

발견등록번호

11-1541000-000482-01

생전분발효부신물을 이용한
고부가가치 생물비료제품개발 및 산업화
(Industrialization and development of highly evaluated
biofertilizer (goods) using raw starch fermentative wastes)

(주)한스바이오

농림수산식품자료실



0004813

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “생전분발효부산물을 이용한 고부가가치 생물비료제품개발 및 산업화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 5 월 29일

주관연구기관명 : (주)한스바이오

주관연구책임자 : 최 충 식

세부연구책임자 : 최 충 식

연 구 원 : 이 중 복

연 구 원 : 전 춘 표

연 구 원 : 최 성 연

협동연구기관명 : (주)광진기업

협동연구책임자 : 김 형 국

연 구 원 : 이 재 영

연 구 원 : 권 오 경

위탁연구기관명 : 안동대학교

위탁연구책임자 : 김 건 우

연 구 원 : 권 기 석

연 구 원 : 조 민 섭

연 구 원 : 김 윤 회

요 약 문

I. 제 목

생전분발효부산물을 이용한 고부가가치 생물비료제품개발 및 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구개발의 목적

본 연구는 국내 약주 제조과정 중에 발생하는 생전분발효부산물과 부숙능력이 우수한 내열성 미생물을 포함한 내병성 유용미생물군을 분리하여 고부가가치 생물비료제품을 개발하고자 한다.

고추재배에 가장 많은 손실을 일으키는 병은 역병과 탄저병으로 이들 병원균에 길항능이 있는 미생물을 분리 선발하고자 한다.

유·무기성분 및 발효 후 잔존하는 효모 및 세균균에 대한 활성조건의 최적화에 따른 고부가가치의 안정된 생물학적 제품을 만드는 재활용 효모농법기술이며, 특히 친환경농법이 요구되는 작물 중에 역병(*Phytophthora capsici*), 탄저병(*Colletotrichum sp.*), 및 흰가루병(*Sphaerotheca aphansis*) 등이 문제인 고추와 *Pythium sp.*과 *Fusarium sp.* 등에 의한 벼모썩음병 등에 대해 내병력을 지닌 차별화된 벼를 생산하고자 한다.

따라서 생전분발효부산물과 유용미생물군을 이용한 다기능맞춤형비료와 방출조절형 비료를 개발하여 고추와 벼의 생육촉진을 유도하여 작물생산성 증대를 꾀하며, 경작토의 지력 향상을 도모하는 혁신적인 기능성 생물비료를 개발 및 산업화하는 것을 목표로 한다.

나. 연구개발의 필요성

우리나라의 농업정책은 시간이 지날수록 화학농법에서 점차적으로 환경친화적인 농법으로 변하고 있으며, 식물병충해 방제와 비료의 개발에 있어서는 환경보전을 앞세우면서 친환경적인 신기술로 전환을 하도록 유도하면서 변화하고 있다.

현대의 농법은 대량재배와 화학농업의 발달로 인하여, 생산량은 급속히 증가 되고 있는 실정이나, 현재 이용되고 있는 화학농약으로 인한 독성과 잔류성 문제로 인하여 변이

중으로 증식되는 식물병원균들에 의해 내성의 획득으로 인해 그 효과가 점점 감소되고 있는 실정이다.

또한 농산물에 잔류 농약으로 인해 환경호르몬 문제가 대두 되고 있으며, 최근 사회적으로 스마트 웰빙, LOHAS (Lifestyles Of Health And Sustainability)의 추구로 인하여 생산자와 소비자 모두 안전성에 초점을 두고 생산과 소비를 하고 있는 실정이다.

생물농업관련의 산업체들이 최근 들어 가장 관심을 갖고 있는 분야는 생물농약과 생물비료의 개발을 최우선적으로 생각하고 있으며, 많은 투자를 하고 있다. 세계농업환경의 변화에 맞춰 우리나라도 우수한 농산물을 재배하여 세계시장에 내놓기 위해서 가장 중요한 것은 안전성의 문제 일 것이다. 따라서 가격경쟁을 떠나 이제는 소비자가 원하는 안전하고 우수한 농산물의 생산으로 차별화를 이루어야한다.

현재 국내 농약시장의 규모는 1조원을 육박하고 있는 실정이며, 그중 생물농약시장은 0.2%로 그 수준이 매우 낮은 실정이다. 국내의 경우 대기업과 중소기업의 34개 회사에서 등록된 토양미생물 제제 57품목, 살충제 6품목, 살균제 27품목, 기타 효소제나 유용미생물 제제로 개발되고 있어, 보다 확실한 효능과 다품종 고부가가치화 작업이 필요하다.

유기성 산업폐기물인 생전분발효부산물의 재활용을 위한 내병성 및 생육촉진효과를 갖는 유용미생물군의 첨가에 의한 2차 발효공법을 통해 처분하는 안정화 개념과 농산물 생산에 필요한 친환경성생물비료 확보

친환경 농산물 생산에 필요한 연구개발을 통한 농산자재 공급 및 시비에 따른 지력 증진 효과 또한 생물농약개발과 생물비료 개발에 관한 연구를 분리하여 진행하고 있어 친환경농자재로서의 다기능(생물농약+생물비료)을 보이는 자재가 필요한 실정이다.

나라마다 다른 기후와 재배작물, 재배환경이 다르면, 우리나라의 경우다 각 지역마다 차이를 보이고 있어 국가적으로 지역적인 차이를 안배한 기술 개발이 필요할 것이다.

친환경 농산물을 생산하는 농가들은 기존 농법과 달리 환경친화적인 방법을 통해 농산물을 생산하기 위해 화학비료와 화학농약을 사용하지 않거나 대폭 줄여 이들을 대체할 수 있는 친환경농업자재의 활용가치가 점점 증가되고 있다.

경상북도에서 가장 많이 재배되고 있는 고추와 농업의 주생산품인 벼에 대해 생산량 증가와 병충해 방제할 수 있는 친환경농업자재의 개발이 필요하다. 따라서, 생태계를 보호하고, 자연과 조화를 이루며 지속 발전 가능한 농업을 위해서는 폐자원을 활용한 친환경농자재의 개발, 생물농약과 생물비료 효과를 보이는 제제의 개발이 필요한 실정이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발의 내용은 생전분발효부산물을 이용한 고부가가치 생물비료제품개발 및 산업화로 생전분발효부산물(주박)의 완숙퇴비 생산을 위한 발효 및 효모포자의 활성촉진 안정화 기술 개발, 우수한 식물병 저항성 유용미생물 자원 확보 및 유용물질의 생산 기술 최적화, *in vitro* test 및 기능성 생물비료의 이화학적 조사, 생전분발효부산물을 이용 기능성생물비료의 포장 실험, 시제품내의 생리활성물질의 안정성 및 안전성 실험 등을 을 주로하여 구체적인 연구 내용과 범위는 다음과 같다.

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	(세부) (주)한스바이오 (생전분발효부산물을 이용한 고부가가치 생물비료제품개발 및 산업화)	○ 생전분발효부산물(주박)의 완숙퇴비를 위한 발효화 및 효모포자의 활성촉진 안정화 기술 개발	- 생전분발효부산물내의 과다 알콜함량 저감법 개발 - 생전분발효부산물의 재발효 후 효모균의 포자 촉진을 위한 활성조건 확립 - 쌀겨, 미강, 유청, 유박 등의 농업부산물을 첨가한 퇴비화 개발 - 각종 증량제(광물질) 및 첨가제에 의한 생전분발효부산물 내의 포자형성 조건 최적화 - 생전발효부산물과 부숙능력을 가진 유용미생물과의 퇴비최적화 (pH, 배양시간, 배양온도 등) 확립

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	(세부) (주)한스바이오 (생전분발효부산물을 이용한 고부가가치 생물비료제품개발 및 산업화)	○ 완전 퇴비화된 생전분발효부산물을 이용한 기능성 생물비료의 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 완숙 퇴비화 후 효모균을 비롯한 기타 생리활성물질을 포함하는 다기능맞춤형 비료 및 방출조절형 생물비료 개발 - 각종 제품안정제(다당류, 규산, 계면활성제 등)첨가에 대한 안전성 조사 - 대량 생산을 위한 효율적인 생산 공정 확립 - 시제품 품질변화에 대한조사(보관온도, 습도, 일광조건, 색상, 냄새, 산도, 부식성, 물리적 성상 등) - 시제품 보관기간에 따른 미생물 성상 조사
1차년도	(위탁) 안동대 (유용미생물의 확보와 생전분발효부산물의 후발효조건 최적화 및 활성검증)	○ 우수한 식물병저항성 유용미생물 자원 확보 및 유용물질의 생산기술 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - 확보된 유용미생물군의 선정 - 유용미생물 배양생산 조건 최적화 - 작물(고추, 벼)에 대한 생리활성(생육, 항진균)검증 - 퇴비(발효)전·후 작물에 대한 생리활성 및 대사 산물조사 - 부산물 첨가 한약재 성분 및 생리활성 조사 - 효모포자 활성조건 조사 - 각종 증량제 및 첨가제에 의한 포자형성 조사

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 년도 (2008)	완전 퇴비화된 생전분발효부산물을 이용한 기능성생물비료의 개발	○ 완전 퇴비화된 생전분발효부산물을 이용한 기능성 생물비료의 개발	- 다기능 맞춤형 비료 개발 - 방출조절형 비료 개발 - 미세과립형 제제화 - 미생물제제 처리후 토양중의 미생물 생존확인 - 내병성 유도
	생전분발효부산물을 이용 기능성생물비료의 포장 실험 (1차)	○ 생전분발효부산물을 이용 기능성 생물비료의 포장 실험 (1차)	- 벼재배 시험 성적 - 고추 재배 시험 성적
	<i>in vitro</i> test 및 기능성 생물비료의 이화학적 조사	○ <i>in vitro</i> test 및 기능성 생물비료의 이화학적 조사	- 고추 내병성 유도 시험 - 유용미생물에 의한 비효상승 및 내병력 상승효과 검증 - 시판농약과 비료와의 비교 검증

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구범위
3차 년도 (2009)	○ 생전분발효부산물을 이용 기능성생물비료의 포장 실험 (2차 고추 시험) 및 산업화	- 고추 재배 시험 성적 - 비효/비해검증 - 제품 생산체계 구축	- 고추 재배 시험 성적 - 시제품의 처리에 따른 비효/비해 검증 및 생산량 - 제형화 방법 구축
	○ 생전분발효부산물을 이용 기능성생물비료의 포장 실험 (2차 벼 시험)	- 벼 생육 시험 - 비효/비해 검증	- 벼 생육 시험 성적 - 시제품의 처리에 따른 비효/비해 검증 및 생산량
	○ 시제품내의 생리활성 물질의 안정성 및 안전성 실험	- 생물비료의 환경생태학적인 안전성 조사 - 시제품의 사용량 검증	- 재배 환경에 미치는 영향 조사 - 시제품의 사용량에 대한 매뉴얼 검증

IV. 연구개발결과

생전분 발효 부산물의 특성을 조사한 결과 탄수화물이 34%, 조단백 5.48%, 조지방 0.62%, 조회분 2.38% 비타민B1 2.08, B2 12.39, C 407.05ppm으로 조사되어져 완숙퇴비의 가능성을 알아볼 수 있었으며, 잔존하는 효모의 량도 4.1×10^3 cfu/g로 조사되어졌으며, 이외에도 다양한 종의 미생물들이 분포되었다.

길항능이 우수한 분리균주를 동정한 결과 *Bacillus* sp.의 근연종으로 동정되어 *Bacillus* sp. AM-651이라 명명을 하고 한국생명공학연구원 생물자원센터에 균주를 기탁하여 기탁번호KCTC 11305BP를 받았으며, 고추역병 방제 미생물 바실러스 속 AM-651이라하여 출원번호 10-2008-0037367로 특허 출원, 고추 역병뿐만 아니라 다른 식물 병원성에 대한 방제능을 조사한 결과 다양한 식물병원 균주에 대해 방제능을 보여 친환경생물소제로의 개발 가능성을 보였다.

생장호르몬인 IAA의 전구체로 알려진 tryptophan에 의한 IAA의 생산량 증가에 대한 실험결과 분리 균주가 tryptophan 의존도가 높은 것으로 조사되었다. 그 중 항진균 활성이 가장 우수하게 보고되어진 *Bacillus* sp. AM-651 균주의 경우 생전분발효산물과 최소배지에서 배양시 26.79 ppm의 높은 농도의 IAA를 생산하는 것으로 조사되었다.

IAA의 농도가 과할 경우 세포신장을 저해하는 에틸렌의 합성을 촉진하기 때문에 이를 조절하기 위하여 배지의 종류 또는 전구체인 tryptophan의 농도를 조절하거나, 적정 농도인 10^{-5} - 10^{-6} M 범위로 농도를 조절하여 사용한다면, 주박과 분리 균주를 이용한 친환경농업제제로의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

분리 균주 중 액체배양에서 가장 가용성 인산화능이 우수한 균주를 분리하여 인산량을 측정된 결과 5일 배양을 하였을 때 분리 균주들은 모두 360~400ppm 이상의 불용성 인을 가용성 인으로 전환 시키는 것으로 조사되어졌다.

생전분발효부산물을 이용하여 개발한 제제에 대한 저장성 실험 결과 4℃에서 100일간 저장시에도 *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* 및 *Rhizoctonia solani* 균주에 대한 생육 저지능을 보았을 때 초기와 비교시 각각 90.4%, 89.5% 및 87.1%로써 매우 높은 안정성이 있음을 알 수 있었다.

고추 현장 포장 시험에 있어 생전분발효부산물을 이용한 친환경 제제를 처리구와 비처리구에서 성장의 차이를 뚜렷이 보였다. 신장의 경우 비처리구에 비해 평균적으로 20~30cm정도 크게 성장 하였으며, 잎의 경우 더 많은 것으로 조사되어졌으며 잎의 색 또한 더 짙게 보였다. 잎의 수와 엽록소량이 많으면 광합성을 하는데 있어서 더욱 효율적이며

에너지 대사가 활발할 것이다. 또한 뿌리 상태의 경우도 대조구에 비해 실험구가 전반적으로 모두 발육상태가 우수한 것으로 조사되었다. 뿌리의 발육은 식물성장에 있어 영양분의 흡수율이 우수하여 고추 수확에 영향을 미칠 것이다.

고추에 있어서는 과실의 생산이 가장 중요한 것이다. 한 고추목에서 고추의 1개당 평균 무게를 계산한 결과 평균 20g으로 대조구에 비해 4g 이상이 더 무거운 것으로 조사되었으며, 표피의 두께 또한 생전분발효부산물을 이용한 생물비료를 처리한 고추가 더 2.1cm로 대조구보다 4mm이상 더 두꺼운 것으로 조사되었다.

고추의 경우 평균적으로 열량은 무처리구에 비해 7.8Kcal 낮게 조사되었으며, 일반적인 탄수화물량은 60.6%로 조사되었다. 지방은 처리구에서 무처리구보다 낮은 것으로 조사되었다. 처리구의 경우 포화지방성분이 지방의 20.8%를 차지하고 있으며, 무처리구의 경우 포화지방이 전체지방의 20.7%를 차지하는 것으로 조사되어 불포화지방산의 함량이 처리구와 무처리구 사이에 큰 차이는 없는 것으로 조사되었다. 당류는 처리구가 무처리구에 비하여 약간 높은 것으로 조사 되었으나 유의성은 없었으며, 단백질의 경우 무처리구가 처리구 보다 약간 높은 것으로 조사되었다.

벼의 경우, 현장 포장시험에서 수확 후 100립중 평균 무게는 재배 품종별로 0.2~0.7g 까지 처리구가 비처리구 보다 더 무거운 것으로 조사되었다. 따라서 시제품을 처리할 경우 낱알의 평균 무게는 증가되는 것으로 평균 무게가 증가 될 것으로 조사되어졌다. 또한 광합성에 따른 엽록소량을 비교하여, 대조구와 실험구의 엽록소량 측정을 통해 광합성 정도를 유추하며, 이러한 엽록소의량에 의해 쌀의 성분이 차이가 있을 것으로 예측하여 대조구와 실험구의 엽록소의 량을 조사결과 생전분발효부산물을 이용하여 만든 친환경 생물비료를 처리한 실험구에서 엽록소량이 1~5 SPAD 이상 높게 조사되어, 전반적으로 우수한 것으로 조사되었다.

생전분발효부산물을 이용하여 만든 비료를 처리하였을 때 토양의 변화상을 조사한 결과 pH는 6.0-6.7로 평균적으로 일정한 수준을 보였으며, 유기물 함량이 평균적으로 증가 및 인산의 경우 처리구에서 대체적으로 높게 나타났는데, 이는 시제품에 사용한 균주들이 토양에서 실제 잘 적응하여 불용성인을 가용화 한 것으로 판단된다. 이러한 결과를 종합하면 생전분발효부산물을 이용한 친환경생물제제가 벼 재배지에서도 효과가 우수한 것으로 판단된다.

생물비료를 처리한 쌀의 경우 평균적으로 열량은 대조구에 비해 2.4Kcal 높게 조사되었으며, 일반적인 탄수화물량은 80%로 조사되었다. 지방은 실험구에서 대조구보다 2배 이상 높은 것으로 조사되었는데 쌀의 지방은 대부분이 산화되기 쉬운 불포화지방산으로

구성되어 있으나, 대조구의 경우 포화지방성분이 지방의 71%를 차지하고 있다.

실험구 재배 쌀은 일반 쌀에 비해 식이섬유도 우수하며, 열량도 높아 생전분발효부산물 생물비료를 이용한다면 친환경재배로의 전환과 쌀의 기능면에서도 좋아질 것으로 판단된다.

국·내외 농약회사에서는 지속적으로 다양한 화학농약 및 화학비료를 개발하고 있다. 하지만 세계화에 발맞춰 생물농약과 생물비료를 개발하지 않으면 경쟁에서 뒤처지게 될 것이다. 현재 외국에서 생산되는 생물농약의 경우 그 성분이 분명치 않아 우리 실정에 맞지 않는 실정이다. 또한 국내에서 생산되는 EM제제의 경우 효과에 대해 신뢰성이 크지 않은 실정이다.

따라서 향후 생물농약과 생물비료의 효과를 보이는 다기능 친환경농자재 소재의 개발에 대한 연구가 주를 이룰 것으로 사료되나 시간적으로는 촉박하게 작용할 것이다. 따라서 본 연구를 토대로 유기농업에 적용한다면 조금이나마 빠르게 친환경 농자재의 개발 기술을 확보할 수 있으며, 농산폐자원의 활용 또한 효과적일 것으로 판단된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구결과를 바탕으로 향후 친환경생물제제로의 등록을 통해 친환경농업에 대한 연구를 지속적으로 실시 할 것이며, 본 과제를 통해 출원한 특허(고추역병방제 미생물 바실러스속 AM-651, 출원번호 10-2008-037367, 생물방제 및 생물 비료효과를 가지는 친환경 농업제제. 10-2009-020330)가 등록 되는대로 본 특허를 바탕으로 추가 연구를 통해 경제적 파급효과를 분석하고 친환경농업제제로의 개발에 활용할 수 있을 것이다.

또한 지역 농업기술센터와 협력하여 본 과제를 통해 개발된 상품을 농민들에게 보급 할 수 있도록 유도하고 지역에 친환경 농업발전을 통해 농산품의 고부가가치의 소득을 올릴 수 있도록 할 것이다.

결론적으로 본 과제를 통해 개발된 생전분발효부산물을 이용한 친환경농자재 소재를 생산 및 판매를 통해 산업화를 수행할 계획이다.

SUMMARY

I. Title of the Project

Industrialization and development of highly evaluated biofertilizer (goods) using raw starch fermentative wastes

II. Objectives of the Research and Development

The research was aimed to Industrialization and development of highly evaluated biofertilizer (goods) using raw starch fermentative wastes with useful antagonistic microorganism.

Biocontrol of plant pathogens provides an alternative means of reducing the incidence of plant diseases without negative aspects of chemical pesticides.

Nowadays, as the resistant fungi about the chemical fungicides has revealed and the concern of environment has increased, the biological control of phytopathogenic fungi by the antagonistic microorganisms is very much indispensable.

III. Contents and Scope of the Research and Development

1. Screening of useful antagonistic microorganisms from soils and raw starch fermentative wastes

2. Identification of antagonistic bacteria

3. *In vitro* and *In vivo* (Field test), antifungal activities of antagonistics bacteria

4. Optimization of culture conditions and mass production

5. Formulations of the highly evaluated biofertilizer (goods) using raw starch fermentative wastes

6. Control effects of the highly evaluated biofertilizer (goods) in a small system and fields naturally occurred plant pathogens

7. Storage ability of the highly evaluated biofertilizer (goods) under the different conditions

8. Application and biological control of the highly evaluated biofertilizer (goods) on post-harvests fruits

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	18
Section 1. Necessities of the Research and Development.....	18
1. Scientific and Technological Aspects.....	18
2. Economic and Industrial Aspects.....	19
3. Social and Cultural Aspects.....	22
Section 2. Objectives and Scope of the Research and Development	23
Section 3. Periods of the Research and Development.....	24
Chapter 2. Research background and current technique status.....	25
Section 1. Status and problem of domestic technology	25
Section 2. Status and problem of foreign technology.....	28
Chapter 3. Results and Discussion.....	29
Section 1. Contents and Methods.....	29
Section 2. Experimental Plan	31
Section 3. Materials and methods.....	32
1. Raw starch fermentative wastes test	32
2. Culture and Isolation	32
3. Antifungal activity test	32
4. Bio-fertilizer effect test	33
가. IAA test	33
나. Phosphoric acid test	35
다. Preservation test	35

라. Fertilizer test	35
5. Field test	37
가. Rice field test	37
나. Red pepper field test	37
Section 4. Results and Discussion.....	38
1. Raw starch fermentative wastes property test.....	38
2. Isolation of microbe in Raw starch fermentative wastes	39
3. Isolation of antifungal microbe.....	40
4. Antifungal activity test.....	52
가. Antifungal activity test of <i>Streptomyces</i> sp. AM-50.....	52
나. Antifungal activity test of <i>Streptomyces</i> sp. HSA.....	55
다. Antifungal activity test of <i>Bacillus</i> sp. AM-651.....	56
5. Capsidiol test	58
6. IAA test	61
7. Phosphoric acid test	66
8. Formulation of Raw starch fermentative wastes fertilizer	70
가. Formulation of solid type	70
나. Formulation of liquid type	73
9. Field test.....	75
가. Red pepper field test	75
나. Rice field test.....	94
10. Fertilizer test	119
11. Harvest test	127
가. Nutrition analysis of red pepper	127
나. Nutrition analysis of rice	130

Chapter 4. Achievement and devotion.....	141
1. Achievement of research objective	141
2. Devotion to related field	142
Chapter 5. Application plans of experimental results	143
Chapter 6. Novel foreign informations related to biofertilizer developments	144
Chapter 7. References	145

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	18
제 1 절	연구개발의 필요성	18
1.	기술적 측면	18
2.	경제·산업적 측면	19
3.	사회·문화적 측면	22
제 2 절	연구개발의 목표 및 범위	23
제 3 절	연구기간	24
제 2 장	국내외 기술개발 현황	25
제 1 절	국내 기술개발 현황	25
제 2 절	국외 기술개발 현황	28
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	29
제 1 절	연차별 연구개발 및 내용	29
제 2 절	연구개발 추진 체계	31
제 3 절	연구 내용	32
1.	생전분발효부산물 특성 조사	32
2.	균주 분리 및 배양	32
3.	항진균 활성조사	32
4.	생물비료 효과 조사	33
가.	성장 호르몬 생산 조사	33
나.	인산 가용화능 조사	35
다.	저장 유통성 검증	35
라.	비료 비해 검증 시험	35

5. 포장 시험	37
가. 벼 재배 시험	37
나. 고추 재배시험	37
제 4 절 연구 결과	38
1. 생전분발효부산물(주박)의 특성	38
2. 생전분발효부산물내 미생물 분리	39
3. 식물병 저항성 유용미생물 분리	40
4. 항진균 활성 조사	52
가. <i>Streptomyces</i> sp. AM-50의 항진균 활성	52
나. <i>Streptomyces</i> sp. HSA의 항진균 활성	55
다. <i>Bacillus</i> sp. AM-651 균주의 항진균 활성	56
5. Capsidiol 생성 조사	58
6. IAA 생산능 조사	61
7. 불용성인산의 가용화능 조사	66
8. 생전분발효부산물을 이용 기능성생물비료 제조	70
가. 고형제제 제조	70
나. 액상제제 제조	73
9. 포장 시험	75
가. 고추 포장 시험	75
나. 벼 포장 시험	94
10. 비료 비해 검증 시험	119
11. 수확물 분석	127
가. 고추 영양성분 분석	127
나. 쌀 영양성분 분석	130
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	141
1. 연차별 목표달성도	141

2. 관련분야의 기여도	142
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	143
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	144
제 7 장 참고문헌	145

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

우리나라의 농업정책은 시간이 지날수록 화학농법에서 환경친화적인 농법으로 변하고 있으며, 식물병충해 방제와 비료의 개발에 있어서는 환경보전을 앞세우면서 친환경적인 신기술로 전환을 하도록 유도하면서 빠르게 변화하고 있다.

현대 농법은 대량재배와 화학농업의 발달로 인하여, 생산량은 급속히 증가 되고 있는 실정이나, 현재 이용되고 있는 화학농약으로 인한 독성과 잔류성 문제로 인하여 변이종으로 증식되는 식물병원균들에 의한 내성의 획득으로 인해 그 효과가 점점 감소되고 있는 실정이다.

화학비료의 경우 무분별하게 사용되는 화학비료의 량으로 인하여 토양의 산성화로 인하여 작물의 재배에 문제를 주며 나아가, 생태계에 부영양화를 초래하고 있어 토양회복과 생태계 보호를 위해 생물비료의 개발이 필요한 실정이다.

유기성 산업폐기물인 생전분발효부산물의 재활용을 위한 내병성 및 생육촉진효과를 갖는 유용미생물군의 첨가에 의한 2차 발효공법을 통해 처분하는 안정화 개념과 농산물 생산에 필요한 친환경성 생물비료 확보가 필요하다.

생전분발효부산물에 함유된 미생물 및 천연물을 활용하는 친환경 농법으로서의 '효모농법'에 대한 체계적인 효능 검증이 필요하다.

친환경 농산물을 생산하는 농가들은 기존 농법과 달리 환경친화적인 방법을 통해 농산물을 생산하기 위해 화학비료와 화학농약을 사용하지 않거나 대폭 줄여 이들을 대체할 수 있는 친환경농업자재의 활용가치가 점점 증가되고 있으므로 화학비료를 대처할 수 있는 친환경소재의 생물제제가 필요하며, 생전분발효부산물을 이용한 유기질 비료의 검증이 필요하다.

고추에 발생하는 병해로는 바이러스병해, 잎에 오는 점무늬병(세균성 점무늬병, 갈색 점무늬병, 흰별무늬병), 흰가루병, 청고병, 탄저병 및 역병 등이 있다.

흰가루병은 노지 및 시설재배에서 전국적으로 발생하며, 식물체의 세력이 약해지거나 일교차가 심할 때 많이 발생하나, 난황유 사용법이 보고되면서 친환경 방제효과가 증가하고 있다.

탄저병은 풋고추와 붉은 고추에 점무늬를 형성하여 확대되면서 과육을 썩게 한다. 역

병은 기저부인 뿌리와 줄기 밑둥이 썩어 시들어 말라죽는 병으로 토양전염성이 있다.

유기합성 농약의 오남용은 저항성 균주의 출현과 잔류문제, 환경문제 등을 야기하므로 환경친화적인 방제법으로 병원균의 생육특성을 제어하는 길항미생물을 이용하여 생물학적 방제를 하는 것이 바람직하다.

2. 경제·산업적 측면

환경친화적인 생물제제 및 효과적인 생산공정의 개발은 생물산업의 핵심분야로 FTA 대비 국제경쟁력을 확보하고, 기존의 화학적 방법을 통한 작물보호체계에 대체 또는 협력으로 합성농약의 원재수입에 대한 대외 의존도를 줄일 수 있다.

미생물과 천연활성물질의 이용은 농업생태계에서 현재의 화학적, 기계적 및 재배적인 유해생물 방제방법을 대체 또는 협력하는 새로운 작물보호전략으로 이용이 가능하다.

그림 1과 같이 2013년부터 실시되는 해양투기처리금지로 유기성 산업폐기물 처리현황은 매립은 감소하고 재활용은 증가하는 추세이다. 생전분발효부산물의 재활용 빈도도 증가하고 있으며, 재활용의 부가가치를 증진하기 위한 방안이 필요하다.

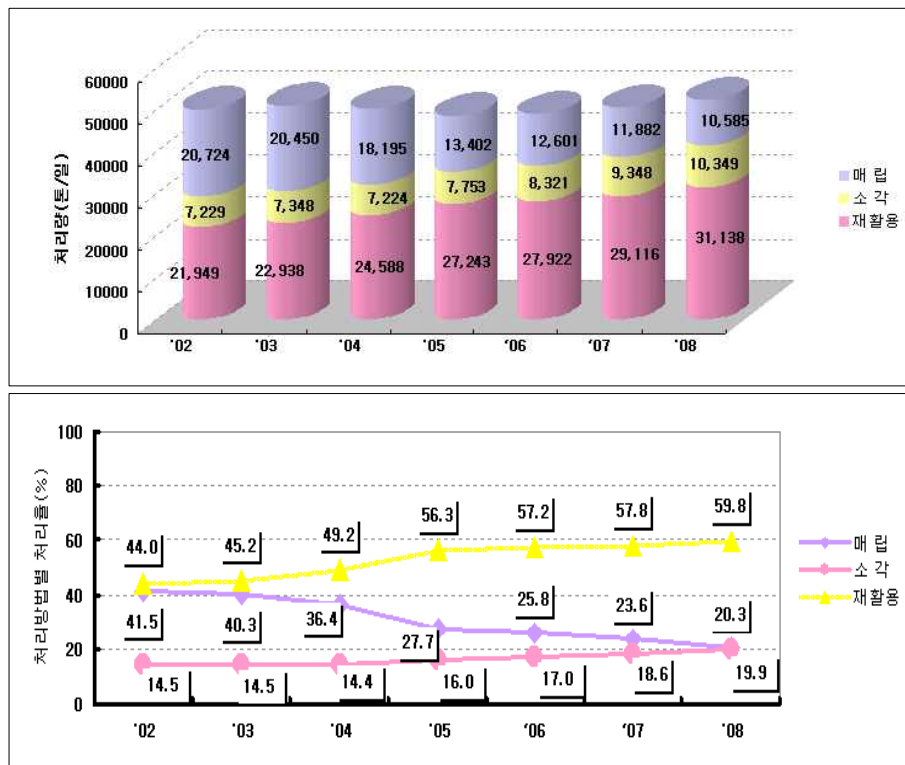


그림 1. 연도별 생활폐기물 처리방법별 처리량 및 처리율 변화추이
(2008 전국폐기물 발생 및 처리현황, 환경부 통계자료, 2009)

경상북도에서 가장 많이 재배되고 있는 고추와 농업의 주생산품인 벼에 생산량 증가와 병충해 방제할 수 있는 친환경농업자재의 개발이 필요하다.

현재 국내 농약시장의 규모는 1조원을 육박하고 있는 실정이며, 그중 생물농약시장은 0.2%로 그 수준이 매우 낮은 실정이지만 잠재적 시장을 형성할 것으로 추측된다.

2007년도 전국 김장용 고추 재배면적은 54,876ha, 경북지역은 14,761ha이며(농림수산식품부, 2009), 지구온난화 방지를 위하여 논의 기능은 유지되어야 하며, 논의 정상적인 순기능 유지를 위하여 친환경농법을 적용한 고부가가치의 산물을 수확할 수 있도록 하여야 한다.

쌀은 우리나라 식생활의 근본을 이루며 우리의 식문화를 형성해오면서 70년대 이전에는 쌀 증산에 관한 문제점이 우리 정부의 최대 과제로 대두되기 시작하였다.

농업 기술의 발전으로 현재 쌀의 부족에 대한 문제점은 사라지고 있으나 2003년 쌀 소비량이 급격히 감소하게 되었다. 이러한 문제점은 우리 식생활 문화가 서구화가 되면서 주식인 쌀 소비 보다는 패스트푸드의 소비량이 증가되어 수입 밀가루의 소비가 증가된 실정이다. 이러한 문제는 국가적으로는 수입농산물로 인한 외화의 유출과 건강학적으로는 성인병의 발병으로 인하여 점차적으로 국민들의 건강을 위협받고 있는 실정이다.

근래 우리나라의 쌀 생산은 주로 육묘과정을 거친 후 기계이앙을 통해 재배하는 방식으로 다수확 위주로 이루어져 왔다. 하지만 WTO와 FTA의 개방체제에 따라 정부의 수곡가에 대한 제한으로 농가에서는 쌀 생산에 대한 비용의 발생과 이익의 측면이 고려되어야 한다. 또한 세계화로 인해 우수농산물을 소비하고 있는 경향이 나타나고 있기 때문에 국민 실정에 맞게 친환경재배를 통해 세계화에 발맞추어 생산하여야 한다.

따라서 화학농약 및 화학 비료의 사용을 줄여 친환경재배를 통해 우리나라 실정에 맞는 친환경농자재의 개발이 매우 필요한 실정이다.

경상북도 북부지역의 안동, 영양, 청송 및 의성 등은 국내 최대 고추 생산지이다. 고추는 김치, 고추장, 양념 및 의약품 원료 등으로 다양한 쓰임새를 가지고 있고, 농가소득 기여도가 높으며, 원예채소 중 재배면적이 가장 넓은 25%를 차지하고 있다. 또한 이렇게 생산된 고추의 소비는 우리나라 국민 1인당 연간 2kg이상을 소비하는 것으로 조사되어져 있다.

고추의 재배면적이 타 작물에 비해 많은 면적을 차지하고 있으면서도 소비량이 많아 중국 등지에서 수입된 고추가 소비되고 있다. 이러한 수입의존을 없애기 위해 많은 재배를 하려해도 농민들이 재배를 주저하는 이유는 고추에 발생하는 식물 병해로 인해 수확량에 대한 확신을 갖기 못한다는 이유인 것으로 사료된다.

고추 재배시 발생하는 대표적인 식물병해는 탄저병, 역병, 및 흰가루병 등이 있다. 그 중 가장 큰 피해를 주는 것은 탄저병과 역병이며, 우리나라 전국 고추 재배지에서 자주 나타나는 가장 큰 문제이다. 고추재배 농가와 관련 산업에서는 이 두 식물병원균에 대한 방제에 역점을 두고 있다.

탄저병은 불완전균류인 *Colletotrichum* sp.에 의해 발생하며, 전염성이 강하여 발병하면 수확량이 50% 이상 감소된다. 역병은 *Phytophthora capsici* 균주의 무성포자에 의하여 번식하는 식물성 병원균이지만 서로 다른 교배형으로 유성적으로 형성되는 난포자는 유전적 변이의 주요 원인이며, 병원성의 변이가 나타나는 것으로 알려져 있다. 이러한 고추 역병은 살균제를 처리하여도 쉽게 방제가 되지 않으며, 병든 포기가 발생하게 되면 병원균이 비바람에 의해 빠른 시간 내에 인접식물로 전파되어 병을 일으키기 때문에 윤작을 실시하여 병원균의 1차 전염원을 제거하는 방법이 가장 좋은 방제로 사료된다.

이러한 문제점으로 인해 고추탄저병 및 역병의 방제를 통해 생산량 증가와 안정된 생산을 위해서 농가에서는 유기화학 농약을 사용하고 있다. 그러나 현재 우리나라에서 사용하고 있는 살균제의 대부분은 원제를 수입하거나 로열티를 지불하고 있어 외화의 낭비로 볼 수 있으며, 또한 합성살균제의 과다 사용으로 생태계의 교란 및 토양오염의 문제를 발생하고 있다. 따라서 길항미생물을 이용하는 생물학적 방제를 통해 재배지의 오염을 줄이고, 안전한 농산물을 재배하는 것이 가장 효과적이라 할 수 있다.

산업적 중요성을 요약하면 다음과 같다.

