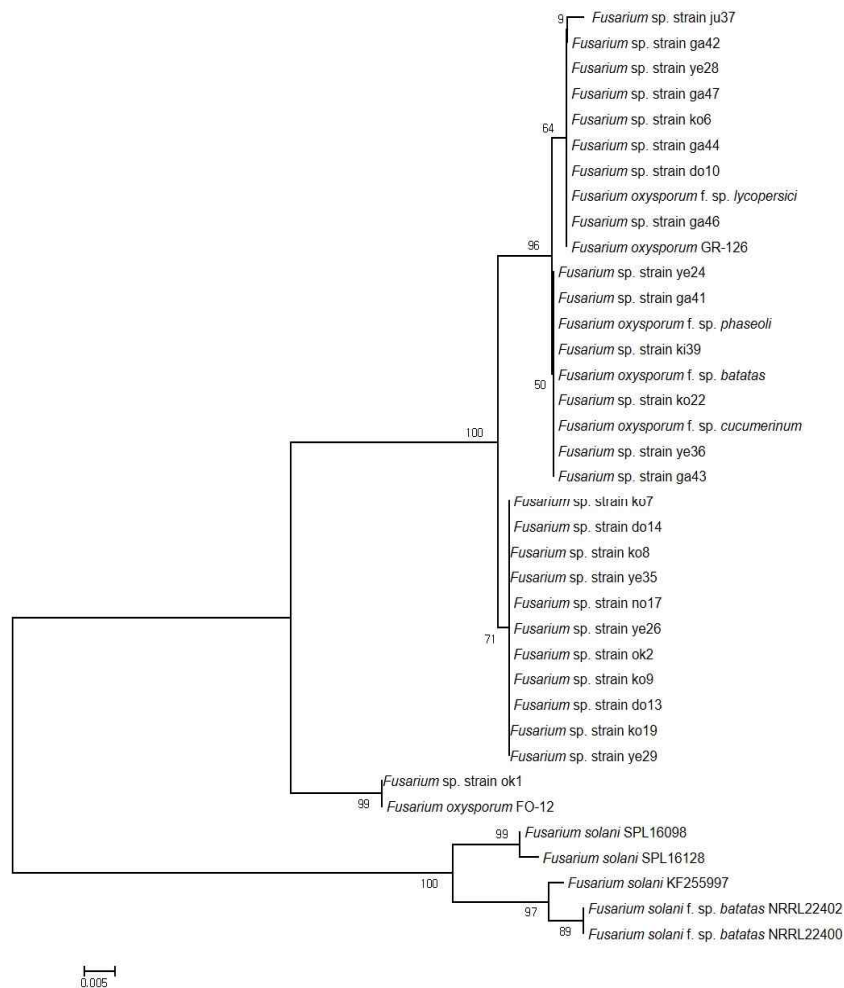


그림 61. 1차년도 고구마 *Fusarium* sp. 분리균주들의 ITS 염기서열 분석

1차년도에 분리된 *Fusarium* sp. strain ko6, do10, ye28, ju37, ga42, ga44, ga46, ga47 이 양파 (한국)에 병을 일으키는 병을 일으키는 *Fusarium oxysporum* GR-126의 ITS 염기서열과 높은 유사성을 보였으며, 고구마 덩굴쪄김병원균인 *Fusarium oxysporum* f.sp. batatas (미국)와는 ko22, ye24, ye36, ki39, ga41, ga43 분리균주와 높은 서열 유사성을 보임. 1차년도 분리균주들과 *Fusarium solani*와는 다른 그룹에 속하는 것을 확인 하였음 (그림 61).

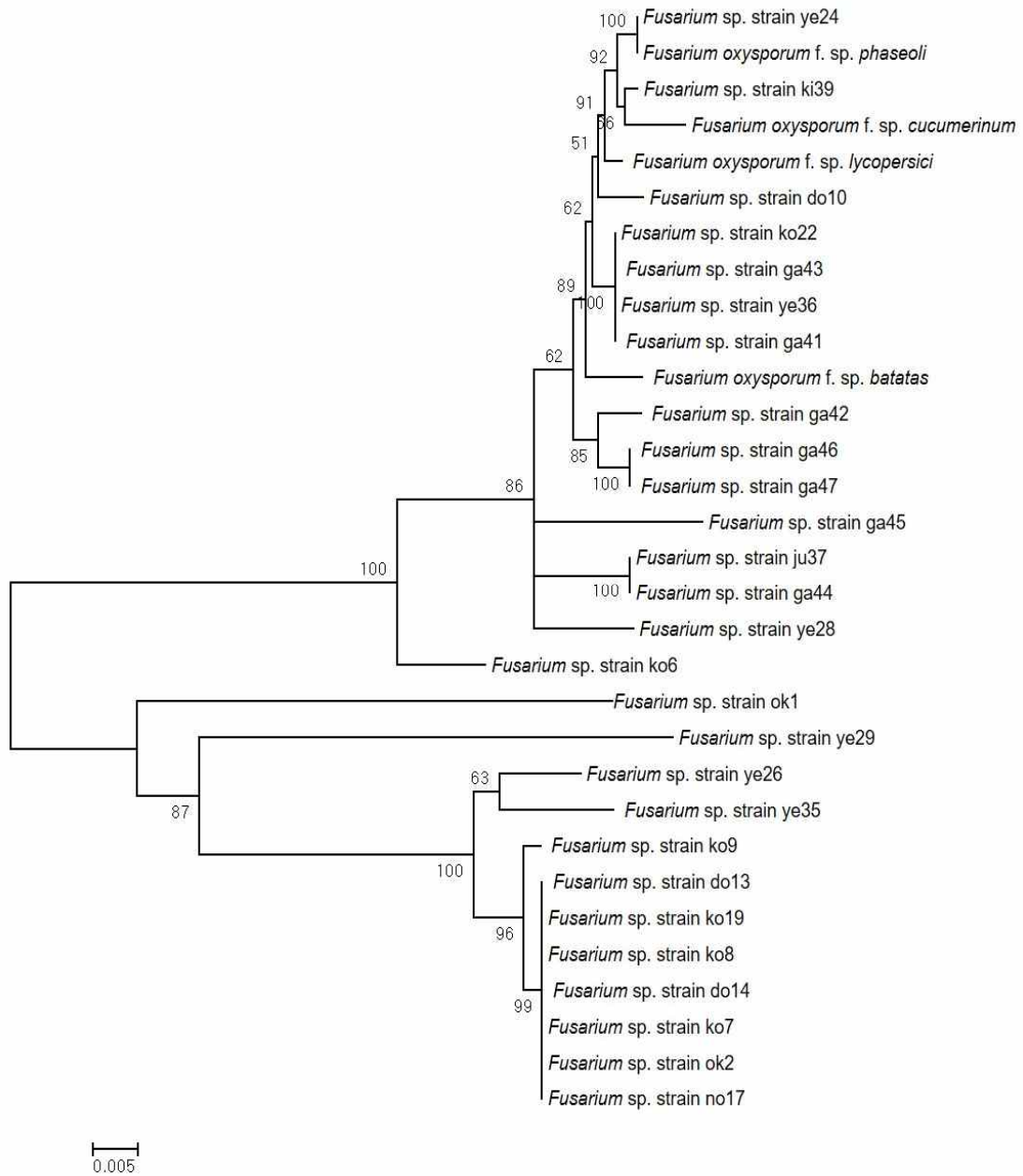


그림 62. 1차년도 고구마 *Fusarium* sp. 분리균주들의 IGS 염기서열 분석분석

1차년도에 분리된 *Fusarium* sp.의 IGS 염기서열 분석 결과, do10, ko22, ye24, ye28, ye36, ki39, ga41, ga42, ga43, ga46, ga47 이 고구마 덩굴쪄김병 (미국)을 일으키는 *Fusarium oxysporum* f.sp. *batatas*와 근연관계에 있음을 확인 (그림 62).

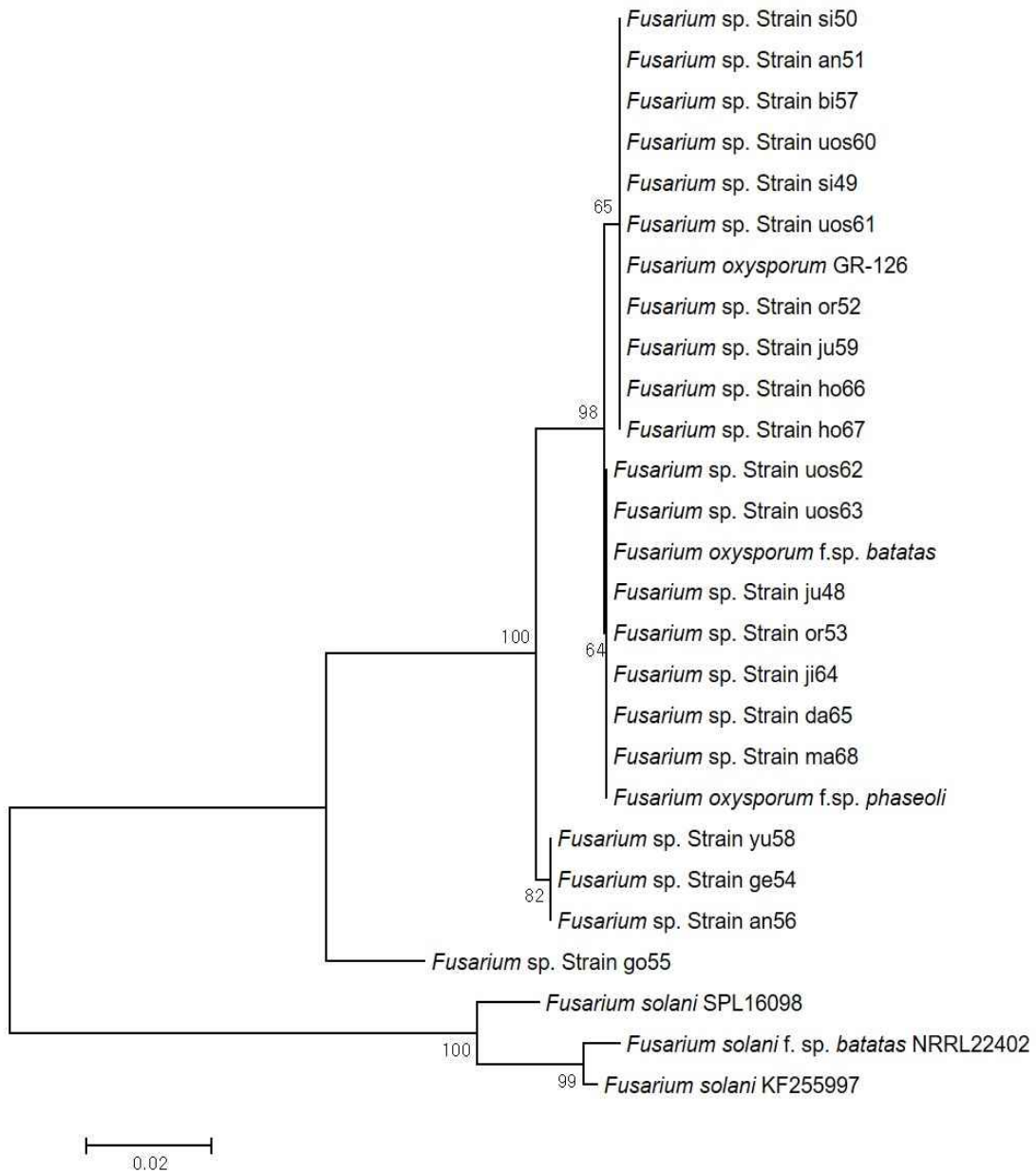


그림 63. 2차년도 고구마 *Fusarium* sp. 분리균주들의 ITS 염기서열 분석

2차년도에 분리된 *Fusarium* sp. strain si49, si50, an51, or52, bi57, ju59, uos60, uos61, ho66, ho67번 분리균주가 양파 (한국)에 병을 일으키는 *Fusarium oxysporum* GR-126의 ITS 염기서열과 높은 유사성을 보였으며, 고구마 덩굴쪄김병원균인 *Fusarium oxyporum* f.sp. batatas (미국)와는 ju48, or53, uos62, uos63, ji64, da65, ma68번 분리균주와 높은 서열 유사성을 보임. 분리균주들과 *Fusarium solani*와는 다른 그룹에 속하는 것을 확인 (그림 63).

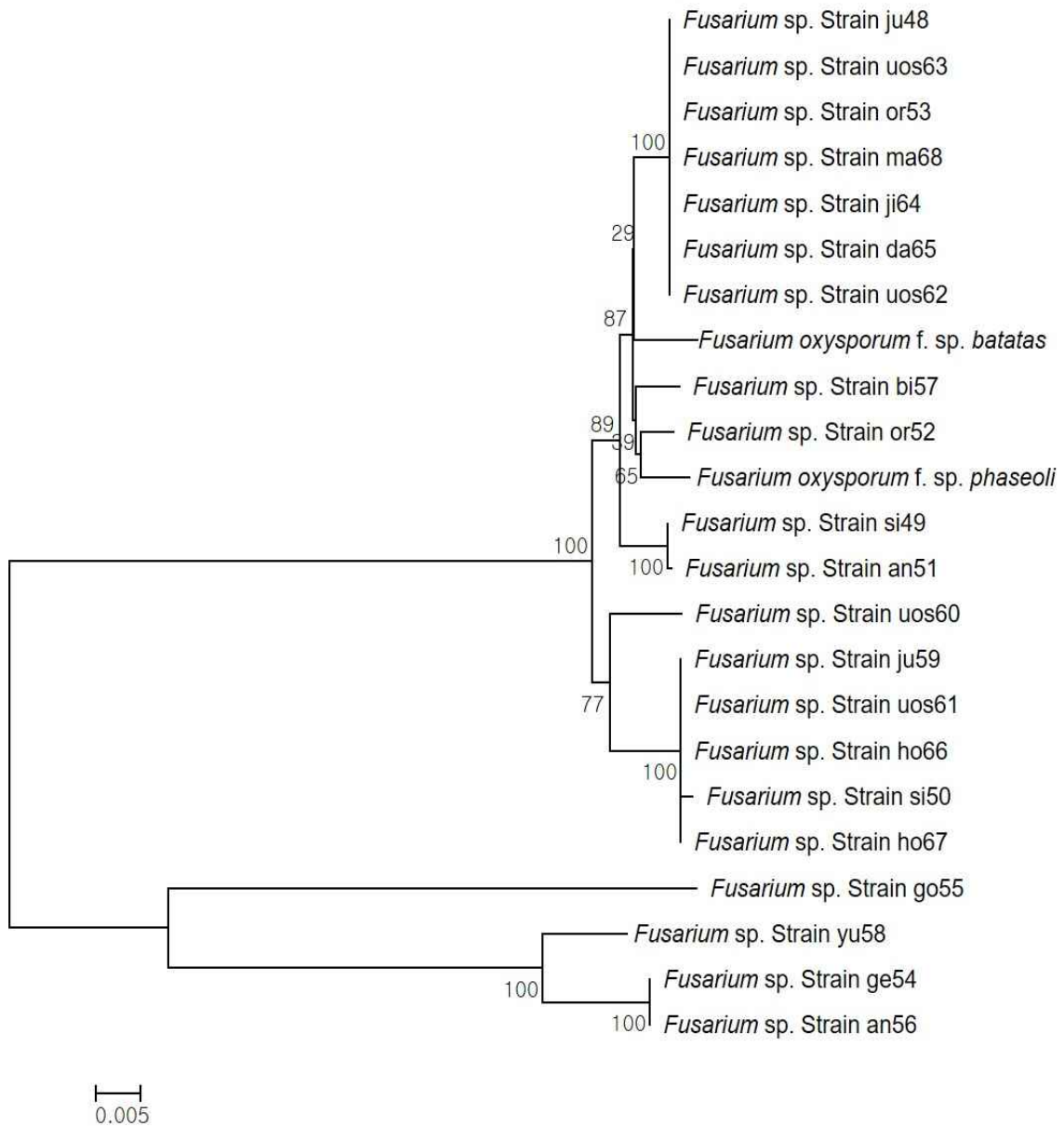


그림 64. 2차년도 고구마 *Fusarium* sp. 분리균주들의 IGS 염기서열 분석

2차년도에 분리된 *Fusarium* sp.의 IGS 염기서열 분석 결과, ju48, or53, uos62, uos63, ji64, da65, ma68번 분리균주가 고구마 덩굴쪄김병원균인 *Fusarium oxysporum* f.sp. *batatas*와 근연관계에 있으며. ge54, go55, an56, yu58번 균주는 ITS 결과와 동일하게 고구마 덩굴쪄김병원균 (미국)과 다른 그룹에 속함 (그림 64).

라. 고구마 재배 묘상에서 분리된 곰팡이 병원성 검정

1차년도 (2017년)에 고창, 논산, 정읍, 예산, 덕소, 김천, 옥천, 강화의 고구마 농장에서 분리된 *Fusarium* sp. 28종의 병원성 검정 실험을 위해, 28종의 곰팡이를 PDA에 7일간 28° C에 배양하여 포자를 수확하였고 멸균된 토양에 고구마식물 (베니하루카)을 이식하였다. 수확된 포자를 106 의 농도로 맞추어 이식된 식물토양에 50ml을 접종하였으며 접종된 식물은 수분이 증발되지 않도록 48시간동안 비닐을 덮고 발병을 유도하였음. 또한, 고구마줄기에 바늘을 사용하여 상처를 낸 뒤 수확된 포자(106 농도)에 숨을 적셔 테이프로 감아 준 후, 수분이 증발되지 않도록 48시간동안 비닐을 덮어 발병을 유도하였음.



그림 65. 1차년도 분리된 *Fusarium* sp.의 베니하루카 품종에 대한 병원성 검정



그림 66. 1차년도 분리된 *Fusarium* sp.의 베니하루카 품종에 대한 병원성 검정

1차년도에 고창, 논산, 정읍, 예산, 덕소, 김천, 옥천, 강화의 고구마 농장에서 분리된 *Fusarium* sp. 28종의 병원성 검정 결과, 정읍지역 고구마줄기에서 분리된 *Fusarium* sp. strain ju37의 토양관주처리에서 습실 처리 후 4일째부터 잘록 증상이 나타났으며 7일째부터 시들어 잎이 황화되는 증상을 보였으며, 상처를 낸 줄기에서도 마른 증상이 보이며 시들음 증상을 보임. *Fusarium* sp. strain ga41의 관주처리에서 습실처리 후 8일째부터 시들음 증상이 보였으나, 상처를 낸 줄기에서는 병 증상이 보이지 않았음 (그림 65 및 66).

2차년도 (2018년)에 다양한 품종에서 분리된 *Fusarium* sp. 21종을 베니하루카 품종에 대해 병원성 검정을 위와 같이 실시하였음.



그림 67. 2차년도 분리된 *Fusarium* sp.의 베니하루카 품종에 대한 병원성 검정



그림 68. 2차년도 분리된 *Fusarium* sp.의 베니하루카 품종에 대한 병원성 검정

2차년도 주황미(해남), 신자미(해남), 안노베니(정읍), 호박(강화), 건풍미(2013), 고건미(2013), 안노베니(2013), Uos-a-1(USA), Uos-ch-3(중국), Uos-ch-5(중국), 진흥미(RDA), 단자미(RDA), 호감미(RDA), Maragarita(일본) 품종에서 분리된 *Fusarium* sp. 21종을 베니하루카 품종에 병원성 검정 결과, 토양관주 처리에서 모두 시들음 증상을 보이지 않았다 (그림 2-67 및 68).



그림 69. 다양한 품종에 대한 Fusarium sp. strain ju37의 병원성 검정

전라남도 정읍지역의 병든 고구마 줄기 (베니하루카)에서 분리된 Fusarium sp. strain ju37를 베니마사리 (익산), 맛젤 (정읍), 백고구마 (웅진), 베니하루카 (논산), 안노베니 (2013), 황금 (고창), 베니사쓰마 (고창), 울미 (RDA), 연자미 (RDA), 풍원미 (RDA), 신건미 (RDA), 단자미(RDA), 신자미 (RDA), 주황미 (RDA), 호감미 (RDA), 진울미 (RDA), 호박 (강화) 품종의 줄기에 상처를 낸 뒤 접종한 결과, 베니하루카, 신자미, 베니마사리, 단자미 품종에서 줄기가 잘록해지며 마른 증상을 보였으며 잎에서도 황화현상을 보였음 (그림 69).



그림 70. 분리된 *Fusarium* sp. strain si50, ho66, ho67의 병원성 검정

2차년도에 다양한 품종에서 분리한 *Fusarium* sp. 21종의 베니하루카 품종에 병원성 검정 (줄기) 결과, ho66 균주만 병원성을 보인 반면 분리된 나머지 균주들은 저항성을 반응을 보였음. 병든 신자미 품종 줄기에서 분리된 *Fusarium* sp. strain si50를 신자미 (RDA) 품종에서 병원성을 보였음. 호감미 품종 줄기에서 분리된 *Fusarium* sp. strain ho66 및 67은 호감미 품종에서 병원성을 보였음 (그림 70).

병원성 검정 결과, 토착 *Fusarium* sp. 균주들에 대한 국내 고구마 재배 품종의 저항성 수준이 다양한 것으로 보임.

마. 분자생물학적 기법을 이용한 곰팡이 병 진단 시스템 개발

1차년도와 2차년도에 확보한 병원성 곰팡이 및 비병원성 곰팡이와 기존에 알려진 병원균의 염기서열 정보들을 토대로 종 특이적 분자 마커 개발을 위해, 42종의 곰팡이를 ITS 및 IGS 염기서열을 분석하였다.

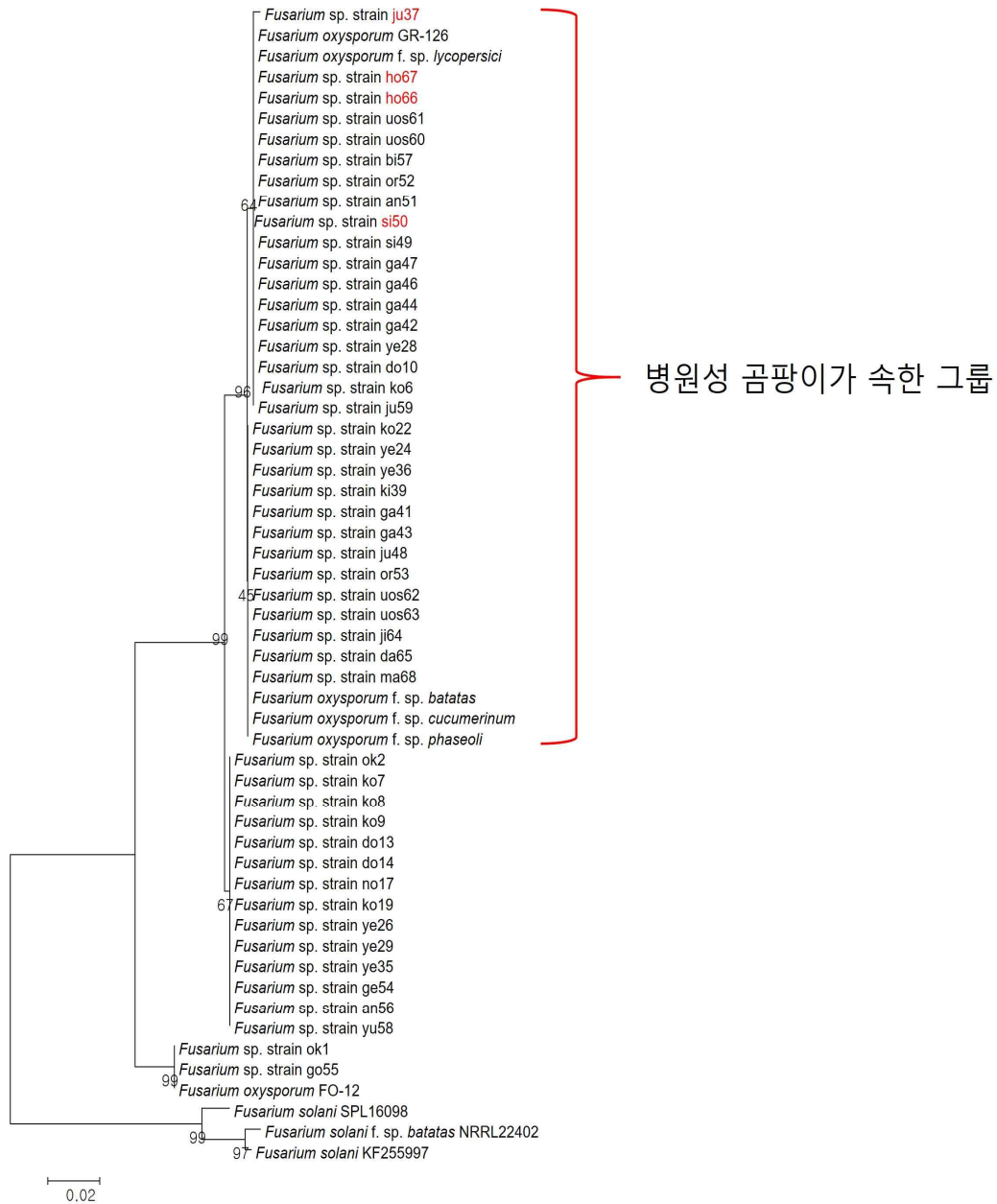


그림 71. 분리된 42종 Fusarium sp. 균주들의 ITS 염기서열 분석

분리된 42종 Fusarium sp. 균주들의 ITS 염기서열 기반으로 분자계통수를 생성한 결과, 병원성 곰팡이가 속한 그룹은 비병원성 곰팡이들과는 다른 그룹에 속하는 것을 확인 하였으며, Fusarium oxysporum과 근연관계임을 보였다 (그림 71).

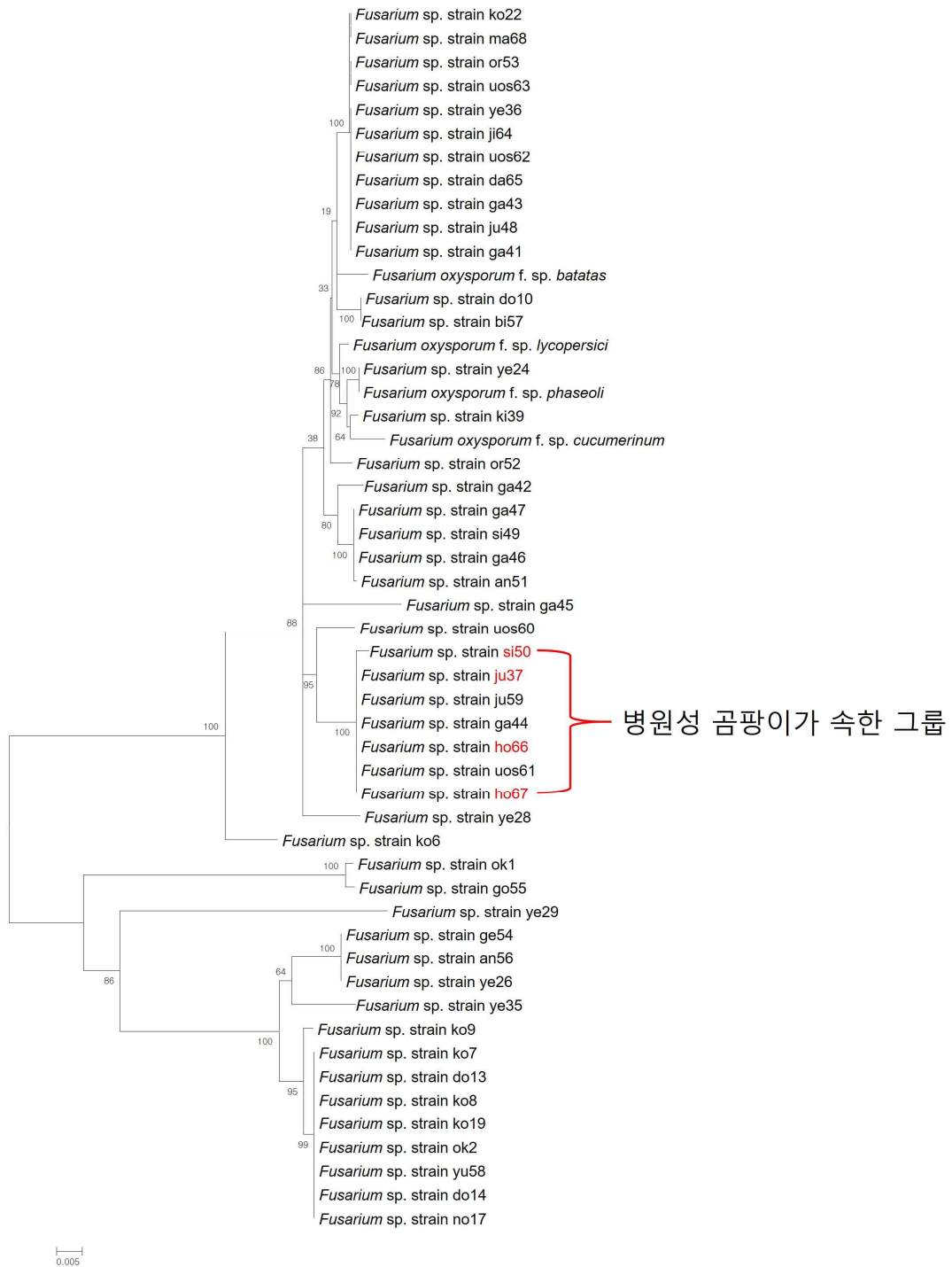


그림 72. 분리된 42종 *Fusarium* sp. 균주들의 IGS 염기서열 분석

분리된 42종 *Fusarium* sp. 균주들의 IGS 염기서열 기반으로 분자계통수를 생성한 결과, 확인된 병원성 곰팡이 ju37, si50, ho66, ho67이 같은 그룹으로 속하였으며, 비병원성 곰팡이들과는 다른 그룹에 속하는 것을 확인하였음 (그림 72).

Internal transcribed spacer (ITS) region

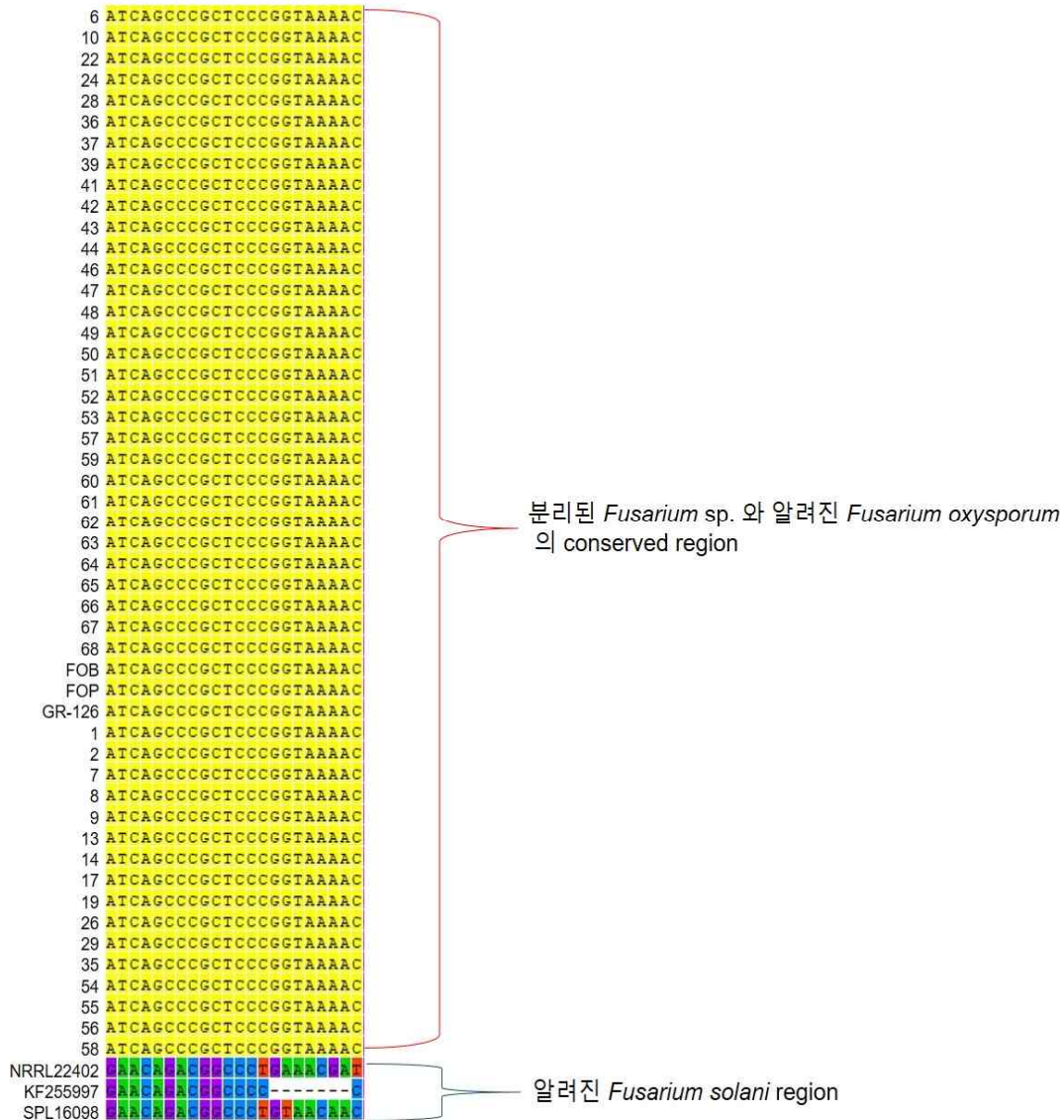


그림 73. 병원성 곰팡이 그룹을 특이적으로 검출하기 위한 ITS 기반 염기서열 분석 확보한 병원성 곰팡이 및 비병원성 곰팡이와 기존에 알려진 병원균의 특이적 PCR 검출을 위한 특이적 primer의 제작을 위해 ITS 염기서열을 비교 분석함. 5 ‘-ATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAC-3’의 염기서열은 확보된 *Fusarium* sp.와 알려진 *Fusarium oxysporum*의 conserved region으로서 기존에 병원성 균주로 알려진 *Fusarium solani*와 상이함 (그림 73).

Internal transcribed spacer (ITS) region

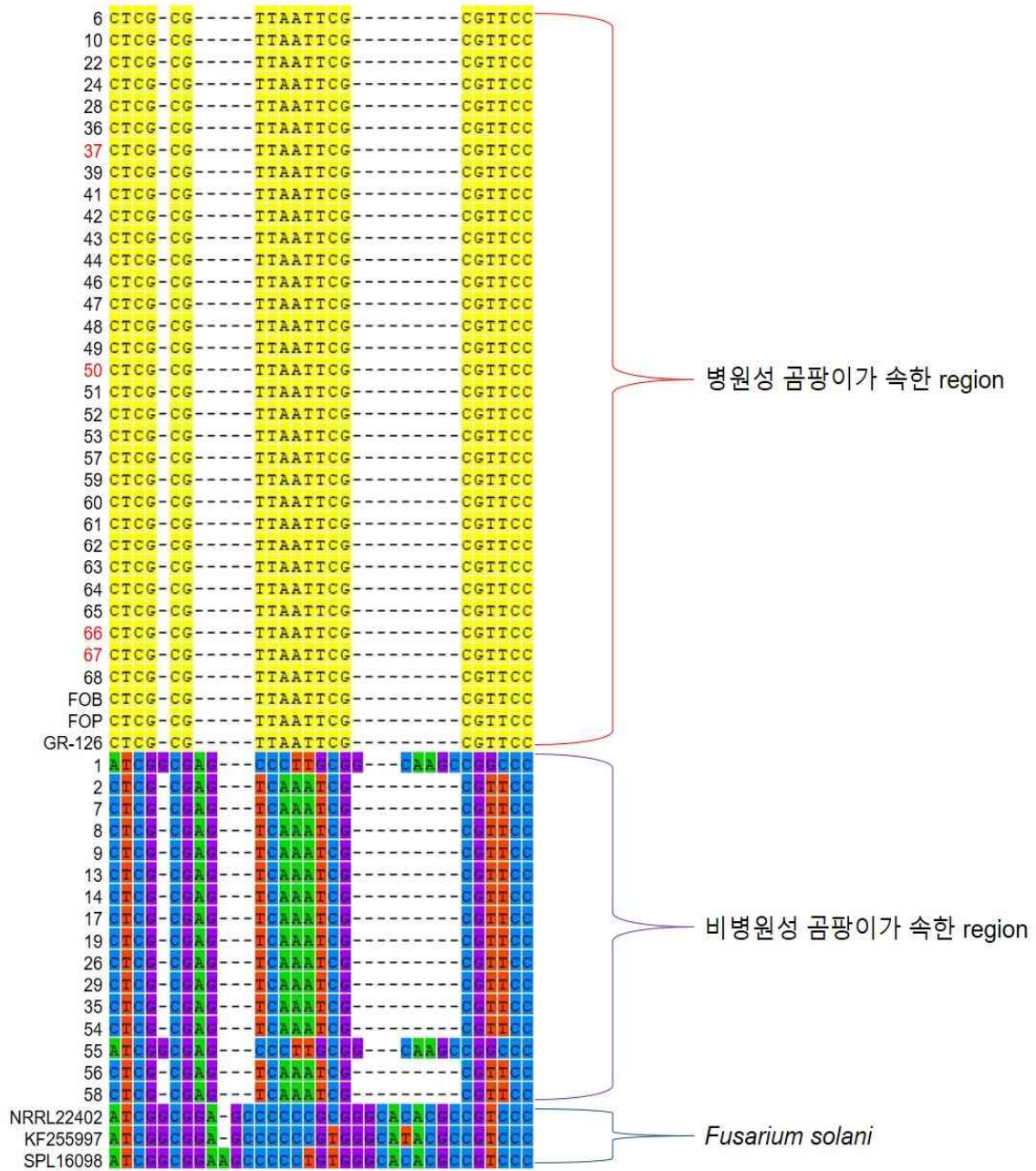


그림 74. 병원성 곰팡이 그룹을 특이적으로 검출하기 위한 ITS 기반 염기서열 분석

5 '-CTCGCGTTAATTCGCGTTCC-3'의 염기서열은 병원성 *Fusarium* sp. strain ju37이 속한 그룹과 비병원성 곰팡이 그룹 및 기존에 병원성 균주로 알려진 *Fusarium solani*와 상이함 (그림 74).

Forward primer 5 '-ATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAC-3' 와 Reverse primer 5 '-GGAACGCGAATTAACGCGAG-3' 를 제작하여 PCR 검출시 비병원성 균주 그룹 및 *Fusarium solani* 검출 되지 않으며, 특이적으로 병원성 균주가 속한 그룹만 검출됨 (그림 75).

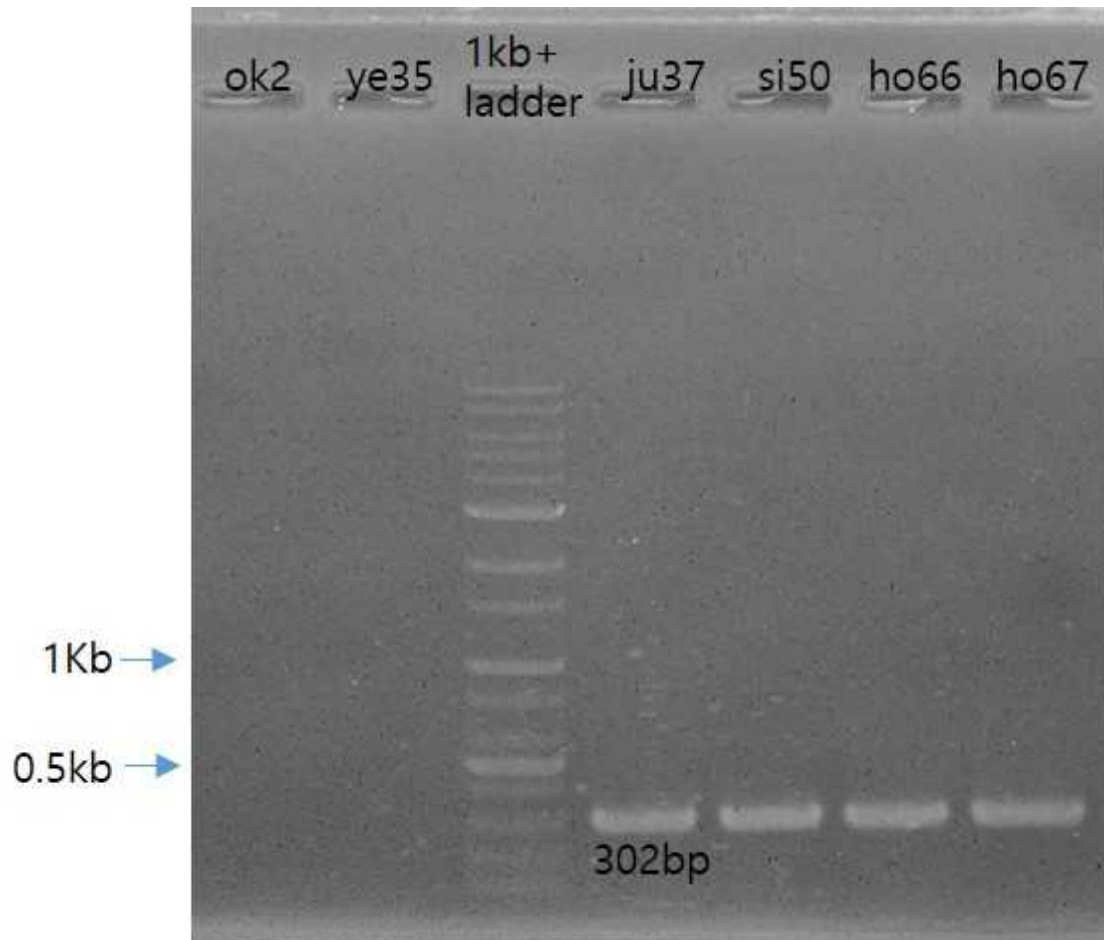


그림 75. 특이적 primer를 이용한 비병원성그룹 균주와 병원성그룹 균주 PCR 검출

4. 고구마 유통기한 연장 및 신선도 유지를 위한 포장재 개발 / 추적이력제 시스템 개발

가. 고구마의 호흡 특성

(1) 요약

MA 포장 시, 포장 내 가스 조성은 포장 안에 들어 있는 식품의 호흡작용에 의해 소모되는 산소 및 발산되는 이산화탄소 양에 의해 결정된다. (농산물 저장 유통기술 핸드북, 407) 따라서 고구마의 MA포장 설계를 위해 고구마의 호흡 특성분석을 진행하였다. 시간에 따른 산소 소비와 이산화탄소 배출 즉, 산소 소비 속도와 이산화탄소 배출속도는 고구마의 호흡속도로 나타낼 수 있으며, 호흡률을 의미한다. 산소 소비와 이산화탄소 배출 모델링을 위하여 비경쟁억제 효소 반응 속도식을 모델로 사용하였다. 비경쟁억제 속도식은 이산화탄소가 호흡속도를 저해하는 역할을 할 경우에 사용하는 것이 일반적이다. 3가지 parameter(V_m , K_m , K_i)을 결정하면, 특정 산소와 이산화탄소 농도에서 호흡속도를 구할 수 있다. 실험은 고구마 저장조건이 아닌 유통조건에 맞추어 실험을 진행하였다. 사용한 고구마는 (주)나나농장에서 출하한 고구마를 사용하였으며, 3가지 품종(베니하루카, 호감미, 호박)에 대해 실험을 진행하였다. 호흡률을 모델링한 결과, 3가지 품종 모두에서 온도가 높아질수록 V_m , K_m 값은 증가하였고, K_i 값은 낮아지는 경향을 보였다.

