

918008-4

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
포스트게놈 다부처 유전체사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004048-01

방선균
유전체
기반의
농작물
진균
제어용
미생물
제제 개발

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

방선균 유전체 기반의 농작물 진균 제어용 미생물 제제 개발

2022. 04. 01.

주관연구기관 / 인하대학교 산학협력단
공동연구기관 / 한국생산기술연구원
공동연구기관 / 에스티알바이오텍

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

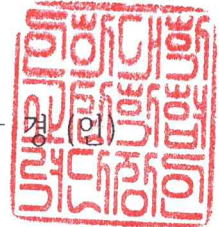
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “방선균 유전체 기반의 농작물 진균 제어용 미생물 제제 개발”(개발기간 : 2018. 04. 25. ~ 2021. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 04. 01.

주관연구기관명 : 인하대학교 산학협력단 (대표자) 유 창 경 (인)



공동연구기관명 : 한국생산기술연구원 (대표자) 이 낙 규 (인)

공동연구기관명 : 에스티알바이오텍 (대표자) 이 상 종 (인)



주관연구책임자 : 김 응 수

공동연구책임자 : 이 도 훈

공동연구책임자 : 이 상 종

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	포스트게놈 다부처 유전체사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호		918008-4	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0401	50%	LB0404	30%	LA0801	20%
	농림식품 과학기술분류	RA0303	60%	RA0305	30%	RA0301	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명	방선균 유전체 기반의 농작물 진균 제어용 미생물 제제 개발						
전체 연구개발기간	2018. 04. 01. ~ 2021. 12. 31. (45개월)						
총 연구개발비	총 1,001,0000 천원 (정부지원연구개발비: 750,000 천원, 기관부담연구개발비 : 251,000 천원)						
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(9단계) 종료시점 목표(9단계)		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		방선균 유전체 기반의 농작물 진균 제어용 미생물 제제 및 생리 활성물질 개발				
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> - 식물 병원성 진균에 대한 항진균력과 토양 적응력이 우수한 방 선균 균주선별 - NGS 기반 유전체 기술을 활용하여 선별된 방선균의 유전체 특 성 규명 - 항진균 기능성, 세포독성, 토양 적응력 및 작물 보호능 검증 - 사업화-실용화를 위한 배양공정 최적화 및 스케일업 - 생물농약용 고부가가치 방선균 미생물제제 및 신규 항진균 폴 리엔 생리활성물질을 개발 				
	목표	<ul style="list-style-type: none"> ○주관연구기관(인하대학교) 항진균 유래 fungicide 활성이 우수한 4종의 NGS 기반의 유전체 분석 ○참여기관 1(생산기술연구원) 사업화-실용화를 위한 배지-배양-스케일업 공정 최적화 ○참여기관 2(에스티알바이오텍) 미생물 제제 후보 방선균의 균주 특성 파악 및 고농도 포자형성, 수확 조건 확립 					
1차년도	내용	<ul style="list-style-type: none"> ○주관연구기관(인하대학교) NGS 기반의 방선균 유전체 해독 및 활용 기술 개발 1) 항진균 유래 fungicide 활성이 우수한 2종의 NGS 기반의 유전 체 분석 (추가적으로 2차 연도 1종, 3차 연도 1종에 대한 유전체 분석실시) 2) 유전정보의 분석 및 이차대사산물 생합성 유전자 후보군 선별 ○참여기관 1(생산기술연구원) 항진균제 최적 생산을 위한 방선균 배지성분 최적화 ○참여기관 2(에스티알바이오텍) 방선균 미생물 제제 실용화 연구 1) 미생물 제제 후보 방선균의 균주 특성 파악 2) 고농도 포자형성, 수확 조건 확립 					

연구개발 목표 및 내용	2차년도	목표	<p>○주관연구기관(인하대학교) 항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리</p> <p>○참여기관 1(생산기술연구원) 항진균제 최적 생산을 위한 방선균 배양공정 최적화</p> <p>○참여기관 2(에스티알바이오텍) 선별된 후보균주의 제형화 및 다양한 조건에서의 항진균력검증</p>
		내용	<p>○주관연구기관(인하대학교) 1) 미생물 제제 후보 방선균의 특성 분석 및 유전자 조작 기술 시스템 구축 2) 방선균 BAC vector system을 이용한 폴리엔 항진균 생합성 유전자군 분리 3) 생리활성을 나타내는 물질의 특성 규명 4) 여러 종류의 진균에 대한 항진균 활성 확인</p> <p>○참여기관 1(생산기술연구원) 미생물 제제 방선균의 발효 조건 최적화</p> <p>○참여기관 2(에스티알바이오텍) 1) 선별된 후보균주의 안정화, 제형화 2) 다양한 조건에서의 방선균 포자 미생물 제제의 토양적응력, 항진균력 검증</p>
	3차년도	목표	<p>○주관연구기관(인하대학교) 항진균 폴리엔 생합성 유전자군의 유전체 재설계를 통한 신규 유도체 도출</p> <p>○참여기관 1(생산기술연구원) 항진균제 최적 생산을 위한 스케일업 최적화</p> <p>○참여기관 2(에스티알바이오텍) 친환경 미생물 제제를 위한 작물 진균 제어능 및 안정성 검증</p>
		내용	<p>○주관연구기관(인하대학교) 1) 거대 생합성 유전자군을 스트렙토마이세스 BAC system을 이용한 분리 및 유전정보 습득 2) 확보한 BAC vector를 이용하여 생리활성물질의 생산성 증대 유도 및 다양한 생리활성물질의 유도체 발굴 3) 유전체 분석 및 이를 통한 유용 생합성유전자군의 파악</p> <p>○참여기관 1(생산기술연구원) 1) 발효 스케일업을 통한 50L 발효기 최적화 2) 폴리엔 물질의 분리정제 시스템 확립 3) 폴리엔 물질 고생산 균주제작과 고순도 분리공정 시스템 개발</p> <p>○참여기관 2(에스티알바이오텍) 1) 친환경 미생물 제제를 위한 작물 진균 제어능 및 안정성 검증 2) Metagenome 분석 시스템을 응용한 미생물군집의 변화 확인</p>
	4차년도	목표	<p>○주관연구기관(인하대학교) 합성생물학 및 유전체 공학 기반의 신규 방선균 미생물 제제 및 활성물질 개발</p> <p>○참여기관 1(생산기술연구원) 사업화-실용화를 위한 배지-배양-스케일업 공정 최적화</p> <p>○참여기관 2(에스티알바이오텍) 시제품의 독성 및 안전성 조사</p>
		내용	<p>○주관연구기관(인하대학교) 합성생물학 기반의 항진균제 고생산 균주개발</p> <p>○참여기관 1(생산기술연구원) 사업화-실용화를 위한 배지-배양-스케일업 공정 최적화</p> <p>○참여기관 2(에스티알바이오텍) 유기농자재 등록 진행</p>

연구개발성과	<p>○ (생명정보자원) 방선균 유전체 해독 4건 스크리닝을 통해 선별한 항진균 활성이 우수한 방선균 4종의 유전체 해독 igem-0000408(<i>S. rubrisoli</i> Inha501), igem-0000409(<i>S. morookaense</i> Inha502), igem-0000867(<i>S. javensis</i> Inha503), igem-0001654(<i>S. collinus</i> Inha504)</p> <p>○ (생명정보자원) 유용 방선균 유전자원 확보 2건 <i>S. rubrisoli</i> Inha501의 BAC library 구축을 통해 유용한 생합성유전자군이 포함된 BAC vector 확보(tautomycetin-like BGC(82kb), neotetrafibricin-like BGC(170kb))</p> <p>○ (지적재산권) 특허 등록 2건 , 특허 출원 4건 특허 등록 - 다양한 생리활성을 갖는 신규 방선균 및 이의 용도, 10-2313936, 2021년 - 농작물 병원성 진균 제어용 신규 방선균 및 이의 용도, 10-2313937, 2021년 특허 출원 - 다양한 생리활성을 갖는 신규 방선균 및 이의 용도, 10-2019-0141882, 2019년 - 농작물 병원성 진균 제어용 신규 방선균 및 이의 용도, 10-2019-0141883, 2019년 - 식물 병원성 진균 제어용 신규 균주 스트렙토마이세스 자벤시스 Inha503 및 이의 용도, 10-2021-0177641, 2021년 - 식물 병원성 진균 제어용 신규 균주 스트렙토마이세스 콜리너스 Inha504 및 이의 용도, 10-2021-0177642, 2021년</p> <p>○ (학술) SCI급 논문 6건 - "<i>Pseudonocardia</i> strain improvement for stimulation of the di-sugarheptaene Nystatin-like <i>Pseudonocardia</i> Polyene B1 biosynthesis " Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 46:649-655. 2019. - "Cell Factory Design and Culture Process Optimization for Dehydroshikimate Biosynthesis in <i>Escherichia coli</i>" Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 7:241. 2019. - "Enantioselective chemoenzymatic synthesis of (R)-γ-valerolactone from levulinic acid" Process Biochemistry 90:113-117. 2019. - "Stimulated Biosynthesis of an C10-Deoxy Heptaene NPP B2 via Regulatory Genes Overexpression in <i>Pseudonocardia autotrophica</i>" Frontiers in Microbiology. 11:19. 2020. - "Recent advances in heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in Streptomyces hosts" Current Opinion in Biotechnology. 69:118-127. 2021. - "Screening and isolation of a novel polyene-producing Streptomyces strain inhibiting phytopathogenic fungi in the soil environment" Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 9:692340. 2021.</p> <p>○ (사업화) 기술이전 2건 및 실용화 1건 기술이전 - 방선균 기반의 항진균 미생물제제 대량생산 및 실용화 기술, 에스티알바이오텍, 250만원, 2019. - 방선균 기반의 항진균 미생물제제 대량생산 및 실용화 기술, 에스티알바이오텍, 1750만원, 2021.</p> <p>유기농자재(상품명 팡스탑) 등록 신청 토마토, 고추 시들음병에 대한 병해관리용 유기농자재 제품등록 (진행 중)</p>
--------	--

<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 마이크로바이옴 기반 폴리엔 특이적인 유전체 스크리닝 전략 확대 적용 ○ 유전체 해독을 통한 방선균 유래 잠재적 유용경로 및 생리활성물질 개발 ○ 기능성 유전자/물질 및 개량공정 최적화를 통한 신약 후보물질 발굴 ○ 구축된 유용성, 안정성, 안전성 등 평가-검증 시스템의 지적재산 창출 ○ 고효율 친환경 미생물제제 제품 등록을 통한 방선균 산업화의 다각화 모색 											
<p>연구개발성과의 비공개여부 및 사유</p>	<p>공개</p>											
<p>연구개발성과의 등록·기탁 건수</p>	<p>논문</p>	<p>특허</p>	<p>보고서 원문</p>	<p>연구 시설 ·장비</p>	<p>기술 요약 정보</p>	<p>소프트 웨어</p>	<p>표준</p>	<p>생명자원</p>		<p>화합물</p>	<p>신품종</p>	
<p>연구개발성과의 등록·기탁 건수</p>	<p>6</p>	<p>4 (등록2)</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>4</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>-</p>
<p>연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황</p>	<p>구입 기관</p>	<p>연구시설 ·장비명</p>	<p>규격 (모델명)</p>	<p>수량</p>	<p>구입 연월일</p>	<p>구입가격 (천원)</p>	<p>구입처 (전화)</p>	<p>비고 (설치장소)</p>	<p>ZEUS 등록번호</p>			
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>방선균</p>		<p>유전체 분석</p>		<p>폴리엔</p>		<p>식물병원성 진균</p>		<p>유기농자재</p>			
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>actinomyces</p>		<p>genome analysis</p>		<p>polyene</p>		<p>phytopathogenic fungus</p>		<p>biocontrol agent</p>			

최종보고서							보안등급							
							일반[√], 보안[]							
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	사업명			포스트게놈다부처유전체사업						
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)										
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)										
				연구개발과제번호	918008-4									
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0401	50%	LB0404	30%	LA0801	20%							
	농림식품과학기술분류	RA0303	60%	RA0305	30%	RA0301	10%							
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문													
	영문													
연구개발과제명	국문	방선균 유전체 기반의 농작물 진균 제어용 미생물 제제 개발												
	영문	Development of microbial fungicide for agricultural plants using actinomycetes genomics-driven approaches												
주관연구개발기관	기관명	인하대학교 산학협력단			사업자등록번호									
	주소				법인등록번호									
연구책임자	성명	김응수			직위									
	연락처	직장전화			휴대전화									
		전자우편			국가연구자번호									
연구개발기간	전체		2018. 04. 25 - 2021. 12. 31 (3년 9개월)											
	단계	1단계	2018. 04. 25 - 2019. 12. 31 (1년 9개월)											
		2단계	2020. 01. 01 - 2021. 12. 31 (2년 0개월)											
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계						
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계				
총계	750,000	25,100	225,900					775,100	225,900	1,001,000				
1단계	1년차	150,000	5,000	45,000				155,000	45,000	200,000				
	2년차	200,000	6,700	60,300				206,700	60,300	267,000				
2단계	3년차	200,000	6,700	60,300				206,700	60,300	267,000				
	4년차	200,000	6,700	60,300				206,700	60,300	267,000				
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	전화	전자우편	비고								
	역할	기관유형												
공동연구개발기관	생산기술연구원	이도훈				공동	정부출연연							
	에스티알바이오텍	이상중				공동	중소기업							
연구개발담당자 실무담당자	성명	최시선			직위									
	연락처	직장전화			휴대전화									
		전자우편			국가연구자번호									

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022 년 4 월 1 일

연구책임자:

김 응 수

주관연구개발기관의 장: 인하대학교 산학협력단장 유 창 경

공동연구개발기관의 장: 한국생산기술연구원 원장 이 도 훈

공동연구개발기관의 장: 에스티알바이오텍 이 상 중 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

○ 연구개발 개요

- 미생물 기반 친환경 생물농약의 필요성은 더 이상의 설명이 필요 없을 정도로 절실하다 (아래 연구개발의 중요성 참조). 현재 생물농약으로는, Bacillus Bt기반의 살충제를 포함한 다양한 미생물 종이 사용되고 있으나, 농업용 작물에 대한 항진균 생물농약으로는 방선균 (특히 Streptomyces) 종이 다수를 차지하고 있다.

- 국내 생물농약 (일명 천연식물보호제) 등록현황 (2012년 12월말 현재)에 따르면, 방선균 기반의 생물 농약으로는 (주)케이아이비씨의 방선균 2종 (스트렙토마이세스고시키엔시스더블유와이324 액제, 스트렙토마이세스콜롬비엔시스더블유와이20 액제)이 등록되어 사용되고 있다.

품목수	용도	구분	농약 품목명	등록규격
1			바실루스서브틸리스와이1888수화제	1X10 ⁹ cfu/g
2			바실루스서브틸리스716수화제	5X10 ⁹ cfu/g
3			바실루스서브틸리스716액상수화제	1X10 ⁹ cfu/g
4		수입	바실루스푸밀루스큐에스티2303액상수화제	1X10 ⁹ cfu/g
5			바실루스서브틸리스다비비1501수화제	1X10 ⁹ cfu/g
6			바실루스서브틸리스1501엽제	1X10 ⁸ cfu/g
7		살균	바실루스서브틸리스케이케이288액상제	5X10 ⁷ cfu/ml
8			바실루스서브틸리스지비365수화제	6X10 ⁷ cfu/g
9			바실루스서브틸리스지비365액상수화제	1X10 ⁷ cfu/ml
10			바실루스서브틸리스케이비시1010수화제	1X10 ⁹ cfu/g
11		제조	스트렙토마이세스고시키엔시스더블유와이524액제	1X10 ⁵ cfu/ml
12			스트렙토마이세스고시키엔시스더블유와이20액제	1X10 ⁴ cfu/ml
13			암펠로마이세스퀴스콜라에이큐94013수화제	1X10 ⁷ cfu/g
14			퍼니바실루스콜리픽사에이시-1액상수화제	5X10 ⁸ cfu/ml

<농림부 워크샵 세미나 자료(방선균 유래 살균제)>

- 국외에서는 더욱 활발하게 방선균 기반 생물농약이 사용되고 있으며, 특히 미국 노보자임의 Streptomyces lydicus WYEC108 (상품명 Actinovate)와 핀란드 Verdera의 Streptomyces K61 (상품명 Mycostop)은 방선균을 주성분으로 하고 있다. 중국의 경우에도 폴리엔계 캔디시신 및 나타마이신을 생산하는 방선균 Streptomyces를 생물농약으로 활용하여 작물의 진균 감염 및 진균공생해충을 친환경적으로 제어하고 있다.

Commercial Product Name	Organism as Active Substance	Registered as Microbial Pesticide
Actinovate, Novozymes BioAg Inc., USA	<i>S. lydicus</i> WYEC 108	Canada, USA
Mycostop, Verdera Oy, Finland	<i>Streptomyces</i> K61	EU, Canada, USA

<대표적인 해외 방선균 생물농약 2종>



< Novozyme의 Streptomyces lydicus 생물농약 (왼쪽)과 Verdera사의 Streptomyces K61 생물농약 (오른쪽) >

- 따라서 본 연구에서는 항진균 활성이 우수한 폴리엔 화합물을 생산하는 방선균을 유전체 검색기술로 선별한 후, NGS 기반으로 유전체를 해독하여 해당 생리활성물질의 특성을 분자수준에서 규명하고, 이들 유용 방선균 (혹은 방선균 유래 생리활성물질)을 생물농약으로 실용화하기 위한 배양공정 최적화 연구를 수행하고자 한다. 보다 구체적인 과제구성은 다음과 같다.

1세부	(주관기관, 인하대)	폴리엔 항진균제를 생산하는 미생물 제제 개발을 위한 NGS기반의 방선균 유전체 분석 및 생합성 유전자군 규명.
2세부	(협동기관, 한국생산기술연구소)	산업용 방선균 배양조건 최적화 및 대량생산을 위한 스케일업 공정 최적화.
3세부	(참여기업, STR바이오텍)	미생물 제제로 사용이 용이하면서도 고효성을 유지하는 방선균 배양공정 및 포자공정 최적화.

○ 연구개발 대상의 국내·외 현황

- 국내 기술 수준 및 시장 현황

<기술현황>

- 다양한 자연환경에 존재하는 미생물을 이용한 미생물농약 (혹은 미생물 유래 생리활성물질)에 대한 국내의 연구개발은 선진국에 비해 30~50년 뒤늦은 1980년대부터 시작되었고, 환경오염 문제에 대한 인식이 바뀌는 2000년대 들어서 본격적으로 연구수준이 많이 향상되었다. 국내 대학 및 연구기관을 주축으로 다양한 농작물 질환 (즉, 담배 모자이크병, 세균성 마름병, 오이의 시들음병, 고추의 역병, 딸기의 시들음병, 눈마름병, 사탕무우의 입고병, 벼의 도열병, 문고병)에 대한 병해방제용 미생물 연구가 보고되었다.

구분	내용	평가
숫자	* 상품화 35종(살균:14종, 살충:21종) (수입:13종, 개발:22종)	* 국내투자(예산, 연구, 인력, 기간)고려 시 적지 않은 제품개발 성과
기술	* 미생물의 선발 및 대량 생산 * 약효 및 제형화 기술 * 안정성(인축 및 환경)확보	* 비실러스는 선진국수준이나 곰팡이배양수준은 부족 * 선진국도 초보단계로 경쟁 가능 * 선진국 대비 초보 단계
시장	* 주요 제품: BT 살충제 * 기타 제품: 살균제 * 해외 수출: 없음 * 시장 규모: 고속 성장 중	* 해외제품 모방/도입 단계 * 독자성/시장 규모가 작음 * 해외제품의 국내시장 진출 가속화 * 선진국 중심으로 고속증가 추세 (미/영/일: 82%, 매출액 15~25%연)
사업 환경	* 등록관련 법규 정비단계 - 미생물농약 등록규정(2001년) - 생화학농약 등록규정(2005년) * 친환경 농산물의 사회적 요구 증가 - 친환경 농업육성과 농산물 안정성 확보대책 발표(2004, 농림부)	* 화학농약보다 안전성 확보용이 - 국가별 등록권장 추세 (개발 비용 및 기간 단축 효과) * '미래의 작물 보호제'에 대한 사회적 요구 증가 및 선진국 수출 추세

< 농림부워크샵 세미나 자료(국내 생물농약의 현황 분석) >

- 국내의 생물농약 (미생물농약과 생화학농약을 포함)에 대한 연구는 1970년대 후반부터 대학교 및 정부 연구기관에서 산발적으로 시작되었으나 1990년대에 들면서부터 연구개발이 어느 정도 활성화되기 시작하였고, 1997년도 친환경농업육성법이 제정되고 정부의 화학농약 사용량 감소를 위한 친환경농업에 대한 지원이 추진되면서 생물농약 (미생물제제) 개발이 본격적으로 진행되었다.

- 1990년대 중반까지 항생작용에 기초했던 생물농약은 뿌리에 사는 생육촉진근권세균에 대한 새로운 사실이 밝혀지면서 그동안 생물농약의 단점인 적용범위가 한정된다는 문제점을 해결하였다.

- 2011년 12월 기준, 등록된 생물농약 (천연식물보호제)은 살충제 13 품목, 살균제 21 품목, 제초제 1 품목 등 총 35 품목으로 살균제가 살충제보다 1.6배 정도 높은 개발 현황을 보였다.

- 현재 생물농약으로는 Bacillus thuringiensis (Bt toxin)와 Baculovirus 등이 사용되고 있으나, 작물의 다양한 진균성 감염을 억제하는 효과적인 Biofungicide의 연구개발은 매우 미흡한 실정이다.

- 2012년 기준 국내 생물농약 살균제로 등록 된 것은 총 21 품목으로 최근 그 수가 많이 증가 하였고, 거의 대부분이 Bacillus subtilis, Streptomyces sp. 등 세균이며 곰팡이는 Trichoderma harzianum 등 3 품목으로 되어 있다.

- 수년 전만 해도 국내 대형 제조사 연구소에서 생물농약과 관련해 비공식적으로 전한 약효는 40%를 조금 넘는 수준이었으나, 불과 몇 년 사이에 생물농약의 약효는 90%를 넘어섰다.

- 생물농약이 자연계에 존재하는 미생물이나 선충 등의 천적관계를 기반으로 하는 만큼 이들을 배양해 살아있는 상태로 오래 유지·보존하는 것이 기술의 핵심이 됐으며 이를 위한 제형기술이 진보했다.
- 2000년대 들어와서 본격적으로 방선균을 대상으로 한 생리활성물질 생합성 연구가 진행중이며, 그 대표적인 예로 선문대와 GeneChem의 neocarzinostatin과 gentamicin, 생명공학연구소 이정준 박사팀과 선문대의 Rubradirin, 명지대 서주원 박사팀의 Spectinomycin과 Bluensomycin을 포함한 5개의 aminoglycoside 계열 항생제 생합성에 대한 연구가 진행중인 것으로 알려져 있다.



(19) 대한민국특허청(KR)	(45) 공고일자	2015년06월03일
(12) 등록특허공보(B1)	(11) 등록번호	10-1524651
	(24) 등록일자	2015년05월26일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(73) 특허권자	경상대학교산학협력단
C12N 1/20 (2006.01)		경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
C12N 1/545 (2006.01)	(72) 발명자	이원석
(21) 출원번호	10-2013-0091222	경남 진주시 서장대로 235, 205동 305호 (이현동, 주공아파트)
(22) 출원일자	2013년07월31일	차재술
심사청구일자	2013년07월31일	경남 진주시 가호로 28, 201동 605호 (가좌동, 가좌주공아파트)
(65) 공개번호	10-2015-0015309	이용복
(43) 공개일자	2015년02월10일	경상남도 진주시 도동천로 310 학대대원A 015호
(58) 선행기술조사문헌	Academic Journal of Plant Sciences, Vol.2, pp.119-123(2009.)*	(74) 대리인
	KR1020120091680 A	이원희
	KR1020120068674 A	
	KR1020080096267 A	
	*는 심사관에 의하여 인용된 문헌	
권해 청구할 수 : 출 5 항	심사관 : 권지연	
(54) 발명의 명칭	스트렙토마이세스 그리시우스 S4-711 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 식물 병 방제용 조성물	

< 국내 생물농약제조사 케이아이비씨 (왼쪽) 및 경상대 방선균 생물농약 특허증 (오른쪽) >

<시장현황>

- 국내의 경우 2000년대, 생물농약 사용비중은 전체 농약시장의 1% 내외 수준이었지만 2010년에는 전체 농약시장의 10% (1천2백20억원)를 차지했다.
- 현재 국내 생물농약 시장은 약 800억 원의 시장을 형성하고 있으며, 친환경농산물 시장규모는 2009년 기준 3조7,355억 원으로 증가 하였고, 2013년에는 5조 955억 원으로 성장했다.

<지식재산권현황>

- 2000년 이후 생물농약의 출원 비율이 급속히 증가해 1990년대 초반 전체 농약특허출원 중 8.9%였던 비중이 2000년대 들어서는 18%로 2배가량 증가했다.
- 2004년 기준 세균, 곰팡이, 바이러스 등 5종의 생물농약에 대한 국내 특허가 등록되었다.

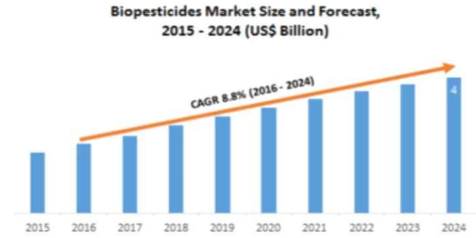
- 국외 기술 수준 및 시장 현황

<기술현황>

- 외국의 생물농약에 대한 연구는 1930년대의 해충의 병원성 미생물 및 식물병원균 길항 미생물에 대한 기초 연구 이후로 꾸준히 진행되어 왔으며, 1970년대 초부터 토양전염 식물병의 생물학적 방제 심포지엄을 기점으로 연구가 활발하게 진행 중이다.
- 생물농약의 개발은 비교적 소규모 회사들을 중심으로 이루어지고 있다는 점과 대부분 미생물에 근간한 미생물 농약 개발이라는 점이 주요 특징이다.
- 선진국에서는 미생물 또는 동·식물유래 생리활성 물질의 분리 및 동정과 같은 대량자동화 시스템을 확보를 발판으로 다양한 신규 천연 생물소재의 탐색과 이를 이용한 대량생산 및 제형화 기술 등 산업화 기술을 축적하였다. 특히 산업화가 용이한 미생물, 천연 활성물질을 대상으로 화학적인 방법을 통한 신규 소재 확보, 생산, 제형화에 대한 연구 성과 및 특허가 전체적으로 균형 있게 개발, 진행 중이다.

<시장현황>

- 전 세계 생물농약 시장은 2003년 468 million US\$, 2005년 672 million US\$, 2011년 1,320 million US\$로 연평균 약 10%의 성장을 나타내었으며, 2017년 까지 약 3,200 million US\$로 연평균 15%이상 성장하였고 2024년까지 4,000million US\$의 시장을 점유할 것으로 예측 된다.



< 2015년 이후 생물농약 시장 성장 예측 >

- 2000년대, 생물농약은 세계 농약시장규모 (2백51억달러)의 3%에 불과했으나 2010년대에는 4백50억달러로 전체 농약시장의 10%를 차지했다.

- 2014년 기준 전세계 작물보호제 시장 규모는 510억달러로 추산되며 연 평균 3.6% 가량 신장되고 있다. 이중 화학농약 시장은 480억달러로 매년 3%대의 성장세를 보인 반면 생물농약 시장은 33억달러 규모로 아직 화학농약에 비해서는 7%가 채 되지 않지만 매년 15%이상 신장하며 가파른 성장세를 보인다.

- 세계 생물농약 시장은 2005년 전체 농약시장의 약 2.5% 수준에 머물렀지만, 최근 연평균 증가율이 9.9%로 계속해서 고성장세를 기록하고 있다. 전세계 약 110개 회사에서 생물농약 사업을 추진하고 있으며, 대표적으로 Agra Quest, Verdera OY, 및 Certis USA, 상기 세 회사가 생물농약 시장의 약 5% 씩을 차지하고 있다. 특히 방선균 유래 생물농약 및 생물비료 회사 및 시장은 꾸준히 증가하고 있는 추세이다.

<지식재산권현황>

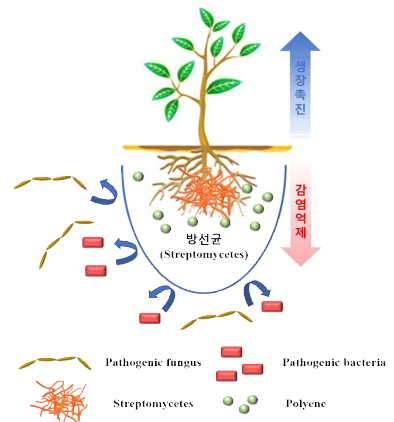
- 선진국을 중심으로 생물농약에 대한 연구가 활발하게 진행 중이다. 지난 2013년 농림수산물교육문화정보원이 발표한 자료에 따르면 관련 연구 건수는 미국 266건(16%), 인도 136건(8%), 중국 123건(7%)으로 나타나는 등 글로벌 작물보호제 업계는 앞다퉀 생물농약 개발 중이다.

- 미국에서 1백80여종에 이르는 성분들이 생물농약으로 등록된 상태며 제품 가지수만 해도 7백종에 이르는 것으로 집계 되었다. (<http://dl.dongascience.com/magazine/view/S200407N032>)

○ 연구개발의 중요성

- 92년 리우 국제환경회의에서 전 세계 농약의 20%를 생물농약으로 대체하자고 결의한 이후, 기존 화학농약에 대한 규제가 점점 심해지고 있어 화학농약의 소비가 유럽과 일본의 경우 해마다 5% 감소하고 있고 이를 대체할 생물농약의 시장규모는 급속히 성장하고 있어 앞으로 크게 주목할 시장으로 관련 기업의 관심을 끌고 있다.

- 기존 화학농약의 독성을 줄이고 환경에 미치는 부작용을 최소화하려는 경향은 농약 개발의 세계적인 추세다. Markets and Markets에서 발간한 생물농약시장 보고서에 의하면 2001년 세계 농약시장의 약 2%인 5.8억 달러에 불과했던 생물농약시장의 가치는 성장률 17.4%를 보이며 지속적인 성장 추세에 있다. 2016년 33억 6000만 달러에 달했고 2022년이면 88억 2000만 달러에 이를 것으로 추산된다. 연구개발 비용이 화학농약에 비해 저렴한 것도 생물농약이 갖는 장점과 함께 기술 개발을 이끄는 주요인이 된다. 현재 생물농약으로는 Bacillus thuringiensis (Bt toxin)와 Baculovirus 등이 주로 사용되고 있으나, 작물의 다양한 진균성 감염을 억제하는 효과적인 Biofungicide의 연구개발은 매우 미흡한 실정이다.

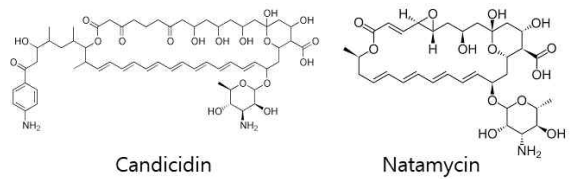


< 방선균 유래 미생물 제제 활성 예시 >

- 생물농약에 대한 연구는 선진국을 중심으로 활발하게 진행 중이다. 농림수산물교육문화정보원에 따르면 2013년 기준 관련 연구건수는 미국 266건(16%), 인도 136건(8%), 중국 123건(7%)으로 나타났다. 이에 반해 우리나라는 인도와 브라질, 독일, 스페인보다 낮은 54건(3%)의 실적을 보였다. 세계 시장에 견줘 국내업체의 생물농약 개발은 미약한 수준이라고 할 수 있다. 그렇지만 우리나라는 바이오분야에 강세를 지니고 있어 생물농약 분야의 시장 성장이 연구 발전에도 탄력을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

- 생물농약에 대한 연구는 선진국을 중심으로 활발하게 진행 중이다. 농림수산물교육문화정보원에 따르면 2013년 기준 관련 연구건수는 미국 266건(16%), 인도 136건(8%), 중국 123건(7%)으로 나타났다. 이에 반해 우리나라는 인도와 브라질, 독일, 스페인보다 낮은 54건(3%)의 실적을 보였다. 세계 시장에 견줘 국내업체의 생물농약 개발은 미약한 수준이라고 할 수 있다. 그렇지만 우리나라는 바이오분야에 강세를 지니고 있어 생물농약 분야의 시장 성장이 연구 발전에도 탄력을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

- 방선균이 생산하는 칸디시딘-나타마이신 등의 폴리엔 화합물은 항진균 활성이 가장 높은 생리활성물질로서, 이미 국외에서는 다양한 농작물 진균감염을 예방하는 생물농약으로 사용되고 있는 실정이다. 하지만 국내에선 폴리엔 생산 방선균을 이용한 생물농약의 개발이 전혀 이루어지지 않고 있는 실정이다. 다만, 본 연구진이 (선행 연구를 통하여) 폴리엔 생산 방선균 포자를 이용하여 마늘 흑색썩음균핵병과 고추 역병에 효과가 있음을 입증하였다.



< 대표적인 방선균 유래 항진균 생물농약 성분 칸디시딘과 나타마이신 >

- 따라서 본 과제에서는 항진균 활성이 우수한 폴리엔 화합물을 생산하는 방선균을 유전체 검색기술로 선별한 후, NGS 기반으로 유전체를 해독하여 해당 생리활성물질의 특성을 분자수준에서 규명하고, 이들 유용 방선균 (혹은 방선균 유래 생리활성물질)을 생물농약으로 실용화하기 위한 배양공정 최적화 연구를 수행하고자 한다. 본 과제에서 제안하는 토양 방선균들을 생물농약으로 산업화 한다면, 농약에 의한 환경오염 문제를 해결하기 위한 대안으로서 유용할 것으로 생각된다.

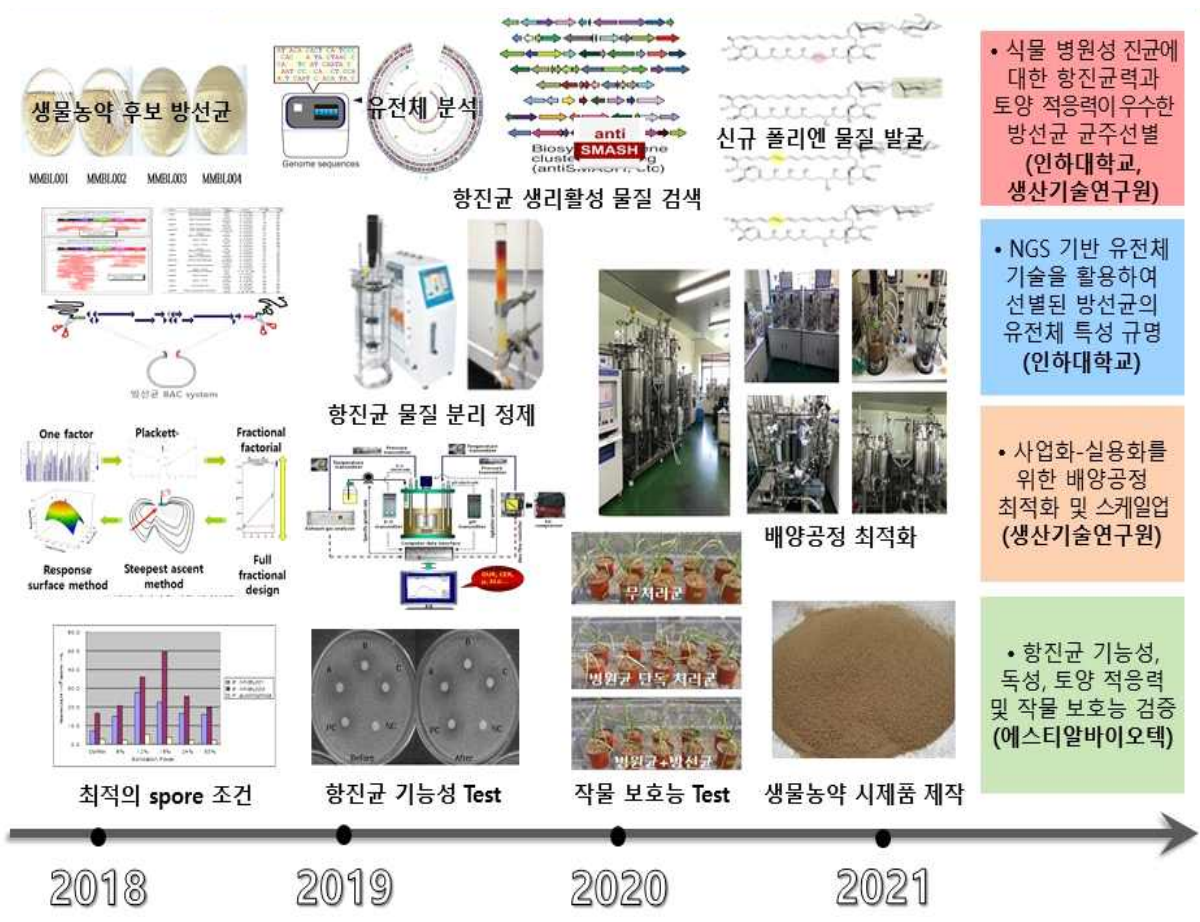
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2-1. 연구개발 목표

최종목표	방선균 유전체 기반의 농작물 진균 제어용 미생물제제 및 생리활성물질 개발
세부목표	1) 식물 병원성 진균에 대한 항진균력과 토양 적응력이 우수한 방선균 균주선별 2) NGS 기반 유전체 기술을 활용하여 선별된 방선균의 유전체 특성 규명 3) 항진균 기능성, 세포독성, 토양 적응력 및 작물 보호능 검증 4) 사업화-실용화를 위한 배양공정 최적화 및 스케일업

2-2. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

○ 연구개발의 추진전략·방법



<1차년도>

- 주관 연구기관(인하대학교) : 항진균 유래 fungicide 활성이 우수한 2종의 NGS 기반의 유전체 분석 (추가적으로 2차 연도 1종, 3차 연도 1종에 대한 유전체분석실시)
- 참여기관 1(생산기술연구원) : 항진균제 최적 생산을 위한 방선균 배지성분 최적화
- 참여기관 2(에스티알바이오텍) : 미생물제제 후보 방선균의 균주 특성 파악 및 고농도 포자형성, 수확조건 확립

<2차년도>

- 주관 연구기관(인하대학교) : 항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리
- 참여기관 1(생산기술연구원) : 항진균제 최적 생산을 위한 방선균 배양공정 최적화
- 참여기관 2(에스티알바이오텍) : 선별된 후보균주의 제형화 및 다양한 조건에서의 항진균력 검증

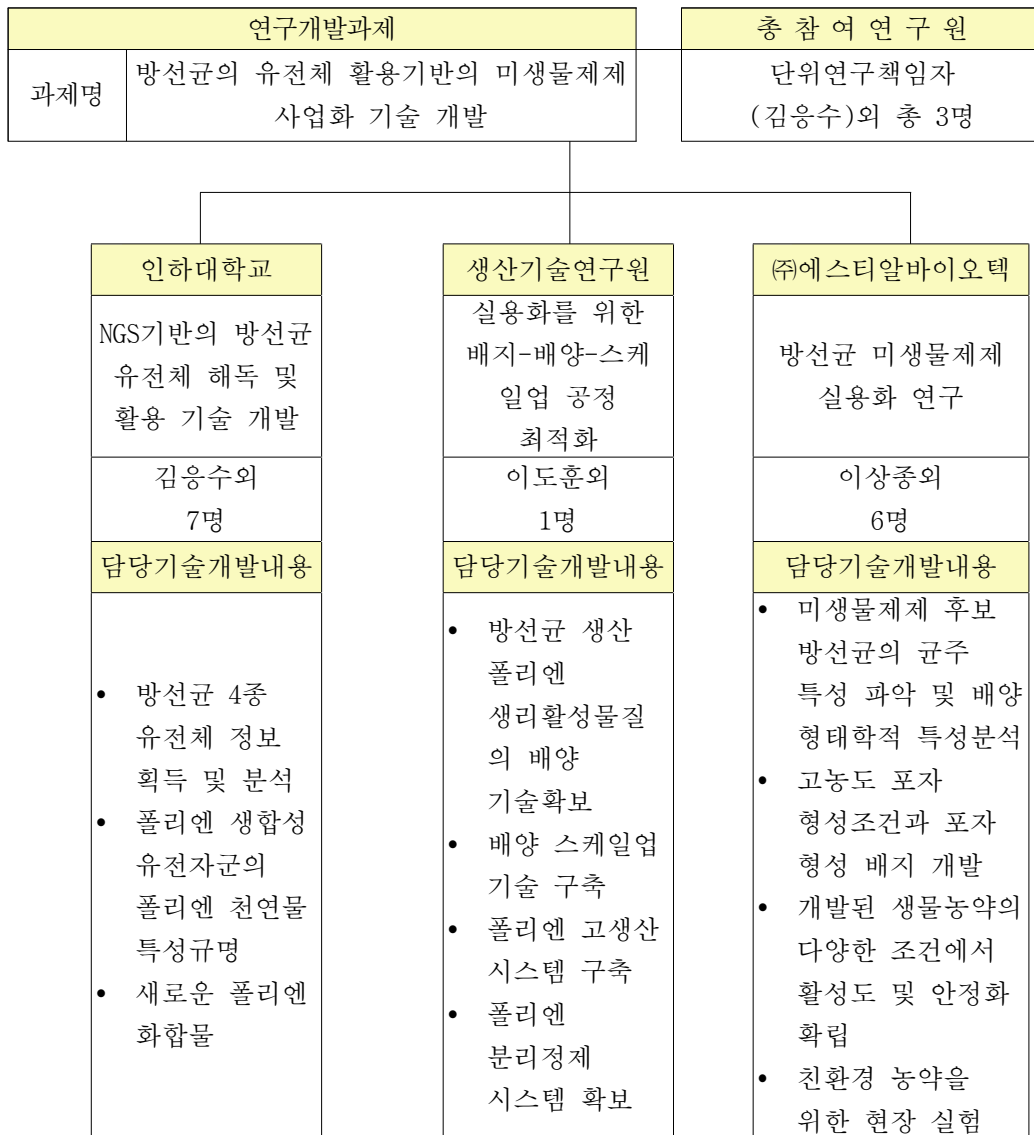
<3차년도>

- 주관연구기관(인하대학교) : 항진균 폴리엔 생합성 유전자군의 유전체 재설계를 통한 신규 유도체 도출
- 참여기관 1(생산기술연구원) : 항진균제 최적 생산을 위한 스케일업 최적화
- 참여기관 2(에스티알바이오텍) : 친환경 미생물제제를 위한 작물 진균 제어능 및 안정성 검증

<4차년도>

- 주관연구기관(인하대학교) : 합성 생물학 및 유전체 공학 기반의 신규 방선균 미생물제제 및 활성물질 개발
- 참여기관 1(생산기술연구원) : 사업화-실용화를 위한 배지-배양-스케일업 공정 최적화
- 참여기관 2(에스티알바이오텍) : 시제품의 독성 및 안전성 조사

○ 연구개발 추진체계



2-3. 당해연도 연구개발 목표 및 결과

○ 1차년도(2018)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2018)	NGS 기반의 방선균 유전체 해독 및 활용 기술 개발 (인하대학 교)	항진균 유래 fungicide 활성이 우수한 2종의 NGS기반의 유전체 분석	방선균 중 항진균 활성이 우수한 후보균주 선정	<p>- 선행연구에서 <i>C. albicans</i>에 대해 항진균력이 우수했던 방선균 MMBL001, MMBL002, MMBL003, MMBL004, 및 <i>P. autotrophica</i>의 잎마름병 유발 원인 곰팡이 <i>Fusarium</i> 계열의 <i>Fusarium oxysporum</i>에 대한 항진균 활성을 확인하여 벼의 잎마름병을 유발하는 진균에 대한 활성을 비교한 결과, 산업적인 미생물체제로 이용하기에는 방선균 MMBL001, MMBL002, MMBL003, MMBL004의 항진균 활성보다 높은 활성의 균주가 필요하여 강력한 항진균 활성을 나타내는 방선균 균주 스크리닝 및 선정 과정을 진행함</p> <p>- 한국생명공학연구원 (KRIIBB)(산업바이오소재 연구센터)으로부터 스크리닝 된 약 2500여종의 방선균 배양액을 분양받아 acetone을 이용하여 compound를 추출하여 진행함</p> <p>- 추출한 총 2500여종의 compound를 <i>F. oxysporum</i>과 <i>C. albicans</i>를 이용하여 항진균 활성 테스트 완료하였으며 항진균 미생물체제로 사용 가능한 후보균 선정 완료 (항진균 활성을 나타내는 148종 선별 완료)</p> <div data-bbox="790 1243 1396 1444" style="text-align: center;"> <p>2419 samples (left circle) 68 samples against <i>C. albicans</i> 10 methyl pentaene 1 58 shared compounds 138 samples against <i>F. oxysporum</i> 80 unique compounds: triene 1, tetraene 1, pentaene 4, methylpentaene 19, heptaene 1, octaene 1 58 shared compounds: tetraene 2, pentaene 9, methylpentaene 5, hexaene 1, heptaene 6</p> </div> <p>그림 1. 약 2500종의 방선균을 이용한 항진균력을 나타내는 방선균 스크리닝 결과</p> <p>- <i>F. oxysporum</i> 대한 항진균 활성을 나타낸 방선균 138종 / <i>C. albicans</i> 대한 항진균 활성을 나타낸 방선균 68종 / <i>F. oxysporum</i>과 <i>C. albicans</i>에 대해 동시에 항진균 활성을 나타낸 방선균- 58종</p>

1차
년도
(2018)

NGS 기반의
방선균
유전체
해독 및
활용 기술
개발
(인하대학
교)

항진균 유래
fungicide
활성이
우수한 2종의
NGS기반의
유전체 분석
교)

방선균 중
항진균
활성이
우수한
후보균주
선정

- *F. oxysporum* 대한 항진균 활성을 나타낸 방선균 138
종

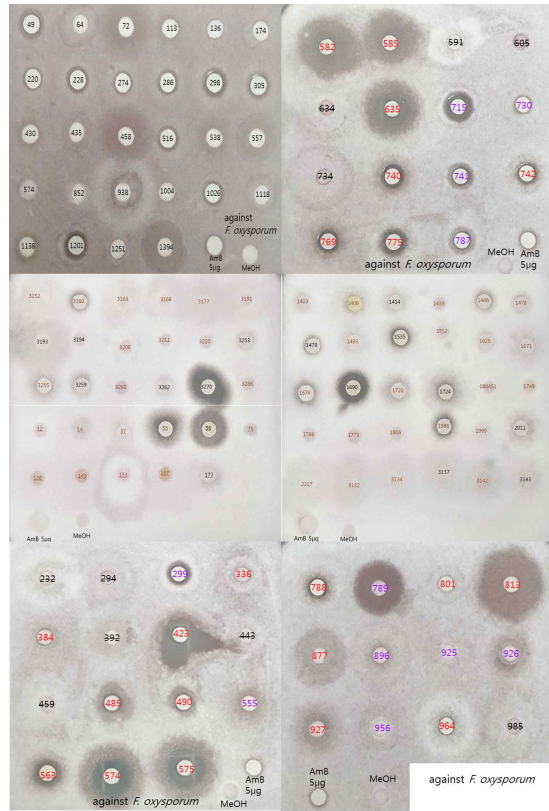


그림 2. *F. oxysporum*에 대한 항진균력 테스트

- *C. albicans* 대한 항진균 활성을 나타낸 방선균 68종

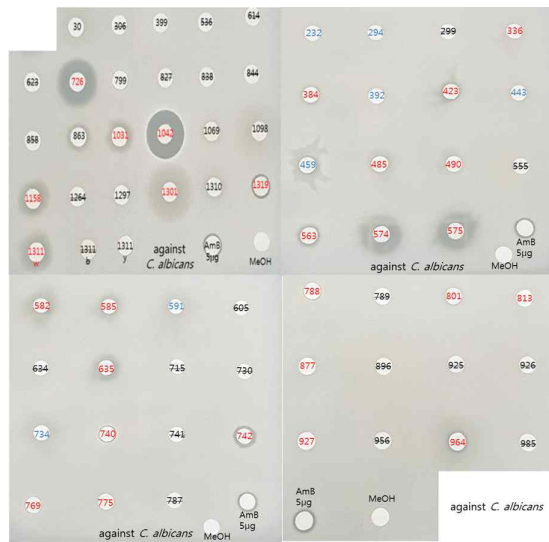
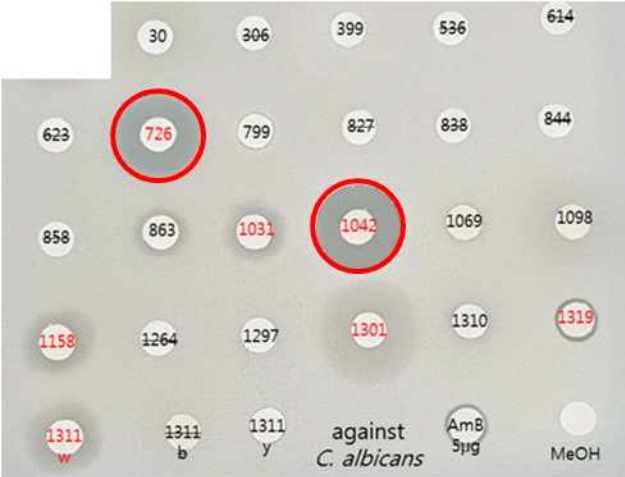
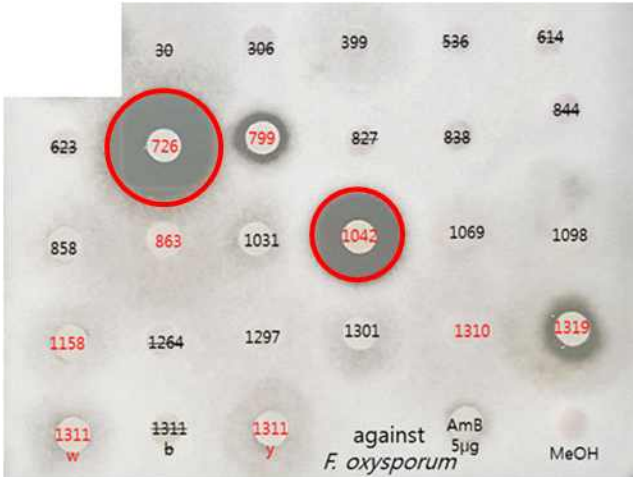