- 유용 폐자원을 활용한 새로운 재활용 기술 연구 및 개발 활성화 필요
- 친환경 농산물 생산에 필요한 생물비료 소재
- 생전분발효부산물의 재활용 용도 다양화
- 단위 면적당 생산량 증대를 위한 과다한 화학비료 및 농약 사용으로 인한 토양의 산성화, 생산력 감퇴, 품질저하 초래에 대한 대안 마련 필요
- 친환경농법을 이용한 생태계보전에 따른 토양의 오염방지 및 농민 건강회복 기여
- 미생물제제(EM제 등)의 수입대체효과 및 안정된 제품 공급에 의한 농가피해감소
- 친환경농자재 관리 방안에 따른 “목록공시제”에 의한 확실한 친환경제제 공급

3. 사회·문화적 측면

농산물의 잔류 농약으로 인해 환경호르몬 문제가 대두되고 있으며, 최근 사회적으로 스마트웰빙, LOHAS (Lifestyles Of Health And Sustainability)의 추구로 인하여 생산자와 소비자 모두 안전성에 초점을 두고 생산과 소비를 하고 있는 실정이다.

국내외적으로 자연생태계 보존과 다양성이 강조되는 지구환경문제가 제기되고 있는 가운데, 화학물질로부터 자연 및 농업생태계에 있어서 오염 최소화를 위한 환경친화적인 생물제제의 개발이 요구되며, 이는 친환경농업, 합성농약의 대체수단, 안전 농산물생산, 새로운 자원의 산업화를 위한 생물농업의 핵심이다.

무공해 생분해성 천연 생물제제는 좀 더 환경에 친화적이고 인축에 대해 안전하며, 선택적이고 효과적인 무공해 생분해성 천연제제이며, 생태적으로 건전하고 환경적으로 안전하며 사회적으로 신뢰성을 갖는 유해생물 방제법과 작물보호체계를 확립할 수 있다.

합성농약의 오남용으로 인해 유해생물의 저항성 문제가 제기됨에 따라 생태적으로 방제하기 곤란한 이러한 유해생물을 효율적으로 방제하고 또한 화학농약의 대체수단으로 이용하기 때문에 환경오염과 인축에 대한 독성문제를 회피하며 화학농약을 개발하거나 원제를 수입할 때 드는 비용이 막대하기 때문에 생물학적 방제를 통한 작물보호는 개발 비용의 절감과 함께 경제 및 산업적인 이득을 창출할 수 있다.

생물농업관련의 산업체들이 최근 들어 가장 관심을 갖고 있는 분야는 생물농약과 생물비료의 개발을 최우선적으로 생각하고 있으며, 많은 투자를 하고 있다.

세계농업환경의 소비자의 수요(needs) 변화에 맞춰 우리나라도 우수한 농산물을 재배하여 세계시장에 내놓아야 할 것이다. 그러기 위해서 가장 중요한 것은 안전성의 문제 일 것이다. 따라서 가격경쟁을 떠나 이제는 소비자가 원하는 안전하고 우수한 농산물의 생산으로 차별화를 이루어야한다.

국가마다 다른 기후와 재배작물, 재배환경이 다르며, 우리나라의 경우도 각 지역마다 차이를 보이고 있어 국가적으로 지역적인 차이를 안배한 기술 개발이 필요하다.

따라서 경상북도에서 가장 많이 재배되고 있는 고추와 농업의 주생산품인 벼에 생산량 증가와 병충해 방제할 수 있는 친환경농업자재의 개발이 필요하다.

또한 생태계를 보호하고, 자연과 조화를 이루며 지속 발전 가능한 농업을 위해서는 폐자원을 활용한 친환경농자재의 개발, 생물농약과 생물비료 효과를 보이는 제제의 개발이 필요하다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 범위

본 연구는 국내 약주 제조과정 중에 발생하는 생전분발효부산물과 부숙능력이 우수한 내열성 미생물을 포함한 내병성 유용미생물군의 분리를 통해 첨가하여 최적화된 발효 공정으로 유기물 부숙 비료를 제조하고자 한다.

유·무기성분 및 발효 후 잔존하는 효모 및 세균군에 대한 활성조건의 최적화에 따른 고부가가치의 안정된 생물학적 제품을 만드는 재활용 효모농법기술이며, 특히 친환경 농법이 요구되는 작물 중에 역병(*Phytophthora capsici*), 탄저병(*Colletotrichum sp.*), 및 흰가루병(*Sphaerotheca aphansis*) 등이 문제인 고추와 *Pythium sp.*과 *Fusarium sp.* 등에 의한 벼 모썩음병 등에 대해 내병력을 지닌 차별화된 벼를 육종 생산하고자 한다.

따라서 생전분발효부산물과 유용미생물군을 이용한 다기능맞춤형비료와 방출조절형 비료를 개발하여 고추와 벼의 생육촉진을 유도하여 생산성 증대를 꾀하며, 경작토의 지력 향상을 도모하는 혁신적인 기능성 생물비료를 개발 및 산업화하는 것을 목표로 한다.

양조부산물인 생전분발효부산물은 유기성 폐기물로서 퇴비화로의 전환에 대한 많은 관심을 가지고 있어 유해물질이 포함되어 있지 않으면서 양질의 퇴비 원료로 사용이 가능하여 유기질 비료로서의 활용성이 매우 높다.

따라서 생전분발효부산물로부터 유용미생물을 분리하고, 균주의 특성을 파악하고, 생전분발효부산물과 함께 활용하여 생물방제효과 및 생물비료 효과를 동시에 나타낼 수 있는 다기능 친환경 생물소재의 개발 가능성이 제고 될 수 가 있다.

제 3 절 연구기간

구분	연구개발의 내용
<p>1차년도 (2007. 5. 30 ~ 2008. 5. 29)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 생전분발효부산물내의 과다 알콜함량 저감법 개발 - 생전분발효부산물의 재발효 후 효모균의 포자 축진을 위한 활성화조건 확립 - 쌀겨, 미강, 유청, 유박 등의 농업부산물을 첨가한 퇴비화 개발 - 각종 증량제(광물질) 및 첨가제에 의한 생전분발효부산물 내의 포자형성 조건 최적화 - 생전발효부산물과 부숙능력을 가진 유용미생물과의 퇴비최적화 (pH, 배양시간, 배양온도 등) 확립 - 완숙 퇴비화 후 효모균을 비롯한 기타 생리활성물질을 포함하는 다기능맞춤형 비료 및 방출조절형 생물비료 개발 - 각종 제품안정제(다당류, 규산, 계면활성제 등)첨가에 대한 안전성 조사 - 대량 생산을 위한 효율적인 생산 공정 확립 - 시제품 품질변화에 대한조사(보관온도, 습도, 일광조건, 색상, 냄새, 산도, 부식성, 물리적 성상 등) - 시제품 보관기간에 따른 미생물 성상 조사 - 확보된 유용미생물균의 선정 - 유용미생물 배양생산 조건 최적화 - 작물(고추, 벼)에 대한 생리활성(생육, 항진균)검증 - 퇴비(발효)전·후 작물에 대한 생리활성 및 대사 산물조사 - 부산물 첨가 한약재 성분 및 생리활성 조사 - 효모포자 활성화조건 조사 - 각종 증량제 및 첨가제에 의한 포자형성 조사
<p>2차년도 (2008. 5. 30 ~ 2009. 5. 29)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 다기능 맞춤형 비료 개발 - 방출조절형 비료 개발 - 미세과립형 제제화 - 미생물제제 처리후 토양중의 미생물 생존확인 - 내병성 유도 - 벼재배 시험 성적 - 고추 재배 시험 성적 - 고추 내병성 유도 시험 - 유용미생물에 의한 비효상승 및 내병력 상승효과 검증 - 시판농약과 비료와의 비교 검증
<p>3차년도 (2009. 5. 30 ~ 2010. 5. 29)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 고추 재배 시험 성적 - 시제품의 처리에 따른 비효/비해 검증 및 생산량 - 제형화 방법 구축 - 벼 생육 시험 성적 - 시제품의 처리에 따른 비효/비해 검증 및 생산량 - 재배 환경에 미치는 영향 조사 - 시제품의 사용량에 대한 매뉴얼 검증

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술개발 현황

현대농업의 급속한 발전과 화학농약의 발달로 다양한 농약이 개발되어 사용하고 있으며, 이로 인하여 내성을 가지는 식물 병원균의 변이에 따라 점차적으로 사용되는 농약은 고독성화 되고 있는 실정이다.

경제적인 측면에서 유기합성된 화학농약의 사용은 점차 감소되어야 할 실정이지만 현재 그 사용량은 변함이 없으며, 유엔환경개발회의에서는 각국의 화학농약 사용량을 25%씩 줄이도록 권장하고 있으며, 우리나라의 경우 2010년까지 화학농약과 화학비료를 각각 50%와 40%로 사용량을 감축시키기 위하여 준비 중이다(Jung 등 2007, Kim 등 2005).

그러나 농산부산물을 이용하여 퇴비화시켜 시비하는 관행법은 유기합성농약과 화학비료에 밀려 활발하게 기술개발이 되지 않고 있는 실정이다.

한편 맥주효모, 착즙박, 도축폐기물 및 낙농부산물을 이용하여 사료 및 비료를 개발하기 위한 연구는 최근 활발하게 진행되고 있다.

생물비료는 제한적으로 개발되고 있으며, 시장 진입 업체수도 서서히 증가하고 있다. 이러한 친환경농업자재에 대한 핵심기술의 개발보급이 원활하지는 않으나 생산업체를 중심으로 친환경농업자재의 생산을 위한 노력이 진행되고 있다.

친환경농자재들은 대부분이 각각의 병원균에 작용하는 생물농약이며, 생물비료로의 단일기능, 즉 독립적으로 작용하는 친환경체제의 개발에 초점을 두고 연구가 진행되었다(Kim 등 1993, Lee 등 2005, Lee 등 2008, Shon 등 1996).

퇴비의 시용이 식물의 생육 및 토양의 화학성에 미치는 영향, 근권 미생물상 변화, 유용토양미생물의 선발 및 이용 등 기능성을 가지는 유기질 비료개발에 대한 연구가 진행되었다(Joo 등 2002, Kang 등 2005).

화학농약으로 인해 발생하는 환경오염의 문제와 친환경 고품질의 농산물을 선호하는 소비자들의 선호도에 맞추기 위해서는 화학농약의 사용을 감소시켜야 한다.

농업환경의 보전 및 안전한 농산물 생산과 생태계의 보존을 우선으로 하는 친환경적인 농업생명과학의 기술이 급속하게 발달되고 있으며, 생물체제의 종류 및 사용량이 급격히 증가될 것으로 예상되어진다.

미생물농약은 화학농약과 달리 미생물 자체 도는 그 기능을 직·간접적으로 사용하기 때문에 방제효과는 다소 늦거나 낮은 효율을 보이는 단점이 있을 수 있다. 하지만 생

물을 그대로 이용한다면, 친환경적으로 작용하여 화학농약에 저항성을 가진 병원미생물들의 출현을 억제할 수 있으며, 지속적인 병제효과를 가지고 있어 발전 가능성이 매우 크다.

최근 우리나라에서도 생물학적 방제에 대한 연구가 많이 되어왔지만 주로 균주의 선발 등에 많은 것이 집중되어 있고, 최적 조건 등에 관한 생물학적 방제 효과의 증진에 대한 연구, 제제 종류에 따른 생존기간, 처리한 생물학적 방제 균주 등의 환경에서 모니터링 등에 대한 연구는 향후 빠른 개발이 요구되고 있는 상태이다.

표 1. 국내 미생물 및 천연물 유래 친환경소재의 주요 특허출원 현황의 예

특허출원번호	특허출원명	출원인
10-2002-0322240	페니실리움속 F70614(KCTC8918P)와 글루코시다제 저해제	한국생명공학연구원
10-2002-0356993	비티함유 미생물 살충제 조성물	동부한농화학(주)
10-2001-0316146	병해충에 길항작용을 갖는 미생물을 포함하는 농약 조성물	동부한농화학(주)
10-2002-0332357	등얼룩풍뎅이 유충방제용 바실러스 파릴리에 및 그를 이용한 등얼룩풍뎅이 유충방제법	삼성에버랜드(주)
10-2001-0313671	항균활성을 갖는 크립토타카리아 아로마키타 추출물	롯데제과(주)
10-2002-0350391	식물에서 추출한 살비성 조성물	(주)네츄로 바이오텍
10-2001-0294023	작물의 병해장제용 균주, 이를 함유하는 미생물 제제 및 그 용도	(주)그린바이오텍
10-2001-0299763	갯빛곰팡이병균의 중복기생균인 신규 아크레모니움 스트릭툼균주 및 이를 이용한 갯빛곰팡이병의 생물학적 방제	한국화학연구원
10-2002-0317666	슈도모나스 플루오레센스바이오바 IPEB111	강원도
10-2001-0312330	키티나아제 생산성 길항균주 세라티아 프로테아 마쿠란스3095 및 이를 이용한 생물학적 방제법	영남대학교
10-2000-0068944	제노랍두스 네마토틸러스를 이용한 살충방법 및 생물농약 조성물	안동대/비아이지
특2002-0039055	제노랍두스 네마토틸러스 미생물제제와 마이크로캡슐화 방법 및 그 제제와 이를 이용한 생물농약 조성물	안동대/비아이지
10-2003-0030070	헤테로랍디티스 메기디스 KCTC10453 BP	안동대/비아이지

제 2 절 국외 기술개발 현황

화학농약에서 친환경 자재로의 전환을 위해서 천연자원 및 유기성 폐기물의 비료화 기술(Sessitsch 등 2004), 생물학적 방법을 통한 생물비료와 생물농약의 개발은 최근 각광을 많이 받고 있는 분야이다(Chen 등 2003, Li와 Zhang 2000).

생물학적 방제의 경우 일반적으로 근권과 가장 관련이 깊다. 식물의 뿌리에 의하여 가장 영향을 많이 받는 것이 토양이라 할 수 있다, 뿌리부터의 누출(exduate)은 세균과 곰팡이를 포함하여 미생물의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 생물학적 방제를 위해서는 영양요구성이 다양하고 성장이 빠르고, 또한 일부 세균들은 식물병원균에 대하여 억제효과를 가지기 때문에 세균에 특히 관심을 갖고 생물학적 방제 균주를 분리하고자 한다. 생물학적 방제가 때로는 그 결과가 균일하지 못할 때도 있지만 미생물을 이용한 생물학적 방제 균주를 사용하여 뿌리를 침해하는 식물병원균을 성공적으로 방제한 사례가 많은 실정이다(Weller, 1988).

많은 연구자들이 세균이 생물학적 방제 효과를 나타내는 기작에 대하여 연구를 해왔다. 유용 *Pseudomonas* sp.는 식물병원균을 하나 이상의 항생물질 또는 다른 물질을 분비하여 병해를 방제한다는 연구보고가 있다(Fraver, 1988; Smith 등 1986; Schneider 1994; Loper와 Ishimaru 1991).

식물병방제에 대한 생물학적 방제기술 개발은 자연 생태계에 대한 교란이나 환경오염을 줄여 친환경적으로 접근하여 농산물의 생산성과 수익차원에서 지속가능한 농업의 근간을 이룰 수 있는 방법으로 지목되고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

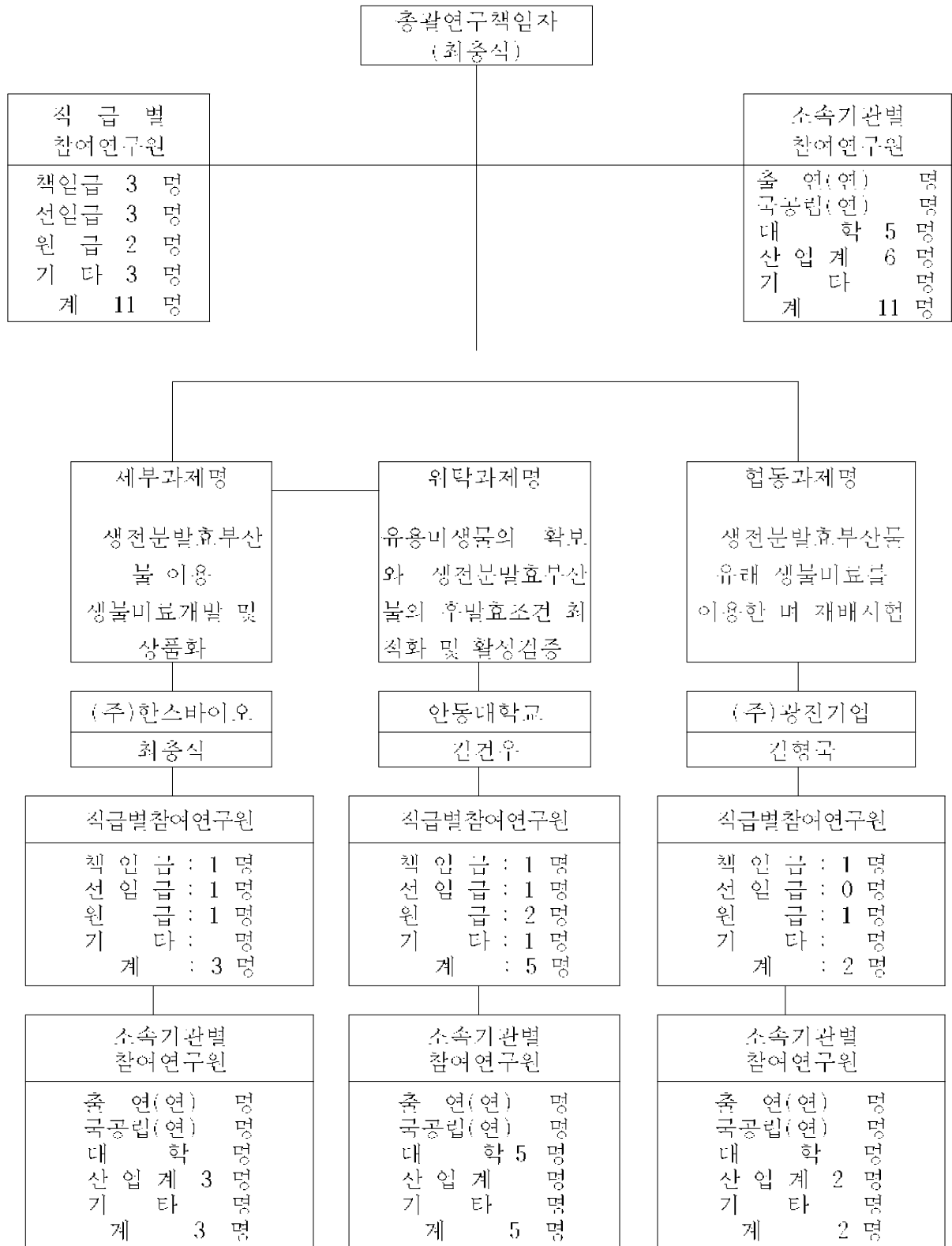
제 1 절 연차별 연구개발 및 내용

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	(세부) (주)한스바이오	○ 생전분발효부산물(주박)의 완숙퇴비를 위한 발효화 및 효모포자의 활성촉진 안정화 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 생전분발효부산물내의 과다 알콜함량 저감법 개발 - 생전분발효부산물의 재발효 후 효모균의 포자 촉진을 위한 활성조건 확립 - 쌀겨, 미강, 유청, 유박 등의 농업부산물을 첨가한 퇴비화 개발 - 각종 증량제(광물질) 및 첨가제에 의한 생전분발효부산물 내의 포자형성 조건 최적화 - 생전발효부산물과 부숙능력을 가진 유용미생물과의 퇴비최적화 (pH, 배양시간, 배양온도 등) 확립
	(생전분발효부산물을 이용한 고부가가치 생물비료제품개발 및 산업화)	○ 완전 퇴비화된 생전분발효부산물을 이용한 기능성 생물비료의 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 완숙 퇴비화 후 효모균을 비롯한 기타 생리활성물질을 포함하는 다기능맞춤형 비료 및 방출조절형 생물비료 개발 - 각종 제품안정제(다당류, 규산, 계면활성제 등)첨가에 대한 안전성 조사 - 대량 생산을 위한 효율적인 생산 공정 확립 - 시제품 품질변화에 대한조사(보관온도, 습도, 일광조건, 색상, 냄새, 산도, 부식성, 물리적 성상 등) - 시제품 보관기간에 따른 미생물 성장 조사
	(위탁) 안동대 (유용미생물의 확보와 생전분발효부산물의 후발효조건 최적화 및 활성검증)	○ 우수한 식물병저항성 유용미생물 자원 확보 및 유용물질의 생산 기술 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - 확보된 유용미생물균의 선정 - 유용미생물 배양생산 조건 최적화 - 작물(고추, 벼)에 대한 생리활성(생육, 항진균)검증 - 퇴비(발효)전·후 작물에 대한 생리활성 및 대사 산물조사 - 부산물 첨가 한약재 성분 및 생리활성 조사 - 효모포자 활성조건 조사 - 각종 증량제 및 첨가제에 의한 포자형성 조사

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 연도 (2008)	완전 퇴비화된 생전분발효부산물을 이용한 기능성생물비료의 개발	○ 완전 퇴비화된 생전분발효부산물을 이용한 기능성 생물비료의 개발	- 다기능 맞춤형 비료 개발 - 방출조절형 비료 개발 - 미세과립형 제제화 - 미생물제제 처리후 토양중의 미생물 생존확인 - 내병성 유도
	생전분발효부산물을 이용 기능성생물비료의 포장 실험 (1차)	○ 생전분발효부산물을 이용 기능성 생물비료의 포장 실험 (1 차)	- 벼재배 시험 성적 - 고추 재배 시험 성적
	<i>in vitro</i> test 및 기능성 생물비료의 이화학적 조사	○ <i>in vitro</i> test 및 기능성 생물비료의 이화학적 조사	- 고추 내병성 유도 시험 - 유용미생물에 의한 비효상승 및 내병력 상승효과 검증 - 시판농약과 비료와의 비교 검증

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구범위
3차 년도 (2009)	○ 생전분발효부산물을 이용 기능성 생물비료의 포장 실험 (2 차 고추 시험) 및 산업화	- 고추 재배 시험 성적 - 비효/비해검증 - 제품 생산체계 구축	- 고추 재배 시험 성적 - 시제품의 처리에 따른 비효/비해 검증 및 생산량 - 제형화 방법 구축
	○ 생전분발효부산물을 이용 기능성 생물비료의 포장 실험 (2 차 벼 시험)	- 벼 생육 시험 - 비효/비해 검증	- 벼 생육 시험 성적 - 시제품의 처리에 따른 비효/비해 검증 및 생산량
	○ 시제품내의 생리활성물질의 안정성 및 안전성 실험	- 생물비료의 환경생태학적인 안전성 조사 - 시제품의 사용량 검증	- 재배 환경에 미치는 영향 조사 - 시제품의 사용량에 대한 매뉴얼 검증

제 2 절 연구개발 추진 체계



제 3 절 연구 내용

1. 생전분발효부산물 특성 조사

생전분발효부산물(주박)은 (주)국순당 황성공장 및 경북 소재 탁주제조공장으로 부터 공급받아 실험에 사용하였으며, 폐기물공정시험기준(환경부 고시)에 준하여 수분, 탄수화물, 조단백, 조지방, 조섬유, 조회분 등을 측정하였으며, 식품공전(식품의약품 고시)에 준하여 비타민 B1, B2 및 C를 측정하고 효모생존량을 측정하여 생전분발효부산물의 특성을 각각 조사하였다.

2. 균주 분리 및 배양

식물병원균의 생장을 억제시키는 길항미생물을 선별하기 위해 경북 북부지역의 고추 재배지 토양과 자연 경작지 토양을 균원시료로 사용하였으며, 채취한 시료 1 g을 9 ml의 멸균생리식염수가 담긴 test tube에 현탁하여, 삼단희석법으로 조제된 시료로부터 현탁액 100 μ l씩 분취하여 LB 및 NA 배지 도말한 다음 30°C에서 2일간 배양하여 미생물을 분리하였다.

순수 분리한 균주들 중 식물병원균을 방제할 수 있는 균주를 선별하기 위하여 paper disc method 방법을 이용하여 각 균주의 배양 상등액을 paper disc 8mm에 100 μ l를 loading 건조시킨 후 disc를 PDA 배지에 접종한 후 중앙에 V8 주스 배지에 전배양한 고추역병의 균총 (5 mm)을 각각 접종 대치배양을 하여 28°C에서 5일간 배양 후 균사생장을 억제시키는 균주를 최종 선별하였다.

3. 식물병원 스펙트럼에 따른 항진균 활성조사

다양한 식물병원성에 대한 항진균 활성을 조사하기 위해 사용된 표준균주로는 *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Alternaria mali*, *Phytophthora infensi*, *Phytophthora capsici*, *Botryosphaeri dothidea*, *Colletotrichum gloeosporioides*를 대상으로 분리 균주의 배양액을 이용 disc 방법인 대치배양법으로 항진균활성을 측정하였다.

4. 생물비료 효과 조사

가. 성장 호르몬 생산 조사

1차년도에 분리동정을 한 AM-651 균주를 포함하여 분리균주 및 주박으로부터 분리한 각각의 균주로부터 생물성장 호르몬인 Indol-3-acetic acid (IAA) 생산 조사는 King-s B 배지(Peptone 2%, K_2HPO_4 0.15%, $MgSO_4$ 0.15%, glycerol 1.5%, pH 7.0)에 접종하여 30°C에서 3일 배양하여 IAA 생산능 확인하였다. 배양 상등액을 Salkowsky reagent와 혼합하여 30분간 반응시킨 후, 반응액의 색상이 분홍색으로 전환된 것을 IAA 생성능이 있는 것으로 결정을 하였으며, 배양액의 생성된 IAA량은 530nm에서 흡광도를 이용하여 측정하였으며 대조구로서 균을 접종하지 않은 배양액을 사용하였고, 표준곡선은 IAA를 이용하여 작성하였다.

또한 그림 2와 같이 IAA의 생산량은 전구체인 L-tryptophan의 양에 따라 그 생성량이 다르게 나타남으로 L-tryptophan의 유무에 따라 IAA의 생산량을 조사하였다.

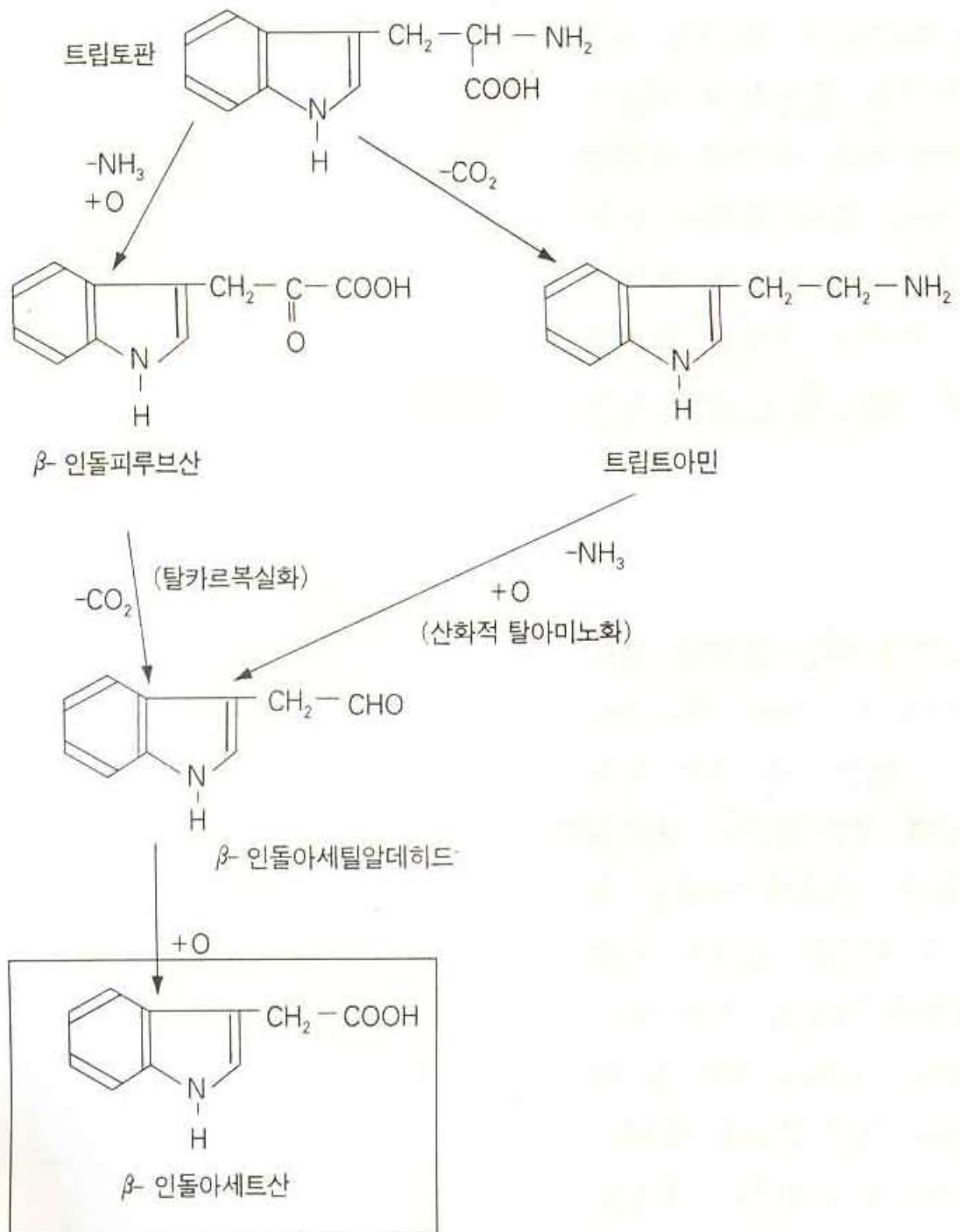


그림 2. 트립토판(Trp)으로부터 인돌아세트산(IAA)의 생산경로.

나. 인산 가용화능 조사

작물의 생장에 필요한 영양소 가운데 중요한 인은 어린 식물과 세포분열이 왕성하게 일어나는 생장점에 가장 많이 함유되어있다. 식물체내에서 인의 역할은 여러 대사작용에 필요한 에너지를 공급해 주며 핵산의 주요한 성분이 된다. 인이 부족한 식물은 뿌리와 줄기의 발달이 빈약하고 발육과 화아 발달 및 개화 상태가 불량하여 과실과 종자 형성이 불균형하게 되어 수량과 품질이 떨어지게 된다.

따라서 화학비료인 인산을 대처할 수 있는 생물비료의 가능성을 알아보기 위해 분리 균주로부터 불용성 인산에 대한 가용능을 조사하여 작물의 인산 이용성을 유도하였다.

불용성 인산 가용능에 대한 실험은 항균활성 및 IAA 생성능을 보이는 균주를 대상으로 NBRIP agar plate (glucose 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.01%, MgSO_4 0.025%, MgCl_2 0.5%, KCl 0.02%와 불용성 인산원으로는 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0.5%, pH7.0)을 사용한 plate assay method로 확인하였다. 분리된 미생물을 NBRIP agar 배지에 획선 도말 후 30℃에서 배양하면서 plate에 clear zone이 생성되는 것을 불용성 인산에 대한 가용능이 있는 것으로 결정하여 판단하였다. 액체상태에서의 불용성 인산의 가용능에 대한 실험은 순수 분리된 미생물을 NBRIP 액체배지에 접종하여 생성된 가용성 인산을 인산측정방법에 의하여 정량을 하였다. 대조군으로는 균주를 접종하지 않은 배지를 사용하였으며, 표준곡선은 KH_2PO_4 를 이용하여 작성하였다.

다. 저장 유통성 검증

미생물을 이용한 친환경제제로의 개발 및 상품화를 위해서는 생산방법과 제품의 제형화 과정에서의 안정성을 높일 수 있는 방법이 필요하다.

본 연구에서는 *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* 및 *Rhizoctonia solani* 균주에 대하여 높은 항진균 활성을 나타내는 배양액을 4℃ 및 상온조건에서 100일간 저장하면서 *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* 및 *Rhizoctonia solani* 균주에 대한 대치배양법을 통해 식물병원균의 생육을 저지하는 정도를 조사하여, 제품의 저장성에 대한 항진균 활성에 대한 안정성을 저장기간에 따른 조사를 하였다.

라. 비료 비해 검증 시험

비료 비해 검증 시험은 *Bacillus* sp. AM-651 유래의 미생물제제가 시설재배 채소류(상추, 케일)의 생육 및 수량에 대한 효과를 검토하여 비료품목 신고를 위하여 비료관리법(법률 제10017호)의 규정에 근거하여 경북대학교 농산물품질안전성평가연구소에 의뢰하여

실험을 진행하였으며, 수행내용은 다음과 같다.

○ 공시작물 : 상추(청치마, 농우바이오), 케일(쌈케일에프시, 아시아종묘)

○ 공시비종 : *Bacillus* sp. AM-651 유래의 미생물제제

○ 공시성분 :

- *Bacillus* sp. AM-651 배양액

- 미생물 배지조성(L):

Glucose :	5 g
K ₂ HPO ₄ :	7 g
KH ₂ PO ₄ :	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ :	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O :	0.1 g
Yeast extract:	0.1 g
pH :	7.0

○ 재배양식 : 시설재배

○ 처리내용 :

(1) 무처리

(2) 대조구(미생물비료; 발근력-FM 애그텍)

(3) 100배 희석액(물 1ℓ: 미생물 제제 10ml)

(4) 1000배 희석액(물 1ℓ: 미생물 제제 1ml)

(5) 5000배 희석액(물 1ℓ: 미생물 제제 0.2ml)

(6) 10000배 희석액(물 1ℓ: 미생물 제제 0.1ml)

○ 처리장소 : 대구광역시 북구 산격3동 1430번지 경북대학교 농대 온실

○ 처리방법 : 직파법

(1) 파종시기 : 파종 - 3월 14일

(2) 처리방법 : 3.3m² 당 수분공급량과 동일하게 미생물제제 처리,
파종 후 5일부터 엽면 살포 처리

(3.3m² 당 물 2ℓ 미생물제제를 희석하여 14일 간격으로 4회 처리)

○ 시험구 배치 : 완전임의 3반복 (분산분석법 - 난괴법)

○ 조사내용 : 토양화학성, 생육, 수량, 품질, 생리장해 등

5. 포장시험

가. 벼 재배시험

생전분발효 부산물과 분리한 유용미생물을 이용하여 새로운 친환경 농자재를 개발하여 시작품을 이용한 소규모의 친환경 벼 재배시험을 통해 이앙부터 수확까지의 결과를 조사하였다.

2차년도는 벼 재배시험을 위해 안동시 농업기술센터의 논 1,200㎡의 소규모 논을 이용하였으며, 3차년도는 벼재배 농가와 계약을 하여 포장시험을 실시하였다.

벼 3품종 (주남, 일품, 설갱)을 각각 400㎡ 정도로 분할하여 일반 농사에서 재배하는 관행방식을 변형하지 않고 화학농약과 화학비료를 대신하여 실험구에 시제품을 처리하여 재배를 하면서 토양의 변화와 벼의 성장 및 쌀의 영양성분의 변화를 조사하였다.

나. 고추 재배시험

본 실험에는 1차년도에 개발된 시제품을 이용하여 고추재배에 사용하였다.

2차년도 고추재배시험은 고추생산지인 경북 영양군 상원지역의 고추 재배 농가의 3,000㎡를 활용하여 고추 수확량과 병해 발생 정도에 대한 조사를 실시하였다.

3차년도 고추 재배시험은 고추생산지인 경북 안동시 남선면 소재의 고추 재배 농가의 1,000㎡와 예천군 농업기술센터 실증시험포장 등을 활용하여 고추 수확량과 병해 발생 정도에 대한 조사를 실시하였다.

제 4 절 연구 결과

1. 생전분발효부산물(주박)의 특성

생전분발효부산물의 특성을 조사한 결과 표 2에서 보는 바와 같이 탄수화물이 34%, 조단백 5.48%, 조지방 0.62%, 조회분 2.38% 비타민B1 2.08, B2 12.39, C 407.05ppm으로 조사되어져 완숙퇴비로의 활용가능성을 볼 수 있었으며, 잔존하는 효모의 량도 4.1×10^3 cfu/g로 조사되어졌으며, 이외에도 다양한 종의 미생물들이 분포되어 있는 우수한 길항 미생물의 기질로서의 특성이 조사되었다.