(2) 재료 및 방법

① 고구마

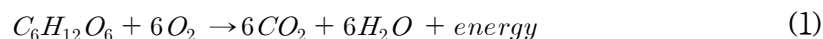
실험에 사용한 고구마는 (주)나나농장에서 저장한 후, 출하하기 직전의 고구마를 사용하였다. 고구마는 13°C, 70%RH에서 저장되었다가 출하되기 3일전에 큐어링 과정을 거쳐 출하된다. 큐어링은 34°C, 70%RH에서 3일간 진행되었다. 고구마의 품종은 국내에서 가장 많이 유통되고 있는 베니하루카, 호박, 호감 고구마를 사용 하였다.

② gas analysis

호흡률을 측정하기 위해 산소 소비량과 이산화탄소 배출량을 측정하였다. 산소 소비량과 이산화탄소 배출량 측정은 폐쇄계방법(closed system method)을 이용하였다.(Lee J. 1987/Fishman S, 1999) 고구마의 산소 소비량은 GC(gas chromatography)를 이용하여 측정하였다. GC의 분석조건은 column: CP7429(select permanent gases/CO₂; Agilent), oven temp.: 35°C, carrier gas: helium(14.5 psi), detector: TCD(thermal conductivity detector), injector temp.: 45°C, detector temp.:100°C 로 하였다.

③ 호흡률 모델링

고구마의 호흡작용을 식 (1)과 같은 화학반응의 개념으로 단순화하여 효소반응속도론을 호흡모델로 이용하였다.



폐쇄계 방법에서 산소 소비 속도와 이산화탄소 배출 속도는 다음과 같은 식으로

나타낼 수 있다.

$$R_{O_2} = \frac{d[O_2]}{dt} \times \frac{\text{Free volume}}{\text{Sample weight} * 100} \quad (2)$$

$$R_{CO_2} = \frac{d[CO_2]}{dt} \times \frac{\text{Free volume}}{\text{Sample weight} * 100} \quad (3)$$

보통, 폐쇄계 방법에 의한 실험은 시간에 따른 산소농도 감소와 이산화탄소농도 증가의 형태로 얻어진다. 산소농도와 이산화탄소농도를 식으로 나타내면 다음과 같다.

$$[O_2] = A_1 t^2 + A_2 t + A_3 \quad (4)$$

$$[CO_2] = B_1 t^2 + B_2 t + B_3 \quad (5)$$

이러한 경과 과정 동안의 기체조성에서 호흡데이터를 얻기 위해 각 시점에서 산소농도의 변화속도($d[O_2]/dt$), 이산화탄소 농도의 변화속도($d[CO_2]/dt$)를 얻어야 한다. 이를 얻기 위해, 가스농도의 변화과정을 회귀곡선으로 표현한 후 이 곡선식을 미분하여 얻는다.(이동선, 1997) 이를, 식으로 나타내면 다음과 같다.

$$\frac{d[O_2]}{dt} = 2A_1 t + A_2 \quad (6)$$

$$\frac{d[CO_2]}{dt} = 2B_1 t + B_2 \quad (7)$$

호흡속도를 모델링하기 위해 식 8과 같은 비경쟁억제 효소반응속도식을 모델로 사용하였다. 비경쟁억제 효소반응속도식은 이산화탄소가 호흡속도를 저해하는 역할을 할 경우에 사용하는 것이 일반적이다. 식 8에서 R은 호흡률, $[O_2]$ 는 산소 농도, $[CO_2]$ 는 이산화탄소 농도, V_m 은 maximum respiration rate, K_m 은 Michaelis-Menten constant, K_i 는 inhibition constant를 나타낸다. 식 8에서 세 가지 parameter(V_m , K_m , K_i)를 결정하면 특정 산소 및 이산화탄소 농도에서의 호흡속도를 구할 수 있다.(K. L. YAM. 1995)

$$R_{O_2 \text{ or } R_{CO_2}} = \frac{V_m [O_2]}{K_m + (1 + [CO_2]/K_i)[O_2]} \quad (8)$$

(3) 결과 및 고찰

① 베니하루카 고구마

㉠ 산소 소비 변화

베니하루카 품종을 폐쇄계 방법을 이용하여 15°C, 20°C, 25°C에서 시간에 따른 밀 폐용기 내 산소 농도를 측정된 결과는 그림 76~78과 같다. 온도가 높아질수록 산소농도가 빠르게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이는 주위 온도가 상승하면 호흡률이 증가하는 일반적인 과채류의 호흡특성과 같다.(KFRI. 2003).

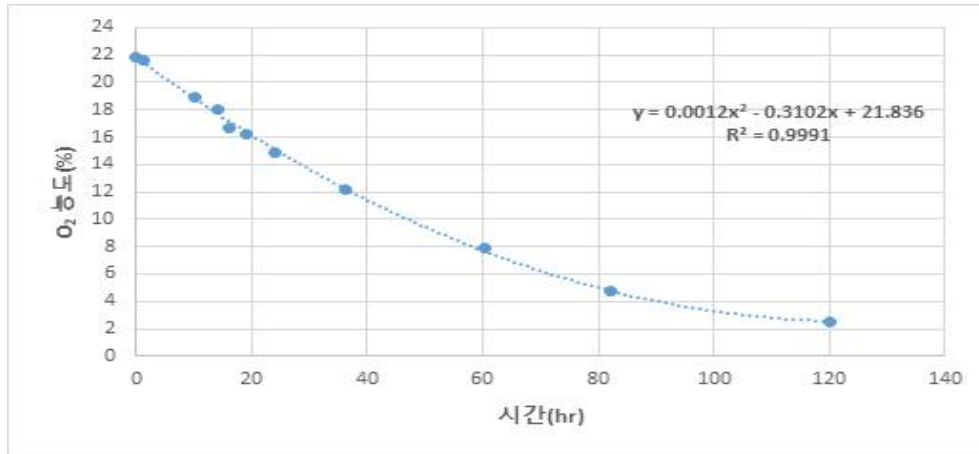


그림 76. Change of oxygen concentration at 15°C (Benny Haruka)

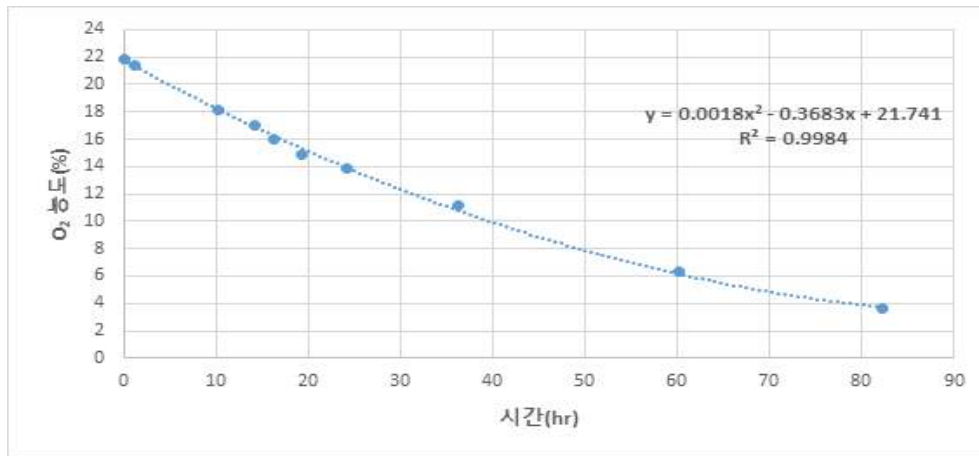


그림 77. Change of oxygen concentration at 20°C (Benny Haruka)

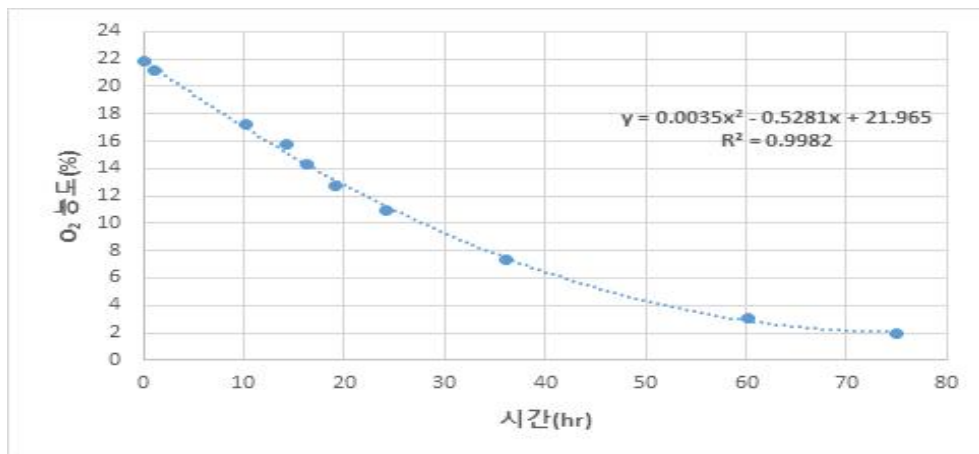


그림 78. Change of oxygen concentration at 25°C (Benny Haruka)

㉔ 이산화탄소 배출 변화

베니하루카 품종을 폐쇄계 방법을 이용하여 15°C, 20°C, 25°C에서 시간에 따른 밀폐용기 내 이산화탄소 농도를 측정된 결과는 그림 2 - 79~31과 같다. 온도가 높아질수록 이산화탄소 농도가 빠르게 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이는 3-①-㉔과 같은 이유로 온도가 높으면, 호흡이 빠르게 진행됨에 따라 나타난 결과이다.

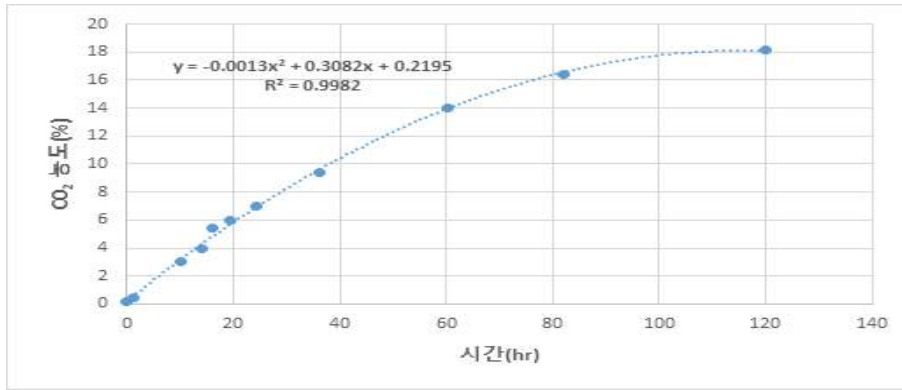


그림 79. Change of carbon dioxide concentration at 15°C (Benny Haruka)

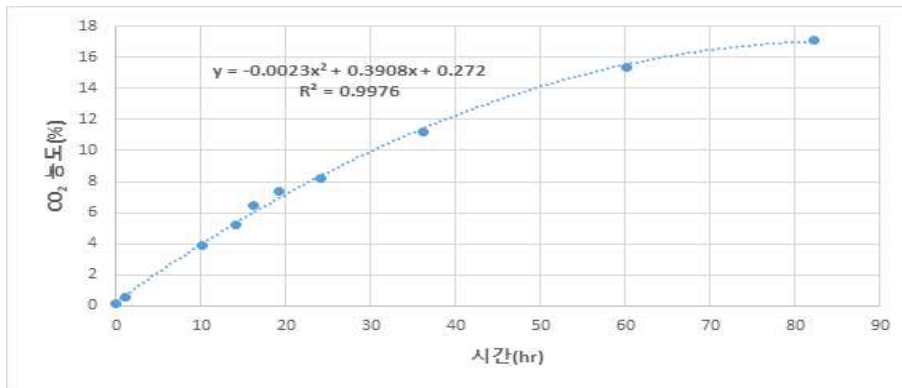


그림 80. Change of carbon dioxide concentration at 20°C (Benny Haruka)

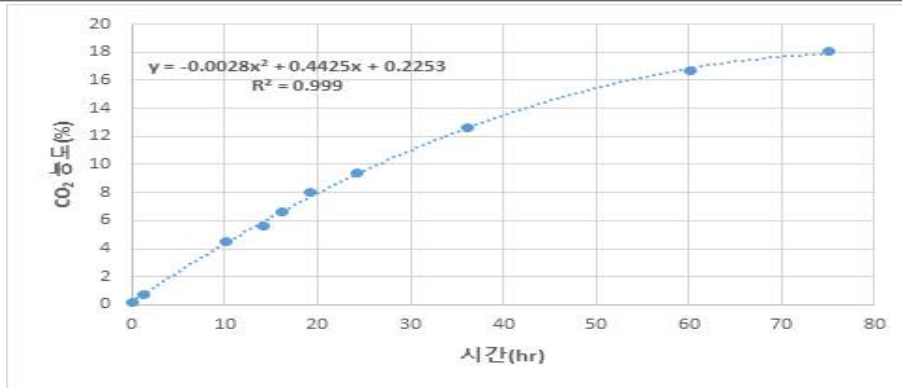


그림 81. Change of carbon dioxide concentration at 25°C (Benny Haruka)

㉔ 산소 소비, 이산화탄소 배출 모델링

베니하루카 품종의 산소 소비와 이산화탄소 배출을 모델링하기 위하여 시간에 따른 용기 내 각 산소와 이산화탄소의 농도 변화를 회귀식으로 fitting 하였고, 이를 1차 미분하여 농도변화율(식 6,7)을 구하고 시료의 무게, 용기부피를 감안하여 각 시점에서의 호흡률(식 2,3)을 구하였다. 이와 같은 방법으로 각 온도별 고구마(베니하루카)의 중량과 용기부피 및 산소, 이산화탄소 각각에 대한 regression coefficient를 구하였다(표 28). 식 (9)는 식 (8)을 multiple linear regression을 이용하기 위해 변형한 식이다. 표 28의 regression coefficient와 시료의 무게, 용기부피를 이용하여 multiple linear regression 한 후, 식 (9)를 이용하여 세 가지 parameters (Vm, Km, Ki)를 결정하였다.

$$R_{O_2 \text{ or } R_{CO_2}} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[O_2]} + \frac{1}{K_i V_m} [CO_2] \quad (9)$$

결정된 세 가지 parameters (Vm, Km, Ki)는 표 29에 나타나 있다. Vm, Km 은 온도가 올라갈수록 증가하는 경향이었고, Ki 는 감소하는 경향이였다. Vm은 산소 소비 속도에서 더 높은 값을 가졌으며, Km, Ki는 이산화탄소 배출 속도에서 더 높은 값을 가졌다.

표 28. Weight, chamber free volume, and Eq.(6), Eq.(7) coefficient values for sweet potatoes (Benny Haruka) at 15°C, 20°C, 25°C

Temperature (°C)	Volume (L)	Weight (kg)	Coefficient values					
			A ₁	A ₂	r ² _A	B ₁	B ₂	r ² _B
15	34.11	5.01	0.0012	-0.3102	0.9991	-0.0013	0.3082	0.9982
20		5.12	0.0018	-0.3683	0.9984	-0.0023	0.3908	0.9976
25		5.05	0.0035	-0.5281	0.9982	-0.0028	0.4425	0.999

표 29. Estimates of respiration model parameters for Eq.(8) for sweet potatoes (Benny Haruka) at 15, 20 and 25°C

Temperature(°C)	Vm(mL/hr·kg)	Km(%O ₂)	Ki(%CO ₂)	r ²
Parameters for O ₂ consumption curve				
15	0.05210	0.1802	26.2530	1
20	0.07084	0.6454	22.4170	1
25	0.1154	0.9467	19.3077	1
Parameters for CO ₂ evolution curve				
15	0.1654	0.2741	24.5754	1
20	0.2165	0.4528	21.1985	1
25	0.4627	0.7128	18.3792	1

② 호감미 고구마

㉑ 산소 소비 변화

호감미 품종을 폐쇄계 방법을 이용하여 15℃, 20℃, 25℃에서 시간에 따른 밀폐용기 내 산소 농도를 측정 한 결과는 그림 82 ~ 84와 같다. 3-①-㉑과 같이 온도가 높아질수록 산소 농도가 빠르게 감소하는 것을 확인할 수 있다.

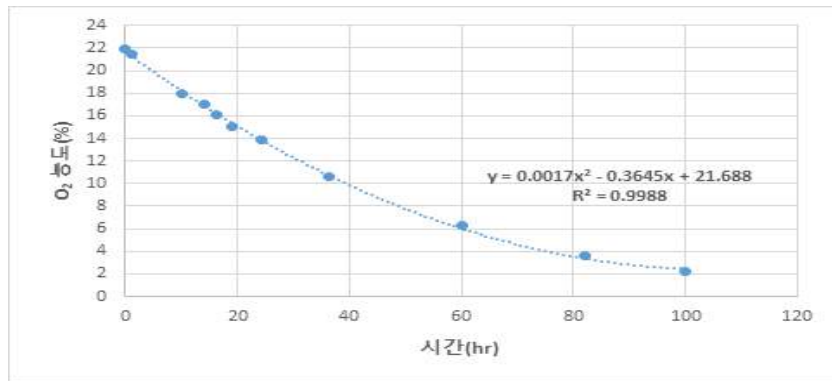


그림 82. Change of oxygen concentration at 15°C (Hogammi)

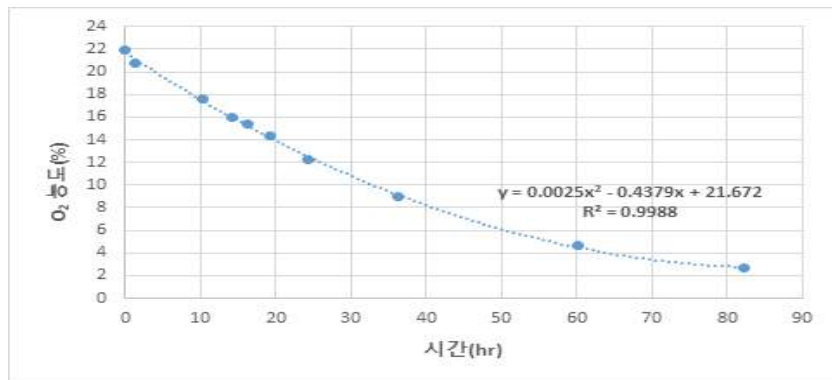


그림 83. Change of oxygen concentration at 20°C (Hogammi)

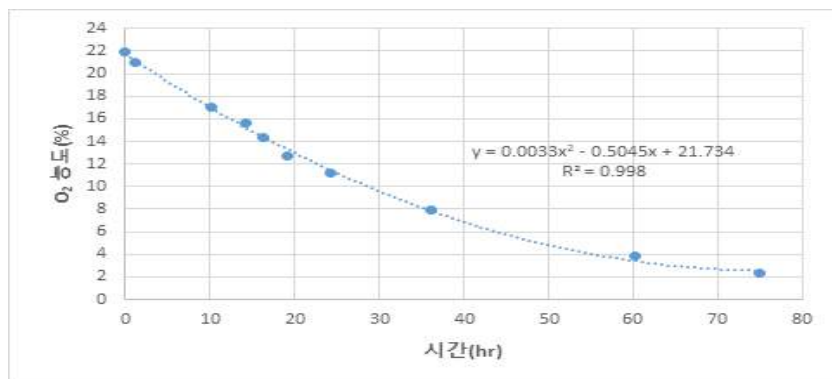


그림 84. Change of oxygen concentration at 25°C (Hogammi)

㉞ 이산화탄소 배출 변화

호감미 품종을 폐쇄계 방법을 이용하여 15°C, 20°C, 25°C 에서 시간에 따른 밀폐 용기 내 이산화탄소 농도를 측정 한 결과는 그림 85 ~ 87와 같다. 3-①-㉞와 같이 온도가 높아질수록 이산화탄소 농도가 빠르게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

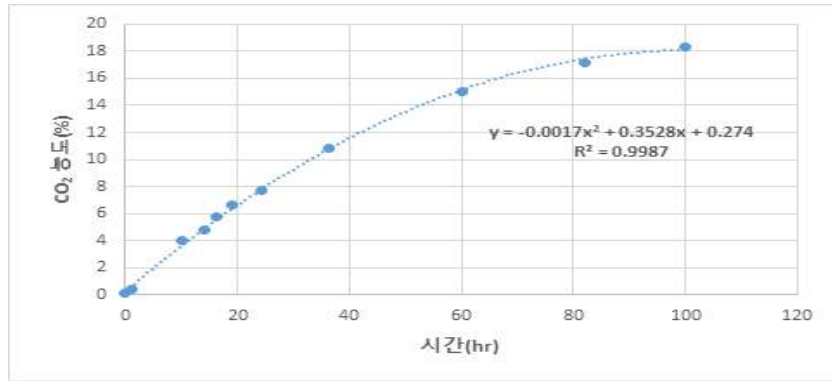


그림 85. Change of carbon dioxide concentration at 15°C (Hogammi)

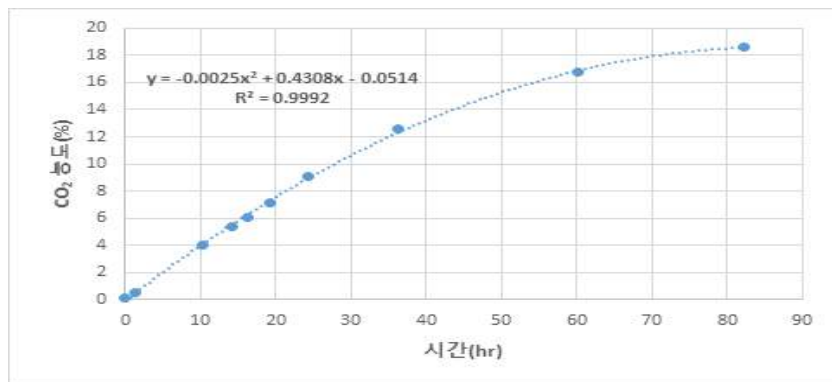


그림 86. Change of carbon dioxide concentration at 20°C (Hogammi)

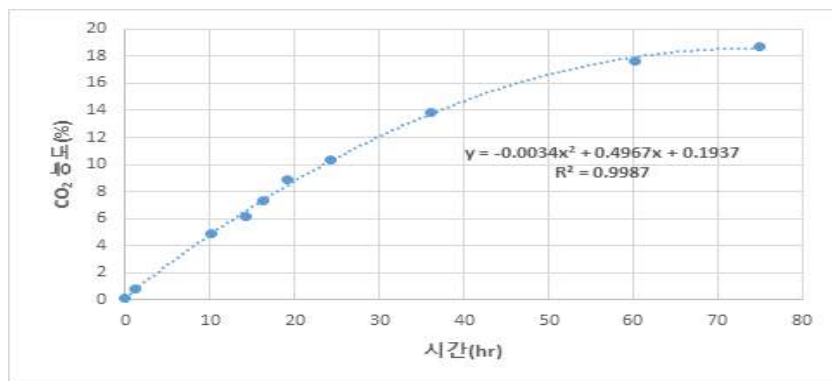


그림 87. Change of carbon dioxide concentration at 25°C (Hogammi)

㉔ 산소 소비, 이산화탄소 배출 모델링

①-㉔에서 측정한 베니하루카 품종의 산소 소비, 이산화탄소 배출 모델링과 같은 방법으로 호감미 품종의 산소 소비, 이산화탄소 배출 모델링을 진행하였다.

결정된 세 가지 parameters (V_m , K_m , K_i)는 표 31에 나타나 있다. V_m , K_m 은 ①-㉔에서 측정한 베니하루카 품종과 마찬가지로 온도가 올라갈수록 증가하는 경향이었고, K_i 는 감소하는 경향이였다. V_m , K_m 은 이산화탄소 소비 속도에서 더 높은 값을 가졌으며, K_i 는 15, 20°C에서는 이산화탄소 배출 속도가 더 높은 값을 가졌고 25°C에서는 산소 소비 속도가 더 높은 값을 가졌다.

표 30. Weight, chamber free volume, and Eq.(6), Eq.(7) coefficient values for sweet potatoes (Hogammi) at 15, 20 and 25°C

Temperature (°C)	Volume (L)	Weight (kg)	Coefficient values					
			A_1	A_2	r^2_A	B_1	B_2	r^2_B
15	34.11	5.08	0.0017	-0.3645	0.9989	-0.0017	0.3528	0.9987
20		5.14	0.0025	-0.4379	0.9988	-0.0025	0.4308	0.9992
25		5.10	0.0033	-0.5045	0.998	-0.0034	0.4967	0.9987

표 31. Estimates of respiration model parameters for Eq.(8) for sweet potatoes (Hogammi) at 15, 20 and 25°C

Temperature (°C)	V_m (mL/hr·kg)	K_m (%O ₂)	K_i (%CO ₂)	r^2
Parameters for O ₂ consumption curve				
15	0.02131	0.3129	20.7077	1
20	0.09620	0.4762	18.9988	1
25	0.1939	0.5948	17.8215	1
Parameters for CO ₂ evolution curve				
15	0.1013	0.4821	22.7480	1
20	0.2439	0.5418	19.0189	1
25	0.4945	0.6495	16.2145	1

③ 호박 고구마

㉗ 산소 소비 변화

호박 품종을 폐쇄계 방법을 이용하여 15°C, 20°C, 25°C에서 시간에 따른 밀폐용기 내 산소 농도를 측정된 결과는 그림 88 ~ 90와 같다. 3-①-㉗과 같이 온도가 높아질수록 산소 농도가 빠르게 감소하는 것을 확인할 수 있다.

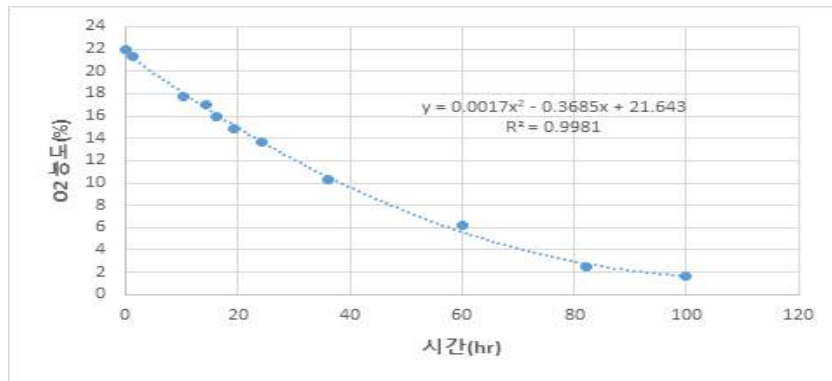


그림 88. Change of oxygen concentration at 15°C (Hobak)

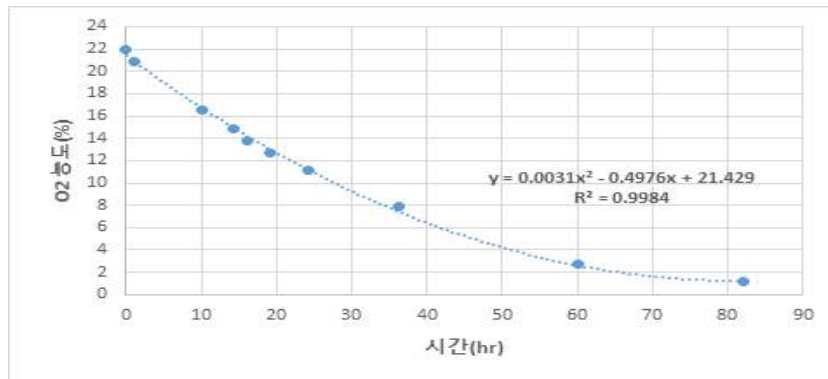


그림 89. Change of oxygen concentration at 20°C (Hobak)

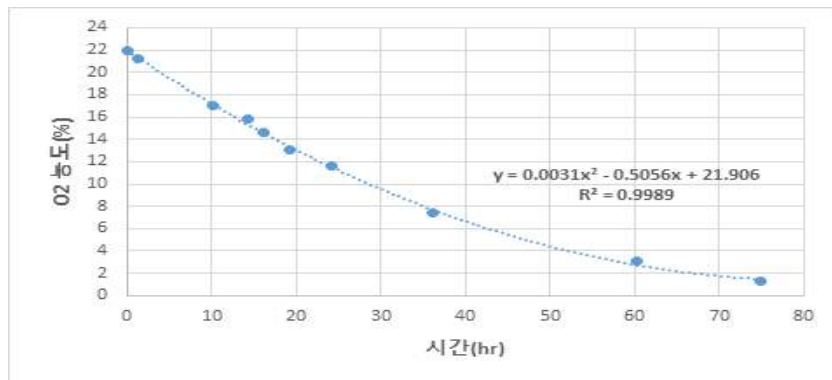


그림 90. Change of oxygen concentration at 25°C (Hobak)

㉞ 이산화탄소 배출 변화

호박 품종을 폐쇄계 방법을 이용하여 15℃, 20℃, 25℃에서 시간에 따른 밀폐용기 내 이산화탄소 농도를 측정된 결과는 그림 2 - 91 ~ 93와 같다. ㉠-㉞와 같이 온도가 높아질수록 이산화탄소 농도가 빠르게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

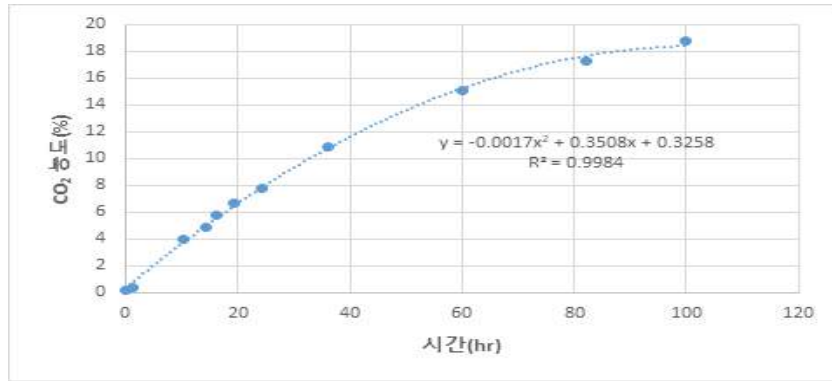


그림 91. Change of carbon dioxide concentration at 15℃ (Hobak)

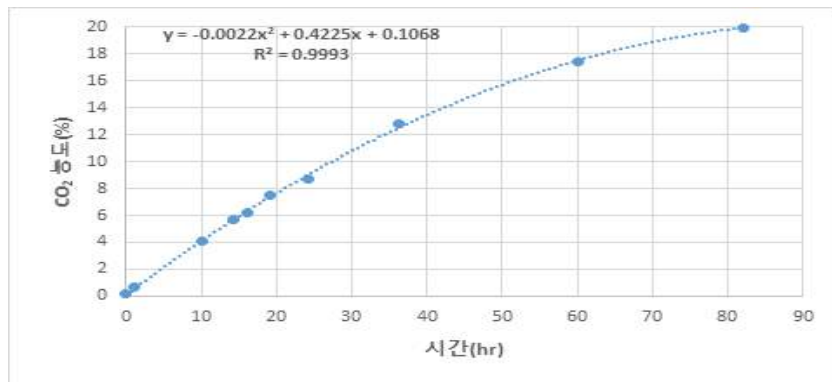


그림 92. Change of carbon dioxide concentration at 20℃ (Hobak)

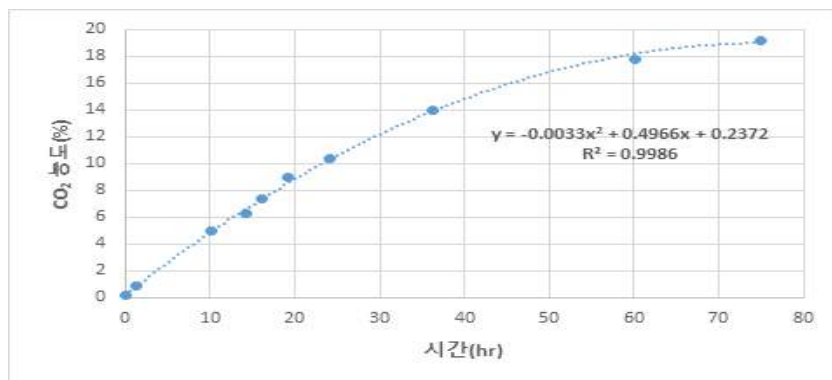


그림 93. Change of carbon dioxide concentration at 25℃ (Hobak)

㉔ 산소 소비, 이산화탄소 배출 모델링

①-㉔에서 측정된 베니하루카 품종의 산소 소비, 이산화탄소 배출 모델링과 같은 방법으로 호박 품종의 산소 소비, 이산화탄소 배출 모델링을 진행하였다.

결정된 세 가지 parameters (V_m , K_m , K_i)는 표 33에 나타나 있다. V_m , K_m 은 ①-㉔에서 측정된 베니하루카 품종과 마찬가지로 온도가 올라갈수록 증가하는 경향이었고, K_i 는 감소하는 경향이였다. V_m 은 이산화탄소 소비 속도에서 더 높은 값을 가지며, K_m 은 15°C에서는 이산화탄소 배출 속도에서 더 낮은 값을 가졌으며, 15, 20°C에서는 더 높은 값을 가졌다. K_i 는 이산화탄소 배출 속도가 더 높은 값을 가졌다.

표 32. Weight, chamber free volume, and Eq.(6), Eq.(7) coefficient values for sweet potatoes (Hobak) at 15, 20 and 25°C

Temperature (°C)	Volume (L)	Weight (kg)	Coefficient values					
			A_1	A_2	r_A^2	B_1	B_2	r_B^2
15	34.11	5.11	0.0017	-0.3685	0.9981	-0.0017	0.3508	0.9984
20		5.04	0.0031	-0.4976	0.9984	-0.0022	0.4225	0.9993
25		5.02	0.0031	-0.5056	0.9989	-0.0033	0.4966	0.9986

표 33. Estimates of respiration model parameters for Eq.(8) for sweet potatoes (Hobak) at 15, 20 and 25°C

Temperature(°C)	V_m (mL/hr·kg)	K_m (%O ₂)	K_i (%CO ₂)	r^2
Parameters for O ₂ consumption curve				
15	0.3331	0.3399	20.0504	1
20	0.7638	0.4965	18.8815	1
25	0.9745	0.5284	17.1625	1
Parameters for CO ₂ evolution curve				
15	0.2451	0.3229	21.1426	1
20	0.4513	0.5012	20.975	1
25	0.7741	0.5418	18.4249	1

나. 포장 내 최적의 산소, 이산화탄소 농도

(1) 요약

유통기한의 연장을 위해서는 포장 내부 기체의 조절이 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 고구마의 MA포장을 위한 최적의 산소 및 이산화탄소 기체 조성을 탐색하였다. 산소와 이산화탄소의 조성을 유지하여 고구마가 최적의 품질을 오랫동안 유지할 수 있는 조건을 결정하였다. 산소와 이산화탄소 조성을 유지 및 조절하기 위해, 산소/이산화탄소 센서와 자동 제어 장치를 이용하여 자동 기체 제어 장치를 구성하였다. 고구마 저장실험은 7일간 진행되었으며, 고구마의 품질을 확인하기 위해 중량감소율, 건조중량감소율, AIS 함량을 측정하였다. 실험 결과, 3% 산소, 5% 이산화탄소 농도에서 고구마의 품질변화가 가장 적게 일어났다. 또한 고구마의 MA 포장 시, 습도에 의한 변화를 고려해야 할 것으로 보이기 때문에 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

(2) 재료 및 방법

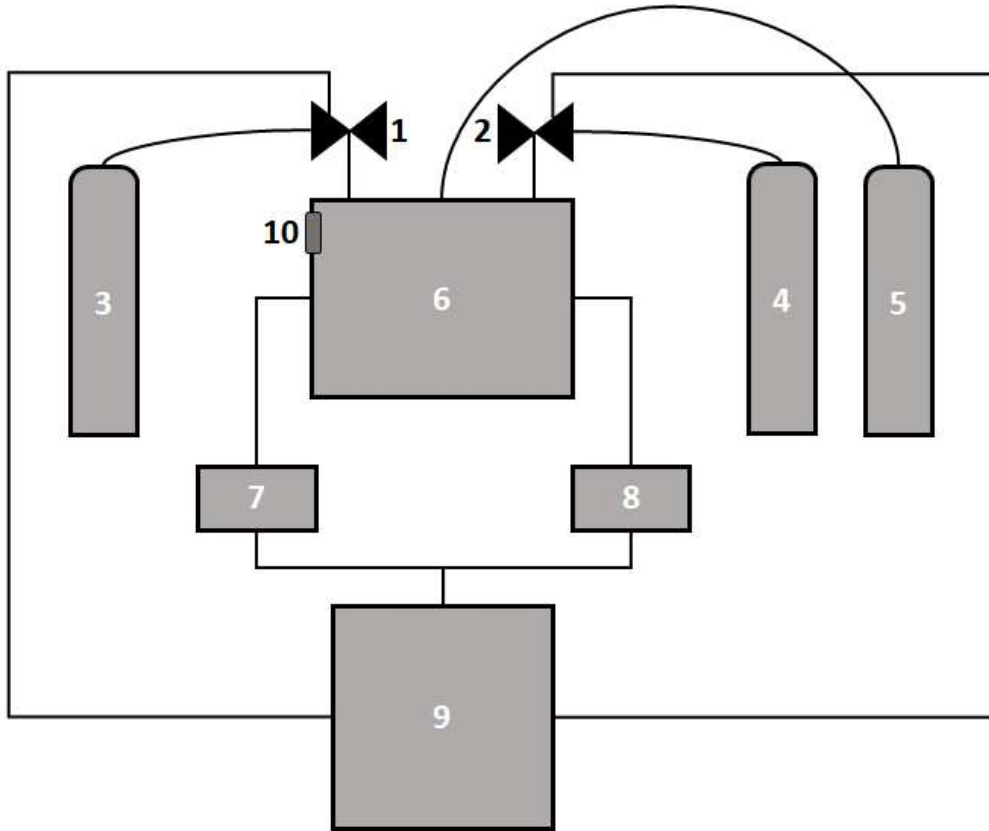
(가) 실험재료

고구마(베니하루카), automatic gas control system (gas sensor, controller, solenoid valve, gas tank, storage chamber), 염화나트륨, 산소 봄베(99.99%), 이산화탄소 봄베(99.99%), 질소 봄베(99.99%)

(나) Automatic gas control system

자동 기체 제어장치는 솔레노이드 밸브, 산소, 이산화탄소, 질소 봄베, 산소 센서, 이산화탄소 센서, 컨트롤 박스(NX9-00, Han Young Nux, Korea)로 이루어져 있다.

고구마 저장 상자 내부의 기체 조성은 고구마의 호흡에 의해 일정하게 유지되지 않는다. 따라서 자동 기체 제어장치를 이용하여 저장 상자 내부의 기체 조성을 원하는 농도로 유지시킬 수 있다. 이 장치가 작동하는 원리는 다음과 같다. 먼저, 컨트롤 박스에 원하는 산소 농도와 이산화탄소 농도를 입력한다. 만약, 산소/이산화탄소 센서가 설정한 값 이하 또는 이상으로 신호를 보내게 되면, 컨트롤 박스가 솔레노이드 밸브를 작동시켜 산소 또는 이산화탄소를 유입시킨다(그림 94). 센서가 설정된 값의 신호를 보내면 컨트롤 박스는 솔레노이드 밸브 작동을 중지하여 다시 기체를 차단한다. 이러한 과정의 flow chart를 그림 95에 나타내었다.