그림 3. *C. albicans*에 대한 항진균력 테스트

- *F. oxysporum*과 *C. albicans*에 대해 동시에 항진균 활
성을 나타낸 방선균- 58종

<p>1차 년도 (2018)</p>	<p>NGS 기반의 방선균 유전체 해독 및 활용 기술 개발 (인하대학 교)</p>	<p>항진균 유래 fungicide 활성이 우수한 2종의 NGS기반의 유전체 분석</p>	<p>HPLC 분석을 통해 polyene compound를 생산하면서 항진균활성이 우수한 후보균주 선정</p>	<p>- <i>F. oxysporum</i>, <i>C. albicans</i>에 대해 항진균 활성을 나타내는 148종의 방선균으로부터 생산되는 compound 성질을 파악하여 폴리엔(Polyene) compound를 생산하며 항진균 활성을 나타내는 후보균을 선별하기 위해 폴리엔 compound detection method를 이용한 HPLC 분석 실시</p>  <p>51종의 방선균의 배양액에서 HPLC 분석 상 polyene compound를 확인 (Triene 1 / Tetraene 3 Pentaene 13 / Methylpentaene 25 / Hexaene 1 / heptaene 7 / octaene 1)</p> <p>그림 4. 51종의 방선균 배양액을 이용한 폴리엔 HPLC 분석 결과</p> <p>- 총 51종의 방선균의 배양액에서 HPLC 분석 상 폴리엔 compound를 확인하였으며 Triene 1종, Tetraene 3종, Pentaene 13종, Methylpentaene 25종, Hexaene 1종, Heptaene 7종, Octaene 1종 분석 완료</p>
-----------------------------	---	---	---	---

<p>1차 년도 (2018)</p>	<p>NGS 기반의 방선균 유전체 해독 및 활용 기술 개발 (인하대학 교)</p>	<p>항진균 유래 fungicide 활성이 우수한 2종의 NGS기반의 유전체 분석</p>	<p>항진균활성 이 우수한 2개의 최종 후보균주 선정</p>	<p>- 항진균 활성이 확인된 148종의 방선균 후보균 중 항진균력이 우수하며 HPLC 분석을 통해 폴리엔 compound를 생산하는 것으로 확인된 51종의 방선균의 16s rRNA sequencing 과 rpoB (RNA polymerase subunit β) 및 특정 CYP sequencing(본 연구진의 폴리엔 특이적인 PCR primer 이용) 염기서열 분석을 수행하였고, 이를 바탕으로 기존에 보고된 방선균들과 비교한 결과 신규성을 가지며 항진균력을 나타내고, 폴리엔 compound를 생산하는 2종의 후보균주 선정</p>  <p>그림 5. 선정된 2종 후보균주의 <i>C. albicans</i>에 대한 항진균 활성 확인</p>  <p>그림 6. 선정된 2종 후보균주의 <i>F. oxysporum</i>에 대한 항진균 활성 확인</p>
-----------------------------	---	---	---	---

1차
년도
(2018)

NGS 기반의
방선균
유전체
해독 및
활용 기술
개발
(인하대학교)

향진균 유래
fungicide
활성이
우수한 2종의
NGS기반의
유전체 분석

신규성이
있는
균주이면서
향진균활성이
우수한
2개의 최종
후보균주
선정

NCBI data를 기반으로 16s rRNA sequence의 비교

Description	Match	Total	Pct(%)
Streptomyces rubrisoli strain FXJ1.725	1430	1446	99
Streptomyces rubrisoli strain FXJ1.526	1430	1446	99
Streptomyces ferrallitis strain SF0p68	1414	1435	99
Streptomyces sparsogenes strain NBRC 13086	1417	1440	98
Streptomyces cuspidosporus strain NBRC 12378	1407	1430	98
Streptomyces abikoensis strain NBRC 13860	1415	1446	98
Streptomyces thioluteus strain NBRC 13341	1415	1446	98
Streptomyces zagrosensis strain UTMC 1154	1416	1448	98
Streptomyces thioluteus strain NBRC 3364	1411	1441	98
Streptomyces abikoensis strain NBRC 13860	1414	1447	98

AN090726

Description	Match	Total	Pct(%)
Streptovercillium reticulum subsp. protomylicum strain NBRC 13932	1442	1447	99
Streptomyces morookaense strain NBRC 13416	1442	1448	99
Streptomyces morookaense strain LMG 20074	1442	1449	99
Streptomyces lavenduligriseus strain NRRL B-3173	1440	1451	99
Streptomyces thioluteus strain NBRC 13341	1437	1449	99
Streptomyces thioluteus strain NBRC 3364	1430	1443	99
Streptomyces luteireticuli strain NRRL B-12435	1433	1449	99
Streptomyces morookaense strain CSSP707	1413	1421	99
Streptomyces luteireticuli strain NBRC 13422	1430	1449	99
Streptomyces orinoci strain NRRL B-3379	1430	1450	99

AN091042

그림 7. 선정된 2종의 후보균주에 대한 16s RNA sequencing 결과

Polyene PCR for identifying AN091042

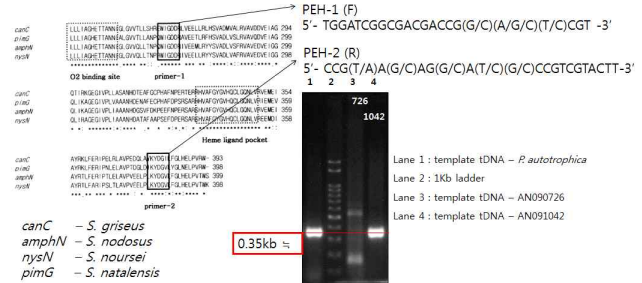


그림 8. 선정된 2종의 후보균주에 대한 폴리엔 특이적인 CYP PCR 및 sequencing 결과

AN091042 Cytochrome P450 hydroxylase partial gene alignment

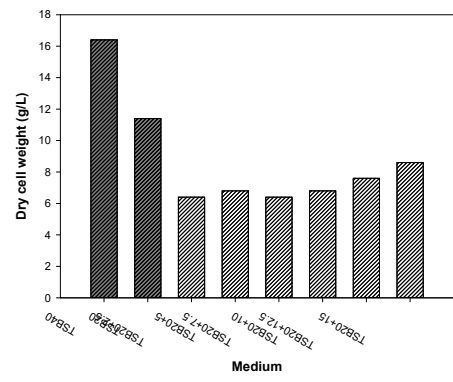



AN090726 rpoB partial gene alignment



그림 9. 선정된 2종의 후보균주에 대한 폴리엔 특이적인 CYP PCR 및 sequencing 결과를 이용한 신규성 검증

<p>1차 년도 (2018)</p>	<p>NGS 기반의 방선균 유전체 해독 및 활용 기술 개발 (인하대학 교)</p>	<p>항진균 유래 fungicide 활성이 우수한 2종의 NGS기반의 유전체 분석</p>	<p>신규성이 있는 균주이면서 항진균활성 이 우수한 2개의 최종 후보균주 선정 및 whole genome sequencing 실시</p>	<div data-bbox="813 206 1364 465"> </div> <p>그림 10. 선정된 2종의 후보균주에 대한 rpoB gene sequencing 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 선정된 2종의 후보균주 분양을 통해 반복 배양 및 항진균 활성을 재검증하고 폴리엔 compound의 생산량을 비교하여 검증을 마친 뒤 whole genome sequencing 진행 중(Macrogen, Korea) - 항진균 활성을 나타내는 폴리엔 compound를 순수하게 분리하여 물질의 신규성을 확보하기 위해 TOF-ion mass 분석 실시하였으며 현재 기존의 compound들과 비교분석 진행 중 <div data-bbox="805 981 1372 1272"> </div> <p>그림 11. 폴리엔 compound의 신규성 확보를 위한 Mass 분석 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 선정된 2종의 균주는 필드 테스트 및 생산최적화를 진행하기 위해 협동기관인 한국생산기술연구원과 (주)에스티알바이오텍에 전달 완료
	<p>사업화-실용화를 위한 배지-배양-스케일업 공정 최적화 (한국생산기술연구원)</p>	<p>항진균제 생산을 위한 최적 배양조건 확립</p>	<p>포자형성 배지와 성장 배양 최적화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ISP2 배지를 SPL사의 plant plate에서 4일간 배양한 경우 1.2×10^8 (spores/ml) 포자를 회수함. <i>P. autotrophica</i>의 균사 성장 형태를 확인하기 위해서 ISP2 배지에서 회수된 포자를 3% 이상에서 접종한 경우 filamentous 균사 유도 <div data-bbox="1018 1753 1161 1928"> </div> <p>그림 12. 96시간 배양 된 생산 배양에서 세포의 morphology</p>

<p>1차 년도 (2018)</p>	<p>사업화-실용화를 위한 배지-배양-스케일업 공정 최적화 (한국생산기술연구원)</p>	<p>항진균제 생산을 위한 최적 배양조건 확립</p>	<p>성장 배양 최적화 및 생산 배양 최적화 수행</p>	<p>- Trpytic Soy Broth가 40 (g/L)로 첨가된 경우에 약 16 (g/L)의 DCW로 최적화 되었으나, 기존 20 (g/L)의 TSB가 첨가된 경우에는 약 11 (g/L)의 DCW가 생산되어 약 30% 가까이 감소하는 경향을 확인</p>  <p>그림 13. 성장 배지 조성에 따른 건조세포중체량 비교</p>  <p>그림 14. 성장 배지 조건에서 건조세포 측정 사진(40g/L TSB: 왼쪽에서 아래 3번째)</p> <p>- 폴리엔의 최종 생산성을 극대화하고자 생산 배지에 관한 최적화를 수행하고자 현재 사용되고 있는 YEME 생산 배지를 중점(기본 배지)로 하여 실험을 수행하였으나 YEME 생산 배지에 phosphate가 무첨가 상태이기 때문에 factor로써 phosphate를 첨가하였으며, 빠른 배지 최적화를 고려하여 Plakett-Burmann과 같은 배지 effect를 테스트할 수 있는 실험 방법은 배제</p>
-----------------------------	--	-------------------------------	---------------------------------	---

1차
년도
(2018)

사업화-실
용화를
위한
배지-배양
-스케일업
공정
최적화
(한국생산
기술연구
원)

항진균제
생산을 위한
최적
배양조건
확립

성장 배양
최적화 및
생산 배양
최적화 수행

- Fractional factorial design으로 실험의 채택을 통해서 yeast와 phosphate factor의 effect와 배지 간 interaction 그래프를 통하여 추가 배지 최적화 방향 설정

	Name	Units	Type	Low	High
A [Numeric]	Sucrose	g/L	Numeric	140	200
B [Numeric]	Glucose	g/L	Numeric	0	10
C [Numeric]	Peptone	g/L	Numeric	0	2
D [Numeric]	Yeast	g/L	Numeric	0	3
E [Numeric]	Malt	g/L	Numeric	1	4
F [Numeric]	MgCl2	g/L	Numeric	0.24	0.72
G [Numeric]	P. Phosphate	g/L	Numeric	1	3

그림 15. Fractional factorial design(2⁷⁻²)

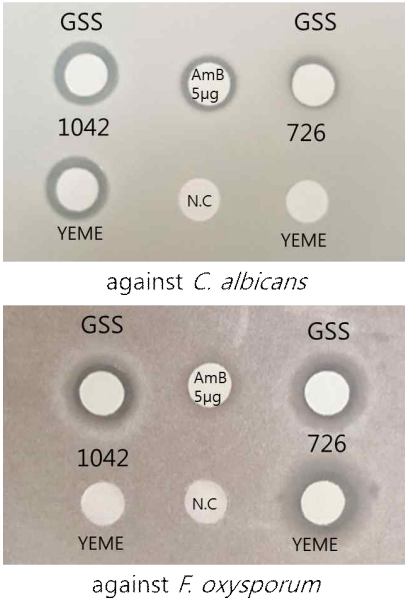
Sheet	Std	Run	Factor 1 A.Sucrose g/L	Factor 2 B.Glucose g/L	Factor 3 C.Peptone g/L	Factor 4 D.Yeast g/L	Factor 5 E.Malt g/L	Factor 6 F.MgCl2 g/L	Factor 7 G.P. Phosph g/L	Response 1 Polyene mg/L
	17	1	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	
	21	2	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	
	16	3	1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	
	8	4	1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	
	7	5	-1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	
	13	6	-1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	
	3	7	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	
	10	8	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	
	22	9	1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	
	4	10	1.000	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	
	25	11	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	
	15	12	-1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	
	11	13	-1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	
	5	14	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	
	6	15	1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	
	2	16	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	
	27	17	-1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
	26	18	1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
	24	19	1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	
	1	20	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	
	14	21	1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	
	23	22	-1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	
	19	23	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	
	12	24	1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	
	32	25	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
	9	26	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	
	20	27	1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	
	30	28	1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	
	31	29	-1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	
	18	30	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	
	28	31	1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	
	29	32	-1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	

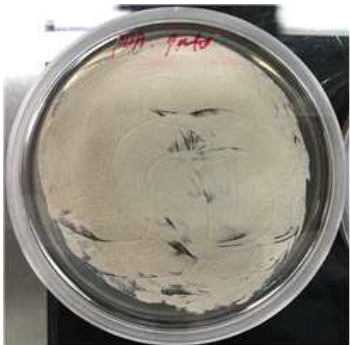

그림 16. Fractional factorial design 실험 테이블

- 폴리엔의 상대적 생산량 분석을 통하여 실험 결과를 분석한 결과 최초로 제시된 모델에 대한 유의성은 (Prob>F 값) 0.0008로써 매우 높은 결과 값을 나타내었으며, 따라서 모델 분석 신뢰 가능

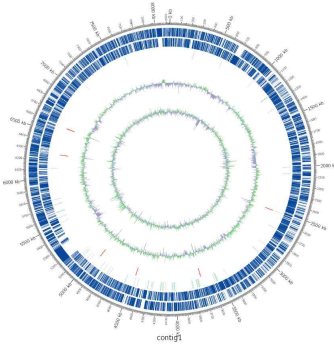
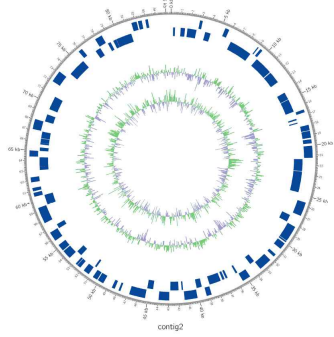
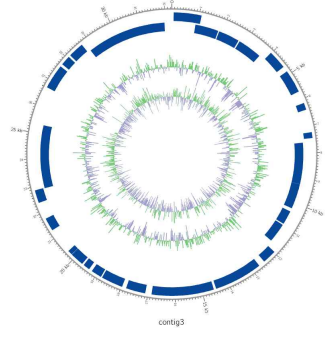

- Factorial design을 통하여 폴리엔 생산에 대한 모델 방정식 폴리엔 = +284.97+35.97* A-39.84* B+0.28* C+228.53* D+6.72* E+124.84* G-1.84* AD+36.84* AE+7.59* AG+1.97* BD-38.59* BE+13.22* CD+12.41* CG-10.22* DE+68.41* DG+9.28* ADE30.22* ADG-7.03* BDE

<p>1차 년도 (2018)</p>	<p>사업화- 실용화를 위한 배지-배 양-스케 일업 공정 최적화 (한국생 산기술연 구원)</p>	<p>항진균제 생산을 위한 최적 배양조건 확립</p>	<p>성장 배양 최적화 및 생산 배양 최적화 수행</p>	<div data-bbox="842 215 1331 846" data-label="Table"> <p>Response 1 Polyene Hierarchical terms added after manual regression A, B, C, D, E, G, AD, AE, AG, BD, BE, CD, CG, DE, DG</p> <p>ANOVA for selected factorial model Analysis of variance table (Partial sum of squares - Type III)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>Sum of Squares</th> <th>df</th> <th>Mean Square</th> <th>F Value</th> <th>p-value</th> <th>Prob > F</th> <th>significant</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Model</td> <td>2.575E+006</td> <td>19</td> <td>1.355E+005</td> <td>6.72</td> <td>0.0008</td> <td></td> <td>significant</td> </tr> <tr> <td>A-Sucrose</td> <td>41400.03</td> <td>1</td> <td>41400.03</td> <td>2.05</td> <td>0.1774</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>B-Glucose</td> <td>50800.78</td> <td>1</td> <td>50800.78</td> <td>2.52</td> <td>0.1384</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>C-Peptone</td> <td>2.53</td> <td>1</td> <td>2.53</td> <td>1.256E-004</td> <td>0.9912</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D-Yeast</td> <td>1.671E-006</td> <td>1</td> <td>1.671E-006</td> <td>82.89</td> <td>< 0.0001</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-Malt</td> <td>1444.53</td> <td>1</td> <td>1444.53</td> <td>0.072</td> <td>0.7935</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>G-P Phosph</td> <td>4.988E+005</td> <td>1</td> <td>4.988E+005</td> <td>24.74</td> <td>0.0003</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>AD</td> <td>108.78</td> <td>1</td> <td>108.78</td> <td>5.396E-003</td> <td>0.9427</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>AE</td> <td>43438.78</td> <td>1</td> <td>43438.78</td> <td>2.15</td> <td>0.1679</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>AG</td> <td>1845.28</td> <td>1</td> <td>1845.28</td> <td>0.092</td> <td>0.7674</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>BD</td> <td>124.03</td> <td>1</td> <td>124.03</td> <td>6.152E-003</td> <td>0.9388</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>BE</td> <td>47663.28</td> <td>1</td> <td>47663.28</td> <td>2.36</td> <td>0.1501</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>CD</td> <td>5591.53</td> <td>1</td> <td>5591.53</td> <td>0.28</td> <td>0.6080</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>CG</td> <td>4925.28</td> <td>1</td> <td>4925.28</td> <td>0.24</td> <td>0.6300</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>DE</td> <td>3341.53</td> <td>1</td> <td>3341.53</td> <td>0.17</td> <td>0.6911</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>DG</td> <td>1.497E+005</td> <td>1</td> <td>1.497E+005</td> <td>7.43</td> <td>0.0184</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>ADE</td> <td>2756.53</td> <td>1</td> <td>2756.53</td> <td>0.14</td> <td>0.7180</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>ADG</td> <td>29221.53</td> <td>1</td> <td>29221.53</td> <td>1.45</td> <td>0.2518</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>BDE</td> <td>1582.03</td> <td>1</td> <td>1582.03</td> <td>0.078</td> <td>0.7842</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>CDG</td> <td>20553.78</td> <td>1</td> <td>20553.78</td> <td>1.02</td> <td>0.3326</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Residual</td> <td>2.419E+005</td> <td>12</td> <td>20161.14</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Cor Total</td> <td>2.816E+006</td> <td>31</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> </div> <p>그림 17. Fractional factorial design 실험 결과</p> <p>- 이와 같은 결과는 우선적으로 생산 배지에서 건조제 포중체량이 낮음으로써 세포 당 폴리엔의 생산성이 낮아져 있고 따라서 반대로, 이를 높여주는 방향으로 생산 배지가 최적화되는 것으로 유추될 수 있지만, 배지간의 농도를 구체적으로 최적화하기 위해서는 streets ascent method와 response surface method와 같은 추가적인 실험 요구</p>	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F	significant	Model	2.575E+006	19	1.355E+005	6.72	0.0008		significant	A-Sucrose	41400.03	1	41400.03	2.05	0.1774			B-Glucose	50800.78	1	50800.78	2.52	0.1384			C-Peptone	2.53	1	2.53	1.256E-004	0.9912			D-Yeast	1.671E-006	1	1.671E-006	82.89	< 0.0001			E-Malt	1444.53	1	1444.53	0.072	0.7935			G-P Phosph	4.988E+005	1	4.988E+005	24.74	0.0003			AD	108.78	1	108.78	5.396E-003	0.9427			AE	43438.78	1	43438.78	2.15	0.1679			AG	1845.28	1	1845.28	0.092	0.7674			BD	124.03	1	124.03	6.152E-003	0.9388			BE	47663.28	1	47663.28	2.36	0.1501			CD	5591.53	1	5591.53	0.28	0.6080			CG	4925.28	1	4925.28	0.24	0.6300			DE	3341.53	1	3341.53	0.17	0.6911			DG	1.497E+005	1	1.497E+005	7.43	0.0184			ADE	2756.53	1	2756.53	0.14	0.7180			ADG	29221.53	1	29221.53	1.45	0.2518			BDE	1582.03	1	1582.03	0.078	0.7842			CDG	20553.78	1	20553.78	1.02	0.3326			Residual	2.419E+005	12	20161.14					Cor Total	2.816E+006	31					
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F	significant																																																																																																																																																																																					
Model	2.575E+006	19	1.355E+005	6.72	0.0008		significant																																																																																																																																																																																					
A-Sucrose	41400.03	1	41400.03	2.05	0.1774																																																																																																																																																																																							
B-Glucose	50800.78	1	50800.78	2.52	0.1384																																																																																																																																																																																							
C-Peptone	2.53	1	2.53	1.256E-004	0.9912																																																																																																																																																																																							
D-Yeast	1.671E-006	1	1.671E-006	82.89	< 0.0001																																																																																																																																																																																							
E-Malt	1444.53	1	1444.53	0.072	0.7935																																																																																																																																																																																							
G-P Phosph	4.988E+005	1	4.988E+005	24.74	0.0003																																																																																																																																																																																							
AD	108.78	1	108.78	5.396E-003	0.9427																																																																																																																																																																																							
AE	43438.78	1	43438.78	2.15	0.1679																																																																																																																																																																																							
AG	1845.28	1	1845.28	0.092	0.7674																																																																																																																																																																																							
BD	124.03	1	124.03	6.152E-003	0.9388																																																																																																																																																																																							
BE	47663.28	1	47663.28	2.36	0.1501																																																																																																																																																																																							
CD	5591.53	1	5591.53	0.28	0.6080																																																																																																																																																																																							
CG	4925.28	1	4925.28	0.24	0.6300																																																																																																																																																																																							
DE	3341.53	1	3341.53	0.17	0.6911																																																																																																																																																																																							
DG	1.497E+005	1	1.497E+005	7.43	0.0184																																																																																																																																																																																							
ADE	2756.53	1	2756.53	0.14	0.7180																																																																																																																																																																																							
ADG	29221.53	1	29221.53	1.45	0.2518																																																																																																																																																																																							
BDE	1582.03	1	1582.03	0.078	0.7842																																																																																																																																																																																							
CDG	20553.78	1	20553.78	1.02	0.3326																																																																																																																																																																																							
Residual	2.419E+005	12	20161.14																																																																																																																																																																																									
Cor Total	2.816E+006	31																																																																																																																																																																																										
	<p>방선균 생물농약 실용화 연구 (에스티 알바이오 텍)</p>	<p>미생물제제 후보 방선균의 균주 특성 파악</p>	<p>후보균주의 특성파악</p>	<p>- 항진균제의 액상 배양을 통한 대량 생산을 위하여 최적 배양 조건을 확립하고자 하였으며, 이를 위해서 일차적으로 플라스크 배양에서의 배양 환경을 조사하여 균주의 특성을 파악하고 특성을 규명</p> <div data-bbox="770 1541 1394 1675" data-label="Diagram"> </div> <p>그림 18. 액상 배양을 위한 실험 설계</p> <p>- 스크리닝을 통해 선정된 균주에 대한 항진균력, 토양 적응력, 안정성 비교를 위한 필드 테스트 수행 전 배지 활성 비교</p>																																																																																																																																																																																								

<p>1차 년도 (2018)</p>	<p>방선균 생물농약 실용화 연구 (에스티 알바이오 텍)</p>	<p>미생물제제 후보 방선균의 균주 특성 과약</p>	<p>후보균주의 특성과약</p>	<div style="text-align: center;">  <p>against <i>C. albicans</i></p> <p>against <i>F. oxysporum</i></p> </div> <p>그림 19. 필드 테스트 수행 전 배지에서의 활성 비교</p> <p>- 선정된 균주 2종의 미생물 제재로써의 가능성을 검증하기 위해 필드 테스트를 수행할 수 있는 한국식물환경연구소에 의뢰하여, 곰팡이에 감염된 배추, 딸기, 고추, 토마토에 대한 항진균, 항미생물에 대한 효능을 검증 중 (겨울철이라 여러 작물에 대한 모종을 구하기가 힘든 상황이다. 봄철이 되면 여러 작물에 대한 필드테스트를 진행하고 활성이 좋은 작물을 target으로 선정할 예정)</p> <p>별지 1</p> <p style="text-align: center;">개별약정서</p> <p>본 계약서의 시험연구용역 계약서 제 2 조, 제 4 조, 제 5 조, 제 6 조, 제 7 조에 의거하며, "시험의뢰사"와 "시험기관"은 상호간의 거래에 있어 아래와 같이 개별약정을 체결하며, 기타 사항은 기본 계약에 따르는 것을 원칙으로 한다.</p> <p style="text-align: center;">***** 아래 *****</p> <p>1. 문서번호: KPER - 18-033 2. 시험기간: 2018. 10 월(계약시) 부터 시험완료시까지.</p> <p>3. 시험항목</p> <table border="1" data-bbox="858 1435 1283 1653"> <thead> <tr> <th>시험번호</th> <th>항목명</th> <th>계약금(60%) (VAT 포함)</th> <th>잔금(40%) (VAT 포함)</th> <th>시험비용액 (VAT 포함)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>KPER-18-F-45</td> <td>토마토 시들음병에 대한 약효약해 시험</td> <td>840,000</td> <td>560,000</td> <td>1,400,000</td> </tr> <tr> <td>KPER-18-F-46</td> <td>고추 시들음병에 대한 약효약해 시험</td> <td>840,000</td> <td>560,000</td> <td>1,400,000</td> </tr> <tr> <td>KPER-18-F-47</td> <td>딸기 시들음병에 대한 약효약해 시험</td> <td>840,000</td> <td>560,000</td> <td>1,400,000</td> </tr> <tr> <td>KPER-18-F-48</td> <td>배추 무름병에 대한 약효약해 시험</td> <td>840,000</td> <td>560,000</td> <td>1,400,000</td> </tr> <tr> <td></td> <td>부가가치세(VAT)</td> <td>336,000</td> <td>224,000</td> <td>560,000</td> </tr> <tr> <td></td> <td>합 계</td> <td>3,696,000</td> <td>2,464,000</td> <td>6,160,000</td> </tr> </tbody> </table> <p>4. 계약일자: 2018. 10. 30.</p> <p>"시험의뢰사" 주 소: 강원도 춘천시 소양강로 56 회 사 명: 위앤스티알바이오텍 대표이사: 이 상 종 (인)</p> <p>"시험기관" 주 소: 경기도 수원시 권선구 오목천로 152 번길 40 수원첨단벤처밸리 403 호 회 사 명: 위첨국식물환경연구소 대표이사: 박 지 성 (인)</p> <p style="text-align: center;"><i>Korea Plants Environmental Res.</i></p> <p>그림 20. 다양한 작물의 곰팡이 감염 약효 필드테스트 의뢰</p>	시험번호	항목명	계약금(60%) (VAT 포함)	잔금(40%) (VAT 포함)	시험비용액 (VAT 포함)	KPER-18-F-45	토마토 시들음병에 대한 약효약해 시험	840,000	560,000	1,400,000	KPER-18-F-46	고추 시들음병에 대한 약효약해 시험	840,000	560,000	1,400,000	KPER-18-F-47	딸기 시들음병에 대한 약효약해 시험	840,000	560,000	1,400,000	KPER-18-F-48	배추 무름병에 대한 약효약해 시험	840,000	560,000	1,400,000		부가가치세(VAT)	336,000	224,000	560,000		합 계	3,696,000	2,464,000	6,160,000
시험번호	항목명	계약금(60%) (VAT 포함)	잔금(40%) (VAT 포함)	시험비용액 (VAT 포함)																																			
KPER-18-F-45	토마토 시들음병에 대한 약효약해 시험	840,000	560,000	1,400,000																																			
KPER-18-F-46	고추 시들음병에 대한 약효약해 시험	840,000	560,000	1,400,000																																			
KPER-18-F-47	딸기 시들음병에 대한 약효약해 시험	840,000	560,000	1,400,000																																			
KPER-18-F-48	배추 무름병에 대한 약효약해 시험	840,000	560,000	1,400,000																																			
	부가가치세(VAT)	336,000	224,000	560,000																																			
	합 계	3,696,000	2,464,000	6,160,000																																			

<p>1차 년도 (2018)</p>	<p>방선균 생물농약 실용화 연구 (에스티 알바이오 텍)</p>	<p>미생물제제 후보 방선균의 균주 특성 과약</p>	<p>후보균주의 특성과약</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Pseudonocardia autotrophica</i>의 배양 최적화를 위해 우선 포자 형성 배지에서의 배양 형태를 관찰한 결과 2~3일 이후 포자 형성이 급격히 높아지나 그 이후에서는 포자의 형성이 낮게 관찰되며 이와 같은 현상은 일반적인 PDA agar 배지에서도 동일하게 관찰됨 - ISP2 medium에서는 약 1.2×10^8 (spores/ml)을 회수 하였으며, PDA 배지에서는 좀 더 높은 2×10^8 (spores/ml)의 포자를 회수 <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> (A)  (B) </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">  </div> <p style="text-align: center;">그림 21. ISP2 배지와 PDA 배지에서 포자 형성 비교</p> <ul style="list-style-type: none"> - 스크리닝을 통해 선정된 2종의 균주에 대한 다양한 배지를 통해 포자형성 및 수확 조건 확인 - 선정된 2종의 균주의 경우 5종의 배지에서 포자가 형성되지 않아 배양액 동결건조를 통한 수확 조건 재정립
-----------------------------	---	---	-----------------------	--

○ 2차년도(2019)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과																									
2차 년도 (2019)	항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리 (인하대학 교)	항진균 유래 fungicide 활성이 우수한 3종의 NGS기반 유전정보 분석	전략미생물 의 전체 유전체해독	<p>(1) Inha501의 whole genome sequencing</p> <p>- <u>PacBio RSII, Illumina platform and De novo assembly</u>를 이용하여 유전체 분석(마크로젠 수행)</p> <table border="1" data-bbox="775 533 1410 658"> <thead> <tr> <th>Contig Name</th> <th>Length (bp)</th> <th>CDS</th> <th>tRNA</th> <th>rRNA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>contig1</td> <td>8,132,230</td> <td>7,189</td> <td>75</td> <td>18</td> </tr> <tr> <td>contig2</td> <td>85,489</td> <td>94</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>contig3</td> <td>32,253</td> <td>35</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>8,249,972</td> <td>7,318</td> <td>75</td> <td>18</td> </tr> </tbody> </table> <p>그림 22. Inha501의 whole genome 정보</p>  <p>그림 23. Inha501의 contig 1 (chromosomal DNA map)</p>  <p>그림 24. Inha501의 contig 2 (linear plasmid map)</p>  <p>그림 25. Inha501의 contig 3 (circular plasmid map)</p> 	Contig Name	Length (bp)	CDS	tRNA	rRNA	contig1	8,132,230	7,189	75	18	contig2	85,489	94	0	0	contig3	32,253	35	0	0	Total	8,249,972	7,318	75	18
Contig Name	Length (bp)	CDS	tRNA	rRNA																									
contig1	8,132,230	7,189	75	18																									
contig2	85,489	94	0	0																									
contig3	32,253	35	0	0																									
Total	8,249,972	7,318	75	18																									

2차
년도
(2019)

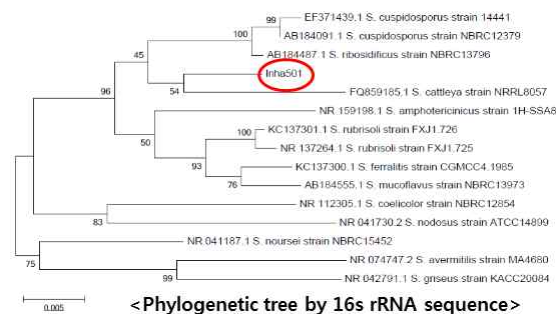
향진균계
생합성 및
조절
유전자
특성 규명
및
유전자군
분리
(인하대학
교)

향진균 유래
fungicide
활성이
우수한 3종의
NGS기반
유전정보
분석

전략미생물
의 전체
유전체해독

- Inha501의 16s rRNA sequence 기반 phylogenetic tree

전체 유전체 정보를 바탕으로 예상 BGC region의 분석과 균주에 대한 동정을 실시하여 Inha501이 신규 균주임을 확인



<Phylogenetic tree by 16s rRNA sequence>

그림 26. Inha501 16s rRNA sequence의 phylogenetic tree

(2) Inha502의 whole genome sequencing

- PacBio RSII, Illumina platform and De novo assembly를 이용하여 유전체 분석(마크로젠 수행)

Contig Name	Length (bp)	CDS	tRNA	rRNA
contig1	8,319,706	7,404	81	21
Total	8,319,706	7,404	81	21

그림 27. Inha502의 whole genome 정보

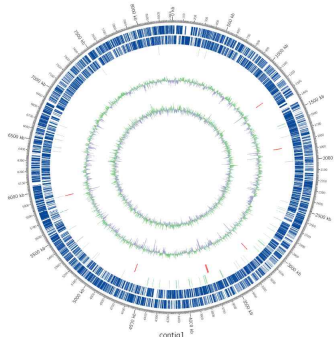


그림 28. Inha502의 contig 1 (chromosomal DNA map)

- Inha502의 16s rRNA sequence기반 phylogenetic tree

전체 유전체 정보를 바탕으로 예상 BGC region의 분석과 균주에 대한 동정을 실시하여 Inha502이 신규 균주임을 확인

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리 (인하대학 교)</p>	<p>항진균 유래 fungicide 활성이 우수한 3종의 NGS기반 유전정보 분석</p>	<p>전략미생물 의 전체 유전체해독</p>	 <p><Phylogenetic tree by 16s rRNA sequence></p> <p>그림 29. Inha502 16s rRNA sequence의 phylogenetic tree</p> <p>(3) Inha503의 whole genome sequencing</p> <p>- 미생물제제 개발을 위한 후보균주 선정 : Inha503</p> <p>1차연도에 2419종의 방선균 중 항진균 활성이 우수한 균주의 선정을 완료하고 polyene compound를 생산하는 균주인 Inha501, Inha502를 선별하여 미생물 제제로 개발하기 위해 실험을 수행하고 있고, 추가로 <u>우수한 항진균 활성의 non-polyene antifungal compound</u>를 생산하는 신규 Inha503 균주를 선별함</p> <p>1차 항진균 테스트 완료 후 선별된 31종의 균주를 GSS plate, 30 °C, 7일간 배양이후 agar plug를 이용한 항진균 활성테스트를 진행하여 후보균주를 선정하였고 HPLC 분석을 통해 non-polyene antifungal compound를 생산하는 균주를 최종 후보균주로 선정</p>  <p>Against <i>F. oxysporum</i></p> <p>Against <i>C. albicans</i> Against <i>A. niger</i></p> <p>그림 30. 후보균주 선정을 위한 항진균 활성테스트 (Agar plug)</p>
-----------------------------	---	---	---------------------------------	--

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리 (인하대학 교)</p>	<p>항진균 유래 fungicide 활성이 우수한 3종의 NGS기반 유전정보 분석</p>	<p>전략미생물 의 전체 유전체해독</p>	<p>GSS broth, 30 ° C, 7일간 진탕배양 이후 Acetone 추출법을 이용한 항진균 활성테스트를 진행하여 항진균 활성이 우수하며 non-polyene antifungal compound을 생산하는 균주를 Inha503 후보균주로 선정</p> <div style="text-align: center;">  <p>Against <i>C. albicans</i> Against <i>A. niger</i></p> <p>Against <i>F. oxysporum</i></p> </div> <p>그림 31. 후보균주 선정을 위한 항진균 활성테스트 (Acetone 추출물)</p> <p>그림 32의 노란색원으로 표시된 <u>AN100585균주</u>를 <u>Inha503</u>으로 선정을 하고 16s rRNA sequence, rpoB sequence의 비교를 통해 기존의 database와 일치하는 정보가 없음을 확인하고 whole genomce sequencing을 수행</p> <p>3차연도의 전략미생물해독을 위한 Inha504 선정은 항진균활성이 우수하면서 polyene compound를 생산하는 AN090291균주(그림 32의 파란색원)로 결정하였고 16s rRNA sequence, rpoB sequence, specific CYP sequence의 비교를 통해 일치하는 정보가 없음을 확인하여 whole genome sequencing을 진행할 예정</p> <div style="text-align: center;">  <p>Against <i>A. niger</i> Against <i>F. oxysporum</i></p> </div> <p>그림 32. Inha503, Inha504 항진균 활성 테스트</p>
-----------------------------	---	---	---------------------------------	--

2차
년도
(2019)

항진균제
생합성 및
조절
유전자
특성 규명
및
유전자군
분리
(인하대학
교)

항진균 유래
fungicide
활성이
우수한 3종의
NGS기반
유전정보
분석

전략미생물
의 전체
유전체해독

- PacBio RSII, Illumina platform and De novo assembly
를 이용하여 유전체 분석(마크로젠 수행)

Contig name	Length	GC (%)	Depth
contig1	1,643,023	70.81	81
contig2	1,034,350	71.34	68
contig3	971,282	71.15	67
contig4	686,930	68.70	53
contig5	574,675	71.88	55
contig6	555,997	71.37	82
contig7	528,262	71.45	76
contig8	349,907	71.53	53
contig9	343,176	72.25	45
contig10	340,308	71.24	46
contig11	316,067	71.68	55
contig12	289,948	71.57	48
contig13	173,196	72.44	45
contig14	164,444	69.54	48
contig15	124,600	71.25	52
contig16	120,445	71.69	41
contig17	113,772	72.26	56
contig18	99,492	70.55	43
contig19	98,691	70.07	37
contig20	97,317	72.93	40
contig21	83,732	71.33	40
contig22	82,742	69.06	37
contig23	78,186	71.11	45
contig24	78,095	72.35	36
contig25	76,060	72.73	43
...
Total	11,469,506	70.98	56

그림 33. Inha503의 whole genome 정보

현재 Inha503의 draft genome sequence는 확보하였고 sequencing 과정에서 universal primer의 binding이 불안정한 문제가 발생하여 보다 큰 크기의 contig 확보를 위해 추가 분석을 진행 중

sequencing된 유전체 정보를 바탕으로 예상 BGC region의 분석과 균주에 대한 동정 작업을 실시하여 Inha503도 신규 균주임을 확인

(1) antiSMASH ver5.0 프로그램을 이용하여 이차대사산물과 관련된 예상 BGC region을 분석하여 항진균 활성을 나타내는 BGC 예측 선별

- Inha501의 antiSMASH 분석 결과

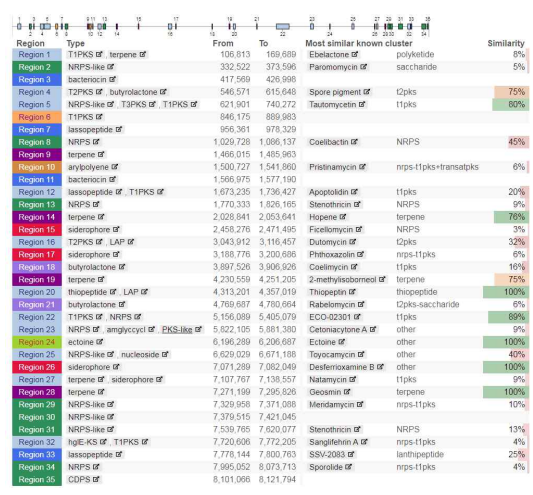


그림 34. Inha501의 antiSMASH 분석결과

활성을
나타내는
예상 BGC
region의
유전분석

2차
년도
(2019)

항진균제
생합성 및
조절
유전자
특성 규명
및
유전자군
분리
(인하대학교)

항진균 유래
fungicide
활성이
우수한 3종의
NGS기반
유전정보
분석

활성을
나타내는
예상 BGC
region의
유전분석

- Inha502의 antiSMASH 분석 결과

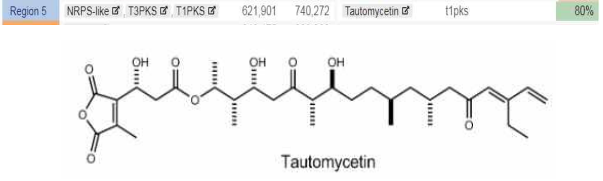
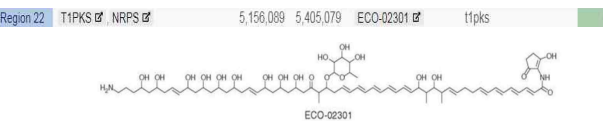
Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1	T1PKS of NRPS-like of butyrolactone of NRPS of LAP of	68,462	272,161	FR-006 of	66%
Region 2	NRPS of	280,846	343,036	Demino-antipain of	55%
Region 3	T2PKS of	746,680	818,320	Lysolipin of	84%
Region 4	NRPS of lanthipeptide of	850,123	913,779	Thienodolin of	14%
Region 5	bacteriocin of	1,076,411	1,085,422		
Region 6	NRPS-like of terpene of	1,169,050	1,228,905	Fluoromycin of	5%
Region 7	transATPKS of PKS-like of	1,348,695	1,462,321	Galycin of	32%
Region 8	terpene of	1,464,798	1,484,428	Plimycin of	5%
Region 9	terpene of	2,181,772	2,202,618		
Region 10	terpene of	2,246,913	2,267,166	2-methylisobomeol of	75%
Region 11	lanthipeptide of	2,400,445	2,421,247	Informalpepin of	42%
Region 12	butyrolactone of	4,164,918	4,180,062	Neocazostatin of	4%
Region 13	oligosaccharide of NRPS of NRPS-like of T2PKS of	4,186,009	4,235,430	FD-584 of	32%
Region 14	NRPS of	4,307,441	4,373,198	Sainamides of	14%
Region 15	siderophore of T3PKS of butyrolactone of	4,513,744	4,563,614	Vazabides A of	23%
Region 16	terpene of	4,760,282	4,780,414	2-methylisobomeol of	75%
Region 17	lanthipeptide of	4,952,781	4,976,478		
Region 18	lanthipeptide of	5,001,958	5,023,637		
Region 19	beta-lactone of	5,405,845	5,432,630	Sainomycin of	4%
Region 20	siderophore of	5,947,403	5,968,625		
Region 21	NRPS of T1PKS of	6,055,094	6,136,116	Althomycin of	100%
Region 22	indole of NRPS-like of terpene of NRPS of T1PKS of hgE-KS of	6,824,803	6,804,306	Hopene of	76%
Region 23	terpene of GDPS of transATPKS of	6,843,358	6,916,559	Cycloheximide/lactiphenol of	27%
Region 24	T2PKS of T1PKS of hgE-KS of	7,009,053	7,087,512	Formicamycin A-M of	32%
Region 25	butyrolactone of T1PKS of	7,171,873	7,215,203	Sporonidins / indimins / lymnamicins of	15%
Region 26	lanthipeptide of	7,261,704	7,283,032		
Region 27	bacteriocin of	7,339,760	7,350,584		
Region 28	lanthipeptide of terpene of lassopeptide of	7,350,772	7,404,399	Blasticidin of	10%
Region 29	other of NRPS of NRPS-like of	7,433,506	7,575,647	Kromycin of	20%
Region 30	lassopeptide of	7,733,190	7,755,495	Anantoin C of	75%
Region 31	T1PKS of	7,796,103	7,843,093	Ishgamide of	11%
Region 32	siderophore of	7,878,850	7,891,630		
Region 33	NRPS of terpene of	8,016,591	8,085,182	Siarasin of	6%
Region 34	T1PKS of	8,177,844	8,225,317	Osazolomycin of	6%

그림 35. Inha502의 antiSMASH 분석결과

- Inha503의 antiSMASH 분석 결과 (contig 1 ~ 10)

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1	terpene of	10,767	33,118	Geosmin of	100%
Region 2	siderophore of	1,244,507	1,258,294	Desferrioxamine B of	100%
Region 1	T1PKS of	796,920	981,288	Mediomycin A of	68%
Region 1	NRPS-like of	106,396	149,236	Echosides of	100%
Region 2	siderophore of	741,386	753,272		
Region 3	bacteriocin of	919,033	930,382		
Region 1	T1PKS of beta-lactone of	440,013	585,843	Lasalocid of	13%
Region 1	terpene of	218,046	244,493	Hopene of	76%
Region 2	T2PKS of	465,451	537,966	Spore pigment of	83%
Region 1	NRPS of arylpolyene of ladderane of	213,521	316,453	Skylamycin of	46%
Region 2	T2PKS of	429,723	502,226	Hexacin of	33%
Region 1	indole of	68,094	89,236	Terfestatin of	61%
Region 2	NRPS of	283,374	327,384	Ochronotic pigment of	75%
Region 3	ladderane of arylpolyene of	371,695	414,078	WS9326 of	25%
Region 1	ectoine of	54,996	65,400	Ectoine of	100%
Region 2	siderophore of	232,069	245,951		
Region 3	terpene of	298,645	319,718	BE-43547 A1-C2 of	20%
Region 1	hserlactone of	11,048	31,803	Daptomycin of	3%
Region 2	T1PKS of	193,803	273,554	Elaiophylin of	83%
Region 1	terpene of	201,603	222,772	2-methylisobomeol of	100%
Region 2	PKS-like of	226,311	267,339	Galbonolides of	20%

그림 36. Inha503 contig 1 ~ 10의 antiSMASH 분석결과

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리 (인하대학 교)</p>	<p>항진균 유래 fungicide 활성이 우수한 3종의 NGS기반 유전정보 분석</p>	<p>전략미생물 의 전체 유전체해독</p>	<p>(2) 선행 연구내용결과와 항진균 활성 특성을 이용하여 가장 가능성이 높은 예상 생합성 유전자군 선별</p> <p>- <u>Inha501의 항진균 활성과 관련있는 생합성 유전자군 예측</u></p> <p><u>Region 5에서 그림 37에서 Tautomycetin (TMC)의 BGC와 매우 유사한 생합성 유전자군을 갖는 것으로 확인</u></p> <p>Tautomycetin은 기존 문헌에 보고된 화합물로서, 항진균 활성과 면역억제 활성을 갖는 것으로 알려져 있음</p> <p>HPLC분석 결과 및 HPLC peak별 항진균활성 테스트 결과를 바탕으로 <u>region 5에서 합성되는 이 물질이 Inha501의 항진균 활성을 나타낼 것이라 판단됨</u></p>  <p>그림 37. Inha501 region 5의 분석결과 및 Tautimycetin의 구조</p> <p><u>Region 22에서 그림 38과 같은 ECO-02301의 생합성 유전자군과 유사한 생합성 유전자군을 갖는 것으로 확인</u></p> <p>ECO-02301은 polyene compound 계열의 pentaene이 기본 골격으로 가지고 있고 환형 구조가 아닌 선형 구조의 polyene compound로 발견된 최초의 물질임</p> <p>HPLC분석 결과 및 HPLC peak별 항진균활성 테스트 결과를 바탕으로 pentaene의 구조이면서 <u>ECO-02301와 비슷한 생합성 유전자군을 갖는 region 22에서 Inha501의 항진균 활성을 나타낼 것이라 판단됨</u></p>  <p>그림 38. Inha501 region 22의 분석결과 및 ECO-02301의 구조</p>
-----------------------------	---	---	---------------------------------	---

2차
년도
(2019)

항진균제
생합성 및
조절
유전자
특성 규명
및
유전자군
분리
(인하대학
교)

항진균 유래
fungicide
활성이
우수한 3종의
NGS기반
유전정보
분석

전략미생물
의 전체
유전체해독

- Inha502의 항진균 활성과 관련있는 생합성 유전자군
예측

Region 1에서 그림 39와 같은 FR-008의 생합성 유전
자군과 유사한 BGC를 갖는 것으로 확인

FR-008은 polyene compound 계열의 heptaene을 기본
골격으로 가지고 있고 환형 구조의 polyene
compound이며 candididin이라는 이름의 강력한 항
진균물질로 알려져 있음

HPLC분석 결과 및 HPLC peak별 항진균활성 테스트
결과를 바탕으로 pentaene의 구조이면서 FR-008과
비슷한 생합성 유전자군을 갖는 region 1에서
Inha502의 항진균 활성을 나타낼 것이라 판단됨

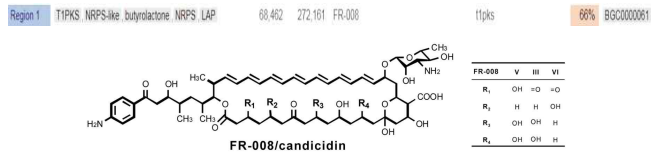


그림 39. Inha502 region 1의 분석결과 및 FR-008/candididin의
구조

- Inha503의 항진균 활성과 관련있는 생합성 유전자군
예측

Draft genome sequencing만 완료된 상태이기에 전체
유전체 분석이 완료되면 추가적인 BGC 분석을 할 예
정

현재 가지고 있는 정보에서는 contig 9의 Region 2
에서 그림 40과 같은 Elaiophylin의 생합성 유전자
군과 유사한 생합성 유전자군을 갖는 것으로 확인

Elaiophylin은 항진균 작용을 하는 물질로 알려져
있으며 autophagy inhibitor로써 암치료를 위한
chemotherapy의 효능을 증진시키는 역할

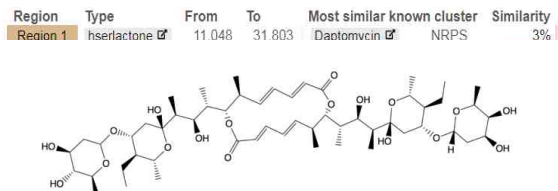


그림 40. Inha503 contig 9 region 2의 분석결과 및 Elaiophylin의
구조

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리 (인하대학 교)</p>	<p>미생물제제 후보 방선균의 특성 분석 및 유전자 조작기술 시스템 구축</p>	<p>배지, 항생제별 특성 확인 및 포자화 조건 확립</p>	<p>- ISP2, ISP4, MS, R2YE 등 여러 방선균용 배지테스트 통해 포자화가 잘되는 배지를 선정</p> <p><u>Inha501의 경우에는 ISP4 medium에서 포자화(4~5일)</u> 가 잘 일어났으며 ISP2 medium에서 가장 성장속도 (3~4일)가 빠른 것을 확인</p> <p><u>Inha502의 경우에는 ISP2, ISP4 medium에서 포자화</u> (4일)가 잘 일어났으며 Inha501보다 모든 배지에서 전반적으로 하루정도 빠르게 성장하는 것을 확인</p>  <table border="1" data-bbox="798 896 1356 1008"> <thead> <tr> <th>MS</th> <th>g/L</th> <th>mISP4</th> <th>g/L</th> <th>ISP2</th> <th>g/L</th> <th>ISP4</th> <th>g/L</th> <th>g/L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>D-mannitol</td> <td>20</td> <td>ISP4</td> <td>39</td> <td>Malt ext.</td> <td>10</td> <td>Starch soluble</td> <td>10</td> <td>NaCl</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Soybean flour</td> <td>20</td> <td>Yeast ext.</td> <td>0.5</td> <td>Yeast ext.</td> <td>4</td> <td>K₂HPO₄</td> <td>1</td> <td>CaCO₃</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>agar</td> <td>20</td> <td>tryptone</td> <td>1.5</td> <td>Glucose</td> <td>4</td> <td>Mg(H₂PO₄)₂</td> <td>1</td> <td>agar</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>agar</td> <td>20</td> <td>MgSO₄</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>그림 41. Inha501, Inha502의 포자화를 위한 배지테스트 결과</p> <p>- 유전자 조작을 한 방선균을 선별 시 자주 사용되는 항 생제 마커의 내성을 확인</p> <p>일반적으로 Inha501과 Inha502는 conjugation이후 <i>E. coli</i> Selection을 위한 사용하는 Nalidixic acid 에서 생장이 조금 저해되나 colony가 생성하는 것을 확인</p> <p>선행연구를 통해 구축된 유전자 조작기술에서 필요 한 construct의 <u>selection marker인 Apramycin,</u> <u>Thiostrepton에 의해 selection이 됨을 확인</u> (구축된 construct를 변경 없이 사용할 수 있음을 확인)</p>  <p>그림 42. Inha501, Inha502의 항생제 별 내성 확인테스트</p>	MS	g/L	mISP4	g/L	ISP2	g/L	ISP4	g/L	g/L	D-mannitol	20	ISP4	39	Malt ext.	10	Starch soluble	10	NaCl	1	Soybean flour	20	Yeast ext.	0.5	Yeast ext.	4	K ₂ HPO ₄	1	CaCO ₃	2	agar	20	tryptone	1.5	Glucose	4	Mg(H ₂ PO ₄) ₂	1	agar	20					agar	20	MgSO ₄	1		
MS	g/L	mISP4	g/L	ISP2	g/L	ISP4	g/L	g/L																																													
D-mannitol	20	ISP4	39	Malt ext.	10	Starch soluble	10	NaCl	1																																												
Soybean flour	20	Yeast ext.	0.5	Yeast ext.	4	K ₂ HPO ₄	1	CaCO ₃	2																																												
agar	20	tryptone	1.5	Glucose	4	Mg(H ₂ PO ₄) ₂	1	agar	20																																												
				agar	20	MgSO ₄	1																																														