표 2. 생전분 발효부산물의 조성성분 분석

조성성분	함유량
수분	56.78%
탄수화물	34%
조단백	5.84%
조지방	0.62%
조섬유	2.38%
조회분	0.35%
비타민B1	2.08ppm
비타민B2	12.39ppm
비타민 C	407.05ppm
Yeast(total)	3×10^9 cfu/g
Yeasy(viable)	4.1×10^3 cfu/g

한편 일반적으로 생전분발효부산물(주박)은 술을 만들고 남은 찌꺼기로 알콜함량이 높아 비료로 사용하는데 있어 문제점을 나타낼 수 있으나, 이러한 알콜에 대한 문제로 인해 시비 시 작물에 대한 문제로 나타날 수 있다. 따라서 알콜에 대한 저감방법으로는 주박을 퇴비화하는 과정 중 야적 및 보관 시에 일부는 자연 휘발되고, 일부는 생전분발효부산물에 존재하는 미생물에 의해 탄소원으로 사용되어 자연 저감되는 특성을 보면, 생전분을 바로 시비하였을 때 잔류알콜에 의한 작물 손해가 나타나는 것을 쉽게 저감할 수 있는 특성을 나타내었다.

2. 생전분발효부산물내 미생물 분리

생전분발효부산물으로 부터 다양한 미생물을 분리하기 위하여 세균 분리용으로 LB 배지를 효모 및 곰팡이 분리를 위하여 YPD 배지를 사용하였다.

그림 3과 같이 10여종 이상의 다양한 미생물이 관찰되었으며, 그 중 항진균 활성 및 IAA생성활성이 우수한 균주를 LB 배지로부터 5종, YPD 배지로부터 4종의 분리 균주와 그 외에 곰팡이와 방선균 젯산균을 분리하여 glycerol에 보관하여 균주의 특성을 조사하고, 위탁연구를 통해 균주의 특성을 조사하였다.



LB 배지



YPD 배지

그림 3. 생전분발효부산물내 미생물 분포

3. 식물병 저항성 유용 길항미생물 분리

식물 병원균에 길항능을 갖는 유용미생물 자원을 확보하기 위해 토양과 생전분발효 부산물로부터 분리한 균주 7종을 분리하고, 이들의 식물병원성에 대한 길항능을 조사한 결과 그림 4와 같은 특징을 갖는 균주를 분리하였다.

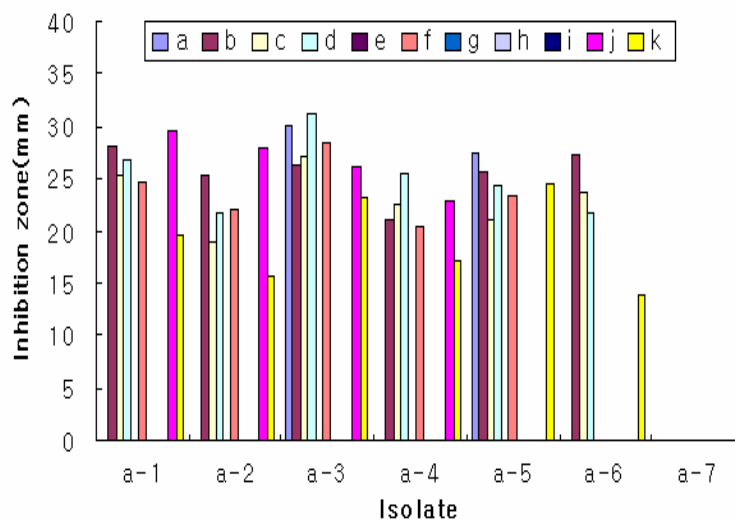


그림 4. 분리 균주의 식물병원균에 대한 길항능.

Plant pathogens : a: *P. capsici*, b: *B. dothidea*, c: *R. solani*,
d: *P. cactorum*, e: *B. grisea*, f: *R. solani*, g: *B. sorokiniana*,
h: *P. infensi*, i: *B. cinerea*, j: *A. rolfsi*, k: *P. ultimum*

분리 균주들은 그림 4와 같이 다양한 식물 병원균에 대하여 방제능을 보이는 것으로 조사되어 식물병해방제 생물비료의 가능성을 알 수 있었다.

그림 5와 같이 식물병원균에 길항 활성을 보이는 *Bacillus* sp., Yeast와 방선균 등을 분리하였으며, 분리 균주중 IAA활성 및 항진균활성을 보이는 균주를 대상으로 식물병원균에 대한 길항능을 조사한 결과 AM651균주가 가장 우수하게 나타났다. 따라서 시제품 개발에 있어 주요한 균주를 AM651로 선정을 하여 AM651을 중심으로 실험을 실시 결과를 도출하였다.

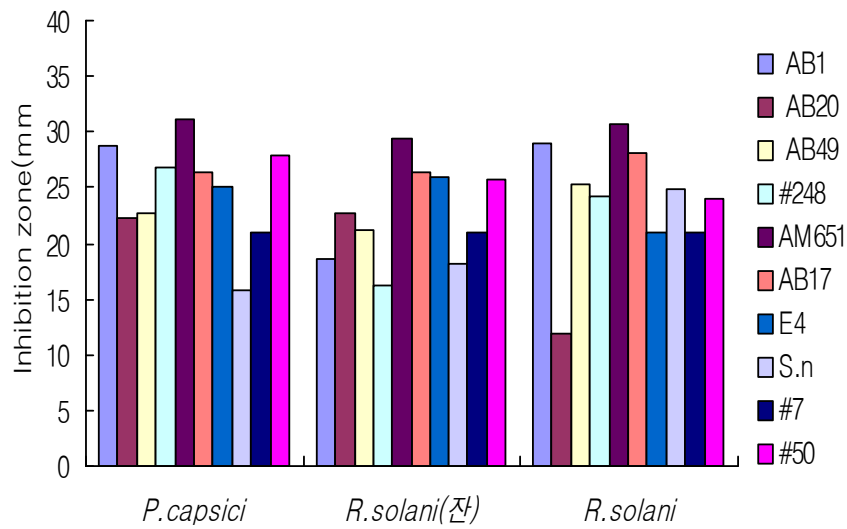


그림 5. 분리균주의 식물병원균에 대한 길항능.

분리 균주를 16S rRNA sequencing 하여 동정한 결과는 표 3과 같은 균에 속하였다.

표 3과 같이 동정된 결과를 바탕으로 각 균주를 HSA007은 *Acetobacter* sp., HSA008은 *Lactobacillus* sp., HSA009는 *Acetobacter* sp., HSA010은 *Lactobacillus* sp., HSA030은 HLS-A1은 *Issatchenkia* sp., HLS-C1은 *Saccharomyces* sp., HLS-C2는 *Saccharomyces* sp., AM-50은 *Streptomyces* sp., HSA-3은 *Streptomyces* sp.로 각각 동정되었으며, *Streptomyces* sp. AM-50균주와 *Streptomyces* sp. HSA-3 균주를 실험에 사용하였다. 분리동정된 균주들은 일반적으로 생물농약 및 생물비료에 사용되는 균주들로 조사되어, 분리 균주가 포함된 생전분발효부산물인 주박을 자체적으로 활용한다면, 친환경 농업소재로의 충분한 활용가능성을 볼 수 있다고 사료된다.

표 3. 분리 균주의 16S rRNA 동정 결과

균주명	가까운 균주 이름	유사도
HSA007	<i>Acetobacter pasteurianus</i> LMG 1629	Identities = 1121/1128 (99%), Gaps = 6/1128 (0%)
HSA008	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. paracasei</i>	Identities = 1117/1137 (98%), Gaps = 15/1137 (1%)
HSA009	<i>Acetobacter tropicalis</i>	Identities = 1137/1159 (98%), Gaps = 11/1159 (0%)
HSA010	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. paracasei</i>	Identities = 1114/1133 (98%), Gaps = 10/1133 (0%)
HSA030	<i>Acetobacter pasteurianus</i> LMG 1629	Identities = 1133/1153 (98%), Gaps = 10/1153 (0%)
HLS-A1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Identities = 562/562 (100%), Gaps = 0/562 (0%)
HLS-C1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Identities = 555/555 (100%), Gaps = 0/555 (0%)
HLS-C2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Identities = 556/556 (100%), Gaps = 0/556 (0%)
AM-50	<i>Streptomyces graminearus</i> NBRC 15420	Identities = 1027/1027 (100%), Gaps = 0/1027 (0%)
HSA-3	<i>Streptomyces natalensis</i> NBRC 13367	Identities = 1025/1027 (99%), Gaps = 0/1027 (0%)

고추 역병이 심하였던 토양으로부터 분리한 균주 중 가장 길항능이 우수한 균주를 AM-651이라 명하고, 이 균주를 이용하여 최소배지, LB 배지 및 생전분발효부산물을 이용하여 배지를 만들어 식물병원균에 대해 대치배양을 통한 길항능을 조사한 결과 그림 6과 같이 주박 뿐만 아니라 첨가물에 따라서도 길항능을 보이는 것으로 조사되었다. 생전분발효부산물인 주박을 이용하여 AM-651균주를 배양하여 배양액을 대치배양하였을 경우 17mm 정도로 나타나던 길항능이 배지의 변화에 따라 처리하였을 경우 그 길항능이 배로 증가 하는 것으로 조사되어 최적화를 하는데 충분한 이용 및 다른 부산물 첨가로 친환경 제제로의 활용가능성이 매우 높은 소재로 판단된다

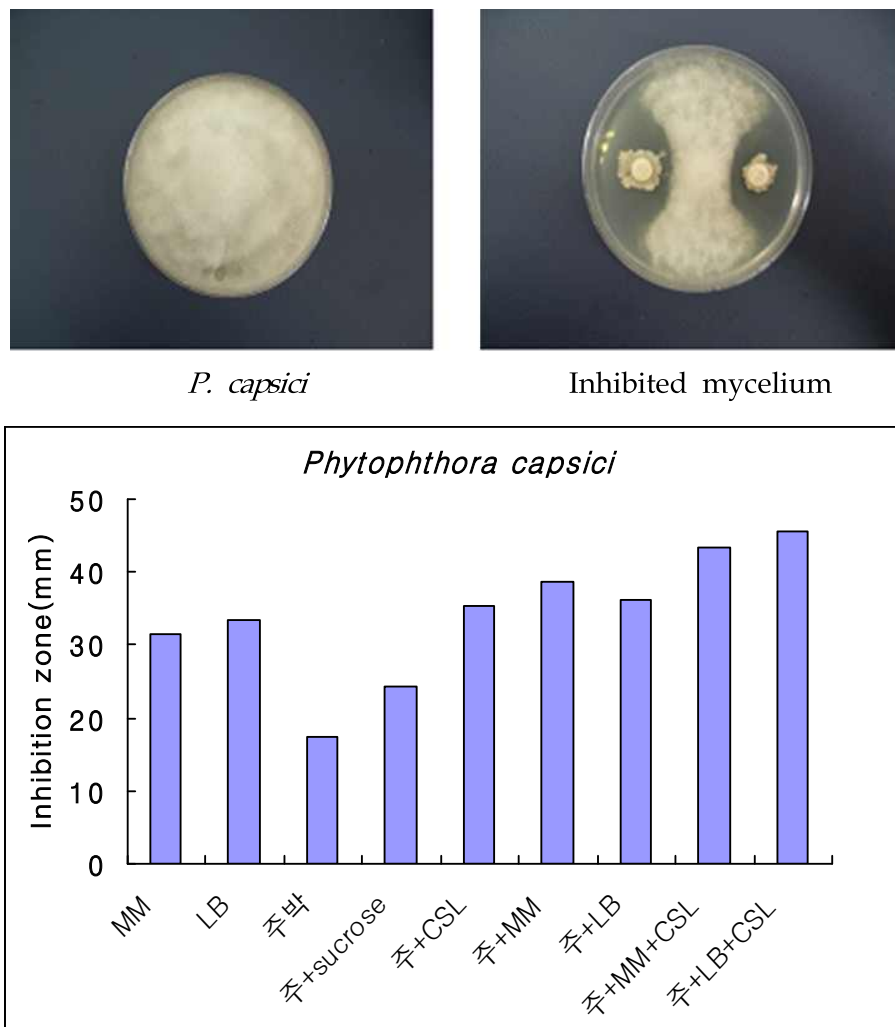


그림 6. 분리 균주 AM651를 이용한 생전분발효부산물과 최소배지 및 첨가물에서의 고추역병에 대한 항진균활성.

길항능이 우수한 분리균주 AM651을 동정한 결과 *Bacillus* sp.의 근연종으로 동정되어 *Bacillus* sp. AM-651이라 명명을 하고(그림 7), 한국생명공학연구원 생물자원센터에 균주를 기탁하여 기탁번호 KCTC 11305BP를 받았으며, 고추역병 방제 미생물 바실러스 속 AM-651이라 하여 출원번호 10-2008-0037367로 특허 출원하였다.

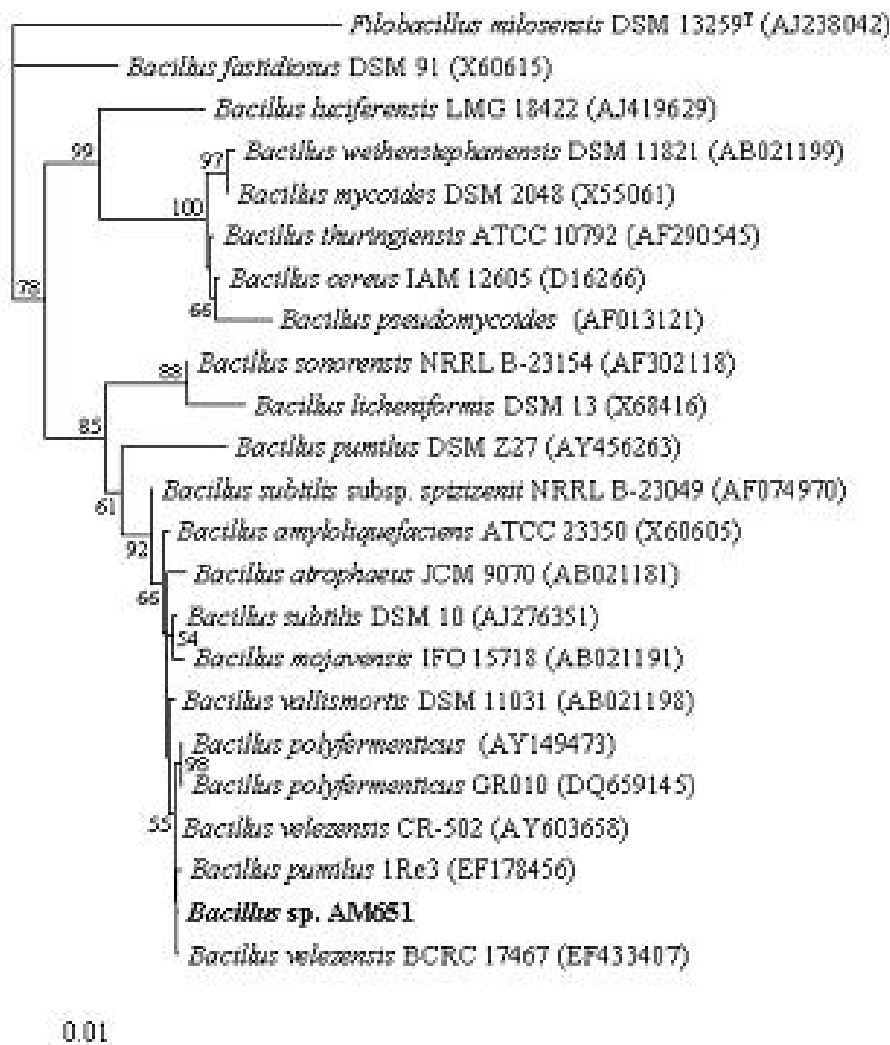


그림 7. Phylogenetic tree for strain AM651 and related organisms based on 16S rDNA sequences.

The distances were calculated using the neighbor-joining method. The numbers at the branch points are bootstrap values (based on 1000 samplings), and only values greater than 50% are shown. The GenBank accession numbers are given. *Filobacillus milosensis* DSM 13259^T was used as the outgroup.

생전분발효부산물(주박)의 보다 높은 길항능을 유도하기 위한 방법으로 다른 부산물을 주박에 첨가하여 *Bacillus* sp. AM-651 균주의 활성도를 조사한 결과 그림 8과 9에서와 같이 부산물(CSL, LB배지, 최소배지) 첨가에 따라 균주의 활성이 높게 조사되었다. 특히 CSL 자체에서는 항진균 활성을 보이지 않았지만, 주박과 CSL를 혼합한 배지에서는 균주의 항진균활성이 두배 이상으로 증가되는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 친환경 제제로의 개발 시 안정화를 위해 다른 첨가물의 첨가에 따른 활성의 증대를 충분히 높일 수 있다고 판단된다.

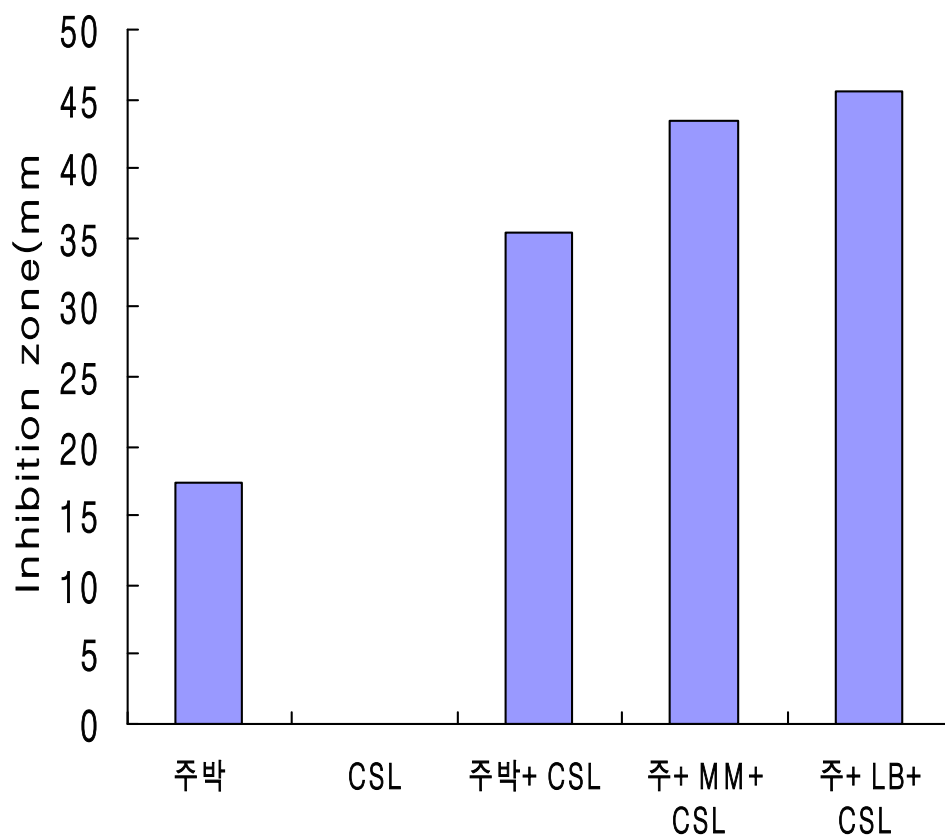


그림 8. 생전분발효부산물(주박)의 활성촉진 및 안정화를 위한 CSL 첨가에 따른 *Bacillus* sp. AM-651 균주를 이용한 역병균에 대한 항진균활성.

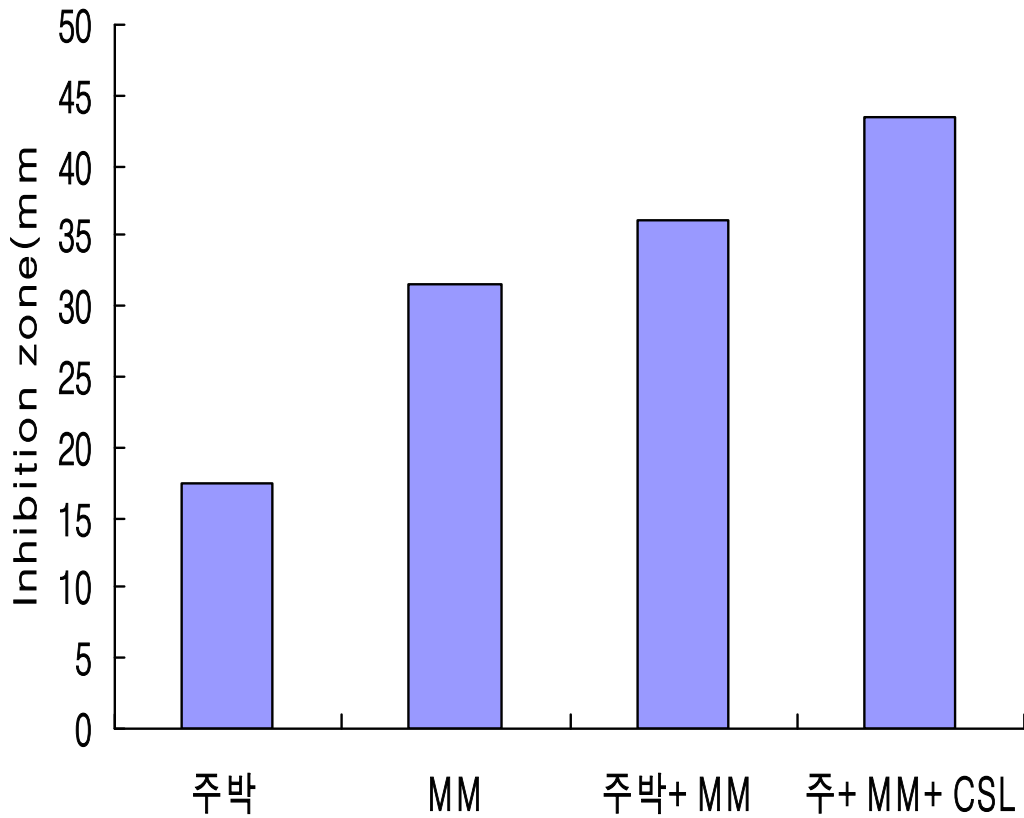


그림 9. 생전분발효부산물(주박)의 활성촉진 및 안정화를 위한 MM 첨가에 따른 *Bacillus* sp. AM-651 균주를 이용한 역병균에 대한 항진균활성.

또한 그림 10과 같이 식물병원균에 다양한 배지조건하에서 조사한 결과로 *Bacillus* sp. AM-651 균주가 우수한 방제능을 보이는 것으로 조사되어져, 향후 친환경농자재로의 개발을 위해서는 다양한 첨가제의 첨가에 따른 최적화공정을 통해 첨가된 부산물에 따른 시너지 효과를 유도 할 수 있을 것으로 사료된다.

이러한 결과를 통하여 혼합제 형태의 생물비료로의 가능성을 입증하였다.

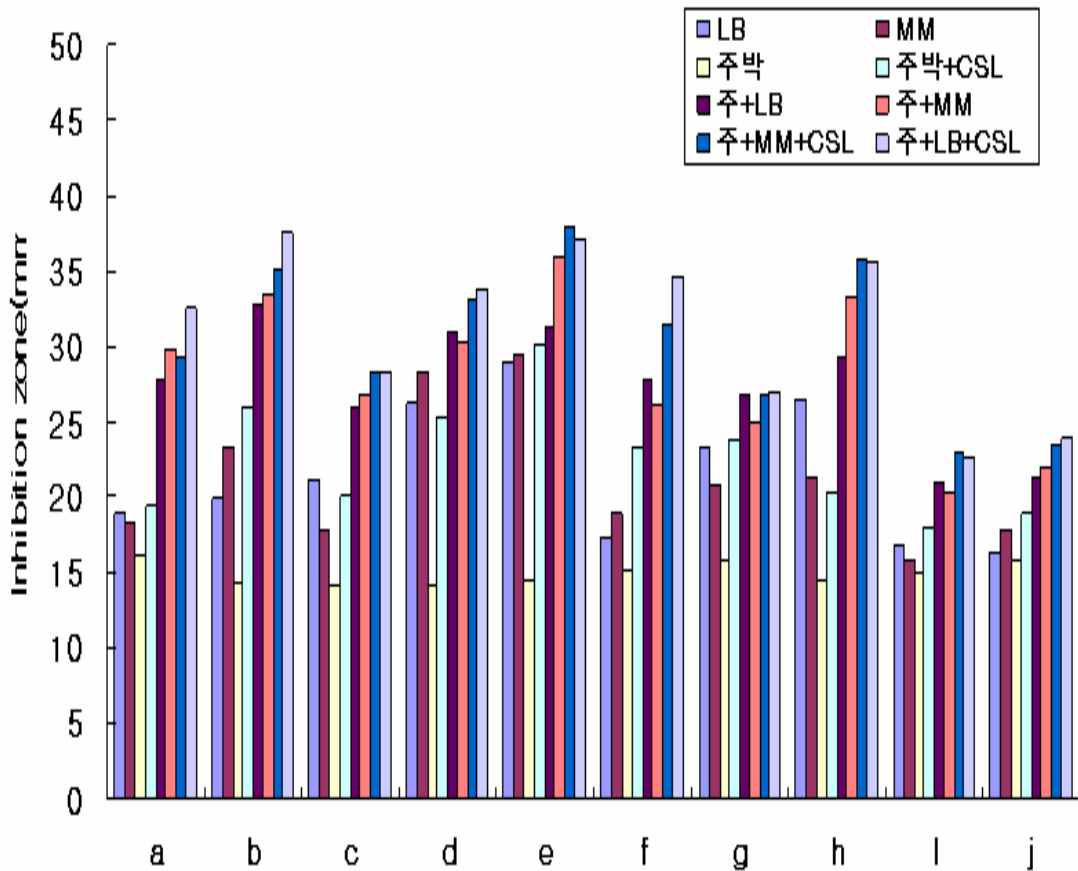


그림 10. 생전분발효부산물(주박)첨가물에 따른 *Bacillus* sp. AM651

균주를 이용한 식물병원균에 대한 항진균활성

a: *Bipolaris sorokiniana*, b: *Rhizoctonia solani*,

c: *Collectrichum glogosporioides*, d: *Botrytis cinerea*,

e: *Fusarium graminearum*, f: *Alternaria mali*,

g: *Phytophthora infensi*, h: *Botryosphaeri dothidea*,

i: *Athelia rolfsii* j: 잔디라지 패취병

분리균주 중 고추 역병에 대해 항진균능이 가장 우수한 *Bacillus* sp. AM-651의 특성을 조사한 결과, 그림 11과 같이 24시간 배양 시 최대의 OD값을 가지며 그때 제어활성은 18.8mm로 조사되었다. 제어활성이 가장 높은 30mm는 배양 48시간인 것으로 조사되어 이는 항진균활성을 나타내는 물질이 2차 대사산물일 것으로 추정된다.

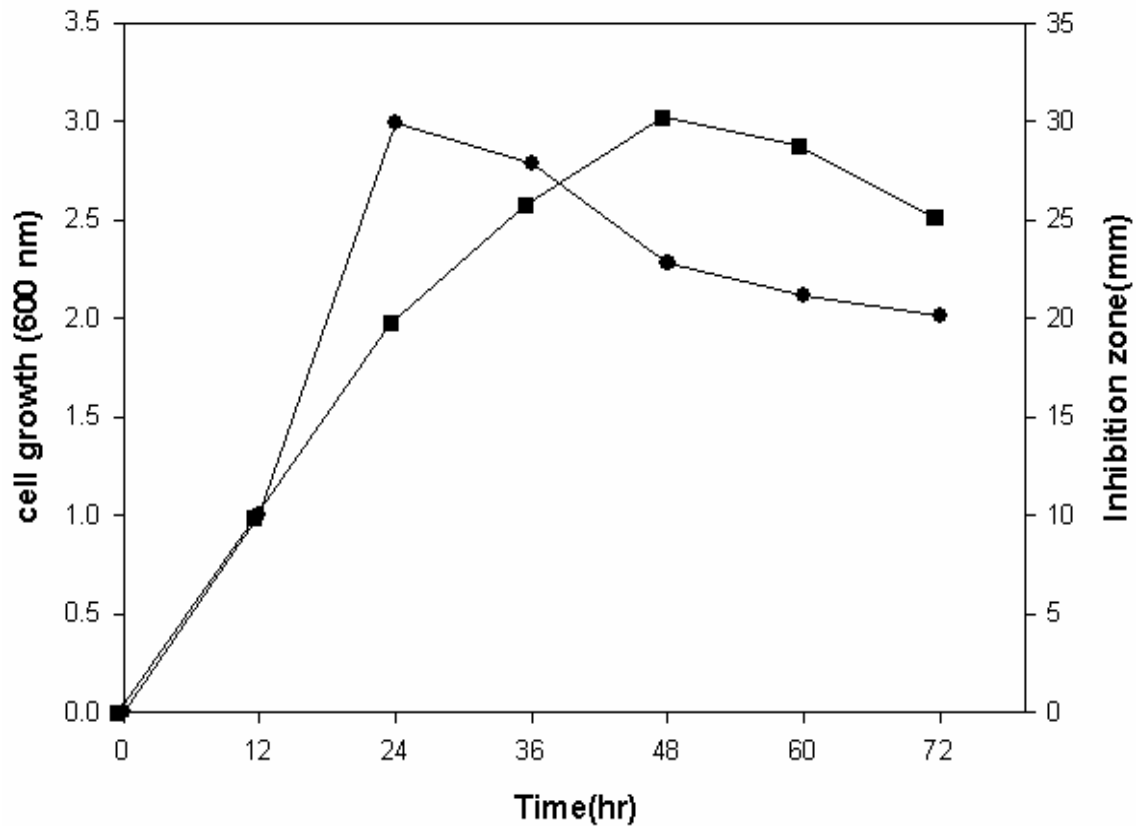


그림 11. Time course of antifungal activity by *Bacillus* sp. AM-651.

(-●-: Cell growth, -■-: Inhibition zone)

그림 12, 13과 같이 분리균주 *Bacillus* sp. AM-651은 pH 7에서 가장 높은 억제율을 보였고, 배양온도에 따른 고추역병균 억제율은 30℃에서 가장 우수하였다.

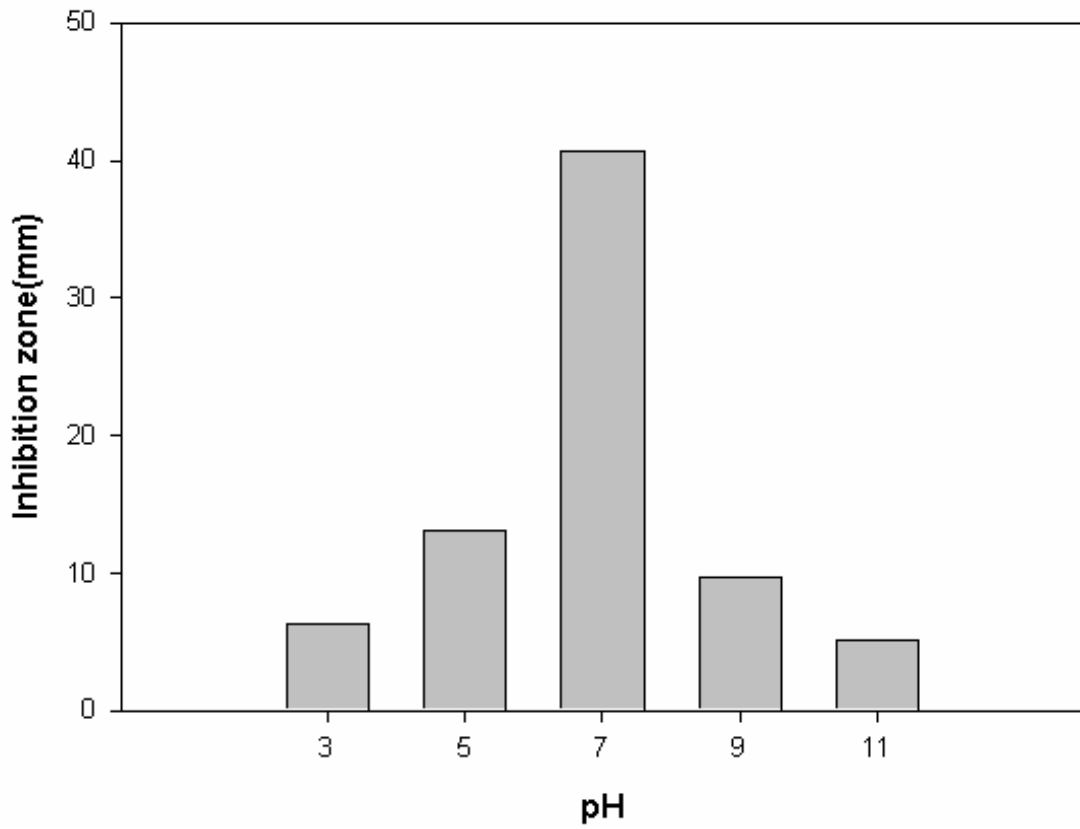


그림 12 . Effect of pH on the antifungal activity from *Bacillus* sp. AM-651.

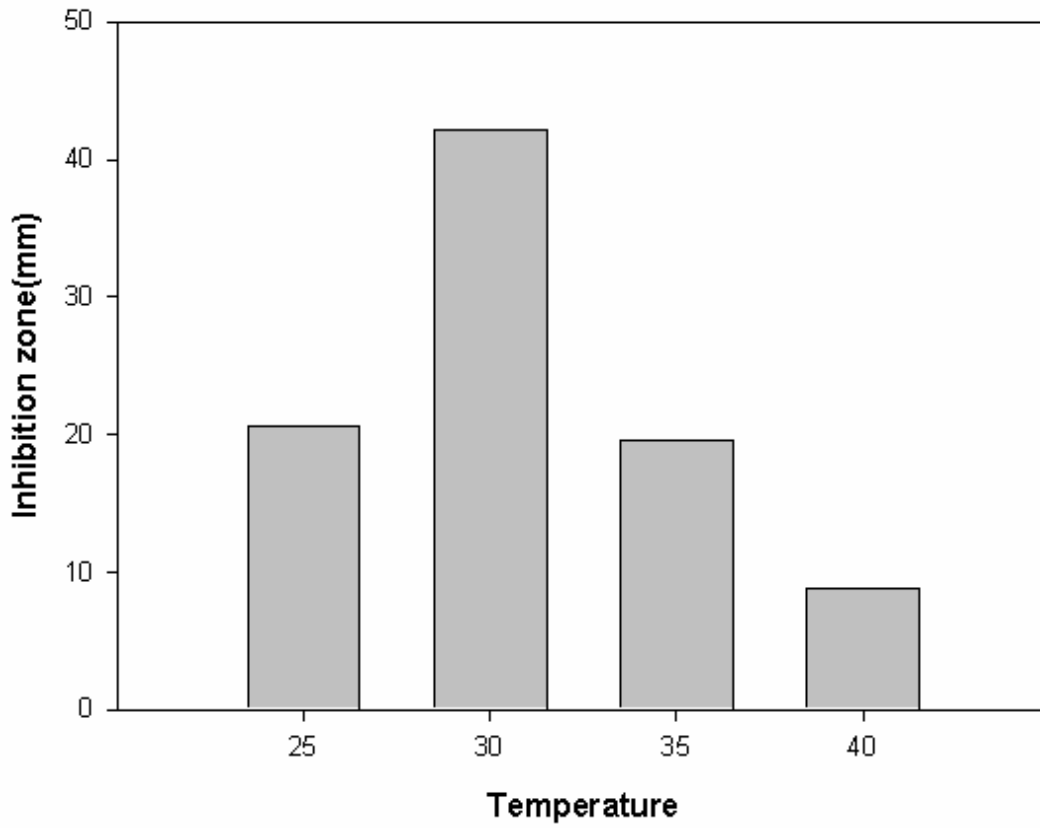


그림 13 . Effect of temperatures on the antifungal activity from *Bacillus sp.* AM-651.

Bacillus sp. AM-651 균주를 고추 역병 뿐만 아니라 다른 식물병원성에 대한 길항 능력을 조사한 결과 표 4에서 보는 바와 같이 다양한 균주에 대해 길항능을 보여 친환경 제제 및 생물 농약으로의 가능성도 보이는 것으로 사료된다.