1,2: Air solenoid valve 6: Storage chamber
 3,4,5: O₂(3), CO₂(4), N₂(5) gas tank 7,8: O₂, CO₂ gas sensor
 9: Control box (NX9-00, HAN YOUNG NUX, KOREA) 10: Vent

그림 94. automatic gas control system

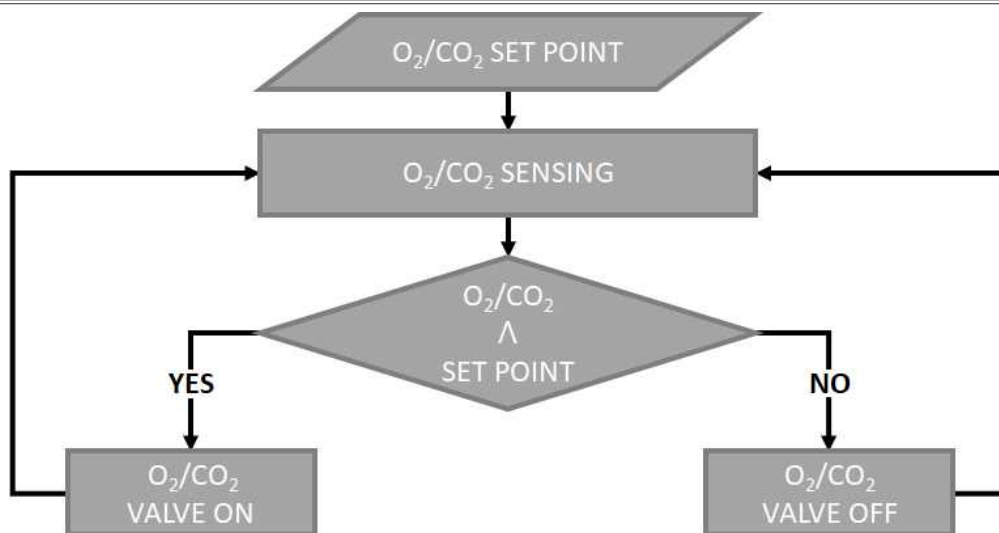


그림 95. Flow chart of automatic gas control system

(다) 저장 실험

적당한 크기의 고구마 5개(약1kg)를 선별하여 저장 상자에 7일간 저장한다. 저장 온도는 일반적인 고구마의 유통온도인 20℃에서 실험을 진행하였다. 산소/이산화탄소의 비율은 각각 21/0 (control), 10/10, 5/10, 3/10, 3/5 조건 하에 저장하여 최적의 산소/이산화탄소 비율을 결정하였다. 가스 조절은 자동 기체 제어장치를 이용하여 조절하였다. 습도의 경우 포화 염 용액을 이용하여 조절하였다. 실험에 사용한 포화 염 용액은 염화나트륨 포화 염 용액을 이용하였다. 염화나트륨 포화 염 용액으로 조절 가능한 상대습도는 75%로 표 34에 나와있는 포화 염 용액 중 고구마의 저장 습도와 가장 비슷한 상대습도를 가지고 있는 것을 확인 할 수 있다(Arnold Wexler et al. 1954).

표 34. Relative humidity of saturated salt solution

Temperature	Relative humidity of saturated salt solution							
	LiCl•H ₂ O	MgCl ₂ •6H ₂ O	Na ₂ Cr ₂ O ₇ •2H ₂ O	Mg(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	NaCl	(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	K ₂ SO ₄
℃	%	%	%	%	%	%	%	%
0	14.7	35.0	60.6	60.6	74.9	83.7	97.6	99.1
5	14.0	34.6	59.3	59.2	75.1	82.6	96.6	98.4
10	13.3	34.2	57.9	57.8	75.2	81.7	95.5	97.9
15	12.8	33.9	56.6	56.3	75.3	81.1	94.4	97.5
20	12.4	33.6	55.2	54.9	75.5	80.6	93.2	97.2
25	12.0	33.2	53.8	53.4	75.8	80.3	92.0	96.9
30	11.8	32.8	52.5	52.0	75.6	80.0	90.7	96.6
35	11.7	32.5	51.2	50.6	75.5	79.8	89.3	96.4
40	11.6	32.1	49.8	49.2	75.4	79.6	87.9	96.2
45	11.5	31.8	48.5	47.7	75.1	79.3	86.5	96.0
50	11.4	31.4	47.1	46.3	74.7	79.1	85.0	95.8

(라) 중량감소율 측정

중량감소율은 0시간, 24시간, 72시간, 120시간, 168시간 간격으로 5개의 산소/이산화탄소 조건에서 고구마 무게를 각각 측정하였다.

(마) 표피 색 측정

색차계(NE 4000, MINOLTA, JAPAN)를 이용하여 표피의 색을 측정하였다.

(바) 건조 중량 감소율 측정

건조 중량은 5개의 고구마를 강판에 갈아서 무작위로 10g을 취한 다음, 70℃에서 48시간 건조하여 중량을 측정하였다.(DAVID H. PICHA. 1985)

(사) AIS(alcohol insoluble solids) 함량 측정

AIS 함량은 과염소산 추출법을 이용하여 측정하였다.(Elif Erurk. 2002)

(아) 통계처리

총 실험은 3반복으로 진행하였고, 실험의 평균값은 SPSS(Statistical Package for the Social Science, Ver. 23) 통계프로그램을 사용하여 유의차 ($\alpha=0.05$) 수준에서 일원배치 분산분석(ANOVA)를 통하여 분석하였다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 중량감소율

고구마를 각각 A(O₂:CO₂=21:0), B(10:5), C(10:10), D(5:5), E(3:5) 조건에서 저장했을 때 중량감소율을 관찰한 결과, 저장 20시간까지는 비슷한 중량감소를 나타내었다. 최종적으로 E(3:5)조건에서 중량감소가 가장 적게 일어났다. E와 B를 비교해보면 산소 농도가 고구마의 중량감소에 상대적으로 많은 영향을 끼치는 것을 확인할 수 있다. 또한 산소의 농도가 가장 높은 A 조성에서 가장 많은 중량감소가 발생했다. 이는 일반적으로 산소의 농도가 높으면 호흡작용이 활발하게 일어나기 때문으로 사료된다.

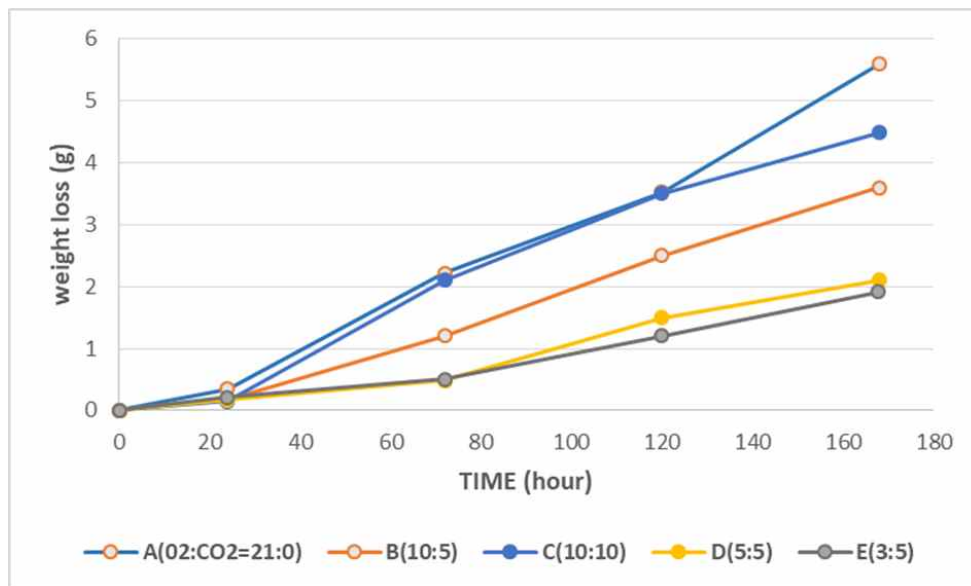


그림 96. Weight loss of sweet potatoes taken after 0, 24, 72, 120, 168 hr

(나) 표피 색 측정

색 측정은 색차계를 이용하여 고구마의 표피를 측정하였으며, L, a, b 값으로 나타났다. 실험결과, 각각의 기체 조건에서의 고구마 표피의 L, a, b - value는 일정

한 양상을 띠며 차이가 나타나지 않았다. 이는 고구마의 외형적 특성에 비롯된 것으로 사료된다. 고구마의 경우, 모양과 크기가 일정하지 않고 표면이 매끄럽지 못하다. 이는 색차계로 측정 시, 오차가 많이 발생할 수 있는 요인으로 작용한다. 따라서 기체 조성에 따른 고구마의 표면 색 측정 방법에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

(다) 건조중량감소율/AIS 함량

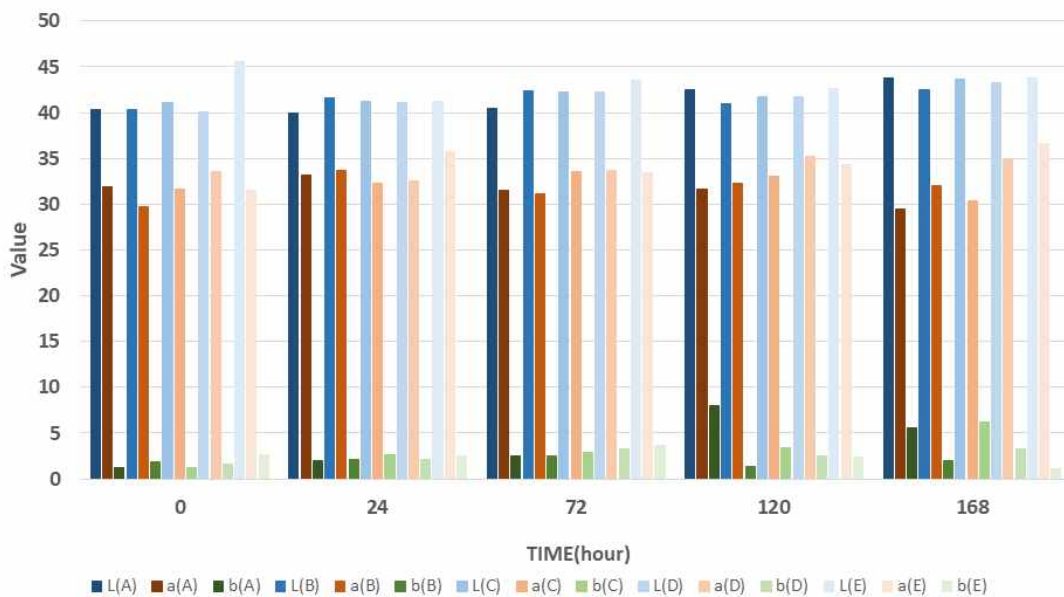


그림 97. a, b value of sweet potatoes taken after 0, 24, 72, 120, 168 hours (O₂ : CO₂ - A=21:0, B=10:5, C=10:10, D=5:5, E=3:5)

고구마를 각 기체 조성에 저장한 후의 건조중량감소율, alcohol insoluble solids (AIS) 함량은 표 25에 나타나있다. alcohol insoluble solids (AIS)의 함량은 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 나타내고 있다. 이는 고구마 내의 당 함량이 증가함에 따라 동반되는 결과로 사료된다(Elif Erurk. 2002). 또한 고구마의 호흡이 상대적으로 빠르게 진행되는 A(21:0) 기체 조성에서 가장 많은 AIS 함량의 감소가 나타났다. 고구마의 호흡이 진행되는 동안, 고구마 내의 전분이 환원당과 dextrin으로 분해된다(Elif Erturk et al. 2007). 따라서 호흡이 상대적으로 빠르게 진행되는 A 기체 조성에서 가장 많은 AIS 함량 감소가 나타난 것으로 사료된다. 반면, 호흡이 상대적으로 느리게 진행되는 E(3:5) 기체조성에서는 AIS 함량 감소가 가장 적게 나타났다. 각 기체 조성에서 나타난 건조중량감소 또한 감소하는 경향을 보였다. 건조중량감소의 경우에도 AIS 함량과 마찬가지로 호흡에 의한 전분의 분해와 관계가 있다(Don R. La Bonte et al. 2000). 하지만, 본 실험에서는 각 기체 조성 간에 유의적인 차이가 나타나지 않는다.

각 기체 조성(A, B, C, D, E)에서 고구마 품질 지표 팩터를 측정된 결과, E(3:5)

기체조성이 고구마 포장에서 가장 적합한 기체조성으로 사료된다. 여기서, 고구마의 호흡특성이 가장 많은 영향을 끼치는 것으로 사료된다. 고구마의 경우, 기체조성뿐만 아니라 습도에 의해서도 호흡 특성이 영향을 받는다. 따라서 추후 습도가 고구마의 품질에 끼치는 영향에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

표 35. Weight loss, dry matter and alcohol insoluble solids (AIS) content of sweet potatoes stored at 20°C for 7days.

Gas composition	Storage time (hr)	Weight Loss (%)	Dry matter (%)	AIS (%)
A*	0	0	22.13	17.27
	24	0.17	21.86	15.51
	72	1.12	22.03	15.12
	120	1.78	21.57	15.35
	168	2.89	21.76	14.65
B	0	0	22.13	17.27
	24	0.10	21.98	15.71
	72	0.64	22.10	15.32
	120	1.34	21.72	14.94
	168	1.97	21.63	14.72
C	0	0	22.13	17.27
	24	0.07	20.97	16.01
	72	1.03	21.20	15.54
	120	1.73	20.63	14.67
	168	2.24	20.15	14.88
D	0	0	22.13	17.27
	24	0.08	21.37	16.05
	72	0.24	21.31	15.84
	120	0.74	21.94	15.68
	168	1.05	20.19	15.59
E	0	0	22.13	17.27
	24	0.10	22.09	16.12
	72	0.24	21.93	16.01
	120	0.58	21.10	15.88
	168	0.93	21.55	15.79

*A: 21:0(O₂:CO₂), B=10:5, C=10:10, D=5:5, E=3:5

다. 고구마의 MAP(modified atmosphere packaging)

(1) 요약

고구마 MA 포장 설계를 계획하고 실행하였다. 이를 위해 천공개수에 따른 산소 및 이산화탄소의 투과도를 측정하였다. 시간이 지남에 따라 산소와 이산화탄소는 필름을 통해 투과하게 되고 그 결과 내부 가스조성이 변화하게 된다. 이를 토대로 투과도를 계산하였고, 천공별로 동일하게 처리하여 천공 개수에 따른 필름의 가스

투과도를 모델링 하였다. 최적 기체는 3% 산소, 5% 이산화탄소이며 이 농도가 되었을 때의 투과도를 구하고, 이를 천공개수에 따른 투과도 모델에 대입하면 필요한 천공 개수를 알 수 있다. 도출된 MA 포장 조건을 실제 고구마에 적용시켜 해당 MA 조건에서 최적 기체 조성을 유지하는지 확인한다. 실험은 (주) 나나농장에서 출하한 고구마로 베니하루카, 호감미, 호박의 세 가지 품종에 대한 MA 포장 조건 적용 실험을 진행하였다. 투과도를 대입하여 천공 개수를 구한 결과, 고구마 포장 내 최적 기체 조성을 유지할 수 있는 MA 포장 조건은 천공이 1.4개 일때이다. 이를 실제 고구마 포장에 적용하여 입증한 결과, 베니하루카는 산소 4.5 %, 이산화탄소 15.4 %, 호박은 산소 4 %, 이산화탄소 16 %, 호감미는 산소 3.7 %, 이산화탄소 16.5 %의 조성을 보였다. 이는 앞서 규명한 MA 포장 시 최적의 기체 조성의 범위에 들어가므로 본 연구에서 설립한 모델링이 실제 MA 포장에 적용 가능성이 입증되었다.

20℃의 등온 조건을 설정하여 고구마를 MAP 포장한 실험군과 control인 대조군을 통해 고구마의 품질을 측정함으로써 증명해 보았다. 20℃로 설정한 이유는 소비자들에게 판매가 되어질 때의 슈퍼마켓 등의 평균적인 온도로서 설정하였다. 고구마의 경우, 증산작용이 활발한 작물이다. 이러한 수분 응축으로 인해 고구마의 품질이 MA 포장을 하더라도 저하되므로, 수분 응축을 제어하기 위하여 수분 흡수제를 고구마에 넣음으로써 수분을 배제하는 방법을 선택하였다. 고구마의 품질 측정 방법으로는 경도, 중량감소율, 곰팡이 생성율을 측정하였다. 실험 결과, 실험군과 대조군의 차이는 존재하였으며, MAP한 고구마가 훨씬 더 품질 변화 속도가 늦은 것이 관찰되었다. MAP한 고구마와 control 된 고구마의 경도는 저장 시간에 따라 감소하였으며 중량 감소율과 곰팡이 생성율은 시간에 따라 증가하였다. 이를 통해 실험적으로 설계된 MAP가 실제 고구마 포장에 적용되었을 때 포장 내 환경을 최적으로 유지해주면서 동시에 품질 변화를 늦춰서 shelf life 연장에 효과가 있다는 것이 입증 되었다. 하지만, 수분 흡수제를 첨가하는 등 경제적인 비용이 증가하므로 수분 응축을 해결할 수 있는 방법이 고안되어야 할 것이다.

(2) 재료 및 방법

(가) 고구마

실험에 사용한 고구마는 (주)나나농장에서 저장한 후, 출하하기 직전의 고구마를 사용하였다. 고구마는 13℃, 70%RH에서 저장되었다가 출하되기 3일전에 큐어링 과정을 거쳐 출하된다. 큐어링은 34℃, 70%RH에서 3일간 진행되었다. 고구마의 품종은 국내에서 가장 많이 유통되고 있는 베니하루카, 호박, 호감 고구마를 사용 하였다. MA 포장 조건 적용 시 한 번에 약 1 kg의 고구마가 포장되었으며 개당 150±20 g인 것으로 선별하였다.

(나) Gas permeability analysis

천공 개수별 산소 및 이산화탄소의 투과도를 측정하기 위해 포장 필름에 n=0부터 n=8까지 천공을 제작하였다. 포장 필름은 polypropylene film으로 두께 60 μm,

표면적 0.0368 m²인 것으로 사용하였으며 포장 용기는 부피 1.92 L인 것을 사용하였다. 0개부터 8개의 천공이 뚫린 PP 필름으로 포장된 포장 용기에 10% O₂, 10% CO₂, N₂ 80%의 조성을 가지는 기체로 가스 치환을 하였다. 가스 치환된 포장 용기의 시간별 산소 및 이산화탄소의 조성 변화를 측정하였다.

(다) 가스 투과도 모델링

Gas permeability analysis에서 측정한 천공 개수별 시간에 따른 산소 및 이산화탄소의 농도를 그래프로 나타내서 변화 추이를 관찰하였다. 기체의 농도는 분압으로 나타내어 식 10에 대입하여 필름의 가스 투과도(TR)를 계산하였다.

$$TR = \frac{V}{S \cdot R \cdot T (t_f - t_i)} \ln \left(\frac{0.21pa - P_i}{0.21pa - P_f} \right) \text{ -----(10)}$$

식 10에 기체 농도를 대입하면 천공 개수에 따른 투과도를 모델링 할 수 있다. 즉, 천공이 n일 때의 기체 투과도를 모델링한 식에 대입하면 도출해낼 수 있다.

(라) 최적 기체 조성을 유지하는 필름의 투과도

고구마를 MA 포장하기 위해 포장 용기 내 최적 기체 조성을 유지할 수 있는 포장 조건을 설계해야 한다. 고구마의 호흡률과 필름의 투과도를 모두 포함하는 MAP 내 공기조성변화 모델링 식은 식 11와 같다. 여기서 P/L을 기체의 투과도로 하며 R은 고구마의 호흡률이다.

$$\frac{dn_{O_2}}{dt} = \frac{P \cdot S \cdot (0.21pa - p_{O_2})}{L} - W \cdot R \text{ -----(11)}$$

여기서 MA 포장은 기체 조성의 평형 상태(dn/dt=0)에서 농산식품의 적정 O₂를 얻을 수 있는 조건으로 한다. 기체 조성이 평형상태일 때 식 11는 식 12과 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{P}{L} = \frac{W \cdot R}{S \cdot (0.21pa - p_{O_2})} \text{ -----(12)}$$

R은 고구마의 호흡률로 식 13로 계산할 수 있으며 pO₂는 산소의 분압이다. 이때 산소의 농도 조건은 최적 기체 농도(O₂ : 1-5%)로 한다. 해당 값들을 대입하면 고구마 포장 내 최적 기체 조성을 유지하는 투과도(P/L)를 계산할 수 있다. 여기서 구한 투과도는 최적 기체 조성을 유지할 때의 기체 투과도(T')이다.

$$R = \frac{Vm \cdot p_{O_2}}{Km + (1 + \frac{p_{CO_2}}{Ki}) \cdot p_{O_2}} \text{ -----(13)}$$

계산된 투과도(T')는 천공이 n일 때의 필름의 투과도 T를 모델링한 식에 대입할 수 있다. 투과도를 대입하면 그때의 천공 개수가 계산된다. 즉, 최적 기체 조성을

유지할 때 필요한 천공 개수를 알 수 있다. 이와 같은 방법으로 포장 용기 내 기체의 조성을 최적으로 유지할 수 있는 MA 조건을 구할 수 있다.

(마) 고구마 MA 포장 적용 입증

투과도 모델링 식에 대입하여 계산된 천공 개수로 실제 고구마를 포장했을 때 최적 기체 조성을 유지하는지 입증 실험을 하였다. 입증 실험은 필름의 투과도를 구할 때와 동일한 포장 용기 및 필름에 약 1 kg의 고구마를 담고 시간별 산소 및 이산화탄소의 조성 변화를 측정하였다. 실험은 베니하루카, 호박, 호감미 모두에 이루어졌다.

(바) 고구마 MAP 품질 측정 (경도, 중량감소율, 곰팡이 생성율)

① 경도(g/cm²)

고구마의 경도(g/cm²)는 texture analyzer를 이용하여 2mm probe로 고구마의 표면으로부터 5mm 지점까지 압축하였을 때, 전체 면적에 대한 최대 힘으로 나타내었다.

② 중량 감소율(%)

초기 중량에 대한 무게를 측정 한 후, 그 다음 실험 날짜에 해당하는 고구마의 무게를 측정하였다. 그 이후 처음 고구마의 무게에 대한 실험 날짜에 해당하는 고구마의 무게 비율을 구함으로써 나타내었다.

③ 곰팡이 생성율(%)

곰팡이가 가시적으로 관찰된 개수를 전체에 대한 비율로 나타내었다.

(사) MAP 수분 흡수제

고구마 내의 습도 조절은 포화 염 용액을 이용하였다. 실험에 사용한 포화 염 용액은 포화 염 용액을 이용하였다. 황산암모늄 포화 염 용액으로 조절 가능한 상대 습도는 80%로 표 36에 나와있는 포화 염 용액 중 고구마의 저장 습도와 가장 비슷한 상대습도를 가지고 있는 것을 확인 할 수 있다(Arnold Wexler et al. 1954).

표 36. Relative humidity of saturated salt solution

Temperature	Relative humidity of saturated salt solution							
	LiCl•H ₂ O	MgCl ₂ •6H ₂ O	Na ₂ Cr ₂ O ₇ •2H ₂ O	Mg(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	NaCl	(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	K ₂ SO ₄
°C	%	%	%	%	%	%	%	%
0	14.7	35.0	60.6	60.6	74.9	83.7	97.6	99.1
5	14.0	34.6	59.3	59.2	75.1	82.6	96.6	98.4
10	13.3	34.2	57.9	57.8	75.2	81.7	95.5	97.9
15	12.8	33.9	56.6	56.3	75.3	81.1	94.4	97.5
20	12.4	33.6	55.2	54.9	75.5	80.6	93.2	97.2
25	12.0	33.2	53.8	53.4	75.8	80.3	92.0	96.9
30	11.8	32.8	52.5	52.0	75.6	80.0	90.7	96.6
35	11.7	32.5	51.2	50.6	75.5	79.8	89.3	96.4
40	11.6	32.1	49.8	49.2	75.4	79.6	87.9	96.2
45	11.5	31.8	48.5	47.7	75.1	79.3	86.5	96.0
50	11.4	31.4	47.1	46.3	74.7	79.1	85.0	95.8

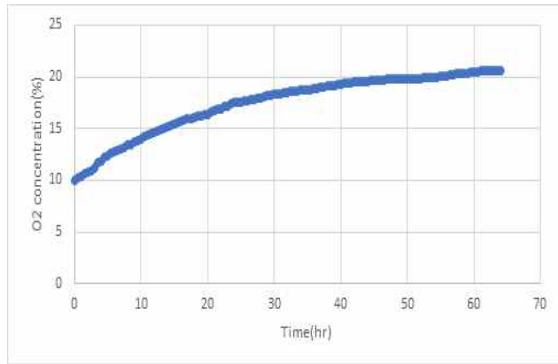
(아) 통계 처리

Non-linear regression에는 non-linear least square (Gauss-Newton algorithm) 방법이 사용되었으며 (Solving nonlinear least squares problem using gauss-newton method.) 선형과 비선형 회귀분석은 SAS (SAS, INC., IL, USA)를 사용하여 수행되었다.

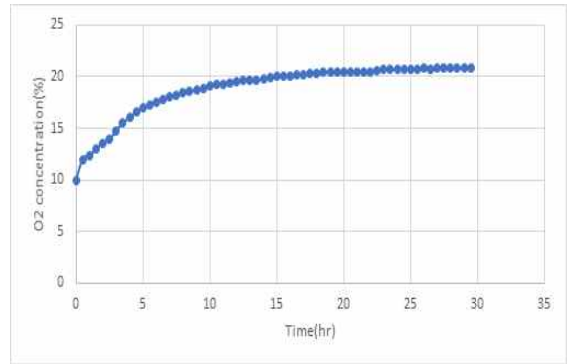
(3) 결과 및 고찰

(가) 천공 개수에 따른 포장 용기 내 산소 농도 변화

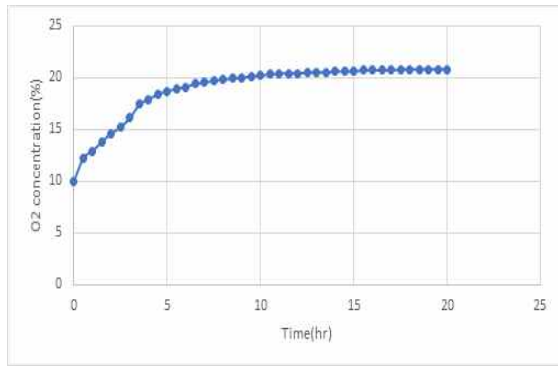
천공 개수를 다르게 한 PP film으로 포장한 포장 용기를 상온(20±5 °C)에서 시간에 따른 포장 용기 내 산소 농도를 측정하였다. 결과는 그림 98과 같으며 시간이 지남에 따라 산소의 양이 증가하다가 대기 농도와 동일해진다.



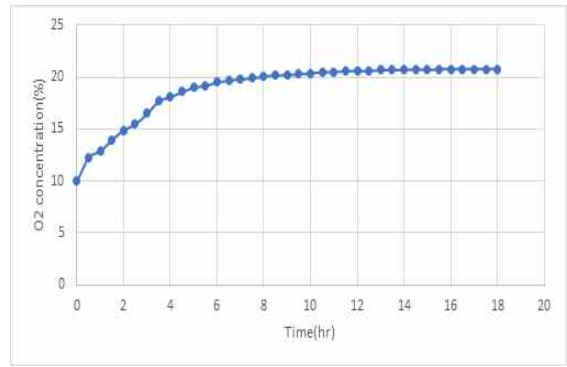
A



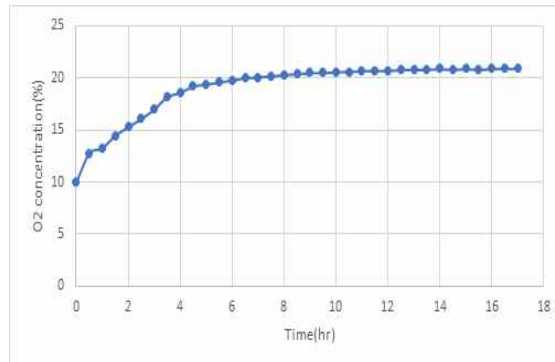
B



C



D

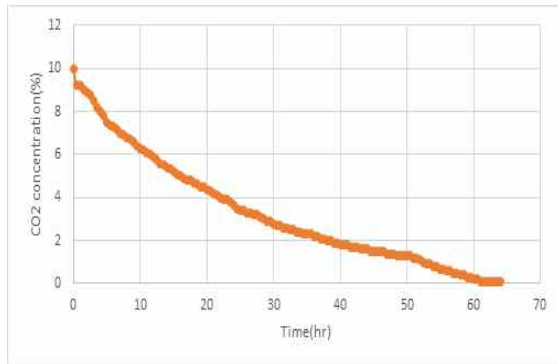


E

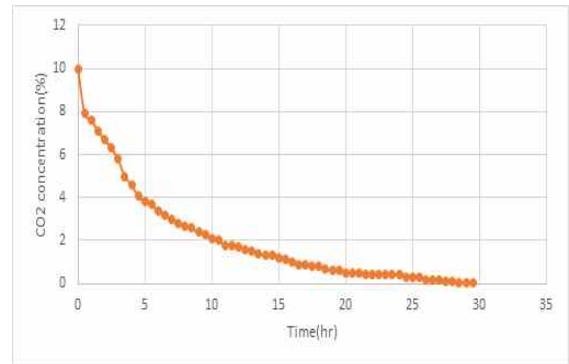
그림 98. Change of oxygen concentration in the packaging. (A) : n=0, (B) : n=2, (C) : n=4, (D) : n=6, (E) : n=8

(나) 천공 개수에 따른 포장 용기 내 이산화탄소 농도 변화

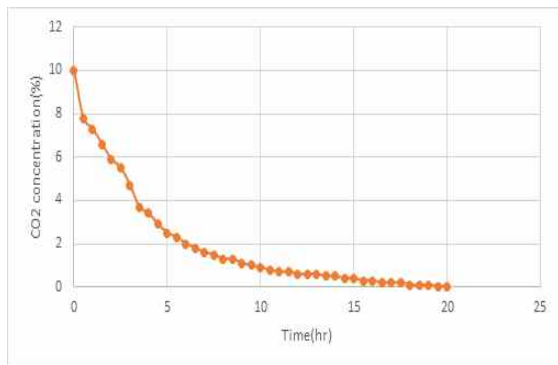
천공 개수를 다르게 한 PP film으로 포장한 포장 용기를 상온($20 \pm 5^\circ\text{C}$)에서 시간에 따른 포장 용기 내 이산화탄소 농도를 측정하였다. 결과는 그림 99와 같으며 시간이 지남에 따라 이산화탄소의 양이 감소하다가 대기 농도와 동일해진다.



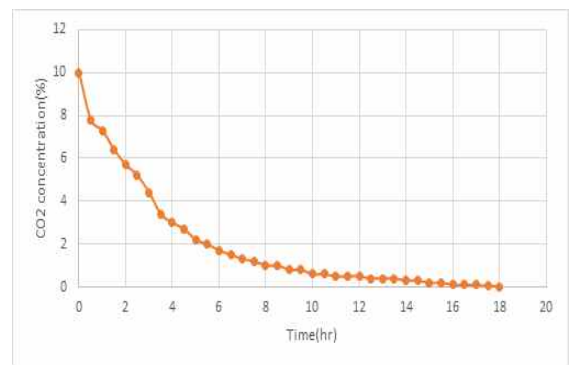
A



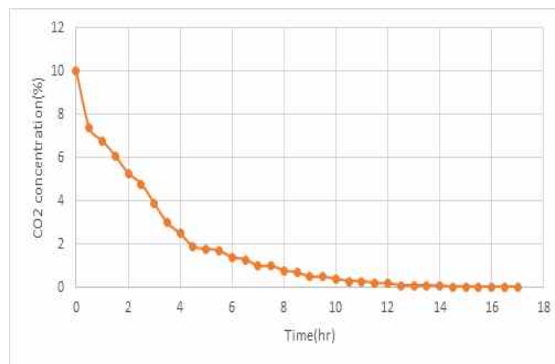
B



C



D



E

그림 99. Change of carbon dioxide concentration in the packaging. (A) : $n=0$, (B) : $n=2$, (C) : $n=4$, (D) : $n=6$, (E) : $n=8$

(다) 천공 개수에 따른 필름의 투과도 모델링

앞서 분석한 포장 필름 내부의 산소 및 이산화탄소 농도 변화를 토대로 필름의 기체 투과도를 구했다. 식 1에 필요한 값을 대입하면 천공 개수에 따른 필름의 투과도(TR)가 나오고 이를 그래프로 나타내면 그림 100와 같다

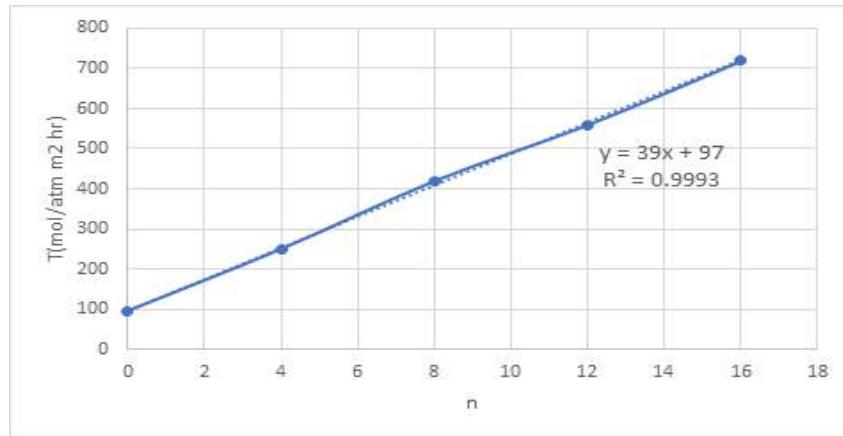


그림 100. Modeling of Transfer Rate of PP film by number of perforations.

그래프를 보면 천공의 개수가 증가할수록 투과도가 증가하는 것을 알 수 있다. 이는 특정 천공 수에서의 기체 투과도를 지시해주므로 MA 포장 설계 시 필요하다.

(라) 최적 기체 조성을 유지하는 MA 포장 조건

고구마를 포장했을 때 내부 기체 조성을 최적으로 유지해주기 위한 필름의 기체 투과도를 계산하였다. 식 3에 필요한 값을 대입하여 투과도(P/L)를 계산하였고 이때의 투과도(T')는 147.4 mol/m²·hr·atm 이다. T' 을 그림 2-104의 천공 개수에 따른 투과도 모델링 식에 대입하여 천공 개수를 구하였다. 고구마 포장 용기 내의 기체 조성을 최적으로 유지해주는 투과도(T') 147.4 mol/m²·hr·atm를 대입하여 계산한 결과, 천공 개수인 n은 약 1.4가 나왔다. 이는 고구마 포장 시 천공을 1.4개 뚫었을 때 포장 용기 내 최적의 기체 조성이 유지됨을 의미한다. 즉, 직접 실험을 하지 않아도 모델링 한 것에 대입하여 간접적으로 값을 도출해낼 수 있다.

(마) MA 조건이 적용된 고구마 포장 용기 내 가스 조성 변화

고구마 포장 시 최적의 기체 조성을 유지할 수 있는 천공 개수를 도출하였고, 이 포장 조건이 실제로 최적 기체 조성을 유지하는지 실험하였다. 베니하루카, 호박, 호감미를 각각 포장 용기에 담고 천공 1.4개가 뚫린 필름으로 포장한 뒤 다른 조건은 동일하게 하여 포장 용기 내부의 기체 조성을 분석하였다. 그 결과, 그림 2-100와 같은 기체 조성 변화를 보였다.

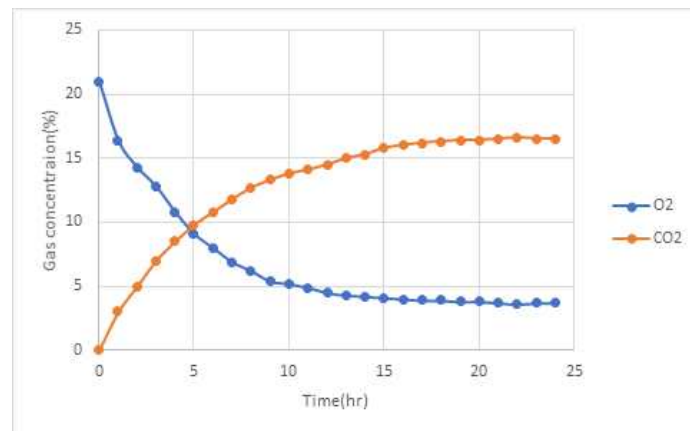
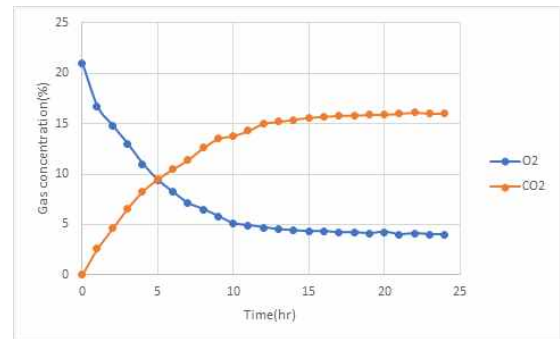
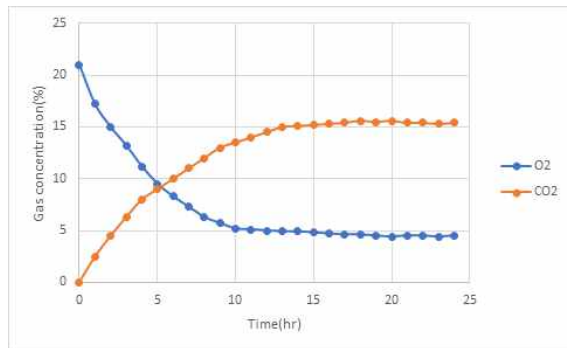


그림 101. Change of oxygen and carbon dioxide concentration in sweet potato packaging when the number of perforation is 1.4 (n=1.4). (A) : Benny Haruka, (B) : Hogammi, (C) : Hobak.

그림 101의 Benny Haruka(A)는 산소는 대기 농도(21 %)에서 감소하다가 4.5 %에서 평형을 유지하였다. 이산화탄소는 대기 농도(0.03 %)에서 증가하다가 15.4 %에서 평형을 유지하였다. Hogammi(B)는 산소 4 %, 이산화탄소 16 %에서 평형을 이루었으며 Hobak(C)은 산소 3.7 %, 이산화탄소 16.5 %에서 평형을 이루었다. 이는 앞서 규명한 산소의 최적 산소 기체 농도는 1-5 %를 만족한다. MA 포장 시 산소 제어로 인한 제어 효과가 더 크며 이산화탄소는 이산화탄소 흡착제를 사용하여 조성을 조절할 수 있으므로 산소 농도에 포장 조건을 맞추는 것이 바람직하다. 따라서 앞서 도출한 천공 개수를 적용하여 고구마를 MA 포장한 결과, 세 품종 모두 최적 기체 조성을 유지하였다. 이는 천공 개수와 투과도의 관계를 모델링한 것이 유효함을 입증할 수 있는 결과이다.

(바) 고구마 포장 (MAP 등온)

고구마의 품질을 측정하기 위해 215 × 175 × 65 mm의 PET 용기 한 면을 PP film으로 열접착(thermoform) 한 용기를 제작하였다. PP film은 두께 0.006 mm, 면적 0.0367 m²의 것이 사용되었으며 MAP의 경우 0.65개이다. 따라서 하나의 천공으로 성능 테스트를 수행하였다. 천공 필름은 leather hole-puncher (지름 2 mm, TUMAINI, Seoul, Korea)를 사용하여 천공이 고르게 배치되게 그림 102과 같이 수동으로 제작하였다. 이 천공 필름을 PET 용기에 열접착 한 뒤 한 면에 습도 측정 센서를 삽입하고 빈틈없이 막아주었다.



그림 102. Sweet potato wrapped (MAP)

(사) 고구마 MAP 품질 측정 (등온)

그림 103은 산소와 이산화탄소 농도를 최적으로 MAP 하였을 때 headspace의 기체 농도 변화와 그 때의 RH 변화를 나타낸다. 산소 농도는 점점 감소하다가 원래 설계치인 5%에 근접하게 3-5%로 유지되었다. 이는 저장 초기에는 산소 호흡에 의한 소모율이 포장 안으로의 투과율보다 더 큰 반면, 후기에는 산소농도가 5%에 도달하면서 소모율과 투과율이 같게 되어 평형 상태를 유지하기 때문이다. 이산화 탄

소 농도는 원래 설계치인 20%에 비하여 15-27%로 다소 차이를 보였다. RH는 예상 한대로 설계치인 80%와 유사한 79-84% 사이를 유지하였다.