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리 (인하대학 교)</p>	<p>미생물제제 후보 방선균의 특성 분석 및 유전자 조작기술 시스템 구축</p>	<p>유전자 조작기술(co njugation) 시스템 구축완료</p>	<p>- <u>확립된 포자화 조건으로 포자로 구성된 stock 구축</u></p> <p>포자화를 잘 하는 colony의 선별과정과 여러 배지 테스트를 통해 포자화 조건을 확립 (ISP4 medium, 30° C, 4~5 days 정지배양)</p> <p>구축된 유전자조작 시스템을 이용하기 편한 spore 형태의 stock 대량제작 완료 (20% glycerol 상태로 -80° C에서 stock 보관)</p> <div data-bbox="842 622 1318 846" data-label="Image"> </div> <p style="text-align: center;">Inha501 / ISP4, 5days Inha502 / ISP4, 4days</p> <p>그림 43. Inha501, Inha502의 정지배양이후 포자화 plate</p> <p>- <u>후보균주의 유전자 조작기술 조건 확립</u></p> <p>Chromosomal Integration을 하는 공벡터 (pSET152)을 이용하여 Inha501, Inha502의 Chromosomal DNA로 Integration하는지 확인과 함께 유전자 조작기술의 조건을 확립하고자 진행</p> <p>3번의 계대배양 이후 <u>Genetic Confirmation (PCR이용)을 통해 Chromosomal DNA로 Integration 하는 것을 확인</u>하였고 유전자 조작기술의 조건을 확립</p> <div data-bbox="774 1458 1390 1720" data-label="Figure"> </div> <p>그림 44. 구축된 유전자 조작기술 시스템을 이용한 Chromosomal DNA로의 Integration 확인 PCR (Genetic confirmation)</p>
-----------------------------	---	--	--	---

(1) Inha501의 항진균 활성을 나타내는 region 5(TMC 유사cluster)의 생합성 유전자군의 분석

- Inha501의 region 5와 TMC 생합성 유전자군의 비교

Bioinformatic analysis을 통해 region 5의 생합성 유전자군과 TMC의 생합성 유전자군의 비교를 통해 예측구조를 도출

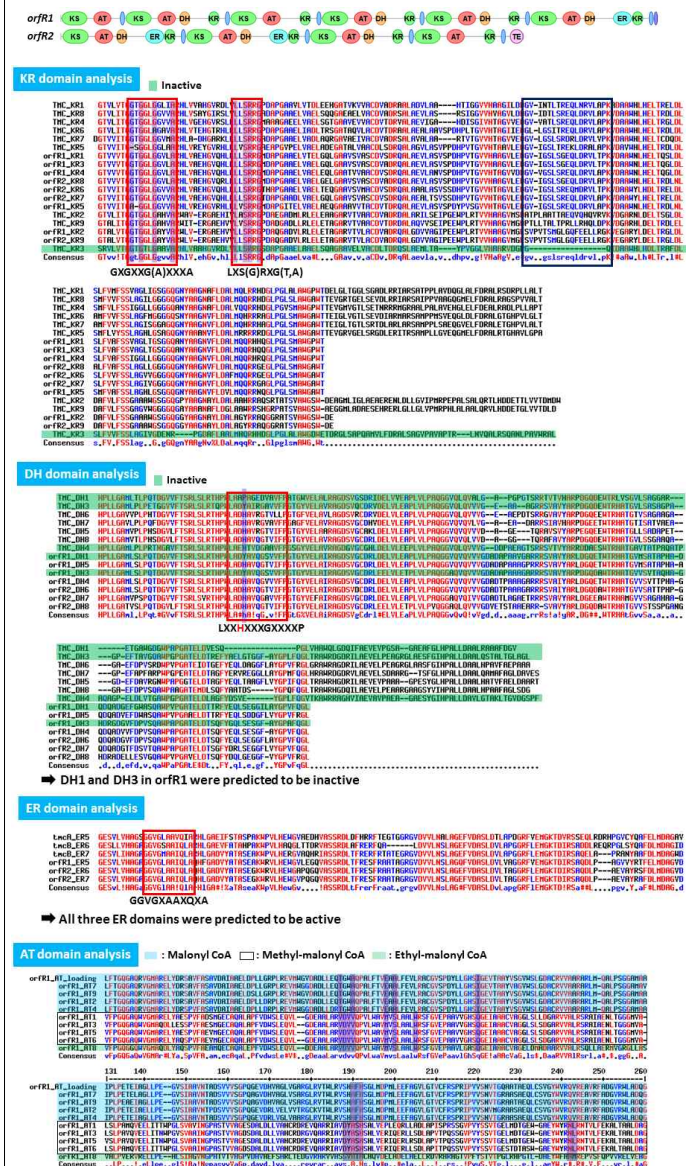


그림 45. Bioinformatic analysis을 이용한 Inha501 region 5의 PKS domain 분석 및 비교

항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리 (인하대학교)

미생물제제 후보 방선균의 특성 분석 및 유전자 조작기술 시스템 구축

균주의 항진균 생합성 유전자군의 규명

2차년도 (2019)

2차
년도
(2019)

항진균제
생합성 및
조절
유전자
특성 규명
및
유전자군
분리
(인하대학
교)

미생물제제
후보
방선균의
특성 분석 및
유전자
조작기술
시스템 구축

균주의
항진균
생합성
유전자군의
규명

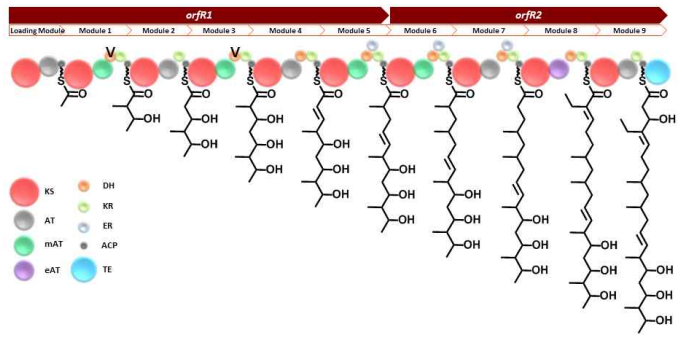


그림 46. Inha501 region 5의 PKS 분석에 따른 Backbone 예측

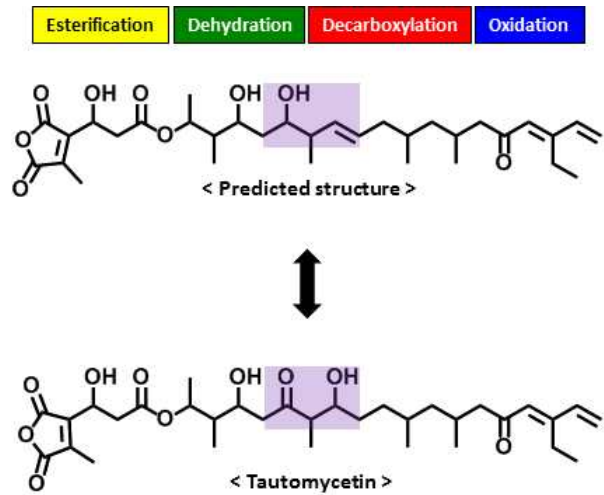


그림 47. Inha501 region 5의 예측구조와 Tautomycetin의 구조비교

- Inha501의 region 5의 생합성유전자군의 규명을 위한 유전자 Knock-out

TMC의 생합성과정 중 가장 기본이 되는 뼈대를 만드는 PKS 유전자의 Knock-out를 통해 실제 region 5가 항진균 활성을 나타내는 물질의 생합성 유전자군인지 확인하고자 진행

그림 48과 같이 Homologous Recombination을 이용한 Knock-out을 유도하였고 그림 49과 같이 PCR을 이용해 Genetic Confirmation까지 완료

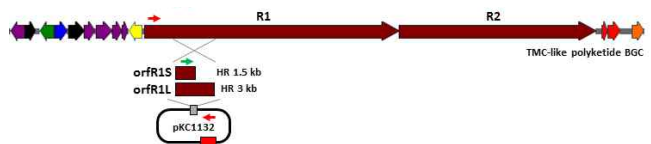


그림 48. Homologous recombination의 유전자 조작을 통한 Inha501 region 5의 PKS Knock-out 전략

2차
년도
(2019)

항진균제
생합성 및
조절
유전자
특성 규명
및
유전자군
분리
(인하대학
교)

미생물체제
후보
방선균의
특성 분석 및
유전자
조작기술
시스템 구축

균주의
항진균
생합성
유전자군의
규명

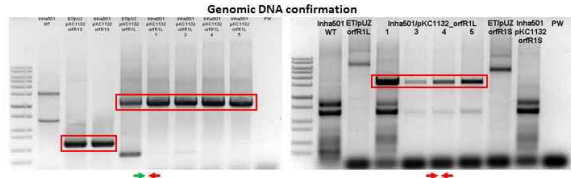


그림 49. Inha501 region 5의 PKS gene Knock-out
(Genetic Confirmation)

Knock-out 이후 비교배양을 진행하기 전 region 5에서 TMC와 유사한 물질이 생성될 것이라 판단하여 TMC 생산배지를 조사하여 그 중 어떤 배지에서 가장 많이 생산되는지 확인하는 실험을 진행하였고 R5 medium에서 가장 생산이 잘되는 것을 확인

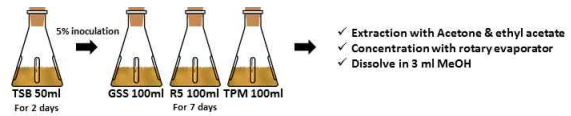


그림 50. 생산배지(GSS, R5, TPM) 비교실험

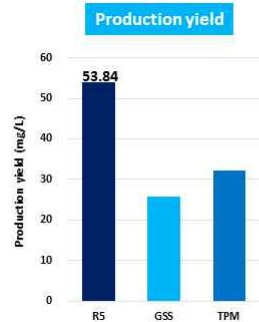
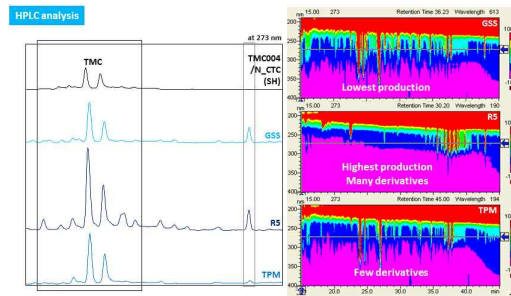


그림 51. HPLC 데이터비교를 통한 생산량 비교와 항진균 활성 확인실험

R5 medium을 이용한 비교배양 분석결과 region 5가 항진균 활성을 나타내는 물질과 관련된 생합성 유전자군임을 확인

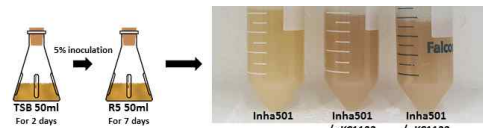


그림 52. R5 medium을 이용한 비교배양

- ✓ Extraction with acetone & ethyl acetate
- ✓ Concentration with rotary evaporator
- ✓ Dissolve in 1 ml MeOH

2차
년도
(2019)

항진균제
생합성 및
조절
유전자
특성 규명
및
유전자군
분리
(인하대학
교)

미생물체제
후보
방선균의
특성 분석 및
유전자
조작기술
시스템 구축

균주의
항진균
생합성
유전자군의
규명

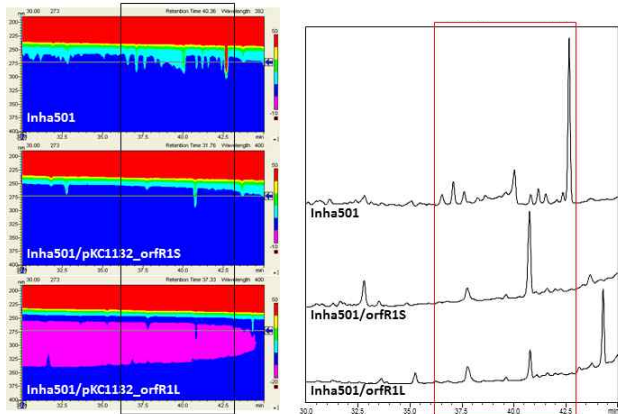


그림 53. HPLC분석을 통해 Inha501 region 5은 TMC 유사 Cluster의 생합성 유전자군임을 확인한 비교배양결과

Inha501의 항진균 활성을 나타내는 생합성 유전자군이 2개 이상으로 확인이 되었으며 region 22의 생합성 유전자군에서 합성될 것이라 예상되는 polyene compound가 배양 시 같이 합성이 되고 있기에 항진균 활성을 갖는 물질에 대한 정확한 규명위해서는 region 22의 생합성 유전자군의 knock-out를 함께 진행하는 추가실험이 필요할 것으로 예상

(2) Inha501의 항진균 활성을 나타내는 region 22(ECO-02301 유사 cluster)의 생합성 유전자군의 분석
- Inha501의 region 22와 ECO-02301 생합성 유전자군의 비교

Bioinformatic analysis을 통해 region 22의 생합성 유전자군과 ECO-02301의 생합성 유전자군의 비교를 통해 예측구조를 도출

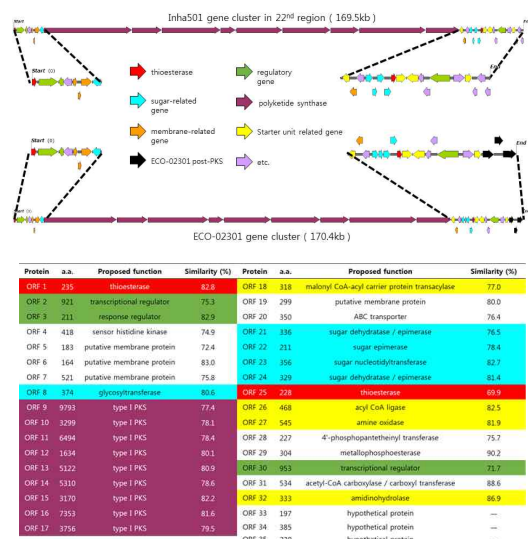


그림 54. Bioinformatic analysis을 이용한 Inha501 region 22과 ECO-02301의 생합성 유전자군의 비교

2차년도 (2019)

항진균제
생합성 및
조절
유전자
특성 규명
및
유전자군
분리
(인하대학
교)

미생물제제
후보
방선균의
특성 분석 및
유전자
조작기술
시스템 구축

균주의
항진균
생합성
유전자군의
규명

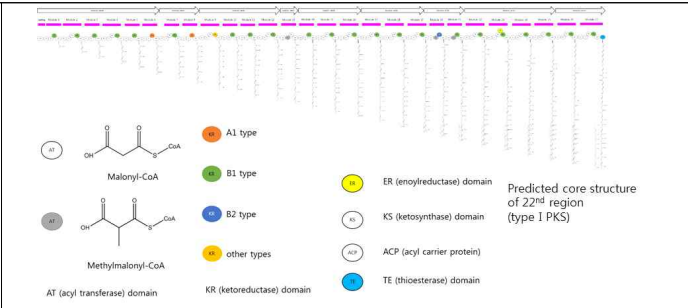


그림 55. Inha501 region 22의 PKS 분석에 따른 Backbone 예측

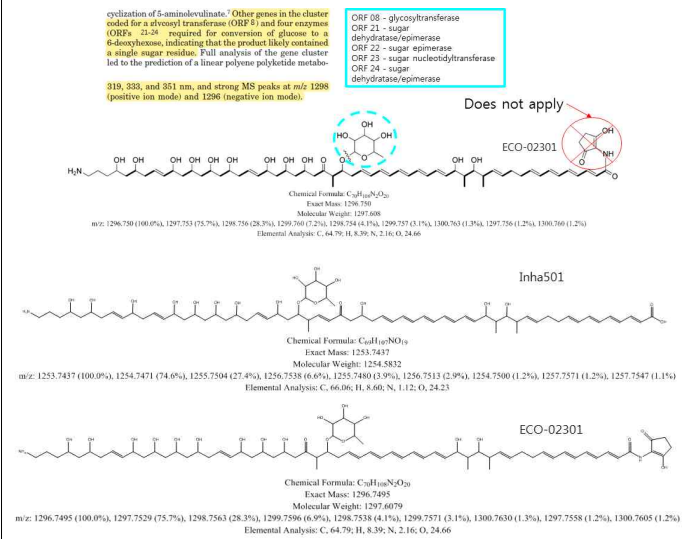


그림 56. Inha501 region 22의 예측구조와 ECO-02301의 구조비교

- Inha501의 region 22의 생합성 유전자군의 규명을 위한 유전자 knock-out

polyene compound의 생합성과정 중 가장 기본이 되는 뼈대를 만드는 PKS 유전자의 Knock-out를 통해 실제 region 22가 항진균 활성을 나타내는 물질의 생합성 유전자군임을 확인하고자 진행

그림 57과 같이 **Homologous Recombination**을 이용한 **knock-out**을 유도하였고 PCR을 이용해 **Genetic Confirmation**까지 완료

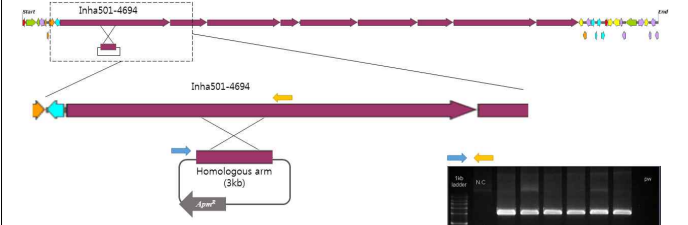


그림 57. Homologous recombination의 유전자 조작을 통한 Inha501 region 22의 PKS Knock-out 전략 및 PKS gene Knock-out 확인 (Genetic Confirmation)

2차
년도
(2019)

항진균제
생합성 및
조절
유전자
특성 규명
및
유전자군
분리
(인하대학
교)

미생물제제
후보
방선균의
특성 분석 및
유전자
조작기술
시스템 구축

균주의
항진균
생합성
유전자군의
규명

비교 배양을 통해 region 22가 항진균 활성을 나타내는 물질과 관련된 생합성 유전자군임을 확인

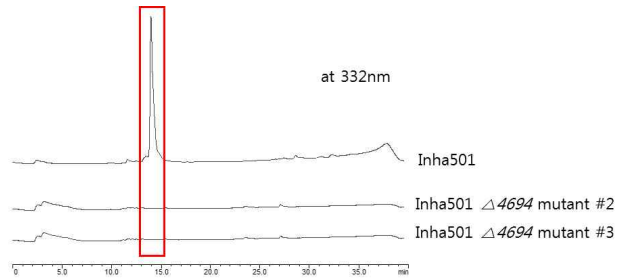


그림 58. HPLC분석을 통해 Inha501 region 22은 ECO-02301 유사 Cluster의 생합성 유전자군임을 확인한 비교배양결과

Inha501의 항진균 활성을 나타내는 생합성 유전자군이 2개 이상으로 확인이 되었으며 region 5의 생합성 유전자군에서 합성될 것이라 예상되는 polyene compound가 배양 시 같이 합성이 되고 있기에 항진균 활성을 갖는 물질에 대한 정확한 규명위해서는 region 5의 생합성유전자군의 knock-out를 함께 진행하는 추가실험이 필요할 것으로 예상

(3) Inha502의 항진균 활성을 가질 것이라 예상하는 region 1 (FR-008 유사 cluster)의 생합성 유전자군의 분석

- Inha502의 region 1와 FR-008 생합성 유전자군의 비교

Bioinformatic analysis을 통해 region 1의 생합성 유전자군과 FR-008의 생합성 유전자군의 비교를 통해 예측구조를 도출

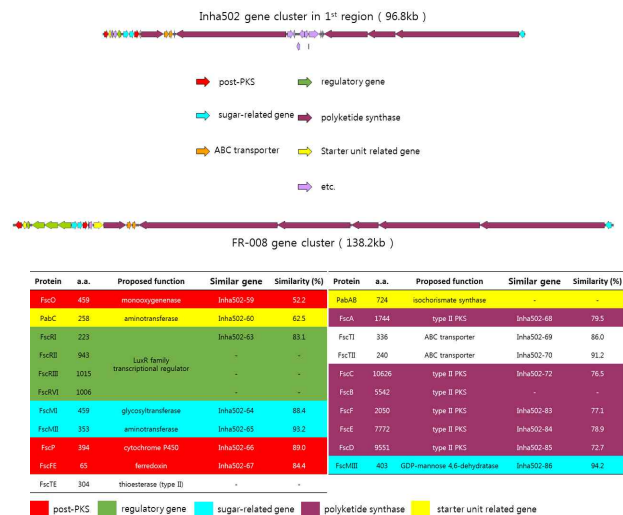


그림 59. Bioinformatic analysis을 이용한 Inha502 region 1과 FR-008의 생합성 유전자군의 비교

2차
년도
(2019)

항진균제
생합성 및
조절
유전자
특성 규명
및
유전자군
분리
(인하대학
교)

미생물제제
후보
방선균의
특성 분석 및
유전자
조작기술
시스템 구축

균주의
항진균
생합성
유전자군의
규명

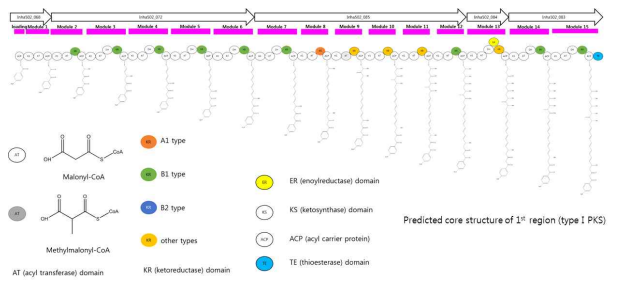


그림 60. Inha502 region 1의 PKS 분석에 따른 Backbone 예측

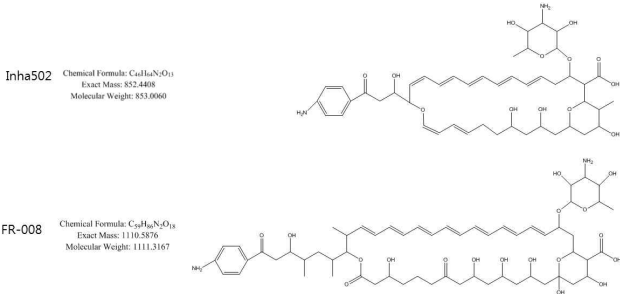


그림 61. Inha502 region 1의 예측구조와 FR-008의 구조비교

- Inha502의 region 1의 생합성 유전자군의 규명을 위한 유전자 knock-out

polyene compound의 생합성과정 중 가장 기본이 되는 뼈대를 만드는 PKS 유전자의 Knock-out를 통해 실제 region 1가 항진균 활성을 나타내는 물질의 생합성 유전자군인지 확인하고자 진행

그림 62과 같이 Homologous Recombination을 이용한 knock-out을 진행 중

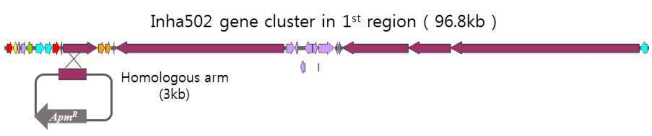


그림 62. Homologous recombination의 유전자 조작을 통한 Inha502 region 1의 PKS Knock-out 전략

2차
년도
(2019)

항진균제
생합성 및
조절
유전자
특성 규명
및
유전자군
분리
(인하대학
교)

미생물제제
후보
방선균의
특성 분석 및
유전자
조작기술
시스템 구축

방선균 BAC
vector
system을
이용한 거대
항진균
물질의
생합성
유전자군
분리

- 확인된 Inha501 region 5 (약 80kb)와 Inha502 region 22 (약 170kb)의 생합성 유전자군을 분리

생합성 유전자군을 분리하고자 BAC library 구축 후 그림 63과 같은 3곳에 Check Primer를 제작하여 PCR을 이용한 Genetic Confirmation을 진행하였고 원하는 cluster가 온전히 포함된 Positive Colony 확보

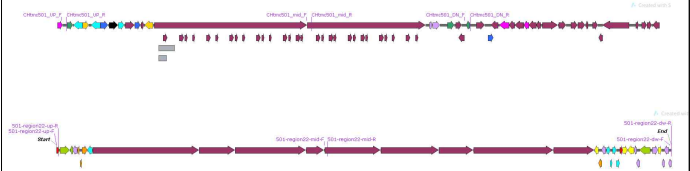
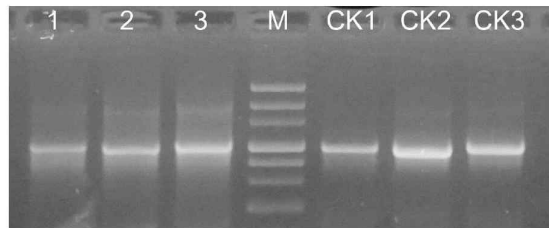


그림 63. Inha501 region 5, region 22의 생합성 유전자군과 3곳의 Check Primer

Name of positive clones	PCR result			Insert size (Kb)
	CHtmc 501 Up (CK1)	CHtmc 501 Middle (CK2)	CHtmc 501 Down (CK3)	
5876 plate02 4N	+	+	+	210 (1 fragment)

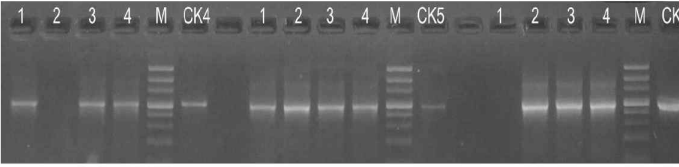
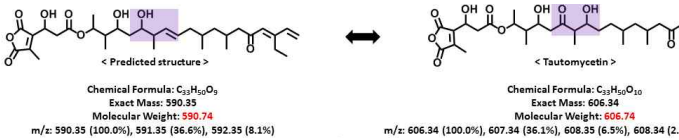
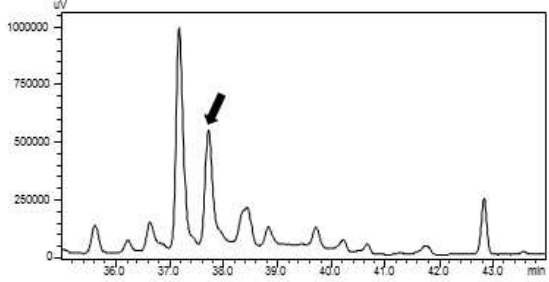
Name of positive clones	PCR result			Insert size (Kb)
	501-region22 Up (CK4)	501 region22 Middle (CK5)	501 region22 Down (CK6)	
5876 plate06 2K	+	+	-	185 (1 fragment)
5876 plate06 10P	-	+	+	210 (2 fragments)
5876 plate05 22N	+	+	+	210 (2 fragments)
5876 plate02 24A	+	+	+	200 (1 fragment)

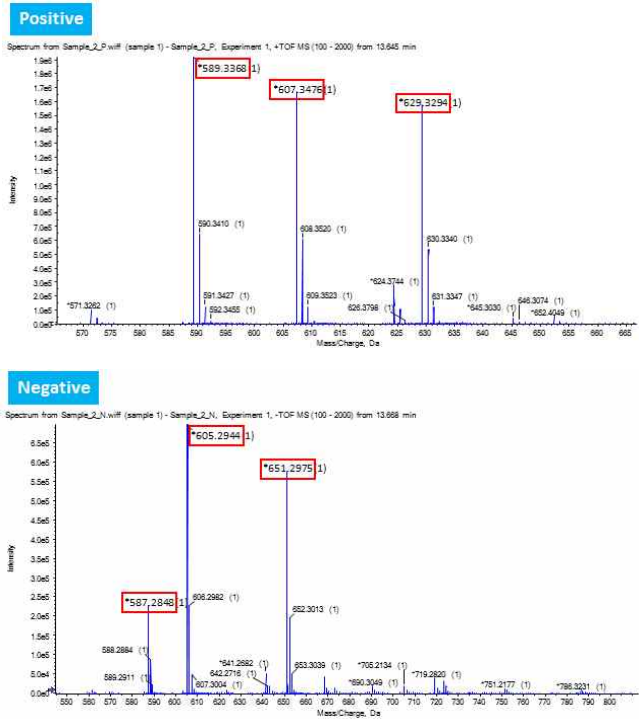
그림 64. BAC library 구축 후 Check Primer를 이용한 genetic confirmation 결과



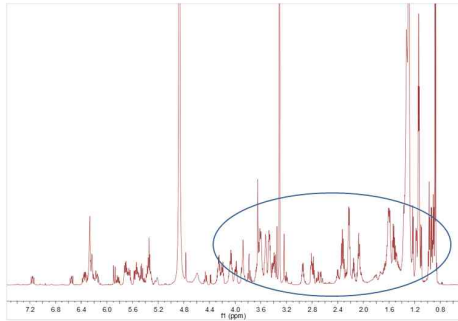
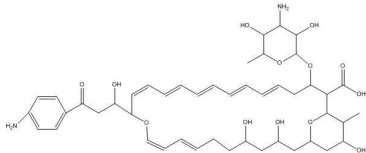
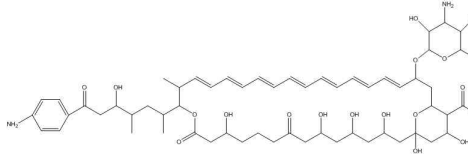
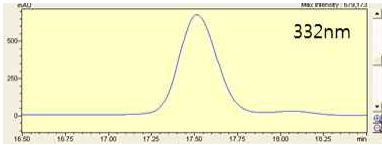
Lanes 1, 2, 3 = Clone 5876 plate02 4N PCR results with CK 1, 2 3 respectively
 CK1= positive control with genomic DNA + CHtmc 501up
 CK2= positive control with genomic DNA + CHtmc 501Middle
 CK3= positive control with genomic DNA + CHtmc 501down
 M=Bio ST 200bp marker (Cat. M200-8R)

그림 65. Inha501 region 5 모든 생합성 유전자군이 있는 colony(5876 plate 02 4N)의 Genetic Confirmation

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리 (인하대학 교)</p>	<p>미생물제제 후보 방선균의 특성 분석 및 유전자 조작기술 시스템 구축</p>	<p>방선균 BAC vector system을 이용한 거대 항진균 물질의 생합성 유전자군 분리</p>	 <p>Lane 1= Clone 5876 plate06 2K, Lane 2= Clone 5876 plate06 10P Lane 3= Clone 5876 plate05 22N4, Lane= 5876 plate02 24A CK4= positive control with genomic DNA 501-region22 up CK5= positive control with genomic DNA 501 region22 Middle CK6= positive control with genomic DNA 501 region22 down M=Bio ST 200bp marker (Cat. M200-8R)</p> <p>그림 66. Inha501 region 22 모든 생합성 유전자군이 있는 colony(5876 plate 05 22N, 5876 plate 02 24A)의 Genetic Confirmation</p> <p>Inha501 chromosomal DNA안 region 5, region 22의 생합성 유전자군을 포함한 vector와 유전자 조작기술을 이용하여 확보된 생합성 유전자군의 이종숙주발현을 통해 관련유전자의 더 정확한 규명을 할 예정이며 cell factory 균주에 도입을 시켜 고생산 균주 확보를 위한 실험을 실시할 예정</p>
	<p>활성을 나타내는 신규물질의 구조 및 특성 규명</p>	<p>측정된 분자량과 예측된 구조의 분자량 비교</p>	<p>(1) Inha501의 region 5의 분석</p> <p>- Bioinformatic analysis를 통해 그림 67의 왼쪽과 같이 예측이 되었고 염기서열상으로 비슷한 TMC의 구조는 그림 67의 오른쪽으로 규명 (예측된 구조의 분자량은 590.74이며 TMC의 분자량은 606.34로 확인)</p> <div data-bbox="746 1249 1428 1388">  <p>< Predicted structure > Chemical Formula: C₃₃H₅₂O₉ Exact Mass: 590.35 Molecular Weight: 590.74 m/z: 590.35 (100.0%), 591.35 (36.6%), 592.35 (8.1%)</p> <p>< Teutomycin > Chemical Formula: C₃₃H₅₂O₁₀ Exact Mass: 606.34 Molecular Weight: 606.74 m/z: 606.34 (100.0%), 607.34 (36.1%), 608.35 (6.5%), 608.34 (2.1%)</p> </div> <p>그림 67. Inha501 region 5의 예측 구조와 TMC의 구조 및 분자량 비교</p> <p>- High Resolution Mass analysis의 결과 예측된 구조가 아닌 TMC와 같은 분자량으로 측정됨을 확인</p> <div data-bbox="805 1556 1356 1836">  </div> <p>그림 68. Inha501 region 5의 HPLC 분석결과 (표시된 peak를 정제하여 mass analysis 진행)</p>	

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리 (인하대학 교)</p>	<p>활성을 나타내는 신규물질의 구조 및 특성 규명</p>	<p>측정된 분자량과 예측된 구조의 분자량 비교</p>	<p>그림 69와 같이 positive ion mode에서는 분자량이 607.35정도로 분석되었고 negative ion mode에서는 분자량이 605.29정도로 분석됨을 확인하여 예측된 구조의 분자량보다는 TMC의 분자량과 일치하는 것을 확인</p>  <p>그림 69. Inha501 region 5의 TMC 유사 cluster 관련 생산되는 물질의 Mass analysis 결과 (Positive Ion Mode, Negative Ion Mode 분석그래프)</p> <p><u>Inha501의 region 5은 TMC 유사 cluster이 아닌 유전자 배열이 다른 TMC cluster이며 Inha501은 TMC를 생산하는 신규 균주로 판단됨</u></p> <p>(2) Inha501의 region 22의 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bioinformatic analysis를 통해 그림 70과 같이 예측이 되었고 염기서열상으로 비슷한 ECO-02301의 구조는 그림 70의 아래쪽으로 규명 (예측된 구조의 분자량은 1253.74이며 ECO-02301의 분자량은 1296.75로 확인)
-----------------------------	---	--	--	---

<p>2차 년도 (2019)</p> <p>항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리 (인하대학 교)</p>	<p>활성을 나타내는 신규물질의 구조 및 특성 규명</p>	<p>측정된 분자량과 예측된 구조의 분자량 비교</p>	<div data-bbox="778 174 1391 436"> <p>Inha501 Chemical Formula: C₆₁H₁₀₇NO₁₉ Exact Mass: 1253.7437 Molecular Weight: 1254.5832 m/z: 1253.7437 (100.0%), 1254.7471 (74.6%), 1255.7504 (27.4%), 1256.7538 (6.6%), 1255.7480 (3.9%), 1256.7513 (2.9%), 1254.7500 (1.2%), 1257.7571 (1.2%), 1257.7547 (1.1%) Elemental Analysis: C, 66.06; H, 8.66; N, 1.12; O, 24.23</p> <p>ECO-02301 Chemical Formula: C₆₁H₁₀₄N₂O₂₀ Exact Mass: 1296.7495 Molecular Weight: 1297.6079 m/z: 1296.7495 (100.0%), 1297.7529 (75.7%), 1298.7563 (28.3%), 1299.7596 (6.9%), 1298.7538 (4.1%), 1299.7571 (3.1%), 1300.7630 (1.3%), 1297.7558 (1.2%), 1300.7605 (1.2%) Elemental Analysis: C, 64.79; H, 8.39; N, 2.16; O, 24.66</p> </div> <p>그림 70. Inha501 region 22의 예측 구조와 ECO-02301의 구조 및 분자량 비교</p> <p>- High Resolution Mass analysis의 결과 예측된 구조와 분자량이 일치하지 않음을 확인</p> <div data-bbox="906 645 1257 801"> </div> <p>그림 71. Inha501 region 22의 생합성 유전자군에서 생산되는 항진균 활성 물질의 2차 정제 후 HPLC 분석결과 (표시된 peak를 정제하여 mass analysis 진행)</p> <div data-bbox="778 945 1391 1249"> </div> <p>그림 72. Inha501 region 22의 생합성 유전자군에서 생산되는 항진균 활성 물질의 예측 구조와 Mass analysis의 측정된 결과</p> <p>예측된 구조의 분자량과 측정된 분자량은 일치하지 않는 것을 확인하였고 정확한 구조분석을 위해 ¹H과 ¹³C NMR분석 진행 중</p> <p>- ¹H과 ¹³C NMR분석을 위한 compound의 정제 NMR분석을 위해 (중국 상하이 교통대의 Shuangjun Lin 교수님 연구팀과 협력하여) 순수한 compound만을 얻기 위한 여러 정제과정을 진행하면서 확인 작업 진행 중</p> <div data-bbox="790 1680 1375 1915"> </div> <p>그림 73. Inha501 region 22의 생합성 유전자군에서 생산되는 항진균 활성 물질의 정제 후 TLC 결과 및 물질 별 HPLC 분석 결과</p>
---	--	--	---

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리 (인하대학 교)</p>	<p>활성을 나타내는 신규물질의 구조 및 특성 규명</p>	<p>측정된 분자량과 예측된 구조의 분자량 비교</p>	<p>- ^1H과 ^{13}C NMR분석</p> <p>^1H NMR분석은 아래의 그림과 같이 데이터 값은 도출을 하였고 이 값을 이용하여 정확한 구조를 밝히기 위해 분석을 진행 중이며 더 순수한 물질을 얻기 위해 추가적인 정제과정 이후에 ^{13}C NMR분석을 진행할 예정</p>  <p>그림 74. Inha501 region 22의 생합성 유전자군에서 생산되는 항진균 활성 물질의 ^1H NMR 분석 결과</p> <p>(3) Inha502의 region 1의 분석</p> <p>- Bioinformatic analysis를 통해 아래 그림과 같이 예측이 되었고 염기서열상으로 비슷한 FR-008의 구조는 그림의 아래쪽으로 규명 (예측된 구조의 분자량은 852.44이며 FR-008의 분자량은 1110.59로 확인)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="751 1189 943 1234"> <p>Inha502 Chemical Formula: $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{13}$ Exact Mass: 852.4408 Molecular Weight: 853.0060</p> </div> <div data-bbox="983 1133 1350 1285">  </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div data-bbox="751 1361 943 1406"> <p>FR-008 Chemical Formula: $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_{18}$ Exact Mass: 1110.5876 Molecular Weight: 1111.3167</p> </div> <div data-bbox="959 1294 1428 1447">  </div> </div> <p>그림 75. Inha502 region 1의 예측 구조와 FR-008의 구조 비교 및 분자량 비교</p> <p>- High Resolution Mass analysis의 결과 예측된 구조와 분자량이 일치하지 않음을 확인</p>  <p>그림 76. Inha502 region 1의 생합성 유전자군에서 생산되는 항진균 활성 물질의 2차 정제 후 HPLC 분석결과 (표시된 peak를 정제하여 mass analysis 진행)</p>
-----------------------------	---	--	--	--

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리 (인하대학 교)</p>	<p>활성을 나타내는 신규물질의 구조 및 특성 규명</p>	<p>측정된 분자량과 예측된 구조의 분자량 비교</p>	<div data-bbox="778 232 1412 459"> </div> <p>그림 77. Inha502 region 1의 생합성 유전자군에서 생산되는 항진균 활성 물질의 예측 구조와 Mass analysis의 측정된 결과</p> <p>예측된 구조의 분자량과 측정된 분자량은 일치하지 않는 것을 확인하였고 정확한 구조분석을 위해 ^1H과 ^{13}C NMR 분석 진행</p> <p>- ^1H과 ^{13}C NMR 분석을 위한 compound의 정제 NMR 분석을 위해 (한국 선문대 송재경 교수님 연구팀과 협력하여) 순수한 compound만을 얻기 위한 여러 정제과정을 진행하면서 확인 작업 진행 중</p> <div data-bbox="766 929 1396 1288"> </div> <p>그림 78. Inha502 region 1의 생합성 유전자군에서 생산되는 항진균 활성 물질의 정제 전과 후의 HPLC 분석 결과 비교 (정제 전 - 왼쪽, 정제 후 - 오른쪽)</p> <p>- ^1H과 ^{13}C NMR 분석 ^1H과 ^{13}C NMR 분석은 아래의 그림과 같이 데이터 값은 도출을 하였고 이 값을 이용하여 정확한 구조를 밝히기 위해 분석을 진행 중</p> <div data-bbox="758 1624 1404 1848"> </div> <p>그림 79. Inha502 region 1의 생합성 유전자군에서 생산되는 항진균 활성 물질의 ^1H NMR과 ^{13}C NMR 분석 결과</p>
-----------------------------	---	--	--	---

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>항진균제 생합성 및 조절 유전자 특성 규명 및 유전자군 분리 (인하대학 교)</p>	<p>여러 종류의 진균에 대한 항진균 활성 확인</p>	<p>항진균 활성을 확인하고자 하는 식물병원성 진균의 선별</p>	<p>다양한 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성 테스트를 통해 미생물 제제로의 가능성을 확인하는 실험을 진행</p> <p>- 항진균 활성을 확인하고자 하는 다양한 식물병원성 진균</p> <p>추가적으로 농촌진흥청 국립농업과학원을 통해 식물병원성 진균 10종과 KCTC, ATCC를 통해 식물병원성 진균 3종을 선정하여 기존과 합쳐 총 15종의 진균에 대한 항진균 활성을 확인하고자 계획하고 진행함</p> <p><i>Fusarium oxysporum</i> (KCTC 46453, KACC 40051, KACC 42795), <i>Fusarium solani</i> (KACC 44891), <i>Fusarium graminearum</i> (KACC 47495), <i>Fusarium verticillioides</i> (KCTC 16672), <i>Fusarium semitectum</i> (KCTC 6065), <i>Alternaria alternata</i> (KACC 40019), <i>Botrytis cinerea</i> (KACC 40574), <i>Phytophthora cactorum</i> (KACC 40166), <i>Rhizoctonia cerealis</i> (KACC 40153), <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (KACC 4003), <i>Curvularia lunata</i> (KACC 40861), <i>Aspergillus niger</i> (ATCC 9642), <i>Candida albicans</i> (ATCC 14053)</p>  <table border="1" data-bbox="778 1411 1385 1541"> <tbody> <tr> <td>KACC.</td> <td>40051</td> <td>42795</td> <td>44891</td> <td>47495</td> <td>40003</td> </tr> <tr> <td>Scientific name</td> <td><i>Fusarium oxysporum</i></td> <td><i>Fusarium oxysporum</i></td> <td><i>Fusarium solani</i></td> <td><i>Fusarium graminearum</i></td> <td><i>Colletotrichum gloeosporioides</i></td> </tr> <tr> <td>KACC.</td> <td>40153</td> <td>40166</td> <td>40574</td> <td>40861</td> <td>40019</td> </tr> <tr> <td>Scientific name</td> <td><i>Rhizoctonia cerealis</i></td> <td><i>Phytophthora cactorum</i></td> <td><i>Botrytis cinerea</i></td> <td><i>Curvularia lunata</i></td> <td><i>Alternaria alternata</i></td> </tr> </tbody> </table>  <p><i>F. verticillioides</i> <i>F. semitectum</i> <i>A. niger</i></p> <p>그림 80. 항진균 활성테스트에 사용 된 다양한 식물병원성 진균의 초기상태</p>	KACC.	40051	42795	44891	47495	40003	Scientific name	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KACC.	40153	40166	40574	40861	40019	Scientific name	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	<i>Phytophthora cactorum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Alternaria alternata</i>
KACC.	40051	42795	44891	47495	40003																							
Scientific name	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>																							
KACC.	40153	40166	40574	40861	40019																							
Scientific name	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	<i>Phytophthora cactorum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Alternaria alternata</i>																							

2차
년도
(2019)

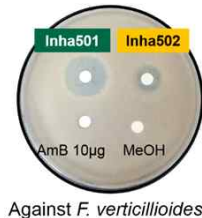
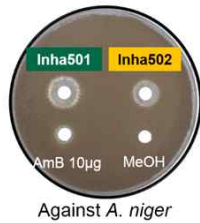
항진균제
생합성 및
조절
유전자
특성 규명
및
유전자군
분리
(인하대학
교)

여러 종류의
진균에 대한
항진균 활성
확인

여러 종류의
진균에 대한
항진균 활성
확인

- Inha501, Inha502의 acetone 추출물을 이용한 진균에
대한 활성 확인

left **Inha501** right **Inha502** extraction 10ul (1x, 5x, 25x dilution)
P.C. - AmB 10ug, N.C. MeOH



Scientific name	disease	antifungal activity	
		Inha501	Inha502
<i>Candida albicans</i>	-	++	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	fusarium wilt	++	++
<i>Fusarium graminearum</i>	fusarium head blight	+++	+++
<i>Fusarium verticillioides</i>	bakanae disease	+++	++
<i>Fusarium semitectum</i>	fusarium blight	++	++
<i>Fusarium solani</i>	fusarium rot	+	++
<i>Aspergillus niger</i>	black mold rot	++	+
<i>Alternaria alternata</i>	leaf spot	+	++
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	bitter rot	+++	+++
<i>Curvularia lunata</i>	ear blight	+++	+++

(The antifungal activity was determined based on the active ring size (++) of Inha501 against *A. niger*)

그림 81. 다양한 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성테스트 결과

배양이 되지 않은 *Botrytis cinerea* (KACC 40574), *Phytophthora cactorum* (KACC 40166), *Rhizoctonia cerealis* (KACC 40153)을 제외하고 항진균 활성 테스트를 진행한 모든 진균에서 활성을 보이는 것을 확인

Inha501, Inha502이 미생물제제로서의 다양한 활용이 가능하다는 연구결과로서 보호 작물의 범위가 넓을 것으로 예상됨

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (한국생산 기술연구원)</p>	<p>항진균제 최적 생산을 위한 방선균 배양공정 최적화</p>	<p>Inha501, Inha502 균주의 배양 최적화</p>	<p>주관기관에서 스크리닝한 우수 폴리엔 생산 균주인 Inha501 및 Inha502를 대상으로 생산성 향상을 위한 배지 및 배양조건 최적화를 수행</p> <p>(1) 고체 배양에서 액상 배양으로의 접종량 최적화</p> <ul style="list-style-type: none"> - M3 plate에서 Inha501, Inha502 균주를 5일 정도 배양한 것으로부터 성장 배양으로 접종할 때 M3 plate의 고체 배지 조각을 1조각부터 4조각까지 각각 성장 배양을 30 mL 플라스크에서 30℃, 200 rpm의 조건에서 3일 동안 진행 <table border="1" data-bbox="833 712 1331 963"> <thead> <tr> <th>M3 plate composition</th> <th>g/L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Starch soluble</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>Agar</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>Soytone</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Glucose</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>CaCO₃</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>FeSO₄ · 7H₂O</td> <td>0.2</td> </tr> </tbody> </table> <p>표 1. M3 plate 조성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 각각의 배양액으로 건조균체중량을 측정하여 세포의 성장을 비교 <table border="1" data-bbox="833 1137 1331 1675"> <thead> <tr> <th>균주-조각 개수</th> <th>건조균체중량(g/L)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>501-1</td><td>0.33</td></tr> <tr><td>501-1</td><td>3.33</td></tr> <tr><td>501-2</td><td>3.33</td></tr> <tr><td>501-2</td><td>5.67</td></tr> <tr><td>501-3</td><td>4</td></tr> <tr><td>501-3</td><td>4.33</td></tr> <tr><td>501-4</td><td>2</td></tr> <tr><td>501-4</td><td>-</td></tr> <tr><td>502-1</td><td>3.67</td></tr> <tr><td>502-1</td><td>4.33</td></tr> <tr><td>502-2</td><td>5</td></tr> <tr><td>502-2</td><td>4.67</td></tr> <tr><td>502-3</td><td>4</td></tr> <tr><td>502-3</td><td>-</td></tr> <tr><td>502-4</td><td>3.33</td></tr> <tr><td>502-4</td><td>8.67</td></tr> </tbody> </table> <p>표 2. 고체배지 접종량별 건조균체중량</p> <ul style="list-style-type: none"> - 그 결과 고체배지로부터 접종한 조각의 수에 세포의 질량 농도가 정비례하는 것은 아니지만 대체로 접종량이 클수록 건조균체중량도 큰 것으로 판단 - 이 실험 이후의 모든 성장 배양은 각 고체 배지에서 가로 × 세로 = 약 1 cm × 1 cm로 통일하여 접종하여 진행 	M3 plate composition	g/L	Starch soluble	20	Agar	20	Soytone	10	Glucose	10	CaCO ₃	3	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	균주-조각 개수	건조균체중량(g/L)	501-1	0.33	501-1	3.33	501-2	3.33	501-2	5.67	501-3	4	501-3	4.33	501-4	2	501-4	-	502-1	3.67	502-1	4.33	502-2	5	502-2	4.67	502-3	4	502-3	-	502-4	3.33	502-4	8.67
M3 plate composition	g/L																																																			
Starch soluble	20																																																			
Agar	20																																																			
Soytone	10																																																			
Glucose	10																																																			
CaCO ₃	3																																																			
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.2																																																			
균주-조각 개수	건조균체중량(g/L)																																																			
501-1	0.33																																																			
501-1	3.33																																																			
501-2	3.33																																																			
501-2	5.67																																																			
501-3	4																																																			
501-3	4.33																																																			
501-4	2																																																			
501-4	-																																																			
502-1	3.67																																																			
502-1	4.33																																																			
502-2	5																																																			
502-2	4.67																																																			
502-3	4																																																			
502-3	-																																																			
502-4	3.33																																																			
502-4	8.67																																																			

방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (한국생산기술연구원)

항진균제 최적 생산을 위한 방선균 배양공정 최적화

Inha501, Inha502 균주의 배양 최적화

(2) 배양 플라스크 종류 최적화

- 성장 배양을 할 때 플라스크의 모양에 따라서 공기가 배양액 중의 세포에 노출시키는 양이 달라져서 배양 조건이 변화
 그러므로 일반적인 모양의 플라스크와 보다 원활한 기체 전달을 위해 비교적 작은 흡이 파여 있는 플라스크, 또 큰 흡이 있는 플라스크로 3개의 플라스크를 가지고 실험을 진행
 (1)번 실험과 마찬가지로 M3 plate에 있는 501, 502 균주로부터 고체 배지를 잘라서 성장 배양을 진행

균주+플라스크 종류	건조균체중량(g/L)
501 일반	3.33
501 작은 흡	7.33
501 큰 흡	7
502 일반	2.33
502 작은 흡	10.7
502 큰 흡	4.33