표 4. *Bacillus sp.* AM-651 균주의 식물병원성 길항능

Plant pathogenic fungi	Inhibition zone (mm)
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	18.50
<i>Botrytis cinerea</i>	20.74
<i>Rhizoctonia solani</i>	19.68
<i>Fusarium graminearum</i>	20.46
<i>Alternaria mali</i>	17.88
<i>Phytophthora infensi</i>	14.11
<i>Phytophthora capsici</i>	32.05
<i>Botryosphaeri dothidea</i>	27.08
<i>Collectrichum gloeosporioides</i>	22.55

4. 항진균 활성 조사

가. *Streptomyces* sp. AM-50의 항진균 활성

분리 균주 *Streptomyces* sp. AM-50의 활용 가능성을 알아보기 위해 *In vitro* 상의 실험을 통해 길항능을 확인하였다.

그림 14와 같이 *Streptomyces* sp. AM-50 균주는 식물병원균주 중 *P. capsici* 와 *C. gloeosporioides*에 항진균활성이 매우 우수한 것으로 조사되었다. 배양기간에 따른 활성을 조사한 결과 배양 7일째에 가장 우수한 활성을 나타내는 것으로 볼 때, 배양액내에 2차 대사산물인 길항능을 갖는 소재에 의한 활성으로 판단된다.

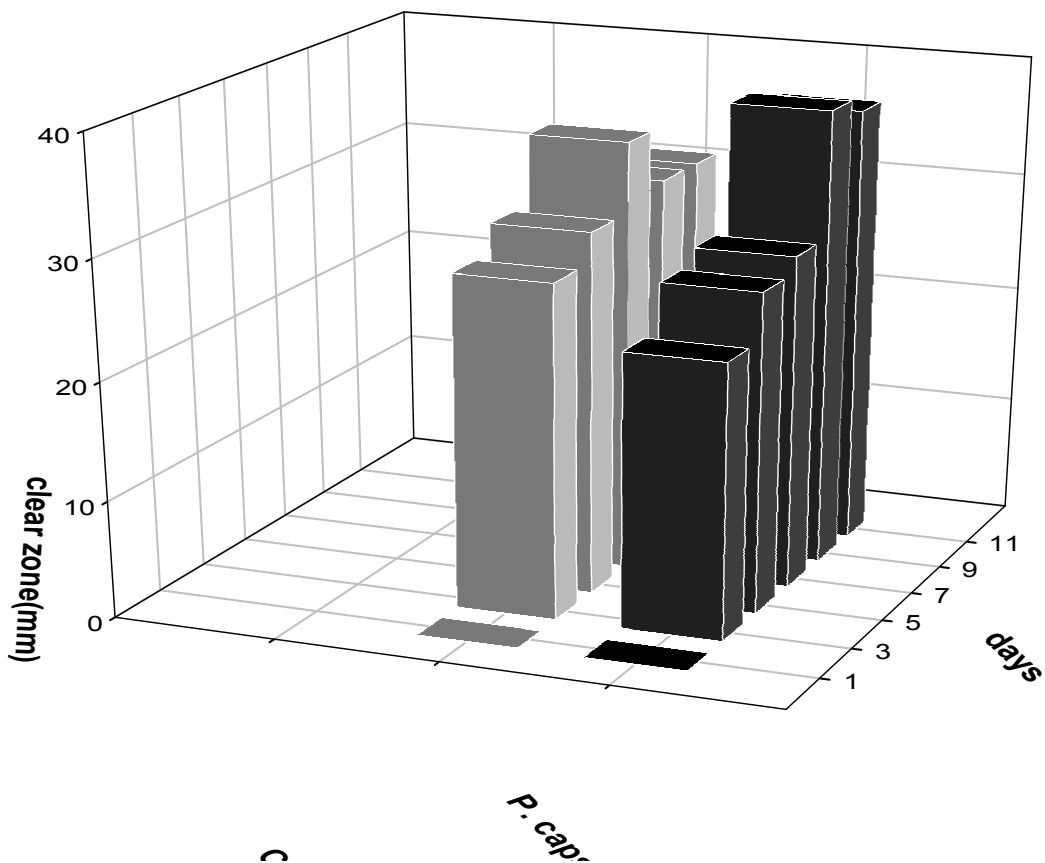


그림 14. *Streptomyces* sp. AM-50 균주의 항진균 활성.

Streptomyces sp. AM-50 균주를 이용하여 시판 농약 중 가장 판매를 많이 하고 있는 화학농약과 비교검증을 통해 균주의 항균능력을 측정된 결과 그림 15와 16에서 보는 바와 같이 화학농약에 비해 월등한 항균능력을 가지고 있는 것으로 조사되었다.

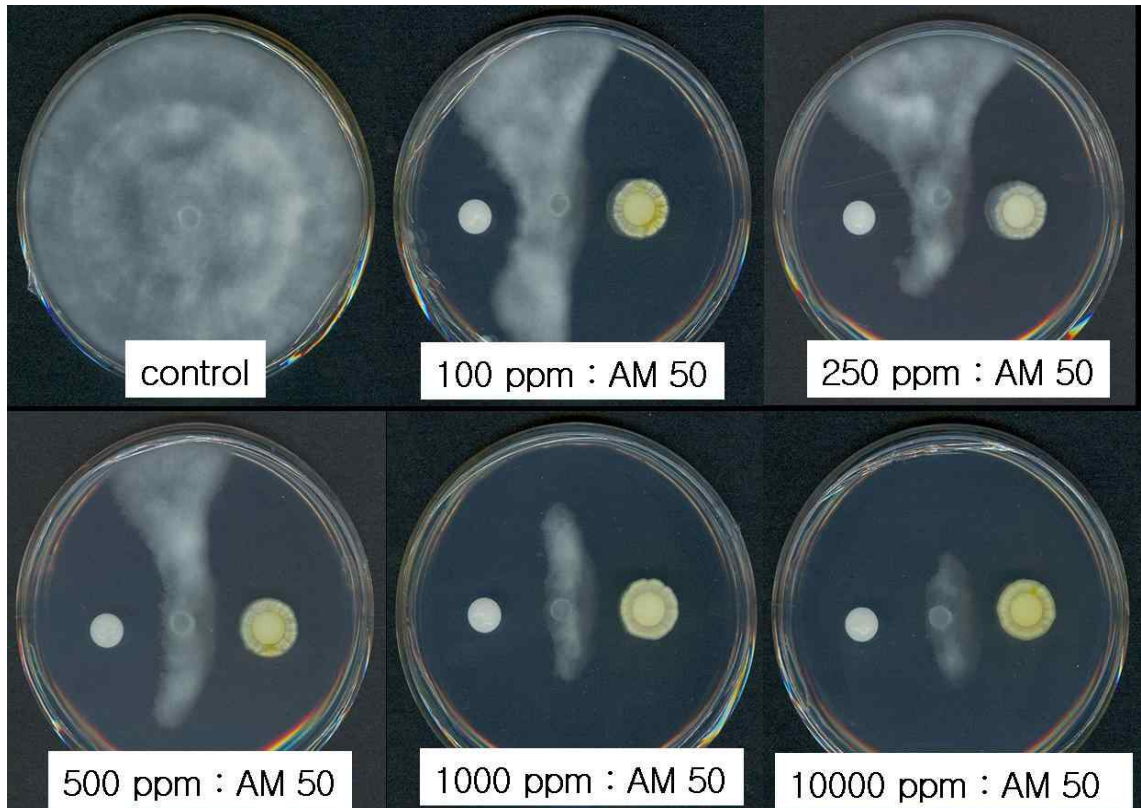


그림 15. 7일 동안 배양한 *Streptomyces* sp. AM-50의 *Phytophthora capsici* 항진균작용.
(compared with chemical pesticide (Kesting, donbangagro))

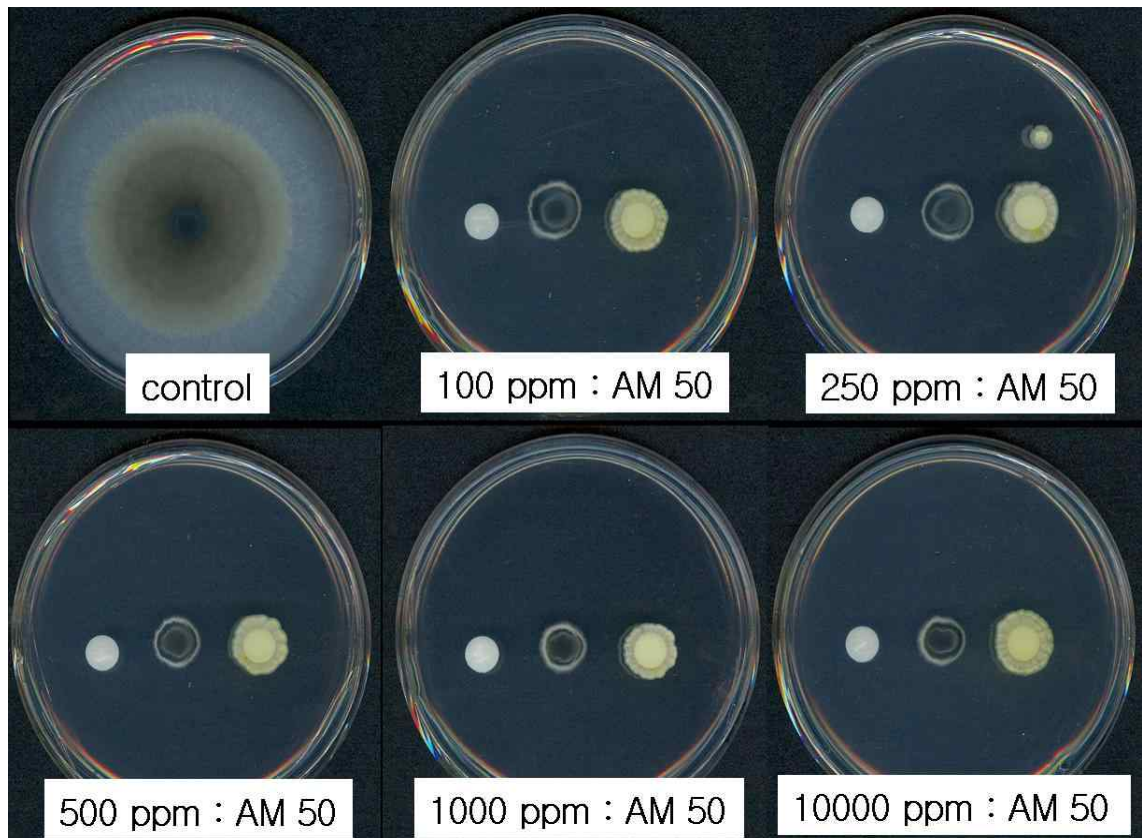
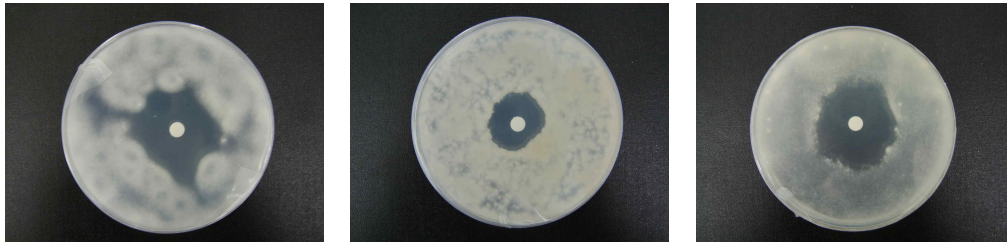


그림 16. 3일 배양 후 *Streptomyces* sp. AM-50의 *C. gloeosporioides* 항진균 작용.
 (compared with chemical pesticide, Sungbochem)

나. *Streptomyces* sp. HSA의 항진균 활성

Streptomyces sp. HSA-3의 경우 그림 17과 같이 고추역병, 고추탄저병 및 벼도열병에 다양하게 항진균 활성이 우수한 것으로 나타나 시제품 개발에 본 균주의 혼용 사용하면 친환경농자재의 항진균제 개발에 매우 효과 적일 것으로 사료된다.



고추역병

고추탄저병

벼도열병

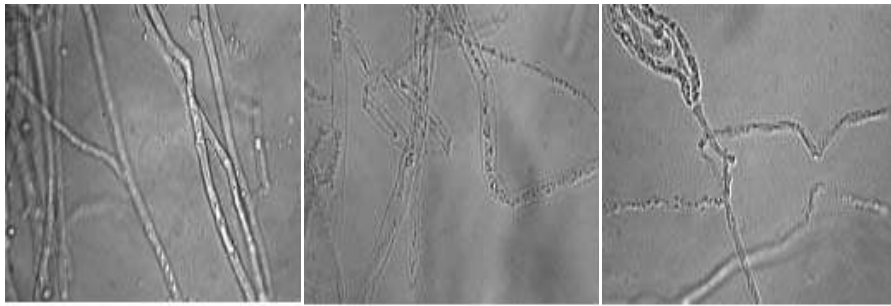
그림 17. *Streptomyces* sp. HSA-3에 의한 항진균활성 측정.

(30°C, 4days, Loading 20 μ l of culture broth)

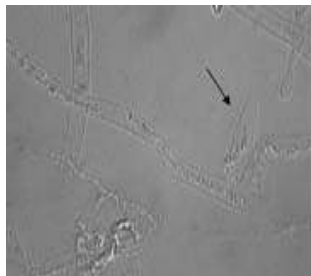
다. *Bacillus sp.* AM-651 균주의 항진균 활성

Bacillus sp. AM-651 균주는 배양 시간에 따라 항진균 능이 다소 차이를 보였다. 고추 역병의 경우 9일째에 항진균 활성이 가장 크게 나타나 38.55mm의 clear zone을 확인 할 수 있었으며, 탄저병의 경우 7일째에 36.31mm의 clear zone을 보여 두 균주에 대해 활성이 우수한 것으로 조사되어졌다.

그림 18과 같이 현미경 조사 결과 *Bacillus sp.* AM-651 균주는 역병 균사를 lysis시키거나 Abnormal swelling현상을 보이는 것으로 역병의 증식을 억제하는 것으로 확인되었다.



Abnormal mycelial lysis of *P. capsici*.



Abnormal swelling (arrow) of *P. capsici*.

그림 18. *Phytophthora capsici*에 대한 *Bacillus sp.* AM-651 균주의 항진균작용

Streptomyces sp. AM-50, *Streptomyces* sp. HSA 및 *Bacillus* sp. AM-651 균주의 고추 역병과, 탄저병 및 벼 도열병에 대해 각각 높은 항진균 활성이 나타나 생전분발 효전분을 이용한 친환경농자재 중 항진균소재 개발에 유용하게 사용될 것으로 조사되었다.

항진균에 대한 활성 결과를 바탕으로 시제품 개발시 균주 혼합 제품을 개발하여 시너지 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

5. Capsidiol 생성 조사

고추를 비롯한 일부 가지과 식물의 세포는 그림 19와 같이 병원균의 감염이나 elicitor의 처리에 의해 capsidiol을 생체방어 물질로 합성하여 저항성을 갖는다.

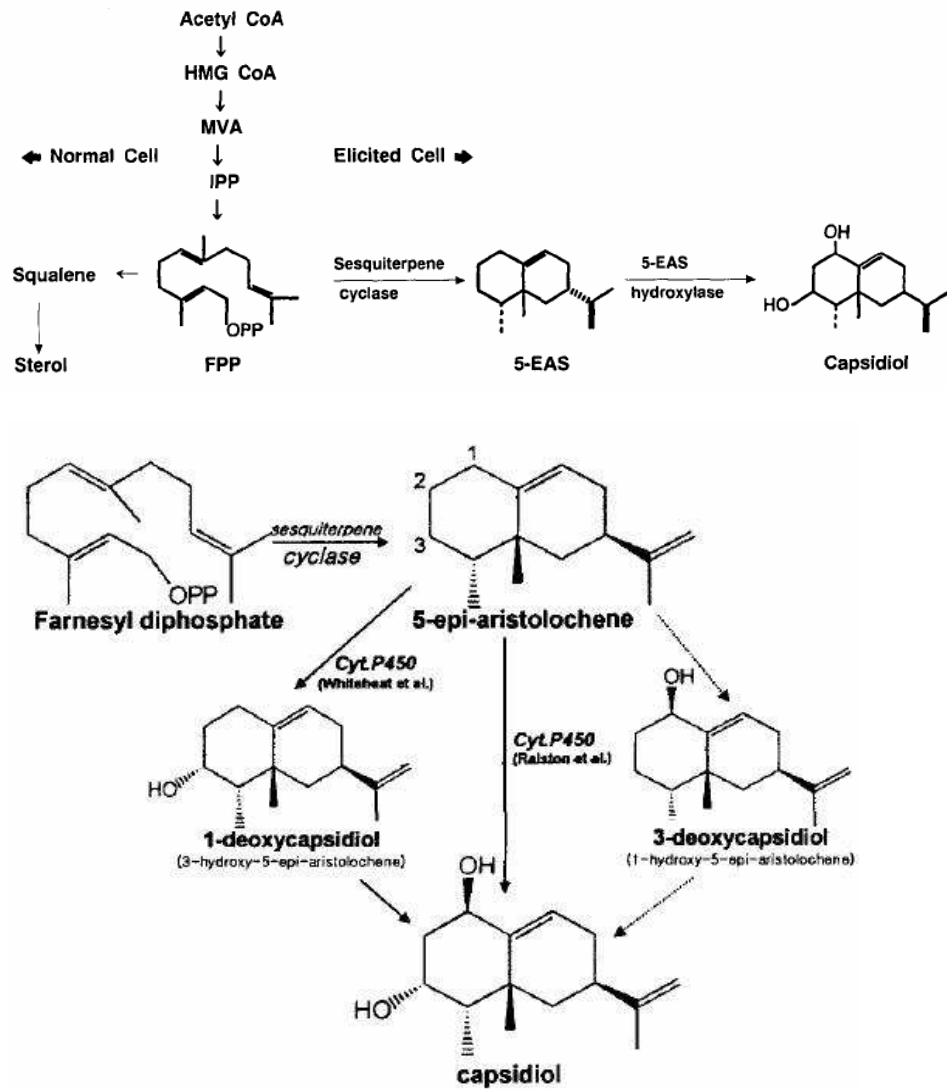


그림 19. Capsidiol 생성과정.

Capsidiol은 정상적인 환경 하에는 식물체에서 전혀 생성되지 않는다. 즉 정상상태에서는 Farnesyl pyrophosphate(FPP, C₁₅)라는 전구물질에서 Squalene(C₃₀)이 생성되는 경로를 유지하지만, 비정상적인 환경에 노출될 경우 Squalene경로는 차단되고 capsidiol(C₁₅) 경로로 대사가 바뀌게 된다.

탄저병에 대한 방제효과 검정을 위하여 1차년도에 분리 균주인 *Bacillus sp.* AM-651 균주를 대상으로 하여 TLC (Silica gel 60 F254, Merck Co.)분석을 통하여 capsidiol 생성여부를 확인하였다.

TLC 분석 결과 그림 20과 같이 5가지 처리별 시료 중 capsidiol의 spot으로 예상되어 지는 spot을 보인 시료는 대조구 두 가지였으며 이중 negative control인 화분의 고추에서 많은 양의 capsidiol을 확인 할 수 있었으나 경북 영양군 상원리 소재의 현장 재배 고추에서는 아주 극소량이 검출되는 것을 확인하였다.

역병균에 강한 저항성을 나타내는 것으로 알려진 Capsidiol은 정상적으로 성장하고 있는 가지과 식물에서는 전혀 생합성되지 않고 병원균이나 elicitor의 처리에 의해 생합성되는 phytoalexin으로 알려져 있으며, 담배나 고추에서는 이미 생합성을 촉진하는 유전자가 알려진 상태이다(Chappell, 1995; Facchini and Chappell, 1992). Capsidiol 생합성과정에 FPP가 cyclase의 촉매에 의해 5-EAS가 되고, 이 물질에 수산기가 첨가되면 최종산물인 capsidiol이 만들어진다. 이 과정에 관여하는 효소가 P450계 효소군으로 분류된 5-EAH이다.

유전자의 발현은 Northern blot과 RT-PCR을 이용하여 분석을 통해 P450 유전자를 probe로 hybridization을 실시하여 식물체 추출을 통한 total RNA로 cDNA를 작성 P450 유전자의 개시암호부위와 종결암호 부위로 Primer를 작성, PCR을 통해 삽입된 산물을 전기영동하여 발현정도를 관찰 할 수 있다. 고추, 피망 및 가지의 계놈상 5-epi-arietol-ochene hydrosulase (5-EAH) 역할을 하는 P450과 그 전단계를 촉매로 하는 효소인 cyclase 유전자가 존재하는지는 현 과제에서 분자적 수준에 대한 연구 계획서 상에서 제외되어 향후 분자적 수준의 접근 방법을 통해 결과를 도출해야 될 것으로 사료된다.

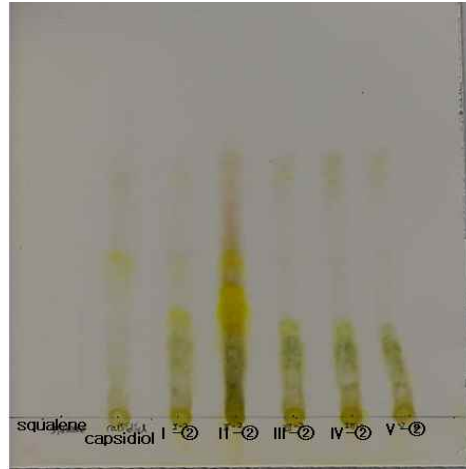


그림 20. TLC를 이용한 capsidiol 측정.

I-control; II-control; III-배양액처리;

IV-*Straptomyces* sp.처리, V-*Bacillus* sp. AM-651처리

경북 영양군 상원인근의 현장 재배 고추 실험구에서는 환경적 스트레스나 병원균의 침입이 이루어지지 않았음을 예상 할 수 있으며, 심각할 정도로 병해에 노출되지 않았다. 이는 고추 이식 전에 토양에 전처리 한 것이 유효한 것으로 판단된다.

Bacillus sp. AM-651 균주를 이용한 항생물질의 정제를 위해 HPLC로부터 RT에서 crude하게 회수를 하여 디스크(disc)상에서 항진균 활성을 확인한 후 역병균에 대치배양을 하여 활성을 보이는 피크(peak)의 분획물을 회수하여 Diaion HP-20 Chromatography를 이용 0, 50, 100% methanol에 용출시켜 본 결과 그림 21과 같이 수층에서 용출된 부분에서 대부분의 길항력을 확인 할 수 있었다.

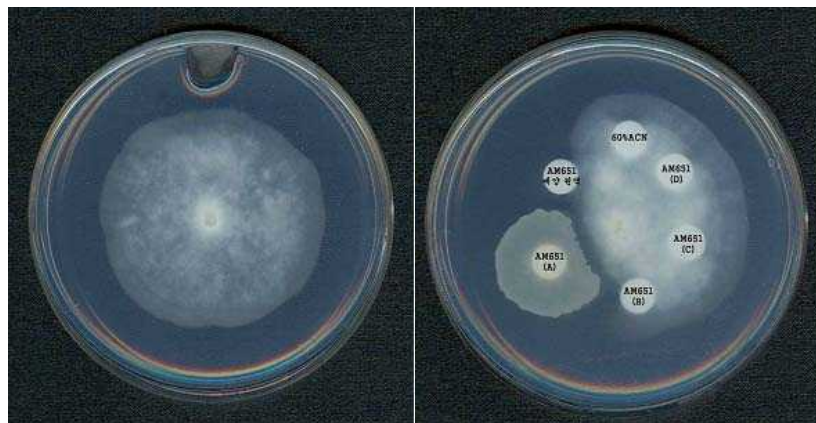


그림 21. 분획물의 역병에 대한 길항능 (A:0%, B:50%, C:100%)

6. IAA 생산능 조사

식물생장 및 과실에 영양을 주는 것은 비료뿐 아니라 호르몬의 역할이 중요하므로 분리 균주로부터 생성되는 대사산물 중 유사 식물생장 호르몬인 Indol-3-acetic acid (IAA) 생산능을 그림 22와 같이 조사하였다.

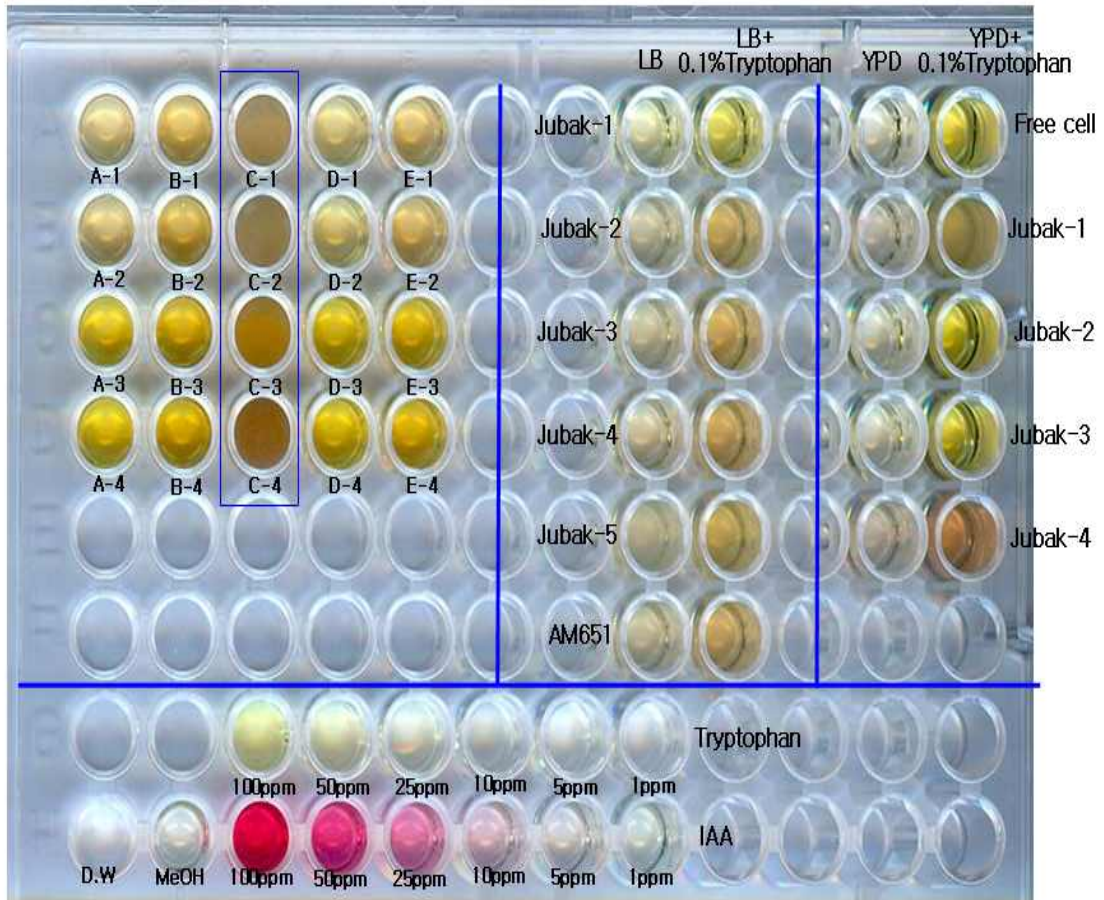


그림 22. IAA 생성 실험.

표 5. *Bacillus* sp. AM-651 균주의 IAA 생성능

Code	Name	OD 550nm	pH	IAA (OD535nm)	Test-Cont	IAA (ppm)
A-1	Jubak	0.734	4.07	0.124	0	0.00
A-2	Jubak+AM651	0.625	4.13	0.1	-0.024	-1.12
A-3	Jubak+0.1%Tryptophan	0.599	4.08	0.113	-0.011	-0.51
A-4	Jubak+0.1%Tryptophan +AM651	0.677	4.12	0.121	-0.003	-0.14
B-1	Jubak+LB	0.492	4.61	0.131	0.007	0.33
B-2	Jubak+LB+AM651	0.58	4.65	0.152	0.028	1.30
B-3	Jubak+LB+0.1%Tryptop han	0.606	4.62	0.165	0.041	1.91
B-4	Jubak+LB+0.1%Tryptop han+AM651	0.582	4.66	0.175	0.051	2.37
C-1	Jubak+MM	0.651	5.9	0.233	0.109	5.07
C-2	Jubak+MM+AM651	2.494	6.45	0.7	0.576	26.79
C-3	Jubak+MM+0.1%Tryptop phan	0.636	5.87	0.312	0.188	8.74
C-4	Jubak+MM+0.1%Tryptop phan+AM651	2.489	6.43	1.01	0.886	41.21
D-1	Jubak+1%Glucose	0.714	4.1	0.128	0.004	0.19
D-2	Jubak+1%Glucose+AM6 51	0.667	4.12	0.107	-0.017	-0.79
D-3	Jubak+1%Glucose+0.1% Tryptophan	0.709	4.09	0.146	0.022	1.02
D-4	Jubak+1%Glucose+0.1% Tryptophan+AM651	0.74	4.13	0.129	0.005	0.23
E-1	Jubak+YPD	0.628	4.39	0.14	0.016	0.74
E-2	Jubak+YPD+AM651	0.761	4.43	0.143	0.019	0.88
E-3	Jubak+YPD+0.1%Tryptop phan	0.706	4.39	0.152	0.028	1.30
E-4	Jubak+YPD+0.1%Tryptop phan+AM651	0.759	4.43	0.167	0.043	2.00

(Jubak = 생전분발효부산물, AM651=*Bacillus* sp. AM-651)

IAA의 전구체로 알려진 tryptophan에 의한 IAA의 생산량 증가에 대한 실험결과, 분리 균주가 tryptophan 의존도가 높은 것으로 조사되었다(Tsavkelova, 등 2007).

표 5와 같이 분리균 중 항진균 활성이 가장 우수한 *Bacillus* sp. AM-651 (Lee 등 2008) 균주의 경우 생전분발효산물과 최소배지에서 배양시 26.79 ppm의 높은 농도의 IAA를 생산하는 것으로 조사되었다.

Tryptophan 의존에 의한 IAA생성 실험 결과, Tryptophan 1 mg/L 경우 최대 41.21 mg/L의 전환을 통해 IAA생성을 보여, tryptophan 첨가시 2배의 증대 효과를 보이는 것으로 나타났다.

표 6 및 7과 같이 생전분발효부산물로부터 분리한 9개 균주의 IAA 생산능을 배지종류를 달리하여 첨가된 tryptophan의 영향을 알아본 결과, 배지의 종류에 따라 다소 차이가 있었으나 tryptophan의 농도가 증가 할수록 IAA의 생산량은 증가함을 알 수 있었으며, 특히 JB-6 균주의 경우 YPD배지에서 tryptophan이 배제된 상태에서 9.30 mg/L의 IAA를 생산하였으나, tryptophan을 1,000 mg/L의 농도로 첨가해 준 결과 39.26 mg/L로 4배 생산량이 증가하였고, 다른 균주들 또한 평균적으로 2~4배씩 증가하는 경향을 보였다.

본 연구에서 분리되어진 균주들이 우수한 점은 전구체인 tryptophan에 의존하지 않고도 배지에 따라 차이를 보이며 일정량의 IAA를 생산하는 것을 알 수 있었다.

특히 JB-9 균주의 경우 MM배지에서 14.27 mg/L을 생산하였으며, 이는 일부 미생물 중 IAA 생산에 기본적으로 배지에 tryptophan이 필요하며, 전구물질인 tryptophan이 없는 경우 IAA를 생산하지 못한다는 보고와는 달리 우수한 생산능력을 가졌음을 알 수 있었다(Jung 2007; Kampert and Strzelczyk 1984).

그러나 IAA의 농도가 높을 경우 세포신장을 저해하는 에틸렌의 합성을 촉진하기 때문에 이를 조절하기 위하여 배지의 종류 또는 전구체인 tryptophan의 농도를 조절하거나, 적정농도인 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ M 범위로 농도를 조절하여 사용한다면, 생전분발효부산물과 분리 균주를 이용한 친환경농업제제로의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

표 6. 배지 종류에 따른 분리 균주의 항진균작용

Isolate designation	Used media	Zone size (mm \pm SD)	
		<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1(IA)
		KACC40157	KACC40106
JB-1	LB	7.54	8.93
	YPD	ND	ND
	MM	12.11	10.34
JB-2	LB	8.75	3.26
	YPD	ND	ND
	MM	4.27	6.38
JB-3	LB	7.36	7.25
	YPD	8.25	8.82
	MM	9.77	10.84
JB-4	LB	11.26	14.26
	YPD	9.05	10.11
	MM	14.27	15.64
JB-5	LB	ND	ND
	YPD	ND	ND
	MM	10.07	10.31
JB-6	LB	15.26	19.34
	YPD	20.17	26.73
	MM	21.00	23.51
JB-7	LB	ND	ND
	YPD	ND	ND
	MM	ND	7.52
JB-8	LB	ND	ND
	YPD	ND	4.02
	MM	6.02	7.63
JB-9	LB	9.04	10.56
	YPD	22.67	17.29
	MM	11.50	14.25

표 7. 배지 구성에 따른 분리 균주의 tryptophan 농도에 의존 indole-3-acetic acid 생성

Isolate designation	Used media	IAA production($\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$) at different tryptophan concentrations ($\mu\text{g/ml}$)				
		0	100	300	500	1000
JB-1	LB	7.16 \pm 0.28	8.92 \pm 0.24	9.34 \pm 0.17	11.63 \pm 0.52	12.62 \pm 0.28
	YPD	ND	ND	1.27 \pm 0.12	2.55 \pm 0.22	3.11 \pm 0.17
	MM	10.96 \pm 0.19	12.02 \pm 0.11	14.72 \pm 0.26	16.27 \pm 0.53	17.92 \pm 0.41
JB-2	LB	5.30 \pm 0.26	5.92 \pm 0.42	5.61 \pm 0.14	5.77 \pm 0.62	6.02 \pm 0.19
	YPD	ND	ND	ND	ND	ND
	MM	8.22 \pm 0.15	9.17 \pm 0.32	11.54 \pm 0.22	15.24 \pm 0.72	18.26 \pm 0.12
JB-3	LB	4.37 \pm 0.21	6.29 \pm 0.23	9.84 \pm 0.22	11.40 \pm 0.34	12.39 \pm 0.26
	YPD	ND	ND	0.52 \pm 0.18	1.42 \pm 0.05	2.33 \pm 0.11
	MM	4.82 \pm 0.12	6.92 \pm 0.23	10.83 \pm 0.07	13.25 \pm 0.19	15.64 \pm 0.05
JB-4	LB	10.56 \pm 0.23	11.73 \pm 0.09	12.82 \pm 0.018	13.91 \pm 0.12	15.24 \pm 0.17
	YPD	ND	0.32 \pm 0.05	1.32 \pm 0.07	2.28 \pm 0.12	4.21 \pm 0.10
	MM	11.93 \pm 0.14	13.27 \pm 0.26	15.72 \pm 0.11	17.20 \pm 0.07	20.21 \pm 0.15
JB-5	LB	8.23 \pm 0.46	9.01 \pm 0.12	9.92 \pm 0.62	10.60 \pm 0.11	14.83 \pm 0.32
	YPD	ND	ND	ND	ND	0.92 \pm 0.63
	MM	9.25 \pm 0.12	14.26 \pm 0.19	17.73 \pm 0.21	20.22 \pm 0.32	24.92 \pm 0.14
JB-6	LB	2.45 \pm 0.17	3.72 \pm 0.16	3.96 \pm 0.42	4.22 \pm 0.21	5.01 \pm 0.10
	YPD	9.30 \pm 0.15	19.23 \pm 0.21	24.71 \pm 0.19	37.44 \pm 0.32	39.26 \pm 0.09
	MM	7.21 \pm 0.17	8.26 \pm 0.54	15.26 \pm 0.42	16.28 \pm 0.24	19.83 \pm 0.12
JB-7	LB	5.22 \pm 0.21	7.17 \pm 0.10	8.39 \pm 0.10	14.24 \pm 0.32	18.63 \pm 0.13
	YPD	ND	ND	ND	1.40 \pm 0.21	2.01 \pm 0.11
	MM	7.27 \pm 0.21	8.92 \pm 0.21	10.92 \pm 0.51	12.73 \pm 0.18	14.92 \pm 0.10
JB-8	LB	3.56 \pm 0.53	4.63 \pm 0.09	6.72 \pm 0.33	8.24 \pm 0.27	10.74 \pm 0.13
	YPD	ND	ND	ND	1.44 \pm 0.16	3.22 \pm 0.17
	MM	5.73 \pm 0.29	7.33 \pm 0.18	10.26 \pm 0.16	14.82 \pm 0.21	18.66 \pm 0.23
JB-9	LB	6.28 \pm 0.11	10.27 \pm 0.26	16.82 \pm 0.11	18.24 \pm 0.31	20.02 \pm 0.17
	YPD	12.51 \pm 0.22	17.72 \pm 0.14	20.58 \pm 0.22	25.63 \pm 0.34	28.31 \pm 0.12
	MM	14.27 \pm 0.23	17.62 \pm 0.52	19.73 \pm 0.13	25.33 \pm 0.55	27.91 \pm 0.35

7. 불용성인산의 가용화능 조사

화학비료의 사용량의 증가로 인하여 질산염뿐만 아니라 인산염의 집적이 작물재배의 문제점으로 나타나고 있어 이에 대한 대책이 필요한 실정이다.