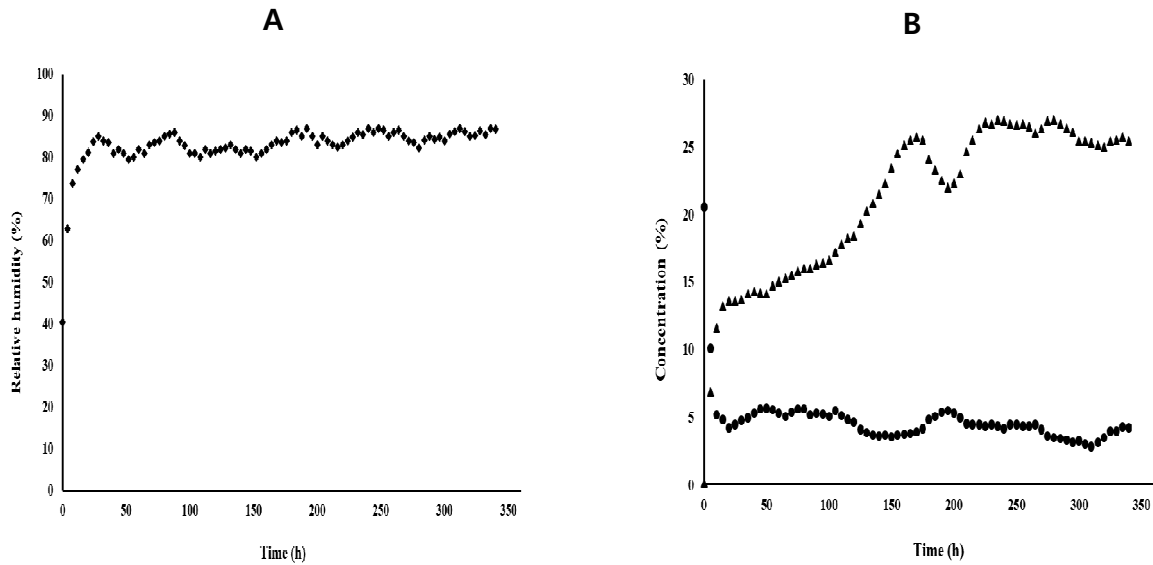
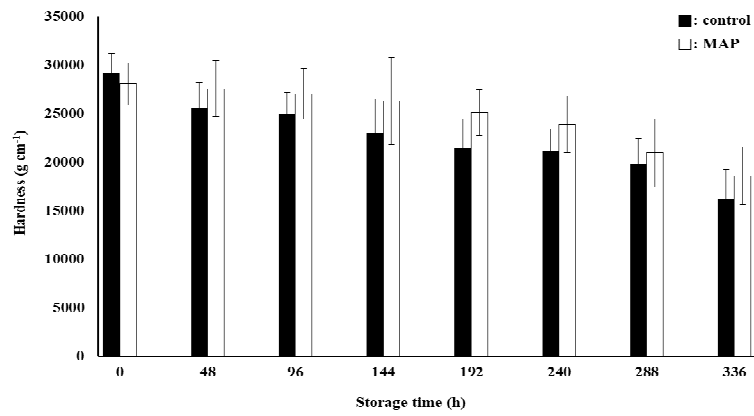


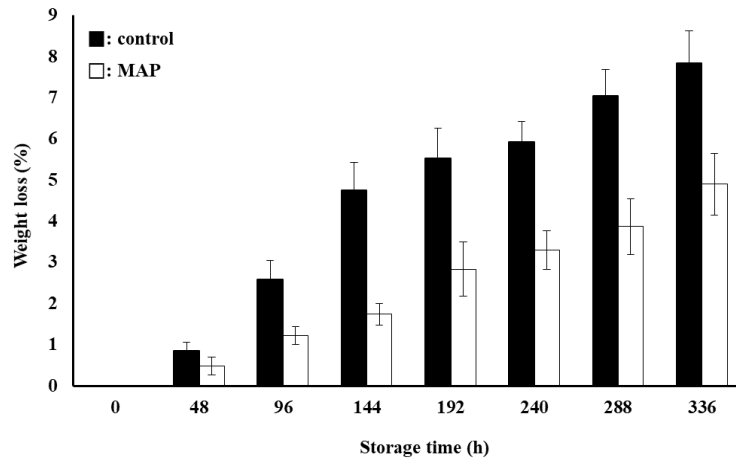
그림 103. Changes in O₂ and CO₂ concentrations (A) and relative humidity (B) of sweet potato headspace over time packed with perforated film conditions with n=1. (●: O₂, ▲: CO₂).

MA 포장된 고구마와 control 된 고구마 모두 경도, 중량 감소율, 곰팡이 생성율을 측정 후 비교해 보았다. 그림 103와 같이 경도는 MA 포장된 고구마와 control 된 고구마 저장 시간에 따라 감소하였고, 중량 감소율과 곰팡이 생성율은 저장 시간에 따라 증가 하였다. 이 세 가지 품질 지표에서 control 된 고구마가 MA 포장 된 고구마보다 변화율이 빨랐다. 경도에서 control은 저장 기간동안 13047.1 g cm⁻¹만큼 감소되었고, MA 포장 된 고구마는 9480.99 g cm⁻¹만큼 감소되었다. 중량 감소율의 경우 control은 7.83% 증가하였고, MA포장 된 고구마는 4.89% 증가하였다. 곰팡이 생성율의 경우, control은 2.4% 증가하였고, MA포장 된 고구마는 1.5% 증가하였다. 이것은 MAP한 고구마가 MAP 하지 않은 고구마에 비해 품질 저하가 적다는 것을 의미한다. 실험적으로 설계한 MAP를 실제로 포장 해보았을 때, 품질 저하 속도가 더딘 것을 통해 고구마의 shelf life를 연장시켰다.

A



B



C

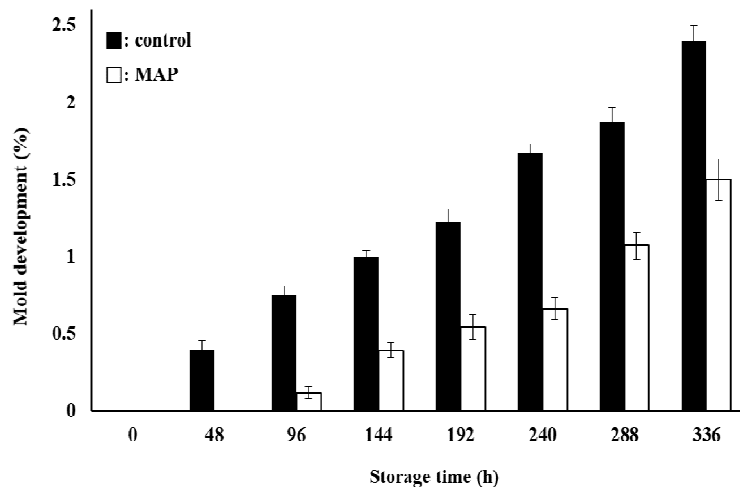


그림 104. Changes in hardness (A), weight loss (B), and mold development (C) of sweet potatoes under modified atmosphere packaging (MAP) and non-MAP (control) during storage. (■: control, □: MAP). Error bars represent standard deviations (n=3).

라. 고구마의 MHP(modified humidity packaging)

(1) 요약

고구마는 증산작용이 활발한 작물이다. 따라서 이러한 수분을 제어할 수 있는 포장 방법이 필요하다. MHP라는 신규 포장 방법을 선택해서 실험을 진행하였다. 호흡작용이 활발한 농산물은 증산작용에 의해 과열 발생으로 수증기가 생긴다. 따라서 이러한 수증기 농도 제어만을 위한 포장 기법은 MHP다. MHP를 설계하기 위해 천공 수와 포장 필름의 수분 투과도 관계식을 실험을 통하여 구축하였다. 고구마 표면 경계층과 포장 headspace, 포장 밖 외기의 RH 차이 관점의 물질 전달 식을 구축하였다. MAP와 마찬가지로 20℃로 실험을 진행하였다. MHP에 대한 천공 수를 68개로 도출하였으며, 도출된 포장 조건으로 고구마를 저장 실험한 결과, headspace의 RH는 최적 범위로 유지 되었다. 고구마의 품질 측정 방법으로는 경도, 중량감소율, 곰팡이 생성률을 측정하였다. 실험 결과, 실험군과 대조군의 차이는 존재하였으며, MHP 한 고구마가 훨씬 더 품질 변화 속도가 늦은 것이 관찰되었다. MHP한 고구마와 control 된 고구마의 경도는 저장 시간에 따라 감소하였으며 중량 감소율과 곰팡이 생성률은 시간에 따라 증가하였다. 이를 통해 실험적으로 설계된 MHP가 실제 고구마 포장에 적용되었을 때 포장 내 환경을 최적으로 유지해주면서 동시에 품질 변화를 늦춰서 shelf life 연장에 효과가 있다는 것이 입증 되었다. 하지만 이 호흡률과 습도를 모두 만족시키는 포장이 개발되어야 함을 사실이다. 따라서 이 두가지를 모두 만족시키고 제어할 수 있는 MAHP가 개발되어야 할 것으로 사료된다.

변온 조건의 고구마의 포장을 위하여 온도는 10℃~30℃로 설정하였다. 고구마가 냉해를 입지 않는 온도인 10℃를 설정하였으며, 여름철 더운 온도인 30℃를 설정함으로써 2주간의 실험을 통해 10℃, 24hr이 지난 후, 30℃, 24hr으로 설정하여 반복 하였다. 변온 조건에서는 MAP는 제외하고 MHP만을 제어하는 포장 기법을 선택하였다. 천공의 개수는 10℃와 30℃의 평균인 20℃로 설정하여 68개로 정하였다. 고구마의 품질 측정 방법으로는 경도, 중량감소율, 곰팡이 생성률을 측정하였다. 실험 결과, 실험군과 대조군의 차이는 존재하였으며, MHP한 고구마가 훨씬 더 품질 변화 속도가 늦은 것이 관찰되었다. MHP한 고구마와 control 된 고구마의 경도는 저장 시간에 따라 감소하였으며 중량 감소율과 곰팡이 생성율은 시간에 따라 증가하였다. 이를 통해 실험적으로 설계된 MHP가 실제 고구마 포장에 적용되었을 때 포장 내 환경을 최적으로 유지해주면서 동시에 품질 변화를 늦춰서 shelf life 연장에 효과가 있다는 것이 입증 되었다.

(2) 재료 및 방법

(가) 고구마

실험에 사용된 고구마는 (주)나나농장에서 저장한 후, 출하하기 직전의 고구마를 사용하였다. 고구마는 13℃, 70%RH에서 저장하다가 출하되기 3일 전에 큐어링 과정

을 거쳐 출하된다. 큐어링은 34°C, 70%RH에서 3일간 진행되었다. 고구마의 품종은 국내에서 가장 많이 유통되고 있는 베니하루카, 호박, 호감 고구마를 사용하였다. MA 포장 조건 적용 시 한 번에 약 1 kg의 고구마가 포장되었으며 개당 150 ± 20 g 인 것으로 선별하였다.

(나) 고구마 MHP 품질 측정 (경도, 중량감소율, 곰팡이 생성율)

① 경도(g/cm²)

고구마의 경도(g/cm²)는 texture analyzer를 이용하여 2mm probe로 고구마의 표면으로부터 5mm 지점까지 압축하였을 때, 전체 면적에 대한 최대 힘으로 나타내었다.

② 중량 감소율(%)

초기 중량에 대한 무게를 측정 한 후, 그 다음 실험 날짜에 해당하는 고구마의 무게를 측정하였다. 그 이후 처음 고구마의 무게에 대한 실험 날짜에 해당하는 고구마의 무게 비율을 구함으로써 나타내었다.

③ 곰팡이 생성율(%)

곰팡이가 가시적으로 관찰된 개수를 전체에 대한 비율로 나타내었다.

(다) MHP 수분 확산도 설계

MHP에서 식품 표면으로부터 headspace로 확산되어 포장 필름을 통해 투과되는 수분은 그림 105와 같다.

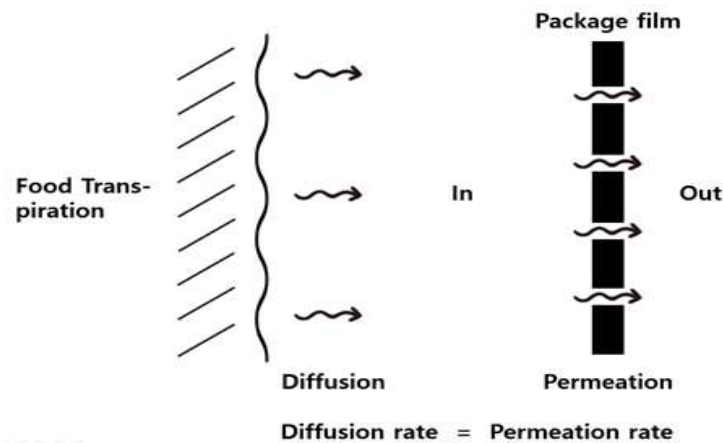


그림 105. Mechanism of steady state of vapor concentration inside MHP

식품 표면에서 확산된 수분은 필름을 통해 포장 외부로 투과되며 이때 확산되는 속도와 투과되는 속도가 같을 때 headspace는 일정한 RH를 유지하면서 MHP가 이루어 진다. 고구마 표면에서 증산되어 포장 내 headspace로 확산되는 수분의 양 J (mol s⁻¹ m⁻²)를 계산하였다. 수분의 확산은 Fick' Law를 따르며 식 14와 같이 나타낼 수 있다.

$$J = \frac{D dP}{RTdz} \quad (14)$$

여기서 D는 수분의 확산 계수이며 dP는 고구마 표면과 headspace 사이의 수증기압 (atm) 차이다. 이때 headspace의 수증기압은 고구마의 최적 습도 조건을 고려하여 공기 중 수증기압의 80%이다. R은 기체상수 (atm m³ mol⁻¹ K⁻¹), T는 headspace 온도 (K), dz는 고구마 표면에서 포장 필름까지의 최단 거리 (m)이다. 확산되는 총 수분의 양 (J')은 고구마 표면 수분 확산도 (J)에 고구마 전체 표면적을 곱해서 도출할 수 있다. (식 15)

$$J' = J \times A \quad (15)$$

여기서 J'은 고구마로부터 확산되는 총 수분의 양 (mol s⁻¹)이며 A는 고구마의 총 표면적 (m²)이다. 고구마의 표면적은 식 16로 계산할 수 있으며 이때 고구마는 elliptical shape라고 가정한다.

$$A = 2\pi \left[a^2 + \frac{ab^2}{\sqrt{a^2 - b^2}} \ln \left(a + \frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{b} \right) \right] \quad (16)$$

여기서 a는 elliptical shape 고구마의 긴 부분 (m)을, b는 짧은 부분 (m)을 나타낸다.

(라) Permeance rate of water vapor through film

천공 개수에 따른 포장 필름의 습도 투과도를 측정하기 위해 215 × 175 × 65 mm의 PET 용기 한 면을 PP film으로 열접착(thermoform) 한 용기를 제작하였다. PP film은 두께 0.006 mm, 면적 0.0367 m²의 것이 사용되었으며 천공 개수는 n=1 부터 n=70 (0.785 - 54.95 mm²)으로 하였다. 천공 필름은 leather hole-puncher (지름 2 mm, TUMAINI, Seoul, Korea)를 사용하여 천공이 고르게 배치되게 수동으로 제작하였다. 이 천공 필름을 PET 용기에 열접착 한 뒤 한 면에 습도 측정 센서를 삽입하고 빈틈없이 막아주었다. 20 °C, RH 80 %의 constant temperature and humidity test chamber (SJ-503HS, Sejong Scientific Co., Bucheon, Korea)에 천공이 뚫린 용기를 넣고 시간에 따른 습도 변화를 측정하였다. 측정된 포장 용기 내 상대 습도를 수증기압으로 환산하여 식 17로 회귀분석하여 J'을 계산하였다. 이는 천공 개수에 따른 습도 투과도로 모델링되었다.

$$\ln(P - P_{air}) = \ln(P_i - P_{air}) + \frac{SRT}{V}(t - t_i)P' \quad (17)$$

여기서 P'은 시간에 따른 필름의 습도 투과양 (mol s⁻¹)을 나타내며 V는 측정 용

기의 부피 (m³), S는 필름 면적 (m²), R과 T는 각각 기체상수 (atm m³ K⁻¹mol⁻¹)와 ambient 온도 (K)를 나타낸다. P_i는 측정 초기 수증기압(atm)이며 P_{air}는 chamber 내부의 수증기압, P는 시간 t에서의 수증기압이다. 도출된 P', 필름 면적, headspace와 ambient air 사이의 수증기압 차 (dP, atm)를 통해 필름 전체의 습도 투과량인 J' (mol s⁻¹)을 구할 수 있다. (식 18)

$$J' = P' S dP \quad (18)$$

(마) MHP 최적 포장필름 설계

MHP에서는 포장 내 최적 상대습도에 도달 후 고구마 표면으로부터의 수분 확산과 필름의 수분 투과율이 같게 되어 그 상대습도가 유지된다. 고구마 포장 용기 내 상대습도를 최적으로 유지하기 위해 고구마 표면과 포장 내 headspace 사이의 수분 확산도, headspace와 외기 사이의 천공 필름을 통한 수분 투과도의 균형이 고려되었다. 앞서 도출한 최적의 습도를 유지할 수 있는 수분 확산도 (J')를 천공 개수에 따른 습도 투과도에 대입하여 천공 개수를 도출하였다. 평형 상태에서의 상대습도는 고구마의 최적 습도 저장 조건인 80%로 하였다.

(바) 통계 처리

Non-linear regression에는 non-linear least square (Gauss-Newton algorithm) 방법이 사용되었으며 (Solving nonlinear least squares problem using gauss-newton method.) 선형과 비선형 회귀분석은 SAS (SAS, INC., IL, USA)를 사용하여 수행되었다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 필름의 습도 투과도

포장 용기 내부의 상대습도 변화를 토대로 천공 개수에 따른 습도 투과도를 도출하였다. 그림 106과 같이 천공의 개수가 늘어날수록 최적 습도 조건(RH 80%)에 도달하는 시간이 줄어든다. 또한 headspace의 습도 변화를 식 (17)을 이용하여 회귀분석하였다. 회귀 분석 결과(표 37) 결정계수는 0.99이상으로 회귀식이 높은 적합도를 가짐을 의미하며 습도 투과도는 천공 개수에 비례하여 증가하였다. Table 2-36의 습도 투과도 J' 과 천공 개수의 관계는 그림 107와 같다.

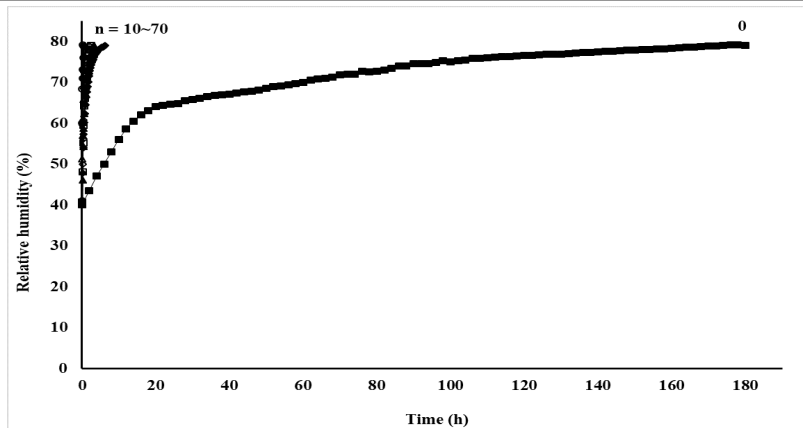


그림 106. Change in headspace RH over time according to the number of perforations (n)

표 37. Regression equations and total water vapor permeance rate (WVPR) according to the number of perforations

Perforation number	Regression equation	R ²	Total WVPR (mol s ⁻¹)
0	$y = 6.031^{1)} - 0.006^{2)}x$	0.9991	0.0006
10	$y = 6.016 - 0.182x$	0.9986	12.055
20	$y = 6.007 - 0.422x$	0.9891	25.471
30	$y = 6.021 - 0.601x$	0.9867	36.186
40	$y = 6.101 - 0.841x$	0.9791	50.711
50	$y = 6.014 - 1.202x$	0.9795	72.371
60	$y = 6.042 - 1.624x$	0.9706	97.981
70	$y = 5.997 - 2.001x$	0.9518	120.62

1) $\ln(P - P_{air})$

2) $\frac{SRT}{V} (t - t_i) P'$

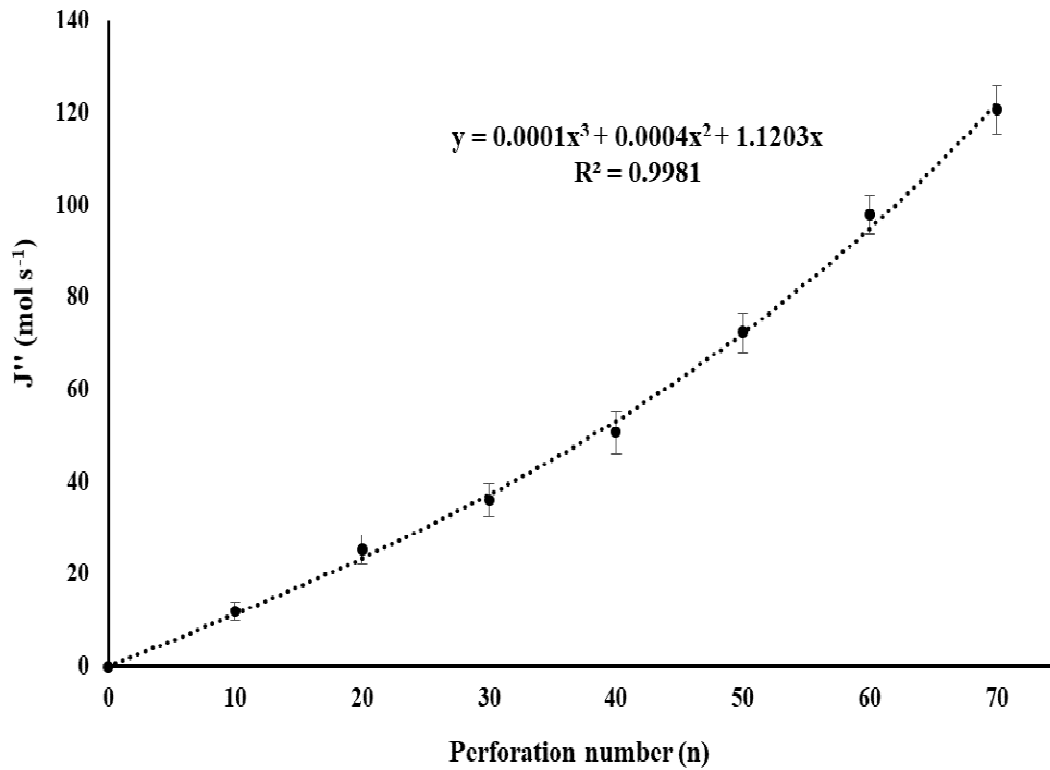


그림 107. Total WVPR of the film according to the number of perforations. Dot lines and error bars represent trend lines and standard deviations (n=3), respectively.

(나) MHP 필름 조건

MHP에서 포장내의 최적 RH에 도달과 고구마 표면으로부터의 수분 확산과 total water vapor permeance rate가 평형을 이룰 때, RH가 유지된다. 고구마 포장의 headspace로 전달된 WVFR은 표 38과 나타냈다. 열 에너지가 실온에서 잘 방출된다는 가정 하에 호흡 열로 인한 온도 변화는 무시하였다. 97.32 mol s⁻¹ flux rate에 대한 천공의 개수는 그림 104에 나타난 다항식 회귀 방정식으로부터 계산하여 62.6개로 도출되었다. 따라서 MHP에서의 최적 필름 천공 수는 63개로 도출 되었다.

표 38. Water vapor flux rate (J') and optimal perforation number for MHP

T (°C)	Water vapor flux rate (J' , mol s ⁻¹)	Optimal perforation number (n)
20	97.32	62.6

(다) 고구마 포장 (MHP 등온/ 변온)

고구마의 품질을 측정하기 위해 215 × 175 × 65 mm의 PET 용기 한 면을 PP film으로 열접착(thermoform) 한 용기를 제작하였다. PP film은 두께 0.006 mm, 면적 0.0367 m²의 것이 사용되었으며 MHP의 경우 63개이다. 따라서 63개의 천공으로 성능 테스트를 수행하였다. 천공 필름은 leather hole-puncher (지름 2 mm, TUMAINI, Seoul, Korea)를 사용하여 천공이 고르게 배치되게 수동으로 제작하였다. 이 천공 필름을 PET 용기에 열접착 한 뒤 한 면에 습도 측정 센서를 삽입하고 빈틈없이 막아주었다.

(라) 고구마 MHP 품질 측정 (등온)

Headspace의 상대습도 변화와 고구마의 품질변화를 측정하였다. 그림 108은 headspace의 RH를 최적으로 MHP 했을 때의 RH 변화를 나타낸다. RH는 초기 농도 (40%)에서 점점 증가하다가 예상 설계치인 80%와 유사한 76-85%사이를 유지한다. 이는 저장 초기에는 고구마의 증산작용으로 인한 수분 생성율이 포장 밖으로의 투습율보다 더 큰 반면, 후기에는 RH가 80%에 도달하면서 생성율과 투습율이 같게 되어 평형 상태를 유지하기 때문이다.

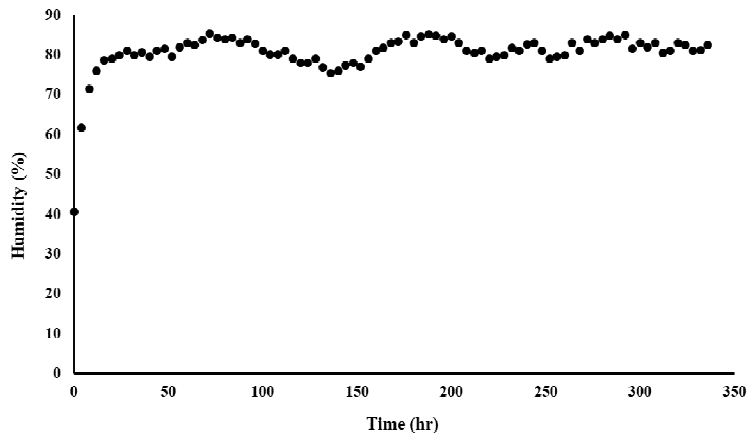


그림 108. Changes in relative humidity (RH) of sweet potatoes headspace over time when packed with perforated film conditions of n=63.

MH 포장된 고구마와 control 된 고구마 모두 경도, 중량 감소율, 곰팡이 생성율을 측정 후 비교해 보았다. 그림 109와 같이 경도는 MH 포장된 고구마와 control 된 고구마 저장 시간에 따라 감소하였고, 중량 감소율과 곰팡이 생성율은 저장 시간에 따라 증가 하였다. 이 세 가지 품질 지표에서 control 된 고구마가 MH 포장 된 고구마보다 변화율이 빨랐다. 경도에서 control은 저장 기간동안 13814.2 g · cm⁻¹만큼 감소되었고, MH 포장 된 고구마는 8920.82 g · cm⁻¹만큼 감소되었다. 중량 감소율의 경우 control은 8.35% 증가하였고, MH 포장 된 고구마는 3.78% 증가하였다. 곰팡이 생성율의 경우, control은 2.1% 증가하였고, MA포장 된 고구마는 1.2% 증가 하였다. 이것은 MHP한 고구마가 MHP 하지 않은 고구마에 비해 품질 저하가 적다

는 것을 의미한다. 실험적으로 설계한 MHP를 실제로 포장 해보았을 때, 품질 저하 속도가 더딘 것을 통해 고구마의 shelf life를 연장 시켰다.

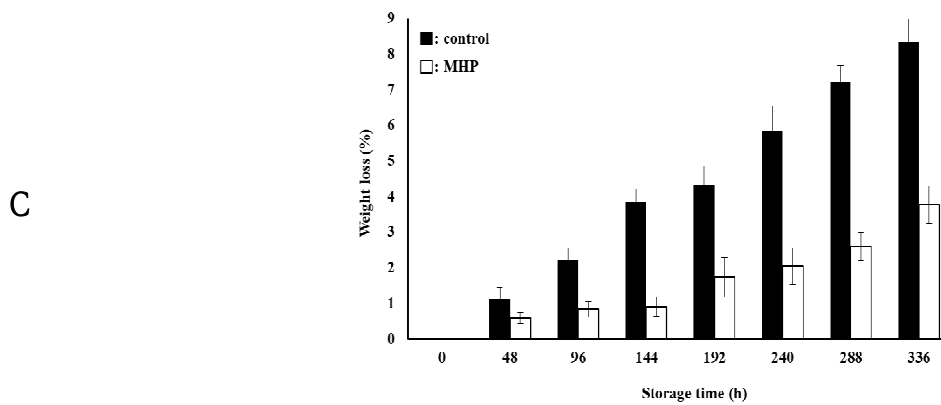
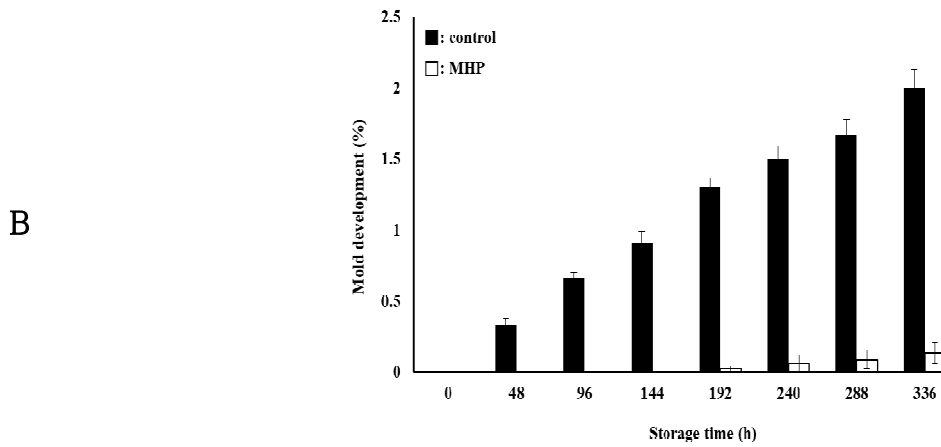
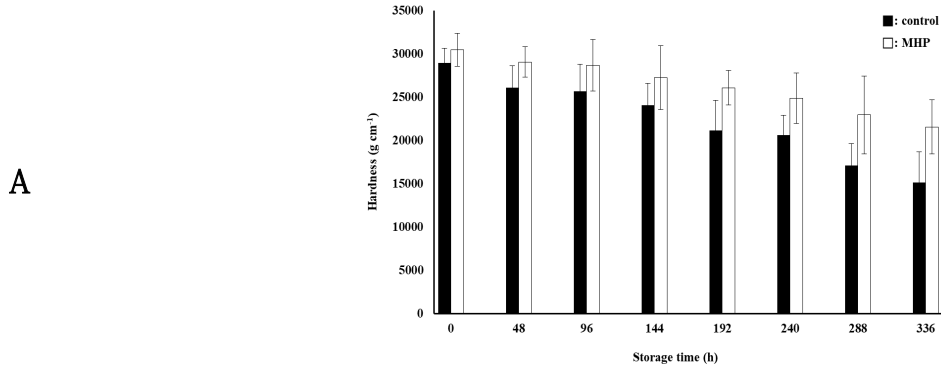


그림 109. Changes in hardness (A), weight loss (B), and mold development (C) of MH packaged and non-MH packaged (control) sweet potatoes during storage tests. (■: control, □: MHP). Error bars represent standard deviations (n=3).

(마) 고구마 MHP 품질 측정 (변온)

MH 포장된 고구마와 control 된 고구마 모두 경도, 중량 감소율, 곰팡이 생성율을 측정 후 비교해 보았다. 그림 110과 같이 경도는 MH 포장된 고구마와 control 된 고구마 저장 시간에 따라 감소하였고, 중량 감소율과 곰팡이 생성율은 저장 시간에 따라 증가 하였다. 이 세 가지 품질 지표에서 control 된 고구마가 MH 포장 된 고구마보다 변화율이 빨랐다. 경도에서 control은 저장 기간동안 9,437 g cm⁻¹만큼 감소되었고, MH 포장 된 고구마는 8920.82 g cm⁻¹만큼 감소되었다. 중량 감소율의 경우 control은 7.59% 증가하였고, MH 포장 된 고구마는 3.99% 증가하였다. 곰팡이 생성율의 경우, control은 3.4% 증가하였고, MA포장 된 고구마는 1.5% 증가하였다. 이것은 MHP한 고구마가 MHP 하지 않은 고구마에 비해 품질 저하가 적다는 것을 의미한다. 실험적으로 설계한 MHP를 실제로 포장 해보았을 때, 품질 저하 속도가 더딘 것을 통해 고구마의 shelf life를 연장시켰다.

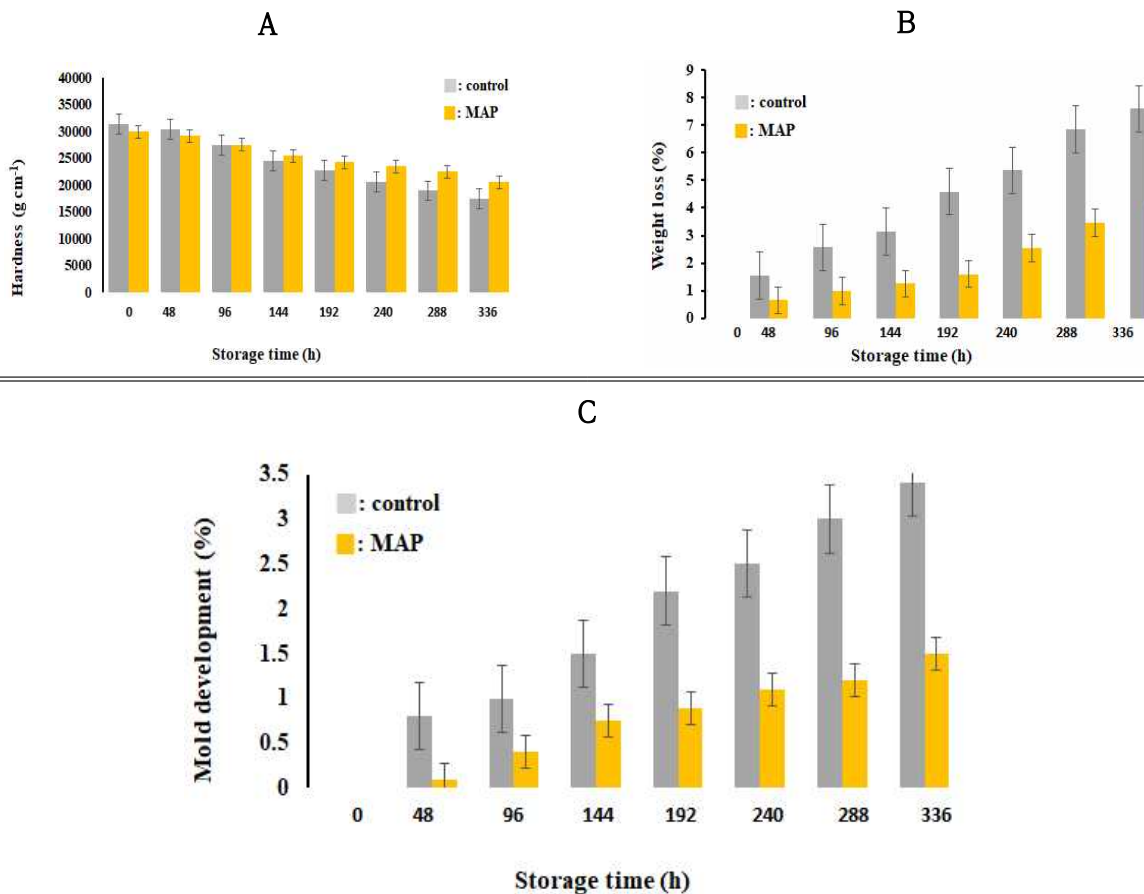


그림 110. Changes in hardness (A), weight loss (B), and mold development (C) of MH packaged and non-MH packaged (control) sweet potatoes during storage tests. (■: control, ■: MHP). Error bars represent standard deviations (n=3).

마. 이력 추적 off-line 스마트 관리 시스템

(1) 요약

고구마의 호흡률, 최적 기체 조성, 기체의 필름 투과도 등을 토대로 MA 포장에 이루어진 고구마의 이력을 추적하는 off-line 스마트 관리 시스템이 개발되어야 한다. 이를 위해 용역업체 (주)DAI와 함께 이력 추적 소프트웨어를 개발하였다. 이력 추적 off-line 스마트 관리 시스템인 QR code는 전북 고창에 위치한 황금터 고구마 농가에 적용되었다. 황금터 농가에서 재배되는 꿀고구마가 적용 대상으로, 이력을 나타낼 수 있는 QR code가 유통 과정에서 부착되었다. 고구마의 유통 과정은 크게 원묘의 생산, 재배, 수확, 출하, 판매(도매, 소매)로 이루어지는데 이중 고구마 원묘의 생산에서부터 출하 단계까지를 이력 추적 범위로 지정하였다. 황금터 농가에서 재배되어 유통되는 고구마에 부착될 QR code에는 농가의 정보, 개체별 품종, 수확시기, 저장기간 및 품질 등이 입력되었다. 특히 원묘의 원산지 정보가 자세히 입력되었으며 QR code 부착 후 농가관리, 원산지관리, 회원정보관리 등이 이루어질 예정이다. 이러한 이력 추적 시스템을 구축하기 위해 고구마 개체 ID, 품종 ID, 농가 ID, 수확시기 ID, 온도 데이터 로거 ID 등의 데이터가 수집되었다. 결과적으로 고구마 원묘의 생산에서부터 출하 단계까지의 이력을 QR code를 통해 추적할 수 있다. 위와 같은 시스템의 개발 및 운영을 위한 기반환경(서버, PC, QR code 등)은 연구기간까지 무상으로 제공되어야 한다. 만약 연구기간 종료까지 실용화 사업화가 이루어지지 않는다면, 연구기간 종료 6개월 간 운영을 위한 기반환경을 무상으로 제공할 예정이다.

(2) 고구마 품질 유지 생산 이력 추적 시스템의 도입

고구마의 유통 선진화를 위하여 최신 IT 기술인 QR 코드 기반 이력 추적 시스템을 적용하였다. 이력 추적 시스템이 적용될 경우 고구마 포장 때 개체의 고유번호라벨(QR code 함께 부착)이 부착되며, 최초의 품종, 농가 정보, 수확시기가 기록된다. 또한 계속적으로 고구마 경작 후 유통이 되는 과정에서 일어나는 시간 온도 기록이 이루어지고 유통과정에서도 최초 고구마 포장에 부여했던 고유번호라벨이 유지되어 경작에서 소비자까지 전 과정이 전산시스템으로 운영된다. 농가 경작, 유통, 판매 단계에서 품종, 농가, 수확시기, 시간-온도 이력을 추적할 수 있으며 경작 후 현 시점까지 경과 시간을 확인할 수 있다. 이력 시스템의 단말부로 고구마 포장에는 QR code가 부착되며 소비자 측에는 스마트 폰을 사용하여 이를 인식한다.



그림 111. 고구마 이력추적 스마트웹 개념도

(3) 고구마 생산 이력 추적 시스템 주요 화면

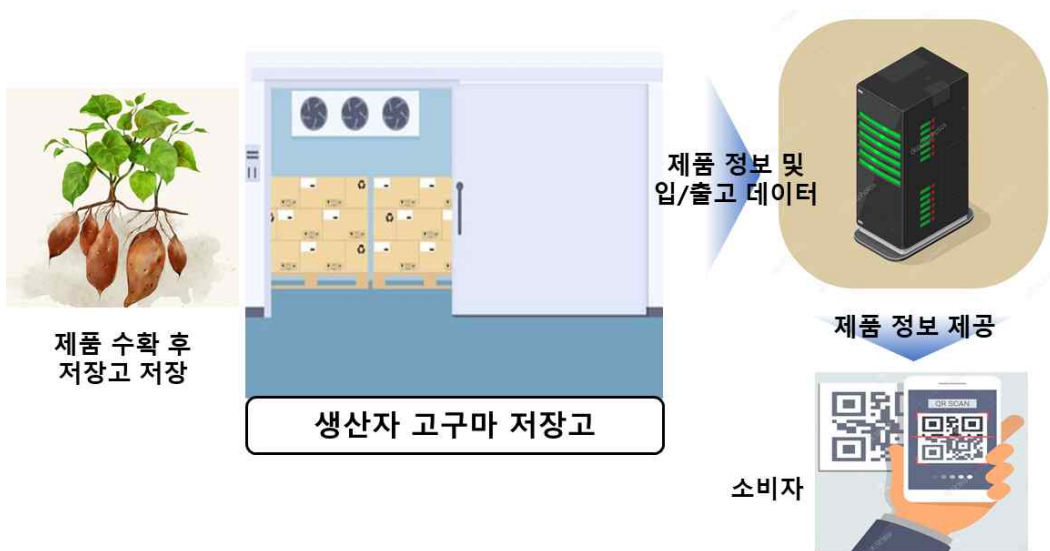


그림 112. 고구마 생산 이력 추적 시스템 개념도

- 고구마의 재배지, 재배 환경, 품종 및 고구마 관련 다양한 정보를 생산자가 입력하고, 이러한 다양한 정보를 소비가 QR Code를 이용하여 확인 할 수 있는 시스템
- 추적 시스템 홈페이지 화면



그림 113. 로그인 화면 및 가입자 정보 입력

- 홈페이지를 가입하면, 가입자 정보를 입력 하며 이 정보는 생산자 혹은 관리자의 정보와 연동이 됨
- 홈페이지는 생산 농가 정보, 제품 정보 그리고 입고(배송) 관련 정보 등으로 크게 구분 됨



그림 114. 농가의 기본 정보 입력

- 가입자의 기본 정보와 연동이 되며, 농장주와 가입자가 다를 수도 있음

- 가입자는 농장에서 생산된 고구마를 관리 및 판매자가 될 수 있음

그림 115. 고구마의 정보 입력

- 생산 농사명과 연동이 되며, 고구마의 생육 환경 정보를 입력함
- 또한 고구마의 수확 날짜, 입고 날짜, 육묘, 바이러스 검정 그리고 종순 생산 관련
- 정보를 입력하며, 입력된 정보를 통합하여 확인 할 수 있음

그림 116. 출하될 고구마 정보 확인

- QR Code를 통해 소비자에게 제공될 정보를 선택하고 Code를 생성함
- QR Code 생성 후 배송 정보를 확인하면, 생산 정보 및 QR Code를 확인 가능

제품 정보

농가명 : 윤씨네

재배지(원산지) : 충남 홍성

품종 : 맛있는 고구마

수확일 : 2019-10-10

입고일 : 2019-10-10

바이러스 검정 : 확인

육묘 : 뭘까요?

종순생산 : 저도 궁금함

Copyright © 고구마 2019

그림 117. QR Code를 통한 정보 확인 앱

5. 고구마 바이러스, 세균, 곰팡이 병진단 키트 상용화

가. 고구마 바이러스, 세균, 곰팡이 병 진단 키트 상용화

(1) 고구마에서 발생하는 주요 바이러스 자원 확보

- 시중에 유통 판매되고 있는 고구마의 감염여부를 판단하기 위하여 재래시장, 마트, 온라인 등에서 고구마를 구입하였다. 고창, 여주, 해남, 함양, 예산, 익산, 나주, 영암, 당진, 무안, 김제, 논산 등의 원산지가 표기된 것.
- 고창, 무안, 예산, 논산의 농가로부터 매년 주기적으로 방문하여 시료채집하기로 협동과제와 공동으로 계획하였다.
- 바이러스 감염된 양성대조구를 확보하기 위하여 국립식량과학원 바이오에너지작물연구소로부터 복합 감염된 고구마 시료를 분양받았다(그림 2-117).