표 3. 배양 플라스크별 건조균체중량

- 일반 플라스크보다 흡이 있는 플라스크에서 세포의 성장이 훨씬 높게 이루어졌다고 판단
 본 실험 이후 모든 성장배양은 작은 흡이 달린 플라스크에 바깥과 공기가 비교적 잘 통하는 스토퍼 (stopper) 뚜껑을 이용하여 진행
 이 결과는 추후 scale-up 과정에서도 산소 전달 효율이 주요한 인자로 고려되어야 함을 확인

(3) 성장배양액에서 생산배양으로의 접종량 최적화

- 성장배양액으로부터 생산배양을 할 때 각 플라스크별로 부피 30 mL로 배양
 그 과정에서 접종량을 1%와 5%, 그리고 10%(v/v)로 변화시키며 실험을 진행하고 그 후 배양액으로 건조균체중량을 측정

	501균주 접종량	건조균체중량 (g/L)	502균주 접종량	건조균체중량 (g/L)
성장배양	1%	4	1%	7
성장배양	5%	6.3	5%	5.3
성장배양	10%	7	10%	6.7
생산배양	1%	17	1%	21.3
생산배양	5%	14	5%	17.7
생산배양	10%	14.3	10%	18.7

표 4. 성장배양액의 접종량별 건조균체중량

방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (한국생산기술연구원)

항진균제 최적 생산을 위한 방선균 배양공정 최적화

Inha501, Inha502 균주의 배양 최적화

- 성장 및 생산 배양 모두에서 접종량에 따른 세포 성장량에 있어 뚜렷한 경향성을 확인할 수는 없었고 적정 접종량을 10%로 정하고 이후 실험들을 진행

G.S.S broth composition	g/L
Soybean flour	25
Glucose	20
Starch soluble	10
Yeast extract	4
NaCl	2
CaCO ₃	2
Beef extract	1
K ₂ HPO ₄	0.25

표 5. G.S.S broth 조성

- 상기 실험을 통해 확인된 플라스크 수준에서의 최적 배양 프로토콜

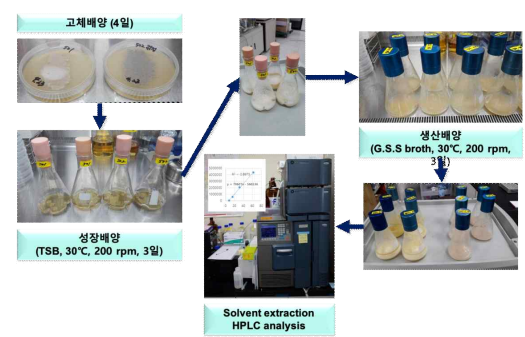


그림 82. 최적화된 플라스크 수준의 Inha501, Inha502 균주 배양 및 폴리엔 생산 과정

(4) Inha502 균주 morphology control

- 그림 83에서와 같이 M3 plate에서 502 균주를 계대배양 하던 중에 기존의 검정색 콜로니뿐만 아니라 노란 빛의 콜로니, 회색 콜로니, 그리고 하얀 색의 콜로니가 함께 발견

- 502 균주가 아닌 외부의 균이나 곰팡이가 유입되어 오염이 된 경우도 있지만 502 균주가 돌연변이가 일어나서 우리가 원하는 polyene의 생산을 할 수도 있다는 가능성을 열어두고 각 콜로니 색상 별로 계대배양을 진행

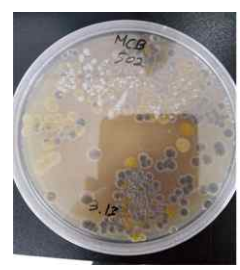
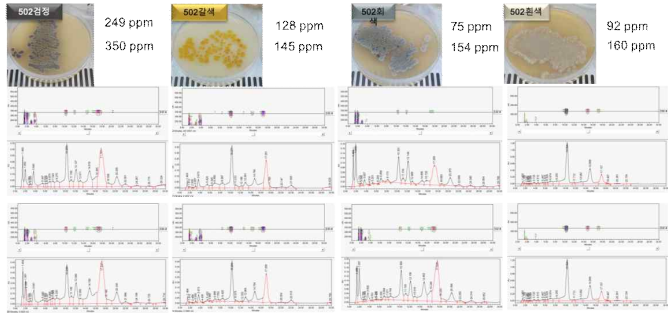
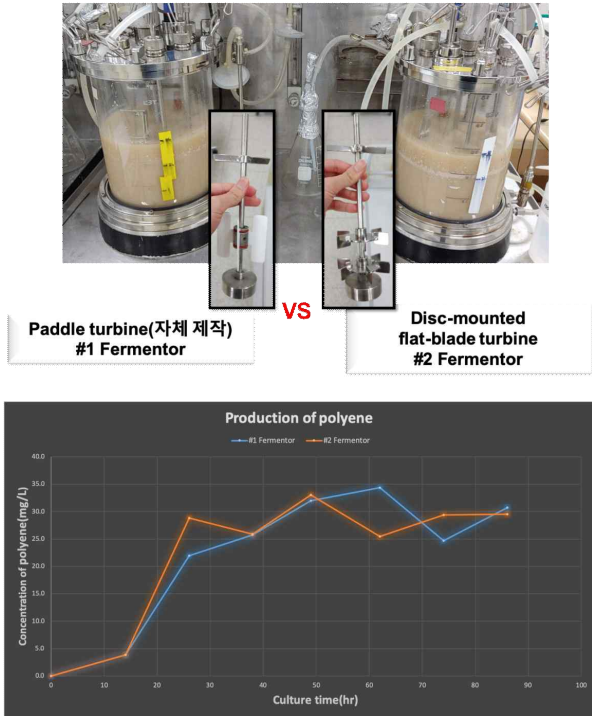


그림 83. 다양한 색을 띠는 Inha502 균주의 콜로니

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (한국생산 기술연구원)</p>	<p>항진균제 최적 생산을 위한 방선균 배양공정 최적화</p>	<p>Inha501, Inha502 균주의 배양 최적화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 502 균주로부터 파생된 4가지 색의 균주가 존재한다고 가정하여 검정색(원래 502균주), 갈색, 회색, 그리고 흰색의 502 균주를 각각 구분하여 계대배양을 진행 - 원래 콜로니가 지니고 있는 색이 그대로 다음 세대에서도 확인되었고 각 균주별 특성을 확인하고자 성장 배양을 진행하고 건조균체중량을 측정 <table border="1" data-bbox="790 593 1380 1003"> <thead> <tr> <th>Sample name</th> <th>건조균체농도 (g/L)</th> <th>건조균체농도 평균(g/L)</th> <th>표준편차</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>502 검정</td> <td>10.3</td> <td rowspan="3">10.9</td> <td rowspan="3">0.96</td> </tr> <tr> <td>502 검정</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>502 검정</td> <td>10.3</td> </tr> <tr> <td>502 갈색</td> <td>6.3</td> <td rowspan="3">12.8</td> <td rowspan="3">7.49</td> </tr> <tr> <td>502 갈색</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td>502 갈색</td> <td>21</td> </tr> <tr> <td>502 회색</td> <td>24.3</td> <td rowspan="3">20.8</td> <td rowspan="3">8.88</td> </tr> <tr> <td>502 회색</td> <td>10.7</td> </tr> <tr> <td>502 회색</td> <td>27.3</td> </tr> <tr> <td>502 흰색</td> <td>19</td> <td rowspan="3">19.3</td> <td rowspan="3">0.58</td> </tr> <tr> <td>502 흰색</td> <td>19</td> </tr> <tr> <td>502 흰색</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table> <p>표 6. 502 균주의 콜로니 색상별 건조균체농도</p> <ul style="list-style-type: none"> - 상기 결과는 회색 및 흰색 균주가 검정색 및 갈색 균주보다 세포 성장 속도가 높음을 보여주며 아래 그림 84에서 확인할 수 있는 바와 같이 콜로니 색상에 따른 폴리엔 생산량의 차이도 존재하였으며, 검은색 콜로니가 가장 높은 생산성을 나타내는 것을 확인  <p>그림 84. 콜로니 생상에 따른 Inha502 균주의 폴리엔 생산 농도</p> <ul style="list-style-type: none"> - 이를 통해 502 균주의 경우 콜로니 morphology에 따라 균주 성장 및 폴리엔 생산성에서 차이를 나타낼 수 있으며 미생물 배양 및 보관 과정에서의 morphology control 필요성을 확인 	Sample name	건조균체농도 (g/L)	건조균체농도 평균(g/L)	표준편차	502 검정	10.3	10.9	0.96	502 검정	12	502 검정	10.3	502 갈색	6.3	12.8	7.49	502 갈색	11	502 갈색	21	502 회색	24.3	20.8	8.88	502 회색	10.7	502 회색	27.3	502 흰색	19	19.3	0.58	502 흰색	19	502 흰색	20
Sample name	건조균체농도 (g/L)	건조균체농도 평균(g/L)	표준편차																																					
502 검정	10.3	10.9	0.96																																					
502 검정	12																																							
502 검정	10.3																																							
502 갈색	6.3	12.8	7.49																																					
502 갈색	11																																							
502 갈색	21																																							
502 회색	24.3	20.8	8.88																																					
502 회색	10.7																																							
502 회색	27.3																																							
502 흰색	19	19.3	0.58																																					
502 흰색	19																																							
502 흰색	20																																							

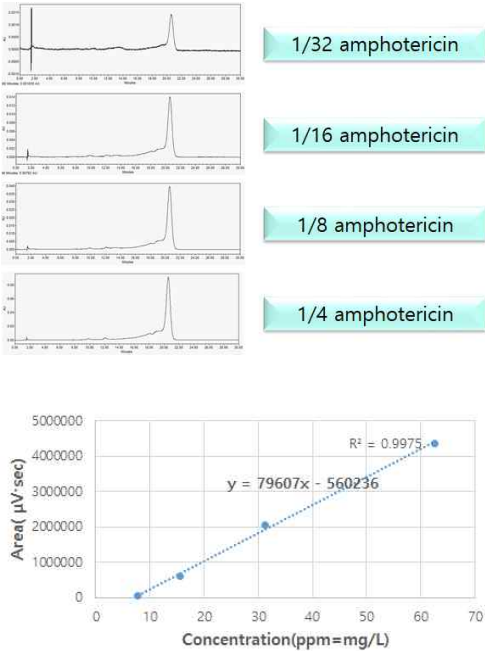
<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (한국생산 기술연구원)</p>	<p>항진균제 최적 생산을 위한 방선균 배양공정 최적화</p>	<p>Inha501, Inha502 균주의 배양 최적화</p>	<p>(5) 발효기 배양</p> <ul style="list-style-type: none"> - 플라스크 수준에서 최적화 된 균주의 배양을 스케일업 하고 작물 테스트 및 미생물제제 제형화에 필요한 cell 및 product의 확보를 위해 Inha501, Inha502 균주를 대상으로 발효기(6L) 배양을 수행 - 주요 배양 변수인 온도가 생산배양시 폴리엔 생산성에 미치는 영향을 확인하는 실험을 수행 <p>아래 그림 85에 도시된 바와 같이 플라스크에서 2단계 성장배양을 거친 후 발효기에서 생산배양을 진행 (G.S.S broth, 접종량 3%(v/v), 1 vvm 교반 속도는 DO를 모니터링하며 적절히 조절 pH는 5N NaOH를 이용하여 6.6-7.3 범위에서 조절 온도는 각각 25, 30, 33 ° C 배양을 진행)</p> <div data-bbox="790 878 1380 1146" data-label="Image"> </div> <p>그림 85. Inha502 균주의 발효기 배양 과정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 실험 결과 Inha502 균주의 경우 25° C에서 가장 높은 폴리엔 생산성을 나타내었으며 온도가 높아질수록 폴리엔 생산성은 감소하는 경향 나타냄 (최종 세포 농도는 10⁵~10⁶ cfu/mL 수준) <div data-bbox="785 1451 1380 1841" data-label="Figure"> <table border="1"> <caption>배양 온도별 polyene 생산성 비교</caption> <thead> <tr> <th>Culture time (hr)</th> <th>33°C (mg/L)</th> <th>30°C (mg/L)</th> <th>25°C (mg/L)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>50</td> <td>100</td> <td>150</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>100</td> <td>150</td> <td>200</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>100</td> <td>250</td> <td>350</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>100</td> <td>300</td> <td>400</td> </tr> <tr> <td>70</td> <td>130</td> <td>300</td> <td>450</td> </tr> <tr> <td>80</td> <td>110</td> <td>350</td> <td>450</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>110</td> <td>350</td> <td>450</td> </tr> </tbody> </table> </div> <p>그림 86. 배양 온도에 따른 Inha502 균주의 폴리엔 생산</p>	Culture time (hr)	33°C (mg/L)	30°C (mg/L)	25°C (mg/L)	0	0	0	0	10	0	0	0	20	50	50	50	30	50	100	150	40	100	150	200	50	100	250	350	60	100	300	400	70	130	300	450	80	110	350	450	90	110	350	450
Culture time (hr)	33°C (mg/L)	30°C (mg/L)	25°C (mg/L)																																													
0	0	0	0																																													
10	0	0	0																																													
20	50	50	50																																													
30	50	100	150																																													
40	100	150	200																																													
50	100	250	350																																													
60	100	300	400																																													
70	130	300	450																																													
80	110	350	450																																													
90	110	350	450																																													

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (한국생산 기술연구원)</p>	<p>항진균제 최적 생산을 위한 방선균 배양공정 최적화</p>	<p>Inha501, Inha502 균주의 배양 최적화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 다음으로 배양 중 산소의 전달 및 균주 morphology에 영향을 줄 수 있는 변수로서 impeller 종류에 따른 폴리엔 생산성 차이를 확인하는 실험을 수행 (G.S.S broth, 접종량 4%(v/v), 1 vvm 교반속도는 DO를 모니터링하며 적절히 조절 pH는 5N NaOH를 이용하여 6.7-7.3 범위에서 조절) - 실험 결과 impeller 종류에 따른 polyene 생산성 차이는 크지 않음을 확인 <div style="text-align: center;">  </div> <p>그림 87. Impeller 종류에 따른 Inha502 균주의 폴리엔 생산성 차이 실험 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 성장 배양을 통해 확보한 균주 자체를 미생물제제의 원료로 활용할 가능성을 고려하여 발효기를 이용한 성장 배양을 수행 (TSB broth, 접종량 4%(v/v), 1 vvm 교반 속도는 DO를 모니터링하며 적절히 조절 5N NaOH, 1M HCl을 이용하여 pH 6.2-7.3으로 조절) - 예상대로 성장배양 과정에서는 폴리엔이 생산되지 않았으며 세포 농도는 3.7×10^5 cfu/mL(Inha501) 및 6×10^5 cfu/mL(Inha502)로 각각 확인
-----------------------------	--	--	--	--

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (한국생산 기술연구원)</p>	<p>항진균제 최적 생산을 위한 방선균 배양공정 최적화</p>	<p>Inha501, Inha502 균주의 배양 최적화</p>	<div data-bbox="783 159 1378 600" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="831 611 1331 640">그림 88. 발효기를 이용한 균주의 성장 배양 실험</p> <p data-bbox="743 678 1428 840">- 상기 발효기 배양을 통해 확보한 균주 및 배양액은 아래 표 7과 같은 일정에 따라 <u>협력업체((주)한국식물환경연구소)에 전달하여 미생물제제의 유기농자재 병해관리용자재 등록실험에 활용</u></p> <table border="1" data-bbox="756 898 1407 1180"> <thead> <tr> <th>균주</th> <th>배양액</th> <th>배양 종류</th> <th>용량</th> <th>날짜</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Inha501</td> <td>성장</td> <td>Fermenter (5L)</td> <td>4L</td> <td>2019.7.9.</td> </tr> <tr> <td>Inha501</td> <td>생산</td> <td>Flask (3L)</td> <td>4L</td> <td>2019.7.2.</td> </tr> <tr> <td>Inha502</td> <td>성장</td> <td>Fermenter (5L)</td> <td>4L</td> <td>2019.7.2.</td> </tr> <tr> <td>Inha502</td> <td>생산</td> <td>Fermenter (5L)</td> <td>1차: 4L 2차: 2L</td> <td>1차: 2019.6.19. 2차: 2019.7.2.</td> </tr> </tbody> </table> <p data-bbox="815 1200 1347 1229">표 7. 실내검정을 위한 배양최적화 및 샘플제공 현황</p> <p data-bbox="592 1442 718 1559">폴리엔 분석 조건 확립</p> <p data-bbox="743 1272 1428 1771"> <ul style="list-style-type: none"> - 배양 조건의 최적화를 위해서는 정확한 분석 방법의 확립이 전제 - 이에 주관기관과 공동으로 Inha501 및 Inha502 균주에서 생산되는 폴리엔을 정성적으로 분석하기 위한 방법의 확립을 진행 <p>(1) 샘플 전처리 및 HPLC 분석 방법 최적화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기존 Inha502 균주의 접종량 별 배양 실험(표 4) 배양액을 원심분리기에 넣고 12,000 rpm에서 10분 간 가동 후 상등액 부분을 1,200μl 취하여 300μl의 1-butanol과 1시간 동안 섞어 폴리엔을 추출 </p>	균주	배양액	배양 종류	용량	날짜	Inha501	성장	Fermenter (5L)	4L	2019.7.9.	Inha501	생산	Flask (3L)	4L	2019.7.2.	Inha502	성장	Fermenter (5L)	4L	2019.7.2.	Inha502	생산	Fermenter (5L)	1차: 4L 2차: 2L	1차: 2019.6.19. 2차: 2019.7.2.
균주	배양액	배양 종류	용량	날짜																									
Inha501	성장	Fermenter (5L)	4L	2019.7.9.																									
Inha501	생산	Flask (3L)	4L	2019.7.2.																									
Inha502	성장	Fermenter (5L)	4L	2019.7.2.																									
Inha502	생산	Fermenter (5L)	1차: 4L 2차: 2L	1차: 2019.6.19. 2차: 2019.7.2.																									

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (한국생산 기술연구원)</p>	<p>향진균제 최적 생산을 위한 방선균 배양공정 최적화</p>	<p>폴리엔 분석 조건 확립</p>	<p>- 이때 butanol은 배양액과 육안으로도 구분이 되는 층을 이루게 되며 생산된 폴리엔은 butanol 층으로 녹아 들어가게 되고 butanol 층인 상등액 100μl를 추출하여 40$^{\circ}$C의 heat block에 넣고 overnight으로 질소 기체를 쏘여주면서 butanol을 증발시키고 그 후 ethanol 200 μl를 각각의 샘플에 넣고 LC tube에 담아서 HPLC 분석을 위한 최종 샘플로 사용</p> <p>- 이와 같은 일련의 과정을 전처리 과정이라고 하겠고 HPLC 분석 조건: Column: Zorbax SB-C18 / Column temperature: 60$^{\circ}$C Flow rate: 1 mL/min / Inlet temperature: 25$^{\circ}$C Mobile phase : A=0.05M ammonium acetate B=methanol (A:B=40:60)</p> <p>- 더불어 전처리 과정이 폴리엔 분석에 미치는 영향을 확인하기 위한 실험을 진행 이를 위해 전처리를 거치지 않은 250 ppm 농도의 amphotericin을 각각 1/4, 1/8, 1/16, 1/32로 희석하여 standard 방정식 작성 (표 8, 그림 89) 해당 식을 이용하여 전처리 과정을 거친 50 ppm amphotericin의 농도를 역산한 결과 6.3 ppm의 계산값을 얻을 수 있었고 현재 사용하고 있는 전처리 과정을 거치는 동안 폴리엔이 분해되거나 타 물질로 전환될 가능성이 있음을 확인하였고 보다 온건한 조건의 전처리가 필요할 것으로 판단</p> <table border="1" data-bbox="853 1344 1308 1630"> <thead> <tr> <th>Concentration (ppm=mg/L)</th> <th>Total area</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>7.8</td> <td>48000</td> </tr> <tr> <td>15.6</td> <td>604000</td> </tr> <tr> <td>31.2</td> <td>2062000</td> </tr> <tr> <td>62.5</td> <td>4367000</td> </tr> <tr> <td>50 ppm amp</td> <td>448000</td> </tr> </tbody> </table>	Concentration (ppm=mg/L)	Total area	7.8	48000	15.6	604000	31.2	2062000	62.5	4367000	50 ppm amp	448000
Concentration (ppm=mg/L)	Total area															
7.8	48000															
15.6	604000															
31.2	2062000															
62.5	4367000															
50 ppm amp	448000															

표 8. Amphotericin의 농도별 HPLC peak 면적값 및 크로마토그램

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (한국생산 기술연구원)</p>	<p>항진균제 최적 생산을 위한 방선균 배양공정 최적화</p>	<p>폴리엔 분석 조건 확립</p>	 <p>그림 89. 폴리엔 분석을 위한 standard curve</p> <p>(2) 개선된 방법을 이용한 폴리엔 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 상기 사항들을 고려하여 개선된 분석 방법을 이용하여 플라스크 배양에서 Inha502 균주로부터 생산되는 폴리엔 분석을 진행 - 배양 조건은 고체배지인 M3 plate로부터 5일~7일 배양 후 3개의 조각씩 30 mL TSB 배지에서 3일간 작은 흡이 있는 플라스크에서 성장 배양을 진행하고 일반 플라스크 및 G.S.S broth를 이용하여 30℃, 200 rpm 조건에서 생산배양을 수행 이전까지 배양액에서 원심분리기로 세포를 분리하고 상등액을 취하여 세포외로 배출된 polyene을 검출하고자 하였으나 세포 내부에도 폴리엔이 존재할 가능성을 고려하고 추출 효율을 높이기 위해 배양액 전체를 이용한 폴리엔 추출을 진행 이를 위해 배양액 30 mL와 20 mL의 <i>n</i>-butanol을 충분히 섞어주었고 각 샘플 당 200μl 만큼의 butanol 층을 뽑아내어 40℃의 heat block에서 하루 동안 증발시켰고 그 후 100μl의 ethanol을 넣어서 HPLC를 분석하기 위한 샘플을 제조 - 결과적으로 얻어진 HPLC data를 분석할 때 유의할 사항은 standard 물질로 사용하는 amphotericin은 heptaene이기 때문에 405 nm 파장에서 가장 높은 peak를 형성하고 Inha502 균주가 생산하는 물질은 pentaene이기 때문에 350 nm 파장에서 가장 높은 흡광도가 측정됨 (표 9 참조)
-----------------------------	--	--	-----------------------------	---

방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (한국생산기술연구원)

향진균제 최적 생산을 위한 방선균 배양공정 최적화

폴리엔 분석 조건 확립

Polyene macrolides	Maxima (nm)		
Trienes	260-262	270-272	282-285
Tetraenes	290-293	300-305	317-322
Pentaenes	317-320	330-335	348-353
Methylpentaenes	320-324	338-342	355-360
Hexaenes	336-340	355-359	375-380
Heptaenes	358-366	377-388	399-410
Octaenes	372-378	395-405	420-425

표 9. UV/Vis absorption maxima of different polyene macrolides

- 그렇기 때문에 amphotericin의 405 nm 파장대의 peak 면적과 생성물의 350 nm 또는 330 nm 대의 peak 면적을 비교하여 농도 분석을 진행

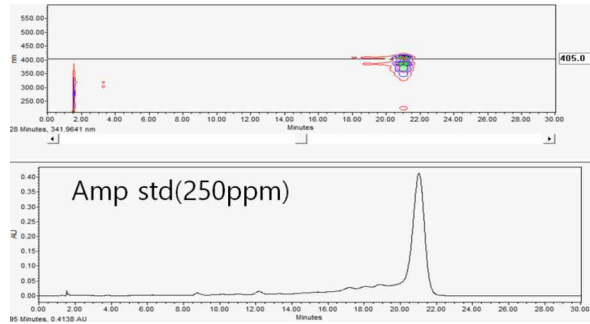


그림 90. Amphotericin의 405 nm 파장에서 chromatogram

- Inha502 균주 배양액의 분석 결과 350 nm 파장에서 폴리엔 peak를 확인(그림 91)

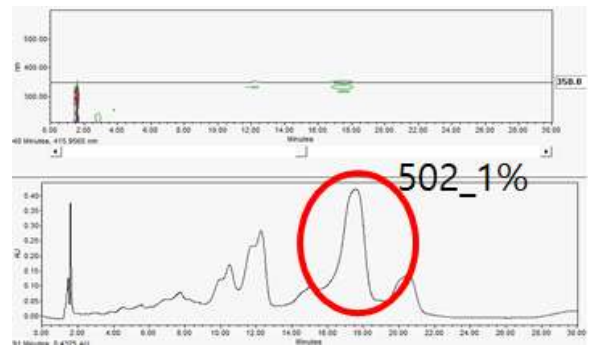
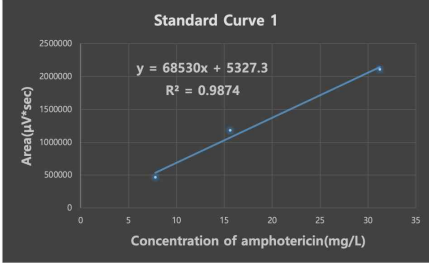


그림 91. 502_1%의 350 nm 파장에서 chromatogram

Sample name	Concentration of polyene (mg/L)
502_1%	347
502_1%	328
502_5%	366
502_5%	403
502_5%	257
502_10%	298
502_10%	292

표 10. Inha502 샘플의 집중량별 polyene 농도

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (한국생산 기술연구원)</p>	<p>항진균제 최적 생산을 위한 방선균 배양공정 최적화</p>	<p>폴리엔 분석 조건 확립</p>	<p>- 나아가 원심농축 기술을 사용하여 폴리엔 추출 후 용매 제거 시간을 크게 단축시키고(하루 이상 → 2시간 30분) 보다 낮은 온도조건을 사용함으로써(40℃ → 30℃) 전처리시 폴리엔의 변성을 최소화 전처리 효과를 고려한 검량선(그림 92)을 분석에 활용하여 정확도를 높이고자 하였음</p>  <p>그림 92. 전처리 손실을 고려한 standard curve</p>
			<p>50L 대량 배양을 위한 5L 발효기에서 의 산소전달 속도 측정</p>	<p>(1) 5L 발효조에서의 산소전달계수 측정</p> <p>호기성 생산균주로부터 세포 또는 대사물질의 생산을 위해서는 배양액 내로의 효율적인 산소전달을 통해 고농도로 세포를 배양함과 동시에 활발한 이차대사 유도가 가장 중요한 것으로 판명 그러나 배지 내에서 산소의 용해도는 매우 낮고, 기체산소가 용존산소로 되어 세포에 의해 이용될 때까지 여러 단계의 제한단계 (limiting step)를 거치게 되어 외부에서 많은 양의 산소를 공급할지라도 실제적으로 세포가 이용할 수 있는 용존산소의 양은 극히 적을 수밖에 없어 용존산소가 발효시 마다 항상 문제점으로 대두</p> <p>- 기체산소가 용존산소가 되는 각 단계마다 산소분자가 이동하기 위해서는 극복해야 할 저항들이 있는데 그 중에서 가장 고려해야 할 단계는 기체 방울을 둘러싸고 있는 liquid film에서의 산소전달이며 생산균주가 배양액에 분산되어 있고 발효배지가 잘 교반될 때 이 단계가 속도제한단계 (rate limiting step)가 되고, 이 단계를 통해서 전체 산소전달속도가 조절 이 단계에서의 산소전달속도 (OTR)은 다음 식에 의해 계산:</p> $OTR = N_A = k_L a (C_{AL}^* - C_{AL})$ <p>$OTR = N_A$: rate of oxygen transfer per unit volume of fluid [gmol/m³/s] k_L : liquid-phase mass transfer coefficient [m/s] a : available area for mass transfer per units volume [m²/m³] C_{AL}^*; oxygen concentration in the broth in equilibrium with the gas phase [gmole/m³] C_{AL}; oxygen concentration in the broth [gmole/m³]</p>

2차
년도
(2019)

방선균
유래
진균제어
미생물제제
대량 생산
공정 개발
(한국생산
기술연구원
)

항진균제
최적 생산을
위한 방선균
배양공정
최적화

50L 대량
배양을 위한
5L
발효기에서
의 산소전달
속도 측정

- 또한 상기의 식을 적절히 정리하여 미분하게 되면 교반 속도나, 공기공급량에 따라 산소공급속도를 측정할 수 있으며 실험은 질소 가스를 배양액 내로 공급하여 용존 산소를 모두 제거한 후(약 900~1600초) 각 조건들에 따라 산소를 공급하면서(1600초 이후) 정밀한 DO probe를 이용하여 시간당 변화하는 용존산소의 변화경향을 측정

이와 같은 방법을 통하여 0.5vvm, 1.0vvm, 1.5vvm에서 rpm을 조절하여 산소전달속도를 측정하였으며 그 결과를 그림 93과 표 11에 제시

즉, 같은 산소 공급속도에서는 교반속도에 따라 산소 전달계수 값이 증가하였으며 0.5vvm, 100rpm에서는 약 0.002(1/sec), 1.5vvm, 300rpm에서는 약 0.032(1/sec)의 값을 갖는 것을 확인

이 결과는 산소전달계수를 토대로 산소 공급속도와 교반속도를 정확하게 조절할 수 있음을 제시

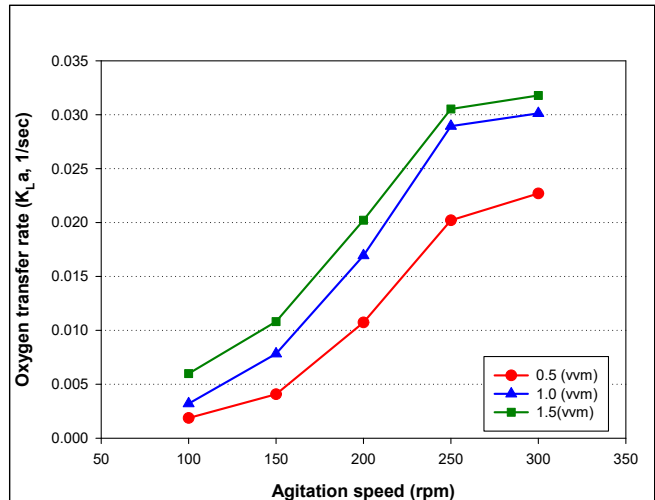


그림 93. 5L 발효조에서 산소전달속도의 측정

	Oxygen transfer rate (K _{La} , hr ⁻¹)		
	0.5vvm	1.0vvm	1.5vvm
100	0.0019	0.0036	0.0059
150	0.0041	0.0081	0.0108
200	0.0107	0.0160	0.0202
250	0.0202	0.0259	0.0305
300	0.0227	0.0331	0.0318

표 11. 5L 발효조에서 산소전달속도의 측정

측정된 5L 발효조에서의 산소전달속도를 기준으로 추후 50L에서도 동일한 실험을 진행할 예정이며, 정확한 산소전달속도를 측정을 비교함으로써 수월하고 경제적인 50L 로의 scale-up이 이뤄질 것으로 판단

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (에스티알 바이오텍)</p>	<p>선별된 후보균주의 제형화</p>	<p>Inha501, Inha502 균주의 제품화를 위한 제형화</p>	<p>주관기관에서 스크리닝한 우수 폴리엔 생산 균주인 Inha501 및 Inha502를 대상으로 배양최적화를 진행한 배양액을 이용한 제형화 수행</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미생물제제 제조를 위한 최적 제형 선정을 위해 생산배양 후 확보한 균체 및 배양액을 이용하여 아래 제시된 조성(표 12)에 따라 제형화 실험을 진행 - 균체 및 기타 formulating agent를 혼합한 후 동결건조를 통해 최종적으로 분말 형태의 제제 시료를 확보 <table border="1" data-bbox="890 616 1273 1635"> <thead> <tr> <th>번호</th> <th>조성</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">1</td> <td>Cell 22%</td> </tr> <tr> <td>Silica 55%</td> </tr> <tr> <td>Milk powder 15%</td> </tr> <tr> <td>7% CMC 10%</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">2</td> <td>Cell 60%</td> </tr> <tr> <td>Silica 20%</td> </tr> <tr> <td>Milk powder 14%</td> </tr> <tr> <td>7% CMC 3%</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">3</td> <td>Ascorbic acid 3%</td> </tr> <tr> <td>Cell 20%</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">4</td> <td>Sucrose 25%</td> </tr> <tr> <td>Starch 55%</td> </tr> <tr> <td>Cell 40%</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">5</td> <td>Sucrose 20%</td> </tr> <tr> <td>Kaolin 35%</td> </tr> <tr> <td>7% CMC 5%</td> </tr> <tr> <td>Cell 40%</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">6</td> <td>Milk powder 40%</td> </tr> <tr> <td>Sucrose 20%</td> </tr> <tr> <td>Cell 40%</td> </tr> <tr> <td>Starch 35%</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">7</td> <td>Sucrose 20%</td> </tr> <tr> <td>7% CMC 5%</td> </tr> <tr> <td>Cell 40%</td> </tr> <tr> <td>Lignin 35%</td> </tr> </tbody> </table> <p>표 12. 실험에 사용된 제형별 조성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 상기한 바와 같이 제작된 미생물제제 시료들의 보관 안정성을 확인하기 위해 실온 보존 전 후 CFU를 측정, 비교하는 실험을 진행 - CFU 측정은 각 시료 3~10 mg을 20% glycerol에 현탁한 후 plate에서 배양하고 콜로니 수를 확인하는 방식으로 진행 	번호	조성	1	Cell 22%	Silica 55%	Milk powder 15%	7% CMC 10%	2	Cell 60%	Silica 20%	Milk powder 14%	7% CMC 3%	3	Ascorbic acid 3%	Cell 20%	4	Sucrose 25%	Starch 55%	Cell 40%	5	Sucrose 20%	Kaolin 35%	7% CMC 5%	Cell 40%	6	Milk powder 40%	Sucrose 20%	Cell 40%	Starch 35%	7	Sucrose 20%	7% CMC 5%	Cell 40%	Lignin 35%
번호	조성																																					
1	Cell 22%																																					
	Silica 55%																																					
	Milk powder 15%																																					
	7% CMC 10%																																					
2	Cell 60%																																					
	Silica 20%																																					
	Milk powder 14%																																					
	7% CMC 3%																																					
3	Ascorbic acid 3%																																					
	Cell 20%																																					
4	Sucrose 25%																																					
	Starch 55%																																					
	Cell 40%																																					
5	Sucrose 20%																																					
	Kaolin 35%																																					
	7% CMC 5%																																					
	Cell 40%																																					
6	Milk powder 40%																																					
	Sucrose 20%																																					
	Cell 40%																																					
	Starch 35%																																					
7	Sucrose 20%																																					
	7% CMC 5%																																					
	Cell 40%																																					
	Lignin 35%																																					

2차 년도 (2019)	방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (에스티알 바이오텍)	선별된 후보균주의 제형화	Inha501, Inha502 균주의 제품화를 위한 제형화	<table border="1"> <thead> <tr> <th>균주</th> <th>제형 조성</th> <th>CFU(/g)</th> <th>CFU(/g) (17일 후)</th> <th>생존율(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">Inha5 01</td> <td>1</td> <td>1.35×10^3</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>0</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>0</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>1.60×10^4</td> <td>3.10×10^3</td> <td>19</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">Inha5 02</td> <td>1</td> <td>1.61×10^4</td> <td>1.90×10^4</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>0</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>2.10×10^3</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>3.85×10^5</td> <td>1.00×10^5</td> <td>25</td> </tr> </tbody> </table> <p>표 13. 미생물제제 시료의 보관 안정성 실험 결과</p> <p>- 실험결과 Inha502균주가 Inha501균주보다 상대적으로 높은 안정성을 나타냄을 확인</p> <p>- <u>제형화 조성 중 1과 7이 적합한 것으로 보이나 보존 안정성 향상을 위한 조성 최적화가 필요</u></p> <p>- 초기 CFU 증가를 위해 보다 다량의 균체 투입이 요구되며, 이를 위한 균주 배양 최적화가 필요함을 확인</p>	균주	제형 조성	CFU(/g)	CFU(/g) (17일 후)	생존율(%)	Inha5 01	1	1.35×10^3	0	0	2	0	-	-	4	0	-	-	7	1.60×10^4	3.10×10^3	19	Inha5 02	1	1.61×10^4	1.90×10^4	100	2	0	-	-	4	2.10×10^3	0	0	7	3.85×10^5	1.00×10^5	25
		균주	제형 조성	CFU(/g)	CFU(/g) (17일 후)	생존율(%)																																					
Inha5 01	1	1.35×10^3	0	0																																							
	2	0	-	-																																							
	4	0	-	-																																							
	7	1.60×10^4	3.10×10^3	19																																							
Inha5 02	1	1.61×10^4	1.90×10^4	100																																							
	2	0	-	-																																							
	4	2.10×10^3	0	0																																							
	7	3.85×10^5	1.00×10^5	25																																							
다양한 조건에서의 항진균력 검증	Inha501, Inha502 균주의 제품화를 위한 실내검정 시험 진행	<p>주관기관에서 스크리닝한 우수 폴리엔 생산 균주인 Inha501 및 Inha502의 배양액을 이용한 화분수준에서의 실내검정 수행</p> <p>4종의 작물(딸기, 토마토, 고추, 배추)을 대상으로 인위적인 식물병원성 진균 감염 후 방제효율 확인 (KP18F45)</p> <p>- <u>고추 및 딸기의 경우 미생물 제제로 등록이 가능한 방제율을 확인</u> 최대 방제율 84.1% (고추, Inha502 배양액 처리)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">시험약제</th> <th colspan="2">약효 시험</th> </tr> <tr> <th>희석 배수 및 사용량</th> <th>처리시기 및 방법</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Inha501 상등액</td> <td>1배</td> <td>정식전 1회 토양관주처리 (11/14)</td> </tr> <tr> <td>Inha501 배양액</td> <td>1배</td> <td>"</td> </tr> <tr> <td>Inha502 상등액</td> <td>1배</td> <td>"</td> </tr> <tr> <td>Inha502 배양액 무처리</td> <td>1배 -</td> <td>" -</td> </tr> </tbody> </table> <p>표 14. 처리내용 (시료관리번호 : KP18F45)</p> <p>- <u>배추에 대한 화분수준의 항진균력 검증 결과</u> 가. 대상병해 : 무름병(<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>) 나. 결과 : 무름병을 유발하는 미생물은 진균이 아닌 박테리아 계열로써 항진균활성에 의한 선별과정에서 골라진 Inha501, Inha502의 테스트 결과 활성이 없는 것으로 확인</p>	시험약제	약효 시험		희석 배수 및 사용량	처리시기 및 방법	Inha501 상등액	1배	정식전 1회 토양관주처리 (11/14)	Inha501 배양액	1배	"	Inha502 상등액	1배	"	Inha502 배양액 무처리	1배 -	" -																								
시험약제	약효 시험																																										
	희석 배수 및 사용량	처리시기 및 방법																																									
Inha501 상등액	1배	정식전 1회 토양관주처리 (11/14)																																									
Inha501 배양액	1배	"																																									
Inha502 상등액	1배	"																																									
Inha502 배양액 무처리	1배 -	" -																																									

2차
년도
(2019)

방선균
유래
진균제어
미생물제제
대량 생산
공정 개발
(에스티알
바이오텍)

다양한
조건에서의
항진균력
검증

Inha501,
Inha502
균주의
제품화를
위한
실내검정
시험 진행

- 딸기에 대한 화분수준의 항진균력 검증 결과

가. 대상병해 : 시들음병(*Fusarium oxysporium*)

나. 시험작물: 딸기(설향)

다. 조사방법 및 판정기준

약효시험 : 최종 약제처리 7일 후 작물별 병발생
정도를 조사

(0: 무발병 ~ 100: 작물고사)

약효시험 : 약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 약해유무
달관조사

라. 딸기 시들음병에 대한 약제방제 효과

시험약제	발병도(%)					유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I	II	III	IV	평균		
Inha501 상등액	20.0	20.0	10.0	10.0	15.0	b	69.2
Inha501 배양액	20.0	10.0	30.0	30.0	22.5	b	53.8
Inha502 상등액	20.0	10.0	20.0	10.0	15.0	b	69.2
Inha502 상등액	20.0	30.0	10.0	10.0	17.5	b	64.1
무처리	45.0	55.0	45.0	50.0	48.8	a	-

C.V.(%) ----- 21.2

마. 딸기에 대한 약해시험(약제처리 후 3, 5, 7일)

시험약제	시험작물	약해정도 (0~5)		비 고
		기 준 량	배 량	
모두싹	딸기 (설향)	0	0	약해 없음

바. 시험결과

딸기 시들음병 방제효과

- 공시물질의 딸기 시들음병에 대한 방제 효과를 확인하기 위하여 작물 정식 후 토양 관주처리하고 병원균을 접종하여 시들음병 발병을 유도한 결과, **공시물질 4종 모두 무처리와 비교하여 방제 효과를 보였습니다.** Inha501 배양액처리구와 Inha502 배양구처리구에서는 관주처리 시 포트상단에 잔여물이 남아있어 실제 포장 처리 시 제제 및 제형을 개선해야 할 것으로 판단됨.

딸기 시들음병 약해확인

- **공시물질 4종의 약해 확인 결과, 딸기의 잎 및 신초에서 외관상 약해증상은 확인되지 않았음.**



딸기 시들음병 초기

딸기 시들음병 후기

건전개체

2차
년도
(2019)

방선균
유래
진균제어
미생물제제
대량 생산
공정 개발
(에스티알
바이오텍)

다양한
조건에서의
항진균력
검증

Inha501,
Inha502
균주의
제품화를
위한
실내검정
시험 진행

- 토마토에 대한 화분수준의 항진균력 검증 결과

가. 대상병해 : 시들음병(*Fusarium oxysporium*)

나. 시험작물: 토마토(호용)

다. 조사방법 및 판정기준

약효시험 : 최종 약제처리 7일 후 작물별 병발생
정도를 조사

(0: 무발병 ~ 100: 작물고사)

약효시험 : 약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 약해유무
달관조사

라. 토마토 시들음병에 대한 약제방제 효과

시험약제	발병도(%)					유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반 복	II 반 복	III 반 복	IV 반 복	평균		
Inha501 상등액	50.0	40.0	30.0	45.0	41.3	ab	21.4
Inha501 배양액	30.0	40.0	40.0	30.0	35.0	bc	33.3
Inha502 상등액	40.0	25.0	30.0	30.0	31.3	bc	40.5
Inha502 상등액 무처리	25.0	25.0	30.0	15.0	23.8	c	54.8
무처리	50.0	40.0	60.0	60.0	52.5	a	-

C.V.(%) ----- 13.0

마. 토마토에 대한 약해시험(약제처리 후 3, 5, 7일)

시험약제	시험작물	약해정도 (0-5)		비 고
		기 준 량	배 량	
모두씩	토마토 (호용)	0	0	약해 없음

바. 시험결과

토마토 시들음병 방제효과

- 공시물질의 토마토 시들음병에 대한 방제 효과를 확인하기 위하여 작물 정식 후 토양 관주처리하고 병원균을 접종하여 시들음병 발병을 유도한 결과, 공시물질 4종 중 Inha502 배양구처리구에서 54.8%의 방제 효과를 보였으나, 관주처리 시 포트상단에 잔여물이 남아있어 실제 포장 처리 시 제제 및 제형을 개선해야 할 것으로 판단됨.

토마토 시들음병 약해확인

- 공시물질 4종의 약해 확인 결과, 토마토의 잎 및 신초에서 외관상 약해증상은 확인되지 않았음.



토마토 시들음병 초기

토마토 시들음병 후기

건전개체

2차
년도
(2019)

방선균
유래
진균제어
미생물제제
대량 생산
공정 개발
(에스티알
바이오텍)

다양한
조건에서의
항진균력
검증

Inha501,
Inha502
균주의
제품화를
위한
실내검정
시험 진행

- 고추에 대한 화분수준의 항진균력 검증 결과

가. 대상병해 : 시들음병(*Fusarium oxysporium*)

나. 시험작물: 고추(PR마니따)

다. 조사방법 및 판정기준

약효시험 : 최종 약제처리 7일 후 작물별 병발생
정도를 조사

(0: 무발병 ~ 100: 작물고사)

약효시험 : 약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 약해유무
달관조사

라. 고추 시들음병에 대한 약제방제 효과

시험약제	발병도(%)									유의차 (DMR T)	방제 가 (%)
	I 반 복	II 반 복	III 반 복	IV 반 복	V 반 복	VI 반 복	VII 반 복	VIII 반 복	평균		
Inha501 상등액	20.0	30.0	20.0	30.0	20.0	20.0	30.0	30.0	25.0	b	68.3
Inha501 배양액	20.0	20.0	15.0	35.0	30.0	20.0	25.0	20.0	23.1	bc	70.6
Inha502 상등액	25.0	15.0	10.0	20.0	20.0	15.0	20.0	10.0	16.9	cd	78.6
Inha502 상등액	0.0	10.0	10.0	20.0	20.0	10.0	20.0	10.0	12.5	d	84.1
무처리	70.0	80.0	80.0	70.0	100	70.0	80.0	80.0	78.8	a	-

C.V.(%) ----- 19.3

마. 고추에 대한 약해시험(약제처리 후 3, 5, 7일)

시험약제	시험작물	약해정도 (0~5)		비 고
		기 준 량	배 량	
모두씩	고추 (PR마니따)	0	0	약해 없음

바. 시험결과

고추 시들음병 방제효과

- 공시물질의 고추 시들음병에 대한 방제 효과를 확인하기 위하여 작물 정식 후 토양 관주처리하고 병원균을 접종하여 시들음병 발병을 유도한 결과, **공시물질 4종 모두 높은 방제효과를 보였고, Inha502 배양액처리구에서 가장 좋은 방제 효과를 보였음.** 배양액과 cell을 혼합처리 한 구에서는 포트상단에 잔여물이 남아 있어 실제 포장 처리 시 제제 및 제형을 개선해야 할 것으로 판단됨.