현재 우리나라 토양은 질소와 인의 집적에 따른 오염정도가 매우 심각한 실정으로 농업생산량 증대와 우수한 농산물의 생산을 위해서는 토양의 지력회복이 중요하다.

일반적으로 토양의 염류 농도는 0.16% 정도가 표준이며, 0.04% 이상이 되면 비료장애를 일으켜 영양의 흡수가 멈춘다고 알려져 있다.

러시아와 동부유럽에서는 1950년대에 이미 불용성 인산을 가용화하는 미생물에 대한 연구가 이루어져 있으며, 인산가용균은 토양 중에 널리 분포하며 분류상도 다양하다 (Illmer 와 Schinner 1992, 1995; Park 등 2008).

생전분발효부산물로부터 분리한 균주들의 인산가용화균의 활용 가능성을 파악한 결과를 바탕으로 시제품을 제조하였다.

분리균주를 NBRIP agar plate에 희석 도말을 한 후 30℃에서 배양을 한 후 투명대를 형성하는 균주를 불용성 인산을 가용화능이 있는 것으로 결정하였으며, 고체배양 상태가 아닌 액체배양에서의 불용성 인산에 대한 가용능 확인을 위해서 NBRIP 액체배지를 이용하여 확인하였다.

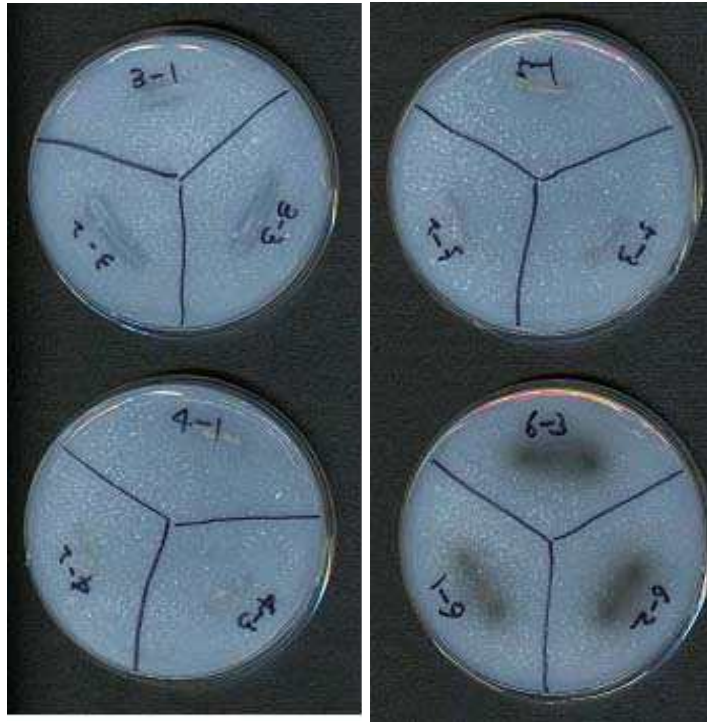


그림 23. 분리균주의 NBRIP agar plate에서 불용성 인산의 가용화.



그림 24. 분리균주의 액체배양에서 불용성인의 가용화.

그림 23 및 24와 같이 plate 상에서 불용성인을 가용화하는 활성을 가지는 균주가 있는 반면 액상에서 가용화를 하는 균주와 액상과 고상 모두 불용성인을 가용화하는 균주가 조사되었다.

분리 균주 중 액체배양에서 가장 가용성 인산화능이 우수한 균주를 분리하여 인산양을 측정된 결과 그림 25와 같이 조사되어졌다. 5일 배양 하였을 때 분리 균주는 360~400ppm 이상의 불용성 인을 가용성 인으로 전환시키는 것으로 조사되었다.

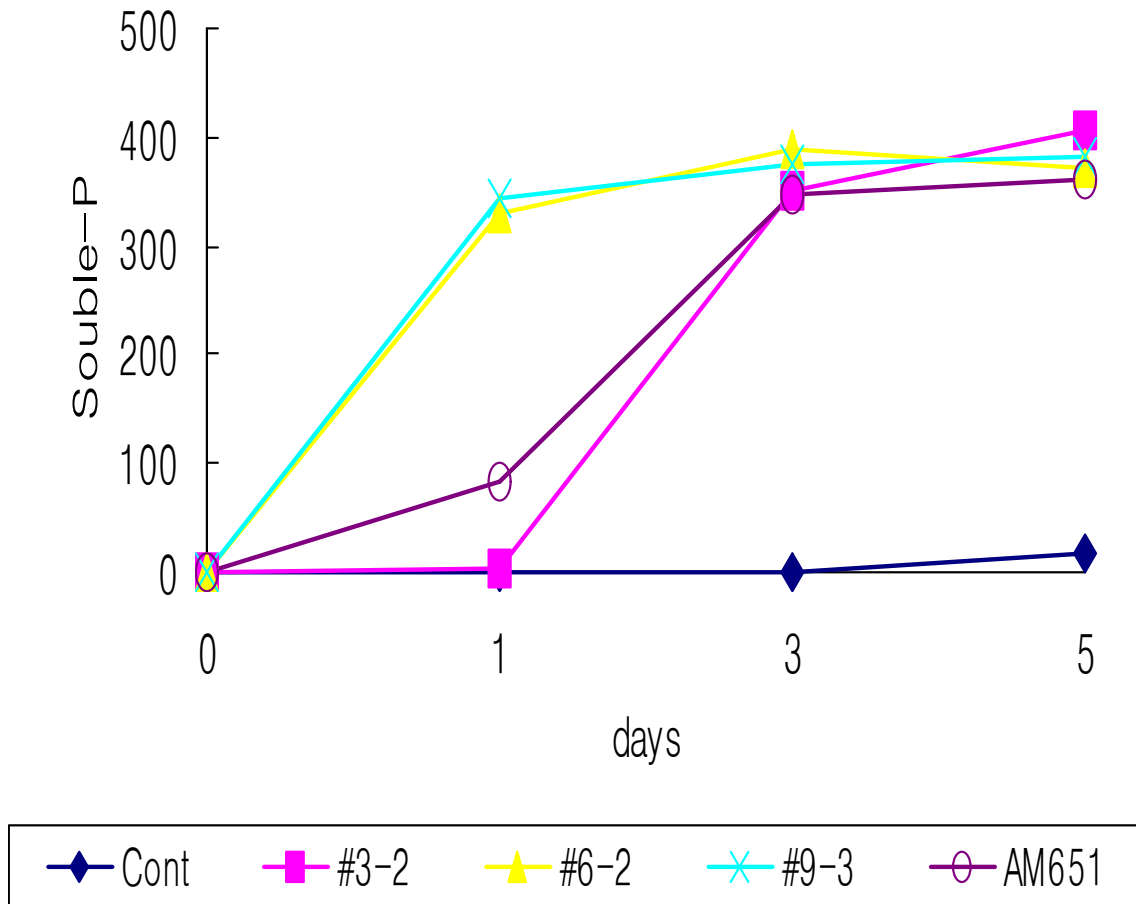


그림 25. 분리균주의 가용화인의 생산량

경작지 토양에 식물이 흡수하기 어려운 불용성 인의 형태로 다량 축적되어 있는 인산염을 가용화시킬 수 있는 미생물은 합성인산 비료의 사용을 경감시키면서 지력의 소실 없이 작물의 생육 및 성장성을 향상시킨다고 보고되었다(Lee 등 2005).

본 연구개발을 통해 만든 시제품에 분리 균주를 이용하여 제품화를 한다면, 비료의 효과가 우수 할 것으로 판단되며, 또한 1차년도에 분리하여 생물학적 방제효과가 우수했던 *Bacillus* sp. AM-651균주의 경우 그림 25에서와 같이 불용성인의 가용화능이 360ppm 이상으로 조사되어져, 다기능성 친환경 생물소재로의 개발 가능성을 제시하였다.

Gupta 등(1994)은 고체 평판배지에서 불용성인산 가용화능의 지표인 투명대의 형성이 생기지 않는 미생물이 액체배양 시 불용성 인산을 가용화 시킬 수 있다고 보고 하였으며, 본 연구에서도 같은 결과를 보였다. 이러한 결과는 미생물에서 생산되는 2차 대사산물의 차이점과 유기산의 확산 속도가 느리기 때문인 것으로 사료된다.

8. 생전분발효부산물을 이용 기능성생물비료 제조

가. 고품제제 제조

기능성 생물 비료의 개발을 위해 입자상의 물질에 의한 토양 공극을 형성 공기 유통을 원활하게 하기 위하여 혼합 처리한 미세 볼 타입(Ball-type)의 고품제제 생물 비료의 개발이 더 적합한 것으로 생각된다. 따라서 혼합제를 이용하여 기능성을 향상시킨 형태의 기능성생물 비료로의 사용이 더 용이한 것으로 조사되어 혼합제의 조성은 표 8과 같이 사용하여 제조하였다.

표 8. 생전분발효부산물 이용 기능성생물비료 조성표

제오라이트 - 40%,
생전분발효부산물(주박) - 50% -효모 : 생리활성물질 생합성, 퇴비부숙, -세균 : 항진균 활성 -방선균 : 항균물질 생성, 퇴비부숙 -젖산균 : 유기산 및 유기당 생성
미네랄 - 10% -유기질소(3%), 인산(2%), 가리(2%), 규산(2%), 마그네슘(0.5%), 칼슘(1.5%), 몰리브덴(0.5%)

고형제제는 그림 26과 같은 공정을 통해 볼 타입의 고체 비료를 제조하였다.



그림 26. 주박을 이용한 고체 친환경생물 소재의 제형화 단계.

본 공정을 통해 생산된 시제품은 그림 27과 같으며, 전자현미경을 통해 표면을 관찰한 결과 미생물이 쉽게 흡착될 수 있는 표면을 가지고 있는 것으로 조사되어졌다.



그림 27. 제형화된 제품과 전자현미경사진.

그림 28과 같이 친환경생물소재로서의 가능성을 알아보기 위해 시비 후에 시제품으로부터 분해되는 것을 조사하기 위해 물리학적 수분테스트를 시제품에 대해 조사해 본 결과 30일 후에도 입자의 형태를 유지하며 서서히 분해가 일어나고, 60일 후에는 완전 분해가 되는 것으로 조사되어 생물 비료로 시비 시 잦은 시비를 하지 않고 비료의 효과를 볼 수 있는 서방형제제로 사용이 가능한 것으로 사료된다.

또한 이러한 효과는 농촌에서 토양에 과도한 비료의 사용으로 인한 2차적인 토양오염을 방제 할 수 있을 것으로 사료된다.

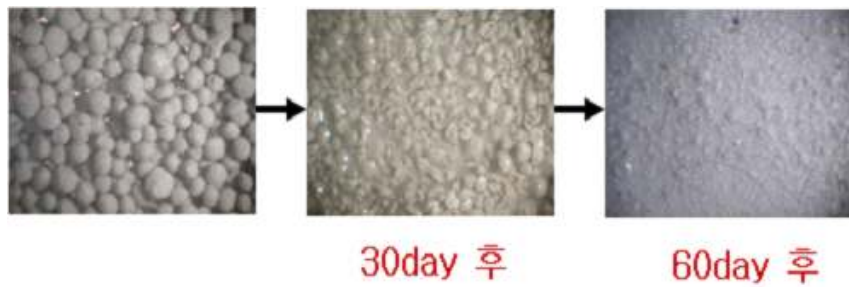


그림 28. 시제품의 수분테스트.

나. 액상제제 제조

작물을 이식하기 전에는 토양처리를 위하여 고형제제가 편리하나 작물 이식 후에 시비 관리를 위하여 액상제제가 편리하여 분리유용균주인 *Bacillus* sp. AM-651균주 배양액을 액상제제로 사용하였다.

Bacillus sp. AM-651균주 액상제제가 친환경생물소재로의 이용가능성을 위해 배양액의 온도 안전성을 조사해 본 결과 그림 29와 같이 넓은 온도의 범위에서 배양액이 안전성을 보이면서 항진균 활성을 보이는 것으로 조사되었다.

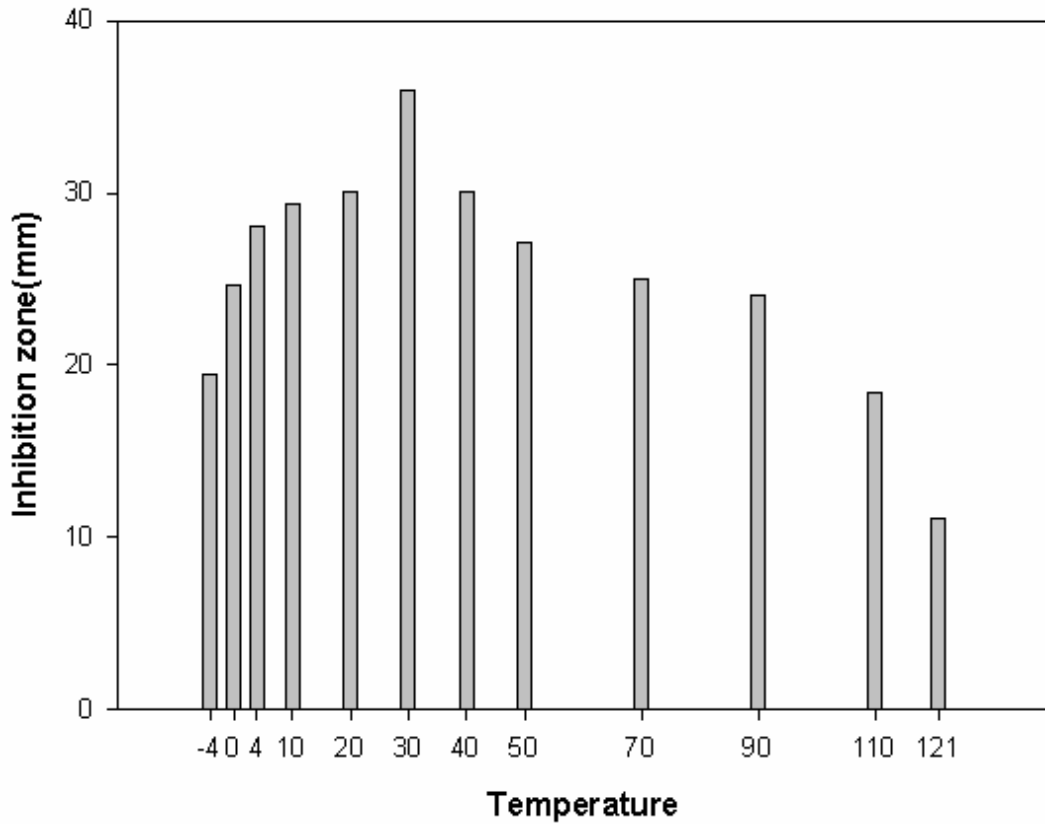


그림 29. Stabilities of temperatures on antifungal activity from culture broth of *Bacillus* sp. AM-651.

친환경제제로의 개발 및 상품화를 위해서는 생산방법과 제품의 제형화 과정에서의 안정성을 높일 수 있는 방법이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* 및 *Rhizoctonia solani* 균주에 대하여 높은 항진균 활성을 나타내는 *Bacillus* sp. AM-651 배양액을 4℃ 및 상온조건에서 100일간 저장하면서 *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* 및 *Rhizoctonia solani* 균주에 대한 생육 저지환의 크기 변화를 조사함으로써 제품의 제형화에 따른 안정성실험을 실시하였다.

표 9. *Bacillus* sp. AM651 배양액의 저장기간에 따른 길항능

day	<i>Phytophthora capsici</i>		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>	
	4℃	상온	4℃	상온	4℃	상온
0	31±0.5mm	31±0.5mm	19±0.6mm	19±0.5mm	23±0.7mm	23±0.6mm
20	31±0.5mm	30±0.7mm	19±0.6mm	19±0.4mm	23±0.7mm	23±0.2mm
40	31±0.4mm	30±0.3mm	19±0.6mm	19±0.1mm	23±0.2mm	21±0.5mm
60	30±0.8mm	29±0.2mm	18±0.9mm	17±0.6mm	22±0.6mm	20±0.6mm
80	29±0.7mm	27±0.4mm	17±0.8mm	15±0.3mm	21±0.4mm	18±0.7mm
100	28±0.6mm	24±0.5mm	17±0.6mm	14±0.4mm	20±0.9mm	16±0.5mm

표 9와 같이 *Bacillus* sp. AM651 배양액은 4℃에서 100일간 저장 시에도 *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* 및 *Rhizoctonia solani* 균주에 대한 생육 저지능을 보았을 때 초기와 비교 시 각각 90.4%, 89.5% 및 87.1%로써 저장 후 사용하는 데 있어서도 제품의 안정성은 매우 높게 나타나는 것으로 조사되어졌다.

친환경미생물제제가 실제 사용될 일반 농가에서는 저온 시설을 별도로 갖추어 놓지 않는 이상 4℃에서 저장한다는 것은 거의 불가능하다. 따라서 실제 농가현장을 고려하여 상온에서의 *Bacillus* sp. AM651 배양액을 100일간 저장하면서 *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* 및 *Rhizoctonia solani* 균주에 대한 생육 저지능을 조사한 결과, 초기와 비교 시 각각 77.5%, 73.7% 및 69.6%의 제품의 안정성을 나타내는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 *Bacillus* sp. AM651 균주가 생산하는 물질이 온도의 변화에도 매우 안정함을 알 수 있었으며, 향후 *Bacillus* sp. AM-651 균주를 이용한 친환경미생물제제로의 제품화 시에도 매우 유용할 것으로 사료된다.

9. 포장시험

가. 고추 포장시험

◎ 2차년도 고추 포장시험

고추의 생육에 대한 조사는 현장 실험 전 실험실상에서 배양액의 처리를 통해 고추의 생육 및 병 저해능에 대한 조사를 토대로 현장 실험에 적용하였다.

식물배양기상에서 고추의 성장을 실험한 결과는 그림 30과 역병처리 고추모의 경우 병이 발병되어 모두 죽는 것으로 조사되었으나, AM-651을 처리한 고추모의 경우 무처리군과 같은 양상을 보이며 성장을 보였으나, 무처리구에서보다 더 증식이 잘되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 생전분발효부산물을 이용한 친환경농업체제를 처리하였을 경우 성장이 촉진 뿐만 아니라 생물 농약으로의 가능성을 볼 수 있었으며, pots 실험에서도 일반적으로 그림에서와 같이 성장능이 우수한 것으로 조사되었다.

또한 역병균 처리 후 시제품을 처리한 결과 대조구에 비해 건강하게 고추가 생육하는 것을 확인할 수 있었다.



그림 30. 식물생장기를 이용한 배양 및 역병처리 시험.

이와 같은 *In vitro* 실험 결과를 기초로 소규모의 현장 실험을 실시하였다. 실험조건은 경북 영양군 상원 소재 고추 재배 농가에 의뢰하여 일반 고추농사의 방식으로 재배를 하였으며, 실험구는 생전분발효부산물을 이용하여 만든 시제품을 처리하도록 하여 고추의 생육 과정 및 고추 생산량을 확인하였다.



그림 31. 현장 재배 사진(2차년도, 경북 영양군 상원 소재 농가).



그림 32. 현장 재배 사진(2차년도, 경북 영양군 상원 소재 농가).



그림 33. 현장 재배 사진(2차년도, 경북 영양군 상원 소재 농가).

그림 34와 같이 제제의 처리구와 비처리구의 성장에서 뚜렷한 차이를 보였다. 신장의 경우 비처리구에 비해 평균 적으로 20~30cm정도 크게 성장 하였으며, 잎 수의 경우 더 많은 것으로 조사되어졌으며 잎의 색 또한 더 진하게 보였다.

잎의 수와 엽록소량이 많으면 광합성을 하는데 있어서 더욱 효율적이며 에너지 대사가 활발할 것이다. 또한 뿌리 상태의 경우도 대조구에 비해 실험구가 전반적으로 모두 발육상태가 우수한 것으로 조사 되었다. 또한 뿌리의 발육은 식물성장에 있어 영양분의 흡수율이 우수하여 고추 수확에 영향을 미칠 것이다.

고추에 있어서는 과실의 생산이 가장 중요한 것처럼 한 고추목에서 고추의 1개당 평균 무게를 계산한 결과 1차년도와 유사하게 평균 20g으로 대조구에 비해 4g 이상이 더 무거운 것으로 조사되었으며, 표피의 두께 또한 생전분발효부산물을 이용한 생물비료를 처리한 고추가 더 2.1cm로 대조구보다 4mm이상 더 두꺼운 것으로 조사되어졌다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 고춧가루로 가공 시 생전분발효부산물을 이용한 친환경 농업제제의 살포로 재배한 고추로 가루를 생산하였을 경우 생산량이 증대하여 농가 소득을 올릴 수 있을 것으로 사료되며, 생물농약으로의 활용도가 높아 친환경 농산물 생산에 효율적이며, 고추재배지에 적용을 통해 농가에서 친환경재배로의 전환이 가능할 것이다.



그림 34. 고추 생육도 비교(좌:대조구, 우:처리구).

◎ 3차년도 고추 포장시험

육묘는 조기수확과 수량 증대, 화아(꽃눈)분화 억제 및 추대방지, 육묘기 보호 및 관리비용 절감, 본 밭 현장에서의 이용율의 향상 등을 목적으로 실시하였다.

고추는 육묘 기간이 60 ~ 80일 이상으로 길고, 본 잎이 3 ~ 4매 전개될 때부터 꽃눈이 분화하기 시작하고 본 잎이 11매 정도 전개할 때에는 약 30개 정도의 꽃눈 분화가 완료되기 때문에 묘의 소실이 조기 수량에 큰 영향을 미친다. 좋은 환경에서 자란 묘는 열매가 달리는 위치가 낮고 동화능력이 우수하여 조기 수확량이 많지만 불량한 환경에서 자란 묘는 생육이 지연되고 동화양분의 합성, 양·수분의 흡수능력 등이 떨어져 결국 생산성이 저하하게 된다. 따라서 최적 환경조건에서 소실이 좋은 튼튼한 묘를 육성하는 것이 매우 중요하다. 좋은 묘란 작물에 따라 다르나 대체로 뿌리가 상처를 받지 않고, 노화되지 않아 활력이 좋아야 하며, 육묘기간이 적당하여 영양생장과 생식생장의 균형이 이루어져야 한다.

그림 35는 본 실험에서 사용한 고추묘의 육묘과정을 나타낸 것이다.



그림 35. 고추묘의 육묘.

본 실험에서 목적으로 하는 고추역병에 대한 억제능이 있는 유용 미생물 배양액을 처리하기 이전에 일반적으로 농가에서 밭을 경운하기 전에 시비하는 퇴비와 석회 등의 밑거름을 밭을 경운하기 3주전에 시비하여 밭 전반에 골고루 퍼지도록 하였으며, 전년도 연구에서 효과가 입증된 생전분발효부산물을 이용한 기능성미생물제제를 1차 처리하였다 (그림 36).



그림 36. 생전분발효부산물 이용 기능성비료 제제의 토양 처리.

밭의 경운은 경운기를 이용하여 깊이갈이를 함으로써 고추가 잘 자랄 수 있는 충분한 작토층을 확보하였다.

이랑의 넓이는 50 ~ 60cm로 하였으며, 관행적인 농법에서 이랑의 높이는 낮은 것보다 높은 것에서 수량증가 및 병해의 발생이 감소하기 때문에 본 실험에서는 관리기를 이용하여 이랑의 높이를 20cm 이상으로 하였다.



그림 37. 밭의 경운.

멀칭재료로 투명비닐의 경우가 흑색비닐보다 아주심기를 한 후 초기의 지온을 약 2 ~ 3℃정도 높여 주지만, 흑색비닐의 경우는 여름철 고온기 때에 투명비닐보다 지온이 상승하는 것을 방지할 수 있다는 장점과, 재배 중 잡초발생을 억제하는 효과가 있으므로 본 실험에서는 흑색비닐을 멀칭재료로 사용하였다.

고추의 아주심기는 마지막 서리가 내린 후에 추위에 의한 피해가 없도록 하기 위하여 2009년 4월 30일에 실시하였으며, 아주심기 전날 고추포트에 물을 충분히 줌으로써 아주심기 시 고추모를 채취하기 쉽도록 하였다.

심을 때는 고추모에 흙을 많이 붙여 채취하였으며 너무 깊게 심으면 줄기 부위에서 새 뿌리가 나와 활착이 늦어지므로 온상에 심어져 있던 깊이를 기준으로 하여 지하 5cm가 되도록 심어주었다.



그림 38. 고추모의 아주심기.

(A: *Bacillus* sp. AM651, B: *Streptomyces* sp. AM50, C: A, B Mixed, D: Control)

고추의 심는 거리는 관행농법에서 품, 작형, 토양 비옥도, 수확기간 등에 따라 다르며, 특히, 심는 거리가 넓을 때에는 초기수량이 적고, 좁을 때에는 초기 수량이 많으나 후기 유인과 정지가 곤란하여 후기 수량이 떨어지기 쉽다. 관행농법에서 노지재배의 경우는 보통 300평당 3,333주(75×45cm: 2줄 재배시)이며, 하우스재배의 경우에는 90×30cm의 심는 거리로 300평당 3,000주 정도를 표준으로 하고 있다. 본 실험에서는 심는 거리를 모종간 약 30cm 정도로 하여 실시하였다.

Bacillus sp. AM-651 배양액을 이용하여 실제 농가에서의 고추역병 방제효과를 위한 검정을 실시하였으며, 대조군으로는 본 연구소에서 연구개발이 완료되어 상품화 준비 중인 *Streptomyces* sp. AM50 배양액과 물 자체만을 처리한 것(무처리구)을 대조구로 사용하였다.



그림 39. 배양액 처리 시 고추의 생육시기별 억제 효과.

(A: *Bacillus* sp. AM651, B: *Streptomyces* sp. AM50, C: A, B Mixed, D: Control)

그림 39는 7월 중순 성장중인 고추의 모습으로 *Bacillus* sp. AM-651 배양액, *Streptomyces* sp. AM50 배양액, AM-651과 AM50을 동일 비율로 혼합한 처리구 및 무처리구 모두에서 역병의 발생은 확인되지 않았으며, 고추의 생육에서도 커다란 차이점은 나타나지 않았다. 일반적으로 고추와 관련하여 역병을 비롯한 탄저병 등의 발생은 장마를 전후하여 많이 발생하는 것으로 알려져 있다.

역병이 발생하기 쉬운 조건으로 연작할 경우 전염원의 밀도가 높아져 발생하기 쉬우며, 비가 많이 오는 날씨가 계속될 때 발생하기 쉽고, 역병 발생은 특히 비와 밀접한 관계를 갖고 있다. 역병균의 포자는 비바람을 타고 전파되며 전파된 포자가 발아하여 병을 일으키는데도 수분이 필요하기 때문이다. 또한 밀식하여 통풍이 잘 안될 때에도 탄저병이 심하게 발생하는 것으로 알려져 있다.

역병에 대한 방제책으로 품종에 따라 역병 발생에 다소 차이는 있으나 저항성 품종으로 개발되어 판매되고 있는 품종들도 있다. 그러나 역병 저항성을 내걸고 나온 품종들 중에는 저항성 수준이 매우 낮거나 없는 품종도 있어서 주의가 필요하다.

깨끗한 상토를 사용하는 것이 중요한데 구입상토를 쓰거나 산흙 혹은 논외의 심토 등 역병에 오염되지 않은 흙을 사용하도록 하며 가지과, 박과 작물 이외의 작물로 2 ~ 3년간격으로 돌려짓기 하는 것도 역병 방지에 효과가 크다. 그리고 이랑사이를 너무 좁게 하면 약제의 살포가 힘들고 통풍이 잘 되지 않아 역병이 발생하기 쉽게 되므로 이랑사이를 가능한 한 넓게 하는 것 또한 매우 중요하다.

따라서 장마발생 이후가 역병의 발생 가능성이 높을 것으로 판단하고 이를 예의주시하면서 실험을 진행하였다. 전년도 실험 결과 각 배양액을 1,000배로 희석하여 처리하였을 때 고추의 생육이 가장 우수하며, 병의 발생정도가 가장 낮은 결과를 참고하여(data not shown) *Bacillus* sp. AM651 배양액과 *Streptomyces* sp. AM50 배양액의 처리 농도는 1,000배로 희석하여 2주 간격으로 직접관주 하여 주면서 고추역병 발생양상을 조사하였다.

그림 40과 같이 각각의 배양액을 1,000배로 희석한 것과, 혼합하여 희석하는 형식으로 하여 시료를 제조한 후 처리하였다.



그림 40. 고추의 생육시기별 배양액의 처리.

그림 41과 같이 각각의 처리구를 비롯하여 무처리구 또한 고추역병의 발생이 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 본 실험에서 포장 실험을 실시한 경북 안동시 남선면 구미리의 인근 농가에서 또한 고추역병의 발생이 없는 것으로 조사되었으며, 이는 고추 관련 병해가 주로 발생하는 장마철에 내린 비의 양이 적었을 뿐만 아니라 비가 내리더라도 배수시설이 잘되어 있어서 물 빠짐이 잘 된 결과라 사료된다.



그림 41. 배양액 처리 시 고추의 생육시기별 억제 효과.

(A: *Bacillus* sp. AM651, B: *Streptomyces* sp. AM50, C: A, B Mixed, D: Control)

병원균인 *Phytophthora capsici*는 분류학상 난균류에 속하며 물을 좋아하는 수생균의 일종인 곰팡이로 다른 곰팡이와 비교하여 덜 진화되어 있다. 따라서 격벽이 없고 하등균류에 속하며 최근의 유전연구에 의하면 물에서 육지로 진화하여 정착한 것으로 보고 있다. 28 ~ 30℃의 온도에서 생육이 왕성하며 생육특성도 물과 불가분의 관계를 유지한다. 이 병원균은 유주자낭을 만들어 다른 기주를 침입할 수 있는 대량의 유주자를 만드는데 유주자는 물속을 헤엄칠 수 있는 2개의 편모를 가지고 있어 기주물질로의 침입을 용이하게 한다. 실제로 고추역병이 심하게 발생하는 지역은 토양에 찰흙 성분이 많이 섞인 의성, 청송, 영양 등의 지역이고 예천, 충주, 진천 등의 지방의 토양은 모래성분이 많이 섞여 있어 병 발생이 현저히 적다.

2008년의 경우 올해 포장 실험을 실시한 밭에서 고추역병이 발생하였던 지역이었으나, 2009년에는 발생하지 않은 것은 밭을 경운할 당시에 1차 처리한 것이 고추역병 예방에 유효하였던 것으로 판단된다.

미생물은 환경의 특성에 따라 필요로 하는 영양물질이 다르므로 미생물의 정상 서식처를 잘 알고 있으면 적절한 배지를 선정하기 쉬우며, 배지의 조성 또한 미생물의 종류에 따라 다르게 된다.

본 연구에서는 일반적으로 미생물 균체수를 확인 하는데 널리 사용되는 배지인 LB, PCA 배지를 사용하여 배양액을 처리한 후에 미생물의 균체수를 확인 하였다.

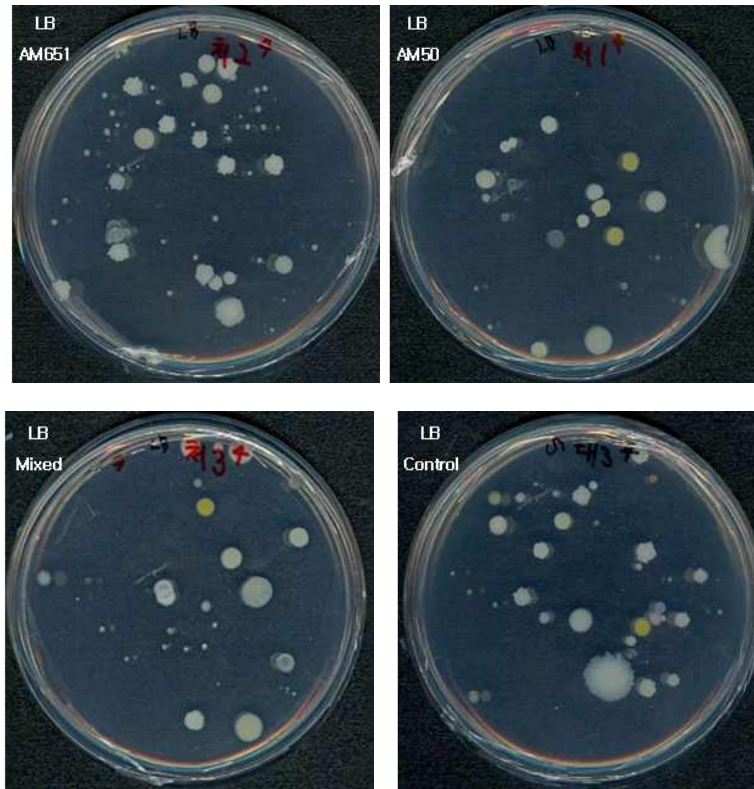


그림 42. 배양액의 처리에 따른 발 토양내 균체수

그림 42와 같이 LB 배지를 사용하여 토양내 일반세균의 분포 정도를 확인 한 것으로 무처리구인 대조구의 경우 균체수가 3.5×10^5 cfu/ml 인 것으로 조사되었으며, 처리구인 *Bacillus* sp. AM651 배양액을 처리했을 경우에는 균체수가 5.2×10^5 cfu/ml로 대조구 보다 균체수가 증가한 것으로 조사되었다. 이는 *Bacillus* sp. AM651 균주가 토양 내에서 안정성이 높은 것으로 사료되며 또한 *Bacillus* sp.속의 균주로서 LB배지에서 생육이 잘 이루어진 것으로 사료된다.

그리고 *Streptomyces* sp. AM50 배양액의 경우와 *Bacillus* sp. AM651 배양액과 *Streptomyces* sp. AM50 배양액을 혼합하였을 경우에는 균체수가 각각 2.1×10^5 cfu/ml과 2.4×10^5 cfu/ml으로 대조구와 비교하였을 때 낮아졌음을 알 수 있었다.

이러한 결과는 *Streptomyces* sp. AM50 배양액 처리구의 경우 방선균으로 전용배지를 사용할 경우에는 균체수의 발현 양상이 달라질 것으로 사료되며, 혼합하여 처리하였을 경우에는 *Bacillus* sp. AM651의 영향으로 *Streptomyces* sp. AM50 배양액 단독 처리구보다 균체수가 다소 증가한 것으로 사료된다.

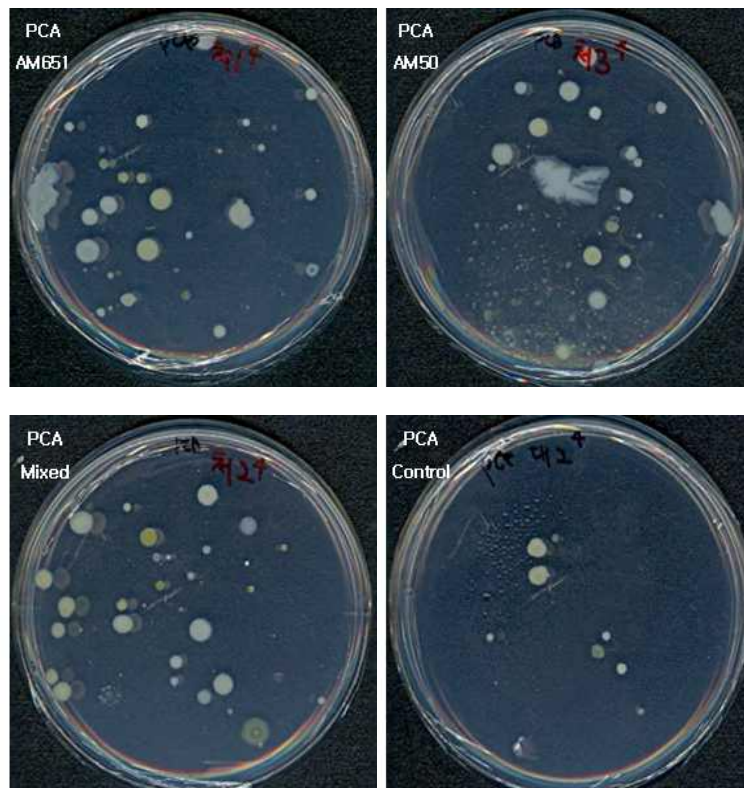


그림 43. 배양액의 처리에 따른 발 토양 내 균체수.