그림 118. 국립식량과학원 바이오에너지작물연구소로부터 분양받은 복합 감염된 고구마

- 110여 개체의 시료를 확보하고, 플라스틱 컵에 고구마 괴근 혹은 줄기가 반쯤 잠길 수 있도록 수돗물을 붓고 직사광선이 들지 않는 반그늘에서 재배하면서, 본엽이 3-4매 전개되었을 때 바로 사용하거나 밀폐봉지에 넣어 -20도씨에 보관하면서 필요시 주형 추출에 사용하였다. 이중 80여종을 선발하여 이후 실험재료로 사용하였다. Total RNA 와 DNA는 각각 BCS Plant RNA Prep Kit와 BCS Plant DNA Prep Kit를 사용하여 추출하였다.

(2) 선행 진단 프라이머를 이용한 진단 키트 제작 조건 확립

- 선행 진단 프라이머기술을 국립농업과학원 작물보호과 바이러스실로부터 농업기술실용화재단을 통하여 국유특허(제10-1459616호) “고구마 바이러스 진단용 프라이머 쌍 및 이를 이용한 진단방법” 과 국유특허(제10-1557045호) “SPV2, SPVC, SPSMV-1 및 SPCFV 다중 진단용 프라이머 세트 및 이를 이용한 진단 방법” 에 대한 기술이전을 받았다.
- 고구마 바이러스 8종 Sweet potato leaf curl virus(SPLCV), Sweet potato

feathery mottle virus(SPFMV), Sweet potato G virus(SPVG), Sweet potato latent virus(SPLV), Sweet potato chlorotic fleck virus(SPCFV), Sweet potato virus 2(SPV2), Sweet potato virus C(SPVC), Sweet potato symptomless virus 1(SPSMV-1)을 진단할 수 있는 기술 이전 받은 프라이머를 이용하여 확보된 고구마 개체 80개체에 대한 검정 테스트를 하였다. 테스트결과 SPLCV, SPFMV, SPGV, SPLV, SPCFV, SPVC, SPV2, SPMV-1 바이러스가 각각 48개, 36개, 26개, 3개, 16개, 33개, 39개, 77개가 검정되었다. 4종 이상의 바이러스에 복합감염된 경우는 38개체였다. (고구마시료 80종의 바이러스별 테스트 결과사진 그림 2-119~124)

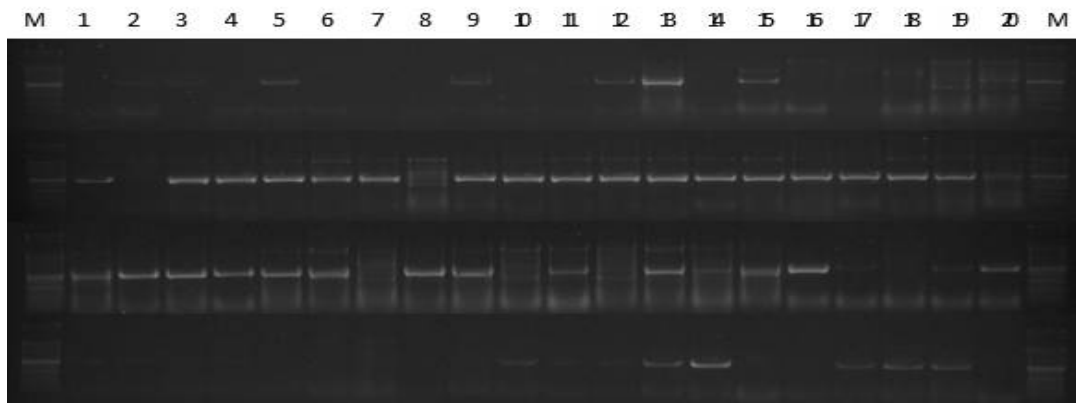


그림 119. SPLCV 진단용 프라이머의 고구마 80종 검정 결과(증폭 산물의 크기506bp). 80개중 48개체에서 진단됨

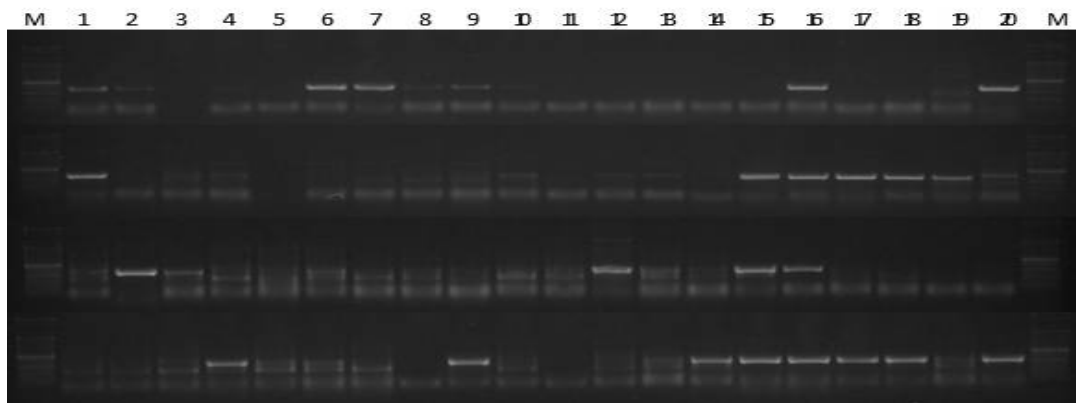


그림 120. SPFMV 진단용 프라이머의 고구마 80종 검정 결과(증폭산물의 크기: 355bp). 80개중 36개체에서 진단됨.

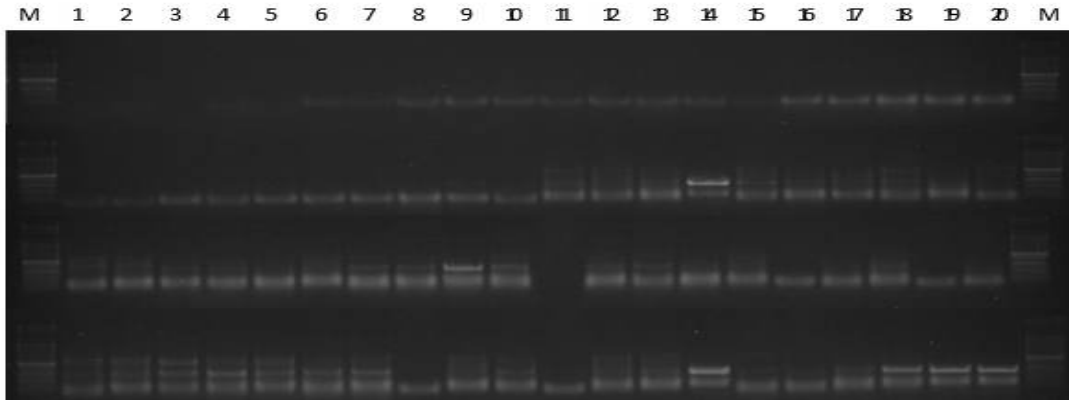


그림 121. SPGV 진단용 프라이머의 고구마 80종 검정 결과(증폭산물의 크기: 285bp). 80개 중 26개체에서 진단됨.

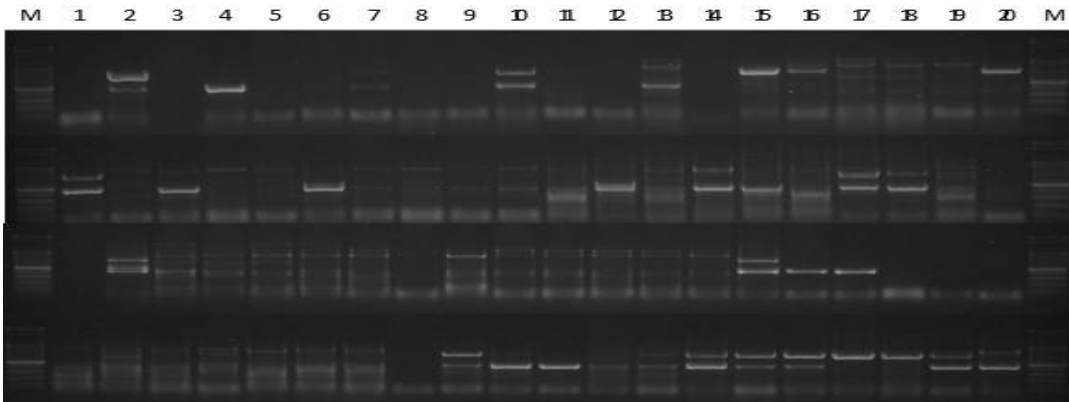


그림 122. SPVC 진단용 프라이머의 고구마 80종 검정 결과(증폭산물의 크기: 447bp). 80개 중 33개체에서 진단됨.

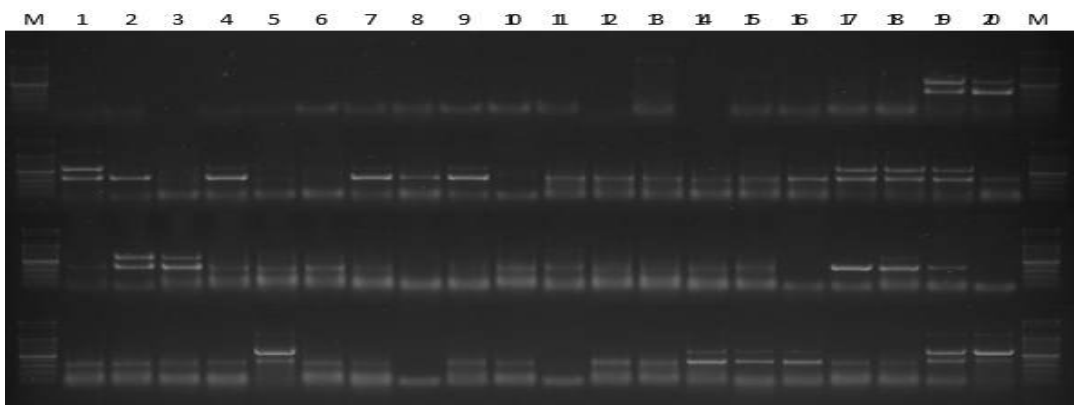


그림 123. SPV2 진단용 프라이머의 고구마 80종 검정 결과(증폭산물의 크기: 369bp). 80개 중 39개체에서 진단됨.

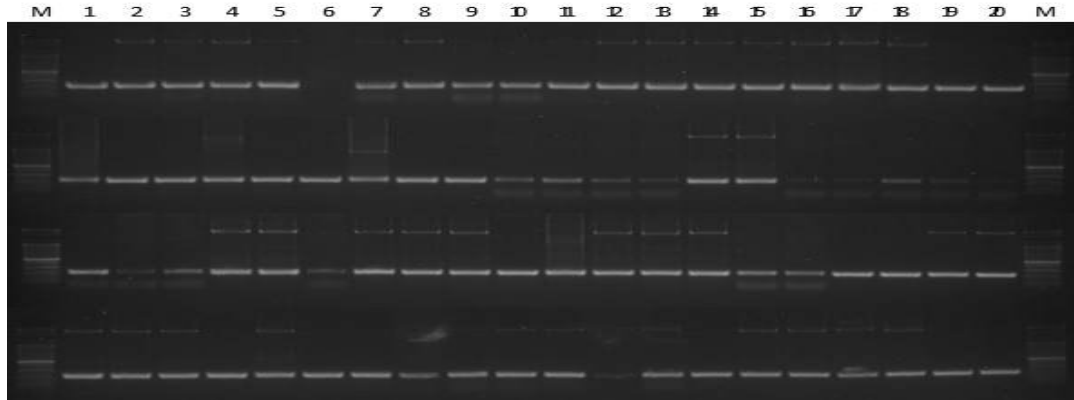


그림 124. SPSMV-1 진단용 프라이머의 고구마 80종 검정 결과(증폭산물의 크기: 230bp). 80개중 77개체에서 진단됨.

- SPLV 검정 결과 3개체에서만 진단이 되었고, SPCFV의 경우에도 16개에서 예상 증폭 산물 크기의 밴드를 확인할 수 있었다(자료 미제출).
- SPLCV, SPFMV, SPSMV-1 바이러스 진단 프라이머의 경우에는 비교적 비특이 밴드가 보이지 않았지만, SPVC, SPV2의 경우에는 많은 비특이 밴드들이 관찰되었다. 이것이 프라이머 특성에 기인한 것인지 아니면 고구마 품종에 따른 것인지, PCR 반응조건 등에 따른 것인지에 대한 추가 실험이 필요하다고 판단되었다.
- 비특이 밴드가 많이 보이는 SPVC 바이러스 진단 프라이머를 선택하여 8개의 감염된 고구마 시료를 가지고 선행 진단 프라이머의 PCR 반응 조건은 42도 30분, 95도 5분, (94도 30초, 55도 30초, 72도 1분 35회 반복), 72도 10분이었다. 기존에 바이오큐브시스템에서 토마토 관련 과제를 수행하면서 얻은 기술력을 바탕으로 하여, 48도 5분, 95도 10분, (95도 20초, 60도 20초, 72도 30초 35회 반복), 72도 5분의 조건으로 변경하여 테스트 해보았다(그림 125).

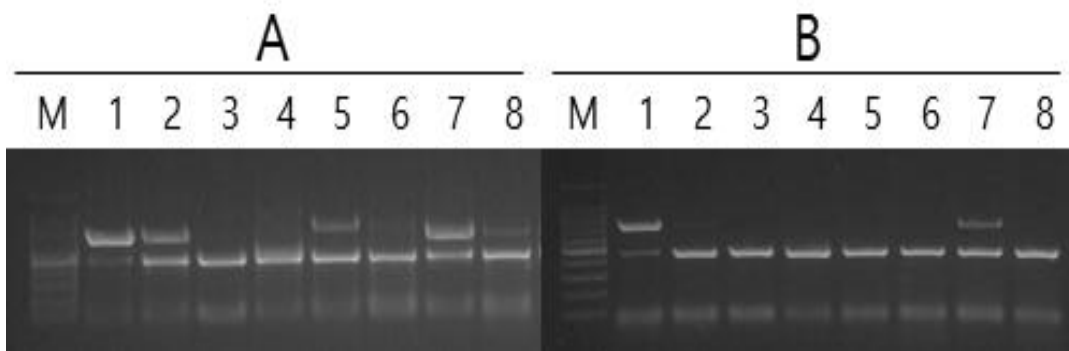


그림 125. RT-PCR 반응 조건에 따른 SPVC 바이러스 진단 프라이머 증폭 양상 비교. A: 기술이전 조건, B: 변형 조건, M:100bp ladder, 1~8: 감염된 고구마 시료

- 그 결과 비교적 많은 비특이 밴드가 사라진 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 아마도 반응에 사용되는 PCR mix나 프라이머가 기술 이전 받은 특허에 사용된 것과 상이해서 나타나는 결과라 생각된다. 그러나 앞으로의 사업화 여건을 고려해 볼 때 조건을 바이오큐브시스템에 맞추는 것이 사업화에 좀 더 유리하다고 판단되었다. 비특이 밴드같은 경우는 PCR 반응조건이나 반응액 뿐만 아니라 프라이머의 특성이나 주형을 준비하는 방법, 상태에 따라서도 영향을 받을 수 있으므로 주형준비법에 대한 추가적인 실험을 진행하였다.
- Geminiviridae에 속하는 SPSMV-1의 경우 거의 96%(80점중 77점) 검출이 되었다. 감염시료를 최대한 확보하기 위해서 괴근의 모양이 고르지 않거나 잎에 증상이 보이는 것으로 추측되는 시료를 주로 선별하기는 했지만, 거의 대부분의 고구마가 감염되었다고 생각하기에는 의문점이 들었다. 이러한 의문점을 해결하기 위해 추후 시퀀싱을 통하여 진단된 결과가 맞는지에 대한 확인과정이 필요할 것이라 생각된다. 또한 이러한 데이터에 대하여 고구마 게놈을 연구하는 기관의 분석이나 전문가의 자문이 필요하다고 판단되어 자문을 진행하였다.

(3) 진단 시스템에 적합한 주형 준비법 개발

- 고구마는 토마토나 고추와는 달리 식물체 내에 당성분이 많아 상처를 입거나 마쇄 후에 시간이 지나면 굳어지게 된다. 이에 따라 다른 식물처럼 RNA나 DNA를 추출할 때 전문가가 아니면 잘 뽑히지 않는 경우가 있다. 국립농업과학원 바이러스실로부터 자문을 구하여 고구마를 가지고 진단을 할 때 잎보다는 줄기부분을 가지고 하는 것이 좀 더 용이한 것을 알게 되었다.
- 고구마 시료의 준비는 증상이 보이는 잎의 잎자루나 개체의 줄기를 채취하여, 지름 1mm이하의 것은 적당히 잘라 주고, 이보다 두꺼운 시료의 경우에는 면도칼을 이용하여 줄기의 바깥 부분을 벗기거나 잘라내어 100mg씩 정량하여 RNA/DNA 추출에 사용하였다(그림 126).

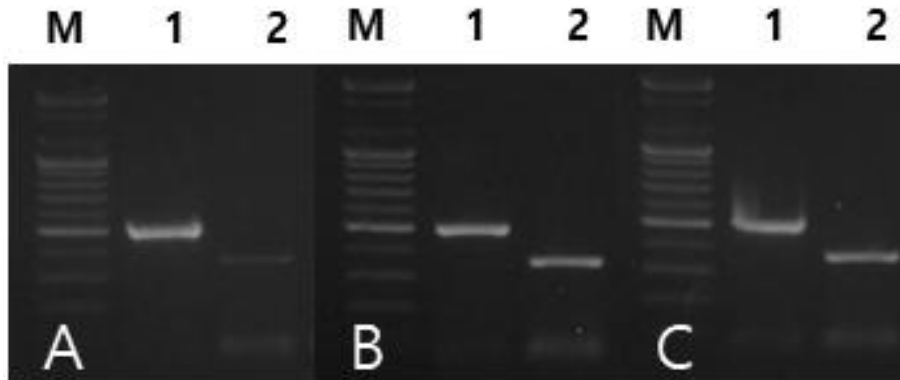


그림 126. 고구마 시료 부위에 따른 비교. A: 잎, B: 줄기, C: 잎+줄기, M: 100bp ladder, 1: SPLCV, 2: SPFMV

- 예비실험 결과 바이러스에 따라 잎에서도 추출이 가능하지만 대체로 줄기를 이용하여 실험하는 것이 대체적으로 잘나오는 것을 확인하였고, 고구마에서 RNA, DNA의 주형추출은 줄기부분을 사용하였다.
- 기존에 잎만 가지고 하거나 잎과 줄기를 같이 사용할 경우에는 마쇄 후 끈적거림이 심해지거나 유발에 붙어서 마쇄액을 획득하기가 힘들었다.
- PCR 반응에 주형은 실험결과에 중요한 영향을 주지만, RNA/DNA를 추출하기 위해서는 숙련된 전문가가 필요하다. 같은 시료라도 뽑는 사람에 따라 다른 결과가 나올 수도 있다. 바이오큐브시스템에서는 이러한 문제점을 극복하고 연구자가 쉽고 빠르게 주형준비를 할 수 있도록 Biocube라는 다공성 세라믹에 관한 특허를 보유하고 있다. 이것을 적용한 BCS FP Kit와 BCS Folder를 이용하여 테스트를 수행하였다(그림 127). 선행 테스트 결과 양성으로 판별된 20개의 고구마 시료를 사용하였다.

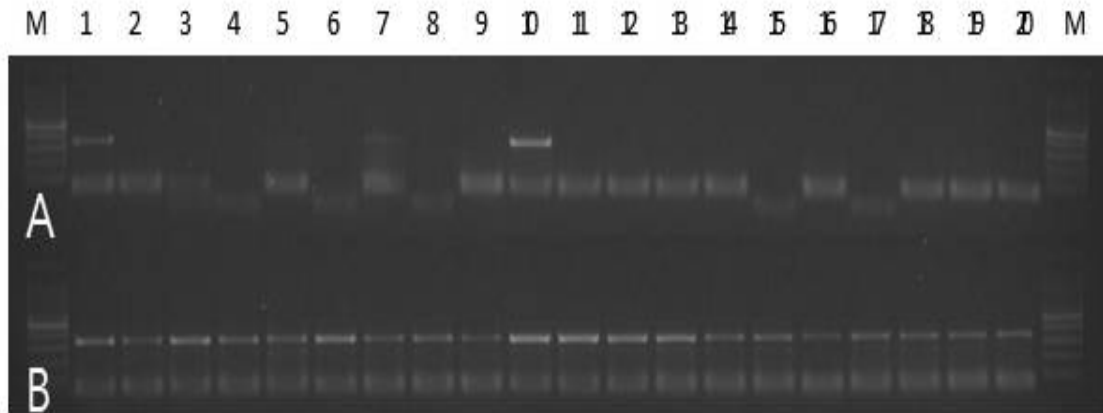


그림 127. SPFMV의 BCS FP Kit를 이용한 정치 시간에 따른 증폭 양상 비교. A: 30분, B: 10분

- 고구마에서는 즙액이 토마토, 고추 같은 작물에 비해 끈적거리고 굳어지는 현상 때문에, FP Kit를 활용한 방법에서 실험과정에 변형이 필요하였다. 이전에는 고려하지 않아도 되었던 즙액을 떨어뜨린 후의 정치 시간이 실험 결과에 큰 영향을 주는 것이 확인되었다. 30분 이상 즙액을 방치하게 되면 Biocube위에 즙액이 굳어져서 PCR 반응이 잘 진행되지 않는 결과를 나타내었다(그림 127A). 10분 이내로 정치 시간을 두고 다시 실험한 결과 같은 시료에서도 확연히 증폭이 잘 되는 것(그림 127B)을 확인할 수 있었다. FP Kit가 농도가 낮은 바이러스의 RNA추출에 유용하지만 고구마라는 작물의 특성을 고려하여 기존과는 다른 실험과정이 필요하다는 것이 확인되었다.

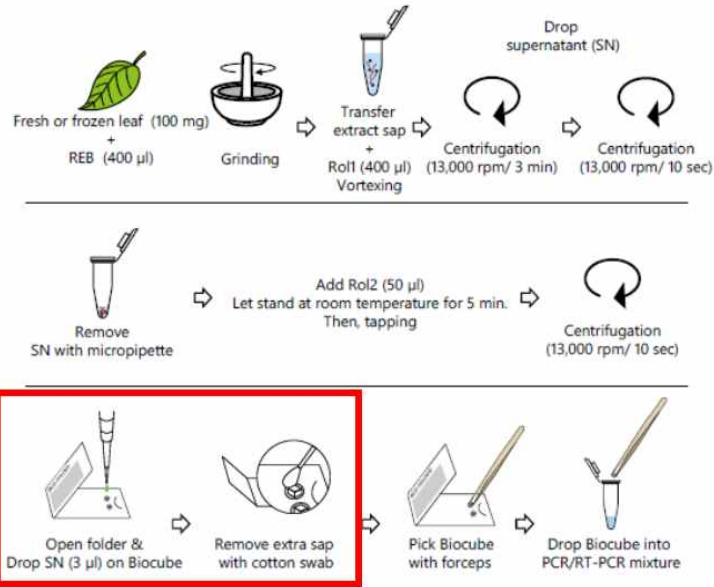


그림 128. BCS FP Kit 매뉴얼 일부. 네모박스: 즙액을 떨어뜨린 후 정치하는 구간.

- 실험 과정(그림 128)중의 거치 시간이 증폭에 영향을 주는지 알기위하여 15분 정치 후에도 PCR 증폭이 잘되던 시료를 가지고 30분 이상 거치시간을 늘려 재실험 해본결과 PCR 밴드 증폭이 되지 않았다(자료 미제출).
- 이상의 결과로 Biocube 이용시 즙액의 정치시간이 일반적으로 최대 10분 넘지 않는 것이 고구마 진단키트 패키지 실험법에 적용되어야 한다는 것을 확인하였다.
- Biocube 적용법의 또 다른 형태인 BCS Folder를 사용하여 테스트를 진행하였다. 두 가지의 적용방법이 있는데, 하나는 시료의 상태가 좋거나 생엽인 경우에는 직접 Biocube를 잎에 접촉시켜 주형을 준비하는 것이고(그림 129). 다른 하나는 냉동엽이거나 시료의 상태가 좋지 못한 경우 일반적인 주형 추출법의 마쇄부분만을 차용하여 사용할 수 있다. 본 실험에서는 DNA 바이러스인 SPSMV-1에 감염된 고구마를 이용하여 아래의 방법으로 테스트를 진행하였다.

**Method 1
solid contact**

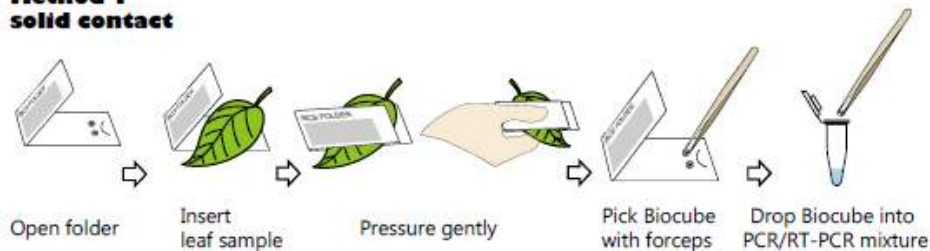


그림 129. BCS Folder 매뉴얼중 일부

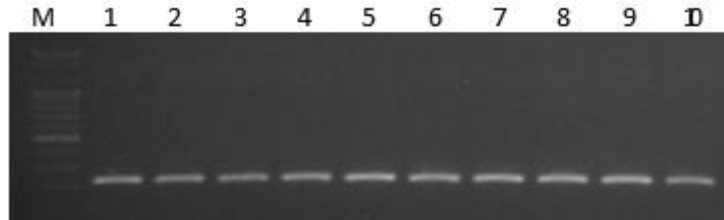


그림 130. Biocube를 이용한 SPSMV-1 (230bp) 검정테스트. M: 100bp ladder, 1~8: 감염된 고구마

- BCS Folder를 사용하여 테스트한 결과(그림 130) RNA Prep Kit를 사용하여 실험한 결과 비슷한 증폭 양상을 나타내었다. 고구마의 식물 DNA도 엽록체 프라이머를 사용하여 테스트해본결과 PCR 반응이 잘되었다(자료 미제출). DNA 바이러스의 검정이나 고구마 식물의 DNA의 추출에는 있을 마쇄하지 않고 직접 사용이 가능한 것으로 확인되었다.
- Biocube를 사용하면 실험과정이 매우 간단해질 뿐 아니라, 쉽고 빠르게 주형 준비가 가능해진다. 그러나 고구마라는 작물의 특성, 진단 프라이머, 바이러스의 종류와 식물의 상태에 따른 진단효과에 대한 연구가 필요하다고 확인되었다. 이는 2차년도에 진단 효과 비교를 통한 실험에서 세부조건 실험을 수행할 예정이다.

(4) 시제품의 적용 효율성 검토 및 개선점 탐색

- 표준화를 위해서는 간략한 방법에서의 개선이 요구된다. 동결건조형 제품은 연구자가 사용시에 주형만 넣어주면 되는 간단한 실험과정을 거치기 때문에 시제품은 동결건조형 One-Step Kit 형태로 제작을 진행하였다. 1차 2차로 나누어서 감염률이 높은 5가지 바이러스에 대한 진단 키트를 제작하였다.
- 진단 프라이머 테스트 결과를 바탕으로 비교적 결과가 잘나오는 SPLCV와 SPFMV의 동결건조형 one-step RT-PCR Detection Kit를 1차 시제품으로 제작하였다. 선행 진단 프라이머 테스트에서 선별한 개체중에 20개를 선발하여 시제품에 대한 테스트를 진행하였다.

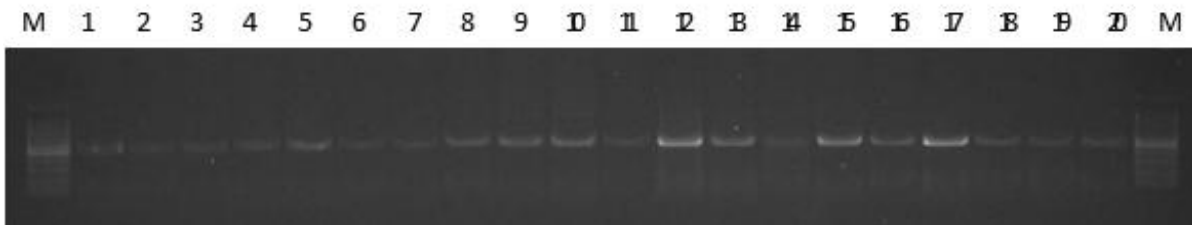


그림 131. 1차 시제품을 이용한 SPLCV 진단 키트 증폭양상. M: 100bp ladder, 1~20: 감염 고구마

- 1차 테스트 결과 SPLCV에서 증폭효율이 낮아진 것을 확인되었다. 간혹 동결건조과정에서 문제점이 발견되기도 하기에 이에 대해 OEM 업체와 협의하여 시제품의 제작 조건을 조정하여 2차로 SPVC, SPV2, SPSMV-1 시제품을 제작하여 재실험을 실시하였다.

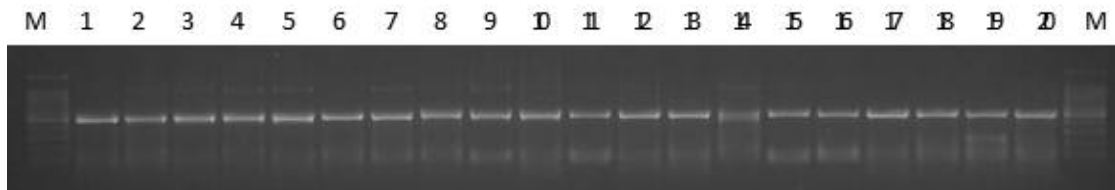


그림 132. 2차 시제품 SPLCV 진단키트 증폭 양상. M: 100bp ladder, 1-20: 감염 고구마

- 2차 시제품 테스트 결과 증폭은 RNA와 비슷한 수준으로 유지되었으나 여전히 몇몇 시료에서 비특이밴드가 나타났다. 이는 프라이머 특성에 기인하거나 고구마 품종에 따른 차이에 기인할 가능성도 존재하는 것으로 판단되었다.
- 예전 과제에서 시제품을 제작하여 분양해본 경험을 토대로 볼 때, 시제품에 대한 결과를 얻기까지는 분양기관의 사정으로 인해 거의 1년 가까이 소요가 되었다. 이런 점을 보완하기 위하여 감염시료를 같이 동봉하거나 RNA를 같이 동봉하여 시제품에 대한 빠른 피드백을 받을 수 있는 기관이나 대학에 시제품에 대한 테스트를 12월~1월 사이에 의뢰할 예정이다.
- 여러 지역의 시료를 테스트하려다 보니 시중에서 구매를 하였고, 이러한 고구마들은 판매되는 제품의 원산지 파악만 겨우 가능할 뿐, 고구마의 품종을 확인하기는 어려웠다. 대부분 밤고구마, 호박고구마 이런 식으로 표기가 되어있었다. 시중에서 완전한 건전고구마를 찾기는 힘들 것으로 예상된다. 조직배양 무균묘를 확보하여 음성 대조구 확보가 필요하다고 판단되었다.
- 동결건조형 키트의 경우에는 액상 믹스와 프라이머를 따로 사용할 때 보다 작업 속도향상이나 여러 가지 프라이머 사용에서 오는 오염문제에서 자유로울 수 있는 장점을 가지고 있으나 비용적인 측면도 고려하여 제품의 다양화나 대량생산 가능에 대한 논의가 필요할 것이라 예상된다.
- 고구마의 즙액이 다른 작물에 비해서 쉽게 굳는 현상으로 인해 타작물과는 다른 주형준비법이 필요하다고 사료된다. 특히 주형 추출에 따른 차이로 인해 진단 키트의 결과에 큰 영향을 줄 수 있기 때문에 키트에 필요한 주형을 준비하는 방법의 표준화가 키트 개발과 병행되는 것이 필요하다. 제품의 구성도 주형을 준비하는 키트와 PCR 반응을 수행할 수 있는 키트를 함께 패키지화해서 사업화하는 것이 더 나은 결과를 얻을 수 있다고 예상된다.

나. 고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 키트 시제품 개발 및 개발된 검증기술을 이용한 현장 적용

(1) 진단 키트 개발용 시료 및 균주 수집 및 유지

- 1차 년도에 수집된 고구마 시료는 고창, 김제, 나주, 논산, 당진, 무안, 여주, 영암, 예산, 익산, 함양, 해남, 화성에서 생산된 총 105개의 시료와 생산지를 알 수 없는 11가지의 시료를 수집하였다(표 39).

표 39. 수집된 고구마 시료 지역별 개수

생산지	개수	생산지	개수
고창	20	영암	6
김제	4	예산	12
나주	2	익산	4
논산	2	함양	10
당진	6	해남	5
무안	26	화성	2
여주	6	-	11
		총합계	116

- 기술이전 받은 프라이머를 이용하여 1차 년도에 고구마 바이러스 8종(Sweet potato leaf curl virus(SPLCV), Sweet potato fethery mottle virus(SPFMV), Sweet potato G virus(SPGV), Sweet potato latent virus(SwPLV), Sweet potato chlorotic fleck virus(SPCFV), Sweet potato virus 2(SPV2), Sweet potato virus C(SPVC), Sweet potato symptomless virus 1(SPSMV-1))에 대하여 수집된 고구마 80개체의 바이러스 감염 여부를 확인하였다. 테스트 결과 SPLCV 48개, SPFMV 36개, SPGV 26개, SwPLV 3개, SPCFV 16개, SPVC 33개, SPV2 39개, SPMV-1 77개가 검정 되었다. 4종 이상의 바이러스에 복합 감염된 경우는 38개체였다(표 40).

표 40. 고구마 시료 80종의 바이러스별 테스트 결과.

생산지역	바이러스명							
	SPLCV	SPFMV	SPGV	SwPLV	SPCFV	SPV2	SPVC	SPSMV-1
고창	9	10	4	0	6	2	11	17
김제	1	0	1	0	0	1	0	2
논산	2	0	0	0	0	1	0	2
무안	19	15	6	0	2	18	10	18
여주	3	0	0	0	1	0	2	4
영암	1	1	5	3	0	0	0	5
예산	4	5	4	0	2	7	5	8
익산	1	0	2	0	0	0	0	2
함양	7	2	0	0	5	7	5	10
해남	0	1	0	0	0	1	0	4
원산지 불명	1	2	4	0	0	2	0	5
총합계	48	36	26	3	16	39	33	77

- 고구마 시료 80개의 바이러스 진단 결과 2종 복합감염 19개체, 3종 복합감염 20개체, 4종 복합감염 18개체, 5종 복합감염 15개체, 6종 복합감염 5개체로 진단되었다. 추후 진단 키트 제작 조건실험에 사용하기 위해, 23개체를 선발하여 김제 늘봄농원에 개체 증식을 의뢰하였다(그림 133).



그림 133. 검정 완료된 시료 중의 일부 외부 포장에 증식(A), 수확한 고구마 시료(B)

- 진단 키트 조건실험에 필요한 8종의 바이러스에 감염된 고구마의 줄기를 시료로 확보하였고, 재검정 후 여분의 시료는 밀폐 봉지에 넣어 -20℃에 냉동 보관하였다(그림 134).



그림 134. 김제 늘봄농원 포장에서 수확한 시료와 유지용 화분

(2) 1차년 개발 시제품 성능 개선 및 제품화

- 고구마 바이러스 진단 키트 7종 (SPFMV, SPGV, SwPLV, SPCFV, SPVC, SPV2, SPSMV-1)의 시제품을 제작하였다. 이 시제품의 성능 테스트 및 개선점 파악을 위하여 협동 기관인 서울시립대 식물유전공학 실험실과 경북대학교 식물바이러스 실험실에 분양하였다(그림 135).



그림 135. 1차 년도에 개발한 시제품 제품 내부 구성.

- 개발된 시제품의 성능 개선과 다중 진단용 세부조건 확립을 위하여 바이러스 별 프라이머 농도에 따른 증폭 양상을 조사하였다(그림 136).

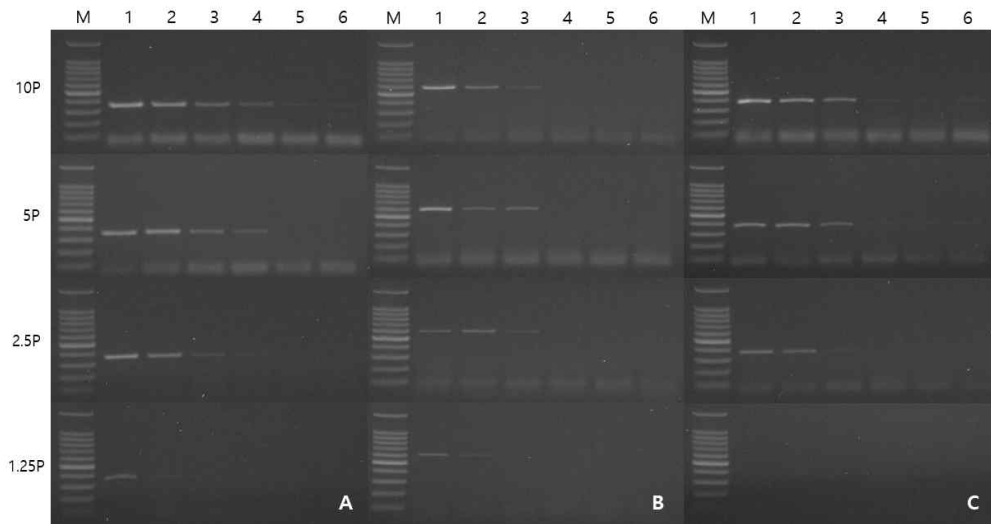


그림 136. 바이러스 별 프라이머 농도에 따른 증폭 양상 결과 중 일부. A: SPFMV, B: SPCFV, C: SPV2, M: 100bp ladder, 1~6: RNA 5배씩 연속 희석. 1.25~10P: 프라이머 농도 (P: pmol/ul)

- 프라이머 농도에 따른 증폭 양상을 비교해 본 결과 대부분의 진단 프라이머가 5pmol/ul 의 농도에서 가장 적합한 것으로 확인되었다. 이후 키트 개선이나 다중 진단용 키트의 조건실험에서 프라이머의 농도를 5pmol/ul로 고정하여 실험을 수행하였다.

(3) 추가 병원균 진단용 키트 시제품의 제작 조건 확립

- 기술이전 받은 2가지의 4종 멀티 조합을 이용하여 선행 실험한 결과 프라이머 간의 경합 현상이 확인되었다(자료 미제출). 이러한 문제점을 해결하고자 바이러스 진단 프라이머 간의 경합 효과를 보기 위한 실험을 수행하였다.
- 8종의 바이러스 중 SPSMV-1를 제외한 7종(SPLCV, SPFMV, SPGV, SwPLV, SPCFV, SPVC, SPV2)에서 2종 멀티가 가능한 21가지 조합의 프라이머 간의 경합 여부를 살펴보았다.
- 8종 모두에 감염된 시료는 없었기 때문에 증폭에 필요한 주형 준비는 7종의 바이러스가 걸린 개체 4가지의 전체 RNA를 혼합하여 준비하였다. RT-PCR 반응액은 각각의 진단용 프라이머 5pmol/ul, RNA 1ul, RT-PCR 2X master mix 10ul 에 D.W를 첨가하여 총 20ul 혼합액으로 반응을 진행하였다. PCR 반응조건은 [48도 5분, 95도 10분, (95도 20초, 60도 20초, 72도 30초 35회 반복), 72도 5분]으로 수행하였다. RNA 혼합액은 연속으로 5배씩 희석하여 프라이머 간의 경합이 일어나는지 확인하였다(그림 137).

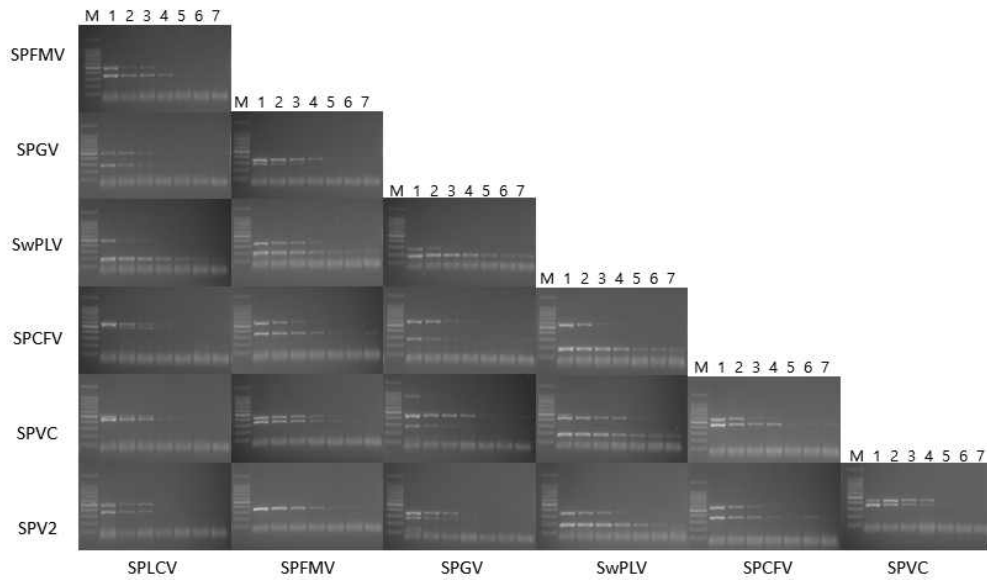


그림 137. 21가지의 2중 멀티 조합의 바이러스 진단 프라이머 간 증폭 양상 비교. M: 100bp ladder, 1-6: RNA 혼합액 5배씩 연속 희석.