고추 시들음병 약해확인



















- **공시물질 4종의 약해 확인 결과, 고추의 잎 및 신초에서 외관상 약해증상은 확인되지 않았음.**












고추 시들음병 초기


고추 시들음병 후기

건전개체

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (에스티알 바이오텍)</p>	<p>다양한 조건에서의 항진균력 검증</p>	<p>Inha501, Inha502 균주의 배양최적화 방향을 선정하기 위한 실내검정 시험 진행</p>	<p>Inha501, Inha502의 배양액을 이용한 화분수준에서의 실내검정 수행한 결과 미생물제제로서 가능성을 확인 추가적인 화분수준의 실내검증을 통해 배양최적화의 방향이 폴리엔을 더 많이 생산하는 배양 최적화 방 향으로 선정할지 균의 수를 증가시키는 배양 최적화 방 향으로 선정할지에 대한 확인시험을 진행 (토마토를 대상으로 인위적인 식물병원성 진균 감염 후 방제효율 확인 (KP18F47))</p> <table border="1" data-bbox="743 600 1420 1030"> <thead> <tr> <th rowspan="2">시험약제</th> <th rowspan="2">주성분 함량 (%)</th> <th colspan="2">약 효 시험</th> <th colspan="2">약 해 시험</th> </tr> <tr> <th>희석 배수 및 사용량</th> <th>처리시기 및 방법</th> <th>기준량</th> <th>배 량</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Inha501 성장배양액 (TSB 배양)</td> <td>1×10⁶ cfu</td> <td>원액살포 (50ml/주)</td> <td>정식직후 토양 관주처리 (9/9)</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Inha501 성장배양액 (GSS 배양)</td> <td>"</td> <td>"</td> <td>"</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Inha502 성장배양액 (TSB 배양)</td> <td>"</td> <td>"</td> <td>"</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Inha502 성장배양액 (GSS 배양)</td> <td>"</td> <td>"</td> <td>"</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>GSS 배지(무배양) 무처리</td> <td>- -</td> <td>" -</td> <td>" -</td> <td>- -</td> <td>- -</td> </tr> </tbody> </table> <p>표 15. 처리내용 (시료관리번호 : KP18F47)</p> <p>가. 대상병해 : 시들음병(<i>Fusarium oxysporium</i>) 나. 시험작물: 토마토(호용) 다. 조사방법 및 관정기준 약효시험 : 최종 약제처리 7일 후 작물별 병발생 정도를 조사 (0: 무발병 ~ 100: 작물고사) 약효시험 : 약제처리 3, 5, 7일 후 외관상 약해유무 달관조사</p> <p>라. 시험구 배치</p> <table border="1" data-bbox="751 1512 1417 1892"> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>501균주 성장배양액</td> <td>501균주 생산배양액</td> <td>502균주 성장배양액</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>502균주 생산배양액</td> <td>GSS 배지(무배양)</td> <td>무처리</td> </tr> </table>	시험약제	주성분 함량 (%)	약 효 시험		약 해 시험		희석 배수 및 사용량	처리시기 및 방법	기준량	배 량	Inha501 성장배양액 (TSB 배양)	1×10 ⁶ cfu	원액살포 (50ml/주)	정식직후 토양 관주처리 (9/9)	-	-	Inha501 성장배양액 (GSS 배양)	"	"	"	-	-	Inha502 성장배양액 (TSB 배양)	"	"	"	-	-	Inha502 성장배양액 (GSS 배양)	"	"	"	-	-	GSS 배지(무배양) 무처리	- -	" -	" -	- -	- -				501균주 성장배양액	501균주 생산배양액	502균주 성장배양액				502균주 생산배양액	GSS 배지(무배양)	무처리
시험약제	주성분 함량 (%)	약 효 시험		약 해 시험																																																				
		희석 배수 및 사용량	처리시기 및 방법	기준량	배 량																																																			
Inha501 성장배양액 (TSB 배양)	1×10 ⁶ cfu	원액살포 (50ml/주)	정식직후 토양 관주처리 (9/9)	-	-																																																			
Inha501 성장배양액 (GSS 배양)	"	"	"	-	-																																																			
Inha502 성장배양액 (TSB 배양)	"	"	"	-	-																																																			
Inha502 성장배양액 (GSS 배양)	"	"	"	-	-																																																			
GSS 배지(무배양) 무처리	- -	" -	" -	- -	- -																																																			
																																																								
501균주 성장배양액	501균주 생산배양액	502균주 성장배양액																																																						
																																																								
502균주 생산배양액	GSS 배지(무배양)	무처리																																																						

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (에스티알 바이오텍)</p>	<p>다양한 조건에서의 항진균력 검증</p>	<p>Inha501, Inha502 균주의 배양최적화 방향을 선정하기 위한 실내검정 시험 진행</p>	<p>다. 토마토 시들음병에 대한 약제방제 효과 (최종약제처리 후 10일차)</p> <table border="1" data-bbox="758 257 1412 694"> <thead> <tr> <th>시험약제</th> <th>전체주수</th> <th>이병주수</th> <th>이병주율(%)</th> <th>방제가(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Inha501 성장배양액 (TSB 배양)</td> <td>20</td> <td>7</td> <td>35</td> <td>63.2</td> </tr> <tr> <td>Inha501 성장배양액 (GSS 배양)</td> <td>20</td> <td>8</td> <td>40</td> <td>57.9</td> </tr> <tr> <td>Inha502 성장배양액 (TSB 배양)</td> <td>20</td> <td>6</td> <td>30</td> <td>68.4</td> </tr> <tr> <td>Inha502 성장배양액 (GSS 배양)</td> <td>20</td> <td>7</td> <td>35</td> <td>63.2</td> </tr> <tr> <td>GSS 배지(무배양)</td> <td>20</td> <td>19</td> <td>95</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>무처리</td> <td>20</td> <td>19</td> <td>95</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table> <p>바. 토마토에 대한 약해시험(약제처리 후 3, 5, 7일)</p> <table border="1" data-bbox="742 784 1420 1142"> <thead> <tr> <th rowspan="2">시험약제</th> <th rowspan="2">시험작물</th> <th colspan="2">약해정도 (0-5)</th> <th rowspan="2">비 고</th> </tr> <tr> <th>기 준 량</th> <th>배 량</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Inha501 성장배양액 (TSB 배양)</td> <td rowspan="5">토마토 (호용)</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>약해 없음</td> </tr> <tr> <td>Inha501 성장배양액 (GSS 배양)</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>약해 없음</td> </tr> <tr> <td>Inha502 성장배양액 (TSB 배양)</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>약해 없음</td> </tr> <tr> <td>Inha502 성장배양액 (GSS 배양)</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>약해 없음</td> </tr> <tr> <td>GSS 배지(무배양)</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>약해 없음</td> </tr> </tbody> </table> <p>사. 시험결과</p> <p>토마토 시들음병 방제효과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시험 약제의 토마토 시들음병에 대한 방제 효과를 확인하기 위하여 작물 정식 직후 토양 관주처리하고 병원균을 접종하여 시들음병 발병을 유도한 결과, 시험 약제 4종 모두 50% 이상의 약효를 확인하였고 시험 약제 중 Inha502 성장배양액 처리구에서 68.4%의 가장 좋은 방제 효과를 보였고, 성장 배양액과 생산 배양액 간의 차이는 거의 없음 <p>토마토 시들음병 약해확인</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시험 약제 5종의 약해 확인 결과, 토마토의 잎 및 신초에서 외관상 약해증상은 확인되지 않았음 <table border="1" data-bbox="750 1758 1412 1982"> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>토마토 시들음병 초기</td> <td>토마토 시들음병 후기</td> <td>건전개체</td> </tr> </table>	시험약제	전체주수	이병주수	이병주율(%)	방제가(%)	Inha501 성장배양액 (TSB 배양)	20	7	35	63.2	Inha501 성장배양액 (GSS 배양)	20	8	40	57.9	Inha502 성장배양액 (TSB 배양)	20	6	30	68.4	Inha502 성장배양액 (GSS 배양)	20	7	35	63.2	GSS 배지(무배양)	20	19	95	0.0	무처리	20	19	95	-	시험약제	시험작물	약해정도 (0-5)		비 고	기 준 량	배 량	Inha501 성장배양액 (TSB 배양)	토마토 (호용)	0	0	약해 없음	Inha501 성장배양액 (GSS 배양)	0	0	약해 없음	Inha502 성장배양액 (TSB 배양)	0	0	약해 없음	Inha502 성장배양액 (GSS 배양)	0	0	약해 없음	GSS 배지(무배양)	0	0	약해 없음				토마토 시들음병 초기	토마토 시들음병 후기	건전개체
시험약제	전체주수	이병주수	이병주율(%)	방제가(%)																																																																					
Inha501 성장배양액 (TSB 배양)	20	7	35	63.2																																																																					
Inha501 성장배양액 (GSS 배양)	20	8	40	57.9																																																																					
Inha502 성장배양액 (TSB 배양)	20	6	30	68.4																																																																					
Inha502 성장배양액 (GSS 배양)	20	7	35	63.2																																																																					
GSS 배지(무배양)	20	19	95	0.0																																																																					
무처리	20	19	95	-																																																																					
시험약제	시험작물	약해정도 (0-5)		비 고																																																																					
		기 준 량	배 량																																																																						
Inha501 성장배양액 (TSB 배양)	토마토 (호용)	0	0	약해 없음																																																																					
Inha501 성장배양액 (GSS 배양)		0	0	약해 없음																																																																					
Inha502 성장배양액 (TSB 배양)		0	0	약해 없음																																																																					
Inha502 성장배양액 (GSS 배양)		0	0	약해 없음																																																																					
GSS 배지(무배양)		0	0	약해 없음																																																																					
																																																																									
토마토 시들음병 초기	토마토 시들음병 후기	건전개체																																																																							

2차 년도 (2019)	방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (에스티알 바이오텍)	다양한 조건에서의 항진균력 검증	Inha501, Inha502 균주의 배양최적화 방향을 선정하기 위한 실내검정 시험 진행	<p>아. 결론</p> <ul style="list-style-type: none"> - Inha501, Inha502의 성장배양액(TSB)과 생산배양액(GSS broth)을 이용한 화분수준에서의 실내검정 수행한 결과 이차대사산물을 만들기 위한 생산배지를 이용한 생산배양액과 균만을 배양하기 위한 성장배지를 이용한 성장배양액의 방제율 차이는 비슷한 것으로 확인 - Inha501, Inha502 기반 미생물제제의 제품화를 위한 공정 최적화의 방향은 비싼 재료가 들어가는 생산배지를 이용한 배양보다는 값싼 재료로 균주의 수를 증가하기 위한 성장배지를 이용한 배양이 사업화에 유리할 것으로 판단되기에 이번에 실시한 실내검증을 토대로 균의 수를 늘리기 위한 배양최적화를 실시 																																																	
			Inha501, Inha502 균주의 포장실험을 통한 항진균력 검증시험 진행	<p>Inha501, Inha502 기반 미생물제제의 제품등록에 필요한 기초자료를 얻기 위해 온실에서 포장실험을 실시 Inha501, Inha502의 성장배양액을 이용하여 약효약해 시험을 진행하고 있으며 11월말까지 완료예정</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">시 험 약 제</th> <th rowspan="2">주성분 함 량 (CFU)</th> <th colspan="2">약 효 시 험</th> <th colspan="2">약 해 시 험</th> <th rowspan="2">시험 년차</th> </tr> <tr> <th>회석배수 및사용량</th> <th>처리시기 및 방법</th> <th>기준량</th> <th>배 량</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Inha501 성장배양액</td> <td>1×10⁶</td> <td>500배</td> <td>발병초 10일간격 3회 약제처리</td> <td>500배</td> <td>250배</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Inha502 성장배양액 무처리</td> <td>1×10⁶ - -</td> <td>" - -</td> <td>" - -</td> <td>" - -</td> <td>" - -</td> <td>" - -</td> </tr> </tbody> </table> <p>표 16. 처리내용 (시료관리번호 : KP19F119)</p> <p>가. 대상병해 : 시들음병(<i>Fusarium oxysporium</i>)</p> <p>나. 시험작물: 토마토(약효 : 토마토, 약해: 토마토, 방울토마토)</p> <p>다. 조사방법 및 판정기준</p> <p>약효시험 : 이병주율(무처리 최소발병율 10%) (최종약제처리 10일 후 구당 전주에 대한 이병주수 조사)</p> <p>약효시험 : 약제처리 후 7일 이내 3회 약해유무 달관조사</p> <p>라. 시험구배치 및 면적: 난괴법 3반복</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>구 분</th> <th>처리수</th> <th>반복수</th> <th>총구수</th> <th>구당면 적(pot)</th> <th>소요면 적(pot)</th> <th>총소요면 적(pot)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>약 효</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>9</td> <td>10 m²</td> <td>90 m²</td> <td>180 m²</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">약 해</td> <td>토마토</td> <td>6</td> <td>3</td> <td>18</td> <td>5 m²</td> <td>90 m²</td> </tr> <tr> <td>방울토마토</td> <td>6</td> <td>3</td> <td>18</td> <td>5 pot</td> <td>90 pot</td> </tr> </tbody> </table>	시 험 약 제	주성분 함 량 (CFU)	약 효 시 험		약 해 시 험		시험 년차	회석배수 및사용량	처리시기 및 방법	기준량	배 량	Inha501 성장배양액	1×10 ⁶	500배	발병초 10일간격 3회 약제처리	500배	250배	1	Inha502 성장배양액 무처리	1×10 ⁶ - -	" - -	" - -	" - -	" - -	" - -	구 분	처리수	반복수	총구수	구당면 적(pot)	소요면 적(pot)	총소요면 적(pot)	약 효	3	3	9	10 m ²	90 m ²	180 m ²	약 해	토마토	6	3	18	5 m ²	90 m ²	방울토마토	6	3
시 험 약 제	주성분 함 량 (CFU)	약 효 시 험		약 해 시 험			시험 년차																																														
		회석배수 및사용량	처리시기 및 방법	기준량	배 량																																																
Inha501 성장배양액	1×10 ⁶	500배	발병초 10일간격 3회 약제처리	500배	250배	1																																															
Inha502 성장배양액 무처리	1×10 ⁶ - -	" - -	" - -	" - -	" - -	" - -																																															
구 분	처리수	반복수	총구수	구당면 적(pot)	소요면 적(pot)	총소요면 적(pot)																																															
약 효	3	3	9	10 m ²	90 m ²	180 m ²																																															
약 해	토마토	6	3	18	5 m ²	90 m ²																																															
	방울토마토	6	3	18	5 pot	90 pot																																															

<p>2차 년도 (2019)</p>	<p>방선균 유래 진균제어 미생물제제 대량 생산 공정 개발 (에스티알 바이오텍)</p>	<p>다양한 조건에서의 항진균력 검증</p>	<p>Inha501, Inha502 균주의 포장실험을 통한 항진균력 검증시험 진행</p>	<p>마. 시험포장 전경</p> 
-----------------------------	--	--------------------------------------	---	---

○ 3차년도(2020)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구 목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2020)	항진균 생합성 유전자군의 유전체 재설계를 통한 신규유도체 도출 (인하대학 교)	genetic engineer ing을 통한 생리활성 물질의 유도체 창출 및 고생산균 주 개발	거대 생합성 유전자군 을 스트렙토 마이세스 BAC system을 이용한 분리 및 유전정보 습득	<p>(1) Inha501의 SBAC library 구축</p> <p>- <u>강력한 항진균 활성을 나타내는 천연물인 INP1, INP2의 생합성 유전자군을 인공염색체 운반체인 SBAC library system을 이용하여 분리</u></p> <p>Inha 501 균주의 genomic DNA를 분리하여 200kb의 insert를 가지는 SBAC library 제작하였고 PCR based screening 방법을 이용하여 INP1 BGC와 INP2 BGC를 분리(그림 3-1)</p> <p>(2) pINP1의 이중숙주발현</p> <p>- <u>INP1 BGC을 포함하는 SBAC 벡터인 pINP1을 방선균 모델균주인 <i>Streptomyces lividans</i> TK21 균주와 <i>Streptomyces coelicolor</i> M511 균주에 형질전환</u></p> <p>분리된 pINP1이 이중숙주에서 효율적으로 발현될 수 있도록 불필요한 DNA 부분을 제거한 pINPs 벡터를 구축(그림 3-2)</p> <p>INP1 BGC가 클로닝된 SBAC 벡터 pINP1s을 이중숙주에서 발현하였으나, Inha501 wild type과 비교하였을 때 INP1으로 추정되는 피크를 확인하지 못함(그림 3-3)</p> <p>INP1 이중숙주발현 균주인 <i>S. lividans</i> TK21/pINP1s와 Inha501 wild type간의 RNA 발현량 비교를 통해 INP1 BGC내 일부 유전자 (<i>inp1A</i>, <i>inp1B</i>, <i>inp1M</i>, <i>inp1R</i>, <i>inp1E</i>)의 발현량이 낮음을 확인(그림 3-4)</p> <p>이를 해결하고자 우선적으로 발현량이 적은 유전자(<i>inp1A</i>, <i>inp1B</i>)의 프로모터 engineering을 진행하고자 construct를 구축하였고 이중숙주발현을 진행 중(그림 3-5)</p> <p>(3) pINP2의 이중숙주발현</p> <p>- <u>INP2 BGC을 포함하는 SBAC vector인 pINP2을 방선균 모델균주인 <i>Streptomyces lividans</i> TK21 strain과 <i>Streptomyces coelicolor</i> M511 strain으로의 형질전환</u></p> <p>분리한 pINP2의 염기서열분석을 통한 확인 결과 필요한 INP2 BGC만을 보유한 pINP2을 확보하는데 성공하여 추가적인 유전자 편집 작업 없이 <i>S. lividans</i> TK21과 <i>S. coelicolor</i> M511과의 이중숙주발현 진행</p>

3차 년도 (2020)	항진균 생합성 유전자군의 유전체 재설계를 통한 신규유도체 도출 (인하대학 교)	genetic engineer ing을 통한 생리활성 물질의 유도체 창출 및 고생산균 주 개발	<p>거대 생합성 유전자군 을 스트랩토 마이세스 BAC system을 이용한 분리 및 유전정보 습득</p>	<p>항진균 활성이 전혀 없는 이중숙주 <i>S. lividans</i>와는 달리, pINP2를 포함하는 재조합 <i>S. lividans</i>에서는 항진균 활성이 증가함을 확인하였으며 HPLC분석을 통해 동일한 pantaene peak과 retention time을 확인(그림 3-6, 3-7)</p> <p>이중숙주 <i>S. coelicolor</i>와 pINP2를 포함하는 재조합 <i>S. coelicolor</i>와 비교 하였을 때 항진균 활성이 관찰할 수 없었지만, HPLC분석을 통해 동일한 pantaene peak과 retention time을 확인하였으며 생성되는 양이 적은 것으로 판단됨(그림 3-7)</p> <p>pINP2를 포함하는 재조합 <i>S. coelicolor</i>에서 생산되는 pantaene을 분리정제 후 항진균 활성을 확인</p>
			<p>BAC 벡터에 분리된 항진균 생합성 유전자 (INP1, INP2)를 이용하여 생리활성 물질의 생산성 증대 유도 및 다양한 생리활성 물질의 유도체 발굴</p>	<p>(1) genetic engineering을 통한 고생산균주 개발</p> <p>- <u>pINP1s의 추가적 도입을 통한 INP1 고생산균주개발</u></p> <p>Inha501 wild type strain에 pINP1s의 도입을 통해 INP1 BGC가 2 copy로 늘어나게 되었고 이로 인해 생산량이 18 mg/L에서 108 mg/L으로 6배 증가한 INP1 고생산 균주를 개발함(그림 3-8)</p> <p>- <u>pINP2의 도입을 통한 INP2 고생산균주개발</u></p> <p>같은 방법으로 Inha501 wild type strain에 pINP2의 도입을 통해 사분수를 늘리는 방법을 사용한 결과 생산량을 121 mg/L에서 325 mg/L으로 2.7배 증가한 균주를 개발함(그림 3-7)</p> <p><i>S. lividans</i> TK21 strain에 pINP2의 도입을 통해 얻어진 형진 전환 균주들의 항진균활성을 비교분석하여 생산량이 높은 colony selection 진행하였음. 그 결과 INP2의 생산량이 wild type보다 3배 높은 336 mg/L로 생산성이 높아진 고생산 균주가 개발되었고, 이 균주에 wild type에 시도했던 방식으로 2 copy 이상의 BGC를 도입할 경우 g/L 수준에 근접한 고생산 균주가 개발될 것으로 예상됨.(그림 3-7)</p> <p>(2) 생리활성물질의 유도체 생산을 위한 균주개량</p> <p>- <u>INP2 H (glycosyltransferase)의 gene knock-out을 통한 INP2 유도체 생산 및 활성변화 확인</u></p> <p>polyene계 compound는 sugar group이 생리활성에서 중요한 영향을 준다는 선행연구결과를 바탕으로, sugar로 인한 INP2의 활성변화를 확인하고자 균주개량 실시</p>

<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>항진균 생합성 유전자군의 유전체 재설계를 통한 신규유도체 도출 (인하대학 교)</p>	<p>genetic engineer ing을 통한 생리활성 물질의 유도체 창출 및 고생산균 주 개발</p>	<p>BAC 벡터에 분리된 항진균 생합성 유전자 (INP1, INP2)를 이용하여 생리활성 물질의 생산성 증대 유도 및 다양한 생리활성 물질의 유도체 발굴</p>	<p>INP2 합성 시 post-PKS modification 과정에서 sugar attachment 기작에 관여하는 glycosyltransferase로 예상되는 <i>inp2-H</i>이 제거된 pINP2ΔH construct를 제작하였고 aglycone상태의 INP2 유도체를 생산하는 균주를 확보(그림 3-9, 3-17B) INP2 aglycone 생산균주 중에서는 <i>S. coelicolor</i> M511/pINP2ΔH 균주에서 160 mg/L로 가장 많은 양이 생산되었고 <i>S. lidivans</i> TK21/pINP2ΔH에서는 생산되지 않는 현상을 확인(그림 3-7) INP2와 INP2 aglycone간의 항진균 활성 확인 시험을 통해 INP2의 sugar부분이 생리활성에서 중요한 역할을 하는 것을 확인(그림 3-6)</p> <p>- <u>INP4 D(sulfurtransferase)의 gene knock-in을 통한 INP2 유도체 생산 및 활성변화 확인</u></p> <p>Inha503의 whole genome sequence 비교를 통해 INP2 BGC와 유사한 linear polyene계열의 INP4 BGC sequence를 확보할 수 있었으며 <i>In silico</i> analysis 결과 INP4 BGC는 Mediomycin BGC와 상당한 유사성을 확인(그림 3-10) INP4와 INP2간의 비교를 통해 INP2는 INP2 H에 의해 sugar group으로 치환되는 부분이 INP4에서는 INP4 D에 의해 sulfur group으로 치환되는 것으로 예측이 되었으며 이를 응용하여 sulfur group이 포함된 INP2 derivative 1 생산균주를 개발하고자 함(그림 3-9, 3-10, 3-17B) <i>S. coelicolor</i> M511/pINP2ΔH에서 INP4 D를 발현시키고자 방선균과 대장균에서 동시 발현할 수 있는 pSE34 발현 벡터를 구축하였고 이중숙주발현을 진행 중이며 생리활성의 변화를 확인 중</p> <p>(4) Inha502의 항진균 활성을 갖는 BGC 검증</p> <p>- <u>Inha502 whole genome sequence내에서 항진균 활성을 갖을 것으로 예측되는 INP3 BGC의 검증</u></p> <p>INP3의 첫 번째 PKS gene인 INP3 A를 knock-out을 위해 homologous recombination 진행(그림 3-11A) HPLC 분석결과 예상한 knock-out의 결과가 아닌 knock-down의 형태로 이뤄진 것으로 판단되며 INP3 A의 변화로 인해 INP3의 생산량이 감소한 것을 확인(그림 3-11B) 추가적인 실험을 통해 INP3 BGC임을 증명할 예정</p>
-----------------------------	--	---	--	--

<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>항진균 생합성 유전자군의 유전체 재설계를 통한 신규유도체 도출 (인하대학 교)</p>	<p>생물농약 후보 항진균의 특성 분석 및 유용 생합성유 전자군의 파악</p>	<p>생물농약 후보 항진균 특성 파악과 whole genome sequence 분석 및 이를 통한 유용 생합성유 전자군의 파악</p>	<p>(1) 생물농약 후보 항진균 특성 파악</p> <p>- 추가적인 항진균 활성 테스트를 통하여 항진균 활성이 우수하 면서 신규성을 갖는 생물농약 후보 항진균 Inha504를 선별</p> <p>polyene이 검출되지 않고 항진균 활성이 우수하였던 AN100585 균주를 Inha503, polyene계열의 compound가 검출되면서 활성이 우수하였던 AN090291균주를 Inha504로 선정(그림 3-12A) 포자상태의 stock 제작을 위해 spore 형성이 잘 이뤄지는 배지 를 찾는 테스트 결과 Inha503은 MS plate에서 Inha504는 ISP4, MS, R2YE plate등 여러 배지에서 sporulation이 잘 형성됨을 확 인(그림 3-12B)</p> <p>- 생물농약 후보 항진균의 특성 파악을 위한 16s rRNA sequence기 반 phylogenetic tree 작성</p> <p>종의 특성을 파악하고 유기농미생물제제의 등록이 원활하게 수 행되기 위하여 유전적으로 가까운 종을 찾아 strain의 종속명을 부여하기 위하여 Inha501, Inha502, Inha503, Inha504의 phylogenetic tree을 작성(그림 3-13) 새롭게 명명한 종속명 <i>Streptomyces rubrisoli</i> Inha501(그림 3-13A, 표 3-1A) <i>Streptomyces morookaense</i> Inha502(그림 3-13B, 표 3-1B) <i>Streptomyces javensis</i> Inha503(그림 3-13C, 표 3-1C) <i>Streptomyces collinus</i> Inha504(그림 3-13D, 표 3-1D)</p> <p>(2) Inha503의 whole genome sequencing</p> <p>- PacBio RSII, Illumina platform and De novo assembly를 이용 하여 유전체 분석</p> <p>2차년도(2019) Inha503의 whole genome sequencing 수행 시 정 확한 sequence 확보가 되지 않아 재반응 진행 재반응 결과 Inha503은 다른 <i>streptomyces</i>계열의 평균적인 chromosome size인 8~9 Mbp를 훨씬 넘는 12 Mbp정도이며 chromosome내에 존재하는 이차대사산물 BGC의 개수는 46개로 평균적인 33개보다 많은 것으로 판단됨(표 3-2A, 그림 3-14) polyene계열의 화합물은 아니나 항진균 활성을 낼 수 있는 region 2(NRP 계열), region 8(PKS), region 9(PKS), region 11(PKS), region 14(NRP), region 34(PKS), region 39 (PKS) 등 의 BGC를 보유하고 있음을 확인하였고 region 29 (PKS, INP4) linear polyene계열의 BGC가 내재하는 것을 확인(그림 3-14B)</p>
-----------------------------	--	---	--	--

<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>항진균 생합성 유전자군의 유전체 재설계를 통한 신규유도체 도출 (인하대학 교)</p>	<p>생물농약 후보 방선균의 특성 분석 및 유용 생합성유 전자군의 파악</p>	<p>생물농약 후보 방선균 특성 파악과 whole genome sequence 분석 및 이를 통한 유용 생합성유 전자군의 파악</p>	<p>(3) Inha504의 whole genome sequencing</p> <p>- <u>PacBio RSII, Illumina platform and De novo assembly를 이용하여 유전체 분석</u></p> <p>Inha504는 9.2 Mbp정도의 chromosome size이며 plasmid를 보유하지 않음을 확인하였으며 이차대사산물 BGC의 개수는 33개로 평균적인 수준으로 판단됨(표 3-2B, 그림 3-15)</p> <p>우선적으로 polyene계열의 화합물에 의해 Inha504가 항진균 활성을 갖는 것으로 판단하고 Inha504 chromosomes내에 존재하는 BGC 중 PKS로 합성되는 BGC를 분석</p> <p>그 중 region 31에서 natamycin(tetraene)과 유사한 BGC가 존재하는 것을 확인하였고 기존의 natamycin과 구조적으로 유사하나 신규유도체를 생성하는 것으로 예상되는 INP5 BGC를 확보하였고 Knock-out방법을 이용하여 예측한 것을 확인할 예정(그림 3-15B)</p> <p>(4) 후보 방선균내에 내재되어 있는 유용한 생리활성유전자군의 bioinformatic analysis</p> <p>- <u>Inha501균주의 <i>In silico</i> analysis를 통한 INP2의 생합성 과정 예측</u></p> <p>Bioinformatic analysis을 통해 <i>S. neyagawaensis</i>에서 생합성되는 neotetrafibricin A와 Inha501에서 생합성 되는 INP2간의 유사성 및 차이점을 확인했으며 그 결과 KR domain에 의해 chiral이 다른 이성질체로 판단됨(그림 3-16)</p> <p>이 사실을 바탕으로 Inha501의 whole genome sequence내에서 INP2 생합성에 관여하는 유전자를 분석 및 정확한 생합성을 예측 (그림 3-17)</p> <p>a) polyketide synthase내에 존재하는 27개의 module 분석을 통하여 INP2의 aglycone 합성 과정을 예측(그림 3-17B)</p> <p>b) starter unit을 합성에 관여하는 ORF-1049는 분리된 INP2 BGC가 아닌 4 Mbp 떨어진 chromosome에 위치해 있는 것을 밝혀냄(그림 3-17B, C). 또한 이중숙주발현을 위해 사용한 <i>S. lividans</i> TK21과 <i>S. coelicolor</i> M511의 chromosome내에 이와 유사한 유전자가 존재함을 확인</p> <p>c) starter unit의 guanidino기를 amine기로 치환하는 guanidinobutyrase가 INP2 BGC내에 하나(<i>inp2-III</i>) 존재하며 이와 유사한 기능을 갖는 <i>orf-4663</i>이 Inha501 chromosome에 위치해 있는 것을 확인(그림 3-17B, C)</p>
-----------------------------	--	---	--	--

<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>항진균 생합성 유전자군의 유전체 재설계를 통한 신규유도체 도출 (인하대학 교)</p>	<p>생물농약 후보 방선균의 특성 분석 및 유용 생합성유 전자군의 파악</p>	<p>생물농약 후보 방선균 특성 파악과 whole genome sequence 분석 및 이를 통한 유용 생합성유 전자군의 파악</p>	<p>d) Glucose에서 rhamnose을 합성하는데 필요한 유전자들 (<i>inp2-LMNO</i>)이 INP2 BGC내에 존재함을 확인(그림 3-17B)</p> <p>e) 합성된 rhamnose는 post-PKS modification 과정에서 glycosyltransferase(<i>inp2-H</i>)에 의해 첨가될 것이며, 이 반응은 INP2의 항진균 활성과 밀접한 연관을 가질 것으로 판단됨(그림 3-17B)</p> <p>- <u>Inha502균주의 <i>In silico analysis</i>를 통한 INP3의 생합성 과정 예측</u></p> <p>Region 1에서 FR-008(pantaene)과 유사한 BGC가 존재하는 것을 확인하였고 기존의 FR-008과 구조적으로 유사하나 신규유도체를 생성하는 것으로 예상되는 INP3의 생합성경로 예측(표 3-3, 그림 3-18)</p> <p>a) <i>502-0074</i>(transposase)에서 <i>502-0082</i>(transposase)까지 sequence를 분석한 결과 외래의 미생물(<i>Catenulispora acidiphila</i>)의 유전자가 transposase의 작용으로 인해 integration된 것을 확인하였으며, 이로 인해 FR-008에서 6개의 PKS gene이 존재하는 것과 다르게 INP3는 5개의 PKS gene을 보유(그림 3-18A, 표 3-3)</p> <p>b) FR-008 starter unit인 PABA(4-aminobenzoic acid)을 합성하기 위해 필요한 pabABC gene은 FR-008 BGC와는 다르게 BGC내에 존재하지 않고 Inha502 chromosome에 존재할 것으로 예측됨(INP3 BGC만 분리하여 이종숙주 발현 시 INP3 생합성이 안 될 가능성이 존재)(그림 3-18B, D)</p> <p>c) Post-PKS modification과정에서 INP3-orfP, INP3-orf-FE에 의해 -COOH로 치환될 것으로 예상됨(그림 3-18C)</p> <p>d) INP3-orfMII, INP3-orfMIII에 의해 합성된 mycosamin (sugar)이 INP3-orfMI(glycosyltransferase)에 의해 첨가될 것으로 예상됨(그림 3-18D)</p> <p>e) INP3 MIV, INP3 MV은 sugar를 modification하는 기능으로 예측되어 FR-008과는 다른 sugar가 합성될 가능성이 있으며, INP3 OII(oxidoreductase), INP3 OIII (hydrolase)의 기능으로 인해 post modification에 관여를 하게 된다면 예측된 INP3에서 추가적인 post-PKS modification이 일어날 가능성이 있음(그림 3-18A)</p> <p>gene knock-out을 통하여 INP3 유도체의 분자량을 확인하며 정확한 생합성 경로를 알아볼 예정</p>
-----------------------------	--	---	--	---

	<p>항진균 생합성 유전자군의 유전체 재설계를 통한 신규유도체 도출 (인하대학 교)</p>	<p>생물농약 후보 방선균의 특성 분석 및 유용 생합성유 전자군의 파악</p>	<p>생물농약 후보 방선균 특성 파악과 whole genome sequence 분석 및 이를 통한 유용 생합성유 전자군의 파악</p>	<p>- Inha504 균주의 <i>In silico</i> analysis를 통한 INP5의 생합성 과정 <u>예측</u></p> <p>Inha504 균주에서 항진균 활성과 관련된 폴리엔계열의 물질의 생합성유전자군을 INP5으로 선정하고 생합성 경로를 예측(그림 3-15B, 그림 3-19)</p> <p>a) Post-PKS modification과정에서 INP5 G, INP3 F에 의해 -COOH로 치환될 것으로 예상(그림 3-19B)</p> <p>b) INP5 J, INP5 C에 의해 합성된 GDP-mycosamin(sugar)이 INP5 K(glycosyltransferase)에 의해 첨가될 것으로 예상됨(그림 3-19B)</p> <p>c) INP5 D에 의해 epoxidation이 일어나 최종적으로 INP5가 생합성될 것으로 예상(그림 3-19B)</p> <p>Natamycin BGC와 비교 시 PKS gene과 post-PKS modification과정에 관여하는 gene간의 긴밀한 유사성을 보이나 PKS module의 수에서 INP5 BGC가 하나 더 존재하기에 -methyl(-CH₃)기 대신에 -propyl(C₃H₇)기가 존재할 것으로 예상됨(그림 3-19B, C)</p>
<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>항진균제 최적 생산을 위한 스케일업 최적화 (생산기술 연구원)</p>	<p>발효 스케일업 을 통한 50L 발효기 최적화</p>	<p>미생물 성장 배양 배지 조성 최적화 및 50 L 발효 수행</p>	<p>(1) Inha502 균주의 50 L 발효조 배양 수행</p> <p>- <u>미생물 제제의 원료인 균체의 대량 확보를 위해 50L 발효조 배양을 수행</u></p> <p>조건이 최적화되지 않은 상태에서 3일간 시험적인 배양을 수행한 결과 최종적으로 6.4×10⁵ cfu/mL의 균체를 획득하였으며 이는 5L 발효기 배양 결과와 유사</p> <p>발효기의 parameter를 결과로 나타낼 경우 Dry cell weight는 최종 약 20(g/L)를 나타내며 배양 36시간에서 거의 세포성장이 완료됨을 확인(그림 3-20)</p> <p>이는 공급된 YPD 배지를 36시간쯤에 모두 소모함으로써 배지 고갈로 판단되며 이때 DO의 레벨도 동시에 상승하는 것을 확인할 수 있음. 따라서 36시간정도에서 적절한 추가 배지의 공급이 가능한 유가식 배양방법을 도입할 시 높은 농도의 세포배양 공정을 확립할 수 있을 것으로 기대됨(그림 3-20)</p>

<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>향진균계 최적 생산을 위한 스케일업 최적화 (생산기술 연구원)</p>	<p>발효 스케일업 을 통한 50L 발효기 최적화</p>	<p>미생물 성장 배양 배지 조성 최적화 및 50 L 발효 수행</p>	<p>(2) 배양 배지 조성 최적화 수행</p> <p>- <u>배지의 최적 탄소원 선정</u></p> <p>2차년도 연구개발 결과 미생물 제제 제조를 위한 제형화 과정에서 초기 CFU 증가를 위해 보다 다량의 균체 투입이 필요함을 확인</p> <p>50 L 배양에서 보다 다량의 균체를 효과적으로 확보하기 위해 배양 배지 조성의 최적화를 수행</p> <p>성장 배양에 사용되는 기본 배지는 YPD broth(dextrose 20 g/L, yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L)이며, 다양한 탄소원과 질소원 그리고 인산염 등의 성분 보충을 통해 균체 성장을 촉진할 수 있으리라 기대</p> <p>우선 다양한 탄소원들이 세포성장에 미치는 영향을 확인하기 위한 실험을 수행</p> <p>해당 실험에 사용된 탄소원은 glucose, potato dextrose, galactose, mannose, fructose, xylose, ribose, arabinose, sucrose, maltose, lactose, dextrin, sorbitol, myo-inositol, glycerol</p> <p>YPD broth의 탄소원은 dextrose 20 g/L로, 상기 탄소원들을 각각 고(40 g/L), 저농도(20 g/L)로 추가하고 배양을 진행</p> <p>a. 구체적인 배양 방법은 Inha502 균주 stock을 YPD agar에 200 µL spreading하여 30℃에서 이틀간 배양</p> <p>b. 배양이 끝난 plate는 punching을 하여 30 mL의 YPD broth가 담긴 멸균된 300 mL baffled flask에 4조각을 넣고 30℃, 150 rpm으로 설정된 shaker에서 2일간 액상 배양 진행</p> <p>c. 배양된 broth를 준비된 배양액이 담긴 300 mL 플라스크에 5% 접종하여 같은 조건에서 4일간 배양</p> <p>d. 배양이 끝난 broth는 filtration을 통해 cell을 회수하여 60℃로 설정된 dry oven에서 2일간 건조한 후 중량을 측정</p> <p>Control인 dextrose 20 g/L 조건과 비교하여 xylose 및 sucrose가 20 g/L 농도에서 균체 생성량을 증가시키는 효과가 있음을 확인(표 3-4)</p> <p>대부분의 탄소원에 대해 고농도(40 g/L) 조건에서는 오히려 최종 균체량이 감소하는 경향이 확인되어 고농도 탄소원에 의한 성장 저해 효과가 존재할 수 있음을 암시(표 3-4)</p> <p>경제성의 측면에서 sucrose 20 g/L를 최적의 탄소원으로 선정하고 다음 단계의 배지 조성 최적화를 진행</p>
-----------------------------	---	---	---	--

<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>항진균제 최적 생산을 위한 스케일업 최적화 (생산기술 연구원)</p>	<p>발효 스케일업 을 통한 50L 발효기 최적화</p>	<p>미생물 성장 배양 배지 조성 최적화 및 50 L 발효 수행</p>	<p>- <u>배지의 최적 질소원 선정</u></p> <p>앞서 선정한 탄소원인 sucrose 20 g/L를 고정하고 질소원 선정 실험을 추가적으로 진행</p> <p>질소원은 크게 complex 성분과 synthetic 성분으로 구분할 수 있는데, 각각의 종류가 다양하기 때문에 본 실험에서는 대표적인 complex 질소원인 tryptone, casitone, yeast extract, tryptic soy both, brain heart infusion, bacto peptone, corn steep solid, cotton seed flour, molasses를 대상으로 고(30 g/L), 저농도(15 g/L) 조건을 설정하고 비교 실험을 진행</p> <p>Peptone 20 g/L 및 yeast extract 10 g/L를 이용하는 control 배양을 동시에 진행하였으며 추가적으로 인산염의 효과를 확인하기 위해 KH_2PO_4 2 g/L를 추가 또는 제외하고 상기 탄소원 선정 실험과 동일한 방법으로 실험을 진행</p> <p>실험 결과에서 알 수 있는 바와 같이 대부분의 경우 인산염 추가 시 세포 생산량이 증가함을 확인(표 3-5A)</p> <p>Corn steep solid, cotton seed flour 이용 시 높은 세포 생산량을 확인하였으나 이들은 불용성 성분으로 최종 건조 균체량 측정 시에 오류가 발생할 가능성을 고려하여 30 g/L의 yeast extract를 최적 질소원으로 선정(표 3-5)</p> <p>- <u>질소원 추가 투입을 통한 균체 생산성 향상</u></p> <p>상기 실험에서 종류에 관계없이 질소원 농도가 높아질 경우 최종 균체 생성량이 증가하는 경향을 확인(표 3-5)</p> <p>배양 중 질소원을 추가 투입함으로써 균체 성장을 촉진할 수 있는 가능성을 확인하는 시험을 수행</p> <p>추가 투입에 적절한 질소원을 선정하기 위해 기본 배지(조성: sucrose 20 g/L, yeast extract 30 g/L, KH_2PO_4 2 g/L)에 synthetic 질소원과 앞서 수행한 질소원 선정 실험에서 좋은 효과를 보였던 complex 질소원 몇 가지를 선정해 배양 중 추가투입 실험을 진행</p> <p>실험에 사용한 synthetic N 성분은 ammonium sulfate, ammonium phosphate monobasic, ammonium phosphate dibasic, ammonium tartrate dibasic, ammonium chloride, ammonium nitrate, ammonium carbonate, ammonium hydroxide, urea 이며, complex N 성분은 peptone, tryptic soy broth, tryptone 추가 농도는 5 g/L로 설정하고 실험을 진행</p> <p>대부분 질소원의 추가 투입은 control과 비교하여 대부분이 상승된 균체 생산성을 보였고 그중 ammonium phosphate monobasic을 5 g/L 추가했을 때 가장 좋은 효과를 확인하고 이후 실험에서 해당 조건을 사용(표 3-6)</p>
-----------------------------	---	---	---	--

<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>항진균제 최적 생산을 위한 스케일업 최적화 (생산기술 연구원)</p>	<p>폴리엔 물질의 분리정제 시스템 확립 및 고순도 분리공정 시스템 개발</p>	<p>폴리엔 화합물의 순수분리 정제 시스템을 구축</p>	<p>(1) INP2의 extraction 최적화</p> <ul style="list-style-type: none"> - <u>extraction과정에서 효율이 높은 방법을 선정하고자 사용하는 용매 최적화 진행</u> <p>추출하는 용매와 관련해서는 Methanol과 butanol이 주로 사용되었고 HPLC 분석 결과 효율은 큰 차이를 보이지 않음(그림 3-21A)</p> <p>추출 후 open column을 이용한 정제 시 추출물의 점성에 따른 효율의 차이가 존재하는데 물 층과 혼합되는 methanol보다는 친수성과 층 분리되는 n-butanol을 사용(그림 3-21B)</p> <ul style="list-style-type: none"> - <u>extraction과정에서 효율이 높은 방법을 선정하고자 pH 최적화 진행</u> <p>낮은 pH상태에서 추출할 경우 더 많은 cell의 lysis와 INP2와 INP2 유도체간의 분리를 기대하고 시험을 수행하였으나 pH가 많이 낮아지면 INP2 degradation으로 인해 수율이 낮아지는 문제를 확인(그림 3-22)</p> <p>약산성상태인 pH 6에서 extraction을 진행할 경우 가장 높은 수율이 확인</p> <p>(2) INP2 생산균주의 배양기간 최적화</p> <ul style="list-style-type: none"> - <u>INP2 생산균주인 <i>S. lividans</i> TK21/pINP2의 배양기간 최적화</u> <p>INP2의 활성을 확인하거나 구조를 파악하기 위해서는 INP2의 순수분리를 진행하여야 하는데 이를 위한 INP2 생산균주의 최적 배양기간 선정</p> <p>생산배지는 INP2의 가장 많은 생산량을 보였던 R5 배지를 사용하였고 5L fermentor(working volume 2L)을 이용한 배양기간 최적화를 진행</p> <p>배양기간별 INP2의 생산량 및 순도를 확인한 결과 3일차에서는 INP2 생합성과정에서의 중간체가 보였으며 5일차로 넘어갈 때 INP2의 생산량이 큰 폭으로 상승 하였고 7일차 이후로는 불순물과 INP2의 유도체들이 쌓이는 것을 관찰(그림 3-23)</p> <p>적절한 배양기간은 5~7일 사이로 판단됨</p>
-----------------------------	---	--	---	--

<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>항진균제 최적 생산을 위한 스케일업 최적화 (생산기술 연구원)</p>	<p>폴리엔 물질의 분리정제 시스템 확립 및 고순도 분리공정 시스템 개발</p>	<p>폴리엔 화합물의 순수분리 정제 시스템을 구축</p>	<p>(3) INP2의 HPLC 분석 method 최적화</p> <p>- <u>HPLC 분석 시 사용할 mobile phase 최적화</u></p> <p>기존에 사용하고 있는 polyene 분석 method로는 INP2 분석이 어려운 것을 확인(MS/MS analysis 결과 순수하게 분리했다고 생각했던 INP2 fraction이 mixture임을 확인)(그림 3-24A, B) INP2의 구조 특성 상 다른 polyene계열의 물질들 보다 친수성으로 판단되어 더 친수성이 있는 acetonitrile을 이용한 HPLC method 최적화를 진행(그림 3-9) 여러 method 중 acetonitrile 40% isocratic method(0.05M ammonium acetate, pH6.5)에서 2개의 peak으로 분리됨을 확인(그림 3-24C) 항진균 활성테스트를 통해 구간 2에서 항진균 활성이 나타나는 INP2 compound를 확인하였고 Mass analysis을 통해 검증(그림 3-24D, E)</p> <p>- <u>HPLC 분석 시 사용할 method 최적화</u></p> <p>HPLC에 사용되는 column의 변화나 column 온도의 변화를 주었으나 긍정적인 결과는 관찰되지 않았으나 1ml/min에서 0.5ml/min로 flow rate를 낮춰 안정적인 분리가 가능하도록 최적화를 진행(그림 3-24F) 기존의 polyene method는 40분이었으나 추출방법의 최적화와 method의 최적화를 통해 분석 method를 20분으로 최적화함</p> <p>(4) INP2의 MPLC 분석 method 최적화</p> <p>- <u>MPLC 분석 시 사용할 method 최적화</u></p> <p>INP2의 HPLC method 방법을 참고하여 대량 분리를 위한 MPLC method 최적화 진행 사용할 column의 수(길이)와 적절한 flow rate에 대한 최적화와 고순도의 INP2 fraction 구간을 확인(그림 3-25, 표 3-7)</p>
-----------------------------	---	--	---	---

	<p>향진균제 최적 생산을 위한 스케일업 최적화 (생산기술 연구원)</p>	<p>폴리엔 물질의 분리정제 시스템 확립 및 고순도 분리공정 시스템 개발</p>	<p>폴리엔 화합물의 순수분리 정제 시스템을 구축</p>	<p>MPLC method flow rate : 20ml/min, pressure : 10bar, column 2개 연결 a) Column만 연결 / MeOH / 100% (10min), 100% -> 30% (30min), 30% (10min) b) Column, sample loading 연결 / MeOH / 30% (20min) c) Column만 연결 / Acetonitrile / 40% (20min) d) Column, sample loading 연결 / Acetonitrile / 40% (60min), mAU 20이상 30s마다 fraction e) Column, sample 연결 / MeOH / 30% (10min), 30% -> 100% (40min), 100% (10min)</p> <p>10분에서 25분까지 retention time이 8.7분대 고순도 INP2가 분리되는 것을 확인(그림 3-25A, B) 폴리엔 화합물의 순수분리정제를 위해 MPLC을 이용한 대량 고 순도 분리정제 시스템을 구축</p>
<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>친환경 농약을 위한 작물 진균 제어능 및 안정성 검증 (에스티알 바이오텍)</p>	<p>선별된 후보균주 의 제형 최적화 진행</p>	<p>미생생물 제제 제조시 균체수 증대 및 안정성 확보를 위한 제형화 기술 개발</p>	<p>(1) 최적 제형화 조건 확인 및 랩 스케일 제형화 수행</p> <p>- <u>최적 제형화를 선정</u></p> <p>2차년도 연구개발 과정에서 확인된 후보 제형 조성들의 최적화 를 통해 균주 생존율, 장기 보관 안정성 등의 측면에서 다음과 같은 최적 제형화 조성을 선정: cell:mixture:cone:starch = 50:40:5:5</p> <p>대용량 동결건조 및 제형화에 앞서 상기 최적 조성 및 랩 스케 일 동결건조기를 이용하여 제형화를 수행한 결과 1×10^7 cfu/g 이상의 균체수 확보가 가능함을 확인(그림 3-26)</p> <p>(2) 대용량 배양 및 제형화 수행</p> <p>- <u>대용량 제형화에 필요한 균체 확보를 위해 Inha501, Inha502 30 L 배양을 수행(그림 3-27A)</u></p> <p>a) 균주 stock을 YPD agar에 200 μL spreading 하여 30°C에서 이틀간 배양 b) 배양이 끝난 plate는 punching을 하여 30 mL의 YPD broth가 담긴 멸균된 300 mL baffled flask에 4조각을 넣어 30°C, 150 rpm 조건으로 설정된 shaker에 2일간 액상배양 진행 c) 배양된 broth를 준비된 배양액이 담긴 5 L flask에 5% 농도 로 접종하여 동일한 조건에서 2일간 배양 d) 배양 후 해당 broth를 이용하여 50 L 발효기의 최적화된 액 체배지(조성: sucrose 20 g/L, yeast extract 30 g/L, KH_2PO_4 2 g/L)에 5% 농도로 접종하여 동일조건에서 2일간 배양</p>

<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>친환경 농약을 위한 작물 진균 제어능 및 안정성 검증 (에스티알 바이오텍)</p>	<p>선별된 후보균주 의 안정화, 제형화</p>	<p>미생생물 제제 제조시 균체수 증대 및 안정성 확보를 위한 제형화 기술 개발</p>	<p>- 30L 배양한 Inha501, Inha502의 제형화 실시</p> <p>배양 종료 후 filtration과 원심분리를 통해 cell을 회수하고 설정된 조성에 따라 제형제와 혼합 후 대용량 장치(20 kg batch type)에서 동결건조 진행(그림 3-27B)</p> <p>- 대용량 제형화에 필요한 균체 확보를 위해 상업 배양 배지(TSB)를 이용하여 Inha501의 300 L 배양을 수행 후 제형화 실시(그림 3-28A)</p> <p>a) 균주 stock을 YPD agar에 200 μL spreading 하여 30℃에서 이틀간 배양</p> <p>b) 배양이 끝난 plate는 punching을 하여 150 mL의 TSB broth가 담긴 멸균된 500 mL baffled flask에 4조각을 넣어 30℃, 200 rpm 조건으로 설정된 shaker에 2일간 액상배양 진행</p> <p>c) 배양된 broth를 준비된 배양액이 담긴 50 L 발효기에 2% 농도로 접종하여 동일한 조건에서 2일간 배양</p> <p>d) 배양 후 해당 broth를 이용하여 500 L 발효기의 최적화된 액체배지(조성: sucrose 20 g/L, yeast extract 30 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L)에 5% 농도로 접종하여 동일조건에서 2일간 배양</p> <p>배양 종료 후 원심분리를 통해 cell을 회수하고 설정된 조성에 따라 제형제와 혼합 후 대용량 장치(20 kg batch type)에서 동결건조 진행(그림 3-28B, C)</p>
		<p>다양한 조건에서 의 항진균력 과 안전성 검증</p>	<p>Inha503, Inha504 균주의 실내검정 시험</p>	<p>(1) Inha503, Inha504 균주의 약효·약해를 조사하기 위한 실내 검정시험</p> <p>- Inha503, Inha504 균주의 시들음병에 대한 항진균력 검증을 위한 약효시험결과</p> <p>새롭게 선별된 Inha503, Inha504의 배양액을 이용하여 실제 작물에 적용하는 약효확인실험을 통해 생물농약으로서의 가능성을 확인하기 위한 실내검정 시험을 진행</p> <p>시험작물은 고추(독야청정), 토마토(슈퍼도태랑), 딸기(설향)을 사용하였고 시들음병(<i>Fusarium oxysporum</i>)에 대한 항진균 활성을 확인(그림 3-29, 표 3-8)</p> <p>약효시험평가는 최종약제처리 10일 후 구당 전체주수에 대한 이병주율을 조사하였고, 처리구 간 유의차 검정은 Duncan 's multiple range test(DMRT)로 95% 수준에서 유의성을 검정</p> $\text{이병주율(\%)} = \frac{\text{이병주수}}{\text{총 조사주수}} \times 100$

<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>친환경 농약을 위한 작물 진균 제어능 및 안정성 검증 (에스티알 바이오텍)</p>	<p>다양한 조건에서 의 향진균력 과 안전성 검증</p>	<p>Inha503, Inha504 균주의 실내검정 시험</p>	<p>실내검정시험 결과 고추, 토마토, 딸기 3종에 대해서 유기농자재로 등록이 가능한 방제가 50%이상의 결과를 확인(표 3-9) 특히, Inha503은 작물 3종 중 토마토의 방제가 72.2%로 가장 좋은 결과를 보였으며, Inha504는 토마토의 방제가 63.9%로 우수한 결과를 확인</p> <p>- <u>Inha503, Inha504 균주의 안전성 검증을 위한 약해시험결과</u></p> <p>새롭게 선별된 Inha503, Inha504의 배양액을 이용하여 실제 작물에 적용하는 약해확인실험을 통해 안전성 검증을 확인하기 위한 실내검정 시험을 진행 약해시험을 위해 사용한 작물은 고추(독야청정, 옐로우 스위트), 토마토(슈퍼도태랑, 미니마루), 딸기(설향)을 사용하였고 Inha503, Inha504를 시험작물에 기준량(500배 희석액)과 배량(250배 희석액)으로 처리한 후 약해유무를 달관조사를 진행하였고 Inha503, Inha504은 약해가 없는 것을 확인(표 3-9)</p> <p>- <u>Inha503, Inha504 균주의 실내검증을 통한 종합적인 전문가의 평가(시험보고서 KPER-19-0-125)</u></p> <p>Inha503, 504의 시험작물(토마토, 고추, 딸기) 시들음병 방제 효과는 50%이상 효과를 보였으며 처리구별 통계적 유의성을 검정한 결과 무처리구와 대비하여 통계적으로 유의성이 인정됨 또한, 작물의 약해시험을 위해 시험자재의 기준량과 배량을 시험작물 5종(토마토, 방울토마토, 고추, 단고추, 딸기)에 살포 후 약해증상을 관찰한 결과, 약해증상은 관찰되지 않았으므로 시험자재 Inha503, 504는 시험작물(토마토, 고추, 딸기)의 시들음병에 대하여 우수한 방제효과를 나타내며 실용성이 있다고 판단됨</p>
			<p>Inha501, Inha502 제형화 제품의 안전성 검증 및 향진균 활성 검증</p>	<p>(1) Inha501, Inha502 제형화 제품의 약해시험결과</p> <p>- <u>Inha501, Inha502 제형화 제품의 약해시험결과(시험보고서 KPER-19-0-123, KPER-19-0-124)</u></p> <p>Inha501, Inha502 제형화 제품의 유기농 자재 제품등록을 위한 유식물 5종에 대한 약해시험을 진행 사용한 작물은 오이(조은백다다기), 토마토(호용), 호박(농우애호박), 상추(선풍), 배추(불암3호)을 사용하였고 시설재배 작물에 적용하였으며, Inha501, Inha502 제형화 제품을 시험작물에 기준량(500배 희석)과 배량(250배 희석)으로 처리한 후 약해유무 달관조사를 진행</p>