그림 43과 같이 PCA 배지를 사용하여 토양 내 미생물의 분포 정도를 확인한 것으로 무처리구인 대조구의 경우 균체수가 1.0×10^5 cfu/ml 인 것으로 조사되었으며, 처리구인 *Bacillus* sp. AM651 배양액을 처리했을 경우에는 균체수가 2.7×10^5 cfu/ml로 대조구 보다 균체수가 증가한 것으로 조사되었으며, *Streptomyces* sp. AM50 배양액의 경우와 *Bacillus* sp. AM651 배양액과 *Streptomyces* sp. AM50 배양액을 혼합하였을 경우에는 균체수가 각각 2.4×10^5 cfu/ml과 2.8×10^5 cfu/ml으로 대조구와 비교하였을 때 높아졌음을 알 수 있었다.

표 10. *Streptomyces* sp. AM50 배양액의 처리에 따른 토양 내 균체수

	ISP2
<i>Bacillus</i> sp. AM651	-
<i>Streptomyces</i> sp. AM50	5.1×10^6
Mixed	2.4×10^5
Control	1.6×10^5

표 10과 같이, *Streptomyces* sp. AM50 배양액의 경우 방선균 유래 물질이므로 앞서 토양 내 일반적인 미생물의 분리에 사용한 배지인 LB, PCA의 경우에는 *Streptomyces* sp. AM50의 경우 보다 정확한 균체수 확인이 전용배지 보다 어렵다. 따라서 방선균의 배양 전용배지인 ISP2 배지를 이용하여 균체수를 확인할 필요가 있다.

그 결과, 대조구의 경우 1.6×10^5 cfu/ml으로 조사되었으나, *Bacillus* sp. AM651 배양액을 처리하였을 경우에는 균체수 확인이 되지 않았다. 이는 *Bacillus* sp. AM651 균주의 영향으로 토양 내 방선균 등의 균들이 생육에 저해를 받은 것으로 생각된다.

Streptomyces sp. AM50 배양액을 처리하였을 경우에는 5.1×10^6 cfu/ml으로 가장 높은 균체수를 나타내는 것을 알 수 있었으며, *Bacillus* sp. AM651 배양액과 *Streptomyces* sp. AM50 배양액을 혼합하였을 경우에도 2.4×10^5 cfu/ml의 균체수를 나타냄을 확인하였다. 이는 전용배지를 사용함에 따른 차이로 판단된다.

나. 벼 포장시험

◎ 벼 생육시험

벼의 재배에 현장적용에 앞서 *in vitro* 상에서 생물 성장기를 이용하여 벼의 성장을 조사한 결과 그림에서와 같이 처리구과 희석 배율에 따라 보의 성장과 뿌리의 성장이 다르게 자라는 것을 알 수 있었다.

분리균주의 배양액 원액의 경우 대조구에 비해 성장이 현저하게 좋지 않았으며, 뿌리의 발육 또한 일어나지 않았다. 100~1000의 희석하여 처리한 모의 경우 대조구에 비해 성장이 우수하며, 뿌리의 상태도 좋은 것으로 조사되었다.

이러한 결과는 배양균에 의해 생성되는 성장촉진 호르몬인 IAA의 생성으로 인해 고농도의 IAA는 생육을 억제한다는 결과를 볼 수 있으며, 1000의 희석 배율이 가장 효율적인 것으로 조사되어 현장적용 시에도 1000배의 희석배율로 처리하여 현장에 적용하였다. 또한 시제품의 개발 시에도 농가에서 사용할 때 1000배의 희석배율로 사용하도록 권장량을 지정할 수 있을 것이다.

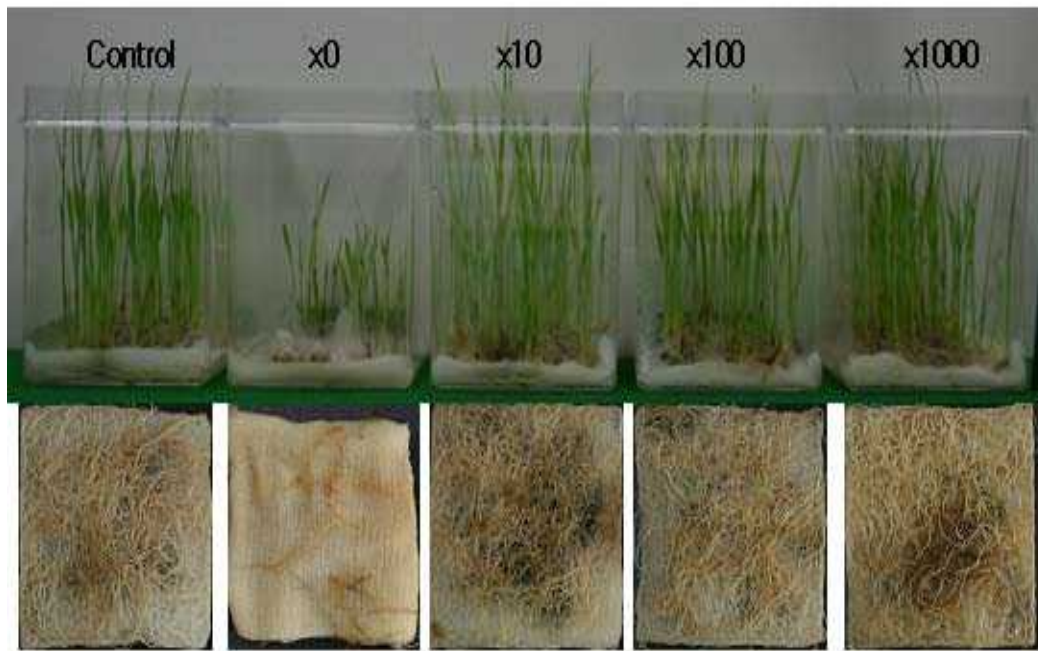


그림 44. 성장기에서의 벼 모의 생육상태.

이러한 벼 성장기의 육묘효과를 토대로 안동시 농업기술센터 내의 논을 이용하여 벼 재배를 2008년도 5월 26일 이앙을 시작하여 2008년 11월 03일에 수확을 하였으며, 수확하기 전까지 3회의 시제품을 사용하여 시비 및 살포를 하였다.

또한 토양을 sampling 하여 살포전·후의 토성의 변화를 측정하였다. 이앙 후 3회 (6월 16일, 7월 30일, 8월 30일)에 걸쳐 재배기간 동안 생전분발효부산물을 이용한 생물비료 및 균주를 논에 시비하였다.

그림 45, 46 및 47은 모이앙부터 수확 시까지의 현장 사진으로 벼의 수확 후 대조구는 도정미량으로 총 중량 200kg, 실험구는 280kg을 수확하였다.



그림 45. 모 이앙부터 수확까지의 과정-1.



그림 46. 모 이앙부터 수확까지의 과정-2.



그림 47. 수확기 벼 상태.

그림 48, 49 및 50과 같이 처리구와 대조구의 벼 생장이 차이가 보였으며 이삭의 수도 차이가 나타나는 것으로 조사되었다.

생전분발효부산물 생물비료 시제품을 처리한 벼의 경우 벼 종에 구분이 없이 벼 잎 성장과 분얼이 우수하였으며 뿌리의 성장도 우수한 것으로 조사되었다. 이러한 결과를 바탕으로 벼 낱알의 100립 무게를 측정하여 생산량과의 상관관계를 조사하였다.

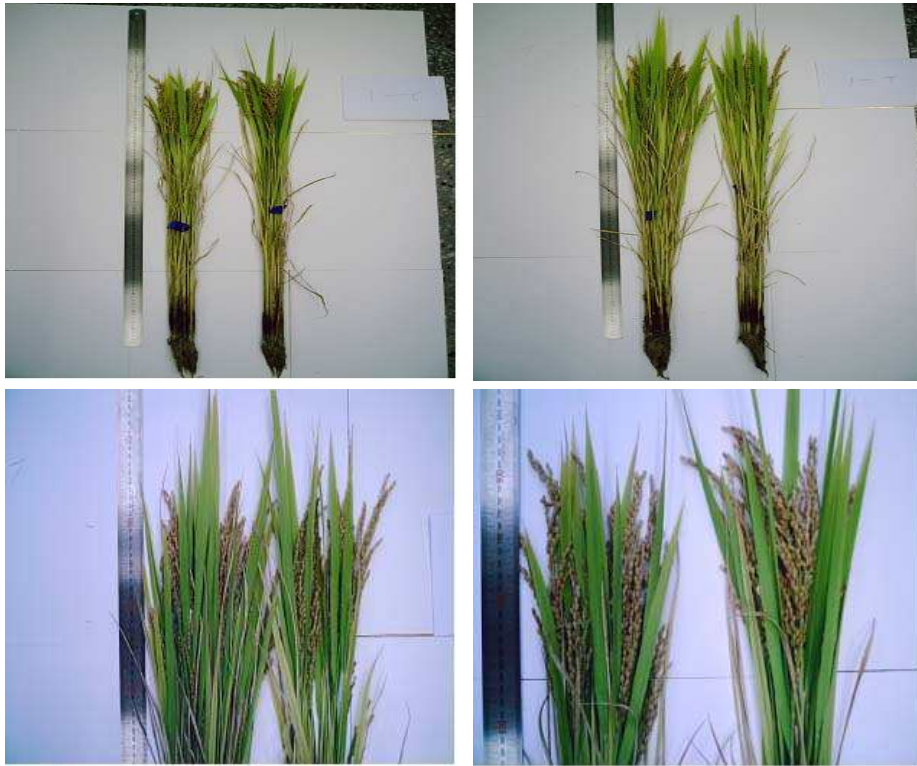


그림 48. 일품벼의 대조구(좌)와 실험구(우).

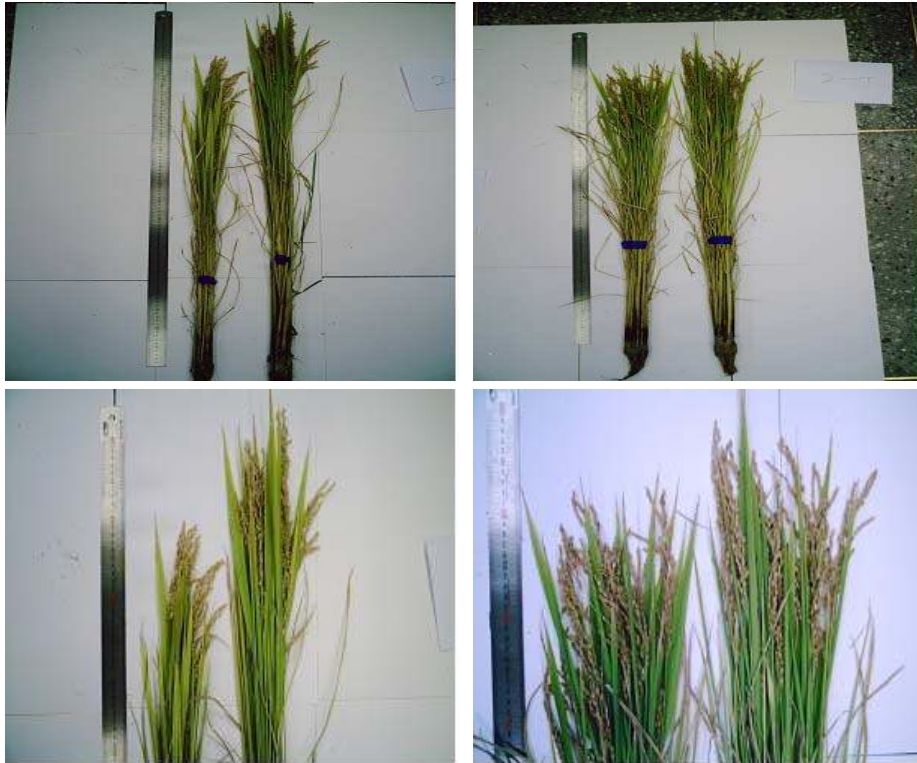


그림 49. 주남벼의 대조구(좌)와 실험구(우).

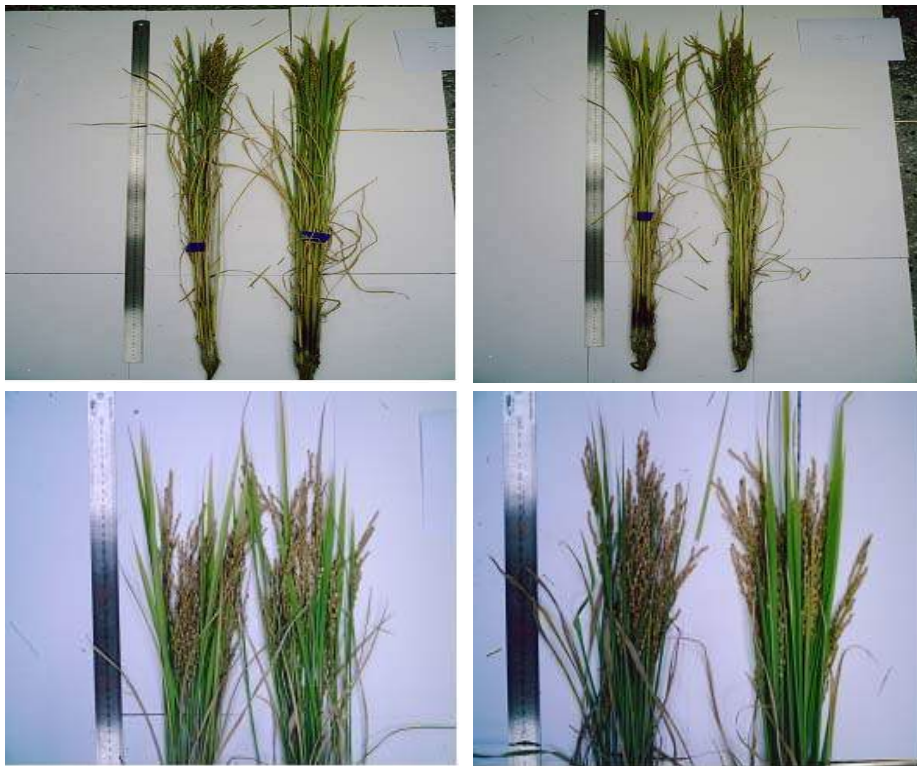


그림 50. 설강벼의 대조구(좌)와 실험구(우).

벼 수확 후 대조구와 처리구에서 같은 품종별로 벼를 채취하여 100중립 낱알의 평균 무게를 측정하여 생전분발효부산물을 이용하여 개발한 시제품의 생물비료 효과를 알아보았다.

그림 51과 같이 100립 중 평균 무게는 재배 품종별로 0.2~0.7g 까지 처리구가 비처리구 보다 더 무거운 것으로 조사되었다. 따라서 시제품을 처리할 경우 낱알의 평균 무게는 증가되는 것으로 평균 무게가 증가 될 것으로 조사되어졌다. 이러한 결과로 보아 생전분발효부산물을 이용하여 개발한 생물 비료의 효과로 인해 수확량을 증대 시킬 수 있을 것으로 판단된다.

식물은 광합성에 의해 에너지 대사와 당을 생성을 한다. 따라서 광합성에 따른 엽록소량을 비교하여, 대조구와 실험구의 엽록소량 측정을 통해 광합성 정도를 유추하며, 이러한 엽록소의량에 의해 쌀의 성분이 차이가 있을 것으로 예측하여 대조구와 실험구의 엽록소의 량을 조사였다. 엽록소 측정은 엽록소 측정기(Model:SPAD-502, Konica Minolta)를 이용하여 대조구와 실험구에서 무작위로 30군데를 선정하여 잎의 1/2지점을 그림 52와 같이 측정하였다.

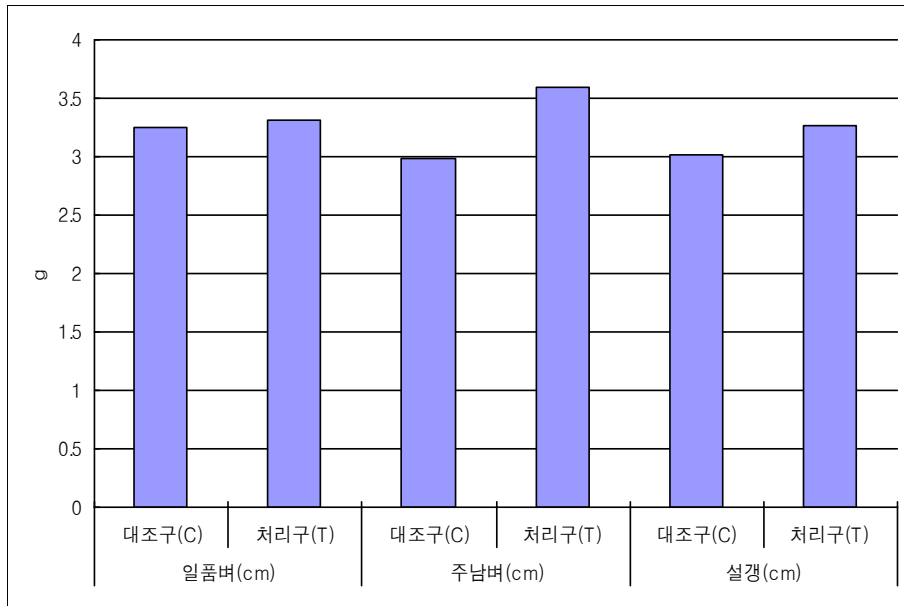


그림 51. 재배벼의 낱알의 평균 무게 (100개)



그림 52. 광합성 측정 (Model: SPAD-502, Konica Minolta).

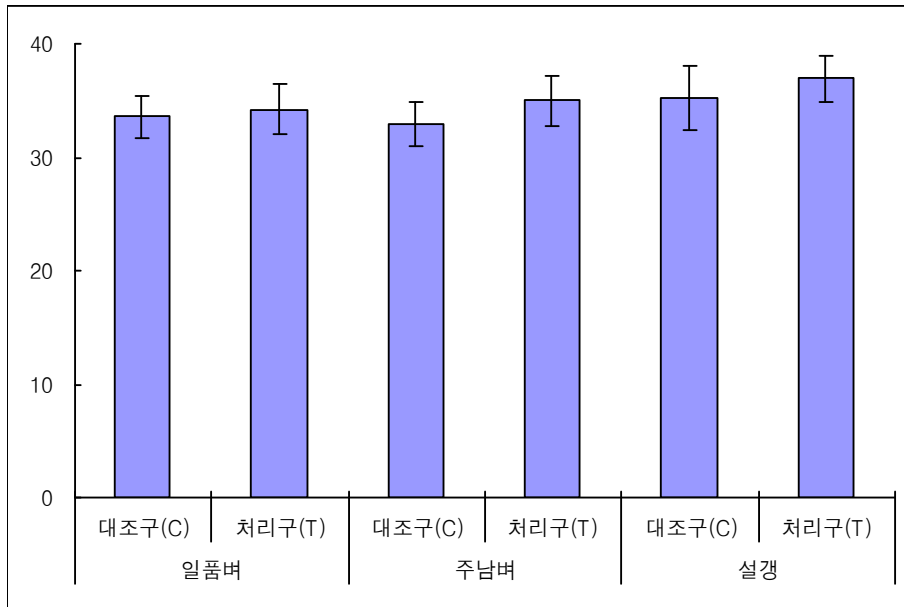


그림 53. 광합성량 조사 (10시-11시).

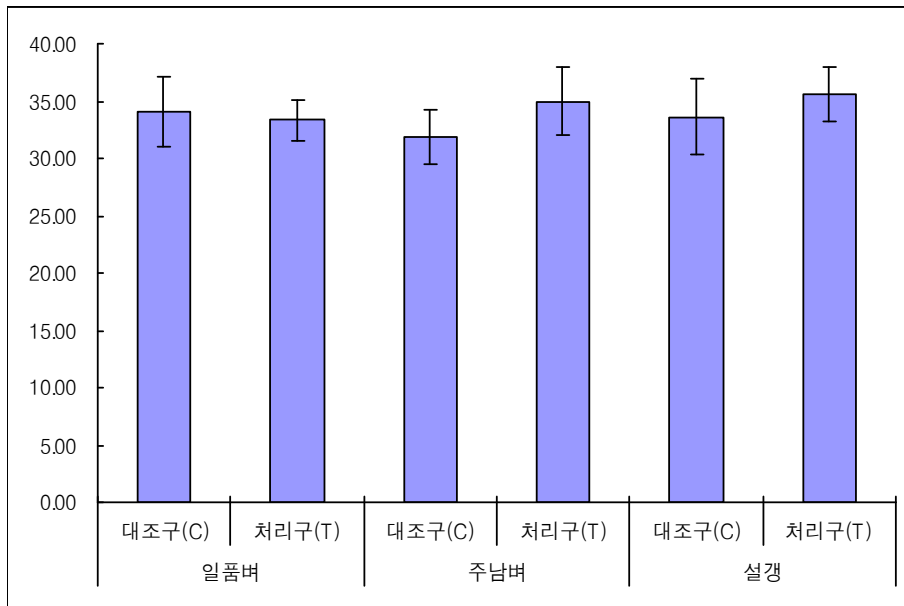


그림 54. 광합성량 조사 (14-15시).

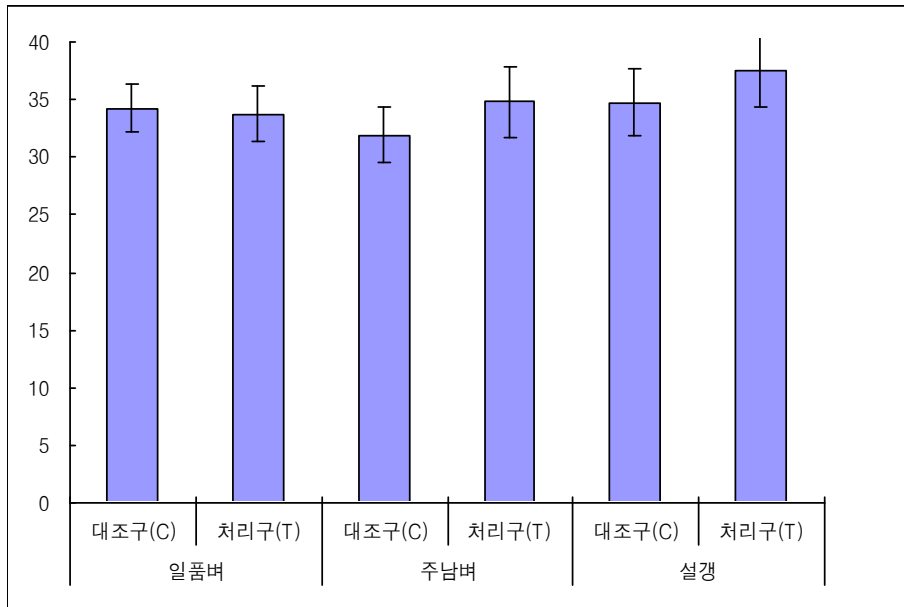


그림 55. 광합성량 조사 (17-18시).

광합성량 측정결과 그림 53, 54 및 55와 같이 생전분발효부산물을 이용하여 만든 친환경 생물비료를 처리한 실험구에서 엽록소량이 1~5 SPAD 이상 높게 조사되어, 전반적으로 우수한 것으로 조사되었다.

이러한 결과는 친환경비료로 사용을 한다면 광합성능을 우수하게 하여 벼 재배에 있어 생육과 열매를 맺어 대사를 활발하게 하여 성장하는데 효과적일 것으로 생각된다. 엽록소의 양은 질소성분과 관련이 있어 실험구의 경우 질소함량이 높은 것으로 사료된다.

표 11. 토양 성분 변화표

항 목	pH (1:5)	OM (g/kg)	AV.P ₂ O ₅	Ex.cat(cmol ⁺ /Kg)			석회양 구량 (kg/10a)	EC (ds/m)
				K	Ca	Mg		
일품-무처리 0day	6.5	15.1	112	0.23	9.18	1.72	98	0.3
일품-무처리 27day	6.5	8.4	105	0.3	8.35	1.51	98	0.22
일품-무처리 89day	6.2	10.2	101	0.31	9.27	1.61	98	0.24
일품-무처리 117day	6.2	12.8	92	0.37	10.19	1.66	98	0.52
일품-처리 0day	6.6	9.7	132	0.36	9.19	1.89	98	0.34
일품-처리 27day	6.7	9.8	140	0.39	8.92	1.72	98	0.33
일품-처리 89day	6.3	11.4	116	0.36	8.53	1.49	98	0.28
일품-처리 117day	6.2	15.6	122	0.39	9.61	1.63	98	0.3
주남-무처리 0day	6.5	12.3	122	0.35	10.78	2.08	98	0.29
주남-무처리 27day	6.6	10.3	122	0.33	9.06	1.71	98	0.25
주남-무처리 89day	6.0	12.8	107	0.34	8.35	1.54	194	0.22
주남-무처리 117day	6.1	14.5	91	0.37	9.9	1.68	98	0.31
주남-처리 0day	6.7	10.7	130	0.34	9.18	1.89	98	0.31
주남-처리 27day	6.6	11	133	0.4	9.01	1.76	98	0.35
주남-처리 89day	6.0	14.7	85	0.33	9.25	1.7	194	0.31
주남-처리 117day	6.3	11.5	117	0.36	8.59	1.48	98	0.28
설갱-무처리 0day	6.6	10.1	124	0.35	10.4	2.01	98	0.31
설갱-무처리 27day	6.5	6.3	113	0.36	9.66	1.81	98	0.35
설갱-무처리 89day	6.3	13.4	117	0.34	9.38	1.69	98	0.27
설갱-무처리 117day	6.2	12.8	83	0.3	9.25	1.63	98	0.24
설갱-처리 0day	6.4	10.7	119	0.37	9.5	1.91	98	0.3
설갱-처리 27day	6.6	12.9	131	0.39	8.66	1.76	98	0.34
설갱-처리 89day	6.1	13.3	121	0.35	8.24	1.62	98	0.21
설갱-처리 117day	6.2	12.4	101	0.37	8.73	1.55	98	0.38

생전분발효부산물을 이용하여 만든 비료를 처리하였을 때 토양의 변화상을 조사한 결과 표 11에서 보는 바와 같이 pH는 6.0~6.7로 평균적으로 일정한 수준을 보였으며, 유기물함량 또한 일정 수준으로 유지가 되는 것으로 조사되었다.

인산의 경우 처리구에서 증가가 되는 것으로 조사가 되었는데 이는 분리 균주가 불용화인을 가용화 인으로 전환 하였기에 나타나는 현상으로 판단된다.

표 11에서와 같이 pH에는 변화를 주지 않는 것으로 조사되었으며, 유기물 함량이 평균적으로 증가되었는데 이는 생전분발효부산물의 시비에 의한 효과로 판단된다. 또한 인산의 경우 처리구에서 대체적으로 높게 나타났는데, 이는 시제품에 사용한 균주들이 토양에서 실제 잘 적응하여 불용성인을 가용화 한 것으로 판단된다. 이러한 결과를 종합하면 생전분발효부산물을 이용한 친환경생물제제가 벼 재배지에서도 효과가 우수한 것으로 판단된다.

재배 기간 중의 논토양 중 미생물상 변화를 관찰한 결과 그림 28과 같았다. 사용한 배지는 일반 미생물 분석으로 LB 및 NA를 사용하였고, YPD의 경우 주박 및 토양내 효모를 파악하기 위하여 사용하였다. 토양 시료 채취는 시제품 1차 살포 직전인 6월 12일(0 day)을 기준으로 하여 7월 9일(27 day), 9월 9일(89 day), 및 10월 7일(117 day)에 채취하였다.

그림 56과 같이 논에 물대기를 하고 있는 중에는 시제품 처리전 보다는 미생물수가 증가하였으나, 수확을 위하여 물 빼기가 되었을 때 급감하였다.

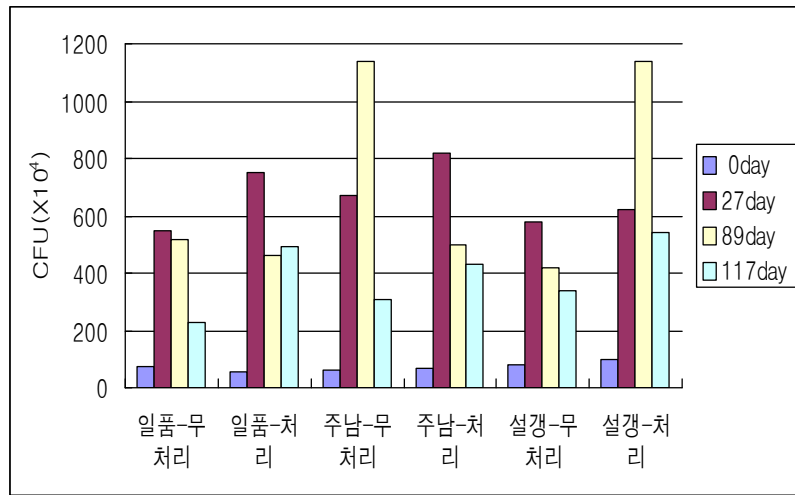
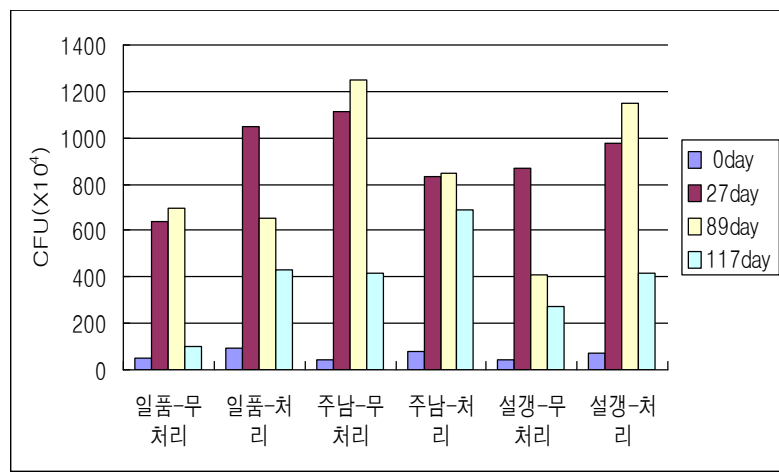
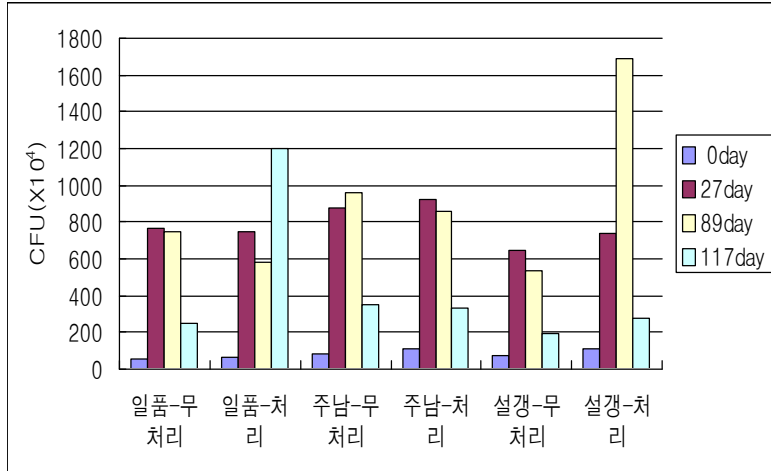


그림 56. 재배 농토양 중의 미생물균수 변화.

◎ 유용미생물의 처리에 따른 벼 도열병에 대한 방제효과

- 종자의 준비

일반적으로 재배지역의 기후특성과 용도에 맞는 우량한 품종을 선택하되 가급적 전년도에 생산된 것이나, 각 지역 농업기술센터 등으로부터 일정량의 종자를 분양받아서 쓴다. 최종년도인 본 실험에서는 전년도 연구에서 재배하였던 품종인 주남벼 품종을 사용하였으며, 충실한 종자를 골라 소독, 침종, 최아 및 육묘를 실시하였다.

- 논외 경운

벼가 잘 자라도록 토양을 갈아주는 것을 경운이라고 하는데, 경운을 하는 깊이는 양분이 흡착되고 뿌리가 뻗는 공간인 작토층을 만드는 것이므로 벼의 생산과 관련하여 중요한 의미를 지닌다. 일반적으로 식토나 식양토에서는 깊게 갈고, 사질토 및 습답에서는 얇게 갈아 주는게 좋으며 우리나라에서 권장하는 경운 깊이는 18cm 이상으로, 본 실험에서도 권장깊이를 기준으로 실시하였다(그림 57).



그림 57. 논외 경운.

- 벼의 육묘 ; *In vitro*에서의 육묘 특성

벼 이앙재배에서 모를 기르는 일을 육묘라 하고, 모를 기르는 장소를 못자리라고 한다. 본 실험은 현장실험으로 가기 이전에 실험실상에서의 규모로 실시하였으며, 상토를 기본 토양으로 하여 30℃, 12시간 간격으로 광 조건을 주·야간 상태로 전환시켜주면서 생물성장기에서 5주간 배양하면서 실험을 실시하였다(그림 58).



그림 58. *In vitro*에서의 벼의 육묘.

배양액의 처리($\times 100$, $\times 1,000$, $\times 10,000$) 및 무처리(Control - D.W, 배지)에 따른 변화를 벼의 성장 길이와 배양액 처리시 균체수의 변화를 LB, PCA 배지를 이용하여 각각 조사하였으며, 배양액의 처리는 표면의 상토가 건조해지기 전에 처리하여 주면서 5주간 실시하였다. 이때, 배양일수에 따른 벼의 성장 길이를 측정한 것은 그림 59와 같았다.

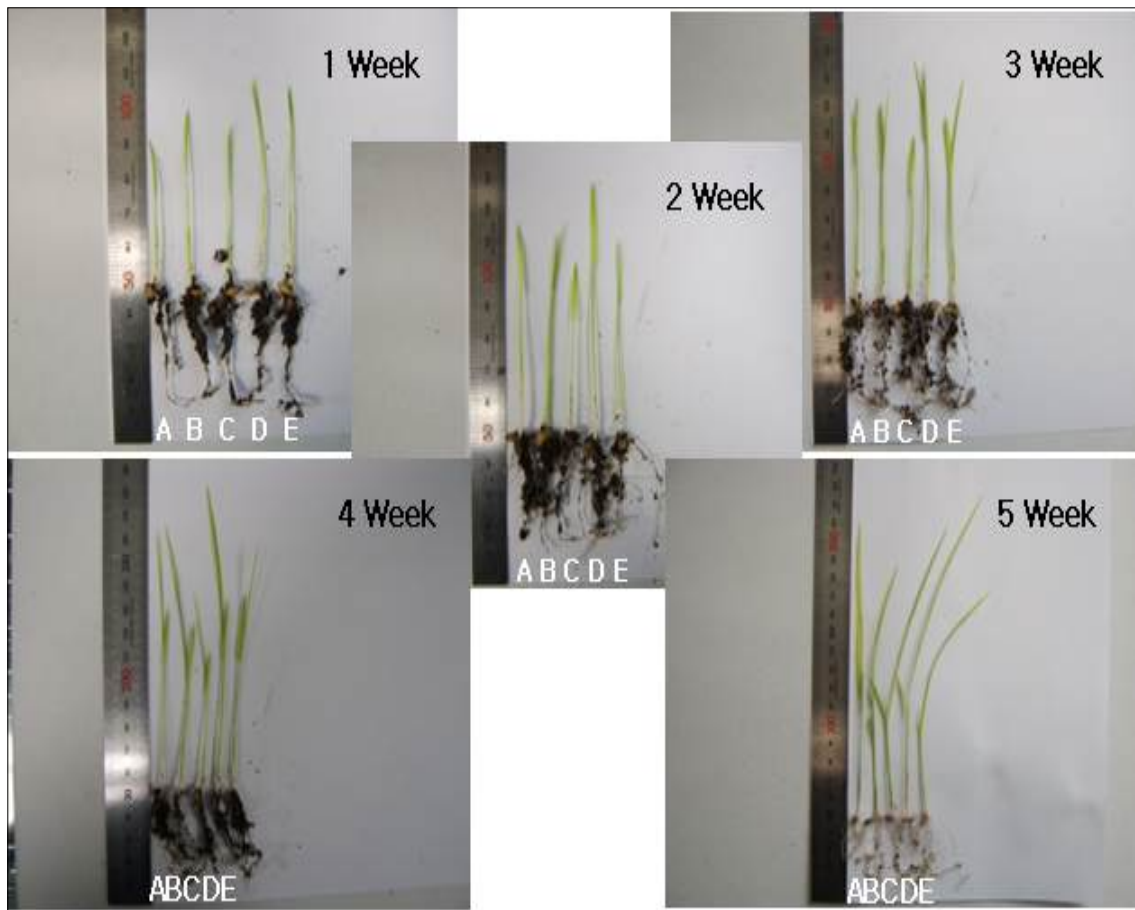


그림 59. 배양일수에 따른 벼의 성장.