- 2중 멀티 조합 경합 비교 결과 SPLCV + SPV2, SPGV + SwPLV, SPGV + SPCFV, SPGV + SPVC, SPGV + SPV2 가 포함되는 조합에서 프라이머 사이에 경합 현상이 일어나거나 증폭 산물의 크기가 비슷하여 멀티 조합으로 적합하지 않다고 판단 되었다. 3중 멀티 가능한 총 56개의 조합 중에서 위의 경우가 포함되는 조합을 제외한, 3중 멀티 14가지 조합의 테스트를 수행하였다(표 41).

표 41. 경합 프라이머를 제외한 14가지의 3중 다중 진단 조합

No	1st	2nd	3rd	No	1st	2nd	3rd
1	SPLCV	SPFMV	SPGV	8	SPFMV	SwPLV	SPCFV
2	SPLCV	SPFMV	SwPLV	9	SPFMV	SwPLV	SPVC
3	SPLCV	SPFMV	SPCFV	10	SPFMV	SPCFV	SPVC
4	SPLCV	SPFMV	SPVC	11	SwPLV	SPCFV	SPVC
5	SPLCV	SwPLV	SPCFV	12	SwPLV	SPCFV	SPV2
6	SPLCV	SwPLV	SPVC	13	SwPLV	SPVC	SPV2
7	SPLCV	SPCFV	SPVC	14	SPCFV	SPVC	SPV2

- 선발된 14개의 조합 결과 8번부터 14번까지의 7가지 Triplex 멀티 조합의 제품화가 가능함을 확인하였다(그림 138). 이 7가지 조합의 3중 다중 진단 키트의 시제품을 제작하였다.

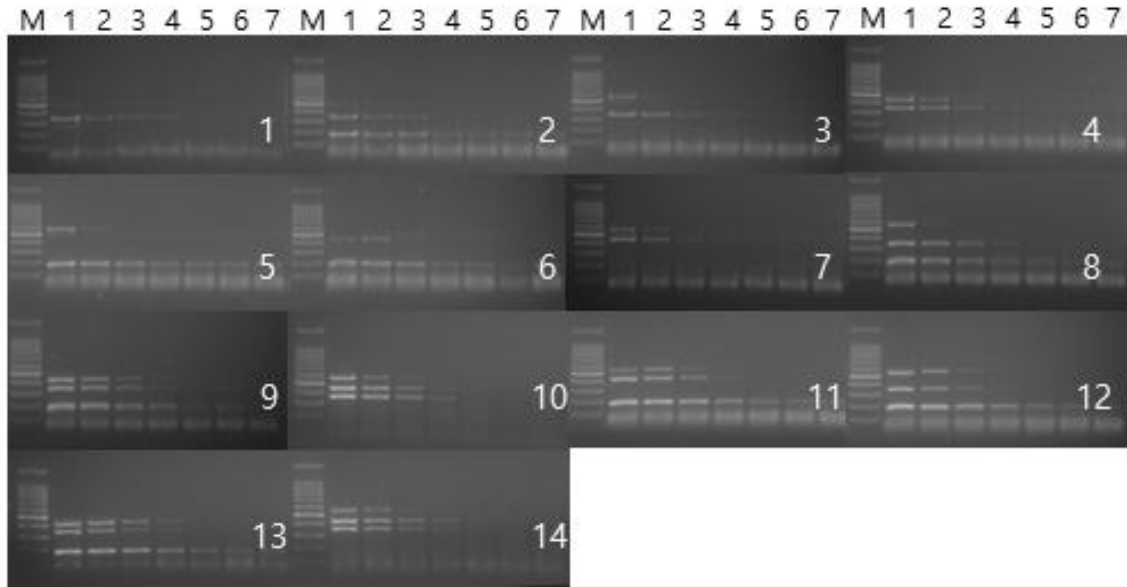


그림 138. 선발된 3종 멀티 14가지 조합의 증폭 양상 비교. M: 100bp ladder, 1~7: RNA 혼합액 5배씩 연속 희석.

- 3종 멀티 조합에 경합이 일어나지 않는 바이러스 프라이머 한 가지를 추가하여 4종 멀티 조합의 경합 여부를 조사하여 증폭 양상을 확인하였다. 두 가지의 4종 다중 진단 조합(A: SPCFV + SPVC + SPFMV + SwPLV, B: SPCFV + SPVC + SPV2 + SwPLV)에 대하여 바이러스 주형의 농도에 따른 증폭 양상 테스트를 수행하였다(그림 139).

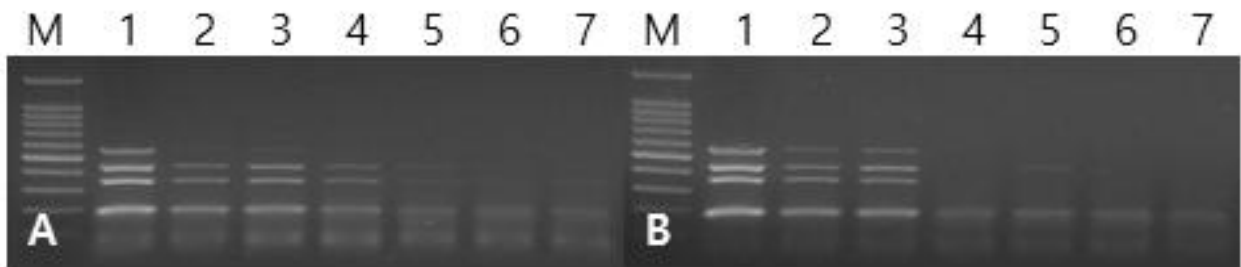


그림 139. 주형 농도에 따른 4종 멀티 조합(A, B) 증폭 양상. M: 100bp ladder, 1~7: RNA 혼합액 5배씩 연속 희석.

- 위의 실험결과를 토대로 하여 3종 멀티 조합 7가지, 4종 멀티 조합 2가지의 시제품을 제작하였다(그림 140). 시제품을 사용하여 시중 일반묘와 조직배양묘를 대상으로 검사를 수행하였다.



그림 140. 3종 다중 진단 키트 시제품 제품 박스 및 내부 포장.

(4) 키트 시제품을 이용한 고구마 바이러스 세부 진단 조건 확립 및 현장 활용성 자체 평가

- 무균묘가 아닌 시중에 유통 중인 일반 고구마 묘의 바이러스 감염 정도를 알아보기 위하여, 시중 종묘상에서 일반 고구마 묘(베니하루카, 호박고구마) 200개를 구매하였다. 바이러스 진단 키트 시제품의 활용성을 테스트하기 위해 일부 개체를 뽑아서 8종 바이러스에 대한 검사를 진행하였다.
- SPSMV-1가 100% 검출되었고, 그다음으로 SPLCV, SPVC, SPFMV, SPV2 순으로 검정 되었다. 감염비율이 적은 바이러스도 있었으나, 묘 대부분은 2개 이상의 바이러스에 감염되어있고 많게는 6종 이상의 바이러스에 감염된 개체도 있는 것으로 파악되었다(그림 2-140).

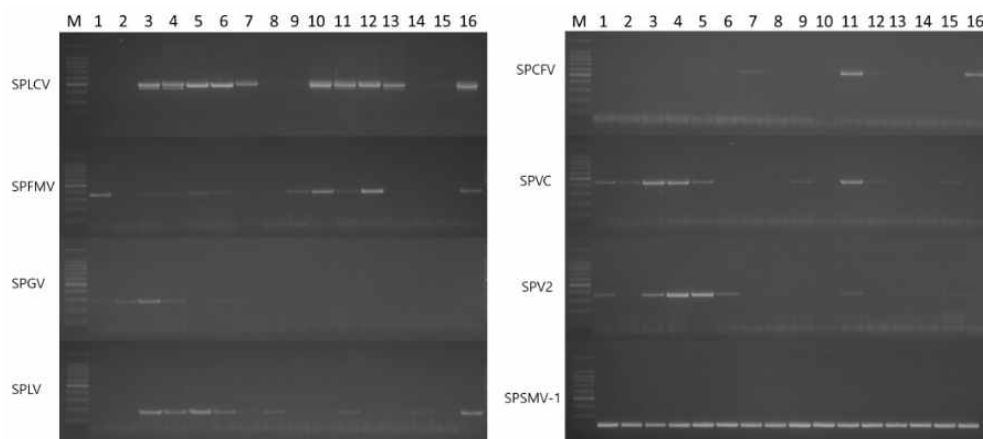


그림 141. 8종의 바이러스 진단 키트 시제품을 이용한 시중에서 구매한 일반 고구마 묘 진단 결과 일부.

- 주관기관인 서울시립대학교와 협동 기관인 경북대학교와 함께 전라북도 고창의 서울시립대학교 실험 포장에서 여러 가지 품종의 고구마 시료를 공동채집하였다. 이 중에서 우리나라에서 주로 재배되는 20품종의 시료에 대한 검사를 진행하였다(표 42).

표 42. 서울시립대학교 실험 포장 주요 20품종 시료 목록

No.	품종	지역	No.	품종	지역
1	베니마시리	익산	11	연자미	RDA
2	맛젤	정읍	12	풍원미	RDA
3	호박고구마	강화	13	신건미	RDA
4	백고구마	웅진	14	단자미	RDA
5	베니하루카	논산	15	신자미	RDA
6	스시오우	2013실험실	16	주황미	RDA
7	안노베니	2013실험실	17	호감미	RDA
8	황금	고창	18	진올미	RDA
9	베니사쯔마	고창	19	kokei 14	일본
10	올미	RDA	20	실크스윗	일본

- 고창 실험 포장으로부터 채집한 20품종의 고구마 줄기 시료를 사용하여 각각 2종(A), 4종(B) 다중 진단 검사를 다중 진단 키트 시제품을 사용하여 검사하였다. 그 결과 4종(B)의 경우 SwPLV에 희미한 밴드가 보이기에 단종으로 재검정을 시행하였다(C). SPGV(D), SPV2(E)는 각각 단종으로 검사를 진행하였다(그림 25). SPLCV 증폭양상(A)을 보면 신건미(13), 호감미(17), kokei 14(19)의 품종에서 비특이 밴드가 나타나는 것을 확인하였다. RNA 바이러스 4종 다중 진단에서도 베니사쯔마(9)에서 증폭 크기와 유사한 크기의 밴드가 관찰되었으나 단종 테스트 결과에서는 증폭이 일어나지 않았다. 이것 또한 품종에 의한 비특이 밴드가 증폭된 것으로 판단되었다(그림 142).

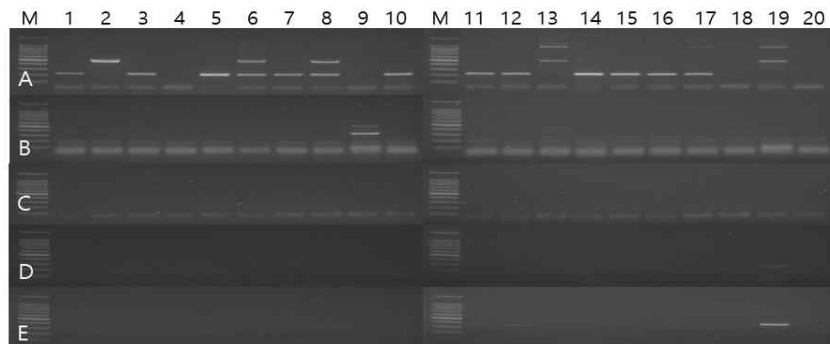


그림 142. 주요 20품종의 바이러스 진단 프라이머 증폭 양상. M: 100 bp marker, 1-20: 20개의 주요 품종, A: SPLCV (506 bp), SPSMV-1 (203 bp), B: SPCFV (579 bp), SPVC (447 bp), SPFMV (355 bp), SwPLV (183 bp), C: SwPLV (183 bp), D: SPGV (285 bp), E: SPV2 (369 bp).

- 배양묘를 검사한 결과 SPSMV-1는 약 65% 정도가 감염되었고 이는 시판 중인 일반 고구마 묘 100% 비해 낮은 수치를 나타내었다. 나머지 바이러스에 감염된 비율은 일반 고구마 묘의 감염 상태와 비교해 보았을 때 현저히 낮음을 알 수 있었다. 특히 백고구마(4)의 경우에는 8종의 바이러스에 감염이 안 되어있는 것을 확인할 수 있었다.

다. 개발된 검증기술을 이용한 현장 적용 및 고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 키트 사업화

(1) 진단용 시료수집 및 진단 키트 테스트

- 전년도에 개발된 키트 조건을 사용하여 기존에 수집한 고구마 시료와 3차년도에 새로운 시료를 일반 농자재마트에 판매중인 고구마 순을 구매하여 그중에 베니하루카 40점, 호박고구마 40점을 구입하여 기존에 조건이 확립된 시제품을 사용하여 테스트 하였다.
- 현장 적용성 테스트를 위하여 3차년도에 새로운 고구마순 베니하루카, 호박고구마 2가지 품종을 100개체씩 구입후 각각 40점씩 80점의 시판중인 일반묘에 대한 검사를 DNA 바이러스 2종 진단키트(그림 143), RNA 바이러스 4종 진단키트를 사용하여 실험을 실시하였다(그림 144).
- SPGV, SPV2 2종의 바이러스는 각각 단종으로 검정을 수행하였다. 배양묘가 아닌 일반묘 80점 검정 결과는 다음과 같다.

바이러스	SPLCV	SPFMV	SPGV	SwPLV	SPCFV	SPVC	SPV2	SPSMV-1
감염	80	66	13	2	13	57	38	80

- SPLCV, SPSMV-1의 경우에는 검사한 시료 전체에서 검출이 되었고, SPFMV, SPVC, SPV2 바이러스 경우에는 반이상이 감염되어있었다. 베니하루카, 호박고구마 2가지 품종의 감염정도는 호박고구마가 4가지 이상의 바이러스에 감염되어 있는 것이 40개중 31개로 베니하루카 품종의 경우(13개) 보다 2배이상 많았다. 전반적으로 배양묘가 아닌 시판중이 일반 고구마 순의 바이러스 감염상태가 심각함을 알 수 있었다.

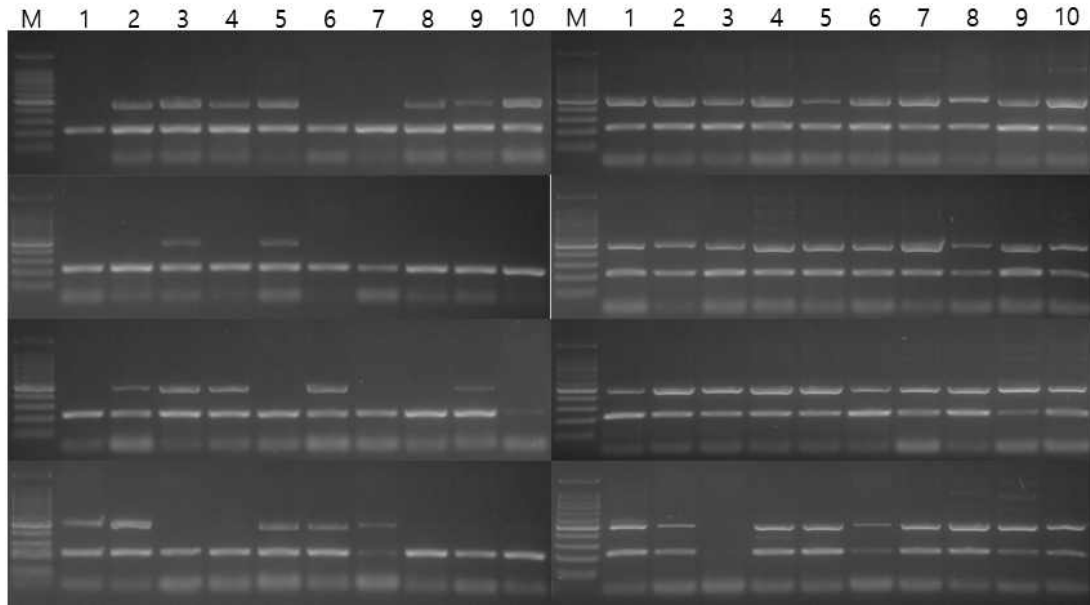


그림 143. 바이오큐브를 활용한 DNA 바이러스 SPLCV, SPSMV-1 증폭 결과

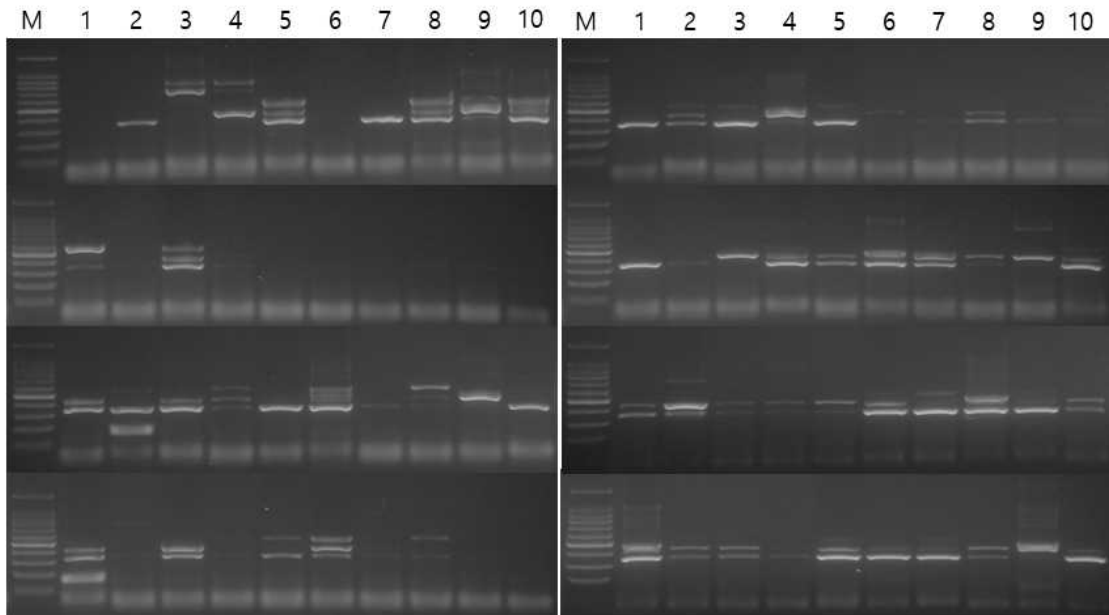


그림 144. 4종 다중 진단 결과(SPCFV, SPVC, SPFMV, SPLV)

- 시중에서 구할 수 있는 고구마 품종은 베니하루카와 호박고구마라고 불리는 품종이 대부분 이었다. 진단 키트 평가 및 성능 향상을 위하여 다양한 품종에 대한 테스트를 진행하였다. 무안 바이오에너지 작물연구소로부터 복합 감염된 고구마 시료(신자미, 울미, 진홍미 등)을 분양 받아 다중 진단 키트 테스트를 수행하였다(그림 145).

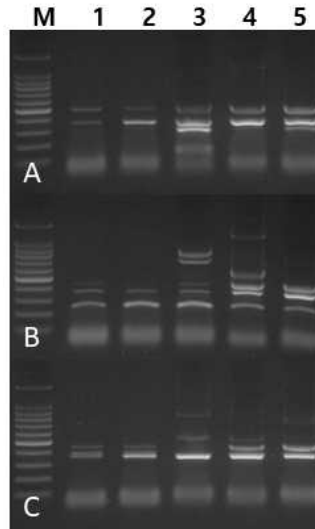


그림 145. 복합감염 고구마 시료의 멀티 진단 테스트 결과. A: SPLCV/SPFMV/SPGV/SPLV 조합, B: SPCFV/SPVC/SPV2/SPSMV-1 조합, C: SPCFV/SPVC/SPFMV/SPLV 조합

- 멀티진단키트의 결과를 확인하기 위하여, 각각의 바이러스에 대한 단종 진단을 수행하였다. 그 결과 울미(4), 진흥미(5)에서 SPVC, SPGV가 감염되어 있는 품종과 개체에서 비특이 밴드 양상이 나타나는 것을 확인하였다.

(2) 진단 키트 개선점 보완 및 향상

- 협동과제기관인 경북대학교 이수현 교수님 으로부터 기존 8종에 대한 향상된 프라이머 정보를 제공받아 기존 진단 키트 조건 실험을 수행하였다.
- 기존의 결과를 보면 품종에 따라 SPVC에서 비특이 밴드가 종종 관찰되는 것을 확인하였다. 고구마 순 일부와 울미, 진흥미의 경우에 SPVC 진단 반응에서 생기는 비특이 밴드가 기존의 다른 산물과 크기가 같아 결과해석에 영향을 미치는 것이 확인되었다. 협동과제기관인 경북대학교로 부터 제공받은 프라이머를 활용하여 우선 SPVC, SPGV, SPV2에 대한 실험을 수행하였다(그림 146).

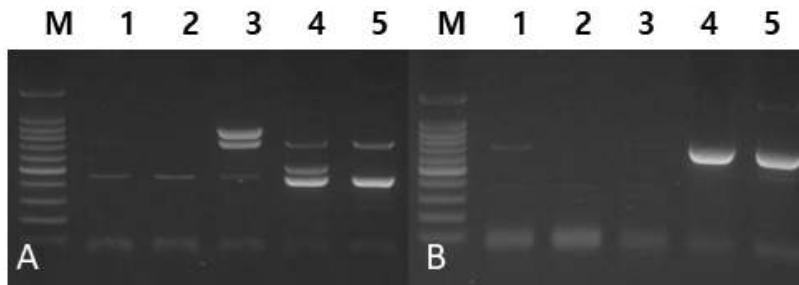


그림 146. 프라이머별 SPVC 증폭 양상 비교. A: 기존 프라이머, B: 새로운 프라이머, 1~5: 고구마 품종별 시료

- 기존 프라이머를 사용하면 품종별로 비특이 밴드가 생긴 것이 관찰되었는데, 새로운 프라이머에서는 기존에 비하여 비특이 밴드가 줄어든 것을 확인하였다.

- 다중 진단키트에서도 사용가능한지를 판별하기위해서, 이전 수행하였던 실험에서 SPVC, SPV2, SPGV 3가지의 프라이머를 교체하여 이전 다중 진단 조합과 비교 실험을 수행하였다(그림 147).
- 그 결과 SPVC, SPV2가 들어간 다중 진단 조합에서는 협동과제에서 제공받은 프라이머로 교체하여 이전 보다 향상된 결과를 얻을 수 있었다. 이후 고구마 바이러스 멀티 진단 키트 제작에 사용하였다. SPGV의 경우에는 다소 비특이 밴드양상이 감소하였으나, 유의할 만큼의 향상된 결과를 얻지는 못하였다.

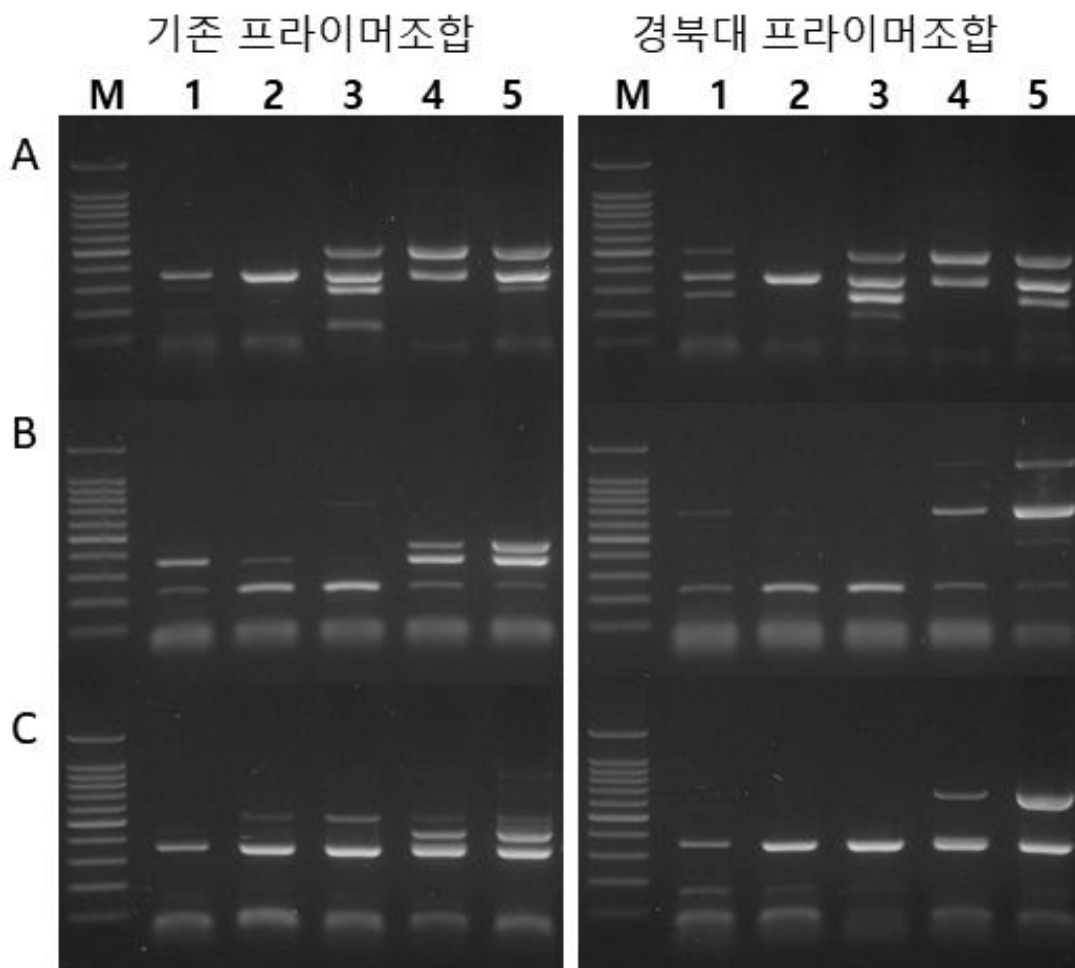


그림 147. 기존 프라이머 조합과 새로운 프라이머 조합의 멀티 증폭양상 비교. A: SPLCV, SPFMV, SPGV, SPLV, B: SPCFV, SPVC, SPV2, SPSMV-1, C: SPCFV, SPVC, SPFMV, SPSMV-1

(3) 새로운 고구마 병 진단 키트 개발

① 바이러스 진단 키트

- 기존에 국내에 보고된 바이러스는 8종이며 그 종류에는 Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), Sweet potato virus G (SPVG), Sweet potato latent virus (SwPLV), Sweet potato leaf curl virus (SPLCV), Sweet potato virus 2 (SPV2), Sweet potato virus C (SPVC), Sweet potato symptomless virus 1 (SPSMV-1), Sweet potato chlorotic fleck virus (SPCFV)가 있다(표 43).

표 43. 고구마 감염 주요바이러스 17종

No	Virus name	Genus	Abb.
1	Sweet potato feathery mottle virus	Potyvirus	SPFMV
2	Sweet potato virus G	Potyvirus	SPVG
3	Sweet potato latent virus	Potyvirus	SwPLV
4	Sweet potato leaf curl virus	Begomovirus (Geminiviridae)	SPLCV
5	Sweet potato mild speckling virus	Potyvirus	SPMSV
6	Sweet potato mild mottle virus	Ipomovirus (Potyviridae)	SPMMV
7	Sweet potato chlorotic stunt virus	Crinivirus (Closteriviridae)	SPCSV
8	Sweet potato collusive virus	Cavemovirus (Caulimoviridae)	SPCV
9	Sweet potato virus 2	Potyvirus	SPV2
10	Sweet potato virus C	Potyvirus	SPVC
11	Sweet potato symptomless virus 1	Mastrevirus (Geminiviridae)	SPSMV-1
12	Sweet potato chlorotic fleck virus	Carlavirus (Betaflexiviridae)	SPCFV
13	Sweet potato vein clearing virus	Solendovirus (Caulimoviridae)	SPVCV
14	Sweet potato pakakuy virus	Badnavirus (Caulimoviridae)	SPPV
15	Sweet potato C6 virus	Carlavirus	SPC6V
16	Sweet potato leaf speckling virus	Luteoviridae (unassigned)	SPLSV
17	Cucumber mosaic virus	Cucumovirus	CMV

- 협동과제를 수행중인 경북대학교 이수현 교수님으로부터 미보고된 바이러스 Sweet potato mild speckling virus(SPMSV), Sweet potato mild mottle virus(SPMMV), Sweet potato chlorotic stunt virus(SPCSV), Sweet potato collusive virus(SPCV), Sweet potato vein clearing virus(SPVCV), Sweet potato pakakuy virus(SPPV), Sweet potato C6 virus(SPC6V), Sweet potato leaf speckling virus(SPLSV) 8종에 대한 프라이머 정보를 공유받고 기존에 수집하였던 고구마 시료 180점에 대한 검사를 수행하였다.
- 경북대의 시료 실험 결과에서 국내 미보고된 바이러스 SPCSV와 SPCV의 두가지 바이러스가 새로 검출되었다는 정보를 제공받았다. 바이오큐브시스템에서도 보유중인 고구마 시료 180점을 경북대학교에서 제공받은 방법으로 total RNA를 10 개씩 풀링하여 총 18점에 대하여 새로운 바이러스 진단 프라이머 8종을 사용하여 실험을 진행하였다. 진단결과 바이오큐브시스템에서 보유중인 시료에서는 SPCSV와 SPCV는 검출되지 않았다(자료미제출). 그러나 SPPV라는 새로운 바이러스가 검출되었다(그림 148).

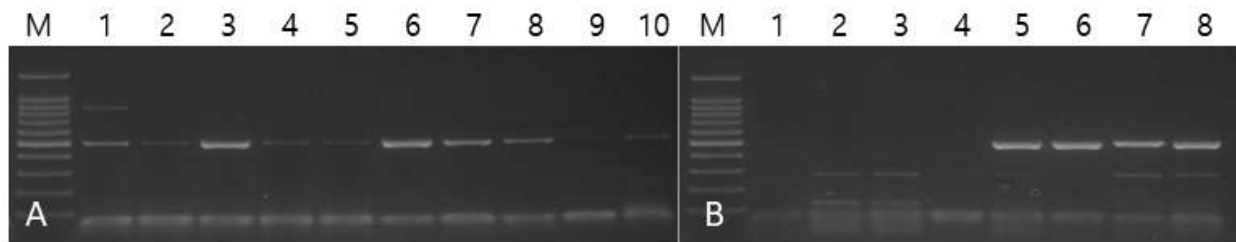


그림 148. SPPV 검정 결과. A: 1~2차년도 시료, B: 3차년도 시료

- 결과를 재확인하기 위하여 국립농업과학원 바이러스실에서 제공받은 SPPV 검출 프라이머와 경북대학교로 부터 제공받은 프라이머를 두가지를 모두 사용하여 기존 보유시료에 대한 실험을 수행하였다(그림 149).
-

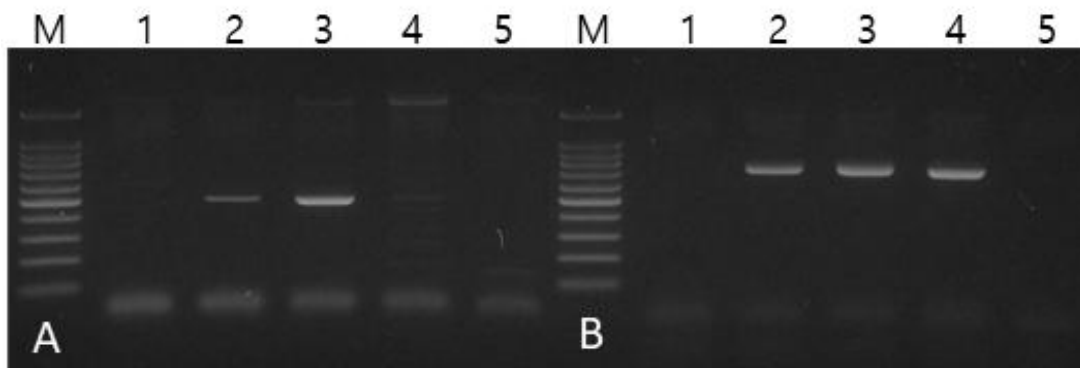


그림 149. SPPV 프라이머별 증폭양상 비교 A: 경북대 제공 프라이머, B: 농과원 제공 프라이머

- 새로운 바이러스의 감염 정도를 조사하기 위하여 160점의 개체에 대한 개별 진단을 국립농업과학원 바이러스실에서 제공받은 프라이머로 검정을 진행하였다. 그 중 일부의 SPPV 증폭 양상 결과를 보면 다음과 같다(그림 150).

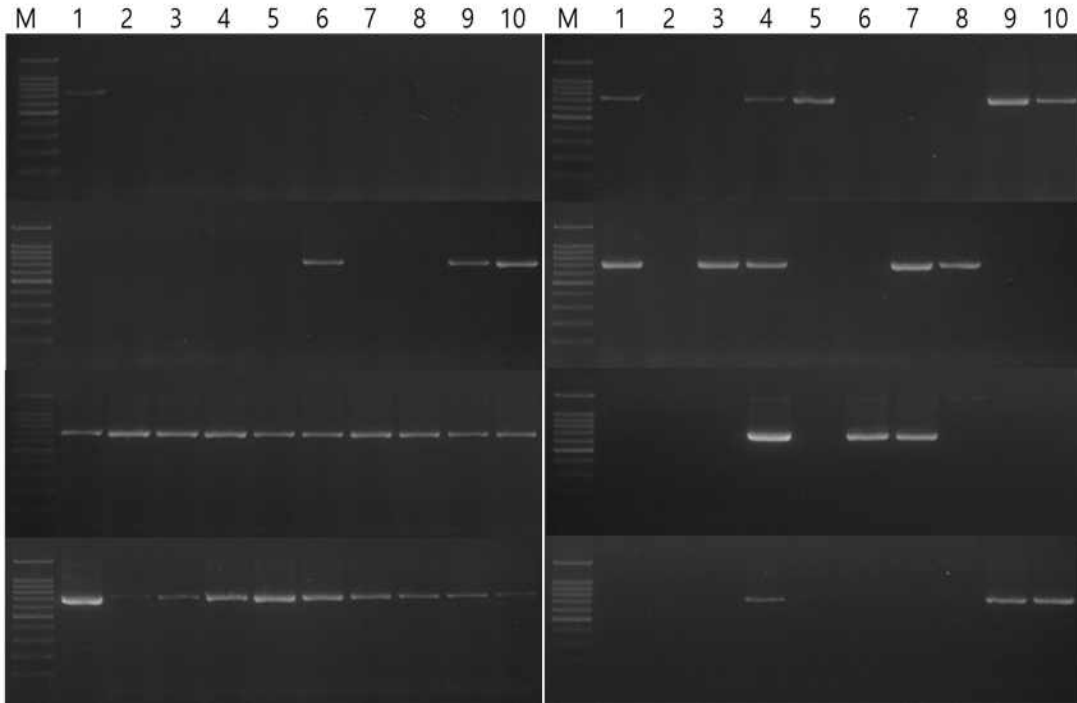


그림 150. 1차년도 보관시료에 대한 SPPV 검정 결과

- 과제 수행중에 수집한 고구마 시료에 대한 테스트 결과 160점중에 78개체에서 SPPV가 검출되었다. 특히 3차년도에 수집한 호박고구마 품종 40개체에서는 100% SPPV가 검출되었다.
- 결과에 대한 확인을 위하여 PCR 산물에 대한 염기서열 분석을 마크로젠에 의뢰 하였다(그림 151).

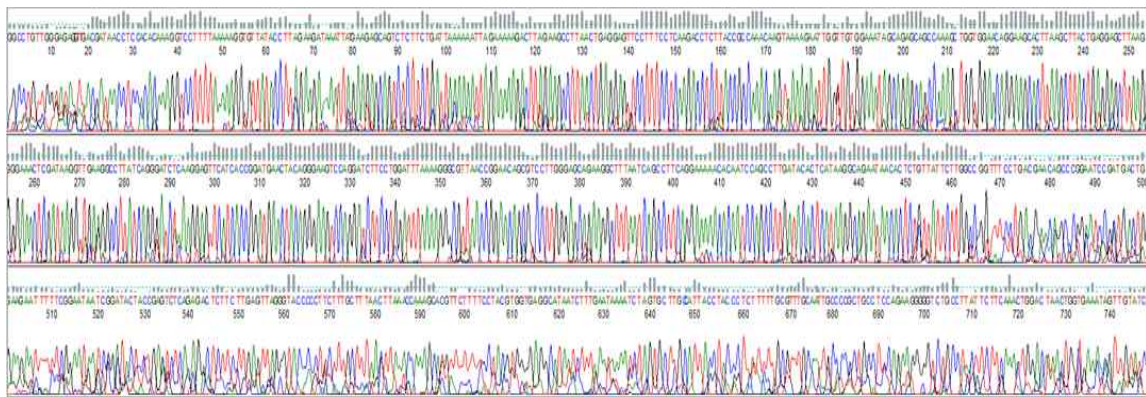


그림 151. 염기서열 분석 결과

- 염기서열 분석 결과 NCBI 검색결과 Sweet potato pakakuy virus(SPPV)와 100% 일치 하는 것을 확인하였다(그림 152).

Sequences producing significant alignments						
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Sweet potato pakakuy virus complete genome	785	785	100%	0.0	98.65%	FJ560943.2
<input checked="" type="checkbox"/> Sweet potato badnavirus B isolate Hunan-184 complete genome	521	521	99%	8e-144	88.01%	MK052981.1
<input checked="" type="checkbox"/> Sweet potato badnavirus B isolate Hunan-24 complete genome	494	494	99%	2e-135	86.88%	MK052980.1
<input checked="" type="checkbox"/> Sweetpotato badnavirus B complete genome	429	429	94%	5e-116	85.20%	FJ560944.1

Download GenBank Graphics Next Previous Descriptions

Sweet potato pakakuy virus, complete genome

Sequence ID: [FJ560943.2](#) Length: 8082 Number of Matches: 1

Range 1: 793 to 1235 GenBank Graphics

Next Match Previous Match

Related Information

[Gene](#) - associated gene details

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
785 bits(425)	0.0	438/444(99%)	1/444(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACGATAACCTCCACACAAAGGTCTTTAAAAAGGTGTTATACCTTAGAAGATAAATAT	60		
Sbjct 793	ACAATAACCTCCACACAAAGGTCTTTAAAAAGGTGTTATACCTTAGAAGAAAAATTA-	851		
Query 61	GAAGAGCAGTCTCTCTGATTAATAAATTAGAAAAAGCCTTAGAAGCCTTAAGTGGAG	120		
Sbjct 852	GAAGAGCAGTCTCTCTGATTAATAAATTAGAAAAAGCCTTAGAAGCCTTAAGTGGAG	911		
Query 121	TTCTTTCTCAAGACCTCTTACCGCCAAACAAGTAAAAAATTGGTTGTGAAATAGCA	180		
Sbjct 912	TTCTTTCTCAAGACCTCTTACCGCCAAACAAGTAAAAAATTGGTTGTGAAATAGCA	971		
Query 181	GAGCAGCCAAAGTGGTGGAAACAGGAAGCCTTAAGCTTACTGAGGAGCTTAAGGGGAAA	240		
Sbjct 972	GAGCAGCCAAAGTGGTGGAAACAGGAAGCCTTAAGCTTACTGAGGAGCTTAAGGGGAAA	1031		
Query 241	CTCGATAAGGTTGAAGGCCTTATCAGGGATCTCAAGGAGTTCATCACCGGATGAACCTACA	300		
Sbjct 1032	CTCGATAAGGTTGAAGGCCTTATCAGGGATCTCAAGGAGTTCATCACCGGATGAACCTACA	1091		
Query 301	GGGAAGTCCAGGATCTCTGGATTTAAAAAGGGCGTTAACCGGAAACAGCGTCTTGGGAG	360		
Sbjct 1092	GGGAAGTCCAGGATCTCTGGATTTAAAAAGGGCGTTAACCGGAAACAGCGTCTTGGGAG	1151		
Query 361	CAGAAAGGCTTTAATCAGCCTTCAGGAAAAACACAATCCAGCCTTGATACACTATAAGGC	420		
Sbjct 1152	CAGAAAGGCTTTAATCAGCCTTCAGGAAAAACACAATCCAGCCTTGATACACTATAAGGC	1211		
Query 421	AGAATAACACTCTGTATTCTTGG	444		
Sbjct 1212	AGAATAACACTCTGTATTCTTGG	1235		

그림 152. NCBI 염기서열 Blast 검색 결과

- SPPV가 3차년도에 수집된 시료뿐만 아니라 이전에 수집하였던 시료에서도 검정되었다. 실험에 쓰인 시료중에 50% 가까이 검출되었으므로, 앞으로 SPPV에 대한 진단도 같이 수행되어야 할것으로 사료된다. 특히 시중에 호박고구마라고 유통되는 품종에서는 수집한 시료에서는 100% 검출이 되었다. 본과제에서는 감염율이 실제 생산량에 미치는 영향까지는 밝히지 못했지만, 배양묘 혹은 건전묘에 비해서 실제 수확량에 커다란 영향을 줄 것이라 예상되어 진다.

②곰팡이 DNA 추출방법 개선 및 곰팡이 병 진단 키트 개발

- 곰팡이 동정을 하기 위해서는 DNA 추출후에 Internal transcribed spacer(ITS) PCR을 수행한다. 이에 필요한 주형 준비과정을 쉽고 빠르게 하면 곰팡이병 진단에 대한 비용과 시간을 절약할 수 있다.
- 바이오큐브를 활용한 기존의 곰팡이 DNA 주형 준비법은 PDA 배지등에서 배양된 균사를 가지고 균사의 일부분을 떼어내어 마쇄액을 사용하여 갈아준후, 그 마쇄액을 바이오큐브에 떨어뜨려서 PCR 반응에 이용하였다(그림 153).