<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>친환경 농약을 위한 작물 진균 제어능 및 안정성 검증 (에스티알 바이오텍)</p>	<p>다양한 조건에서 의 항진균력 과 안전성 검증</p>	<p>Inha501, Inha502 제형화 제품의 항진균 활성 검증 및 안전성 검증</p>	<p>약해시험결과 Inha501, Inha502 제형화 제품은 오이, 토마토, 호박, 상추, 배추에 대하여 약해가 없어 유기농 자재 공시용으로 적합할 것으로 판단됨(그림 3-30)</p> <p>이러한 사실을 바탕으로 제형화 제품의 유기농 자재 등록을 위한 유효 미생물 균수 및 균 동정분석, 병원성 미생물 5종 분석, 잔류농약검사의 과정을 “강원대 친환경농산물안전성센터”에서 진행 중이며 분석시험이 완료되면 독성검사(인축독성시험-급성경구독성, 급성경피독성시험, 안점막자극성시험, 피부자극성시험, 피부감작시험 / 생태독성시험 - 담수어영향시험)를 “에이비솔루션”에서 실시할 예정</p> <p>(2) Inha501, Inha502 제형화 제품의 약효시험결과</p> <p>- <u>Inha501, Inha502 제형화 제품의 토마토 시들음병에 대한 약효 시험결과(시험보고서 KPER-19-0-119, KPER-19-0-120)</u></p> <p>Inha501, Inha502 제형화 제품의 토마토 시들음병에 대한 항진균 활성을 확인하고자 시설 재배 작물에 대한 포장실험을 진행 시험장소는 경기도 수원시 권선구, 강원도 화천군 사내면에서 진행하였으며 사용한 작물은 토마토(슈퍼도태랑, 슈퍼스타)이며 시들음병(<i>Fusarium oxysporum</i>)에 대한 항진균 활성을 확인 시험 방법은 난괴법 3반복 및 완전임의배치법 3반복으로 진행을 하였고 약효시험은 7, 14, 21일 약제 처리가 끝나고 10일 후 이병주수를 조사함</p> <p>시험장소는 경기도 수원시 권선구, 강원도 화천군 사내면에서 진행하였으며 사용한 작물은 토마토(슈퍼도태랑, 슈퍼스타)이며 시들음병(<i>Fusarium oxysporum</i>)에 대한 항진균 활성을 확인(그림 3-31)</p> <p>a. 경기도 수원시 권선구에서의 약해시험 결과 토마토 시들음병의 무처리구 평균 발병율이 13.1%로 약제를 평가하기에 충분한 조건</p> <p>Inha501 제형화 제품은 51.5%, Inha502 제형화 제품은 54.8%의 방제 효과를 보였으며 처리구별 통계적 유의성을 검정한 결과 무처리구와 대비하여 통계적으로 유의성이 인정(표 3-10A)</p> <p>작물의 약해시험을 위해 공시자재의 기준량과 배량을 토마토 및 방울토마토에 살포 후 약해증상을 관찰한 결과, 약해증상은 관찰되지 않음</p> <p>b. 강원도 화천군 사내면에서의 약해시험 결과 토마토 시들음병의 무처리구 평균 발병율이 15.4%로 약제를 평가하기에 충분한 조건</p>
-----------------------------	--	---	--	---

<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>친환경 농약을 위한 작물 진균 제어능 및 안정성 검증 (에스티알 바이오텍)</p>	<p>다양한 조건에서 의 항진균력 과 안전성 검증</p>	<p>Inha501, Inha502 제형화 제품의 항진균 활성 검증 및 안전성 검증</p>	<p>Inha501 제형화 제품은 65.0%, Inha502 제형화 제품은 65.7%의 방제 효과를 보였으며 처리구별 통계적 유의성을 검정한 결과 무처리구와 대비하여 통계적으로 유의성이 인정(표 3-10B) 작물의 약해시험을 위해 공시자재의 기준량과 배량을 토마토 및 방울토마토에 살포 후 약해증상을 관찰한 결과, 약해증상은 관찰되지 않음(표 3-11C)</p> <p>종합적인 전문가의 의견으로 Inha501, Inha502 제형 제품은 약해증상은 관찰되지 않았고 방제가 50%이상의 약효가 입증되었기에 토마토 시들음병에 대한 실용성이 있다고 판단</p> <p>- <u>Inha501, Inha502 제형화 제품의 고추 시들음병에 대한 약효시험결과</u></p> <p>현재 시험은 완료 하였고 결과보고서를 기다리는 중이며 고추에서도 방제가 50%이상으로 약효가 입증되었고 약해시험 또한 약해없음이 관찰되었기에 고추 시들음병에 대한 실용성이 있다고 판단됨</p>
	<p>3차 년도 (2020)</p>	<p>Inha501, Inha502 제형화 제품으로 인한 토양의 미생물의 분포 변화 분석</p>	<p>Metagenome 분석 시스템을 응용한 토양미생물군집의 변화 확인</p>	<p>(1) Inha501, Inha502 제형화 제품으로 인한 토양 미생물군집의 변화 확인</p> <p>- <u>Metagenome 분석 시스템을 응용한 Inha501, Inha502 제형화 제품으로 인한 토양미생물군집의 변화관찰</u></p> <p>미생물과 토양(환경)간의 상호작용을 관찰하고자 Inha501, Inha502 제형화 제품으로 인한 토양의 변화를 Metagenome 분석 시스템을 응용하여 관찰하고자 하였으며 Inha501, Inha502 균주가 토양에 잘 정착하였는지 확인하고자 함 Inha501, Inha502 제형화 제품의 약해시험을 진행한 고추농가의 토양을 채취하여 total DNA 추출 진행 중 추출한 토양 sample의 total DNA을 이용하여 16s rRNA sequence기반의 종 분류를 위한 metagenome 분석이 진행 중이며 채취한 토양은 control(생존한 작물의 토양), 무처리군(시들음병으로 인해 고사한 작물의 토양), Inha501처리군, Inha502처리군에서 각각 2개를 무작위 선별하여 진행함 분석한 결과를 바탕으로 Inha501, Inha502의 투입으로 인한 토양 미생물군집의 변화를 관찰하고 무처리군과의 비교를 통해 미생물간의 상호작용 및 식물간의 상호작용을 밝히는데 연구 자료로 활용할 예정 또한 추출한 토양 sample의 total DNA을 이용하여 Inha501, Inha502의 specific primer을 이용한 qRT-PCR을 진행하여 대략적인 토양에서의 분포율을 확인하여 토양 적응력을 검증할 예정</p>

※ 3차연도 연구결과 그림 및 표

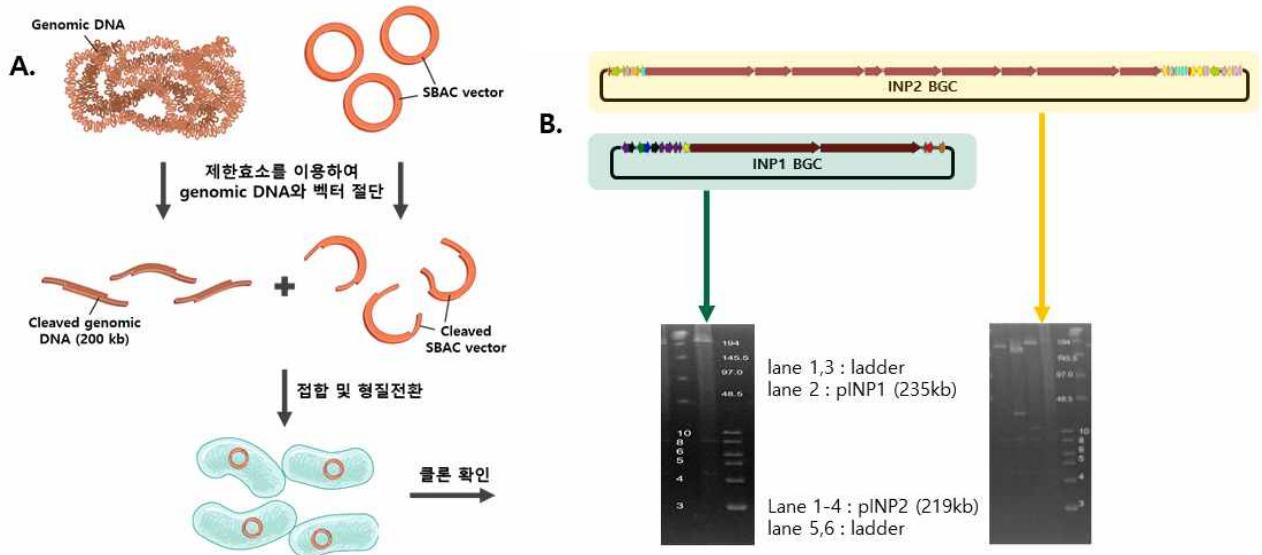


그림 3-1A. INP1, INP2 BGC의 *Streptomyces* 클론 확인
 그림 3-1B. INP1, INP2 BGC을 포함하는 SBAC vector 확인 (INP1 BGC (81kb)를 포함하는 pINP1, INP2 BGC (170kb)를 포함하는 pINP2)

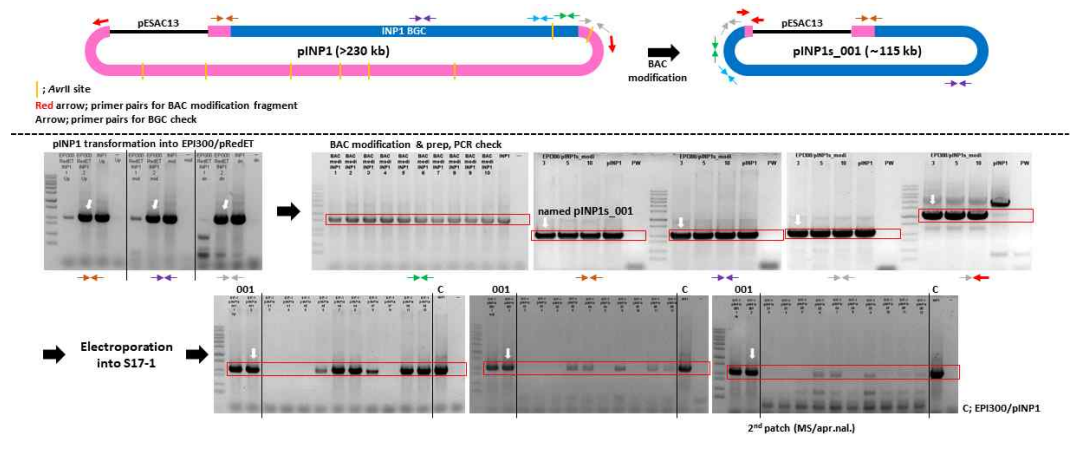


그림 3-2. partial digestion을 이용한 self ligation 방법으로 필요 없는 부분이 제거된 pINP1s vector 구축

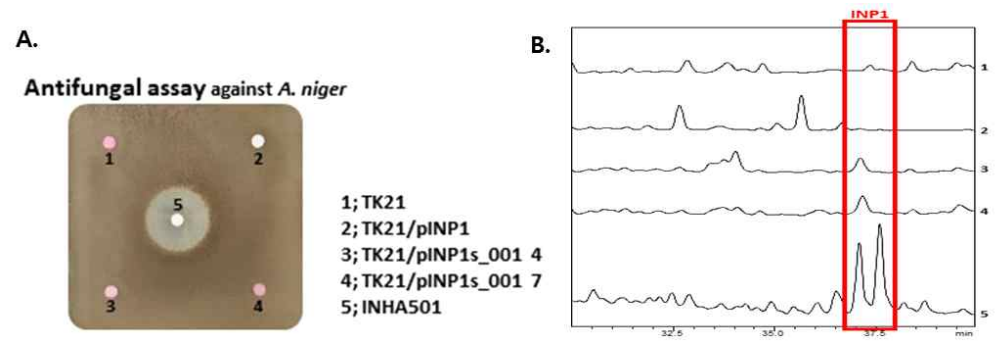
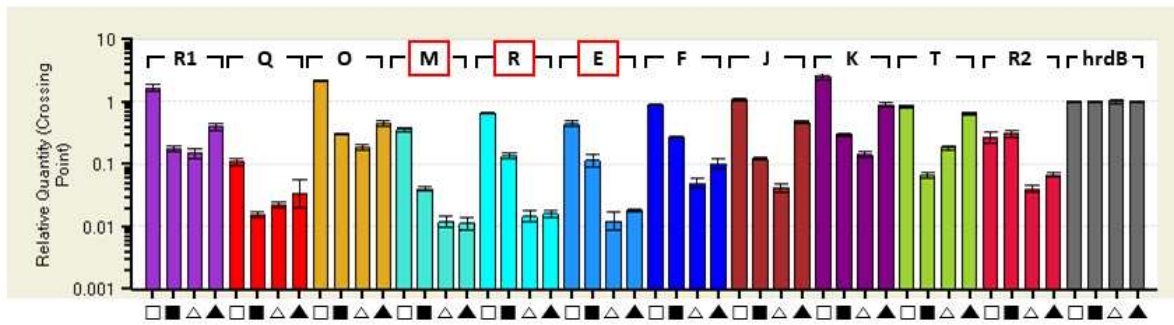
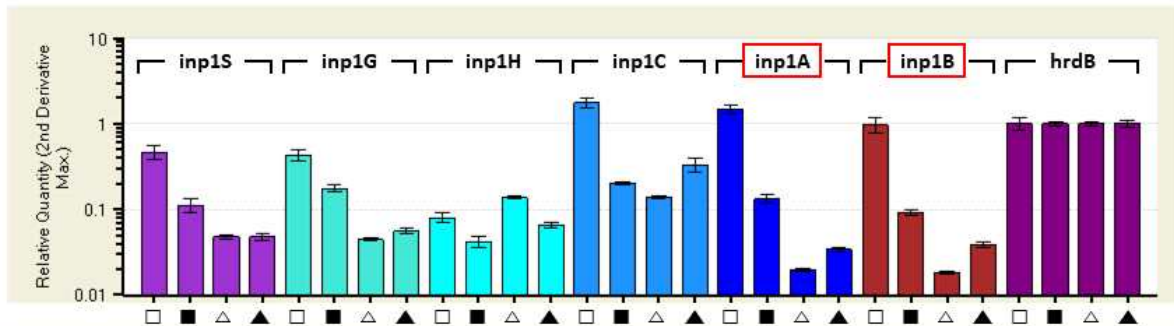


그림 3-3. INP1 BGC의 *S. lividans* TK21에 이중숙주발현 후 항진균 활성 확인 및 HPLC 분석



- ✓ Inp1A, Inp1B ; polyketide synthase
 - ✓ Inp1M; predicted dehydratase
 - ✓ Inp1R; probable cytochrome P450
 - ✓ Inp1E; predicted acyl-CoA transferases/carnitine dehydratase
- ; Inha501 Day 3
 - ; Inha501 Day 5
 - △; TK21/pINP1s_001 Day 3
 - ▲; TK21/pINP1s_001 Day 5

그림 3-4. *S. lividans* TK21/pINP1s와 Inha501 wild type간의 INP1 관련 유전자 전사량 비교

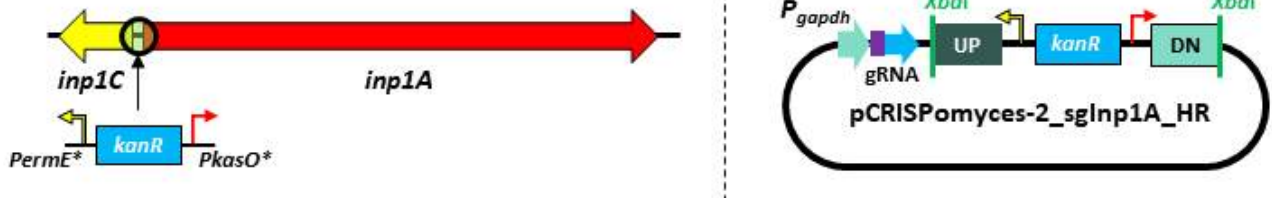


그림 3-5. CRISPER-Cas9 system기반의 프로모터 engineering construct 구축



그림 3-6. INP2, INP2 aglycone 이중숙주발현 균주인 *S. lividans* TK21/pINP2, *S. lividans* TK21/pINP2ΔH (colony 1 ~ 6)의 항진균활성테스트

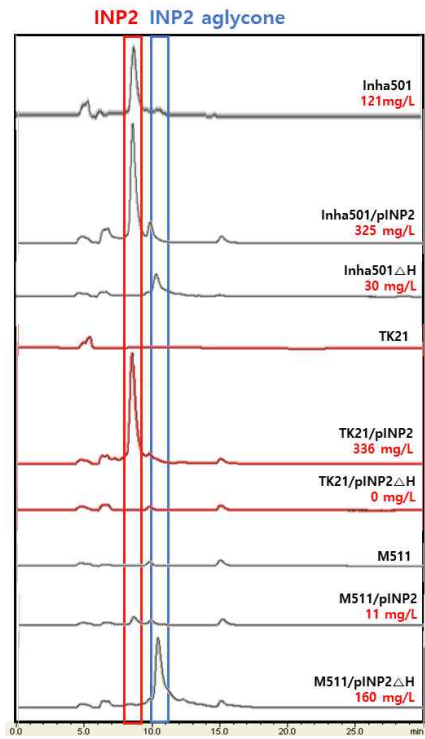


그림 3-7. INP2, INP2 aglycone 생산균주의 배양 후 HPLC 분석결과

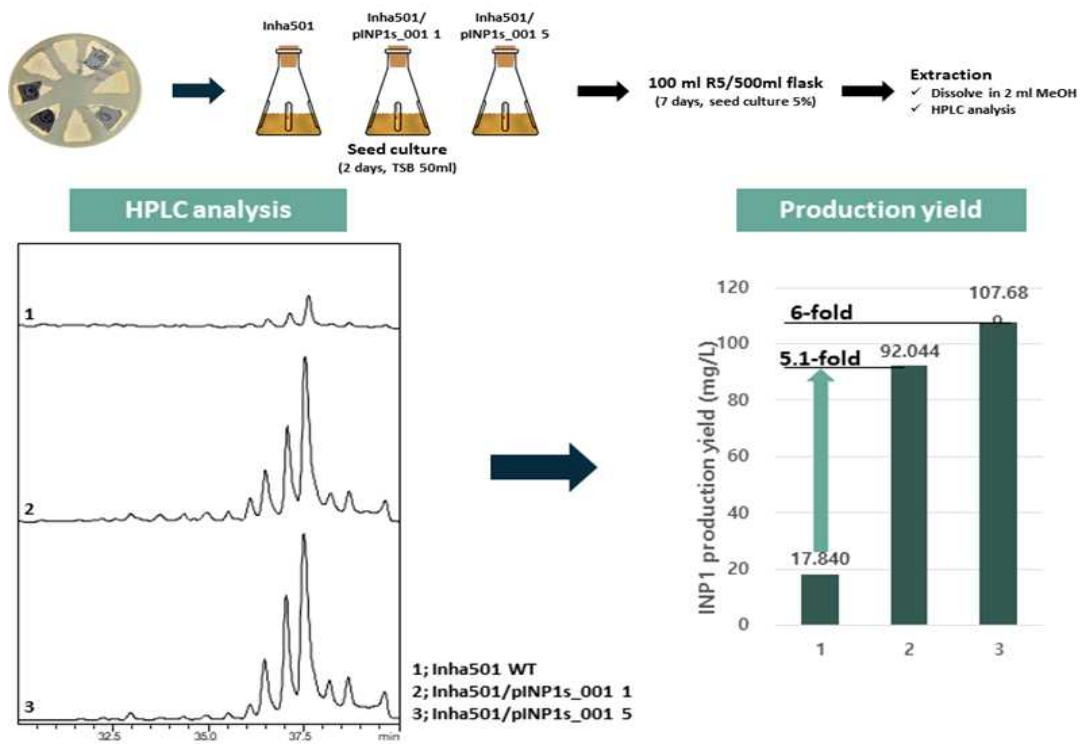


그림 3-8. Inha501 wild type과 INP1 과발현균주의 비교배양 및 HPLC 분석결과

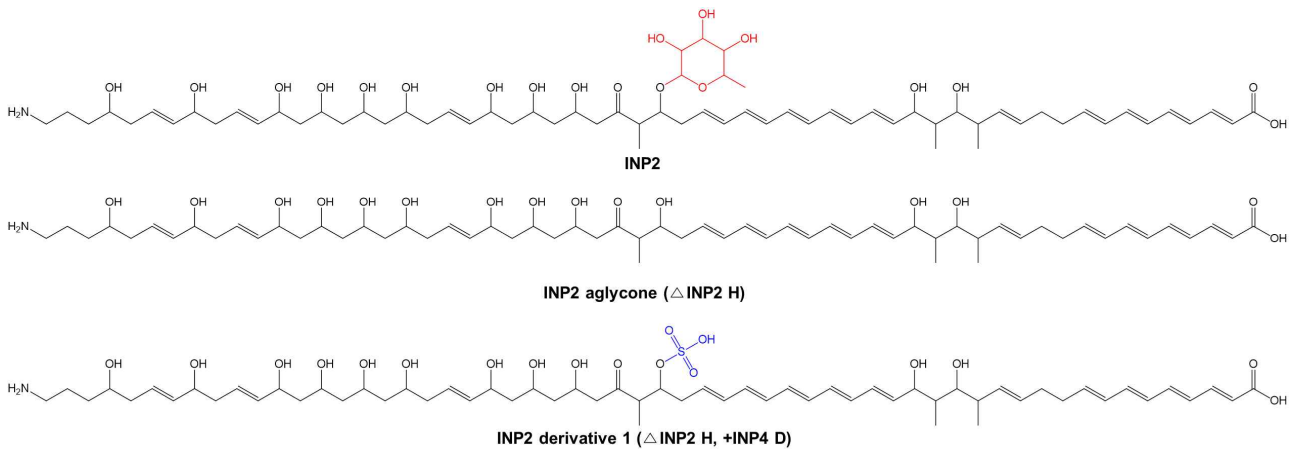


그림 3-9. INP2와 INP2 유도체의 예상 구조

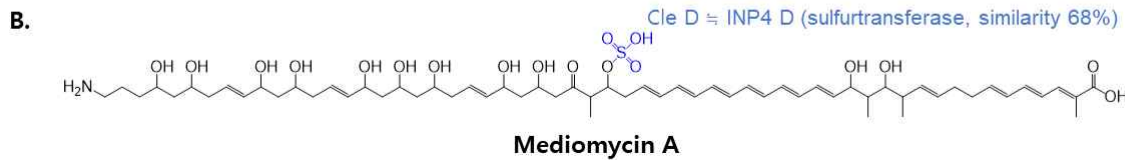
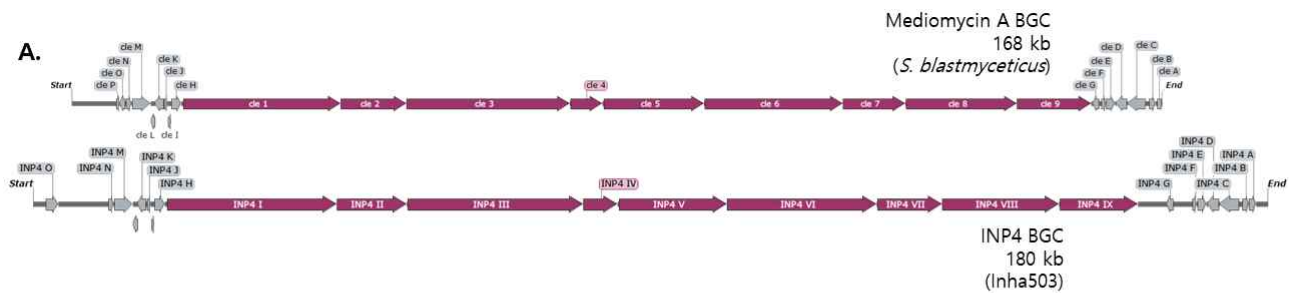


그림 3-10. Mediomicin A BGC와 INP4 BGC간의 비교

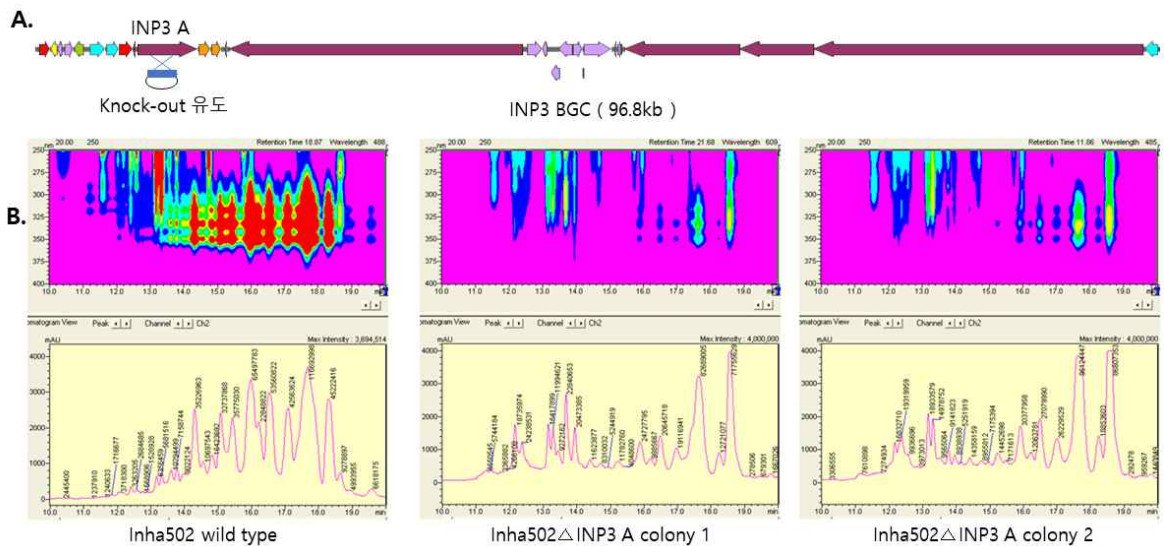


그림 3-11. INP3 A knock-out scheme(A) 및 Inha502 wild type과 Inha502 Δ INP3 strain의 비교배양 후 HPLC분석결과(B)

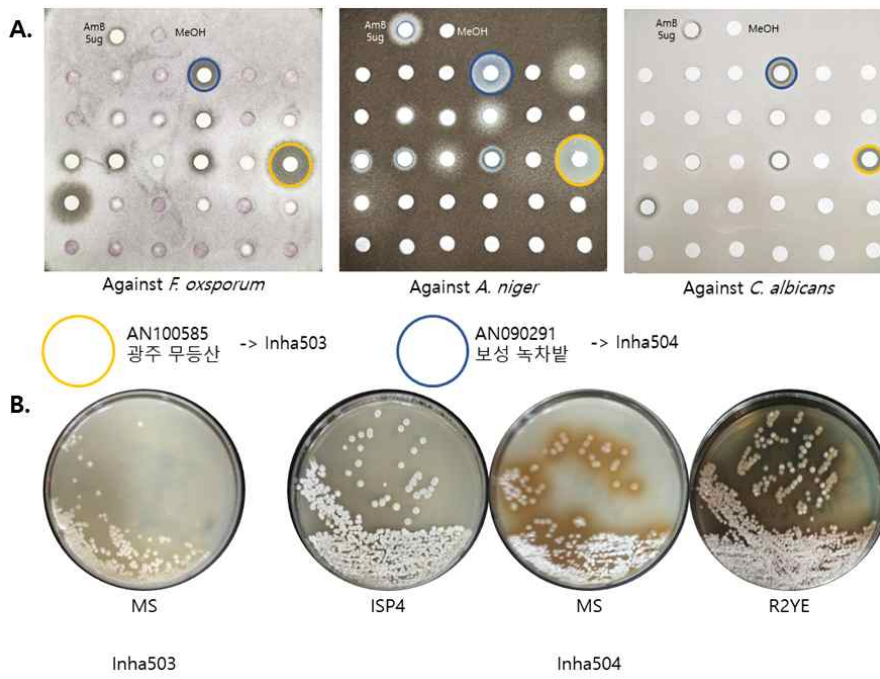


그림 3-12. Inha503, Inha504를 선정한 항진균 활성테스트 결과(A) 및 Inha503, Inha504의 배지테스트 결과(B)

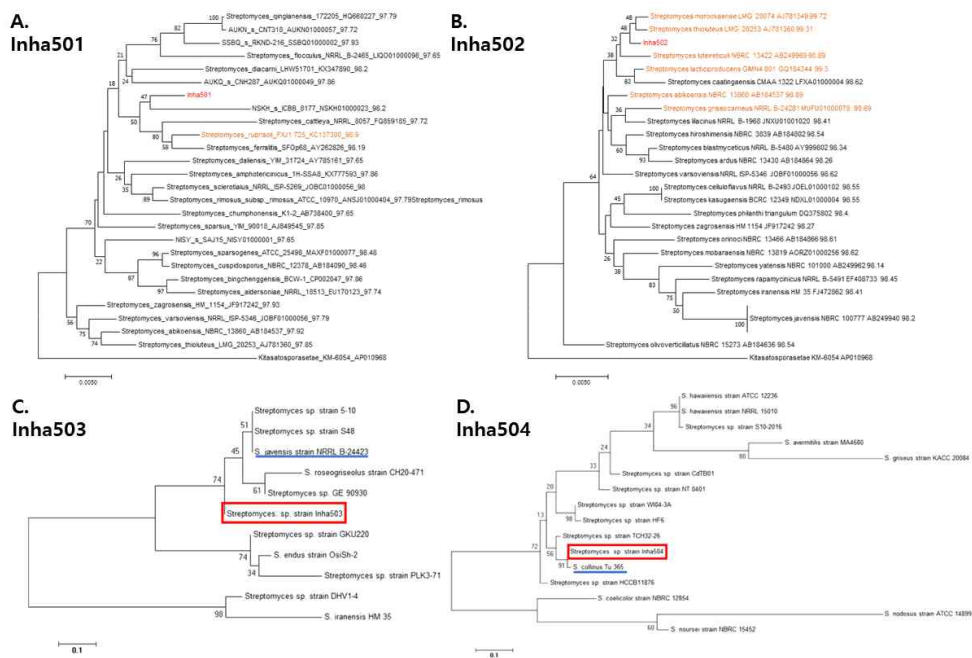


그림 3-13. 생물농약 후보 균주들의 16s rRNA sequence기반 phylogenetic tree

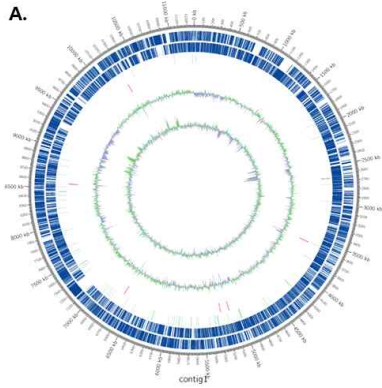


그림 3-14. Inha503의 contig 1(chromosomal DNA map)(A)과 antiSMASH 분석결과(B)

B.

Region	Type	Most similar known cluster	Similarity
Region 1	T1PKS	herbimycin A	26%
Region 2	NRPS	coelicidin	100%
Region 3	siderophore	natamycin	9%
Region 4	NRPS	6-methylstreptomycin	25%
Region 5	NRPS, T1PKS	mediomycin A	20%
Region 6	butyrolactone	cythomycin A	9%
Region 7	NRPS	gripenolone / fipmycin A	8%
Region 8	T1PKS	halichromycin C	74%
Region 9	T1PKS	nigericin	100%
Region 10	T1PKS	salinomycin	8%
Region 11	T1PKS	elaiophyllin	83%
Region 12	lactonase	diatomycin	3%
Region 13	butyrolactone		
Region 14	NRPS, T3PKS, other	teglymycin	84%
Region 15	T1PKS, NRPS	verapipolactin	17%
Region 16	terpene	spore pigment	76%
Region 17	T2PKS		83%
Region 18	T1PKS	s58-p1	11%
Region 19	bacteriocin		
Region 20	siderophore		
Region 21	NRPS-like	echoside A / echoside B / echoside C / echoside D / echoside E	100%
Region 22	siderophore	desferrioxamin B	100%
Region 23	terpene	geldamycin	100%
Region 24	T2PKS	W57008A / hexarion B / hexarion C	33%
Region 25	ladderane, arylpolyene, NRPS	atratumycin	57%
Region 26	inolis	5-isoprenylindole-3-carboxylate β -D-glycosyl ester	61%
Region 27	NRPS	ochromycin pigment	75%
Region 28	arylpolyene, ladderane	atratumycin A	31%
Region 29	T1PKS	mediomycin A	82%
Region 30	ectoine	ectoine	100%
Region 31	siderophore		
Region 32	terpene	BE-43547A1 / BE-43547A2 / BE-43547B1 / BE-43547B2 / BE-43547B3	20%
Region 33	T1PKS, lactactone	lasaloid	15%
Region 34	NRPS, nucleoside, T1PKS	rapamycin	92%
Region 35	PKS-like	rustmin	20%
Region 36	terpene	2-methylisoborneol	100%
Region 37	T1PKS, NRPS-like	geldanamycin	69%
Region 38	T1PKS, ladderane, arylpolyene	atratumycin	28%
Region 39	T1PKS, NRPS-like	hygrobin A / hygrobin B	93%
Region 40	NRPS	halobactin	3%
Region 41	lanthipeptide	reserpinomycin	9%
Region 42	T1PKS, hglE-KS	balfoimycin B1	58%
Region 43	bacteriocin		
Region 44	NRPS	leinamycin	5%
Region 45	terpene	atolypene A / atolypene B	23%
Region 46	terpene	oxalomycin B	6%

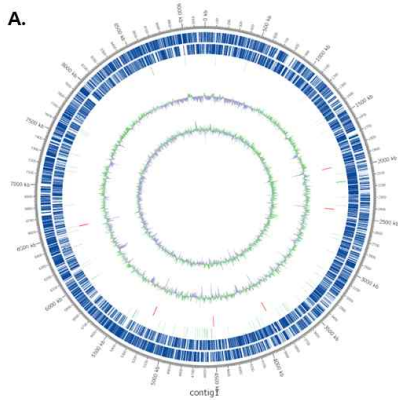


그림 3-15. Inha504의 contig 1(chromosomal DNA map)(A)과 antiSMASH 분석결과(B)

B.

Region	Type	Most similar known cluster	Similarity
Region 1	lanthipeptide	venezuelin	100%
Region 2	terpene	KS-505a	11%
Region 3	T1PKS, terpene	cremimycin	40%
Region 4	bacteriocin		
Region 5	lanthipeptide		
Region 6	terpene, melanin	melanin	71%
Region 7	NRPS, T1PKS	foxicins A-D	12%
Region 8	T2PKS, ectoine	kosinostatin	47%
Region 9	T3PKS	herboxidien	6%
Region 10	T1PKS, hglE-KS	cinnamycin	19%
Region 11	ectoine	ectoine	100%
Region 12	melanin	istamycin	5%
Region 13	siderophore	desferrioxamin B / desferrioxamine E	83%
Region 14	T2PKS, NRPS, T1PKS	spore pigment	83%
Region 15	NRPS	triacsins	6%
Region 16	ladderane, NRPS	pepticcinnamin E	26%
Region 17	terpene	albatravonone	100%
Region 18	siderophore		
Region 19	bacteriocin		
Region 20	other, T1PKS	tetronasin	3%
Region 21	bacteriocin		
Region 22	terpene	geosmin	100%
Region 23	siderophore		
Region 24	terpene	pentalenolactone	58%
Region 25	T3PKS, other	kanamycin	1%
Region 26	terpene	hopene	92%
Region 27	lassopeptide	phthoxazolol	9%
Region 28	other	A-503083 A / A-503083 B / A-503083 E	7%
Region 29	NRPS, bacteriocin	informatipeptin	57%
Region 30	T3PKS	germicidin	100%
Region 31	T1PKS	natamycin	68%
Region 32	lanthipeptide		
Region 33	lanthipeptide	venezuelin	100%

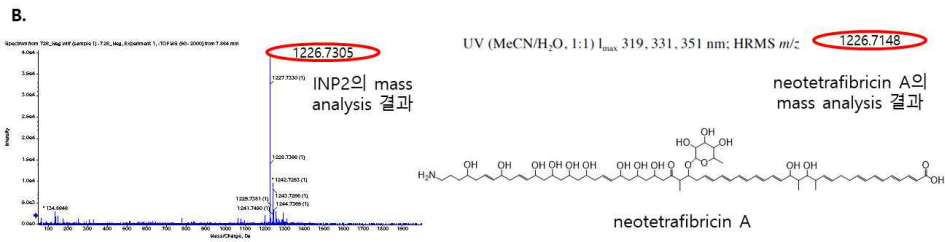
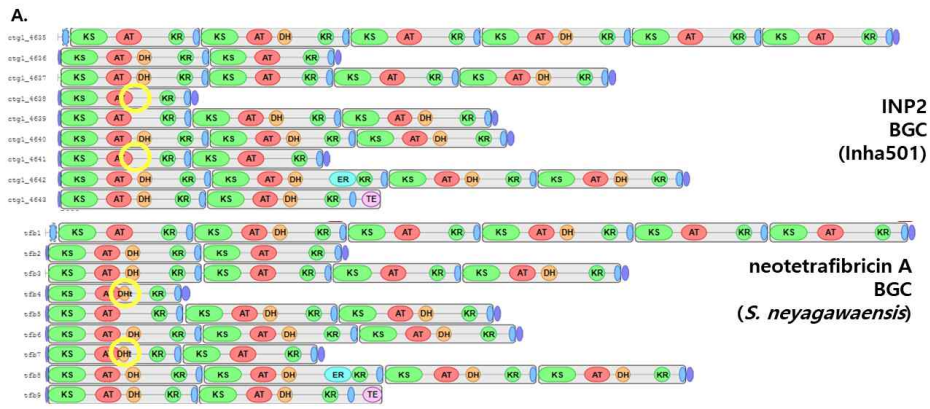


그림 3-16. INP2와 neotetrafibricin A의 PKS간의 비교(A) 및 mass analysis를 통한 동일한 분자량 확인(B)

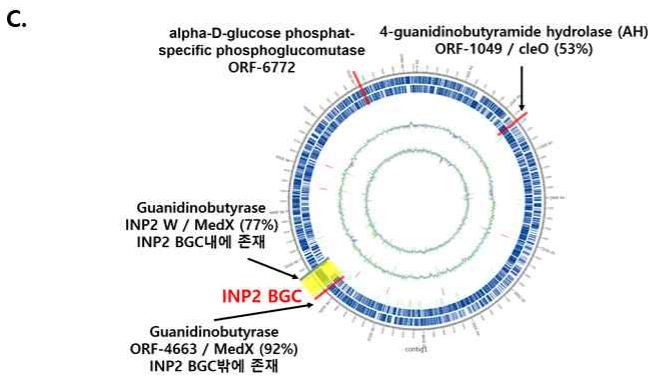
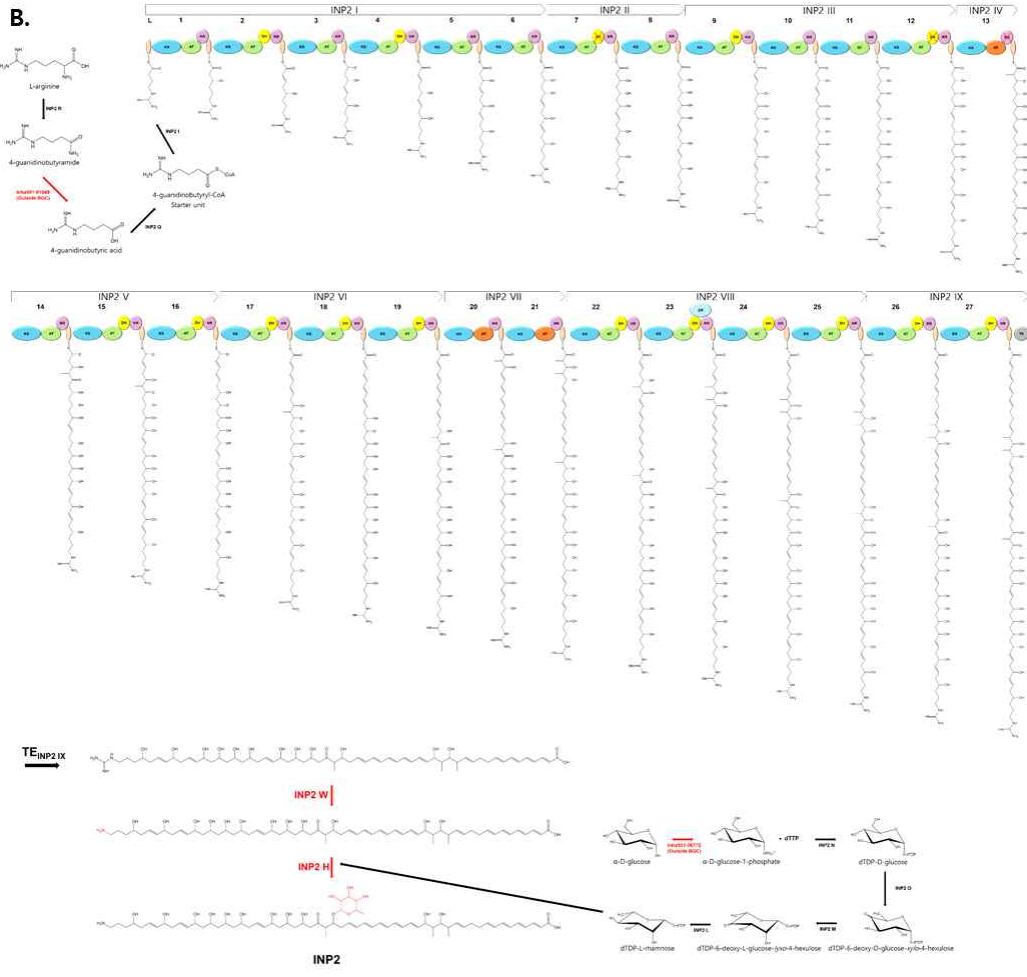
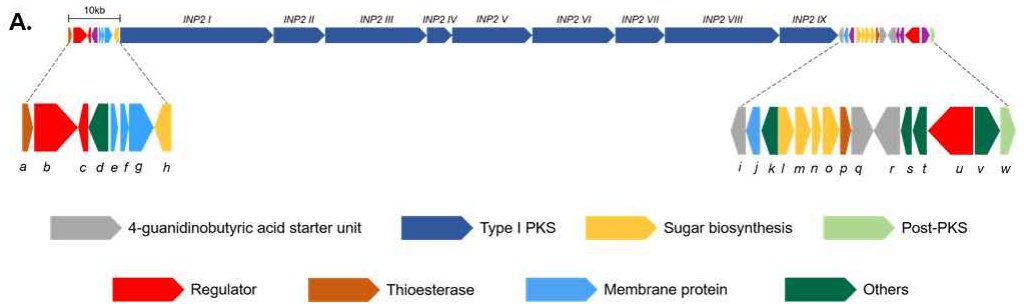


그림 3-17. INP2의 전체 BGC(A)와 생합성 경로 예측(B) 및 INP2 BGC밖에서 합성에 관여하는 유전자의 위치(C)

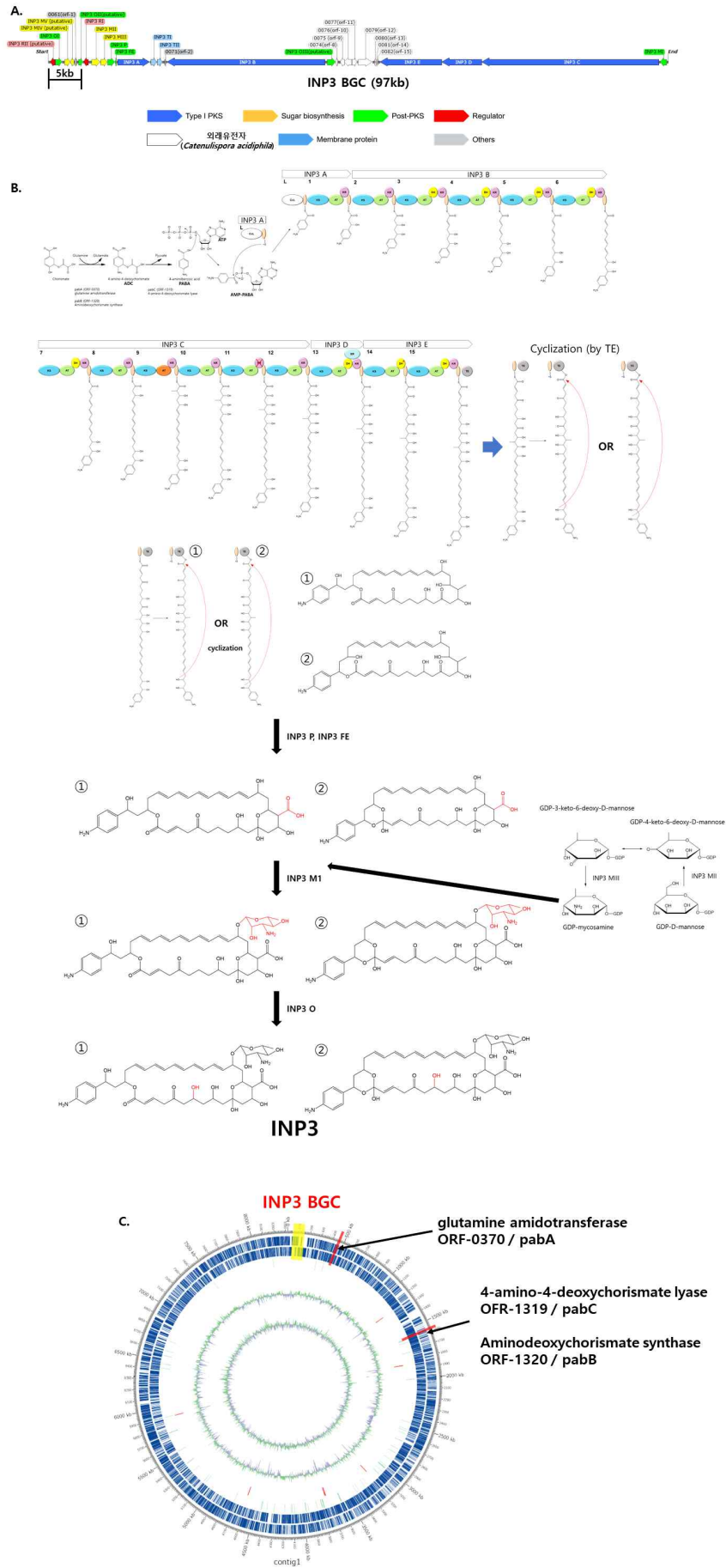
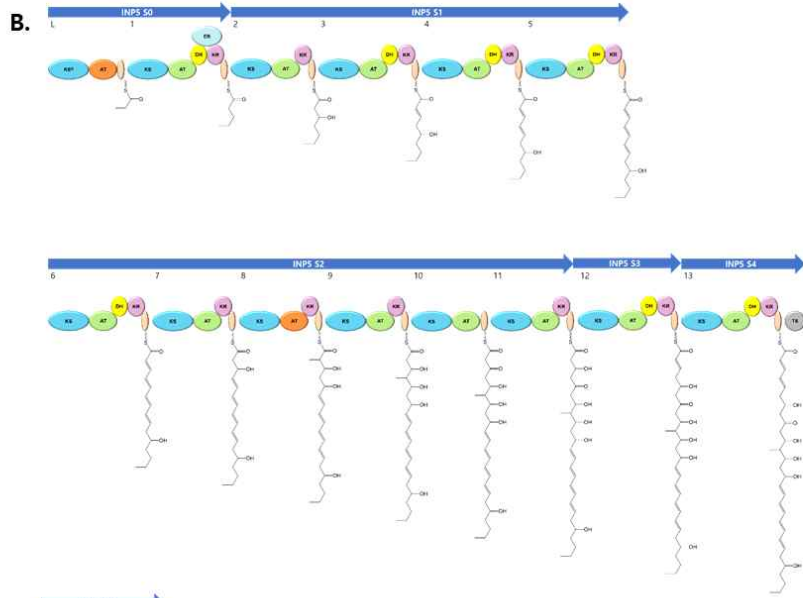
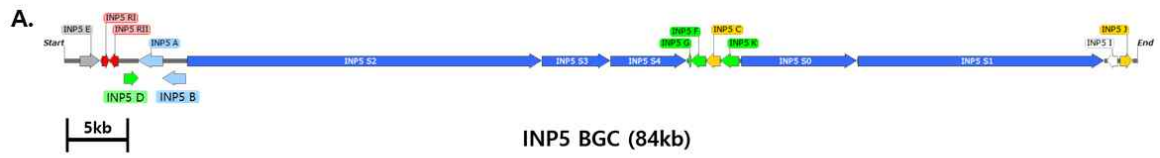


그림 3-18. INP3의 전체 BGC(A)와 생합성 경로 예측(B) 및 INP3 BGC밖에서 합성에 관여하는 유전자의 위치(C)



cyclization

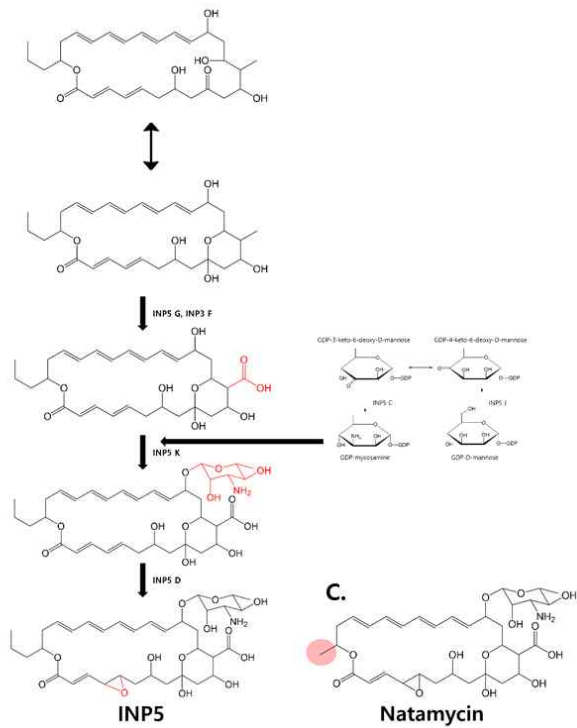


그림 3-19. INP5의 전체 BGC(A)와 생합성 경로 예측(B) 및 Natamycin의 구조(C)