(A-D.W, B-배지 자체, C- $\times 100$, D- $\times 1,000$ 및 E- $\times 10,000$)

볍씨를 소독·침종 한 후에 30°C 에서 24시간 최아 시킨 다음 5주일간 성장시켰을 때 전반적으로 대조구인 D.W, 배지 처리구와 비교 시 *Bacillus* sp. AM651 배양액 원액을 $\times 1,000$ 으로 희석하여 처리하였을 때가 가장 우수한 성장 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

이러한 결과는 그동안 보고된 자료들에 의하면 식물생장호르몬인 IAA의 농도가 식물의 성장에 커다란 영향을 미친다고 알려져 있으며, 과잉으로 존재 시에는 오히려 식물의 성장을 저해 시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.

이는 식물체의 신장 효과를 보이는 IAA의 최적 농도는 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ mol이며, 더 높은 농도에서는 신장생장이 저해되며 $10^{-1} \sim 10^{-2}$ mol일 경우에는 제초제로서의 역할을 할 수 있는 것으로 문헌에 보고되어 있다.

본 실험에서 가장 우수한 성장효과를 나타낸 $\times 1,000$ 으로 희석한 배양액의 IAA 농도를 조사해본 결과 문헌에서와 같이 약 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ mol의 농도로 IAA가 존재함을 알 수 있었다.

따라서 배양액을 $\times 100$ 으로 희석하여 처리한 경우에는 식물생장호르몬인 IAA의 과잉으로 인한 식물생장저해를 일으킨 것으로 보여지며, 배양액을 $\times 10,000$ 으로 희석하여 처리한 경우 생육 초기에는 생장에 별다른 영향은 없었으나 생육 후반으로 갈수록 벼의 성장과 더불어 보았을 때 IAA 농도가 낮음으로 인하여 성장 역시 늦어지는 것으로 사료된다.

한편 생장 5주차로 접어들면서 잎의 색깔이 연하게 노랗게 변하는 것을 확인 할 수 있었는데 이는 질소 성분과 같은 영양성분의 결핍으로 인한 주요 증상으로 판단된다.

현행 농법에서 못자리 육묘의 경우 관행법에 따르면 보통 30일 전후하여 이앙을 하고 있으며, 본 실험에서의 품종인 주남벼의 경우에는 약 4주정도 육묘시에 생장 정도가 우수 하였으므로 육묘기간은 약 30일로 하면 좋을 것으로 사료된다.

또한 주남벼의 특이적인 현상으로 못자리 일수 70일 묘의 이앙시에는 불시출수가 많은 것으로 알려져 있다.

- 육묘에 따른 토양 내 균체수의 변화

5주 동안 벼가 성장하는데 있어서 *Bacillus* sp. AM651 배양액의 처리 및 무처리에 따른 미생물 균체수의 변화를 알아보하고자 LB, PCA 배지를 사용하여 배양액의 처리에 따른 미생물의 균체 수 변화를 확인하였다(표 12, 13).

표 12. 배양액의 처리와 벼의 생장에 따른 토양 내 균체수의 변화

LB	1 wk	2 wk	3 wk	4 wk	5 wk
Control (D.W)	3.9×10^5	2.5×10^5	4.0×10^5	2.0×10^5	1.1×10^5
Control (배지)	4.1×10^5	4.3×10^5	3.9×10^5	4.4×10^5	3.1×10^5
×100	4.6×10^7	3.6×10^7	4.3×10^7	2.2×10^7	1.6×10^7
×1,000	7.3×10^6	6.0×10^6	7.1×10^6	6.2×10^6	5.7×10^6
×10,000	3.4×10^6	1.6×10^6	8.3×10^5	1.9×10^6	7.9×10^5

표 12와 같이 LB 배지를 사용하여 벼의 생장일수에 따른 토양내 미생물의 변화를 확인 한 것으로 무처리구인 대조구(D.W)의 경우 균체수가 $1.1 \times 10^5 \sim 4.0 \times 10^5$ 인 것으로 조사 되었으며, 처리구인 *Bacillus* sp. AM651 배양액을 희석정도에 따라서 처리했을 경우에 생장정도가 가장 우수하였던 ×1,000으로 희석하여 처리한 경우 $5.7 \times 10^6 \sim 7.3 \times 10^6$ 로 대조구보다 균체수가 증가한 것으로 조사되었다. 이는 *Bacillus* sp. AM651 균주의 영향으로 토양 내에서 안정성이 우수하였던 기존의 결과를 고려한다면 미생물이 잔존하여 생육을 유도한 영향이라 사료된다.

표 13. 배양액의 처리와 배의 성장에 따른 토양 내 균체수의 변화

PCA	1week	2week	3week	4week	5week
Control	2.9×10^6	3.3×10^6	1.4×10^6	1.8×10^6	3.4×10^6
Control (배지)	3.1×10^6	4.0×10^6	3.1×10^6	3.3×10^6	3.7×10^6
×100	3.0×10^7	9.7×10^6	2.0×10^7	2.2×10^7	2.0×10^7
×1,000	6.4×10^6	7.3×10^6	5.5×10^6	7.0×10^6	5.0×10^6
×10,000	4.1×10^6	4.2×10^6	4.9×10^6	4.5×10^6	4.6×10^6

표 13과 같이 PCA 배지를 사용하여 배의 성장일수에 따른 토양내 미생물의 변화를 확인한 것으로 무처리구인 대조구(D.W)의 경우 균체수가 $1.4 \times 10^6 \sim 3.4 \times 10^6$ 인 것으로 조사되었으며, 처리구인 *Bacillus* sp. AM651 배양액을 희석정도에 따라서 처리했을 경우에 성장정도가 가장 우수하였던 ×1,000으로 희석하여 처리한 경우 $5.0 \times 10^6 \sim 7.3 \times 10^6$ 로 LB 배지에서와 마찬가지로 대조구 보다 균체수가 증가한 것으로 조사되었다.

- 현장에서의 육묘 특성

육묘 방법으로 가로×세로×깊이(60cm×30cm×3cm) 크기의 육묘상자를 사용하는데, 상자 육묘는 기계이앙을 위한 육묘법이다. 육묘상자에 상토를 담고 최아종자를 파종하고 복토한 후 치상하여, 중모의 경우 30~35일 정도 육묘하여 이앙하였다.

모내기를 할 때 표준 재식밀도는 손이앙 시 30cm×15cm 간격으로 1포기에 3~4모를 심으며, 기계 이앙 시에는 평야지 1모작 기준으로 평당 75~85포기에 1포기 3~4모가 적당하며, 이앙심도로서 벼를 이앙하는 깊이는 2~3cm가 되게끔 조절하여 심어주었다(그림 60).



그림 60. 벼의 육묘 및 모내기

- 배양액의 처리 방법 및 처리 횟수

전년도 실험 결과 각 배양액을 1,000배로 희석하여 처리하였을 때 벼의 생육이 가장 우수하였으며, 병의 발생정도가 가장 낮은 결과를 참고하여(data not shown) *Bacillus* sp. AM651 배양액의 처리 농도는 1,000배로 희석하여 2주 간격으로 처리하여 주면서 병해의 발생양상을 조사하였다.

그림 61과 같이 각각의 배양액을 1,000배로 희석한 것과, 혼합하여 희석하는 형식으로 시료를 제조한 후 처리하였다.



그림 61. 벼의 생육 시기별 배양액의 처리.

벼와 관련된 병해는 약 200여종에 이르나, 이 중 피해가 커서 방제를 필요로 하는 병해는 약 20여종으로 잎 도열병, 이삭도열병, 잎집무늬마름병 등이 있다.

본 실험에서의 주요 방제목적의 병해인 도열병은 흐린 날이 계속되거나 일조량이 적고 비교적 저온이면서 다습할 때 많이 발생하는데, 질소질 비료를 과다하게 시용할 경우에도 발병이 증가한다. 발생부위에 따라서 잎 도열병· 이삭목도열병· 이삭가지도열병이 있으며, 각 시기 및 부위별 저항성은 동일하지 않으며 특히, 출수기에 비가 오거나 강풍이 불어 이삭도열병에 걸리면 치명적인 피해를 입을 수 있다.

병든 벳집이나 벳씨 속에서 균사가 분생포자로 월동하여 1차 전염원이 된다. 발병적 온은 20~25℃, 습도 90% 이상이면 최적조건이다. 분생포자의 전파 최적온도는 20~22℃, 숙주에 부착한 분생포자의 발아 최적온도는 25~28℃, 포화습도이다. 이때 병반은 갈색 방추형이며, 만성형· 급성형의 구분이 있다. 발병을 조장하는 요인으로는 질소질 비료의 과다 시용 또는 편용, 저온· 다습· 일조부족, 강풍으로 상처가 생길 때, 만식, 밀식조건, 종자소독이 철저하지 못할 때 등이 있을 수 있다.

그림 62와 같이 처리구와 무처리구 모두 병해는 없는 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 본 실험에서 3차년도 포장 실험을 실시한 경북 안동시 남선면 구미리의 인근 농가에서 또한 병해의 발생이 없는 것으로 조사되었다.



그림 62. 벼의 생육 시기별 배양액의 처리.

- 토양 내 균체수의 변화

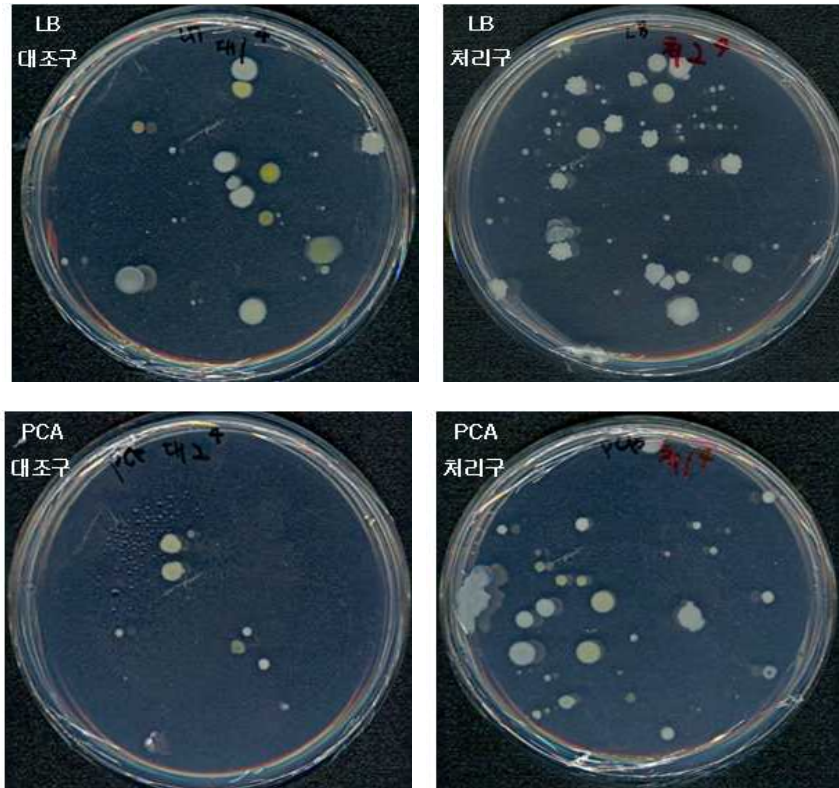


그림 63. 배양액의 처리에 따른 토양 내 균체수.

그림 63과 같이 *Bacillus* sp. AM651 배양액을 처리한 실험구와 처리하지 않은 토양내 일반세균의 분포 정도를 LB 및 PCA 배지를 사용하여 확인한 것이다.

무처리구인 대조구의 경우 LB, PCA 배지에서 조사된 균체수가 각각 2.1×10^5 cfu/ml, 9×10^4 cfu/ml인 것으로 조사되었으며, 처리구의 경우에는 균체수가 각각 5.2×10^5 cfu/ml, 2.7×10^5 cfu/ml로 대조구보다 균체수가 증가한 것으로 조사되었다. 이는 *Bacillus* sp. AM651 균주가 토양 내에서 안정성이 높은 것으로 사료되며, 이는 벼의 생육과 병충해의 예방에 있어서 상당히 의미 있는 결과라 사료된다.

10. 비료 비해 검증시험

비료 비해 검증시험을 수행하기 위하여 선정된 토양의 시험 전 토양화학성은 표 14와 같이 조사하였다.

표 14. 시험 전 토양화학성 시험

NH ₄ -N (ppm)	NO ₃ -N (ppm)	PH (1:5)	OM (g/Kg)	P ₂ O ₅ (mg/Kg)	Ex. cation(cmol ⁺ /Kg)			EC (ds/m)
					K	Ca	Mg	
42.533	8.838	7.7	17.12	233	0.31	8.67	2.95	0.89

상추에 대한 처리별 생육도는 표 15, 16 및 17과 같았다.

표 15. 상추생육도(잎 수)

처리	잎 수			
	4/20	5/2	5/10	5/17
무비구	4.83 ±0.62 ^{ab}	7.61±1.46 ^{ab}	12.33±3.41 ^b	14.56±3.38
대조구	4.94±0.73 ^{ab}	8.00±1.57 ^{ab}	11.67±2.30 ^{ab}	16.28±3.39
100배 희석액	4.33±0.59 ^b	6.72±1.64 ^a	9.50±1.54 ^a	13.78±2.07
1000배 희석액	5.00±0.69 ^{ab}	7.72±0.96 ^{ab}	10.67±1.37 ^{ab}	13.72±2.44
5000배 희석액	5.17±0.92 ^a	8.56±1.85 ^b	12.17±3.03 ^b	15.56±1.85
10000배 희석액	4.78±0.88 ^{ab}	7.67±0.91 ^{ab}	11.44±1.89 ^{ab}	14.72±2.47
p value	< 0.05	< 0.05	< 0.05	> 0.05

^{abc} significantly different from other samples determined by Bonferroni's Multiple Comparison Test (n=18)

표 16. 상추생육도(잎장)

처리	잎장			
	4/20	5/2	5/10	5/17
무비구	3.83±1.06	7.4±2.76 ^{ab}	10.00±1.96 ^{ab}	14.03±4.55 ^{ab}
대조구	4.24±1.47	8.21±2.26 ^b	13.57±3.78 ^c	15.92±4.85 ^a
100배 희석액	3.79±1.46	5.67±1.14 ^a	9.12±2.00 ^a	11.81±2.03 ^b
1000배 희석액	3.78±1.00	6.50±1.56 ^{ab}	10.42±2.21 ^{ab}	12.76±2.04 ^{ab}
5000배 희석액	4.92±1.99	7.31±1.84 ^{ab}	12.12±2.35 ^{bc}	14.30±2.76 ^{ab}
10000배 희석액	4.32±1.26	6.46±0.94 ^{ab}	10.72±1.14 ^{ab}	12.19±1.72 ^b
p value	> 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

^{abc} significantly different from other samples determined by Bonferroni's Multiple Comparison Test (n=18)

표 17. 상추생육도(잎폭)

처리	잎폭 (cm)			
	4/20	5/2	5/10	5/17
무비구	2.11±0.46	4.36±1.54 ^{ab}	8.50±3.67 ^{bc}	9.82±2.78 ^{ab}
대조구	2.21±0.64	4.76±1.46 ^b	8.84±2.21 ^{bc}	10.60±3.19 ^b
100배 희석액	2.01±0.89	3.30±0.66 ^a	6.28±1.21 ^a	8.02±1.39 ^a
1000배 희석액	2.06±0.84	3.46±0.73 ^a	7.16±1.56 ^{abc}	9.48±3.04 ^{ab}
5000배 희석액	2.46±0.78	4.14±1.19 ^{ab}	12.12±2.35 ^{ab}	9.65±1.43 ^{ab}
10000배 희석액	2.09±0.53	3.56±0.45 ^{ab}	7.35±1.05 ^{ab}	8.48±1.39 ^a
p value	> 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

^{abc} significantly different from other samples determined by Bonferroni's Multiple Comparison Test (n=18)

그림 64와 같이 비료시비에 따른 비해검증을 실시하였다.

























대상 작물	상추		케일	
	5주차	8주차	5주차	8주차
무처리구				
대조구				
100배 회석액				
1000배 회석액				
5000배 회석액				
10000배 회석액				

그림 64. 비료 비해 검증시험 사진.

상추와 케일을 대상작물로 설정하여 시험한 결과, 그림 64에서와 같이 각 처리구에서 5주차까지는 상추의 잎 수는 크게 차이가 나지 않다가 파종 5주차 넘어가면서 일부 유의성이 나타나 100배 희석액에서 5, 7, 8주차까지 약간의 생육저해가 나타났으나 최종 수확한 9주차에는 95% 신뢰수준에서 각 처리구별로 차이를 보이지 않았다.

잎의 길이생장의 경우에는 파종 5주차까지는 유의성 있는 차이를 보이지 않다가 7주차 이후에는 배양 희석액을 투여한 전체 구간에서 약간의 길이생장 억제현상이 나타났다. 또한 잎의 넓이생장의 경우에는 파종 5주차까지는 유의성 있는 차이를 보이지 않다가 7주차 이후에는 100배 희석액에서 약간의 넓이생장 억제현상이 나타났다.

케일에 대한 처리별 생육도는 표 18, 19 및 20과 같았다.

표 18. 케일생육도(잎수)

처리	잎수			
	4/20	5/2	5/10	5/17
무비구	3.39±0.7 ^b	6.22±1.26	8.83±1.69	10.50±1.5 ^{ab}
대조구	2.94±0.73 ^{ab}	5.67±1.24	8.94±1.06	10.00±1.88 ^{ab}
100배 희석액	2.56±0.86 ^a	5.61±0.92	8.11±1.18	9.17±2.28 ^a
1000배 희석액	2.94±0.64 ^{ab}	5.78±0.81	8.44±1.34	9.83±2.09 ^{ab}
5000배 희석액	3.28±0.57 ^b	6.22±0.88	8.94±2.04	11.44±0.98 ^b
10000배 희석액	2.83±0.71 ^{ab}	6.17±0.99	8.72±1.45	10.39±1.85 ^{ab}
p value	< 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.05

^{abc} significantly different from other samples determined by Bonferroni's Multiple Comparison Test (n=18)

표 19. 케일생육도(잎장)

처리	잎장(cm)			
	4/20	5/2	5/10	5/17
무비구	3.88±0.58 ^b	7.75±1.87	10.94±2.4 ^b	11.91±2.22
대조구	3.19±0.43 ^a	6.27±1.73	8.44±2.06 ^a	10.42±3.05
100배 희석액	3.31±0.40 ^a	6.64±1.82	9.29±2.81 ^{ab}	12.44±8.66
1000배 희석액	3.39±0.39 ^a	7.39±1.58	10.67±2.32 ^b	12.75±3.21
5000배 희석액	3.56±0.40 ^{ab}	7.24±1.10	10.53±1.08 ^{ab}	12.61±1.74
10000배 희석액	3.33±0.52 ^a	6.60±1.27	9.89±1.53 ^{ab}	12.26±1.62
p value	< 0.05	> 0.05	< 0.05	> 0.05

^{abc} significantly different from other samples determined by Bonferroni's Multiple Comparison Test (n=18)

표 20. 케일생육도(잎폭)

처리	잎폭(cm)			
	4/20	5/2	5/10	5/17
무비구	2.59±0.56 ^b	4.93±0.96 ^b	7.36±1.89 ^{ab}	9.38±1.86 ^{ab}
대조구	2.07±0.24 ^a	3.77±1.09 ^a	6.38±1.74 ^a	7.98±2.42 ^a
100배 희석액	2.06±0.37 ^a	4.35±1.37 ^{ab}	6.68±2.39 ^{ab}	8.31±2.72 ^{ab}
1000배 희석액	2.18±0.25 ^a	4.79±1.00 ^b	8.32±1.99 ^b	10.00±2.71 ^{ab}
5000배 희석액	2.37±0.36 ^{ab}	4.80±0.76 ^b	7.66±1.24 ^{ab}	10.27±2.06 ^b
10000배 희석액	2.15±0.25 ^a	4.36±0.80 ^{ab}	7.39±1.29 ^{ab}	9.48±1.65 ^{ab}
p value	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

^{abc} significantly different from other samples determined by Bonferroni's Multiple Comparison Test (n=18)

케일의 잎 수는 9주차에서 100배 희석액과 5000배 희석액 시험구에서만 유의적인 차이가 났을 뿐 나머지 파종 후 전기간에 걸쳐서는 차이가 나지 않았다.

케일 잎의 길이생장은 파종 후 5주차와 8주차에서 무비구와 대조구, 혹은 각 희석배수 시료간에 무작위적인 차이가 나타나다가 9주차에서는 95% 신뢰수준에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

케일 잎의 넓이생장도 파종 후 전기간에 걸쳐 무작위적인 차이가 나타나다가 9주차에서 대조구에 대한 5,000배 희석액의 생육이 유의적으로 좋았다.

파종 후 9주차 상추와 케일의 처리별 생체중 및 건물중은 표21, 22와 같았다.

표 21. 처리별 생체중 및 건물중 - 상추 건조 전, 후 중량

	BW (g)	AW (g)	AW/B W*100 (%)
무처리	27.17±19.76	2.87±2.06	10.55
대조구	32.15±13.99	3.45±1.57	10.72
100배 희석액	18.57±6.13	1.98±0.63	10.68
1000배 희석액	22.92±11.20	2.47±1.09	10.79
5000배 희석액	25.25±6.34	2.61±0.76	10.35
10000배 희석액	22.29±7.68	2.43±0.84	10.89

※ BW: 건조전 중량, AW: 건조후 중량

※ 모든 구간의 P value > 0.05

표 22. 처리별 생체중 및 건물중 - 케일 건조 전, 후 중량

	BW (g)	AW (g)	AW/B W*100 (%)
무처리	29.24±15.47	3.08±1.69	10.55
대조구	27.81±18.59	2.92±1.85	10.48
100배 희석액	17.42±5.63	1.95±0.63	11.22
1000배 희석액	29.40±8.99	3.21±0.81	10.91
5000배 희석액	31.97±16.68	3.47±1.66	10.84
10000배 희석액	27.18±7.84	2.91±0.91	10.71

※ BW: 건조전 중량, AW: 건조후 중량

※ 모든 구간의 P value > 0.05

표 21과 같이 파종 후 9주차 상추의 건조 전, 후 중량은 모든 구간에 걸쳐 95% 신뢰 수준에서 유의한 차이가 발견되지 않았다.

표 22와 같이 파종 후 9주차 케일의 건조 전, 후 중량은 모든 구간에 걸쳐 95% 신뢰 수준에서 유의한 차이가 발견되지 않았다.

생체 중과 건물 중의 비가 모두 일정하게 나타나 생리장해는 나타나지 않을 것으로 판정되었다.

시험 후 토양의 화학성은 표 23과 같았다.

표 23. 비료비해 시험 후 토양화학성

처리	NH ₄ -N (ppm)	NO ₃ -N (ppm)	pH (1:5)	OM (g/Kg)	P ₂ O ₅ (mg/Kg)
시험전토양	42.533	8.838	7.7	17.12	233
무비구	82.845	3.394	8.0	19.35	283
대조구	87.443	1.936	8.1	18.58	280
100배 희석액	261.133	13.153	8.7	17.28	277
1000배 희석액	141.231	12.245	8.4	24.27	321
5000배 희석액	79.740	18.367	8.1	21.23	398
10000배 희석액	108.554	6.869	8.0	21.07	324

Ex.cation(cmol ⁺ /Kg)			EC
K	Ca	Mg	(ds/m)
0.31	8.67	2.95	0.89
0.34	7.33	3.20	0.62
0.28	7.28	3.12	0.85
0.67	9.12	3.28	1.40
0.59	8.59	3.31	1.17
0.38	9.08	3.25	0.67
0.39	8.99	3.29	0.71

시험 전과 비교하여 시험 후 토양에서 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 양이 증가함에 따라 토양 pH도 증가하였으며 Organic Matter(OM) 및 P_2O_5 도 증가한 경향을 보였으나 95% 신뢰도 기준으로 유의성 있는 증가를 나타내지는 않았으며 나머지 토양화학성에도 별다른 변화가 발견되지는 않았다.

이상의 비료비해 시험 결과는 다음과 같다.

- 가. (주)한스바이오에서 제공한 *Bacillus* sp. AM651 유래의 미생물제제를 실험에 사용하였다.
- 나. 파종 후 4회에 걸친 미생물제제 처리(1차; 4월 2일, 2차; 4월 16일, 3차; 4월 30일, 4차; 5월 14일)하였고 미생물제제 100배 희석액 처리구에서 상추의 경우 잎장 및 잎폭의 유의미한 수준의 생육억제가 나타났으나 중량에서는 차이를 보이지 않아 상추 및 케일의 생육은 잎수, 잎장, 잎폭 및 중량을 고려할 때 전체 시험구에 걸쳐 유의성있는 차이를 보이지 않았다.
- 다. 의뢰한 토양미생물제제를 각 농도별로 사용하였을 경우에 생리장해는 나타나지 않았다.
- 다. 전반적인 생육정도로 보아 토양미생물제제를 1000배 - 5000배 희석하여 처리시 엽채류(상추, 케일) 시설재배에서 생육 및 수량성 증진에 효과가 있을 것으로 판단된다.

11. 수확물 분석

가. 고추 영양성분 분석

- 고추의 수확량 및 무기물 함량

Bacillus sp. AM651 배양액, *Streptomyces* sp. AM50 배양액, AM651과 AM50을 동일 비율로 혼합한 처리구 및 무처리구로 부터 고추의 각 생산량은 붉은고추(생)를 기준으로 *Bacillus* sp. AM651 배양액 처리시 45.5kg, *Streptomyces* sp. AM50 배양액의 처리시 46.5 kg, *Bacillus* sp. AM651 배양액과 *Streptomyces* sp. AM50 배양액의 혼합 처리시 46kg 및 무처리시 45kg으로 나타났다. 수치적으로 처리구간의 약간의 차이가 있었으나 큰 유의성은 없는 것으로 사료된다.

표 24. 배양액의 처리에 따른 고추의 무기물 함량

(mg/100g)

	비타민C	Mg	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Na	K
A	214.9	21.9	16.5	0.1이하	1.0	0.1이하	0.1이하	0.1이하	1.9	26.6
B	208.7	26.6	15.9	0.1이하	1.9	0.1이하	0.1이하	0.1이하	1.4	39.7
C	193.7	32.3	15.3	0.1이하	1.3	0.1이하	0.1이하	0.1이하	1.5	26.5
D	206.1	25.6	19.9	0.1이하	1.3	0.1이하	0.1이하	0.1이하	1.2	29.9

(A: *Bacillus* sp. AM651, B: *Streptomyces* sp. AM50, C: A, B Mixed, D: Control)

고추는 다양한 비타민을 많이 함유해서 식품적인 가치가 높고 붉은색소와 매운맛을 함유해서 대표적인 양념채소로 자리 잡고 있다. 고추 가식부 100g당 일반성분은 열량 39~221kcal, 수분 15.5~84.6%, 단백질 2.6~11.6g, 지질 1.7~11.0g, 탄수화물 10.3~50.6g, 회분 0.8~7.9g으로 알려져 있다.

표 24는 *Bacillus* sp. AM651 배양액, *Streptomyces* sp. AM50 배양액, AM651과 AM50을 동일 비율로 혼합한 처리구 및 무처리구로 부터 생산된 고추의 무기물 함량을 측정한 결과이다.

그 결과, 비타민 C 함량의 경우 control은 206.1mg, *Bacillus* sp. AM651 배양액 처리시 214.9mg, *Streptomyces* sp. AM50 배양액 처리 시 208.7mg 및 혼합 처리 시 193.7mg으로 분

실험에서의 주요 목적 물질인 *Bacillus* sp. AM651 배양액 처리 시 가장 높은 비타민 C 함량을 보였다. 이러한 결과는 일반적인 고추의 비타민 C 함량이 26~116mg 이라는 보고와 비교하여 본다면 미생물유래 배양액의 처리 시 보다 높은 비타민 C 함량을 나타냄을 알 수 있었다. 마그네슘 함량의 경우 대조구는 25.6mg, *Bacillus* sp. AM651 배양액 처리 시 21.9mg, *Streptomyces* sp. AM50 배양액 처리 시 26.6mg 및 혼합 처리 시 32.3mg으로 혼합처리 시 가장 높은 마그네슘 함량을 나타냄을 알 수 있었다. 이러한 마그네슘은 반드시 섭취해야 할 무기물질로 인체 내에서 칼슘, 인과 함께 뼈의 대사에 중요한 기능을 하며 아미노산의 활성화와 ATP의 합성, 단백질의 합성에 결정적인 역할을 한다. 또한 신경전달 작용에서 칼슘과 서로 상반되는 작용은 물론 보완작용을 하기도 하며 근육을 이완시키는 기능을 한다.

칼슘 함량의 경우 일반적인 고추에서 16~58mg이라는 보고와 비교하면 본 실험에서 생산된 고추의 경우 15~19mg으로 기존 보고와 유사한 것으로 조사되었으며, 철의 경우에도 마찬가지로 일반적인 고추에서 0.9~6.8mg이라는 보고와 비교하면 본 실험에서 생산된 고추의 경우 1.0~1.9mg으로 기존 보고와 유사한 것으로 조사되었다. 그러나 나트륨과 칼륨 함량의 경우 일반적인 고추에서 12~56mg과 284~2930mg이라는 보고와 비교하면 본 실험에서 생산된 고추의 경우 1.2~1.9mg과 26~39mg으로 기존 보고와 비교하면 약 10배~100배까지 차이가 있는 것으로 조사되었다.

이러한 결과는 고추의 재배 품종, 병해의 방제를 위해 사용되는 약제의 종류, 지역적인 특성 등에 의한 차이라 사료된다.

- 수확 고추의 영양성분 분석

본 실험에서는 *Bacillus* sp. AM651 배양액, *Streptomyces* sp. AM50 배양액, AM651과 AM50 배양액을 동일 비율로 혼합한 처리구 및 무처리구를 이용하여 2009년도 5월부터 2009년도 11월 까지 재배 수확한 고추 중에서 *Bacillus* sp. AM651 배양액 처리구와 무처리구 만을 대상으로 하여 경북바이오산업연구원에 의뢰하여 영양분석한 결과 표 25와 같이 처리구와 무처리구 간의 영양성분의 차이가 있음을 알 수 있었다.

표 25. 수확 고추의 영양성분

항목	무처리구	처리구
열량	385.0Kcal	377.2Kcal
탄수화물	60.2g/100g	60.6g/100g
당류	18.8g/100g	18.0g/100g
단백질	14.38g/100g	14.33g/100g
지방	9.64g/100g	8.62g/100g
포화지방	2.0g/100g	1.8g/100g
트랜스지방	0.0g/100g	0.0g/100g
콜레스테롤	0.0mg/100g	0.0mg/100g
나트륨	18.0mg/100g	15.0mg/100g

표 25와 같이 *Bacillus* sp. AM651 배양액을 처리한 고추의 경우 평균적으로 열량은 무처리구에 비해 7.8Kcal 낮게 조사되었으며, 일반적인 탄수화물량은 60.6%로 조사되었으며 지방은 처리구에서 무처리구보다 낮은 것으로 조사되었다. 처리구의 경우 포화지방성분이 지방의 20.8%를 차지하고 있으며, 무처리구의 경우 포화지방이 전체지방의 20.7%를 차지하는 것으로 조사되어 불포화지방산의 함량이 처리구와 무처리구 사이에 큰 차이는 없는 것으로 조사되었다. 당류는 처리구가 무처리구에 비하여 약간 높은 것으로 조사되었으나 큰 차이는 없었으며, 단백질의 경우 무처리구가 처리구 보다 약간 높은 것으로 조사되었다.

나. 쌀 영양성분 분석

2008년 2차년도 사업을 통해 개발된 시제품을 이용하여 2008년도 5월부터 2008년도 11월 까지 재배 수확한 쌀을 경북바이오산업연구원에 의뢰하여 영양분석한 결과 표 26과 같이 대조구와 실험구에서의 차이가 있었다.

표 26. 수확 쌀의 영양성분

항목	대조구	실험구
열량	354.3Kcal	356.7Kcal
탄수화물량	81.0g/100g	80.0g/100g
식이섬유	1.8g/100g	3.7g/100g
당류(유리당)	1.0g/100g	2.0g/100g
단백질	5.2g/100g	5.6g/100g
지방	1.4g/100g	2.4g/100g
포화지방	0.4g/100g	1.0g/100g
트랜스지방	0g/100g	0g/100g
코레스테롤	0mg/100g	0mg/100g
나트륨	0.6mg/100g	0.9mg/100g

표 26과 같이 전분발효부산물인 주박을 이용한 생물비료를 처리한 쌀의 경우 평균적으로 열량은 대조구에 비해 2.4Kcal 높게 조사되었으며, 일반적인 탄수화물량은 80%로 조사되었다. 지방은 실험구에서 대조구보다 2배 이상이 높은 것으로 조사되었는데 쌀의 지방은 대부분이 산화되기 쉬운 불포화지방산으로 구성되어 있으나, 대조구의 경우 포화지방성분이 지방의 71%를 차지하고 있다. 실험구의 경우 포화지방이 전체지방의 58%를 차지하는 것으로 조사되어 불포화지방산의 함량이 더 많았다. 유리당은 실험구가 대조구에 비해 2배 정도 높게 조사되어 밥맛의 변화를 줄 것으로 판단된다. 단백질의 경우 질소 시비량에 따라 단백질 함량의 변화도 나타나는 것으로 보고되어 있으나, 본 실험에서는 질소 시비를 처리하지 않은 생물비료의 효과로 단백질 함량의 차이는 0.4%정도 높게 조사되어졌다. 단백질함량이 많으면 영양학적으로 우수하다고 생각되어지나 식미의 관점에서는 경도가 높고 점도가 낮은 밥이 되어 찰지지 못하다. 실험구 재배 쌀은 일반 쌀에 비해 식이섬유도 우수하며, 열량도 높아 생전분발효부산물 생물비료를 이용한다면 친환경 재배로의 전환과 쌀의 기능면에서도 좋아질 것으로 판단된다.

수확한 벼로 지은 밥의 특성을 알아보기 위해 Reogram (Model: SUN RHEO METER COMPAC-100 II, SUN SCIENTIFC Co. LTD.)을 이용하여 물성을 조사하였다. 재배한 쌀을 일반적으로 가정에서 사용하는 방식(쌀 150g과 물의 양은 100ml 동일량)으로 밥을 지은 후 상온에서 10분간 방치 후 Reogram을 이용하여 밥의 경도, 응집성, 탄력성, 점성, 부착성 등 물성을 측정하였다. 측정조건은 load cell press 10kg, cross head speed 120mm/min, 진입깊이 5.0mm, 시료와 아답터거리 5.0mm에서 측정하였다.