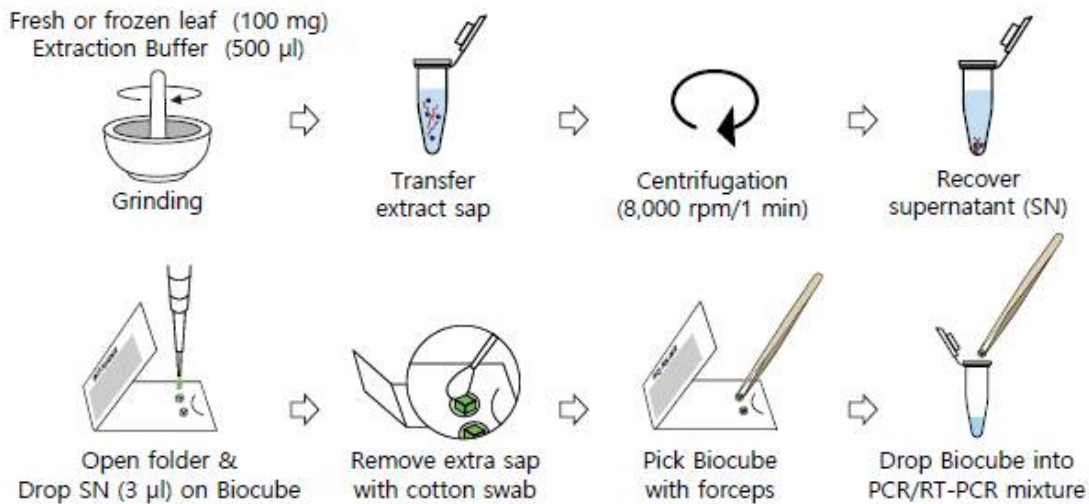


그림 2-153 마쇄액을 이용한 바이오큐브 활용 매뉴얼

- DNA 추출과정이 기존의 키트사용이나 매뉴얼방법에 비하여 무척간단하나, 이를 좀더 개선하고자 다양한 방법을 모색하였다. 고체배지에 직접 활용하기에는 바이오큐브를 고체 배지에 접촉시켜 시료를 채취하기 어렵고, 일관된 시료추출이 수행되지 않는 단점을 가지고 있었다.
- 이러한 단점을 극복하고, 좀 더 빠르고 간단하게 바이오큐브(Biocube)에 균사체를 접촉시킬 방법을 고민하였다. 여러가지 시도 중에 마쇄액을 면봉에 적셔서 균사체를 바이오큐브위에 옮기는 방법을 테스트하였다. 그 결과 비교적 일정한 결과를 얻을수 있는것을 확인하였고, 좀더 세부 조건을 잡기위해 면봉을 바이오큐브에 묻히는 방법(자료미제출), 마쇄액(EB) 사용 유무를 비교하여 보았다. 마쇄액을 사용하지 않을때도, 일정한 결과를 보이는것을 알 수 있었다. 위의 조건들을 정리하여 아래와 같은 곰팡이 시료 추출 조건을 확립하였다.(그림 154)
- 곰팡이 DNA 추출 테스트를 위한 곰팡이는 동아대학교 이정관교수님께 분양 받아 실험에 사용하였다.

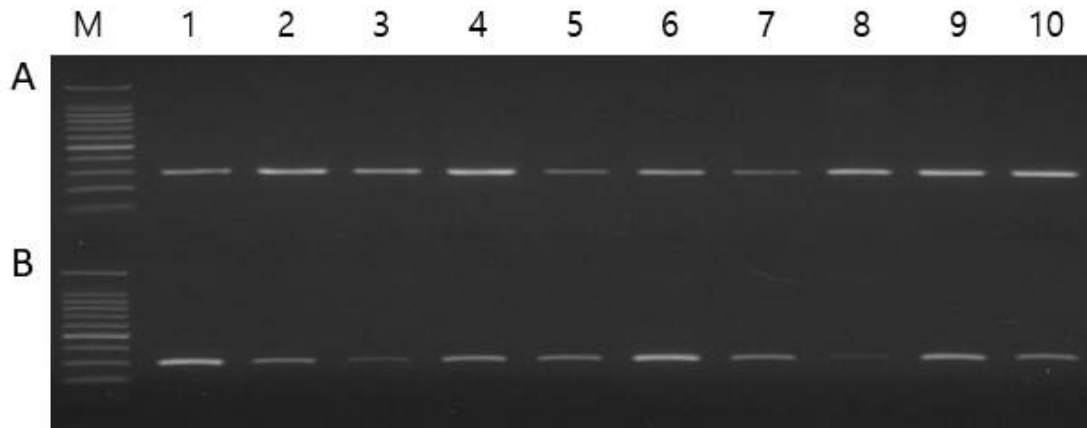


그림 154. 마쇄액 사용에 유무에 따른 곰팡이 DNA 증폭 양상. A: EB 사용안함, B: EB 사용

- 바이오큐브를 활용한 곰팡이 추출방법

1. 곰팡이 배지 또는 균사 부분을 면봉으로 긁어준다.
2. Biocube에 5 초간 눌러준다.
3. 수초 후 면봉의 반대편으로 Biocube 주변의 여액이나 이물질을 제거한다.
4. Biocube를 PCR 반응액(mixture + primer 등)에 넣고 PCR 을 진행한다.



그림 155. 곰팡이 추출에 면봉을 사용한 바이오큐브 적용방법

- 협동과제인 고려대학교 김범석교수님 실험실로부터 고구마 병원성 곰팡이 균주 (*Fusarium oxysporium*)를 분양받고, 병원성 곰팡이만을 선택적으로 진단할 수 있는 특이 프라이머 정보를 제공받았다. 위에서 확립한 곰팡이 추출방법을 이용하여 고구마 병원성 곰팡이에 대한 실험을 진행하였다(그림 155).

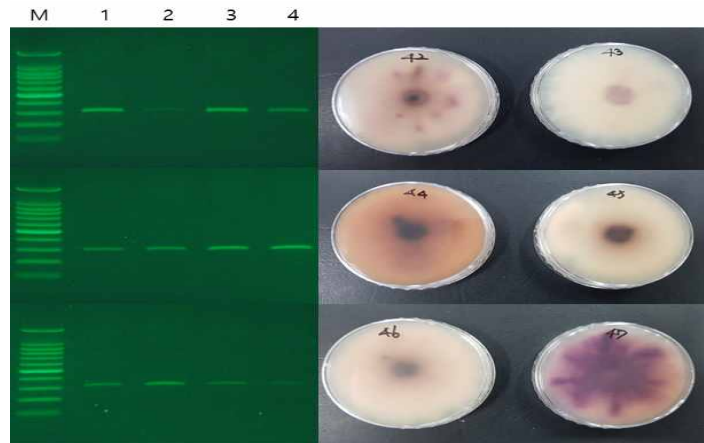


그림 156. 바이오큐브를 활용한 병원성 곰팡이 특이 진단 프라이머 결과.

- 협동과제(고려대학교)로부터 제공받은 프라이머를 이용하여 곰팡이 진단 키트 제작하였고, 여기에 향상된 곰팡이 주형 준비법을 포함하여, 고구마 곰팡이 진단 패키지를 제작하였다.

(4) 매뉴얼 제작 및 제품의 홍보

- 개발된 제품의 원활한 사용을 위하여 각각의 제품에 대한 매뉴얼을 제작하였다. 다른 연구에서도 본 과제의 결과를 활용할 수 있도록 하기 위해 바이오큐브 관련 활용법 및 진단키트 관련 홍보/설명 자료를 제작하였다.
- 바이오큐브를 활용한 곰팡이 DNA 추출방법의 경우에는 고구마 뿌리 썩음병을 일으키는 곰팡이 진단 뿐만 아니라, 인삼 뿌리 썩음병을 일으키는 곰팡이 진단에도 활용이 가능하다고 생각되었다. 이에 대한 설명자료를 가지고 국립원예특작원 인삼특작연구소와 동아대학교 식물진균병학 실험실을 방문하여 곰팡이 DNA 추출방법에 대한 소개와 설명을 하고 관련 시제품을 분양하였다. 인삼병원성 곰팡이에도 적용이 가능한 것을 확인하였다(그림 157).

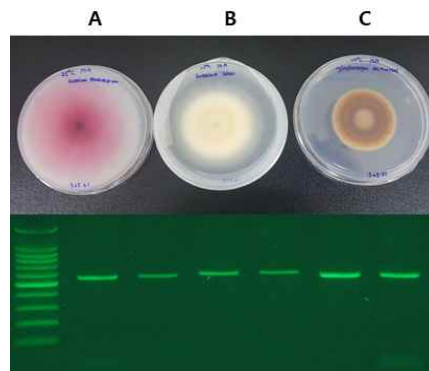


그림 157. 인삼 병원성 곰팡이 ITS PCR 결과 A: *F. graminearum*, B: *F. solani*, C: *C. destructans*, 각각 2반복.



1. 실험과정

1. 곰팡이의 가장자리 부분을 면봉으로 긁어준다.
2. Biocube에 5 초간 눌러준다.
3. 수초 후 면봉의 반대편으로 Biocube 주변의 여액이나 이물질을 제거한다.
4. Biocube 를 PCR tube(mixture, primer)에 넣고 PCR 을 진행한다.



PCR Condition	온도	시간	반복
Initial Denaturation	95°C	5m	1
Denaturation	94°C	1m	25
Annealing	55°C	1m	
Extension	72°C	1m	
Elongation	72°C	3m	1
Storage	12°C	-	-

2. 실험결과

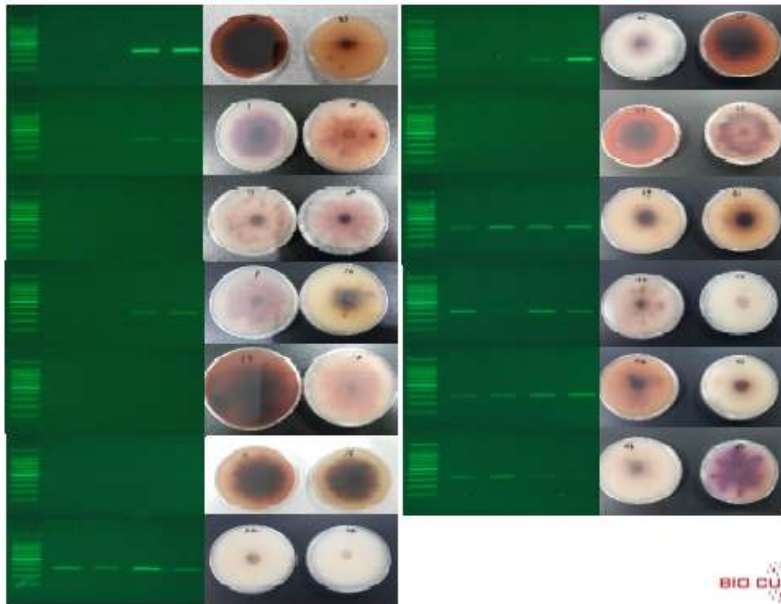


그림 158. 다른 곰팡이 연구에 바이오큐브 활용을 위한 설명자료

- 과제에서 개발된 고구마 바이러스, 곰팡이 진단 키트 관련 홍보 웹페이지를 제작하였고, 바이오큐브시스템 홈페이지(<http://www.biocubesystem.com>)에 페이지 개설하였다(그림 158).
- 고구마 진단키트 활용과 관련하여 고구마 진단용 시료의 준비법 및 곰팡이 시료 준비법에 대한 설명자료도 함께 게시하였다.

BCS Detection kit

BCS PCR / RT-PCR Detection kit(single & multiplex)는

PCR(RT-PCR)2X Master mix가 동결 건조 되어 8-strip PCR tube에 붙여진 제품으로

별도의 시약을 따로 넣을 필요없이 template와 멸균수만 넣어 PCR수행이 용이 하도록 설계되었습니다.

사용법

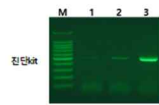
Total RNA & DNA 사용 시

Template	1ul
멸균수	19ul
Final volume	20ul

BCS folder & Biocube 사용 시

Biocube	1입
멸균수	20ul
Final volume	20ul

실험결과



1: Biocube, 2: 샘플, 3: TR

적용 제품



© 2013 - 2018 Biocube System Inc. all rights reserved.

그림 159. 바이오큐브시스템 홈페이지내에 고구마 진단 키트 관련 페이지

- 유관기관 및 사용자에게 배포하기 위한 홍보지를 제작하였다(그림 160).

고구마 바이러스, 곰팡이 병 간편 진단 키트/패키지

BCS Sweet Potato Virus RT-PCR Detection Package

1. RT-PCR Preparation

RT-PCR Primers	1.5 ul
Template/Biobuffer	5 ul
Water	14.5 ul
Final	20ul

2. RT-PCR Protocol

Initial Denaturation	95 °C 10 min	1
Pre-Amplification	50 °C 10 min	1
Denaturation	95 °C 30 sec	1
Amplification	50 °C 30 sec	35
Extension	72 °C 30 sec	1
Final Extension	72 °C 10 min	1

3. Results

Method

1. Wet cotton swabs with **EP buffer**
2. Collect sample with swabs
3. Pipette swabs on **Biocube** for 5 second
4. Drop **Biocube** into PCR mixture

중요키워드

- 바이러스 진단 키트
- 곰팡이 바이러스 진단 키트
- 곰팡이 바이러스 진단 키트
- 병원 곰팡이 바이러스 진단 키트
- 곰팡이 바이러스 진단 키트
- GMO 진단 키트

그림 160. 고구마 바이러스, 곰팡이 병 간편진단 키트 홍보지

BCS Sweet Potato Virus RT-PCR Detection Package

(SPLCV, SPCFV, SPFMV, SPGV, SPVC, SPV2, SwPLV, SPSMV-1)

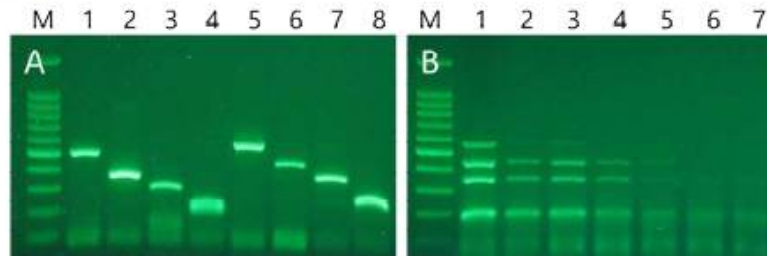
1. RT-PCR Preparation

Contents	Volume	Note
RT-PCR Premix	1 tube	
Template(Biocube)	1(1)	
D.W	19ul (20ul)	
Final	20ul	

2. RT-PCR Protocol

Step	Temp(°C)/Time	Cycle
cDNA Synthesis	48/ 5min	1
Pre-denaturation	95/ 10min	1
Denaturation	95/ 20sec	35
Annealing	60/ 20sec	
Extension	72/ 30sec	
Final Extension	72/ 5min	1

3. Results



A) M: 100bp ladder, 1: SPLCV, 2: SPFMV, 3: SPGV, 4: SwPLV, 5: SPCFV, 6: SPVC, 7: SPV2, 8: SPSMV-1

B) M: 100bp ladder, 1~7: five folded dilutions, SPCFV/SPVC/SPFMV/SwPLV



그림 161. 고구마 바이러스 진단 키트 매뉴얼 일부

- 본 과제에서 개발한 키트 및 패키지에 대한 설명자료 및 매뉴얼을 제작하고 이를 관련 연구기관과 연구자들에게 배포하여 홍보할 예정이다. 고구마 뿐 아니라 다른 식물 병원성 곰팡이, 바이러스 진단 분야에서도 본연구에서의 결과가 활용될 수 있도록 다방면으로 홍보가 필요하다고 판단되었다.

- 바이러스, 곰팡이 진단키트의 홍보 및 활용성 제고를 위하여 관련학과 대학교 교수님께 자문을 요청하였고, 실제 사용 가능성이 높은 연암대학교 스마트원예학과 2학년 대학생들을 위한 교육 특강에서 실습 교재로 사용할 수 있었다.
- 실제 키트 실습자료로 사용 곰팡이는 본과제에서 향상시킨 곰팡이 배지에서 면봉을 사용하여 직접추출하여 진단 실험을 수행하였고, 고구마 멀티 진단 키트는 미리 준비한 전체 RNA를 주형으로 사용하였다.(그림 162)

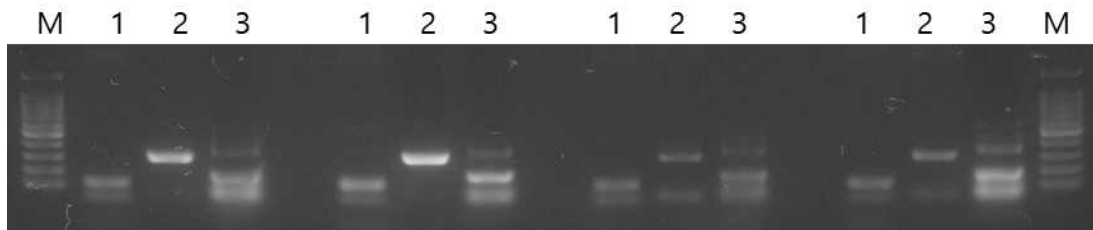


그림 162. 진단 패키지 교육실습 결과 M: 100bp ladder, 1: GMO, 2: 곰팡이, 3: 고구마 멀티

- 대부분의 실습생들은 DNA 실험이나 PCR 진단키트 사용이 처음임에도 불구하고, 위와 같은 결과를 얻을 수 있었다.
- 이는 본과제를 통해 개발한 곰팡이 DNA추출법이 이러한 실험을 처음 접하게 되는 초보자들도 10분 정도의 간단한 설명만으로도 곰팡이 병 진단 실험을 수행할 수 있음을 확인하였다. 고구마 바이러스 다중 진단 키트의 경우에는 진단에 필요한 반응액과 특이 프라이머가 모두 키트안에 포함되어 동결건조된 형태로 제공되었다. 진단 키트의 사용방법은 증류수 19ul와 주형 1ul 를 동결건조된 진단 키트 반응액에 넣어 주기만 하면, 쉽게 PCR 진단 키트를 활용할 수 있었다.

6. 고구마 건전묘 제품 상용화 전략 수립을 위한 기반 환경 분석

가. 농산물 상용화 관련 국내외 법·제도 현황

(1) 국내 국립농산물품질관리원의 관련 법률 및 제도 조사·분석

- 농산물이력추적관리제도는 농산물 생산단계부터 판매단계까지 각 단계별로 정보를 기록·관리함
 - 농산물의 안전성 등에 문제가 발생할 경우 해당 농산물을 추적하여 원인을 규명하고 필요한 조치를 할 수 있도록 농산물을 생산단계부터 판매단계까지 각 단계별로 정보를 기록·관리
 - 농산물 생산이력추적 제도를 통해 문제발생 시 신속하게 원인을 규명하고 정확하게 제품을 회수 할 수 있음
 - 제품 생산이력을 확인이 가능하여 제품에 대한 신뢰성을 확보 할 수 있으며, 공정한 거래가능
 - 제품의 효율적인 품질관리·안전관리·재고관리에 기여
- 농산물이력추적관리 등록 요약 및 절차
 - 신청자격: 대통령령으로 정하는 농수산물을 생산하거나 유통 또는 판매하는 자는 이력추적관리 등록을 하도록 규정하고 있으나 현재까지 규정된 품목은 없음, 농산물의 생산·유통·판매를 희망하는 자
 - 대상품목: 식용을 목적으로 생산하는 농산
- 농산물에 이력추적관리 표시를 할 때는 표시대상 농산물에 이력추적관리 등록 표시가 인쇄된 스티커를 부착해야 함
- 국내 지리적표시제는 농수산물 또는 농수산 가공품의 명성·품질 기타 특징이 본질적으로 특정지역의 지리적 특성에 기인하는 경우 그 특정 지역에서 생산된 특산품임을 표시
- 농산물에 대해 지리적표시를 실시함으로써 지리적 특산품의 품질 향상과 지역 특화산업으로의 육성 도모
- 농수산물 품질관리법에 따라 지리적 표시제 등록신청 및 사후관리가 이루어지고 있음
 - 신청자격 : 특정지역에서 지리적 특성을 가진 농수산물 또는 농수산 가공품을 생산하거나 가공하는 자로 구성된 단체(법인만 해당)에 한정
 - 다만, 지리적 특성을 가진 농수산물 또는 농수산 가공품의 생산자 또는 가공업자가 1인일 때는 개인도 가능
 - 대상품목 : 지리적 특성을 가진 농수산물 또는 농수산 가공품
- 지리적표시등록을 받은 자가 그 표시를 하려면 지리적표시품의 포장·용기의 표면 등에 등록명칭을 표시
- 국내 품종보호제도는 식물신품종 육성자의 권리를 법적으로 보장하는 지적재산권의 한 형태로 특허권, 저작권, 상표등록권과 유사하게 육성자에게 배타적인 상업

- 적 독점권을 부여함
- 품종보호제도는 1995년 종자산업법 제정과 함께 도입되어, 2012년 종자산업법에서 식물신품종보호법이 분리·제정되었고 2013년 6월 2일자로 발효
- 품종보호 출원은 새로 육성한 작물의 신품종에 대하여 상업적 독점권인 품종보호권을 받기 위해 품종보호출원서를 작성하여 제출하는 것
- 품종보호대상 : 모든 작물
- 보호요건 : 품종보호를 받고자 출원한 품종이 품종보호요건을 구비하여 식물신품종 보호법에서 규정한 출원방식에 위배되지 않고 등록료를 납부하는 경우에는 품종보호권을 부여

(2) 국외 주요 선진시장 관련 법률 및 제도 조사·분석

- 농산물이력추적관리 제도
 - ① 유럽연합 : 생산과 가공, 유통 등 전 과정에 걸쳐서 식품과 사료, 식품 생산 동물 혹은 식품·사료에 의도적으로 포함되거나 포함될 것으로 예상되는 성분을 추적함
 - ② 일본 : 농림수산성은 ‘식품의 이력추적 (추적 가능성)’ 을 생산, 가공 및 유통의 특정한 단계 또는 복수의 단계를 통해 식품의 이동을 파악할 수 있는 것으로 정의
 - ③ 미국 : 최근 「식품안전현대화법(FSMA, 2011)」의 제정 취지에 따라 예방중심(기존에는 대응중심)의 식품안전관리체계를 구축해나가고 있음. 미국의 이력추적은 산업체가 작성·관리한 기록에 의존하고 있으며, 기본적으로 식품의 전후 단계(one-up /one-down) 이력정보를 기록하도록 함
 - ④ 중국 : 2010년부터 중국 상무부와 재정부가 육류, 채소, 주류제품의 유통이력추적체계 구축 시범사업을 추진해 옴

지리적표시제도

- 지리적표시(geographical indication)는 일반적으로 출처표시(indication of source)와 원산지명칭(appellation of origin)의 양자 개념을 모두 포함하는 상위개념
- ① 유럽 : 농업 생산 다양성을 촉진하고, 농업 종사자의 소득을 향상시켜 농업 경제에 유익하게 하고, 특히 덜 개발되었거나 외딴 지역에 이익이 되는 특성들을 보유한 상품들의 장려목적으로 지리적표시 보호제를 운영
 - ② 미국 : 증명표장은 소유자 이외의 자의 상품이나 서비스에 대하여 지역적 원산지 또는 재료, 생산방식, 품질, 정밀도, 또는 기타 특성을 인증하거나 상품이나 서비스에 대한 노동이 어떠한 단체(union) 또는 기타 조직에 의하여 수행되었다는 것을 인증하기 위한 것임
 - ③ 일본 : 지리적 표시에 대해 적극적인 보호제도 (등록에 의한 보호)는 없었으나, ‘06년 상표법 개정으로 지역단체상표제도를 도입하였으며, ‘15년 6월 특정 농림 수산물 및 식료품의 보호법 (지리적 표시 (GI) 법)이 발효됨

□ 국제품종보호제도

국제적으로 식물신품종보호 제도는 독일, 프랑스, 영국, 네덜란드 등 유럽 국가의 육종가들이 중심이 되어 지적재산권 제도로 발전함. ‘국제식물신품종보호동맹(UPOV)’ 새로 육성된 식물품종을 각국이 공통의 기본원칙에 따라 보호하여 우수한 품종의 개발, 유통을 촉진함으로써 농업발전에 기여하기 위해 설립됨

- ① 유럽연합 : CPVO(Communiting Plant Variety Office)는 28 개 회원국을 포함하여 EU의 식물 다양성 권리 시스템을 관리하는 유럽 연합기구
 - 사회 이익을 위한 새로운 식물 품종개발을 지원하기 위해 효율적인 지적 재산권 시스템을 제공하고 홍보
 - 식물 다양성 보호시스템은 유럽 집행위원회(European Commission)법에 의해 제정되었으며, 이 보호시스템을 통해 유럽 연합 전체에 유효한 지적재산권을 부여 받을 수 있음
- ② 미국 : 식물 다양성 보호소(Plant Variety Protection Office (PVPO))는 새로운 품종의 씨앗과 괴경 품종 육종가의 지적 재산권을 보호하고, 보호 인증서를 발행하여 식물 다양성 보호법 (PVPA)을 관리함
- ③ 일본 : 농림수산성의 신사업창출과 종묘 심사실에서 식물신품종을 보호하고 있으며, 1947년에 종묘법이 제정되었으며, 1978년에 식물다양성(PVP) 및 종자법을 제정함
 - 새로운 품종의 개발 및 육종은 많은 시간과 투자가 필요하며, 신품종에 대해 제3자가 쉽게 번식할 수 있기 때문에 이를 보호하고 신품종 개발을 장려하기 위해 다양성 등록 시스템을 운영
- ④ 중국 : 식물신품종보호조례에 의해 보호를 받기 위해서는 식물신품종이 참신성, 특이성, 일치성, 및 안정성을 갖추어야 함
 - 품종권을 취득한 경우, 권리자는 권한을 부여받은 품종에 대하여 배타적 독점권을 향유 할 수 있음

나. 농산물 상용화 관련 국내외 선행특허 분석

(1) 바이러스 무병주 생산 관련 특허 분석

□ 바이러스 무병주 관련 국내외 특허 동향 및 주요 핵심특허를 분석함으로써 특허 선행기술의 존재여부를 검토

- 미국, 유럽, 일본, 한국, 중국 전체적으로 무병주 생산에 대한 개발이 저조하며, 2008년도부터 중국의 연구활동이 급격히 증가하는 추세를 보임
- 본 분야와 관련하여 최근 18년간('00~'17) 대상 국가 전체 180건으로 조사되었으며, 자국내 특허활동이 두드러지는 국가는 중국(169건)이 74%로 가장 많은 비중을 차지함
- 이어 한국(25건)과 일본(17건)이 각각 11%, 8%를 차지하고 있으며, 미국과 유럽의 경우 14건, 3건으로 연구활동의 거의 없는 것으로 보여짐

-
- 글로벌 상위 TOP10을 분석한 결과 대한민국(정부기관)이 11개로 최상위 출원인으로 나타났으며, 이어 Tianjin Fenghua Yulon Agricultural Development Co., Ltd.와 Yuelan Lan 등 중국 출원인이 상위 출원인으로 나타남

(2) 대량변식 시스템관련 특허 분석

- 고구마 대량변식 시스템 개발 관련 국내외 특허 동향 및 주요 핵심특허를 분석함으로써 특허 선행기술의 존재여부를 검토
- 미국, 유럽, 일본, 한국, 중국 전체적으로 식물체 대량변식관련 연구개발이 저조하며, 최근 2014년도부터 중국의 연구활동이 증가 하는 추세를 보임
- 본 분야와 관련하여 최근 18년간('00~'17) 대상 국가 전체 471건으로 조사되었으며, 자국내 특허활동이 두드러지는 국가는 중국(359건)이 76%로 가장 많은 비중을 차지함
- 이어 한국(46건)과 일본(39건)이 각각 10%, 8%를 차지하고 있으며, 미국과 유럽의 경우 18년간 출원 건수가 20건 내외의 특허수를 보유하고 있음
- 글로벌 상위 TOP10을 분석한 결과 최상위 출원인으로 Shanghai Institute of garden plants과 Wuhu European Standard Agricultural Development Co., Ltd.이 각 9개씩 특허를 출원하였으며, 모두 중국 출원인임

(3) 바이러스 진단시스템 관련 특허 분석

- 고구마 바이러스병 진단시스템개발 관련 국내외 특허 동향 및 주요 핵심특허를 분석함으로써 특허 선행기술의 존재여부를 검토
- 미국, 유럽, 일본, 한국, 중국 전체적으로 바이러스 진단 관련 특허활동이 저조하며, 2010년도부터 중국활동이 증가하는 추세를 보임
- 본 분야와 관련하여 최근 18년간('00~'17) 대상 국가 전체 100건으로 조사되었으며, 자국내 특허활동이 두드러지는 국가는 중국(62건)이 62%로 가장 많은 비중을 차지함
- 이어 한국(16건), 일본(11건), 미국(6건), 유럽(5건)으로 연구 활동이 20건 미만 수준임
- 고구마 바이러스병 진단시스템 분야에서 글로벌 최상위 출원인으로 Fujian Academy of Agricultural Sciences Institute of Plant Protection가 12개의 특허를 출원하였고, 이어서 상위 출원인에 중국과 한국 출원인이 있는 것으로 조사됨

(4) 품종판별 특허 분석

- 고구마 품종판별 기술 관련 국내외 특허 동향 및 주요 핵심특허를 분석함으로써 특허 선행기술의 존재여부를 검토
- 식물개체의 품종을 판별하는 기술자체에 집중하여 기술의 대상을 고구마에서 식물체로 범위를 넓혀 식물체의 품종판별 기술에 대한 특허 조사 진행

- 미국, 유럽, 일본, 한국, 중국 전체적으로 품종판별관련 연구개발이 저조하며, 최근 2011년도부터 중국의 연구활동이 증가하는 추세를 보임
- 본 분야와 관련하여 최근 18년간('00~'17) 대상 국가 전체 220건으로 조사되었으며, 자국내 특허활동이 많은 국가는 중국(89건)이 40%로 가장 많은 비중을 차지함
- 이어 한국(53건)과 일본(44건)이 각각 24%, 20%를 차지하고 있으며, 미국과 유럽의 경우 15%이 미치지 못하는 활동을 하고 있음
- 품종판별 기술 특허관련 글로벌 최상위 출원인은 가톨릭대학교 산학협력단이 차지하였고, 그 외 글로벌 TOP10에는 중국과 함께 한국의 출원인이 많이 분포하고 있음

다. 해당 기술의 핵심가치

(1) 기술의 차별성

무병건전묘 생산을 위한 식물 성장촉진 박테리아 확인

- Bacillus subtilis strain JS의 처리는 전반적으로 종순(묘)의 성장을 촉진하는 모습을 사진에서 관찰할 수 있었으며, 지상부의 길이에 대한 생체중의 비율을 봐도 높게 나타나는 것으로 보아 다른 처리구에 비해 건강한 우량묘 생산에 효과적임을 확인 가능함

(2) 기술의 독창성

무병건전묘 생산을 위한 식물 성장촉진 박테리아 활용 결과

- 고구마 무병주 생산에 있어서 건강한 묘 생산을 위해 본 연구팀이 개발한 B. subtilis strain JS 처리는 지상부 길이 및 생체중의 증가, 지상부 길이 당 무게비의 증가, 우량묘 생산비율이 월등히 증가한 것으로 나타나 고구마 종순을 이용한 묘 생산에 있어서 식물성장촉진 박테리아 Bacillus subtilis strain JS의 적극적인 활용이 필요하다고 판단됨

(3) 기술의 혁신성

무병묘 보급을 위한 농가 시험적용 결과

- 무병묘를 이용하여 농가에 시험적용하고, 무병묘의 농가적용에 보완점 등을 파악하였다. 먼저 성장점배양을 통한 조직배양묘의 잎 등을 이용하여 바이러스 검정을 통해 무병묘로 판단된 기내 배양체를 본 연구결과에서 기술한 바와 같이 액체배지를 이용한 계대배양을 통해 증식시킴
- 증식시킨 무병묘를 트레이묘판에 정식하여 생육시킨 후 약 8마디 정도가 되면 채묘하여 본밭에 정식하여 재배하였다. 전북 정읍시 포장 50평에 무병묘는 1000주를 시험 재배하여 조사한 결과, 무병주 이용의 경우 고구마 괴근의 피색이 선명하고, 표면이 보다 깨끗하게 나타남
- 한편 전체적으로 시장에서 요구하는 것 보다 괴근의 크기가 크게 형성되는 것으

로 관찰됨

라. 선행기술개발 동향 등의 기술성 분석

(1) 기술성 분석

□ 바이러스 무병주 생산 관련 특허 분석

- 바이러스 무병주 관련 국내외 특허 동향 및 주요 핵심특허를 분석함으로써 특허 선행기술의 존재여부를 검토
 - 미국, 유럽, 일본, 한국, 중국 전체적으로 무병주 생산에 대한 개발이 저조하며, 2008년도부터 중국의 연구활동이 급격히 증가하는 추세를 보임
 - 본 분야와 관련하여 최근 18년간('00~'17) 대상 국가 전체 180건으로 조사되었으며, 자국내 특허활동이 두드러지는 국가는 중국(169건)이 74%로 가장 많은 비중을 차지함
 - 이어 한국(25건)과 일본(17건)이 각각 11%, 8%를 차지하고 있으며, 미국과 유럽의 경우 14건, 3건으로 연구활동의 거의 없는 것으로 보여짐
 - 글로벌 상위 TOP10을 분석한 결과 대한민국(정부기관)이 11개로 최상위 출원인으로 나타났으며, 이어 Tianjin Fenghua Yulon Agricultural Development Co., Ltd.와 Yuelan Lan 등 중국 출원인이 상위 출원인으로 나타남

□ 대량번식 시스템관련 특허 분석

- 고구마 대량번식 시스템 개발 관련 국내외 특허 동향 및 주요 핵심특허를 분석함으로써 특허 선행기술의 존재여부를 검토
- 미국, 유럽, 일본, 한국, 중국 전체적으로 식물체 대량번식관련 연구개발이 저조하며, 최근 2014년도부터 중국의 연구활동이 증가 하는 추세를 보임
 - 본 분야와 관련하여 최근 18년간('00~'17) 대상 국가 전체 471건으로 조사되었으며, 자국내 특허활동이 두드러지는 국가는 중국(359건)이 76%로 가장 많은 비중을 차지함
 - 이어 한국(46건)과 일본(39건)이 각각 10%, 8%를 차지하고 있으며, 미국과 유럽의 경우 18년간 출원 건수가 20건 내외의 특허수를 보유하고 있음
 - 글로벌 상위 TOP10을 분석한 결과 최상위 출원인으로 Shanghai Institute of garden plants과 Wuhu European Standard Agricultural Development Co., Ltd.이 각 9 개씩 특허를 출원하였으며, 모두 중국 출원인임

□ 바이러스 진단시스템 관련 특허 분석

- 고구마 바이러스병 진단시스템개발 관련 국내외 특허 동향 및 주요 핵심특허를 분석함으로써 특허 선행기술의 존재여부를 검토
- 미국, 유럽, 일본, 한국, 중국 전체적으로 바이러스 진단 관련 특허활동이 저조하며, 2010년도부터 중국활동이 증가하는 추세를 보임
 - 본 분야와 관련하여 최근 18년간('00~'17) 대상 국가 전체 100건으로 조사되었으며, 자국내 특허활동이 두드러지는 국가는 중국(62건)이 62%로 가장 많은

비중을 차지함

- 이어 한국(16건), 일본(11건), 미국(6건), 유럽(5건)으로 연구 활동이 20건 미만 수준임
- 고구마 바이러스병 진단시스템 분야에서 글로벌 최상위 출원인으로 Fujian Academy of Agricultural Sciences Institute of Plant Protection가 12개의 특허를 출원하였고, 이어서 상위 출원인에 중국과 한국 출원인이 있는 것으로 조사됨

□ 품종판별 특허 분석

- 고구마 품종판별 기술 관련 국내외 특허 동향 및 주요 핵심특허를 분석함으로써 특허 선행기술의 존재여부를 검토
- 식물개체의 품종을 판별하는 기술자체에 집중하여 기술의 대상을 고구마에서 식물체로 범위를 넓혀 식물체의 품종판별 기술에 대한 특허 조사 진행
 - 미국, 유럽, 일본, 한국, 중국 전체적으로 품종판별관련 연구개발이 저조하며, 최근 2011년도부터 중국의 연구활동이 증가하는 추세를 보임
 - 본 분야와 관련하여 최근 18년간('00~'17) 대상 국가 전체 220건으로 조사되었으며, 자국내 특허활동이 많은 국가는 중국(89건)이 40%로 가장 많은 비중을 차지함
 - 이어 한국(53건)과 일본(44건)이 각각 24%, 20%를 차지하고 있으며, 미국과 유럽의 경우 15%이 미치지 못하는 활동을 하고 있음
 - 품종판별 기술 특허관련 글로벌 최상위 출원인은 가톨릭대학교 산학협력단이 차지하였고, 그 외 글로벌 TOP10에는 중국과 함께 한국의 출원인이 많이 분포하고 있음

마. 관련 시장 현황분석

(1) 국내외 시장

□ (가) 세계 고구마 시장 현황

- 세계 건강기능식품 시장 규모
 - FAO 통계에 따르면 2014년 기준으로 전 세계 고구마 생산량은 재배면적은 8,352천ha로 2000년의 9,787천ha에서 15% 가량 감소하였으며, ha당 수량 역시 12,763kg으로 10% 가량 감소하였으나 생산액의 경우 2009년 275억 달러에서 2012년 현재 약 313억 달러로 급속한 성장세를 보이고 있음
- 대륙별 고구마 재배면적 현황
 - 고구마 재배지역은 주로 아시아, 아프리카로 2014년 재배면적은 아시아 4,023천ha, 아프리카 3,888천ha로 세계 재배면적 8,352천ha의 95% 정도 차지하고 있고, 생산량은 아시아 79,214천M/T, 아프리카 22,631천M/T으로 세계 생산량 106,602천M/T의 96% 정도로 대부분을 차지하고 있으며, 남미, 북중미, 대양주 순으로 확인됨

- 국가별 고구마 생산 시장 현황
 - 중국의 경우 고구마 생산량은 1990년 약 1억 4백만 톤에서 2014년 기준 70.9백만 톤으로 연평균 1.8% 가량의 감소세를 보이고 있으나 전세계 시장의 생산량에서 차지하는 비중은 66.5%로 세계 시장에서 가장 큰 비중을 차지하고 있으며, 다음으로 나이지리아, 탄자니아, 우간다, 베트남 등이 재배량이 많으나 생산량이 상대적으로 미미한 수준

□ (나) 국내 고구마 시장 현황

- 생산 현황
 - 2015년 기준, 우리나라의 고구마 재배면적은 19,357ha 이며 생산량은 294,655M/T으로 2012년 이후 재배면적과 생산량이 지속적인 감소세를 보이고 있는 상황이며 이는 단위당 수량감소로 인한 결과로 파악됨
 - 단수 감소의 주요 원인으로서는 가뭄과 태풍피해 등 기후변화로 인한 상품성 저하 및 수확량 감소 등의 요인이 작용한 것으로 분석(한국농수산물유통공사, 2013)
- 지역 및 규모별 현황
 - 시도별로 국내 고구마 산지별 재배면적을 비교하였을 때 2005년 기준으로 경기도가 전국의 21.4%로 가장 넓은 재배면적을 보유하고 있으나, 2015년 기준 전라남도가 전국의 22.3%를 차지하며 가장 넓은 재배면적을 보유한 지역으로 부상하는 등 주요 산지의 지리적 변화가 나타남
 - 2015년 기준으로, 지리적 재배면적 비중은 전남 4,315ha(22.3%), 전북 3,333ha(17.2%), 경기 2,952ha(15.3%) 순으로 분석됨
 - 최근 여주 고구마 재배면적은 2011년 1,870ha, 2012년 1,800ha, 2014년 1,700ha 수준으로 지속적 감소세를 보이는데, 이는 연작피해 방지로 재배지의 이동 때문인 것으로 분석(한국농수산물유통공사, 2013)
- 재배농가 분포 및 경영규모
 - 고구마 재배규모별 농가분포는 2000년에 0.1ha 미만이 305,552호로 전체의 93.4%에서 2015년에 220,001호로 88.2%로 낮아진 반면, 0.1~0.7ha 규모의 농가는 증가하는 추세이며 규모화가 이루어지고 있는 것으로 추정됨
- 고구마 소비동향
 - 소비자 가구의 고구마 유형별 매동향 분석 결과, 2010~2015년간의 연평균 고구마 가구당 구입액은 27,862원, 구입횟수는 3.9회, 구매가구 비율은 78.7%로 나타남

(2) 타겟시장 현황분석

□ (가) 국내 고구마 가격 동향

- 연도별 가격동향
 - 고구마 가격은 10kg 상품기준으로 2000년 9,128원에서 정점인 2012년 36,142원

까지 계속 상승하다가 2년간 36% 급락 후 2015년부터 다시 상승하여 2016년 가격은 27,454원으로 나타남

- 월별 가격동향

- 최근 3개년 고구마 월별 가격을 살펴보면 저장 고구마 수요 증가 및 저장·감모비용 증가로 7월까지 가격이 높게 형성되는데 특히 고구마 수요가 가장 많은 5월~7월까지의 가격이 매우 높고, 그 이후는 수요 감소 및 저장물량 출하 증가로 하향곡선을 보이며, 고구마 수확기인 10월부터는 가격이 낮게 형성되고 있음