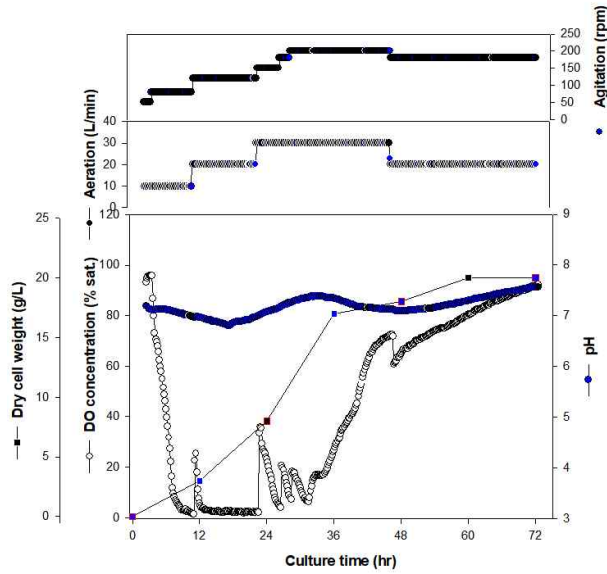


그림 3-20. 50 L 발효기를 이용한 Inha502 균주의 배양 결과

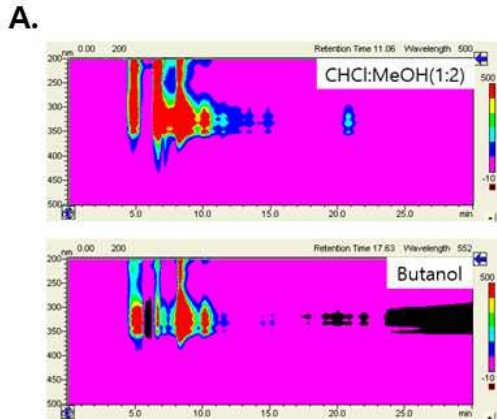


그림 3-21A. INP2 추출 용매 간의 효율 비교



그림 3-21B. INP2 추출 용매 간의 층분리 비교

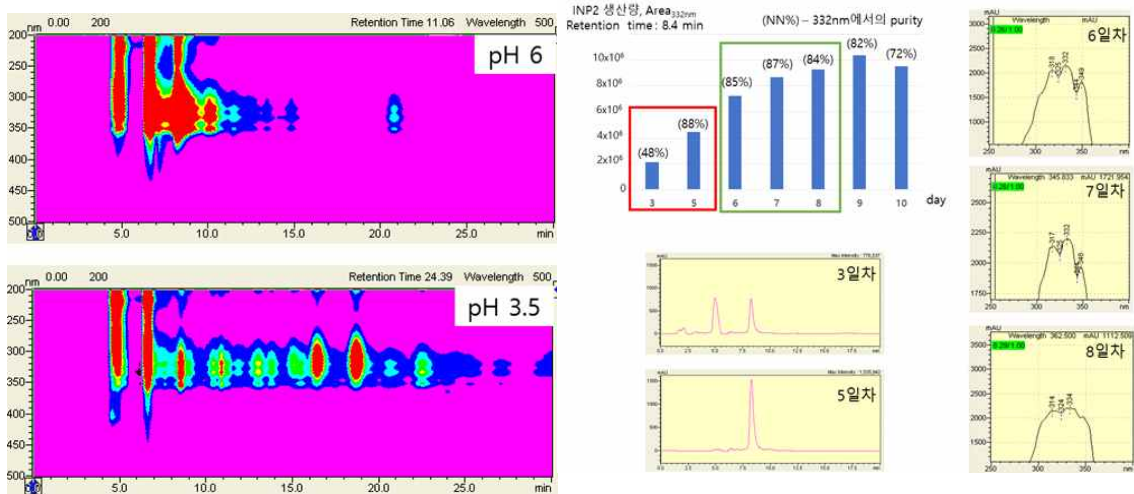


그림 3-22. INP2 추출 pH에 따른 효율 비교

그림 3-23. 배양 기간 별 INP2의 생산량과 순도 비교

MeOH/ H₂O gradient method

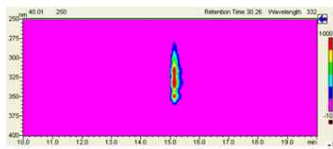


그림 3-24A. 기존의 polyene method를 통한 INP2 HPLC 분석결과

UPLC

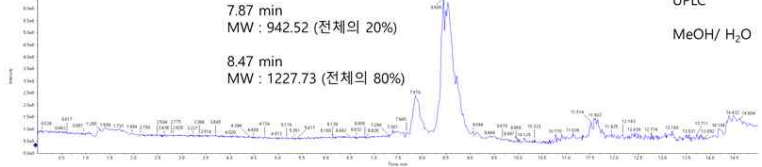


그림 3-24B. INP2의 UPLC 분석 결과 (2개의 compound가 혼합됨)

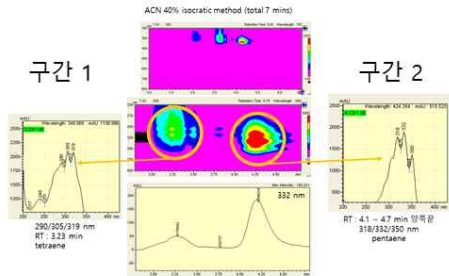


그림 3-24C. Acetonitrile 40% isocratic method를 통한 INP2 HPLC 분석결과



그림 3-24D. 구간 별 항진균 활성 확인

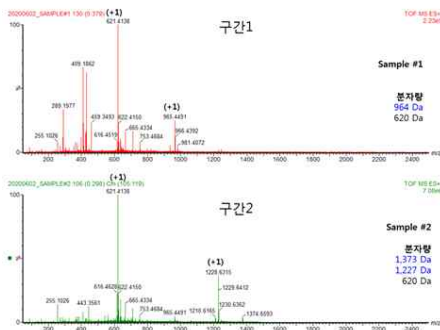


그림 3-24E. 구간별 Mass analysis (구간2 - INP2)

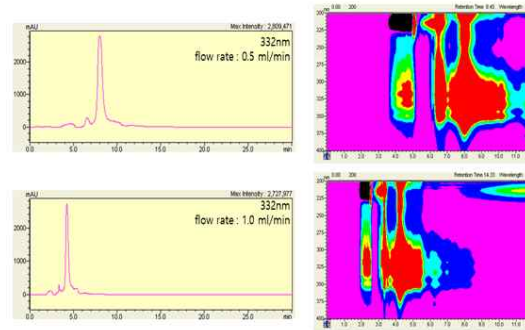


그림 3-24F. flow rate 변화를 통한 INP2의 HPLC 분석 method 최적화

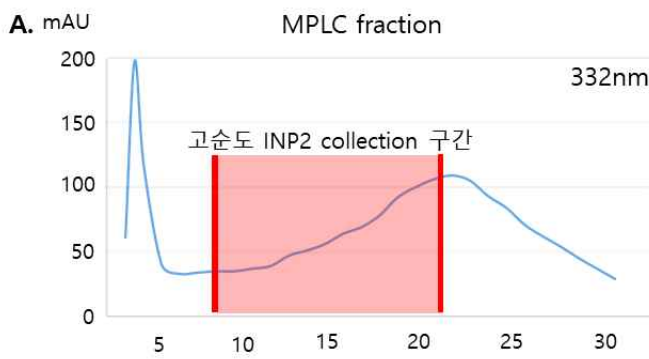
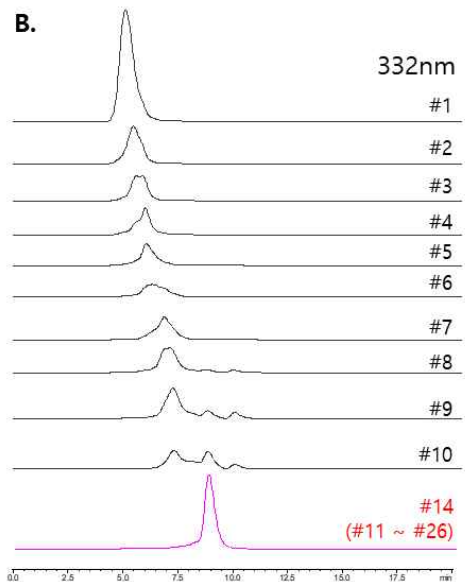


그림 3-25. MPLC fraction 별 mAU_{332nm} 측정(A) 및 fraction 별 HPLC 분석결과(B)



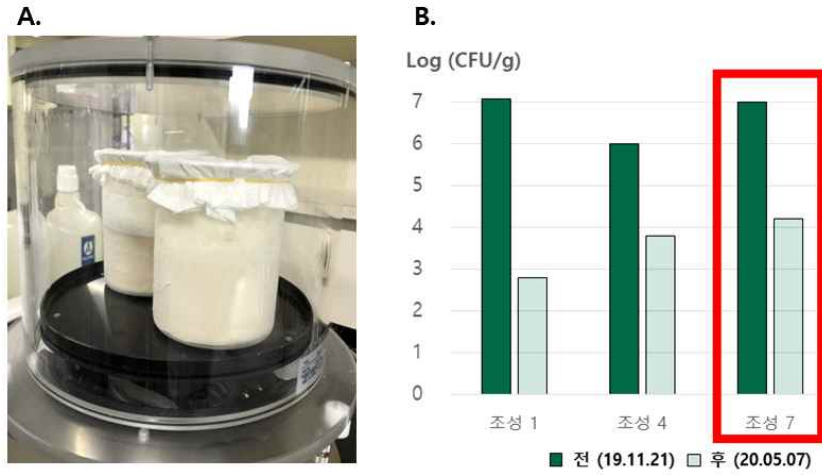


그림 3-26. 제형화 제작(A) 이후 기간 별 CFU 비교실험(B)



그림 3-27A. 시제품 제작을 위한 30 L 배양

그림 3-27B. 대용량 제형화를 위한 동결건조 수행



그림 3-28A. Inha501 시제품 제작을 위한 300 L 배양

그림 3-28B. Inha501 시제품 제작을 위한 cell 회수

그림 3-28C. Inha501 시제품 제작

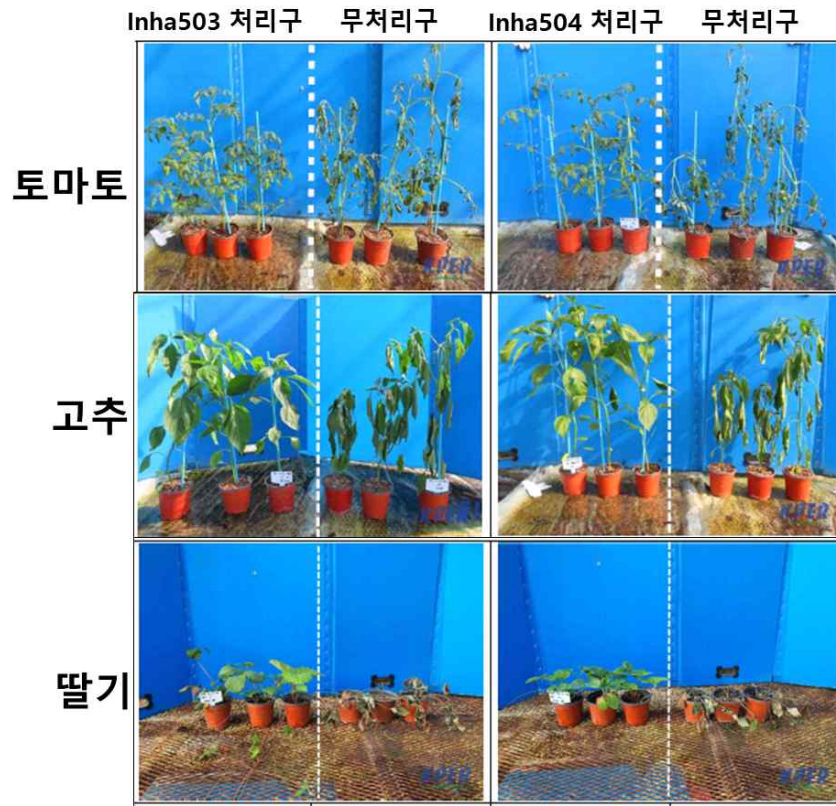


그림 3-29. Inha503, Inha504의 시들음병에 대한 실내검증결과



그림 3-30A. Inha501 제형화 제품의 유식물5종 약해시험



그림 3-31. Inha501, Inha502 제형화 제품의 약효시험

Hit Taxon name	Hit strain name	accession	Similarity (%)	Variation ratio (bp)
<i>S. rubrisoli</i>	FXJ1.725(T)	KC137300.1	98.30	16/1448
<i>S. sparsogenes</i>	ATCC 25498	MAXF01000077.1	98.48	22/1445
<i>S. cuspidosporus</i>	NBRC 12378	AB184090.1	98.46	22/1424
<i>S. diacarni</i>	LHW51701	KX347890.1	98.20	26/1448
<i>S. ferralitis</i>	SFOp68	AY262826.1	98.19	26/1438

A. Inha501

Hit Taxon name	Hit strain name	accession	Similarity (%)	Variation ratio (bp)
<i>S. javensis</i>	NRRL B-24423	DQ445793.1	99.80	3/1503
<i>Streptomyces</i> sp.	GKUJ220	KY923054.1	99.47	8/1514
<i>S. endus</i>	OsiSh-2	KU324469.1	99.41	9/1515
<i>Streptomyces</i> sp.	PLK3-71	MN116537.1	99.40	9/1512
<i>Streptomyces</i> sp.	5-10	MK356358.1	99.87	2/1491

C. Inha503

Hit Taxon name	Hit strain name	accession	Similarity (%)	Variation ratio (bp)
<i>S. morookaena</i>	LMG 20074	AJ81349.1	99.72	4/1446
<i>S. thiololiteus</i>	LMG 20259	AJ81360.1	99.31	10/1445
<i>S. lacticiproducens</i>	GIMN4.001	CG184344.1	99.30	10/1420
<i>S. luteireticuli</i>	NBRC 13422	AB249969.1	98.89	16/1446
<i>S. abikoensis</i>	NBRC 13860	AB184537.1	98.89	16/1441

B. Inha502

Hit Taxon name	Hit strain name	accession	Similarity (%)	Variation ratio (bp)
<i>S. collinus</i>	Tu 365	CP006259.1	99.93	1/1514
<i>Streptomyces</i> sp.	WI04-3A	EU080961.1	99.08	14/1518
<i>Streptomyces</i> sp.	CdTB01	CP013743.1	98.75	19/1516
<i>Streptomyces</i> sp.	NT 0401	DQ985808.1	98.75	19/1516
<i>Streptomyces</i> sp.	TCH32-26	MH598364.1	99.66	5/1470

D. Inha504

표 3-1. 생물농약 후보 균주들과 유사한 strain들 간의 16s rRNA sequence 비교

Contig name	Length	CDS	tRNA	rRNA
contig1	11,278,619	9,113	87	18
contig2	353,968	330	1	0
contig3	351,144	310	0	0
contig4	133,023	122	0	0
contig5	82,224	93	0	0
contig6	6,443	7	0	0
Total	12,205,421	9,975	88	18

표 3-2A. Inha503의 whole genome 정보

Contig name	Length	CDS	tRNA	rRNA
contig1	9,194,571	8,072	90	18
Total	9,194,571	8,072	90	18

표 3-2B. Inha504의 whole genome 정보

Protein	a.a.	Proposed function	Similar gene	Similarity (%)	Protein	a.a.	Proposed function	Similar gene	Similarity (%)
FscO	459	monooxygenase	Inha502-59	52.2	PabAB	724	isochorismate synthase	-	-
PabC	258	aminotransferase	Inha502-60	62.5	FscA	1744	type II PKS	Inha502-68	79.5
FscRI	223	LuxR family transcriptional regulator	Inha502-63	83.1	FscTI	336	ABC transporter	Inha502-69	86.0
FscRII	943		-	-	FscTII	240	ABC transporter	Inha502-70	91.2
FscRIII	1015		-	-	FscC	10626	type II PKS	Inha502-72	76.5
FscRVI	1006		-	-	FscB	5542	type II PKS	-	-
FscMI	459	glycosyltransferase	Inha502-64	88.4	FscF	2050	type II PKS	Inha502-83	77.1
FscMII	353	aminotransferase	Inha502-65	93.2	FscE	7772	type II PKS	Inha502-84	78.9
FscP	394	cytochrome P450	Inha502-66	89.0	FscD	9551	type II PKS	Inha502-85	72.7
FscFE	65	ferredoxin	Inha502-67	84.4	FscMIII	403	GDP-mannose 4,6-dehydratase	Inha502-86	94.2
FscTE	304	thioesterase (type II)	-	-					

■ post-PKS
■ regulatory gene
■ sugar-related gene
■ polyketide synthase
■ starter unit related gene

표 3-3. Bioinformatic analysis을 이용한 INP3 BGC와 FR-008 BGC의 비교

Carbon source		Low (20g/L)	High (40g/L)	
Monosaccharide	Hexose	Glucose	10.989	10.323
		Galactose	9.324	3.663
		Mannose	9.657	5.994
		Fructose	10.323	6.993
	Pentose	Xylose	14.652	5.661
		Ribose	12.321	7.659
Arabinose		12.987	4.995	
Oligosaccharides		Sucrose	14.652	4.995
		Maltose	13.986	6.327
		Lactose	4.662	13.32
Polysaccharides		Dextrin	10.989	5.328
Sugar alcohols		Myo-inositol	10.656	5.328
		Glycerol	9.99	9.99

표 3-4. 탄소원 비교 실험 결과

w/ P	nitrogen source	15g	30g	w/o P	nitrogen source	15g	30g
1	tryptone	2.997	5.328	1	tryptone	1.998	4.995
2	casitone	3.663	5.661	2	casitone	2.331	3.663
3	yeast extract	4.662	7.992	3	yeast extract	4.662	6.993
4	tryptic soy broth	4.329	6.66	4	tryptic soy broth	3.996	5.661
5	brain heart infusion	2.997	3.996	5	brain heart infusion	2.331	3.663
6	bacto peptone	1.332	2.331	6	bacto peptone	1.332	1.665
7	corn steep solid	1.998	6.993	7	corn steep solid	0.333	0.666
8	cotton seed flour	7.659	19.314	8	cotton seed flour	9.324	15.318
9	molasses	0.666	2.331	9	molasses	1.332	2.331
10	control(pep20 + yeast10)	2.331	5.994	10	control(pep20 + yeast10)	4.662	8.658

표 3-5A. 질산염 비교 실험 결과 (인산염 추가)

표 3-5B. 질산염 비교 실험 결과 (인산염 미추가)

	Nitrogen source	DCW (g/L)
1	Ammonium sulfate	36.963
2	Ammonium phosphate monobasic	39.294
3	Ammonium phosphate dibasic	38.628
4	Ammonium tartrate dibasic	37.629
5	Ammonium chloride	37.296
6	Ammonium carbonate	38.295
7	Ammonium hydroxide	37.629
8	Urea	38.628
9	Peptone	37.296
10	Tryptic soy broth	37.962
11	Tryptone	37.962
12	Control	37.296

표 3-6 질소원 추가 투입 실험 결과

#	1	2	3	4	5	6
RT (min)	5.00	5.32	5.45, 5.71	5.84	5.90	6.25
7	8	9	10	11 ~ 26	27	28
6.79	7.08	7.14	7.18, 8.69	8.71~8.75	8.63	8.61

표 3-7 MPLC를 이용한 INP2 분리정제 후 fraction별 retention time 결과

시험약제	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I반복	II반복	III반복	평균		
Inha503	20.0	20.0	20.0	20.0	b	72.2
Inha504	40.0	20.0	20.0	26.7	b	63.9
무처리	80.0	60.0	80.0	73.3	a	-

C.V.(%) ----- 23.6

시험약제	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I반복	II반복	III반복	평균		
Inha503	20.0	40.0	20.0	26.7	b	61.1
Inha504	40.0	40.0	20.0	33.3	b	50.0
무처리	60.0	80.0	60.0	66.7	a	-

C.V.(%) ----- 27.3

시험약제	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I반복	II반복	III반복	평균		
Inha503	40.0	40.0	40.0	40.0	b	53.3
Inha504	40.0	60.0	20.0	40.0	b	55.0
무처리	80.0	100.0	80.0	86.7	a	-

C.V.(%) ----- 24.0

표 3-8. 작물 시들음병에 대한 Inha503, Inha504의 약효시험결과

시험약제	시험작물 (품종)	약해정도 (0~5)		비 고
		기 준 량	배 량	
Inha503	토마토 (슈퍼도태량)	0	0	약해 없음
	방울토마토 (미니마루)	0	0	약해 없음
	고추 (독야청청)	0	0	약해 없음
	단고추 (옐로우 스위트)	0	0	약해 없음
	딸기 (설향)	0	0	약해 없음
Inha504	토마토 (슈퍼도태량)	0	0	약해 없음
	방울토마토 (미니마루)	0	0	약해 없음
	고추 (독야청청)	0	0	약해 없음
	단고추 (옐로우 스위트)	0	0	약해 없음
	딸기 (설향)	0	0	약해 없음

표 3-9. 작물에 대한 Inha503, Inha504의 약해시험결과

A. 수원에서의 결과

시험약제	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
Inha501	6.8	5.4	6.8	6.3	b	51.5
Inha502	5.4	5.4	6.8	5.9	b	54.8
무처리	13.5	10.8	14.9	13.1	a	-

C.V.(%) ----- 10.7

B. 화천에서의 결과

시험약제	이병주율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
Inha501	4.4	5.7	5.7	5.3	b	65.0
Inha502	5.9	5.7	4.3	5.3	b	65.7
무처리	16.2	17.1	12.9	15.4	a	-

C.V.(%) ----- 15.5

표 3-10. 토마토 시들음병에 대한 Inha501, Inha502 제형화 제품의 약효시험 결과

○ 4차년도(2021)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구 목표	연구개발 수행내용	연구결과
4차 년도 (2021)	식물 병원성 진균에 대한 항진균력과 토양 적응력이 우수한 방선균 균주선별 (인하대학 교)	여러 종류의 진균에 대한 항진균 활성 확인	여러 종류의 진균에 대한 항진균 활성 확인	<p>다양한 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성 테스트를 통해 미생물 제제로 Inha503, Inha504 가능성을 확인하는 실험을 진행</p> <p>- Inha503, Inha504의 agar plug을 이용한 진균에 대한 활성 확인</p>  <p>그림 4-1. 다양한 식물병원성 진균에 대한 활성테스트 결과 (Inha503)</p>  <p>그림 4-2. 다양한 식물병원성 진균에 대한 활성테스트 결과 (Inha504)</p> <p><u>Inha503, Inha504는 미생물제제로서의 다양한 활용이 가능하다는 연구결과로서 보호 작물의 범위가 넓을 것으로 예상됨</u></p>

4차
년도
(2021)

NGS 기반
유전체
기술을
활용하여
선별된
방선균의
유전체
특성 규명
(인하대학
교)

생물농약
후보
방선균의
특성
분석 및
유용
생합성유
전자군의
파악

whole
genome
sequence
분석 및
이를
통한
유용
생합성유
전자군의
파악

- Inha504 균주의 *In silico* analysis를 통한 INP5의 생합성 과정
예측

Inha504 균주에서 항진균 활성과 관련된 폴리엔계열의 물질의
생합성유전자군을 **INP5**으로 선정하였고 **bioinformatic
analysis**을 통해 lucensomycin과 유사함을 확인

Length:	88,008
Identity:	83,378 / 88,008 (94.74%)
Gaps:	589 / 88,008 (0.67%)

(Yushchuk, Oleksandr, et al. Scientific reports Scientific
reports(2021), 11(1), 1-14.)

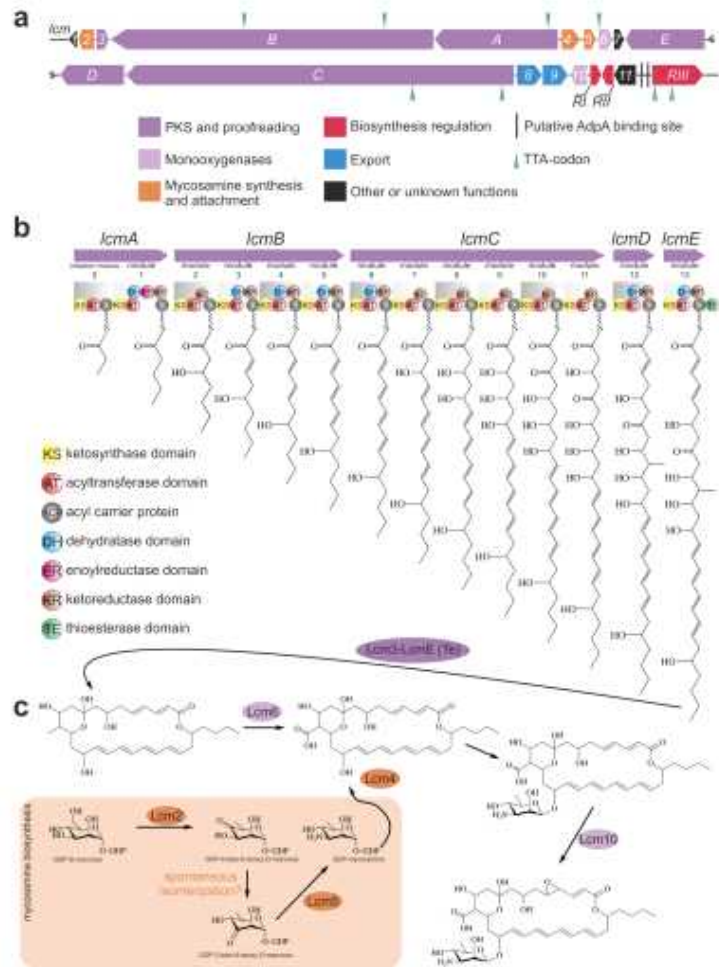


Figure 3. A scheme of Lcm biosynthetic gene cluster (*lcm* BGC) (a) and proposed sequence for the Lcm PKS assembly line (b) with the tailoring reactions (c). For more details, please see the main text and Table 1.

그림 4-3. INP5와 유사한 LCM의 생합성경로 (논문그림첨부)

4차
년도
(2021)

NGS 기반
유전체
기술을
활용하여
선별된
방선균의
유전체
특성 규명
(인하대학
교)

생물농약
후보
방선균의
특성
분석 및
유용
생합성유
전자균의
파악

whole
genome
sequence
분석 및
이를
통한
유용
생합성유
전자균의
파악

Inha504 균주에서 생산되는 INP5의 분자량 측정을 위해 배양 및 물질정제 실시

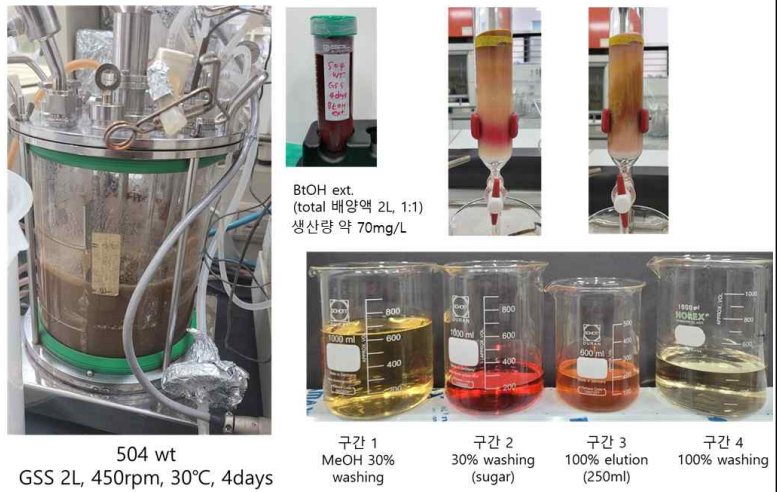


그림 4-4. Inha504의 배양 및 INP5의 정제

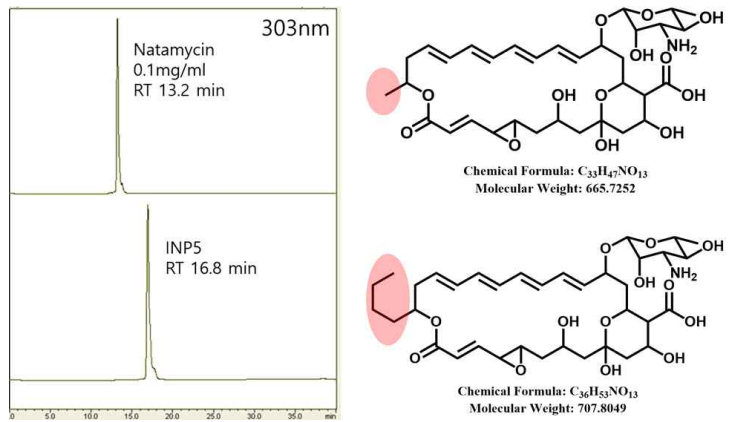


그림 4-5. Natamycin과 INP5의 HPLC 분석 결과 및 구조

LC-MS 분석을 통해 INP5의 분자량은 707g/mol로 lucensomycin와 유사함을 확인

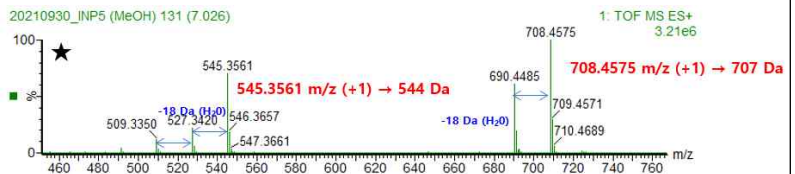


그림 4-6. INP5의 LC-MS 분석결과

Inha504에서 생산되고 항진균활성을 갖는 polyene compound인 INP5는 lucensomycin의 생합성유전자군의 유사성과 거의 동일한 분자량으로 측정되기에 거의 유사한 구조를 갖을 것으로 판단됨

4차
년도
(2021)

항진균
폴리엔
생합성
유전자군의
유전체
재설계를
통한
신규유도체
도출
(인하대학
교)

genetic
engineer
ing을
통한
생리활성
물질의
유도체
창출 및
고생산균
주 개발

BAC
벡터에
분리된
항진균
생합성
유전자를
이용하여
생리활성
물질의
생산성
증대
유도 및
다양한
생리활성
물질의
유도체
발굴

INP2와 Neotetrafibricin사이의 유사성을 확인하여 INP2를 I-NTF(Inha-Neotetrafibricin)이라 재명명하고 개발한 I-NTF 고생산균주의 발현량 확인과 유전자 조작을 통해 확보한 유도체 I-NTF aglycone과의 생리활성비교 진행

(1) I-NTF 또는 I-NTF 유도체 생산균주의 구축 및 생산량 비교

- BAC library 구축을 통해 분리한 I-NTF BGC를 이용하여 I-NTF 생산균주 및 I-NTF 유도체 생산균주를 구축한 후 생산량 비교

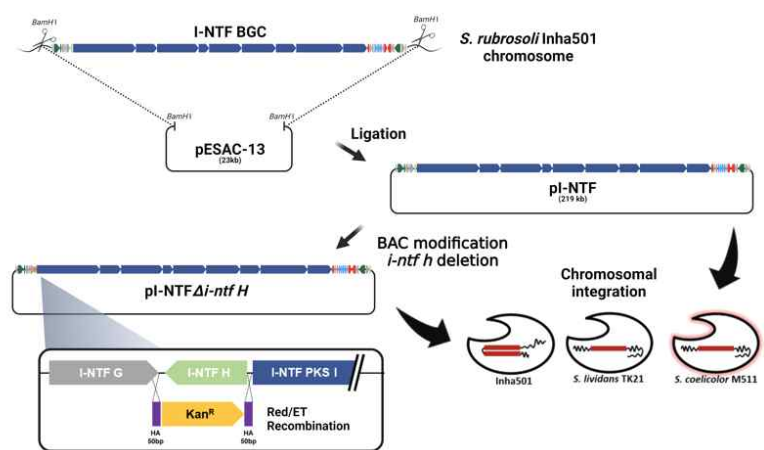


그림 4-7. I-NTF 생합성유전자군의 분리 및 I-NTF 또는 I-NTF 유도체생산균주 구축을 위한 모식도

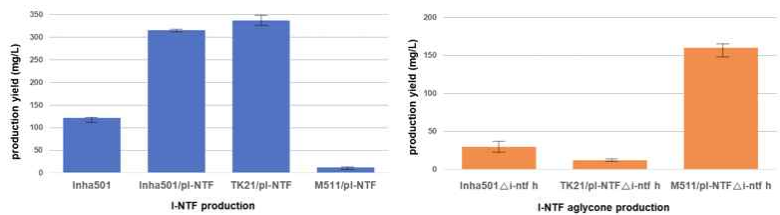


그림 4-8. I-NTF 생산균주와 I-NTF aglycone 생산균주의 생산량 비교그래프

I-NTF 생산균주 중 *S. lividans* TK21에 이중숙주발현한 균주에서 가장 많은 생산량을 보였고 I-NTF aglycone 생산균주 중 *S. coelicolor* M511에 이중숙주발현한 균주에서 가장 많은 생산량을 보였음. 고생산균주구축을 통해 I-NTF와 I-NTF aglycone간의 생리활성비교가 가능해짐

4차
년도
(2021)

항진균
폴리엔
생합성
유전자군의
유전체
재설계를
통한
신규유도체
도출
(인하대학
교)

genetic
engineer
ing을
통한
생리활성
물질의
유도체
창출 및
고생산균
주 개발

BAC
벡터에
분리된
항진균
생합성
유전자를
이용하여
생리활성
물질의
생산성
증대
유도 및
다양한
생리활성
물질의
유도체
발굴

(2) I-NTF 생산균주의 발현량 비교

- I-NTF 생산균주의 발현량비교

I-NTF 생산균주 중 가장 많은 생산량을 보였던 *S. lividans* TK21/pI-NTF에서 가장 많은 발현량을 보임
I-NTF BGC내에 있는 유전자들은 Inha501내의 조절시스템보다 *S. lividans* TK21에서 더 많이 발현되는 것으로 판단되며 다른 고생산 Host를 이용하여 이중숙주발현한다면 더 높은 생산량의 고생산균주를 개발할 것으로 생각됨

그림 4-9. I-NTF 생산균주의 발현량 비교 (빈둥그라미 - Inha501 wt / 동그라미 - Inha501/pI-NTF / 세모 - TK21/pI-NTF)

(3) I-NTF과 I-NTF aglycone의 생리활성 비교

- I-NTF과 I-NTF aglycone을 이용한 여러 가지 식물병원성진균의 항진균활성 비교

I-NTF와 I-NTF aglycone을 이용하여 2가지 진균에 대한 항진균 활성비교실험을 통해 I-NTF내에 존재하는 sugar modif가 항진균활성에 중요한 역할을 하는 것을 확인
추가적인 식물병원성진균에 대한 항진균 활성을 진행하였고 여러 진균에서 polyene에 존재하는 sugar modif는 활성과 밀접한 관계가 있음을 증명

그림 4-10. 여러 가지 식물병원성진균에 대한 I-NTF와 I-NTF aglycone 항진균 활성확인실험

4차
년도
(2021)

항진균
폴리엔
생합성
유전자군의
유전체
재설계를
통한
신규유도체
도출
(인하대학교)

genetic
engineer
ing을
통한
생리활성
물질의
유도체
창출 및
고생산균
주 개발

BAC
벡터에
분리된
항진균
생합성
유전자를
이용하여
생리활성
물질의
생산성
증대
유도 및
다양한
생리활성
물질의
유도체
발굴

- I-NTF과 I-NTF aglycone을 이용한 여러 가지 식물병원성진균
의 RPMI test

I-NTF와 시중에 판매되고 있는 Amphotericin B와 Nystatin A1
과의 RPMI test를 통해 정량적으로 항진균활성을 비교

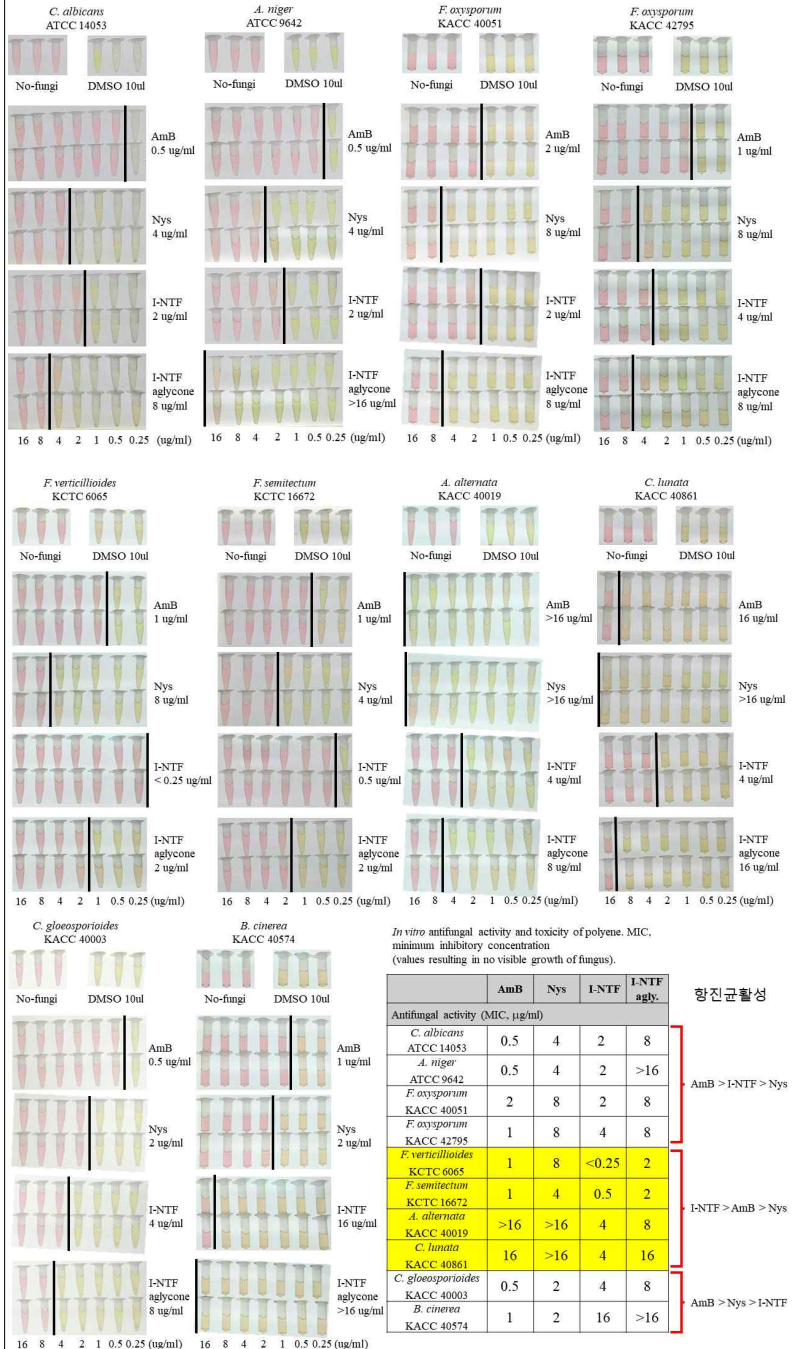


그림 4-11. 여러 가지 식물병원성진균에 대한 항진균 활성비교실험 (RPMI)

I-NTF의 sugar modif는 항진균활성에서 중요한 부분임을 확인할 수 있었고 일부 진균에는 I-NTF가 더 강력한 항진균활성을 나타내기에 생물농약으로의 발전 가능성을 확인

4차 년도 (2021)

항진균제
생합성 및
조절
유전자
특성 규명
및
유전자군
분리
(인하대학교)

미생물
제제
후보
방선균
의 특성
분석 및
유전자
조작기
술
시스템
구축

방선균
BAC
vector
system을
이용한
거대
항진균
물질의
생합성
유전자군
분리

- Inha501 chromosome내에 유용 생합성 유전자군 분리

Inha501의 whole genome sequencing 이후 bioinformatic analysis를 통해 I-TMC(INP1), I-NTF(IPN2)뿐만 아니라 유용한 생합성 유전자군이 chromosome상에 존재함을 확인
I-TMC, I-NTF 생합성 유전자군을 분리하기 위해 구축하였던 BAC library를 이용하여 추가적인 생합성 유전자군을 확보하고자 함

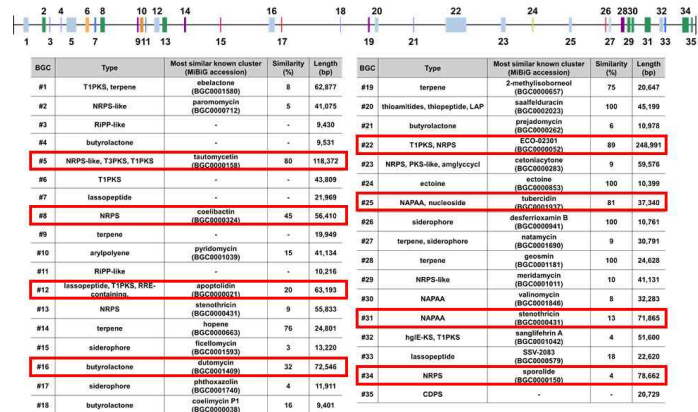


그림 4-12. Inha501의 생합성유전자군 분석 및 발현가능성이 높은 region

Check primer를 제작하고 BAC library 스크리닝을 진행하여 region 8, 12, 16, 25, 31, 34를 포함하는 positive colony 확보

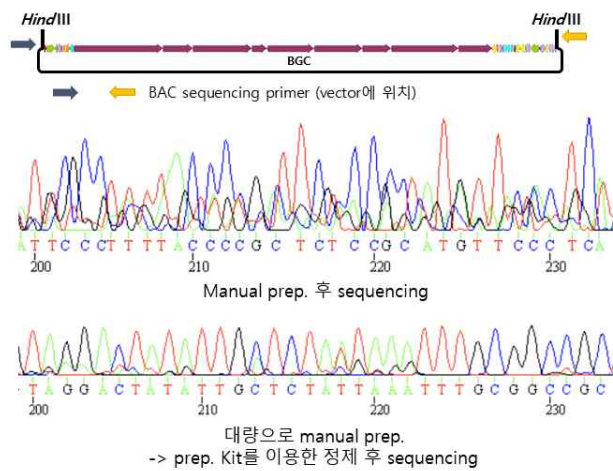


그림 4-13. 스크리닝 후 sequencing을 통해 확보한 BAC vector의 map

4차
년도
(2021)

항진균제
최적
생산을
위한
스케일업
최적화
(생산기술
연구원)

발효
스케일업
을 통한
500L
발효기
최적화

미생물
500L
배양
최적화

500L급 대규모 배양공정

- 500리터 생산배양(1차 수행)

발효 조건

배지:TSB 40g/L, 온도: 37°C, Aeration: 0.5(vvm), Agitation speed: 50~130(rpm), pH control: pH 6.8~7.3, 배양시간:2.5일

	Condition 1	Condition 2	Condition 3
pH control	x	x	pH6.8~7.3
rpm	100-130	100-130	50-80
TSB	40 (g/L)	40 (g/L)	40 (g/L)
Temp.	37°C	37°C	37°C
Aeration	0.5(vvm)	0.5(vvm)	0.5(vvm)

표 4-1. 500리터 발효조 배양 조건 (1차 수행)

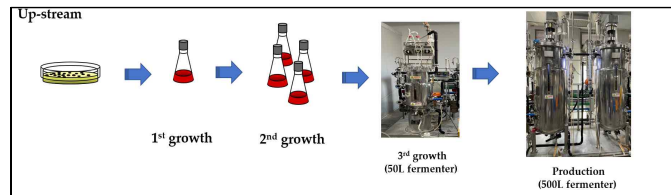
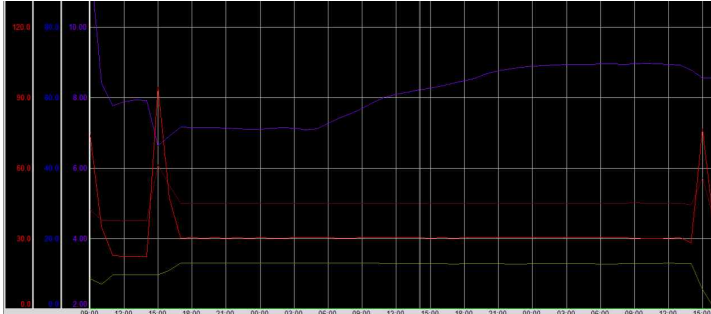


그림 4-14. 500리터 생산배양 모식도

500리터 생산배양은 상기의 모식도와 같이 연속적인 배양공정을 통하여 수행하였다(그림 4-14). 생산 균주 (501 또는 502)균주의 stock을 기재발된 YPD agar에 200 μ L spreading하여 30°C에서 5~7일간 배양하였다.

배양이 끝난 plate는 punching을 하여 30 mL의 YPD broth가 담긴 멸균된 300 mL baffled flask에 4조각을 넣고 30°C, 150 rpm으로 설정된 shaker에서 2일간 액상 배양(1st growth culture)한후, 다음으로 3L 플라스크에 600ml의 YPD 배지가 멸균된 플라스크에 5% 접종량으로 1차성장과 동일한 조건에서 2차 플라스크 실험을 수행하며 단, 이때 플라스크의 rpm은 120~150rpm으로 수행하였다. 1차 접종은 총 50리터 발효조로의 5% 접종을 위해서 3개이상을 진행한 후, 최종적으로 1.5L seed를 50L 발효조(조업량: 30L)로 접종하였다. 이 때에는 성장배양 배지를 YPD배지로 진행하였고, 배양기간은 1.5일로 진행하였고 최종적으로 500리터 발효기 배양은 5% 접종으로하여 TSB배지에서 수행하였으며, 배양 조건은 상기에 제시하였다(표 4-1).

<p>4차 년도 (2021)</p>	<p>항진균제 최적 생산을 위한 스케일업 최적화 (생산기술 연구원)</p>	<p>발효 스케일업 을 통한 500L 발효기 최적화</p>	<p>미생물 500L 배양 최적화</p>	<p>500리터 생산배양결과</p> <p>500리터 발효결과 배양 70시간 건조세포중체량은 약 10g/L를 획득하였다(그림 4-15). 배양 기간 동안 pH는 계속적으로 증가하기 때문에 다량의 산 버퍼가 계속적으로 공급되어야 한다. 이는 TSB배지내의 탄소원이 포도당 단일로 소량 함유하고 있기 때문에 유기산의 생산이 낮고 반면 과량의 질소원을 이용하여 세포 성장이 일어남에 따라 배양액내의 pH가 증가하는 것으로 판단된다. 배양액내의 성장한 균사를 고체배지에 도달한 경우 약 1×10^6(CFU/ml)를 획득하였다. 이는 배양 사진을 현미경으로 관찰한 결과 매우 긴 형태의 균사로 성장이 이뤄지고 있기 때문에 건조세포중체량 대비 낮은 CFU를 보이는 것으로 판단된다(그림 4-16). 반면, 3가지 조건에서 500리터급 발효조의 배양을 수행한 결과 건조세포중체량은 유사한 성장패턴을 보였으며 최종적으로 약 10 g/L를 획득함에 따라 500리터 발효조 배양의 안정성과 재현성은 매우 높은 것으로 판단된다.</p> <div data-bbox="670 952 1364 1209"> </div> <p>그림 4-15. Condition 3의 500리터 발효조 배양결과 (왼쪽 그래프)와 3가지 조건에서 건조세포중체량의 비교(오른쪽 그래프)</p> <div data-bbox="805 1332 1252 1814"> </div> <p>그림 4-16. 500리터 condition3 발효종료후 균사 현미경 사진</p>
-----------------------------	---	--	------------------------------------	---

<p>4차 년도 (2021)</p>	<p>향진균계 최적 생산을 위한 스케일업 최적화 (생산기술 연구원)</p>	<p>발효 스케일업 을 통한 500L 발효기 최적화</p>	<p>미생물 500L 배양 최적화</p>	<p>- 500리터 생산배양(2차 수행) 발효 조건 배지:TSB 40(g/L)+glucose 20(g/L), 온도: 37℃, Aeration: 0.5(vvm), Agitation speed: 50~130(ppm), pH control: pH6.8~7.3, 배양시간:2.5일 본 실험에서는 생산배지의 조건을 기존 TSB에 글루코오스를 첨가함으로써 세포성장을 촉진하고 동시에 첨가된 글루코오스에 의해서 균사의 길이를 짧게 유도함으로써 배양 종료후, 균사의 CFU를 증가시키고자 하였다. 50L 발효조의 실험은 기존의 발효 실험과 동일하게 TSB 배지를 이용하였다. 이때의 파라미터를 그림에 나타낸 결과 기존 배양과 유사하게 pH(보라색)의 경우에는 초기 pH7정도에서 지속적으로 증가여 배양말기에는 약 pH8정도로 유지됨을 확인하였다. 반면 용존산소(붉은 붉은색)의 경우에는 초기 급속히 하락한 후 rpm의 조절에 의해서 30% 이상을 계속 유지함으로써 발효조내로의 산소공급은 충분히 공급되고 있음을 확인하였다(그림 4-17).</p>  <p>그림 4-17. 500리터 발효조의 배양 파라미터</p> <p>500리터 발효결과 글루코오스가 첨가된 현재의 배양에서는 배양 60시간에 약 12(g/L)의 건조세포중체량을 획득하였다. 배양 동안의 pH는 기존과 유사하게 산과 알칼리의 지속적 공급으로 일정하게 유지되었으며, 용존산소의 경우에는 rpm의 지속적 조절로 최종 100rpm을 20시간에 도달시킨후 이후 배양종료까지는 그대로 유지되었다. 반면, 배양액내의 성장한 균사를 고체배지에 도달한 경우 약 1×10^7(CFU/ml)를 획득함에 따라 글루코오스가 첨가되었을 경우 건조세포량의 20%증가와 10배높은 CFU를 획득할 수 있는 500리터규모 발효기 배양 공정을 수립할 수 있었다(그림 4-18, 4-19).</p>
-----------------------------	---	--	------------------------------------	---

4차
년도
(2021)

항진균제
최적
생산을
위한
스케일업
최적화
(생산기술
연구원)

발효
스케일업
을 통한
500L
발효기
최적화

미생물
500L
배양
최적화

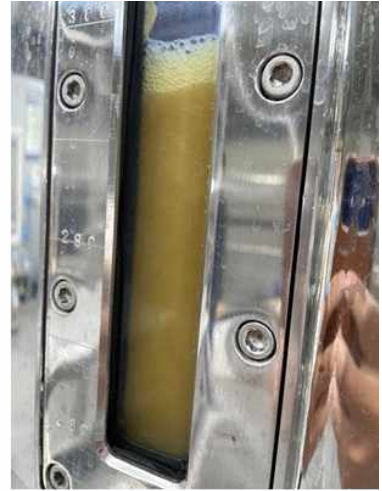


그림 4-18. 500리터 발효조 배양모니터링과 발효조사진(위의 왼쪽), 500리터 발효조 배양액사진(위의 오른쪽)500리터 발효조(아래 왼쪽), 500리터 발효조(아래 오른쪽)

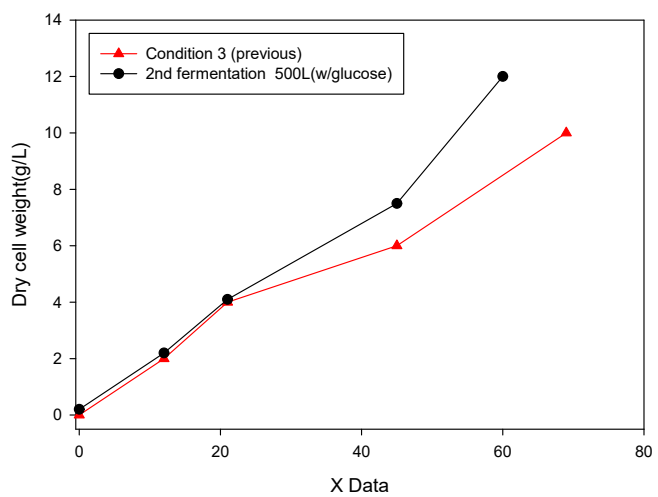


그림 4-19. 500리터 2차 발효과정 배양에서의 건조세포증체량 비교

4차
년도
(2021)

항진균제
최적
생산을
위한
스케일업
최적화
(생산기술
연구원)

고농도세
포
배양을
위한
유가식
배양공정
의 개발

미생물
50L
유가식
배양공정
최적화

기존 3차년도 50리터 발효조 공정에서 TSB배지를 통한 생산배양의 결과 접종후 용존산소의 급격한 하락을 통해 초기 지속적인 통기량과 교반속도의 제어가 중요한 배양학적 요소임을 확인함과 동시에 배양 30시간 이후로 발효조내의 용존산소가 꾸준히 증가하면서 48시간 이후에는 용존산소의 농도가 70%~80%에 도달하는 것을 관찰함(그림 4-20). 이 같은 현상은 배양액에 존재하는 다양한 성분중 특정 성분의 고갈에 따른 세포성장의 제한이 일어나고 있음을 의미하며 따라서 적절한 배지의 공급은 지속적인 세포성장을 유도할 수 있는 공정의 개발이 가능함을 나타내는 결과로 판단된다.