표 27. 물성 정의

용어	단위	정의
최대응력 (stress)	g/cm ²	외부에서 가해진 힘, 불균일 가열 또는 영구변형의 결과로 발생하는 단위면적당 힘.
탄력성 (elasticity)	%	변형된 물체가 변형을 일으킨 힘이 제거되면 원래의 모양과 크기로 되돌아가려는 성질. 이러한 성질을 가진 물체는 탄성적으로 반응한다.
응집성 (aggregation)	%	동일 물질의 표면간의 부착성을 나타냄
씹음성 (chewiness)	g/cm ²	삼키기 쉬운 상태로 반 고체식품을 씹는데 요구되는 에너지
깨짐성 (brittleness)	g/cm ²	현저한 흐름이 일어나기 전에 변형없이 부서지는 성질
부착성 (stickiness)	g/cm ²	물질과 접근된 이웃 표면 간의 부착성과의 표면특성을 나타냄

표 28. Reogram을 이용한 밥의 물성 변화측정

	최대응 력 (Max1) g	최대응 력 (Max2) g	그래프 면적 (A1) Erg	그래프 면적 (A2) Erg	탄력성 %	응집성 %	씹음성 g	깨짐성 g	부착성 g
Y사	133.3	110	315.8	235.6	89.2	74.9	99.7	8898.4	-20
대조구	180	156.6	446.3	361.9	89.2	82.4	147.7	13868.8	-23.3
실험구	206.6	186.6	570.2	467.5	93.5	81.9	169.2	15776.6	-20

표 28과 같이 밥알의 탄력성은 생전분발효부산물을 이용하여 생산한 쌀이 평균 93.5%로 나타났으며, 대조구의 경우 평균 89.2%, 시중 판매쌀은 평균 89.2%로 나타나 생전분발효부산물을 이용한 재배쌀이 탄성력이 우수한 것으로 조사되어졌다. 경도의 경우 대조구에 비해서 실험구가 더 좋은 것으로 나타났으며, 쌀의 경우 밥알의 조직감 중 식미지수 및 점착성은 지역변이가 크며, 응집력 및 탄성력은 변이 계수가 낮다는 보고가 있다.

본 연구를 통해 시제품으로 개발한 생전분발효부산물 생물비료를 사용한 재배쌀의 경우 대조구에 비해 쌀의 탄력성, 응집력, 경도, 씹음성 등이 높게 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 향후 차기년도에 토성이 다른 재배지역을 선정하여 재배하였을 경우 2차년도와 동일한 결과를 나타낸다면, 범용적인 상품이 될 것으로 판단된다. 또한 이상의 결과를 바탕으로 일반 재배쌀과 생전분발효부산물 생물비료를 이용한 친환경재배 쌀의 밥맛을 추정할 수 있는 기본자료 확보가 가능하다.

- 수확한 주남벼의 특성

쌀의 영양성분은 품종, 재배지역 및 환경 등에 따라서 차이는 있으나 백미를 기준으로 보았을 때 전분 77.6%, 단백질이 6.3~7.1%, 조지방 0.3~0.5%, 조섬유 0.2~0.5%, 조회분 0.3~0.8%, 기타 비타민 등이 함유되어 있으며, 무기질로서는 인, 칼륨, 마그네슘, 나트륨, 철분 등이 함유 되어있다. 쌀은 단백질 공급원으로써 중요한 역할을 하는데 특히, 쌀은 밀과 비교하였을 때 아미노산 조성 중 성장기 어린이에게 좋은 필수 아미노산인 라이신 함량이 2배 정도 많고, 아미노산가와 단백질가가 높으며, 소화흡수율 및 체내 이용률이 좋은 특성을 가진다.

본 실험에서는 *Bacillus* sp. AM651 배양액을 이용하여 2009년도 5월부터 2009년도 11월 까지 재배 수확한 쌀을 경북바이오산업연구원에 의뢰하여 영양분석한 결과 표 29와 같이 처리구와 무처리구 간의 영양성분의 차이가 있음을 알 수 있었다.

표 29. 수확 쌀의 영양성분

항목	무처리구	처리구
열량	338.4Kcal	349.8Kcal
탄수화물량	77.3g/100g	79.0g/100g
당류	0.14g/100g	0.3g/100g
단백질	5.36g/100g	5.83g/100g
지방	0.88g/100g	1.17g/100g
포화지방	0.5g/100g	0.5g/100g
트랜스지방	0g/100g	0g/100g
콜레스테롤	0mg/100g	0mg/100g
나트륨	1.0mg/100g	5.0mg/100g

표 29에서 보는 바와 같이 *Bacillus* sp. AM651 배양액을 처리한 쌀의 경우 평균적으로 열량은 무처리구에 비해 11.4Kcal 높게 조사되었으며, 일반적인 탄수화물량은 79.0%로 조사되었다. 지방은 처리구에서 무처리구보다 높은 것으로 조사되었는데 쌀의 지방은 대부분이 산화되기 쉬운 불포화지방산으로 구성되어 있으나, 처리구의 경우 포화지방성분이 지방의 42.7%를 차지하고 있으며, 무처리구의 경우 포화지방이 전체지방의 56.8%를 차지하는 것으로 조사되어 불포화지방산의 함량이 처리구 보다는 더 적은 것으로 조사되었다.

당류는 처리구가 무처리구에 비해 2배 정도 높게 조사되어 밥맛의 변화를 줄 것으로 판단된다. 단백질의 경우 질소 시비량에 따라 단백질 함량의 변화도 나타나는 것으로 보고되어 있으나, 본 실험에서는 질소 시비를 처리 하지 않은 생물비료의 효과로 단백질 함량의 차이는 처리구가 무처리구와 비교 하였을 때 높게 조사되어졌다. 단백질함량이 많으면 영양학적으로 우수하다고 생각되어지나 식미의 관점에서는 경도가 높고 점도가 낮은 밥이 되어 찰지지 못하다. 처리구에서의 재배 쌀은 무처리구 재배 쌀에 비하여, 열량도 높게 조사 되었으므로, 전년도에 생전분발효부산물 생물비료와 *Bacillus* sp. AM651 배양

액을 활용 한다면 친환경재배로의 전환과 쌀의 영양학적인 면에서도 우수할 것으로 판단 된다.

- 밥의 물성 특성

수확한 벼로 지은 밥의 특성을 알아보기 위해 Reogram (Model: SUN RHEO METER COMPAC-100Ⅱ, SUN SCIENTIFC Co. LTD.)을 이용하여 물성을 조사하였다. 재 배한 쌀을 일반적으로 가정에서 사용하는 방식(쌀 150g과 물의 양은 100ml 동일량)으로 밥을 지은 후 상온에서 10분간 방치 후 Reogram을 이용하여 밥의 경도, 응집성, 탄력성, 겹성, 부착성 등 물성을 측정하였다. 측정조건은 load cell press 10kg, cross head speed 120mm/min, 진입깊이 5.0mm, 시료와 아답터거리 5.0mm에서 측정하였다.

표 30. Reogram을 이용한 밥의 물성 변화측정

	최대응력 (Max1) g	최대응력 (Max2) g	그래프 면적(A1) Erg	그래프 면적(A2) Erg	탄력성 %	응집성 %	씹음성 g	깨짐성 g	부착성 g
추청벼	154.3	123.5	355.2	245.1	85.4	68.9	92.1	9788.2	-20
무처리구	183.2	174.3	440.4	353.9	90.1	73.2	155.4	13795.3	-20
처리구	212.3	205.7	580.7	465.4	94.8	78.5	176.9	16556.4	-20

표 30과 같이 밥알의 탄력성은 *Bacillus* sp. AM651 배양액을 처리하여 생산한 쌀이 평균 94.8%로 나타났으며, 무처리구의 경우 평균 90.1%, 시중 판매쌀인 추청벼의 경우 평균 85.4%로 나타나 *Bacillus* sp. AM651 배양액을 이용한 재배쌀이 탄성력이 우수한 것으로 조사되었다. 또한, 경도의 경우 대조구에 비해서 처리구가 더 좋은 것으로 나타났으며, 쌀의 경우 밥알의 조직감 중 식미지수 및 점착성은 지역변이가 크며, 응집력 및 탄성력은 변이 계수가 낮다는 보고가 있다.

본 연구를 통해 시제품으로 개발한 *Bacillus* sp. AM651 배양액을 사용한 재배쌀의 경우 대조구에 비해 쌀의 탄력성, 응집력, 경도, 씹음성 등이 높게 나타났다. 이러한 결과는 전년도 결과에서처럼 생전분발효부산물 생물비료와 *Bacillus* sp. AM651 배양액 모두 밥의 물성을 증진시키는데 우수한 효과가 있는 것으로 나타남에 따라, 본 연구에서 개발된 생

전분발효부산물 생물비료와 *Bacillus* sp. AM651 배양액은 관련 병해의 방제 및 예방의 역할 뿐만 아니라 쌀의 섭취 시 식미를 개선하고자 하는데도 상당히 뛰어난 효과가 있으므로 다양한 방면으로의 활용이 가능한 상품이 될 수 있다고 사료된다.

- 재배쌀을 활용한 주남벼의 홍국 발효 특성

본 실험에서는 수확한 주남벼의 *Bacillus* sp. AM651 배양액 처리구와 무처리구를 이용하여 홍국색소와 monacolin K 생산능이 우수한 *Monascus purpureus* 균주를 이용하여 각각의 홍국 배양 특성과 monacolin K 생산능 및 배양기간에 따른 항산화활성 및 항고혈압 활성을 조사하였다.

홍국균주의 배양을 위한 기본배지는 3% rice flour, 0.15% NaNO₃, 0.25% KH₂PO₄ 및 0.1% MgSO₄ · 7H₂O로 구성된 Lin's 배지를 사용하였으며, 종 배양은 포자 현탁액 1 ml 을 접종하여 30℃에서 130 rpm의 속도로 5일간 진탕 배양하였고, 본 배양은 종 배양과 동일한 Lin's 배지에 종 배양액을 2%(v/v)로 첨가한 후 초기 pH 5.5, 배양온도 30℃에서 130 rpm으로 5일간 진탕 배양하였다.

홍국쌀을 제조하기 위하여 본 연구과제의 3차년도 실험을 통하여 수확한 주남벼를 원료로 사용하였으며, 대조군으로 (주)한스바이오에서 제품생산에 사용하는 양반쌀(추청벼)을 사용하였다.

쌀은 세척하여 불순물을 제거한 다음 30분간 침지 후 1시간 이상 물 빼기를 하여, 초기 수분함량이 28~30% 되게 맞추고 각각 100 g을 배양 용기에 넣어서 121℃에서 30분간 증자하였다. 30℃ 정도가 되게 냉각 후 최적생산배지에서 배양한 배양액을 2%(v/v)가 되도록 접종하여 30℃ 항온배양기에서 7일간 배양하였고, 홍국균 배양체의 덩어리를 하루에 3회 흔들어서 덩어리 형성을 방지하였으며, 배양 완료 후에는 50℃에서 수분함량 10% 이하로 건조하여, 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

Ethanol 가용성 홍국색소 추출을 위하여 80% ethanol을 사용하였으며 홍국 분말과 ethanol 간의 비율은 1 : 9로 하여 추출하였다. 즉, 홍국분말 50 g에 80% ethanol을 450 ml을 가하여 30℃에서 1 시간 동안 130 rpm으로 진탕하여 80% ethanol 가용성 색소를 추출하였다.

Ethanol 가용성 홍국색소의 정량은 홍국쌀을 80% EtOH로 추출하고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 증류수로 적정배수까지 희석하여 UV-VIS spectrophotometer (Hewlett Packard 8453, Germany)를 사용하여 yellow 색소는 400 nm, red 색소는 500 nm에서 측정된 흡광도 값을 각각의 홍국색소 값으로 나타내었다. 또한,

red 색소와 yellow 색소의 생성량을 500 nm/400 nm의 비율로서 상대적으로 비교하였고, 1.0을 기준으로 하여 그 이상은 red 색소의 생성 비율이 높은 것으로 그 이하는 yellow 색소의 생성 비율이 높은 것으로 나타내었다.

그 결과, *Monascus purpureus*를 이용하여 본 연구과제에서 수확한 주남벼의 *Bacillus* sp. AM651 배양액 처리구와 무처리구 및 대조구인 추청벼를 사용하여 제조된 홍국쌀은 그림 65와 같았다.

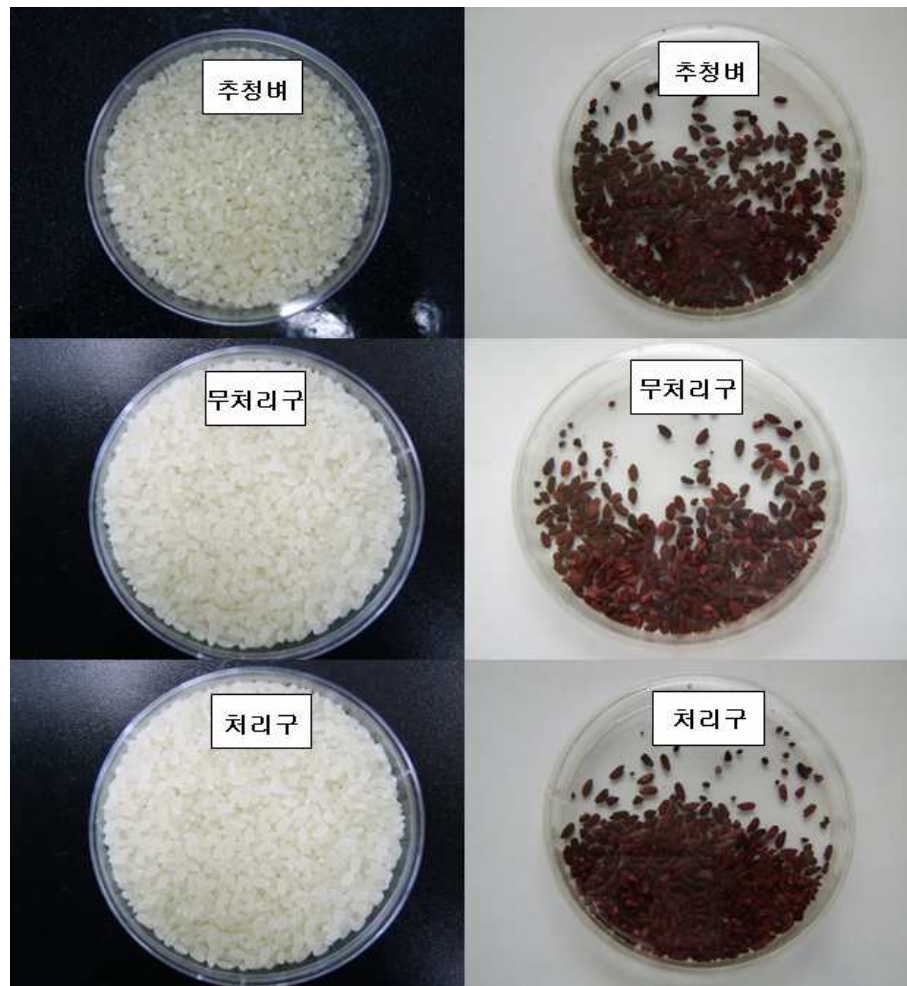


그림 65. 쌀의 종류별 배양 전과 배양 후 상태변화.

쌀의 종류별 홍국쌀을 제조한 후 80% EtOH로 추출하였을 때 홍국색소의 생산량은 표 31과 같다.

표 31. 쌀의 종류별 홍국색소의 생산

	Pigment productivity(Absorbance)		
	Yellow	Red	Red/Yellow
추청벼	28.95	29.85	1.03
무처리구	19.96	21.68	1.08
처리구	25.45	26.52	1.04

표 31과 같이, 7일간 배양 시 red 색소의 경우 대조구인 추청벼가 가장 높은 생산량을 보였으며, 처리구의 경우 대조구와 비교 시 약간 낮은 색소의 생산량을 보였으나 무처리구 보다는 생산량이 높은 것을 알 수 있었다. 이처럼 같은 균을 사용하더라도 기질인 쌀의 종류에 따라서 홍국색소의 생산량이 달라지는 것은 쌀의 구성성분과 그 이용성의 차이 때문이라 판단된다.

Monacolin K는 비활성형 모나콜린 K(Lactone form MK)와 활성형 모나콜린 K(Active form MK)로 나누어 제조한다. Lactone form monacolin K는 메비놀린 (mevinolin, monacolin K) 표준품 10mg을 정밀하게 달아 75% 에탄올로 50m³에 녹여 표준용액으로 하며, active form monacolin K는 표준품 10mg을 정밀하게 달아 75% 에탄올로 50m³에 완전히 용해시킨 후 2.0m³를 취하여 4m³ 바이알에 넣고 0.05N 수산화나트륨 에탄올용액 0.5m³를 넣고 혼합한 후 실온에서 최소 30분 방치하여 표준용액으로 하며 이는 건강기능식품공전을 기준으로 제조하였다.

Monacolin K의 추출은 홍국쌀 0.25g에 80% EtOH 5ml을 첨가하여 30℃, 150rpm으로 3시간 동안 교반하고 정지시킨 후 상등액을 membrane filter(0.2μm, Millipore)로 여과하여 시료로 사용하였으며, 이때 사용한 HPLC 분석조건의 다음과 같다.

Monacolin K의 정량은 Luna 5u Phenyl-Hexyl column(250 × 4.6mm)이 장착된 HPLC를 이용하여 flow rate : 1.0ml/min, UV 237nm에서 검출하면서 injection volume 20μl로 하여 acetonitrile : 0.1% Phosphoric acid = 55 : 45의 비율로 용출시킨 후 표준 monacolin K를 이용하여 peak의 면적비로써 비교 정량분석 하였다.

*Monascus purpureus*를 이용하여 홍국쌀을 제조한 후 80% EtOH로 추출하였을 때 Monacolin K의 생산량은 표 32와 같다.

표 32. 쌀의 종류별 monacolin K의 생산

	Productivity(mg/kg)
	Monacolin K
추청벼	156.4
무처리구	152.8
처리구	167.3

표 32와 같이 대조구인 추청벼와 비교하였을 때 처리구가 167.3mg/kg으로 가장 높은 Monacolin K의 생산량을 보였다.

Monacolin K의 경우, 본 균주를 이용한 기존의 결과를 보면 배양일이 15일 이상부터 건강기능식품 기준을 넘는 생산량을 보이는 것으로 조사 되었으며, 배양일 20일 때 건강기능식품 기준의 약 4배에 해당되는 Monacolin K를 생산하는 것으로 조사된 바 있다.

홍국쌀에서의 전자공여능(항산화활성)은 DPPH의 환원력을 이용하는 Biois의 방법으로 측정하였다. 시료 200 μ l에 DPPH용액(DPPH 12.5mg을 에탄올 100ml에 용해) 800 μ l를 가한 후 10분간 반응시키고 525nm에서 흡광도를 측정하여 시료 무첨가 대조구와 활성을 비교하였다.

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 응용하여 측정하였으며, 각 에탄올 추출물 시료 50 μ l에 2% Na₂CO₃용액 1ml을 넣고, 50% Folin시약 50 μ l를 넣은 후 상온에서 30분간 방치하여 반응 시킨 후 UV-VIS spectrophotometer를 사용하여 760nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 이때 표준물질은 tannic acid를 사용하였으며, 적정농도로 만든 후 위와 같은 방법으로 실험하여 표준곡선을 구하였다.

*Monascus purpureus*를 이용하여 홍국쌀을 제조한 후 80% EtOH로 추출하였을 때 배양에 따른 DPPH radical 소거활성 및 총 폴리페놀 함량을 측정 결과는 표 33과 같다.

표 33과 같이, 홍국균을 배양하지 않은 백미 자체에서는 DPPH radical 소거활성 및 총 폴리페놀 함량이 거의 없는 것으로 조사되었으나, 전체 시료에서 배양기간이 길어지면 DPPH radical 소거활성 및 총 폴리페놀 함량 역시 증가 되는 것을 알 수 있었으며, 대조구인 추청벼와 비교하였을 때 처리구가 DPPH radical 소거활성 및 총 폴리페놀 함량 모두 각각 56.7%, 902.2mg/kg으로 가장 우수한 활성을 나타내는 것으로 조사 되었다. 이는 본 균주가 처리구의 발효 과정에서 생산하는 대사물질들이 우수한 항산화 효과를 나타내는 것으로 사료 된다.

표 33. 쌀의 종류별 DPPH radical 소거활성 및 총 폴리페놀 함량

	발효 전		발효 후	
	DPPH radical scavenging activity(%)	Total polyphenol contents (mg/kg)	DPPH radical scavenging activity(%)	Total polyphenol contents (mg/kg)
추청벼	5.3	-	53.7	891.4
무처리구	4.6	-	51.4	886.7
처리구	5.1	-	56.7	902.2

ACE 저해활성의 측정은 Cushman과 Cheung의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 100 μ l에 100mM sodium borate buffer(pH 8.3) 100 μ l를 가한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 preincubation시켰다. 여기에 기질로서 HHL용액 50 μ l를 가하여 다시 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 1N HCl 250 μ l를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 1ml를 가하여 30초간 vortexing한 다음 3,000rpm으로 15분간 원심분리 한 후 상등액 800 μ l를 취하였다. 이 상등액을 120 $^{\circ}$ C에서 40분간 완전히 건조시킨 후 동일조건의 100mM sodium borate buffer 1ml을 가하여 완전히 용해시켜 228nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해활성을 계산하였다.

*Monascus purpureus*를 이용하여 홍국쌀을 제조한 후 80% EtOH로 추출하였을 때 배양에 따른 ACE (angiotensin converting enzyme) 저해활성을 측정 결과는 표 10과 같았다.

표 34. 쌀의 종류별 ACE(angiotensin converting enzyme) 저해활성

	ACE inhibitory activity(%)	
	발효 전	발효 후
추청벼	53.5	78.4
무처리구	41.6	57.3
처리구	45.8	65.6

고혈압과 관련된 인자 중에서 angiotensin- I converting enzyme(ACE)은 불활성형인 angiotensin- I 의 C말단 His-Leu을 절단하여 angiotensin- II를 생성하고 혈압을 감소시키는 물질인 bradykinin에 대한 불활성화 효소이므로 ACE 저해제는 ACE의 작용을 저해함으로써 혈압을 낮추어 준다고 알려져 있다.

표 34 같이 ACE 저해활성은 홍국균을 배양하지 않은 초기의 백미에서도 약 40~50% 정도의 저해효과를 나타내는 것으로 조사되었으나, 발효가 되면서 ACE 저해효과는 점차 증가하는 것으로 조사되었다. 그 결과, 대조구인 추청벼의 경우 발효 후에 78.4%의 비교적 높은 저해효과를 나타내었으며, 처리구가 65.6%의 ACE 저해효과를 나타내는 것으로 조사되었다.

이러한 결과를 보았을 때, 대조구인 추청벼 보다는 ACE 저해효과가 낮았으나 본 연구에서의 재배 품종인 주남벼의 발효에 적합한 홍국 균주의 선발과 발효 조건의 최적화가 이루어진다면 향후 고혈압과 관련된 홍국발효미로의 개발을 유도할 수 있는 결과라 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 목표달성도

구분	연도	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2007	○ 생전분발효부산물(주박)의 완숙 퇴비를 위한 발효화 및 효모포자의 활성촉진 안정화 기술 개발	20 %	- 생전분발효부산물(주박)의 퇴비화 조건 도출
		○ 완전 퇴비화된 생전분발효부산물을 이용한 기능성생물비료의 개발	40 %	- 생물비료 개발
		○ 우수한 식물병 저항성 유용미생물 자원 확보 및 유용물질의 생산 기술 최적화	40 %	- 유용물질 확인 및 분석
		합계	100 %	
2차 년도	2008	○ 완전 퇴비화된 생전분발효부산물을 이용한 기능성생물비료의 개발	30 %	- 다기능 맞춤형 비료 개발 - 방출조절형 비료 개발 - 미세과립형 제제화
		○ 생전분발효부산물을 이용 기능성생물비료의 포장 실험 (1 차)	30 %	- 벼재배 시험 성적 - 고추 재배 시험 성적
		○ 내병성 유도 실험	20 %	- 고추 내병성 유도 시험
		○ <i>in vitro</i> test 및 기능성 생물비료의 이화학적 조사	20 %	- 유용미생물에 의한 비효상승 및 내병력 상승효과 검증
		합계	100 %	
3차 년도	2009	○ 생전분발효부산물을 이용 기능성생물비료의 포장 실험 (2 차)	40 %	- 벼재배 시험 성적 - 고추 재배 시험 성적
		○ 생전분발효부산물을 이용한 기능성생물비료의 산업화	50 %	- 제품 대량생산체계 구축 - 시제품 공급 및 판매
		○ 시제품내의 생리활성물질의 안정성 및 안전성 실험	10 %	- 생물비료의 환경생태학적인 안전성 조사
		합계	100 %	
최종 평가		○ 생전분발효부산물(주박) 내의 발효 후 잔존하는 효모의 친환경농법인 '효모농법'으로 활용	20 %	- 잔존하는 효모량 (total cell 3×10^9 /g viable cell 4.1×10^3 cfu/g)
		○ 완전 퇴비화된 생전분발효부산물을 이용한 기능성생물비료의 개발	60 %	- 다기능 맞춤형 비료 개발 완성도 - 방출조절형 비료 개발 완성도 - 미세과립형 제제화 완성도
		○ 생전분발효부산물에서의 고체배양물의 작물생육촉진 기능강화	20 %	- 생육촉진 효과 검증
		합계	100 %	

2. 관련분야의 기여도

- 항진균 활성을 갖는 미생물균주의 분리 및 분리 균주와 주박을 이용한 항진균 효과 증대 및 생물비료로의 개발
- 분리균주의 물질 분석을 통해 배양액으로부터 식물 성장호르몬 (IAA)과 유사한 물질의 확인
- 다기능 맞춤형 비료 개발 및 방출조절형 비료 개발
- 미세과립형 제제화를 통해 미생물제제 처리 후 토양중의 미생물 생존확인
- 제제처리에 따른 벼 재배시험 성적 및 고추 재배시험 성적
- 유용미생물에 의한 비효상승 및 내병력 상승효과 검증
- 시판농약과 생물비료와의 비교 검증
- 길항균주를 이용하여 식물병해 억제 기능성 제제 개발
- 액비로 개발하여 액제 배양액 처리 시 작물에 미치는 영향 조사
- 고추재배 시기에 따른 효율적인 적용법 확립을 위하여 재배시기 환경여건 검토
- 고추 포장시험 및 농산물 품질 향상 검사
- 비해/비효 검증시험
- 기존 동일군의 친환경 제품과의 우수성 및 효능 비교 조사
- 고추역병에 유용미생물의 추가 분리 확보
- 생전분발효부산물과 유용미생물과의 혼합 배양조건 확립
- 작물 생리활성(생육촉진, 항진균능)촉진 IAA, 가용인산증가 미생물 실험 검증
- 유용미생물에 의한 비효상승 및 내병력 상승효과 검증
- 시제품 및 배양액을 관주 및 살포를 통해 토성의 변화 조사
- 식물생장기 실험을 통해 현장 살포시의 비율 조절
- 벼 재배 시기별 적용방법을 관행농법에 따른 비료 살포 및 병행 처리방법으로 시행 결과 비교
- 작물의 품질 변화를 생산량과 영양성분의 변화 측정 비교
- 본 과제를 통해 재배한 벼를 이용하여 2차 농산물 가공 적성 실험

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구결과를 바탕으로 향후 친환경생물제제로의 등록을 통해 친환경농업소재 개발에 대한 연구를 지속적으로 실시 할 것이며, 본 과제를 통해 출원한 특허(고추역병방제 미생물 바실러스 속 AM-651, 출원번호 10-2008-037367, 생물방제 및 생물 비료효과를 가지는 친환경농업제제. 10-2009-020330)가 등록 되는대로 본 특허를 바탕으로 추가 연구를 통해 경제적 파급효과를 분석하고 친환경농업제제 시장에 진출할 예정이다.

지역 농업기술센터와 협력하여 본 과제를 통해 개발된 상품을 농민들에게 보급하여 지역에 친환경 농업을 통해 소득 증대가 가능하도록 한다.

본 과제를 통해 개발된 성과물을 이용한 친환경농자재 중 생물소재를 생산 및 판매를 통해 산업화를 수행할 계획이다.

현재 본 연구를 통해 개발된 시제품을 예천농업기술센터와 공동으로 농가사용을 추진하고 있으며, 보다 과학적인 자료와 정보의 축적을 위한 연구개발이 향후에도 계속 진행되어야 한다.

- 산업화를 위한 보완

본 연구의 친환경농자재 생전분발효부산물을 이용한 고부가가치 생물비료제품개발 및 산업화는 농산 폐자원을 활용한 다기능성 비료의 개발로 실험실 규모인 *in vitro* 조건에서 식물병원균의 항진균활성을 보이는 미생물을 분리하고, 주류생산 후 나오는 폐자원인 주박을 이용하여 생물 비료 효과를 *in vitro* 상에서 확인한 후, 제제화를 통해 산업화의 가능성을 조사하였다.

미생물로부터 생산되는 대사물질을 탐색하고, 이를 이용하여 포자발아억제, 곰팡이균사생육 억제활성을 평가하였으며, 식물생장 조절기 내에서의 성장증식의 효과를 조사하였다.

또한 소규모의 고추와 벼 재배를 통해 실제의 방제효과 및 비료효과를 조사한 경우의 양호한 결과이나 환경 변화가 심한 현장적응실험에 따른 최적화조건설정이 보강되어야 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근 유기합성 농약과 정밀 화학농약 사업의 발달로 인하여 농업환경악화와 농산물의 안전성에 대한 욕구가 점점 증가되고 있는 추세이다.

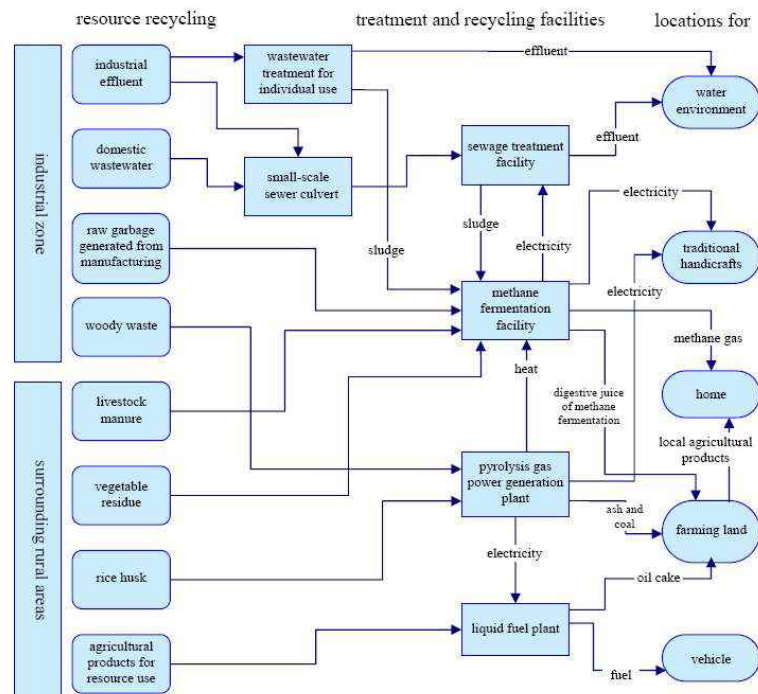
농업생산에도 친환경적으로 많은 적용을 하려고 노력하고 있는 실정이다. 친환경 농업에 필요한 친환경생물소재의 연구를 위해 살충제, 살균제, 식물생장조절제 등의 다양한 바이오 농약 연구에 대해 발전되고 있다.

외국의 경우 독일을 제외한 대부분의 국가에서 친환경농자재 관리에 대해 최소한의 기준만을 설정하고 민간단체에서 위임 관리하고 있는 실정이다.

일본의 경우 농림물자의 규격화 및 품질표시의 적정화에 관한 법률 (JAS법) 및 지력증진법 (11조)에 의한 관련법령으로 관리를 하고 있다.

미국은 국가유기농계획(National organic program, NOP)와 유기물검토연구소(Organic materials review institute, OMRI)에 의해서, 캐나다는 유기농자재기준인 Codex 기준에 준용하여, 인증기관별로 자재품목별 사용방법, 사용기준을 정하여 농가 지도를 하고 있다.

해외생물농약 개발 현황과 생물농약의 시장 규모 및 특허 등의 최신 연구동향 자료를 수집하여 본 과제를 원활하게 수행할 수 있었다.



[참고 그림] 폐기물로부터 바이오비료를 생산하는 친환경기술

제 7 장 참고문헌

1. **Chappell, J.** 1995. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plant. *Annu. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 521-547.
2. **Chen, S.K., Edwards, C.A., and Subler, S.** 2003 The influence of two agricultural biostimulants on nitrogen transformations, microbial activity, and plant growth in soil microcosms. *Soil Biol. Biochem* 35(1), 9-19.
3. **Facchini, P.J. and Chappell, J.** 1992. Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Pro. Natl. ACad. Sci. USA.* 89: 11088-11092.
4. **Gupta, R., Singal, R., Shanker, A., Chander, R., And Saxena, R.K.** 1994 A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40(3), 255-260.
5. **Illmer, P. and Schinner. F.** 1992 Solubilisation of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol. Biochem* 24(4), 389-395.
6. **Illmer, P. and Schinner. F.** 1995 Solubilisation of inorganic calcium phosphates: solubilisation mechanisms. *Soil Biol. Biochem* 27(3), 257-263.
7. **Joo, G.J., Kim, J.H., and Kang, S.J.** 2002 Isolation of antagonistic *Bacillus ehimesis* YJ-37 and its antifungal activity against vegetable damping-off fungi. *Kor. J. of Life Sci.* 12(2), 200-207.
8. **Jung, H.I., Kim, K.K., Park, H.C., Lee, S.M., Kim, Y.G., Kim, H.S., Lee, C.Y., and Son, H.J.** 2007 Isolation and Characteristics of Bacteria Showing Biocontrol and Biofertilizing Activites. *Kor. J. of Life Sci.* 17(11), 1682-1688.
9. **Jung, H.K., Kim, J.R., Woo, S.M., and Kim, S.D.** 2007 Selection of the auxin, siderophore, and cellulase-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanisms. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem* 50(1), 23-28.
10. **Kang, S.J., Kim, J.H., and Joo, G.J.** 2005 Isolation of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* and physicochemical properties of compost mixed with microbial formulation. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 23(3), 342-350.
11. **Kampert, M. and Strzelczyk, E.** 1984 Effect of pH on production of cytokinin-like substances by bacteria isolated from soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine

- (*Pinus silvestris* L). *Acta Microbiol. Pol.* **33**(1), 77-85.
12. Kim, S. J., Kim, M. Y., Koo, B. S., Yoon, S. H., Yeo, Y. S., Park, I. C., Kim, J. W., and Whang, K.S. (2005) Isolation and phylogenetic characterization of chitinase producing oligotrophic bacteria. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **41**(4), 293-299.
 13. Kim, S.H., Suh, H.J., and Kim, C.O. 1993. Taxonomy, purification and physicochemical properties of novel antifungal antibiotic AF-011A. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**(6), 556-536.
 14. Li, Z. and Zhang, H. 2000 Application of Microbial fertilization in sustainable agriculture. *J. Crop Prod* **3**(1), 337-347.
 15. Lee, J.H., Kang, B.K., Kwon, H.K., Jung, J.H., and Nam, H.K. 2005 Isolation and Identification of activated microorganisms of biocide development. *Kor. J. Env. Hlth* **31**(1), 31-38.
 16. Lee, J.B., Shin, J.H., Jang, J.O., Shin, K.S., Choi, C.S., Kim, K.W., Jo, M.S., Jeon, C.P., Kim, Y.H., and Kwon G.S. 2008 Antifungal Activity of *Bacillus* sp. AM-651 Against *Phytophthora capsici*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**(3), 227-232.
 17. Park, K.H., Park, G.T., Kim, S.M., Lee, C.Y., and Son, H.J. 2008 Conditions for Soluble phosphate production by environment-friendly biofertilizer resources, *Pseudomonas fluorescens*. *Kor. J. Env. Sci.* **17**(9), 1033-1037.
 18. Sessitsch, A.S., Reiter, B., and Berg, G. 2004 Endophytonic bacterial communities of field-growth potatoplants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Can. J. Microbiol.* **50**(4), 239-249.
 19. Shon, B.K., Hong, J.H., and Park, K.J. 1996 Comparative studies on static windrow and aerated static pile composting of the mixtures of cattle manure and rice hulls. *Kor. Soc. Soil Sci. Fert.* **29**(4), 403-410.
 20. Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A., Botina, S.G., and Netrusov, A.I. 2007 Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol. Res.* **162**(1), 69-76.

주 의

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