□ (나) 생산지 유통실태

- 생산자

- 작형별로는 고구마순 재배는 비닐하우스에서 2월 중순부터 시작하고 약 2개월 후 포전에 정식하며, 출하시기는 노지재배 경우 4월 중순부터 5월 하순까지 정식하고, 8월 중순부터 10월 하순까지 수확하며, 출하는 9월부터 익년 7월까지 하며, 출하가집중되는 시기는 10월~12월임
- 재배품종별로 경기, 충청지역은 밤고구마 재배가 많으며, 남부지방은 호박고구마 재배가 많은편, 호박고구마는 정식 후 초기 활착이 어려워 재식이 많은 편이나 소비자 선호도가 증가, 높은 시장가격, 우량종묘 및 재배기술의 발달 등으로 재배면적이 증가 추세에 있음
- 수확은 정식 후 110~120일 정도 시작하여 서리가 내리기 전 종료하며, 씨고구마용은 130~140일 정도에 수확하고, 밤고구마는 7월초~10월 말까지, 호박고구마는 8월 중순~11월 말까지 수확함
- 대규모 재배농가들은 자가 저온저장 시설을 구비하고 있으며, 저장출하 비중이 높고, (고구마는 수확기에 약 30~40%를 출하하고, 나머지는 저장 후 익년 7월까지 출하) 소규모 농가들은 지역농협(계약재배·수매)과 산지유통인(포전거래)을 통해 판매하는데 반해, 여주는 수도권 도매시장 접근성이 좋아 농가 직접출하 비율이 높고, 논산은 생산자단체 위탁출하가 많으며, 해남은 포전거래 비율이 높은 것으로 파악됨

- 생산자단체

- 계약은 3~5월경 상호간 계약서를 작성하고, 계약금은 일부 선지급하며, 잔금은 현물납품 후 정산 지급하는 방식으로 이루어지며 생산자가 수확작업을 책임지고 수매창고 도착도 조건으로 수매함
- 여주, 해남지역은 민간유통업체가 많아 대형유통업체, 홈쇼핑, 인터넷 등 도매시장 이외의 판매비중이 높고, 유통은 대부분 흙고구마에서 세척고구마로 변하고 소포장(2kg) 출하비중이 점점 증가하는 추세임
- 대부분의 조합은 자체 창고를 보유하고 있으며, 일부는 임대 중

- 산지유통인

- 구입방법은 포전매매(계약재배)이며, 계약시기는 보통 수확 1개월 전인 7~8월경 거래함
- 농가는 수확 전까지 포전을 관리하며, 거래조건은 계약금은 30% 가량 지불하며 잔금은 수확 시 완불하고 수확은 산지유통인 책임임
- 저장품은 PVC상자에 담아 등급별로 구분후 저온창고에 적재하고, 시장출하품은 골판지 상자에 담아 출하함
- 판매방법은 도매시장과 가공공장에 출하하며, 위탁판매의 형태로 주로 출하하고, 시기는 수확기에는 시장가격에 따라 변동이 있으며 일부는 저장창고 입고 후 익년 7월까지 판매함

□ (다) 소비지 유통실태

- 가락동 농수산물도매시장
 - 서울 전체 반입량의 50~60% 정도 차지하는 것으로 추정되고, 나머지 물량은 수도권(구리, 인천, 안양, 수원 등) 도매시장이나 청량리, 영등포 등의 유사도매시장으로 반입되는 것으로 추정됨
 - 2013년 주 출하도는 경기 40.6%, 충남 30.3%, 전북 16.1%, 전남 5.8%, 기타 7.2% 순이고, 총 반입량 중 3개도에서 87.0%를 차지함
 - 연간 반입량은 작황에 따라 다르나 일반적으로 약 35,000~50,000톤 내외이며, 저장고구마는 2월 설 전후 저장창고를 개방하기 때문에 3월에 최고 반입량을 보임(연간 거래금액은 약 700~800억 수준)
- 중도매인
 - 가락시장 전체 고구마 거래량의 약 70%는 경매, 약 30%는 위탁판매로 거래되고 있음
 - 큰 규모의 중도매인은 1일 평균 약 1,500~2,000상자까지 구입하여 판매하고, 대부분 중도매인은 300~400상자 정도 판매함
 - 1회당 평균 소매상으로 10 박스 내외, 대형유통업체로 200 박스 내외, 대량수요처로 500박스 내외 판매함
 - *대량수요처 : 가공업체, 급식, 식자재납품, 요식업소 등
- 농협유통 하나로클럽
 - 구입은 농협 도매사업단을 통해 통합 발주하며, 공동선별·출하를 실시하는 산지 생산자단체를 대상으로 물량을 확보함
 - 판매수수료는 가락시장 경락가격을 참조하여 결정하는데 4%임
 - 판매는 2kg상자, 800g봉지, 100g 단위 벌크 판매형태임

바. 연구개발 성과의 상용화 전략 수립

(1) 단계별 상용화 전략

□ (가) 타겟 시장 및 개발제품 도출 단계(~2018년)

- 확인된 시장 및 관련 제품군 현황을 통해 생산 제품군 유형을 도출하고 이 중

- 상용화 가능한 전략을 검토하여 적용한 결과 아래 2가지의 전략 도출이 가능함
- (상용화 전략 1) 농가에 직접 기술판매 및 센터 구축을 통한 출하물 직접관리
 - (상용화 전략 2) 관리 기관에 기술판매 실시 후 출하물 간접관리
- 상기 2가지 전략 중 PEST분석을 통해 시장, 산업, 기술, 자사 내부역량 등을 포함한 적합성 검토 결과 가장 적합성이 높은 방법은 전략1로 확인됨
 - 해당 상용화 전략을 위해 1차적으로 선행되어야 할 것은 고구마 건전묘를 직접 생산하는 농가와의 거래 안정성 확보이며, 이후 센터를 통한 스마트 유통 관리 실시를 위해 유통 및 판매처와의 협의 필요함
 - 시장 창출을 위해 전방산업인 농가와의 교섭을 통해 판매 채널을 확보하여 판로를 개척하는 방법과 후방산업인 유통 및 판매업체와의 교섭을 통한 신규 시장 창출방법이 존재함
- (나) 제품 상용화 단계(2019년~2020년)
- 시장 확보 이후 실질적으로 상용 가능한 제품 형태를 최종적으로 선정하여 제품 개발 완료 단계에 돌입하며, 이 단계에서 제품의 효과성을 부각시킬 수 있는 방법을 모색하는 것이 중요함
 - 개발된 제품을 상용화 시키기 위한 시제품 제작 및 성능(성분)테스트를 완료 후 상용화 소요기간의 단축을 위해 참여기관별 역할을 분배(제품 교육 및 기획(A), 국내 전시회 및 박람회 참여 전략 수립(B), 후속과제 탐색 지원(C))하여 병행 실시가 필요하며 이를 통해 주관기관과 참여기관의 지속성 있는 체계 구축이 가능함
 - 해당 단계를 통해 지속적 예산확보와 시장진입을 위한 사전 준비 완료가 가능함
- (다) 시장 진입 단계(2021년~2022년)
- 시장 진입을 위한 사전 준비 완료가 모두 완료 되었다면, 이후 생산농가 및 유통판매자를 중심으로 판매채널 및 마케팅 채널을 확보하는 것이 필요하며, 원료를 판매하는 농가와의 유대를 바탕으로 유통 및 판매채널을 추가 모색하는 방안도 모색할 필요가 있음
 - 농가의 경우 생산품에 대한 유통 및 판매처와 컨택 포인트가 있는 경우가 존재함
 - 제품의 판매 경로 확보이후 제품 판매의 안정화를 위해 온·오프라인으로 판매 채널을 확대할 수 있도록 해당 판매채널을 보유한 위탁판매 업체를 선정하는 것이 추가적으로 필요한지에 대한 검토가 필요함
- (라) 시장 확대 단계(2022년 이후)
- 국내시장 안정화를 위해 1차적으로 확보된 유통 판매 채널 이외에 지속적으로 유통 및 판매처를 확보하는 것이 중요함
 - 지속적인 연구개발을 통해 생산량 확대 및 새로운 유통 관리 기술 제품 개발이 필요하며, 신제품 개발 완료 시 기존 확보된 판매처를 통해 유통 및 판매

실시가 가능함

- 신제품 및 신기술 개발 기술력 확보 시 수요처 확대에 따른 생산시설 확보 및 인력 충원을 위해 내부 역량 진단을 실시하고 진단 결과에 따라 시설 및 인력 증강 실시
- 국외 전시회 또는 박람회에 해당 제품을 출품하여 홍보를 진행하는 한편 해외 수요처 및 매출처 발굴을 병행하여 국내시장 안정화와 더불어 해외시장으로의 진출을 준비하는 것이 필요함

제 3 절 연구개발 성과

1. 국내외 논문 게재

논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
Disease control efficacy of 32,33-didehydroroflamycoin produced by Streptomyces rectiviolaceus strain DY46 against gray mold of tomato fruit	Scientific reports	Jeong Do kim, Min Young Park, Byeong Jun Jeon and Beom Seok Kim	9	영국	Nature	SCI	2019.09.19	https://doi.org/10.1038/s41598-019-49779-6
Modeling respiration rates of <i>Ipomoea batatas</i> (sweet potato) under hermetic storage system	Food Science and Biotechnology	Seo Hyeon Han	-	한국	Springer	SCI	2019.08.12	https://doi.org/10.1007/s10068-019-00660-2

논문 Modeling respiration rates of *Ipomoea batatas* (sweet potato) under hermetic storage system의 acknowledge는 동국대학교 산학협력단에 기재된 연구과제번호를 기준으로 작성하였으며, 확인을 위해 관련 자료를 마지막 페이지에 첨부파일로 추가합니다.

2. 국내 및 국제학술회의 발표

회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
한국포장학회 (포스터 명 : 고구마 포장내 최적의 산소 이산화탄소 농도 조건 규명)	장한동, 양정화, 이승주 (동국대학교)	2017.10.19	익산식품클러스터	대한민국
The 2018 KSPP Spring Meeting and Conference	이다솜 (경북대학교)	2018.04.26	충북대학교	대한민국
The Korean Society for Plant Biotechnology 2018 Annual Conference	섭화림 (서울시립대학교)	2018.05.31	여수 엑스포컨벤션센터	대한민국
한국포장학회 (포스터 명: 고구마의 밀봉 저장 중 호흡률 모델링)	한서현, 안명현, 김도현, 이승주 (동국대학교)	2018.11.08	제주도 엠스테이호텔	대한민국
한국식물생명공학회	박형준, 섭화림, 김수정, 김선형 (서울시립대학교)	2019.06.14	농촌진흥청	대한민국
The 2019 KSPP Fall International Conference & Symposium for Smart Crop Protection	이홍규 (경북대학교)	2019.10	나주 중흥골드스파 & 리조트	대한민국
2019(사) 한국산업식품공학회 추계 정기총회 및 학술대회	강수현 (동국대학교)	2019.10.25	양재 aT센터	대한민국

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

지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
		출원인	출원일	출원번호	등록 인	등록일	등록번호	
Multiplex PCR kit for detection SPCFV, SPVC, SPFMV and SwPLV	SPCFV, SPVC, SPFMV 및 SwPLV 다중 진단용 PCR 키트	서울시립대학교	2018-12-12	10-2018-0159605	-	-	-	-
Multiplex PCR kit for detection SPCFV, SPV2 and SwPLV	SPCFV, SPV2 및 SwPLV 다중 진단용 PCR 키트	서울시립대학교	2018-12-12	10-2018-0159604	-	-	-	-
Multiplex PCR kit for detection SPLCV and SPSMV-1	SPLCV 및 SPSMV-1 다중 진단용 PCR 키트	서울시립대학교	2018-12-12	10-2018-0159603	-	-	-	-
Composition for promoting sweet potato rooting containing NAA and potassium nitrate as effective component and uses thereof	NAA 및 질산칼륨을 유효성분으로 함유하는 고구마의 발근 촉진용 조성물 및 이의 용도	서울시립대학교	2018-12-12	10-2018-0159607	-	-	-	-
Tetra primers ARMS-PCR molecular marker for discriminating cultivars of sweet potato and uses thereof	고구마 품종 판별을 위한 테트라 프라이머 ARMS-PCR 용 분자마커 및 이의 용도	서울시립대학교 산학협력단	2019-09-30	10-2019-0120901	-	-	-	-
Specific primer set for detection of Fusarium wilt in sweet potato and use thereof	고구마 덩굴쪄김병균 검출용 프라이머 세트 및 이의 용도	전병준, 김범석(책임)	2019-10-02	10-2019-0122423	-	-	-	-

4. 사업화 현황

(단위 : 명, 년)

사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
						국내	국외		
기술 이전	신제품개발	국내	SPV2, SPCVC, SPSMV -1 및 SPCFV 다중 진단용 프라이머 세트 및 이를 이용한 진단 방법 / 고구마 바이러스 진단용 프라이머 쌍 및 이를 이용한 진단방법	고구마 바이러스 병 진단키트 사업화	(주)바이오 큐브시스템	180		2019	

5. 기타

- 고구마 중앙 관리시스템 구축 (<https://goguma.uscmcenter.com/register.php>)
- “고구마 건전묘 제품 상용화 전략 및 비즈니스 모델 수립 “ 출판을 통한 고구마 시장 및 동향 분석 보고서 출간

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절 목표

구분	내용
최종목표	<ul style="list-style-type: none"> • 고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 관리 기준 수립 • 품종 혼입화를 방지를 위해 개발된 검증기술을 이용한 현장 적용 • 고구마 생과 이력 추적 스마트 관리 시스템 개발을 통한 품종단일화 촉진 및 효율적 스마트 유통망 구축 • 고구마 포장재의 개선을 통한 농가소득 증대 • 품종의 순도 및 바이러스, 박테리아, 곰팡이균에 대한 감염여부 조기 확인을 위한 관리 기준 수립
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> • 고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 관리 기준 수립 <ul style="list-style-type: none"> - 조직배양묘가 무병주라는 오해 개선 및 소규모로 난립되어 있는 고구마 무병주 생산 업체에 대한 중앙 집중식 관리 기준 도입 - 현재 검사되어지고 있는 고구마 바이러스 4종 외 무병주 관련 추가 검증시스템 개발 (기 수행된 IPET 지원 R&D 사업을 통해 바이러스 8종 검사 가능) - 새로운 외래 품종 도입에 따른 추가 바이러스 진단 시스템 개발 필요) - 진단 키트 개발을 통한 바이러스에 대한 추가적 검증시스템 개발 - 현 5종 검사시스템에서 바이러스 8종 이상에 대한 검사시스템 개발 - 8종외에 추가 바이러스 검사 시스템 개발을 위한 신규 바이러스 탐색 • 품종 혼입화를 방지를 위해 개발된 검증기술을 이용한 현장 적용 <ul style="list-style-type: none"> - 무병주에 초점이 맞춰진 현재 보급시스템에서 새로운 품종 마커를 이용한 과학적 품종 순도 검증 - 국내 재배중인 일반적인 고구마 품종 8종에 대한 품종 판별 마커 개발 • 고구마 생과 이력 추적 스마트 관리 시스템 개발을 통한 품종단일화 촉진 및 효율적 스마트 유통망 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 무병주 묘 생산에서 소비까지 전 과정의 추적 이력시스템을 개발하여

구분	내용
	<p>소비자에게 생산이력에 대한 정보 제공</p> <ul style="list-style-type: none"> - 소비자가 스마트 앱을 이용하여 간편하게 생산이력 시스템을 확인할 수 있는 시스템 구축 - 대형마트 및 경매시장에서의 적용과 효율적인 관리시스템을 통한 농가 소득 증대방안 제시 - 고구마 생산이력제 추적을 위한 앱 개발 및 기존 포장보다 보존력이 우수한 포장방법을 개발 (기체제어포장법 (MAP) 최적화) <ul style="list-style-type: none"> • 품종의 순도 및 바이러스외의 무병성등을 확인 가능한 관리 기준 수립 <ul style="list-style-type: none"> - 무병주에 대한 바이러스 검증 외에 곰팡이 및 박테리아병 등에 대한 지속관리 표준화 대응, 관리 방안구축 - 품종혼합 방지를 위한 체계적 관리 시스템 마련과 고구마 무병주 생산 방식의 매뉴얼화 - 곰팡이 및 박테리아에 의한 고구마병 진단시스템 5종이상 개발 • 중앙 고구마 무병주 및 스마트 유통관리 센터 운영을 통한 고구마 무병주 생산부터 소비까지의 표준화 <ul style="list-style-type: none"> - 표준화된 고구마 무병주 생산 기법 소개 및 저장성 증대를 위한 클린 포장 기법 도입 - 센터 운영을 이용한 고구마 농업인이 현장에서 필요로 하는 생산기술 및 유통정보 제공

제 2 절 목표 달성여부

1. 고구마 무병주 생산 보급체계 확립 및 생산품 이력 추적 관리시스템 개발

구분	연구개발 목표	달성도	연구개발 내용
1차 연도 (2017)	고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 관리 기준 수립	100	<ul style="list-style-type: none"> • 선행과제를 통해 개발된 고구마 무병묘 대량생산방법의 현장 적용을 위한 육묘법 개선 • 무병주를 이용하여 증식된 건전묘의 현장 적용 타당성 검증 및 실질적 증식시스템 개발
	품종 혼입화 방지를 위해 개발된 검증기술을 이용한 현장 적용	100	<ul style="list-style-type: none"> • 국내 5대 주요 고구마 재배지(논산, 해남, 고창, 예산, 여주)의 재배품종 확보를 통한 고구마 품종 혼입정도 파악 • 선행과제에서 개발된 마커를 기반으로 한 주요재배품종에 대한 이력확인
2차 연도 (2018)	고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 관리 기준 수립	100	<ul style="list-style-type: none"> • 논산 동오 시드와의 현장 시험을 통한 경제성 분석 • 효율적 건전묘의 생산을 위한 현존 시스템 개선
	품종 혼입화 방지를 위해 개발된 검증기술을 이용한 현장 적용	100	<ul style="list-style-type: none"> • 선행과제에서 개발된 마커를 기반으로 한 주요재배품종에 대한 이력확인 • 개발된 마커로 분리되지 않는 품종에 대한 신규마커 개발
3차 연도 (2019)	고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 관리 기준 수립	100	<ul style="list-style-type: none"> • 기존 농가 및 타 육묘업체와의 경제성 비교분석 및 효율적 프로토콜 작성 및 제공
	품종 혼입화 방지를 위해 개발된 검증기술을 이용한 현장 적용	100	<ul style="list-style-type: none"> • 신규품종 판별마커의 개발 및 현장 활용
	중앙 고구마 무병주 및 스마트 유통관리 센터 운영	100	<ul style="list-style-type: none"> • 중앙고구마 무병주 및 스마트 유통관리센터 운영을 통한 고구마 무병주 생산부터 소비까지의 표준화 • (https://goguma.uscmcenter.com/register.php)고구마 이력 추적제를 위한 중앙관리센터 사이트 구축을 통한 소비자들의 QR code 검색을 통한 고구마 육묘단계에서부터의 정보 제공 가능

2. 고구마 신규 바이러스 진단을 위한 기초연구

구분	연구개발 목표	달성도	연구개발 내용
1차 연도 (2017)	고구마 바이러스병의 발생상황 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> • 새로운 외래 품종 도입 등 환경 변화에 따른 고구마 감염 바이러스병의 발생상황 조사
	표준화된 고구마 바이러스 진단 시스템 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> • 안정적이고, 효율적인 고구마 감염 바이러스 진단을 위한 표준 진단시스템 확립
2차 연도 (2018)	고구마 바이러스병의 발생상황 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> • 새로운 외래 품종 도입 등 환경 변화에 따른 고구마 감염 바이러스병의 발생상황 조사
	바이러스별 계통 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> • 진단법 개발을 위한 국내외 고구마 발생 바이러스별 탐색
3차 연도 (2019)	신규 고구마 감염 바이러스 등 진단 시스템 개발 및 표준화 진단 시스템 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> • 국내 미보고 바이러스 등 신규 고구마 감염 바이러스 진단 시스템 개발
		100	<ul style="list-style-type: none"> • 미동정 바이러스 등 고구마 바이러스병 진단 시스템 확립

3. 세균, 곰팡이 병의 조기진단 및 키트 상용화를 위한 기초연구

구분	연구개발 목표	달성도	연구개발 내용
1차 연도 (2017)	고구마 재배 묘상에서 곰팡이 및 박테리아 병의 발생 상황 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> • 논산 동오 시드 고구마 재배 묘상에서 발생한 곰팡이 및 박테리아 병의 발생 상황 및 병원균 조사 • 수집된 곰팡이 및 세균의 균학적 특성 조사 • 확보한 곰팡이 및 세균의 DNA를 추출
	분자생물학적 기법을 이용한 곰팡이 및 박테리아 병 진단 시스템 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> • 고구마에 병을 일으키는 주요 식물병원균에 대한 염기서열 및 분자표지마커 개발 가능 유전자에 대한 정보 조사
2차 연도 (2018)	고구마 재배 묘상에서 곰팡이 및 박테리아 병의 발생 상황 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> • 1차년도 곰팡이 및 박테리아 병 발생 동향 확인 및 병원균 조사 계속
	분자생물학적 기법을 이용한 곰팡이 및 박테리아 병 진단 시스템 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> • 확보한 병원성 곰팡이 및 박테리아와 기존에 알려진 병원균의 염기서열 정보들을 토대로 종 특이적 분자 마커 개발 • 수집한 병원성 곰팡이 및 박테리아의 속 또는 종 내 특이적 PCR 검출을 위한 특이적 primer의 제작 및 특이성 검정
3차 연도 (2019)	고구마 재배 묘상에서 곰팡이 및 박테리아 병의 발생 상황 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> • 곰팡이 및 박테리아 병에 대한 지속관리 표준화 대응, 및 관리 방안 구축
	분자생물학적 기법을 이용한 곰팡이 및 박테리아 병 진단 시스템 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> • 개발된 진단 시스템의 유용성 검정 및 현장 활용

4. 고구마 유통기한 연장 및 신선도 유지를 위한 포장재 개발 / 추적이력제 시스템 개발

구분	연구개발 목표	달성도	연구개발 내용
1차 연도 (2017)	고구마의 호흡 특성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> 고구마의 산소 소비 모델링 고구마의 이산화탄소 배출 모델링 포장 내 최적의 산소, 이산화탄소 농도 조건 규명
2차 연도 (2018)	고구마 MA(Modified Atmosphere) 포장 설계	100	<ul style="list-style-type: none"> 포장 내 대기 조성(산소, 이산화탄소 농도) 모델링 포장 내 대기 조성에 따른 고구마 품질 모델링 최적의 포장재, 용기를 확립
	고구마 이력 추적 off-line스마트 관리 시스템 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> 고구마 추적 이력제 시스템 개발
3차 연도 (2019)	시간 온도 이력에 따른 포장 내 고구마 품질 모델링	100	<ul style="list-style-type: none"> MA 포장 고구마의 품질변화 kinetics 규명 MH 포장 고구마의 품질변화 kinetics 규명
	고구마 이력 추적 off-line 스마트 관리 시스템의 현장적용 및 수정 방안	100	<ul style="list-style-type: none"> 고구마 이력 추적 시스템의 현장적용 및 수정정보완

5. 고구마 바이러스, 세균, 곰팡이 병진단 키트 상용화

구분	연구개발 목표	달성도	연구개발 내용
1차 연도 (2017)	고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 키트 시제품 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> • 진단키트 개발을 위한 시료 및 균주 확보 • 농과원에서 8종 바이러스의 진단 키트 제작 조건 확립 • 진단시스템에 적합한 주형(DNA/RNA) 준비법 확립 • 협동과제에서 개발된 진단 시스템에 적합한 PCR/RT-PCR premix 제작 • 시제품 제작 및 현장 활용도 조사
2차 연도 (2018)	고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 키트 시제품 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> • 신규 개발된 검사시스템을 활용하여 시제품 개선 및 현장 활용도 조사
	개발된 검증기술을 이용한 현장 적용	100	<ul style="list-style-type: none"> • 현장 활용도 조사를 통한 시제품 개선
3차 연도 (2019)	개발된 검증기술을 이용한 현장 적용	100	<ul style="list-style-type: none"> • 개발된 검사시스템을 활용하기 위한 효율적 매뉴얼 작성 및 보완 • 신규 진단키트 시제품 개발 및 현장 활용
	고구마 무병주 대량생산을 위한 검증 표준화 키트 사업화	100	<ul style="list-style-type: none"> • 고구마 무병주 생산의 표준화를 위한 진단시스템 제품 상용화

6. 고구마 건전묘 제품 상용화 전략 수립을 위한 기반 환경 분석

구분	연구개발 목표	달성도	연구개발 내용
1차 연도 (2017)	고구마 건전묘 제품 상용화를 위한 관련 법·제도 분석 및 선행 특허 분석	100	• 고구마 건전묘 관련 국내외 법·제도 분석 및 선행 특허 분석
		100	• 주요 유사특허에 대한 유사도, 독창성, 차별성 등의 종합적 분석을 통한 특허획득 대처 방안 수립
2차 연도 (2018)	고구마 건전묘 제품 상용화 전략 수립을 위한 기반 환경 분석	100	• 해당기술의 핵심가치(차별성, 독창성, 혁신성), 선행기술개발 동향 등의 기술성 분석
		100	• 관련 시장분석(시장규모 및 전망, 주요 경쟁사, 주요 수요처, 시장진입장벽 등)
		100	• 연구개발 성과의 상용화 전략 수립
3차 연도 (2019)	비즈니스 모델(B/M) 수립	100	• 개발 제품의 사업모델 수립(주요 제품군, 고객군, 이해관계자별 주요 Activity 등) 및 사업 프로세스 구축
		100	• 제품 상용화를 위한 핵심기술의 가치, 파급시장 분석, 서플라이 체인, 전후방 연관산업 등의 기반 분석
		100	• B/M 수립을 위한 핵심 파트너, 핵심활동, 핵심지원, 가치제안, 고객관계, 마케팅 채널, 고객세분화, 비용구조, 수익흐름 등의 분석

7. 관련 분야의 기술 발전에의 기여도

○ 고구마 무병주 생산 보급체계 확립 및 생산품 이력 추적 관리시스템 개발

- 생산 농가에서 고구마 무병묘 대량 생산방법(B. subtilis strain JS)의 적용 효과는 실질적으로 수확량 증대 및 건전성 유지를 나타내었다. 이는 농가에서 본 연구팀에서 개발한 대량 생산방법의 사용이 고구마 생산 농가에 적용 가능할 뿐만 아니라 생산량 증가 및 소득 증대에 기여할 것으로 생각된다.
- 농가에서 무병주의 사용 가능성 및 경제성을 확인하였고, 8종의 바이러스를 검정하여 실질적으로 농가에서 사용 가능한 16품종 (베니마사리, 맛젤, 백고구마, 베니하루카, 안노베니, 황금, 베니사쯔마, 울미, 연자미, 풍원미, 신건미, 단자미, 신자미, 주황미, 호감미, 진올미)의 무병주 확보하였다.
- 고구마 66개체 (중복 품종 포함)의 GBS분석을 통하여 품종 별 유전자형 확보와 품종 구분을 위한 SNPs마커를 획득 하였고, 이 연구 결과는 국내 고구마 농가에서의 품종의 혼입을 방지하고 고구마 관련 상품의 단일화 및 규격화를 이룰 수 있을 것으로 생각된다.

○ 2. 고구마 신규 바이러스 진단을 위한 기초연구

- 본 연구에서 고구마 주산지 농가들의 고구마를 확보하여 지역별, 품종별 바이러스의 발생 상황을 조사하였고, 이를 통해 바이러스에 의한 고구마 품질 및 생산량의 저해 심각성이 판단되었으며, 무병주 생산의 필요성을 알 수 있게 되었다.
- 기존에 알려진 바이러스 8종과 국내 보고되지 않았던 고구마 바이러스 8종에 대하여 특이적 프라이머 설계를 통하여 효율적인 바이러스 진단을 할 수 있게 되었으며, 이와 같은 고구마 무병주 생산 시스템을 구축을 통해 수확량 및 품질 향상을 기대할 수 있을 것이다.

○ 3. 세균, 곰팡이 병의 조기진단 및 키트 상용화를 위한 기초연구

- 국내 재배 고구마에 발생하는 곰팡이 및 세균 병에 대한 현황 파악을 통하여, 그 중 고구마 덩굴쪼김병의 원인이 되는 *Fusarium* sp. 종에 대한 병원성 검정을 하였다. 이 결과는 국내 고구마 수확량 및 품질에 대하여 곰팡이와 세균의 영향 조사에 기여할 것이다.
- 국내에서 발생된 곰팡이의 계통 분석을 통해 각 곰팡이 및 세균들의 종별 계통별 병리학 적 특성을 구명할 수 있을 것으로 기대하고 있으며, 이를 통해 병의 방제 체계를 수립함으로써 양질의 고구마 생산에 기여할 수 있을 것으로 기대하고 있다.
- 곰팡이에 대한 유전정보 확보 및 무병주 생산을 위한 식물 병원균에 대한 분자표지마커로의 이용이 가능할 것으로 생각된다.

○ 4. 고구마 유통기한 연장 및 신선도 유지를 위한 포장재 개발 / 추적이력제 시스템 개발

- 본 연구에서 고구마의 호흡 특성을 분석하여, 고구마 포장 기술에 적절한 포장재와 용기

확립 및 포장 내 적절한 대기 조성을 모델링하였다. 또한, 포장 방법에 따른 품질을 비교하여 고구마 보관에 적합한 환경 확립 및 유통기한 연장, 신선도 유지에 기여할 것으로 기대되어 진다.

- 고구마 이력 추적 소프트웨어 개발 및 고구마 유통에 QR code 적용을 실시하였다. 이는 고구마 소비자들이 제품의 품질 정보 (농가의 정보, 개체별 품종, 수확 시기, 저장 기간 및 품질 등)을 손쉽게 획득할 기회를 제공하고 향후 품질의 균일화를 위한 전반적인 추적 및 관리에 용이하게 이용될 것으로 기대되어 진다.

○ 5. 고구마 바이러스, 세균, 곰팡이 병진단 키트 상용화

- 기존 사용되던 고구마 바이러스의 프라이머와 주형 준비법의 개선을 통한 다중 진단 키트 제작 조건 확립 및 제품 개발을 하였다. 이는 무병묘 고구마 생산 및 확인 용도로 사용되어 품질 향상 및 생산량 증대에 기여할 것으로 기대된다.
- 곰팡이 DNA 추출 방법 개선 및 국내 고구마에 발생하는 곰팡이 병 특이적 프라이머를 활용하여 곰팡이 진단키트를 제작 하였으며, 제품의 원활한 사용을 위해 매뉴얼 제작 및 제품 홍보를 실시하였다. 이는 국내 고구마의 생산에 많은 영향을 미치는 뿌리썩음병의 발생율을 낮출 것으로 기대되어 진다.

제 3 절

목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책 (후속연구의 필요성 등)

- 논문 4편 목표 중 2편 (Disease control efficacy of 32,33-didehydroroflomycoin produced by *Streptomyces rectiviolaceus* strain DY46 against gray mold of tomato fruit, Modeling respiration rates of *Ipomoea batatas* (sweet potato) under hermetic storage system)을 게재하였다. 그 중, 후자 논문의 acknowledge는 과제 번호를 다른 논문들과 상이하게 적었으며, 이는 동국대학교 산학협력단에 기록된 연구과제번호를 기준으로 작성하였고, 이를 참고 자료로 제출한다. 그 밖에도 현재 1편 (Molecular identification of sweet potato accessions using tetra primer ARMS-PCR based on SNPs from GBS) revision중임.
- 나머지 3편은 현재 기재를 위한 논문 작성중임 (① Genotyping by sequencing(GBS) and single nucleotide polymorphism(SNP) linkage of sweet potato, ② Characterization of metabolites in sweet potato storage root, ③ Analysis of Starch biosynthesis and accumulation in Sweet potato cv. Yulmi) 2020년도 상반기까지 논문 초과달성 가능할 것으로 판단됨.

제 4 장 연구결과의 활용 계획 등

1. 고구마 무병주 생산 보급체계 확립 및 생산품 이력 추적 관리시스템 개발

- 지역 별 베니하루카 혼재(RAPD결과)를 확인하였고, 고품질 고구마의 표준관리를 위해 SNPs 마커를 통한 고구마 품질(식감 등)의 단일화 및 규격화 실시
- 고구마 중앙 관리 사이트(<https://goguma.uscmcenter.com/register.php>) 구축을 통한 고구마의 육묘단계에서부터 저장, 유통단계까지의 관리 시스템 구축
- 이를 통하여 효율적 품종 관리 및 육묘단계에서부터의 정보를 소비자에게 제공할 수 있음.



그림 163. 고구마 생과에 사용되는 포장지



그림 164. 고구마 포장지 내에 부착되는 이력 추적 QR 코드



그림 165. QR 코드를 통한 고구마의 이력 추적 관리 시스템

2. 고구마 신규 바이러스 진단을 위한 기초연구

- 해남지역에서는 현재 무분별한 외국산 고구마의 유입으로 새로운 바이러스가 국내에 정착되어진 상태임. 익산, 고창, 논산 지역으로의 유입이 되고 있음.
- 추후 바이러스 진단을 위한 기초연구를 실시할 예정이며, 이를 통하여 새로운 바이러스 추적을 위한 진단시스템 개발 예정임.

3. 세균, 곰팡이 병의 조기진단 및 키트 상용화를 위한 기초연구

- 현재 덩굴쪄김병 (Fusarium sp.) 진단시스템은 전무한 상태임. 현재 본 과제를 통해 처음 개발되어졌고 덩굴쪄김병 조기 예방이 가능해짐.
- 육묘장 토양, 씨고구마 등을 대상으로 덩굴쪄김병 조기 진단을 통한 병의 확산 방지 가능해짐. 또한 우수한 품질의 고구마 생산가능.

4. 고구마 유통기한 연장 및 신선도 유지를 위한 포장재 개발 / 추적이력제 시스템 개발

- 고구마의 호흡 특성을 분석하여 포장 내 최적의 산소, 이산화탄소 농도 조건을 규명.
- 고구마의 유통기한 연장을 위해 적절한 환경 조성 (포장 내부 기체 조절)을 위한 포장재, 용기 등을 확립.

5. 고구마 바이러스, 세균, 곰팡이 병진단 키트 상용화

- 기존에 알려진 것과 본 과제를 통해 얻어진 고구마 감염 바이러스 17종과 곰팡이 균주 (*Fusarium oxysporium*)에 대한 자원 확보를 하였고, 고구마 특성을 기반으로 한 샘플의 주형 준비법을 개발.
- 고구마 바이러스 및 곰팡이 병 진단 키트가 개발되었고, 현재 바이오큐브 홈페이지 (<http://www.biocubesystem.com>)에서 진단 키트 관련 자료들과 매뉴얼 등을 확인 가능.
- 본 과제의 결과는 고구마의 무병주 확인을 손쉽게 할 수 있으므로, 이를 활용하여 무병주 생산의 대량생산을 위한 검증 표준화 키트로서 이용 가능.
- 부수적으로는 이 키트 제작 방법을 활용하여 앞으로 고구마에서 새롭게 발견될 병 진단도 추가적으로 진행될 수 있을 것으로 판단.

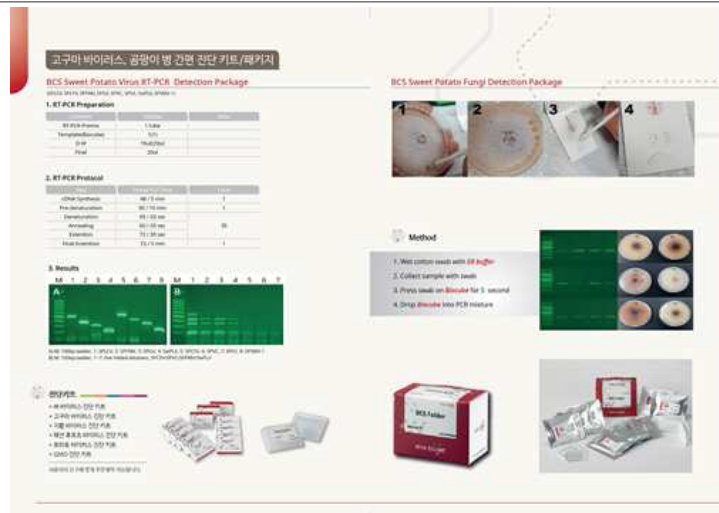


그림 166. 고구마 바이러스, 곰팡이 병 간편진단 키트 홍보지

6. 고구마 건전묘 제품 상용화 전략 수립을 위한 기반 환경 분석

- 본 연구에서 고구마 건전묘 제품 관련 국내외 법과 제도, 선행 특허의 현황을 파악하고, 본 연구의 핵심 가치, 기술성 분석, 관련 시장 분석 실시를 통해 본 연구 성과의 상용화를 위한 전략을 단계별 (타겟 시장 및 개발제품 도출 단계 - 제품 상용화 단계 - 시장 진입 단계 - 시장 확대 단계)로 수립.

붙임. 참고문헌

- Appel DJ and Gordon TR (1996) Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Mol. Pl.-Microbe Interact* 9: 125-138
- Arnold Wexler and Saburo Hasegawa (1954) Relative Humidity-Temperature Relationships of Some Saturated Salt Solutions in the Temperature Range 0°C to 50°C. *J National Bureau of Standards*. 53: 13-26
- DAVID H. PICHA. (1985) Crude Protein, Minerals, and Total Carotenoids in Sweet Potatoes. *J Food Sci* 50: 1768-1769
- Don R. La Bonte, David H. Picha, Hester A. Johnson (2000) Carbohydrate-Related Changes in Sweetpotato Storage Roots during Development. *J AMER SOC HORT SCI* 125(2): 200-204
- Elif Erurk et al. (2002) Modified Atmosphere Packaging of Fresh-cut Sweetpotatoes (*Ipomoea batatas* L.). *ISHS*. 223-230
- Fishman S, Rodov V, Peretz J, Ben-Yehoshua S (1999) Model for gas exchange dynamics in modified-atmosphere packages of fruits and vegetables. *J Food Sci* 60: 1078-1083
- Jeong HJ, Jo YD, Park SW, Kang BC (2010) Identification of Capsicum species using SNP markers based on high resolution melting analysis. *Genome* 53(12): 1029-1040
- KFRI (2003) Post-harvest treatments and storage technology for extending the freshness of sweet potato. 24-26
- Kim JS, Jang HW, Kim JS, Kim HJ, Kim JH (2012) Molecular identification of *Schisandra chinensis* and its allied species using multiplex PCR based on SNPs. *Genes Genomics* 34(3): 283-290
- Kou M, Xu JL, Li Q, Liu YJ, Wang X, Tang W, Yan H, Zhang YG, Ma DF (2017) Development of SNP markers using RNA-seq technology and tetra-primer ARMS-PCR in sweetpotato. *J Integr Agric* 16(2): 464-470
- Kwak HR, Kim MK, Jung MN, Lee SH, Park JW, Kim KH, Choi HS (2006) Virus diseases incidences of sweet potato in Korea. *Plant Pathol J* 22: 239-247
- Kwak HR, Kim MK, Shin JC, Lee YJ, Seo JK, LEE HU, Jung MN, Kim SH, Choi HS (2014) The current incidence of viral disease in Korean sweet potatoes and development of multiplex RT-PCR assays for simultaneous detection of eight sweet potato viruses. *Plant Pathol J* 30(4): 416-424
- Lee J (1987) The design of controlled or modified packaging systems for fresh produce In: *Food Product-Package Compatibility*. Gray JI, Harte BR, Miltz J (eds). Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, USA
- Park MJ, Kim MK, In JG, Yang DC (2006) Molecular identification of Korean ginseng by

-
- amplification refractory mutation system-PCR. Food Res Int 39(5): 568-574
- Wu S, Lau KH, Cao Q, Hamilton JP, Sun H et al (2018) Genome sequences of two diploid wild relatives of cultivated sweetpotato reveal targets for genetic improvement. Nat Commun 9(1). doi:10.1038/s41467-018-06983-8
 - Yang S, Li X, Huang F, Huang Y, Liu X, Wu J, Wang Q, Deng Z, Chen R, Zhang M (2018) A new method based on SNP of nrDNA-ITS to identify *Saccharum spontaneum* and its progeny in the genus *Saccharum*. PLoS ONE 13: e0197458
 - Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN (2001) An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Res 29(17): e88

붙임. 참고자료

- 논문 Modeling respiration rates of *Ipomoea batatas* (sweet potato) under hermetic storage system의 acknowledge는 동국대학교 산학협력단에 기재된 연구과제번호를 기준으로 작성하였으며, 확인을 위해 관련 자료를 마지막 페이지에 첨부파일로 추가합니다.

[별첨 1]

[연구 제 3-1 호 서식]

연구비 지급신청서

산학회계

연구책임자	소 속	식품생명공학과	성 명	이승주
연구과제번호	S-2018-A0436-00004	연구기간	2018-01-01 ~ 2018-12-31	
연구과제명	고구마 유통기한 연장 및 신선도 유지용 위한 포장재 개발 / 추적이력제 시스템 개발 [2/3]			
지원기관/사업명	농림축산식품부 / 농림기술개발연구			

신 청 내 역					
예 산 비 목	실행예산총액 (A)	기신청액 (B)	예산잔액 (A-B)	청구금액	청구 후 잔액
간접비	14,494,000	13,044,600	1,449,400	0	1,449,400
학생인건비	19,200,000	19,200,000	0	0	0
연구장비재료비	12,560,940	8,478,900	4,082,040	0	4,082,040
연구활동비	15,468,991	15,130,000	338,991	150,000	188,991
연구과제추진비	7,103,176	3,318,900	3,784,276	167,400	3,616,876
연구수당	9,000,000	9,000,000	0	0	0
총 계	77,825,107	68,172,400	9,652,707	317,400	9,335,307

첨 부 : 영수증 및 관련서류 1부.

※ 실행예산총액 = 실행예산 + 이자수입액 + 기타수입액 + 미사용잔액

청 구 일: 2018년 11월 19일

신 청 자: 이승주 (인)

과제담당자: 박혜령

산학협력단장 귀하

주 의

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