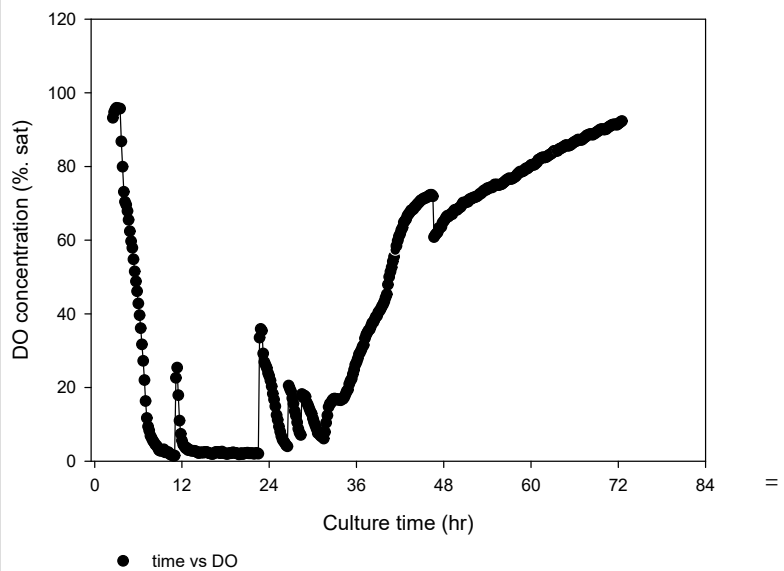


그림 4-20. 50리터 회분식배양 공정의 용존산소 파라미터 비교

상기와 같은 문제를 해결하고자 50리터규모 유가식배양 공정의 모식도를 하기와 같이 설계하였다(그림 4-21).

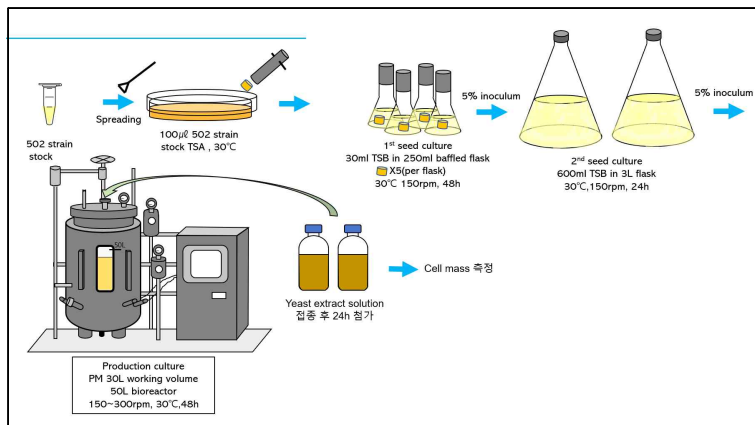


그림 4-21. 제품생산을 위한 전체 배양공정과 분리정제 공정의 모식도

4차
년도
(2021)

항진균제
최적
생산을
위한
스케일업
최적화
(생산기술
연구원)

고농도세
포
배양을
위한
유가식
배양공정
의 개발

미생물
50L
유가식
배양공정
최적화

50리터 규모에서 유가식 배양 최적화를 위해서 기존에 사용한 TSB 생산배지를 control 기준으로하였고, 표12에 의해서 최적화된 생산 배지를 유가식 배양의 회분식 배양용 생산배지로 실험을 수행하였다. fed-batch는 기존 고농도의 질소원 배지에서 높은 생산성을 나타냄에 따라 15(g/L)의 yeast extract를 배양 24시간에 pulse feeding 하였다.

실험결과 TSB control 배지의 batch culture에서는 20시간이후 세포농도가 선형으로 일정하게 증가하여 최종 11(g/L)의 건조세포중체량을 나타내었다(그림 4-22). 반면, 신규 생산배지의 경우 같은 20시간까지 매우빠른 성장속도를 보이며 배양 20시간에 거의 8(g/L)의 건조세포중체량을 확인할 수 있었다. DO 프로파일을 비교하였을 때도 yeast extract의 fed-batch의 경우에는 용존산소의 농도가 control조건에서보다 더 오랫동안 계속하여 낮은 상태를 보임에 따라 첨가된 yeast extract에 의해서 세포성장이 계속적으로 이뤄짐을 확인할 수 있다(그림 4-23)

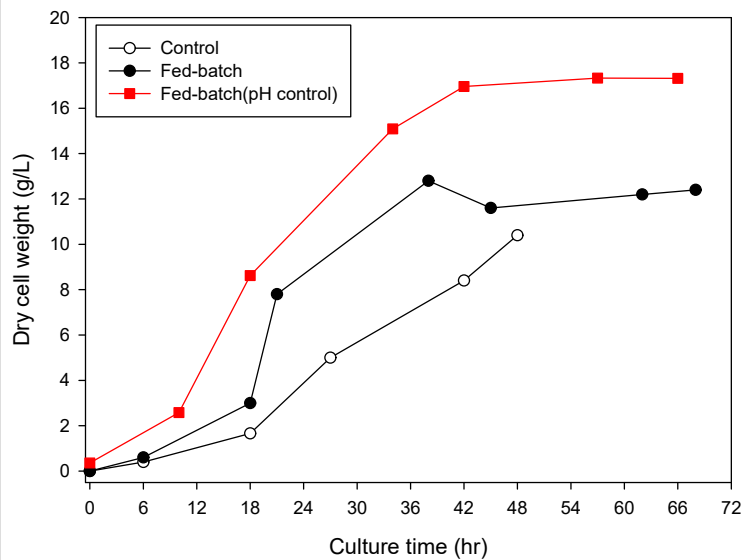


그림 4-22. 50리터 발효조에 배양방식에 따른 건조세포중체량의 비교

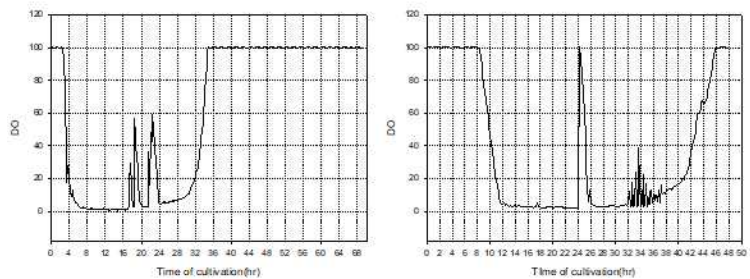


그림 4-23. 50리터 배양(왼쪽:control, 오른쪽:유가식배양)의 DO 프로파일

4차
년도
(2021)

항진균제
최적
생산을
위한
스케일업
최적화
(생산기술
연구원)

고농도세
포
배양을
위한
유가식
배양공정
의 개발

미생물
50L
유가식
배양공정
최적화

하지만 fed-batch의 경우 feeding이후 지속적으로 pH가 증가하여 저농도의 산으로는 pH의 유지가 힘들었으며, 장착된 염산 버퍼가 모두 소진되어 pH가 지속적으로 증가함을 확인하였다. 이와 같은 상황은 40시간이후 세포성장에 악영향을 미쳐 건조중체량이 증가하지 않는 현상을 확인하였으며, 이때는 pH는 약 7.8임을 고려할 때 장기적인 fed-batch를 위해서는 pH7.8이하의 조절이 중요함을 확인할 수 있었다(그림4-24).

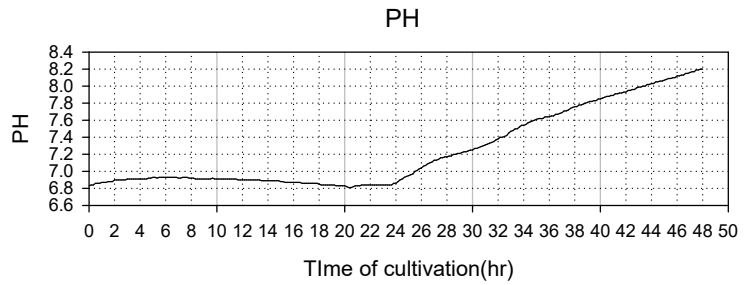


그림 4-24. 50리터 회분식 배양의 pH 프로파일

상기와 같은 문제를 해결하고자 5N HCl을 이용하여 pH를 일정하게 유지하면서 동일한 시간에 yeast extract를 동일하게 공급하는 유가식 배양을 수행하였다(그림 4-25). 실험결과 발효조의 pH는 초기 7.0에서 조금 증가하여 pH7.3에서 배양종료시까지 일정하게 유지됨을 확인할 수 있었다. 건조세포중체량을 비교하였을 때, pH control된 경우 기존 유가식배양과 동일하게 배양 18-20시간까지 급속한 세포성장이 이뤄졌으며 이후 약 24시간에 yeast extract의 첨가가 이뤄진 이후에도 세포건조중체량이 꾸준히 증가하여 배양 말기에는 약 17.3(g/L)의 높은 생산성을 확인할 수 있었다(그림 4-22). 더불어 약 42시간에 세포성장속도가 억제됨에 따라 추가적인 배지의 공급이 필요하며 이 경우 현재보다 높은 고농도의 유가식 배양이 가능할 것으로 판단된다.

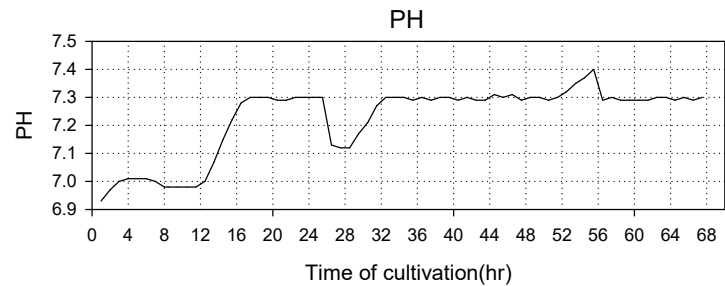


그림 4-25. 50리터 유가식 배양의 pH 프로파일

4차
년도
(2021)

친환경
농약을
위한 작물
진균
제어능 및
안정성
검증
(에스티알
바이오텍)

선별된
후보균주
의 제형
최적화
진행

미생생물
제제
제조시
균체수
증대 및
안정성
확보를
위한
제형화
기술
개발

분리정제 및 동결건조

미생물제제 제조를 위한 최적 제형 선정을 위해 STR바이오텍과 공동연구를 통해서 아래 제시된 조성에 따라 제형화 실험을 진행하였다(표 4-2). 균주로는 Inha502를 사용하였으며, 생산배양 후 확보한 균체 및 배양액을 이용하여 제형화 연구를 진행하였다.

동결건조 제형화 (%)		동결보호제 (g/L)	
Wet cell	50	Trehalose	500
Water	18	NaCl	2
동결보호제	25	KH ₂ PO ₄	11.2
corn starch	7	K ₂ HPO ₄	15
		Xanthan gum	2
		Carboxymethylcellulose Sodium	2

표 4-2. 동결건조 제형화 조건과 동결보호제 성분

실험결과 동결건조후 확보된 미생물제제에서 CFU를 측정해본 결과 약 1*10³(CFU/g)으로 비교적 저조하게 나타났다. 이는 500리터 발효조에서 세포를 회수하는 공정에서 대량의 세포를 빠른 시간에 회수하기 위해서 연속식 원심분리기를 사용한 결과 세포 대비 다량의 배양액이 동시에 회수된 것으로 나타났다. 따라서 동결건조 제형화 조건에서 높은 비율로 배양액이 유입됨과 동시에 반대로 동결보호제의 양이 상대적으로 낮은 농도로 첨가된 결과로 사료된다(그림 4-26).



그림 4-26. 500리터 발효액의 연속식 원심분리(왼쪽)와 동결보호제 첨가후 사진(오른쪽)

4차
년도
(2021)

친환경
농약을
위한 작물
진균
제어능 및
안정성
검증
(에스티알
바이오텍)

선별된
후보균주
의 제형
최적화
진행

미생생물
제제
제조사
균체수
증대 및
안정성
확보를
위한
제형화
기술
개발

상기의 실험결과 실험실 조건과 다르게 세포회수 공정에서 연속식 원심분리기의 문제점을 보완하고 초기 세포의 수를 증대시킨 500리터 발효조의 실험을 토대로 분리정제 공정 및 동결보존 공정의 최적화를 수행하였다. 실험에 사용된 동결건조의 조건은 상기의 실험과 동일하며 water의 비율을 세포회수후 존재하는 배양액의 양을 고려하여 동결보호제와 corn starch의 성분비율을 조절하였다. 세포의 회수공정에서 연속식 원심분리기의 경우 빠른 시간 회수할 수 있는 장점에 비해 일정량의 배양액이 동시에 회수되는 상황을 고려하였으며, 이를 통해 최종적으로 동결보호제와 corn starch의 양을 조절하여 실험을 수행하였다 (그림 4-27, 4-28). 따라서 기존보다 높은 점성을 갖는 혼합액을 제조하였으며, 이를 동결건조기 이동하여 추후 실험을 수행하였다.

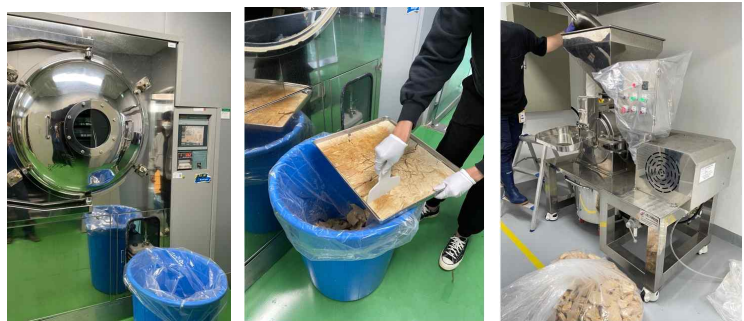


그림 4-27. 동결건조기 실험(왼쪽)와 동결건조후 사진(가운데) 및 분쇄과정(오른쪽)

Lyoph-Pride		INFORMATION	진행단계	4	설정온도	10.7 °C	설정진공	0 mtor			
FREEZE		21/05/11	16:37	신반온도	10.8 °C	플드트림	-77.4 °C	현재진공	11 mtor		
UNUSED		알림내역									
Up		TriggerDate	TriggerTime	Message							
Down											
Prev											
Next											
First											
Last											
Del											
ALL											
HEAT											
#1 PRO HOLD	HEAT PROGRAM	SV01	SV02	SV03	SV04	SV05	SV06	SV07	SV08	SV09	SV10
#2 PRO HOLD	TEMP. (°C)	-38.0	-20.0	-20.0	-10.0	-1.0	0.0	5.0	10.0	20.0	30.0
#3 PRO RUN	VAC. (mTorr)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
화면 전환	Time (min)	340	100	50	700	60	500	240	300	1000	9999
	PRO. TIME (Min)	0	0	0	34	60	500	240	300	1000	9999

그림 4-28. 동결건조기 실험조건

4차년도 (2021)

친환경 농약을 위한 작물 진균 제어능 및 안정성 검증 (에스티알 바이오텍)

선별된 후보균주의 제형 최적화 진행

미생생물 제제 제조시 균체수 증대 및 안정성 확보를 위한 제형화 기술 개발

동결건조를 위한 조건은 하기에 제시된 그림과 같고 완전건조를 위해 2.5일동안 수행하였다. 이를 추가실험을 위해 (재)농축산용 미생물산업육성지원센터에 의뢰하여 미세분말로 분쇄하여 보관하였다. 실험 결과 기존과 다르게 1×10^5 (CFU/g)를 획득할 수 있었으며 100배가까이 향상된 조건을 확보할 수 있었다. 단, 세포의 회수에서 사용되는 원심분리기에 존재하는 기존의 박테리아와 동결건조시의 오픈된 공간에서 생성되는 세포의 오염에 따라 일부 오염된 세포가 재생됨을 확인할 수 있었으나, 이는 추후 시제품 제작을 위한 독성등의 실험에는 영향이 없음을 확인하였다. 따라서 최종적으로 500리터 발효조 배양공정을 위해서 세포의 agar plate 배양에서부터 일련의 up-stream공정을 최적화하였으며, 이어지는 down-stream의 분리정제 공정 및 동결공정의 최적화를 통해 제품의 생산을 위한 공정을 확립하였다 (그림 4-29).



그림 4-29. 제품생산을 위한 전체 배양공정과 분리정제 공정의 모식도

4차
년도
(2021)

유기농자재
등록 진행
(에스티알
바이오텍)

시제품의
독성 및
안전성
조사

시제품의
독성 및
안전성
조사

Inha502기반으로 제작한 유기농자재(상품명 : 팡스탑) 등록을 위한 시험진행

- 균동정시험, 병원성미생물시험, 잔류농약검사
- 유기농자재 등록을 위해 필요한 균동정시험, 병원성미생물시험, 잔류농약검사를 실시
- 균동정시험결과 10^6 CFU/g으로 측정되었고 병원성미생물, 잔류농약은 검출되지 않음을 확인

제 EFAP-20-1149-M-1호

미생물제제 분석성적서

위 탁 자	① 성 명 (법인명)	㈜에스티알바이오텍	② 주민등록번호 (법인등록번호)	*****-*****
	③ 주 소	[REDACTED]		
공 시 품	④ 성 상	분상		
	⑤ 상 표 명 (유효미생물)	<i>Streptomyces morookaense</i> Inha502 (<i>Streptomyces morookaense</i>)		
	⑥ 제조회사	㈜에스티알바이오텍		
	⑦ 검사방법	1. 유전자 염기서열 상동성 검색을 통한 균주 확인		
	⑧ 용 도	등록/인증용(신규)		
⑨ 분석항목		유효미생물	분석치 [cfu/mL(g)]	
		<i>Streptomyces morookaense</i>	4.0 × 10 ⁶	

그림 4-30. 팡스탑의 균동정시험서

제 EFAP-20-1149-M-2호

병원성미생물 검사성적서

위 탁 자	① 성 명 (법인명)	㈜에스티알바이오텍	② 주민등록번호 (법인등록번호)	*****-*****
	③ 주 소	[REDACTED]		
공 시 품	④ 성 상	분상		
	⑤ 상 표 명	<i>Streptomyces morookaense</i> Inha502		
	⑥ 제조회사	㈜에스티알바이오텍		
	⑦ 검사방법	o 병원성미생물 선택배지를 이용한 검정		
	⑧ 용 도	등록/인증용(신규)		
⑨ 검 사 항 목		병 원 성 미 생 물		검 사 결 과
		병원성 대장균(<i>Escherichia coli</i> O157:H7)		불검출
		병원성 살모넬라(<i>Salmonella</i> spp.)		불검출
		황색포도상구균(<i>Staphylococcus aureus</i>)		불검출
		리스테리아 모노사이토제네스(<i>Listeria monocytogenes</i>)		불검출
	바실리스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>)		불검출	

그림 4-31. 팡스탑의 병원성미생물 검사성적서

4차 년도 (2021)

유기농자재 등록 진행 (에스티알 바이오텍)

시제품의 독성 및 안전성 조사

시제품의 독성 및 안전성 조사

잔류농약 시험(검사)성적서

1. 검사시료

발급번호	제 EFAP-20-1149-P 호	발급일	2020. 11. 19.	
		시험책임자	함헌주	
의뢰인	성명	㈜에스티알바이오텍	사업자등록번호	
	주소			
의뢰내용	대상품목명	Streptomyces morookaense Inha502	Lot. No.	20.09.25
	시험개요	잔류농약검사 (Abamectin B1 등 322종)		
	용도	유기농업자재 공시용		

2. 검사결과

No.	검출성분명 (Pesticide Name)	검출지 (mg kg ⁻¹)
1		

그림 4-32. 팡스탑의 잔류농약 시험성적서

- 독성검사

유기농자재 등록을 위해 필요한 독성검사인 담수어류영향시험, 경구병원성시험, 경피시험, 피부자극시험, 안점막자극시험을 수행 (담수어류영향시험의 방법이 관련 법규의 변화로 인해 당초 예상보다 3~4개월 뒤에 실시)

2. 시험정보

(해당항목에 체크(☑)해 주십시오)

시험분야	<input type="checkbox"/> 농약	<input checked="" type="checkbox"/> 유기농업자재	<input type="checkbox"/> 비료	<input type="checkbox"/> 기타
시험항목	<input type="checkbox"/> 어류급성독성시험 <input checked="" type="checkbox"/> 잉어 (Cyprinus carpio) <input type="checkbox"/> 송사리 (Oryzias latipes) <input type="checkbox"/> 미생물담수어류영향시험(미생물) <input type="checkbox"/> 제브라피쉬 (Danio rerio) <input checked="" type="checkbox"/> 담수어류영향시험(미생물) <input type="checkbox"/> 미꾸리 (Misgurnus auguilicaudatus) <input type="checkbox"/> 꿀벌급성접촉독성시험(Apismellifera) <input type="checkbox"/> 꿀벌영향시험(Apismellifera)_미생물 <input type="checkbox"/> 물벼룩 독성시험(Daphnia magna) <input type="checkbox"/> 꿀벌업상잔류독성시험(Apismellifera)			
	<input type="checkbox"/> 급성경구시험, <input type="checkbox"/> 급성경피시험, <input type="checkbox"/> 피부자극시험, <input type="checkbox"/> 안점막자극시험 <input checked="" type="checkbox"/> 미생물제제, <input checked="" type="checkbox"/> 경구병원성시험, <input checked="" type="checkbox"/> 경피시험, <input checked="" type="checkbox"/> 피부자극시험, <input checked="" type="checkbox"/> 안점막자극시험			
생물	<input type="checkbox"/> 약해 ■ 시험작물: <input type="checkbox"/> 고추, <input type="checkbox"/> 상추, <input type="checkbox"/> 오이, <input type="checkbox"/> 배추, <input type="checkbox"/> 콩			
	<input type="checkbox"/> 비해 ■ 기타작물:			
	<input type="checkbox"/> 약효 ■ 시험작물:			
의뢰목적	<input checked="" type="checkbox"/> 등록시험용(☑ 국내 <input type="checkbox"/> 국외) <input type="checkbox"/> 친환경유기농자재(☐ 공시 <input type="checkbox"/> 효능표시)			
	<input type="checkbox"/> 인/허가제출자료(제출처:) <input type="checkbox"/> 스크리닝(독성, 약효) <input type="checkbox"/> 기타 ()			
시험의뢰일	2021년 8월 13일	보고서완료회망일	2021년 12월 31일	

3. 시험물질 정보

제품명	팡스탑	색상	진한 노란색
주원료	Streptomyces morookaense Inha502	유효성분	미생물(방선균)
주원료투입비율	50%	유효성분 함량	10 ⁶ CFU/g
사용농도 (희석배수/표준사용농도)	500배 (200g/10a)		
사용방법	관주처리		
제조회사	에스티알바이오텍	Lot No.	2021.04.02.
보관조건	상온	유효기간	6개월
시험물질 제공량	2kg	잔여량 처리방법	<input checked="" type="checkbox"/> 반환 <input type="checkbox"/> 폐기
첨부자료	<input type="checkbox"/> 시험성적서 <input type="checkbox"/> MSDS <input type="checkbox"/> 안정성자료 <input type="checkbox"/> 기타		
시험물질 조제 및 사용시 유의사항			
기타사항			

그림 4-33. 독성검사이험 의뢰서

독성검사(담수어류영향시험, 경구병원성시험, 경피시험, 피부자극시험, 안점막자극시험) 수행결과 유기농자재 등록에 문제 없음을 확인

4차
년도
(2021)

유기농자재
등록 진행
(에스티알
바이오텍)

시제품의
독성 및
안전성
조사

시제품의
독성 및
안전성
조사

5.4. 자극성의 판정 (Table 4.)

초기시험과 확인시험을 [표 2. 피부반응 평가표]에 의해 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 24, 48 및 72 시간의 홍반 및 가피, 부종의 평균점수 모두 "0.00" 이었고 [표 3. 피부 1차 자극표]에 의해 자극성을 구분하면 "없음"이었다. 이상의 결과로부터 팡스탑은 New Zealand White계 토끼의 피부에 처리 시 자극성이 없는 물질로 구분되었다.

Table 3. Evaluation of skin irritation

Sites	Phases	Number of animals	Days after treatment			
			0 (1hr)	1	2	3
Control sites	Erythema & Eschar	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	0	0
	Edema	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	0	0
Test sites	Erythema & Eschar	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	0	0
	Edema	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	0	0

그림 4-34. New Zealand White계 토끼를 이용한 팡스탑의 피부자극성시험

Table 3. No eyes washed evaluation of eye irritation (Non-treatment)

Time	Number of animals	Corneal opacity : degree of density	Iris	Conjunctiva	
				Redness	Edema
1 hr	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
24 hr	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
48 hr	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
72 hr	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
7 d	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0

5.4. 자극성의 판정 (Table 3.)

초기시험과 확인시험을 [표 3. 안반응 평가표]에 의해 24, 48 및 72시간의 개체별 평균값을 산출한 결과, 각 개체의 각막혼탁, 홍채반응의 평균점수는 모두 "0.00"이었고, 결막 발적의 평균점수는 "1.67", "0.00" 및 "0.00" 이었으며 부종의 평균점수는 "1.67", "1.00" 및 "0.33"이다. 이상의 시험결과, New Zealand White계 토끼를 이용한 팡스탑의 안점막자극성시험에서 자극성은 [표 4. 안점막 자극표]에 의거 "없음"으로 구분되었다.

그림 4-35. New Zealand White계 토끼를 이용한 팡스탑의 안점막자극성시험

4차
년도
(2021)

유기농자재
등록 진행
(에스티알
바이오텍)

시제품의
독성 및
안전성
조사

시제품의
독성 및
안전성
조사

이상의 시험결과, 팜스탑의 랫드를 이용한 단회 경구 투여 시 장기와 대변에서 미생물이 검출되지 않았으며, 부검 시 이상증상이 관찰되지 않았다. 따라서 팜스탑의 5.2×10^5 cfu 단위에 해당하는 미생물을 랫드에 단회 경구 투여 시 주요 장기 (위)에서 잔존하지 않고 시험 종료 시까지 중독증상 및 치사가 없는 것으로 보아 급성독성으로 인한 영향은 없는 것으로 판단된다.

Appendix 1. 시험기간 중 시험생물 치사 및 중독증상

구분	성별	시험생물수	치사수	중독증상
시험군 (5.2×10^5 cfu/개체 투여군)	수컷	12	0	N.D. ^a
	암컷	12	0	N.D.
대조군 (비투여군)	수컷	8	0	N.D.
	암컷	8	0	N.D.

a : Not Detected

그림 4-36. 팜스탑의 랫드를 이용한 급성경구독성/병원성시험

Appendix 1. Mortality of rats

Group	Dose (cfu)	Sex	Number of animals	Days after administration										
				0					1	2	3	4	5	
				30 min	1hr	2hr	3hr	4hr						
1	6.5×10^5	Male	5	0 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6.5×10^5	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Group	Dose (cfu)	Sex	Number of animals	Days after administration									
				6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	6.5×10^5	Male	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6.5×10^5	Female	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a : Number of dead animals

5.1. 일반중독증상 및 치사동물 (Table 1., Appendix 1., 2.)
 팜스탑을 개체당 처리약량 6.5×10^5 cfu로 경피 노출한 결과, 생존한 모든 개체에서 특이한 일반중독증상은 관찰되지 않았으며 치사개체도 관찰되지 않았다.

5.2. 체중변화 (Table 2., Appendix 3.)
 모든 시험동물의 체중은 약제투여 후 경과 일에 따라 증가추세를 보였다.

5.3. 반수치사약량 (LD₅₀)
 랫드를 이용한 팜스탑의 급성경피독성시험 결과, 개체당 6.5×10^5 cfu씩 단회 경피 투여 시 영향이 없는 것으로 판단된다.
 그림 4-37. 랫드를 이용한 팜스탑의 급성경피독성시험

4차
년도
(2021)

유기농자재
등록 진행
(에스티알
바이오텍)

시제품의
독성 및
안전성
조사

시제품의
독성 및
안전성
조사

Nominal concentration (cfu/mL)	Number of fish	Cumulative mortality (30 days)	LC ₅₀ ^a (cfu/mL)	NOEC ^b (cfu/mL)
Control	10	0	> 1.7×10 ² , < 9.5×10 ²	1.7×10 ²
1.7×10 ²	30	0		
9.5×10 ²	30	30		
1.7×10 ³	30	30		

a: Median lethal concentration, based on nominal concentration of active ingredient

b: No observed effect concentration

Nominal concentration (cfu/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		0day	1day	2day	3day	4day	5day	6day	7day
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0
1.7×10 ²	30	0	0	0	0	0	0	0	0
9.5×10 ²	30	0	2	30	30	30	30	30	30
1.7×10 ³	30	0	30	30	30	30	30	30	30





Nominal concentration (cfu/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		8day	9day	10 day	11 day	12 day	13 day	14 day	15 day
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0
1.7×10 ²	30	0	0	0	0	0	0	0	0
9.5×10 ²	30	30	30	30	30	30	30	30	30
1.7×10 ³	30	30	30	30	30	30	30	30	30

Nominal concentration (cfu/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		16 day	17 day	18 day	19 day	20 day	21 day	22 day	23 day
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0
1.7×10 ²	30	0	0	0	0	0	0	0	0
9.5×10 ²	30	30	30	30	30	30	30	30	30
1.7×10 ³	30	30	30	30	30	30	30	30	30

Nominal concentration (cfu/mL)	Number of fish	Cumulative mortality							
		24 day	25 day	26 day	27 day	28 day	29 day	30 day	
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	
1.7×10 ²	30	0	0	0	0	0	0	0	
9.5×10 ²	30	30	30	30	30	30	30	30	
1.7×10 ³	30	30	30	30	30	30	30	30	

그림 4-38. 팡스탑의 담수어류 잉어 (*Cyprinus carpio*) 영향 시험

<p>4차년도 (2021)</p>	<p>유기농자재 등록 진행 (에스티알 바이오텍)</p>	<p>시제품의 독성 및 안전성 조사</p>	<p>시제품의 독성 및 안전성 조사</p>	<p>- 유기농자재 등록신청</p> <p>유기농자재 등록을 위해 필요한 시험을 완료 후 유기농자재 제품등록을 위해 현재 신청을 하여 등록 중</p> <p style="text-align: center;">유기농업자재 공시 신청서</p> <p><small>* 위쪽의 작성방법을 읽고 작성하시기 위하여, []에는 해당되는 곳에 √표를 합니다. (오복)</small></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%;">접수번호</td> <td style="width: 50%;">접수일시</td> <td style="width: 25%;">처리기간</td> <td style="width: 10%;">3개월</td> </tr> <tr> <td colspan="2">업체명 : 에스티알바이오텍</td> <td colspan="2">사업자등록번호</td> </tr> <tr> <td colspan="2">대표자 성명 : 이상종</td> <td colspan="2">생년월일</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">신청인</td> <td colspan="3">본 사 : [REDACTED]</td> </tr> <tr> <td colspan="3">주 소 : [REDACTED]</td> </tr> <tr> <td colspan="4">제조장 및 보관장고 [REDACTED]</td> </tr> <tr> <td colspan="4">지재의 명칭 : <i>Streptomyces morookaense</i> Inha502 배양액</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">생산 구분</td> <td><input type="checkbox"/> 국내</td> <td colspan="2">수입국:</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> 수입</td> <td colspan="2">제조회사명:</td> </tr> <tr> <td colspan="2">주성분 (원트)</td> <td colspan="2">성분(원트)명</td> </tr> <tr> <td colspan="2">상 표 명</td> <td colspan="2">합량(%)</td> </tr> <tr> <td colspan="2">지재의 구분</td> <td colspan="2">세부 내용</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">그림 4-39. 유기농자재 공시 신청서 (팡스탑)</p>	접수번호	접수일시	처리기간	3개월	업체명 : 에스티알바이오텍		사업자등록번호		대표자 성명 : 이상종		생년월일		신청인	본 사 : [REDACTED]			주 소 : [REDACTED]			제조장 및 보관장고 [REDACTED]				지재의 명칭 : <i>Streptomyces morookaense</i> Inha502 배양액				생산 구분	<input type="checkbox"/> 국내	수입국:		<input type="checkbox"/> 수입	제조회사명:		주성분 (원트)		성분(원트)명		상 표 명		합량(%)		지재의 구분		세부 내용	
접수번호	접수일시	처리기간	3개월																																															
업체명 : 에스티알바이오텍		사업자등록번호																																																
대표자 성명 : 이상종		생년월일																																																
신청인	본 사 : [REDACTED]																																																	
	주 소 : [REDACTED]																																																	
제조장 및 보관장고 [REDACTED]																																																		
지재의 명칭 : <i>Streptomyces morookaense</i> Inha502 배양액																																																		
생산 구분	<input type="checkbox"/> 국내	수입국:																																																
	<input type="checkbox"/> 수입	제조회사명:																																																
주성분 (원트)		성분(원트)명																																																
상 표 명		합량(%)																																																
지재의 구분		세부 내용																																																
	<p>미생물체제로 인한 토양의 미생물의 분포 변화 분석</p>	<p>Metagenome 분석 시스템을 응용한 토양미생물군집의 변화 확인</p>	<p>(1) Inha501, Inha502 제형화 제품으로 인한 토양 미생물군집의 변화 확인</p> <p>- Metagenome 분석 시스템을 응용한 Inha501, Inha502 제형화 제품과 Inha503, Inha504로 인한 토양미생물군집의 변화 관찰</p> <p>미생물과 토양(환경)간의 상호작용을 관찰하고자 Inha501, Inha502로 인한 토양의 변화를 Metagenome 분석 시스템을 응용하여 관찰하고자 하였으며 Inha501, Inha502 균주가 토양에 잘 정착하였는지 확인하고자 함. 또한 Inha503, Inha504의 발전가능성을 확인하고자 동시에 진행함</p> <p>추출한 토양 sample의 total DNA을 이용하여 16s rRNA sequence기반의 종 분류를 위한 metagenome 분석이 진행 중이며 채취한 토양은 control(생존한 작물의 토양), 무처리군(시들음병으로 인해 고사한 작물의 토양), Inha501처리군, Inha502처리군, Inha503처리군, Inha504처리군에서 각각 3개를 무작위 선별하여 진행함</p> <p>분석한 결과를 바탕으로 토양 미생물군집의 변화를 관찰하고 무처리군과의 비교를 통해 미생물간의 상호작용 및 식물간의 상호작용을 밝히는데 연구 자료로 활용할 예정이며 정량적으로 곱팡이가 감소한 수치를 측정하고자 함</p> <p>또한 추출한 토양 sample의 total DNA을 이용하여 Inha501, Inha502의 specific primer을 이용한 qRT-PCR을 진행하여 대략적인 토양에서의 분포율을 확인하여 토양 적응력을 검증할 예정</p>																																															

<p>4차 년도 (2021)</p>	<p>유기농자재 등록 진행 (에스티알 바이오텍)</p>	<p>시제품의 약효, 약해 검사</p>	<p>시제품의 효과와 안전성 조사</p>	<p>(1) Inha502기반의 제형화 제품의 유기농업자재 등록</p> <p>- <u>Inha502기반의 제형화 제품인 “팡스탑” 을 등록하기 위하여 관련 서류 재발급</u></p> <p>Inha502로 발급 받았던 약해, 약효시험 보고서 및 관련 문서들의 재발급 진행 (Inha502 -> 팡스탑)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p><u>시험결과보고서</u></p> <p>과제명: 토마토 시들음병 약제방제 효과시험 (상표명: [nha501, 팡스탑])</p> <p>시험의뢰자 기관 명: ㈜에스티알바이오텍 소재 지: [REDACTED] 대표 자: 이상중</p> <p>발행일 2020년 10월 20일</p> <p>시험기관 (주)한국 식물 환경 연구소</p> <p>시험번호  KPER-19-O-119</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p><u>시험결과보고서</u></p> <p>과제명: 토마토 시들음병 약제방제 효과시험 (상표명: [nha501, 팡스탑])</p> <p>시험의뢰자 기관 명: ㈜에스티알바이오텍 소재 지: [REDACTED] 대표 자: 이상중</p> <p>발행일 2020년 10월 20일</p> <p>시험기관 (주)한국 식물 환경 연구소</p> <p>시험번호  KPER-19-O-120</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;"> <p><u>시험결과보고서</u></p> <p>과제명: 고추 시들음병 약제방제 효과시험 (상표명: [nha501, 팡스탑])</p> <p>시험의뢰자 기관 명: ㈜에스티알바이오텍 소재 지: [REDACTED] 대표 자: 이상중</p> <p>발행일 2020년 11월 6일</p> <p>시험기관 (주)한국 식물 환경 연구소</p> <p>시험번호  KPER-19-O-121</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p><u>시험결과보고서</u></p> <p>과제명: 고추 시들음병 약제방제 효과시험 (상표명: [nha501, 팡스탑])</p> <p>시험의뢰자 기관 명: ㈜에스티알바이오텍 소재 지: [REDACTED] 대표 자: 이상중</p> <p>발행일 2020년 11월 6일</p> <p>시험기관 (주)한국 식물 환경 연구소</p> <p>시험번호  KPER-19-O-122</p> </div> </div> <p>그림 4-40. 유기농자재 공시 신청을 위한 약효시험보고서 (팡스탑)</p>
-----------------------------	--	-----------------------------------	------------------------------------	--

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

다양하고 유용한 생리활성을 만들어내는 방선균을 이용하여 식물 병원성 진균에 대한 항진균력을 검증하고 포장실험을 통해 실제 작물에 대한 적용이 가능하다는 것을 확인하여 미생물제제로서 가능성을 증명하였다. 또한 NGS 기술을 활용하여 방선균의 유전체 정보를 확보하고 유용한 생합성유전자군을 분석할 수 있었고 유전자조작을 통해 큰 크기의 유전정보를 성공적으로 분리하고 유도체 생산균주 제작을 하였기에 향후 유용 생합성유전자군 분리 및 응용할 수 있는 기술을 얻게 되었다.

우수한 방선균 선별하고 이 선별된 균주를 기반으로 미생물 제제를 개발하고자 산학연이 긴밀한 협조를 통해 제품화-사업화를 수행한 사례로 평가하며 이러한 결과들을 응용하여 항생제, 항암제, 면역억제제, 항진균제, 농약 등 바이오 산업에서 중요한 부분을 차지하고 있으므로 식품, 의약 및 농업 등의 산업에서 널리 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

○ 가. 미생물 유전체사업의 성과목표

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		4	1	0	0	0	4	0	0	0
1차 년도	목표	2	0	0	0	0	2	0	0	0
	실적	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2차 년도	목표	1	0	0	0	0	1	0	0	0
	실적	1	0	0	0	0	3	0	0	0
3차 년도	목표	1	0	0	0	0	1	0	0	0
	실적	1	0	0	0	0	1	0	0	0
4차 년도	목표	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	실적	0	2	0	0	0	0	0	0	0
계	목표	4	1	0	0	0	4	0	0	0
	실적	4	2	0	0	0	4	0	0	0

○ 나. 기타 성과목표

성과목표	사업화지표									연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출		투자유치	논문 SC I	비 SC I	논문 평균 IF			학술 발표	정책 활용	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	5	20		5	30	30							5		5				
최종목표	4	2		2	20	1					4		2.75	8		4			
1) 목	0	0		0	0	0					1		2	2		1			

차 년 도	표 실 적	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
2 차 년 도	목 표	1	0	0	0	0				1	2	2	1		
	실 적	2	0	1	2.5	0				3	3.69	3	3		
3 차 년 도	목 표	1	1	1	0	0				1	3	2	1		
	실 적	0	0	0	0	0				1	4.19	2	2		
4 차 년 도	목 표	2	1	1	20	1				1	4	2	1		
	실 적	2	2	1	17.5	0 진행중				2	7.82	2	2		
소 계	목 표	4	2	2	20	1				4	2.75	8	4		
	실 적	4	2	2	20	0 진행중				6	5.15	9	7		
종료 1차년도		0	0	0	0	0				0	0	2	0		
종료 2차년도		2	0	1	2.5	0				3	3.69	3	3		
종료 3차년도		0	0	0	0	0				1	4.19	3	2		
종료 4차년도		2	2	1	17.5	0 진행중				2	5.15	2	2		
소 계		2	0	2	20	0 진행중				6	5.15	9	4		
합 계		2	0	2	20	0 진행중				6	5.15	9	6		

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[미생물유전체사업 성과]

□ 전략미생물 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	크기 (Mbp)
1	<i>Streptomyces</i> sp. Inha501	whole genome sequencing	2019.8.13. ~ 2020. 10. 1	igem-0000408	8.25
2	<i>Streptomyces</i> sp. Inha502	whole genome sequencing	2019. 9. 2 ~ 2020. 10. 1	igem-0000409	8.32
3	<i>Streptomyces</i> sp. Inha503	whole genome sequencing	2019. 10. 31 ~ 2020. 10. 1	igem-0000867	11.46
4	<i>Streptomyces</i> sp. Inha504	whole genome sequencing	2020. 10. 19 ~ 2021. 10. 1	igem-0001654	9.20

□ 유용 유전자원 확보

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	위치	크기 (Kbp)
1	<i>Streptomyces</i> sp. Inha501 I-TMC BGC	I-TMC 생합성유전자군	533,757 ~ 749,118	215
2	<i>Streptomyces</i> sp. Inha501 I-NTF BGC	I-NTF 생합성유전자군	5,159,828 ~ 5,359,034	199

□ NABIC 등록 (추후에 사업단에서 등록 예정)

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	크기 (Mbp)
1	<i>Streptomyces</i> sp. Inha501	whole genome sequencing	2019.8.13. ~ 2020. 10. 1	igem-0000408	8.25
2	<i>Streptomyces</i> sp. Inha502	whole genome sequencing	2019. 9. 2 ~ 2020. 10. 1	igem-0000409	8.32
3	<i>Streptomyces</i> sp. Inha503	whole genome sequencing	2019. 10. 31 ~ 2020. 10. 1	igem-0000867	11.46
4	<i>Streptomyces</i> sp. Inha504	whole genome sequencing	2020. 10. 19 ~ 2021. 10. 1	igem-0001654	9.20

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Pseudonocardia strain improvement for stimulation of the di-sugar heptaene Nystatin-like Pseudonocardia polyene B1 biosynthesis	Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology	Chi-Young Han, Jin-Young Jang, Hye-Jin Kim, Sisun Choi, Eung-Soo Kim	46, pp649-655	스위스	Spriner	SCIE (2.993)	2019.05	1367-5435	50
2	Cell Factory Design and Culture Process Optimization for Dehydroshikimate Biosynthesis in <i>Escherichia coli</i>	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	Si-Sun Choi, Seung-Yeul Seo, Sun-Ok Park, Han-Na Lee, Ji-soo Song, Ji-yeon Kim, Ji-Hoon Park, Sangyong Kim, SangJoung Lee, Gi-Taek Chun, Eung-Soo Kim	7, article 241	스위스	Frontiers	SCIE (5.112)	2019.10	2296-4185	33
3	Stimulated Biosynthesis of an C10-Deoxy Heptaene NPP B2 via Regulatory Genes Overexpression in Pseudonocardia autotrophica	frontiers in microbiology	Heung Soon Park, Hye Jin Kim, Chi Youung Han, Hee Ju Nah, Sisun Choi, Eung-Soo Kim	Volume 11, article 19	스위스	Frontiers	SCIE (4.190)	2020.01	1664-302X	100
4	Enantioselective chemoenzymatic synthesis of (R)- γ -valerolactone from levulinic acid	Process Biochemistry	Dohoon Lee, Young Joo Yeon	90, pp 113-117	네덜란드	Elsevier	SCIE (2.952)	2020.03	1359-5113	50

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
5	Screening and isolation of a novel polyene-producing <i>Streptomyces</i> strain inhibiting phytopathogenic fungi in the soil environment	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	Heung Soon Park, Hee Ju Nah, Seung-Hoon Kang, Sisun Choi, Eung-Soo Kim	9:692340	스위스	Frontiers	SCIE (5.890)	2021. 07	2296-4185	33
6	Recent advances in heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in <i>Streptomyces</i> hosts	current opinion in biotechnology	Hahk-Soo Kang, Eung-Soo Kim	Volume 69, pp 118-127	네덜란드	Elsevier	SCIE (9.740)	2021. 06	1879-0429	33

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	The 9th Japan-Korea Chemical Biology Symposium	한치영	2018. 05. 23	인천, central park hotel	대한민국
2	KMB 2018 45th Annual Meeting & International Symposium	한치영	2018. 06. 29	여수, EXPO convention center	대한민국
3	KMB 2019 46th Annual Meeting & International Symposium	이도훈	2019. 06. 24	제주, ICC	대한민국
4	KMB 2019 46th Annual Meeting & International Symposium	박홍순	2019. 06. 24	제주, ICC	대한민국
5	The 4th A3 Foresight Symposium on Chemical Synthetic Biology of Natural Products	박홍순	2019. 07. 07	상하이, Shanghai Jiao Tong University	중국
6	The 3rd International Conference on Natural Products Discovery & Development in the Genomic Era	최시선	2020. 01. 12	샌디에고, Wyndham San Diego Bayside Hotel	미국
7	The 3rd International Conference on Natural Products Discovery & Development in the Genomic Era	박홍순	2020. 01. 12	샌디에고, Wyndham San Diego Bayside Hotel	미국
8	KMB 2021 48th Annual Meeting & International Symposium	박홍순	2021. 06. 24	부산, BEXCO	대한민국
9	The 6th mBiome International Conference	김응수	2021. 12. 10	서울, Yonsei University	대한민국

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Streptomyces</i> sp. AN090726(Inha501)	KCTC13999BP	한국생명공학연구원	2019년
2	<i>Streptomyces</i> sp. AN091042(Inha502)	KCTC14000BP	한국생명공학연구원	2019년
3	<i>Streptomyces javensis</i> Inha503	KCTC14682BP	한국생명공학연구원	2021년
4	<i>Streptomyces collinus</i> Inha504	KCTC14683BP	한국생명공학연구원	2021년

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 명칭	국명	출원 및 등록					기여율 (%)	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록일	등록 번호		
1	특허	다양한 생리활성을 갖는 신규 방선균 및 이의 용도	인하대학교 산학협력단	2019. 11.07.	10-2019-0141882	2021. 10.12.	10-2313936	100	
2	특허	농작물 병원성 진균 제어용 신규 방선균 및 이의 용도	인하대학교 산학협력단	2019. 11.07.	10-2019-0141883	2021. 10.12.	10-2313937	100	√
3	특허	식물 병원성 진균 제어용 신규 균주 스트랩토마이세스 자벤시스 Inha503 및 이의 용도	인하대학교 산학협력단	2021. 12.13.	10-2021-0177641			100	
4	특허	식물 병원성 진균 제어용 신규 균주 스트랩토마이세스 콜리너스 Inha504 및 이의 용도	인하대학교 산학협력단	2021. 12.13.	10-2021-0177642			100	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√									

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	목적	인증기관 (해당 시)
1	팡스탑	2021.04.02	에스티알바이오텍	유기농자재 제품등록	한국식물환경연구소, 친환경농산물안전성센터, 한국생물안전성연구소

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (천원)	누적 징수 현황
1	노하우	방선균 기반의 항진균 미생물제제 대량생산 및 실용화 기술	(주)에스티알바이오텍	2019.11	2,500	2,500
2	특허	- 다양한 생리활성을 갖는 신규 방선균 및 이의 용도 - 농작물 병원성 진균 제어용 신규 방선균 및 이의 용도	(주)에스티알바이오텍	2021.11	17,500	17,500

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

[사회적 성과]

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	취업	2021		2			1	1		1			1
2	취업	2020	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				2				2	1	1			
3	취업	2019	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				2		1	3		2	1			

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 전략미생물 해독 4건	○ 향진균활성이 우수한 4종의 신규 방선균의 whole genome sequencing 완료	○ 100
○ 유용유전자원 확보 1건	○ S. rubrisoli Inha501의 BAC library 구축을 통해 유용한 생합성유전자원이 포함된 BAC vector 확보 (tautomycetin-like BGC (82kb), neotetrafibric in-like BGC(170kb))	○ 200
○ 지식재산권 (특허 출원 4건과 특허 등록 2건)	○ 특허 출원 4건과 특허 등록 2건 완료	○ 100
○ 기술실시 (기술이전 2건 및 기술료 2000만원)	○ 기술이전 - 방선균 기반의 향진균 미생물제제 대량생산 및 실용화 기술, 에스티알바이오텍, 250만원, 2019. - 방선균 기반의 향진균 미생물제제 대량생산 및 실용화 기술, 에스티알바이오텍, 1750만원, 2021.	○ 100
○ 사업화 (제품등록 1건)	○ 유기농자재 등록 신청 토마토, 고추 시들음병에 대한 병해관리용 유기농자재 제품등록 (진행 중)	○ 80 (진행 중)
○ 논문 (SCI급 4편 및 평균 IF 2.75 이상)	○ SCI급 논문 6편(평균 IF 5.15)	○ 150 (187)
○ 학술발표 (구두발표 및 포스터발표 8건)	○ 구두발표 및 포스터발표 9건	○ 112
○ 인력양성 (5명)	○ 인력양성 6명	○ 120

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 사업화를 위한 방선균 유기농자재 제품 (제품명 팡스탑) 등록 신청하여, 현재 심사 진행 중
 - 시제품 준비과정 (e.g. 대용량 발효 시 방선균 포자 오염문제) 및 독성시험 (e.g. 독성검사 중 어독성 관련 기준이 강화됨에 따라 검사기관의 시설보완 관련해서 검사시작이 늦어짐) 진행이 다소 지연되어, 등록 신청이 계획보다 2-3개월 지연됨
-

2) 자체 보완활동

현재 심사 중인 제품 등록이 조속히 완료될 수 있도록, 참여기업 및 공동연구기관과 지속적인 연구 협력 체제 유지

3) 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 유용 미생물 유전체 스크리닝 전략 확대 적용을 통한 마이크로바이옴 기반 기술 구축
- 방선균 유래 유용 생리활성 물질 생합성 경로 규명을 통한 신약 후보물질 발굴 시스템 구축
- 기능성 유전자/물질 및 개량공정 최적화를 통한 유용 미생물의 실용화-산업화에 기여
- 구축된 유용성, 안정성, 안전성 등 평가-검증 시스템의 지적재산 창출에 기여

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 고효율 친환경 미생물제제 제품 등록을 통한 방선균 실용화-산업화의 다각화 모색
- 확보한 방선균 유전체 정보를 활용한 추가적인 유용 유전자원 발굴
- 확보한 방선균의 다양한 생리활성 스크리닝을 통한 신약 후보물질 발굴

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	2	
	비SCIE	0	
	계	2	
국내논문	SCIE	-	
	비SCIE	-	
	계	-	
특허출원	국내	-	
	국외	-	
	계	-	
특허등록	국내	-	
	국외	-	
	계	-	
인력양성	학사	0	
	석사	2	
	박사	1	
	계	3	
사업화	상품출시	1	
	기술이전	-	
	공정개발	-	
제품개발	시제품개발	-	
비임상시험 실시		-	
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	-
		2상	-
		3상	-
	의료기기	-	
진료지침개발		-	
신의료기술개발		-	
성과홍보		-	
포상 및 수상실적		-	
정성적 성과 주요 내용		-	

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈유전체 다부처 연구개발사업 방선균 유전체 기반의 농작물 진균 제어용 미생물 제제 개발연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트 게놈 유전체 다부처 연구개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.